การจำลองดีเอ็นเอและโครโมโซม

(The Replication of DNA and Chromosomes)

หัวข้อย่อย

1. ลักษณะพื้นฐานสำคัญของการจำลองดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต
2. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอและเอนไซม์ DNA Polymerase
3. องค์ประกอบร่วมในการจำลองดีเอ็นเอ
4. ลักษณะพิเศษของการจำลองโครโมโซมในยูแคริโอต

ลักษณะพื้นฐานสำคัญของการจำลองดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต

ในมนุษย์การสังเคราะห์สายใหม่ของดีเอ็นเอเกิดขึ้นในอัตราเร็วประมาณ 3000 นิวคลีโอไทด์ต่อนาที ส่วนในแบคทีเรียเกิดขึ้นประมาณ 30000 นิวคลีโอไทด์ต่อนาที เห็นได้ว่ากลไกของเซลล์ในการจำลองดีเอ็นเอจะต้องทำงานอย่างรวดเร็ว แต่ที่สำคัญจะต้องมีความถูกต้องแม่นยำ ซึ่งจริงๆ แล้วทุกๆ หนึ่งพันล้าน นิวคลีโอไทด์ที่เติมเข้าไปในสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่ จะมีความผิดพลาดเกิดขึ้นหนึ่งครั้งแต่ก็จะมีการแก้ไขเกิดขึ้นทันที กุญแจสำคัญของความรวดเร็วและถูกต้องนั้น ปัจจุบันเป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วแต่ก็ยังคงเหลือรายละเอียดในระดับโมเลกุลให้ได้ศึกษาค้นหาคำตอบกันต่อไป

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคล้ายกับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีนคือ ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน

1. เริ่มต้นสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ
2. การสังเคราะห์ต่อเนื่องจากจุดเริ่มต้น
3. การหยุดการสังเคราะห์

การจำลองดีเอ็นเอแบบกึ่งอนุรักษ์ (semiconservative replication)

หลังจากที่ Watson กับ Crick ได้นำเสนอรูปร่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยเบสคู่สม พวกเขาก็รู้ได้ทันทีเลยว่าการจับกันของเบสคู่สมแบบจำเพาะนี้เองที่เป็นพื้นฐานให้กับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ เมื่อสายของดีเอ็นเอถูกแยกออกเป็นสายเดี่ยวโดยการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสคู่สม แต่ละสายก็จะทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่คู่กัน โดยอาศัยการจับกันแบบจำเพาะของเบสเป็นตัวกำหนดชนิดของเบสที่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ เช่น สายแม่แบบที่มีเบส Adenine ก็จะทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์สายใหม่อาศัยการจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนโดยเติม Thymine เข้าไปในสายดีเอ็นเอที่กำลังสังเคราะห์ใหม่ เรียกการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแบบนี้ว่า การสังเคราะห์แบบกึ่งอนุรักษ์ (semiconservative replication) เพราะเนื่องจากว่าสายดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะประกอบไปด้วยดีเอ็นเอสายเก่าหนึ่งสายจับกับดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่อีกหนึ่งสาย (รูปที่ 1)

Matthew Meselson และ Franklin Stahlแสดงให้เห็นถึงการจำลองดีเอ็นเอเป็นแบบกึ่งอนุรักษ์ในแบคทีเรีย *E.coli* โดยอาศัยสารไนโตรเจนกัมมันตรังสีที่มีน้ำหนักต่างกันคือ ^{15}N และ ^{14}N ซึ่งมีน้ำหนักเบากว่า โดยดูการเปลี่ยนแปลงของความหนาแน่นของดีเอ็นเอขณะที่มีการจำลองดีเอ็นเออาศัยการปั่นเหวี่ยงในสารที่มีความหนาแน่นลดหลั่นกัน ซึ่งปัจจุบันนี้วิธีการดังกล่าวยังสามารถใช้ในการแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการศึกษาโครงสร้างและการจำลองดีเอ็นเอ หลังจากการทดลองดังกล่าวพบว่าในจุลินทรีย์หลายชนิดมีการจำลองดีเอ็นเอแบบกึ่งอนุรักษ์เช่นกัน

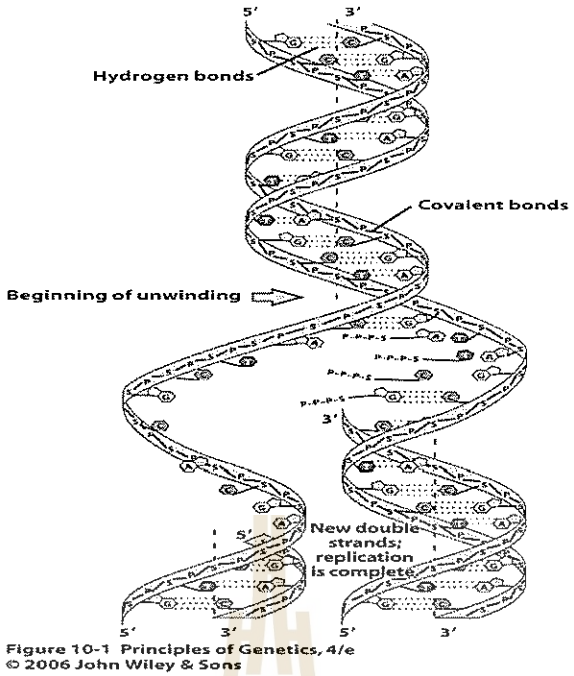
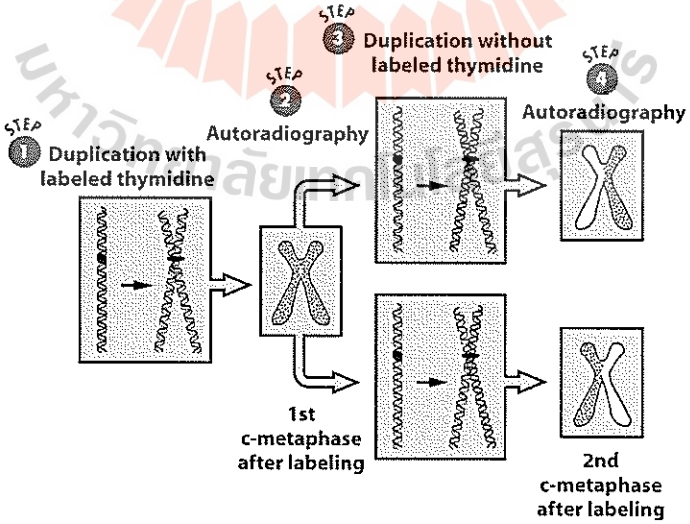


Figure 10-1 Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons

รูปที่ 1. แสดงการจำลองดีเอ็นเอแบบกึ่งอนุรักษ์

ในปี ค.ศ. 1957 J. Herbert Taylor, Philip Woods และ Walter Hughes แสดงให้เห็นถึงการจำลองดีเอ็นเอในยูแคริโอตเป็นแบบ กึ่งอนุรักษ์ เป็นครั้งแรก (รูปที่ 2) โดยคณะวิจัยได้ทำการศึกษาในรากที่กำลังงอกของถั่วชนิดหนึ่งอาศัยสารกัมมันตรังสี ^{3}H-thymidine เป็นตัวติดตามดีเอ็นเอ เขาปล่อยให้เซลล์ของรากถั่วให้มีการแบ่งเซลล์ในอาหารที่มี ^{3}H-thymidine อยู่ หลังจากนั้นจึงย้ายรากถั่วไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารดังกล่าวแต่มีสาร alkaloid colchicines ซึ่งสารนี้จะจับกับไมโครทิวบูลทำให้ไม่เกิดการสร้างเส้นใย spindle ขึ้นจึงเป็นผลให้ไม่มีการดึงแยกของโครโมโซมในระยะ Anaphase ดังนั้นเซลล์ดังกล่าวจึงมีจำนวนโครโมโซมเป็นเท่าตัวของเซลล์ปกติด้วยวิธีการนี้เองทำให้คณะวิจัยสามารถศึกษาจำนวนครั้งของการจำลองดีเอ็นเอในแต่ละเซลล์



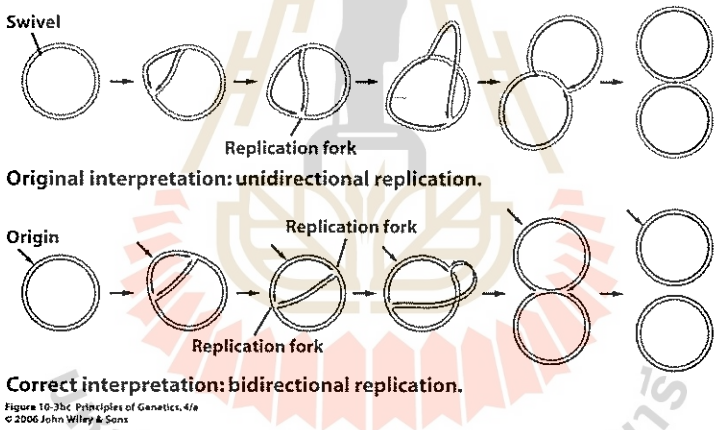
Interpretation of the autoradiographs above in terms of semiconservative replication.

Figure 10-2c Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons

รูปที่ 2. แสดงการทดลองของ Taylor และคณะพิสูจน์ว่าการจำลองดีเอ็นเอเป็นแบบกึ่งอนุรักษ์

ค.ศ. 1963 John Cairns เป็นผู้ที่แสดงให้เห็นถึงรูปร่างของโครโมโซม *E.coli* ทั้งหมดขณะที่มีการจำลองตัวเองโดยอาศัยสารกัมมันตรังสี เขาเลี้ยง *E.coli* ในอาหารที่มี ^{3}H-thymidine เป็นเวลานานแล้วทำให้เซลล์ *E.coli* แตกออกโดยไม่ทำให้โครโมโซมแตก แล้วจึงเก็บโครโมโซมบนกระดาษกรองจากนั้นติดลงบนสไลด์แก้วแล้วเคลือบด้วยน้ำยาที่ไวต่ออนุภาคชนิด β (ซึ่งถูกปลดปล่อยออกมาจาก tritium มีพลังงานต่ำ) ประกบฟิล์มวางไว้ในที่มืดเป็นเวลานานเพื่อปล่อยให้สารกัมมันตรังสีปลดปล่อยพลังงานออกมา เมื่อนำฟิล์มไปล้างพบว่าโครโมโซมของ *E.coli* ซึ่งมีรูปร่างแบบวงแหวนมีลักษณะเป็นรูป θ ขณะที่มีการจำลองโครโมโซม ภาพถ่ายจากสารกัมมันตรังสียังเผยให้เห็นว่ามีการแยกออกจากกันของสายดีเอ็นเอแม่แบบที่ปกติจับกันเป็นคู่ และการจำลองดีเอ็นเอแบบกึ่งอนุรักษ์ก็เกิดขึ้นไปพร้อม ๆกับการแยกของสายแม่แบบ เนื่องจากดีเอ็นเอที่เป็นสายคู่มีการเรียงตัวแบบหมุนเป็นเกลียว 360°C ดังนั้นการแยกเกลียวจะต้องมีการหมุนเกิดขึ้นซึ่งปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์รู้แล้วว่าการกระทำดังกล่าวอาศัยเอนไซม์ที่ชื่อ topoisomerases ที่ช่วยทำให้สายของดีเอ็นเอหนึ่งสายขาดออกชั่วคราว (ตำแหน่งพันธะ phosphodiester ของสายดีเอ็นเอสายหนึ่ง)

Cairns แปลผลภาพถ่ายจากสารกัมมันรังสีว่าการจำลองโครโมโซมแบบกึ่งอนุรักษ์ของ *E.coli* เริ่มต้นที่จุดจำเพาะที่เรียกว่า *origin* แล้วก็ดำเนินต่อจากจุดนี้ไปในทิศทางเดียวจนกระทั่งครบรอบแต่ต่อมานักวิทยาศาสตร์รุ่นหลังพบว่าแท้ที่จริงการจำลองโครโมโซมเกิดขึ้นที่จุด *origin* แล้วดำเนินต่อไปในสองทิศทาง ซึ่งถ้ามองจากจุด *origin* ออกไปทั้งสองข้างจะเห็นลักษณะเหมือนชิบที่ถูกเปิดออกมีรูปร่างเหมือนตัว Y ลักษณะเช่นนี้เรียกว่า replication fork ซึ่ง replication fork ทั้งสองจะมีการเคลื่อนที่ไปในทิศตรงกันข้าม (รูปที่ 3)



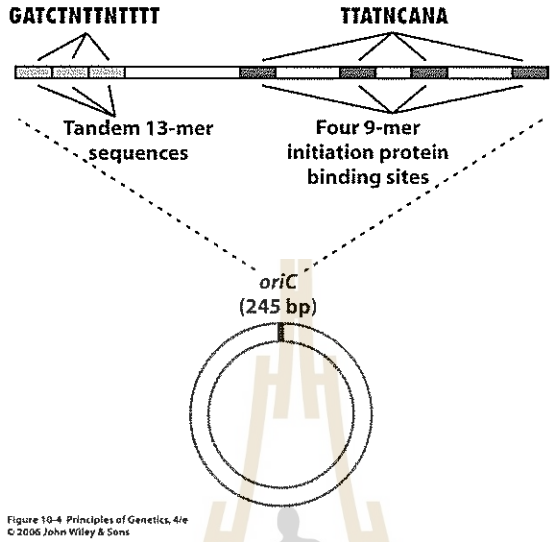
รูปที่ 3. แสดงการจำลองดีเอ็นเอแบบทิศทางเดียวและแบบสองทิศทาง

จุดเริ่มต้นของการจำลองโครโมโซม

Cairns แสดงให้เห็นว่าการจำลองโครโมโซมนั้นมีจุดเริ่มต้นหรือ origin แล้วจึงมีการจำลองโครโมโซมจนครบวง แต่จุดดังกล่าวมีความเฉพาะต่อตำแหน่งบนโครโมโซมหรือไม่ หรือว่าเป็นแบบสุ่ม คำตอบคือในแบคทีเรียและไวรัสจะมีจุด origin เพียงหนึ่งจุดต่อหนึ่งโครโมโซมและทำหน้าที่ในการควบคุมการจำลองโครโมโซมทั้งหมด ในพวกยูแคริโอตซึ่งมีโครโมโซมขนาดใหญ่จะมีจุด origin อยู่หลายจุดเพื่อควบคุมการจำลองดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ซึ่งอยู่ในแต่ละโครโมโซม ปัจจุบันมีหลักฐานชี้ชัดว่าการมีจุด origin หลายจุดในโครโมโซมพวกยูแคริโอตก็จะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะ แต่ละ origin จะควบคุมการจำลองดีเอ็นเอแต่ละหน่วยซึ่งเรียกว่า replicon ดังนั้นในพวกยูแคริโอตก็จะมีหลาย replicons

Origin เพียงตำแหน่งเดียวที่พบใน *E.coli* เรียกว่า *oriC* (รูปที่ 4) ได้มีการศึกษาโดยละเอียด ซึ่ง *oriC* นี้มีความยาว 245 คู่นิวคลีโอไทด์และมี 2 ตำแหน่งที่มีลำดับซ้ำและคงที่เสมอ ตำแหน่งแรกเป็นตำแหน่ง

ที่มีความยาว 13 เบสพบว่ามีการเรียงของ 13 เบสซ้ำกันถึง 3 ครั้งและมีเบส A:T อยู่มากซึ่งช่วยให้เกิดการแยกกันของสายดีเอ็นเอได้ง่ายขึ้นเกิดเป็นลักษณะเหมือนฟองที่พองออกของสายดีเอ็นเอ (replication bubble) ส่วนอีกองค์ประกอบหนึ่งของ *oriC* เป็นลำดับเบส 9 เบสที่มีการเรียงตัวแบบซ้ำกัน 4 ครั้งแต่มีลำดับเบสอื่นมาขั้นอยู่ภายใน โดยลำดับเบส 9 เบสที่มีการเรียงตัวแบบซ้ำกัน 4 ครั้งนี้มีความสำคัญต่อการจับของโปรตีนที่ทำให้เกิด replication bubble ขึ้น



รูปที่ 4. แสดงโครงสร้างของ *oriC* ใน *E.coli* ซึ่งมีเพียงหนึ่งตำแหน่ง

ในพวกยูแคริโอตที่มี origin หลายจุดนั้นพบว่าแต่ละจุดมีความจำเพาะต่อลำดับดีเอ็นเอ ในยีสต์มีการศึกษาในส่วนของโครโมโซมที่แยกออกไปจากโครโมโซมปกติแต่เป็นโครโมโซมที่เป็นแบบวงแหวนและมีการจำลองตัวเองโดยมีตำแหน่งบนโครโมโซมที่เป็นตัวควบคุมเรียก ARS (Autonomously Replicating Sequences) elements ซึ่งพบว่าจำนวน ARS ที่พบจะสอดคล้องกับจำนวน origin ที่พบและมีการทดลองที่แสดงให้เห็นว่า ARS ทำหน้าที่เป็น origin

ARS element มีความยาวประมาณ 50 คู่เบสโดยมีส่วนที่เป็นแกนอยู่ 11 เบสที่มี A:T อยู่มากถ้าภายใน 11 เบสนี้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเบสชนิดอื่นมันจะกระทบต่อการทำหน้าที่ของ ARS ในการเป็น origin

ATTTATPuTTTA

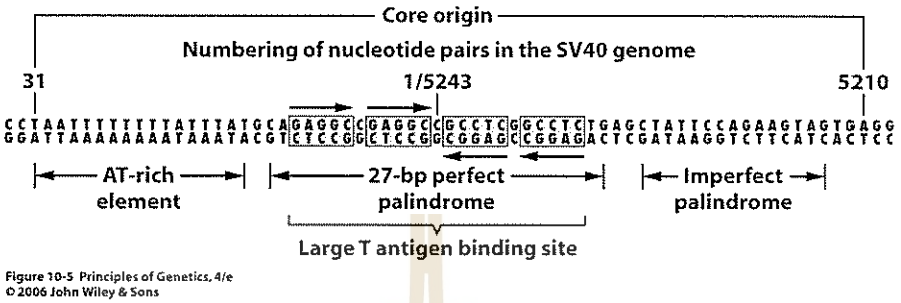
TAAATAPyAAAT

(โดย Pu เป็นเบสชนิด purines ตัวใดตัวหนึ่งส่วน Py เป็นเบสชนิด pyrimidines ตัวใดตัวหนึ่งเช่นกัน)

การศึกษาจุด origin โครโมโซมในยูแคริโอตมักไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากจุด origin ที่พบในยีสต์ไม่เหมือนในยูแคริโอตส่วนใหญ่และจุดเริ่มต้นของการจำลองโครโมโซมเกิดแบบสุ่มหรือเกิดหลายตำแหน่ง เมื่อคิดทบทวนจากเหตุผลต่างๆ เชื่อว่าจุดเริ่มต้นของการจำลองโครโมโซมเกี่ยวข้องกับลำดับเบสของดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวอาจเป็นพันคู่เบส ซึ่งพบใน metazoans ทำให้ยากต่อการศึกษา

มีการศึกษาหนึ่งที่เข้าใกล้ความสำเร็จในการแสดงลักษณะของ origin ที่ทำงานในการจำลองโครโมโซมในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงนั้นก็คือ ดีเอ็นเอไวรัสที่ชื่อ simian virus 40 (SV40) โดยไวรัสชนิดนี้มีการเพิ่มจำนวนตัวมันในเซลล์ของสัตว์พวกเลี้ยงลูกด้วยน้ำนม SV40 มี genome เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่แบบวงแหวนยาว 5243 คู่นิวคลีโอไทด์ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการศึกษาการจำลองโครโมโซมในยูแคริโอต ซึ่งที่จริงแล้วรายละเอียดของการจำลองโครโมโซมของ SV40 ก็ยังไม่เป็นที่เข้าใจนัก ที่จุด origin ของมันจะมีลำดับเบสที่เป็นแกนอยู่ 64 คู่เบส (รูปที่ 5) ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเริ่มต้นในการจำลองดีเอ็นเอในเซลล์ที่ถูก infect จาก

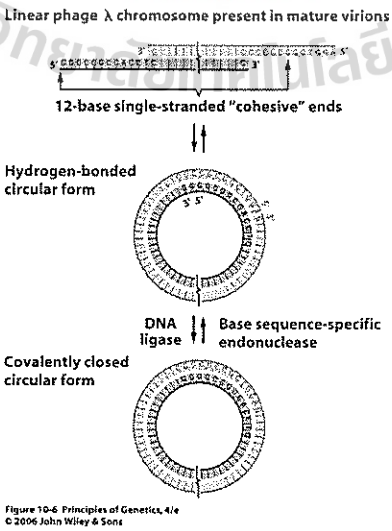
SV40 ภายในลำดับเบสที่เป็นแกนบริเวณตรงกลางจะมี 27 คู่เบสและด้านข้างทั้งสองจะประกอบด้วยเบสที่มี A:T อยู่มากและเบสอื่นๆ การจำลองดีเอ็นเอเริ่มขึ้นเมื่อมีโปรตีนที่ชื่อ T antigen ไปจับที่ตำแหน่งแกนของ origin ซึ่งมันจะช่วยโปรตีนที่มาจากเซลล์ในการคลายเกลียวดีเอ็นเอที่จุด origin ในไวรัสบางชนิดเช่น Epstein-Barr พบว่ามีจุด origin ถึง 3 จุดด้วยกันในการเริ่มการจำลองดีเอ็นเอ จุด origin หนึ่งจะใช้สำหรับการจำลองดีเอ็นเอของไวรัสเมื่ออยู่แบบ latent infection ส่วนอีก 2 จุดจะใช้ในการควบคุมการจำลองดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มจำนวนเมื่อมันอยู่แบบ lytic infection



รูปที่ 5. แสดงบริเวณลำดับเบสบริเวณแกนของจุด origin ในไวรัส SV40

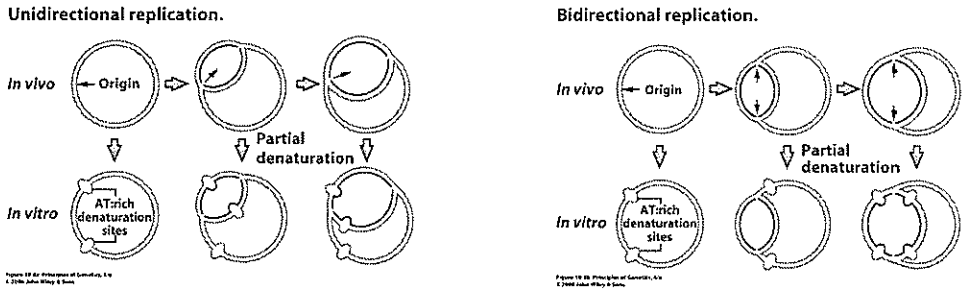
การจำลองดีเอ็นเอแบบสองทิศทาง

การศึกษาการจำลองดีเอ็นเอแบบสองทิศทางเกิดจากการศึกษาการจำลองดีเอ็นในไวรัสที่ก่อโรคกับแบคทีเรียเรียก bacteriophage ซึ่งตัวที่ใช้ศึกษาคือ bacteriophage lambda (phage λ) ซึ่งก่อโรคกับเชื้อ *E.coli* ตัวของ phage λ นั้นมีความยาวเพียง 17.5 ไมโครเมตร โครโมโซมมีความพิเศษคือ มีลักษณะเป็นดีเอ็นเอแบบเส้นตรงแต่ปลาย 5′ ทั้งสองด้านจะมีส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นสายเดี่ยวยื่นออกไปยาว 12 เบสและทั้งสองข้างของเบสนั้นเป็นเบสคู่สมกันจึงสามารถวกกลับมาจับกันได้เรียกปลายทั้งสองด้านนี้ว่า ปลายเหนียว (sticky หรือ cohesive ends) เราจะพบลักษณะของ phage λ โครโมโซมในลักษณะที่วงแหวนเมื่อ phage λ ดีเอ็นเอถูกฉีดเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน (รูปที่ 6) การเชื่อมต่อของโครโมโซมจากลักษณะเส้นตรงกลายเป็นแบบวงแหวนเกิดจากการทำงานของเอ็นไซม์ที่ชื่อ DNA ligase ซึ่งทำหน้าที่ในการเชื่อมสายของดีเอ็นเอสายเดียวที่ขาดออกจากกันภายในเกลียวของดีเอ็นเอสายคู่ เอนไซม์ DNA ligase มีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดสำหรับการจำลองดีเอ็นเอ การซ่อมแซมดีเอ็นเอและการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอต่างโมเลกุลกัน



รูปที่ 6. แสดงการเปลี่ยนรูปแบบของโครโมโซม phage λ ระหว่างแบบเส้นตรงและแบบวงแหวน

Schnos และ Inman แสดงให้เห็นว่าการจำลองดีเอ็นเอของ phage λ โครโมโซมเกิดขึ้นแบบสองทิศทาง นอกจากนี้ยังพบการจำลองดีเอ็นเอแบบสองทิศทาง (รูปที่ 7) ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ อีก เช่นใน phage T7 แต่การจำลองดีเอ็นเอแบบสองทิศทางก็ไม่ได้เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตทั่วไป เช่นใน coliphage P2 มีการจำลองโครโมโซมแบบทิศทางเดียว



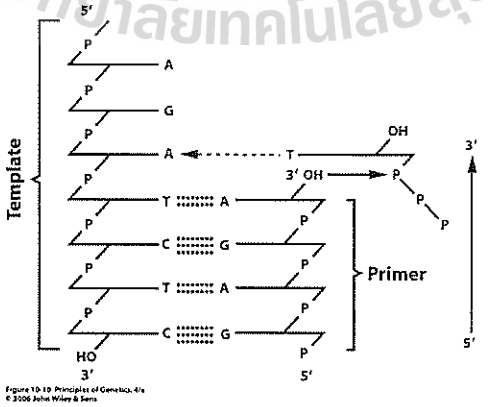
รูปที่ 7. แสดงการจำลองดีเอ็นเอแบบทิศทางเดียวและแบบสองทิศทาง

เอนไซม์ DNA polymerase และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

การศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลส่วนใหญ่ได้จากการทำให้เซลล์นั้นแตกแล้วแยกเอาออร์แกเนล โมเลกุลขนาดใหญ่ และองค์ประกอบอื่นของเซลล์ แล้วจึงค่อยนำมาประกอบกันในหลอดทดลองวิธีการนี้เรียกว่าระบบ *in vitro* ซึ่งวิธีการนี้สามารถเจาะลึกปฏิกิริยาชีวะเคมีของเซลล์ได้ง่ายกว่าระบบ *in vivo* ซึ่งแน่นอนว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้วยระบบ *in vitro* นั้นมีคุณค่า แต่อย่างไรก็ตามเราไม่ควรด่วนสรุปว่าเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในระบบ *in vitro* นั้นจะต้องเกิดในระบบ *in vivo* ด้วย

การค้นพบ DNA polymerase I ใน *Escherichia coli*

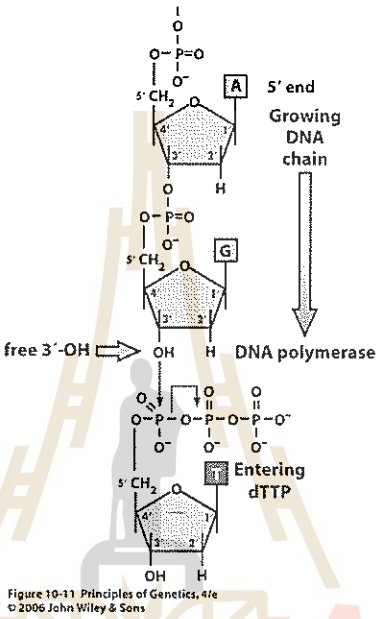
การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองบรรลุผลสำเร็จเป็นครั้งแรกโดย Arthur Kornbers และคณะในปี ค.ศ. 1957 Kornbers ได้รับรางวัล Nobel ในปี ค.ศ. 1959 จากงานที่ทำนี้คือการแยกเอาเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์เข้าไปในสายของดีเอ็นเอที่มีอยู่ก่อน ตอนแรกเรียกเอนไซม์นี้ว่า Kornberg's enzyme แต่ปัจจุบันรู้จักกันในชื่อ DNA polymerase I โดยเอนไซม์นี้จะทำงานก็ต่อเมื่อมีดีเอ็นเออยู่ก่อนทำหน้าที่เป็นแม่แบบ และ primer นอกจากนี้มันต้องการ 5′-triphosphates ของ deoxyribonucleoside ทั้ง 4 ชนิด โดยเอ็นไซม์จะทำงานในสภาวะที่มี Mg^{2+} อยู่ (รูปที่ 8)



รูปที่ 8. แสดงความจำเป็นของดีเอ็นเอที่เป็นแม่แบบกับ primers ขณะมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

1. Primer DNA ทำหน้าที่ให้ 3′-OH ว่างไว้เพื่อให้นิวคลีโอไทด์ตัวใหม่เข้ามาเชื่อมต่อได้ DNA polymerase I ไม่สามารถเริ่มการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยตัวมันเองได้ ซึ่งแน่นอนว่ามันจะต้องอาศัยดีเอ็นเอที่มีอยู่ก่อนและมี 3′-OH ว่างไว้เพื่อที่เอนไซม์จะได้สร้างพันธะ phosphodiester ระหว่าง 3′-OH ที่อยู่ที่ปลายของสายดีเอ็นเอที่เป็น primer กับ 5′-phosphate ของ deoxyribonucleotide ที่เข้าไปใหม่ (รูปที่ 9)

2. Template DNA ทำหน้าที่เป็นแม่แบบให้กับสายดีเอ็นเอที่กำลังสังเคราะห์ใหม่โดยอาศัยเบสคู่สม โดยเอนไซม์ DNA polymerase I จะอาศัยแม่แบบเป็นตัวกำหนดเบสตัวใหม่ที่จะเติมเข้าไปในสายของดีเอ็นเอที่กำลังสังเคราะห์อยู่ ปฏิกิริยาของ DNA polymerase I เป็นแบบ nucleophilic attack โดยการสังเคราะห์นั้นจะเกิดขึ้นในทิศ 5′ ไป 3′ เสมอ



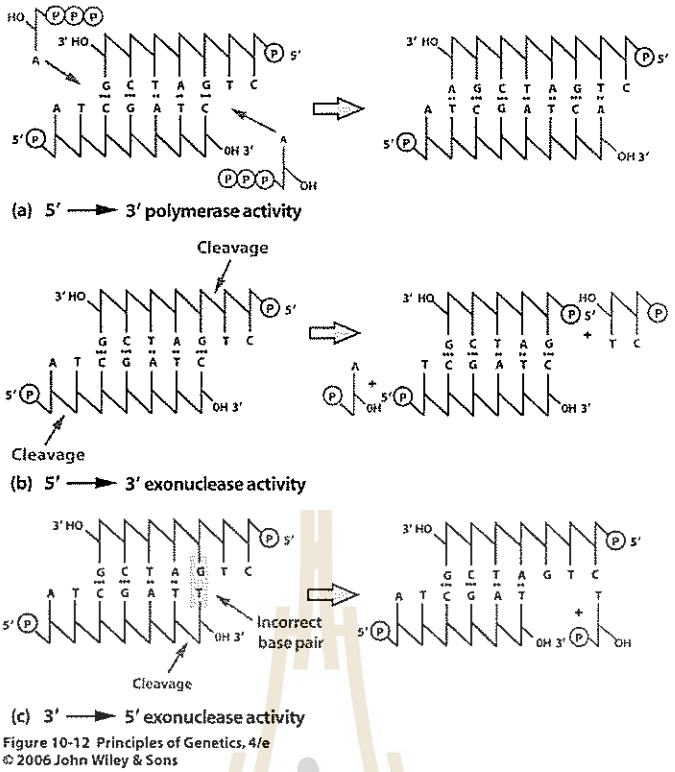
รูปที่ 9. แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase I ใน E.coli

เอนไซม์ DNA polymerase I เป็นโพลีเปปไทด์สายเดียวถูกสร้างขึ้นจากยีนที่ชื่อว่า *polA* จากการวิจัยต่อมาพบว่าเอนไซม์นี้ไม่ใช่เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการจำลองดีเอ็นเอใน *E.coli* แบบกึ่งอนุรักษ์แต่เป็นการทำหน้าที่ของเอนไซม์ตัวอื่น ถึงแม้จะเป็นเช่นนั้นก็ตามแต่ถ้าว่า DNA polymerase I ได้ทำหน้าที่สำคัญใน *E.coli* คือเป็นกุญแจสำคัญในการจำลองโครโมโซมและเป็นหัวใจสำคัญในการซ่อมดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย

นอกเหนือไปจากหน้าที่ในการเติมนิวคลีโอไทด์ที่ทราบกันแล้ว DNA polymerase I ยังมีอีก 2 หน้าที่เป็น nuclease ซึ่งสามารถย่อยกรดนิวคลิอิกได้ หน้าที่แรกเป็น exonuclease คือย่อยกรดนิวคลิอิกจากปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้าน ในขณะที่ endonuclease จะย่อยกรดนิวคลิอิกจากด้านใน ซึ่ง DNA polymerase I มีคุณสมบัติของ 5′ ไป 3′ exonuclease activity โดยจะย่อยกรดนิวคลิอิกจากปลาย 5′ เข้าไปหา 3′ นอกจากนี้มันยังมีคุณสมบัติของ 3′ ไป 5′ exonuclease activity โดยจะย่อยกรดนิวคลิอิกจากปลาย 3′ เข้าไปหา 5′ สรุปก็คือ

DNA polymerase I มี 3 หน้าที่ดังนี้ (รูปที่ 10)

1. 5′ ไป 3′ polymerase activity
2. 5′ ไป 3′ exonuclease activity
3. 3′ ไป 5′ exonuclease activity



รูปที่ 10. แสดงการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase I ทั้ง 3 หน้าที่ใน E.coli

DNA polymerase มีหลายชนิด

ที่จริงแล้วมี DNA polymerase อีกอย่างน้อย 4 ชนิดที่พบใน *E.coli* ได้แก่ DNA polymerase II, DNA polymerase III, DNA polymerase IV และ DNA polymerase V DNA polymerase II เหมือนกับ DNA polymerase I คือทำหน้าที่ซ่อมดีเอ็นเอแต่มันจะมีอยู่ในปริมาณที่น้อยมากในเซลล์ของ *E.coli* DNA polymerase II มีหน้าที่ 5′ไป 3′ polymerase และ 3′ ไป 5′ exonuclease แต่จะไม่มีหน้าที่ 5′ไป 3′ exonuclease

DNA polymerase III มีหน้าที่ 5′ ไป 3′ polymerase และ 3′ ไป 5′ exonuclease อย่างไรก็ดี หน้าที่ 5′ ไป 3′ exonuclease จะทำงานก็ต่อเมื่ออยู่บนดีเอ็นเอที่เป็นสายเดียว เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการศึกษาใน DNA polymerase IV, V, II พบว่ามีหน้าที่สำคัญในการจำลองดีเอ็นเอในส่วนที่เกิดความเสียหาย

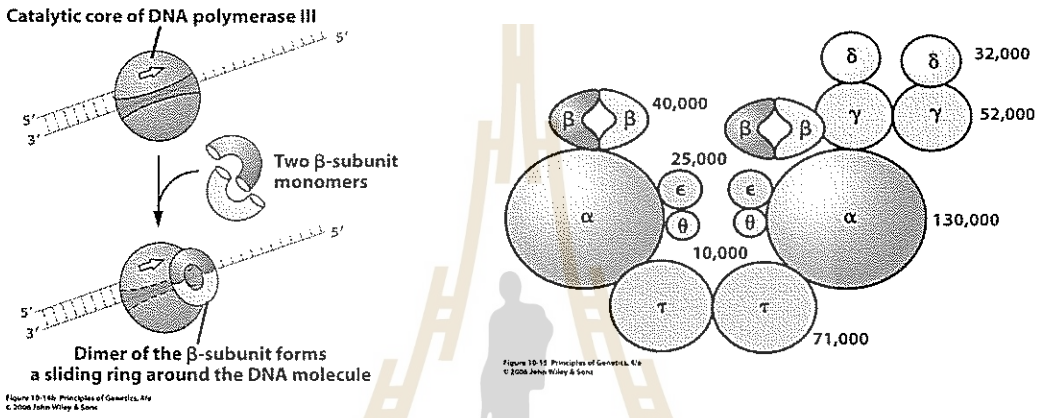
ในสิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอตยิ่งพบว่ามีความซับซ้อน ซึ่งปัจจุบันค้นพบ DNA polymerase ถึง 7 ชนิดแล้ว ในมนุษย์ได้มีการตั้งชื่อ DNA polymerase ทั้ง 7 ชนิดดังนี้คือ α, β, γ, δ, ε, ζ และ η พบว่ามี 3 หรือมากกว่า (α, δ และ/หรือ ε) ทำหน้าที่ร่วมกันในการจำลองดีเอ็นเอแบบกึ่งอนุรักษ์ในนิวเคลียส ส่วน DNA polymerase γ ทำหน้าที่จำลองดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียและ DNA polymerase β, ζ และ η ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอในนิวเคลียส DNA polymerase บางตัวพบว่าไม่มี 3′ ไป 5′ exonuclease

DNA polymerase III : เอนไซม์จำลองโครโมโซมใน *E.coli*

เหตุการณ์ที่ชี้ให้เห็นว่า DNA polymerase III เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการจำลองดีเอ็นเอแบบกึ่งอนุรักษ์ใน *E.coli* เกิดจากการศึกษาการแยกสายพันธุ์ *E.coli* ที่กลายพันธุ์ที่ยีน *polC* ซึ่งปัจจุบันเปลี่ยนเป็นยีน *dnaE* สายพันธุ์นี้จะสร้าง DNA polymerase III เมื่อมันเจริญที่อุณหภูมิ 25°C แต่จะไม่มีการสร้าง DNA polymerase III เมื่อมันเจริญที่ 43°C เมื่อเซลล์ที่มียีน *dnaE* ที่กลายพันธุ์เจริญที่อุณหภูมิ 25°C แล้วเปลี่ยนให้

ไปเจริญที่ 43°C การจำลองดีเอ็นเอจะหยุด ชี้ให้เห็นว่าผลผลิตจากยีน *dnaE* มีความจำเป็นต่อการจำลองดีเอ็นเอ ต่อมาจึงรู้ว่า ยีน *dnaE* แปลรหัสออกมาจะได้เป็นส่วน α หน่วยย่อยของ DNA polymerase III ซึ่งมีหน้าที่ 5′ ไป 3′ polymerase

DNA polymerase III เป็นเอนไซม์ที่ประกอบจากหน่วยย่อยๆ หลายหน่วย(รูปที่ 11) สำหรับรูปแบบที่สมบรูณ์ของเอนไซม์ (holoenzyme) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 900,000 ดาวน์ตัน องค์ประกอบที่น้อยที่สุดที่ทำงานได้ของเอนไซม์ในหลอดทดลองประกอบด้วย 3 หน่วยย่อยได้แก่ α (ผลผลิตจากยีน *dnaE*) , ε (ผลผลิตจากยีน *dnaQ*), และ θ (ผลผลิตจากยีน *holE*) หน่วยย่อยเพิ่มเติมคือ τ (ผลผลิตจากยีน *dnaX*) เป็นผลให้เกิดไดเมอร์ขององค์ประกอบที่น้อยที่สุดที่ทำงานได้ของเอนไซม์และช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ ส่วนหน่วยย่อย β (ผลผลิตจากยีน *dnaN*) ของ DNA polymerase III จะจับกันเป็นไดเมอร์คล้ายปากกาจับวัตถุเพื่อจับดีเอ็นเอแม่แบบไม่ให้ DNA polymerase III หลุดออก

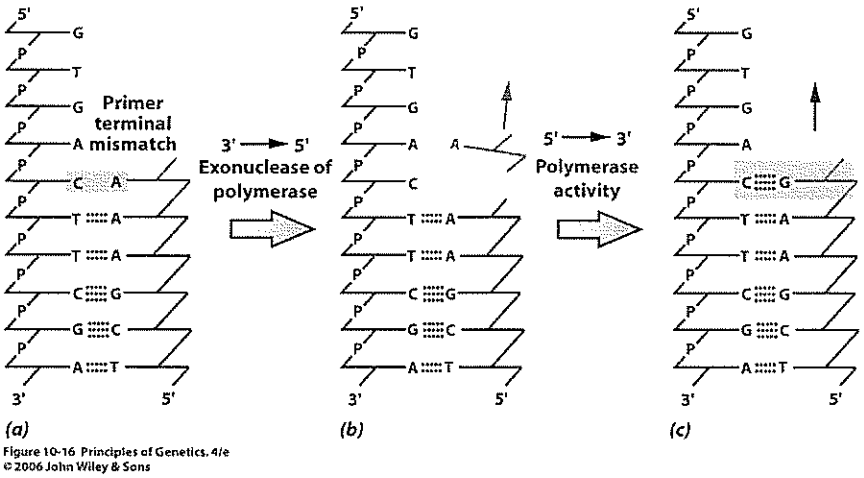


รูปที่ 11. แสดงองค์ประกอบของ DNA polymerase III และการทำงานร่วมกันกับหน่วยย่อย β

หน้าที่ตรวจสอบความถูกต้องของเอนไซม์ DNA polymerase

การตรวจสอบความถูกต้องในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเกิดขึ้นกับสายดีเอ็นเอที่กำลังสังเคราะห์อยู่ โดยกระบวนการตรวจสอบประกอบไปด้วยการสแกนที่ปลายสายของดีเอ็นเอที่กำลังสังเคราะห์เพื่อหาความผิดพลาดและแก้ไข ขั้นตอนนี้อาศัยการทำงานของ DNA polymerase ที่มี 3′ ไป 5′ exonuclease เมื่อพบว่ามีการจับกันของเบสที่ผิดคู่ (mismatch) ที่ปลายด้าน 3′ เอนไซม์จะทำหน้าที่ตัดเอาเบสที่จับผิดคู่นี้ออกไป แต่ถ้าพบว่าที่ปลายนั้นมีการจับที่ถูกต้องแล้ว เอนไซม์ก็จะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจาก primer ต่อไปโดยอาศัย 5′ ไป 3′ polymerase (รูปที่ 12)

ในเอนไซม์ที่มีเพียงองค์ประกอบหน่วยเดียวเช่น DNA polymerase I ของ *E.coli* พบว่าหน้าที่ในการตรวจสอบความถูกต้องจะรวมอยู่ในตัวของเอนไซม์หน่วยเดียวนี้ แต่ถ้าเป็นกรณีของ DNA polymerase III ของ *E.coli* หน้าที่การตรวจสอบความถูกต้องนี้จะขึ้นอยู่กับหน่วยย่อยของเอนไซม์ที่ชื่อ ε ส่วน DNA polymerase IV ของ *E.coli* เราไม่พบหน้าที่ของ exonuclease สำหรับในยูแคริโอต DNA polymerase γ, δ, และ ε ทำหน้าที่ทั้งตรวจสอบความถูกต้องและ exonuclease แต่จะไม่พบใน polymerase α และ β



รูปที่ 12. แสดงหน้าที่ 3′ ไป 5′ exonuclease ตรวจสอบความถูกต้องขณะสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

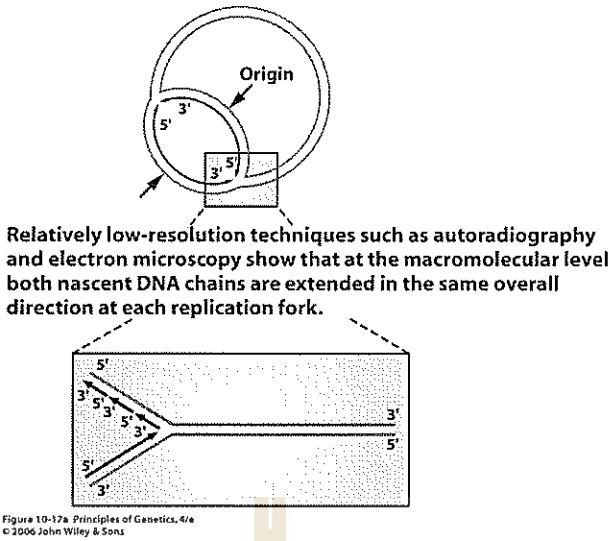
ความซับซ้อนขององค์ประกอบที่ใช้ในการจำลองดีเอ็นเอ

จากการศึกษาภาพถ่ายการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้สารกัมมันตรังสีจะเห็นว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเกิดขึ้นพร้อมกันทั้งสองเส้น ทิศทางโดยภาพรวมเหมือนจะเกิดการสังเคราะห์ไปในทิศทางเดียวกัน แต่จากความรู้เรื่องการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase พบว่าเอนไซม์จะมีการเติมเบสเข้าที่ 3′-OH ที่ว่างอยู่ นั่นแสดงว่าตัวเอนไซม์มีทิศในการทำงานจาก 5′ ไป 3′ ทำให้เป็นที่สงสัยของนักชีวเคมีว่าจริงๆ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของทั้งสองสายเกิดขึ้นในทิศทางเดียวกันหรือไม่ มีเอนไซม์ชนิดอื่นที่ทำงานในทิศ 3′ ไป 5′ หรือไม่ ซึ่งคำตอบคือไม่มีเอนไซม์สังเคราะห์ดีเอ็นเอใดทำงานในทิศ 3′ ไป 5′

เป็นที่แน่ชัดแล้วว่ากลไกในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอมีความซับซ้อนกว่าที่เราคิดกันก่อนหน้านี้ และอีกอย่างก็คือตัวเอ็นไซม์ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้เอง มันจะต้องอาศัย primer ที่มี 3′-OH ที่ว่างไว้ ถ้าเช่นนั้นสายดีเอ็นเอเส้นใหม่จะเริ่มต้นสังเคราะห์ได้อย่างไร ? และยังต้องคำนึงถึงการหมุนรอบแกนของดีเอ็นเอขณะที่มีการคลายเกลียวอีกด้วย

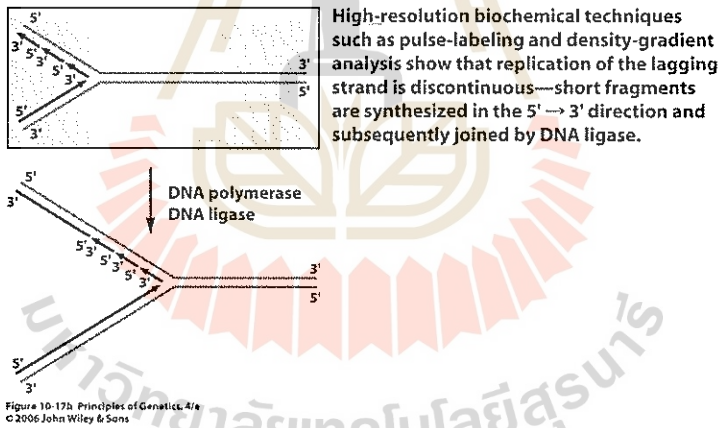
การสังเคราะห์แบบต่อเนื่องและการสังเคราะห์แบบไม่ต่อเนื่องของดีเอ็นเอ

จากที่ได้กล่าวก่อนหน้านี้แล้วว่าสายดีเอ็นเอทั้ง 2 สายที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ที่บริเวณ replication fork ขณะที่มีการสังเคราะห์ให้ยืดยาวออก ภาพโดยรวมเหมือนไปในทิศทางเดียวกัน แต่เนื่องจากทิศทางของสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่มีทิศทางตรงกันข้ามกับทิศทางของสายที่เป็นแม่แบบดังนั้น สายหนึ่งจะมีการสังเคราะห์ในทิศ 5′ ไป 3′ ส่วนอีกสายหนึ่งมีการสังเคราะห์ในทิศ 3′ ไป 5′ (รูปที่ 13)



รูปที่ 13. แสดงการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีทิศทางต่างกันในแต่ละสาย

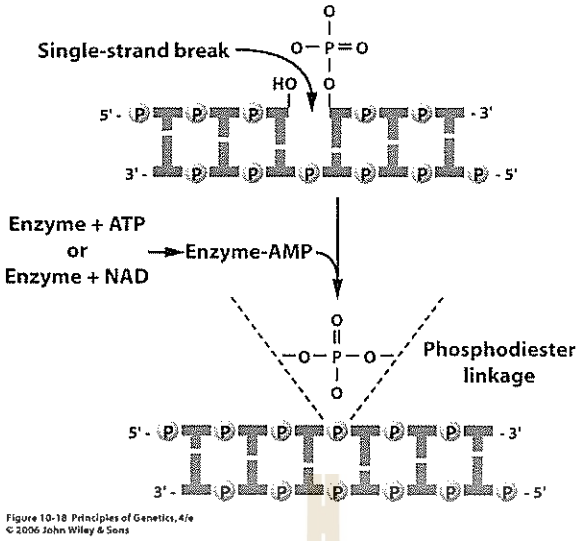
แต่เรารู้ว่า DNA polymerase มีทิศทางในการทำงาน 5′ ไป 3′ เท่านั้น ปัญหานี้ถูกแก้ไขได้ด้วยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นหนึ่งเกิดขึ้นแบบต่อเนื่อง (continuous) เรียกสายนี้ว่า leading strand ส่วนอีกเส้นหนึ่งสังเคราะห์แบบไม่ต่อเนื่อง (discontinuous) เรียกสายนี้ว่า lagging strand ซึ่งมีการสังเคราะห์เป็นท่อนสั้น ๆ (สังเคราะห์ในทิศทาง 5′ ไป 3′) และมีการเชื่อมต่อแต่ละท่อนสั้นเข้าด้วยกันในภายหลัง (รูปที่ 14)



รูปที่ 14. แสดงการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายหนึ่งแบบต่อเนื่องแต่อีกสายหนึ่งแบบไม่ต่อเนื่อง

การเชื่อมต่อช่อง (Nick) ในดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNA ligase

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดแบบไม่ต่อเนื่องทำให้ได้ท่อนดีเอ็นเอท่อนสั้นๆ เรียกว่า Okazaki fragments (ซึ่งตั้งชื่อเป็นเกียรติกับนักวิทยาศาสตร์ 2 คนที่ค้นพบคือ Reiji Okazaki และ Tuneko Okazaki ในปีค.ศ. 1960s) โดยท่อนสั้นๆ นี้จะต้องถูกเชื่อมให้ต่อกันเป็นสายดีเอ็นเอที่ปรากฏในโครโมโซม กลไกในการเชื่อมต่อนี้จะอาศัยเอนไซม์ที่ชื่อว่า DNA ligase (รูปที่ 15) โดยเอนไซมนี้จะสร้างพันธะ phosphodiester ที่ขาดหายไประหว่างท่อนของ Okazaki แต่ละท่อน อาศัยพลังงานที่ได้จาก NAD หรือ ATP



รูปที่ 15. แสดงการทำงานของเอนไซม์ DNA ligase

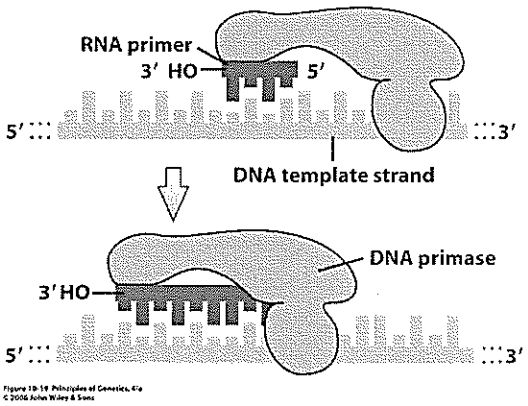
DNA ligase จะไม่สามารถเชื่อมต่อบริเวณที่มีเบสของดีเอ็นเอขาดหายไป (เรียกบริเวณที่เบสขาดหายไปนี้ว่า gaps) การเชื่อมปิดบริเวณ gap นี้จะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่าง DNA polymerase (สังเคราะห์เบสที่ขาดหายไป) และ DNA ligase (เชื่อมปิดช่อง nick) ดังนั้น DNA ligase มีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและยังมีความจำเป็นต่อการซ่อมแซมดีเอ็นเอและการเกิด recombination อีกด้วย

สายดีเอ็นเอเริ่มต้นด้วย RNA primers

จากที่ได้ทราบมาแล้วว่า DNA polymerase ทุกตัวต้องอาศัย DNA primer ที่มีอยู่ก่อนแล้วและจะต้องมี 3′-OH ว่างอยู่พร้อมทั้งดีเอ็นเอที่เป็นแม่แบบเพื่อเริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ไม่มี DNA polymerase ใดที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้โดยปราศจากสิ่งที่กล่าวไปแล้ว ดังนั้นจะต้องมีกลไกพิเศษบางอย่างเพื่อเริ่มต้นดีเอ็นเอสายใหม่ ในขณะที่การสังเคราะห์ดีเอ็นเอแบบต่อเนื่องนั้นต้องการการเริ่มต้นที่จุด origin เพียงแค่ครั้งเดียวแต่สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแบบไม่ต่อเนื่องนั้นจะต้องการการเริ่มต้นในแต่ละท่อนของ Okazaki

RNA polymerase เป็นเอนไซม์เชิงซ้อนที่สังเคราะห์ RNA โดยอาศัยดีเอ็นเอเป็นแม่แบบ ซึ่งเป็นที่รู้กันมานานว่ามันสามารถสังเคราะห์ RNA ที่ตำแหน่งจำเพาะบน DNA ได้ และเมื่อการสังเคราะห์เสร็จสิ้นลงก็จะพบว่าสายของ RNA ที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นจะยังคงจับอยู่กับ DNA (RNA-DNA hybrid) ที่เป็นแม่แบบโดยอาศัยพันธะไฮโดรเจน เนื่องจาก DNA polymerase สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจาก RNA primer ที่มี 3′-OH ว่างอยู่ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์ได้พิสูจน์ความคิดนี้และพบว่าถูกต้อง

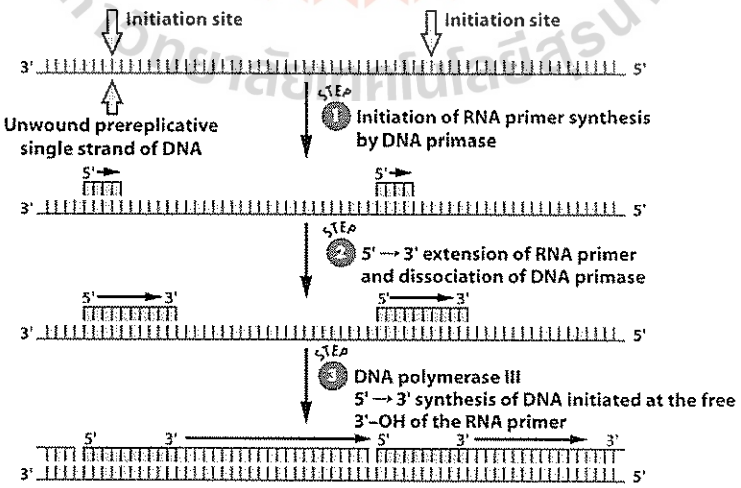
ต่อมานักวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่แต่ละสายนั้นจะเริ่มต้นด้วยท่อนสั้นๆ ของ RNA primer ที่ถูกสังเคราะห์โดย DNA primase (รูปที่ 16)



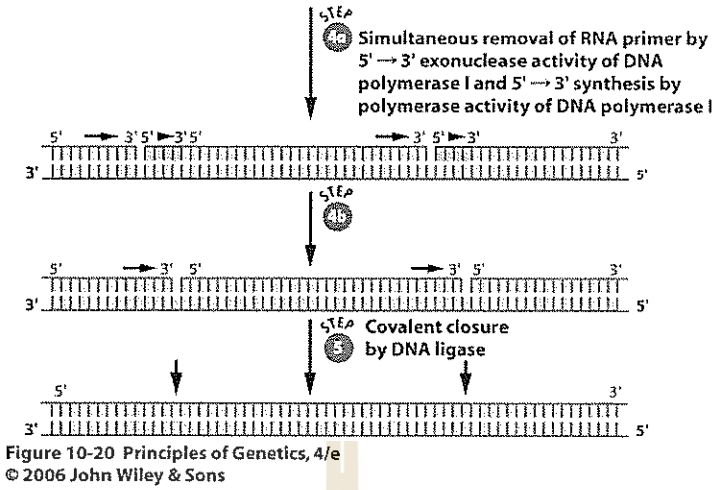
รูปที่ 16. แสดงการเริ่มต้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้องการ RNA primer ที่สังเคราะห์โดย DNA primase

ใน *E.coli* เอนไซม์ DNA primase ถูกสร้างจากยีนชื่อ dnaG โดยในพวกโพแคริโอตจะสังเคราะห์ RNA primer ที่มีความยาวประมาณ 10-60 นิวคลิโอไทด์ แต่ในยูแคริโอตจะสั้นกว่ามีความยาวเพียง 10 นิวคลิโอไทด์ โดย RNA primer ทำหน้าที่ให้ 3′-OH เพื่อให้ DNA polymerase สังเคราะห์นิวคลิโอไทด์ต่อจาก primer ใน *E.coli* เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเติม deoxyribonucleotides คือ DNA polymerase III ทั้งการสังเคราะห์ที่เกิดขึ้นแบบต่อเนื่องและแบบไม่ต่อเนื่อง DNA polymerase III จะหยุดสังเคราะห์ท่อน Okazaki เมื่อมันไปชนกับ RNA primer ที่อยู่ข้างหน้าในสาย lagging strand

RNA primer ในที่สุดก็จะถูกกำจัดออกไปและถูกแทนที่ด้วยสายของดีเอ็นเอโดยการทำงานของเอนไซม์ที่ชื่อ DNA polymerase I ใน *E.coli* ซึ่งมีหน้าที่ของ 5′ ไป 3′ exonuclease ใช้ในการตัดเอา RNA primer ออกไปและในเวลาเดียวกันตัวเอนไซม์ก็จะใช้หน้าที่ของ 5′ ไป 3′ polymerase ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้นมาแทนที่ RNA primer ในที่สุดแต่ละท่อนของ Okazaki ก็จะประกอบไปด้วยสายของดีเอ็นเอ จากนั้นท่อนสั้นๆ ก็จะถูกเชื่อมต่อกันด้วยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA ligase ที่ทำหน้าที่ในการสร้างพันธะ phosphodiester (รูปที่ 17)



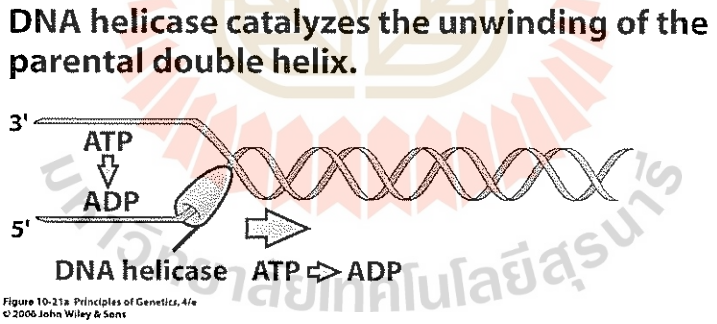
(มีภาพต่อหน้าต่อไป)



รูปที่ 17. แสดงการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและการแทนที่ RNA primer ในสายที่มีการสังเคราะห์แบบไม่ต่อเนื่อง

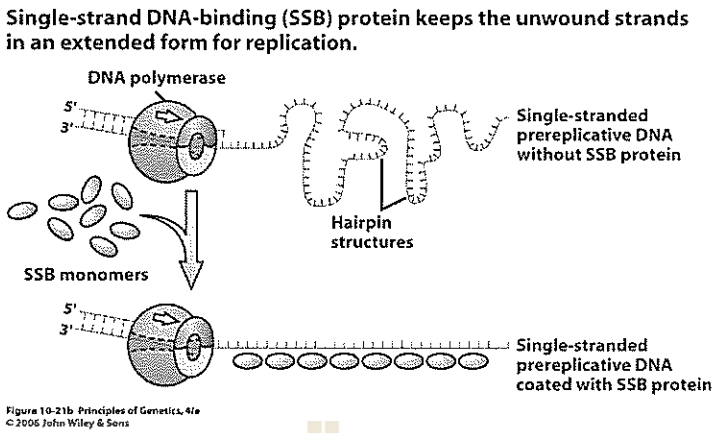
การคลายเกลียวของดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ Helicase, DNA-binding protein, และ Topoisomerases

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอแบบกึ่งอนุรักษ์ ดีเอ็นเอสายแม่แบบจำเป็นต้องคลายเกลียวออกเพื่อทำหน้าที่เป็นแม่แบบ ซึ่งจากแบบจำลอง 3 มิติของ Watson กับ Crick นั้นเรารู้ว่าหนึ่งรอบของดีเอ็นเอนั้นมีเบสอยู่ด้วยกันถึง 10 คู่ ใน *E.coli* พบว่าใน 1 นาที DNA polymerase สามารถเติมเบสเข้าไปในสายดีเอ็นเอที่กำลังสังเคราะห์อยู่ได้ถึง 30,000 เบสนั่นหมายความว่าดีเอ็นเอจะต้องมีการคลายเกลียวหรือดีเอ็นเอจะต้องหมุนถึง 3,000 รอบต่อนาที การคลายเกลียวของดีเอ็นเอเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ DNA helicases ซึ่งสร้างจากยีน *dnaB* โดยการคลายเกลียวดีเอ็นเอจะอาศัยพลังงานจาก ATP (รูปที่ 18)



รูปที่ 18. แสดงการทำงานของเอนไซม์ DNA helicase ในการคลายเกลียวดีเอ็นเอ

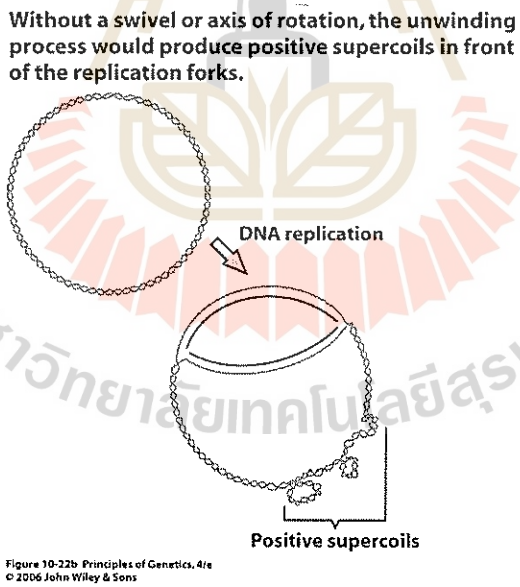
หลังจากดีเอ็นเอคลายเกลียวแล้ว แต่ละสายของดีเอ็นเอจะต้องรักษาสภาพที่เป็นเส้นเดี่ยวเอาไว้ มิฉะนั้นมันอาจจะกลับมาจับกันคืนด้วยพันธะไฮโดรเจนหรือมันอาจจะจับกันเองภายในสายเดียวกัน ซึ่งการรักษาสภาพให้อยู่เป็นสายเดี่ยวอาศัยการจับของโปรตีน single-strand DNA binding protein (SSB protein) (รูปที่ 19)



รูปที่ 19. แสดงหน้าที่ของ single-strand DNA binding protein (SSB protein)

การเข้าจับของ SSB protein จะเป็นแบบร่วมกันโดยเริ่มต้นจากมอนอเมอร์ของ SSB protein ตัวแรกจะไปกระตุ้นมอนอเมอร์ตัวอื่นๆให้เข้ามาจับบนสายของดีเอ็นเอ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ตลอดทั้งสายของดีเอ็นเอสายเดี่ยวถูกเคลือบด้วย SSB protein ใน *E.coli* โปรตีน SSB ถูกสร้างจากยีน *ssb*

โครโมโซมของ *E.coli* นั้นเป็นแบบวงแหวน ดังนั้นเมื่อเกิดการคลายเกลียว ดีเอ็นเอไม่มีแกนให้ยึด ดังนั้นขณะที่คลายเกลียวจะเกิดเกลียวที่ด้านหน้าทำให้เกิด positive supercoils พันกันยุ่งเหยิง (รูปที่ 20)



รูปที่ 20. แสดง positive supercoils ที่เกิดขึ้นที่ด้านหน้าขณะที่มีการคลายเกลียวดีเอ็นเอ

เพื่อแก้ปัญหานี้ *E.coli* มีเอนไซม์ชื่อ DNA topoisomerase มีอยู่ 2 ชนิดคือ DNA topoisomerase I ทำหน้าที่ตัดสายดีเอ็นเอหนึ่งสายให้ขาดชั่วคราวหรือทำให้เกิด nick แล้วมาจับกับตัวมันไว้ ส่วนชนิดที่ 2 คือ DNA topoisomerase II ทำหน้าที่ตัดสายดีเอ็นเอทั้งสองสายออก ข้อสำคัญของเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่แตกต่างกันคือ DNA topoisomerase I ทำหน้าที่ลดเกลียว supercoils ลงครั้งละ 1 รอบ ส่วน DNA topoisomerase II ทำหน้าที่ลดหรือเพิ่มเกลียว supercoils ครั้งละ 2 รอบ

สำหรับ DNA topoisomerase I นั้นจะสงวนพลังงานที่ได้จากการตัดสายของดีเอ็นเอหนึ่งสายแล้วเชื่อมติดกับตัวมันไว้ปล่อยให้สายดีเอ็นเอด้านที่ไม่ได้จับกับเอนไซม์หมุนรอบสายดีเอ็นเอเส้นที่ไม่ถูกตัดแล้ว จึงใช้พลังงานที่เกิดจากการปล่อยสายดีเอ็นเอที่มันจับไว้ในการเชื่อมรอย nick ที่เกิดขึ้นกลับคืน (รูปที่ 21)

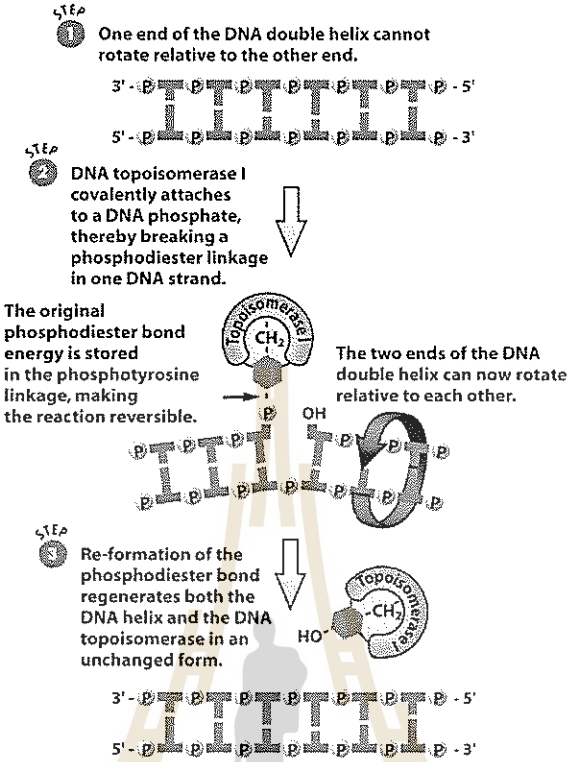


Figure 10-23 Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons

รูปที่ 21. แสดงการทำงานของ DNA topoisomerase I

ส่วน DNA topoisomerase II ทำงานโดยการตัดสายดีเอ็นเอทั้งสองสายแล้วสร้างพันธะโควาเลนซ์กับปลายที่ตัด แล้วปล่อยให้สายของดีเอ็นเอที่ยังจับกันเป็นเกลียวเคลื่อนที่ผ่ายรอยตัดเพื่อลด positive supercoil หรือเพิ่ม negative supercoil ครั้งละ 2 รอบ โดยกระบวนการนี้ต้องใช้พลังงาน ATP แล้วจึงต่อยเชื่อมปลายของดีเอ็นเอที่ถูกตัดกลับคืน (รูปที่ 22)

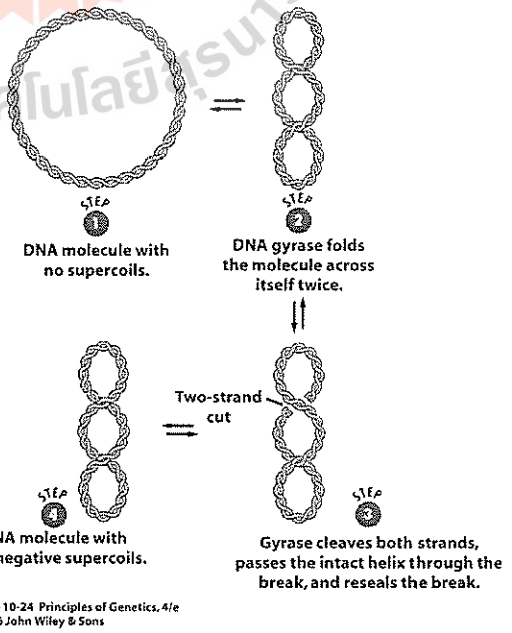


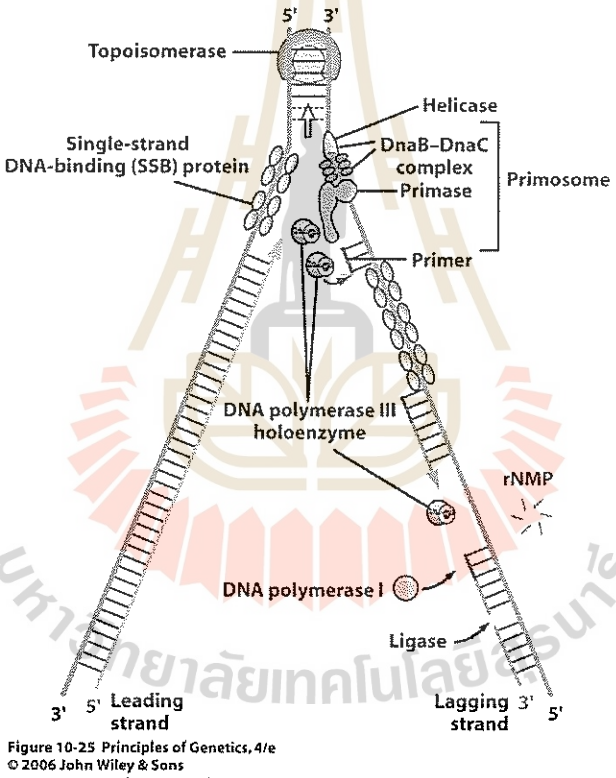
Figure 10-24 Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons

รูปที่ 22. แสดงการทำงานของ DNA topoisomerase II

เอนไซม์ DNA topoisomerase II ที่รู้ลักษณะเป็นอย่างดีใน *E.coli* มีชื่อเรียกว่า DNA gyrase ซึ่งมี 4 หน่วยย่อย โดย 2 หน่วยย่อยของ α ถูกสร้างจากยีน *gyrA* (เดิมเรียกยีนนี้ว่า *nalA* สำหรับสร้างกรด nalidixic) ส่วนอีก 2 หน่วยย่อยเป็น β ถูกสร้างจากยีน *gyrB* (เดิมเรียกยีนนี้ว่า *cou* สำหรับสร้าง coumermycin) ทั้ง nalidixic และ coumermycin เป็นยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งการจำลองดีเอ็นเอใน *E.coli* โดยเข้าไปยับยั้งการทำงานของ DNA gyrase โดย nalidixic และ coumermycin เข้าไปจับกับหน่วยย่อย α และ βของเอนไซม์ DNA gyrase ตามลำดับ ซึ่งการจำลองดีเอ็นเอใน *E.coli* ต้องอาศัยการทำงานของ DNA gyrase ด้วยเช่นกัน

องค์ประกอบในการจำลองดีเอ็นเอ (prepriming proteins, primosomes, replisomes)

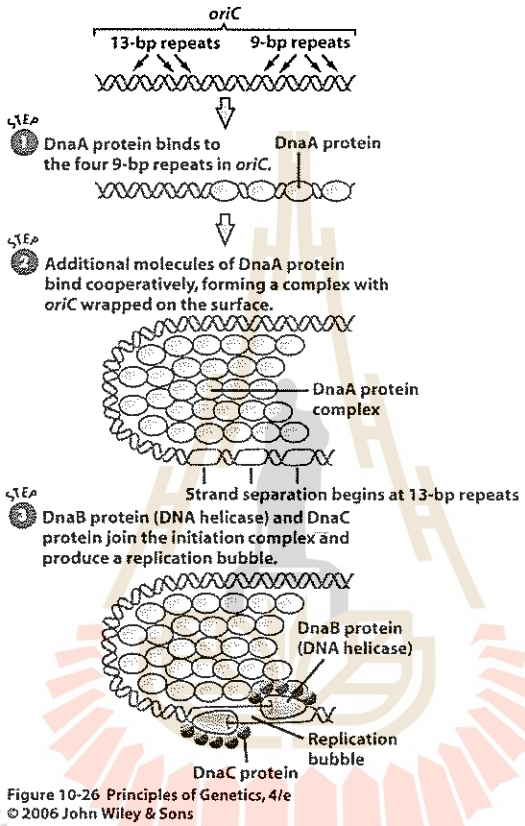
จากสิ่งที่ได้กล่าวมาตั้งแต่ต้นถึงองค์ประกอบต่างๆ ที่จำเป็นต่อกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ ต่อไปจะกล่าวถึงการร่วมกันขององค์ประกอบต่างๆ ในขณะที่มีการจำลองดีเอ็นเอโครโมโซม เพื่อความเข้าใจเราจะพิจารณาลำดับเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นกับการจำลองดีเอ็นเอแบบวงแหวนซึ่งเป็นโครโมโซมของ *E.coli* โดยภาพต่อไปนี้แสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบต่างๆ (รูปที่ 23) ที่จำเป็นต่อการจำลองดีเอ็นเอพร้อมทั้งแสดงตำแหน่งของการทำงานขององค์ประกอบต่างๆ ณ จุด replication fork ด้วย



รูปที่ 23. แสดงองค์ประกอบที่สำคัญที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่บริเวณ replication fork

การเริ่มต้นในการจำลองโครโมโซมของ *E.coli* เกิดขึ้นที่ *oriC* (ซึ่งมีลำดับเบสที่เป็นเอกลักษณ์โดยการจำลองดีเอ็นเอจะเริ่มต้นที่บริเวณนี้) โดยเกิดการแยกของสายดีเอ็นเอบริเวณนี้เกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า replication bubble ซึ่งเกิดจากการเข้าเป็นจับของโปรตีนที่ตำแหน่ง *oriC* (รูปที่ 24) โดยขั้นแรกจะมี DnaA protein (สร้างจากยีน *dnaA*) จำนวน 4 โมเลกุลเข้าไปจับที่ตำแหน่ง 9 คู่เบสเรียงซ้ำกับ 4 ครั้ง (four 9-bp repeats)ใน *oriC* ต่อจากนั้นก็จะมี DnaA protein เข้ามาร่วมกันจับตำแหน่งนี้ 20 ถึง 40 โพลีเปปไทด์ ทำให้ดีเอ็นเอตำแหน่ง *oriC* เกิดโค้งงอพัน รอบผิวของกลุ่มโปรตีน สายของดีเอ็นเอเริ่มแยกออกจากกันภายในบริเวณที่เป็น 13 คู่เบสเรียงซ้ำกัน 3 ครั้ง (3 tandem 13-bp repeats) แล้วกระจายออกไปจนเกิดเป็น

replication bubble โปรตีนเชิงซ้อนของ DnaB (DNA helicase) และโปรตีน DnaC จำนวน 6 โมเลกุล เข้าร่วมในองค์ประกอบเชิงซ้อนที่จุดเริ่มต้นเพื่อก่อให้เกิดการจำลองดีเอ็นเอแบบสองทิศทางเกิดเป็น two bidirectional replication forks นอกจากนี้ยังพบว่ามีโปรตีน DnaT เข้าร่วมที่จุดเริ่มต้นด้วยแต่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด ส่วนโปรตีนตัวอื่นได้แก่ DnaJ, DnaK, PriA, PriB, PriC, DNA-binding protein HU, DNA gyrase และ DNA-binding (SSB) protein โปรตีนบางตัวพบว่าเข้าร่วมที่จุดเริ่มต้นของการจำลองดีเอ็นเอแต่ก็ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด ส่วน DnaA protein ดูเหมือนว่าจะเป็นตัวที่รับผิดชอบหลักในการหาตำแหน่งของ *oriC* เพื่อเริ่มแยกสายดีเอ็นเอในกระบวนการเริ่มการจำลองดีเอ็นเอ

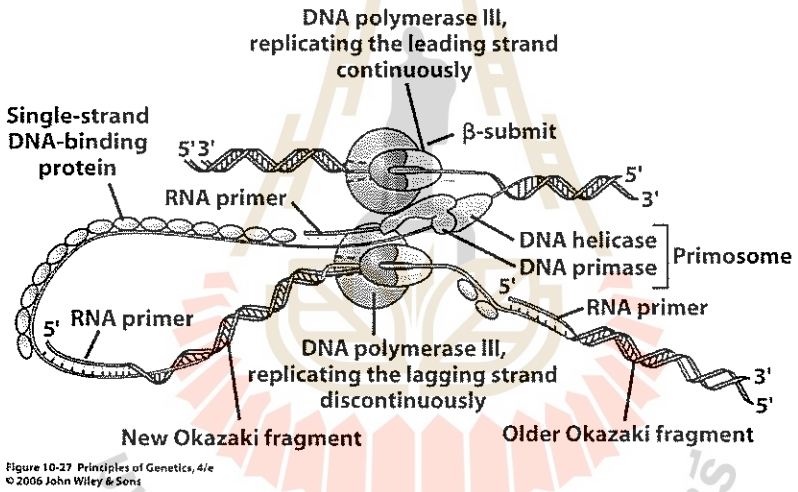


รูปที่ 24. แสดงการเข้าจับของโปรตีนต่างๆ ที่บริเวณจุด *oriC* ของ *E.coli* ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

อนึ่งเมื่อเกิด replication fork ขึ้นกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่จะถูกเริ่มต้นด้วยการสังเคราะห์ RNA primers โดย DNA primase สำหรับสายดีเอ็นเอใหม่ที่มีการสังเคราะห์แบบต่อเนื่อง (leading strand) ต้องการ RNA primers เพียงครั้งแรกครั้งเดียว แต่ในดีเอ็นเอสายใหม่ด้านที่มีการสังเคราะห์แบบไม่ต่อเนื่อง (lagging strand) ต้องการ RNA primers เพื่อเริ่มต้นสังเคราะห์ในทุกๆ ท่อนของ Okazaki การเริ่มต้นสังเคราะห์ Okazaki fragment ในสายดีเอ็นเอเส้น lagging strand เริ่มต้นโดย primosome (เป็นโปรตีนเชิงซ้อนประกอบด้วย DNA primase และ DNA helicase) ตัว primosome จะเคลื่อนที่ไปบนดีเอ็นเออาศัยพลังงาน ATP ขณะที่เคลื่อนไปนั้น DNA helicase จะคลายเกลียวแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบออก ส่วน DNA primase ก็จะสังเคราะห์ RNA primers เพื่อเป็นตัวเริ่มต้นของ Okazaki fragment การสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจาก RNA primers กระทำโดยการเติม deoxyribonucleotides เข้า 3′-OH ของ RNA primers โดยการทำงานของ DNA polymerase III ส่วน DNA topoisomerase ช่วยแก้ไขเกลียวที่พันกันด้านหน้าของดีเอ็นเอขณะที่มีการคลายเกลียว สำหรับ single-strand DNA-binding protein จะจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่งถูก

คลายเกลียวเพื่อให้ DNA polymerase III เข้าถึงเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้ จากนั้น RNA primers ก็จะถูกแทนที่ด้วย DNA โดยอาศัยการทำงานของ DNA polymerase I และตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของพันธะ phosphodiester ระหว่างท่อนของ Okazaki ก็จะถูกเชื่อมต่อเข้ากันด้วยการทำงานของ DNA ligase เป็นอันสิ้นสุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดีเอ็นที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาก็จะขดแน่นอยู่ภายใน nucleoid ของ *E.coli*

ขณะที่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ replication fork ก็จะมีการเคลื่อนที่ไปบนสายดีเอ็นเอที่เป็นแม่แบบ โดยดีเอ็นเอสายใหม่ก็จะถูกสังเคราะห์ขึ้นด้วยการทำงานอย่างเป็นระบบดังที่กล่าวมาแล้ว องค์ประกอบทั้งหมดที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอก็จะเคลื่อนที่ไปตามตำแหน่งที่เป็น replication fork เรียกองค์ประกอบทั้งหมดนี้รวมกันว่า replisome ใน replisome จะประกอบด้วย DNA polymerase III holoenzyme ซึ่งประกอบไปด้วยเอนไซม์ทำหน้าที่หลักในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 2 แกน (รูปที่ 25) โดยแกนที่หนึ่งใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสาย leading strand ส่วนแกนที่สองใช้สังเคราะห์ดิเอ็นเอในสาย lagging strand, primosome ทำหน้าที่คลายเกลียวดีเอ็นสายแม่แบบและสังเคราะห์ RNA primers ซึ่งจำเป็นมากในสาย lagging strand ในการทำงานของ DNA polymerase III ทั้งสายที่มีการสังเคราะห์แบบ leading strand และ lagging strand เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ที่ควบคู่กันทั้งสองสาย สายแม่แบบที่มีการสังเคราะห์แบบ lagging strand จำเป็นที่จะต้องสร้างเป็นบ่วง (loop) เพื่อให้ แกนที่สองของ DNA polymerase III holoenzyme ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ Okazaki fragment



รูปที่ 25. ไดอะแกรมแสดง replisome ใน *E.coli* แสดงให้เห็น DNA polymerase III holoenzyme ที่มี 2 แกนหลักในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งสองสายไปพร้อมๆ กัน

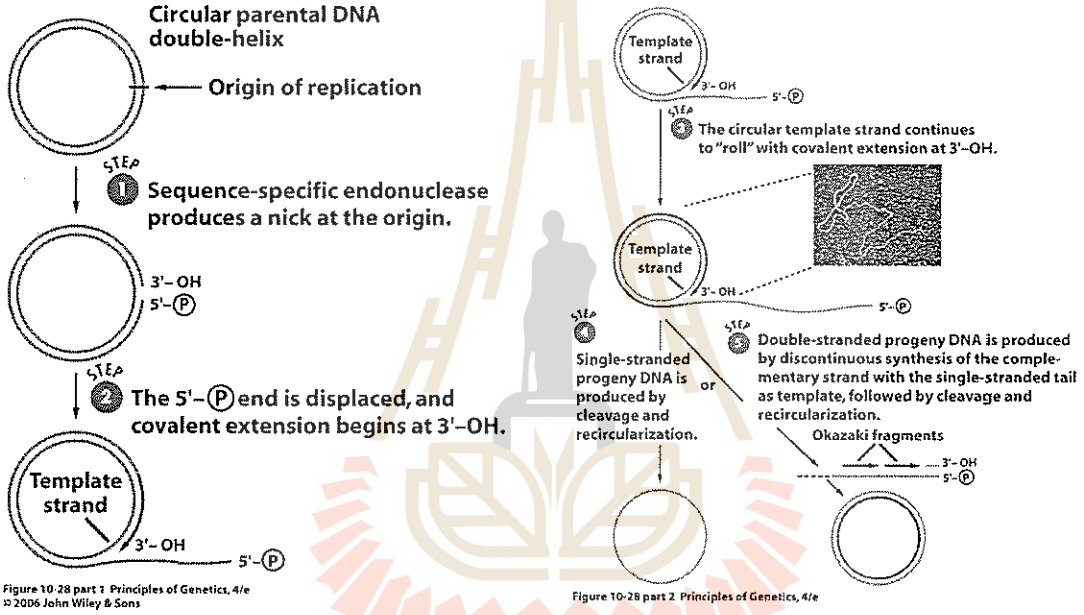
ใน *E.coli* การหยุดการจำลองโครโมโซมเกิดขึ้นได้หลายตำแหน่งภายในบริเวณที่เรียกว่า terA และ terB ซึ่งยับยั้งการเคลื่อนที่ของ replication fork ที่เกิดในทิศทวนเข็มและตามเข็มนาฬิกาตามลำดับ จากนั้น DNA topoisomerase หรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด recombination ของดีเอ็นเอก็จะแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอใหม่ที่สร้างขึ้นออกจากกัน

การจำลองดีเอ็นเอแบบ Rolling-circle

จากที่กล่าวมาข้างต้นเราได้พิจารณาถึงการจำลองดีเอ็นเอแบบ θ-shaped, eye-shaped และ Y-shaped มาแล้ว ตอนนี้เรากำลังจะกล่าวถึงการจำลองดีเอ็นเออีกแบบที่มีความสำคัญเรียกว่า rolling-circle replication ซึ่งการจำลองดีเอ็นเอแบบนี้พบได้ใน 1. การจำลอง genome ของไวรัสหลายชนิด 2. ในแบคทีเรีย

ที่มีการถ่ายดีเอ็นเอจากเซลล์ผู้ให้ไปยังเซลล์ผู้รับในระหว่างที่มีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมแบบหนึ่ง 3. ในพวกสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนของ extrachromosomal DNA ที่มียีนต่างๆ ของ ribosomal RNA ระหว่างที่มีการสร้างเซลล์ไข่ (oogenesis)

การจำลองดีเอ็นเอแบบ Rolling-circle (รูปที่ 26) เป็นกระบวนการหนึ่งสำหรับการจำลองดีเอ็นเอที่เป็นแบบวงแหวน ลักษณะเฉพาะของการจำลองดีเอ็นเอแบบ Rolling-circleก็คือ เส้นหนึ่งของดีเอ็นเอที่เป็นแบบวงแหวนจะคงรูปแบบวงแหวนไว้และหมุนวนรอบตัวเองทำหน้าที่เป็นแม่แบบสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เป็นcomplementary strand โดยการจำลองดีเอ็นเอนั้นเริ่มขึ้นเมื่อมีเอนไซมตัดภายในชนิดที่จำเพาะต่อลำดับเบส ตัดสายหนึ่งของดีเอ็นเอที่เป็นวงแหวนทำให้ได้ดีเอ็นเอปลายเปิดหนึ่งสายที่มี 5′-phosphate และอีกปลายหนึ่งเป็น 3′-OH ปลายด้าน 5′-P จะถูกแทนที่ด้วยดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่โดยการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นจากการเติม deoxyribonucleotide ต่อเข้าที่ปลายของ 3′-OH ในขณะที่สายดีเอ็นเออีกสายหนึ่งที่ไม่ถูกตัดและอยู่ในรูปวงแหวนก็จะมีการหมุนไปเรื่อยๆ



รูปที่ 26. แสดงกลไกในการจำลองดีเอ็นเอแบบ Rolling-circle

การจำลองดีเอ็นเอแบบ Rolling-circle สามารถสร้างได้ทั้งแบบดีเอ็นสายคู่และแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยว ส่วนปลายด้าน 5′-P ก็สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้โดยทำหน้าที่เป็นแม่แบบและเกิดการสังเคราะห์แบบไม่ต่อเนื่องจากนั้นจึงค่อยตัดปลายที่ติดอยู่กับดีเอ็นเอวงแหวน แล้วจึงค่อยเชื่อมปลายของสายดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรงเข้าด้วยกันก็จะได้เป็นดีเอ็นเอสายคู่แบบวงแหวน หรือปลายด้าน 5′-P อาจจะสร้างเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวแบบวงแหวนก็ได้ก็โดยการตัดด้าน 3′-OH ออกจากดีเอ็นเอที่เป็นวงแหวนแล้วจึงเชื่อมปลายทั้งสองด้านเข้าด้วยกันเกิดเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวแบบวงแหวน

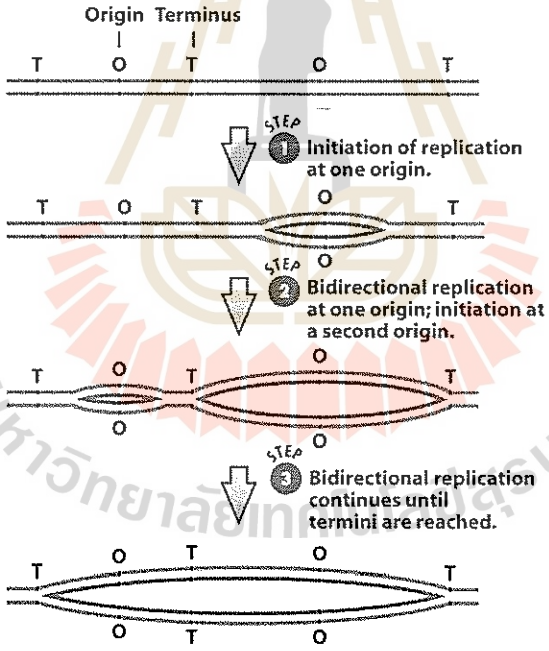
ลักษณะเฉพาะของการจำลองโครโมโซมในยูแคริโอต

ข้อมูลเกือบทั้งหมดเกี่ยวกับการจำลองดีเอ็นเอได้มาจากผลของการศึกษาใน *E.coli* และในไวรัสของแบคทีเรียบางชนิด มีข้อมูลน้อยมากที่ได้จากการศึกษาในยูแคริโอต แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวก็เพียงพอที่จะสรุปได้ว่า หลักเกณฑ์ส่วนใหญ่ของการจำลองดีเอ็นเอในโพแคริโอตและในยูแคริโอตเหมือนกันรวมไปถึงมนุษย์ด้วย RNA primers และ Okazaki fragment จะสั้นกว่าในยูแคริโอตจะสั้นกว่าในโพแคริโอต มี

leading และ lagging strand เหมือนกัน แต่ทว่าลักษณะเฉพาะบางประการของการจำลองดีเอ็นเอในยูแคริโอตจะมีความเฉพาะสำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีความซับซ้อน ยกตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นเพียงช่วงสั้นๆ ในวัฏจักรเซลล์ ซึ่งไม่เหมือนกับพวกโพแคริโอตที่เกิดได้ตลอดเวลา นอกจากนี้พวกยูแคริโอตจะพบว่ามีจุดเริ่มต้นของการจำลองดีเอ็นหลายตำแหน่งในโครโมโซม และเกิดการจำลองดีเอ็นเอแบบสองทิศทางโดยอาศัยเอนไซม์ที่ polymerase มากกว่าสองชนิด

Replicons หลายตำแหน่งในโครโมโซม

ถ้ากล่าวถึงโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) ที่มีขนาด 6.5 x 10^7 คู่เบส อัตราเร็วของการจำลองดีเอ็นเอในแมลงหวี่ประมาณ 2600 คู่เบสต่อนาทีที่ 25°C ถ้ามีจุดเริ่มต้นของการจำลองดีเอ็นเอเพียงหนึ่งจุด มันจะต้องใช้เวลา 17.5 วันในการจำลองโครโมโซมเพียงหนึ่งแท่ง แต่ถ้ามี 2 จุดก็จะใช้เวลาเหลือเพียง 8.5 วัน แต่ในความเป็นจริงแมลงหวี่จำลองโครโมโซมได้ภายใน 3-4 นาทีและมีการแบ่งนิวเคลียสทุกๆ 9-10 นาที ซึ่งเป็นที่แน่ชัดว่าโครโมโซมขนาดใหญ่ของแมลงหวี่หนึ่งโครโมโซมจะต้องมีจุดเริ่มต้นการจำลองโครโมโซมมากกว่า 1 จุดแน่นอน แท้ที่จริงแล้วการจำลองโครโมโซมขนาดใหญ่ในแมลงหวี่ใช้เวลาเพียง 3.5 นาทีควรมี replication fork มากกว่า 7000 ตำแหน่งกระจายอยู่ทั่วโครโมโซม ดังนั้น origin of replication หลายตำแหน่งจึงมีความจำเป็นอย่างมากต่อการจำลองดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะในยูแคริโอตช่วงที่มีการแบ่งเซลล์ (รูปที่ 27)



Diagrammatic interpretation of the replication of the DNA molecules visualized above.

Figure 10-29c Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons

รูปที่ 27. แสดงตำแหน่ง origin of replication (o) ที่มีหลายจุดในดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่

DNA polymerases ที่ตำแหน่ง Replication fork

การจำลองดีเอ็นเอในยูแคริโอตต้องการการทำงานของ DNA polymerase ที่แตกต่างกันถึง 3 ชนิด ได้แก่ polymerase α (Pol α), polymerase δ (Pol δ) และ polymerase ε (Pol ε) แต่ละเอนไซม์ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วย นอกจากนี้ยังพบว่ามีโปรตีนอีกอย่างน้อย 27 ชนิด (รูปที่ 28)

ในยูแคริโอตพบว่า Pol α มีความจำเป็นต่อการเริ่มสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง origins และการ priming ของ Okazaki fragment ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่า Pol α จะอยู่ร่วมกับ DNA primase โดย primase ทำหน้าที่สังเคราะห์ RNA primers แล้ว Pol α จึงค่อยเติม deoxyribonucleotide ต่อจาก primers สร้างเป็นสายของ RNA-DNA ที่มีความยาวประมาณ 30 นิวคลิโอไทป์ หลังจากนั้นสายของ RNA-DNA นี้ก็จะถูกสังเคราะห์ต่อด้วย Pol δ ซึ่งเชื่อว่าเป็น polymerase ตัวหลักที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ Pol δ จะต้องมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนที่ชื่อว่า PCNA (proliferating cell nuclear antigen) และ replication factor C (Rf-C) เพื่อกระตุ้นการทำงาน PCNA เหมือนเป็นตัวจับดีเอ็นเอและเคลื่อนสไลด์ได้ช่วยทำให้ Pol δ ไม่หลุดออกจากดีเอ็นเอแม่แบบ ส่วน Rf-C มีความสำคัญต่อ Pol δ คือช่วยพา PCNA ไปอยู่บนดีเอ็นเอ PCNA ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 3 หน่วยจับกันเป็นวง Rf-C เหนี่ยวนำให้รูปร่างของ PCNA เปลี่ยนแล้วไปครอบปิดบนสายดีเอ็นเอเพื่อประโยชน์ในการสไลด์ไปบนสายดีเอ็นเอ

Polymerase δ และ polymerase ε ทั้งคู่มีคุณสมบัติของ 3′ไป 5′ exonuclease ซึ่งจำเป็นต่อการตรวจสอบความถูกต้องของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ทั้งคู่ขาดคุณสมบัติของ 5′ไป 3′ exonuclease ดังนั้นมันจึงไม่สามารถกำจัดเอา RNA primers ออกไปได้ไม่เหมือนกับ DNA polymerase I ของ E.coli ที่มีคุณสมบัติดังกล่าว การนำเอา RNA primers ออกนั้นในยูแคริโอตอาศัยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ ribonuclease H1 ซึ่งทำลาย RNA ที่จับอยู่กับ DNA และ ribonuclease FEN-1 (F1 nuclease 1) จากนั้น Polymerase δ จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้นแทนที่ RNA primer ที่ถูกทำลายทิ้งแล้วจึงตามด้วยการเชื่อมส่วนที่เป็น nick เข้าด้วยกันด้วยการทำงานของ DNA ligase

Polymerase ε มีความจำเป็นต่อการจำลองดีเอ็นเอใน in vivo และการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เกิดจากความเสียหายบางชนิด อย่างไรก็ตามการทำงานของมันยังไม่รู้แน่ชัด

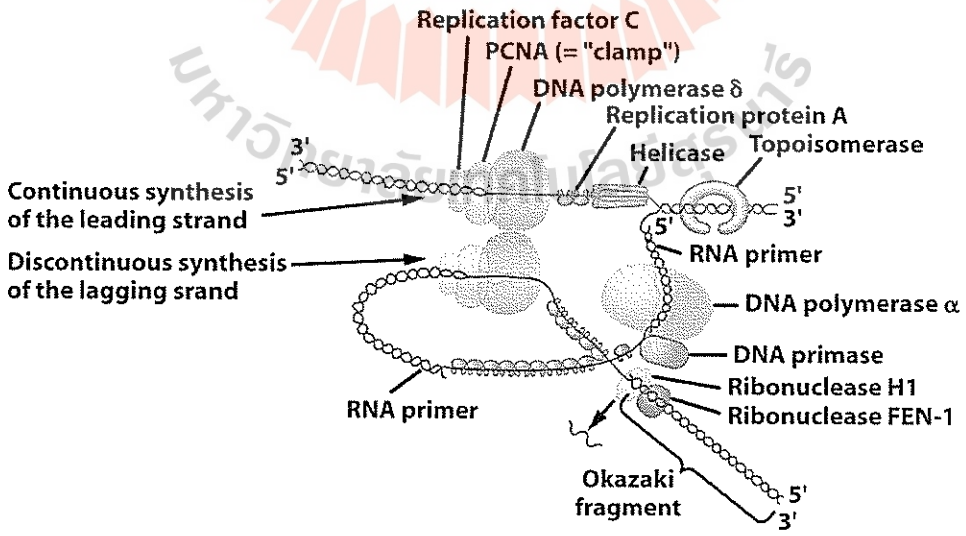
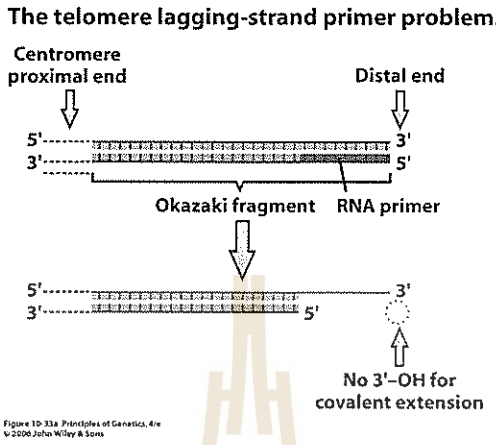


Figure 10-31 Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons

รูปที่ 28. แสดงองค์ประกอบที่จำเป็นบริเวณ replisome ในยูแคริโอต

การจำลองโครโมโซมที่บริเวณปลายด้วยเอนไซม์ Telomerase

ที่บริเวณปลายของดีเอ็นเอในโครโมโซมที่เป็นแบบเส้นตรงด้านที่มีการสังเคราะห์แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อมีการทำลาย RNA primer ไปเมื่อจะสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้นมาแทนที่จะเกิดปัญหาที่ท่อน Okazaki ท่อนสุดท้ายที่จะไม่มี 3′-OH (primer) เพื่อให้เอนไซม์มาเติม deoxyribonucleotide (รูปที่ 29)



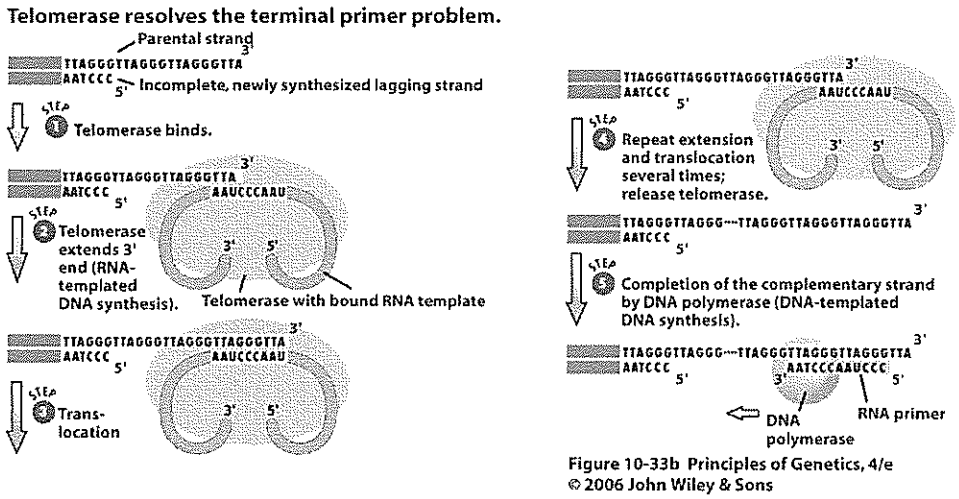
รูปที่ 29. แสดงปัญหาที่เกิดขึ้นบริเวณ telomere ในดีเอ็นเอสาย lagging

ซึ่งอาจจะมีการแก้ไขแบบใดแบบหนึ่งดังนี้

1. ปลายของ telomere จะต้องมีโครงสร้างลักษณะเฉพาะที่เอื้อต่อการเกิดการจำลองดีเอ็นเอของมัน
2. จะต้องมีเอนไซม์พิเศษที่สามารถแก้ปัญหาในการจำลองดีเอ็นเอบริเวณปลายของสาย lagging strand

อันที่จริงทั้ง 2 วิธีดังกล่าวเป็นเรื่องจริงที่พบ โดยโครงสร้างพิเศษที่ปลายของ telomere นั้นเหมาะเจาะต่อกระบวนการเติมปลาย telomere โดยอาศัยเอนไซม์ที่มี RNA อยู่ภายในชื่อว่า telomerase

ปลาย telomeres ของมนุษย์ซึ่งประกอบไปด้วยลำดับเบสซ้ำๆ ที่มีลำดับดังนี้ TTAGGG โดยเอนไซม์ telomerase จะจดจำบริเวณที่มีเบส G อยู่มากโดยเฉพาะที่ปลาย telomere ที่มีปลาย 3′ ยื่นออกไปยาวกว่าปลาย 5′ ที่เป็นเส้นดีเอ็นเอคู่ขนาน (รูปที่ 30) โดยเอนไซม์จะต่อเติมสายของดีเอ็นเอด้าน 3′ นี้ให้ยาวออกไปในทิศทาง 5′ ไป 3′ ตามลำดับเบสที่พบซ้ำๆไปทีละชุดโดยอาศัย RNA ที่อยู่ในตัวเอนไซม์เป็นแม่แบบส่วนตัวเอนไซม์ telomerase จะไม่เติมช่องว่างที่เกิดในฝั่งตรงข้าม หลังจากมีการเติมปลายของ telomere ไปพอประมาณ DNA polymerase ก็จะเข้ามาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ complementary strand ถ้าปราศจากการทำงานของ telomerase ปลายโครโมโซมที่เป็นแบบเส้นตรงจะสั้นเข้าๆ ถ้าการหดสั้นเข้าของโครโมโซมเข้าไปจนถึงตำแหน่งที่เป็นยีน การหดสั้นข้าวของโครโมโซมนี้อาจทำให้ตายได้



รูปที่ 30. แสดงการทำงานของเอนไซม์ Telomerase ในการแก้ปัญหา telomere ดีเอ็นเอสาย lagging

ความยาวของ telomere และอายุไขของมนุษย์

เซลล์ร่างกายทั่วไปจะไม่มีการทำงานของเอนไซม์ telomerase ซึ่งต่างจากเซลล์ตันกำเนิด ดังนั้นเมื่อนำเซลล์ร่างกายของมนุษย์มาเลี้ยง เซลล์เหล่านี้จะมีการแบ่งเซลล์อย่างจำกัดโดยทั่วไปเพียง 20-70 ครั้ง ก่อนที่เซลล์นั้นจะแก่และตาย เมื่อเราวัดความยาวของ telomere ในเซลล์ร่างกายที่นำมาเลี้ยง พบความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของ telomere กับจำนวนครั้งของการแบ่งเซลล์ก่อนที่เซลล์จะแก่และตายในที่สุด เซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์แบบไม่จำกัดพบว่าเซลล์เหล่านี้จะมีการทำงานของเอนไซม์ telomerase เช่น เซลล์มะเร็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี