سه نوع DNA پلیمراز در سلول کلی‌باسیل وجود دارند

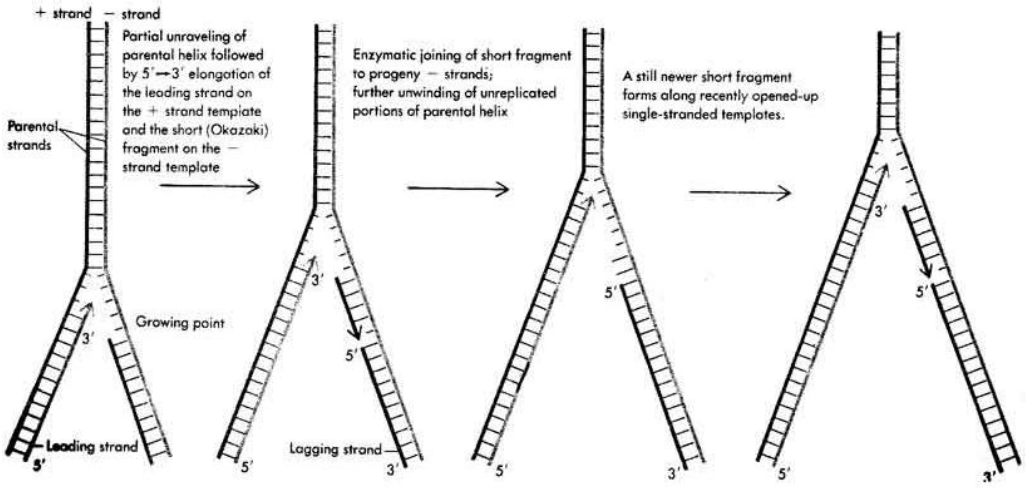
ترتیب شرکت آنزیم‌هایی که در همانندسازی DNA عمل می‌کنند پیچیده‌تر از آن بود که در ابتدا با مطالعه DNA پلیمراز اولیه (حال به DNA پلیمراز I موسوم است) تصور می‌شد. حداقل سه نوع آنزیم DNA پلیمراز در سلول کلی‌باسیل یافت می‌شود که دو تای آن نقش بارزی در همانندسازی DNA ایفا می‌کنند (جدول).

جدول : خصوصیات DNA پلیمراز I, II, III سلول کلی‌باسیل

	Pol I	Pol II	Pol III
عمل			
پلیمرازی ۳َ ⟵ ۵َ	+	+	+
اگزونوکلئازی ۵َ ⟵ ۳َ	+	+	+
اگزونوکلئازی ۳َ ⟵ ۵َ	+	−	⊕
سنتز پلیمر بدون پیش‌ساز (عدم نیاز به پرایمر)	−	−	−
اطلاعات عمومی			
وزن ملکولی (کیلو دالتون)	۱۰۹	۱۲۰	۱۴۰
تعداد تقریبی در هر سلول	۴۰۰		۱۰ − ۲۰
سرعت سنتز* [۱]	۱	۰/۰۵	۱۵
ژن ساختمانی مربوط	pol A	pol B	dna E,N,Z
وجود جهش یافته کشنده	بلی	خیر	بلی

زمانی تصور می‌شد که آنزیم DNA پلیمراز I یکی از آنزیم‌های اصلی در تولید پلی‌دزاکسی ریبونوکلئوتیدها است. اما امروزه می‌دانیم که این عمل را عمدتاً آنزیم DNA پلیمراز III انجام می‌دهد و

DNA پلیمراز I اغلب برای پرکردن فضاهای خالی بین قطعات اوکازاکی در رشته پیرو بکار گرفته می‌شود (شکل).



طبق فرضیه، گفته می‌شود که رشته‌های پیرو دختر در اثر اتصال قطعات کوچک بوجود می‌آیند و سنتز در هر یک از قطعات در جهت $5' \rightarrow 3'$ پیش می‌رود.

نقش اصلی آنزیم DNA پلیمراز II هنوز مشخص نشده است چرا که سلول‌های حاوی ژن جهش‌یافته آنزیم فوق، ظاهراً بدون هیچ اشکالی به حیات خویش ادامه می‌دهند، بنابراین مشخص کردن عمل DNA پلیمراز II دشوار است.

تصحیح اشتباهات با خاصیت اگزونوکلئازی $3' \rightarrow 5'$

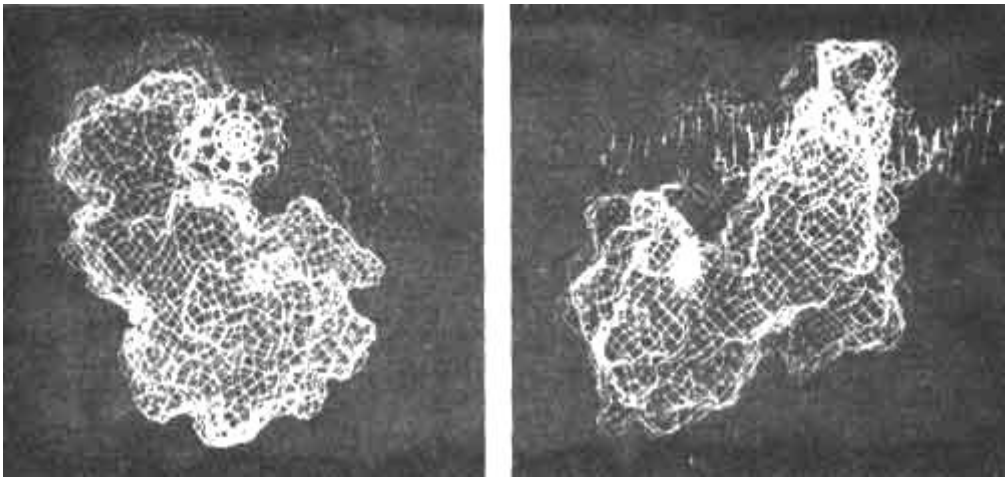
پس از تخلیص سه آنزیم DNA پلیمراز نشان داده شد که هر یک از آنها دارای فعالیت اگزونوکلئازی $3' \rightarrow 5'$ نیز هستند. وجود چنین فعالیتی نشانگر آن است که آنزیم‌های فوق قادراند که انتهای پلی‌نوکلئوتید را قطع یا اضافه کنند، به هر حال در حضور مقدار متوسط از سوبسترا (دزاکسی ریبونوکلئوزیدهای تری‌فسفاته) فعالیت سنتزی (خاصیت پلیمرازی) بیش از فعالیت اگزونوکلئازی است. سئوالی که مطرح می‌شود این است که چرا فعالیت اگزونوکلئازی و پلیمرازی هر دو در یک رشته پلی‌پپتیدی قرار دارد؟ ابتدا وجود فعالیت تخریب کننده (اگزونوکلئازی) بی‌معنی به نظر می‌رسید ولی بعدها اهمیت آن مشخص شد. فعالیت اگزونوکلئازی متوجه نقاطی از DNA در همانندسازی می‌شود که جفت بازهای ناجور (غلط) حضور داشته باشند. اگر به طور اشتباه یک باز ناجور (غیرمکمل) به انتهای $3' - OH$ زنجیره متصل شود آنزیم اگزونوکلئاز نوکلئوتید فوق را قبل از قرار گرفتن نوکلئوتید بعدی بر می‌دارد. بنابراین فعالیت اگزونوکلئازی $3' \rightarrow 5'$ باعث افزایش صحت بیشتر همانندسازی در مقایسه با شرایطی که فقط فعالیت پلیمرازی حضور می‌داشت می‌شود.

از آنجا که نیاز مبرمی به دوباره خوانی زنجیره ساخته شده وجود دارد، نوکلئوتیدها هیچ‌گاه به انتهای $5'$ اضافه نمی‌شوند چرا که اگر نوکلئوتیدی به انتهای $5'$اضافه شود، با توجه به آنکه گروه پرانرژی تری‌فسفات نیز در این انتها قرار خواهد گرفت، شرایط برای طویل شدن از انتهای $5'$ (به خاطر وجود گروه تری‌فسفات) مساعد خواهد شد. ولی در این شرایط در صورت وجود اشتباه، برداشتن نوکلئوتید از انتهای $5'$سبب باقیمانده یک نوکلئوتید $- 5' -$ منوفسفات می‌شود که از لحاظ انرژی شرایط مساعدی

برای ادامه کار آنزیم DNA پلیمراز ندارد. ممکن است تصور شود که در صورت وجود عمل شبه‌لیگاز، نوکلئوتید بعدی بتواند به انتهای $5'$اضافه شود ولی در این صورت عمل همانندسازی بسیار کند می‌شد. بنابراین هیچ یک از پلیمرزاها قادر به سنتز در جهت $3' \rightarrow 5'$ نمی‌باشند.

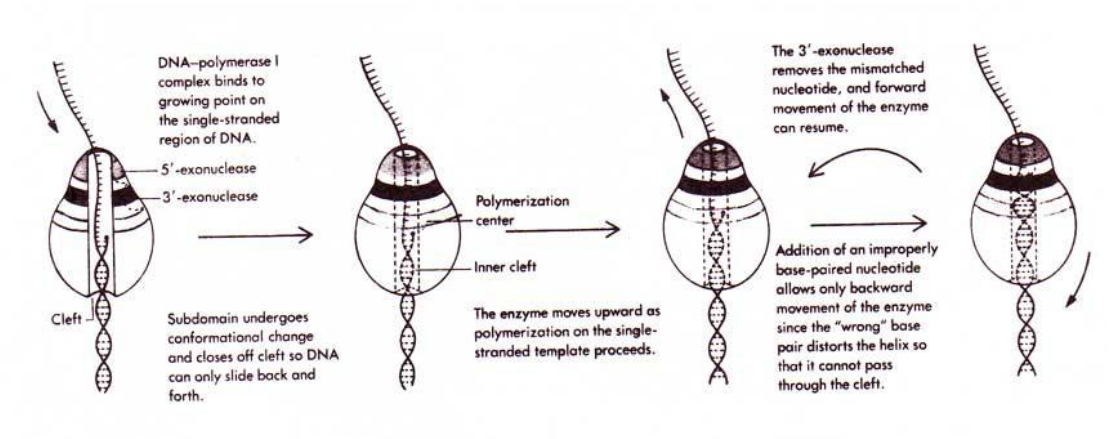
آنزیم DNA پلیمراز عمل خویش را بطور متوالی انجام می‌دهد

شروع کار DNA پلیمراز مستلزم اتصال آن به DNAاست و این اتصال در طول همانندسازی ادامه می‌یابد تا آنکه علامت خاصی سبب جدا شدن آن از DNA شود. این موضوع با مطالعه دقیق ساختمان سه بعدی آنزیم‌های فوق مشخص شد. برای مطالعه ساختمان آنزیم، لازم است که مقدار زیادی آنزیم با درجه خلوص بالا وجود داشته باشد. امروزه با ابداع روش نوترکیبی DNA این مهم امکان‌پذیر شده است. بدین ترتیب که ژن مورد نظر را به ناحیه کنترلی بخصوصی که بیان بسیار زیاد یک ژن را امکان‌پذیر می‌نماید متصل می‌کنند در نتیجه مقدار زیادی آنزیم خالص تولید می‌شود. اولین آنزیمی که بدین ترتیب تولید شد و مورد مطالعه قرار گرفت قطعه‌ای از انتهای کربوکسیل آنزیم DNA پلیمراز I بود که به قطعه کلنو معروف است. قطعه فوق دارای فعالیت DNA پلیمرازی و اگزونوکلئازی $3' \rightarrow 5'$ است که کار دوباره خوانی و برداشتن نوکلئوتیدهای ناجور را بعهده دارد. قطعه فوق دو منطقه بارز دارد: منطقه بزرگتر دارای حفره‌ای می‌باشد که قطر آن ۲۰ آنگستروم است وبار کلی مثبت دارد و به DNA متصل می‌شود (شکل).



اتصال مولکول DNA به قطعه کلنو (قسمتی از آنزیم DNA پلیمراز I). نحوه اتصال از بالا (تصویر چپ) و از پهلو (تصویر راست) نشان داده شده است.

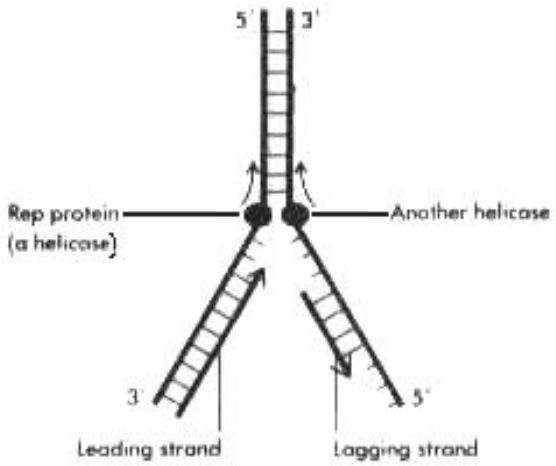
در حالی که منطقه کوچکتر ناحیه‌ای برای اتصال نوکلئوتیدها دارد. ناحیه دیگری در قطعه کلنو وجود دارد که بعد از وصل شدن DNA به حفره بزرگ مسدود می‌شود. با قرار گرفتن صحیح DNA، این مولکول تنها می‌تواند به طرف جلو یا عقب در حفره حرکت کند. در هنگام همانندسازی چنانچه یک نوکلئوتید ناجور به زنجیره متصل شود برآمدگی در مارپیچ مضاعف DNA بوجود می‌آید در نتیجه حرکت DNA در حفره بزرگ (که قطر نیمه‌جامد آن ۲۰ آنگستروم است) را دشوار می‌سازد. در چنین شرایطی مولکول DNA چاره‌ای جز حرکت در جهت عقب را ندارد و با چنین حرکتی نوکلئوتید ناجور در تماس با منطقه اگزونوکلئاز $3' \rightarrow 5'$ قرار می‌گیرد و بدین ترتیب آنزیم فوق نوکلئوتید ناجور را از انتهای زنجیره قطع می‌کند (شکل).



تصویری شماتیک از نحوه دوباره‌خوانی زنجیره پلی‌نوکلئوتیدی بعد از اتصال یک نوکلئوتید ناجور.

آنزیم‌های هلیکاز مارپیچ مضاعف را در ناحیه چنگال همانندسازی باز می‌کنند

دو زنجیره مولکول DNA در محل چنگال همانندسازی به اندازه کافی از یکدیگر جدا نمی‌شوند، تا عمل همانندسازی DNA با سرعت کافی انجام گردد. به منظور جدا شدن زنجیره‌های فوق، سلول از پروتئین‌هایی به نام هلیکاز استفاده می‌کند. هلیکاز به ATP و مولکول تک‌رشته‌ای DNA متصل می‌شود و بدین وسیله با استفاده از انرژی ATP بتدریج در طول رشته DNA حرکت کرده و دو زنجیره DNA را از یکدیگر جدا می‌کند. هلیکاز II و یا III به زنجیره‌ای که از روی آن رشته پیرو ساخته می‌شود متصل شده، در جهت $5' \rightarrow 3'$ حرکت می‌کند. به رشته رهبر، هلیکاز دیگری (rep) متصل می‌گردد و جهت حرکت آن $3' \rightarrow 5'$ می‌باشد (شکل).



هلیکازها باعث بازشدن مارپیچ مضاعف در جلو چنگال همانندسازی می‌شوند. پروتئین rep (یک نوع هلیکاز) در یک زنجیره به سمت $3' \to 5'$ حرکت می‌کند، در حالی که هلیکاز دیگر (مثل هلیکاز II یا III) بر روی رشته مکمل در جهت $5' \to 3'$ حرکت می‌نماید.

تبدیل ATP به ADP به نحو نامعلومی تغییرات سه بعدی در مولکول هلیکاز ایجاد می کند کـه تنها در یک جهت بر روی رشته‌های DNA ایی که به آنها متصل شده است می‌تواند حرکت کند.