

هماندسازی و نسخه برداری در ژنوم DNA میتوکندری

• دکتر فاطمه منصوری

استادیار گروه ایمنولوژی و ژنتیک، دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

mansouri1600@hotmail.com

چکیده

درگیر در زنجیره انتقال الکترون، ۲۲ ژن برای tRNA، ۲ ژن برای کد کردن ریبوزوم های 12S,16S و همچنین ۱۳ ژن برای سنتز پلی پپتید پروتئین میتوکندریایی هستند [۱]. سلول ها دارای هزاران نسخه از DNA میتوکندریایی هستند که در تعداد زیادی از میتوکندری ها توزیع شده اند. DNA میتوکندریایی به طور مستقل در ماتریکس داخلی میتوکندری واقع شده است. دو رشته تشکیل دهنده DNA میتوکندریایی میزان گوانین و سیتوزین متفاوتی دارند. از این رو رشته ای که درصد گوانین بیشتری دارد به نام رشته سنگین یا H می نامند و رشته ای که درصد گوانین کمتری دارد به نام رشته سبک یا L می نامند. رشته ها هر کدام دارای مبدا های جداگانه برای شروع همانند سازی هستند. همانند سازی DNA میتوکندریایی توسط تجمع پروتئین هایی که متشکل از DNA پلیمرز (Poly)، پروتئین های باند شونده به DNA تک رشته میتوکندریایی (SSB میتوکندریایی)، DNA هلیکاز میتوکندریایی، توپوایزومرازها و فعالیت های RNase H انجام می شود.

مدل های کنونی همانند سازی DNA میتوکندریایی

دو حالت همانند سازی DNA برای تکثیر ژنوم میتوکندریایی پیشنهاد شده است، (۱) مدل جابجایی غیر همزمان رشته^۲ و (۲) مدل همانندسازی دو طرفه رشته جفت شده^۳ [۲، ۳]. در مدل جابجایی غیر همزمان رشته ها و یا مدل کلاسیون^۴ همانند سازی DNA میتوکندریایی به روش نامتقارن انجام می شود به طوریکه همانند سازی

ژنوم میتوکندریایی DNA حلقوی دو رشته ای است. همانند سازی DNA میتوکندری با کمک آنزیم های اختصاصی درون میتوکندری و مستقل از هسته انجام می شود. یک سلول دارای هزاران نسخه از DNA دو رشته ای میتوکندریایی در ماتریکس داخلی میتوکندری است. در مرحله اول همانند سازی احتیاج به نسخه های کوچک RNA ای است که به کمک RNA پلی مرزهای میتوکندریایی تولید شده اند و می توانند پرایمرهای ضروری در همانند سازی DNA میتوکندریایی را فراهم نمایند. تاکنون چند روش برای همانند سازی مطرح شده است مانند مدل جابجایی نامتقارن، مدل رشته جفت شده و مدل RITOLS. این مقاله مروری بیشتر مدل های کنونی همانند سازی DNA میتوکندری و نیز پروتئین هایی که در همانند سازی میتوکندریایی دخیل هستند مانند DNA پلی مرز انسانی و زیر واحدهای فرعی آن، DNA هلیکاز میتوکندری یا هلیکاز چشمک زن، پروتئین های باند شونده به DNA تک رشته ای و چگونگی ترمیم شکاف بازی را مورد بررسی قرار می دهد.

کلمات کلیدی: میتوکندری، همانندسازی، نسخه برداری

مقدمه

ژنوم میتوکندریایی (mtDNA) یک ژنوم چند نسخه ای حلقوی بسته از 61.965 جفت باز تشکیل شده است که ۳۷ ژن را کد می کند. ۱۳ ژن برای کد کردن پروتئین های

1- mtSSB

2- asynchronous strand displacement model

3- strand-coupled bidirectional replication model

4- Clayton

است شروع می شود و سنتز DNA در طول رشته DNA میتوکندریایی پیشرفت می کند و پس از این که همانند سازی رشته L کامل شد خاتمه می یابد [۲].

با این وجود همانند سازی هر دو مدل نیازمند پرایمرهای RNA ای هستند که با وساطت ماشین همانند سازی برای ایجاد یک RNA جدید و نوظهور مورد استفاده قرار می گیرند [۸]. این RNA ها تشکیل می شود، پردازش می شود و یک هیبرید DNA/RNA تشکیل می شود. از آنجا که DNA پلیمرز γ به انتهای OH-3' نیاز دارد، این RNA های کوچک انتهایی OH-3' فعال را برای DNA پلیمرز γ فراهم می کند و سپس DNA پلیمرز γ از این انتها به عنوان آغازگر استفاده کرده و آن را گسترده می دهد [۱۰]. RNA پلیمرز توسط پروتئین های TFAM و TFB2 جذب ناحیه LPS می شود تا برای شروع نسخه برداری با اندازه متناسب با طول ژنوم به کار گرفته شوند [۱۱، ۱۲]. این نسخه های RNA ای از ناحیه LPS می توانند جدا شوند یا قبل از تولید آغازگرها برای همانند سازی DNA به کار روند. در شرایط همانندسازی، RNA پلیمرز میتوکندریایی پرایمرهای کوتاه RNA ای به اندازه ۷۵-۲۵ نوکلئوتید را خواهد ساخت و می تواند توسط DNA پلیمرز γ گسترش یابد [۱]. شواهد بیشتری پیشنهاد شده است که RNA پلیمرز ترکیب RNA پرایمری ۲۵ نوکلئوتیدی در ناحیه OriL سنتز می کند [۱۲]. این RNA پرایمرها با کمک پلیمرز γ توسعه یافته و برای تکمیل همانند سازی شروع شده در رشته پیشرو به کار می روند. بنابراین، RNA پلیمرز آغازگر پرایمرهای RNA ای برای DNA پلیمرز در نواحی OriH و OriL را فراهم می کند [۷]. در مدل رشته جفت شده، همانند سازی دو طرفه از یک منطقه در نزدیکی OriH به دنبال پیشرفت دو شاخه در اطراف حلقه DNA میتوکندریایی آغاز می شود [۹، ۱۰]. این روش به نام مدل Holt و یا مدل مقارن^۳ نیز نام دارد [۳]. همانندسازی DNA توسط SSB، Twinkle، DNA پلیمرز، هلیکاز میتوکندریایی RNaseH1 و عوامل آغازی و خاتمه دهنده رونویسی انجام می شود [۷] (شکل ۲).

DNA میتوکندریایی از مبدا رشته سنگین (OH) دختری از روی رشته سبک مادری از جهت ۵' به طرف ۳' شروع می شود. در این شرایط رشته سنگین مادری ۵۰۰ تا ۶۰۰ نوکلئوتید کنار می رود و ساختاری به شکل حلقه یا لوپ را می سازد که به نام D-Loop می نامند. سنتز رشته سنگین آنقدر ادامه می یابد تا وقتی که دو-سوم رشته سنگین سنتز شود [۴]. سپس همانند سازی از مبدا رشته سبک (OL) شروع می شود و سنتز رشته سبک دختری از روی رشته سنگین مادری و از جهت ۵' به طرف ۳' در جهت خلاف رشته سنگین آغاز می شود [۵]. در هر دو رشته سنتز به طور پیوسته و در یک جهت انجام می شود [۶]. تحقیقات نشان داده که در روش همانند سازی مقارن در قسمت وسط همانندسازی رشته ها مکان های حساس به RNase H وجود دارد، که بیانگر یک مکانیسم دیگری است که ابتدای سنتز رشته پیشرو قطعات کوچک RNA ای گذاشته می شود و این روش به نام RNA گنجانیده شده در تمام رشته پیشرو^۱ RITOLS نامیده شده است (شکل ۱). در همه مدل ها، آغاز همانندسازی کمک پرایمر RNA ای کوچک آماده توسط RNA Polymerase میتوکندری تولید می شود و همچنین واکنش های پلیمریزاسیون DNA توسط DNA پلیمرز هولواگزیم γ انجام می شود [۷]. در مدل جابجایی نامتقارن رشته ها جهت انجام همانندسازی نیاز به نسخه برداری اولیه DNA میتوکندریایی در ناحیه OriH (داخل D-LOOP) از پروموتور رشته سبک^۲ LPS است [۸]. پرایمرهای لازم برای شروع همانندسازی DNA میتوکندریایی در OriH در مرحله اول توسط فرآیند آغاز نسخه برداری در پروموتور رشته سبک (LPS) تولید می شود. آنزیم γ سنتز رشته H با استفاده از پرایمرهای کوچک RNA ای آغاز می کند وقتی سنتز رشته H تقریباً ۷۰٪ کامل شد، مبدا رشته سبک برای سنتز شروع به فعالیت می کند [۷، ۹]. همانند سازی رشته L در نزدیکی منطقه کد گذاری WANCY tRNA که در شکل تک رشته ای برای ایجاد یک ساختار شاخه-حلقه پایدار لازم

- 1- RNA Incorporated Throughout Lagging Strand
- 2- light-strand promoter
- 3- Strand-symmetric model



DNA پلیمرز میتوکندریایی انسان، زیر واحد کاتالیتیکی و زیر واحد فرعی

از میان 16 DNA پلیمرز موجود در یوکاریوت ها، DNA پلیمرز گاما تنها DNA پلیمرز موجود در میتوکندری پستانداران است و از این رو تکثیر و تعمیر تمام ۱۶/۵ kb ژنوم میتوکندریایی حلقوی را بر عهده دارد [۱۳]. هولواآنزیم پلیمرز انسان از یک زیر واحد کاتالیتیکی (توسط ژن POLG در ناحیه کروموزومی 15q25) و فرم دیمریک از زیر واحد فرعی (توسط ژن POLG2 در لوکوس کروموزومی (17q24.1) تشکیل شده است [۱۴]. زیر واحد کاتالیتیکی آنزیم ۱۴۰ کیلودالتون (p140) است که فعالیت اگزونوکلازی ۳' به ۵' و فعالیت لیازی فسفات دئوکسی ریبوز (dRP) دارد [۱۵]. زیر واحد فرعی پروتئین ۵۵ کیلودالتون (p55) است که برای باند شدن و سنتز DNA مورد نیاز است [۱۶]. جهش در ژن POLG برای اولین بار در سال ۲۰۰۱ به علت التهاب خارجی چشمی پیشرونده (PEO) کشف شد [۱۴] و مشخص شد که یکی از عوامل عمده بیماری میتوکندری ناشی از اختلالات یا نقصان در DNA میتوکندریایی است [۱۷]. از جمله Alpers و اختلال وسیع میوهپاتوپاتی مغزی یا میتوکندریایی بیماری‌هایی مانند سندرم میونوروپاتی، آتاکسی حساس به میوپاتی که وابسته به اختلالات میتوکندری است [۱۸]. اگر چه بیشتر اختلالات مربوط به جهش ژن POLG است اما جهش در ژن POLG2 نیز می تواند باعث PEO و نشانه های مشابه PEO باشد [۱۹].

خصوصیات بیوشیمیایی DNA پلیمرز میتوکندری

DNA پلیمرز گاما دارای فعالیت قوی در شرایط آزمایشگاهی با سوبستراهای پرایمرهای مختلف از قبیل سوبسترای DNA طبیعی و سوبستراهای هوموپولیمریک مانند: پلی (dA)، الیگو (dT)، پلی (dC)، الیگو (dG) است. فعالیت پلیمرازی به اندازه سوبسترای الگوی و پرایمر بستگی دارد. همچنین پلیمرز می تواند نقش کاتالیزوری بر روی پرایمر و الگوی داشته باشد که در حضور فلزات Mn^{+2}, Mg^{+2} (به عنوان فلز فعال کننده کاتالیزور) فعالیت DNA پلیمرز را تسریع می کنند تا پلیمریزاسیون با

استحکام بالا انجام گیرد [۲۰]. همچنین DNA پلیمرز نسخه برداری معکوس با کارایی بالاتر از HIV-1 انجام می دهد، اما فعالیت نسخه برداری معکوس پلیمرز به مراتب کارآمدی کمتری نسبت به فعالیت همانندسازی آن در توالی طبیعی DNA است [۱۶]. از آنجایی که آنزیم پلیمرز گاما تنها پلیمرز DNA میتوکندریایی در انسان است، توانایی اش برای استفاده در طیف وسیعی از سوبستراها اجازه می دهد تا هم در همانندسازی و هم در تعمیر نقش تخصصی داشته باشد و این بر خلاف ۱۵ آنزیم DNA پلیمرز هسته ای است که هر یک نقش منحصر به فردی دارند. غلظت نمک مطلوب برای فعالیت پلیمرز نیز در حضور P55 به سوبستراهای مورد استفاده بستگی دارد. DNA پلیمرز گاما در حضور سوبستراهای هوموپولیمریک (rA) و سوبستراهای الیگو (dt₁₂₋₁₄)، با غلظت ۷۵ میلی مول NaCl فعال است، در حالی که نمک بهینه ۲۵ میلی مول برای سوبسترای پلی (dA) مورد نیاز است. ناحیه N ترمینال زیر واحد کاتالیتیکی از DNA پلیمرز دارای فعالیت اگزونوکلازی برای تجزیه نوکلئوتید تازه تشکیل شده در رشته DNA در حال شکل گیری است [۲۱]. این فعالیت به حضور اسید اسپارتیک و اسید گلوتامیک بستگی دارد. فعالیت اگزونوکلازی به عوامل pH و حضور کاتیون های فلزی دو ظرفیتی نیاز دارد و توسط غلظت بالایی از NaCl تحریک می شود. فعالیت اگزونوکلازی کارآمد می تواند DNA تک رشته ای را تجزیه کند و عدم تطابق نوکلئوتیدی و هر گونه اشتباه در دو رشته DNA را تشخیص می دهد [۲۰]. فعالیت اگزونوکلاز γ انسانی دارای قدرت سنتز DNA با کیفیت بالا را دارا می باشد که آن هم به دلیل انتخاب صحیح نوکلئوتیدها و تصحیح کارآمد می باشد [۱۳]. از طرفی اتصال زیر واحد P55 سبب افزایش قدرت سنتز DNA می شود. عملکرد اصلاحی اگزونوکلاز با افزایش ۲۰ برابری بیشتر از عملکرد اشتباه گذاری نوکلئوتیدها است. با کمال تعجب، فعالیت اگزونوکلاز زیر واحد کاتالیتیکی بر اثر تعامل با زیر واحد فرعی آن میسر می شود و این ممکن است به دلیل تعامل زیر واحد فرعی با هسته کاتالیزوری در هولواآنزیم پلیمرز باشد [۱۵].

ترکیب ریونوکلئوتید

در طی همانندسازی DNA، DNA پلیمراز میتوکندری باید ترجیحا ترکیبی از دئوکسی ریونوکلئوتید و ریونوکلئوتید باشد و باید بین دو منطقه ای که در آن بیشتر ریونوکلئوتید است، تفاوت قائل شود. در سال ۱۹۷۳، گراسمن و همکاران ثابت کردند که فراوانی ریونوکلئوتیدها در DNA میتوکندریایی انسان و موش ده برابر سایر نقاط ژنوم می باشد [۲۲]. DNA میتوکندریایی دارای ۳۰-۱۰۰ ریونوکلئوتید منفرد هستند که به اندازه ۵۰۰ bp بین آن ها فاصله افتاده است. ریونوکلئوتیدها در DNA میتوکندریایی ممکن است از هضم ناقص پرایمرهای تصادفی فاصله دار RNA به وجود آیند و یا به اشتباه در طول سنتز DNA گنجانیده شده اند، همانطور که در مدل RITOLS پیشنهاد شده است [۶]. بنابراین پلیمراز γ منبع احتمالی از ترکیبات ریونوکلئوتیدی داخل DNA میتوکندریایی است. بررسی های اولیه نشان داد که DNA پلیمراز می تواند به شکل یک ریونوکلئوتید داخل DNA ترکیب شده باشد و مطالعه اخیر نشان داد که پلیمراز انسان قادر به شناسایی هر چهار ریونوکلئوتید تری فسفات می باشد [۲۳]. هر دو مدل از همانندسازی DNA میتوکندریایی (مدل جابجایی نامتقارن رشته و مدل همانندسازی جفت شده) با ۱۶/۵ کیلو جفت باز ژنوم میتوکندریایی انسان توسط هولو آنزیم پلیمراز گاما همانند سازی می شود [۱۶]. همانطور که قبلا اشاره شد در مدل نامتقارن DNA پلیمراز با گسترش رشته H از RNA پرایمر نشان می دهد که می توان سنتز DNA را از یک ریونوکلئوتید شروع کرد. با این حال، در مدل همانند سازی RITOLS واسطه های همانند سازی شامل مناطق DNA/RNA هیبرید و توالی غنی از RNA گسترده در رشته پیشرو، نشان دهنده نقشی برای DNA پلیمراز در ترکیب این ریونوکلئوتیدها در طی سنتز رشته در حال شکل گیری است [۲۴]. آنزیم RNase H

می تواند RNA متصل به DNA را حذف کند جایی که RNase H1 طی فرآیندی قطعات طولانی هیبرید DNA/RNA را می شکند و RNase H2 به طور تک تک ریونوکلئوتیدها را از DNA بر می دارد [۲۴]. در حالی که هر دو آنزیم H1 و H2 در هسته یافت شده اند، ولی فقط RNase H1 در میتوکندری فعالیت دارد. بنابراین، عدم فعالیت RNase H2 در میتوکندری کمک می کند تا توضیح دهد که چرا باقیمانده های ریونوکلئوتیدی در ژنوم میتوکندریایی (بدون در نظر گرفتن منبع) وجود دارند.

ترمیم شکاف بازی در میتوکندری

DNA پلیمراز گاما نیز در ترمیم به روش ایجاد شکاف باز BER^۱ در DNA میتوکندریایی نقش دارد [۲۵]. روش های ترمیم در میتوکندری یا از طریق تک نوکلئوتیدی BER^۲-SN و یا از طریق مسیرهای طولانی LP-BER^۳ می تواند رخ دهد [۱۳، ۲۶]. در هر دو مورد، DNA گلیکوزیلاز توالی آن قسمت از DNA آسیب دیده را حذف می کند و آنزیم AP اندونوکلاز رشته 5' DNA را برش می زند و به اندازه یک نوکلئوتید فضای خالی می گذارد که شامل یک گروه 5'-drp می باشد [۱۳]. در روش SN-BER این drp نصف شده و سپس حذف می شود و در نتیجه شکاف توسط یک نوکلئوتید توسط پلیمراز پر می شود و سوبسترای مناسب برای بستن توسط لیگاز ساخته می شود [۲۵]. میزان و سرعت واکنش ترمیم توسط آنزیم لیاز به طور قابل توجهی برای پلیمراز گاما نسبت به پلیمراز هسته ای کندتر است [۲۷].

پروتئین باند شده به DNA تک رشته میتوکندریایی (SSB)

مدل نامتقارن همانند سازی DNA میتوکندریایی وجود تک رشته DNA میتوکندریایی با کمک پروتئین باند شده به DNA (SSB^۵) نشان می دهد که پروتئین میتوکندریایی SSB جزء اصلی همانند سازی DNA میتوکندریایی است و

- 1- Base excision repair
- 2- single-nucleotide BER
- 3- long-patch BER
- 4- 5'-deoxyribose phosphate
- 5- Single-stranded DNA binding protein



می تواند پیچش DNA را باز کند [۲۳]. پروتئین باند شده به DNA تک رشته میتوکندری در مخمر و برخی حیوانات به شکل منفرد و ۳۱ کیلو دالتون می باشد و پروتئین باند شده به DNA پستانداران به صورت تترامر با وزن مولکولی ۶۱ کیلو دالتون است [۲۸]. تترامر SSB میتوکندریایی دارای میل ترکیبی زیادی به DNA و جایگاه های DNA دارای ۲ تا ۳۷ نوکلئوتیدی دارد. در دروزوفیلا، DNA پلیمراز γ با کمک SSB میتوکندریایی سنتز DNA میتوکندری را تقریباً ۴۲ برابر افزایش می دهد و در مگس سرکه هایی که ژن SSB میتوکندریایی آن ها جهش یافته بود، DNA میتوکندریایی آن ها دچار نقصان شده و عملکرد زنجیره تنفسی شان مختل می شود. در انسان ها تحریک دو برابری SSB میتوکندریایی قابل توجه است. در شرایط آزمایشگاهی سیستم همانندسازی، SSB میتوکندریایی انسان باعث تحریک سنتز DNA می شود و باعث می شود تا محصولاتی به اندازه ۳۱ کیلوباز تولید شود ولی اگر DNA پلیمراز γ به تنهایی عمل می کرد تنها محصولی با ۲ کیلوباز تولید می شد. تحریک پلیمراز γ انسانی توسط SSB میتوکندریایی انسانی اختصاصی است و این در مورد هیچ گونه DNA پلیمراز هسته ای مشاهده نشده است [۲۹]. علاوه بر این SSB میتوکندریایی به طور اختصاصی باعث تحریک DNA هلیکاز میتوکندری نیز می شود [۳۰].

هلیکاز DNA میتوکندریایی یا هلیکاز چشمک زن

محصول ژن C10orf2 کد کننده آنزیم هلیکاز است. آنزیم هلیکاز میتوکندریایی به شکل هگزامر و هپتامر و بسته به نمک و کو فاکتور مشاهده شده است [۳۱]. این هلیکاز میتوکندریایی در محل مشخص با نوکلئوتیدهای میتوکندریایی قرار می گیرد و با شکل نقطه به نقطه فلورسانس میتوکندریایی یادآور ستارگان چشمک زن است به خاطر همین نامش را، هلیکاز چشمک زن گذاشتند در طول مسیر نوکلئوتیدها حرکت می کند. این مشاهدات نشان می دهند که هلیکاز DNA میتوکندریایی چشمک زن برای تنظیم انواع همانند سازی DNA میتوکندریایی در پستانداران ضروری است. هلیکاز فعال به طور ویژه توسط SSB میتوکندریایی انسانی تحریک شده و آنزیم به تنهایی

پیچ های اولیگونوکلئوتید کوتاه را باز می کند [۳۱].

توپوایزومراز

توپوایزومرازا (توپوزها) آنزیم هایی هستند که با شکستن پیوندهای فسفو دی استری در جهت معکوس باعث تغییر توپولوژی DNA می شود و باعث عبور رشته دوم DNA از شکاف می شود. در حالی که همه توپوزهای باعث می شوند DNA از جایگاه فعال تیروزین شکسته شوند بنابراین آن ها براساس مکانیسم عمل به دو نوع I(A,B) یا نوع II(A,B) طبقه بندی می شوند [۳۲]. نوع I توپوایزومراز فقط یک رشته از DNA را برش می زند، در حالی که نوع II توپوز باعث شکسته شدن همزمان دو رشته در DNA می شود. شکست هایی که توپوایزومراز ایجاد می کند باعث انجام عملکردهای خاص DNA بدون هیچ گونه محدودیتی می شوند [۳۳]. در نتیجه، توپوزها نقش اساسی در واکنش های DNA مانند از بین رفتن سوپرکویل در طول همانند سازی و نسخه برداری دارند. تا به امروز، شش توپوایزومراز در انسان شناخته شده است که دو تا از شش آنزیم نوع II هستند و توپوایزومراز میتوکندری از نوع I است. در این شش آنزیم، دو نوع فعال در میتوکندری اند، که اعمال آن ها در ذیل توضیح داده شده است. در حالی که این احتمال وجود دارد که دیگر توپوزها نقش اساسی در عملکردهای DNA میتوکندری داشته باشند ولی اطلاعات کمی در مورد هویت و نقششان موجود است [۳۲]. توپوایزومراز I و IIIA میتوکندریایی تنها دو توپوایزومرازی هستند که در میتوکندری انسانی واقع شده اند [۳۴]. علاوه بر این، شواهد نشان می دهند که این دو آنزیم برای عملکرد میتوکندری در نسخه برداری و یا همانندسازی مهم هستند [۳۲].

توپوایزومراز های میتوکندری

توپوایزومراز I میتوکندری از نوع توپوایزومراز IB است که برای فعالیت مطلوب نیاز به یک فلز دو ظرفیتی و pH قلیایی دارد. مطالعات نشان داده اند که این آنزیم سازگار شده تا در میتوکندری فعالیت اپتیمم داشته باشد. توپوایزومراز I میتوکندری در داخل میتوکندری متمرکز است و شدیداً در بافت های غنی از میتوکندری مانند قلب و مغز



بیان می‌شود. علاوه بر این، توپوایزومراز نوع یک میتوکندری به شکل مجموعه‌های کووالانسی با DNA میتوکندری قرار می‌گیرد. استفاده از camptothecin (سم شناخته شده توپوایزومراز) محل جدا شدن توپوایزومراز I که شبیه به یک خوشه نامتقارن در لوپ D (مکان تنظیمی توپوایزومراز) میتوکندری قرار می‌گیرد نشان داده است. camptothecin باعث کاهش سطح شکل‌گیری لوپ D شده که نهایتاً عدم فعالیت توپوایزومراز میتوکندریایی، تشکیل لوپ D در میتوکندری را کاهش می‌دهد [۳۴]. این نتایج حاکی از آن است که توپوایزومراز I می‌تواند نقش جدید در تنظیم همانندسازی میتوکندری و یا نسخه برداری داشته باشد و می‌تواند استرس سوپرکویل در طی همانندسازی DNA میتوکندری را کاهش دهد [۳۳]. در هسته، توپوایزومراز III به ترکیب مجدد عوامل واسطه‌ای کمک می‌کند. شواهد دیگر اشاره به نقش اساسی توپوایزومراز در بقا DNA میتوکندری دارد. در سال ۲۰۱۰ Wu و همکاران نشان دادند که توپوایزومراز برای حفظ ژنوم DNA میتوکندریایی مگس سرکه ضروری است [۳۵]. مگس سرکه بدون فرم توپوایزومراز میتوکندری می‌تواند تا دوره بلوغ رشد کند، اما قدرت باروری آن کم می‌شود. اثر شگرف آن در مگس سرکه‌های ماده اتفاق می‌افتد، که به طور کامل نابارور می‌شوند، چون مقدار DNA میتوکندریایی آن‌ها به طور چشمگیری کاهش یافته است. مطالعات زیادی در باکتری‌ها نشان می‌دهد که توپوایزومراز III و توپوایزومراز نوع IA، با همکاری RecQ و SSB چنگال همانندسازی در مرحله پایانی را باز می‌کند. روی هم رفته، این نتایج نشان می‌دهند که توپوایزومراز III نقش مهمی در بقا DNA میتوکندریایی دارد چرا که تعدادی شاخه‌های رشته DNA میتوکندریایی والدین را در پایان همانندسازی حذف می‌کند [۳۴].

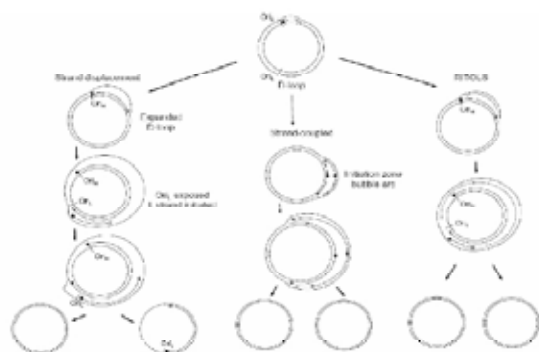
فعالیت ریبونوکلاز H در میتوکندری

همانطور که قبلاً اشاره شد آنزیم ریبونوکلاز برای حذف RNA ضروری است که در DNA یافت می‌شود. دو شکل از ریبونوکلاز H وجود دارد (H1, H2). ریبونوکلاز H1 طی فرآیندهایی هیبرید RNA/DNA را شکسته و ریبونوکلاز H2 به صورت تک تک ریبونوکلوئید 5' منوفسفات در DNA را حذف می‌کند. تنها ریبونوکلاز H1 در میتوکندری

نقش دارد [۳۶]. مطالعات نشان داده که جنین موش‌های حامل جهش ژن ریبونوکلاز H1 مرده به دنیا می‌آیند که می‌تواند منجر به کاهش قابل توجهی در محتوای DNA میتوکندریایی شود. در حالی که بیشتر ریبونوکلازهای H1 عمدتاً در هسته واقع شده‌اند، اما بخشی از پروتئین ریبونوکلاز H1 در میتوکندری یافت می‌شود [۲۱]. از آنجایی که بیان دیر هنگام ریبونوکلاز H1 در میتوکندری می‌تواند به مرگ سلولی منجر شود نقش احتمالی ممکن برای ریبونوکلاز H1 حذف پرایمر RNA در منشا همانندسازی در رشته سنگین و سبک رشته DNA و یا پردازش قطعات در مدل همانندسازی جفت شده در همانندسازی DNA میتوکندریایی می‌باشد [۳۶].

نتیجه‌گیری

همانندسازی DNA میتوکندری در ابتدا با فرآیند نسخه برداری انجام می‌شود. مدل غیر همزمان و مدل رشته‌های جفت شده برای همانندسازی و تکثیر DNA میتوکندریایی ارائه شده است. آنزیم‌های DNA هلیکاز، توپوایزومراز γ میتوکندریایی، پروتئین‌های باند شونده به رشته DNA و ریبونوکلاز H1 در همانندسازی نقش دارند.



شکل ۱: مدل‌های همانندسازی DNA میتوکندریایی

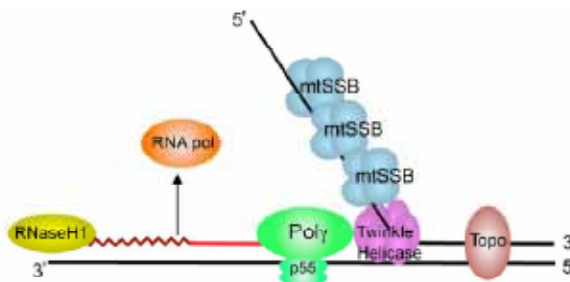
سمت چپ، مدل جابجایی نامتقارن. همانندسازی در OriH منشاء همانندسازی رشته سنگین DNA با جابجایی رشته شروع می‌شود، بنابراین یک حلقه به شکل D ایجاد می‌شود. این سنتز پیشرفت می‌کند تا این که در ناحیه مبدا رشته سبک (OriL) همانندسازی در جهت مخالف شروع می‌شود. قسمت وسط، مدل رشته‌جفت شده همانندسازی دو جهتی از یک منطقه نزدیک OriH شروع می‌شود و با پیشروی همزمان دو شاخه همانندسازی از هر دو طرف پیش می‌رود. سمت راست،



همانندسازی DNA میتوکندری

هلیکاز DNA میتوکندریایی سبب باز شدن دو رشته DNA می شود که رشته منفرد با SSB میتوکندریایی پوشانده شده است، توپوایزومرازاها وظیفه آزاد کردن پیچش سوپرکویل ها در DNA را دارند. سنتز رشته جدید توسط آنزیم DNA پلیمراز γ انجام می شود در حالی که RNA پرایمری که به وسیله RNA Polymerase تشکیل شده بود با فعالیت RNaseH1 از بین می رود.

مدل RITOLS همانندسازی رشته پیشرو مشابه مدل جابجایی نامتقارن شروع می شود اما رشته پیشرو در ابتدا از نسخه های RNA به عنوان پرایمر اولیه (RNA خط چین شده) قبل از تبدیل شدن به DNA استفاده می کند [۲].



شکل ۲: دیاگرام کلی همانند سازی DNA میتوکندریایی با پروتئین های شرکت کننده در

References

- 1- Fernandez-Silva, P., J.A. Enriquez, and J. Montoya, Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol*, 2003. 88(1): p. 41-56.
- 2-Brown, T.A., et al., Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev*, 2005. 19(20): p. 2466-76.
- 3- Holt, I.J., H.E. Lorimer, and H.T. Jacobs, Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*, 2000. 100(5): p. 515-24.
- 4- Tapper, D.P. and D.A. Clayton, Mechanism of replication of human mitochondrial DNA. Localization of the 5' ends of nascent daughter strands. *J Biol Chem*, 1981. 256(10): p. 5109-15.
- 5- Clayton, D.A., Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 1982. 28(4): p. 693-705.
- 6- Yang, M.Y., et al., Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell*, 2002. 111(4): p. 495-505.
- 7- Fuste, J.M., et al., Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Mol Cell*, 2010. 37(1): p. 67-78.
- 8- Falkenberg, M., N.G. Larsson, and C.M. Gustafsson, DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 2007. 76: p. 679-99.
- 9- Bowmaker, M., et al., Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem*, 2003. 278(51): p. 50961-9.
- 10- Yasukawa, T., et al., A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell*, 2005. 18(6): p. 651-62.
- 11- Tynismaa, H., et al., Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum Mol Genet*, 2004. 13(24): p. 3219-27.
- 12- Wanrooij, S., et al., Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(32): p. 11122-7.
- 13- Graziewicz, M.A., M.J. Longley, and W.C. Copeland, DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem Rev*, 2006. 106(2): p.405-383.
- 14- Wong, L.J., et al., Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations. *Hum Mutat*, 2008. 29(9): p. E150-72.
- 15- Johnson, A.A. and K.A. Johnson, Exonuclease proofreading by human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem*, 2001. 276(41): p. 38097-107.

- 16- Bebenek, K. and T.A. Kunkel, *Functions of DNA polymerases. Adv Protein Chem*, 2004. 69: p. 137-65.
- 17- Longley, M.J., et al., *Disease variants of the human mitochondrial DNA helicase encoded by C10orf2 differentially alter protein stability, nucleotide hydrolysis, and helicase activity. J Biol Chem*, 2010. 285(39): p. 29690-702.
- 18- Copeland, W.C., *Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. Annu Rev Med*, 2008. 59: p. 131-46.
- 19- Van Goethem, G., et al., *Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. Nat Genet*, 2001. 28(3): p. 211-2.
- 20- Copeland, W.C., N.K. Lam, and T.S. Wang, *Fidelity studies of the human DNA polymerase alpha. The most conserved region among alpha-like DNA polymerases is responsible for metal-induced infidelity in DNA synthesis. J Biol Chem*, 1993. 268(15): p. 11041-9.
- 21- Lee, H.R. and K.A. Johnson, *Fidelity and processivity of reverse transcription by the human mitochondrial DNA polymerase. J Biol Chem*, 2007. 282(44): p. 31982-9.
- 22- Grossman, L.I., R. Watson, and J. Vinograd, *The presence of ribonucleotides in mature closed-circular mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973. 70(12): p. 3339-43.
- 23- Mignotte, B., M. Barat, and J.C. Mounolou, *Characterization of a mitochondrial protein binding to single-stranded DNA. Nucleic Acids Res*, 1985. 13(5): p. 1703-16.
- 24- Lee, D.Y. and D.A. Clayton, *Properties of a primer RNA-DNA hybrid at the mouse mitochondrial DNA leading-strand origin of replication. J Biol Chem*, 1996. 271(39): p. 24262-9.
- 25- Pinz, K.G. and D.F. Bogenhagen, *The influence of the DNA polymerase gamma accessory subunit on base excision repair by the catalytic subunit. DNA Repair (Amst)*, 2006. 5(1): p. 121-8.
- 26- Szczesny, B., et al., *Long patch base excision repair in mammalian mitochondrial genomes. J Biol Chem*, 2008. 283(39): p. 26349-56.
- 27- Akbari, M., et al., *Mitochondrial base excision repair of uracil and AP sites takes place by single-nucleotide insertion and long-patch DNA synthesis. DNA Repair (Amst)*, 2008. 7(4): p. 605-16.
- 28- Van Dyck, E., et al., *A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in S. cerevisiae is homologous to E. coli SSB. EMBO J*, 1992. 11(9): p. 3. 30-421.
- 29- Lee, Y.S., W.D. Kennedy, and Y.W. Yin, *Structural insight into processive human mitochondrial DNA synthesis and disease-related polymerase mutations. Cell*, 2009. 139(2): p. 312-24.
- 30- Genuario, R. and T.W. Wong, *Stimulation of DNA polymerase gamma by a mitochondrial single-strand DNA binding protein. Cell Mol Biol Res*, 1993. 39(7): p. 625-34.
- 31- Spelbrink, J.N., et al., *Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. Nat Genet*, 2001. 28(3): p. 223-31.
- 32- Zhang, H., L.H. Meng, and Y. Pommier, *Mitochondrial topoisomerases and alternative splicing of the human TOP1mt gene. Biochimie*, 2007. 89(4): p. 474-81.
- 33- Wang, J.C., *Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(6): p. 430-40.
- 34- Zhang, H. and Y. Pommier, *Mitochondrial topoisomerase I sites in the regulatory D-loop region of mitochondrial DNA. Biochemistry*, 2008. 47(43): p. 11196-203.
- 35- Wu, J., L. Feng, and T.S. Hsieh, *Drosophila topo IIIalpha is required for the maintenance of mitochondrial genome and male germ-line stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(14): p. 6228-33.
- 36- Cerritelli, S.M., et al., *Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. Mol Cell*, 2003. 11(3): p. 807-15.

