



به نام خدا

بیولوژی سلولی و مولکولی

همانندسازی DNA و جهش

دکتر محمد درویش خادم

D.V.M., Ph.D. of Biochemistry

دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان

همانندسازی DNA: فرآیند نیمه حفاظت شده

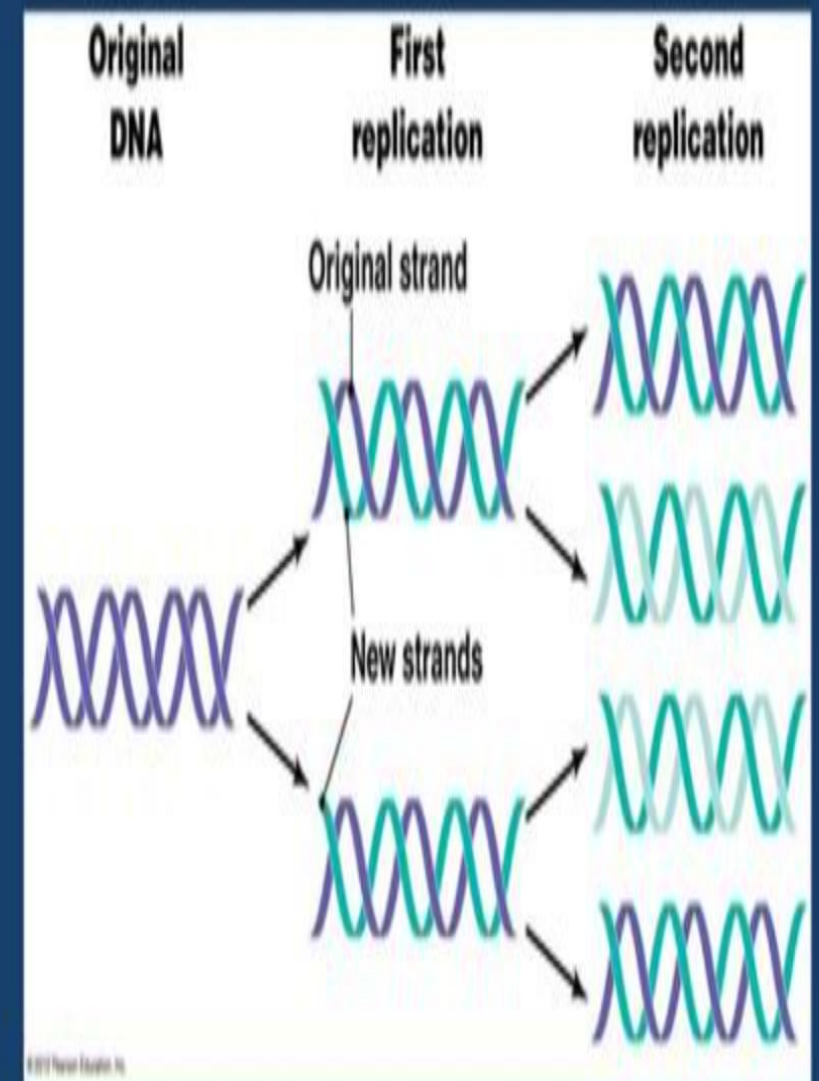
همانندسازی فرآیندی است که طی آن یک مولکول DNA دو رشته‌ای، دو کپی کاملاً یکسان از خود تولید می‌کند. این فرآیند به صورت **نیمه حفاظت شده** انجام می‌شود، به این معنی که هر مولکول DNA جدید شامل یک رشته از مولکول مادر و یک رشته تازه سنتز شده است.

۱

آماده‌سازی

از حالت فشرده رها شده و
آنزیم‌های **توپوایزومراز** پیچ و
تاب‌های اضافی را برطرف می‌کنند

Semiconservative model of DNA replication



توپوایزومرازها

توپوایزومرازها آنزیم‌هایی هستند که با شکستن و اتصال مجدد پیوندهای فسفودی‌استر، توپولوژی یا شکل فضایی DNA را تغییر می‌دهند. این آنزیم‌ها به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند:

- **توپوایزومراز نوع I:** این آنزیم‌ها تنها یک رشته از DNA را برش می‌دهند تا پیچش‌ها را باز کنند و فعالیت آن‌ها معمولاً به ATP نیاز ندارد.

- **توپوایزومراز نوع II:** این آنزیم‌ها هر دو رشته DNA را به طور همزمان برش می‌دهند و برای فعالیت خود به ATP نیاز دارند.

DNA ژیراز (DNA Gyrase) در پروکاریوت‌ها نمونه‌ای از این دسته می‌باشد که می‌تواند ابرمارپیچ‌های منفی ایجاد کند.

برخی آنتی‌بیوتیک‌ها مانند کینولون‌ها (سپروفلوکساسین) و نوویوسین با مهار توپوایزومرازهای باکتریایی عمل می‌کنند.

Semiconservative model of DNA replication

هماندسازی DNA: فرآیند نیمه حفاظت شده

هماندسازی فرآیندی است که طی آن یک مولکول DNA دو رشته‌ای، دو کپی کاملاً یکسان از خود تولید می‌کند. این فرآیند به صورت **نیمه حفاظت شده** انجام می‌شود، به این معنی که هر مولکول DNA جدید شامل یک رشته از مولکول مادر و یک رشته تازه سنتز شده است.

۱

آماده‌سازی

از حالت فشرده رها شده و آنزیم‌های توپوایزومراز پیچ و تاب‌های اضافی را برطرف می‌کنند

۳

سنتز همزمان

دو رشته جدید به طور همزمان ساخته می‌شوند

۲

شروع دوجته

هماندسازی از مبدأ در دو جهت مخالف آغاز می‌شود

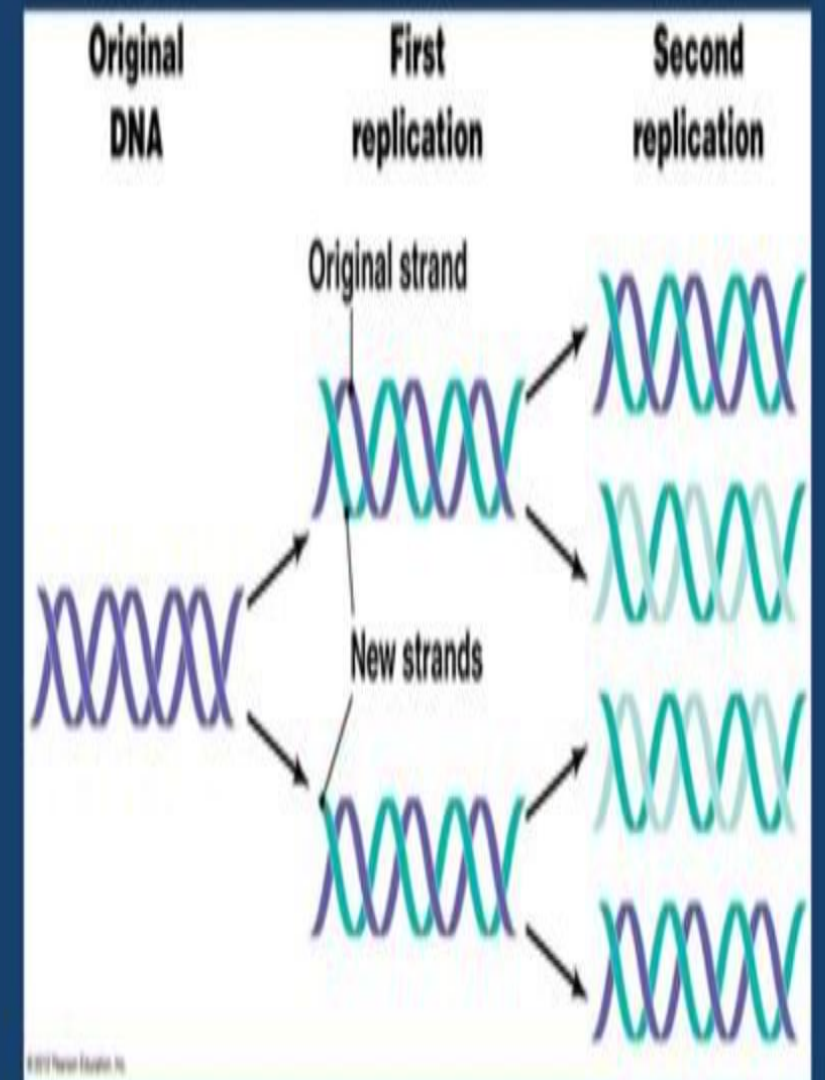
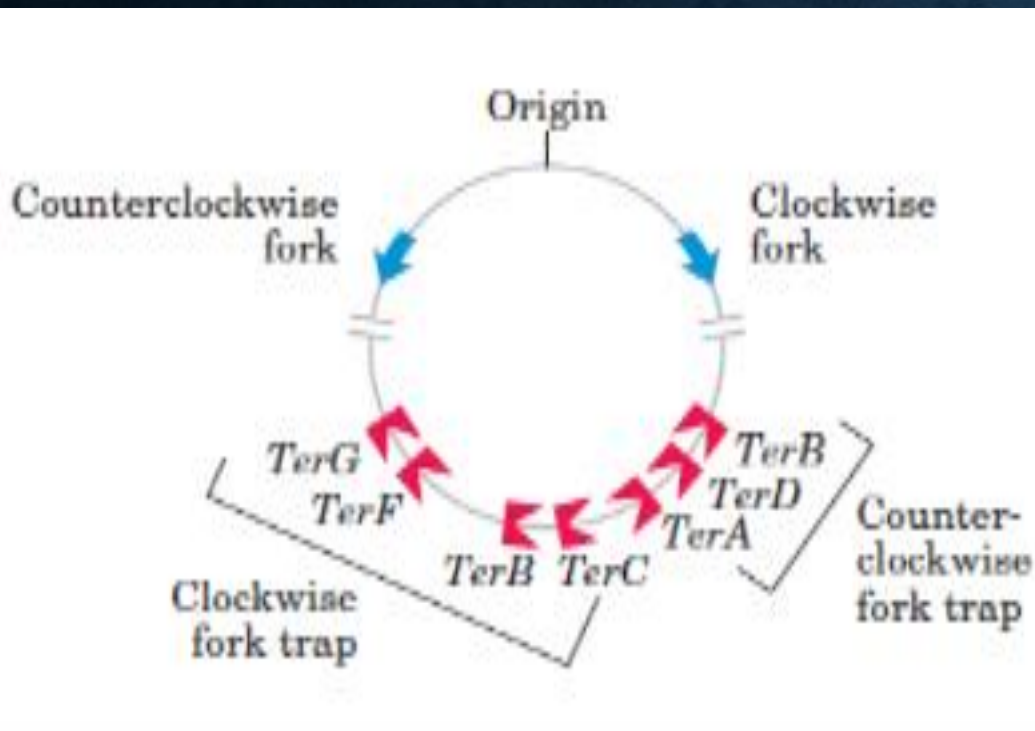


TABLE 25-3 Proteins Required to Initiate Replication at the <i>E. coli</i> Origin			
Protein	<i>M_r</i>	Number of subunits	Function
DnaA protein	52,000	1	Recognizes <i>oriC</i> sequence; opens duplex at specific sites in origin
DnaB protein (helicase)	300,000	6 ^a	Unwinds DNA
DnaC protein	174,000	6 ^a	Required for DnaB binding at origin
HU	19,000	2	Histonelike protein; DNA-binding protein; stimulates initiation
FIS	22,500	2 ^a	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 ^a	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>
^a Subunits in these cases are identical.			

مراحل همانندسازی در پروکاریوت‌ها



شروع (Initiation)

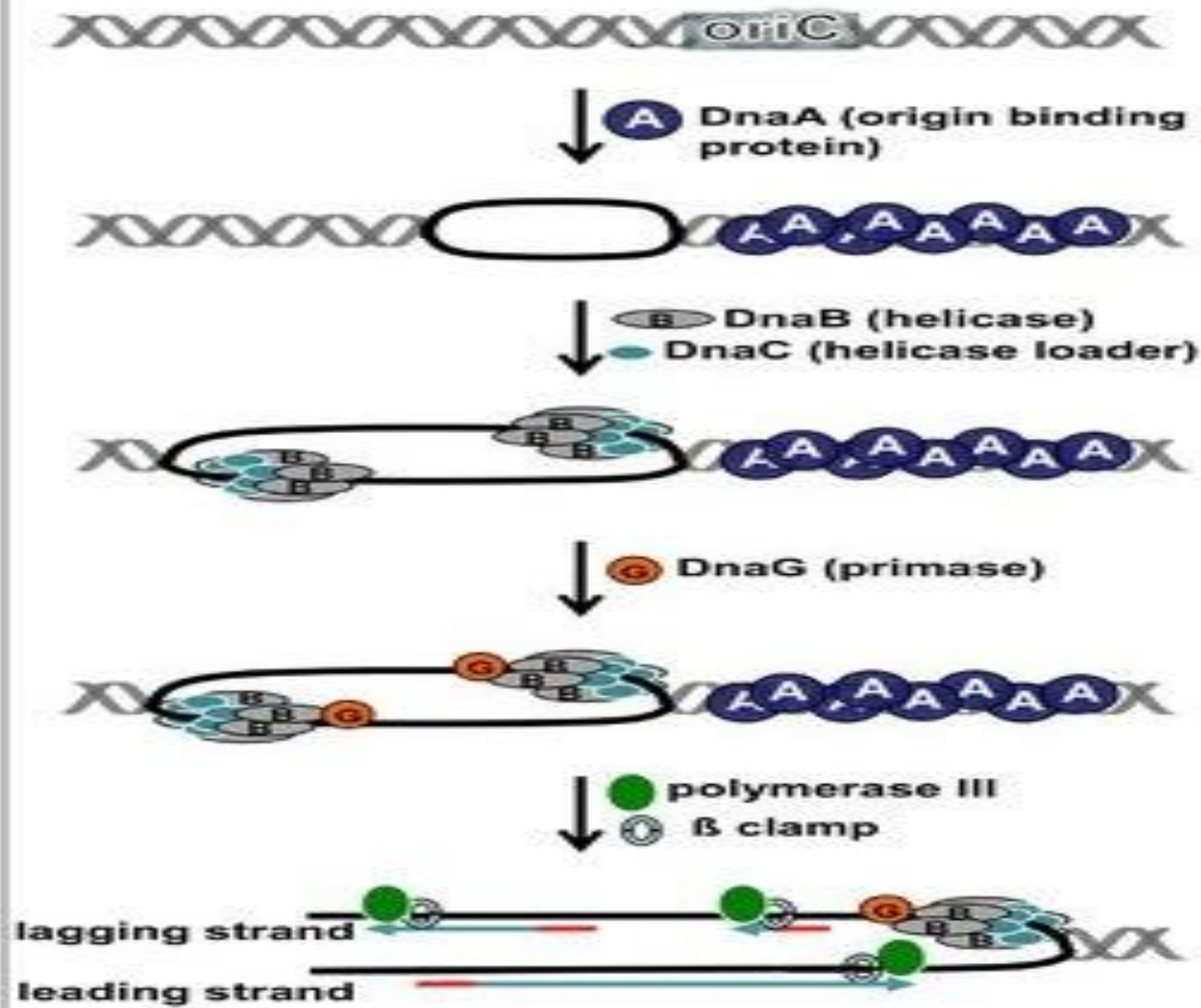
پروتئین DnaA به OriC متصل شده و دو

رشته را باز می‌کند.

هلیکاز (DnaB) چنگال همانندسازی را ایجاد

می‌کند.

پریماز (DnaG) پرایمر RNA را سنتز می‌کند.



Replication initiation in bacteria

مراحل همانندسازی در پروکاریوت‌ها



شروع (Initiation)

پروتئین DnaA به OriC متصل شده و دو

رشته را باز می‌کند.

هلیکاز (DnaB) چنگال همانندسازی را ایجاد می‌کند.

پریماز (DnaG) پرایمر RNA را سنتز می‌کند.



طویل شدن (Elongation)

DNA پلیمراز III، نوکلئوتیدها را اضافه می‌کند.

رشته پیشرو (leading) پیوسته و

رشته پیرو (lagging) به صورت قطعات آوکازاکی سنتز می‌شود.

DNA پلیمراز I، پرایمرها را حذف کرده و DNA لیگاز شکاف‌ها را می‌بندد.

Polymerases of <i>E. coli</i>					
	DNA polymerase				
	I	II ^a	III	IV ^a	V ^a
Structural gene ^b	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC</i> (<i>dnaE</i>)	<i>dinB</i>	<i>umuC</i>
Subunits (number of different types)	1	7	9	1	3
M_r	103,000	88,000 ^c	1,065,400	39,100	110,000
3'→5' exonuclease (proofreading)	Yes	Yes	Yes	No	No
5'→3' exonuclease	Yes	No	No	No	No
Polymerization rate (nucleotides/s)	10–20	40	250–1,000	2–3	1
Processivity (nucleotides added before polymerase dissociates)	3–200	1,500	≥500,000	1	6–8

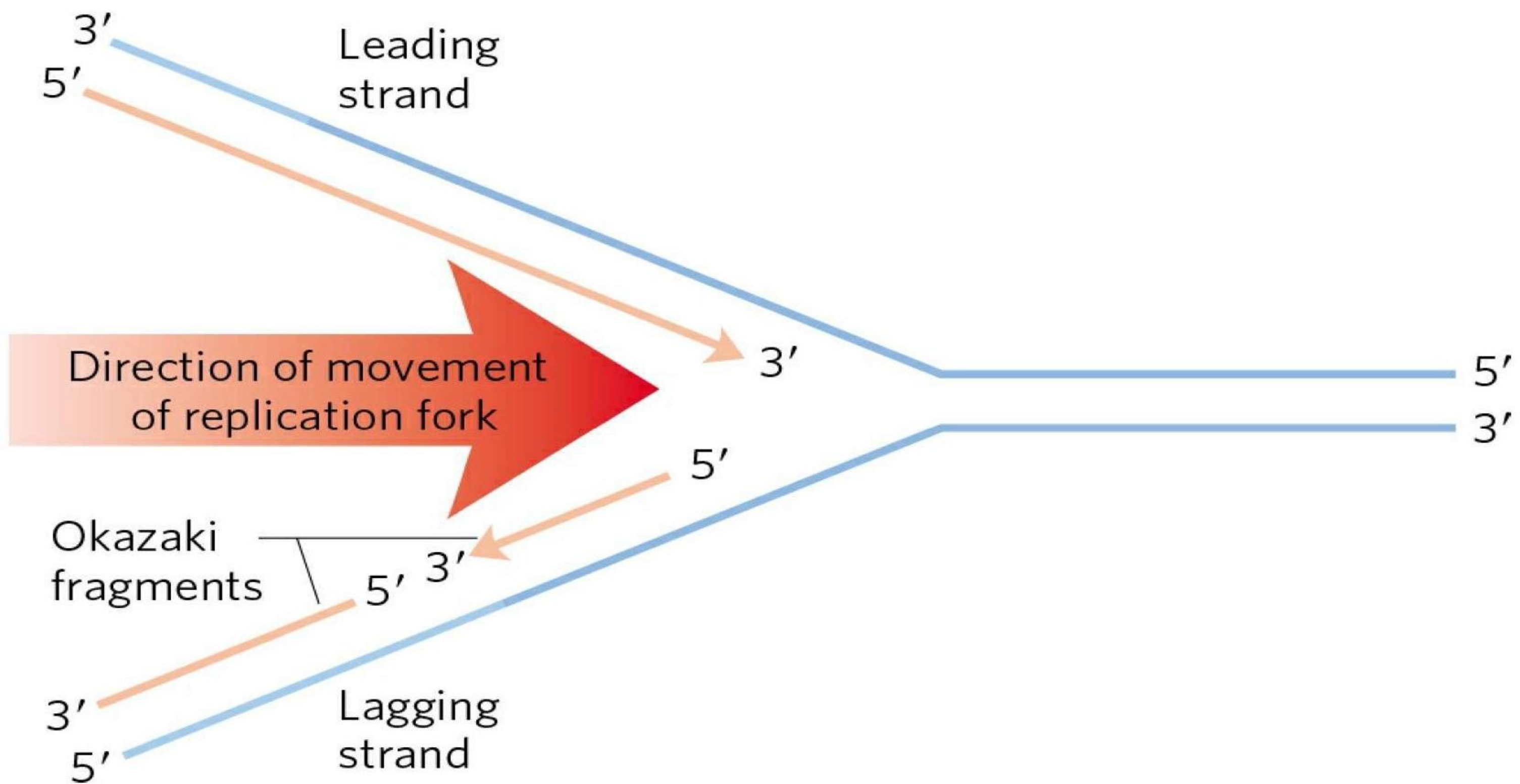


FIGURE 25-4 Defining DNA strands at the replication fork.

مراحل همانندسازی در پروکاریوت‌ها

شروع (Initiation)

پروتئین DnaA به OriC متصل شده و دو رشته را باز می‌کند.

هلیکاز (DnaB) چنگال همانندسازی را ایجاد می‌کند.

پریماز (DnaG) پرایمر RNA را سنتز می‌کند.

طویل شدن (Elongation)

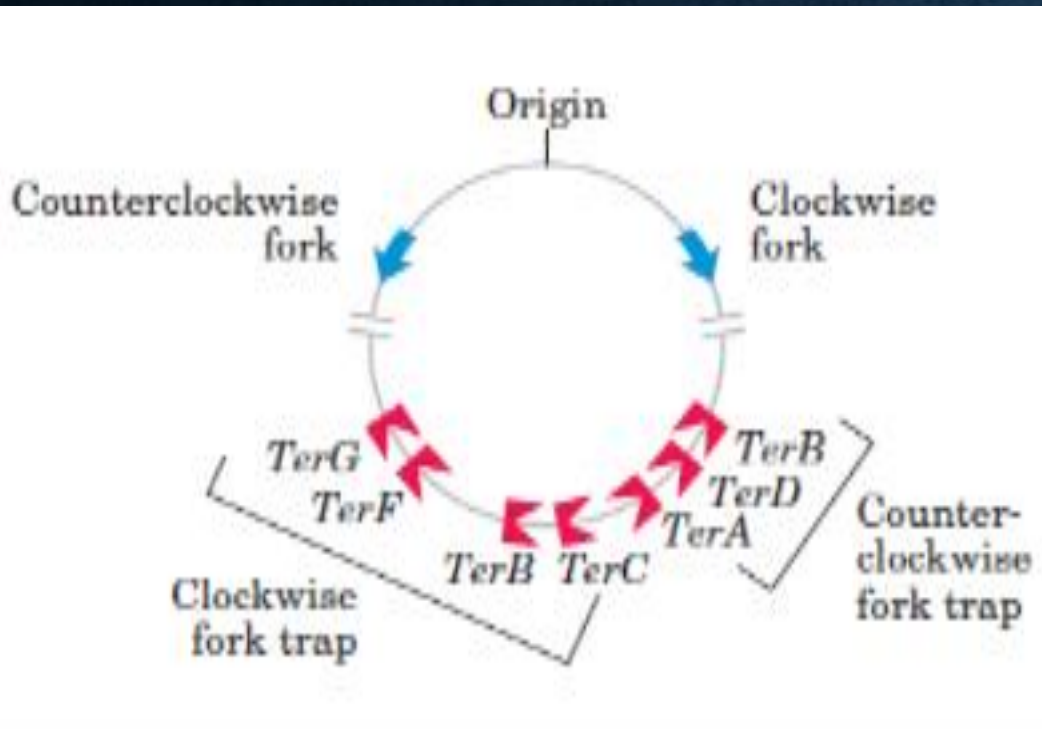
DNA پلیمراز III، نوکلئوتیدها را اضافه می‌کند.

رشته پیشرو (leading) پیوسته و رشته پیرو (lagging) به صورت قطعات اوکازاکی سنتز می‌شود.

DNA پلیمراز I، پرایمرها را حذف کرده و DNA لیگاز شکاف‌ها را می‌بندد.

پایان (Termination)

دو چنگال همانندسازی به یکدیگر یا به توالی‌های Ter می‌رسند و فرآیند پایان می‌یابد.



همانندسازی در یوکاریوت‌ها

مبدأ همانندسازی

چندین مبدأ در هر کروموزوم برای همانندسازی سریع‌تر ژنوم بزرگ

DNA پلیمرازهای متنوع

پلیمراز α برای پرایمر،

پلیمراز **دلتا** (δ) و **اپسیلون** (ϵ) برای سنتز اصلی،

پلیمراز **گاما** (γ) برای میتوکندری،

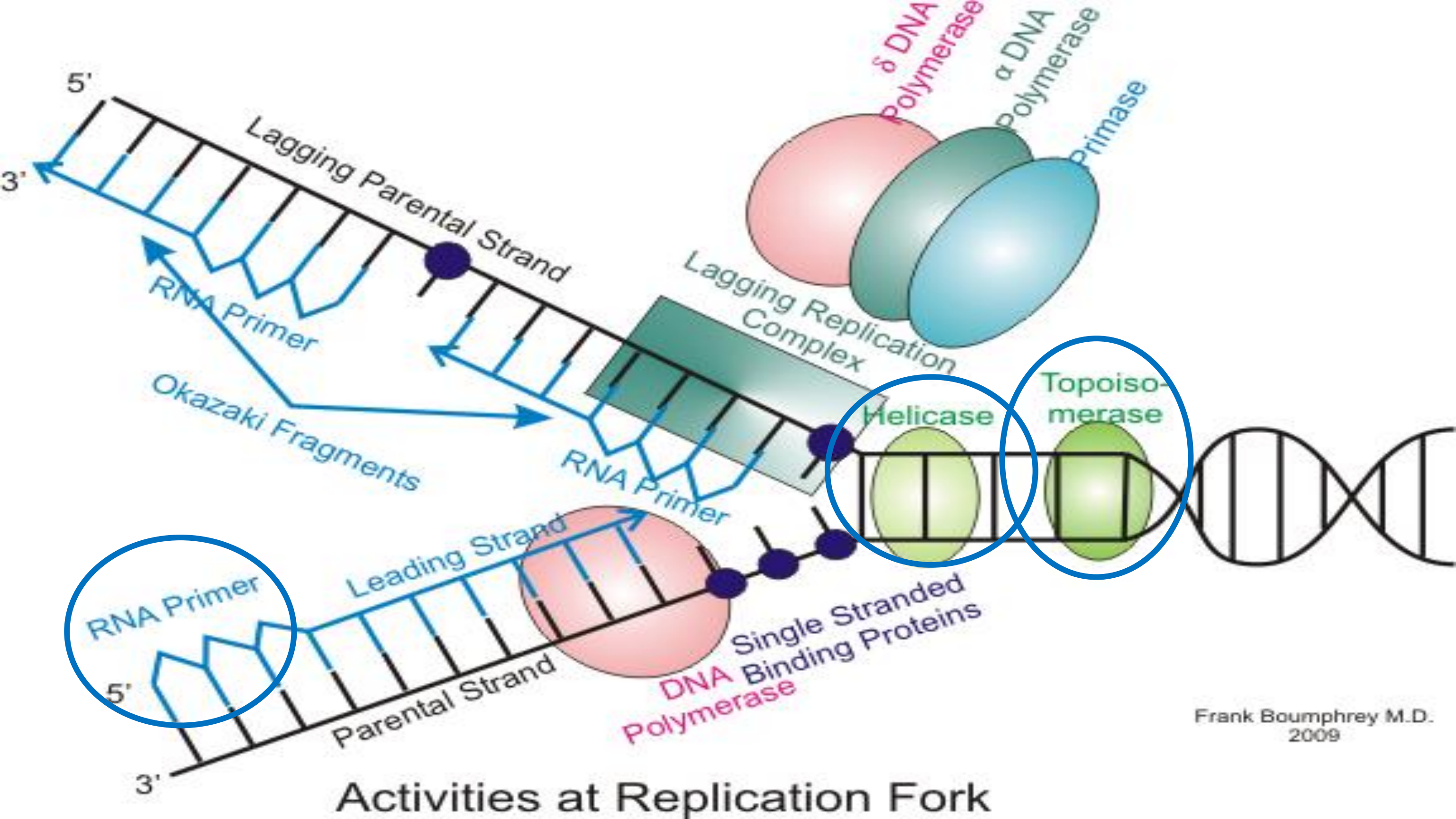
پلیمراز **بتا** (β) برای ترمیم

حذف پرایمر پیچیده

ترکیب فعالیت‌های RNase H و **FEN1** برای حذف پرایمرهای RNA

چالش تلومری

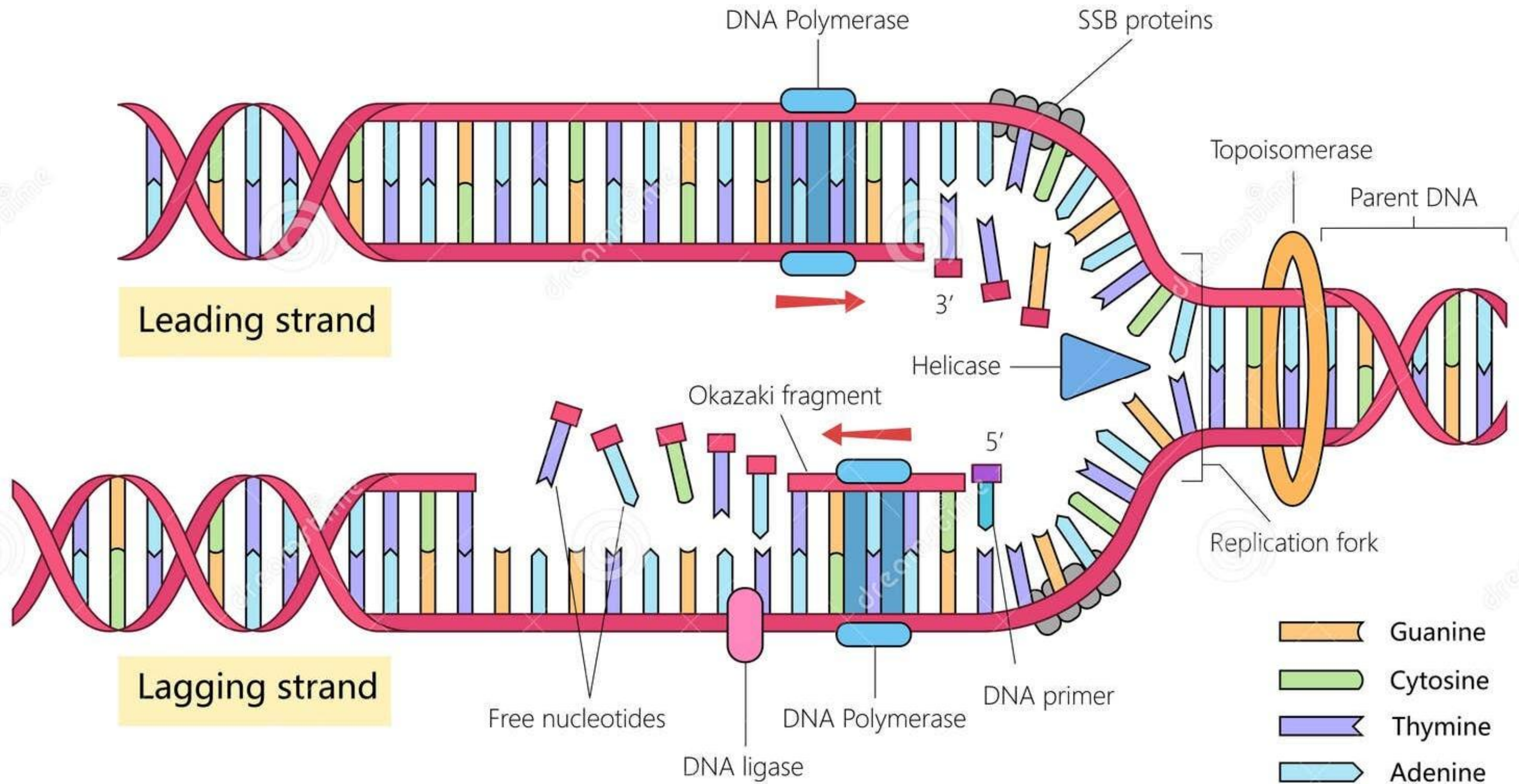
آنزیم تلومراز برای حفظ انتهای کروموزوم‌های خطی



Frank Boumphrey M.D.
2009

Activities at Replication Fork

DNA Replication



DNA replication: bacteria and humans

function	<i>E. coli</i>	human (2001 team Nobel)
helicase	DnaB	MCM2-7
helicase loading	DnaC	ORC, Cdt1, Cdc6
ssDNA binding	SSB	RPA
priming	DnaG	Pol α /primase
sliding clamp	β	PCNA
clamp loader	γ complex	RFC
polymerase	Pol III core	Pol δ / Pol ϵ
RNA removal	Pol I / RNase H	Dna2 / FEN-1
DNA ligation	Ligase	Ligase I

generally the proteins do a similar job but are structurally distinct

جهش و ترمیم DNA

سفری در دنیای تغییرات ژنتیکی و مکانیسم‌های دفاعی سلول

جهش: تغییرات پایدار در DNA

جهش به هرگونه تغییر پایدار در توالی DNA گفته می‌شود که می‌تواند پیامدهای متفاوتی بر ساختار و عملکرد پروتئین‌ها داشته باشد.

جهش‌های جانشینی

جایگزینی یک باز با باز دیگر.

اگر پورین با پورین جایگزین شود، هم‌جنس (Transition)

اگر پورین با پیریمیدین جایگزین شود، غیرهم‌جنس (Transversion)

جهش‌های تغییر چارچوب

اضافه یا حذف شدن یک یا چند نوکلئوتید (که ضربی از سه نباشد) که باعث تغییر کامل چارچوب خواندن کدون‌ها و پروتئین حاصل می‌شود.

انواع جهش‌های نقطه‌ای و پیامدها

جهش‌های نقطه‌ای تغییراتی **در سطح یک نوکلئوتید منفرد** ایجاد می‌کنند که بسته به نوع تغییر در کدون، پیامدهای متفاوتی بر پروتئین نهایی دارند.

جهش خاموش (Silent)

تغییر در کدون منجر به **تغییر اسید آمینه نمی‌شود**.

مثال: تغییر UUU به UUC که هر دو فنیل آلانین را کد می‌کنند. معمولاً تأثیری بر پروتئین ندارد.

جهش بدمعنی (Missense)

جایگزینی یک اسید آمینه با اسید آمینه دیگر.

مثال کلاسیک: بیماری **کم‌خونی داسی‌شکل** که

گلوبتالیک اسید با والین جایگزین می‌شود.

جهش بی‌معنی (Nonsense)

کدون اسید آمینه به **کدون خاتمه** تبدیل می‌شود، منجر به توقف زودرس ترجمه و پروتئین ناقص. بسیاری از **تالاسمی‌ها** از این نوع هستند.

عوامل جهش‌زا

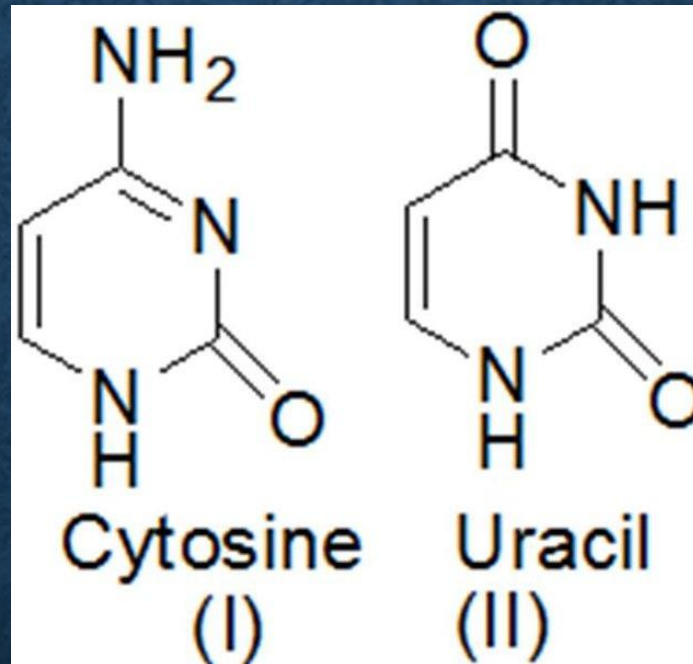
- * خطاهای همانندسازی
- * تغییرات خودبه‌خودی مانند دپوریناسیون

عوامل شیمیایی

- * عوامل آلکیله‌کننده

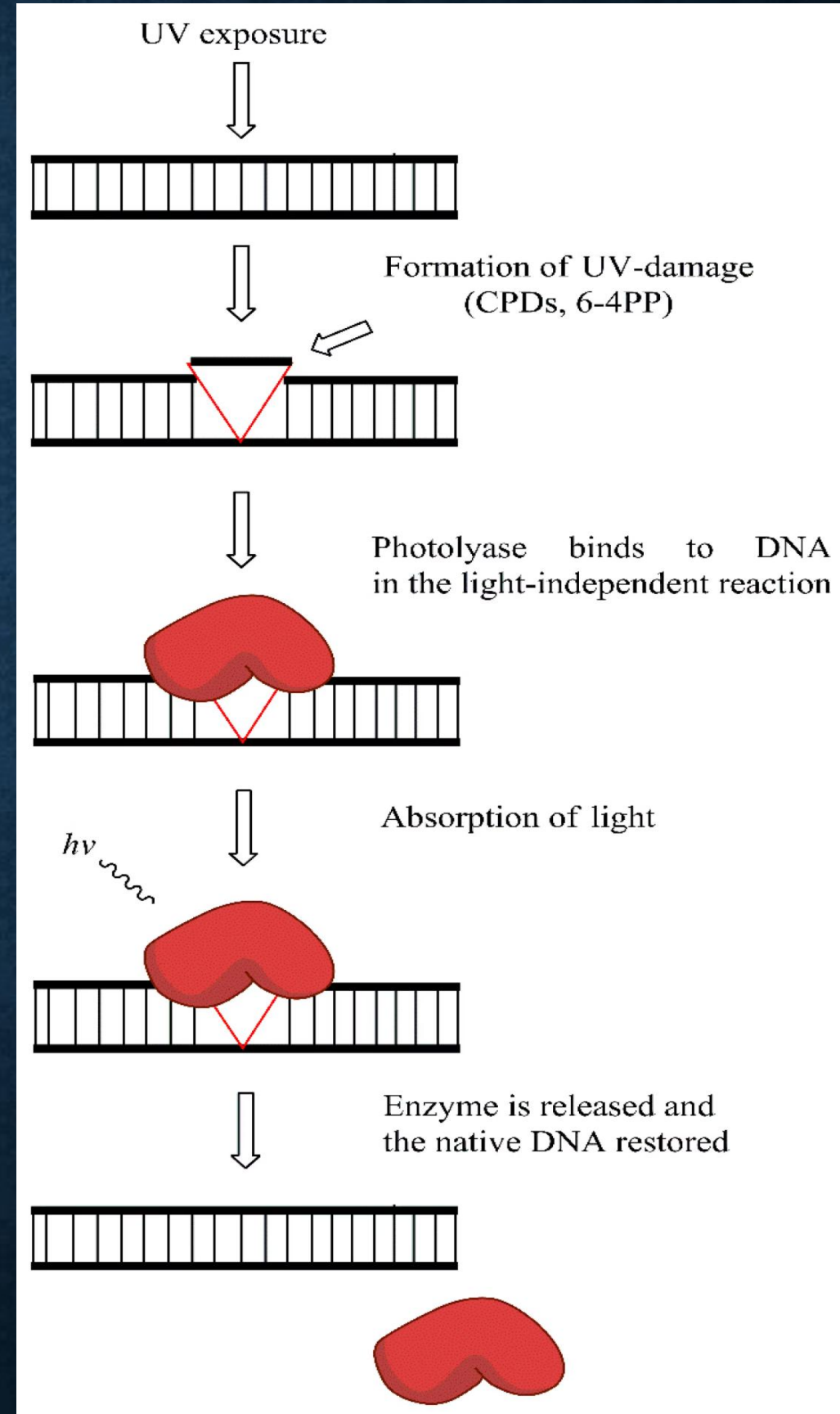
* آنالوگ‌های باز

- عوامل دآمین‌کننده مانند
نیتروز آمین (دآمیناسیون سیتوزین به یوراسیل)



تشعشعات

- پرتو فرابنفش (UV): ایجاد دایمرهای پیریمیدینی
- اشعه ایکس

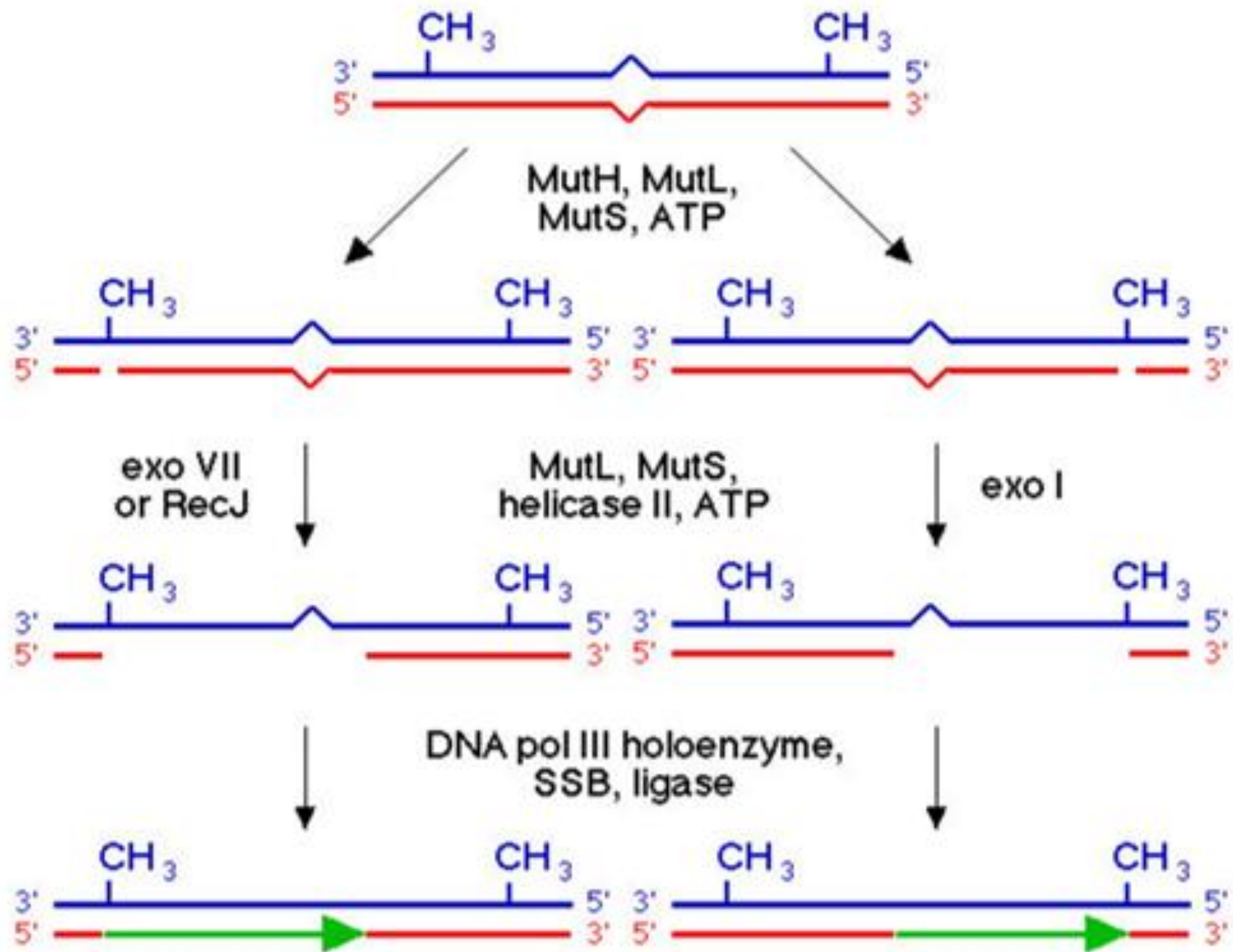


سلول‌ها برای حفظ تمامیت ژنوم خود دارای سیستم‌های ترمیمی پیچیده‌ای هستند که خطاها و آسیب‌های DNA را شناسایی و تصحیح می‌کنند.

۱

ترمیم عدم تطابق (Mismatch Repair)

خطاهای پنهان مانده از DNA پلیمراز را تصحیح می‌کند.
نقص در این سیستم با **سرطان ارثی روده بزرگ غیرپولیپی** مرتبط است.



مکانیسم‌های ترمیم DNA

سلول‌ها برای حفظ تمامیت ژنوم خود دارای سیستم‌های ترمیمی پیچیده‌ای هستند که خطاها و آسیب‌های DNA را شناسایی و تصحیح می‌کنند.

۱

ترمیم عدم تطابق (Mismatch Repair)

خطاهای پنهان مانده از DNA پلیمراز را تصحیح می‌کند. نقص در این سیستم با **سرطان ارثی روده بزرگ غیرپولیپی** مرتبط است.

۳

ترمیم با برداشتن نوکلئوتید (NER)

آسیب‌های بزرگ مانند دایمرهای تیمین را ترمیم می‌کند. نقص در این سیستم باعث بیماری **گزودرما پیگمنتوزوم** می‌شود.

۲

ترمیم با برداشتن باز (BER)

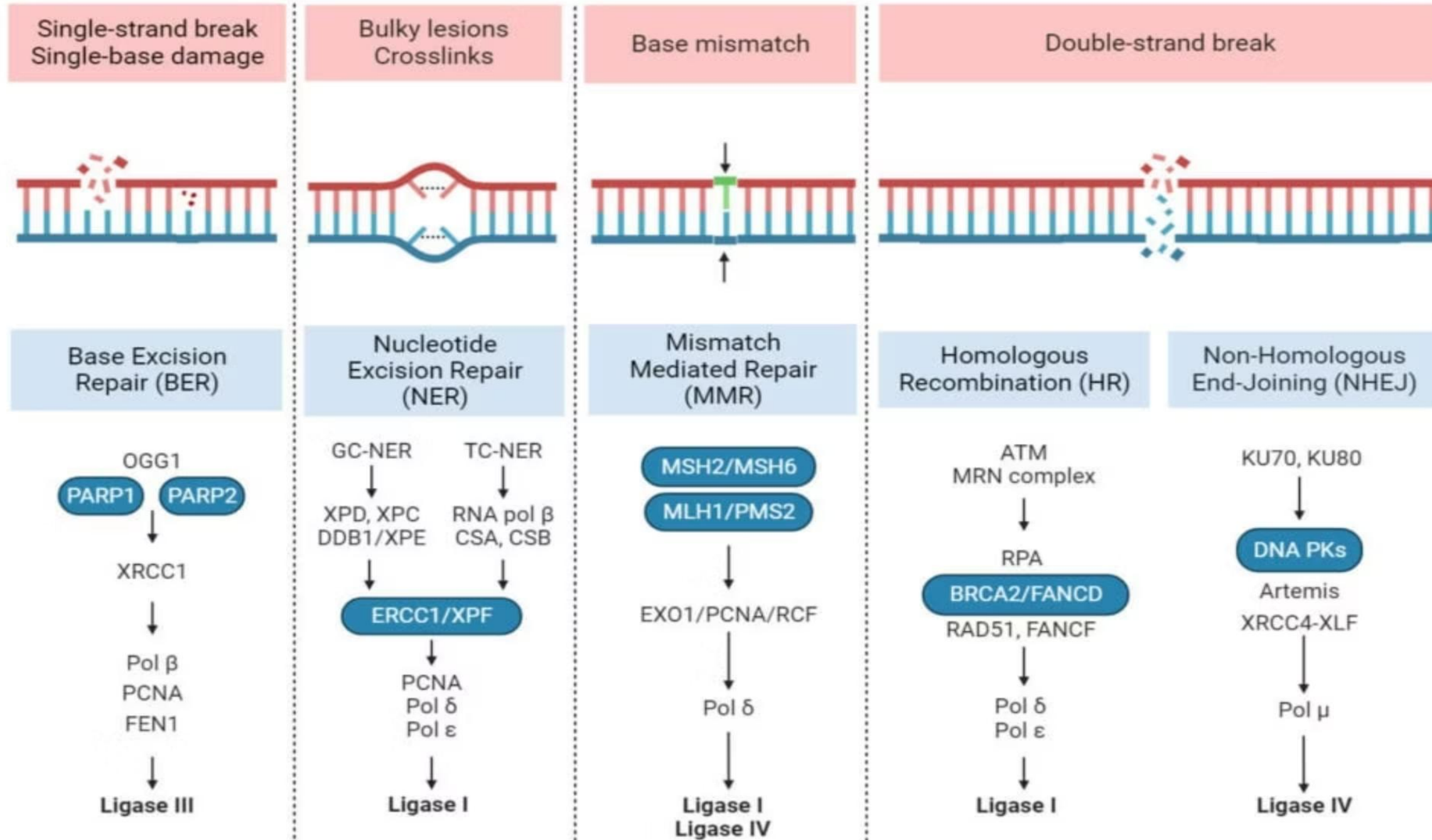
بازهای آسیب‌دیده را توسط **DNA گلیکوزیلاز** حذف می‌کند. سپس DNA پلیمراز و لیگاز جای خالی را ترمیم می‌کنند.

۴

ترمیم شکست دو رشته‌ای

شکستگی‌های خطرناک در هر دو رشته را از طریق اتصال انتهاهای غیرهمولوگ (NHEJ) یا نوترکیبی همولوگ (HR) ترمیم می‌کند.

DNA Repair Mechanisms



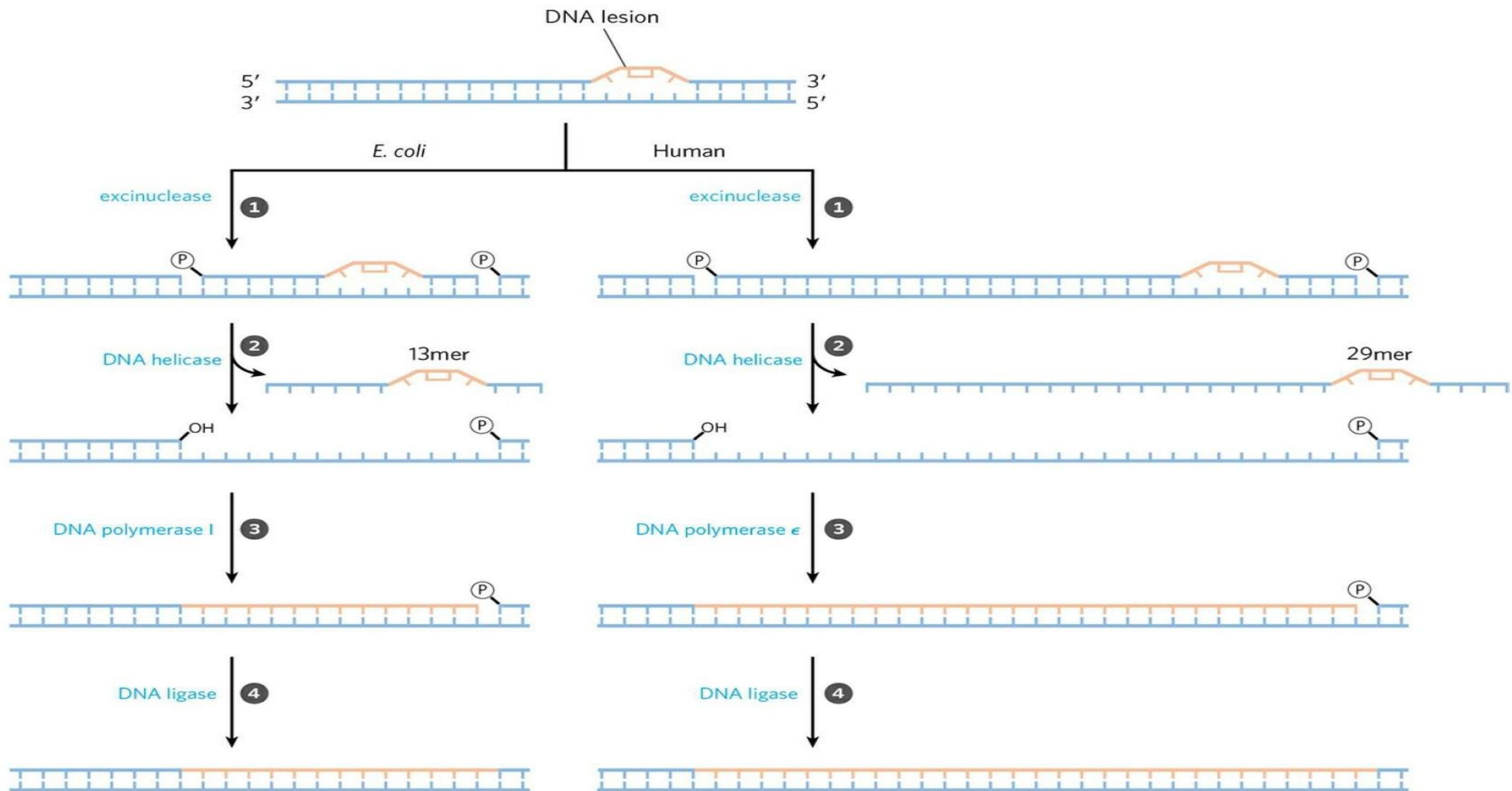


FIGURE 25-25 Nucleotide-excision repair in *E. coli* and humans.

ترمیم دایمرهای تیمین

در باکتری E.coli

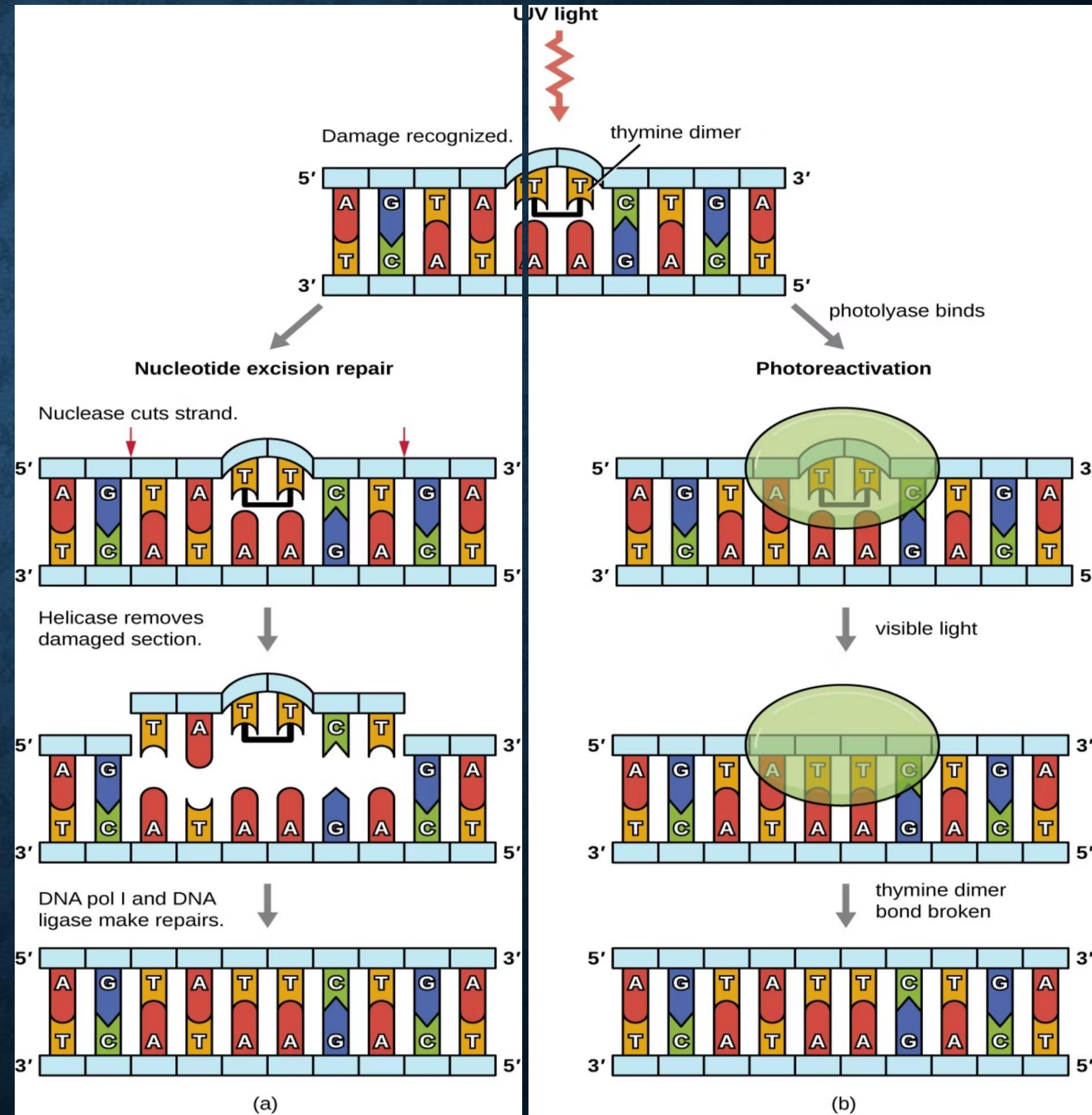
آنزیم **فتولياز** با استفاده از نور مرئی و کوفاکتور FAD،
دایمرهای تیمین-تیمین را مستقیماً ترمیم می‌کند.

در انسان

سیستم NER، مسئولیت ترمیم را بر عهده دارد:

اندونوکلازها ناحیه آسیب‌دیده را می‌برند،

سپس DNA پلیمراز و لیگاز جای خالی را پر می‌کنند.



عوامل مؤثر بر همانندسازی DNA

آنتی متابولیت‌ها

مهار آنزیم‌های کلیدی در سنتز نوکلئوتیدها. مثال‌ها: آلپورینول، ۵-فلوروئوراسیل، متوترکسات

آنالوگ‌های بازی

ترکیبات شبیه به بازهای استاندارد که به اشتباه در DNA قرار می‌گیرند. مثال‌ها: ۵-بروموئوراسیل، ۲-آمینوپورین، آزاسرین که منجر به جهش‌های هم‌جنس می‌شوند.

عوامل آلکیل‌کننده

افزودن گروه‌های آلکیل به بازهای DNA که در جفت‌شدن بازها اختلال ایجاد می‌کند.

عوامل میانجی

مولکول‌های حلقوی مسطح که بین جفت‌بازها قرار می‌گیرند و باعث جهش تغییر چارچوب می‌شوند. مثال: اکتینومايسين D

مهارکننده‌های تقسیم

کلشی‌سین: جلوگیری از تشکیل رشته‌های دوک و مانع تقسیم سلولی صحیح

آنزیم‌های نوکلئاز

نوکلئازها آنزیم‌هایی هستند که **پیوندهای فسفودی استری** در زنجیره اسیدهای نوکلئیک را می‌شکنند و بر اساس نحوه عملکرد به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند.

اندونوکلئازها

پیوندها را در **نقاط داخلی زنجیره** می‌شکنند
DNase I و DNase II غیراختصاصی هستند.
اندونوکلئازهای محدودکننده توالی‌های خاص را
شناسایی و برش می‌دهند.

— ابزار بنیادین مهندسی ژنتیک

اگزونوکلئازها

نوکلئوتیدها را از **انتهای آزاد زنجیره** (۵' یا ۳')
به صورت تک به تک جدا می‌کنند.
در جهت ۵' به ۳' یا ۳' به ۵' فعالیت می‌کنند و در
ویرایش DNA نقش حیاتی دارند.

شاد و پیروز باشید...