تضاعف DNA (DNA replication):

يتضاعف DNA عندما تدخل الخلية في الطور الذي يتضاعف فيه DNA (**S phase**) حيث تقوم **DNA polymerases** بتصنيع خيوط جديدة عن طريق إضافة نيوكليوتيدات إلى مجموعة الهيدروكسيل (**3'-OH**) الموجودة على النيوكليوتيدة السابقة باستخدام خيطي DNA المنفصلين عن بعضهما ويستخدمان كقالب للتضاعف، وبالتالي يتكون جزيئين جديدين مزدوجين من جزيء مزدوج واحد.

آلية تضاعف DNA (Mechanism of DNA replication):

يتضاعف DNA من خلال ثلاثة مراحل متتالية:

1. مرحلة البدء (**Initiation stage**).
2. مرحلة الاستطالة (**Elongation stage**).
3. مرحلة الإنهاء (**Termination stage**).

مرحلة البدء (Initiation stage):

لا يبدأ **DNA polymerase** في مواقع عشوائية على الكروموسومات. يبدأ تضاعف DNA في كل من **بدائيات النواة** (**Prokaryotes**) و**حقيقيات النواة** (**Eukaryotes**) عند موقع محدد يعرف بـ **منشأ التضاعف** (**Origin of replication**) ويرمز له اختصاراً بـ ***Ori***، وهو عبارة عن تسلسل خاص من النيوكليوتيدات في مواقع محددة على الكروموسومات. في النوع البكتيري ***E. coli*** يبلغ حجم منشأ التضاعف **245 bp** ويعرف بـ ***OriC***.

يبدأ تضاعف DNA بإرتباط **البروتين البادئ** (**Initiator protein**) وهو **Dna A protein** **ويتميز بتسلسل غني بـ AT** (**AT-rich sequence**) (مثل التسلسل التالي في ***E. coli***: **TTATCCACA** الموجود في منطقة نشوء التضاعف ***OriC***)، وتتفكك الروابط الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية مما يؤدي إلى إنفصال شريطي DNA عن بعضهما في هذه المنطقة، ثم يقوم إنزيم **Helicase** بفك الإرتباط بين شريطي DNA ابتداءً من هذه المنطقة.

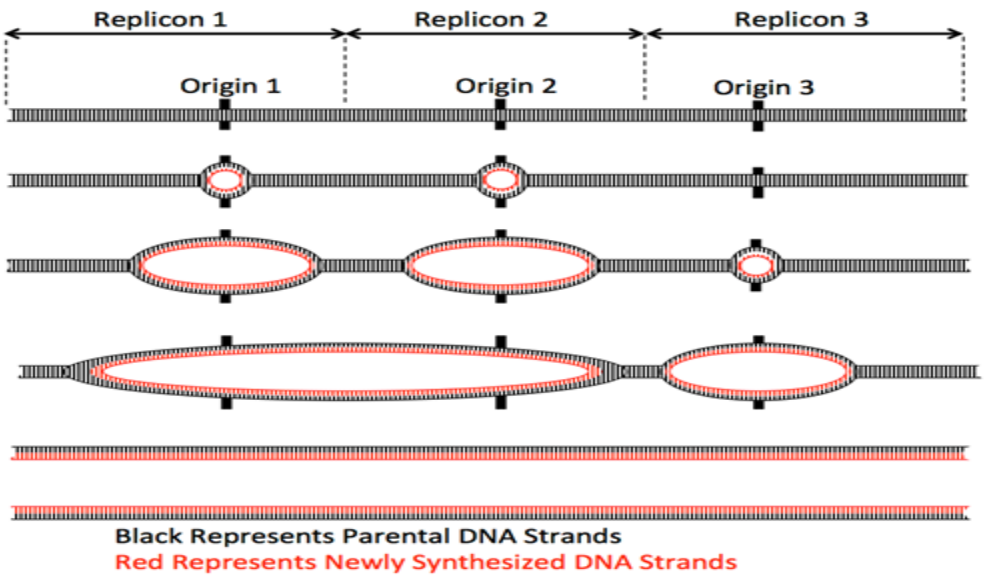
يوجد في بدائيات النواة **كروموسوم دائري** (**Circular chromosome**) وذو حجم صغير وتركيب بسيط، وبالتالي هناك حاجة إلى منشأ تضاعف واحد لمضاعفة كامل **الجينوم** (**Genome**). على سبيل المثال تمتلك ***E. coli*** جينوم (الكروموسوم) يقدر حجمه بـ **4.5 Mbp** ويتضاعف بالكامل خلال **40 دقيقة** تقريباً من خلال منشأ تضاعف واحد، ويكون التضاعف **بكلا الاتجاهين** (**Bi-directional replication**)، وعند سرعة تقدر بلمرة (**DNA polymerase**) تقدر بـ **1000 bases/second/fork**.

تم اكتشاف **خمسة** **DNA polymerases** في بدائيات النواة، ويعتبر **DNA Polymerase III (Pol III)** هو الإنزيم الرئيس والمسؤول عن عملية تضاعف DNA.

DNA Polymerase I (Pol I) وظيفته ملء الفراغات التي تنشأ أثناء تصنيع **خيط DNA المتأخر** (**DNA lagging strand**) (يوضح لاحقاً) أو الفراغات التي تنشأ أثناء **آليات تصحيح الأخطاء** (**Error-correcting mechanisms**).

Pol II و Pol IV و Pol V: تستخدم أثناء تضاعف DNA عند الحاجة إلى أنواع معينة من الإصلاح في أوقات أخرى في دورة الحياة الخلوية.

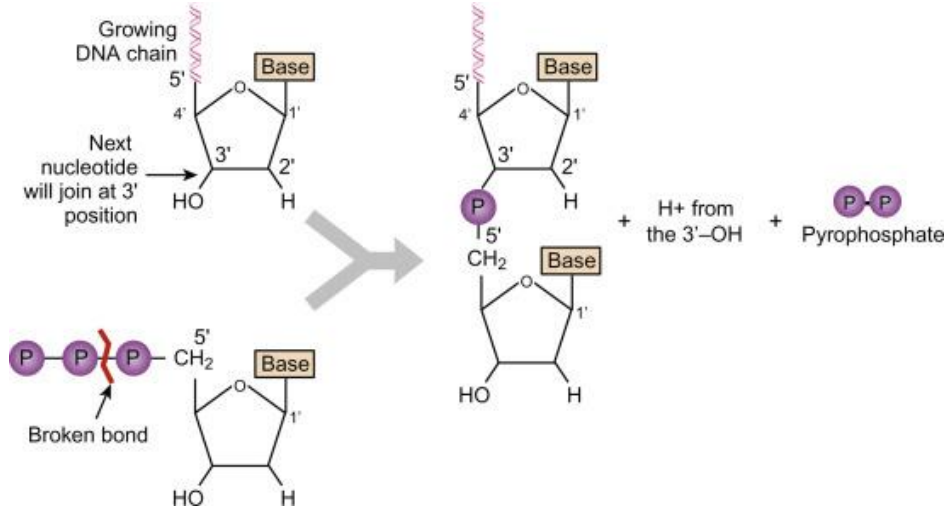
يوجد في حقيقيات النواة العديد من **الكروموسومات الطولية** (**Linear chromosomes**)، وهذا يتطلب وجود أكثر من منشأ للتضاعف لكل كروموسوم لتتضاعف مجموعة الكروموسومات بالكامل خلال **8 ساعات** أثناء الطور الذي يتضاعف فيه DNA (**S phase**) من دورة الخلية. على سبيل المثال يحتوي **الجينوم ثنائي الكروموسومات** (**Diploid genome**) للإنسان على **46 كروموسوم** (**6×10^9 base pairs**). أقصر الكروموسومات يبلغ طوله **50 Mbp**، وبالتالي لابد من وجود أكثر من منشأ للتضاعف على طول الكروموسوم. معدل حركة **شوكة التضاعف** (**Replication fork**) أبطأ منه في بدائيات النواة (**100 bases/second/fork**)، ولذلك تمتلك حقيقيات النواة منشآت عديدة للتضاعف موزعة على طول كل كروموسوم حتى تتمكن الخلية من مضاعفة كل كروموسوم خلال **S phase**.

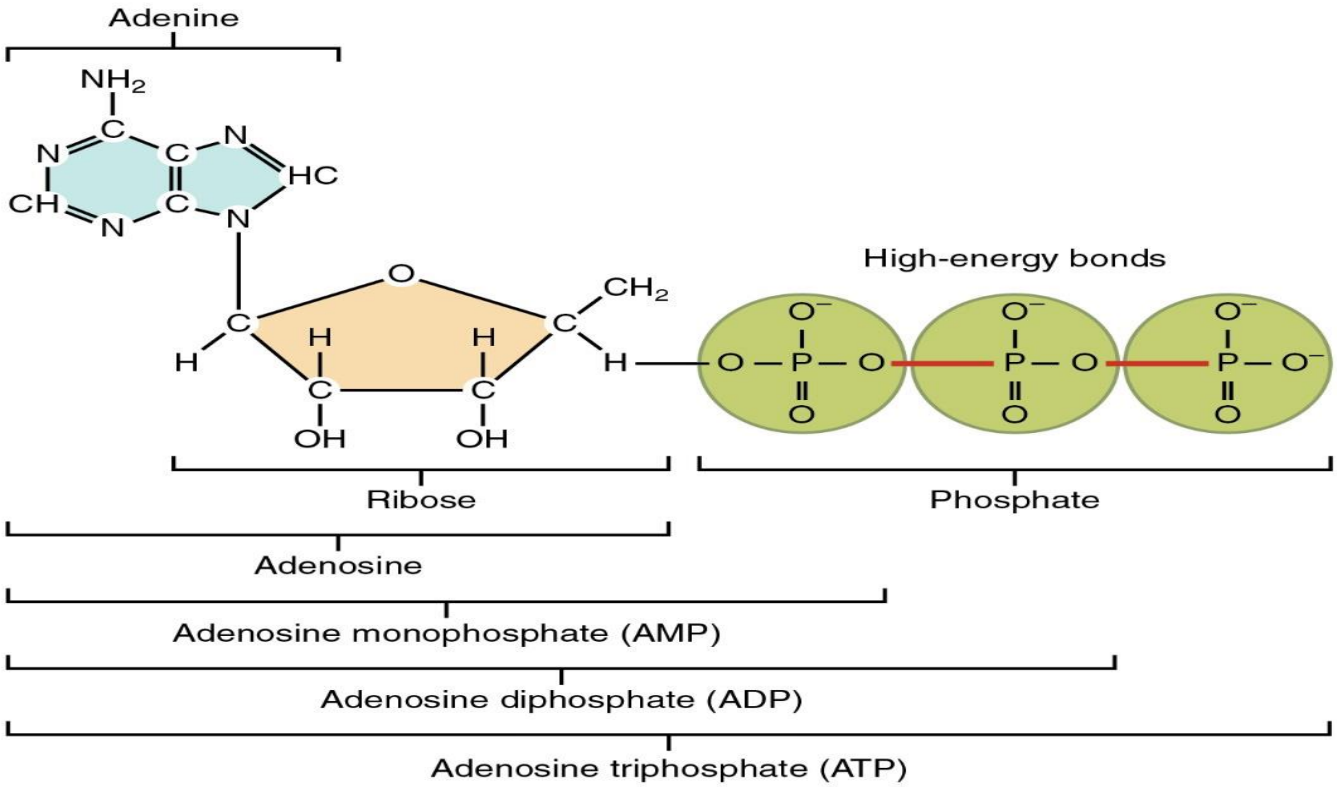


Schematic of a eukaryote chromosome showing multiple origins (1, 2, 3) of replication, each defining a replicon (1, 2, 3). Replication may start at different times in S-phase. Here #1 and #2 begin first then #3. As the replication forks proceed bidirectionally, they create "replication bubbles" that meet and form larger bubbles. The end result is two semi-conservatively replicated duplex DNA strands, with the parental strands in black and the newly-synthesized strands in red.

مرحلة الاستطالة (Elongation stage):

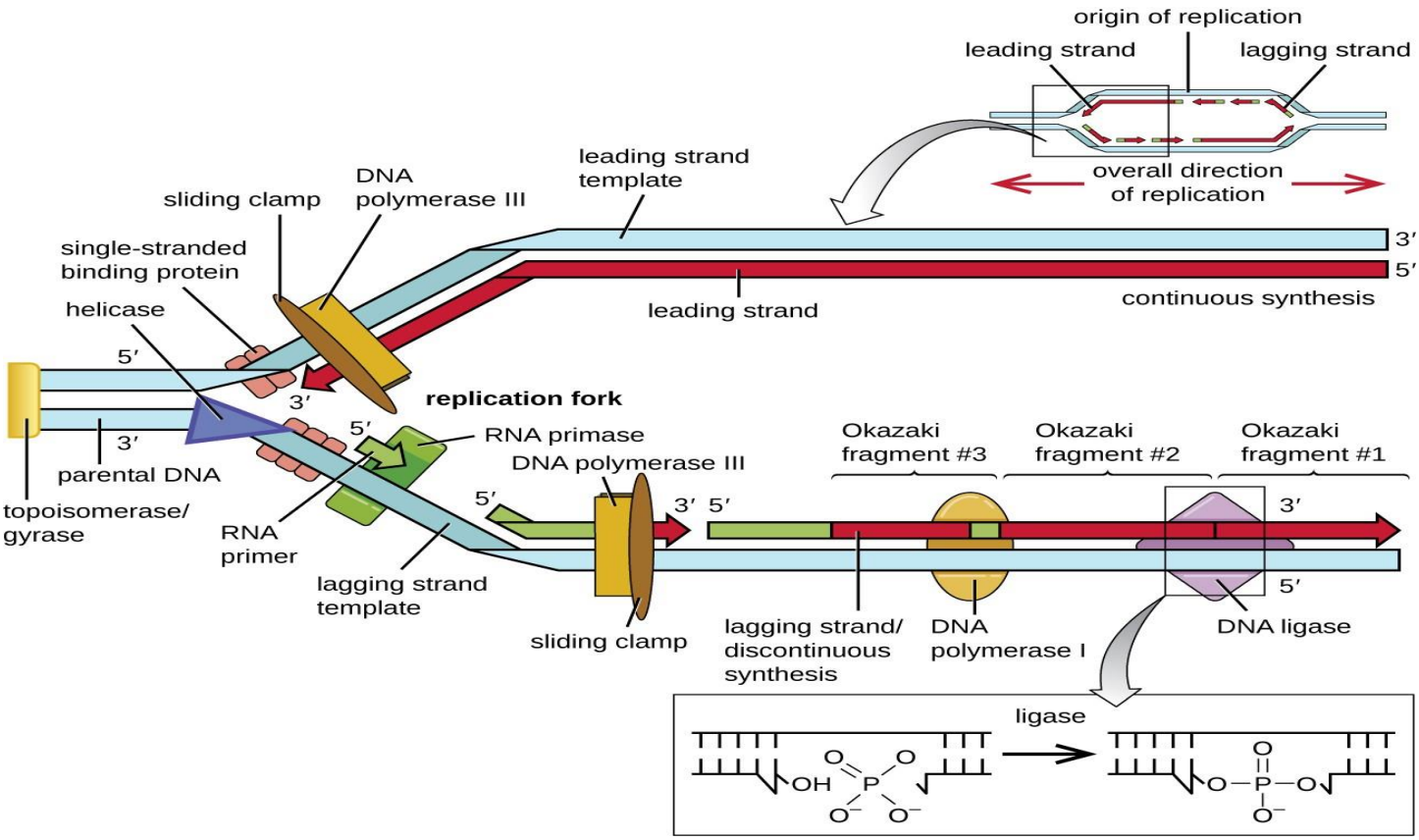
مع استمرار **DNA polymerase** على طول **الخيط القالب** (**DNA template**)، فإن النيوكليوتيدة التي ترتبط تزواجياً مع كل قاعدة نيتروجينة على الخيط القالب سوف **ترتبط تساهمياً** (**Covalent bond**) بـ **3' end** من الخيط الجديد. الطاقة التي تحتاجها هذه العملية يتم توفيرها بواسطة **النيوكليوتيدة ثلاثية الفوسفات** (**Nucleotide triphosphate**) حيث تتحرر اثنتين من مجموعة الفوسفات ويبقى مجموعة فوسفات واحدة تستخدم للربط مع النيوكليوتيدة التالية (**Phosphodiester bond**).





مرحلة الإنهاء (Termination stage):

في بدائيات النواة تستمر الاستطالة بشكل **ثنائي الاتجاه** (**Bidirectionally**) حتى تلتقي شوكتي التضاعف، ثم تتم إزالة **بادئات RNA** (**RNA primers**) بواسطة **DNA polymerase I** ، ثم يقوم هذا الإنزيم بتنصيع النيوكليوتيدات المناسبة التي تحل محل بادئات RNA. يتم وصل قطع DNA الناتجة بواسطة إنزيم متخصص هو **DNA ligase** والذي يكون **Phosphodiester bond** بين النيوكليوتيدتين. في حقيقيات النواة تستمر الاستطالة بشكل **ثنائي الاتجاه** (**Bidirectionally**) حتى تلتقي كل شوكتي تضاعف متجاورتين مع بعضها أو أن شوكة التضاعف تصل إلى نهاية الكروموسوم.



DNA replication in bacteria. At the origin of replication, **topoisomerase II** relaxes the supercoiled chromosome. Two replication forks are formed by the opening of the double-stranded DNA at the origin, and **helicase** separates the DNA strands, which are coated by single-stranded binding proteins to keep the strands separated. DNA replication occurs in both directions. An RNA primer complementary to the parental strand is synthesized by **RNA primase** and is elongated by **DNA polymerase III** through the addition of nucleotides to the 3′-OH end. On the leading strand, DNA is synthesized continuously, whereas on the lagging strand, DNA is synthesized in short stretches called Okazaki fragments. RNA primers within the lagging strand are removed by the exonuclease activity of **DNA polymerase I**, and the Okazaki fragments are joined by **DNA ligase**.

Step in Replication	Prokaryotic cells	Eukaryotic cells
Recognition of origin of replication	Dna A protein	Unknown
Unwinding of DNA double helix	Helicase (requires ATP)	Helicase (requires ATP)
Stabilization of unwound template strands	Single-stranded DNA-binding protein (SSB)	Single-stranded DNA-binding protein (SSB)
Synthesis of RNA primers	Primase	Primase
Synthesis of DNA Leading strand Lagging strand	 DNA polymerase III DNA polymerase III	 DNA polymerase δ DNA polymerase α
Removal of RNA primers	DNA polymerase I (5 →3' exonuclease)	Unknown
Replacement of RNA with DNA	DNA polymerase I	Unknown
Joining of Okazaki fragments	DNA ligase (requires NAD)	DNA ligase (requires ATP)
Removal of positive supercoils ahead of advancing replication forks	DNA topoisomerase II (DNA gyrase)	DNA topoisomerase II