بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

هماهنگ‌سازی

دکتر آسیه صادقی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

گروه بیوشیمی

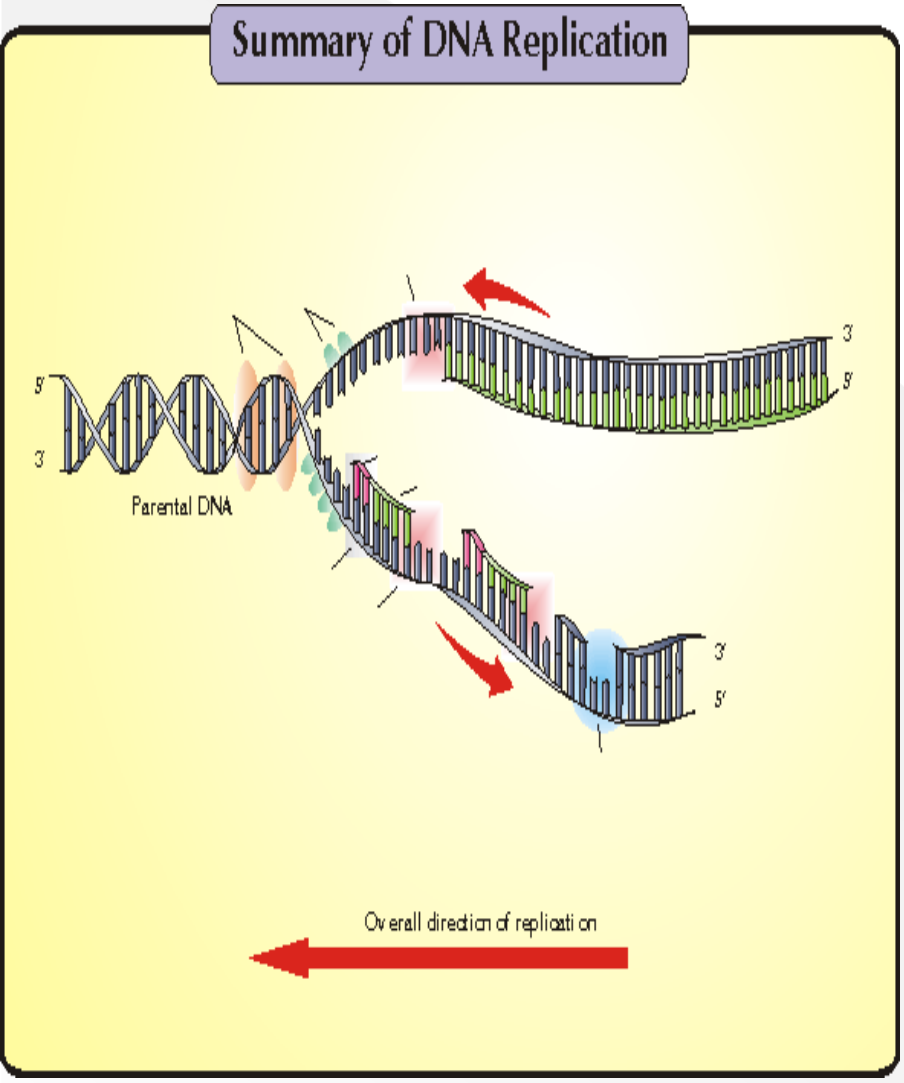
همانندسازی DNA

- کلیات همانندسازی
- همانندسازی در باکتریها
- همانندسازی در اوکاریوتها

قسمت اول

کلیات همانندسازی

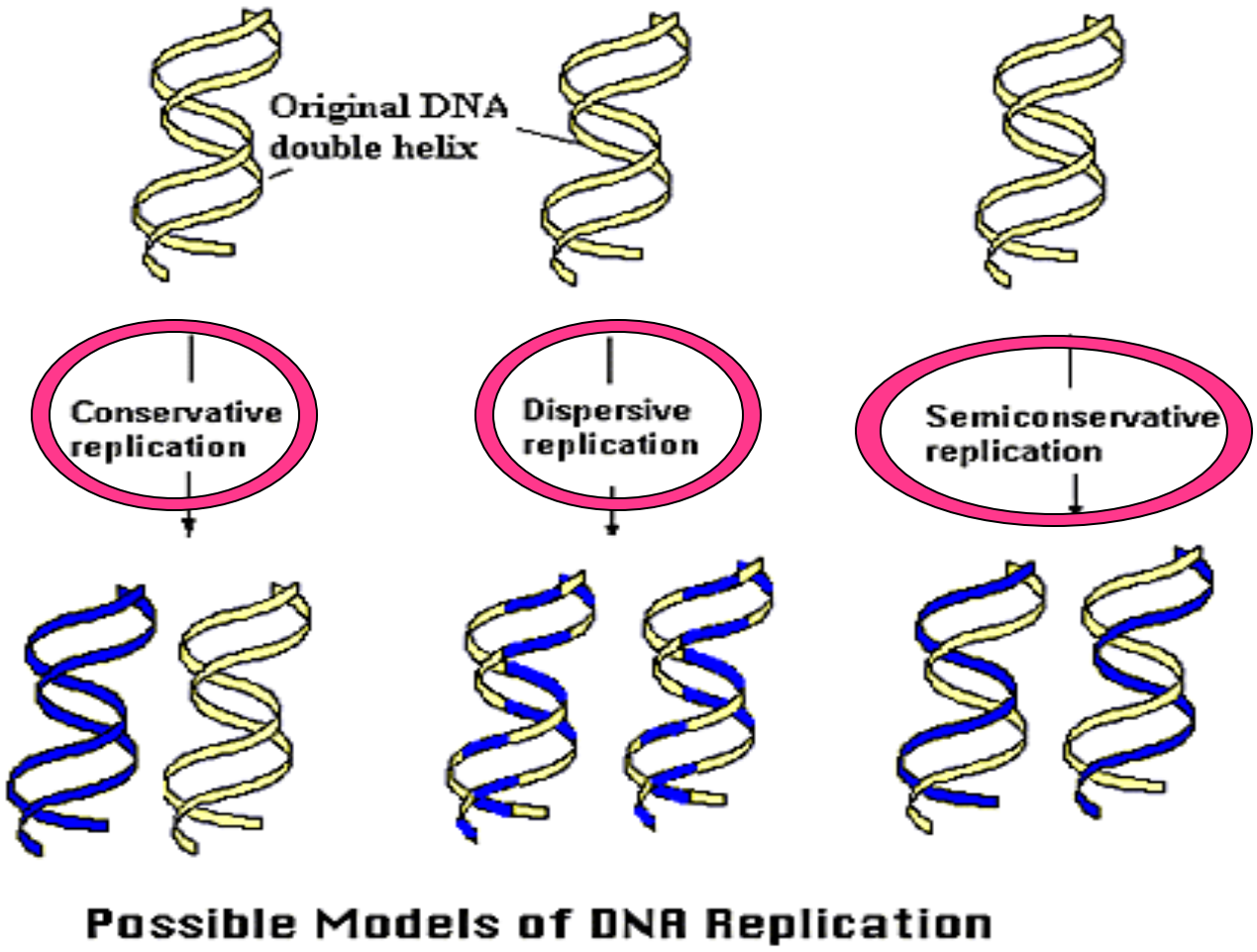
همانندسازی (نگاه کلی)



- در طی تقسیم کل DNA باید همانندسازی شود.
- مارپیچ دو رشته ای DNA باز می شود.
- بازهای نمایان شده به نوکلئوتیدهای شناور در نوکلئوپلاسم متصل می شود.
- DNAپلیمراز نوکلئوتیدهای مکمل
- را وصل می کند.

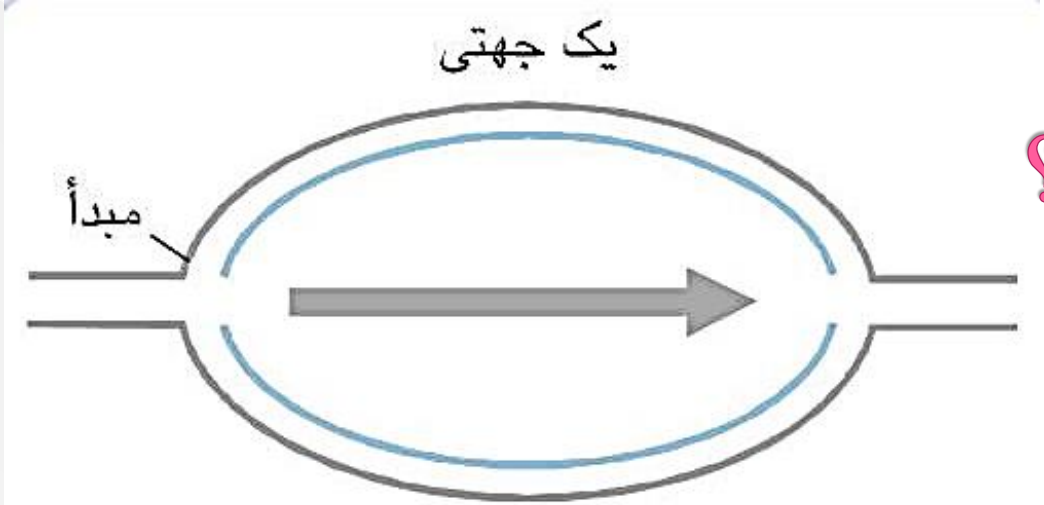
تئوری همانندسازی

کدام درست است؟

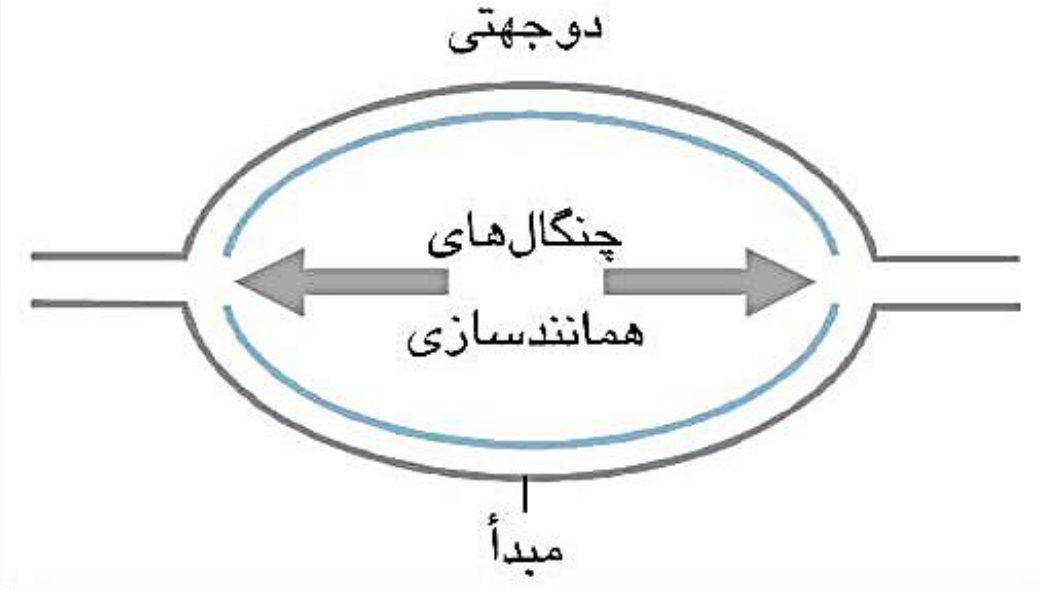


Possible Models of DNA Replication

همانندسازی یک جهتی یا دو جهتی؟



همانندسازی از محلی به نام **مبداء** همانندسازی آغاز می شود که غنی از AT می باشد.

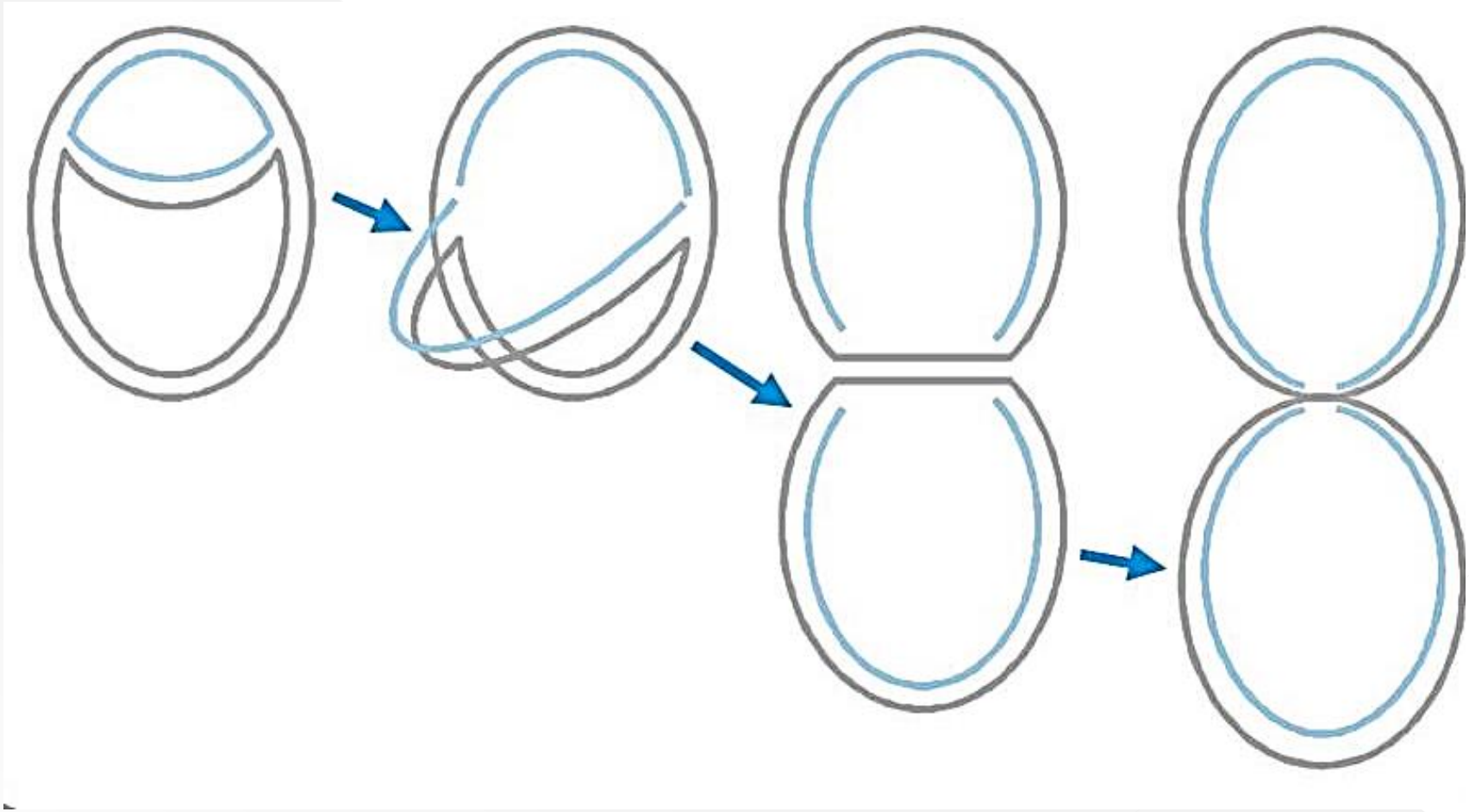


چنگال همانندسازی: محلی در مولکول DNA که در آن همانندسازی به طور فعال در حال انجام است.

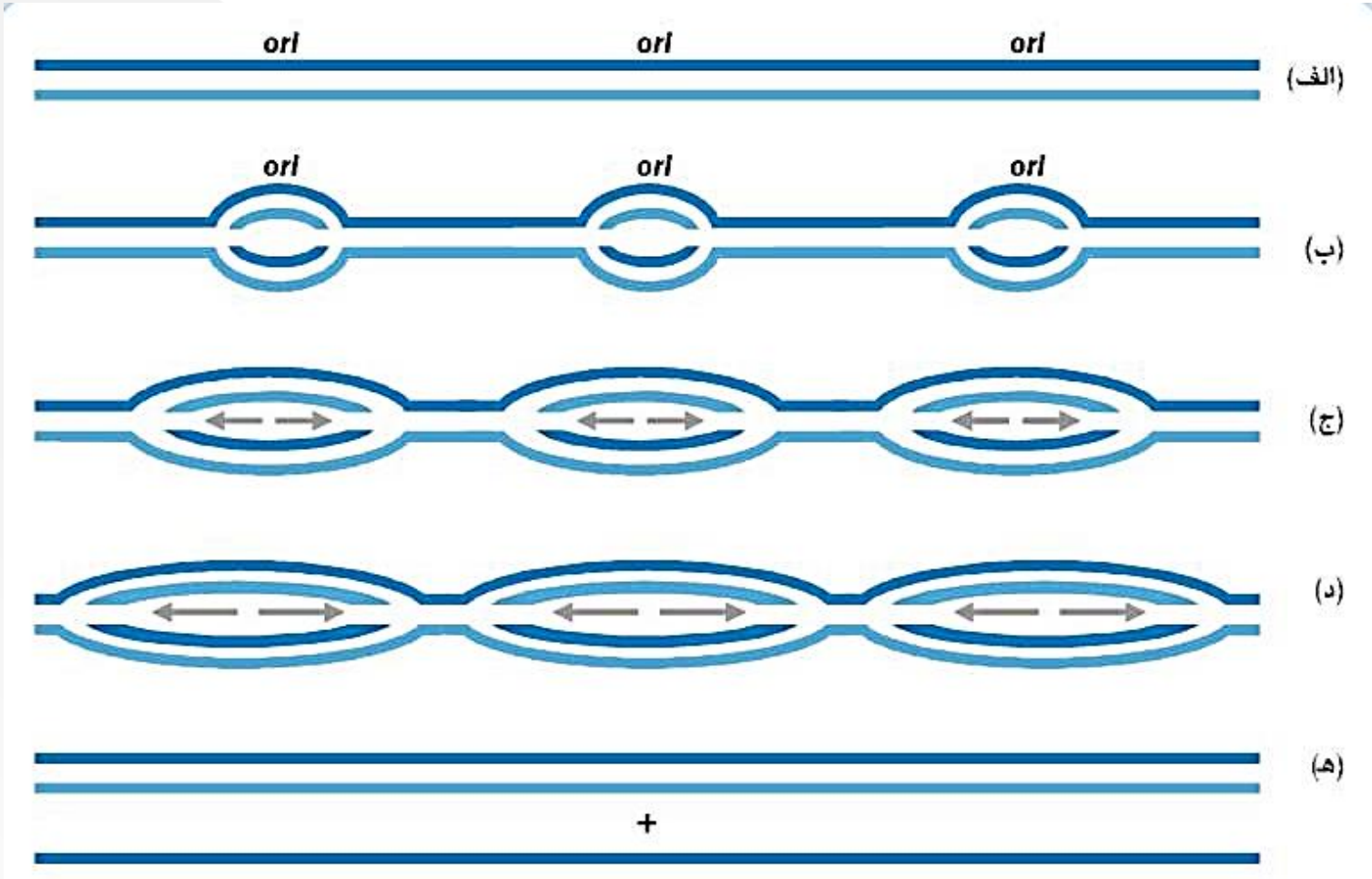
رپلیکون

- واحد DNAای که در آن همانندسازی رخ می دهد
- دارای یک مبدا همانندسازی
- در هر چرخه سلولی یکبار همانندسازی انجام می دهد
- ژنوم باکتری دارای یک رپلیکون حلقوی اما ژنوم اوکاریوتی دارای رپلیکون های متعدد می باشد.

رپلیکون حلقوی باکتری



رپلیکون های پشت سرهم اوکاریوتها



آنزیمهای همانندسازی

1- DNA پلیمرازها (سنتز DNA، پر کردن جاهای خالی)

DNAرپلیکاز یا رپلیزوم: DNAپلیمراز به همراه عوامل پروتئینی همراه با آن که برای همانندسازی نیاز می باشد.

۲- RNAپلیمرازها= پریمازها (شروع کننده سنتز DNA)

۳- هلیکازها (باز کننده پیچ های مارپیچ)

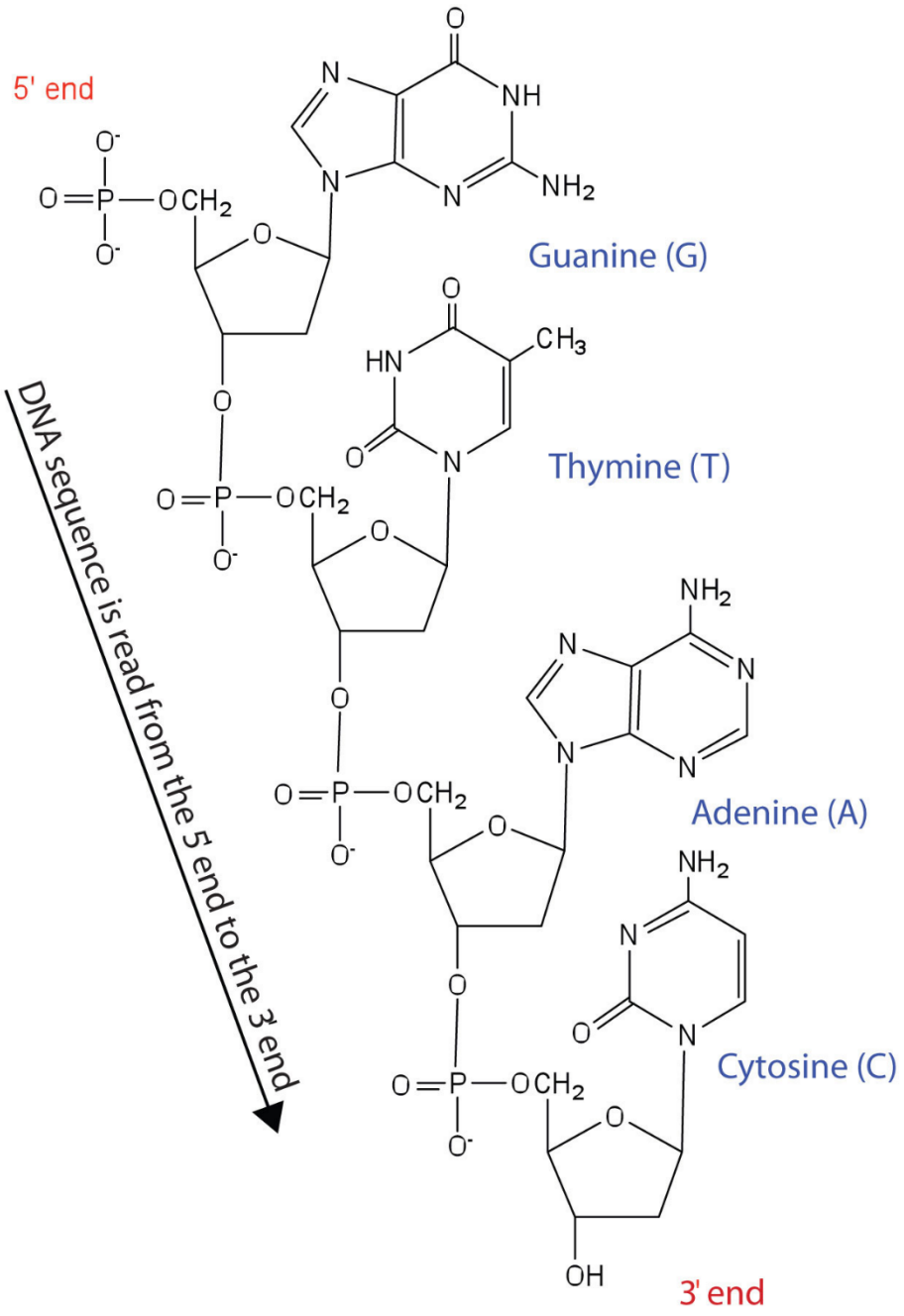
۴- توپوایزومرازها (حذف پیچ ها در ابر مارپیچ)

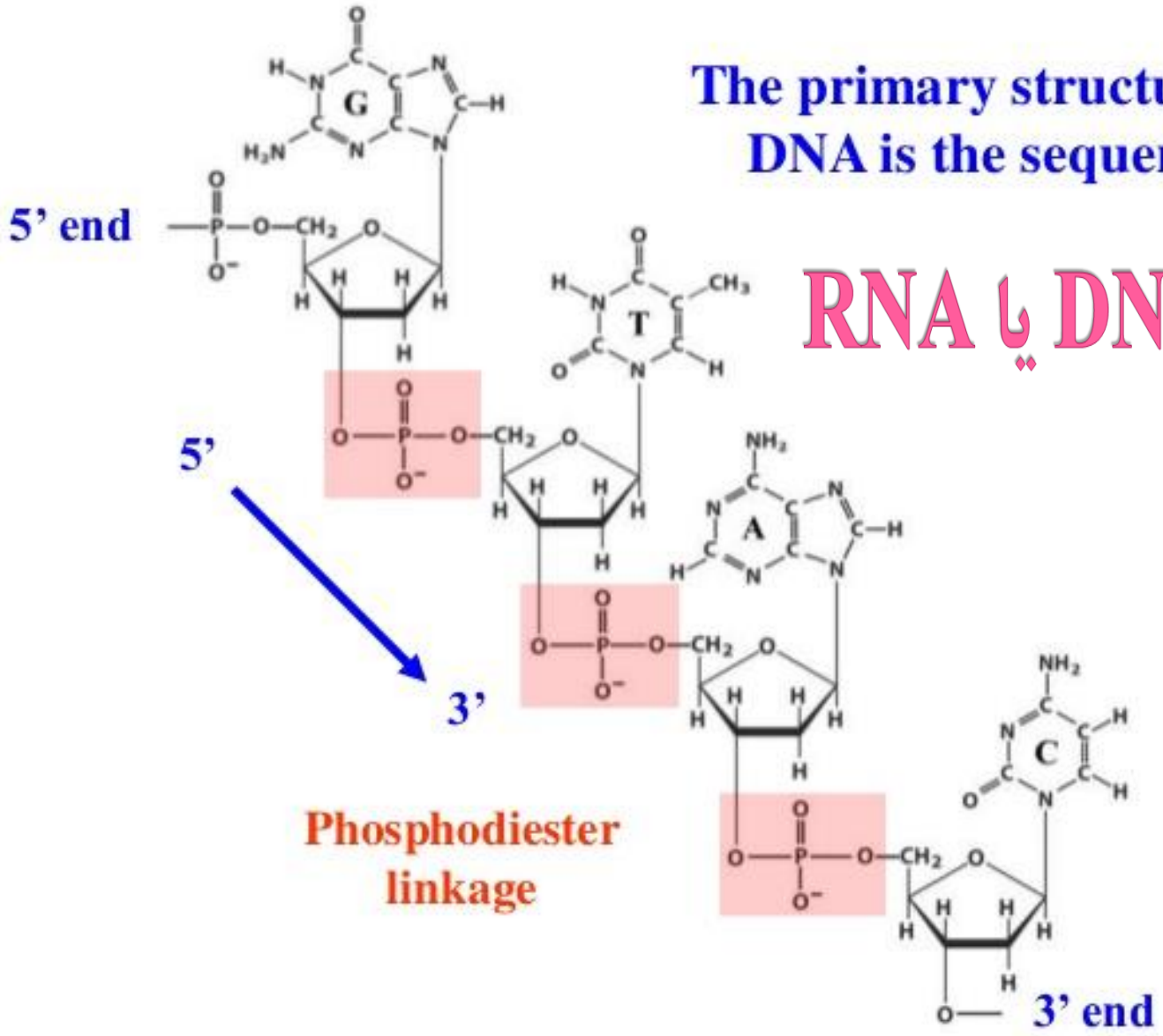
۵- لیگازها : قطعات اوکازکی را بهم وصل می کند.

نیازهای آنزیمی همانندسازی

آنزیم	عملکرد
DNA پلیمراز	برای سنتز رشته جدید که پلیمریزاسیون نوکلئوتیدها را در جهت۵←3 انجام می دهد.
۳← ۵ اگزونوکلئاز	برای غلط گیری (برداشت نوکلئوتید غلط) با هیدرولیز پیوند فسفودی استری از انتهای ۳
۵←۳ اگزونوکلئاز	برای ویرایش (برداشت پرایمر) با هیدرولیز پیوند فسفواستری از انتهای ۵
پرایماز	یک RNAپلیمراز است که پرایمر (آغازگر) را سنتز می کند
لیگاز	برای ایجاد پیوند فسفودی استر و حذف برش
هلیکاز	برای باز نمودن مارپیچ DNA از طریق از بین بردن پیوندهای هیدروژنی بین بازهای مکمل
توپوایزومراز	برای حذف ابرفنرهای مثبت

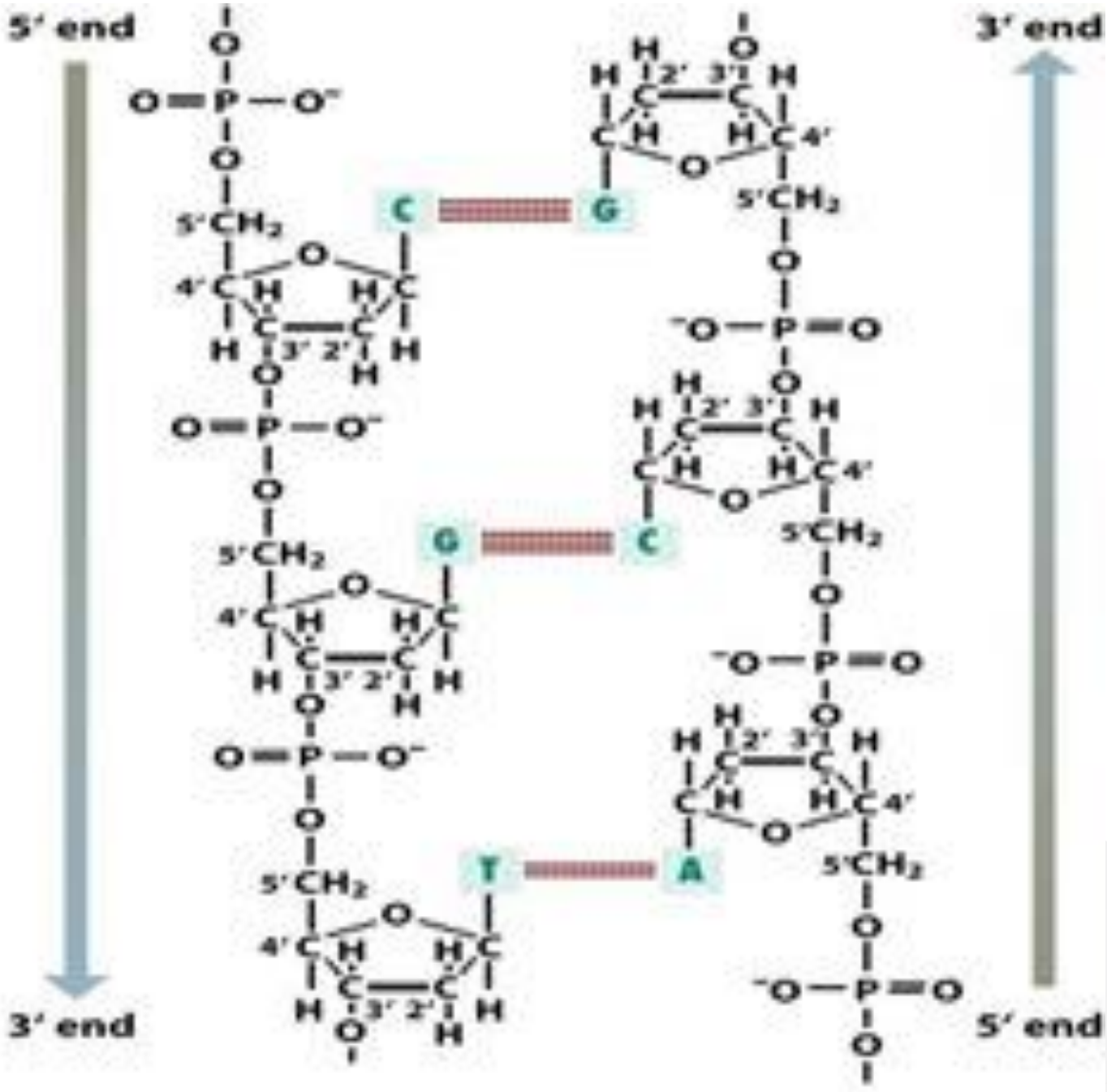
جهت سنتز RNA یا DNA

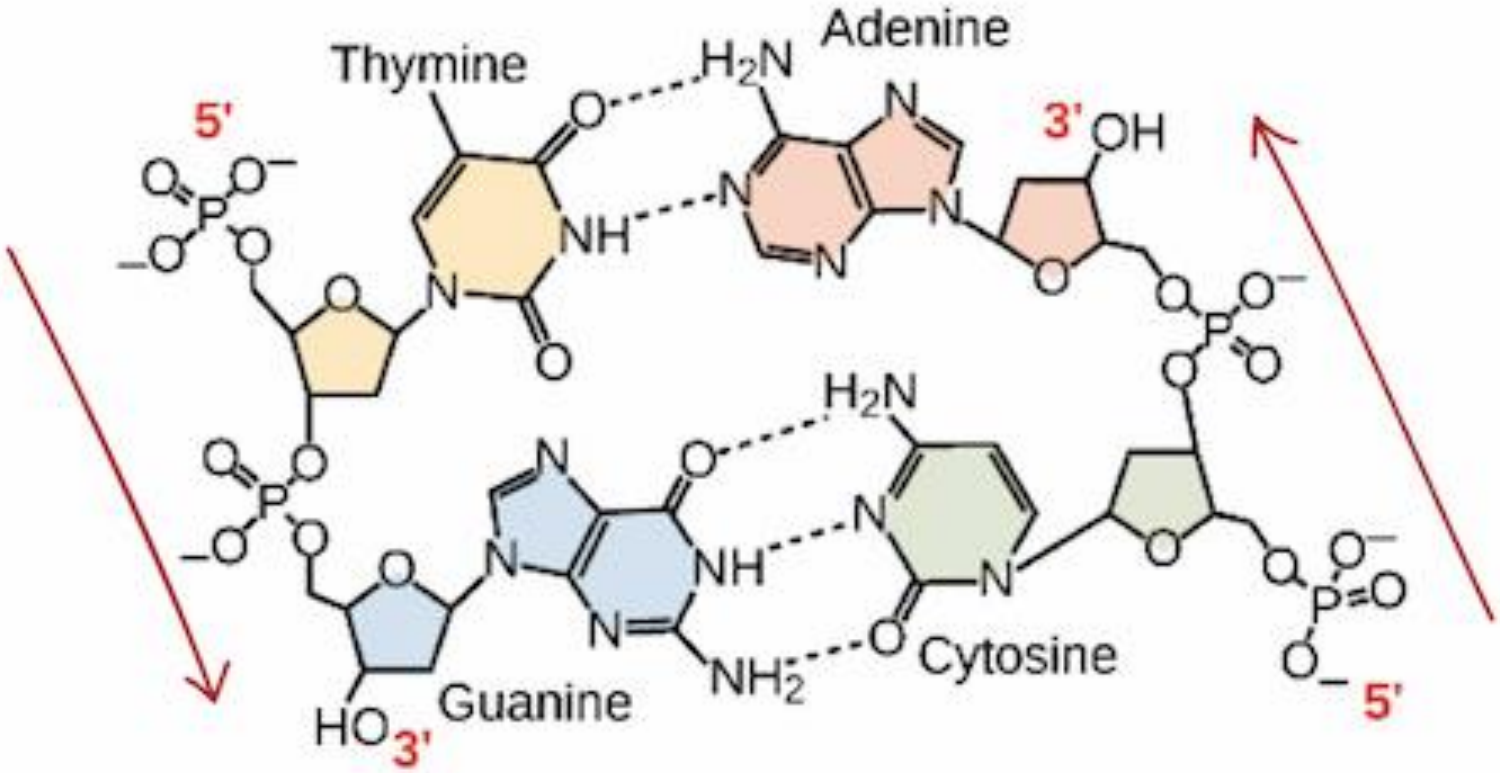




جهت سنتز DNA یا RNA

جهت دو رشته DNA



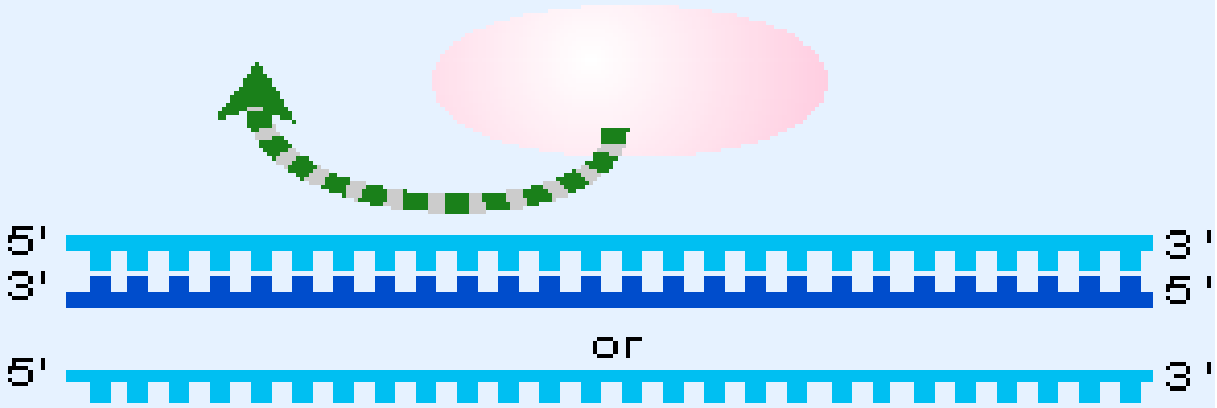

Thymine
Adenine
5'
3'
OH
Guanine
Cytosine
HO
3'
5'

آنزیمها/پریماز

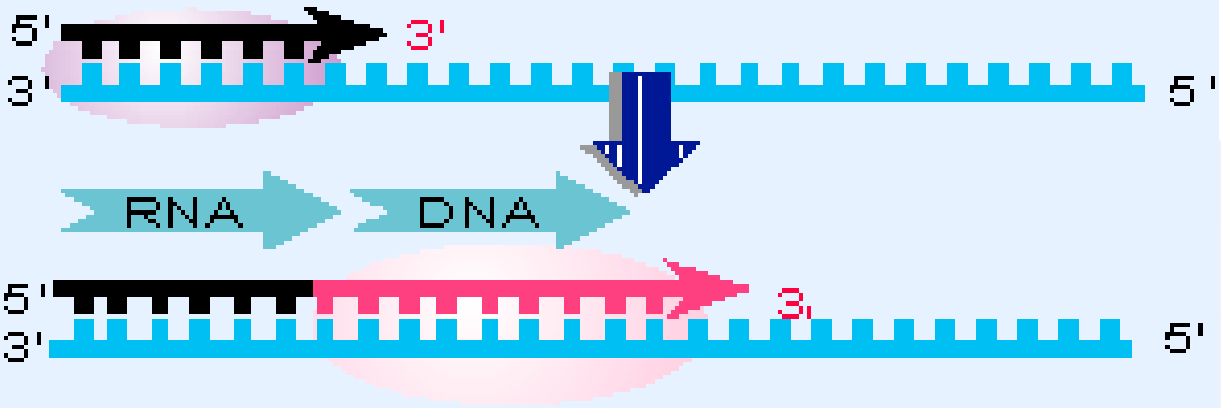
- DNAPs نمی توانند سنتز DNA را آغاز کنند (**سنتز de novo ندارند**) و باید پرایمرهایی از قبل وجود داشته باشند.
- آنزیمهای مسئول سنتز پرایمر، **پریماز** نامیده می شوند.
- پریماز پرایمر را در جهت ' ۵ به ' ۳ سنتز می کنند.
- فعالیت **اگزونوکلئازی ندارد**.
- بخشی از **پریموزوم** می باشد.

آنزیم‌ها/پریماز

RNA پلیمراز قادر نیست سنتز DNA را بر روی تک رشته یا دو رشته DNA بدون پرایمر آغاز کند.



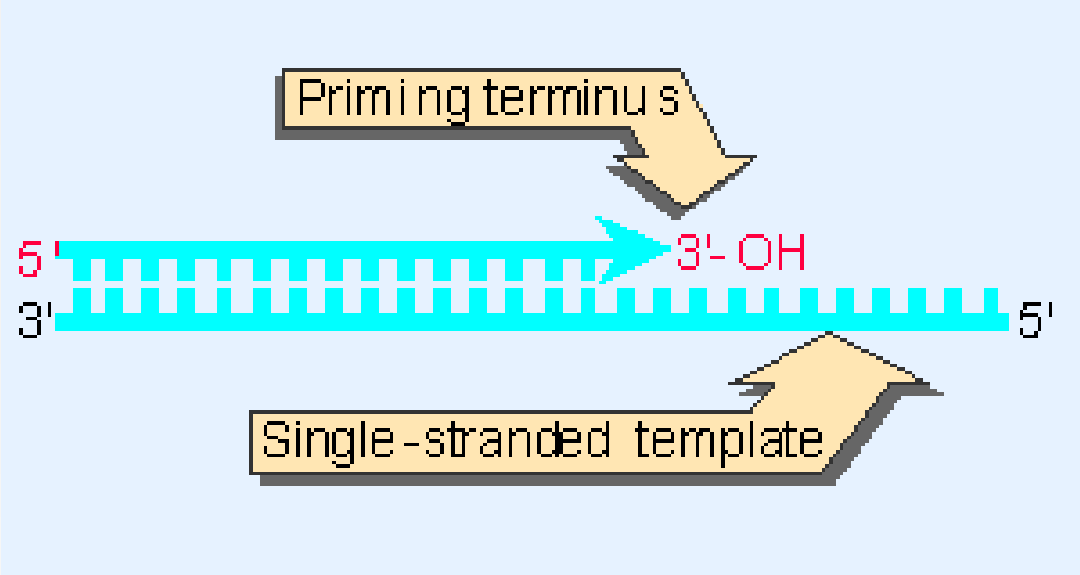
RNA پرایمر توسط پریماز ساخته می شود و در ادامه DNAپلیمراز شروع به سنتز DNA می کند.



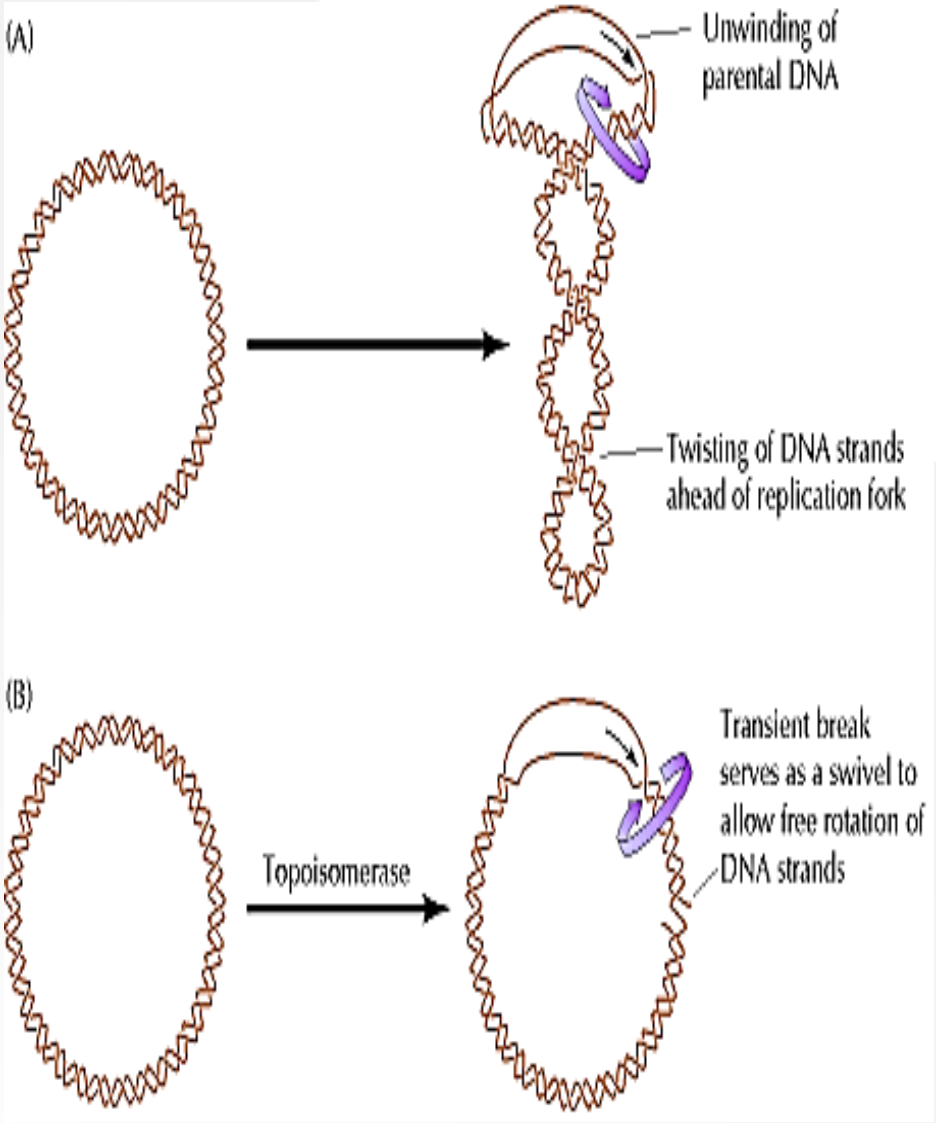
واکنش پرایمنگ

پریماز (پلیمراز RNA)

پرایمر (۱۰ بازی)

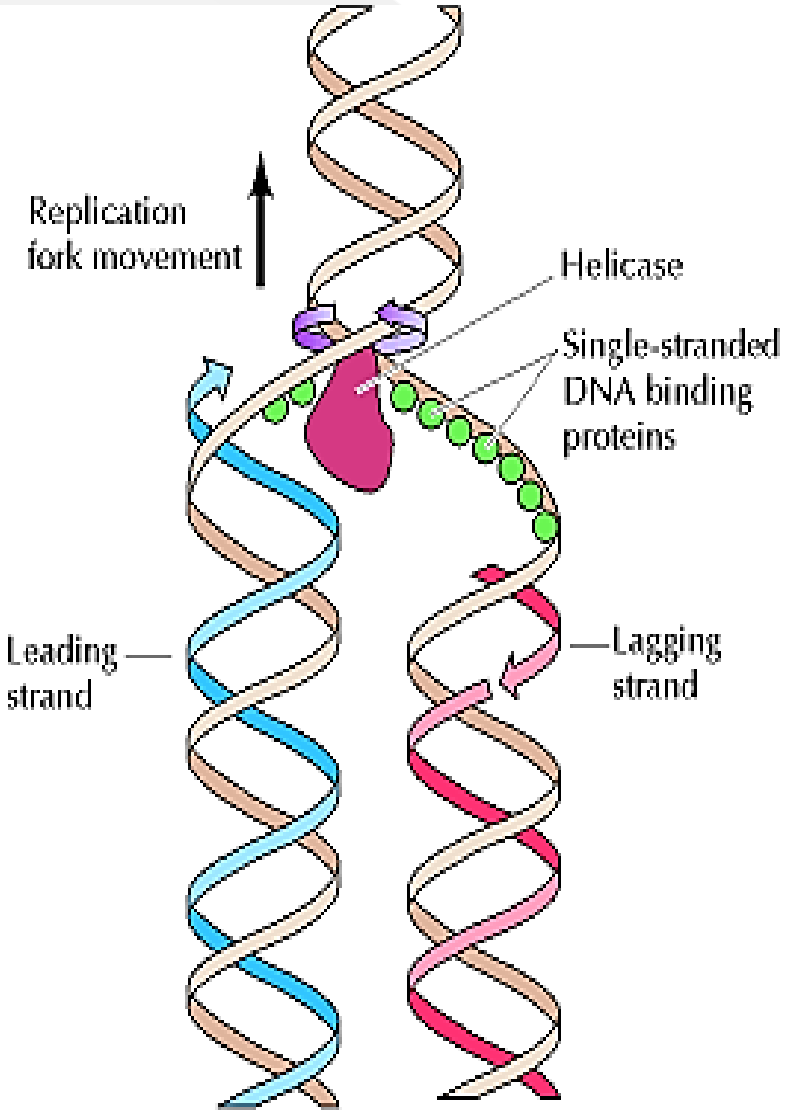


آنزیمها /توپوایزومرازها



- این آنزیمها پیچ های ایجاد شده در اثر پیشرفت چنگال همانندسازی را از بین می برند.
- دو نوع توپوایزومراز اصلی در یوکاریوتها وجود دارد: ۱ و ۲
- کلاس ۲ توپوایزومرازها در باکتریها **ژیراز** نامیده می شود.

آنزیمها/هلیکازها



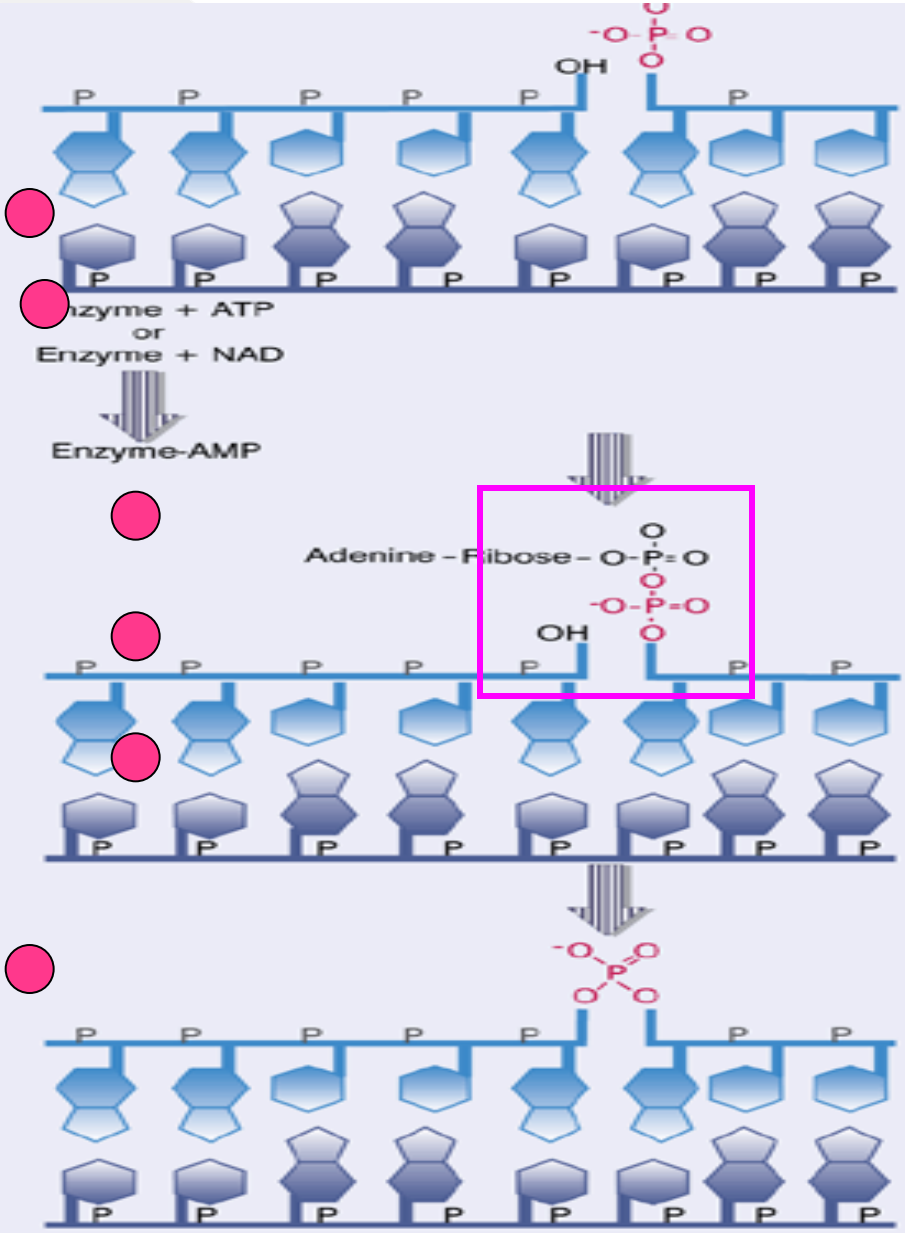
آنزیمهایی که با مصرف ATP باعث شکستن پیوندهای هیدروژنی و در نتیجه باز شدن و جدا شدن دو رشته DNA می شوند.

انواع متفاوتی هلیکاز وجود دارند:

DnaB در پروکاریوتها

سایر هلیکازها

آنزیمها/لیگاز

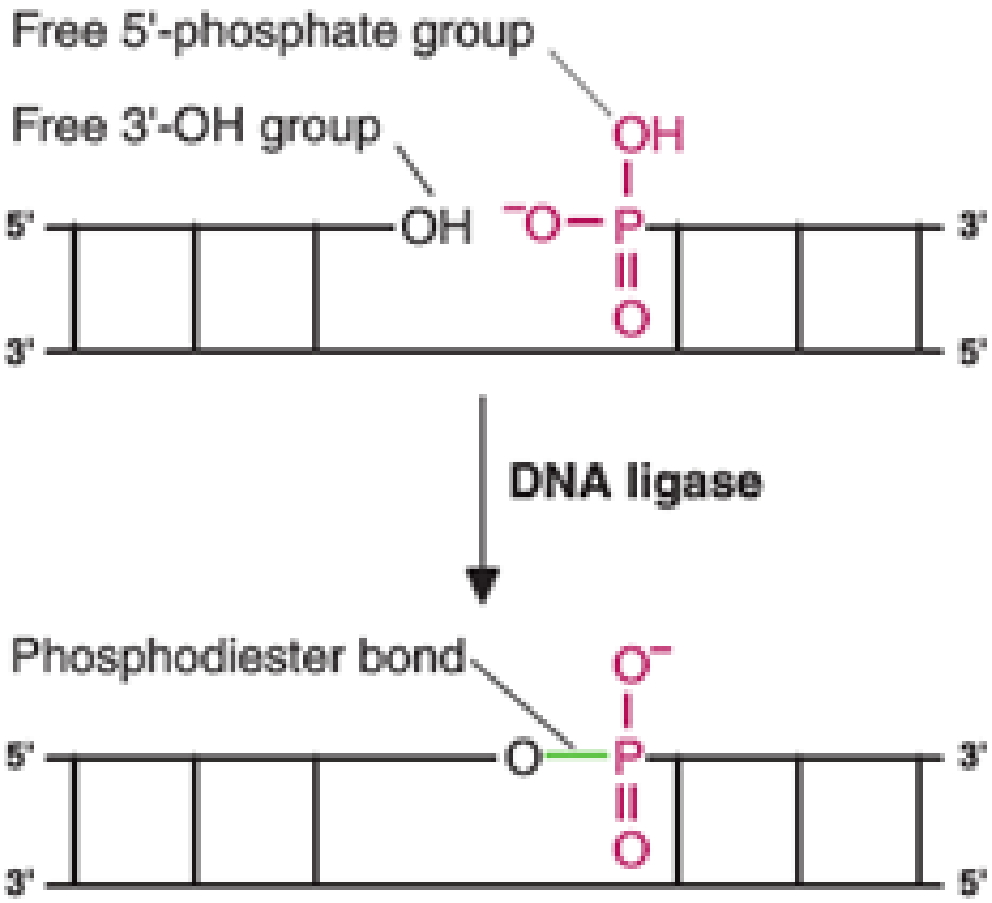


لیگازها قطعات DNA را به هم وصل می کند.
انرژی مورد نیاز آنها از ATP یا NAD فراهم می گردد

Phage--ATP
E.coli--NAD

Eukaryote--ATP

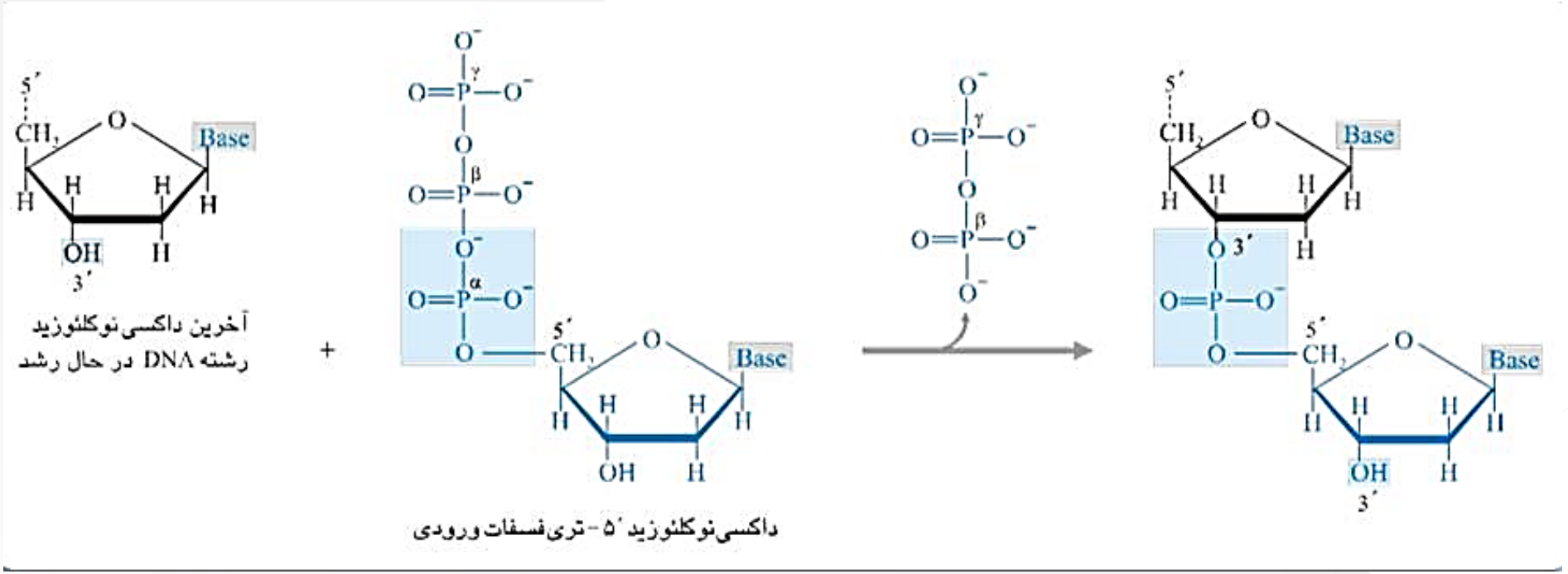
T4DNAلیگاز DNA دو رشته ای Blunt را بهم وصل می کند.


Free 5'-phosphate group
Free 3'-OH group
OH
OH
⁻O
P
O
5'
3'
3'
5'
DNA ligase
Phosphodiester bond
O⁻
O
P
O
5'
3'
3'
5'

نیازهای غیر آنزیمی همانندسازی

- ۲- الگو (DNA دو رشته ای)
- ۳- واحدهای ساختاری (dNTP و NTPها)
- ۴- کوفاکتور: همراه با نوکلئوتیدهای آزاد می باشد
- پرایمر (آغازگر): برای شروع سنتز توسط DNA پلیمراز
- ۵- انرژی (انرژی dNTPها و ATP)
- ۶- فاکتورهای پروتئینی

شیمی سنتز رشته جدید DNA



اضافه شدن هر نوکلئوتید معادل مصرف دو ATP

صحت همانندسازی DNA

کنترل در سه مرحله:

۱- انتخاب نوکلئوتید صحیح

هندسه باز نوکلئوتید جدید (پهنای مولکول BDNA، ۲nm است)

پیوندهای هیدرژنی بین جفت بازهای استاندارد

۲-فعالیت **غلط گیری**: برداشت نوکلئوتید غلط با فعالیت اگزونوکلئازی **'۳ به '۵**

۳- **مکانیسم ترمیم بد تطابق:** در صورت ماندن خطا بعد از همانندسازی برش توسط اندونوکلئا، برداشت نوکلئوتید اشتباه توسط اگزونوکلئاز، سنتز مجدد توسط DNAپلیمراز و دوختن توسط DNA لیگاز

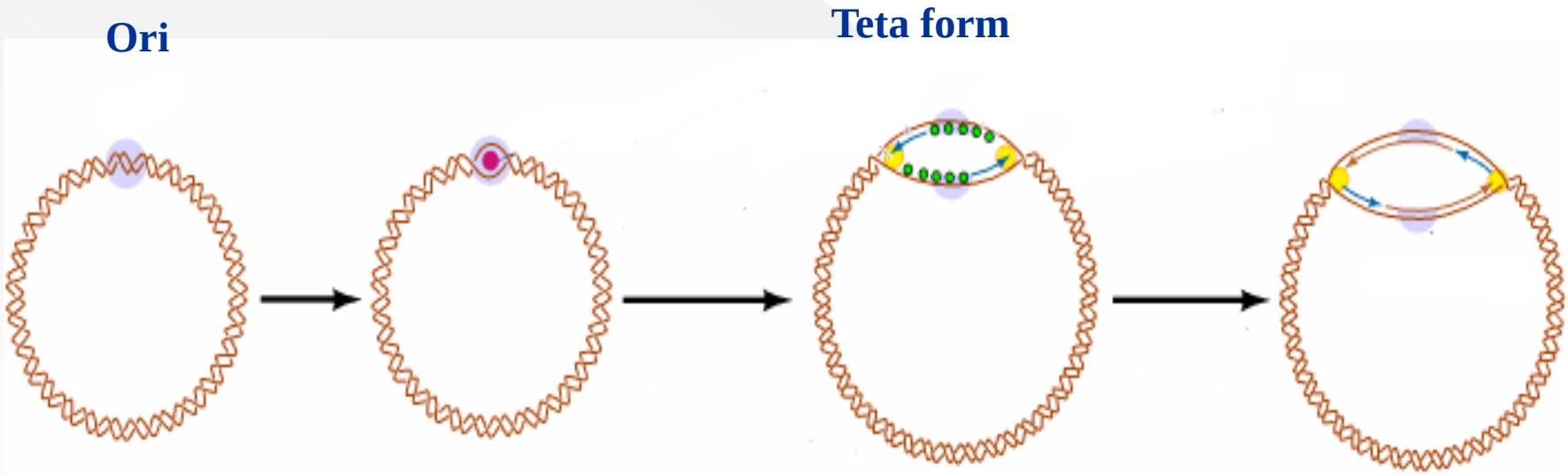
نیازمندیهای مربوط با ایجاد حباب و پیشرفت آن

- هلیکاز
- پروتئین های اتصالی به DNA
- توپوایزومرازها: بر طرف کردن ابرمارپیچ های مثبت که در جلوی چنگال همانندسازی در حال حرکت شکل می گیرد

همانندسازی در پروکاریوتها

همانندسازی / جایگاه شروع

- ژنوم باکتری یک رپلیکون حلقوی است که یک مبداء همانندسازی دارد
- حاصل این همانندسازی ساختار تتا شکل است
- جایگاه شروع توالی غنی از AT دارد.



آنزیمها/ DNA پلیمرازها

عملکرد:

۱- سنتز DNA در جهت ' ۵ به ' ۳

۲- فعالیت اگزونوکلئازی ' ۳ به ' ۵ (غلط گیری یا Proofreading)

۳-فعالیت اگزونوکلئازی ' ۵ به ' ۳ فقط مخصوص DNAP1

انواع:

DNAPI: فراوانترین DNAپلیمراز در E.coli، جاهای خالی ایجاد شده در اثر برداشت پرایمر را پر می کند و همچنین در ترمیم DNA نقش دارد. قطعه بزرگ یا **کلینو** (Klenow) آن فعالیت اگزونوکلئازی ' ۳ به ' ۵ و پلیمرازی ' ۵ به ' ۳ دارد. قطعه کوچک فعالیت **اگزونوکلئازی ' ۵ به ' ۳** دارد

DNAP II: در ترمیم DNA نقش دارد.

DNAP III: آنزیم **اصلی** در تکثیر و همانند سازی DNA

DNA پلیمرازها در باکتری

DNAپلیمراز	I	II	III
فعالیت پلیمرازی ' ۵ به ' ۳	+	+	+
فعالیت اگزونوکلئازی ' ۳ به ' ۵ (Proof reading)	+	+	+
فعالیت اگزونوکلئازی ' ۵ به ' ۳	+	–	–
TNO(nt/min)	۶۰۰	۳۰	۹۰۰۰
تعداد/سلول	۴۰۰	؟؟؟	۲۰-۱۰
پیشروندگی (تعداد نوکلئوتید افزودنی قبل از جدایی)	۳-۲۰۰	۱۵۰۰	حداقل ۵۰۰۰۰۰
ژن	pol A	pol B	pol C

ساختمان DNA پلیمراز III

- **هسته کاتالیتیکی**

زیرواحد α: فعالیت پلیمرازی

زیرواحد ε: فعالیت اگزونوکلئازی ' ۳ به ' ۵

زیرواحد θ: در تثبیت زیرواحد ε نقش دارد

- **دیمر β (گیره)**

اتصال هسته کاتالیتیکی به رشته الگو و سر خوردن در طول آنبرای افزایش خاصیت پیشروندگی

- **کمپلکس بارگیری گیره یا کمپلکس γ:** شامل پنج زیرواحد $\tau_2\gamma\delta\delta'$

زیرواحد δ در باز کردن گیره و زیرواحد γ و δ' در بارگیری گیره نقش دارند

زیرواحد τ: در تثبیت اتصال به الگو و دیمریزاسیون هسته های کاتالیتیک نقش دارد

ساختمان DNA پلیمراز III

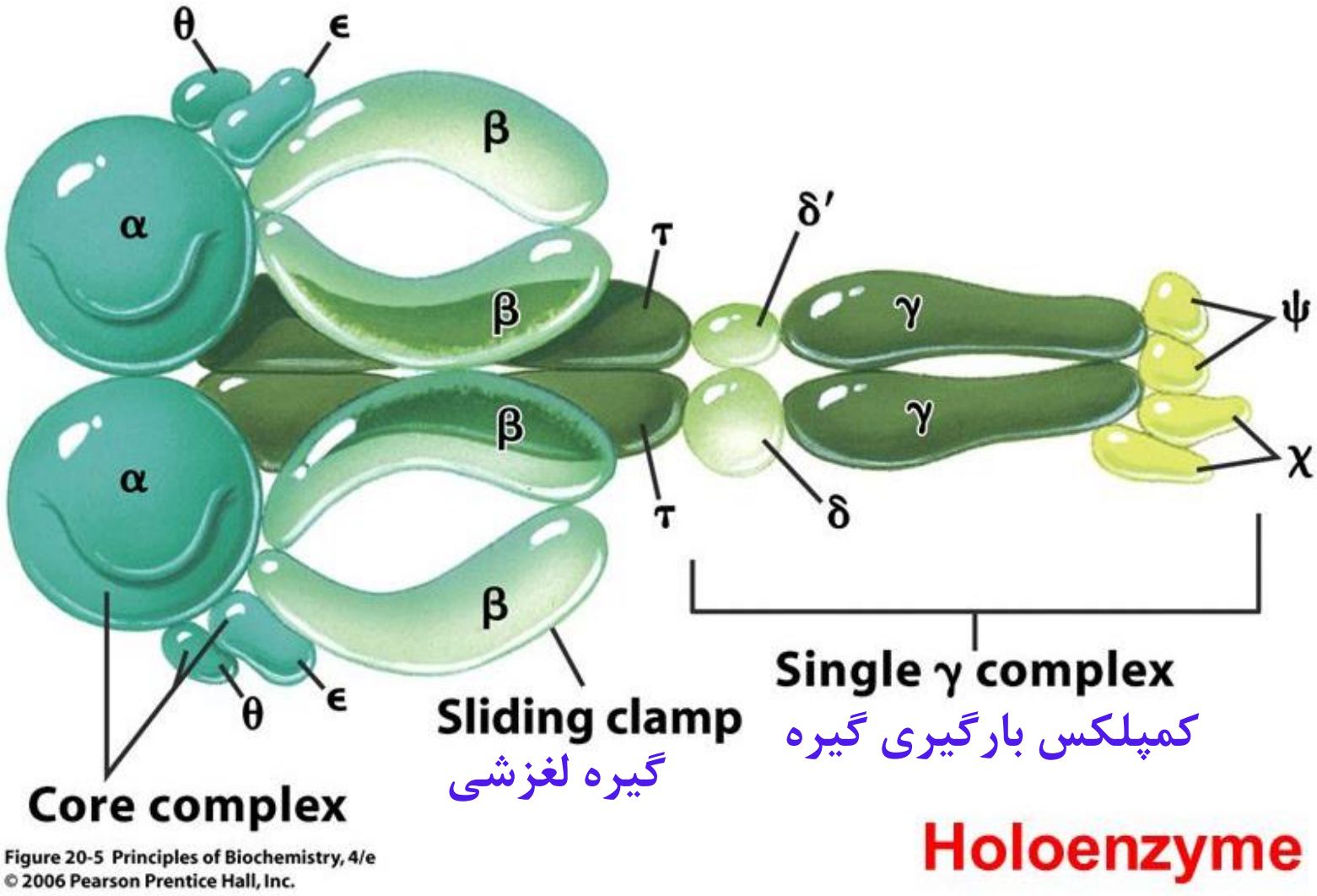


Figure 20-5 Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

مراحل همانندسازی

- شروع (initiation)
- طویل سازی (Elongation)
- خاتمه (Termination)

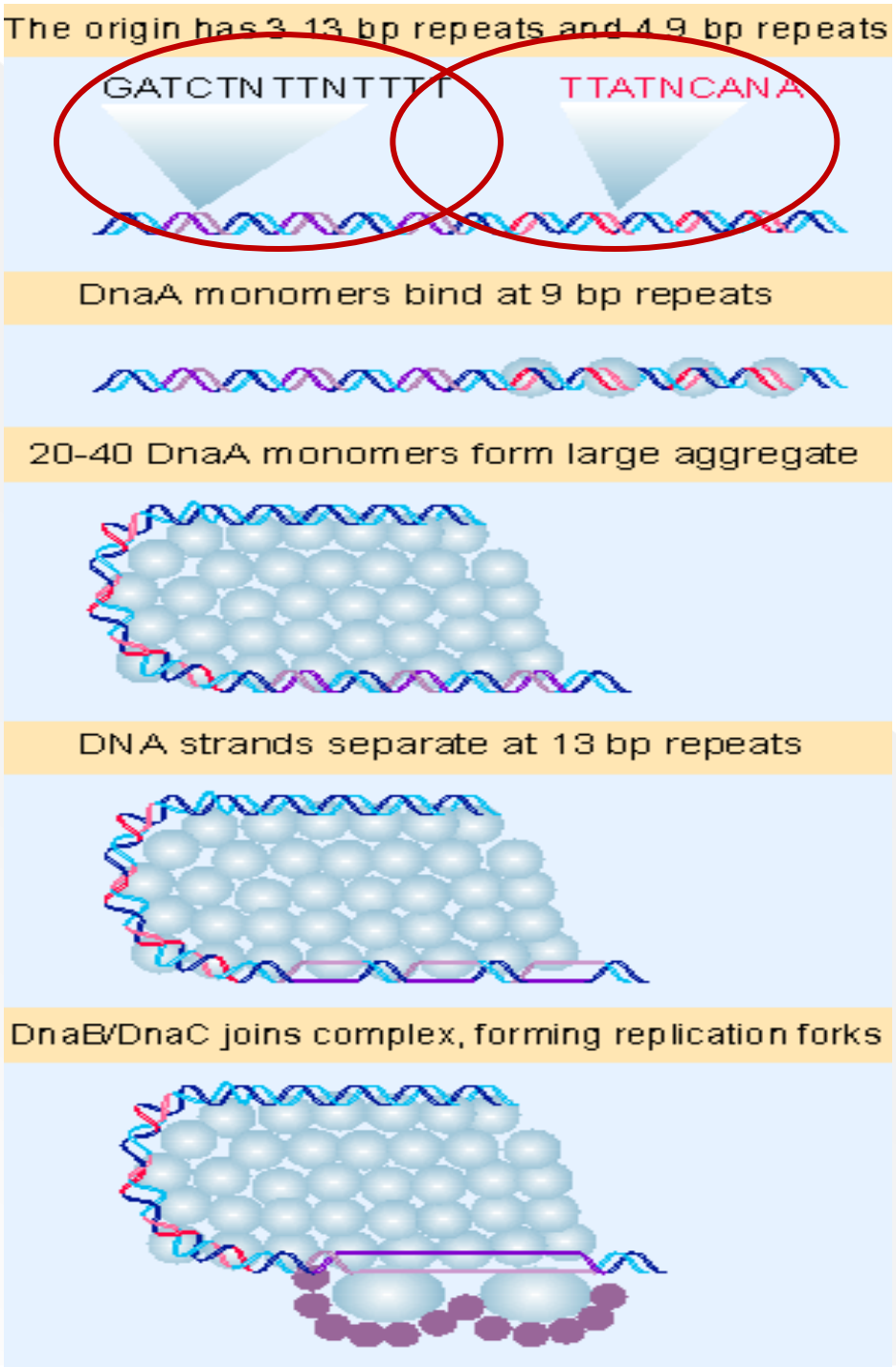
فاکتورهای پروتئینی مورد نیاز برای شروع همانندسازی در E.coli

- **Dna A** : شناسایی مبدا و باز نمودن مارپیچ در این محل
- **پروتئین HU**: کمک به پروتئین **Dna** در باز نمودن مارپیچ
- **Dna B**: فعالیت هلیکازی
- **Dna C**: کمک به اتصال **DnaB** به چنگال همانندسازی
- **Dna G**: پریماز
- **SSBP**: به **DNA** تک رشته ای متصل شده و آنها را جدا از هم نگه می دارد
- **DNA**ژیراز: به عنوان توپوایزومراز مسئول حذف ابرفنرهای مثبت

مراحل شروع همانندسازی

- گام اول: تشکیل کمپلکس پره پرمینگ
- گام دوم: تشکیل پرایموزوم
- گام سوم: تشکیل رپلیزوم

گام اول:
شناسایی مبداء و تشکیل کمپلکس پره پرایمینگ



۱- اتصال DnaA به چهار توالی نه مری

۲- پیچیدن oriC اطراف هسته تشکیل شده از DnaA

۳- اتصال DnaA به توالی های ۱۳مری

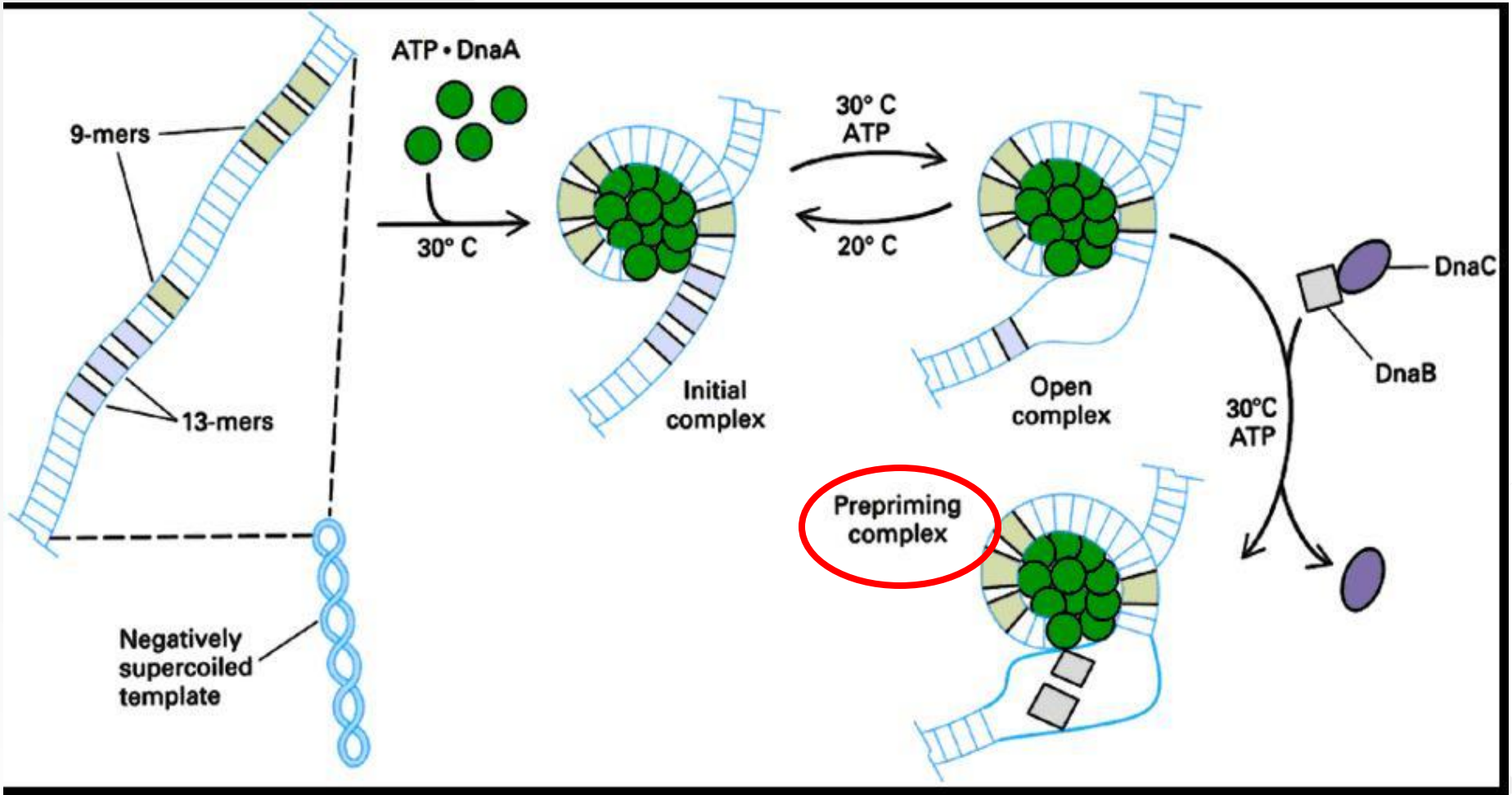
۴- در محل توالی های ۱۳ مری دو رشته DNA از هم جدا می شوند

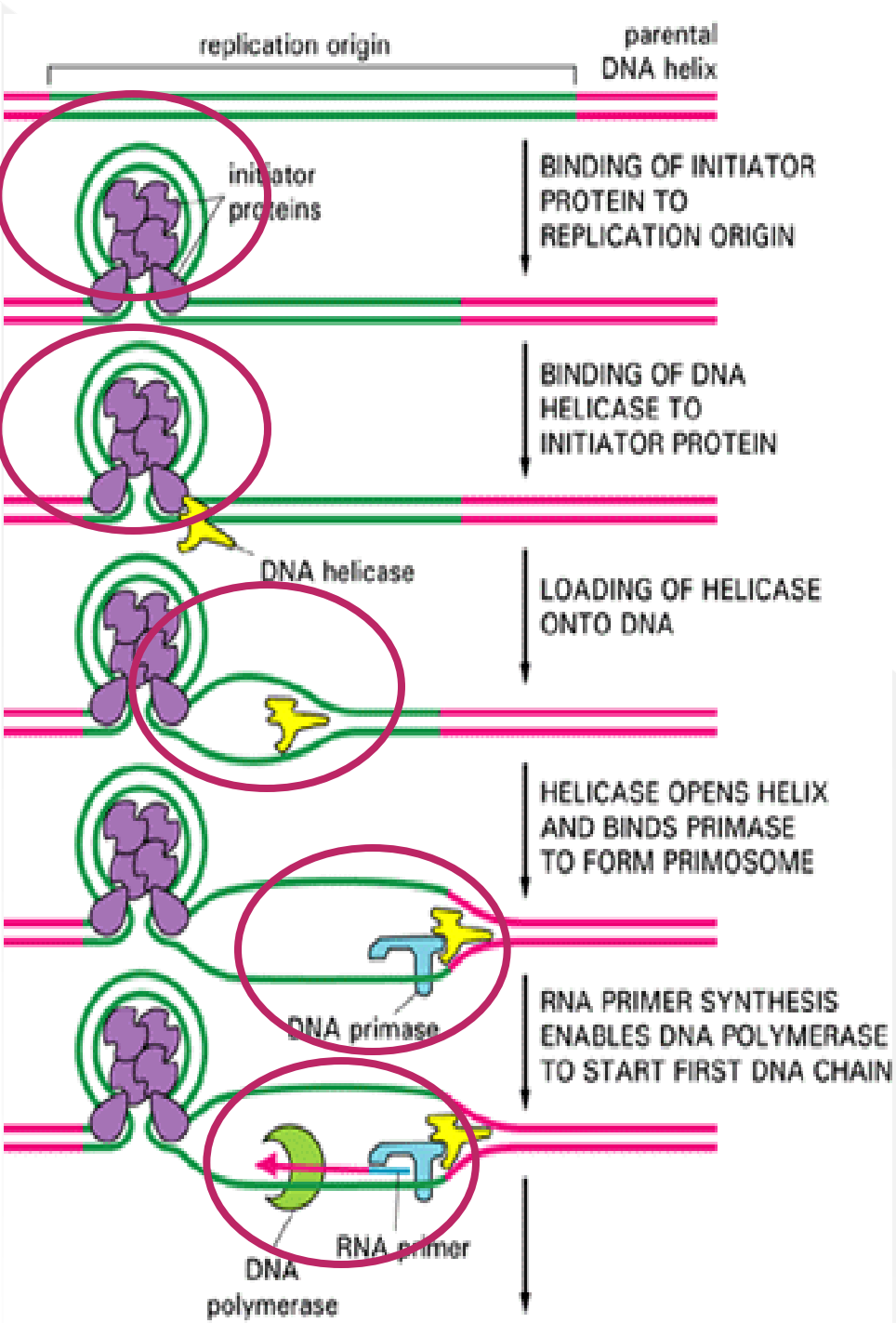
۵-فراخوانی کمپلکس DnaC-DnaB

۶- با اتصال پروتئین SSB به تک رشته های DNAمانع دورشته ای شدن آنها می گردد

شناسایی مبداء و تشکیل کمپلکس پره پرایمینگ

Dna A متصل شده و شروع به ذوب مارپیچ دو رشته ای می کند.
سپس هلیکاز به باز کردن رشته های DNA ادامه می دهد.





گام دوم: اضافه شدن پرایماز و و تولید پرایموزوم

پس از شناسایی جایگاه شروع توسط DnaA و باز شدن دو رشته DNA توسط Dna B(هلیکاز) و تشکیل لوپ چشمی شکل

۷- اضافه شدن پریماز (DnaG) و تولید **پریموزوم** (مجموعه DnaG + DnaB)

۸- اضافه شدن DNAپلیمراز III به پرایموزوم و تشکیل کمپلکس **رپلیزوم**

DNAژیراز جزء رپلیزوم نمی باشد

طویل سازی:

تشکیل پیوند فسفو دی استر ' ۵ به ' ۳

رپلیزوم:

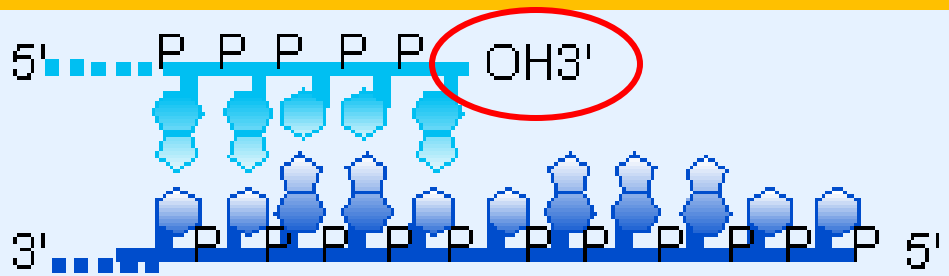
مجموع فاکتورها و آنزیمهای همانندسازی که در محل چنگال همانندسازی با هم حرکت می کنند کمپلکس بزرگی را بوجود میاورند که به آن رپلیزوم گویند.

هیدرولیز پیروفسفات

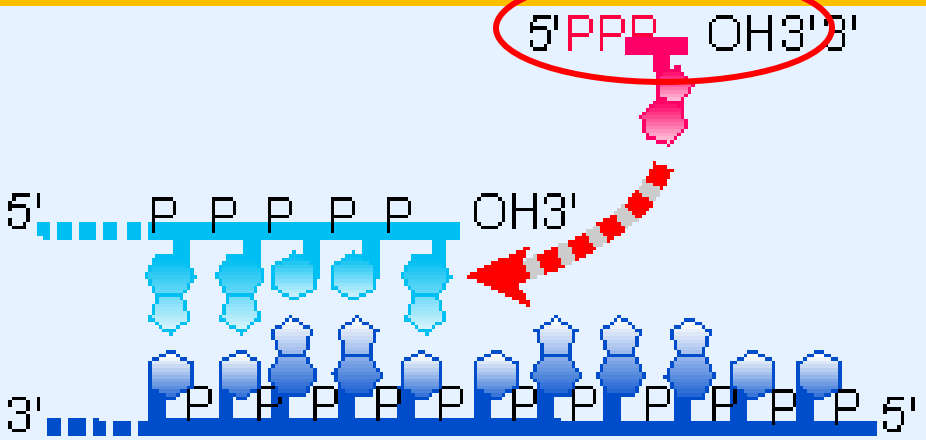
برای برگشت ناپذیری واکنش ضروری است

معدل مصرف دو ATP برای اضافه شدن هر نوکلئوتید

انتهای ’OH3 آزاد بر روی رشته الگو



نوکلئوتید تری فسفات وارد واکنش می شود



وقتی که نوکلئوتید به زنجیره اضافه می شود دی فسفات آزاد می گردد.

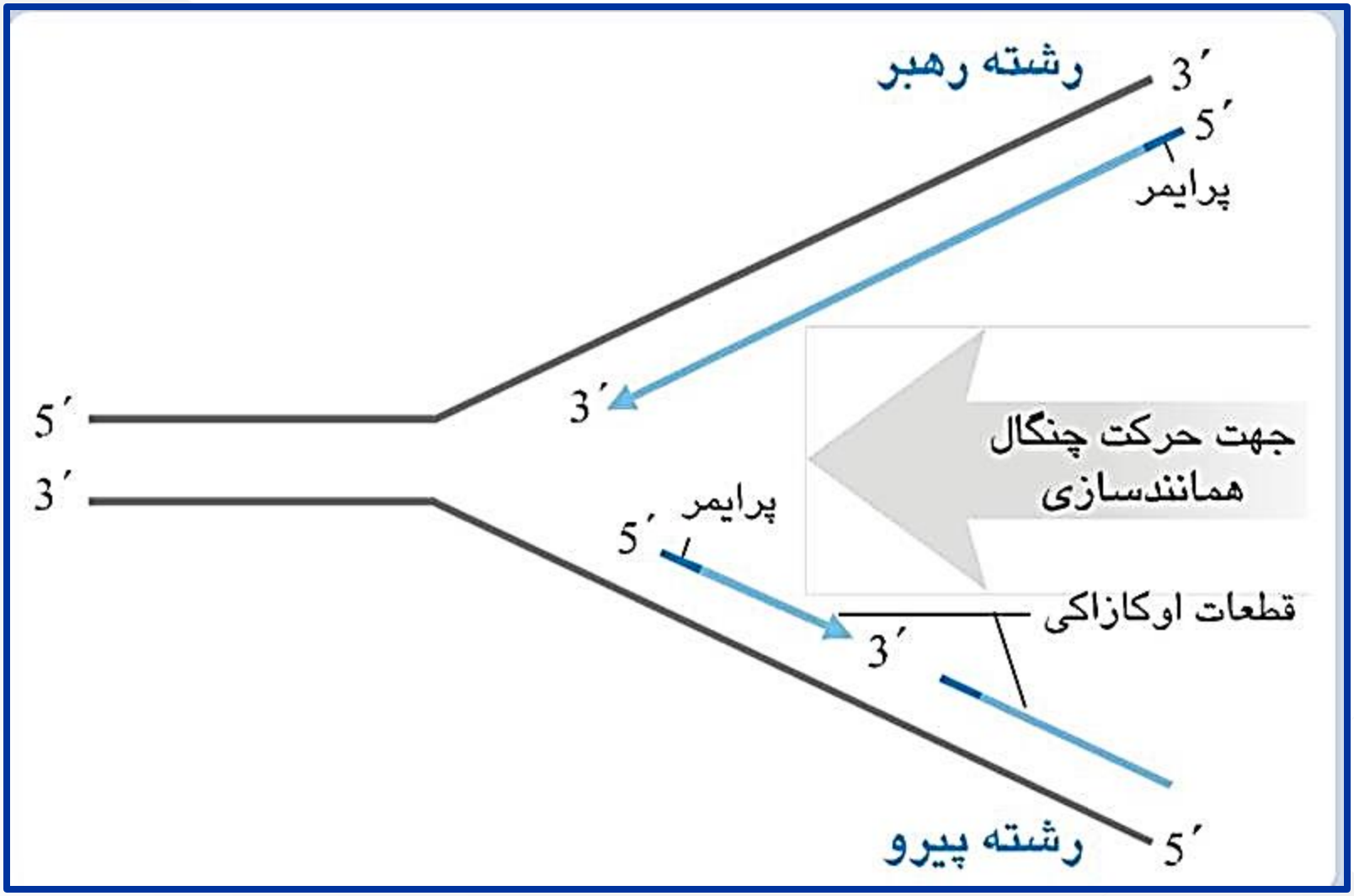
سنتز همزمان دو رشته DNA

دو رشته DNA در خلاف جهت هم قرار گرفته اند.

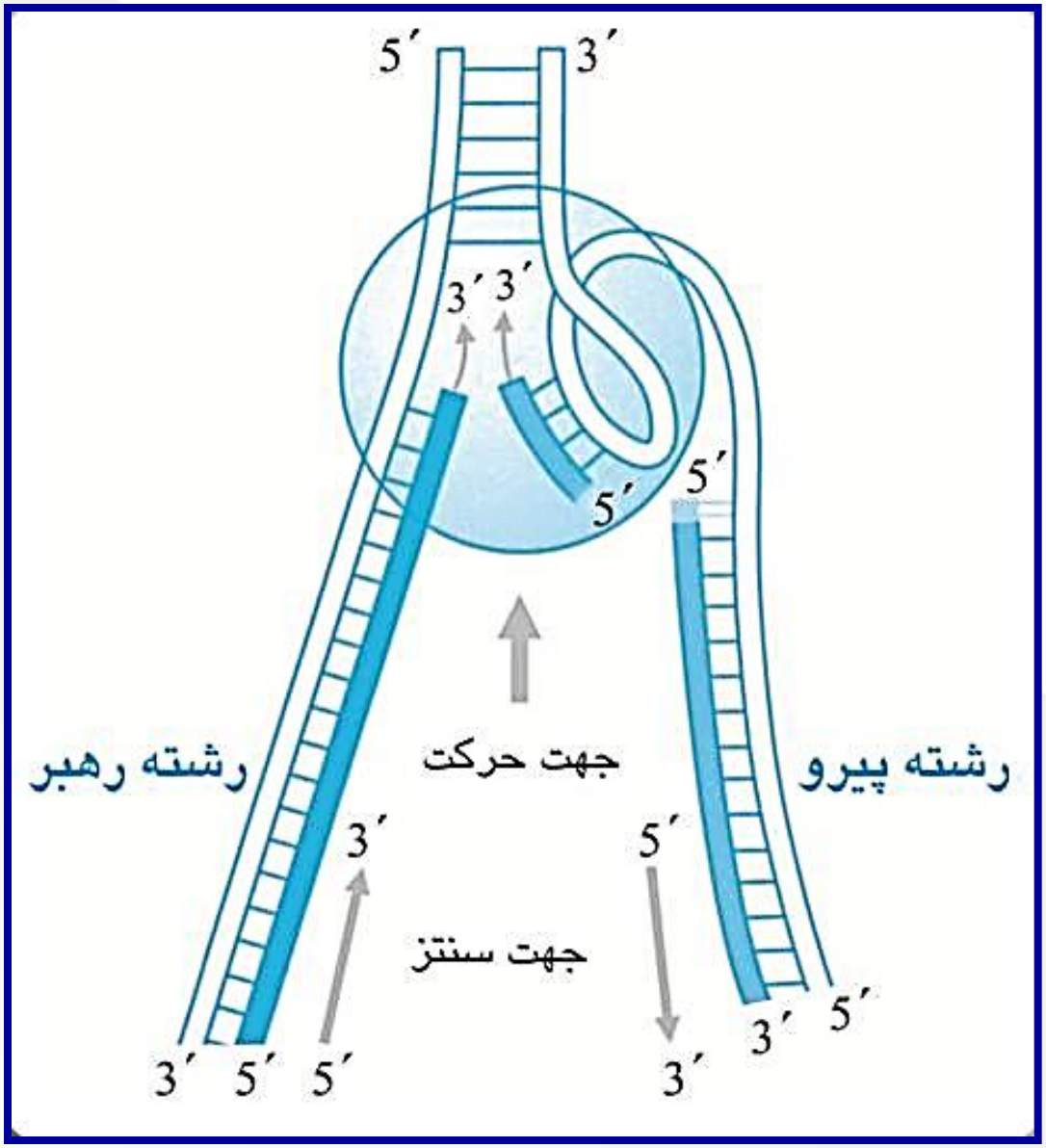
سنتز DNA فقط در جهت ' ۵ به ' ۳ می باشد.
دو رشته DNA همزمان سنتز می شود
اما چگونه؟

یک رشته به صورت پیوسته سنتز می شود که رشته پیشرو (Leading) strand نامیده می شود.
و
رشته دیگر به صورت ناپیوسته (قطعات اوکازاکی) ساخته می شود که رشته پیرو (Lagging strand) نامیده می شود.

چنگال همانندسازی و چگونگی سنتز رشته پیرو و رهبر



طویل سازی: نحوه تغییر سنتز رشته پیرو



سنتز رشته های مکمل دو رشته DNA توسط یک هولوآنزیم DNAپلیمراز III انجام می شود

قطعه اوکازاکی

ساختار:

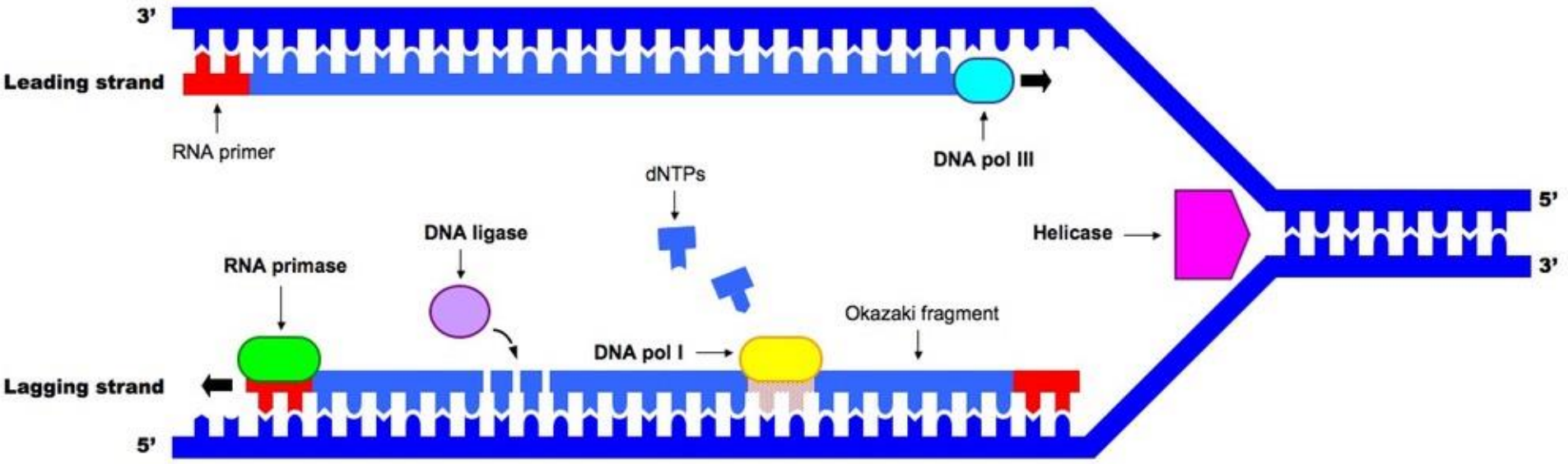
توالی کوتاهی (۱۰ نوکلئوتید) از پرایمر RNA

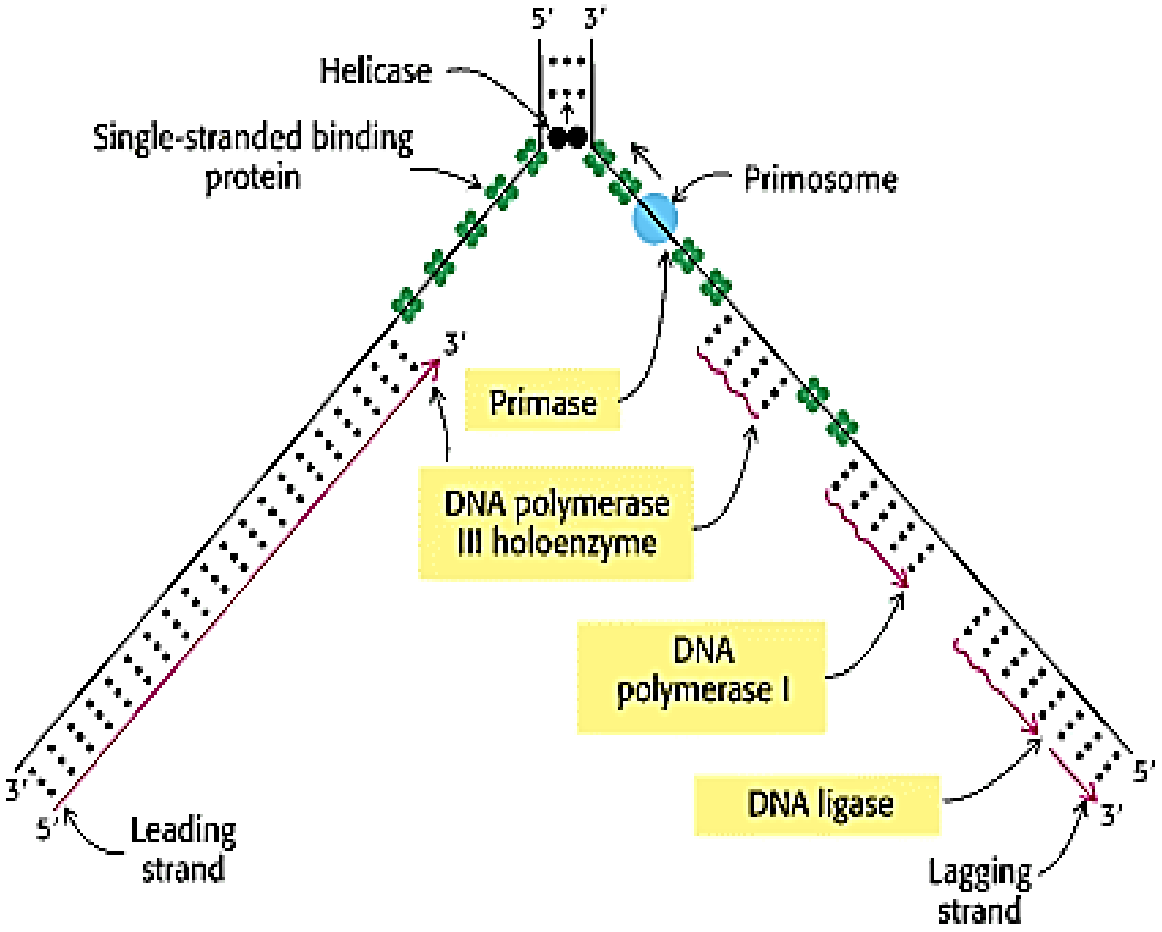
چگونه ساخته می شود:

پرایمر توسط پریماز و DNA توسط DNAP III

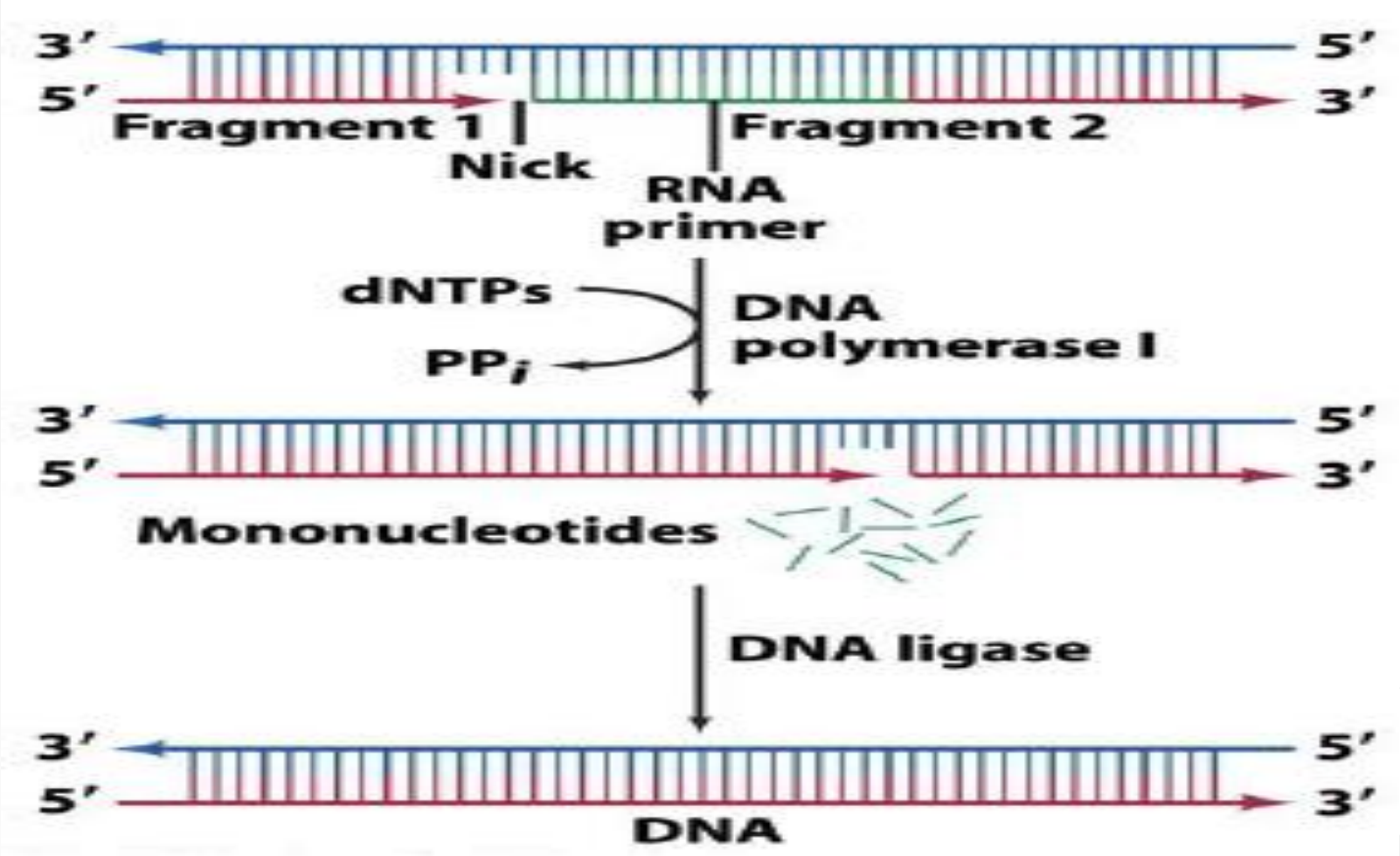
چگونه قطعات به هم وصل می شوند:

ابتدا پرایمر قطعه اوکازاکی قبلی توسط DNAP1 هیدرولیز و جایگزین می شود سپس دو انتهای DNA توسط لیگاز بهم وصل می شود■




5'
3'
Helicase
Single-stranded binding protein
Primosome
3'
Primase
DNA polymerase III holoenzyme
DNA polymerase I
DNA ligase
3'
5'
5'
Leading strand
Lagging strand

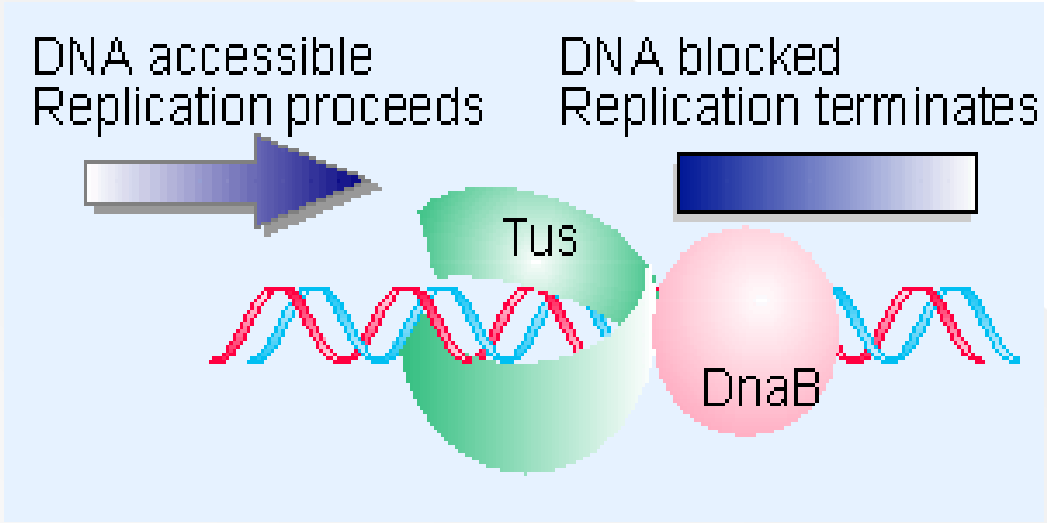
NICK Translation مکانیسم
(در حذف پرایمر و جایگزینی آن با DNA)



ختم همانندسازی در EColi

۱- توالی Ter، توالی حفظ شده ای با ۲۳ باز می باشد.

۲-پروتئین Tus: به توالی Ter متصل شده و همانندسازی را فقط در یک جهت متوقف می کند.

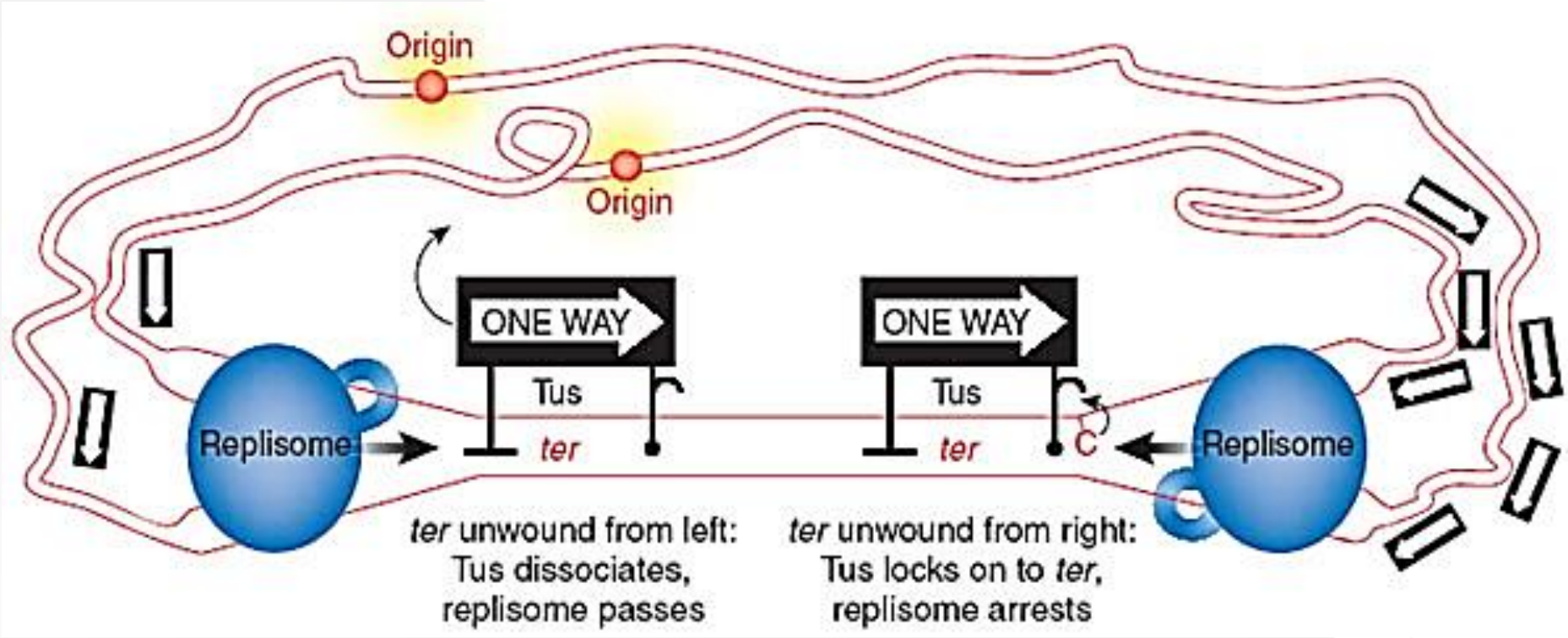


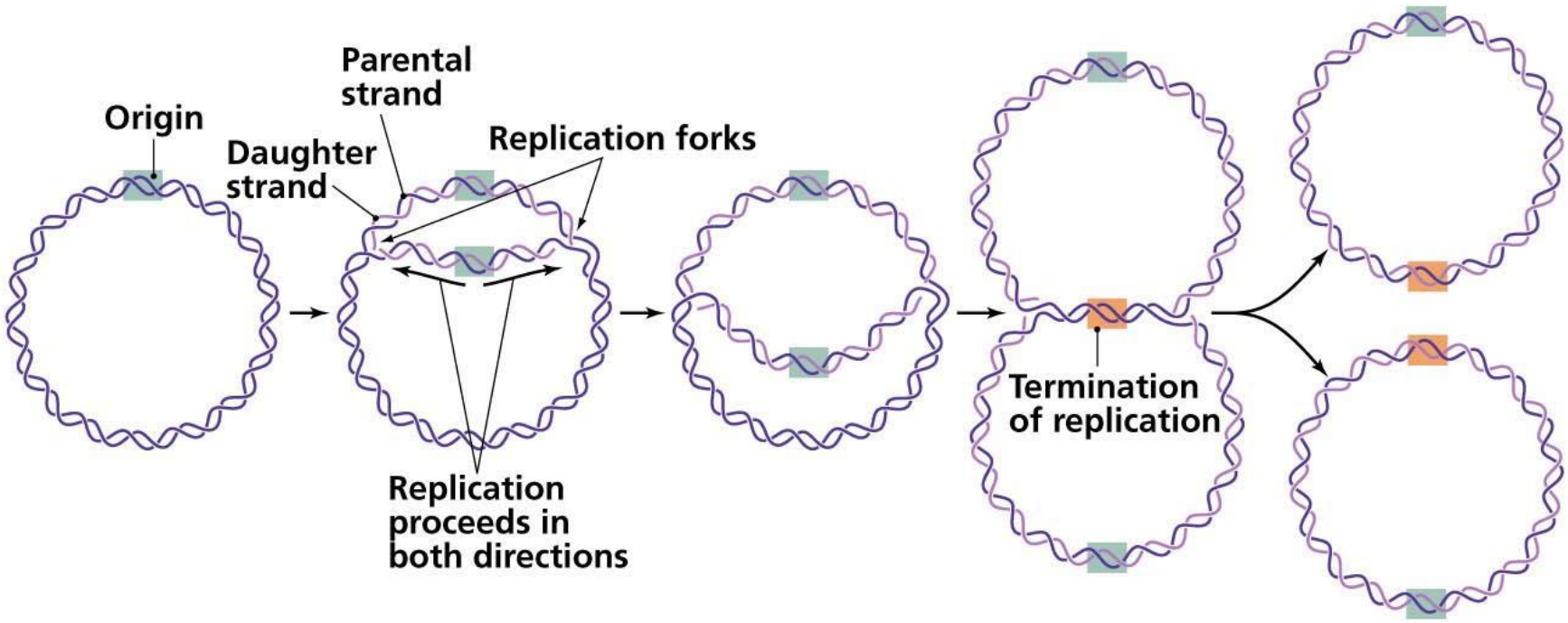
۳- توقف فعالیت هلیکاز

۴- توقف همانندسازی

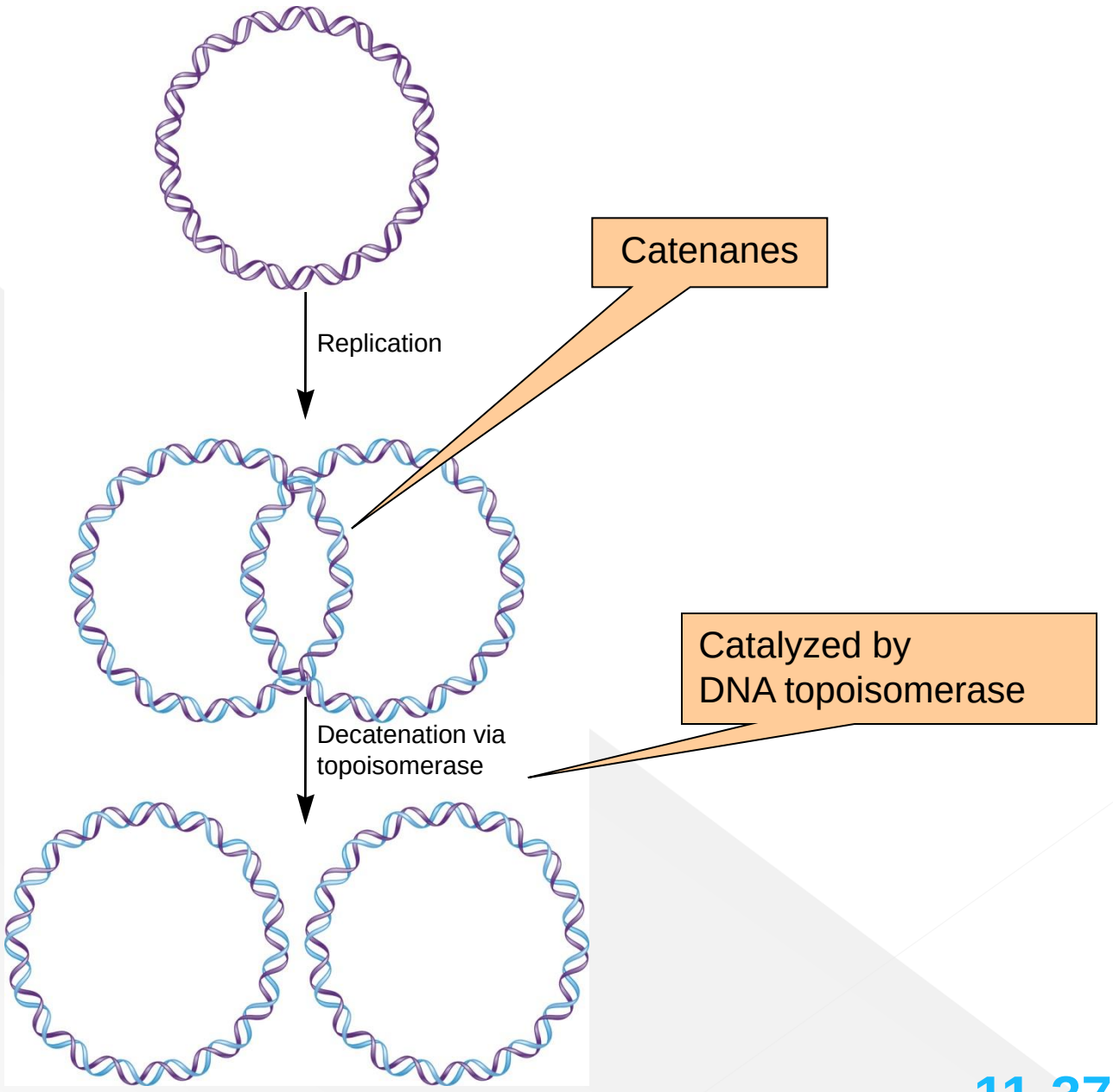
۵-دکاتناسیون توسط توپوایزومراز

انتهای همانندسازی کروموزوم حلقوی باکتری



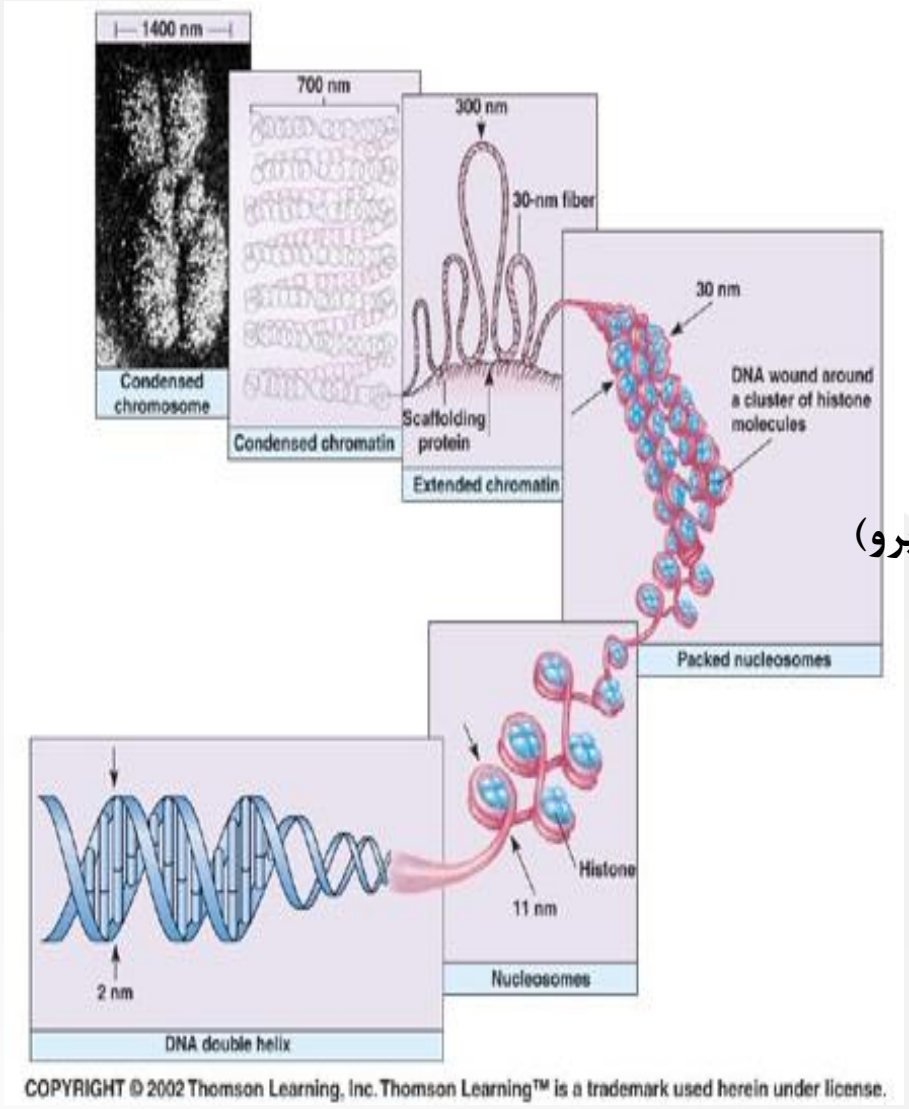


Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.


Catenanes
Replication
Catalyzed by
DNA topoisomerase
Decatenation via
topoisomerase

همانندسازی در یوکاریوت‌ها

همانندسازی در یوکاریوتها/تفاوتهای بین یو و پرو



سرعت همانند سازی در یوکاریوتها کم می باشد، حداقل به علت:

۱- DNA خیلی طویل هست

۲-موانع فیزیکی زیادی وجو دارد

۳- سرعت پایین همانندسازی

(سرعت چنگال همانندسازی در یو یک بیستم پرو)

اما

چگونه این مسئله حل شده است؟

۱- داشتن صدها رپلیکون و لذا صدها جایگاه شروع

۲- استفاده از عوامل پروتئینی مختلف

مراحل متفاوت همانندسازی در یوکاریوتها

- **شناسایی توالی مبداء همانندسازی** (توالی های غنی از AT) **با ORC**
- **آغاز توسط DNAP α**
- **طویل سازی با رپلیزوم**
- **ختم با تلومراز**

ORC: origin recognition complex

DNAپلیمرازهای مختلف در یوکاریوتها

DNAپلیمراز α : فعالیت پریمازی و آندونوکلئازی

DNAپلیمراز β:
در برداشت پرایمر و ترمیم DNA نقش دارد (مشابه DNAپلیمراز I در پروکاریوتها)

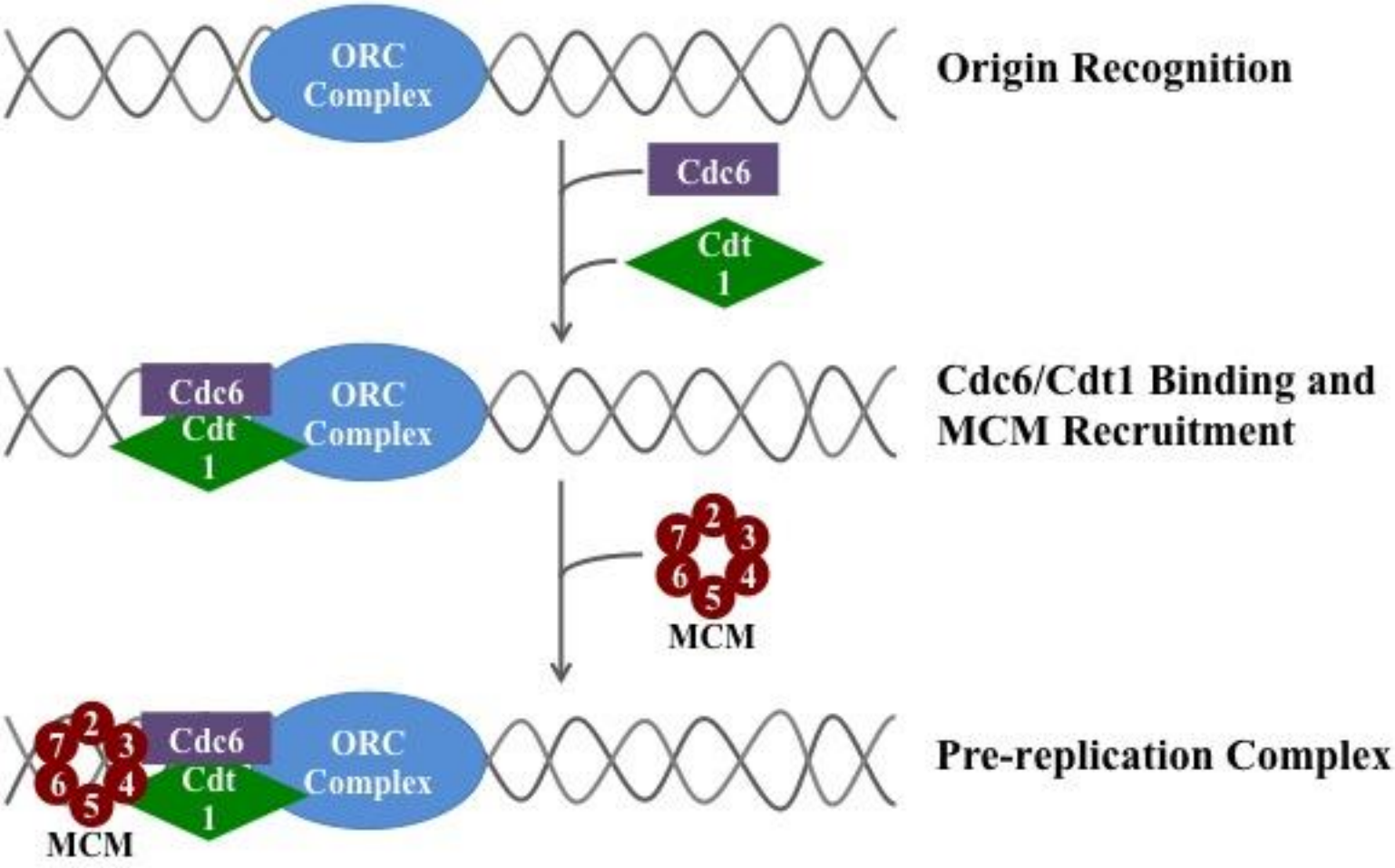
DNAپلیمراز γ:
همانندسازی DNA میتوکندریایی را بر عهده دارد (دارای خاصیت پلیمرازی و اگزونوکلئازی '۳ به '۵ می باشد.

DNAپلیمراز ε:
درهسته بیشتر نقش ترمیم دارد (دارای خاصیت پلیمرازی و اگزونوکلئازی '۳ به '۵ می باشد.

DNAپلیمراز δ: آنزیم **اصلی** سنتز کننده در یوکاریوتها (مانند DNAپلیمراز III در پروکاریوتها)

.

مجوز شروع همانندسازی در مخمر



مجوز شروع همانندسازی در مخمر

کمپلکس آنزیمی ORC (Origine recoginition complex به معنی کمپلکس شناساگر مبداء) ناحیه OirC (مبداء همانندسازی) را شناسایی می کند. (مشابه کار Dna A در پروکاریوتها)

پروتئین Cdc6 عملی مشابه به Dna C انجام می دهد (کار Dna C فراخوانی هلیکاز Dna B هست)
Cdc6 و Cdt1 باعث می شود که MCM (Mini Chromosome Maintenance) که دارای فعالیت هلیکازی است به مبدا متصل شود.

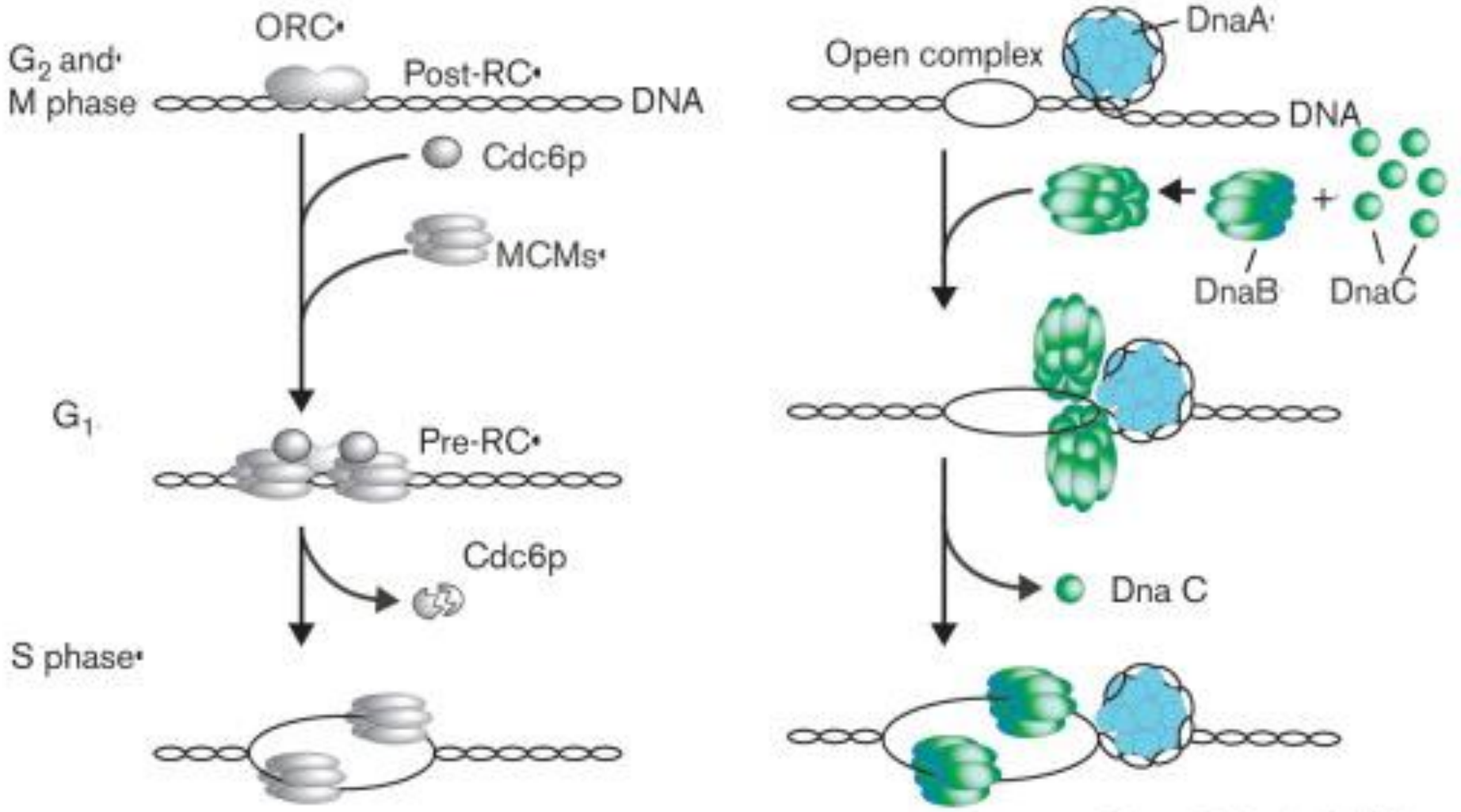
MCM با خاصیت ATPآزی خود، پیوندهای هیدروژنی بین بازها را باز می‌کند تا DNAپلیمراز بتواند عمل سنتز را انجام دهد.

مجموعه این پروتئین های را فاکتورهای کسب مجوز می گویند

مقایسه آغاز همانندسازی در پرو و یوکاریوتها

آغاز همانندسازی در یوکاریوت

آغاز همانندسازی در پروکاریوت



همانندسازی یوکاریوتی با DNAپلیمراز α آغاز و توسط DNAپلیمراز δ ادامه میابد

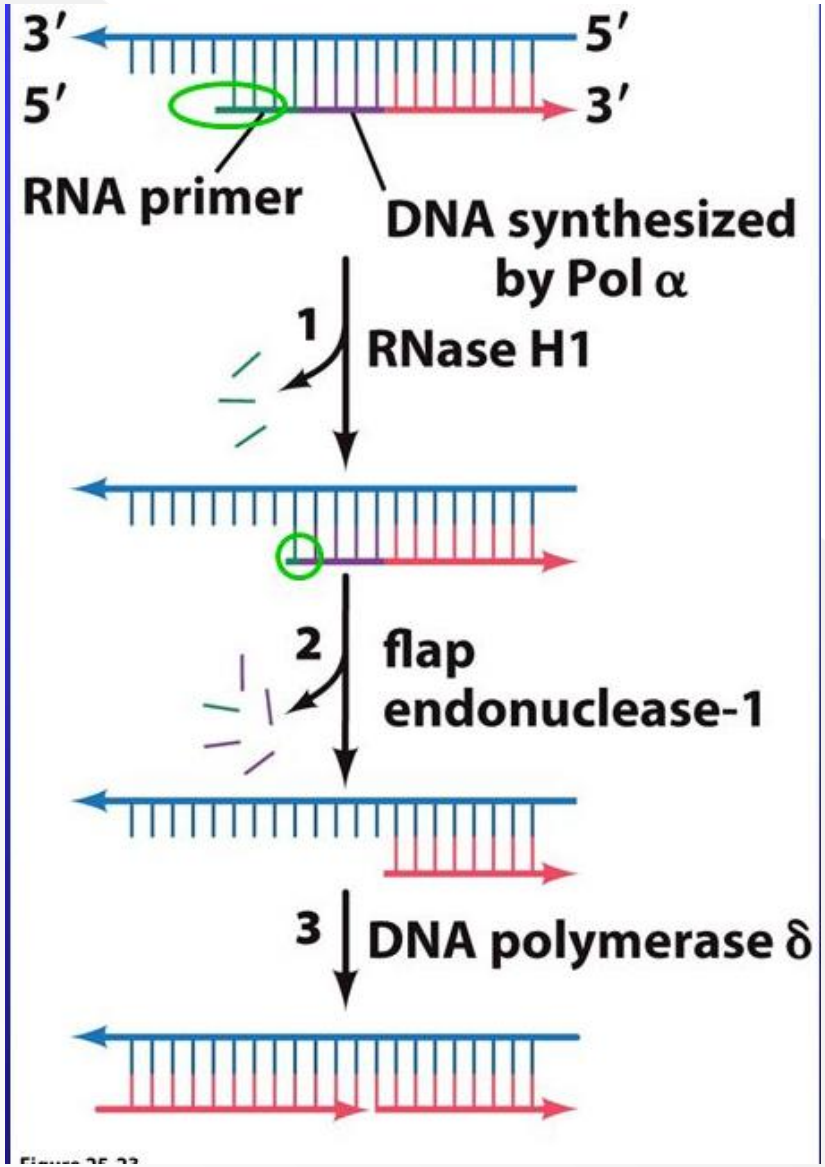
- ۱- DNAپلیمراز α ابتدا با فعالیت پریمازی قطعه پرایمر RNA را سنتز می کند سپس
- با فعالیت DNAپلیمرازی خود حدود ۲۰ داکسی ریبونوکلئوتید را به آن اضافه می کند
- فاکتور همانندسازی RFC جایگزین Polα می شود و به پرایمر متصل می گردد
- فراخوانی PCNA (به عنوان گیره برای اتصال به رشته الگو)
- اتصال DNAپلیمراز δ به PCNA

RFC: replication factor C

مقایسه دستگاه همانندسازی بین پروکاریوتها و یوکاریوتها

عملکرد	EColi	یوکاریوت
سنتز رشته پیشرو و پیرو	دیمر نامتقارن از پلیمراز III	پلیمرازδ
گیره یا Sliding clamp	زیراحد بتا پلیمراز III	PCNA
بارگیری گیره یاClamp loader	کمپلکس γ از پلیمراز III	RFC
پریماز	Dna G	پلیمراز α
اتصال به DNA تک رشته	SSB	RPA
برداشت پرایمر	POL I	FEN1 , RNase H
باز کردن پیچ های DNA	ژیراز (توپوایزومراز II)	توپوایزومراز I و II

برداشت پرایمر در یوکاریوتها

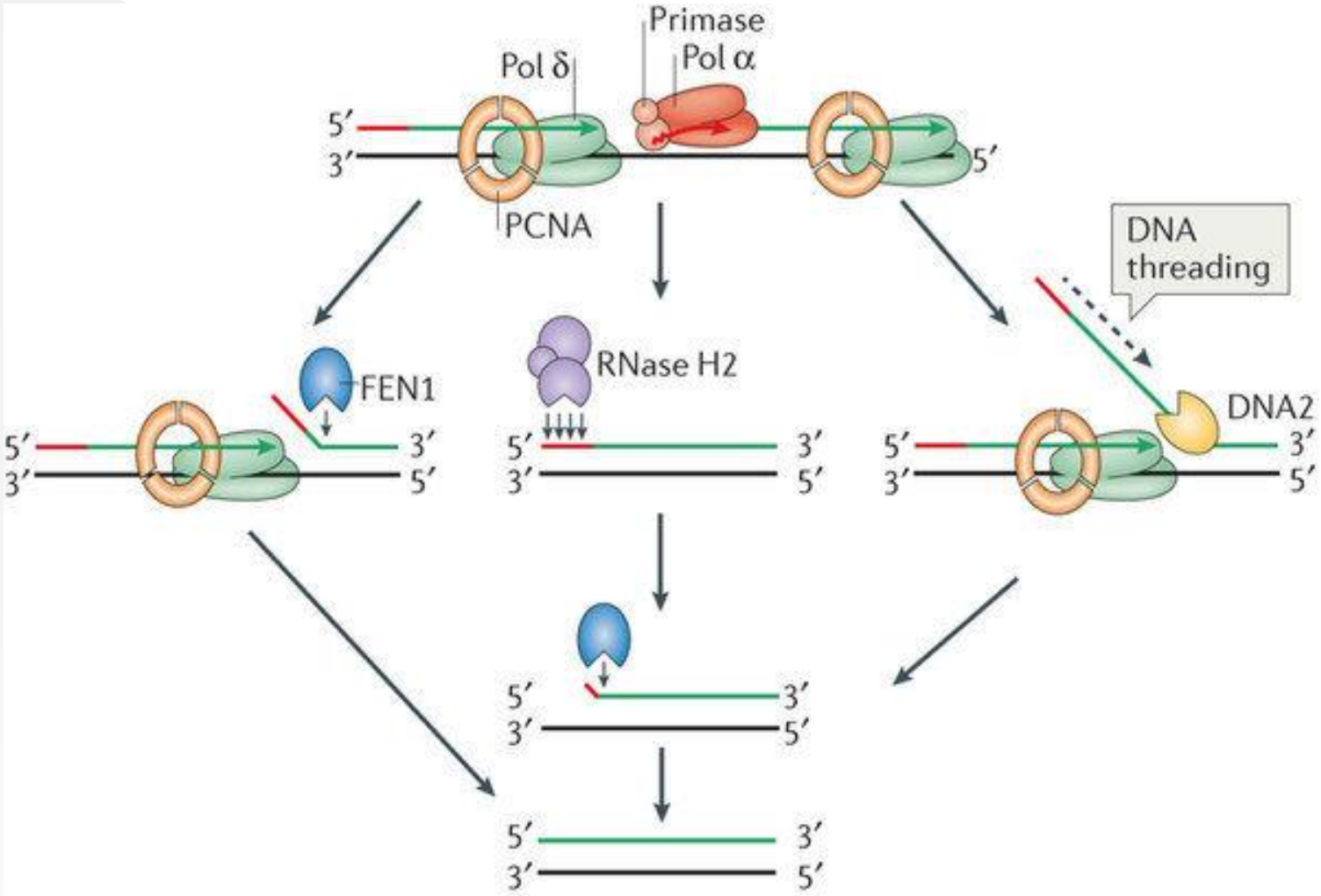


۱- هیبرید DNA-RNA توسط RNAse H1 از بین می رود.

۲- DNA سنتز شده توسط DNAPα با آنزیم FEN1 حذف می شود.

۳-DNAPδ جای خالی را پر می کند

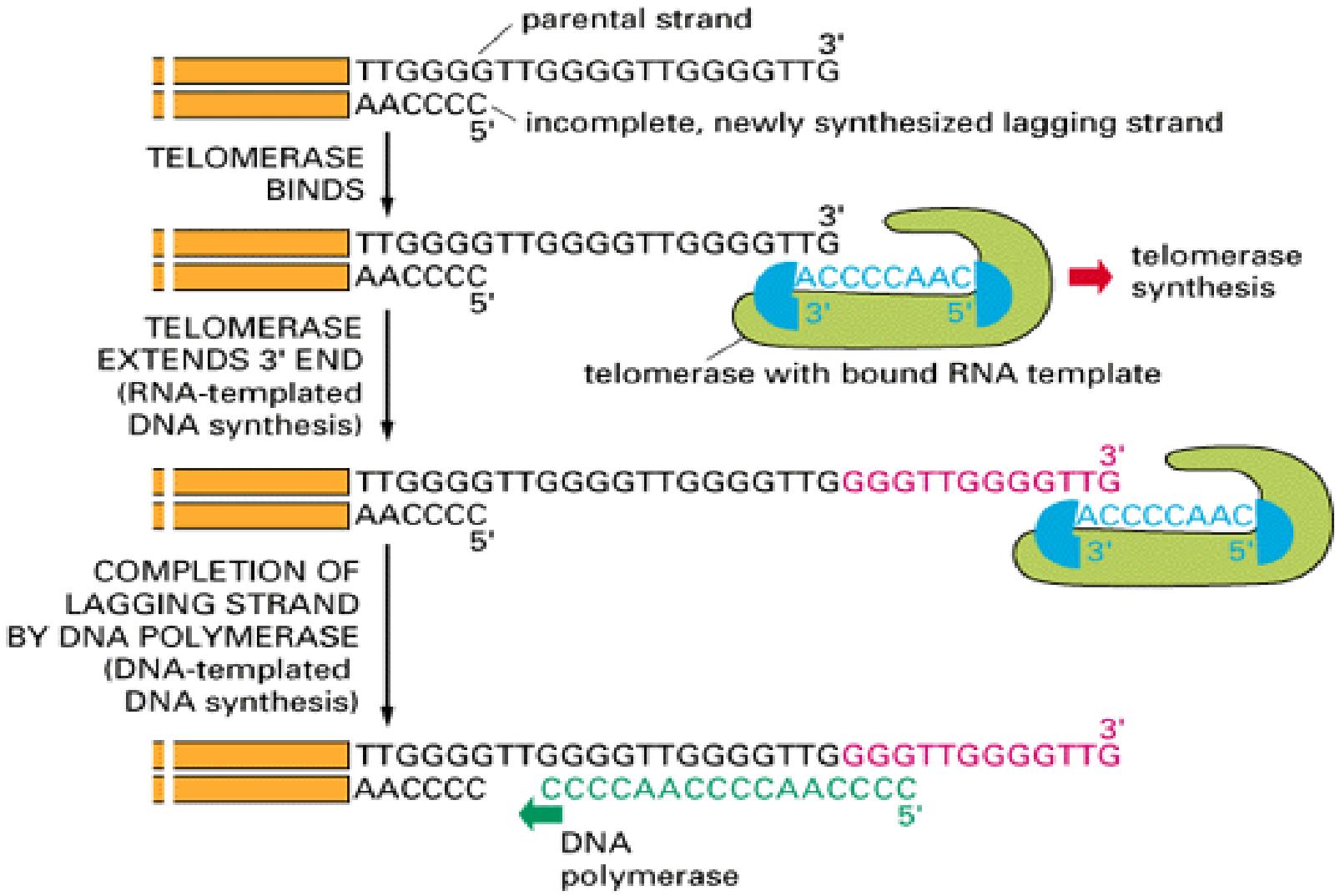
FEN1: flap structure-specific endonuclease 1


Primase
Pol δ
Pol α
5′
3′
5′
PCNA
DNA
threading
FEN1
RNase H2
DNA2
5′
3′
3′
5′
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

DNAپلیمرازهای مختلف در یوکاریوتها

DNAپلیمراز	α	β	γ	ε	δ
جایگاه	هسته	هسته	میتوکندری	هسته	هسته
عملکرد	پریماز	ترمیم	همانندسازی	ترمیم	
فعالیت پلیمرازی ۵' به ۳'	+	+	+	+	+
فعالیت اگزونوکلئازی ۳' به ۵'	–	–	+	+	+
فعالیت اگزونوکلئازی ۵' به ۳'	–	–	–	+	–

پایان همانندسازی در ژنومهای خطی/ تلومراز



سمومی که همانندسازی را مهار می کنند

- **میتومایسین**: بین دو رشته DNA کراسلینک برقرار می کند و مانع می شوند به عنوان الگو عمل کنند
- **اسیدنالیدیک**: مهار ژیراز