الجـــزء الرابع

التعبير الجزيئى ونقل المعلومات الوراثية

Molecular Expression and Transmission of Genetic Information

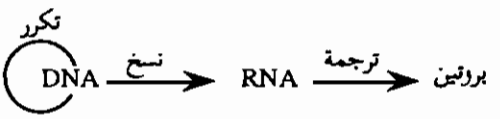
* حمض دى أوكسى ريبونيوكلييك وتركيب المادة الوراثية
* تكرر حمض دى أوكسى ريبونيوكلييك
* نسخ حمض دى أوكسى ريبونيوكلييك
* البناء الحيوى للبروتين
* تنظيم التعبير الجينى

obeikandl.com

إن كفاءة الكائنات الحية فى الوصول إلى درجة عالية من التنظيم والمحافظة على خصائص النوع تنشأ من المعلومات الوراثية المخزنة فى المادة الوراثية والتى تحدد نوع ونمط العمليات البيولوچية فيها. وفى هذا الجزء الأخير من الكتاب سنتعرض لبعض الأسئلة الأساسية المتعلقة بترابط المعلومات الوراثية وتطور الكائنات الحية وهى (١) ما هى الطبيعة الجزيئية للمادة الوراثية؟ (٢) كيف يتم نقل المعلومات الوراثية بهذه الدرجة من الدقة من جيل لآخر؟ (٣) كيف تترجم المعلومات الوراثية فى النهاية فى صورة تتابع محدد للأحماض الأمينية فى جزيئات البروتين؟.

كان لنموذج الحلزون المزدوج لحمض دى أوكسى ريبونيوكلييك DNA الذى اقترحه واطسون وكريك عام ١٩٥٣ دوراً كبيراً ليس فقط فى معرفة التركيب المنتظم الذى يتميّز به DNA ولكن أيضا فى تفسير ميكانيكية استنساخ جزيئات DNA. ولقد أدى هذا بدوره إلى اقتراح نظرية المبدأ الرئيسى central dogma للوراثة الجزيئية التى تفترض ثلاثة عمليات رئيسية فى النقل والتعبير عن المعلومات الوراثية. العملية الأولى هى التكرر replication التى تشمل نسخ جزئ DNA وتكوين جزيئات DNA جديدة يكون فيها تتابع النيوكليوتيدات متماثل تماما لتلك الموجودة فى جزئ DNA الأصلى. والعملية الثانية هى النسخ transcription، وهى العملية التى يعاد فيها نسخ جزء من الرسائل الوراثية فى DNA فى صورة حمض ريبونيوكلييك RNA. أماً العملية الثالثة فهى الترجمة translation التى يتم فيها ترجمة الرسائل الوراثية الموجودة فى RNA بواسطة الريبوسومات إلى جزيئات بروتين.

المبدأ الرئيسى للوراثة الجزيئية والذى يوضح سريان المعلومات الوراثية خلال العمليات الأساسية: التكرار والنسخ والترجمة. وسنرى فيما بعد أنه تم تعديل المبدأ الرئيسى ليشمل عمليات وراثية أخرى مثل النسخ المضاد **reverse transcription**



فصل ٢٢

حمض دى أوكسى ريبونيوكلييك : التركيب والوظيفة الوراثية

Deoxyribonucleic Acid: Structure And Genetic Role

قبل أن نبدأ دراستنا لحمض دى أوكسى ريبونيوكلييك DNA وهو الجزئ الحامل للمعلومات الوراثية يكون من المفيد معرفة طبيعة المعلومات. فالمعلومات بصورة عامة تُعنى التنظيم أو الترتيب order وهى عكس الإنتروبى entropy الذى يُعبر عن العشوائية أو عدم التنظيم. وأحيانا يطلق على المعلومات بالإنتروبى السالب negative entropy ، لذلك فإن المعلومات ترتبط بالطاقة، وفى الحقيقة أنه يُمكن تقدير المعلومات كميا وربطها بوحدات الإنتروبى والطاقة.

المعلومات الوراثية هى تتابع خطى للقواعد النتروجينية فى جزئ DNA ، بينما تعمل وحدات دى أوكسى ريبوز والفوسفات كهيكل لربط هذه القواعد. وبالرغم من أن DNA هو عادة الصورة التى تُخزَّن فيها المعلومات الوراثية التى تنتقل من الخلية الأصل (الأبوية) إلى الخلايا الجديدة (البنوية) بعملية التكرار، فإنه معروف الآن أن حمض ريبونيوكلييك RNA هو الصورة التى تُخزَّن فيها المعلومات الوراثية فى بعض الفيروسات. هذه المعلومات الوراثية توفر اللبنات المطلوبة لإنجاز البناء الدقيق لمجموعة البروتينات المميزة للخلية والتى تحدد بدورها شكل وتنظيم وعمل الخلية.

حمض دى أوكسى ريبونيوكلييك هو الجزئ الحامل للمعلومات الوراثية

بالرغم من اكتشاف DNA فى أنوية الخلايا منذ زمن بعيد يرجع إلى عام ١٨٦٩ ، فلم يُعرف أنه الجزئ الحامل للمعلومات الوراثية إلاّ عام ١٩٤٤ . فقد كان يعتقد حتى هذا التاريخ أن البروتينات النووية هى الحاملة للمعلومات الوراثية بينما يقوم DNA بدور ثانوى، إلا أنه فى ذلك العام أثبت الباحث الأمريكى آفرى Avery وزملائه أن DNA وليس البروتين هو الجزئ الحامل للمعلومات الوراثية. فعندما قامت هذه المجموعة من الباحثين بإضافة DNA المستخلص من السلالة المعدية للبكتريا المسببة للإلتهاب الرئوى pneumo-cocci إلى السلالة غير المعدية من هذه البكتريا وجدوا أن الأخيرة تتحول إلى السلالة المعدية ويكون هذا التحول وراثيا، بمعنى أن الأجيال التالية تكون معدية. وقد استنتج آفرى وزملائه أن DNA المستخلص من السلالة المعدية هو الذى يحمل الرسائل الوراثية إلى السلالة غير المعدية حيث يندمج مع DNA للسلالة غير المعدية ويحولها إلى سلالة معدية.

أمكن أيضا التوصل إلى دليل قاطع بأن DNA هو المادة الحاملة للمعلومات الوراثية من دراسة الفيروس البكتيرى T_2 الذى يهاجم بكتريا القولون. فيتكون الفيروس البكتيرى T_2 من جزئ DNA محاط بغلاف بروتينى، وعندما إستخدم هيرشى Hershey وتشاس Chase (١٩٥٢) الفيروس T_2 يحتوى على DNA معلم بالفوسفور ٣٢ المشع (^{32}P)، وجدوا أن DNA لجسيمات الفيروس وليس الغطاء البروتينى هو الذى يدخل الخلية البكتيرية ويولد المعلومات الوراثية اللازمة لتكاثر الفيروس.

ومن هذه التجارب المهمة والتجارب الكثيرة التى تلتها فقد أصبح من المؤكد فى الوقت الحاضر أن DNA هو الجزئ الحامل للمعلومات الوراثية فى الخلايا الحية.

حمض ريبونيوكلييك هو الجزئ الحامل للمعلومات الوراثية فى بعض الفيروسات

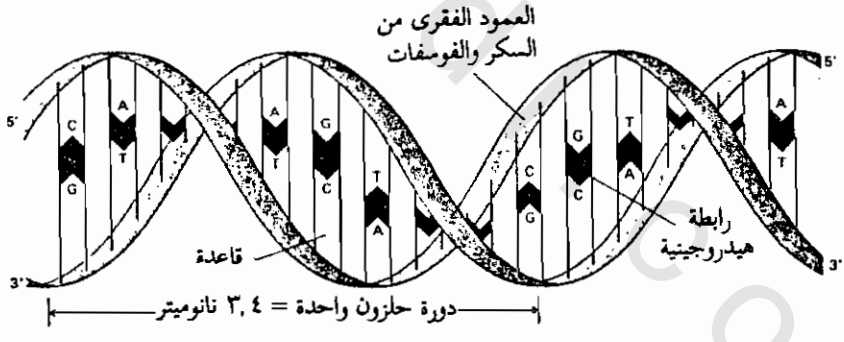
يعتبر DNA هو المادة الحاملة للمعلومات الوراثية فى جميع الخلايا أولية النواة Prokaryotic والخلايا مميزة النواة Eukaryotic. أما فى الفيروسات من ناحية أخرى تكون المادة الحاملة للمعلومات الوراثية إما DNA أو RNA. ففيروس تبرقش أوراق التبغ tobacco

mosaic virus الذى يصيب أوراق التبغ هو أحد الفيروسات التى تحتوى على RNA، فيتألف هذا الفيروس من جزئ فردى RNA محاطاً بغلاف من البروتين، ويمكن فصل الجزء البروتينى عن RNA بالمعاملة بالفينول. ولقد وجد أن RNA المفصول من الفيروس معدى لنبات التبغ بينما البروتين الفيروسى ليس كذلك. كما أن التجارب المختلفة التى حضر فيها هجن لجسيمات الفيروس من سلالات مختلفة أوضحت أيضا أن التخصص الوراثى للفيروسات يكمن فى RNA.

نموذج الحلزون المزدوج لحمض دى أوكسى ريبونيوكلييك

قام العالمان واطسون Watson وكريك Crick عام ١٩٥٣ بتحليل صورة الأشعة السينية لألياف DNA، حيث توصلا إلى أن DNA يتألف من خيطين من سلاسل عديد النيوكليوتيد يلتفان حول بعضهما ليكوّنا ما يُسمى بالحلزون المزدوج double helix (شكل ٢٢ – ١). وأهم خصائص هذا النموذج نلخصها فيما يلى:

١ ـ تلتف سلسلتان من عديد النيوكليوتيد حول بعضهما بصورة حلزونية حول محور عام وتسير السلسلتان فى اتجاهين متضاديين.



شكل ٢٢ – ١

مخطط بيانى لنموذج الحلزون المزدوج الذى اقترحه واطسون وكريك لـ DNA

٢ ـ تبرز قواعد البيورين والبيريميدين نحو داخل الحلزون بينما تكون وحدات الفوسفات ودى أوكسى ريبوز إلى الخارج ويكون مستوى القواعد عموديا على محور الحلزون.

٣ ـ قطر الحلزون يساوى ٢٠ أنجستروم وتكون القواعد مفصولة عن بعضها بمسافة ٣,٤ أنجستروم على طول محور الحلزون، وترتبط ببعضها بزاوية دوران تساوى ٣٦ درجة، ولذلك فإن دورة الحلزون تتكرر كل ١٠ قواعد على كل سلسلة.

٤ ـ يتم التماسك بين السلسلتين بواسطة الروابط الهيدروچينية بين أزواج القواعد المتقابلة فى السلسلتين، بحيث يزدوج الأدنين (A) فى أحد السلسلتين دائما مع الثايمين (T) فى السلسلة الأخرى، بينما يزدوج الجوانين (G) فى أحد السلسلتين دائما مع السايتوسين (C) فى السلسلة الأخرى.

٥ ـ التتابع المحدد للقواعد هو الحامل للمعلومات الوراثية.

وأهم خصائص نموذج الحلزون المزدوج لـ DNA هو التخصص فى إزدواج القواعد، فقد إستنتج واسطون وكريك أن الأدنين يجب أن يزدوج مع الثايمين، والجوانين مع السايتوسين.

حمض دى أوكسى ريبونيوكلييك جزئ عملاق وطويل

أهم خصائص جزيئات DNA الموجودة طبيعيا فى الخلايا الحية هو أوزانها الجزيئية الكبيرة وكذلك أطوالها الكبيرة جداً. فقد أوضحت الدراسات الأولية أن الوزن الجزيئى لـ DNA قد يبلغ عشرة مليون أو أقل والذى يكافئ ١٥,٠٠٠ زوج من القواعد. إلا أنه باستحداث طرف فصل جديدة لجزيئات DNA الطبيعية اتضح أن أوزانها الجزيئية أكبر من ذلك بكثير. فمن المعروف فى الوقت الحاضر أن جزيئات DNA الطبيعية مثل تلك الموجودة فى بكتريا القولون كبيرة جداً بحيث لا يمكن فصلها فى صورة سليمة وذلك لسهولة تكسُّرها أثناء عملية الفصل.

أوضحت الدراسات أيضا أن جزيئات DNA المختلفة تتباين فى أطوالها، إلا أنها تتسم بصورة عامة بأطوالها الكبيرة بالمقارنة بالجزيئات البيولوچية الأخرى. فعلى سبيل المثال تحتوى خلية بكتريا القولون على جزئ DNA وحيد فى هيئة حلزون مزدوج حلقى يتألف من أربعة ملايين من أزواج القواعد وتبلغ كتلته ٢,٦ × $١٠^{١٦}$ كيلو دالتون

وطول الجزئ يساوى ١٣,٦ × ١٠^٦ انجستروم. ويوضح جدول (٢٢ – ١) أبعاد بعض جزيئات DNA فى الكائنات المختلفة.

جدولة ٢٢ – ١

أحجام بعض جزيئات DNA

الكائن	أزواج القواعد (بالألف، أو كيلو قاعدة)	طول الجزئ (ميكروميتر)
الفيروسات		
SV40	٥,١	١,٧
λ Phage	٤٨,٦	١٧
T_2 phage	١٦٦	٥٦
البكتريا		
الميكوبلازما	٧٦٠	٢٦٠
بكتريا القولون	٤٠٠٠	١٣٦٠
الكائنات مميزة النواء		
الخميرة	١٣٥٠٠	٤٦٠٠
الدروسوفيلا	١٦٥٠٠٠	٥٦٠٠٠
الإنسان	٢٩٠٠٠٠٠	٩٩٠٠٠٠

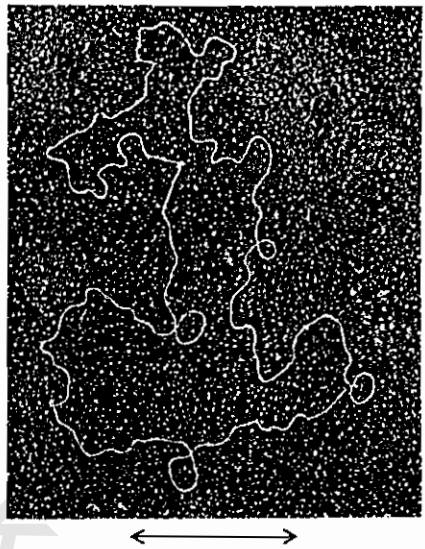
كيلو قاعدة Kilobase (kb) **وحدة طول تساوى ألف زوج من القواعد فى جزئ الحمض النووى الحلزون المزدوج (أو ألف قاعدة فى الجزئ أحادى الخيط). واحد كيلو قاعدة لجزئ** DNA **الحلزون المزدوج لها طول يساوى ٣٤, ميكروميتر وكتله حوالى ٦٦٠ كيلو دالتون.**

ويجدر الإشارة أن أصغر جزيئات DNA أطول بكثير من أى من جزيئات البروتينات. فجزئ DNA لفيروس SV40 كمثال يحتوى على ٥١٠٠ زوج من القواعد وطوله يساوى ١,٧ ميكروميتر (١٧٠٠٠ أنجستروم)، بينما بروتين الكولاجين وهو من أطول البروتينات يبلغ طوله ٣٠٠٠ أنجستروم.

بعض جزيئات DNA تكون حلقية

أوضحت صور المجهر الإلكترونى أن جزيئات DNA الطبيعية فى عدد من الكائنات تكون فى صورة حلقية (شكل ٢٢ – ٢). مثال ذلك تحتوى بكتريا القولون على جزئ واحد

obeikandl.com



شكل ٢٢ - ٢

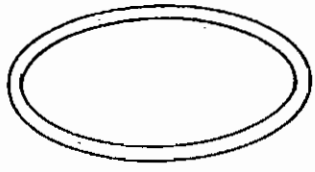
صورة بالمجهر الإلكترونى لـ DNA الحلقى فى الفيروس لامبدا (λ) المحلل للبكتريا λ bacteriophage.

DNA حلزون فى هيئة دائرة مغلقة. ويشير الإصطلاح دائرى إلى إتصال طرفى سلسلة DNA وليس لهيئته الهندسية، فمن الثابت أن جزيئات DNA سواء الخيطية أو الحلقية توجد فى الخلايا الحية فى صورة مُدمجة، فالملاحظ أن طول محيط DNA الحلقى فى بكتريا القولون أطول ألف مرة من قطر خلية البكتريا ذاتها. بالإضافة إلى ذلك فإن جزيئات DNA لبعض الفيروسات مثل الفيروس لامبدا (λ) المحلل للبكتريا λ bacteriophage تتحول بين الصورة الخيطية والصورة الحلقية، فتوجد الصورة الخيطية داخل جسيمات الفيروس بينما توجد الصورة الحلقية داخل خلايا العائل.

جزيئات DNA الحلقية يمكن أن تتواجد فى صور ذات التفاف مفرط (فائق)

جزيئات DNA الحلقية المفصولة بعناية فى صورتها الطبيعية من الفيروسات والبكتريا

والميتوكوندريا وجدت فى صورة ذات التفاف مفرط (فائق) supertwisted (شكل ٢٢ – ٣)، بمعنى أن محور الحلزون المزدوج نفسه يلتف ليكوّن حلزون مفرط الإلتفاف. أما جزئ DNA غير الملتف حول نفسه من ناحية أخرى يُعرف بالصورة المسترخاة relaxed form.



(أ) الصورة المسترخاة لـ DNA.

(ب) الصورة ذات الإلتفاف المفرط لـ DNA.

شكل ٢٢ – ٣

مخطط بيانى لـ (أ) DNA فى الحالة المسترخاة (ب) DNA فى الحالة ذات الإلتفاف المفرط.

ويبدو أن الصورة ذات الإلتفاف المفرط لها أهمية بيولوجية لسببين: الأول أن الصورة ذات الإلتفاف المفرط يكون لها شكل مُدْمج عن الصورة المسترخاة، وبذلك فإن الصورة الملتفة قد يكون لها دور فى تعبئة DNA. وثانيا أن DNA الحلقى الملتف قد يغير درجة انفكاك الحلزون المزدوج وبالتالى يؤثر على تفاعله مع الجزيئات الأخرى.

الكروموسوم عبارة عن جزئ DNA مُفْرد (أحادىّ)

يُستخدم الإصطلاح كروموسوم chromosome للإشارة إلى الأحماض النووية المخزّنة للمعلومات الوراثية فى الفيروسات وفى الخلايا أولية النواه والخلايا مميزة النواه. لكن كلمة كروموسوم والتى معناها الجسم الملون قد إستخدمت فى بادئ الأمر للإشارة إلى الأجسام الى تقبل الصبغ بشدة فى أنوية خلايا الكائنات مميزة النواه والتى يمكن مشاهدتها بالمجهر الضوئى بعد صبغ الخلية بأحد الصبغات. ويمكن فقط مشاهدة كروموسومات الخلايا

obeikandl.com

مميزة النواه والتى تظهر كأجسام مُمدَّدة فى النواه قبل الإنقسام الميتوزى للخلايا الجسمية مباشرة وأثناء المراحل المختلفة لهذا الإنقسام (شكل ٢٢ – ٤). أمَّا فى المرحلة البينية بين الإنقسامات فإن الكروموسومات تكون طويلة جداً وملتفة حول بعضها وتُكوِّن تجمعاً غير منتظم ولا يمكن تمييزها وتبدو ككتلة من الخيوط داخل النواه.

شكل ٢٢ ـ ٤

المادة الكروموسومية (الكروماتين) تكون منتشرة بصورة عشوائية فى المرحلة البينية بين الإنقسامات (أ)، بينما عندما تُجهِّز الخلية نفسها للإنقسام أو أثناء الإنقسام فإن الكروماتين ينتظم فى صورة كروموسومات واضحة (ب).

كروموسوم الخلايا أولية النواه عبارة عن جزئ DNA مُفْرد (أحادى). فتحتوى بكتريا القولون مثلا على كروموسوم واحد عبارة عن جزئ DNA فردى حلقى وكبير. لكن هل كروموسوم الخلايا مميزة النواه عبارة عن جزئ DNA فردى؟. كان من الصعب الإجابة على هذا السؤال المهم لفترة قريبة نظرا لتعرُّض جزيئات DNA الكبيرة للتكسر أثناء عملية الفصل. ولكن باستخدام طرق التصوير الإشعاعى الذاتى autoradiography فى تقدير حجم جزيئات DNA فى المخلوط دون فصله أوضحت أن الكروموسوم فى الخلايا مميزة النواه عبارة عن جزئ DNA فردى فى هيئة حلزون مزدوج.

تحتوى الخلايا مميزة النواه على معلومات وراثية أكبر بكثير من الخلايا أولية النواه وبالتالى فإن عدد الكروموسومات فيها يكون أكبر، فخلايا الإنسان مثلا تحتوى على ٤٦ كروموسوماً بينما بكتريا القولون تحتوى على كروموسوم واحد (جدول ٢٢ ـ ٢). إلا أن عدد الكروموسومات لا يعكس درجة التطور، فالدجاج به ٧٨ كروموسوم بينما الإنسان به ٤٦ كروموسوم.

جدول ٢٢ - ٢

عدد الكروموسومات الطبيعية فى الأنواع المختلفة من الكائنات الحية

الكائن	عدد الكروموسومات
الكائنات أولية النواه	
البكتريا	١
الكائنات مميزة النواه	
دورسوفيلا ميلانوجاستر	٨
نحل العسل	١٦
الأذرة	٢٠
الضفدعة	٢٦
الفأر	٤٢
الأرنب	٤٤
الإنسان	٤٦
الدجاج	٧٨

DNA فى الخلايا مميزة النواه يرتبط بقوة ببروتين قاعدى يُدعى هستون

يوجد إختلاف أساسى بين DNA فى الخلايا أولية النواه والخلايا مميزة النواه. فبينما يوجد DNA فى النوع الأول من الخلايا فى صورة غير مرتبطة مع الهستونات (ربما يكون مرتبط مع أنواع مشابهة للهستونات ولكن ذلك لم يتأكد بصورة قاطعة)، فإن DNA فى أنويه الخلايا مميزة النواه يوجد مرتبطا بالهستونات histones، وهى مجموعة من البروتينات القاعدية الصغيرة. وفى الحقيقة تُشكل الهستونات حوالى ٥٠٪ من كتلة كروموسومات الأنوية بينما النصف الآخر عبارة عن DNA. ويُعرف معقد الهستون مع DNA للمادة الكروموسومية بالكروماتين chromatin الذى يكون فى صورة ألياف دقيقة. ويمكن فصل الهستونات من DNA بمعاملة الكروماتين بالأملاح أو الأحماض المخففة، وعند تفريد الهستونات بكروماتوجرافى التبادل الأيونى وجد أنها تحتوى على خمسة أنواع يطلق عليها H1 , H2A , H2B , H3 , H4 يتراوح وزنها الجزيئى بين ١١ ألف إلى ٢١

obeikandl.com

ألف (جدول ٢٢ ـ ٣). وأهم خصائص الهستونات هو محتواها المرتفع من المجموعات الجانبية الموجبة نتيجة لوجود الحمض الأمينى لايسين أو أرجنين.

جدول ٢٢ ـ ٣

أنواع الهستونات وأوزانها الجزيئية

الهستون	الوزن الجزيئى	لايسين ٪	أرجنين ٪
H1	٢١٠٠٠	٢٩	١,٥
H2A	١٤٥٠٠	١١	٩,٥
H2B	١٣,٧٠٠	١٦	٦,٥
H3	١٥,٣٠٠	١٠	١٣,٥
H4	١١,٣٠٠	١١	١٤

يمكن أن توجد الهستونات فى صور مختلفة وذلك لأنه يمكن تغيير المجموعات الطرفية لبعض الأحماض الأمينية فى الهستونات إنزيميا بواسطة عمليات ميثلة أو فسفرة أو أسيلة. وهذه التفاعلات التى قد تؤدى إلى تعديل الشحنة وكفاءة الروابط الهيدروجينية وكذلك تعديل هيئة الهستونات قد يكون لها دوراً مهماً فى تنظيم تكرر ونسخ DNA.

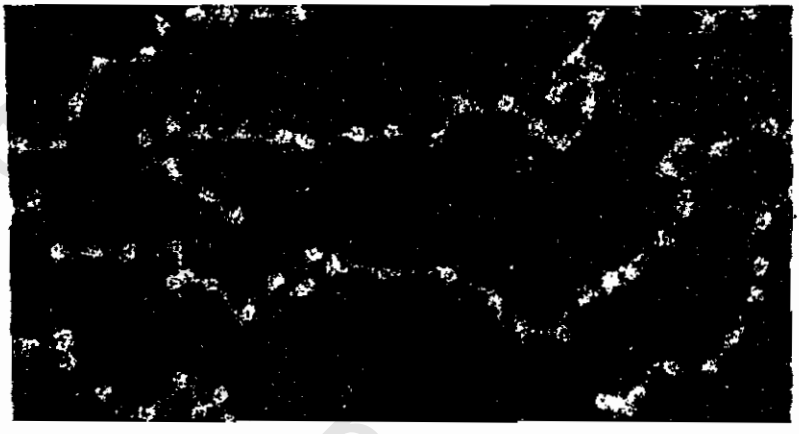
النيوكليوسومات هى الواحدات المتكرره فى الكروماتين

كيف ترتبط الهستونات مع DNA لتكوّن ألياف الكروماتين؟. فى عام ١٩٧٤ اقترح Roger Kornberg بناء على عدة أدله أن الكروماتين يتألف من وحدات متكرره كل منها يحتوى على ٢٠٠ زوج قاعدة من DNA (يتراوح العدد ما بين ١٥٠ إلى ٢٠٠ زوج قاعدة الذى يعتمد على نوع الكائن ونوع النسيج) ووحدتين من كل من الهسونات H2A , H2B , H4, H3. ومعظم الـ ٢٠٠ زوج قاعدة (١٤٦) يلتف من الخارج حول هذه الهستونات التى تُشكّل قلب النيوكليوسوم nucleosome core، أما بقية القواعد التى تعرف بالوصلة DNA linker فتربط النيوكليوسومات المتجاوره وتشارك فى مرونة سلسلة النيوكليوسومات. ويختلف طول هذه الوصلات ما بين ٢٠ إلى ١٢٠ زوج قاعده، ويكون كل منها مرتبط بجزئ من الهستون H1.

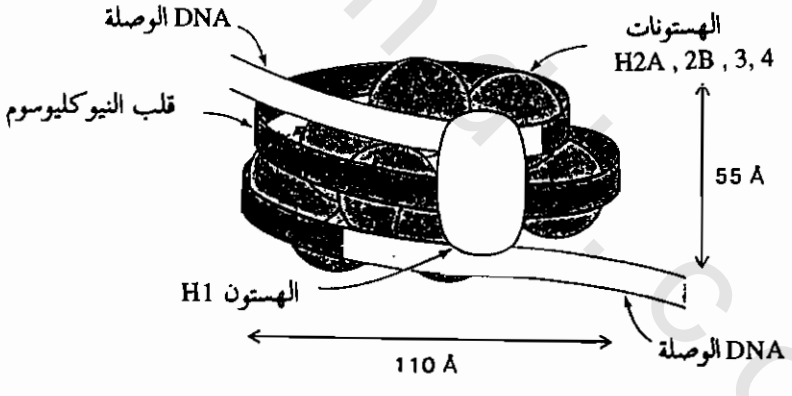
obeikandl.com

وتمت بللوره قلب النيوكليوسوم ودراسته بالمجهر الالكترونى وطريقة انحراف أشعة اكس، حيث اتضح أن قلب النيوكليوسوم عبارة عن جسيمات مسطحه أبعادها ١١٠ × ١١٠ × ٥٥ انجستروم (A°) ويتألف من طبقتين. والـ ١٤٦ زوج قاعده فى DNA تلتف من الخارج حول قلب النيوكليوسوم لتكون حوالى ١ ٣/٤ دورة من الحلزون الفائق يسارى الإلتفاف left-handed superhelix (شكل ٢٢ – ٥). كما أوضحت

(أ)



(ب)



شكل ٢٢ ـ ٥

(أ) صورة بالمجهر الالكترونى للكروماتين موضحا فيه الجسيمات التى تشبه الكريات (النيوكليوسوم)

(ب) مخطط بيانى يوضح تركيب النيوكليوسوم. الحلزون المزدوج يلتف حول جزيئات الهستون الثمانية (جزيئين من كل من H2A , H2B , H3 , H4) . أما الهستون H1 يرتبط من الخارج بـ DNA الوصله Linker DNA .

الدراسات التى أجريت على النيوكليوسومات من كائنات مختلفة أن تركيب قلب النيوكليوسومات يكون ثابت، بينما يتركز الإختلاف بين النيوكليوسومات فى التباين فى طول الوصلات التى تتراوح بين ٢٠ إلى ١٢٠ زوج قاعده.

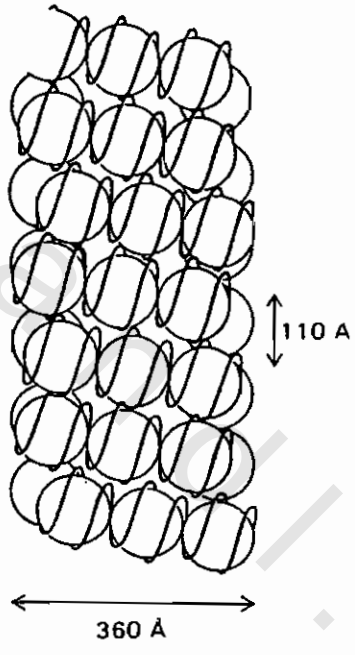
وبالإضافة إلى الهستونات فإن الكروماتين يحتوى على كمية مساوية تقريبا من البروتينات الأخرى (معظمها بروتينات حامضية) التى ترتبط بدرجة ما مع نظام النيوكليوسوم المتكرر. وهذه البروتينات الكروموسومية غير الهستونية تكون متنوعه وتشمل إنزيمات بلمره DNA وإنزيمات بلمره RNA بالإضافة إلى البروتينات المُنظِّمة. ونظرا لأن البروتينات الكروموسومية غير الهستونية لا تشترك فى التركيب الأساسى للكروماتين فإن درجة انتشارها وتماثلها يختلف من نوع إلى آخر من الخلايا.

النيوكليوسوم هو المرحلة الأولى فى تكاثف DNA

إن إلتفاف DNA حول قلب (لب) النيوكليوسوم يشارك فى تعبئه DNA وذلك بخفض امتداده الخطى. فقطع DNA المحتوية على ٢٠٠ زوج قاعدة فى الصورة الممتدة يكون طولها فى المحلول حوالى ٦٨٠ انجستروم. بالمقارنة فإن هذه الكمية من DNA تتواجد فى النيوكليوسوم الذى يبلغ قطره ١٠٠ انجستروم، وعلى ذلك فإن نسبة التعبئة (درجة التكاثف degree of condensation) للنيوكليوسوم تكون حوالى ٧. كيف يمكن مقارنة هذه القيمة مع درجة تكاثف DNA فى الكروموسومات؟.

إن كروموسومات الإنسان فى الطور الاستوائى metaphase التى تكون عاليه التكاثف تحتوى على ٥,٣ × $١٠^{٩}$ زوج قاعده التى تقابل طول خطى مقداره ١٨٠ سم. وهذه الكمية من DNA تكون معبأه فى ٤٦ كروموسوم اسطوانى الذى يكون طولها حوالى ٢٠٠ ميكروميتر (µm). وعلى ذلك فإن نسبة التعبئة لـ DNA فى كروموسومات الطور الاستوائى تكون حوالى $١٠^{٤}$. من ناحية أخرى فإن DNA فى أنويه الطور البينى inter-phase يكون أكثر تشتتا (تفرقا) ويحتوى على نسبة تعبئة تساوى $١٠^{٢}$ إلى $١٠^{٣}$. ويتضح من ذلك أن النيوكليوسوم هو الخطوة الأولى فى إدماج DNA.

ما هو مستوى التنظيم التالى لـ DNA؟. أحد الاقتراحات هو نموذج الملف اللولبى solenoidal model (شكل ٢٢ ـ ٦) وفيه تنتظم النيوكليوسومات بذاتها فى نظام حلزونى فى الكروماتين الذى يكون قطره ٣٦٠ انجستروم (A°)، وتكون نسبة التعبئة فيه حوالى ٤٠. ولف مثل هذه الملفات اللولبية فى صورة حلقات يوفر تكاثف إضافى. ويعتقد أن سلسلة من البروتينات غير الهستونية تشارك فى ثبات التركيبات العالية للكروموسومات.



شكل ٢٢ ـ ٦

نموذج الملف اللولبى المقترح للكروماتين

الخلايا مميزة النواة تحتوى أيضا على DNA سيتوبلازمى

بالإضافة إلى DNA الذى يوجد فى أنويه الخلايا مميزة النواة، فإن كمية صغيرة جداً من DNA الذى يختلف عن DNA النووى فى محتواه من القواعد يوجد فى السيتوبلازم وذلك أساساً فى الميتوكوندريا، كما تحتوى أيضا كلوروبلاست خلايا البناء الضوئى على كمية صغيرة من DNA. وعادة يوجد أقل من ١,٠ ٪ من DNA الخلوى الكلى فى هذه

العضيات فى الخلايا الجسمية غير المنقسمة، ولكن فى الخلايا الملقحة والمنقسمة حيث توجد الميتوكوندريا بكميات كبيرة ترتفع كمية DNA السيتوبلازمى. ويعتبر جزئ DNA فى الميتوكوندريا صغير جداً بالمقارنة بجزئ DNA النووى فيبلغ وزنه الجزيئى ١٠ مليون فقط فى الخلايا الحيوانية ويوجد فى صورة حلزون مزدوج حلقى، أما جزئ DNA فى الكلوروبلاست من ناحية أخرى أكبر من DNA فى الميتوكوندريا بحوالى عشرة مرات، كما أن DNA فى الميتوكوندريا أو الكلوربلاست لا يوجد مرتبطا مع الهستونات.

DNA الميتوكوندرى (mDNA) يشفر لجزيئات RNA الناقلة الميتوكوندرية ولجزيئات RNA الريبوسومية ولعدد من برتينات الميتوكوندريا. فنجد على سبيل المثال أن DNA فى ميتوكوندريا الخميرة يُشفِّر لعشرة أنواع من البروتينات، وجزيئين RNA ريبوسومية وستة وعشرين نوعاً من جزيئات RNA الناقلة. ومع أن حوالى ٩٥٪ من بروتينات الميتوكوندريا تشفر بواسطة DNA النووى فإن المشاركة الوراثية لـ DNA الميتوكوندرى تعتبر على قدر كبير من الأهمية. مثال ذلك أن ثلاثة وحدات من الوحدات السبعة المكونة لإنزيم cytochrome oxidase، وثلاثة وحدات من الوحدات العشرة المكونة لإنزيم ATPase الموجودان فى الغشاء الداخلى للميتوكندريا يشفرا بواسطة DNA الميتوكوندرى. إن وجود جينومات منفصلة فى الخلية يعتبر من أحد المبهمات فى وراثة الخلية ـ إذ كيف يتزامن تكرر DNA الميتوكوندرى مع تكرر DNA فى النواة ومع إنقسام الخلية؟. وكيف يدخل البروتين المتكون فى السيتوسول إلى الميتوكوندريا ويرتبط مع نواتج الجينات الميتوكوندرية؟. والأهم من ذلك لماذا تحتوى الميتوكوندريا فى الأصل على جينات خاصة بها؟. إن الإجابة على هذه الأسئلة لم تعرف بعد.

> جينوم **Genome** يشير إلى المحتوى الوراثى للخلية أو الفيروس، وفى الخلايا مميزة النواه أحيانا ما يشير إلى مجموعة كروموسومية واحدة كاملة أحادية العدد الكروموسومى (**Haploid**).

تدخل الميتوكوندريا ،الكلوروبلاست، فى عملية إنقسام أثناء إنقسام الخلية حيث يتضاعف DNA فيهما، وعلى ذلك فإن كل خلية من الخليتين البنويتين الناتجتين من الإنقسام تحتوى تقريبا على نفس العدد من الميتوكوندريا والكلوروبلاست وبالتالى نفس الكمية تقريبا من DNA السيتوبلازمى.

بعض البكتريا تحتوى على DNA إضافى فى صورة بلازميد وعناصر وراثية متحركة أخرى

سبق أن ذكرنا فى هذا الفصل أن المادة الوراثية فى البكتريا مُمثَّلة فى كروموسوم فردى عبارة عن DNA حلقى وكبير والذى يتواجد فى المنطقة النووية. مع ذلك فإن معظم أنواع البكتريا تحتوى أيضا على واحد أو أكثر من جزيئات DNA الحلقية الصغيرة التى تكون حرة الحركة فى السيتوبلازم، لذلك فإنها تدعى العناصر الوراثية المتحركة mobile genetic elements، أو العناصر اللاكروموسومية extrachromosomal elements، أو الكروموسومات الصغيرة.

تعتبر البلازميدات أهم أقسام العناصر الوراثية المتحركة التى تحتوى على عدد قليل من الجينات بالمقارنة بالكروموسوم البكتيرى الذى يحتوى على آلاف من الجينات، إلا أن بعض أنواع البكتريا تحتوى على بلازميدات كبيرة نسبيا. تحمل البلازميدات جينات خاصة بتثبيط المضادات الحيوية (جينات أو عوامل المقاومة resistance genes)، وتمثيل المنتجات الطبيعية وإنتاج المواد السامة، لذلك فإن البلازميدات تعتبر كروموسومات مساعدة أو ثانوية accessory chromosomes. ويمكن للبلازميدات التكرر (التضاعف) ذاتيا بصورة مستقلة عن الكروموسوم البكتيرى. فتحتوى خلية البكتريا كمثال على حوالى ٢٠ نسخة من الكروموسومات الصغيرة ونسخة واحدة أو اثنين من الكروموسومات البكتيرية (الكبيرة).

والبلازميدات التى تحمل جينات أو عوامل المقاومة تمنح خلايا بكتريا العائل (الخلايا المحتوية على هذا النوع من البلازميد) مقاومة للمضادات الحيوية مثل تتراسيكلين tetra-cycline والاستربتوميسين streptomycin. وهذه الخلايا البكتيرية التى توجد فى جسم

الإنسان نتيجة للعدوى لا تموت بالمعاملة بالمضادات الحيوية التى تحدث الموت فقط للخلايا البكتيرية الحساسة للمضادات الحيوية. ويمكن للبلازميدات الانتقال من الخلية المقاومة إلى الخلية الحساسة لنفس النوع أو نوع آخر من البكتريا بعملية التزاوج وتحولها إلى خلايا مقاومة.

وفى الآونة الأخيرة ظهرت أهمية تطبيقية خاصة للبلازميدات ألا وهى إمكان عزلها من خلايا البكتريا وربطها مع جينات جديدة ثم إدخالها مرة ثانية إلى خلية العائل الطبيعية. ومثل هذا البلازميد المحور يمكن أن يتكرر وينسخ ثم يجعل خلية العائل تكون البروتينات التى تشفر بهذا الجين الدخيل. ومثل هذه الإتحادات الوراثية الجديدة genetic recombination تبشر بمستقبل فريد فى إنتاج البروتينات المرغوبة بكميات كبيرة.

الجين عباره عن جزء من DNA الذى يشفر لسلسلة عديد الببتيد أو RNA

دعنا الآن ننتقل إلى الوحدات الوظيفية فى جزيئات DNA وهى الجينات genes. يُعرَّف الجين فى الوقت الحاضر بأنه جزء من DNA مسئول عن توجيه بناء سلسلة عديد ببتيد واحدة. وإلى وقت قريب كان التعريف المتفق عليه هو أن الجين جزء من DNA مسئول عن توجيه بناء انزيم واحد (جين واحد ـ انزيم واحد)، ثم عُدِّلت هذه النظرية لتأخذ الصورة العامة جين واحد ـ بروتين واحد وذلك لأن بعض الجينات توجه بناء البروتينات التى ليست إنزيمات.

عدد كبير من البروتينات تتكوَّن من أكثر من سلسلة عديد ببتيد واحد، وفى بعض هذه البروتينات تكون سلاسل عديد الببتيد فى البروتين متماثلة، وفى هذه الحالة يُوجه بناء جميع سلاسل عديد الببتيد فى البروتين بواسطة نفس الجين. أما بعض البروتينات الأخرى تحتوى على نوعين أو أكثر من سلاسل عديد الببتيد المختلفة الذى يحتوى كل منها على تتابع خاص من الأحماض الأمينة. فى هذه الحالة فإن كل نوع من سلاسل عديد الببتيد يوجه بواسطة جين خاص، ويتم تجميع سلاسل عديد الببتيد بعد بنائها لتكوين البروتين. لذلك فإن العلاقة جين واحد ـ بروتين واحد تم تعديلها لتأخذ الصوره جين واحد ـ عديد ببتيد واحد one gene - one polypeptide.

مع ذلك فإنه لا يتم التعبير عن كل الجينات فى صورة سلاسل عديد الببتيد، فبعض الجينات تُشفِّر أى تُوجِّه بناء أنواع مختلفة من جزيئات RNA الناقلة، والبعض الآخر تُشفِّر لأنواع مختلفة من جزيئات RNA الريبوسومية. ويطلق على الجينات التى تُشفِّر للبروتينات وجزيئات RNA بالجينات التركيبية structural genes فتحدد هذه الجينات تركيب نواتج الجينات وهى البروتينات أو RNA. تحتوى جزيئات DNA أيضا على أجزاء أخرى التى تقوم بوظائف تنظيمية، فيعمل بعضها كإشارات تحدد مواضع بدء ونهاية الجينات التركيبية، والبعض الآخر يشارك فى تحريك تضاعف الجينات التركيبية وإيقافها. وعلى ذلك فإن الكروموسومات تحتوى على جينات تركيبية وأجزاء تنظيمية regulatory sequences أو جينات تنظيمية regulatory genes. ومجموع الجينات فى الخلية أو الفيروس تعرف بالجينوم genome.

يوجد عدد كبير من الجينات فى الكروموسوم الواحد

نظرا لأن كل جين تركيبى يُوجِّه بناء سلسلة عدد ببتيد واحدة فإنه من الناحية النظرية يمكن تقدير عدد الجينات فى الكروموسوم الواحد من عدد سلاسل عديد الببتيد التى تشفر بهذا الكروموسوم. ومن الواضح أنه يمكن تحديد عدد الجينات فى الكروموسوم بالتقريب فى حالة الكائنات التى تحتوى على كروموسوم واحد، بينما يصبح ذلك أكثر تعقيداً فى خلايا الكائنات عديدة الكروموسوم. ففى حالة بكتريا القولون التى تحتوى على كروموسوم واحد يقدر عدد الجينات فيها بحوالى ثلاثة آلاف وربما يصل إلى خمسة آلاف. فعند فصل بروتينات خلايا بكتريا القولون باستخدام التفريد الكهربى فى إتجاهين أمكن فصل ١١٠٠ سلسلة عديد ببتيد مختلفة. ولكن من المعتقد أن ذلك أقل تقدير حيث أن هذه الطريقة ليست بالكفاءة لفصل جميع سلاسل عديد الببتيد، كما أنها ليست حساسة بدرجة كبيرة فى الكشف عن عديدات الببتيد التى توجد بكمية صغيرة جداً فى خلية البكتريا.

ومن المعتقد أن عدد الجينات فى كروموسوم الخلايا مميزة النواه أكبر بكثير من عدد الجينات فى كروموسوم بكتريا القولون، فالوزن الجزيئى لـ DNA (وبالتالى عدد

النيوكليوتيدات) فى كروموسوم الخلايا مميزة النواه أكبر بكثير من الوزن الجزيئى لـ DNA فى كروموسوم بكتريا القولون. بالإضافة إلى ذلك فإن عدد سلاسل عديد الببتيد فى الخلايا مميزة النواه يفوق بكثير عددها فى بكتريا القولون.

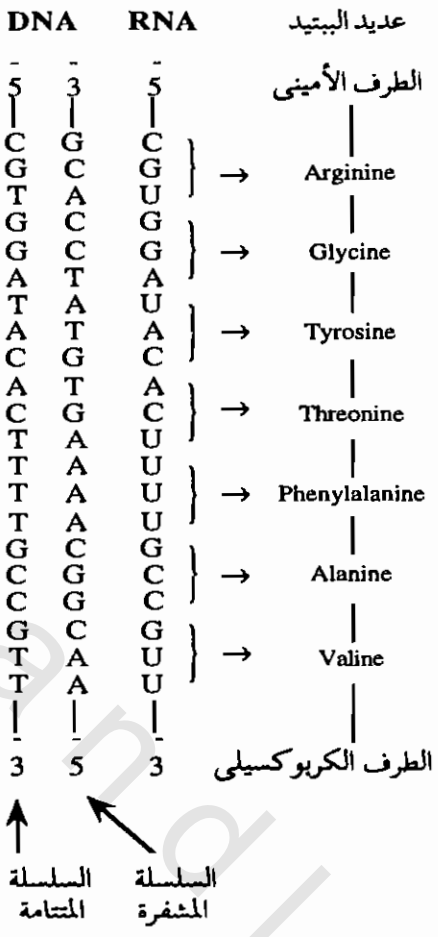
حجم الجين

يمكن بالتقريب معرفة حجم الجينات التركيبية أى التى تُوجّه بناء عديد الببتيد أو RNA المختلفة بطريقة غير مباشرة. فمن المعروف فى الوقت الحاضر أن كل حمض أمينى فى سلسلة عديد الببتيد يتحدّد موضعه فى السلسلة بواسطة ثلاث قواعد متتابعة فى جزئ DNA والتى تُعرف بالشفرة الوراثية (أو الكودون) genetic code، والتى تُمثّل العلاقة المتوازية بين تتابع القواعد فى DNA (أو RNA المنسوخ منه) وتتابع الأحماض الأمينية فى البروتين. ونظرا لعدم وجود تتابعات فاصلة بين الشفرات الوراثية فى الخلايا أولية النواة فإن الشفرات الثلاثية فى جزئ DNA تنتظم تعاقبيا والتى تقابل تتابع الأحماض الأمينية فى سلسلة عديد الببتيد المشفّر منها (شكل ٢٢ ـ ٧). ولأن سلسلة عديد الببتيد تحتوى بين ٥٠ إلى ٢٠٠٠ حمض أمينى فى تتابع محدد، فإن الجين المسئول عن توجيه بناء سلاسل عديد الببتيد يحتوى على الأقل من ١٥٠ إلى ٦٠٠٠ وحدة نيوكليوتيد. وبكلمات أخرى فإن حجم الجينات يتراوح ما بين ١٥٠ إلى ٦٠٠٠ وحدة نيوكليوتيد.

الجينات التى تُوجّه بناء جزيئات RNA الناقلة تكون أصغر بكثير من الجينات المسئولة عن توجيه بناء سلاسل عديد الببتيد وذلك لأن كل نيوكليوتيد فى RNA يُشفّر بواسطة وحدة نيوكليوتيد أحادية فى DNA.

DNA البكتيرى يحتوى على نمط معين من القواعد المميثلة التى تقوم بحمايته من إنزيمات النيوكلينز

بالإضافة إلى القواعد الأساسية الأربعة أدنين وجوانين وسايتوسين وثايمين التى توجد فى جزيئات DNA، فإن DNA البكتيرى يحتوى أيضا على بعض المشتقات الميثيلية لهذه القواعد. ولقد إتضحت الأهمية البيولوجية لهذه القواعد المميثلة من الدراسات



شكل ٢٢ ـ ٧

الاستقامه (التوازى) collinarity بين تتابع النيوكليوتيدات فى DNA و RNA الرسول وتتابع الأحماض الأمينية فى سلسلة عديد الببتيد. الوحدات الثلاثية من النيوكليوتيدات التى تمثل الشفرات الوراثية تحدد تتابع الأحماض الأمينية فى البروتينات خلال المركب الوسيط RNA الرسول الذى يحتوى على ثلاثيات من النيوكليوتيدات (كودونات codons) متتامة مع المصيغ (القالب templete)

الوراثية والبيوكيميائية على البكتريا. فكل نوع من البكتريا يحتوى على نمط مميِّز للقواعد المميثلة فى DNA الخاص بها والذى يميزه عن DNA فى أنواع البكتريا الأخرى. وعند

obeikandi.com

دخول DNA من أحد الأنواع الأخرى إلى الخلية البكتيرية الحية فإنه سوف يُميَّز على أنه جزئ دخيل وذلك لإفتقاره نمط الميثلة المميز لـ DNA للخلية البكتيرية. فى هذه الحالة يقوم إنزيم nuclease البكتيرى بتفكيك كل من خيطى DNA الدخيل فى المواضع التى تفتقد نمط الميثلة المشابه لجزيئات DNA البكتيرى.

يوجد اثنين من الإنزيمات التى تتكامل فى تخصصها وتقوم بحماية DNA لأى من أنواع البكتريا هما (١) modification methylase و (٢) restriction endonuclease. فالإنزيم الأول يكون مسئول عن إنتاج نمط ميثلة مُميَّز فى DNA فى خلايا العائل، حيث تظل مجموعات الميثايل مرتبطة بـ DNA طول فترة حياة الخلية، الإنزيم الثانى من ناحية أخرى يقوم بتفكيك خيطى DNA الدخيل الذى لا يحتوى على مجموعات ميثايل بنفس نمط DNA لخلية العائل.

ولقد تم اكتشاف أكثر من ١٥٠ إنزيم restriction endonuclease فى أنواع البكتريا المختلفة، وبعض أنواع البكتريا تحتوى على أكثر من مجموعة من إنزيمات modification methylase و restriction endonuclease. بعض جزيئات DNA للفيروسات البكتيرية مع ذلك تحتوى على أنواع مختلفة من القواعد المحوَّرة التى تُمكنها من الهرب من المهاجمة بإنزيمات restriction endonucleose.

DNA فى الخلايا مميزة النواه يحتوى على بعض الأجزاء الساكنة وعلى تتابعات تتكرر عدد كبير من المرات

عادة ما تحتوى الخلايا أولية النواه على نسخة واحدة من DNA فى كل خلية، وفى جميع الحالات تقريبا فإن جزئ DNA يحتوى على نسخة واحدة من أى جين. وبصرف النظر عن الجينات المنظَّمة وبعض أجزاء DNA التى تُمثل إشارات لبدأ وإنهاء التعبير الجينى فإن جزءاً صغيراً جداً من DNA يكوون ساكنا أو غير مترجم.

من ناحية أخرى نجد أن التنظيم التركيبى والوظيفى لجزيئات DNA فى الخلايا مميزة النواه يكون على درجة كبيرة من التعقيد. فيحتوى جزئ DNA فى هذه الخلايا على أجزاء ساكنة أى لا تترجم تحتوى على تتابع من وحدات النيوكليوتيد التى قد تتكرر فى بعض الأنواع إلى أكثر من مليون مرة.

ولقد أمكن الحصول على نسبة التتابعات المتكررة فى DNA وذلك من الدراسات الحركية لمعدّل (سرعة) إعادة الإلتحام لخيطى DNA المفردة الناتجة من الدنترة الحرارية thermal denaturation لـ DNA المزدوج بعد تجزئته إلى أجزاء صغيرة. ففى هذا النوع من التجارب يُجزأ DNA أولا إلى أجزاء صغيرة ثم تغير طبيعته (يدنتر) برفع درجة حرارة المحلول إلى درجة أعلى من درجة إنصهار DNA، ثم يبرد هذا المحلول الذى يحتوى على DNA أحادى الخيط إلى درجة تقل ٢٥° م عن درجة الإنصهار، وهى الدرجة المثلى لإعادة التحام السلاسل المتتامة لتكوين DNA الحلزون المزدوج. وحيث أن عملية إعادة الالتحام تتم بالتصادم العشوائى بين السلاسل الفردية فإن سرعة إعادة الالتحام فى مستحضرات DNA المتساوية التركيز يعتمد على تركيز السلاسل الفردية المتتامة. لذلك نجد أن DNA المحتوى على تتابعات متكررة يكون إعادة التحامه أسرع من DNA الذى لا يحتوى على مثل هذه التكرارات. وبصورة عامة فإن سرعة إعادة الالتحام تعتمد على عدد التتابعات المتكررة.

ولقد أظهرت تجارب إعادة الإلتحام أن ١٠٪ من DNA الفأر يحتوى على أكثر من مليون نسخة من تتابع متكرر يحتوى على حوالى ٣٣٠ زوج من القواعد والذى يسمى الأجزاء عالية التكرار highly repetitive segments، وحوالى ٢٠٪ تحتوى على تتابعات خاصة تتكرر على الأقل ١٠٠٠ مره وتسمى الأجزاء متوسطة التكرار moderately repetitive. أما الـ ٧٠٪ الأخرى فى DNA الفأر فتحتوى على أجزاء غير متكررة بالإضافة إلى أجزاء قد تتكرر عدد قليل من المرات. ويسمى الحمض النووى DNA المحتوى على مثل هذه التتابعات عالية التكرار بـ DNA المتكرر repetitive DNA أو DNA التابع satellite DNA.

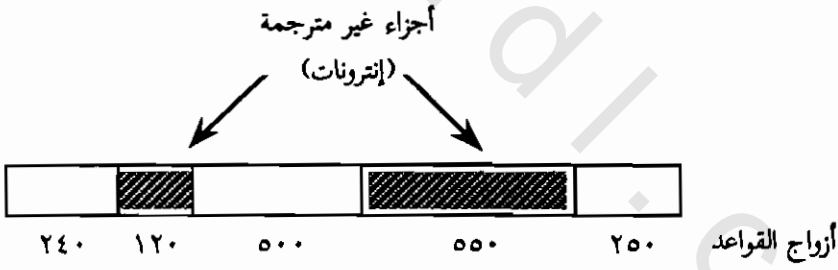
كل الكائنات مميزة النواه التى درست حتى الآن فيما عدا الخميرة وجد أنها تحتوى على DNA المتكرر، هذا بالمقارنة بالكائنات غير مميزة النواه التى لا تحتوى على DNA المتكرر. ولقد وجد أن نسبة التتابعات عالية التكرار ومتوسطة التكرار وأحادية التكرار تختلف من نوع لآخر فى الكائنات مميزة النواه.

ولا يعرف على وجه التحديد الدور الذى تقوم به الأجزاء عالية التكرار، إلا أن وجود

هذه الأجزاء فى منطقة السنترومير فى الكروموسوم يقترح اشتراك هذه الأجزاء فى ترتيب (تراص) الكروموسومات أثناء الإنقسام الميوزى والإنقسام الميتوزى.

عدد كبير من جينات الخلايا مميزة النواه يتخللها أجزاء غير مترجمة تُعرف بالانترونات

يحتوى عدد كبير إن لم يكن معظم جينات الخلايا مميزة النواه على خصائص تركيبية غير عادية، فتتابع القواعد فى هذه الجينات يتخللها أجزاء من DNA التى لا تُشفِّر للأحماض الأمينية فى عديد الببتيد الناتج. وهذه الأجزاء غير المترجمة تخل بالعلاقة الخطية المتوازية بين تتابع القواعد فى الجين وتتابع الأحماض الأمينية فى عديد الببتيد. هذه الأجزاء غير المترجمة فى الجين يطلق عليها إنترونات introns، بينما لأجزاء المُشفِّرة فى الجين تدعى الإكسونات exons. وأحد الأمثلة لذلك هو الجين المُشفِّر للسلسلة بيتا (β) فى الهيموجلوبين الذى يحتوى على إثنين من الأجزاء غير المترجمة أحدهما يحتوى على ٥٥٠ زوج من القواعد والآخر يحتوى على ١٢٠ زوج من القواعد. وعلى ذلك فإن الجين يتجزأ إلى ثلاثة أجزاء مُشفِّرة.



جين السلسلة بيتا فى الهيموجلوبين

وفيما عدا بعض الاستثناءات، فإن جميع جينات الخلايا مميزة النواه التى اختبرت حتى الآن وجدت أنها تحتوى على انترونات التى تختلف فى العدد والموضع والطول بالنسبة لطول الجين الكلى.

ووظيفة الانترونات ليست واضحة بصورة تامة، وهى أحد النقاط التى تضاربت فيها الآراء. أحد هذه الأراء هو أن الأنترونات تمثل إشارات تنظيمية خاصة، أما الرأى الآخر

فيقترح أن الإنترونات تمثل قواطع تفصل الجين إلى وحدات صغيرة (جينيات صغيرة) التى تتحد لتكونّ جينات جديدة أثناء تطور النوع ـ وبغض النظر عن وظيفة الإنترونات فإنها تمثل أحد المشاكل الرئيسية فى تفهم نسخ الجينات.

أمكن تحديد تتابع القواعد فى بعض جزيئات DNA

تمكن سانجر Sanger فى عام ١٩٧٧ لأول مرة من تحديد تتابع القواعد فى كل جزئ DNA للفيروس البكتيرى ϕ X 174 الذى يحتوى على خمسة آلاف قاعدة. وهذا النجاح غير العادى قد فتح الباب أمام عديد من الباحثين لتحديد تتابع القواعد فى الأحماض النووية الأخرى، فقد أمكن بعد ذلك التاريخ من تحديد تتابع القواعد فى عدد من الجينات المختلفة. ومن الواضح فى الوقت الحالى أنه يمكن من ناحية المبدأ تحديد تتابع القواعد فى أى جزئ DNA.

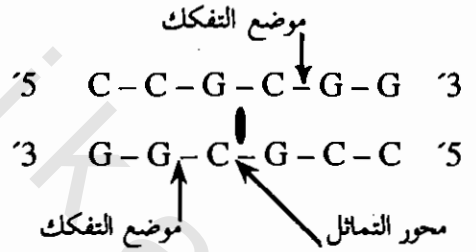
كان هناك ثلاثة تطورات أساسية شاركت بنجاح فى تحديد تتابع القواعد فى جزيئات DNA. الأول إكتشاف إنزيمات restriction endonucleases التى تفكك DNA عند عدد محدود من المواضع، والثانى تحسين طرق التفريد الكهربى لفصل أجزاء DNA، أما التطور الثالث هو إدخال تقنية DNA Cloning التى مكنت من تحضير كميات كبيرة نسبيا من الجينات النقية.

إنزيمات Restriction endonuclease ساهمت بدور كبير فى تحديد تتابع القواعد فى جزئيات DNA

إنزيمات r. endonuclease تستطيع أن تُميِّز تتابع خاص من القواعد فى DNA فى الحلزون المزدوج وتفكك كلا الخيطين فى الحلزون عند هذا التتابع. وتعتبر هذه الإنزيمات أداة لا غنى عنها فى تحليل تركيب الكرومرسوم وتحديد تتابع القواعد فى جزئيات DNA الكبيرة وفى فصل الجينات وفى تكوين جزيئات DNA جديدة عن طريق الإتحادات الوراثية.

وتوجد إنزيمات r. endonuclease فى أنواع مختلفة من أولية الأنوية (غير مميزة النوى) ووظيفتها الأساسية كما ذكرناه سابقا هو تفكيك جزيئات DNA الغريبة

(الدخلية)، بينما جزيئات DNA الخاصة بالعائل لا تتفكك لأن المواضع التى يتم عندها التفكك تكون مميثلة. والنقطة الجديرة بالملاحظة هو أن عدد كبيرة من إنزيمات r. endonuclease تُميِّز تتابع خاص من أربعة إلى ستة أزواج من القواعد حيث تحلل رابطة الفوسفات ثنائية الإستر فى هذه المنطقة. أضف إلى ذلك أن التتابع فى مناطق التفكك يحتوى على محور تماثل ثنائى الدوران twofold rotational symmetry، وبمعنى آخر أن تتابع ازواج القواعد يكون Polindrome. مثال ذلك نجد أن التتابع الذى يميز بواسطه الأنزيم المستخلص من Streptomyces achromogenes هو :



Polindrome

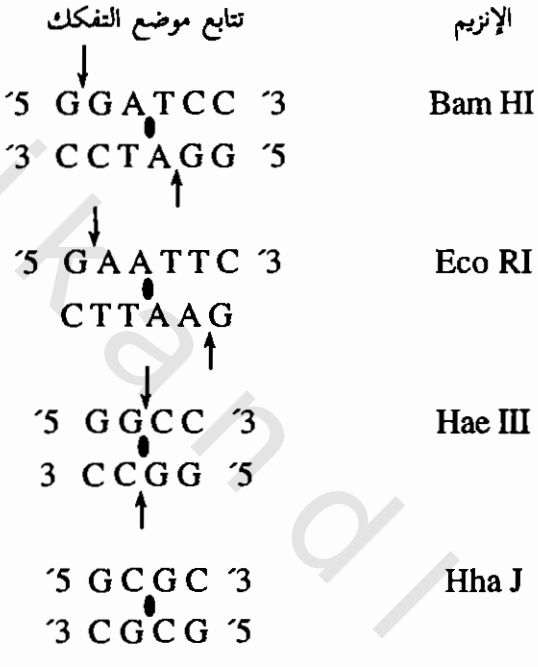
كلمة أو جملة يكون قراءتها من اليمين إلى الشمال مماثل لقراءتها من الشمال إلى اليمين.

مثال ذلك: رادار

وتخصُّص عدد من هذه الإنزيمات مُوضَّح فى شكل (٢٢ ـ ٨). واسم هذه الانزيمات يتألف من رمز مختصر من ثلاثة حروف مشتق من إسم العائل، مثال ذلك Eco يشير إلى إنزيم E. coli، Hin يشير إلى إنزيم Haemophilus influenzae. ثم يتبع ذلك بلقب السلاله ورقم لاتينى يحدد ترتيب اكتشاف الانزيم فى الكائن.

تستخدم إنزيمات r. endonuclease فى تفكيك DNA إلى شظايا (قطع) صغيرة التى يمكن تحليلها بسهولة عن الجزئ الأصلى. مثال ذلك أن DNA لـ Simian Virus 40 (SV 40) يتفكك عند موضع واحد بواسطة إنزيم Eco RI، وعند أربع مواضع

بواسطة Hpa، وعند أحدى عشر موضع بواسطة Hind. وقطعDNA الناتجة من تأثير أحد هذه الإنزيمات يمكن تفكيكها إلى قطع أصغر بأحد إنزيماتr. endonuclease الأخرى. ويمكن فصل هذه القطع بواسطة إلكتروفوريسيس الجيل حيث يمكن تحديد تتابع القواعد فى كل منها، ومن تداخل تتابع القواعد فى هذه القطع يمكن الوصول إلى تتابع القواعد DNA فى الأصلى.



شكل ٢٢ ـ ٨

تخصص بعض إنزيمات restiction endonuclase. موضع التفكك فى خيطى DNA موضّح بسهم.

obeikandl.com

المراجـــع

Ayala, F., and J. Kiger: Modern Genetics, Benjamin - Cummings, Menlo Park, Calif., 1980.

Barrel B. G., and B. F. C. Clark: Handbook of Nucleic Acid Sequences, Joynson - Bruvvers, Oxford, 1974.

Bauer, W. R.: Structure and Reactions of Closed Duplex DNA. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 7 : 287 - 313 (1978).

Bauer, W. R., F. H. C. Crick, and J. H. White, "Supercoiled DNA," Sci. Am., 243 : 118 - 133 July (1980).

Bloomfield, V. A., D. M. Crothers, and I. Tinoco, Ir.: Physical Chemistry of Nucleic Acids, Harper & Row, 1974.

Cantor, C. R., and P. R. Schimmell: Biophysical Chemistry, Part 1: The Conformation of Biological Mocromolecules, Freeman, San Francisco, 1980.

Conn, E. E., P. K. Stumpf, G. Bruening and R. H. Doi: Outlines of Biochemistry (5 th ed.), John Wiley & Son, 1987.

Davidson, E. H., and R. J. Britten: "Possible Role of Repetitive Sequences," Science, 204: 1052 - 1059 (1979).

Davidson, J. N. : The Biochemistry of the Nucleic Acids, Academic Press, 1977.

Dupraw, E. J.: DNA and Chromosome, Holt, New York, 1970.

Kornberg, R. D., and A. Klug: "The Nucleosomes," Sci. Am., 244 : 52 - 78, February (1981).

Lehninger, A. L.: Principle of Biochemistry, Worth, New York, 1982.

Strayer, L.: Biochemistry, 2nd ed., Freeman, San francisco, 1981.

Zubay, G. (Coord. author): biochemistry, Addison - Wesley, Reading, Mass., 1983.

obeikandl.com

تمارين

١ ـ اكتب التتابع المتمم (باستخدام الرمز ٥َ ← ٣َ القياسى) لـ DNAالحلزون المزدوج الذى يكون فيه أحد الخيوط محتوى على أحد التتابعات التالية:

(أ) GATCAA

(ب) TCGAAC

(حـ) ACGCGT

(د) TACCAT

٢ ـ محتوى أحد خيوط DNA الحلزون المزدوج (بوحدات الكسر المولى) هو:

[A] = ٣,، [G] = ٢٤,

(أ) ماذا يمكن أن تقول عن [T] و [C] فى نفس الخيط .

(ب) ماذا يمكن أن تقول عن [A] و [G] و [T] و [C] فى الخيط المتمم.

٣ ـ DNA لأحد طافرات bacteriophage λ له طول محيطى يساوى ١٥ ميكروميتر بدلا من ١٧ ميكروميتر التى تمثل طول النوع غير الطافر. كم عدد أزواج القواعد المفقودة من هذا الطافر.

٤ ـ أحسب الوزن بالجرامات لجزئ DNA حلزون مزدوج طوله ٢٠٠,٠٠ ميل (تساوى المسافة بين الأرض والقمـر). وزن DNA الحلزون المزدوج يساوى ١× $١٠^{-١٨}$ جرام لكل ١٠٠٠ زوج من القواعد وكل زوج من القواعد يمتد ٣٤, نانوميتر. للمقارنه لاحظ أن جسم الإنسان يحتوى على ٥, جرام DNA.

obeikandl.com

٥ ـ ما هو العدد الأدنى من أزواج النيوكليوتيدات فى جين إنزيم Pancreatic ribonuclease (يحتوى الإنزيم على ١٢٤ حمض أمينى). لماذا يتوقع أن يكون عدد أزواج النيوكليوتيدات اكبر من اجابتك؟

٦ ـ DNA للفيروس البكتيرى M13 يحتوى على القواعد الأربعة بالنسب التالية A = ٢٣٪، T = ٣٦٪، G =٢١٪ و C = ٢٠٪. ماذا تشير هذه المعلومات عن DNA.

obeikandl.com

فصل ٢٣

تكرر حمض دى اوكسى ريبونيوكلييك

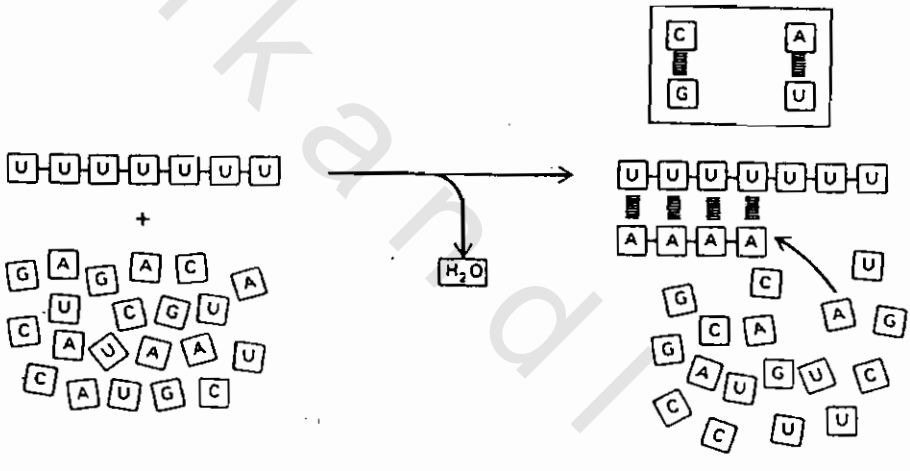
Replicotion of DNA

ناقشنا فى الفصل السابق الخصائص التركيبية لجزئ DNA وطبيعة الجينات والكروموسومات. وفى هذا الفصل سنوضح ميكانيكية تكرر (تناسخ) DNA لتكوين جزيئات DNA جديدة. فمن المعروف أنه قبل انقسام الخلية الحية مباشرة إلى خليتين فإنه يتم تكرر DNA فى الخلية الأصل (الأبوية) بحيث تحتوى كل من الخليتين الجديدتين (البنويتين) على DNA نسخة طبق الأصل لـ DNA فى الخلية الأبوية، وبذلك فإن الخليتين الجديدتين يحملان نفس صفات الخلية الأبوية. ومن ثم يتبين لنا أن تكرر DNA قبل انقسام الخلية يمثل الكيفيه التى تنتقل بها المعلومات الوراثية من جيل إلى الجيل التالى.

تعتبر الإنزيمات والبروتينات الأخرى التى تشترك فى تكرر جزئ DNA من أكثر العوامل الحفازة البيولوجية تميزاً، ليس فقط لمقدرتهم على بناء جزئ DNAضخم من وحدات بنائية صغيرة وهى النيوكليوتيدات، ولكن لأن ذلك يتضمن أيضا نقل المعلومات الوراثية من جزئ DNA الأصل إلى جزئ DNA الجديد بدقة متناهية. بالإضافة إلى ذلك فإن هذه الإنزيمات تقوم بوظيفة ميكانيكية وذلك بفك شريطى DNA المزدوج قبل عملية التكرر.

سلسلتى DNA يعملا كقالب (مُصيغ) فى عملية تكرر DNA

فى تكرر DNA يحدد كل من خيطى DNA تتابع النيوكليوتيدات فى خيطى DNA الجديد، فكلا خيطى DNA الأصل يعملا كقالب (مُصيغ) template فى بناء خيوط DNA الجديدة. وتُعرَّف الصياغة templing، والتى تمثل أحد الأركان الهامه فى نقل المعلومات الوراثية فى الأنظمة الحية، بأنها العملية التى ينسخ فيها تتابع القواعد لـ DNA (أو جزء منه) بواسطه إزدواج القواعد المتمم (A مع T أو G مع C)وهذا يتطلب عملية تعارف بين النيوكلوتيدات فى DNA الأصل والنيوكليوتيدات الحرة المكونة للخيوط الجديدة (شكل ٢٣ ـ ١). ولكن من الضرورى تفهم لماذا تحتاج عملية التكرر (وكذلك النسخ والترجمة) إلى قالب (مصيغ) ؟.



شكل ٢٣ ـ ١

الإرتباط التفضيلى يحدث بين ازواج النيوكليوتيدات (C مع G و A مع T) بواسطة روابط كيمائية ضعيفة (أعلى). وهذا الإزدواج يُمكّن أحد النيوكليوتيدات أن تعمل كقالب (مصيغ) فى بناء خيط جديد (اليمين).

فى البناء الحيوى للجزيئات الكبيرة غير الحاملة للمعلومات مثل الجلايكوجين الذى يحتوى فقط على نوع واحد من الوحدات البنائية وهو D ـ جلوكوز، فإن تماثل ونقاوة الناتج النهائى يتحدد بواسطة المركز النشط لإنزيم جلايكوجين سنثتيز glycogen

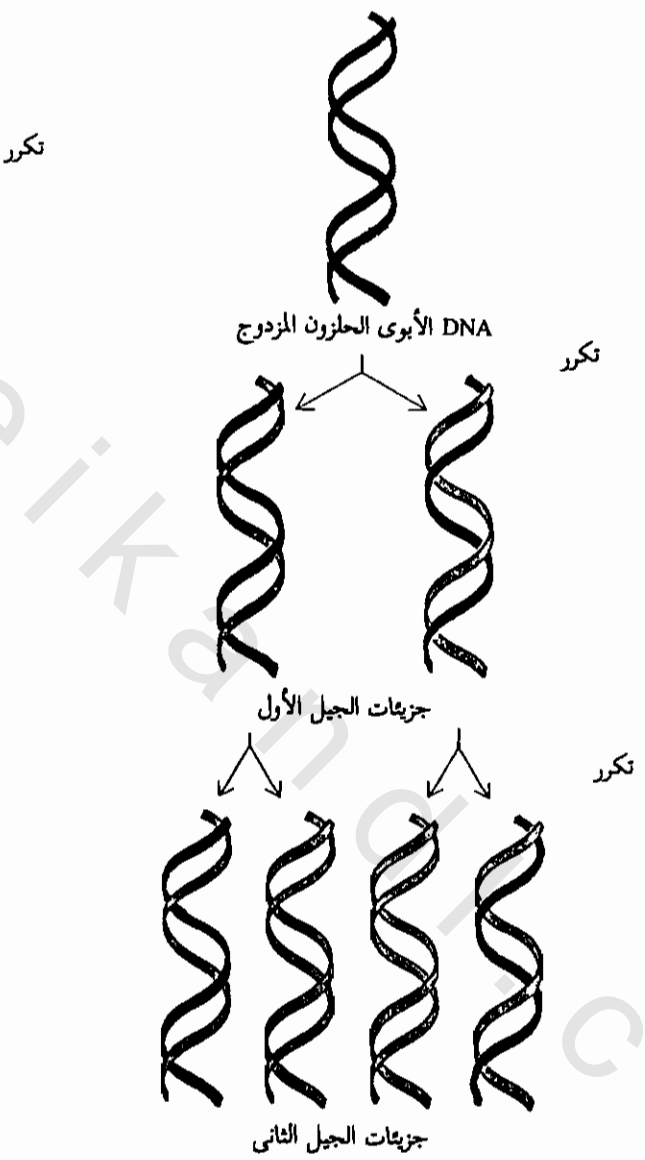
synthetase. فالركز النشط فى هذا الإنزيم يمكن أن يستقبل فقط UDP ـ جلوكوز والنهاية المختزلة لسلسلة الجلايكوجين النامية. ومن حيث المبدأ فإنه يمكن إعتبار المركز النشط لهذا الإنزيم (أو الإنزيمات الأخرى) بأنه قالب حيث أن هناك تطابقاً بين المواد الخاضعة والمركز النشط للإنزيم.

تختلف الصورة عن ذلك فى حالة بناء DNA أو RNA أو عديد الببتيد، فجزئ DNA مثلا قد يحتوى على عدة ملايين من وحدات النيوكليوتيدات المختلفة التى توجد فى تتابع خاص بحيث لا يمكن للمركز النشط فى الإنزيم بمفرده من تحديد التتابع الكلى للنيوكليوتيدات فى الجزئ، لذلك فإنه من الضرورى فى هذه الحالة استخدام DNA كقالب لتحديد التتابع فى جزئ DNA الجديد.

تكرر DNA يتم بطريقة نصف محافظة

أدى نموذج الحلزون المزدوج الذى اقترحه واطسون وكريك لجزئ DNA إلى كيفية مقبولة لتكرر (أو تناسخ) DNA، فافترضا هذان العالمان أن كل من خيطى DNA الأبوى يعملان كقالب فى عملية التكرر حيث يُبنى على كل خيط سلسلة DNA جديدة، وهذا يتطلب انفكاك ولو جزئى للحلزون المزدوج الأبوى. وبهذه الطريقة فإنه يتكون جزيئيين DNA متماثلين تماما لجزئ DNA الأبوى كل منهما يحتوى على خيط مشتق من DNA الأبوى بينما الخيط الأخرى يكون حديث التكوين. وهذه الطريقة فى تكرر DNA التى يتم فيها توزيع ذرات DNA الأبوى مناصفة بين جزيئى DNA الناتجان من التكرر يطلق عليها الطريقة نصف المحافظة semiconservative للتكرر (شكل ٢٣ ـ ٢). هذا بالمقارنة مع نماذج أخرى اقترحت لعملية التكرر، منها الطريقة المحافظة conservative حيث ينسخ خيطى DNA الأبوى دون انفصالهما وبذلك يكون أحد الجزيئين الناتجين من التكرر جديد تماماً أما الجزئ الآخر فيكون قديماً أى الجزئ الأبوى.

أبدت الأدلة التجريبية الكيفية نصف المحافظة فى تكرر DNA، وأهم هذه الأدلة التجربة التى أجراها ميسلون Messelson وستال Stahl (١٩٥٨). فقد قاما بتنمية

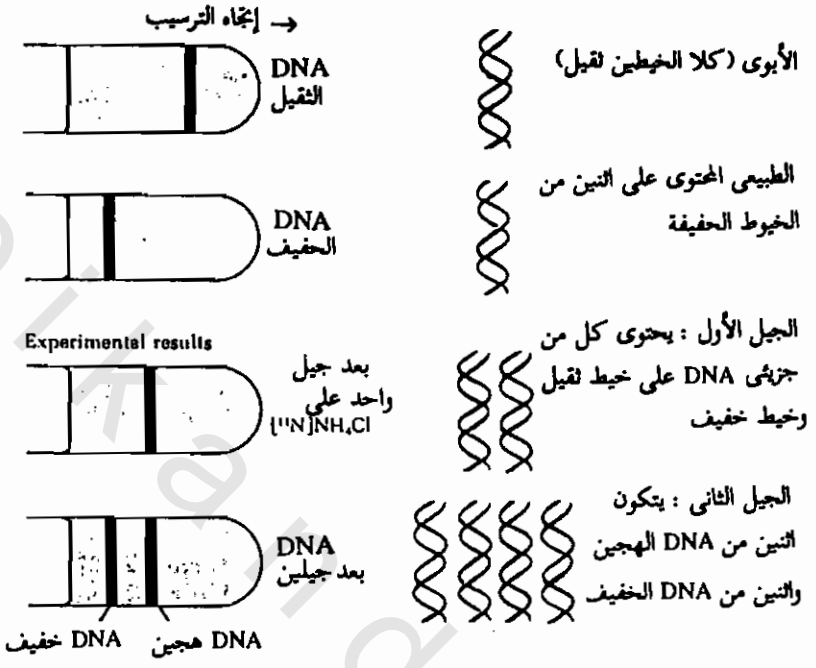


شكل ٢٣ ـ ٢

مخطط بيانى يُوضح تكرر DNA بالطريقة نصف المحافظة. خيوط DNA الأبوى موضحة باللون الداكن بينما خيوط DNA حديثة التكوين موضحة باللون الفاتح. فى كل دورة تكرر فإن خيطى DNA يعملا كقالب لتكوين خيوط DNA المتممة حديثة التكوين.

obeikandl.com

بكتريا القولون فى بيئة تحتوى على $^{15}NH_4Cl$ كمصدر وحيد للنتروجين لعدة أجيال وبذلك تكون جميع ذرات النتروجين فى جزئ DNA من النظير الثقيل للنتروجين ^{15}N، وتكون كثافة DNA المحتوى على ^{15}N أكبر من كثافة DNA المحتوى على ^{14}N .



شكل ٢٣ ـ ٣

نتائج تجربة ميسلون وستال. DNA - الثقيل (^{15}N DNA) يصل إلى حالة الإتزان فى موقع قريب من قاع إنبوبة الطرد المركزى عن DNA الطبيعى (^{14}N DNA) فى متدرج كلوريد السيزيوم. أما DNA الهجين أى الذى يحتوى على سلسلة ^{15}N DNA وسلسلة ^{14}N DNA يكون فى موضع وسط بين DNA الثقيل و DNA الخفيف.

الاختبارات التى أجريت على DNA فى الجيل الأول والثانى أوضحت أن تكرر DNA يتم بالطريقة نصف المحافظة.

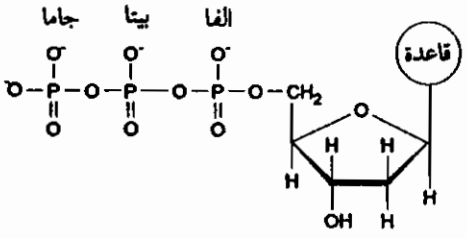
نقلت خلايا بكتريا القولون بعد ذلك إلى بيئة تحتوى على $^{14}NH_4Cl$ ثم سمح لهذه

لخلايا بالنمو لجيل واحد. وعندما فصل DNA من هذه الخلايا وقدرت كثافته بطريقة الطرد المركزى فى متدرج من كلوريد السيزيوم(C_sCl) ظهرت طبقة واحدة كثافتها بين DNA الطبيعى (يحتوى على ^{14}N) و DNA الثقيل (يحتوى على ^{15}N)، وهذه هى النتيجة المتوقعة إذا كان DNA مؤلف من خيط جديد (يحتوى على ^{14}N) وخيط أبوى (يحتوى على ^{15}N) (شكل ٢٣ ـ ٣).

وعندما سمح للخلايا بالنمو للجيل الثانى فى البيئة التى تحتوى على ^{14}N فإن DNA المفصول أظهر طبقتين أحدهما له كثافه مماثلة لـ DNA الطبيعى (^{14}N DNA) والآخر له كثافة مماثلة لـ DNA الهجين ($^{15}N, ^{14}N$ DNA). ولقد استنتج العالمان من هذه النتائج أن DNA الجديد يحتوى على خيط من الأصل وخيط جديد والتى تتفق مع نظرية واطسون وكريك.

البناء الإنزيمى لجزئ DNA: إكتشاف إنزيم بلمرة DNA

بعد أو أوضحنا الخصائص العامة لتكرر DNA، دعنا الآن ننتقل إلى الأحداث الإنزيمية الجزيئية المشتملة فى تكرر DNA. ترجع معلوماتنا عن البناء الإنزيمى المعملى لجزئ DNA إلى أبحاث كورنبرج ومجموعته بجامعه استانفورد التى بدأت عام ١٩٥٦ على بكتريا القولون. فعندما حضن مستخلص خلايا بكتريا القولون مع مخلوط من الـ دى أوكس نيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات التى تحتوى على نظير الفوسفور ٣٢ (^{32}P) فى الموضع الفا (α) (شكل ٢٣ ـ ٤) وجد أنه تتكون كمية صغيرة جداً من DNA الجديد الذى يحتوى على فوسفور ٣٢ فى مجموعة الفوسفات. وبعد عشر سنوات من الأبحاث المتواصلة فى معمل كورنبرج أمكن فصل الإنزيم الذى يحفز هذا التفاعل فى



شكل ٢٣ ـ ٤

دى أوكسى ريبونيوكليوسيد ثلاثى الفوسفات الذى يحتوى على فوسفور مشع (^{32}P) فى الموضع الفا (α).

صورة متجانسة والذى سمى إنزيم بلْمرة DNA (DNA polymerase). ويطلق على هذا الإنزيم الآن إنزيم بلْمرة DNA الأول DNA Polymerase I، حيث أمكن بعد ذلك فصل إنزيمات بلمرة أخرى.

وإنزيم بلْمرة DNA الأول يحفز إضافة وحدات دى اوكسى ريبونيوكليوتيد خطوة خطوة إلى سلسلة DNA.

$$(dNMP)_n + d\,NTP \rightleftharpoons (d\,NMP)_{n+1} + PPi$$

(DNA يحتوى على n وحدة دى أوكسى ريبو نيوكليوتيد) ⇌ (DNA يحتوى على (n+1) وحدة دى أوكسى ريبو نيوكليوتيد)

حيث dNMP و dNTP يشيران إلى دى أوكسى ريبونيوكليوسيد ٥َ ـ أحادى الفوسفات و ٥َ ـ ثلاثى الفوسفات على التوالى. ويحتاج إنزيم بلْمرة DNA إلى العناصر التالية لبناء سلسلة DNA:

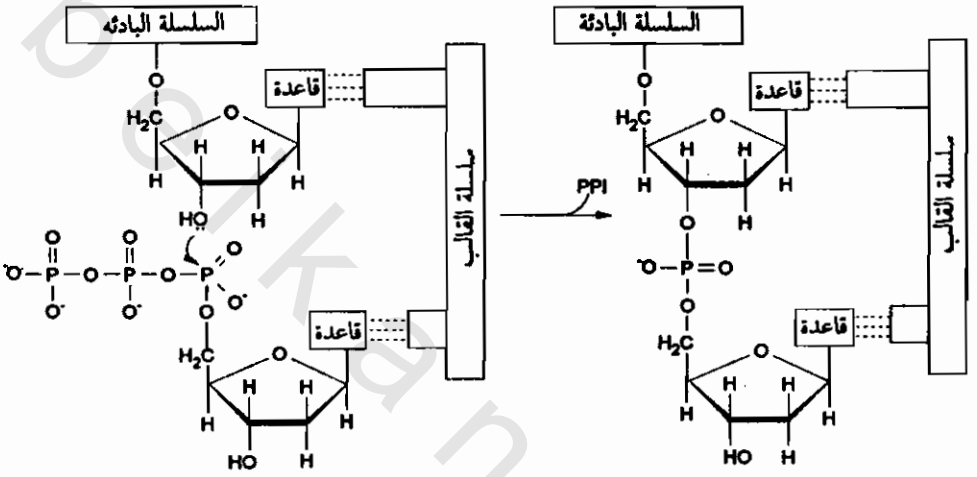
١ ـ الأنواع الأربعة من دى أوكسى ريبونيوكليوسيد ٥َـ ثلاثى الفوسفات، وهى دى أوكسى أدينوزين ثلاثى الفوسفات (dATP)، دى أوكسى جوانوزين ثلاثى الفوسفات (dGTP)، دى أوكسى ثايميدين ثلاثى الفوسفات (dTTP)، ودى أوكسى سايتوزين ثلاثى الفوسفات (dCTP). وسوف يستخدم الرمز المختصر dNTP للإشارة إلى جميع دى أوكسى نيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات. أيونات المغنسيوم ضرورية أيضا لهذا التفاعل.

٢ ـ يجب وجود سلسلة من DNA (أو RNA) تكون فيها مجموعة الهيدروكسيل الثالثة (3´-OH) حرة، فتعمل هذه السلسلة كبادئ primer يضاف اليها وحدات دى أوكسى ريبونيوكليوتيد.

٣ ـ من الضرورى تواجد DNA قالب الذى يمكن أن يكون سلسلة فردية أو حلزوناً مزدوجاً، إلاّ أن الهيئة المزدوجة تكون نشطة فقط عندما يكون خيطى الحلزون المزدوج منفكّة فى موضع أو اكثر.

وتفاعل استطالة السلسلة الذى يُحفز بإنزيم بلْمرة DNA يتم بالمهاجمة النيوكليوفيلية

بمجموعة الهيدروكسيل الثالثة (3-OH´) فى السلسلة البادئة على مجموعة الفوسفات ألفا فى دى أوكسى ريبونيوكليوسيد ثلاثى الفوسفات الجديد. وبذلك تتكون رابطة فوسفات ثنائية الإستر مع انفراد البيروفوسفات (شكل ٢٣ ـ ٥). أما التحلل اللاحق للبيروفوسفات يدفع تفاعل البلْمرة إلى الامام. واستطالة سلسلة DNA تسير فى الاتجاه ٥َ ← ٣َ.

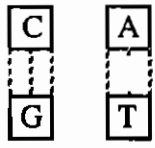


شكل ٢٣ ـ ٥

تفاعل إستطالة السلسلة الذى يُحفز بإنزيم بلمرة DNA.

إنزيم بلمرة DNA يأخذ التعليمات من القالب

يحفز إنزيم بلْمرة DNA تكوين رابطه الفوسفات ثنائية الإستر فقط إذا كانت القاعدة فى النيوكليوتيد القادم (الجديد) متتامة مع القاعدة المقابلة فى سلسلة القالب. فاحتمال تكوين الرابطة التساهمية يكون ضعيفاً جداً إلا اذا كوّنت القاعدة القادمة إزدواج من نوع واطسون وكريك مع القاعدة المقابلة على سلسلة القالب. وعلى ذلك فإن إنزيم بلمرة DNA عبارة عن إنزيم مُوجّه بالقالب templet - directed enzym، وفى الحقيقة إنه أول إنزيم من هذا النوع تم اكتشافه.



الإرتباط المفضل الذى يتم بين زوجين من النيوكليوتيد (A مع T و G مع C) بواسطة الروابط الهيدروجينية الضعيفة ـ يطلق على هذا النوع من الإرتباط بارتباط واطسون وكريك حيث قد أقترح أول مرة بواسطة هذين العالمين.

وهناك عدة أدلّة تجريبية والتى تشير إلى أن انزيم بلمرة DNA يأخذ تعليماته من القالب وهى:

١ ـ بناء كمية محسوسة من DNA تتم فقط عند وجود النيوكليو سيدات ثلاثية الفوسفات الأربعة و DNA قالب.

٢ ـ إنزيم بلْمرة DNA يمكن أن يقوم بإدماج بعض القواعد المشابهة. فعلى سبيل المثال يمكن لليوراسيل أو ٥ ـ برومو ـ يوراسيل أن تندمج فى موضع الثايْمين.

٣ ـ يعتمد محتوى القواعد فى DNA المتكون حديثا على طبيعة القالب وليس على الكميات النسبية للنيوكليوتيدات. أضف إلى ذلك أن DNA الناتج يحتوى على نفس محتوى القواعد فى DNA القالب الحلزون المزدوج.

بكتريا القولون تحتوى أيضا على أثنين من إنزيمات بلْمرة DNA الأخرى

بعد مرور ١٥ عاما من اكتشاف إنزيم بلْمرة DNA الأول فى بكتريا القولون أُكتشف فى هذه البكتريا اثنين من إنزيمات البلْمرة الأخرى الذى اطلق عليهما إنزيم البلمرة الثانى DNA Polymerase II وإنزيم البلمرة الثالث DNA polymerase III. وهذين الإنزيمين يشبهان إنزيم البلمرة الأول فى الأوجه التالية (جدول ٢٣ ـ ١):

١ ـ كل منهما يحفز البناء الموجّه من القالب لجزئ DNA من دى اوكسى ريبونيوكليوسيد ثلاثية الفوسفات.

٢ ـ كل منهما يحتاج إلى بادئ تكون فيه مجموعة الهيدروكسيل الثالثة (OH - 3′) حرة.

٣ ـ البناء الحيوى لسلاسل DNA تكون فى الاتجاه ٥′ ← ٣′.

جدول ٢٣ ـ ١

خواص إنزيمات البلمرة I و II و III من بكتريا القولون

	Pol I	Pol II	Pol III
البلمرة: ٥َ ← ٣َ	+	+	+
التفكك الطرفى: ٣َ ← ٥َ	+	+	+
التفكك الطرفى: ٥َ ← ٣َ	+	−	+
بناء البوليمر الجديد	+	−	−
الوزن الجزيئى (كيلو دالتون)	١٠٩	١٢٠	١٤٠
عدد الجزيئات فى الخلية	٤٠٠		١٠ ـ ٢٠
رقم التحول*	١٠	,٥	١٥٠

* عدد النيوكليوتيدات المبلرة عند ٣٧ْم / ثانية/ لكل جزئ من الإنزيم
+ و − يشيران إلى وجود أو غياب الخاصية المدونة على التوالى

وتختلف هذه الإنزيمات فى تفضيلها لهيئة القالب، فإنزيمى البلمرة الثانى والثالث يفضلان DNA مزدوج السلاسل الذى يحتوى على فجوه صغيرة، بالمقارنة فإن السلاسل الفردية القريبة من المناطق مزدوجة السلاسل تكون هى القالب المفضل للبوليمريز الأول. ويختلف أيضا المعدّل الحفْزى لهذه الإنزيمات خارج الخلايا، فيضاف ١٠ نيوكليوتيدات فى الثانية بواسطة إنزيم البلمرة الأول و ,٥ نيوكليوتيد فى الثانية بواسطة إنزيم البلمرة الثانى، بينما يضاف ١٥٠ نيوكليوتيد فى الثانية بواسطة إنزيم البلمرة الثالث. كذلك نجد أن انزيم البلمرة الأول والثالث لهما أيضا ثلاثة أنشطة انزيمية. فبالإضافة إلى نشاط البلمرة، فإن هذين الإنزيمين لهما القدرة على تفكيكDNA تصاعديا مـن طرف مجموعة الهيدروكسيل الثالثة الحرة، (5´→ 3´ exonuclease) أو من طرف مجموعة الهيدروكسيل الخامسة الحرة (3´ → 5´ exonuclease).

وهنا نتساءل ـ ما هو الدور الذى تقوم به هذه الانزيمات داخل الخلايا؟. وكما

obeikandi.com

سنرى بعد قليل أن متراكب إنزيمى يحتوى على إنزيم البلمرة الثالث يكون مسئولاً عن بناء معظم أجزاء DNA الجديدة، إنزيم البلمرة الأول من ناحية أخرى يزيل الجزء البادئ ويملأ الفجوات، أما الدور الذى يقوم به إنزيم البلمرة الثانى فليس معروفاً حتى الآن.

إنزيم البلمرة الثالث عبارة عن تجمع من سبع وحدات عديد ببتيد

يعمل إنزيم البلمرة الثالث DNA Polymerase III (Pol III) داخل الخلايا كجزء من متراكب إنزيمى مؤلف من وحدات فرعية عديدة هوPol III holoenzyme الذى يتألف على الأقل من سبعة أنواع من عديد الببتيد (جدول ٢٣ ـ ٢). أحد هذه

جدول ٢٣ ـ ٢

مكونات DNA Polymerase III Holoenzyme

الوحدة الفرعية		الكتلة (كيلو دالتون)
الفا	(α)	١٣٠
إبسلون	(ε)	٢٧,٥
ثيتا	(θ)	١٠
تاو	(τ)	٧١
جاما	(γ)	٥٢
دلتا	(δ)	٣٢
بيتا	(β)	٤٠,٦

الوحدات الفرعية α و ε و θ **هى مكونات** Pol III

الوحدات الفا (α) تقوم بنشاط التفكك الطرفى ٥َ ← ٣َ (3´→ - 5´ exonuclease) بالاضافة إلى وظيفة البلمرة، بينما عديد الببتيد ابسلون (ε) يقوم بوظيفة التفكك الطرفى ٣َ ← ٥َ (5´→ 3´ exonuclease). وواحد أو أكثر من عديد الببتيد الباقية ترتبط بجزئ ATP اللازم لـ Pol III لبدء البناء على نهايه RNA البادئ، أما وظيفة وحدات عديد الببتيد الباقية فليست معروفة.

تكرر DNA فى بكتريا القولون

أوضحت الدراسات البيوكيميائية والوراثية الحديثة أن عملية تكرر DNA فى بكتريا القولون يحتاج بالاضافة إلى إنزيمات البلمرة إلى أكثر من خمسة عشر إنزيما وبروتينا أخرى. فعملية التكرر تتم فى عدد كبيرة من الخطوات المتتالية التى تشمل التعرّف على منشأ بدأ التكرر وفك الحلزون المزدوج وفصل سلاسل القالب بعيداً عن بعضها والبدأ فى بناء السلاسل الجديدة واستطالة السلاسل الجديدة وازدواج السلال مع بعضها ووقف البناء. وكل هذه العمليات السابقة تتم بمعدّل كبير، كما تتم عملية التكرر بدقة متناهية. ويطلق على المتراكب الذى يحتوى على جميع الإنزيمات والعوامل المساعدة التى تشترك فى عملية بناء DNA جديد بنظام تكرر DNA (DNA replicase system) أو ريليسوم replisome. والآن دعنا نوضح خطوات تكرر DNA فى بكتريا القولون بشئ من التفصيل.

عملية التكرر تبدأ عند مواضع محددة تعرف بأصول التكرر

هل يبدأ تكرر DNA من أى مكان فى الكروموسوم أو أن هناك مواضع محددة تبدأ عندها عملية التكرر؟. فنجد أن تكرر DNA عملية على درجة كبيرة من الدقة وعلى ذلك فإن بدأ التكرر من مواضع محددة هى الأكثر إحتمالاً. ففى البكتريا وعديد من الفيروسات التى تنمو فى الخلايا مميزة النوى وجد أن عملية التكرر تبدأ من موضع محدد فى جزئ DNA يطلق عليه منشأ أو أصل التكررreplication origin. ومنشأ التكرر فى بكتريا القولون عبارة عن تتابع خاص من ٢٤٥ زوج من القواعد تعرف بالموضع oriC. وهذا التتابع يحتوى على منطقة من تسعة أزواج من القواعد التى تتكرر أربع مرات والتى يمكن أن ترتبط ببروتين خاص يدعى dna A فى حاله بكتريا القولون، ويمثّل معقد البروتين مع هذه القطعة من DNA إشارة بدء التكرر. ولكن كيف يقوم بروتين dna A بوظيفته فإنه غير معروف، لكن أحد الإحتمالات هو أنه ربما ينشئ موضع يكون مناسباً لتجميع الوحدات الفرعية السبعة لـ DNA Pol III لتكوين holoenzyme النشط.

تحتوى جزيئات DNA فى الخلايا مميزة النواة كما سيتضح فيما بعد على عدد كبير

من مواضع أصول التكرر التى يبدأ عندها عملية التكرر فى نفس الوقت وذلك لضمان إتمام عملية التكرر فى وقت مناسب نظراً لكبر حجم هذه الجزيئات.

DNA الحلقى يتكرر فى اتجاهين

أوضحنا فى الفصل السابق أن جزئ DNA البكتيرى وعدد كبير من جزيئات DNA الفيروسية عبارة عن حلزون مزدوج حلقى. والسؤال الآن هو كيف يتم تكررDNA الحلقى؟. فهل ينشطر جزئ DNA الحلقى أولا ليُكوِّن جزئ خطى قبل عملية التكرر، أم تتم عملية التكرر وهو فى الصورة الحلقية؟. للإجابة على هذا السؤال قام جون كارنز John Cairns عام ١٩٦٣ بأحد التجارب المهمه مستخدما فيها طريقة التصوير الإشعاعى الذاتى autoradiography التى أوضحت أن DNA فى بكتريا القولون يتكرر وهو فى الصورة الحلقية المغلقة.

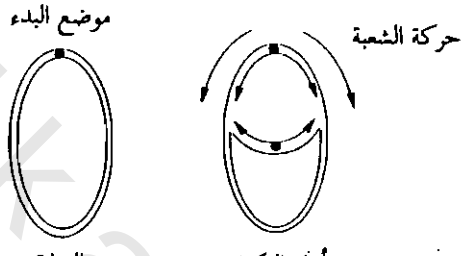
فعندما نميت بكتريا القولون فى بيئة تحتوى على الثايْميين المعلم بالنظير المشع للهيدروجين (التريتيوم ^3H) ثم فصلت جزئيات DNA بعناية ثم نشرت على شريحة فوتوغرافية حساسة للجسيمات بيتا ـ التى يتكون عليها أثر من حبيبات الفضة للأجزاء المشعة ـ وجدا أن DNA المفصول أثناء عملية التكرر يظهر فيه عقدة (حلقة) إضافية نشطة اشعاعياً، حيث يظهر الجزئ فى صورة الحرف اللاتينى ثيتا (θ) (شكل ٢٣ ـ ٦). وهذا التركيب ثيتا يوضح أن جزئ DNA يحافظ على هيئته الحلقية أثناء عملية التكرر.

شكل ٢٣ ـ ٦

مخطط بيانى لكروموسوم بكتريا القولون أثناء علية التكرر. الخيوط الحلقية المتصلة تعبر عن DNA الأبوى بينما الخيوط غير الحلقية تمثل الخيوط المبتنية حديثا.

أُعتقد فى بادئ الأمر أن عمليه التكرر تبدأ من نقطة ثابتة فى DNA الأبوى وتتحرك

فى اتجاه واحد حول جزئ DNA، لكن التجارب التى أُجريت حديثا على كروموسوم بكتريا القولون أوضحت أن عمليه التكرر تبدأ من نقطة واحدة ولكن تتحرك فى اتجاهين متضادين فى نفس الوقت وبنفس السرعة إلى أن يتقابلا. وبلكمات أخرى فإن هناك شعبتى تناسخ تبدءان من نفس النقطة ولكن تتحرك إحداهما فى اتجاه حركة عقرب الساعة، بينما الأخرى تتحرك فى اتجاه مضاد لحركة عقرب الساعة حول الكروموسوم الحلقى (شكل ٢٣ ـ ٧). وبتقابل شعبتى التناسخ وانتهاد عملية التكرر ينفصل المزدوجان الحلقيان الجديدان الكاملان الذى يحتوى كل منهما على خيط قديم وخيط جديد.

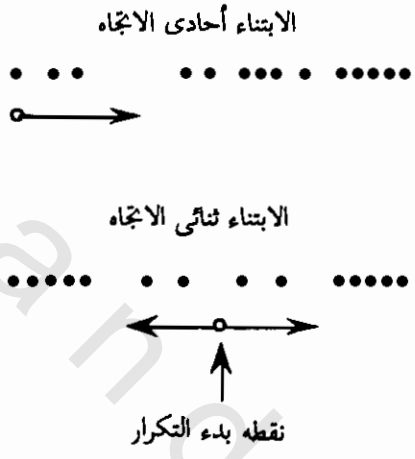


شكل ٢٣ ـ ٧

مخطط بيانى للتكرر ثنائى الإتجاه. تبدأ شعبتى التناسخ من نقطة منشأ واحدة ولكن أحدهما يتحرك فى إتجاه حركة عقرب الساعة أما الشعبة الأخرى تتحرك فى الإتجاه المضاد.

ولقد تم التحقق من ميكانيكة التكرار ثنائى الاتجاه فى كروموسوم بكتريا القولون باستخدام طريقة التصوير الإشعاعى الذاتى. فنميت بكتريا القولون فى بداية تكرر الكروموسوم فى وسط يحتوى على ثايمين يحتوى على كمية متوسطة من التريتيوم المشع، وبعد عدة دقائق من التحضين نقلت البكتريا إلى وسط يحتوى على ثايمين يحتوى على مستوى عالى من التريتيوم المشع. ولقد استخدم مستويين من النشاط الإشعاعى فى هذه التجربة للحصول على نوعين من أثر حبيبات الفضة فى شريحة التصوير الإشعاعى الذاتى، أحدهما أثر منخفض الكثافة يقابل أجزاء DNA التى تتكون فى البداية والثانى أثر عالى الكثافة يقابل أجزاء DNA التى تتكون مؤخرا. فإذا كانت عملية التكرر أحادية الاتجاه unidirectional فإن الحبيبات منخفضة الكثافة تتواجد عند

أحد الأطراف بينما الحبيبات عالية الكثافة تكون عند الطرف الآخر. من ناحية أخرى إذا كان التكرار ثنائى الاتجاه bidirectional فإن وسط الأثر يكون منخفض الكثافة (شكل ٢٣ ـ ٨). والذى تم الحصول عليه فى هذه التجربة هو الأثر من النوع الأخير الذى كانت فيه الحبيبات الكثيفة فى كلا الطرفين بينما الحبيبات المنخفضة الكثافة كانت فى الوسط والذى يشير إلى أن تكرر كروموسوم بكتريا القولون يكون ثنائى الاتجاه. والعنصر الوراثى مثل الكروموسوم البكتيرى الذى يشكل وحدة مستقلة لتكرر DNA والذى يكون قادر على التكرار تحت تحكمه الذاتى يسمى الريبلكون replicon.



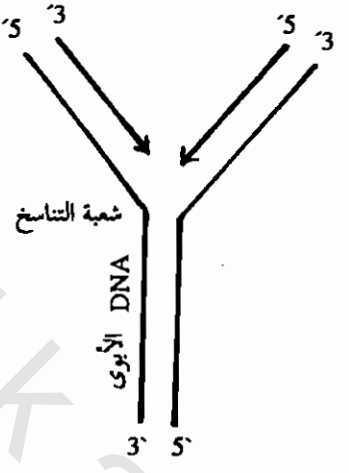
شكل ٢٣ ـ ٨

نماذج التصوير الإشعاعى الذاتى المتوقعة للتكرار أحادى الاتجاه والتكرار ثنائى الاتجاه عندما تنقل البكتريا من وسط يحتوى على ثايمين متوسط الإشعاع إلى وسط يحتوى على ثايمين عالى الإشعاع.

أحد خيطى DNA تُبنى بطريقة غير مستمرة

من المعروف أن خيطى DNA الأبوى عند شعبة التناسخ يعملان كقالب لبناء DNA الجديد. لكنه من المعروف أيضاً أن خيطى DNA الأبوى متضاديين فى الإتجاه وهذا يتطلب أن يكون بناء أحد الخيطين فى الاتجاه ٥َ ← ٣َ وفى الإتجاه ٣َ ← ٥َ للخيط

الآخر (شكل ٢٣ ـ٩). مع ذلك فإن جميع إنزيمات بلمرة DNA المعروفة تبنى DNA فى الإتجاه ٥َ ← ٣َ وليس فى الاتجاه ٣َ ← ٥َ. كيف يظهر إذن أن أحد خيطى DNA البنوى باستخدام طرق الفصل الضعيفة كما لو أنه ينمو فى الاتجاه ٣َ ← ٥َ.

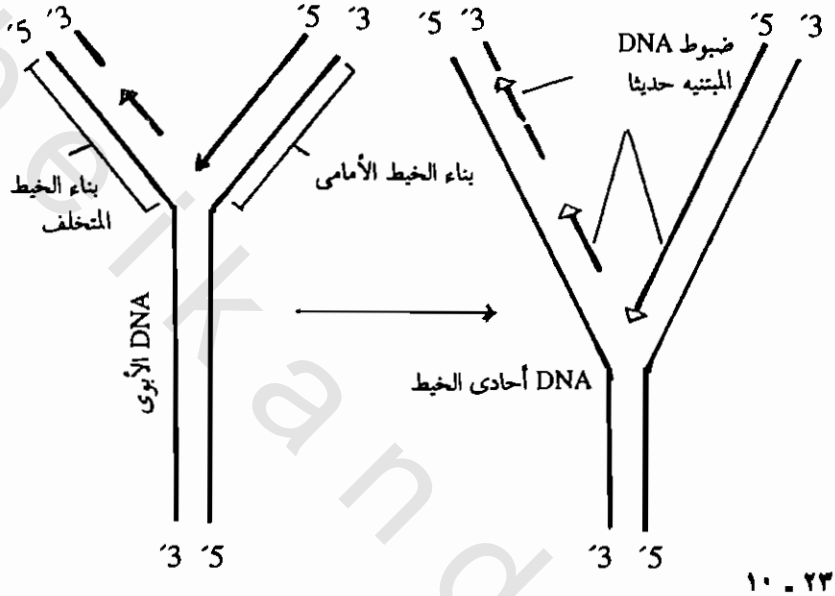


شكل ٢٣ ـ ٩

إستخدام طرق الفصل الضعيفة أظهرت أن إتجاه بناء DNA يكون فى الاتجاه ٥َ ← ٣َ لأحد الخيطين الجديدين وفى الاتجاه ٣َ ← ٥َ للخيط الآخر. لكن فى الحقيقة فإن كلا الخيطين يبنى فى الاتجاه ٥َ ← ٣َ كما هو واضح فى شكل (٢٣ ـ ١٠)

استطاع اليابانى ريجى أوكازاكى Reiji Okazaki من الإجابة على هذا السؤال فى أواخر الستينات عندما لاحظ أن نسبة كبيرة من خيوط DNA المتكونة حديثا توجد فى صورة أجزاء صغيرة. وهذه الوحدات تحتوى على حوالى ألف من النيوكليوتيدات (تعرف بأجزاء أوكازاكى Okazaki fragments) وتظهر بجوار شعبة التناسخ. ولقد فُسِّرت هذه النتائج على أساس أن عملية التكرار تتم فى الاتجاه ٥َ ← ٣َ لكل من الخيطين الجديدن. فتتم عملية البناء لأحد الخيطين بصورة مستمرة بينما الخيط الجديد الآخر يبنى بصورة غير مستمرة أى تتم عملية البناء فى صورة أجزاء التى ترتبط مع بعضها بعد ذلك بواسطة إنزيم DNA ligase بتقدم عملية التناسخ (شكل ٢٣ ـ ١٠). والخيط الذى يبنى بصورة مستمرة يعرف بالخيط الأمامى (القيادى) leading strand، بينما ذلك

الذى يُبنى بصورة غير مستمرة فيعرف بالخيط المتخلف (المتباطئ) lagging strand حيث يتخلف بناؤه عن الخيط الأمامى. وهذا الاختلاف فى معدّل النمو بين الخيط الأمامى والخيط المتخلف ينشأ عنه قطاع صغير من DNA الأبوى وحيد السلسلة عند شوكة التناسخ.



شكل ٢٣ ـ ١٠

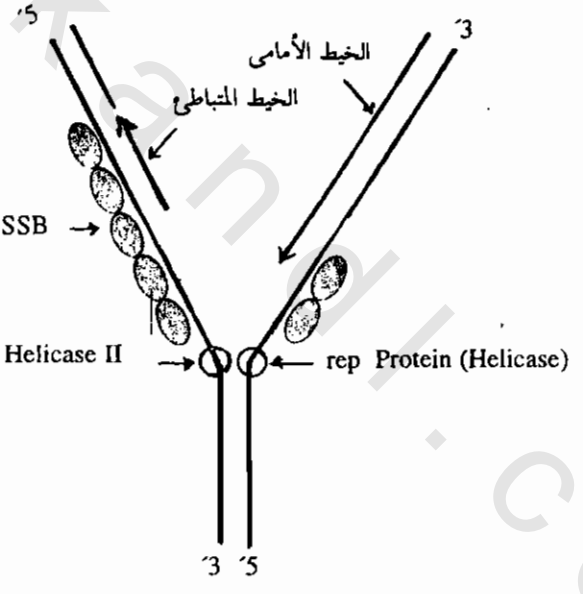
مخطط بيانى لشعبة التناسخ. كل من خيطى DNA يبنى فى الإتجاه ٥َ ← ٣َ. الخيط الأمامى يُبنى بصورة مستمرة بينما الخيط المتخلف يبنى فى صورة أجزاء صغيرة (أجزاء اكازاكى) التى ترتبط ببعضها تساهميا بتقدم عملية التناسخ.

عملية التكرر تحتاج أولاً إلى فصل فيزيائى لسلسلتى DNA

أوضحنا أن عملية التكرر تبدأ عند موضع محدد فى جزى DNA البكتيرى وعند عديد من المواضع فى جزيئات DNA فى الخلايا مميزة النواه. كما أوضحنا أيضا أن DNA يوجد فى هيئة حلزون مزدوج حيث يلتف خيطى DNA حول بعضهما ويتماسكا بواسطة الروابط الهيدروجينية بين القواعد المتقابلة فى الخيطين. ويتضح من ذلك أنه يجب أولا فصل خيطى DNA الأبوى على الأقل فى قطاعات صغيرة يحتوى كل منها

على أصل من أصول بدء التكرر حتى يمكن لإنزيمات البلمرة من قراءة تتابع القواعد على خيطى القالب.

أوضحت الدراسات الحديثة أن الحلزون المزدوج الأبوى فى بكتريا القولون يفتح عند شعبة التناسخ بواسطة اثنين من البروتينات التى تعرف بـ helicase الذى يستخدم كل منهما طاقة تحلل جزيئات ATP لفصل زوج من القواعد. الأول rep protein (أو helicase) يرتبط بالخيط الذى يُوجِّه بناء الخيط الأمامى ويتحرك فى الاتجاه ٣َ ← ٥َ، والبروتين الآخر helicase II يرتبط بالقالب الذى يُوجِّه بناء الخيط المتخلف ويتحرك فى الإتجاه ٥َ ← ٣َ (شكل ٢٣ ـ ١١). وكل من الخيطين المفصولين فى DNA الأبوى تتفاعل بعد ذلك مع عدة جزيئات من بروتين الربط لـ DNA فردى الخيط

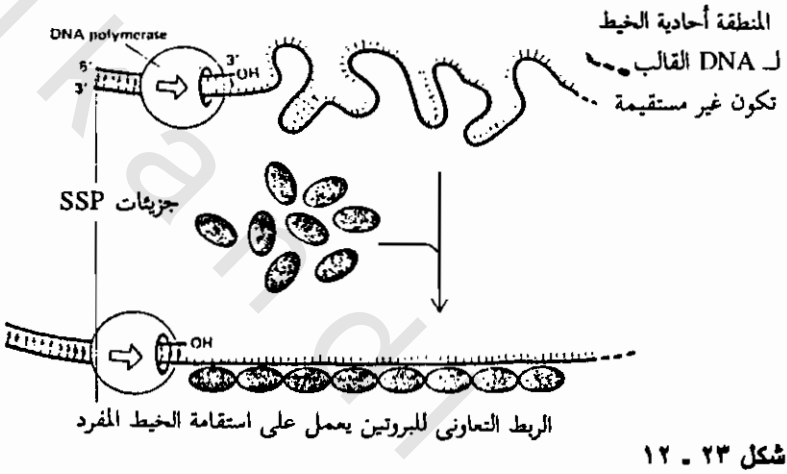


شكل ٢٣ ـ ١١

يُعتقد أن DNA الحلزون المزدوج يفتح فى مقدمه شوكه التناسخ بمعدّل سريع بالتأثير المشترك لانزيم DNA helicase وبروتين الربط للخيط الفردى لـ DNA (SSB). الـ rep protein يتحرك على قالب الخيط الأمامى فى الاتجاه ٣َ ← ٥َ، بينما helicase II يتحرك على قالب الخيط المتباطئ فى الاتجاه٣َ ← ٥َ.

Single Strand DNA - Binding Protein (SSB) (يعرف أيضا بالبروتين المفكك helix ` destablizng). والدور الذى يقوم به بروتين الربط هو تثبيت الخيوط الفردية المتكونة بواسطة إنزيمhelicase بحيث تتمكن هذه المناطق المنفكة من العمل كقالب (شكل ٢٣ ـ ١١).

وبروتين الربط يرتبط فقط بالخيوط الفردية ولا يرتبط مباشرة بأجزاء DNA فى هيئة الحلزون المزدوج، إلا أنه يُقلقل DNA الحلزون المزدوج بإرتباطه بالأجزاء أحادية الخيط. والدور الذى يقوم به هو فرد هيكل الخيوط الفردية وجعل القواعد فيها متاحه للإزدواج مع القواعد القادمة (شكل ٢٣ ـ ١٢).



شكل ٢٣ ـ ١٢

توضيح تأثير بروتين الربط (SSB) على هيئه الخيط الفردى لـ DNA. فتتجمع جزيئات هذا البروتين فى هيئة عنقودية طويلة التى تقوم بفرد الخيط والتى تساعد عملية البناء للخيط الجديد.

البناء الحيوى لـ DNA يحتاج إلى RNA بادئ

السؤال الذى يطرح نفسه الآن هو كيف يبدأ البناء الحيوى لجزئ DNA ؟. فكما ذكرنا سابقا فإن إنزيمات بلمرة DNA تحتاج إلى بادئ primer تكون فيه مجموعة الهيدروكسيل الثالثة (OH -3´) حرة وذلك لبدء تفاعلات البلمرة فى بناء DNA. فما

هو البادئ إذن فى بناء الخيوط الجديدة؟. المعلومات الأولى عن طبيعة البادئ استمدت من مشاهدة أن أجزاء أوكازاكى ترتبط من الطرف ٥َ بسلسلة قصيرة من RNA تحتوى على ١ ـ ١٠ نيوكليوتيد والتى تكون متتامة مع DNA القالب. هذه النتائج أدت إلى الاقتراح بأن RNA هو البادئ لبناء DNA. ولقد اتضح فيما بعد أن الإنزيم الذى يبنى قطع RNA البادئ فى أجزاء اوكازاكى هو إنزيم RNA Primase. وانزيم Primase فى بكتريا القولون عبارة عن سلسلة عديد ببتيد فردية وزنها الجزيئى ٦٠ كيلو دالتون، ولا يكون هذا الانزيم فعّالا بذاته إلاّ إذا ارتبط مع ستة أو سبع سلاسل عديد ببتيد أخرى ليكوّن تجمع يعرف بـ Primosome. وهذا المعقد البروتينى يتحرك فى الاتجاه ٥َ ← ٣َ على قالب الخيط المتخلف ليكوّن أجزاء من RNA التى تعمل كبادئ لأجزاء أوكازاكى.

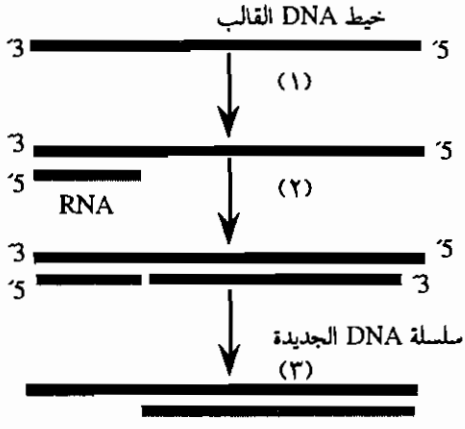
بدء بناء الخيط الأمامى يتم خارج الخلية (فى أنبوبه الاختبار) فى وجود RNA Pol-ymerase أو Primase، إلاّ أنه يستحث بدرجة كبيره عند تواجد كلا الانزيمين. لذلك يعتقد ان هذين الانزيمين يعملا متعاونين داخل الخلية لبدء بناء الخيط الأمامى.

ويبدو من ذلك أن تكرر DNA فى بكتريا القولون يتم بالصورة التالية (شكل ٢٣ ـ ١٣):

١ ـ يقوم إنزيم Primase فى حالة الخيط المتخلف (أو إنزيم Primase + إنزيم RNA Polymerase فى حالة الخيط الأمامى) ببناء سلسلة قصيرة من RNA (١٠ نيوكليوتيدات) التى تكون متتامة مع خيط DNA القالب. وهذه الإنزيمات بالمقارنة بإنزيم DNA Polymerase لا تحتاج إلى بادئ لبدء تفاعل البلمرة.

٢ ـ مجموعة الهيدروكسيل الثالثة (3′-OH) فى وحدة الريبونيوكليوتيد الطرفية فى سلسلة RNA تعمل كبادئ لبناء خيط DNA جديد بواسطة DNA Polyme-rase holoenzyme. ومعظم DNA الجديد يبنى بواسطة هذا المتراكب الإنزيمى.

٣ ـ تفصل سلسلة RNA البادئ من الجزء المهجن RNA - DNA بواسطه إنزيم بلمرة DNA الأول DNA Polymerase I.



شكل ٢٣ ـ ١٣

بدء البناء الحيوى لجزئ DNA

(١) يقوم إنزيم Primase ببناء سلسلة قصيرة من RNA تكون متتامة مع خيط DNA القالب.

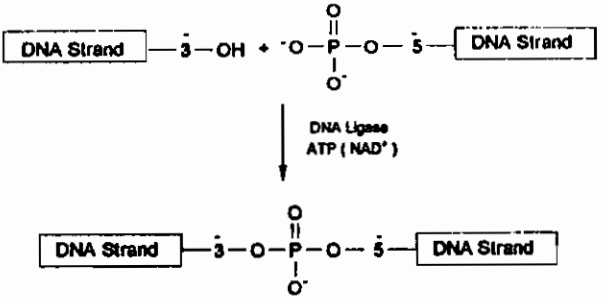
(٢) سلسلة RNA المتكونه تعمل كبادئ لبناء سلسلة DNA جديدة.

(٣) فصل سلسلة RNA التى تترك فجوة تملأ بعد ذلك بواسطة إنزيم البلمرة الأول.

٤ ـ إزالة سلاسل RNA تترك فجوات بين أجزاء DNA، وتملأ هذه الفجوات بواسطة إنزيم البلمرة الأول الذى يكون مناسباً لبناء DNA استجابة للتعليمات الموجهة من القالب أحادى الخيط.

انزيم DNA Ligase يربط أجزاء DNA

يقوم إنزيم البلمرة الأول كما أوضحنا سالفا ببناء DNA فى مواضع RNA البادئ الذى يزال من أجزاء اوكازاكى ولكنه لا يستطيع ربط سلسلتى DNA بين هذه الأجزاء. لذلك يقوم إنزيم آخر وهو DNA ligase بربط أجزاء أوكازاكى وكذلك غلقDNA الحلقى بعد تكوين الخيط الأمامى. فيحفز إنزيم DNA ligase تكوين رابطة فوسفات ثنائية الإستر بين سلسلتى DNA (شكل ٢٣ ـ ١٤). ويحتاج هذا الإنزيم إلى مجموعة OH حرة عند الطرف ٣َ لأحد سلسلتى DNA ومجموعة فوسفات عند الطرف ٥َ للسلسلة الأخرى. كما يحتاج تكوين رابطة الفوسفات ثنائية الإستر بين هاتين



شكل ٢٣ ـ ١٤

انزيم DNA ligase يحفز ارتباط سلسلتى DNA اللتان يُكونّان جزءاً من جزئ حلزون مزدوج.

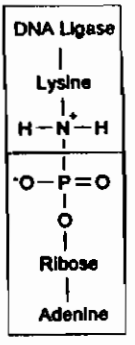
المجموعتين إلى طاقة التى تستمد من NAD^+ فى حالة بكتريا القولون والبكتريا الأخرى، بينما فى الخلايا الحيوانية والفيروسات البكتيرية فإن التفاعل يُدفع بواسطة ATP.

وأحد الخصائص الأخرى لإنزيم DNA ligase أنه لا يستطيع ربط جزيئين من DNA فردى الخيط، ولكن يجب أن تكون سلسلتى DNA اللذان يرتبطا بواسطة الإنزيم جزءاً من DNA الحلزون المزدوج. ومعنى ذلك أن إنزيم DNA ligase يغلق الكسور الموجودة فى العمود الفقرى لـ DNA الحلزون المزدوج. وهذه العملية تعتبر أساسية للبناء الطبيعى لـ DNA ولإصلاح DNA التالف وكذلك فى ربط سلاسل DNA فى الاتحادات الوراثية الجديدة.

والتفاعل الذى يُحفز بإنزيم DNA ligase يتم فى ثلاثة خطوات:

١ ـ يتفاعل ATP (أو NAD^+) معDNA ligase ليتكوّن معقد من الإنزيم و AMP، حيث يكون ارتباط AMP بالإنزيم عن طريق مجموعة الأمينو إيسلون للحمض الأمينى لايسين فى الإنزيم خلال رابطة فوسفواميد Phosphoamide (شكل ٢٣ ـ ١٥).

٢ ـ فى الخطوة التالية تُنقل مجموعة AMP من الإنزيم إلى مجموعة الفوسفات فى الطرف ٥ لـ DNA، وبذلك تنشط مجموعة الفوسفات.



شكل ٢٣ ـ ١٥
المركب الوسيط (إنزيم ـ AMP) .

٣ ـ والخطوة الأخيرة هى مهاجمة نيوكلوفيلية بواسطة مجموعة OH - 3´ على مجموعة الفوسفات المنشطة وتكوين رابطة الفوسفات ثنائية الإستر وانفراد AMP .

$$E + ATP\ (NAD^{+}\text{أو}) \rightleftharpoons E - AMP + PPi\ (NMN)$$

$$E - AMP + \text{Ⓟ} - 5' - DNA \rightleftharpoons E + AMP - \text{Ⓟ} - 5' - DNA$$

$$DNA - 3' - OH + AMP - \text{Ⓟ} - 5' - DNA \rightleftharpoons$$

$$DNA - 3' - O - \text{Ⓟ} - 5' - DNA + AMP$$

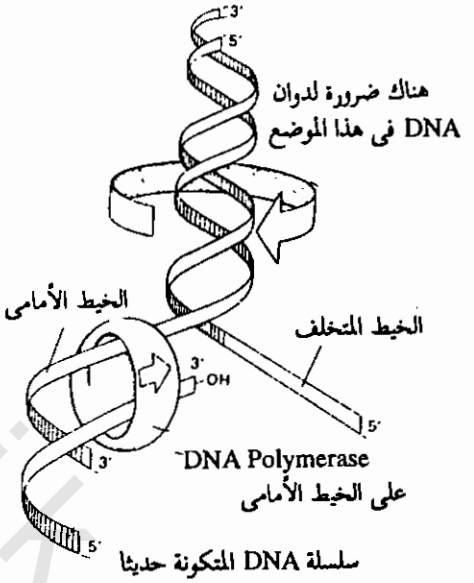
$$DNA\ 3' - OH + \text{Ⓟ} - 5' - DNA + ATP\ (\text{أو } NAD) \rightleftharpoons$$

$$DNA - 3' - O - \text{Ⓟ} - 5' - DNA + AMP\ (\text{أو } NMN) + ppi$$

شكل ٢٣ ـ ١٦
ميكانيكية التفاعل الذى يُحفز بواسطة إنزيم DNA ligase .

بعض البروتينات الخاصة الأخرى تمنع تشابك (التواء) DNA

سوف نناقش الآن أحد المشاكل الهندسية المصاحبة لتكرر DNA ألا وهى لف DNA أثناء عملية التكرر. فتكوين عشرة أزواج من القواعد عند شعبة التناسخ أثناء عملية التكرر يتطلب دوران DNA الأبوى دورة كاملة حول محوره (شكل ٢٣ ـ ١٧)، وإلاَّ ستنشأ حلزنة زائدة (التواء) فى DNA الأبوى أمام شوكة التناسخ. وعلى ذلك فإنه بتحرك

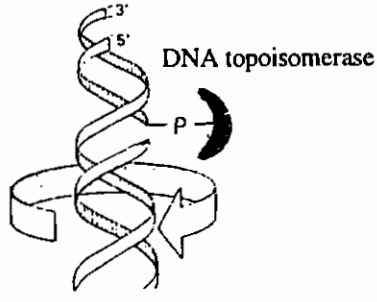


شكل ٢٣ ـ ١٧
توضيح لمشكلة الالتواء التى تحدث أثناء تكرر. فبتحرك شوكة التناسخ بمعدّل ٥٠٠ نيوكليوتيد فى الثانية فإن الحلزون الأبوى يجب أن يدور بمعدل ٥٠ دورة فى الثانية.

شوكة التناسخ فإن جزء الكروموسوم الموجود أمامها يجب أن يدور بسرعة وهى عملية تتطلب إضافة كمية كبيرة من الطاقة فى حالة الكروموسومات الطويلة. ويعتقد أن أحد أنواع البروتينات التى تعرف بإنزيم التشكُّل المكانى لـ DNA (DNA topoisomerase) (فى الكائنات غير مميزة النواه يعرف هذا البروتين بإنزيم اللف أو الدوران DNA gyrase) يحل هذه المشكلة عن طريق تكوين وصلة متراوحة Swivel تسمح بدوران الحلزون المزدوج الأبوى أمام شوكة التناسخ.

ويمكن النظر إلى DNA topoisomerase على أنه نيوكليز عكس-reversible nu clease الذى يقوم أولا بتفكيك مؤقت لأحد خيطى DNA ثم يرتبط تساهميا بالنهاية المنفكّة. والموضع المنفك مؤقتا بواسطة DNA topoisomerase يسمح لـ DNA الحلزون من الدوران على أى من جانبى الكسر حول رابطة الفوسفات ثنائية الإستر،

وبذلك يُزيل أى إجهاد متراكم نتيجة للالتواء (شكل ٢٣ ـ ١٨). ونظرا لأن الإرتباط بين البروتين و DNA ذو طاقة مرتفعة نسبيا فإن تفاعل التفكك يكون عكسيا وبذلك يُغلق الجزء المكسور بمجرد انفصال البروتين.



شكل ٢٣ ـ ١٨

رسم بيانى لتفاعل DNA topoisomerase الذى يقوم بفك أحد خيطى DNA وبذلك يسمح بدوران DNA الأبوى أمام شوكة التناسخ.

الأحداث الجزيئية لتكرر DNA فى بكتريا القولون

المعلومات المتاحة فى الوقت الحاضر للأحداث الجزيئية لتكرر DNA فى بكتريا القولون يمكن تلخيصها فى شكل (٢٣ ـ ١٩) وجدول (٢٣ ـ ٣). والخصائص المميزة لهذه العملية هو اشتراك عدد كبير من البروتينات، فقد أوضح التحليل الوراثى والبيوكيميائى اشتراك ١٥ نوعاً من البروتينات على الأقل فى تكرر DNA. وهنا نتساءل ـ لماذا تكون عملية تكرر DNA على درجة كبيرة من التعقيد؟. من الواضح أن التعقيد فى نظام التكرر. ربما يكون ضرورياً لضمان درجة مرتفعة من الدقة فى عملية التكرر.

إنزيمات بلمرة DNA تصحح الأخطاء فى DNA

أوضحت الدراسات الوراثية أن تكرر DNA فى بكتريا القولون يتم بخطأ لا يتجاوز نيوكليوتيد واحد لكل $١٠^{٩}$ ـ $١٠^{١٠}$ نيوكليوتيد. ونظرا لأنه يوجد حوالى $٤,٥ \times ١٠^{٦}$ زوج من القواعد فى كروموسوم بكتريا القولون فإنه من المتوقع دخول نيوكليوتيد واحد

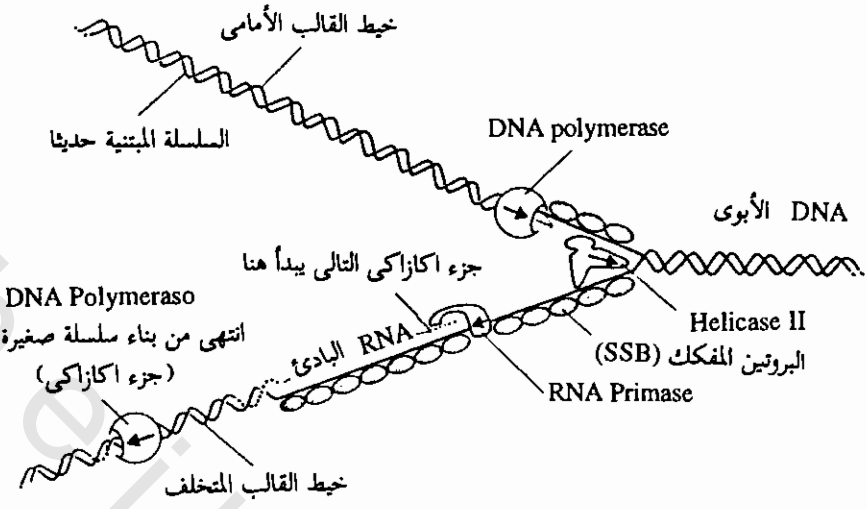
جدول ٢٣ ـ ٣

البروتينات التي تشترك في تكرر DNA في بكتريا القولون

البروتين	الوظيفة
helicase	يُفكِّك DNA الحلزون
SSB	يُثبِّت المناطق أحادية الخيط
DNA topoisomerase (DNA gyrase)	يسمح بدوران DNA الحلزون في مقدمة شوكة التناسخ لإزالة الإجهاد الناتج عن الدوران
Primosome (Primase)	يبني RNA البادئ
DNA Polymerase III holoenzyme	يبني سلسلة DNA الجديدة على خيط القالب
DNA Polymerase I	يزيل البادئ ويملأ الفراغات
DNA ligase	يربط أطراف أجزاء DNA في الخيط المتخلف
Dna A	يرتبط بموضع أصل التكرر

بطريق الخطأ لكل ١٠٠٠٠ خلية تدخل في إنقسام واحد. ولقد اعتقد في بادئ الأمر أن الدرجة المرتفعة من الدقة في تناسخ المعلومات الوراثية يرجع أساساً إلى إزدواج القواعد بين سلسلة القالب والسلسلة المتكونة حديثا، إلا أن الدراسات الحديثة أوضحت أنه إذا إقتصرت دقة عملية التناسخ على إزدواج القواعد فقط فإن تكرار الخطأ يكون أكبر من ذلك بكثير، حيث يبلغ الإندماج الخاطئ نيوكليوتيد واحد لكل ١٠^{٤} ـ ١٠^{٥} نيوكليوتيد.

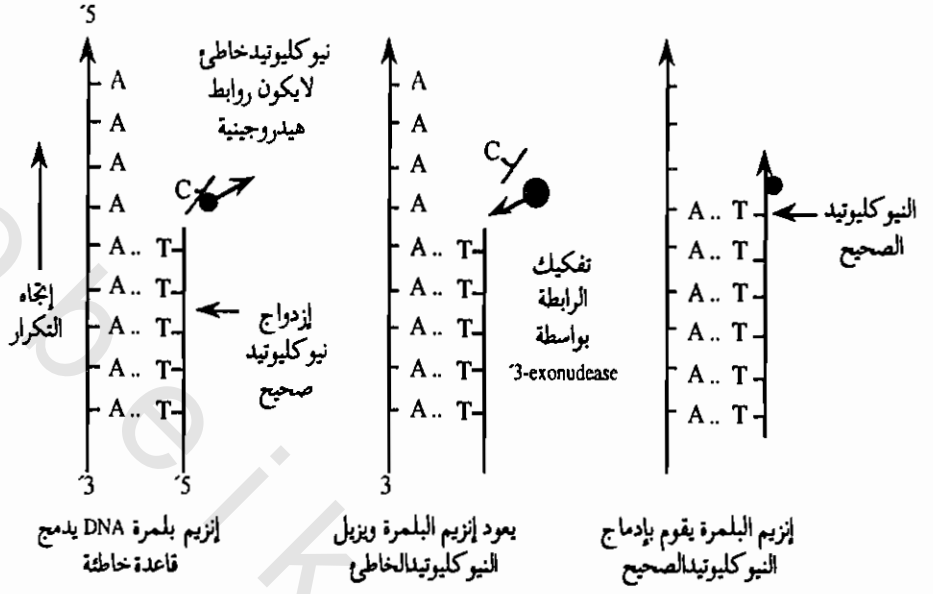
ولقد أوضحت الأبحاث التالية أن الدقة في تكرر DNA ربما ترجع إلى الوظائف الإضافية لإنزيمات بلمرة DNA. فقد أشرنا من قبل أن إنزيمات البلمرة الأولى والثانية لها القدرة على إزالة وحدات النيوكليوتيد من الطرف ٣َ في إتجاه مضاد لإتجاه عملها



شكل ١٣ ـ ١٩
رسم تخطيطى للأحداث الإنزيمية عند شعبة التناسخ فى بكتريا القولون.

كإنزيمات بلمرة. وهذه الوظيفة الإضافية تُمثِّل وسيلة لتصحيح الأخطاء فى سلاسل DNA الجديدة. فإذا إدمجت أحد القواعد الخاطئة بواسطة إنزيم البلمرة، فإن للإنزيم القدرة على كشف فشلها فى تكوين الإندماج الصحيح مع القاعدة المقابلة فى القالب. وبذلك يعود الإنزيم ويزيل النيوكليوتيد الخاطئ من الطرف ٣َ للسلسلة، ثم يعود الإنزيم بعد ذلك ليضيف القاعدة الصحيحة فى الإتجاه ٥َ ← ٣َ الطبيعى، وعلى ذلك فإنه يتم فحص كل نيوكليوتيد مضاف بتحرك شعبة التناسخ عبر خيط القالب (شكل ٢٣ ـ ٢٠).

ولقد اوضحت الدراسات التركيبية أن انزيم البلمرة يحتوى على شق cleft موجب الشحنة قطره ٢٠ انجستوم الذى يرتبط به DNA . ومن المحتمل أن يحدث غلق لهذا الشق بعد ارتباط DNA وبذلك فإن DNA يمكن ان ينزلق فقط إلى الامام أو الخلف خلال الشق. وعلى ذلك فإن DNA المحتوى على أحد القواعد الخاطئة التى لا تستطيع الازدواج مع القاعدة المقابلة يكون له هيئة مشوّهة التى لا تسمح له بالانزلاق بسهولة خلال الشق. وعندما يحدث ذلك فإن DNA المشوّة ربما يتحرك إلى الخلف حيث يقترب من مركز نشاط exonuclease 5´-3´ فى الانزيم الذى يزيل القاعدة المدمجة الخاطئة.



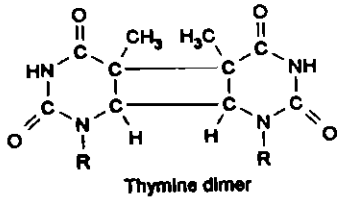
شكل ٢٣ . ٢٠

تصحيح الإندماج الخاطئ للنيوكليوتيد بواسطة نشاط 3` - exonuclease لإنزيم بلمرة DNA .

الأضرار التى تحدث فى DNA يتم إصلاحها بصورة مستمرة

تحدث أضرار متنوعة لجزيئات DNA بواسطة عوامل كيميائية وفيزيائية مختلفة، لذلك فإن الخلايا تحتوى على ميكانيكيات لإصلاح مثل هذه الأضرار. وتشمل هذه الأضرار تغيرات فى القواعد أو فقدها، تفكك رابطة الفوسفات ثنائية الإستر، والإرتباط المستعرض بين خيطى DNA. وتنتج هذه الأضرار بواسطة الإشعاع المؤين (أشعة إكس وأشعة جاما والأشعة الكونية)، والأشعة فوق البنفسجية، وبواسطة عديد من الكيماويات. وكثير من هذه الأضرار يمكن إصلاحها وذلك لأن المعلومات الوراثية مخزنة فى كلا خيطى الحلزون المزدوج، ولذلك فإن المعلومات التى تفقد من أحد الخيوط تسترجع بواسطة الخيط الآخر.

أحد ميكانيكيات الإصلاح المعروفة جيداً هو إزالة أو استئصال ثنائيات البيريميدين Pyrimidin dimer (شكل ٢٣ ـ ٢١) التى تتكون بتعرض DNA للأشعة فوق البنفسجية. فتحت هذه الظروف ترتبط قواعد البيريمدين (خاصة الثايمين) المتجاورة على

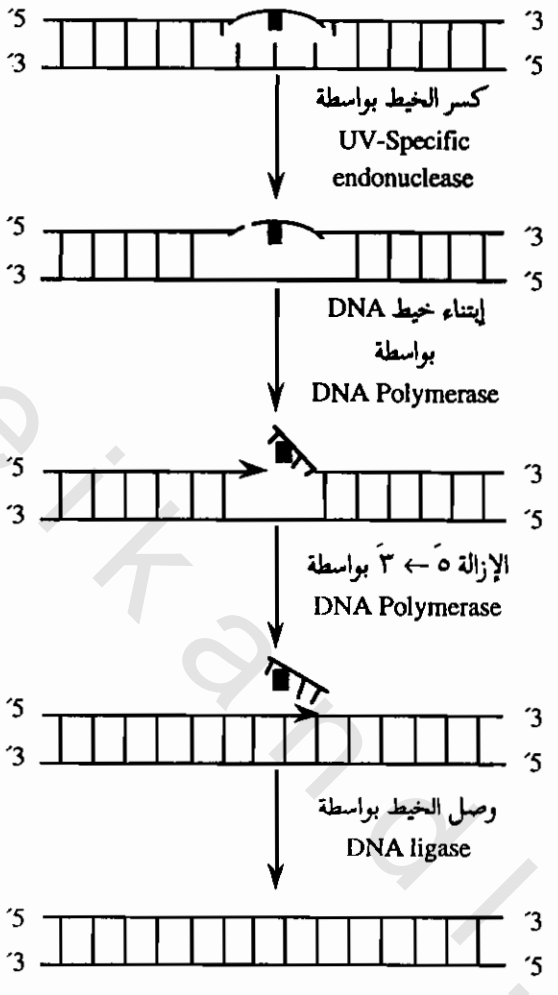


شكل ٢٣ ـ ٢١

تركيب ثنائى الثايمين thymine dimer

خيط DNA فردى إرتباطها تساهميا مكوِّنة ثنائيات البيريميدين. ومثل هذه الثنائيات لا تكون مناسبة لتشكيل الحلزون المزدوج فى هذه المنطقة، لذلك تحدث إعاقة (قفل) لعملية التكرر والتعبير الجينى ما لم يزال هذا التلف. وتتضمن ميكانيكية الإصلاح الإستئصالى إزالة ثنائيات البيريميدين من جزئ DNA وابتناء قطعة بديلة من DNA بواسطة أربعة من الأنشطة الإنزيمية (شكل ٢٣ ـ ٢٢). الأول UV-Specific endo-nuclease يتعرف على المنطقة التالفة (المشوهة) ويقوم بكسر رابطة الفوسفات ثنائية الإستر فى خيط DNA التالف بالقرب من ثنائيات البيريميدين عادة من الجانب ٥َ. ثم تزاح القطعة المحتوية على الثنائى فى الخيط التالف بعيداً عن خيط DNA الآخر (السليم) لتسمح لإنزيم البلمرة الأول DNA Polymerase I (أو نوع مماثل من إنزيمات البلمرة) بإبتناء قطعة جديدة فى الإتجاه ٥َ ← ٣َ. بعد ذلك تُزال منطقة ثنائى البيريميدين بواسطة النشاط الإنزيمى ٥َ ← ٣َ إكسونيوكليز 3′ exonuclease activity → 5′ لإنزيم بلمرة DNA. وأخيراً فإن القطعة المبتنية حديثا من DNA والجزء الأصلى لسلسة DNA يتم ربطهما بواسطة إنزيم DNA ligase. أما نظام الإصلاح البديل عن ذلك هو أن ثنائى البيريميدين يمكن أن يرجع إلى حالته الطبيعية بواسطة تفاعل ضوئى كيميائى Photo-chemical reaction، فتحتوى كل الخلايا تقريبا على إنزيم منشط ضوئيا Photoacti-vating enzyme الذى يُميِّز الثنائيات ويشطرها إلى قواعدها الأصلية عند إمتصاصه للضوء الأزرق.

مرض جفاف الجلد الملون Xeroderma Pigmentosum هو أحد الأمراض الوراثية الذى يورث كصفة جسمية متنحِّية وينتج عن خلل فى إنزيم الـ Endonuclease الذى



شكل ٢٣ ـ ٢٢

إصلاح منطقة DNA التى تحتوى على ثنائى الثايمين.

يشطر خيط DNA بالقرب من ثنائى البيريميدين. ويكون نتيجة لذلك عدم إمكان إصلاح التلف الذى يحدث فى DNA نتيجة للتعرض للأشعة فوق البنفسجية. ويظهر جلد الأفراد المصابة بهذا المرض حساسية شديدة لضوء الشمس والأشعة فوق البنفسجية، كما يصبح الجلد جاف مع ضمور فى الأدمة Dermis وتقرن Keratoses فى الجلد وظهور سرطان الجلد فى أماكن متفرقة. وعادة ما يموت هؤلاء المرضى قبل سن الثلاثين

نتيجة للنمو الثانوى لأورام الجلد الخبيثة. والنتائج الإكلينيكية الحادة لهذا الإنزيم المعيوب توضح الأهمية الخطيرة لعمليات إصلاح DNA.

تكرر DNA فى الخلايا مميزة النواه يماثل من الناحية الأساسية تكرار DNA فى الخلايا أولية النواه

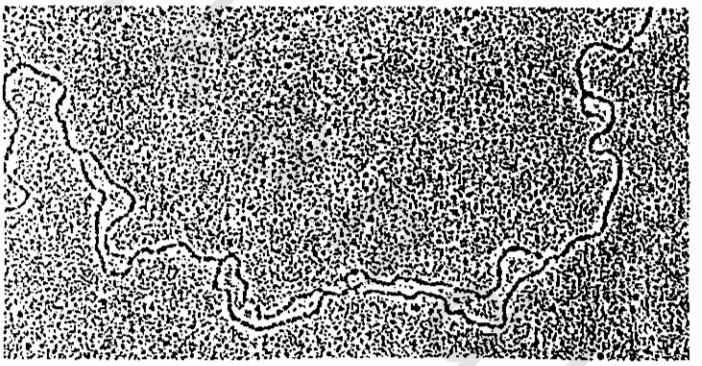
معظم المعلومات الموضحة فى شكل (٢٣ ـ ١٩) وجدول (٢٣ ـ ٣) تم الحصول عليها فى أواخر السبعينات عندما أمكن تكرر DNA خارج الخلايا باستخدام متراكبات الأنظمة الإنزيمية النقية المفصولة من البكتريا والفيروسات البكتيرية. والتطور الذى تم فى تفهُّم عمل هذه الأنظمة كان نتيجة لتوفر طفرات تختلف فى نشاط الجينات (أى تكررها) وبذلك أمكن فصل وتنقية الإنزيمات المقابلة.

ونظرا لصعوبة الحصول على طفرات فى الكائنات مميزة النواة، فإنه لم يتم حتى الآن دراسة التفاصيل الإنزيمية لتكرر DNA فى هذه الكائنات. مع ذلك فإن المخطط العام للتكرر والذى يشمل الشكل الهندسى لشوكة التناسخ واستخدام RNA بادئ يظهر أنها تماثل تلك الموجودة فى الكائنات أولية النواة. الاختلاف الأساسى يرجع إلى أن عملية التكرر فى الخلايا مميزة النواة لا تتم على DNA الحر (غير المرتبط) ولكن تتم على الكروماتين الذى يكون فيه DNA مرتبط بقوة بالهستونات. وكما أوضحنا فى فصل ٢٢ أن هذه الهستونات تكوِّن ما يُشبه المتراكبات القرصية التى يلتف حولها DNA والتى تنشئ تركيبات متكررة تعرف بالنيوكليوسومات. ويتوقع من ذلك أن تكرر DNA فى الخلايا مميزة النواة يشتمل على عدة تغيرات هندسية قبل تعرضه لجهاز التناسخ الإنزيمى.

DNA فى الخلايا مميزة النواة يتكرر فى اتجاهين عند عدد كبير من المواضع

من الواضح أن تكرر DNA فى الخلايا مميزة النواة الذى ينتظم فى صورة نيوكليوسومات فى ألياف الكروماتين يكون أكثر تعقيداً من تكرر الكروموسومات البكتيرية. إلا أن جزئ DNA فى الخلايا مميزة النواة كجزيئات DNA البكتيرية يتكرر بالطريقة نصف المحافظة. بالإضافة إلى ذلك فإن الدراسات التى استخدم فيها المجهر الإلكترونى والتصوير الإشعاعى الذاتى autoradiography أوضحت أن DNA فى الخلايا مميزة النواة يتكرر فى إتجاهين

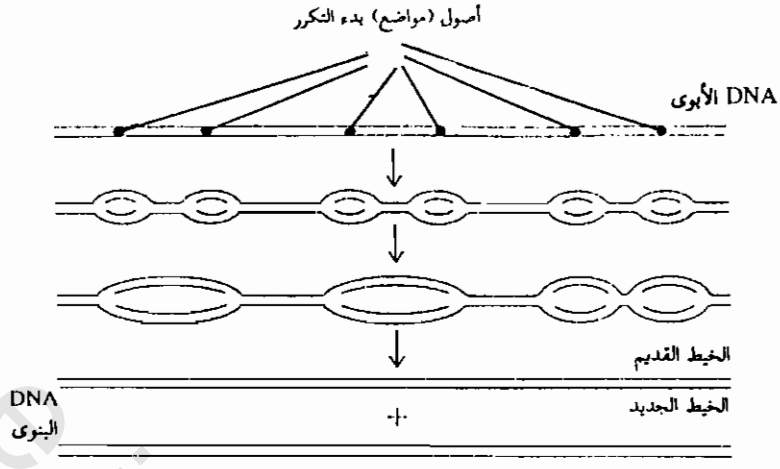
فى عدد كبير من المواضع. وبدء التكرر فى عدد كبير من المواضع يكون ضرورياً نظراً للطول الكبير لجزئ DNA فى الخلايا مميزة النواة. مثال ذلك أن أكبر كروموسومات حشرة الدروسوفيلا يبلغ طوله ٢,١ سم أو ٦٢٠٠٠ كيلو قاعدة، وحيث أن شعبة التناسخ فى الدروسوفيلا تتحرك بمعدّل ٢,٦ كيلو قاعدة / دقيقة (هذا بالمقارنة بـ ١٦ كيلو قاعدة / دقيقة فى بكتريا القولون)، فإن تكرر هذا الكروموسوم فى الدروسوفيلا يستغرق أكثر من ١٦ يوم إذا بدأت عملية التكرر من موضع واحد. لكن زمن التكرر الحقيقى الذى يقل عن ثلاثة دقائق ينجز بتعاون أكثر من ستة آلاف شعبة تناسخ. فيظهر فى جزئ DNA المفصول من نواة الدروسوفيلا أثناء التكرر سلسلة من مناطق التكرر المنظومة التى تشبه العين "eye Form" (شكل ٢٣ ـ ٢٣)، فعند كل نقطة تكرر ينشأ



شكل ٢٣ ـ ٢٣

صورة مجهرية لـ DNA الكروموسومى المتكرر المفصول من أنوية حشرة الدروسوفيلا. القطع الذى تشبه العين تمثل مناطق التكرر الجديدة.

شعبتى تناسخ اللذان يتحركان فى إتجاهين متضادين فى نفس الوقت (شكل ٢٣ ـ ٢٤). وبهذه الطريقة فإن التكرر الكلى للكروموسوم فى الخلايا مميزة النواة يتم فى وقت قصير أقل من الوقت اللازم لتكرر الكروموسوم البكتيرى. والجزء من DNA الذى يبتنى من أحد أصول التكرر يدعى أيضا بالريبليكون replicon أو وحدة التكرر replication unit. ونظراً لأن الخلايا مميزة النوى تحتوى على أكثر من كروموسوم فيجب أن تتم عملية التكر لهذه الكروموسومات فى نفس الوقت، ولذلك تظهر آلاف من شعب التناسخ أثناء عملية التكرر فى نواة الخلية.



شكل ٢٣ ـ ٢٤

رسم تخطيطى لتكرر كروموسوم الخلايا مميزة النوى. التكرر ثنائى الإتجاه يبدأ من عدد كبير من المواضع فى نفس الوقت والذى يستمر حتى تتكون الخيوط الجديدة.

الخلايا مميزة النواة تحتوى على ثلاثة أنواع من إنزيمات بلمرة DNA

تحتوى الخلايا مميزة النوى على الأقل على ثلاثة أنواع من إنزيمات بلمرة DNA (DNA polymerase) (جدول ٢٣ ـ ٤). إنزيم البلمرة ألفا (α) يلعب الدور الأساسى فى تكرر الكروموسوم، بينما الإنزيم (β) يشارك فى إصلاح DNA، أما

جدول ٢٣ ـ ٤

إنزيمات بلمرة DNA (DNA Polymerases) فى الخلايا مميزة النواة

النوع	مكان تواجده	الدور الأساسى
الفا (α)	النواة	تكرر DNA النووى
بيتا (β)	النواة	إصلاح DNA النووى
جاما (γ)	الميتوكوندريا	تكرر DNA الميتوكوندرى

الإنزيم جاما (γ) يكون مسئول عن تكرر DNA فى الميتوكوندريا. وهذه الإنزيمات مثل إنزيمات الخلايا غير مميزة النواة تستخدم النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات كمركبات

بادئة نشطة، وتقوم بالإستطالة المُوجَّهة بالقالب على البادئ فى الإتجاه ٥َ ← ٣َ. من ناحية أخرى نجد أن إنزيمات بلمرة DNA فى الخلايا مميزة النواه ليس لها نشاط نيوكلييز nuclease، ويبدو من ذلك أن اصلاح الأخطاء أثناء تكرر DNA ينجز بواسطة إنزيمات نيوكلييز التى تكون مرتبطة بإنزيمات البلمرة فى صورة متراكبات إنزيمية.

ولقد تم حديثا إكتشاف إنزيم نووى أخر دلتا (δ) الذى يختلف عن الإنزيم (α) فى أنه يحتوى على نشاط التفكك الطرفى ٣َ ← ٥َ (5´ exonuclease → 3´)، كما أنه يستطيع تكرر الطول الكلى للقالب، بينما الإنزيم (α) يكون متوسط (يضيف حوالى ١٠٠ نيوكليوتيد)، ولذلك فإن هناك إعتقاد أن الإنزيم (α) يبنى الخيط المتخلف (أجزاء أوكازاكى) بينما الإنزيم دلتا (δ) يبنى الخيط الأمامى.

المراجـــع

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson: Molecular Biology of the Cell, 2nd ed., Garland Publishing Inc., New York, 1989

Alberts, B., and R. Sternglanz: Recent Excitement in the DNA Replication Problem, "Nature, 269: 655 - 661 (1977).

Bollum, F. J.: Mammalian DNA Polymerases in Progress. in W. E. cohn (ed.), Nucleic Acid Research and Molecular Biology Vol 15, Academic Press, New York. 1975.

Cold spring Harber Laboratory: Replication and Recombination. Cold Spring Harber Symposia of Quantitative Biology, Vol. 43, 1979.

Conn, E. E., P. K. Stumpf, G. Bruening, and R. H. Doi: Outlines of Biochemistry (5 th ed.), John Wiley & Sons, 1987.

Davidson, J. N.: The Biochemistry of the Nucleic Acids, Academic Press, 1977.

Friedberg, E. C.: DNA Repair, Freeman, San Francisco, 1985.

Kornberg, A.: DNA Replication, Freeman, San Francisco, 1980.

Lehman, I. R.: "DNALigase: Structure, Mechanism, Function," Science, 186: 790 - 779 (1974).

Lehninger, A. L.: Principle of Biochemistry, Worth, New York, 1982.

Strayer, L.: Biochemistry, 2nd ed., Freeman, San Francisco, 1981.

Wickner, S. H.: DNA Replication Proteins of Escherichia Coli, Ann. Rev. Biochem. 47: 1163 - 1193 (1978).

Zubay, G. (Coord. author): Biochemistry, Addison - Wesley, Reading, Mass., 1983.

obeikandl.com

تمارين

١ ـ أجب عن الجمل التالية بصح أو خطأ ـ وإذا كانت خطأ اشرح لماذا؟

(أ) تكرر كل الأحماض النووية يوجه بواسطة الإزدواج المتمم للقواعد.

(ب) بعد دورة تكرر واحد لجزئ DNA فإن بعض جزيئات DNA البنوية لا تحتوى على المادة الأبوية.

(جـ) كروموسوم بكتريا القولون يتألف من عدّة تحت وحدات تكرر مستقلة.

(د) التكرر فى إتجاه واحد لجزئ DNA المزدوج الحلقى يحتاج إلى عدة وصلات متراوحه Swivels Points لإزالة الإلتواء. مع ذلك فإذا كان التكرر ثنائى الإتجاه فإن ذلك لا يحتاج إلى الوصلات المتراوح لأن الإلتواء الذى يحدث فى أحد الإتجاهات يزال بالإلتواء المضاد عند شوكة التناسخ.

(هـ) من الناحية النظرية فإن الطافر الذى يكون معيوب فى إنزيم DNA Ligase لا يكون قادراً على تكرر الكروموسوم ولا على إصلاح DNA.

٢ ـ ما هى النتيجة التى كان من الممكن أن يتحصل عليها العالمان Meselson و Stahl إذا كان تكرر DNA يتم بطريقة محافظة. حدد التوزيع المتوقع لجزيئات DNA بعد جيل واحد وجيلين من التكرر المحافظ لـ DNA.

٣ ـ فى تجربة جون كيرنز John Cairns

(أ) لماذا استخدم الثايميدين النشط إشعاعيا لتتبع طريقة تكرر DNA.

(ب) هل يكون استخدام الأدينوزين أو الجوانوزين النشط إشعاعيا متكافئ الفائدة لإستخدام الثايميدين.

(جـ) وضح المسار الإنزيمى الذى يتم بواسطته إدماج الثايميدين النشط إشعاعياً فى DNA لبكتريا القولون.

٤ ـ (أ) من المعلومات المعروضة فى هذا الفصل، أذكر الوقت الذى يُستغرق فى تكرر كروموسوم بكتريا القولون على ٣٧° م إذا بدأت شوكتى التناسخ من نقطة الأصل.

(ب) تحت ظروف خاصة فإن خلايا بكتريا القولون يمكن أن تنمو وتنقسم فى ٢٠ دقيقة. هل يمكن أن تُعطى اقتراحا ليكفية حدوث ذلك.

٥ ـ ما هو عدد دورات فك الإلتواء (الإلتفاف) التى يجب أن تتم فى كروموسوم بكتريا القولون أثناء تكرره؟

٦ ـ (أ) إحسب الوقت اللازم لتناسخ جين ريبونيوكلييز ribonuclease (١٠٤ زوج قاعدة) فى بكتريا القولون إذا كانت شوكة التناسخ تتحرك بمعدّل ٧٥٠ زوج قاعدة فى الدقيقة.

(ب) شوكة التناسخ فى خلية الإنسان تتحرك بمعدل (١/١٠) تلك فى بكتريا القولون. ما هى المعلومات الإضافية التى تحتاجها لحساب المعدل الأدنى للتكرر فى جين الإنسان لبروتين يحتوى على ١٠٤ حمض أمينى.

٧ ـ أكتب تتابع القواعد لقطعة من DNA يتم تكررها بواسطة DNA Polymerase من DNA القالب الذى يحتوى على التتابع التالى :

(´5) AGCTTGCAACGTTGCATTAG (´3)

٨ ـ إرتباط سلسلتى DNA بواسطة DNA ligases, الذى يدفع بواسطة NAD^+ أو ATP يعتمد على نوع الكائن. افترض أن أحد إنزيمات DNA ligase الجديدة تحتاج إلى مصدر طاقة مختلف. إقترح بديل مناسب لـ NAD^+ أو ATP لهذا التفاعل.

فصل ٢٤

النسخ : بناء RNA على DNA القالب

Transcription: Synthesis of RNA on DNA Templete

أوضحنا فى الفصل السابق كيف تنتقل المعلومات الوراثية من جيل إلى الجيل التالى بتكرر DNA أثناء إنقسام الخلية. والآن سننتقل إلى موضوع التعبير عن المعلومات الوراثية. فالجينات أو المُوّرثات فى DNA تحقق وظائفها عن طريق تحديد أنواع البروتينات التى تُصنّع بواسطة الخلايا، مع ذلك فإن DNA ليس هو المُصيغ المباشر لبناء البروتين ولكن يقوم قسم خاص من جزيئات RNA كوسيط فى نقل المعلومات الوراثية من DNA إلى البروتين. ومن الثابت الآن أن سريان المعلومات الوراثية فى الخلية العادية بناءاً على المبدأ الرئيسى central dogma يكون بالصورة التالية:

$$\text{DNA} \xrightarrow{\text{نسخ}} \text{RNA} \xrightarrow{\text{ترجمة}} \text{protein}$$

فى هذا الفصل سنقدم بعض الأدلة التى تُؤكّد أن جزيئات RNA الرسول (mRNA) هى الحاملات الوسيطة للمعلومات بين DNA والبروتين، بينما جزيئات RNA الأخرى والتى تشمل RNA الريبوسومية (rRNA) و RNA الناقلة (tRNA) تمثل عناصر فى جهاز بناء البروتين. ثم سنوضح بعد ذلك كيف تُبنى جزيئات RNA بعملية النسخ transcription وفقاً لتعليمات DNA المصيغ (القالب). ثم يلى عملية النسخ عملية ترجمة translation التى تحدد فيها جزيئات RNA الرسول نظام تتابع الأحماض الأمينية فى سلاسل عديد الببتيد للبروتين كما سنوضحها فى الفصل التالى.

يوجد اختلاف أساسى بين تكرر DNA ونسخة. ففى عملية التكرر يتم نسخ الكروموسوم بأكمله لينتج DNA جديد مماثل لـ DNA الأصل، لكن فى عملية النسخ فليس من الضرورى نسخ كل جزيئات DNA فى الخلية، لكن عادة يتم نسخ جين واحد أو مجموعة جينات. وعلى ذلك فإن عملية النسخ تكون عملية انتقائية لجزء من DNA تحدد ببداية ونهاية الجزء المراد نسخه.

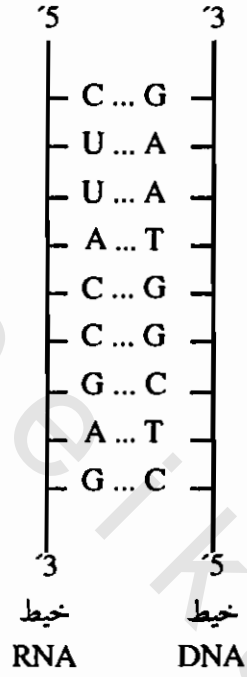
RNA الرسول هو حامل المعلومات الوسيط فى بناء البروتين

إن فكرة إشتراك أحد أنواع جزيئات RNA فى حمل الرسائل الوراثية من DNA إلى نظام بناء البروتين قد نشأت من ملاحظة أن DNA فى الخلايا مميزة النواه يقتصر وجوده تقريبا على النواة بينما بناء البروتين يتم على الريبوسومات فى السيتوبلازم. وعلى ذلك فإن الرسائل الوراثية يجب أن تحمل بواسطة أحد أنواع الجزيئات الكبيرة من النواة إلى السيتوبلازم، ولقد اقترح أن RNA يقوم بهذه المهمة لأنه يوجد فى كل من النواة والسيتوبلازم. كما لوحظ أيضا أن بدأ بناء البروتين يكون مصحوبا بإرتفاع مستوى السيتوبلازم من RNA. إلا أن الدليل الحاسم على توسيط RNA فى ابتناء البروتين هى تلك الدراسات التى أجريت على خلايا بكتريا القولون المصابة بالفيروس T_2. فقد وجد أن الإندفاع فى بناء بروتين الفيروس فى خلايا البكتريا يكون مصحوبا بإبتناء جزء صغير من جزيئات RNA ذات فترة نصف عمر قصيرة، كما أن محتوى جزيئات RNA هذه من النيوكليوتيدات يكون مماثل لنيوكليوتيدات DNA الفيروسى وليس DNA الخاص بالعائل (البكتريا). هذه الحقائق بالإضافة إلى دلائل أخرى قد حدت بكريك أن يقترح أن RNA يقوم بحمل المعلومات الوراثية من DNA فى النواة إلى موضع بناء البروتين فى السيتوبلازم. وبعد عام ١٩٦١ أطلق فرانسوا جاكوب Franscois Jacob وجاك مونو Jaques Monod إسم RNA الرسول messenger RNA (mRNA) على جزيئات RNA التى تقوم بحمل المعلومات الوراثية من DNA إلى الريبوسوم فى الخلية، حيث تعمل كمصيغ لبناء سلاسل عديد الببتيد. ويوجد فى الخلية الواحدة مئات من جزيئات RNA الرسول كل منها يُشفِّر لواحد أو أكثر من سلاسل عديد الببتيد.

جزيئات mRNA جزيئات وحيدة السلسلة تختلف أطوالها بدرجة كبيرة. ففى الخلايا أولية النواة قد يُشفَّر جزئ mRNA لسلسلة فردية أو لسلسلتين أو أكثر من سلاسل عديد الببتيد. وفى حالة ما يحمل mRNA شفرات لسلسلة واحدة من عديد الببتيد يُدعى بأحادى التوريث monogenic أو monocistronic أمَّا إذا كان يحمل شفرات لسلسلتين أو أكثر من عديد الببتيد فيُعرف فى هذه الحالة بعديد التوريث Polygenic أو Polycistronic، وغالبا ما تكون سلاسل عديد الببتيد هذه مرتبطة وظيفيا مثل الإنزيمات التى تشترك فى نفس السلسلة الأيضية. ويلاحظ أن الحد الأدنى لطول جزئ mRNA يتحدد بطول سلسلة عديد الببتيد التى يقوم بتوجيه بنائها، مثال ذلك أن سلسلة عديد الببتيد التى تحتوى على ١٠٠ حمض أمينى تحتاج إلى mRNA يحتوى على الأقل على ٣٠٠ نيوكليوتيد حيث أن كل حمض أمينى يتحدد موضعه فى السلسلة بواسطة شفرة من ثلاثة قواعد.

دراسات التهجين أوضحت أن القواعد فى mRNA تكون متتامة مع القواعد فى DNA المصيغ (القالب)

إذا أخذنا فى الإعتبار أن mRNA هو الحامل الوسيط للمعلومات الوراثية من DNA إلى البروتين فإن ذلك يستدعى أن يكون تتابع القواعد فى mRNA متتام مع تتابع القواعد فى DNA الذى يعمل مصيغ (قالب) فى إبتناء mRNA. ولإثبات هذه الفرضية استخدام Sol Spiegelman (١٩٦١) اختبار التهجين hybridization test. فمن المعروف أن تسخين DNA الحلزون المزدوج إلى درجة حرارة أعلى من درجة حرارة إنصهاره يؤدى إلى تكوين الخيوط الفردية، وإذا بُرِّد المخلوط ببطئ فإنه يعاد التحام الخيوط الفردية لتكوّن الحلزون المزدوج. ولقد وجد أن جزيئات الحلزون المزدوج تتكون فقط من الخيوط الفردية التى تكون متتامة فى قواعدها. وهذه المشاهدات تقترح أن هجين الحلزون المزدوج DNA - RNA يُمكن أن يتكون فقط من خيط فردى DNA و RNA إذا كان تتابع القواعد فيهما متتامة (شكل ٢٤ ـ ١). وحيث أنه بعد إصابة بكتريا القولون بالفيروس T_2 فإن DNA الفيروسى (T_2 DNA) يعمل كقالب فى



شكل ٢٤ ـ ١

الهجين RNA - DNA يُمكن أن يتكون فقط إذا كان خيط RNA و DNA يحتويان على تتابع قواعد متتام.

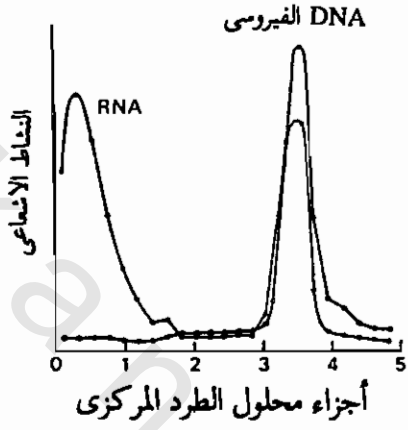
تكوين RNA المتكون بعد العدوى، فقد أُجرى اختبار التهجين بين T_2 DNA و RNA المتكوّن بعد العدوى بالنظام التالى:

١ ـ RNA المتكون بعد عدوى بكتريا القولون بالفيروس T_2 (T_2mRNA) عُلّم بواسطة ^{32}P. حُضّر أيضا T_2DNA المُعلّم بـ ^{3}H باستخدام تجربة منفصلة.

٢ ـ سُخّن مخلوط من T_2mRNA و T_2DNA إلى ١٠٠° م لتفكيك DNA الحلزون المزدوج إلى خيوط فردية. وهذا المحلول الذى يحتوى على خيوط فردية من RNA و DNA ترك ليبرد ببطئ إلى درجة حرارة الغرفة.

٣ ـ تم تحليل المخلوط المبرّد بواسطة الطرد المركزى فى متدرج الكثافة.

وقد تم الحصول على ثلاثة حزم (شكل ٢٤ ـ ٢). الحزمة الكثيفة عبارة عن RNA وحيد الخيط، والحزمة الثانية تحتوى على DNA الحلزون المزدوج والحزمة الثالثة تحتوى على جزيئات الحلزون المزدوج الهجين DNA - RNA. وعلى ذلك فإن T_2mRNA يكوّن هجين مع T_2 DNA. بالمقارنة فإن T_2mRNA لا يكوّن هجين مع DNA البكتيرى. وهذه التجربة وتجارب مماثلة توضح أن تتابع القواعد فى mRNA يكون متمم مع DNA الذى يعمل كقالب فى ابتناء mRNA.



شكل ٢٤ ـ ٢

توزيع النشاط الإشعاعى (^{32}P , ^{3}H) فى متدرج الكثافة لكلوريد السيزيوم يوضح أن معظم RNA المتكونة بعد العدوى يرتبط مع T_2 DNA.

جزيئات RNA الريبوسومية وجزيئات RNA الناقلة تُبنى أيضا على DNA القالب

استخدم بعد ذلك اختبار التهجين لتحديد ما إذا كان جزيئات RNA الريبوسومية (rRNA) وجزيئات RNA الناقلة (tRNA) تبنى على DNA القالب أم لا. ولهذا الغرض عُلّمت جزيئات RNA من بكتريا القولون بواسطة ^{32}P وأضيفت إلى DNA غير المعلّم من بكتريا القولون وسخّن هذا المخلوط ثم برد ببطئ. وأظهرت نتائج هذه التجربة تكوين الهجن RNA - DNA مع كل من rRNA (5S r RNA , 16S rRNA , 23S rRNA) و tRNA والذى يشير أن التتابعات المتتامة لهذه الـ RNA موجودة فى جينوم بكتريا القولون.

كل جزيئات RNA فى الخلايا أولية النواه تُبنى بواسطة نوع واحد من إنزيمات بلمرة RNA (RNA بوليمريز)

إن فكرة وجود RNA كوسيط لنقل المعلومات الوراثية من DNA إلى البروتين حفزت البحث عن إنزيم يبنى RNA بناء على تعليمات DNA المصيغ. وفى عام ١٩٦٠ تمكّن كل من Hurwitz و Weiss من اكتشاف هذا الإنزيم الذى أطلق عليه إنزيم بلمرة RNA (RNA Polymerase) . ولقد تمت دراسة إنزيم بلمرة RNA فى الخلايا أولية النواة حيث وجد أن نوع واحد من إنزيمات RNA Polymerase يحفز بناء كل جزيئات RNA (tRNA , rRNA , mRNA) . ولقد وجد أن الإنزيم المستخلص من بكتريا القولون يحتاج إلى العناصر التالية لإبتناء RNA :

١ ـ **قالب :** القالب المفضّل هو DNA الحلزون المزدوج، مع ذلك فإن الخيط الفردى لـ DNA يمكن أن يعمل أيضا كقالب.

٢ ـ **وحدات بنائية نشطة :** يحتاج بناء RNA إلى الريبونيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات الأربعة: ATP و GTP و UTP و CTP.

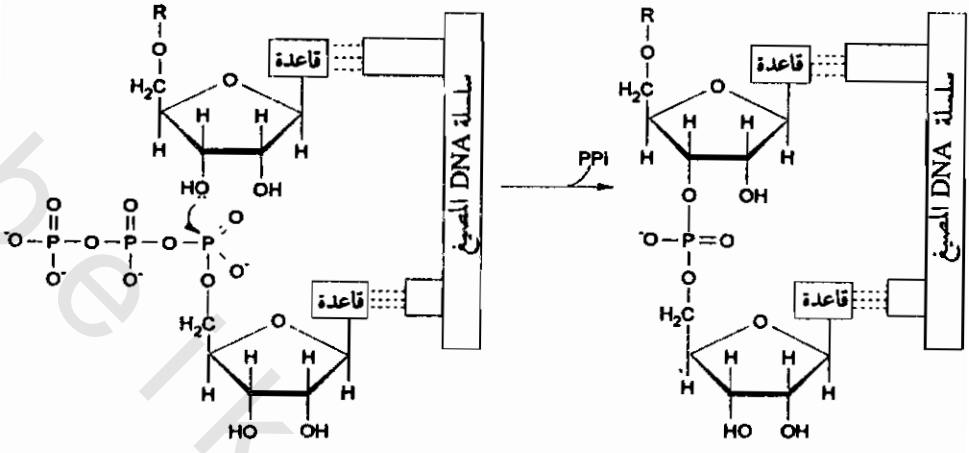
٣ ـ **أيون ثنائى التكافؤ:** مثل Mg^{2+} أو Mn^{2+}، إلا أن أيون Mg^{2+} هو الذى يستخدم فى الخلايا.

يحفز إنزيم بلمرة RNA بدء واستطالة سلسلة RNA والتفاعل الذى يحفز بهذا الإنزيم هو:

$$(RNA)_n + \text{ribonucleoside triphosphate} \rightleftharpoons (RNA)_{n+1} + PP_i$$

ويماثل البناء الحيوى لجزئ RNA بناء DNA فى عديد من الأوجه (شكل ٢٤ ـ ٣): (١) البناء يكون فى الإتجاه ٥َ ← ٣َ، (٢) يظهر أيضا أن ميكانيكية التفاعل متشابهة. من ناحية أخرى فإن بناء RNA يختلف عن بناء DNA فى بعض الأوجه الأخرى، فإنزيم بلمرة RNA لايحتاج إلى بادئ، كذلك فإن DNA القالب يحفظ

بصورة كاملة فى بناء RNA بينما يكون نصف محافظ فى بناء DNA، وثالثا فإنه يبدو أن إنزيم بلمرة RNA ليس له أى نشاط تفكيكى (nuclease) لسلسلة RNA.



شكل ٢٤ ـ ٣
ميكانيكية تفاعل إستطالة سلسلة RNA الذى يحفز بإنزيم بلمرة RNA

إنزيم بلمرة RNA من بكتريا القولون يتألف من وحدات فرعية

إنزيم بلمرة RNA (RNA polymerase) المستخلص من بكتريا القولون إنزيم مُعقَّد التركيب حيث تبلغ كتلته ٥٠٠ كيلو دالتون ويتكون من وحدات فرعية (جدول ٢٤ ـ ١). والمعقَّد الإنزيمى الذى له التركيب $\alpha_2 \beta\beta'\delta$ من الوحدات الفرعية يُدعى الإنزيم الكامل holoenzyme. وكما سنرى بعد قليل أن الوحدة الفرعية سجما (σ) يُمكن أن تنفصل من الإنزيم بعد بدء بناء RNA مباشرة، والإنزيم بدون الوحدة الفرعية سيجما ($\alpha_2 \beta\beta'$) يُدعى قلب الإنزيم core anzyme. ويعتقد أن الوحدة الفرعية β' تُشارك فى الإرتباط بـ DNA القالب، والوحدة الفرعية β تُشارك فى إرتباط الريبونيوكليوسيد ثلاثى الفوسفات، والوحدة α تكون ضرورية لربط الوحدات الفرعية. أما الوحدة سجما (σ) تشترك فى التعرُّف والإرتباط بموضع بدء النسخ، ولذلك يُشار إليها أحيانا بعامل البدأ أو العامل الإستهلالى initiation factor.

جدول ٢٤ ـ ١

الوحدات الفرعية فى RNA Polymerase من بكتريا القولون

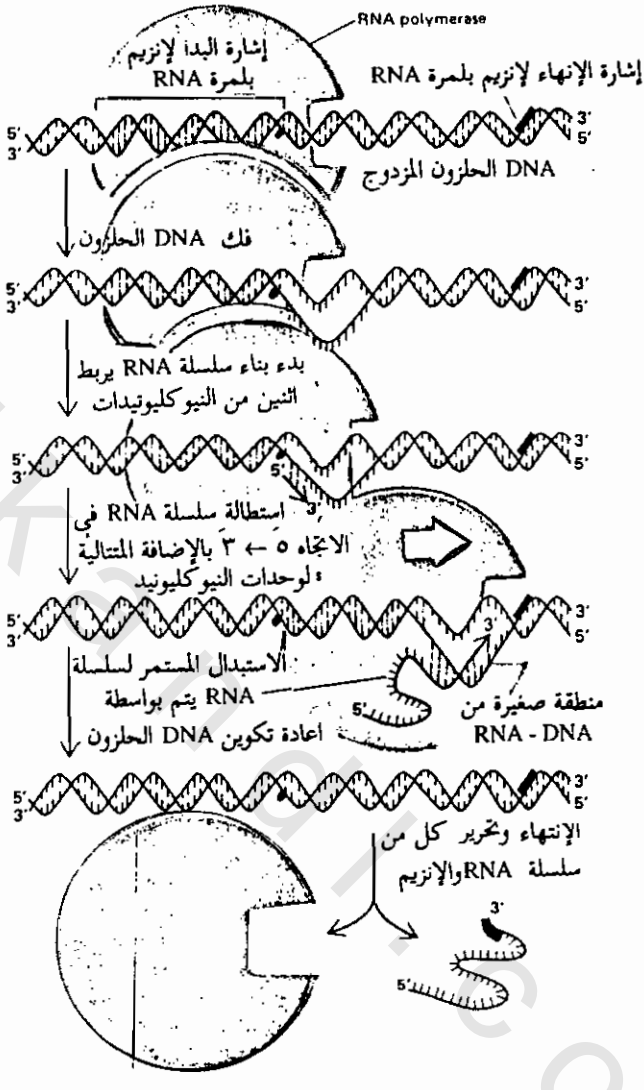
الوحدة الفرعية	العدد	الكتلة (كيلودالتوان)
α	٢	٤٠
β	١	١٥٥
β`	١	١٦٥
σ	١	٩٥

عملية النسخ تتم فى ثلاثة مراحل: البدء ـ الإستطالة ـ والإنهاء

يقوم إنزيم بلمرة RNA بنسخ منطقة وراثية مختارة على DNA التى تشمل التتابع المشفِّر بـ RNA. وتحدد بداية ونهاية هذه المنطقة بواسطة تتابعات خاصة التى تمثل إشارات البدأ والإنهاء. وتتم عملية النسخ فى ثلاثة مراحل هى البدء initiation والإستطالة elon-agation والإنهاء termination (شكل ٢٤ ـ ٤). كما تتم عملية النسخ على أحد خيطى DNA فقط، والذى يحدد أى من الخيطين سينسخ هو إشارة البدء. وأثناء عملية النسخ يتكون RNA على خيط DNA القالب وبذلك يتكون الهجين DNA - RNA، وعند انتهاء عملية النسخ ينفصل RNA من خيط DNA القالب بالوصول إلى إشارة الإنهاء. والآن دعنا نأخذ هذه الخطوات بشئ من التفصيل.

إنزيم بلمرة RNA يميز تتابع بدء خاص على DNA القالب يُعرف بموضع بدء الحفز

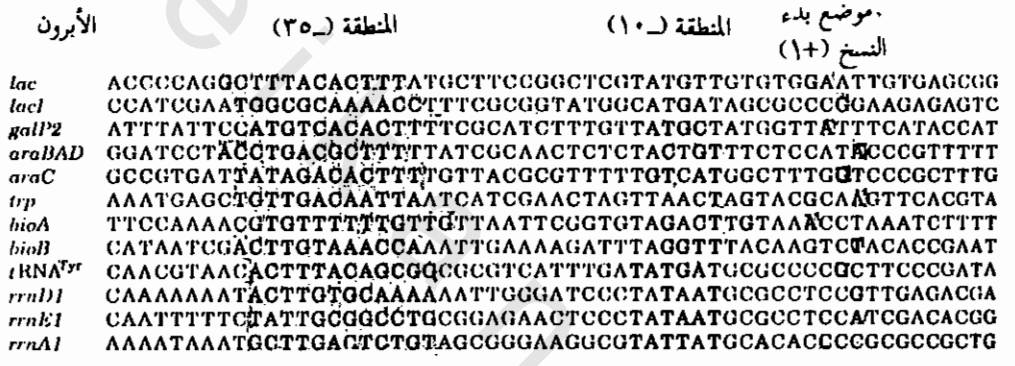
تبدأ عملية النسخ بإرتباط إنزيم بلمرة RNA بتتابع خاص على DNA يُعرف بموضع تقدم أو بدأ الحفز Promoter. فما هى الخصائص التركيبية لموضع بدء الحفز؟. من الواضح أن موضع بدء الحفز يجب أن يحتوى على تتابع من القواعد الذى يعطى DNA شكل خاص فى هذا الموضع والذى يكون مناسب للإرتباط بإزيم بلمرة RNA كما يحدث فى حالة إرتباط الإنزيم بالمادة الخاضعة. والدراسات المقارنة التى أجريت على أكثر



شكل ٢٤ ـ ٤

مخطط بيانى لخطوات نسخ DNA. إنزيم بلمرة RNA يبدأ عملية البناء عند إشارة بدء خاصة ثم ينهى عملية البناء عند إشارة خاصة، حيث يتم عندها إنفصال الإنزيم وسلسلة RNA المتكوّنة من خيط DNA القالب.

من ١٠٠ موضع لبدأ الحفز أوضحت أن هذا الموضع يتألف من حوالى ٤٠ زوج من القواعد، ويحتوى على اثنين من التتابعات الشائعة، أحدهما يحتوى على ٦ أزواج قواعد ويقع على بعد ١٠ أزواج من القواعد من موضع بدأ بناء RNA ويعرف بالتتابع ـ١٠، والآخر يبعد بـ ٣٥ زوج من القواعد من موضع بدأ بناء RNA ويعرف بالتتابع ـ ٣٥ (شكل ٢٤ ـ ٥). ولقد وجد أن عدد قليل من مواضع بدء الحفز تكون التتابعات ـ ١٠ و ـ ٣٥ متماثلة، لكن معظم مواضع بدء الحفز تختلف عن بعضها فى نيوكليوتيد أو أكثر.



شكل ٢٤ ـ ٥

تتابعات موضع بدء الحفز Promoter لبعض الجينات المختارة فى بكتريا القولون

وهناك من الأدلّة القوية ما يُشير إلى أن التتابعات ـ ١٠ و ـ ٣٥ هى المناطق المهمة فى موضع الحفز. فقد وجد أن معظم الطفرات التى تهدم وظيفة موضع بدأ الحفز تغير النيوكليوتيدات فى هذه المناطق. وثانيا أن إنزيم بلمرة RNA المرتبط بموضع بدء الحفز يحمى التتابعات ـ ١٠ و ـ ٣٥ من الهضم بواسطة إنزيمات تفكك DNA (DNase).

الوحدة الفرعية سجما (σ) تُمكّن إنزيم بلمرة RNA من التعرُّف على تتابع بدء الحفز

عند غياب الوحدة سجما (σ) فإن قلب إنزيم بلمرة RNA ($\alpha_2 \beta\beta'$) يقوم بعملية

النسخ ولكن بصورة عشوائية على كلا خيطى DNA. ولكن عند إضافة الوحدة الفرعية سجما (σ) إلى قلب الإنزيم فإن الإنزيم الكامل holoenzyme ($\alpha_2 \beta\beta' \sigma$) يقوم بعملية النسخ من الموضع الصحيح لبدء النسخ والذى يشير إلى أن الوحدة الفرعية سجما تُمكّن الإنزيم من التعرُّف والإرتباط المتخصص بإشارة بدء الحفز Promoter.

والوحدة الفرعية سجما (σ) تُشارك فى البدء المتخصص وذلك بخفض جاذبية إنزيم بلمرة RNA إلى المناطق العامة فى DNA (فيما عدا منطقة بدء الحفز) بعامل يساوى ١×١٠^{٤}. بالإضافة إلى ذلك فإن الوحدة سجما (σ) تُمكّن إنزيم بلمرة RNA من التعرُّف على تتابع موضع بدء الحفز. كذلك فإن الوحدة الفرعية سجما (σ) تُشارك أيضا فى فتح الحلزون المزدوج لمسافة دورة واحدة تقريبا وذلك لتجهيز جزء من أحد خيطى DNA الذى سيعمل كقالب (مصيغ) للقواعد القادمة. ويبدأ الإنزيم بعد الإرتباط بموضع بدء الحفز بتكوين رابطة الفوسفات ثنائية الإستر الأولى.

البروتينات المنظِّمة تُؤثر على بدء النسخ بالإرتباط بالقرب أو خلال موضع بدء الحفز

غالبا ما يكون مُعدَّل النسخ لجين ما غير ثابت، ولكنه يتغير تبعا لإحتياج الخلية تحت ظروف النمو المختلفة، ومثل هذا الجين يقال عنه إنه جين تحت تحكُّم تنظيمى. ففى بكتريا القولون فإن تنظيم النسخ غالبا ما يتم بواسطة بروتينات متخصصة والتى بارتباطها بالقرب من أو خلال موضع بدأ الحفز تزيد أو تخفض معدَّل النسخ. وهذه البروتينات التى تشمل بروتينات الكبح repressor تمنع ارتباط إنزيم بلمرة RNA بموضع بدء الحفز وبذلك تثبط النسخ. أمَّا المنشِّطات activators فترتبط مع إنزيم بلمرة RNA وتستحث نشاطه. وسوف نتعرض لهذا الموضوع بالتفصيل فى فصل ٢٦.

الوحدة الفرعية سجما (σ) تنفصل من الإنزيم بعد تكوين رابطة الفوسفات ثنائية الإستر الأولى حيث يقوم قلب الإنزيم بعملية الإستطالة

تنفصل الوحدة الفرعية سجما (σ) من الإنزيم الكامل RNA Polymerase Holoenzyme بعد بدء بناء سلسلة RNA الجديدة وبذلك يُمكن لها من الإرتباط بقلب إنزيم

بلمرة آخر. ويبدو من ذلك أن دور الإنزيم الكامل هو التعرُّف على موضع بدء الحفز والبدء فى بناء سلسلة RNA بينما تكون وظيفة قلب الإنزيم هو إستطالة سلسلة RNA. فيقوم قلب الإنزيم ($\alpha_2 \beta\beta'$) بإستطالة سلسلة RNA النامية وذلك بإضافة وحدة ريبونيوكليوتيد خطوة خطوة إلى السلسلة النامية وذلك فى الإتجاه ٥َ ← ٣َ إلى أن يقابل إشارة إنهاء البناء. ويتحرك قلب إنزيم بلمرة RNA عبر خيط DNA القالب فى الإتجاه ٣َ ← ٥َ وذلك لأن خيط القالب يكون مضاد الاتجاه لخيط RNA المبتنى حديثا. كما يقوم جزئ فردى من إنزيم بلمرة RNA ببناء كل سلسلة RNA.

ويجب الإشارة هنا أن إنزيم بلمرة RNA يفتقد إلى نشاط التفكك nuclease activity. ولذلك فإنه بالمقارنة بإنزيم بلمرة DNA لا يستطيع إصلاح الإندماج الخاطئ للريبونيوكليوتيدات، وبالتالى فإن دقة النسخ تكون أقل من التكرر. فمعدَّل الخطأ فى بناء RNA تكون فى حدود خطأ لكل 10^4 أو 10^5 نيوكليوتيد مضاف، وهى بذلك تكون أكبر بمقدار 10^5 مرة عن بناء DNA. ويمكن للخلية من تحمُّل هذا المعدَّل الكبير من الأخطاء وذلك لأن الخلية تبنى عدد كبير من نسخ RNA لكل جين.

ولقد وجد أن سلاسل RNA تبدأ عادة بـ PPPA أو PPPG. فلقد وجد أن الطرف ٥َ لسلسلة RNA المبتنية حديثا عادة ما تحتوى على مجموعات الفوسفات الثلاثية. ومعظم سلاسل RNA فى الخلايا لا تحتوى على مجموعات الفوسفات الثلاثية والذى يرجع إلى تفكيك النسخ الأولية لـ RNA داخل الخلايا بواسطة إنزيمات النيوكلييز.

البروتين Nus A يرتبط بقلب إنزيم بلمرة RNA أثناء الإستطالة والإنهاء

تم إكتشاف عامل يسمى البروتين Nus A منذ عدة سنوات ويعتقد أن له دور فى عملية النسخ. وقد إتضح أن البروتين Nus A يرتبط بجزئ بلمرة RNA الذى يبنى سلسلة RNA بمجرد انفصال الوحدة الفرعية سجما (σ). وبعد إنتهاء عملية ا لنسخ وتحرير الإنزيم فإن الوحدة الفرعية سجما (σ) تحل محل البروتين Nus A فى الإنزيم وذلك لجاذبيتها الكبيرة للإرتباط بقلب الإنزيم الحر.

ومن الصعب فى الوقت الحاضر تحديد دور خاص للبروتين Nus A فى عملية

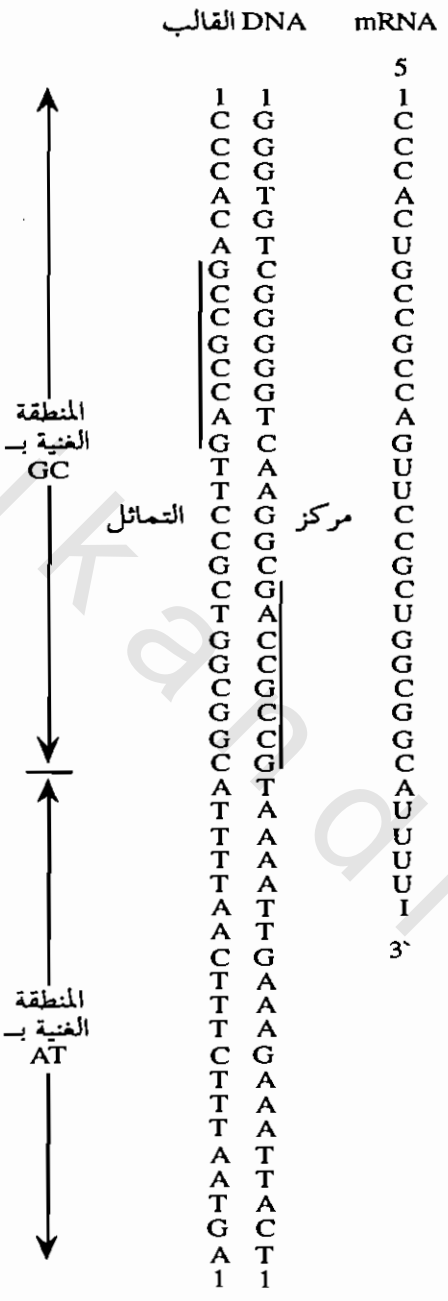
النسخ. ولكن الدراسات البيوكيميائية التى أُجريت خارج الخلايا (فى أنبوبة الإختبار) أوضحت أن للبروتين Nus A تأثير واضح على معدّل بناء RNA وعلى إنهاء بناء RNA والذى يتم بواسطة إنزيم بلمرة RNA.

DNA القالب يحتوى على إشارات إيقاف تنهى عملية النسخ

يستمر إنزيم بلمرة RNA فى إضافة وحدات الريبونيوكليوتيد إلى سلسلة RNA النامية إلى أن يقابل موضع خاص على DNA القالب ذات تتابع خاص من القواعد يُعرف بإشارة الإنهاء termination signal، والتى يتم عندها إيقاف إضافة وحدات ريبونيوكليوتيد جديدة إلى سلسلة RNA ثم تحرير كل من الإنزيم وسلسلة RNA المبتنية حديثا من DNA القالب. وقد تتم عملية الإنهاء بدون أى عوامل مساعدة إضافية غير إشارة الإنهاء، إلا أنه فى بعض المواضع قد يساعد بروتين خاص (البروتين رو (ρ) Rho) فى إنهاء عملية النسخ، حيث يشارك هذا البروتين فى تحرير الإنزيم وسلسلة RNA من DNA القالب عند إشارة الإنهاء.

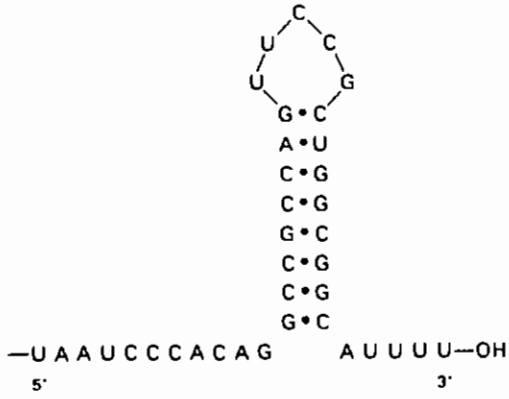
وتحليل تتابع القواعد فى إشارات الإنهاء التى لا تحتاج إلى البروتين رو (ρ) أوضحت وجود منطقة غنية بالإزدوج GC قبل موضع الإنهاء يليها منطقة غنية بالإزدواج AT. وأهم خصائص تتابع الإنهاء هو وجود محور تماثل دوران ثنائى twofold Symmetry للمنطقة الغنية بـ GC (شكل ٢٤ ـ ٦). وعلى ذلك فإن نسخة RNA لهذه المنطقة تكون متتامة ذاتيا حيث تزدوج القواعد فيها لتكوّن تركيب يشبه دبوس الشعر hairpin structure (شكل ٢٤ ـ ٧). بالإضافة إلى ذلك فإن سلسلة RNA المبتنية حديثا تنتهى بعدّة قواعد يوراسيل التى تُشفّر بواسطة المنطقة الغنية بأزواج القواعد AT فى DNA. وأحد هذين التركيبين أو كلاهما يُشارك فى تحرير إنزيم بلمرة RNA عند وصوله إلى هذه الإشارة.

أما إشارات الإنهاء التى تعتمد على وجود البروتين رو (ρ) لا تحتوى على تتابع عديد الأدنين pol (A)، وبذلك لا يحتوى RNA المتكون على تتابع عديد اليوراسيل pol (U)، كما أن معظمها لا يستطيع تكوين تركيب دبوس الشعر. كيف يمكن إذن للبروتين رو



شكل ٢٤ ـ ٦

تتابع DNA المقابل للطرف ٣ لـ mRNA الخاص بالتريتوفان من بكتريا القولون.



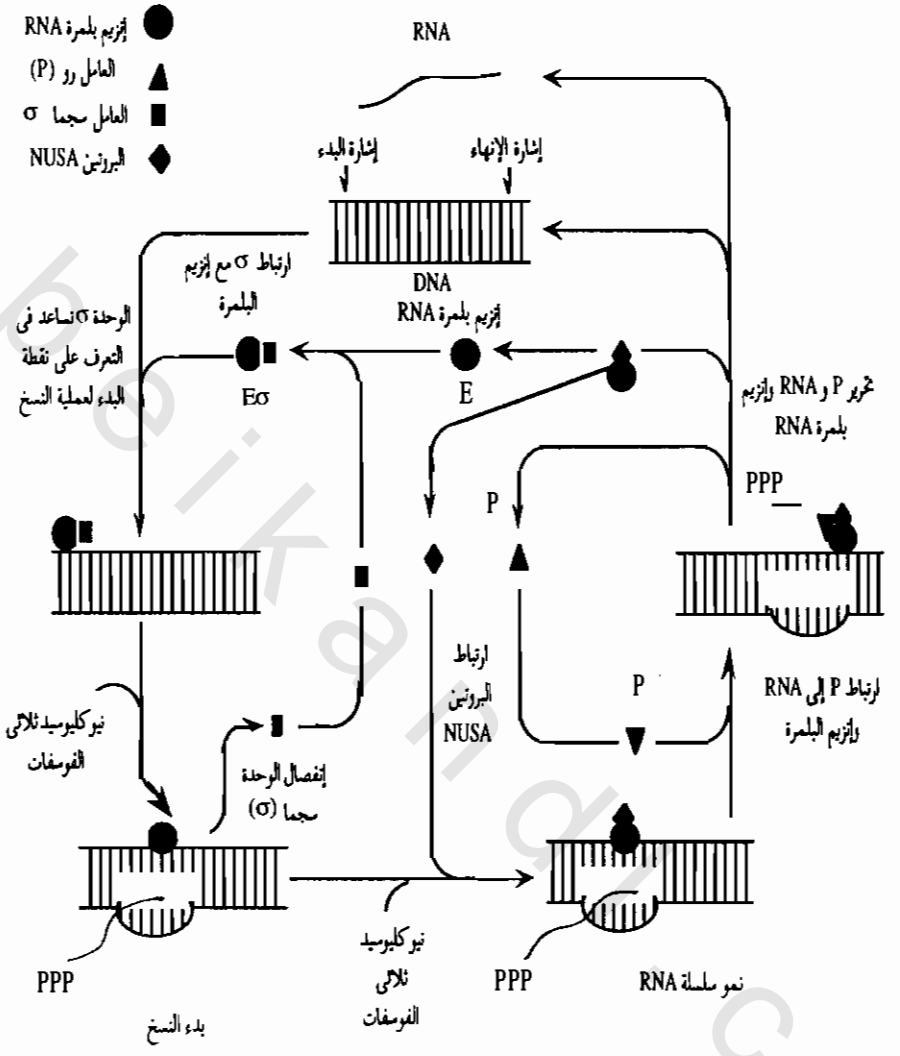
شكل ٢٤ ـ ٧

تتابع القواعد للطرف ٣َ لنسخة mRNA لأويرون التربتوفان من بكتريا القولون الذى يوضح تركيب دبوس الشعر.

(ρ) من إنهاء بناء سلسلة RNA عند بعض إشارات الإنهاء؟. أحد الإقتراحات أن البروتين رو (ρ) يرتبط بسلسلة RNA ويتحرك فى إتجاه إنزيم بلمرة RNA الذى وصل إلى إشارة الإنهاء، وبذلك فإن البروتين رو (ρ) يحل محل إنزيم بلمرة RNA من النهاية ٣َ لسلسلة RNA . ويُمكن بذلك تلخيص الأحداث الجزيئية المشتملة فى عملية النسخ فى شكل (٢٤ ـ ٨).

أحد خيطى DNA فقط يعمل كقالب لبناء RNA فى كل جين

من الناحية الأساسية فإن خيطى DNA لجين ما يُمكن أن يُنسخا إلى نوعين مختلفين من جزيئات mRNA كل منهما ينتج من استخدام أحد خيطى DNA كقالب. ولكن حيث أن الدراسات الوراثية توضح أن كل جين يشفر لبروتين واحد فإنه من الثابت أن أحد خيطى DNA فقط يستخدم كقالب فى بناء RNA. ولكن أى من الخيطين سيتم نسخه فإن ذلك سوف يختلف من جين إلى آخر. ومن المعتقد أن الذى يحدد أى من خيطى DNA سوف ينسخ هو إشارة البدأ أو الحفز فى DNA، فتوضع هذه الاشارة بحيث توجه انزيم بلمرة RNA فى إتجاه معين عبر منطقة وراثية ما على DNA وهذا يحدد تلقائيا أى من الخيطين سيتم نسخه (شكل ٢٤ ـ ٩).

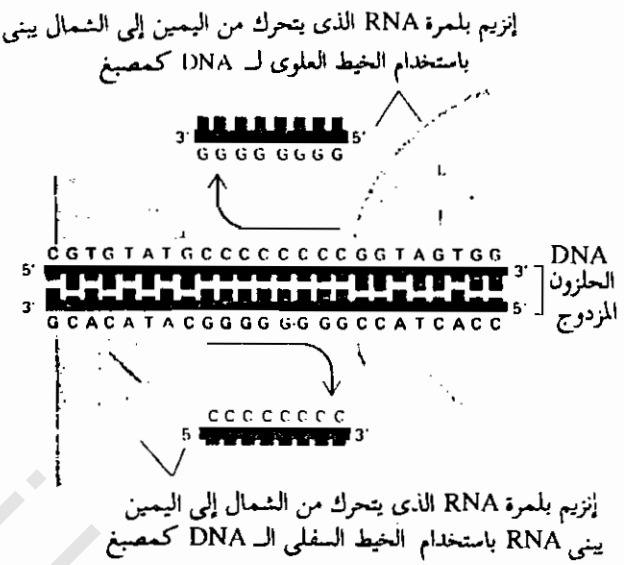


شكل ٢٤ ـ ٨

الخطوات المشتملة فى بناء RNA على DNA القالب.

ثلاثة أنواع مختلفة من إنزيمات بلمرة RNA تقوم ببناء جزيئات RNA فى مميزة النواه

بالرغم من أن الأساس العام لنسخ DNA فى الخلايا مميزة النواة يُماثل ذلك فى الخلايا



شكل ٢٤ ـ ٩

نظرا لأن خيطى DNA اللذان يعملان كقالب يجب أن يُنسخا فى الإتجاه ٥َ ← ٣َ فإن إتجاه حركة إنزيم بلمرة RNA هو الذى سيحدد أى من خيطى DNA يعمل كقالب فى بناء RNA. وإتجاه حركة إنزيم بلمرة RNA يتحدد بدوره بواسطة إشارة البدأ على DNA.

أولية النواة، إلا أن جهاز النسخ يكون أكثر تعقيداً فى النوع الأول من الخلايا عن النوع الثانى. فبينما يتم بناء الأنواع الثلاثة من جزيئات RNA أى mRNA و tRNA و rRNA فى الخلايا أولية النواة بواسطة نوع واحد من إنزيمات بلمرة RNA، نجد أن الخلايا مميزة النواة تحتوى على ثلاثة أنواع من إنزيمات بلمرة RNA التى يرمز إليها بالرمز I و II و III، حيث يقوم كل منها بنسخ مجموعة جينات معينة (جدول ٢٤ ـ ٢). من بين هذه الإنزيمات الثلاثة فإن إنزيم البلمرة II فقط يقوم بنسخ الجينات التى تترجم إلى بروتين. وكما هو متوقّع فإن هذه الإنزيمات الثلاثة تميز إشارات بدأ مختلفة على DNA.

عدد كبير من جزيئات RNA تُعدَّل كيميائيا بعد النسخ

جزيئات RNA التى تنتج بواسطة إنزيمات بلمرة RNA يُطلق عليها النسخ (المنسوخات)

جدول ٢٤ ـ ٢

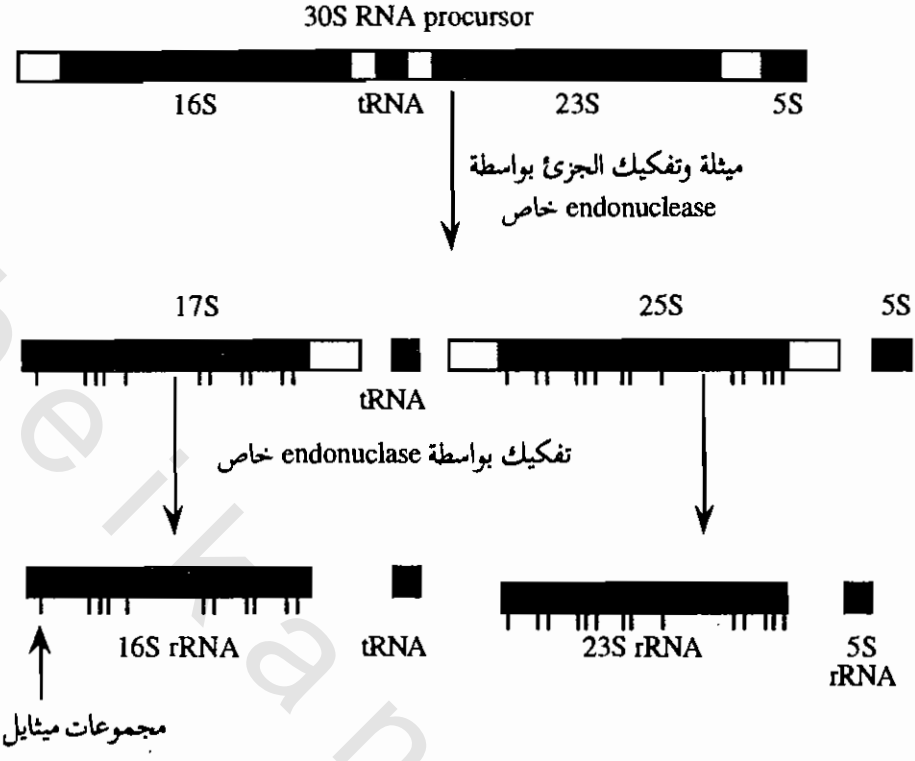
نواتج حفز إنزيمات بلمرة RNA فى الخلايا مميزة النواة

الإنزيم	ناتج الحفز *
RNA Polymerase I	5.8S 18S 28S rRNA
RNA Polymerase II	mRNA
RNA Polymerase III	tRNA, 5S rRNA

* S هى وحدة سفدبرج.
وهى وحدة معامل الترسيب للجزيئات البيولوجية فى مجال الطرد المركزى فائق السرعة. ووحدة S = ١٠$^{-١٣}$ ثانيه.

الأصلية Primary transcripts، وهذه النسخ الأصلية عادة ما يحدث لها تحورات إنزيمية إضافية قبل أن تصبح نشطة وظيفيا. فجزيئات RNA الريبوسومية فى كل الخلايا مميزة النواة والخلايا أولية النواة تنشأ من جزيئات RNA أكبر. ففى الخلايا مميزة النواة نجد أن جزيئات RNA الريبوسومية التى معامل ترسيبها ١٦ (16S) و ٢٣ (23S) تشتق من جزئ RNA طويل ذو معامل ترسيب ٣٠ (30S). فهذا الجزئ الكبير يحدث له عملية ميثلة عند قواعد محددة ثم يتفكك ليعطى جزيئات RNA وسيطة لها معامل ترسيب 17S و 25S والتى تزال أجزاء من أطرافها بواسطة إنزيمات النيوكلييز لتعطى جزيئات RNA الريبوسومية التى معامل ترسيبها 16S و 23S (شكل ٢٤ ـ ١٠). أما RNA الريبوسومى الذى له معامل ترسيب 5S (5S rRNA) فينتج من النهاية ٣َ للجزئ الأصلى (30S).

فى الخلايا مميزة النواة تنشأ جزيئات RNA الريبوسومية ذات معامل ترسيب 18S و 28S من جزيئات RNA أكبر معامل ترسيبها (45S) وذلك عبر سلسلة من الخطوات التى تشمل إدخال مجاميع ميثايل فى الغالب على مجموعات الهيدروكسيل ٢َ فى وحدة الريبوز فى حوالى ١٠٠ وحدة نيوكليوتيد من بين ١٤٠٠٠ وحدة نيوكليوتيد فى



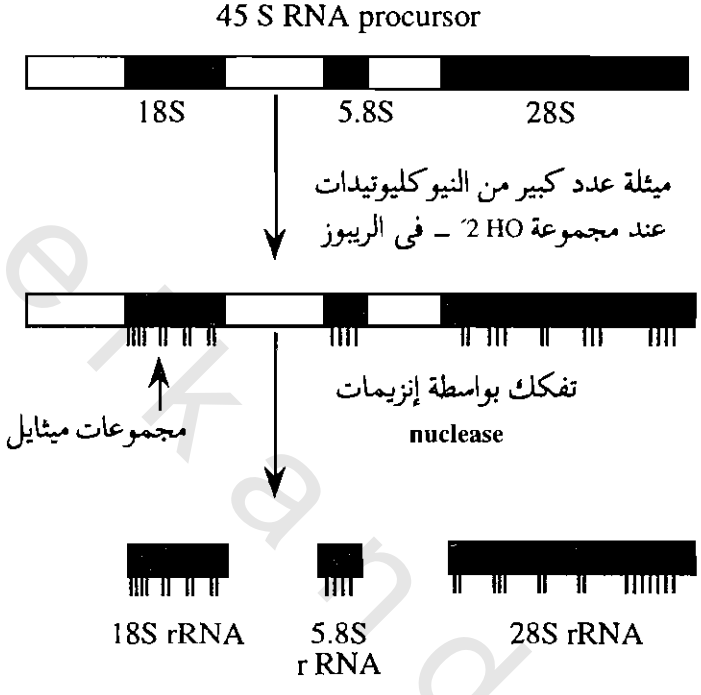
شكل ٢٤ ـ ١٠

معالجة نسخة RNA الريبوسومية فى الخلايا أولية النواة. فجزيئات 16S rRNA و 23S rRNA تشتق من النسخة الأصلية 30S RNA بواسطة إنزيمات nuclease . وقبل عملية التفكك تحدث عملية ميثلة لبعض القواعد فى جزئ RNA (الخطوط القصيرة) . يتكون أيضا جزئ tRNA من منتصف جزئ 30S RNA .

الجزئ. يتبع عملية الميثلة سلسلة من التفكك الإنزيمى التى تؤدى إلى تكوين 18S rRNA و 28S rRNA و 5.8S rRNA (شكل ٢٤ ـ ١١).

جزيئات RNA الناقلة تنشأ أيضاً من جزيئات RNA أكبر وذلك بالإزالة الإنزيمية لبعض وحدات النيوكيوتيدات الذائدة من الطرف ٥َ أو ٣َ. بالإضافة إلى ذلك فإن نُسخ RNA الناقلة الأصلية تدخل أيضا فى نوعين مختلفين من العمليات. الأولى إضافة ثلاثة نيوكيوتيدات إلى الطرف ٣َ فى بعض جزيئات RNA، مثال ذلك إدخال الثلاثية CCA

إلى النهاية ٣َ فى جزيئات RNA الناقلة التى لاتحتوى أصلاً على التتابع الطرفى. وثانياً فإن بعض القواعد فى جزيئات RNA الناقلة تُعدَّل بواسطة الميثلة والبعض بإزالة مجموعة الأمين والبعض الآخر بالإختزال.



شكل ٢٤ ـ ١١

معالجة نسخة RNA الريبوسومية من الخلايا مميزة النواة. عملية الميثلة التى تتم فى الخطوة الأولى تتم على مجموعة الهيدروكسيل ٢َ ـ فى وحدة الريبوز.

جزيئات mRNA التى تتكون بواسطة إنزيم البلمرة II فى الخلايا مميزة النواة يتم تعديلها عند كلا الطرفين

هناك بعض الإختلافات الأساسية بين جزيئات mRNA فى الخلايا مميزة النواة والخلايا أولية النواة فى كل من التركيب والوظيفة:

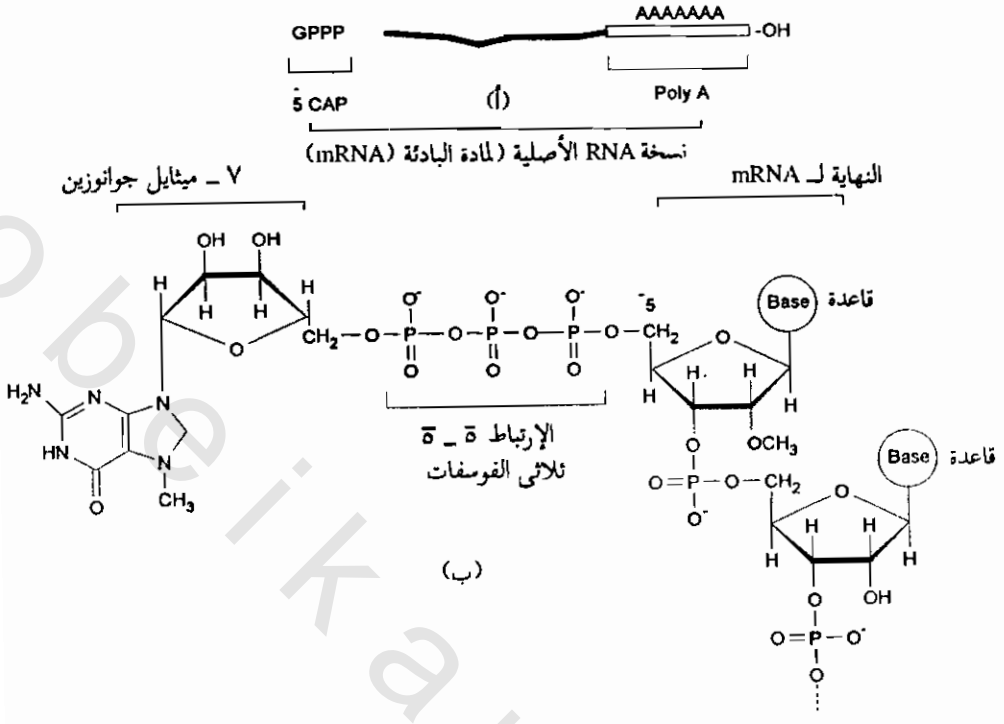
١ ـ جزيئات RNA التى تتكون مباشرة بواسطة إنزيم RNA Polymerase II أى النسخ الأصلية عادة مايحدث لها عدة تحورات قبل أن تنتقل من النواة إلى السيتوسول، فعمليتا النسخ والترجمة تكونا منفصلتان فى الوقت والمكان فى الخلايا مميزة النواة بينما تزدوج هاتان العمليتان فى الخلايا أولية النواة.

٢ ـ يتراوح حجم النسخ الأصلية فى الخلايا مميزة النواة بين ٢ ـ ٢٠ كليو قاعدة، ولذلك يشار إليها بأحماض RNA النووية غير المتجانسة heterogeneous nuclear RNA (hn RNA) نظراً لتباين أوزانها الجزيئية. وهذه الجزئيات عاده ما تكون أطول عدّة مرات من جزيئات RNA الرسول المشتقة منها. وليس من المعروف ما إذا كان لجزيئات RNA النووية غير المتجانسة أى دور آخر غير كونها المادة البادئة لجزيئات RNA الرسول.

٣ ـ جزيئات RNA الرسول فى الخلايا مميزة النواة تكون أحادية الوظيفة monocistron-ic، أى أن كل منها يعمل كقالب لسلسة عديد ببتيد فردية. بالمقارنة فإن عدداً كبيراً من جزيئات RNA الرسول فى الخلايا أولية النواة تكون عديدة الوظيفة pol-ycistronic، أى أن جزئ RNA الرسول يعمل كمصيع لإثنين أو ثلاثة من سلاسل عديد الببتيد.

٤ ـ جزيئات RNA الرسول فى الخلايا مميزة النواة تحتوى على نيوكليوتيد مُحوَّر عند الطرف ٥َ يُعرف بالقمة أو القلنسوة Cap. فيندمج ٧ـ ميثايل جوانوزين بالطرف ٥َ فى جزئ RNA الرسول بالإرتباط ٥َ ـ ٥َ ثلاثى الفوسفات (شكل ٢٤ ـ ١٢). ويعتقد أن وظيفة هذا النيوكليوتيد المعدّل ٧ـ ميثايل جوانوزين ثلاثى الفوسفات GPPP هو المشاركة فى ثبات جزيئات mRNA بحماية الطرف ٥َ من إنزيمات الفوسفاتيز والنيوكلييز. بالإضافة إلى ذلك فإنها تشارك فى ارتباط mRNA بالريبوسوم لبدء الترجمة.

٥ ـ معظم جزيئات mRNA فى الخلايا مميزة النواة تحتوى فى الطرف ٣َ على ما يقرب من ١٠٠ إلى ٢٠٠ وحدة أدنين متتالية Poly A. ويعتقد أن هذا التعاقب من وحدات الأدنين يشارك فى ثبات mRNA ولكنه ليس مهماً لعملية الترجمة.



شكل ٢٤ ـ ١٢

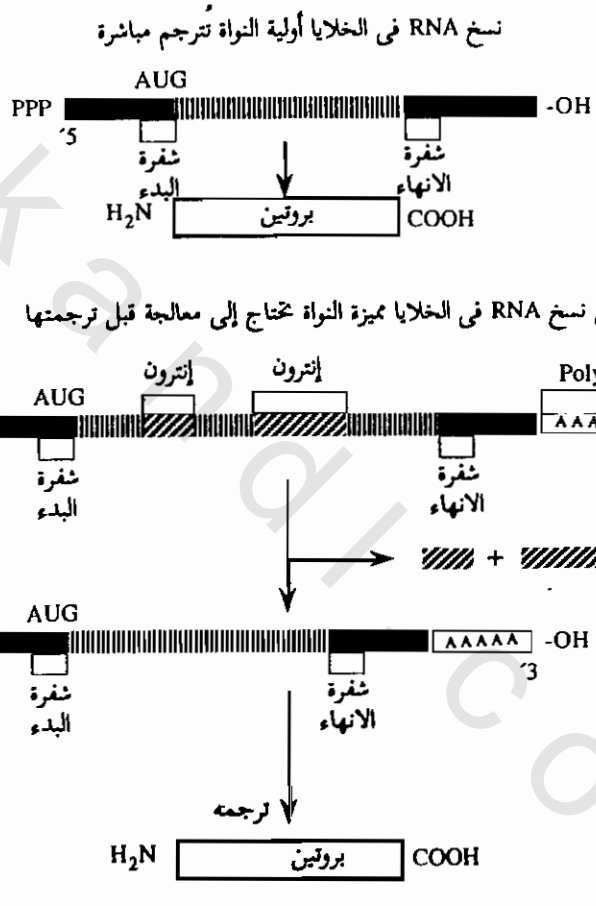
(أ) نسخة RNA التى تتكون بواسطة RNA Polymerase II يتم تعديلها عند الطرف ٥َ بإضافة ٧ـ ميثايل جوانوزين ثلاثى الفوسفات GPPP وإضافة عديد الأدنين Poly A عند الطرف ٣َ.

(ب) تركيب القمة ٥َ (5' - Cap) التى توجد عند الطرف ٥َ فى جزيئات mRNA فى الخلايا مميزة النواه.

المناطق غير المشفَّره (الإنترونات) فى النسخ الأصلية لجزيئات RNA الرسول يتم إزالتها إنزيميا

جزيئات RNA النووية غير المتجانسة هى المادة البادئة لجزيئات RNA الرسول فى الخلايا مميزة النواة. وهذه الجزيئات عادة ما تكون أطول عدة مرات من جزيئات RNA الرسول التى تشتق منها. راجع فى أن الجينات تحتوى على أجزاء غير مترجمة يطلق عليها

إنترونات introns بينما الأجزاء المشفّرة فى الجين تدعى بالإكسونات exons، والإنترونات عادة تكون أطول بكثير من الأكسونات. وبأكتشاف الإنترونات فى DNA ظهرت عدة تساؤلات حول ما إذا كانت هذه الإنترونات تنسخ مع الإكسونات لتعطى النسخ الأصلية لـ RNA (تُمثل المادة البادئة لجزيئات RNA الرسول) والتى تكون القواعد فيها ذات علاقة متوازية مع القواعد فى الإكسونات والإنترونات فى DNA، أو أن إنزيم بلمرة RNA ينسخ فقط الإكسونات دون الإنترونات.



شكل ٢٤ ـ ١٣

مقارنة بين نسخ RNA الرسول فى الخلايا أولية النواة والخلايا مميزة النواة. نسخ RNA الرسول فى الخلايا مميزة النواة هى التى تحتوى على إنترونات التى يجب أن تُزال قبل عملية الترجمة.

أوضحت الدراسات الوراثية أن إنزيم بلمرة RNA فى الخلايا مميزة النواة ينسخ كل من الإوكسونات والإنترونات بالتتابع الذى توجد عليه فى الجينات لتكوّن النسخ الأصلية لـ RNA التى تحتوى على مجموعة من الأجزاء غير المشفرة التي تكون متتامة مع النيوكليوتيدات فى الإنترونات المقابلة. وهذه الإنترونات يجب أن تزال من كل نسخ RNA حتى يُمكن تحويل كل نسخة إلى جزئ RNA رسول الذى يشفّر للبروتين (شكل ٢٤ ـ ١٣). من ناحية أخرى فإن جزيئات RNA الرسول فى الخلايا أولية النواة لا تحتوى على إنترونات ولذلك يتم ترجمتها مباشرة (شكل ٢٤ ـ ١٣).

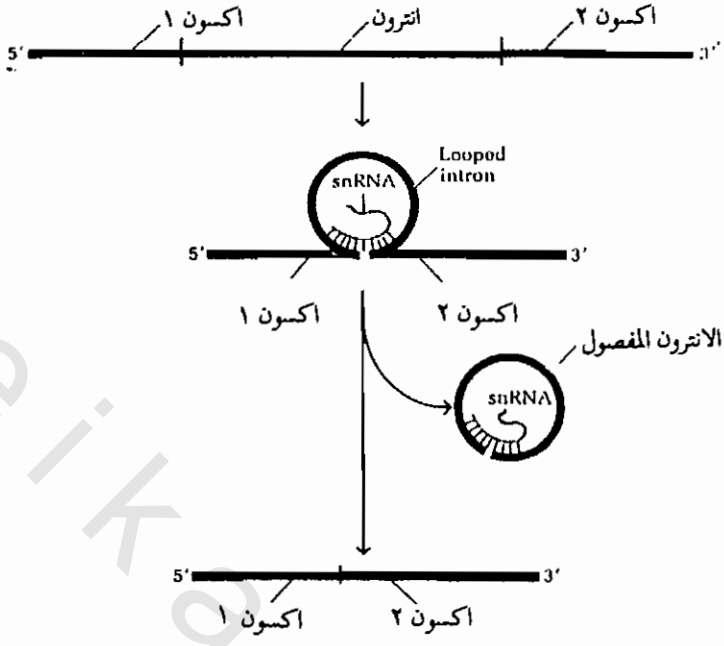
إنزيمات الوصل المتراكب تزيل الإنترونات من نسخ RNA الأصلية

هناك عدة أدلّه تجريبية تشير إلى أن معالجة نسخ mRNA لإزالة الإنترونات غير المترجمة تتم بطريقة لاتنفصل فيها الإكسونات (الأجزاء المترجمة) فيزيائيا عن بعضها. فالإكسونات المتتابعة يتم وصلها ببعض بواسطة إنزيمات الوصل المتراكب Splicing en-zymes التى يتعاون معها نوع آخر من جزيئات RNA التى توجد فى النواة يطلق عليها جزيئات RNA النووية الصغيرة Small nuclear RNAs (Sn RNAs). وهذه الجزيئات الصغيرة والتى تحتوى على حوالى ١٠٠وحدة نيوكليوتيد لها تتابع قواعد متتام مع القواعد فى نهايتى كل إنترون. فإزدواج القواعد بين Sn RNA ونهاية الإنترون الذى يأخذ شكل حلقى يدفع الأكسونات المتتالية فى الوضع المناسب للوصل الإنزيمى للإكسونات وإزالة الإنترون الفاصل (شكل ٢٤ ـ ١٤).

وبعد إزالة جميع الإنترونات بهذه الطريقة والتى تُكمّل معالجة نسخ mRNA الأصلية فإن جزيئات mRNA الناتجة تترك النواة إلى السيتوبلازم. أما أجزاء الإنترونات المفصولة من النسخ الأصلية من ناحية أخرى يتم هدمها بواسطة إنزيمات النيوكلييز nucleases.

DNA يتم نسخه من جزيئات RNA الفيروسية بالنسخ العكسى (المضاد)

بعض فيروسات RNA المسببة للسرطان فى الأنسجة الحيوانية مثل فيروس Rous Sarco-ma Virus المسبب للسرطان فى الطيور تحتوى على إنزيمات بلمرة DNA التى تُوجّه



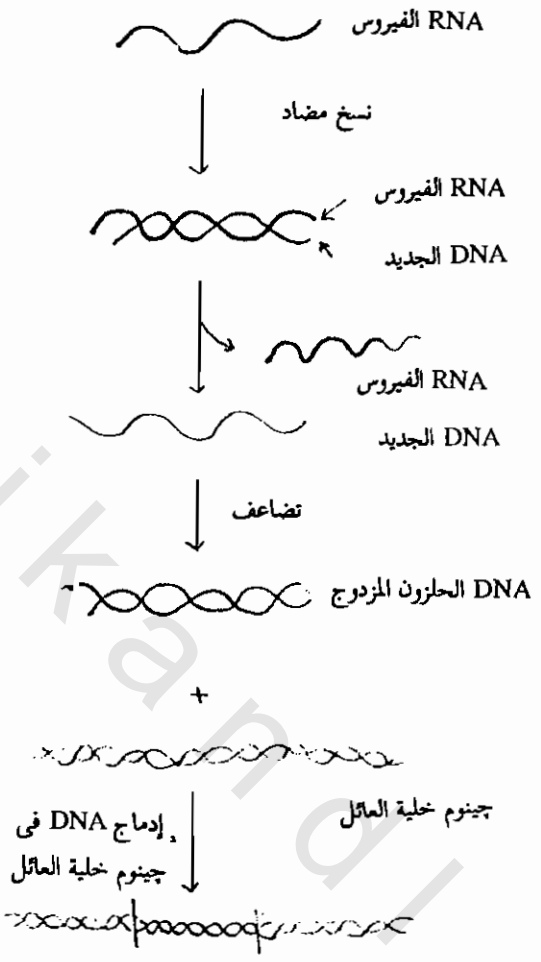
شكل ٢٤ـ ١٤

رسم تخطيطى يُوضح كيف تشارك إنزيمات الوصل المتراكب وجزيئات RNA النووية الصغيرة فى إزالة الإنترون من نسخة RNA الأصلية البادئة.

بواسطة RNA ويُطلق عليها عادة reverse transcriptase. فبعد دخول الفيروس إلى خلايا العائل فإن إنزيم البلمرة الفيروسى يحفز البناء الإنزيمى لسلسة DNA التى تكون متتامة مع سلسلة RNA الفيروسية ويتكون هجين RNA-DNA. ثم تنفصل سلسلة DNA المتكوِّنة ويُبنى عليها سلسلة متتامه أخرى من DNA. وبتكوين DNA الذى يحتوى على جينات مسببة للسرطان فإنه يندمج فى جينوم خلايا العائل، وهذه الجينات ربما تظل ساكنة ولايتم ترجمتها لعدة أجيال (شكل ٢٤ ـ ١٥). ولكن تحت ظروف خاصة فإنه يتم تنشيط الجينات الفيروسية التى تعمل على تضاعف الفيروس. وتحت ظروف أخرى فإن هذه الجينات قد تعمل على تحوُّل الخلية العادية إلى خلية سرطانية.

وإنزيمات reverse transcriptase التى توجد فى فيروسات RNA المسببة للأورام

obeikandl.com



شكل ٢٤ ـ ١٥

بناء DNA من RNA المصيغ بواسطة النسخ العكسى وإدماج DNA فى جينوم خلايا العائل.

تُثْبت أن سريان المعلومات الوارثية قد يكون عكسياً من RNA إلى DNA، كما أنها توضح ميكانيكية إدماج الجينات السرطانية التى تحمل فى صورة RNA فى خلايا العائل.

وهناك من الأدلّة المتزايده ما يشير إلى أن DNA لعدد كبير من أنواع الحيوانات يحتوى على جينات التى نشأت فى الأصل من RNA الفيروسية حتى لو لم تتعرض هذه الحيوانات بذاتها إلى هذه الفيروسات. وهذه المشاهدات قد أدّت إلى افتراض أن

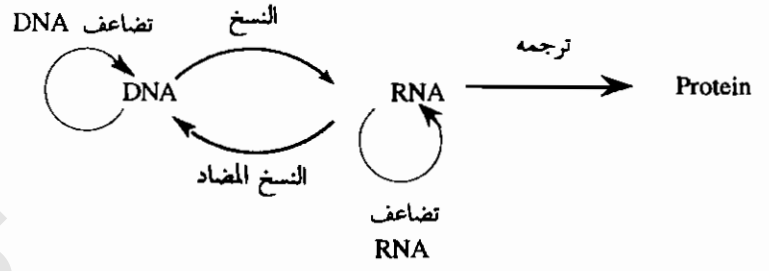
جينات بعض RNA الفيروسية قد إدمجت فى كروموسومات أسلاف هذه الحيوانات وانتقلت بذلك من جيل إلى الجيل التالى بواسطة تكرر DNA الخلوى بما فى ذلك جينات السرطان Cancer genes (أو الإنكوجينات oncogenes) التى ادخلت فى الأصل فى صورة RNA فيروسى. وأحد النظريات لمنشأ السرطان هو أن كروموسوماتنا تحتوى على جينات سرطان ساكنة، وأن هذه الجينات السرطانية (الإنكوجينات onco-genes) عاده لايتم نسخها، ولكن عند تنشيطها بتعريض الجينوم للعوامل المسرطنة Car-cinogenic agents فإنه يتم نسخ الإنكوجينات وترجمتها لتعطى نواتج جينيَّة تُحوِّل خلية الإنسان العادية إلى خلايا خبيثة malignant cells . ويعتقد أن ذلك يتم عن طريق تداخل هذه الجينات السرطانية فى ميكانيكية تنظيم التعبير الجينى للجينات التى تتحكم فى معدَّل انقسام الخلايا.

بعض جزيئات RNA الفيروسية تتضاعف بواسطة إنزيم بلمرة RNA الموجَّه من RNA

بعض الفيروسات المحللة لبكتريا القولون E. coli bocteriophages يكون الكروموسوم فيها عبارة عن RNA بدلا من DNA. وجزيئات RNA فى هذه الفيروسات والتى تعمل كـ m RNA لبناء البروتينات الفيروسية تتضاعف فى خلايا العائل تحت حفز إنزيم RNA replicase، وهو عبارة عن إنزيم بلمرة RNA موجَّه من RNA. وهذه الإنزيمات لا توجد عادة فى خلايا بكتريا القولون العائل ولكنها تتكون استجابة لـ RNA الفيروسى.

تكوين سلسلة RNA جديدة بهذا الإنزيم يتم فى الإتجاه ٥َ ← ٣َ ويحتاج الإنزيم إلى RNA كقالب لكنه لا يعمل مع DNA، فالإنزيم لايُماثل إنزيم بلمرة RNA أو DNA فى أنه يكون متخصص للقالب. وعلى ذلك فإن إنزيم RNA replicase يستخدم فقط RNA الفيروسى كقالب وبذلك لايتم تضاعف RNA لخلايا العائل.

النسخ المضاد (العكسى) وتضاعف RNA يستدعى أن يُعدَّل المبدأ الريئسى Central dogma للوراثه الجزيئية ليأخذ الصوره الموضحة فى شكل (٢٤ ـ ١٦).



شكل ٢٤ ـ ١٦

امتداد المبدأ الرئيسى للوراثة الجزيئية ليشمل النسخ المضاد وتضاعف RNA.

كان لإكتشاف إنزيمى reverse transcriptase و RNA replicase أثر كبير فى تطور مجالات الهندسة الوراثية التى تتضمن إضافة أو إزالة أو تغيير فعل إنزيمى (جين) ما داخل الخلية. ففى كثير من الأحيان يكون من السهل الحصول على الرسالة الوراثية (جين) المرغوبة فى صورة RNA بدلا من DNA الذى يصعب فصله وتنقيه من الجينوم. ويمكن تكوين نسخ عديدة من الرسالة الوراثية فى mRNA باستخدام إنزيم RNA replicase، ثم تحوّل الرسالة الوراثية من mRNA إلى DNA (جين) بواسطة إنزيم reverse transcriptase. يتم بعد ذلك إدخال الجين (DNA) وإدماجة فى جينوم البكتريا حيث يتم نسخه وترجمته للحصول على ناتج الجين (بروتين).

عملية النسخ (بناء RNA) تُثبّط بواسطة بعض المضادات الحيوية

تم تمييز عدد كبير من مثبطات تخليق RNA التى ثبت أهميتها فى التعرُّف على ميكانيكية النسخ وفى فصل سلالات طافرة التى تكون إنزيماتها مقاومة للتثبيط. ومن هذه المثبطات المضاد الحيوى ريفاميسين rifamycin والمضاد الحيوى شبه الإصطناعى ريفامبسين rifampicin اللذان يثبطان بناء RNA فى أولية النواة وليس مميزة النواة. فيتداخل ريفامبسين مع تكوين رابطة الفوسفات ثنائيه الإستر الأولى فى سلسلة RNA. من ناحية أخرى نجد أن هذا المضاد الحيوى لا يمنع ارتباط إنزيم RNA polymarase

مع DNA القالب، كما أن إستطالة سلسلة RNA لاتتأثر بهذا المثبط. وهذه الدرجة العالية من الإنتقائية فى تثبيط بناء RNA يجعل ريفامبسين أداة تجريبية مفيدة. مثال ذلك أنه يمكن إستخدام هذا المضاد الحيوى فى تثبيط بدء بناء سلاسل RNA جديدة دون التأثير على نسخ السلاسل التى بدأت فى مرحلة الإستطالة. ويبدو أن موضع تأثير ريفامبسين هو الوحدة بيتا (β) فى إنزيم بلمرة RNA.

المضاد الحيوى أكتينوميسين ـ د (actinomycin D) يثبط عملية النسخ بطريقة مختلفة. فيرتبط اكتينوميسين ـ د بقوة مع DNA الحلزون المزدوج وبذلك يمنع DNA من العمل كقالب فعّال فى بناء RNA. ولقد أوضحت الدراسات الطيفية والهيدروديناميكية أن حلقة الفينوأكسازون Phenoxazon ring فى الاكتينوميسين تنزلق بين أزواج القواعد المتجاورة فى DNA محدثة تشوُّه فى DNA الذى يمنع حركة إنزيم بلمرة RNA عبر القالب. وهذا النوع من الإرتباط يطلق عليه الإقحام intercalation، ولهذا يستخدم أكتينوميسين ـ د كمثبط لبناء RNA فى كل من الخلايا مميزة النواة وأولية النواة.

المثبط المميز لعملية النسخ فى مميزة النواة هو ألفا أمانيتين α - amanitin، وهو المادة السامة الأساسية فى فطر عيش الغراب السام Amanita phalloids. وهذه المادة السامة تثبط إنزيم RNA Polymerase II فى مميزة النواة ولكنها لاتؤثر على إنزيم RNA Poly-merase I أو إنزيمات بلمرة RNA فى البكتريا أو الميتوكوندريا أو الكلوروبلاست.

مركب Cordycepin (٣ ـ دى أوكسى أدينوزين) فى صورته المفسفرة الثلاثية يعتبر أحد مشابهات القواعد ويثبط معظم إنزيمات RNA Polymerase، حيث يندمج فى سلسلة RNA النامية ولكنه يسبب إنهاء الإستطالة حيث أنه لايحتوى على مجموعة الهيدروكسيل الثالثة اللازمة لتكوين رابطة الفوسفات ثنائية الإستر التالية.

تحديد تتابع القواعد فى RNA

يُمكن فى الوقت الحالى تحديد تتابع القواعد فى جزيئات RNA وذلك بإستخدام إنزيمات endonucleases و exonucleases وتقنية إلكتروفوريسيس الجيل. فتعلّم أولا

النهايات ٥َ و ٣َ فى سلسلة RNA بمجموعات نشطة إشعاعيا. ثم تهضم السلسلة المعلّمة جزئيا لتنتج مجموعة من الأجزاء الصغيرة. ويمكن إجراء عملية التحلل الجزئى الإنتقائية إنزيميا بواسطة إنزيمات النيوكلييز المتخصصة (جدول ٢٤ ـ ٣).

جدول ٢٤ ـ ٣

الإنزيمات المستخدمة فى تحديد تتابع القواعد فى RNA (X و Y و Z و N تعبر عن أى من القواعد الأربعة)

الإنزيم	النوع	موضع الإنشطار	الناتج
Ribonuclease T_1	Endo; and exonuclease	- XpGpYpZ -	- XpGp + YpZ -
Pancreatic ribonuclease	Endo; and exonuclease	- XpUpYpZ -	- XpUp + YpZ -
		- XpCpYpZ -	- XpCp + YpZ -
Ribonuclease U_2	Endo-, and exonuclease	- XpGpYpZ -	- XpGp + YpZ -
		- XpApYpZ -	- XpAp + YpZ -
Ribonuclease 1	Endo-, and exonuclease	- XpNpYpZ -	- XpNp + YpZ-
(From P. Polycephalum)	N = A, G, U	- YpZp	- YpZ + P_i
Alkaline phosphatase (From E.Coli)	Phosphatase	PxpY -	XpY + P_i
Bovin-Spleen phosphodiestrase	Exonuclease	XpYpZ	Xp + YpZ
Snake-Venom Phosphodiestrase	Exonculease	- XpYpZ	- XpY + pZ
Polynucleotide Kinase	Kinase	ATP + XpYp -	PXpYp - + ADP

والأجزاء الناتجة يمكن فصلها بواسطة إلكتروفوريسيس الجيل، وتتابع القواعد فى سلسلة RNA يمكن قراءتها مباشرة بواسطة التصوير الإشعاعى الذاتى.

المراجـــع

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Reberts, and I. D. Watson: Moleculor Biology of the Cell, 2nd ed., Garland Publishing Inc., New York, 1989.

Adhya, S., and M. Gottesman: "Control of Transcription Termination", Ann. Rev. Biochem. 47: 967 - 996 (1978).

Altman, S.: Biosynthesis of tRNA. In Altman, S., (ed.) Tranfer RNA. PP 48 - 77. MIT Press, 1978

Brenner, S., F. Jacob, and M. Meselson: An Unstable Intermediate Carrying Information From Genes to Ribosomes for Protein Synthesis. Nature, 190 : 576 - 581 (1961).

Burgess, R. R., A. A. Travers, J. J. Dunn, and E. K. Bautz: Factor Stimulating Transcription by RNA Polymerase. Nature, 221 : 43 - 46 (1969).

Chamberlin, M., J. : The Selectivity of Transcription. Ann Rev. Biochem. 43 : 721 - 776 (1974).

Conn, E. E., P. K. Stumpf, G. Bruening, and R. H. Doi: Outlines of Biochemistry (5 th ed.), John Wiley & Sons, 1987.

Lehninger, A. L.: Principles of Biochemistry, Worth, New York, 1982

Losick, R., and M. Chamberlin (eds.): RNA Polymerase. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1976.

Miller, O. L., : The visualization of Genes in Action, Sci. Am. 228 : 34 - 42, March (1973).

Perry, R. P.: Processing of RNA. Ann. Rev. Biochem., 45 : 605 - 630, 1976.

Strayer, L.: Biochemistry, 2nd ed., Freeman, San Francisco, 1981.

Temin, H.: "RNA - Directed DNA Synthesis," Sci. Am., 226 : 24 - 33, January (1972).

Travers, A.: RNA Polymerase Specificity and the Control of Growth, Nature, 263: 641 - 646, (1976).

Zubay, G. (coord. author): Biochemistry, Addison - Wesley, Reading Mass., 1983.

opelkandl.com

تمارين

١ـ قارن بين DNA Polymerase I و RNA Polymerase فى بكتريا القولون من الجوانب التالية:

(أ) تركيب تحت الوحدات

(ب) المواد البادئة المنشطّة.

(جـ) إتجاه إستطالة السلسلة

(د) أنشطة Nuclease

(هـ) المحافظة على القالب

(و) الإحتياج إلى بادئ Primer

(ز) طاقة تفاعل الإستطالة

٢ ـ تم نسخ أحد خيوط جزئ DNA بصورة كاملة إلى mRNA بواسطة RNA Pol-ymerase. وكانت نسبة القواعد فى خيط DNA القالب هى G = ٢٤,١ ٪ ، C = ١٨,٥ ٪ ، A = ٢٤,٦ ٪ و T = ٣٢,٨ ٪. لذلك فإن نسبة القواعد فى جزئ RNA المتكون حديثا تكون:

(أ) G = ٢٤,١ ٪ ، C = ١٨,٥ ٪ ، A = ٢٤,٦ ٪ و U = ٣٢,٨ ٪

(ب) G = ٢٤,٦ ٪ ، C = ٢٤,١ ٪ ، A = ١٨,٥ ٪ و U = ٣٢,٨ ٪

(جـ) G = ١٨,٥ ٪ ، C = ٢٤,١ ٪ ، A = ٣٢,٨ ٪ و U = ٢٤,٦ ٪

obeikandi.com

(د) G = ٣٢,٨٪، C = ٢٤,٦٪، A = ١٨,٥٪ و U = ٢٤,١٪

(هـ) لا أحد من هذه النسب

٣ ـ أحد خيوط جزئ DNA يحتوى على ٥١٠ قاعدة بنسب القواعد التالية A = ٢١٪، G = ٢٩٪، C = ٢٩٪ و T = ٢١٪ تم تكرره لينتج خيط متمم. DNA المزدوج الناتج استخدم كقالب بواسطة RNA Polymerase الذى نسخ الخيط الجديد فى DNA المزدوج لينتج خيط RNA يحتوى على نفس العدد من القواعد

(أ) حدد نسب القواعد فى RNA المتكون

(ب) إفترض أن RNA Polymerase يقف نشاطه بعد أن يقوم بنسخ ٢٠٠٠ قاعدة فقط من خيط DNA الجديد. ما هى نسب القواعد فى RNA القصير الجديد.

٤ ـ أكتب تتابع القواعد فى جزئ mRNA الذى يُشيَّد من خيط DNA القالب الذى يحتوى على التتابع التالى:

´5 - ATCGTACCGTTA - ´3

٥ ـ جزئ RNA يتحلل مائيا بسهولة بواسطة القواعد بينما DNA ليس كذلك. كيف تفسر ذلك.

٦ ـ كيف يمكن لمركب Cordycepin (´3 - deoxyadenosine) إيقاف تخليق RNA؟

٧ ـ جزئ DNA سوف يهجن مع جزيئات mRNA المنسوخة منه. كيف تفسر أن ٥٠٪ على الأكثر من DNA الكلى لبكتريا القولون يمكن أن يهجن مع كل جزيئات mRNA لبكتريا القولون.

٨ ـ ما هى النواتج المتوقعة من الهضم الجزئى للأليجونيوكليوتيد التالى:

´5 - PGCAGUACUGUC - ´3

بواسطة كل من الإنزيمات التالية:

(أ) Pancreatic ribonuclease

(ب) Ribonuclease T_1

(جـ) Ribonuclease U_2

(د) Physarum ribonuclease I

٩ ـ التحلل المائى المكثف لأحد الأليجونيوكليوتيدات بواسطة إنزيم Pancreatic ribonuclease ينتج Cp، 2Up، AGCp و GAAUp. التحلل المائى لنفس الأليجونيوكليوتيد بواسطة إنزيم ribonuclease T_1 يعطى AAUp، UAGp و CCUGp. ما هو تتابع الأليجونيوكليوتيد.

١٠ ـ إنزيمات DNA Polymerase لها القدرة على كشف وتصحيح الأخطاء فى سلاسل DNA الجديدة. من ناحية أخرى فإن إنزيمات RNA Polymerase ليس لها هذه الكفاءة. هل يمكن أن تُعطى تفسير بيولوجى مناسب لهذا الإختلاف الدقيق؟

obeikandl.com

فصل ٢٥

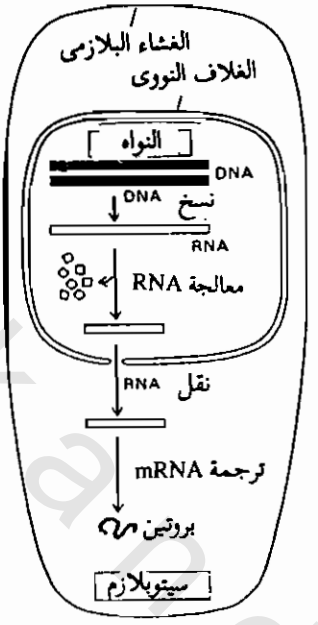
البناء الحيوى للبروتين

Biosynthesis of Protein

أوضحنا فى الفصل السابق كيف تُنسخ المعلومات الوراثية من جزئ DNA إلى جزئ mRNA وهو الحامل الوسيط للمعلومات بين الجين وسلسلة عديد الببتيد المقابلة. وفى هذا الفصل سنوضح ترجمة المعلومات الوراثية المتضمنة فى تتابع النيوكليوتيدات فى mRNA إلى تتابع للأحماض الأمينية فى البروتين. يبدأ البناء الحيوى للبروتين بنسخ جينات معينة فى صورة mRNA وينتهى بتجميع الأحماض الأمينية فى نواتج نشطة للجينات وهى البروتينات (شكل ٢٥ ـ ١). وهذا التفاعل الكلى والذى يشمل إعادة صياغة تتابع النيوكليوتيدات فى الأحماض النووية فى صورة تتابع للأحماض الأمينية فى البروتينات يدعى بالترجمة translation. والعلاقة المتناظرة بين تتابع القواعد فى DNA (أو mRNA المنسوخ منه) وتتابع الأحماض الأمينية فى البروتين يطلق عليها الشفرة الوارثية genetic code. فالمعلومات الوراثية الموجودة على الجين تنتظم فى ثلاثيات كل منها يتألف من ثلاثة قواعد تُعرف بالكودون Codon أو شفرة ثلاثية الذى يحدد كل منها موضع حمض أمينى واحد فى سلسلة عديد الببتيد.

يتم البناء الحيوى للبروتين فى كل الأنظمة الحية على عُضَّيات (جسيمات) خلوية تُعرف بالريبوسومات ribosomes. وتعمل الريبوسومات على قراءة القواعد فى mRNA، وفى أثناء هذه العملية فإن الريبوسومات ترتبط وتتحرك عبر سلسلة mRNA. وعادة ما

يشترك عدد من الريبوسومات فى قراءة القواعد فى جزئ mRNA واحد فى نفس الوقت والتركيب الناتج يعرف بالبوليسوم Polysome.



شكل ٢٥ ـ ١
رسم تخطيط لعملية بناء البروتين (DNA → RNA → Protein) فى الخلايا مميزة النواه.

الكودون عبارة عن تتابع محدد من ثلاث قواعد

إن العلاقة التى تحكم ترجمة تتابع النيوكليوتيدات (القواعد) فى الجين إلى تتابع للأحماض الأمينية فى البروتين تعرف بالشفرة الوراثية genetic code. ولقد أوضحت التجارب الوراثية أن تتابع القواعد فى جزئ mRNA الذى يعمل كمركب وسيط فى نقل المعلومات الوراثية تقرأ فى ترتيب متسلسل فى مجموعات من ثلاث قواعد، وكل ثلاثية من القواعد والتى تعرف بالكودون Codon تحدد حمض أمينى واحد. ونظر لأن جزئ mRNA عبارة عن بوليمر خطى من أربع قواعد مختلفة، فإن هناك متسع لتكوين $٦٤=٤^{٣}$ شفرة ثلاثية (كودون) مختلفة. ولقد أمكن التعرُّف على تتابع القواعد فى

الأربعة وستون كودون (شكل ٢٥ ـ ٢)، كما أمكن أثبات أنَّ واحد وستون كودون تستخدم فى تحديد الأحماض الأمينية بينما الثلاثة كودونات الأخرى تُستخدم كإشارة إنهاء بناء سلسلة عديد الببتيد. ونظراً لأنه يوجد عشرين حمضاً أمينياً فإن كل منهم يتحدد بعدة كودونات، ومعنى ذلك أن الشفرة تكون متكررة. وباستثناء التربتوفان

الموضع الأول الطرف ٥َ	الموضع الثانى U	C	A	G	الموضع الثالث الطرف ٣َ
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	TrP	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

شكل ٢٥ ـ ٢

الشفرة الوراثية. مجموعات من ثلاثة قواعد فى mRNA (كودونات) تُترجم إلى أحماض أمينية أثناء بناء البروتين. مثال ذلك أن الكودون GUG تترجم إلى فالين بينما الكودون GAG تترجم إلى حمض جلوتاميك.

والمثيونين الذى يحدد كل منهما بثلاثية واحدة، فإن الثمانية عشر حمض أمينى الأخرى تحدد باثنين أو أكثر من الثلاثيات وهذا ما يعرف بترادف (أو تحلل) الشفرة الوراثية de-genaracy of the genetic code. والكودونات التى تحدد نفسى الحمض الأمينى تعرف بالمترادفات Synonyms.

فى معظم الحالات عندما يكون للحمض الأمينى أكثر من كودون يكون الإختلاف بين هذه الكودونات فى القاعدة الثالثة فقط، مثال ذلك أن الألآنين يحدد بواسطة الثلاثيات GCU و GCC و GCA و GCG. ويظهر من ذلك أن القاعدة الأولى والثانية التى تشترك فى الكودونات الأربعة هما اللّتان تحددان تخصص الشفرة أمّا القاعدة الثالثة تكون أقل تخصصاً.

وأحد الخصائص العامة للشفرات أنها متماثلة فى جميع الأنواع التى أُختبرت والتى تشمل الإنسان وبكتريا القولون ونبات الدخان والبرمائيات وغيرهم من الكائنات. ومن الأمور المتفق عليها الآن أن الشفرة الوراثية عامة Universal بين جميع الكائنات.

البناء الحيوى للبروتين يتم فى خمس خطوات رئيسية

دعنا الآن نُوضّح عملية البناء الحيوى للبروتين بصورة عامة قبل أن نناقش خطواتها بشئ من التفصيل. من المعروف فى الوقت الحالى أن البناء الحيوى للبروتين يتم فى خمس خطوات رئيسية، ويحتاج إلى معاونة عدد كبير من الجزيئات. ورغم أن البناء الحيوى للبروتين متماثل من الناحية الأساسية فى الخلايا مميزة النواة والخلايا أولية النواة فإن هناك بعض الإختلافات فى التفاصيل.

يُبنى البروتين فى إتجاه مجموعة الأمينو إلى مجموعة الكربوكسيل بالإضافة المتتالية للأحماض الأمينية إلى النهايه الكربوكسيلية لسلسلة عديد الببتيد النامية. وتشمل الخطوة الأولى فى بناء البروتين تنشيط الأحماض الأمينية وذلك بإرتباط كل حمض أمينى بأحد جزيئات RNA الناقلة (tRNA) على حساب طاقة ATP وتكوين أمينو أسايل tRNA وهو الصورة النشطة للحمض الأمينى. ومن المعروف أنه يوجد على الأقل نوع واحد من جزيئات tRNA لكل حمض أمينى. أمّا الخطوات التالية فى بناء البروتين تشمل البدء

والإستطالة والإنهاء. فتؤدى مرحلة البدء إلى إرتباط جزئ tRNA (المرتبط بالحمض الأمينى البادئ) مع إشارة على جزئ mRNA هى الموضع P (Peptidyl site) على الريبوسوم والذى يمثل واحد من موضعى الإرتباط لجزئ tRNA. أماً مرحلة الإستطالة فتبدأ بإرتباط أحد جزيئات أمينو أسايل tRNA مع موضع الارتباط الآخر على الريبوسوم والذى يعرف بالموضع A (aminoacyl Site). ثم تتكون بعد ذلك رابطة ببتيدية بين مجموعة الأمينو فى أمينو أسايل - tRNA القادم ومجموعة الكربوكسيل فى الحمض الأمينى البادئ. ينتقل الببتيد الثنائى - tRNA من الموضع A إلى الموضع P حيث تنفرد جزيئات tRNA الأخرى من الريبوسوم. ثم يرتبط بعد ذلك جزئ أمينوأسايل - tRNA آخر فى الموضع A ليبدأ دورة إستطالة أخرى. ويتم إكتمال بناء سلسلة عديد الببتيد عند قراءة إشارة الإيقاف (الإنهاء) على جزئ mRNA بواسطة بروتين عامل الإنفصال والذى يؤدى إلى فصل سلسلة عديد الببتيد من الريبوسوم. وأخيراً فإنه لتكوين الهيئة البيولوجية النشطة فإن سلسلة عديد الببتيد تنطوى لتأخذ الشكل المجسم ثلاثى الأبعاد. بالإضافة إلى ذلك فإن سلسلة عديد الببتيد قد تُعدَّل إنزيميًا قبل عملية الطى لإزالة الأحماض الأمينية البادئة، كما قد يتم إدخال مجموعات فوسفات أو ميثايل أو كربوكسيل فى بعض الأحماض الأمينية لسلسلة عديد الببتيد.

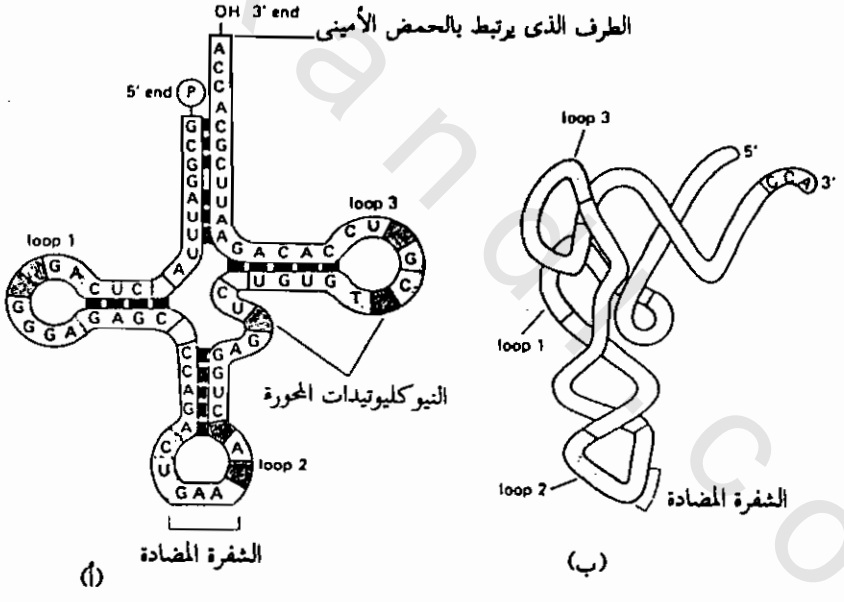
جزيئات tRNA ضرورية لتنشيط الأحماض الأمينية وتحديد تتابعها فى سلسلة عديد الببتيد

تعتبر جزيئات RNA الناقلة (tRNA) العوامل الأساسية فى بناء البروتين التى ترتبط بها الأحماض الأمينية قبل دخولها فى عملية البلمرة. فإرتباط الأحماض الأمينية عن طريق مجموعتها الكربوكسيلية بجزئيات tRNA يُنشّطها ويحوّلها إلى صورة مرتفعة فى الطاقة التى تُكوّن الروابط الببتيدية تلقائياً. وعملية التنشيط هذه تكون ضرورية لبناء البروتين حيث أن تكوين الرابطة الببتيدية بين الأحماض الأمينية الحرة لاتكون مناسبة من الناحية الثرماديناميكية.

إرتباط الأحماض الأمينية مع جزيئات tRNA ليس مهماً فقط لتنشيط مجموعاتها

الكربوكسيلية اللازمة لتكوين الروابط الببتيدية، ولكن أيضاً لأن الأحماض الأمينية بذاتها ليس لها القدرة على تمييز الكودونات على mRNA. فتحمل الأحماض الأمينية إلى الريبوسوم بواسطة جزيئات tRNA متخصصة التى يمكن لها التعُّرف على وتمييز الكودونات على جزئ mRNA، وبذلك فإن جزيئات tRNA تعمل كوصيلات مهايئة adaptor.

ولتفهُّم كيفية عمل جزيئات tRNA كوصيلات مُهايئة فى ترجمة تتابع القواعد فى الأحماض النووية إلى تتابع للأحماض الأمينية فى البروتين يكون من الضرورى توضيح تركيب جزيئات tRNA. فقد أدت دراسة تتابع القواعد فى عدد من جزيئات tRNA وكذلك نتائج دراسة الأشعة السينية إلى إستنتاج أن جميع جزيئات tRNA لها الخواص التركيبية التالية (شكل ٢٥ ـ ٣):



شكل ٢٥ ـ ٣

تركيب جزئ tRNA (أ) مخطط عام للتركيب موضحا فيه مناطق إزدواج القواعد فى الجزئ. (ب) التركيب المجسم ثلاثى الأبعاد كما أوضحته دراسة إنحراف الأشعة السينية.

١ ـ جزئ tRNA عبارة عن سلسلة فردية تحتوى مابين ٧٣ و ٩٣ وحدة ريبونيوكليوتيد.

٢ ـ تحتوى جزيئات tRNA على عدد من القواعد غير العادية (المحوَّرة) التى تتراوح بين ٧ إلى ١٥ لكل جزئ. وعدد كبير من هذه القواعد عبارة عن مشتقات ميثيلية methylated derivatives للقواعد الأساسية والتى تتكوَّن بالتعديل الإنزيمى لنسخ tRNA الأصلية. والدور الحقيقى لهذه القواعد المحوَّرة غير مؤكد، لكن أحد الإحتمالات هو أن عملية الميثلة تمنع إزدواج القواعد وبالتالى تؤدى إلى وجود نتوءات ضرورية لبعض التفاعلات الأخرى. أيضاً فإن عملية الميثلة تضفى خصائص هيدرفوبية لبعض مناطق جزيئات tRNA التى قد تكون مهمة فى تفاعلاتها مع الإنزيمات والبروتينات الريبوسومية.

٣ ـ الطرف ٥َ لجزيئات tRNA تكون مفسفرة وعادة تكون فوسفات الجوانين.

٤ ـ تتابع القواعد فى الطرف ٣َ لجزيئات tRNA يكون سايتوزين ـ سايتوزين ـ أدنين (CCA)، حيث يرتبط الحمض الأمينى المنشَّط بمجموعة الهيدروكسيل الثالثة فى وحدة الريبوز للأدينوزين الطرفى.

٥ ـ نصف القواعد تقريبا فى جزيئات tRNA تكون فى حالة ازدواج مُكوِّنة مناطق من الحلزون المزدوج، بينما تكون خمس مجموعات من القواعد غير مزدوجة مُكوِّنة خمسة أزرع أو حلقات Loop. وإثنان من هذه الأزرع تشارك فى عملية المهايئة وهى زراع الإرتباط بالحمض الأمينى وزراع الشفرة المضادة.

٦ ـ الشفرة المضادة أو الكودون المضاد anticodon عبارة عن تتابع معين من ثلاث قواعد التى تكون متتامة مع قواعد الشفرة الثلاثية المقابلة على جزئ mRNA، وكل جزئ tRNA يحتوى على شفرة مضادة مميزة. ويوجد لكل حمض أمينى مابين جزئ إلى أربعة جزيئات tRNA يمكن لها الإرتباط بهذا الحمض الأمينى.

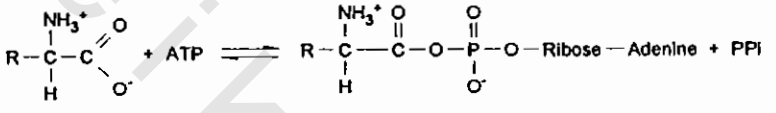
تنشيط الأحماض الأمينية يتم بارتباطها بجزيئات RNA الناقلة بواسطة إنزيمات Synthetases متخصصة

يبدأ البناء الحيوى للبروتين بتنشيط الأحماض الأمينية بارتباطها مع جزيئات tRNA المقابلة بواسطة مجموعة خاصة من الإنزيمات تعرف بـ aminoacyl - tRNA - Syn-

thetases كل منها يقوم بربط أحد الأحماض الأمينية مع جزئ tRNA المقابل. فتوجد إنزيمات Synthetases مختلفة كل منها خاص بأحد الأحماض الأمينية: أحدهما يربط الجليسين مع $tRNA^{Gly}$، الآخر يربط الآنين مع $tRNA^{Ala}$ وهكذا. والتفاعل الكلى لتنشيط الأحماض الأمينية الذى يحفز بهذة الإنزيمات هو:

$$\text{Amino acid} + \text{ATP} + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{aminoacyl - tRNA} + \text{AMP} + PP_i$$

ويتم هذا التفاعل فى خطوتين، فى الخطوة الأولى يتكون أمينو أسايل أدنيلات aminoa-cyladenylate بتفاعل الحمض الأمينى مع ATP.



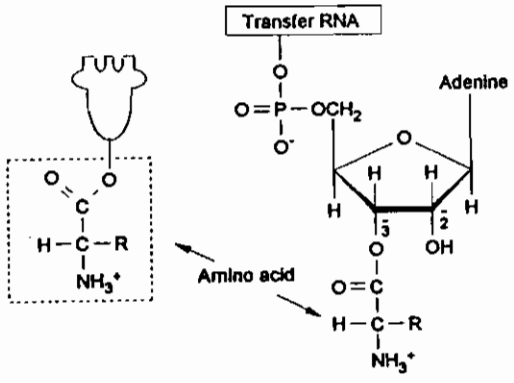
aminoacyladenylate
(aminoacyl - AMP)

فى الخطوة الثانية تُنقل مجموعة أمينو أسايل من أمينو أسايل أدنيلات إلى جزئ tRNA ويتكون أمينو أسايل ـ tRNA وهو المركب النشط فى بناء البروتين.

$$\text{aminoacyl - AMP} + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{aminoacyl - tRNA} + \text{AMP}$$

ويكون انتقال مجموعة أمينوأسايل فى هذا التفاعل إمَّا إلى الموضع ٢َ أو ٣َ فى وحدة ريبوز الأدنيلات الطرفية لجزئ tRNA (شكل ٢٥ ـ ٤)، مع ذلك فإن مجموعة الأسايل المنشَّطة يُمكن أن تنتقل بسرعة بين مجموعة الهيدروكسيل ٢َ و ٣َ.

إنزيمات aminoacyl- tRNA synthetase على درجة كبيره من التخصص بالنسبة للحمض الأمينى المُنشَّط وفى tRNA المستقبل. ومن الثابت أن تخصص هذه الإنزيمات يُمثِّل درجة كبيرة من الأهمية للإندماج الصحيح للأحماض الأمينية فى سلسلة عديد الببتيد. فأى إرتباط خاطئ لحمض أمينى مع tRNA لتكوين أمينو أسايل - tRNA غير مناسب يؤدى إلى إندماج خاطئ للحمض الأمينى فى سلسلة عديد الببتيد لأن الإندماج الصحيح يتحدد بالشفرة المضادة على tRNA وليس بالحمض الأمينى المنشط.

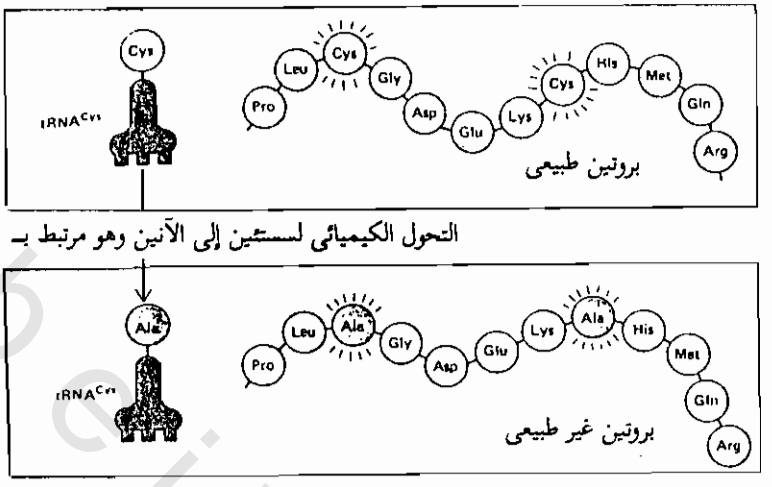


شكل ٢٥ ـ ٤

تركيب أمينو أسايل - tRNA . مجموعة الكربوكسيل فى الحمض الأمينى تُكوّن رابطة استر مع الريبوز (إما مع الأكسجين ٢َ أو ٣َ فى الريبوز) . (أ) التركيب العام. (ب) رسم تخطيطى.

التعرُّف على الكودون يتم بواسطة الشفرة المضادة وليس بالحمض الأمينى المُنشَّط

لقد أوضحنا من قبل أن الشفرة المضادة على tRNA هى موضع التعرُّف للكودون على mRNA، وأن عملية التعرُّف تتم بازدواج القواعد بين الكودون والشفرة المضادة. فهل يلعب الحمض الأمينى المرتبط بجزئ tRNA أى دور فى عملية التعرُّف؟. لقد تم الإجابة على هذا السؤال من خلال التجربة التى تم فيها تحويل أحد الأحماض الأمينية المرتبط بجزئ tRNA المتخصص بوسيلة كيميائية إلى حمض أمينى آخر (سِستئين ← ألآنين). وعندما حضّن هجين أمينو أسايل ـ tRNA الناتج (الذى يحتوى على ألآنين ولكنه مرتبط بـ t RNA الخاص بالسِستئين) مع نظام بناء بروتين خالى من الخلايا وجد أن سلسلة عديد الببتيد المتكوِّنة تحتوى على ألآنين فى مواضع السِستئين (شكل ٢٥ ـ ٥). وبكلمات أخرى فإن ألآنين قد أُدمج فى سلسلة عديد الببتيد على أنه سِستئين وذلك لأنه مرتبط بجزئ tRNA الخاص بالسِستئين. ويتضح من ذلك أن التعرُّف على الكودون لايعتمد على الحمض الأمينى المرتبط بجزئ tRNA.



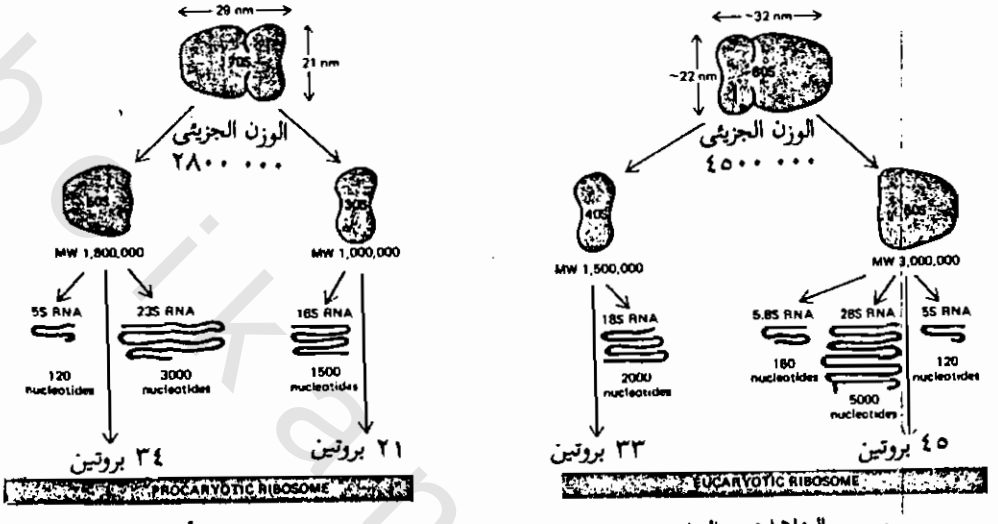
شكل ٢٥ ـ ٥

أحد التجارب التى توضح أن tRNA وحده وليس الحمض الأمينى المرتبط به هو الذى يتعرَّف على الموضع (الكودون) التى يوضع فيها كل حمض أمينى أثناء بناء البروتين.

الريبوسومات هى العضيَّات التى يُبنى عليها البروتين

بعد أن أوضحنا المرحلة الأولى فى البناء الحيوى للبروتين وهى تنشيط الأحماض الأمينية بإرتباطها بجزيئات tRNA، ننتقل الآن إلى المراحل التالية وميكانيكية البناء. فهذه العملية المعقدة تتم على الريبوسومات ribosomes التى يمكن اعتبارها جهاز بناء البروتين. وتتشابه ريبوسومات الخلايا مميزة النواة والخلايا أولية النواه من ناحية التصميم والوظيفة، فكل منها يتألف من وحدة كبيرة ووحدة صغيرة. والوحدة الصغيرة فى ريبوسوم الخلايا مميزة النواة لها معامل ترسيب يساوى ٣٠ وحدة سفدبيرج (30S) وتحتوى على جزئ RNA ريبوسومى (rRNA) و٣٣ نوعاً مختلفاً من البروتينات الريبوسومية، بينما الوحدة الكبيرة التى معامل ترسيبها يساوى ٦٠ وحدة سفدبيرج (60S) تحتوى على ثلاثة أنواع من جزيئات rRNA مرتبطة بأكثر من ٤٠ نوعاً من البروتينات الريبوسومية. من ناحيه أخرى نجد أن ريبوسومات خلايا أولية النواة تكون أصغر فى الحجم وتحتوى على عناصر

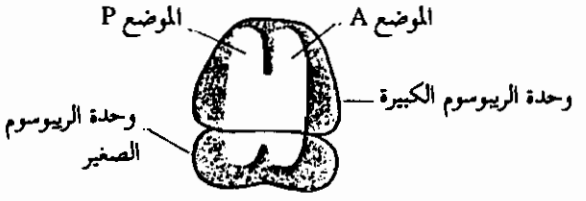
أقل (شكل ٢٥ ـ ٦). تحتوى خلية بكتريا القولون على حوالى ١٥٠٠ ريبوسوم والتى تُمثِّل ربع الوزن الجاف للخلية.



شكل ٢٥ ـ ٦

مقارنة لتركيب ريبوسومات الخلايا مميزة النواة والخلايا أولية النواة. بالرغم من الإختلاف فى التركيب فإن الوظيفة متماثلة.

يحتوى الريبوسوم على موضعى إرتباط مختلفين يمكن لجزيئات tRNA من الإرتباط بهما: أحد الموضعين يحمل جزئ tRNA الذى يرتبط طبيعيا بالنهاية النامية لسلسلة عديد الببتيد ويطلق عليه Peptidyl - tRNA binding Site أو الموضع P، أماً الموضع الآخر يحمل جزئ tRNA القادم المرتبط بالحمض الأمينى ويطلق عليه aminoacyl - tRNA binding Site أو الموضع A (شكل ٢٥ ـ ٧).



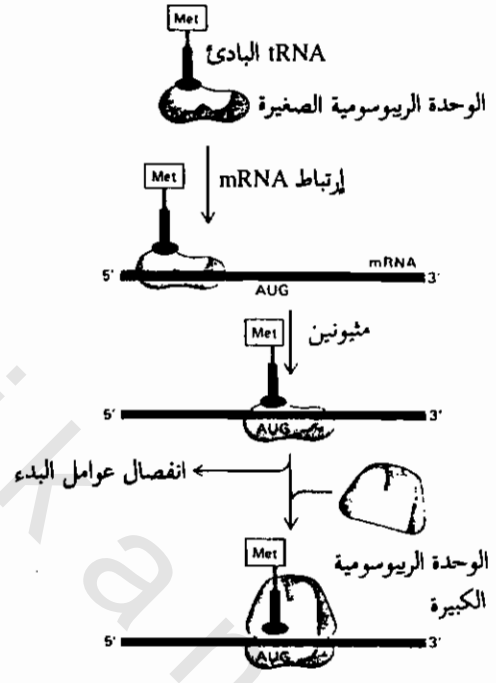
شكل ٢٥ ـ ٧

رسم تخطيطى لموضعى الإرتباط A و P على الريبوسوم.

عمليه البدء تحدد هيكل القراءة لبناء البروتين

يحتوى جزئ mRNA على الكودونات التى تحدد تتابع الأحماض الأمينية فى سلسلة عديد الببتيد، والذى يحدد نقطة بدء قراءة الكودونات على mRNA هو تعشيق الريبوسوم مع mRNA وتكوين متراكب البدء initiation complex. هذا المتراكب يتجمع عند الموضع الصحيح على mRNA الذى يبدأ عنده بناء سلسلة عديد الببتيد.

تعتبر عملية البدء من العمليات المعقدة والتى تشتمل على عدة خطوات تُحفز بواسطة ثلاثة بروتينات يطلق عليها عوامل البدء initiation Factors (IF) يرمز إليها بـ IF-1 و IF-2 و IF-3. ونظراً لتعقيدها فإن تفاصيل عملية البدء مازال غير مؤكّد، مع ذلك فإنه من الواضح أن تكوين متراكب البدء يتم فى ثلاثة خطوات. فى الخطوة الأولى ترتبط الوحدة الريبوسومية الصغيرة مع العامل البادئ الثالث IF-3 الذى يمنع الوحدة الريبوسومية الصغيرة والكبيرة من الإتحاد ثانية. يتبع ذلك ارتباط mRNA مع الوحدة الريبوسومية الصغيرة بطريقه تسمح بإرتباط الكودون البادئ فى mRNA (وهو 5´, AUG, 3´) مع موضع خاص على هذه الوحدة (شكل ٢٥ ـ ٨). يُوجه الكودون البادئ AUG إلى الموضع الصحيح فى الوحدة الريبوسومية الصغيرة بواسطة إشارة خاصة فى mRNA توجد على الجانب ٥ للكودون AUG. هذه الإشارة تحتوى أساساً على تتابع من ٦ إلى ٨ من قواعد الأدنين والجوانين التى يتم التعرف عليها بواسطة ازدواج متمم من القواعد فى RNA الريبوسومى فى الوحدة الريبوسومية الصغيرة.



شكل ٢٥ ـ ٨

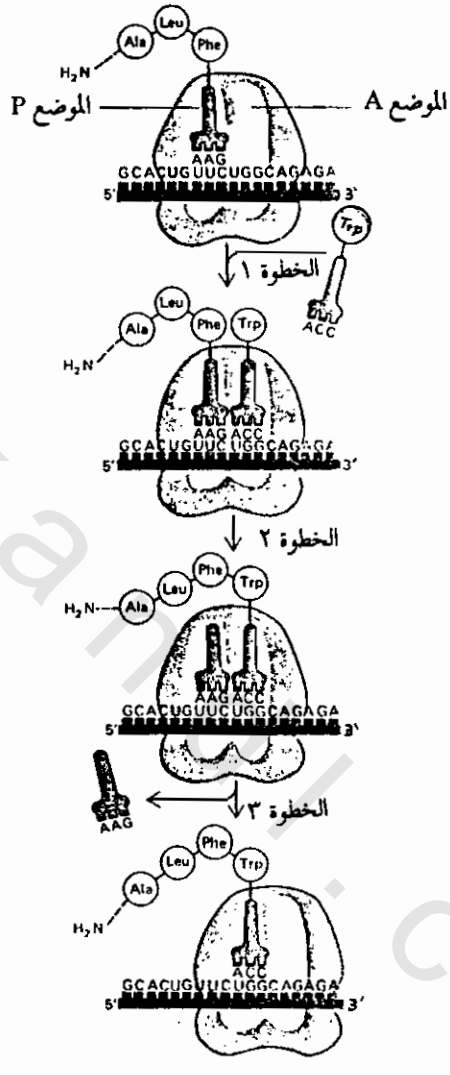
طور البدء فى بناء البروتين فى الخلايا مميزة النواة. نفس العمليات تتم أيضا فى الخلايا أولية النواة فيما عدا أن الحمض الأمينى البادئ المرتبط بـ t RNA هو N ـ فورميل ميثونين.

فى الخطوة الثانية فإن جزئ $tRNA_F$ بادئ خاص مرتبط بالمثيونين فى الخلايا مميزة النواة (أو بـ N ـ فورميل مثيونين فى الخلايا أولية الأنوية) يُحمِّل عل الكودون البادئ AUG. وتفاعل التحميل هذا يحفز بواسطة عامل البدء IF-1 و IF-2. ونظراً لوجود كودون واحد AUG للمثيونين التى تُشفِّر لكل من المثيونين البادئ وذلك الذى يوجد فى الأجزاء الداخلية لسلسلة عديد الببتيد فإن الذى يُحدد أى من الكودونات AUG تستخدم ككودون بادئ هو إشارة البدء على الجانب 5َ للكودون AUG.

فى الخطوة الثالثة ترتبط الوحدة الريبوسومية الكبيرة مع هذا المتراكب وتتحرر فى نفس الوقت عوامل البدء IF-1 و IF-2 و IF-3 من الريبوسوم. وينتج عن ذلك تكوين الريبوسوم الكامل الفعّال الذى يحتوى على mRNA ومثيونين ـ $tRNA_F$ الذى يحتل الموضع P على الريبوسوم، أمّا الموضع A على الريبوسوم يكون غير مشغول ولكنه فى مرحلة الاستطالة يستقبل جزيئات أمينو أسايل ـ tRNA التالية.

إستطالة سلسلة عديد الببتيد تتم بالإضافة المتكررة لأمينو أسايل ـ tRNA

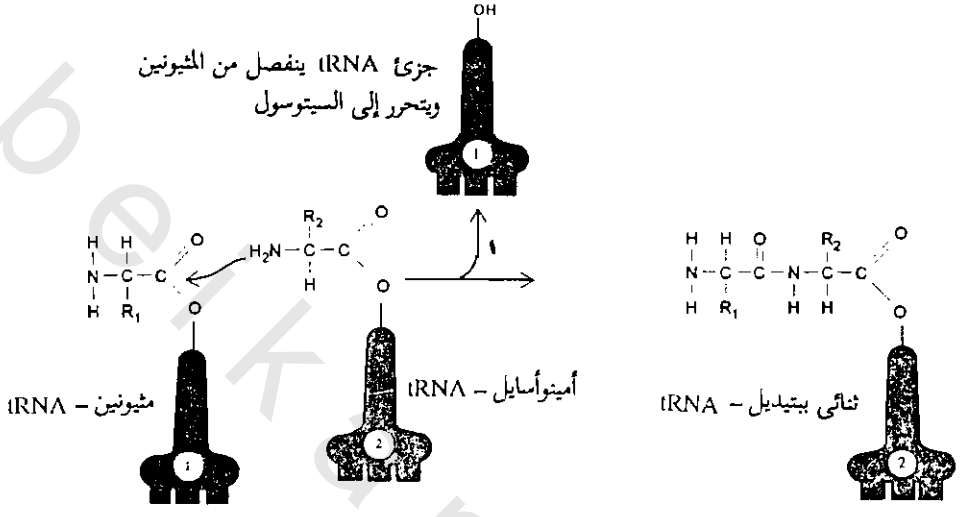
أن عملية استطالة سلسلة عديد الببتيد على الريبوسوم يُمكن إعتبارها عملية دورية تتم فى ثلاثة خطوات (شكل ٢٥ ـ ٩)؛ (١) إرتباط أمينو أسايل ـ tRNA (التعرف على الكودون) (٢) تكوين الرابطة الببتيدية (٣) الإنتقال. وعدد هذه الدورات يكون مساوياً لعدد الأحماض الأمينية التى تضاف إلى السلسلة. وتبدأ الدورة بإدخال أحد أمينوأسايل ـ tRNA فى الموضع A المجاور للموضع P المرتبط بـ مثيونين ـ tRNA. والذى يحدد نوع أمينوأسايل ـ tRNA القادم هو الكودون فى mRNA الموجودة فى الموضع A. ويشارك فى هذه الخطوة جزئ GTP وإثنين من البروتينات تُعرف بعوامل الإستطالة elongation factors تأخذ الرمز المختصر EF - Tu و EF - Ts. ويتكون بذلك معقد يحتل فيه أمينو أسايل ـ tRNA الموضع A، بينما يحتل مثيونين ـ tRNA الموضع P. فى الخطوة الثانية فإن مجموعة الكربوكسيل الطرفيه تنفك من tRNA الموجود فى الموضع P وتُكوّن رابطة ببتيدية مع الحمض الأمينى المرتبط بجزئ tRNA على الموضع A (شكل ٢٥ ـ ١٠). يحفز هذا التفاعل إنزيم Peptidyl transferase وهو أحد الإنزيمات التى توجد مرتبطة بالريبوسوم. ونتيجه لهذا التفاعل فإنه يتكون ثنائى ببتيديل ـ tRNA على الموضع A ويظل tRNA البادئ مرتبطا بالموضع P. وفى الخطوة الثالثة من دورة الإستطالة فإن الريبوسوم يتحرك عبر mRNA فى اتجاه الطرف ٣ بمسافة تقدر بكودون واحد (ثلاثة قواعد)، ويكون نتيجة لذلك انتقال ثنائى ببتيديل ـ tRNA من الموضع A إلى الموضع P وفى نفس الوقت يتحرر tRNA الموجود فى الموضع P ويتم خروجه إلى السيتوسول، وبذلك يصبح الكودون الثالث فى mRNA متمركز فى الموضع A والكودون الثانى فى الموضع P. وهذه الخطوة تحتاج إلى طاقة وتتم بواسطة سلسلة من التغيرات فى الهيئة



شكل ٢٥ ـ ٩

طور الإستطالة فى بناء البروتين على الريبوسوم. الثلاثة خطوات فى الدورة تتكرر عدّة مرات بعدد الأحماض الأمينية فى سلسلة عديد الببتيد.

الفراغية التى تحدث فى أحد البروتينات الريبوسومية بمساعدة تحلل جزئ GTP المرتبط بالبروتين. وبإنتهاء الخطوة الثالثة فإن الموضع A الخالى يكون جاهزاً لإستقبال جزئ tRNA المرتبط بالحمض الأمينى التالى والذى يبدأ دورة جديدة.



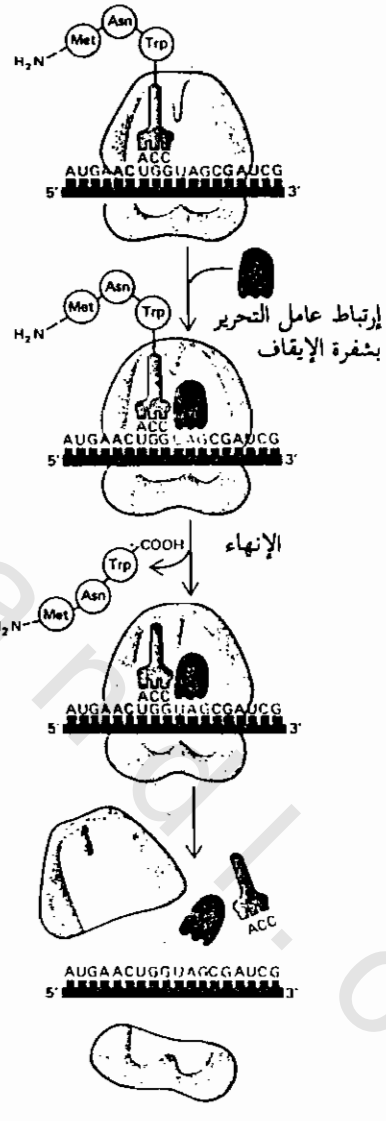
شكل ٢٥ ـ ١٠

تكوين الرابطة الببتيدية الأولى. تُنقل مجموعة المثيونيل إلى مجموعة الأمينو فى أمينوأسايل ـ tRNA التالى ويتكون ثنائى ببتيديل ـ tRNA الذى يحتل الموقع A.

إنهاء بناء سلسلة عديد الببتيد يحتاج إلى إشارة خاصة

تُوجد ثلاث كودونات فى جزئ mRNA تُعرف بكودونات الإيقاف stop codons والتى تنهى عملية الترجمة أى بناء سلسلة عديد الببتيد. وهذه الكودونات الثلاثة UAA و UAG و UGA لا تُشفِّر لأى من الأحماض الأمينية، فالخلايا العادية لاتحتوى على جزيئات tRNA تحمل شفرات مضادة متممة لكودونات الإنهاء.

أحد البروتينات الذى يُطلق عليه عامل التحرير release factor يمكن أن يرتبط مباشرة بأى من كودونات الإيقاف التى تصل إلى الموضع A فى الريبوسوم. هذا الإرتباط



شكل ٢٥ ـ ١١

الطور النهائى فى بناء البروتين. إرتباط عامل التحرير بكودون الإيقاف ينهى عملية الترجمة. تنفصل سلسلة عديد الببتيد ويتفكك الريبوسوم إلى الوحدتين 50S و 30S.

obeikandl.com

يخل بنشاط إنزيم Peptidyl transferase المجاور حيث يجعل الإنزيم يحفز إضافة جزئ ماء بدلا من مجموعة الأمينو الحرة إلى الحمض الأمينى لببتيديل - tRNA . ونتيجة لذلك فإن مجموعة الكربوكسيل الطرفية لسلسلة عديد الببتيد النامية تتحرر من إرتباطها بجزئ t RNA . ونظراً لأن هذا هو الإرتباط الوحيد الذى يربط بين سلسلة عديد الببتيد النامية للريبوسوم فإن سلسلة عديد الببتيد (البروتين) تتحرر إلى سيتوبلازم الخلية (شكل ٢٥ ـ ١١).

عدد من الريبوسومات قد تقوم بترجمة جزئ mRNA فردى

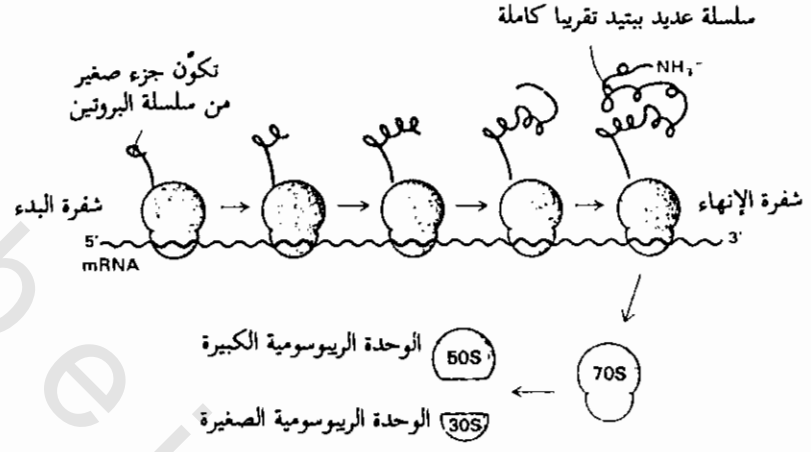
قد يقوم عدد كبير من الريبوسومات بترجمة جزئ mRNA فردى فى نفس الوقت وذلك فى حالة إحتياج الخلية لبناء سلسلة عديد الببتيد بمعدّل كبير. ومجموعة الريبوسومات التى ترتبط بجزئ mRNA تُسمى عديد الريبوسوم أو بولى سوم Poly-some . وتعمل الريبوسومات فى هذه الوحدة بطريقة منفصلة فكل منها يبنى سلسلة كاملة من عديد الببتيد (شكل ٢٥ ـ ١٢). وأعلى كثافة للريبوسومات على جزئ mRNA يكون حوالى ريبوسوم لكل ثمانى وحدات نيوكليوتيد، والريبوسومات القريبة من الطرف ٥َ لجزئ mRNA تكون قد كوّنت جزء صغير من سلسلة عديد الببتيد بينما تلك القريبة من الطرف ٣َ تكون قد انتهت تقريباً من بناء السلسلة.

عدد كبير من البروتينات يتم تعديلها بعد الترجمة

عد كبير من عديد الببتيد التى تتكوّن بعملية الترجمة لجزئ mRNA لاتُمثّل الناتج النهائى أو الصورة الفعّالة للبروتين، فسلسلة عديد الببتيد ربما تُعدّل بعدة طرق مختلفة بعد إنفصالها من الريبوسوم والتى تشمل:

١ ـ تُزال مجموعة الفورميل المرتبط بالمثيونين الطرفى فى بروتينات البكتريا والكائنات أولية النواة الأخرى بإنزيم deformylase، كما قد يزال أيضاً واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية فى الطرف الأمينى بواسطة إنزيمات aminopeptidase .

٢ ـ يُمكن أن تتكوّن الرابطة ثنائية الكبريتيد disulfide bond بأكسدة إثنين من الأحماض الأمينية فى سلسلة عديد الببتيد.



شكل ٢٥ ـ ١٢

رسم تخطيطى لعديد الريبوسوم (بولى سوم) . تتحرك الريبوسومات عبر mRNA فى الإتجاه ٥ ← ٣ حيث يقوم كل منها ببناء سلسلة عديد ببتيد كاملة .

٣ ـ يُمكن أن تتحور المجموعات الجانبية لبعض الأحماض الأمينية فى سلسلة عديد الببتيد، مثال ذلك إدخال مجموعات الهيدروكسيل على برولين ولايْسين فى الكولاًجين. كما تتكون الجلايكوبروتينات بإرتباط السكريات مع السلاسل الجانبية للإسباراجين وسيرين وثريونين. كذلك يتم فسفرة بعض البروتينات، كما يتم إضافة المجموعات التعويضية لبعض الإنزيمات قبل إنطواء سلسلة عديد الببتيد وتحوُّلها إلى الهيئة المجسمة ثلاثية الأبعاد.

٤ ـ من المحتمل أن تنفك سلسلة عديد الببتيد فى موضع أو أكثر، مثال ذلك تحول ناشئ الأنسولين Proinsuline إلى أنسولين.

٥ ـ فى بعض المراحل أثناء أو بعد عملية الترجمة تتحول سلسلة عديد الببتيد للبروتينات الكُرِّية globular proteins تلقائياً إلى الهيئة المجسمة ثلاثية الأبعاد النشطة بيولوجياً.

البناء الحيوى للبروتين يثبط بواسطة عدد كبير من المضادات الحيوية

نظراً لما للبناء الحيوى للبروتين من دور رئيسى فى عمليات الأيض جميعها، ولما تتميز به هذه العمليات من درجة تعقيد كبيره، فليس من الغريب أن نجد أن عدداً كبيراً من المضادات الحيوية تقوم بتثبيط عملية الترجمة (بناء البروتين). بالإضافة إلى ذلك فنظراً لإختلاف الريبوسومات البكتيرية من الناحية التركيبية عن الريبوسومات السيتوبلازمية فى الخلايا مميزة النواة فإن عديد من المضادات الحيوية تثبط بناء البروتين فى البكتريا دون التأثير على بناء البروتين فى الخلايا مميزة النواة. لذلك تستخدم المضادات الحيوية كعقاقير مضادة للبكتريا وغيرها من الكائنات أولية النواة.

أمكن التعرف على عدد كبير من المضادات الحيوية المُثبِّطة لبناء البروتين، كما أمكن أيضاً التعرُّف على ميكانيكية (آليـة) التثبيط لهذه المضادات الحيوية (جدول ٢٥ ـ ١).

جدول ٢٥ ـ ١
بعض المضادات الحيوية المثبطة لبناء البروتين فى الكائنات أولية النواة

المضاد الحيوى	فعل المضاد الحيوى
ستربتوميسين (Streptomycin)	يثبط عملية البدأ كما يحدث قراءة خاطئة للكودونات فى mRNA.
تتراسيكلين (Tetracycline)	يثبط إرتباط أمينو أسايل ـ tRNA بالموضع A فى الريبوسوم.
كلورأمفينيكول (Chloramphenicol)	يثبط نشاط إنزيم Peptidyl transferase فى الريبوسوم.
إريثروميسين (Erythromycin)	يثبط حركة الريبوسومات على mRNA.

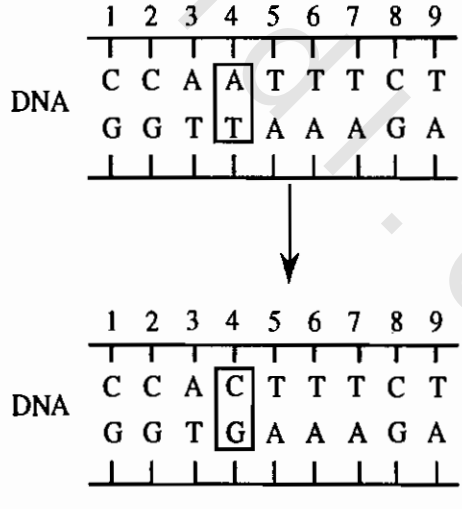
الطفرات الوراثية تنتج من التغير فى تركيب المادة الوراثية

أوضحنا فى فصل ٢٢ أن المعلومات الوراثية الممثلة فى تتابع أزواج القواعد فى جزئ

DNA يحافظ عليها بعملية التكرر ونظام تصحيح الأخطاء. مع ذلك فإن بعض الأخطاء فى إدماج القواعد وبعض التغيرات فى جزيئات DNA التى تحدث بواسطة العوامل البيئية قد تمر بدون إصلاح وتؤدى إلى تغير دائم فى جينات وكروموسومات الكائن الحى. فى هذه الحالة فإن الخلايا البنوية سوف تختلف عن الخلايا الأبوية فى تتابع القواعد فى DNA أو فى كمية DNA. وهذه التغيرات فى المادة الوراثية تعرف بالطفرات mutation.

يوجد نوعان من الطفرات: طفرات الجينات (الطفرات الجينية) gen mutations تؤثر على واحد أو عدد قليل من النيوكليوتيدات خلال الجين. أمّا النوع الثانى وهو الطفوات الكروموسومية chromosomal mutations فتؤثر على تركيب أو عدد الكروموسومات فى الخلية. ولو أنه غالباً ما يقتصر إستخدام مصطلح طفرة على التغيرات الجينية.

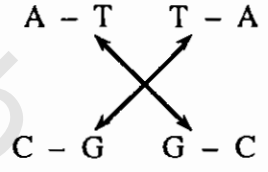
تشتمل طفرات الجينات أيضاً على نوعين من الطفرات هما طفرات الإستبدال لزوج من القواعد base-pair substitution وطفرات تغير إطار القراءة frameshift mutation. ويحدث النوع الأول نتيجة لإستبدال زوج من القواعد بزوج آخر غير صحيح (شكل ٢٥ ـ ١٣)، أو بإستبدال عدة أزواج من القواعد. ويحتوى أيضا الإستبدال الفردى لزوج



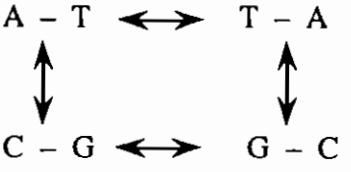
شكل ٢٥ ـ ١٣

طفرات الإستبدال لزوج من القواعد. زوج القواعد AT (رقم ٤) يتحول إلى CG.

من القواعد على نوعين: الأول هو الإستبدال المتكافئ (الإنتقالى) transition، ويتم فيه استبدال أحد البيوريبات ببيورين آخر أو أحد البيربميدينات ببريميدين آخر. أمّا النوع الثانى وهو الإستبدال غير المتكافئ (المستعرض) transversion يتم فيه إستبدال بيورين ببريميدين أو بيريميدين ببيورين.

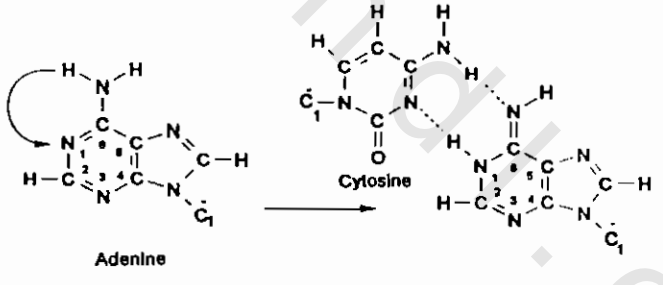


الاستبدال المتكافئ



الاستبدال غير المتكافئ

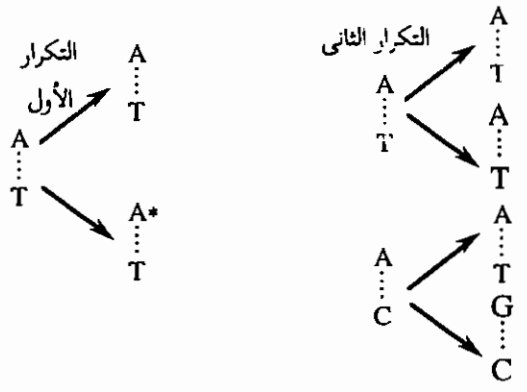
والإستبدال المكتافئ يمكن أن يحدث تلقائياً كما إقترح واطسون وكريك. فقد لاحظاً أن ذرات الهيدروجين فى القواعد يمكن أن تغير مواضعها فى نفس القاعدة مكونة صور مترددة tautomeric Forms الذى يكون إحتمال تكوينها صغير جداً. وهذه الصور المترددة النادرة يمكن أن تكوّن أزواج قواعد غير A-T , G-C، مثال ذلك أن صورة الإيمينو المترددة imino tautomer للأدنين يمكن أن تزدوج مع السايتوزين (شكل ٢٥ ـ ١٤).



شكل ٢٥ ـ ١٤

الصورة المترددة النادرة للأدنين تزدوج مع السايتوزين بدلا من الثايمين. وهذه الصورة المترددة سوف تتكون بانتقال بروتون من مجموعة الأمينو المرتبطة بذرة الكربون السادسة إلى ذرة النتروجين رقم واحد (N_1).

وفى الدورة التالية للتكرر فإن الأدنين فى الصورة المترددة الطبيعية سوف يزدوج مع الثايمين، بينما السايتوسين سوف يزدوج مع الجوانين. وعلى ذلك فإن أحد جزيئات DNA البنوية سوف يحتوى على زوج القواعد G - C بدلاً من زوج القواعد A - T (شكل ٢٥ ـ ١٥).

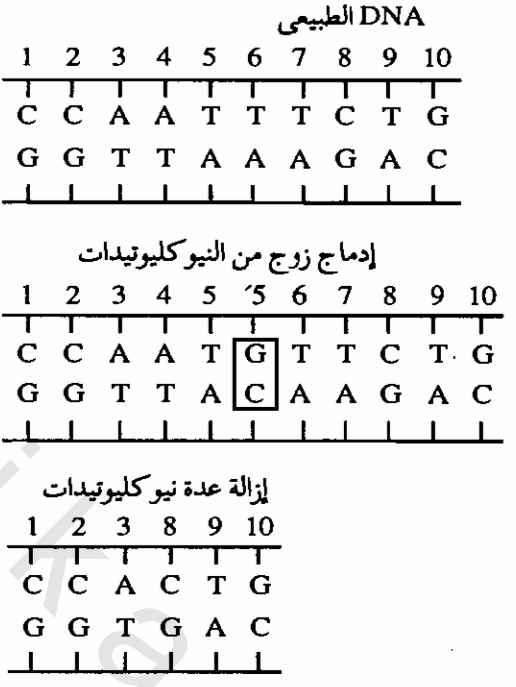


شكل ٢٥ ـ ١٥

إزدواج الصورة المترددة النادرة للأدنين (A*) مع الساتيوسين يؤدى إلى تكوين زوج القاعدة G-C فى الجيل التالى.

وطفرات استبدال زوج من القواعد سوف تؤدى إلى تغير كودون فى الجين التى تحدث فيه، وهذا بدوره قد يؤدى إلى إستبدال حمض أمينى واحد بحمض أمينى آخر فى سلسلة عديد الببتيد التى تشفر بهذا الجين. وإستبدال حمض أمينى بآخر غالبا لاينتج عنه تغير ملموس فى الخواص البيولوجية للبروتين، ومثل هذه الطفرات يطلق عليها الطفرات الصامتة silent mutations. فى بعض الحالات الأخرى مع ذلك قد يكون للحمض الأمينى المستبدل تأثيراً كبيراً بحيث يصبح البروتين غير نشط بيولوجياً، ومثل هذه الفطرات غالبا ما تكون مميتة lethal للخلية.

طفرات تغير إطار القراءة تنتج من إضافة addition أو حذف deletion زوج أو أكثر من النيوكليوتيدات فى الجين (شكل ٢٥ ـ ١٦). والنتيجة الطبيعية لهذا النوع من الطفرات هو تغير إطار قراءة الكودونات من موضع الإضافة أو الحذف وبذلك فإن سلسلة عديد الببتيد الناتجة تحتوى على تتابع صحيح للأحماض الأمينية حتى موضع الطفرة، ولكنها تحتوى على تتابع مختلف كلية للأحماض الأمينية بعد هذا الموضع. وفى مثل هذا النوع من الطفرة غالبا ماينتج بروتين طافر يختلف بدرجة كبيرة فى محتواه من الأحماض الأمينية عن البروتين الطبيعى، ويكون البروتين الطافر فى هذه الحالة غير نشط بيولوجياً.



شكل ٢٥ ـ ١٦
طفرات تغيير إطار القراءة التى تنتج من إضافة أو حذف زوج أو أكثر من النيوكليوتيدات فى الجين.

الريبوسومات المرتبطة بالشبكة الإندوبلازمية تبنى بروتينات الغشاء والبروتينات المفرزة خارج الخلية

فى الخلايا مميزة النواة تتواجد بعض الريبوسومات فى صورة حرة فى السائل الخلوى cy-tosol، بينما البعض الآخر يكون مرتبط بنظام غشائى يعرف بالشبكة الأندوبلازمية en-doplasmic reticulum (ER). والجزء من الشبكة الإندوبلازمية المرتبط بالريبوسومات يعرف بالشبكة الإندوبلازمية الخشنه rough ER نظراً لمظهرها المحبب (شكل ٢٥ ـ ١٧)، بالمقارنة بالشبكة الإندوبلازمية الملساء smooth ER التى تكون مجردة من

شكل ٢٥ ـ ١٧

صورة بالمجهز الإلكترونى للشبكة الإندويلازمية الخشنة.

الريبوسومات. ومن الثابت أن كل البروتينات المفرزة خارج الخلية المعروفة تبنى بواسطة الريبوسومات المرتبطة بالشبكة الإندوبلازمية. والريبوسومات المرتبطة بهذا النظام الغشائى تبنى أيضاً عدداً كثيراً من بروتينات الغشاء البلازمى وأغشية بعض العضيات مثل الليسوسومات lysosomes. والشبكة الإندوبلازمية الخشنة بعكس الشبكة الإندوبلازمية الملساء تحتوى على إثنين من البروتينات الغشائية يطلق عليها ريبوفورينات ribophorins اللذان يتفاعلا بصورة متخصصة مع الوحدة الريبوسومية الكبيرة.

ولقد أدى إكتشاف الشبكة الإندوبلازمية الخشنة ودورها فى بناء بروتينات الغشاء والبروتينات المفرزة خارج الخلية إلى ظهور ثلاثة أسئلة تتعلق بابتناء ومسار البروتينات التى تتكون بواسطة الريبوسومات المرتبطة بالشبكة الإندوبلازمية، ألا وهى:

١ ـ هل هناك صنفين من الريبوسومات ـ أحدهما حر فى السائل الخلوى والآخر مرتبط بغشاء الشبكة الإندوبلازمية ـ أو أن كل الريبوسومات فعلياً صنف واحد؟. وإذا كان هناك صنف أو نوع واحد من الريبوسومات، فما الذى يحدد ما إذا كان ريبوسوم ما يتواجد فى صورة حرة أو مرتبط بالشبكة الإندوبلازمية الخشنة؟.

٢ ـ كيف يُمكن لسلسلة عديد الببتيد المبتنية حديثاً الناشئة من الريبوسومات المرتبطة أن

تعبر حاجز النفاذية (الغشاء) للشبكة الإندوبلازمية الخشنة؟. مثال ذلك أن البروتنيات المفرزة مثل مولّدات الإنزيمات (زيموجينات) البنكرياسية قد وجدت داخل تجويف الشبكة الإندوبلازمية بعد ابتنائها مباشرة.

٣ ـ ما الذى يحدد المستقر الأخير لأماكن وجود البروتينات التى تُبنى بواسطة الريبوسومات المرتبطة؟. فبعض البروتينات تصدر إلى خارج الخلية والبعض الآخر يُوجّه إلى داخل الخلية. كما أن بعض البروتينات التى تبنى بواسطة الشبكة الإندوبلازمية الخشنة تدخل فى بناء الأغشية البلازمية والأغشية داخل الخلية حيث تُمثل جزءاً متكاملاً فى بنية الغشاء.

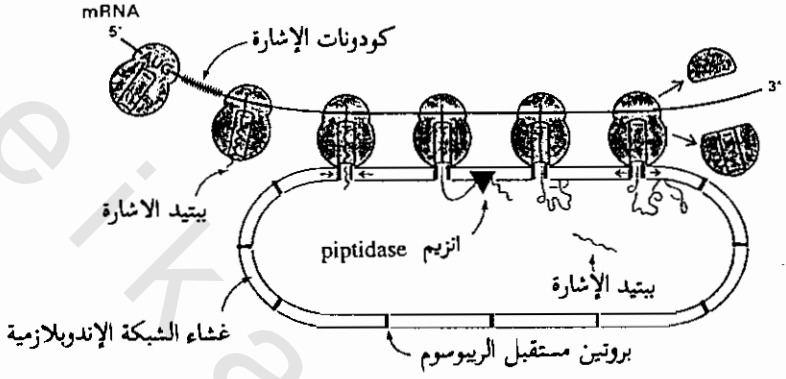
الخلايا مميزة النواة تحتوى على نوع واحد من الريبوسومات

أمكن الإجابة على السؤال الأول من الدراسات التى أجريت على أنشطة بناء البروتينات بواسطة الريبوسومات فى الأنظمة الخالية من الخلايا cell-free systems. فقد تم فصل الريبوسومات الحرة من السائل الخلوى ثم أضيفت إلى أغشية الشبكة الإندوبلازمية الخشنة التى جُرّدت من ريبوسوماتها. وهذا النظام المشكل من جديد وجد أن له القدرة على بناء البروتينات المفرزة عندما أُمدّ بجزيئات mRNA المناسبة والعوامل الذائبة الأخرى. وبطريقة مماثلة وجد أيضاً أن الريبوسومات المفصولة من الشبكة الإندوبلازمية الخشنة تكون نشطة تماماً فى بناء البروتينات التى تحرر إلى السائل الخلوى. بالإضافة إلى ذلك فإنه لم يكتشف أية إختلافات تركيبية بين الريبوسومات الحرة والريبوسومات المعزولة من الشبكة الإندوبلازمية الخشنة. ويتضح من ذلك أن الريبوسومات المرتبطة والريبوسومات الحرة هى حقيقة نوع واحد، وأن الذى يحدد ما إذا كان ريبوسوم ما يكون حراً أو مرتبطاً بالشبكة الإندوبلازمية يعتمد على نوع البروتين الذى تقوم ببنائه.

تتابعات الإشارة تُمكّن البروتينات المفرزة من عبور غشاء الشبكة الإندوبلازمية

السؤال الآن ـ ماهى العلامة التى توجد على البروتين المبنى حديثاً التى تحدد ما إذا كان الريبوسوم المُشيّد لهذا البروتين يكون حراً فى السائل الخلوى أو مرتبطاً بالشبكة

الإندوبلازمية الخشنة. فى عام ١٩٧٠ إقترح كل من David Sabatini و Gunter Blobel أن علامة أو إشارة الربط عبارة عن تتابع من الأحماض الأمينية يقع بالقرب من الطرف الأمينى لسلسلة عديد الببتيد المبتنية حديثاً. ونظرية الإشارة signal hypothesis هذه (شكل ٢٥ ـ ١٨) دُعِّمت بعد ذلك بالنتائج التى تحصَّل عليها كل من Cesar



شكل ٢٥ ـ ١٨

نظرية الإشارة لبناء بروتينات الغشاء والبروتينات المفرزة. فى هذا النموذج فإن تتابع الإشارة الذى يوجد فى الطرف الأمينى لسلسلة عديد الببتيد المبتنية حديثا يربط الريبوسوم بغشاء الشبكة الإندويلازمية. ثم بعد ذلك يُستوْصل تتابع الإشارة بواسطة إنزيم Peptidase الذى يوجد فى جانب تجويف الشبكة الإندويلازمية.

Milstein و George Brownlee، فقد وجدا أن سلسلة الإيمينوجلوبين التى تُبنى خارج الخلية بواسطة الريبوسومات الحرة تحتوى على تتابع إضافى من عشرين حمضاً أمينياً فى جانب الطرف الأمينى، بينما لاتوجد فى البروتين المبنى فى الخلية. ثم وجد بعد ذلك أن كل البروتينات المفرزة الأساسية من البنكرياس تحتوى على تتابع إضافى فى الطرف الإمينى من حوالى ٢٠ حمض أمينى عند بنائها خارج الخلية بواسطة الريبوسومات الحرة. ومعروف فى الوقت الحاضر تتابع الإشارة لعدد كبير من البروتينات المفرزة، وطول هذا التتابع يتراوح مابين ١٥ إلى ٣٠ حمض أمينى الذى يكون أغلبها من الأحماض

الأمينية غير القطبية. ويمكن تلخيص العناصر الأساسية فى نظرية الإشارة (شكل ٢٥ ـ ١٨) فى النقاط التالية:

١ ـ جزيئات mRNA التى تُشفِّر للبروتينات المفرزة خارج الخلية أو بروتينات الغشاء تحتوى على تتابع معين من الكودونات يلى مباشرة كودونات البدء يطلق عليها كودونات الإشارة signal codons.

٢ ـ ترجمة جزيئات mRNA تبدأ بواسطة ريبوسومات حرة (غير مرتبطة بغشاء الشبكة الإندوبلازمية) التى تبنى أولا تتابع الإشارة للأحماض الأمينية المقابلة لكودونات الإشارة.

٣ ـ نشوء تتابع الإشارة من الريبوسوم تستحث إرتباط الريبوسوم بغشاء الشبكة الإندوبلازمية وكذلك تكوين ثقب عبر الغشاء يحيط بتتابع الإشارة.

٤ ـ وبإستمرار الترجمة فإن سلسلة عديد الببتيد الناتجة تدفع خلال الثقب إلى تجويف الشبكة الإندوبلازمية الخشنة، بينما يتم إزالة تتابع الإشارة بواسطة إنزيم peptidase قبل إنتهاء الترجمة.

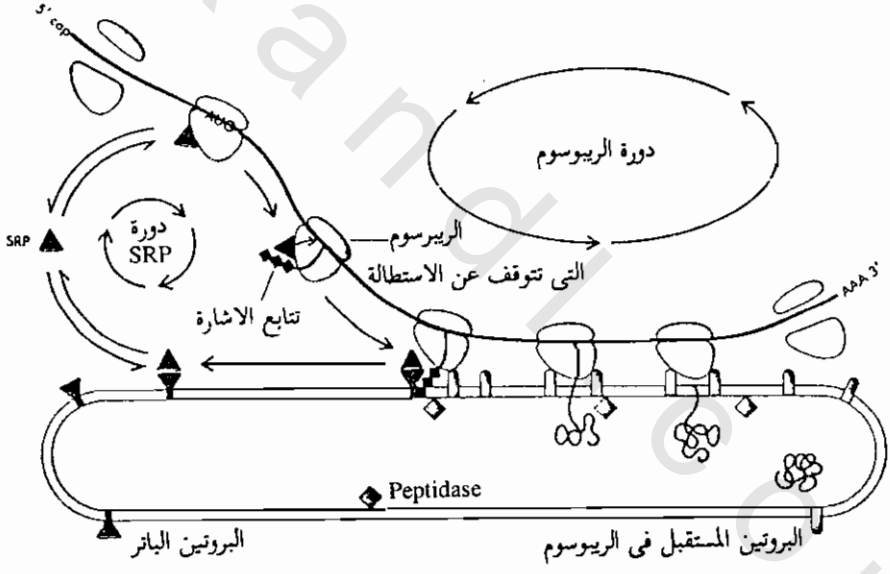
٥ ـ إنتهاء الترجمة يؤدى إلى تحرير البروتين فى تجويف الشبكة الإندوبلازمية الخشنة وغلق الثقب وإنفصال وحدات الريبوسوم من mRNA وبالتالى من الغشاء.

والسمة المميزة لميكانيكية نظرية الإشارة هو أن نقل سلسلة عديد الببتيد عبر غشاء الشبكة الإندوبلازمية يكون مزدوج مع عملية الترجمة. من ناحية أخرى نجد أن بعض البروتينات يمكن أن تعبر غشاء الشبكة الإندوبلازمية بعد إنتهاء بنائها. مثال ذلك أن معظم بروتينات الميتوكوندريا والكوروبلاست تُشفَّر بواسطة الجينات النووية وتبنى بواسطة الريبوسومات الحرة. وهذه البروتينات تتحرر إلى السائل الخلوى ثم تعبر بعد ذلك غشاء الشبكة الإندوبلازمية، ومعنى ذلك أن نقل هذه البروتينات يكون بعد الترجمة وليس أثناء الترجمة. ومما هو مثير للإنتباه أن بروتينات الميتوكوندريا والكوروبلاست مثل البروتينات المفرزة تحتوى على تتابع من الأحماض الأمينية فى الطرف الأمينى الذى يزال بعد عبورها غشاء الشبكة الإندوبلازمية.

جسيمات إشارة التعارف تعمل كمنظّمات سلبية لترجمة البروتينات المفرزة

تم فى الآونة الأخيرة اكتشاف معقد من RNA ـ بروتين الذى يلعب دوراً مهماً فى تنظيم ترجمة البروتنيات المفرزة وضمان تعارفها مع غشاء الشبكة الإندوبلازمية. ولقد سمى هذا المعقد بجسيم إشارة التعارف signal recognition particle (SRP) نظراً لإرتباطة المتخصص مع تتابع الإشارة للبروتينات المفرزة حديثة التكوين. يتألف SRP من RNA (حوالى ٣٠٠ نيوكليوتيد) وستة بروتينات مختلفة تتراوح أوزانها مابين ٩ إلى ٧٢ كيلو دالتون.

والسمة المميزة لطريقة عمل SRP هو قدرتها على الإرتباط مع الريبوسومات ووقف بناء البروتين (شكل ٢٥ ـ ١٩). ويتم وقف الترجمة ليس عند البدء، ولكن عندما



شكل ٢٥ ـ ١٩

وظيفة جسيم إشارة التعارف (SRP) والبروتين الباتر فى نقل البروتينات عبر الشبكة الإندوبلازمية.

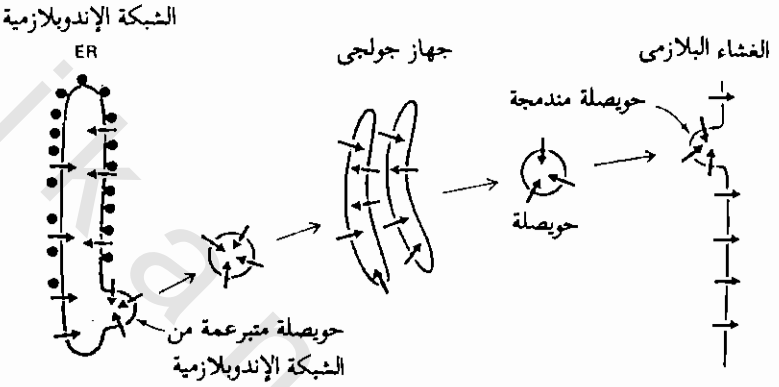
يكون طول سلسلة عديد الببتيد المتولدة حوالى ٧٠ حمض أمينى. ولايقوم SRP بوقف الترجمة لكل جزيئات mRNA ولكنه يعمل بصورة متخصصة مع تلك التى تُشفِّر للبروتينات المفرزة. ويمكن عكس وقف الترجمة فقط عندما يتلامس SRP مع البروتين الباتر docking protein (٧٢ كيلو دالتون) وهو أحد بروتينات الشبكة الإندوبلازمية المتكاملة. ثم بعد ذلك ينتشر SPR بعيداً لبدء نقل سلسلة عديد ببتيد جديدة.

إن نشاط SRP كمنظم سلبى للترجمة له دلالة بيولوجية مهمة. فعدد كبير من البروتينات المصدَّرة بواسطة خلايا الثدييات هى إنزيمات مفككة (مثل إنزيمات nuclease و protease)، والوجود العرضى لهذه الإنزيمات فى السيتوبلازم يحدث دمار (تحطيم) للخلية التى تكوِّنها. وبوقف الترجمة لهذه الإنزيمات فى منتصف الطريق، فإن SRP يضمن عدم إتمام الترجمة إلا بعد أن يصبح الغشاء الصحيح (الذى يتم خلاله عبور البروتين) متاحاً.

البروتينات المتكونة على الشبكة الإندوبلازمية الخشنة تُوجَّه إلى مواضع تواجدها خلال جهاز جولجى

يبنى على الشبكة الإندوبلازمية الخشنة أنواع مختلفة من البروتينات التى تشمل البروتينات التى تدخل فى تركيب الأغشية والبروتينات التى تؤدى وظائفها خارج الخلية مثل بعض الإنزيمات وبروتينات بلازما الدم وبعض الهورمونات البروتينية والأجسام المضادة. وعدد كبير من هذه البروتينات يتم تحويلها إلى جلايكوبروتينات glycopro-teins بإرتباطها بوحدات كربوهيدراتية فى تجويف الشبكة الإندوبلازمية الخشنة. وفى معظم الحالات يتم هذا التحوُّل بإرتباط أليجوسكرِّيد مع السلسلة الطرفية للإسباراجين فى البروتين، وفى حالات قليلة يكون إرتباط الأليجوسكَّريد مع البروتين عن طريق السيرين والثريونين. تنقل البروتينات بعد ذلك من تجويف الشبكة الإندوبلازمية إلى جهاز جولجى golgi apparatus بواسطة حويصلات Vesicles تحتوى على البروتين بداخلها والتى تندمج مع جهاز جولجى (شكل ٢٥ ـ ٢٠). وهذه الحويصلات تنقل أيضاً بروتينات الغشاء إلى الغشاء البلازمى وإلى الليسومات lysosomes وإلى الأماكن الخلوية المختلفة.

بالإضافة إلى ذلك فإن هذه الحويصلات تحمل البروتينات والليبيدات من الغشاء البلازمى إلى الأغشية الداخلية. وعلى ذلك فإن الحويصلات تلعب الدور الأساسى فى نقل البروتينات من موضع خلوى إلى موضع خلوى آخر. وفى جهاز جولجى يتم أيضاً تكملة معالجة الجلايكوبروتينات بإضافة وحدات سكر إضافية، ثم تصنَّف البروتينات فى جهاز جولجى وتُرسل إلى مواضعها النهائية. ولكن كيف تُصنَّف البروتينات فى جهاز جولجى وتُوجَّه إلى مواضعها المناسبة؟ فإن الإجابة غير معروفة فى الوقت الحالى.



شكل ٣٥ ـ ٢٠

نقل بروتينات الغشاء البلازمى والبروتينات المفرزة من الشبكة الإندوبلازمية إلى الغشاء البلازمى.

البروتينات الخلوية تُهدم وتستبدل ببروتينات حديثة التكوين

إن الجزيئات الخلوية تكون خاضعة بصورة مستمرة للتجديد. مثال ذلك تتفكك البروتينات بصورة مستمرة إلى وحداتها البنائية من الأحماض الأمينية وتستبدل ببروتينات حديثة التكوين. فنجد أن فترة نصف عمر بروتينات كبد الفأر تكون حوالى يوم واحد، ولبروتينات المخ والعضلات تكون ٣ و ٦ أيام على التوالى،بينما فتره نصف عمر بعض الإنزيمات تكون ساعة أو ساعتين. وفى البكتريا وجد أن البروتينات المُنظَّمة تتفكك بصورة تامة خلال عدة دقائق من بنائها.

والنظرة الأولى قد تُوحى أن التفكك المستمر لبروتينات الخلية يُمثّل عملية تبديد عالية، إلا أن التفكير المنطقى يستدعى أن تمد هذه العملية الكائن بميزة إنتقائية واضحة. ومن الثابت فى الوقت الحاضر أن تجديد البروتينات الخلوية هى عملية على درجة كبيرة من الأهمية، وذلك لأنها: (١) تُنظّم مستوى الإنزيمات فى الخلية (٢) تحمى الكائن من تراكم البروتينات غير الطبيعية (٣) تتحكم فى كتلة الأنسجة و (٤) رفع كفاءة الكائن على التأقلم مع ظروف التغذية الفقيرة.

والدليل الأول عن الحالة الحركية (الديناميكية) لمكونات الخلية ظهر فى أوائل الأربعينات عندما استخدمت الأحماض الأمينية المعلمة بالنظائر المشعة بواسطة Schoen-heimer و Borsook. إلا أن أهميه هذه الظاهره لم تتضح بصورة كاملة إلا فى السبعينات بعد أن تجمعت معلومات كافية عن المسارت الأيضية وميكانيكية تنظيم هذه العملية.

تفكك البروتينات والتحكم فى مستوى الإنزيمات

تُزال البروتينات الخلوية الطبيعية بمعدّل يعتمد على تماثل جزيئاتها. كما يُزال بروتين ما بحركيات الرتبة الأولى First order kinetics، والذى يشير أن إختيار الجزيئات التى تهدم يتم بصورة عشوائية وليس إعتماداً على عمرها. ومعدّل التفكك بحركيات الرتبة الأولى يميز بفترة نصف العمر half - life ($t_{1/2}$) وهى عبارة عن الوقت اللازم لتفكك ٥٠٪ من جزيئات المادة. وفترة نصف العمر للإنزيمات المختلفة فى الأنسجة تختلف إختلافا جوهريا كما هو موضح بجدول (٢٥ ـ ٢). والشئ الملفت للنظر أن الإنزيمات سريعة التفكك هى تلك التى تتواجد فى مواضع التحكم الأيضى المهمة، بينما الإنزيمات التى يكون معدّل تفككها بطئ يكون لها نشاط أيضى ثابت تحت الظروف الفسيولوجية المختلفة.

مستوى بروتين ما فى الخلية يتحدد بالتوازن بين معدّل بنائه ومعدّل إنحلاله، لذلك فإن الإختلافات الضمنية فى معدّلات التفكك للبروتينات المختلفة قد تكون أحد الوسائل المهمة فى تنظيم مستوى الإنزيمات. فالمعدّل العالى للتفكك يُشارك مع إنخفاض معدّل

البناء فى الإسراع من خفض تركيز الإنزيم، من ناحية أخرى فإن تركيز الإنزيمات التى لها فترة نصف حياة صغيرة يمكن أن يرتفع إلى مستوى جديد عندما يزيد معدّل بنائه.

جدول ٢٥ ـ ٢
فترة نصف الحياة لبعض إنزيمات كبد الفأر

الإنزيم	فترة نصف الحياة (ساعة)
الإنزيمات سريعة التفكك	
Ornithin decarboxylase	,٢
RNA Polymerase I	١,٣
Tyrosine aminotronsferase	٢
Serine hydratase	٤
Phosphoenol Pyruvate Carboxylase	٥
الإنزيمات بطيئة التفكك	
Aldolase	١١٨
Cytochrom b	١٣٠
Lactic dehydrogenase (isoenzyme 5)	١٤٤
Cytochrom C	١٥٠
β - Glucoronidase	٢٤٠

ولقد أمكن ملاحظة تغيرات فى فترة نصف العمر لبعض الإنزيمات تحت الظروف الفسيولوجية المختلفة. ففى عدد من الحالات لوحظ إنخفاض معدّل التفكك للإنزيم عند تواجد العامل المساعد Cofactor أو المادة الخاضعة. فإنخفاض التفكك بذاته قد يؤدى إلى زيادة مستوى الإنزيم حتى فى غياب أى تغير فى معدّل بنائه. مثال ذلك وجد أن فترة نصف العمر لإنزيم tryptophan oxygenase تطول فى وجود المادة الخاضعة وهى التربتوفان والعامل المساعد الهيم. وهناك من الأمثلة العديدة التى تم إكتشافها حيث تعمل المواد الخاضعة والعوامل المساعدة على تثبيت البروتين تجاه التفكك الخلوى. ومن الناحية

الفسيولوجية فإن هذا التأثير يضمن تركيز مرتفع من الإنزيم عند تواجد المادة الخاضعة بكمية كبيرة. ولقد تم إكتشاف ظاهرة أخرى لإنزيم glytamine synthase حيث وجد أن الناتج النهائى للتفاعل وهو الجلوتامين يزيد من معدّل تفكك الإنزيم ويخفض تركيزه، وفى هذه الحالة فإن الجلوتامين يثبط معدّل تكوينه الذاتى. وبالرغم من أن تعميم هذا النوع من التحكم مازال غير واضح، إلا أنه ربما يُمثّل ميكانيكية مفيدة فى تنظيم مستوى الإنزيمات.

وهناك من الأدلّة العديدة فى الوقت الحالى ما يشير إلى أن الإختلافات فى درجة ثبات البروتينات المختلفة يتحدد بدرجة كبيرة بإختلافها فى هيئتها البنائية conformation. كما أن فحص عدد كبير من البروتينات السيتوبلازمية المعروف أن لها فترة نصف عمر طويلة أوضحت احتواء هذه البروتينات على تتابع ثبات (إستقرار) stablizing sequence من المثيونين ـ سيرين ـ ألآنين ـ ثريونين ـ ڤالين ـ جليسين (أو سستئين) عند الطرف الأمينى. مع ذلك فإن هناك دلالة واضحة على أن تتابعات أو إشارات أخرى معقدة تكون مهمة فى إنتقاء البروتين الذى سيتفكك.

التفكيك الإنتقائى للبروتينات غير الطبيعية

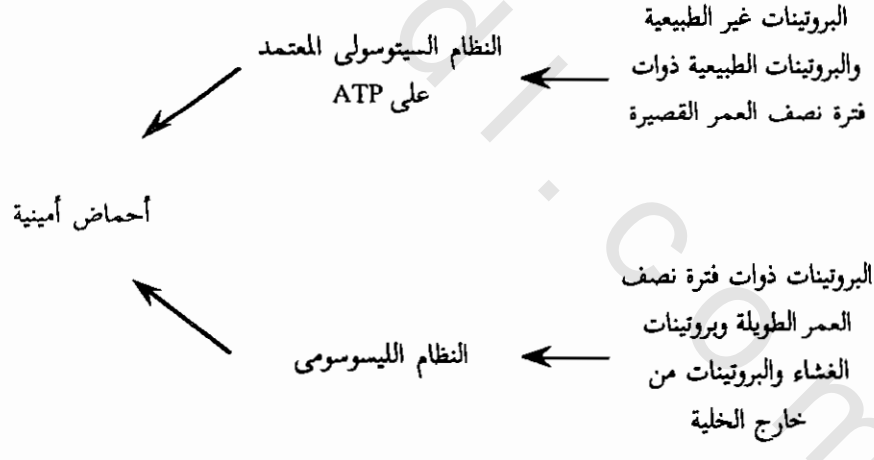
أحد الوظائف الأساسية لتفكك البروتينات الخلوية فى خلايا الحيوانات والبكتريا هو حماية الكائن من تراكم البروتينات الخلوية ذوات الهيئة البنائية غير الطبيعية. وهذه العملية تُمثّل بذلك نوع من نظام الوقاية (التصحاح) sanitation system الخلوى التى تمنع تراكم عديد الببتيد المتغيرة (المدنترة denatured) جزئيا التى تكون ضارة للكائن. ويعتبر هذا النظام الوقائى مهماً بصورة خاصة فى الكائنات عديدة الخلايا مثل الإنسان التى تنقسم خلاياها بمعدّل بطئ أو لاتنقسم على الإطلاق وبذلك لايحدث تخفيف لتركيز هذه الببتيدات المتغيرة بواسطة إنقسام الخلية.

كل من الخلايا البكتيرية والحيوانية تفكك أيضا البروتينات ذوات التركيبات المتغيرة التى تنشأ كنتيجة لبعض الطفرات. مثال ذلك أن الهيموجلوبين الذى يحتوى على مشابه الڤالين (α ـ أمينو ـ β ـ كلوروبيوترات) فى مواضع الڤالين تكون فترة نصف عمره فى

الخلايا الشبكية reticulocyte حوالى ١٠ دقائق، بينما الهيموجلوبين الطبيعى يبقى فترة عمره التى تبلغ ١٢٠ يوم. نجد أيضا فى بكتريا القولون أن إنزيم β-galoctosidase الذى يفتقد إلى جزء من السلسلة الببتيدية من الطرف الأمينى نتيجة للطفرة nonsense mutation يتفكك بفترة نصف عمر تبلغ عدة دقائق بينما الإنزيم الطبيعى يكون ثابتا فى هذه الخلايا.

الخلايا مميزة النواة تحتوى على اثنين من أنظمة تفكك البروتين

تحتوى الخلايا مميزة النواة على نظامين لتفكك البروتين: النظام الليسوسومى lysosomal system ويقتصر وجوده على الخلايا مميزة النواة ويقوم بتفكك البروتينات ذوات فترة نصف العمر الطويلة وبروتينات الغشاء والبروتينات من خارج الخلية. أما النظام الثانى وهو النظام السيتوسولى المعتمد على ATP (ATP - dependent cytosolically system) فيوجد فى كل من الخلايا مميزة النواة وخلايا البكتريا ويقوم بتفكك البروتينات الطبيعية ذوات فترة نصف العمر القصيرة والبروتينات غير الطبيعية (شكل ٢٥ ـ ٢١).



شكل ٢٥ ـ ٢١

مسارات تفكك البروتين فى خلايا الثدييات.

الليسوسومات تفكك البروتينات بطريقة غير انتقائية

الليسوسومات lysosomes عبارة عن عضيّات فجوية محاطة بغشاء وتحتوى بداخلها على حوالى ٥٠ إنزيم من الإنزيمات التى تقوم بعملية التفكك المائى لأنواع مختلفة من الجزيئات الخلوية الكبيرة، من بينها أنواع مختلفة من إنزيمات تفكك البروتينات المعروفة بإسم كاسيبسين cathepsins. وتحافظ الليسوسومات على رقم هيدروجينى حامضى (حوالى ٥) بداخلها والذى يُمثّل الرقم الهيدروجينى الأمثل لمحتوياتها الإنزيمية. وتحوُّل الرقم الهيدروجينى الأمثل للإنزيمات الليسوسومية إلى الجانب الحامضى ربما يعمل على حماية الخلية من التسرُّب العرضى لهذه الإنزيمات الذى يُثبط نشاطها خارج الليسوسوم حيث يكون الرقم الهيدروجينى السائد فى السائل الخلوى (السيتوسول) حوالى ٦,٨.

تقوم الليسوسومات بتفكك المكونات الخلوية مثل البروتينات بإندماجها مع أجزاء صغيرة من السيتوبلازم أو بقايا العضيّات الأخرى المراد هضمها مُكوِّنة ما يُعرف بالفجوات ذاتية الإلتهام autophagic vacuole، حيث يتم هضم أو تفكيك البروتينات بواسطة إنزيمات الليسوسوم. وتقوم الليسوسومات بطريقة مشابهة أيضا بتفكك البروتينات ذات المصدر الخارجى التى تدخل الخلايا عن طريق البلعمة الداخلية endocytosis.

ولقد أمكن التعرُّف على دور الليسوسومات فى تفكك البروتينات الخلوية بإستخدام المثبطات الليسوسومية. مثال ذلك نجد أن المركبات القاعدية الضعيفة مثل كلوروكوين chloroquine والأمونيا تنفذ بسهولة إلى داخل الليسوسوم وترفع من قاعدية المحلول الليسوسومى الداخلى. وبمعاملة خلايا الثدييات بهذه المركبات وجد أنها تخفض المعدَّل الإجمالى لتفكك البروتين. كما أن معاملة خلايا الثدييات ببعض المضادات الحيوية مثل أنتيبان antipain التى تثبط إنزيمات الكاسيبسين أعطت نفس التأثير. ولقد أظهر إستخدام هذه المثبطات أن تفكك البروتينات بواسطة الليسوسوم لايكون انتقائى. فهذه المثبطات لا تؤثر على تفكك الإنزيمات التى لها فترة نصف عمر قصيرة، كما أنها لا تؤثر على تفكك البروتينات الطبيعية، ولكنها تخفض بدرجة ملحوظة تفكك البروتين عندما يكون الأيض الهدمى هو السائد فى الخلايا مثل ظروف التجويع. ويبدو من ذلك أن النظام الليسوسومى يفكك البروتينات بطريقة غير إنتقائية، كما إنه من الثابت أيضا أن تفكك

البروتينات بهذا المسار يزداد فى بعض الحالات المرضية، لذلك فإن هناك إمكانية فى إستخدام المثبطات الليسوسومية كعقاقير فى عدد من أمراض الإنسان التى تكون مصحوبة بزيادة فى تفكك البروتين مثل مرض فقد العضلات muscle wastage.

النظام السيتوسولى المعتمد على ATP يفكك البروتينات بطريقة إنتقائية

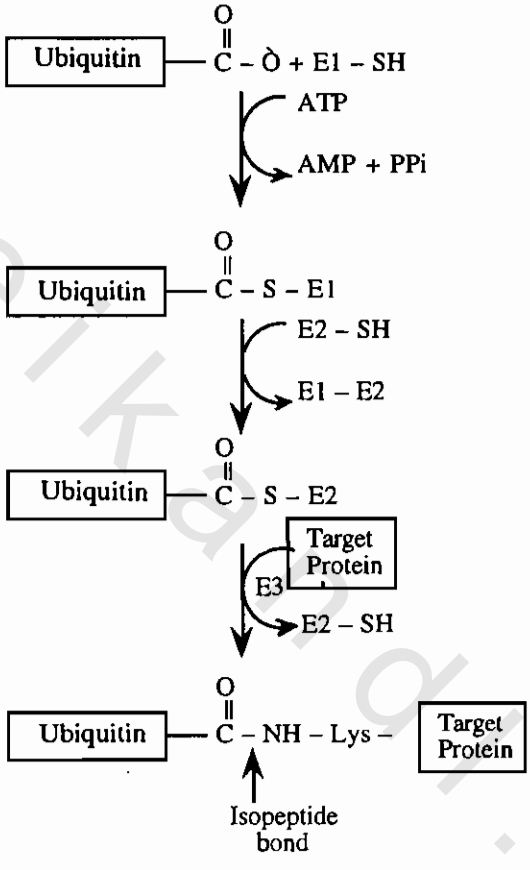
كان هناك إعتقاد سائد حتى تاريخ قريب أن النظام الليسوسومى فى الخلايا الحيوانية هو النظام الوحيد أو على الأقل النظام الأولى لتفكك البروتينات الخلوية. إلا أن وجود بعض الخلايا (مثل خلايا الدم الحمراء وبكتريا القولون) التى لا تحتوى على ليسوسومات ومازال لها القدرة على تفكيك البروتينات غير الطبيعية دلّل على وجود نظام تفكك آخر.

وفى أوائل السبعينات تمكن جولدبيرج Goldberg وزملاؤه من تحضير نظام خالى من الخلايا من بكتريا القولون ومن الخلايا الشبكية retlculocyte ومن الميتوكوندريا، وهذا النظام له القدرة على تفكيك البروتين إنتقائيا بصورة مماثلة للخلايا السليمة والذى أظهر إحتياجه إلى ATP. والدراسات التى أجريت بعد ذلك على الخلايا الشبكية أوضحت أن بروتين أبى كويتن ubiquitin الذى لم يكن معروف له وظيفة من قبل يكون ضرورياً لنظام التفكك المعتمد على ATP. ويتألف هذا البروتين من سلسلة عديد ببتيد فردية ويحتوى على ٧٦ حمض أمينى وأظهر تماثل بين الكائنات المختلفة مثل الإنسان والضفدع والدروسوفيلا، ويختلف فقط فى ثلاثة أحماض أمينية عن ذلك الموجود فى الخميرة.

والبروتينات التى تُنتقى للدخول فى عملية التفكك ترتبط تساهميا ببروتين أبى كويتن. وهذه العملية التى تماثل تنشيط الأحماض الأمينية تتم فى ثلاثة خطوات (شكل ٢٥ ـ ٢٢):

١ ـ فى تفاعل يحتاج إلى ATP، ترتبط مجموعة الكربوكسيل الطرفية فى أبى كويتن خلال رابطة استرثيول thioester bond مع الإنزيم المُنشِّط لأبى كويتن ubiquitin activating enzyme (E1) -، الذى يبلغ وزنه ١٠٥ كيلو دالتون ويحتوى على وحدتين فرعيتين متماثلتين.

٢ ـ ينتقل أبى كويتن بعد ذلك إلى مجموعة السلفهيدريل لأحد البروتينات الصغيرة العديدة (يبلغ وزنها ٢٥ ـ ٧٠ كيلو دالتون) التى تسمى البروتينات الحاملة لأبى كويتن ubiquitin carrier proteins (E2's).



شكل ٢٥ ـ ٢

التفاعلات المتضمنة فى إرتباط أبى كويتن مع البروتين الذى سيتم تفككه. فى الخطوة الأولى ترتبط مجموعة الكربوكسيل الطرفية فى أبى كويتن خلال رابطة إسترثيول مع E1 فى تفاعل يُدفع بتحلل ATP. وأبى كويتن المنشّط ينقل فى الخطوة التالية إلى مجموعة السلفهيدريل فى E2، ثم يُنقل بعد ذلك فى تفاعل يُحفز بـ E3 إلى مجموعة الأمينو إبسلون (ε) فى الليسين على البروتين الذى سيتم تفككه، وبذلك يعلم البروتين الذى يتم تفككه بواسطة UCDEN.

٣ ـ وأخيرا فإن إنزيم Ubiquitin - Protein ligase (E3) ينقل أبى كويتن المُنشَّط من E2 إلى مجموعة الأمينو إيسلون (ε) للحمض الأمينى ليسين فى البروتين المراد تفككه مُكوناً بذلك رابطة ببتيدية مشابهة isopeptide bond. ويبدو من ذلك أن E3 يلعب الدور الأساسى فى إنتقاء البروتين الذى سيتم تفككه. وعادة ما ترتبط عدة جزيئات أبى كويتن مع البروتين. والبروتين المرتبط بأبى كويتن يتم تفككه بعملية تعتمد على ATP بواسطة متراكب بروتينى يعرف بالإنزيم المفكك للبروتينات المزدوجة بأبى كويتن Ubiquitin - Conjugate degrading Enzyme (UCDEN)، وهذا الإنزيم المفكك للبروتينات يفكك فقط البروتينات المرتبطة مع أبى كويتن.

obeikandl.com

obeikandl.com

المراجـــع

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson: Molecular Biology of the Cell, 2nd ed., Garland Publishing Inc., New York, 1989.

Brimacombe, R., G. Stoffler, and H. G. Wittmann: Ribosome Structure. Ann. Rev. Biochem. 47: 217 - 249 (1978).

Brown, D. D.: "Gene Expression in Eukaryotes", Science, 211: 667 - 674 (1981).

Cold Spring Harbor Laboratory: Mechanisms of Protein Biosynthesis, (Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, Vol. 34) 1969.

Conn, E. E., P. K. Stumpf, G. Bruening, and R. H. Doi: Outlines of Biochemistry (5 th ed.), John Wiley & Sons, 1987.

Crick, F. H. C.: "The Genetic Code III," Sci. Am., 215: 55 - 62, October (1966).

Gole, E. F., E. Cundiffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond, and M. H. Waring: The Molecular Basis of Antibiotic Action, 2nd ed., Wiley, 1981.

Kim, S. H.: Three - dimentional Structure of transfer RNA and Its Functional Implications. Advan. Enzymol., 46: 279 - 315 (1978).

obeikandl.com

Lake, J.: The Ribosome, "Sci. Am., 245: 84 - 97, August (1981).

Lehninger, A. L.: Principle of Biochemistry, Worth, New York, 1982.

Lewin, B.: Gene Regulation II, 2nd ed., Wiley, New York, 1980.

Palade, G.: "Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis," Science, 189: 347 - 357 (1975).

Schimmel, P. R.: Understanding the Recognition of Transfer RNAs by Aminoacyl Transfer RNA Synthetases," Adv. Enzymol., 49: 187 - 222 (1979).

Strayer, L.: Biochemistry, 2nd ed., Freeman, San Francisco, 1981.

Wold, F.: In Vivo Chemical Modification of Proteins, Ann. Rev. Biochem., 50: 783 - 805 (1981).

Zubay, G. (Coord. author): Biochemistry, Addison - Wesley, Reading, Mass., 1983.

obeikandl.com

تمارين

١ ـ أجب عن الجمل التاليه بصح أو خطأ ـ وإذا كانت خطأ إشرح لماذا؟

(أ) تخليق كل من mRNA والبروتين يشتمل على قوالب من عديد النيوكليوتيد.

(ب) تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين تتحدد أثناء التخليق بالتفاعل المتمم بين الأحماض الأمينية وتتابع ثلاث نيوكليوتيدات (الكودون) فى mRNA القالب.

(جـ) الجسيمات الريبوسومية فى مميزة النوى تكون أكبر إلى حد ما وأكثر تعقيداً عن تلك فى أولية الأنوية.

(د) عند بدء سلسلة عديد ببتيد جديدة فإن F-Met-t RNA يرتبط بالموضع A على الريبوسوم.

(هـ) أثناء تخليق عديد الببتيد فإن الريبوسومات تتحرك عبر mRNA فى الأتجاه ٣ ← ٥.

(و) تكوين كل رابطة ببتيدية على الريبوسوم تحتاج إلى رابطتين من روابط الفوسفات الغنية بالطاقة بالإضافة إلى تلك المستخدمة فى تنشيط الأحماض الأمينية.

٢ ـ كم عدد روابط الفوسفات الغنية بالطاقة التى تستهلك فى :

(أ) إدماج نيوكليوتيدة واحدة فى mRNA النامى بدءاً من نيوكليوسيد أحادى الفوسفات.

(ب) إدماج حمض أمينى واحد فى سلسلة عديد الببتيد النامية بدءاً من الأحماض الأمينية الحرة.

٣ ـ حدد تتابعات الأحماض الأمينية فى الببتيد المتكون على الريبوسومات إستجابة للرسائل التالية. إفترض أن الشفرة المضادة (anticodon) الأولى تبدأ بالقاعدة الأولى على الشمال.

(أ) GGUCAGUGGCUCCUGAUU

(ب) UUGGAUGCGCCAUAAUUUGCU

(جـ) CAUGAUGCCUGUUGCUAC

٤ ـ الخيط المنسوخ من عينة من DNA الحلزون المزدوج يحتوى على التتابع التالى:

5´ - CTTAACACCCCTGACTTCGCGCCGTCG - 3´

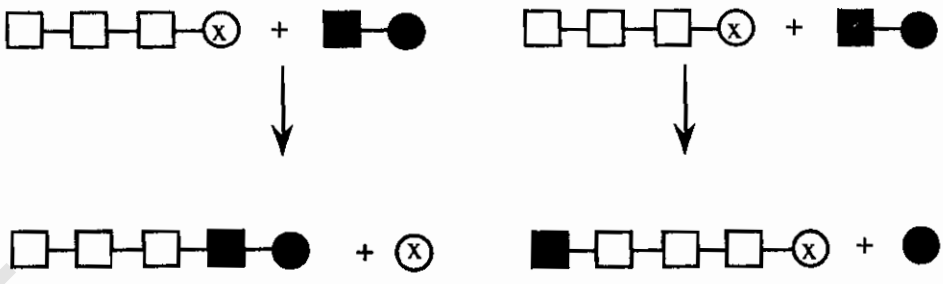
(أ) ما هو التتابع فى mRNA الذى ينسخ من هذا الخيط ؟

(ب) ما هو تتابع الأحماض الأمينية الذى يشفر بهذا التتابع بدءاً من النهاية 5´ ؟

(جـ) إفترض أنه تم نسخ وترجمة الخيط الآخر فى هذه العينة من DNA. هل يكون تتابع الأحماض الأمينية الناتجة مماثل لتلك فى (ب) ؟ إشرح الأهمية البيولوجية للإجابة فى (ب) و (جـ).

٥ ـ كم عدد روابط الفوسفات الغنية بالطاقة التى تستهلك فى تخليق بروتين يحتوى على ٢٠٠ حمض أمينى بدءاً بالأحماض الأمينية الحرة.

٦ ـ يوجد ميكانيكيتين أساسيتين لإستطالة الجزيئات البيولوجية



النوع الثانى　　النوع الأول

فى النوع الأول فإن المجموعة المنشطة (ⓧ) تنفرد من السلسلة النامية. وفى النوع الثانى فإن المجموعة المنشطة تنفرد من الوحدة القادمة بإضافتها إلى السلسلة النامية. حدد أى من الميكانيكتين تستخدم فى تخليق كل من المواد التالية

(أ) تخليق الجلايكوجين

(ب) تخليق الأحماض الدهنية

(جـ) تخليق DNA

(د) تخليق RNA

(هـ) تخليق البروتين

٧ ـ أحد نسخ mRNA لجين T_7 phage يحتوى على تتابع القواعد التالى:

5´ - AACUGCACGAGUAACACAAGAUGGCU - 3´

وضح تأثير الطفرة التى تغير القاعدة G (معلمة بالسهم) إلى القاعدة A

obeikandl.com

فصل ٢٦

تنظيم التعبير الجينى

Regulation of Gena Expression

لقد سبق أن رأينا أن التحكم فى نشاط عدد كبير من البروتينات يتم بواسطة ميكانيكيات مختلفة التى تشمل التنشيط بإزاله جزء من سلسلة البروتين، والتأثيرات غير الوضعية (الألوستيريه)، والتحورات التساهمية. بالإضافة إلى ذلك فإنه من الثابت أن الخلايا الحيه تحتوى على كيفيات مختلفه لتنظيم معدّل بناء البروتينات المختلفه بحيث تحتوى كل خليه على عدد النسخ المناسبة من كل بروتين اللازم لتنفيذ النشاط الأيضى بكفاءة وبصورة اقتصادية. فبكتريا القولون مثلا تحتوى على جينات لأكثر من ٢٠٠٠ نوع مختلف من البروتينات، إلاّ أنه لا يتم التعبير عن كل هذه الجينات فى نفس الوقت، كما لا يوجد نفس العدد من جزيئات البروتينات المختلفة التى تم تكوينها. بالإضافه إلى ذلك فإن كمية بعض أنواع هذه البروتينات يكون ثابتاً مثل إنزيمات الإنحلال السُّكَرِّى، بينما البعض الآخر مثل انزيم β - galactosidase تختلف كميتة بدرجة كبيرة بتغير العناصر الغذائية فى البيئة.

نجد أيضا أن خلايا الكائن متعدد الخلايا كل منها يكون مميز بأنواع خاصة من البروتينات رغم أنها تحتوى على نفس الكروموسومات. فكل الخلايا فى الحيوانات الراقية تحتوى تقريبا على نفس الإنزيمات المشتركة فى مسارات الأيض المركزية، إلا أن الأنواع المختلفة من الخلايا مثل خلايا العضلات والمخ والكبد كل منها يتميز بتراكيب ووظائف بيولوجية خاصة التى تعتمد على وجود مجموعه خاصة من البروتينات. فكبد الثدييات

obeikandl.com

مثلا يحتوى على كل الإنزيمات المشتركة فى دورة اليوريا بينما لا توجد هذه الإنزيمات فى الأنسجة الاخرى.

ويتضح من هذا العرض أن هناك بعض الجينات تكون فعّالة والبعض الآخر يكون ساكن، كما أن الجينات الفعّالة تختلف فى معدّل نشاطها. والسؤال المطروح الآن ما هى الميكانيكيات التى تحكم نشاط الجينات أى التى تحكم معدّل بناء البروتينات؟. إن الدراسات العديدة التى أجريت على الكائنات غير مميزة النواة (خاصة بكتريا القولون) أوضحت أن نشاط الجينات فى هذه الكائنات ينظم على مستوى النسخ وليس على مستوى الترجمة. وبالرغم من أن معلوماتنا قليلة فى الوقت الحاضر عن تنظيم التعبير الجينى فى الخلايا مميزة النواة، فإنه من الثابت أن هذا التنظيم يتم بطريقة مختلفة. وسنوضح فى الفقرات التالية تنظيم التعبير الجينى فى الكائنات غير مميزة النواة، ثم نتبعها بتنظيم التعبير الجينى فى الكائنات مميزة النواة.

كروموسوم بكتريا القولون

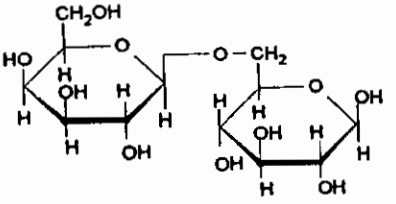
قبل البدء فى مناقشة ميكانيكيات التعبير الجينى فى بكتريا القولون يكون من المفيد إلقاء نظرة عامة على كروموسوم هذا الكائن. تحتوى بكتريا القولون على كروموسوم رئيسى فردى فى صورة DNA حلزون مزدوج حلقى يتألف من ٣×١٠^{٦} قاعدة التى تشفّر لأكثر من ٢٠٠٠ بروتين. ويتم تنظيم نشاط هذا النظام المعقد بحيث أنه تحت ظروف النمو النشطة فإن حوالى ٥ ٪ فقط من هذا الجينوم يكون نشط فى عملية النسخ، أماً بقيه الجينات فقد تكون ساكنة أو تنسخ بمعدّل بطئ جداً. وعند تغيير ظروف النمو فإن بعض الجينات النشطة يتم إيقافها، بينما بعض الجينات غير النشطة يتم تشغيلها. ويتضح من ذلك أن بكتريا القولون تحتوى على الأقل على اثنين من الميكانيكيات التى تنظم نشاط الجينات: الميكانيكية الأولى هى الاستحثاث induction، ويتم فيها تشغيل بعض الجينات الساكنة وبناء البروتينات المقابلة.أماً الميكانيكية الثانية فهى الكبح أو وقف البناء repression، ويتم خلالها ايقاف نشاط بعض الجينات ووقف بناء البروتينات المقابلة. وسنقوم فى الأجزاء التالية بشرح هاتين الميكانيكيتين.

بعض إنزيمات البكتريا يتم استحثاث بنائها

الإنزيمات الأساسية (البنيوية) constitutive enzyme هى تلك التى توجد فى خلايا البكتريا بكميات ثابتة بغض النظر عن الحالة الأيضية للكائن. مثال ذلك الإنزيمات التى تشترك فى مسارات الأيض المركزية مثل إنزيمات الانحلال السُّكَّرى. الإنزيمات المُستحثَّة inducible enzuymes من ناحية أخرى هى تلك التى يختلف تركيزها فى الخلايا، فتوجد فى الخلايا البكتيرية بكميات صغيرة جداً ولكن يمكن أن يرتفع تركيزها ألف مرة أو اكثر عند وجود المواد الخاضعة لها فى البيئة. وتحت هذه الظروف فإن الإنزيمات المستحثَّة ربما تكون ضرورية لنقل المادة الخاضعة داخل الخلية أو تحويلها إلى أحد الأيضات التى يمكن أن تستخدم بواسطة الخلية.

يعتبر إنزيم β - galactosidase الذى يحلل اللاكتوز إلى جلوكوز وجالاكتوز أكثر الإنزيمات المستحثة دراسة. فعند تنمية بكتريا القولون على بيئة تحتوى على جلوكوز فإن كل خلية تحتوى تقريبا على عشرة جزيئات من إنزيمβ - galactosidase، ولكن عند نقل البكتريا إلى بيئة تحتوى على لاكتوز كمصدر وحيد للكربون والطاقة فإنه فى خلال دقيقة أو دقيقتين تقوم الخلايا ببناء إنزيم β - galactosidase بكميات كبيرة ويصبح عدد نسخ الإنزيم فى كل خلية حوالى ألف أو أكثر. ويقوم إنزيمβ - galactosidase المتكون بتحليل اللاكتوز إلى جلوكوز وجالاكتوز اللذان يمكن استخدامهما بواسطة الخلية كمصدر للطاقة والكربون. وعلى ذلك فإن إنزيم β - galactosidase يعتبر انزيم مُسْتحث inducible enzyme. ويتكون أيضا اثنين من البروتينات معβ - galactosidase هما galactoside Permease وthiogalactoside transacetylase، وبينما يقوم البروتين الأول بنقل اللاكتوز إلى داخل الخلية فإن الوظيفة البيولوجية للبروتين الثانى غير معروفة.

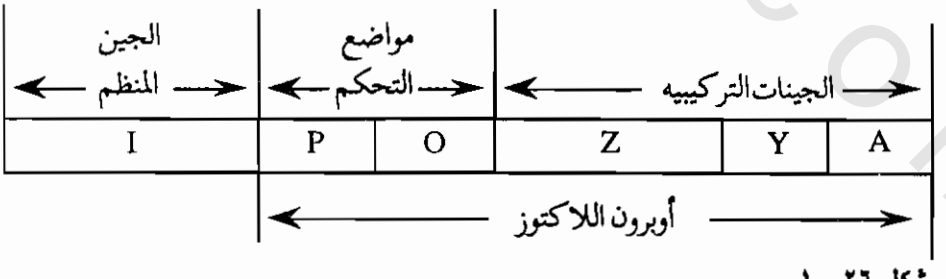
والمستحث الفسيولوجى هو حقيقة ألُلولاكتوز allolactose الذى يتكون من اللاكتوز. فاللاكتوز بذاته ليس عاملاً مستحثاً ولكنه يتحول إلى المشابه اللولاكتوز وهو العامل المستحث الحقيقى.



Allolactose

نظرية الأوبرون

أمكن توضيح العلاقة الجزيئية بين الاستحثاث الإنزيمى ووقف بناء الإنزيمات من الأبحاث التى أجراها فرانسوا جاكوب وجاك مونو عام ١٩٦١ . فقد أدت دراستهم على إنزيم β - galactosidase فى بكتريا القولون من اقتراح نظرية الأوبرون Operon hypothesis للتحكم الوراثى لبناء البروتين فى الخلايا أولية النواة عن طريق التحكم فى عملية النسخ . والعناصر الوراثية لهذا النموذج هى جين منظِّم regulatory gene (I) ، والتتابع المشغِّل (العامل) operator sequece (O) ، ومجموعة من الجينات التركيبيةstructural genes وهى ثلاثة جينات Z و Y و A فى حالة أوبرون اللاكتوز التى تمثل الجينات الخاصة بـ β - galactosidase و Permease و transacetylaseعلى التوالى . بالإضافة إلى ذلك فإنه يوجد موضع آخر يُسمى تتابع بدء الحفز Promoter site (P) الذى يرتبط به إنزيم بلمرة RNA (شكل ٢٦ ـ ١) . فينتج الجين المنظِّم بروتين يُعرف بالكابح repressor (فى حالة أوبرون اللاكتوز يعرف lac repressor) الذى عند ارتباطه بالتتابع المشغل (O) فإنه يمنع نسخ الجينات التركيبة الثلاثة Z و Y و A نتيجة لإعاقته لدخول انزيم بلمرة RNA إلى موضع ارتباطه (الموضع P) .



شكل ٢٦ ـ ١

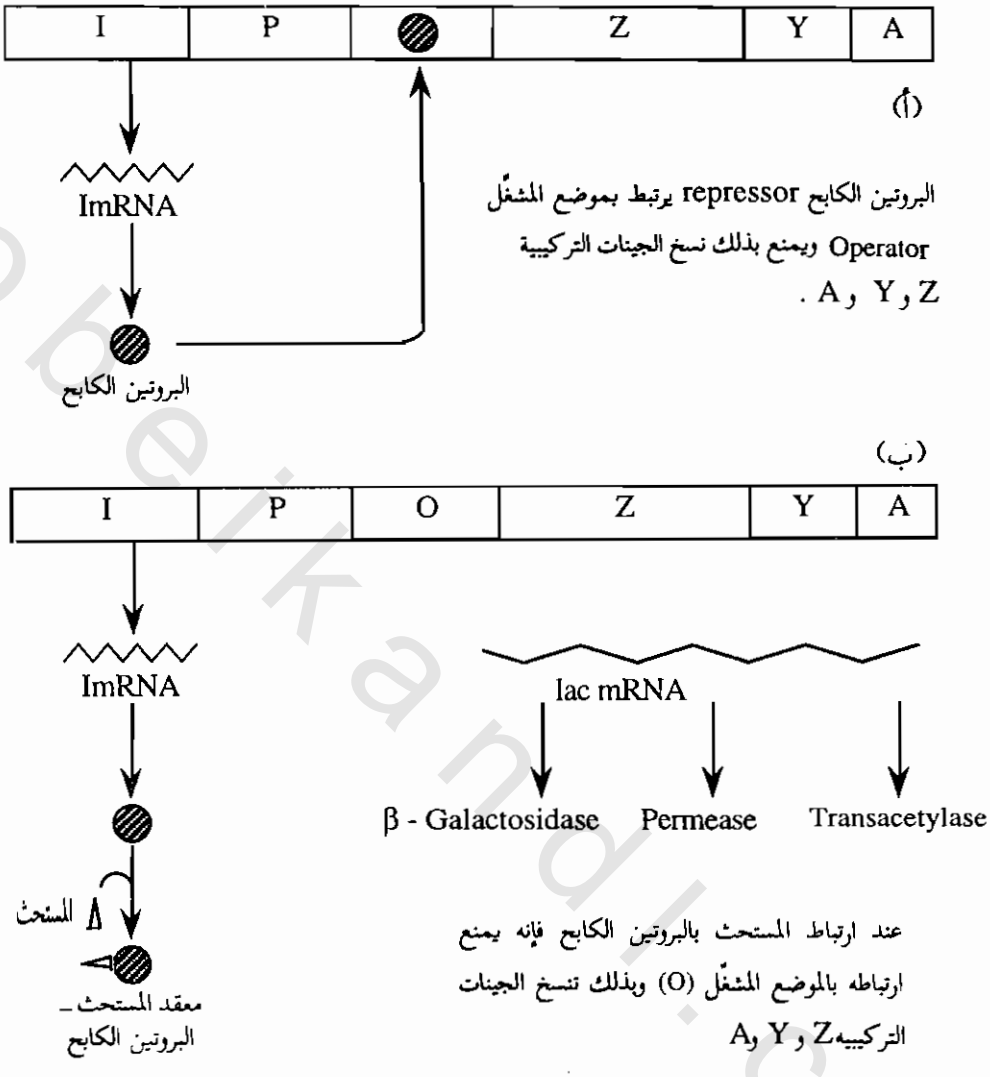
خريطه اوبرون اللاكتوز فى بكتريا القولون وجينه المُنظِّم

أما فى حالة وجود المستحث inducer مثل أللولاكتوز فإنه يرتبط بموضع خاص على البروتين الكابح ويؤدى إلى تغيير فى هيئته الفراغية فتنخفض قوة ارتباطه بالتتابع المشغل (O)فينفصل منه ويبدء بذلك نسخ الجينات التركيبة الثلاثة Z و Y و A وتكوين جزئ mRNA (lac mRNA)فردى. ثم تنتقل جزيئات mRNA الناتجة من عملية النسخ إلى الريبوسومات حيث تعمل كقوالب لبناء الإنزيمات الثلاثة β - galactosidase و galac-toside Permease و galactoside acetylase، وبذلك يمكن للخلية من استخدام اللاكتوز كمصدر للطاقة والكربون (شكل ٢٦ ـ ٢). وفى الحقيقة فإن الجينات التركيبية الثلاثة تُنسخ لتعطى جزئ mRNA فردى الذى يُشفّر بعد ذلك للبروتينات الثلاثة. وجزئ mRNA الذى يُشفّر لأكثر من بروتين كما هو فى حالة بروتينات اللاكتوز يطلق عليه النسخة عديدة التوريث Polycistronic transcript (أو Polygenic).

والدراسات البيوكيميائية التى أجريت على البروتين الكابح للاكتوز lac repressor أوضحت أنه يتألف من أربع وحدات فرعية متماثلة وزن كل منها ٣٧ كيلو دالتون وكل منها يحتوى على موضع ارتباط بالمستحث inducer. ويرتبط البروتين الكابح بقوة وسريعا بالمشغّل operator (O)، فثابت التفكك لمعقد الكابح ـ المشغل يبلغ $١٠^{-١٣}$ مولر. وهذه الدرجة العالية من الجاذبية تكون ضرورية وذلك بسبب قله عدد جزيئات البروتين الكابح فى خلية بكتريا القولون من النوع البرى Wild type.

الأدينوزين أحادى الفوسفات الحلقى يستحث نسخ عدد من الأوبرونات القابلة للإستحثاث الأيضى الهدمى

بالرغم من الاعتقاد السائد فى بادئ الأمر أن أوبرون اللاكتوز يكون تحت التحكم السالب فقط بواسطة البروتين الكابح للاكتوز lac repressor، فإنه من الثابت الآن أنه حتى فى وجود المستحث الذى يعادل تأثير البروتين الكابح فإنه يوجد بروتين يعمل كوسيط للتحكم الموجب للاوبرون. ولقد تم اكتشاف هذا البروتين موجب التحكم أثناء دراسة كيفيه غلق بعض الأوبرونات بواسطة الجلوكوز (الأوبرونات الحساسة للجلوكوز) الذى يتحكم كل منها فى تفكيك سكر خاص (مثل اللاكتوز والجالاكتوز ولأرابينوز



شكل ٢٦ ـ ٢

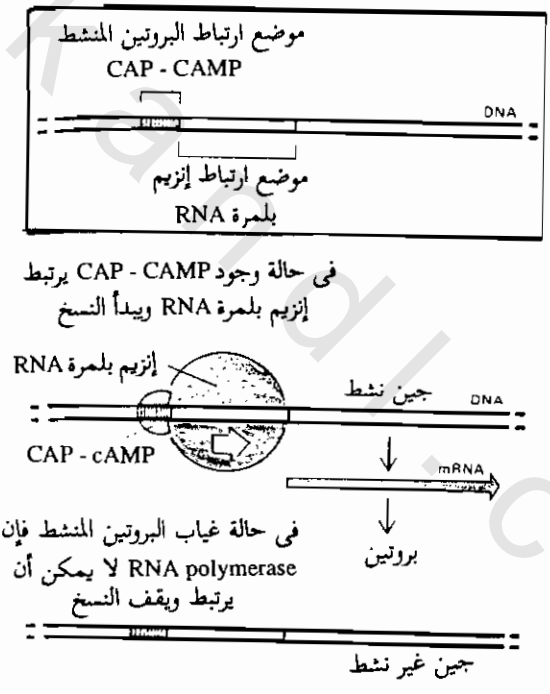
مخطط بيانى لأوبرون اللاكتوز فى:

(أ) الحالة المثبطة (فى غياب المستحث) يرتبط البروتين الكابح مع موضع المشغّل (O) ويمنع عملية النسخ.

(ب) الحالة المستحثة (فى وجود المستحث) يرتبط المستحث (أللولاكتوز فى هذه الحالة) مع البروتين الكابح وينتج عن ذلك انفصال البروتين الكابح من DNA ويسمح لإنزيم بلمرة RNA من الإرتباط بموضع بدء الحفز (P) وبدء عملية النسخ.

والمالتوز). مثال ذلك أنه عند تنمية بكتريا القولون فى وجود كل من الجلوكوز واللاكتوز فإن البكتريا تستخدم الجلوكوز دون اللاكتوز، كما أن الخلايا لن تقوم ببناء بروتينات اللاكتوز. وعلى ذلك فإن خلايا البكتريا لها القدرة على الإحساس بوجود أو غياب الجلوكوز والذى يتم بميكانيكية مختلفة. ويطلق على الأساس الجزيئى للتأثير المثبط للجلوكوز بكبح الأيض الهدمى catabolic repression.

ففى غياب الجلوكوز يزداد تركيز الأدينوزين أحادى الفوسفات الحلقى cAMP الذى يرتبط بأحد البروتينات المنشطة Catabolite gene activator Protein (CAP)، ويتكون بذلك متراكب cAMP - CAP الذى يرتبط بدوره فى موضع على DNA مجاور لموضع ارتباط إنزيم بلمرة RNA (شكل ٢٦ ـ ٣). وإرتباط هذا المتراكب بجزئ



شكل ٢٦ ـ ٣

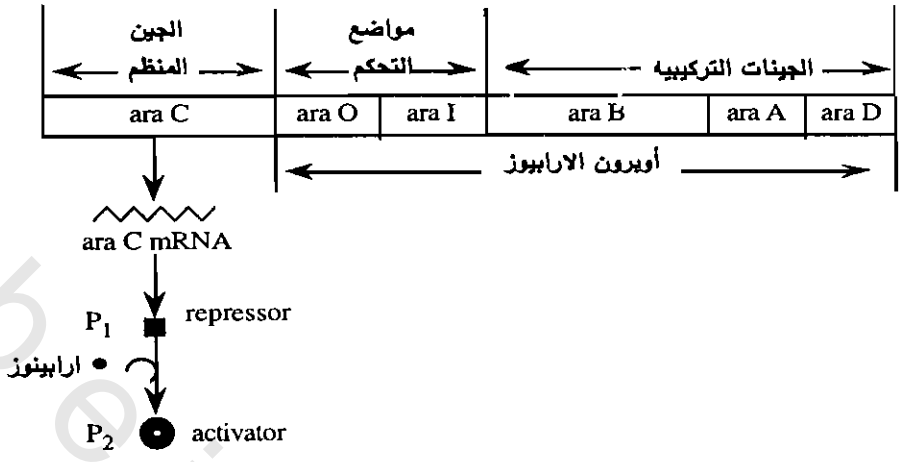
مخطط بيانى يوضح ميكانيكية تنظيم نسخ الجين بواسطة البروتين المنشط (CAP) فى حالة أوبرون اللاكتوز فى بكتريا القولون. فارتباط إنزيم بلمرة RNA يكون ضعيفا إلا إذا إرتبط البروتين المنشط بالموضع المجاور.

DNA يؤدى إلى نشوء مواضع تداخلات إضافية لإنزيم بلمرة RNA وبذلك يسهل إرتباطه DNA وبدء النسخ. من ناحية أخرى فعند توافر الجلوكوز بكمية كبيرة تكون كمية cAMP قليلة جداً ولا يتكون المتراكب CAP - cAMP، وتحت هذه الظروف فإن ارتباط إنزيم بلمرة RNA بجزئ DNA لا يكون قويا ولا تنسخ جينات اللاكتوز. والطريقة التى يتحكم بها الجلوكوز فى مستوى cAMP فى الخلية غير معروفة.

ويبدو أن المعقد **CAP - cAMP** يعمل بطريقة مماثلة مع الأوبرونات المستحثة الأخرى. وعلى ذلك فإنه يتم التحكم فى الأوبرونات المستحثة بميكانيكيات متكاملة التى تستخدم **cAMP** والمستحثات المتخصصة كجزيئات إشارة.

الصور المختلفة لنفس البروتين تُنشط وتثبط النسخ لأوبرون الأرابينوز

تستطيع البكتريا استخدام سكر الأرابينوز كجزئ وقود خلال تحويله إلى زيليولوز ٥ ـ فوسفات وهو أحد المركبات الوسيطة فى مسار فوسفات البنتوز (فصل ١٤) وذلك بالتأثير المتعاقب لإنزيمات arabinose isomerase و ribulokinase و-ribulose 5 - phos-phate epimerase. وهذه الإنزيمات تُشفَّر بواسطة الجينات ara A و ara B و ara D على التوالى. وهذه الجينات التركيبية بالإضافة إلى موضع بدء الحفز Promotor (ara I) وكذلك المُشغِّل Operator (ara O) تؤلف أوبرون الأرابينوز arabinose operon (شكل ٢٦ ـ ٤). وهذا الأوبرون يُنظم بواسطة ara C الذى يكون مجاور لموضع المُشغِّل. وأوبرون الأرابينوز مثل أوبرون اللاكتوز يمكن أن يُنشط بواسطة معقد الـ CAP و cAMP. وناتج الجين المنظم ara C هو بروتين الذى يمكن أن يتواجد فى هيئتين بنائيتين مختلفتا الوظيفة يطلق عليهما P_1 و P_2. ففى غياب الأرابينوز فإن هذا البروتين يعمل كابح(P_1)، فيرتبط P_1 مع المشغل O الذى يمنع نسخ الأوبرون. من ناحية أخرى فإن الأرابينوز يزيل الهيئة P_1 من المُشغِّل ويحول الإتزان إلى P_2، وهى الصورة المنشَّطة. ثم ترتبط الصورة P_2 وكذلك المعقد CAP - cAMP مع موضع بدء الحفزPromotor الذى يُمكِّن إنزيم بلمرة RNA من بدء النسخ. وعلى ذلك فإن نفس البروتين المنظم يُمكن أن يقوم بوظيفة التحكم الموجب (تنشيط النسخ) والتحكم السالب (تثبيط النسخ).



شكل ٢٦ ـ ٤

خريطة أوبرون الأرابينور وجينه المنظم.

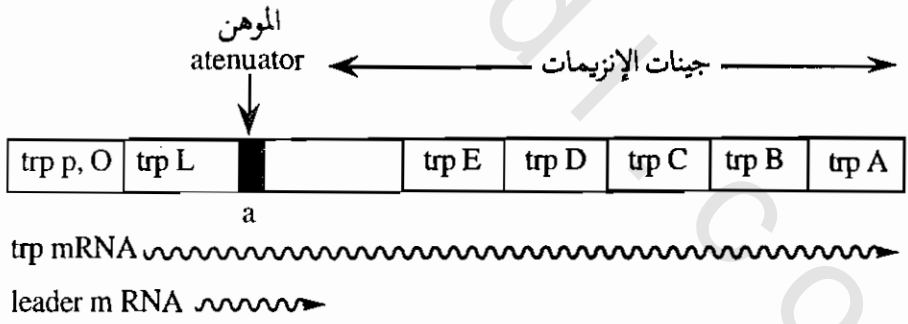
الخلايا أولية النواة لها القدرة أيضا على إيقاف بناء البروتينات

الكيفيه الأخرى لتنظيم بناء الإنزيمات فى البكتريا والتى يظهر أنها عكس المشاهد فى الاستحثاث الإنزيمى هو وقف (كبح) بناء الإنزيمات enzyme repession . فعند تنمية بكتريا القولون فى بيئة تحتوى على أملاح الأمونيوم كمصدر وحيد للنتروجين فإنها تقوم بتكوين جميع المركبات النتروجينية من $NH4^+$ والمصدر الكربونى. هذه الخلايا تحتوى بالطبع على جميع الأنظمة الإنزيمية اللازمة لبناء الأحماض الأمينية العشرين. إلا أنه إذا أضيف حمض أمينى واحد (هستيدين مثلا) إلى البيئة فإنه يوقف بناء مجموعة الإنزيمات المشاركة فى بناء الهستيدين من الأمونيا والمصدر الكربونى، بينما تظل الخلايا نشطة فى بناء الأنظمة الإنزيمية الأخرى التى تشارك فى تكوين الـ ١٩ حمض أمينى الأخرى. وإيقاف بناء الإنزيمات المسئولة عن تكوين الهستيدين نتيجة لإضافة الهستيدين إلى البيئية تعرف بوقف (كبح) بناء الإنزيماتenzyme repession. وتشمل معظم حالات وقف بناء الإنزيمات تلك الإنزيمات التى تشترك فى مسارات الأيض البنائى خاصة بناء الأحماض الأمينية. والكيفية المقترحة لوقت بناء الإنزيمات مماثلة لتلك المشتملة فى الاستحثاث فيما عدا أن المادة الكابحة التى يوجّه بنائها الجين المنظم لا تكون

فعّالة إلا فى وجود الناتج النهائى لمسار البناء (الهِسْتيدين مثلا) أو أحد مشتقاته، وبذلك يتم نسخ إنزيمات الأوبرون فى غياب الناتج النهائى ويقف النسخ فى وجوده. ويوجد أيضا عنصر تحكم آخر فى الأوبرون يعرف بالتباطؤ (التوهن) attenuation. دعنا الآن نأخذ أوبرون التربتوفان كمثال لتوضيح عناصر التحكم فى بناء الانزيمات.

نظام معقد الكابح ـ المُشغِّل يُمثِّل العنصر الأول للتحكم فى نسخ أوبرون التربتوفان

يحتوى أوبرون التربيتوفان trp operon (شكل ٢٦ ـ ٥) على خمسة جينات تركيبية تُشفِّر لخمسة من الإنزيمات التى تُحوِّل الكوريسمات إلى التربتوفان. وهذه الإنزيمات الخمسة تبنى بصورة متعاقبة ومتناسقة وبكميات مولارية متساوية وذلك بترجمة trp mRNA متعدد التوريث Polycistronic (الجينات التركيبية الخمسة تُنسخ فى صورة جزئ mRNA فردى). وأهم السمات المميزة لهذا الأوبرون أن عملية الترجمة تبدء قبل انتهاء عملية النسخ. بالإضافة إلى ذلك فإن بكتريا القولون يمكن أن تُغيِّر من معدّل بناء هذه الإنزيمات فى مدى ٧٠٠ مره استجابه للتغير فى احتياجها للتربتوفان.



شكل ٢٦ ـ ٥

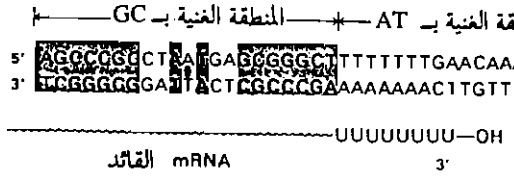
مخطط لأوبرون التربتوفان موضحا موضع بدء الحفر Promotor (p) ، المُشغِّل operator (o) والمُوهِّن attenuator وجينات التتابع القائد leader sequence (L) وإنزيمات مسار التربتوفان (E وD وC وB وA).

كيف يتم هذا التنظيم ؟. أحد مستويات التحكم يتم بواسطة ارتباط كابح خاص مع منطقة مُشغِّل التربتوفان (O) trp operator على DNA. فعند توفر التربتوفان فانه يرتبط مع كابح التربتوفان، ومعقد الكابح ـ تربتوفان يرتبط بقوة مع منطقة المُشغِّل (O) ويمنع ارتباط إنزيم بلمرة RNA مع موضع بدء الحفر Promotor (P) ولذلك يقف نسخ جينات التربتوفان. وكابح التربتوفان هو بروتين وزنه ٥٨ كيلو دالتون ويُشفَّر بواسطة trp R gene الذى يوجد بعيداً عن أوبرون التربتوفان. ولا يستطيع الكابح بمفرده من الارتباط بموضع المُشغِّل ولكن الذى يستطيع ذلك هو معقد الكابح ـ التربتوفان، ولذلك فإن التربتوفان يعتبر مساعد الكابح corepressor.

بناء التربتوفان يُنظم أيضا بواسطة الإبطاء (التوهين)

اعتقد فى بادئ الأمر أن نظام الكابح ـ المُشغِّل هو الميكانيكية الوحيدة لتنظيم بناء التربتوفان على مستوى النسخ فى بكتريا القولون. إلا أن اكتشاف طافرات بكتريا القولون الحاملة لا نتقاصات فى أوبرون التربتوفان فى المنطقة بين المُشغِّل (O) وجين الإنزيم الأول (trp E) والتى أظهرت زيادة كبيرة فى انتاج trp mRNA تشير إلى وجود عنصر تحكم نسخ أضافى لأوبرون التربتوفان. ولقد أظهر تحليل التتابع اللاحق للطرف `O لـ trp mRNA وجود تتابع قائد leader sequence (trp L) من ١٦٢ نيوكليوتيدة قبل كودون البدء للإنزيم الأول (trp E). ثم اتضح بعد ذلك أن طفرة النقص التى تزيد مستوى trp mRNA تقع فى منطقه القائد فى حدود ٣٠ ـ ٦٠ نيوكليوتيدة قبل موضع بدء trp E. والمشاهدة المهمة الأخرى أنه عندما يكون مستوى التربتوفان منخفض فإنه ينتج نسخة trp mRNA الكاملة المحتوية على ٦٧٠ نيوكليوتيدة بما فيها تتابع القائد الكامل، بينما عندما يكون مستوى التربتوفان مرتفع تتكون نسخ قصيرة تحتوى فقط على الـ ١٣٠ نيوكليوتيدة الأولى من تتابع القائد. ولقد استنيج Yanofsky أن نسخ أوبرون التربتوفان يجب أن يُنظَّم بواسطة موضع الإنهاء الذى يُطلق عليه المبطئ أو الموهن attenu-ator ويوجد بين المُشغِّل Operator (O) وجين الإنزيم الأول trp E فى المسار. وهذا الموضع المنظَّم يحتوى على تتابع غنى بـ GC متبوعا بتتابع غنى بـ AT ، وكل من

هاتين المنطقتين فى المُوهِّن تحتوى على محور تماثل ثنائى (شكل ٢٦ ـ ٦). بالإضافة إلى ذلك فإن طرف المنسوخ القائد (leader mRNA) ينتهى بسلسلة من اليوراسيل (U).



شكل ٢٦ ـ ٦
تتابع القواعد فى موضع مُوهِّن التربتوفان.

ويبدو أن منطقة المُشغِّل ومنطقة الموهِّن يتكاملا فى تنظيم نسخ جينات التربتوفان فى مدى أوسع من تركيزات التربتوفان عما هو منتظر من المُشغِّل بمفرده. فعندما يتوفر التربتوفان للخلية يتم وقف النسخ بارتباط معقد التربتوفان ـ الكابح مع المشغل. وبانخفاض مستوى التربتوفان فى الخلية يزال الكبح ويبدأ النسخ. مع ذلك فإنه ما أن يبدأ بناء جزئ trp mRNA فإنه لا ينمو آليا (أوتوماتيكيا) إلى الطول الكامل، ولكن بدلا من ذلك فإن معظم جزيئات trp mRNA يقف نموها حتى قبل أن يتم نسخ الجين الأولى إلى أن يتم التحقق عن طريق المُوهِّن أن كمية التربتوفان المتوفرة للخلية قليلة.

التوهين يُنجز بواسطة ترجمه القائد

كيف يمكن لموضع المُوهِّن فى أوبرون التربتوفان استشعار مستوى التربتوفان فى الخلية. يمكن تفهم ذلك من ملاحظة أن جزء من mRNA القائد يتم ترجمته، وكذلك وجود بواقى التربتوفان عند الموضعين ١٠ و١١ فى عديد الببتيد القائد الذى يتألف من ١٤ حمض أمينى (شكل ٢٦ ـ ٧) والذى له دلالة هامة. فعندما يكون التربتوفان متوافر للخلية تبنى سلسلة القائد الكاملة، أما اذا كان مستوى التربتوفان منخفض فإن الريبوسوم يتوقف عند الكودون UGG (الخاصة بالتربتوفان) نظرا لندرة tryptophanyl tRNA. والريبوسوم المتوقف يُغير بطريقة ما تركيب mRNA بحيث أن إنزيم بلمرة RNA ينسخ الأوبرون فيما وراء موضع المُوهِّن. والسمة المميزة لميكانيكية التحكم هذه هو ازدواج

Met- Lys- Ala- Ile- Phe- Val- Leu -Lys- Gly- Trp- Trp- Arg- Thr- Ser- Stop

- AUG AAA GCA AUU UUC GUA CUG AAA GUU UGG UGG CGC ACU UCC UGA-

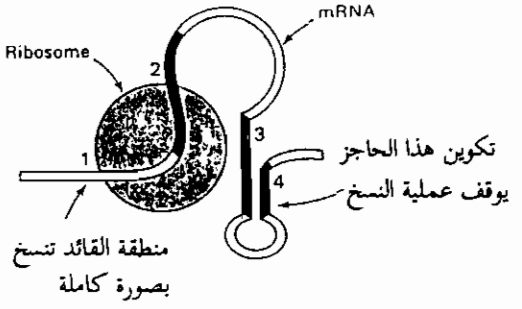
شكل ٢٦ ـ ٧

تتابع الأحماض الأمينية فى الببتيد القائد للتربتوفان وتتابع القواعد فى mRNA القائد المقابل.

عملية الترجمة مع عملية النسخ، فالريبوسوم الذى يترجم mRNA القائد للتربتوفان يعقب من الخلف جزئ إنزيم بلمرة mRNA الذى ينسخ DNA القالب. ولقد أوضحت الدراسات الحديثة أن الريبوسوم المتوقف عند الكودون UGG يُغيرُ البناء الثانوى لـ mRNA من تنظيم ازدواج قواعد يساند النسخ إلى إزدواج قواعد مختلف الذى يسمح لإنزيم بلمرة RNA من القراءة خلال موضع الموهن (شكل ٢٦ ـ ٨). ولقد بدأ فى الوقت الحاضر معرفة أن جزيئات الأحماض النووية مثلها مثل جزيئات البروتين يمكن أن تغير من هيئتها البنائية والذى يلعب دوراً تنظيميا مهماً.

تنظيم التعبير الجينى فى الكائنات مميزة النواة

بعد أو أوضحنا فى الأجزاء السابقة الميكانيكيات المشاركة فى تنظيم التعبير الجينى فى الكائنات أولية النواة، ننتقل الآن إلى موضوع تنظيم التعبير الجينى فى مميزة النواة والذى يبدو أنه مختلف فى تفاصيله عن النوع الأول. فاختلاف خلايا مميزة النواة عن خلايا أولية النواة فى كثير من الأوجه يتطلب عناصر إضافية عديدة لتنظيم نشاط جيناتها. فخلايا مميزة النواة تحتوى على معلومات وراثية أكبر بكثير عن خلايا أولية النواة، كما أن DNA فى مميزة النواة العليا يرتبط ببروتينات قاعدية تعرف بالهستونات، بينما DNA فى الكائنات الدنيا ليس كذلك. نجد أيضا أن جينومات مميزة النواة تحتوى على درجة عالية من التنظيم البنائى أكثر من جينومات أولية النواة. والاختلاف الرئيسى الآخر هو أن كروموسومات مميزة النواة محاطة بغشاء نووى، بينما هذا الغشاء والأغشية الداخلية الأخرى لا توجد فى أولية النواة. والنتيجة المهمة لذلك هو أن النسخ والترجمة تكونا منفصلتا فى المكان والزمان فى مميزة النواة، بينما تكونا هاتين العمليتين مزدوجتين فى



(أ) مستوى عالى من الترتبوفان

(ب) مستوى منخفض من الترتبوفان

شكل ٢٦ ـ ٨

نموذج للتوهين فى أوبرون التريتوفان فى بكتريا القولون. عندما يكون مستوى التريتوفان مرتفع (أ) فإن منطقة القائد (القطعة ١) من trp mRNA تترجم بصورة كاملة. الجزء ٢ يتفاعل مع الريبوسوم والذى يُمكّن الأجزاء ٣ و ٤ من الإزدواج، وهذه المنطقة المزدوجة القواعد تعطى إشارة بطريقة ما لإنزيم بلمرة RNA من وقف النسخ. بالمقارنة فإنه عندما يكون مستوى التريتوفان منخفض (ب) فإن الأجزاء ٣ و ٤ لا يتم بينهما ازدواج لأن الريبوسوم يتوقف عند كودون التريتوفان فى الجزء ١، حيث يزدوج الجزء ٢ مع الجزء ٣ بدلا من سحبها إلى الريبوسوم وبذلك فإن الأجزاء ٣ و ٤ لا تستطيع الإزدواج. وبالتالى تستمر عملية النسخ.

أولية النواة. والأهم من ذلك أن خلايا الأنسجة المختلفة فى الكائن مميز النواة تقوم بوظائف متباينه والذى يتطلب بنائها لبروتينات مختلفة، ولذلك فإن خلايا الفقاريات تُبرمج لنسخ مجموعة معينة من الجينات. وبالرغم من أن معلوماتنا قليلة فى الوقت الحاضر عن تنظيم

التعبير الجينى فى مميزة النواة، إلا أن هذا المجال فى نمو سريع لأنه بالإمكان الآن عزل جينات مميزة النواة وإكثارها ومعرفة تتابع القواعد فيها فى أنظمة محددة جيداً.

ميكانيكيات تنظيم التعبير الجينى فى مميزة النواة يختلف عن أولية النواة

يُعتقد أن نظم الأوبرونات غير هامة فى مميزة النواة العالية، هذا إذا كانت موجودة أصلا. فبينما تشير بعض الأدلّة على وجود الأوبرونات أو وحدات مشابهة لها فى مميزة النواة البسيطة مثل الفطريات، فإنه يبدو أن أنظمة الأوبرونات غير موجودة فى مميزة النواة الراقية. والمعلومات المتوفرة الآن تشير إلى أن تنظيم التعبير الجينى فى مميزة النواة يتم بالدرجة الأولى على مستوى النسخ، إلا أن معالجه RNA ودرجة ثبات RNA الرسول وجد أنها تلعب أيضا دوراً فى تنظيم التعبير الجينى. وقد ثبت فى بعض الحالات أيضا أن تنظيم التعبير الجينى فى مميزة النواة يتم على مستوى الترجمة، كما وجد أيضا أن معدّل تفكك البروتين يلعب دوراً مهما فى التحكم الدقيق فى مستوى نواتج الجين. مع ذلك فإنه نظرا لأن بناء RNA هو الخطوة الأولى فى التعبير الجينى، فإن التحكم فى معدّل بناء RNA ربما يكون له السيطرة على مستويات التنظيم الأخرى. وسوف نتعرض فى الأجزاء التالية للعناصر المشتملة فى تنظيم التعبير الجينى فى مميزة النواة العالية.

تكاثف DNA غير النشط فى الهيتروكروماتين

لقد سبق أن أوضحنا أن DNA الكروموسومى فى مميزة النواة يرتبط مع الهستونات مكونا وحدات متكررة هى النيوكليوسومات، وهذه النيوكليوسومات تنتظم فى تركيبات أعلى مكونة ألياف الكروماتين. ويمكن تمييز نوعين من الكروماتين فى الطور البينى inter-phase هما الهيتروكروماتين heterochromatin واليوكروماتين euchromatin. ويشير الهيتروكروماتين إلى مناطق الكروماتين شديده التكاثف التى تكون خاملة فى النسخ، بالمقارنة باليوكروماتين الذى يكون منتشر ونشط فى النسخ إلى RNA. يحتوى كل من الهيتروكروماتين واليوكروماتين تقريبا على نفس نسبه DNA إلى الهستون والذى يشير إلى أن DNA فى كلاهما يُعبأ فى نفس التركيب النيوكليوسومى الأساسى. لذلك فإن الأساس البيوكيميائى لاختلاف الهيتروكروماتين واليوكروماتين غير معروف، إلا أنه أثناء

الأنقسام الميتوزى فإن اليوكروماتين يتحول مؤقتا إلى صورة لا يمكن تمييزها عن الهيتروكروماتين.

والملاحظ أيضا أنه ليس فقط يكون الهيتروكروماتين غير نشط، ولكن يمكن للجينات أن تُثبط بإعادة تنظيم كروموسومى الذى يتم فيه إدماج الجينات النشطة فى منطقة الهيتروكروماتين. وهذا يقترح وجود وسائل تحكُّم التى يمكن لها من فتح أو غلق وظيفة قطاع طويل من كروموسوم ما. ولقد تم توضيح ذلك فى حشرة الدروسوفيلا ولكنه يتم أيضا فى أنظمة الثدييات.

وأكثر الأمثلة توضيحا لذلك هى كروموسومات الجنس. ففى إناث الثدييات نجد أن أزواج الكروموسومات x المتناظرة تبدو مختلفين كلية، فأحدها يظهر فى صورة عالية التكاثف (الذى يشير أنه غير نشط)، بينما الآخر يكون ممتد وغير متكاثف (الذى يشير أنه نشط). وقد تم التأكد من ذلك بواسطة التحليل البيوكيميائى الذى أوضح أنه فى كل خلية أنثوية فإن الجينات التى توجد فقط على أحد الكروموسومين x تكون نشطة. وأكثر من ذلك فإن أى من الكروموسومين x يكون غير نشط فإنه يختلف من خلية إلى أخرى، وعلى ذلك فإن نسيج الأنثى يحتوى على اثنين من أنواع الخلايا المختلفة. ومرة أخرى فإن الأساس الجزيئى لهذه الظاهرة ما زال غير معروف، إلا أنه قد يرتبط بدرجة ميثلة DNA (كما سنوضحها فيما بعد). والنتيجة المهمة لتثبيط الكروموسوم x هى اقتراح وجود وسائل التى تغلق بصورة متخصصة تعبير أحد الكوموسومات بصورة كاملة، وأن هذا الغلق يرتبط بطريقة ما مع انتظام (تعبئه) DNA فى الكروماتين بصورة مُكثَّفة.

وبالرغم من أن الكروموسومات الأخرى فى مميزة النواة لا تظهر ظاهرة التأثير الكلى أو لا تأثير (كل الكروموسوم نشط أو غير نشط)، فإنها قد تحتوى على مناطق من الهيتروكروماتين الذى يعتمد طولها على عمر الكائن. مثال ذلك أن عدداً كبيراً من المناطق التى تكون فى صورة هيتروكروماتين فى المراحل الأخيرة من عمر الكائن تكون في صورة يوكروماتين فى المراحل الأولى من التطور، ومثل هذه المناطق ربما تحتوى على جينات برمجت لتكون فعالة فقط فى المراحل الأولى لتكوّن الجنين. من ناحية أخرى نجد أن DNA المجاور للسنترومير والذى يحتوى على تتابعات شديدة التكرر هو

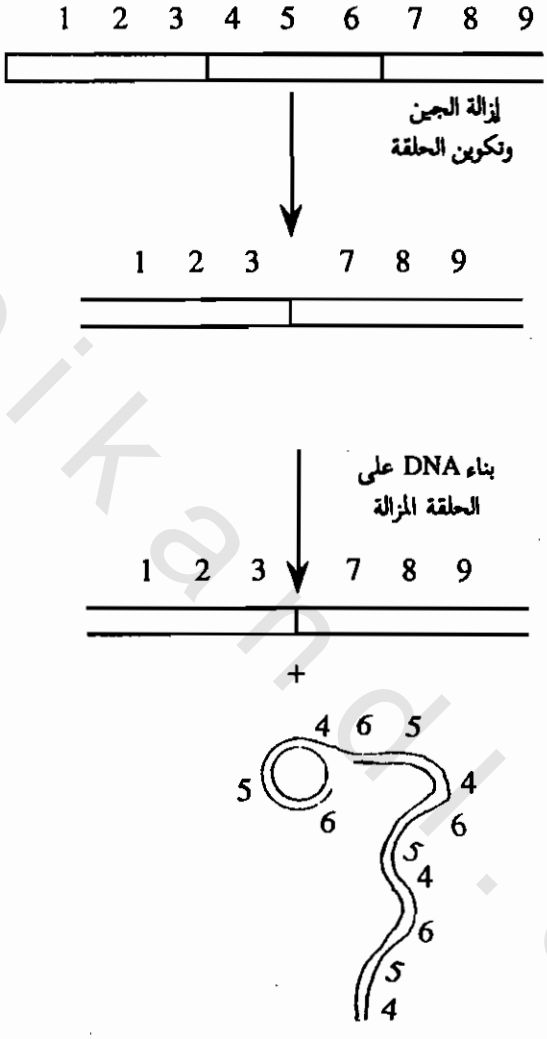
أحد الأمثلة للهيتروكروماتين الذى لا يُنسخ مطلقا، ولكنه ربما يلعب دوراً فى تركيب الكروموسوم والمحافظة عليه.

بعض جينات مميزة النواة يتم تضخيمها: تضخيم الجين

عدد كبير من بروتينات خلايا مميزة النواة تُشفَّر بواسطة جينات أحادية النسخة single copy genes، أو بواسطة عدد قليل من النسخ الجينيَّة. مع ذلك فإن خلايا مميزة النواة تحتوى على بعض الجينات التى تتواجد فى عدد كبير من النسخ، كما أن هذه الجينات يتم تضخيمها فى بعض مراحل دورة حياه الخلية لتعطى ألآف من نسخ الجين. مثال ذلك الجينات التى تُشفَّر لجزيئات RNA الريبوسومية البادئة (45S rRNA) التى تتفكك وتعالج فى النواة لتعطى جزيئات RNA الريبوسوميةrRNA 28S و rRNA 18S وrRNA 5.8S، التى توجد فى الريبوسومات الناضجة. أما جزيئات 5S rRNA، من ناحيه أخرى تُبنى فى مكان آخر فى النواة ثم تنتقل إلى النويَّات وهى موضع بناء جزيئات RNA الريبوسومية الثلاثة الأخرى، حيث يحدث تجميع لهذه الجزيئات مع البروتينات الريبوسومية (حوالى ٧٠, إلى ٨٠ نوع من البروتين) وتتكون الريبوسومات.

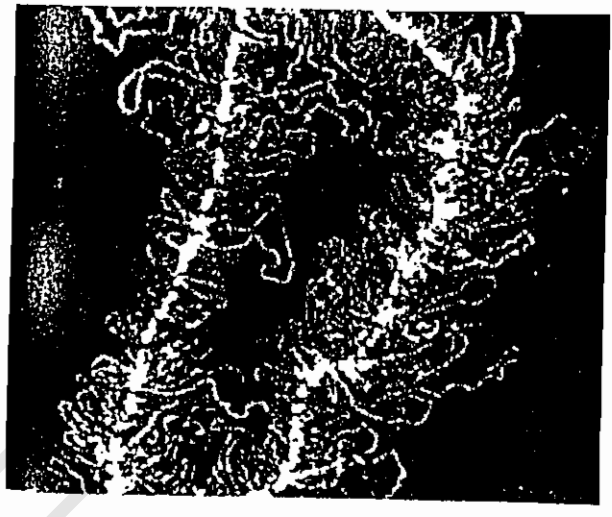
والدراسات التى أُجريت على ضفدع Xenopus leavis أوضحت أن الخلية الجسميَّة فيه تحتوى على حوالى ٥٠٠ نسخة من الجين المُشفَّر لجزيئات RNA الريبوسومية البادئة (45S rRNA). أما أثناء تكوين البويضة ونضجها oogenesis فإنه يحدث تضخيم انتقائى للجينات المشفَّرة لـ 45S rRNA حيث تتكرر هذه الجينات عدة ألآف من المرات (شكل ٢٦ ـ ٩) لتكوِّن حوالى ٢ × ١٠^{٦} نسخة من الجين. و RNA المضخَّم يوجد فى صورة حلقات خارج كروموسومية extrachromosomal cir-cles وتكون الكروموسومات خلال هذه المرحلة طويلة التركيب وعلى شكل الفرشاة ومنها اعطيت إسم الكروموسومات الفرشائية lampbrus chromosomes (شكل ٢٦ ـ ١٠). وهذا التضخيم الانتقائى يُمكِّن البويضة من تكوين حوالى ١٠^{١٢} ريبوسوم اللازمة لعملية البناء السريع للبروتين التى تحدث بعد عملية اخصاب البويضة ودخولها فى عملية انقسام سريع. وفى غياب تضخيم الجين فإن تكوين هذا العدد الكبير من الريبوسومات قد

يستغرق عدة أجيال. وبناء على المفهوم الحالى فإن التضخيم الانتقائى لبعض الجينات قد يتم أثناء نمو النباتات والحيوانات الراقية.



شكل ٢٦ ـ ٩

رسم بيانى لكيفية تضخيم جينات RNA الريبوسومية فى بويضات البرمائيات (ضفدع xenopus leavis). يتكون الجين المضخم كجزئ DNA مفصول عن الكروموسوم.



شكل ٢٦ ـ ١٠

صورة فلوروسنسية للكروموسوم الفرشائى من نواة بويضة Notophthalmus Viridescens. الحلقات العديدة النشطة فى عملية النسخ على الكروموسوم تعطى الكروموسوم شكل الفرشاة.

جينات معينة يُمكن تنشيطها لعملية النسخ: التنشيط الجينى الإنتقائى

إن التحكم فى التعبير الجينى فى مميزة النواة يتم على مستوى النسخ كما يحدث فى أولية النواة. وأحد الأدلّة المباشرة على ذلك هو نتائج الدراسات التى أجريت على كروموسومات الحشرات أثناء التكوّن (التطور). فتحتوى الغدد اللعابية لحشرة الدروسوفيلا على كروموسومات عملاقة giant chromosomes، وكل من هذه الكروموسومات العملاقة (التى تُعرف أيضا بالكروموسومات البوليتينية Polyten chromosomes) يتألفُ من عدد كبير من الكروموسومات المتراصة جانبيا. وكل كروموسوم عملاق يحتوى على سلسلة مميزة من الحزم (كروموير chromomer) التى يمكن مشاهدتها تحت المجهر الضوئى. وفى أثناء تطور اليرقة larva إلى العذراء فإن بعض هذه الحزم تكبر أو تُنفخ puffed وذلك لأن DNA فى هذه المناطق يتحول من الصورة المتكاثفة إلى صورة منتشرة (شكل ٢٦ ـ

١١)، وتُمثل هذه الانتفاخات المناطق النشطة نسخيا. ولقد وجد أن تكوين الانتفاخات Puffing يمكن أن يُستحث فى الغدد اللعابية المفصولة خارج الحشرة بواسطة الاكديسون ecdysone، وهو أحد الهورمونات الإسترويديه الحشرية. فتحدث انتفاخات لبعض مناطق معينه التى تنقبض فى تتابع زمنى، كما يصاحب ذلك تغيرات فى جزيئات mRNA المبتنية.

شكل ٢٦ ـ ١١

تكوين الانتفاخ Puff فى الكروموسوم البوليتينى أثناء التطور (التكوُّن). والسهم يشير إلى انتفاخ واضح فى كروموسوم حشرة الدروسوفيلا.

والنتائج التى يمكن استخلاصها من دراسة الكروموسومات البوليتينية العملاقة هو (١) حدوث تنشيط انتقائى لبعض الجينات فى مراحل معينة من حياة الحشرة (٢) هذا التنشيط يتم بالاستحثاث الهورمونى (٣) حدوث تغيرات مورفولوجية فى المنطقة التى يحدث فيها تنشيط للجين، فيزال تكاثف DNA ويتحول إلى حالة أكثر انتشاراً مُكوِّنا انتفاخات مميزة.

الحساسية لإنزيمات النيوكلييز تُميِّز مناطق الكروماتين النشطة

إن التغيرات المورفولوجية المشاهدة فى الكروموسومات العملاقة للدروسوفيلا توضح أن الجينات النشطة (أو تلك التى لها إمكانية النشاط) تدخل كروماتيناتها فى تغيرات تركيبية كبيرة بالمقارنة بالمناطق الساكنة فى الكروموسوم. إن إزالة التكاثف فى منطقة ما من DNA لتكوين الانتفاخات غالبا ما يكون شرطاً ضرورياً ولكنه ليس كافيا للنسخ. أضف إلى ذلك أن صورتى الكروماتين التى يمكن تمييزهما فى خلايا الفقاريات لا يرتبطا مباشرة مع نشاط الجين. فبينما يظل الهيتروكروماتين متكاثف وغير نشط فى بناء RNA فى الطور البينى فإن بقية الـ DNA (اليوكروماتين) لا يكون كله نشط نسخيا، حيث أنه فى المتوسط يكون حوالى ٧٪ فقط من تتابعات الجينوم يتم نسخها إلى جزيئات RNA فى خلية مميزة النواة النموذجية. لذلك أجريت محاولات للبحث عن طرق أخرى للكشف عن التغيرات التى تحدث فى اليوكروماتين فى تلك المناطق التى تُعبِّر عن جينات معينة.

أحد المؤشرات المهمة للتغير فى تركيب الكروماتين فى مناطق الجينات النشطة هو الحساسية لإنزيم النيوكلييز (DNase). فقد أثبتت الدراسات المتوالية زيادة حساسية الجينات النشطة للهضم بإنزيم DNase I، بينما الجينات غير النشطة ليست كذلك. بالإضافة إلى ذلك فقد وجد أن حساسية الجينات النشطة لـ DNase I يعتمد على وجود اثنين من البروتينات الكروموسومية غير الهستونية التى تعرف بالمجموعات عالية الحركة highyl mobility group (HMG) وهما HMG 14 و HMG 17 (ولقد سميا بذلك نظراً لحركيتهما العالية فى مجال كهربى فى جيل البولى اكريلاميد). فعند إزالة هذه البروتينات من الكروماتين النشط فإنه يفقد حساسيته تجاه إنزيم النيوكلييز، وعندما تضاف مرة أخرى تسترد الحساسية.

ولقد وجد أنه عندما يعامل الكروماتين المحتوى على الجينات النشطة أو التى لها امكانية التنشيط بواسطة تركيزات منخفضة من DNase I فإنه يحدث تكسُّر لجزيئات DNA فى عدد من المواضع التى تمثل المواضع فائقة الحساسية hypersensitive sites. وهذه المواضع من DNA عادة ما توجد فى المقدمة، أى مجاورة لنهاية الجينات النشطة المقابلة للطرف ٥َ لـ RNA الرسول. وهذه المواضع فائقة الحساسية لإنزيم النيوكلييز

يبدو أنها تُمثِّل النوافذ المفتوحة التى تسمح للبروتينات للدخول إلى تتابعات التحكم فى DNA، فهذه المناطق تكون خالية من النيوكليوسومات.

نشاط الجين يرتبط أيضا بالميثلة المنخفضة لـ DNA

فى معظم جينومات مميزة النواة الراقية بما فيها خلايا الثدييات فإن حوالى ٥٪ من قواعد السايتوسين (C) فى DNA تحوَّر بواسطة عملية ميثلة methylation عند الموضع ٥ فى حلقة السايتوسين. وعملية الميثلة تحدث بالدرجة الأولى عند التتابع CpG لتنتج mCpG (حيث mC تمثل ٥ ـ ميثايل سايتوسين)، وتظهر متماثلة على كلا خيطى DNA (حيث أن النيوكليوتيد الثنائى CpG دائما يزدوج مع التتابع GpC فى الحلزون المزدوج المتضادالإتجاه).

ولقد اتضح فى السنوات الأخيرة أن التتابعان CpG فى المناطق المجاورة لعدد كبير من الجينات تكون منخفضة الميثلة فى الأنسجة التى يتم فيها تعبير الجين بالمقارنة بالأنسجة التى يكون فيها الجين غير نشط. وقد أمكن تقدير درجة الميثله فى منطقة جين ما باستخدام إنزيمات restriction endonuclease، حيث تبيَّن أن غياب الميثلة فى الجين النشط لايكون كاملاً، فقد وجد أن مايقرب من ٣٠٪ من التتابعات CpG تكون مميثلة فى المناطق المنسوخة بالمقارنة بحوالى ٧٠٪ ميثلة لكل التتابعات CpG فى DNA فى الخلايا الحيوانية. وكما هو مشاهد فى حالة المناطق الحساسة للنيوكليز، فإن الميثلة المنخفضة تُغطِّى منطقة أكثر من الجزء المنسوخ لجين ما.

وبالرغم من أن ازالة الميثلة لاتكون مزدوجة مع بدء التعبير فى كل جين تم اختباره، فإن التماثل بينهما والمشاهد فى معظم الحالات يكون لافت للنظر. وهذا يطرح السؤال العام ما إذا كان التغير فى ميثلة DNA هو سبب أو نتيجة لتنشيط الجين؟. ويمكن للميثلة من تنظيم التعبير الجينى بطريقتين أساسيتين. الأولى هى أن إضافة مجموعة الميثايل على الموضع الخامس فى السايتوسين ربما يزيد (أو يخفض) التأثير المتبادل بين DNA والبروتينات الكابحة أو المنشِّطة، إذْ أن مجموعة الميثايل فى السايتوسين تنتأ (تمتد) فى الأخدود الرئيسى للحلزون المزدوج حيث غالبا ما يتم التعارف المتخصص بين DNA

والبروتين. والثانية حيث أن إضافة مجموعة الميثايل إلى السايتوسين تؤدى إلى ازدحام (حشد) جزيئى فى الأخدود الرئيسى فإن الميثلة تؤدى إلى تغيير اتزان الهيئة البنائية من الصورة B القياسية (نموذج الحلزون المزدوج لواطسون وكريك) إلى صورة أخرى (خاصة الصورة Z التى فيها يمكن للأخدود الرئيسى الكبير من إزالة بعض الإجهاد الفراغى الناتج عن وجود مجموعات الميثايل). وحيث أن البروتينات التى ترتبط بـDNA تكون حساسة بصورة عامة للبناء الفراغى لسلسلة الفوسفات ـ السكر فىDNA بالإضافة إلى تتابع القواعد عند مواضع التعارف، فإن مثل هذه التغيرات فى الهيئة البنائية ربما تغير بدرجة كبيرة درجة ارتباط الكابحات (أو المنشطات) بـ DNA. مع ذلك فإن العلاقة الحقيقية بين مستوى الميثلة والتعبير الجينى ما زالت غير واضحة. وأكثر من ذلك فإنه ليس من الواضح كيفية الإزالة الإنتقائية للميثلة فى بعض المواضع عندما يكون مرغوب تنشيط الجين فى هذا الموضع. واللغز الأخير ظهر من ملاحظة أن بعض مميزة النواة (خاصة الحشرات) تنظم نشاط جيناتها بدرجة عالية من الدقة بدون ميثلة DNA على الإطلاق.

بدء النسخ يتم بوساطه عوامل خلوية متخصصة التى تعمل على مواضع تقدم الحفز والمعززات

إن خلايا مميزة النواة المتمايزة لها كفاءة عالية فى التعبير الانتقائى لجينات معينة. فمعدلات البناء لبروتين ما فى خليتين فى نفس الكائن ربما يختلف بعامل قد يصل إلى 10^9، بمعنى أن جينات مميزة النواة التى لا يتم التعبير عنها تكون مغلقة تماما. بالمقارنة فإن أنظمة خلايا أولية النواة القابلة للكبح مثل أوبرون اللاكتوز فى بكتريا القولون تظهر اختلاف فى معدل نسخها لا يتعدى ألف مرة.

وبالإضافة إلى ارتباط عملية النسخ بتركيب الكروماتين ومستوى الميثلة، فإن التحكم فى بدء النسخ يمثل أيضا أحد العناصر الرئيسية فى تنظيم التعبير الجينى فى مميزة النواة. والدراسات الوراثية التى أجريت على جينات مميزة النواة لتحديد ما إذا كانت عمليات تنظيم النسخ هى ميكانيكيات موجبة أو سالبة التحكم، أوضحت أن معظم ميكانيكيات

التحكم فى النسخ هى ميكانيكيات مُوجبة التى تشمل الارتباط الانتقائى لعوامل متخصصة بتتابعات التحكم فى DNA التى تُنظِّم معدَّل بدء النسخ، وهذا حقيقى سواء نُسخ الجين بواسطة إنزيم RNA Polymerase I أو II أو III.

ولقد ثبت أن تتابعات تقدم الحفز Promoter والمُعزِّز enhancer تتوسط تعبير الجينات الخاصة بالخلية. والمُعزِّز هو تتابع من القواعد يكون ضرورى للنشاط الكامل لموضع تقدم الحفز، ولكن يمكن أن يتواجد فى مواضع مختلفة واتجاه مختلف بالنسبة لموضع بدء الحفز.

ولقد اكتشفت تتابعات المُعزِّز أولا فى فيروسات DNA المسببة للاورام مثل SV 40 و Polyoma، حيث وجد أن طفرة الانتقاصات فى منطقة المُعزِّز (الذى يتألف من ٧٢ زوج قاعدة ويحتوى على تكرر مترادف) فى DNA لفيروس SV 40تخفض تعبير الجين المبكر بعامل أكبر من ١٠٠. ثم ثبت بعد ذلك وجود تتابع المُعزِّز فى كثير من جينات الثدييات وجينات الفيروسات الأخرى. وأحد الأمثلة لتأثير المُعزِّز هو فتح نسخ جين الإيمنيوجليوبين، أما المثال الآخر هو تأثير الهورومونات الإسترويدية الذى سنناقشه بعد قليل. وأحد النماذج المقترحة لعمل المُعزِّز هو أن التفاعل المتخصص لتتابع المعزز مع بروتين (أوبروتينات) خلوية خاصة ينشئ بناء ثلاثى الأبعاد من DNA يكون ذات جاذبية عالية لإنزيم بلمرة RNA.

التحكُّم الموجب للتعبير الجينى بواسطة الهورمونات الإسترويدية: تأثير المُعزِّز وثبات DNA الرسول

تعتبر الهورمونات الإسترويدية steroid hormones عناصر مهمة فى التنظيم الفسيولوجى والتطور (التكوُّن) للحيوانات. فعند معاملة الخلية المستهدفة بالهورمون الاسترويدى يستحث بناء جزيئات RNA جديدة عادة خلال عدة دقائق. مثال ذلك أن إعطاء هورمون β- estradiol (وهو أحد الهورمونات الجنسية الأنثوية) إلى الدجاج تجعل قناة البيضات oviduct تزيد مستوى mRNA المُشفِّر لبروتين أُفالبيومين من ١٠ جزيئات إلى ٥٠,٠٠٠جزئ لكل خلية، بينما يزداد مستوى أُفالبيومين من مستوى منخفض جداً

يصعب الكشف عنه إلى مستوى يُمثِّل الناتج الرئيسى للبروتينات المتكونة حديثا. والهورمونات الإسترويدية مع ذلك لا تعمل مباشرة بذاتها، ولكن بدلا من ذلك فإنها ترتبط مع بروتينات مستقبلة عالية التخصص (تعرف بمستقبلات الهورمون الإسترويدى Steroid hormone receptors) التى يوجد منها عدة ألآف من النسخ فى السائل الخلوى لكل خلية. ومعقد الهورمون ـ المستقبل ينتقل بعد ذلك إلى النواة حيث يتفاعل مع موضع جينومى خاص (المُعزِّز) لفتح نسخ جين (أوجينات) معينة، وفى بعض الأحيان تكبح عملية النسخ.

ويظهر من ذلك أن تأثير المستقبلات الهورمونية الإسترويدية كمُنظِّمات مُوجبة (أو مُنشِّطات) للنسخ تُماثل تلك الخاصة بتنظيم النسخ بواسطة المعقد CAP - cAMP فى أولية النواة مثل بكتريا القولون، إلا أن أنظمة مميزة النواة تبدو أكثر تعقيداً. مثال ذلك أن أنواع مختلفة من الخلايا تحتوى على نفس المستقبل لهورمون إسترويدى معين، إلا أنها تبنى بروتينات مختلفة استجابة للهورمون. ويبدو من ذلك أن الجينات المستحثَّة بواسطة هورمون استرويدى ما هى فقط التى تكون متاحة للتنشيط فى كل نوع من الخلايا المستجيبة لهذا الهورمون.

يشترك أيضا فى التنظيم بالهورمونات الإسترويدية ميكانيكيات تعمل على مستويات أخرى خلاف التعبير الجينى. وأهم هذه الميكانيكيات هو الثبات الانتقائى لمنسوخات RNA المستحدثة بالهورمون ضد التفكك السيتوبلازمى. مثال ذلك أنه فى كبد ضفدع xenopus تكون فترة نصف العمر لـ mRNA الخاص بالفيتيلوجنين Vitellogenin (فيتيلوجنين هو بروتين أولى لمح البيض) فى حدود ٣ أسابيع فى وجود الهورمون المستحث إستروجين estrogen، بينما تنخفض فترة نصف العمر إلى ١٦ ساعة عند سحب الإستروجين. ومرة أخرى يبدو أن الهورمون يعمل على ثبات mRNA خلال نوع من البروتينات المستقبلة التى تختلف عن البروتينات المستقبلة التى تنشط النسخ. ولقد شوهد أيضا الثبات الانتقائى لـ mRNA لعدد من الجينات الأخرى التى تنشط بواسطة الهورمونات الإسترويدية. بالإضافة إلى ذلك فإنه قد سجل حدوث تغير فى معالجة RNA بعد معاملة الخلايا المستهدفة بالهورمون. ونجد من ذلك أن الهورمونات الاسترويدية

ترفع مستوى أنواع معينة من جزيئات mRNA بواسطة معالجات متناسقة لكل من عمليات النسخ وعمليات ما بعد النسخ.

التحكم فى الترجمة فى مميزة النواة

إن أهمية التحكم على مستوى الترجمة فى مميزة النواة لم يكن معروضا للمناقشة لفترة طويلة. فالسؤال الذى كان مطروحاً آنذاك هو لماذا تبدد الطاقة فى بناء mRNA الذى قد لايستخدم بواسطة الخليه؟. فالتنظيم على مستوى الترجمة قد يكون ذو معنى فى البكتريا التى تتميز بجزيئات mRNA عديدة التوريث Polycistronic. فإذا كانت الخلية فى حاجة إلى أحد النواتج البروتينية بينما لا تحتاج إلى الآخر فإن لتحكم على مستوى الترجمة يكون مطلوبا. بالمقارنة فإن جزيئات mRNA فى مميزة النواة تكون أحادية التوريث monocistronic، بالإضافة إلى ذلك فإن بناء هذه الجزيئات يحتاج إلى خطوات عديدة بعضها يكون تحت التنظيم الخلوى. وقد يبدو من ذلك أن تنظيم الترجمة فى مميزة النواة يكون غير ضرورى. إلا أن الدراسات البيوكيمائية أوضحت أن التنظيم على مستوى الترجمة فى مميزة النواة يوفر طريقة سريعة للتحكم فى التعبير الجينى ويستخدم فى مدى واسع بواسطة الكائنات مميزة النواة الراقية.

فى بعض الحالات يتم تعديل مستوى الترجمة بواسطة تغيير لعناصر أساسية فى جهاز الترجمة الخلوى، ومثل هذه التغيرات تؤثر بالطبع على نشاط كل جزيئات mRNA فى الخلية. مثال ذلك أنه يبدو أن فسفرة البروتينات الريبوسومية (خاصة البروتين 6S فى الوحدة الريبوسومية 40S) تكون مرتبطة بمستوى البولى سوم العالى بعد استحثاث خلايا الثدييات بواسطة أنواع مختلفة من عوامل النمو. أو كما سنرى فى الجزء التالى فإن التحوُّر لعامل البدء فى الترجمة eIF - 2 هو الوسيلة المستخدمة بواسطة خلايا الدم الحمراء غير الناضجة reticulocytes لربط بناء بروتيناتها مع توافر الهيم (وهو المجموعة التعويضية المرتبطة فى الهيموجلوبين).

وهناك استراتيجيات أخرى تطبق لتغيير الترجمة لنوع واحد من جزيئات mRNA (أو مجموعة mRNA خلوية). وعدد كبير من هذه الميكانيكيات تعمل عند أو قبل خطوة

البدء فى الترجمة. والميكانيكيات المشتملة قبل البدء هى التباين الكبير فى فترة نصف العمر لـ mRNA، وكذلك تغيير ثبات mRNA استجابة لبعض العوامل. والبديل عن ذلك هو أن mRNA قد يوجد فى حاله ثبات فى السيتوبلازم ولكنه يعزل بطريقة ما عن جهاز الترجمة. أضف إلى ذلك أن طور الإستطالة فى بناء البروتينات يمكن أن يُنظَّم بطريقة متخصصة كما اتضح من تأثير جسيمات إشارة التعارف signal recognition particles (SRP) على استطالة البروتينات المفرزة خارج الخلية وعلى ذلك فلم يعد هناك شك فى اشتراك التحكم فى الترجمة فى وظائف خلايا مميزة النواة. وكما ذكرنا فإن مثل هذه الميكانيكيات تعمل على عناصر مختلفة من جهاز الترجمة.

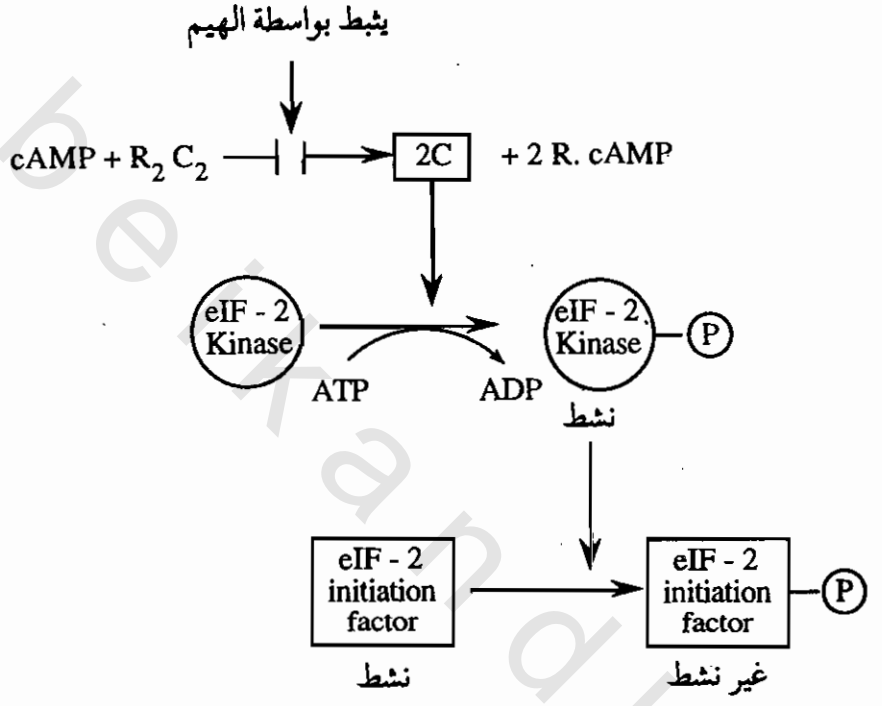
التحكم فى الترجمه لبناء الهيوجلوبين بواسطة الهيم

أحد الأمثلة للتنظيم على مستوى الترجمة يوجد فى خلايا الدم الحمراء غير الناضجة reticulocyte فى الثدييات. هذه الخلايا فقدت أنويتها ولكنها تحتفظ بمستوى عالى من mRNA الذى يشفِّر أساساً لسلاسل الهيموجلوبين. وخلايا الدم الحمراء غير الناضجة تتميز بمعدَّل عالى لبناء البروتين، لذلك فإن مستخلص هذه الخلايا كان النظام المفضل لدراسة عملية الترجمة. وفى الحقيقة فإن معظم معلوماتنا عن الميكانيكيات المشتملة فى بناء البروتين قد استمدت على الدراسات التى أجريت على مستخلص هذه الخلايا.

يقوم مستخلص خلايا الدم الحمراء ببناء سلاسل بروتين الهيموجلوبين بمعدَّل عالى ولكنه ينخفض مالم يضاف الهيم (فى الخلية يتكون الهيم فى الميتوكوندريا التى لا تتواجد فى مستخلص الخلايا). ويحدث الانخفاض لأن النقص فى الهيم يُنشِّط أحد منبطات بدء بناء البروتين الذى يطلق عليه المثبط المتحكم فى الهيم heme controlled inhibitor (HCI)، والذى ثبت أنه إنزيم كينيز Kinase متخصص. والهدف الذى يعمل عليه هذا الكينيز هو عامل البدء eIF - 2 فى الترجمة (eIF - 2 يقابل IF - 2 فى غير مميزة النواة) الذى يرتبط بـ GTP وينقل $met - t\ RNA_f$ إلى الوحدة الريبوسومية الفرعية 40S. وتثبيط eIF-2 بواسطة الفسفرة يؤدى إلى توقف بناء البروتين.

كيف يمكن للهيم من تنظيم نشاط هذا الكينيز؟. تأثير الهيم على هذا الكينيز الذى

يعرف بـ eIF - 2 Kinase يتم بواسطة إنزيم كينيز آخر معتمد على AMP الحلقى (شكل ٢٦ ـ ١٢). فانزيم eIf - 2 Kinase الذى يُحوِّر عامل البدء eIF - 2 يوجد فى صورتين، صورة غير مفسفرة غير نشطة وصورة مفسفرة نشطة. وفسفرة eIF - 2 Ki-



شكل ٢٦ ـ ١٢

سلسلة الفسفرة التى تؤدى إلى تثبيط عامل بدء الحفز eIF - 2 فى مميزة النواة.

nase تُستحثُّ بواسطة الكينيز المعتمد على AMP الحلقى الذى يتألف من اثنين من الوحدات المنظمة (R) واثنين من الوحدات الحافزة (C). إن المعقد $R_2 C_2$ غير النشط يتفكك بواسطة AMP الحلقى (cAMP) إلى الوحدتين C النشطة حفزيا والوحدتين R. ويقوم الهيم بوقف هذا التفكك وبذلك فإن إنزيمى الكينيز فى المسار لاتصبح مُنشطَّة وبالتالى فإن eIF - 2 لايفسفر ويظـل نشط فى بدأ بناء البروتين. وهذا النظـام من التحكم يماثل التحكم فى أيـض الجلايكوجـين، والتماثل الآخر هو أن التأثيـرات

المُنظِّمة لإنزيمات الكينيز هذه تُعكس بواسطة إنزيمات فوسفاتيز متخصصة phospha-tase. ويعتقد وجود إنزيمات كينيز أخرى التى تُنشِّط بعوامل مختلفة، ولكن جميعها تمارس تأثيراتها التنظيمية على نفس العامل eIF - 2 اللازم لعملية بدء بناء سلسلة عديد الببتيد.

obeikandl.com