



هماندسازی

فصل چهارم

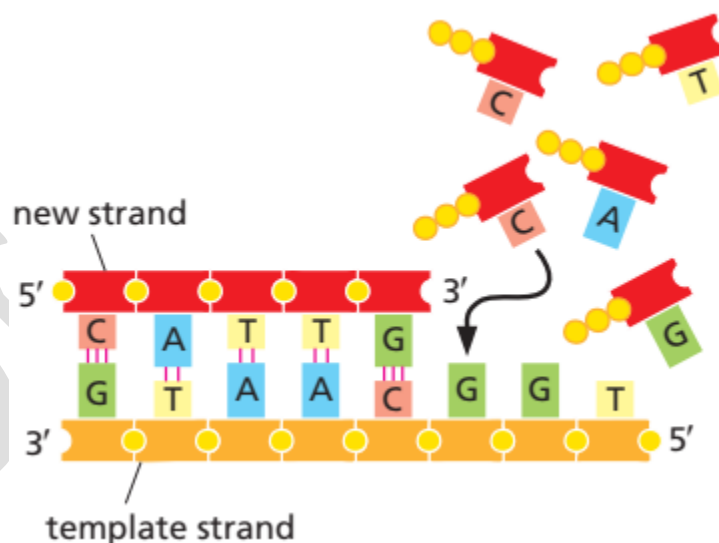
Dr. Noorollahi

حسین نوراللهی

دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی

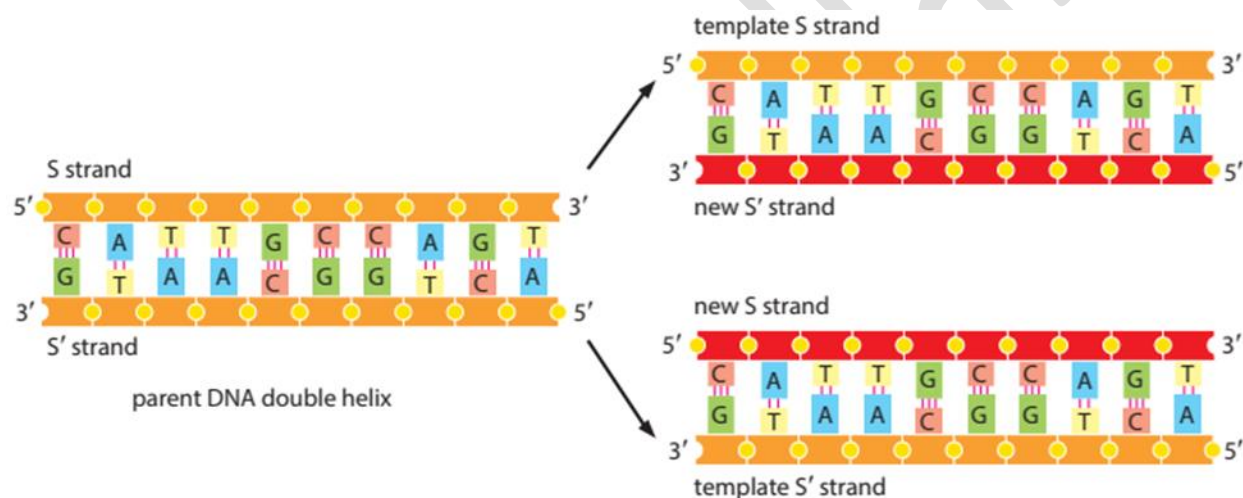
noorollahih@gmail.com

ساختار دو رشته دی ان ای عامل پیچیده شدن ردیفی بازهای نیتروژن دار با پیوندهای استکینگ و پیوندهای هیدروژنی بین بازها در رشته های روبروی هم است. جفت شدن بازهای A با T با دو پیوند هیدروژنی و G با C با سه پیوند هیدروژنی اصل مکملیت بازها در دی ان ای دو رشته ای است. بنابراین همانندسازی دی ان ای به جفت شدن دو رشته دی ان ای مطابق قانون AT/GC بستگی دارد. از طرفی، برای تکمیل همانندسازی، نیاز هست تا بین گروه فسفات یک نوکلئوتید با گروه قند نوکلئوتید قبلی پیوند کووالانسی تشکیل می شود.



هر رشته مارپیچ دوتایی دی‌ان‌ای دارای توالی نوکلئوتیدی است که دقیقاً مکمل توالی رشته مقابل است پس هر رشته می‌تواند به عنوان الگو یا Template برای سنتز رشته مکمل جدید عمل کند. بنابراین اطلاعات ژنتیکی دی‌ان‌ای

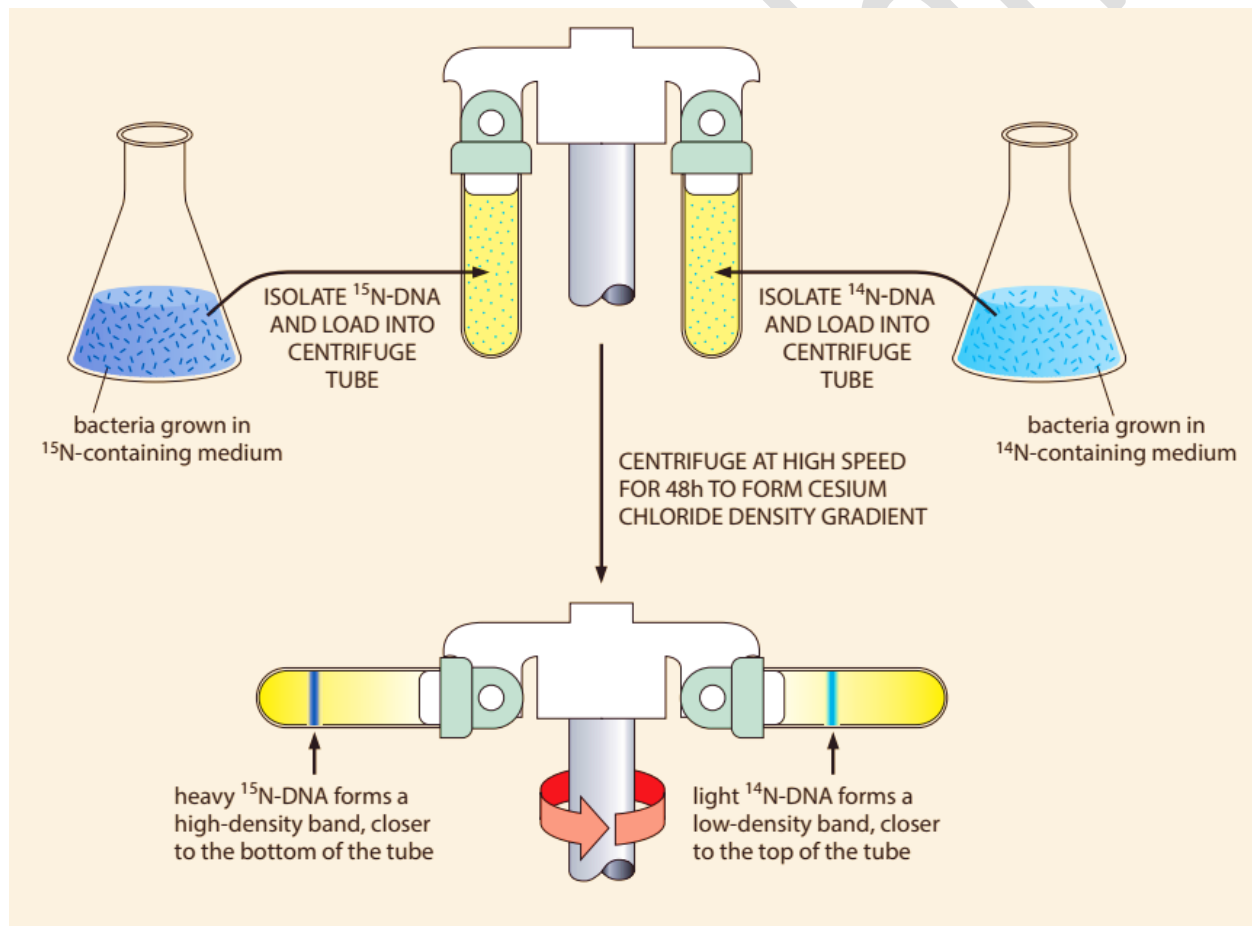
می‌تواند با یک فرایند ساده به درستی کپی شود به طوری که ابتدا دو رشته از هم جدا شده و هر رشته به عنوان الگویی برای تولید رشته مکمل جدید عمل کند. این توانایی یعنی همین که هر رشته از مولکول دی‌ان‌ای بتواند به عنوان الگویی برای تولید رشته مکمل عمل کند به سلول این اجازه را می‌دهد تا ژن‌های خود را قبل از انتقال به نسل بعدی کپی یا همانندسازی کند این کار به کمک پروتئین‌هایی صورت می‌گیرد که همراه یکدیگر ماشین همانندسازی یا Replication Machine را می‌سازند. طی همانندسازی دی‌ان‌ای، دو مولکول دو رشته‌ای کامل از مولکول دی‌ان‌ای اصلی ایجاد می‌شود. هر مولکول دی‌ان‌ای جدید مشابه دی‌ان‌ای والد است و چون هر رشته والد به عنوان یک الگو برای رشته جدید عمل می‌کند هر یک از مارپیچ‌های دوتایی جدید دارای یک رشته اصلی یا همان رشته والدی و یک رشته کاملاً جدید دختری هستند به همین دلیل این نوع همانندسازی را نیمه حفاظتی می‌گویند.



در اواخر دهه ۱۹۵۰ دانشمندان ۳ مکانیسم پیشنهاد شده برای همانندسازی دی‌ان‌ای را مورد بررسی قرار دادند در اولین مدل که مدل حفاظتی بود دو رشته دی‌ان‌ای والدی حین همانندسازی با هم و دو رشته دختری نیز هنگام همانندسازی با هم باقی می‌مانند. در مدل نیمه حفاظتی دی‌ان‌ای تازه سنتز شده متشکل از یک رشته دختری و یک رشته والدی بود. در سومین مدل یعنی مدل پراکنده قطعاتی از رشته‌های دی‌ان‌ای جدید و رشته‌های والدی در هر دو رشته پراکنده می‌شوند. اما طبق مدلی که پیش‌تر، واتسون و کریک برای همانندسازی پیشنهاد کردند سنتز یکی از رشته‌های جدید یعنی رشته پیشرو در جهت چنگال همانندسازی و سنتز رشته دیگر یعنی رشته پیرو به صورت قطعات کوچک و در خلاف جهت حرکت چنگال همانندسازی انجام می‌شود.

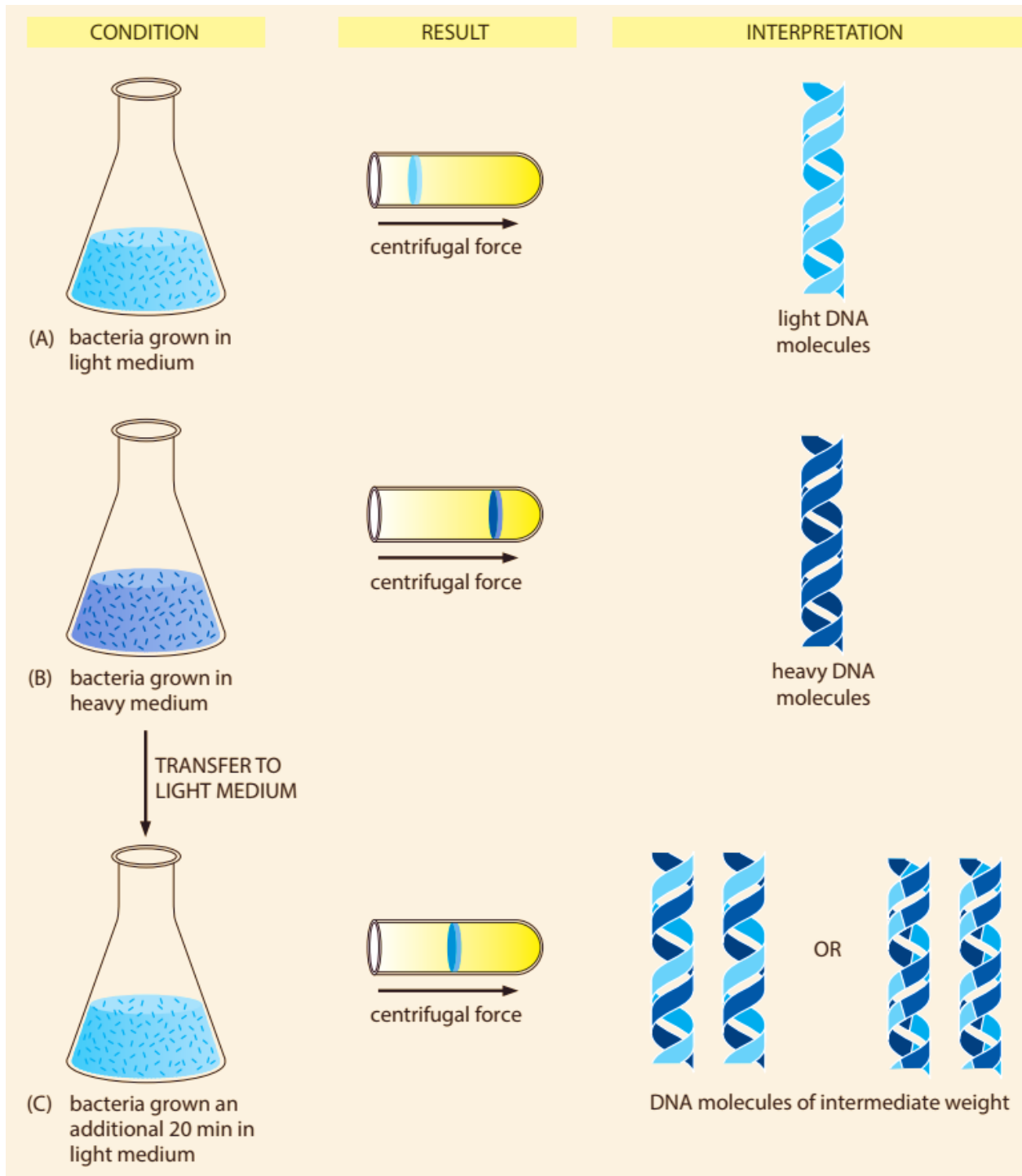
روشی که مزلسون و استال در سال ۱۹۵۸ برای تشخیص رشته‌های دختری تازه سنتز شده از رشته‌های والدی ابداع کردند مبتنی بر نشاندار کردن دی‌ان‌ای با ایزوتوپ سنگین نیتروژن بود بنابراین نیتروژن موجود در بازهای دی‌ان‌ای،

بصورت سنگین و سبک دیده شدند. آنها برای انجام این آزمایش سلول‌های باکتری *E.coli* را در محیط حاوی نیتروژن ۱۵ برای نسل‌های متعدد کشت دادند در نتیجه جمعیتی از سلول‌ها به وجود آمدند که محتوای دی‌ان‌ای آنها نیتروژن سنگین نشاندار شده بود. در شروع آزمایش باکتری‌ها به محیط حاوی نیتروژن ۱۴ منتقل شدند بنابراین همه رشته‌های دی‌ان‌ای تازه سنتز شده با نیتروژن سبک نشاندار شدند اما رشته‌های والدی همچنان به فرم سنگین باقی ماندند. در ادامه غلظت دی‌ان‌ای را با سانتریفیوژ شیب سزیم کلراید یا سانتریفیوژ شیب گرادیان بررسی کردند. اصولاً اگر هر دو رشته دارای نیتروژن ۱۴ باشد به علت سبک بودن نزدیک به لبه لوله آزمایش رسوب می‌کند و اگر هر دو رشته حاوی نیتروژن ۱۵ باشند تمامی دی‌ان‌ای سنگین بوده و در پایین لوله سانتریفیوژ رسوب می‌کنند ولی اگر یک رشته حاوی نیتروژن ۱۴ و رشته دیگر حاوی نیتروژن ۱۵ باشد دی‌ان‌ای نیمه سنگین با چگالی متوسط به وجود می‌آید.



بعد از اولین دور همانندسازی نتایج نشان دادند که تمامی دی‌ان‌ای‌ها دارای چگالی نیمه سنگین هستند که با هر دو مدل نیمه حفاظتی و پراکنده مطابقت دارد و چون تمام دی‌ان‌ای در یک نوار منفرد رسوب کرده بود مدل

حفاظتی رد شد. بعد از دومین دور همانندسازی ترکیبی از دی‌ان‌ای سبک و سنگین مشاهده شد که این نتایج فقط با مدل نیمه حفاظتی مطابقت داشت. مدل پراکنده وجود نیتروزن سنگین در هر چهار رشته را پیشگویی می‌کرد.

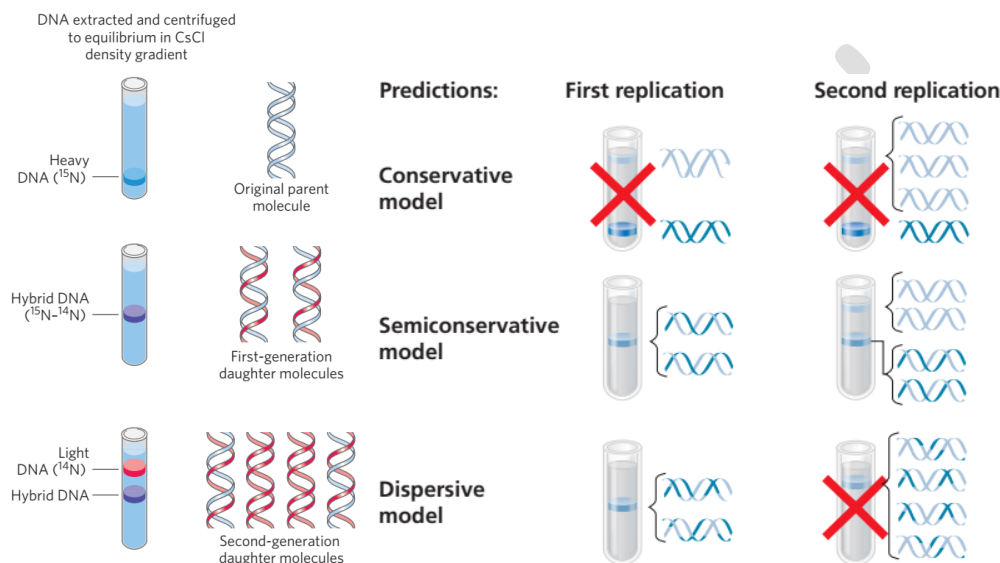


آزمایش مزلسون-استال

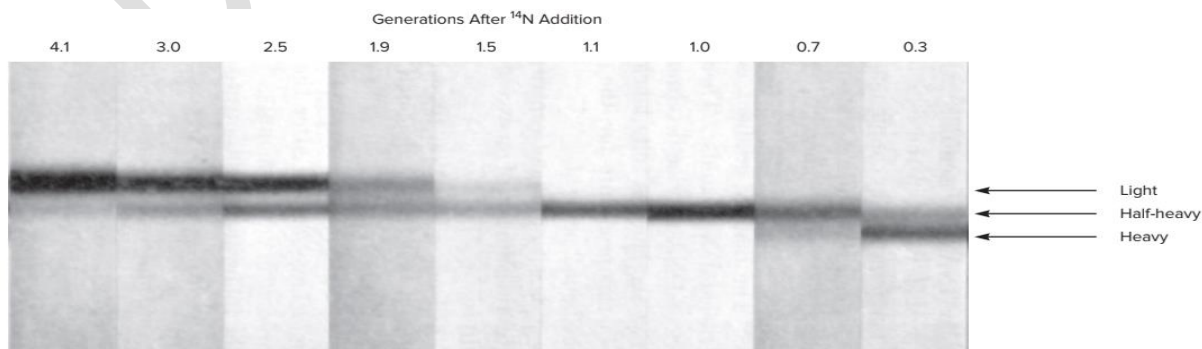
مزلسون و استال کار خود را بر روی دو دسته باکتری E.coli که یکی را در محیط حاوی نیتروژن سنگین و دیگری را در محیط حاوی نیتروژن سبک کشت داده بودند، شروع کردند. نیتروژن موجود در محیط می تواند به بازهای نوکلئوتیدها وارد شده و در تولید دی‌ان‌ای باکتری شرکت کنند. بنابراین بعد از رشد باکتری‌ها برای چندین نسل متوالی، دو جمعیت باکتری به دست آوردند (یکی دارای دی‌ان‌ای سنگین و دیگری دارای دی‌ان‌ای سبک). در ادامه، مزلسون و استال باکتری‌ها را لیز کرده و دی‌ان‌ای آنها را در یک لوله حاوی سزیم کلراید با غلظت بالا قرار دادند. در این روش که لوله‌ها با سرعت بالا سانتریفیوژ می‌شوند سزیم کلراید یک شیب چگالی ایجاد می‌کند و مولکول‌های دی‌ان‌ای آنقدر ته‌نشین می‌شوند تا اینکه به منطقه هم‌چگال با چگالی خود برسند (اساس سانتریفیوژ شیب چگالی). بر این اساس، متوجه شدند که می‌توانند بین دی‌ان‌ای سنگین حاوی نیتروژن ۱۵ و دی‌ان‌ای سبک حاوی نیتروژن ۱۴ با مشاهده موقعیت‌های مختلف دی‌ان‌ای در درون شیب سزیم کلراید تمایز قائل شوند چون که دی‌ان‌ای سنگین چگال‌تر از دی‌ان‌ای سبک بوده و در بخش پایین‌تر لوله جمع می‌شود. بعد از اینکه آنها این روش را برای تشخیص دی‌ان‌ای سنگین از سبک ابداع کردند (امروزه برای جدا کردن دی‌ان‌ای پلازمیدی و دی‌ان‌ای کروموزومی باکتری هم استفاده می‌شود) شروع به آزمودن فرضیه‌هایی که در رابطه با نحوه همانندسازی از قبل ارائه شده بودند، کردند. یکی از این فرضیه‌ها نتایج مقاله‌ای بود که واتسون و کریک در مجله نیچر چاپ کرده بودند بطوریکه رشته‌های مارپیچ دی‌ان‌ای حین همانندسازی باز شده، هر رشته برای ساخت رشته مکمل دختری به عنوان الگو عمل می‌کند (امروزه این مدل را تحت عنوان مدل نیمه حفاظتی می‌شناسیم) البته قبل از این واتسون و کریک در مقاله قبلی خود که ساختار دی‌ان‌ای را پیشنهاد کرده بودند از مکانیسم جفت شدن بازهای مکمل به عنوان روشی برای توصیف کپی برداری مواد ژنتیکی ارائه کرده بودند. دانشمندان دیگر مانند دلبروک فرضیه‌های واتسون و کریک را رد کرده و مدل پراکنده را به عنوان مدل ترجیحی همانندسازی ارائه داده بودند و مدل سوم نیز تحت عنوان مدل حفاظتی برای همانندسازی مطرح بود که در این مدل مارپیچ والد بعد از کپی برداری دست نخورده باقی مانده و مولکول دختری شامل دو رشته دی‌ان‌ای کاملاً جدید خواهد بود.

مزلسون و استال که آزمایش آنها به عنوان یکی از زیباترین آزمایش‌های زیست‌شناسی مطرح است، برای ارزیابی این سه فرضیه ابتدا یک ظرف از باکتری‌ها را که در محیط حاوی نیتروژن سنگین رشد داده بودند را به محیط حاوی نیتروژن سبک وارد کردند. در شروع آزمایش، دی‌ان‌ای از نوع سنگین بود اما با تقسیم‌های مکرر باکتری، دی‌ان‌ای سنتز شده جدید از نوع سبک می‌شد. آنها در ادامه توانستند تجمع دی‌ان‌ای سبک را پایش کرده و از آن به عنوان معیاری برای تایید یا رد هر کدام از فرضیه‌ها استفاده کردند. آنها مشاهده کردند که بعد از یک نسل کشت، دی‌ان‌ای والدی سنگین که متشکل از دو رشته حاوی نیتروژن ۱۵ بود، حذف شده و یک گونه جدید از دی‌ان‌ای که نواری مابین دی‌ان‌ای دارای نیتروژن سنگین و دی‌ان‌ای دارای نیتروژن سبک بود را تشکیل شده است بنابراین این گونه نتیجه‌گیری کردند که مارپیچ تازه ساخته شده باید ترکیبی از ایزوتوپ‌های سبک و سنگین باشد. این مشاهدات در همان ابتدا مدل حفاظتی همانندسازی دی‌ان‌ای که طبق آن دی‌ان‌ای والد به طور کامل باید از نوع سنگین باقی بماند و دی‌ان‌ای دختری باید به طور کامل از نوع سبک باشد را رد می‌کرد. ولی تا به اینجا، نتایج با مدل نیمه حفاظتی و همین‌طور مدل پراکنده که طبق آن دی‌ان‌ای هیبرید مخلوطی از رشته‌های سبک و سنگین است، سازگار بود. برای ایجاد تمایز بین دو گروه باقی مانده، مزلسون و استال به حرارت دهی روی آوردند. با حرارت دهی پیوندهای هیدروژنی بین دو رشته شکسته شده و ایجاد تک

رشته می‌کند. بنابراین وقتی که قبل از سانتریفیوژ، مولکول‌های هیبرید را حرارت دادند مشاهده کردند که یک رشته دی‌ان‌ای سنگین و دیگری سبک است این یافته مدل نیمه حفاظتی را تایید می‌کرد چون اگر مدل پراکنده درست بود رشته‌های حاصل باید مخلوطی از قطعات سنگین و سبک بودند و تمام نوارهای ایجاد شده در سانتریفیوژ در منطقه چگالی حد واسط قرار می‌گرفتند. این آزمایشات زیست‌شناسان را متقاعد کرد که فرضیه واتسون کریک و مدل نیمه حفاظتی برای همانندسازی درست است.



واتسون و کریک در مقاله معروف دو صفحه‌ای خود در سال ۱۹۵۳ در مورد تشریح مدل ساختار دی‌ان‌ای پیشنهاد کردند که جفت شدن بازهای مکمل یعنی آدنین/تیمین و گوانین/سیتوزین با یکدیگر در طول دو رشته مارپیچ دی‌ان‌ای باعث حفظ دو رشته دی‌ان‌ای در کنار یکدیگر می‌شوند. آن‌ها در انتهای این خبر علمی بزرگ یادآور شدند که این جفت بازهای اختصاصی مفروض، مکانیسم کپی برداری احتمالی را برای مواد ژنتیکی پیشنهاد می‌کنند و یک ماه بعد در مجله نیچر در مقاله دوم خود در رابطه با چگونگی همانندسازی دی‌ان‌ای پیشنهاد کردند که دو رشته مارپیچ دی‌ان‌ای باز شده و هر رشته برای ساخت رشته مکمل دختری به عنوان الگو عمل می‌کند.



M. Meselson & F. Stahl (1958), "The Replication of DNA in *Escherichia coli*," *PNAS*, 44(7): 671–682, Fig. 4A. courtesy of M. Meselson

1. Add an excess of ^{14}N -containing compounds to the growth medium so all of the newly made DNA will contain ^{14}N .

2. Incubate the cells for various lengths of time. Note: The ^{15}N -labeled DNA is shown in purple and the ^{14}N -labeled DNA is shown in blue.

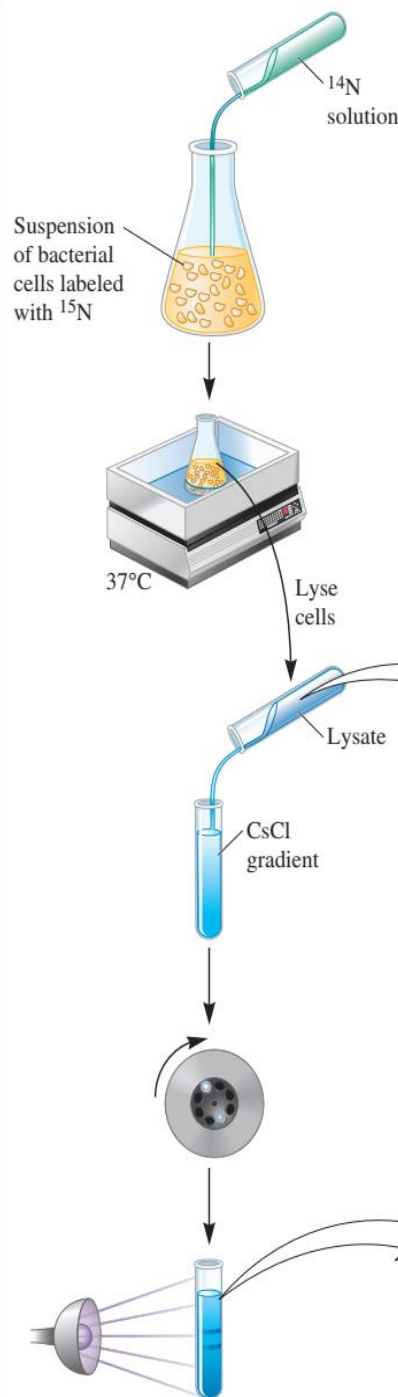
3. Lyse the cells by the addition of lysozyme and detergent, which disrupt the bacterial cell wall and cell membrane, respectively.

4. Load a sample of the lysate onto a CsCl gradient. (Note: The average density of DNA is around 1.7 g/cm^3 , which is well isolated from other cellular macromolecules.)

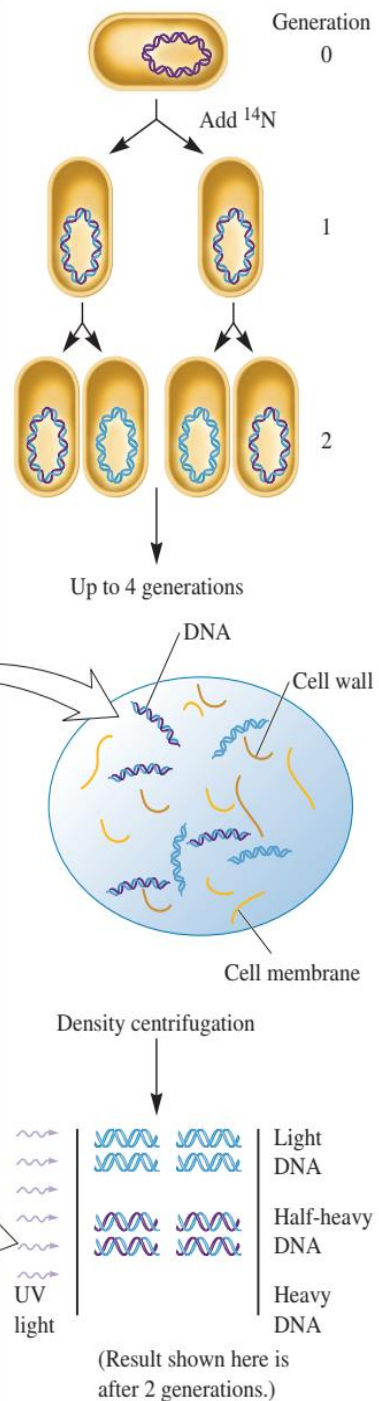
5. Centrifuge the gradients until the DNA molecules reach their equilibrium densities.

6. DNA within the gradient can be observed under a UV light.

Experimental level

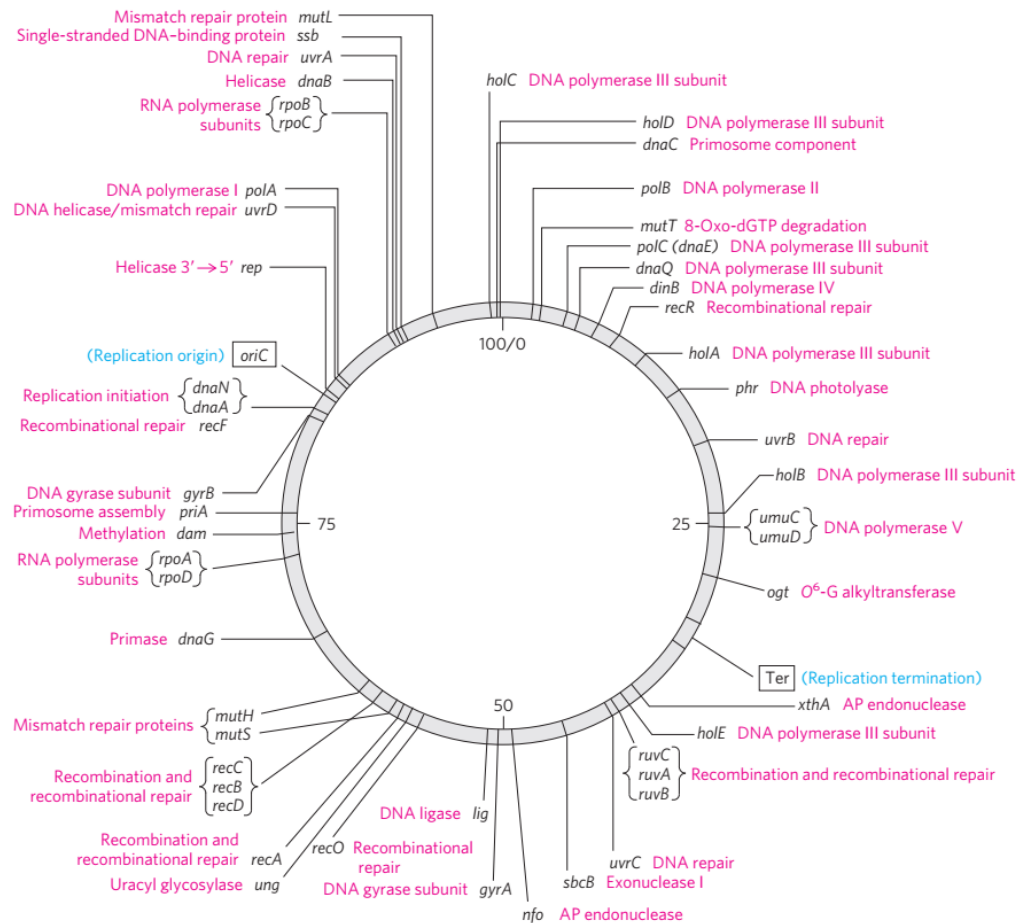


Conceptual level



همانندسازی در باکتری

ژنوم باکتری که در یک مولکول حلقوی با ۴.۶ میلیون جفت نوکلئوتید جا گرفته است فقط دارای یک مبدا همانند سازی است.



در باکتری ها و مخمر مبدا همانندسازی منطقه ای به طول تقریبی ۱۰۰ جفت باز را در بر می گیرد و شامل توالی هایی است که پروتئین های آغازگر را جذب می کنند. بنابراین، کروموزوم باکتریایی فقط یک مبدا همانندسازی به نام OriC که به آن اصطلاحاً OriC یا Origin of Chromosomal Replication نیز گفته می شود، دارد و همانندسازی از این نقطه شروع شده و در دو جهت ادامه می یابد. همچنین، دو چنگال همانندسازی در دو جهت متفاوت نسبت به مبدا حرکت می کنند که در نهایت در سمت مقابل به هم می رسند تا فرآیند همانندسازی را کامل کنند. لازم به ذکر است، جداسازی جهش یافته هایی در E.coli که دارای ناهنجاری هایی در همانندسازی بودند به شناخت ما از نقش پروتئین ها و نحوه همانندسازی دی ان ای کمک کرده است.

سه نوع توالی در ناحیه OriC وجود دارد

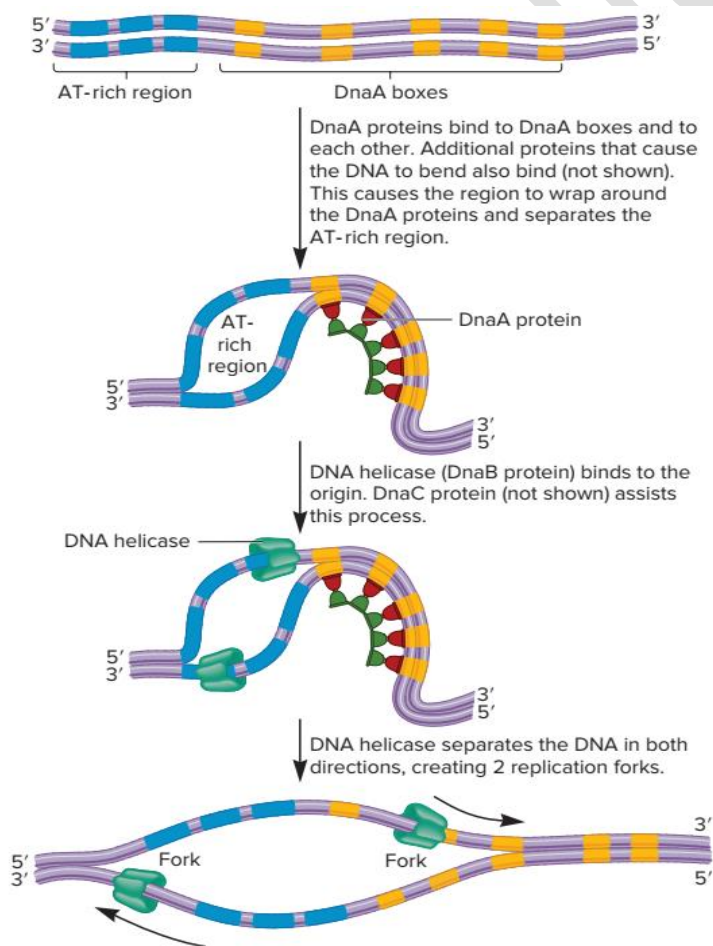
- ناحیه غنی از AT
- توالی های اتصال DnaA
- جایگاه متیلاسیون GATC



جایگاه های GATC در تنظیم همانندسازی دی ان ای نقش دارند به طوری که این جایگاه ها می توانند توسط آنزیم Dam متیله شوند (پیش از شروع همانندسازی نیز این جایگاه ها بر روی هر دو رشته متیله هستند). متیلاسیون کامل جایگاه های GATC شروع همانندسازی در مبدا را تسهیل می کند. بعد از همانندسازی دی ان ای، رشته های جدید، متیله نیستند چون که آدنین به جای متیل آدنین در همانندسازی رشته های دختری مشارکت دارد بنابراین همانندسازی دی ان ای بلافاصله در مبدا همانندسازی شروع نمی شود و تا متیله شدن کامل توالی های ذکر شده به تعویق می افتد و با توجه به اینکه چند دقیقه زمان لازم است تا آنزیم Dam توالی های GATC را در این ناحیه متیله کنند در نتیجه همانندسازی مجدد دی ان ای بلافاصله انجام نمی شود.

آغاز همانندسازی

همانندسازی با اتصال پروتئین‌های DnaA به توالی مخصوصی به نام جعبه DnaA در مبدا همانندسازی شروع می‌شود. پروتئین‌های DnaA به شکل متصل به ATP بوده و برای شروع همانندسازی به ۵ جعبه مخصوص DnaA در ناحیه OriC متصل می‌شوند. پروتئین‌های دیگری نظیر Hu و IHF منجر به خمیده شدن دی‌ان‌ای در اطراف کمپلکس پروتئین‌های DnaA می‌گردند و در نتیجه دو رشته دی‌ان‌ای در ناحیه غنی از AT از هم باز می‌شود. به دنبال جدا شدن نواحی غنی از AT، پروتئین‌های DnaA به کمک پروتئین DnaC، آنزیم هلیکاز را به این جایگاه می‌آورند (اسم دیگر DNA هلیکاز، DnaB می‌باشد).



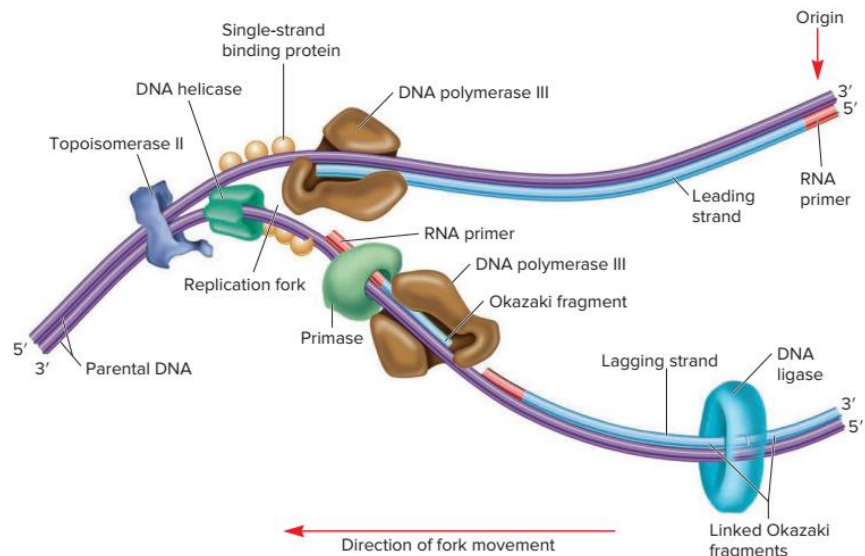
بخش مفهومی

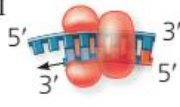
مارپیچ دو رشته دی‌ان‌ای به طور طبیعی به دلیل داشتن تعداد زیادی از پیوندهای هیدروژنی که بین بازهای دو رشته ایجاد شده‌اند به طور محکم به هم قفل شده‌اند و بسیار پایدارند در نتیجه فقط دمای نزدیک به نقطه جوش آب می‌تواند انرژی حرارتی لازم برای جدا کردن دو رشته را تأمین کند ولی می‌دانیم که در سلول‌های زنده این حالت امکان‌پذیر نیست بنابراین سوال پیش می‌آید که این شرایط دمایی در یک سلول زنده چگونه فراهم می‌شود؟

فرآیند سنتز دی‌ان‌ای، به وسیله پروتئین‌های آغازگر شروع می‌شود که به توالی‌های اختصاصی دی‌ان‌ای به نام مبدا همانندسازی متصل می‌شوند و با شکستن پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازها باعث جدا شدن دو رشته دی‌ان‌ای از هم می‌گردند. این پیوندها که موجب پایداری ساختار مارپیچ دو رشته‌ای دی‌ان‌ای می‌گردند به تنهایی پیوند ضعیفی هستند بنابراین جدا کردن جفت بازها در یک توالی کوتاه دی‌ان‌ای به انرژی زیادی نیاز نداشته و پروتئین‌های آغازگر به راحتی می‌توانند مارپیچ دوتایی را حتی در دمای طبیعی باز کنند و نکته مهم این است که دی‌ان‌ای در نواحی مبدا همانندسازی غنی از توالی‌های AT بوده و چون جفت بازهای AT توسط پیوندهای هیدروژنی کمتری نسبت به جفت بازهای GC به هم متصل هستند بنابراین به راحتی باز می‌شوند.

همانندسازی دی‌ان‌ای به همکاری تعداد زیادی از پروتئین‌ها و آنزیم‌ها نیاز دارد که به طور هماهنگ با هم عمل می‌کنند تا ماشین همانندسازی ایجاد و دی‌ان‌ای جدید سنتز شود.

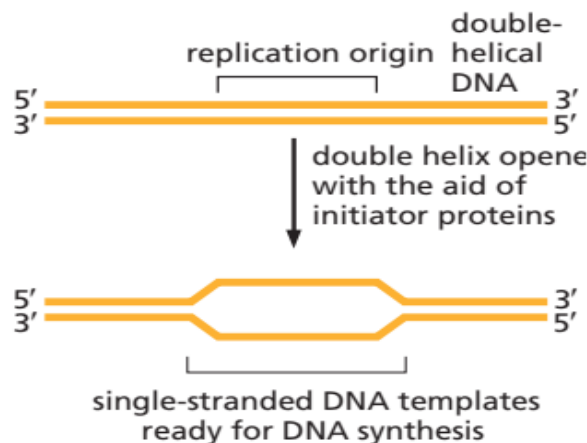
- DNA helicase breaks the hydrogen bonds between the DNA strands.
- Topoisomerase II alleviates positive supercoiling.
- Single-strand binding proteins keep the parental strands apart.
- Primase synthesizes an RNA primer.
- DNA polymerase III synthesizes a daughter strand of DNA.
- DNA polymerase I excises the RNA primers and fills in with DNA (not shown).
- DNA ligase covalently links the Okazaki fragments together.



Protein	Function
Helicase 	Unwinds parental double helix at replication forks
Single-strand binding protein 	Binds to and stabilizes single-stranded DNA until it is used as a template
Topoisomerase 	Relieves overwinding strain ahead of replication forks by breaking, swiveling, and rejoining DNA strands
Primase 	Synthesizes an RNA primer at 5' end of leading strand and at 5' end of each Okazaki fragment of lagging strand
DNA pol III 	Using parental DNA as a template, synthesizes new DNA strand by adding nucleotides to an RNA primer or a pre-existing DNA strand
DNA pol I 	Removes RNA nucleotides of primer from 5' end and replaces them with DNA nucleotides added to 3' end of adjacent fragment
DNA ligase 	Joins Okazaki fragments of lagging strand; on leading strand, joins 3' end of DNA that replaces primer to rest of leading strand DNA

بخش مفهومی

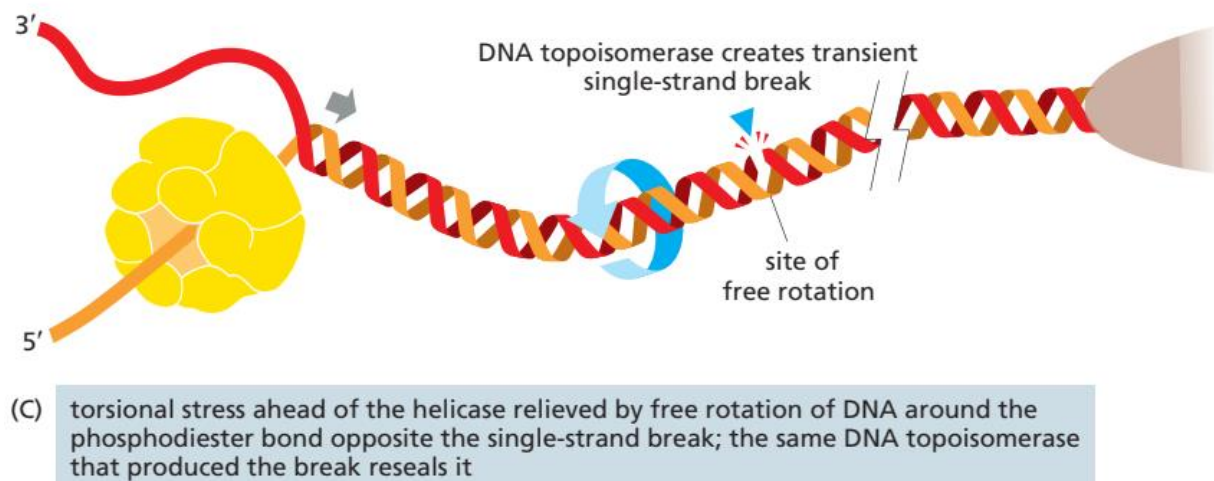
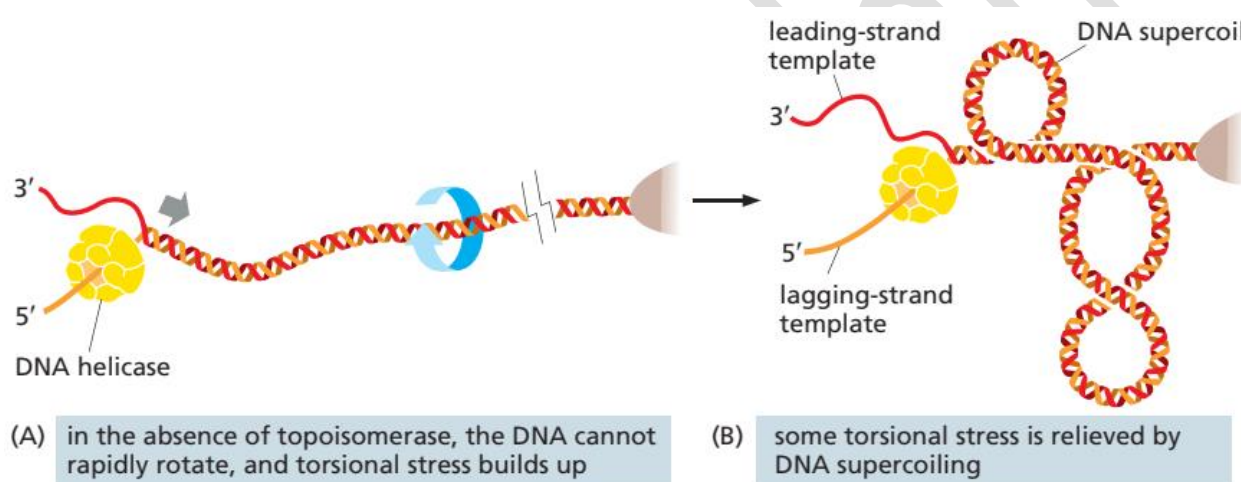
اولین مشکلی که ماشین همانندسازی با آن روبروست دسترسی به نوکلوتیدهایی است که در جلوی روی چنگال همانندسازی و در نتیجه در درون مارپیچ دوتایی قرار دارند.



برای انجام همانندسازی، مارپیچ دوتایی دائماً در مقابل چنگال همانندسازی باید باز شود طوری که نوکلئوزید تری فسفات‌های ورودی بتوانند با رشته الگو جفت باز تشکیل دهند. دو نوع از این پروتئین‌ها یعنی هلیکاز و دیگری پروتئین‌های متصل شونده به تک رشته به طور هماهنگ عمل می‌کنند تا این کار انجام گردد. کمپلکس چند زیر واحدی هلیکاز در راس ماشین همانندسازی قرار داشته و با استفاده از انرژی هیدرولیز ATP حرکت کرده و در طول دی‌ان‌ای، مارپیچ دوتایی را باز می‌کند. پروتئین‌های متصل شونده به تک رشته به تک رشته‌های حاصل از فعالیت هلیکاز باز شده، متصل می‌شوند و به طور موقت از تشکیل مجدد جفت بازها جلوگیری می‌کنند. خود این باز شدن موضعی مارپیچ دوگانه، مشکل جدیدی را ایجاد می‌کند. همچنان که هلیکاز به پیش می‌رود و دی‌ان‌ای را در چنگال همانندسازی باز می‌کند، دی‌ان‌ای پیچ می‌خورد. این پیچش اضافی در قسمت جلو ماشین همانندسازی، تنش را در دی‌ان‌ای ایجاد می‌کند که اگر این پیچش باز نشود در برابر حرکت ماشین همانندسازی به سمت جلو مقاومت خواهد کرد. سلول‌ها از پروتئین‌هایی به نام توپوایزومراز برای جلوگیری از این پیچش اضافی استفاده می‌کنند. این آنزیم‌ها شکست گذرا در اسکلت دی‌ان‌ای ایجاد می‌کنند که به طور موقت این تنش را از بین می‌برد. لازم به ذکر است که این آنزیم قبل از رها کردن دی‌ان‌ان، شکاف ایجاد شده در رشته را ترمیم می‌کند.

نقش هلیکازها و توپوایزومرازها در باز شدن و رفع پیچش دو رشته

۲ دی‌ان‌ای هلیکاز، جدا شدن دو رشته را از ناحیه OriC شروع می‌کنند و برای جدا کردن دو رشته دی‌ان‌ای از هم از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP استفاده می‌کنند. در نتیجه هلیکازها به دی‌ان‌ای تک رشته‌ای متصل شده و در طول دی‌ان‌ای در جهت ۵ پیریم به ۳ پیریم حرکت می‌کنند بنابراین حرکت هلیکازها از ناحیه OriC در هر دو جهت صورت می‌گیرد که این حالت از همانندسازی را همانندسازی دوطرفه یا بای دایرکشنال می‌نامند. فعالیت **هلیکازها** منجر به شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازها و تولید ابر مارپیچ مثبت در بخش جلویی هر چنگال همانندسازی می‌شود که آنزیم **توپوایزومراز II** که دی‌ان‌ای زیراز هم نامیده می‌شود جلوتر از دی‌ان‌ای هلیکاز حرکت کرده و ابر مارپیچ مثبت را کاهش می‌دهد.



نقش پروتئین‌های متصل شونده به دی‌ان‌ای تک رشته

بعد از اینکه دو رشته دی‌ان‌ای از هم باز شد این دو رشته باید دور از هم نگه داشته شوند. در نتیجه، ماشین همانندسازی دی‌ان‌ای جهت پیشروی نیازمند پروتئین‌های متصل شونده به دی‌ان‌ای تک رشته‌ای یا **SSB** ها است. این پروتئین‌ها، با اتصال به دی‌ان‌ای والدی از تشکیل مجدد مارپیچ دو رشته جلوگیری می‌کند به این طریق بازهای موجود بین دو رشته والدی در شرایطی قرار می‌گیرند که می‌توانند با نوکلئوتیدهای منفرد پیوند هیدروژنی برقرار کنند.

Protein	M_r	Number of subunits	Function
DnaA protein	52,000	1	Recognizes ori sequence; opens duplex at specific sites in origin
DnaB protein (helicase)	300,000	6*	Unwinds DNA
DnaC protein	174,000	6*	Required for DnaB binding at origin
HU	19,000	2	Histonelike protein; DNA-binding protein; stimulates initiation
FIS	22,500	2*	DNA-binding protein; stimulates initiation
IHF	22,000	2	DNA-binding protein; stimulates initiation
Primase (DnaG protein)	60,000	1	Synthesizes RNA primers
Single-stranded DNA-binding protein (SSB)	75,600	4*	Binds single-stranded DNA
DNA gyrase (DNA topoisomerase II)	400,000	4	Relieves torsional strain generated by DNA unwinding
Dam methylase	32,000	1	Methylates (5')GATC sequences at <i>oriC</i>

انواع دی‌ان‌ای پلیمراز و ساختار آن

در باکتری ای کلای ۵ پروتئین متمایز در نقش دی‌ان‌ای پلیمراز فعالیت می‌کنند که از شماره ۱ تا ۷ شماره گذاری می‌شوند. دی‌ان‌ای پلیمرازهای ۱ و ۳ در همانندسازی دی‌ان‌ای در حالت عادی و دی‌ان‌ای پلیمرازهای ۲، ۴ و ۷ در ترمیم دی‌ان‌ای آسیب دیده نقش دارند. آنزیم پلیمرازی که بخش عمده همانندسازی دی‌ان‌ای را در چنگال همانندسازی انجام می‌دهد دی‌ان‌ای پلیمراز ۳ می‌باشد.

	DNA polymerase		
	I	II	III
Structural gene*	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
Subunits (number of different types)	1	7	≥10
M_r	103,000	88,000 [†]	791,500
3'→5' Exonuclease (proofreading)	Yes	Yes	Yes
5'→3' Exonuclease	Yes	No	No
Polymerization rate (nucleotides/s)	10–20	40	250–1,000
Processivity (nucleotides added before polymerase dissociates)	3–200	1,500	≥500,000

دی‌ان‌ای پلیمراز III اتصالات کوالانسی بین فسفات یک نوکلئوتید و قند نوکلئوتیدهای قبلی را کاتالیز می‌کند. دی‌ان‌ای پلیمراز III تعداد ۱۰ زیر واحد متفاوت دارد که نقش‌های متعددی را در فرآیند همانندسازی ایفا می‌کنند. زیر واحد آلفا، سنتز دی‌ان‌ای و تشکیل پیوند بین دو نوکلئوتید مجاور را کاتالیز می‌کند و زیر واحد اپسیلون از دی‌ان‌ای پلیمراز ۳ در Proofreading یا خطاگیری در جهت ۳ پریم به ۵ پریم و حذف نوکلئوتیدهای اشتباه نقش دارد. مجموعه این دو زیر واحد در کنار هم را **هولوآنزیم** دی‌ان‌ای پلیمراز III می‌نامند. دی‌ان‌ای پلیمراز I نیز که فقط از یک زیر واحد تشکیل شده است در همانندسازی دی‌ان‌ای، حذف RNA پرایمرها و پر کردن نواحی خالی با دی‌ان‌ای، نقش دارد.

Subunits of DNA Polymerase III of *E. coli*

Subunit	Number of subunits per holoenzyme	M_r of subunit	Gene	Function of subunit	
α	2	129,900	<i>polC (dnaE)</i>	Polymerization activity	Core polymerase
ε	2	27,500	<i>dnaQ (mutD)</i>	3'→5' Proofreading exonuclease	
θ	2	8,600	<i>holE</i>	Stabilization of ε subunit	
τ	2	71,100	<i>dnaX</i>	Stable template binding; core enzyme dimerization	Clamp-loading (γ) complex that loads β subunits on lagging strand at each Okazaki fragment
γ	1	47,500	<i>dnaX*</i>	Clamp loader	
δ	1	38,700	<i>holA</i>	Clamp opener	
δ'	1	36,900	<i>holB</i>	Clamp loader	
χ	1	16,600	<i>holC</i>	Interaction with SSB	
ψ	1	15,200	<i>holD</i>	Interaction with γ and χ	
β	4	40,600	<i>dnaN</i>	DNA clamp required for optimal processivity	

زیر واحد کاتالیتیکی همه دی‌ان‌ای پلیمرازها ساختاری شبیه دست انسان دارند بطوریکه دی‌ان‌ای الگو در کف دست قرار گرفته و شصت اطراف دی‌ان‌ای می‌پیچد سپس دئوکسی ریبو نوکلئوتیدها وارد جایگاه کاتالیتیکی شده و بر اساس قانون AT/GC به رشته الگو متصل می‌شوند (انتخاب اینکه کدام نوکلئوتیدها به انتهای ۳ پریم اضافه خواهند شد بر اساس رابطه مکملیت و ایجاد جفت باز بین نوکلئوتید ورودی با رشته الگو تعیین می‌شود). سپس این نوکلئوتیدها به طور کووالانسی با مصرف انرژی به انتهای ۳ پریم رشته در حال ساخت اضافه می‌گردند. دی‌ان‌ای پلیمرازها همچنین، یک جایگاه ۳ پریم اگزونوکلازی دارند که جفت بازهای اشتباه جور شده را حذف می‌کنند.

بخش مفهومی

چالش مهمی که همانندسازی با آن مواجه است امکان جدا شدن یا اصطلاحاً سر خوردن پلیمراز حین انجام پلیمریزاسیون از رشته الگو است. دی‌ان‌ای پلیمرازها اکثراً فقط می‌توانند یک قطعه کوتاه از نوکلئوتیدها را قبل از جدا شدن از رشته الگو سنتز کنند ولی در حالت عادی، دی‌ان‌ای پلیمراز برای اضافه کردن نوکلئوتید جدید به رشته در حال رشد هر بار از دی‌ان‌ای جدا نمی‌شود بلکه متصل به دی‌ان‌ای الگو باقی مانده و در طول آن حرکت می‌کند تا تکثیر کامل گردد، اما چگونه؟

پروتئینی که حین همانندسازی در پشت چنگال همانندسازی، پلیمراز را به طور محکم به الگو متصل نگه می‌دارد، گیره لغزنده یا DNA Clamp می‌باشد. در واقع، زیر واحد بتا هولوآنزیم که پروتئین گیره یا Clamp هم نامیده می‌شود با حرکت در طول رشته الگو منجر به پیوستگی هولوآنزیم با دی‌ان‌ای می‌شود. در واقع، زیر واحد بتا به صورت دایمر درآمده و به شکل

حلقه می تواند رشته های مارپیچ دی ان ای را در خود جای دهد بعبارت دیگر، این کمپلکس، حلقه ای را دور مارپیچ دی ان ای ایجاد می کند و با اتصال محکم به پلیمراز، امکان حرکت آن در طول رشته الگو را بدون اینکه از آن جدا شود، فراهم می کند (در صورت عدم وجود گیره لغزنده، دی ان ای پلیمراز فقط قطعه کوتاهی را می تواند سنتز کند و خیلی زود از روی رشته سر می خورد). در غیاب زیر واحد بتا، دی ان ای پلیمراز III سنتز دی ان ای با سرعتی در حدود ۲۰ نوکلئوتید در ثانیه انجام می شود و آنزیم دی ان ای پلیمراز بعد از اتصال حدود ۱۰ نوکلئوتید به هم از دی ان ای الگو جدا می شود اما در حضور زیر واحد بتا در هولوآنزیم سرعت سنتز به ۷۵۰ نوکلئوتید در ثانیه می رسد و در رشته پیشرو دی ان ای پلیمراز III می تواند سنتز یک قطعه با طول ۵۰۰ هزار نوکلئوتید را پیش از آنکه جدا شود انجام دهد.

تجمع این گیره در اطراف دی ان ای به فعالیت پروتئین دیگری به نام بارگذار گیره یا Clamp Loader نیاز دارد که با هیدرولیز ATP باعث اتصال محکم گیره لغزنده در اطراف مارپیچ دوتایی می شود. بنابراین، مجموعه چند زیر واحدی تحت عنوان سوار کننده گیره یا کلمپ لودر به هولوآنزیم دی ان ای پلیمراز امکان می دهند به دی ان ای متصل باقی بماند.

نکته مهم: این بارگیری تنها یک بار در هر چرخه همانندسازی برای رشته پیشرو نیاز است با این حال در رشته پیرو هر بار که یک قطعه اوکازاکی جدید ساخته می شود، گیره باز شده و دوباره به رشته اتصال می یابد.

ویژگی های آنزیم دی ان ای پلیمراز

- دی ان ای پلیمراز نمی تواند سنتز دی ان ای را با اتصال دو نوکلئوتید ابتدایی به یکدیگر شروع کند این آنزیم فقط طویل سازی رشته از پیش موجود را انجام می دهد (پرایمر از نوع RNA).
- دی ان ای پلیمراز فقط در جهت ۵ پریم به ۳ پریم می تواند نوکلئوتید اضافه کند (پلیمریزاسیون در جهت ۵ پریم به ۳ پریم صورت می گیرد).
- دی ان ای پلیمراز یک آنزیم پیشرونده یا Processive است.
- دی ان ای پلیمراز III سنتز رشته های دختری را با سرعت کاتالیز می کند زیرا یک آنزیم پیشرونده یا Processive است به این معنا که پس از برقراری اتصالات کووالانسی بین نوکلئوتید ها در رشته در حال سنتز از رشته الگو جدا نمی شود در عوض به صورت چسبیده به دی ان ای الگو باقی مانده و به هنگام سنتز رشته های دختری در طول رشته الگو حرکت می کند.
- دی ان ای پلیمراز یک آنزیم وابسته به الگو می باشد.

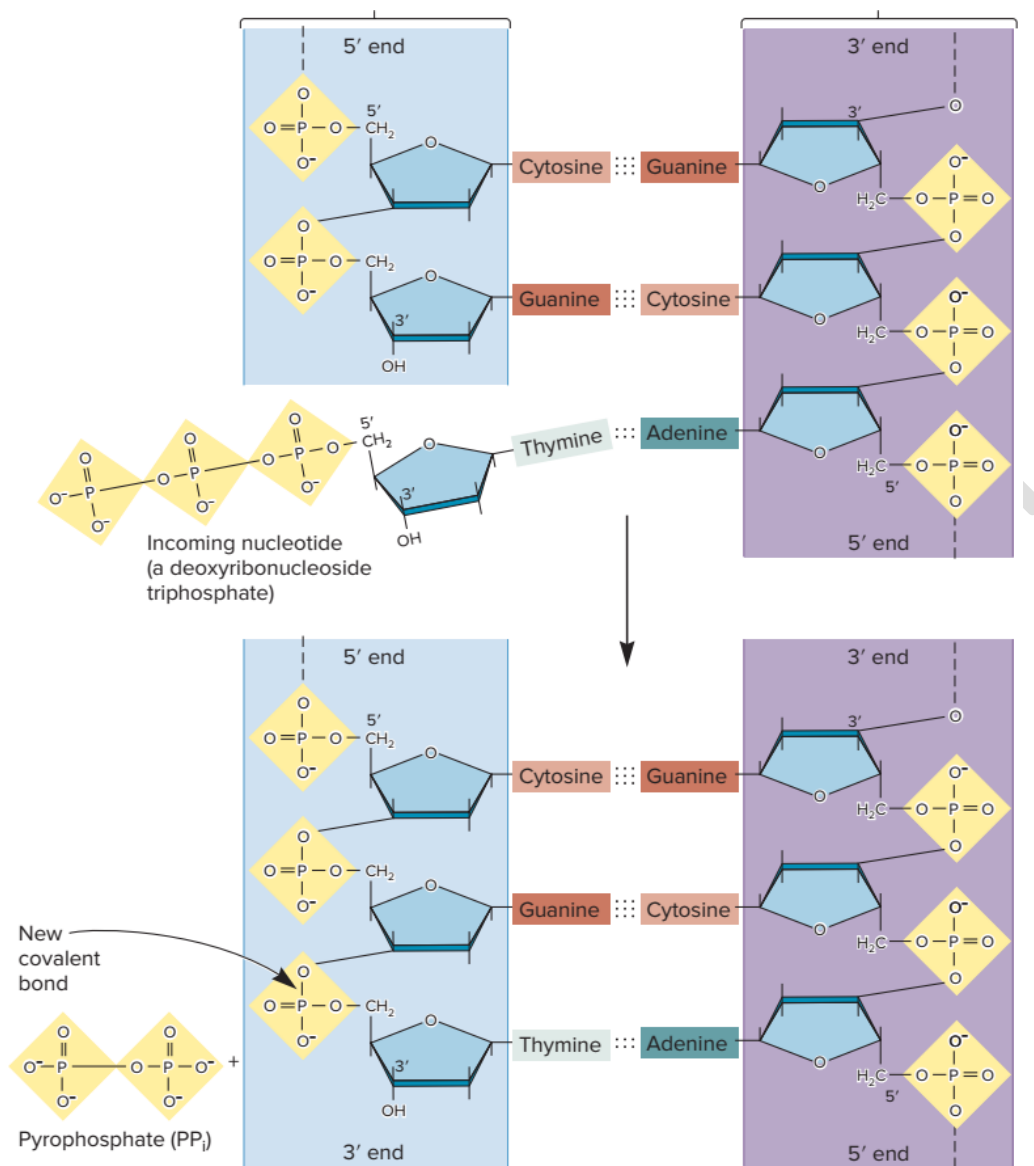
○ از ویژگی‌های مهم دی‌ان‌ای پلیمراز وابسته به الگو بودن آن (بدین معنی که بدون وجود رشته الگو امکان سنتز رشته جدید را نخواهد داشت) می‌باشد و چون با استفاده از رشته والد به عنوان الگو دی‌ان‌ای جدید را سنتز می‌کند به همین دلیل به آن پلیمراز وابسته به الگو می‌گویند. در واقع دی‌ان‌ای پلیمراز با استفاده از توالی‌های رشته دی‌ان‌ای والد به عنوان الگو اضافه شدن نوکلئوتید به انتهای ۳ پریم رشته در حال رشد را کاتالیز می‌کند.

○ دی‌ان‌ای پلیمراز برای فعالیت خود نیاز به ATP دارد.

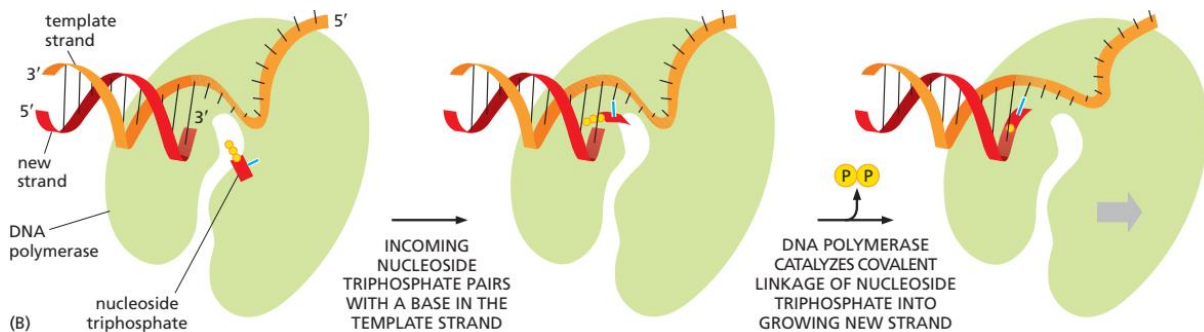
تشکیل پیوند کووالانسی از نوع استری نیازمند انرژی است

می‌دانیم، آنزیم **دی‌ان‌ای پلیمراز** تشکیل پیوندهای کووالانسی بین نوکلئوتیدهای مجاور را کاتالیز کرده و بر این اساس سنتز رشته‌های دختر را به عهده دارد. واکنش پلیمریزاسیون مستلزم تشکیل یک پیوند فسفودی استر بین انتهای ۳ پریم زنجیره دی‌ان‌ای در حال رشد و گروه ۵ پریم فسفات نوکلئوتید ورودی است که تشکیل پیوند کووالانسی از نوع استری نیازمند انرژی می‌باشد.

بطور کلی پروتئین‌های نیازمند انرژی دخیل در همانندسازی دی‌ان‌ای، برای فعالیت خود، انرژی را از هیدرولیز نوکلئوزید تری فسفات‌ها به دست می‌آورند. بنابراین، انرژی پلیمریزاسیون توسط خود نوکلئوزید تری فسفات ورودی فراهم می‌شود. به طوری که هیدرولیز پیوندهای فسفات پر انرژی این واکنش را امکان‌پذیر می‌کند و مونومرهای نوکلئوتیدی را به زنجیره متصل کرده، در نتیجه پیروفسفات آزاد می‌شود. پیروفسفات نیز به فسفات معدنی هیدرولیز شده و در نتیجه واکنش پلیمریزه شدن را بصورت برگشت ناپذیر ممکن می‌سازد.

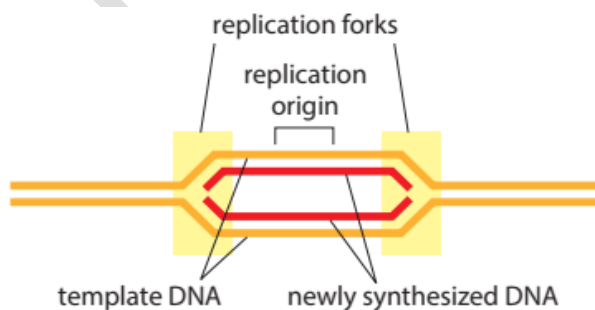


دئوکسی ریبونوکلئوتید تری فسفات ها یا dNTP ها شامل سه گروه فسفات متصل به کربن ۵ پریم دئوکسی ریبوز هستند. dNTP ها ابتدا وارد جایگاه کاتالیتیکی آنزیم دی ان پلیمراز شده و بر اساس قانون AT/GC به رشته الگو متصل می شوند سپس گروه هیدروکسیل ۳ پریم نوکلئوتید قبلی با گروه فسفات مجاور نوکلئوتید تازه وارد شده واکنش می دهد این واکنش بسیار انرژی زا بوده و منجر به شکل گیری یک پیوند کووالانسی بین قند در انتهای ۳ پریم رشته دی ان ای و فسفات موجود در نوکلئوتید وارد شده فراهم می کند. تشکیل این پیوند کووالانسی منجر به تشکیل رشته جدیدی می شود که در جهت ۵ پریم به ۳ پریم سنتز می شود بنابراین پیروفسفات بصورت PPi جدا می شود و به دو فسفات می شکند. در نتیجه، برقراری پیوند کووالانسی بین دو نوکلئوتید مجاور از طریق هیدرولیز ATP و خروج دو فسفات بتا و گاما پر انرژی به صورت پیروفسفات صورت می گیرد.



شکل گیری چنگال همانندسازی

در هر مبدا همانندسازی، دو چنگال همانندسازی تشکیل می‌شوند و طی فرآیند همانندسازی، تقاطع Y را ایجاد می‌کنند. این دو چنگال همانندسازی در دو جهت مخالف از سمت مبدا حرکت می‌کنند (به همین دلیل همانندسازی دی‌ان‌ای هم روی کروموزوم باکتری و هم روی کروموزوم‌های یوکاریوتی را دو طرفه یا بای دایرکشنال می‌نامند). سپس، ماشین همانندسازی بر روی دی‌ان‌ای حرکت کرده دو رشته را از هم باز می‌کند و با استفاده از هر رشته به عنوان الگو، تولید رشته دختری جدید را انجام می‌دهد. سرعت حرکت چنگال همانندسازی ۱۰۰۰ جفت نوکلئوتید در ثانیه برای باکتری‌ها و ۱۰۰ جفت نوکلئوتید در ثانیه برای انسان است. سرعت کمتر حرکت چنگال در انسان و در واقع در یوکاریوت‌ها به خاطر ساختار کروماتینی پیچیده‌تر در کروموزوم‌های یوکاریوتی است.



چنگال همانندسازی نامتقارن

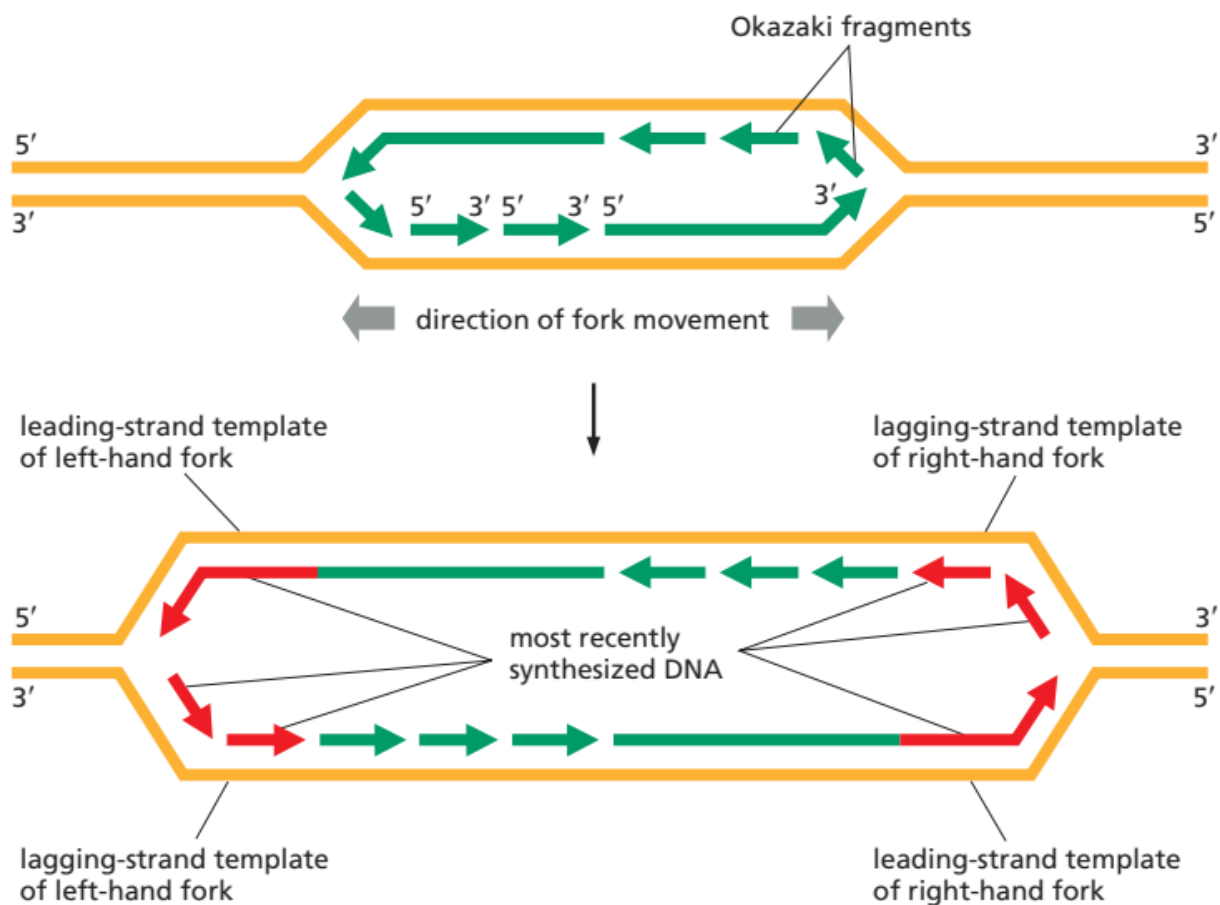
با توجه به اینکه چنگال همانندسازی نامتقارن بوده و هر دو رشته دی‌ان‌ای جدید باید در یک جهت یعنی در جهت حرکت چنگال همانندسازی سنتز شوند و از طرفی، چون اسکلت قند فسفات هر رشته از مارپیچ دوتایی دی‌ان‌ای

دارای جهت گیری شیمیایی یا قطبیت منحصر به فرد می باشند و دو رشته در خلاف جهت هم قرار می گیرند. در نتیجه، جهت ۵ پریم به ۳ پریم واکنش پلیمریزاسیون دی ان ای، مشکلی را در چنگال همانندسازی ایجاد می کند. بنابراین به نظر می آید که یکی از رشته ها در جهت ۵ پریم به ۳ پریم و دیگری در جهت ۳ پریم به ۵ پریم ساخته می شوند. پس سوال پیش می آید با توجه به اینکه همه آنزیم های دی ان ای پلیمراز واحدهای نوکلئوتیدی جدید را فقط قادر به اضافه کردن به انتهای ۳ پریم رشته در حال ساخت هستند این مشکل یعنی سنتز رشته ۳ پریم به ۵ پریم چگونه توجیه می شود؟ عبارت دیگر، با توجه به اینکه زنجیره دی ان ای جدید فقط در جهت ۵ پریم به ۳ پریم می تواند ساخته شود و قاعدتا در این صورت فقط یکی از رشته ها در چنگال همانندسازی می توانند سنتز شوند، برای رشته دیگر چه اتفاقی می افتد؟

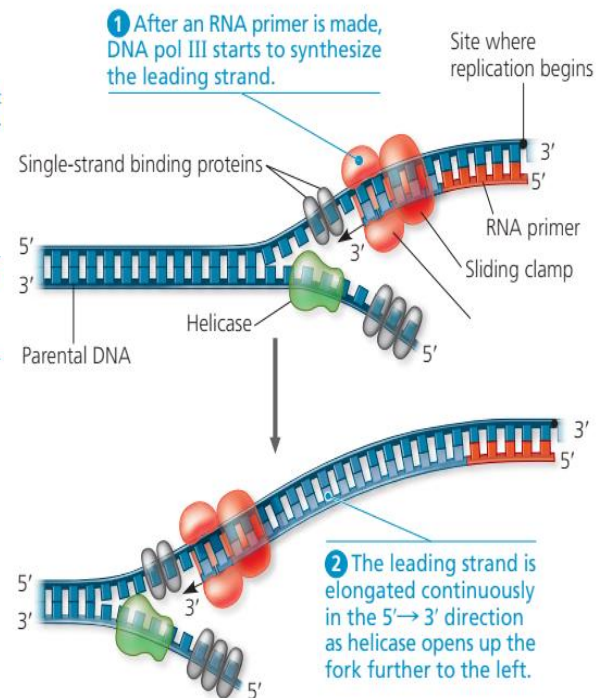
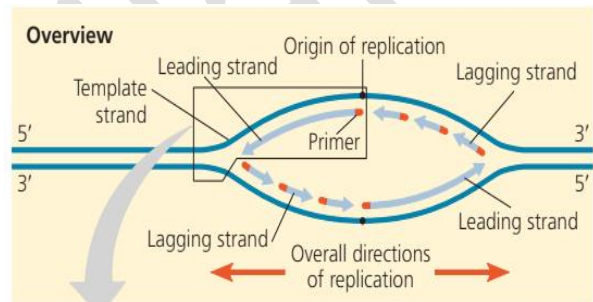
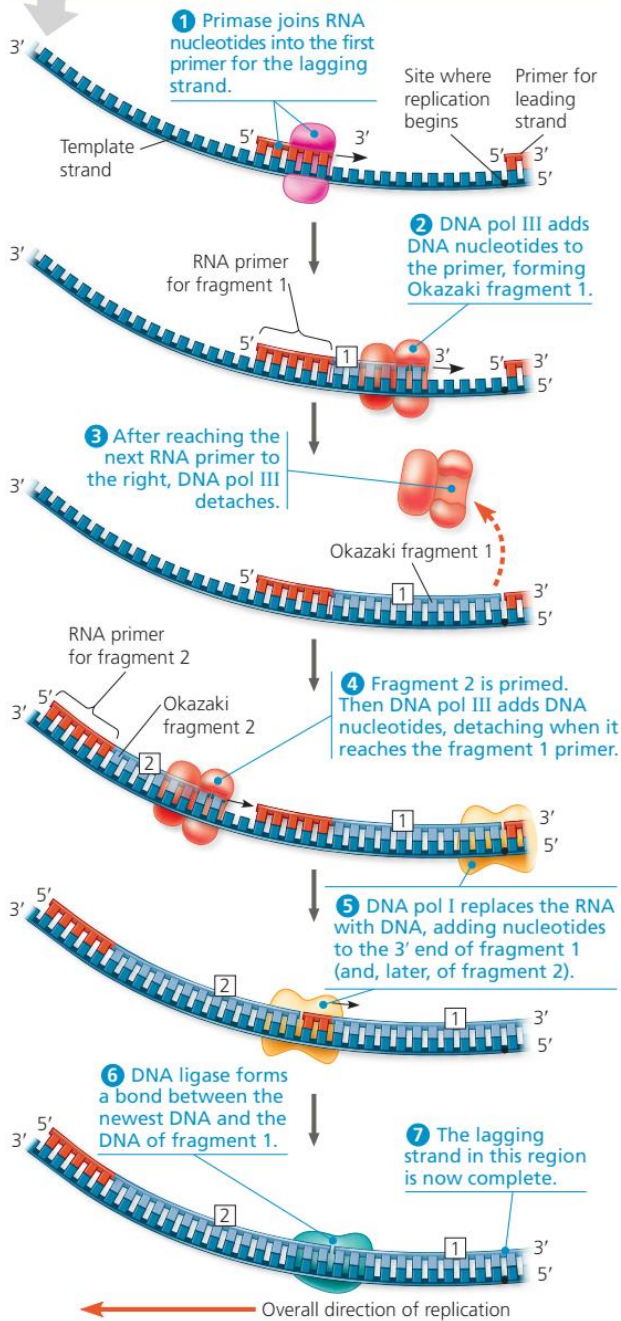
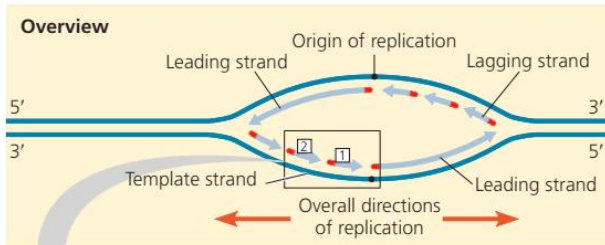
این مشکل با استفاده از روش اتصال قطعات کوتاه به هم حل می شود به طوری که رشته ای از دی ان ای که به نظر می رسد در جهت اشتباه ۳ پریم به ۵ پریم سنتز می شود به طور ناپیوسته و در قطعات کوچک متوالی و مجزا، آن هم با جهت گیری ۵ پریم به ۳ پریم ساخته می شود. در این حالت، آنزیم دی ان ای پلیمراز در خلاف جهت چنگال همانندسازی حرکت کرده و در نتیجه قطعات کوچک جدید به صورت متوالی و پشت سر هم می توانند در جهت ۵ پریم به ۳ پریم ساخته شوند. این قطعات کوچک دی ان ای را، قطعات اکازاکی (هم نام با کاشف آن) می نامند که نهایتاً می توانند با فعالیت آنزیم لیگاز به هم متصل شده و یک رشته پیوسته را ایجاد کنند. به این رشته دی ان ای که به طور ناپیوسته سنتز می شود رشته پیرو یا Laging می گویند چون که فرآیند اتصال قطعات کمی تاخیر ایجاد می کند. در مقابل رشته ای که به طور پیوسته تولید می شود رشته پیشرو یا Leading Strand نامیده می شود. بنابراین، چنگال همانندسازی در همه سلول ها چه یوکاریوت چه پروکاریوت دارای دو رشته پیشرو و پیرو است این ویژگی نشان دهنده این حقیقت است که تمامی آنزیم های دی ان ای پلیمراز فقط در جهت ۵ پریم به ۳ پریم فعالیت می کنند (این محدودیت به دی ان ای پلیمراز اجازه می دهد که کار خود را بازبینی کند).

همانندسازی در رشته پیشرو و پیرو

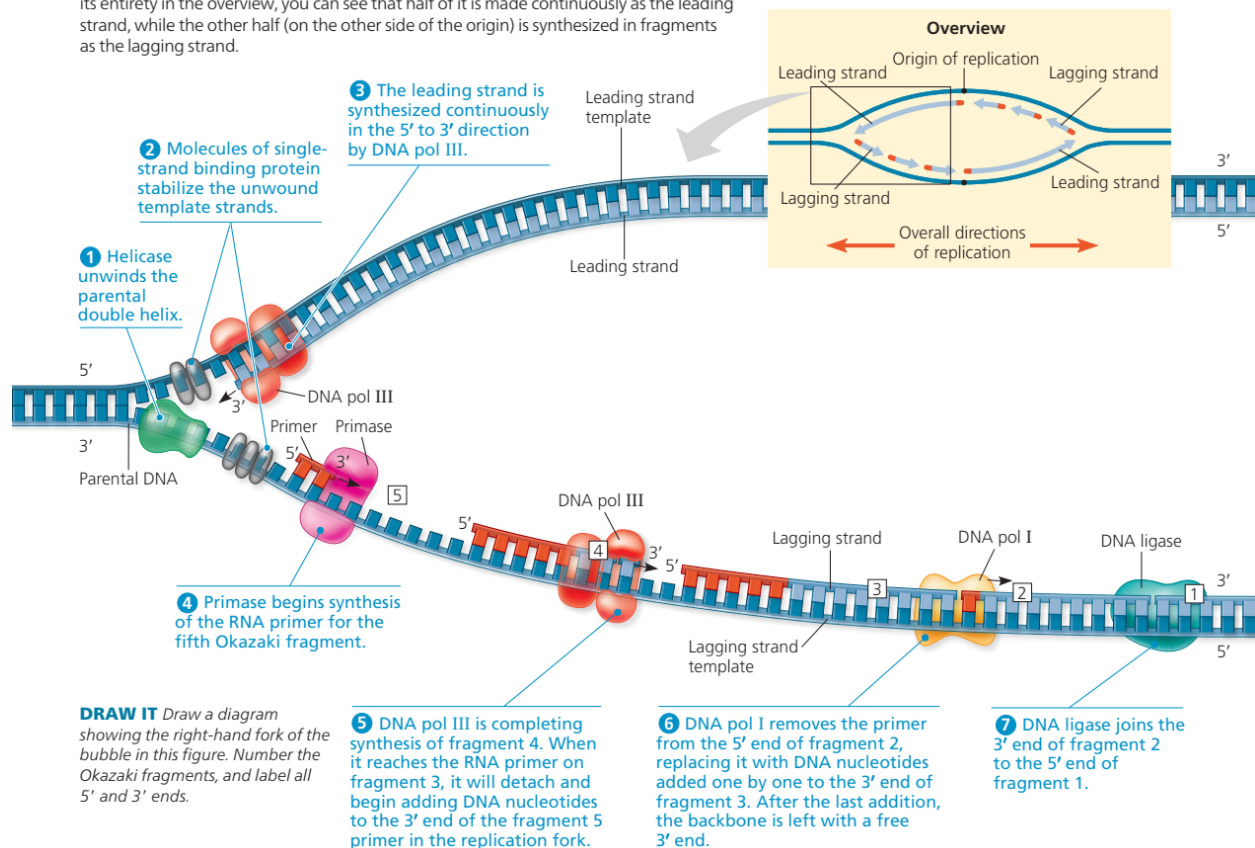
در رشته **پیشرو** فقط یک پرایمر در مبدا همانندسازی شکل می گیرد ولی در رشته **پیرو** چندین پرایمر تولید می شوند که نهایتاً RNA پرایمرها حذف خواهند شد. در مقابل، رشته پیرو به صورت قطعات منقطع جدا از هم سنتز می شوند طول این قطعات (قطعات اوکازاکی) در باکتری معمولاً بین ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ نوکلئوتید و در یوکاریوت ها بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتید می باشد. بنابراین، سنتز رشته پیرو نیز مانند رشته پیشرو در جهت ۵ پریم به ۳ پریم انجام می شود (اما در جهت دیگری از چنگال همانندسازی).



زمانی که دی‌ان‌ای پلیمراز به انتهای قطعه اوکازاکی می‌رسد اصولاً باید از الگو جدا شود و بر روی RNA پرایمر بعدی در چنگال همانندسازی قرار بگیرد. برای این منظور، کمپلکس سوار کننده گیره یا Clamp Loader دی‌ان‌ای پلیمراز را در جایگاه تشکیل RNA پرایمر بعدی قرار می‌دهد.



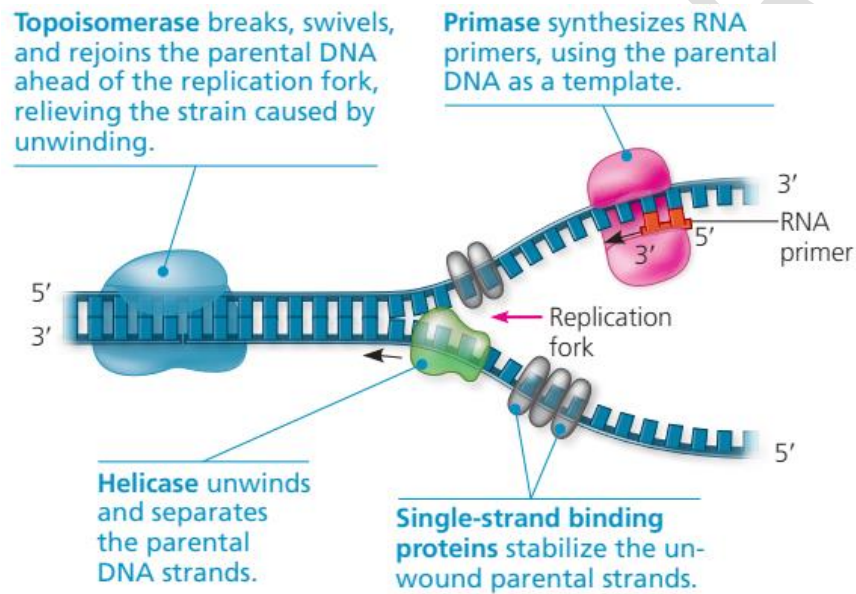
▼ **Figure 16.18 A summary of bacterial DNA replication.** The detailed diagram shows the left-hand replication fork of the replication bubble shown in the overview (upper right). Viewing each daughter strand in its entirety in the overview, you can see that half of it is made continuously as the leading strand, while the other half (on the other side of the origin) is synthesized in fragments as the lagging strand.

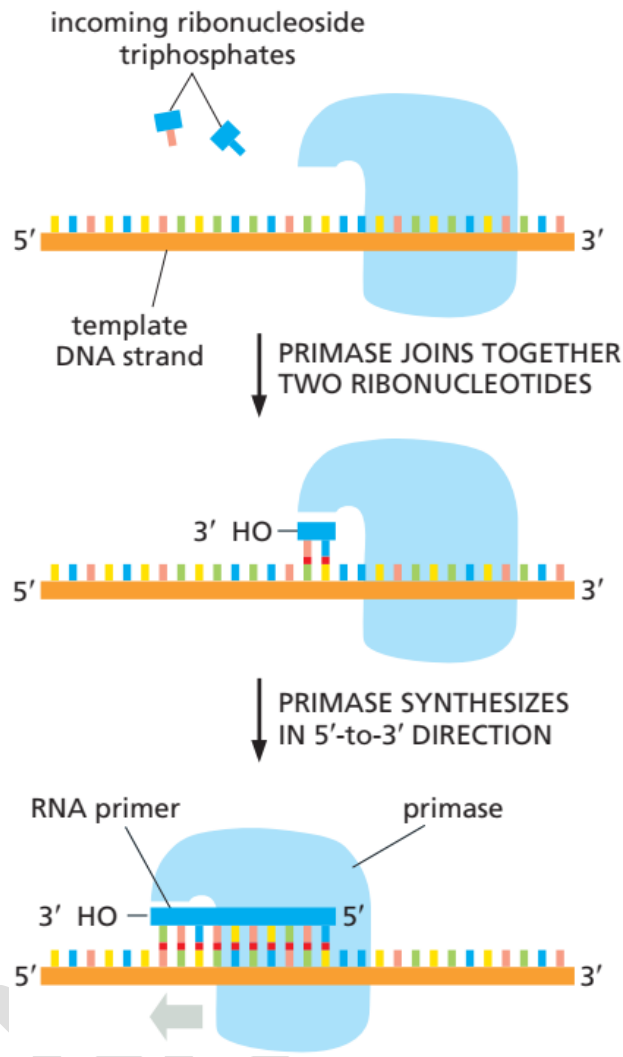


سنتز قطعات کوتاهی از RNA، بعنوان پرایمر برای شروع فعالیت دی‌ان‌ای پلیمراز

از آنجایی که آنزیم دی‌ان‌ای پلیمراز وابسته به الگو می‌باشد بنابراین از قبل باید توالی کوتاهی به صورت انتهای آزاد ۳ پریم داشته باشد تا دی‌ان‌ای پلیمراز بتواند بر اساس رشته الگو، نوکلئوتیدهای جدید را به انتهای ۳ پریم رشته جدید در حال رشد اضافه کند. بنابراین برای آغاز به کار فعالیت آنزیم دی‌ان‌ای پلیمراز، ابتدا نیاز هست که یک توالی کوتاه سنتز شود که آنزیم بتواند آن را شناسایی کرده و نوکلئوتیدهای بعدی را به انتهای ۳ پریم آزاد توالی موجود اضافه کند (سنتز بصورت *de novo* امکان پذیر نیست). بنابراین، فرآیند بعدی در همانندسازی، تولید رشته کوتاهی از RNA تحت عنوان RNA پرایمر است (این رشته از اتصال ریبونوکلئوتیدها به هم توسط آنزیم دیگری به غیر از دی‌ان‌ای پلیمراز ساخته می‌شود). بعبارت دیگر، قطعات کوتاهی از RNA، بعنوان پرایمر برای شروع فعالیت آنزیم دی‌ان‌ای پلیمراز و ساخت دی‌ان‌ای جدید عمل می‌کنند. در نتیجه، برای آغاز همانندسازی، آنزیم دیگری نیز نیاز است که شروع سنتز رشته پلی نوکلئوتید را بدون نیاز به انتهای جفت باز آزاد و به سادگی با اتصال دو نوکلئوتید به هم کاتالیز کند. این آنزیم پرایماز یا Primase نام دارد که مثالی از آنزیم‌های

RNA پلیمراز وابسته به الگو است یعنی می‌تواند با استفاده از الگوی دی‌ان‌ای، RNA بسازد. در واقع، این آنزیم (پریماز)، دی‌ان‌ای سنتز نمی‌کند و با استفاده از رشته دی‌ان‌ای به عنوان الگو نوع دیگری از اسید نوکلئیک به نام RNA را سنتز می‌کند و از آنجایی که، یوراسیل می‌تواند با آدنین جفت شود در نتیجه پرایمر RNA سنتز شده می‌تواند با استفاده از خاصیت جفت شدن مکمل بازها دقیقاً مانند دی‌ان‌ای ساخته شود. این قطعه کوتاه RNA که حدود ۱۰ نوکلئوتید طول دارد با رشته الگو جفت باز تشکیل داده و انتهای ۳ پرایم آزاد را برای شروع عمل پلیمریزاسیون در اختیار دی‌ان‌ای پلیمراز قرار می‌دهد.

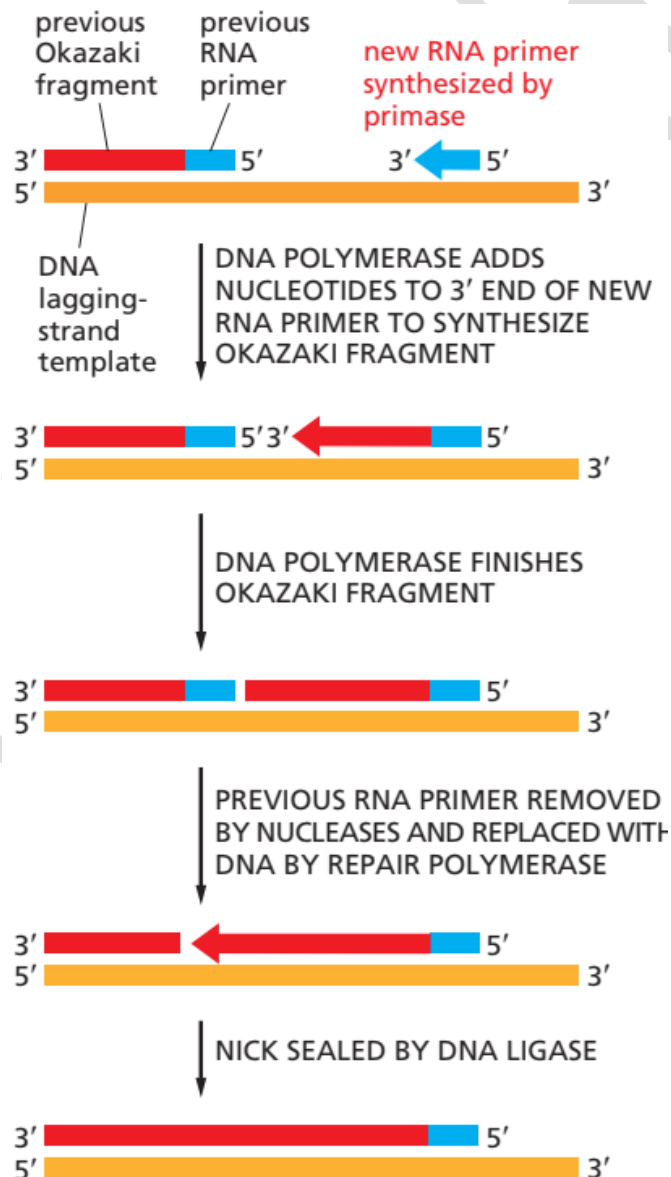




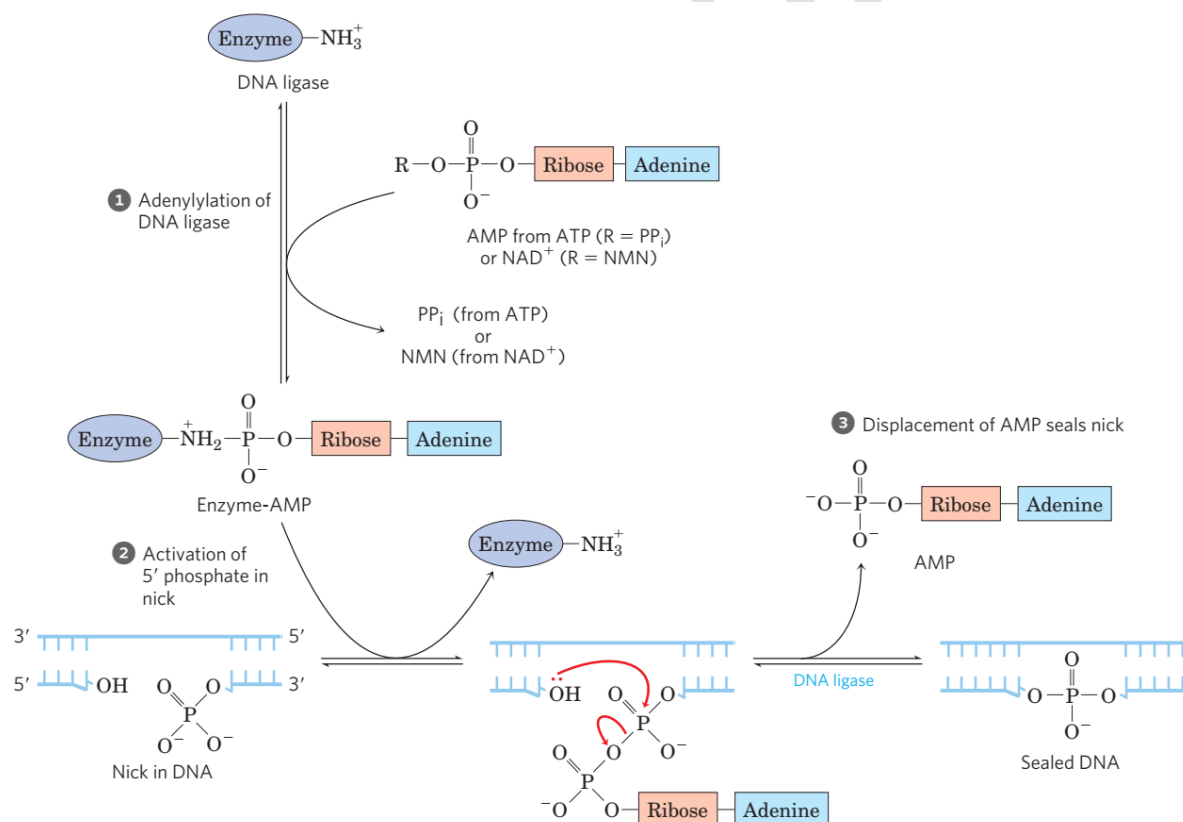
برای رشته پیشرو فقط یک RNA پرایمر برای شروع همانندسازی در مبدا همانندسازی نیاز است و زمانی که چنگال همانندسازی شکل گرفت دی‌ان‌ای پلیمراز این قطعه پرایمر را در جهت ۵ پرایم به ۳ پرایم گسترش می‌دهد. اما در رشته پیرو که دی‌ان‌ای به طور ناپیوسته از طریق اتصال قطعات مختلف اکازاکی سنتز می‌شود برای ادامه پلیمریزاسیون هر قطعه، نیاز به پرایمر جدید است.

قطعات اوکازاکی باید به هم متصل شوند

در ادامه، برای تولید یک رشته دی‌ان‌ای پیوسته از تکه‌های مجزا، آنزیم‌های دیگری نیز نیاز هستند. این آنزیم‌ها به ترتیب ابتدا RNA پرایمر را حذف کرده جای آن را با دی‌ان‌ای پر می‌کنند و نهایتاً قطعات دی‌ان‌ای را به هم متصل می‌کنند. برای منظور ابتدا یک نوکلئاز که به آن پلیمراز ترمیمی یا اصطلاحاً دی‌ان‌ای پلیمراز ۱ (چون زودتر کشف شده بود) می‌گویند، پرایمر را تجزیه می‌کند و جای آن را با دی‌ان‌ای پر می‌کند و سپس آنزیم دیگری به نام دی‌ان‌ای لیگاز انتهای ۵ پیریم فسفات یک قطعه دی‌ان‌ای را به انتهای ۳ پیریم هیدروکسیل قطعه بعدی متصل می‌کند.

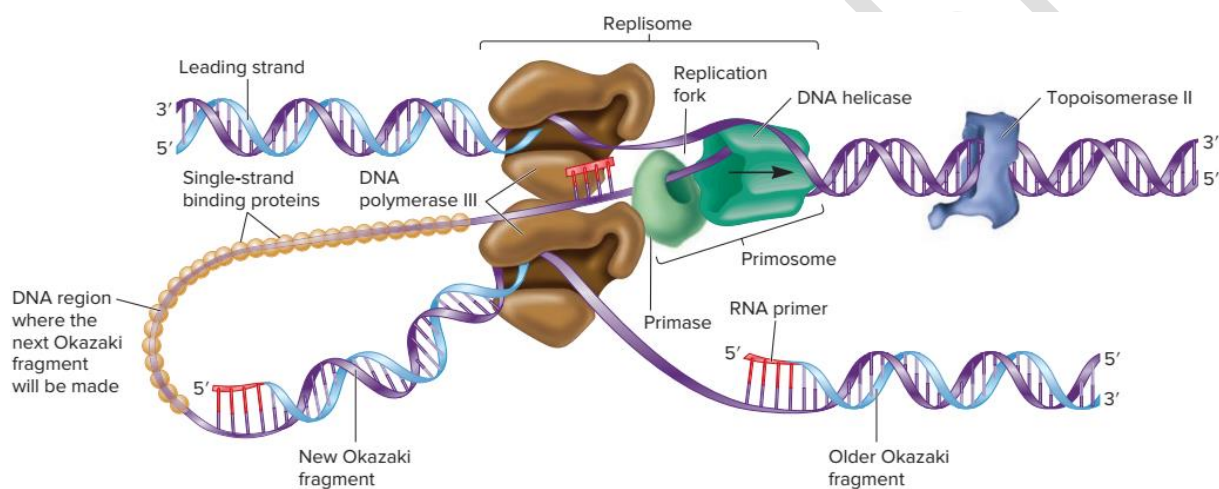


بعبارت دیگر، برای تکمیل رشته پیرو ۳ فرآیند پشت سر هم باید اتفاق بیفتد تا قطعات اوکازاکی به هم متصل شوند. اول اینکه RNA پرایمرها حذف شوند دوم در ناحیه حذف شده دی‌ان‌ای سنتز شود و نهایتاً اتصال کووالانسی بین قطعات دی‌ان‌ای برقرار شود. در *E. coli* حذف RNA ها و سپس سنتز قطعات دی‌ان‌ای در نواحی حذف شده، به وسیله دی‌ان‌ای پلیمراز I انجام می‌شود این آنزیم فعالیت اگزونوکلازای ۵ پریم به ۳ پریم دارد یعنی RNA پرایمر را در جهت ۵ پریم به ۳ پریم حذف کرده و برای پر کردن این ناحیه از انتهای ۳ پریم قطعات اوکازاکی به عنوان پرایمر استفاده می‌کند. با پر شدن کامل شکاف یک پیوند کووالانسی باید آخرین نوکلئوتید اضافه شده توسط دی‌ان‌ای پلیمراز I را به رشته دی‌ان‌ای مجاور که قبلاً با دی‌ان‌ای پلیمراز III تولید شده بود متصل کند. نهایتاً **دی‌ان‌ای لیگاز** پیوند کووالانسی بین قطعات مجاور را کاتالیز کرده و فرایند همانندسازی را در رشته پیرو تکمیل می‌کند. دی‌ان‌ای لیگاز در پروکاریوت‌ها برای انجام این واکنش نیاز به NAD^+ دارند در حالی که یوکاریوت‌ها و آرکی‌ها نیازمند ATP است. بنابراین، همانندسازی در رشته پیشرو به صورت ممتد و در مسیر چنگال همانندسازی اما رشته پیرو با استفاده از قطعات منقطع و دور از چنگال همانندسازی اتفاق می‌افتد.



مفهوم پرایموزوم، رپلیزوم و دی‌ان‌ای پلیمراز دایمر

اتصال دی‌ان‌ای هلیکاز و پرایماز به طور فیزیکی به هم تشکیل مجموعه‌ای به نام **پرایموزوم** را می‌دهد که چنگال‌های همانند سازی را هدایت می‌کنند. پرایموزوم خود با دو هولوآنزیم دی‌ان‌ای پلیمراز ارتباط فیزیکی برقرار کرده و **رپلیزوم** را ایجاد می‌کند. همچنین، واژه دی‌ان‌ای پلیمراز دایمر یا **Dimering Polymerase** برای دو هولوآنزیم دی‌ان‌ای پلیمراز به کار می‌رود.

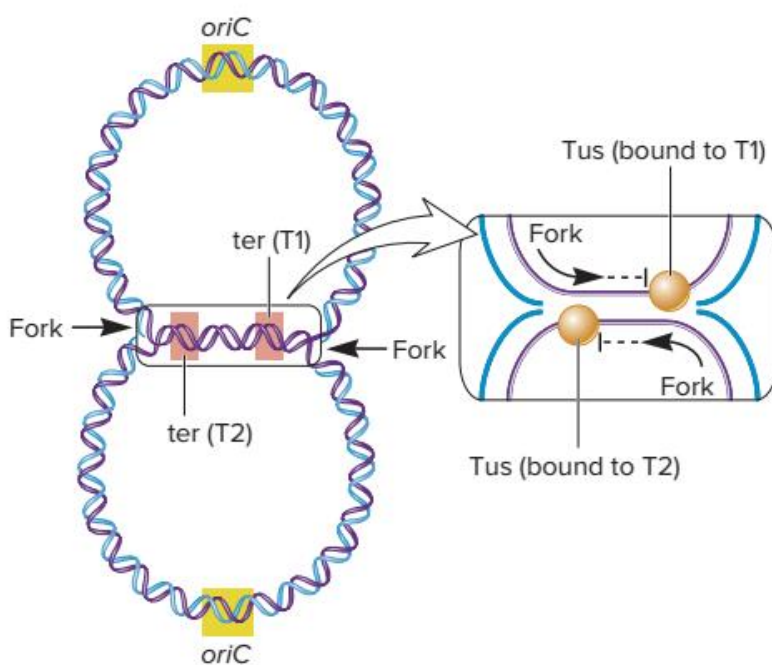


Proteins of the *E. coli* Replisome

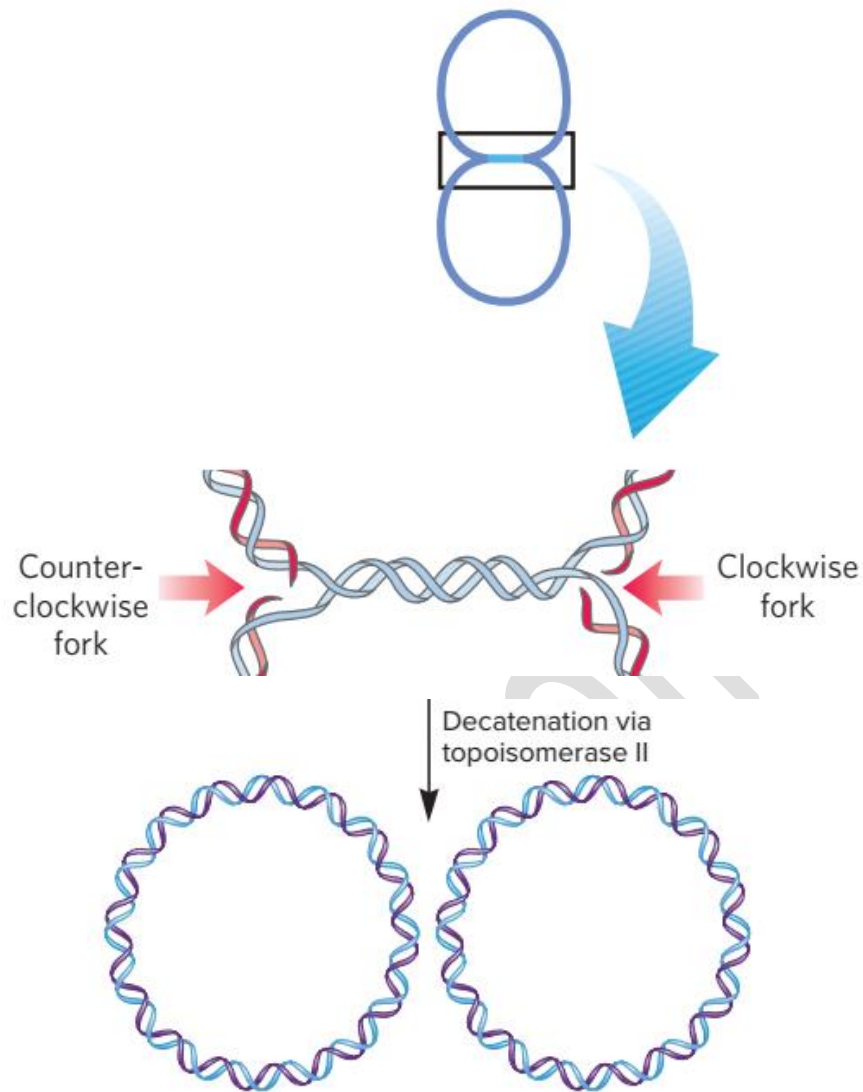
Protein	M_r	Number of subunits	Function
SSB	75,600	4	Binding to single-stranded DNA
DnaB protein (helicase)	300,000	6	DNA unwinding; primosome constituent
Primase (DnaG protein)	60,000	1	RNA primer synthesis; primosome constituent
DNA polymerase III	791,500	17	New strand elongation
DNA polymerase I	103,000	1	Filling of gaps; excision of primers
DNA ligase	74,000	1	Ligation
DNA gyrase (DNA topoisomerase II)	400,000	4	Supercoiling

اتمام همانندسازی

همانندسازی زمانی به اتمام می‌رسد که دو چنگال همانندسازی در توالی‌های خاتمه Termination Sequences به یکدیگر برسند. در سمت مقابل OriC در کروموزوم باکتری E.coli یک جفت توالی خاتمه به نام توالی‌های Ter وجود دارد و پروتئینی که به توالی‌های Ter متصل شده و حرکت چنگال همانندسازی را متوقف می‌کنند TUS یا termination utilization substances می‌گویند. T1 از ادامه حرکت چنگال همانندسازی در جهت چپ به راست ممانعت می‌کند اما به چنگال همانندسازی دیگر اجازه حرکت می‌دهد و T2 از حرکت چنگال همانندسازی در جهت راست به چپ جلوگیری کرده اما ممانعتی برای چنگال همانندسازی مقابل ایجاد نمی‌کند. همانندسازی دی‌ان‌ای به محض رسیدن به چنگال همانندسازی مقابل معمولاً در T1 یا T2 متوقف می‌شود در نهایت دی‌ان‌ای لیگاز دو رشته دختری را به صورت کووالانسی به هم متصل می‌کند و دو مولکول دو رشته‌ای تولید می‌شود.



با اتمام همانندسازی دی‌ان‌ای، یک مشکل باقی می‌ماند و آن هم عبارت است از دو مولکول دی‌ان‌ای حلقوی متصل به هم به نام کاتنان (Catenane). در E.coli توپوایزومراز II برش موقت در رشته‌های دی‌ان‌ای ایجاد کرده و پس از جدا شدن رشته‌ها دوباره آنها را به هم متصل می‌کند و به کاتنان‌ها امکان جدا شدن می‌دهد تا مولکول‌های حلقوی منفرد و جدا از هم تولید شوند.



صحت همانندسازی با سه مکانیسم تنظیم می‌شود

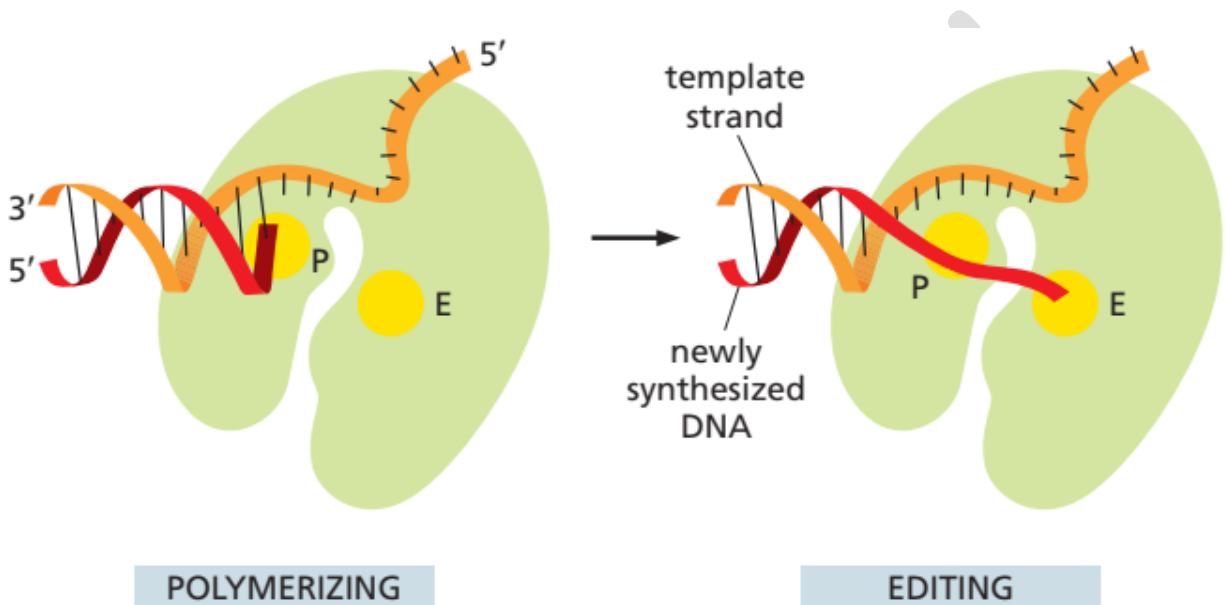
سنتز دی‌ان‌ای با درجه بالایی از دقت یا صحت اصطلاحاً Fidelity انجام می‌گیرد که سه عامل در این دقت نقش دارند:

○ پایداری جفت بازها

پیوندهای هیدروژنی بین G با C و A با T نسبت به پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازهای اشتباه بسیار پایدارتر است بنابراین در حالت عادی تمایل برقراری جفت بازهای استاندارد بیشتر از فرم‌های غیرمعمول است.

○ ساختار جایگاه فعال آنزیم

جایگاه فعال دی‌ان‌ای پلیمراز اتصال نوکلئوتیدها را زمانی که جفت بازهای صحیح رشته‌های مقابل هم قرار می‌گیرند کاتالیز می‌کند به دنبال جفت شدن ناجور نوکلئوتیدها یک انحراف در ساختار مارپیچ به وجود می‌آید که معمولاً از قرارگیری نوکلئوتیدهای نادرست در جایگاه فعال ممانعت می‌کند.



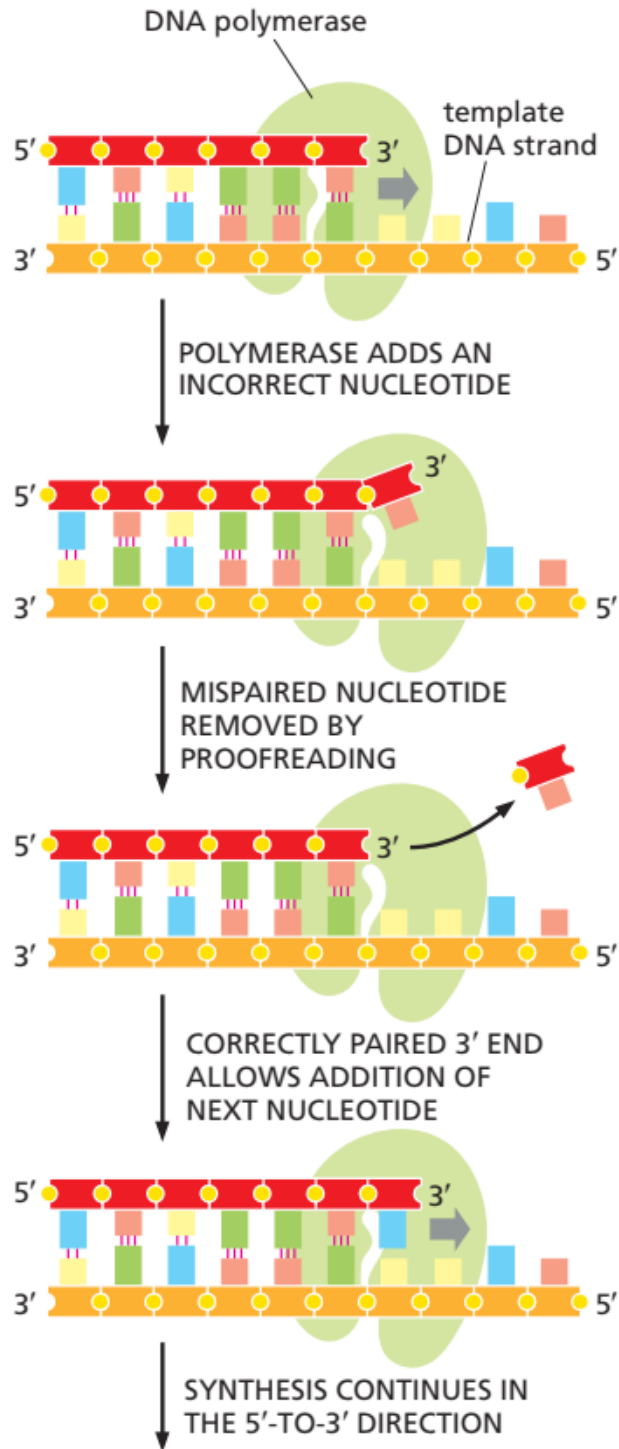
○ عمل تصحیح یا پروفایندینگ

دی‌ان‌ای پلیمراز نوکلئوتیدهای ناجور جفت شده را شناسایی کرده آنها را از رشته دختری حذف می‌کند. این حذف به کمک فعالیت اگزونوکلئازی انجام می‌شود که پیوند بین دو نوکلئوتید مجاور در انتهای ۳ پریم رشته تازه سنتز شده را می‌شکند. توانایی حذف بازهای ناجور جفت شده به کمک این مکانیسم را تصحیح دی‌ان‌ای پلیمراز می‌نامند. عمل تصحیح با حذف نوکلئوتیدها در جهت ۳ پریم به ۵ پریم انجام می‌شود و پس از حذف نوکلئوتید اشتباه، دی‌ان‌ای پلیمراز فرآیند سنتز دی‌ان‌ای را مجدداً از جهت ۵ پریم به سپریم از سر می‌گیرد.

دی‌ان‌ای پلیمراز خاصیت خود تصحیحی دارد

میزان اشتباهات دی‌ان‌ای پلیمراز فقط یک در هر ۱۰ به توان ۷ نوکلئوتید است که کپی می‌کند. گرچه A با T و G با C جفت بازهای پایدار تشکیل می‌دهند ولی جفت بازهای ضعیف تر مثل G با T و A با C هم می‌توانند تشکیل

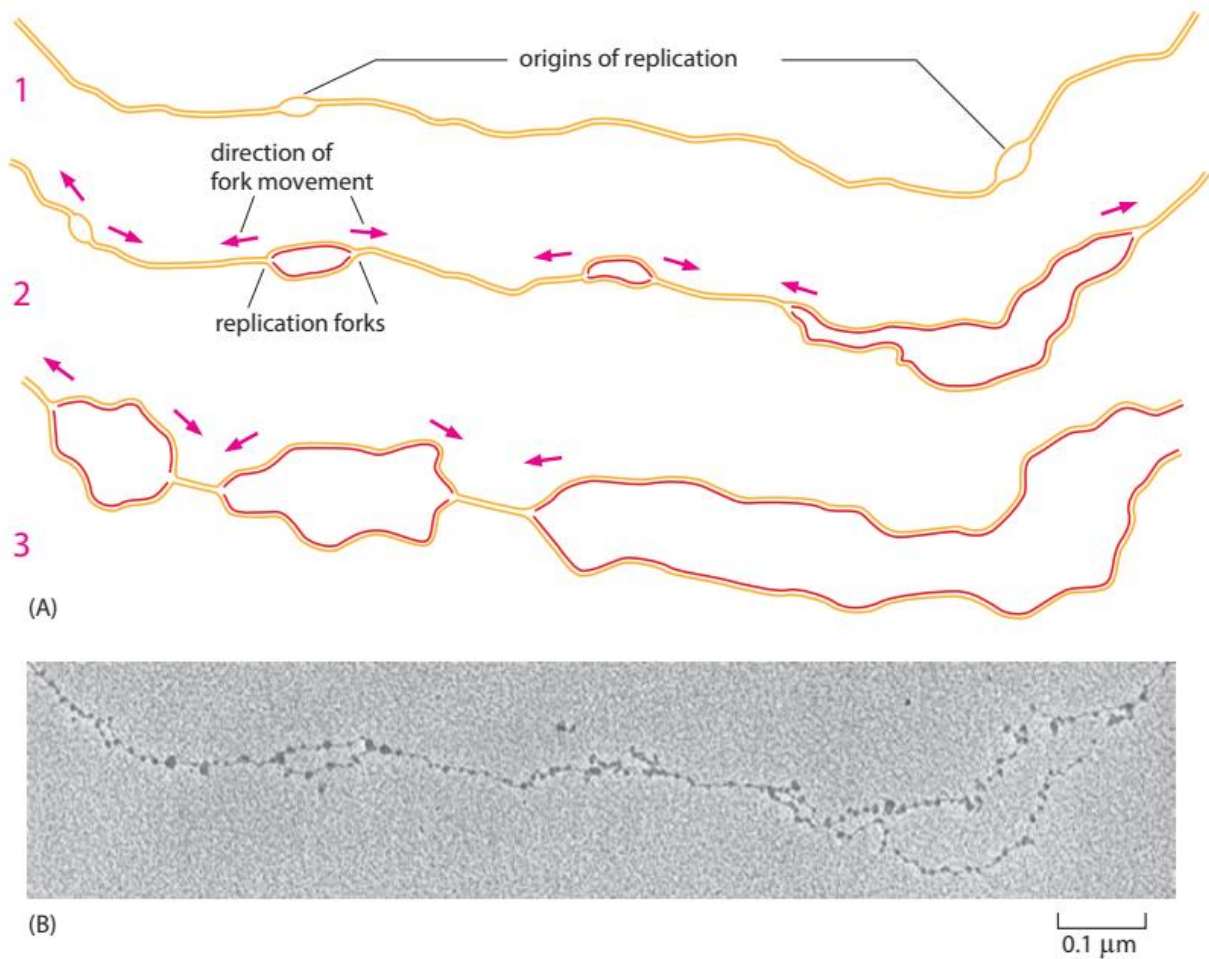
شوند این جفت بازهای نادرست بسیار کمتر از جفت بازهای صحیح ایجاد می‌شوند اما اگر در زنجیره باقی بمانند توانند باعث انباشت جهش‌ها گردند. در این خصوص دی‌ان‌ای پلیمراز ۲ خاصیت ویژه دارد که دقت همانندسازی دی‌ان‌ای را بسیار افزایش می‌دهد. اول اینکه آنزیم، تشکیل جفت باز بین نوکلئوزید تری فسفات جدید و رشته الگو را کنترل می‌کند و فقط زمانی که درست با هم جفت شده باشند به لحاظ ساختاری دچار باز آرای بی ساختاری شده (منظور آنزیم است) و اجازه جفت شدن و همین‌طور اجازه اضافه شدن نوکلئوتید جدید را می‌دهد. دوم اینکه حتی اگر دی‌ان‌ای پلیمراز دچار خطا شده و نوکلئوتید اشتباه را اضافه نماید این خطا را می‌تواند طی فعالیتی به نام تصحیح یا Proofreading برطرف کند. بطوریکه، در طی سنتز دی‌ان‌ای اگر نوکلئوتید اشتباهی به رشته در حال ساخت اضافه شده باشد، آنزیم دی‌ان‌ای پلیمراز آن را از رشته جدا کرده، با یک نوکلئوتید صحیح جایگزین می‌کند و سپس به کار خود ادامه می‌دهد. فرآیند تصحیح، همزمان با ساخت دی‌ان‌ای انجام می‌گیرد یعنی قبل از اینکه آنزیم، نوکلئوتید دیگری را به رشته دی‌ان‌ای در حال رشد اضافه کند بررسی می‌کند که آیا نوکلئوتید قبلی با رشته الگو به درستی جفت باز تشکیل داده است یا نه؟ اگر تشکیل جفت باز درست بود، پلیمراز نوکلئوتید بعدی را اضافه می‌کند و اگر اشتباه باشد، آنزیم، نوکلئوتید ناجور را حذف کرده و مجدداً فعالیت پلیمرازی را از سر می‌گیرد.



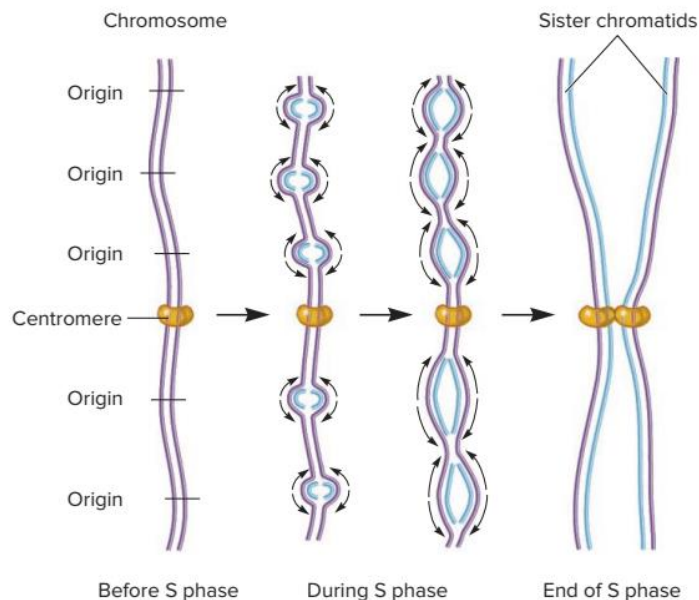
هماندسازی دی‌ان‌ای یوکاریوتی

مخمرها به عنوان موجودات مدل برای مطالعه فرآیند همانندسازی یوکاریوت‌ها و همینطور چرخه سلولی هستند. پیچیدگی همانندسازی دی‌ان‌ای یوکاریوتی به چند عامل بستگی دارد یکی اینکه سلول‌های یوکاریوتی کروموزوم‌های خطی بلندتری دارند و کروماتین در ساختاری به نام نوکلئوزوم فشرده شده است و همینطور تنظیم چرخه سلولی یوکاریوت‌ها پیچیده‌تر است. به دلیل بلندتر بودن و خطی بودن کروموزوم‌های یوکاریوتی شروع همانندسازی از چندین مبدا همانندسازی اتفاق می‌افتد.

در سال ۱۹۶۸ جول هوبرمن و آرتور ریت مدارکی مبتنی بر وجود مبدهای همانندسازی با اضافه کردن نوکلئوتیدهای نشاندار 3H-thymidine به کشت سلول‌های در حال تقسیم ارائه کردند. دئوکسی تیمیدین‌های نشاندار توسط سلول‌ها جذب شده و در سنتز رشته‌های جدید دی‌ان‌ای در یک دوره کوتاه شرکت کردند سپس سلول‌ها در معرض غلظت بسیار بالایی از دئوکسی تیمیدین‌های غیر نشاندار قرار گرفتند تا از اتصال دئوکسی تیمیدین‌های نشاندار ممانعت شود. کروموزوم‌ها سپس از سلول‌ها جدا شده و در معرض اتورادیوگرافی قرار گرفتند و همانطور که انتظار می‌رفت قطعات نشاندار در بین قطعات غیر نشاندار به صورت پراکنده مشاهده شدند این نتایج با فرضیه وجود چندین مبدا همانندسازی در کروموزوم‌های یوکاریوتی مطابقت دارد.



بنابراین همانندسازی دی‌ان‌ای یوکاریوتی از تعداد زیادی مبدأ همانندسازی در دو جهت در فاز S چرخه سلولی صورت می‌گیرد که نهایتاً چنگال‌های همانندسازی مختلف به همدیگر می‌رسند و همانندسازی را کامل می‌کنند. در پایان فاز S سانتومرها هم همانندسازی می‌کنند تا در M جدا شوند.

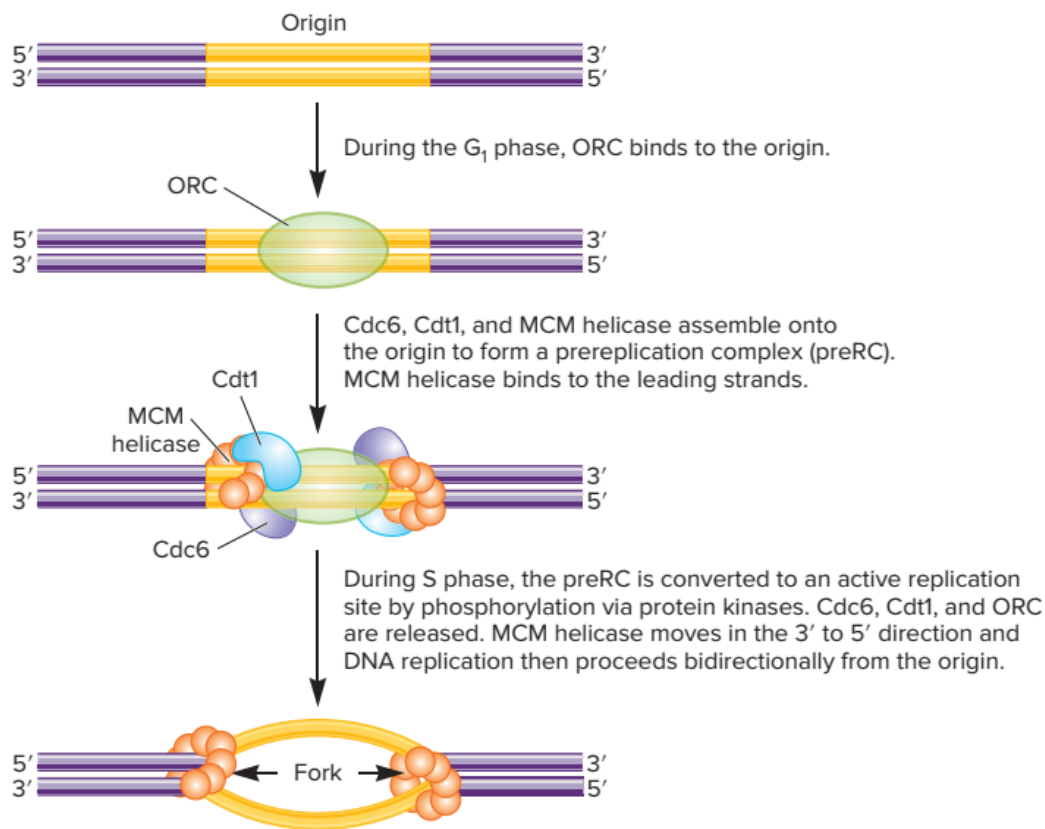


در ژنوم انسان تقریباً ۱۰ هزار مبدأ همانندسازی وجود دارد (به طور متوسط ۲۲۰ مبدأ در هر کروموزوم) به طوری که شروع همانندسازی از نقاط مختلف زمان لازم برای کپی برداری از کل ژنوم را تا حد زیادی کاهش می دهد.

در مخمر ساکارومایسس سرویزیه چندین مبدأ همانندسازی و توالی های آن شناسایی شده اند. این توالی ها را عناصر **ARS** یا **autonomously replicating sequence** یا اصطلاحاً توالی های همانندسازی کننده خودمختار می نامند این عناصر ۵۰ جفت باز طول داشته و برای شروع همانندسازی کروموزوم ضروری هستند عناصر **ARS** نیز همانند **Orig** نسبت به سایر بخش های دیگر دی ان ای درصد بالاتری از **A** و **T** را به خود اختصاص می دهند. توالی های حفظ شده **ATTTAT(A or G)TTTA** همراه با سایر عناصر عملکرد مبدأ را افزایش می دهند این آرایش مشابه نواحی همانندسازی باکتریایی می باشد که شامل یک ناحیه غنی از **AT** و توالی های ویژه ای مثل جعبه **DnaA** هستند.

همانندسازی دی ان ای یوکاریوتی نیازمند تشکیل کمپلکس پیش همانندسازی **pre-RC** در طول فاز **G1** چرخه سلولی می باشند بخشی از **pre-RC** را گروهی از پروتئین ها به نام کمپلکس تشخیص دهنده مبدأ **Origin recognition complex** یا **ORC** تشکیل می دهند که به عنوان آغاز کننده تجمع **pre-RC** عمل می کنند. **ORC** اتصال **cdc6**، **cdt1** و گروهی متشکل از ۶ پروتئین به نام **MCM** هلیکاز را هدایت می کند. اتصال **MCM** هلیکاز در مبدأ، فرآیندی به نام صدور مجوز همانندسازی یا **DNA replication licensing** را کامل می کند (فقط مبداهایی که **MCM** هلیکاز دارند می توانند سنتز دی ان ای را شروع کنند). در فاز **S** چرخه سلولی **pre-RC** توسط پروتئین کینازها فسفریله و فعال می شود این فسفریلاسیون منجر به آزاد شدن **cdc6**، **cdt1** و **orc** و تجمع دیگر عوامل همانندسازی دی ان ای پلیمراز می شود.

بنابراین بطور خلاصه در فاز G1 چرخه سلولی ORC به ARS متصل می‌شود. در فاز S کمپلکس pre-RC شامل *cdc6*، *cdt1* و ORC هلیکاز توسط کینازها فسفریله می‌شوند این فسفوریاسیون از طریق CDK ها و DDK ها، pre-RC را به جایگاه فعال همانندسازی تبدیل کرده و منجر به جدا شدن *cdc6*، *cdt1* و *orc* می‌شوند و هلیکاز در جهت ۳ پریم به ۵ پریم پیش می‌رود و همانندسازی دی‌ان‌ای در دو جهت ادامه می‌یابد.



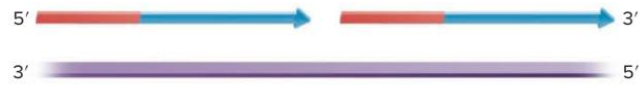
سلول‌های پستانداران تقریباً بیش از ۱۲ نوع دی‌ان‌ای پلیمراز مختلف دارند. چهار نوع از این دی‌ان‌ای پلیمرازها با نام‌های آلفا، اپسیلون، دلتا و گاما دارای نقش اساسی در همانندسازی دی‌ان‌ای هستند. از بین این‌ها، دی‌ان‌ای پلیمراز گاما در همانندسازی دی‌ان‌ای میتوکندری و دی‌ان‌ای پلیمرازهای آلفا، اپسیلون و دلتا در همانندسازی دی‌ان‌ای هسته‌ای نقش دارند. نوع دیگری از دی‌ان‌ای پلیمراز به نام بتا، در همانندسازی دی‌ان‌ای طبیعی شرکت نمی‌کند اما نقش مهمی در برداشت بازهای نادرست دی‌ان‌ای آسیب دیده دارد.

آلفا، تنها پلیمراز یوکاریوتی است که در ارتباط با پرایماز عمل می‌کند. نقش عملکردی دی‌ان‌ای پلیمراز آلفا-پرایماز سنتز یک پرایمر DNA-RNA کوتاه متشکل از ۱۰ نوکلئوتید RNA و ۲۰ تا ۳۰ نوکلئوتید DNA است. این رشته کوتاه DNA-RNA در ادامه توسط دی‌ان‌ای پلیمراز اپسیلون یا دلتا برای همانندسازی رشته‌های مختلف دی‌ان‌ای

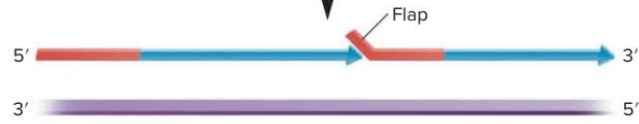
استفاده می‌شوند. برای این منظور دی‌ان‌ای پلیمراز آلفا-پرایماز از چنگال همانندسازی جدا شده سپس دی‌ان پلیمراز اپسیلون یا دلتا جایگزین آن می‌شود این مبادله را تغییر پلیمرازی یا Polymerase Switch می‌نامند. بنابراین به طور خلاصه دی‌ان‌ای پلیمراز آلفا به همراه پرایماز در شروع همانندسازی نقش دارند و دی‌ان‌ای پلیمرازهای اپسیلون و دلتا به ترتیب در همانندسازی رشته‌های پیشرو و پیرو در طول فاز S نقش دارند.

Eukaryotic DNA Polymerases	
Polymerase Types*	Function
α	Initiates DNA replication in conjunction with primase
ϵ	Replication of the leading strand
δ	Replication of the lagging strand
γ	Replication of mitochondrial DNA
η, κ, ι, ξ (lesion-replicating polymerases)	Replication of damaged DNA
$\alpha, \beta, \delta, \epsilon, \sigma, \lambda, \mu, \phi, \theta, \eta$	DNA repair or other functions*

یکی از تفاوت‌های کلیدی بین همانندسازی دی‌ان‌ای یوکاریوتی و پروکاریوتی چگونگی حذف پرایمرهای RNA است. پرایمرهای RNA باکتریایی توسط دی‌ان‌ای پلیمراز I حذف می‌شوند در حالی که دی‌ان‌ای پلیمراز در یوکاریوت‌ها چنین نقشی ندارد. در عوض آنزیمی به نام Flap Endonuclease مسئول حذف RNA پرایمر است. علت نامگذاری فلپ اندونوکلاز به این خاطر است که قطعات کوچک یا فلپ RNA تولید شده در اثر فعالیت دی‌ان‌ای پلیمراز دلتا را حذف می‌کند. یعنی فعالیت پلیمراز دلتا که سمت چپ قطعات اوکازاکی را تا رسیدن به RNA پرایمر قطعه اوکازاکی مجاور در سمت راست ادامه می‌دهد، سبب می‌شود که بخشی از RNA پرایمر یک زبانه کوتاه تشکیل دهد که توسط فلپ اندونوکلاز حذف می‌گردد سرانجام همه RNA پرایمرها حذف شده و دی‌ان‌ای لیگاز می‌تواند قطعات دی‌ان‌ای را به هم متصل کند.



DNA polymerase δ elongates the left Okazaki fragment and causes a short flap to occur on the right Okazaki fragment.



Flap endonuclease removes the flap.



DNA polymerase δ continues to elongate and causes a second flap.



Flap endonuclease removes the flap.

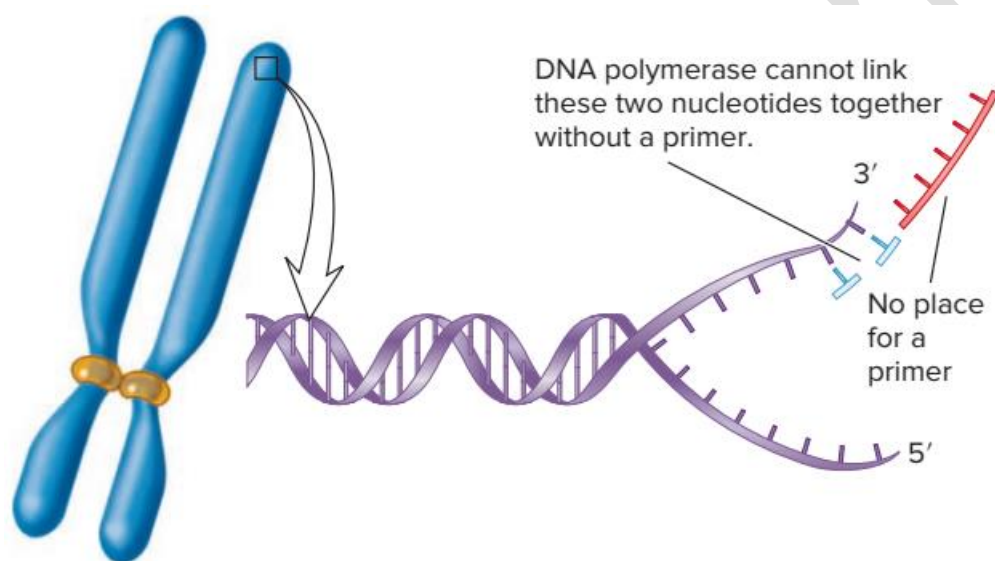


Process continues until the entire RNA primer is removed.
DNA ligase seals the two fragments together.



تلومراز، انتهای کروموزوم‌های یوکاریوتی را همانندسازی می‌کند

کروموزوم‌های خطی یوکاریوتی در انتهای خود دارای تلومر هستند. واژه تلومر به مجموعه‌ای از توالی‌های دی‌ان‌ای و پروتئین‌های خاصی که به این توالی‌ها متصل می‌گردند اطلاق می‌گردد. اگرچه رشته پیشرو تا انتهای کروموزوم می‌تواند به صورت پیوسته همانندسازی شود ولی برای رشته پیرو با توجه به مطالبی که ذکر شد امکان پذیر نیست و زمانی که RNA پرایمر انتهایی در روی رشته پیرو برداشته شود راهی برای جایگزینی ۱۰ نوکلئوتید برداشته شده انتهایی نیست بنابراین در هر دور همانندسازی، رشته پیرو کوتاه‌تر خواهد شد.

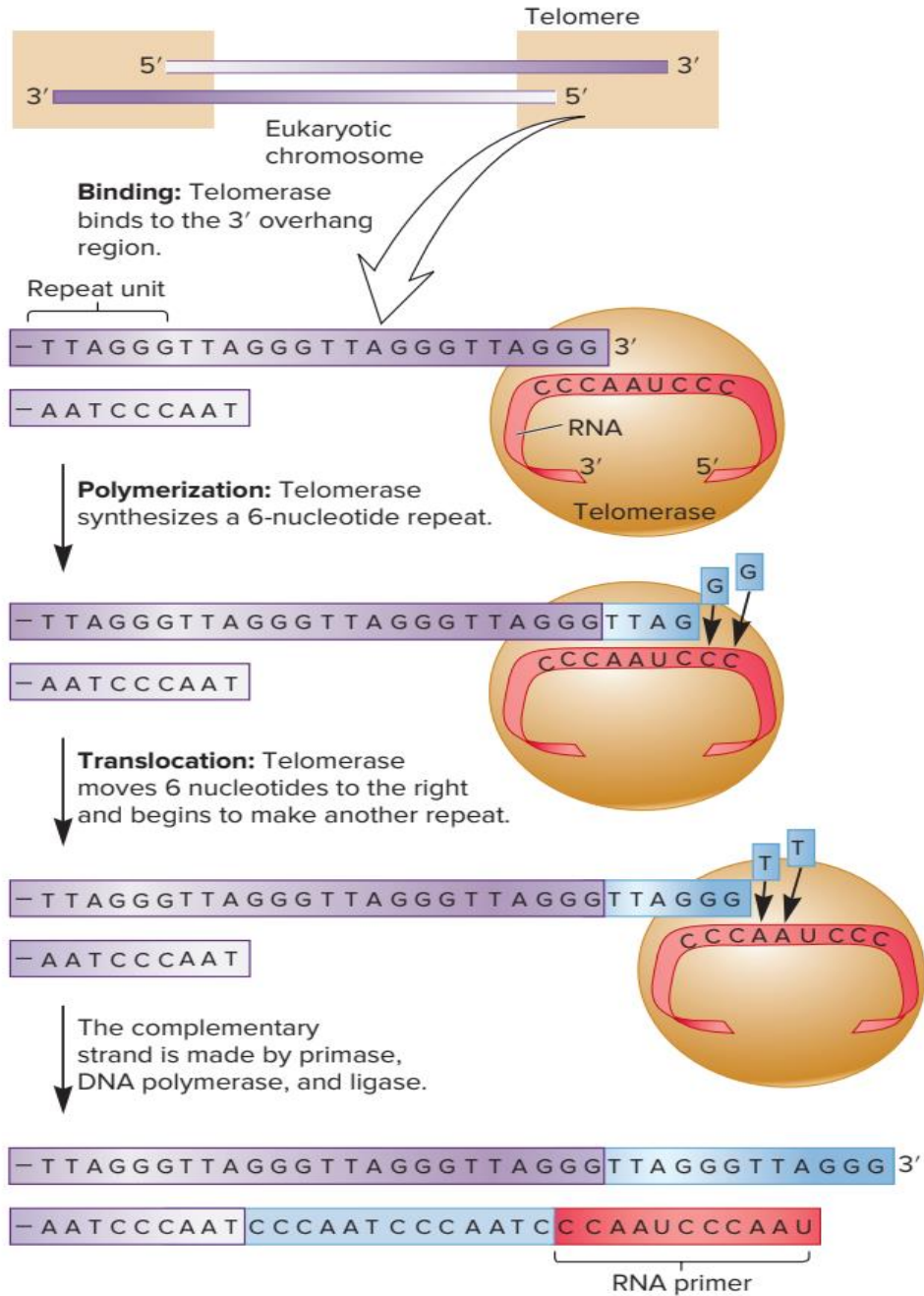


بنابراین، مشکل دیگری که در همانندسازی مطرح است پلیمریزاسیون انتهای کروموزوم‌ها است چون همانندسازی دی‌ان‌ای فقط در جهت ۵ پرایم به ۳ پرایم انجام می‌شود و با توجه به اینکه رشته پیرو در چنگال همانندسازی بصورت قطعات دی‌ان‌ای ناپیوسته ساخته می‌شوند و هر کدام با یک RNA پرایمر حاصل از فعالیت پرایماز آغاز می‌گردند وقتی که چنگال همانندسازی به انتهای کروموزوم می‌رسد با یک مشکل جدی مواجه می‌شود. در باکتری‌ها به دلیل حلقوی بودن کروموزوم مشکل همانندسازی انتهایی حل شده است و در یوکاریوت‌ها نیز توالی‌های نوکلئوتیدی تکراری طویل در انتهای کروموزوم که به صورت ساختارهایی به نام تلومر وجود دارند این مشکل را حل کرده‌اند.

Telomeric Repeat Sequences Within Selected Organisms

Group	Example	Telomeric Repeat Sequence
Mammals	Humans	TTAGGG
Slime molds	<i>Physarum, Didymium</i>	TTAGGG
	<i>Dictyostelium</i>	AG ₍₁₋₈₎
Filamentous fungi	<i>Neurospora</i>	TTAGGG
Budding yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TG ₍₁₋₃₎
Ciliates	<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG
	<i>Paramecium</i>	TTGGG(T/G)
	<i>Euplotes</i>	TTTTGGGG
Flowering plants	<i>Arabidopsis</i>	TTTAGGG

توالی های تلومری آنزیمی را به نام تلومراز به انتهای کروموزوم جذب می کنند که این آنزیم با استفاده از الگوی RNA که بخشی از خود آنزیم است نسخه های متعددی از آن، بصورت توالی دی ان ای تکراری به رشته پیرو اضافه می کند. بنابراین تلومرها علاوه بر مزیت هایی که قبلاً ذکر شد امکان همانندسازی انتهای کروموزوم ها را در یوکاریوت ها فراهم می کنند. مزیت دیگری که تلومرها دارند این است که به سلول اجازه می دهند تا بین انتهای طبیعی کروموزوم و شکست های دو رشته ای که در میانه کروموزوم گاهی به صورت تصادفی رخ می دهند، بتواند تمایز قائل شود چون این شکستگی ها خطرناک بوده و باید سریعاً ترمیم شوند. توالی دی ان ای تکراری موجود در تلومرها علاوه بر توانایی در جذب تلومراز سایر پروتئین هایی که به طور فیزیکی از انتهای کروموزوم محافظت می کنند و همینطور در حفظ طول تلومر نقش مهمی دارند را نیز به خود جذب می کنند.



سلول‌هایی که با نرخ بالایی تقسیم می‌شوند مثل آن‌هایی که سطح روده را می‌پوشانند و یا سلول‌های خونی که در مغز استخوان تولید می‌شوند تلومر از خود را کاملاً فعال نگه می‌دارند (سلول‌های سرطانی نیز از این قاعده مستثنا نیستند). انواع دیگر سلول‌ها به تدریج فعالیت تلومر از خود را کاهش می‌دهند چون که بعد از چرخه‌های مختلف تقسیم سلولی تلومر در سلول‌های ایجاد شده جدید به قدری کوتاه می‌شود که به آن طول بحرانی می‌گویند و دیگر امکان همانندسازی انتهای کروموزوم وجود ندارد، در این موقع، این سلول‌ها از تقسیم باز می‌ایستند که تحت عنوان

حد هایفلایک یا Hayflick limit شناخته می‌شود یعنی سلول‌ها بعد از حدود ۵۰ الی ۱۰۰ تقسیم سلولی متوالی معمولاً از تقسیم می‌ایستند و به نظر می‌رسد چنین فرایندی به عنوان یک حفاظ علیه تکثیر کنترل نشده سلول‌ها عمل می‌کند.

