

บทที่ 12

การสังเคราะห์ DNA หรือกระบวนการเรพลิเคชัน

วัตถุประสงค์ เมื่อนักศึกษาเรียนจบบทนี้แล้ว ควรจะมีความสามารถในการ

1. บอกความแตกต่างระหว่างวิธีการสังเคราะห์ DNA ที่อาจเป็นไปได้ทั้ง 3 แบบ
2. อธิบายการสังเคราะห์ DNA หรือกระบวนการเรพลิเคชันแบบกึ่งอนุรักษ์
3. จำแนกประเภท คุณสมบัติและการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerases
4. อธิบายการทำงานของเอ็นไซม์ DNA ligase
5. เรียบเรียงขั้นตอนกระบวนการเรพลิเคชันตามลำดับ พร้อมเอ็นไซม์และแฟคเตอร์ต่าง ๆ ที่จำเป็นตลอดจนการยับยั้งกระบวนการ
6. เขียนการเรียงตัวที่ผิดปกติของเบสบนสาย DNA เพื่อแสดงการผ่าเหล่าแบบต่าง ๆ
7. เขียนกลไกการซ่อมแซม DNA ที่ผ่าเหล่า พร้อมตัวอย่างที่แสดงให้เห็นว่าระบบซ่อมแซม DNA อาจป้องกันมิให้เกิดการผ่าเหล่าได้

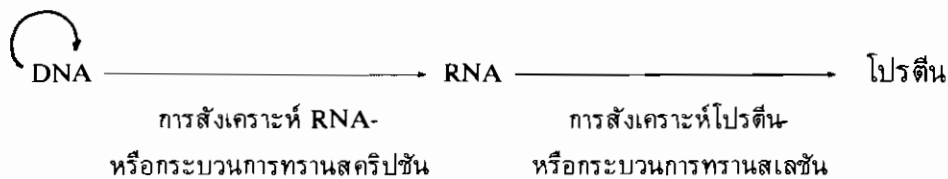
บทนำ

กรดนิวคลีอิกแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid, DNA) และกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) DNA และ RNA เป็นโพลีนิวคลีโอไทด์สายยาว มีองค์ประกอบหลักคือ เบส น้ำตาลและฟอสเฟต ใน DNA น้ำตาลเป็นประเภทดีออกซีไรโบส เบสเพียวรีนคือ อะดีนีนและกวานีน เบสพิริมิดีนคือ ไสโทซีนและไซโทซีน ใน RNA นั้นน้ำตาลเป็นไรโบส เบสเพียวรีนคือ อะดีนีนและกวานีน เบสพิริมิดีนคือ ไสโทซีนและยูราซิล จะเห็นว่า DNA ต่างกับ RNA ตรงส่วนประกอบของน้ำตาลและเบสพิริมิดีน

DNA เป็นสารพันธุกรรมที่เก็บข้อมูลต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตในโพรคาริโอท (prokaryotes) และยูคาริโอท (eukaryotes) โมเลกุล DNA จะมีลักษณะเป็นสายคู่เส้นตรงหรือสายคู่ขดปิด ในไวรัสสารพันธุกรรมอาจจะเป็น DNA หรือ RNA ทั้งนี้แล้วแต่ชนิดของไวรัส โมเลกุล DNA หรือ RNA ของไวรัสจะมีลักษณะเป็นสายเดี่ยวหรือสายคู่ก็ได้

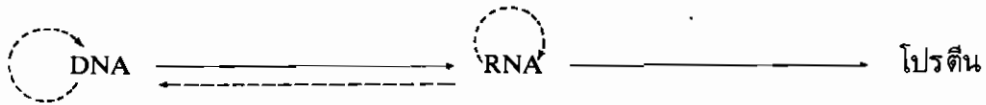
ข้อมูลทางพันธุกรรมซึ่งจะว่าไปแล้วก็คือ ข้อมูลของเบสเพียวรีนหรือเบสพิริมิดีนในกรดนิวคลีอิกนั่นเอง ข้อมูลนี้จะถูกถ่ายทอดไปยังลูกหลานโดยสมมุติฐาน Central Dogma ของ Francis Crick สมมุติฐานนี้ตั้งขึ้นในปี ค.ศ. 1958 กล่าวว่า DNA ในเซลล์แม่ (mother cell) จะมีการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ให้เหมือนเดิมก่อน ขั้นตอนนี้เป็นการลอกแบบของ DNA (replication หรือ duplication) DNA ที่ได้นี้จะถูกถ่ายทอดไปยังเซลล์ลูกหลาน (daughter cell) จากนั้นจะมีการถอดข้อมูล (transcription) ใน DNA ออกมาเป็น RNA RNA ที่สังเคราะห์ได้ก็จะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ (template) ในการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป ขั้นตอนนี้เป็นการแปลข้อมูล (translation) โปรตีนจะมีโครงสร้างและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นอย่างไรก็ขึ้นอยู่กับข้อมูลทางพันธุกรรมในโมเลกุล DNA แรกเริ่ม ดังนั้นการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมในเซลล์ทั่ว ๆ ไป จะประกอบด้วย 3 กระบวนการใหญ่ ๆ ดังแผนผังที่ได้แสดงไว้

การสังเคราะห์ DNA หรือกระบวนการเรพลีเคชัน



ต่อมาปี ค.ศ. 1970 Howard Temin และ David Baltimore ได้พบว่า oncogenic RNA viruses ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดเนื้องอก มีเอนไซม์ reverse transcriptase ทำให้ไวรัสนี้

สามารถที่จะใช้ RNA สายเดี่ยวเป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ DNA ได้ การถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมจึงมีกรณีพิเศษขึ้นมา สรุปได้ว่าทั้ง DNA และ RNA ต่างก็ถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ในขั้นตอนการลอกแบบได้ แต่โปรตีนไม่มีคุณสมบัติอันนี้ ข้อมูลในโปรตีนจึงไม่ถูกส่งต่อไป แผนผังข้างล่างแสดงการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมในกรณีพิเศษ เกิดขึ้นในเซลล์ที่ติดเชื้อจาก RNA ไวรัส



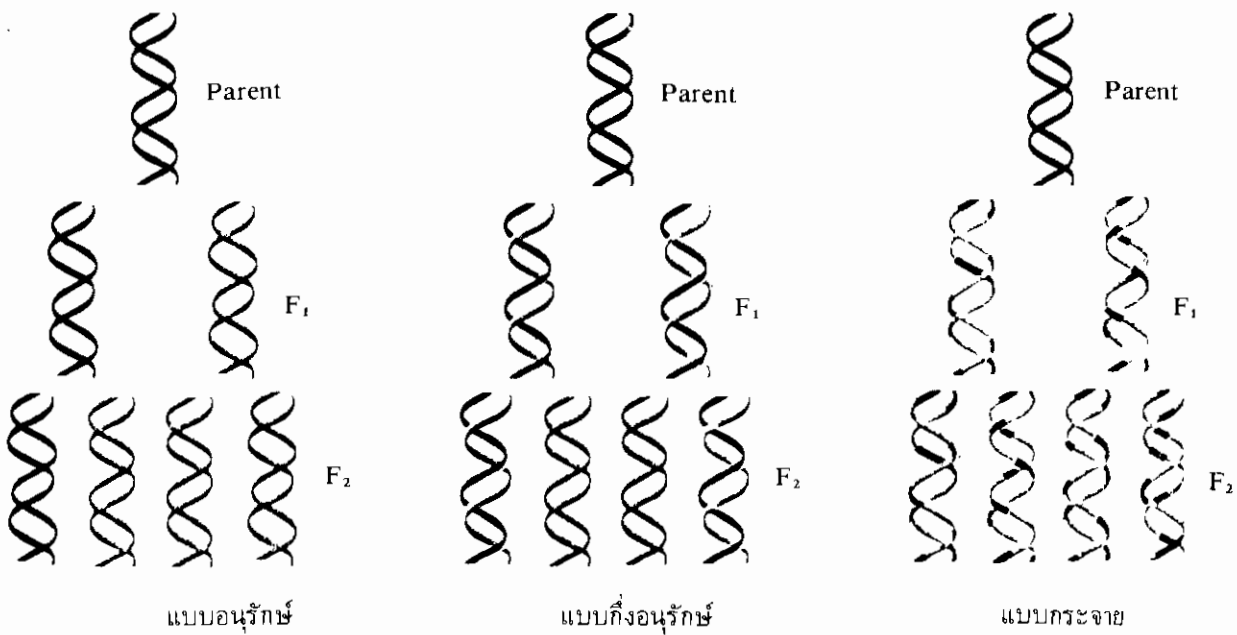
12.1 รูปแบบการสังเคราะห์ DNA หรือกระบวนการเรพลีเคชัน

มีวิธีการที่เป็นไปได้อยู่ 3 แบบ (รูปที่ 12-1) คือ

1. แบบอนุรักษ์ (conservative) ใช้ DNA สายคู่อันเดิมเป็นแม่พิมพ์สังเคราะห์ DNA สายคู่อันใหม่ขึ้นมาโดยคงคู่ของ DNA เดิมไว้ไม่ให้เกิดเปลี่ยนแปลง ในเซลล์รุ่นลูก (F_1) จะได้ DNA 2 คู่ คู่หนึ่งเป็น DNA คู่เดิมของเซลล์แม่ อีกคู่หนึ่งเป็น DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ทั้งสองสาย ในเซลล์รุ่นหลาน (F_2) จะได้ DNA 4 คู่ คู่หนึ่งเป็น DNA คู่เดิมของเซลล์แม่ อีกสามคู่เป็น DNA ที่สังเคราะห์ใหม่ล้วนทุกสาย

2. แบบกึ่งอนุรักษ์ (semi-conservative) วิธีการนี้จะแยก DNA สายคู่ที่เป็นแม่พิมพ์ออกเป็นสองสาย สังเคราะห์ DNA สายใหม่ขึ้นมาประกบสายเดิมแต่ละสายไว้ โดยมีการจับคู่เบสระหว่างสายเดิมกับสายใหม่ F_1 จะได้ DNA 2 คู่ แต่ละคู่จะมี DNA สายเดิมและสายใหม่พันเกลียวกันอยู่ F_2 จะได้ DNA 4 คู่ 2 คู่จะเหมือนใน F_1 อีก 2 คู่จะเป็น DNA สายใหม่ทั้งหมด

3. แบบกระจาย (dispersive) DNA สายเดิมจะถูกตัดเป็นช่วง ๆ แล้วสังเคราะห์ DNA ใหม่ขึ้นมาทดแทนส่วนที่ขาดหายไปให้ครบสมบูรณ์ ดังนั้นใน F_1 และ F_2 จะให้ DNA ที่มีลักษณะเหมือนกันหมดทุกคู่ เป็น DNA เดิมและ DNA ใหม่กระจายสลับกันเป็นช่วง ๆ ตลอดเกลียว



รูปที่ 12-1 กระบวนการเรพลิเคชันที่เป็นไปได้ทั้ง 3 วิธี

ช่วงเวลานั้น James Watson และ Francis Crick คาดว่าในสามวิธีการดังกล่าว แบบกึ่งอนุรักษ์น่าจะเป็นไปได้มากที่สุด ในเวลาต่อมา Matthew Meselson และ Franklin Stahl ได้ทำการทดลองเพื่อพิสูจน์เกี่ยวกับกลไกของกระบวนการเรพลิเคชัน

การทดลองของ Meselson และ Stahl เขาเลี้ยง *E. Coli* ในน้ำเลี้ยง (culture medium) ซึ่งมี $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ เป็นสารอาหารไนโตรเจน ^{15}N เป็นธาตุไอโซโทปที่หนักกว่า ^{14}N ซึ่งเป็นไนโตรเจนธรรมดา DNA ของ *E. Coli* ที่เลี้ยงไว้จึงมีไนโตรเจนของเบสเป็น ^{15}N จากนั้นเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเป็น $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ DNA ของ *E. Coli* ที่สังเคราะห์ขึ้นมาทีหลังก็จะมีไนโตรเจนของเบสเป็น ^{14}N DNA ที่มีไนโตรเจนเป็น ^{15}N จะหนักกว่า DNA ที่มี ^{14}N เลี้ยง *E. Coli* เหล่านั้นไว้จนกระทั่งแบ่งเซลล์ไปหลาย ๆ ครั้ง ทำการสกัด DNA ออกจากเซลล์ที่ได้ใน F_1 , F_2 และ F_3 ใช้เทคนิค density gradient equilibrium sedimentation ในซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) จะสามารถแยก DNA ที่มีน้ำหนักต่างกันได้ เทคนิคนี้ทำให้ CsCl จัดตัวตามเกรเดียนต์ความหนาแน่นตั้งแต่ปากหลอดเซนตริฟิวจ์จนถึงก้นหลอด DNA จะถูกแรงหมุนเหวี่ยงพาไปหยุดอยู่ตรงตำแหน่งที่แรงลอยตัวของ DNA เท่ากับความหนาแน่นของ CsCl ณ จุดนั้น ทำให้เห็นเป็นแถบ (band) แถบของ ^{15}N -DNA จะอยู่ล่าง แถบของ ^{14}N -DNA อยู่บน ส่วนแถบของ DNA สายผสมที่มีทั้ง ^{14}N และ ^{15}N จะอยู่ตรงกลาง (รูปที่ 12-2)

หลอดเปรียบเทียบ
ทิศทางการเซดิเมนต์



DNA ในเซลล์แม่เป็นสายหนัก
สองสาย (^{15}N -DNA)



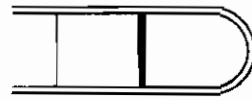
DNA สายเบาสองสาย
(^{14}N -DNA)



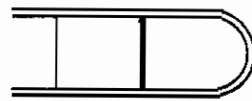
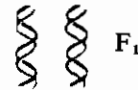
DNA สายหนักและ
สายเบาผสมกัน



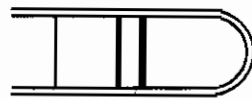
ผลที่ได้จากการทดลอง



DNA ที่ได้จากการ
แบ่งตัวครั้งที่ 1



DNA ที่ได้จากการ
แบ่งตัวครั้งที่ 2



DNA ที่ได้จากการ
แบ่งตัวครั้งที่ 3



รูปที่ 12-2 ผลการทดลองของ Meselson และ Stahl ทางซ้ายมือเป็นตำแหน่งต่างๆของแถบ DNA ทั้งที่เป็น DNA เปรียบเทียบและ DNA ที่ได้จากการทดลอง ทางขวามือเป็นองค์ประกอบของ DNA เปรียบเทียบสายหนัก (^{15}N -DNA) สายเบา (^{14}N -DNA) DNAสายหนักและ DNA สายเบาผสมกัน และองค์ประกอบของ DNA ที่ได้จากการทดลอง

ผลการทดลองของ Meselson และ Stahl ปรากฏออกมาดังรูป 12-2 ใน F_1 ได้ DNA แถบเดียวเป็นแถบของ ^{14}N - ^{14}N DNA F_2 ได้ 2 แถบ แถบหนึ่งเป็น ^{14}N - ^{14}N DNA และอีกแถบหนึ่งเป็น ^{14}N -DNA F_3 ได้ 2 แถบเช่นเดียวกับ F_2 แต่แถบซึ่งเป็น ^{14}N -DNA มีความเข้มมากกว่าใน F_2 ผลดังกล่าวสนับสนุนว่ากลไกการเรพลิเคชันเป็นแบบกึ่งอนุรักษ์เนื่องจาก

1. ผลของ F_1 ได้เพียงแถบเดียว การเรพลิเคชันที่เกิดอาจเป็นแบบกึ่งอนุรักษ์หรือแบบกระจาย แต่ไม่ใช่แบบอนุรักษ์เพราะถ้าเป็นแบบอนุรักษ์ต้องได้ DNA 2 แถบ

2. ผลของ F_2 ได้ DNA 2 แถบ แถบหนึ่งเป็น ^{14}N - ^{14}N DNA อีกแถบหนึ่งเป็น ^{14}N -DNA แสดงว่าการเรพลิเคชันไม่ใช่แบบกระจาย ถ้าเป็นแบบกระจายต้องได้ DNA ใน F_2 เพียง 1 แถบเท่านั้น และกลไกการเรพลิเคชันนี้ก็ได้เป็นแบบอนุรักษ์ ถ้าเป็นแบบอนุรักษ์จริง DNA 2 แถบที่ได้แถบหนึ่งเป็น ^{14}N -DNA อีกแถบหนึ่งเป็น ^{14}N -DNA

3. ผลของ F_3 ช่วยยืนยันว่าการเรพลิเคชันควรเป็นแบบกึ่งอนุรักษ์

การทดลองของ Meselson และ Stahl จึงช่วยพิสูจน์สมมุติฐานของ Watson และ Crick ที่ว่ากลไกของกระบวนการเรพลิเคชันของ DNA เป็นแบบกึ่งอนุรักษ์

12.2 เอ็นไซม์ DNA polymerases ของ E.Coli

ปัจจุบันเอ็นไซม์ DNA polymerases มี 3 ชนิด คือ

1. DNA polymerase I (DNA pol I)
2. DNA polymerase II (DNA pol II)
3. DNA polymerase III (DNA pol III)

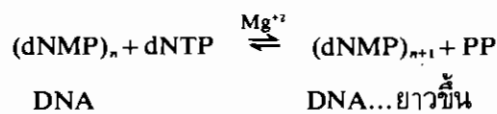
เอ็นไซม์ DNA pol I มีแอกติวิตีค่อนข้างสูง จึงบดบังแอกติวิตีของเอ็นไซม์ DNA pol II และ DNA pol III ไว้ เป็นเหตุให้เอ็นไซม์ DNA pol II และ DNA pol III ถูกค้นพบช้ากว่าเอ็นไซม์ DNA pol I เป็นเวลานานถึง 15 ปี

ตารางที่ 12-1 การเปรียบเทียบคุณสมบัติเอ็นไซม์ DNA polymerases ทั้ง 3 ชนิด

คุณสมบัติ	DNA pol I	DNA pol II	DNA pol III
1. หน้าที่			
5' → 3' polymerization	+	+	+
5' → 3' exonuclease	+	-	-
3' → 5' exonuclease	+	+	+
2. K_m สำหรับดีออกซีไรโบ- นิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต	ต่ำ	ต่ำ	สูง
3. การยับยั้งโดย-SH รีเอเจนต์	-	+	+
4. น้ำหนักโมเลกุล	109,000	120,000	180,000
5. จำนวนโมเลกุล/เซลล์	400	100	10
6. จำนวนนิวคลีโอไทด์ที่โพลีเมอเรส/ นาที/โมเลกุล ที่ 37°C	≈ 1,000	≈ 50	≈ 15,000
7. ค่า Molecular activity เปรียบเทียบ	1	0.05	15

12.2.1 เอ็นไซม์ DNA polymerase I

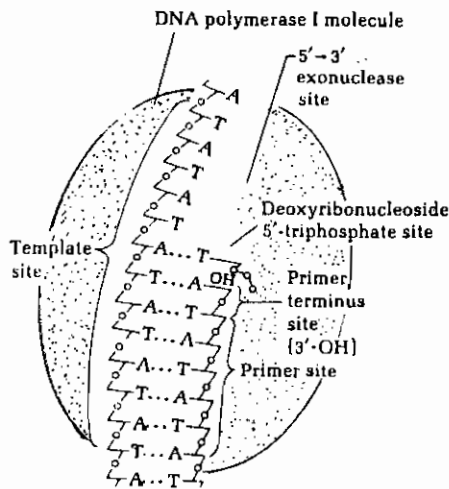
เป็นเปปไทด์สายเดี่ยวประกอบด้วยกรดอะมิโน 1,000 ตัว มีหมู่-SH แต่ไม่เกี่ยวข้องกับแอคติวิตี มีพันธะไดซัลไฟด์หนึ่งแห่ง อะดอมของธาตุสังกะสีซึ่งจำเป็นต่อแอคติวิตีของเอ็นไซม์มากจะอยู่ตรงบริเวณเร่ง เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA



บริเวณเร่งของเอ็นไซม์ DNA pol I มีตำแหน่งจำเพาะที่สำคัญ 5 แห่ง (รูปที่ 12-3) คือ

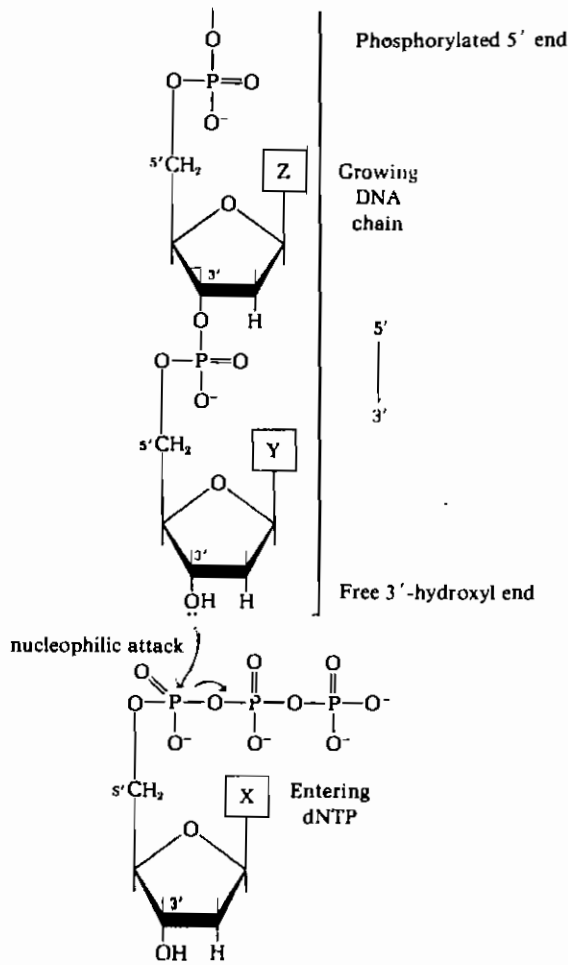
1. ตำแหน่งที่จะจับกับ DNA แม่พิมพ์ (template site)
2. ตำแหน่งที่จะจับกับไพรเมอร์ (primer site)

3. ตำแหน่งที่จะจับกับปลาย 3'-OH ของไพรเมอร์ (primer terminus site)
4. ตำแหน่งที่จะจับกับดิวอกซีไรโบนิวคลีโอไซด์-5'-ไตรฟอสเฟต และ Mg^{+2} (deoxyribonucleoside-5'-triphosphate site)
5. ตำแหน่งที่มีแอกติวิตีของ 5' → 3' exonuclease (5' → 3' exonuclease site)



รูปที่ 12-3 ตำแหน่งจำเพาะต่างๆ ที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์ DNA Pol I

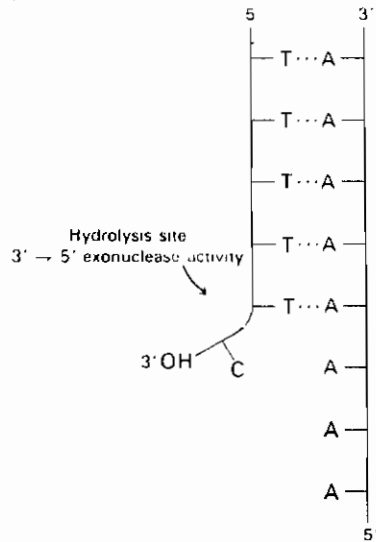
เอ็นไซม์ DNA pol I เร่งปฏิกิริยาการเติมดิวอกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ตัวใหม่เข้ากับ DNA ไพรเมอร์ที่มีปลาย 3'-OH อิสระ จะเป็นนิวคลีโอไซด์ตัวใดนั้นขึ้นอยู่กับ การเรียงตัวของเบสใน DNA แม่พิมพ์ อิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวทางปลาย 3'-OH อิสระจะไปทำปฏิกิริยา nucleophilic attack ตรงอัลฟาฟอสฟอรัสอะตอมของนิวคลีโอไซด์ตัวที่เข้าไปใหม่ สร้างเป็นพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์และไฮโดรไลซ์ไพโรฟอสเฟต (PP) ให้หลุดไป เอ็นไซม์ DNA pol I เร่งปฏิกิริยาการโพลีเมอไรซ์ในทิศทาง 5' → 3' ได้คราวละหลาย ๆ นิวคลีโอไซด์ที่เอ็นไซม์จะหลุดออกจากแม่พิมพ์แต่ละครั้ง (รูปที่ 12-4)



รูปที่ 12-4 ปฏิกิริยา nucleophilic attack โดยเอ็นไซม์ DNA pol I

แอกติวิตี 3' → 5' exonuclease ของเอ็นไซม์ DNA pol I

แอกติวิตี 3' → 5' exonuclease ของเอ็นไซม์ DNA pol I เป็นประโยชน์มากเวลามีความผิดพลาดในขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA สามารถไฮโดรไลซ์โมโนนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ถูกต้องออกจากปลาย 3'-OH อิสระของ DNA เบสของโมโนนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดนี้จะต้องไม่จับคู่อยู่กับเบสของ DNA อีกสายหนึ่ง (รูปที่ 12-5)



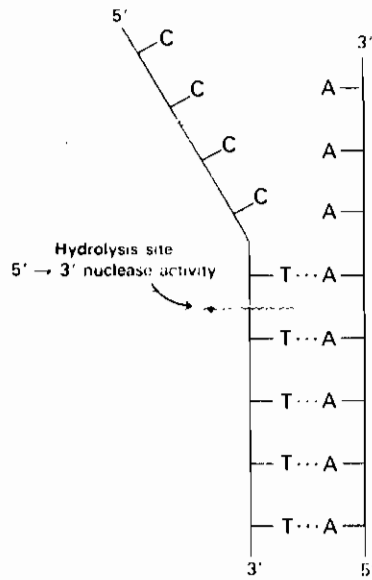
รูปที่ 12-5 แอคติวิตี $3' \rightarrow 5'$ exonuclease ของเอ็นไซม์ DNA pol I

ในรูป 12-5 เบสบนแม่พิมพ์เป็น A ดังนั้นเบสที่จับคู่กันควรจะเป็น T แต่กลายเป็น C จึงไม่มีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสทั้งสอง การโพลีเมอไรซ์หยุดชะงัก แอคติวิตี $3' \rightarrow 5'$ exonuclease จะช่วยตัดเบสออกไปก่อนแล้วจึงทำการโพลีเมอไรซ์ต่อไป จะเห็นว่า การสังเคราะห์ DNA นั้นมีความถูกต้องและแม่นยำมาก การเรียงตัวของเบสจะถูกตรวจซ้ำสอง เพื่อกันความผิดพลาด

แอคติวิตี $5' \rightarrow 3'$ exonuclease ของเอ็นไซม์ DAN pol I

แอคติวิตี $5' \rightarrow 3'$ exonuclease ต่างจากแอคติวิตี $3' \rightarrow 5'$ exonuclease ที่กล่าวมาแล้ว (รูปที่ 12-6) คือ

1. ทำการไฮโดรไลซ์ DNA สายคู่ได้ หมายถึงว่าเบสของ DNA สองสายจับคู่กันอยู่ด้วยพันธะไฮโดรเจนก็สามารถไฮโดรไลซ์ได้
2. จะไฮโดรไลซ์พันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทางด้านปลาย $5'$ หรือถัดปลาย $5'$ เข้าไปบ้างเล็กน้อย
3. อยู่คนละตำแหน่งกับแอคติวิตี $3' \rightarrow 5'$ exonuclease
4. แอคติวิตีเพิ่มสูงขึ้นเวลาที่มีการสังเคราะห์ DNA



รูปที่ 12-6 แอคติวิตี 5' → 3' exonuclease ของเอ็นไซม์ DNA pol I

แอคติวิตี 5' → 3' exonuclease จะช่วยแก้ไขข้อผิดพลาดในโมเลกุล DNA เช่น เวลาที่ DNA ถูกฉายแสงอุลตราไวโอเล็ตแล้วเกิดเป็นโรมินไดเมอร์ขึ้น แอคติวิตีนี้จะช่วยตัดสาย DNA ช่วงที่เกิดโรมินไดเมอร์ออก

หากทำการย่อยสลายเอ็นไซม์ DNA pol I ด้วยเอ็นไซม์ protease จะได้ผลิตภัณฑ์สองส่วน ส่วนแรกเป็นส่วนที่เล็กและมีแอคติวิตี 5' → 3' exonuclease ส่วนที่สองใหญ่กว่ามีแอคติวิตีของ 3' → 5' exonuclease และ polymerase จึงมีการคาดกันว่าในโมเลกุลเอ็นไซม์ DNA pol I ซึ่งเป็นเปปไทด์สายเดี่ยวจะประกอบด้วยเอ็นไซม์ถึงสองชนิดด้วยกัน

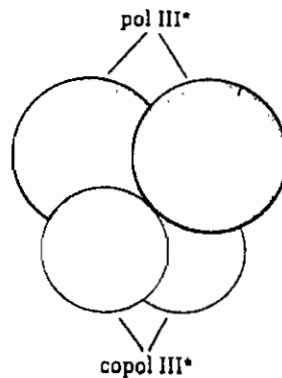
12.2.2 เอ็นไซม์ DNA polymerase II และ DNA polymerase III

ปี ค.ศ. 1969 P.DeLucia และ J.Cairns ได้แปรสายพันธุ์ E.Coli เป็น pol A₁ E.Coli pol A₁ นี้มีแอคติวิตีของ DNA pol I น้อยมากเพียงประมาณ 0.5-1.0% ของแอคติวิตีเดิม การเจริญเติบโต การแพร่พันธุ์ การเรพลิเคชันในสายพันธุ์ pol A₁ เหมือนสายพันธุ์เดิม (wild type) ทุกประการ แต่จะไวต่อแสงอุลตราไวโอเล็ตและรังสีเอ็กซ์มากขึ้น การผ่าเหล่าแบบ deletion เพิ่มสูงขึ้นเช่นนี้แสดงว่า E.Coli pol A₁ ถึงแม้จะไม่มีเอ็นไซม์ DNA pol I กระบวนการเรพลิเคชันก็ยังเกิดขึ้นได้ดังเดิม แต่ความผิดพลาดของ DNA ไม่ได้รับการแก้ไข ทำให้ P.Delucia และ J.Cairns ลงความเห็นว่ายังมีเอ็นไซม์อื่นที่ไม่ใช่ DNA Pol I ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์

DNA เอ็นไซม์ DNA Pol I น่าจะทำหน้าที่เกี่ยวกับการซ่อมแซมแก้ไขสิ่งผิดพลาดของ DNA มากกว่า

ในเวลาต่อมา M.L.Gefer และคณะได้ทำการสกัดเอ็นไซม์ DNA pol II ได้สำเร็จ เอ็นไซม์นี้เป็นเปปไทด์สายเดี่ยวมีคุณสมบัติดังตาราง 12-1 บทบาทและหน้าที่ของเอ็นไซม์ DNA pol II ยังไม่เป็นที่กระจ่างนัก

ในปี ค.ศ. 1972 ได้มีการค้นพบเอ็นไซม์ DNA pol III โดย T.Kornberg (ลูกชายของ A.Kornberg) และ M.L.Gefer เอ็นไซม์ DNA pol III ไม่ค่อยอยู่ตัวลำบากต่อการสกัดมาก จึงทำให้พบเอ็นไซม์นี้ทีหลังสุด อย่างไรก็ตามเขาทั้งสองได้ทำให้เอ็นไซม์นี้บริสุทธิ์ขึ้นจากเดิมถึง 10^4 เท่า ปรากฏว่า DNA pol III ว่องไวมากที่สุดในกลุ่ม DNA polymerases ทั้งสามชนิด (ดูตาราง 12-1) A.Kornberg และคณะพบว่าเอ็นไซม์ DNA pol III ซับซ้อนกว่าที่คิดไว้มาก รูปแบบที่ว่องไวจะเป็น pol III* ซึ่งรวมตัวอยู่กับ copolymerase III* (copol III*) เป็นคอมเพล็กซ์ระหว่าง pol III*-copol III* เรียกว่าไฮโลเอ็นไซม์ DNA pol III (รูปที่ 12-7)



รูปที่ 12-7 คอมเพล็กซ์ของ pol III*-copol III* ซึ่งจะเป็นตัวเริ่มต้นกระบวนการเรพลิเคชันเมื่อมีทุกสิ่งพร้อม หลังจากเริ่มต้นไปแล้ว copol III* จะแตกตัวออกพร้อมกับ $ADP + P_i$

ปัจจุบันคาดว่าเอ็นไซม์ DNA pol I ทำหน้าที่เกี่ยวกับการซ่อมแซม DNA เอ็นไซม์ DNA pol II ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด ส่วนเอ็นไซม์ DNA pol III ทำหน้าที่เรพลิเคชันโดยตรง DNA polymerases ทั้งสามชนิดไม่สามารถเริ่มต้นการสังเคราะห์ DNA ได้ด้วยตนเอง ต้องอาศัยไพโรเมอร์เป็นตัวตั้งต้น

12.3 เอ็นไซม์ DNA ligase

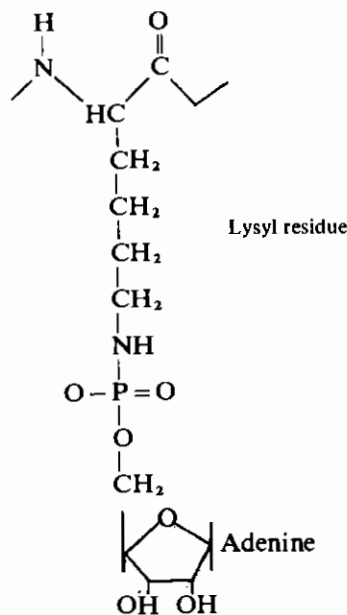
เอ็นไซม์ DNA ligase ของ E.Coli เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวน้ำหนักโมเลกุล 77,000 เร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์เพียงหนึ่งพันธะระหว่าง 3'-OH ของ DNA สายหนึ่ง กับปลาย 5'-PO₄ ของ DNA อีกสายหนึ่ง เป็นการเชื่อม DNA สายหนึ่งสายใดใน DNA สายคู่ให้ต่อเนื่องกันซึ่งจำเป็นมากในการสังเคราะห์ DNA การซ่อมแซมรอยหักของ DNA รวมทั้งวิธีการต่าง ๆ ทางเจเนติกส์คอมบินเนชัน. ปฏิกิริยาการเชื่อมสาย DNA นี้ต้องการพลังงาน สำหรับ E.Coli หรือแบคทีเรียจะใช้ NAD⁺ เป็นตัวให้พลังงาน เซลล์สัตว์หรือไวรัสบางชนิดจะใช้ ATP เป็นแหล่งพลังงานแทน

กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ DNA ligase มี 3 ขั้นตอน (รูปที่ 12-8) คือ

ขั้นตอนที่ 1 NAD⁺ หรือ ATP เข้าทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์เป็นคอมเพล็กซ์ของ E-AMP โดยที่ AMP จะจับกับหมู่ Σ -NH₂ ของกรดอะมิโนไลซีนจำเพาะในโมเลกุลเอ็นไซม์ด้วยพันธะฟอสโฟเอมีต

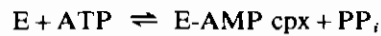
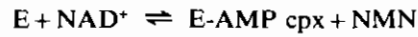
สายเปปไทด์ของเอ็นไซม์

DNA ligase



โครงสร้างคอมเพล็กซ์ E-AMP

ข้อแตกต่างระหว่างการใช้ NAD⁺ หรือ ATP



ถ้าใช้ ATP เป็นแหล่งพลังงาน จะเกิดไพโรฟอสเฟต PP_i ซึ่งจะถูกสลายต่อเป็น อนินทรีย์ฟอสเฟต (2P_i) ทำให้ปฏิกิริยาดำเนินไปทางขวาได้ดีขึ้น เท่ากับว่าต้องสลายพันธะ ฟอสเฟตถึงสองพันธะในการเกิดคอมเพล็กซ์ E-AMP

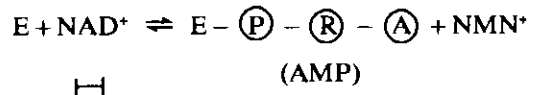
ขั้นตอนที่ 2 มีการโยกย้าย AMP จากเอ็นไซม์ DNA ligase ไปยังปลาย 5'-PO₄ ของ DNA สายหนึ่ง เพื่อสร้างพันธะไพโรฟอสเฟตอันใหม่ ทั้งนี้เป็นการกระตุ้นหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ของสาย DNA

ขั้นตอนที่ 3 เกิดปฏิกิริยา nucleophilic attack ของปลาย 3'-OH ไปยังฟอสฟอรัส อะตอมของหมู่ฟอสเฟตที่ถูกกระตุ้น เป็นการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์เชื่อม DNA 2 สาย เข้าด้วยกัน ส่วนที่เป็นโมเลกุล AMP หลุดออก

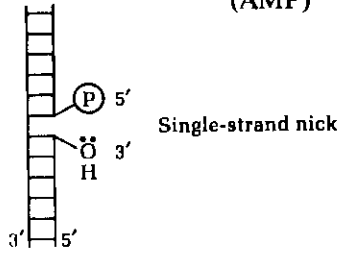
12.4 รายละเอียดและขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA หรือกระบวนการเรพลิเกชัน

12.4.1 RNA ไพรมอร์ (RNA primer)

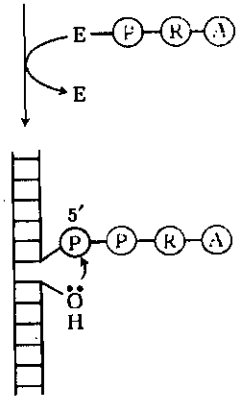
เอ็นไซม์ DNA polymerase ไม่สามารถเริ่มต้นการสังเคราะห์ DNA ได้เอง ต้องอาศัย RNA ไพรมอร์ซึ่งมีความยาวโดยประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ และมีปลาย 3'-OH อิสระ เอ็นไซม์ primase เป็นเอ็นไซม์ RNA polymerase ที่จำเพาะชนิดหนึ่ง ทำหน้าที่สังเคราะห์ RNA ไพรมอร์นี้ขึ้นมา โดยมีเบสเข้าคู่กันกับ DNA แม่พิมพ์ การสังเคราะห์ RNA ไม่ต้องการ ไพรมอร์ โอลิโกเอ็นไซม์ DNA pol III จะเติมดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์-5'-ไตรฟอสเฟตเข้าที่ ปลาย 3'-OH ของ RNA ไพรมอร์ DNA ที่สังเคราะห์จึงติดอยู่กับ RNA ไพรมอร์ เอ็นไซม์ DNA pol I มีหน้าที่ที่จะต้องไฮโดรไลซ์ RNA ไพรมอร์ออกแล้วสังเคราะห์ DNA ขึ้นมาทดแทน (รูปที่ 12-9)



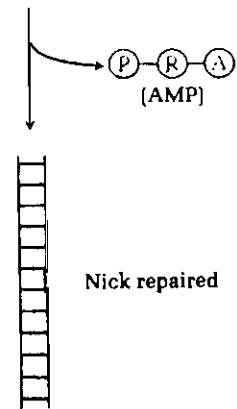
ขั้นตอนที่ 1



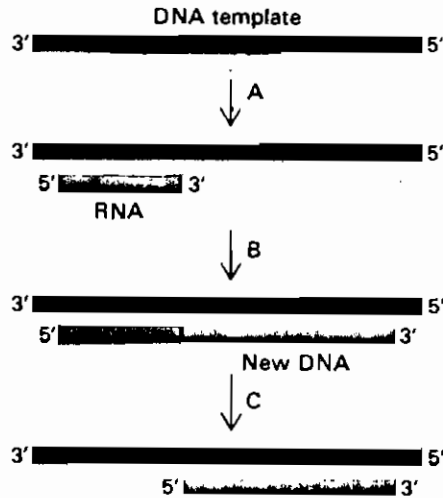
ขั้นตอนที่ 2



ขั้นตอนที่ 3



รูปที่ 12-8 การเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ DNA ligase ใน *E. Coli* ในรูปเป็นการซ่อมแซมรอยหักของ DNA

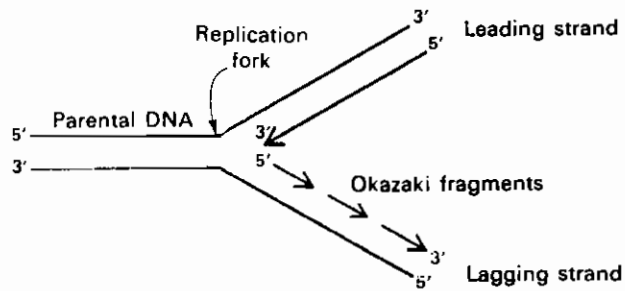


รูปที่ 12-9 การเริ่มต้นการสังเคราะห์ DNA

- A) เอ็นไซม์ primase สังเคราะห์ RNA ช่วงสั้น ๆ
- B) RNA ช่วงสั้นนั้นจะทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์
- C) เอ็นไซม์ DNA pol I จะไฮโดรไลซ์ส่วนไพรเมอร์ออก ทำให้เกิดช่องว่าง แล้วสังเคราะห์ DNA ขึ้นมาแทน

12.4.2 การสังเคราะห์ DNA เป็นแบบไม่ต่อเนื่อง (discontinuous)

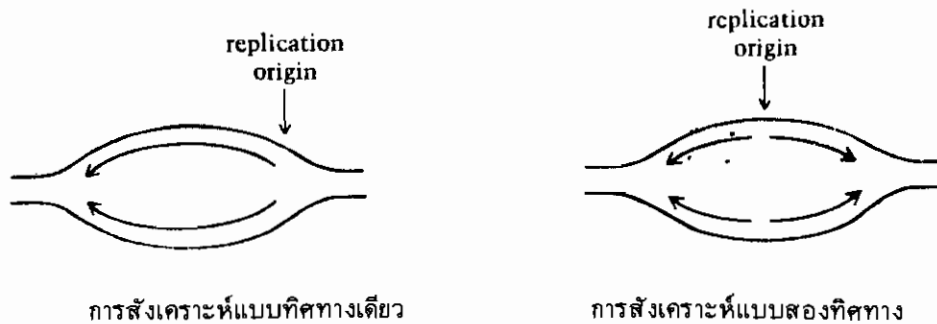
กระบวนการเรพลิเคชันเกิดขึ้นในช่วงเวลาหนึ่ง ๆ ของวัฏจักรเซลล์เท่านั้น มิได้เกิดขึ้นตลอดเวลา โมเลกุล DNA ที่เป็นเกลียวคู่จะคลายเกลียวออกเป็นสองสาย เกิดเป็น replication fork DNA สายเก่า (parental strand) ทั้งสองสายจะทำหน้าที่แม่พิมพ์ ทิศทางการสังเคราะห์เป็นแบบ 5' → 3' DNA สายใหม่ที่สังเคราะห์ได้จะมีสายหนึ่งเป็นสายต่อเนื่อง (leading strand) อีกสายหนึ่งเป็นสายไม่ต่อเนื่อง (lagging strand) DNA ที่ได้จะเป็นช่วงสั้น ๆ หลายช่วง แต่ละช่วงยาวประมาณ 1,000-2,000 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า แท่งโอคาซากิ (Okazaki pieces หรือ Okazaki fragments) เรียกตามชื่อ Reiji Okazaki ผู้ค้นพบ แท่งโอคาซากิเหล่านี้จะถูกเชื่อมติดกันเป็นสายที่หลังโดยเอ็นไซม์ DNA ligase (รูปที่ 12-10)



รูปที่ 12-10 แผนภาพแสดง replication fork สาย DNA ที่ต่อเนื่อง (leading strand) และสาย DNA ที่ไม่ต่อเนื่อง (lagging strand)

12.4.3 ทิศทางการสังเคราะห์ DNA

บน DNA จะมีจุดเริ่มต้นที่จำเพาะ (Origin locus) จากจุดนี้กระบวนการเรพลิเคชันจะเป็นไปในทิศทางเดียว (Unidirectional) หรือสองทิศทาง (bidirectional) ก็ได้ จากการศึกษาพบว่าเซลล์ต่างๆ แทบทุกชนิดมีเรพลิเคชันเป็นแบบสองทิศทาง ยกเว้น DNA ไวรัสจะมีเรพลิเคชันเป็นแบบทิศทางเดียว ไม่ว่าทิศทางการสังเคราะห์จะเป็นแบบใดก็ตาม เรพลิเคชันของ DNA แม้พิมพ์ทั้งสองสายจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน (simultaneously)



การสังเคราะห์แบบทิศทางเดียว

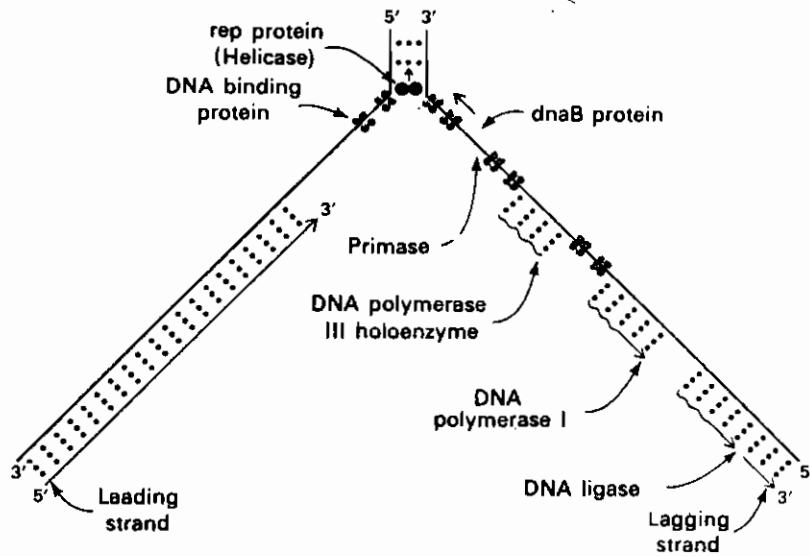
การสังเคราะห์แบบสองทิศทาง

DNA ของไวรัสและ DNA ของโปรคาริโอตจะมีจุดเริ่มต้นจำเพาะเพียงแห่งเดียวในโมเลกุล ส่วน DNA ของยูคาริโอตจะมีจุดเริ่มต้นจำเพาะหลายจุดด้วยกัน

12.4.4 โปรตีนที่จำเป็นในกระบวนการเรพลิเคชันของ E. Coli

ตารางที่ 12-2 หน้าที่ ขนาดโมเลกุล จำนวนโมเลกุลภายในเซลล์ของโปรตีนต่างๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์ DNA (ดูประกอบรูปที่ 12-11)

ชื่อโปรตีน	หน้าที่	ขนาดโมเลกุล (Kdal)	จำนวนโมเลกุล/เซลล์
DNA gyrase	เปลี่ยน supertwisted DNA ไปเป็น relaxed DNA	400	-
helicase	คลายเกลียว DNA	65	50
DNA binding protein (DBP)	ช่วยค้ำจุน DNA สายเดี่ยว ที่จะทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์	74	300
dnaB protein	ชี้แนะจุดเริ่มต้นให้เอ็นไซม์ primase	≈ 250	20
primase	สังเคราะห์ RNA ไพรมเมอร์	60	100
DNA pol III holoenzyme	สังเคราะห์ DNA	>300	20
DNA pol I	ตัด RNA ไพรมเมอร์ออกและ สังเคราะห์ DNA ขึ้นมา ทดแทน	109	300
DNA ligase	เชื่อม DNA fragments	74	300



รูปที่ 12-11 แผนภาพแสดงโปรตีนและเอ็นไซม์ต่างๆ ตรงตำแหน่ง replication fork (ดูประกอบกับตาราง 12-2)

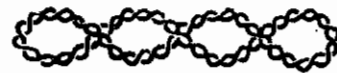
12.4.5 ขั้นตอนกระบวนการเรพลิเคชันใน E.Coli

แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน (รูปที่ 12-13)

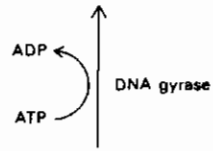
1. ขั้นตอนการเตรียมตัว (Prepriming)
2. ขั้นตอนการสร้าง RNA ไพรมเมอร์ (Priming)
3. ขั้นตอนเพิ่มความยาว (Elongation)
4. ขั้นตอนหยุดการสังเคราะห์ (Termination)

ขั้นตอนการเตรียมตัวและขั้นตอนการสร้าง RNA ไพรมเมอร์

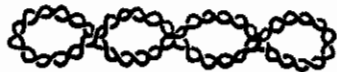
เอ็นไซม์ DNA gyrase เปลี่ยนคอนฟอร์เมชันของ supertwisted DNA (อาจเรียก supercoiled DNA หรือ superhelical DNA) ให้เป็น relaxed DNA ก่อน (ดูรูป 12-12) จากนั้นอาศัยความร่วมมือของโปรตีนต่างๆ มากมาย (ดูรูป 12-11) เอ็นไซม์ helicase ไปจับที่โมเลกุลของ relaxed DNA ทำให้เกิดการคลายเกลียวตรงตำแหน่ง replication fork DNA สายเดียว 2 สายที่ได้จากการคลายเกลียวจะมีโปรตีน DBP ช่วยค้ำจุนโครงสร้าง เพื่อทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ที่เหมาะสม โปรตีน dnaB เป็นตัวชี้ตำแหน่งที่จะสร้าง RNA ไพรมเมอร์ในทิศทาง 5' → 3' แก่เอ็นไซม์ primase โปรตีน dnaB เคลื่อนตัวไปตามจุดต่างๆ ของแม่พิมพ์เพื่อเริ่มการสร้าง RNA ไพรมเมอร์หลายๆ ช่วง



Negatively supercoiled DNA

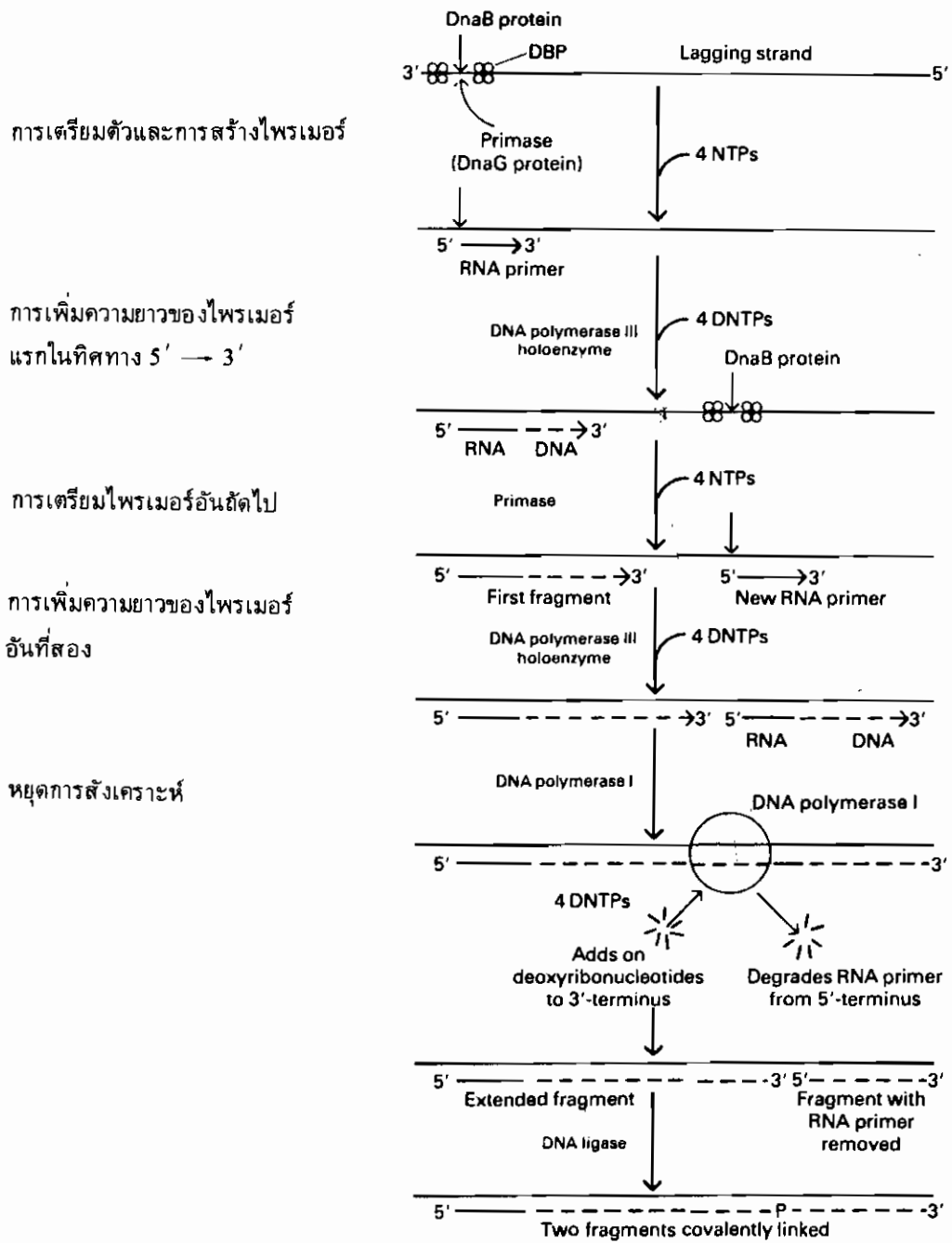


Relaxed DNA



Positively supercoiled DNA

รูปที่ 12-12 การทำงานของเอ็นไซม์ gyrase



รูปที่ 12-13 การเรพลิเคชันบน DNA สายไม่ต่อเนื่อง (lagging strand)

ขั้นตอนเพิ่มความยาวและขั้นตอนหยุดการสังเคราะห์

เมื่อมี RNA ไพรเมอร์แล้ว ไฮโลเอ็นไซม์ DNA pol III จะเร่งปฏิกิริยาการเติมนิวคลีโอไซด์-5'-ไตรฟอสเฟตที่เข้าคู่กับเบสบน DNA แม่พิมพ์เข้าที่ปลาย 3'-OH ของ RNA ไพรเมอร์ เป็นการต่อสายให้ยาวออกไปเรื่อยๆ ในทิศทาง 5' → 3' จนได้แห่งโอกาซาคี เมื่อปลาย 3'-OH ของแห่งโอกาซาคีอันแรกใกล้จะพบกับ RNA ไพรเมอร์ของแห่งโอกาซาคีอันถัดไป เอ็นไซม์ DNA pol I จะตัด RNA ไพรเมอร์ของแห่งโอกาซาคีอันที่สองออกไป เอ็นไซม์ DNA pol I จะตัด RNA ไพรเมอร์ของแห่งโอกาซาคีอันที่สองออกไป แล้วเติมดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์-5'-ไตรฟอสเฟตเข้าที่ปลาย 3'-OH ของแห่งโอกาซาคีแห่งแรกแทน (ดูรูป 12-13) การตัดไพรเมอร์อาศัยแอกติวิตี 5' → 3' exonuclease ส่วนการเติมนิวคลีโอไทด์อาศัยแอกติวิตี 5' → 3' polymerization ของเอ็นไซม์ DNA pol I ทั้งสองอย่างนี้เกิดขึ้นคนละแห่งบนบริเวณเร่งของโมเลกุลเอ็นไซม์ เมื่อการเรียงตัวของเบสครบตาม DNA แม่พิมพ์แล้ว เอ็นไซม์ DNA ligase จะเป็นตัวเชื่อมปลาย 3'-OH และปลาย 5'-PO₄ ของแห่งโอกาซาคีแต่ละแห่ง ให้ต่อกันเป็นสาย DNA ที่สมบูรณ์

12.4.6 การยับยั้งกระบวนการเรพลิเคชัน

สารยับยั้งกระบวนการเรพลิเคชันมีมาก แต่ละประเภทก็มีกลไกการยับยั้งต่างกันออกไป เป็นต้นว่า

1. อาจจะไปจับกับเอ็นไซม์ DNA polymerases
2. อาจจะไปจับกับโปรตีนต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการสร้าง DNA
3. อาจจะสอดแทรกโมเลกุลเข้าไปในสาย DNA แม่พิมพ์ ขัดขวางการสังเคราะห์ DNA
4. อาจจะมีโครงสร้างคล้ายคลึงดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์-5'-ไตรฟอสเฟต ซึ่งเป็นซับสเตรทในกระบวนการเรพลิเคชัน ทำให้สารนั้นกลายเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันกันกับซับสเตรทที่แท้จริง ยังผลให้การสังเคราะห์สิ้นสุดลง
5. นอกจากนั้นก็ยังมีสารพวกยาปฏิชีวนะ สารที่ทำให้เกิดการผ่าเหล่า (mutagens) สารพิษ สารต่อต้านเชื้อไวรัส (anti-viral agents) ฯลฯ เป็นต้น

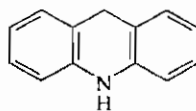
12.5 การผ่าเหล่า (Mutation) ในโมเลกุล DNA

สารเคมีบางอย่างทำให้เกิดการผ่าเหล่าได้ การผ่าเหล่าที่การเรียงตัวของเบสบนโมเลกุล DNA ผิดไปเพียงตำแหน่งเดียว (single-point mutation) แบ่งออกเป็น 4 ชนิด (ดูรูป 12-14) ดังนี้ คือ

1. Transition คู่ของเบสเพียวรีน-พิริมิดีนคู่หนึ่งถูกแทนที่ด้วยเบสเพียวรีน-พิริมิดีนอีกคู่หนึ่ง การผ่าเหล่าชนิดนี้อาจเกิดขึ้นเองหรือถูกชักนำด้วยสารเคมีที่โครงสร้างคล้ายคลึงเบส (base analog) เช่น 5-โบรโมยูราซิล (5-bromouracil, BU) โครงสร้างคล้ายโรบิน อาจเข้าแทนที่โรบินได้เวลาเกิดเรพลิเคชัน ซึ่งถ้าเป็น BU จะจับคู่กับกวานีน (BU-G) แทนที่จะเป็นโรบินจับกับอะดีนีน (T-A) 2-อะมิโนเพียวรีน (2-aminopurine, AP) สามารถแทนที่ได้ทั้งอะดีนีนและกวานีนซึ่งเป็นเบสเพียวรีนทั้งคู่ กรดไนตริกอาจทำให้อะดีนีนเกิดปฏิกิริยาดีอะมิเนชันกลายเป็นไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) แล้วจับคู่กับไซโตซีน (H-C) แทนที่จะเป็นอะดีนีนจับคู่กับโรบิน (A-T)

2. Transversion คู่ของเบสเพียวรีน-พิริมิดีนคู่หนึ่งถูกแทนที่ด้วยเบสพิริมิดีน-เพียวรีนอีกคู่หนึ่ง สามารถเกิดขึ้นได้เองและเป็นการผ่าเหล่าชนิดที่พบบ่อย

3. Insertion มีเบสคู่หนึ่งเพิ่มขึ้นมาเป็นพิเศษไปจากการเรียงตัวตามปกติของเบสบนสาย DNA การผ่าเหล่าแบบนี้ถูกชักนำให้เกิดขึ้นโดยสารเคมี acridine สารนี้เป็นสารประกอบพวก heterocyclic โมเลกุลมีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติกที่อยู่ในระนาบเดียวกัน ง่ายแก่การสอด



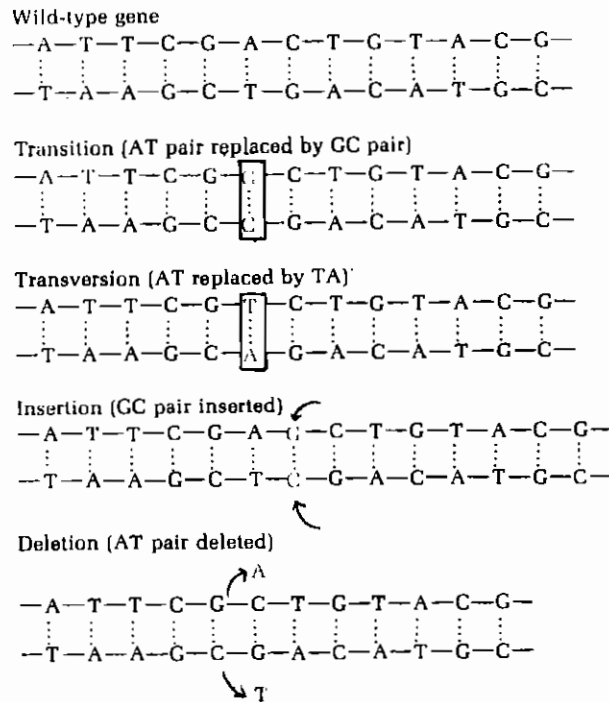
acridine

ตัวแทรกเข้าไปในระหว่างเบสบน DNA สายใดก็ได้ เมื่อเกิดเรพลิเคชันจะมีการจับคู่ระหว่าง acridine กับเบสตัวใดตัวหนึ่ง ซึ่งเมื่อเรพลิเคชันอีกครั้ง DNA สายใหม่ที่ได้อีกก็จะมีเบสเพิ่มขึ้นมาอีกหนึ่งคู่

4. Deletion เบสคู่หนึ่งหายไปจากการเรียงตัวตามปกติบนสาย DNA สาเหตุของการที่เบสหายไปเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเนื่องจาก pH หรืออุณหภูมิสูงเกินไป หรือสารเคมีบางอย่างทำให้เกิดเบสที่ไม่สามารถจับคู่ได้ ตัวอย่างของสารที่ทำให้เกิดการผ่าเหล่าแบบนี้คือ proflavin

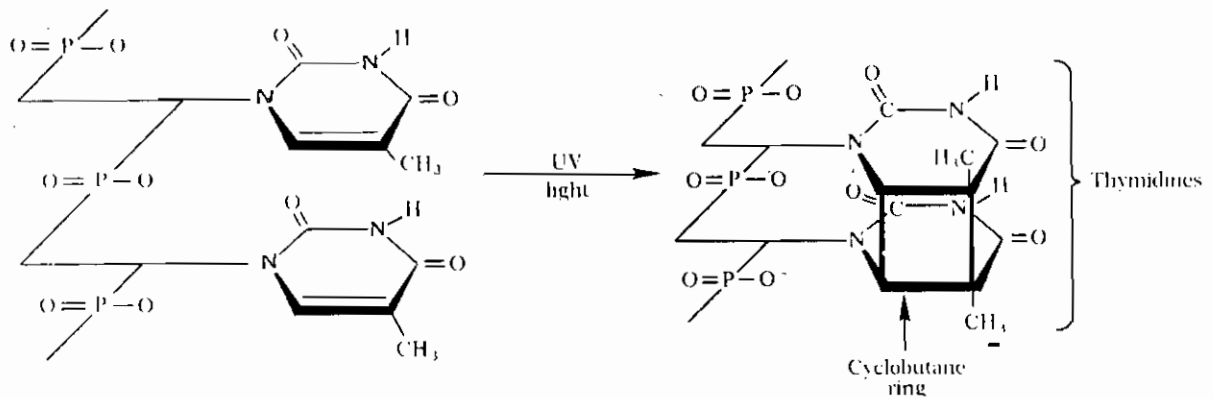
การผ่าเหล่าแบบ Transition และ Transversion จัดเป็น silent mutation การเรียงตัวของเบสที่ผิดไปในลักษณะเช่นนี้มีผลทำให้กรดอะมิโนบนโมเลกุลโปรตีนผิดพลาดไปเพียงตัวเดียว แต่โปรตีนนั้นยังคงทำหน้าที่อย่างเดิมได้ ส่วน Insertion และ deletion จัดเป็น frame-

shift mutation การที่เบสเพิ่มขึ้นมาหรือหายไปหนึ่งคู่ ทำให้การอ่านรหัสดัดยยะ (triplet code) ตั้งแต่จุดที่เกิดการผ่าเหล่าขึ้นไปทางปลาย 3' ผิดพลาดไปจากเดิมหมด กรดอะมิโนในโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นมาจะผิดไปหลายตัว เช่นนี้เป็นอันตรายรุนแรงถึงชีวิต



รูปที่ 12-14 Single-point Mutation ประเภทต่างๆ

มีรายงานว่า lysergic acid diamide (LSD) และคาเฟอีน (caffeine) เป็นสารที่ชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าได้เช่นกัน รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมาเป็นรังสีที่มีกำลังสูงในการทำให้เกิดการผ่าเหล่า แสงอัลตราไวโอเล็ตอาจทำให้ผิวหนังของคนที่ถูกแดดนาน ๆ เป็นมะเร็งได้ โดยที่แสงนี้จะไปทำให้เกิดไธมีนไดเมอร์ (thymine dimer หรือ T-T dimer) ขึ้นระหว่างเบสไธมีนสองตัวที่อยู่ติดกัน (รูปที่ 12-15) ไธมีนทั้งสองจะสร้างพันธะโควาเลนต์เป็นวงแหวนไซโคลบิวเทน (cyclobutane ring) เช่นนี้ทำให้สายเกลียว DNA ตรงบริเวณนั้นเกิดการบิดจนเสียรูป (distortion) เปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันของโมเลกุล DNA เวลาเรพลีเคชันอาจผิดพลาดบางครั้งอันตรายรุนแรงถึงตายได้



รูปที่ 12-15 โครงสร้างไธมีนไดเมอร์ (T-T ไดเมอร์)

12.6 การซ่อมแซม DNA (Repair of DNA)

DNA เป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างเปราะแตกหักเสียหายได้ง่ายโดยที่

1. โมเลกุล DNA สายเดี่ยวหรือสายคู่อาจจะแตกหักเนื่องมาจากการคดงอหรือแรงเฉือน (shear forces)
2. เบสเพียวรีนภายในโมเลกุล DNA อาจจะถูกไฮโดรไลซ์หลุดไป ถ้ามีการเปลี่ยนแปลง pH ในที่นั้นต่ำลงไปจนสภาวะเกือบจะเป็นกรดอ่อน
3. สารเคมีจากสิ่งแวดล้อมบางอย่างอาจเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเบสได้
4. รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา แสงอัลตราไวโอเล็ต สามารถทำให้เบสเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี

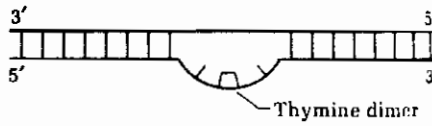
อย่างไรก็ตามข้อมูลต่าง ๆ บนสายพันธุกรรม DNA ถูกส่งไปยังลูกหลานหลายชั่วอายุ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ทั้งนี้เพราะ DNA มีกลไกที่จะซ่อมแซมโมเลกุลส่วนที่บกพร่องหรือแตกหักโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์

กลไกการซ่อมแซม DNA (repair mechanisms) แบ่งเป็น 3 วิธี คือ

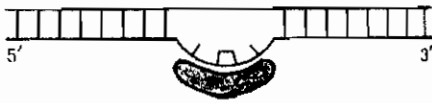
1. Enzymatic photoreactivation วิธีนี้ยังไม่ค่อยเป็นที่กระจ่างนัก ใช้ซ่อมแซมความผิดพลาดของ DNA ที่เป็นไธมีนไดเมอร์ (ดูรูป 12-15 และ 12-16) กระทำโดยฉายแสงสีน้ำเงิน (Visible blue light) ไปที่เซลล์นั้น พลังงานจากแสงดังกล่าวจะไปกระตุ้น photoreactivation enzyme ซึ่งจับอยู่ตรงตำแหน่งที่เกิดไธมีนไดเมอร์อยู่แล้ว ให้สลายพันธะโควาเลนต์ที่เชื่อมเบส

โรบินสองตัว ซึ่งก็คือการทำลายวงแหวนไซโคลอิวเทนให้ได้เบสโรบินอิสระนั่นเอง เซลล์ส่วนใหญ่จะมี photoreactivation enzyme จึงมีกลไกการซ่อมแซมแบบนี้

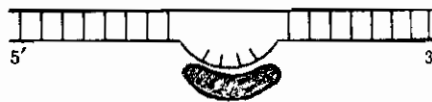
1. ความบกพร่องเนื่องจากโรบินไดเมอร์



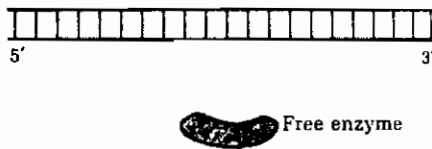
2. Photoreactivation enzyme ไปจับที่โรบินไดเมอร์



3. มีการกระตุ้นโดยใช้แสงสีน้ำเงิน เพื่อตัดวงแหวนไซโคลอิวเทนออก



4. การซ่อมแซมเสร็จเรียบร้อย photoreactivation enzyme หลุดเป็นอิสระ

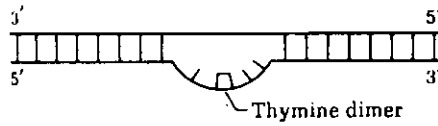


รูปที่ 12-16 การซ่อมแซมโรบินไดเมอร์โดย photoreactivation enzyme

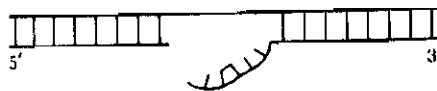
2. Excision repair เป็นวิธีการตัด-ต่อ-ตัด-เชื่อม (cut-patch-cut-seal process) สาย DNA ที่ผิดพลาด โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของเอ็นไซม์หลายชนิด ไม่ต้องการพลังงานแสง เช่น ในกรณีโรบินไดเมอร์ (รูปที่ 12-17) เซลล์จะมีเอ็นไซม์ endonuclease ที่จำเพาะทำให้เกิดรอยหัก (nick) ตรงปลาย 5' ใกล้ๆ โรบินไดเมอร์ เมื่อ DNA ส่วนที่ผิดพลาดนี้ถูกเปิดออก

เอ็นไซม์ DNA pol I จะสังเคราะห์ DNA ส่วนที่ถูกต้องขึ้นมาแทนในทิศทาง $5' \rightarrow 3'$ โดยใช้ปลาย $3'-OH$ ของ DNA สายที่มีรอยหักเป็นไพรเมอร์ จากนั้นเอ็นไซม์ DNA pol I จะใช้แอกติวิตี $5' \rightarrow 3'$ exonuclease ตัดไซมีนไธม์เมอร์ทิ้งไป DNA ส่วนที่สังเคราะห์ใหม่จะถูกเชื่อมเข้ากับ DNA สายเก่าโดยเอ็นไซม์ ligase ก็จะได้ DNA ที่ถูกต้องสมบูรณ์ สามารถเกิดเรพลีเคชันต่อไป

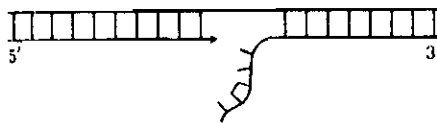
1. ความบกพร่องเนื่องจากไซมีนไธม์เมอร์



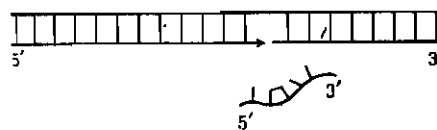
2. ปลายข้างหนึ่งของส่วนที่บกพร่องถูกเอ็นไซม์ endonuclease จำเพาะตัดออก



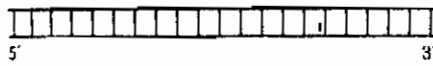
3. ต่อสายที่ถูกต้องไปทางปลาย $3'$ โดยเอ็นไซม์ DNA pol I เพื่อทดแทนส่วนที่ถูกตัดออก



4. ปลายอีกข้างหนึ่งของส่วนที่บกพร่องถูกตัดออกโดยแอกติวิตี $5' \rightarrow 3'$ exonuclease ของเอ็นไซม์ DNA pol I



5. เอ็นไซม์ ligase เชื่อม DNA ส่วนที่สร้างใหม่ให้ติดเข้ากับปลายเก่า



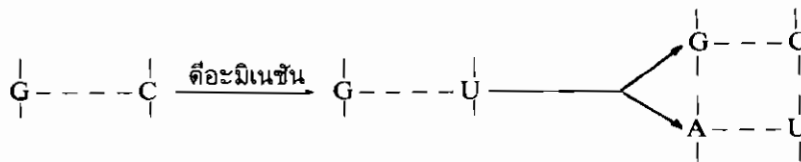
รูปที่ 12-17 ขั้นตอนการซ่อมแซม DNA ที่เกิดโรนีนไดเมอร์โดย excision repair

3. Recombination repair คำว่าเจเนติกรีคอมบิเนชัน (genetic recombination) หมายถึงกระบวนการทางพันธุกรรมที่รวมเอายีนจากโครโมโซมหนึ่งเข้ากับยีนของอีกโครโมโซมหนึ่งโดยใช้พันธะโควาเลนต์ การรวมในที่นี้อาจจะเป็นการสอดใส่ (insertion) ยีนเข้าไปใน DNA สายคู่โดยตรง หรือเป็นการแลกเปลี่ยน (exchange) ยีนระหว่างสองโครโมโซม ทั้งนี้อาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ endonuclease, DNA polymerase I และ DNA ligase

การซ่อมแซมแบบ recombination repair เป็นการนำเอายีนของโครโมโซมที่ต้องการไปทดแทนยีนที่ผิดพลาดในอีกโครโมโซมหนึ่ง

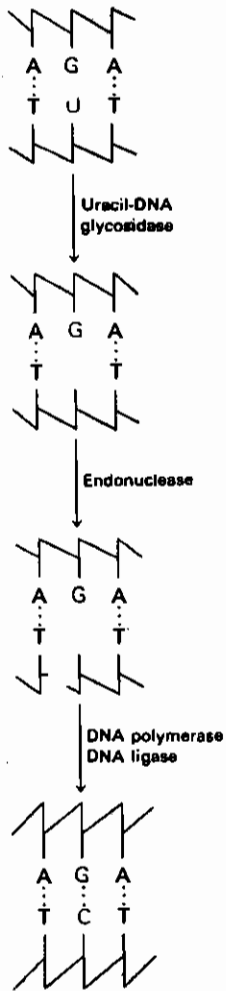
ระบบการซ่อมแซมช่วยป้องกันมิให้เกิดการผ่าเหล่า

ไซโตซีนในโมเลกุล DNA อาจเกิดปฏิกิริยาคืออะมิเนชัน (deamination) กลายเป็นยูราซิลได้เอง ซึ่งเมื่อเกิดกระบวนการเรพลิเคชันแล้วแทนที่จะได้คู่เบส G-C ที่เหมือนกัน ก็จะได้คู่เบส A-U

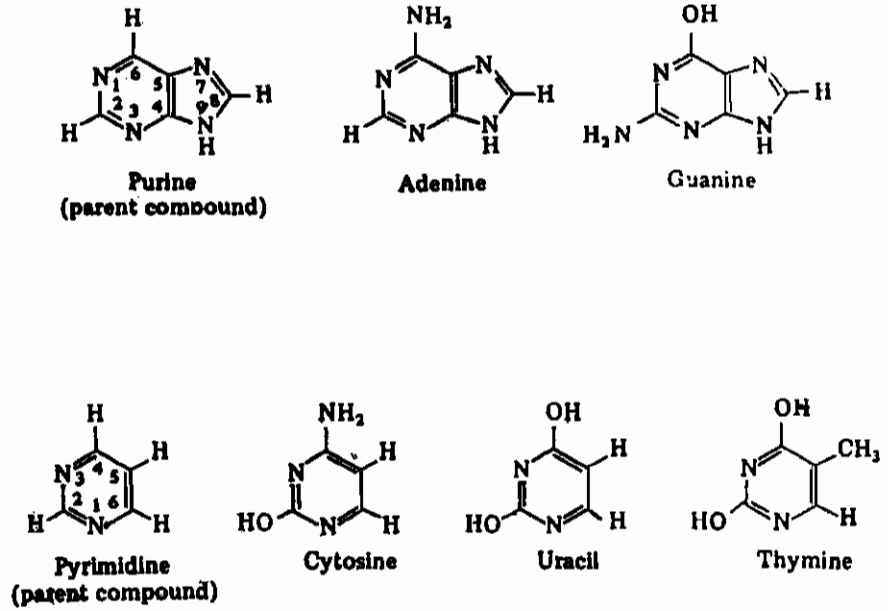


เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการค้นพบระบบซ่อมแซมแบบใหม่ ทำให้เบส A-U ที่ผิดพลาดไม่ถูกถ่ายทอดไปยังลูกหลาน เริ่มแรกเอ็นไซม์ uracil-DNA glycosidase ตัดเฉพาะพันธะไกลโคซิดิกระหว่างเบสยูราซิลและน้ำตาลดีออกซีไรโบส ทำให้เบสยูราซิลหลุดออกแต่โครงสร้างส่วนอื่นคงเดิม (รูปที่ 12-18) จากนั้นเอ็นไซม์ endonuclease จะทำให้เกิดรอยหักตรงใกล้ตำแหน่งที่เบสหลุดไป เพื่อให้เอ็นไซม์ DNA polymerase I ทำหน้าที่ตัดน้ำตาลดีออกซีไรโบสและฟอสเฟตออกแล้วใส่ไซโตซีนที่ถูกต้องเข้าไปแทน เอ็นไซม์ไลเกส (ligase) จะทำหน้าที่เชื่อม DNA ส่วนที่เติมเข้าไปใหม่ให้ติดกับ DNA ส่วนเก่าให้เรียบร้อย

ก)



ข)



รูปที่ 12-18 ก) การตัดเบสยูราซิลที่ผิดพลาดออกไปเคมเบสไซโตซีนที่ถูกต้องลงไปแทน

ข) โครงสร้างเบสพิวรีนและเบสไพริมิดีน

การที่เอ็นไซม์ uracil-DNA glycosidase ตัดเฉพาะยูราซิลที่มาจากไซโตซีนที่เกิดดีอะมิเนชัน โดยไม่ตัดไซมีน ทั้ง ๆ ที่โครงสร้างของยูราซิลกับไซมีนคล้ายกันมาก ต่างกันเฉพาะตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของยูราซิลเป็นไฮโดรเจนแต่ของไซมีนเป็นหมู่เมธิลเท่านั้น แสดงว่าหมู่เมธิลมีความสำคัญและเป็นข้อดีอีกอันหนึ่งสำหรับ DNA ที่ A จับคู่กับ T แต่ใน RNA A จับคู่กับ U เพราะถ้าหากใน DNA A จับคู่กับ U จะทำให้เกิดความสับสนระหว่าง U ที่ถูกต้องกับ U ที่มาจากไซโตซีนเกิดดีอะมิเนชัน ระบบซ่อมแซมอาจบกพร่องเพราะไม่สามารถแยกความแตกต่างของ U ที่ถูกต้องกับ U ที่มาจากไซโตซีน คู่เบส G-C ก็กลายเป็นคู่เบส A-U ในเซลล์ลูกหลาน โดยไม่ได้รับการแก้ไขข้อผิดพลาดทำให้เกิดการผ่าเหล่าได้ ดังนั้นระบบซ่อมแซมจึงสามารถป้องกันมิให้เกิดการผ่าเหล่า ที่สำคัญการค้นพบระบบซ่อมแซมนี้ยังชี้ให้เห็นว่าการที่มีเบสไซมีนอยู่ใน DNA แต่มีเบสยูราซิลอยู่ใน RNA นั้นเหมาะสมเป็นที่สุด ทำให้การถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมนั้นถูกต้องมากยิ่งขึ้น

บทสรุป

การสังเคราะห์ DNA หรือกระบวนการเรพลิเคชันที่เป็นไปได้มี 3 แบบ คือ แบบอนุรักษ์ แบบกึ่งอนุรักษ์ และแบบกระจาย Meselson และ Stahl ได้ทำการทดลองโดยใช้หลักการ sedimentation equilibrium สามารถพิสูจน์ได้ว่ากระบวนการเรพลิเคชันที่เกิดขึ้นจริง คือแบบกึ่งอนุรักษ์

เอ็นไซม์ DNA polymerase I เร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างปลาย 3'-OH อิสระของ DNA ไพริเมอร์ กับอัลฟาฟอสฟอรัสอะตอมของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ที่เข้าไปใหม่ ปฏิกิริยานี้เป็นแบบ nucleophilic attack การสังเคราะห์ DNA เป็นไปในทิศทาง 5' → 3' เอ็นไซม์ DNA polymerase I มีแอกติวิตีของ 3' → 5' exonuclease คอยช่วยตัดโมโนดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เข้ากับ DNA แม่พิมพ์ออกไป คล้ายกับเป็นการตรวจสอบก่อนที่จะมีการจับคู่ของเบสเกิดขึ้น เพื่อให้การสังเคราะห์ DNA ถูกต้องและแม่นยำที่สุด นอกจากนั้นแล้วเอ็นไซม์ DNA polymerase I ยังมีแอกติวิตีของ 5' → 3' exonuclease ที่จะตัด DNA ส่วนที่เกิดความผิดพลาดขึ้นแล้วออกไป เช่น ในกรณีไรโบมีนไธเมอร์ เป็นต้น ปัจจุบันคาดว่าเอ็นไซม์ DNA pol I จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการซ่อมแซม DNA เท่านั้น โฮโลเอ็นไซม์ DNA pol III เป็นเอ็นไซม์ที่จะทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการเรพลิเคชันโดยตรง ส่วนหน้าที่และบทบาทของเอ็นไซม์ DNA pol II ยังไม่เป็นที่กระจ่าง เอ็นไซม์ DNA ligase จะเชื่อมสาย DNA ใน DNA สายคู่ที่มีรอยแตกหักเข้าด้วยกันโดยอาศัยปฏิกิริยา nucleophilic attack ระหว่างปลาย 3'-OH ของ DNA สายหนึ่งกับปลาย 5'-PO₄ ของ DNA อีกสายหนึ่ง ซึ่งก็คือการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์นั่นเอง

การสังเคราะห์ DNA แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเตรียมตัว ขั้นตอนการสร้าง RNA ไพริเมอร์ ขั้นตอนเพิ่มความยาว และขั้นตอนหยุดการสังเคราะห์ การทำงานอาศัยโปรตีนและเอ็นไซม์หลายชนิด

ขั้นตอนการเตรียมตัวและขั้นตอนการสร้าง RNA ไพริเมอร์ มีการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันและคลายเกลียวของสาย DNA เพื่อทำการสังเคราะห์ RNA ไพริเมอร์ ในทิศทาง 5' → 3' ขึ้นหลาย ๆ ช่วง ขั้นตอนเพิ่มความยาวและขั้นตอนหยุดการสังเคราะห์เป็นการต่อสาย DNA ให้ยาวออกไปจาก RNA ไพริเมอร์ในทิศทาง 5' → 3' เช่นกัน โดยโฮโลเอ็นไซม์ DNA pol III จนกระทั่งได้แท่งโอคาซากิมากมาย เอ็นไซม์ DNA pol I จะตัด RNA ไพริเมอร์ทิ้งและสร้าง DNA ใหม่ขึ้นมาทดแทน RNA ไพริเมอร์ส่วนที่ถูกตัดไป จากนั้นเอ็นไซม์ DNA ligase

จะเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างแท่งโองาซาก็แต่ละแท่ง เพื่อเชื่อม DNA ให้เป็นสายยาวที่สมบูรณ์

การผ่าเหล่าในโมเลกุล DNA เกิดขึ้นได้ 4 แบบ คือ transition, transversion, insertion และ deletion อย่างไรก็ตามการผ่าเหล่าที่เกิดขึ้นทั้ง 4 แบบนี้ อาจได้รับการแก้ไขโดยกลไกการซ่อมแซม DNA ของเซลล์ DNA เป็นสารเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมที่สำคัญยิ่งของสิ่งมีชีวิต ข้อมูลเหล่านั้นต้องมีความถูกต้องมากที่สุด ผิดพลาดไม่ได้ง่าย ๆ กลไกการซ่อมแซม DNA มี 3 วิธี คือ enzymatic photoreactivation, excision repair และ recombination repair ระบบซ่อมแซม จะช่วยแก้ไขข้อผิดพลาดต่าง ๆ เพื่อกันมิให้เกิดการผ่าเหล่าได้

คำถามท้ายบท

1. การถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมประกอบด้วยกระบวนการอะไรบ้าง
2. กระบวนการเรพลิเคชันที่เป็นไปได้ทั้งสามแบบมีอะไรบ้าง แต่ละแบบเป็นอย่างไร
3. กลไกการเรพลิเคชันที่เกิดขึ้นจริงเป็นแบบใด
4. อธิบายการทดลองของ Meselson และ Stahl
5. เอนไซม์ DNA polymerase ของ *E. coli* มีกี่ชนิด อะไรบ้าง แต่ละชนิดหน้าที่แตกต่างกันอย่างไร
6. บริเวณเร่งของเอนไซม์ DNA pol I มีตำแหน่งจำเพาะที่สำคัญกี่แห่ง อะไรบ้าง
7. บอกข้อแตกต่างระหว่างแอกติวิตีของ 5' → 3' exonuclease กับแอกติวิตี 3' → 5' exonuclease ของเอนไซม์ DNA pol I
8. ในบรรดาเอนไซม์ DNA pol I, เอนไซม์ DNA pol II และเอนไซม์ DNA pol III เอนไซม์ใดมีความว่องไวมากที่สุด เอนไซม์ใดทำหน้าที่เกี่ยวกับการซ่อมแซม DNA เอนไซม์ใดทำหน้าที่เรพลิเคชันโดยตรง
9. เอนไซม์ DNA ligase ทำหน้าที่อะไร มีกลไกการเร่งปฏิกิริยาอย่างไร
10. การสังเคราะห์ DNA ต้องการ RNA ไพรมเมอร์ อยากทราบว่า RNA ไพรมเมอร์มีที่มาอย่างไร
11. แทง์โอภาซากิหมายถึงอะไร
12. การสังเคราะห์ DNA เป็นไปในทิศทาง 5' → 3' หรือ 3' → 5' เป็นแบบทิศทางเดียวหรือสองทิศทางจากจุดเริ่มต้น
13. บอกหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการเรพลิเคชันของโปรตีนต่อไปนี้ DNA gyrase, helicase, DBP, dnaB โปรตีน
14. เขียนแผนภาพแสดงการเรพลิเคชันบน DNA สายไม่ต่อเนื่อง
15. การยับยั้งกระบวนการเรพลิเคชันเป็นไปในลักษณะใดบ้าง
16. การผ่าเหล่ามีกี่แบบ อะไรบ้าง แบบใดจัดเป็น frame-shift mutation
17. ไทมินไคเมอร์เกิดจากอะไร มีผลเสียต่อคอนฟอร์เมชัน DNA อย่างไร
18. โมเลกุล DNA ก่อนข้างเปราะอาจได้รับความเสียหายในลักษณะใดบ้าง
19. การซ่อมแซม DNA มีกี่วิธี อธิบายกลไกการซ่อมแซม DNA ของแต่ละวิธี
20. ระบบการซ่อมแซมที่เพิ่งค้นพบใหม่ ช่วยชี้ให้เห็นความเหมาะสมของการที่มีเบสไซมีนอยู่ใน DNA และมีเบสยูราซิลอยู่ใน RNA นั้น หมายความว่าอย่างไร