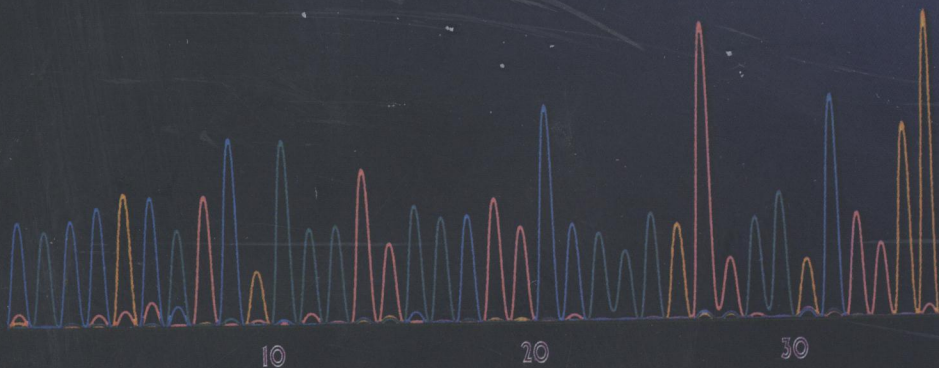


دكتور / فتحي محمد عبد التواب

البيولوجيا الجزيئية للجينوم



CACCGCATCGAAATTAAGTTCCAAAGTTAAGCTTGG



مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamahelali@yahoo.com



المكتبة الأكاديمية
شركة مساهمة مصرية



البيولوجيا الجزيئية للجينوم

أساذ دكنور
فئحي محمد عبدالنواب



الناشر
المكتبه الاكاديميه
شركه مساهمه مصريه

٢٠٠٧

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فضاء العلوم الطبيعيله

www.snvdz.com



مع تحيات د. سلام حسين عويد الهلالي

<https://scholar.google.com/citations?>

[user=t1aAacgAAAAJ&hl=en](https://scholar.google.com/citations?user=t1aAacgAAAAJ&hl=en)

salamalhelali@yahoo.com

<https://www.facebook.com/salam.alhelali>

[https://www.facebook.com/groups/
/Biothesis](https://www.facebook.com/groups/Biothesis)

[https://www.researchgate.net/profile/
/Salam_Ewaid](https://www.researchgate.net/profile/Salam_Ewaid)

07807137614



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ هَلْ أَتَى عَلَى الْإِنْسَانِ حِينٌ مِّنَ الدَّهْرِ لَمْ يَكُنْ
شَيْئًا مَّذْكُورًا ﴿١﴾ إِنَّا خَلَقْنَا الْإِنْسَانَ مِنْ نُطْفَةٍ
أَمْشَاجٍ نَّبْتَلِيهِ فَجَعَلْنَاهُ سَمِيعًا بَصِيرًا ﴿٢﴾ ﴾

صدقة الله العظيم

سورة الإنسان (آيات ٢، ١)

إهداء إلى

زوجتي العزيزة الأستاذة الدكتورة/ مي فؤاد محمود
لمؤازرتها المستمرة لي أثناء معاناتي في وضع هذا الكتاب

إبنى وإبنتى الأعزاء عمرو ، ونورتان

لنقتهما في دور الآداب والعلوم في تقدم الأمة

مُتَكَمِّمَات

شهدت بداية القرن العشرين محاولات جادة من جانب علماء الوراثة لتحديد هوية بعض الجينات ورسم الخرائط الوراثية لبعض الكائنات وخاصة حشرة الدروسفلا ونبات الذرة الشامية والفأر والبكتريا والخميرة. وقد إستتبط علماء الوراثة مجموعة من الطرق لرسم الخرائط الوراثية والتي إعتمدت على تناول الدراسة بمسارين رئيسين:

إذ إعتمد المسار الأول على تحليلات الطفرات التلقائية أو تلك الطفرات المستحدثة بالمطفرات الكيماوية أو الفيزيائية.

فى حين إعتمد المسار الثانى على إستخدام الطفرات المتحصل عليها لرسم الخرائط الوراثية بتحليلات الإرتباط والعبور، وفى بعض الكائنات مثل الدروسفلا أمكن إستنباط الخريطة المادية Physical لتحديد مواقع الجينات على الكروموسومات. و قد كانت هذه الطرق التى تمت منذ أكثر من ثمانين عاما تعد فعالة فى وقتها وتم إستخدامها على نطاق واسع فى الدراسات الوراثية المبكرة إلا أنه يعيب تلك الطرق ضرورة توفر طفرة واحدة على الأقل لكل جين فى الجينوم وأنه من الصعب الحصول على هذه الطفرات بالإضافة إلى أن الطفرات غالبا ما تكون مميتة مما يجعل من الصعب إن لم يكن من المستحيل رسم خريطة لجين طافر. لذلك إستبدل الوراثيون فى منتصف الثمانيات من القرن الماضى هذه الطرق الكلاسيكية المعتمدة على الطفرات بإستخدام تقنيات د ن أ المعاد صياغته Recombinant DNA لإجراء التحليلات الوراثية. وفى هذه الطريقة يتم تجزئة جينوم الكائن إلى شظايا أو قطع محددة من التتابعات

التي يتم تحميلها في بلازميدات لعمل كلونات يطلق عليها في مجموعها المكتبة الجينومية.

ويتم بعد ذلك ترتيب الكلونات في مجموعات متداخلة Overlapping والتي يتم تجميعها في الخرائط الوراثية Genetic Maps والخرائط المادية Physical Maps المشتمة على الجينوم بأكمله. وتتمثل الخطوة النهائية في تحليل تتابعات الكلونات والتعرف على جميع الجينات التي يحتويها هذا الجينوم من خلال تتابعات النيوكليوتيدات وبذلك أصبح في إستطاعتنا لأول مرة عزل جين معين من مجموع الجينات التي يحتويها جينوم ما والتي قد تصل إلى عشرات الآلاف من الجينات وكلونته وإجراء الدراسات عليه بمفرده ومعرفة تركيبه ووظيفته وتفاعله مع البيئة المحيطة أو مع غيره من الجينات الأخرى ويطلق على مجموع هذه الطرق مصطلح الجينوم Genomics.

وقد أدى إختراع جهاز PCR إلى إحداث طفرة هائلة غير مسبوقة في مجال التحليلات الجينومية.

ومن جهة أخرى نتج عن الكم الهائل من البيانات في المكتبات الجينومية وخاصة تلك التي تختص بالكائنات الراقية مثل الإنسان بما يحتويه من ٣٠-٤٠ ألف جين إلى ضرورة اللجوء إلى إستخدام الحاسبات الإلكترونية وإستنباط طرق جديدة لتحليل هذه البيانات و المساعدة في رسم الخرائط الجينومية وقد نشأ عن ذلك فرع جديد من العلوم يطلق عليه المعاوماتية الحيوية Bioinformatics وهو عبارة عن تزاوج بين البيولوجيا والحاسبات والتي فتحت مجالا واسعا لتحليل تركيب وظائف الجينومات المعقدة.

ويتم عادة تقسيم التحليلات الجينومية إلى عدة أقسام حيث تعرف الجينوميا Genomics بأنها تشتمل على دراسة تركيب ووظيفة الجينوم ويطلق مصطلح الجينوميا الوظيفية Functional Genomics على دراسة وتحديد وظيفة ناتج الجين ويشمل ذلك تعبير الجين والعلاقة بين نتاج و تركيب ناتج الجين مع غيره من نواتج جينات أخرى في نفس الكائن أو في غيره من الكائنات الأخرى والتفاعلات الجزيئية لنواتج الجين وتعرف الجينوميا التركيبية Structural Genomics على أنها الدراسات المختصة بتحديد الوحدات التركيبية والتركيب الكامل للبروتين وعلاقة تلك التحليلات التركيبية بالوظيفة.

ومن جهة أخرى نشأت تحليلات الجينوميا المقارنة Comarative Genomes والتي تُعنى باستخدام التشابه في التتابعات النيوكليدية والترتيب المقارن للجينات في مختلف الكائنات لتحديد وظيفة الجين وعلاقاته التطورية.

ويطلق على دراسة المحتوى الكلى للخلية من جزيئات ر ن أ والذى يعكس طرز التعبير الجيني مصطلح Transcriptome في حين يطلق مصطلح Proteome على المحتوى الكلى للخلية من البروتينات والذى يعكس إمكاناتها البيوكيماوية.

وقد أدت تطبيقات الكلونة الجينات أو تكنولوجيا الجين إلى فتح آفاق واسعة في مجالات متعددة مثل إنتاج الأدوية المعدلة وراثيا والأكثر فاعلية وفي إنتاج نباتات وحيوانات معدلة وراثيا ومكتسبة لصفات هامة مثل تحمل الظروف البيئية القاسية مثل الجفاف أو الملوحة أو الحرارة المرتفعة....إلخ.

كما توصلت دراسات وبحوث تكنولوجيا الجين إلى إستنباط طرق حديثة لعلاج بعض الأمراض الوراثية فيما يسمى العلاج بالجينات وكذلك إنتاج أدوية حديثة مهندسة وراثيا وأكثر فاعلية فى علاج الكثير من الأمراض.

إلا أن التقدم الهائل فى هذه المجالات صاحبه بعض التخوف من إمكان حدوث بعض الأخطار على الإنسان والبيئة نتيجة للتوسع فى إستخدام الكائنات المعدلة وراثيا (GMO) فى الغذاء أو الدواء وقد أدى ذلك إلى إنشاء لجان قومية للأمان الحيوى للتأكد من مدى سلامة الغذاء أو الدواء وعدم وجود أى خطورة من إستخدامه.

كما نشأت بعض المخاوف المتعلقة بأخلاقيات إستخدام تقنيات العلاج بالجينات وتم وضع معايير تحدد الشروط الواجب إتخاذها عند إجراء هذه التقنيات مع التأكيد على تحريم إستخدامها فى الخلايا التناسلية (الجرثومية) للإنسان أو فى إدخال جينات لصفات معينة بهدف رفع قدرات أو إمكانيات الفرد عن المستوى العام للمجتمع الذى يعيش فيه.

إن كل يوم يأتى بجديد فى مجال الجينوميا مما يجعل الباحثون فى سباق مستمر مع الزمن لملاحقة التطورات المستمرة فى هذا المجال الحيوى والذى يتعلق مباشرة بالإنسان و بيئته.

ويضم الكتاب فى فصوله الأولى شرحا تفصيليا لتركيب و وظائف المادة الوراثية والتعبير الجينى وذلك للتمهيد للفصول الخاصة بالتحليلات الجينومية وتطبيقات تكنولوجيا الجين.

أمل أن يساهم هذا الكتاب فى إثراء المكتبات العربية بالموضوعات المتعلقة بالبيولوجيا الجزيئية وهندسة الجينات لما لهذه الموضوعات الحيوية من

أهمية كبيرة للباحثين والدارسين في كليات العلوم والزراعة والطب والصيدلة وغيرها من المعاهد والمراكز البحثية في مصر والبلاد العربية.

ولا يفوتني أن أتقدم بالشكر والتقدير إلى المكتبة الأكاديمية ممثلة في صاحبها ومديرها الأستاذ/ أحمد أمين ، كما أتقدم بشكر خاص للمهندس/ حمدي قنديل مدير الإنتاج بالمكتبة الأكاديمية على ما بذله من جهد متواصل في متابعة مراحل طبع هذا الكتاب.

والله سبحانه و تعالى ولى التوفيق ...؛

المؤلف

فنحي محمد عبدالنواب

القاهرة في / / ٢٠٠٦

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المحتويات

الصفحة	الموضوع
٣١	الفصل الأول: علم الوراثة من منظور تاريخي
٣٣	التحول الوراثي
٣٥	الإستقال الوراثي
٣٦	ثبات كمية د ن أ في الكروموسومات
٣٧	التأثير المطفر للأشعة فوق البنفسجية
٣٩	تركيب جزئ د ن أ
٤٠	أهم الإنجازات في مجال البيولوجيا الجزيئية
٤٣	الفصل الثاني: تركيب جزئ د ن أ DNA Structure
٤٤	المعادلة المركزية Central Dogma
٤٧	قاعدة Charagaff لتزاوج القواعد النيتروجينية
٤٨	نموذج الحلزون المزدوج لجزئ د ن أ
٥٣	بعض خواص جزئ د ن أ
٥٣	ثبات التناظر Stability of Tautomeric Forms
٥٦	الذنترة وإعادة الإتحاد Denaturation and Annealing
٦٠	الصور المختلفة لجزئ د ن أ

٦٣ ارتباط جزئ د ن أ البكتيري ببروتينات شبه هستونية

٦٥ الفصل الثالث: تناسخ د ن أ

DNA Replication

٦٨ الطريقة شبه المحافظة لتناسخ د ن أ (تجربة ميسيلسون وستاهل) ...

٧٢ منشأ التناسخ وشوكات التناسخ ووحدات التناسخ

٧٧ نموذج بناء جزئ د ن أ

٨٣ بناء د ن أ في الكائنات الدقيقة

٨٣ أنواع إنزيمات بلمرة د ن أ في بكتريا القولون

٨٥ دور إنزيمات د ن أ في تصحيح الأخطاء Proofreading

٨٩ أهمية RNA البادئ لتناسخ جزئ د ن أ

..... أنواع البروتينات التي تساعد على فك الحزنة وانفصال سلسلتي

٩٣ د ن أ

..... تركيب إنزيم البلمرة DNA pol III ودور إنزيمات Topoisomerases

٩٧ في تناسخ د ن أ

١٠٦ نموذج الدوائر المتدرجة لتناسخ د ن أ الحلقي Rolling Circles ...

١٠٩ بدء شوكات التناسخ عند منشأ التناسخ

..... الفصل الرابع: تناسخ الكروموسومات

١١٣ في الخلايا مميزة النواة

DNA Replication in Eucaryotes

١١٣ بناء د ن أ في مميزة النواة

١١٩	وجود تتابعات محددة من د ن أ تميز مناشئ التناسخ
١٢٢	ضوابط لمنع تكرار بدء التناسخ في الخلايا مميزة النواة
١٢٤	تضاعف النيوكليوسومات عند شوكات التناسخ
١٢٨	تناسخ منطقة التلومير في الكروموسوم
١٣٠	تتابع تناسخ مناطق د ن أ المختلفة خلال فترة البناء (S)
١٣١	يتم تناسخ مناطق الهيتروركروماتين متأخرًا في فترة البناء (S)
١٣٢	تناسخ الجينات الأكثر نشاطًا يتم في مرحلة مبكرة جدًا من فترة S ..
١٣٥	تنظيم نشاط مناشئ التناسخ حسب المراحل التكوينية للكائن
١٣٦	إنزيمات بلمرة د ن أ في الخلايا المميزة النواة

الفصل الخامس: الأساس الجزيئي للطفرات

١٣٩	وطرق إصلاح أخطاء التناسخ
١٤٠	طبيعة الطفرات
١٤١	طفرات تغير القاعدة الواحدة Single Base Mutation
١٤٤	معدل الخطأ عند إضافة النيوكليوتيدات أثناء عملية التناسخ
١٤٤	طرق التحكم في مستويات الطفرات
١٤٥	الجينات المطفرة Mutators
١٤٦	نتائج أخطاء الانزلاق Slippage Errors أثناء التناسخ
١٤٧	الطفرات الناتجة عن تغيرات كبيرة نسبيًا في تتابعات القواعد
١٤٨	أهمية دراسة المطفرات الكيماوية
١٥٢	ميكانيكيات إصلاح الأخطاء في د ن أ

١٥٥	إصلاح طفرات التعرض للأشعة فوق البنفسجية
١٥٦	إصلاح طفرات إضافة الأكليل
١٥٩	الإصلاح بالاستئصال
١٦٢	دور إنزيمات الجليكوسيليز في الإصلاح
١٦٢	استئصال قاعدة واحدة
١٦٥	استئصال النيوكليوتيدة
١٦٨	تصحيح أخطاء عدم المطابقة Mismatch Repair
١٧٠	تصحيح أخطاء ما بعد التناسخ
١٧٠	الإصلاح بالاتحاديات الجديدة
	دور بروتينات الإنقاذ S.O.S. في إصلاح دن أ (الإصلاح القابل
١٧٣	للخطأ Error Prone Repair)
١٧٥	المطفرات الطبيعية وطرق التعرف عليها

الفصل السادس: بناء ر ن أ في غير ممزة النواة

RNA Synthesis in Prokaryotes

١٧٩	تركيب جزئ ر ن أ
١٨٠	البناء الأنزيمي لجزئ ر ن أ على قالب دن أ
١٨٣	تركيب إنزيم بلمرة ر ن أ RNA Polymerase
١٨٧	اختيار سلسلة واحدة من دن أ للعمل كقالب لبناء ر ن أ
١٨٩	اتجاه البناء في جزئ ر ن أ
١٩١	دور منطقة تتابع المستبدئ Promoter في بناء ر ن أ

الموضوع الصفحة

١٩٦		تأثير ارتباط إنزيم البلمرة مع تتابع المستبدئ Promoter في فك حلزنة د ن أ وبدء عملية النسخ
١٩٨		الكفاءة النسبية لتتابعات المستبدئ Promoters
١٩٩		دور البروتينات المنظمة Regulators في التأثير على بدء النسخ
٢٠٠		نيوكلتيدات بدء بناء سلسلة ر ن أ
٢٠٠		فك الحلزنة وإعادتها أثناء تقدم إنزيم بلمرة ر ن أ
٢٠١		دور إشارات الإنهاء أو التوقف في انتهاء النسخ

٢٠٥ الفصل السابع: بناء ر ن أ في مميزة النواة

RNA Synthesis in Eucaryotes

٢٠٥		أنواع إنزيمات بلمرة ر ن أ في مميزة النواة
٢٠٧		دور عوامل النسخ Transcription Factors (TF) في الارتباط بالمستبدئ Promoter
٢١٢		اختلاف النشاط النسخي لإنزيم RNA pol II حسب تتابعات د ن أ القالب
٢١٤		تعديل أو تجهيز النسخ الأولية لسلاسل mRNA
٢١٩		حذف تتابعات كبيرة متخللة من hnRNA أثناء تجهيز mRNA في النواة
٢٢١		تراكب ر ن أ المراسل RNA Splicing
٢٢٤		دور البروتينات النووية الصغيرة snRNA في عملية التراكب
٢٢٥		Splicing
٢٢٥		يتم حذف الإنترونات في شكل عروات Lariats

٢٣٠	حذف عدة إنترونات من كل جزئ من hnRNA
٢٣٣	بناء ر ن أ الريبوسومي على مجموعات مترادفة من الجينات المتماثلة

الفصل الثامن: الشفرة الوراثية

٢٣٧

Genetic Code

٢٣٧	التوازي بين تتابع القواعد في جزئ د ن أ وتتابع الأحماض الأمينية في البروتين Colinearity Between Base Sequences in DNA and Amino Acid Sequences in Protein
٢٤١	الشفرة ثلاثية Triplet Code
٢٤٣	الأدلة الوراثية على ثلاثية الشفرة Genetic Evidence for a Triplet Code
٢٤٨	استنباط الشفرة الوراثية Dicephring of the Genetic Code
٢٤٩	تقنية المتعدد النيوكليتيدي المتجانس Homopolymers
٢٥٢	تقنية البوليميرات المختلقة العشوائية Random Copolymers
٢٥٤	تقنية الارتباط المباشر لثلاثيات القواعد التركيبية Direct Triplet Binding
٢٥٧	تقنية عديدات النيوكلييدات المعروفة التسابع Polymers of Known Sequence
٢٦١	الخواص الرئيسية للشفرة الوراثية
٢٦١	الشفرة الوراثية تقرأ بصورة مستمرة بلا فواصل أو تداخل بين الكودونات

الصفحة	الموضوع
٢٦٤	الشفرة مترادفية المعني Synonyme (أو انحلالية Degenerate)
٢٦٨	التأرجح في مضاد الشفرة
٢٧٠	كودون بدء الترجمة وكودونات إنهاء الترجمة
	اختلاف مقادير tRNA النوعية وتكرار استخدام الكودونات المختلفة
٢٧٢	في الشفرة
٢٧٣	تحيز الشفرة Codon Bias
٢٧٥	الشفرة الوراثية عامة Universal (تقريباً)
٢٧٦	تأكيد الشفرة الوراثية في الخلية الحية

الفصل التاسع: بناء البروتين

٢٧٧	Protein Synthesis
٢٨١	دور إنزيم Aminoacyl-tRNA Synthetase في عملية الترجمة
٢٨٦	دور الريبوسومات في تكوين الروابط الببتيدية
٢٩٢	تحرك الريبوسومات خطوة خطوة على سلسلة mRNA القالب
٢٩٣	مراحل عملية بناء البروتين
٢٩٤	مرحلة البدء Initiation Stage
٣٠٠	عوامل البدء
٣٠٢	اتجاه الترجمة (5'→3')
٣٠٣	مرحلة الاستطالة Elongation Stage
٣٠٥	مصدر الطاقة اللازمة لعملية الاستطالة
	دور عوامل الاستطالة Elongation Factors (EF) في بناء
٣٠٦	البروتين

٣٠٨	 Termination (Release) مرحلة إنهاء الترجمة
٣١١	 دور GTP في مراجعة أخطاء الترجمة
٣١٢	 البقعة السحرية "pp Gpp" Magic Spot
٣١٣	 دور بعض المضادات الحيوية في وقف بناء البروتين
٣١٧	 الترجمة في مميزة النواة

الفصل العاشر: تنظيم التعبير الجيني

٣١٩

في غير مميزة النواة

Regulation of Gene Expression in Procaryotes

٣٢٢	 Types of Feedback Inhibition أنواع التثبيط بالتغذية الرجعية
٣٢٤	 Isozymes تعدد الصور الإنزيمية (مشابهات الإنزيم)
٣٢٦	 Concerted Feedback Inhibition التثبيط المتناسق
٣٢٦	 Additive or Commulative FBI النشاط التجمعي أو التراكمي
٣٢٧	 Co-operative FBI التثبيط التعاوني
٣٢٧	 Genetic Control التحكم الوراثي
٣٣٢	.. Operon دور البروتينات المنشطة في بدء عملية النسخ للأوبرون
٣٣٦	 تعريف الأوبرون
٣٣٦	 العناصر الرئيسية للأوبرون
٣٣٧	 Lac Operon تركيب أوبرون اللاكتوز
٣٤٠	 الأدلة الوراثية لإثبات نموذج الأوبرون
٣٤٤	 Typtophan Operon أوبرون التربتوفان
٣٤٧	دور منطقة التباطؤ Attenuation في تنظيم نسخ أوبرون التربتوفان

الفصل الحادي عشر: تنظيم التعبير الجيني

٣٥٣

في مميزة النواة

Regulation of Gene Expression in Eucaryotes

٣٥٧

..... Gene-in-Site التنظيم المكاني

٣٥٨

..... Gene-in-Time التنظيم الزماني

٣٦٠

..... Transcription Factors عوامل النسخ

٣٦٤

..... Promoter and Enhancer البروموتور والمحفز

٣٦٤

..... البروموتور

٣٦٦

..... المحفز

٣٦٨

..... تنظيم النشاط النسخي بعوامل بيئية

٣٦٨

..... الحرارة وجينات الصدمة الحرارية

٣٧٠

..... الضوء : جينات ريبيلاز كاربوكسيليز في النبات (RBC)

٣٧٢

..... تنظيم النسخ بواسطة عوامل بيولوجية

٣٧٢

..... الهرمونات الستيرويدية

٣٧٤

..... الهرمونات الببتيدية

٣٧٦

..... Post-transcription Regulation تنظيم التعبير الجيني بعد النسخ

٣٧٧

..... Alternative Splicing of RNA بدائل التراكيب

٣٧٨

..... Troponin جين التروبونين

٣٧٩

..... Calcitonin جين كالسيتونين البشري

٣٨١

..... Sxl جين المرتبط بالجنس

الصفحة	الموضوع
٣٨٣	 Stability of mRNA معدل ثبات م ر ن أ
٣٨٥	 mRNA Transport انتقال م ر ن أ
٣٨٨	 mRNA Editing مراجعة م ر ن أ
٣٩٠	 تنظيم الترجمة في غير مميزة النواة
٣٩٤	 تنظيم الترجمة في مميزة النواة
٤٠٣	الفصل الثاني عشر: تكنولوجيا د ن أ المعاد صياغته
	Recombinant DNA Technology
٤٠٤	 Restriction Endonucleases أنزيمات القطع المحددة
٤١٠	 Cloning الكلونة
٤١٣	 Cloning Vectors أنواع ناقلات الكلونة
٤١٣	 البلازميد
٤١٣	 الفاج
٤١٤	 انكوزميد
٤١٤	 YAC
٤١٤	 BAC
٤١٦	 المكتبة الجينومية
٤٢٠	 cDNA مكتبة
٤٢٥	 تكوين مكتبة cDNA من جزيئات منتخبة من م ر ن أ
٤٢٨	 طرق الحصول على الكلون المرغوب من مكتبة الجينات
٤٣٢	 تحديد وعزل كلون نوعي من مكتبة الجينات

الموضوع الصفحة

٤٣٧	 Design of Probes تصميم الواسمات
٤٣٨	 cDNA استنباط الواسمات بالإستعانة بمكتبة
٤٣٩	 استنباط الواسمات بمعلومية تتابعات الأحماض الأمينية للبروتين
	Multigene استنباط الواسمات لجين ضمن مجموعات جينات متقاربة
٤٤٣	 Family
٤٤٤	 PCR تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل
٤٤٩	 PCR الشروط الواجب توافرها في تجارب
٤٤٩	 PCR طرق تحليل نواتج
٤٥٠	 التفريد الكهربى
٤٥١	 PCR كلونة نواتج
٤٥٥	 دراسة موقع وتركيب الجين في جزئ د ن أ
٤٥٥	 Gene Location تحديد موقع الجين
٤٥٩	 فصل الكروموسومات في مميزة النواة البدائية
	تحديد موقع الجين على كروموسومات مميزة النواة بطريقة التهجين
٤٦٢	 In Situ Hybridization في الموضع
٤٦٤	 DNA Sequencing تحليل التتابعات النيوكليدية في جزئ د ن أ
٤٦٤	 Chain Termination طريقة إنهاء بناء السلسلة
٤٦٨	 Chemical Degradation طريقة الهدم الكيماوى
٤٧٠	 PCR تحليل تتابعات نواتج
٤٧٦	 تكوين تتابعات طويلة من د ن أ
٤٧٨	 بعض الإنجازات الهامة في تحليل تتابعات د ن أ

الفصل الثالث عشر: التحليلات الجينومية

٤٨١

Genomic Analysis

٤٨٣

طرق تكوين التتابعات المتجاورة Assembly of Contigs

٤٨٤

طريقة Shotgun

٤٨٦

طريقة Clone Contig

٤٨٦

المشي على الكروموسوم Chromosome Walking

٤٨٧

القفز على الكروموسوم Chromosome Jumping

استخدام الخرائط الوراثية والفيزيائية للمساعدة في بناء تتابعات

٤٩٢

الجينوم

٤٩٤

دراسة ما بعد الجينوميا Post-Genomics

٤٩٥

تحديد موقع الجين في تتابعات الجينوم

٤٩٦

البحث عن إطار قراءة مفتوح ORF

٤٩٨

تحديد ORF الصحيحة

٥٠٠

تحديد وظيفة جين غير معروف

٥٠٠

تحليلات الحذف Deletion Analysis

٥٠١

Reporter Gene

٥٠٤

تحديد نواتج ترجمة جين مكلون HART, HRT

تحليل البروتينات باستخدام الطفرات معملياً Site Directed

٥٠٩

Mutagenesis

٥١١

هندسة البروتين Protein Engineering

٥١٢

دراسة التفاعلات بين البروتينات

٥١٣

استعراض الفاج Phage Display

٥١٤	 Yeast Two-hybrid System نظام الهجينان في الخميرة
	Gene Silencing تقنيات إسكات التعبير الجيني
٥١٧	 Gene Knockout, Gene Knockdown
	Trascriptome دراسة المحتوى النسخي والمحتوى البروتيني للجينوم
٥٢١	 and Proteome
٥٢٩	 بعض المفاهيم الجديدة الناتجة عن التحليلات الجينومية

الفصل الرابع: تطبيقات تكنولوجيا الجين

Applications of Gene Technology

٥٣٧	 إنتاج بروتينات معدلة وراثيًا
٥٣٩	 الأنسولين المعدل وراثيًا
٥٤٤	 إنتاج هرمون النمو البشري في خلايا بكتريا القولون
٥٤٧	 إنتاج عامل التجلط VIII
٥٥٠	 إنتاج بروتينات بشرية معدلة أخرى
٥٥١	 إنتاج فاكسينات بتكنولوجيا الجين
٥٥٤	 استنباط فاكسينات حية معدلة وراثيًا
	Recombinant إنتاج بروتينات معدلة وراثيًا في الحيوانات الحية
٥٥٦	 Protein From Live Animals
	Recombinant Protein إنتاج بروتينات معدلة وراثيًا في النبات
٥٥٧	 From Plants
	Identification of تحديد الجينات المسؤولة عن الأمراض البشرية
٥٥٨	 Genes Responisble for Human Diseases

٥٦٣	 Gene Therapy	العلاج بالجينات
٥٦٦		العلاج الجيني للسرطان
	Diagnosis and Screening of	تشخيص وحصر العيوب الوراثية
٥٦٧	 Genetic Disorders	
	Forensic	استخدام البصمة الوراثية في القضايا الشرعية
٥٦٩	 Applications	
	Gene Cloning in	استخدام تكنولوجيا الجين في الزراعة
٥٧٠	 Agriculture	
٥٧١		إضافة الجين
٥٧١		إنتاج نباتات مقاومة للحشرات
٥٧٦		الطرح الجيني
٥٧٦	Antisense RNA	استخدام ر ن أ مضاد المعنى لتنظيم التعبير الجيني
٥٨٠		استخدام asRNA لإنتاج ثمار طماطم طويلة العمر
٥٨٣	Biosafety and GMO	الأمان الحيوي والكائنات المعدلة وراثيًا
٥٨٥		المخاطر المحتملة على البيئة
٥٨٦	Transgenic Animals	الحيوانات المعدلة وراثيًا
٥٨٩	Gene Technology and Ethics	تكنولوجيا الجين والأخلاقيات
٥٨٩	Gene Testing and Ethics	الاختبارات الوراثية والأخلاقيات
	Ethical Issues in Gene	القضايا الأخلاقية والعلاج بالجينات
٥٩١	 Therapy	
٥٩٣		التأثير السلبي لتكنولوجيا الجين على الدول النامية

٥٩٥	الفصل الخامس عشر: مقدمة في المعلوماتية الحيوية
	Bionformatics
٥٩٦	قواعد البيانات Data Bases
٥٩٩	تحديد إطارات القراءة المفتوحة ORF
٦٠٠	استخدام التناظر لتعريف الجينات Using Homology to Find Genes
٦٠٣	أسس البحث عن التشابه Principles of Similarity Searching
٦٠٥	استخدام برنامج BLAST لتحديد التشابه في تتابعات البروتين
٦٠٦	تفسير نتائج BLAST
٦٠٧	العرض البياني Graphic Display
٦٠٩	قائمة إصابة الهدف The Hit List
٦١٢	المحاذاة The Alignments
	تحليل ر ن أ غير الشفري وتتابعات د ن أ غير الجينية Analysis of
٦١٥	Non-coding RNA and Extragenic DNA
٦١٥	تحديد وظيفة جين جديد Identifying The Function of a New Gene
	اختيار أنسب برنامج BLAS للدراسات المختلفة لتحديد درجة تشابه
٦١٦	التتابعات
٦١٩	الفصل السادس عشر: الجينوميا المقارنة
	Comparative Genomics
٦٢٢	استخدام الجينوميا المقارنة في النبات
٦٢٥	استخدام الجينوميا المقارنة في دراسة الأمراض الوراثية البشرية ...
٦٣١	مراجع مختارة Selected References

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفصل الأول

علم الوراثة من منظور تاريخي

يعتقد أن علم الوراثة قد نشأ حول فكرة وجود عناصر غير مرئية محتوية على المعلومات الوراثية، والتي سميت فيما بعد بأسم الجينات، وأن هذه العناصر تنتقل إلى كل من الخليتين البنويتين عند انقسام الخلية.

إلا أنه قبل أن يتم الانقسام فلا بد أن يكون بمقدور الخلية الأم تكوين نسخة من جيناتها حتى تعطى مجموعة كاملة من هذه الجينات إلى كل خلية بنوية. إذ أن الجينات في الحيوان المنوى أو البويضة تنقل الصفات الوراثية من جيل إلى الجيل التالي. وعند إعلان قوانين مندل للوراثة ثم تصحيح الفكرة السائدة عن العوامل الوراثية من نظرية الدمج Blending Theory إلى نظرية العوامل المستقلة المتميزة Particulate Theory والتي تظل فيه الجينات محتفظة بكيونتها واستقلالها من جيل إلى جيل. وقد أدى ذلك إلى الاعتقاد بأن هذه العوامل الوراثية المسؤولة عن الصفات البيولوجية المختلفة لابد أن تكون مركبة من نظم من الذرات التي لابد أن تخضع لقوانين الكيمياء والفيزياء أو بمعنى آخر لابد أن هذه الجينات تتكون من جزيئات معينة موجودة في الخلية الحية.

في البداية لم يمكن تحديد أو حتى تخيل طبيعة هذه الجزيئات التي يمكنها أن تُخزن في الخلية ويكون بمقدورها إدارة الأنشطة المختلفة للكائن أثناء نموه

وتمايزه وفي نفس الوقت يكون باستطاعتها أن تتضاعف (تتكرر) بطريقة دقيقة وصحيحة وبصفة مستمرة تقريباً Unlimited.

عقب إعلان نظرية الكروموسومات للوراثة Chromosome Theory of Inheritance في بداية القرن العشرين أصبح من الواضح أن الكروموسومات هي الحاملة للمعلومات الوراثية ولكن تبين في تلك المرحلة المبكرة أن الكروموسومات مكونه من مركبات عديدة تشمل البروتينات والأحماض النووية وخاصة الحامض النووي الديوكسي ريبوزي DNA

وقد تركز البحث في البداية على التعرف على أنواع من البروتينات النوعية نظراً لأن البروتينات تحتوى بين جزيئاتها على قدر واسع من الاختلافات الكيماوية والبيولوجية مما يؤهلها للقيام بمهمة المادة الوراثية في حين اعتبرت الأحماض النووية غير صالحة لهذه المهمة نظراً لافتقارها إلى التباين الكيماوي الواسع بين جزيئاتها. وأنه بالتالي من المستبعد وجود وظيفة وراثية لجزيء د.ن.أ وأن كل مهمته أن يعمل كإطار لتدعيم البنية الأساسية للكروموسومات.

ظلت المحاولات مركزة في هذا الاتجاه إلى أن وصلت إلى طريق مسدود حيث ثبت أنه لا يوجد أى نوع من بروتينات الخلية يمكن أن تتوفر فيه شروط المادة الوراثية وهي:

- ١- القدرة على اختزان جميع المعلومات الوراثية المطلوبة لإدارة وتنظيم الأنشطة الأيضية في الخلية.
- ٢- القدرة على التضاعف بانتظام وبدقة بحيث يمكن انتقال المعلومات وتوريثها للخلايا البنوية بطريقة مضبوطة.

- ٣- القدرة على التعبير لهذه المعلومات الوراثية في صورها المختلفة.
- ٤- القدرة على الطفرات بنسب منخفضة جدا بحيث تحدث تغيرات وراثية يمكن توريثها إلى النسل.

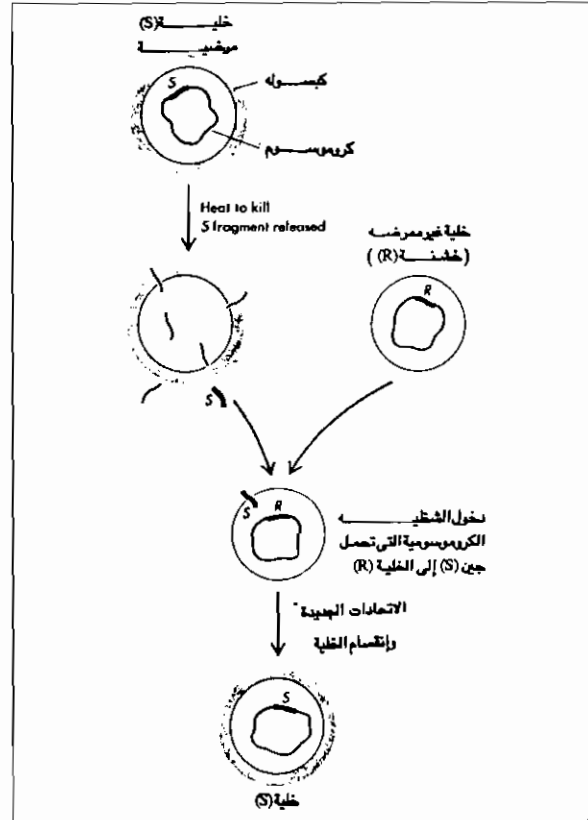
من هنا تحول الانتباه، بعد فيض من البحوث والدراسات إلى دن.أ، على اعتباره هو بالفعل المادة الوراثية في معظم الخلايا الحية (عدا قليل من الفيروسات يكون ر.ن.أ . هو المادة الوراثية بها).

يمكن تلخيص الأدلة على أن دن.أ هو المادة الوراثية في الآتي:

١- التحول الوراثي Genetic Transformation:

تمكن أفرى Avery ومعاونوه عام ١٩٤٤ من التوصل إلى أن المادة الوراثية تكمن في دن.أ. بالخلية وليس في بروتيناتها وذلك بعد قيامهم بتجربة رائدة للتحول الوراثي بين سلالتين من البكتريا المسببة للالتهاب الرئوي في الإنسان من نوع Pneumococcus، حيث كانت السلالة الأولى وتسمى S-type لها القدرة على تكوين حافظة أو كبسولة من عديدات السكر Polysaccharides حولها مما يقيها من أجهزة الدفاع في الحيوان المصاب ويمكنها من أحداث الإصابة بالمرض وقد أعطيت الاسم S (Smooth) لأن مستعمراتها النامية على البيئة الصلبة تعطى مظهراً أملس. أما السلالة الأخرى المستخدمة فهي السلالة R-type وهي طافرة تفتقر إلى الأنزيم المسئول عن بناء سكريات الكبسولة مما يجعل مظهر المستعمرة على البيئة الصلبة خشناً Rough وهذه السلالة تكون غير مرضية لعدم قدرتها على مقاومة الجهاز المناعي بالجسم نظراً لعدم وجود الكبسولة الواقية حولها.

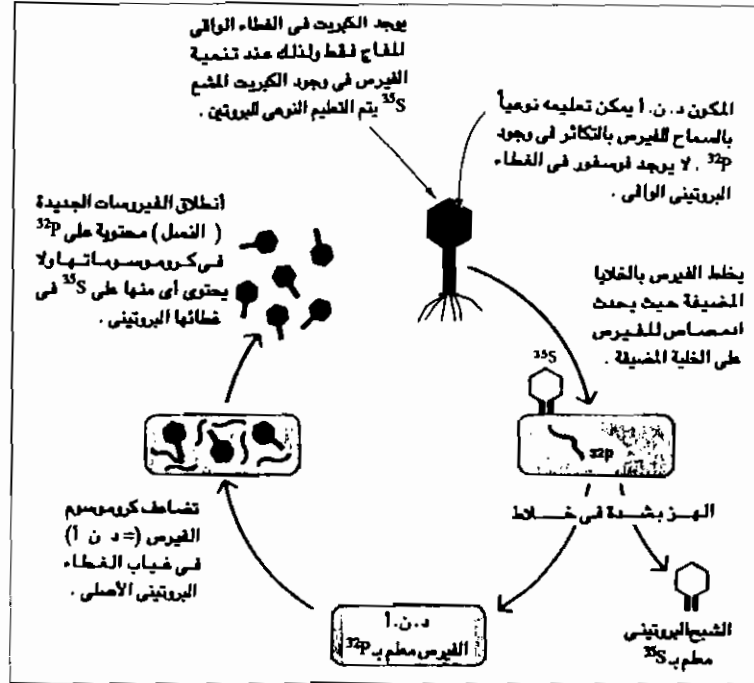
عندما أضاف Avery مستخلصاً نقياً من د.ن.أ. للسلالة S بعد التخلص من البروتينات و ر.ن.أ. . إنزيمياً، إلى مزرعة من السلالة R أمكن الحصول على بعض الخلايا من نوع S ومن جهة أخرى، فقدت السلالة S القدرة على تحويل السلالة R تماماً عندما تم تكسير د.ن.أ. بالمعاملة بإنزيم DNase أى أن جزئ د.ن.أ. هو المسئول عن عملية التحول الوراثي وكان هذا أول دليل عملي على أن د.ن.أ. هو مادة الوراثة (الشكل ١-١).



الشكل (١-١): تجربة التحول الوراثي لاثبات أن د.ن.أ. هو المادة الوراثية حيث أضيفت صفة الكبسولة الملساء (S) إلى خلية من سلالة غير مكبسلة (خشنة R) فتحولت الأخيرة إلى خلايا ملساء (S)

٢- الاستئفال الوراثنى (النقل الفاجى) Genetic Transduction:

حىث قام هيرشى Hershey وتشيز Chase عام ١٩٥٢ بعدوى بكترياً القولون *E.coli* بالفاج T_2 بعد تعليم بروتينات الغطاء المحيط بالفاج بالكبريت المشع ^{35}S فى حين تم تعليم جزئ د.ن.أ. الداخلى بالفوسفور المشع ^{32}P ومن المعروف أن الفاج يقوم بحقن محتوياته الداخلية فقط (د.ن.أ) إلى داخل الخلية البكتيرية فى حين يبقى الغطاء المغلف له معلقاً خارج الخلية المحقونة ويمكن التخلص منه بالرج بحرص فى خلاط. تبين أن معظم الفوسفور المشع (وبالتالى د.ن.أ الفاج) قد دخل إلى الخلية البكتيرية فى حين لم تظهر آثار للكبريت المشع إلا النادر جداً والتى وجدت معلقة بالجدار الخارجى للخلية البكتيرية (الشكل ١-٢) وقد وجد أن جميع النسل الناتج من الفاج بعد تكاثره داخل الخلية البكتيرية والذى خرج بعد تحليل الخلية البكتيرية Lysis وانفجارها يحتوى على ^{32}P فوسفور مشع مصدره بالطبع د.ن.أ الفاج الأصى ولا يحتوى أى نسل من الفاج على أى أثر من ^{35}S مما يدل على أن بروتين الفاج لم يكن له أى دور فى انتقال المادة الوراثية إلى النسل فى حين أن د.ن.أ هو المادة الوراثية.



الشكل (٢-١): إثبات أن د.ن.أ. للفاج T_2 هو الذي يحمل المعلومات الوراثية وأن الغطاء البروتيني يستخدم فقط كغطاء واقى ولا يحمل أى معلومات وراثية

٣- ثبات كمية د.ن.أ في الكروموسومات:

بينت الدراسات السيتولوجية والسيطوكيماوية في الكائنات مميزة النواة أن د.ن.أ يوجد في النواة فقط (فيما عدا د.ن.أ الميتوكوندريا والكلوروبلاست) فسي حين أن البروتينات توجد في النواة والسيطوبلازم والغشاء البلازمي. بالاضافة إلى ذلك فقد ثبت أن كمية د.ن.أ في الخلية الثنائية العدد الكروموسومي Diploid Cell يكون ثابتاً دائماً للكائن الواحد ويساوى ضعف الكمية الموجودة في الخلية الجاميطية الاحادية Haploid (الجدول ١-١).

فى حين لا توجد هذه العلاقة الثابتة فى كمية البروتينات من نوعية الخلايا اعلاه.

بالاضافة على ذلك فإن د.ن.أ وبعكس البروتينات وغيرها من الجزيئات الاخرى فى الخلية يكون ثابتاً أيضاً Metabolically Stable بمعنى أنه لا تجرى له عملية بناء ثم هدم بسرعة ولكن بمجرد أن يتم بناؤه فى الخلية فإن د.ن.أ يظل فيها محتفظاً بخواصة طالما أن الخلية تنمو نمواً طبيعياً.

الجدول (١-١)

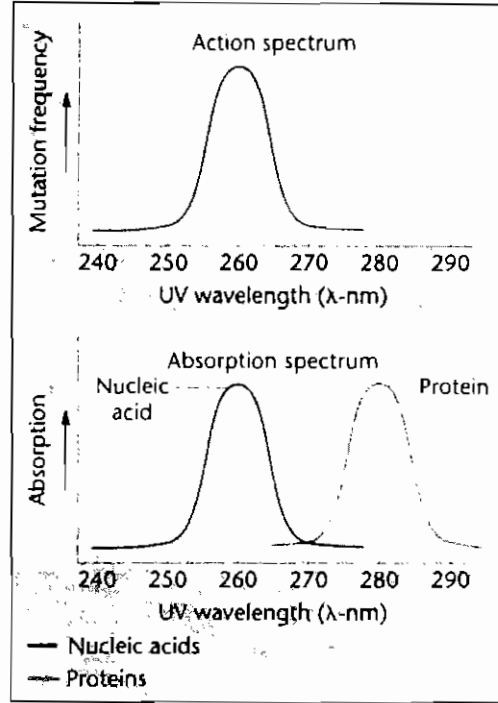
محتوى الخلية الاحادية (n) والثنائية (2n) لبعض الأنواع (Picogram)

الكائن	n	2n
الانسان	٣,٢٥	٧,٣٠
الدجاجة	١,٢٦	٢,٤٩
السمك	٢,٦٧	٥,٧٩
الكابوريا	١,٦٥	٣,٤٩

التأثير المطفر للأشعة فوق البنفسجية:

تبين أن الأشعة فوق البنفسجية تعطى أعلى معدل للطفر عند طول موجة 260nm. ومعروف أن جزيئات د.ن.أ ، ر.ن.أ يمتصان هذه الأشعة بقوة عند 260nm ومن جهة أخرى وجد أن البروتين يمتص معظم هذه الأشعة عند 280nm إلا أنه لم تحدث أية تأثيرات طفيرية عند هذه الموجة الأخيرة.

ويعطى هذا الدليل غير المباشر برهاناً على أن الأحماض النووية وليست البروتينات هي بالفعل المادة الوراثية (الشكل ١-٣).



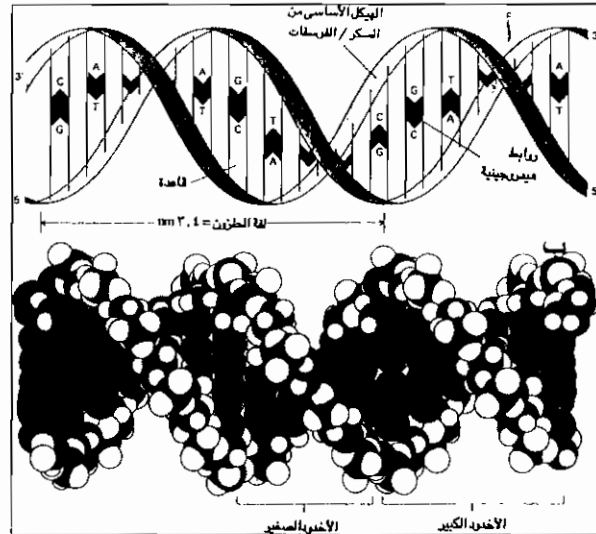
الشكل (٣-١): مقارنة المجال الضوئي الذي يحدد طول موجة UV الأكثر فاعلية لإحداث الطفرات ومجال الامتصاص الذي يبين أطوال الموجات التي يمتص عندها كل من أ البروتين والأشعة فوق البنفسجية UV

ومن أمثلة الأدلة المباشرة : ما قدمته تقنية د.ن.أ المعاد صياغته و Recombinant DNA التي أدت الى انتاج نباتات وحيوانات محولة وراثياً Transgenic Plants and Animals حيث يتم نقل جين معين (مثل جين الأنسولين البشري) إلى بكتريا القولون *E.coli* فقد وجد أن هذه البكتريا قد اكتسبت هذا الجين وتم بالفعل انتاج الأنسولين البشري في خلايا البكتريا المحولة وراثياً. وقد أمكن أيضاً الحصول على دليل مباشر آخر عندما تم حقن Microinjection جين β -Globin البشري في البويضة المخصبة للفأر حيث وجد

ان هذا الجين موجود بالفعل فى أنسجة الفأر الناضج جنسياً والمحول وراثياً وانتج β -Globin البشرى وامكن متابعة توريثه فى نسل هذا الفأر. ويدل ذلك وغيره من نتائج التحول الوراثى فى مميزة النواة دلالة قاطعة على أن د.ن.أ هو المادة الوراثية حيث أنه اجتاز شرط القدرة على التعبير Expression وسوف نعرف فى الفصول التالية كيف يتم تخزين وتناسخ وطفور وتعبير د.ن.أ فى مميزة النواه.

تركيب جزئ د ن أ:

شهد عام ١٩٥٣ الميلاد الحقيقى لعلم البيولوجيا الجزيئية بالمعنى الحديث حين اعلن واتسون وكريك Watson & Crick نموذج الحلزون المزدوج لتفسير تركيب جزئ د.ن.أ (الشكل ١-٤).



الشكل (١-٤): نموذج الحلزون المزدوج لجزئ د.ن.أ تتزاوج (تلتف) سلسلتان متكاملتان فى تقابعات النيوكليوتيدات ومتضادتان فى الإتجاه على شكل حلزون مزدوج يمينى الدور (الشكل ١-٤-أ يمثل رسماً تخطيطياً للنموذج والشكل ١-٤-ب يمثل نموذجاً فراغياً)

وذلك بعد اجرائهما لدراسات مستفيضة وكذلك تفسيرهما الصحيح للنتائج التي اظهرتها صور انحراف الأشعة السينية X-ray Diffraction التي أجراها ويلكنز Wilkins، وفرانكلين Franklin لجزيء د.ن.أ وكذلك بالاستفادة من النتائج التي اعلنها شاراجاف Charagaff عام ١٩٥٠ عن محتوى د.ن.أ من القواعد النتروجينية فيما يعرف بقاعدة شاراجاف.

وقد قوبل هذا النموذج في البداية بحملة من عدم التصديق إلا أن البحوث والدراسات المستفيضة في هذا المجال اثبتت أن هذا النموذج هو الوحيد حتى الآن الذي يمكن على أساسه تفسير خواص المادة الوراثية وبذلك فتح الباب على مصراعيه لتطور علم البيولوجيا الجزيئية.

والجدول التالي يبين بعض الاحداث الهامة في مجال تطور علم البيولوجيا الجزيئية.

الجدول (٢-١): أهم الإنجازات في مجال البيولوجيا الجزيئية

١٨٦٩	Miescher عزل مادة د. ن. أ لأول مرة واسماها نيوكلين Nuclein.
١٩٤٤	أثبت Avery ومعاونوه أن د. ن. أ هو المادة الوراثية بتجارب التحول الوراثي في بكتريا القولون.
١٩٤٩	Charagaff أثبت العلاقة بين كمية القواعد النتروجينية في جزيء د. ن. أ (C= G, A = T).
١٩٥٢	Hershey أثبت أن د. ن. أ هو المادة الوراثية في تجارب الاستئصال الوراثي (انتقال بالفاج).
١٩٥٣	Watson & Crick إعلنا نموذج الحلزون المزدوج لتركيب جزيء د. ن. أ.
١٩٥٥	Kornberg إكتشاف أنزيم بلمره جزيء د. ن. أ DNA Polymerase.

١٩٦١	Marmur & Doty إكتشاف خاصية إعادة الاتحاد Renaturation فى جزئ د. ن. أ المدنتر Denatured مما فتح المجال لعملية التهجين بين جزيئات الاحماض النووية،
١٩٦٢	Arber أعطى أول دليل على وجود أنزيمات القطع المحددة DNA Restriction Endonucleases مما أدى بعد ذلك إلى تنقيتها واستخدامها فى دراسة تتابع د. ن. أ بواسطة Nathan & Smith.
١٩٦٦	Nirenberg, Ochoa & Khorana فك الشفرة الوراثية Genetic Code.
١٩٦٧	Gellert أكتشاف انزيم اللحام DNA ligase الذى يستخدم فى وصل شظايا د. ن. أ ببعضه.
١٩٧٠	Temin, Mizutani & Baltimore اكتشاف انزيم النسخ العكسى Reverse Transcriptase الذى أدى فيما بعد إلى الحصول على جينات تركيبية Synthetic Genes (cDNA).
١٩٧٣-١٩٧٢	تطور تقنيات كلونه د. ن. أ فى معامل Berg, Cohen, Boyer.
١٩٧٧-١٩٧٥	Maxam & Gilbert, Sanger & Coulson استنباط طرق سريعة لدراسة تتابع القواعد فى جزئ د. ن. أ.
١٩٨٢-١٩٨١	أنج Spardiling دروسفلا محولة وراثيا كما أنتج Palmmiter فئران محولة وراثيا.
١٩٨٢	إنشاء Gene Bank فى المعهد القومى للصحة NIH بالولايات المتحدة الأمريكية.
١٩٨٣	Cech & Altman أثبتا أن ر. ن. أ يمتلك خواص انزيميه.
١٩٨٥	اخترع mallis ومعاونوه جهاز PCR
١٩٨٧	استنبط Capecchi طرق لنقل واستبدال جينات مستهدفة فى الخلايا الجنينية الجذعية للفأر.
١٩٨٨	اختيار Watson كمنسق عام لمشروع الجينوم البشرى.
١٩٨٩	اللجنة الاستشارية للمعهد القومى للصحة NIH لبحوث د. ن. أ المعاد صياغته توافق لأول مرة على تجربة نقل جين بشرى.

استطاع Tsui , Collins ومعاونوهما أن يكلونوا (Clone) "جين التليف الحويصلي" وهو الجين الذى يؤدي إليه الطافر إلى موت طفل من كل ٢٠٠٠ طفل فى الولايات المتحدة "مرض الطفولة المميت".	١٩٨٩
تمكن Fields and Song من استنباط نظام Yeast Two Hybrid System لدراسة التفاعل بين البروتينات.	١٩٨٩
استنبط Olson ومساعدوه (STS) Sequence Tagged Sites.	١٩٨٩
استنبط Lipman ومساعدوه برنامج BLAST للتعرف على درجة التماثل بين تتابعات د. ن. أ والبروتين.	١٩٩٠
قام Simon وزملاؤه بدراسة كيفية استخدام BAC's لكلونة اجزاء كبيرة من تتابعات د. ن. أ البشرية.	١٩٩٠
قدم Hood and Hunkapillar تقنية جديدة أوتوماتيكية لتحليل تتابعات د. ن. أ.	١٩٩١
نجح Venter وزملاؤه فى تحليل تتابعات أول جينوم بالكامل وهو جينوم <i>Haemophilus influenzae</i> .	١٩٩٥
أعلن Goffeau ومجموعة من العلماء على المستوى الدولى اتمام تحليل تتابعات أول كائن فى مميزة النواة وهو خميرة الخباز <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> .	١٩٩٦
اكتشف Lockhart وزملاؤه وكذلك Brown and DeRisi تقنية Microarrays.	١٩٩٦-١٩٩٧
نجح Sulston and Waterston فى تحليل التتابعات الكاملة لكائن متعدد الخلايا وهو الديدان.	١٩٩٨
أعلن فريق العلماء والباحثين استكمال تحليل تتابعات الجينوم البشرى.	٢٠٠١

الفصل الثاني

تركيب جزئ د. ن. أ

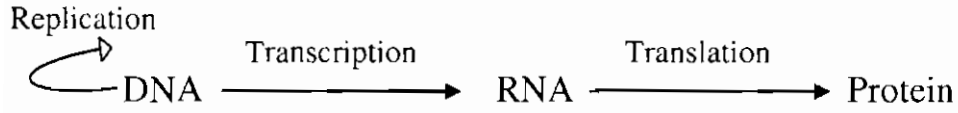
DNA Structure

قبل أن نتطرق إلى تركيب جزئ د. ن. أ (الخلزون المزدوج) يجدر بنا أولاً أن نتعرف على المكونات الكيميائية للأحماض النووية بنوعيتها د. ن. أ، ر. ن. أ نظراً للأدوار الرئيسية التي تقوم بها في حفظ المادة الوراثية ونقلها من جيل إلى جيل.

تعد الأحماض النووية من الجزيئات الكبيرة الحجم نسبياً وذات أهمية بيولوجية قصوى. تحتوى معظم الكائنات الحية على كميات متفاوتة من الأحماض النووية بنوعيتها د. ن. أ و ر. ن. أ في حين توجد بعض الفيروسات لا يوجد بها إلا د. ن. أ والبعض الآخر لا يحتوى إلا على ر. ن. أ فقط.

يعتبر د. ن. أ المصدر الرئيسى للمعلومات الوراثية وكما سيأتى بعد فإن لهذا الجزيء القدرة على التكاثر Replication (التكرار الذاتى Self-replication) يتم نسخ Transcription المعلومات الموجودة فى جزيء د. ن. أ إلى نسخ Copies من ر. ن. أ الذى يحتوى تتابع نيوكليوتيداته على الشفرات "الثلاثية الأحرف" الخاصة بتتابع الأحماض الأمينية عندما يتم بناء البروتينات فى عملية تعرف بالترجمة Translation لهذه الشفرات. يطلق على تتابع أو تدفق

هذه الأحداث البيولوجية الهامة اسم المبدأ المركزي أو المعادلة المركزية Central Dogma ويمكن تلخيصها كالآتي:

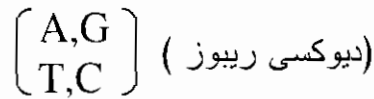


حيث يشير السهم الدائري حول د. ن. أ إلى قدرته على التضاعف الذاتي في حين يتم نسخ جزئ ر. ن. أ على قالب من د. ن. أ وتتم عملية بناء البروتين تحت إدارة تتابع القواعد (الشفرات) في جزئ ر. ن. أ التي يقال لها أنها تترجم إلى تتابع مقابل من الأحماض الأمينية التي يتم ربطها على الريبوسوم بروابط ببتيدية.

يوجد د. ن. أ في الكائنات مميزة النواة داخل النواة في حين يتكون ر. ن. أ في النواة ثم يمر منها إلى السيتوبلازم حيث يتم بناء البروتين على الريبوسومات.

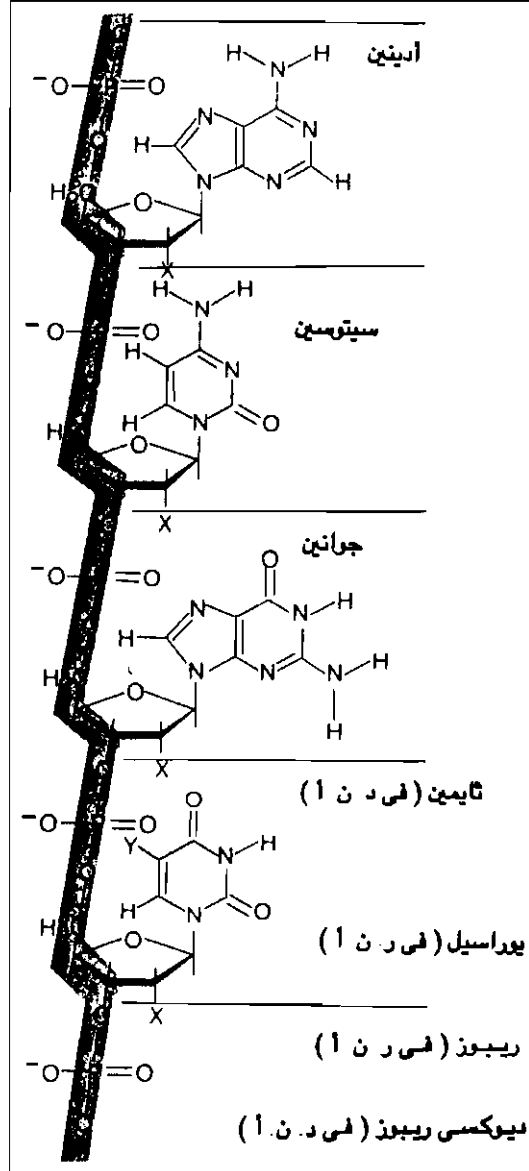
يتكون جزئ الحامض النووي من سكر خماسي (ريبوز في حالة ر. ن. أ، ديوكسي ريبوز في حالة د. ن. أ) وحامض فوسفوريك وقواعد نيتروجينية من نوع البيورين (أدينين A ، جوانين G) وهي ثنائية الحلقة أو البيريميدين (أحادية الحلقة) : (سيتوسين C وثايمين T أو يوراسيل في حالة ر. ن. أ U).

يؤدي التحليل المائي الكامل لجزئ د. ن. أ إلى :
د. ن. أ ← سكر خماسي + قواعد نيتروجينية + حامض فوسفوريك.



يتكون جزئ الحامض النووي من متعدد خطى من الوحدات البنائية الاساسية التي يطلق على كل منها نيوكليوتيدة Nucleotide ترتبط مع بعضها بروابط فوسفو استيرية ثنائية Phosphodiester Bond (الشكل ١-٢) تصل هذه الرابطة ذرة كربون رقم ٥^١ فى السكر الخماسى للنيوكليوتيدة بذرة الكربون رقم ٣^١ فى السكر الخماسى للنيوكليوتيدة التالية لها. وعلى ذلك فإن الهيكل الاساسى للحامض النووي د. ن. أ يتكون من تعاقب السكر الخماسى مع حامض الفوسفوريك فى حين تتصل قواعد النيتروجينية بهذا السكر الخماسى برابطة جليكوسيدية كما فى الشكل (١-٢).

يتضح من هذا الشكل أن حامض الفوسفوريك فى جزئ د. ن. أ يستخدم مجموعتين حامضيتين فقط فى تكوين الرابطة الأستيرية الثنائية بينما تبقى المجموعة الحامضية الثالثة حرة مما يكسب الحامض النووي الخواص الحامضية وبذلك يتمكن جزئ د. ن. أ من تكوين روابط ايونية مع البروتينات القاعدية (الهستونات). كما أن وجود هذه المجموعة الحامضية الحرة تتسبب فى أن الحامض النووي يكون قابلاً للصبغ بسهولة بالصبغات القاعدية Basophilic.



الشكل (١-٢): جزء من سلسلة حامض نووي مفردة يبين النيوكلييدات ومكوناتها وكذلك الهيكل الأساسي المكون من وحدات مترادفة من السكر والفوسفات

يلخص الجدول ١-٢ بعض الفروق الرئيسية في التركيب الكيماوى بين د.ن. أ.و.ر.ن. أ.

الجدول ١-٢ بعض الفروق الرئيسية في التركيب الكيماوى بين د.ن. أ.و.ر.ن. أ.

ر ن أ	د ن أ	الموقع
فى السيتوبلازم أساسا وفى النوية	فى النواة أساسا	الموقع
ريبوز	ديوكسى ريبوز	السكر الخماسى
سيتوسين (C)	سيتوسين (C)	القواعد البيريميدينية
يوراسيل (U)	ثيمين (T)	القواعد البيورينية
أدينين (A)	أدينين (A)	التفاعل الكيماوى
جوانين (G)	جوانين (G)	الأنزيم المحلل مائيا
صبغات Basophilic مع المعاملة بإنزيم ريبونيكليز Ribonuclease RNase	فولجين	دوره فى الخلية
بناء البروتين	DNase	الوزن الجزيئى
منخفض نسبياً	المادة الوراثية مرتفع جداً	

قاعدة Charagaff لتزاوج القواعد النتروجينية:

قام شاراجاف عام ١٩٤٩-١٩٥٣ بتحليل محتوى جزئ د.ن.أ. من القواعد النتروجينية فى عدد كبير من الكائنات الحية المختلفة (الجدول ٢-٢) وقد وجد أن القواعد الأربعة لا توجد بكميات متساوية كما أن نسبها تختلف من نوع من الكائنات إلى النوع الآخر مما أدى إلى الاعتقاد بأن تتابع القواعد النتروجينية فى جزئ د.ن.أ. أكثر أهمية من كمياتها أو مقدارها فى تحديد خصائصها الوراثية. كما أثبتت نتائج شاراجاف أيضا أن نسب القواعد النتروجينية الأربعة ليست

عشوائية على الاطلاق حيث تبين أن كمية الأدينين (A) فى جميع الكائنات تساوى كمية الثايمين (T) فى حين تساوت كمية السيتوسين (C) مع كمية الجوانين (G) وقد ساعدت هذه القاعدة البيولوجية الهامة فى فهم التركيب الثلاثى الأبعاد لجزئ د.ن.أ فى الحلزون المزدوج كما سيأتى بعد .

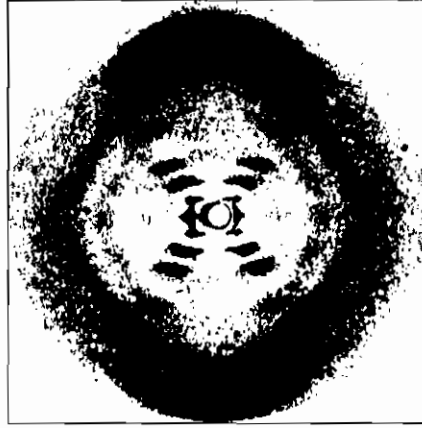
الجدول ٢-٢ البيانات التى أدت إلى استنباط قاعدة شاراجاف

مصدر د.ن.أ	نسب القواعد			
	Purine Pyrimidine	G/C	A/T	T/C
الثور	١,١٠	١,٠٠	١,٠٤	١,٤٣
الإنسان	١,٠	١,٠٠	١,٠٠	١,٧٥
الدجاجة	٠,٩٩	٠,٩١	١,٠٦	١,٢٩
سمك السلمون	١,٠٢	١,٠٢	١,٠٢	١,٤٣
نبات القمح	٠,٩٩	٠,٩٧	١,٠٠	١,١٨
قطر الخميرة	١,٠٠	١,٢٠	١,٠٣	١,٩٢
فيروس الانفلونزا	١,٠٠	٠,٩١	١,٠٧	١,٥٤
بكتريا القولون (K2)	١,٠٠	٠,٩٩	١,٠٩	٠,٩٥
البكتريا السبحية لدرن الدجاج	١,١٠	١,٠٨	١,٠٩	٠,٤٠

نموذج الحلزون المزدوج لجزئ د.ن.أ DNA double helix:

اهتم العلماء بتحليل صور انحراف أشعة X لجزئيات د.ن.أ والتي قام بها Wilkins R. and Franklin فى الفترة من ١٩٥٠-١٩٥٢ (الشكل ٢-٢) وقد أظهرت هذه الصور طرزا معينة منتظمة أدت بالعلماء إلى التكهن بأن جزئ د.ن.أ ليس فقط حلزونى التركيب بل أهم من ذلك أنه يتكون من أكثر من سلسلة واحدة من متعدد النيوكليوتيدات، قد تكون اثنتين أو ربما ثلاثة سلاسل. فى نفس الوقت أمكن تحديد الروابط الفوسفودايستر التى تربط بانتظام بين النيوكليوتيدات

فى سلسلة د.ن.أ. كما كان لقاعدة شاراجاف أهمية كبيرة فى التوصل إلى معرفة العلاقة بين القواعد النتروجينية فى جزئ د.ن.أ. ذو التركيب الحلزونى المزدوج. أدى ذلك وغيره من الأبحاث إلى اعلان واتسون وكرىك Crick عام ١٩٥٣ عن نموذج الحلزون المزدوج لتفسير تركيب جزئ د.ن.أ. بحيث توفرت فى هذا النموذج الخواص والشروط المطلوبة للمادة الوراثية.



الشكل (٢-٢): صورة انحراف الأشعة السينية بجزئ د ن أ يدل الطراز المتقاطع فى الوسط على أن الجزئ يأخذ شكل اللولب أو الحلزون بينما تدل المناطق الكثيفة فى قمة وقاعدة الصورة على أن القواعد البيورينية والبيريميدينية بسمك $3.4 \text{ \AA}$ وتتراص بانتظام متجاورة ومتعامدة على محور الحلزون

يتكون جزئ د.ن.أ. حسب هذا النموذج من سلسلتين متكاملتين من متعددات النيوكليوتيدات ملتفة أو متحلزنة كل حول الأخرى بانتظام فى شكل لولب مزدوج يمينى الاتجاه (الشكل ٢-٣-أ) ويكون طول الدورة الكاملة للحلزون $34 \text{ \AA}$ وبذلك تكون كل دورة للحلزون مكونه من ١٠ قواعد لكل سلسلة. ومن جهة أخرى، فإن قطر الحلزون المزدوج هو $20 \text{ \AA}$. تتكون كل سلسلة فى هذا الحلزون من عديد من النيوكليوتيدات المرتبطة بروابط فوسفواسثيرية ثنائية بين

السكر والفوسفات كما سبق القول في حين ترتبط القواعد النتروجينية بالسكر برابطة جليكوسيدية وتكون متعامدة على المحور الأساسي للجزئ وموجودة إلى الداخل بحيث تتقابل القواعد النتروجينية من إحدى السلسلتين مع القواعد المكمل لها في السلسلة المقابلة حسب قاعدة شارجاف ($C \equiv G, A = T$)، وجد أن أزواج القواعد النتروجينية تكون مفلطحة واسطحها كارهة للماء مما يجعلها تتلاصق بقوى يطلق عليها قوى التراص stacking forces ويبعد كل زوج من القواعد عن الذي يليه بمسافة $3.4 \text{ \AA}$.

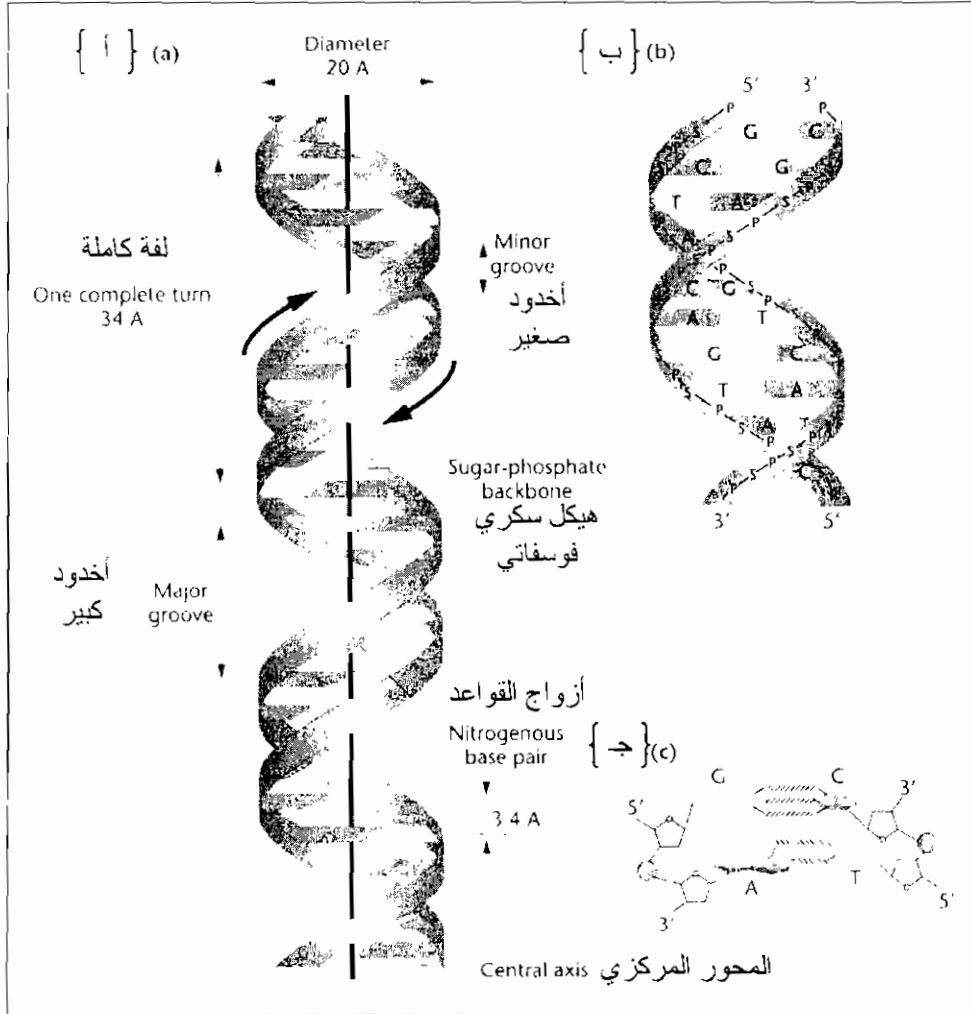
ترتبط القواعد المتقابلة بين السلسلتين بروابط هيدروجينية بحيث ترتبط G مع C بثلاث روابط هيدروجينية في حين ترتبط A مع T برابطتين فقط (الشكل ٢-٣-ج).

وجد أن هذه التزاوجات بين القواعد هي الوحيدة الممكنة نظرا لأن تقابل قاعدتين من نوع البورين (ثنائية الحلقة وكبيرة الحجم نسبيا) سيحتل فراغا كبيرا بحيث لا يسمح بتكوين حلزون منتظم ومن جهة أخرى سيؤدي تقابل قاعدتين من نوع البيريميدين معا إلى شغل فراغ صغير نسبياً مما يؤدي إلى خللة غير مرغوبة في الحلزون.

يؤدي التقيد بقاعدة تزاوج القواعد هذه Base Pairing Rule إلى وجود علاقة تكامل صارمة بين تتابع القواعد بين السلسلتين في الحلزون المزدوج. فمثلا إذا كان لدينا التتابع:

5'-ATGCAGTC-3' على أحد السلسلتين

فنجد : 3'-TACGTCAG-5' على السلسلة المقابلة



الشكل (٢-٣)

(أ) نموذج الحزبون المزدوج كما اقترحه واتسون وكريك - تمثل الأشرطة المتلففة الهيكل الأساسي المكون من السكر - والفوسفات وتمثل أزواج القواعد النيتروجينية بأشرطة أفقية ويمثل الخط الرأسى المحور المركزى للحزبون.

(ب) شكل تفصيلي يبين القواعد وهيكل السكر - الفوسفات والروابط الهيدروجينية للحلزون.

(ج) توضيح للطبيعة المتضادة الاتجاه للحلزون والتراص الأفقي للقواعد.

وكما سنرى فيما بعد فإن خاصية تكامل القواعد النيتروجينية هامة جدا في عملية تناسخ ال د. ن. أ. وفي التعبير الجيني.

وطبقاً لنموذج الحلزون المزدوج فإن حتمية تضاد الاتجاه تأتي من حقيقة عدم إمكان تغيير زوايا الروابط النيتروجينية بين مكونات النيوكليوتيدات.

ويترتب على حتمية التزاوج بين (T, A) ، (C, G) أنه لابد أن تكون الروابط الفوسفواسيري الثنائية للسلسلتين موجهة في اتجاهين متضادين Antiparallel أى أن اتجاه 5' - C إلى 3' - C يسرى في اتجاهين متضادين وعلى ذلك فإن الحلزون المزدوج اذا إنقلب بواقع 180° فإنه سيبدو ظاهرياً مطابقاً للحلزون الأصلي .

تبين أن الروابط الجليوسيدية التي تربط القواعد بالسكر لا تكون موجهة لبعضها البعض بالضبط مما يؤدي إلى أن الهيكل الأساسي (سكر - فوسفات) لسلسلتى الحلزون المزدوج لا يكونان على مسافات متساوية من محور الحلزون وبذلك يكون الأخدودان المتكونان على طول المحور الأساسي غير متساويان في الحجم (العمق)، فيتكون اخدود عميق يسمى الأخدود الكبير أو الرئيسي Major Groove بالتناوب مع أخدود أقل عمقاً يسمى الأخدود الصغير Minor Groove .

تكون أرضية الأخدود الكبير مملوءة بذرات النتروجين والاكسوجين التي تخص أزواج القواعد التي تعلوه والتي تمتد الى الداخل من الهيكل الأساسي الخاص بها. وعلى العكس من ذلك نجد أن أرضية الاخدود الصغير تكون

مملوءة بذرات النيتروجين والأكسوجين للقواعد والتي تمتد إلى الخارج في اتجاه الهيكل الأساسي.

وقد تبين أن امكانات حدوث روابط هيدروجينية في الأخدود الكبير تؤدي إلى امكان زيادة الاعتماد عليه في التعرف على تتابع القواعد في جزئ د.ن.أ. عما في الأخدود الصغير.

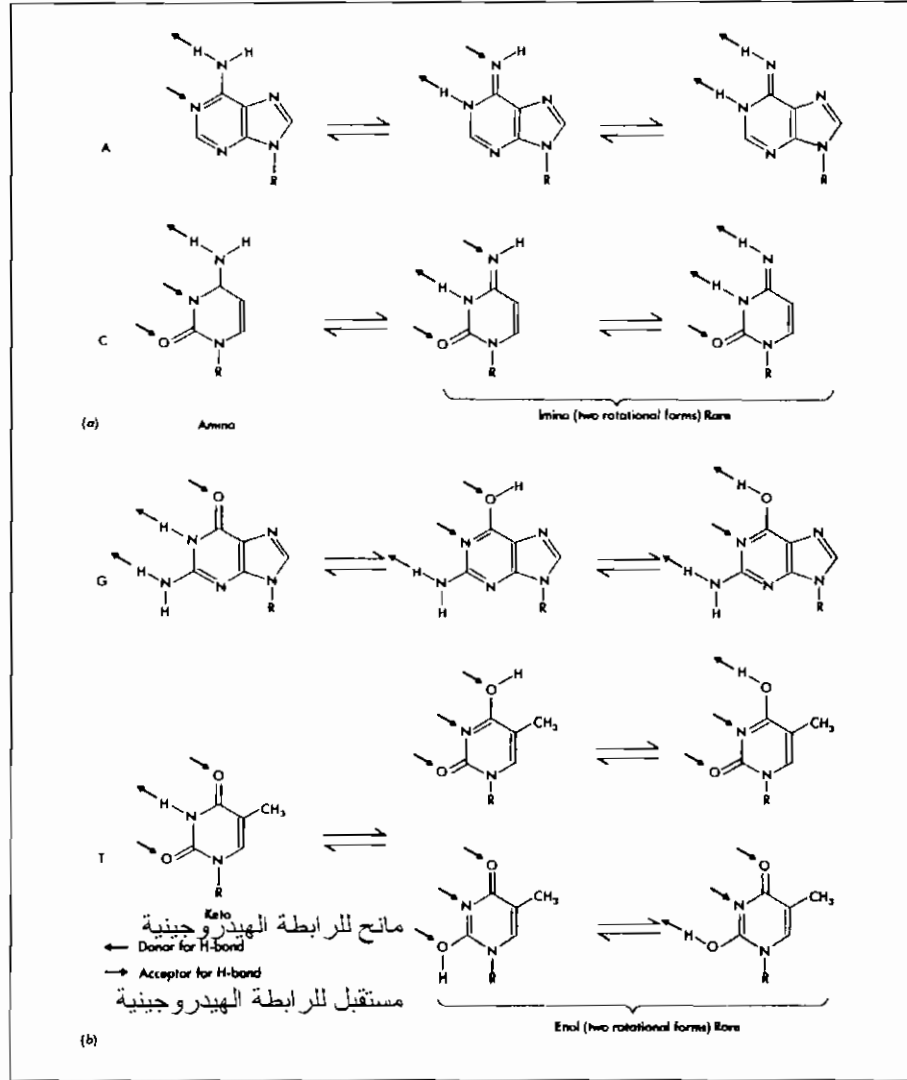
وقد أدت هذه الحقيقة إلى التكهن بأن بعض البروتينات المتخصصة (مثل البروتين المثبط Repressor أو المستحث Inducer) التي تتفاعل وترتبط مع تتابعات معينة على جزئ د.ن.أ. عن طريق تكوين روابط هيدروجينية مع مجاميع معينة توجد على الأغلب في الأخدود الكبير.

بعض خواص جزئ د.ن.أ.:

ثبات التناظر Stability of Tautomeric Form:

تبين أن ذرات الهيدروجين المرتبطة بالأكسجين أو النيتروجين في القواعد البيورينية أو البيريميدينية تفضل صورا ارتباطية معينة كما تميل إلى البقاء في أماكن معينة ولا تنتقل بين ذرات الأكسوجين أو النيتروجين في تلك القواعد إلا في حالات نادرة ويقال في هذه الحالة أن تلك الذرات ثابتة أو مستقرة التناظر Tautamerically Stable حيث يكون الوضع الطبيعي أن يكون النيتروجين في الصورة الأمينية (NH₂) Amino Form بينما الوضع النادر تكون في الصورة الإيمينية (NH) Imino Form كما في الشكل (٢-٤)، كما أن ذرة الأكسوجين المرتبطة بذرة C6 في الجوانين والثايمين تكون عادة في الصورة الكيتونية Keto From (C=O) ونادرا ما تأخذ الشكل الإينولي Enol (COH). ويعد هذا الثبات أو الاستقرار مهما جدا حتى يمكن لجزئ د.ن.أ. أن يقوم

بوظائفه البيولوجية بصورة منتظمة. فلو كانت ذرات الهيدروجين حرة الحركة وليست ثابتة في مواقعها هذه لأصبح من الشائع أن تتمكن قاعدة الإدينين (A) من التزاوج مع قاعدة السيوسين (C) في حين قد تتزاوج قاعدة الجوانين (G) مع الثايمين (T). وسوف يؤدي ذلك على اختلال في تتابع القواعد بين السلسلتين بحيث تفقد صفة التكامل الأساسية، وبالتالي يفقد جزئ د . ن . أ أهم خاصية من خصائصه وهي القدرة على التناسخ الذاتي Self Replication بدون أخطاء. إذ أنه لو سمح للصور النادرة أن تزداد فسيؤدي ذلك إلى زيادة كبيرة وغير مرغوبة في الأخطاء (الطفرات) ما يؤثر سلباً على نمو وانقسام الخلية.



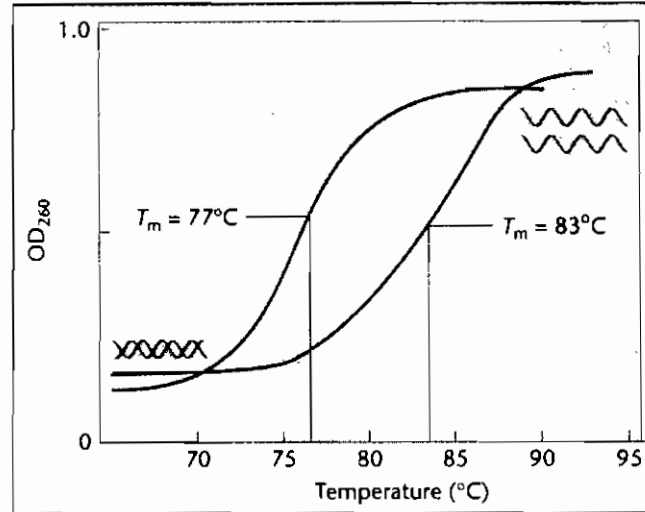
الشكل (٢-٤): صور التناظر التوتاميرية في القواعد النيتروجينية

(أ) القواعد A و C تكون عادة في الصورة الأمينية (Amino) ولكنها نادراً ما تأخذ الصورة الإيمينية (Imino).

(ب) القواعد T و G تكون عادة في الصورة الكيتونية (Keto) ولكنها نادراً ما تأخذ الصورة الأنوليية (Inol).

الدنترة وإعادة الاتحاد Denaturation And Annealing:

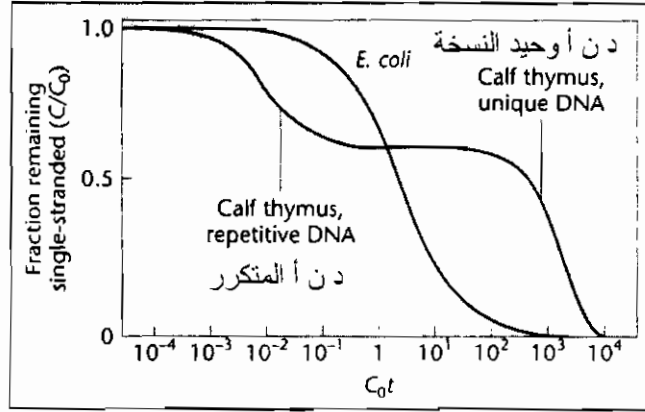
من الخصائص الهامة لجزئ د . ن . أ قدرة السلسلتين الداخلتين في تركيبة على الانفصال والابتعاد عن بعضهما تحت ظروف معينة فيما يعرف بعملية الدنترة Denaturation وذلك عند تعريض الحلزون المزدوج لدرجة حرارة أعلى من درجة الحرارة الفسيولوجية (أى حوالى ٩٥°م) ويحدث ذلك نتيجة لكسر الروابط الهيدروجينية، وهى روابط ضعيفة وسهلة الكسر بطبيعتها، والتي تربط أزواج القواعد في السلسلتين. ونتيجة لارتباط C, G بثلاث روابط هيدروجينية فإن يلزم فى حالة الجزيئات الغنية فى نسبة القواعد G, C درجة حرارة أعلى من تلك التى ترتفع فيها نسبة AT حيث أن الأخيرة تكون مرتبطة برابطتين فقط أى أن درجة حرارة الدنترة (ويطلق عليها نقطة الانصهار T_m) أو حرارة الانصهار وعندها يكون ٥٠% من السلسلتين قد انفكت وتعتمد على نسبة $(G+C / A+T)$ بحيث ترتفع بزيادة هذه النسبة وإذا تم التبريد البطئ لجزئ د . ن . أ المدنتر فإن السلسلتين المتكاملتين سيعاد اتحادهما حيث تسمى هذه العملية Anealing أو Renaturation وتتجاذب أزواج القواعد وترتبط بروابط هيدروجينية حسب قاعدة شاراجاف وبذلك يستعيد الجزئ التركيب الحلزوني الأصلي. ويمكن متابعة هذه التحولات فى المعمل بقياس درجة امتصاص الأشعة فوق البنفسجية UV (أو الكثافة الضوئية OD) عند 260nm باستخدام سبكتروفوتوميتر حيث تنخفض لزوجة د . ن . أ أثناء الدنترة ويرتفع امتصاص UV. وبين الشكل (٢-٥) عملية الانصهار في نوعين مختلفين من د. ن. أ من حيث محتواهما من نسبة GC.



الشكل (٥-٢): العلاقة بين زيادة درجة امتصاص أشعة UV وارتفاع درجة الحرارة في جزيئين من د ن أ يختلفان في محتوَاهما من G≡C الجزئ الذي تكون درجة حرارة الانصهار فيه (Tm) ٨٣°م يحتوي على مقدار أعلى من G≡C عن الجزئ بدرجة انصهار (Tm) ٧٧°م

تعد خاصية الدنترة و إعادة الاتحاد ذات فائدة كبيرة في البيولوجيا الجزيئية حيث أنها تعد الأساس لواحدة من أهم التقنيات في الوراثة الجزيئية وهي تقنية التهجين الجزيئي Molecular Hybridization وبين الشكل (٢-٦) كيفية استخدام هذه الخاصية لتقدير حجم الجينوم (عدد النيوكليوتيدات) لكائن ما، إذ وجد أنه عندما تتم عملية إعادة الاتحاد تحت ظروف قياسية فإن الجينوم الأكبر حجماً سيأخذ وقتاً أطول لإعادة الاتحاد عن الجينوم الصغير الحجم. ويرجع ذلك إلى أن تتابعات القواعد تأخذ وقتاً أطول للتوصل إلى التتابع المكمل الصحيح (فكلما زاد حجم الجينوم كلما زادت فرص التصادم بين التتابعات غير الصحيحة - غير المكتملة - بين الجزيئات) وقد أدت دراسات إعادة الاتحاد إلى اكتشاف التتابعات المتكررة في جزئ د . ن . أ في الكائنات مميزة النواة.

فعندما تكون تتابعات معينة في الجزئ عالية التكرار Highly Repetitive فإن إعادة الاتحاد بينها سيكون أسرع بكثير عما في التتابعات الممثلة بنسخ وحيدة (الشكل ٦-٢).

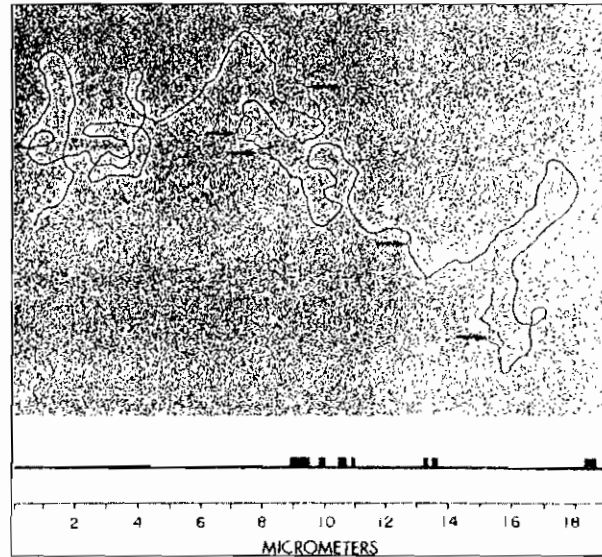


الشكل (٦-٢): منحني Cot لجزئ د ن أ في الغدة التيموسية للعجل حيث يحدث للجزء المتكرر من د ن أ العجل إعادة الاتحاد بسرعة عن جزئ د ن أ من بكتيريا القولون في حين يحدث العكس في حالة الجزء غير المتكرر من جزئ د ن أ في العجل

كما يمكن استخدام تقنية التهجين الجزيئي (على اعتبار وجود درجة معقولة من تكامل القواعد بين جزيئات د . ن . أ وتحت ظروف حرارية مناسبة) بحيث يمكن إعادة الاتحاد (التهجين) بين جزيئين من الحامض النووي من مصادر مختلفة وقد يؤدي هذا إلى امكانية التهجين بين نوعين Species مختلفين من د . ن . أ. ويعد ذلك ذو أهمية خاصة في دراسة العلاقات التطورية بين الانواع على المستوى الجزيئي أو حتى بين جزئ د . ن . أ وجزئ ر . ن . أ.

وعلى سبيل المثال فإنه جزئ ر . ن . أ من السهل تهجينه بمنطقة من د . ن . أ الذي تم نسخة عليها أصلاً أو مع د . ن . أ من نوع Species آخر بشرط أن يكون التتابع النيوكليتي متكامل بدرجة معقولة.

يمكن أيضاً الاستفادة من عملية الدنترة لجزئ د . ن . أ في عمل خريطة مادية لجزئ د . ن . أ فيما يعرف بعملية رسم خرائط الدنترة الجزئية Partial Denaturation Mapping. تعتمد هذه التقنية على حقيقة أن المنطقة الغنية في أزواج القواعد AT تنفصل كما سبق القول بمعدل أسرع وأسهل عن GC. ويمكن التعرف على هذه المناطق تحت المجهر الإلكتروني على شكل عروات loops أو فقاعات bubbles . يمكن قياس المسافات بين العروات ونهاية جزئ د . ن . أ كما في الشكل (٧-٢).



الشكل (٧-٢): صورة بالمجهر الإلكتروني لجزئ د ن أ الفاج لامبدا تشير الأسهم إلى أماكن حدوث الدنترة (التفكك) وتبين الخريطة الخطية (إلى أسفل) التفكك الجزئي حيث تدل المستطيلات على مواقع التفكك وطولها النسبي

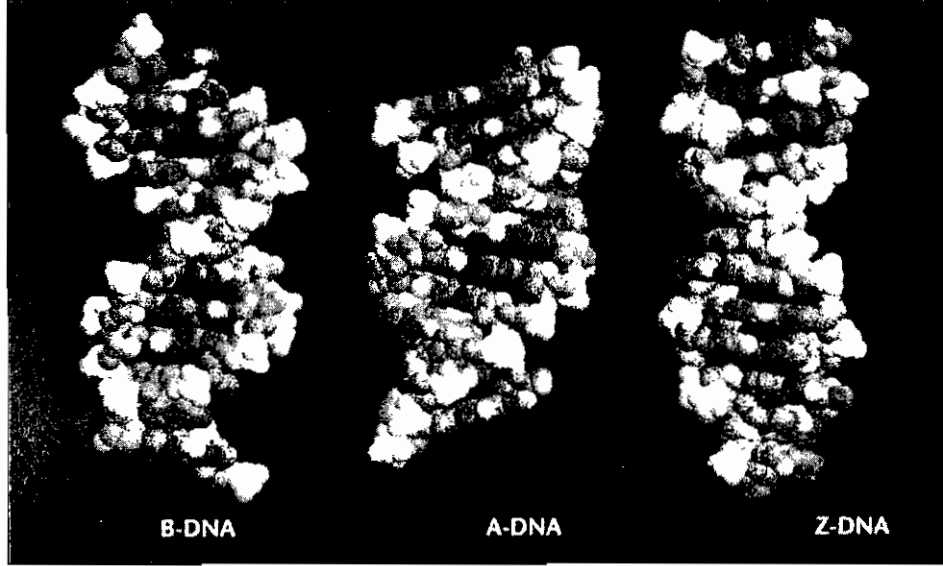
الصور المختلفة لجزئ د . ن . أ:

ظل الاعتقاد السائد حتى وقت قريب أن جزئ د . ن . أ لا يوجد إلا في صورة Configuration واحدة كما قدمها واتسون وكريك وبمعدل دوران ثابت (36A°) للحلزنة بين القواعد المتجاورة (أى عشرة أزواج من النيوكليوتيدات لكل لفة حلزونية واحدة). إلا ان الدراسات الحديثة اثبتت أن درجة الدوران في الحقيقة هي 34.6° وبالتالي يكون عدد القواعد في كل لفة 10,4 قاعدة.

ومن جهة أخرى، كان الاعتقاد السائد أن الشكل الهندسي للحلزون موحد ومنتظم. إلا أن التجارب اللاحقة أثبتت أن د . ن . أ متعدد الصور حسب تتابع القواعد في الجزئ. يعد ذلك هاما جداً حيث يؤثر على تفاعله مع البروتينات. وقد وجد أن هناك ثلاث صور مختلفة لجزئ د . ن . أ أكثرها شيوعاً وثباتاً هي الصورة الأصلية التي قدمها واتسون وكريك والتي تعرف بالصورة B (الشكل ٢-٨) وهو حلزون منتظم يمينى الدورة. وإلى جانب ذلك توجد صورة أخرى نادرة يطلق عليها الصورة (A) يحتوى فيها الجزئ على بعض مناطق ذات تتابعات معينة وهو يمينى الدورة أيضاً إلا أن أزواج القواعد تكون منحدره أو مائلة بشدة كما تكون منزاحة نحو الخارج بالنسبة لمحور الحلزون مما يؤدي إلى تكوين حلزون أقصر وأوسع عما في الصورة B (الشكل ٢-٨) يتكون هذا النوع عادة تحت ظروف الملوحة أو ظروف نقص الماء كما أنه الأكثر شيوعاً عند تزاوج ر . ن . أ RNA مع د . ن . أ DNA كما هو الحادث في الأجزاء البادئة Primer في شظايا أوكازاكي كما سيأتى بعد. ويرجع ذلك إلى أن مجموعة الهيدروكسيل في سكر الريبوز في جزئ ر . ن . أ لا تسمح بتكوين حلزون هجين بين RNA/ DNA من النوع B.

ويعد هذا هو السبب أيضاً في أن حلزون ر . ن . أ / ر . ن . أ RNA (في دبوس الشعر Hairpin) الذي يتكون أحياناً من النوع A .

يوجد نوع ثالث من ر . ن . أ النادر ذو حلزون يساري الدورة يسمى الصورة (Z) (الشكل ٨-٢) وهو متعرج وغير منتظم ومن هنا جاءت تسميته Z ويتميز بوجود تتابعات خاصة ويتكون تحت ظروف خاصة.



الشكل (٨-٢): الصور الثلاثة للحلزون المزدوج لجزيء د ن أ ويلاحظ أن كلا منها يحتوي على نفس العدد من أزواج النيوكليوتيدا (٢٢ نيوكليوتيدة) ويتكون كل منها من سلسلتين متضادتي الاتجاه ومرتبطة معاً بروابط هيدروجينية بين القواعد المتكاملة

الصورة (B) الأكثر شيوعاً (يميني الدورة).
 الصورة (A) نادرة وتحدث تحت ظروف الإجهاد البيئي مثل الجفاف والملوحة (يميني الدورة).
 الصورة (Z) نادرة جداً والحلزون غير منتظم (يساري الدورة) ويتكون عندما يكون تتابع القواعد ذو طابع خاص غير عادي (عالي جداً في نسبة GC).

قد يكون لكل من هذه الصور النادرة دور في التعرف على البروتينات التي ترتبط بـ د . ن . أ (مثل المستحث Inducer أو المثبط Repressor) كما سيأتي بعد.

يمكن تلخيص بعض الفروق الأساسية بين الصور الثلاثة لجزئ د . ن . أ كما في الجدول (٣-٢).

الجدول ٣-٢: مقارنة بين بعض الخواص التركيبية لصور د . ن . أ

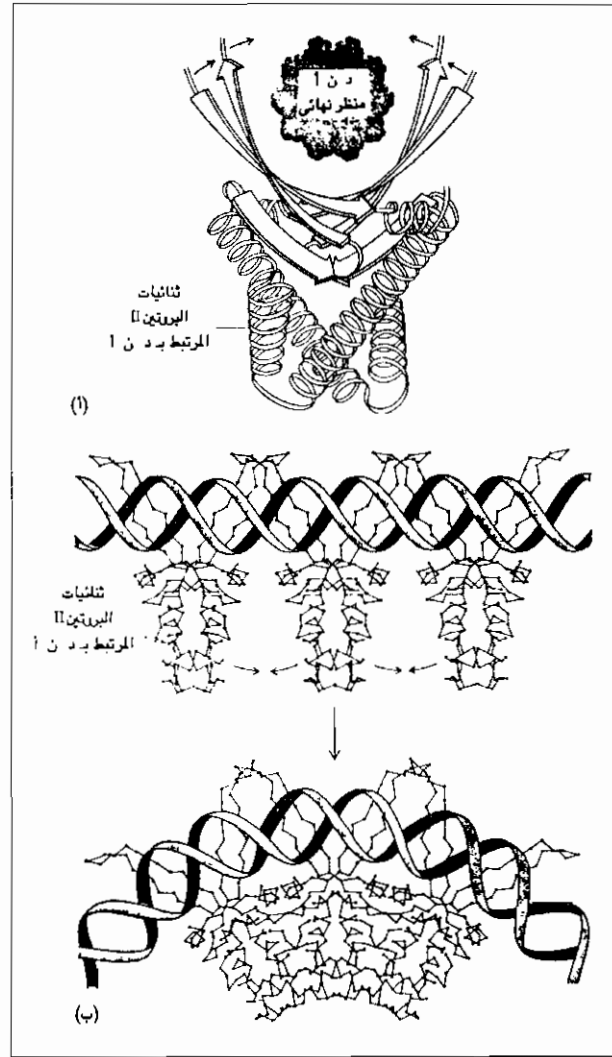
الصورة			المقارنة
Z	B	A	
نادر جدا	شائع	نادر	معدل حدوثه
مستطيل ورفيع	أطول وأرفع	قصير وواسع	الشكل العام
$3.8A^{\circ}$	$3.32A^{\circ}$	$2.3A^{\circ}$	الإرتفاع بين أزواج القواعد
يسارى	يمينى	يمينى	اتجاه الحلزون
12	١٠,٤	١١	عدد القواعد لكل دورة حلزون
-60°	34.6°	33.6°	متوسط الدوران لكل زوج من القواعد
-9°	-1.2°	$+19.0^{\circ}$	درجة ميل القواعد بالنسبة للمحور
الأخدود الكبير	خلال أزواج القواعد	الأخدود الكبير	موقع محور الحلزون
مفلطح على سطح الحلزون أو غير موجود	واسع ومتوسط العمق	ضيق جدا وعميق جدا	نسب الأخدود الكبير
ضيق جدا وعميق جدا	ضيق ومتوسط العمق	واسع جدا وضحل	نسب الإخدود الصغير

ارتباط جزئ د. ن. أ البكتيري ببروتينات شبه هستونية:

ظل الاعتقاد السائد لعدة أحقاب أن جزئ د. ن. أ البكتيري يكون عارياً ولا ترتبط به أية بروتينات شبه هستونية بحيث لا يوجد له تركيب منضغط شبيه بكروماتين كروموسومات مميزة النواة.

ولكن تبين حديثاً باستخدام تقنيات أكثر تقدماً أن بعض المناطق من كروموسوم بكتريا القولون تنتظم في تراكيب تشبه حبات الخرز والتي أمكن استخلاص كميات صغيرة من البروتينات القاعدية منها تشبه الهستونات. وقد يكون لذلك الارتباط علاقة بوجود مناطق منضغطة بانتظام على طول الكروموسوم البكتيري حتى يمكنه أداء وظائفه. أمكن بلورة إحدى هذه البروتينات ويطلق عليها البروتين II المرتبط بـ د. ن. أ DNA-Binding Protein II وتبين أنه مكون من سلاسل ببتيدية حجمها ٩٥٠٠ دالتون ترتبط ببعضها في ثنائيات Dimers ويمتد منها أذرع غنية في الأرجينين لها القدرة على التفاعل مع الفوسفات في الهيكل الأساسي لجزئ د. ن. أ. ومن المرجح أن هذه الثنائيات البروتينية المتجاورة مع د. ن. أ في غير مميزة النواة تقوم بتكوين تنظيم حلزوني معين مع د. ن. أ. المرتبط من الخارج كما في الشكل (٢-٩).

ومن الجدير بالاهتمام أن متوسط درجة التحلزن الفائق (أي عدد لفات التحلزن الفائق لكل ١٠ أزواج من القواعد) يبلغ حوالى ٠,٠٥ لجميع الحلزونات الطبيعية لجزئ د. ن. أ سواء في البكتريا أو في الخلايا مميزة النواة مما يوحي بأن التركيب الكروماتيني قد يكون متشابهة في غير مميزة النواة ومميزة النواة على السواء.



الشكل (٩-٢): البروتينات شبه الهسونية المرتبطة بجزء د ن أ في بكتريا القولون

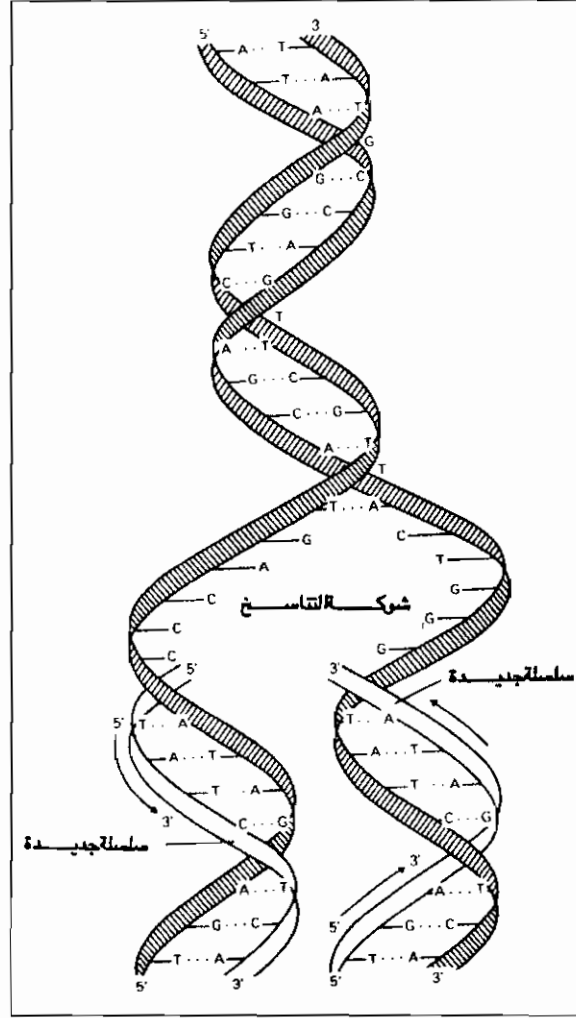
الفصل الثالث

تناسخ د. ن. أ DNA Replication

بعد الإعلان عن نموذج واتسون وكريك لتركيب جزئ د. ن. أ، اتجه اهتمام العلماء إلى معرفة كيفية تناسخ جزئ د. ن. أ. وتعد عملية تناسخ جزئ د. ن. أ عملية أساسية للمادة الوراثية ولا بد من اتمامها بدقة متناهية حتى نضمن استمرار انتقال العوامل الوراثية عند انقسام الخلية. ولأشك أن ذلك يعد عملاً ضخماً ومعقداً فعلى سبيل المثال لو تخيلنا حدوث هذه العملية في جينوم الإنسان المحتوى على ٣ بليون زوج من القواعد في ٢٣ زوج من الكروموسومات فإنه لى يتم تكرار (تناسخ) جزئ بهذا الحجم بدقة فإن ذلك يتطلب ميكانيكية على درجة عالية من الكفاءة والدقة.

يمكن اعتبار ميكانيكية تناسخ (تضاعف) جزئ د. ن. أ نتيجة مباشرة لطبيعة تركيب الحلزون المزدوج. إذ لابد أن تتفصل السلسلتين المكونتين للحلزون حتى يتسنى استخدام كل منها كقالب لبناء جزئ جديد من د. ن. أ. ولكي يحدث هذا الانفصال يجب أن تنفك أولاً حلزنة اللولب وذلك بدوران الأجزاء غير المتكررة من الحلزون حول محورها كما أن الروابط الهيدروجينية التي تربط بين أزواج القواعد المتقابلة في الجزئ الأصلي تكون سهلة الكسر عادة بدون الحاجة إلى بذل طاقة أو تفاعل أنزيمى.

وجد أن المجاميع الجانبية في أزواج القواعد المتقابلة (بعكس مركبات عضوية أخرى) في مقدورها تكوين عدد من الروابط الهيدروجينية المتخصصة جدا (النوعية)، وبذلك يتوفر لدينا قالب نموذجي لبناء جزئ جديد عليه حيث يتم التجاذب بين القواعد في القالب والقواعد المكملة في السلسلة الجديدة الجارية بناؤها عندما تضاف القواعد واحدة تلو الأخرى طبقا لقاعدة شاراجاف ($G \equiv C, T = A$) ويتم ذلك بصورة دقيقة بحيث تتعدم تقريبا فرصة حدوث خطأ (10^{-8}) مما يؤدي إلى إنتاج جزيئين جديدين عبارة عن صورة طبق الأصل دقيقة للجزئ الأصلي (الشكل ٣-١) وتكون إحدى السلسلتين في كل جزئ عبارة عن سلسلة جديدة والسلسلة الأخرى هي القديمة التي استخدمت كقالب لبناء السلسلة الجديدة.

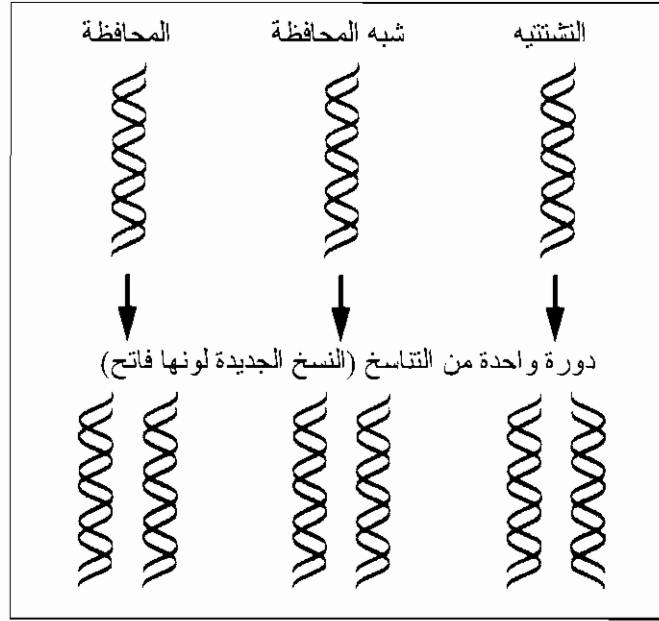


الشكل (٣-١): شكل تخطيطي يبين ميكانيكية تناسخ جزئي د ن أ حيث يتم التناسخ بفك حلزونة السلسلتين المكونتين للحلزون المزدوج ثم استخدام كل سلسلة كقالب لبناء سلسلة جديدة حسب قاتون تزاوج القواعد: (A تقابل T, C تقابل G) ويلاحظ أن التناسخ يتم في الاتجاه 3'→5' فقط

الطريقة شبه المحافظة لتناسخ د. ن. أ:

يقترح نموذج واتسون وكريك أن التناسخ يتم حسب ميكانيكية تعرف بالطريقة شبه المحافظة Semi-conservative بمعنى أن نصف جزئ د. ن. أ الأصلي (سلسلة) يحافظ عليه في حين يتم بناء سلسلة جديدة عليها.

ألا أنه بالإضافة إلى ذلك فقد اقترح نموذجين آخرين لتناسخ د. ن. أ ويعتمد كليهما على استخدام د. ن. أ الأبوي كقالب. ويسمى النموذج الأول الطريقة المحافظة Conservative Replication حيث يتم بناء سلسلة جديدة مكملة على كل قالب من السلسلتين القالب تماماً كما في الطريقة شبه المحافظة إلا أنه بعد التضاعف (التكاثر) تتضمن السلسلتين الجديدتين معا في حلزون جديد تماماً بينما تتجاذب السلسلتين الأبويتين لتكون الحلزون الأصلي أي أن الحلزون الأصلي قد تمت المحافظة عليه أما النموذج الثاني ويطلق عليه الطريقة التشتتية Dispersive Replication حيث تتوزع (تتشتت) السلسلتان الأبويتان بين حلزونين جديدين بعد التناسخ وبذلك تكون كل سلسلة مكونة من أجزاء من د. ن. أ الأبوي وأخرى من د. ن. أ الجديد (الشكل ٣-٢) إلا أن كلا من الطريقة المحافظة والتشتتية لم يتوافر لهما التحقق التجريبي من صحتها بينما تم ذلك للطريقة شبه المحافظة كما يتضح من تجربه ميسلسون وستاهل.

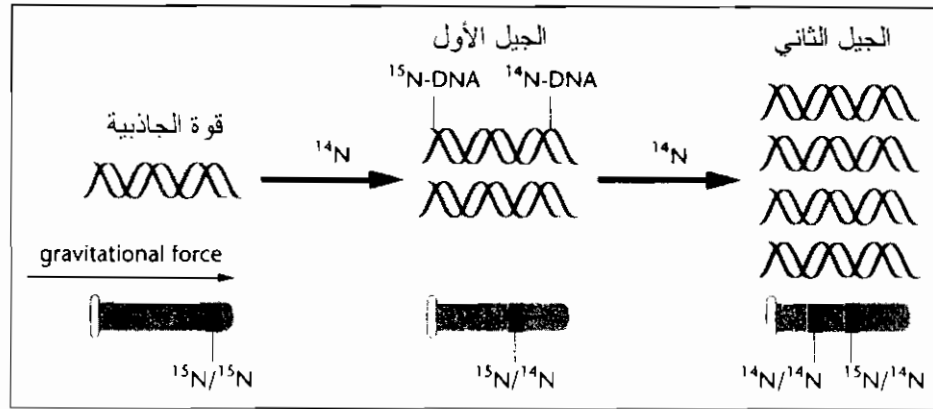


الشكل (٣-٢): نتائج دورة واحدة من تناسخ د ن أ لكل من الطرق الثلاث الممكنة للتناسخ

تجربة ميسيلسون وستاهل :

قام ميسيلسون وستاهل Meseleson and Stahl عام ١٩٥٨ بتجربة على بكتريا القولون واستخدما النتروجين الثقيل (النظير المشع) N^{15} فى تنمية المزرعة البكتيرية لعدة أجيال حتى يتأكدا من أن كل ذرات النتروجين فى جزئ د. ن. أ معلمه بالنتروجين الثقيل. بعد ذلك تم نقل الخلايا البكتيرية إلى مزرعة تحتوى على النتروجين العادى (الخفيف) N^{14} . ثم استخلص د. ن. أ من الخلايا وتم تقدير كثافته بواسطة الطرد المركزى فائق السرعة Ultracentrifugation فى متدرج كثافى Density Gradient من محلول كلوريد السيزيوم وتبين انه بعد أول دورة (جيل) من الانقسام ظهرت قمة واحدة تمثل جزئ هجين (ثقيل / خفيف) H/L نتيجة لتكوين الجزئ من سلسلة أصلية ثقيلة وسلسلة مكملة خفيفة وفى

الجيل الثاني ظهرت قمتان لجزيئات د. ن. أ واحدة تمثل الهجين والآخرى تمثل الخفيف فقط L/L كما في الشكل (٣-٣).

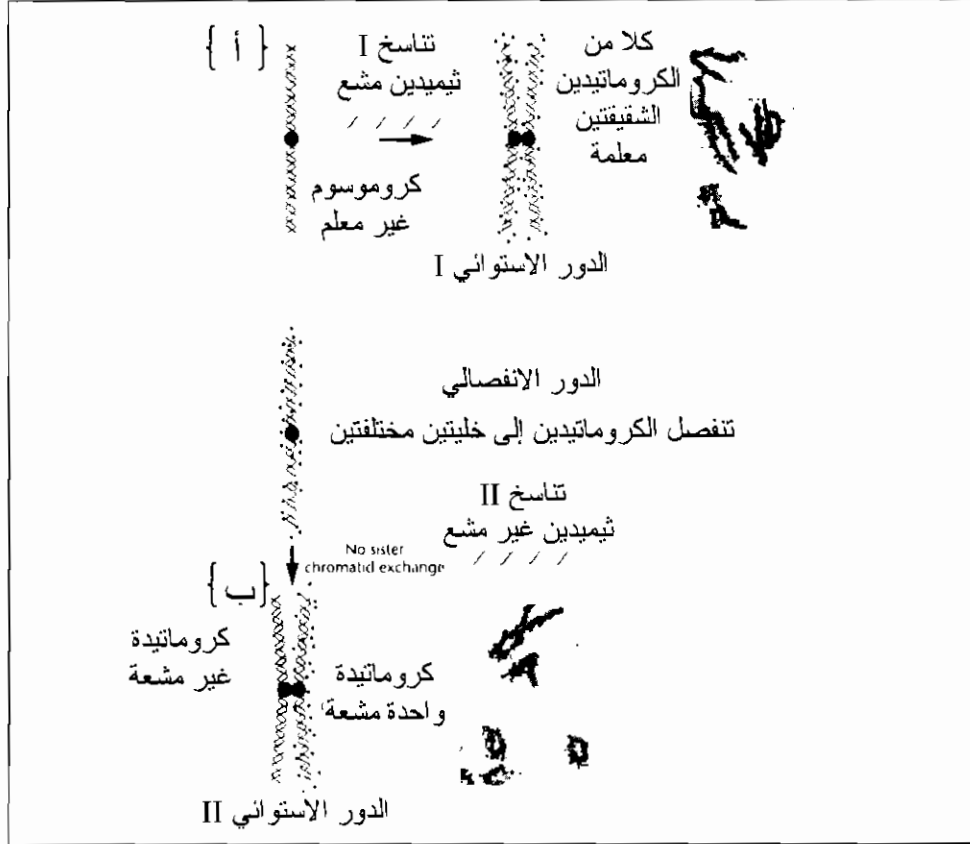


الشكل (٣-٣): النتائج المتوقعة لجيلين من التناسخ بالطريقة شبه المحافظة في تجربة ميسلسون وستاهل

يعكس ذلك بوضوح حتمية انفصال السلسلتين الأصليتين ثم استخدام كل سلسلة كقالب لبناء نسخة عليها مما يؤكد صحة نموذج التناسخ بالطريقة شبه المحافظة.

ومن جهة أخرى تمكن تيلور Taylor ومعاونوه عام ١٩٥٧ من إثبات الطريقة شبه المحافظة في الكائنات مميزة النواه. إذا أنه من المعروف أن كل كروماتيده في الكروموسوم تمثل جزئ واحد من د. ن. أ. تم تعليم خلايا القمم النامية لجذور نبات الفول بالثيميدين المشع ^3H Thymidine ثم سمح لها بعد ذلك بالنمو في بيئة غير معلمة، وعند دراسة كروموسومات هذه الخلايا في الدور الاستوائي بعد جيل (دورة) أو جيلين (دورتين) من الانقسام الخلوي وذلك باستخدام طريقة التصوير بالأشعاع الذاتي Autoradiography تبين أن كلا من

الكروماتيدتين كانتا مشعتان بعد جيل واحد (دورة) في حين كانت كروماتيده واحدة فقط هي المشعة بعد دورتين من انقسام الخلية كما هو متوقع حسب النظرية شبه المحافظة لتناسخ د. ن. أ (الشكل ٣-٤).



منشأ Origin وشوكات Forks ووحدات التناسخ Units of Replication

هناك عدة اسئلة تفرض نفسها بخصوص تناسخ د. ن. أ بالطريقة شبه المحافظة:

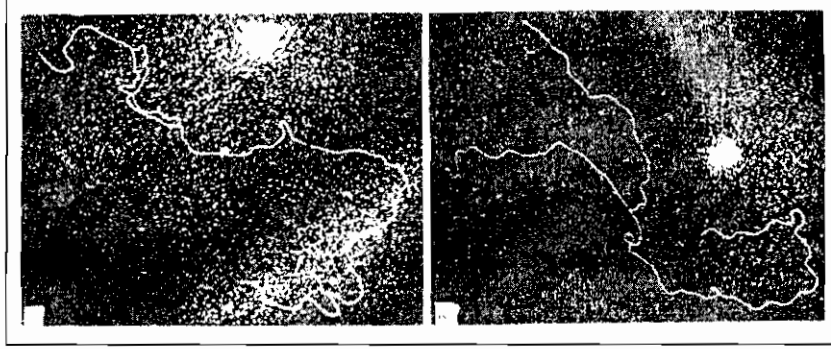
أين يبدأ التناسخ Origin of Replication؟ وهل هناك نقطة واحدة يبدأ منها التناسخ أو أن هناك أكثر من منشأ على طول الكروموسوم؟ وهل نقطة المنشأ تكون عشوائية؟

أو أنها تقع على منطقة محددة على طول الكروموسوم؟ ومن جهة أخرى ، عندما يبدأ التناسخ فهل يستمر في اتجاه واحد أو في اتجاهين معا بعيداً عن المنشأ؟ وبمعنى آخر هل التناسخ وحيد الاتجاه Unidirectional أو ثنائي الاتجاه Bidirectional وللإجابة على هذه التساؤلات تمكن العلماء من إعطاء عدد من الأدلة التجريبية .

فقد تم عزل الجزئ الخطي لـ د. ن. أ على فترات اثناء عملية التناسخ للفيروس T7 وفحصه تحت المجهر الالكتروني وكان من المتوقع أن تبدأ عملية التضاعف (التناسخ) عند إحدى النهايتين أو عندهما معاً حيث أنه من السهل تخيل أن يبدأ انفصال السلسلتين عند الأطراف وليس في المناطق الداخلية للحلزون المزدوج.

إلا أنه تبين أن التضاعف يبدأ في الحقيقة من الداخل ومن نقطة واحدة معينة تسمى نقطة منشأ التناسخ Origin of Replication وقد وجد أنه بالنسبة

لهذا الفيروس تكون هذه النقطة على مسافة حوالي ١٧% من بداية النهاية اليسرى للجزء كما في الشكل (٣-٥).



الشكل (٣-٥): تناسخ جزئ د ن أ للفاج T7

- (أ) صورة بالمجهر الإلكتروني لجزئ د ن أ لفاج T7 الذي بدء للتو في التناسخ والذي تظهر به فقاعه تناسخ صغيرة تقع على مسافة 17% من النهاية اليسرى للخريطة الوراثية.
- (ب) مرحلة متقدمة من تناسخ الجزئ الذي يظهر فيه شكل حرف Y نتيجة لوصول شوكة التناسخ إلى نهاية الشوط.

وبمجرد أن يبدأ بناء جزئ د. ن. أ يستمر البناء في الاتجاهين مما يعطى شكل العين (-O-) التي لا تلبث أن تنمو لتأخذ شكل حرف Y (ومن هنا جاءت تسميتها شوكة التناسخ Replication Fork).

وتظل عملية التناسخ حتى تصل الشوكة إلى نهاية جزئ د ن أ.

كما إن ظهور هذه الاشكال ينفي أن عملية التناسخ تتم على مرحلتين بمعنى أنه يتم الانفصال التام بين السلسلتين الأبويتين أولاً قبل أن تبدأ عملية التناسخ في المرحلة الثانية.

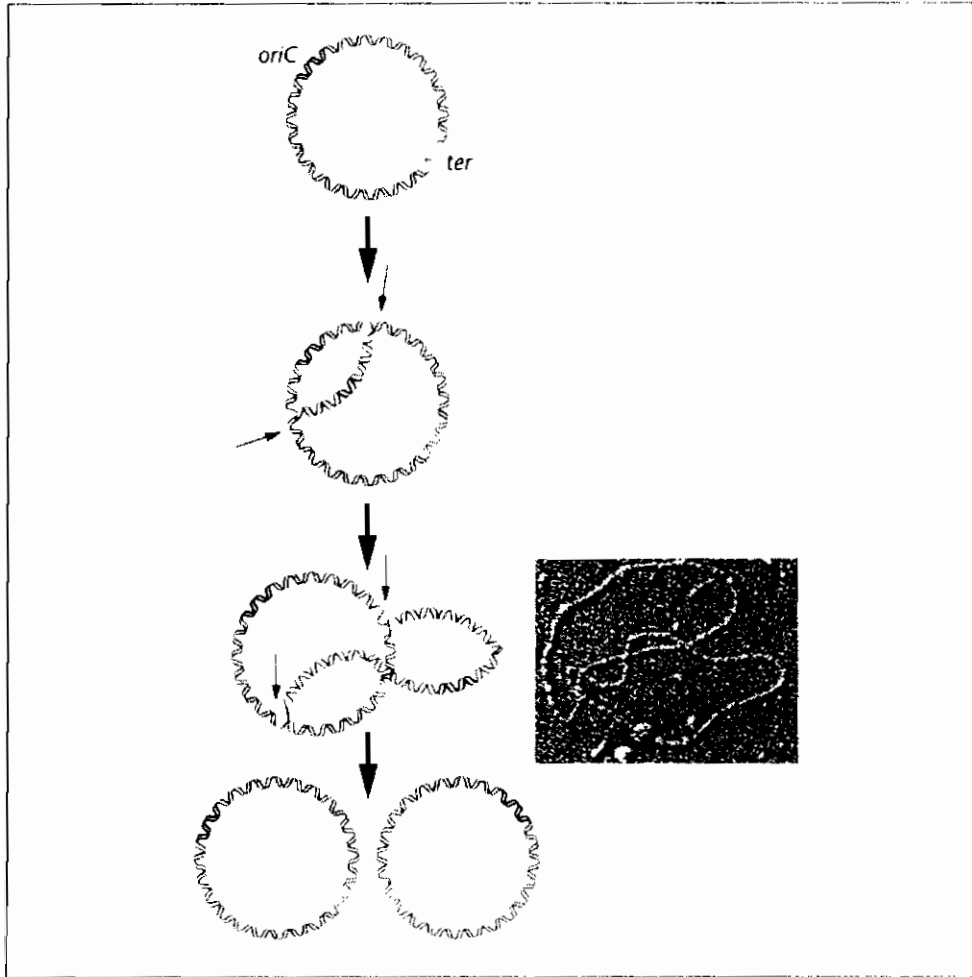
فقد تبين أنه في كل هذه المراحل الوسطية للتناسخ تكون هناك أجزاء صغيرة فقط غير متحلزنة وحيدة السلسلة.

يدل ذلك على أن السلاسل الجديدة يبدأ بناؤها بمجرد أن تبدأ عملية جزيئية لفك الحلزنة وانفصال جزئي للسلسلتين.

في حالة جزئ د. ن. أ الحلقي كما في بكتريا القولون لا يتحتم أن يتحول الجزئ الحلقي إلى جزئ خطي (مستقيم) ولو بصورة مؤقتة على العكس من ذلك وجد عند دراسة المراحل الوسطية لتضاعف كثير من الجزيئات الحلقية من د. ن. أ أن السلاسل الأبوية تحافظ على الشكل الحلقي طول فترة التناسخ.

وقد اكدت تجارب Cairns (باستخدام Radioisotope, Autoradiography) أن التناسخ يحدث أو يبدأ عند نقطة منشأ واحدة في بكتريا القولون وتسمى (oriC) وتتكون من ٢٤٥ زوج من القواعد، على الرغم من أن عملية بناء د. ن. أ تحتاج إلى عدد صغير من القواعد.

ظهر في مثل هذه الجزيئات اثناء تضاعفها شكل (θ ثيتا) عندما تبدأ في تكوين فقاعة التناسخ عند نقطة البداية "المنشأ" كما في الشكل (٣-٦).

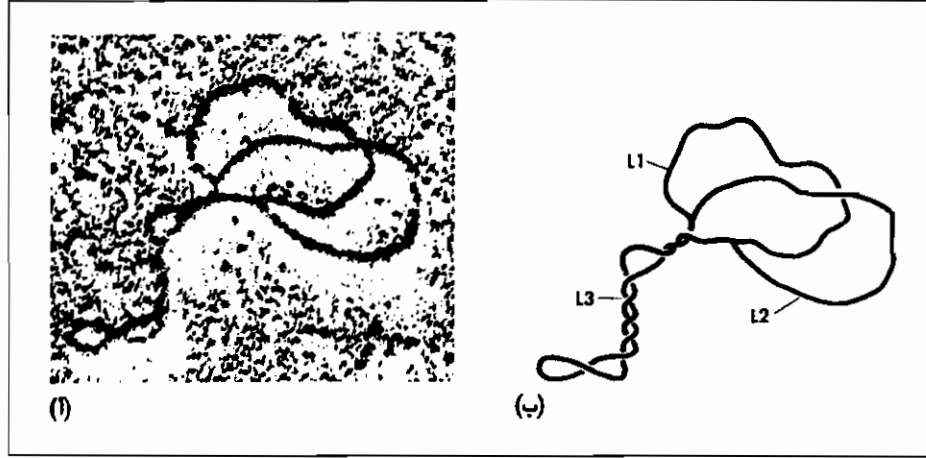


الشكل (٣-٦): التناسخ ثنائي الاتجاه في بكتريا القولون
وصورة المجهر الإلكتروني بالمجهر تبين علمية التناسخ

تنمو الفقاعة (الشوكة) في الاتجاهين المتضادين ولكن كيف يتسنى لجزئ
حلقى مقفول من د. ن. أ أن تنفك حلزنته أثناء التضاعف (التناسخ).

أمكن اكتشاف مجموعة من الانزيمات يطلق عليها Topoisomerases تقوم بعملية فتح/ غلق Nicking/Closing (أو كسر/ لحام) لجزئ د. ن. أ بحيث تساعد إما على ازدياد درجة الحلزونية أو استرخاء الحلزون حسب طبيعة المرحلة التي يمر بها الجزئ.

في الفاج SV₄₀ تبين أن كلا من السلسلتين الأبويتين تظلان على حالهما في معظم فترات دورة التضاعف (الشكل ٣-٧) ويحدث للجزء غير المتضاعف من الشكل ثيما θ الوسطى تحلزن فائق على فترات منتظمة للحيلولة دون تشوه أو تشابك الحلزون ويتم ذلك بإحدى طريقتين: إما أن يتكون حلزون فائق سلبي وذلك بفعل انزيم Topoisomerase II (Gyrase) كمقدمة لاستطالة السلسلة، أو بتكوين حلزون فائق موجب باستطالة فقاعات التناسخ وذلك في حالة حدوث كسر في السلسلة وهو أمر نادر حيث من الممكن في هذه الحالة توقف استطاله نمو الفقاعة لاستحالة الاستمرار في تكوين حلزونة فائقة موجبة أشد. وسنتعرض بالتفصيل لدور Topoisomerases في التناسخ فيما بعد.



الشكل (٣-٧): تناسخ جزئ د ن أ للفاغ SV 40

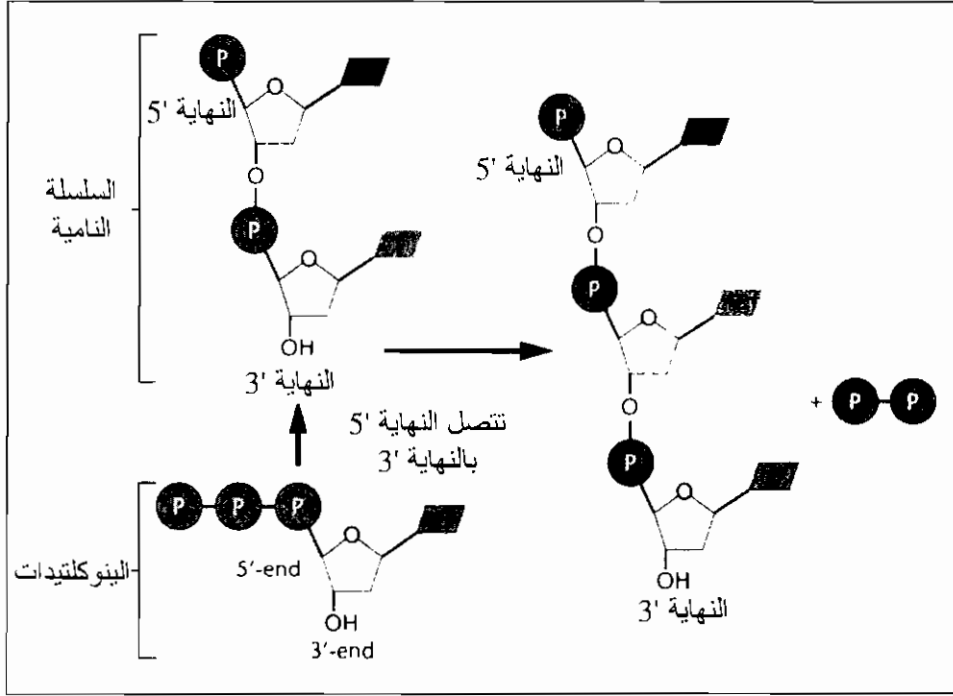
- (أ) صورة بالمجهر الإلكتروني لمرحلة مبكرة من التناسخ.
 (ب) شكل تخطيطي يبين السلاسل الأبوية المتحلزنة وغير المتناسخة. وتمثل المناطق L1 و L2 الأجزاء التي تم تناسخها بالفعل في حين تشير L3 إلى المنطقة غير المتناسخة التي تأخذ شكل فائق التحلزن. يلاحظ أنه خلال دورة التناسخ يظل جزئ د ن أ متماسك.

نموذج بناء جزئ د. ن. أ DNA Synthesis model:

سبق التنوية إلى أن السلسلتين المشاركتين في جزئ د. ن. أ تكونان متضادتين في الاتجاه Antiparallel ويعني ذلك أن كلا من السلسلتين البنويتين الجارى بناؤهما على كل من شوكتى التناسخ لابد أن يكونا أيضا في اتجاهين متضادين، وعلى ذلك فلا بد أن يكون الاتجاه العام لنمو السلسلة في الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ لإحدى السلسلتين بينما المفروض أن يكون النمو للسلسلة المضادة في الاتجاه $3' \rightarrow 5'$.

إلا أن جميع انزيمات بلمرة د. ن. أ DNA Polymerase المعروفة حتى الآن والتي تشارك في اضافة وحدات النيوكليوتيدات يمكنها الاضافة ونمو

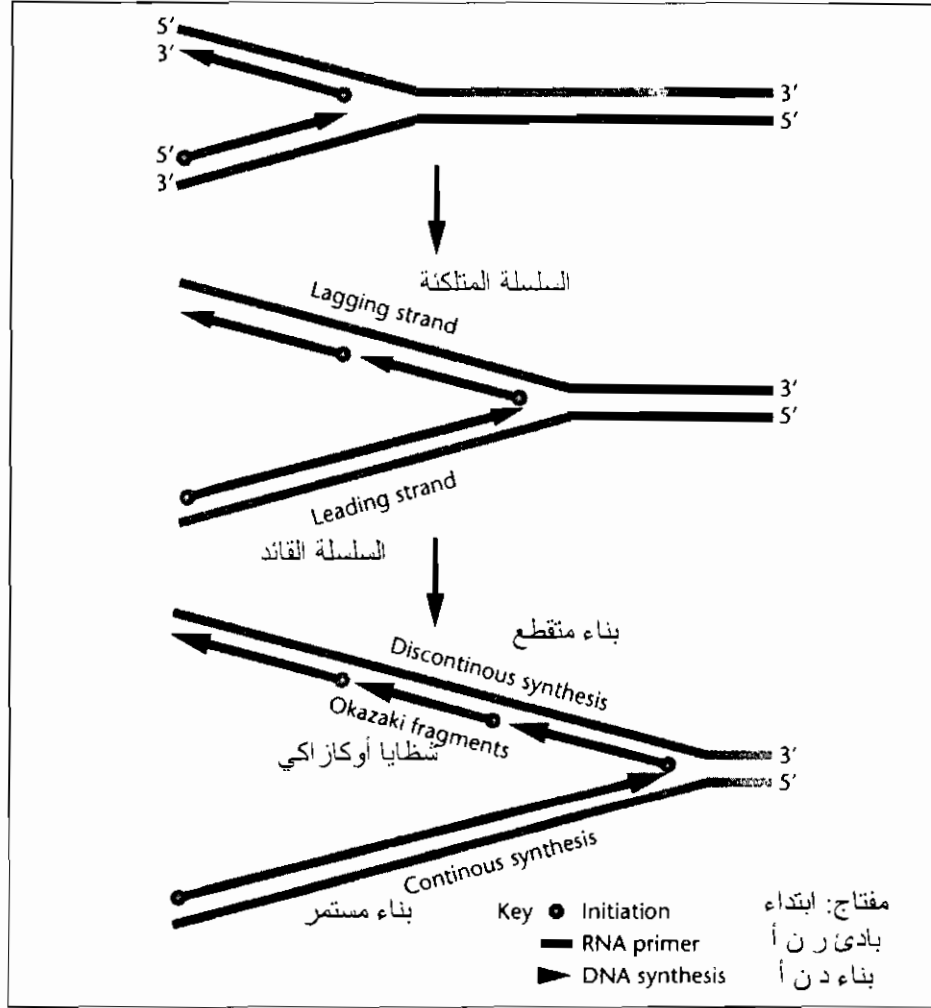
واستطالة السلسلة في الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ فقط نظرا لأن التفاعل الكيميائي الذي تساعد فيه هذه الانزيمات يسمح للنيوكلييدة ثلاثية الفوسفات للتفاعل فقط مع مجموعة الهيدروكسيل الحرة في النهاية $3'OH$ للسلسلة النامية، الشكل (٣-٨).



الشكل (٣-٨): يتم بناء سلسلة د ن أ في الاتجاه $5' \rightarrow 3'$

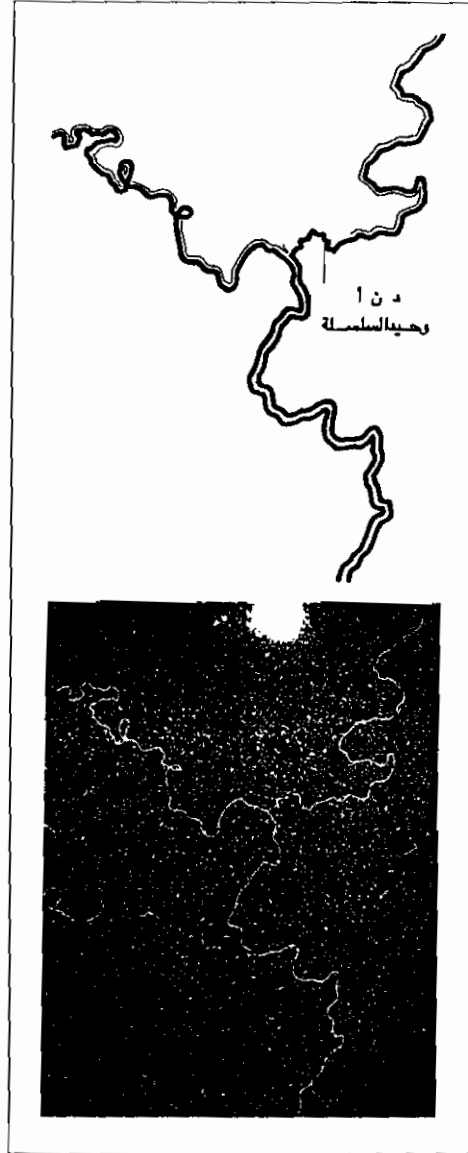
لحل هذه المعضلة، تمكن أوكازاكي Okazaki عام ١٩٦٩ من اكتشاف قطع قصيرة متقطعة من د. ن. أ يتم بناؤها في الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ على الخيط القالب المضاد لاتجاه البناء الطبيعي للسلسلة. وقد توصل إلى ذلك بعد تعريضه بكتريا القولون للثيميدين المشع ^3H Thymidine لمدة ثوان قليلة حيث ظهرت له قطع د. ن. أ. قصيرة بطول حوالي ١٠٠٠-٢٠٠٠ نيوكلييدة معلمة بالأشعاع،

وسميت هذه القطع القصيرة شظايا أوكازاكي Okazaki Fragments نسبة إلى مكتشفها (تكون طول هذه الشظايا في خلايا الكائنات مميزة النواة بطول ٢٠٠ نيوكليوتيد فقط وقد يكون لذلك علاقة بطول شريط د. ن. أ الملتف حول النيوكليوسوم) ثم توصل هذه القطع القصيرة ببعضها بفعل انزيم لحام د. ن. أ DNA Ligase (الشكل ٣-٩).



الشكل (٩-٣): حتمية القطبية المتضادة في بناء د ن أ على طول السلسلتين نظرًا لأن السلسلتين متضادتي الاتجاه وأن إنزيم بلمرة د ن أ III يبني فقط في الاتجاه (5'→3') فلا بد أن يكون البناء على السلسلة المتكئة متقطع مما يؤدي إلى إنتاج شظايا أوكازاكي بينما يتم البناء بصورة مستمرة وغير متقطعة على سلسلة القائد ويقوم بادئ ر ن أ باستبداء عملية البناء على كل من السلسلتين

وقد تأكد الآن أن شظايا أوكازاكي عبارة عن نواتج أولية لإحدى السلسلتين فقط وهي تلك التي تأخذ الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ أما السلسلة ذات الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ فإنها تبنى أو يتم تناسخها على شكل خيط مستمر وغير متقطع من البداية إلى النهاية. وهي لذلك تكون عادة أسرع في معدل بنائها وتسبق في ذلك الخيط المتقطع مما أدى إلى تسمية هذا الخيط بالخيط القائد Leading Strand في حين سمي الخيط المتقطع بالخيط التابع أو البطئ Lagging Strand يؤدي الفرق في سرعة البناء بين الخيطين إلى ظهور منطقة صغيرة من د. ن. أ. الأبوى في صورة احادية السلسلة عند شوكة التناسخ (الشكل ٣-١٠) ثم تصبح مزدوجة السلسلة عند بدء شظية أوكازاكي في الظهور والتي يستمر بناؤها حتى تصل إلى نهاية الشظية السابقة لها والتي لا تلبث أن تلتحم بها. يبدأ بناء شظايا أوكازاكي عند نقطة محددة على طول قالب السلسلة البطيئة وتحدد المسافة بين هذه النقط متوسط طول شظايا أوكازاكي المتكونة أثناء تناسخ جزئ معين من د. ن. أ.



الشكل (٣-١٠): يؤدي اختلاف سرعة الحركة بين الخيط القائد والخيط المتكئ إلى ظهور منطقة صغيرة وحيدة السلسلة في جزئ د ن أ الأبوي عند شوكة التناسخ

بناء د. ن. أ في الكائنات الدقيقة:

DNA Synthesis in Microorganisms:

يمثل التوصل الى أن التناسخ يتم بالطريقة شبه المحافظة وأنه ثنائي الاتجاه ، طراز أو نموذج فقط لتضاعف د. ن. أ والاتحاد بين السلسلتين اللتين تم بناؤهما إلا انه تظل هناك معضلة أكثر تعقيدا تتمثل في معرفة كيفية حدوث البناء الفعلي لسلسلة طويلة مكملة متعددة النيوكليوتيدات على القالب وسنبدأ باستعراض أنواع أنزيمات بلمره د. ن. أ و دور كل منها في عملية البناء.

أنواع انزيمات بلمره د. ن. أ في بكتريا القولون:

DNA Polymerases:

اكتشف حتى الآن في خلايا بكتريا القولون *E.coli* ثلاثة أنواع من انزيمات بلمرة د. ن. أ وقد تم تحديد دور إثنين منها في عملية تناسخ د. ن. أ. فبينما كان يظن سابقاً أن انزيم البلمره DNA Polymerase I (DNA Pol I) والذي كان أول انزيم يكتشف في هذه المجموعة، هو الانزيم الرئيسي المسؤول عن بلمره جزئ د. ن. أ إلا أنه أمكن التحقق من أن هناك انزيم آخر وهو (DNA Pol III) والذي اكتشف لاحقاً هو الذي يقوم بالدور الأساسي في بلمرة جزئ د. ن. أ وعلى العكس من ذلك تبين أن انزيم (DNA Pol I) يقوم أساساً بملئ الفراغات أو الفجوات الصغيرة بين شظايا أوكازاكي المتكونة على الخيط المتكئ. في حين لم يتحدد بعد دور معين للانزيم الثالث وهو (DNA Pol II) في عملية البلمرة حيث أن الطفرات التي لا تنتج هذا الأنزيم لا تتأثر بغيابه.

وقد أمكن تحديد دور كل من هذه الانزيمات في الخلية *in vivo* كالآتي:

- ١- يفترض أن انزيم د. ن. أ بوليميريز I قد يكون مسئولاً عن ازالة بادئ ر. ن. أ القصير وكذلك ملئ الفجوات الناتجة عن تلك الازالة كما أن

نشاطة فى التحليل الطرفى Exonudease يسمح بتصحيح الاخطاء Proofreading أثناء هذه العملية وقد إنتقت أهمية هذا الانزيم فى عملية البلمرة الاساسية عندما اكتشفت طفرة لغياب هذا الانزيم فى بكتريا القولون إلا أن عملية بناء جزئ د. ن. أ لم تتأثر بهذا الغياب.

٢- يبدو ان أنزيم د. ن. أ بوليميرنز II يلعب دورا فى اصلاح الأخطاء الناجمة عن التلف الذى قد يحدث فى جزئ د. ن. أ نتيجة التعرض لعوامل خارجية مثل الاشعة فوق البنفسجية.

٣- يعد انزيم د. ن. أ بوليميرز III هو الانزيم الأساسى المسئول عن عملية البلمرة اللازمة لعملية التناسخ كما أن نشاطه فى التحليل الطرفى $3' \rightarrow 5'$ Exonuclease تمكنه من إصلاح الاخطاء وسوف يتم عرض وظيفة كل من هذه الانزيمات بالتفصيل فيما بعد.

يبين الجدول (١-٣) بعض الخواص الرئيسية لكل من هذه الانزيمات.

الجدول (١-٣) بعض خواص انزيمات البلمرة DNA Pol III, II, I
في بكتريا القولون

Pol III	Pol II	Pol I	الوظيفة
			الوظيفة:
+	+	+	البلمرة 5'→3'
+	-	+	التحليل الطرفي 3'→5' exonuclease
+	-	+	التحليل الطرفي 5'→3' exonuclease
-	-	-	بدء البلمرة
+	+	+	الاحتياج لبداي من ر. ن. أ لبدء البلمرة
			خواص عامة :
١٤٠	١٢٠	١٠٩	الحجم (kda)
١٥	؟	٤٠٠	عدد الجزيئات في الخلية
٩٠٠٠	٣٠	٦٠	معدل البلمرة *
dnaE, N, Z	Pol B	Pol A	الجينات التركيبية المعروفة
نعم	لا	نعم	الطفرات المميتة الشرطية

* عبارة عن عدد النيوكليوتيدات المبلمرة عند درجة 37°م في الدقيقة لكل جزئ من الأنزيم.

دور انزيمات بلمرة د. ن. أ في تصحيح الأخطاء Proofreading:

يتبين من هذا الجدول أن انزيمي Pol III, Pol I تمتلك خواص التحليل أو القطع الطرفي Exonuclease في الاتجاه 3'→5' بالإضافة إلى وظيفة البلمرة الأساسية. ويعني ذلك أنه في مقدور كل من هذه الأنزيمات أن يعيد قطع أو هدم سلسلة متعدد النيوكليوتيدات الحديثة التكوين فضلا عن دوره الأصلي في استطالتها. إلا أن اتجاه البناء يكون أقوى بكثير من اتجاه الهدم. ولكن لماذا توجد

خاصية القدرة على الهدم في نفس الوقت الذى يفترض فيه أن هذه الأنزيمات تقوم أساسا بدور بنائى؟

تبين أن وجود هذه الخاصية ذو أهمية بالغة فى عملية تصحيح الأخطاء Proofreading أثناء عملية بناء سلاسل جزيئات د. ن. أ الجديدة حيث وجد أن خاصية الهدم الطرفى Exonuclease تنشط بصفة خاصة عند وجود أزواج قواعد غير متكاملة أضيفت فى غير أماكنها الصحيحة أثناء عملية البناء فلو حدث بالصدفة أن قاعدة غير صحيحة أضيفت بالخطأ على النهاية 3' للسلسلة النامية فإنه لابد من التخلص منها فى الحال حتى لا تورث هذه الخطأ ويكون احتمال إزالتها عالى قبل إضافة القاعدة التالية ويتم ذلك بفعل الهدم الطرفى لهذه الانزيمات.

أى أن هذا النشاط الهدمى يعطى الفرصة لتصحيح الأخطاء مبكرا مما يؤدى إلى إنتاج سلاسل د. ن. أ دقيقة جدا وأكثر انضباطا بكثير عما لو اعتمدنا فقط على خاصية التزاوج بين أزواج القواعد المكملة فقط.

قد يعزى عدم ظهور انزيم بلمرة د. ن. أ فى الاتجاه 5'→3' إلى الاحتياج المستمر إلى عملية التصحيح هذه. إذ لو افترضنا إمكان استطاله السلسلة فى هذا الاتجاه فإن النهاية النامية ستكون دائماً منتهية بمجموعة ثلاثية الفوسفات والتى تكونه روابطها المرتفعة الطاقة ضرورية لإضافة النيوكلييدة التالية. من جهة أخرى سيؤدى نزع أو إزالة أحدث نيوكلييده مضافة من مثل هذه السلسلة النامية المنتهية بمجموعة ثلاثية الفوسفات أثناء عملية تصحيح الأخطاء إلى ظهور سلسلة ذات نهاية 5' أحادية الفوسفات Monophosphate - 5' والتى ستكون بمحتوى طاقتها المحدود غير قادرة على الاستطالة بواسطة إنزيم البلمرة

الأفتراضى هذا مما يؤدى إلى توقف عملية الاستطالة فى السلسلة. وعلى ذلك فإنه يكون من الأسهل تصحيح الخطأ الناتج عن اضافة قاعدة غير صحيحة للتو إلى النهاية 3' للسلسلة عن تلك المضافة إلى النهاية 5' ومما يؤكد ذلك أن فرصة ظهور إنزيم بلمرة فى الاتجاه 5'→3' معدومة حتى الان لإفتقاده لخاصية تصحيح الأخطاء فى حين أن التناسخ فى الاتجاه 3'→5' يسمح للإنزيم نفسه فى نفس الوقت بتصحيح الأخطاء بكفاءة عالية.

يتميز إنزيم بلمرة د. ن. أ III بأنه بمجرد أن يبدأ عملية الاستطالة للسلسلة النيوكليدية فإنه يستمر ملتصقاً بالسلسلة مضيفاً نيوكليدات جديدة (واحدة تلو الأخرى) حسب التتابع المكمل للسلسلة القالب إلى أن يتم وصوله إلى إشارة تجعله ينفصل عن السلسلة. ولكن لماذا يظل إنزيم بلمرة د. ن. أ متصلًا بالقالب إلى نهاية المشوار المحدد له بدون انقطاع؟

أظهر التركيب الثلاثى الأبعاد لجزئ البلمرة (DNA Pol III) أن هذا الإنزيم يحتوى على نطاقين أو مجالين Domains محدودين، يحتوى النطاق الأكبر على برزخ أو شق عميق ذو شحنة كهربية موجبه ويبلغ نصف قطرة 20Å° وترتبط سلسلة د. ن. أ فى هذا الشق فى حين قد يحتوى النطاق الأصغر على منطقة للارتباط بالنيوكليدية القادمة. يبدو أن تحت النطاق الذى يتميز بالمرونة لدية المقدرة على إغلاق الشق بعد إرتباط سلسلة د.ن. أ. وعندما تكون سلسلة د. ن. أ فى هذا الوضع فإنه يكون باستطاعتها التحرك فقط إما إلى الخلف أو إلى الأمام من خلال الشق. يعتقد أنه فى حالة اضافة نيوكليدية خاطئه لهذه السلسلة والتي لا يمكنها أن تتزاوج بطريقة صحيحة مع القاعدة المقابلة فسيؤدى ذلك إلى تشوية وعدم تناسب عند هذه النقطة (القاعدة) مما يحول بين

وتتضح أهمية النشاط الهدمي الطرفي $5' \rightarrow 3'$ لهذا الأنزيم في تصحيح الأخطاء عندما اكتشفت طفرة في تحت الوحدة E لهذا الأنزيم والمسئولة عن هذا النشاط حيث أدت هذه الطفرة إلى زيادة كبيرة في الأخطاء وعدم القدرة على تصحيحها.

أهمية RNA البادئ في تناسخ جزئ د. ن. أ.:

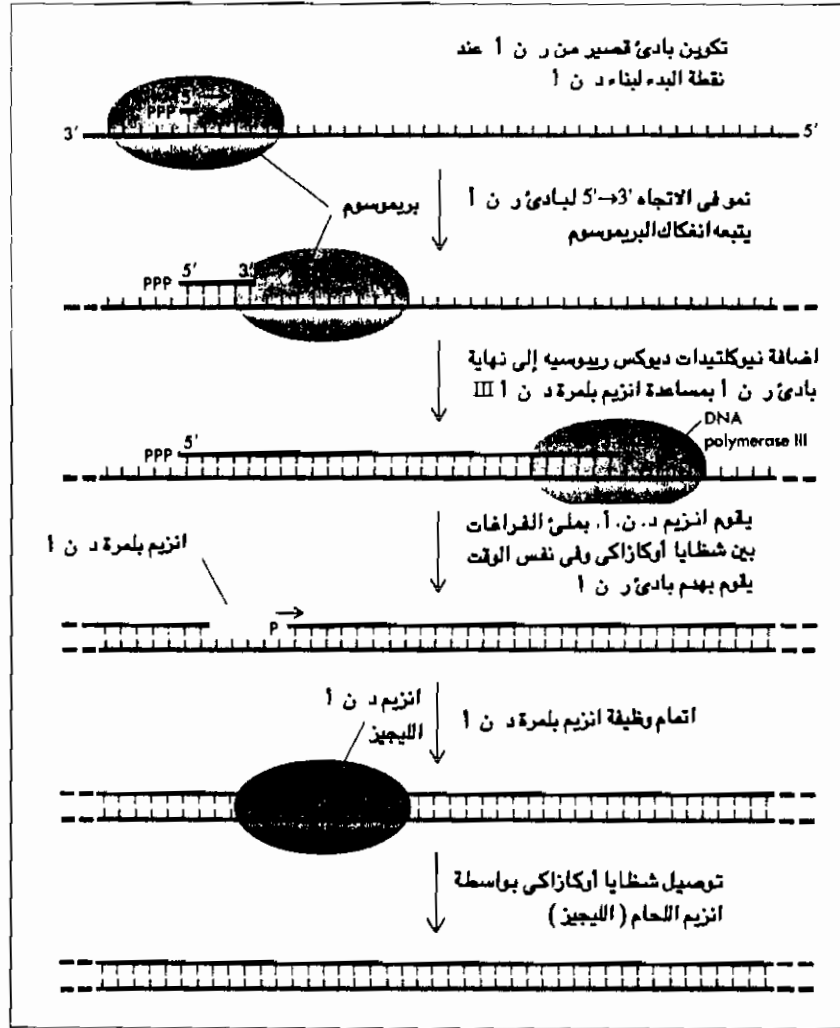
تبين أن إنزيمات بلمرة د. ن. أ. DNA Polymerases المعروفة حتى الآن ليس في مقدورها بدء عملية البلمرة وبناء السلسلة من الصفر *de novo* بل لابد أن تكون مسبقة ببادئ قصير حتى يمكنها بدء نشاط البلمرة واستطالة سلسلة د. ن. أ. وقد تبين أن عملية بدء بناء أي سلسلة من د. ن. أ. يتطلب وجود بادئ قصير جداً من ر. ن. أ. RNA (حوالي ١٠ نيوكليوتيدات في مميزة النواة وقل من ذلك في غير مميزة النواة) أي أن نقطة البداية (المنشأ) لبناء د. ن. أ. على السلسلة القالب لا يتم التعرف عليها بواسطة إنزيمات بلمرة د. ن. أ. مخصوصة ولكن بإنزيمات تقوم بنسخ Transcribe د. ن. أ. لإنتاج سلسلة بادئ قصيرة جداً من ر. ن. أ. يمكن التعرف على إنزيم خاص يعرف بالبريميز DNA Primase وهو يختلف تماماً عن إنزيم بلمرة ر. ن. أ. RNA Polymerase الخاص بعملية نسخ جزيئات ر. ن. أ. على قالب د. ن. أ. كما أنه لا يحتاج إلى نهاية $3'-OH$ حره لبدء البناء.

تقوم هذه الإنزيمات بالتعرف على تتابعات خاصة على السلسلة القالب (سواء القائد أو التابع) لجزئ د. ن. أ. وجد أن إنزيم البريميز في خلايا بكتريا القولون عبارة عن سلسلة واحدة من متعدد الببتيد يبلغ حجمه ٦٠ كيلو دالتون وتوجد منها حوالي ٥٠-١٠٠ نسخة في الخلية الواحدة. ثبت أنه يلزم لبدء

نشاط هذا الإنزيم أن تدخل ضمن معقد مكون من ٦-٧ بروتينات أخرى لتكون معقداً كبيراً يعرف بالبريموسوم Primosome و يتحرك هذا المعقد خطوة خطوة (الخطوة = نيوكلييدة) في الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ على القالب الخاص بالخيط المثلثي ليستبدئ البدايات المتكررة لشظايا أوكازاكي التي يتم بناؤها بصورة متقطعة على هذا القالب التابع. يعتقد أن مكونات البريموسوم المختلفة تقوم بالعمل فيما بينها بصورة تعاونية co-operative لتأمين حركة البريموسوم على جزئ د. ن. أ وكذلك في ازاحة البروتينات الخاصة بتثبيت السلاسل الفردية من د. ن. أ (والتي يطلق عليها البروتينات المرتبطة بالسلسلة الفردية لجزئ د. ن. أ (SSB) كما سيأتي بعد) كما تقوم بروتينات البريموسوم بالتعرف على مواقع البدء (المنشأ) الصحيحة وبلمرة وحدات الريبونيوكلييدات لتكوين بادئ قصير جداً من سلسلة ر. ن. أ أي أن البريموسوم يتحرك على قالب د. ن. أ في الاتجاه العكسي للاتجاه الذي لابد أن يتحرك عليه عندما يعمل على بناء ر. ن. أ مما قد يفسر لماذا يكون ر. ن. أ البادئ قصير السلسلة جداً لا يتعدى ٣-١٠ نيوكلييدات.

يوجد لكل كائن تتابع متشابه لجميع بادئات ر. ن. أ مما يؤكد حقيقة أن البريموسوم يقوم ببناء ر. ن. أ. البادئ عند تتابعات معينة (متخصصة) على طول الخيط المثلثي (التابع) لجزئ د. ن. أ القالب.

بمجرد أن يتم بناء ر. ن. أ البادئ، يبدأ نشاط إنزيم بلمرة د. ن. أ (DNA Pol III) نظراً لأن البادئ قد هيا له نهاية $3' \text{ OH}$ حرة في نهاية سلسلته القصيرة ويبدأ في بناء شظايا أوكازاكي بحيث يتم تناسخ قالب د. ن. أ التابع في صورة غير مستمرة (متقطعة) (الشكل ٣-١٢).



الشكل (٣-١٢): استخدام بادئ قصير من ر ن أ

لبدء بناء شظايا أوكازاكي على القالب المثلث

يتم بعد ذلك إزالة ر. ن. أ البادئ في خطوة لاحقة من خلال نشاط إنزيم DNA Pol I الذي يقوم بملئ الفجوات أو الفراغات بين شظايا د. ن. أ. بحيث يضيف النيوكليوتيدات الواحدة تلو الأخرى إلى النهاية 3' التي تقع إلى

الخلف منه وفي نفس الوقت يقوم بتحليل وهدم سلسلة ر. ن. أ البادئ التي تسبقه. تتم عملية هدم ر. ن. أ نتيجة لنشاط موقع مختلف تماماً عن ذلك المسئول عن عملية التصحيح 5'→3' إذ أن ذلك الموقع النشط في الهدم الطرفي 3'→5' يمكنه إزالة الديوكسي نيوكليوتيدات بالإضافة إلى الريبونيوكليوتيدات وعلى ذلك فإن استخدامه لا يكون قاصراً على إزالة بادئ ر. ن. أ ولكنه يقوم أيضاً بتحليل وهدم مناطق د.ن. أ التي يحدث لها تلف نتيجة للتعرض للإشعاع.

يلي ذلك عملية لحام أو لصق شظايا أو كازاكي ببعضها البعض بمساعدة إنزيم اللحام (الليجيز) DNA Ligase الذي يقوم بتوصيل النهاية 3' للشظية الجديدة من د. ن. أ بالنهاية 5' للشظية السابقة لها. وهكذا حتى نحصل في النهاية على خيط كامل متصل (الشكل ٣-١٢) وقد تأكدت وظيفة انزيم الليجيز في لحام شظايا أوكازاكي عندما لوحظ أنه في بكتريا طافرة لنقص الأنزيم تراكتت شظايا أوكازاكي بدون لحام.

ولكن لماذا تلجأ الخلية إلى بدء السلسلة ببائ ر. ن. أ الذي لا بد أن يزال في خطوة لاحقة وتفضل ذلك على بدئها ببائ من د. ن. أ الذي يفترض أنه لا توجد حاجة إلى إزالته فيما بعد؟ سبق أن ذكرنا أنه لم يوجد حتى الآن إنزيم بلمرة د. ن. أ يمكنه بدء البناء من الصفر *de novo*، بالإضافة إلى ذلك يمكن تفسير تفضيل وجود بادئ ر. ن. أ في بداية شظايا أو كازاكي على أساس أن الأنزيم الذي يمكنه بدء بناء السلسلة من الصفر *de novo* يفتقر عادة إلى القدرة والكفاءة لإجراء عملية التصحيح الذاتي، وعلى ذلك فإن الإنزيم الذي يستطيع استبداء بناء شظايا أوكازاكي سيكون بالضرورة معرضاً لإنتاج نسخة غير صحيحة نسبياً (10^{-3}) مما يؤدي في النهاية إلى زيادة معدل الطفرات بدرجة كبيرة

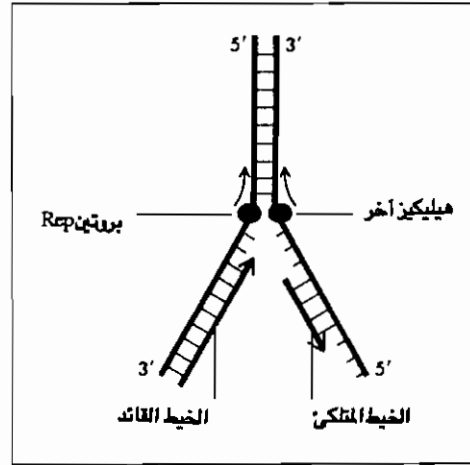
جداً مما يؤثر على حيوية الخلية ونشاطها بشكل سلبي. ولذلك فإنه يبدو أن وجود بادئ من ر. ن. أ بدلاً من د. ن. أ في بداية السلسلة له ميزة أن هذه التتابعات القصيرة من الريبونوكليوتيدات يمكن اعتبارها بمثابة كشافات يسهل على DNA Pol III أن يتعرف عليها فيما بعد ويقوم بتكسيروها وإزالتها أي أن الإنزيم يميزها على أنها بقع رديئة يجب مسحها وإزالتها.

أنواع البروتينات التي تساعد على فك الحلزنة وانفصال سلسلتى د. ن. أ:

حيث أن سلسلتى الحززون المزدوج الواقعة أمام شوكة التناسخ لا تنفصلان تلقائياً بالمعدل المناسب تحت الظروف العادية نظراً لأن الحززون يكون ثابت جداً والروابط الهيدروجينية تصل بين أزواج القواعد بطريقة منتظمة وتحتاج في كسرها إلى درجة حرارة عالية نسبياً في التجارب المعملية (حوالي 96°م)، لذلك فإنه يلزم وجود عوامل مساعدة في الخلية لفصل السلسلتين حتى يتسنى لإنزيمات بلمرة د. ن. أ. أن تؤدي دورها في عملية التناسخ على قالب د. ن. أ. وجد أن هناك مجموعة من البروتينات التي تقوم بهذا الغرض يطلق عليها هيليكيزز Helicases، تقوم هذه البروتينات (بالارتباط مع ATP) بالالتصاق بأجزاء وحيدة السلسلة من د. ن. أ. وتستخدم الطاقة الناتجة من التحليل المائي لجزئ ATP للتحرك إلى الأمام وزيادة معدل انفصال سلسلتى د. ن. أ.

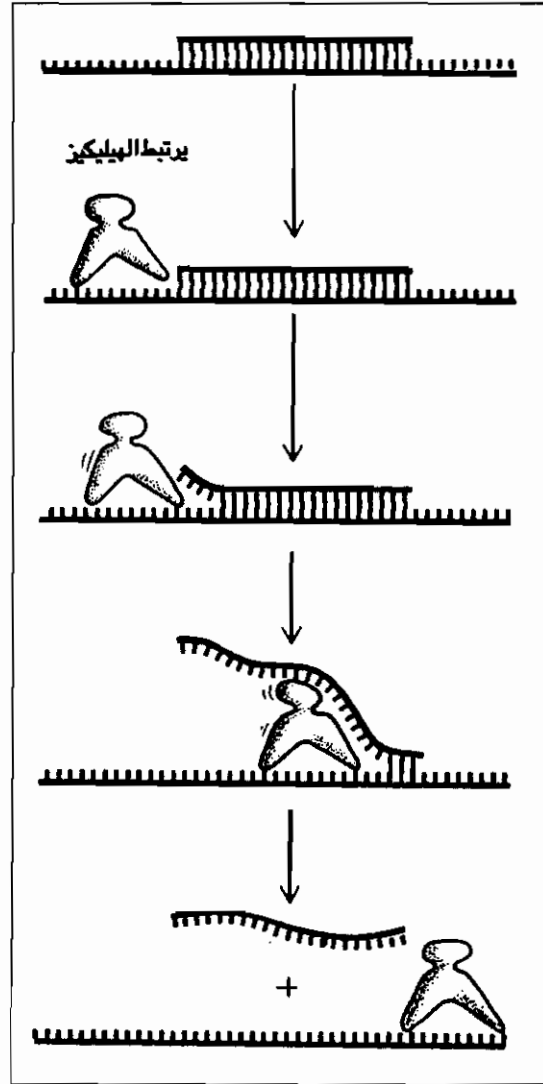
يوجد نوعان من هذه البروتينات أحدهما (هيليكيز II أو I) يرتبط بالقالب الخاص بالخيط البطئ (التابع) ويتحرك في الاتجاه 3'→5' في حين يطلق على النوع الآخر اسم Rep protein وهو يرتبط بالقالب الخاص بالخيط القائد ويتحرك

في الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ (الشكل ٣-١٣) تستمر إنزيمات الهليكيز في التقدم أمام شوكة التناسخ لفصل سلسلتى د. ن. أ القالب تمهيداً لعمل إنزيمات البلمرة.



الشكل (٣-١٣): تقوم إنزيمات الهليكيز Helicases بفك حلزونة د ن أ أمام شوكة التناسخ، يتحرك البروتين (Rep Protein) وهو من أنواع الهليكيز على أحد السلسلتين في الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ في حين يتحرك إنزيم هليكيز آخر (هليكيز I أو II) على السلسلة المكملية في الاتجاه $5' \rightarrow 3'$

ويبين الشكل (٣-١٤) الطريقة التى تعمل بها إنزيمات الهليكيز.

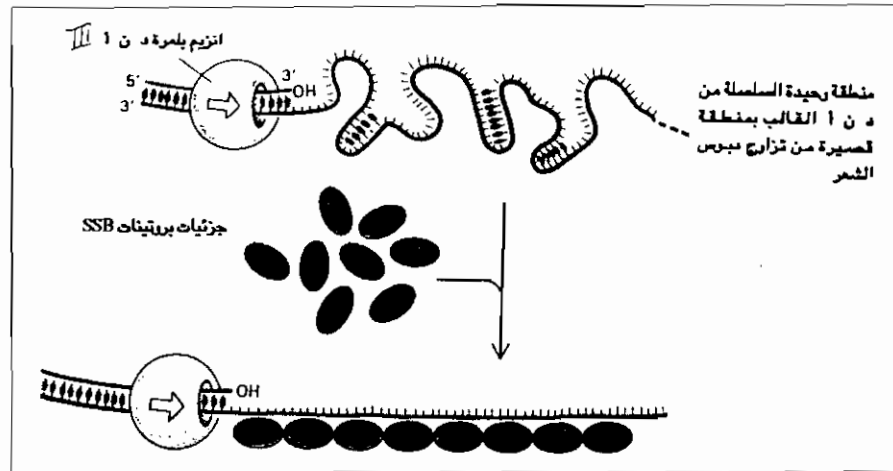


الشكل (٣-١٤): ميكانيكية عمل إنزيمات الهليكيز

يتم إعادة اتحاد Annealing منطقة قصيرة من د ن أ مع سلسلة طويلة مفردة من د ن أ لتكوين منطقة حلزون مزدوج محدودة تنفك هذه المنطقة المزدوجة عند مرور الهليكيز على سلسلة د ن أ محرراً الشظية القصيرة من د ن أ ويحتاج هذا التفاعل إلى وجود جميع بروتينات الهليكيز و ATP

من جهة أخرى، وجد أن سلسلة القالب عندما تكون في صورة مفردة فإنها تكون معرضة للأنتشاء أو الانطباق على نفسها بسرعة وبسهولة في المناطق المفردة لميلها الطبيعي لتكوين مناطق مزدوجة بين أزواج القواعد المتقابلة ولو بطريقة خاطئة مكونة عروات تشبه دبوس الشعر Hairpin مما يعيق عملية التناسخ. توجد مجموعة بروتينات خاصة تقوم بالارتباط بسرعة بالمناطق المفردة من سلسلة القالب لتثبيت هذه المناطق والمحافظة عليها مفردة وممتدة بدون انحناءات أو انتشاءات لحين وصول إنزيم البلمرة إليها.

وجد أن هذه البروتينات المثبتة تلتصق بمنطقة من د. ن. أ بدون أن تحجب القواعد النروجينية حتى تظل الأخيرة معرضة لعملية التناسخ، يطلق على هذه المجموعة من البروتينات اسم بروتينات الارتباط بسلسلة د. ن. أ. المفردة Single Stranded DNA Binding Proteins واختصاراً (SSB) ويبين الشكل (٣-١٥) كيفية عمل هذه البروتينات.



الشكل (٣-١٥): دور بروتينات SSB أثناء عملية التناسخ حيث يؤدي ارتباط هذه البروتينات بالسلسلة المفردة إلى منع انثنائها قبيل عملية التناسخ مما يسهل مرور إنزيم بلمرة د ن أ على القالب المفرد

وجد أن هذه البروتينات لا تحتاج إلى طاقة من ATP ولم يتحدد لها حتى الآن دور إنزيمي معين و تتكون من أربعة تحت وحدات Subunits طول كل منها ١٧٧ حامض أميني بحيث ترتبط كل وحدة رباعية Tetramer بمجموعات متجاورة من النيوكليوتيدات على السلسلة المفردة طولها ٣٢ نيوكليوتيدة. يؤدي ارتباط وحدة من SSB بمنطقة ما إلى تشجيع أو حفز ارتباط وحدة أخرى من SSB بمنطقة مجاورة على السلسلة ويطلق على هذه العملية الارتباط التعاوني Cooperative Binding.

تركيب إنزيم البلمرة DNA Pol III:

وجد أن إنزيم بلمرة د. ن. أ من نوع DNA Pol III المسئول عن استطالة سلسلة د.ن.أ أثناء عملية التناسخ يتكون من سبع تحت وحدات من متعدد البيبتيد تكون معاً إنزيم كامل Holoenzyme ولا بد أن توجد هذه الوحدات جميعاً معاً حتى يمكن للإنزيم أن يقوم بوظائفه على الوجه الأكمل . وجد أن واحدة من هذه الوحدات وتسمى ϵ تقوم بنشاط الهدم الطرفي Exonuclease $3' \rightarrow 5'$ بالإضافة إلى وظيفة البلمرة في حين تقوم الوحدة ϵ بالهدم الطرفي في الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ ترتبط واحدة أو أكثر من الوحدات الأخرى بجزئ ATP حتى يمكن بدء الاستطالة عند النهاية $3' H$ لبداي ر. ن. أ.

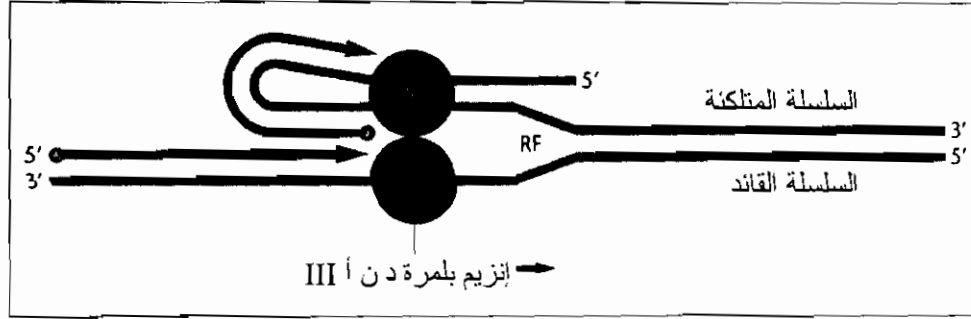
يبين الجدول (٣-٢) أنواع البروتينات المشاركة في تناسخ جزئ د.ن.أ في بكتريا القولون وملخصاً لوظائف كل منها.

الجدول (٢-٣) أنواع البروتينات المشاركة
في تناسخ د. ن. أ في بكتريا القولون E.coli

الوظيفة	عدد تحت الوحدات	الكتلة (Kdal)	اسم البروتين
الارتباط بالسلسلة المفردة	٤	٧٤	SSB
تجميع الريموسوم وتنشيطه	٣	٦٦	Protein i
	٢	٢٨	Protin n
	١	٧٦	Protin n'
	١	١٧	Protin n''
	١	٢٩	Dna C
	٦	٣٠٠	Dna B
بناء البادئ ر. ن. أ	١	٦٠	Primase
البلمرة DNA polymerase	(٢)	(٧٦٠)	Pol III Holoenzyme
البلمرة و exonuclease 5'→3'	١	١٤٠	∞
البلمرة و exonuclease 3'→5'	١	٢٥	ε
٢x استطالة السلسلة د. ن. أ الجديدة	١	١٠	θ
	١	٣٧	β
	١	٥٢	δ
	١	٣٢	δ
	١	٨٣	T
ملئ الفجوات وإزالة بادئ ر. ن. أ	١	١٠٢	Pol I
اللحام بين شظايا أوكازاكي	١	٧٤	Ligase
زيادة الحلزنة	٤	٤٠٠	Topoisomerase II (Gyrase)
	٢	٢١٠	Gyr A
	٢	١٩٠	Gyr B

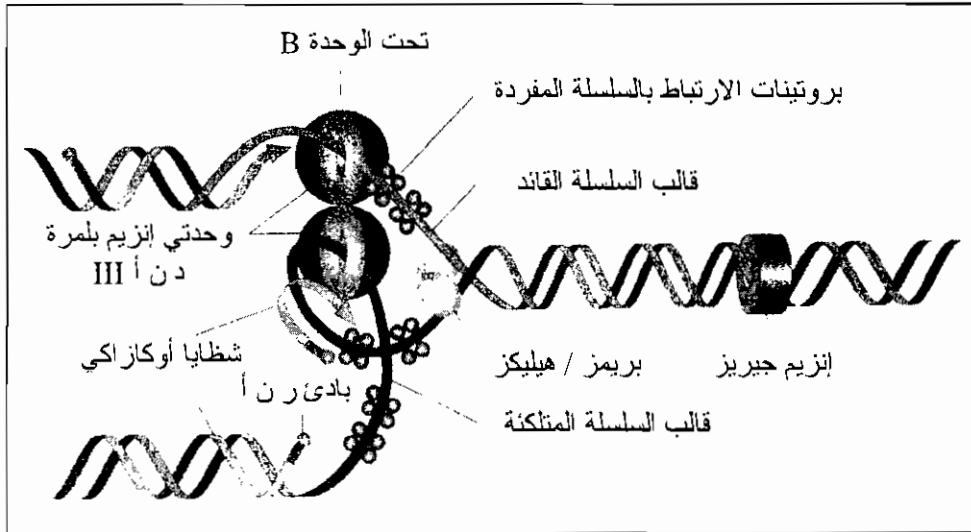
فك الحلزون وفصل سلسلتى د.ن.أ.	١	٦٥	Rep Protein
فك الحلزون وفصل سلسلتى د.ن.أ.	١	٧٥	Helicase II
نقطة بداية التناسخ فى د.ن.أ.	٤	٤٨	Dna A
استرخاء الحلزون الفائق السلبى		١٠٠	Topoisomerase I

تقوم هذه البروتينات بالعمل فى تنسيق تام مع بعضها ويطلق عليها فى مجموعها ماكينة التناسخ Replication Machine مما يؤدى إلى إنتاج جزيئات د.ن.أ. صحيحة وخالية من الأخطاء. تبين أن معظم هذه البروتينات تكون مرتبطة ببعضها فى صورة معقدات مكونة من عدة إنزيمات (الكتلة 10^6 Dalton) وتتحرك بسرعة على خيط د.ن.أ. وقد وجد أن هناك جزيئين من إنزيم DNA Pol III عند شوكة التناسخ بحيث يمكن لهذا الثنائى الإنزيمى أن يقوم بإدارة عملية استطالة كلاً من الخيطين القائد والتابع فى نفس الوقت ويتطلب ذلك أن ينتهى الخيط التابع إلى الخلف (ربما وراء Pol III) حتى يمكنه أن يرتبط بمكونات البلمرة فى نفس اتجاه الخيط القائد. وطبقاً لهذا الافتراض فإن البادئ المتكون بفعل البريموسوم سيكون مغطى بواسطة DNA Pol III عندما يكون قالب الخيط التابع ماراً من البريموسوم وسيكون مغطى بواسطة DNA Pol III عندما يكون قالب الخيط التابع ماراً من خلال معقد الإنزيم Pol III. وعندما تصل السلسلة النامية إلى شظية أوكازاكي السابقة لها فإن الانحناء أو العروه ستسترخى. وفى هذا الوقت سيؤدى بناء الخيط القائد المستمر إلى توفر منطقة مفردة جديدة من قالب الخيط التابع التى يمكنها أن تتحنى إلى الخلف وتشارك فى تكوين شظية أوكازاكي التالية. بهذه الميكانيكية لن يكون الفرق كبيراً بين معدل بناء واستطالة الخيط القائد والخيط التابع (الشكل ٣-١٦).



الشكل (٣-١٦): يتم التناسخ معاً وفي نفس الوقت على كلا من السلسلة القاند والسلسلة المتكئة على شوكة تناسخ واحدة. تنحني السلسلة المتكئة لكي تعكس الاتجاه المادي وليس البيوكيميائي للتناسخ وينشط الإنزيم بوحدين بحيث تتوزع كل وحدة على إحدى السلسلتين للقيام بعملية البناء

بالإضافة إلى ذلك سيتم انفصال البريموسوم عن د. ن. أ القالب بنفس السرعة التي تتحرك بها مكونات جزئ DNA Pol III المشاركة في بلمرة د. ن. أ. يطلق علي معقد البروتينات المشاركة في تناسخ د. ن. أ والتي تشمل جزئين من DNA Pol III والبريموسوم اسم ريبليوسوم (وهي عادة تكون في حجم الريبوسوم) ويوضح الشكل (٣-١٧) الدور الذي تقوم به كل من هذه البروتينات في عملية تناسخ د. ن. أ.

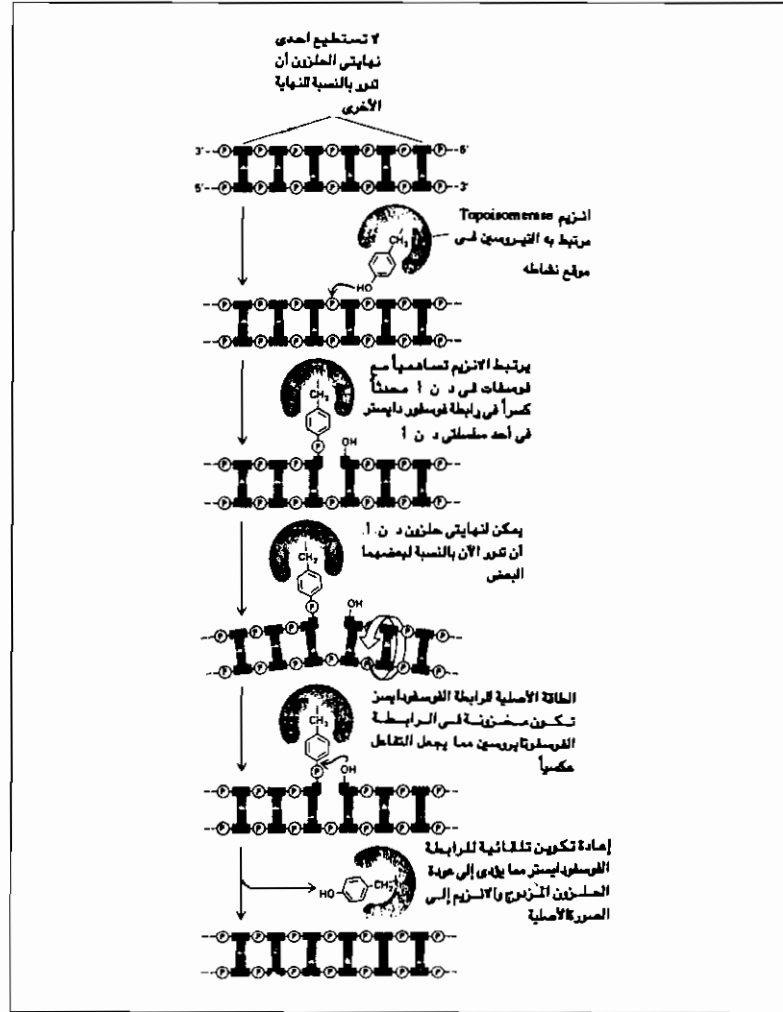


الشكل (٣-١٧): ملخص لعملية بناء دن أ عند شوكة تناسخ واحدة

دور انزيمات Topoisomerase في تناسخ د. ن. أ:

أن توضيح الحلزون المزدوج لجزئ د. ن. أ "كسلم مسطح" لا يأخذ في الاعتبار مشكلة الدوران أو الالتفاف Winding الذي يحدث أثناء تناسخ د. ن. أ من المعروف أن كل ١٠ أزواج من القواعد توازي دورة التفاف كاملة حول محور الحلزون المزدوج الأصلي. معنى ذلك أنه لكي تتحرك شوكة التناسخ فإنه يتحتم على جميع أجزاء الكروموسوم التي تسبق الشوكة أن تدور بسرعة (الشكل ٣-١٨) مما يتطلب استهلاك مقدار كبير من الطاقة وعلى الأخص في حالة الكروموسومات الطويلة نسبياً. ولذلك لجأت الخلية إلى ميكانيكية بديلة إنشاء عملية التناسخ عن طريق تكوين محور ارتكاز للدوران "Swivel" في جزئ د. ن. أ بواسطة بروتينات خاصة يطلق عليها DNA Topoisomerases، يمكن اعتبار هذه المجموعة من البروتينات بمثابة انزيمات تحليل مائي نووي عكسي

“Reversible Nucleases” حيث ترتبط تساهمياً بمجموعات الفوسفات فى الهيكل الأساسى لجزئ د. ن. أ، وبذلك تقوم بتكسير رابطة فوسفواستير ثنائية فى سلسلة د. ن. أ. ومن خواص هذه الرابطة التساهمية التى تكونت بين انزيم Topoisomerase وفوسفات د. ن. أ احتفاظها بالطاقة الناتجة عن كسر الرابطة الفوسفواستير الثنائية وبهذا يكون تفاعل الكسر عكسياً بحيث التئام (لحام) سريع بدون الحاجة إلى مصدر طاقة إضافى. وتجدر الإشارة هنا إلى أن عملية إعادة الالتحام هنا تختلف عما يحدث عن طريق انزيم اللحام DNA Ligase الذى سبقت الإشارة إليه.



الشكل (٣-١٨): تفاعل أحداث ثغرة عكسية (Nicking) الذي يتم في د ن أ مميزة النواة

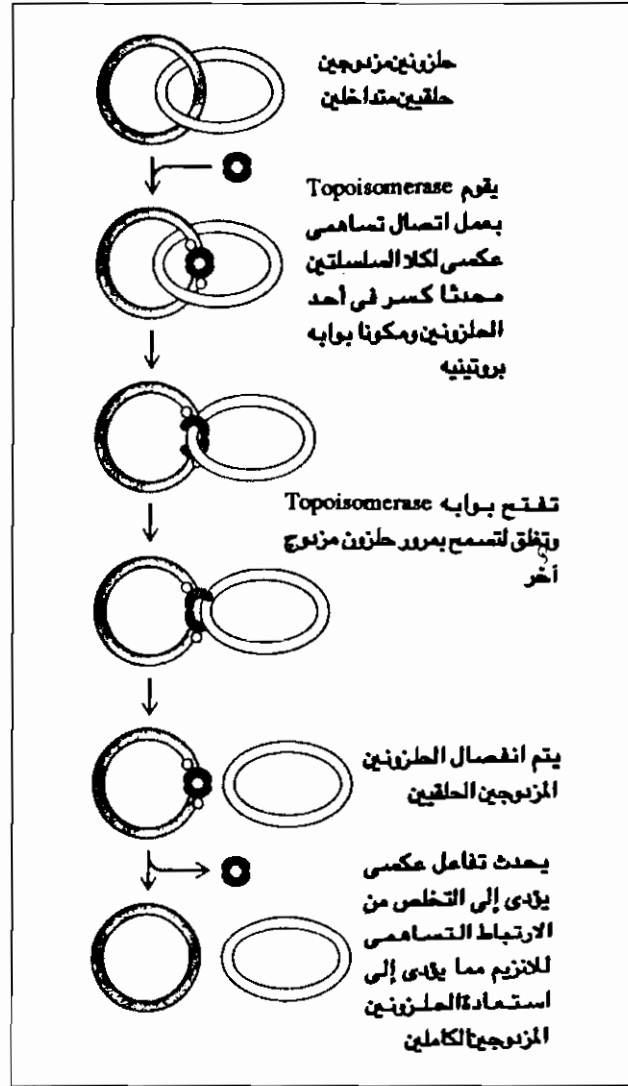
بمساعدة إنزيم Topoisomerase I

حيث تكون هذه الإنزيمات رابطة تساهمية مؤقتة مع جزئ د ن أ

يوجد نوعين من Topoisomerases الأول يسمى Topoisomerase I

ويحدث تأثيره عن طريق إحداث كسر (أو ثغره صغيرة) "Nick" في إحدى

سلسلتى الحلزون المزدوج فقط أى أنه يعمل على مستوى السلاسل المفردة. يؤدي القطع أو الكسر الصغير هذا الى السماح لشطري حلزون د. ن. أ الموجودين على جانبي الكسر بالدوران بحرية بالنسبة لبعضها البعض بحيث تستخدم الرابطة الفوسفواسثير الثنائية فى السلسلة المقابلة للكسر كنقطة إرتكاز للدوران (الشكل ٣-١٩) وإذا نشأ أى توتر أو شد Tension فى حلزون د. ن. أ فإن اتجاه هذا الدوران سيتحدد بما يضمن تخفيف التوتر أو الشد. ينتج عن ذلك أن تناسخ د. ن. أ يمكن أن يتم بعد حدوث دوران لمنطقة قصيرة فقط من الحلزون وهى المنطة التى تسبق مباشرة شوكة التناسخ. ويحدث نفس الشئ أثناء عملية نسخ Transcription د. ن. أ لتكوين ر. ن. أ.



الشكل (٣-١٩): ميكانيكية عمل إنزيم Topoisomerase II في فصل جزيئين حلقيين من د ن أ أثناء التناسخ ويحتاج هذا الإنزيم إلى ATP لأداء وظيفته يوجد هذا الإنزيم في كل من الخلايا غير مميزة النواة ومميزة النواة

أما النوع الثاني من هذه الانزيمات فيسمى Topoisomerase II ويقوم بدوره عن طريق تكوين رابطة تساهمية مع كل من السلسلتين في الحلزون المزدوج لجزئ د.ن.أ. في نفس الوقت مما يسبب قطع مؤقت في السلسلتين. يتم تنشيط هذا الانزيم عن طريق مواقع موجودة على الكروموسومات حيث يتعابر حلزونان مزدوجان فوق بعضهما البعض، وعندما يرتبط Topoisomerase II بنقطة التعابر هذه فإنه :

- ١- يكسر أحد الحلزون المزدوجين (عكسياً) مما يؤدي إلى إنشاء بوابة في د.ن.أ.
- ٢- يمر جزئ د.ن.أ. مزدوج آخر من خلال هذا الكسر (البوابة).
- ٣- يعيد التحام الكسر ثم يفصل عن د.ن.أ.

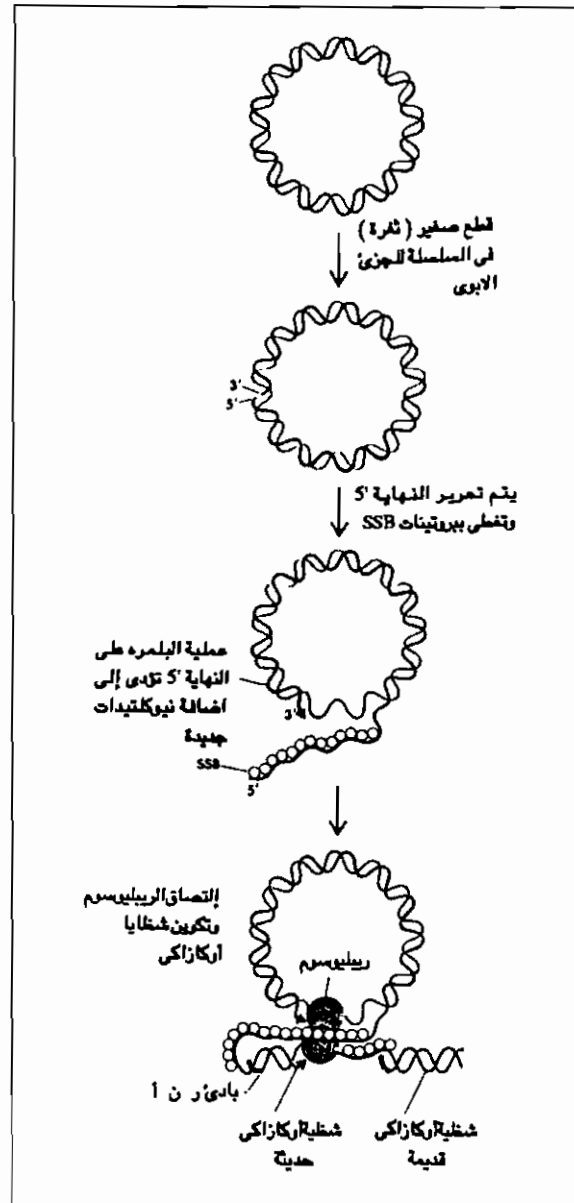
بهذه الكيفية فإن انزيم DNA Topoisomerase II يمكنه بكفاءة أن يقوم بفض الاشتباك بين جزيئين حلقيين من د.ن.أ. كما في الشكل (٣-١٩) يقضى هذا التفاعل نفسه على مشكلة تشابك وتعدّد جزئ د.ن.أ. "Tangling" التي كان من الممكن أن تحدث أثناء تناسخ د.ن.أ.

نموذج الدوائر المتدرجة لتناسخ د.ن.أ. الحلقي Rolling Circles:

توجد طريقة بديلة لتناسخ د.ن.أ. الحلقي في البكتريا تسمى طريقة الدوائر المتدرجة حيث يبدأ بناء د.ن.أ. بإحداث قطع محدد عند منشأ التناسخ في سلسلة معينة (+) من الحلقة المزدوجة الأبوية. يؤدي ذلك إلى أن تصبح النهاية 5' منفصلة عن الحلقة المزدوجة وسائبة مما يسمح لانزيم DNA Pol III بإضافة نيوكليوتيدات إلى النهاية 3' OH الحرة. ومع تقدم شوكة التناسخ فإن النهاية 5' للسلسلة المكسورة ستتدحرج وتتسحب كذيل حر يزداد طولاً مع استمرار

التناسخ (الشكل ٣-٢٠). يتم تغطية هذا الذيل بسرعة ببروتينات SSB لمنع التواءه أو التفافه. ويسمى هذا التركيب التناسخي "الدائرة المتدحرجة" Rolling circle لأن امتداد واسترخاء الذيل 5' وحيد السلسلة ينتج عن دوران الحلزون المزدوج القالب حول محوره. ولا يتسبب هذا الانفكاك في أى مشاكل توبولوجية Topological حيث أن الدائرة تظل متماسكة بسلسلة واحدة من د. ن. أ مما يعطية حرية الحركة حول الروابط التساهمية الكثيرة الموجودة فى الهيكل الأساسى.

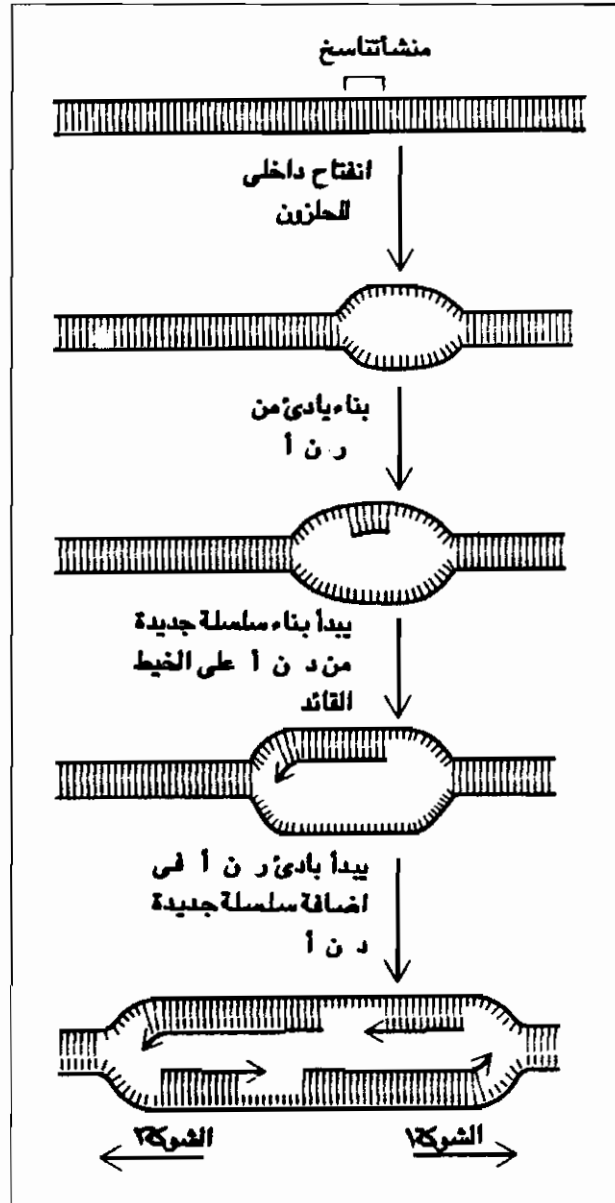
عند استخدام ميكانيكة الدائرة المتدحرجة لتناسخ د. ن. أ المزدوج فإن النهاية 5' (الذيل) المفردة السلسلة تتحول بسرعة إلى حلزون مزدوج نتيجة لتكوين شظايا أوكازاكي عليها. يحتمل أن القوة المتحركة لاستمرار عملية فك الذيل 5' من الدائرة المتدحرجة ليست ناتجة عن تفاعلات البلمرة التى تحدث على النهاية OH 3' ولكنها ناتجة عن حركة الريبليوسوم المدفوع بمكوناته من الهليكيز (الشكل ٣-٢٠).



الشكل (٣-٢٠): ميكانيكية الدائرة المتدرجة لتناسخ جزيء DNA الحلقي القوة المؤدية إلى فك حلزونة الذيل 5' تنتج من حركة الريبليوسوم المدفوع بمكوناته من الهيليكييز

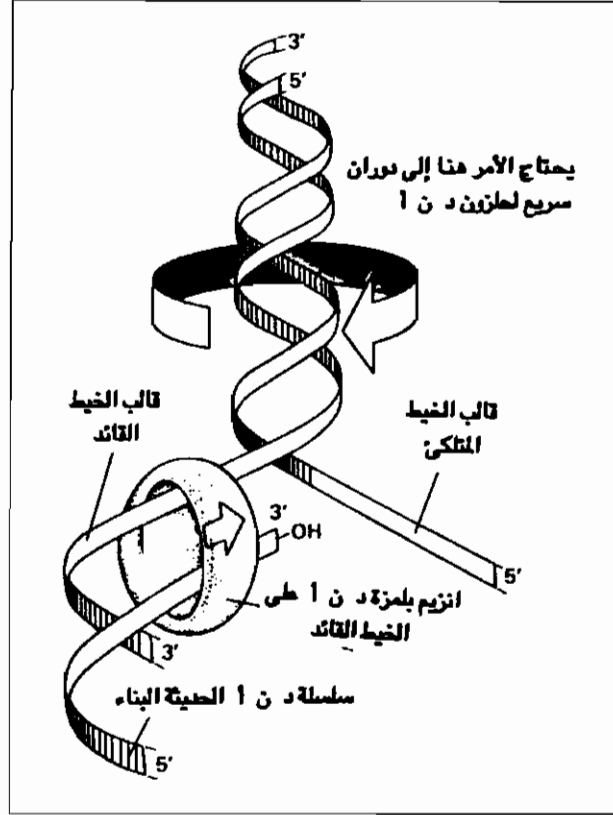
بدء شوكات التناسخ عند منشأ التناسخ:

تبدأ شوكات التناسخ في كل من البكتريا والثدييات عند تركيب معين يعرف بفقاعة التناسخ Replication Bubble وهي منطقة على جزئ د. ن. أ يتم فيها انفصال السلسلتين المستخدمتين كقالب لبناء د. ن. أ (الشكل ٣-٢١) وقد تبين أن هذه الفقاعة تتكون عند تتابع محدد من القواعد على الجزئ يعرف بمنشأ التناسخ Replication Origin والذي يبلغ طوله حوالي ٣٠٠ نيوكليتيده. توجد مناشئ تناسخ مشابهة في كروموسومات مميزة النواة ولو أنه لم تتحدد تتابعاتها بدقة بعد .



الشكل (٣-٢١): رسم تخطيطي للعمليات التي تجرى لبدء تكوين شوكتات التناسخ عند منشأ التناسخ

تبين فى التجارب المعملية *In Vitro* أن بدء شوكة التناسخ فى البكتريا والفيروس تبدأ بالطريقة المبينة فى الشكل (٣-٢٢) حيث ترتبط نسخ عديدة من البروتين المستبدئ Initiator Protein بمواقع معينة عند منشأ التناسخ لتكوين معقد بروتينى كبير. يربط هذا المعقد انزيم الهليكيز فى منطقة مفردة السلسلة من د. ن. أ القالب فى منطقة قريبة من الحلزون. كما يتم ارتباط انزيم بريميز DNA Primase ويتكون البريموسوم الذى يتحرك بعيداً عن المنشأ ويتكون بادئ من ر. ن. أ الذى يبدأ السلسلة الجديدة الأولى من د. ن. أ يؤدي ذلك إلى تجمع سريع لبقية بروتينات التناسخ لتكوين معقدات بروتينية للتناسخ تتحرك بعيداً عن نقطة المنشأ فى الاتجاه المضاد (الشكل ٣-٢٢). تستمر عملية التناسخ ثنائية الاتجاه حتى ينتهى تناسخ كل قالب د. ن. أ الذى يسبق كل شوكة. تتحرك كل شوكة بعيداً عن المنشأ بمعدل حوالى ٥٠٠ نيوكلييدة فى الثانية الواحدة حتى ينتهى تناسخ جزئ د. ن. أ بأكمله ويستغرق ذلك فى البكتريا حوالى ٣٠-٤٠ دقيقة فقط.



الشكل (٣-٢٢): عملية فك الحلزونة أثناء تناسخ جزئ د ن أ ولكي يتم تحرك شوكة التناسخ في البكتريا بسرعة ٥٠٠ نيوكلييدة في الثانية فإن الحلزون المزدوج أمام الشوكة لابد أن يدور بسرعة ٥٠ نيوكلييدة في الثانية

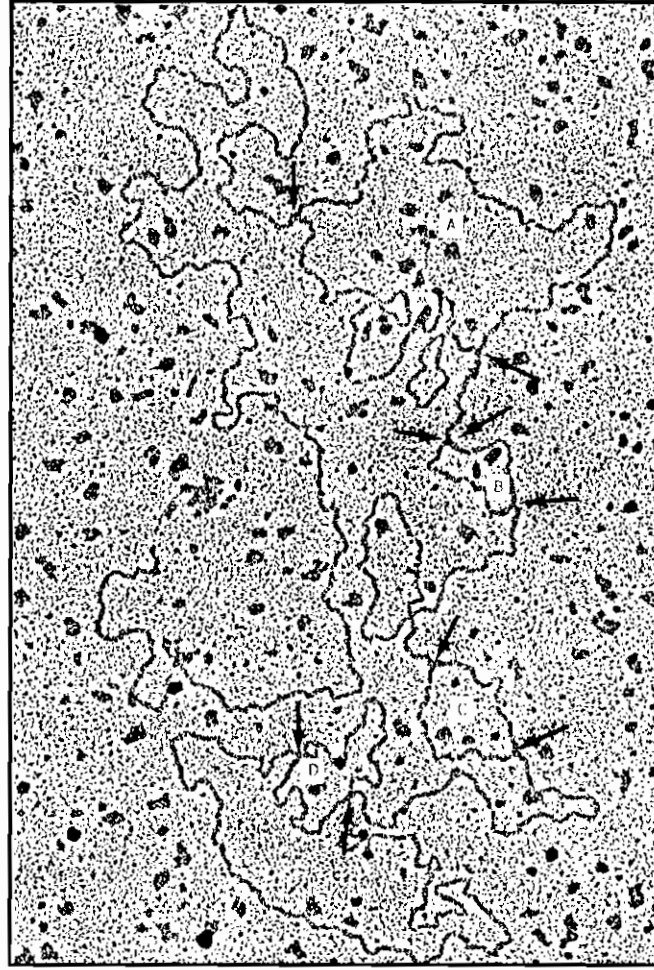
الفصل الرابع

تناسخ د. ن. أ الكروموسومات في الخلايا مميزة النواة

بناء د. ن. أ في مميزة النواة:

اثبتت البحوث أن عملية تناسخ د. ن. أ في مميزة النواة تتم بطريقة مشابهة لما يحدث في البكتيريا. ففي كلتا الحالتين يتم فصل (فتح) السلسلتين عن بعضهما عند منشأ التناسخ وتتكون شوكتي تناسخ ويتم بناء د. ن. أ في اتجاهين متضادين Bidirectional على كل من السلسلة القائد والسلسلة المتلكئة بواسطة انزيم بلمرة د. ن. أ. ويحتاج انزيم بلمرة د. ن. أ في مميزة النواة نفس المتطلبات الأساسية مثل ما يحدث في البكتيريا وهي : أربعة نيوكليوتيدات وقالب من د. ن. أ وبادئ Primer إلا أنه نظراً لأن جينومات مميزة النواة تحتوي كل خلية منها على كمية كبيرة جداً من د. ن. أ مقارنة بالبكتيريا (مثال 4.6 Mbp في البكتيريا مقابل 120 Mbp في الدروسفلا و 3200 Mbp في الإنسان) ومن جهة أخرى فإن أطول كروموسوم في الدروسوفلا يحتوي على 65Mbp مقابل 4.6 Mbp في البكتيريا وفي نفس الوقت نجد أن سرعة تناسخ د. ن. أ في الدروسوفلا تكون بمعدل حوالي ٢٦٠٠ زوج نيوكليوتيد في الدقيقة عند درجة 25°م وبذلك لو اقتصر البناء في الدروسوفلا على شوكة تناسخ واحدة فإن معنى ذلك أن يستغرق تناسخ د. ن. أ لهذا الكروموسوم ١٧,٥ يوماً. وبشوكتي تناسخ

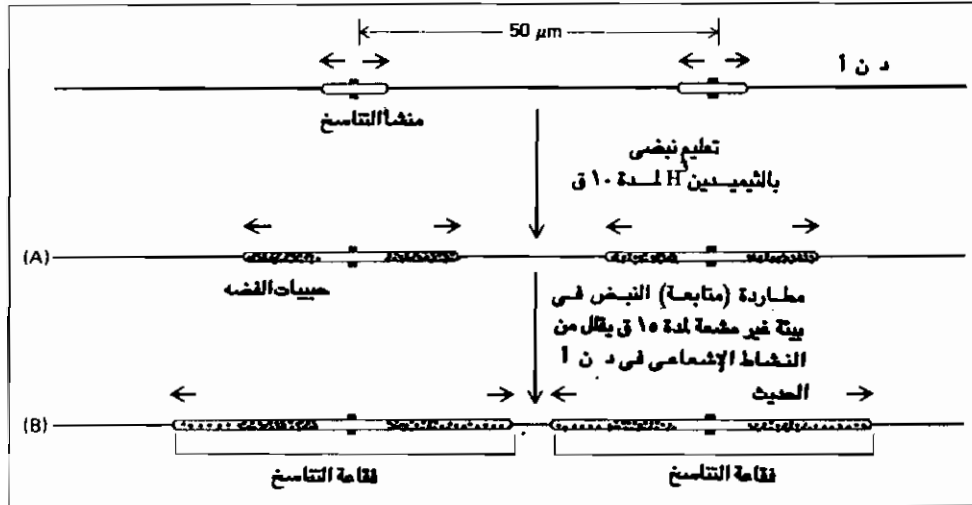
تتحركان في اتجاهين متضادين من منشأ مركزي فإن هذا الكروموسوم سيتم تناسخه في ٨,٥ يوماً. ولكن لو عرفنا أن كروموسومات جنين الدروسوفلا يتم تناسخها في ٣ إلى ٤ دقائق فقط وأن انقسام النواة يحدث مرة كل ٩ إلى ١٠ دقائق في مرحلة الانقسام المبكر Early Cleavage Division ، فإن ذلك يحتم علينا أن نفترض وجود عدد كبير من مناشئ التناسخ على طول كل كروموسوم في الدروسوفلا وغيرها من مميزة النواه حتى يمكن ان تتم عملية التناسخ بالسرعة المطلوبة أثناء دورة انقسام الخلية وخاصة أنها تتم أثناء دور البناء S فقط والتي تمثل فترة زمنية محدودة في دورة الخلية. في حين أنه في البكتريا، يحدث تناسخ د. ن. أ بدون توقف أثناء دورة الخلية. وفي الحقيقة فإنه لكي يحدث اتمام تناسخ كروموسوم الدروسوفلا في ٣,٥ دقيقة فلا بد أن يحتوى مثل هذا الكروموسوم على حوالى ٧٠٠٠ شوكة تناسخ موزعة على مسافات متساوية على طول جزئ د. ن. أ وقد اثبتت التجارب ذلك بالفعل حيث أمكن بفحص جزئ د. ن. أ في الدروسوفلا تحت المجهر الالكترونى، التحقق من وجود عدد كبير من شوكات التناسخ (الشكل ٤-١) والتي تعمل في وقت واحد. إلا أنه من الواضح ، كما سيأتى بعد ، أن عدد شوكات التناسخ لكل كروموسوم ليس ثابتاً في كل مراحل النمو والتكوين في مميزة النواة إذ أن التناسخ يستبدأ في مواقع كثيرة في الفترة الجنينية حيث يكون الانقسام الخلوى سريعاً جداً وذلك مقارنة بأعداد أقل في المراحل المتأخرة من التمايز.



الشكل (١-٤): صورة بالمجهر الإلكتروني لجزئ د ن أ في الدروسفلا يبين مواقع متعددة للتناسخ ويظهر في هذا الشكل أربعة تركيبات للتناسخ بشكل (O-O) (A إلى D) في جزء من جزئ د ن أ وتشير الأسهم إلى مواقع شوكات التناسخ

وقد تحقق ذلك أيضاً بدراسة الطريقة العامة لتناسخ كروموسوم الإنسان حيث تنمي خلايا الإنسان في مزرعة خلايا وتعلم لفترة قصيرة بالثيميدين المشع ^3H Thymidine بحيث يكون د. ن. أ المتكون خلال هذه الفترة الوجيهة

ذو إشعاع عال. ثم تكسر الخلايا بلطف ويؤخذ د. ن. أ ويفرد بعناية على سطح شريحة زجاجية مبطنة بمحلول تصوير حتى يمكن تحديد طراز د. ن. أ المشع بطريقة التصوير بالإشعاع الذاتى Autoradiography. اختير الوقت المسموح به للتعليم بالإشعاع بحيث تعطى كل شوكة تناسخ فرصة للحركة بمقدار عدة ميكرومترات على طول سلسلة د. ن. أ القالب. يؤدي ذلك إلى إمكان التعرف على د. ن. أ الذى تم تناسخه حيث يظهر على هيئة خطوط من حبيبات الفضة فى صورة الإشعاع الذاتى تحت المجهر الضوئى. بهذه الطريقة يمكن تقدير كل من سرعة واتجاه حركة شوكة التناسخ (الشكل ٤-٢) والذى يتبين منه أن التناسخ يتم فى اتجاهين متضادين. يدل المعدل الذى يتم به زيادة طول د. ن. أ المتناسخ مع زيادة فترة الإشعاع على أن شوكة التناسخ تتحرك بسرعة ٥٠ نيوكليتيده فى الثانية. ويمثل ذلك حوالى $\frac{1}{10}$ من السرعة التى تتحرك بها شوكة التناسخ فى البكتريا. وقد يرجع بطء الحركة فى مميزة النواه إلى الصعوبة التى تواجهها عملية تناسخ د. ن. أ فى الكائنات التى يكون فيها د. ن. أ الكروموسومى منضغط فى صورة كروماتين (نيوكليوسوم). وكما سبق الإشارة فإن متوسط طول كروموسوم الإنسان حوالى ١٥٠ مليون زوج نيوكليتيدي ولكى يتم تناسخ مثل هذا الجزئ الكبير من البداية إلى النهاية بشوكة تناسخ واحدة وبسرعة ٥٠ نيوكليتيده فى الثانية فإن ذلك سيستغرق $10 \times 150 \times 0.2 = 3 \times 10^3$ ثانية أى حوالى ٨٠٠ ساعة وهو أمر مستبعد بطبيعة الحال.



الشكل (٢-٤): إثبات أن حركة شوكة التناسخ تحدث أثناء مرحلة البناء S في مميزة النواة

ثم تعليم محدود لـ د ن أ الحديث البناء في الخلايا البشرية بوميض

من الثيميدين العالي الإشعاع (H^3 -Thymidine)

(أ) تم تحليل الخلايا وأجري فرد لـ د ن أ على شريحة زجاجية وتمت عملية التصوير بالإشعاع الذاتي

Autoradiography فظهر خط من حبيبات الفضة على د ن أ المشع.

(ب) نفس التجربة في أ فيما عدا أنه إتاحت فترة زمنية أكبر للتحضير في بيئة غير مشعة مما أدى إلى

دورات تناسخ متتالية من د ن أ وقد تبين أن أزواج الخطوط الداكنة تحتوي على حبيبات فضة تتدرج

بالتناقص في الاتجاهين المتضادين، ويبين ذلك الحركة ثنائية الاتجاه للشوكة من منشأ تناسخ

مركزي.

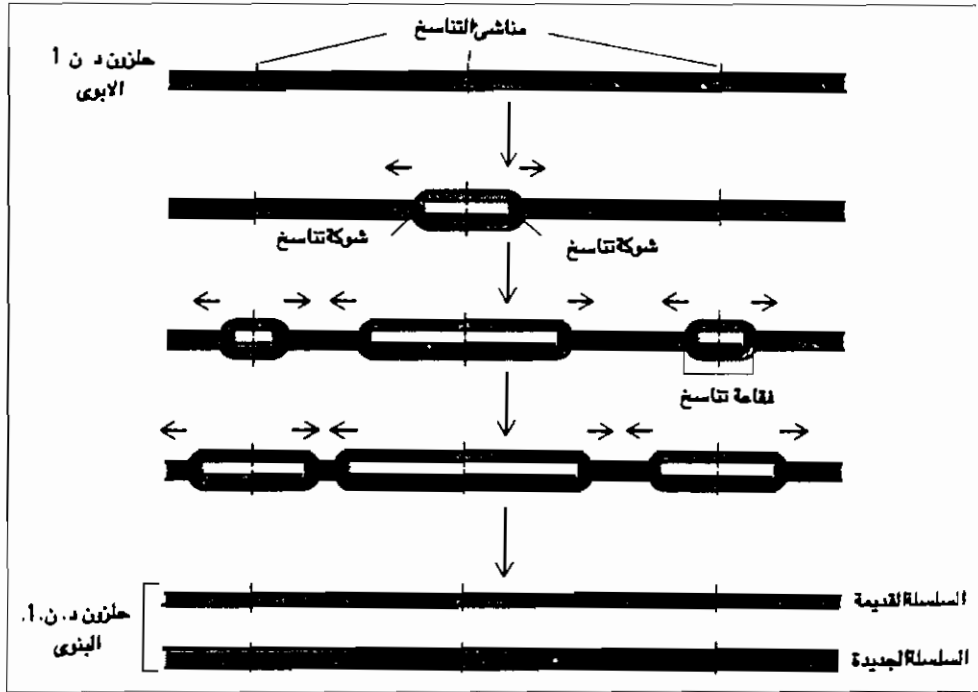
وقد أظهرت صور الإشعاع الذاتي (الشكل ٣-٤) أن هناك عدد كبير من

شوكات التناسخ تتحرك في وقت واحد على كل كروموسوم من مميزة النواة.

بالإضافة إلى ذلك فإنه توجد عدة شوكات تناسخ توجد بالقرب من بعضها

البعض في نفس منطقة د. ن. أ في حين تخلو بعض مناطق أخرى من أي

شوكات تناسخ.



الشكل (٤-٣): طراز تناسخ د ن أ في كروموسوم مميزة النواة حيث تكون مناشئ التناسخ موزعة على مسافات من ٣٠٠,٠٠٠ إلى ٣٠٠,٠٠٠ زوج نيوكليدي في معظم الخلايا ويعتقد أن شوكة التناسخ تتوقف فقط عندما تتقابل مع شوكة تناسخ تتحرك في الاتجاه المضاد أو عندما تصل إلى نهاية الكروموسوم، وبهذه الطريقة فإن كل الكروموسوم يتم تناسخه

وقد أثبتت عدة تجارب لاحقة ما يأتي:

- ١- أن كل كروموسوم يمكن أن يحتوى على عدة الاف من مناشئ التناسخ.
- ٢- أن مناشئ التناسخ تميل إلى العمل فى مجاميع تسمى وحدات التناسخ Replication Units وتتكون كل وحدة من حوالى ٢٠ إلى ٨٠ منشأً تناسخ.
- ٣- يبدأ نشاط وحدات التناسخ خلال مرحلة S فى الميوزى ويستمر حتى يتم تناسخ جزئى د. ن. أ الكروموسومى بأكمله.

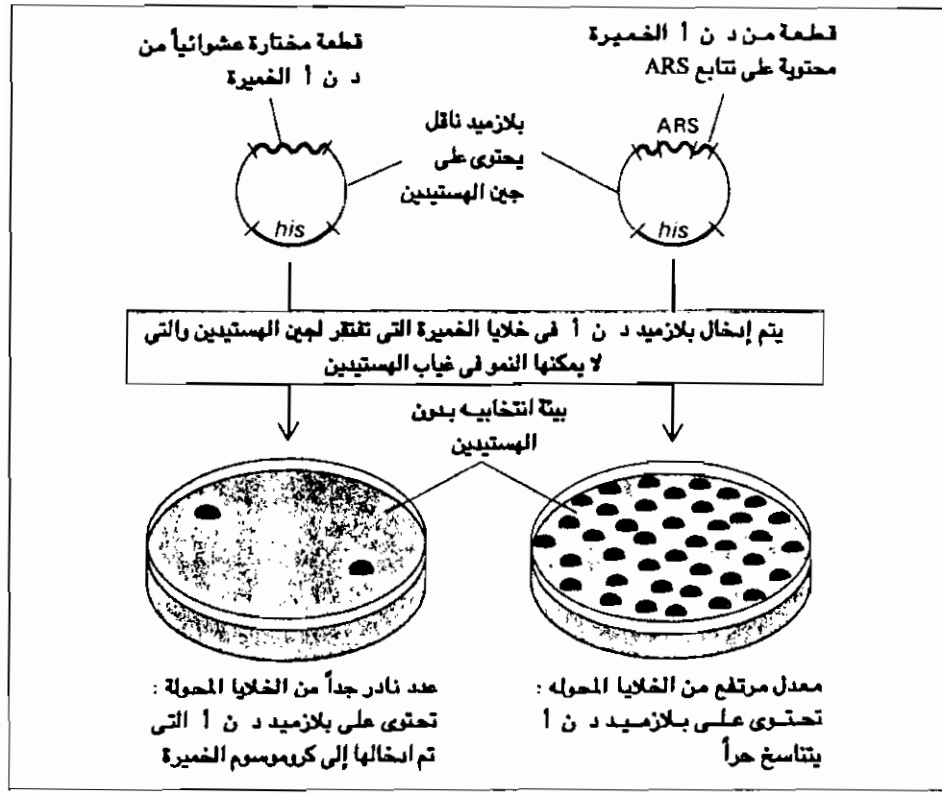
- ٤- داخل وحدة التناسخ الواحدة تكون المناشئ الفردية على مسافات تبلىح حوالي ٣٠,٠٠٠ إلى ٣٠٠,٠٠٠ زوج نيوكليتيدي من بعضها البعض، وقد يوجد منشأ تناسخ واحد لكل عروة أو نطاق كروماتيني.
- ٥- كما هو الحال في البكتريا، تكون شوكة التناسخ في أزواج وتتكون فقاعة تناسخ وتتحرك شوكة التناسخ في اتجاهين متضادين بعيداً عن نقطة المنشأ المشتركة وتظل في الحركة إلى أن تلتقي (رأساً برأس) مع شوكة تناسخ أخرى آتية من الاتجاه المضاد (أو إلى أن تصل إلى نهاية الكروموسوم). بهذه الطريقة يمكن لعدد كبير من شوكات التناسخ أن تقوم بدورها مستقلة على كل كروموسوم بحيث يكتمل بناء جزيئين كاملين من الحلزون المزدوج البنوي على السلسلتين الأبويتين التي يستخدم كل منهما كقالب (الشكل ٣-٤).

وجود تنابعات محددة من د. ن. أ تميز مناشئ التناسخ:

سبق الإشارة إلى وجود تنابعات محددة في مناشئ التناسخ في البكتريا والفيرس، إلا أنه في مميزة النواة لم تتحدد بصفة قاطعة بعد تنابعات خاصة بمناشئ التناسخ ولو أنه توجد أدلة على أن تناسخ د. ن. أ يبدأ في مواقع محددة وثابته على الكروموسومات في خلايا الثدييات.

وقد يفيد في معرفة تنابعات مناشئ التناسخ النظام الذي تمت دراسته بالتفصيل في خميرة الخباز حيث أمكن إجبار خلايا الخميرة على أخذ د. ن. أ غريب (عملية تحول Transformation) وقد أمكن استخدام عدد من البلازميدات الكشافة لهذا الغرض. ولا تستطيع البلازميدات البكتيرية عادة أن تتضاعف في الخميرة ولكن عند إضافة تنابعات معينة من د. ن. أ الخميرة إلى هذه البلازميدات فإنها تصبح قادرة على التضاعف. يطلق على هذه التنابعات اسم

تتابعات التناسخ الذاتي (ARSes) Autonomous Replication Sequences
(الشكل ٤-٤).



الشكل (٤-٤): تتابعات التناسخ الذاتي (عناصر ARS) في الخميرة تعمل هذه التتابعات كمناشئ للتناسخ وتمكن البلازميدات التي تحتويها من التناسخ حرة في الخلية المضيفة بدون الحاجة إلى إدخالها إلى كروموسوماتها

يمكن لهذه التتابعات ARSes أن تزيد معدل التناسخ في المعمل *in vitro* باستخدام مستخلص الخميرة في حين توجد في الخلية *in vivo* عناصر ARSes أخرى في الجينوم تتناسخ في أوقات معينة أثناء دور S في الخميرة. تبين أن

ARsEs المُدخلة Inserted في البلازميد تتناسخ في نفس الوقت الذي يتم فيه تناسخ مثيلاتها الموجودة في الكروموسوم.

على الرغم من أن هذه الأدلة غير مباشرة إلا أنها تقترح أن ARsEs قد تكون هي المناشئ الحقيقية للتناسخ في الكروموسومات. ويبين الشكل (٤-٥) تتابع جزء قصير طوله ٥٧-٤٩ زوج من القواعد من د. ن. أ. الخميرة التي وجد أنها كافية لأعطاء البلازميد خاصية التناسخ الذاتي. يوجد تتابع قصير مشترك محفوظ Consensus وهام في حين أن بقية التتابعات لا تبدى تناظر كبير على الرغم من أهميتها الوظيفية ويكون التناظر قصيراً لدرجة لا يمكن توقع حدوث تهجين خلطي بين تتابعات ARsEs في الجينوم.

```
consensus: ATTTATATTTA
              T      G      T

aaaagtaaaaTTTaATATTTTggatgaaaaaaacca t t t t tagact t t t t c t t aact
*      *      * * * * * * * * * * * * * * *
gatcat t g t a t g T T T T A T G T T T T g t c t g g a a a a c a t a t a g t a c g g a t a
```

الشكل (٤-٥): التتابعات المتناظرة بين عناصر ARS في نوعين من الخميرة، تدل النجوم (*) على مواقع التناظر وتمثل الحروف الكبيرة أفضل تناظر للتابع المحفوظ في ARS الخميرة

وجد أن عدد هذه التتابعات ARsEs في جينوم الخميرة يوجد بتكرار مساو للتكرار المتوقع لمناشئ تناسخ الخميرة (أى حوالى مرة كل ٤٠,٠٠٠ زوج نيوكليدي).

ضوابط لمنع تكرار بدء التناسخ فى الخلايا مميزة النواة:

يوجد فى كل مجموعة كروموسومية حوالى ٣٠,٠٠٠ منشأ تناسخ يتم تنشيطها بالتتابع على مدى عدة ساعات فى دور S فى دورة الخلية إلا أنه لكى يتم تناسخ د. ن. أ بدقة فلا بد للخلية أن تضمن أن كل منشأ تناسخ لا يستخدم الا مرة واحدة فقط فى كل دورة خلية. إن منع تكرار بدء التناسخ فى الدورة الواحدة عملية هامة جداً وأساسية فى تناسخ مميزة النواة وتمثل فرق جوهري بينها وبين غير مميزة النواة. حيث أنه عند منتصف دور S تكون بعض أجزاء من الكروموسوم لم تبدأ بعد فى التناسخ فى حين تكون أجزاء أخرى قد أتمت تناسخها تماماً. يتطلب ذلك متابعة دقيقة عند منتصف وفى آخر دور S.

إن مناشئ التناسخ التى استخدمت بالفعل قد تم أيضاً تناسخها وهى على درجة كبيرة من التشابة فى تتابعها على الأقل مع مناشئ التناسخ الأخرى التى لم يأت عليها الدور لبدء التناسخ بعد.

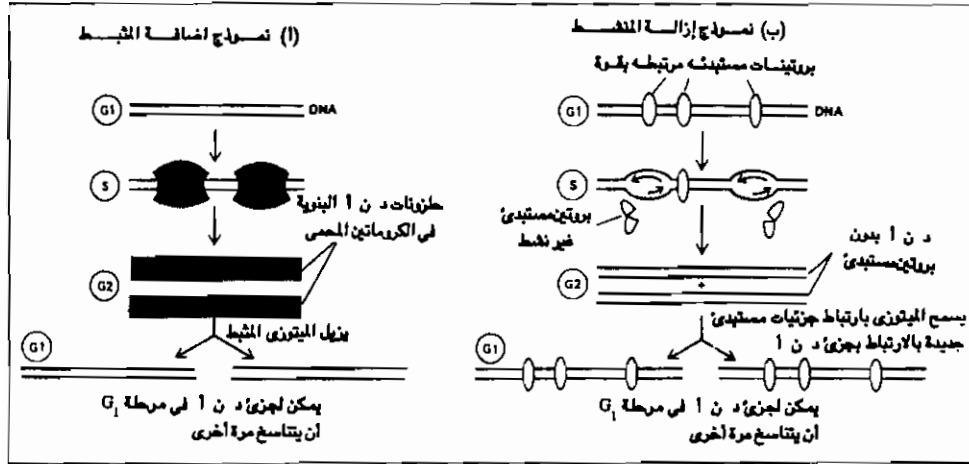
ولكن الخلية لا تحتاج إلى استخدام كل منشأ تناسخ مرة واحدة فى كل دورة خلية فى الدور S فكيف يمكن التمييز بين هذه المناشئ لمنع تكرار استخدامها؟

أمكن باستخدام تقنية الدمج الخلوى Cell Fusion التوصل إلى بعض التفسير.

فعندما تم دمج خلية فى دور S مع خلية فى دور G1 فإن عملية بناء د. ن. أ تستحث فى نواة الخلية G1 مما يشير إلى أن التحول من الدور G1 إلى S تم بواسطة عامل منشط لعملية بناء د. ن. أ وقابل للانتشار Diffusible من

الخلية S إلى الخلية G1. من جهة أخرى، عندما تم دمج خلية فسي دور S مع خلية في دور G2 (أى خلية اتمت للتو دور S) فقد وجد أن النواة في الخلية G2 لم تستحث لبناء د.ن.أ. نظرا لأن عملية البناء مستمرة بدون عوائق في النواه في دور S. ولذلك فإن النواه في دور G2 التى أتمت بناء كل د. ن. أ الخاص بها مرة واحدة تبدو كما لو كانت ممنوعة من الدخول فى دورات جديدة من التناسخ فى نفس دورة الخلية وذلك بواسطة عوامل مثبطة غير قابلة للانتشار Non Diffusible والتي تكون مرتبطة بشدة بجزئ د. ن. أ الخاص بها. وإذا تمت إضافة هذا المثبط داخليا أثناء دور S فى أعقاب كل شوكة تناسخ فإنه سيحل مشكلة عدم تكرار تناسخ منطقة المنشأ أكثر من مرة فى دورة الخلية الواحدة، وذلك عن طريق إحداث تعديل فى الكروماتين الخاص بـ د. ن. أ الذى تم تناسخه حديثاً وبذلك نضمن أن الجزء من د. ن. أ الذى تم تناسخه مرة لن يتكرر تناسخه مرة أخرى فى نفس دور S كما فى الشكل (٤-٦).

يوجد تفسير آخر يعتمد على افتراض وجود بروتين بادئ مرتبط بشدة يحدث له إيقاف لنشاطه inactivation عند مرور شوكة التناسخ (الشكل ٤-٦ ب).



الشكل (٤-٦): ميكانيكيين بديلتين لتفسير "موانع إعادة التناسخ" التي تحمي د ن أ المنسوخ حديثاً من تكرار تناسخه في نفس دورة الخلية، وهذه المواقع ضرورية للمحافظة على دقة التناسخ إلا أن الطبيعة الجزيئية لها غير معروفة، تزال عادة الموانع أثناء الانقسام الميوتوزي إلا أنه في بعض الأنواع القليلة من الخلايا المتخصصة (مثل خلايا الغدد اللعابية ليرقات حشرة الدروسفلا) فإنه يتم إزالتها بدون الميوتوزي مما يؤدي إلى تكوين الكروموسومات البوليكتينية العملاقة

(أ) نموذج يعتمد على إضافة مثبط إلى كل الكروماتين المتناسخ حديثاً.

(ب) نموذج يعتمد على الارتباط القوي لبروتين محفز (منشط) الذي يعمل مرة واحدة فقط والذي يمكن إضافته إلى د ن أ أثناء الميوتوزي فقط.

وبغض النظر عن طبيعة هذا العامل المثبط لتناسخ د. ن. أ فإنه لا بد من إزالته عند أو قبيل بدء فترة الميوتوزي حيث أنه بعد أنقسام الخلية لا توجد حماية لـ د. ن. أ البنوي في النواة في دور G_1 .

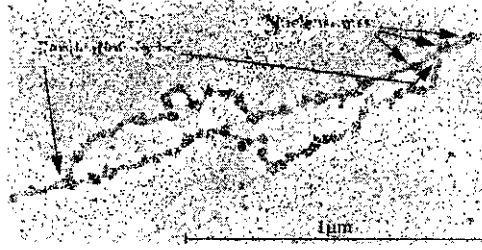
تضاعف النيوكليوسومات عند شوكات التناسخ:

Duplication of Nucleosomes at Replication Forks

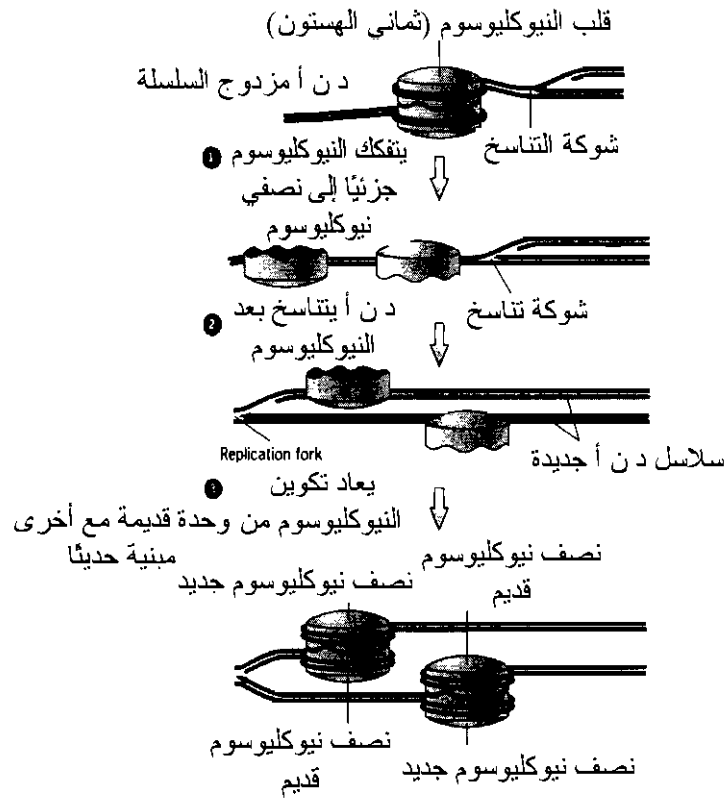
حيث أن د. ن. أ مميزة النواة في الدور البنوي يكون معبأ في نيوكليوسومات (قطر كل منها ١٠ نانو ميتر) ويحتوي كل نيوكليوسوم على

١٦٦ زوج نيوكليتيدي ملف في دروتين حول ثمانية جزيئات من الهستون. وعند الاخذ في الاعتبار حجم النيوكليوسومات والحجم الكبير للريبليوسوم Repliosome، فإنه كان من غير المتوقع أن تتحرك شوكة التناسخ من خلال نيوكليوسوم كامل إلى الجانب الآخر له إلا أن صور المجهر الإلكتروني للكروماتين أثناء تناسخه في الدروسفلا قد بينت بوضوح إحتفاظ النيوكليوسومات بتركيبها الطبيعي وبنفس المسافات على جانبي شوكات التناسخ (الشكل ٤-١٧). أي أن النيوكليوسومات تبدو بنفس التركيب والمسافات خلف شوكات التناسخ مباشرة (Post-Replicative DNA) بالضبط كما كانت أمام شوكات التناسخ (Pre-Replicative DNA).

وعلى ذلك فقد تم اقتراح عدة نماذج للتغيرات المرحلية Transient في تركيب النيوكليوسوم والتي تسمح للريبليوسوم ببناء د. ن. أ عند وصوله إلى النيوكليوسوم. حيث يفترض أن النيوكليوسوم ينقسم بصورة مؤقتة إلى نصفين نيوكليوسوم أثناء مرور الريبليوسوم خلاله ثم يحدث إعادة تجميع لهذين النصفين في نيوكليوسوم كامل خلف شوكة التناسخ (الشكل ٤-١٧ب).



{ أ }



{ ب }

الشكل (٧-٤): تحرك شوكة التناسخ بعد النيوكليوسوم

(أ) صورة بالمجهر الإلكتروني تبين النيوكليوسومات على جانبي كل شوكة تناسخ في الدروسفلا.

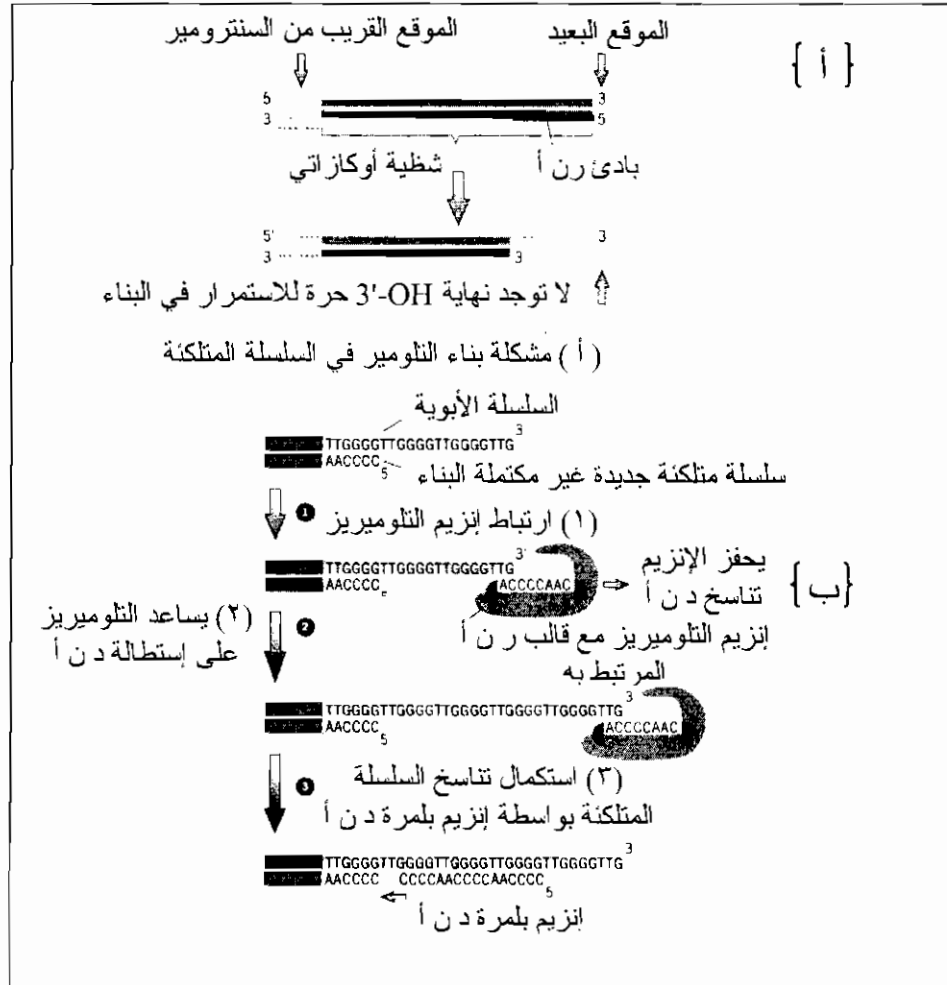
(ب) نموذج لتحرك شوكة التناسخ بعد النيوكليوسوم.

وبصرف النظر عن الميكانيكية التي تتحرك بها شوكة التناسخ خلال النيوكليوسومات فإن تناسخ د. ن. أ. وتجميع النيكليوسومات تكون مقترنة coupled بشدة في مميزة النواه حيث يحتاج تضاعف (تناسخ) الكروماتين أثناء دورة الخلية مميزة النواة إلى كمية من الهستونات الجديدة تساوى تقريباً كمية د. ن. أ المتناسخ حديثاً. لهذا السبب نجد أن معظم مميزات النواة يحتوى جينومها على نسخ عديدة لكل من جينات الهستونات. ففي الفقاريات على سبيل المثال يوجد حوالى ٢٠ مجموعة متكررة وتحتوى كل مجموعة على الجينات الخمسة المنتجة للهستونات. وعلى العكس من معظم البروتينات التي يتم بناؤها بصورة مستمرة أثناء الدور البيني، نجد أن الهستونات يتم بناؤها اساساً في دور S فقط حيث يرتفع خلالها مستوى mRNA للهستونات إلى حوالى ٥٠ ضعف كنتيجة لزيادة معدل النسخ من جهة وانخفاض معدل هدم mRNA. من جهة أخرى ونتيجة للتركيب غير العادى للنهاية 3' (لإنعدام وجود ذيل Poly A كما سيأتى بعد) نجد أن معظم أنواع mRNA الخاصة بالهستونات تكون غير مستقرة بصورة غير عادية وقصيرة العمر بحيث تنهدم خلال دقائق عندما يتوقف بناء د. ن. أ عند نهاية الدور S (أو عند إضافة مثبطات لايقاف بناء د. ن. أ قبل الألوان). وعلى العكس من ذلك، نجد أن جزيئات الهستونات نفسها تكون مستقرة وثابتة ويمكن أن تستمر بدون هدم طول عمر الخلية. وقد يكون الارتباط الوثيق بين بناء د. ن. أ وبناء الهستونات راجعاً ولو جزئياً إلى ميكانيكية التغذية الرجعية Feedback التي تتحكم في مستوى الهستون الحر لضمان أن كمية الهستون الناتجة مناسبة لكمية د. ن. أ المنتجة.

تناسخ منطقة التلومير في الكروموسوم:

من بين الفروق الرئيسية بين تناسخ د. ن. أ في غير مميزة النواه ومميزة النواه طبيعة تركيب الكروموسومات في كل منها. فعلى العكس من الكروموسوم الحلقي المقفول في البكتيريا نجد أن كروموسومات مميزة النواه تكون خطية. وعند تناسخها فإنها تواجه بمشكلة خاصة عند نهاياتها الطرفية المفتوحة والتي يطلق عليها منطقة التلومير Telomere. وبينما يستمر البناء بصورة طبيعية الى نهاية الخيط القالب، تنشأ صعوبة على الخيط المثلثي عندما تتم إزالة ر. ن. أ البادئ (الشكل ٤-٨) وقد تم حل هذه المشكلة بدراسة انزيم خاص بمنطقة التلومير ويطلق عليه انزيم تيلوميريز Telomerase حيث وجد انه يحتوى فى تركيبه على تتابع قصير من ر. ن. أ وقد استخدم تيلومير الطفيل *Tetrahymena thermophila* الذى يحتوى على تتابعات مترادفة من GGGTTG فى معرفة كيفية اضافة نهايات نيوكليدية محددة إلى الكروموسومات بواسطة انزيم التيلوميريز.

يتعرف انزيم التلوميريز على تتابعات التلومير الغنية فى القاعدة G فى النهاية المفردة السلسلة 3'-overhang مما يؤدي إلى استطالتها فى الاتجاه 3'→5' بمعدل وحدة تكرارات مترادفة فى كل مرة. وكما سبق القول، تبين أن انزيم التلوميريز يعد فريداً فى احتوائه على سلسلة قصيرة من قالب ر. ن. أ ضمن تركيبه. وبعد اضافة عدد من وحدات التكرارات المترادفة اعلاه بواسطة هذا الانزيم، فإن انزيم بلمرة د. ن. أ يقوم ببناء الخيط المكمل. وبدون نشاط انزيم التلوميريز فإن الكروموسومات الخطية Linear ستتوالى فى القصر واذا استمر حذف هذه الاجزاء الطرفية بحيث تصل إلى جين أو جينات ضرورية لحياة الكائن فإن ذلك قد يؤدي إلى موته.



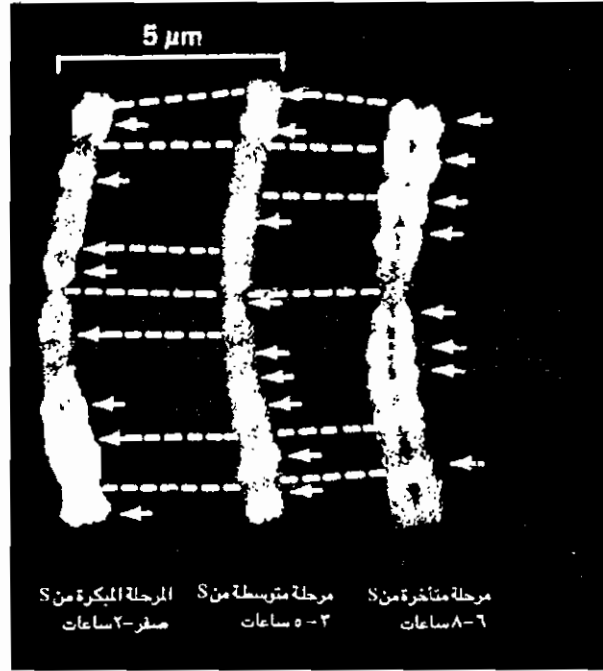
الشكل (٤-٨): تناسخ منطقة التيلومير في كروموسوم Tetrahymena

- (أ) نتيجة لعدم وجود نهاية 3'OH حرة عند نهاية سلسلة البادئ، فإن إنزيم بلمرة دن أ لا يمكنه استبدال بادئ رن أ الذي يبدأ منه بناء دن أ عند نهاية السلسلة المتلكنة.
- (ب) يتم تناسخ نهايات هذه الكروموسومات بإنزيم خاص يسمى تيلوميريز الذي يمنع نهايات الكروموسومات من أن تصبح أقصر وأقصر مع كل دورة تناسخ ويتم تحديد تتابع النيوكليوتيدات عند نهايات السلسلة المتلكنة بواسطة جزئ قصير من رن أ والموجود كمكون أساسي لإنزيم التيلوميريز.

تتابع تناسخ مناطق د. ن. أ المختلفة خلال فترة البناء (S):

إن اتمام تناسخ جزئ د. ن. أ في المنطقة بين منشأ التناسخ والمنشأ الذي يليه يحتاج إلى حوالي ساعة فقط إلا أنه وجد أن دور S يستغرق عادة حوالي ثماني ساعات في خلية الثدييات. يشير ذلك إلى أن مناشئ التناسخ لا تنشط في نفس الوقت وأن د. ن. أ في كل وحدة تناسخ (المحتوية على مجموعة من ٢٠-٨٠ منشأ كما سبق القول) يجري تناسخها في فترة قصيرة فقط من دور البناء (S) والسؤال الآن هو: هل يتم تنشيط وحدات التناسخ المختلفة بطريقة عشوائية أم يوجد نظام معين يتم على أساسه تنشيط التناسخ في المناطق المختلفة من الجينوم طبقاً لترتيب أو تتابع زمني معين؟

يمكن الإجابة على هذا السؤال باستخدام مشابهة الثيميدين Thymidine Analog وهو 5- Bromodeoxyuridine (BrdU) لتعليم مجموعة من الخلايا على فترات قصيرة محددة أثناء دور البناء (S). وفي دور (M) يمكن تمييز تلك المناطق من الكروموسومات الميتوزية التي أخذت BrdU في بناء د. ن. أ حيث أنها تكون أقل قابلية للصبغ بواسطة صبغات خاصة (الشكل ٤-٩).



الشكل (٩-٤): صورة بالمجهر الضوئي للكروموسومات الميوزية المصبوغة التي تم فيها تعليم مغاير Differentially ن. د. أ المتناسخ أثناء فترات محددة في دورة S السابقة

في هذه التجارب تنمو الخلايا في مزرعة وفي وجود البرومو ديوكسي يوريد (BrdU) ويتم تعليمها لفترة وجيزة بالثيميدين أثناء الفترة المبكرة والمتوسطة والمتأخرة من دورة S، وحيث أن ن. د. أ المتكون أثناء فترة التعليم بالثيميدين يكون حلزون مزدوج بحيث يكون الثيميدين في سلسلة BrdU على السلسلة الأخرى، فإنه يصعب بشدة ويكون داكناً عن بقية ن. د. أ (الذي يحتوي على BrdU على كلا السلسلتين)، فيظهر كحزمة لامعة (الأسهم) في هذه الصور السالبة، توصل الخطوط المتقطعة المواقع المقارنة على النسخ الثلاثة للكروموسوم الميوزي

يتم تناسخ مناطق الهيتروكروماتين متأخراً في فترة البناء (S):

من المعروف أنه توجد على طول جزئ د. ن. أ في مميزة النواة مناطق أكثر تكثفاً عن المناطق الأخرى كما هو الحال في مناطق الهيتروكروماتين الذي

يظل في حالة تكثف شديد Highly Condensed أثناء الدور البيئي. في حين نجد أن الكروماتين النشط يأخذ شكلاً غير متكثف، الذي يبدو أنه مناسباً لنسخ ر. ن. أ. عليه. يمكن تفسير الميكانيكية التي تحدد توقيت تناسخ د. ن. أ. من خلال ملاحظة أن مناطق الهيتروكروماتين، بما فيها المنطقة المحيطة بالسنترومير والتي تظل متكثفة خلال الدور البيئي، يتم تناسخها متأخراً جداً في دور البناء S. يمكن أن يعزى هذا التناسخ المتأخر إلى تكثيف د. ن. أ. بشدة في الكروماتين. ويدعم هذا الاستنتاج الاختلاف في توقيت تناسخ كروموسومى X فى إناث الثدييات. إذ على الرغم من أن هذين الكروموسومين يحتويان على نفس تتابع د. ن. أ. إلا أننا نجد أن واحداً منها فقط يكون نشطاً في حين يظل الآخر خاملاً. وجد أن معظم مناطق X فى الكروموسوم الخامل يكون متكثفاً بشدة فى شكل هيتروكروماتين، ويتم تناسخ د. ن. أ. الخاص به فى مرحلة متأخرة ويتم تناسخه ببطء على مدى فترة S فى حين أن تلك المناطق من الجينوم التى يكون الكروماتين فيها أقل تكثفاً أثناء الدور البيئي تكون الأكثر تعرضاً لميكانيكيات للتناسخ فى مراحل مبكرة من فترة البناء S.

تظهر صور الإشعاع الذاتى أن شوكات التناسخ تتحرك بسرعات متناسبة خلال فترة البناء S بحيث أن مدى تكثف د. ن. أ. لا يؤثر على شوكات التناسخ بعد تكوينها. يبدو أن الترتيب الذى يتم به تنشيط مناشئ التناسخ يعتمد (على الأقل جزئياً) على تركيب الكروماتين فى المنطقة التى يوجد بها هذا المنشأ.

تناسخ الجينات الأكثر نشاطاً يتم فى مرحلة مبكرة جداً من فترة S:

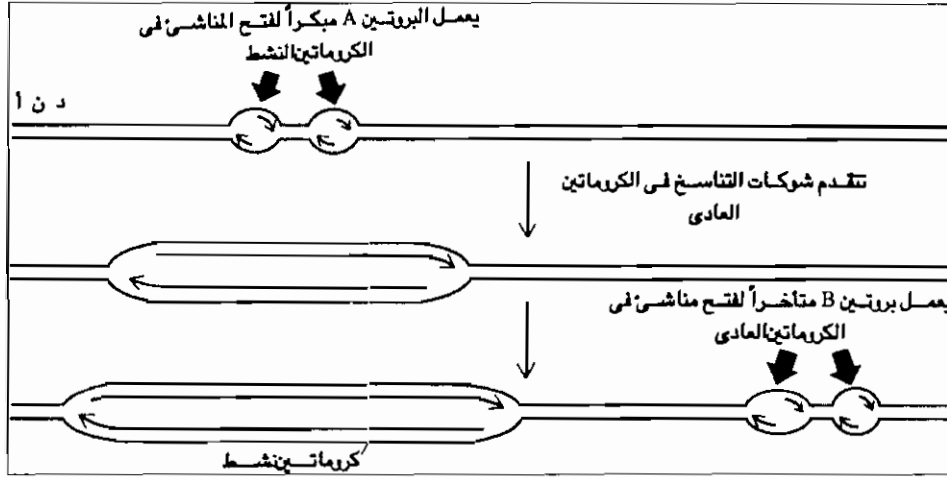
توجد مجموعة من الجينات التى تنشط بصفة عامة فى جميع الخلايا بدون تخصص خلوى ويطلق عليها الجينات غير المتخصصة House Keeping Genes

"الشغالة" وهي تختلف عن الجينات الأخرى التي لا تنشط إلا في خلايا نوعية (Spatial Development) أو في مرحلة معينة من عمر الكائن (Temporal Development).

تبين أن هذه المجموعة من الجينات يتم تناسخها في مرحلة مبكرة من فترة S. فقد أجريت تجارب تبين فيها أن هذه الجينات تتناسخ في جميع أنواع الخلايا التي أختبرت في أولى مراحل فترة S، في حين أن مجموعات الجينات التي تنشط في بعض أنواع من الخلايا المتخصصة فقط يتم تناسخها مبكراً في هذه الخلايا المتخصصة فقط في حين يجري استنساخها متأخراً في أنواع الخلايا الأخرى. فعند دراسة نشاط جين أحد جلوبيونات المناعة Immunoglobulins ويبلغ طوله حوالي 300,000 زوج نيوكليدي، وجد أن جميع مناطق الكروماتين لهذا الجين قد أكملت تناسخها قرب بداية فترة البناء S في الخلايا المتخصصة في إنتاج الأجسام المناعية (Plasma Cells (APC)) وهي تلك الخلايا التي يكون فيها الجين نشطاً جداً، مما يؤيد وجود عدة مناشئ للتناسخ داخل الجين يتم تنشيطها في نفس الوقت تقريباً. بينما في الخلايا غير المتخصصة في إنتاج هذه الجلوبيونات المناعية لم تظهر سوى شوكة تناسخ وحيدة حيث بدأت من إحدى نهايتي هذا الموقع الوراثة بعد حوالي ساعة من بداية فترة البناء S ثم تحركت على شريط د.ن.أ. بالسرعة العادية وهي 3000 نيوكليدية في الدقيقة الواحدة.

يبين الشكل (٤-١٠) نموذجاً لتفسير ذلك، حيث يتم استخدام جميع مناشئ التناسخ الموجودة في الكروماتين النشط في مرحلة مبكرة جداً من فترة البناء S وعند وصول شوكات التناسخ المتكونة عند هذه المناشئ سيتم وصولها في

النهاية إلى المناطق الكروموسومية المجاورة المحتوية على كروماتين أكثر تكثفاً (هيتروكروماتين). وعلى ذلك فإن أى جين يقع على بعد أقل من مليون زوج نيوكليوتيدى من منشأ تناسخ فى منطقة الكروماتين النشط سيتم تناسخه فى منتصف فترة S.



الشكل (١٠-٤): نموذج لتفسير لماذا يتم التناسخ للكروماتين النشط ميكراً فى دور S بينما الكروماتين العادي (غير النشط) يتم تناسخه متأخراً فى دور S، يعتقد أن أنواع مختلفة من البروتينات المحفزة ترتبط بمنشأ التناسخ فى الكروماتين العادي، وتفسير بديل قد يتم استخدام مجموعتي المنشأ بواسطة نفس الميكانيكية الجزيئية ولكن فى أوقات مختلفة نظراً لأن التركيب المتكثف (المتحلزن) للكروماتين العادي يؤخر الارتباط الصحيح للبروتينات المشاركة فى التناسخ وتفسير بديل قد يتم استخدام مجموعتي المنشأ بواسطة نفس الميكانيكية الجزيئية ولكن فى أوقات مختلفة نظراً لأن التركيب المتكثف (المتحلزن) للكروماتين العادي يؤخر الارتباط الصحيح للبروتينات المشاركة فى التناسخ

لتفسير كيف يتم تناسخ المناطق الكروموسومية غير النشطة والتي تقع بعيداً عن المناطق النشطة (كما هو الحال فى الكروموسوم X غير النشط فى الأنثى) فإنه يفترض وجود مجموعة أخرى من منشأ التناسخ التى تنشط فى

منتصف أو في أواخر دور S بحيث يمكنها بدء شوكات تناسخ في أى صورة من صور الكروماتين.

تبين أن الجينات غير المتخصصة (الشغالة) Housekeeping Genes تقع في مناطق الكروماتين الغنية في حزم G-C في حين تقع الجينات العادية (التخصصية) والتي تنشط فقط في خلايا متخصصة في مناطق الكروماتين الغنية في حزم A-T.

تنظيم نشاط مناشئ التناسخ حسب المراحل التكوينية للكائن:

وجد أن دورة الخلية تكون سريعة بصورة غير عادية أثناء طور الانفلاج الأول في معظم الخلايا البيضية التي ينقسم فيها البلاستومير بدون أى نمو للخلية. وتكون فترة البناء S قصيرة بشكل ملحوظ أثناء هذا الطور التقلجي. من جهة أخرى توجد حالات تكون فترة S فيها طويلة جداً، حيث نجد أنه في المرحلة السابقة مباشرة للميتوزي تكون فترة S طويلة جداً في جميع الكائنات التي درست حتى الآن. وعلى سبيل المثال في سمندل الماء Newt تستغرق فترة S ساعة واحدة في مرحلة البلاستولا، في حين تستغرق حوالي ٢٠ ساعة في الخلايا الجسدية الناضجة وتصل إلى حوالي ٢٠٠ ساعة في المرحلة التي تسبق الميتوزي في الخلايا المولدة للحيوانات المنوية Spermatogonia. ترجع الفروق في طول فترة S إلى تغيرات في أعداد مناشئ التناسخ النشطة. تحتوى الخلايا الجنينية على أعداد كبيرة من مناشئ التناسخ النشطة، في حين تقل أعداد هذه المناشئ كثيراً في كروموسومات مرحلة ما قبل الميتوزي.

توجد حالة مماثلة في الدروسفلا حيث وجد أن فترة S في النواة الجنينية تستغرق من ٣ إلى ٤ دقائق بينما تستغرق حوالي ٦٠٠ دقيقة في الخلايا الجسدية للحشرة البالغة. وجد أن الخلايا المنفلجة في هذه الحشرة تحتوى على مناشئ للتناسخ بشكل ملحوظ في الخلايا الناضجة حيث يصل إلى حوالي ١٢ ميلليميكرون. من الواضح أن نشاط عدد مناشئ التناسخ تخضع للمرحلة التكوينية Developmental Stage التي يمر بها الكائن. وأن كثيراً منها يكون نشطاً في مرحلة تكوين الجنين في حين تظل أعداد قليلة منها فقط هي النشطة في مرحلة نضج الكائن. يدل ذلك على وجود تنظيم معقد يتحكم في بدء تكوين شوكات التناسخ بطريقة تسمح بتناسخ مناطق د. ن. أ المختلفة في الجينوم وفقاً لجدول زمنى دقيق.

إنزيمات بلمرة د. ن. أ في الخلايا المميزة النواة.

تبين وجود أربع صور على الأقل من إنزيم بلمرة د. ن. أ DNA Polymerases وهي ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) وذلك في جميع نظم الخلايا مميزة النواة.

تحتوى الصورة α على عدد من تحت الوحدات بحيث تتفاعل تحت وحدتين منها لتعطى نشاط أنزيم Primase ما يدل على أن الصورة α pol تحتوى على النشاط الأنزيمى المطلوب للتناسخ المتقطع Discontinueos للخيوط المملكتى.

ومن جهة أخرى ، لا تحتوى الصورة Pol δ على نشاط البريميز. وتدل النتائج على انها مختصة بتناسخ د. ن. أ للخيوط القائد. بالإضافة إلى ذلك، لابد أن تكون المعقدات الانزيمية محتوية على انزيمات هيليكيز لفك حلزونة اللولب

الجدول (٤-١) مقارنة بين تناسخ د. ن. أ في غير مميزة النواة ومميزة النواة

المقارنة	غير مميزة النواة	مميزة النواة
طول بادئ ر. ن. أ طول شطايا أو كازاكي في الخيط التابع	حوالي ٥-٨ نيوكلييدة حوالي ١٠٠٠-٢٠٠٠ نيوكلييدة	حوالي ٩-١٠ نيوكلييدة حوالي ٢٠٠ نيوكلييده
معدل سرعة تحرك شوكة التناسخ عدد مناشئ التناسخ ميكانيكية منع إعادة بدء التناسخ في نفس دورة الخلية	٥٠٠ نيوكلييدة في الثانية واحد فقط لا توجد	٥٠ نيوكلييدة في الثانية عدة الاف وتحت تنظيم تكويني توجد

الفصل الخامس

الأساس الجزيئي للطفور وطرق إصلاح أخطاء التناسخ

حيث أن إمكانات نمو وتمايز أى كائن تتحدد بما يحتوية جينومة من الجينات، لذلك فإنه يتحتم أن يحدث تغير (طفور) فى المادة الوراثية د. ن. أ لملائمة تطور الكائنات مع البيئة المحيطة بها. إلا أنه من المعروف أن التغيرات التطورية عادة ما تكون نادرة الحدوث. لهذا يتميز جزئ د. ن. أ بالثبات والاستقرار أثناء تخزينه وتناسخه فى الخلية على مدى الأجيال. حيث أن ذلك من شأنه المحافظة على بقاء الكائنات ونموها. أن المحتوى الجينى للخلية يترجم عادة إلى آلاف من البروتينات المختلفة والتي قد يؤدي أى تغير فى أى منها إلى أثار ضارة بالخلية والكائن نفسه. وعلى ذلك فإن على الخلية أن تقابل تحد من شقين.

الأول: لابد أن تكون النظم الأنزيمية الخاصة بتناسخ د. ن. أ فيها دقيقة جداً.

الثانى: أن يكون بمقدور الخلية استنباط نظم دقيقة لإصلاح الأخطاء العارضة التى قد تحدث فى جزئ د. ن. أ أثناء حفظة أو تناسخه.

أن جزئ د. ن. أ عبارة عن مركب عضوى معقد ذو قدرة محدودة على الثبات حيث أنه لايعانى فقط من الالتاف التلقائى المتمثل فى فقدان بعض القواعد النتروجينية بل أنه معرض ايضا للهجمات الموجهة اليه من الكيماويات الطبيعية (وغير الطبيعية) والاشعاع الذى قد يحطم هيكله الأساسى أو يحدث تغيرا كيماوياً فى قواعد. معروف أن الطفرات تنشأ بصفة عامة عندما يؤدى التلف الحادث إلى تغيير فى الخواص الشفرية للقواعد. ونظراً لأن قدرة الكائن على احتمال أو مقاومة المعدل الطبيعى للتلف فى المادة الوراثية محدودة. فلا بد أن تتواجد فى الخلية ميكانيكيات انزيمية تخصصية لاصلاح الأماكن التالفة فى جزئ د. ن. أ.. وتخصص البكتريا وغيرها من الكائنات نسبة لا بأس بها من جينومها لانتاج وتنظيم عمل النظم الانزيمية الاصلاحية بها.

طبيعة الطفرات:

تتضمن الطفرات التلقائية معظم التغيرات التى قد تحدث فى تتابعات القواعد فى جزئ د. ن. أ إذ نجد أن بعض الطفرات قد يكون لها تأثير طفيف على الناتج النهائى للجين مثل طفرات الحساسية للحرارة -Temperature Sensitive التى تنتج عادة من تغير قاعدة بأخرى.

إلا أن كثير من الطفرات التلقائية قد تقضى على وظيفة الجين تماماً. مثل هذه الطفرات المدمرة والتى يطلق عليها "الطفرات اللاغية" Null Mutations لا تقتصر فقط على تبديل قواعد أو اضافة أو حذف قاعدة ما ولكنها تشمل اضافات أو اقتضابات كبيرة الحجم نسبياً، كما قد تتضمن اعادة ترتيب بعض اجزاء الكروموسوم.

طفرات تغير القاعدة الواحدة Single Base Mutation:

يعد هذا النوع من الطفرات من أبسط أنواع الطفرات. وترجع أهميتها إلى أن حدوث تغير في قاعدة واحدة بما ينتج عنه من تغير في أحد البروتينات يؤثر على دقة تناسخ جزيء د. ن. أ. كما أن هناك العديد من الطفرات الهامة تعطى تأثيرها عن طريق أحداث تغييرا في قاعدة واحدة، هذا بالإضافة إلى أن طفرات تغير القاعدة الواحدة تعتبر حرجة وضرورية بالنسبة للتطور لأنها تقوم بتغيير الجينات تدريجياً وبطرق غير حادة وطفيفة بحيث تنتج في النهاية تباين وراثي مفيد للكائن.

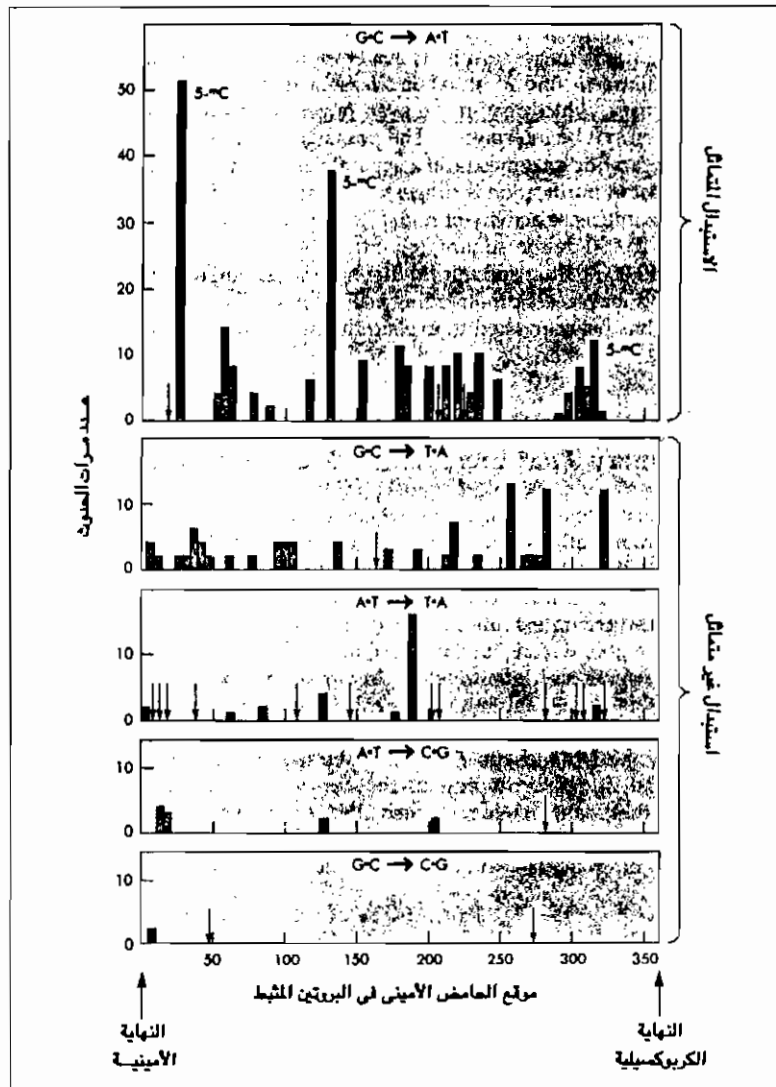
يمكن متابعة أنواع طفرات القاعدة الواحدة التلقائية عن طريق دراسة طفرات إيقاف الترجمة Translation Stop Codon. ففي الجين المنظم لانتاج اللاكتوز والذي يدخل ضمن مكونات أوبرون اللاكتوز في بكتريا القولون Lactose Operon (I) والمسئول عن انتاج البروتين المثبط لنشاط أوبرون اللاكتوز (وسوف نتناول ذلك بالتفصيل فيما بعد) امكن اثبات أن هذه الطفرات ناتجة عن تغيرات في قواعد مفردة في بعض الشفرات الثلاثية التي كانت متطابقة في الأصل مع شفرة إيقاف النسخ (Nonsense) وذلك في اثنتان من ثلاث مواضع للقواعد. كما أمكن اثبات أن المثبط الفعال ينتج مرة أخرى من الجين الطافر في الخلية المحتوية على جين كابث Suppressor (وهو ذلك الجين الذي يسمح بترجمة شفرة الإيقاف على أنها شفرة لأحد الأحماض الأمينية Missense) وبذلك تستمر عملية النسخ والتسالي الترجمة إلى البروتين المعين).

أظهرت هذه التجارب والتحليلات أن بالامكان الحصول على جميع أنواع التغيرات فى القواعد فى تتابع جزئ د. ن. أ فمثلا طفرة الاستبدال المتماثل Transition تنتج عندما تحل قاعدة بيورينية محل أخرى من نفس المجموعة ($G \leftrightarrow A$) أو تحل قاعدة بيريميدينية محل أخرى بيريميدينية ($G \leftrightarrow T$) ونحصل على طفرة الاستبدال المغاير Transversion عندما تستبدل قاعدة بيورينية بقاعدة بيريميدينية أو العكس كما فى الشكل (٥-١).

تبين أن هناك اختلاف فى معدل الطفور بين المواقع المختلفة التى يمكن أن يحدث بها طفور حيث ظهر أن هناك "مواقع ساخنة" (Hot Spots) يحدث بها الطفور بمعدل أعلى بكثير عما فى باقى المواقع الأخرى.

تكون تغيرات القواعد المفردة عادة من النوع العكسى Reversible ويكون معدل الطفرة الرجعية Back Mutation إلى القاعدة الأصلية الطبيعية مماثلاً فى المقدار لمعدل التغير إلى القاعدة الطافرة. تمثل هذه الحقيقة فرقاً جوهرياً للتمييز بين تغير القاعدة المفردة والتغيرات الأكثر شدة مثل الاقتضابات الكبيرة Deletions التى لا يمكن أن تسترجع بالطفور العكسى. وهناك حالة وسطية تتم فى حالة اضافة Insertion or Addition أو حذف Deletion لقاعدة واحدة إذ قد يحدث هنا طفور عكسى ولكن بمعدل أقل بكثير عما فى حالة تغير القاعدة المفردة (طفرات الاستبدال).

تمثل معظم حالات طفرات الاستبدال هذه حالات فشل نادرة فى عملية تناسخ د. ن. أ وذلك عندما يحدث اضافة النيوكلييدة غير الصحيحة إلى السلسلة النامية على الرغم من أنها لا تتزاوج طبيعياً مع القاعدة المقابلة على القالب.



الشكل (١-٥): توزيع أنواع الطفرات التلقائية التي تؤدي إلى أحداث كودون التوقف في جين المنظم المنتج للبروتين المثبط لأوبرون اللاكتوز. ويتبين هنا الأنواع الأربعة لطفرات الاستبدال غير المتماثل Transversion وواحدة من النوعين المحتملين لطفرة الاستبدال المتماثل Transition والتجارب الأخرى تبين أن الاستبدال الآخر المتماثل (AT→GC) يمكن أن يحدث أيضاً تلقائياً. تدل الأسهم الرأسية على مواقع الطفرات المحتملة. السيتوسين الممethyl (5 me-C) تعتبر مواقع ساخنة للطفرات.

معدل الخطأ عند اضافة النيوكليوتيدات أثناء عملية التناسخ:

حيث أن نظام Lac يكشف حالات طفور القاعدة الواحدة في أى من ٨٠ موقع محدد فإنه يصبح من اليسير حساب معدل ظهور كل طفرة عند تناسخ د.ن.أ وبالتالي المعدل الذى يخطئ فيه نظام التناسخ فى كل موقع. وجد أن متوسط معدل الخطأ هذا لجميع المواقع الثمانية يكون حوالى 10^{-9} لكل دورة تناسخ. ولكن لو أخذنا فى الاعتبار أن البقع الساخنة تعطى طفرات بمعدل يزيد ٢٥ ضعف عن المعدل المتوسط فى حين توجد مواقع أخرى تعطى معدل للطفور أقل بحوالى ٢٥ ضعف عن المتوسط. كما ظهر من حساب طفرات الاستبدال فى مواقع معينة فإن معدل الخطأ بصفة عامة يتراوح بين 10^{-7} إلى 10^{-11} لكل دورة تناسخ. وعلى الرغم من وجود نظام لتصحيح أخطاء التناسخ Proofreading فى البكتريا إلا أن وجود هذا النظام فى الخلايا مميزة النواه لم يتحقق بعد.

طرق التحكم فى مستويات الطفور:

قد يبدو للوهلة الأولى أن تكرار الأخطاء يعكس مباشرة مدى الدقة الموروثة فى تزاوج القواعد AT, GC إلا أنه عندما يتعين على انزيم بلمرة د.ن.أ أن يقوم باضافة 10^{-9} نيوكليوتيدة مثلا فإنه من المتوقع أن يحدث خطأ نادر فى تزاوج قاعدة أو عدد قليل من القواعد أثناء التناسخ. بالاضافة إلى ما يمكن أن يحدثه التغير فى صور التناظر بين القواعد من حدوث تزاوجات خاطئة يصل معدلها أحيانا إلى 10^{-4} وهو أعلى بكثير من التكرار الفعلى للطفرة التلقائية. أمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق نشاط انزيم بلمرة د.ن.أ فى تصحيح الأخطاء Proofreading أو المراجعة والتى سبق الإشارة إليها حيث

يؤدي نشاط الهدم الطرفي ($3' \rightarrow 5'$) Exonuclease الموجود ضمن وظائف انزيمات البلمرة الى ازالة القواعد المضافة بالخطأ إلى النهاية النامية للسلسلة الجديدة أولاً بأول .

أثبتت دراسات على جزيئات انزيمات البلمرة الطافرة أن معدل الطفور قد يكون محكوماً بالعلاقة بين معدل نشاط الهدم الطرفي الخلفي ($3' \rightarrow 5'$) ومعدل نشاط البناء ($5' \rightarrow 3'$) بمعنى أنه إذا انخفضت كفاءة النشاط الهدمي الطرفي ($5' \rightarrow 3'$) ارتفع معدل الطفور بدرجة كبيرة وغير عادية. من جهة أخرى، إذا ارتفعت كفاءة نشاط الهدم الطرفي ($3' \rightarrow 5'$) فسيؤدي ذلك إلى انخفاض حاد في معدل الطفور. وعلى الرغم من وجود نظام تصحيح أخطاء التناسخ Proofreading في البكتريا وغير مميزة النواة ألا أن وجود هذا النظام في مميزة النواة لم يتحقق بعد.

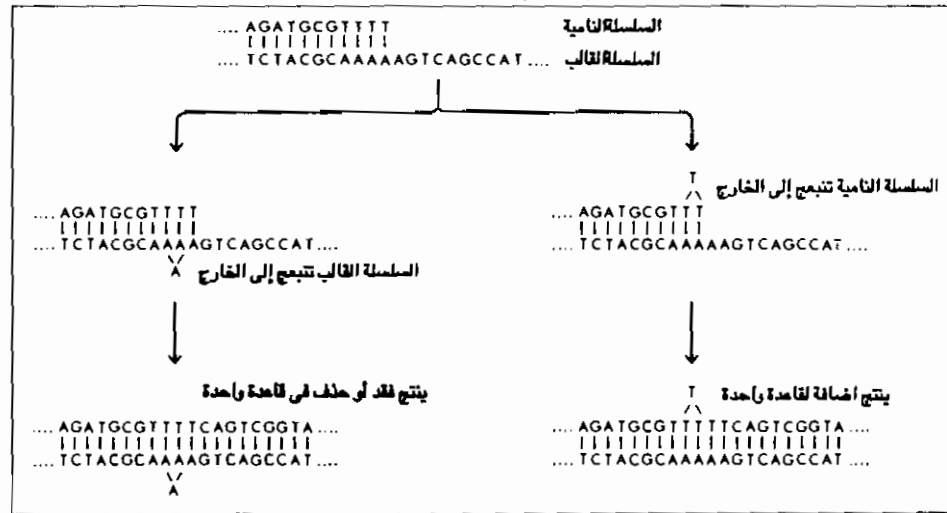
الجينات المطفرة Mutators:

توجد في البكتريا بعض الطفرات التي تكون وظيفتها زيادة معدل الطفور في جينات أخرى ويطلق عليها Mutators. وعموماً فإن هذه الجينات المطفرة تحدث زيادة في معدل الطفور في جميع الجينات التي تمت دراستها وبالتالي فلا بد أنها تؤثر على البروتينات التي تدخل ضمن ماكينة التناسخ. من أفضل الجينات المطفرة المعروفة في بكتريا القولون الجين Mut D الذي يؤدي نشاطه إلى حدوث تغيير في الوحدة E في انزيم بلمرة د. ن. أ DNA Pol III مما يؤدي إلى انخفاض معدل الهدم الطرفي ($3' \rightarrow 5'$) وتقل كفاءة الانزيم في التعرف عليه وإزالة القاعدة غير الصحيحة التي تضاف إلى النهاية النامية لسلسلة د. ن. أ.

كما أن الجينات المطفرة Mut H و Mut L و Mut S تتدخل في تركيب ونشاط نوعيات البروتينات التي تعمل في اصلاح اخطاء التزاوج بين القواعد. وهى العملية التي يقوم أثناءها انزيم بلمرة د. ن. أ بعملية مسح scanning لجزئ د. ن. أ الحديث البناء لاكتشاف القواعد المضافة بالخطأ وتصحيحها.

نتائج أخطاء الإنزلاق Slippage Errors أثناء التناسخ:

إن أخطاء التناسخ بواسطة انزيم بلمرة د. ن. أ لا تكون عادة مقصورة على تغيرات في زوج واحد من القواعد اذ يحتمل أن يتم حذف أو اضافة واحدة أو عدد قليل من ازواج القواعد كنتيجة لحدوث إزاحة للقواعد "الانبعاث للخارج" (Looping Out) سواء في السلسلة القالب (معطية اقتضاب أو حذف) أو في السلسلة الجديدة النامية (معطية إضافة). تحدث هذه الأخطاء بصفة خاصة عند وجود تتابعات لقواعد مترادفة في جزئ د. ن. أ ويمكن لهذا الجزء المنبجج (المنزلق) أن يستقر بالتزاوج الطبيعي بين القواعد في المنطقة التي تلى القاعدة غير المتزاوجة كما في الشكل (٥-٢).



الشكل (٥-٢): تحدث إضافات أو حذف بسبب الأخطاء (الخطأ) عند النهاية النامية للتناسخ

عندما يجيئ الدور على جزئ د. ن. أ المحتوى على هذا الخطأ لكي يعمل كقالب، فإن الاقتضاب أو الإضافة سيتم نسخها بدقة مما يؤدي في النهاية إلى تثبيت الطفرة. تؤدي الطفرة الناتجة عن إضافة أو اقتضاب زوج واحد أو عدد قليل من أزواج القواعد إلى تغيير اطار القراءة داخل بعض التتابعات الشفرة للبروتين مسببة إخلال كامل في عملية بناء ذلك البروتين. وتسمى هذه الطفرة طفرة تحرك الإطار Frame Shift Mutation وينتج عنها بروتين غير فعال.

الطفرات الناتجة عن تغيرات كبيرة نسبياً في تتابعات القواعد:

توجد كثير من الطفرات التي يرتفع فيها عدد القواعد المتغيرة بحيث تشمل إعادة ترتيب كبيرة في تتابعات هذه القواعد. وتوجد هذه التغيرات في الطفرات المسؤولة عن تدمير وظيفة ونشاط الجين. يمكن اقتطاع أجزاء كبيرة من د. ن. أ والتي قد تصل إلى آلاف النيوكليوتيدات من خلال عملية غير طبيعية لنشاط انزيمات الاتحادات الجديدة أثناء عملية العبور أو نتيجة لحدوث أخطاء في عملية تناسخ سلسلة د. ن. أ قالب.

من جهة أخرى يمكن لبعض أجزاء جزئ د. ن. أ أن تتقلب Inverted من خلال عملية تكوين الاتحادات الجديدة داخل جزئ د. ن. أ أو قد يحدث تبادل بين أجزاء من الكروموسومات غير المتناظرة في مميزة النواة بحيث يترتب على ذلك أن الجينات القريبة من مكان التبادل لايتسنى تنظيمها بدقة.

وحيث أن الكروموسومات تتميز بالثبات في تركيبها فإن التغيرات الكروموسومية التلقائية لابد أن تمثل حوادث نادرة.

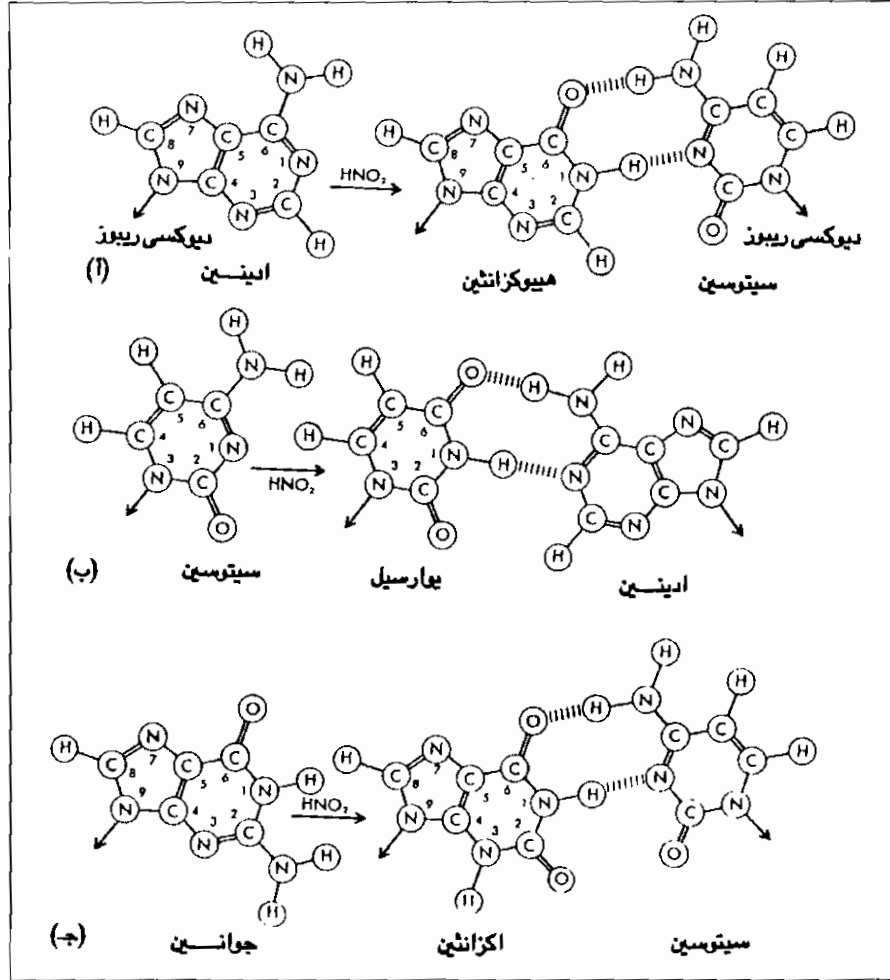
أهمية دراسة المطفرات الكيماوية:

لاشك أن المطفرات الكيماوية تؤدي إلى زيادة هائلة في معدل حدوث الطفرات، مما يعنى أنها تتدخل بطريقة مباشرة في مسارات تناسخ د. ن. أ بالخلية. لذلك يفيد استحداث طافرات بمطفرات معينة في دراسة أهمية كل من بروتينات ماكينة التناسخ في عملية بناء د. ن. أ كما أن المطفرات الطبيعية تؤثر على جميع الكائنات بما فيها الانسان.

تمتلك البكتريا والفيروس نظم وراثية خاصة يمكن استخدامها بكفاءة في دراسة ميكانيكية عمل عدد كبير من المطفرات كما أنها تقدم طرق مباشرة وسهلة لاختبار مدى قدرة أى مادة كيماوية على إحداث الطفرور (مطر كيماوى) بحيث يمكن تجنب استخدامه واستبعاده أو اتخاذ الاحتياطات عند استخدامه.

تعمل المطفرات أما بطريقة مباشرة على جزئ د. ن. أ لتغيير خواص القالب أو عن طريق تخريب عملية التناسخ بحيث تؤدي إلى اضافة القاعدة الخطأ.

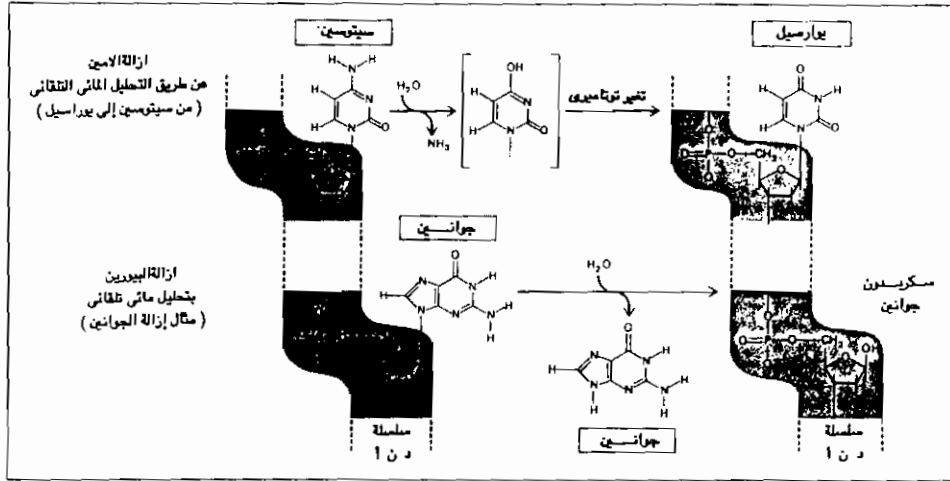
تتفاعل الكيماويات النشطة مع د. ن. أ DNA-reactive Chemicals مثل حامض النيتروز (HNO_2) أو ناقلات الألكيل أو المؤكسدة Alkylating Agents مثل ميثيل نيتروزو جوانيديين Methyl Nitrosoguanidine مباشرة مع د. ن. أ بحيث تؤثر على القواعد فتغيرها إلى تراكيب كيماوية جديدة. وهذه التراكيب الجديدة (القواعد الجديدة) تتزاوج غالباً بطرق مختلفة عن القواعد الأصلية المشتقة منها. أى أن المطفر قد أدى في النهاية إلى تغيير في التسلسل الشفرى لجزئ د. ن. أ (الشكل ٥-٣).



الشكل (٥-٣): عملية إزالة مجموعة الأمين بالأكسدة في قواعد جزيء د. ن. أ بواسطة حامض النيتروز وتأثيرها على تزاوج القواعد:

- أ - يتحول الأدينين إلى الهيبوكزانتين الذي يتزاوج مع السيتوسين بدلا من الثايمين.
- ب - يتحول السيتوسين إلى اليوراسيل الذي يرتبط بالأدينين بدلا من الجوانين.
- ج - يتحول الجوانين إلى الأكزانتين الذي يستمر في الارتباط بالسيتوسين ولكن برابطتين هيدروجينيتين فقط. لا يحتوى الثايمين (واليوراسيل) لجزيء د. ن. أ على مجموعة أمينو لذلك لا يحدث بهما تغير.

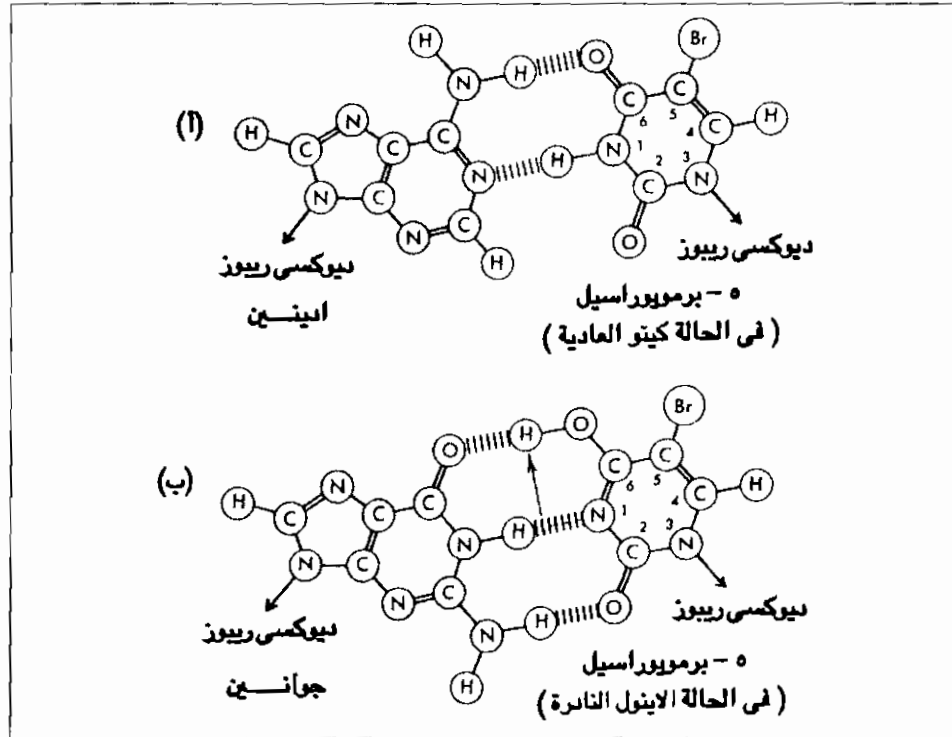
ألا أن بعض القواعد المشتقة لا يمكنها أن تتزاوج بالمرّة. ويؤدى التلف أحيانا إلى ازالة القاعدة نهائياً من الهيكل الأساسى لجزئ د. ن. أ كما فى الشكل (٤-٥) وفى هذه الحالة تنشأ الطفرة عندما تحاول ماكينة التناسخ اصلاح الضرر الذى تعرض له جزئ د. ن. أ بطرق خاصة بحيث تؤدى ميكانيكية الاصلاح نفسها إلى احداث طفرات أخرى فيما يعرف بالإصلاح القابل للخطأ Error Prone Repair كما سيأتى بعد .



الشكل (٤-٥): تفاعلان كيميائيان يحدثان تلقائياً بكثرة ويؤديان إلى احداث تلف خطير فى تركيب جزئ د. ن. أ فى الخلية، وهما تفاعل ازالة مجموعة الأمين أو ازالة البيورين، ويمثل كل تفاعل بمثال نوعي

توجد مجموعة أخرى من المطفرات تسمى مشابهاً للقواعد Base Analogs والتي يؤدى تشابهها مع القواعد الطبيعية الى اضافتها بالخطأ كما لو كانت نيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات فى سلسلة د. ن. أ أثناء التناسخ الطبيعى. إلا أن تركيبها الشاذ يؤدى إلى تزاوج بين القواعد بطريقة غير صحيحة وغير دقيقة مما يؤدى إلى حدوث أخطاء متكررة أثناء عملية التناسخ.

ومن أمثلة اشباه القواعد ذات التأثير القوى فى أحداث الطفرات مادة 5- Bromouracil وهى مشابهة للقاعدة النيتروجينية الثايمين، يعتقد أن قدرتها الطفرية ترجع إلى أن ذرة الهيدروجين فى الموقع رقم ١ بها ليست ثابتة بدرجة كافية مثل ذرة الهيدروجين المقابلة فى الثايمين بحيث يحدث أحيانا لهذه الذرة أن ترتبط بذرة الأكسجين المتصلة بذرة الكربون رقم ٦ (الشكل ٥-٥) مما يؤدي إلى تزاوج البرومويوراسيل مع الجوانين.



الشكل (٥-٥): نتائج تزاوج ٥-بروميوراسيل مع القواعد النيتروجينية

- أ - فى الحالة الكيتو العادية وفى وجود ذرة هيدروجين فى الموقع (N) يرتبط البروميوراسيل بالآدينين.
- ب- فى الحالة الاينول النادرة فإن التحرك التوتاميرى لذرة الهيدروجين هذه يحدد التزاوج النوعى مع الجوانين.

توجد مجموعة ثالثة من المطفرات الكيماوية تشمل مطفرات تحريك الاطار Frame Shift Mutagens مثل البروفلافين Proflavin الذى يحدث إقتضاب أو حذف أو اضافة لقاعدة واحدة أو أحيانا لعدد قليل من القواعد. تتميز مطفرات تحريك الاطار بأن جزيئاتها مفلطحة ومتعددة الحلقات Polycyclic مما يمكنها من الارتباط بالأسطح المفلطحة للقواعد بطريقة مماثلة لقوى الترصاص بين القواعد فى الحلزون المزدوج. قد تعمل هذه المطفرات أيضا عن طريق الارتباط بالقواعد المنبجعة إلى الخارج Looping-Out إما فى سلسلة د. ن. أ القالب أو السلسلة الجديدة أثناء عملية بناء الجزيء مما يؤدي إلى تثبيت العروات المنبجعة بحيث تتزايد فرصة حدوث طفرات فى المنطقة المزاحة.

ميكانيكيات اصلاح الأخطاء فى د. ن. أ:

يمكن للطفرة أن تستمر وتبقى عندما يكون التغير الوراثى الذى أحدثته ليس ضارا أو فى حالات نادرة عندما يكون مفيدا ولكن غالبية الطفرات تكون ضارة ومدمرة ولا تقوى الخلية على احتمالها ولذلك لابد من توفر ميكانيكيات انزيمية متخصصة لاصلاح ما افسدته التغيرات الطارئة.

سبق الإشارة إلى أن بعض القواعد قد تزال منها مجموعات معينة ومثال ذلك ما يحدث لقاعدة السيتوسين عندما تحدث ازالة تلقائية لمجموعة الأمين بها Deamination (الشكل ٥-٤) بحيث تتحول إلى يوراسيل الذى يتزوج فى د. ن. أ مثل الثايمين مما يؤدي إلى تحول زوج القواعد GC لكى يصبح AT عند تناسخ د. ن. أ وإذا لم يحدث تصحيح سريع لهذه التغيرات فإن قاعدة سيتوسين من كل ١٠٠٠ قاعدة فى الجينوم البشرى يمكن أن تتحول إلى

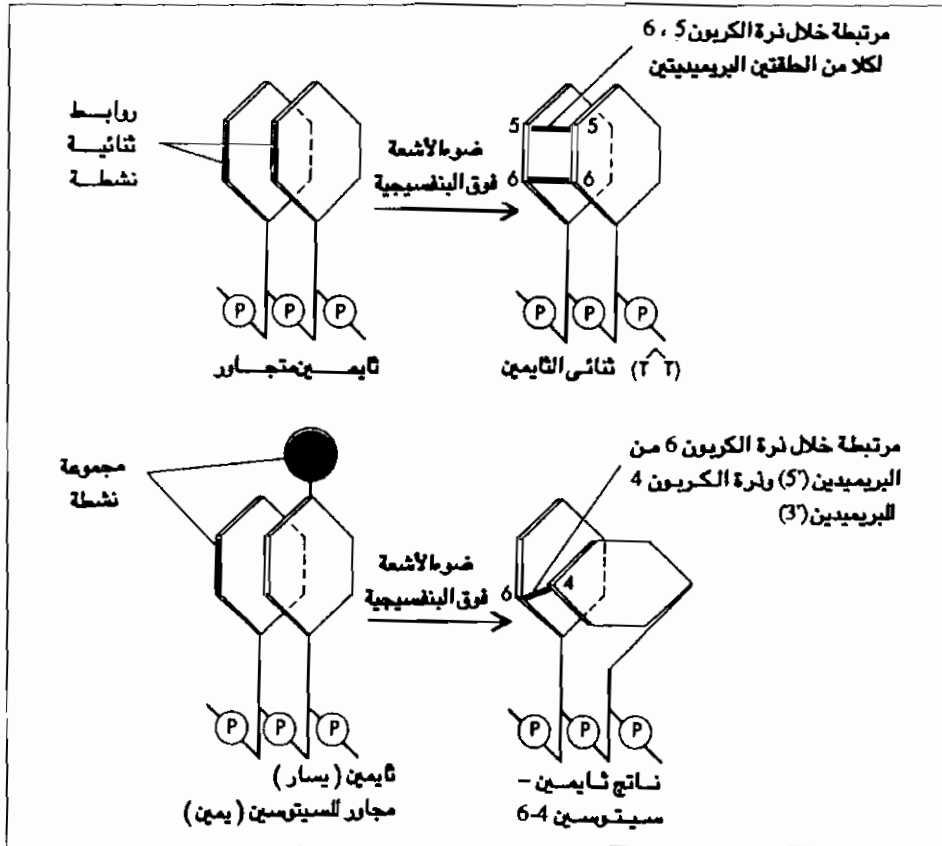
يوراسيل في فترة حياة الانسان مما يعنى ارتفاع معدل الطفور إلى مستويات لا تحتمل.

كما أن هناك نوع آخر من التغيرات أشد خطورة مثل ذلك الذى يؤدي الى كسر فى الهيكل الأساسى للجزئ (Sugar/Phosphate) أو الذى يحدث تغيرا كبيرا جداً فى أحد القواعد لدرجة أنها تفقد أى شبه أو صلة بأى قاعدة نتروجينية تماماً.

من الطبيعى أن مثل هذه التغيرات الشديدة تحول دون الحصول على التعبير الصحيح للجين، بالإضافة إلى انها تمنع استمرار عملية تناسخ د. ن. أ حيث أن انزيم بلمرة د. ن. أ يتوقف عن البناء عندما يصل إلى تزاوج قواعد خاطئ. وفضلاً عن ذلك فإن انكسار الهيكل الأساسى يجعل السلسلة غير صالحة للعمل كقالب.

من التغيرات النموذجية التى تمنع تزاوج القواعد تكون ثنائى بيريميدينى Pyrimidine Dimer. وجد أن الأشعة فوق البنفسجية (200nm) تمتص بشدة بالقواعد ويتراكم على ذلك تفاعل كيمائى ضوئى Photochemical يؤدي إلى الاتحاد بين قاعدتي بيريميدين متجاورتين فى تراكيب غير قابله للتزاوج مثل ثنائى الثايمين كما فى الشكل (٥-٦). يمكن لجزيئات د. ن. أ فى خلايا الجلد المعرضة لأشعة الشمس العادية على سبيل المثال أن تكتسب الآلاف من هذه الثنائيات فى اليوم الواحد. وإذا لم يتم التخلص منها بانزيمات الإصلاح المناسبة فى الخلية ينشأ مرض جلدى يسمى الجفاف الجلدى الملون Xeroderma Pigmentosa الناتج عن خلل وراثى فى الانزيمات المسئولة عن فك الثنائيات وغيرها من الأخطاء التى تحدث بفعل الأشعة فوق البنفسجية.

ويؤدي المكون فوق البنفسجي من أشعة الشمس الى حدوث نسبة عالية من موت وضمور خلايا الجلد ويتسبب في نمو خلايا سرطانية عديدة في الأفراد المصابين (الشكل ٥-٧).



الشكل (٥-٦): تكوين ثنائيات البريميدين الناتجة عن التفاعل الضوئي عند التعرض للأشعة فوق البنفسجية



الشكل (٧-٥): التأثيرات المظهرية للمرض الوراثي Xeroderma Pigmentosum
الآفراد الحاملة لهذا المرض تظهر بها أورام جلدية بعد التعرض لضوء الشمس. الأفراد الأصيلة للطفرات
الجسمية المتنحية المسنولة عن هذا المرض تكون أقل فعالية في إصلاح الأخطاء في DNA الناتجة عن
التعرض لضوء الأشعة فوق البنفسجية

إصلاح طفرات التعرض للأشعة فوق البنفسجية:

Photoreactivation Repair:

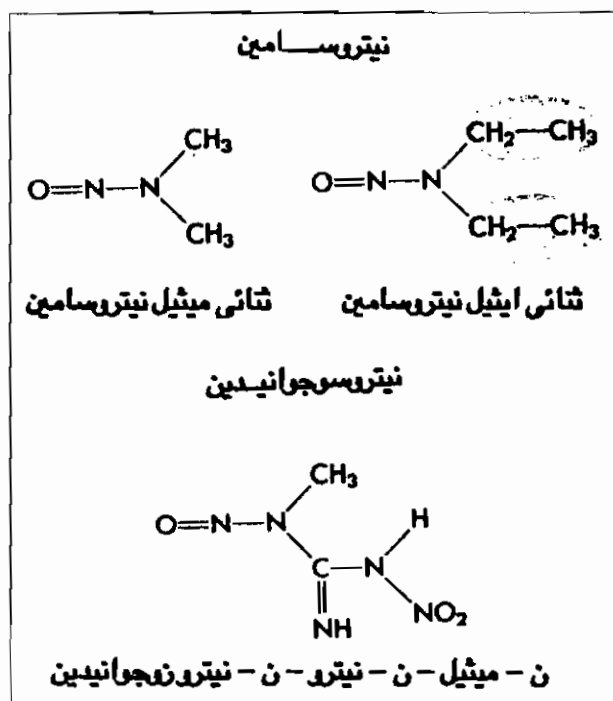
على الرغم من أن معظم التلف في جزيء د. ن. أ يكون خطيراً وغير
قابل للإصلاح إلا أنه يوجد نوعين شائعين من هذه الأضرار أو الأخطاء التي

يمكن اصلاحها مباشرة بواسطة انزيمات متخصصة تقوم بعملية عكسية تمحو بها أثر التغير المتلف.

وُجد أن ثنائيات البريميدين تكون هدفا لانزيم متخصص الذى يرتبط بهذه الثنائيات ويساعد على حدوث تفاعل ضوئى كىماوى آخر مستخدما فى هذه الحالة الضوء العادى مما يودى إلى فك ارتباط الثنائيات وتحويلها إلى قواعد بيريميدينية مفردة عادية. وتسمى هذه العملية التفاعل التنشيطى الضوئى Photoreactivation وقد اطلق على هذا الانزيم فى البداية Photolyse ألا أن الدراسات الحديثة أثبتت أن عملية الاصلاح هذه تعتمد على نشاط أنزيمى متخصص يطلق عليه (PRE) Photoreactivation Enzyme.

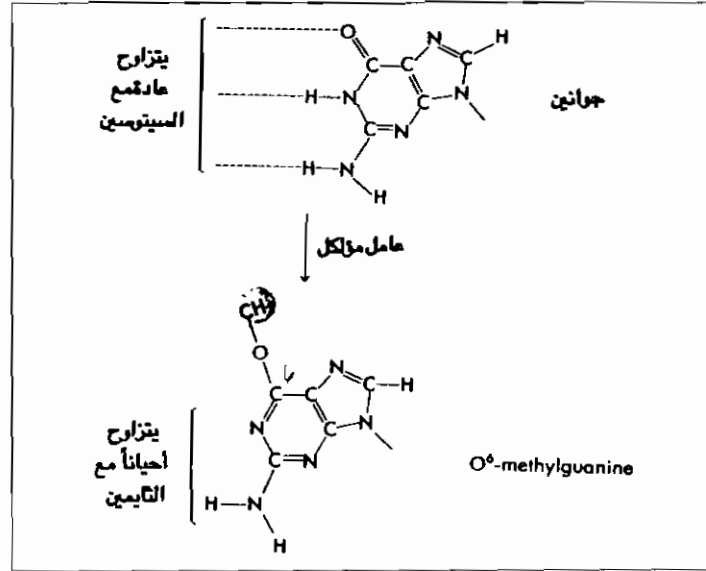
اصلاح طفرات أضافة الاكيل Alkylation Repair:

قد يحدث التلف أو الضرر فى جزئ د. ن. أ نتيجة لعملية انتقال الاكيل Alkylation حيث تنتقل مجموعة ميثيل أو إيثيل إلى مواقع نشطة فى القواعد أو الى الفوسفات فى الهيكل الاساسى للجزئ. وتشمل الكىماويات المؤلكة نيتروزامين Nitrosamine والمطر الكىماوى الفعال ميثيل نيتروزوجوانيديين Meththyl- 1- Nitrosoguanidine (الشكل ٥-٨).



الشكل (٨-٥): بعض المطفرات المؤكدة تظهر مجموعات الألكيل النشطة مظلة

من أكثر القواعد حساسية لعملية نقل الألكيل قاعدة الجوانين التي تتعرض لنقل مجموعة ميثيل Methylation في ذرة الأوكسوجين المرتبطة بذرة الكربون رقم ٦ وينتج المركب O⁶-Methylguanine الذي يخطئ كثيراً في التزاوج بحيث يتزاوج مع الثايمين مما يؤدي إلى تغير الزوج GC إلى AT عند تناسخ د. ن. أ كما في الشكل (٩-٥). يلاحظ أنه رغم أن النتيجة واحدة إلا أن الاختلال الحادث هنا ينتج عن عملية Methylation في حين أن نفس النتيجة تحدث عندما يتم إزالة مجموعة الأمين Deamination من قاعدة السيتوسين (كما سبق الإشارة).



الشكل (٩-٥): تفاعل الجوانين بعامل مؤكل لتكوين O⁶-Methylguanine

تتم إزالة هذا الخطأ أو الضرر بفعل انزيم O⁶-Methylguanine Methyltransferase الذي يتحكم في انتاجه الجين (ada). يتعرف هذا الانزيم على O⁶-Methylguanine في الحلزون ويقوم بإزالة مجموعة الميثيل عن طريق نقلها إلى أحد الأحماض الامينية (Cysteine) الموجودة ضمن تركيب بروتينات الانزيم نفسه. ومن المحتمل أن هذا الانزيم ينشط أيضا في إزالة مجاميع الميثيل من الهيكل الفوسفاتي لجزئ د. ن. أ. و تجدر الإشارة هنا إلى أن جزئ الانزيم الذي يشترك في مثل هذا التفاعل لا يستعيد نشاطه في إزالة الميثيل مرة أخرى نظراً لبقاء مجموعة الميثيل في تركيبه نفسه بعد انتهاء التفاعل مما يعنى أنه يلزم استهلاك جزئ انزيم جديد كل مرة لإزالة مجموعة ميثيل واحدة.

عند تعريض بكتريا القولون النامية لتركيز منخفض وغير ضار من النيتروزوجواندين فإنها تصبح بعد المعاملة أكثر مقاومة للتأثير المطفر والسمام لهذه المادة. يطلق على هذه المقاومة المستحدثة الاستجابة التكيفية Adaptive Response وهي تنتج من ارتفاع مقداره ألف ضعف في محتوى الخلية من انزيم O⁶-Methylguanine Methyltransferase يصاحبه استحداث في إنزيم Glycosylase الذي يزيل القواعد المؤكدة من الهيكل الأساسي لجزء د. ن. أ. ويتم وقف استبداء كلا من الانزيمين بطفرات في الجين ada مما يشير إلى أن نواتج هذا الجين عبارة عن انزيم الترانسفيريز ومنظم موجب للجين نفسه ولانزيم الجليكوسيلز.

الإصلاح بالاستئصال Excision Repair:

أن تركيب جزئ د. ن. أ من سلسلتين متكاملتين هو الذى يسمح بإصلاح معظم الأخطاء في د. ن. أ بغض النظر عن طبيعة التغير الكيماوى المصاحب للتلف. إذ أن فقد بعض المعلومات الوراثية من أحد السلسلتين يمكن تعويضه بنسخ هذه المعلومات نفسها من السلسلة المكملة لتجديد المنطقة التى حدث بها التلف. ينطبق هذا بصفة خاصة إذا اقتصر التلف على قاعدة واحدة في إحدى السلسلتين المتكاملتين.

توجد مسارات متعددة للإصلاح بالاستئصال Excision Repair أو الحذف التى يتم فيها إزالة قاعدة تالفة أو قطعة خاطئة من الهيكل الأساسى. تؤدي جميع هذه المسارات إلى نفس النواتج الوسيطة حيث يحدث كسر أو فجوة في سلسلة أحادية من د. ن. أ في موقع الضرر مما يهيئ نهاية OH 3 حرة تمكن انزيم بلمرة د. ن. أ DNA Polymerase I من بدء البناء لتتابع جديد يحل محل الجزء

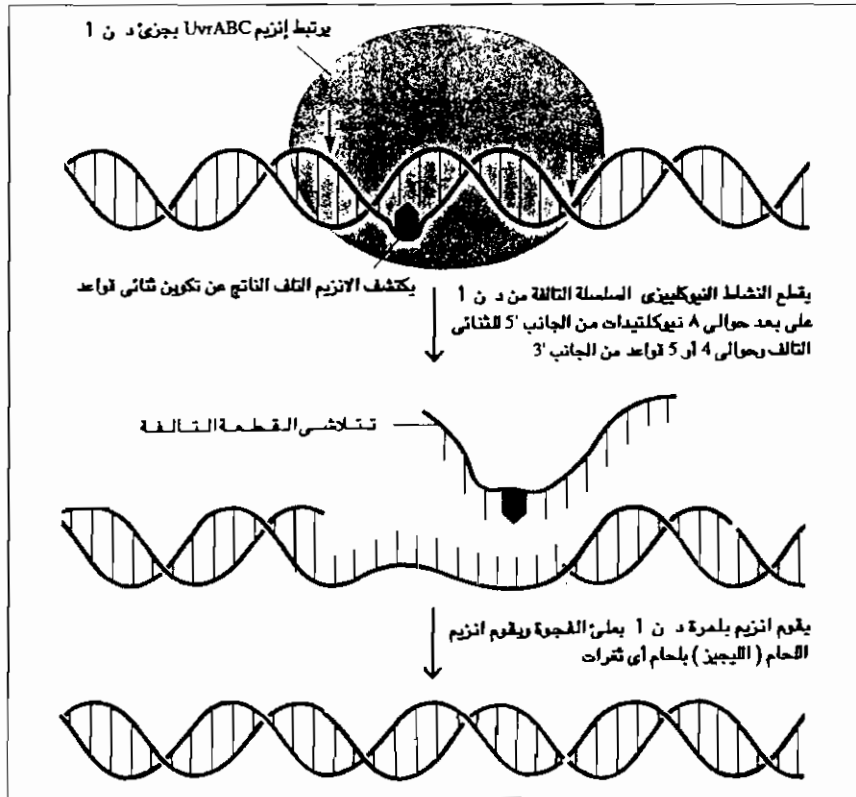
التألف معتمداً في ذلك على التتابع المقابل في السلسلة المكملة التي لم يلحقها أى ضرر.

تبين أن الخلايا الطافرة للجين المسئول عن انتاج إنزيم البلمرة DNA pol تكون كفاءتها في الإصلاح بالاستئصال منخفضة جداً مما يؤكد أن هذا الإنزيم هو الذى يقوم بالدور الأساسى في هذا النوع من الإصلاح حيث أنه يكون بالكثرة والسرعة اللازمة لملئ الفراغات او الفجوات الصغيرة بكفاءة في المناطق التألفة المنتشرة على الجزئ والتي يستدعى الأمر إصلاحها بسرعة. في حين نجد أن إنزيم البلمرة DNA Pol III ولو أن به نشاط $3' \rightarrow 5'$ Exonuclease إلا أنه نظراً لكبر حجمة وتعقيده ولضرورة أن يظل مرتبطاً بشوكة التناسخ النامية لفترة طويلة ووجوده بعدد قليل نسبياً من النسخ في الخلية فإنه لا يقوم عادة بهذا الدور.

والإنزيم الآخر الهام في هذه العملية هو إنزيم الليجيز (اللحام) DNA Ligase الذى يقوم بلحام الأجزاء ببعضها بعد أن ينتهى إنزيم البلمرة من عمله.

في حالة الأخطاء الناتجة عن التعرض للأشعة فوق البنفسجية وجد أنه، إلى جانب الطفرات التي تحدث في الجين الخاص بإنزيم Photoreactivation Enzyme والتي تؤدي إلى تعطيل عملية الإصلاح في بكتريا القولون، أن الطفرات الحساسة للأشعة فوق البنفسجية (وبالتالى تفشل في إصلاح هذا التلف) تحدث في ثلاث مواقع وراثية uvrA, uvrB, uvr C وبالعكس التنشيط الضوئى السابق الإشارة إليه. نجد أن نظام الإصلاح الذى تشفر له هذه الجينات ليس مختصاً بإصلاح التلف الناتج من الأشعة فوق البنفسجية فقط ولكنه يتعرف على أى تلف شديد ينتج عنه تشوية في الحلزون المزدوج للجزئ.

تشفر هذه الجينات الثلاث لتحت وحدات Subunits منفصلة لإنزيم واحد وهو إنزيم uvrABC Endonuclease الذي يقوم بإزالة الجزء التالف من د. ن. أعن طريق قطع السلسلة المحتوية على هذا التلف، ويحدث ذلك بأن يقوم الإنزيم بعمل قطع على جانبي الجزء التالف مما يؤدي إلى إزالة ١٢ قاعدة أوليجونيوكلتيديية محتوية على الجزء التالف ويتم ملئ الفجوة الناتجة بإنزيم البلمرة DNA PolII بالإضافة نيوكليوتيدات مكملة لتلك الموجودة على السلسلة السليمة ثم تلحم بانزيم اللحام (الليجيز) كما في الشكل (١٠-٥).



الشكل (١٠-٥): نظام الإصلاح بالاستئصال للثنائيات وبعض أنواع التلف الكبيرة وذلك بواسطة انزيمات uvr ABC

اتضح حديثاً أن إنزيم uvr ABC Endonuclease لا يتعرف على الجزء التالف مباشرة ولكنه يتعرف عليه من خلال الشكل غير الطبيعي لجزئ د. ن. أ ولكن كيف يتم ذلك؟

تبين أن الكسرين اللذين يحدثهما الإنزيم يحدثان على نفس الجانب من الحلزون بحيث يبعدان عن بعضهما بمسافة تزيد قليلاً عن دورة كاملة للحلزون في حين أن التلف يكون أقرب إلى الجهة الأخرى من الحلزون. من الممكن أنه لكي تقترب المواقع النشطة للإنزيم بالحلزون فإنه يقوم باحاطة الحلزون لكي يلمس الجانب الآخر مما يؤدي إلى أن تكون المسافة ١٢ قاعدة.

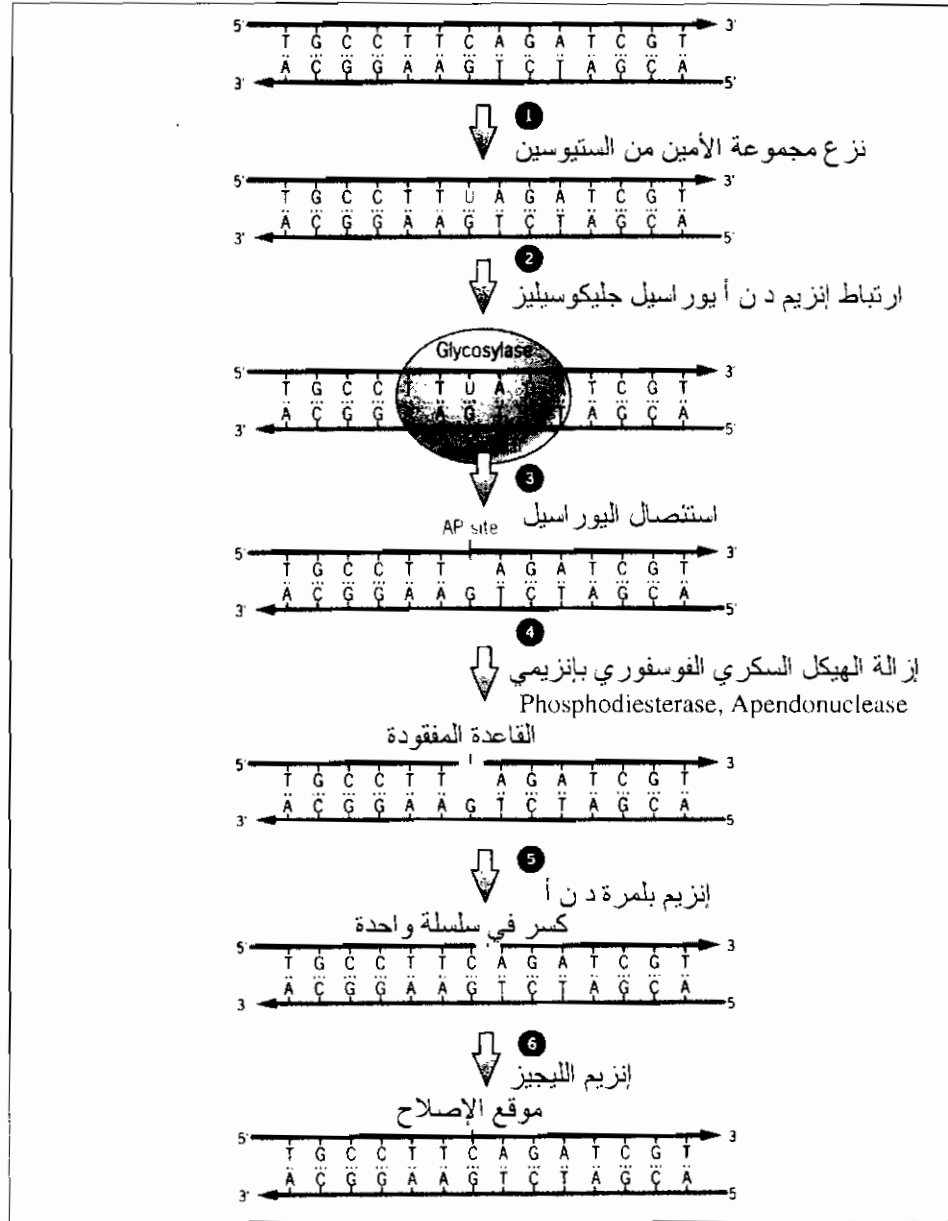
دور إنزيمات الجليكوسيليز DNA Glycosylases في الإصلاح:

(أ) استئصال قاعدة واحدة: Base Excision Repair

توجد طريقة أخرى لإزالة القواعد التالفة حيث تقوم إنزيمات د. ن. أ الجليكوسيليز بالتعرف على قاعدة واحدة غير صحيحة وإزالتها من الهيكل الأساسي لجزئ د. ن. أ تاركة ثغرة أو ثقب Hole يطلق عليه موقع AP وهو اختصار لـ Apurine (أى يفتقر إلى A أو G) أو Apyrimidine (يفتقر إلى C أو T) ثم يتم التعرف على الثقب بواسطة إنزيم APendonuclease الذي يكسر الرابطة الفوسفواسثيرية الثنائية في الهيكل الأساسي تاركاً نهاية 3OH يبدأ منها إنزيم البلمرة DNA PolII في البناء لتعويض النيوكليوتيدات المفقودة بالإضافة إلى بعض النيوكليوتيدات المجاورة.

توجد عدة أنواع مختلفة من إنزيمات د. ن. أ الجليكوسيليز يختص كل منها في إزالة نوع معين من القواعد غير الطبيعية أو التالفة وعلى الأخص القواعد المميثلة Methylated Bases كما يقوم إنزيم Uracil -DNA Glycosylase

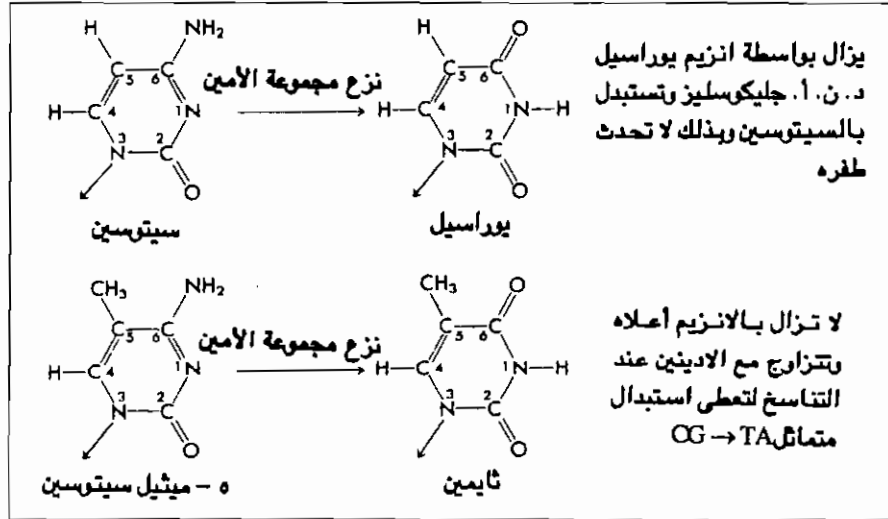
بتصحيح الخطأ الناشئ عن عدم الثبات الطبيعي للسيتوسين حيث أنه يحدث أحياناً عملية نزع تلقائي لمجموعة الأمين من السيتوسين بمعدل منخفض جداً ليعطى يوراسيل. يتعرف الجليكوسيليز على اليوراسيل ويزيله مما يتيح الفرصة لإحلال السيتوسين بإنزيم البلمرة كما في الشكل (٥-١١).



الشكل (١١-٥): إصلاح جزئ دن أ بمسار استئصال القاعدة الواحدة . يمكن بدء الإصلاح باستخدام أى من إنزيمات DNAglycosylase المختلفة فى المثال المبين يبدأ uracil DNA glycosylase عملية الإصلاح

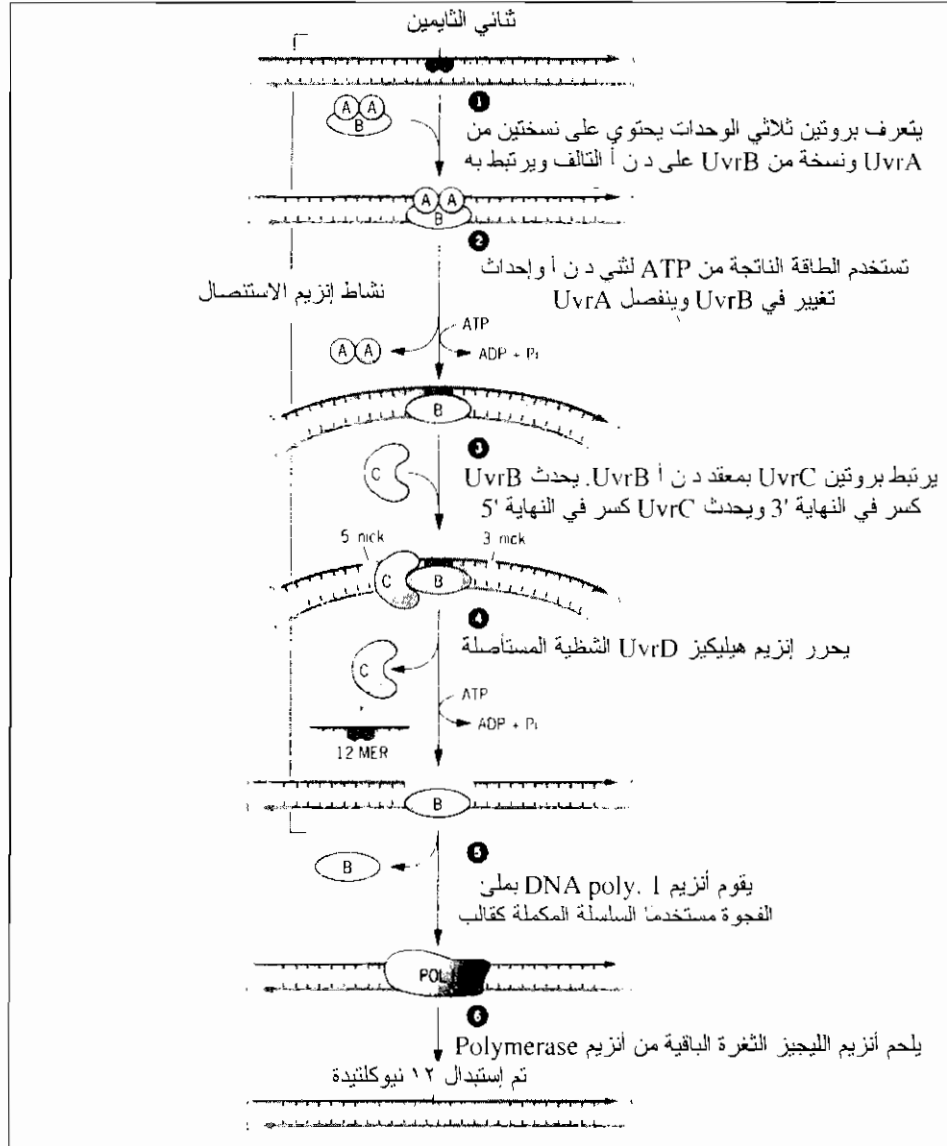
(ب) استئصال نيوكليدية Nucleotide Excision Repair:

أن النظام الإصلاحي السابق يخفق أو يضعف بشكل ملحوظ إذا كان السيتوسين ممثّل على ذرة الكربون رقم ٥ كما يحدث مثلاً في التتابعات المحمية من تأثير انزيمات القطع المحددة (Restriction Endonucleases) (كما سيأتي بعد) يتزاوج السيتوسين الممّثل على ذرة كربون 5-Methyl Cytosine طبيعياً أثناء تناسخ د.ن.أ ولا يمكن إزالته بانزيم DNA Glycosylase ولكن عملية إزالة مجموعة الأمين من السيتوسين ينتج عنها ثايمين وليس يوراسيل وحيث أن الثايمين قاعدة طبيعية من قواعد د.ن.أ فإنه لا يمكن إزالتها بانزيم Uracil DNA Glycosylase أو أي انزيم آخر ولكنها تبقى وتتزاوج مع الادينين في الجيل التالي للخلية مما يؤدي إلى حدوث الطفرة واستمرارها وعلى ذلك فإن 5-Methylcytosine يعتبر بقعة ساخنة للطفرة التلقائية (الشكل ٥-١٢).



الشكل (٥-١٢): الأساس الجزيئي للبقعة الساخنة للقاعدة O-مثيل سيتوسين

مما يستدعى اللجوء الى ميكانيكية أكثر شدة بحيث تؤدي الى استئصال ليس القاعدة المعيبة فقط بل استئصال الهيكل الفوسفوسكري معها بأكمله. وفي هذا النظام يقوم انزيم فريد في نشاط الهدم الطرفي الاستئصالي يسمى Excinuclease بأحداث قطع على جانبي النيوكليوتيدة المحتوية على القاعدة المعيبة ويتطلب لنشاطه نواتج ثلاث جينات *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* بالإضافة إلى نشاط *DNA Helicase II* (*uvrD*) يبلغ طول د. ن. أ. المستقطع على جانبي القاعدة المراد اصلاحها حوالي ١٢ نيوكليوتيدة ويقوم أنزيم *Pol I* ببناء الفجوة بلية انزيم ليجيز الذي يقوم بعمل اللحام كما في الشكل (٥-١٣).



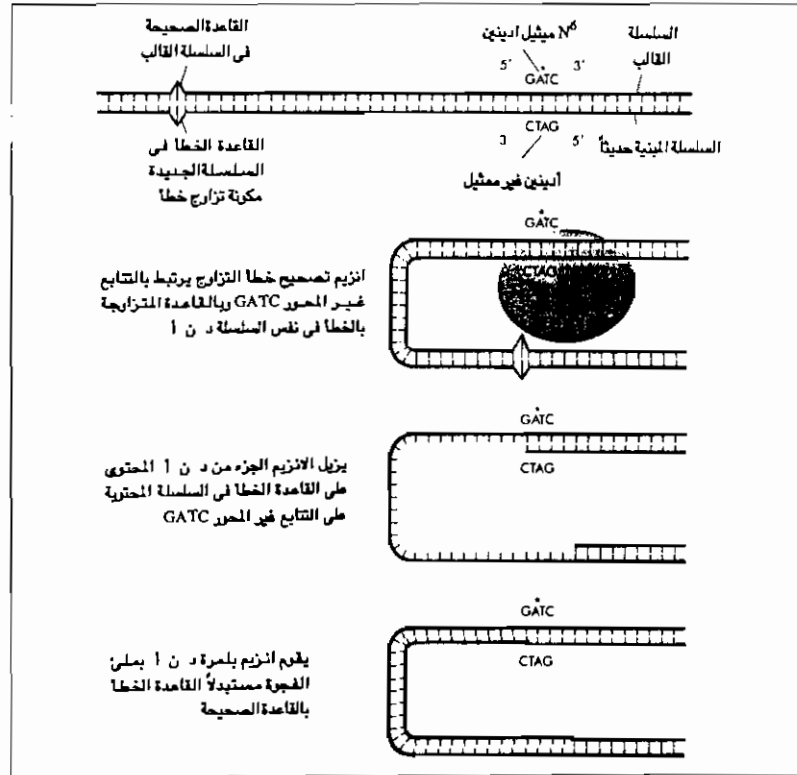
الشكل (٥-١٣): إصلاح دن أ بمسار استئصال النيوكليوتيدة الواحدة في بكتريا القولون . يتطلب نشاط إنزيم Excision nuclease وجود نواتج ثلاث جينات UvrA و UvrB و UvrC يحدث استئصال النيوكليوتيدة في الإنسان بمسار مشابه فيما عدا أن بروتينات أخرى عديدة تشارك في العملية كما أنه يتم استئصال أوليجونوكليوتيد طولها ٢٩ نيوكليوتيدة

تصحيح أخطاء عدم المطابقة Mismatch repair:

أن بعض حالات أخطاء التزاوج بين القواعد قد لا يتم اكتشافها بميكانيكية المراجعة Proofreading التي تقوم بها انزيمات البلمرة DNA Polymerase III إذا أن هناك حد أقصى لما يمكن أن تقوم به هذه الانزيمات في مجال التصحيح حيث يقدر معدل الخطا الطبيعي لها بحوالي 10^{-10} أى زوج قواعد خطأ لا يكتشف لكل 10^{-10} زوج متناسخ. لذلك اكتشف في بكتريا القولون أنزيم آخر على جانب كبير من الدقة يقوم باكتشاف الأخطاء المتسربة من عملية المراجعة ويقوم بتصحيح أخطاء ما بعد التناسخ Post-Replication Repair ويسمى انزيم تصحيح عدم المطابقة Mismatch Correction Enzyme والذي ينتج بواسطة الجينات mut S, mut L, mut H. يقوم هذا الإنزيم بعملية مسح Scanning وإعادة مراجعة لجزئ د. ن. أ حديث التناسخ ليتعرف على أزواج القواعد غير الصحيحة، ويقوم بإزالة منطقة أحادية السلسلة تحتوى على النيوكلييدة الخطأ مما يعطى الفرصة لإنزيم البلمرة لإدخال (أو اضافة) القاعدة الصحيحة وملئ الفجوة الناتجة. ولكن برزت مشكلة هامة وهى التعرف على أى من القاعدتين فى الزوج النيوكلييتيدى هى الخطأ حيث أن كلاهما مكونان طبيعيين لجزئ د. ن. أ وإذا أزيلت إحدى القاعدتين من هذا الزوج عشوائياً فإن معدل احتمال أن تزال القاعدة الصحيحة بدلاً من الخطأ يصل إلى ٥٠% وبالتالي تكون الطفرة قد استقرت بدلاً من تصحيحها وإزالتها. وللتغلب على هذه المشكلة تبين وجود اشارة خاصة محكومة بتوقيت محدد تقوم بتوجيه عملية إزالة التزاوج الخطأ لتعمل على السلسلة حديثة البناء فقط بحيث يزيل الإنزيم الجزء من د. ن. أ المحتوى على القاعدة غير الصحيحة وقد يزيل معها عشرات النيوكلييدات الصحيحة وذلك من السلسلة المحتوية على التتابع النوعى GATC المجاور لهذه

القاعدة المطلوب إزالتها كما في الشكل (٥-١٤) وعامل الوقت له أهمية بالغة في توجيه نشاط انزيم التصحيح للسلسلة المطلوبة حيث أن الأنزيم لا يستطيع التعرف على التتابع الكشاف إذا كان الأدينين في هذا التتابع القصير قد تمت ميثلته إلى N⁶ Methyladenine بأنزيم الميثلة Adenine Methylase المشفر بالجين dam، قبل وصول انزيم التصحيح إليه وبالتالي لا يمكن إزالة القاعدة غير الصحيحة. والمدحش هنا أن معظم تتابعات GATC في الخلية يحدث بها تحويل من هذا النوع (أى ميثلة الأدينين) بعد تناسخها ولكن بعد فترة قصيرة جداً من التأخير قد لا تزيد عن ثوان أو دقائق قليلة إلا أن هذه الفترة الزمنية الوجيزة تكون كافية لكي يرتبط انزيم التصحيح بهذا التتابع ولذلك فإن الإنزيم لابد أن يتجه إلى سلسلة د. ن. أ الجديدة والتي تم بناؤها للتو والتي لم يتحور فيها التتابع الكشاف بعد بإضافة مجموعة الميثيل إلى الأدينين بدلاً من التوجه إلى السلسلة القالب التي يكون فيها الميثلة قد تمت منذ فترة.

يتعرف انزيم التصحيح هنا ليس فقط على القاعدة الخطأ ولكنه يتعرف أيضاً على بعض الإضافات أو الاقتضابات وبالتالي فإنه يقلل من فرص حدوث طفرات تحرك الإطار بالإضافة إلى طفرات الاستبدال.



الشكل (٥-١٤): نموذج يبين كيف يقوم نظام إصلاح أخطاء عدم التطابق Mismatch في بكتريا القولون باستبدال قاعدة خاطئة ومتزاوجة بالخطأ في الحلزون المزدوج لجزئ د. ن. أ.

تصحيح أخطاء ما بعد التناسخ Post Replication Repair:

الإصلاح باتحادات جديدة Recombinational Repair:

عرفنا أن الإصلاح الاستثنائي Excision Repair يستخدم السلسلة المكملية كقالب لإحلال جزء جديد بدلاً من الجزء التالف من د. ن. أ. ولكن يحدث أحياناً أن هذا القالب نفسه لا يكون متوفراً كما يحدث مثلاً عندما تتقابل شوكة التناسخ

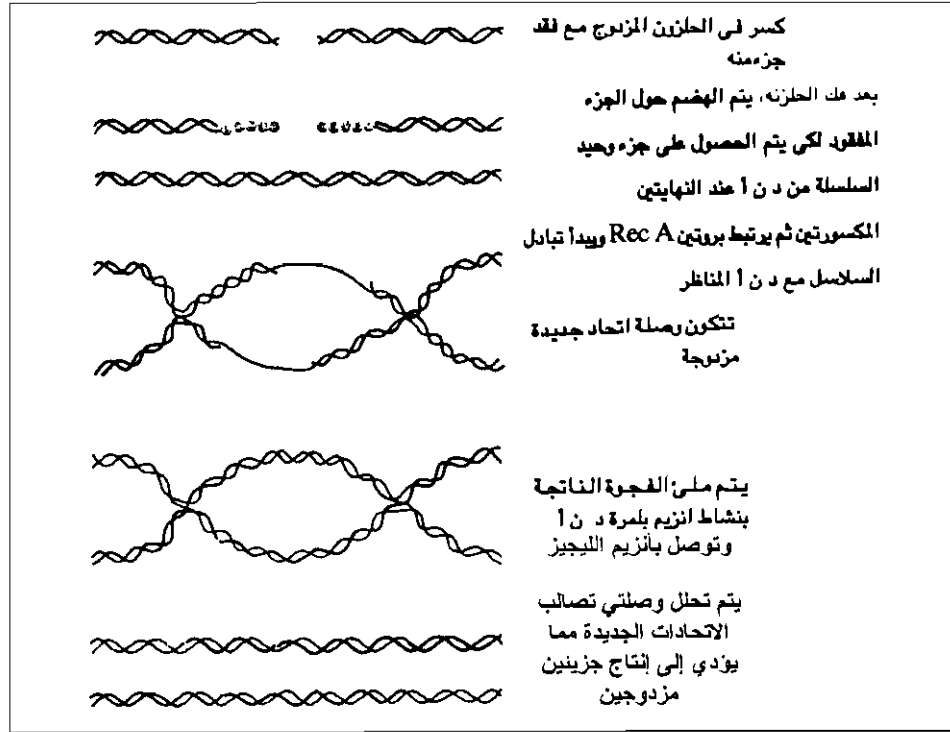
مع منطقة مشوهة أو تالفة (مثل ثنائي البيريميدين) بحيث تنقطع العلاقة بين السلسلتين في منطقة التشوه قبل أن يتمكن الإصلاح الاستتصالي من الوصول إليها. بالإضافة إلى ذلك إذا كانت كلتا القاعدتين في الزوج النيوكليدي قد تغيرتا كأن ترتبطان تصاليا Crosslinked بمادة كيميائية مثل العقار المسرطن Mitomycin، فإن أى منهما لا تستطيع أن تستخدم كقالب للأخرى.

ومن جهة أخرى فإن الحلزون المزدوج حين يحدث به كسر مستعرض يشمل السلسلتين ويصاحبه فقد لجزء من الحلزون المزدوج نهائياً مما يؤدي الى صعوبة إصلاح المنطقة التالفة مباشرة بالدقة المطلوبة.

في جميع هذه الحالات نجد أن جميع المعلومات (التتابعات النيوكليدية) الاصلية والمكملة قد فقدت في مكان التلف ولا يمكن استرجاعها إلا عن طريق البحث عن جزء آخر مناظر في جزئ د. ن. أ منفصل في الخلية نفسها ولكنه متطابق مع الجزء التالف. يسمى ذلك بالإصلاح التالى لعملية الاتحادات الجديدة Recombinational Repair، حيث يتوفر دائماً مصدر مناسب لاحتياطي د. ن. أ في الخلية. فمثلاً عندما تترك منطقة تالفة في قطعة مفردة من د. ن. أ عند مرور شوكة التناسخ فإن د. ن. أ البنوي الآخر سيحمل نفس التتابع. وإذا حدث تلف لكلا السلسلتين في منطقة غير متناخسة، فإن البكتريا النشطة في النمو يكون لديها عادة نسخة إضافية أو أكثر من كروموسوماتها يمكن استخدامها في هذه الحالة. وبديهي أن خلايا مميزة النواة ثنائية المجموعة الكروموسومية سيتوفر لديها نسخ إضافية من د. ن. أ لاستخدامه في عملية مماثلة للإصلاح.

وجد أن العنصر الأساسي في عملية التصحيح بالاتحادات الجديدة عبارة عن انزيم يقوم بإعادة الاتحاد Annealing بين تتابعات كل من جانبي المنطقة

الثالفة وتلك المكملة لها في جزئ د. ن. أ. السليم وبذلك يحدث التطابق الحرج الذي يتعرف على الجزء الذي يحمل المعلومات الناقصة. وجد أن هذا النشاط الانزيمي يتم في بكتريا القولون عن طريق RecA protein كما في الشكل رقم (١٥-٥).



الشكل (١٥-٥): نموذج لإصلاح كسر في الحلزون المزدوج لجزئ د. ن. أ.

بواسطة نشاط بروتين Rec A

دور بروتينات الانقاذ S.O.S. في إصلاح د. ن. أ (الإصلاح القابل للخطأ Error-prone Repair):

من المعروف أن الخلية يمكنها غالباً تنظيم تعبير الجينات حسب الحاجة لمنتجات هذه الجينات. لذلك فليس مستغرباً أن نجد الكثير من إنزيمات الإصلاح لجزئ د. ن. أ يتم تنشيطها عند الطلب والمتمثل في حدوث تلف د. ن. أ. وعلى سبيل المثال تنشط إنزيمات ميثيل ترانسفيراز DNA Methyltransferase عند وجود د. ن. أ مؤلّك Alkylated بطريقة غير عادية. ولكن أهم وأكبر مجموعة يتم استبدالها أو "استنفاؤها" تتكون من مجموعة من الجينات يطلق عليها جينات الانقاذ S.O.S. والتي يتم استبدالها عند حدوث تدمير شديد في جزئ د. ن. أ يؤدي إلى إيقاف بناء د. ن. أ تماماً. من أمثلة أنواع التلف الذي يحفز جينات الانقاذ ذلك التلف الناتج عن تكوين ثنائي البريميدين الذي يحول دون حدوث تزواج بين القواعد تماماً، بحيث عندما تصل إليه شوكة التناسخ فإنها تتوقف وتتركه ثم تبدأ من جديد بعد مسافة من هذا التشوه الحادث مما يؤدي إلى تكوين فجوة في د. ن. أ والتي لا يلبث أن يرتبط بها RecA Protein. وفضلاً عن بدء التبادل بين سلاسل د. ن. أ عن طريق الإصلاح بالاتحادات الجديدة فإن الارتباط الحادث بين RecA Protein وبين سلسلة مفردة من د. ن. أ يؤدي إلى حفز RecA Protein لكي يقوم بوظيفة انزيمية مختلفة تماماً عن وظيفة الاتحادات الجديدة وهي: هدم (بالتحليل المائي) للمثبط الخاص بجينات الانقاذ S.O.S. (والمعروف باسم مثبط Lex A) وبهذه الطريقة يقوم RecA Protein بتحفيز عملية إصلاح د. ن. أ بكل من طريقة الاتحادات الجديدة بالإضافة إلى استبداء نشاط حوالي ١٥ جين من جينات الانقاذ S.O.S. نتيجة لتخليصه لها من

البروتين المثبط. والجدول (١-٥) يبين عدد من جينات الانقاذ وملخص لدور كل منها في الاصلاح.

الجدول (١-٥) جينات الانقاذ S.O.S ودورها في اصلاح د. ن. أ

اسم الجين	دورة في اصلاح د. ن. أ
أولاً:	جينات معروفة الوظيفة
uvr A uvr B uvr C	تشفر لانزيم الاستئصال Excision Endonuclease
umu D umu C	يشفران للبروتين المطلوب لاصلاح د. ن. أ الناتج من عملية الاصلاح القابل للخطأ Error-Prone Repair ولمعظم مسببات الطفرور.
sul A	يشفر للبروتين المثبط لانقسام الخلية (ربما لتعطى فرصة زمنية لاصلاح د. ن. أ)
ثانياً:	جينات داخلية في بناء د. ن. أ ولكن دورها المحدد في الاصلاح غير معروف.
SSb	ينتج البروتينات المرتبطة بالسلسلة المفردة SSB
uvr D	ينتج انزيم هليكيز II الذى يقوم بفصل السلسلتين أمام شوكة التناسخ
him A	يشفر لأحد البروتينات الداخلة في الاتحادات الجديدة المحددة الموقع
Rec N	يدخل في اصلاح د. ن. أ بالاتحادات الجديدة
ثالثاً:	جينات غير معلومة الوظيفة
din A din B din D din F	

وعلى الرغم من أنه معروف الآن كيف أن مشابهاً القواعد وبعض القواعد المُحوّرة (المُعدّلة) تسبب طفرات من خلال التزاوج غير الصحيح، إلا أنه لم يتضح بعد كيف تنشأ الطفرات عندما تكون القواعد مشوهة وتالفة جداً لدرجة أنها تفقد القدرة على التزاوج تماماً. ولكن هذه الحالة هي أهم العمليات على الإطلاق لأن معظم المطفرات الطبيعية والتالي معظم المسرطنات Carcenogens تعمل على أن تظل الخلايا في إنتاج سلاسل د. ن. أ بالرغم من غياب القالب بما يحتويه من معلومات وراثية لازمة للتناسخ في مواقع التلف.

وفي محاولة شبه يائسة من الخلية لاصلاح هذه الاخطاء الكبيرة التي نتجت عن تلف كبير في سلسلتى د. ن. أ الابوية وعدم وجود قالب سليم للتناسخ فإنها تلجأ إلى تنشيط ما يسمى SOS Repair System أى الاصلاح بإنقاذ ما يمكن انقاذه للهروب من التأثيرات المميتة الناتجة من هذا التلف. وفي هذا المسار الانقاذى يؤدى نشاط بروتينات الانقاذ إلى دفع انزيم Pol III إلى الاستمرار فى التناسخ خلال الجزء التالف من القالب بدون توقف عند منطقة التلف وتكون النتيجة تلافى وجود فجوة فى د. ن. أ البنوى الناتج إلا أن ذلك يكون على حساب صحة عملية التناسخ نفسها. حيث تحتوى نواتج التناسخ هذه على اخطاء جسيمة تؤدى إلى زيادة كبيرة فى معدل الطفرور ولذلك سمي هذا النوع من الاصلاح- الاصلاح المصحوب (القابل) بالخطأ Error Prone Repair.

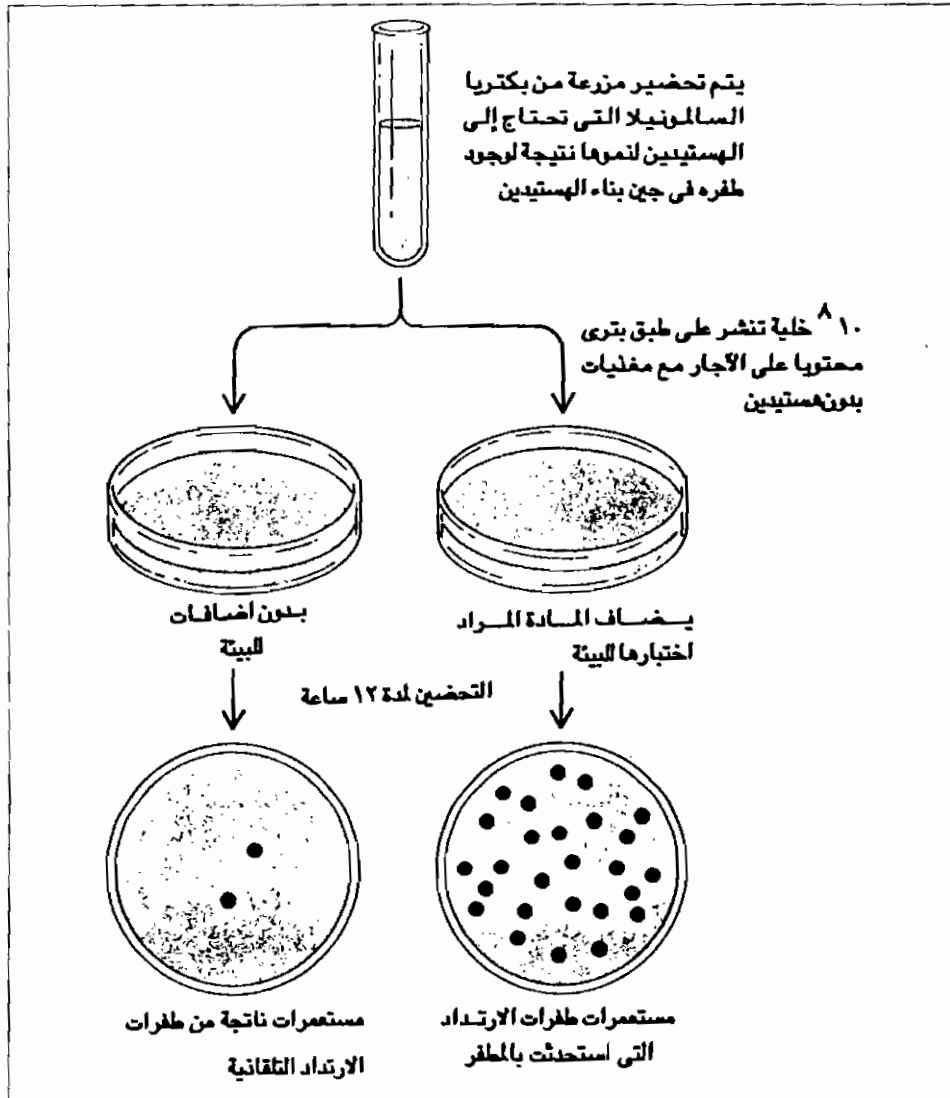
المطفرات الطبيعية وطرق التعرف عليها:

من المهم التعرف على المطفرات وتفايدى تعرض الإنسان لها لسببين وهما:

- ١- أن التغيرات الوراثية العشوائية تكون عادة ضارة للأجيال المقبلة. ولكن حتى الطفرات الجسدية Somatic Mutations أى تلك التى تحدث فى الخلايا اللاجنسية قد تهدد حياة الكائن نفسه. إذ من المعروف أن السرطان ينتج غالباً من طفرات جسدية تؤدي إلى نمو غير منتظم للخلايا.
- ٢- قد يكون هناك ارتباط بين بعض الأمراض المرتبطة بالشيخوخة مثل تصلب الشرايين Atherosclerosis وبين تراكم د. ن. أ تالف لم يمكن اصلاحه. بل هناك فرضية بأن عملية الشيخوخة بكاملها قد تنتج عن تلف غير عكسي فى د. ن. أ فى الخلايا الجسدية.

ثبت أن معظم المطفرات تكون فى نفس الوقت مسرطنات. وقد تم التوصل إلى طريقة سهلة لتحديد ما إذا كانت مادة ما مسرطنة أم لا وذلك عن طريق استخدام سلالات بكتيرية معينة فى اختبار القدرة الطفرية لهذه المادة. فقد استنبط Ames دكتور إيميز اختبار سمي بأسمه Ames test (الشكل ٥-١٦) وقد استفاد إيميز من عدة خواص مميزة لسلالة من بكتيريا السالمونيلا Salmonella بحيث يسهل قياس معدل الطفرور الرجعى Reversion إلى المظهر الوحشى للبكتريا فى طفرة عوز للهستدين. كما أن هذه السلالة تحتوى على بلازميد باستطاعته التعبير بكفاءة عن صور مظهرية مغايرة يحكمها جينين umu C, umu D والتى تكون ضرورية فى حالة ما إذا كان التلف من النوع المطفر. إلا أنه تبين أن معظم المركبات المسرطنة وخاصة النواتج الطبيعية لا تظهر نشاطاً مسرطناً إذا تمت اضافتها مباشرة إلى البكتريا النامية ولكن لابد أن يحدث لها تنشيط أولاً عن طريق التحضين Incubation مع مستخلص من كبد الثدييات. وهى عملية مشابهة لما يحدث فى الطبيعة عندما يتم تمثيل المواد الغريبة فى الكبد. وأثناء عملية التنشيط هذه يتم تحويل المواد المسرطنة إلى

مشتقات محبة للماء تتفاعل بسهولة مع القواعد في جزئ د. ن. أ. ولكن هل جميع المواد المطفرة الهامة لابد أن تكون بالتالي مسرطنة؟



الشكل (٥-١٦): اختبار إيمز لتقدير المقدرة الطفرية (المسرطنة) لمادة مطفرة على أساس قدرتها على إحداث الطفرور الرجعي إلى الطراز الوحشي في سلالة من بكتريا السالمونيلا المعدلة وراثيا

تبين من الدراسات على الأمراض الوبائية بأن تدخين السجائر من أهم المواد المسرطنة التي تواجه الإنسان وقد تبين من اختبار إيمز أن التدخين مطفر قوى.

كما أن الخطر الكامن لبعض المطفرات من الكيماويات الصناعية مثل Ethylene Dichloride معروف تماماً. وهناك الكثير من ملوثات البيئة قد تكون مسرطنة. ولكن تبين حديثاً أن معظم مصادر المطفرات والمسرطنات تأتي من الإغذية وحتى في الغذاء العادي مثل الخضروات الشائعة.

إذ أن النبات يقوم بإنتاج مواد سامة للدفاع عن نفسه ضد المفترسات مثل الحشرات ثم يقوم الكبد بتمثيلها بحيث تكون النواتج مطفرات فعالة. كما تبين أن معظم المطفرات تكون مؤكسدات Oxidants مثل شق الأكسوجين Oxygen Radicals الذي يتفاعل مع قواعد د. ن. أ وهناك مصدر غذائي آخر يمكن أن يؤدي إلى الطفرات بل وإلى السرطان وهي الدهون التي يتم تمثيلها إلى مؤكسدات نشطة في الكبد إلا أن الأمل يكمن في تفادي هذه المخاطر المحتملة عن طريق بعض مضادات التأكسد الطبيعية Antioxidants مثل الجلوتاثيون Glutathione.

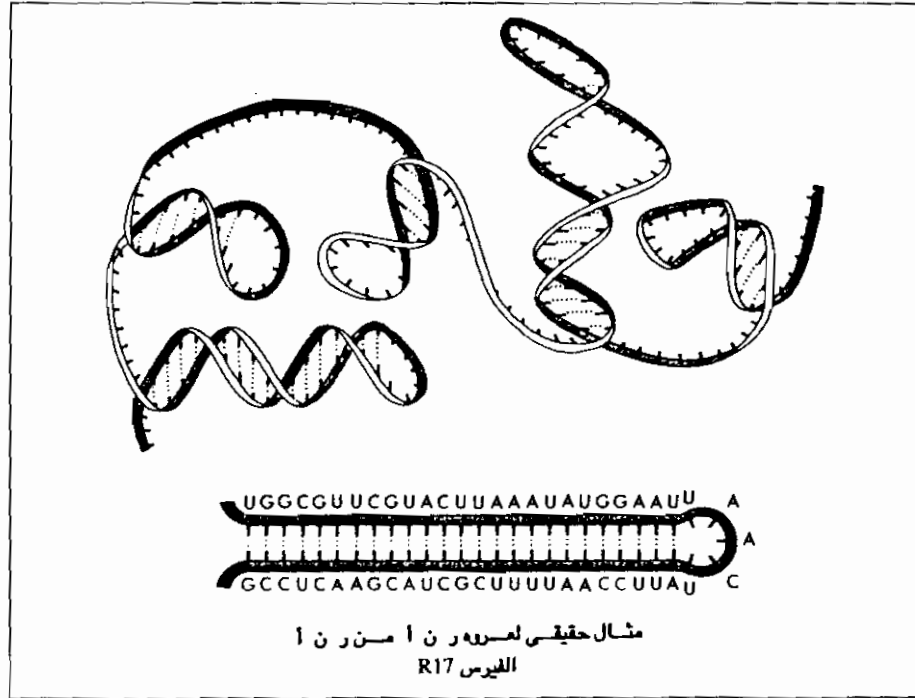
الفصل السادس

بناء ر. ن. أفي غير مميزة النواة RNA Synthesis in Prokaryotes

تركيب جزئ ر. ن. أ:

يتكون جزئ ر. ن. أ عادة من سلسلة مفردة بعكس د. ن. أ وهو ينسخ على قالب د. ن. أ وتعد سلاسل ر. ن. أ قصيرة جداً بالمقارنة بجزئ د. ن. أ حيث تمثل كل سلسلة من ر. ن. أ عادة تتابعات خاصة بجين واحد أو بمجموعة من الجينات التي تربطها علاقة وظيفية مشتركة فيما يسمى بالأوبرون Operon كما سيأتي بعد. على الرغم من أن جزئ ر. ن. أ يكون أحادي السلسلة إلا أنه قد يتشكل في تركيبات مختلفة أكثر تعقيداً. توجد في معظم أنواع ر. ن. أ مناطق قصيرة تأخذ شكل قريب من الحلزون المزدوج والتي تتكون نتيجة لتكون ما يسمى بتركيب دبوس الشعر Hairpin بين تتابعات متكاملة بحيث تتزاوج عند التوائها وتكون منطقة مزدوجة السلسلة كما في الشكل (٦-١).

بالإضافة إلى أزواج القواعد الثابتة AU, GC فإنه قد يتكون تزاوج ضعيف من نوع GU والتي تساهم أيضاً في التركيب الثانوي (الثاني) لجزئ ر. ن. أ.



الشكل (٦-١): إنشاء سلسلة ر. ن. أ مينا مناطق عديدة مزدوجة الحلزون مرتبطة ببعضها بروابط هيدروجينية

من المعروف أنه توجد ثلاث أنواع رئيسية من ر. ن. أ وهي ر. ن. أ انمراسل mRNA، ر. ن. أ الريبوسومي rRNA، ر. ن. أ الناقل tRNA ويقوم كل منها بدور محدد في عملية الترجمة وبناء البروتين كما سيأتي بعد.

في حالة tRNA مثلاً نجد أن طبيعة تكوينه ووظيفته تحتم أن تنتشئ السلسلة لتكوين عدد من العروات (فيما يعرف بشكل ورقة البرسيم Clover Leaf Shape كما سيأتي بعد) ولذلك يوجد عدد كبير من التتابعات المتكاملة الداخلية

حتى يمكنها أن تتزاوج عند تقابلها في هذه العروات حتى يتسنى للجزئ أن يأخذ هذا الشكل المميز في التركيب الثالثي Tertiary.

تحتوى كل خلية غير مميزة النواة على عدد كبير ومختلف من جزيئات ر.ن. أ والتي تتراوح في الطول بين ٧٠ نيوكلييدة إلى عشرات الالاف من النيوكلييدات. وهي في الغالب من نوع السلاسل الطولية المفردة ولكن يوجد القليل منها الذى يأخذ شكلاً حلقياً.

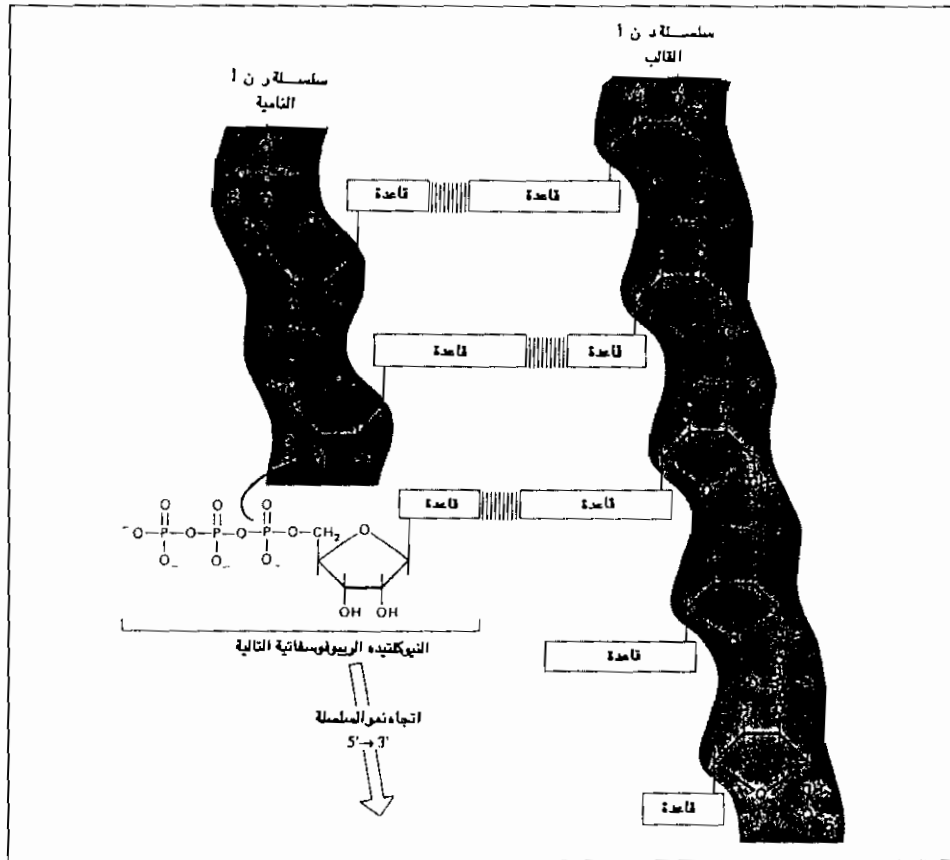
البناء الأنزيمى لجزئ ر.ن. أ على قالب د.ن. أ:

تدعو حقيقة أن ر.ن. أ مثله مثل د.ن. أ يتكون من سلسلة طويلة غير متفرعة مكونة من تتابعات مختلفة لأربعة نيوكلييدات (U, A, C, G) إلى افتراض أن المعلومات الوراثية المخزونة في سلاسل د.ن. أ يتم انتقالها إلى تتابع مكمل من نيوكلييدات ر.ن. أ.

وطبقاً لهذه الفرضية فإنه لا بد أن يحدث انفصال بين سلسلتى د.ن. أ في مرحلة معينة من دورة الخلية لتعمل السلاسل المفردة كقالب يتم عليها بناء ر.ن. أ تكاملياً مع تتابع القواعد الموجودة على القالب بحيث يتقابل A مع U, G مع C. ولا بد من وجود ضوابط لمعرفة إذا كانت سلسلة د.ن. أ المنفصلة ستستعمل كقالب لإنتاج سلسلة مكمل من د.ن. أ أو في بناء سلسلة من ر.ن. أ.

أمكن التحقق من وجود تلك الضوابط عندما تم اكتشاف الانزيم المسئول عن التخليق الحيوى لجزئ ر.ن. أ والذي سمي فى البداية انزيم النسخ Transcriptase ثم أصبح اسمه انزيم بلمرة ر.ن. أ RNA Polymerase والذي

يوجد في جميع خلايا غير مميزة النواة. فمثلاً وجد أن خلية بكتريا القولون الواحدة تحتوى على حوالى ٣٠٠٠ جزئ من هذا الانزيم. يقوم ذا الانزيم بربط الوحدات البنائية لسلاسل ر. ن. أ وهى الريبونوكليوتيدات Ribonucleotides ببعضها وذلك بتكوين روابط 3', 5' فوسفودايستر التى تعمل على ثبات الهيكل الأساسى لجزئ ر. ن. أ كما فى الشكل (٢-٦).

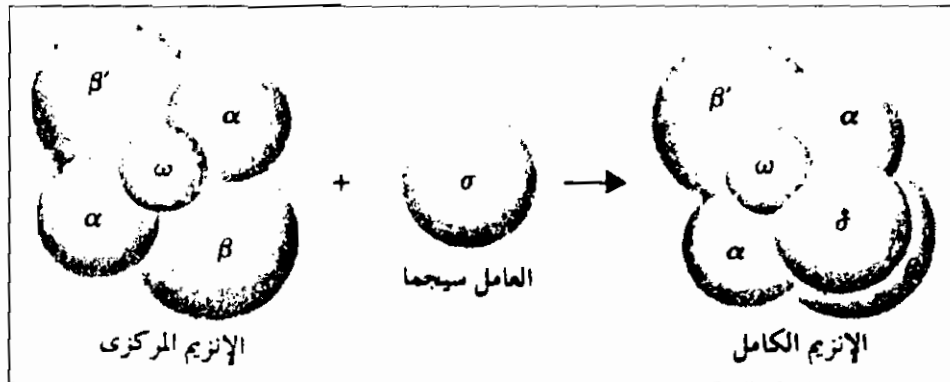


الشكل (٢-٦): دور انزيم ر. ن. أ فى بكتريا القولون فى اضافة النيوكليوتيدات الريبوسومية لاستطالة سلسلة ر. ن. أ على أساس قانون تزاوج القواعد مع مكملاتها فى د. ن. أ القالب ويكون البناء فى الاتجاه 3' → 5'

إلا ان ذلك لا يمكن أن يحدث إلا فى وجود قالب من د. ن. أ مما يدل على أن د. ن. أ لابد أن يقوم بترتيب النيوكليوتيدات التى تدخل فى تتابع ر. ن. أ بمعلومية تتابع القواعد فى السلسلة د. ن. أ القالب وذلك حتى يستطيع انزيم ر. ن. أ العمل بكفاءة فى عملية البناء.

تركيب انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase:

يتكون انزيم بلمرة ر. ن. أ من عدد من تحت الوحدات وتتكون الصورة النشطة للانزيم والمسماه بالانزيم الكامل Holoenzyme من خمس سلاسل من متعددات الببتيد المختلفة وهى ($\alpha, \beta', \beta, \sigma, \omega$) وترتبط مع بعضها بروابط ثانوية غير تساهمية. وتمثل كل وحدة مرة واحدة فى الجزئ الكامل فيما عدا الوحدة ω التى تمثل بوحدين ويكون الوزن الجزيئى للانزيم الكامل حوالى ٥٠٠,٠٠٠ دالتون (الشكل ٦-٣) ويلخص الجدول (٦-١) الوحدات الداخلة فى تركيب الانزيم فى بكتريا القولون ووظيفة كل منها فى عملية النسخ.



الشكل (٦-٣): رسم توضيحي للتركيب المعقد لانزيم بلمرة ر. ن. أ.

الجدول (٦-١) تحت وحدات subunits لانزيم بلمرة ر. ن. أ
في بكتريا القولون وعوامل النسخ ووظيفة كل منها

تحت الوحدة	اسم الجين	الموقع على الخريطة (دقائق)*	الوزن الجزيئي (Dalton)	عند تحت الوحدات في الانزيم	الوظيفة
β' (بيتا)	rpo C	٨٩,٥	١٥٥,٠٠٠	١	الارتباط مع د. ن. أ؟
β (بيتا)	rpo B	٨٩,٥	١٥١,٠٠٠	١	موقع التفاعل لبلمرة ر. ن. أ
σ (سيجما)	rpo D	٦٦,٥	٧٠,٠٠٠	١	التعرف على تتابع promoter وبدء البلمرة
α (الفا)	rpo A	٧٢	٣٦,٥٠٠	٢	؟
ω (أوميغا)	--	—	١١,٠٠٠	١	؟
عوامل النسخ					
(Rho) P	rho	84.5	٤٦,٠	٦	انتهاء أو وقف البلمرة
nus A	nus A	٦٥	٦٩,٠٠٠	١	الاستطالة والانتهاء.

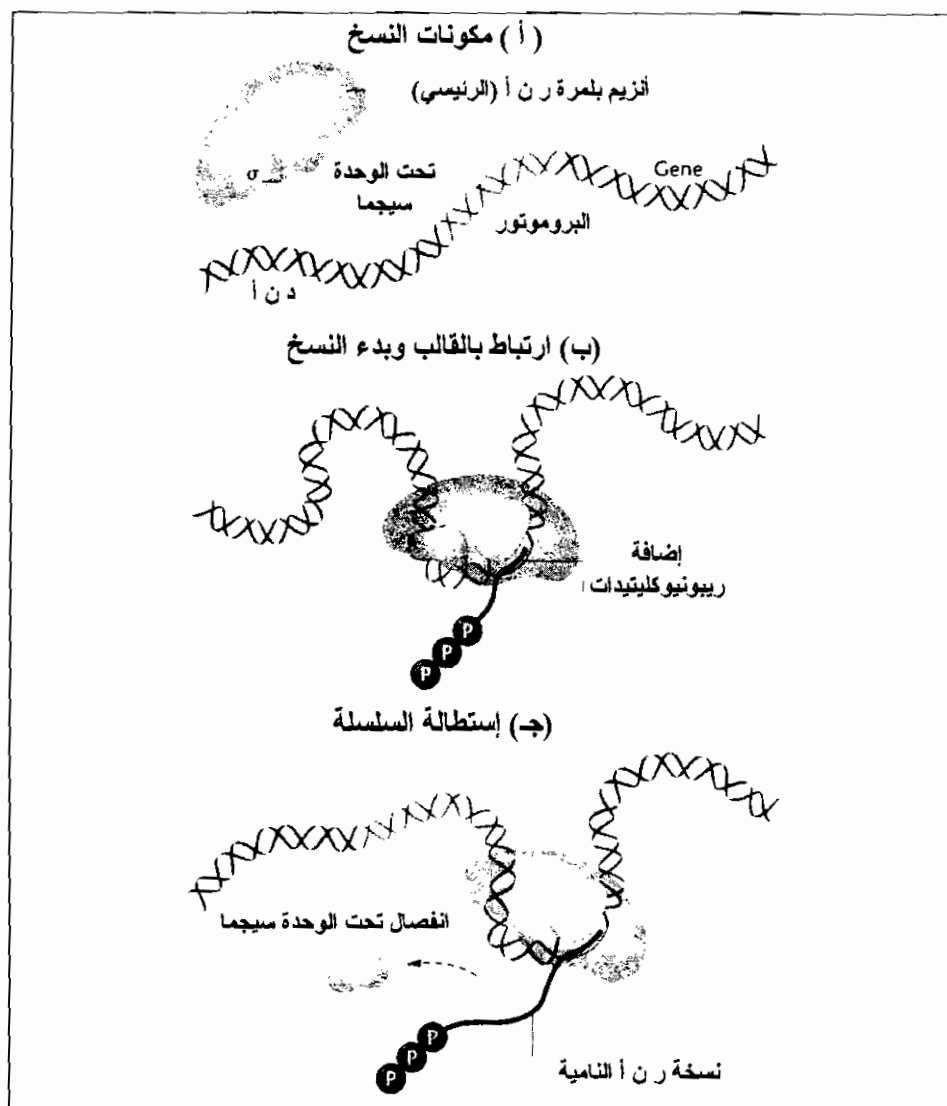
* يشير إلى الموقع على الخريطة المعروفة عن التركيب الحلقى لجزء د. ن. أ. في بكتريا القولون والذي يمثل بستين دقيقة.

لا يوجد ارتباط قوى بين تحت الوحدة سيجما (σ) مع بقية مكونات الإنزيم. لذلك يمكن فصل معقد إنزيمي مكون من (β' , B, α_2 , w) بدون الوحدة σ ويطلق على هذا المعقد الإنزيم المركزي core enzyme حيث تبين أن باستطاعة أن

يقوم بتكوين الروابط الفوسفودايستر اثناء بناء سلسلة ر. ن. أ بنفس الكفاءة التي يقوم بها الإنزيم الكامل أى فى وجود أو غياب الوحدة سيجما σ ويعتقد بأن مركز النشاط الإنزيمى يقع فى الوحدة β للإنزيم المركزى.

إلا أن تحت الوحدة σ تلعب دوراً رئيسياً وهاماً فى التعرف على نقطة بدء بناء السلسلة على قالب د. ن. أ والمعروفة بأسم منطقة تتابع المستبدئ Promoter كما سيأتى بعد. ويبين الشكل (٦-٤) رسماً تخطيطياً لعملية بناء ر. ن. أ بواسطة إنزيم بلمرة ر. ن. أ.

ويظهر من الشكل المراحل الثلاثة للنسخ وهى البدء والاستطالة والانتهاء.



الشكل (٤-٦): المراحل المبكرة للنسخ في غير مميزة النواة

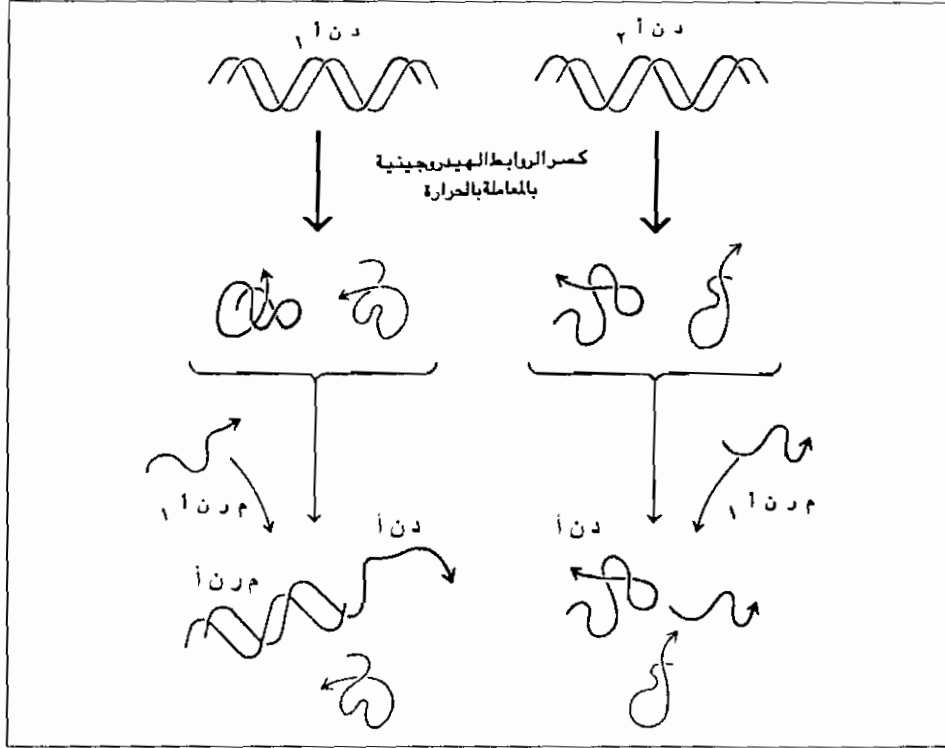
- أ - مكونات العملية.
- ب - ارتباط القالب عند الموقع (١٠-) وتشمل تحت الوحدة سيجما لإنزيم بلمرة ر ن أ وبدء بناء ر ن أ.
- ج - إستطالة السلسلة بعد انفصال تحت الوحدة سيجما من معقد النسخ ويتحرك الإنزيم على طول قالب د ن أ.

اختيار سلسلة واحدة من د. ن. أ للعمل كقالب لبناء ر. ن. أ.:

فى حين يحتوى جزئ د. ن. أ عادة على عدد كبير جداً من الجينات فإن كل جزئ من ر. ن. أ يمثل عادة تتابعات ريبونوكليوتيدية مكملّة محدودة تمثّل جين واحد محدد. وعلى ذلك فإنه إذا افترضنا أن كل من سلسلتى د. ن. أ يمكن أن تستخدمان كقالب لبناء سلسلة معينة من ر. ن. أ، فإن معنى ذلك أن كل جين سينتج منه نسختين من ر. ن. أ بتتابعات مكملّة. وحيث أن كل الأدلة الوراثةيّة تُجمع على أن كل جين يتحكم فى جزئ واحد من البروتين (متعدد الببتيد) فإن ذلك سيضعنا أمام أحد احتمالين: إما أن واحدة فقط من سلاسل ر. ن. أ هى التى سيتم بنائها أو إذا كان لا بد من بناء السلسلتين فإن إحداها فقط ستكون نشطة وفعالة. ولكن تبين أن الاحتمال الأول هو الصحيح ففى الخلية الحية *in vivo* لا يوجد إلا نوع واحد من سلسلة ر. ن. أ التى تمثّل جين معين. كما أمكن البرهنة على ذلك بدراسة ر. ن. أ المتكون فى الخلية البكتيرية بواسطة فيروس SP8 الذى يتكاثر فى الخلية البكتيرية *Bacillus Subtilis*. يتميز الحلزون المزدوج لهذا الفيروس باحتواء كل سلسلة على قواعد مختلفة ومميزة بحيث يمكن التعرف على كل منهما بطرق جزيئية خاصة كما يمكن فصل السلسلتين بسهولة وبذلك يمكن معرفة ما إذا كان ر. ن. أ المتكون يحتوى على تتابعات من القواعد مكملّة لسلسلة واحدة فقط أم لكلا السلسلتين.

استخدمت فى ذلك تقنية تهجين ر. ن. أ مع د. ن. أ RNA/ DNA Hybridization حيث تَخلط جزيئات ر. ن. أ مع السلاسل المفردة من د. ن. أ الناتجة عن عملية الدنترة للحلزون المزدوج Denaturation بالتسخين. عند إجراء عملية إعادة الاتحاد Renaturation بالتبريد البطئ لهذا الجزئ المدنتر فى وجود سلاسل ر. ن. أ التى سبق بناؤها على قالب د. ن. أ الفيروس نفسه فإن

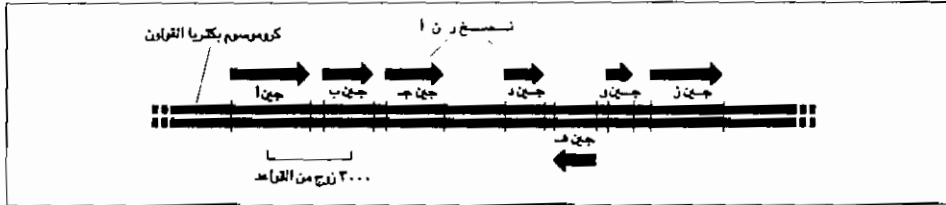
بعضاً من ر.ن. أ سينجذب إلى مناطق د.ن. أ المكملة في احدى السلسلتين فقط ويكون حلزون مزدوج كما في الشكل (٥-٦).



الشكل (٥-٦): استخدام الهجين د.ن. أ / ر.ن. أ لبيان التكامل في تتابع القواعد من جزئ ر.ن. أ. وأحد سلسلتى د.ن. أ القالب. يبين الجانب الأيسر من الشكل التخطيطى تكوين جزئ هجينى بين جزئ ر.ن. أ. وأحد السلسلتين للقالب. ويبين الجانب الايمن لماذا يسمح تكوين هجين د.ن. أ / ر.ن. أ بالكشف عن التكامل فى التتابع. إذا تم خلط نفس جزئ ر.ن. أ مع د.ن. أ غريب فأنه لن يتكون جزئ هجين

تبين أن ر.ن. أ المبنى حيويًا فى الخلية سيتجه إلى تكوين هجين مع إحدى السلسلتين من د.ن. أ للفيروس SP8 فقط، مما يعنى أنه بالنسبة لجين ما يتم التخليق الحيوى لتتابعات ر.ن. أ على إحدى السلسلتين من د.ن. أ فقط. أى

أن النسخ لا يتم إلا على سلسلة قالب واحد بالنسبة لجين معين. وبصفة عامة فإن إحدى السلسلتين من د. ن. أ في الكائنات غير مميزة النواة تستخدم كقالب لمجموعة من الجينات في حين قد تستخدم السلسلة الأخرى كقالب لنسخ عدد آخر من الجينات كما في الشكل (٦-٦).



الشكل (٦-٦): منطقة قصيرة من كروموسوم بكتيري تبين عملية نسخ عدة جزيئات من ر. ن. أ. على قالب د. ن. أ. أ المحتوى على عدة جينات متجاورة

ويتم ذلك الاختيار بتوجيه من منطقة تتابع المستبدئي Promoter الموجودة على سلسلة د. ن. أ التي تؤدي إلى ارتباط إنزيم بلمرة ر. ن. أ بالسلسلة القالب الصحيحة لجين معين كما سيأتي بعد.

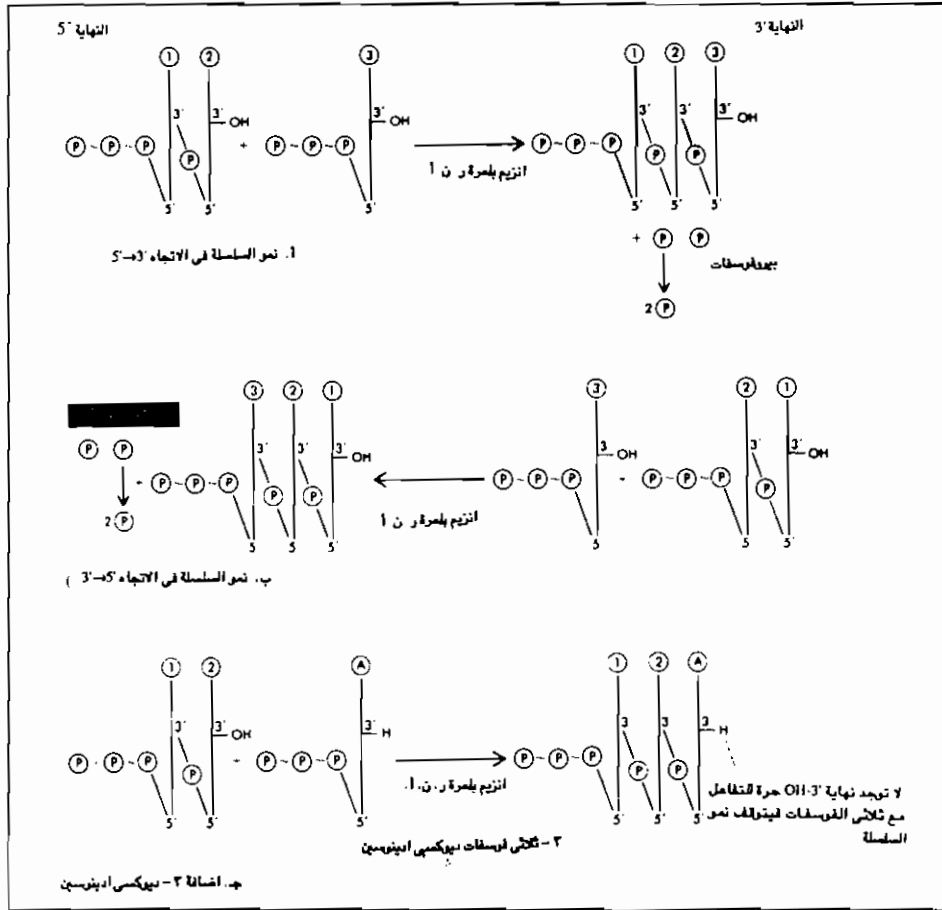
إتجاه البناء في جزئ ر. ن. أ:

إن إتجاه البناء في جزئ ر. ن. أ يتحدد (كما في د. ن. أ) بإتجاه ارتباط السكر الريبوزي بالفوسفات في الهيكل الأساسي للجزئ فإذا انتهت السلسلة بذرة كربون رقم 5' فيطلق عليها النهاية 5' في حين يطلق على النهاية المحتوية على الذرة رقم 3' النهاية 3'.

هناك احتمالان فقط لإتجاه البناء في ر. ن. أ. أما في الإتجاه 3'→5' أو 5'→3' فإذا كان النمو في الإتجاه 3'→5' فإنه من المتوقع أن تكون النيوكلييدة الأولى في السلسلة محتوية على مجموعة ثلاثية من الفوسفات P - P - P ولكن

إذا كانت السلسلة ستنمو في الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ فإنه من المتوقع أن تكون النيوكلييدة التي تنتهى بها السلسلة هي المحتوية على مجموعة فوسفات ثلاثية P - P - P.

تبين أن الاحتمال الأول هو الصحيح حيث وجد أنه في السلاسل الحديثة البناء تكون أحدث نيوكلييدة مضافة للنهية النامية عند النهاية $3'$ في حين تكون مجاميع الفوسفات الثلاثية P - P - P مرتبطة بالنيوكلييدة التي ابتدأ بها بناء السلسلة. كما أمكن البرهنة على الاتجاه البنائي $3' \rightarrow 5'$ باستخدام المثبط الأيضى Deoxyadenosine $3'$ - وهو مشابه لقاعدة الأدينين ولكن مع عدم وجود ذرة الأوكسجين على ذرة الكربون $3'$ والتي تشارك في تكوين أحد الروابط الهيدروجينية بين القواعد. عند اضافة هذا المثبط إلى الخلايا البكتيرية فإنه يتم أولاً فسفرته إلى P - P - P deoxyadenosine phosphate $3'$ ثم يتم ارتباطه بعد ذلك بالنهاية $3'$ النامية من السلسلة وحيث أنه لا يحتوى على مجموعة OH $3'$ فإنه لا يمكنه استقبال نيوكلييدات جديدة فتقف سلسلة ر. ن. أ عن النمو والاستطالة مما يؤكد أن البناء لا بد أن يتم في الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ فقط كما في الشكل (٦-٧).

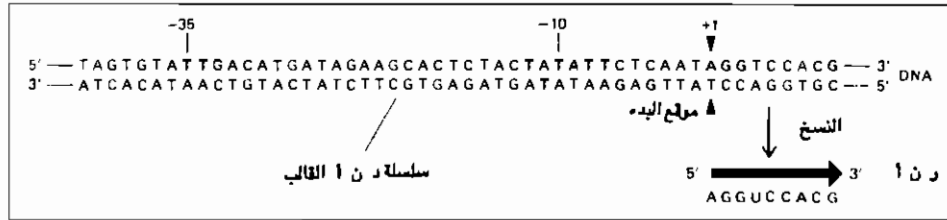


الشكل (٦-٧): رسم تخطيطي لأكتبات أن اتجاه النسخ هو 3' → 5' باستخدام ٣- ثلاثي فوسفات ديوكسي أدينوسين

دور منطقة تتابع المستبدئ Promoter في بناء ر. ن. أ:

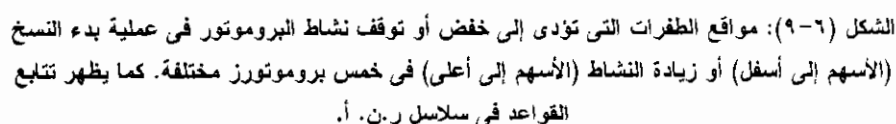
في حين انه لا يوجد أي دور بنائي للوحدة سيجما (σ) في إنزيم ر. ن. أ الكامل إلا أن لها وظيفة هامة جداً حيث تقوم بالتعرف على إشارات البدء على

طول جزئ د. ن. أ قالب. وقد أظهرت نتائج التجارب العملية *In Vitro* أنه في غياب الوحدة σ قد يتم بناء سلسلة ر. ن. أ ولكن ببدائيات غير صحيحة مما يجعل السلسلة الناتجة غير صالحة لعملية بناء البروتين المطلوب حيث يتم ارتباط الإنزيم المركزي Core Enzyme بأماكن عشوائية على طول قالب د. ن. أ مما يعطى ر. ن. أ بتتابعات غير صحيحة وبالتالي نحصل على منتج غير فعال. ولكن وجود الوحدة σ مع بقية الوحدات فى الإنزيم يؤدي الى التعرف على الموقع الصحيح لبداية النسخ مما يدل على أن الإنزيم الكامل Holoenzyme لديه المقدرة على الارتباط نوعياً مع تتابع البدء على جزئ د. ن. أ الذى يعرف بمنطقة تتابع المستبدئ Promoter. تتكون هذه المنطقة فى بكتريا القولون من حوالى ٥٠-٦٠ نيوكليتيده ويرتبط بها إنزيم بلمرة ر. ن. أ فى منطقة تمتد حوالى ٤٠ قاعدة قبل بدء النسخ Upstream إلى حوالى ٢٠ قاعدة بعد بدء النسخ Downstream. تبين أن هناك تتابعات نوعية محفوظة فى منطقة تتابع الابتداء هذا ويطلق عليها التتابع الكشاف المحفوظ Consensus Sequence، لابد أن يتعرف عليها إنزيم بلمرة ر. ن. أ وهى تتكون من تتابعين طول كل منهما ٦ نيوكليتيديات وتقعان قبل موقع بدء النسخ بحيث يفصل بينهما حوالى ١٧ نيوكليتيده من التتابعات غير المحددة من د. ن. أ كما فى الشكل (٦-٨).



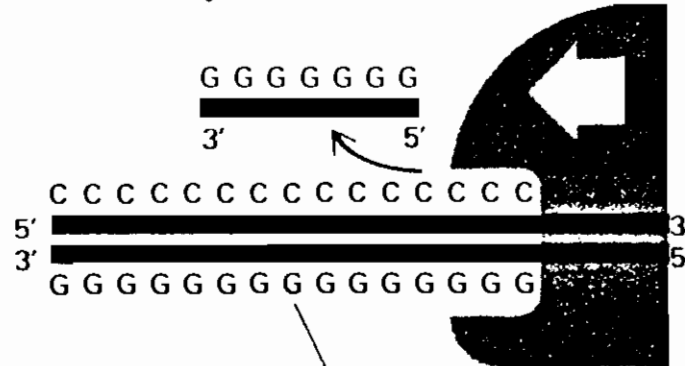
الشكل (٦-٨): منطقة تتابع البروموتور على سلسلة د. ن. أ القالب التي يتعرف عليها إنزيم بلمرة ر. ن. أ لبدء النسخ لسلسلة ر. ن. أ. تتكون منطقة البروموتور من تتابعين قصيرين على بعد حوالي -٣٥ إلى -١٠ نيوكليتيده من نقطة بدء نسخ سلسلة ر. ن. أ. وتحدد هذه التتابعات موقع ارتباط إنزيم بلمرة ر. ن. أ، وتكون هذه التتابعات مع موقع البدء منطقة البروموتور. ويؤدي حدوث طفرات في أي من هذه التتابعين المحفوظين إلى توقف نشاط البروموتور في حين لا يتأثر هذا النشاط إذا حدثت التغيرات في أي تتابعات أخرى

يبدأ التتابع السداسي الأول عند موقع النيوكليتيده رقم -٣٥ قبل بدء النسخ وتتكون غالباً من التتابع (TTGACA) في حين يقع التتابع السداسي الثاني عند النيوكليتيده رقم -١٠ قبل بدء النسخ وتتكون من التتابع (TATATT). وجد أنه لا بد أن يرتبط إنزيم البلمرة ر. ن. أ بهذين الموقعين قبل أن تبدأ عملية النسخ الفعلية عند نيوكليتيده البدء في الموقع رقم +١ على سلسلة د. ن. أ القالب. وقد تبين أن أي تغيير (طفور) في أي من هذين التتابعين السداسيين يؤدي إلى توقف نشاط البروموتور وبالتالي توقف بدء النسخ بإنزيم بلمرة ر. ن. أ في حين لا تتأثر عملية النسخ كثيراً إذا حدث تغير في التتابعات الأخرى في منطقة الابتداء Promoter كما في الشكل (٦-٩).

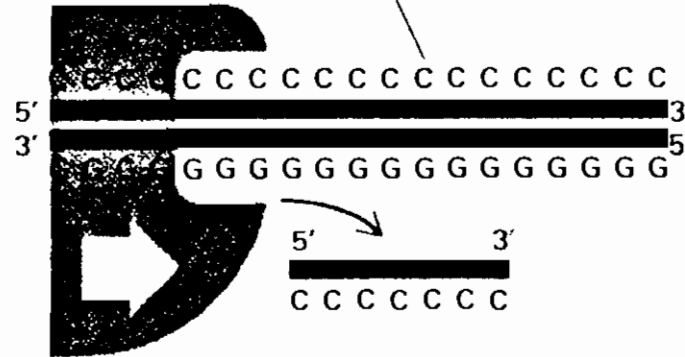


۱۹۴

تحرك إنزيم بلمرة ر ن أ من اليمين إلى اليسار
يؤدي إلى تكوين سلسلة ر.ن.أ. باستخدام
السلسلة العليا لجزء د ن أ كقالب



الحلزون المزدوج لجزء د ن أ



تحرك إنزيم بلمرة ر ن أ من اليسار إلى اليمين
يؤدي إلى إنتاج سلسلة ر ن أ باستخدام
السلسلة السفلى لجزء د ن أ كقالب

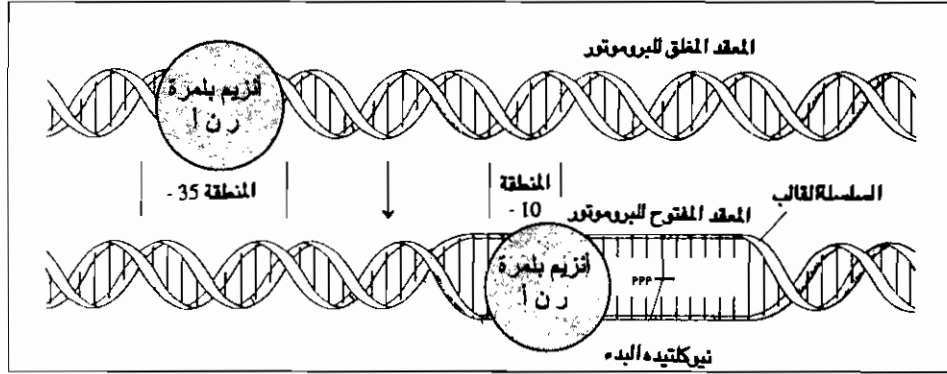
الشكل (١٠-٦): أهمية اتجاه تتابع القواعد في البروموتور في اختيار سلسلة د. ن. أ القالب الصحيح
لنسخ سلسلة ر. ن. أ بواسطة إنزيم بلمرة ر. ن. أ.

تأثير ارتباط إنزيم البلمرة مع تتابع المستبدى Promoter فى فك حلزنة د.ن. أ و بدء عملية النسخ:

تبين فى بكتيريا القولون أن إنزيم بلمرة ر.ن. أ يرتبط بمنطقة تتابع المستبدى Promoter فى خطوتين محددتين: حيث يبحث أولاً عن منطقة الابتدء ويرتبط بها ارتباطاً مبدئياً ضعيفاً فى المعقد المقفول (Closed) أى قبل فك الحلزون المزدوج لجزئ د.ن. أ ويحدث هذا التعرف المبدئى غالباً فى المنطقة (٣٥-) حيث تبين أن الطفرات التى تمنع الارتباط مع تتابع المستبدى هى تلك التى تؤدى إلى تغيير القواعد فى هذه المنطقة. والخطوة الثانية تتم عند تحول المعقد المقفول إلى معقد مفتوح، ويتم فيه ارتباط إنزيم بلمرة ر.ن. أ بقوة بتتابع المستبدى Promoter. فى هذه المرحلة من التحول يتم فك حلزنة حوالى ١٧ زوج من القواعد وتتكون ما يسمى فقاعة التناسخ Transcription Bubble بدءاً من منطقة (١٠-) مما يجعل السلسلة المفردة للقالب معرضة ومكشوفة لفعل إنزيم بلمرة ر.ن. أ لاستخدامها كقالب لتوجيه تتابع نسخ القواعد فى سلسلة ر.ن. أ النامية.

تبين أن المنطقة (١٠-) تكون عادة غنية فى أزواج القواعد AT ومعروف أنها تكون أسهل فى الانفكاك بالدنترة عن الأزواج GC. وقد تبين أن الطفرات التى تمنع تكوين المعقد المفتوح تقع فى نفس هذه المنطقة إذ تحدث هذه الطفرات تغير فى تتابع المنطقة (١٠-) ولكنها تحافظ على محتواها من أزواج القواعد AT مما يشير إلى أن هذه المنطقة تأخذ شكلاً مميزاً ونوعياً بحيث يتعرف عليها إنزيم البلمرة بالإضافة إلى كونها سهلة الأنصهار. يؤدى فك الحلزنة الجزئى فى حلزون د.ن. أ عند تكوين المعقد المفتوح إلى امتداد منطقة

د. ن. أ التي تلامس إنزيم بلمرة ر. ن. أ بحيث تشمل النيوكليوتيدات التي تلي منطقة (-10) التي كانت سابقاً على الجانب الآخر من حلزون د. ن. أ بالنسبة لجهة الارتباط كما في الشكل (٦-١١).



الشكل (٦-١١): ارتباط إنزيم بلمرة ر. ن. أ بالمعقد المغفول والمفتوح للبروموتور
يبين الشكل منطقة تلامس الإنزيم بالبروموتور عند بداية الارتباط (المعقد المغفول) وبعد انفصال سلسلتي د. ن. أ للسماح ببداية نمو سلسلة ر. ن. أ (المعقد المفتوح) تبدو مواقع التلامس داكنة اللون

يلى ذلك تحرك إنزيم بلمرة ر. ن. أ خطوة خطوة على قالب د. ن. أ (الخطوة = اضافة ريبونيوكلتييدة واحدة) مع استمرار الانفكاك الجزئي للحلزون أمام الإنزيم حتى يمكن أن تستمر عملية النسخ. وبذلك تنمو السلسلة بمعدل نيوكلييدة في كل خطوة في الاتجاه $5' \rightarrow 3'$. وبمجرد بدء استطالة سلسلة ر. ن. أ تتفصل الوحدة سيجما σ من المعقد الإنزيمي وتصبح حرة للارتباط بإنزيم مركزي آخر Corenzyme. وقد يفسر ذلك على أساس إما أنها قد أدت دورها في التعرف على منطقة تتابع المستبدئي Promoter عند نقطة بدء النسخ وبذلك لم يعد لها دور تقوم به أو أن استمرار وجودها في المعقد الإنزيمي الكامل قد يؤدي إلى استمرار الارتباط القوي بين الإنزيم الكامل وبين ألـ Promoter مما يحول دون سهولة حركة الإنزيم على القالب لبدء رحلة البلمرة

فى حين يكون هذا الارتباط ضعيف فى غياب الوحدة σ مما يتيح للانزيم حرية الحركة فى اتجاه استطالة سلسلة ر.ن.أ.

وعلى العكس من ذلك، وجد أن الارتباط بين الإنزيم الكامل Holoenzyme وبين مناطق د.ن.أ غير المحتوية على تتابع المستبدى Promoter يكون ضعيفاً جداً مما يسمح بتحريك الإنزيم على القالب بسرعة بحثاً عن منطقة المستبدى. أى أن دور الوحدة سيجما فى هذه الحالة هو تثبيط الارتباط غير النوعى بين د.ن.أ القالب وبين الأنزيم.

ظهر حديثاً أنه إلى جانب الوحدة سيجما الرئيسية ($\sigma 70$) المسؤولة عن التعرف على مناطق المستبدى Promoter الرئيسية فى جينوم بكتريا القولون توجد وحدات نوعية أخرى من الوحدة سيجما مثل ($\sigma 28, \sigma 32, \sigma 38, \sigma 54$) تكون متخصصة فى التعرف على نوعيات خاصة من تتابع المستبدى غير العادية والتي تمثل نقطة بدء النسخ لأنواع غير عادية من ر.ن.أ مسؤولة عن إنتاج بروتينات متخصصة تحتاجها الخلية تحت الظروف غير العادية مثل ظروف الإجهاد البيئى.

الكفاءة النسبية لتتابعات المستبدى Promoters:

تبين وجود فروق كبيرة فى فعالية ونشاط المستبدى بحيث قد يعمل بعضها بكفاءة أكبر عن البعض الآخر، بحيث تسمح بحدوث دورات أكثر وأسرع لبدء بناء ر.ن.أ. وقد تبين أن معدل حدوث كلا من خطوتى الارتباط الأولى وتكوين المعقد المفتوح تختلف بين تتابعات المستبدى المختلفة Promoter ما بين مرة واحدة كل عشرة دقائق أو أكثر إلى بدء الارتباط مرة كل

ثانية أو ثانيتين فقط. تعد هذه احدى وسائل التحكم فى معدل التعبير الجينى
Regulation of Gene Expression.

دور البروتينات المنظمة Regulators فى التأثير على بدء النسخ:

إن معدل النسخ لجين ما ليس من الضرورى أن يكون ثابتاً ولكنه يمكن أن يتغير حسب احتياجات الخلية تحت الظروف المختلفة من النمو. يقال لمثل هذا الجين بأنه منظم regulated. يتم تنظيم النسخ فى بكتريا القولون عن طريق بعض البروتينات النوعية التى يؤدى ارتباطها بجزئ دن.أ بالقرب من أو داخل المستبدئ promoter إلى زيادة أو انخفاض فى معدل البناء لإنزيم بلمرة ر.ن.أ. وتشمل هذه البروتينات المنظمة المثبطات repressors والتى تقوم بإيقاف أو منع الارتباط بين إنزيم بلمرة ر.ن.أ مع تتابع المستبدئ وبالتالي توقف عملية النسخ. كما تشمل المنشطات Activators التى ترتبط بإنزيم بلمرة ر.ن.أ وتحفز نشاطه. وجد أن المستبدئ Promter الذى يحتاج إلى منشطات لكى يعمل بكفاءة أكبر يكون فيه التتابع المحفوظ consensus sequence فى النقطة (-35) غير متطابق أو غير متشابه مع التتابع النموذجى مما يعنى أن المنشط يعمل كبديل لتعويض النقص الوظيفى لهذا الجزء من موقع الارتباط.

يمكن أن يعمل بروتين ما كمثبط المستبدئ معين فى حين قد يقوم هذا البروتين نفسه بدور المنشط لمستبدئ آخر والعكس صحيح، ويتوقف ذلك على الموقع الدقيق لنقطة ارتباطه.

نيوكلتيدات بدء بناء سلسلة ر.ن.أ:

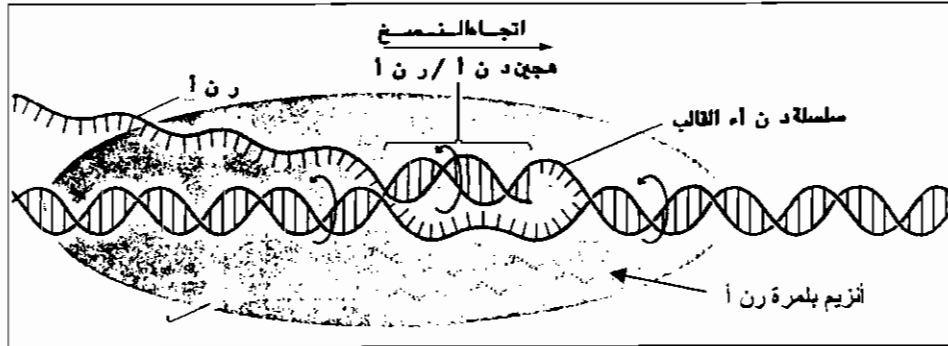
إن بدء النسخ الحقيقي يحدث عادة عند حافة المنطقة التي يرتبط فيها إنزيم بلمرة ر.ن.أ بقلب د.ن.أ ذو السلسلة المفردة وعلى بعد حوالى ١٣ إلى ١٣ قاعدة من بداية منطقة (-١٠) وبذلك يبدو أن مركز النشاط لهذا الإنزيم يقع فى النهاية البعيدة له فى اتجاه بناء ر.ن.أ. وقد وجد أن أول نيوكليتيده يتم اضافتها فى سلسلة ر.ن.أ حديثة البناء تكون عادة إما ثلاثى فوسفات الأدينين أو ثلاثى فوسفات الجوانين. وفى بعض الأحيان قد تبدأ بثلاثى فوسفات السيتوسين (PPPC). وفى أحيان نادرة قد تكون قاعدة البدء ثلاثى فوسفات اليوراسيل (PPPU). ولكن قد يحدث إزالة لهذه القاعدة الأولى فى المراحل التالية من نضج السلسلة وذلك بفعل إنزيمات التحليل المائى للأحماض النووية Nucleases فى الخلية.

فك الحزنة وإعادتها أثناء تقدم إنزيم بلمرة ر.ن.أ.:

يقوم إنزيم بلمرة ر.ن. أ بفك حلزنة د.ن. أ باستمرار أثناء تقدمة في عملية النسخ على القالب لبناء سلسلة ر. ن. أ واستطالتها وذلك لكي تصبح نيوكلييدات القالب معرضة للنسخ. تبدأ نقطة النمو والاستطالة لسلسلة ر.ن. أ بمنطقة مكونة من هجين ر. ن. أ / د. ن. أ بطول حوالي ١٢ قاعدة والتي تنفك عندما تترك سلسلة ر. ن. أ السلسلة القالب وتعود سلسلتى حلزون د. ن. أ إلى التحلزن مرة أخرى حول بعضهما البعض في حلزون مزدوج كما في الشكل (٦-١٢).

إلا أن المنطقة من د.ن.أ. التي تكون غير متحلزنة بمرور إنزيم البلمرة عليها تكون أطول قليلاً من طول منطقة هجين ر.ن. / د.ن.أ. إذ تكون بطول

حوالى ١٧ قاعدة وهى تساوى المسافة التى تنتفك عند بداية بدء تكوين المعقد المفتوح عند منطقة المستبدئ Promoter.

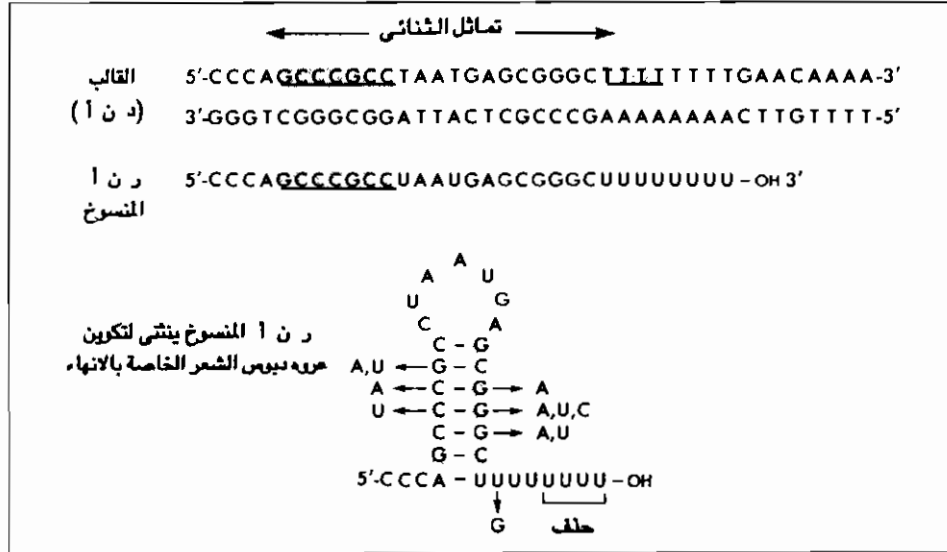


الشكل (٦-١٢): نموذج لمعقد الاستطالة المكون من إنزيم بلمرة ر.ن.أ ود.ن.أ القالب وسلسلة ر.ن.أ النامية. يدل اتجاه الاسهم على الدوران الذى يجب أن يحدث فى جزئ د.ن.أ لتنفك الحلزنة كلما تعرضت السلسلة القالب للإنزيم ولتكوين هجين مؤقت من د.ن.أ و ر.ن.أ ولكى تتحلزن سلاسل د.ن.أ مرة أخرى عندما تنحدر سلسلة ر.ن.أ.

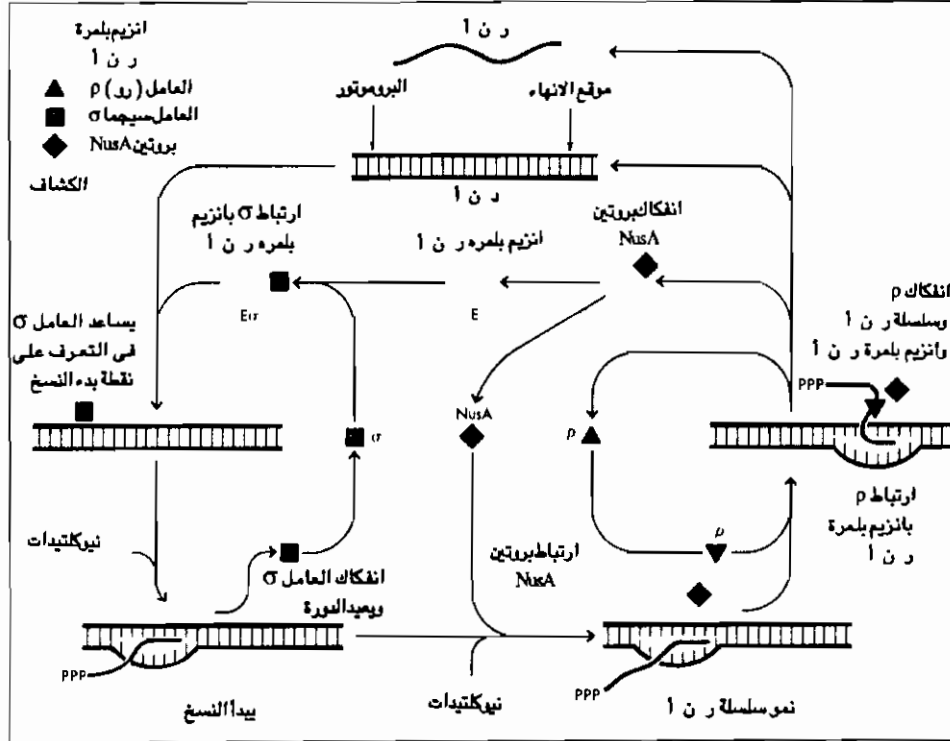
دور اشارات الإنهاء أو التوقف فى إنهاء النسخ:

توجد إشارات فى جزئ د.ن.أ البكتيرى تسمى الموقوفات أو مواقع الإنهاء Terminators والتى تكون وظيفتها وقف بناء ر.ن.أ عند نقطة محددة على قالب د.ن.أ. فعند موقع الانهاء يتوقف إنزيم بلمرة ر.ن.أ عن إضافة نيوكليوتيدات جديدة إلى سلسلة ر.ن.أ وتنفك السلسلة عنه ويترك الإنزيم د.ن.أ القالب لى يبدأ دوره جديدة من النسخ. وفى بعض مواقع الانهاء تحتاج عملية الايقاف إلى بروتين إضافى يسمى عامل ρ (رو Rho) فى حين قد يقوم الإنزيم المركزى نفسه Core Enzyme بهذا الدور بدون الحاجة إلى عوامل إضافية.

توجد تتابعات معينة في منطقة الايقاف في سلسلة د.ن. أ القالب تتكون من تتابع ثنائي تماثل Dyad Symmetry في د. ن. أ على مسافة ١٥ إلى ٢٠ نيوكليتيده قبل نهاية منطقة نسخ ر.ن. أ يليه تتابع من ٦ قواعد أدينين A في سلسلة د. ن. أ القالب والتي يتم نسخها إلى ست قواعد من اليوراسيل U عند نهاية سلسلة ر. ن. أ كما في الشكل (٦-١٣) يتوقف إنزيم بلمرة ر. ن. أ عن إضافة أي نيوكلييدات جديدة عندما يتم نسخ منطقة الايقاف هذه حيث يتكون بسرعة حلزون بتركيب دبوس الشعر Hairpin في هذه المنطقة مما يؤدي إلى توقف النسخ وانزلاق إنزيم بلمرة ر.ن. أ عن السلسلة القالب لجزء د.ن. أ كما يحدث إنفكاك لسلسلة ر. ن. أ المبنية حديثاً، وتصبح حرة ويبين الشكل (٦-١٤) دور كل من إنزيم بلمرة ر. ن. أ وعامل سيجما σ وعامل ρ و Rho في بناء ر. ن. أ.



الشكل (٦-١٣): تتابع منطقة انهاء النسخ المستقلة عن العامل ρ وتركيب سلسلة ر.ن. أ التي توقف نموها. الطفرات التي تحتها خط تؤدي إلى منع جزئي أو كلي لعملية الايقاف



الشكل (٦-١٤): دور إنزيم بلمرة ر.ن.أ. والعامل سيجما σ والعامل ρ (رو) والبروتين NusA في عملية بناء سلسلة ر.ن.أ.

الفصل السابع

بناء ر. ن. أ. فى مميزة النواة RNA Synthesis in Eucaryotes

أن عملية بناء ر.ن.أ. Transcription فى مميزة النواة عملية على درجة عالية من الانتقائية Selective. ففى معظم الثدييات على سبيل المثال لا يتم نسخ أكثر من حوالى ١% من مجموع التتابعات التى توجد فى د.ن.أ. الخلية الى تتابعات فعالة من ر.ن.أ. أى فى صورة ر.ن.أ. المراسل الناضج Mature mRNA. وتحدث عملية الانتقاء على مستويين:

الأول: حدوث نسخ جزئى فقط لتتابعات معينة من د. ن. أ. لانتاج ر.ن.أ. النووى غير المتجانس hnRNA.

الثانى : بقاء نسبة صغيرة فقط من هذه التتابعات المنسوخة نتيجة لإجراء عمليات تجهيز وتعديل وحذف Splicing لتتابعات كثيرة من ر. ن. أ. النووى قبل خروج ر. ن. أ. النهائى إلى السيتوبلازم.

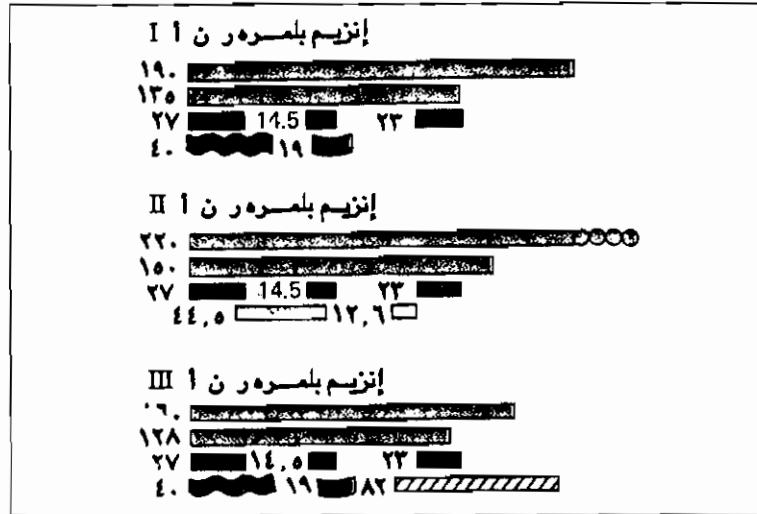
أنواع انزيمات بلمرة ر. ن. أ. فى مميزة النواة:

على العكس مما وجد فى غير مميزة النواه حيث يعمل انزيم بلمرة ر. ن. أ. واحد لانتاج الأنواع المختلفة من ر. ن. أ. تبين أنه فى مميزة النواة توجد ثلاثة أنواع مختلفة من انزيمات بلمرة ر. ن. أ. وهى:

- ١- انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase I ويختص ببناء السلاسل الطويلة الخاصة بجزئيات ر.ن.أ الريبوسومي rRNA.
- ٢- انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase II ويختص بنسخ سلاسل جزئيات ر. ن. أ المراسل mRNA.
- ٣- انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase III ويقوم ببناء عدد من سلاسل ر. ن. أ القصيرة مثل ر.ن.أ الناقل و ر.ن.أ الريبوسومي قصير السلسلة (5S rRNA).

يتكون كل انزيم من هذه الانواع الثلاثة من عدد من تحت الوحدات. وقد تتشابه الانزيمات الثلاثة في بعض مكوناتها من تحت الوحدات إلا أنها تحتوى على تحت وحدات فريدة تميز كل نوع من هذه الانزيمات كما فى الشكل (٧-١) وعلى العكس من انزيم بلمرة ر.ن.أ فى البكتريا الذى يمكنه مباشرة الارتباط بمنطقة تتابع المستبدئ Promoter، نجد أن انزيمات بلمرة ر.ن.أ فى مميزة النواة لا يمكنها أن ترتبط بتتابع المستبدئ إلا فى وجود بعض البروتينات النوعية الموجودة بالفعل على جزئ د.ن.أ نفسه.

تحتوى خلية الثدييات عادة على حوالى ٤٠٠٠٠ جزئ من انزيم البلمرة RNA Polymerase II وعلى نفس العدد تقريباً من انزيم البلمرة RNA Polymerase I وحوالى ٢٠٠٠٠ جزئ من انزيم البلمرة RNA Polymerase III. علماً بأن التركيز الفعلى لانزيمات البلمرة يختلف حسب معدل نمو الخلية.



الشكل (٧-١): رسم تخطيطي يبين الاختلافات في تركيب تحت الوحدات البروتينية المكونة لإنزيمات بلمرة ر.ن.أ في مميزة النواة (الخميرة). تظهر تحت الوحدات المتشابهة بنفس المظهر. يظهر الوزن الجزيئي لتحت الوحدات بالكيلو دالتون. وتأخذ تحت الوحدات الثلاثة المتماثلة في الوزن الجزيئي في الإنزيمات الثلاثة اللون الأسود الداكن

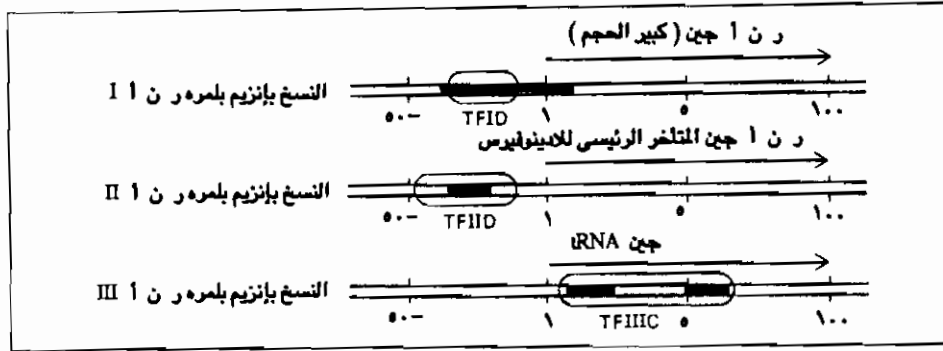
دور عوامل النسخ Transcription Factors في الارتباط بالمستبدئ

:Promoter

لا يمكن لإنزيمات بلمرة ر.ن.أ التعرف مباشرة على منطقة المستبدئ في مميزة النواة، ولكن لا بد أولاً من حدوث ارتباط لبروتينات نوعية مع تتابعات معينة في د.ن. أ القالب لتنشيط المستبدئ وتحفيزه على الدخول في عملية النسخ. يطلق على هذه البروتينات النوعية اسم عوامل النسخ Transcription Factors (TF) وهي ضرورية لبدء بناء ر.ن.أ، وهي تختلف عن عوامل بدء النسخ في غير مميزة النواة (عامل سيجما) في أنها ترتبط بجزء د.ن.أ مستقلة

عن انزيم بلمرة ر. ن. أ. تتعرف كل من الانزيمات الثلاثة على مستبدئ Promoter ذو نوعية مختلفة ويحتاج كل منها في الغالب إلى عوامل نسخ (TF) مختلفة عن الآخر ويرمز اليها بـ TFI, TFII, TFIII ، على الترتيب. ويكون الرمز متبوعاً بحرف يدل على اسبقية اكتشافه. فمثلا TFIIIA كان أول عامل نسخ اكتشف للعمل مع انزيم RNA Polymerase III.

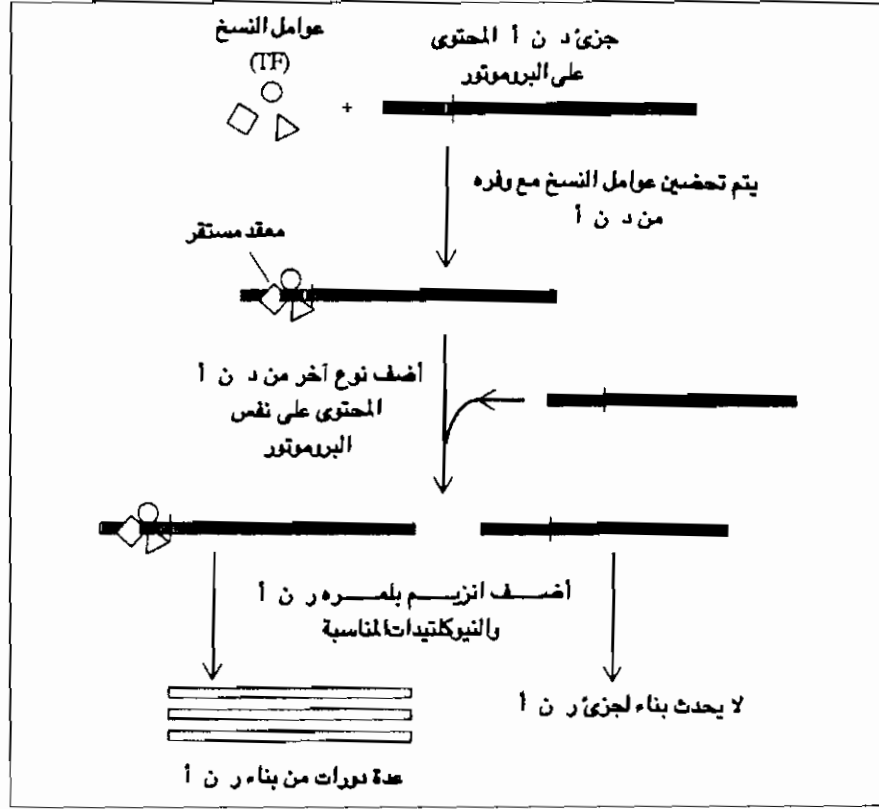
دلت الدراسات المعملية *In Vitro* على أن عوامل النسخ TF عبارة عن معقدات نسخ ثابتة نسبياً وتقوم بجذب جزئيات انزيمات بلمرة ر. ن. أ انتقائياً لمنطقة تتابع الابتداء النوعية والخاصة بكل منها. ويرتبط كل من عوامل النسخ المختلفة بالمنطقة الخاصة به في المستبدئ Promoter على سلسلة د. ن. أ القالب. ويكون كلا من انزيم البلمرة ر. ن. أ I، وانزيم بلمرة ر. ن. أ II معقدات مع كل من عوامل النسخ النوعية الذي يرتبط به قبل موقع بدء النسخ (Upstream) مباشرة. إلا أن عوامل النسخ الرئيسية لانزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Pol. III ترتبط في نقطة لاحقة Downstream بعد موقع بدء النسخ مباشرة مما يعنى أن انزيم RNA Pol. III لابد أن يقوم بنسخ منطقة ارتباط عامل النسخ بدون أن يزيع أو يزيل عامل النسخ من على قالب د. ن. أ كما فى الشكل (٧-٢) يبدو أن هذا العامل (TFIII C) يؤدي إلى إنشاء د. ن. أ حول نفسه لتكوين حبيبة كبيرة من البروتين النووى.



الشكل (٢-٧): تكوين معقدات مستقرة لعوامل النسخ (TF) على الجين (في د.ن.أ) تدل المستطيلات السوداء على مواقع التتابعات الضرورية لنشاط البروموتور. والمنطقة المظلمة تدل على الجزء من الجين المرتبط بعوامل النسخ. تدل الأرقام على المواقع على جزئ د.ن.أ (مقدرة بعدد أزواج النيوكليوتيدات) بالنسبة لموقع بدء النسخ (+١).

وقد تبين أنه لا بد من تكوين معقد مستقر وثابت نسبياً بين عامل نسخ معين وبين منطقة المستبدى Promoter حتى يمكن ضمان انتظام عملية النسخ بصفة مستمرة. وقد امكن التحقق من ذلك بتجربة معملية تم فيها مقارنة تأثير تحضين د.ن.أ مع عامل النسخ المناسب، في حين اضيف العامل نفسه إلى نفس د.ن.أ في التجربة المقارنة ولكن بدون اعطاء فترة التحضين المناسبة.

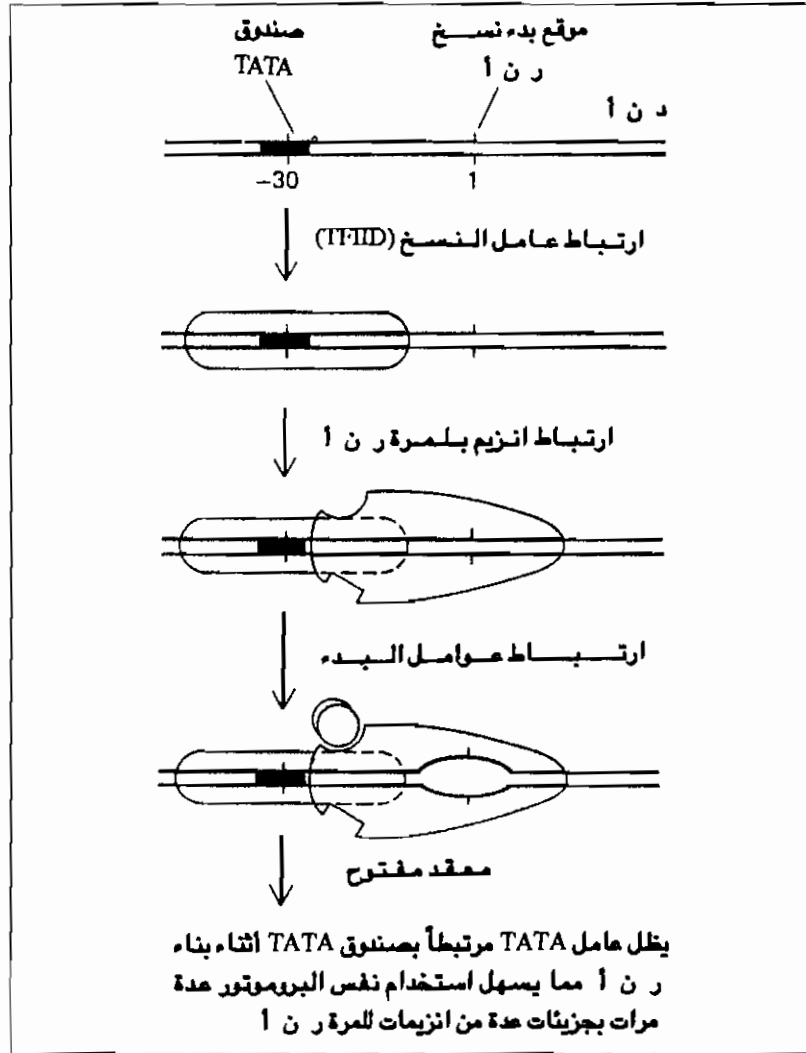
تبين أنه في الحالة الأولى كانت فترة التحضين كافية لتكوين معقد ثابت ومستقر من د.ن.أ وعامل النسخ، وبذلك نشطت عملية النسخ عدة مرات لهذا الجزئ من د.ن.أ في حين لم يتسنى ذلك لنفس الجزئ من د.ن.أ نتيجة لعدم إتاحة الفرصة لتكوين المعقد المذكور كما في الشكل (٣-٧).



الشكل (٧-٣): تجربة معملية لإثبات ضرورة تكوين معقد نسخي مستقر في منطقة البروموتور في مميزة النواه حتى يمكن بدء عملية النسخ

يوجد عامل نسخ هام جداً لعدد كبير من تتابعات المستبدى Promoter لانزيم RNA Pol II وهو TFIID والذي يتكون من معقد بروتيني كبير الحجم ويطلق عليه عادة عامل TATA لانه يرتبط نوعياً بتتابع نوعى محفوظ Consensus Sequence غنى فى A-T يسمى صندوق [TATA Box] يتمركز عند حوالى (٢٥-) قاعدة قبل موقع بدء النسخ (+١) ويؤدى نشاط عامل النسخ

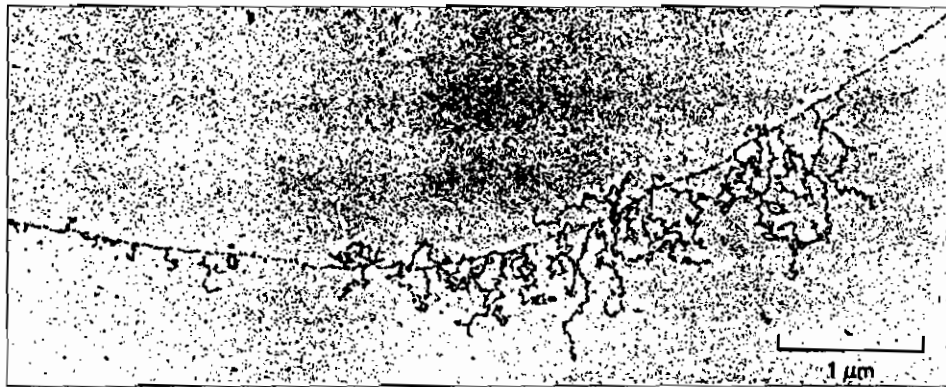
TATA إلى تحفيز النشاط النسخي لانزيم RNA Pol. II كما هو مبين في الشكل (٤-٧).



الشكل (٤-٧): ميكانيكية التعرف على منطقة البروموتور بواسطة إنزيم بلمرة رن. أ. II في مميزة النواة. لا بد من ارتباط عامل النسخ (TFIID) بصندوق TATA لتكوين معقد نسخي مستقر قبل أن يتمكن الانزيم من التعرف على البروموتور

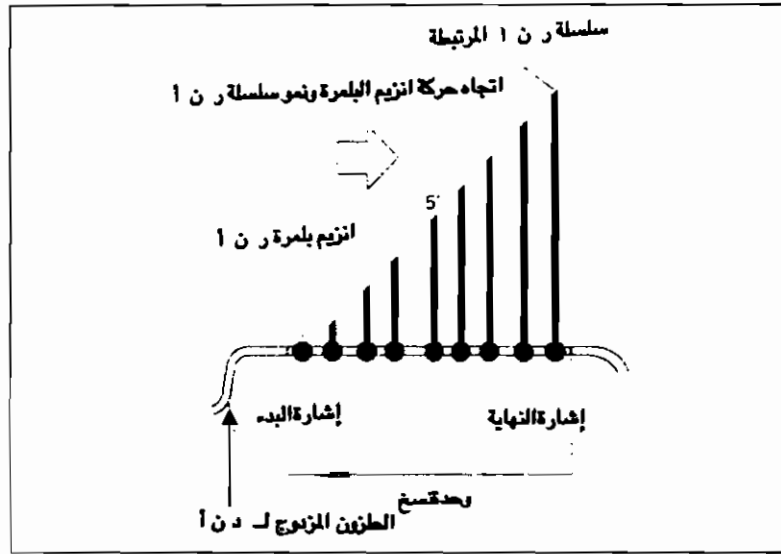
اختلاف النشاط النسخي لأنزيم RNA Pol. II حسب تتابعات د.ن.أ. القالب:

وجد أن انزيم RNA Pol. II المشترك فى عملية النسخ يبدو تحت المجهر الإلكتروني كحبيبات كروية تجر وراءها ذيلًا من سلسلة تمثل ر.ن.أ. وجد أن هذه الحبيبات تبدو عادة كوحدات متباعدة نسبيًا. ويشير ذلك إلى أن معظم الجينات التى يتم نسخها إلى جزيئات ر.ن.أ. أولية (Precursors) تكون ذات تكرار منخفض وقد يفسر ذلك على أساس إتاحة الفرصة لوحدة من انزيم البلمرة لاتمام عملية النسخ لجين معين قبل أن تبدأ وحدة انزيمية أخرى فى عملية النسخ. ولكن يحدث أحيانا أن عدداً كبير نسبياً من جزيئات انزيم بلمرة ر.ن.أ. II (مرتبطاً بها سلاسل ر.ن.أ. النامية) تكون متجمعة مع بعضها. تظهر هذه التجمعات بصفة خاصة فى التتابعات التى تمثل عدد محدود من الجينات التى يتم نسخها بتكرار أكبر كما فى الشكل (٧-٥).



الشكل (٧-٥): منطقة من الكروماتين تحتوى على جين يتم نسخه بمعدل عالى جداً بحيث تظهر عدة جزيئات من انزيم بلمرة ر.ن.أ. II ملتصقة بنواتج نسخها من سلاسل ر.ن.أ. فى نفس الوقت، ويكون اتجاه النسخ من اليسار إلى اليمين

يتزايد طول سلاسل ر.ن. أ المرتبطة بالانزيم في مثل هذه التجمعات في اتجاه النسخ مما يعطيها طرازاً مميزاً بحيث يحدد هذا الطراز مواقع بدء وإنهاء أو توقف انزيم بلمره ر.ن. أ II بالنسبة لكل وحدة نسخ نوعية Transcription Unit كما في الشكل (٦-٧).



الشكل (٦-٧): وحدة نسخ نموذجية. مبيناً اتجاه النسخ ومواقع البدء والتوقف في الوحدة

- يمكن تلخيص النتائج الهامة التي توصلت إليها الدراسات البيوكيميائية الموازية للنتائج المتحصل عليها من المجهر الالكتروني في النقاط التالية:
- ١- أن جزئيات انزيمات بلمرة ر.ن. أ في مميزة النواه (كما في غير مميزة النواة) تبدأ وتنتهي النسخ عند مواقع نوعية محددة على الكروموسوم.
 - ٢- أن متوسط طول سلسلة ر.ن. أ الناتجة من أنزيم البلمرة RNA Pol II في وحدة النسخ يبلغ حوالى ٨٠٠٠ نيوكلييدة وقد يزيد إلى أكثر من ٢٠٠٠٠ نيوكلييدة. أن هذا الطول الكبير نسبياً، والذي يزيد كثيراً عن الطول

المتوسط لسلسلة mRNA الناضج الذى يدخل فعلاً فى عملية الترجمة إلى بروتين والذى يبلغ حوالى ١٢٠٠ نيوكليوتيد (يشفر لبروتين بطول ٤٠٠ حامض امينى). قد يعكس التركيب المعقد للجين فى مميزة النواة وخاصة وجود عدد من الانترونات Introns فى النسخ الأولية للجين والتي يتم استئصالها فى المرحلة اللاحقة لتجهيز mRNA النهائى أو الناضج Mature mRNA كما سيأتى بعد.

٣- على الرغم من أن معدل استطالة سلسلة ر.ن.أ يبلغ فى المتوسط حوالى ٣٠ نيوكليوتيد فى الثانية على مستوى جميع أنواع ر.ن.أ فإن مواقع بدء النسخ المختلفة لجزيئات انزيم بلمره ر.ن.أ II تختلف كثيراً فى درجة كفاءتها بحيث يتم نسخ بعض الجينات بمعدل اسرع عن الأخرى.

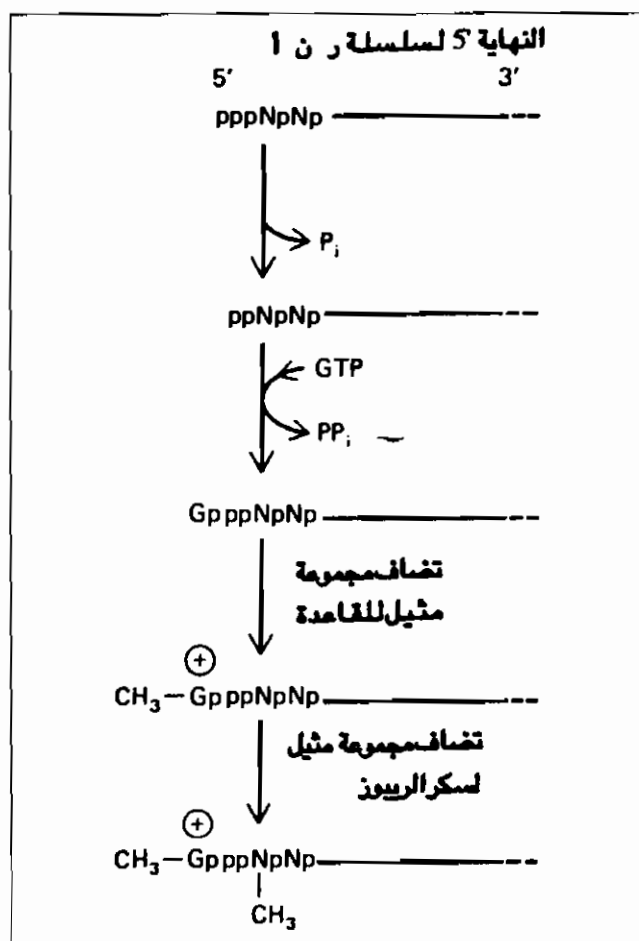
تعديل أو تجهيز النسخ الأولية لسلاسل mRNA : RNA Processing

تعرف النواتج الأولية لعملية النسخ بواسطة انزيم RNA Pol. II باسم جزيئات ر.ن.أ غير المتجانس النووى (hnRNA) وترجع هذه التسمية إلى أن هذه الجزيئات تكون غير متجانسة فى احجامها الأولية بمجرد انتاجها فى النواه.

يكون مصير قليل من هذه النسخ الأولية أن تترك النواه فى صورة جزيئات ر.ن.أ المرسل mRNA إلا أن ذلك لا يحدث قبل أن تتم بها عملية تحويل تساهمية عند كل من النهاية 5' والنهاية 3' أثناء عملية النسخ وهذه التعديلات هامة جداً وضرورية لحسن اداء سلاسل mRNA لوظيفتها فى الترجمة فى السيتوبلازم كما سيأتى بعد.

يتم أولاً التعديل أو التحوير في النهاية 5' لسلسلة ر.ن.أ (وهي النهاية المتكونة أولاً أثناء عملية النسخ) وذلك بإضافة ما يسمى بقلنسوة Cap الجوانين المميثلة Methyated – G Nucleotide. وتحدث التغطية بالقلنسوة مباشرة عقب بناء الثلاثين نيوكلييدة الأولى في سلسلة ر.ن.أ النامية. وتشتمل على تكثيف مجموعة الفوسفات الثلاثية لجزئ GTP مع مجموعة ثنائية للفوسفات متبقية على النهاية 5' للسلسلة النامية كما في الشكل (٧-٧) وتقوم هذه القلنسوة بدور رئيسي في عملية استبداء بناء البروتين كما يبدو أنها تقوم بحماية النسخة النامية من ر.ن.أ من عمليات التحلل والهدم.

ولا تتحدد النهاية 3' لمعظم سلاسل ر.ن.أ المراسل mRNA بمنطقة انتهاء النسخ أو توقفة (حيث أن النسخ يستمر ويتجاوز هذه النهاية النوعية في الناتج الأولى hnRNA).



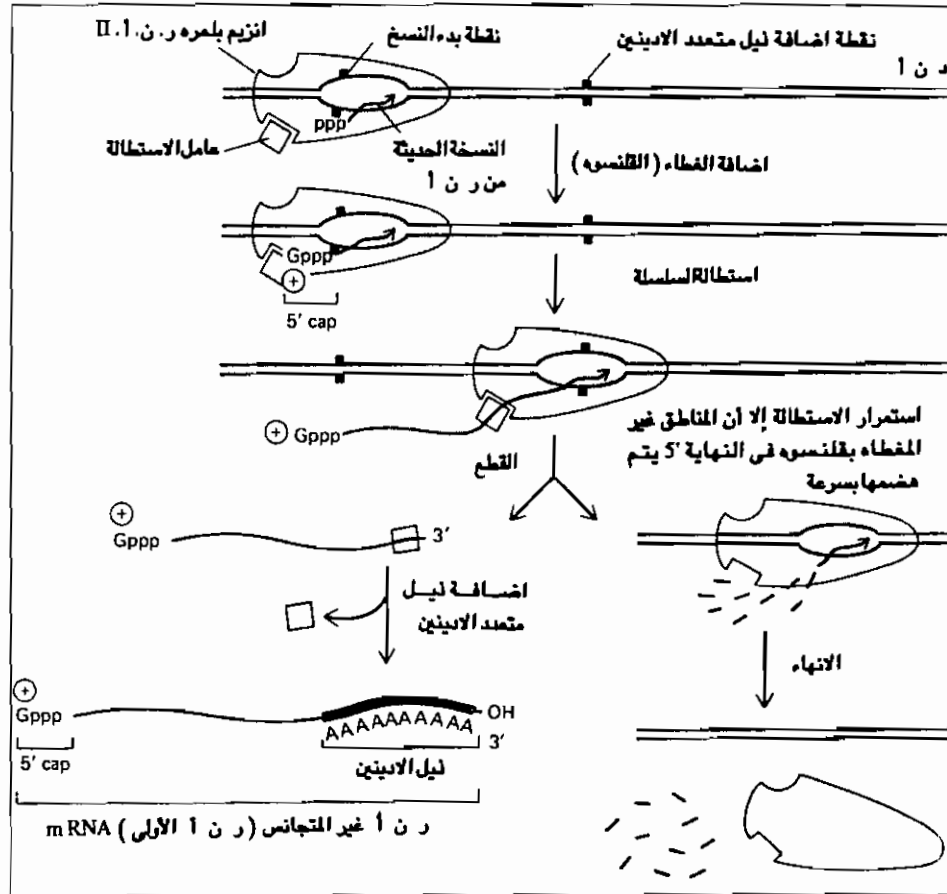
الشكل (٧-٧): تفاعلات تكوين الغطاء (القلنسوة) عند النهاية '5 لسلسلة ر.ن.أ الجارى بناؤها بواسطة الزيم بلمرة ر.ن.أ II

ولكنها تتميز بتحويل أو تعديل من نوع آخر بحيث يحدث كسر نوعي للسلسلة النامية عند موقع محدد، ثم يضاف إلى النهاية '3' المكسورة ذيل من عديد الادينين polyA tail بواسطة انزيم بلمرة مستقل بحيث يصل طول هذا الذيل إلى حوالي ١٠٠-٢٠٠ أو أكثر من قواعد الادينين. يتم التعرف على نقطة

الاشارة المميزة لمكان الكسر أو القطع بظهور التتابع النوعي القصير: AAUAAA فى سلسلة ر.ن. أ والتي تقع على بعد ١٠-٣٠ نيوكليتيده قبل موقع القطع واطافة الذيل. بعد احداث الكسر أو القطع مباشر يقوم انزيم Poly A Polymerase باضافة ذيل متعدد الأدينين إلى النهاية 3 فى سلسلة ر.ن.أ لاتمام النسخة المبدئية أو الأولية من ر.ن.أ كما فى الشكل (٧-٨).

لم تتحدد حتى الآن وظيفة ذيل polyA على وجه الدقة، ولكنه قد يكون له دور فى تسهيل خروج ر.ن.أ المراسل mRNA الناضج من النواه، كما يعتقد أنه يلعب دوراً فى ثبات أو استقرار جزيئات mRNA بحيث يؤخر عملية هدمها فى السيتوبلازم حتى يمكنها أن تشارك فى عدد محدد من دورات الترجمة قبل هدمها. وقد تبين بالفعل أنه فى غياب ذيل polyA فإن نسخ mRNA يتم هدمها بسرعة كبيرة.

على الرغم من أن نواتج نسخ انزيم بلمرة ر.ن.أ II تمثل أكثر من نصف ر.ن.أ الاجمالى المنتج فى الخلية، إلا إن معظم هذه النسخ تكون غير ثابتة وقصيرة العمر، بحيث أن ما يتبقى منها بالفعل فى وقت ما بالخلية لا يمثل إلا نسبة ضئيلة جداً من إجمالى ر.ن.أ كما فى الجدول (٧-١).



الشكل (٧-٨): بناء جزئ ر.ن.أ غير المتجانس النووي hnRNA بواسطة انزيم بلمره ر.ن.أ. II وإضافة ذيل من متعدد الاديين polyA إلى سلسلة ر.ن.أ مما يؤدي إلى كسر السلسلة ليتسنى إضافة هذا الذيل

الجدول (٧-١) بعض المقادير النسبية من أنواع ر.ن.أ.
في خلية نموذجية للتدييات

نوع ر.ن.أ.	الكمية المنتجة الأولية (كنسبة من إجمالي ر.ن.أ.)	*الكمية المتبقية بالفعل (كنسبة من إجمالي ر.ن.أ.)
rRNA (في النواة)	٣٩ %	٤ %
rRNA (في السيتوبلازم)	—	٧١
hnRNA (في النواة)	٥٨*	٧
mRNA الناضج (في السيتوبلازم)	—	٣
tRNA	٣	١٥

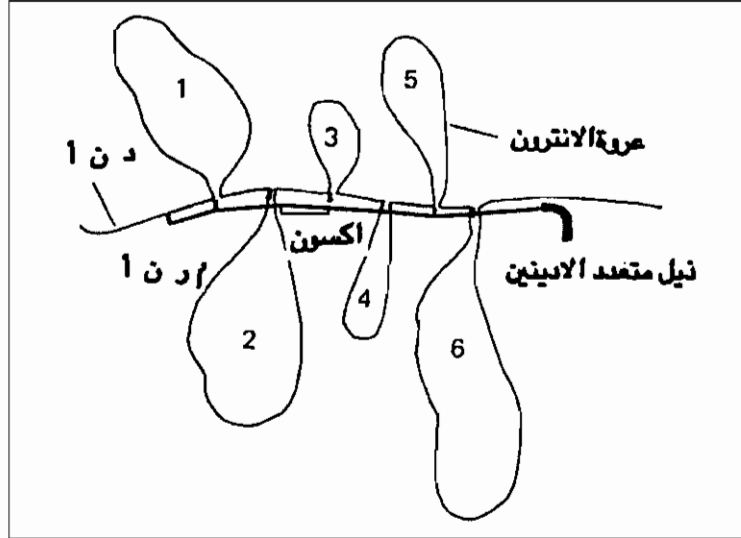
* يلاحظ أنه على الرغم من أن معظم ر.ن.أ. الأولى المنسوخ يكون في صورة hnRNA إلا أن معظمه يتم هدمه وبذلك فإن النسبة المتبقية في صورة mRNA الناضج تكون ضئيلة جداً ولا تتعدى ٣% ر.ن.أ. في الخلية.

تبين أن كلا من عمليتي اضافة القلنسة G على النهاية 5' وإضافة الذيل polyA إلى النهاية 3' تحتاجان إلى نشاط انزيم RNA pol II بالاضافة إلى أحد عوامل الاستطالة Elongation Factor الذى يكون مرتبط بالانزيم أثناء عملية النسخ.

حذف تتابعات كبيرة متخللة من hnRNA أثناء تجهيز mRNA فى النواة:

ثبت أن النسخة الأولية الناتجة فى النواه من hnRNA تكون غير ثابتة إذ تبين أن طول جزئيات hnRNA الحديثة البناء ينخفض بسرعة بحيث يصل إلى طول جزئيات mRNA السيتوبلازمى بعد حوالى ٣٠ دقيقة فقط من انتاجها (من حوالى ٦٠٠٠ نيوكليتيده فى سلسلة hnRNA ينخفض العدد إلى حوالى ١٥٠٠

نيوكلتيده في سلسلة mRNA). وبعد هذه الفترة القصيرة تبدأ جزيئات mRNA في الخروج من النواة بحيث لا يصل إلى ستيوبلازم الخلية إلا حوالي ٥% فقط من إجمالي hnRNA الأصلي الذي انتج في النواة في حين يتم هدم معظم ما تبقى منه إلى شظايا قصيرة في النواة على مدى حوالي ساعة. تبين أن هذه التتابعات الطويلة التي يتم هدمها لا تقع بالمره على أى من طرفى السلسلة 5' أو 3' ولكنها تكون متخللة للسلسلة في مناطق وسطية. وقد تحقق ذلك عند مقارنة تتابعات النيوكليوتيدات في سلسلة mRNA معين بالتتابعات المقابلة فى د. ن. أ المستخدم كقالب للنسخ باستخدام تقنية التهجين بين ر. ن. أ / د. ن. أ والتحليلات الجزيئية للمقارنة بين تتابعات د. ن. أ الاصلية وتتابعات mRNA النهائى حيث ظهر وجود تتابعات متخللة فى د. ن. أ غير موجودة فى mRNA المنسوخ عليها وذلك فى حالات متعددة مثل جين β -globin و Ovalbumin فى الفقاريات. أى أن الجين فى مميزة النواة لا يتكون من تتابعات شفرية مستمرة بل تتخلله تتابعات غير شفرية طويلة، بعكس جينات غير مميزة النواة التى تتكون من تتابع شفرى مستمر. ويطلق على التتابعات التى توجد فى د. ن. أ مميزة النواة ولكنها تحذف من mRNA اسم الانترونات Introns فى حين تسمى التتابعات الشفرية الموجودة فى mRNA تتابعات الاكسونات Exons كما فى الشكل (٧-٩).

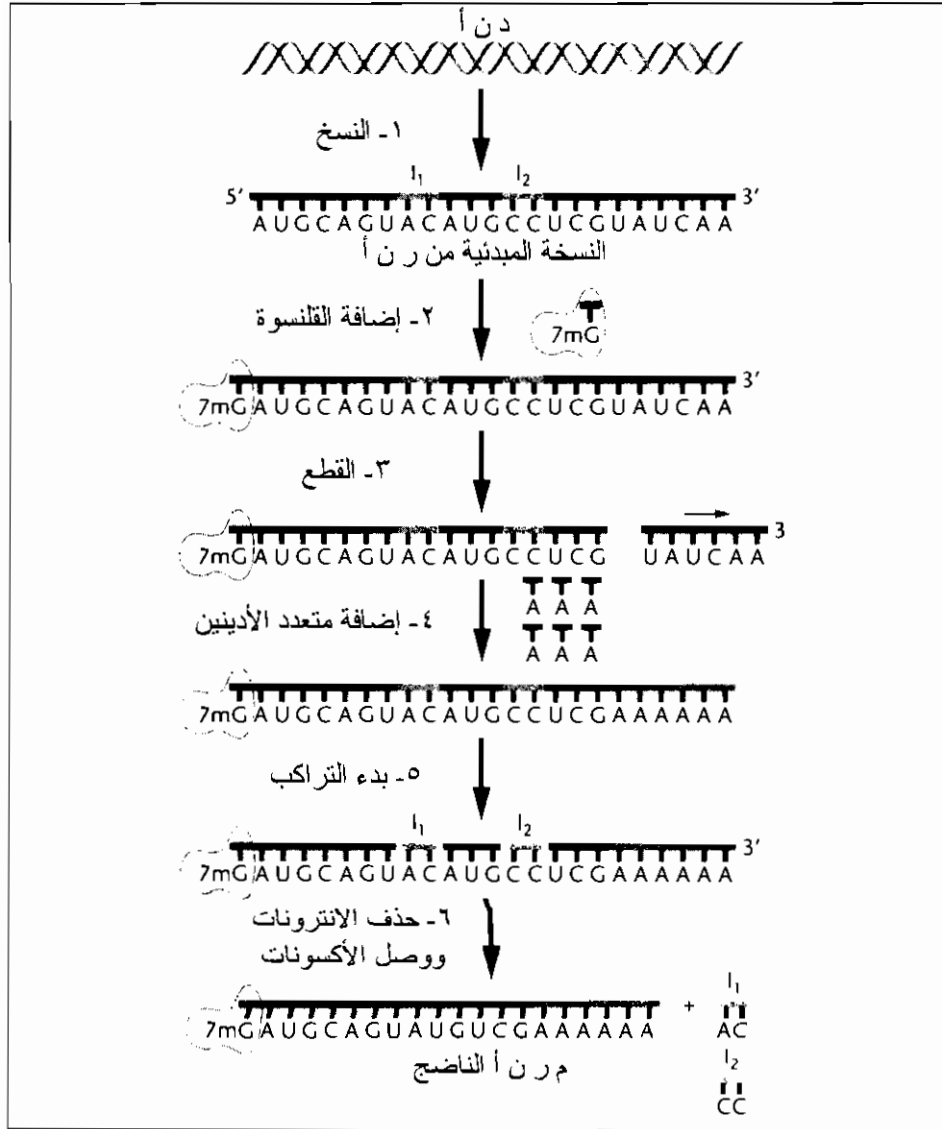


الشكل (٧-٩): اثبات وجود انترونات في جينات مميزة النواة بتجربة التهجين بين د.ن.أ و ر.ن.أ حيث يتم هنا انتاج بيثا جنوبيين mRNA ويتم عزله وتنقيته من الخلايا المتخصصة في انتاجه. ثم تجرى تجربة تهجين من mRNA ومنطقة د.ن.أ المحتوية على هذا الجين. تبدو المناطق من جزئ د.ن.أ التي لا يحدث بها تهجين مع ر.ن.أ كمرواح ممتدة إلى الخارج وهي تمثل الانترونات في هذا الجين

تراكب ر. ن. أ المراسل RNA splicing:

يتم حذف أو استبعاد تتابعات الانترونات المتخللة لجزئ hnRNA أثناء عملية تجهيز mRNA، ثم توصل تتابعات الاكسونات ببعضها بعملية تشبه القص/ واللصق ر. ن. أ RNA Splicing حيث تتبعج الإنترونات للخارج في صورة عرواح Lariats قبل إستبعادها. من المعروف أن النسخة الأولية من hnRNA مطابقة في الطول والتتابع لمنطقة القالب من د.ن.أ المنسوخة عليه، بحيث تحتوي هذه النسخة على جميع الأكسونات والإنترونات، في حين نجد أن تلك الأخيرة تحذف أو تستبعد أثناء تجهيز mRNA. تحدث هذه العملية في نواه

الخلية قبل أن يخرج mRNA إلى السيتوبلازم، بحيث يحتوى فقط على تتابعات الإكسونات التى تشفر لسلسلة متعدد ببتيد نوعى عند الترجمة على الريبوسومات. تمثل تتابعات الإنترونات فى hnRNA نسبة كبيرة جداً من الطول الكلى للجزئ، ويختلف طول وعدد هذه الإنترونات من جين إلى آخر. ويفسر ذلك كيف يتبقى من الطول الكلى للنسخة الأصلية من hnRNA (حوالى ٥٠٠٠٠ نيوكليتيده) تتابع قصير فقط من mRNA يتراوح بين ٥٠٠، ٣٠٠٠ نيوكليتيده فقط. ويبين الشكل (٧-١٠) مراحل عملية تجهيز ر.ن. أ بعد نسخه .Postranscriptial Processing



الشكل (٧-١٠): عملية تجهيز جزئ ر ن أ بعد النسخ في مميزة النواة Post transcription. يتم تعديل جزئ ر ن أ النووي غير المتجانس (hnRNA) و تحويله إلى mRNA الذي يحتوي على القلنسوة 5'G cap ونيل متعدد الأدينين على النهاية 3', ثم تتم إزالة الإنترونات

دور البروتينات النووية الصغيرة snRNP في عملية التراكب :Splicing

يتم تكثيف سلسلة ر. ن. أ المنسوخة حديثاً بسرعة إلى مجموعات متجاورة من الحبيبات المحتوية على بروتينات وتتكون كل حبيبة من حوالي ٥٠٠ نيوكليتيده من ر. ن. أ ملتفة حول معقد بروتيني يقوم بتكثيف وتجهيز كل نسخة نامية من ر. ن. أ وهذا المعقد يشبه إلى حد ما تركيب النيوكليوسومات في الكروماتين.

يمكن فصل وتنقية حبيبات hnRNP's الناتجة (وتسمى حبيبات الريبونيوكلوبروتين النووية غير المتجانسة) بعد معاملة النواة بإنزيم الريبونيوكليليز RNase بطريقة تسمح فقط بهدم شريط ر. ن. أ الرابط بين الحبيبات. تترسب هذه الحبيبات عند 30S ويبلغ قطر كل منها ضعف قطر النيوكليوسوم (أى حوالى 20nm). يتكون بروتين اللب أو البروتين المركزى فى كل حبيبة من حوالى ثمانية أنواع مختلفة من البروتينات يتراوح مجموع وزنها الجزيئى بين ٣٤٠٠٠ إلى ١٢٠٠٠٠ دالتون. وتعد هذه البروتينات أكثر البروتينات وفرة فى النواة بعد الهستونات. تحتوى كل من هذه البروتينات الثمانية على نسخه أو أكثر من تتابع مشترك قصير ونوعى من الاحماض الأمينية.

تبين وجود بعض الحبيبات الثابتة (المستقرة) والتي تكون أقل شيوعاً فى النواة عن الحبيبات السابقة. وتوحى مواقعها على سلاسل ر. ن. أ بأنها تقوم بدور هام فى عملية التراكب Splicing. تتكون هذه الحبيبات بسرعة جداً عند نقاط الالتقاء بين تتابعات الانترونات والاكسونات. وكلما استطالت سلسلة ر. ن. أ

يحدث التحام بين هذه الحبيبات فى أزواج لتكوين معقد كبير يسمى Spliceosome الذى يقوم بعملية التراكب Splicing (القطع والربط) فى سلاسل ر.ن.أ.

أظهرت نتائج التجارب البيوكيماوية أن النواه تحتوى على عدد من المعقدات المتكونة من بروتينات مقترنة مع ر.ن.أ قصير السلسلة (لا يزيد طول السلسلة عن ٢٥٠ نيوكليتيده). وقد اطلق على هذه المعقدات اسم معقدات البروتينات الريبونووية الصغيرة Small Nuclear Ribonucleoproteins (sn RNP's) ويرمز اليها كالاتى:

U1, U2, U3,..... U12 RNA'S وهى تشبة فى تركيبها الريبوسومات من حيث حدوث اقتران فى كل منها بين ر.ن.أ والبروتينات إلا أنها أصغر بكثير فى الحجم عن الريبوسومات حيث يصل وزنها الجزيئى إلى حوالى ٢٥٠٠٠٠ دالتون مقابل ٤,٥ مليون دالتون للريبوسوم.

تبين أن كل من هذه الأنواع من sn RNP's تقوم بالتعرف على تتابع نوعى فى سلسلة hnRNA من خلال التزاوج التكاملى بين القواعد RNA/ RNA وتشارك بعض هذه المعقدات الصغيرة فى عملية التراكب Splicing كما أن بعضها يقوم بدور فى تفاعلات الكسر Cleavage التى تؤدى إلى تكوين نهايات 3' لبعض سلاسل ر.ن.أ حديثة التكوين.

يتم حذف الانترونات فى شكل عروات Lariat:

تختلف الانترونات فى الطول ما بين ٨٠ نيوكليتيده إلى ١٠٠٠٠ نيوكليتيده أو أكثر وتختلف عن الاكسونات فى أن تتابعات القواعد فيها ليس لها دور أو أهمية محددة حتى الآن لذلك يعتقد بأن الانترونات قد تراكتت بها الطرفان

بمعدل سريع أثناء التطور. كما أنه من الممكن تغيير معظم تتابعات الانترونات بدون أن يصاحبه أى تغيير يذكر فى وظيفة الجين. وقد أدى ذلك على افتراض أن الانترونات ليس لها وظيفة بالمرّة وأنها تمثل غالباً "مخلفات وراثية" Genetic Junk وهو ما سوف نتعرض له فيما بعد. وقد وجد أن أهم التتابعات الثابتة أو المحفوظة فى الانترون هى تلك التتابعات المطلوبة لاستبعاد أو استئصال الانترون حيث تبين وجود تتابع نوعى محفوظ Consensus Sequence عند كل من نهايتى منطقة الأنترون. وأن هذا التتابع المحفوظ يتشابه تقريباً فى جميع الانترونات المعروفة حتى الآن. وجد أن تغيير (بالطفرة) فى هذا التتابع المحفوظ يقلل من فاعلية عملية التراكب Splicing ويؤثر سلبياً على حذف الانترونات من النسخة الأولية لجزئ ر.ن.أ hnRNA.

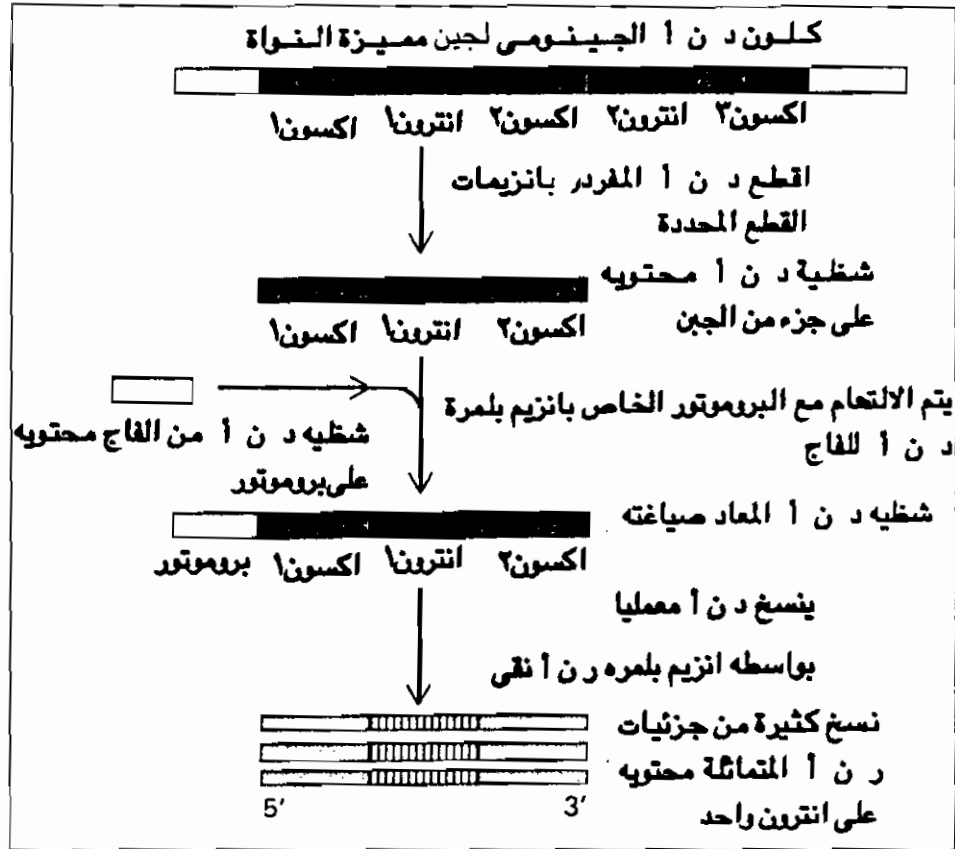
توجد هذه التتابعات الطرفية عند موقعين نوعيين من مواقع التراكب Splice Site وهما مواقع التراكب 5' Splice Site ويسمى الموقع المعطى أو الواهب Donner Site وموقع التراكب 3' Splice Site ويطلق عليه الموقع المستقبل Acceptor Site كما هو موضح بالشكل (٧-١١).

اكسون 5'	انترن	اكسون 3'
5'---C---A--- or A G GU or A G U A G	U U U U U U U U U U U or or or or or or or or or C C C C C C C C C C C	C G or AG or U A
التتابع المحفوظ لموقع التراكب 5' (الموقع الواهب)	التتابع المحفوظ لموقع التراكب 3' (الموقع المستقبل)	

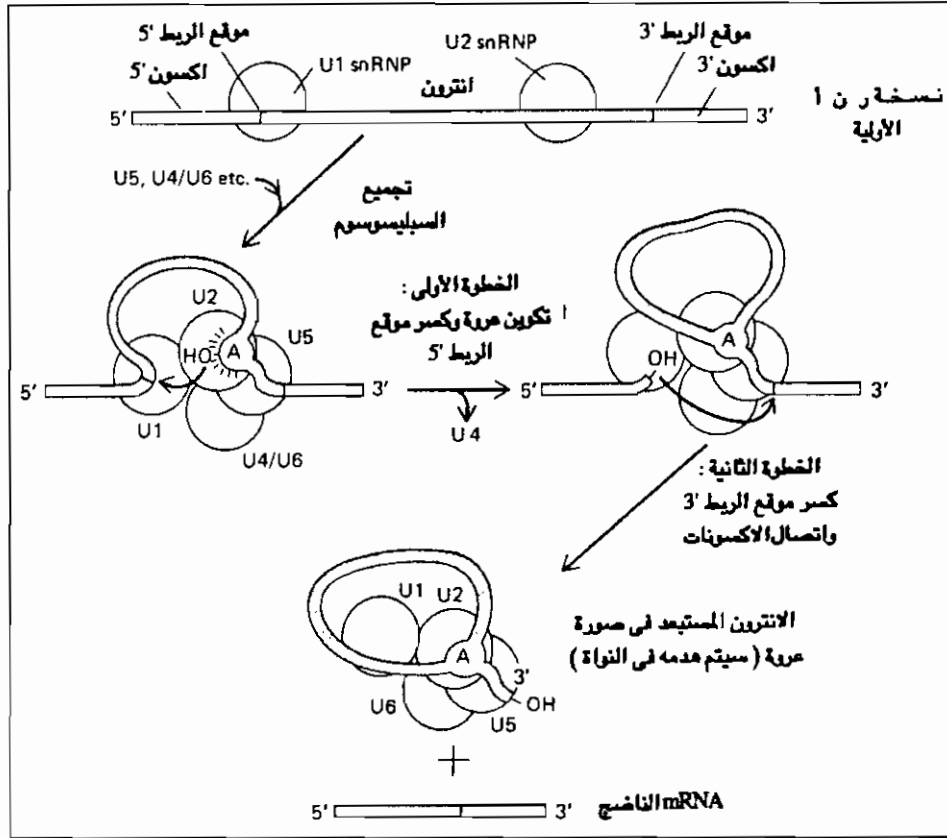
الشكل (٧-١١): التتابعات النيوكليدية المحفوظة Consensus Sequences لمواقع الربط 5', 3' المستخدمة فى تجهيز سلسلة ر.ن.أ. ويلاحظ أن الثنائى النيوكليدى المظلل على الجانبين يكون عادة ثابتاً ولا يتغير

لابد أن تتم تفاعلات التراكب (الحذف وإعادة الالتحام) Splicing لسلسلة ر.ن.أ بدقة متناهية حيث أن أى خطأ حتى ولو لم يتجاوز نيوكلييدة واحدة سيؤدى إلى تغيير فى إطار القراءة فى جزئ ر.ن.أ المراسل النهائى الناتج وقد يؤدى إلى طفرات عديدة المعنى.

أمكن دراسة عملية استبعاد أو حذف تتابعات الإنترونات بتجربة معملية *In Vitro* حيث تم الحصول على أحد الأنواع التركيبية من سلاسل ر.ن.أ الأولية المحتوية على انترون واحد عن طريق تحضين تتابع محدد من د.ن.أ مع أنزيم بلمرة ر.ن.أ النشط كما فى الشكل (٧-١٢) وعند إضافة هذه الجزيئات الناتجة من ر.ن.أ الأولى إلى مستخلص خلوى، تبين أنه يتم فيها عملية التراكب splicing فى تفاعل انزيمى من خطوتين وفى وجود ATP وبعض الأنواع المختارة من البروتينات النووية الصغيرة وخاصة : U1, U2, U5, sn RNP's و U4/U6 وبعض بروتينات نوعية أخرى. وبعد إتاحة فترة تحضين طويلة نسبياً، تتجمع هذه المعقدات أولاً فى معقد كبير يسمى سبليسوسوم Spliceosome. وقد أدى إمكان التعرف على أنواع ر.ن.أ التى تظهر كنواتج وسطية أثناء التفاعل بالإضافة إلى تحديد أنواع snRNP's المطلوبة لإنتاجها إلى اكتشاف أن الانترون يستأصل فى صورة عروة Lariat كما يتبين فى مسار التراكب Splicing فى الشكل (٧-١٣).



الشكل (٧-١٢): شكل تخطيطي للطريقة المستخدمة لإنتاج كميات وفيرة من ر.ن. أ. النقي لدراسة عملية تراكم ر.ن. أ. معملياً. تعتمد الطريقة على القدرة على إنتاج كمية كبيرة من ننايات د.ن. أ. المرغوب بطرق الهندسة الوراثية بالإضافة إلى توفر انزيمات بلمرة ر.ن. أ. من الفاج T7 أو SP6 التي تقوم بنسخ د.ن. أ. معملياً بكفاءة عالية. ويربط شظايا د.ن. أ. مميزة النواة ببروموتور الفاج، فإن انزيم بلمرة ر.ن. أ. يمكن استخدامه لإنتاج كميات كبيرة من ر.ن. أ. معملياً مشفرة لشظايا د.ن. أ. ويمكن إضافة الغطاء ٥ الموجود في hnRNA إلى هذه الجزئيات من ر.ن. أ. بالطرق البيوكيماوية



الشكل (٧-١٣): دور السبليسوسوم (المكون من تجمع البروتينات الصغيرة U1, U2, U5, U6) في

وغيره من المكونات) في تراكب ر.ن.أ الأولى. بعد تجميع السبليسوسوم يتم التفاعل في خطوتين:

- ١- تقوم نيوكليتيده ادينوسية خاصة (A) موجودة بالقرب من موقع الربط 3' بمهاجمة موقع الاستبعاد 5' مما يؤدي إلى كسره. ثم ترتبط النهاية المكسورة تساهمياً بهذه القاعدة A مكونة نيوكليتيده متفرعة.
- ٢- يتم إضافة النهاية المعرضة 3'OH للأكسون الأول إلى بداية الإكسون الثاني مع إحداث كسر في جزئ ر.ن.أ عند موقع الربط 3' مما يؤدي إلى اتصال الإكسونين ببعضها واستبعاد الانترن في صورة عروة. تحدث هذه العمليات في النواة وتؤدي إلى إنتاج mRNA ناضج من النسخة الأولية لجزئ ر.ن.أ hnRNA.

أمكن تحديد بعض الوظائف النوعية التخصصية لبعض أنواع sn RNP's
 فمثلاً: U1 snRNP يرتبط بموقع التراكب 5' Splice Site وذلك بمساعدة تتابع
 نيوكليوتيدى فى U1 RNA المقترن فى هذا المعقد، حيث وجد أن هناك تتابع
 نيوكليوتيدى فى هذا المعقد الصغير يكون مكماً للتتابع النيوكليوتيدى المحفوظ
 المكون من ٩ نوكلتيدات فى هذا الموقع من الانترون وحيث أنه قد تبين أن
 RNA يمتلك خاصية العمل كإنزيم (Ribozyme) فإنه من المحتمل أن يكون ر .
 ن. أ نفسه أو المكونات البروتينية للسبليسوسوم هى المسئولة عن كسر وتكوين
 الروابط التساهمية التى تتطلبها عملية التراكب splicing.

حذف عدة إنترونات من كل جزئ من hnRNA:

حيث أن السبليسوسوم يتعرف أساساً على التتابع المحفوظ عند حدود كل
 انترون، لذلك فإن موقع التراكب 5' (الموقع المعطى) عند طرف أى إنترون
 معين يمكن أن يوصل بموقع التراكب 3' (الموقع المستقبل) لأى إنترون آخر
 أثناء عملية القطع والربط Splicing. وعلى ذلك فعندما أجريت تجربة لضم
 النصفين 5', 3' لانترونين مختلفين أمكن لانزيمات التراكب أن تتعرف على تتابع
 الانترون الهجين وتقوم بحذفها. وعلى ضوء هذه النتيجة أمكن معرفة أن جينات
 الفقاريات بصفة عامة تحتوى على عدد من الإنترونات قد تصل إلى ٥٠ إنترون
 كما فى الجدول (٧-٢).

الجدول (٧-٢) حجم بعض الجينات البشرية وعدد الايترونات بها

اسم الجين	* حجم الجين (Kbp)	حجم hmRNA (Kbp)	*** عدد الايترونات
بيتا جلوبيين β -globin	١,٥	٠,٦	٢
انسولين Insulin	١,٧	٠,٤	٢
بروتين كينيز (P.K.C)C	١١	١,٤	٧
البيومين Albumin	٢٥	٢,١	١٤
كتاليز Catalase	٣٤	١,٦	١٢
كولاجين Collagen	٣٨	٥	٥٠
مستقبل LDL	٤٥	٥,٥	١٧
عامل التخثر VIII	١٨٦	٩	٢٥
ثيروجلوبيولين Thyroglobulin	٣٠٠	٨,٧	٣٦
Dystrophin **	>٢٠٠٠	١٧	>٥٠

* يمثل حجم الجين هنا التتابعات المنسوخة لكل جين بالإضافة إلى التتابعات المنظمة المجاورة الخاصة بكل جين.

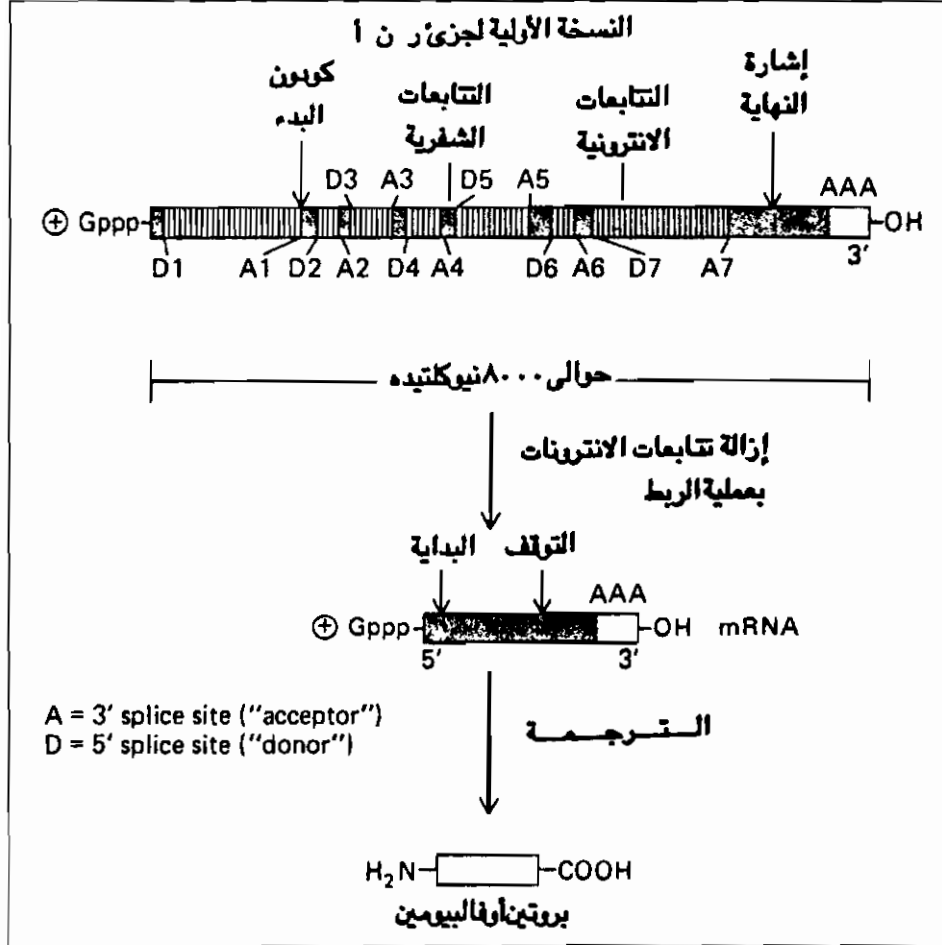
** يؤدي حدوث طفرة في هذا الجين إلى مرض ضمور العضلات Duchene M.D.

*** تعتبر جينات الهستونات والانتروفيريون من الأمثلة النادرة في جينات مميزة النواة التي تخلو من الايترونات.

وجد أنه إذا حدث خطأ في التزاوج بين مواقع التراكب 5'، 3' أثناء عملية تراكب ر.ن. أ Splicing. فإن ذلك سيؤدي حتماً إلى غياب بعض التتابعات الشفرية الهامة من mRNA الناتج مما يؤدي إلى عدم إنتاج بروتين فعال عند الترجمة ولكن يحدث بطريقة ما أن هذا الخطأ يمكن تلافيه كالأتي:

تبين أن ماكينة تراكب ر.ن.أ تضمن عادة أن كل موقع التراكب 5' يتزاوج فقط مع أقرب موقع تراكب 3' التالي له مباشرة في اتجاه مسار تتابع بناء ر.ن.أ (أي من 5' إلى 3') كما في الشكل (٧-١٤) ولم تعرف حتى الآن بطريقة محددة

الطريقة التي يتم بها هذا التزاوج المتتالي بين مواقع التراكب على الرغم من أن تجمع معقد السبليسوسوم في أثناء عملية نسخ سلسلة ر.ن.أ النامية يفترض أن له دور رئيسي في ضمان التزاوج الصحيح بين مواقع التراكب المناسبة.



الشكل (٧-١٤): النسخة الأولية لسلسلة ر.ن.أ لجين أوفالبيومين Ovalbumin في الدجاج مبينا الإزالة المنتظمة لسبعة إنترونات للحصول على mRNA الناضج الفعال. يرمز إلى موقع الربط 5' بالحرف D وإلى موقع الربط 3' بالحرف A في هذا الشكل

كما توجد بعض الأدلة على أن الدقة الكامنة في الشكل الثلاثي الأبعاد في سلسلة ر.ن.أ والذي تتخذه تتابعات الأنترونات والإكسونات قد تلعب دوراً رئيسياً في هذا الانضباط.

بناء ر.ن.أ الريبوسومي على مجموعة مترادفة من الجينات المتماثلة:

وجد أنه جينوم مميزة النواة يحتوى على نسخ متكررة ترادفياً من جينات rRNA موزعة في مجموعات على الكروموسومات المختلفة عند مناطق تنظيم النويات (Nucleolus Organizer Region (NOR، بحيث يكون كل جين (بطول يختلف من حوالى ٨٠٠٠ إلى ١٣٠٠٠ نيوكليوتيد حسب الكائن) منفصل عن الجين المجاور بتتابعات غير منسوخة تعرف بخيط د.ن.أ الرابط spacer الذى يختلف بدوره كثيراً في الطول وفي تتابع القواعد. ونتيجة للنظام التكرارى المترادف ووجود عدد كبير نسبياً من النسخ لكل من جينات rRNA، ونظراً لأن معدل النسخ فيها يكون سريعاً فإن ذلك يؤدي إلى إنتاج عدد كبير من نسخ ر.ن.أ الريبوسومي للوفاء باحتياجات الخلية العالية من جزيئات ر.ن.أ الريبوسومي التى تحتاجها لتكوين الريبوسومات اللازمة في عملية بناء البروتين كما سيأتى بعد.

يتم نسخ جينات rRNA بواسطة إنزيم بلمرة ر.ن.أ (RNA pol I) وينتج كل جين نفس النسخ الأولية من rRNA. يصل طول هذه النسخ الأولية في الإنسان والتي تعرف بـ 45S RNA إلى حوالى ١٣٠٠٠ نيوكليوتيد، وقبل أن تترك النواه في صورة حبيبات ريبوسومية بعد إقترانها بنوعيات معينة من البروتينات فى النوبة والتي يسمى البروتينات الريبوسومية

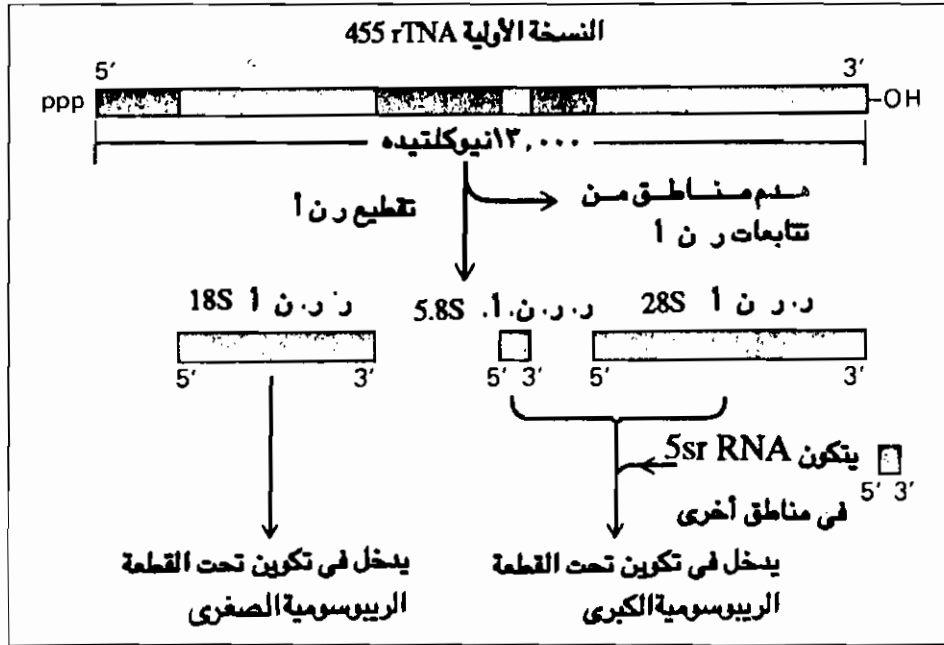
Ribosomal Proteins. تم تكسير كل وحدة من هذا المنتج الأولي 45S rRNA إلى ثلاث أنواع من rRNA بمعدل نسخة واحدة من كل نوع وهي:

28 Sr RNA (وطوله حوالى ٥٠٠٠ نيوكلييدة).

18 Sr RNA (وطوله حوالى ٢٠٠٠ نيوكلييدة).

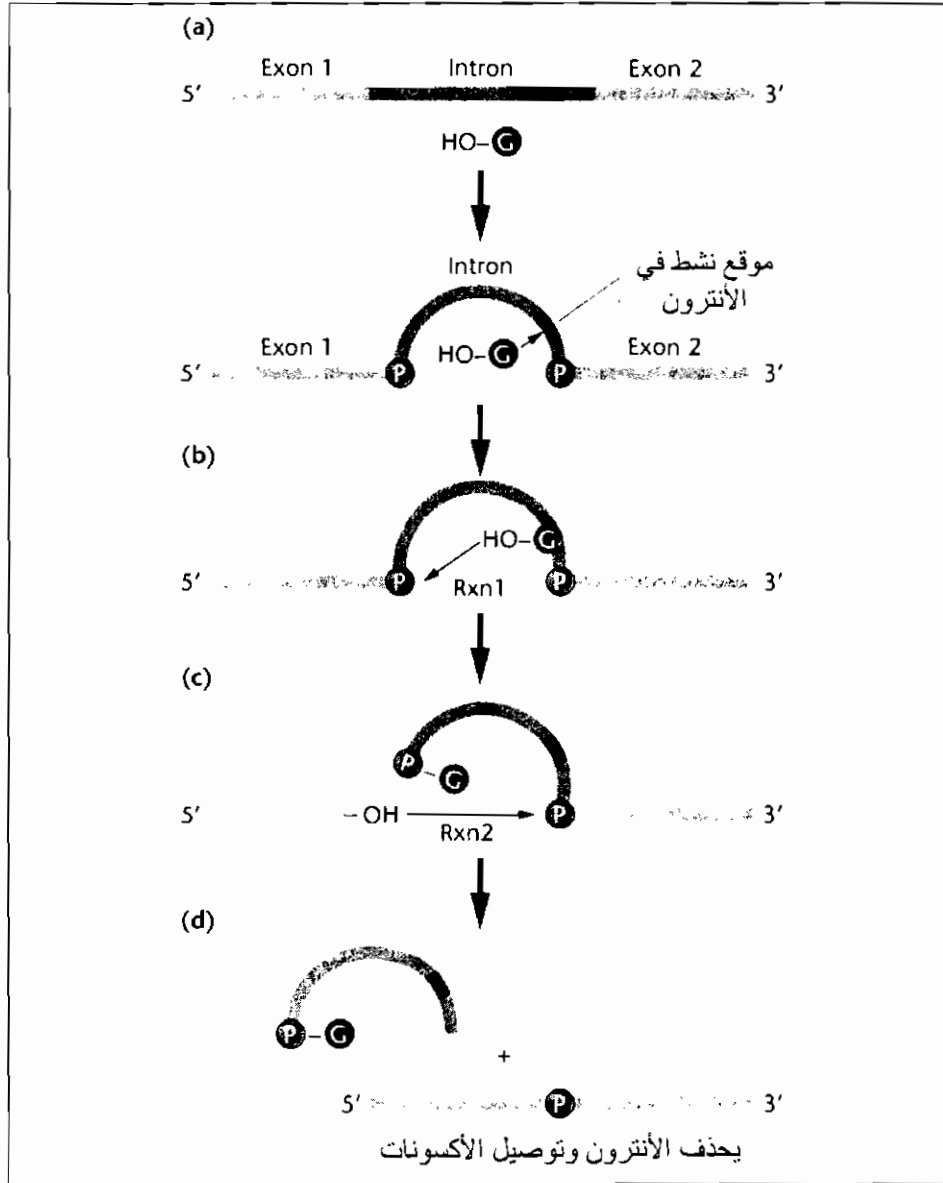
5.8 Sr RNA (وطوله حوالى ١٦٠ نيوكلييدة).

وتوجد ضوابط لكى ينتج من كل نسخة أولية من 45S RNA نسخة واحدة من كل من هذه الأنواع الثلاثة، بحيث يتم هدم وتحليل ما يتبقى من فائض من التتابعات فى الوحدة الأولية والذي يقدر بحوالى ٦٠٠٠ نيوكلييدة فى النواه كما فى الشكل (٧-١٥). يوجد نوع رابع من rRNA وهو 5S rRNA وهو ينسخ مستقلاً عن الأنواع الثلاثة السابقة وهو يوجد فى نسخ متكررة فى أماكن متفرقة بعيدة تماماً عن منطقة 45S RNA الرئيسية. ويكون هذا النوع من rRNA قصير جداً بطول حوالى ١٢٠ نيوكلييدة فقط، وهو ينسخ بواسطة انزيم RNA pol III الذى يقوم أيضاً بنسخ الجينات الخاصة بانتاج tRNA والذى لا يزيد طول سلسلة كل منها عن حوالى ٧٥-١٠٠ نيوكلييدة فقط والذى تتم فى قواعده النتروجينية تعديلات غير عادية فى عملية ما بعد النسخ Post-Transcription لكى يأخذ التركيب الثالثى والفعال فى الترجمة والذى يأخذ شكلاً مميزاً يعرف بشكل ورقة البرسيم clover-leaf كما سيأتى بعد.



الشكل (٧-١٥): طريقة تجهيز جزئ ر.ن.أ الريبوسومي الأولى 45S r RNA لإنتاج الأنواع الثلاثة المختلفة من ر.ن.أ الريبوسومي. ويتم التخلص من حوالي نصف طول الجزئ الأولى في هذه التفاعلات

وتجدر الإشارة إلى أن عملية استبعاد أو حذف الانترونات من جزئيات rRNA الأولية (وكذلك mRNA في الميتوكوندريا و tRNA الميتوكوندريا) يتم بعملية استئصال ذاتي حيث تحتوي الانترونات نفسها على النشاط الانزيمي اللازم لإزالتها ويسمى RNA الذي يحتوى على نشاط تحليل ذاتي Autocatalytic بالريبوزيم Ripozyme ويبين الشكل (٧-١٦) عملية الاستئصال الذاتي للانترون.



الشكل (٧-١٦): ميكانيكية التراكب Splicing حيث يتم إزالة المجموعة (١) من الإنترونات من النسخة الأولية لإنتاج rRNA و يتم ذلك بعملية إستئصال ذاتية يشترك فيها تفاعلان للأسترة العابرة
Transestrification

الفصل الثامن

الشفرة الوراثية Genetic Code

التوازي بين تتابع القواعد في جزئ د.ن.أ وتتابع الاحماض الأمينية
في البروتين:

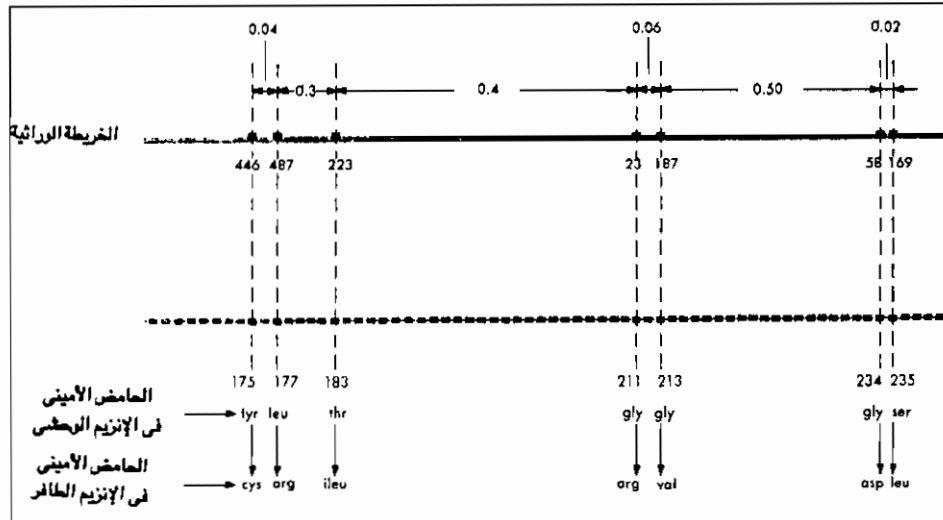
Colinearity Between Base Sequences in DNA and Amino Acid Sequences in Protein:

حيث أنه ثبت أن تتابع القواعد في جزئ د.ن.أ هو الذي يحدد تتابع
الأحماض الأمينية في سلسلة متعددة الببتيد الذي يمثل الناتج النهائي
end product لتعبير الجين، ونظراً لأن الكروموسوم يتكون من تتابعات خطية
للجينات، فإنه من البديهي أن كل منطقة تتابع نيوكليدي ستحدد بروتينا نوعيا
بحيث نتوقع وجود تلازم أو تواز تام Colinearity بين تتابع القواعد في هذه
المنطقة وتتابع الأحماض الأمينية في البروتين الناتج عنها.

وقد أمكن التحقق من وجود هذا التوازي عند دراسة الخريطة الوراثية
والجزيئية لتتابع القواعد في جزئ د.ن.أ وخريطة تتابع الأحماض الامينية في
البروتين الذي يتحكم في انتاجه. إذ تمكن يانفسكي Yanofsky عام ١٩٦٤ من
رسم الخريطة الوراثية للجين الذي يتحكم في انتاج سلسلة متعدد الببتيد A لانزيم
تربتوفان سينثيتيز Tryptophan Synthetase في بكتريا القولون *E. Coli*.

كما أمكنه التعرف على مواقع طافرات معينة باستخدام تكرارات الاتحادات الجديدة حيث استخدم تقنية رسم الخريطة الوراثية بالحذف لتحديد المواقع في الطافرات القريبة من بعضها. كانت السلالات الطافرة تحتوى على اقتضابات (حذف) تمتد على مسافات مختلفة على طول الجين A من أحد طرفيه ولكنها كانت تختلف في المسافة التي تغطيها على طول الجين.

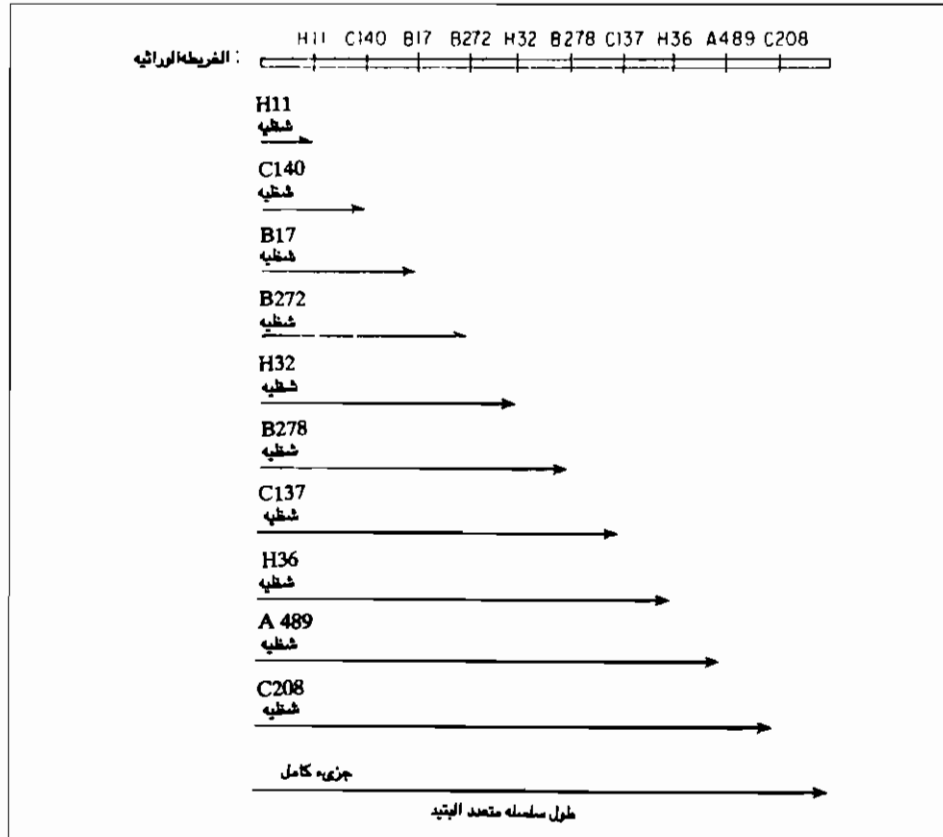
وبدراسة البروتين الطافر الناتج من كل من هذه الطافرات ومقارنة تتابع الأحماض الأمينية به بتلك الناتجة في بروتين الطراز الوحشى، أمكن التعرف على أماكن الإحلال لمواقع الأحماض الأمينية في سبع طافرات. وبمقارنة خريطة البروتين بمواقع الطفرات على الخريطة الوراثية لهذا الجين، تبين أن هناك تطابقاً بين مواقع الأحماض الامينية الخاطئة والمستبدلة في كل بروتين طافر ومواقع حدوث طفرات الحذف، مما يدل على وجود تواز بين تتابع القواعد في جزئ د.ن.أ (الجين) وبين تتابع الأحماض الأمينية في البروتين الناتج من هذا الجين كما في الشكل (٨-١).



الشكل (٨-١): التوازي بين الجين (د.ن.أ) والنتائج النهائية له (البروتين). يتبين في هذا الشكل الخريطة الوراثية لربع الجين المتحكم في تتابع الأحماض الأمينية لبروتين تربتوفان سينثيز A في بكتريا القولون. يدل الرقم 0.4، مثلا على المسافة الوراثية بين الطفرتين A446 و A487. وتدل الأرقام بالنسبة لتتابع الأحماض الأمينية على مواقعها في سلسلة متعدد الببتيد الجزئية (بطول ٢٦٧ حمض أميني) وتكون النهاية الأمينية إلى اليسار

كما استخدم ساربهاي Sarbhaie تقنية أخرى تشتمل على طافرات تؤثر على بناء البروتين في رأس الفاج T4 حيث يوجد نوع من الطفرات تسمى طفره إيقاف بناء البروتين Termination قبل الأوان. وعلى ذلك فإنه إذا كان الجين والبروتين متوازيان فإن حدوث طفره من هذا النوع في منتصف المسافة على طول الجين أثناء عملية الترجمة لابد أن تتسبب في أن النصف الأول من البروتين سيتم بناؤه في حين لا يحدث بناء للنصف الثاني منه، أي من نقطة طفرة الأنهاء وما بعدها. وهكذا يمكن بعمل طفرات متتالية تشمل مسافات مختلفة من الجين أن نتتبع مدى الطول الذي تم أنهاء بناؤه من البروتين.

وقد أمكن باستخدام مطفرات كيميائية معينة استحداث ١٠ طافرات مختلفة فى الجين المتحكم فى بناء بروتين الرأس فى فاج T4 وأمکن رسم خريطة وراثية بطرق تحليل الاتحادات الجديدة. وقد تبين أن طفرات الإنهاء المختلفة أحدثت توقف لعملية بناء سلسلة البروتين عند نقاط مختلفة على طول السلسلة. معروف أن البروتين يبدأ بنائه من النهاية الأمينية ($-NH_2$) إلى النهاية الكربوكسيلية ($-COOH$). وفى كل طفرة تبين وجود النهاية الأمينية لسلسلة متعددة الببتيد إلا أن عدديات الببتيدات التالية لهذه البداية اختلفت حسب السلسلة الطافرة. إذ تبين أن الطفرات المختلفة يحتوى كل منها على ببتيديات مختلفة فى الأطوال بحيث أنه عند ترتيبها من النهاية N إلى النهاية C للبروتين، وجد أنها تمثل بناء أطوال مختلفة من سلسلة متعدد الببتيد لبروتين الفاج T4. والاهم من ذلك أن طول كل من هذه السلاسل الببتيدية الطافرة (والتي تقل بدرجات متفاوتة عن الطول الكلى للسلسلة الوحشية للبروتين الفعال) تتناسب مع أماكن حدوث الطفرة على طول الجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين، بحيث يتلائم توقف استطاله سلسلة متعددة الببتيد مع مكان حدوث طفرة الإنهاء فى الخريطة الوراثية للجين مما يؤكد مرة أخرى مفهوم التوازى بين تتابع القواعد فى د. ن. أ (الجين) وبين تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج. كما فى الشكل (٨-٢).



الشكل (٨-٢): استخدام طفرات الانهاء Termination لاثبات العلاقة المتوازية بين تتابع القواعد في الجين (د.ن.أ) وبين تتابع الاحماض الأمينية وطول سلسلة متعدد الببتيد الناتج حيث يتناسب طول السلسلة الناتجة مع موقع حدوث طفرة الانهاء

الشفرة الثلاثية : Triplet code:

حيث أنه توجد أربعة أنواع من القواعد النروجينية فقط في جزئ د. ن. أ وهي التي تقوم بتخصيص الأحماض الامينية العشرين في البروتين، فإنه من الضروري أن توجد توافق وتبادل لهذا القواعد الأربعة لكي يتسنى لها أن تفي

بالتشفير لتلك الأحماض الامينية. وفى الحقيقة فإن بناء البروتين يحتاج إلى أكثر من عشرين شفرة عند الأخذ فى الاعتبار اشارات البدء واشارات التوقف أو انتهاء بناء سلسلة البروتين.

يسمى تتابع القواعد فى ر.ن.أ المراسل mRNA الموازى أو المحدد لحامض أمينى معين "الكودون" Codon لهذا الحامض الأمينى، وتسمى تتابعات اشارات البدء كودونات الابتداء Start Codons فى حين تسمى تتابعات اشارات الانهاء كودونات الايقاف Stop Codons. ويطلق على مجموع هذه الكودونات اسم الشفرة الوراثية Genetic Code.

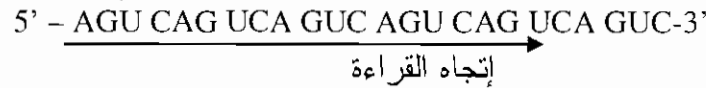
وقبل أن يكتشف سر الشفرات الوراثية فقد كان من المفترض أنه اذا كانت جميع الشفرات لابد أن تحتوى على نفس العدد من القواعد فإن كل كودون (شفرة) لابد أن تحتوى على ثلاثة قواعد على الأقل، ويرجع ذلك إلى الاتى:

— لو افترضنا شفرة القاعدة الواحدة فإن ذلك يعنى أننا سيكون لدينا $4^1 = 4$ أى أربع كودونات أحادية الشفرة كما أن كودون القاعدتين سيعطينا $4^2 = 16$ كودون وهذا العدد لازال قاصرا عن الوفاء بالعدد المطلوب من الشفرات حيث لابد أن يزيد عن 20 كودون. وعلى ذلك فإن الكودون ثلاثى القاعدة سيكون أكثر ملائمة لاعطائنا العدد المطلوب وأكثر إذ سنحصل على $4^3 = 64$ كودون وقد تبين بعد ذلك أن الشفرة الوراثية ثلاثية الأحرف بالفعل وأن جميع الشفرات الأربعة والستون المحتملة تحمل معلومات وراثية بطريقة أو أخرى. وكما سنعلم فيما بعد يمكن أن تعين أكثر من شفرة أو كودون واحد للتشفير لنفس الحامض الأمينى.

الأدلة الوراثية على ثلاثية الشفرة:

Genetic Evidence For Triplet Code:

فى البكتريوفاج T₄ الخاص ببكتريا القولون تبين أنه اذا تمت تنمية هذا الفاج فى بيئة محتوية على المطفر الكيماوى بروفلافين proflavin الذى يتداخل مع الأسطح المتراصة المفلطحة للقواعد فى جزئ د.ن. فإنه ينتج طفرات حذف أو طفرات اضافة لقاعدة واحدة مما يؤدى إلى طفرات تحريك الاطار frame shift mutation نظراً لأن القواعد تقرأ بالتتابع كما هو موضح فيما يلى:



وعلى ذلك فإن أى من طفرة الاضافة أو الحذف سيؤدى كل منهما إلى تحريك أو تغيير اطار القراءة لوحدات الكودونات الخاصة بالأحماض الأمينية الداخلة فى بروتين نوعى معين حيث نجد أن كل حامض أمينى يلى القاعدة المضافة مثلاً سيكون مختلف كما يلى:

تتابع لأحماض الأمينية : Ser His Phe Asp Lys Leu

mRNA من د.ن.أ. الأصلى 5' - AGC CAC UUA GAC AAA CUA - 3'

mRNA من د.ن.أ. المضاف اليه القاعدة :

5' - AGC ACA CUU AGA CAA ACU A - 3'

Ser Thr Leu Arg Gln Thr تتابع الأحماض الأمينية.

وقد تبين بالفعل وجود طفرات للفاج T₄ فى النسل تسمى طافرات تحريك الاطار وهى تنشأ بمعدل ١٠^{-٥} - ١٠^{-٦}. وإذا نميت طافرات تحريك الاطار مرة اخرى فى بيئة محتوية على المطفر بروفلافين فإن بعض الفاج سيظهر بحيث يستعيد الطراز المظهرى الوحشى لتتابع الأحماض الأمينية فى البروتين.

وقد أجريت تجربة لتحديد أى من الأحداث الطفرية ستكون مسئولة عن استعادة الطراز الوحشى. وباستبعاد احتمال حدوث طفرة حذف قاعدة فى نفس موقع طفرة الاضافة للقاعدة السابقة، نظراً لأن هذا الاحتمال ضعيف جداً، فإنه قد تبين أن حدوث طفرة حذف فى موقع قاعدة أخرى قريبة من موقع الاضافة الأول قد يؤدي إلى استعادة اطار القراءة الصحيح وفى بعض الأحيان قد ينتج عنها بروتين فعال بيولوجيا على الرغم من أن تتابعات الأحماض الأمينية بأكملها فى الطراز الوحشى للبروتين الأصلي لن تكون متطابقة مع تلك الناتجة عن الطفرتين (الاضافة والحذف). وقد تبين أن ذلك هو ما يحدث بالفعل عند دراسة مجموعة من الطافرات المستحدثة بالبروفلايين فى الجين rIIB لفاج T₄ الخاص ببيكتريا القولون حيث ظهر أن الجمع بين هذه الأحداث الطفرية المتضادة سيعطى نفس التأثير. يحتوى بروتين rIIB لفاج T₄ على منطقة يمكن تغيير أو احلال Substitution عدد كبير من الأحماض الامينية بها دون أن تتغير أو تتأثر فاعلية البروتين بشكل ملحوظ إلا أنه حتى فى هذه المنطقة يمكن للبروفلايين استحداث طفرات تؤدي إلى ايقاف نشاط البروتين تماماً.. يحدث عادة عند التهجين بين سلالتين من الفاج كل منها تحمل طفرة مختلفة فى نفس الجين، وذلك عن طريق العدوى المشتركة لبيكتريا القولون بهاتين الطفرتين، أن بعض الطرز الوحشية للفاج ستتأثر نتيجة الاتحادات الوراثة بين موقعي الطفرتين. ولكن عندما يتم التهجين بين طفرتي بروفلايين عشوائيتين لـ r II فإنه لا ينتج باستمرار نسل فاج ذو طراز وحشى.

أثبتت نتائج الاتحادات الجديدة أن الطافرات يمكن تصنيفها فى مجموعتين محددين تسمى إحداهما المجموعة (+) والآخرى (-) وأن التهجين بين طافرتين أحدهما تتبع المجموعة (+) والآخرى تتبع المجموعة (-) (أى من نوعين

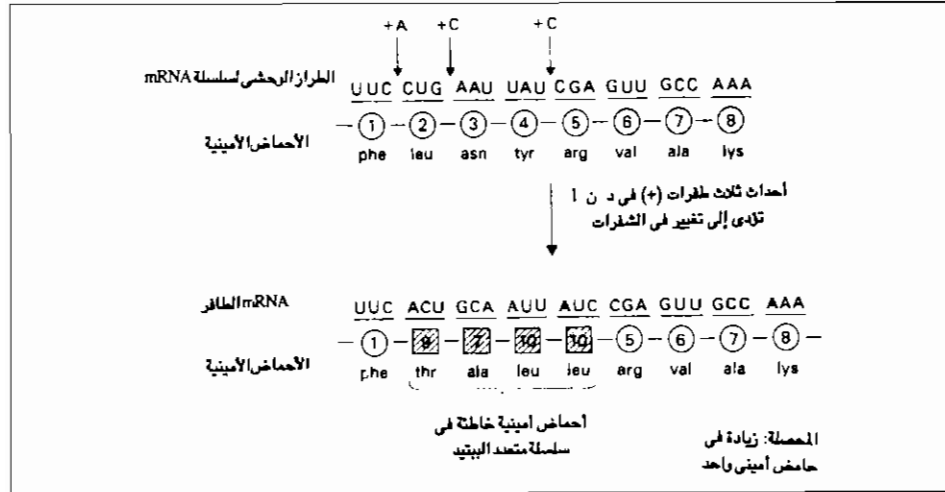
مختلفين) سيؤدي إلى الحصول على الطراز المظهري الوحشي للبروتين الناتج. في حين لا يمكن الحصول على هذه النتيجة لو تم التهجين بين طرازين من نفس المجموعة أى بين (-) و (-) أو بين (+) و (+).

أمكن تفسير هذه النتائج على النحو التالي :

- يمكن اعتبار أن مجموعة الطافرات (+) تكون محتوية على اضافة لقاعدة واحدة في حين أن المجموعة (-) تعد ذات نقص لقاعدة واحدة وأن الطافرات المزدوجة من النوع (+) (+) أو (-) (-) ستحتوي على قاعدتي اضافة أو نقص في قاعدتين على الترتيب. وأن كل طفرة مزدوجة متشابهة ستؤدي إلى تحريك اطار القراءة بمعدل قاعدتين ومثل هذا التحريك من شأنه الا يعطى طرازا مظهرياً وحشياً للبروتين حيث لن يتكون بروتين فعال. ولكن في حالة الطفرة المزدوجة غير المتشابهة (+) (-) الناتجة عن الاتحادات الجديدة فإنه على الرغم من أن تحريك اطار القراءة الذي تم في النقطة التالية لموقع طفرة الاضافة (+) سيؤدي إلى قراءة غير صحيحة للاطار وبالتالي سيؤدي إلى ادخال أحماض أمينية خاطئة، إلا أن هذا سرعان ما يتم تصحيحه عند النقطة التالية لطفرة الحذف التالية (-) حيث سيستعاد اطار القراءة الصحيح مرة أخرى فيما يلي هذه النقطة مباشرة. وفيما بين موقعي الاضافة (+) والحذف (-) سيكون تتابع الأحماض الأمينية غير صحيح في سلسلة متعدد الببتيد ولن يتطابق في هذه المسافة مع تتابعه في البروتين الوحشي، ولكن إذا كانت كلا الطفرتين تقعان في منطقة لا يؤثر تغيير الأحماض الأمينية بها كثيراً في فعالية البروتين الناتج فإن الجمع بين (+) (-) أو (-) (+) سينتج بروتينا فعالاً، بمعنى أنه إذا تم استعادة اطار القراءة قبل الوصول إلى منطقة حرجة لا تتحمل التغيير في تتابع الأحماض الأمينية فإنه يمكن

انتاج بروتينات فعالة ويقال للبروتين الناتج بأنه شبيه بالطراز الوحشى
Pseudo-Wild Type Protein.

وبهذا المنطق فإن طفرة رجعية للطفرة (+) لابد أن تكون قد نتجت عن استحداث طفرة أخرى من المجموعة (-) فى موقع آخر قريب. وواضح أن طفرات مزدوجة من نفس المجموعة (+) (+) أو (-) (-) لن تستطيع استعادة الإطار الصحيح للقراءة نظراً لأن الشفرة الوراثية لا يمكن أن تكون ثنائية الأحرف، إذ أنه لو كانت ثنائية الأحرف لأمكن استعادة إطار القراءة فى مثل هذه الطفرات المزدوجة المتشابهة. من جهة أخرى، وجد أنه عند اجراء اتحاد بين ثلاث طفرات من نفس المجموعة أى (+ + +) (- - -) أمكن استعادة الطراز الوحشى للبروتين فى حين أن الجمع بين طفرات ثلاثية مختلطة (+) (+) (-) أو (-) (-) (+) لن يعطى بروتينا وحشياً. تبين أنه اذا كانت مواقع الطفرات الثلاثية المتشابهة قريبة جداً من بعضها على جزئ د.ن.أ فإنها ستنتج بروتين شبيه بالطراز الوحشى حيث سيكون تتابع الأحماض الأمينية فيه مشابها للطراز الوحشى فيما عدا مواقع حدوث الطفرات الثلاثية كما فى الشكل (٨-٣). يؤكد ذلك أن الشفرة الوراثية ثلاثية الأحرف Triplet، ويبين الشكل (٨-٤) كيف أن توافق من ثلاثة طفرات متشابهة (+ + +) أو (- - -) فقط هى التى ستنتج طرازاً مظهرياً وحشياً للبروتين.



الشكل (٨-٣): شكل تخطيطي يبين كيف يمكن استعادة إطار قراءة mRNA أثناء الترجمة عن طريق أحداث ثلاث طفرات إضافية متقاربة (طفرة القاعدة الواحدة) لثلاث نيوكليوتيدات في جزئ د.ن. أ. وتكون النتيجة زيادة حامض أميني واحد في سلسلة متعدد الببتيد

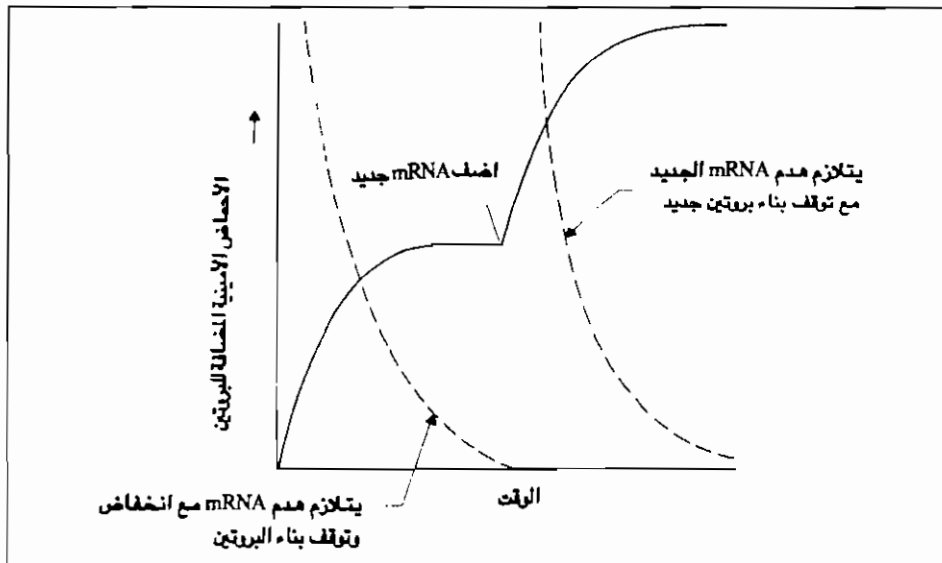
المنطقة المقابلة		المنطقة غير المقابلة (الحساسة)	
استبدال الأحماض الأمينية لا تؤثر كثيراً على الطراز البروتيني		يجب أن يبقى إطار القراءة بدون تغيير للمحافظة على الطراز البروتيني	
الطراز البروتيني	ABC DEF GHI JKL	LMN OPQ RST VWX	
(+) ₁	ABD CDE FGH IJK	LMN OPQ RST UVW X	أحد طرفه مفردة تحرك إطار القراءة بمعدل قاعدة واحدة بتغيير الكودونات في المنطقة الحساسة
(+) ₂	ABC DEE FGH IJK	LMN OPQ RST UVW X	
(+) ₃	ABC DEF GHI JJK	LMN OPQ RST UVW X	
(-), (+) ₂	ABD CDE 2FG HIJ	KLM NOP ORS TUV WX	أحداث طفرتين لا يعيد إطار القراءة في المنطقة الحساسة
(-), (+) ₂ (+) ₃	ABD CDE 2FG HIJ	5KL MNO PQR STU VWX	

أحداث ثلاث طفرات يغير إطار القراءة ويعيد إطار القراءة والطراز البروتيني

الشكل (٨-٤): شكل تخطيطي لإثبات أن أحداث ثلاث طفرات إضافية (طفرة القاعدة الواحدة) (١، ٢، ٣ غير المظللة) وليس اثنتان تؤدي إلى استعادة إطار القراءة في المنطقة الحساسة (مظللة) في بروتين rII للفاج T4 وذلك إذا كانت الشفرة الوراثية ثلاثية. سيكون هناك حامض أميني زائد في المنطقة الحساسة للتركيب (+)، (+)، (+) ولكن ذلك لا يؤدي إلى طراز طافر

استنباط الشفرة الوراثية: Deciphering of the Genetic Code

اعتمدت التجارب البيوكيماوية للتعرف على الشفرات الوراثية الدالة على الأحماض الأمينية المختلفة على استخدام نظام بناء البروتين في المعمل *In Vitro* في نظام خارج الخلية Cell Free System، حيث وجد نيرنبرج Nirenberg عام ١٩٦١ أنه يمكن استخدام مستخلص من خلايا بكتريا القولون المحتوي على الريبوسومات و ر.ن.أ الناقل tRNA وانزيمات أمينواسيل سينثيتيز Aminoacyl Synthetases و ر.ن.أ المراسل mRNA والأحماض الأمينية في بناء سلاسل متعدد الببتيد في المعمل *In Vitro* إلا أن هذا التفاعل يستمر لفترة قصيرة (دقائق معدودة) ثم يتوقف إلا إذا اضيف إليه mRNA تركيبي جديد كما في الشكل (٨-٥).



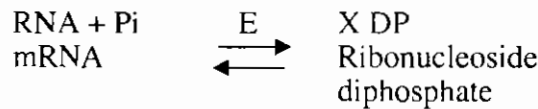
الشكل (٨-٥): شكل تخطيطي يبين اعتماد استمرار بناء البروتين معملياً على توفر mRNA. ينخفض معدل بناء البروتين كلما حدث هدم لجزيئات mRNA ثم يرتفع معدل البناء مرة أخرى عند إضافة جزيئات جديدة من mRNA

وقد اعتبر ذلك اكتشافاً هاماً حيث أنه عندما يتم استهلاك mRNA الطبيعي فإنه يمكن استخدام mRNA تركيبى مخلوق انزيمياً فى هذا النظام. وجد أن فاعلية مثل هذا النوع من mRNA التركيبى تكون ضعيفة الا اذا تم تغيير الوسط الأيونى واطافة بعض المكونات الأخرى، حيث تبدأ الترجمة فى أماكن عشوائية بدون الحاجة إلى كودون البدء.

وسوف نستعرض فيما يلى شرحاً موجزاً لبعض التقنيات البيوكيميائية الرئيسية التى استخدمت فى استنباط الشفرة الوراثية.

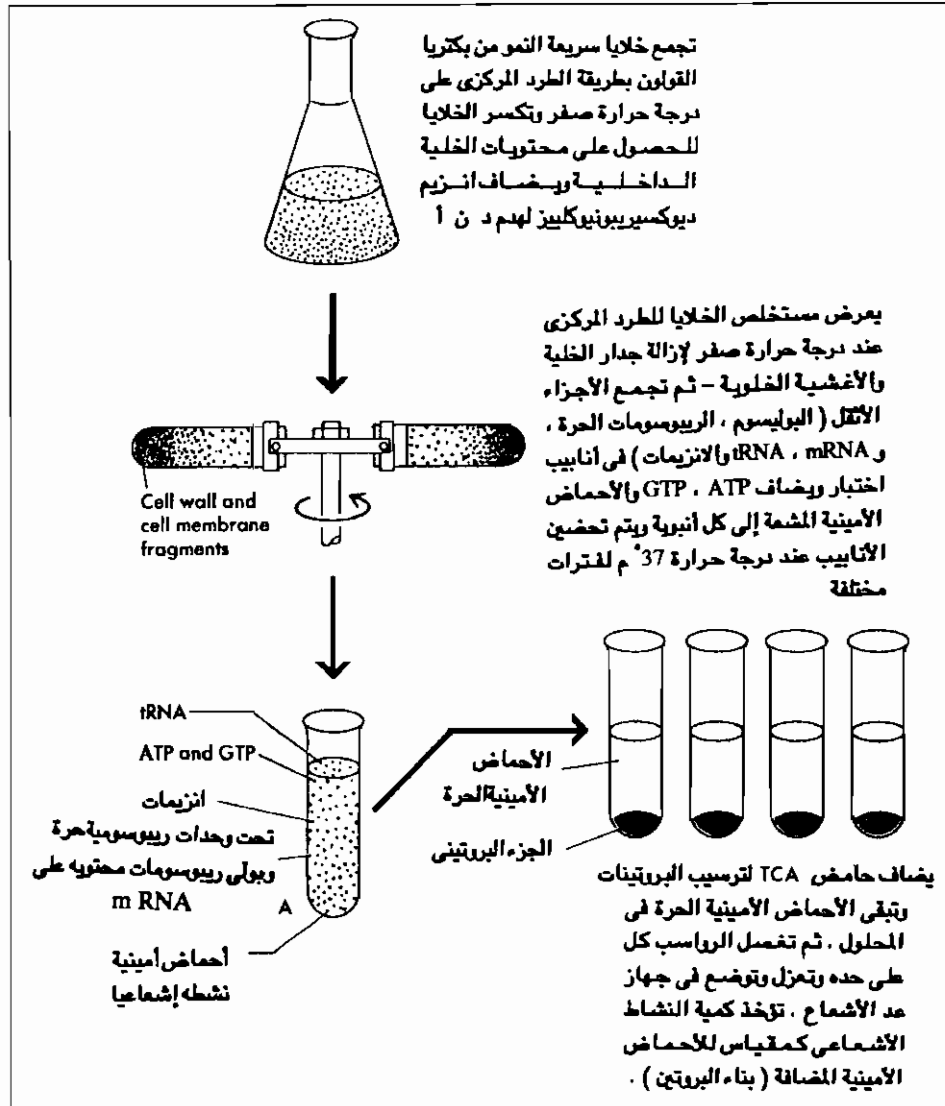
أولاً: تقنية المتعدد النيوكليوتيدى المتجانس Homopolymers:

فى التجارب الأولية، استخدم نيرنبرج ومثاى Nirenberg and Mathaie سلسلة من التفاعلات تحتوى كل منها على ٢٠ حامض أمينى ولكن بشرط وجود حامض أمينى واحد فى كل أنبوبة معلم بالاشعاع وبقية الأحماض التسعة عشر غير معلمة فى كل تجربة. وتحتوى كل أنبوبة على جميع المكونات الأخرى اللازمة لبناء البروتين فى المعمل *In Vitro* فيما عدا mRNA الطبيعى. ثم يضاف لكل مخلوط تفاعل mRNA تركيبى مكون من تتابعات مترادفة من نفس القاعدة: مثلاً Poly U: وقد أمكن تخليق هذه النوعيات من mRNA الصناعى باستخدام نشاط انزيم Polynucleotide Phosphorylase الذى يساعد فى التفاعل التالى:



وعادة يتم التفاعل من اليسار إلى اليمين ولكن فى وجود وفرة من ثنائى الفوسفات فأن التفاعل يجبر على الاتجاه من اليمين إلى اليسار أى فى اتجاه تكوين mRNA تركيبى. بعد تحضير مخاليط التفاعل مع mRNA التركيبى الأحادى القاعدة Homopolymer (أى المكون من قاعدة من نوع واحد متكرر ترادفيا فى متعدد النيوكليوتيد)، يتم ترسيب البروتين المتكون فى كل أنبوبة بإضافة ثلاثى كلورات الخليك TCA، ثم يكشف عن وجود الاشعاع فى البروتين المترسب والتى يستدل بها على نوع الحامض الأمينى المعلم بالاشعاع الذى تم ادخاله فى سلسلة متعدد الببتيد النوعى. وقد وجد أن Poly U يودى إلى إدخال حامض الفينيل الانين المشع فقط فى البروتين المترسب وذلك بصورة مترادفة ونتيجة لذلك فقد أمكن استنتاج أن UUU لابد أن يكون هو الكودون المسئول عن التشفير لحامض الفينيل الانين. ويعد هذا أول كودون تمت معرفته فى الشفرة الوراثية بصفة عامة.

كما أمكن بتجارب مشابهة معرفة أن AAA يشفر لليسين فى حين يشفر الكودون CCC للبرولين إلا أن GGG لم يمكن تحديد أى من الأحماض الأمينية يشفر له فى ذلك الوقت نظراً لصعوبة ارتباط Poly G بالريبوسومات. والجدول (٨-١) يلخص نتائج هذه التقنية كما يبين الشكل (٨-٦) . بعض التفاصيل الخاصة بعملية بناء البروتين معملياً *In Vitro*.



الشكل (٨-٦): رسم تخطيطي لعملية بناء البروتين معمليا *In Vitro*

الجدول (٨-١) قياس معدل ظهور حامض الفينيل ألانين المشع في متعدد الفينيل ألانين باستخدام م. ر. ن. أ تركيبى متجانس فى نظام بناء البروتين فى المعمل *In Vitro*

النشاط الاشعاعى فى البروتين الناتج (Count Per Minnte)	م. ر. ن. أ التركيبى
٤٤	لايوجد
٣٩٨٠٠	Poly U
٥٠	Poly A
٣٨	Poly C

ثانياً: تقنية البوليميرات المختاطة العشوائية
Random Copolymers

كانت الخطوة التالية هي تخليق بوليميرات من mRNA وتحديد الشفرات الوراثية في تجارب معملية مشابهة لما سبق الإشارة اليه. واستناداً إلى قانون الاحتمالات، لنفترض أننا قمنا بتخليق بوليمر مختلط عشوائى متعدد النيوكليوتيدات باستخدام انزيم Polynucleotide Phosphorylase مع إضافة كلا من GDP , UDP بنسبة ٥ : ١ أى :

$$5n \text{ UDP} + n \text{ GDP} \xrightarrow{\text{E}} (\text{U 5G})_n + 6 n \text{Pi}$$

فإن الاحتمال النسبي للحصول على ثلاثى قواعد يحتوى على ثلاث قواعد من نوع U فقط فى هذا المتعدد سيكون $5 \times 5 \times 5 = 125$ فى حين أن الاحتمال النسبي للحصول على ثلاثى يحتوى على U واحد واثنان من G سيكون: $5 \times 1 \times 1 = 5$ فإذا كانت الشفرة $UUU = U_3$ تشفر للفينيل الانين

كما سبق القول ، UG2 تشفر للحامض الأميني المجهول X فإنه يمكن أن نتوقع أن تكرر إضافة حامض الفينيل الانين الى سلسلة متعدد الببتيد الناتجة ستكون مكافئة في القيمة إلى النسب من التكرار الثلاثي U في متعدد النيوكليوتيد في mRNA التركيبي.

$$\frac{UG_2}{U_3} = \frac{\text{تكرار اضافة الحامض الأميني (X) في متعدد الببتيد}}{\text{تكرار اضافة حامض الفينيل الانين في متعدد الببتيد}} = \frac{5}{125} = 4\%$$

أى أنه لكل مائة جزئ حامض فينيل الانين مضاف للسلسلة سيوجد حوالى أربعة جزيئات من الحامض X فى نفس السلسلة. وعندما تم تحليل متعدد الببتيد الناتج وجد أن نسبة حامض الجلايسين Glycine فى السلسلة المتكونة كان بالفعل 4% فى حين كانت نسبة التربتوفان حوالى 5% مما يفترض معه أن الثلاثي UG2 يشفر لهذين الحامضين الأمينين ولكن مع اختلاف تتابع القواعد. وواضح أن هذه التقنية لا تعطى أى معلومات محددة عن تتابع القواعد فى الكودونات لذلك كانت النتائج غامضة.

ويمكن تلخيص النتائج التى حصل عليها Nirenberg and Speyer عام ١٩٦٣ بهذه الطريقة فى الجدول (٨-٢).

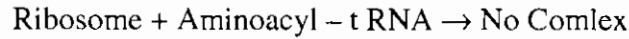
الجدول (٨-٢) نتائج تقنية البوليميرات المختلطة العشوائية .

الكودون	تكرار الحصول على حامض أميني في السلسلة		الثلاثيات المحتملة	نوع المتعدد النيوكلتيدى المختلط العشوائى Random Copolymer
	الفعلى	المتوقع		
U ₃ = phe U ₂ G=cyst, val UG ₂ = gly, try pt.	phe : 100 cys:20, val: 20 gly : 4, try, 5	125 (100) 25 (20) 5 (4), (5)	U ₃ (5x5x5) U ₂ G (5x5x1) UG ₂ (5x1x1)	Poly - UG بنسبة 1 : 5
A ₃ = lys A ₂ U = lle, asn AU ₂ = leu, tyr pt.	lys: 100 ile: 20, asn: 28 leu: 20, asn: 28	125 (100) 25 (20) 5 (4)	A ₃ (5x5x5) A ₂ U (5x5x1) AU ₂ (5x1x1)	Poly- AU بنسبة 1 : 5
C ₃ = pro C ₂ G = ala, arg CG ₂ = gly	pro : 100 ala : 22, arg: 19 gly : 5	125 (100) 25 (20) 5 (4)	C ₃ (5x5x5) C ₂ G (5x5x1) CG ₂ (5x1x1)	Poly - CG بنسبة 1 : 5

ثالثًا: تقنية الارتباط المباشر لثلاثيات القواعد التركيبية

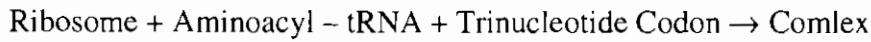
Direct Triplet Binding:

في خطوة متقدمة لاستنباط الشفرة الوراثية تم اجراء تجارب على الارتباط المباشر النوعى لثلاثيات من القواعد النوعية المحددة التابع على الريبوسومات ضمن نظام بناء البروتين في المعمل *In Vitro* بحيث كان التفاعل بصفة عامة كالتالى:



أى ريبوسومات + أمينو أسيل - tRNA ← لا يتكون معقد

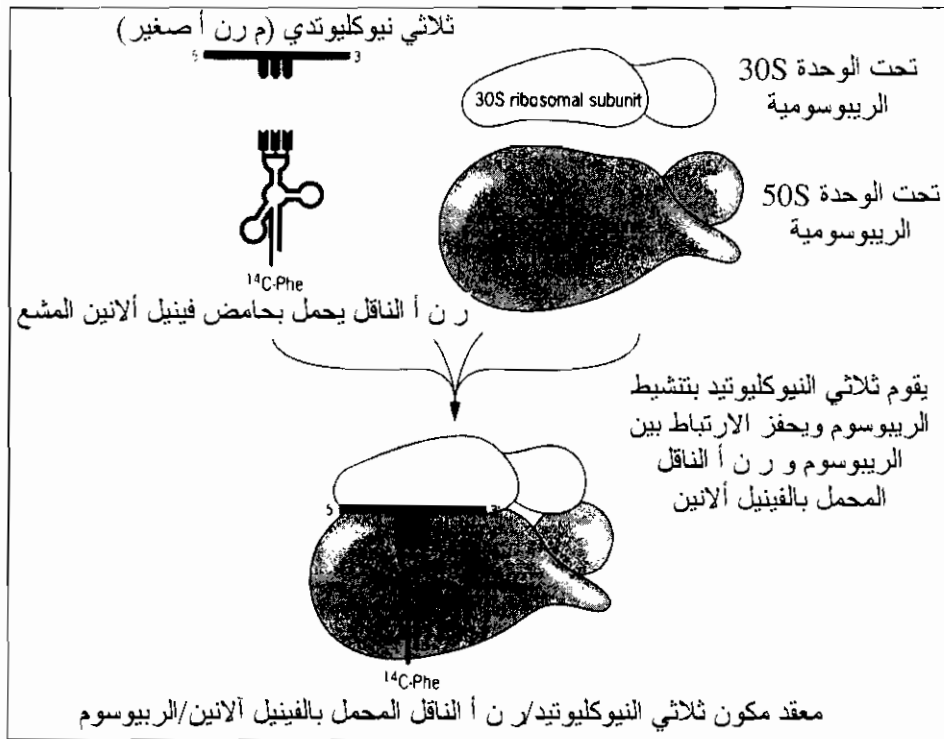
في حين يكون ناتج التفاعل :



ريبوسومات + امينو أسيل - tRNA + كودون ثلاثى ← يتكون معقد

وكانت الفكرة مبنية باختصار على أن ر.ن.أ الناقل tRNA المحمل بحامض أميني نوعى X (يسمى أمينواسيل tRNA) لن يرتبط مع الريبوسومات

الحررة ولكن الثلاثية النيوكليوتيدية (الكودون) النوعية ستعمل كوسيط لربط امينواسيل tRNA بالريبوسومات. وكانت التقنية بسيطة نسبياً إذ يتم حجز الريبوسومات على مرشحات (فلتر) من نترات السيليولوز بحيث يمكن التمييز بين جزئيات امينواسيل tRNA المرتبطة بالريبوسومات عن تلك الحررة التي لم ترتبط بها حيث يتم التخلص من هذه الأخيرة بغسيل المرشح بمحلول مناسب حيث يسمح بمرور جزئيات امينواسيل tRNA الحررة وكذلك نيوكليوتيدات الأليجو من خلال المرشح في حين لا يسمح بمرور المعقدات المكونة على الريبوسوم من امينواسيل tRNA + الكودونات النوعية الثلاثية (الشكل ٨-٧).



الشكل (٨-٧): تحفيز ارتباط امينو أسيل tRNA بالريبوسوم باستخدام م ر ن أ صناعي (تركيبى) صغير مكون من ثلاث نيوكليوتيدات فقط وقد ساعدت هذه التقنية كثيراً في إكتشاف قاموس الشفرة الوراثية

وعلى ذلك فقد تم اضافة نيوكليوتيدات ثنائية أو ثلاثية تركيبية معروفة لتتابع مع امينواسيل tRNA ذو نشاط اشعاعي نوعى فى الحامض الأمينى للمعلم بالاشعاع. اختبرت كل من هذه النيوكليوتيدات الأوليجو مع جميع نوعيات امينواسيل tRNA بحيث يكون فى كل مرة احداها فقط هو المعلم بالاشعاع فى حين تكون التسعة عشر نوعاً الاخرى غير معلمة.

تم تقدير كمية الأشعاع التى تتبقى على المرشح (نتيجة عدم مرور المعقد المكون من امينواسيل tRNA المشع المرتبط بالريبوسوم) لكلا من التفاعلات العشريين والتى يحتوى كل منها على حامض أمينى نوعى مشع.

ويلخص الجدول (٣-٨) بعض النتائج التى حصل عليها ليدر ونيرنبرج عام ١٩٦٤ Leder and Nirenberg.

الجدول (٣-٨) نتائج تقنية الارتباط المباشر لثلاثيات القواعد التركيبية

الكودون	كمية الحامض الأمينى المشع (P.mole) المرتبط بالريبوسوم		ثنائيات و ثلاثيات النيوكليوتيدات المضافة
	Cys tRNA cys	leu - tRNA leu	
--	٠,٢٩	٠,٧٦	لاشئ
UGU = Cys	١,٤٦	٠,٧٨	UGU
UUG = leu	٠,٣٢	١,٧٤	UUG
--	٠,٣٤	٠,٩٢	GUU
--	٠,٢١	٠,٩٢	UG
--	٠,٣٤	٠,٨٦	GU

من هذا الجدول يمكن استخلاص النتائج الهامة التالية :

- ١- أن ثنائيات القواعد لا تعطى ارتباطاً على الريبوسومات في حين أعطت ثلاثيات القواعد ارتباطاً مما يؤكد أن الشفرة لا يمكن أن تكون ثنائية القواعد.
- ٢- أن مفهوم الشفرة الثلاثية قد تأكد بصورة قاطعة.
- ٣- أن تتابع القواعد في الشفرة الثلاثية من الأهمية بمكان في تحديد نوع الحامض الأميني النوعي الذي يشفر له كل كودون ثلاثي.

رابعاً: تقنية عديدات النيوكليوتيدات المعروفة التتابع Polymers of Known Sequence

كانت الخطوة الأخيرة في استنباط الشفرة الوراثية هي استخدام سلاسل تركيبية من متعدد النيوكليوتيدات ذات تتابع معروف. وقد استخدم هذه التقنية Khorana عام ١٩٦٧ في التعرف على عدد كبير من الكودونات النوعية المحددة لعدد من الأحماض الأمينية. استخدم كورانا بوليميرات مختلطة مكونة من وحدات متكررة ترادفياً من قاعدتين مختلفتين، مما يؤدي إلى إضافة حامضين من الأحماض الأمينية النوعية (يتم تشجيعها لإمكان متابعتها). وعند استخدام هذه البوليميرات التركيبية في نظام بناء البروتين في المعمل *In Vitro* يختبر مدى إضافة أى من الثمانية عشر حامض أميني الباقية غير المعلمة وذلك عند استخدام حامض أميني ثالث مشع وسبعة عشر حامض غير مشع إلى مخلوط التفاعل في كل مرة مع أحداث التبادل والتوافق الممكنة، عند استخدام هذه الأحماض الامينية في مخاليط التفاعل. وقد تبين أن سلسلة متعدد الببتيد أحتوت في كل مرة على حامضين نوعيين مشعين فقط ولم تحدث أى إضافة لحامض مشع ثالث إلى السلسلة الناتجة .

كانت ميكانيكية اضافة الحامضين الأمينيين متشابهة كما كانت الكمية المضافة من كل منهما متكافئة وكان معدل اضافة أى من الحامضين الأمينيين فى السلسلة تزداد فى وجود الحامض الثانى فى حين ينخفض معدل اضافته فى غيابه. وكانت إحدى هذه التجارب التى شملت تحفيز اضافة الفالين والسيستين بواسطة UG-poly مثلاً لمثل هذه التجارب.

فإذا كان تتابع القواعد : UGU GUG UGU GUG UGU

يملى تكوين متعدد الببتيد : cys - val - cys - val - cys

فإن معنى ذلك أن الكودون UGU يمثل السيستين فى حين يمثل الكودون GUG الفالين.

وقد إتجهت دراسات تالية بواسطة كورانا ومعاونوه إلى استخدام تتابعات معلومة من ثلاثيات ورباعيات النيوكليوتيدات المتكونة بشكل ترادفى بحيث أدى تحليل سلاسل متعدد الببتيد الناتجة إلى التعرف على اضافة أحماض أمينية نوعية بتتابع معين. وقد أمكن التعرف فى النهاية على حوالى نصف عدد الشفرات الأربعة والستون بهذه التقنية . ويمكن تلخيص النتائج فى الجدول (٤-٨).

الجدول (٨-٤) نتائج تقنية عديدات النيوكليوتيدات المعروفة التتابع

الشفرات (الكودونات)	الأحماض الأمينية المضافة في سلسلة متعدد الببتيد	الكودونات المتعرف عليها	mRNA تركيبى (بوليمير مختلط معروف التتابع)
5'CUC3' UCU	leucine	<i>CUC /UCU /CUC</i>	poly (C – U)n
UGU	Serine		
GUG	Cysteine	<i>UGU /GUG /UGU</i>	poly (U.G)n
ACA	Valine		
CAC	Threonine	<i>ACA /CAC /ACA</i>	poly (AC)n
AGA	Histidine		
GAG	Arginine	<i>AGA /GAG /AGA</i>	poly (AG)n
	Glutamine		

ولتفسير الدور الذى يقوم به متعدد النيوكليوتيدات فى هذا المجال، سنأخذ المتعدد PolyGAA كمثال؛ حيث يتحكم هذا المتعدد فى تكوين أما متعدد الليسين Polylysine أو متعدد الجلوتامين Polyglutamine أو متعدد الأرجينين Polyarginine مما يعنى أن واحداً فقط من أحد الأحماض الأمينية الثلاثة تلك سيدخل فى تكوين متعدد الببتيد اعتماداً على نقطة البدء لثلاثية قواعد عشوائية عند بداية الرسالة كالاتى:

5'- AAG - AAGAAG - 3'
lys – lys – lys

أو

5'- GAAGAAGAA - 3'
glu – glu – glu

أو

5'- AGA AGA AGA - 3'
Arg – Arg – Arg

وقد نوالى استنباط الكودونات المشفرة من مثل هذه البوليميرات النيوكليدية التركيبية الثنائية والثلاثية والرابعة التتابعات. وقد أسفرت جميع

هذه الدراسات عن استنباط كودونات نوعية محددة لأحماض أمينية نوعية وذلك بالنسبة لواحد وستين كودون من الأربعة والستين المحتملة كما في الجدول رقم (٥-٨).

وتشفر الكودونات الثلاث الباقية لإنهاء أو وقف بناء سلسلة البروتين.

الجدول (٥-٨) الشفرة الوراثية

First position (5' End)	U C A G				Third Position (3' End)
	U	C	A	G	
U	UUU] Phe UUC UUA] Leu UUG	UCU] Ser UCC UCA UCG	UAU] Tyr UAC UAA* Stop UAG* Stop	UGU] Cys UGC UGA* Stop UGG Trp	U C A G
C	CUU] Leu CUC CUA CUG	CCU] Pro CCC CCA CCG	CAU] His CAC CAA CAG	CGU] Arg CGC CGA CGG	U C A G
A	AUU] Ile AUC AUA AUG+ Met	ACU] Thr AAC ACA ACG	AAU] Asn AAC AAA AAG	AGU] Ser AGC AGA AGG	U C A G
G	GUU] Val GUC GUA GUG+	GCU] Ala GCC GCA GCG	GAU] Asp GAC GAA GAG	GGU] Gly GGC GGA GGG	U C A G

* كودونات الإنهاء أو عديم المعنى

* يستخدم أيضا لتحديد كودون البدء $tRNA^{Met}$ - Met-formly لذلك فإن كودون القالين غير محدد "غامض" حيث أنه يشفر لكلا من القالين والمثيونين.

الخواص الرئيسية للشفرة الوراثية:

Major Characteristics of The Code:

أولاً : الشفرة الوراثية تقرأ بصورة مستمرة بلا فواصل أو تداخل بين الكودونات:

The Code is Comma Free and Non Overlapping:

أمكن إثبات عدم التداخل في قراءة ثلاثيات الكودونات في الشفرة الوراثية بمتابعة تأثير استحداث طفرات القاعدة الواحدة single base mutation في تتابع القواعد في جزئ د ن أ. فإذا حدث تداخل بين الكودونات، فإن معنى ذلك أن ينتج لدينا تغيير في أكثر من حامض أميني واحد في سلسلة البروتين الناتجة؛ في حين لو كانت الشفرة غير متداخلة فسيقتصر التغيير على حامض أميني واحد نتيجة لطفرة استبدال القاعدة الواحدة كما هو موضح في المثال التالي:

عند عدم وجود تداخل	عند وجود تداخل	تتابع القواعد لكودونات الأحماض الأمينية
a b (AGU) (ACG)	a b c d (AGU) (GUA) (UAC) (ACG)	mRNA الطبيعي AGUACG
x b (AGC) (ACG)	x y z d (AGC) (GCA) (CAC) (ACG)	↓ mRNA الطافر AG C ACG

حيث نجد أنه إذا كانت الشفرة متداخلة، سيؤدي الاستبدال في قاعدة واحدة إلى تغيير مقابل في ثلاث أحماض أمينية نوعية في البروتين الناتج في حين أنه في حالة الشفرة غير المتداخلة سيقصر التغيير على استبدال حامض أميني واحد في البروتين. وقد دلت نتائج التجارب على أن الفرض الثاني هو الصحيح والأمثلة كثيرة منها:

١- وجد انجرام Ingram أن الطفرة Hbs المسؤولة عن انتاج هيموجلوبين منجلي طافر يؤدي إلى الأنيميا المنجلية تشتمل على تغيير في حامض أميني واحد نتيجة لاستبدال قاعدة واحدة بقاعدة أخرى في الجين؛ مما أدى إلى إحلال الفالين في البروتين الطافر محل الجلوتامين في البروتين الطبيعي.

٢- استحدث ويتمان Wittman طفرات في فيروس TMV- RNA وذلك بمعاملة الحامض النووي بالمطفرات، وعند عزل البروتينات من السلالات الطافرة وهضمها بإنزيم التربسين وتحليلها، وجد أنه في جميع الحالات لم يحدث إلا استبدال لحامض أميني واحد فقط في أي من المواقع الطفرية.

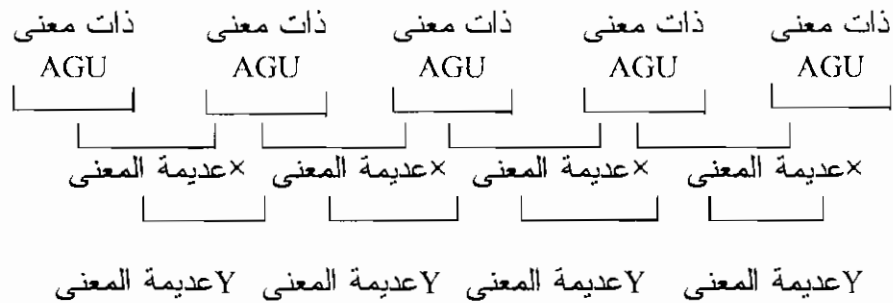
٣- وجد يانفسكي Yanofsky أنه عند استبدال أحد الأحماض الأمينية في السلسلة A من أنزيم Tryptophan Synthetase في بكتريا القولون بإحدى المطفرات، فقد تبين أن الحامضين الأمينيين الواقعين على جانبي هذا الحامض المستبدل لم يتغيرا بالمرة.

فإذا اتفقنا على أن الشفرة غير متداخلة، فإن ذلك يحتم أن يكون هناك طرق للقراءة الصحيحة أو القراءة الخطأ وإلا لأمكن قراءة التتابع النيوكليدي التالي في ثلاث إطارات للقراءة مختلفة كالآتي:

AGU AGU AGU AGU AGU	فمثلاً التتابع
(AGU) (AGU) (AGU) (AGU) (AGU)	حيث قد يقرأ :
(GUA) (GUA) (GUA) (GUA) (GUA)	أو
(UAG) (UAG) (UAG) (UAG) (UAG)	أو

وبالطبع ستتم ترجمة كل من هذه القراءات الثلاث إلى أحماض أمينية نوعية مختلفة اعتماداً على نقطة بدء القراءة.

يمكن التغلب على هذه الصعوبة إما بأن تتم قراءة التتابع النيوكليدي من نقطة بدء نوعية محددة وثابتة، أو أن تكون طبيعة الشفرة الموروثة تسمح بالقراءة الصحيحة فقط بحيث تمنع حدوث الأخطاء. وقد اقترح كريك Crick مفهوم "شفرة بدون فواصل" على أساس أن إطار القراءة الصحيح موروث في التتابع نفسه، بحيث أن بعض تتابعات القواعد ستمثل أحماض أمينية في حين لا يكون للبعض الآخر أى معنى في هذا المجال. على ذلك فإن بعض الكودونات الأربعة والستين فقط هي التي تستخدم في التشفير عند الترجمة. وعند كل نقطة في الشفرة ستكون هناك قراءة واحدة فقط هي الصحيحة في حين تكون جميع القراءات المحتملة الأخرى عديمة المعنى ولا تشفر لأى حامض أمينى. بمعنى أنه إذا تجاوزت الكودونات فى إطار واحد معين، فإن القراءة ستكون صحيحة وذات معنى Sense فى حين أن جميع الإطارات الأخرى المتداخلة للقراءة ستكون غير صحيحة أو عديمة المعنى Nonsense وعلى ذلك تكون :



ف نجد أنه فيما عدا القراءة في الإطار الأول التي تمثل القراءة الصحيحة نجد أن كل من الاحتمالات الأربعة للكودونات الثلاثية XXX المحتملة في الإطارات الأخرى للقراءة لن تكون ممثلة أو محددة لأحماض أمينية ولكنها عديمة المعنى حيث أنها لو كانت تشفر لحامض أميني واحد مترادف فإن التتابع XXXX وكذلك التتابع YYYYY سيعطى قراءة ذات معنى في الإطار الخطأ.

وقد تم تجميع الكودونات الستون الأخرى في عشرين مجموعة تحتوي كل مجموعة على ثلاث كودونات. وتشتمل كل مجموعة على توافق دواره لنفس الثلاث قواعد النروجينية ووجد أن واحداً فقط من هذه الكودونات الثلاث الموجودة في كل مجموعة تمثل حامضاً أمينياً فعلى سبيل المثال:

لو أن التتابع ذو معنى AGU AGU =

فإن التتابع عديم المعنى GUA =

والتتابع عديم المعنى UAG =

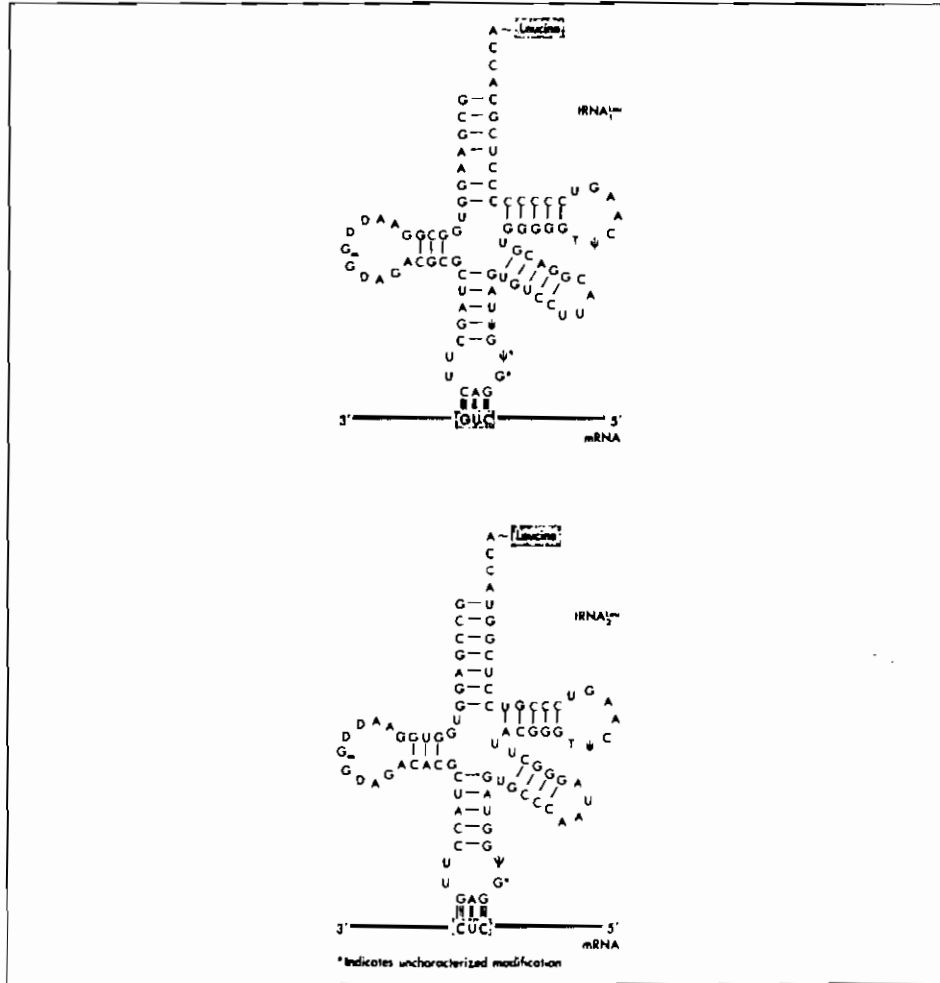
ثانياً : الشفرة ترادفية المعنى Synonyms (أو انحلالية Degenerate):

حيث يوجد لدينا ٦١ كودوناً تشفر لعشرين حامض أميني في حين تشفر الثلاثة كودونات الباقية لإنهاء أو إيقاف بناء البروتين، وفيما عدا الميثيونين والتربتوفان اللذان يوجد لكل منهما كودون واحد، فمن الواضح أن هناك أكثر من كودون واحد يمكن أن يشفر لنفس الحامض الأميني الواحد. بمعنى أن بعض الكودونات مترادفة المعنى عند القراءة (ويطلق على الشفرة في هذه الحالة بأنها انحلالية Degenerate) وعلى سبيل المثال نجد أن الليوسين يتم تشفيره بستة كودونات وهي : UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG.

ويلاحظ أنه في معظم الحالات تختلف الكودونات المترادفة عند موقع القاعدة الثالثة في الكودون في حين تكون القاعدتين الأولى والثانية ثابتتين بالنسبة لكل حامض أميني نوعي، مما يوحي بأن هذين الموقعين يعتبران الأكثر أهمية في تحديد الكودون النوعي لكل حامض (الشكل ٨-٨). وكنيجة لذلك فإن أي طفرة تحدث في القاعدة الموجودة في الموقع الثالث للكودون يمكن غالباً أن لا يكون لها تأثير سلبي على عملية الترجمة إلى بروتين، لأن الحامض الأميني المحدد ستم إضافته في مكانه من السلسلة بالرغم من حدوث هذه الطفرة وتسمى مثل هذه الطفرات بالطفرة الساكنة أو الصامتة Silent Mutation.

وقد أوضحت نتائج دراسات تتابع القواعد في د ن أ أن جميع الكودونات الأربعة والستون يمكن استخدامها في الكائن الحي *In Vivo*. وقد يعطى إمكان استخدام جميع هذه الكودونات ميزة وقائية في التقليل من تأثير الطفرات الضارة التي قد تحدث للكائن الحي. إذ لو افترضنا أن عدد كبير من الكودونات كانت عديمة المعنى فإن معنى ذلك أن الطفرات التي قد تحدث في العدد القليل الباقي ذو المعنى ستكون أكثر ضراوة وبمعدل حدوث أعلى بكثير بحيث تؤثر بالسلب على فعالية البروتين الناتج. بالإضافة إلى ذلك فإن طبيعة تنظيم الشفرات الوراثية تعمل على التقليل من تأثير الطفرات على عملية الترجمة أثناء عملية بناء البروتين. فمثلاً حتى في حالة حدوث طفرة في موقع القاعدة الأولى للكودون فإنه من المحتمل أن تتم ترجمة الكودون المتغير الناتج إلى حامض أميني مشابه في خواصه للحامض الأصلي (إن لم يعط نفس الحامض). كما أن الكودونات المحتوية على قاعدة بيريميدينية في الموقع الثاني عادة تكون مختصة بالتشفير للأحماض الأمينية الكارهة للماء Hydrophobic في حين أن الكودونات المحتوية على قاعدة بيورينية في الموقع الثاني تكون عادة مختصة بالتشفير

للأحماض الأمينية القطبية Polar (الجدول ٨ - ٥) ونظراً لأن طفرات الاستبدال المتمثل Transition هي الأكثر شيوعاً في طفرات استبدال القاعدة الواحدة، فإن أي تغيير في الموقع الثاني للكودون سيؤدي غالباً إلى استبدال حامض أميني بآخر له خواص مشابهة إلى حد كبير.



الشكل (٨-٨): وجود جزيئين مختلفين من tRNA، للحامض الأميني الليوسين بحيث يتعرف كل منهما على كودون مختلف مما يوضح ترادفية الشفرة

وكما سبق القول لن تؤثر طفرة الاستبدال المتماثل في الموقع الثالث على التخصصية الموروثة للكودون بالنسبة للتشفير للحامض الأميني النوعي بل والأكثر من ذلك فإنه حتى لو حدثت طفرة استبدال غير متماثل Transversion في هذا الموقع بالذات فإنه لن يكون لها تأثير على الحامض الأميني المضاف في حوالى نصف الحالات.

كما توجد خاصية أخرى مميزة في الشفرة الوراثية وهى أنه طالما أن الموقعين الأول والثاني يكونان مشغولين بالقاعدة G أو C فإن أى من القواعد الأربعة المحتملة لو احتلت الموقع الثالث ستعطى كودون مختص بالتشفير لنفس الحامض الأميني. ولو قارنا في الجدول (٨-٥) على سبيل المثال الكودونات الخاصة بكل من الأحماض الأمينية الألانين، البرولين، الأرجينين والجلاليسين فسوف تتضح هذه الظاهرة.

ومن جهة أخرى، وفي حالة ما إذا كان الموقعان الأول والثاني للكودون مشغولين بالقاعدة A أو U فإن نوع القاعدة الموجودة في الموقع الثالث سيكون له تأثير كبير على نوع الحامض الأميني الذى تترجم له هذه الكودونات. ويفسر ذلك على أساس أن زوج القواعد GC يرتبط بقوة أكثر من الزوج AU. لذلك فإن التزاوج غير الصحيح فى القاعدة الثالثة فى الحالة الأولى يمكن احتمالها نظراً لارتباط الموقعين الأول والثاني بروابط قوية (هيدروجينية) بين الزوج GC عما فى حالة AU حيث تكون الروابط ضعيفة نسبياً. ولذلك فإن وجود أى من النيوكليوتيدات الأربعة فى الموقع الثالث بصفة عامة قد يكون مرتبطاً بميكانيكية أمان للتقليل من أخطاء قراءة الشفرة الوراثية.

ثالثاً : التآرجح فى مضاد الشفرة Wobble in Anticodon:

إذا افترضنا من البداية أنه يوجد فى كل جزئ tRNA مضاد للشفرة لكل كودون فإن معنى ذلك أنه لابد أن يكون لدينا على الأقل ٦١ نوع مختلف من tRNA بالإضافة إلى ثلاثة إضافية تختص بإنهاء الترجمة. إلا أن الأدلة أكدت على أن هناك عدد أقل من tRNA عما كان متوقعاً حسب ذلك الافتراض، وأن كل tRNA نوعى يمكنه أن يميز عدد من الكودونات المختلفة. وقد ساعد على ذلك اكتشاف قاعدة غير عادية فى مضاد الشفرة على tRNA وهى قاعدة الأنوسين Inosine، وهى تختلف عن القواعد الأربعة المعروفة، وتنشأ نتيجة لعملية تعديل إنزيمى فى قاعدة الأدينين فى عروة مضاد الشفرة فى جزئ tRNA حيث يتم نزع مجموعة الأمين على ذرة الكربون رقم ٦ فتصبح مجموعة كيتونية على هذه الذرة وينتج الأنوسين.

وقد اقترح Crick مفهوم التآرجح Wobble لتفسير ذلك. ويعنى هذا المفهوم أن القاعدة فى النهاية 5' فى مضاد الكودون ليس ثابتاً (أو مقيداً) فى مكانه مثل القاعدتين الأخريتين مما يسمح بتكوين روابط هيدروجينية مع أى من عدة قواعد واقعة على النهاية 3' فى الكودون المقابل. إلا أنه تبين أن ذلك لا يشمل جميع التباديل الممكنة حيث وجد أن التزاوج فى هذه الحالة يقتصر على القواعد المبينة فى الجدول (٨-٦).

الجدول (٨-٦) التزاوجات الممكنة حسب مفهوم التآرجح

القاعدة الأولى في مضاد الكودون	القاعدة الثالثة في الكودون
G	U أو C
C	G
A	U
U	A أو G
I	A أو U أو C

وطبقاً لهذا الجدول فإنه من الممكن للقاعدة U في الوضع المتأرجح (الأول في مضاد الكودون) أن تتزاوج مع الأدينين أو الجوانين. كما تستطيع قاعدة الإنوسين I أن تتزاوج مع A أو U أو C. تبين أن التزاوجات بين القواعد المسموح بها حسب مفهوم التآرجح هي تلك التي تعطى مساحة ريبوز - ريبوز قريبة من تلك المحددة بتزاوجات AU أو GC. وعلى ذلك فإن التزاوجات التي قد تتم بين قاعدتي بيورين أو بين قاعدتي بيريميدين سيكون من شأنها إعطاء مسافة ريبوز أطول أو أقصر من اللازم مما يؤدي إلى فشل التزاوج.

تبين أن قوانين التآرجح لأي من tRNA لا تسمح بأن تتعرف قاعدة ما على جميع الكودونات الأربعة. وكما هو واضح من الجدول أعلاه فإن الإنوسين يمثل أقصى حد يمكن لقاعدة في مضاد الكودون أن تتعرف على قواعد الموقع الثالث في الكودون (وهي هنا ٣ قواعد).

وقد أيدت جميع الدراسات الحديثة مفهوم التآرجح، فقد تنبأ Crick من البداية بوجود ثلاثة أنواع على الأقل من tRNA للكودونات الستة الخاصة بالسيرين (AGC, AGU, UCG, UCA, UCC, UCU).

كما أن الحامضين الأمينيين الآخرين (الليوسين والأرجينين) والمشفّر كل منهما بستة كودونات تمتلك أنواع مختلفة من tRNA لمجموعة الكودونات التي تختلف في الموقع الأول أو الثاني.

تبين أن ذلك يرجع إلى أن القاعدة في الموقع الأول في مضاد الكودون Anticodon (على النهاية 5') تكون لها حرية حركة أكثر عن تلك الموجودتين في الموقعين الآخرين، مما يفسر وجود التآرجح في الموقع الثالث 3' للكودون. وعلى العكس من ذلك نجد أن الموقع الثالث في مضاد الكودون (3') يكون مقيد الحركة مما قد يفسر انعدام حدوث ظاهرة التآرجح في الموقع الأول (5') للكودون.

رابعاً : كودون بدء الترجمة (AUG) Initiation Codon

وكودونات إنهاء الترجمة (UAC, UAA, UGA) Termination Codons:

حيث أن بناء البروتين يتم في الاتجاه من 3' → 5' كما سيأتي بعد، وحيث أن البناء يتم من النهاية الأمينية NH_2 ؛ فقد تبين أن إشارة البدء لبناء البروتين هي الكودون AUG. وقد وجد أن هذا الكودون له وظيفتين متميزتين، فعندما يكون AUG في بداية منطقة التشفير Coding Region لجزء mRNA في البكتيريا فإنه سيشفّر لإضافة N-Formyl Methionine (Fmet) في حين أن نفس الكودون AUG في أي مكان آخر بعيد عن منطقة البدء هذه سيشفّر للميثيونين العادي (Met).

وكما سيأتي عند دراسة عملية بناء البروتين في البكتيريا، فإنه يوجد نوعاً مميزاً من tRNA يسمى fmet-tRNA يختلف عن tRNA الخاص بالميثيونين العادي. ولكي يتم ارتباط fmet-tRNA بالريبوسوم فإن الأمر يتطلب وجود

بروتين نوعي يسمى بروتين البدء رقم 2 (Initiation Factor2) (IF2) : في حين يستخدم met tRNA نفس عامل الاستطالة Elongation Factor الذي تستخدمه بقية أنواع tRNA الأخرى. جدير بالذكر أنه في مميزة النواة يوجد نوع واحد من tRNA، جزئ البدء $tRNA_i^{met}$ مختص ببدء بناء سلسلة البروتين حيث تبدأ السلسلة هنا بالميثيونين وليس Formyl Methionine.

يجب التنويه هنا إلى أن mRNA الطبيعي *In Vivo* يبدأ الترجمة دائماً بالكودون AUG في حين أن ذلك ليس شرطاً حتماً في حالة استخدام mRNA التركيبي في المعمل *In Vitro* كما في حالة التجارب التي استخدمت لاستنباط الشفرات الوراثية والتي سبق شرحها.

من جهة أخرى، تؤدي قراءة أي من الكودونات الثلاثة : UAG, UAA, UGA إلى توقف استطالة السلسلة وإنهاء عملية بناء البروتين Termination. إذ أنه عندما يصل الريبوسوم إلى أحد هذه الكودونات الثلاثة فإن سلسلة متعدد الببتيد التامة استطالة تنزلق من على الريبوسوم وتتفك عنه. وعلى العكس من جميع الكودونات الأخرى نجد أن كودونات الإنهاء الثلاثة هذه لا يمكن التعرف عليها بأي من tRNA النوعية المعروفة، في حين يتم التعرف عليها وقراءتها بواسطة بروتينات نوعية تسمى عوامل الانفكاك أو الإنهاء Release Factors (RF) كما سيأتي بعد.

وتجدر الإشارة إلى أنه قد يوجد أكثر من كودون إنهاء الشفرة جنباً إلى جنب في نهاية منطقة التشفير كضمان إضافي لايقاف عملية بناء البروتين عند نهاية منطقة التشفير Coding Region في جزئ mRNA.

خامساً : اختلاف مقادير tRNA النوعية وتكرار استخدام الكودونات المختلفة في الشفرة:

يحدث أحياناً أن عدة جزيئات من tRNA التي تم بناؤها قد تحتوى على تتابعات نيوكليديده مختلفة كثيراً ولكنها في نفس الوقت تحتوى على نفس مضاد الكودون المختص بكودون نوعي لحامض أميني معين. وغالباً ما تكون إحدى هذه النوعيات المتشابهة موجودة بمقادير كبيرة بالمقارنة بالنوعيات الأخرى الحاملة لنفس مضاد الكودون (قد تصل إلى أكثر من حوالى ١١ ضعف). ففي بكتريا القولون على سبيل المثال يوجد tRNA رئيسي للتيروسين tRNA^{tyr} ونوع آخر من tRNA ثانوى بالنسبة لنفس الحامض وكلاهما يحتوى على نفس مضاد الكودون (5'-AUG-3'). وقد وجد بصفة عامة أن كلا من نوعي tRNA الرئيسى والثانوى يتم نسخهما من جينين مختلفين، وأن الفرق في تكرار وجودهما يرجع إلى اختلاف في سرعة أو معدل نسخ كل منهما والتي ترجع إلى الاختلاف في كفاءة منطقة البروموتور بينهما وكذلك لفروق أخرى في عملية تجهيز جزيئ ر ن أ الناقل tRNA بعد النسخ. لم تتحدد حتى الآن بصفة قاطعة وظيفة ر. ن. أ. الناقل الثانوى Secondary tRNA وقد يكون له دور في تنظيم عملية الترجمة نظراً لوجوده بكميات ضئيلة نسبياً كما أنه يقوم بدور في كبت فعل الجين Suppression of Gene Action.

من جهة أخرى، نجد أنه نظراً لحقيقة أن معظم الأحماض الأمينية تتحدد بأكثر من كودون واحد فإن ذلك يدعو للتساؤل عما إذا كانت جميع الكودونات الخاصة بنفس الحامض يتم استخدامها بنفس التكرار، أم أن هناك أفضلية لبعضها على البعض الآخر في معدل أو تكرار استخدامها أثناء عملية الترجمة.

فعلى سبيل المثال، فى كائن يحتوى على د ن أ غنى فى AT فإنه من المتوقع أن تكون معظم الكودونات محتوية على U أو A فى الموقع الثالث. وفى الحقيقة فقد وجد أن التتابع الكلى لجزئ د ن أ الأحادى فى جينوم البكتريوفاج ØX174 يحتوى على 24% A، 22% C، 23% G، 31% T. وقد تبين أن U هى القاعدة المفضلة بالفعل فى الموقع الثالث للكودون. وحتى فى الكائنات التى لا يوجد تحيز فى نسب تكوين القواعد، نجد أن استخدام الكودونات ليس متروكاً للصدفة. وحيث أننا نعرف الآن تتابع القواعد لكثير من جينات بكتريا القولون فقد أصبح واضحاً أن هناك بعض الكودونات التى تستخدم بمعدل عالى جداً فى حين قد لا تستخدم كودونات أخرى لنفس الحامض إلا نادراً.

وجد أنه فى جينات الكائنات الراقية، يكون استخدام الكودونات أيضاً غير خاضع للصدفة. إلا أنه تبين وجود اختلاف فى تكرار استخدام بعض الكودونات بين مميزة النواة وغير مميزة النواة. ويطلق على هذه الظاهرة تحيز الكودون Codon Bias. وجد أن تكرار ظهور كودونات نوعية معينة فى بكتريا القولون يرتبط ارتباطاً وثيقاً بمدى توفر جزئيات tRNA الخاصة بها. ويتضح ذلك بصفة خاصة فى حالة البروتينات التى يتم إنتاجها بكميات كبيرة (مثل RecA Protein والبروتينات الريبوسومية) إذ نجد أن تلك الأنواع من mRNA تحتوى على كودونات يتم قراءتها بواسطة أكثر أنواع tRNA وفرة (يطلق على جزئيات tRNA النوعية التى تحتوى على مضاد لنفس الشفرة اسم مشابهاة المستقبلات Isoacceptors)، فى حين لا يحتوى هذا الـ mRNA على كودونات مقابلة لنوعيات tRNA الثانوية.

فى خلايا مميزة النواة نجد أيضا أن الكودونات المقابلة لمشابهات المستقبلات الرئيسية من tRNA تستخدم عادة بأعلى تكرار. ومن أمثلة ذلك ما يحدث بالنسبة لبروتينات الخميرة وخاصة أنزيمى GDP, ADI حيث نجد أن أكثر من ٩٦% من الأحماض الأمينية بها يتم تشفيرها بواسطة ٢٥ كودون فقط وهى تلك التى يكون tRNA المقابل لها موجودا بوفرة.

وعلى ذلك فيبدو أنه فى الجينات ذات التعبير القوى يكون اختيار الكودون محكوما بمدى وفرة tRNA وقد يكون لذلك علاقة بتنظيم عملية الترجمة لكى تصل إلى فعاليتها المثلى. وقد يشير ذلك إلى أن الكودونات المقابلة لنوعيات tRNA النادرة قد يكون دورها هو إبطاء عملية الترجمة. وحتى عندما يتأرجح نوع واحد من tRNA ليستطيع قراءة عدة كودونات، فإن أحد هذه الكودونات يكون عادة هو المفضل. وقد أدى تحليل تلك الأفضليات الى استنتاج بعض خواص التفاعل بين الكودون ومضاد الكودون ويمكن تلخيص أهمها فى الآتى:

- أن بعض التعديلات أو التحويلات فى القاعدة U فى الموقع 5' (المتأرجح) لمضاد الكودون يعطى أفضلية للقاعدة A على G فى الموقع الثالث للكودون.
- أن القاعدة إنوسين I فى الموقع 5' (المتأرجح) لمضاد الكودون تفضل التزاوج مع القاعدة U أو C عن التزاوج مع القاعدة A.
- عندما تكون تزاوجات القاعدتين الأولتين فى الكودون مع مضاد الكودون من نوع AU، نجد أن الموقع الثالث المفضل يكون مشغولا بالقاعدة C (معطيا تزاوج GC) بدلا من U (الذى يعطى زوج ثالث من نوع AU)؛ بمعنى آخر يفضل التفاعل القوى فى تزاوج الكودون مع مضاد الكودون.

سادساً : الشفرة الوراثية عامة (تقريباً) The code is nearly universal:

وجد أن Poly-U يؤدي إلى إضافة حامض الفينيل الانين فى التجارب المعملية *in Vitro* فى مستخلصات خلوية مأخوذة من أنواع مختلفة من الكائنات تتراوح بين البكتريا والثدييات. ونفس الشيء تم الحصول عليه عند استخدام Poly C حيث وجد أنه يحفز إدخال البرولين فى تكوين عديد البرولين. وكذلك الحال فى Poly A الذى يختص بالتشفير لليسين فى متعدد الليسين. وقد تم ذلك بصفة عامة بصرف النظر عن نوع المستخلص الخلوى أو مصدره. وقد تأكدت شمولية الشفرة وانطباقها على جميع أنواع الكائنات تقريباً بتجارب حديثة اشتملت على دراسة تتابع القواعد فى د ن أ لجينات محددة تشفر لبروتينات تنتمى إلى أنواع Species مختلفة، وبهذا يبدو أن الشفرة الوراثية قد ظلت ثابتة على مدى أحقاب تطورية طويلة.

من جهة أخرى وجد أن الشفرة الوراثية فى جينوم الميتوكوندريا mtDNA فى الإنسان وغيره من الثدييات قد شذت عن هذه القاعدة فى بعض الخواص ومنها:

- أن الكودون UGA لا يقرأ فى الميتوكوندريا على أنه كودون إنهاء الترجمة ولكنه يشفر لحامض التربتوفان.
- أن الميثيونين الداخلى يتم تشفيره بكل من الكودونين AUG, AUA بدلا من الأيزوليوسين فى حين أن الميثيونين فى بداية الترجمة يشفر له بالكودونات : AUG, AUA, AUU, AUC.
- أن الكودونين AGG, AGA ليسا كودونان للتشفير للأرجينين ولكنهما بدلا من ذلك يستخدمان كإشارة لإنهاء الترجمة فى الميتوكوندريا. وبذلك يوجد

أربع كودونات لوقف الترجمة في الميتوكوندريا وهى : UAA, UAG, UGA, AGG.

— أن عدد أنواع tRNA في الميتوكوندريا يقل بكثير عما فى سيتوبلازم الخلية مميزة النواة حيث لا يزيد فى الأولى عن ٢٢ نوع فقط فى حين يصل فى الثانية إلى ٣١ نوع.

تأكيد الشفرة الوراثية فى الخلية الحية:

In Vivo Confirmation of The Code:

أمكن التأكيد على صحة الخواص الرئيسية للشفرة الوراثية باستخدام بكتريوتا ج MS2 والذى يتكون جينومه من سلسلة مفردة من ر ن أ ويبلغ طوله ٣٥٠٠ ريبونوكليوتيد تمثّل ثلاث جينات فقط وقد تمكّن فيرز ومعاونوه Fiers *et al.* من تحليل تتابع هذه الجينات ونواتجها من سلاسل متعدد الببتيدات.

وعند مقارنة تتابع التيوكلتيدات فى الجين مع تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج، تبين وجود تواءم (تطابق) بين التتابعين بمعنى أنه وطبقا لقاموس الشفرة الوراثية فإننا نجد أن التتابع الخطى للتيوكلتيدات (وبالتالى تتابع ثلاثيات الشفرات) تتفق تماما مع التتابع الخطى للأحماض الأمينية للبروتين وبالإضافة إلى ذلك، فقد وجد أن كودون أول حامض أميني هو AUG وهو كودون البدء، فى حين كان كودون آخر حامض أميني فى السلسلة متبوعا بكودونين مترادفين لإنهاء الترجمة وهما UAG, UAA وقد ثبت بعد ذلك بطرق التحليل فى الحى *In Vivo* أن خواص الشفرة الوراثية التى تأكدت فى البكتريا والفيروس تتشابه تماما مع تلك الموجودة فى مميزة النواة.

الفصل التاسع

بناء البروتين Protein Synthesis

تقوم الأنواع الثلاثة من ر ن أ وهي: rRNA, tRNA, mRNA بالدور الرئيسي في عملية الترجمة Translation، أى بناء البروتين، حسب المعادلة المركزية Central Dogma :

Replication النسخ



وكان يعتقد في البداية أن جميع هذه الأنواع الثلاثة تستخدم كقالب template في عملية الترجمة، إلا أنه تبين أن واحدا منها فقط وهو ر ن أ المراسل mRNA هو الذى يقوم بالفعل بدور القالب، فى حين يقوم النوعان الآخران بأدوار أخرى هامة للمساعدة فى توجيه وإتمام عملية الترجمة.

وقد دلت الدراسات على أنه لا توجد علاقة تجاذب نوعية specific affinity بين المجاميع الجانبية فى كثير من الأحماض الأمينية وبين القواعد النيتروجينية الموجودة فى mRNA القالب، لذلك اتجهت البحوث إلى محاولة التعرف على نوعية معينة من ر ن أ تقوم بدور الوسيط أو المهيئ adaptor بين

ر ن أ المراسل mRNA وبين الأحماض الأمينية ليعمل كهزمة الوصل بينهما وقد تم التوصل إلى أن جزيئات ر.ن.أ. الناقل tRNA هي التي يمكنها أن تقوم بهذا الدور.

تحتوى الخلية على مجموعة من ر ن أ الناقل وهى عبارة عن جزيئات من الأحماض النووية الريبوزية صغيرة الحجم (بطول حوالى ٧٠-٩٠ نيوكليوتيد). يسمح تركيب جزيئ tRNA بوجود موقعين نوعيين مستقلين ويمكن لأحدهما أن يتعرف على ويرتبط بالحامض الأميني بمساعدة أنزيم نوعى يسمى tRNA Synthetase؛ فى حين يقوم الموقع الآخر الموجود فى الطرف الآخر من الجزيئ والمحتوى على مضاد الكودون بالتعرف على ثلاثية الكودون الموجودة فى تتابع القواعد على جزيئ mRNA مما يسمح للأحماض الأمينية بأن تصطف طبقا لهذا التتابع النيوكليوتيدى.

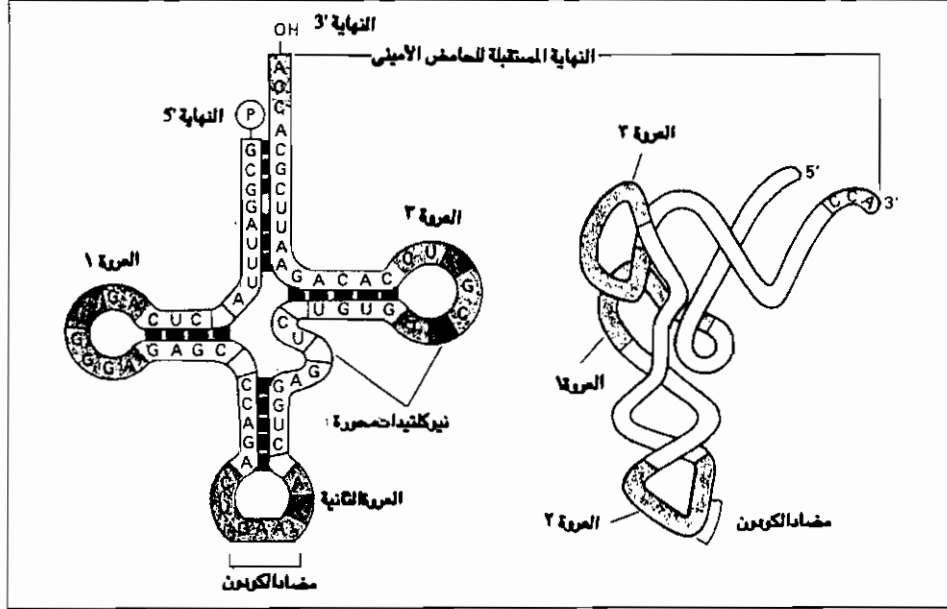
يسمح تركيب جزيئ tRNA بأن يرتبط بحامض أميني واحد من الأحماض العشرين المعروفة. فمثلا يطلق على tRNA المتخصص فى حمل أو نقل الجلايسين اسم tRNA^{gly}. وهكذا.. ويوجد لكل حامض أميني نوع واحد من tRNA التخصصى وقد توجد عدة أنواع من tRNA يستطيع كل منها التفاعل مع نفس الحامض الأميني.

قبل أن يشارك الحامض الأميني فى بناء سلسلة متعدد الببتيد، فإن نهايته الكربوكسيلية (-COOH) ترتبط تساهميا مع النهاية 3' لجزيئ tRNA النوعى المحتوى على مضاد الكودون الصحيح الخاص بهذا الحامض (مضاد الكودون هو التتابع الثلاثى المكمل لتتابع الكودون الثلاثى النوعى لحامض أميني معين على جزيئ mRNA). يؤدى التزاوج الصحيح بين الكودون ومضاد الكودون

بواسطة الروابط الهيدروجينية إلى اماكن وضع الحامض الأميني في مكانه في سلسلة البروتين النامية طبقا للأوامر الموجودة في تتابع النيوكليوتيدات في جزيء mRNA، مما يسمح بالاستخدام الصحيح للشفرة الوراثية في ترجمة تتابع النيوكليوتيدات إلى تتابع مقابل من الأحماض الأمينية في البروتين. يقوم tRNA بدور أساسي كوسيط في عملية الترجمة حيث ترتبط إحدى نهايتيه بحامض أميني نوعي في حين تتزاوج النهاية الأخرى مع الكودون الخاص بهذا الحامض على جزيء mRNA أي يمكن القول بأن tRNA يقوم بدور همزة الوصل بين تتابع النيوكليوتيدات وتتابع الأحماض الأمينية. من جهة أخرى تؤدي الرابطة التساهمية التي تحدث بين الحامض الأميني وبين جزيء tRNA إلى تنشيط الحامض الأميني عن طريق تكوين رابطة ذات طاقة عالية عند النهاية الكربوكسيلية لهذا الحامض بحيث يمكنها أن تتفاعل مع المجموعة الأمينية للحامض الأميني التالي في تتابع متعدد الببتيد، حيث تستخدم طاقة التنشيط هذه في تكوين رابطة ببتيدية. تعد عملية التنشيط هذه ضرورية لبناء البروتين لأن الأحماض الأمينية غير المنشطة لا يمكن إضافتها مباشرة إلى سلسلة متعدد الببتيد النامية.

تعتمد وظيفة جزيء tRNA على دقة تركيبه الثلاثي الأبعاد Three Dimension Structure. وقد أمكن دراسة التركيب الدقيق لعدة جزئيات مختلفة من tRNA وذلك بتقنيات متخصصة، وقد وجد أن جزيء tRNA يحتوي على مناطق تكون فيها سلسلة متعدد النيوكليوتيدات متزاوجة في حين توجد مناطق محتوية على قواعد متحورة Modified. كما تبين حدوث تفاعلات غير عادية بين القواعد لكي يتمكن الجزيء من الانثناء أو الانطباع. ظهر في التركيب الدقيق لجزيء tRNA احتواءه على عروات وسيفان متزاوجة القواعد بحيث يأخذ

تركيب الجزيء شكلا يشبه شكل ورقة البرسيم clover leaf shape ويعتقد أنه لابد أن يتم تحويل هذا الشكل بدرجة أكثر تعقيدا حتى تأخذ شكل حرف L لكي يكون الجزيء فعالا ويقوم بوظيفته كمهيئ، كما في الشكل (٩-١).

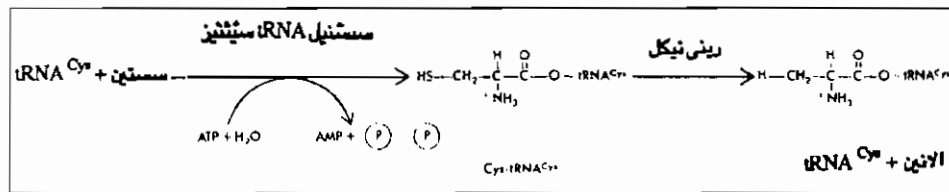


الشكل (٩-١): التركيب ثلاثي الأبعاد لجزيء tRNA ويتبين المناطق ذات القواعد المتزاوجة تخطيطيا في الشكل الأيسر (شكل تركيب ورقة البرسيم) في حين يتبين التركيب ثلاثي الأبعاد (شكل حرف L) إلى اليمين. تستقبل أحد النهايات الحامض الأميني، في حين تحتوى النهاية الأخرى على النيوكليوتيدات الثلاثة لمضاد الكودون. يرتبط الحامض الأميني في النهاية ذات التتابع CCA عند النهاية 3' للجزيء

وقد تبين وجود عدد من النيوكليوتيدات غير العادية في جزيء tRNA قد تصل نسبتها إلى حوالي ١٠% من إجمالي النيوكليوتيدات، والتي تنشأ عن عملية تحويل أو تعديل للنيوكليوتيدات العادية في عملية التجهيز التي تعقب عملية نسخ tRNA. وقد تبين أن وجود هذه النيوكليوتيدات غير العادية يساعد على أن يأخذ جزيء tRNA التركيب المطلوب لكي يقوم بوظيفته.

دور أنزيم Aminoacyl-tRNA Synthetase في عملية الترجمة:

وجد أن جزئ tRNA، وليس الحامض الأميني الذي يحمله، هو الذى يحدد مكان إضافة هذا الحامض فى سلسلة متعدد الببتيد أثناء عملية الترجمة. وقد تأكد ذلك بوضوح بعد تجربة مثيرة تم فيها تحميل $tRNA^{cys}$ بحامض السيستين، ثم أجريت عملية تحويل لحامض السيستين المحمل إلى حامض الألانين بعملية يتم فيها نزع مجموعة SH بالرينى نيكل Raney Nickel كما فى الشكل (٢-٩) وبذلك ينتج جزئ Ala-tRNA هجين أى "Alanyl-tRNA^{cys}" وعند استخدام مثل هذا الجزئ فى نظام بناء البروتين المعملى وجد أن كل موقع للسيستين فى سلسلة متعدد الببتيد الناتج قد استبدل بحامض الالانين Alanine مما يبين مبدأين أساسيين. أولهما أن الحامض الأميني المحمل ليس له دور فى تحديد موقع إضافته فى سلسلة متعدد الببتيد، والثانى والأهم أن جزئ tRNA يقوم بدور المهيئ فقط بين الحامض الأميني وبين mRNA وأن التفاعل الحرج يكمن فى التطابق الصحيح بين جزئ tRNA النوعى والحامض الأميني المخصص له، وتتم هذه المطابقة بواسطة أنزيم Aminoacyl-tRNA Synthetase.



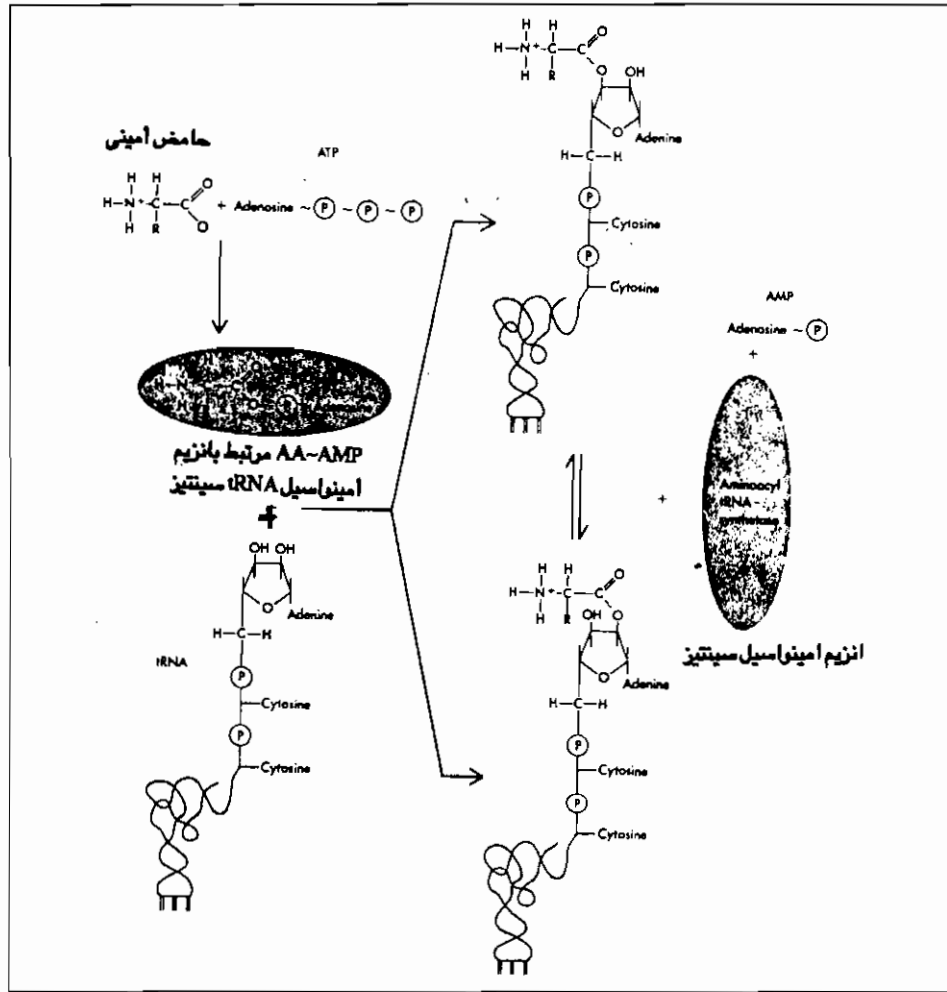
الشكل (٢-٩): تجربة لإثبات أن جزئ tRNA يقوم بدور المهيئ. أمكن تحويل السلسلة الجانبية للحامض الأمينى السيستين إلى الالانين بعد تحميل الأول على $tRNA^{cys}$. تتم إضافة الالانين فى مكان السيستين فى جزئ الهيموجلوبين

تبين وجود أنزيم نوعي Aminoacyl tRNA Synthetase متخصص لكل حامض أميني (أي يوجد 20 أنزيم من هذا النوع) بحيث يكون أحدهما متخصصاً في التزاوج بين الحامض الأميني (X) و tRNA (X)، وهكذا.

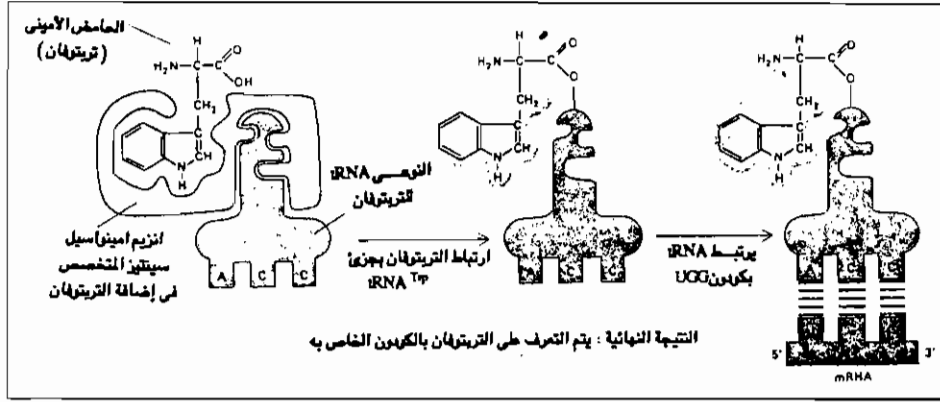
يتم تفاعل التزاوج على خطوتين ويؤدي إلى الحصول على جزئيات Aminoacyl-tRNA كما في الشكل (٩-٣). ويتضح من هذا الشكل أن هذا الأنزيم نفسه هو الذي يساعد على تنشيط الحامض الأميني كما سبق الذكر. كما يبين الشكل (٩-٤) كيف تتم ترجمة الشفرة الوراثية من خلال نشاط هذا الأنزيم من جهة ومن خلال التزاوج الصحيح بين مضاد الكودون في tRNA والكودون المقابل في جزئ mRNA القالب، ويتضح من هذا الشكل أن هاتين العمليتين مستقلتان تماماً عن بعضهما.

ولكن كيف يتسنى لهذا الأنزيم المطابقة Matching بين الحامض الأميني الصحيح وبين جزئ tRNA النوعي الخاص به، وخاصة في حالة الأحماض الأمينية المتشابهة التركيب. أمكن معرفة كيف يتم هذا التمييز بمتابعة ما تم التوصل إليه بالنسبة لأنزيم Isoleucyl-tRNA حيث أمكن لهذا الأنزيم أن يميز بين الأيزوليوسين والفالين، وهما حامضان أمينيان متشابهان تماماً فيما عدا وجود مجموعة ميثيل إضافية في حالة الأيزوليوسين وبالتالي فإن الفرق يكمن في طاقة الارتباط Binding Energy بأنزيم Isoleucyl-tRNA Synthetase والتي لا تزيد عن ٣ كيلو سعر (3 K cal) وهي مقدار ضئيل من الطاقة يبدو للوهلة الأولى أنه غير كاف لمنع الخطأ في الاختيار بين هذين الحامضين. فعلى سبيل المثال عندما يوضع Isoleucyl-tRNA Synthetase مع مخلوط متكافئ الكمية من حامض الأيزوليوسين والفالين فإنه قد يحدث التنشيط الخاطئ لجزئ

واحد من الفالين (Val-AMP) في نفس الوقت الذي يتم فيه التنشيط الصحيح لـ ١٠٠ جزئ من الأيزوليوسين (Iso - AMP) في هذا المخلوط نفسه.



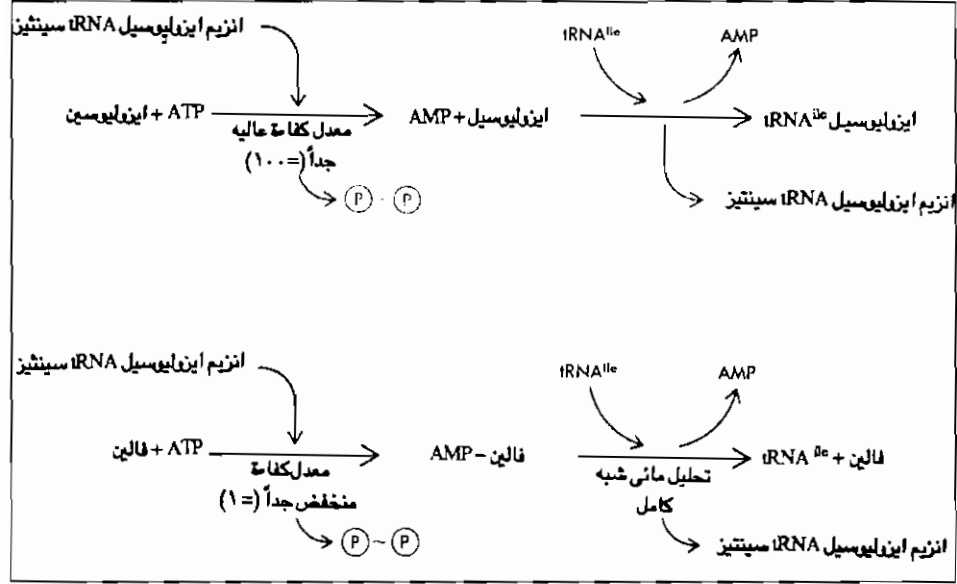
الشكل (٩-٣): تنشيط الحامض الأميني بـ ATP ونقله إلى النهاية CCA لجزئ tRNA النوعي. لاحظ أنه بمجرد أن يرتبط الحامض الأميني بالجزئ فإنه يمكنه الانتقال بسرعة بين النهاية 3', 2' OH للأدينوسين النهائي في جزئ tRNA



الشكل (٩-٤): دور كل من جزئ tRNA وأنزيم أمينو أسيل tRNA سينتيز في ترجمة الشفرة الوراثية حيث يتم ربط المحامل الأميني بجزئ tRNA النوعى عند النهاية CCA برابطة تساهمية بفعل الأنزيم في حين تتم قراءة ثلاثيات الكودون في mRNA بمضاد الكودون في عروة مضاد الكودون في tRNA حسب قانون تزاوج القواعد

وعند نقل هذه الجزئيات المنشطة من الفالين (Val~AMP) في خطوة تالية إلى جزئيات tRNA-IsoI فإنه يحدث نسبة عالية من الخطأ غير المسموح به. إلا أن هذا النقل يتم عادة بتكرار منخفض جدا حيث وجد أنه عندما يرتبط tRNA-IsoI بالمعقد:

Val~AMP - IsoI-tRNA Synthetase فإن جميع جزئيات Val~AMP تقريبا تتفكك بالتحليل المائي بسرعة إلى مكوناتها من الفالين و AMP (الشكل ٩-٥).



الشكل (٩-٥): التمييز بين الحامضين المتشابهين ايزوليوسين والفالين عند تكون ايزوليوسيل tRNA ile

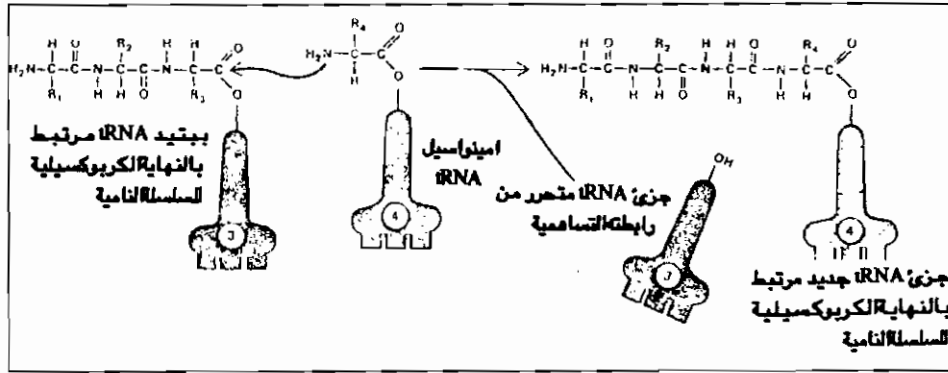
ويتطلب هذا النوع من المراجعة Proofreading الارتباط المستمر بين الحامض الأميني وبين الموقع النشط لأنزيم aa-tRNA Synthetase وذلك من خلال خطوتي التفاعل الأنزيمي الذي يقوم بها هذا الأنزيم، وبذلك يمكن أن يحدث التمييز أو التفريق بين الأيزوليوسين والفالين مرتين وبالتالي تنخفض نسبة الخطأ إلى $10^{-2} \times 10^{-2} = 10^{-4}$.

ويبدو الآن أن عملية المراجعة تحدث فقط في تلك الأنزيمات التي لا يمكن الحصول فيها على درجة كافية من الدقة في المطابقة في خطوة واحدة للاختيار. فمثلا تبين حديثا من دراسة التركيب الدقيق لأنزيم Tyrosyl-tRNA Synthetase أن هذا الأنزيم باستطاعته التمييز بين حامضين أميين متشابهين جدا وهما الفينيل الانين والتيروسين عن طريق تكوين روابط هيدروجينية نوعية

مع مجموعة OH للتيروسين وهناك مجموعات أخرى من الأحماض الأمينية يتم فيها عملية التمييز بدون الحاجة إلى مراجعة مثل الاسبارجين وحامض الاسبارتيك؛ السيتوسين والهستيدين؛ الليسين والتربتوفان.

دور الريبوسومات في تكوين الروابط الببتيدية:

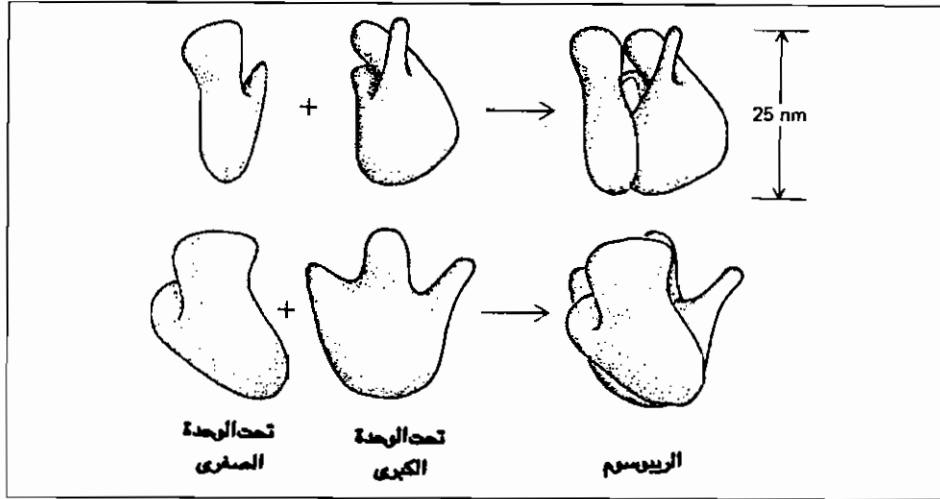
يعد تكوين الرابطة الببتيدية بمثابة التفاعل الرئيسى فى عملية بناء البروتين حيث ترتبط مجموعة الكربوكسيل (COOH -) فى النهاية النامية لسلسلة متعدد الببتيد بمجموعة الأمين (NH_2 -) الحرة للحامض الأمينى المضاف، وبالتالي فإن البروتين يتم بناؤه خطوة خطوة من النهاية الطرفية الأمينية إلى النهاية الطرفية الكربوكسيلية. ويلاحظ أنه على مدى مرحلة بناء البروتين بأكملها تظل النهاية الكربوكسيلية لسلسلة متعدد الببتيد النامية منشطة Activated عن طريق الرابطة التساهمية بينها وبين جزئ tRNA الببتيدى $\text{Peptidyl} \sim$ tRNA ويتم كسر هذه الرابطة التساهمية الغنية بالطاقة عند إضافة كل حامض أمينى. إلا أنها تعوض مباشرة عن طريق تكوين رابطة تساهمية جديدة مشابهة تتم عند إضافة أحدث حامض أمينى كما فى الشكل (٩-٦) وبهذه الطريقة يحمل كل حامض أمينى عند إضافته طاقة التنشيط المطلوبة لإضافة الحامض الأمينى التالى له وليست تلك الخاصة بإضافته هو نفسه.



الشكل (٩-٦): نمو سلسلة متعدد الببتيد خطوة بخطوة بإضافة حامض أميني في كل خطوة إلى النهاية الكربوكسيلية الغنية في الطاقة الموجودة في الرابطة التساهمية المتكونة من ارتباطها مع جزئ tRNA

وقد تبين أن عملية تكوين الرابطة الببتيدية تتم على الريبوسومات، وهى تلك الحبيبات الكروية التى تعد بمثابة السطح Work Bench الذى يتم عليه عملية بناء البروتين، لأنه لا يمكن بناء البروتين حراً فى السيتوسول، نظراً للحاجة إلى تنظيم عملية ترجمة كل كودون فى mRNA فى تتابع مضبوط وفى تنسيق تام مع مضاد الكودون الموجود فى tRNA دون أى خلل قد يؤدى إلى تغيير فى إطار القراءة وتقوم الريبوسومات بهذا الدور بالتنسيق الهام.

وتتكون الريبوسومات من معقدات كبيرة الحجم نسبياً من ر ن أ والبروتينات. ويتشابه تنظيم ووظيفة الريبوسومات فى غير مميزة النواة وفى مميزة النواة بصفة عامة فى احتواء كل منهما على تحت وحدة كبيرة Subunit وأخرى صغيرة ترتبطان معاً لتكوين معقد ذو وزن جزئى مرتفع جداً كما فى الشكل (٩-٧).



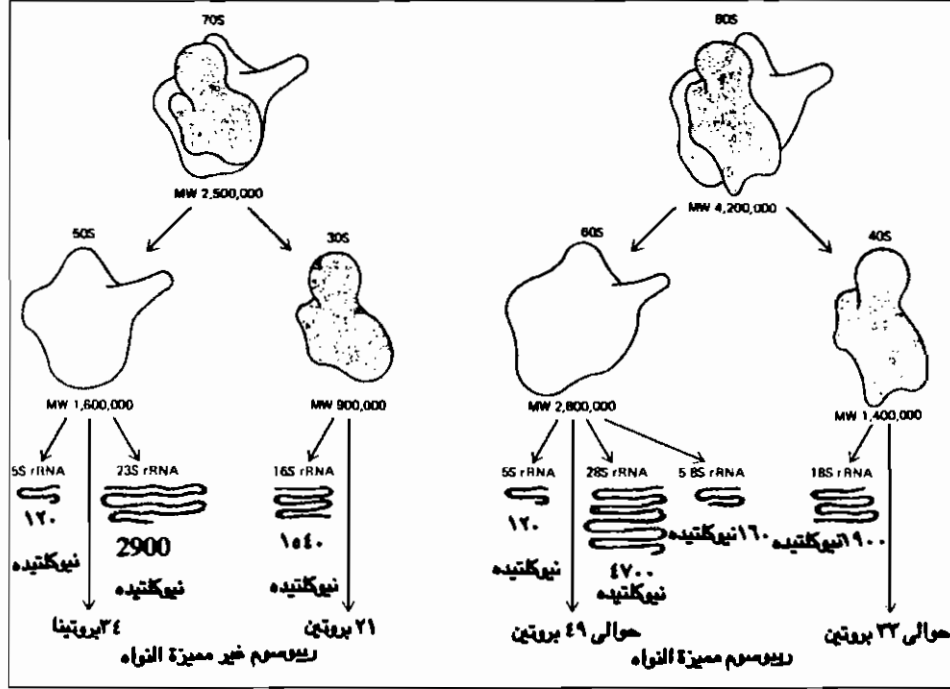
الشكل (٧-٩): نموذج ثلاثي الأبعاد للريبوسوم البكتيري كما يرى من زاويتين مختلفتين

تبين أن تحت الوحدة الصغيرة في الريبوسوم تقوم بالربط بين mRNA و tRNA، في حين تقوم تحت الوحدة الكبيرة بالمساعدة في تكوين الرابطة الببتيدية بين الأحماض الأمينية في سلسلة متعدد الببتيد.

وجد أن حوالى أكثر من نصف وزن الريبوسومات عبارة عن rRNA وتوجد أدلة متزايدة على أن جزئيات rRNA تلعب دوراً رئيسياً في النشاط الحفزي (الأنزيمي).

يحتوى الريبوسوم على عدد كبير من البروتينات إلا أن معظمها لم تعرف له وظيفة محددة بعد مما يرجح أن بروتينات الريبوسوم تقوم أساساً بتنشيط أو تحفيز وظيفة rRNA وأن جزئيات rRNA وليست البروتينات الريبوسومية هي التي تساعد في كثير من التفاعلات الأنزيمية التي تتم على الريبوسوم. تجدر الإشارة هنا إلى أنه لم تتوفر حتى الآن معلومات تدل على إمكان احتواء rRNA

على أى معلومات وراثية أو على قيامه بدور القالب فى عملية الترجمة. ويلخص الشكل (٨-٩) المقارنة بين تركيب الريبوسومات فى غير مميزة النواة وفى مميزة النواة.



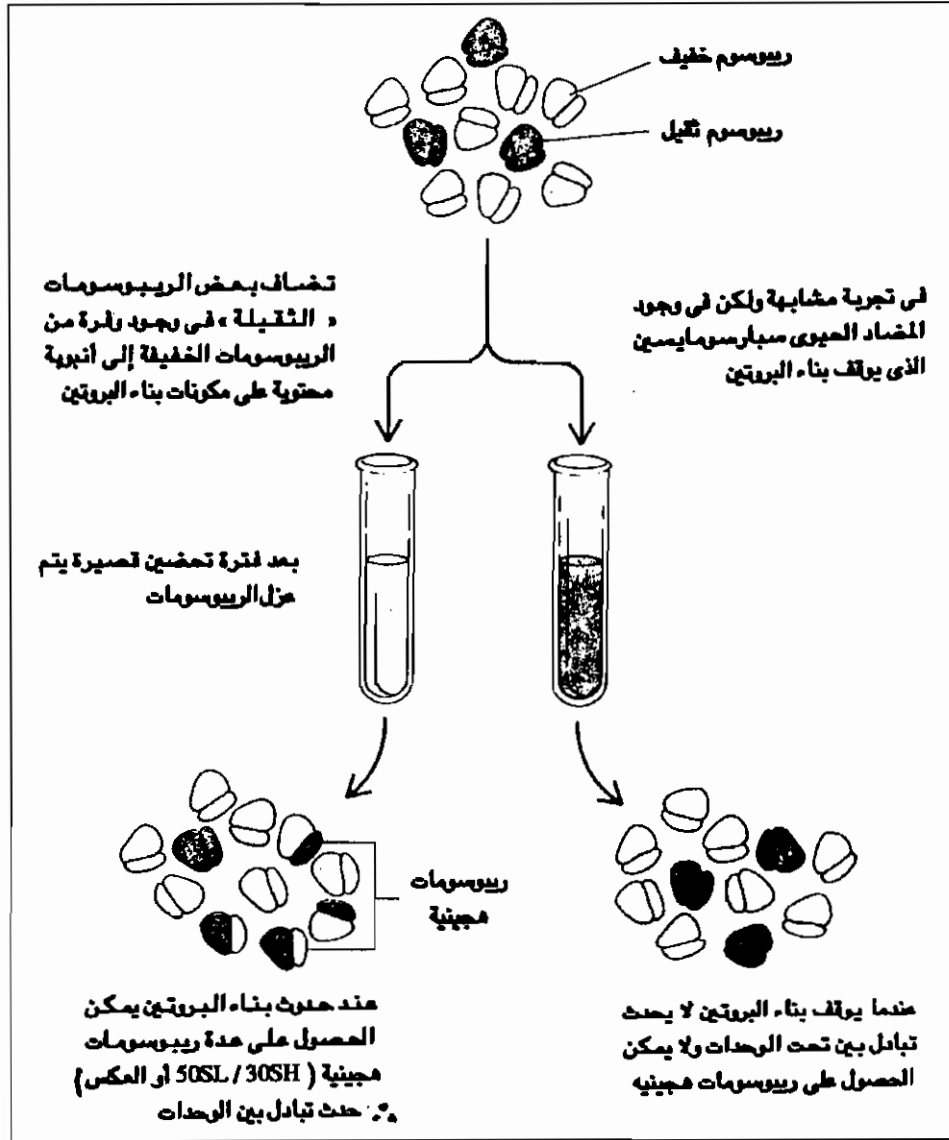
الشكل (٨-٩): مقارنة بين تركيب ريبوسومات غير مميزة النواة ومميزة النواة

تبين أن تحت الوحدتين المكونتين للريبوسوم لا تكونان مرتبطتين بصفة دائمة ولكن يتم ارتباطهما فقط عندما يبدأ اشتراك الريبوسوم فى عملية بناء البروتين، ثم انفصالان مرة أخرى عند الانتهاء من ترجمة آخر شفرة (كودون) على mRNA لتبدأ دورة جديدة وهكذا. وقد استدل على ذلك من تجارب تمت على بكتريا القولون وفى الخميرة، حيث أظهرت تلك التجارب أن معظم الريبوسومات يتم تفكيكها إلى تحت وحداتها وإعادة اتحادها بصفة دورية. إذ أنه

عند تنمية الخلايا في نظائر مشعة (ثقيلة) ثم نقلها إلى بيئة غير مشعة (خفيفة) بدأت تظهر ريبوسومات هجينية :

(L 50 S /H30S أو H 50 S/L 30 S) ويدل معدل ظهورها على أن تحت الوحدات يتم تبادلها بمعدل مرة في كل دورة بناء للبروتين. وقد تم التأكد من ذلك بتجربة معملية لبناء البروتين *In Vitro* حيث يمكن متابعة مصدر الريبوسومات الثقيلة (المشعة) في وجود كمية فائضة من الريبوسومات الخفيفة (غير المشعة). ففي خلال حوالى دقيقة (وهي الفترة التي يستغرقها بناء سلسلة كاملة من البروتين في البكتريا) وجد أن معظم الريبوسومات الثقيلة قد اختفت في نفس الوقت الذي ظهرت فيه ريبوسومات هجينية (H 50S/L 30S أو L 50S/H 30S) كما في الشكل (٩-٩).

ومما يؤكد أن هذا التبادل بين تحت الوحدات يعتمد كلية على عملية بناء البروتين، تبين أنه عند إضافة المضاد الحيوى Sparsomycin الذى يوقف استطالة سلسلة متعدد الببتيد، فإنه في نفس الوقت يمنع التبادل بين تحت وحدات الريبوسوم كما هو موضح بالشكل (٩-٩).

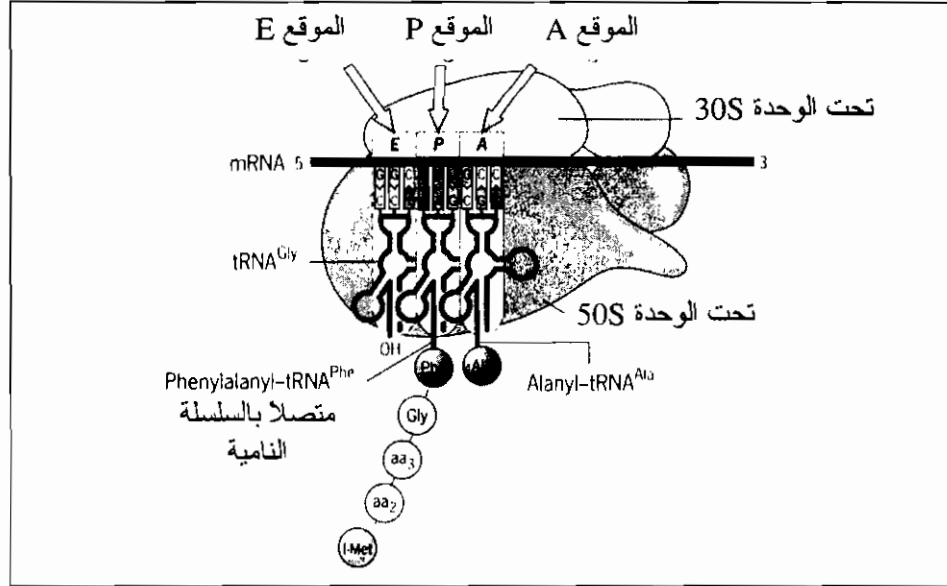


الشكل (٩-٩): الاعتماد الاجباري لتبادل تحت وحدات الريبوسوم على عملية بناء البروتين

تحرك الريبوسومات خطوة خطوة على سلسلة mRNA القالب:

يحتوى الريبوسوم على أربعة مواقع للارتباط بجزئيات ر ن أ وهى :
 موقعا خاصا للارتباط بسلسلة mRNA ويوجد فى تحت الوحدة الصغيرة 30S
 وثلاث مواقع لارتباط tRNA ويشارك فى تكوينها تحت الوحدات 30S، 50S
 معا. وهذه المواقع الثلاثة الأخيرة تسمى أحدهما موقع ارتباط tRNA الببتيدى
 tRNA Binding Site - Peptidyl أو الموقع "P" "P-site" وهو الذى يتصل به
 جزئ tRNA المرتبط بالنهاية النامية لسلسلة متعدد الببتيد. أما الموقع الثانى
 فيسمى موقع ارتباط امينواسيل tRNA. tRNA Binding Site - Aminoacyl أو
 "A site" ويرتبط به جزئ tRNA التالى والمحمل بالحامض الأمينى المراد
 إضافته إلى السلسلة النامية لمتعدد الببتيد. أما الموقع الثالث فيسمى موقع الخروج
 "Exit Site" "E Site" فيصل إليه tRNA بعد تفريغ شحنته من الحامض الأمينى
 الخاص به تمهيدا لإنفكاك هذا الجزئ من tRNA وتركه للريبوسوم ليشارك فى
 دورة جديدة من الارتباط مع جزئ جديد من نفس الحامض الأمينى المتخصص
 فيه (الشكل ٩-١٠).

ولكى يكون ارتباط جزئ tRNA بأى من الموقعين قويا، لابد أن يكون
 التزاوج صحيحا بين مضاد الكودون فى هذا الجزئ النوعى من tRNA وبين
 الكودون الثلاثى المقابل فى سلسلة mRNA المرتبط بالريبوسوم. كما أن
 الموقعين P,A يحتلان مكانين متجاورين بشدة على الريبوسوم لدرجة أن جزئى
 tRNA المحتلان لهما لا توجد أمامها فرصة إلا تكوين تزاوج مع الكودونين
 المتجاورين مباشرة فى جزئ mRNA كما فى الشكل (٩-١٠).



الشكل (٩-١٠): يحتوى كل معقد من ريبوسوم - م رن أ على ثلاثة مواقع لإرتباط aa-tRNA ويتم شغل الموقع A بمعقد Alanyl tRNA فى حين يتم شغل الموقع P بمعقد Phenylalanyl-tRNA^{Phe} وترتبط سلسلة متعدد الببتيد النامية تساهميا بمعقد Phenylalanyl-tRNA ويتم شغل الموقع E بجزئ tRNA gly قبل تحريره من الريبوسوم

يتحرك الريبوسوم بمعدل كودون ثلاثى واحد على mRNA فى كل خطوة، ولو أن هناك مفهوم بديل بأن شريط mRNA هو الذى يمر من خلال الريبوسوم بمعدل ٣ نيوكليوتيدات فى كل خطوة إلا أن المفهوم الأول هو المرجح حتى الآن.

مراحل عملية بناء البروتين :

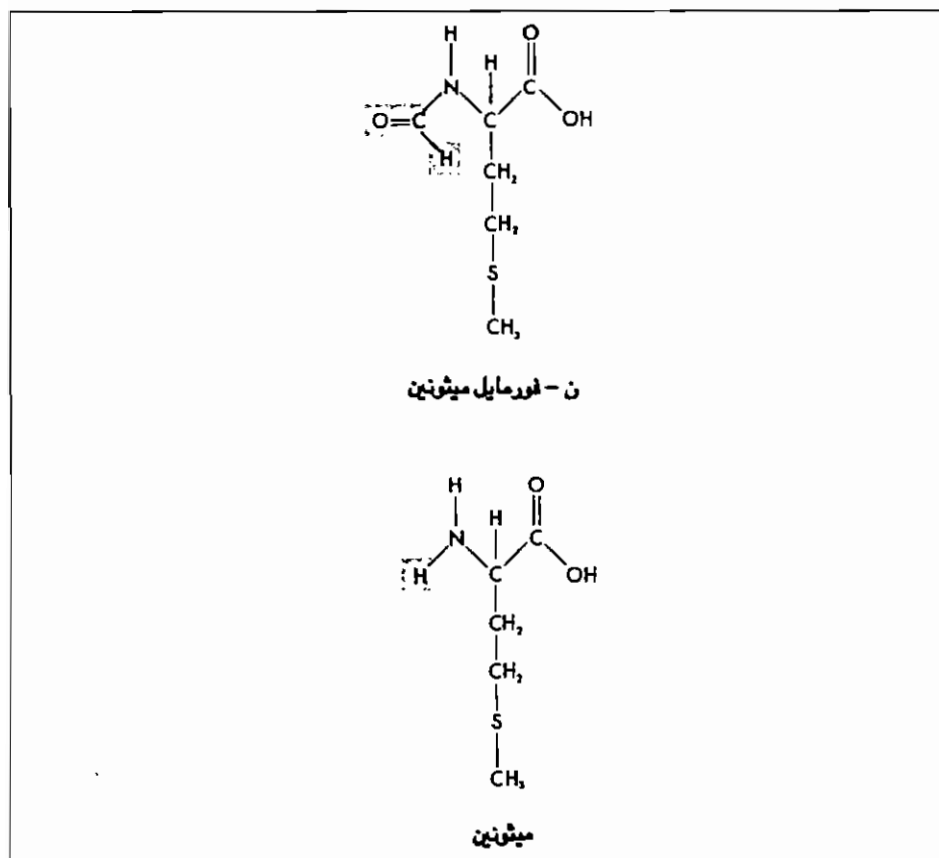
يمكن، لتسهيل المتابعة فقط، تقسيم عملية بناء البروتين إلى ثلاث مراحل رئيسية وهى:

- ١- مرحلة البدء Initiation
- ٢- مرحلة الاستطالة Elongation
- ٣- مرحلة الإنهاء أو الإيقاف Termination

أولاً: مرحلة البدء Initiation:

تبين أن عملية القراءة الصحيحة للشفرات على سلسلة mRNA القالب تتوقف على الموقع الابتدائي الذي يتم فيه ارتباط الريبوسوم بتتابعات القواعد في mRNA. إذ أنه في مرحلة البدء لبناء البروتين، يتم تجميع تحت وحدتي الريبوسوم وارتباطهما في الموقع المضبوط على mRNA حيث تبدأ القراءة الصحيحة للشفرة، وبالتالي حيث يبدأ بناء سلسلة متعدد الببتيد.

وقد تبين أنه بالنسبة لمعظم البكتيريا يكون الحامض الأميني الأول في السلسلة هو Methionine N-Formyl (وهو عبارة عن حامض الميثونين بعد تعديله بإضافة مجموعة فورمات إلى مجموعة الأمين الطرفية) (الشكل ٩-١١).



الشكل (٩-١١): المقارنة بين ن. فورمايل الميثونين والميثونين

وبذلك يتم شغل مجموعة الأمين الطرفية مما يؤدي إلى منع إمكان إضافة هذا الحامض المتحور في الأماكن الداخلية بالسلسلة أثناء مرحلة الاستطالة نظراً لأن مجموعة الأمين تكون غير حرة نتيجة لارتباطها بالفورمات. تتم إضافة مجموعة الفورمات أنزيمياً إلى الميثونين بعد أن يرتبط هذا الأخير بجزئ tRNA الخاص به. فقد تبين أن هناك نوعين من tRNA^{Met}. أحدهما متخصص في حمل ميثونين البدء ويسمى tRNA_i^{Met}. وهذا الجزئ يسمح بتفاعل الفورمات

فى حين يوجد نوع آخر من $tRNA^{Met}$ يقوم بحمل الميثيونين الداخلى أثناء مرحلة الاستطالة ولا يحدث عليه تفاعل القورمات ويسمى $tRNA^{Met}$ (للميثيونين الداخلى). بينت تحليلات تتابع القواعد فى كلا النوعين من $tRNA$ أن كلا منهما يحتوى على نفس مضاد الكودون (CAU) مما أدى إلى التساؤل عن كيف يتسنى لنفس الكودون (AUG) أن يشفر لكلا من حامض البدء N-Formyl Methionine وكذلك للميثيونين الداخلى فى السلسلة؟ وقد تبين وجود ثلاثة فروق فى التركيب الدقيق لتتابع القواعد بين جزيئى $tRNA$ كما فى الشكل (٩-١٢).

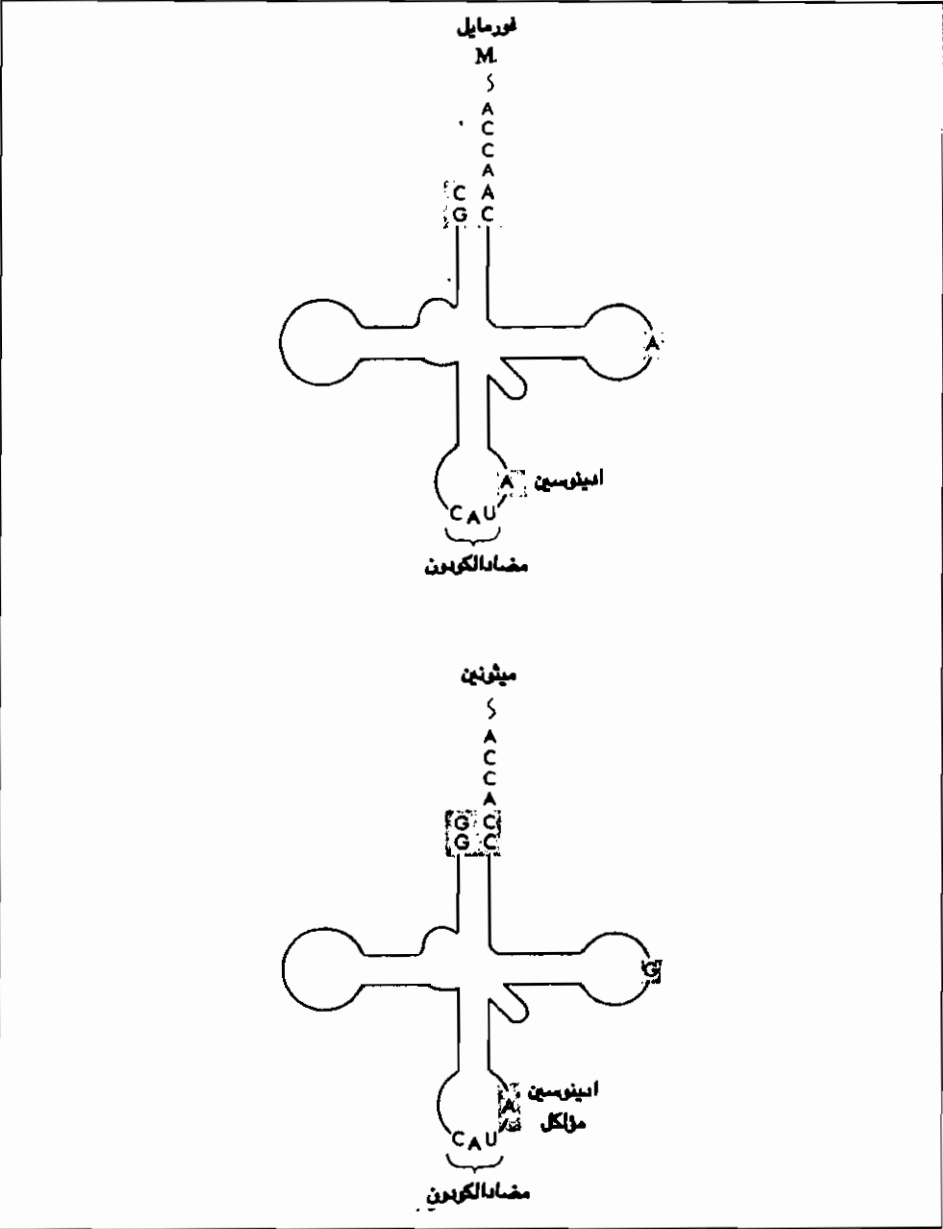
ومن جهة أخرى تبين أن بناء البروتين فى البكتريا يبدأ بتكوين معقد من تحت الوحدة الصغيرة 30S للريبوسوم مع $Met - tRNA^{Met}$ و mRNA عند الكودون AUG ثم لاتبث تحت الوحدة الكبيرة 50S أن تتحد لتكوين الريبوسوم 70S الفعال. ويحتوى كل جزئ من mRNA على موقع ارتباط نوعى بالريبوسوم خاص بكل من البروتينات التى تم بناؤها مستقلة على هذا الريبوسوم.

فعلى سبيل المثال توجد ثلاث مواقع من هذا النوع على RNA لجينوم الفاج R17 الذى يشفر لثلاث بروتينات رئيسية. ويتخلل كل من هذه المواقع تتابعات نيوكليدية تكون وظيفتها وضع mRNA بدقة على المكان المحدد من سطح الريبوسوم قبل بدء عملية بناء البروتين. ولكن كيف يتمكن الريبوسوم من التفريق أو التمييز بين كودون AUG البدء، أى عند بداية قراءة الجين، والكودون نفسه الذى يشفر للميثيونين الداخلى؟ أمكن الاجابة على هذا السؤال عندما تم التعرف على أول تتابع بدء عن طريق ربط الريبوسوم مع mRNA

نوعى ثم تلى ذلك المعاملة بانزيم ريبونيوكليراز لتحليل جميع mRNA ماعدا المنطقة المرتبطة بالريبوسوم حيث تكون محمية من التحليل الانزيمى.

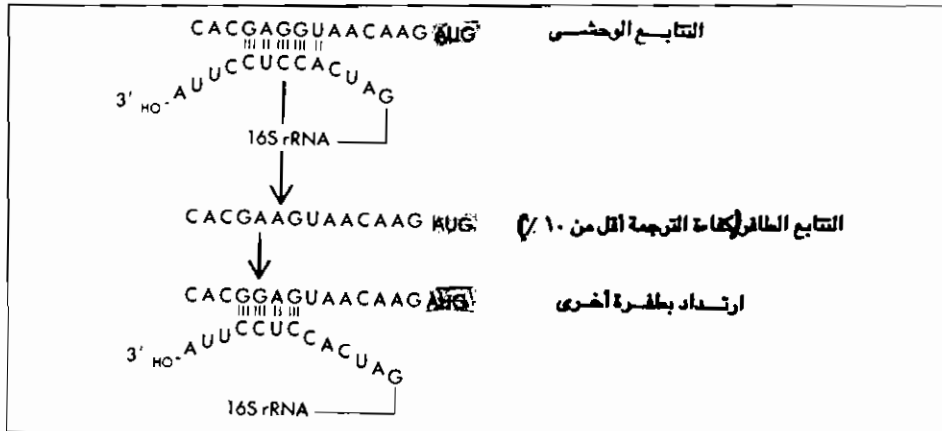
وعند تحليل التتابعات المكونة من ٣٠ نيوكلييدة فى هذه المنطقة المحمية وجد أنها تحتوى على AUG's بالقرب من الوسط متبوعة بنيوكلييدات تشفر للثلاث أو الأربع أحماض الأمينية الأولى فى سلسلة متعدد الببتيد. وقد وجد أن هذه النيوكلييدات يتم التعرف عليها نوعياً بواسطة تحت الوحدة الريبوسومية الصغيرة 30S وأن هذا التتابع يختلف من جين الى آخر. ولكن وجد أن هناك مجموعة مكونة من ٣ إلى ٩ نيوكلييدات بيورينية تقع فى الجهة 5' من المنطقة المحمية فى mRNA ويعتبر هذا التتابع القصير من القواعد هاما جداً لربطه بالريبوسوم. وجد أن معظم مواقع ارتباط الريبوسوم تحتوى على تتابعات مثل: AGGA أو GAGG تقع على بعد حوالى ٨ إلى ١٣ نيوكلييدة قبل كودون البدء.

وتتزوج هذه التتابعات مع تتابعات مكملة لها موجودة فى منطقة غنية بالبيريميدينات فى النهاية 3' لسلسلة
16S rRNA : (5' GAUACCUCCUUA-OH 3').



الشكل (٩-١٢): مواقع الاختلافات بين ن - فورميل ميثيونين $tRNA^{Met}$ وميثونيل $tRNA^{Met}$

يؤدي هذا التزاوج إلى وضع كودون البدء AUG في موقع يسمح له بالارتباط بمضاد الكودون الخاص بجزئ $\text{Met tRNA}^{\text{Met}}$ الخاص بالبدء والمرتبطة بتحت الوحدة 30S. وبذلك تكون القدرة على تكوين تفاعلين منفصلين لتزاوج القواعد في نفس الوقت: mRNA/tRNA (مضاد الكودون/ الكودون) وبين mRNA/16S rRNA أى بين (mRNA/30SrRNA) هي التي تسمح بالتمييز بين منطقة البدء الحقيقية وبين المواقع الأخرى الداخلية التي قد تحتوى على الكودون AUG الذى يشفر للمثيونين الداخلى. وكما هو متوقع فإن الطفرات التي تؤدي إلى تغيير في المنطقة الغنية في البيورين في موقع ارتباط الريبوسوم تؤدي إلى خفض كفاءة ترجمة mRNA ويمكن استعادة كفاءة الترجمة باستخدام طفرة أخرى تستعيد التكامل في تزاوج القواعد للنهاية 3' في 16S rRNA حتى ولو كان التابع مختلف عن ذلك الذى في mRNA الأصلي كما في الشكل (٩-١٣).



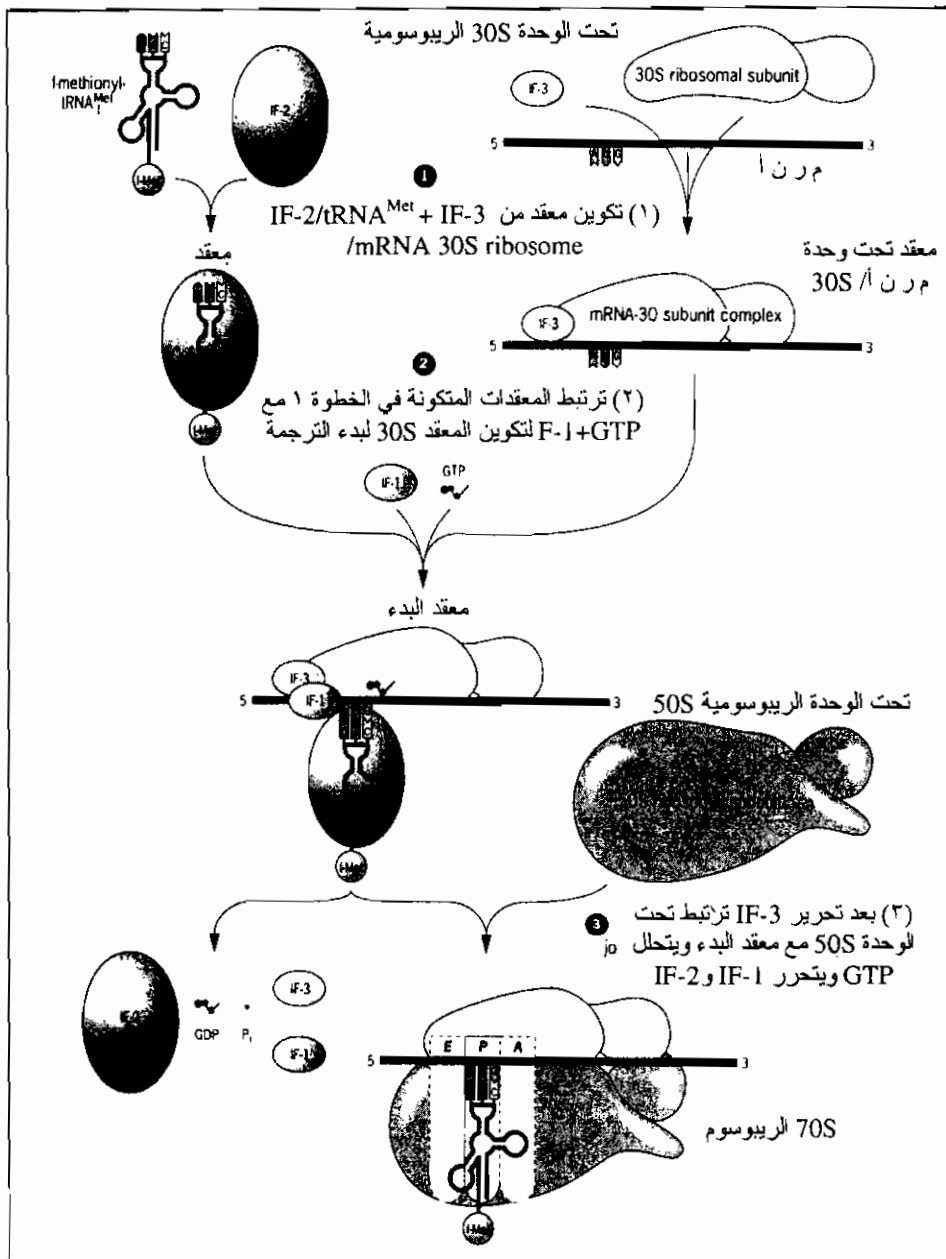
الشكل (٩-١٣): تتابع منطقة البدء عند بداية سلسلة mRNA للجين ٣,٠ في الفاج T7 ويؤدي تفاعلها مع النهاية 16S rRNA إلى وضع الريبوسوم في مكان البداية الصحيح على شريط mRNA لبدء الترجمة. وتؤدي طفرة استبدال متماثل من نوع G إلى A الى وقف هذا التفاعل. ويمكن استعادة هذه الوظيفة لو حدث طفرة استبدال متماثلة أخرى (A إلى G) في موقع قريب. يبدو كودون البدء AUG مظللاً في هذا الشكل

عندما تبدأ استطالة سلسلة متعدد الببتيد لابد أن يحدث انفكاك للتزاوج الحادث بين القواعد بين mRNA, 16S rRNA وذلك لكي يصبح mRNA حر الحركة على سطح الريبوسوم. تؤدي هذه الحركة إلى أن يصبح الريبوسوم على اتصال بمناطق mRNA التي لم يكن من الممكن أن يرتبط بها في السابق لولا أن عملية البناء قد استهلكت في المنطقة السابقة. ولضمان استمرار حركة الريبوسوم فإنه لابد أن يتم فك مؤقت لمناطق الحلزنة المزدوجة (المكونة لدبوس الشعر Hairpin) الموجودة على مناطق mRNA أمام الريبوسوم، وبذلك تتكون مناطق مفردة السلسلة يمكنها أن تشارك في عملية الترجمة.

عوامل البدء (IF) Initiation Factors

تبين أنه إلى جانب ضرورة وجود mRNA, N-formyl-Met tRNA^{Met} وتحت الوحدات الريبوسومية 30S و 50S، فإنه لابد لكي تبدأ عملية بناء البروتين أن تتوفر ثلاث بروتينات نوعية مختلفة تكون مرتبطة قليلاً بالريبوسوم وتسمى عوامل البدء وهي : IF1, IF2, IF3 كما في الشكل (٩-١٤).

في الخطوة الأولى يتم ارتباط هذه العوامل الثلاثة بتحت الوحدة 30S، ويساعد GTP على استقرار ارتباط هذه العوامل. ومن المرجح أنه يرتبط مباشرة بالعامل IF2. يمنع العامل IF3 الاتحاد بين تحت الوحدات 50S, 30S ولذلك فقد عرف في البداية بعامل تفكك الريبوسوم.



الشكل (٩-١٤): مرحلة بدء الترجمة في بكتريا القولون

ويعتقد الآن أن العامل IF3 يؤدي إلى تغيير دقيق في شكل تحت الوحدة 30S مما يمنع اتحادها بتحت الوحدة 50S ويساعد في نفس الوقت على الارتباط بين تحت الوحدة 30S وبين mRNA. يساعد العامل IF1 على ارتباط كلا من IF2 و IF3. وبين الجدول (٩-١) الوزن الجزيئي لعوامل البدء IF وكذلك عوامل الاستطالة (EF) وعوامل الانتهاء أو الانفكاك (RF) كما سيأتي بعد. في الخطوة التالية يتم ارتباط mRNA , F Met tRNA^{Met} بمعقد IF-30S-GTP. وفي هذا التفاعل يحدث ارتباط وثيق بين Met tRNA^{Met} مع المعقد IF2-GTP، وبمجرد تكوين معقد البدء 30S Initiation Complex ينفصل العامل IF3 ويلقى ذلك ارتباط تحت الوحدة 50S بمعقد البدء مما يؤدي إلى التحليل المائي لجزئ GTP وانفصال عامل البدء الآخرين. ويطلق على المعقد النهائي معقد البدء 70S Initiation Complex.

اتجاه الترجمة 3' → 5':

بعد أن يتم الارتباط الصحيح بين منطقة البدء لجزئ mRNA ومعقد البدء والريبوسوم يتحرك الريبوسوم في اتجاه ثابت أثناء بناء البروتين حيث أنه ليست لديه حرية الحركة إلا في الاتجاه إلى اليمين أو إلى اليسار، مما يؤكد حقيقة أن جزئ mRNA له اتجاه ثابت ومحدد في القراءة بحيث تقرأ النهاية 5' أولاً وتستمر القراءة متجهة إلى نهاية 3' ومما يدل على ذلك أنه وجد في البكتريا أن الريبوسوم يمكنه أن يرتبط بسلسلة غير تامة البناء من mRNA أثناء نسخها على قالب د.ن.أ. وعلى العكس من ذلك إذا كان بناء البروتين يتم في الاتجاه 5' → 3' فإن ذلك يعني أنه لا تبدأ ترجمة جزئ mRNA في البكتريا إلا بعد الانتهاء تماماً من نسخه على قالب د.ن.أ. وانزلاقة أولاً من على هذا القالب وهذا

ما لا يحدث في البكتريا مما يؤكد أن الترجمة تتم في الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ وهو نفس اتجاه النسخ.

الجدول (٩-١) خواص بعض العوامل المشاركة في بناء البروتين في بكتريا القولون

العوامل	الوزن الجزيئي بالتقريب	القدرة على الارتباط مع (GDP) GTP	الوفرة النسبية لعدد الريبوسومات
عوامل البدء			
IF 1	٩٠٠٠	-	$\frac{1}{\sqrt{V}}$
IF 2	١٢٠٠٠	+	$\frac{1}{\sqrt{V}}$
IF 3	٢٢٠٠٠	-	$\frac{1}{\sqrt{V}}$
عوامل الاستطالة:			
EF-TU	٤٥٠٠٠	+	١٠
EF-TS	٣٠٠٠٠	+	١
EF-G	٨٠٠٠٠	+	١
عوامل الانتهاء:			
RF 1	٣٦٠٠٠	-	$\frac{1}{\sqrt{V}}$
RF 2	٣٨٠٠٠	-	١
RF 3	٤٦٠٠٠	+	$\frac{1}{\sqrt{V}}$

ثانياً: مرحلة الاستطالة Elongation:

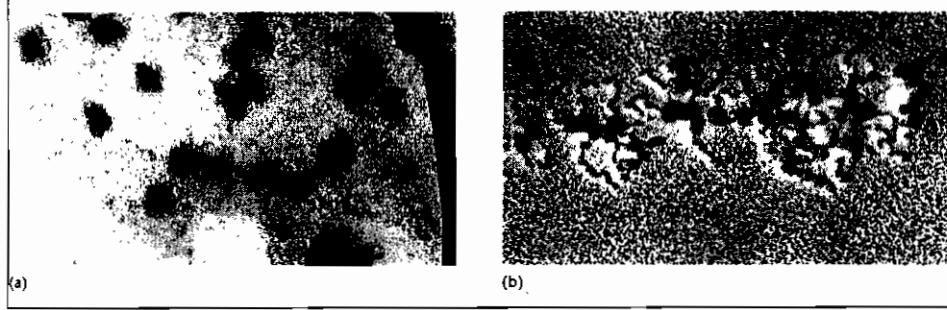
يرتبط $fMet \text{ tRNA}^{Met}$ مباشرة من البداية بالموقع P دون أن يمر على الموقع A بحيث يكون الموقع A مهياً لاستقبال الحامض المحمل على tRNA التالي وجد أن عامل البدء IF2 لابد أن يتحرر بالتحليل المائي لجزئ GTP قبل

أن يرتبط aa-tRNA التالي بالريبوسوم. حيث أنه ثبت قطعياً أن جميع جزيئات aa-tRNA ماعدا $\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$ لابد أن تصل إلى الريبوسوم وترتبط به عند الموقع A.

وتتم عملية الاستطالة على ثلاث مراحل كالآتي:

- ١- الارتباط بين امينواسيل - ر.ن.أ الناقل Aminoacyl- tRNA بالموقع A على الريبوسوم.
- ٢- انتقال سلسلة متعدد الببتيد النامية من tRNA الموجود في الموقع P إلى tRNA في الموقع A وذلك عن طريق تكوين رابطة ببتيدية جديدة.
- ٣- انتقال الريبوسوم على mRNA لكي يصل إلى الكودون التالي في الموقع A. واثاء هذه الخطوة الاخيرة ينتقل المعقد (المكون من سلسلة متعدد الببتيد النامية + tRNA) من الموقع A إلى الموقع P في حين ينتقل جزئ tRNA بين الموقع P إلى الموقع E ومنه إلى السيتوسول لكي يتم تحميله مرة أخرى بالحامض الاميني النوعي الخاص به.
- ٤- يصبح الموقع A الخالي الآن حراً لكي يستقبل جزئ جديد من aa-tRNA والذي يتحدد نوعيته حسب تزاوج القواعد الصحيحة بين مضاد الكودون وبين الكودون المقابل في mRNA.
- ٥- في البكتريا ، واثاء مرحلة الاستطالة وبمجرد انتهاء مرور الجزء الأول من mRNA من خلال الريبوسوم، فإن هذا الجزء يصبح حراً للارتباط من جديد مع تحت وحدة صغرى أخرى للريبوسوم لتكوين معقد بدء ترجمة Initiation Complex جديد. ويمكن لهذه العملية أن تتكرر عدة مرات مع مرور أجزاء جديدة من نفس سلسلة mRNA مما يؤدي إلى

تكوين ما يسمى البوليريبيوسوم Polyribosomes أو بوليسوم Polysomes (الشكل ٩-١٥).



الشكل (٩-١٥): البوليريبيوسومات تحت المجهر الإلكتروني

- أ - بوليريبيوسومات ناتجة من خلايا الأرنب مشاركة في ترجمة م ر ن أ الهيموجلوبين.
- ب - بوليريبيوسومات من الخلايا العملاقة لذبابة Midgefly.

مصدر الطاقة اللازمة لعملية الاستطالة:

نظراً لأن المجموعة الكربوكسيلية للحامض الأميني يتم تنشيطها عند ارتباطها تساهمياً بجزئ tRNA النوعي، فقد كان يفترض أنه لا توجد هناك حاجة إلى استهلاك طاقة إضافية لتكوين الرابطة الببتيدية. إلا أنه تبين أن هذا الافتراض غير صحيح. إذ وجد أنه إلى جانب الحاجة إلى جزئ GTP لتكوين معقد البدء Initiation Complex فإن الأمر يتطلب أيضاً تحليل جزيئين آخرين من GTP عند إضافة كل حامض أميني إلى السلسلة النامية. وقد ثبت ذلك عندما تبين أن هناك عوامل استطالة Elongation factors تساهم في عملية استطالة ونمو سلسلة متعدد الببتيد وأن تلك المساهمة تحتاج إلى استهلاك طاقة من GTP كما سيأتى بعد، علماً بأن هذه العوامل لا تشارك مباشرة في تكوين الرابطة الببتيدية.

دور عوامل الاستطالة (EF) Elongation Factors في بناء البروتين:

كان يعتقد مبدئياً أن ارتباط جزئ aa-tRNA بالريبوسوم عملية لا انزيمية تحدث عندما يصطدم جزئ Aminoacyl-tRNA بالموقع A المرتبط بالكودون النوعي للحامض الأميني. غير أنه تبين فيما بعد أن هناك مجموعة من البروتينات الصغيرة تسمى عوامل الاستطالة (EF) Elongation Factors لا بد من اشتراكها في هذه العملية لكي يتم الارتباط بصورة صحيحة (الجدول ٩-١). ويبدأ ذلك عندما يتفاعل أحد هذه العوامل (EF-TU) مع GTP و aa-tRNA لتكوين معقد مكون من: aa-tRNA- EF-TU- GTP. ويوجد العامل EF-TU بوفرة في بكتريا القولون بحيث تساوي عدد جزيئاته عدد جزيئات tRNA في الخلية البكتيرية. ولا بد من توفر GTP لكي يتم ارتباط Aminoacyl- RNA بالموقع A.

يمكن لهذا العامل EF-TU الارتباط مع أى جزئ من aa-tRNA فيما عدا Fmet-tRNA^{met}. ولم تتضح بعد الطريقة التي يتم فيها تمييز ذلك. وبعد ارتباط aa-tRNA بعامل الاستطالة EF-TU فإن المكون aa-tRNA ينتقل إلى الموقع A على الريبوسوم مع انفصال معقد حر من EF-TU-GDP والفوسفات. وجدير بالذكر أن هذا المعقد يفقد نشاطه ولا يمكنه الارتباط مرة أخرى مع Aminoacyl tRNA جديد.

ويتطلب إعادة استخدام EF-TU لربط جزئ جديد من aa-tRNA مع الريبوسوم مساهمة عامل استطالة آخر يسمى EF-TS، حيث يقوم هذا العامل بفصل GDP عن EF-TU ويحل محل الأول ليكون معقد مؤقت مع EF-TU. وعندما يجد هذا المعقد الجديد جزئ GTP يتكون معقد من GTP-EF-TU

وينفصل العامل EF-TS مرة أخرى، ثم يقوم المعقد EF-TU-GTP بربط جزيء آخرى من aa-tRNA بالريبوسوم وهكذا تعاد الدورة.

تبين أن تكون الرابطة الببتيدية يتم بمساعدة انزيم Peptidyl Transferase وذلك على تحت الوحدة 50S. وقد وجد أن هناك ستة بروتينات ريبوسومية على الأقل، وكذلك 23S rRNA ضرورية لنشاط هذا الانزيم. كما أن هناك ستة بروتينات أخرى وكذلك 5S rRNA تساهم في هذا النشاط الانزيمي. وبذلك يمكن تخيل انزيم Peptidyl Transferase كمركز نشاط على الريبوسوم يقوم بضبط اصطفاف جزيئين من aa-tRNA بالطريقة المضبوطة للسماح بتكوين الرابطة الببتيدية .

وفي هذه الخطوة تتكون رابطة ببتيدية بين مجموعة الامين في aa-tRNA في الموقع A والنهية الكربوكسيلية للسلسلة الببتيدية النامية المرتبطة مع tRNA في الموقع P وبالتالي تتصل السلسلة تساهميا مع tRNA في الموقع A.

وحيث أن جزيئات aa-tRNA تمثل صورة منشطة من الأحماض الأمينية فإن هذا التفاعل لابد أن يكون تلقائيا بدون الحاجة إلى بذل طاقة اضافية.

تبين وجود عامل استطالة ثالث وهو EF-G وهو ضروري لحركة سلسلة Peptidyl-tRNA من الموقع A إلى الموقع P ويطلق على هذا العامل أيضاً اسم Translocase. وفي هذه العملية يتكون أولاً معقد من EF-G-GTP-Ribosome ثم يحدث الانتقال مقرونًا بتحريك جزيء tRNA الحر من الموقع P إلى الموقع E ومنه إلى السيتوسول. ونتيجة لهذه الخطوة يصبح الموقع A خالياً ومهيأ لاستقبال

حامض أميني جديد aa-tRNA. ويتطلب تحرير العامل EF-G من هذا المعقد لاعادة استخدامه حدوث التحليل المائي لجزئ GTP الى GDP وفوسفات حيث تستخدم الطاقة الناتجة لبدء دورة جديدة من الاستطالة على الريبوسوم.

وجد أنه تحت الظروف المثالية لنمو ونشاط بكتريا القولون، يتم بناء سلسلة متعدد الببتيد بطول حوالى ٣٠٠-٤٠٠ حامض أميني فى حوالى ١٠-٢٠ ثانية، وأنه فى اثناء هذه الفترة لا تبقى السلسلة النامية فى صورة سلسلة مفرودة ولكنها تأخذ بسرعة الشكل الثلاثي الابعاد الخاص بها، وذلك عن طريق تكوين عدة روابط ثانوية بحيث قد تأخذ السلسلة الشكل النهائى للبروتين النوعى قبل اضافة الأحماض الأمينية الأخيرة إلى النهاية الطرفية للسلسلة.

ثالثاً: مرحلة انتهاء الترجمة (Termination(Release):

تبين أنه لكى يتم انتهاء عملية بناء سلسلة متعدد الببتيد لابد أن يتوفر شرطين: أولهما أن يوجد كودون نوعى يعمل كإشارة ايقاف لإستطالة السلسلة، والشرط الثانى هو توفر بروتينات نوعية تسمى بروتينات الأنفكاك أو الأنهاء Release Factors (RF) التى تقوم بقراء اشارات انتهاء بناء السلسلة.

ويرجع ذلك إلى حقيقة أنه عندما تصل سلسلة متعدد الببتيد الى تمام استطالتها، فإن نهايتها الكربوكسيلية تظل مرتبطة بأخر جزئ من tRNA وعلى ذلك فلا بد لعملية الانهاء أن تشتمل على ازاحة هذا الجزئ الطرفى من tRNA وتحرير مجموعة الكربوكسيل منه. وعندما يتم ذلك تنفك السلسلة الناشئة التامة النمو بسرعة من على الريبوسوم وذلك نظراً لأن ارتباطها بالريبوسوم كان بواسطة هذا الجزئ الأخير من tRNA. تبين وجود ثلاث كودونات فى الشفرة الوراثية متخصصة فى اعطاء اشارة الايقاف لعملية بناء البروتين فى الخلية

وهي UAA, UAG, UGA. إلا أنه تبين أن هذه الكودونات النوعية لا يمكن لأي نوع من tRNA التعرف عليها ولكن يتم التعرف عليها فقط بواسطة بروتينات نوعية تسمى عوامل الانفكاك (RF) Release Factors.

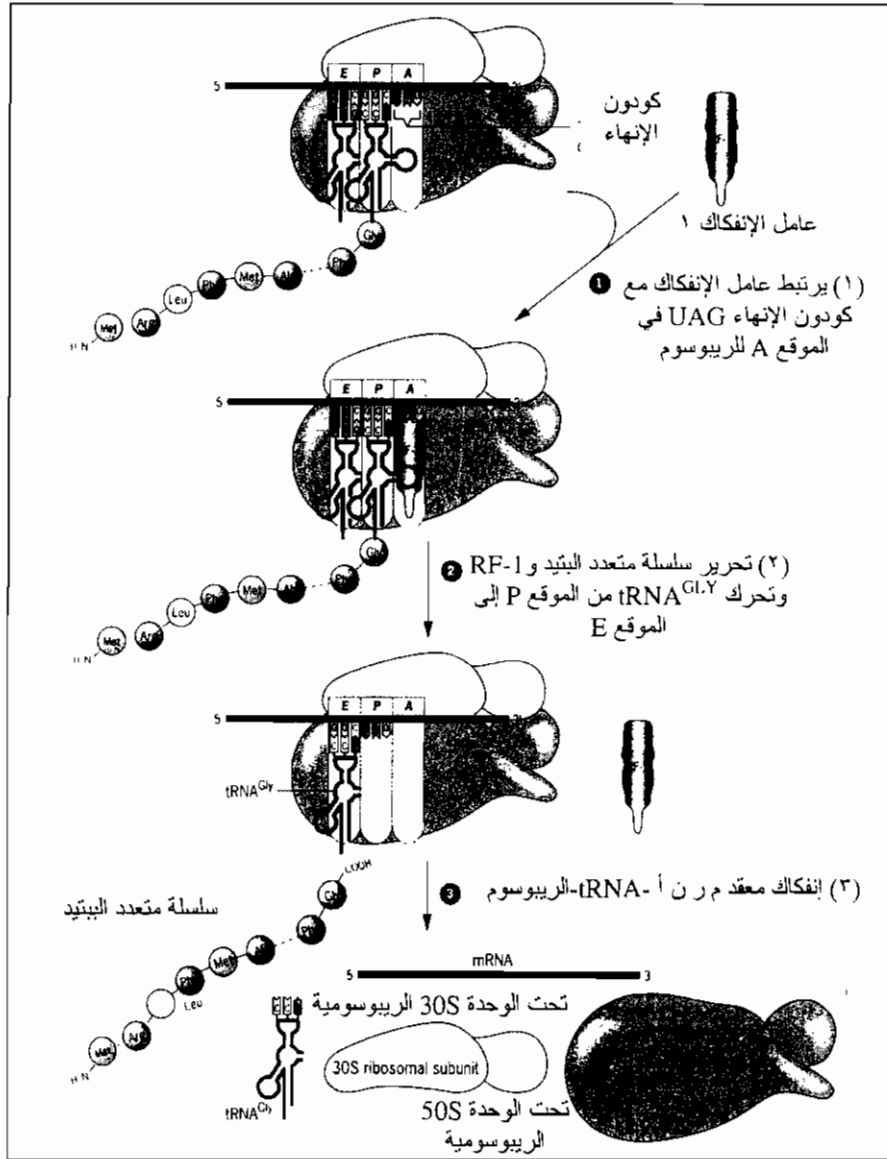
يحتل أحد عوامل الانفكاك الموقع A على الريبوسوم عندما يتم الوصول إلى الكودون الخاص بالانتهاء على سلسلة mRNA مما يؤدي إلى منع إضافة أي aa-tRNA جديد إلى هذا الموقع. وقد تبين وجود ثلاث أنواع من عوامل الانفكاك في بكتريا القولون وهي : RF1, RF2, RF3 (جدول ٩-١) ويتعرف العامل RF1 على كودونى الايقاف : UAA, UAG فى حين يتعرف العامل RF2 على كودونى الايقاف : UAA, UGA.

يؤدي ارتباط عامل الانفكاك بالموقع A على الريبوسوم إلى دفع انزيم Peptidyl Transferase إلى نقل السلسلة الببتيدية التامة النمو إلى جزئ ماء بدلا من جزئ aa-tRNA فتتزلق السلسلة الكاملة متحررة من الريبوسوم نظراً لعدم وجود ما يربطها به، كما تتحرر من جزئ tRNA فى حين يتحرك جزئ tRNA غير المشحون الى الموقع E ومنه إلى السيتوسول.

هناك عامل انفكاك ثالث RF3 وهو يحتاج إلى GTP و GDP لنشاطه، ويبدو أنه يساعد على تحفيز تفاعل الانفكاك وتحرير سلسلة متعدد الببتيد من الريبوسوم. إلا أنه لا يقوم باحتلال الموقع A مباشرة كما يحدث فى العاملين RF1, RF2.

يلى ذلك انفكاك mRNA من موقع ارتباطه على الريبوسوم، وهذا الأخير لا يلبث أن يتفكك الى تحت الوحدات 30S, 50S اللتان تبحثان عن جزئ

mRNA جديد لبدء دورة جديدة من عملية بناء البروتين. ويبين الشكل (٩-١٦) دور عوامل الانفكاك في عملية انتهاء بناء سلسلة متعددة الببتيد.



الشكل (٩-١٦): إنهاء ترجمة سلسلة متعدد الببتيد في بكتريا القولون

دور GTP فى مراجعة أخطاء الترجمة:

عندما يرتبط tRNA بالحامض الأمينى الخاص به، فإنه يكون معقد مع عامل الاستطالة EF الذى يرتبط بقوة مع الحامض الأمينى فى جزئ AA~tRNA من جهة وجزئ من GTP من جهة أخرى. وجد أن هذا المعقد وليس tRNA فقط هو الذى يتزاوج مع الكودون المناسب فى mRNA. إذ أن وجود عامل الاستطالة المرتبط فى هذا المعقد هو الذى يسمح بالتزاوج الصحيح بين الكودون ومضاد الكودون، ولكنه فى نفس الوقت يمنع مؤقتاً الحامض الأمينى من أن يضاف إلى سلسلة متعددة الببتيد النامية. إلا أن هذا التعرف المبدئى للكودون لا يلبث أن يدفع عامل الاستطالة إلى استهلاك جزئ GTP المرتبط به (بالتحليل المائى إلى GDP + فوسفات) مما يؤدي إلى انفكاك عامل الاستطالة من هذا المعقد على الريبوسوم تاركاً جزئ AA ~ tRNA بحيث يصبح فى الامكان أن يستمر بناء البروتين. وكما هو موضح فى الشكل (٩-١٧) فإن عامل الاستطالة يقوم بعملية تأخير قصيرة بين خطوة التزاوج بين الكودون ومضاد الكودون وخطوة استطالة سلسلة متعدد الببتيد مما يعطى فرصة لجزئ tRNA غير الصحيح المرتبط بأن يترك الريبوسوم. إذ أن جزئ tRNA غير الصحيح يعطى عدد أقل من الروابط الهيدروجينية بين الكودون ومضاد الكودون عما يحدث بالنسبة للجزئ الصحيح، بحيث يكون ارتباط الأول ضعيفاً بالريبوسوم وبالتالي يكون أكثر تعرضاً للانفكاك بسهولة أثناء هذه الفترة الوجيزة. وحيث أن التأخير الذى يسببه عامل الاستطالة يؤدي بمعظم جزئيات tRNA غير الصحيحة المرتبطة بالريبوسوم إلى الانفكاك عنه وتركه بدون أن تستخدم فى بناء البروتين، فإن هذا العامل يؤدي إلى زيادة نسبة الأحماض

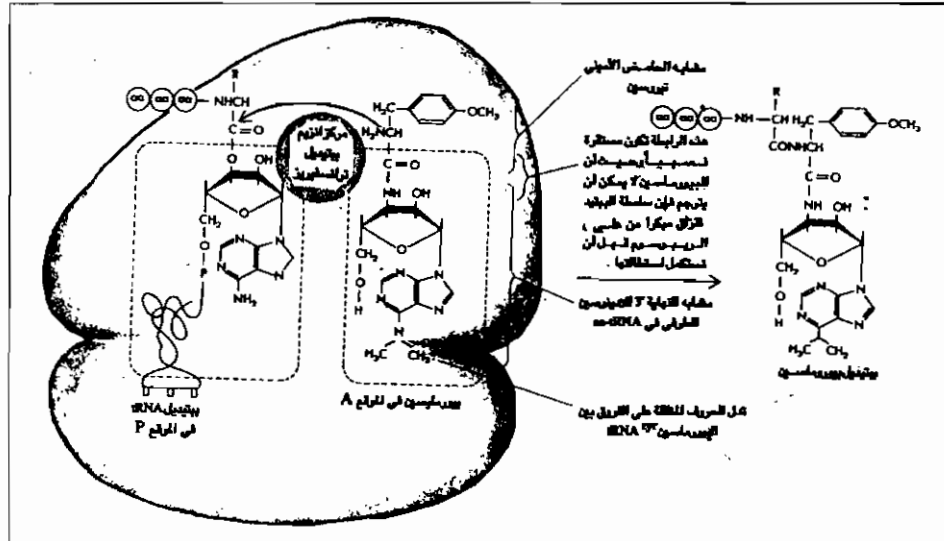
العادي للبكتريا تتكون كميات ضئيلة جداً من PPGPP نجد أنه تتراكم كميات كبيرة منه أثناء مجاعة الخلية. يعتقد أن هذه الجزيئات غير العادية تقوم بدور الاشارات التي توقف نوعياً بناء سلاسل rRNA و tRNA في الخلية أي انها تقوم بدور تنظيمي للحيلولة دون إنتاج كميات ريبوسومات أكثر مما تستطيع الخلية استخدامه. يطلق على هذا التثبيط النوعي لبناء rRNA و tRNA تحت ظروف المجاعة ونقص الأحماض الأمينية اسم "الاستجابة المحدودة" Stringent Response.

وقد تبين وجود طفرة استرخائية Relaxed Mutation تؤدي إلى الاستمرار في إنتاج rRNA, tRNA على الرغم من نقص الأحماض الأمينية. وقد وجد أن بعض الخلايا الطافرة هذه ينقصها انزيم ذو وزن جزيئي حوالى 75000 دالتون. يسمى بعامل الإلزام Stringent Factor وأن هذا العامل هو الذى يرتبط بالريبوسوم ويقوم بتحويل PPG إلى PPGPP.

دور بعض المضادات الحيوية فى وقف بناء البروتين:

تبين أن بعض المضادات الحيوية يمكن استخدامها للقيام بدور مفيد جداً فى تتبع خطوات بناء البروتين فعلى سبيل المثال:

١- وجد أن البيورومايسين Puromycin، مثبط قوى لنمو جميع الخلايا، وهو يؤدي هذا الدور عن طريق إيقاف نمو واستطالة سلسلة متعدد الببتيد كما فى الشكل (٩-١٨).



ويرجع ذلك إلى أن هذا المضاد الحيوي يتشابه في تركيبه مع تركيب النهاية 3' لجزيء AA ~ tRNA (مثل التيروسين أو الفينيل ألانين)، مما يؤدي إلى إمكان ارتباطه بالموقع A على الريبوسوم بطريقة فعالة جداً بحيث يحتل هذا الموقع بدلاً من AA ~ tRNA والأهم من ذلك أن إنزيم Peptidyl Transferase يقوم باستخدام هذا المضاد الحيوي كبديل بحيث ينقل سلسلة متعدد الببتيد إلى المستقبلات الموجودة عليه. ونظراً لأن جزيء البيورومايسين صغيراً جداً بالمقارنة بجزيء tRNA لذلك فإن ارتباطه بالموقع A يكون ضعيف جداً مما يؤدي إلى انفكاك سلسلة متعدد الببتيد النامية والمنتوية بالبيورومايسين عن الريبوسوم مما يؤدي إلى توقف عملية الاستقطالة وإنتاج سلاسل ببتيدية غير كاملة بأطوال مختلفة. وتجدر الإشارة هنا إلى أن حقيقة إضافة البيورومايسين إلى النهاية

الكربوكسيلية للسلسلة النامية يؤكد أن بناء البروتين يحدث من النهاية N إلى النهاية C.

٢- حامض الفوسيديك Fusidic acid: يتدخل هذا المضاد الحيوي في عملية انطلاق عامل الاستطالة EF-G بعد أن يؤدي دوره في عملية الانتقال، حيث يؤدي استمرار ارتباط المعقد EF-G-GDP إلى منع ارتباط المعقد التالي:

AA~tRNA-EF-TU-GTP على الموقع A على الريبوسوم والذي لابد أن يسبق أى دورة جديدة للاستطالة، مما يوقف نمو سلسلة متعدد الببتيد.

٣- Chloramphenicol و Sparsomycin يقوم كل من هذين المضادين الحيويين بتنشيط تفاعل انزيم Peptidyl Transferase نتيجة لارتباطهما نوعياً بتحت الوحدة 50S.

٤- Streptomycin يرتبط بتحت الوحدة 30S بحيث يوقف عملية بدء بناء سلسلة متعدد الببتيد.

وילخص الجدول (٩-٢) دور بعض المضادات الحيوية في تنشيط عملية بناء البروتين في الخلية.

الجدول (٩-٢) دور بعض المضادات الحيوية
في تثبيط بناء البروتين

المثبطات	التأثير النوعي
أ- تعمل فقط على غير مميزة النواة ١- تيتراسيكلين Tetracyclin.	يمنع ارتباط AA~tRNA بالموقع A على الريبوسوم
٢- ستربتومايسين Streptomycin.	يمنع انتقال معقد الابتداء إلى خطوة الاستطالة ويسبب أخطاء في قراءة الشفرة الوراثية.
٣- كلورامفينيكول Chloromphenicol.	يوقف تفاعل انزيم Peptidyl Transferase على الريبوسوم.
٤- اريثرومايسين Erythromycin.	يمنع تفاعل الانتقال Translocation على الريبوسوم
ب- تعمل على غير مميزة النواة ومميزة النواة: ١- بيورومايسين Puromycin.	يسبب تحرر سلسلة متعدد الببتيد قبل اكتمال نموها عن طريق ارتباطه بنهاية السلسلة النامية.
ج- تعمل على مميزة النواة فقط: ١- سيكلوهكساميد Cyclohexamide.	يوقف تفاعل الانتقال على الريبوسوم.
٢- انيسومايسين Anisomycin.	يوقف تفاعل انزيم Peptidyl Transferase على الريبوسوم.

الترجمة في مميزة النواة :

لا تختلف عملية الترجمة في مميزة النواة عما يتم في البكتيريا إلا في قليل من الخواص. حيث نجد أنه في مميزة النواة يكون حجم جزيئات الريبوسوم أكبر مما في البكتيريا وأن مكوناتها من ر.ن.أ والبروتينات تكون أكثر تعقيدا عما في البكتيريا.

من جهة أخرى نجد أن فترة نصف العمر لجزيء mRNA في مميزة النواة تكون عادة أطول بكثير عن مثيلاتها في البكتيريا وحيث أن معظم mRNA في مميزة النواة يستمر فعالاً لعدة ساعات وليس لدقائق (في البكتيريا) قبل أن يحدث له هدم بانزيمات الريبونوكلييز مما يجعله متوافراً لفترة أطول بكثير ليشترك في بناء كميات أكبر من البروتين. وتوجد بعض الفروق في مرحلة بدء الترجمة في مميزة النواة. فقد رأينا كيف يتم تجهيز mRNA بقلنسوة من الجوانين عند النهاية^{5'}. وقد تبين أن وجود هذه القلنسوة ضروري للترجمة الفعالة حيث وجد أن mRNA الذي يخلو من القلنسوة لا تتم ترجمته بنفس الكفاءة. وبالإضافة إلى ذلك، تحتوي معظم أنواع mRNA في مميزة النواة على تتابع تعارف يحيط بكودون البدء AUG مكون من التتابع ACCAUGG ويعرف بتتابع كوزاك Kozak. ويبدو أن هذا التتابع يقوم بنفس الوظيفة في مميزة النواة التي يقوم بها تتابع Shine-Dalgarno في غير مميزة النواة وكلاهما يقوم بتسهيل الارتباط المبدئي بين mRNA مع نحت الوحدة الصغرى للريبوسوم. وهناك فرق آخر وهو أنه في مميزة النواة لا تحتاج عملية بدء الترجمة إلى فورمايل ميثيونين إلا أن الكودون AUG في مميزة النواة يحتاج إلى وجود (tRNA_{met}) وهو المختص ببدء الترجمة بإضافة حامض الميثيونين. وتتشابه العوامل البروتينية (عوامل البدء والاستطالة والانهاء) في ترجمة كلا من البكتيريا ومميزة النواة

إلا أن الأخيرة تحتوى على اعداد اكبر من هذه العوامل فى كل خطوة، وبعضها يكون أكثر تعقيداً عما فى البكتريا. ومن المعروف أن عدد كبير من الريبوسومات يكون مرتبطاً بأغشية الشبكة الاندوبلازمية الخشنة فى خلايا مميزة النواة، الا أن هذه الاغشية غير موجودة فى سيتوبلازم البكتريا. ويؤدى هذا الارتباط فى مميزة النواة إلى تسهيل إفراز البروتينات حديثة البناء من الريبوسومات مباشرة إلى القنوات الموجودة فى الشبكة الاندوبلازمية حيث يتم توجيه مسارها الافرازى. فى حين نجد أنه فى غير مميزة النواة يحدث انطلاق السلاسل الببتيدية مباشرة من الريبوسومات الى السيتوبلازم.

وأخيراً فإن هناك فرق كبير فى معدل سرعة استطالة سلسلة متعدد الببتيد، فى البكتريا نجد أن السلسلة تزيد استطالتها بمعدل ١٥ حامض أمينى فى الثانية الواحدة (عند درجة حرارة ٣٧°م) فى حين يكون هذا المعدل ابطأ بكثير فى مميزة النواة.

الفصل العاشر

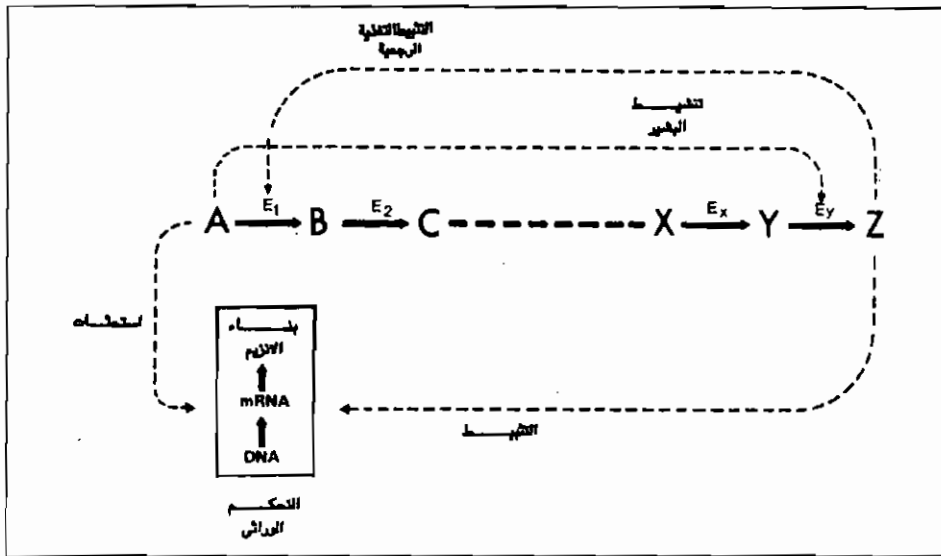
تنظيم التعبير الجيني في غير مميزة النواه

تتميز الخلية الحية بوجود تباين كبير في أعداد الجزيئات المختلفة للبروتينات النوعية ، لذلك كان لا بد من وجود نظم لتأمين البناء الإختياري لتلك البروتينات التي تحتاجها الخلية بكميات كبيرة.

كما أن الخلية البكتيرية بطبيعتها محافظة ، بمعنى أنها نادرا ما تستهلك طاقة في بناء أو هدم مواد تزيد عن احتياجاتها. لذلك نجد ان الخلية قد استتبطت نظم للتحكم في مستويات انتاج الاف المركبات الكيماوية بداخلها. ويتم تنظيم النشاط الانزيمي عن طريق ميكانيكيتين رئيسيتين وهما: التحكم الوراثي والتحكم في النشاط الحفزي كما هو موضح في الشكل (١٠-١).

يتضمن التحكم الوراثي تنظيم انتاج الكمية الكلية لحزيئات إنزيم معين وسوف نتعرض لذلك فيما بعد عند دراسة نظام الأوبرون ، حيث تكون محصلة هذا النظام أن الإنزيم لا يتم انتاجه الا عند الحاجة اليه فقط. اما التحكم في النشاط الحفزي Catalysis ، فيتضمن تغيير في نشاط الإنزيم بدون تغيير في الكمية الكلية للإنزيم المنتج أي أن التغيير يكون نوعيا وليس كميا. ويتم ذلك

بصفة خاصة في الانزيمات التنظيمية الألوستيرية Allosteric Enzymes بفعل جزيئات ألوستيرية منشطة أو مثبطة.

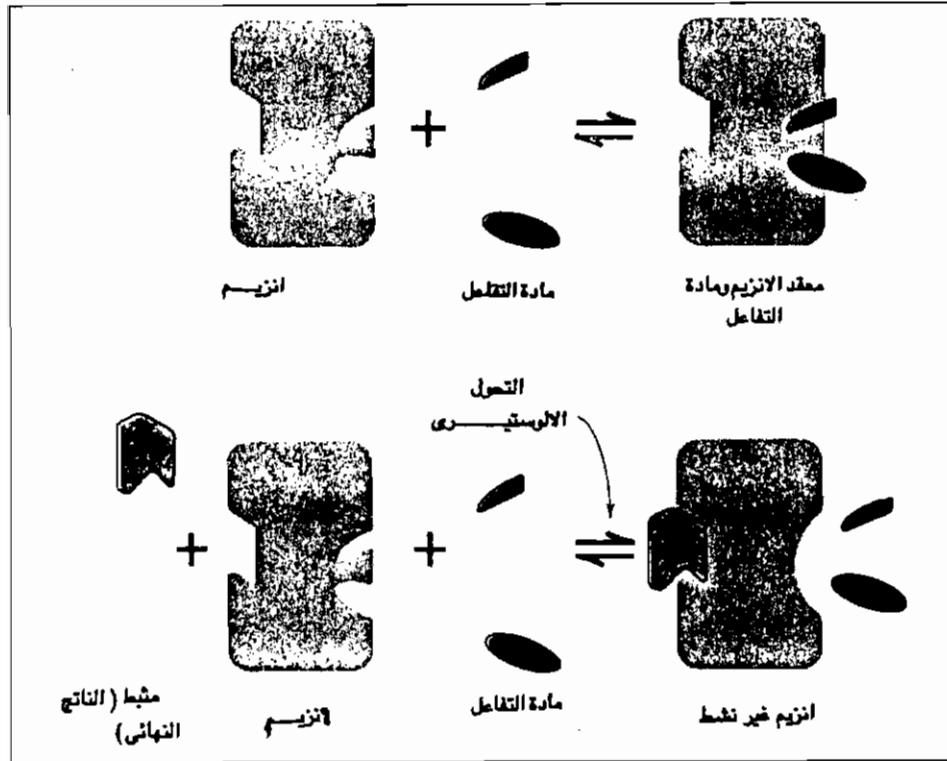


الشكل (١٠-١): شكل تخطيطي يبين نظم التحكم في النشاط الإنزيمي عن طريق التثبيط بالتغذية الرجعية ونظام التحكم الوراثي (الأوبرون)

توجد ميكانيكيتين رئيسيتين لهذا النوع من التحكم وهما :
التثبيط بالتغذية الرجعية (FBI) Feed Back Inhibition ، والتثبيط بمادة
التفاعل الأولية Substrate كما هو موضح بالشكل (١٠-١).

في حالة التغذية الرجعية يعمل المنتج النهائي End Product في السلسلة
الايضية كمثبط الوستيري للإنزيم الأول في السلسلة ، ويترتب على ذلك انه
عندما يتم بناء كمية كافية من هذا المنتج النهائي ، فإن السلسلة الايضية باكملها
يتم إيقافها وبذلك تتجنب الخلية استمرار إنتاج وتراكم مركبات أكثر من
احتياجاتها . ويبين الشكل (١٠-٢) كيف أن ارتباط المنتج النهائي يؤدي إلى

تثبيط نشاط الإنزيم بهذه الميكانيكية والتي تتضمن عملية تحول الوستيري
Allosteric Transformation.



الشكل (١٠-٢): شكل تخطيطي لتفاعل التحول الألوستيري

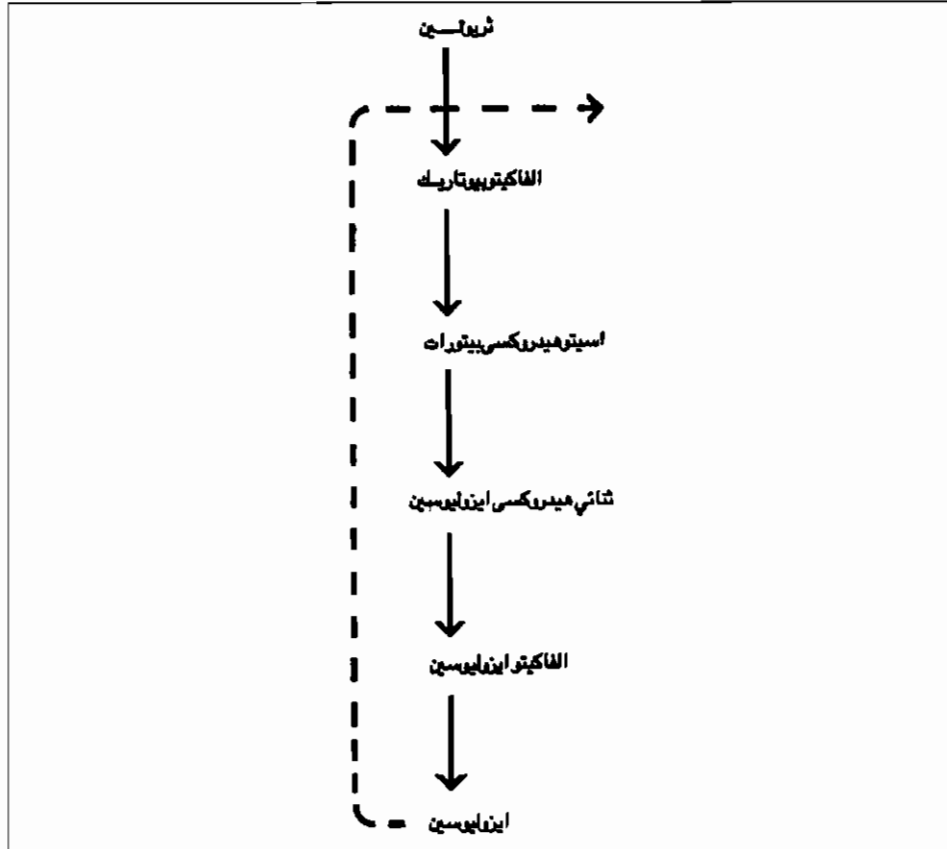
ويتم ذلك في موقع على الإنزيم غير الموقع النوعي للارتباط بمادة التفاعل. وعادة يكون الارتباط ضعيف بحيث يسهل فك الارتباط عندما تتغير الظروف حتى يمكن للإنزيم أن يستعيد نشاطه إذا احتاجت الخلية إليه، أي أن التفاعل هنا يكون عكسياً. أما في حالة التنشيط بمادة التفاعل الأولية، فإن أول مادة تفاعل في سلسلة المسار الأيضي تعمل كمنشط الوستيري للإنزيم الأخير في السلسلة.

من جهة اخرى، يعد النظام الوراثى طريقة بطيئة نسبيا للتحكم فى النشاط الإنزيمى ، فى حين يعد نظام التثبيط بالتغذية الرجعية نظام سريع جدا لضمان أن مستويات النشاط الإنزيمى كافية وفى حدود احتياجات الخلية فقط.

أنواع التثبيط بالتغذية الرجعية Types of Feedback Inhibition:

يمكن تقسيم التثبيط بالتغذية الرجعية إلى الأنواع التالية:

- ١- فى حالة سلاسل الايض المستقيمة (غير المتفرعة) وحيث يفصل عادة بين مادة التفاعل الأول وبين المنتج النهائي عدد من الخطوات الإنزيمية ، فإن المنتج النهائي عند وصوله الى مستوى معين من التركيز يقوم بالارتباط بالإنزيم المساعد فى الخطوة الاولى مسببا إيقاف نشاطه وبالتالي يودى إلى توقف أى نشاط جديد فى السلسلة الأيضية. والمثال على ذلك ما يحدث فى السلسلة الأيضية للحامض الامينى الايزوليوسين كما فى الشكل (١٠-٣).



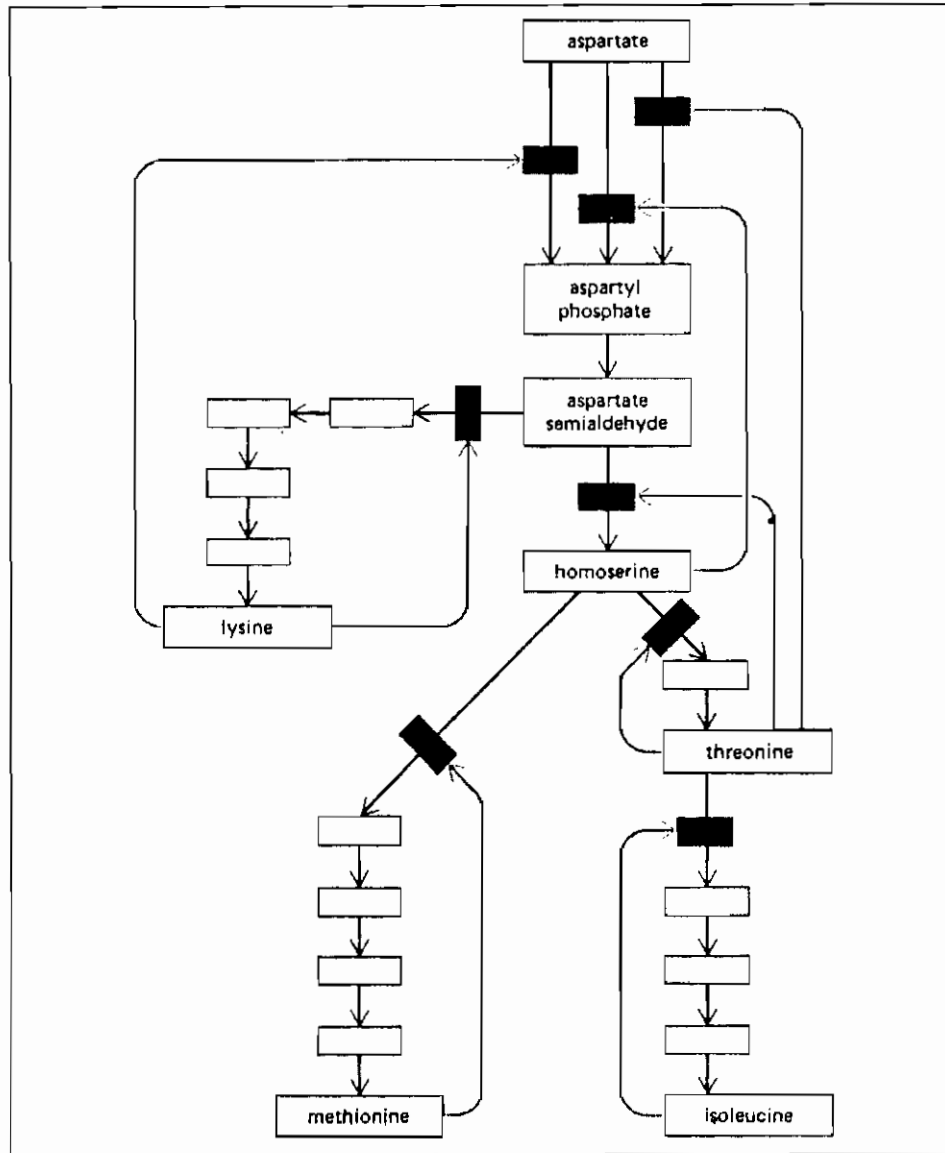
الشكل (١٠-٣): مثال لنظام التغذية الرجعية في السلاسل الايضية البسيطة (غير المتفرعة) في بناء الأيزوليوسين من الثريونين. تبين الخطوط المتقطعة أن الأيزوليوسين (الناتج النهائي) يقوم بتنشيط الانزيم الذي يساعد في تفاعل الخطوة الأولى (ثريونين - > الفا-كيتوبوتاريك)

٢- في حالة السلاسل الايضية المتفرعة Branched Pathway حيث تبدأ سلسلة الايض بمادة تفاعل مشتركة ثم لا تلبث السلسلة ان تتشعب بحيث تنتهي بعدد من النواتج النهائية المختلفة. ومعنى ذلك أنه إذا طبقت نفس القاعدة المعمول بها في حالة السلاسل غير المتفرعة ، فإنه بمجرد

وصول أى من المنتجات النهائية إلى مستوى معين من التركيز سيتم ارتباط هذا المنتج بإنزيم الخطوة الأولى في السلسلة ، مما يعنى وقف السلسلة بأكملها وما يترتب على ذلك من توقف إنتاج النواتج النهائية الأخرى ، على الرغم من أنها قد لا تكون قد وصلت إلى المستوى المطلوب والذي يفى باحتياجات الخلية ما قد يؤدي ذلك من نتائج سلبية. لذلك اقترحت أربعة انواع من الشببب بالتغذية الرجعية لتفسير ما يحدث فى حالة السلاسل المتشعبة وهى:

أ- تعدد الصور الانزيمية (مشابهات الانزيم) Isozymes:

حيث يكون للإنزيم المشارك فى أول خطوة من السلسلة الأيضية عدة صور (مشابهات انزيمية) ، بحيث يختص كل واحد من المنتجات النهائية المختلفة بالارتباط نوعيا بأحد هذه الصور مما يؤدي إلى إيقاف جزئى للسلسلة المتفرعة، بحيث يتم إيقاف الخطوات الوسطية المؤدية إلى هذا المنتج النهائى وحده فى حين يستمر الإنتاج فى الأفرع الأخرى من السلسلة إلى أن تصل بدورها إلى المستوى المطلوب للخلية ، فيحدث الارتباط بين صورة أخرى للإنزيم مع المنتج النهائى التالى وهكذا . والمثال على ذلك ما يحدث فى سلسلة الايض المتفرعة الخاصة بإنتاج الأحماض الامينية الثلاثة: الليسين والأيزوليوسين والمثيونين حيث تبدأ كلها من مادة تفاعل اولية مشتركة وهى حامض الاسبارتيك كما فى الشكل (١٠-٤).



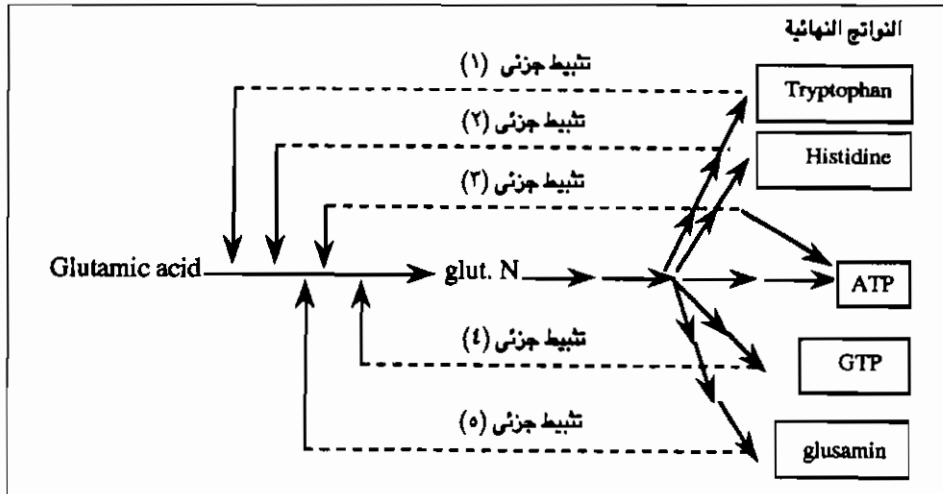
الشكل (١٠-٤): مثال لنظام التنشيط بالتغذية الرجعية في سلاسل الايض المتفرعة حيث يتم تثبيط بناء الاحماض الأمينية الاليسين والمثيونين والثريونين والايزوليوسين في البكتريا بنظام تعدد الصور الانزيمية (مشابهات الانزيمات)

ب- التثبيط المتناسق Concerted Feedback Inhibition:

حيث لا يحدث إيقاف للسلسلة المتفرعة إلا عندما يتم الوصول إلى مستويات كافية من جميع النواتج النهائية معا: بمعنى أن وجود أحد المنتجات النهائية بكمية زائدة لا يكفي لإيقاف السلسلة الايضية بأكملها.

ج- التثبيط التجميعي أو التراكمي Additive or Cumulative FBI:

حيث يؤدي كل من النواتج النهائية إلى أحداث تثبيط جزئي فقط ، ولكن عندما تتوفر كميات زائدة من منتجات نهائين أو أكثر فإن درجة التثبيط المشترك لهما ستكون مساوية لمجموع التثبيط الذي يحدثه كل منهم على حده. ويتضح ذلك في السلسلة المتفرعة الخاصة بإنتاج التربتوفان والهستيدين و ATP, GTP والجلوسامين وتبدأ جميعا بحامض الجلوتاميك كما في الشكل (١٠-٥) ، حيث يحدث إغلاق للخطوة الأولى في السلسلة وهي Glutamic --> Glut. N بنظام تجميعي حسب عدد النواتج النهائية التي تصل إلى مستوى تركيز معين في البيئة.



الشكل (١٠-٥): مثال للنظام التراكمي للتثبيط بالتغذية الرجعية في سلاسل الأيض المتفرعة

د- التثبيط التعاوني Co-operative FBI:

حيث يكون التثبيط المشترك لاثنين أو أكثر من النواتج النهائية أقوى من التأثير التجميحي لهما أى أن وجود اثنين أو أكثر من النواتج النهائية بكمية فائضة سيعطى درجة من التثبيط الرجعى أعلى من مجموع التثبيط الناتج عن فعل كل منهما على حدة.

التنظيم الوراثى Genetic Control:

يتم تنظيم التعبير الجينى فى البكتريا أساسا على مستوى عملية بناء ر ن أ المراسل mRNA أى على مستوى النسخ Transcription. ويتم ذلك عادة بالسماح ببدء أو منع بدء عملية النسخ بواسطة انزيم بلمرة ر ن أ. وحيث أن البكتريا تعتمد فى الحصول على غذائها من المواد المتوفرة فى الوسط المحيط بها مباشرة فإنها تستجيب بسرعة للتغيرات التى تحدث فى هذا الوسط حسب وفرة هذه المواد الغذائية .

تبين أنه اذا أتاحت لبكتريا القولون الفرصة للأختيار بين سكرى الجلوكوز واللاكتوز كمصدر للكربون فإن البكتريا تفضل استهلاك الجلوكوز الموجود فى البيئة أولا قبل أن تبدأ فى استخدام اللاكتوز كمصدر للطاقة اللازمة لها. وقد لوحظ أن التحول الى استخدام اللاكتوز كان مقرونا بفترة توقف فى نمو البكتريا تم خلالها بناء انزيم بيتا جلاكتوسيديز B-Galactosidase الذى يقوم بالمساعدة فى عملية التحليل المائى لسكر اللاكتوز الى جلوكوز وجلاكتوز. أمكن عزل وتمييز بعض الطافرات البكتيرية التى تتميز بوجود بعض النقص النوعى فى تنظيم هذا التحكم مما أدى فى النهاية الى التوصل الى البروتين المثبط للاكتوز Lactose Repressor Protein وقد أدت الدراسات البيوكيماوية والوراثية التى

اجريت على مثبط سكر اللاكتوز ومثبط فاج لامبدا وعدد آخر من البروتينات المنظمة للنشاط الأيضى فى البكتيريا إلى استنتاج نموذج عام للتنظيم على مستوى النسخ فى الخلية غير مميزة النواة .

تبين أن ارتباط هذه البروتينات المثبطة نوعياً بمتابعات معينة فى جزئ د ن أ يؤدي إلى تثبيط أو حث بدء بناء ر ن أ لذلك الجين ، وذلك من خلال الارتباط بالمنطقة التالية مباشرة لمنطقة البروموتور حيث موقع ارتباط إنزيم بلمرة ر ن أ لبدء عملية النسخ.

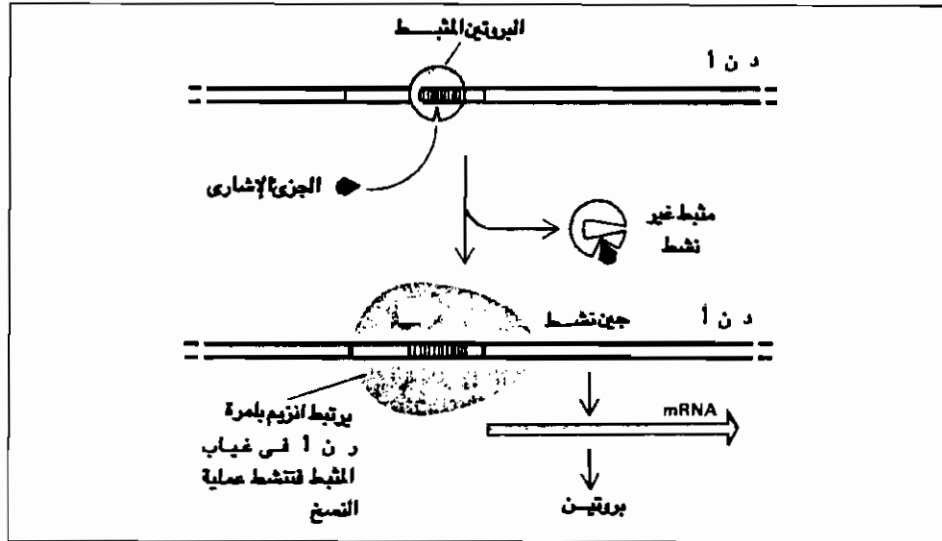
لوحظ أن التغيرات التى تحدث فى عملية الارتباط النوعي لتلك البروتينات التنظيمية على جزئ د ن أ تؤدي إلى فتح أو قفل التعبير الجيني.

معروف أن كروموسوم بكتريا القولون يتكون من جزئ حلقى واحد من د ن أ بطول حوالى 4.3×10^6 زوج نيوكليدي . ويمثل هذا الطول ما يكفي للتشفير لحوالى 4000 بروتين نوعي . وعلى الرغم من أن نسبه فقط من هذه البروتينات هى التى يتم بنائها فى فترة ما ، إلا أن البكتريا بمقدورها تنظيم تعبير عدة جينات طبقاً لمستويات التركيز داخل الخلية لبعض مواد التفاعل النوعية والتي تختلف حسب مصادر الغذاء المتاحة فى بيئة الخلية البكتيرية.

وقد أمكن التحقق من وجود بروتين مثبط للاكتوزوالذي يقوم بالارتباط بوحدة نسخية تسمى أوبرون اللاكتوز Lac Operon، بحيث يؤدي هذا الارتباط النوعي إلى توقف انتاج إنزيم بيتا جلاكتوسيديز β -Galactosidase فى غياب اللاكتوز. وقد تبين أن هذا المثبط يقوم بإيقاف Repression عملية النسخ لهذا الأوبرون عن طريق ارتباطه بمتابع نوعي قصير فى جزئ د ن أ يتكون من

حوالي ٢١ زوج نيوكليوتيد يطلق عليه «المشغل» Operator والذي يتداخل في تتابعه مع تتابع منطقة البروموتور السابقة له مباشرة. عندما يتم ارتباط البروتين المثبط بمنطقة المشغل فإنه يمنع إنزيم بلمرة ر ن أ من بدء عملية نسخ ر ن أ عند منطقة البروموتور ، مما يؤدي إلى إيقاف عملية النسخ للمنطقة المجاورة من جزيئ د ن أ وبذلك يلعب دور ضبط أو تنظيم إنتاج إنزيم بيتاجالكتوسيديز حسب احتياج الخلية. تبين أنه في وجود كمية من سكر اللاكتوز يتكون جزيء من السكر يسمى Allolactose وهو أحد الصور الأيزوميرية لسكر اللاكتوز في الخلية حيث يرتبط هذا السكر نوعيا بالبروتين المثبط مما يؤدي إلى انفكاكة وإزاحته عن منطقة المشغل وبذلك يمكن استئناف عملية النسخ في عملية تسمى «إبطال التثبيط» Derepression ويترتب على ذلك أن تتمكن الخلية من إنتاج ليس فقط إنزيم B-galactosidase ولكن جميع الإنزيمات اللازمة لهدم اللاكتوز ولكن ذلك يحدث فقط عندما يتوفر اللاكتوز (مادة التفاعل) في البيئة كما في الشكل (١٠-٦).

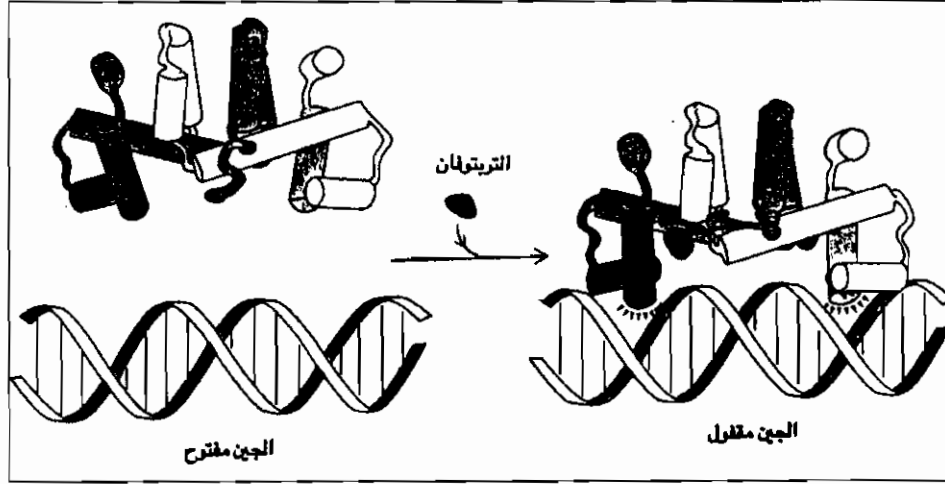
ويلاحظ أن اللاكتوز (اللولاكٲوز) يعمل هنا كجزيئ إشاري Signal Molecule نوعي بحيث يؤدي وجوده إلى تنشيط الوحدة النسخية بأكملها عن طريق خفض أوتقليل قدره المثبط على الارتباط بمنطقة المشغل.



الشكل (١٠-٦): إبطال تثبيط Derepression الجين في البكتريا حيث يقوم جزئ اإشارى صغير بالارتباط بالبروتين المثبط بحيث يغير من شكله فيترك جزيء د ن ١ مما يسمح بتعبير الجينات المجاورة ونسخها

ولكن من جهة أخرى تبين وجود نظم أخرى يقوم فيها الجزئ اإشارى بعملية عكسية تماما لما يحدث فى أوبرون اللاكتوز ، أى أنه يستخدم في وقف نشاط الوحدة النسخية عن طريق زيادة النشاط التثبيطى للمثبط وبالتالي رفع قدرته على الارتباط بمنطقة المشغل . وقد تبين أن ذلك يحدث فى عملية التحكم فى التعبير الجينى لخمس جينات متجاورة تعمل فى تنسيق فيما بينها للتشغيل لإنتاج الانزيمات اللازمة لإنتاج الحامض الأميني تربتوفان في بكتريا القولون. ويطلق على هذه الوحدة النسخية اسم أوبرون التربتوفان Trp. Operon. وجد أن البروتين المثبط للتربتوفان يتحكم في إنتاج الجزئ الكبير المتعدد السسترون Polycistronic من mRNA الذى يشفر للخمس بروتينات معا. إلا أن هذا البروتين التنظيمي يكون عادة في صورته الاولى غير فعال ويسمى Aporepressor ويحتاج لكر يتحول إلى الصورة الفعالة إلى الارتباط نوعيا

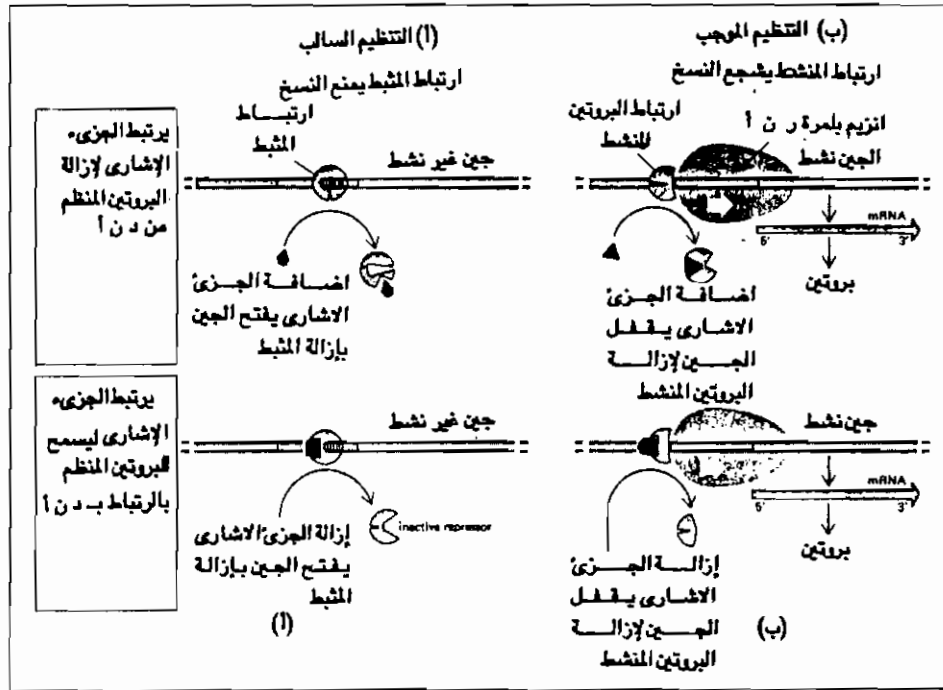
بجزئ من التريتوفان (المنتج النهائي) حتى يجعله مثبط نشط Active Repressor يمكنه الارتباط بمنطقة المشغل وإيقاف النسخ لوحدة الاوبرون كما في الشكل (٧-١٠).



الشكل (٧-١٠): يؤدي ارتباط التريتوفان بالمثبط إلى تغير في شكل المثبط مما يسمح له بالارتباط بقوة بالتتابع النوعي في جزئ د ن ا مما يوقف النسخ للجينات المسنولة عن التشفير للانزيمات الخاصة بإنتاج التريتوفان في اوبرون التريتوفان. يبين الشكل ثلاثي الأبعاد كيف أن ارتباط التريتوفان يؤدي إلى زيادة المسافة بين حلزوني التعارف (الأسطوانة المظلمة) في الثاني مما يسمح بتكوين تفاعلات لروابط هيدروجينية متماثلة التي تظهر هنا كأشعة

أى أنه بالنسبة لأوبرون اللاكتوز تؤدي الزيادة في تركيز اللاكتوز (الجزئ الاشاري) إلى انفكاك البروتين المثبط من على التتابع النوعي لجزئ د ن ا الخاص بأوبرون اللاكتوز وبالتالي تنشط النسخ في حين أن زيادة تركيز التريتوفان (كجزئ اشاري) تؤدي إلى زيادة كفاءة المثبط للارتباط بمنطقة المشغل مما يؤدي إلى تثبيط النسخ. ونظراً لأنه في كلتا الحالتين يؤدي ارتباط البروتين المنظم بمنطقة المشغل إلى كبت النسخ ، فيطلق على هذا النوع من

التحكم اسم التنظيم السلبي Negative Regulation كما في الشكل (١٠-٨) أى أنه في التنظيم السلبي يحدث التعبير الجيني الا اذا تم إيقافه بواسطة جزيء منظم (مثبط).



الشكل (١٠-٨): ملخص لميكانيكيات التحكم الوراثي السلبي (أ) والتحكم الموجب (ب) في غير مميزة النواة. يلاحظ ان اضافة جزيء اشارى صغير مستحث يمكنه أن ينشط الجين إما بإزالة المثبط من على DNA (الجزء العلوى إلى اليسار) أو بربط بروتين منشط للجين (الجزء السفلى إلى اليمين). وب نفس الطريقة يؤدي اضافة جزيء اشارى مثبط إلى إيقاف النشاط النسخي للجين إما بإزالة البروتين المنشط من على DNA (الجزء الأيمن العلوى) أو بربط البروتين المثبط بجزيء DNA (الجزء الأيسر السفلى).

دور البروتينات المنشطة في بدء عملية النسخ للأوبرون:

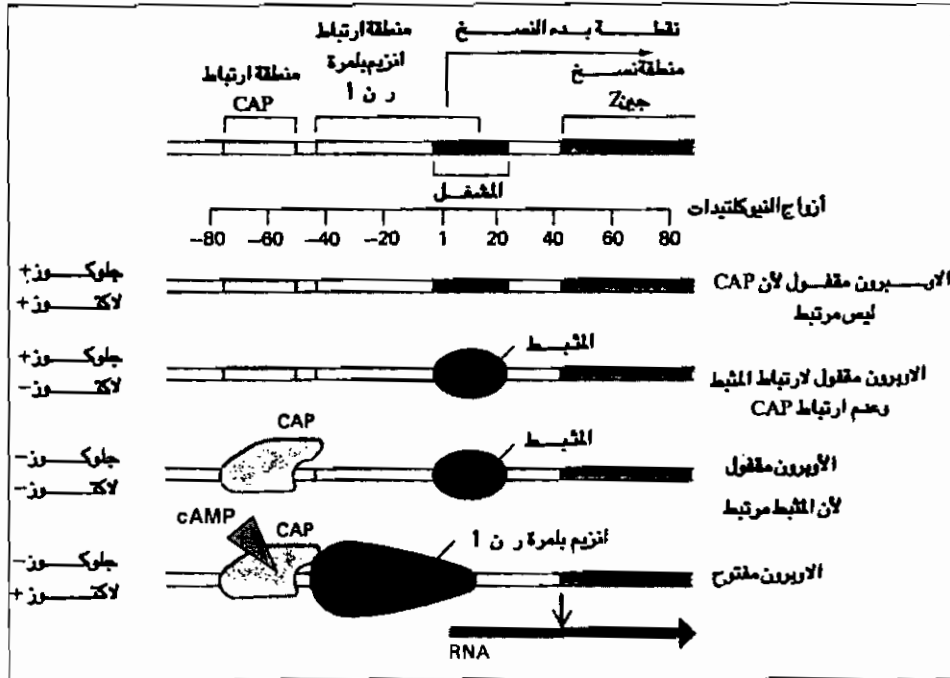
إلى جانب نظام التحكم السلبي المشار إليه سابقاً ، حيث يرتبط البروتين المثبط بالقرب من منطقة البروموتور ويتدخل في نشاط انزيم بلمرة RNA ،

يوجد نوع آخر من التحكم يسمى التنظيم الموجب Positive Regulation حيث لا يحدث النسخ الا في وجود جزئ منظم (منشط) حيث يؤدي وجود بروتين نوعي يسمى البروتين المنشط Activator Protein إلى تسهيل عمل إنزيم بلمرة ر ن أ وقد تبين أن هذا النوع من التنظيم الموجب يكون ضرورياً لبعض الوحدات النسخية في بكتريا القولون، وخاصة تلك التي تحتوى على بروتور ضعيف نسبياً بحيث لا يستطيع في حد ذاته الارتباط بكفاءة بإنزيم بلمرة ر ن أ ويتم تنشيط مثل هذه الوحدات النسخية عن طريق ارتباط البروتين المنشط بمنطقة نوعية مجاورة على جزئ د ن أ ، بحيث يتمكن هذا البروتين من أن يتلامس مع إنزيم بلمرة ر ن أ بطريقة تؤدي إلى زيادة قدرة الأخير على بدء النسخ.

يحدث أحياناً أن يتشابه الدور الذي يقوم به البروتين المنشط مع ذلك الذي يقوم به البروتين المثبط ، بل أنه في بعض النظم الوراثية في البكتريا قد يقوم نفس البروتين التنظيمي بدور المثبط والمنشط معا عندما ترتبط جزيئاته بعدة مواقع في الجينوم بحيث يقوم بتنشيط النسخ في بعض المناطق في حين يلعب دوراً منشطاً للنسخ في مناطق أخرى. تتم عملية التنشيط عندما يرتبط البروتين المنشط بجزيئات اشارة Signal Molecules بحيث تؤدي إلى زيادة أو خفض قدرته التنشيطية ، وبالتالي تؤدي إلى فتح أو قفل نشاط الوحدة النسخية على الترتيب ترجع تسمية هذا النوع من التحكم الجيني بالتنظيم الموجب إلى حقيقة أن عملية النسخ تحدث بكفاءة أعلى في وجود البروتينات التنظيمية عما في حالة غيابها كما في الشكل (١٠-٨ ب). في حالة اوبرون اللاكتوز Lac Operon نجد أن هناك نوعاً خاصاً من البروتين المنشط يسمى Catabolite Activator Protein ويطلق عليه اختصاراً (CAP)، بحيث يتيح هذا البروتين للبكتريا أن

تستخدم مصدر بديل للكربون فقط عندما لا يتوفر الجلوكوز في البيئة ، والذي يعد بالطبع مصدراً مثالياً للكربون. في حالة أوبرون اللاكتوز يحدث تنسيق بين عمل البروتين المثبط للاكتوز والبروتين المنشط CAP لكي يتم انتاج التعبير الجيني المناسب. وكما سبق القول فان وجود اللاكتوز يؤدي الى انفكاك البروتين المثبط عن د ن أ ، الا أنه تبين أن ذلك ليس كافياً في حد ذاته لتنشيط عملية النسخ لاوبرون اللاكتوز ، نظراً لأن منطقة البروموتور ضعيفة مما يؤدي إلى انخفاض درجة ارتباط إنزيم بلمرة ر ن أ بها. لذلك تحتاج عملية النسخ بواسطة هذا البروموتور الي تقوية درجة ارتباط إنزيم بلمرة ر ن أ بالبروموتور ويتم ذلك عن طريق ارتباط البروتين المنشط (CAP) في منطقة تسبق مباشرة منطقة البروموتور كما هو موضح في الشكل (١٠-٩). تنطبق نفس الميكانيكية على بروموتور المالتوز والجلالكتوز وغيرهما من الإنزيمات الخاصة بتمثيل السكريات.

يتم تنظيم عملية ارتباط البروتين المنشط CAP بجزئ د.ن.أ. حسب تركيز الجلوكوز في البيئة وذلك لضمان استخدام مصادر بديلة للكربون فقط في غياب الجلوكوز. ويحدث ذلك عندما يؤدي عدم توفر الجلوكوز في البيئة الى استحداث زيادة في مستوى الخلية من جزيئات AMP الحلقى cAMP والذي يعمل كجزئ اشاري للخلية البكتيرية وكذلك في الخلية مميزة النواة كما سيأتى بعد.



الشكل (١٠-٩): تأثير تركيز الجلوكوكورتيكويد على تنظيم بدء النشاط النسخي في اوبرون اللاكتوز من خلال مفعولهما على البروتين المثبط والجين المنشط CAP. تؤدي اضافة اللاكتوز إلى زيادة تركيز اللاكتاتوز الذي يزيل المثبط من على DNA وعند اضافة الجلوكوكورتيكويد ينخفض تركيز cAMP الضروري لنشاط CAP فيترك الأخير DNA. مما يؤدي إلى قتل الاوبرون. يعتقد أن بروتين CAP يلامس انزيم بلمرة RNA. لمساعدة على بدء النسخ

يرتبط cAMP بالبروتين CAP محدثاً تغييراً في الشكل التركيبي لهذا البروتين مما يمكنه من الارتباط بكفاءة بالتتابع النوعي الموجود على جزيء DNA مما يؤدي بالتالي الى تنشيط نسخ الجينات المجاورة. ولكن عندما يكون الجلوكوز متوفراً في البيئة ، ينخفض مستوى تركيز cAMP بحيث يتفكك عن البروتين CAP فيتحول الأخير الى الصورة غير النشطة التي لا يمكنها ان ترتبط بجزيء DNA مما يؤدي الى تحول الخلية بسرعة الى استخدام الجلوكوز فقط ، ويتوقف النسخ حتى في وجود كمية كبيرة من اللاكتوز في البيئة كما في الشكل

(٩-١٠) وقد تبين أن إنتاج جزئ cAMP يعتمد على نشاط إنزيم Adenyl Cyclase وأن وجود الجلوكوز يثبط نشاط هذا الإنزيم.

تعريف الأوبرون:

وجد في عدد كبير من النظم البكتيرية أن مجموعة من الجينات التي تشفر لعدد من البروتينات النوعية التي ترتبط ببعضها بعلاقات وظيفية محددة ، من الممكن أن يتحكم في تعبيرها جميعا مشغل واحد Operator ، وعادة تكون هذه المجموعة من الجينات مرتبطة بشدة على الكروموسوم البكتيري. ويطلق على المنطقة من المادة الوراثية التي تحتوى على عدد من الجينات التي تربطها علاقة وظيفية متناسقة والتي تتكون من المشغل وعدد من الجينات التركيبية اسم الأوبرون. وحسب التعريف فإن الأوبرون عبارة عن وحدة نسخ وراثية ذات تعبير متناسق.

العناصر الرئيسية للأوبرون:

يتكون الأوبرون من مجموعة من الجينات المتجاورة التي تربطها علاقات وظيفية ويطلق عليها الجينات التركيبية (S) Structural Genes.

- ١- يتم تنظيم تعبير هذه الجينات التركيبية في الأوبرون عن طريق تتابع نيوكليدي قصير نسبيا يسمى المشغل Operator (O) ويوجد عادة قبل أول جين تركيبى من ناحية النهاية 5'.
- ٢- يوجد جين منظم Regulator مستقل (i) يقوم بالتحكم في إنتاج البروتين المثبط Repressor الذي ينتج عن تفاعلة مع المشغل إحداث تثبيط متناسق ومنتظم لجميع الجينات التركيبية معا وفي نفس الوقت بمعنى أنه يحدث

- توقف متواز وكى فى تعبير جميع الجينات التركيبية الخاصة بهذا الأوبرون بحيث تظل نسبة التعبير الجينى ثابتة بين هذه الجينات.
- ٣- يحدث إعادة تنشيط (أو إيقاف للتنشيط) Derepression لجميع الجينات التركيبية معا وفى نفس الوقت وب نفس المعدل (فيما يسمى بإعادة التنشيط المتناسق Co-ordinate Derepression) ويتم ذلك إما باستخدام جزئ مستحث Inducer أو نتيجة لحدوث طفرة تأسيسية Constitutive Mutation فى المشغل (Oc).
- ٤- تؤدي طفرة الاقتضاب أو الحذف Deletion التى تشمل منطقة المشغل فقط (O) الى وقف متناسق للنشاط النسخى لجميع الجينات التركيبية فى الأوبرون.
- ٥- يبدأ النسخ عند منطقة البروموتور التى تسبق منطقة المشغل والتى تقع الى اليسار منها ، حيث يرتبط إنزيم بلمرة ر ن أ بهذه المنطقة لبدء النسخ.
- ٦- يتم نسخ الإوبرون كوحدة نسخية كبيرة مكونة من جزئ RNA متعدد السيسترونات Polycistronic mRNA بحيث يشتمل على جميع مناطق الجينات التركيبية معا بدلا من ان يتم النسخ على مستوى كل جين تركيبى على حدة إلا أنه عند الترجمة تتم ترجمة كل جين تركيبى مستقلا الى بروتين محدد.

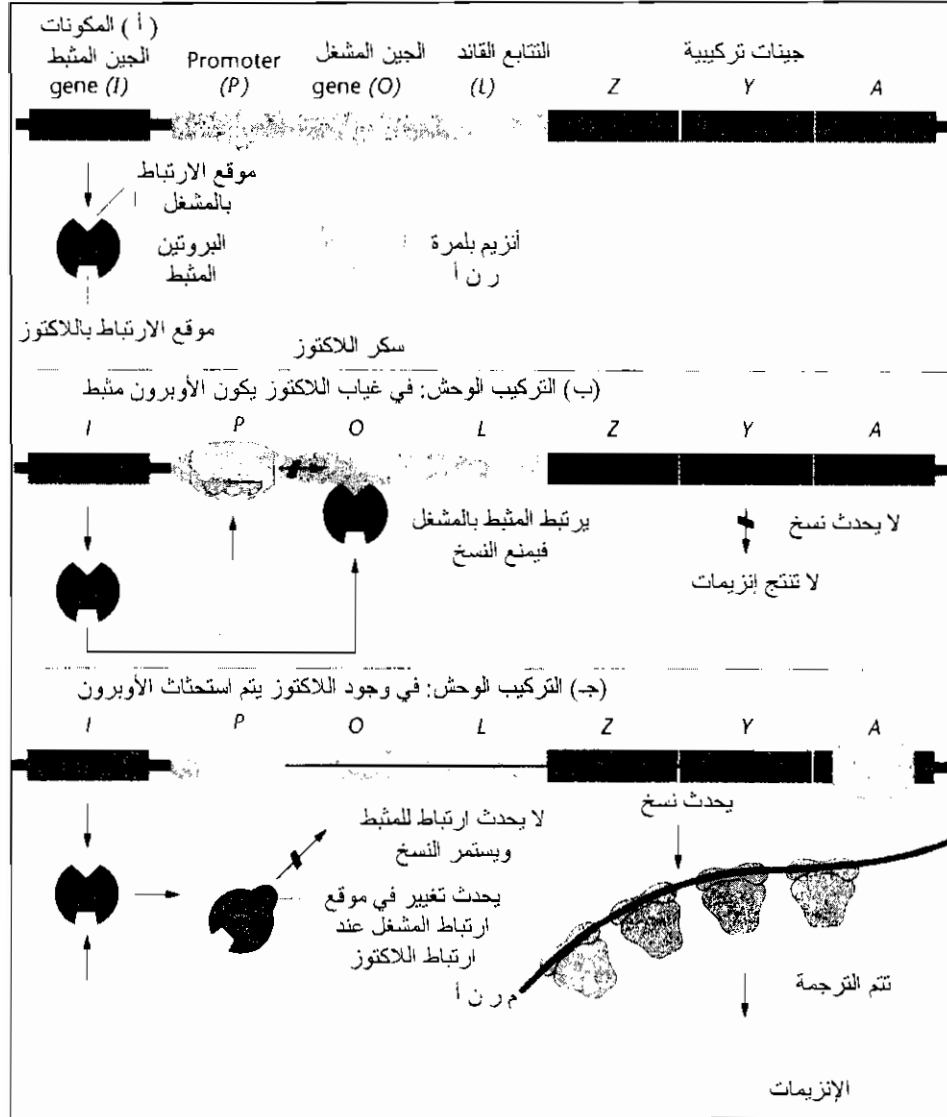
تركيب اوبرون اللاكتوز Lac Operon:

تتكون الوحدة النسخية لأوبرون اللاكتوز من ثلاث جينات تركيبية وهى على الترتيب من اليسار الى اليمين:

الجين z : ويتحكم فى انتاج انزيم بيتا جلاكتوسيديز β -Galactosidase.

والجين y : ويقوم بانتاج انزيم Lac Permease عند الترجمة.
والجين a : وينتج انزيم Transacetylase عند الترجمة.

ويتم نسخ جينات هذه الانزيمات الثلاثة معا في وحدة نسخية واحدة يطلق عليها أوبرون اللاكتوز. ويوجد الجين المنظم (i) الذي ينتج البروتين التنظيمي المثبط Repressor Protein الى اليسار من مجموعة الجينات التركيبية ، يليه منطقة البروموتور (P) التي ترتبط بها انزيم بلمرة ر ن أ ثم منطقة المشغل (O) الذي يرتبط به البروتين المثبط كما في الشكل (١٠-١٠).



الشكل (١٠-١٠): مكونات أوبرون اللاكتوز Lac Operon وتأثير وجود أو غياب سكر اللاكتوز على إستحداثه Induction

الأدلة الوراثية لإثبات نموذج الاوبرون:

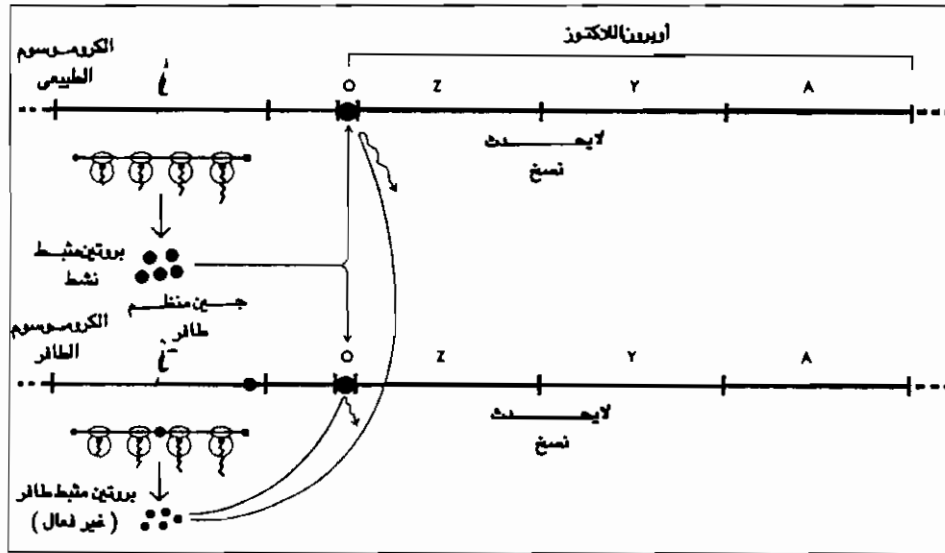
Genetic Proof of The Operon Model:

١- طفرات في الجين المنظم (i) Regulatory Gene:

تؤثر الطفرات التي تحدث في الجين الخاص بإنتاج البروتين المثبط (i) على القدرة على التحكم في تعبير أوبرون اللاكتوز ، وقد ساعدت هذه الطفرات بشكل كبير في استنباط نموذج الاوبرون.

أمكن التعرف على عدة انواع من الطفرات التي تحدث في الجين i : ومنها الطفرة (i⁻) حيث يصبح الجين غير قادر على انتاج بروتين مثبط فعال. ويتم ذلك إما بطفرة تغيير القاعدة الواحدة أو طفرة حذف Deletion في هذا الجين. وتؤدي طفرة الحذف في الجين i الى غياب البروتين المثبط بالكامل في حين تؤدي الطفرات الاخرى الى انتاج بروتين مثبط غير فعال بحيث لا يتمكن من الارتباط بقرين المثبط الخاص به وبالتالي لا يمكنه ان يأخذ الشكل النشط في التثبيط. أى لا يمكنه الارتباط بالتتابع النيوكليدي الخاص به على المشغل. ويؤدي حدوث الطفرة i- الى انتاج جميع انزيمات الاوبرون بصرف النظر عن الاحتياج اليها من عدمه ويقال لهذه الطفرات بانها طافرات تأسيسية Constitutive Mutations. ويبين الشكل (١٠-١١) كيف امكن استخدام خلايا بكتيرية ثنائية جزيئا Partial Diploid بالنسبة للكروموسوم البكتيري وبتركيب (i/i-) لبيان ان وجود أليل واحد من الجين i يكون سائدا على الأليل الطافر i- حيث وجد انه في هذه الحالة لن تتكون اى كمية من جزيئات انزيم بيتا جلاكتوسيداز B-Galactosidase في هذه الخلايا في غياب اللاكتوز في البيئة ، حيث ان وجود نسخة واحدة من الأليل الوحشى i سيؤدي الى انتاج كمية كافية

من البروتين المثبط للقيام بتنشيط كلا الموقعين للمشغل في الكروموسومين ويطلق على الجين i الذى ينتج بروتين مثبط قابل للانتشار Diffusible بأنه ذو تأثير عابر Trans-Acting. من جهة أخرى توجد طفرة أخرى يطلق عليها i^s حيث تؤدي الى تنشيط فائق للأوبرون Super Repression نتيجة لأن الطفرة أدت الى تغيير دائم في منطقة ارتباط البروتين المثبط بسكر اللاكتوز (Inducer) بحيث يظل المثبط الطافر مرتبط بقوة بالمشغل حتى في وجود فائض من اللاكتوز.

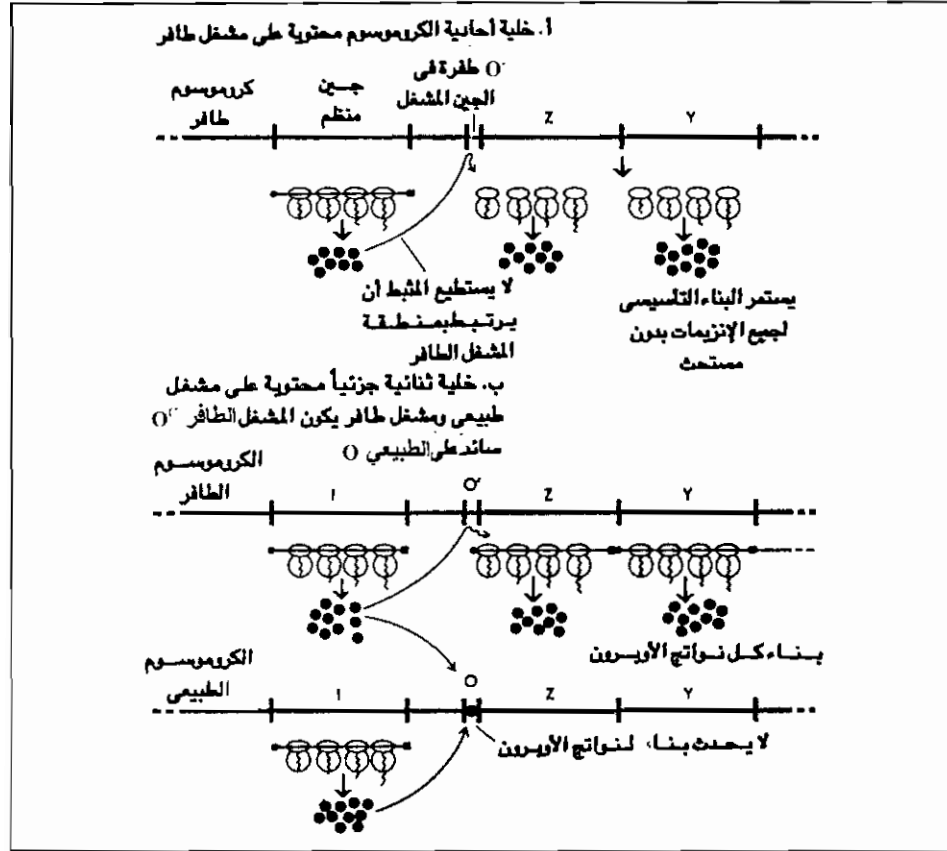


الشكل (١٠-١١): استخدام تركيب ثنائي جزئي في كروموسوم البكتريا لاثبات ان وجود مثبط واحد فعال يكون سائد على وجود مثبط غير نشط. لا تنتج أى كميات من انزيمات الاوبرون فى هذه الحالة

٢- طفرات فى الجين المشغل (O) Operon:

أمكن عزل سلسله من الطافرات التأسيسية Constitutive Mutations فى هذا الجين بحيث تفقد القدرة على التحكم فى انتاج الانزيم الذى يستمر انتاجه بصرف النظر عن وجود المستحث Inducer من عدمه.

وعند تحديد موقع تلك الطفرات تبين ان عددا منها كان متجمعا بالقرب من الجين Z فى منطقة المشغل . وقد اطلق على هذه الطافرات التأسيسية Operator Constitutive Mutations (O^c). وقد وجد انها قد فقدت القدرة على الارتباط بالبروتين المثبط ، بحيث لا يمكن وقف عملية النسخ فى الوقت المناسب . وقد تم التأكد من ذلك بمقارنة ما يحدث فى الخلايا أحادية الكروموسوم Haploid والثنائية الجزئية Partial Diploid والخليطه بالنسبة لهذا الموقع اى بتركيب (O/O^c) كما فى الشكل (١٠-١٢) حيث تبين انه فى الخلايا الأحادية كانت الطفرة التأسيسية O^c فعاله بحيث منعت ارتباط المثبط بالمشغل مما أدى الى استمرار إنتاج إنزيمات الأوبرون فى غياب المستحث (اللاكتوز) أما فى حالة الخلايا الثنائية جزئيا بتركيب (O/O^c) فقد وجد أن الأليل O^c كان سائدا على O بحيث تغلبت الطفرة O^c على الأليل الوحشى O وجعلت فى امكان الخلية الثنائية الجزئية ان تستمر فى انتاج الانزيمات الثلاثة للأوبرون بالرغم من غياب المستحث (قارن ما يحدث بالنسبة للتركيب O^c/O بما يحدث بالنسبة للتركيب (i/i^-)). ويدل ذلك على ان منطقة المشغل من النوع Cis-Acting وليس بمقدورها انتاج أى منتج ينتشر Diffusible.



الشكل (١٠-١٢): تنظيم النسخ في أوبرون اللاكتوز بالمشغل الطبيعي والطاقر لمنطقة المشغل (O/O)

٣- طفرات في الجينات التركيبية Structural Genes:

أمكن عزل طفرات عديدة المعنى لكل من الجينات التركيبية الثلاثة لأوبرون اللاكتوز وقد تبين ان تتابع مواقع هذه الجينات على الكروموسوم البكتيري من اليسار إلى اليمين هو a, y, z. بينت الطفرات عديدة المعنى في الموقع z أن تأثيرها لن يقتصر على وقف انتاج الانزيم المسئول عنه فقط وهو

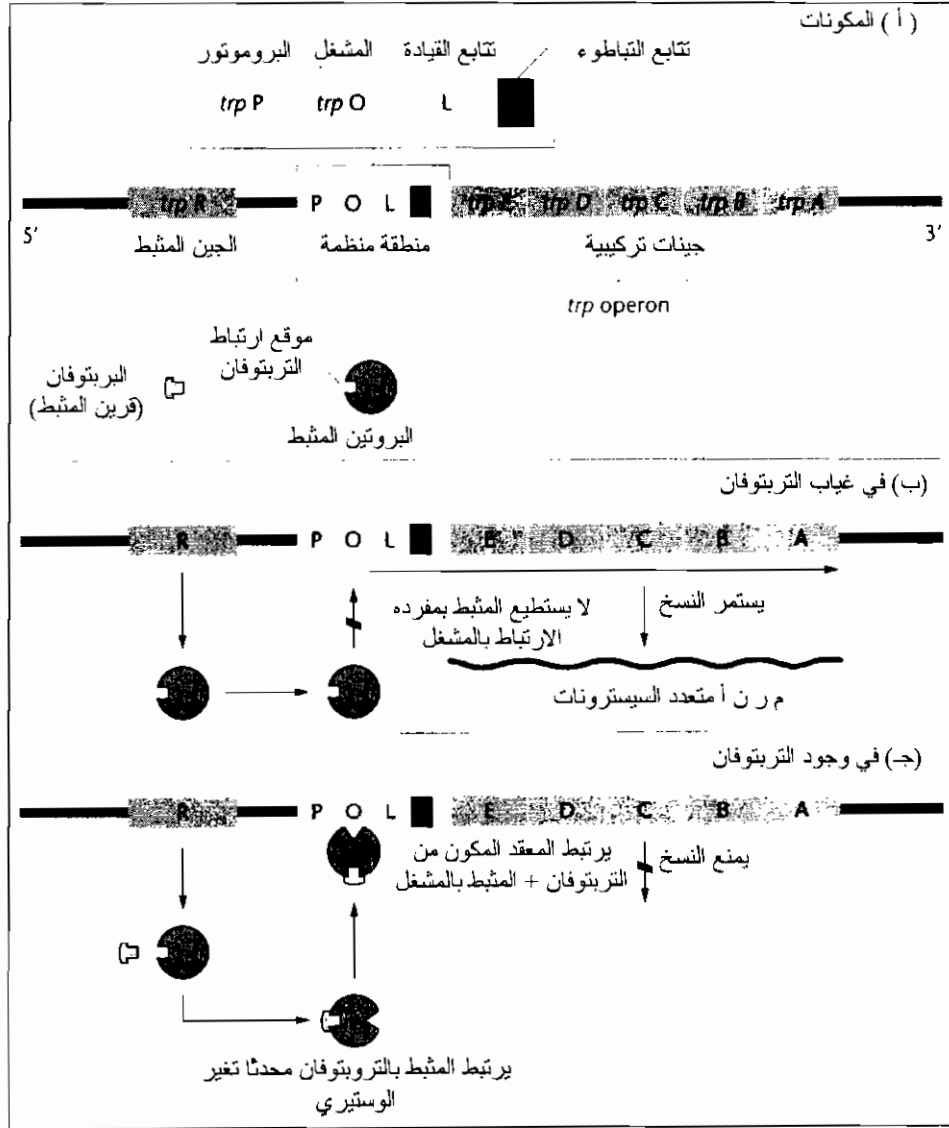
بيتا جلاكتوسيديز β -Galactosidase ولكن تأثيرها سيمتد ليشمل تعبير الجينان التاليان a,y بحيث يتوقف انتاج انزيمي Permease, Transacetylase على الترتيب في حين لو حدثت الطفرة في الموقع y فقط فان التأثير المانع سي شمل الجين التالي له في الخريطة الكروموسومية وهو الجين a في حين لن تؤثر هذه الطفرة على الجين السابق له في الترتيب أى الجين z فيستمر في انتاج انزيم بيتا جلاكتوسيديز β -Galactosidase في نفس الوقت الذى يتوقف فيه انتاج انزيمي Permease, Transacetylase. واذا حدثت الطفرة فى الجين التركيبى a فسيقتصر تأثيرها على تعبير هذا الجين فقط فلا ينتج انزيم Transacetylase ويستمر الجينان الاخران فى انتاج الانزيمات الخاصة بها بدون تغيير. ويطلق على هذا النوع من الطفرات اسم الطفرات القطبية Polar Mutation حيث انها ذات اتجاه محدد فى التأثير مما يفترض معه وجود تدرج فى التأثير القطبي فى اتجاه النسخ '3'--->'5' وليس العكس. ويعتقد انه كلما اقتربت الطفرة القطبية من تتابع المشغل Operator كلما زاد التأثير القطبي لهذه الطفرة بحيث يقل أو ينعدم تعبير الجينات التالية مباشرة لها ، في حين يقل التأثير كلما كان موقع الطفرة القطبية بعيدا عن المشغل. وقد تم تفسير ذلك على أساس أن الجينات الثلاثة يتم نسخها في صورة جزئ mRNA واحد كبير متعدد السيسترونات Polycistronic في الاتجاه القطبي '3'--->'5' حسب تتابع الجينات a-y-z ، بحيث يكون من الصعب على انزيم البلمرة RN أ الاستمرار في النسخ في المنطقة التالية للطفرة القطبية مما يؤدي الى توقف النسخ.

أوبرون التربتوفان Tryptophan Operon:

يتكون أوبرون التربتوفان من خمس جينات تركيبية متجاورة. ويعد أوبرون التربتوفان في بكتريا القولون من النوع القابل للكبت أو التثبيط

Repressible System حيث يتم التثبيط عن طريق الناتج النهائي End Product لسلسلة الأيض التي يتحكم فيها هذا الأوبرون وهو الحامض الأميني التربتوفان الذي يعمل هنا كقرين مثبط Co-repressor بحيث يرتبط بالبروتين المثبط الأولي غير الفعال Aporepressor ويحوّله إلى الصورة الفعالة فينشط في التثبيط مما يجعله قادراً على الارتباط بمنطقة المشغل وقفل الأوبرون.

تحتاج الخلية إلى التربتوفان لبناء البروتين ، وعندما يكون التربتوفان متوفر في البيئة فإن جميع الإنزيمات الخمسة التي تساعد في سلسلة البناء الخاصة بالتربتوفان تكون غير متوفرة نتيجة لتثبيط نسخ جميع الجينات التركيبية الخاصة بها . ويعتبر هذا الأمر طبيعياً نظراً لأن جميع الأوبرونات التي تتحكم في إنتاج مركب أو جزئ نهائي لا بد أن تكون قابلة للتثبيط عندما يزيد إنتاج هذا المنتج النهائي عن حدود احتياج الخلية . في حين أن الأوبرونات المسؤولة عن انحلال أو هدم مادة التفاعل (مثل سكر اللاكتوز) لا بد أن تكون من النوع القابل للإستبداء Inducible عند توفر مادة التفاعل حتى يتسنى تحليل أو هدم هذه المادة بالإنزيمات التي تنتج عن نشاط الأوبرون. ويبين الشكل (١٠-١٣) مكونات الأوبرون التربتوفان.



الشكل (١٠-١٣)

- أ - مكونات أوبرون التريبتوفان *Trp Operon* والعناصر المنظمة.
- ب - إستحثاته.
- ت - تثبيط نشاطه.

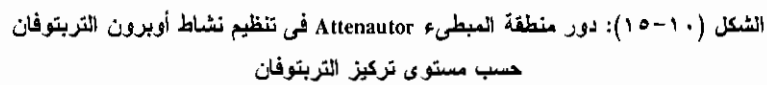
دور منطقة التباطوء Attenuation في تنظيم نسخ أوبرن الترتوفان:

في البداية كان المفهوم الشائع ان بناء الانزيمات الخمسة في أوبرون الترتوفان يتم تنظيم نسخها بصفة رئيسية عن طريق البروتين المثبط : وكما سبق القول فان الملاحظ هنا أن نسخ الجينات الخمس المتجاورة المكونة لأوبرون الترتوفان يحدث فقط عندما تكون كمية الترتوفان محدودة جدا في بيئة الخلية البكتيرية.

وعلى ذلك فإن الترتوفان يعمل في هذه الحالة ليس كمستحث للنسخ ولكنه على العكس من ذلك تماماً ، يعمل كقرين مثبط Co-repressor بحيث يكون دوره عبارة عن تنشيط المثبط النوعي الخاص به حتى يمكنه أن يرتبط بتتابع المشغل لأوبرون الترتوفان. ولذلك فإنه عندما يكون تركيز الترتوفان منخفض، نجد أن منطقة المشغل تكون حرة مما يسمح لعملية النسخ لجزئ mRNA بأن تبدأ من منطقة البروموتور المجاورة.

إلا أنه تبين حديثاً أنه بالإضافة إلى هذا التنظيم المبدئي توجد ميكانيكية تحكم اضافية تعمل على تنظيم هذا الأوبرون. إذ وجد أن مجرد بدء بناء جزئ ر ن أ المراسل mRNA لا يعنى بالضرورة أن عملية البناء هذه ستستمر تلقائياً إلى أن نحصل على جزئ كامل من mRNA بل تبين أن معظم جزيئات mRNA لجينات أوبرون الترتوفان تتوقف عن النمو بعد البداية مباشرة ، وقبل أن يبدأ حتى نسخ أول جين في هذا الأوبرون ولا تستأنف النسخ إلا إذا حدث تأكيد ثان وبطريقة أخرى مستقلة بأن الترتوفان غير متوفر في البيئة بالفعل.

- ولكن كيف يتسنى لإنزيم بلمرة ر ن أ تخطى عقبة منطقة المبطئ لاستكمال عملية البناء وخاصة عندما يكون تركيز التريتوفان منخفضاً. تكمن الإجابة على هذا السؤال عند دراسة ثلاث خواص لتتابعات منطقة القيادة :
- ١- وجود شكل عروة دبوس شعر ثانية بالإضافة إلى عروة دبوس الشعر الخاصة بانتهاء النسخ ويمكن أن تتكون هذه العروة الإضافية من تزاوج المنطقة ٢، ١ في منطقة القيادة Leader كما في الشكل (١٠-١٥).
 - ٢- أن تتابع القواعد في المنطقة ٢ يكون متكامل مع المنطقة ٣ مما يعلى فرصة لتزاوج هاتين المنطقتين أيضاً لتكوين عروة دبوس شعر أخرى مما يحول دون تكوين عروة دبوس الشعر الخاصة بالانتهاء (٣/٤).
 - ٣- تختص منطقة Leader من ر ن أ بالتشفير لسلسلة قصيرة من الببتيدات القائدة مكونة من حوالي ١٤ حامض أميني مسبقة بموقع ارتباط قوى بالريبوسوم. وجد ان تتابع منطقة القيادة يحتوى على كودونين متتاليين للتريتوفان. وقد تبين أن هذه خاصية مميزة لهذه المنطقة فقد وجد فى أوبرونات أخرى مثل أوبرون الليوسين أن هذه المنطقة النوعية تحتوى على أربعة كودونات مترادفة تشفر لليوسين فى حين يحتوى أوبرون الهستدين على ستة كودونات متتالية للهستيدين فى كل المنطقة.



تبين أن وظيفة هذه الكودونات هي منع الريبوسوم من محاولة الاشتراك في ترجمة منطقة القيادة Leader. ومعنى ذلك أنه عندما يكون تركيز التربتوفان منخفضاً جداً في الخلية يكون مقدار ^{trp} -tRNA منخفضاً جداً مما يحتم على الريبوسوم أن يتوقف عندما يصل إلى كودون التربتوفان في منطقة القيادة ويظل mRNA حول كودون التربتوفان مرتبطاً بالريبوسوم وبالتالي لا يمكنه الدخول في تكوين عروه دبوس الشعر للإنتهاء (٤/٣) ويبين الشكل (١٠-١٥) النتائج المترتبة على ذلك. حيث يكون الريبوسوم مقيداً بكودون التربتوفان في مكان يسمح بأن تظل المنطقة ٢ حرة للإرتباط بالمنطقة ٣ أويؤدي هذا بدوره إلى عدم إمكان تكوين عروه دبوس الشعر الخاصة بالإنتهاء (٤/٣) مما يسمح لإنزيم بلمرة ر ن أ بعبور منطقة المبطئ إلى الأوبرون ويتم نسغ جينات هذا الأوبرون. ولكن إذا حدث من جهة أخرى أن توفرت كميات كبيرة من التربتوفان في البيئة ، وبالتالي ارتفع مقدار جزيئات ^{trp} -tRNA مما يسمح للريبوسوم بالتحرك خلال كودون التربتوفان ، فإن الريبوسوم سيشتغل منطقة التتابع ٢ مما يسمح بتكون عروة دبوس الشعر الخاص بالإنتهاء النسخ (٤/٣) وبالتالي يتوقف النسخ عند نهاية منطقة القيادة في جزئ mRNA. هناك احتمال آخر وهو أن الترجمة قد تتوقف قبل كودون التربتوفان (وذلك نظراً لندرة أحد الأحماض الأمينية الأخرى) أو قد تفشل في البدء للمرة مما يؤدي إلى أن يصبح التتابع ١ حراً لكي يتزاوج مع التتابع ٢ وبالتالي تتكون عروة دبوس شعر الإنتهاء (٤/٣) التي تؤدي إلى إيقاف عملية تعبير الجينات في هذا الأوبرون.

يعتقد أن أهمية منطقة القيادة في جزئ mRNA ترجع فقط إلى أنها تضع الريبوسوم في المكان المناسب أثناء عملية الترجمة لهذه المنطقة نفسها. ومما يؤكد هذا الدور الفريد ان ببتيد القيادة يتم تحليله انزيميا بعد ذلك مباشرة.

من الممكن ان يكون وجود كلا من ميكانيكتى التحكم بالتثبيط والابطاء يؤديان الى السماح فقط بحدوث النشاط النسخى حسب المستوى الذى يتوفر فيه التريبتوفان فى الخلية بحيث يحتاج الأمر الى خطوتين للاستجابة حسب تصاعد درجة الاحتياج الى التريبتوفان. إذ تحدث الاستجابة المبدئية المتمثلة فى توقف ارتباط البروتين المثبط بمنطقة المشغل. وعندما تدعو الحاجة الى انتاج المزيد من التريبتوفان فان الخطوة الثانية تؤدي الى الاسترخاء فى نظام الابطاء. وقد تبين ان بعض نظم الأوبرون الأخرى مثل أوبرون الهستيدين His Operon وأوبرون الليوسين Leu-operon تعتمدان اساسا على نظام الأبطاء ولا يحتوى أى منهما على نظام البروتين المثبط.

وعلى ذلك فان تنظيم إنتاج التريبتوفان يتم على ثلاث مستويات وهى:

- ١- Repressor/Operator.
- ٢- Attenuation.
- ٣- Feedback Inhibition.

الفصل الحادي عشر

تنظيم التعبير الجيني في مميزة النواه

عندما اكتشف جاكوب ومونود Jacob and Monod نظام الأوبرون لتنظيم التعبير الجيني في بكتريا القولون عام ١٩٦٠ اتجهت الأنظار الى محاولة إكتشاف نظام مقابل لتنظيم التعبير الجيني في مميزة النواه. وعلى الرغم من أن بعض سمات تنظيم التعبير الجيني في أوبرون اللاكتوز يمكن أن تكون موجودة في مميزة النواه الا انه من الواضح أن خلايا مميزة النواه قد كونت نظام أكثر تعقيدا لتنظيم التعبير الجيني.

ومعروف أنه في مميزة النواه متعددة الخلايا يمثل تنظيم التعبير المتغاير Differential Regulation لب التمايز الخلوي والوظيفي. إن السؤال الاساسى هو كيف يتمكن الكائن من تفعيل التعبير الجيني لمجموعة معينة من الجينات في نوع معين من الخلايا في حين يعطي الأمر لمجموعة أخرى من الجينات لكي تنشط في التعبير الجيني في نوع اخر من الخلايا. ففي حين نجد أن مجموعة من الجينات تنشط في أنسجة أو خلايا معينة فمثلا نجد أن هناك مجموعة من الجينات التي تنشط في التعبير في الخلايا العصبية الا انها تكون مثبطة (ساكنة) في خلايا البنكرياس التي ينشط بها مجموعة مختلفة تماما من الجينات ونفس

لشيء يحدث في خلايا الدم وهكذا. يطلق على التخصص بين الخلايا المختلفة لتنظيم المكانية Spatial Regulation أو "جين في المكان". gene-in-site. ومن جهة أخرى نجد أن هناك مجموعة من الجينات يتم تنظيمها حسب مراحل نمو وتمايز الكائن من مرحلة الخلية الزيجوتية إلى مرحلة النضج ويطلق على هذا النوع من التنظيم اسم التنظيم الزمني Temporal أو "gene-in-time".

ومن ناحية أخرى تبين أن هناك جينات يتم تنظيم تعبيرها ببعض لآشارات البيولوجية مثل الهرمونات أو نتيجة لمحفزات بيئية مثل الحرارة والضوء وسوف نتعرض ذلك بالتفصيل فيما بعد.

وهناك عوامل كثيرة تساعد على فهم الطبيعة المعقدة لتنظيم التعبير لجيني في مميزة النواه عنها في غير مميزة النواه: تحتوي خلايا مميزة النواه على مقادير أكبر بكثير من المعلومات الوراثية عن تلك الموجودة في مميزة النواه كما أن د ن أ يكون مرتبط بالهستونات وغيرها من البروتينات في صورة معقدات لتكوين الكروماتين، ويعتبر تركيب الكروماتين ، سواء المفتوح (غير المتحلزن) و الذي يكون معرضا للنسخ أو في الصورة المقفولة (متحلزن) و الذي يكون غير قابل للنسخ، من العوامل الهامة في تنظيم تعبير الجين.

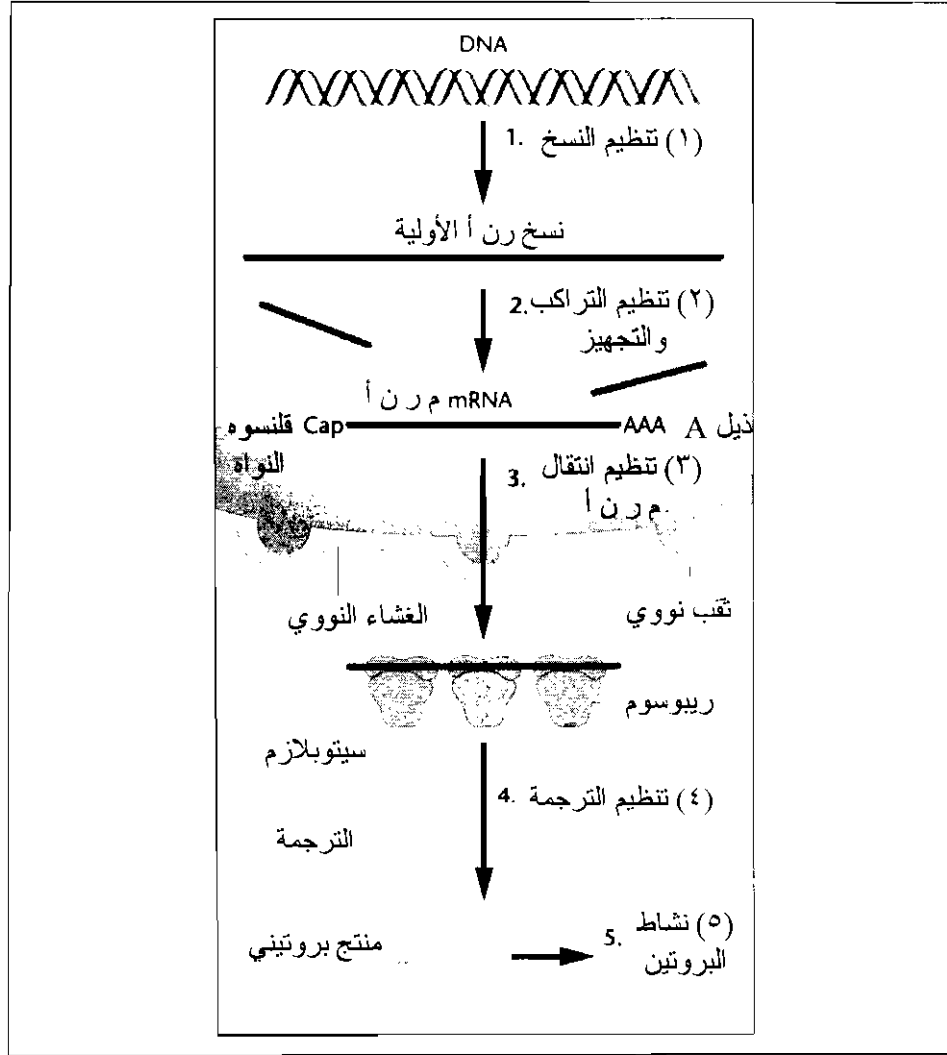
حيث أنه في مميزة النواه تكون عملية النسخ منفصلة في المكان و الزمان عن الترجمة بحيث يحدث النسخ في النواه في حين تتم الترجمة في مرحلة لاحقة في السيتوبلازم و بذلك فإنه يتحتم على م.ر.ن.أ. أن ينتقل من النواه إلى السيتوبلازم لكي يستخدم كقالب لبناء البروتين.

يتم تجهيز نسخ رن أ وتقليل حجمها (طولها) قبل نقلها الى السيتوبلازم.

يتميز م.ر.ن.أ. في مميزة النواه بأنه أطول بكثير في فترة منتصف العمر ($t_{1/2}$) عن نظيرة في غير مميزة النواه. بحيث اذا حدث قفل لعملية النسخ في غير مميزة النواه فإن م.ر.ن.أ. يتحلل في دقائق قليلة وتتوقف الترجمة بينما لا يحدث ذلك عادة في مميزة النواه.

تتميز معظم الكائنات مميزة النواه الراقية بنوعيات خلايا متميزة. والتي تستخدم مجموعات مختلفة من الجينات المتداخلة Overlapping لتكوين بروتينات مختلفة بالرغم من أن كل خلية تحتوى على المجموعة الكاملة من الجينات.

وكنتيجة لهذه العوامل، فإن التعبير الجيني في مميزة النواه يمكن أن يتم التحكم فيه وتنظيمه بطرق عديدة وفي مراحل مختلفة (الشكل ١١-١) والتي تشمل التنظيم أثناء: (١) النسخ (مثل مل يحدث في غير مميزة النواه)، (٢) تجهيز وتراكب Splicing لنسخة م.ر.ن.أ. الأولية والذي يشار الية بتنظيم ما بعد النسخ Post Transcriptional لكي يصبح في الصورة الفعالة، (٣) انتقال م ر ن أ من النواه الى السيتوبلازم ، (٤) الترجمة (أى اختيار أى من م ر ن أ سيتم ترجمته) ، (٥) تعديل البروتين المترجم لكي يصبح فى الصورة الفعالة وظيفيا.



الشكل (١١-١): المستويات المحتملة للتنظيم أثناء مراحل التعبير الجيني

وقبل ان نتطرق الى دور كل من هذه العوامل في تنظيم التعبير الجيني
يجدر بنا أن نشرح ببعض التفصيل مفهوم كل من التنظيم المكاني Spatial

والزمني Temporal لتعبير الجين نظرا للدور الهام لذى يلعبه كل منهما في تمايز ونمو خلايا الكائنات ميزة النواة.

أولاً: التنظيم المكاني (Spatial Regulation (Gene-in-Site):

تعطى جينات التيوبولين Tubulin في نبات الأرابيدوبسيس Arabidopsis مثالا واضحا للتنظيم المكاني حيث تمثل بروتينات التيوبولين الوحدات البنائية للأنايب الدقيقة (الخيوط) Microtubules في الخلية. ويوجد نوعان رئيسيان من هذه البروتينات α ، β وتدخل هذه البروتينات في تكوين الشعيرات Cilia والأسواط Flagella كما أنها توجد في كثير من الأماكن داخل الخلايا في السيتوبلازم وحول الغلاف النووي وفي أماكن متخصصة تسمى مراكز تنظيم الميكروتوبوليز (MOC) وتلعب هذه البروتينات دورا هاما في حركة الخلايا حيث تقوم الأسواط والأهداب بالانقباض والانبساط لمساعدة الخلية على التحرك من مكان الى آخر. وفي داخل الخلايا تكون هذه الخيوط مسؤولة عن حركة الكروموسومات أثناء الانقسام الميوزي.

ويشفر لكل من α و β تيوبولين مجموعات محددة من الجينات تختص كل مجموعة بأحد هذين النوعين. فمثلا في نبات Arabidopsis يوجد ستة جينات α و ٩ جينات β تيوبولين وعند عزل بعض هذه الجينات ومتابعة تعبيرها وجد ان كل جين يتم تعبيره بطراز مكاني Spatial نوعي.

فقد وجد مثلا أن الجين TUA1 والذي يشفر لنوع مختلف من α تيوبولين يتم تعبيره تفضيلا في حبوب اللقاح (الشكل ١١-٢) كما يحدث بعض التعبير أيضا في المتك ولكن لا يحدث أي تعبير بالمرّة في الأوراق أو السيقان أو الجذور. وعلى العكس من ذلك ، وجد أن TUB1 يتم تعبيره فقط في أجزاء من

الجدور التي تلي مباشرة القمة النامية للجزر. ومن جهة أخرى وجد ان جين TUB8 يتم تعبيره في الحزم الوعائية للنبات فقط. وتدل هذه الاختلافات في التعبير الجيني على تنظيم مكاني نوعي في التعبير الجيني في الأنسجة المختلفة حسب احتياج النبات.

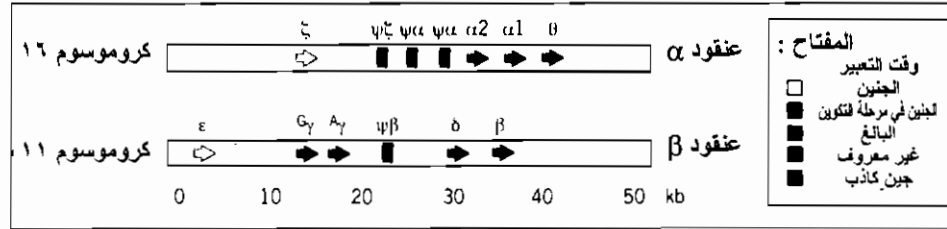


الشكل (١١-٢): أزهار نبات الارابيدوس تم صبغها لتحديد مكان تعبير جين Gus المرتبط ببروموتور خاص بجين TUA1 الفاتوبولن حيث إقتصرت التعبير على المتك فقط مما يؤكد مفهوم gene-in-site

ثانيًا: التنظيم الزمني (Temporal Regulation (gene-in-time):

تعتبر مجموعة جينات الهيموجلوبين أفضل مثال للتنظيم الزمني للتعبير الجيني. ويتكون بروتين الجلوبيين من أربعة سلاسل ببتيدية، اثنتان منها من نوع سلاسل α واثنان منها من النوع β . وفي الجينوم البشري يوجد مجموعة من الجينات المتعددة لكل من α و β جلوبيين موزعة على النحو التالي:

توجد جينات α جلوبيين على الكروموسوم رقم ١٦ ومكونة من ٢٨ كيلو قاعدة في حين تقع جينات β جلوبيين على الكروموسوم رقم ١١ ومكونة من ٤٥ كيلو قاعدة (الشكل ١١-٣) ووجد أن الجينات المكونة لكل عنقود Cluster عبارة عن تكرارات لجين جلوبيين أصلي Ancestral بحيث تكون عائلة صغيرة من الجينات المتعددة Multigene Family. وعلى مدار مراحل التطور انفصلت وتتنوعت هذه المجموعة من الجينات عن بعضها نتيجة لحدوث طفرات عشوائية في كل منها بحيث أصبح كل منها حالياً يشفر لسلسلة مختلفة قليلاً. وفي بعض من هذه الجينات المتكررة، أدى حدوث طفرات تحريك الاطار Frame Shift أو طفرات إنهاء الترجمة Chain Termination إلى انعدام قدرتها على تكوين سلاسل ببتيدية. ويطلق على مثل هذه المجموعة الأخيرة من الجينات "الجينات الكاذبة Pseudogenes" ويرمز لها في الشكل أعلاه بالرمز (ψ).



الشكل (١١-٣): تأكيد مفهوم تنظيم التعبير الجيني المرتبط بمراحل التمايز gene-in-time في جينات β جلوبيين البشرية.

ومن الخصائص الهامة لكل من مجموعتي جينات α و β أن تعبيرها يتم على مراحل زمنية مختلفة حسب تكوين ونمو الفرد بحيث يقتصر تنشيط التعبير الجيني لمجموعة الجينات في أحد الجوانب (الأيسر) على مرحلة الجنين Embryo في حين يتم تعبير الجينات التي تقع في المنطقة الوسطى للترتيب في مرحلة نمو الجنين Fetus أما الجينات الواقعة على الجانب الآخر (الأيمن) فإن

تعبيرها يبدأ فقط بعد الميلاد Post-Natal. ويبدو أن هذا التنشيط المتتابع للجينات من جانب إلى آخر في المجموعة مرتبط بالحاجة إلى إنتاج أنواع مختلفة قليلاً من الهيموجلوبين أثناء أطوار النمو والتميز حيث يحتاج الجنين Embryo والجنين النامي Fetus والطفل الوليد إلى متطلبات اكسوجينية مختلفة حسب اختلاف النمو في الأجهزة الدورية لكل منها وحسب اختلاف البيئة التي يتكون وينمو فيها كل منها. ويبدو أن اختلاف التوقيات الزمنية لتنظيم بدء تنشيط تعبير جينات الجلوبيين عبارة عن موائمة وتكيف مع الظروف المتغيرة التي تحدث في هذه المراحل المختلفة.

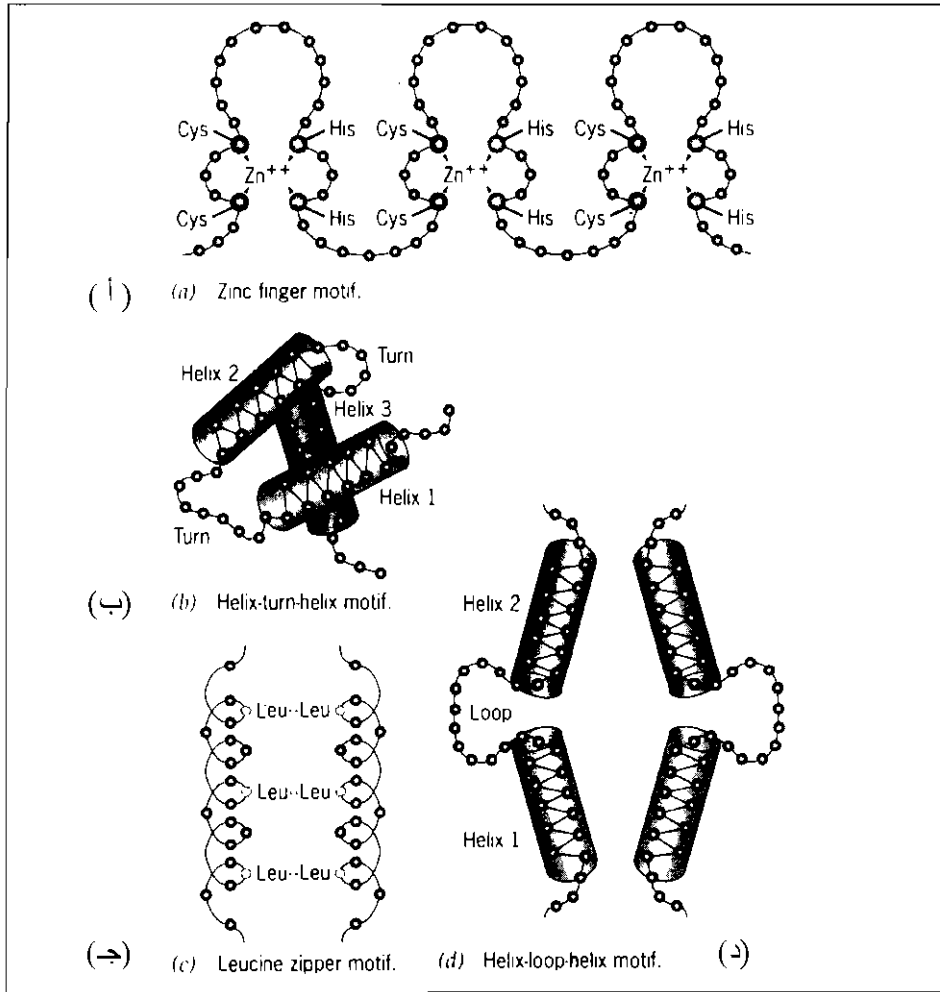
عوامل النسخ: Transcription Factors (T.F):

على العكس من البكتريا والتي يحتاج فيها البروموتور (المستبدئي) إلى أعداد قليلة نسبياً من البروتينات لتنظيم النسخ (سواء بروتينات مثبطة Repressors أو منشطة Activators) نجد أنه في مميزة النواه تكون هناك حاجة ماسة إلى اشتراك عدد أكبر من البروتينات التنظيمية التي تؤدي دوراً متناسقاً في تنظيم عملية النسخ. كما أن عملية التنظيم هذه تكون أكثر تعقيداً نظراً لأن الجينات تكون موجودة داخل النواة. ولكي تشارك هذه الجينات في عملية النسخ فلا بد أن يتم إرسال إشارات بيئية (مثل الضوء أو الحرارة) أو بيولوجية (الهرمونات) من خارج الخلية لتمر من الغشاء البلازمي إلى السيتوبلازم ومنه إلى الغلاف النووي ثم إلى النواه لتصل في النهاية إلى الكروموسومات أي أن خلايا مميزة النواة تحتاج إلى نظم إشارية Signals داخلية للتحكم في نسخ د ن أ. كما أن هناك مشكلة أخرى وهي أن معظم مميزة النواة متعددة الخلايا مما يحتم على الإشارات البيئية أن تمر من خلال طبقات من الخلايا حتى يكون

لها تأثير على عملية نسخ الجينات في نسيج معين . وعلى ذلك فإنه لابد من وجود نظم اتصالات بين الخلايا وبعضها ليتم تنظيم التعبير الجيني.

وكما يحدث في غير مميزة النواة، فإن تنظيم النسخ في مميزة النواة يشتمل على تفاعل بين بروتينات نوعية وبين د ن أ، وترتبط بروتينات تنظيمية موجبة أو سالبة مع تتابعات نوعية من د ن أ (في البروموتور Promotor والمحفز Enhancer والمسكت Silencer) كما سيأتي ذكرها فيما بعد، مما يؤدي الى تثبيط أو تحفيز النسخ. ويطلق على هذه المجموعة من البروتينات المتخصصة اسم عوامل النسخ Transcription Factors (TF) وتتميز هذه البروتينات باحتوائها على نطاقين كيماويين هامين على الأقل وهما نطاق الارتباط مع د ن أ ونطاق تنشيط النسخ وقد تحتل هذه النطاقات اجزاء مختلفه من جزئ البروتين أو قد تكون متداخلة المواقع. ويبدو أن هناك تفاعلا فيزيائيا يحدث بين عوامل النسخ. فقد يتلامس أحد عوامل النسخ المرتبط بالمحفز أو مع تلك المرتبطة بالبروموتور ومن خلال هذه الاتصالات والتفاعل بينها فإن نطاق تنشيط النسخ في TF يؤدي إلى إحداث حدوث تغيرات في الأشكال التركيبية للبروتينات المتجمعة ممهدة الطريق لإنزيم بلمرة ر ن أ RNA Polymerase لبدء النسخ. وتحتوى كثير من عوامل النسخ على خصائص تركيبية Structural Motifs مميزة والتي تنتج من الارتباط بين الاحماض الأمينية المكونة لسلاسل متعددة الببتيد. وأحد هذه التركيبات هو أصابع الزنك Zink Fingers وهو عبارة عن عروة مكونة من سلسلة ببتييد قصيرة والتي تتكون عندما يرتبط حامضين من السستين في جزء وحامضين من الهستيدين في جزء قريب مع أيون من الزنك ، مما يؤدي الى بروز جزء ببتيدي بين زوجي

الأحماض الامينية مما يعطى شكل الأصبع (الشكل ١١-٤-أ) وقد تبين من تحليلات الطفرات أن هذه الأصابع تلعب دورا هاما في الارتباط مع د ن أ.



الشكل (١١-٤): طرز التركيبات المختلفة في الأنواع المختلفة من عوامل النسخ

- أ - طراز إصبع الزنك في عامل النسخ SP1. في الثدييات.
- ب - حلزون - لفة - حلزون.
- ج - سوستة الليوسين.
- د - حلزون - عروة - حلزون.

ويوجد تركيب آخر في كثير من عوامل النسخ ويطلق عليه (حلزون - لفه - حلزون) helix-turn-helix ، والمكون من ثلاث حلزونات قصيرة من الأحماض الأمينية مفصولة عن بعضها بلفات (الشكل ١١-٤-ب). وقد بينت التحليلات الوراثة والبيوكيماوية أن القطعة الحلزونية الأقرب للنهاية الكربوكسيلية تكون مسئولة عن الارتباط بجزء د ن أ بينما تدخل الحلزونات الأخرى في تكوين ثنائيات بروتينية.

كما يوجد تركيب ثالث يسمى "سوسته الليوسين" Leucine Zipper ويتكون من سلسلة من الأحماض الأمينية بحيث يكون كل حامض سابع في السلسلة هو الليوسين (الشكل ١١-٤-ج) ويسمح هذه التركيب بتكوين ثنائيات Dimers من خلال التفاعل بين جزيئات الليوسين في كل من مناطق السوسته. وتكون تتابعات السوسته في العادة مجاوره لمجموعة من الأحماض الأمينية الموجبة الشحنة. وعندما تتفاعل سوستتان ، فإن هذه المناطق المشحونة تبرز للخارج في اتجاهين متضادين مكونه سطحاً يمكنه الارتباط بجزء د.ن.أ سالب الشحنة.

والتركيب الرابع الموجود في بعض عوامل النسخ يسمى (حلزون - عروة - حلزون helix-loop-helix) ويتكون من منطقتين حلزونيتين من الأحماض الأمينية يفصلها عروة غير حلزونية (الشكل ١١-٤-د) وتسمح مناطق الحلزونية بتكوين الثنائيات بين سلسلتى متعدد الببتيد وقد يتواجد هذا التركيب بالقرب من سلسلة من الأحماض الأمينية موجبة الشحنة وعندما تتكون الثنائيات Dimers فإن هذه الأحماض الأمينية يمكنها الارتباط بجزء د.ن.أ سالب الشحنة.

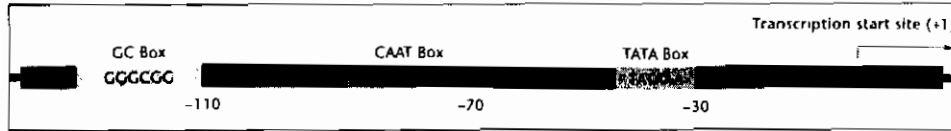
البروموتور والمحفز Promoter and Enhancer:

وهما عبارة عن مناطق تتابعات من د.ن.أ. Cis-Acting وليس لها منتج إلا أننا نعرف أن بدء النسخ يتم على البروموتور الخاص بجين معين والذي يتم التعرف عليه بإنزيم بلمرة ر.ن.أ. RNA Polymerase II. إلا أنه لكي يتم البدء بدقة لعملية النسخ من منطقة البروموتور فإن الأمر يحتاج إلى عدد من البروتينات (عوامل النسخ) كما سبق القول. ويوجد نوعان من عوامل النسخ. فتلک التي ترتبط بتتابعات البروموتور تسمى عوامل النسخ الأساسية Basal Transcription Factors في حين تلك التي ترتبط بالمحفز يطلق عليها عوامل النسخ الخاصة Special Transcription Factors. وبينما نجد أن نشاط البروموتور يؤدي إلى البدء الصحيح لعملية النسخ Initiation of Transcription نجد أن نشاط المحفز يؤدي إلى زيادة معدلات النسخ Maximization of Rate of Transcription.

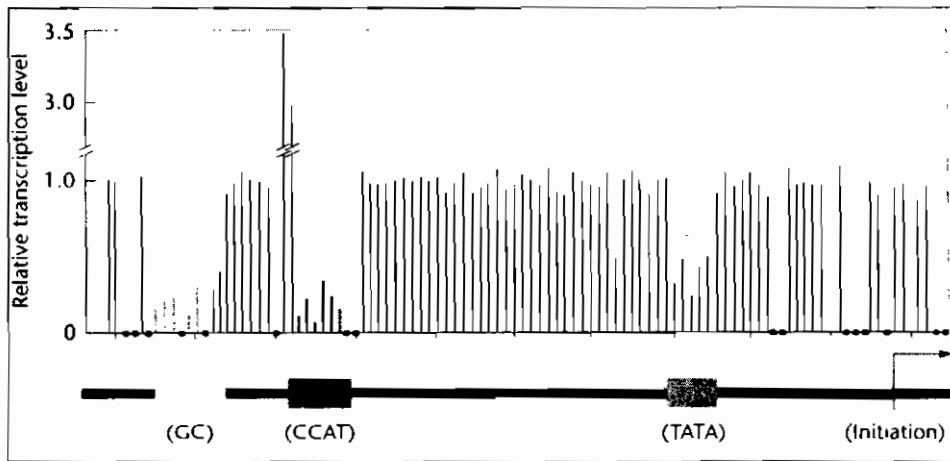
البروموتور Promotor:

يوجد البروموتور في منطقة قريبة ومجاورة قبل الجين Upstream الذي يقوم بتنظيم نسخة. ويتكون البروموتور من تتابعات د.ن.أ. تقع عادة على بعد حوالي ١٠٠ زوج من القواعد قبل الجين 5'-Upstream (الشكل ١١-٥) وتحتوي المنطقة الرئيسية للبروموتور على تتابع يسمى صندوق TATA تقع على بعد ٢٥-٣٠ زوج من القواعد قبل نقطة بدء النسخ ويرمز لها (-) 25 to -30 وتتكون من ٨ أزواج من القواعد المحفوظة Consensus مكونة من أزواج من A=T فقط. وتكون محاطة غالباً من الجانبين بمناطق غنية في G=C. وقد تأكدت أهمية صندوق TATA بتحليلات الطفرات (الشكل ١١-٦) حيث تبين أن

حدوث طفرات داخل تتابع هذا الصندوق يؤدي إلى خفض شديد في معدل النسخ بينما لا يتأثر النسخ في المناطق الأخرى المجاورة بالرغم من حدوث طفرات بها.



الشكل (١١-٥): يشتمل البروموتور عند النهاية 5' لجينات مميزة النواة على تتابعات متخصصة في عملية النسخ: صندوق TATA (-30) وصندوق CAAT (-70) وصندوق GC (-110)



الشكل (١١-٦): ملخص لتأثير طفرات القاعدة الواحدة في منطقة البروموتور على معدل النسخ في جين β جلوبيين ، يمثل كل خط رأسى مستوى النسخ الناتج بعد طفرة في نيوكليوتيدة واحدة (منسوبة للطراز الوحشى) في تجارب منفصلة . تمثل النقط مواقع النيوكليوتيدات التى لم يحدث بها طفرات ويلاحظ أن مناطق الصناديق GC و CCAT و TATA هي أكثر المناطق التى تؤثر فيها الطفرات على مستوى النسخ

ويرجع هذا الانخفاض في معدل النسخ نتيجة لفقد القدرة على الارتباط بعوامل النسخ (TF) المسؤولة عن تحفيز النسخ. وعلى مسافة أبعد على يسار

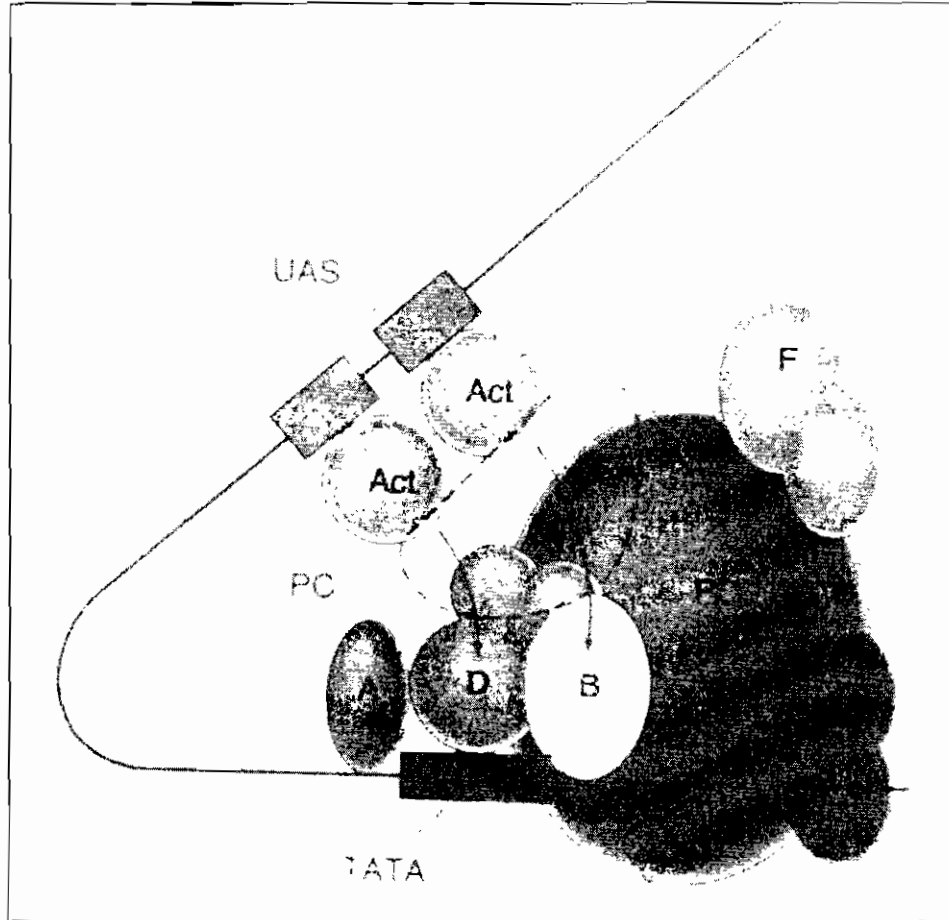
هذا الصندوق يوجد تتابعين آخرين مهمين لعملية بدء النسخ. ويسمى احدهما صندوق CAAT وتتابعة المحفوظ هو CCAAT ويمثل بالمنطقة (٧٠-) إلى (٨٠-) وتؤدي الطفرات في هذا الصندوق ايضا إلى خفض كبير في معدل النسخ أما الصندوق الاخر والذي يقع على بعد -١١٠ قاعدة فيسمى صندوق GC. وتتابعة المحفوظ هو GGGCGG وقد تأكدت أهميته ايضا بتحليل الطفرات التي يؤدي حدوثها داخله إلى خفض شديد في معدل النسخ كما في الشكل أعلاه.

المحفز Enhancer:

بالاضافة إلى منطقة البروموتور نجد أن النسخ في معظم الخلايا مميزة اننواة يتأثر بمنطقة اضافية من تتابعات د.ن.أ تسمى المحفز، والذي يؤدي نشاطه إلى زيادة كبيرة في معدل النسخ.

وهناك بعض الامثلة على الاختلاف في موقع المحفز، ففي جينات السلسلة المناعية الثقيلة يقع المحفز داخل الجين نفسه في انثرون يقع بين اكسونين. ومن جهة اخرى، وجد أن المحفزات الخاصة بجينات β -Globin في الانسان تقع بعد نقطة بدء النسخ Downstream. ولكن كيف يتسنى للمحفز أن يلعب دور في عملية النسخ في حين أنه قد يقع على بعد الاف القواعد من البروموتور ومن نقطة بدء النسخ. تبين أن ذلك يتم عندما ترتبط مجموعة عوامل النسخ الخاصة مع تتابعات المحفز حيث يؤدي ذلك إلى تغيير في شكل الكروماتين Configuration بحيث يحدث ثنى لجزئ د.ن.أ ويتكون قوس Loop بحيث تصبح منطقة البروموتور والمحفز في موقعين متواجهين مما يسهل معه التفاعل بين عوامل النسخ الموجودة عليهما لتنشيط عملية النسخ كما في الشكل (١١-٧) الذي يبين التفاعل المتناسق بين عوامل النسخ وارتباطها بكل

من البروموتور والمحفز لتكوين معقد بدء النسخ (PIC) Preinitiation Complex (PIC) لكي يبدأ انزيم بلمرة ر.ن.أ في عملية النسخ. والجدول التالي يعطى مقارنة بين البروموتور والمحفز.



الشكل (١١-٧): (PIC) حيث يسمح إنحاء جزئ د ن أ بتفاعل البروتينات المنشطة (Act) الموجودة على المحفز مع عوامل النسخ الموجودة على البروموتور مما يؤدي إلى ارتفاع معدل النسخ

الجدول (١): مقارنة بين البرومونور والمحفز

المحفز	البرومونور
١- يقع على بعد آلاف أزواج القواعد من نقطة بدء النسخ.	١- يقع في منطقة قريبة مجاورة لنقطة بدء النسخ
٢- يمكن أن يعمل في الاتجاه الامامي Forward أو الاتجاه المنقلب Inverted	٢- يعمل فقط في الاتجاه الامامي Forward direction
٣- قد يقع في منطقة قبل upstream أو بعد downstream من نقطة بدء النسخ.	٣- يقع في منطقة قبل نقطة بدء النسخ فقط upstream
٤- مسئول عن زيادة معدل النسخ maximization of rate of transcription	٤- مسئول عن بدء عملية النسخ Initiation of transcription
٥- ترتبط به مجموعة عوامل النسخ الخاصة Special TF	٥- ترتبط به مجموعة عوامل النسخ الاساسية basal TF

تنظيم النشاط النسخي بعوامل بيئية:

Regulation of Transcription by Environmental Factors (Signals):

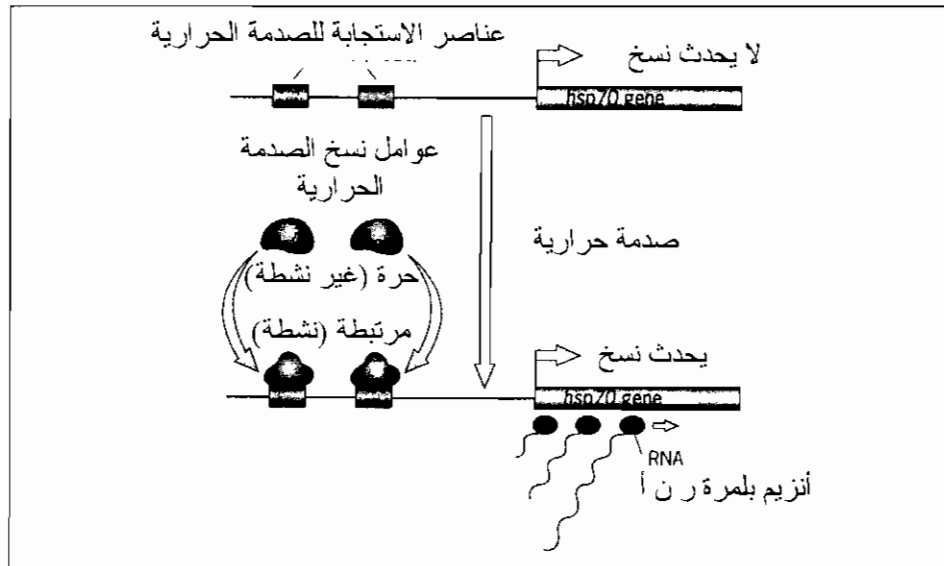
أولاً : الحرارة وجينات الصدمة الحرارية:

Temperature: The Heat Shock Genes:

وجد أنه عندما يتعرض الكائن لاجهاد حرارى فإنه يستجيب ببناء مجموعة من البروتينات التى تساعد على استقرار وثبات البيئة الداخلية للخلية. ويطلق على هذه البروتينات بروتينات الصدمة الحرارية Heat-Shock Proteins. وتوجد هذه البروتينات فى كل من الكائنات غير مميزة النواة ومميزة النواة وتعد من أكثر البروتينات المحفوظة شيوعاً. وبمقارنة تتابعات الاحماض الامينية لهذه البروتينات فى كائنات متباعدة فى الأحقاب التطورية، وجد أن نسبة التطابق

بينها مازالت كبيرة فمثلاً وجد أن درجة التشابه بين بروتينات الصدمة الحرارية في بكتريا القولون وحشرة الدروسفلا حوالي ٤٠-٥٠% .

ويتم تنظيم التعبير لبروتينات الصدمة الحرارية (HSP) على مستوى النسخ. بمعنى أن الإجهاد الحراري يستحث نوعياً نسخ الجينات المشفرة لهذه البروتينات (الشكل ١١-٨) ففي الدروسفلا مثلاً يوجد أحد هذه البروتينات ويسمى HSP 70 (أشارة إلى أن وزنه الجزيئي 70KD) يتم تشفيره بمجموعة من الجينات على احد الكروموسومات الجسدية (الأوتوسومات) وقد تبين أنه عندما ترتفع درجة الحرارة عن ٣٣م، كما يحدث في أيام الصيف الحارة، فإن كل من هذه الجينات يتم نسخة إلى م.ر.ن.أ والتي يتم ترجمتها بالتالي إلى سلاسل ببتيدية HSP70.



الشكل (١١-٨): إستحثاث النسخ في جين Hsp70 في حشرة الدروسفلا نتيجة للصدمة الحرارية. يقع HSE/5 بين ٤٠ و ٩٠ زوج من القواعد قبل موقع بدء النسخ

ويتم استحداث نسخ هذا الجين بواسطة عامل النسخ للصدمة الحرارية Heat Shock Transcription Factor (Hstf) الموجود في نواة حشرة الدروسفلا، وعندما تتعرض الحشرة للاجهاد الحراري فإن عامل النسخ HSTF يتغير كيميائياً بعملية فسفرة Phosphorylation مما يؤدي إلى تنشيطه بحيث يرتبط نوعياً بتتابعات نيوكليدية سابقة Upstream لجين HSP70 وينتج عن ذلك أن يصبح الجين معرضاً أكثر للنسخ بواسطة أنزيم بلمرة ر.ن.أ RNA Pol II . ويلي ذلك عملية ترجمة لبروتينات الصدمة. ويطلق على التتابعات التي يرتبط بها HSTF اسم عناصر الاستجابة للصدمة احارارية Heat-Shock Response Elements (HSRE) ويعتقد انها تشمل منطقة المحفز Enhancer

ثانياً: الضوء: جينات إنزيم ريبولوز كاربوكسيليز في النبات:

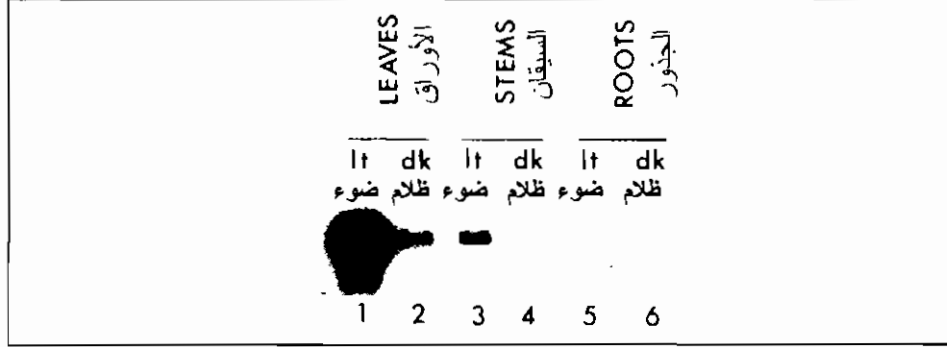
Light: The Ribulose 1.5-Bis Phosphate Carboxylase Genes In Plants (RBC):

يعد انزيم (RBC) من أكثر البروتينات شيوعاً على سطح الأرض. ويلعب هذا الانزيم دوراً هاماً في عملية البناء الضوئي في النباتات الخضراء ويؤدي نشاط هذا الانزيم إلى تثبيت ثاني أكسيد الكربون بإدخاله إلى جزيئات الجلوكوز والتي يتم بعد ذلك تمثيلها لكي تمد الخلايا بالطاقة. وتعتمد هذه العملية على قدرة النبات على امتصاص الطاقة الضوئية.

وفي غياب الضوء تتوقف العملية تماماً وتنتفي الحاجة إلى إنزيم RBC، مما يؤكد أن إنتاج هذا الانزيم يتم استحداثاً نوعياً عندما يتعرض النبات للضوء.

يتكون انزيم RBC من معقد مكون من وحدة كبيرة وأخرى صغيرة ويقع الجين المشفر للوحدة الكبرى في الكلوروبلاست بينما يقع جين الوحدة الصغيرة في النواة.

وقد تم تحليل تعبير جين الوحدة الصغرى (rbcS) في عدد من الانواع النباتية وقد بينت هذه التحليلات أن جين (rbcS) يتم نسخة بقوة عند تعريض النبات للضوء (الشكل ٩-١١).



الشكل (٩-١١): إستحداث النسخ في الجين الخاص بتحت الوحدة الصغرى لإنزيم ريبيلوز ٥,١ ثنائي الفوسفات كريبوكسيليز (RBC) عند التعرض للضوء

ويعتقد أن الضوء يتم امتصاصه بواسطة بروتين في السيتوبلازم يسمى الفيتوكروم Phytochrome الذي يكون مرتبطاً بجزئ ممتص للضوء يسمى الكروموفور Chromophore. ويؤدي امتصاص الضوء بهذا الكروموفور إلى تغيير تركيبى في سلسلة ببتيد الفيتوكروم مما ينتج عنه تغيرات نوعية في بروتينات أخرى ذات صلة بهذه العملية. ويبدو أن بعض من هذه البروتينات ترتبط بمناطق قبلية Upstream تسبق جين rbcS وتقوم بتنشيط النسخ، وتكون هذه الاستجابة سريعة وقوية مما ينتج عنها إنتاج كميات كبيرة من نسخ ر.ن.أ

rbcS بعد التعرض للضوء، مما يؤدي إلى توفر اعداد كبيرة من نسخ ر.ن.أ اللازمة لإنتاج بروتينات الوحدة الصغيرة من RBC.

وتوجد عملية اخرى يتم من خلالها انتاج الوحدة الكبرى وعلى ذلك فإن التعرض للضوء يؤدي إلى استحثاث induction انتاج أحد الانزيمات الرئيسية لعملية البناء الضوئي.

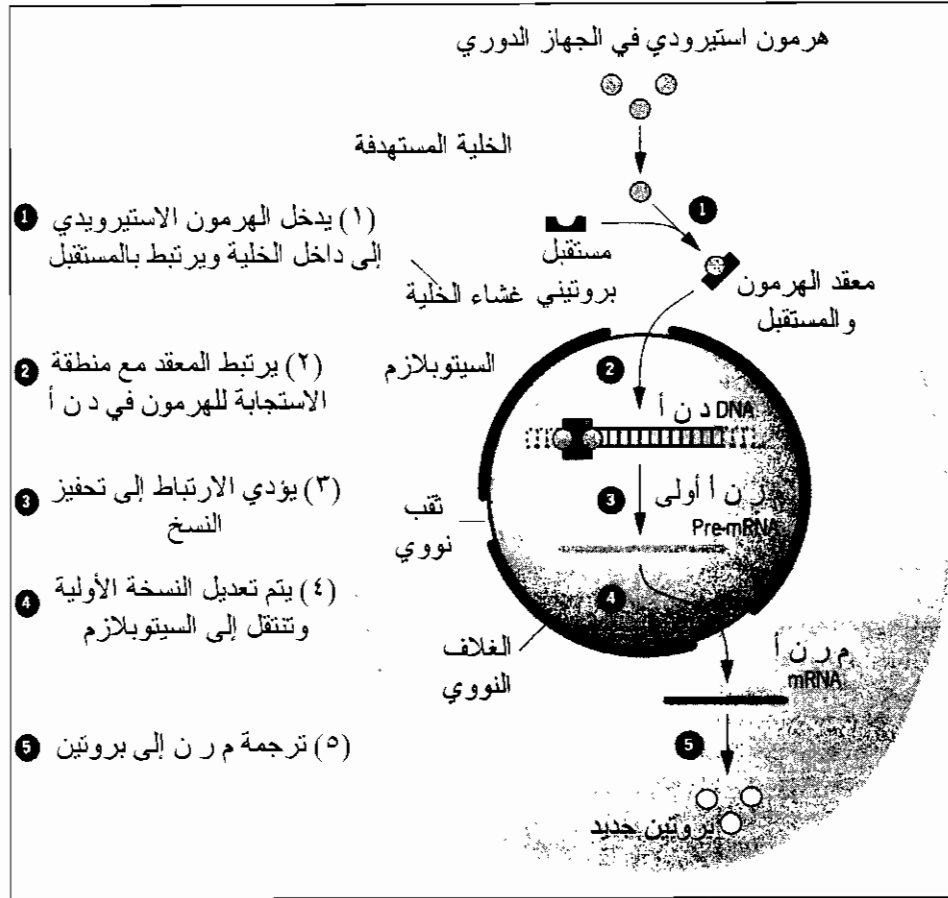
تنظيم النسخ بواسطة عوامل بيولوجية:

Regulation of Transcription by Biological Singals:

١ - الهرمونات الستيرويدية Steroid Hormones:

توجد في الثدييات مجموعتان رئيسيتان من الهرمونات وهي الهرمونات الستيرويدية Steroid Hormones والهرمونات الببتيدية Peptide Hormones وتتميز الهرمونات الستيرويدية بأنها جزيئات صغيرة الحجم وتذوب في الليبيدات وهي مشتقة من الكوليسترول ونظرا لصغر حجمها وطبيعتها الليبيدية فإنها تمر بسهولة من خلال الغشاء البلازمي للخلية. ومن امثلة الهرمونات الستيرويدية : الاستروجين والبروجستيرون التي تقوم بأدوار هامة في الدورات التكاثرية (التناسلية) الانثوية Female Reproductive Cycles ويقابلها في الذكور هرمون التستسترون Testosterone. كما يتبع هذه المجموعة هرمونات جلو كورتيكويد Glucocorticoid التي تدخل في تنظيم مستويات السكر في الدم. وعند دخول أحد هذه الهرمونات في الخلية فإنها ترتبط مع بروتينات سيتوبلازمية نوعية تسمى مستقبلات الهرمونات Hormone Receptors. ويوجد لكل نوع من هذه الهرمونات مستقبلات متخصصة نوعية. ويرتبط الهرمون بالمستقبلات الخاصة به مكونا معقد يمر من خلال الغلاف النووي إلى النواه

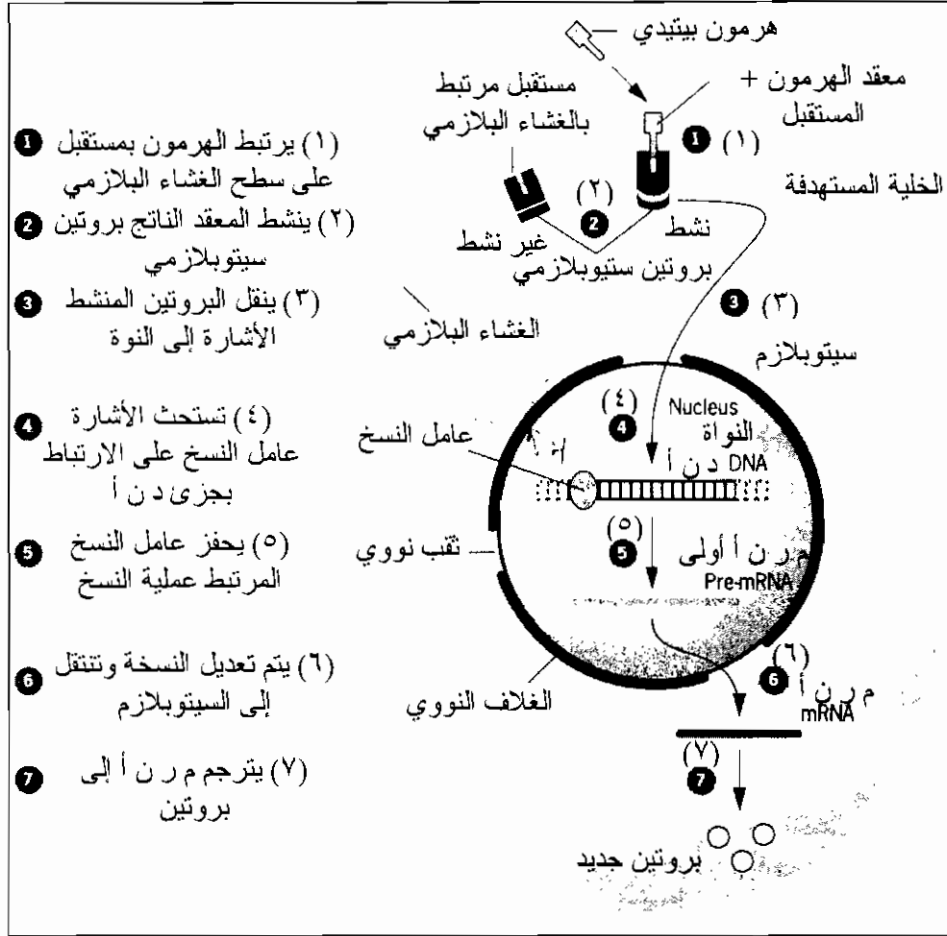
حيث يقوم بدوره كعامل نسخ لتنظيم تعبير جينات معينة (الشكل ١١-١٠). ومن ذلك يتبين أن هذا النوع من الهرمونات يقوم بدور مباشر في تنظيم النسخ.



الشكل (١١-١٠): تنظيم التعبير الجيني بالهرمونات الاستيرودية. يرتبط الهرمون مع مستقبلات خاصة داخل الخلية المستهدفة (في السيتوبلازم) ويمر المعقد الناتج إلى النواة حيث يبدأ نسخ جين معين

٢- الهرمونات الببتيدية Peptide Hormones:

تتكون هذه الهرمونات من سلاسل خطية Linear Chains من الأحماض الأمينية ويتم تشفيرها بعدد من الجينات النووية. ومن أمثلة هذه الهرمونات هرمون الأنسولين Insulin الذي ينظم مستويات السكر في الدم، وهرمون Somatotropin الذي يعد هرمون نمو وهرمون البرولاكتين Prolactin الذي يساعد على إفراز اللبن في أنثى الثدييات. ونظراً لأن هذه المجموعة من الهرمونات تكون عادة كبيرة الحجم وذات طبيعة غير دهنية مما يجعلها غير متوافقة مع الطبيعة الدهنية لتركيب الغشاء البلازمي، لذلك فإنها لا يمكنها المرور مباشرة من الغشاء البلازمي وحيث أنه يتعذر مرورها مادياً Physically من غشاء الخلية فإنها لابد أن ترسل اشاراتها إلى داخل الخلية بواسطة مستقبلات بروتينية موجودة على سطح الغشاء البلازمي Membrane-Bound Receptor Proteins (الشكل ١١-١١) وعندما يتفاعل هرمون ببتيدي مع مستقبلاته الخارجية فإن ذلك يؤدي إلى أحداث تغيرات تركيبية في هذه المستقبلات بحيث يؤدي في النهاية إلى أحداث تغييرات في بروتينات أخرى داخل الخلية أي أن هذا النوع من الهرمونات يقوم بدور غير مباشر في تنظيم النسخ.



الشكل (١١-١١): تنظيم التعبير الجيني بالهرمونات الببتيدية يرتبط الهرمون

(إشارة خارجية) بمستقبل على سطح الغشاء البلازمي للخلية المستهدفة

- أ - يؤدي المعقد المتكون إلى تنشيط بروتين في السيتوبلازم الذي يؤدي إلى سلسلة من التغيرات داخل الخلية .
- ب - تنقل هذه التغيرات الإشارات إلى النواة حيث يقوم عامل النسخ بتحفيز نسخ جين معين ثم يلى ذلك ترجمته إلى بروتين جديد .

إذ نتيجة لحدوث سلسلة من هذه التغيرات، يتم إرسال الإشارة الهرمونية من خلال السيٲوبلازم في الخلية ومنه إلى النواه حيث تعطى التأثير الخاص المؤدى إلى تنظيم تعبير جينات معينة. وتسمى هذه العملية استئقال الإشارة Signal Transduction ويتم ذلك بواسطة تتابعات نوعية في جزئ د.ن.أ وتسمى Hormone Response Elements (HREs) ويعتقد أنها تقع في منطقة المحفز. وترتبط بهذه المنطقة عوامل النسخ لكى تبدأ عملية النسخ بواسطة انزيم بلمرة ر.ن.أ. وبالنسبة للهرمونات الببتيدية فإن المستقبلات تظل مرتبطة بالغشاء البلازمى حتى بعد تكوينها لمعقد مع الهرمون. أى أن الإشارة الهرمونية يتم نقلها إلى النواه بواسطة بروتينات أخرى (عوامل النسخ).

تنظيم التعبير الجينى بعد النسخ:

Post-Transcriptional Regulation of Gene Expression:

كما سبقت الإشارة إلى حدوث تنظيم التعبير الجينى فى نقاط كثيرة على طول المسار من د.ن.أ إلى البروتين. وعلى الرغم من أن تنظيم النسخ يعد من أوضح العمليات وأكثرها استخداماً فى تنظيم التعبير الجينى فى مميزة النواة ، إلا أن تنظيم ما بعد النسخ Post-Transcription يحدث أيضاً فى كثير من الكائنات. ويتم تعديل نسخ ر.ن.أ غير المتجانس النووى (hnRNA) وتجهيزها قبل أن تخرج إلى السيٲوبلازم فى صورة م.ر.ن.أ. الناضج لكى تتم الترجمة على الريبوسومات. وتشتمل عملية التجهيز لجزئ hnRNA على حذف الانترونات ويتم تراكب Splicing (لصق) الاكسونات (مناطق التشفير) جنباً إلى جنب وتضاف للنهاية 5' فلنسوة G ويتم بناء ذيل متعدد الأدينين للنهاية 3' ثم تخرج جزيئات mRNA م.ر.ن.أ إلى السيٲوبلازم. وهناك عدد من نظم التنظيم فى م.ر.ن.أ وستدرس هنا أهم أربعة منها وهى:

- ١- بدائل التراكب Alternative Splicing of mRNA.
- ٢- ثبات م.ر.ن. أ. Stability of mRNA.
- ٣- انتقال mRNA Transport mRNA.
- ٤- مراجعة mRNA Editing mRNA.

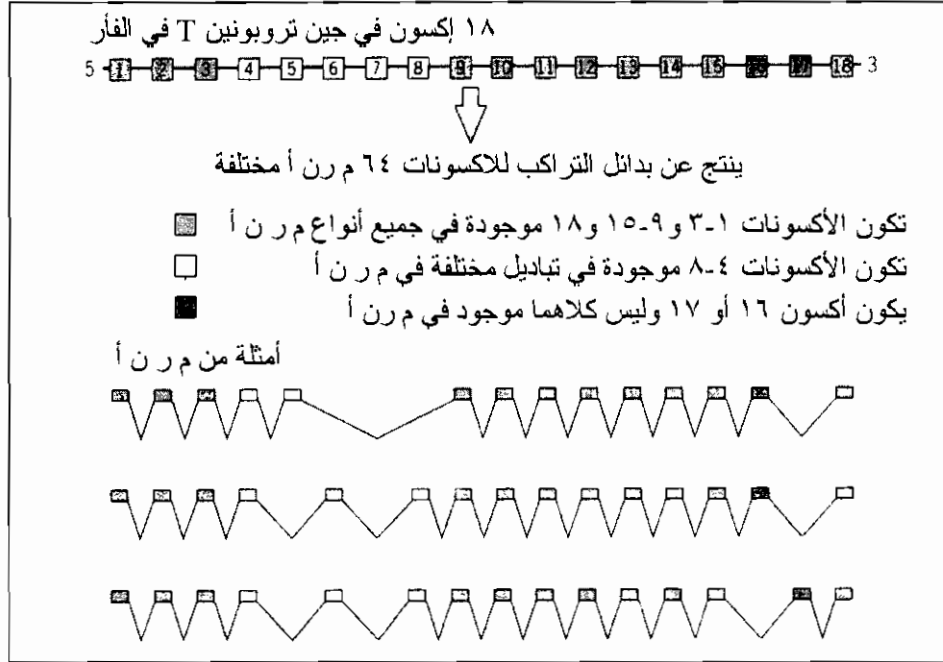
أولاً: بدائل التراكب Arternative Splicing of mRNA:

تؤدي عملية التغيير النوعي في تراكب م.ر.ن.أ. (أي حذف الانترونات ولصق الاكسونات) إلى انتاج نسخ كثيرة ومختلفة من نفس نسخة ر.ن.أ. الأولية بحيث يختص كل منها في انتاج بروتين نوعي مختلف. ويتم ذلك بصفة خاصة عندما يحتوى الجين على عدد كبير من الانترونات متخللة الاكسونات حيث أنه قد يتم حذف الانترونات بشكل منفصل لكل انترون على حدة أو تحذف كمجموعة مع بعضها وذلك حسب الكيفية التي تتفاعل بها ماكينة التراكب مع سلسلة ر.ن.أ. وإذا حدث أن انترونين يتم حذفهما معاً، فإن الاكسون الموجود بينهما قد يتم حذفه ايضاً. وبذلك يكون لدى ماكينة التراكب فرصة لتعديل التتابعات الشفرية لجزئ ر.ن.أ. بحذف بعض الاكسونات. وتعد ظاهرة اختلاف بدائل تراكب نسخ ر.ن.أ. هامة للاقتصاد في استخدام المعلومات الوراثية إذ انه بدلاً من اللجوء إلى التكرار الجيني gene duplication، فإن هذه العملية تعطى الفرصة لكي نحصل من نفس الجين على اعداد كبيرة من النسخ المختلفة حسب مواقع التراكب وبالتالي اعداد من البروتينات النوعية المختلفة.

وفيما يلي بعض الامثلة لبدائل التراكب:

أ- جين التروبونين *Troponin-T gene*:

يعتبر ما يحدث من تعدد التراكيب اثناء تعبير الجين الخاص ببروتين Troponin T ، وهو بروتين يوجد في العضلات الهيكلية للفقاريات ، مثالا جيداً لتعدد وتداخل عملية التراكيب Alternative Splicing. ويتراوح حجم هذا البروتين بين ١٥٠ إلى ٢٥٠ حامض امينى. يبلغ طول جين Troponin T فى الفأر أكثر من ١٦ كيلو قاعدة ويحتوى على ١٨ اكسون مختلف (الشكل ١١-١٢) ، ويتم تراكيب نسخ ر.ن.أ لهذا الجين بطرق مختلفة لانتاج اعداد كبيرة من م.ر.ن.أ النوعية المختلفة وعند ترجمتها فإنها تعطى انواع كثيرة من متعددات ببتيدية T النوعية. وقد وجد أن جميع هذه الببتيدات المتعدده تشترك فى وجود الاحماض الامينية لللاكسونات ١ إلى ٣ و ٩ إلى ١٥ واكسون ١٨. إلا أن المناطق المشفرة بالاكسونات من ٤ إلى ٨ قد تكون نواتجها أما موجودة أو غائبة حسب طراز التراكيب وفى أى تبادل، بالإضافة إلى حدوث اختلاف آخر ناتج عن وجود أو غياب المناطق المشفرة باكسون ١٦ و ١٧ بحيث أنه إذا وجد اكسون ١٦ غاب ١٧ والعكس صحيح ويتوقع عند حدوث جميع هذه التباديل الحصول على ٦٤ نوع مختلف من م.ر.ن.أ.



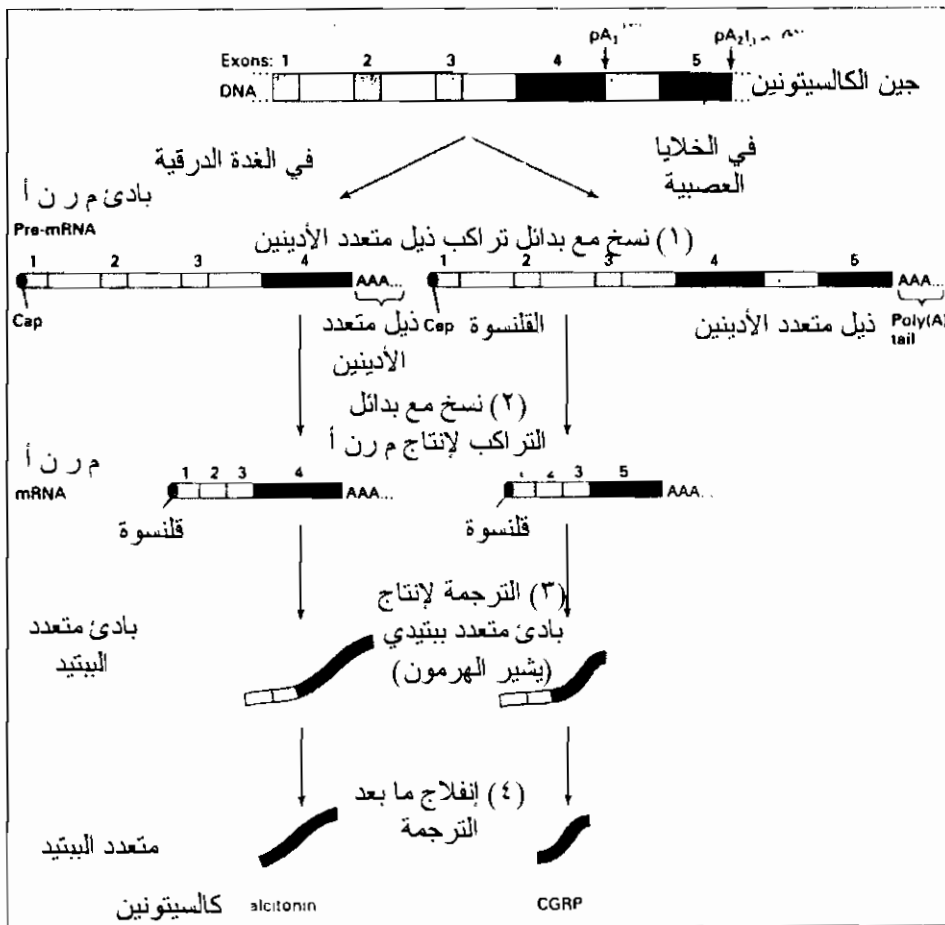
الشكل (١١-١٢): بدائل التراكيب لنسخة ر ن أ الناتجة من جين التروبونين T في الفأر.
يبين الشكل ثلاث حالات فقط من بين ٦٤ م ر ن أ محتملة

ويبدو أن هذه الصور المختلفة من بروتين التروبونين T تقوم بوظائف متباينة قليلا في العضلات مما ينعكس على الاختلافات التي تحدث في نشاط الخلية العضلية.

ب- جين كالسيتونين البشري:

Human Calcitonin Gene(Alternative Splicing and Alternative Poly A:

وتمثل عملية التراكيب في هذا الجين دور كل من تداخل التراكيب وتغيير مكان اضافة ذيل متعدد الأدينين إلى النهاية 3' في انتاج بروتينات نوعية ذات وظائف مختلفة في انسجة مختلفة (الشكل ١١-١٣).



الشكل (١١-١٣): تؤدي عملية بدائل تراكب ذيل الأدينين و إكسونات هرمون الكالسيتونين البشري (CALC) إلى نواتج نوعية في الأسجة حيث ينتج CALC في الغدة الدرقية في حين ينتج CGRP في بعض الخلايا العصبية المتخصصة

إذ ينتج عن التراكب بروتين كالسيتونين (CALC) في الغدة الدرقية، بينما يحدث تراكب من نوع آخر في بعض الخلايا العصبية Neurons يؤدي إلى إنتاج بروتين آخر متخصص يسمى Calcitonin-Gen Related Peptide (CGRP) ويرجع ذلك إلى أن الجين الأصلي يحتوي على خمسة أكسونات ويحدث

التراكب على مرحلتين، ففي المرحلة الأولى يتراكم موقع اضافة ذيل متعدد الادينين Poly A حيث يحدث في الغدة الدرقية اضافة هذا الذيل عند نهاية الاكسون رقم ٤ مع حذف الاكسون رقم ٥ في حين تحدث هذه الاضافة في الخلايا العصبية عند نهاية الاكسون الخامس بدون حذف. وفي المرحلة الثانية من التراكب يحدث في حالة الغدة الدرقية اضافة القلنسوة G عند النهاية 5' بدون أى تعديلات أخرى بحيث يكون م.ر.ن.أ الناتج محتوئ على الاكسونات من ١ إلى ٤.

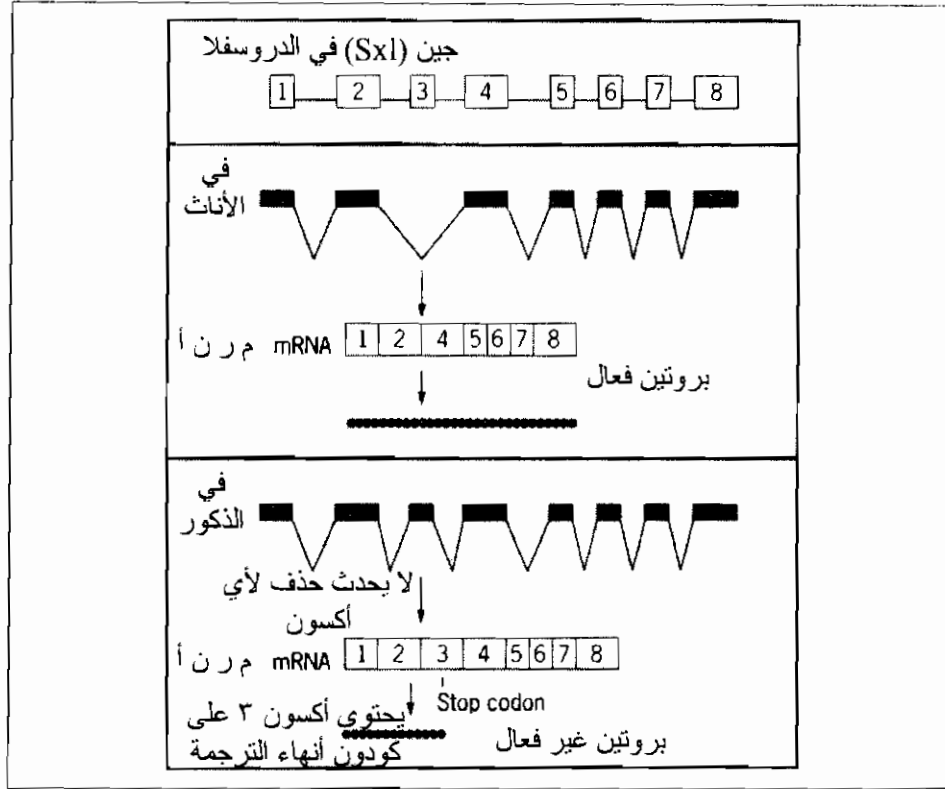
أما في حالة الخلايا العصبية فيؤدى التراكب المغاير فيها إلى حذف الاكسون رقم ٤ بحيث يصبح م.ر.ن.أ الناضج مكون من الاكسونات ١ ، ٢ ، ٣ ، ٥ ويؤدى ذلك بالطبع إلى اختلاف تركيب ووظائف البروتين الناتج في كل من هذين النسيجين.

ج- جين (Sxl) المرتبط بالجنس:

X- Linked Sex – Lethal gene (Sxl):

وهو جين موجود على كروموسوم X فى حشرة الدروسفلا ومسئول عن تعيين الجنس فيها ويشتمل على ثمانى اكسونات. ويعد هذا الجين المنظم الرئيسى لعملية تعيين الجنس فى هذه الحشرة Master Regulator. ففي كروموسومات الانثى يتم تراكم نسخ هذا الجين بحيث يتم حذف الاكسون رقم ٣ مما يؤدى إلى انتاج م.ر.ن.أ يشفر لبروتين منظم، بينما فى كروموسومات الذكر فإن نسخ هذا الجين يتم تراكمها بطريقة مختلفة Alternatively Spliced بحيث تشتمل على الاكسون رقم ٣ المحتوى على كودون انتهاء الترجمة. وينتج عن ذلك أنه عندما يترجم م.ر.ن.أ فى الذكور فإنه يعطى ببتيدي قصير يفتقر إلى نشاط تنظيمي (الشكل ١١-١٤). وفى حالة الجنين XX، حيث يوجد بروتين Sxl

بالكامل، يتم تعبير مجموعة معينة من الجينات والتي تؤدي إلى تمايز هذه الأجنة إلى أنثى. وعلى العكس من ذلك، نجد أنه في حالة الجنين XY حيث يغيب الطول الكامل لبروتين Sxl يتم تعبير مجموعة أخرى من الجينات التي تسبب تمايز هذا الجنين ليكون ذكراً.



الشكل (١١-١٤): تبادل التراكيب لنسخ ر ن أ الناتجة من جين (Sxl) في الدروسفلا

وبالطبع تخضع عملية التراكيب هذه في النهاية إلى النسب بين الأوتوسومات وعدد كروموسومات X. وعلى ذلك فإن تباين التراكيب في Sxl RNA مسئول عن التمايز الجنسي في الدروسفلا.

ثانيًا: معدل ثبات م.ر.ن. أ. Stability of mRNA:

حيث أن م.ر.ن. أ. يعمل كقالب لبناء البروتين في السيتوبلازم كما سبق القول، فإن ترجمة هذه النسخ من م.ر.ن. أ. يمكن أن تتم بواسطة العديد من الريبوسومات أثناء تحركها على طول م.ر.ن. أ. في نظام متتابع. وتستمر عملية الترجمة هذه إلى أن يحدث هدم لجزئ م.ر.ن. أ. وعلى ذلك فإن هدم م.ر.ن. أ. يعتبر نقطة تنظيم للتحكم في النظام العام التعبير الجيني.

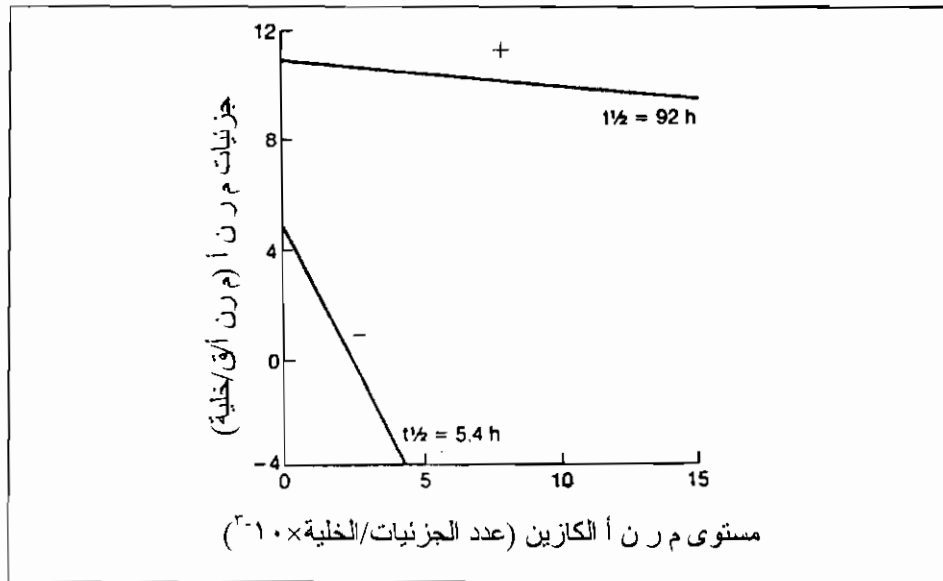
ويستطيع م.ر.ن. أ. طویل العمر Long-Lived أن يدخل في دورات كثيرة من بناء البروتين في حين لا يحدث ذلك في حالة م.ر.ن. أ. قصير العمر Short-Lived وفي حالة م.ر.ن. أ. الذي يتم هدمه بسرعة فإنه لا بد من تعويض ذلك بعملية نسخ اضافية حتى لا يتوقف بناء البروتين الذي يشفر له. وقد يكون توقف انتاج هذه البروتين جزء من برنامج نمو وتمايز الكائن. أذ عندما يؤدي البروتين وظيفته فإنه قد تنتفي الحاجة إليه بعد ذلك حتى أن استمرار بناء هذا البروتين قد يكون ضاراً بالخلية وفي هذه الحالات قد يمثل الهدم السريع لم.ر.ن. أ. ميكانيكيه لمنع استمرار بناء بروتين غير مرغوب فيه بعد مرحلة معينة من التمايز.

وقد تبين أن فترة نصف العمر ($t_{1/2}$) الخاصة بـجزئ م.ر.ن. أ. تتأثر بعوامل كثيرة. فمثلاً وجد أن طول ذيل متعدد الأدينين Poly A يلعب دوراً مهماً في ثبات م.ر.ن. أ. إذ كلما زاد طول هذا الذيل كلما طالت فترة نصف العمر لهذا الجزئ والعكس صحيح. ومن المعروف أن م.ر.ن. أ. الهستون لا يحتوى على ذيل متعدد الأدينين وقد وجد انه قصير العمر جداً.

ومن جهة أخرى، تبين أن وجود تتابعات معينة في المنطقة UTR 3' (أي المنطقة 3' غير المترجمة) يؤثر بشدة على ثبات م.ر.ن.أ. فقد ثبت أن عددا من أنواع م.ر.ن.أ قصيرة العمر تتميز بوجود التتابع AUUUA بتكرار مترادف في لمنطقة UTR 3' وعند نقل هذه التتابعات إلى منطقة UTR 3' لجزئ م.ر.ن.أ آخر أكثر ثباتاً فقد تحول إلى جزئ أقل ثباتاً وأقصر عمراً.

بالإضافة إلى ذلك أظهرت بعض الدراسات أن ثبات م.ر.ن.أ يتأثر ببعض الهرمونات فقد وجد أن هرمون الاستروجين يزيد ثبات ويطيل عمر mRNA لجين فيتولوجنين Vitellogenin في أبوذئبه *Xenopus leavis*

كما وجد أن هرمون البرولاكتين Prolactin يطيل فترة نصف العمر لنسخ م.ر.ن.أ لجين الكازين Casein gene (الشكل ١١-١٥).



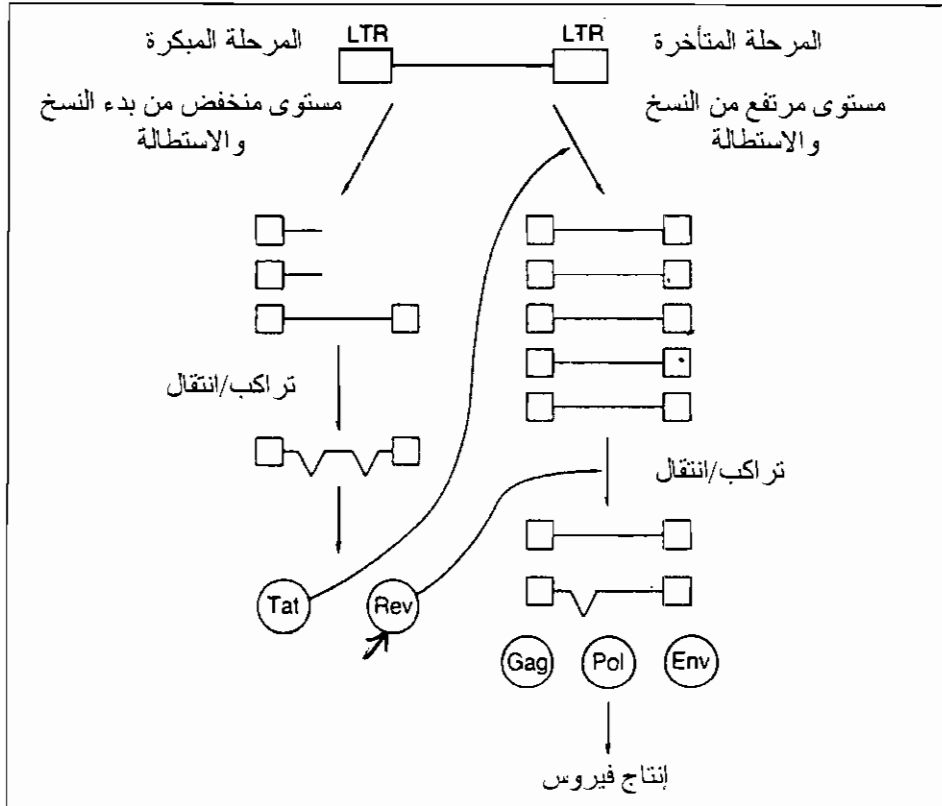
الشكل (١١-١٥): إختلاف ثبات م ر ن أ (فترة نصف العمر) لبروتين الكازين في وجود (+) أو غياب (-) هرمون البرولاكتين

ثالثاً: انتقال mRNA Transport mRNA:

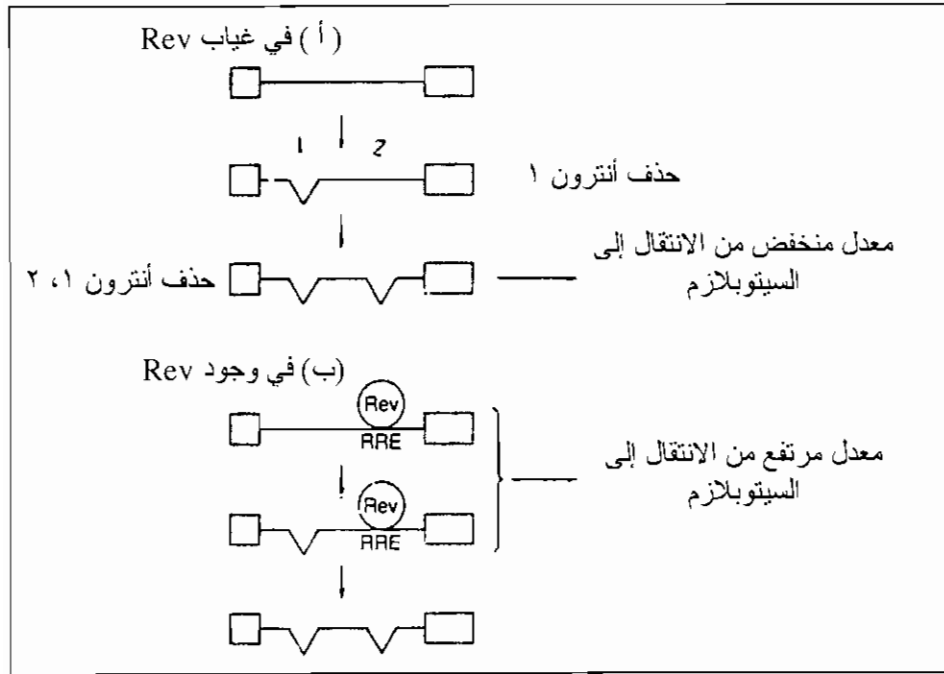
تبين انه مقدار ما يخرج من نواة خلية الثدييات من جزيئات hnRNA في صورة mRNA يمثل ٥% فقط من مجموع الجزيئات التي تم بنائها داخل النواة. حيث أنه اثناء عملية التجهيز والتعديل والتراكب، يتم التخلص من اعداد كبيرة من جزيئات ر.ن.أ غير المرغوب فيها بالهدم بواسطة معقد بروتيني كبير يسمى Exosome الذي يتكون من عدد من تحت الوحدات ذات نشاط انزيمى للهدم الطرفى لجزيئات ر.ن.أ RNA Exonucleases. وكما سبق القول فإن عملية خروج ر.ن.أ من النواة يتم تأخيرها حتى تنتهى عملية التجهيز Processing. وعلى ذلك، فإن أى ميكانيكية تؤدي إلى منع استكمال عملية التراكب Splicing فى جزئ معين من ر.ن.أ يمكن أن توقف عملية خروج ر.ن.أ من النواة.

وتعد عملية تنظيم خروج RNA لفيروس HIV النموذج المفضل لهذه الظاهرة والمسماه Regulated Nuclear Transport of mRNA (الشكل ١١-١٦) حيث تتم عملية بناء mRNA على مرحلتين، فى المرحلة الميكره للعدوى بالفيروس يتم بناء عدد محدود جداً من نسخ ر.ن.أ الكاملة الاستطالة واعداد قليلة من النسخ الناقصة الاستطالة وبإطوال متفاوتة. ويحدث للنسخ الكاملة عملية تراكب Splicing وانتقال mRNA Transport تام التجهيز (بعد حذف انترون ١ و ٢) إلى السيتوبلازم حيث تتم ترجمته إلى بروتينين أحدهما يسمى Tat والآخر يسمى Rev. وفى المرحلة المتأخرة للعدوى يساعد بروتين Tat على تنشيط عملية بدء النسخ والاستطالة الكاملة لعدد كبير من جزيئات ر.ن.أ وبعدها يساعد بروتين Rev على تراكب وانتقال جزيئات ر.ن.أ إلى السيتوبلازم بحيث تكون أما كاملة الاستطالة (محتوية على انترون ١ و ٢) او محذوف منها الانترون رقم ١ فقط. وفى السيتوبلازم يتم ترجمة ثلاثة بروتينات هامة لانتاج وحدات جديدة

من الفيروس وهي Gag, Pol, Env ويبين الشكل (١١-١٧) الدور الذي يقوم به البروتين Rev في تسهيل عملية انتقال ر.ن.أ من النواة إلى السيتوبلازم.



الشكل (١١-١٦): تنظيم تعبير جين HIV و إنتقاله. في المرحلة المبكرة من العدوى يحدث مستوى منخفض من إستحداث النسخ و إستطالة منتجا عدد صغير من م ر ن أ الفيروس التام التراكب الذي يشفر لبروتيني Tat و Rev و عند إنتاج هذين البروتينين ، يحفز Tat على إستحداث و إستطالة النسخ مما يؤدي إلى زيادة في إنتاج م ر ن أ الفيروس. يقوم بروتين Rev بعد عملية النسخ بتحفيز عملية التراكب و الإنتقال لجزيئات م ر ن أ غير المترابطة أو المحذوف منها الانترون رقم (١) فقط والتي يتم ترجمتها إلى ثلاث بروتينات تركيبية Gag, pol, Env وهي فيروسية



الشكل (١١-١٧): يؤدي ارتباط Rev بمنطقة الاستجابة (RRE) في رن أ لجين HIV إلى تحفيز انتقال رن أ غير المعدل أو المترابك (يحذف أنترون ١ فقط) ولا يحدث انتقال لجزيئات رن أ التي حذفت منها الأنترونين ١ و ٢ معاً نظراً لغياب موقع الارتباط ببروتين Rev والموجود على الأنترون (٢)

فقد تبين وجود تتابع قصير متخلل للأنترون رقم ٢ ويسمى عنصر الاستجابة لريف Rev Responsive Element (RRE) وفي حالة غياب بروتين Rev وحدوث Splicing للأنترون ١ فقط أو للأنترون ١ و ٢ معاً فإن ذلك سيؤدي إلى انخفاض شديد في معدل انتقال رن.أ إلى السيتوبلازم. ومن جهة أخرى ، في حالة وجود بروتين Rev وفي وجود نسخ رن.أ كامل بدون تراكب أو بتراكب جزئي يشمل حذف أنترون ١ فقط فإن ذلك يعطى فرصة أكبر لارتباط Rev بمنطقة RRE الموجودة في الأنترون رقم ٢ مما يساعد على حدوث معدل عالي جداً من انتقال رن.أ إلى السيتوبلازم.

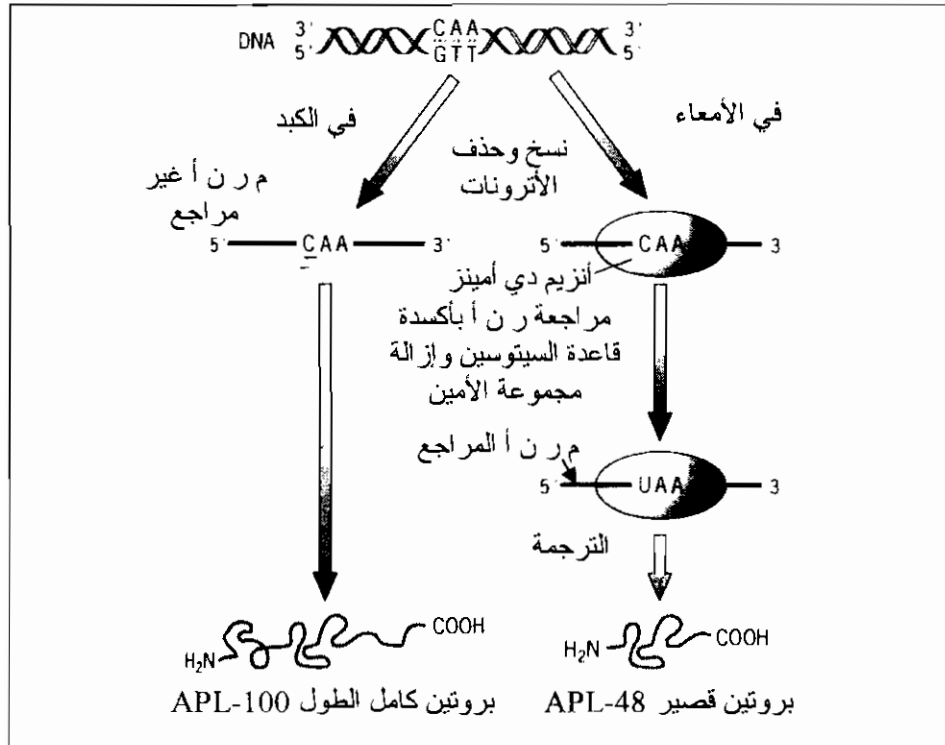
ويعد بروتين Rev أول بروتين تنظمى لعملية انتقال ر.ن.أ إلى السيتوبلازم. وقد افترضت ميكانيكيتان لتفسير عمل بروتين Rev ويعتمد التفسير الاول على اماكن حدوث تفاعل هذا البروتين مباشرة مع نظام خلوى لنقل ر.ن.أ ويرتبط مع مستقبل نووى يسمى Exportin مما يؤدي إلى تسهيل انتقال ر.ن.أ إلى خارج النواة. ويفترض الاقتراح الثانى أن Rev يقوم بدور غير مباشر بحيث يؤدي الى إزاحة مؤقتة لبروتينات تراكب ر.ن.أ والتي قد تمنع ر.ن.أ من الانتقال قبل أن يتم تراكبه Splicing

رابعاً: مراجعة م.ر.ن.أ mRNA Editing:

سبق الإشارة إلى القاعدة أو المبدأ الاساسى Central Dogma فى تدفق المعلومات الوراثية التى تبدأ من د.ن.أ الذى يتم نسخ تتابعات جين معين منه كصورة مكملّة طبق الاصل من تتابعات المنطقة التى يمثلها هذا الجين فى صورة جزئ م.ر.ن.أ بلا زيادة أو نقصان والذى يعمل بدوره كقالب لترجمة الشفرات الثلاثية التى يحتويها إلى احماض امينية فى سلاسل ببتيدية مقابلة حسب قاموس الشفرة الوراثية.

إلا أنه من المدهش حقاً حدوث إستثناءات لهذه القاعدة العامة. إذ يحدث احيانا أن م.ر.ن.أ نفسه لابد ان تتم فيه عملية مراجعة Editing بإضافة (أو حذف) بعض القواعد حتى يمكن ترجمته إلى بروتين نوعى فعال ليفى باحتياجات نسيج نوعى معين، بينما تصلح النسخة الأصلية غير المراجعة للترجمة إلى بروتين فعال آخر فى نسيج آخر أى يكون لدينا نسختين مختلفتين من م.ر.ن.أ.

والمثال على ذلك ما وجد في نسخ م. ر. ن. أ الخاصة بجين Apolipoprotein B في الثدييات والذي يلعب البروتين الناتج منه دوراً مهماً في انتقال جزيئات الليبيدات، وتبين أن هذا البروتين له صورتين متقاربتين جداً (الشكل ١١-١٨).



الشكل (١١-١٨): عملية المراجعة Editing لجزيء م ر ن أ أبوليوبروتين Apolipoprotein-B في أمعاء الثدييات

إذ وجد أن احد الصورتين من هذا البروتين ويسمى الجزء الكبير (APB-100) ذو وزن جزيئي مرتفع (512KD) يتم بناؤه في الكبد، في حين أن الصورة الأخرى ويسمى البروتين الأصغر (APB-48) يتم بناؤه في الأمعاء.

وقد تبين أن تتابع البنوكليتيدات في هذا الجين كان بالطبع متطابقاً في كل من الكبد والامعاء، بل والأكثر من ذلك كانت نسختي م.ر.ن.أ متساويتين في الحجم (14.5 Kb) إلا أنه بينما كان هذا التتابع طبيعي في APB-100 بحيث كانت الشفرة الثلاثية عند الموقع ٦٦٦٦ هي CAA وتشفر للجلوتامين وتستمر بعدها ترجمة هذا الجزء الكبير إلى نهايته بدون توقف لنحصل على بروتين APB-100 في الكبد بحيث يكون طول السلسلة ٤٥٦٣ حامض أميني. إلا أن ذلك لم يحدث بالضبط في الامعاء ولكن حدث استبدال للقاعدة C في نسخة م.ر.ن.أ بالقاعدة U في هذا الموقع (6666) بحيث أصبحت الشفرة الثلاثية UAA وهي تمثل كما نعرف شفرة إيقاف الترجمة عند هذه النقطة وعدم استمرارها فينتج البروتين الصغير في الامعاء APB-48 المكون من ٢١٥٣ حامض أميني. وقد تبين أن هذا الاستبدال من C إلى U قد تم بواسطة نشاط انزيم RNA-Binding Deaminase.

تنظيم الترجمة Translational Control:

أولاً: في غير مميزة النواة:

حيث أننا نعرف الآن أن نظام الأوبرون في *E.coli* يحتوي على عدد من الجينات التركيبية (٣ في حالة lac أوبرون و ٥ في حالة Trp أوبرون) وبالتالي يتم نسخ هذه الجينات معاً في م.ر.ن.أ متعدد السسترونات Polycistronic ، إلا أن الترجمة تتم منفصلة لكل جين على حدة. كما نعرف أنه نظراً لعدم وجود نواه في البكتريا فإنه يمكن أن تحدث عمليات النسخ والترجمة وهدم م.ر.ن.أ في نفس الوقت تقريباً ولذلك فإننا يمكن أن نتوقع أن يتم إنتاج البروتينات بمقادير مختلفة من نفس نسخ mRNA وذلك عن طريق ميكانيكيات مختلفة منها:

- ١- اختلاف فعالية بدء الترجمة:
Unequal Efficiencies of Translational Initiation:
وهي ظاهرة معروف حدوثها عند كودونات AUG للجينات المختلفة.
- ٢- تغييرات في سرعة (فعالية) حركة الريبوسوم:
Altered Efficiencies of Ribosome Movement:
ويحدث ذلك عندما تتكون عروة دبوس الشعر أو غيرها من التراكيب على جزئ mRNA مما يؤدي إلى اعاقه تحرك الريبوسوم على طول هذا الجزئ.
- ٣- اختلاف معدل الهدم في مناطق م.ر.ن.أ:
Differential Rates of Degradation:
حيث تكون بعض مناطق م.ر.ن.أ أكثر عرضة للهدم السريع عن غيرها من المناطق.

يوجد في م.ر.ن.أ البكتيري تتابع محفوظ من ستة نيوكليوتيدات يسمى Shine-Dalgarno Sequence ويقع دائماً على بعد عدد قليل من كودون بدء الترجمة AUG. ويتزاوج هذا التتابع مع القواعد المقابلة في 16S RNA في الوحدة الصغرى للريبوسوم بغرض وضع الكودون AUG في المكان الصحيح على الريبوسوم.

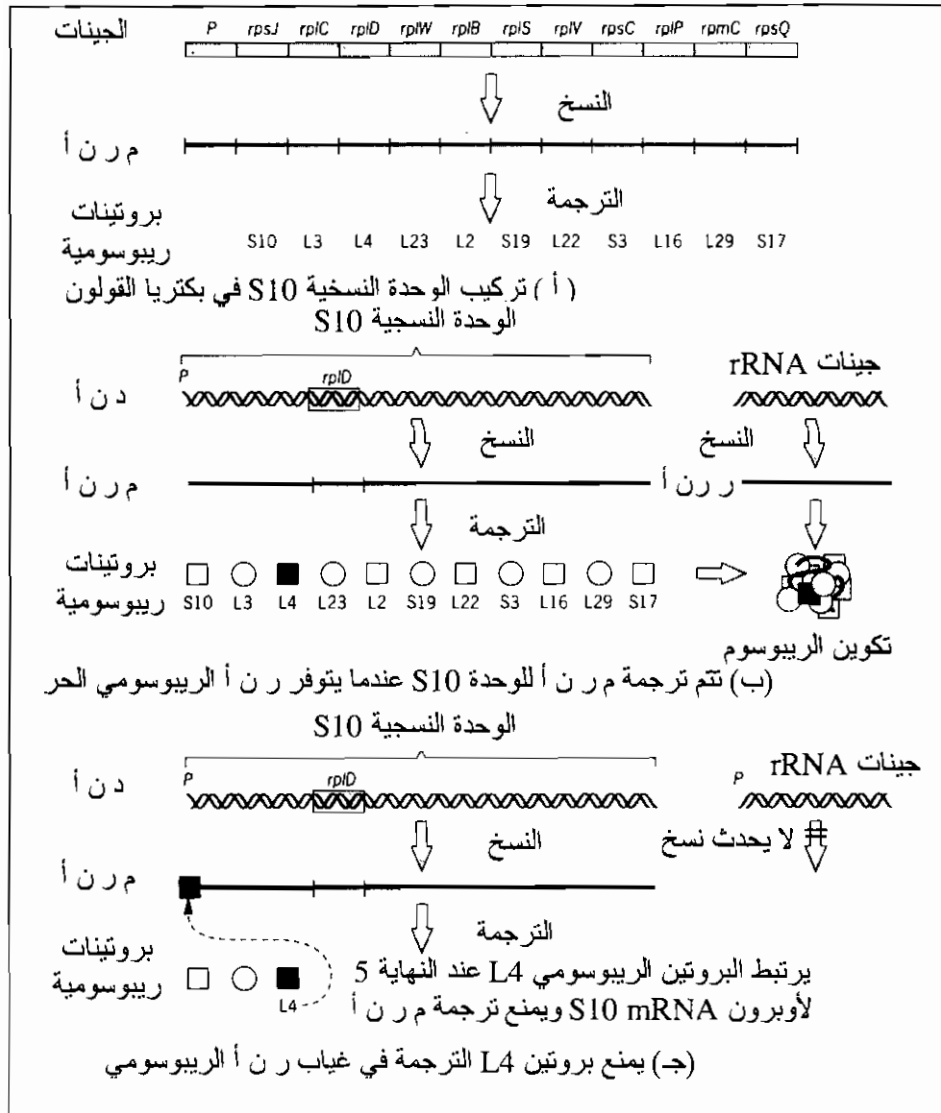
ويعطى هذا التفاعل مساهمة كبيرة لفاعلية عملية بدء الترجمة حيث تمد الخلية البكتيرية بطريقة بسيطة للتحكم في بناء البروتين عن طريق ما يعرف بميكانيكية التحكم السلبي في الترجمة. وتتطوى هذه الميكانيكية على حجب Blocking تتابعات Shine-Dalgarno إما بتغطيتها بالارتباط ببروتين أو بمشاركتها في التزاوج مع قواعد مقابلة في احدى مناطق م.ر.ن.أ. ويحتوى عدد كبير من م.ر.ن.أ البكتيري على بروتينات نوعية مثبطة للترجمة

Translational Repressor Proteins والتي يمكنها الارتباط في منطقة مجاورة لتتابع Shine-Dalgarno مما يؤدي إلى تثبيط ترجمة هذا الجزء من م.ر.ن.أ فقط.

وعلى سبيل المثال فإن بعض البروتينات الريبوسومية يمكنها تثبيط ترجمة م.ر.ن.أ الخاص بها نفسها عن طريق الارتباط بالمنطقة 5'UTR. ويطلق على هذه الميكانيكية اسم التنظيم الذاتي السلبي Negative Self-Regulation أو Negative Autogenous Regulation (الشكل ١١-١٩).

وفي هذه الميكانيكية تقوم مجموعة البروتينات الريبوسومية للجين S10 (الخاص بالوحدة الصغرى) بهذا النوع من التنظيم السلبي. تحتوى وحدة النسخ S10 على ١٠ جينات ذات تنظيم متناسق وكلها تشفر لبروتينات ريبوسومية (الشكل ١١-١٩ أ) وفي حالة وحدة النسخ S10، وجد أن أحد الجينات في هذه الوحدة يقوم بتثبيط ترجمة جميع نسخ جينات الوحدة النسخية. أى أن الجين المشفر للبروتين المثبط يكون هو نفسه أحد الجينات التي يتم تنظيمها (بالتثبيط) وبذلك يكون الجين المثبط قد تم تنظيمه ذاتياً وسلبياً. فى الوحدة النسخية S10 يكون الجين المنظم هو rPID الذى يشفر للبروتين L4. وعندما يوجد rRNA حراً فى الخلية فإن بروتين L4 يرتبط بـ rRNA هذا (الشكل ١١-١٩ ب).

ويتجمع فى تركيب الريبوسوم. اما فى حالة غياب rRNA فإن بروتين L4 يرتبط بالنهاية 5' للوحدة النسخية S10 ويثبط ترجمتها (الشكل ١١-١٩ جـ) ويؤدي هذا الى منع بناء بروتينات ريبوسومية عندما لا يوجد لها احتياج فى الخلية.



الشكل (١١-١٩)

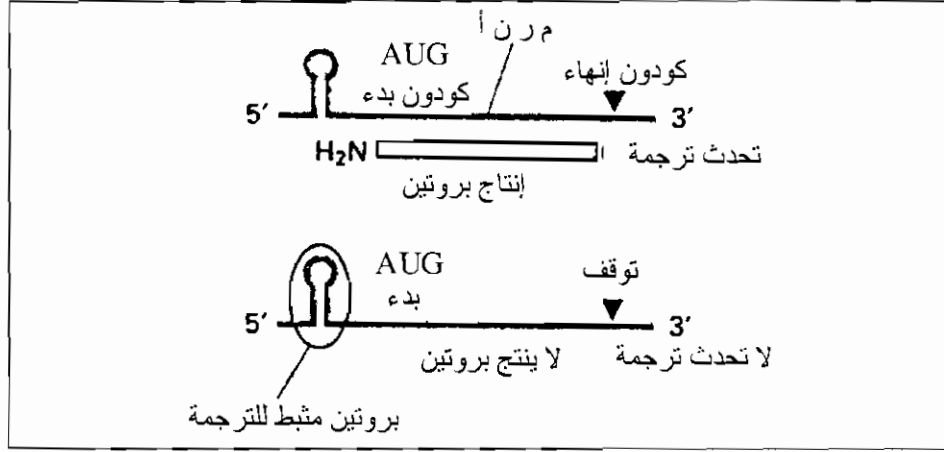
- أ - تركيب جين S10 في بكتريا القولون (ب) و(ج) تنظيم النسخ لهذا الجين تكون ترجمة م ر ن أ تحت تحكم بروتين L4 الذي يرتبط بتتابع نيوكليدي بالقرب من النهاية 5' لنسخة S10.
- ب- تفاعل البروتينات الريبوسومية مع rRNA لتكوين الريبوسوم.
- ت- في غياب rRNA يرتبط بروتين L4 قرب النهاية 5' لنسخة S10 و يمنع عملية الترجمة.

ثانياً: تنظيم الترجمة في مميزة النواة:

سبقت الإشارة إلى أن م.ر.ن.أ في مميزة النواة لا يحتوى على تتابع Shine-Dalgarno ، وبدلاً من ذلك يتقرر اختيار كودون بدء الترجمة AUG اعتماداً على قرابة لمنطقة القلنسوة G-cap عند النهاية 5' لجزئ م.ر.ن.أ وهو الموقع الذى ترتبط عنده الوحدة الصغرى للريبوسوم مع mRNA لبدء الترجمة. وقد وجد أن مميزة النواة تستخدم أيضاً مثبطات للترجمة.

ويرتبط بعض من هذه المثبطات بالنهاية 5' لجزئ م.ر.ن.أ وبالتالي تتوقف عملية بدء الترجمة. فى حين يتعرف البعض الآخر من هذه المثبطات على تتابعات نيوكليدية عند المنطقة 3' UTR لأنواع معينة من م.ر.ن.أ وتعمل على خفض معدل بدء الترجمة عن طريق التداخل Interference مع عملية الاتصال بين قلنسوة 5' G-cap ومنطقة 3' Poly A والتي لا بد من حدوثها بطريقة صحيحة لضمان فعالية الترجمة. ومن الأمثلة التى تمت دراستها للتدليل على حدوث التحكم السلبى فى الترجمة فى مميزة النواة تنظيم ترجمة م.ر.ن.أ الفيريتين Feritin حيث وجد أن هذه الميكانيكية تؤدي إلى السماح بزيادة سريعة فى بناء بروتين الفيريتين الذى يقوم بتخزين الحديد وبذلك ترتفع مستويات أيونات الحديد الذائبة فى سيتوبلازم الخلية. ويقوم الحديد هنا بدور تنظيمى اعتماداً على وجود تتابع من حوالى 30 نيوكليوتيدة فى منطقة القيادة 5' فى جزئ م.ر.ن.أ للفيريتين. وينطبق هذا التتابع المستجيب للحديد Iron-Response Sequence فى تركيب يعطى شكل ساق وعروة والذى يرتبط به بروتين مثبط للترجمة يسمى Aconitase والذى يمنع ترجمة أى تتابعات م.ر.ن.أ لاحقة Downstream (الشكل ١١-٢٠). ويعتبر الاكونيتيز بروتين مرتبط بالحديد Iron-Binding Protein ويؤدى تعرض الخلية لوفرة من الحديد إلى انفكاكة (أى

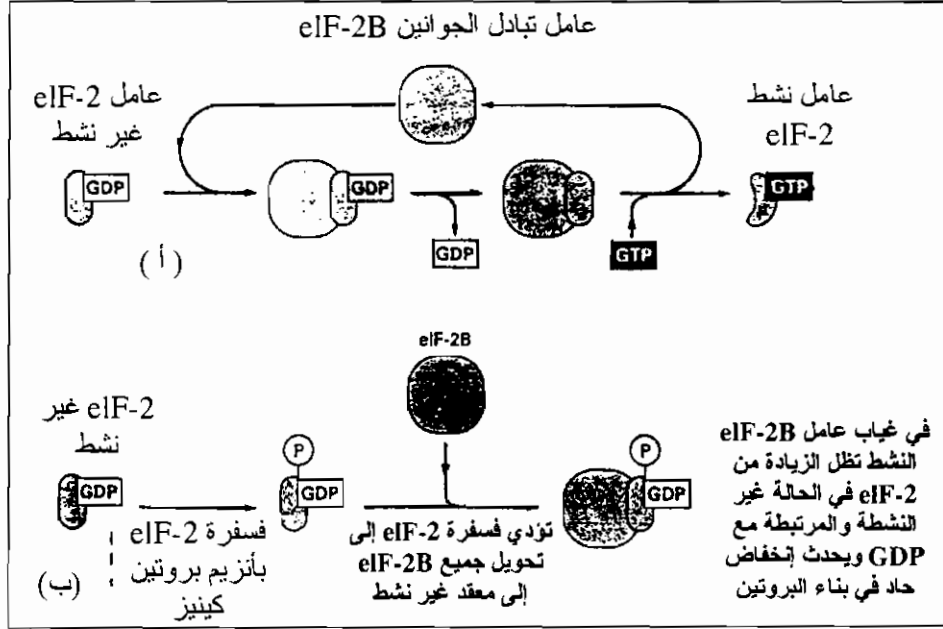
اللاكونتينز) من جزئ mRNA للفيريتين بحيث يؤدي إلى إزاحة مثبط الترجمة مما يؤدي الى زيادة انتاج الفيريتين إلى أكثر من مائة ضعف.



الشكل (٢٠-١١): التحكم السلبي في عملية النسخ في مميزة النواة ويتم ذلك بواسطة ارتباط بروتين نوعي مع تتابع مقابل في م ر ن أ بحيث يعمل كمثبط للترجمة. يؤدي هذا الارتباط إلى خفض مستوى الترجمة لجزئ م ر ن أ

من جهة أخرى وجد ان خلايا مميزة النواة تستخدم ميكانيكية الفسفرة لعامل بدء الترجمة elf-2 لتقليل معدل بناء البروتين استجابة لبعض العوامل البيئية مثل عدم توفر عوامل النمو أو نقص بعض المغذيات Nutrients أو عند الإصابة بالفيروس أو عند الارتفاع المفاجئ في الحرارة. وتتم الفسفرة بنشاط انزيمات معينة للبروتين كينيز التي تنشط استجابة للظروف اعلاه. وقد سبق شرح دور عامل بدء الترجمة elf-2 في عملية ترجمة البروتين في فصل سابق. وقد وجد انه نظراً لان العامل elf-2 يرتبط بشدة بجزئ GDP فإن هناك عامل آخر يسمى elf-2B تبرز الحاجة إليه ليؤدي إلى تحرير GDP حتى يمكن ارتباط جزئ جديد من GTP بالعامل elf-2 حتى يمكن إعادة استخدام هذا الأخير

(الشكل ١١-٢١ أ) ويحدث تثبيط لاعادة استخدام العامل eIF-2 عند فسفرته وذلك لأن eIF-2 المفسفر يرتبط بشدة بالعامل eIF-2B وبصورة غير عادية مسبباً وقف نشاط العامل eIF-2B.



الشكل (١١-٢١): دورة eIF-2

- أ - عادة تدوير eIF-2 بواسطة عامل تبادل الجوانين (eIF-2B).
- ب - تؤدي فسفرة eIF-2 إلى التحكم في معدلات بناء البروتين عن طريق منع نشاط eIF-2B.

وحيث أنه يوجد مقادير من eIF-2 أكثر من eIF-2B في الخلية فإن eIF-2 المفسفر يمكنه الارتباط بشدة eIF-2B ومنع إعادة الاستخدام مما يؤدي إلى بطء شديد في بناء البروتين (الشكل ١١-٢١ ب).

وتعد عملية تنظيم مستوى eIF-2 النشاط هامة بصفة خاصة في خلايا الثدييات، حيث تمثل جزءاً من الميكانيكية التي تسمح لهذه الخلايا بالدخول في

مرحلة من الراحة وعدم الانقسام Nonproliferating (تسمى Go) - بحيث ينخفض معدل بناء البروتين فيها إلى خمس ($\frac{1}{5}$) معدله في الخلايا النشطة في الانقسام.

كما يمكن أن يتم تنظيم الترجمة إذا لجأت الخلية مميزة النواة إلى استخدام كودون بدء AUG بديل يقع في منطقة لاحقة Downstream من نقطة بدء الترجمة الصحيحة. إذ أن الترجمة الطبيعية عادة تبدأ من كودون AUG الذى يقع Downstream من النهاية 5' مباشرة لجزئ م.ر.ن.أ حيث أنه أول كودون يصادف الوحدة الصغرى للريبوسوم.

إلا أن التتابعات النيوكليوتيدية المحيطة مباشرة بهذا الكودون تؤثر على كفاءة عملية بدء الترجمة. فإذا كان موقع التعرف مع الريبوسوم ضعيف، فإن الريبوسوم سيتخطى أول كودون AUG ويتجه إلى الارتباط بالكودون الثانى أو الثالث AUG وتعد هذه الظاهرة التى تعرف "بالمسح المتسرب Leaky Scanning" استراتيجية تستخدم كثيراً لإنتاج بروتين أو أكثر متقاربين فى التركيب من نفس جزئ mRNA ويختلفان فقط فى النهاية الامينية لكل منهما. فهي تسمح مثلاً لبعض الجينات بإنتاج نفس البروتين بحيث يحتوى على تتابعات اشارية مرتبطة بالنهاية الامينية له أو العكس مما يتيح امكانية توجيه هذه البروتينات إلى مواقع مختلفة فى الخلية.

وفى بعض الحالات، يمكن للخلية تنظيم الوفرة النسبية من صور البروتين Isoforms الناتجة من "المسح المتسرب"، فمثلاً فى بعض أنواع الخلايا، تؤدي الزيادة النوعية فى وفرة عامل بدء الترجمة eIF-4f إلى تفضيل استخدام كودون AUG الاقرب للنهاية 5' فى جزئ م.ر.ن.أ .

يوجد نوع آخر من التنظيم يستخدم واحد أو أكثر من اطارات القراءة المفتوحة القصيرة (ORF) التي تقع بين النهاية 5' لجزئ م.ر.ن.أ وبين بداية الجين. وعادة ما تكون الاحماض الامينية المشفرة لهذه الاطارات Upstream (UORFs) غير مهمة وانما تستخدم هذه (s' UORFs) لأداء وظيفة تنظيمية فقط، حيث أن هذه الاطارات القصيرة تعمل على خفض كبير في ترجمة الجين اللاحق Downstream وذلك عندما تتجح في تقييد حركة معقد ريبوسوم بدء الترجمة بحيث يتجه الريبوسوم الى ترجمة UORF وينفك عن م.ر.ن.أ قبل أن يصل إلى تتابعات تشفير البروتين.

وقد وجد أن خميرة الخباز تحتوى على أربعة s' UORF قصيرة والتي تستخدمها الخميرة لمواجهة المجاعة أو النقص في بعض المغذيات النوعية وذلك عن طريق إيقاف بناء كل انواع البروتينات فيما عدا تلك المطلوبة لبناء تلك المغذيات الناقصة في البيئة. ففي الخميرة يوجد م.ر.ن.أ يشفر لبروتين يسمى GCN4 وهو جين يشفر لبروتين تنظيمي ضروري لتنشيط عدد من الجينات التي تشفر لبروتينات هامة لبناء احماض امينية. وتكون مناطق UORFs الاربعة مسئولة عن احداث زيادة انتقائية Selective في ترجمة GCN4 استجابة لفسفرة العامل elf-2 مدفوعا بالنقص الحاد في الاحماض الامينية. ويتم ذلك بميكانيكية تتلخص في أن تحت وحدات الريبوسوم تتحرك على طول م.ر.ن.أ حيث تصادف كل من UORFs إلا انها تقوم بترجمة تحت مجموعة واحدة منها فقط. فمثلاً إذا تمت ترجمة UORF رقم ٤، كما هو الحال في الخلايا غير المجعدة غذائياً Unstarved، فإن الريبوسوم يتفكك عند نهاية هذه UORF وتكون عملية ترجمة GCN4 ضعيفة أو معدومة. ويؤدي الانخفاض في نشاط elf-2 إلى زيادة

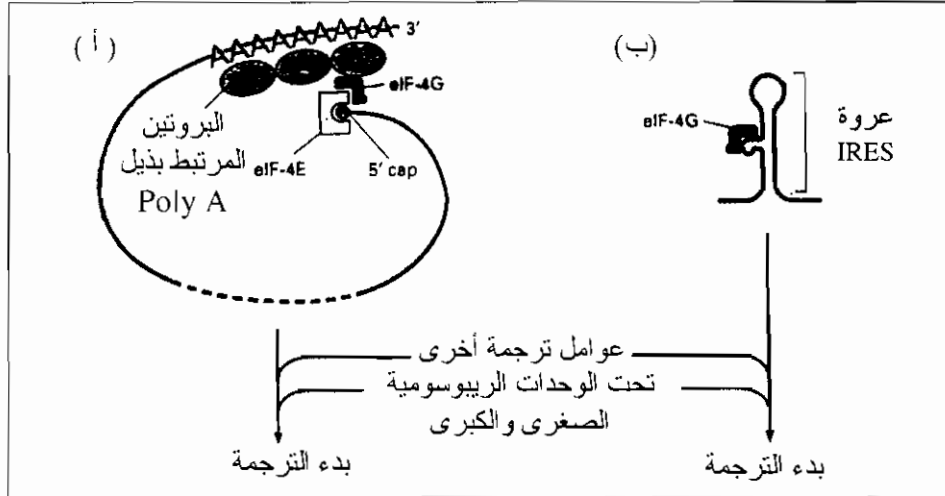
فرصة تحرك الريبوسوم الماسح ليصل إلى UORF الرابع قبل أن يكتسب القدرة على بدء الترجمة.

ومثل هذا الريبوسوم يمكنه بدء الترجمة بكفاءة لجزئ م.ر.ن.أ GCN4 مما يؤدي إلى انتاج بروتينات تحفز بناء الاحماض الامينية التى تحتاجها الخلية.

وتوجد ميكانيكية اخرى تؤدي إلى تنظيم الترجمة وذلك من خلال طريقة اخرى تمكن للخلية من بدء الترجمة عند مواقع بعيدة عن النهاية 5' لجزئ م.ر.ن.أ وفي هذه الحالة تبدأ الترجمة مباشرة عند مواقع معينة من تتابعات ر.ن.أ يسمى كل منها موقع دخول داخلى للريبوسوم (IRES) Internal Ribosome Entry site وقد توجد IRES فى أماكن مختلفة فى م.ر.ن.أ.

وفى بعض الحالات غير العادية يمكن لتتابع تشفير بروتينين معينين هجينين ان تكون موجوده ترادفيا على نفس م.ر.ن.أ بحيث تتم ترجمة التتابع الأول بالطريقة العادية لميكانيكية المسح الريبوسومى فى حين تتم ترجمة التتابع الثانى بواسطة IRES. وتكون IRES بطول مئات النيوكليوتيدات وتتثنى فى تركيبات نوعية يمكنها الارتباط بنفس البروتينات المستخدمة لبدء عملية الترجمة التى تعتمد على وجود القلنسوة G-Cap (الشكل ١١-٢٢). وفى الحقيقة فإن كل مجموعة من IRES تحتاج إلى مجموعة معينة من عوامل البدء إلا أن كل هذه IRES تستغنى عن الحاجة إلى قلنسوة Cap 5' G أو عوامل بدء الترجمة التى تتعرف عليها (elf-4E). وقد اكتشفت IRES'S لأول مرة فى بعض فيروسات اصابة الثدييات بحيث تعطى طريقة مبتكرة للفيروس لكى يسخر ماكينة ترجمة

العائل لحسابه. فعند الإصابة، تنتج هذه الفيروسات انزيم بروتينيز (موجود في جينوم الفيروس) الذي يؤدي نشاطه إلى انفلاج عامل الترجمة elf-4G للخلية المصابة مما يجعله غير قادر على الارتباط بالعامل elf-4E (معقد الارتباط بالقلنسوة 5' G-Cap) ويؤدي ذلك إلى وقف معظم عمليات الترجمة في خلية العائل وتحول عملية الترجمة بكفاءة إلى تتابعات IRES الموجودة في كثير من م.ر.ن.أ. الفيروسى ويصبح العامل elf-4G الناقص أحد مكونات بدء الترجمة عند هذه المواقع الداخلية. وقد يحفز ترجمة بعض م.ر.ن.أ. المحتوى على IRES. وتحدث هذه الميكانيكية أيضا في م.ر.ن.أ. الخلو، فعندما تدخل الخلية مميزة النواة مرحلة M في دورة الخلية، ينخفض معدل الترجمة إلى حوالى ٢٥% عن معدلها في المرحلة البينية Interphase للخلية. ويحدث هذا الانخفاض الحاد نتيجة عملية نزع الفسفرة Dephosphorylation من معقد الارتباط بالقلنسوة elf-4E والذي يعتمد على دوره الخلية بحيث تنخفض قدرته على الارتباط بالقلنسوة 5'-Cap. إلا أن جزيئات م.ر.ن.أ. المحتوية على IRES تكون منيعة ضد هذا التأثير ويزداد المعدل النسبى لترجمتها عندما تدخل الخلية في دور M.



الشكل (١١-٢٢): ميكانيات استحداث الترجمة

- أ - تتطلب الميكانيكية المعتمدة على تكوين القلنسوة وجود مجموعة من عوامل البدء التي يساعد على تجميعها على م ر ن أ وجود القلنسوة 5' و ذيل متعدد الادنين.
- ب- تحتاج الميكانيكية المعتمدة على IRES فقط إلى تحت مجموعة من عوامل بدء الترجمة العادية و التي تتجمع مباشرة على عروة IRES.

ومن الأمثلة المثيرة للفضول ما تم التوصل اليه مؤخراً عن ميكانيكية اضافة مزيد من ذيل متعدد الادنين PolyA-Tail في السيتوبلازم وأثر ذلك على تنظيم الترجمة. إذ من المعروف أن عملية الاضافة المبدئية لذيل Poly A النهائية 3' في جزئ م.ر.ن.أ تحدث في النواة بطريقة أوتوماتيكية في معظم أن لم يكن جميع نسخ م.ر.ن.أ في خلايا مميزة النواة. ومعروف أن ثبات mRNA يعتمد على طول هذا الذيل بحيث انه مع كل دورة ترجمة يحدث هدم جزئي لبعض نيوكليوتيدات هذا الذيل ويقصر تدريجياً في الطول في السيتوبلازم بحيث ينتهي الأمر الى هدم mRNA بالكامل. إلا أنه في بعض الحالات يحدث العكس في السيتوبلازم بمعنى أن ذيل poly A يزداد طولاً باضافة وحدات جديدة من

نيوكلتيدات الأدينين اليه. وتعد هذه الميكانيكية نموذج إضافي من تنظيم الترجمة. ففي امهات البويضات الناضجة Oocytes وجد أن عملية هدم mRNA الطبيعية التي تحدث في بقية الخلايا لا تحدث في هذه الخلايا العملاقة وذلك حتى تتمكن هذه الخلايا من بناء مخزون ضخم من م.ر.ن.أ للتحضير لعملية الاخصاب. وفي هذه الخلايا يكون معظم م.ر.ن.أ المخزون في السيتوبلازم طول ذيل PolyA فيها لايزيد عن 10-30 نيوكلييدة فقط عند النهاية 3' ولا يحدث لها ترجمة في هذه الصورة. وفي مراحل معينة اثناء نضج الاوسيت وبعد الاخصاب مباشرة Post-Fertilization وعندما تكون الخلية الزيجوتية الأولى في حاجة إلى البروتينات التي تشفر لها هذه النسخ من م.ر.ن.أ، تحدث اضافة لمتعدد A لمجموعات مختاره من م.ر.ن.أ في السيتوبلازم مما يحفز بقوة بدء ترجمتها.

الفصل الثاني عشر

تكنولوجيا د. ن. أ المعاد صياغته

Recombinant DNA Technology

شهد النصف الثاني من خمسينيات القرن العشرين مولد الوراثة الجزيئية Molecular Genetics مع إعلان نموذج الحلزون المزدوج DNA Double Helix الذى أعلنه واتسون وكريك Watson and Crick عام ١٩٥٣ لتفسير تركيب جزئ د. ن. أ على اعتبار أنه مادة الوراثة، حيث تكمن العوامل الوراثية المسؤولة عن الصفات المختلفة للكائن فى تتابع القواعد النيتروجينية الموجودة على شريط د. ن. أ فى النواة. أعقب ذلك تطورات متلاحقة فى الستينات للتعرف على الأساس الجزيئ لعملية تضاعف وتناسخ جزئ د. ن. أ والتركيب الدقيق للجين والنظم الوراثية والبيوكيماوية المسيطرة على معدل التعبير الجينى مثل نظم الأوبرون Operon System. واستمرت مراكز البحوث منذ السبعينيات وحتى الآن فى نشر نتائج البحوث فى هذا المجال بحيث أصبح كل يوم يسأتى بجديد.

تكنولوجيا الجين المعاد صياغته:

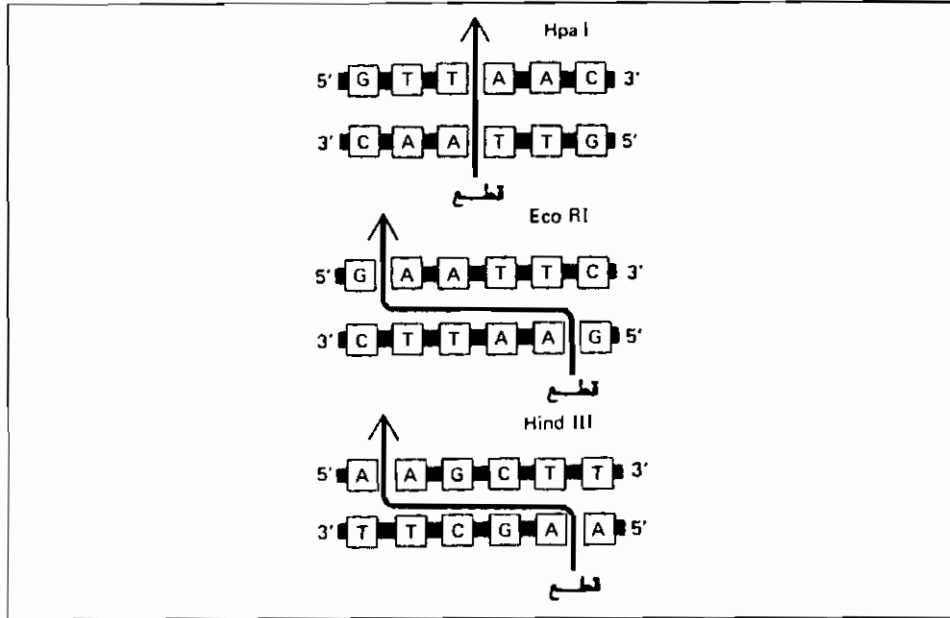
Recombinant DNA Technology :

شهد منتصف السبعينات ميلاد Recombinant DNA Technology أو تقنية الجين Gene Technology. وفيما يلي شرح مختصر لبعض العناصر الرئيسية المستخدمة في هذه التقنية.

انزيمات القطع المحددة Restriction Endonucleases:

توجد بعض انزيمات القطع الداخلي Endonucleases وهي تلك الانزيمات التي تقوم بقطع جزيء د. ن. أ عند تتابعات محددة من أزواج القواعد الداخلية يطلق عليها تتابعات التعرف Recognition Sequences والتي يوجد بداخلها موقع معين يعرف بموقع القطع Cleavage Site.

وتعتبر إنزيمات القطع الداخلي الأداة الرئيسية في بحوث د. ن. أ المعاد صياغته Recombinant DNA . وقد جاءت تسمية هذه الانزيمات في الأصل بالانزيمات المحددة Restriction Enzymes نتيجة لأن وجودها في خلية بكتيرية معينة يحد أو يمنع نمو البكتريوفاج بها. تقوم انزيمات القطع الداخلي بقطع د. ن. أ الى قطع صغيرة عند تتابع نوعي متخصص محدد. وعلى العكس من معظم التفاعلات الانزيمية أو الكيماوية أو الفيزيائية التي تحدث قطعاً عشوائياً في جزيء د. ن. أ فإن هذه الإنزيمات المحددة والتي يبلغ عددها حوالي ٢٠٠ انزيم تتعرف على تتابعات نوعية قصيرة مكونة من ٤-٦ أزواج من القواعد وتحدث كسر نوعي فيها كما في الشكل (١٢-١).



الشكل (١٢-١): تتابعات النيوكليوتيدات في د ن أ التي يتم التعرف على كل منها بواسطة ثلاثة إنزيمات قطع محددة شائعة الاستخدام و يتكون التتابع عادة من ستة أزواج من القواعد

ويوجد إلى جانب هذه الانزيمات في الخلية البكتيرية مجموعة مصاحبة من انزيمات الميثلة DNAmethylases التي تقوم بإضافة مجموعات ميثيل إلى جزئ د. ن. أ البكتيري حتى تحمية من أن يستخدم كمادة تفاعل فتقوم انزيمات القطع المحددة لنفس البكتيريا بتكسيره وهضمة ذاتياً. وعلى ذلك فإن انزيمات ميثلة د. ن. أ النوعية الموقع تكون ملازمة دائماً لانزيمات القطع المحددة في البكتيريا. تسمى انزيمات القطع حسب نوع البكتيريا التي تستخلص منها هذه الانزيمات كما في الجدول (١٢-١).

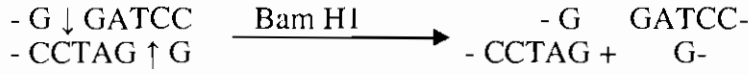
الجدول (١٢-١): بعض الانزيمات محددة القطع الداخلى والتتابعات النوعية التى تتعرف عليها وموقع القطع لكل منها (↓).

الانزيم	التتابع المميز	المصدر البكتيرى
Bam HI	G ↓ GATCC CCTAG ↑ G	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H.
Bg I II	A ↓ GATCT TCTAG ↑ A	<i>Bacillus globigi</i>
Eco RI	G ↓ AATTC CTTAA ↑ G	<i>E. coli</i> RY13
Eco RII	↓ CCTGG GGACC ↑	<i>E. coli</i> R245
Hind III	A ↓ AGCTT TTCGA ↑ A	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
Hha I	GCG ↓ C C ↑ GCG	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
Hpa I	GTT ↓ AAC CAA ↑ TTG	<i>Haemophilus parainfluenza</i>
Mst II	CC ↓ TNAGG GGANT ↑ CC	<i>Microcoleus</i> strain
Past I	CTGCA ↓ G G ↑ ACGTC	<i>Providencia stuarti</i> 164
Taq I	T ↓ CGA AGC ↑ T	<i>Thermus aquaticus</i> YTI

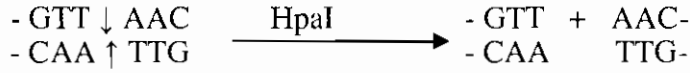
* N= أى نوع من النيوكليوتيدات الأربعة.

فمثلاً انزيم Eco RI يستخلص من بكتريا القولون *E. coli* وهكذا. تكون أول ثلاث حروف من اسم الانزيم مشتقة من أول حرف فى الجنس البكتيرى الذى يستخلص منه (E) والحرفين الأولين فى النوع البكتيرى (co)، وقد يتبع ذلك اسم السلالة النوعية التى استخدمت فى الاستخلاص (R) ورقم لاتينى (I) يحدد أسبقية اكتشاف الانزيم. يتعرف كل انزيم على تتابع نوعى من أزواج القواعد فى جزئ د. ن. أ مكونا من ٤-٧ من أزواج القواعد. ويحدث كسراً محدداً به [وتبين الأسهم فى الجدول (١٢-١)] مكان القطع بين القواعد لكل

انزيم] وقد ينتج عن القطع نهايات مزدوجة السلسلة blunt ends كما فى حالة انزيم (Hpa I) أو نهايات وحيدة السلسلة sticky ends (لزجة) كما فى حالة انزيم Bam HI كما فى الشكل التالى :



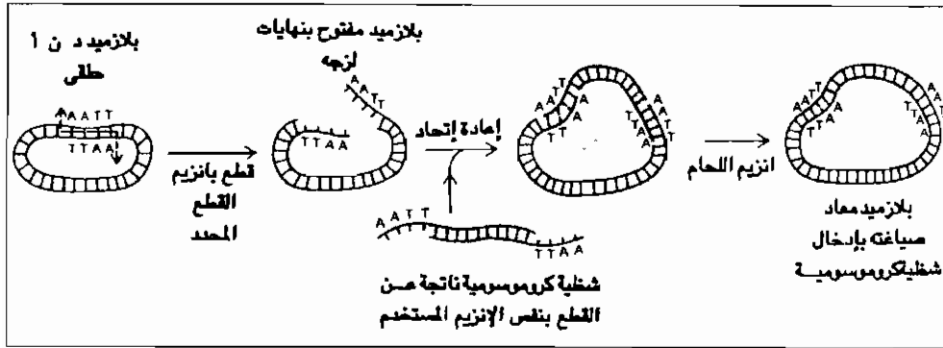
نهاية لزجة



نهاية مزدوجة .

ويرجع ذلك إلى الميكانيكية التى يستخدمها الانزيم. وتعد النهايات اللزجة ذات فائدة عملية كبيرة فى تكوين جزئ د. ن. أ هجينى معاد صياغته (الشكل ١٢-٢) يمكن فى حالة عدم الحصول على نهايات فردية لزجة Sticky Ends، استخدام انزيم Terminal Transferase للحصول على ذيل فردى فى نهاية القطع المحددة وفى وجود عدد معين من نيوكليوتيدات dATP لانتاج ذيل من عديد الادينين Poly A Tail (طوله حوالى ١٠٠ نيوكليوتيدة) على النهاية (3') على د.ن. أ البلازميد بينما يمكن اضافته إلى ذيل من عديد الثايمين Poly T بنفس الطول على نهاية د. ن. أ المرغوب اضافته إلى البلازميد. ويتم بعد ذلك التقاء القطع عند الذيل المتكاملة بخاصية تزاوج القواعد Base Pairing ويتكون بينها روابط هيدروجينية وتستكمل عملية الالتحام بمساعدة انزيمات Polymerase I وLigase كما سبق الذكر (أنظر الشكل ١٢-٢). وإذا افترضنا أن النيوكليوتيدات تكون موزعة بتتابع عشوائى فى جزئ ما من د. ن. أ فإنه من الممكن حساب معدل تكرار القطع الذى يحدثه انزيم معين فى طول معين من د.ن. أ. إذ أنه لكل موقع فى جزئ د. ن. أ يكون هناك ٤ احتمالات: (T, G, C, A) وعلى ذلك فإن انزيم القطع الذى يتعرف على ٤ أزواج من القواعد سيحدث قطع (فى

المتوسط) مرة كل ٢٥٦ زوج من القواعد (٤) في حين أن الانزيم الذي يتعرف على ٦ أزواج من القواعد سيقوم بالقطع كل ٤٠٩٦ زوج نيوكليدي (٤).



الشكل (١٢-٢): تمكن النهايات اللزجة الناتجة من بعض أنواع إنزيمات القطع المحددة من التحام قطع من د ن أ ببعضها حسب قانون تزاوج القواعد المكمل. شظايا د ن أ المتصلة بهذه الكيفية يمكنها تكوين روابط تساهمية قوية بمساعدة إنزيم الليجيز ويبدو في الشكل بلازميد معاد صياغته بإضافة د ن أ كروموسومي إليه

ونتيجة لذلك فإن قطعة ما من د. ن. أ ستحتوي على مواقع خطية مختلفة ومميزة للأنزيمات المختلفة وبالتالي يمكن رسم خرائط القطع المحدد Restriction Maps. وعند هضم د. ن. أ بأنزيم قطع معين فإن نهايات جميع القطع الناتجة ستكون محتوية على نفس التتابع النيوكليدي ويمكن عزل القطع الناتجة باستخدام تقنية التفريد الكهربى باستخدام جيل الاجاروز Agarose كما سيأتى بعد. وتعد هذه الخطوة اساسية فى الكلونة Cloning كما تعتبر أحد الاستخدامات الرئيسية لهذه الانزيمات. ويمكن بالاستخدام الصحيح لهذه الانزيمات واختيار الانزيم المناسب الحصول على شظايا قصيرة نسبياً من د. ن. أ تحتوى على جين معين ويمكن فصل هذه الشظية عن بقية الشظايا غير المرغوبة بطريقة التفريد الكهربى.

بالإضافة إلى هذه المجموعة من انزيمات القطع المحدد توجد عدة انزيمات تقوم بأدوار رئيسية في مجال الهندسة الوراثية، ويلخص الجدول (١٢-٢) دور هذه الانزيمات في بحوث د. ن. أ المعاد صياغته Recombinant DNA.

الجدول (١٢-٢) بعض الانزيمات الهامة في بحوث د ن أ المعاد صياغته

الانزيم	التفاعل	الدور الأساسي
١- أنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase	نزع مجموعة الفوسفات من النهاية 5' من ر. ن. أ أو د. ن. أ	التخلص من مجاميع 5'-P04 قبل التعليم بالكينيز لمنع الالتحام الذاتي self- ligation
٢- BAL 31 nuclease	تحليل كل من النهايتين 5', 3' في جزئ د. ن. أ	تقصير مضطرد في جزئ د. ن. أ
٣- أنزيم لحام د. ن. أ DNA ligase	يساعد في الربط بين جزيئات د. ن. أ	توصيل جزيئات د. ن. أ ببعضها
٤- DNA Pol I	بناء د. ن. أ مزدوج السلسلة من د. ن. أ أحادي السلسلة	بناء د. ن. أ المزدوج السلسلة وعمل ثغرة للترجمة -nick translation
٥- DNase I	تحت الظروف المناسبة ينتج قطع وحيدة السلسلة في د. ن. أ	ثغرة الترجمة - وعمل خريطة لمواقع التتابعات فائقة الحساسية.
٦- Exonuclease III	نزع نيوكليوتيدات من النهاية 3' لجزئ د. ن. أ	دراسة تتابعات قواعد د. ن. أ وعمل خريطة التفاعل بين د. ن. أ والبروتين
٧- λ Exonuclease	نزع نيوكليوتيدات من النهاية 5' لجزئ د. ن. أ	دراسة تتابعات قواعد د. ن. أ DNA sequencing

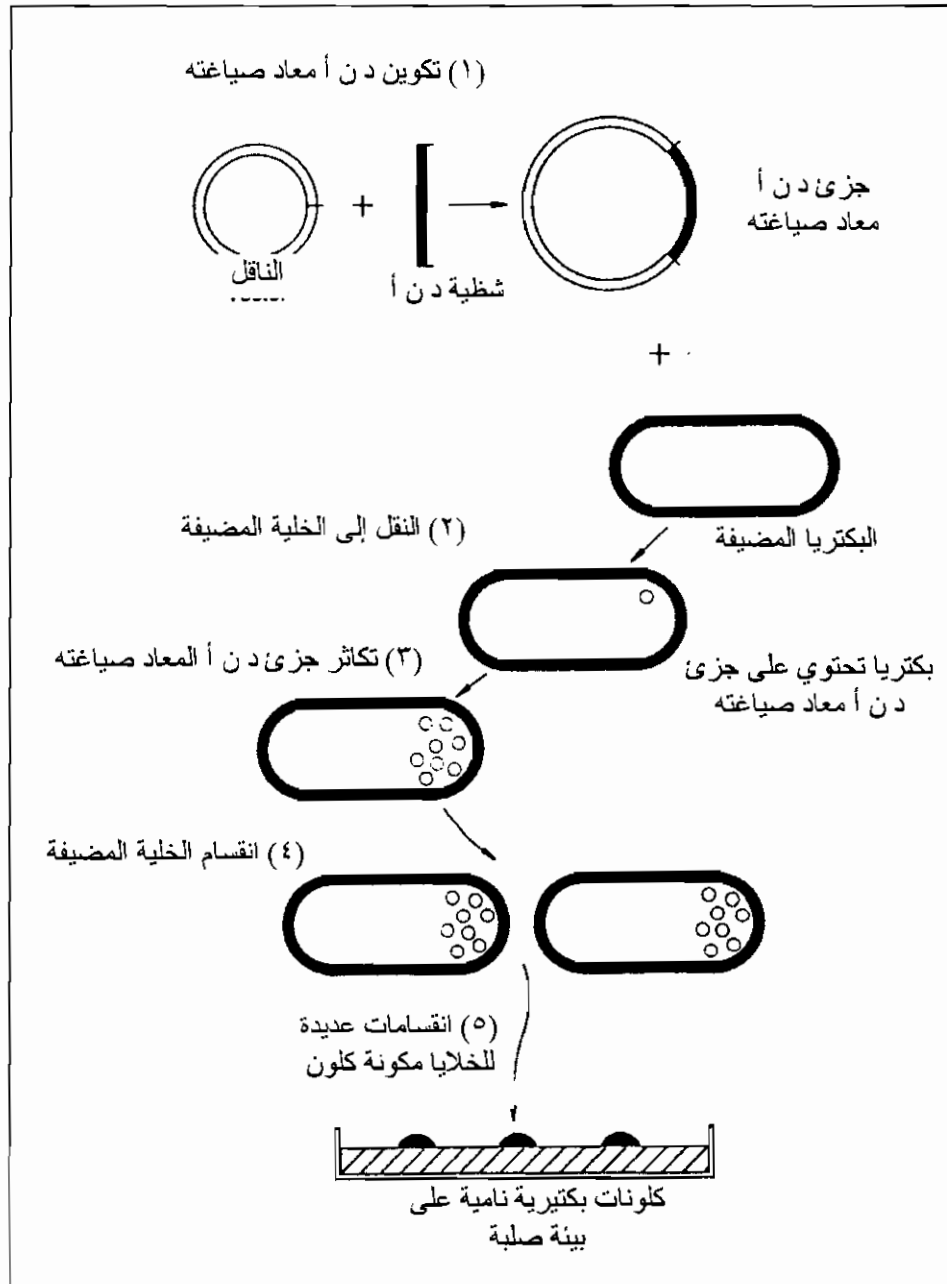
تعلـيم DNA أو RNA بالفوسفور المشع P^{32} .	نقل الفوسفات الطرفية (موقع γ) من ATP الى مجموعات $5'-OH$ فى دن.أ أو ر.ن.أ	Polynucleotide kinase -٨
بناء cDNA من mRNA وفى دراسة خريطة النهاية $5'$ من RNA	بناء DNA على قالب RNA	٩- انزيم النسخ العكسى Reverse Transcriptase
ازالة عروة دبوس الشعر Hairpin فى عملية بناء cDNA وفى دراسة خريطة mRNA (من كلا النهايتين $5'$, $3'$)	هدم دن.أ وحيد السلسلة	١٠- S I nuclease
اضافة ذيل متعدد متجانس Homopolymer (أى مكون من قاعدة واحدة متكررة مثل Poly A) لتكوين نهايات لزجة.	اضافة نيوكليوتيدات إلى النهاية $3'$ من جزئ دن.أ بدون الحاجة إلى قالب دن.أ	Terminal Transferase -١١

الكلونة Cloning:

يمكن تعريف الكلون بأنه عدد كبير من الجزيئات أو الخلايا المتطابقة التى تنشأ من أصل واحد. يمكن عن طريق الكلونة انتاج أعداد كبيرة من جزيئات دن.أ المتماثلة التى يمكن تعريفها وتمييزها أو استخدامها فى أغراض اخرى. تعتمد هذه التقنية على حقيقة أن جزيئات دن.أ الهجينية "الكيميرى" يمكن ادخالها فى ناقلات الكلونة Cloning Vectors التى تكون عادة أما بلازميد بكتيرى أو فاج أو كوزميد Cosmid والذى يستمر بعد ذلك فى التناسخ فى خلية مضيفة Host Cell ولكن تحت تأثير نظم التحكم الخاصة بهم. وبهذه الطريقة يمكن

الحصول على أعداد هائلة من نسخ الجين. وتتلخص الخطوات الأساسية لكلونة الجين Gene Cloning (الشكل ١٢-٣) في الآتي:

- ١- إدخال قطعة أو شظية من د.ن.أ محتوية على الجين المطلوب كلونته في ناقل الكلونة Cloning Vector لا نتاج د.ن.أ معاد صياغته (كيميري) Recombinant DNA.
- ٢- يلعب الناقل دور وسيلة الانتقال لإدخال الجين إلى الخلية المضيفة والتي تكون عادة بكتريا على الرغم من أنه يمكن استخدام خلايا حيية أخرى لاستضافة الجين.
- ٣- يتكاثر الناقل داخل الخلية المضيفة منتجا أعداد كبيرة جداً من النسخ المتطابقة بما في ذلك نسخ من الجين المكلون.
- ٤- عندما تنقسم الخلية المضيفة فإن نسخ من جزيئات د.ن.أ المعاد صياغته Recombinant DNA تمر إلى خلايا النسل حيث يحدث بها تضاعف جديد للناقل.
- ٥- يعد عدد كبير من انقسامات الخلية المضيفة نحصل على كلون Clone (مستعمرة) من الخلايا المضيفة المتطابقة وتحتوي كل خلية في هذا الكلون على نسخة أو أكثر من د.ن.أ المعاد صياغته. ويقال للجين المحمول في الجزيء المعاد صياغته أنه قد تكلون Cloned.



الشكل (١٢-٣): الخطوات الأساسية في عملية كلونة الجين

أنواع ناقلات الكلونة Cloning Vectors:

البلازميدات:

تكون البلازميدات البكتيرية عادة مكونة من جزئ صغير حلقى مزدوج من د.ن.أ والذي تكون وظيفته الطبيعية هي إكساب الخلية المضيفة لصفة المناعة ضد بعض المضادات الحيوية. وللبلازميدات عدة خواص تجعلها مفيدة جدا كناقلات الكلونة. إذ انها توجد كنسخة وحيدة أو عدة نسخ في البكتيريا، وتتناسخ مستقلة عن د.ن. أ البكتيري كما أن تتابع القواعد في جزئ د.ن.أ البلازميد معروف بالكامل مما يتيح معرفة المكان الدقيق لنشاط القطع للانزيم والذي يتم فيه إدخال د.ن.أ المراد اضافته. ويكون البلازميد أصغر بكثير من كروموسوم الخلية المضيفة مما يجعل من السهل عزله منها.

الفاج:

يتكون د.ن. أ الفاج من جزئ خطي من د.ن. أ الذي يمكن فيه ادخال القطع المرغوبة من د.ن. أ الجديد (الاجنبي) في عدة مواقع للقطع الانزيمي المحدد. ويتم تجميع د.ن. أ الهجينى (الكيميرى) بعد أن يستكمل الفاج دورة التحلل للبكتيريا Lytic Cycle وينتج وحدات فاج ناضجة معدية، والميزة الرئيسية للناقلات من نوع الفاج هي أنه بينما يمكن للبلازميد استقبال أو ادخال شظية د.ن. أ بطول حوالى ١-١٠ كيلو قاعدة، فإن الفاج يمكنه استيعاب شظايا د.ن. أ بطول يتراوح بين ١٠-٢٠ كيلو قاعدة ويرجع ذلك إلى أن ما يمكن لحجم رأس الفاج أن تستوعبه يكون محدوداً.

الكوزميد Cosmid:

وهي مجموعة من الناقلات يمكنها أن تستقبل شظايا أطول من د. ن. أ وهي تجمع بين أفضل مميزات البلازميد والفاج معاً.

والكوزميد عبارة عن بلازميد يحتوي على تتابع د.ن.أ تسمى مواقع Cos (Sites) المطلوبة لتعبئة د.ن.أ لامتداد في حبيبة الفاج. وتنمو هذه الناقلات في صورة بلازميد في البكتيريا، ولكن حيث أن معظم د.ن.أ اللامبدا يتم استبعاده فإنه يمكن إدخال قطع أكبر من د.ن.أ الكيميري في رأس الحبيبة الفيروسيّة. ويمكن للكوزميد أن يستوعب قطع د.ن.أ بطول من ٣٥ إلى ٥٠ كيلو قاعدة.

وقد استتبعت مؤخرًا ناقلات كلونة Cloning vectors لديها القدرة على استيعاب شظايا د.ن.أ ذات أحجام أكبر . ومن أهم هذه الناقلات:

الكروموسوم البكتيري الصناعي:

Bacterial Artificial Chromosomes BAC's:

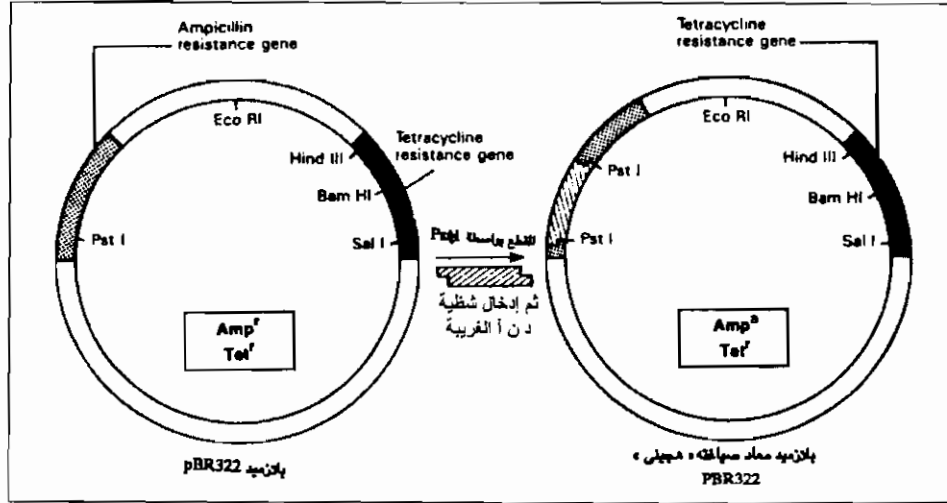
المشتق من بلازميد F. ويمكن لهذا الناقل أخذ شظية د.ن.أ بطول ٣٠٠-٦٠٠ ك قاعدة مما يؤدي إلى خفض عدد كلونات مكتبة الجينوم البشري إلى ٣٠٠٠٠ كلون فقط. كما استتبعت ناقلات تجمع بين مزايا بكتريوفاج P1 وBAC's ويطلق عليها PAC's Derived Artificial Chromosomes P1 وتصل سعة هذا الناقل الى ٣٠٠ ك قاعدة. ومن جهة أخرى امكن تكوين ناقل ذو سعة كبيرة تصل من ٦٠٠-١٢٠٠ ك قاعدة ويطلق عليه Yeast Artifical Chromosome YAC's وهو مشتق من بلازميد بكتريا القولون PBR322 مع إضافة عدد من جينات الخميرة اليه. ويبين الجدول (١٢-٣) مقارنة بين سعة هذه الناقلات.

الجدول (١٢-٣) بعض الناقلات الشائعة الاستخدام في الكثونة

حجم د.ن.أ الذى يمكن ادخاله (kb)	الناقل vector
١٠ - ٠,١	Plasmid pBR 322
٢٠ - ١٠	Lambda Phage 4 A
٥٠ - ٣٥	Cosmids
٦٠٠-٣٠٠	BAC's
١٢٠٠-٦٠٠	YAC's
٣٠٠	PAC's

يمكن أثناء عملية إدخال د.ن.أ إلى منطقة فعالة للناقل Vector أن يحدث تداخل مع عمل أو نشاط هذه المنطقة. ولذلك يجب الحذر من الاخلال بأحد الوظائف الضرورية للناقل. إلا أن هذا المفهوم يمكن استغلاله أيضا للتوصل إلى تقنية انتخابية. إذ يحتوى البلازميد pBR322 مثلا على جين المناعة ضد المضاد الحيوى (Tetracyclin (tet^R، وكذلك الجين الخاص بالمناعة ضد Ampicillin (amp^R) ويستخدم عادة موقع واحد للأنزيم PstI داخل جين المقاومة للامبسلين (amp^R) كموقع إدخال لقطعة من د.ن.أ الغريب. وبالإضافة إلى أن هذا الموقع يحتوى على نهاية لزجة، فإن د.ن.أ المضاف فى هذا الموقع سيحدث خلافاً جين المقاومة للامبسلين مما يؤدي إلى أن تكون الخلية البكتيرية الحاملة لهذا البلازميد حساسة للامبسلين كما فى الشكل (١٢-٤) وبالتالي يمكن التمييز بين البلازميد الأصيلى والبلازميد الهجينى بفقد الأخير لصفة المقاومة للامبسلين مع احتفاظه بالمقاومة للتراسيكلين. ويمكن التأكد من حدوث الإدخال عن طريق معرفة الفرق فى الحجم بين البلازميد الأصيلى والبلازميد الهجينى بطريقة التفريد الكهربى، حيث يكون البلازميد الأخير أكبر حجماً عن الناقل الأصيلى.

وسنتعرض فيما بعد للطرق المختلفة لاختيار الكلون المحتوى على الجين محل الدراسة.



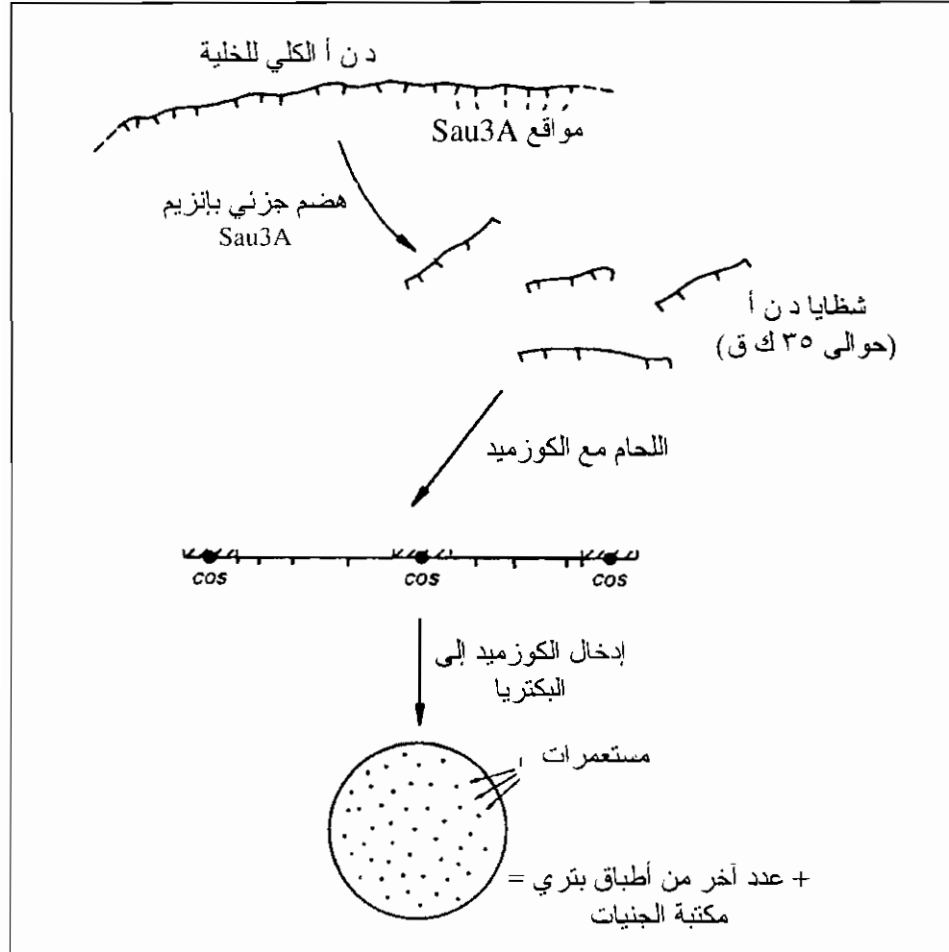
الشكل (٤-١٢): يتم التعرف على البلازميد المعاد صياغته بإدخال شظية د ن أ المرغوبة باستخدام إنزيم PstI مما يحدث خللا في الجين المسئول عن المقاومة للأمبيسلين مما يفقده القدرة على المقاومة لهذا المضاد الحيوى عند تنمية البكتريا فى بيئة محتوية على الأمبسلين

مكتبة د.ن.أ (بنك الجينات) Gene library:

أ- المكتبة الجينومية:

يمكن باستخدام انزيمات القطع المحددة والأنواع المختلفة لناقلات الكلونة تعبئة الجينوم الكامل لكائن ما فى ناقلات. يطلق على المجموعة المكونة من هذه الكلونات المعاد صياغتها اسم المكتبة الجينومية. يمكن تكوين مكتبة جينوم من جميع قطع د.ن.أ. المأخوذة من خط خلايا أو نسيج معين بحيث تكون هناك فرصة لاحتواءها على جميع الجينات الخاصة بهذا الكائن المأخوذة منه.

يتم انتاج مكتبة الجينوم بعزل وتنقية محتوى الخلية من د.ن.أ. بإجراء عملية هضم جزئي لـ د.ن.أ. بإنزيم قطع يتميز بارتفاع معدل نشاطه القطعي مثل Sau3A. والغرض من ذلك هو الحصول على شظايا د.ن.أ. طويلة نسبيا مما يضمن أن معظم الجينات ستكون سليمة ولم يحدث لآى منها أى تجزئة نتيجة القطع (الشكل ١٢-٥).



الشكل (١٢-٥): تكوين مكتبة جينات فى ناقل الكوزميد

ويمكن استخدام الفاج كناقل في مثل هذه المكتبات أو الكوزميد أو YAC أو BAC لأنها تسمح بإدخال شظايا د.ن.أ كبيرة نسبياً (جدول ١٢-٣) وحيث أن الهدف هو الحصول على مكتبة كاملة فإن عدد الشظايا المطلوب يكون متناسباً عكسياً مع حجم الشظية وطردياً مع حجم الجينوم كما في الجدول (١٢-٤).

الجدول (١٢-٤) عدد الكلونات Clones اللازمة لتكوين المكتبة الجينومية لمجموعة من الكائنات

النوع Species	حجم الجينوم (bp)	عدد الكلونات اللازمة		
		شظايا ١٧ ك قاعدة (١)	شظايا ٣٥ ك قاعدة (٢)	شظايا ٣٠٠ ك قاعدة (٣)
بكتريا القولون	4.6×10^6	٨٢٠	٤١٠	٤١
خميرة الخباز	1.8×10^6	٣٢٢٥	١٥٠٠	١٥٠
حشرة الدروسفلا	1.2×10^8	٢١٥٠٠	١٠٠٠٠	١٠٠٠
الإنسان	3.2×10^9	٥٦٤٠٠٠	٢٧٤٠٠٠	٣٠٠٠٠
الضفدع	2.3×10^9	٤٠٥٣٠٠٠	١٩٦٩٠٠٠	١٩٦٩٠٠
الأرز	5.7×10^8	١٠٠٠٠٠	٤٩٠٠٠	٤٩٠٠

* محسوبة على أساس احتمال $P=95\%$ أن أي جين معين سيكون موجود في المكتبة. (١) باستخدام λ فاج كناقل للكلونه. (٢) باستخدام الكوزميد كناقل للكلونه. (٣) باستخدام BAC's كناقل للكلونه.

تمثل الأعداد المذكورة في الجدول عدد شظايا د.ن.أ (كلونات مستقلة) اللازمة للوصول إلى احتمال ٩٥% لإمكان الحصول على تتابع معين من د.ن.أ في مكتبة د.ن.أ المعاد صياغته بمتوسط طول الشظية المدخلة 2×10^6 نيوكليوتيدة. يرجع الاختلاف في العدد إلى اختلاف عدد الجينات التي يحملها كسل كائن ممثل في الجدول وتحسب عدد الكلونات اللازمة من المعادلة:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

حيث P تمثل الاحتمال المطلوب و f تمثل الجزء من الجينوم الكامل فى الكلون الواحد؛ وعلى سبيل المثال فى حالة مكتبة جينوم الإنسان المذكورة فى الجدول أعلاه، وعلى اعتبار أن هناك 3×10^9 نيوكلييدة فى الجينوم الاحادى فتكون :

$$N = \frac{\ln(1 - 0.99)}{\ln \left(1 - \left(\frac{2 \times 10^4}{3 \times 10^9} \right) \right)}$$

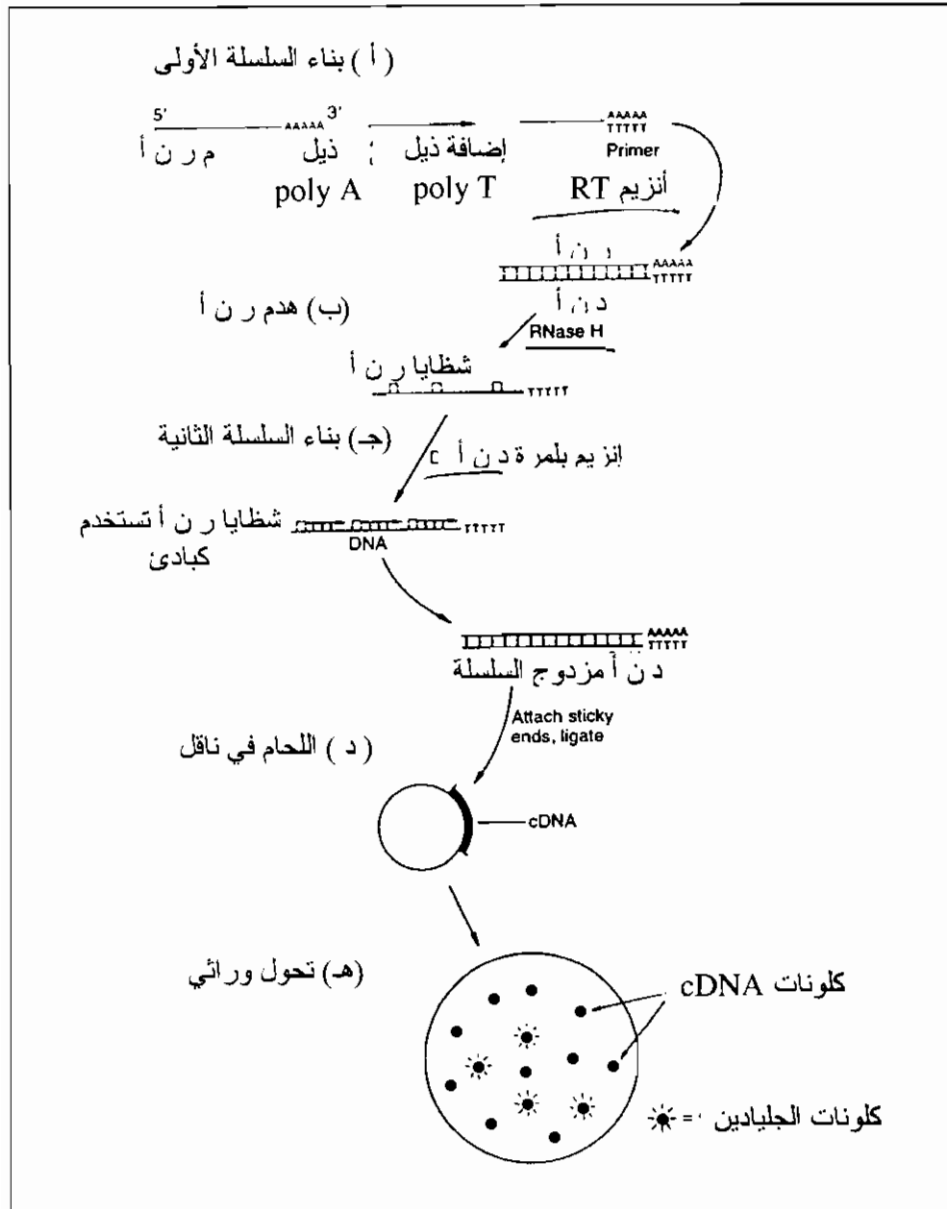
وميزة تكوين مكتبة مكونة من شظايا د.ن.أ طويلة نسبياً تبدو واضحة اذا قورنت بنتائج المعادلة أعلاه فيما إذا كان حجم شظايا د.ن.أ بحجم أقل أى 5×10^3 بدلاً من 2×10^4 .

وعلى ذلك فإن مكتبة الجينوم البشرى المحتوى على 10^6 شظية د.ن.أ معاد صياغتها بطول كبير نسبياً (2×10^4) ستصل فرصة الحصول عليها كاملة الى 99% وبالتالى فإن احتمال الحصول على جين وحيد النسخة سيكون مرتفعاً.

يطلق على هذه الطريقة اسم طريقة Shotgun أى أننا فى قطع جميع الجينوم بحثاً عن الجينات المرغوبة كمن يصوب بالبندقية على هدف غير معلوم. كما أن هذه التقنية تستغرق وقتاً طويلاً وعملاً متصلاً والنتيجة قد لا تكون مضمونة اذ قد نحصل على شظايا لا شفرية كثيرة ضمن الأعداد الهائلة من الشظايا الموجودة فى مكتبة الجينوم.

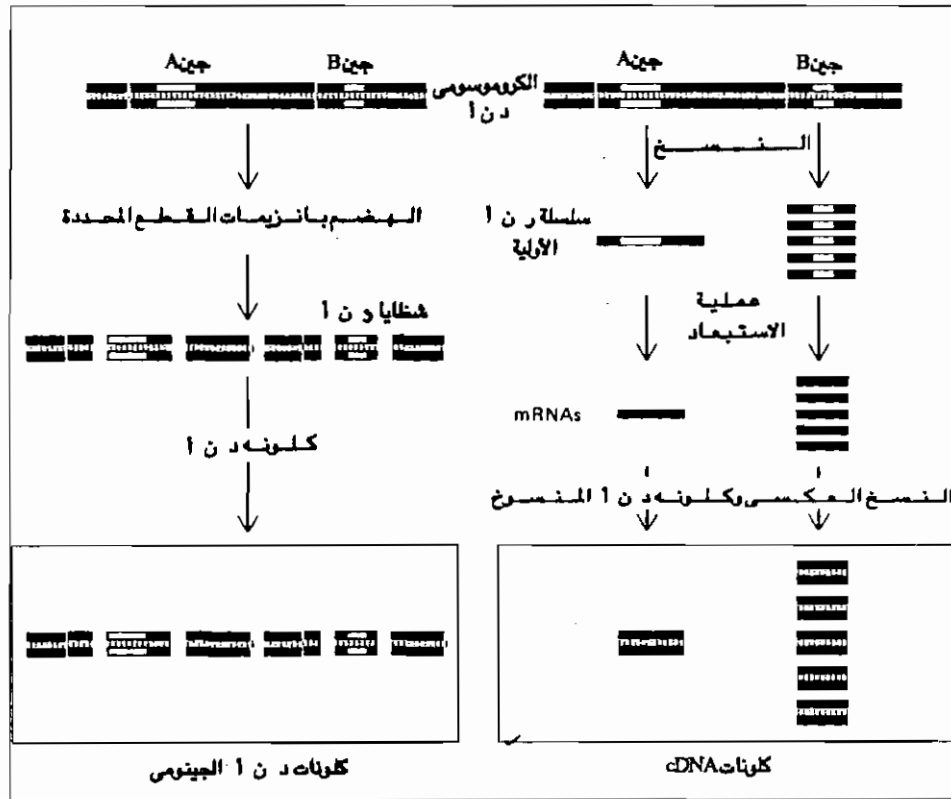
ب- مكتبة cDNA:

وتعتمد على تقنية متخصصة تعتمد على كلونة د.ن.أ المنسوخ cDNA. حيث يقتصر الاختيار على تلك التتابعات من د.ن.أ التي يمكن نسخها إلى ر.ن.أ والتي يفترض أنها تمثل جينات معينة. ويحدث ذلك عن طريق استخلاص mRNA من الخلايا المتخصصة في إنتاج بروتين معين بكميات كبيرة حيث تزداد نسبة mRNA النوعي الذي يشفر لهذا البروتين (راجع gene-in site و gene-in time في الفصل الحادي عشر). ثم يتم إنتاج نسخ من د.ن.أ المنسوخ Complementary DNA (cDNA) على قالب من ر.ن.أ المراسل mRNA باستخدام انزيم النسخ العكسي Reverse Transcriptase. ويتم تحويل جزيئات د.ن.أ الوحيدة السلسلة الناتجة إلى جزيئات مزدوجة بفعل انزيم بلمرة د.ن.أ، DNA Poly I. ثم يتم بعد ذلك ادخال هذه الجزيئات إلى البلازميد ثم تجرى عملية الكلونة كما في الشكل (١٢-٦).



الشكل (١٢-٦): إحدى الطرق الممكنة لكتونة cDNA
Poly A = أدينوسين متعدد ، أولجو d.T = متعدد الثايميدين

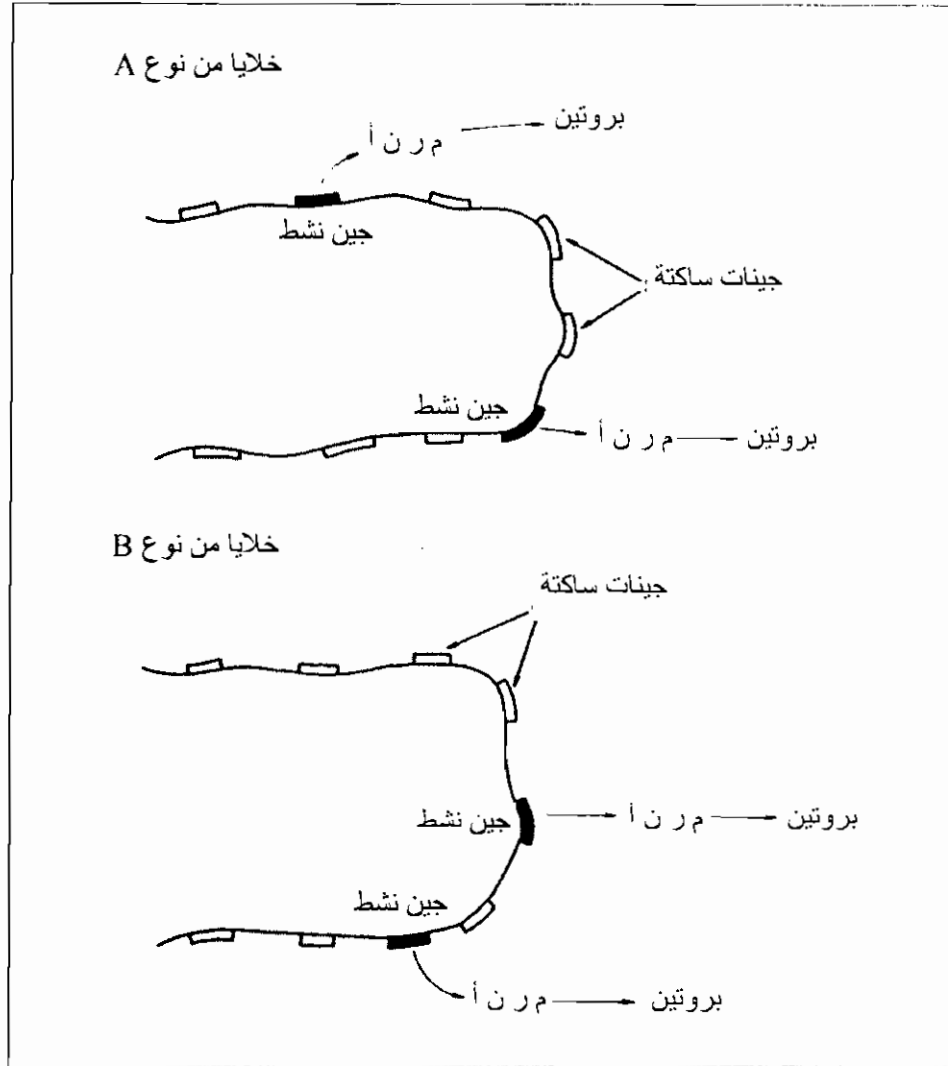
يسمى كل كلون متحصل عليه بهذه الطريقة كلون د.ن. أ المنسوخ
cDNA، في حين تسمى المجموعة الكاملة للكلونات المشتقة من تحضير أحد
أنواع mRNA مكتبة د.ن. أ المنسوخ cDNA Library. وهناك فرق هام بين
كلونات د.ن. أ الجينوم وكلونات د.ن. أ المنسوخ كما هو موضح في الشكل
(٧-١٢).



الشكل (٧-١٢): شكل تخطيطي للفروق بين كلونات د ن أ المنسوخ cDNA وكلونات
د ن أ الجينومي. يتم نسخ الجين A بتكرار منخفض في حين يتم نسخ الجين B بتكرار مرتفع

إذ نجد أن كلونات الجينوم تمثل عينة عشوائية من جميع تتابعات د.ن.أ. في كائن ما، وفيما عدا حالات استثنائية نادرة، ستكون متشابهة بصرف النظر عن طراز الخلية المستخدم في استخلاصها، بعكس الحال في كلونات د.ن.أ. المنسوخ cDNA إذ أنها ستحتوى فقط على تلك المناطق من الجينوم التى تم نسخها الى mRNA وحيث أن خلايا الأنسجة المختلفة تكون عادة متخصصة لإنتاج أنواع معينة من جزيئات mRNA النوعى فإن مكتبة د.ن.أ. المنسوخ ستختلف بالطبع حسب أنواع ووظائف الخلايا المستخدمة لتحضير المكتبة (الشكل ١٢-٨).

توجد عدة مميزات لاستخدام مكتبة د.ن.أ. المنسوخ cDNA لكلونة الجينات. أولاً: أن كثير من البروتينات يتم إنتاجها بكميات كبيرة جداً بواسطة الخلايا المتخصصة، مما يعنى أن mRNA الذى تنتجه هذه الخلايا للترجمة لهذه البروتينات سيكون وفيراً لدرجة أن مكتبة cDNA المحضرة من الخلايا ستكون غنية جداً في جزيئات د.ن.أ. المنسوخ cDNA الذى يشفر للبروتينات النوعية كما في الشكل (١٢-٧). أن وفرة cDNA المرغوب فيه في المكتبة يقلل بشكل كبير مشكلة التعرف على الكلون المرغوب في المكتبة. فعلى سبيل المثال نجد أن الهيموجلوبين ينتج بكميات كبيرة في خلايا الدم الحمراء ولهذا السبب فإن جينات الجلوبيين كانت من بين أول الجينات التى تمت كلونتها.



الشكل (١٢-٨): إختلاف تعبير الجينات بإختلاف نوعيات الخلايا

والميزة الثانية لكلونات cDNA أنها تحتوى على التتابعات الشفرية فقط Exons بدون الانترونات، وعلى ذلك فإذا كان الهدف من الكلونة هو التوصل

الى تتابع الاحماض الأمينية للبروتين من تتابع القواعد فى د.ن.أ الموازى أو لانتاج البروتين بكميات كبيرة عن طريق دفع الجين المكلون إلى التعبير فى خلية البكتريا أو الخميرة، فإنه من الأفضل أن نبدأ باستخدام cDNA لأن البكتريا أو الخميرة ليس باستطاعتها اجراء عملية استبعاد الانترونات مما يسبب مشكلة عند استخدام الكلون الجينومى.

تعتبر مكتبات الجينوم ومكتبات د. ن. أ المنسوخ (cDNA) مصادر هامة للاستخدام فى البحوث ويتوفر العديد منها حالياً من مصادر تجارية.

تكوين مكتبة د. ن. أ. المنسوخ من جزيئات منتخبة من mRNA:

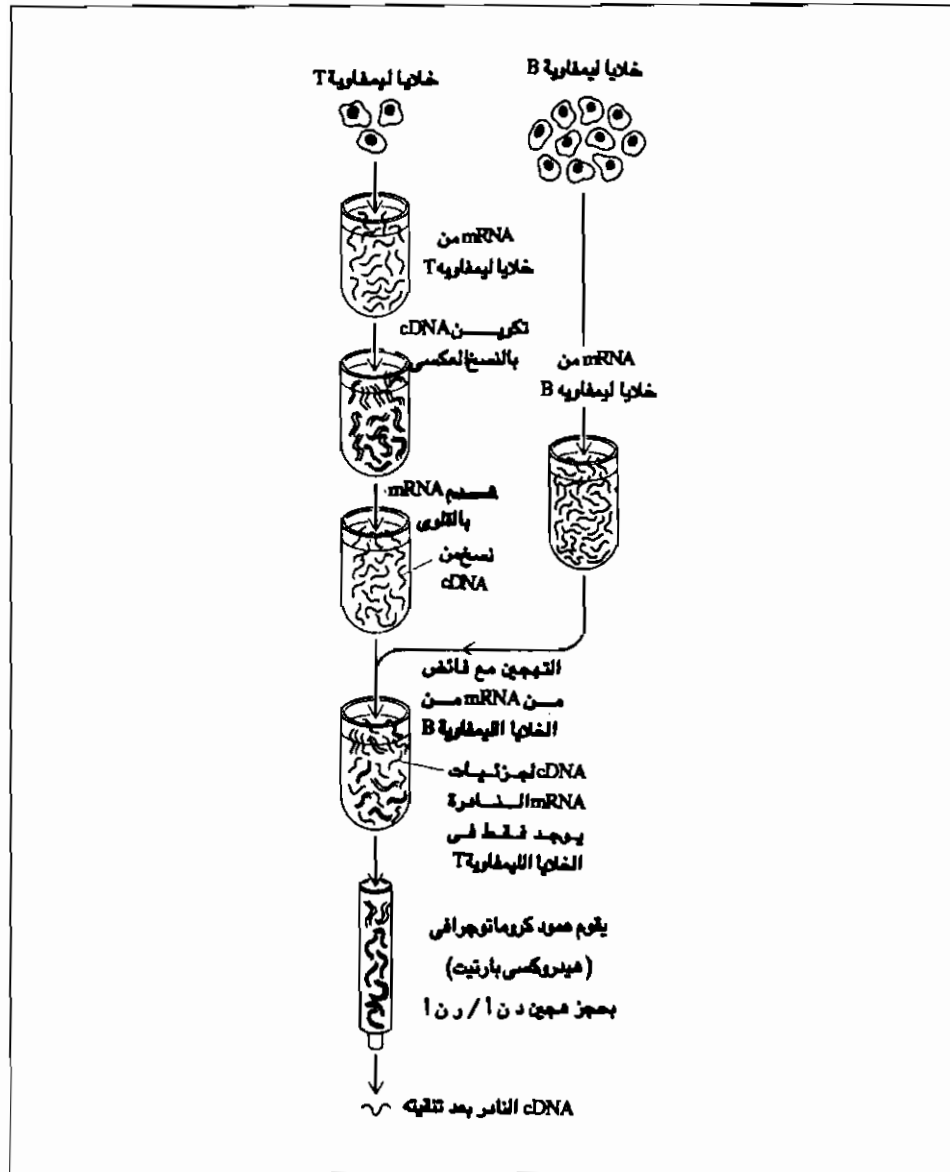
عندما يتم تحضير cDNA من خلايا يكون فيها تعبير الجين المرغوب عالياً جداً فإن غالبية كلونات cDNA يتوقع أن تحتوى على تتابع الجين المرغوب هذا، مما يعطى فرصة للحصول عليه بإقل جهد ممكن وبدرجة عالية من الكفاءة. أما فى حالة الجينات الأقل درجة فى معدل النسخ فتوجد عدة طرق يمكن استخدامها للأكثر من جزيئات mRNA النوعى قبل تكوين مكتبة cDNA فعلى سبيل المثال إذا توفر جسم مضاد للبروتين المستهدف فإنه يمكن استخدامه للترسيب الموجه لتلك البوليريبيوسومات المحتوية على سلاسل متعدد الببتيد المرغوبة.

وحيث أن تلك البوليسومات ستحتوى أيضاً على mRNA الذى يشفر لذلك البروتين فإنه يمكن أكثر جزيئات mRNA المرغوبة إلى أكثر من ألف ضعف.

وهناك طريقة بديلة أعلى كفاءة لإكثار أى تتابع نيوكليدي معين قبل انتاج كُنونات cDNA ويسمى التهجين الطرحى, Subtractive Hybridization يمكن استخدام هذه الطريقة إذا توفر نوعان متقاربان بشدة من طرز الخلايا من نفس الكائن ولكن أحد الطرازين فقط ينتج البروتين المرغوب. وقد استخدمت هذه الطريقة لأول مرة لمعرفة بروتينات مستقبلات سطح الخلية الموجودة على الخلايا T الليمفاوية (ليمفوسايت) T-Lymphocytes وليست تلك الموجودة على B-Lymphocytes ويمكن استخدامها أيضاً في الخلية التي يتم فيها تعبير اليل إلى بروتين.

في حين لا يحدث أى تعبير للأليل الطافر في نفس الخلية، وتكون أول خطوة هي بناء cDNA باستخدام mRNA من طراز الخلية الذي ينتج البروتين المرغوب. ثم يتم تهجين هذه الجزيئات من cDNA مع كمية وفيرة من جزيئات mRNA المستخلصة من الطراز الخلوي الآخر.

يتم التعرف على تلك التتابعات من cDNA النادرة التي تفشل في العثور على جزيئات مكملية من mRNA للتمازج معها والتي تمثل في الغالب تتابعات mRNA الموجودة فقط في الطراز الأول من الخلايا. يتم فصل هذه التتابعات غير المتزاوجة وتنقيتها بطرق بيوكيماوية معينة والتي تتضمن فصل الأحماض النووية وحيدة السلسلة عن مزدوجة السلسلة كما في الشكل (٩-١٢).

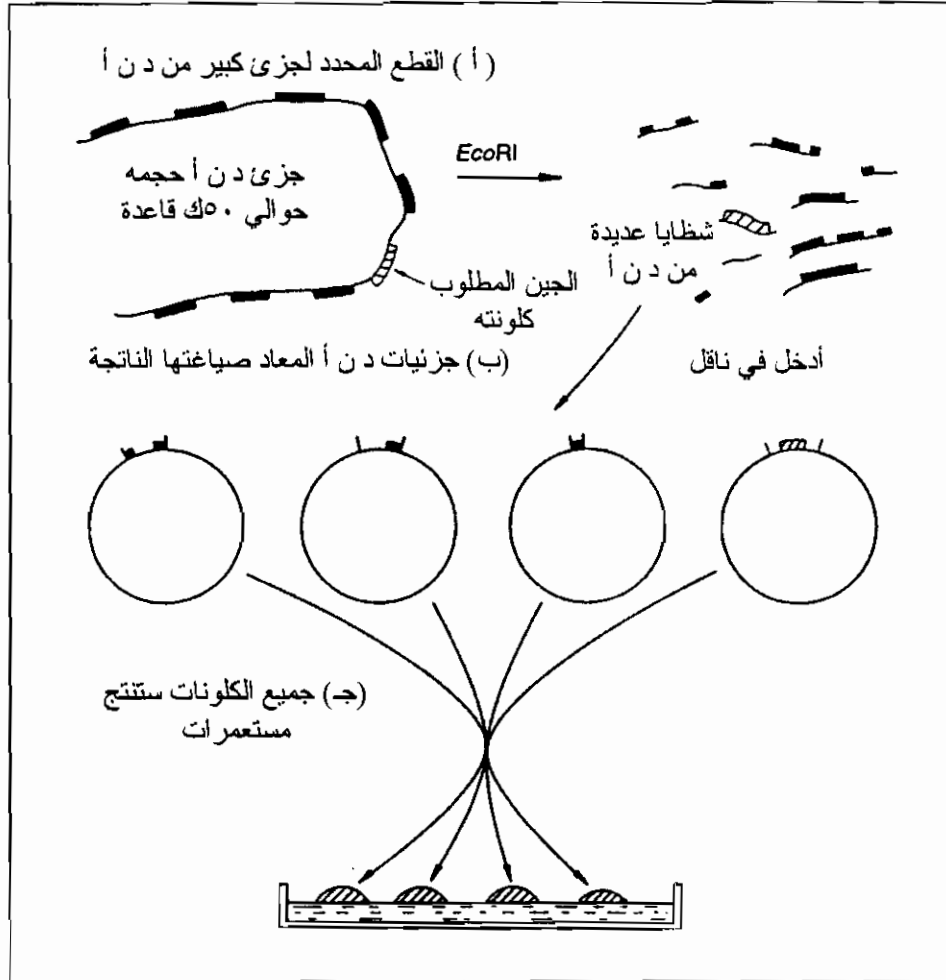


الشكل (٩-١٢): استخدام طريقة التهجين الطرحي لتنقية الكولونات النادرة من cDNA التي يوجد لها mRNA في الخلايا الليمفاوية من النوع T و لكن ليس من النوع B

للتعرف على الكلون المحتوى على الجين المرغوب يتم نقل Blotting أطباق المزرعة المحتوية على المستعمرات البكتيرية النامية على قطعة من ورق الترشيح التي تلتصق بها بعض المستعمرات البكتيرية. يتم معاملة المستعمرات الملتصقة والتي تعرف بالنسخ المطابقة Replicas.

طرق الحصول على كلون مرغوب من مكتبة الجينات:

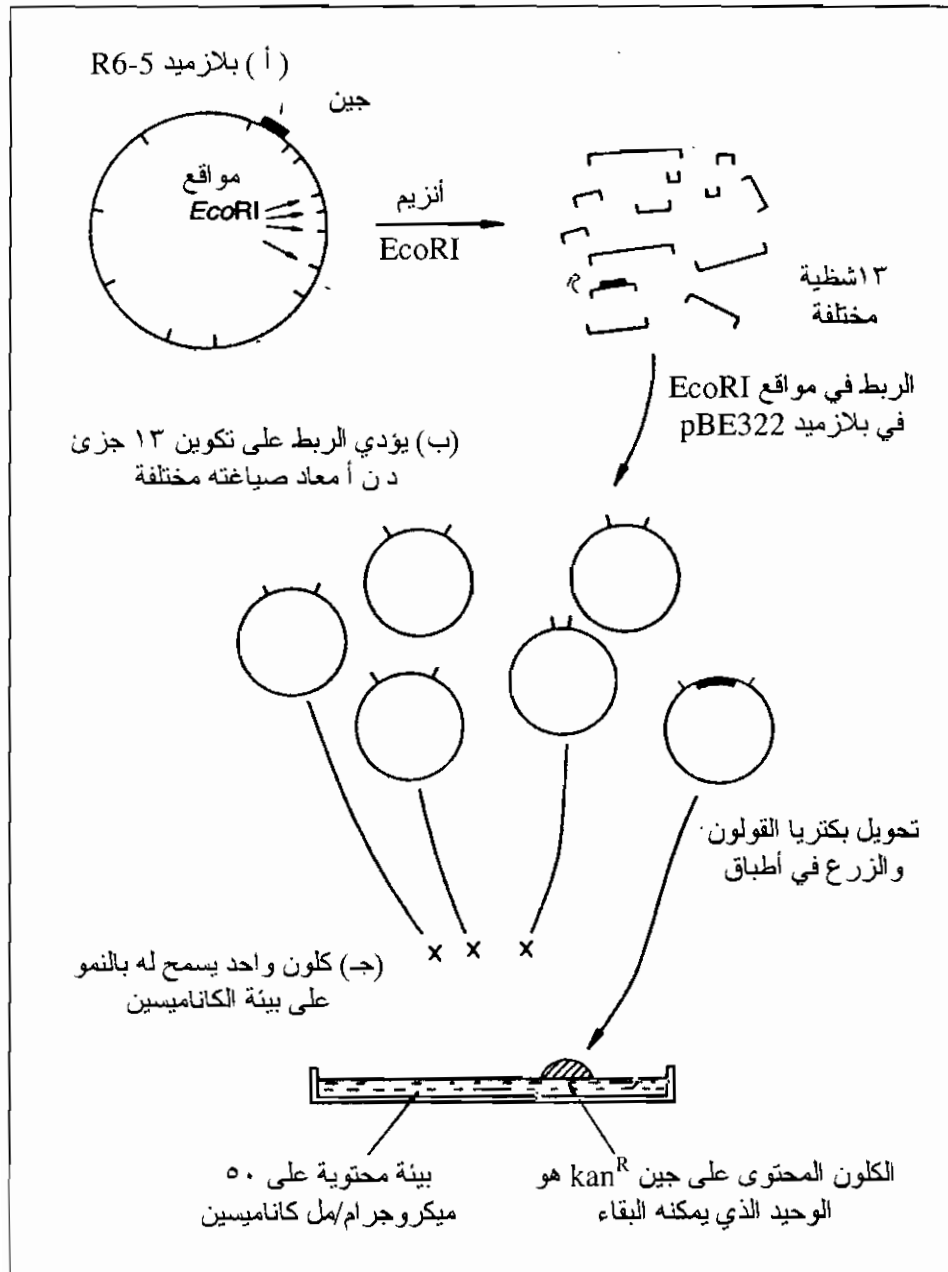
أن أهم مشكلة في عملية كلونة الجين تتركز في التعرف على المجموعات النادرة من الكلونات التي تحتوى على شظية د.ن.أ المحتوى على الجين المرغوب (الشكل ١٢-١٠) وتكون هذه المشكلة أشد صعوبة بصفة خاصة فى مكتبة الجينوم حيث قد يقتضى الأمر ضرورة التعرف على خلية واحدة بكتيرية من بين مليون خلية بحيث تكون محتوية على جين بشرى معين.



الشكل (١٠-١٢): مشكلة الإنتخاب

وتوجد طريقتين أساسيتين للحصول على الكلون المرغوب:

- ١- الانتخاب المباشر للجين المرغوب direct selection بمعنى أنه يتم تصميم التجربة بحيث تكون الكلونات المتحصل عليها هي فقط المحتوية على الجين المطلوب كما في الشكل (١١-١٢).

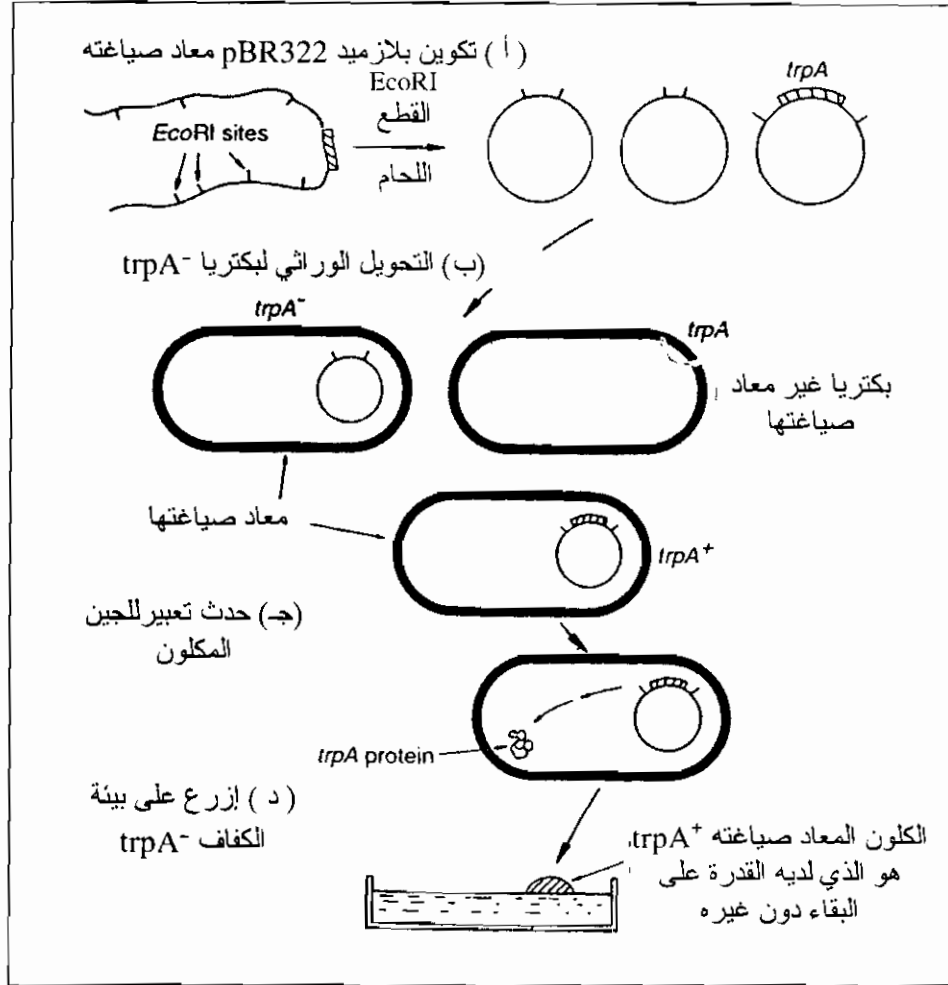


الشكل (١٢-١١): الانتخاب المباشر لكلونة جين المقاومة للكاناميسين (Kan^R) في بلازميد R6-5

حيث يتم الانتخاب للكلون المحتوى على جين المقاومة للكاناميسين فقط وذلك بتميمته على بيئة أجار تحتوى على هذا المضاد الحيوى. إلا أن هذا الطريقة تقتصر على الانتخاب لجينات المقاومة للمضادات الحيوية.

٢- استخدام طريقة معدلة فيما يسمى بطريقة Marker-Rescue للانتخاب لأحد الجينات المسؤولة عن كثير من انزيمات البناء الحيوى Biosynthetic Enzymes. مثل تحديد الكلون المحتوى على جين *trpA* (الشكل ١٢-١٢) إلا أن هناك بعض المحددات لهذه الطريقة حيث تتطلب وجود سلالة بكتيرية طافرة للجين المطلوب الكشف عنه ($TrpA^-$) بالإضافة إلى ضرورة توافر بيئة الكفاف التى يمكن للطراز الوحشى لهذا الجين فقط أن ينمو عليها.

إلا أن هاتين الطريقتين تصلحان فقط للتعرف على كلونات الجينومات الصغيرة لغير مميزة النواة مثل بكتريا القولون ولكنها تكون قاصرة عن أداء هذا الدور فى حالة الكائنات الراقية مميزة النواة والتى يكون جينومها موزعاً فى عشرات الالاف من الكلونات.



الشكل (١٢-١٢): الإختاب المباشر لجين $trpA^+$ المكلون في بكتريا القولون الطافرة للزيتوفان ($trpA^-$)

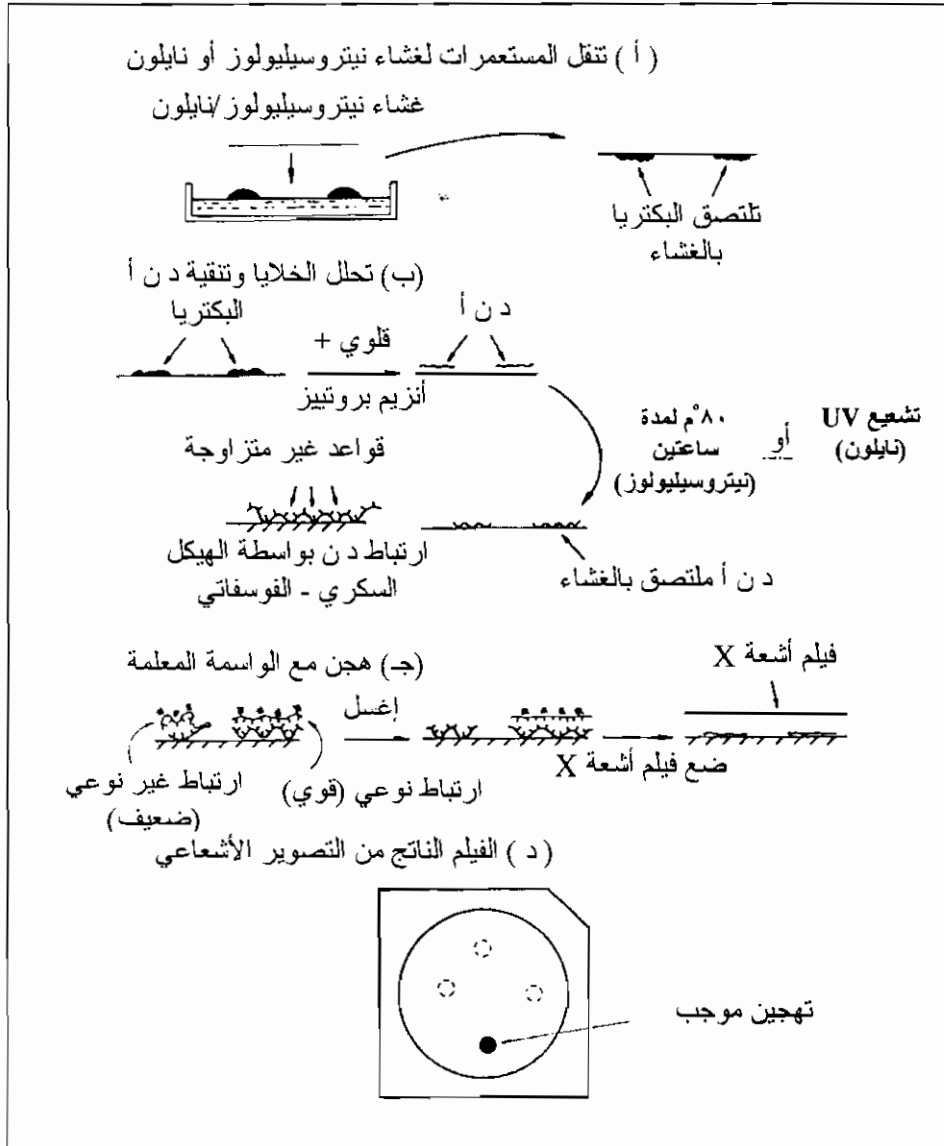
تحديد وعزل كلون من مكتبة الجينات:

Identification of a Clone From a Gene Library :

تستخدم تقنية التهجين بالواسمات (المشعة) Hybridization Probing بحيث

يمكن بهذه التقنية التعرف على الكلونات الهجينية في المستعمرات البكتيرية

لمكتبة الجينات مباشرة بطريقة *In Situ Probing* أى التنقيب فى الموقع كما فى الشكل (١٢-١٣).

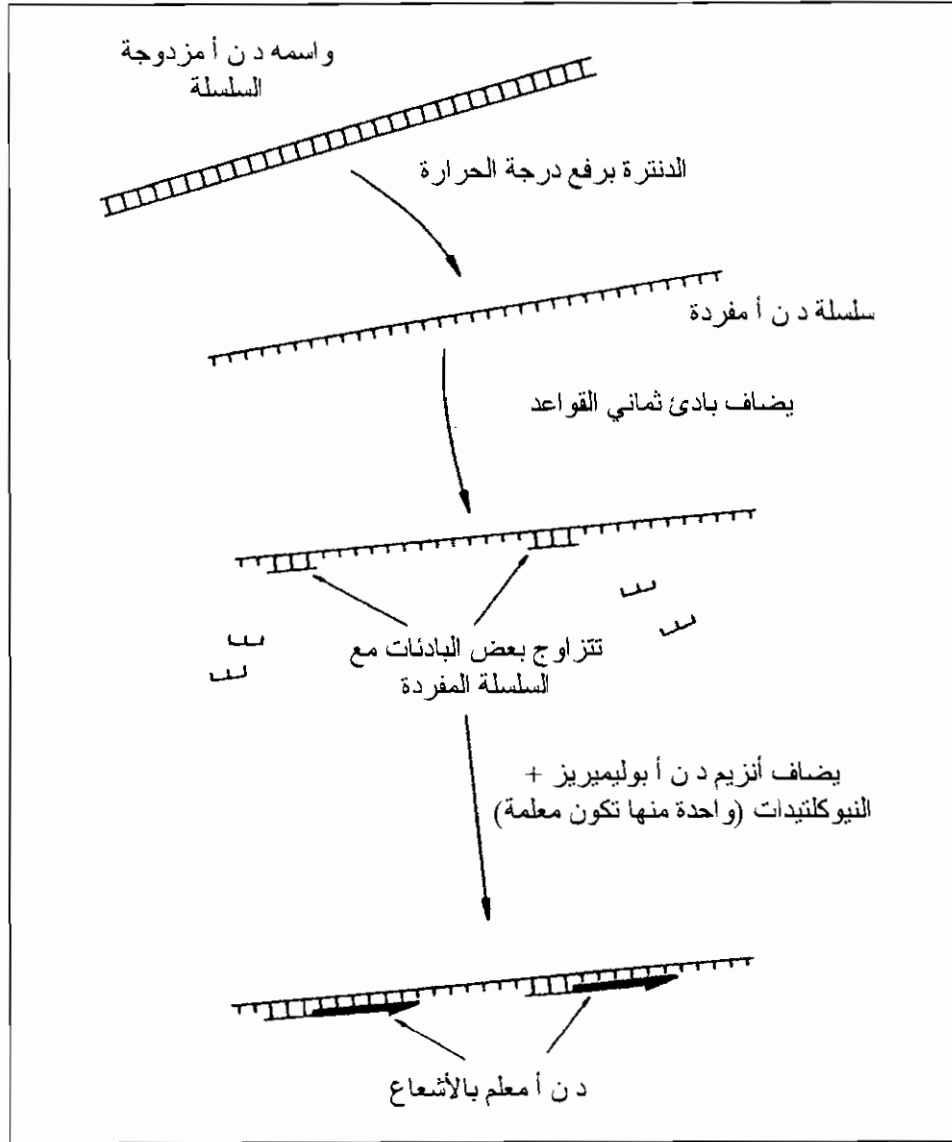


الشكل (١٢-١٣): تهجين المستعمرات بالواسمة المعلمة بالإشعاع

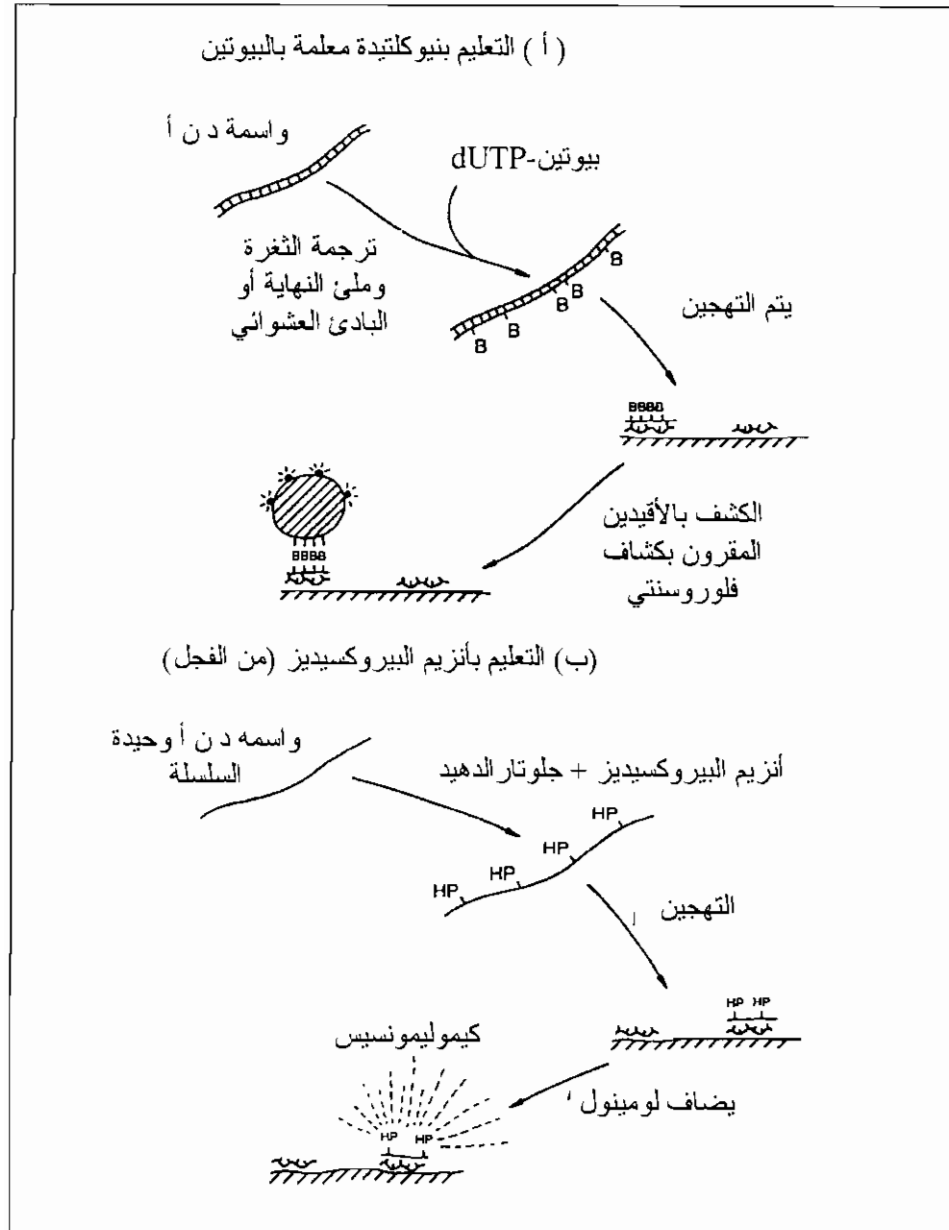
ويتم ذلك بأن تنقل أولاً المستعمرات البكتيرية إلى غشاء من النيتروسليلوز أو النايلون ثم يعامل الغشاء بانزيم Protease ومحللول قلوى للتخلص من المكونات غير النووية وتؤدي هذه المعاملات أيضا إلى دنترنة دن.أ وكسر الروابط الهيدروجينية بين سلسلتى دن.أ ويبقى دن.أ وحيد السلسلة فقط على الغشاء والذي تتم معاملته حراريا، فى حالة غشاء النيتروسليلوز على درجة ٨٠ م لمدة ساعتين أو بالتعرض للأشعة فوق البنفسجية UV فى حالة غشاء النايلون. والغرض من ذلك تثبيت دن.أ على الغشاء ، بحيث يكون دن. ن. أ ملتصقا بالغشاء عن طريق الهيكل السكرى الفوسفاتى فى حين تكون القواعد حرة لكى تتزاوج مع الواسمات المشعة وهذه الأخيرة تتم دنترتها وتضاف إلى الغشاء فى محللول كيماوى يساعد على التهجين بين قواعد الواسمه والقواعد المكملة فقط فى دن.أ المثبت. وبعد فترة يغسل الغشاء للتخلص من الواسمات غير المرتبطة ويتم تحديد مكان الواسمه المرتبطة بالتصوير بالأشعاع الذاتى .Autoradiography

الواسمات Probes:

هى عبارة عن جزيئات أوليجو دن.أ مكونه من عدد محدود من النيوكليوتيدات (١٨-٢٠ نيوكليوتيدة) ذات تتابعات نوعية Specific مكملة لتتابع محفوظ فى جين معين بحيث يتم التجاذب بينهما فقط. ويتم تعليم Labeling هذه الواسمات أما بالأشعاع بإضافة الفوسفور المشع ^{32}P (الشكل ١٢-١٤) إلا أن الباحثين اتجهوا مؤخرا إلى استخدام طرق تعليم Labelling لا تستخدم المواد المشعة تلافيا للأخطار التى قد تنجم من استعمالها ومشاكل التخلص من النفايات المشعة لذلك استخدمت لهذا الغرض طريقتين كما فى الشكل (١٢-١٥).



الشكل (١٢-١٤): تعليم دن أ بالإشعاع بطريقة البادئ Priming ثمانى القاعدة العشوائى. يكون مخلوط البادئ العشوائى معقد بحيث يحتوى على بعض الجزيئات التى يمكنها أن تتزاوج مع الواسمة



الشكل (١٢-١٥): طريقتان لتعليم الواسمات بدون إشعاع

وتعتمد الطريقة الأولى على استخدام نيوكليوتيدات ثلاثي فوسفات ديوكسي يوريدين (dUTP) والتي يتم ارتباطها بالتفاعل مع البيوتين Biotin وهو جزيء يتفاعل بقوة مع بروتين الافيدين Avidin. وبعد التهجين في الموضع يمكن تحديد مواقع الواسمة المرتبطة بإضافة الافيدين المتفاعل مع كاشف فلورسنت.

أما الطريقة الثانية فتعتمد على تكوين معقد من الواسمة وأنزيم البيروكسيداز Horseradish Peroxidase ثم يتم الكشف عن موقع تهجين الواسمة مع الجين عن طريق قابلية الانزيم لتحليل مادة لومينول Luminol بحيث تطلق اشعاعات Chemiluminescence.

ويمكن تسجيل الاشارات المنبعثة على فيلم تصوير عادي بطريقة مشابهة للتصوير بالاشعاع الذاتي Autoradiography.

تصميم الواسمات : Design of Probes

وكما سبق القول فإن تتابع الواسمة لابد أن يكون مكملًا للتتابع المحفوظ لجزء من الجين المكلون حتى يمكن أن يحدث Hybridization Probing. ولكن يحدث أحيانا كثيرة أن الجين نفسه غير معروف أو غير متوفر وخاصة إذا كان الهدف من التجربة هو إيجاد كلون له.

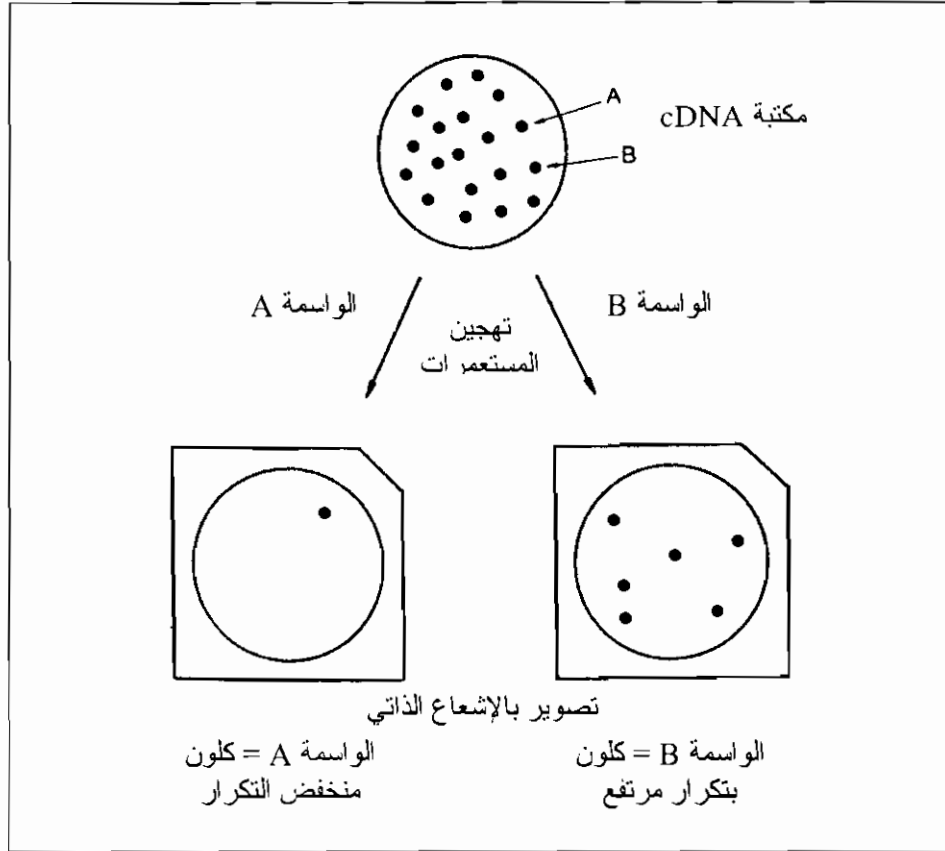
ويعتمد استنباط الواسمات على حسب المعلومات المتوفرة عن الجين المرغوب وهناك ثلاث احتمالات :

١- عندما يعطى الجين تعبيراً قوياً في نوع معين من الخلايا فيتم تكوين مكتبة cDNA.

- ٢- عندما يكون تتابع الاحماض الامينية فى سلسلة متعدد الببتيد التى يشفر لها الجين معروفاً كلياً أو جزئياً.
- ٣- عندما يكون الجين ضمن مجموعة جينات متقاربة الوظيفة Multigene Family.

أولاً: استنباط الواسمات بالاستعانة بمكتبة cDNA:

تعتمد هذه الطريقة على مبدأ الوفرة ضد الندرة . Abundancy VS Scarcity فعند تكوين مكتبة cDNA من حبوب القمح مثلاً فإنه نظراً لأن البروتين الرئيسى الموجود اثناء نمو الجنين فى حبه القمح سيكون من نوع بروتين الجليادين gliadin فإننا نتوقع الحصول على نسبة عالية من نسخ ر.ن.أ الجليادين. ويتم التعرف على كلونات جين الجليادين باستخدام جميع كلونات cDNA من المكتبة كل على حدة كواسمة لجميع أفراد الكلونات الأخرى فى المكتبة (الشكل ١٢-١٦). يتم اختيار كلون بطريقة عشوائية ويتم تنقية د.ن.أ المعاد صياغته فى هذا الكلون (Insert) ويعلم Labelled ويستخدم كواسمة لبقية الكلونات فى المكتبة ويكرر ذلك باستخدام كلونات اخرى كواسمات إلى أن نحصل على الكلون الذى يتجهج مع نسبة كبيرة من كلونات المكتبة. ويعد هذا الكلون الوفير من Abundant cDNA Clone بمثابة Clone محتمل للجليادين ويجرى تحليله بالتفصيل (عن طريق تحليلات تتابعات د.ن.أ وعزل نواتج الترجمة) حتى يمكن التأكد من هويته.



الشكل (١٦-١٢): البحث بالتهجين في مكتبة جينات (cDNA) للتعرف على كلون متوفر في المكتبة بتكرار عال

ثانياً: استنباط الواسمات عندما تكون تتابعات الأحماض الأمينية للبروتين الذي يشفر له الجين معروفة كلياً أو جزئياً:

وفي هذه الحالة يمكن استخدام قاموس الشفرة الوراثية Genetic Code للتنبؤ بالتتابع النيوكليوتيدي للجين المقابل. ويعد هذا التنبؤ تقريبي نظراً لأنه، فيما عدا الميثيونين والتربتوفان اللذين يمثل كل منهما بكودون واحد فقط، نجد

أن جميع الأحماض الأمينية الأخرى يشفر لكل منها إثنين أو أكثر من الكودونات، فمثلاً حامض الالانين يشفر له بأربعة كودونات وهي GCA, GCT, GCG, GCC، بحيث تكون نيوكليتين GC مشتركة في الكودونات الأربعة.

وكمثال لتوضيح كيفية إجراء هذه التنبؤات، سنأخذ بروتين السييتوكروم Cytochrome C الذي يلعب دوراً هاماً في السلسلة التنفسية Respiratory Chain لجميع الكائنات الهوائية التنفس Aerobic، ويبين الشكل (١٢-١٧) تتابع الأحماض الأمينية لبروتين السييتوكروم في الخميرة. ويحتوي هذا التتابع على منطقة تبدأ من الحامض الأميني رقم ٥٩ التي تتكون من Trp- Asp- Glu- Asn- Met Asn- وبمعلومية قاموس الشفرة الوراثية نجد أن هذه الببتيدية السادسة يشفر لها بالاتي:

TGG – GAC^TC – GAC^AC – GAAC^TC – ATG

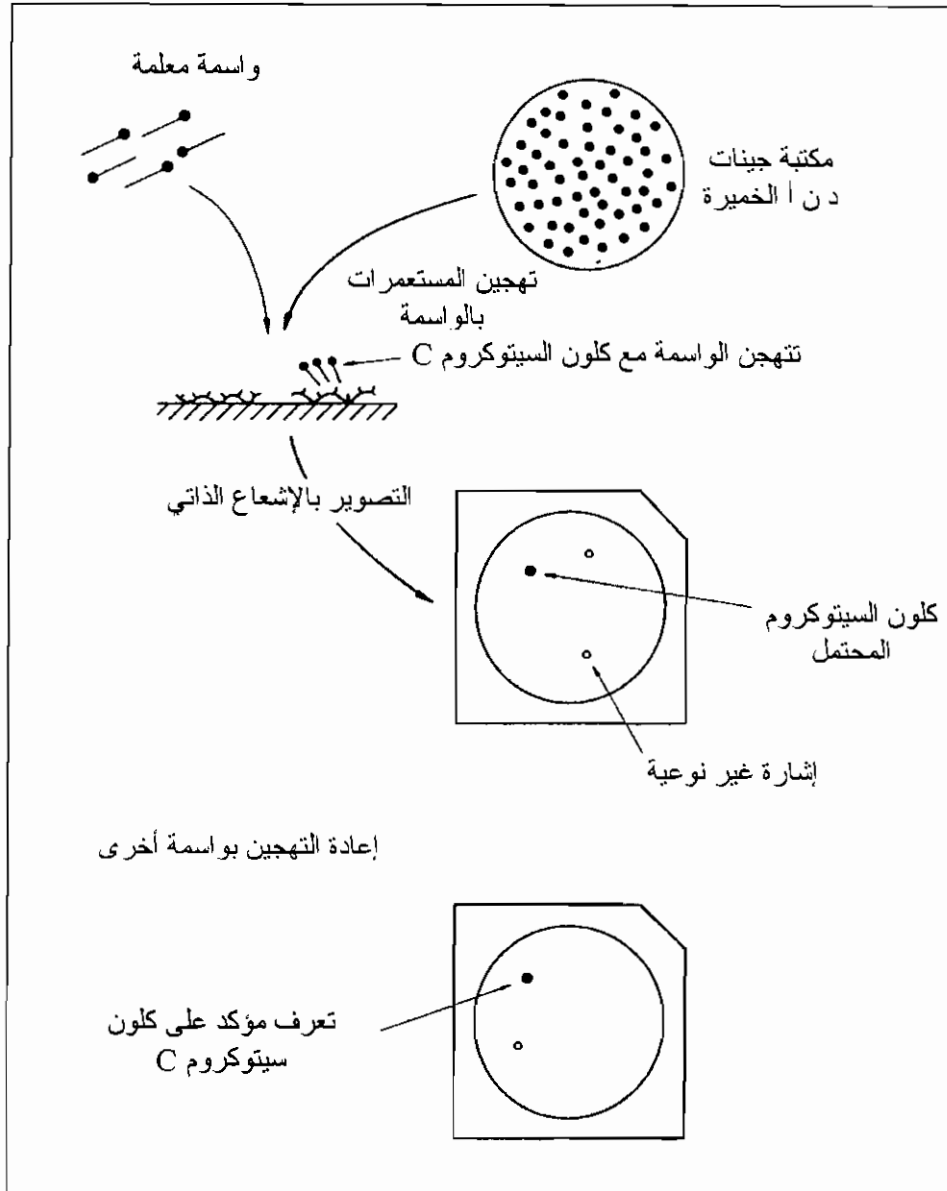
15
GLY-SER-ALA-LYS-LYS-GLY-ALA-THR-LEU-PHE-LYS-THR-ARG-CYS-GLU-
30
LEU-CYS-HIS-THR-VAL-GLU-LYS-GLY-GLY-PRO-HIS-LYS-VAL-GLY-PRO-
45
ASN-LEU-HIS-GLY-ILE-PHE-GLY-ARG-HIS-SER-GLY-GLN-ALA-GLN-GLY-
60
TYR-SER-TYR-THR-ASP-ALA-ASN-ILE-LYS-LYS-ASN-VAL-LEU-TRP-ASP-
75
GLU-ASN-ASN-MET-SER-GLU-TYR-LEU-THR-ASN-PRO-LYS-LYS-TYR-ILE-
90
PRO-GLY-THR-LYS-MET-ALA-PHE-GLY-GLY-LEU-LYS-LYS-GLU-LYS-ASP-
103
ARG-ASN-ASP-LEU-ILE-THR-TYR-LEU-LYS-LYS-ALA-CYS-GLU

الشكل (١٢-١٧): تتابع الأحماض الأمينية لبروتين سييتوكروم C في الخميرة وتمثل الببتيدية السادسة (التي تحتها خط) كيف يمكن التنبؤ بالتتابع النيوكليدي من تتابع الأحماض الأمينية المقابلة

وبالرغم من أن هذا التتابع يمثل ١٦ تتابعا محتملا ، فإن ١٤ من ١٨ نيوكلييدة يمكن التنبؤ بها بالتأكد، وبذلك يمكن بناء واسمة أوليجونيوكليتيديّة

باستخدام هذه التنبؤات وقد يكون في امكان هذه الواسمة التعرف على الجين المشفر لبروتين السيوكروم.

وفي هذه الحالة يتم بناء عدد ١٦ أوليجونيوكليد واسمه مختلفه و المشفره لتتابع الاحماض الامينية اعلاه. ويمكن استخدامها لاستكشاف مكتبة cDNA الخميرة وسوف تتعرف واحده من هذه الواسمات على التتابع الصحيح لهذه المنطقة من Cytochrome C . وستدلنا اشارة التهجين في الموضع على الكلونات التي تحتوى على هذا الجين (الشكل ١٢-١٨).



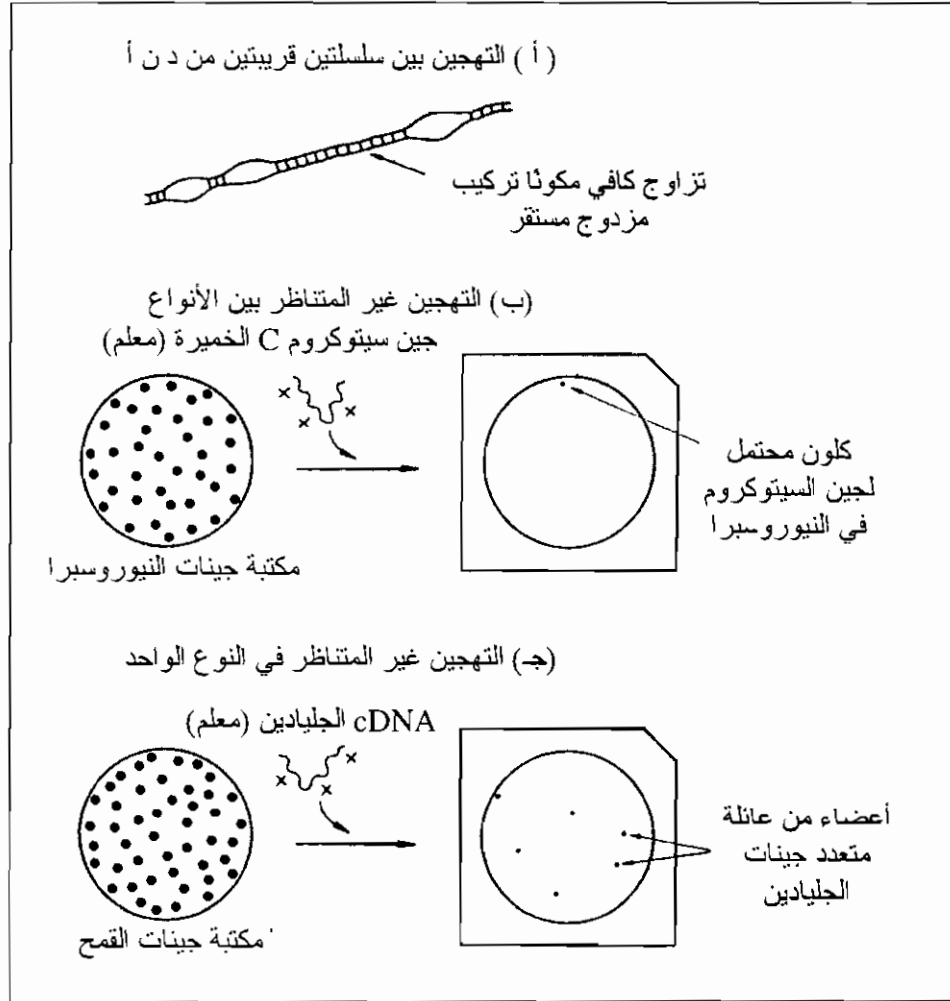
الشكل (١٢-١٨): استخدام أوليجو نيوكليوتيد تركيبى معلم النهاية للتعرف على كلون السيتوكروم في الخميرة

ثالثاً: استنباط الواسمات عندما ينتمى الجين لمجموعة جينات متقاربة :Multigene Family

يمكن التعرف على تتابعات متشابهة بنسبة عالية عند مقارنة جينين يشفران لنفس البروتين ولكنهما ينتميان لكائنات مختلفة مما يعنى المحافظة على تركيب الجين اثناء عملية التطور. وغالبا ما يتشابه بدرجة عالية جينان من كائنات قريبة بحيث أن واسمه مفردة السلسلة من احد هذين الجينين يمكنها تكوين هجين مستقر وثابت مع الجين الآخر وعلى الرغم من أن الجزيئين ليسا متكاملين تماما، إلا أنه يحدث تزاوج للقواعد بينهما بدرجة كافية لتكوين تركيب هجينى مستقر (الشكل ١٢-١٩).

ويستخدم التنقيب غير المتجانس Heterologous Probing فى التهجين بين تتابعات متقاربة للتعرف على الكلونات المرغوبة. فمثلا يمكن استخدام واسمه Cytochrome C والسابق الاشارة اليها، فى التنقيب عن هذا الجين فى كائن اخر (يتبع جنس آخر) مثل النيوروسيرا *Neurospora Crassa* بحيث نحصل على تزاوج قواعد يكون كافيا لاعطاء اشارة للاستدلال على Clone السيتوكروم C فى مكتبة النيوروسيرا (الشكل ١٢-١٩ ب).

ومن جهة أخرى، يمكن استخدام التنقيب غير المتجانس للتعرف على جينات فى نفس الكائن كالقمح مثلا ولكن فى اصناف مختلفة كما يحدث فى حالة واسمة جين الجليادين السابق الاشارة اليها (الشكل ١٢-١٩ ج).



الشكل (١٢-١٩): التهجين غير المتناظر Heterologous Probing

تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل:

Polymerase Chain Reaction (PCR):

يعد توصل Mullis عام ١٩٨٥ الى مفهوم الكلونة في الانبوب *In Vitro* Cloning وتقديمة لتقنية PCR من أهم وأعظم الاكتشافات التي حدثت في الثلاث

الآخر من القرن العشرين ، حيث أحدثت طفرة هائلة في مجال التقنيات الحديثة المستخدمة في البيولوجيا الجزيئية مما ساعد الباحثون على تطوير أبحاثهم بطريقة غير مسبوقة نظراً لما لهذه التقنية، والتي تتميز بالسهولة والدقة، من تطبيقات متعددة في المجالات البيولوجية المختلفة.

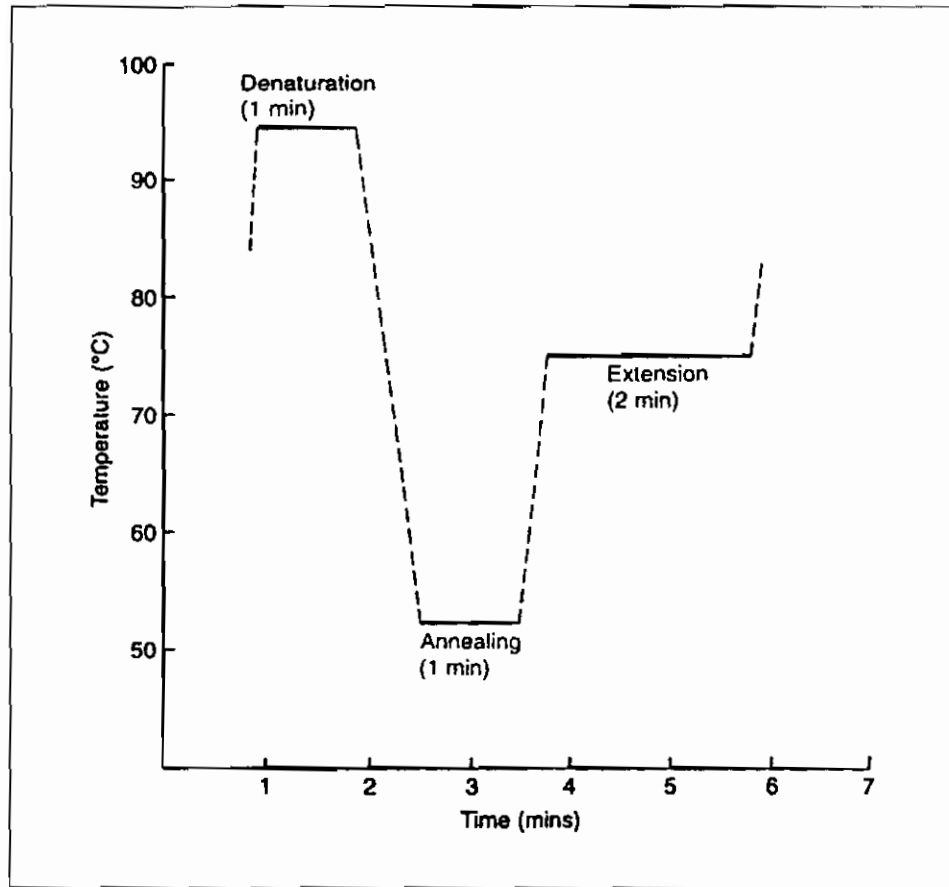
ويؤدي PCR إلى اكثار منتخب Selective Amplification لمنطقة مختاره من جزيء د.ن.أ. ويمكن اختبار أى منطقة من أى جزيء د.ن.أ. للأكثار بشرط معرفة التتابعات النيوكليدية عند حدى هذه المنطقة، حيث يؤدي ذلك إلى امكان تكوين زوج من البادئ Pair of Primers مكون من عدد محدود من النيوكليديات لا يقل عن ١٠ ولا يزيد عن ٣٠ نيوكليديده بحيث تكون تتابعات النيوكليديات فى احد بادئى الزوجين مكمل لتلك الموجودة على احد حدى المنطقة المراد مضاعفتها (اكثارها) فى حين يكون البادئ الآخر مكمل للحد الآخر المحيط بهذه المنطقة وبذلك عند اجراء تجربة PCR يتم التهجين بين البادئ وهذه الحدود يحدث تضاعف Amplification للمنطقة بينهما بطريقة دقيقة وسريعة بمساعدة انزيم بلمرة د.ن.أ. متخصص لا يتأثر بدرجات الحرارة العالية وهو Taq Polymerase I.

ولبدء تجربة PCR يوضع فى الانبوبة د.ن.أ. القالب مضاف اليه زوج البادئ المتخصص ومخلوط من النيوكليديات الأربعة A,T, C,G ومحلول كلوريد المغنسيوم بتركيز معين (٣-٧ ميكروجرام / لتر) وانزيم Taq Polymerase ويتم تحضينة فى جهاز PCR، ويختار البرنامج المناسب والذي يبدأ برفع درجة الحرارة إلى ٩٤° م لدنترة د.ن.أ. وفصل سلسلتى د.ن.أ. القالب، يليها خفض

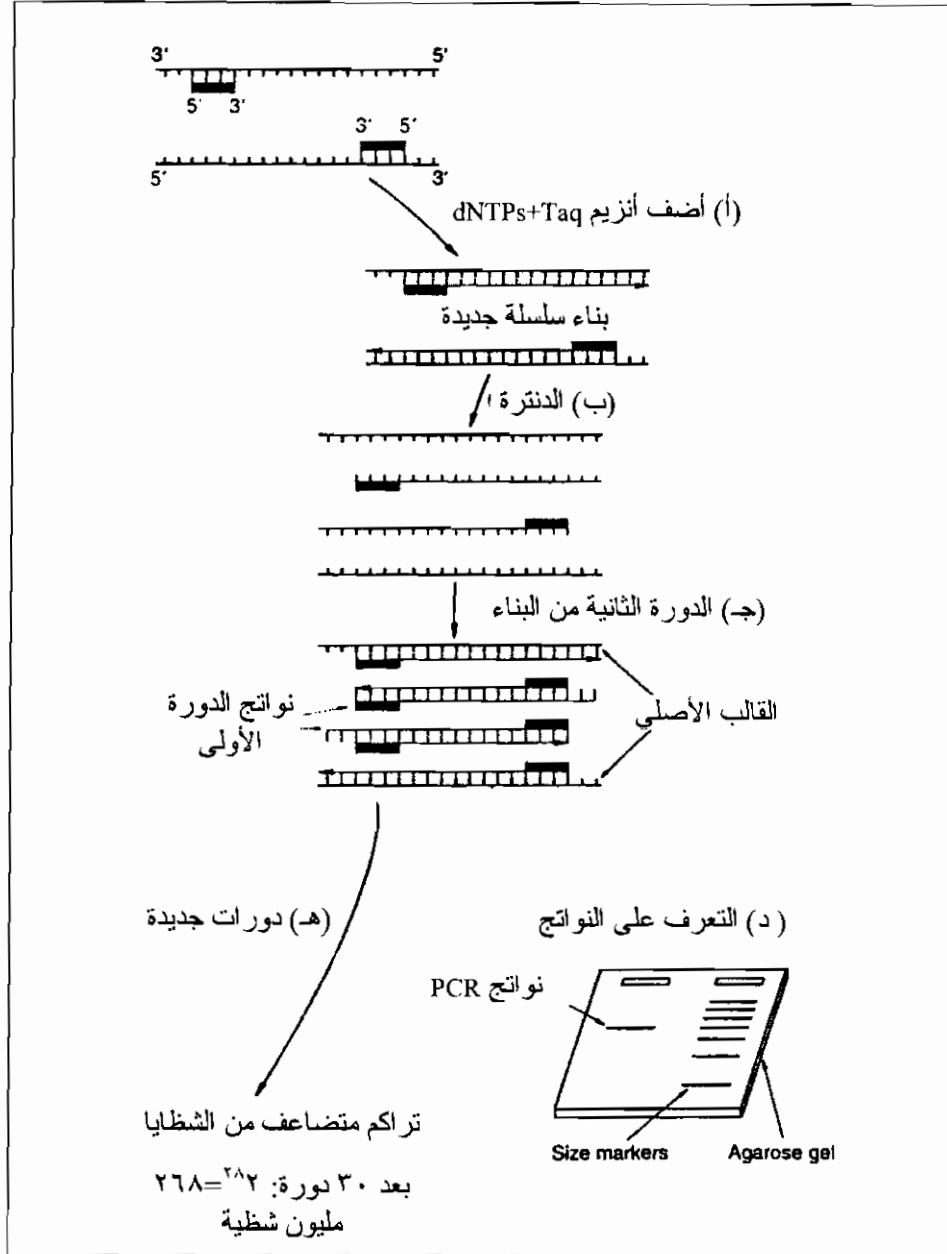
تدرجى للحرارة الى ٥٠-٦٠ م درجة ليتم التهجين والتزاوج بين تتابعات البادئ مع حدود المنطقة المراد تضاعفها.

ثم يتم رفع درجة الحرارة إلى ٧٢م للمساعدة في بدء نشاط انزيم Taq لبناء سلسلة جديدة على المنطقة المرغوبة. ويبين الشكل (١٢-٢٠) منحنى التدرج الحرارى فى PCR. وهكذا تستمر هذه العملية ٢٥-٣٦ دورة مما يؤدي إلى بناء عدة ملايين نسخة من قطعة د.ن.أ. وبعد الانتهاء من التجربة يتم تحليل نواتج التضاعف Amplification بالتفريد الكهربى على جيل الأجاروز والصبغ بمادة ايثيديم بروميد Ehtidium Bromide (الشكل ١٢-٢١).

كما يمكن لنواتج التضاعف أن تكون فى بلازميد ناقل ويتم فحصها بالتقنيات القياسية مثل تحليل تتابعات د.ن.أ.



الشكل (١٢-٢٠): منحنى البرنامج الحرارى فى PCR



الشكل (١٢-٢١): تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

الشروط الواجب توافرها في تجارب PCR:

- لكي يتم الحصول على نواتج تضاعف PCR دقيقة وصحيحة للمنطقة المراد اكثارها، لابد من مراعاة ما يأتي :
- ١- أن يكون تصميم البادئ دقيقاً وصحيحاً بحيث يتجه فقط إلى المناطق المستهدفة في القالب لضمان الحصول على نواتج التضاعف المطلوبة فقط.
 - ٢- أن يكون طول البادئ مناسباً بحيث لا يقل عن ١٠ نيوكليوتيدات ولا يزيد عن ٣٠ نيوكليوتيدة حتى لا نحصل على نواتج تضاعف غير مرغوبة في حالة البادئ القصير جداً أو خفض شديد في نواتج التضاعف في حالة البادئ الطويل جداً .
 - ٣- مراعاة التطبيق الدقيق لمنحنى درجات الحرارة حسب البرنامج المختار في PCR إذ لو ارتفعت حرارة التهجين Annealing عن الحرارة المثلى فلن يحدث تهجين بين البادئ والقالب وبالتالي لا نحصل على ايه نواتج تضاعف ، والعكس صحيح إذا انخفضت كثيراً درجة الحرارة عن الدرجة المطلوبة فسينتج عن ذلك تهجين خاطئ في مواقع غير صحيحة للبادئ على القالب Mismatched hybrid ونحصل على نواتج PCR غير صحيحة.

طرق تحليل نواتج:

Analysis of PCR Amplification Products PCR:

- ١- التفريد الكهربى.
- ٢- الكلونة.
- ٣- تحليل التتابعات النيوكليوتيدية.

أولاً: التفريد الكهربى لنواتج PCR:

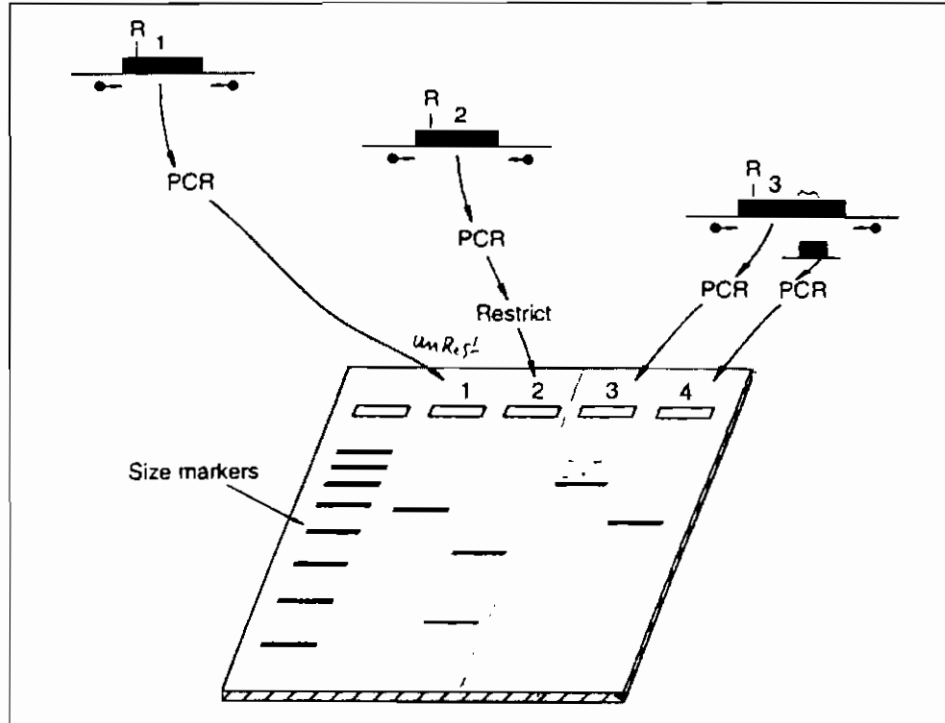
كما سبق الإشارة فإن نواتج التضاعف يتم اختبار أولى لها بأخذ جزء من ناتج التفاعل وتفريده على جيل اجاروز بالتفريد الكهربى. ويدل ظهور حزمة واحدة تمثل الناتج المتضاعف على نجاح التجربة. أما إذا ظهرت أكثر من حزمة أو لم تظهر حزمة بالمرّة فإن ذلك يدل على حدوث اخطاء فى التجربة ولا بد من اعادتها.

بالاضافة إلى ذلك فإن هناك حالات يستخدم فيها التفريد الكهربى لجيل الاجاروز للحصول على معلومات أكثر عن نواتج PCR منها:

أ - يمكن التحقق من وجود مواقع قطع محددة Restriction Sites من عدمه فى المنطقة المتضاعفة بمعاملة ناتج PCR بإنزيم قطع محدد Restriction Endonuclease قبل جريان العينة بالتفريد الكهربى (الشكل ١٢-٢٢) ويطلق على هذه التقنية PCR-Based RFLP (PBR) وتعد من البدائل السهلة والسريعة لتقنية RFLP حيث تحتاج إلى كمية صغيرة من د.ن.أ ولا تحتاج إلى استخدام النقل Southern Blotting.

وتستخدم هذه الطريقة فى استنباط الخرائط الحينومية وفى دراسة الامراض الوراثية كما سيأتى بعد .

الأساس لعملية DNA Profiling وهى من التقنيات المحورية فى علم الطب الشرعى (العدلى) كما سيأتى بعد.

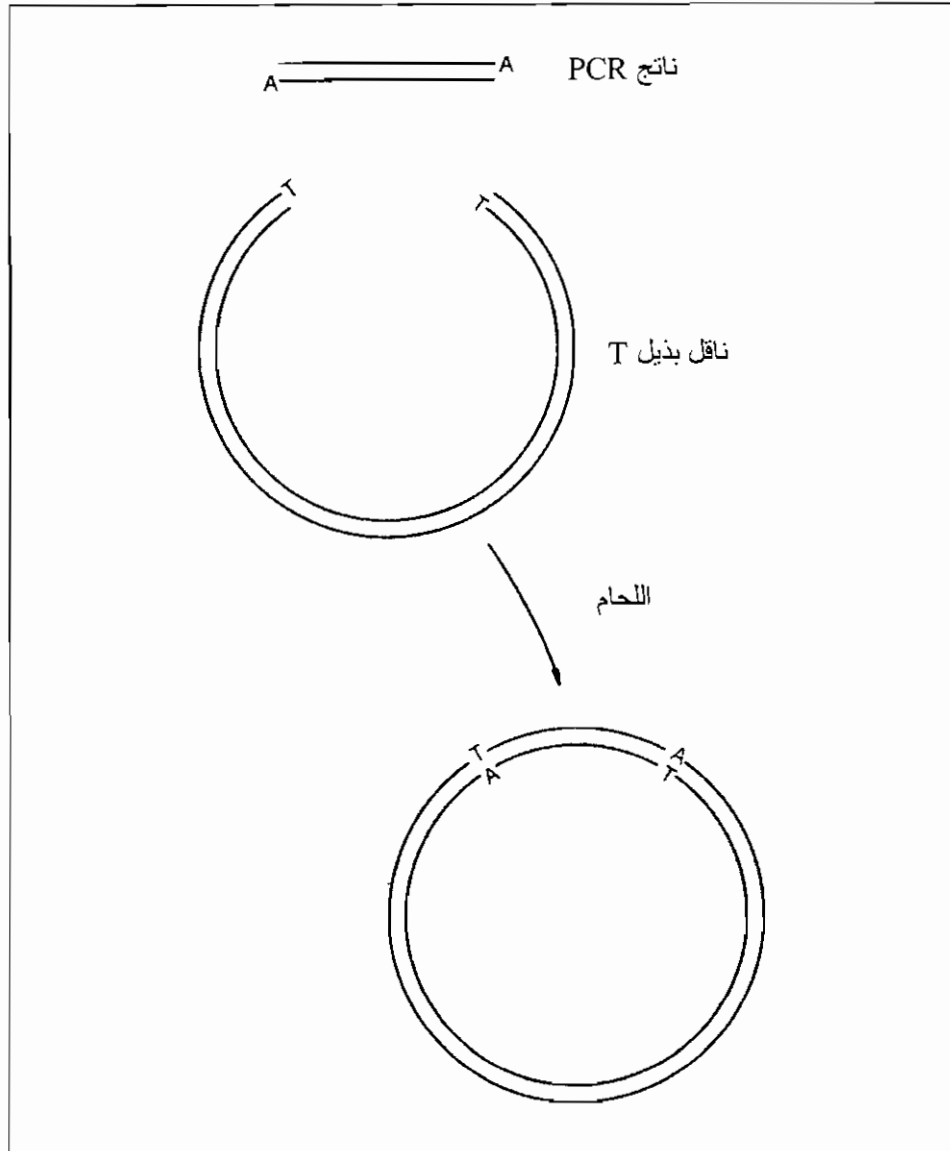


- الشكل (١٢-٢٢): يعطى التفريد الكهربى لنواتج PCR معلومات عن جزئ د ن أ القالب
- المضممار ١ و ٢ يبين على التوالى ناتج PCR غير محدد القطع بالإنزيم الذى يقطع عند الموقع R.
 - يبين المضممار ٣ النتيجة عندما يكون د ن أ القالب محتويا على إضافة Insertion فى المنطقة المتكاثرة Amplified.
 - يبين المضممار ٤ النتيجة عندما يكون د ن أ القالب قد فقد جزء فى المنطقة المتكاثرة.
- ب- الكشف عن وجود طفرات اضافة Insertion أو حذف Deletion فى جزئ د.ن.أ فيها يطلق عليه "طفرة الطول" Length Mutation والتي تكون

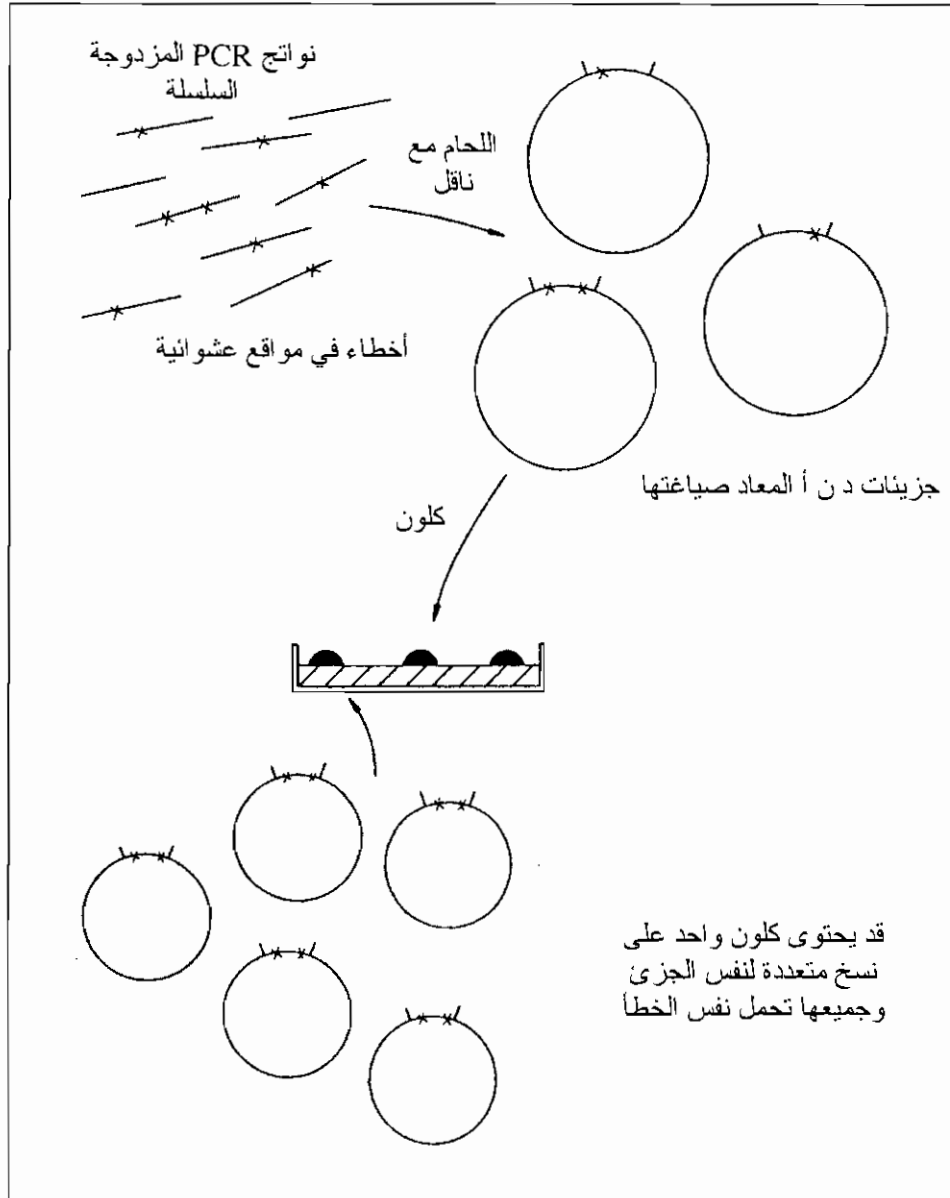
ثانياً: كلونة نواتج PCR:

يمكن من الناحية النظرية كلونة نواتج PCR فى بلازميدات لتكوين مكتبة جينات إلا أنه من الناحية العملية توجد بعض الصعوبات منها أن نواتج البلمرة

بانزيم TaqI تكون نهايتها مرتبطة بنيوكليدية اضافية من الادينوسين مكونة Overhang مما يعيق عملية الكلونة. ويمكن التغلب على هذه الصعوبة باستخدام ناقل Vector خاص يحتوى على ذيل من نيوكليدية T واحدة كما فى الشكل (١٢-٢٣) ومن جهة أخرى تبين أن Taq Polymerase يعمل اخطاء أثناء بناء د.ن.أ ، إذ أحيانا ما يضع نيوكليدية خطأ فى السلسلة النامية مما يؤدي إلى تراكم الاخطاء بمعدل خطأ واحد لكل ٩٠٠٠ نيوكليدية يتم بناؤها مما يقتضى الحذر عند كلونة هذه النواتج (الشكل ١٢-٢٤) وقد تم انتاج Taq Polymerase محتويا على خاصية تصحيح الاخطاء Proofreading بحيث يمكن تلافى مثل هذه الاخطاء.



الشكل (١٢-٢٣): إستخدام ناقل خاص يحتوى على ذيل T لكتونة نتائج PCR



الشكل (١٢-٢٤): يؤدي التكرار العالي لحدوث أخطاء و الناتج من إنزيم Taq إلى بعض الصعوبات عند كلونة نواتج PCR

دراسة موقع وتركيب الجين فى جزئ د.ن.أ:

أولاً: تحديد موقع الجين Gene Location:

توجد تقنيات متعددة لتحديد موقع جين معين فى جزئ د.ن.أ وتتحدد طبيعة الطريقة المستخدمة حسب حجم جزئ د.ن.أ بحيث تختلف الطريقة فى حالة الجزيئات الصغيرة مثل تلك الخاصة بالبلازميدات وكروموسومات الفاج عن تلك المستخدمة لتحديد موقع الجين على جزئ د.ن.أ كبير الحجم كما فى كروموسومات مميزة النواة.

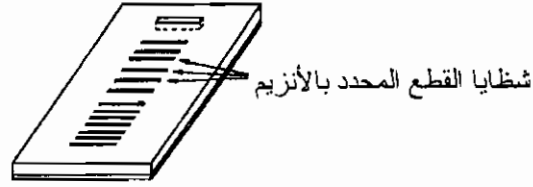
أ - تحديد موقع الجين فى جزئ صغير الحجم:

فى حالة جزيئات د.ن.أ صغيرة الحجم مثل البلازميد البكتيرى PBR 322 أمكن بالانتخاب المباشر التوصل الى أن الجين المشفر للمقاومة للمضاد الحيوى كاناميسين Kanamycin موجود ضمن كلونات القطعة R6-5 الناتجة عن القطع بإنزيم القطع المحدد EcoRI والتي أنتجت ١٣ شظية. ولكى نعرف بالتحديد على أى من هذه الشظايا يقع جين الـ Kan^R حتى يمكن أن نضعه على خريطة القطع المحددة للشظية (R6-5)، ولكى يتم ذلك لابد أولاً أن يتم تفريد كهربى على جيل الاجاروز لنواتج القطع المحدد للمنطقة R6-5 (الشكل ١٢-٢٥ ب). ويلي ذلك عملية نقل بطريقة Southern Blotting (الشكل ١٢-٢٥ ب) متبوعة بعملية التنقيب بالتهجين hybridization Probing (الشكل ١٢-٢٥ ج) حيث تعطى صورة Autoradiography الاشارة الموجبة الدالة على ترتيب الشظية المحتوية على جين Kan^R بالنسبة للشظايا الأخرى.

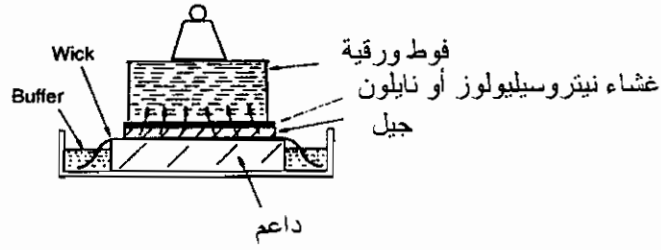
وأخيراً وباستخدام خريطة القطع المحددة للقطعة R6-5 يمكن وضع هذه الشظية فى موقعها على تلك الخريطة (الشكل ١٢-٢٥ د).

ومن جهة أخرى، يمكن استخدام تقنية النقل Southern لتحديد مكان جين معين مكلون ضمن جزئ كبير الحجم نسبياً من د.ن.أ. المعاد صياغته Recombinant DNA كما في الشكل (١٢-٢٦) إلا أن استخدام Restriction Mapping و Southern يكون قاصراً عن تحديد موقع الجين إذا زاد حجم جزئ د.ن.أ. عن ٢٥٠ كقاعدة.

(أ) التفريد الكهربى لبلازمين R6-5 المقطوع بأنزيم EcoRI



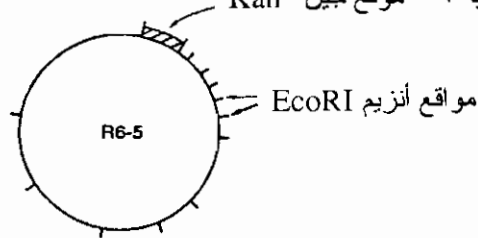
(ب) النقل بـ Sothern



(ج) نتيجة التهجين بالواسمة

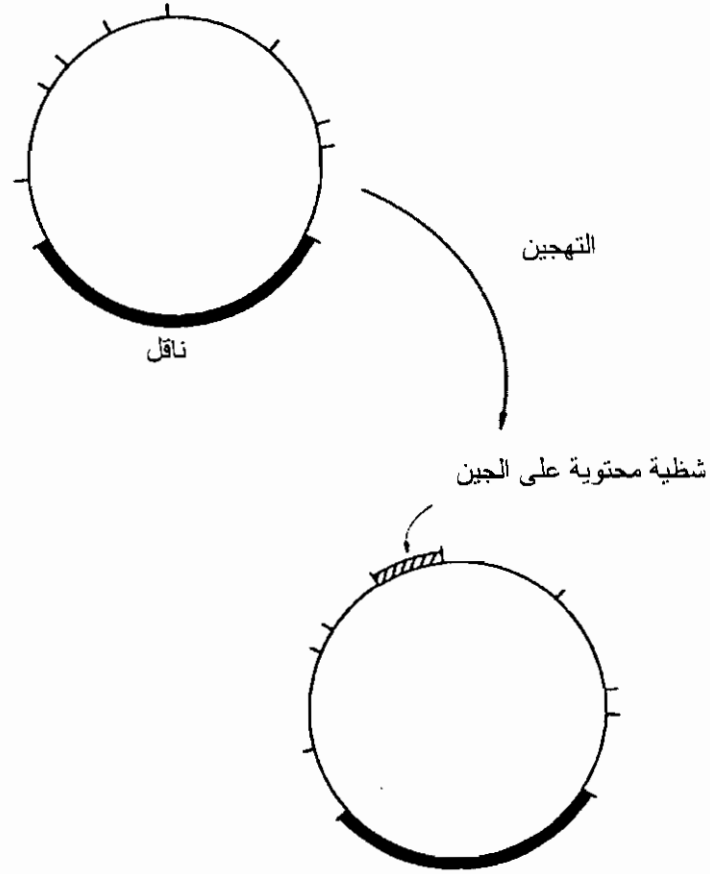


(د) يحدد مكان الشظية على خريطة القطع المحدد للبلازميد الشظية ٦ = موقع جين Kan^R



الشكل (١٢-٢٥): النقل بطريقة Southern

جزئ د ن أ معاد صياغته – أين يقع الجين؟



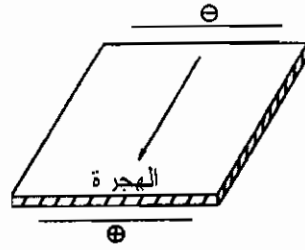
الشكل (١٢-٢٦): يمكن استخدام التهجين بطريقة Southern لتحديد موقع جين مكلون من جزئ د ن أ (كبير الحجم نسبياً) المعاد صياغته

ب- فصل الكروموسومات في مميزة النواة الصغيرة (البداية):

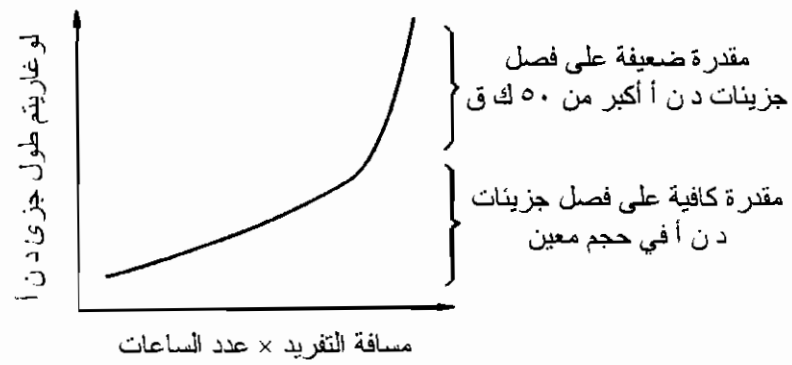
Separating Chromosomes of Lower Eukaryote By Gel Electrophoresis:

ثبت أن طرق التفريد الكهربى العادية على جيل الاجاروز لا يمكنها فصل الحزم الخاصة بشظايا د.ن.أ إذا زاد حجمها عن ٥٠ ك قاعدة كما فى الشكل (١٢-٢٧) ولذلك لا يمكن الاعتماد عليها فى فصل الجزيئات (أو الكروموسومات) الكبيرة الحجم نسبياً. وقد امكن التغلب على هذه الصعوبة باستخدام ما يسمى Pulsed Field Electrophoresis (PFE) وهو من عدة أنواع وأشهرها Orthogonal Field Alternative Gel Electrophoresis (OFAGE) وفيه يحدث للمجال الكهربى تغيير فى المسار بين زوجين من الاقطاب Electrodes ويقع كل زوج من هذه الاقطاب بزاوية 45° بالنسبة للمحور الطولى للجيل (الشكل ١٢-٢٨). وينتج عن ذلك مجال نبضى Pulsed Field مما يجبر جزيئات د.ن.أ على تغير اتجاهها باستمرار تبعاً للنبضات. وعندما يحدث تبادل للمجالين بطريقة منتظمة، فإن محصلة الحركة لجزيئات د.ن.أ فى الجيل ستستمر من احدى النهايتين إلى النهاية الاخرى فى خط مستقيم تقريباً إلا أنه مع كل تغيير يحدث فى اتجاه المجال فإن على كل جزئ د.ن.أ أن يعيد استقامة حركته Realign بزاوية ٩٠° قبل أن يستمر فى الهجرة. ويعد ذلك اهم نقطة فى هذا النظام حيث يكون باستطاعة الجزيئات الصغيرة نسبياً (القصيرة) أن تعمل Realigning أسرع من الجزيئات الأطول مما يسمح للجزيئات القصيرة بالحركة والتقدم بسرعة أكبر إلى نهاية الجيل. وقد أمكن بهذه التقنية الوصول إلى زيادة هائلة فى قدرة الجيل على فصل جزيئات قد يصل طولها إلى عدة الاف ك قاعدة. ويبين الشكل (١٢-٢٨ ب) فصل كروموسومات الخميرة بهذه التقنية.

(أ) جيل التفريد الكهربائي التقليدي

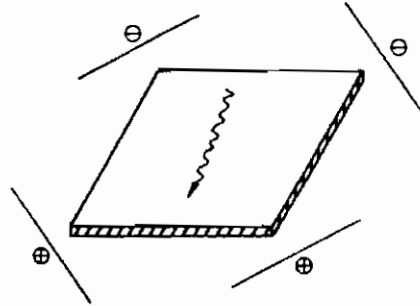


(ب) تأثير حجم دن أ على معدل التفريد

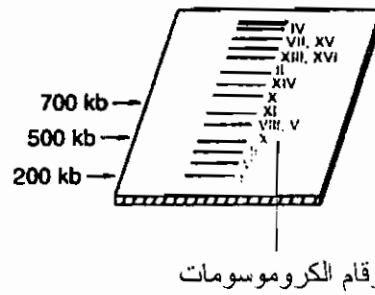


الشكل (١٢-٢٧): محددات جيل التفريد الكهربائي التقليدي

(أ) جهاز OFAGE



(ب) فصل كروموسومات الخميرة بجهاز OFAGE



الشكل (١٢ - ٢٨): التفريد الكهربى بجهاز أورثوجونال التبادلى (OFAGE)

ويمكن الاستفادة من هذه التقنية أيضا فى عزل وتنقية د.ن.أ من كل كروموسوم على حدة وتكوين مكتبات جينية كروموسومية وبالطبع تكون هذه المكتبات اصغر بكثير فى عدد الكlonات الخاصة بها عما فى المكتبة الجينومية مما يجعل من السهل التعامل معها. بالاضافة إلى ذلك، فإنه يمكن نقل Southern

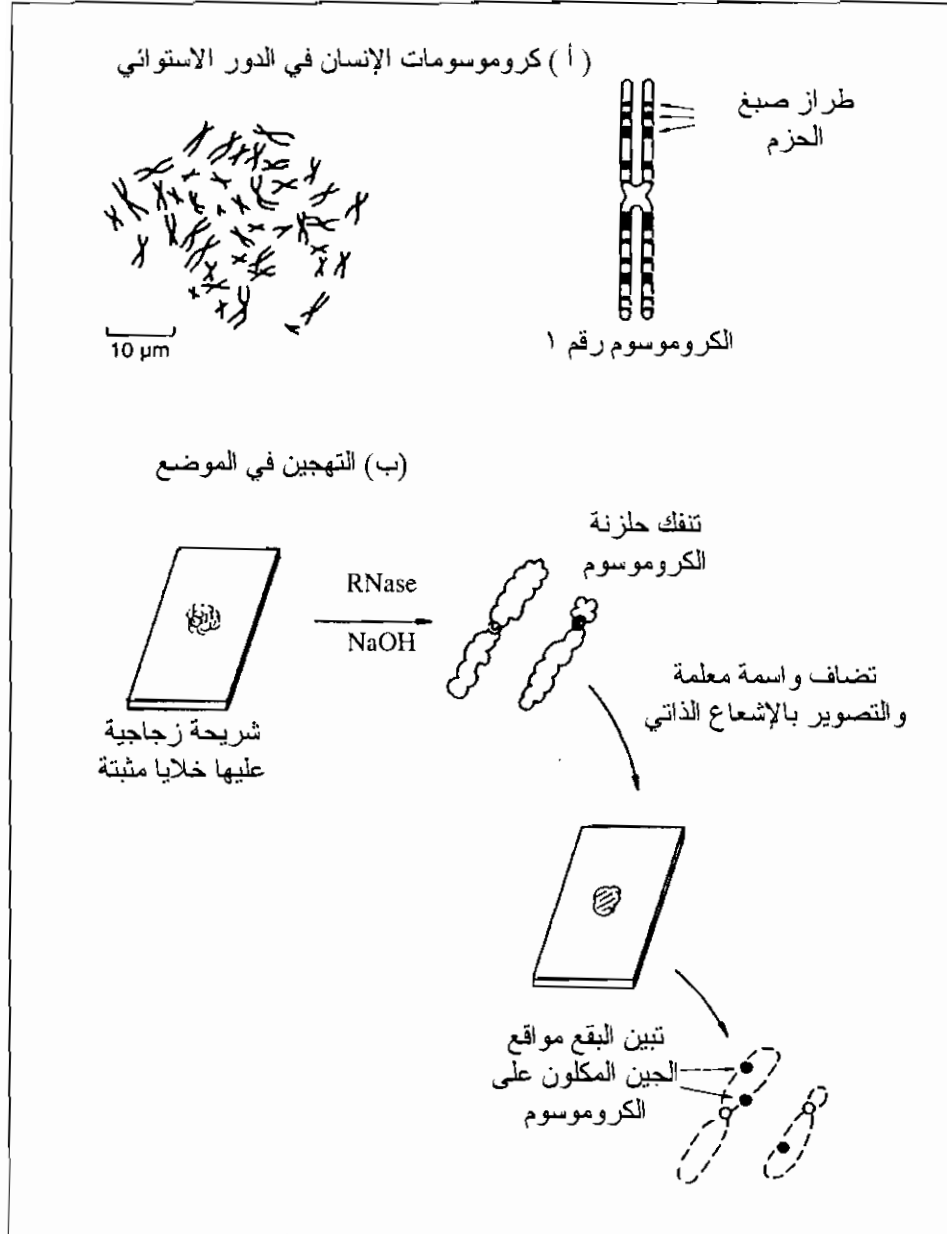
لحزائت د.ن.أ على غشاء نيتروسيليز أو نايلون وأجراء تعريف للجينات المكلونة بطرق التحليل القياسية.

**ج- تحديد موقع الجين على كروموسومات مميزة النواة بطريقة التهجين فى
الموضع *In Situ Hybridization*:**

فى حالة كروموسومات مميزة النواة الراقية حيث يزيد طول جزيئات د.ن.أ فيها عن ٥٠ ألف كيلو قاعدة كما فى الثدييات والنباتات الراقية، نجد أن PFE لا يمكنه فصل مثل تلك الكروموسومات الكبيرة الحجم. لذلك يمكن تحديد موقع الجين فى هذه الحالة بتقنية التهجين فى الموضع *In Situ Hybridization*.

حيث يمكن بها تحديد على أى كروموسوم يقع الجين بالإضافة إلى موقع الجين على الكروموسوم نفسه.

وتتلخص الطريقة فى تفريد كروموسومات الدور الاستوائى الميتوزى على شريحة ميكروسكوبية ومعاملتها بانزيم الريبونوكليز ومحلول هيدروكسيد الصوديوم لهدم ر.ن.أ ودنترة جزيئات د.ن.أ وإضافة الى التحضير الكروموسومى واسمة مشعة للجين المطلوب تحديد موقعة حيث يحدث تهجين بين الواسمة والجين على الكروموسوم والذى يتم الكشف عنه بالتصوير بالأشعاع الذاتى Autoradiography (الشكل ١٢-٢٩).



الشكل (١٢-٢٩): التهجين في الموضع In Situ Hybridization

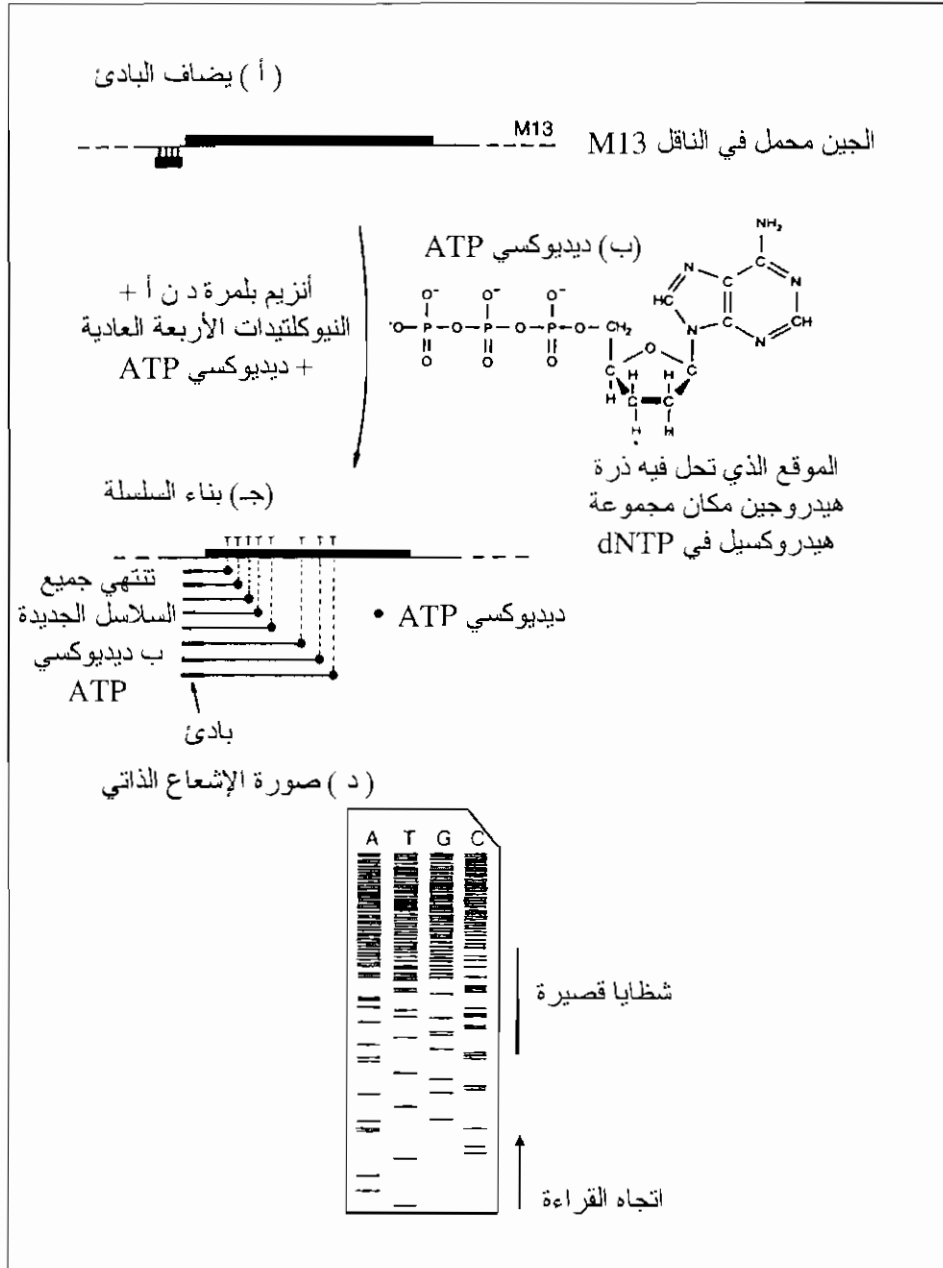
ويمكن الاستعاضة عن الواسمة المشعة باستخدام كاشف فلورسنتى مرتبط بلواسمة بحيث يمكن التعرف على التهجين مباشرة باستخدام ميكروسكوب فلورسنتى Fluorescet Microscope وإذا استخدمت فلورسنت بالوان مختلفة Fluorochromes فإنه يمكن التعرف على أكثر من جين واحد فى نفس الوقت حيث سيعطى كل نوع من الفلورسنت اشارات لونية مميزة ويطلق على هذه التقنية (FISH) Fluorescent In Situ Hybridration.

تحليل التتابعات النيوكليدية فى جزئ د.ن.أ DNA sequencing:

تعد طرق تحليل تتابعات الاحماض النووية من أهم التقنيات المستخدمة فى مجال البيولوجيا الجزيئية والتي يمكن بها التحديد الدقيق لترتيب النيوكلييدات فى تتابعات مستمرة فى قطعة من د.ن.أ. وعلى الرغم من أن طرق تحليل التتابعات بدأت منذ بداية الستينات من القرن الماضى إلا أن أواخر السبعينات شهدت ظهور تقنيات سريعة وفعالة لتحليل تتابعات د.ن.أ.

أ - طريقة إنهاء بناء السلسلة Chain Termination Method:

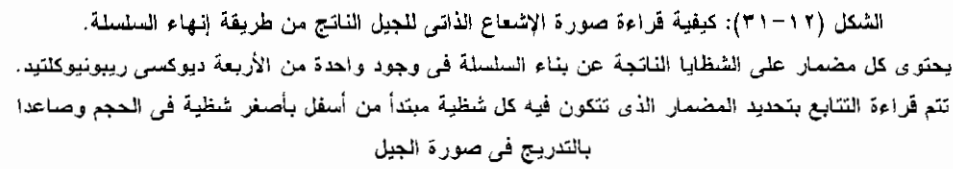
وقد استتبها Sanger and Coulson وتتطلب الطريقة استخدام سلسلة د.ن.أ مفردة للبناء عليها ولذلك تتم كلونة مثل هذه السلسلة فى ناقل M13 وحيد السلسلة بحيث يتم بناء سلسلة د.ن.أ المكملية عليها بانزيم DNA Pol 1 أو أنزيم Sequenase. ويحتاج الامر إلى وجود بادئ Primer لكى يستطيع الانزيم بدء البناء (الشكل ١٢-٣٠) ويتكون مخلوط التفاعل من العناصر الاساسية المعروفة لبناء د.ن.أ بحيث يتوفر فيها النيوكلييدات الاربعة العادية A,C,G,T dNTP's مع مراعاة أن تكون إحدى هذه النيوكلييدات معلمه بالاشعاع مع توزيع هذا المخلوط فى أربعة انابيب وتعطى الحروف : T,G,C,A.



الشكل (١٢-٣٠): طريقة ساجروكولسون لتحليل تنابعات د ن أ بإنهاء سلسلة د ن أ

وبالإضافة إلى مخلوط النيوكليوتيدات الأربعة في كل انبوبة يضاف نيوكليتيده واحدة معدله منزوع منها مجموعة $3'OH$ وتسمى Dideoxy Nucleotide والتي تتوقف عندها عملية استطالة سلسلة د.ن.أ الجديدة نظراً لعدم وجود مجموعة $3'OH$ حرة بها والتي تحتاجها عملية البناء لإضافة النيوكليتيده التالية. أى أن انهاء السلسلة يحدث أينما يتم الاضافة الانزيمية لهذه النيوكليتيده المعدلة. وإذا احتوى المخلوط في الانبوبة A على Dideoxy ATP فإن الانهاء سيحدث عندما تتقابل مع النيوكليتيده T على طول تتابعات السلسلة القالب، وتكون النتيجة هي الحصول على مجموعة من السلاسل الجديدة المختلفة الأطوال ولكنها تشترك في أن كل منها ينتهي بالنيوكليتيده المعدلة Dideoxy A. نفس الشيء سيحدث في الانبوبة C ولكن بإضافة Dideoxy C والانبوبة G بإضافة Dideoxy G والانبوبة T بإضافة Dideoxy T.

يلى ذلك التفريد الكهربى لمحتويات الانابيب الأربعة من مجموعة سلاسل د.ن.أ. Oligo جنباً إلى جنب. ويمكن باستخدام التصوير بالأشعاع الذاتى، التعرف على التتابعات حيث تتم قرائتها من أسفل الجيل إلى أعلى كالآتى (الشكل ١٢-٣١).



٤٦٧

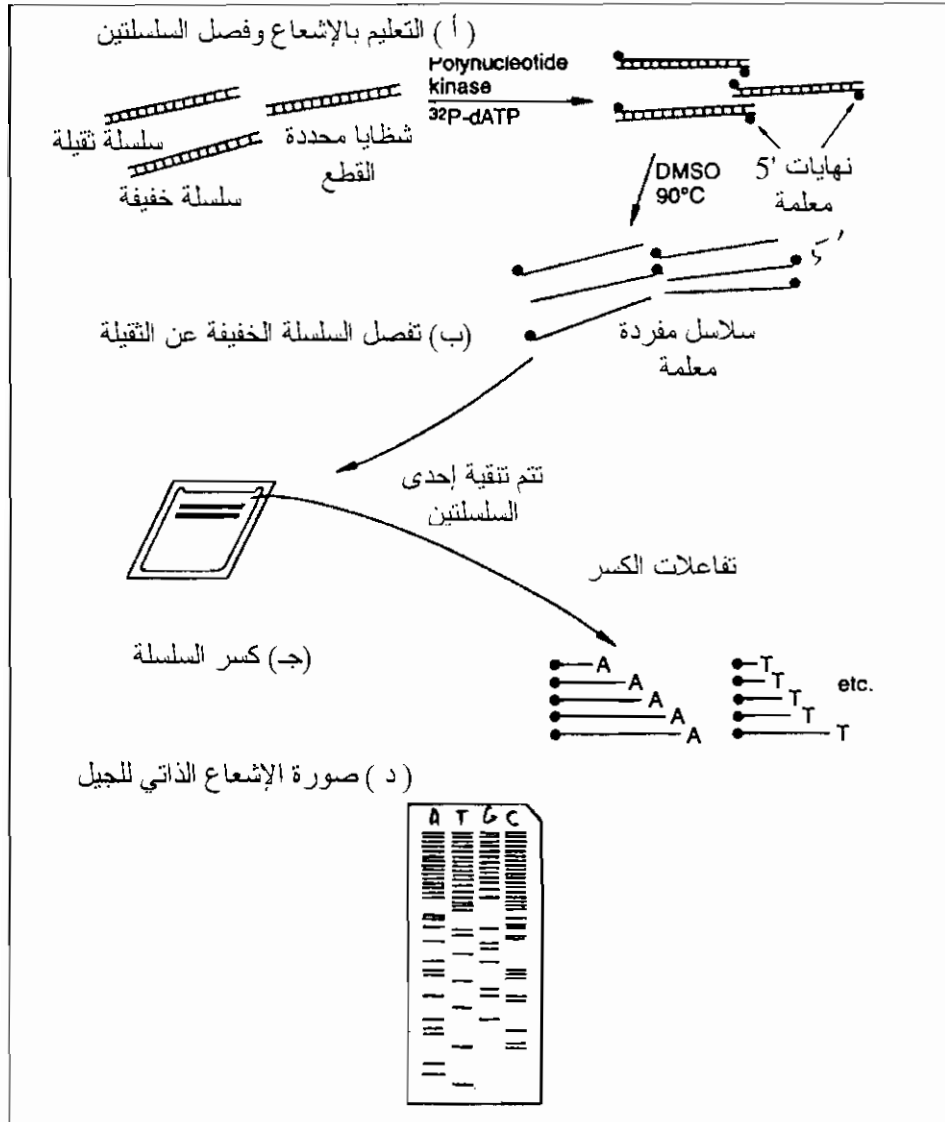
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي
salamalhelali@yahoo.com

ويكون التتابع عند هذه النقطة هو AT. وتستمر عملية القراءة من أسفل إلى أعلى حتى نصل إلى نقطة تكون فيها السلاسل متداخلة ويصعب قراءتها وعموماً فإن هذه الطريقة تنتج قراءة تتابعات لحوالي ٤٠٠ نيوكليotide من صورته اشعاع ذاتي واحده Autoradiograph

ب- طريقة الهدم الكيماوى Chemical degradation of DNA:

استنبط هذه الطريقة Maxam and Gilbert وتحتاج هذه الطريقة إلى استخدام قطع دن.أ مزدوجة السلسلة وبذلك لا تحتاج إلى الكلونة فى الناقل M13 ولا إلى بادئ نظراً لأن الأساس فى هذه الطريقة ليس البناء ولكن هدم جزئ دن.أ ثنائى السلسلة الموجود بالفعل باستخدام محاليل كيماوية موجهة ليتسنى قطعه عند نيوكليotide نوعية معينة. ويتم أولاً التعليل Labeling بالفوسفور المشع ^{32}P عند النهاية 5' لقطعة دن.أ مزدوجة السلسلة المراد تحليل تتابعها، ثم يضاف Dimethylsulphoxide (DMSO) ويتم التسخين على درجة ٩٠°م ويؤدى ذلك إلى تفكيك الحلزون المزدوج وندثرة جزئ دن.أ. يلى ذلك فصل السلسلتين بالتفريد الكهربى على اساس أن احدى السلسلتين تكون أثقل قليلاً من الأخرى على اعتبار احتوائها على نسبة أعلى من البيورينات. ويتم فصل وتنقية احدى السلسلتين ثم يتم تقسيمها إلى أربع عينات وتعامل كل عينة بإحدى محاليل كاشفات القطع. وفى الحقيقة فإن أول مجموعة من الكاشفات تحدث تعديل فى تركيب النيوكليotide المتخصصة لها بحيث تجعلها معرضة للقطع عند هذه النيوكليotide عند اضافة مادة البيريدين Piperidine. وتتم عملية التعديل Modification وتفاعل القطع Cleavage Reaction تحت ظروف قياسية تؤدي إلى احداث قطع واحد فى السلسلة. وتحتفظ بعض الشظايا المقطوعة بالفوسفور المشع ^{32}P 5'. وبعد التفريد الكهربى، يمكن التعرف على تتابعات النيوكلييدات

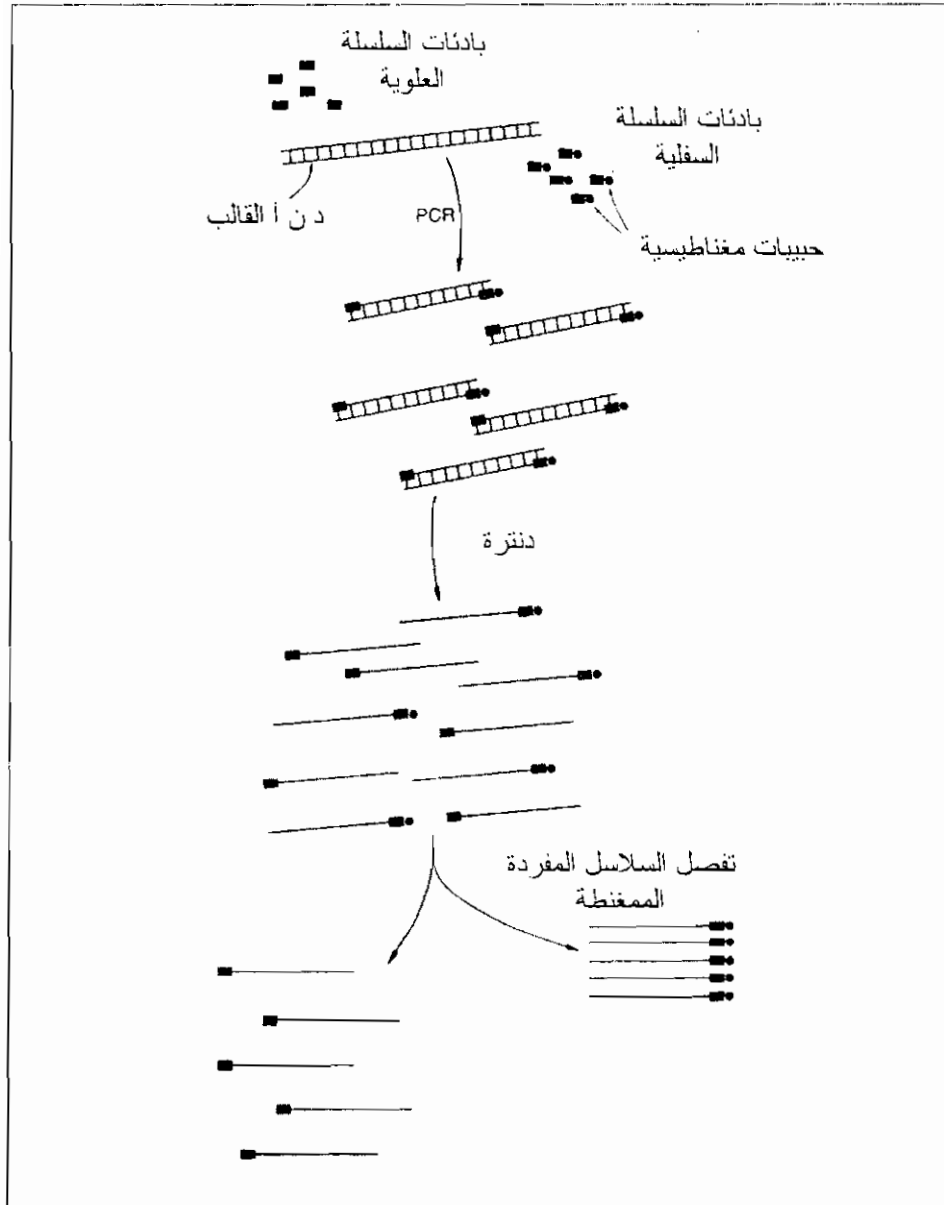
بالتصوير الذاتى الاشعاعى Autoradiography وتتم قراءة النتائج من اسفل إلى اعلى كما سبق الشرح فى طريقة انهاء البناء (الشكل ١٢-٣٢).



الشكل (٣٢-١٢): طريقة ماكسام وجلبيرت لتحليل نتائج د ن أ بالهدم الكيماوى

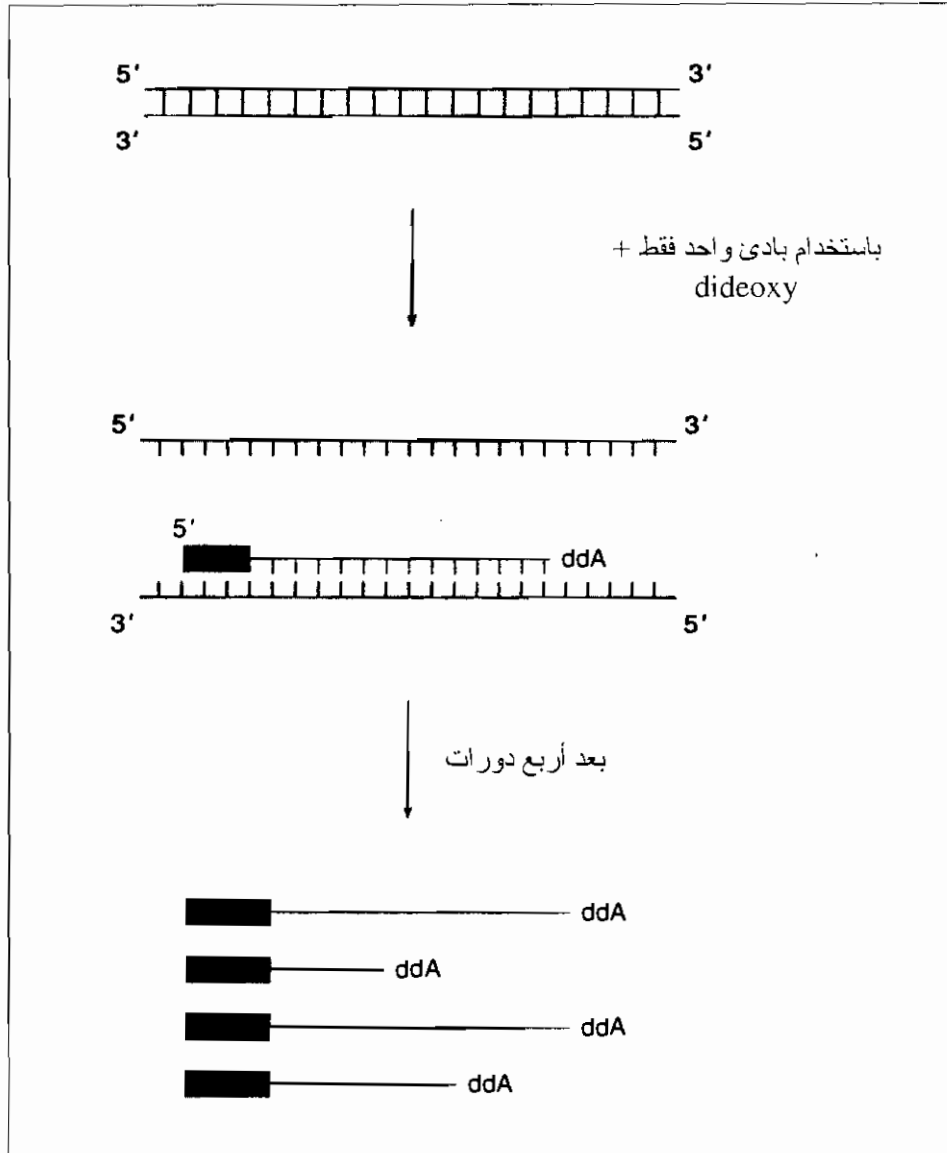
تحليل تتابعات نواتج PCR Sequencing PCR Products:

يحتاج الامر في اغلب الأحيان إلى تحديد تتابعات الشظايا الناتجة من PCR ويمكن نظرياً اجراء ذلك عن طريق كلونة هذه الشظايا مع استخدام تقنية انتهاء السلسلة السابق الاشارة اليها. إلا أنه نظراً للمشاكل الخاصة بكلونة هذه الشظايا فإنه من الأفضل أن يتم تحليل تتابعاتها مباشرة Direct بدون كلونة باستخدام تقنية انتهاء السلسلة Chain Termination وحيث أن هذه التقنية تتطلب استخدام سلسلة مفردة من د.ن.أ، فإنه يمكن عمل تعديل في البادئ المستخدم بحيث يكون احد الزوجين مرتبط بقطعة من المغناطيس والاخر عادى. ثم يتم الاكثار فى جهاز PCR وبذلك يمكن فصل السلسلتين بعد نهاية برنامج PCR كما فى الشكل (١٢-٣٣) ويتم بعد ذلك اجراء تحليل التتابعات بطريقة انتهاء السلسلة.



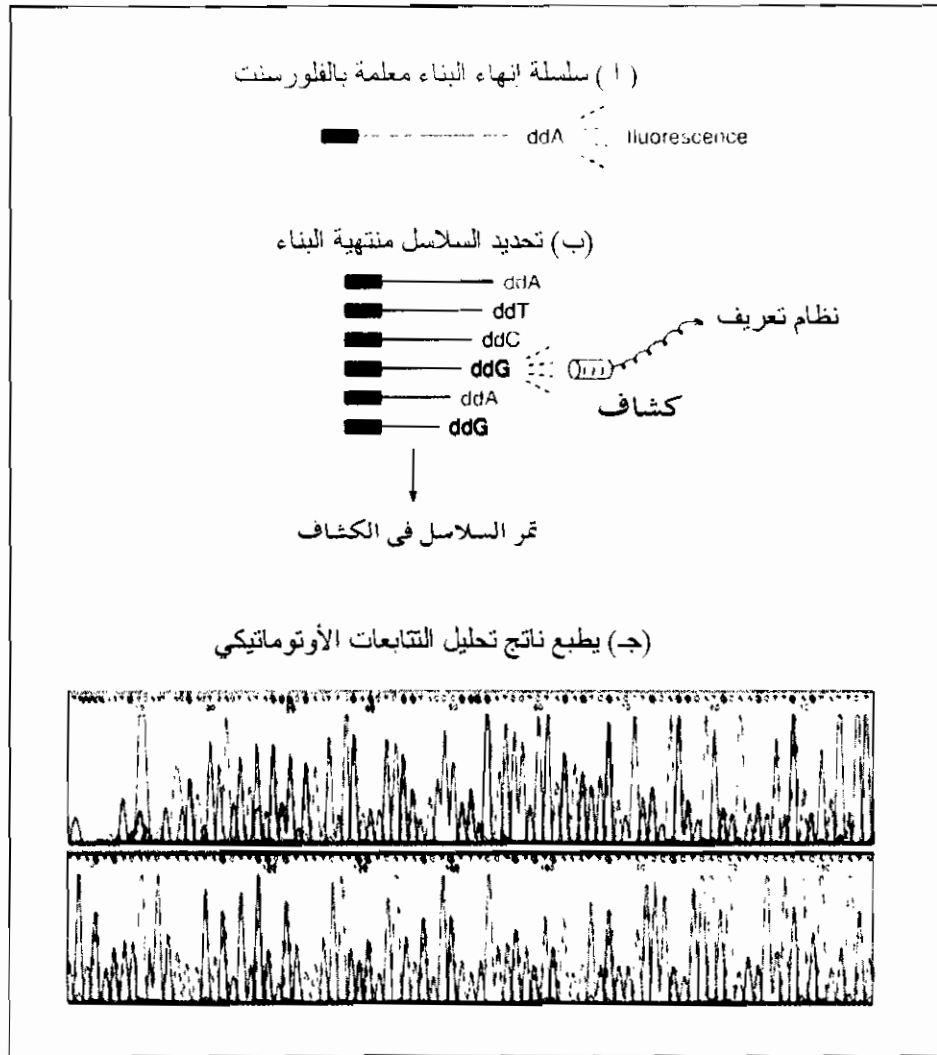
الشكل (١٢-٣٣): طريقة للحصول على عينة نقية من سلسلة مفردة من د ن أ من ناتج PCR مزدوج السلسلة. يتم تعليم أحد البادئين بحبيبات ممغنطة وبعد إنتهاء دورات PCR تتم دنترة نواتج PCR مزدوجة السلسلة و تفصل السلاسل الممغنطة من تلك غير الممغنطة

وتوجد تقنية بسيطة وسهلة لتحليل تتابعات نواتج PCR ويطلق عليها Thermal Cycle Sequencing وتتضمن الجمع بين PCR وتحليل تتابعات النواتج في تفاعل واحد. وفي هذه التقنية يستخدم مخلوط للتفاعل مشابه لمخلوط PCR مع اختلافين هامين أولهما استخدام بادئ واحد Single Primer فقط (وليس زوج) ومعنى ذلك أن عملية الاكثار المميزة لتقنية PCR لا يمكن أن تحدث ولكن كل ما يحدث هو أن سلسلة واحدة من د.ن.أ. القالب هي التي سيتم أكثارها الى نسخ عديدة. ولا بد من استمرار هذا الاكثار نظراً لأن التفاعل يكون متسلسل حرارياً Thermally Cycled تماماً مثل ما يحدث في PCR، والفرق أو الاختلاف الثاني هو أن هذا التفاعل المعدل يجرى اربع مرات على التوازي وفي كل مرة مع نيوكلييدة معدلة Dideoxy مختلفة (G, C, T, A) مما يؤدي إلى انتهاء بناء الشظايا الجديدة عند كل من هذه النيوكلييدات المعدلة (الشكل ١٢-٣٤). يلي ذلك التفريد الكهربى للنواتج كما في حالة تقنية انتهاء السلسلة.



الشكل (١٢-٣٤): الأساس في تحليل نتائج دن أ بطريقة Thermal Cycle Sequencing. يتم تحضير PCR مع إضافة بادئ واحد فقط (وليس زوج من البادئات) واحد داي ديوكس نيوكلييدة Dideoxy NTP حيث يحدث بناء لأحد سلاسل القالب إلى العديد من سلاسل إنهاء البناء (بطريقة ساتجر - كولسون)

وقد تم تطوير عملية تحليل التتابعات بجعلها Automated وبدلاً من استخدام التعليم بالاشعاع استعويض عنه بالتعليم الفلورسنتى والذى يتم برابط فلورسنت بلون مختلف Different Fluorochrome مميز لكل قاعدة Dideoxy (مثلاً أحمر مع A وأزرق مع T وأصفر مع G وأخضر مع C) وتستمر متابعة اشارات الفلورسنت بنوع خاص من Imaging System يتضمن استخدام كمبيوتر لقراءة تتابعات د.ن.أ بدلاً من الاعتماد على نظر الباحث. ويتم وضع نواتج التفاعل فى انبوبة شعيرية واحدة لنظام التفريد الكهربى وامرارها على كشاف فلورسنتى Fluorescent Detector الذى يحدد نوع الاشارة الفلورسنت المنبعثة من كل حزمة ويغذى النتائج للكمبيوتر الذى يقوم بتحويل المعلومات إلى تتابعات د.ن.أ المقابلة. ويمكن طبع التتابعات لفحصها أو تخزين فى الكمبيوتر للقيام بتحليلات أكثر (الشكل ١٢-٣٥).



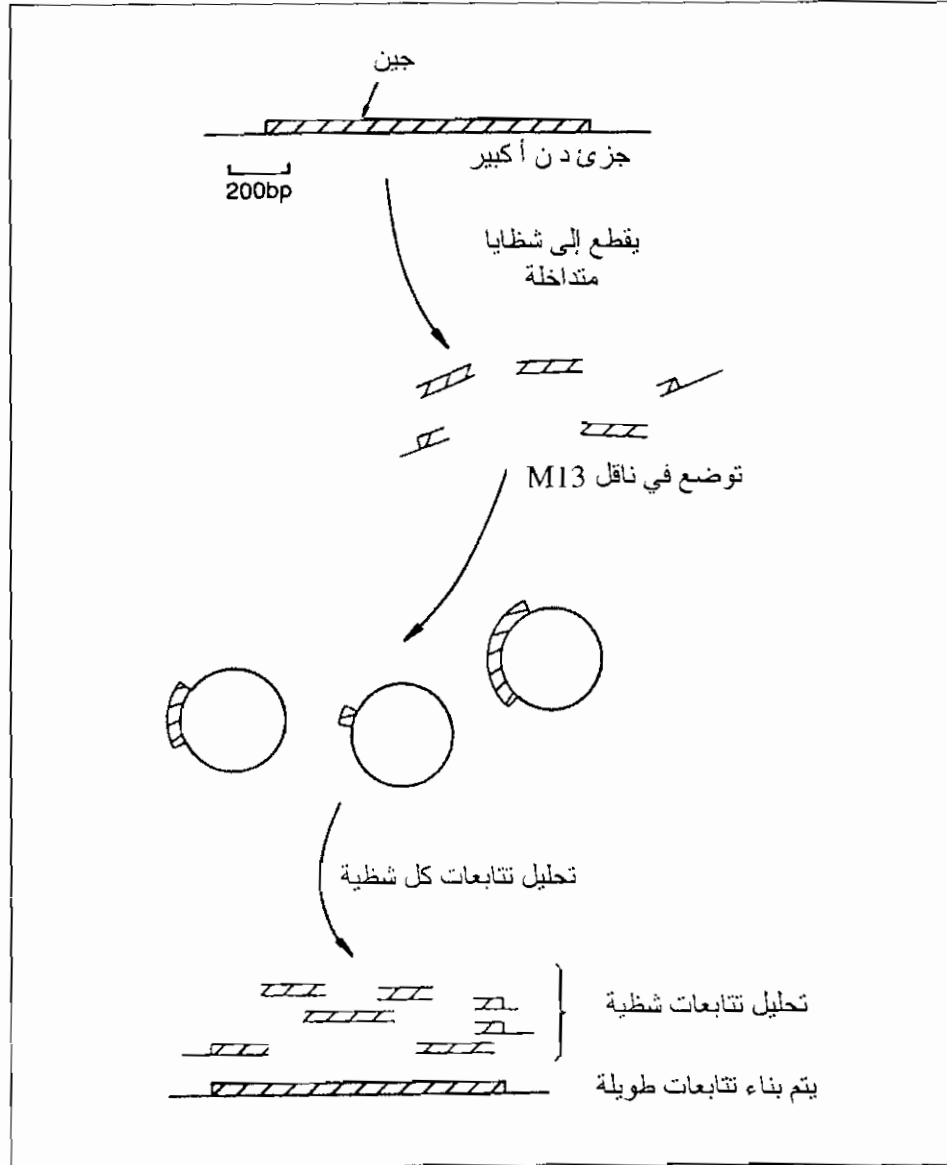
الشكل (١٢-٣٥): تحليل تتابعات د ن أ أوتوماتيكيا:

- أ - يتم تعويم كل من Dideoxy NTP بكشاف فلورسنتي.
- ب- يتم تعويم كل من Dideoxy NTP بكشاف فلورسنتي مختلف اللون بحيث يمكن تمييز السلاسل المنتهية البناء أثناء مرورها على الكشاف Detector.
- ج- مثال لتتابعات د ن أ مطبوعة من الكمبيوتر.

ويمكن لجهاز تحليل التتابعات الأوتوماتيكي Automated Sequencer أن يقرأ حتى ٩٦ تتابع مختلف في ساعتين وبذلك يعطي بيانات أكثر وبسرعة أكبر عما هو ممكن بالتحليل اليدوي، حيث يعطي الشوط الواحد للتحليل تتابع ٧٥٠ نيوكليوتيدة مقابل ٤٠٠ نيوكليوتيدة فقط بالتحليل اليدوي ويمكن بالتحليل الأتوماتيكي واستخدام Robotic Systems وبنظام مشابه للمصنع حيث يوجد ٩٦ مسار أو خط تحليل تتابع أوتوماتيكي تعمل معا بالتوازي للحصول على تتابعات ٥٠ مليون نيوكليوتيدة على مدى يومين من التشغيل المتواصل للنظام مما يعد قفزة هائلة في مجال تحليل التتابعات.

تكوين تتابعات طويلة من د.ن.أ.:

ويتم ذلك من خلال اجراء تجارب تحليل تتابعات د.ن.أ. لعدد كبير من الشظايا المكونة أو لنواتج PCR بحيث تكون جميعها مشتقة من جزئ د.ن.أ. واحد أكبر الشكل (١٢-٣٦) ولا بد أن تكون هذه الشظايا متداخلة Overlapping حتى تكون التتابعات نفسها متداخلة. ويمكن التعرف على مواقع التداخلات إما بالعين المجردة أو باستخدام الكمبيوتر. ويتم تكوين التتابع الرئيسي Master Sequence أو Contig بالتدريج. وتوجد عدة طرق لانتاج الشظايا المتداخلة. إذ يمكن قبل الكلونة تقطيع جزئ د.ن.أ. بأربع أو خمسة انزيمات قطع محددة. وهناك طريقة أخرى لتكسير جزئ د.ن.أ. وهي تسليط ذبذبات قوية Sonication مما يؤدي إلى تقطيع جزئ د.ن.أ. بطريقة عشوائية أكثر مما يؤدي إلى زيادة احتمالات الحصول على شظايا متداخلة يمكن وضعها في التتابع الرئيسي Contiguous Master Sequence.



الشكل (١٢-٣٦): بناء تتابعات د ن أطويلة من مجموعة تتابعات متداخلة قصيرة

وقد تحققت نجاحات هامة في مجال تحليل التتابعات النيوكليدية في عدد من الجينومات وكان أول كائن تم تحليل تتابعاته هو بكتريوفاج ϕX 174 وتلاه تحليل فيروس SV 40 والبلازميد PBR 322. وبعد ذلك توالى تحليلات تتابعات جينومات أكبر مثل جينوم الميتوكوندريا البشرية وبكتريوفاج λ وقد تم مؤخراً تحليل التتابعات الكاملة لجينومات الخميرة والدروسفلا والنيماتودا ونبات الارابيدوبس ونبات الارز وتوجت بالانتهاء من تحليل التتابعات الكاملة للجينوم البشرى.

ويبين الشكل (١٢-٣٧) التقدم الهائل الذى حدث فى كفاءة تحليلات تتابعات الجينوم المختلفة وبعض الانجازات التى تمت فى هذا المجال.

انجازات هامة فى تحليل تتابعات د.ن.أ.		
اكتشف Miescher د.ن.أ.	١٨٦٨	درجة الكفاءة القاعدة / الفرد / السنه
اثبت Avery أن د.ن.أ هو مادة الوراثة.	١٩٤٤	
اعلن Watcon & Crick الحلزون المزدوج لـ د.ن.أ.	١٩٥٣	
تحليل تتابعات "tRNA للخميرة بواسطة Holley	١٩٦٥	١

تحليل تنابعات بكتريوفاج λ بواسطة wu	١٩٧٠	١٥
		١٥٠
استنبط Sanger طريقة انهاء السلسلة لتحليل التنابعات واستنبط Glibert طريقة الهدم الكيماوي لتحليل التنابعات	١٩٧٧	١٥٠٠
استنبط Messing ناقل الكلونة M13	١٩٨٠	١٥٠٠٠
استنبط Hood نظام تحليل تنابعات اوتوماتيكي جزئي	١٩٨٦	٢٥٠٠٠
		١٠٠٠٠٠
اعلن Venter تحليل تنابعات أول جينوم بكتيري واستخدم فيها اجهزة اوتوماتيكية بالفلورسنت تدار بالانسان الاتي robot وقدم مفهوم تحليل التنابعات بجهاز PCR	١٩٩٥	١,٠٠٠,٠٠٠
المجموعة الدولية للعلماء اعلنت تحليل التنابعات الخاصة بجينوم الخميرة	١٩٩٦	الكفاءة / قاعدة/ الماكينة/السنة
شركة Perkin- Elmer اخترعت جهاز تحليل تنابعات يحتوى على ٩٦ انبوبة شعرية يتم تشغيله اوتوماتيكياً بالكامل	١٩٩٨	١٥٠,٠٠٠,٠٠٠
تحليل التنابع الكامل لجينوم دودة النماتودا	١٩٩٨	

تحليل التتابع الكامل لمناطق اليوكروماتين في جينوم الدروسفلا وكذلك تحليل التتابع الكامل لجينوم نبات الارادبيدوبس	٢٠٠٠
نشر العلماء القائمون على HGP وشركة Celera أول مسودة للتتابعات الجينوم البشرى.	٢٠٠١
نشر أول مسودة لتتابعات جينوم الازر	٢٠٠٢

الشكل (١٢-٣٧): بعض الانجازات الهامة فى تحليل تتابعات د. ن. أ

الفصل الثالث عشر

التحليلات الجينومية Genomic Analysis

منذ أكثر من سبعين عاماً دأب الوراثيون على استخدام مصطلح الجينوم Genome للدلالة على نسخة كاملة من المعلومات الوراثية أو مجموعة كامله من الكروموسومات (الاحادية) للكائن. وعلى العكس من ذلك نجد أن مصطلح جينوميا Genomics من المصطلحات الحديثة جداً. وقد كان Thomas Roderick أول من اطلق هذا المصطلح عام ١٩٨٦ للإشارة إلى أحد المجالات الوراثية التي تهتم برسم الخرائط Mapping وتحليل التتابعات وتحليل وظائف الجينومات بالكامل. وقد اتخذ هذا المصطلح ايضاً لتسمية مجلة علمية جديدة باسم Genomics مختصة بنشر الابحاث الخاصة بهذا المجال الحديث.

ونتيجة للتقدم الهائل في هذا المجال والذي أدى إلى التوصل الى رسم خرائط مفصلة وتتابعات للجينومات المختلفة، فقد تم تقسيم مجال الجينوميا إلى: جينوميا تركيبية Structural Genomics وتختص بدراسة تركيب الجينوم، وجينوميا وظيفية Functional Genomics وتختص بدراسة وظائف جينات الجينوم والتي تشمل التحليلات النسخية Transcriptome أى المجموعة الكاملة من ر.ن.أ. المنسوخة من الجينوم، والتحليلات البروتينية Proteome أى المجموعة الكاملة من البروتينات المشفرة من الجينوم.

وقد تفرعت الجينوميا الوظيفية الى مجال جديد وهو Proteomics والذي يختص بتقدير تركيب ووظائف جميع البروتينات فى الكائن الحى.

وبينما نجد أن الجينوميا التركيبية متقدمة بشكل جيد نتيجة لتوفر التتابعات النيوكليدية الكاملة لعدد كبير من الكائنات ، فإن الجينوميا الوظيفية تبدو على اعتاب مرحلة نمو هائلة. وقد ساعد على ذلك استتباط تقنيات حديثة مثل Gene Chips, Microarray مما ساعد العلماء على متابعة وتحليل تعبير جينومات كاملة (أى جميع الجينات فى كائن ما) فى المراحل المختلفة من النمو والتمايز أو استجابة للتغيرات البيئية التى يتعرض لها الكائن مثل الاجهادات الحرارية أو نقص بعض المغذيات. والأمل كبير ان تقدم هذه التقنيات معلومات هامة عن وظائف الجينات وكيفية تفاعلها مع بعضها وكذلك تفاعلها مع البيئة المحيطة بها.

ولدراسة الجينوم يجب اجراء ثلاثة تحليلات هامة وهى:

- ١- الجينوميا Genomics وتتمثل فى الحصول على بيانات تحليل تتابعات د.ن.أ فى صورة اعداد هائلة من التتابعات الفردية بطول ٥٠٠-٨٠٠ قاعدة والتى يجب تجميعها فى تتابعات جينومية متجاورة Contiguous ولذلك لابد من وجود استراتيجية يتم على اساسها التجميع الصحيح لهذه التتابعات بدون أخطاء أو فجوات.
- ٢- ما بعد الجينوميا Post-Genomics أو الجينوميا الوظيفية Functional Genomics ويتم فيها تحليل التتابعات لتحديد مواقع الجينات ، والتتابعات التنظيمية Control Sequence وغيرها من العوامل الهامة. ويتبع ذلك سلسلة من التجارب لتحديد وظائف أى جينات جديدة غير معلومة الوظائف Candidate Genes أو Orphans.

٣- المعلوماتية الحيوية Bioinformatics وتتضمن استخدام الكمبيوتر للمساعدة في دراسات ما بعد الجينوميا وتشمل تجميع التتابعات المتجاورة Contigs بالكمبيوتر (باستخدام برامج متخصصة) ودراسة التتابعات للكشف عن وجود الجينات والتنبؤ بوظائف بعض الجينات الجديدة وتخزين الكميات الهائلة من البيانات والمعلومات التي يتم الحصول عليها خلال مراحل تنفيذ المشروعات الجينومية. ويطلق على المعلوماتية الحيوية Molecular Biology in Silico في إشارة إلى أهمية الكمبيوتر في هذا الشأن.

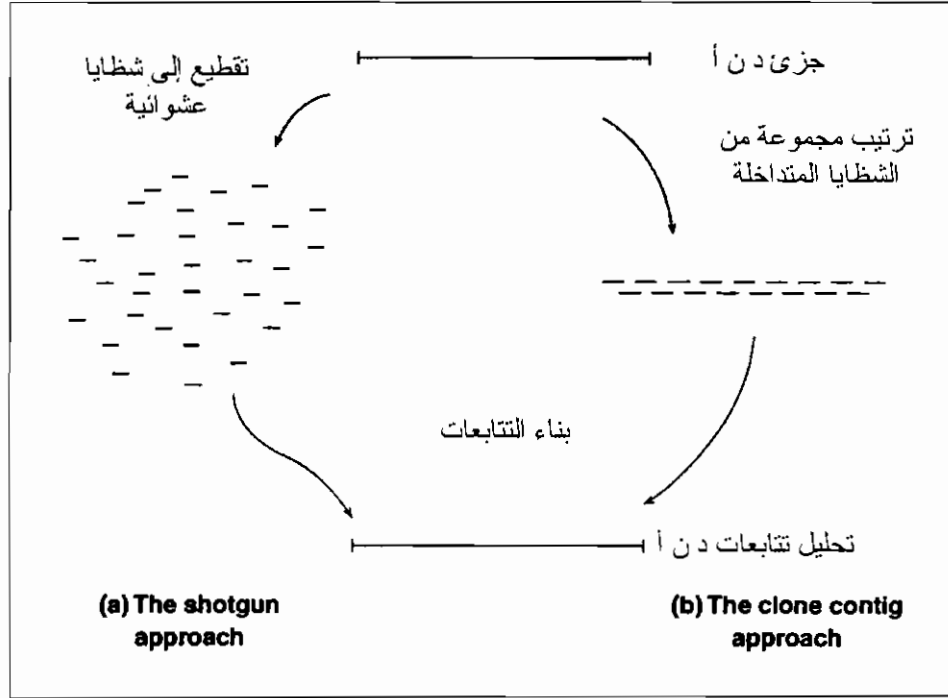
طرق تكوين التتابعات المتجاورة Assebnly of Contigs:

لقد أصبح الحصول على بيانات تتابعات د.ن.أ عملية روتينية في المشاريع الجينومية وخاصة بعد استخدام الطرق الاوتوماتيكية في هذا المجال كما سبق القول. ولكن المشكلة الأولى والحقيقية تتمثل في الحاجة إلى تجميع أو اصطاف assemble الالاف وحتى الملايين من شظايا التتابعات بطول ٧٥٠ قاعدة، في شكل تتابع جينومي متجاوز (متراص). ويتم استخدام استراتيجيتين لهذا الغرض (الشكل ١٣-١):

١- طريقة Shotgun Approach والتي يتم فيها تقطيع أو كسر الجينوم عشوائياً إلى شظايا قصيرة ويتم فحص التتابعات الناتجة للتعرف على التداخلات بينها Overlaps وتستخدم هذه التداخلات في المساعدة على بناء التتابعات المتجاورة للجينوم.

٢- طريقة الكلونات المتجاورة Clone Contig Approach وتتضمن خطوة مبدئية يتم فيها تحديد الكلونات المتداخلة Overlapping ثم يلي ذلك تحليل تتابعات قطع د.ن.أ المكلونة وتوضع هذه القطع في أماكنها الصحيحة

على خريطة الـ Contig توطئة للبناء التدريجي للتتابعات المتداخلة للجينوم.



الشكل (١-١٣)

(أ) طريقة Shotgun و (ب) Clone Contig لترتيب التتابعات الجينومية

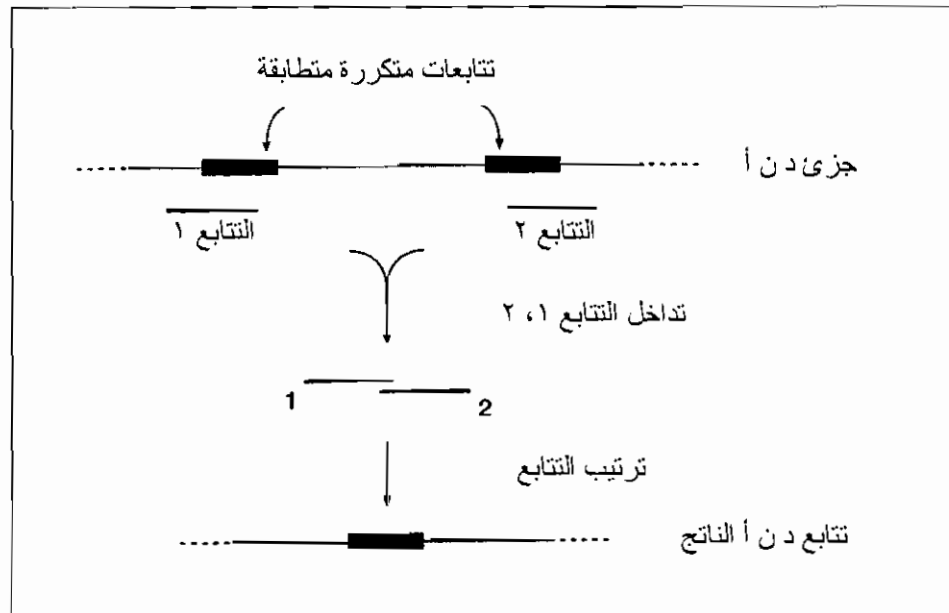
أولاً: طريقة Shotgun لبناء تتابعات الجينوم:

The Shotgun Approach To Genome Sequencing:

أن أهم عامل في نجاح هذه الطريقة هو التعرف على التداخلات الصحيحة بين جميع تتابعات الشظايا التي تم انتاجها بهذه الطريقة (Sonication). ويجب أن تكون عملية تحديد هذه التداخلات دقيقة تماماً حتى يمكن الحصول على التتابعات الصحيحة للجينوم إذ أن أى خطأ في تعريف زوج من تتابعات الشظايا

المتداخلة يؤدي إلى حدوث سلسلة من الأخطاء مما يجعل العملية غير مجدية ولا يعتد بنتائجها. وتزداد احتمالات الوقوع في أخطاء في الجينومات الكبيرة الحجم. لذلك يفضل استخدام هذه الطريقة في تحليل تتابعات الجينومات البكتيرية الصغيرة.

وتنشأ المشاكل عند استخدام هذه الطريقة في الجينومات الكبيرة الحجم نتيجة لاحتوائها على تتابعات متكررة من د.ن. أ. Repetitive DNA Sequences كما في مميزة النواة. أذ انه عند تجميع التتابعات المتجاورة فإن تلك التتابعات التي تقع جزئياً أو كلياً داخل وحدة متكررة من د.ن. أ. يمكن بالخطأ اعتبارها متداخلة مع التتابع المتكرر المتماثل في وحدة متكررة أخرى (الشكل ١٣-٢).



الشكل (١٣-٢): مشكلة وجود تتابعات متكررة عند تحليل تتابعات د ن أ بطريقة Shotgun. قد ينتج عن ذلك غياب قطعة من جزء د ن أ من تتابع د ن أ الكلي

وقد يؤدي ذلك إلى وضع اجزاء من تتابعات الجينوم في غير اماكنها الصحيحة أو فقدتها تماماً. وقد امكن التغلب على هذه المشكلة بالاستعانة بالخرائط الوراثية والفيزيائية لتوجيه تجميع (رص) التتابعات المتحصل عليها بهذه الطريقة كما سيأتى بعد.

ثانياً: طريقة Clone Contig Approach:

ولا تعاني هذه الطريقة من مشاكل وجود التتابعات المتكررة في جزئ د.ن.أ في الجينومات الكبيرة، إلا أنها تتطلب بذل عمل أكثر لذلك تأخذ وقتاً طويلاً وتكلفة أكثر، ويتطلب تكوين سلاسل كلونات د.ن.أ المتداخلة هذا الوقت والجهد الاضافى وبمجرد الانتهاء من هذه العملية تجرى عملية تحليل تتابعات كل قطعة بطريقة Shotgun ويتم بناء تتابعات الجينوم خطوة خطوة كما فى الشكل اعلاه.

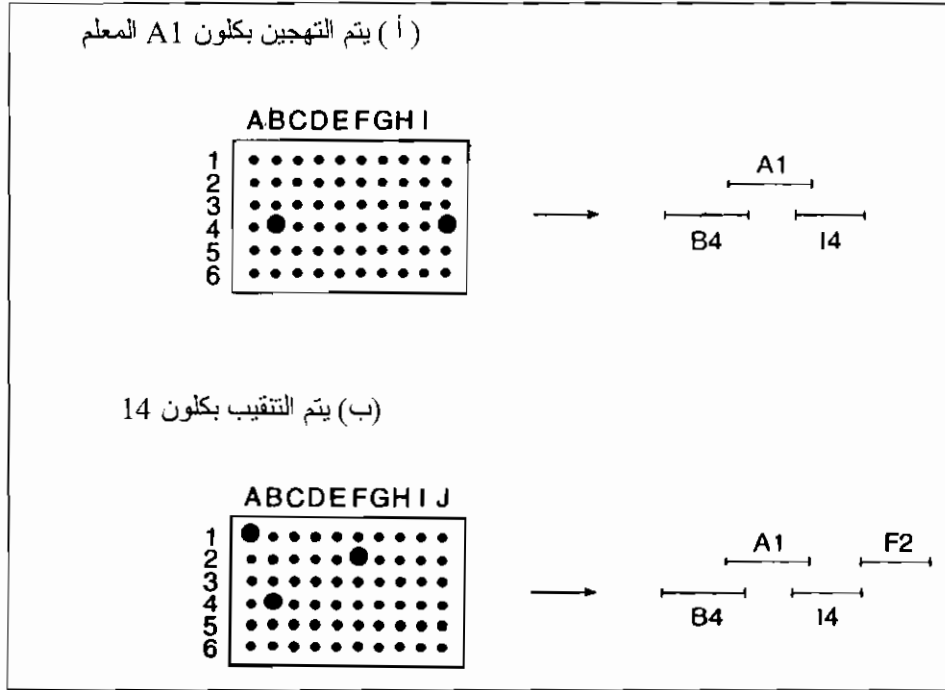
ويجب أن تكون الشظايا طويلة بقدر الامكان لتقليل العدد الكلى من الكلونات المطلوبة لتغطية الجينوم بأكمله. ولذلك يحتاج الأمر إلى استخدام ناقلات كلونة ذات سعة كبيرة مثل BAC's.

وتوجد طريقتين لبناء Clone Contig وهما:

١ - طريقة المشى على الكروموسوم Chromosome Walking:

وتبدأ هذه العملية باختيار كلون عشوائياً من المكتبة ويتم تعليمه Labelled ويستخدم كواسمة تهجينية مقابل جميع الكلونات الاخرى فى المكتبة (الشكل ١٣-٣-أ). وتكون الكلونات التى تعطى اشارة تهجين مع الكلون الواسم هى التى تتداخل معه. ويلي ذلك استخدام احد هذه الكلونات المتداخلة كواسمة (ويتم تعليمها) وتبدأ دورة جديدة من التنقيب عن التداخلات، وهكذا حتى يتم الكشف

عن جميع التداخلات الممكنة بين الكلونات فى المكتبة (الشكل ١٣-٣-ب) وبذلك يتم بناء Clone Contig خطوة خطوة. إلا أن هذه الطريقة تعتبر مجهده وشاقة ويستعان بها فقط فى الكروموسومات القصيرة التى تحتوى على عدد قليل نسبياً من الكلونات أو عندما يكون الغرض منها ملئ الفجوات الصغيرة بين إلى Contigs والتى تم بناؤها بطرق أخرى سريعة.

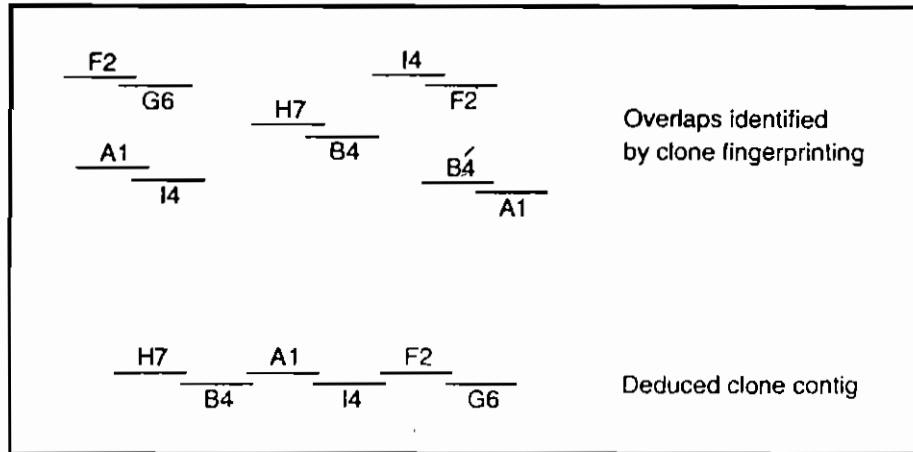


الشكل (١٣-٣): المشى على الكروموسوم Chromosome Walking

٢- طريقة القفز على الكروموسوم Chromosome Jumping

وهى طريقة اسرع بكثير من المشى على الكروموسوم حيث يتطلب المشى أن يتم ذلك خطوة خطوة ببطء من نقطة بداية محددده Fixed وخاصة عندما تكون المسافات كبيرة بين الكشافات الجزيئية الاقرب للجين المرغوب.

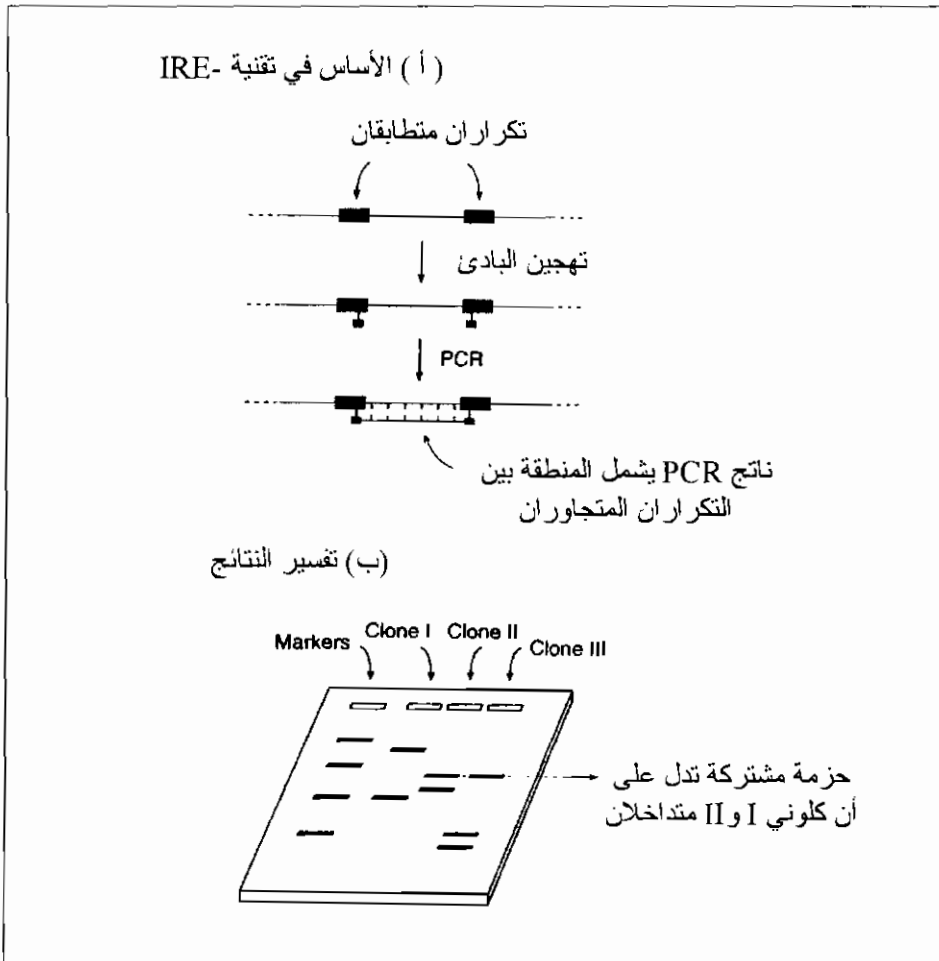
بينما في طريقة القفز على الكروموسوم لا يحتاج الامر أن يبدأ ببناءه Conting من نقطة بداية محددة ولكن يكون الغرض هو التعرف على أزواج من الكلونات المتداخلة Pairs of Overlapping Clones وعندما نحصل على عدد كافي من أزواج الكلونات المتداخلة، فإن بناء الـ Conting سيكون سهلا وتعرف هذه الطريقة ببصمة الكلون Clone Fingerprinting (الشكل ١٣-٤).



الشكل (١٣-٤): تكوين Clone Contig بتقنية بصمة الكلون Clone Fingerprinting

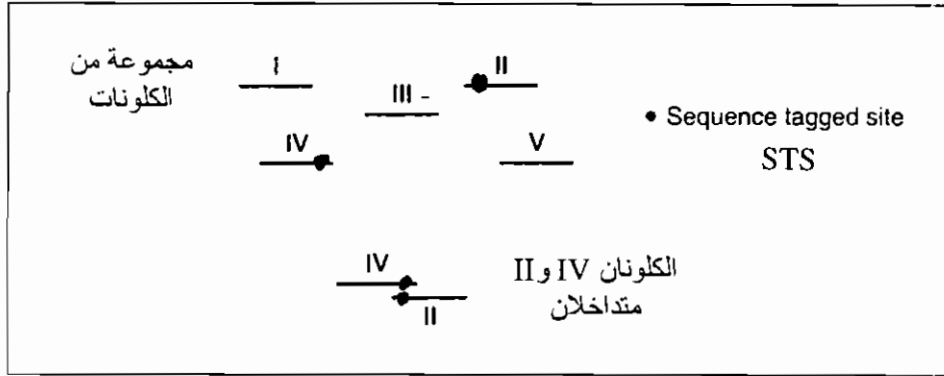
ومن الطرق المستخدمة طريقة Repetitive DNA PCR والمعروفة ايضا بأسم Interspersed Repeat Element PCR (IRE-PCR) ويستخدم هذا النوع من PCR بادئات يتم تصميمها بحيث تتزاوج مع تتابعات د.ن.أ المتكررة Repetitive مما يدفعها إلى توجيه الاكثار Amplification لجزئ د.ن.أ في المنطقة المحصورة بين منطقتين متكررتين متجاورتين (الشكل ١٣-٥). وتنتشر التتابعات المتكررة النوعية بطرز خاصة بطريقة عشوائية في جينوم مميزة النواة وعلى مسافات مختلفة فيما بينها مما يؤدي إلى الحصول

على أطوال (احجام) مختلفة من نواتج PCR عند استخدام هذه البادئات لعمل بصمات لكلونات د.ن.أ في مميزة النواة. وإذا حصلنا على زوج من الكلونات يعطى نفس الحجم من نواتج PCR فلا بد انهما يحتويان على تكرارات على ابعاد متساوية نتيجة لان شطايا د.ن.أ المكلونة في هذه الحالة تكون متداخلة.



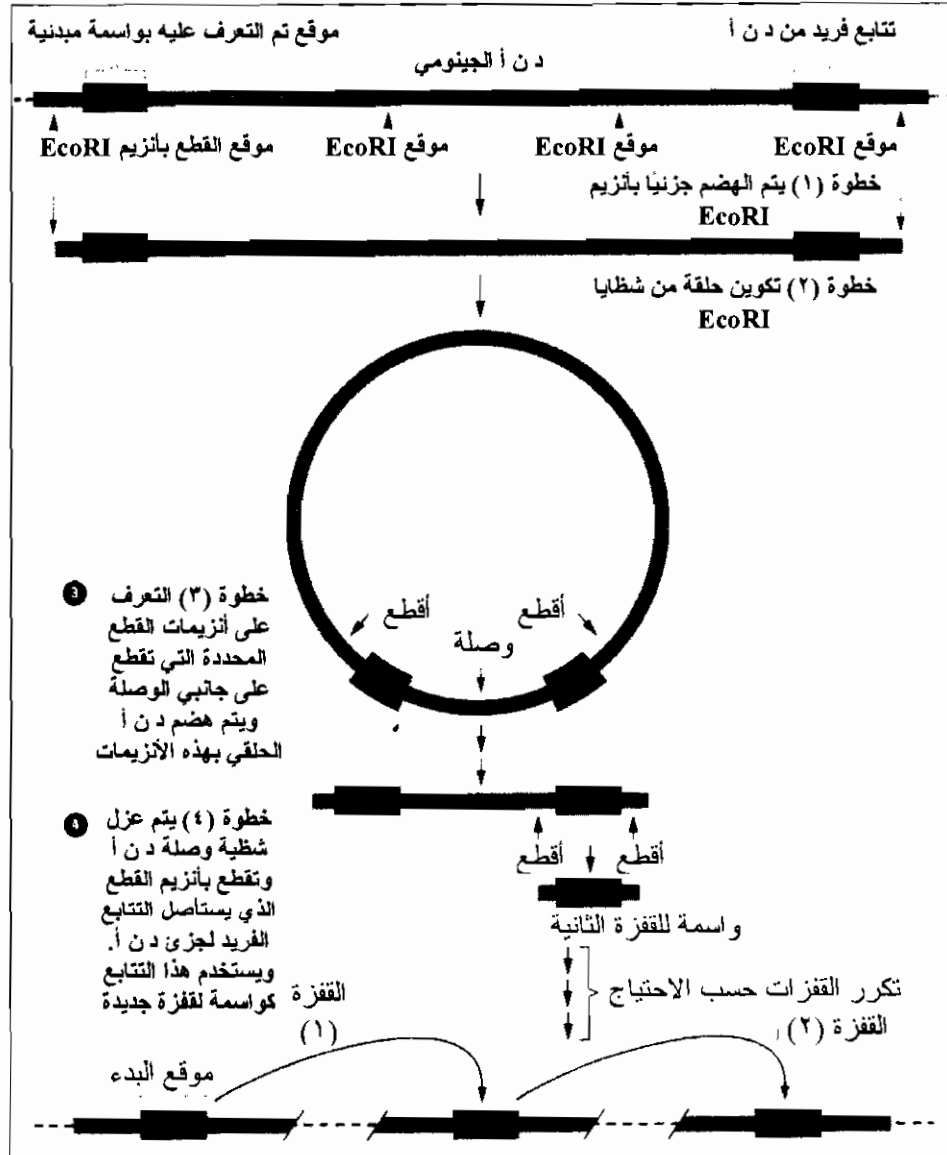
الشكل (١٣-٥): تقنية PCR للتتابعات المتداخلة (IRE - PCR)

وتوجد طريقة أخرى لبناء Contig وتعتمد على Sequence (STS) Tagged Sites وهي عبارة عن تتابع جزئي للجين وتتميز بأنها تقع في مكان فريد في الجينوم، وتستخدم مع جهاز PCR كبادئات لعمل البصمة للكلونات كما في الشكل (٦-١٣).



الشكل (٦-١٣): تقنية محتوى STS لرسم الخريطة

وفي حالة القفز على الكروموسوم قد تتسع القفزة الواحدة بحيث نعطي مسافة ١٠٠ كيلو قاعدة أو أكثر كما في الشكل (٧-١٣). وتتميز طريقة القفز على الكروموسوم بإمكان القفز فوق تتابعات د ن أ المتكررة والتي تعيق عملية المشي.



الشكل (٧-١٣): القفز على الكروموسوم Chromosome Jumping كطريقة مختصرة وسريعة عن المشي على الكروموسومات الطويلة. ويمكن استخدام هذه الطريقة للقفز فوق التتابعات المتكررة من د ن أ التي توقف عملية المشي على الكروموسوم

استخدام الخرائط الوراثية والمادية للمساعدة فى بناء تتابعات الجينوم

Using Maps to Aid Sequence Assembly

تستخدم الخرائط الوراثية والسيولوجية والمادية للتحقق من صحة وضع Clone Conting فى مكانة الصحيح فى التتابعات الجينومية.

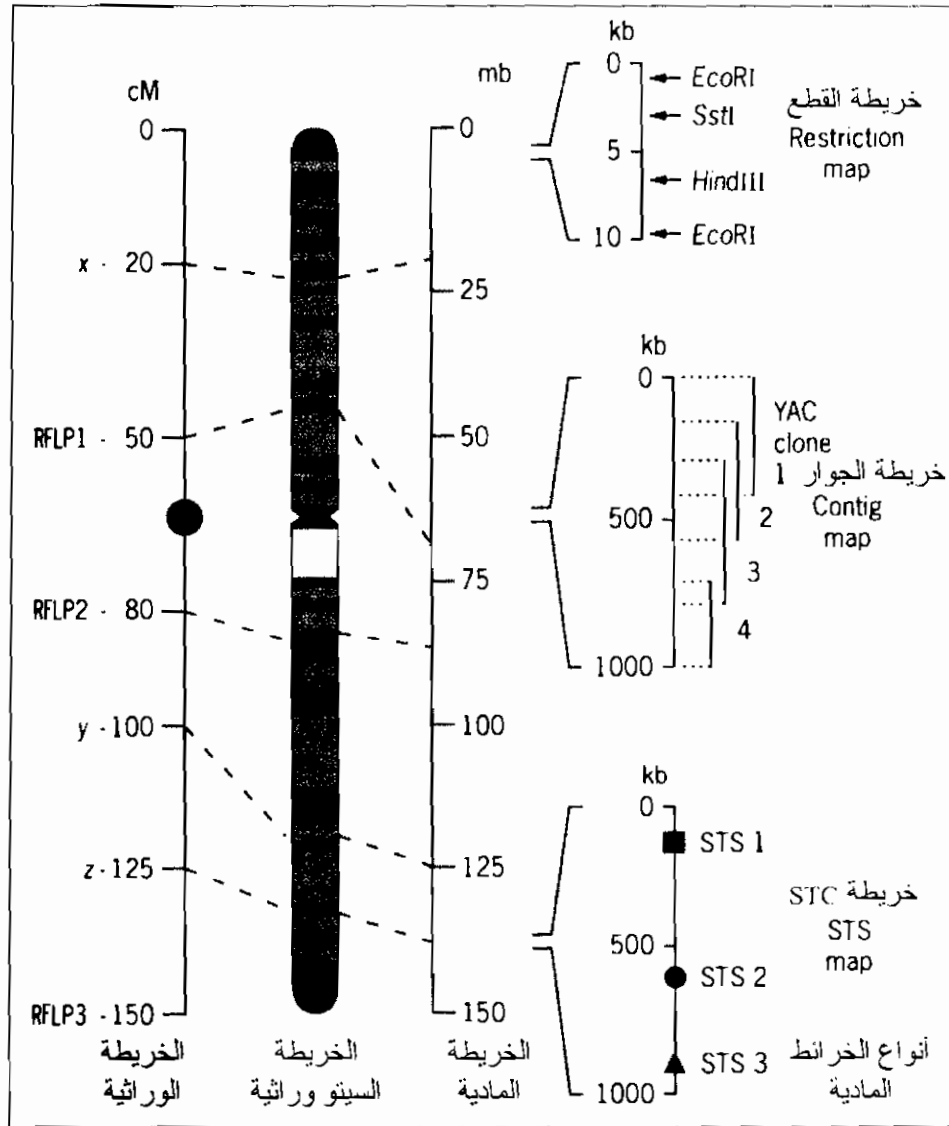
وقد تبين أن الخرائط المبنية على اساس STS ذات أهمية خاصة إذ انها يتم تحديدها بكل من التخریط الوراثى والمادى معا مما يعنى انه يمكن استخدامها لتثبيت Anchor Clone Contig على خريطة الجينوم مما يساعد على تحديد مكان الـ Contig على الكروموسوم.

ويمكن الحصول على الخرائط الوراثية Genetic Map بتحديد المسافات الوراثية من نسب العبور الوراثى فى النسل الناتج من التهجين بين آباء متفارقة فى صفة ما، او فى حالة الانسان عن طريق تحليل شجرة النسب Pedigree Analysis أو بإستنباط كشافات جزيئية DNA Markers مثل RFLP أو SSR أو SNP.

أما الخرائط المادية Physical Map فيتم استنباطها من خلال تحديد مكان تتابع معين مثل (EST) على جزئ د.ن.أ الكروموسومى بطريقة FISH السابق شرحها.

وعندما يتم رسم الخريطة المادية لكروموسوم ما فإنه يجب ربطها بالخرائط الوراثية والسيولوجية Cytogenetic. ويتم تحديد التلازم بين الخرائط

الوراثية والمادية بتعيين موضع الكلونات على الخريطة المادية لجينات سبق معرفة موقعها على الخريطة الوراثية (الشكل ١٣-٨).



الشكل (١٣-٨): التلائم بين الخرائط الوراثية والسيتووراثية والمادية للكروموسوم

ويطلق على الجينات المشتركة في مواقعها بين الخرائط الوراثية والخرائط المادية اسم جينات "وتدية" Anchor لأنها تثبت أو تربط الخريطة انمادية بالخريطة الوراثية والعكس صحيح. وكما سبقت الإشارة اعلاه فإن خرائط STS تكون اكثر الخرائط المادية والوراثية التي يمكن أن توفى بهذا الغرض.

وترجع أهمية اللجوء إلى هذه الخرائط للمساعدة في بناء تتابعات د.ن.أ. لجينوم وخاصة في الجينومات الكبيرة الحجم مثل تلك الموجودة في الكائنات مميزة النواة لأنها تستخدم كدليل Guide لمراجعة عملية تجميع التتابعات والتأكد من أن هذه العملية قد تمت بطريقة صحيحة من خلال تجميع الاعداد الكبيرة من التتابعات القصيرة الناتجة من جهاز تحليل التتابعات الاوتوماتيكي (بطول حوالى ٧٠٠ نيوكلييدة لكل تتابع قصير). وإذا حدث أن كشف ما Marker تم استنباطة بالخرائط الوراثية أو المادية وظهر في التتابع الجينومي في موقع غير متوقع فإن ذلك يعنى أنه قد حدث خطأ في تجميع التتابعات بحيث يجب أن يعاد النظر في مثل هذه الحالة لتصحيح هذا الخطأ.

دراسة ما بعد الجينوميا Post-Genomics:

إن استكمال عملية تحليل تتابعات الجينوم ما هي إلا بداية، إذ انه يتعين تحديد مواقع الجينات والتعرف على وظيفة كل جين وهي عملية ليست سهلة وذلك حتى في حالة الجينومات التي تمت دراستها باستفاضة بطرق التحليلات الوراثية وتقنيات كلونة الجينات.

فعلى سبيل المثال، فقد أظهر تحليل تتابعات فطر الخميرة *S.cervisiae* والتي تعد من افضل الكائنات التي تمت دراستها، أن هذا الجينوم يحتوى على حوالى ٦٠٠٠ جين منها ٣٦٠٠ جين فقط هي التي تم تحديد وظائف لكل منها إما على اساس دراسات سابقة تمت على الخميرة او لوجود جينات فى الخميرة متطابقة فى تتابعاتها مع كائنات أخرى. ومعنى ذلك أن هناك ٢٤٠٠ جين لم يتحدد لها وظيفة حتى الان ويطلق على مثل هذه الجينات Orphans "يتامى".

وهنا يأتى الدور الهام للمعلوماتية الحيوية Bioinformatics والتي يطلق عليها احيانا Molecnler Biology *In Silico* بحيث تساعد فى تعيين وظائف ممكنة لكثير من هذه الجينات.

تحديد موقع الجين فى تتابعات الجينوم:

يمكن بسهولة معرفة موقع الجين إذا كانت تتابعات الاحماض الامينية للبروتين الناتج من هذا الجين معروفة مما يسمح بالتنبؤ بالتتابعات النيوكليديّة لهذا الجين أو إذا كان قد سبق تحليل تتابعات cDNA أو EST لهذا الجين.

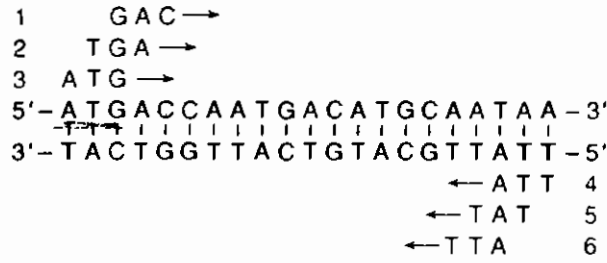
إلا أنه فى كثير من الأحيان لا توجد معلومات مسبقة عن كثير من الجينات بحيث يمكن منها التعرف على التتابع الصحيح لهذه الجينات، وفى هذه الحالات فإن تحديد موقع الجين يكون صعباً حتى لو توفرت الخريطة التى يقع عليها. إن معظم الخرائط تتميز بدقة محدودة ويمكنها فقط التكهّن بالموقع التقريبى للجين تاركه مئات من كيلو قاعدة أو أكثر للبحث عنها، وكثير من الجينات لا تظهر على الخرائط نظراً لأن وجودها ذاته غير متوقع، فكيف يمكن تحديد مثل هذه الجينات فى تتابعات الجينوم؟

البحث عن اطار قراءة مفتوح:

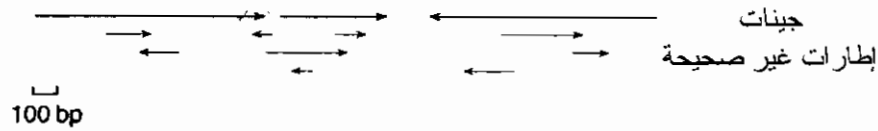
Searching For Open Reading Frame (ORF):

أن تتابع د.ن.أ للجين عبارة عن ORF أى مكون من سلسلة من الكودونات الثلاثية تبدأ بكودون البدء (ATG) وينتهى بكودون الانهاء (TAA أو TAG أو TGA). يتم البحث عن ORF فى التتابعات الجينومية عادة بالكمبيوتر، ويعتبر ذلك أول خطوة فى تحديد موقع الجين. ومن المهم أن يتم بحث جميع الاطارات الستة المحتملة لأن الجين يمكن ان يتجه فى أى من الاتجاهين على طول جزئ د.ن.أ ثنائى السلسلة (الشكل ١٣-٩-أ) وفى حالة الجينوم البكتيرى فإن النتيجة ستكون التعرف على ORF طويل نسبيا الذى يتكون غالباً من الجينات، مع وجود بعض ORF's القصيرة الموجودة جزئياً أو كلياً داخل الجينات ولكنها تقع فى ORF مختلفة (الشكل ١٣-٩-ب) وهذه التتابعات القصيرة تمثل بالتأكيد تباديل نيوكليوتيدية تكونت بالصدفة ولكنها لا تمثل جينات حقيقية.

(أ) لكل تتابع نيوكليدي ستة إطارات للقراءة



(ب) النتيجة النموذجية للبحث عن ORF في جينوم بكتيري



الشكل (٩-١٣): البحث عن إطارات قراءة مفتوحة (ORF)

(أ) يوجد ستة ORF لكل تتابع من د ن أ وقد يحتوى أى منها على جين.

(ب) نتيجة البحث عن ORF فى جينوم البكتريا.

تبيين الأسهم إتجاه الجينات و التتابعات ORF غير الصحيحة.

تعد عملية تحديد موقع الجين فى مميزة النواة أصعب بكثير، إذ أن جينومات مميزة النواة تحتوى على قدر كبير جداً من د.ن.أ المتكرر Repetitive وكذلك على أعداد كبيرة من الانترونات متخللة للجينات. ويؤدى ذلك إلى أنه عند فحص التتابعات سنجد الكثير من ORF's القصيرة التى لا يمكن اهمالها فقد امكن فى جينوم الخميرة مثلاً التعرف على اكثر من ٤٠٠ ORF's قصيرة والتى

اعتبرت تمثل جينات حقيقية ومن المحتمل أن تمثل بعض هذه ORF القصيرة جينات إلا أن الغالبية منها ليست جينات حقيقية.

التمييز بين الجينات الحقيقية وORF العشوائية:

تحتوى بعض الجينومات وخاصة الجينوم البشرى وغيره من الفقاريات على بعض الأدلة التي تساعد على التعرف على ORF الخاص بجين فعلى وتمييزه عن ذلك الذى يمثل ORF عشوائى ويتم استبعاده ومن هذه الأدلة ما يلى:

- ١- CpG Islands: حيث وجد فى الجينوم البشرى أن حوالى ٥٠-٦٠% من الجينات تحتوى على منطقة غنية فى تتابعات G.C ويطلق عليها جزر CpG Island وغالباً ما تمثل نقطة بداية الجين.
- ٢- تحيز الكودون Codon bias: يمكن استخدام ظاهرة تحيز الكودون كوسيلة مفيدة للتعرف على الجين. إذ أن المعروف أن جميع الاحماض الامينية ماعدا الميثيونين والتريتوفان يشفر لها بكودونين أو أكثر، فعلى سبيل المثال نجد أن الحامض الامينى الانين Alanine يتم تشفيره بأربعة كودونات: GCA, GCC, GCG, GCT وفى معظم الجينومات لا يتم استخدام جميع الكودونات الأربعة بنفس المعدل، ففي الانسان مثلاً، تبين وجود تحيز نحو استخدام الكودون GCC بمعدل يزيد أربعة اضعاف عن GCG، وعلى ذلك إذا حصلنا على ORF يحتوى على تكرار عالى High Frequency من الكودونات النادرة فإن الاحتمال الاقوى هو انه لايمثل جين بشرى فيتم استبعاده.
- ٣- البحث عن درجة التطابق Homology Search: فى خطوة تالية للتعرف المبدئى على جين ما يتم البحث عن مدى التطابق بين تتابعات هذا الجين

المبدئي (ORF) مقارنة مع جميع التتابعات الجينية المتوفرة فى قاعدة بيانات د.ن.أ العالمية باستخدام برامج كمبيوتر متخصصة وتشمل المقارنة ليس فقط الجينات المعروفة للكائن تحت الدراسة ولكن جينات اخرى من جميع الانواع الاخرى.

ويقصد بذلك انه إذا تشابه جينان من كائنين مختلفين فى تتابعات النيوكليوتيدات فقد يتشابهان ايضا فى الوظيفة مما يعكس تاريخهما التطورى المشترك.

ولإجراء اختبار التطابق يتم عادة ترجمة تتابعات النيوكليوتيدات للجين المبدئي إلى ما يقابلها من الاحماض الامينية باستخدام قاموس الشفرة الوراثية حيث أن ذلك يؤدى إلى زيادة كفاءة البحث عن التطابق نظراً لاننا نتعامل هنا مع ٢٠ حامض امينى فى حين انه فى حالة التتابعات النيوكليوتيدية سيكون التعامل مع ٤ قواعد فقط أى أن فرصة حدوث خطأ فى تتابع حامضين أمينيين ستكون (١/٢٠) أى ٥% فى حين يرتفع هذا الاحتمال الخاطئ ليصل إلى (١/٤) أى ٢٥% فى حالة استخدام التتابعات النيوكليوتيدية.

وتتم هذه التحليلات من خلال شبكة الانترنت بالاتصال بموقع لاحدى الشبكات الدولية الخاصة بقواعد بيانات د.ن.أ واستخدام برنامج بحث متخصص مثل BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) وإذا اعطت النتيجة تتابعات لإكثر من ٢٠٠ حامض أمينى فى الطول ونسبة تشابه Identity ٣٠% أو أكثر مع تتابع ما فى قاعدة المعلومات (بمعنى أن ٣٠ من كل ١٠٠ موقع يوجد بها نفس الحامض الامينى فى كلا التتابعين) ، فإن التتابعين غالباً ما يكونا متطابقين وبالتالي يكون ORF تحت الدراسة قد تم التحقق من أنه جين حقيقى.

ولزيادة التحقق يمكن اجراء اختبارات النسخ والترجمة المعملية *In Vitro* للتأكد من أن الجين سيتم نسخة إلى RNA وبروتين على التوالي.

تحديد وظيفة جين غير معروف:

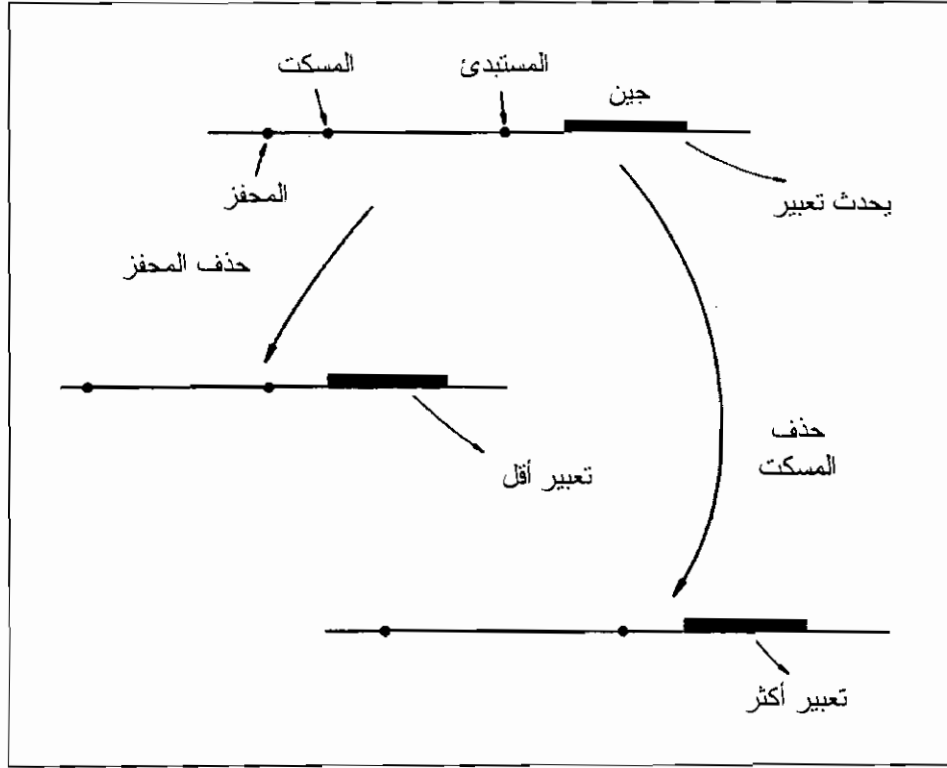
Determining The Function of an Unknown Gene

هناك احتمالات كبيرة فى أن يتم من خلال المعلوماتية الحيوية Bioinformatics و Homolgy Search التوصل إلى تحديد وظيفة للجين غير المعروف وظيفته (orphan) خاصة عندما تتوفر معلومات عن العلاقة بين تركيب البروتين ووظيفته. وعموماً يوجد حتى الان طرق عديدة لدراسة وظيفة الجين.

تحديد التتابعات التنظيمية للجين بتحليلات الحذف:

Identifying Control Sequences by Deletion Analysis:

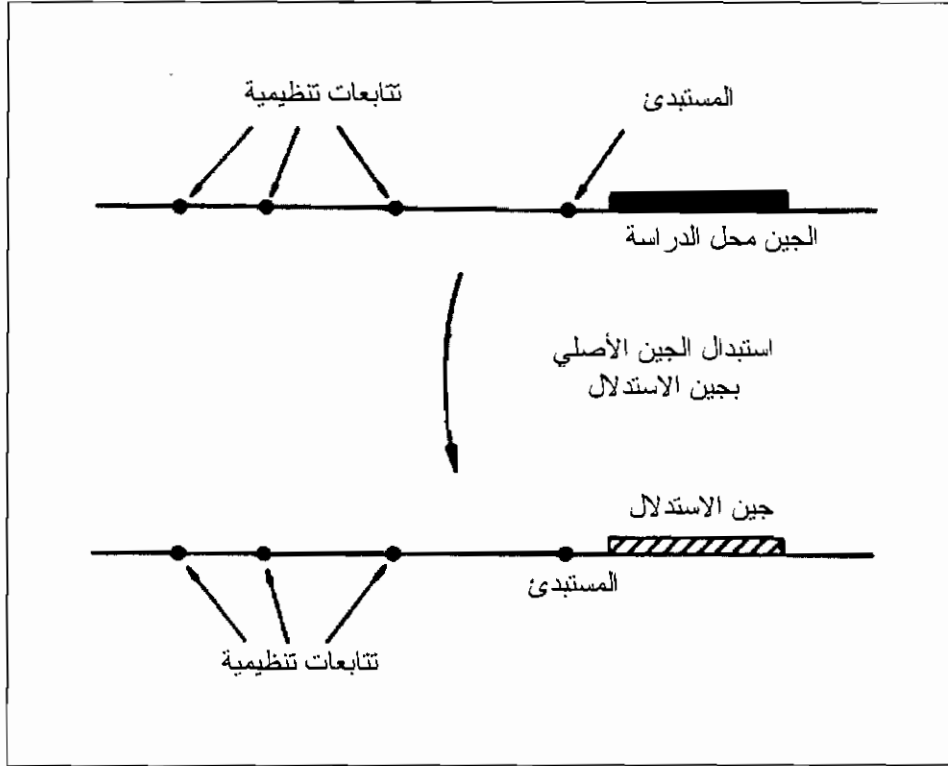
يمكن بتحليلات الحذف التعرف على كل من مواقع ووظائف التتابعات النيوكليدية التى تتحكم فى تعبير الجين. وتعتمد هذه التقنية على افتراض أن حذف التتابع التنظيمى المتحكم فى تعبير الجين سيؤدى إلى تغيير فى الطريقة التى يحدث بها تنظيم تعبير جين مكون يتحكم فيه هذا التتابع التنظيمى (الشكل ١٣-١٠). فمثلا إذا تم حذف تتابع مثبت للتعبير فى جين ما، فإن ذلك سيؤدى إلى ارتفاع معدل تعبير هذا الجين. ومن جهة اخرى يمكن التعرف على التتابعات التنظيمية النوعية والمتخصصة فى تغيير التعبير الجينى فى نسيج معين Tissue-Specific حيث أن حذفها سيؤدى إلى أن الجين المستهدف سيتم تعبيره فى انسجة اخرى غير النسيج المتخصص النوعى.



الشكل (١٣-١٠): الأساس في تحليلات الحذف

وتستخدم تقنية جين الإستدلال Reporter Gene في تحديد التتابعات التنظيمية التي يتم حذفها ومتابعة تأثير غيابها على تعبير الجين المكون. والغرض من استخدام Reporter gene هو سهولة متابعة التغير الحادث في طراز التعبير للجين المكون وتمييزه عن الطراز الطبيعي للتعبير للنسخة الأصلية للجين قبل الحذف. وجين الإستدلال Reporter Gene عبارة عن جين اختبأرى يرتبط بالمنطقة القبلية Upstream Region للجين المكون (الشكل ١٣-١١) بحيث يحل محل الجين نفسه. وعند ادخاله إلى الكائن المضيف فإن طراز تعبير الجين التقريرى سيقاد بالضبط تعبير الجين الاصلى نظرا

لأن الجين التقريرى يكون تحت تأثير نفس التتابعات التنظيمية مثل الجين الاصلى.



الشكل (١١-١٣): جين الاستدلال Reporter gene

ويجب اختيار الجين التقريرى بعناية بحيث يستوفى بعض الشروط

الاساسية التالية:

- ١- أن يشفر هذا الجين لطراز مظهرى مختلف ولا يوجد مثيل له فى الكائن المضيف.
- ٢- أن يتم التعرف بسهولة على الطراز المظهرى الجديد فى الكائن المضيف.

٣- يفضل أن يكون في الامكان تقدير هذا الطراز المظهري كميًا.

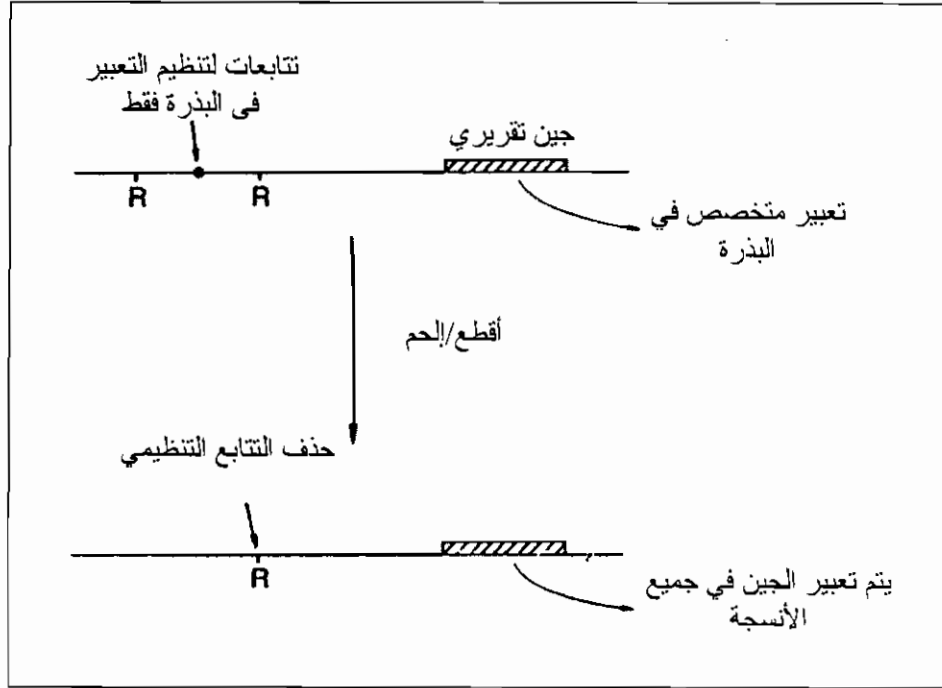
وقد أمكن تحديد عدد من الجينات التقريرية لدراسة التنظيم الجيني
الجدول (١).

الجدول (١) بعض نماذج للجينات التقريرية المستخدمة في دراسة التنظيم
الجيني في الكائنات الراقية

الجين	نواتج الجين	التحليل assay
LacZ	β - galactosidase	اختبار كيمائى هستولوجى
Neo	Neomycin phosphotranseferase	مقاومة المضاد الحيوى كاناميسين
cat	Chloramphenicol acetyltransferase	مقاومة المضاد الحيوى كلورامفينيكول
Lux	Luciferase	انبعاث ضوءى حيوى Bioluminescence
urid A	β - glucouronidase (GUS)	اختبار كيمائى هستولوجى

اجراء اختبار الحذف:

بعد اختيار الجين التقريرى وانتاج التركيب المعاد صياغته، يمكن اجراء
الحذف فى المنطقة القبلية Upstream لهذا التركيب باحدى طرق الحذف كما فى
الشكل (١٢-١٣).



الشكل (١٣-١٢): تحليلات الحذف: يتم ربط جين الإستدلال Reporter Gene (التقري) بالمنطقة السابقة Upstream لجين متخصص يشفر لأحد بروتينات البذرة في النبات. أدت إزالة الشظية المحصورة بين موقعي R إلى حذف النتابع التنظيمي الذي يحدد تعبير الجين في البذرة بحيث يحدث تعبير لجين الإستدلال في أنسجة النبات المختلفة

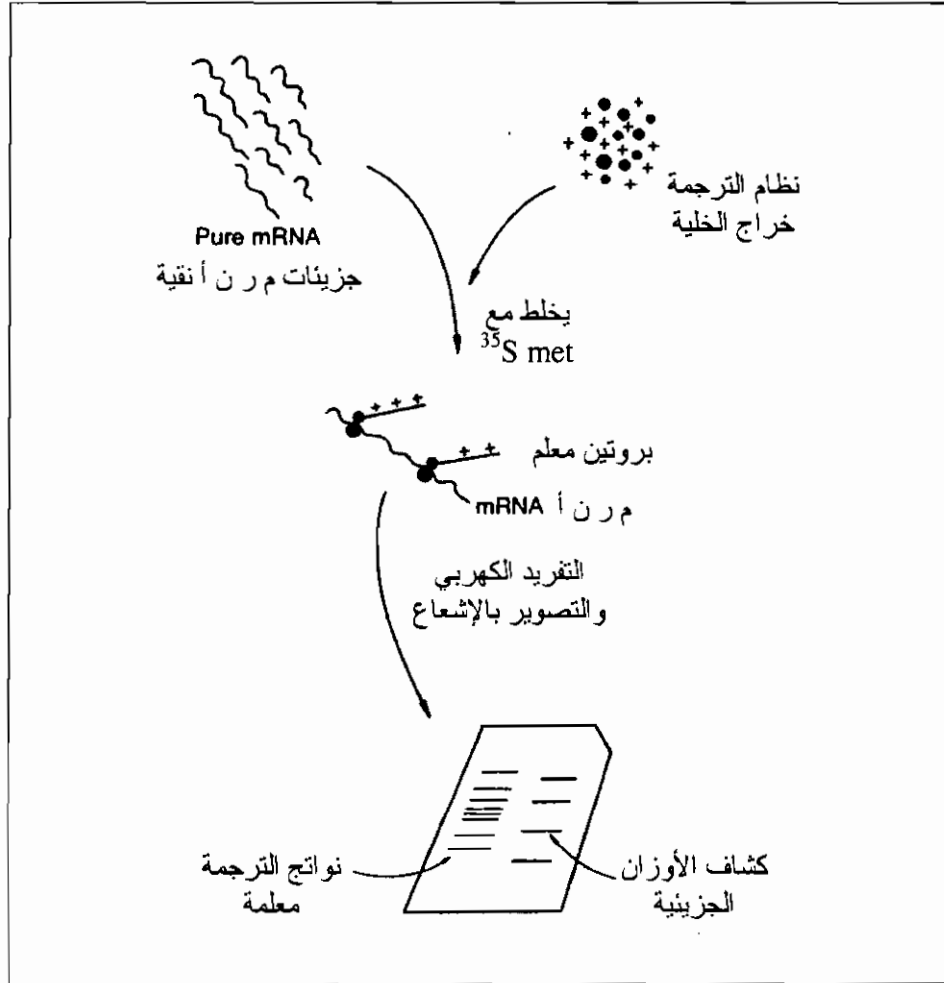
يلى ذلك دراسة تأثير الحذف بعد إدخال التركيب في الكائن المضيف وتقدير طراز ومعدل تعبير الجين التقري في إذا حدثت زيادة في التعبير فإن ذلك يعنى أنه قد حدثت إزالة لتتابع مثبط أو مسكت Silencing، في حين أن حدوث انخفاض في معدل التعبير يعنى حذف منطقة منشط أو محفز. أما إذ نتج عن الحذف تغيير في التخصص النسيجي Tissue Specificity فإنه يشير إلى أن المنطقة المستهدفة بالحذف تمثل تنابعاً تنظيمياً متخصصاً في الاستجابة في نسيج نوعي Tissue- Responsive.

تحديد نواتج ترجمة جين مكلون:

Identifying The Translation Product of a Cloned Gene:

توجد تقنيتين رئيسيتين للتعرف على نواتج ترجمة الجين المكلون وهما
 hybrid-release translation (HRT) أى ترجمة ر.ن.أ المحرر من الهجين
 و hybrid-arrest translation (HART) أى ترجمة ر.ن.أ المرتبط بالهجين وكلا
 التقنيتين تعتمدان على قدرة من م. ر.ن.أ النقى على إدارة بناء البروتين فى
 نظام ترجمة بدون خلية Cell-Free System أى فى انبوبة الاختبار *In Vitro*
 وفى وجود تحضير يحتوى على جميع العناصر والمكونات اللازمة لإجراء هذه
 الترجمة مثل tRNA والريبوسومات وغيرها من المكونات . ويمكن الحصول
 على المكونات اللازمة للترجمة المعملية هذه من حبوب القمح أثناء انباتها أو من
 خلايا الأرنب Reticulocytes والتي تكون نشطة بدرجة عالية فى عملية بناء
 البروتين .وتتم عملية الترجمة خارج الخلية عند اضافة عينة من م. ر.ن.أ. الى
 نظام الترجمة خارج الخلية هذا مع مخلوط من ٢٠ حامض أميني بحيث يكون
 حامض الميثيونين معلم بالكبريت المشع (^{35}S).

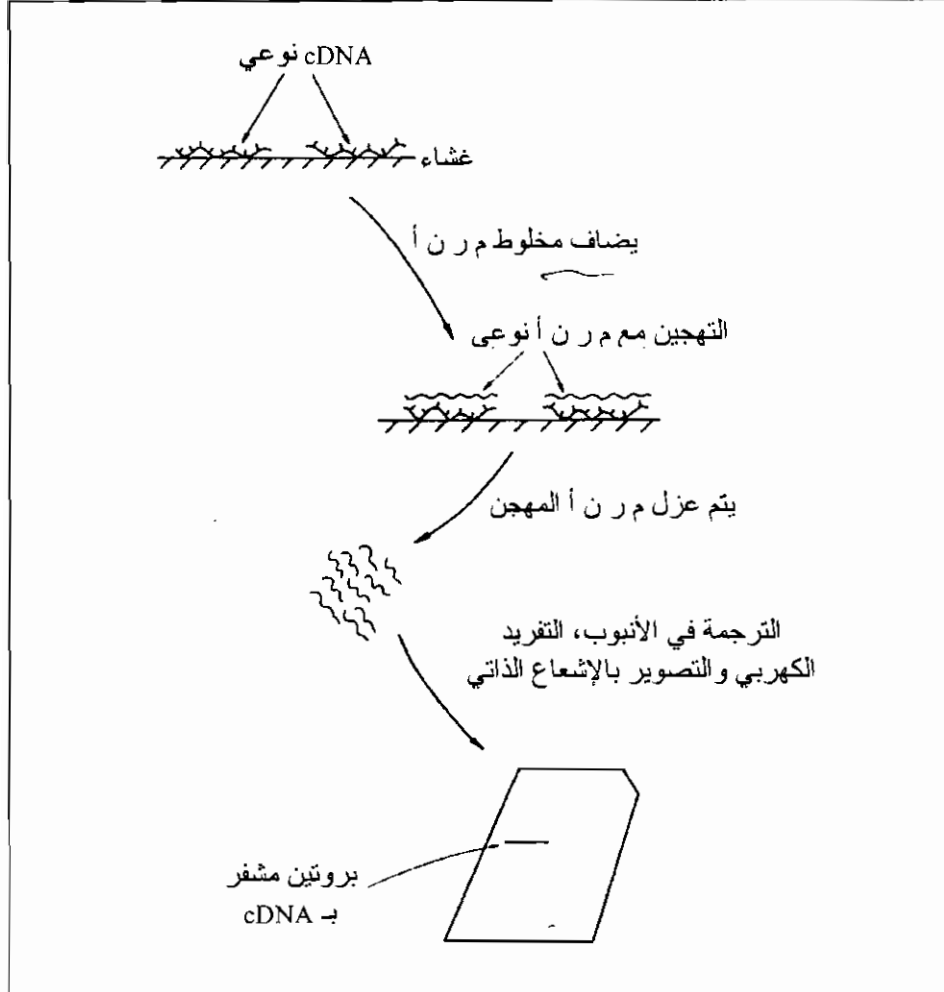
وتتم ترجمة جزيئات م. ر.ن.أ إلى مخلوط من البروتينات المشعة
 (الشكل ١٣-١٣) والتي يمكن فصلها بالتفريد الكهربى وفحصها بالتصوير
 الاشعاعى الذاتى. وتكون كل حزمة ممثلة لبروتين معين مشفر بواسطة احد
 جزيئات م. ر.ن.أ الموجوده فى العينة .



الشكل (١٣-١٣): الترجمة خارج الخلية (في الأنبوب *In Vitro*)

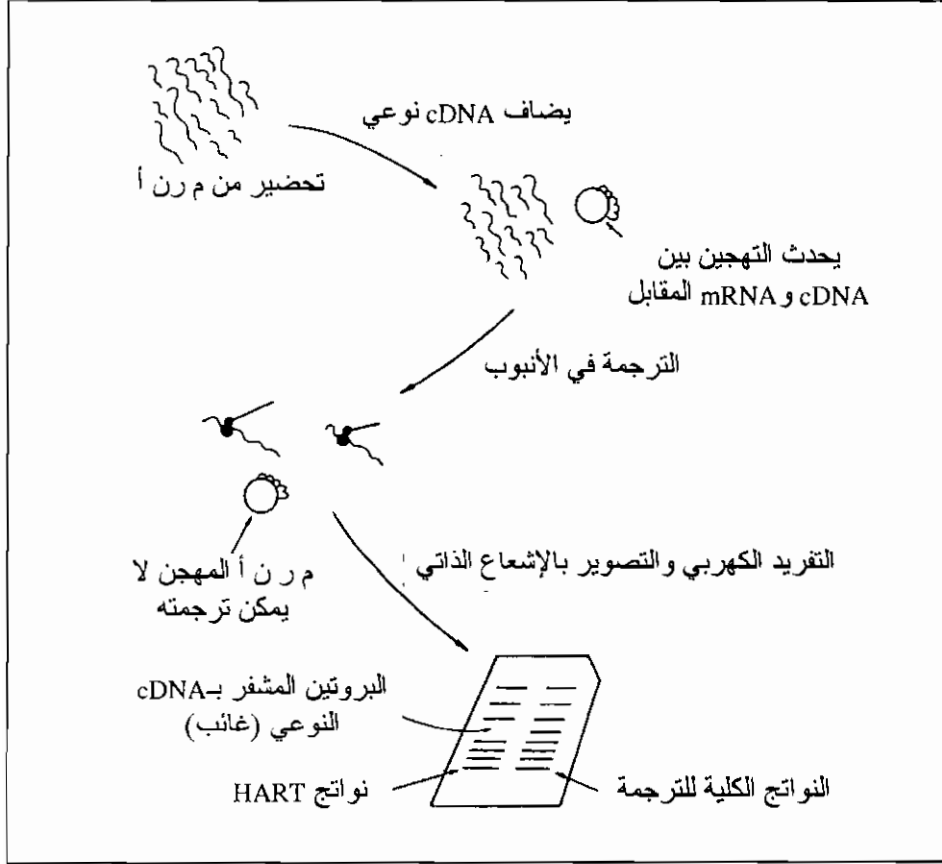
ويستخدم في كلا التقنيتين كلون cDNA محضر مباشرة من عينة م.ر.ن.أ تحت الدراسة ويستخدم كواسمة قابضة Catching Probe. وفي تقنية HRT تتم دنتره cDNA ويثبت على غشاء نيترو سيليلولوز أونايلون ويحضان مع عينه م.ر.ن.أ المراد اختبارها (الشكل ١٣-١٤). وفي هذه الاثناء يحدث التهجين بين

م.ر.ن.أ مع مقابلة من cDNA ويبقى ملتصقا بالغشاء. وبعد إزالة الجزيئات الحرة يتم استعادة م.ر.ن.أ المهجن ويتم ترجمته في نظام خارج الخلية وينتج عن هذه الترجمة عينة وحيدة نقية من البروتين في صورة الاشعاع الذاتي.



الشكل (١٣-١٤): الترجمة بتقنية تحرير الهجين (HRT) Hybrid Release

أما فى تقنية (HART) فيمكن الفرق فى أن cDNA المدنتر يضاف مباشرة إلى عينة م.ر.ن.أ (الشكل ١٣-١٥) ويحدث التهجين هنا أيضا بين cDNA ومقابلة من م.ر.ن.أ إلا انه فى هذه الحالة لا تتم إزالة م.ر.ن.أ غير المرتبط (الحر).



الشكل (١٣-١٥): الترجمة بتقنية تقييد الهجين (HART) Hybrid arrest

وبدلاً من ذلك تتم ترجمة العينة بأكملها فى نظام خارج الخلية وهنا لا يستطيع م.ر.ن.أ المرتبط بالتهجين أن يدير عملية الترجمة مما يؤدى إلى

ترجمة جميع أنواع م ر ن أ في العينة إلى بروتينات ماعدا البروتين المشفر بالجين المكلون. أى يتم تحديد بروتين الجين المكلون بأنه ذلك البروتين الذى تغيب حزمته من صورة الاشعاع الذاتى.

تحليل البروتينات باستخدام الطفرات فى الأنبوب (معمليا):

Analysis of Proteins by *In Vitro* Mutagenesis

على الرغم من أن كلا من HRT, HART يمكنها التعرف على نواتج الترجمة للجين المكلون، إلا أنها تكون قاصرة عن اعطاء معلومات عن البروتين نفسه. ومن الامور الهامة معرفة العلاقة بين تركيب البروتين ووظيفته. ويمكن دراسة هذه العلاقة باستحداث طفرات فى الجين المشفر لهذا البروتين ثم متابعة تأثير تغيير تتابعات الاحماض الامينية على خواص ونشاط الناتج البروتينى. وتوجد تقنيات مختلفة لاستحداث الطفرات إلا أن طريقة الطفرة الموجهة للموقع Site-Directed Mutagenesis هى التقنية المفضلة للحصول على طفرة فى أى موقع محدد على الجين لاحداث طفرة القاعدة الواحدة Point Mutation.

وفى هذه الطريقة تتم كلونة الجين المستهدف فى صورة سلسلة مفردة فى ناقل الكلونة M13.

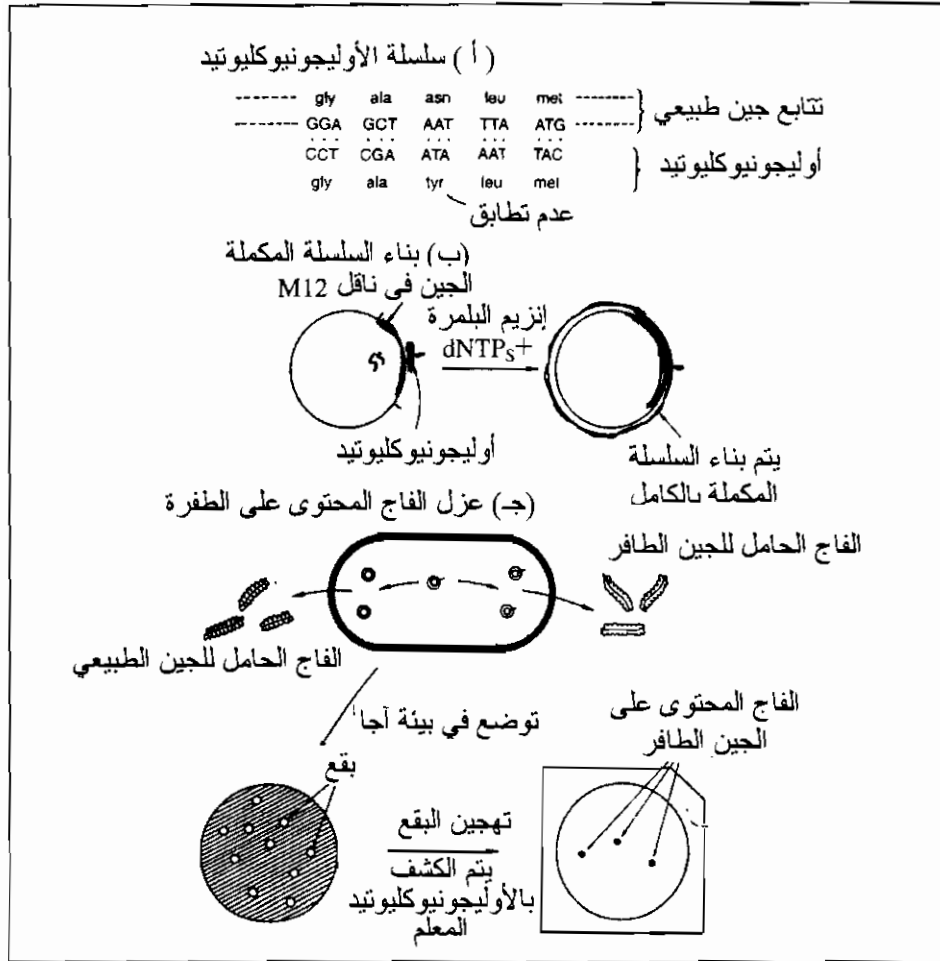
وتكون الخطوة الأولى هى عزل وتنقية سلسلة د.ن.أ مفردة للجين والتعرف على تتابعات المنطقة المطلوب استحداث طفرة فيها.

ثم يتم بناء سلسلة قصيرة من أوليجونيوكلتيد مكمل لتتابعات للمنطقة المستهدفة إلا أنها تحتوى على النيوكلييدة المغايرة المرغوبة (الشكل ١٣-١٦ أ).

وبالرغم من وجود درجة من عدم التطابق، فإن شظية الأوليجو سنتهجن مع د.ن.أ. وحيد السلسلة وتعمل كبادئ Primer لبناء سلسلة مكملية باستخدام شظية كلينو من انزيم DNA Pol 1 (الشكل ١٣-١٦ ب). ويستمر هذا التفاعل البنائي إلى أن يتم بناء سلسلة جديدة كاملة ويصبح الجزئ المعاد صياغته ثنائي السلسلة تماماً.

يجرى بعد ذلك إدخال لجزئ د.ن.أ. الناتج في خلايا بكتريا القولون حيث يؤدي تناسخه إلى انتاج نسخ عديدة من جزئ د.ن.أ. المعاد صياغته. وطبقاً للطريقة شبة المحافظة لتناسخ د.ن.أ. فإن نصف عدد جزيئات د.ن.أ. الثنائية السلسلة الناتجة تكون غير طافرة في كلا من السلسلتين بينما النصف الآخر سيكون طافراً وبذلك يكون نصف نسل الفاج يحمل نسخاً من الجزيئات غير الطافرة والنصف الآخر يحمل جزيئات طافرة. وتزرع الفاج الناتج من خلايا بكتريا القولون على بيئة اجار صلبة لانتاج بقع plaques ويكون نصف عدد البقع Plaques محتوية على جزئ د.ن.أ. المعاد صياغته الاصلى بينما النصف الآخر يكون محتويًا على النسخ الطافرة. ويتم التعرف على البقع المحتوية على الجزئ الطافر باستخدام واسمة معلمة من الأوليجو الذي سبق استخدامه اعلاه (الشكل ١٣-١٦ ج).

ومن خصائص الخلايا المحتوية على M13 انها لا يحدث لها تحلل Lyse وإنما تستمر في الانقسام، وبذلك يمكن للجين الطافر أن يتم تعبيره في خلايا بكتريا القولون المضيفة للحصول على بروتين معاد صياغته. ويمكن تنقية هذا البروتين من الخلايا ودراسة خواصه. ويمكن بهذه التقنية معرفة تأثير استحداث طفرة القاعدة الواحدة على معدل نشاط البروتين.



الشكل (١٣ - ١٦): تقنية الطفرة الموجهة للموقع (Site-Directed)

هندسة البروتين Protein Engineering:

لقد قدمت تقنية الطفرة الموجهة الموقع Site-Directed Mutagenesis إمكانات هائلة سواء في مجال البحوث الأساسية أو في البحوث التطبيقية. فمثلا يمكن الآن دراسة كيف يؤثر تركيب البروتين على فعل الإنزيم

Enzyme Action. وفي الماضي كان هذا ممكناً من خلال تحليلات بيوكيماوية مطولة وشاقة للتوصل إلى معلومات عن تحديد الأحماض الأمينية التي تلعب دوراً في تحديد الارتباط بمادة التفاعل والوظائف الحفزية في جزئ الإنزيم. والآن ومن خلال تقنية الطفرور الموجه يمكن تحديد دور كل حامض أميني على حده في نشاط الإنزيم. وذلك عن طريق استبداله بحامض أميني آخر ودراسة تأثير ذلك على نشاط الإنزيم. وقد أدى ذلك إلى إحداث تقدم هائل في طريقة فهم الحفز البيولوجي Biological Catalysis وادى إلى نشأة مجال جديد يسمى هندسة البروتين Protein Engineering والتي تستخدم فيه تقنيات الطفرور الموجه لاستنباط انزيمات جديدة لأغراض بيوتكنولوجية. فعلى سبيل المثال ، أدى تبديل تتابعات الأحماض الأمينية عند النيوكلييدة رقم ٢٢٢ في الجين المشفر لانزيم Subtilisin (الموجود في المنظفات الصناعية لغسيل الملابس) إلى إحلال حامض الالانين محل حامض الميثونين بعد أن تبين أن الأخير يتأكسد عند استخدام الماء الساخن كما يتأثر باستخدام المبيضات مثل Chlorax وقد أدى هذا الإحلال إلى إنتاج انزيم Subtilisin مهندس وراثياً ويتحمل الحرارة العالية ولايتأثر كثيراً بالكلوراكس.

دراسة تفاعلات البروتينات:

Studying Protein-Protein interactions:

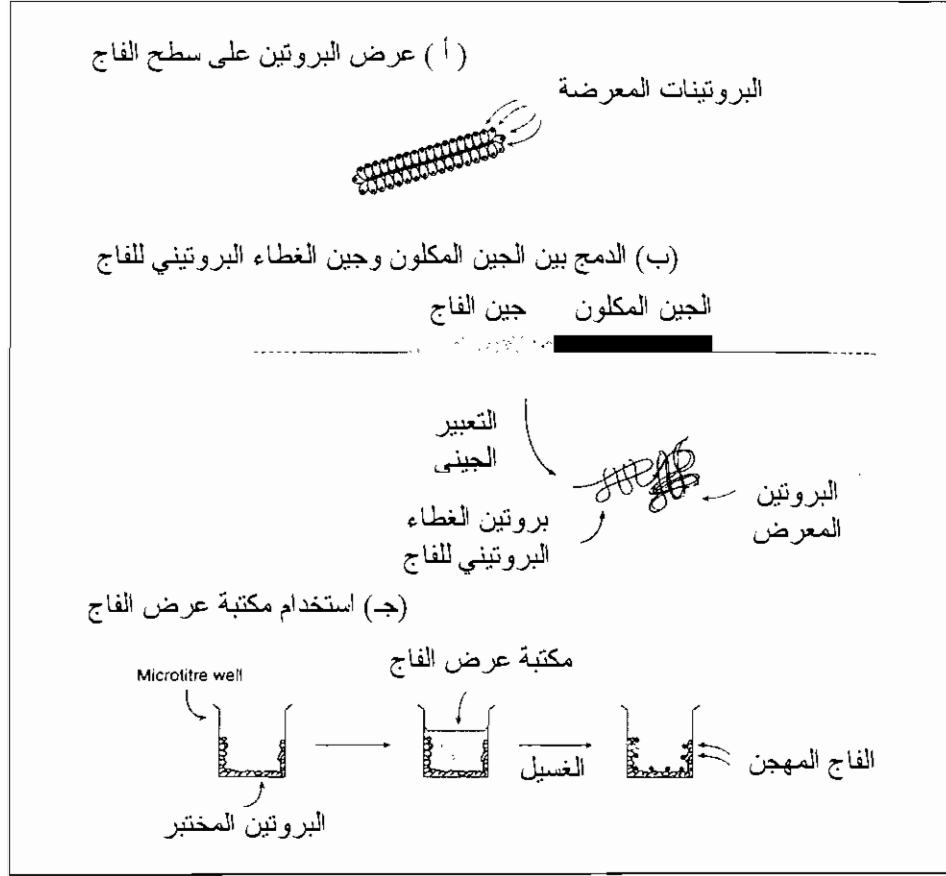
وجد في الخلايا الحية أن قليل جداً من البروتينات يمكن ان تقوم بوظائفها في عزله تامة عن بقية البروتينات، ولكن معظمها يعمل معاً في المسارات البيوكيماوية وفي المعقدات البروتينية الكبيرة. ويمكن معرفة وظيفة بروتين ما لم تسبق دراسته وذلك عن طريق تحديد أى بروتينات أخرى يعمل معها في الخلية. وتستخدم تقنيتين هامتين للوصول إلى ذلك وهما:

- استعراض الفاج Phage Display.
- ونظام الهجينين في الخميرة Yeast-Two Hybrid System.

أولاً: استعراض الفاج Phage Display:

وقد سميت هذه التقنية بهذا الاسم لأن البروتين يتم عرضه على سطح البكتريوفاج M13 (الشكل ١٣-١٧-أ) ويحدث ذلك بكونه الجين المشفر لهذا البروتين في الناقل M13 بحيث يحدث اندماج بين الجين المكون مع جين الفاج الخاص ببروتين الغطاء Coat Protein (الشكل ١٣-١٧-ب) وبعد ادخال الجين المكون في خلايا بكتريا القولون يقوم الجين المندمج Fused Gene بإدارة عملية بناء بروتين هجينى مكون جزئياً من بروتين الغطاء وجزئياً من البروتين المكون ويبرز البروتين الهجينى من غطاء الفاج بحيث يصبح البروتين المكون معرضاً على سطح الفاج مما يعطى الفرصة لدراسته.

وتجرى هذه التقنية عادة مع مكتبة عرض الفاج Phage Display Library مكونة من عدد كبير من الفاج المعاد صياغته وكل منه يعرض بروتين مختلف. ويمكن تحضير مكتبات كبيرة مكونة من كلونات من مخلوط من cDNA من نسيج معين أو حتى بكونه شظايا د.ن.أ الجينومية. وتتكون المكتبة من فاج عارضا مدى واسع من البروتينات المختلفة والتي تستخدم للتعرف على تلك البروتينات التى تتفاعل مع البروتين المختبر. ويتم تثبيت البروتين فى Wells of a Microtitre Tray أو على حبيبات يمكن استخدامها فى عمود كروماتوجراف يتم خلطها بمكتبة عرض الفاج (الشكل ١٣-١٧-ج) ويمثل الفاج الذى يظل ملتصقا بالميكروتيتير تراه بعد سلسلة من الغسيل هو الفاج الذى يعرض البروتين الذى يتفاعل مع البروتين المختبر المثبت فى جوانب الوعاء Tray.



الشكل (١٣-١٧): عرض الفاج Phage Display

- أ - عرض البروتينات على سطح فاج خيطي معاد صياغته.
- ب - الاندماج الجيني المستخدم في عرض البروتين.
- ج - طريقة الكشف عن التفاعل بين البروتين المختبر و مكتبة عرض الفاج.

ثانياً: نظام الهجينين في الخميرة Yeast-Two Hybrid System:

تعتمد هذه التقنية على اكتشاف أن التعبير الجيني في فطر الخميرة يعتمد على التفاعل بين أزواج من عوامل النسخ (الشكل ١٣-١٨-أ) وفي هذا النظام يتم تبديل زوج من عوامل النسخ مسئولة عن تعبير جين معين في الخميرة

ويحل محله بروتينات مندمجة Fusion Proteins وبحيث يكون كل بروتين مكون جزيئاً من أحد عاملي النسخ وجزيئاً من البروتين المختبر وتقاس قدره زوج البروتينات المندمجة هذه على إدارة تعبير الجين المستهدف في الخميرة.

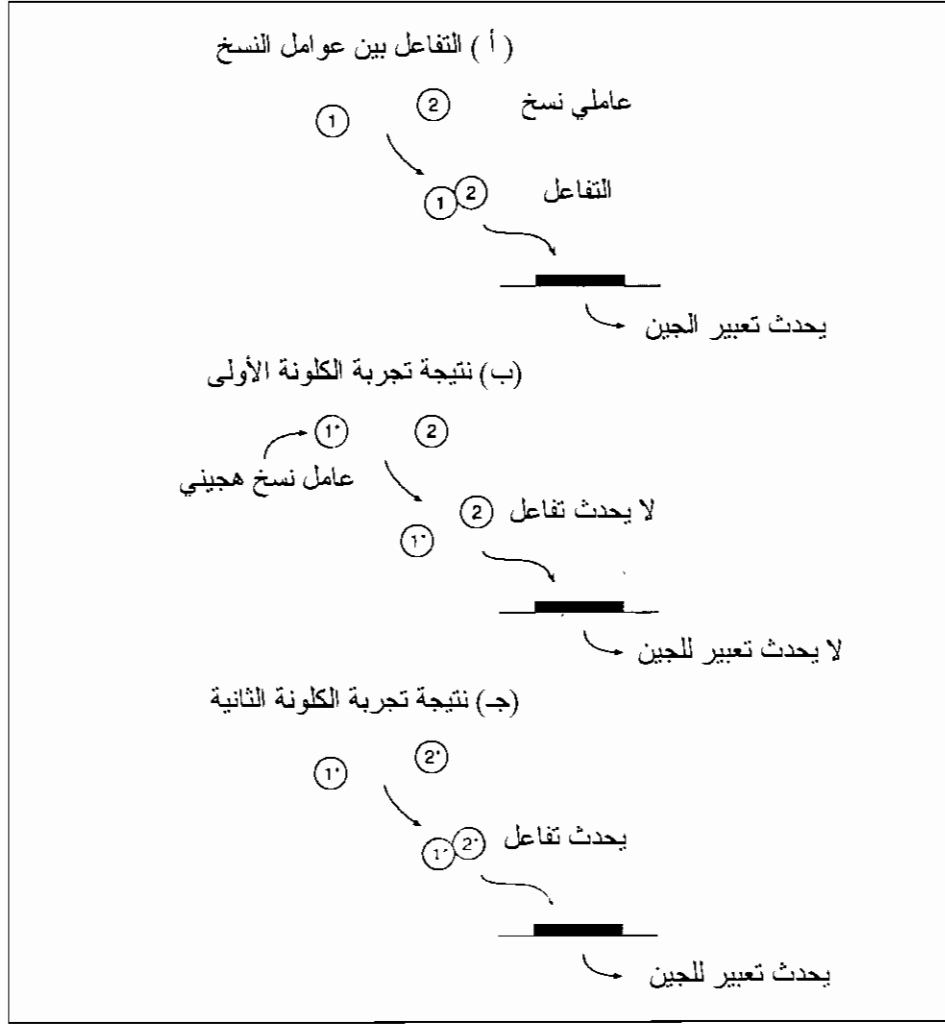
ولاجراء هذا الاختبار، لابد من اجراء تجربتي كلونة في الخميرة وتشتمل التجربة الأولى على الجين المشفر للبروتين المراد اختباره ويتم دمج هذا الجين مع الجين الخاص بإحد زوجي عوامل النسخ ويلحق هذا التركيب بكلون الخميرة.

ولا تستطيع الخميرة المعاد صياغتها هنا أن يتم فيها تعبير الجين المستهدف نظراً لأن عامل النسخ المعدل هنا لا يمكنه التفاعل مع قرينه (الشكل ١٣-١٨-ب)

وفي تجربة الكلونة الثانية يتم تكوين نسخة هجينية لعامل النسخ الآخر (القرين) ويكلون في الخميرة.

ويدل استعادة تعبير الجين المستهدف على أن عاملي النسخ الهجينين يمكنها التفاعل مع بعضها البعض.

ويجب أن يتم الإتصال بين الجين المستهدف وعاملي النسخ بطريقة معينة بحيث أن هذا التفاعل يتم بين مكونات البروتينات المختبره في الهجن البروتينيه وليس بين قطع بروتينات عوامل النسخ (الشكل ١٣-١٨-ج). وبعد ذلك يتم تعريف ازواج البروتينات المتفاعلة.



الشكل (١٣-١٨): نظام الهجينان في الخميرة Yeast-Two Hybrid System

- أ - زوج من عوامل النسخ التي يجب أن تتداخل حتى يمكن حدوث التعبير الجيني.
- ب - إستبدال عامل النسخ (١) ببروتين هجينى ١* يؤدي إلى منع التعبير الجينى لأن ١* لا يمكنه التفاعل مع العامل (٢).
- ج - إستبدال العامل (٢) بالبروتين الهجينى ٢* مما يؤدي إلى إستعادة التعبير الجينى إذا تمكن الجزء الهجينى من ١* و ٢* من التفاعل.

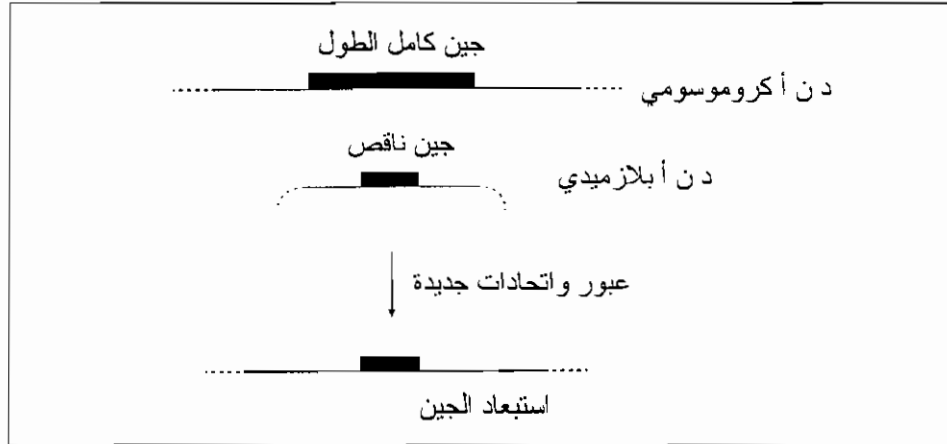
ويمكن أن تشتمل تجربة الكلونة الثانية على مكتبة من الجينات المعدلة تمثل بروتينات مختلفة بحث يمكن اختبار أحد البروتينات مقابل بروتينات أخرى كثيرة في هذا النظام.

ثالثا : تقنيات إسكات التعبير الجيني Gene Silencing:

1 - Gene Knockout:

ويتم في هذه التقنية استخدام نسخة منقوصة Deleted للجين "للتخلص" Knockout من النسخة الفعالة الموجودة في كروموسوم الكائن وبذلك يتم الحكم على وظيفة هذا الجين نتيجة لغياب هذه الوظيفة بعد هذه الإزالة للنسخة الفعالة له.

اذ يحدث نتيجة للاتحادات الجديدة Recombination بين الجين المنقوص والنسخة الكاملة الكروموسومية أن يحل الأول محل الثاني (الشكل ١٣-١٩) ويتم بعد ذلك تقييم تأثير هذا التخريب على الطراز المظهري Phenotype للكائن لمعرفة الوظيفة (الغائبة هنا).



الشكل (١٣-١٩): حذف الجين (Knockout) بإتحادات جديدة بين نسخة كروموسومية للجين ونسخة ناقصة (Deleted) في بلازميد الكلونة

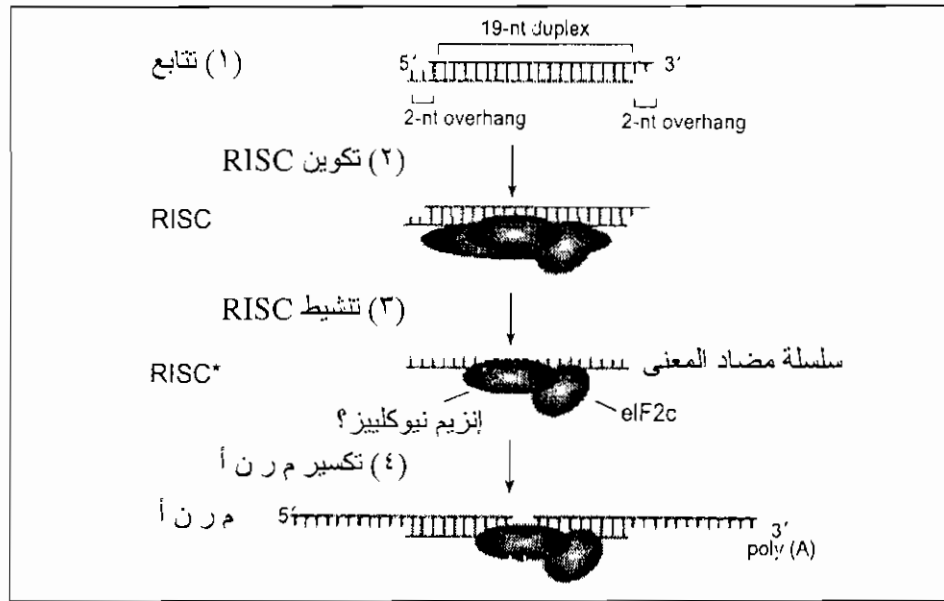
ويستخدم Knockout الفأر للاستدلال على ما يقابلها في الجينات البشرية حيث يحتوى الفأر على نسخة ناقصة للجين وقد ساعدت هذه التقنية على تحديد وظائف لعدد من الجينات إلا أن هناك بعض المشاكل التي قد تنشأ في هذا الشأن فمثلاً بعض عمليات الاستبعاد Knockout قد لا يكون لها تأثير واضح على الطراز المظهري للكائن ويكون ذلك إما نتيجة لأن هذا الجين يمكن الاستغناء عنه بمعنى أنه حتى بعد إيقاف نشاطه يمكن لجينات أخرى تعويض غيابه، أو أن التغير المظهري ضعيف وغير محسوس لدرجة أنه لا يمكن التعرف عليه.

٢ - إيقاف تعبير نسخ *mRNA* بتقنية *siRNA* and Gene Knockdown:

وهي من أحدث التقنيات لدراسة وظيفة الجين Gene Function وتعتمد هذه التقنية على إدخال سلسلة تركيبية Synthetic مزدوجة قصيرة من ر.ن.أ يتراوح طولها بين ٢١-٢٣ نيوكليوتيد بحيث يكون تتابع النيوكليوتيدات فيها مكملًا لنسخة mRNA المراد إيقاف تعبيرها ولذلك يطلق على هذه التقنية Post Transcriptional Gene Silencing (PTGS) أى تثبيط تعبير الجين بعد النسخ حيث تستخدم إحدى سلسلتى siRNA في توجيه RISC إلى mRNA المستهدف بحيث يتم تدميره بإنزيمات ريبونوكليز. ويتكون RISC من معقد ريبونوكليزى كبير يطلق عليه RNA Induced Silencing Complex ويتحد مع هذه المعقد جزئ siRNA. ويحتوى RISC على نشاط إنزيم RNase III وإنزيم Helicase الذى يقوم بفصل سلسلتى siRNA. وقد أدى إستنباط هذه التقنية إلى سهولة دراسة وظيفة الجين Gene Function بطريقة سريعة ودقيقة وغير مكلفة. وتتميز هذه التقنية بإمكان الكشف عن وظيفة أى جين الذى يتم تعبيره سواء فى طراز نوعى من الخلايا أو فى مسار أيسى نوعى. فقد أمكن مثلاً بهذه التقنية

تحديد وظائف معظم الجينات في جينوم C.Elegance وعددها ١٩ ألف جين. ويبين الشكل (١٣-٢٠) ميكانيكية هذه التقنية ويتطلب نجاح هذه التقنية مراعاة المتطلبات التالية:

- ١- دقة إختيار تتابع siRNA المكمل لنسخة mRNA المستهدفة.
- ٢- بناء siRNA أو تكوين بلازميدات معاد صياغتها تحتوى على تتابع د.ن.أ. المشفر لجزئ siRNA.
- ٣- إختيار الطريقة المثلى لإنتقال Transfection جزئ siRNA أو البلازميد المشفر له في الخلايا المستهدفة.
- ٤- متابعة Monitoring فعالية إسكات تعبير الجين Gene Silencing.



الشكل (١٣-٢٠): إزالة تعبير الجين (Knockdown) بتقنية SiRNA

- ١- إدخال جزئ siRNA.
- ٢- تكوين المعقد RISC.
- ٣- إنفصال سلسلتى siRNA بإنزيم هيليكيز و تنشيط RISC.
- ٤- تقوم إحدى سلسلتى siRNA بتوجيه RISC إلى مرن أ المستهدف لتدميره.

أولاً: إختيار المتابع الصحيح لجزئ siRNA:

- تبين أن هناك شروط يجب استيفاءها لإختيار جزئ siRNA أهمها:
- ١- إختيار المتابع المكمل لجزئ mRNA بحيث يكون على بعد Downstream من ٥٠-١٠٠ نيوكلييدة من كودون بدء الترجمة.
- ٢- يجب أن لا يشمل هذا المتابع المناطق غير الشفرة سواء على النهاية 5'UTR أو 3'UTR.
- ٤- أن يكون محتوى جزئ siRNA من GC يتراوح بين ٣٠-٧٠%.
- ٥- الطول الأمثل لجزئ siRNA هو ٢١ نيوكلييدة بحيث تكون إحدى السلسلتين فيه محتوى على تتابع AA(N)19TT بحيث تمثل N أى نيوكلييدة حسب المتابع المكمل فى mRNA المراد إبطال تعبيره فى حين تكون نيوكليدين على الجانبين من نوع Uridines مفردتين ومكونة Overhang كما يجب أن تحتوى النهايتين على مجموعة 5'phosphate ، 3'OH.

ثانياً: إختيار أنسب ناقل تعبير Expression Vector:

وجد أن أفضل ناقل للتعبير يستخدم فيه الوحدات التنظيمية لإنزيم بلمرة رن.أ. RNA pol III والتي تسمح بتعبير siRNA فى جميع الانسجة. ويستخدم ناقل التعبير PDECAP بنجاح فى كثير من الكائنات مميزة النواة.

ثالثاً: إختيار الطريقة المثلى لنقل جزئ siRNA إلى الخلايا المستهدفة (العدوى) Transfection:

توجد وسائل عديدة لإحداث عملية النقل Transfection بنجاح منها إستخدام الحبيبات الليبوسومية Liposomes لتغليف جزئ siRNA أو البلازميد

الخاص به أو بإجراء عملية Electroporation "الإختراق الكهربى" أو بإستخدام قاذفة الجينات Biolistic Gun فى حالة الخلايا النباتية.

رابعاً: متابعة تأثير siRNA على إبطال تعبير mRNA:

يتم التحقق من نجاح siRNA فى تثبيط (Knockout) تعبير جين معين بإستخدام تقنية النقل الغربى Western Blot و Immunofluorescence بإستخدام الأجسام المضادة النوعية Specific Antibody للبروتين المستهدف كما يمكن متابعة ذلك من غياب الطراز المظهرى phenotype للصفة وكذلك من تحليلات النقل الشمالى Northern Blot حيث تغيب حزمة م.ر.ن.أ المستهدفة.

دراسة المحتوى النسخى والمحتوى البروتينى للجينوم:

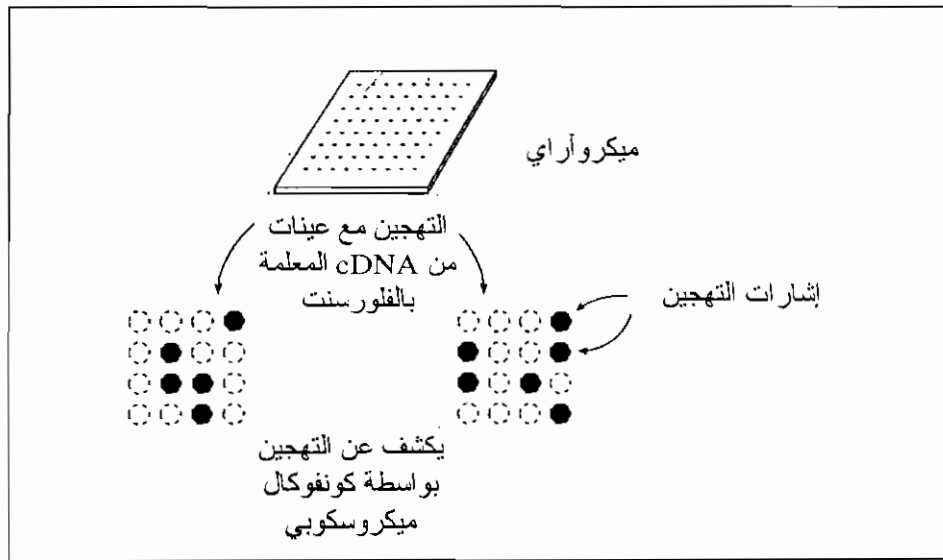
Transcriptome and Proteome:

كما سبق القول يمكن تعريف المحتوى النسخى Transcriptome بأنه محتوى الخلية من جزئيات ر.ن.أ.والذى يعكس الطراز العام للتعبير الجينى فى هذه الخلية.

فى حين يعرف المحتوى البروتينى Proteome بأنه محتوى الخلية من البروتينات والذى يعبر عن قدراتها البيوكيماوية.

وقد نشأت تقنية دراسة المحتوى البروتينى Transcriptome بداية كجزء من المشروع البحثى لدراسة ما بعد الجينوميا فى فطر الخميرة. وفى هذه التقنية يتم اجراء نوع متطور Sophisticated من تحليلات التهجين وفى هذه الدراسة وضعت عينات من الكلونات الفردية لكل من الجينات الخاصة بالخميرة وعددها ٦٠٠٠ جين مكلون على شريحة زجاجية فى مصفوفات رأسية وأفقية ٨٠×٨٠

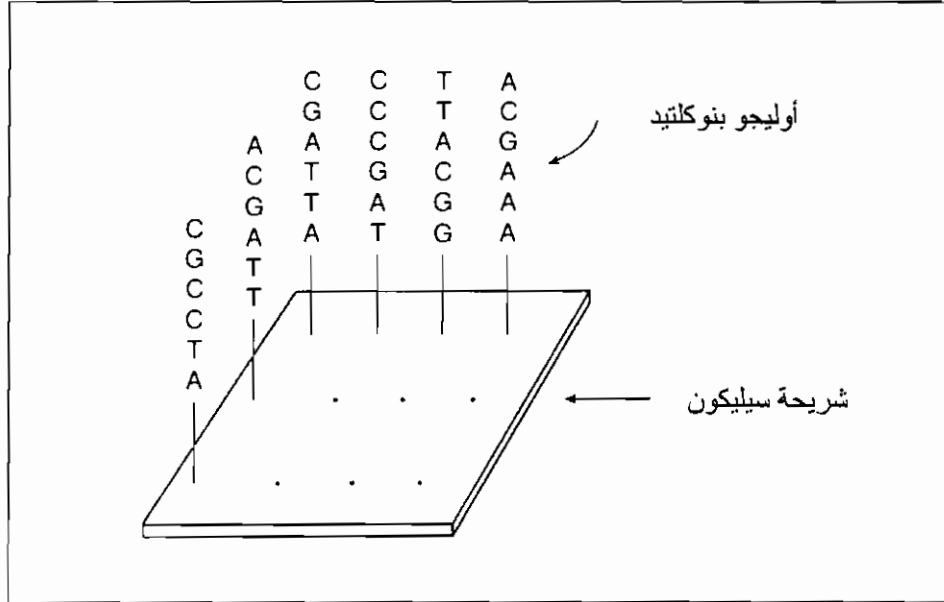
ويسمى هذا التحضير Microarray. ولتحديد أى من هذه الجينات يكون نشطاً فى خلايا الخميرة نامية تحت ظروف إجهاد معينة (جفاف أو حرارة أو نقص مغذيات الخ)، يستخلص م. ر. ن. أ من هذه الخلايا المعرضة لهذا الإجهاد ويحول هذا م. ر. ن. أ إلى cDNA الذى يعلم بالفلورسنت ويهجن مع عينات الجينات المكلونة فى الـ Microarray (الشكل ١٣-٢١) ويتم تحديد أين حدث التهجين حسب اشارات الفلورسنت التى يتم التعرف عليها باستخدام Confocal Microscope. والكلونات التى تعطى اشارات تدل على أن هذه الجينات بالذات هى التى كانت نشطة تحت ظروف الإجهاد محل الدراسة ويمكن تكرار التجربة مع cDNA آخر مستخلص تحت ظروف إجهاد أخرى.



الشكل (١٣-٢١): تحليلات الميكرو أراى Microarray. فى هذا المثال حدث تهجين بين الميكروأراى مع تحضيرين مختلفين من cDNA بحيث يكون كل منهما معلم بكشاف فلورسنتى مختلف اللون. ويتم تحديد الكلونات التى تتهجن مع cDNA بالفحص المجهرى Confocal Microscopy

تستخدم Microarray حالياً للتعرف على التغيرات التي تحدث في المحتوى النسخي لعدد كبير من الكائنات وفي بعض الحالات تستخدم نفس الاستراتيجية المستخدمة في الخميرة، إلا أن ذلك يكون ممكناً فقط في حالة الكائنات المحتوية على عدد قليل نسبياً من الجينات. يمكن استخدام Microarray لمسح جميع الجينات البشرية بحيث يمكن القيام بها على ١٠ شرائح 18×18 ملمتر إلا أن تحضير كلونات لكل من ٣٠-٤٠ ألف جين سيكون عملاً شاقاً. ومن حسن الحظ أن ذلك قد لا يكون ضرورياً. فمثلاً لدراسة التغيرات في المحتوى النسخي الذي يحدث كنتيجة للسرطان، يمكن تحضير Microarray باستخدام مكتبة cDNA من نسيج طبيعي. وعند التهجين مع cDNA معلم مستخلص من النسيج السرطاني يمكن معرفة أي من الجينات حدث لها زيادة في النشاط Up-Regulation وأي منها حدث لها انخفاض في النشاط Down-Regulation استجابة للإصابة بالسرطان.

وإلى جانب الـ Microarray تم استحداث تقنية ذات إمكانيات واسعة أكبر بكثير يطلق عليها DNA Chips وهي عبارة عن رقائق من السليكون تحمل أعداد كبيرة جداً من نيوكليوتيدات الأوليجو (بطول ٢٠-٣٠ نيوكليوتيدة) والتي يتم بناؤها مباشرة على سطح الرقائق والتي يمكن تحضيرها بكثافة تصل إلى مليون أوليجو لكل سنتيمتر مربع وهي كثافة أعلى بكثير مما في Microarray العادية (الشكل ١٣-٢٢) ويتم تحديد مواقع التهجين بين الـ Oligonucleotide والواسمات (cDNA المعلم) إلكترونياً. وحيث أنه يتم تحضير أوليجونيوكلتيدات على الرقائق *de novo* باستخدام طريقة أوتوماتيكية خاصة (Robot) فإنه يمكن عمل Chips لكل جين بشري أو أي كائن آخر بسهولة نسبية.



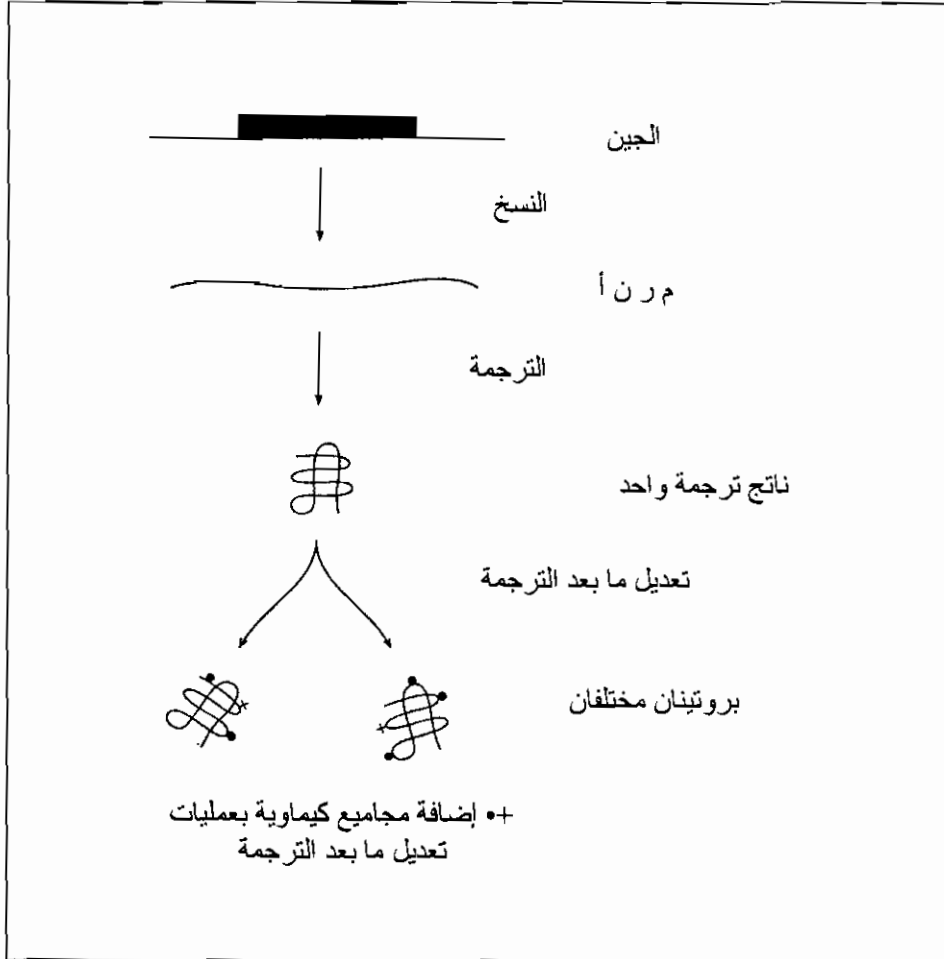
الشكل (١٣-٢٢): شريحة د ن أ DNA Chip يمكن للشريحة الحقيقية حمل عدد أكثر بكثير من الأوليغونيوكلتيد عن المبين و يبلغ طول كل أوليغو حوالي ٢٠-٣٠ نيوكليتيدة

دراسة المحتوى البروتيني للخلية Proteome:

تؤدي دراسة المحتوى البروتيني للخلية إلى امدادنا بمعلومات اضافية عن وظائف الجينات و التي لا يمكن الحصول عليها من دراسة الـ Transcriptome فقط ، نظراً لان جزئ م.ر.ن.أ واحد يمكنه أن يعطى أكثر من نوع واحد من البروتين المتغاير نتيجة لتعديلات لاحقة للترجمة Post-Translational Processing (الشكل ١٣-٢٣).

ففي مميزة النواة نجد أن معظم البروتينات الناتجة من ترجمة م.ر.ن.أ معين قد يحدث لها عمليات تعديل لاحقة بإضافة مجموعات كيميائية مثل عمليات

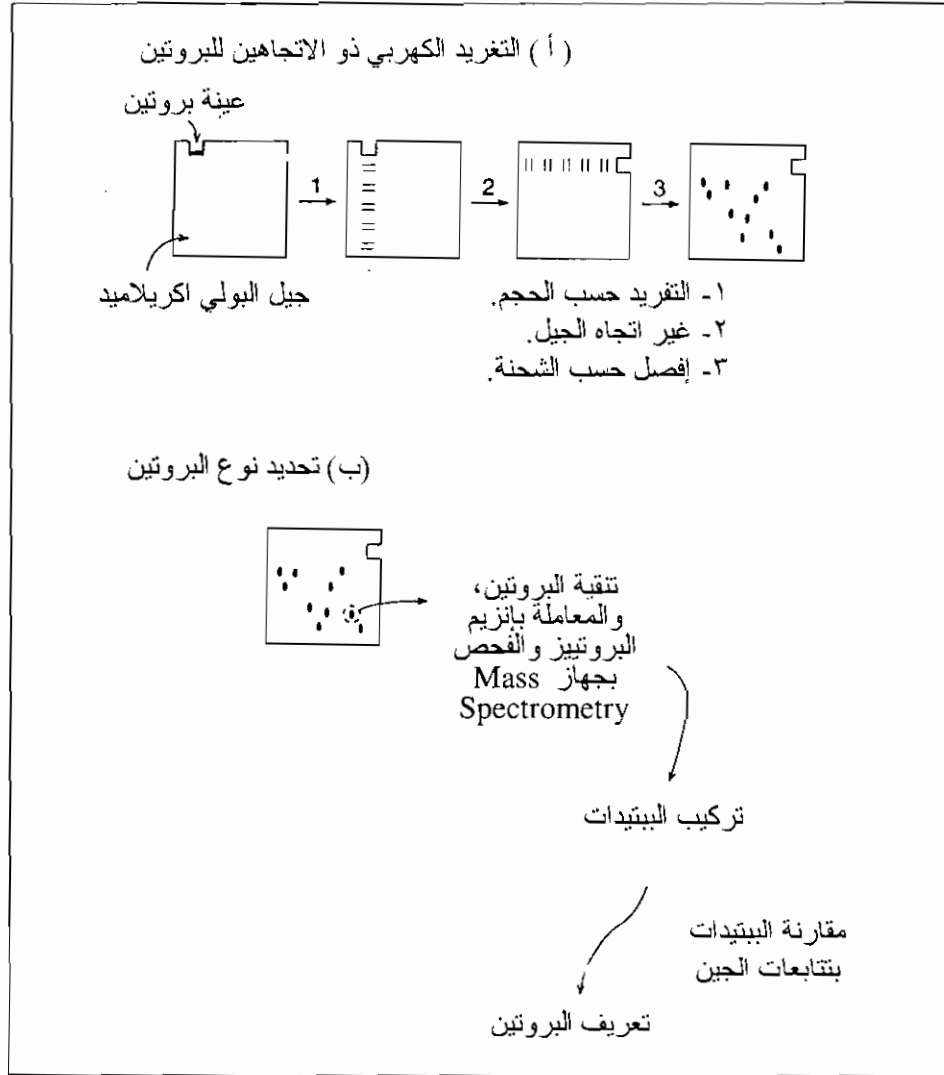
الفسفرة Phosphorylation أو اضافة سكريات Glycosylation أو كبرته Sulphanation .. الخ. وذلك لكي تنشط هذه البروتينات وتتخصص في أداء وظيفة معينة.



الشكل (١٣-٢٣): يمكن للجين الواحد أن يشفر لبروتينين مختلفين بوظائف مختلفة، إذا حدث تعديل للنسخة الأولية للبروتين بطريقتين مختلفتين من عمليات التجهيز بعد الترجمة

ولدراسة البروتيوم يتم أولاً فصل المحتوى البروتيني الكامل للخلية أو النسيج وذلك باستخدام تقنية التفريد الكهربى ذو الاتجاهين Two-Dimensional Electrophoresis وفى هذه التقنية يوضع البروتين فى مجرى Well فى احد جانبي جيل الاكرلاميد للتفريد الكهربى. يتم تفريدها فى هذا الاتجاه حسب اوزانها الجزيئية، ثم يدار الجيل بعد ذلك بزاوية ٩٠° ويجرى تفريد كهربى ثان وفى هذه الحالة يتم فصل حزم البروتينات حسب الشحنات الموجودة عليها. وتكون النتيجة هى الحصول على طراز تفريد كهربى ذو اتجاهين باحجام وأشكال وكثافات مختلفة، وتمثل كل بقعة بروتين مختلفة أو مجموعة مقاربة من البروتينات (الشكل ١٣-٢٤-أ)، وتقدر الاختلافات بين البقع البروتينية عند مقارنة جيلين مختلفين.

ولتعريف البروتين الناتج فى بقعة معينة، يتم تنقية عينه منها من الجيل وتعامل بإنزيم Protease (Restriction Endoprotease) الذى يقطع سلسلة متعدد الببتيد عند تتابع معين للاحماض الأمينية (يشبه إلى حد كبير ما يحدث مع انزيمات القطع المحددة التى تقطع جزئ د.ن.أ عند تتابع معين) ويتم تحليل الببتيدات الناتجة عن التقطيع متبقية Mass Spectrometry (الشكل ١٣-٢٤-ب) الذى يحدد تركيب الاحماض الامينية فى كل ببتيده. وتكون هذه المعلومات كافية عادة لإمكان التعرف على الجين المشفر لهذا البروتين بالرجوع إلى تتابعات النيوكليوتيدات فى الجينوم وباستخدام قاموس الشفرة الوراثية.



الشكل (١٣-٢٤): تحليلات البروتيوم Proteome analysis

- أ - جيل الأكريلاميد للتفريد الكهربائي للبروتين في الإجهاد Two-Dimensional.
- ب - تحديد البروتين الموجود في بقعة واحدة بالمعاملة بإنزيم البروتينيز يليه استخدام تقنية Mass Spectrometry للببتيدات الناتجة.

وتسمى هذه الطريقة Peptide Mass Fingerprinting (PMF). والتدليل على أهمية الطريقة في التعرف على وظيفة الجين قام بعض العلماء بتطبيقها على بكتريا *Mycoplasma Genitalium* والذي يعتبر أصغر جينوم بكتيري (0.58 mb) في محاولة للتعرف على الحد الأدنى من التفاعلات البيوكيميائية والأيضية التي يتطلبها النظام الحيوي. وباستخدام التفريد الكهربى ذو الاتجاهين 2D.Electrophoresis أمكن التعرف على 427 بقعة بروتينية على الجيل فى طور Exponential Phase. وقد تم تحليل 201 بروتين منها والتعرف عليها بطريقة (PMF) ومقارنتها ببروتينات معروفة. وقد تم التعرف من هذه التحليلات على 158 بروتين معروف (33% من المحتوى البروتيني) فى حين ظل 17 بروتين غير معروف. واشتملت البقع الباقية على شظايا مشتقة من بروتينات أكبر أو صور مختلفة من نفس البروتين (مشابهات البروتين) ونواتج معدله لاحقة للترجمة. وقد تضمنت البروتينات التي تم تحديدها: انزيمات خاصة بالتفاعلات الايضية للطاقة وتناسخ د.ن.أ ونسخه وترجمته وكذلك الانزيمات الخاصة بنقل المواد خلال الغشاء البلازمي. وعندما تحولت الخلية البكتيرية إلى الطول Stationary Phase حدث انخفاض بنسبة 42% فى المواد البروتينية التي تم بناؤها.

كما ظهرت بروتينات جديدة، فى حين حدثت تغيرات فى نسب بروتينات اخرى كثيرة. ويبدو أن هذه التغيرات نتجت عن نقص فى بعض المغذيات وارتفاع الحموضة فى بيئة النمو والتأقلم مع بعض التغيرات البيئية. وقد ساعدت هذه النتائج على تحديد الحد الأدنى من التعبير الجيني الذى يكون ضرورياً للمعيشة المستقلة للكائن والتغيرات التي تحدث فى التعبير الجيني التي تصاحب التحول من طور Exponential إلى طور Postexponential. كما أظهرت النتائج

انه من غير المحتمل وجود ظروف يمكن أن يتم فيها تعبير جميع المحتوى البروتيني للخلية دفعة واحدة. حيث وجد أن ٣٣% فقط من هذا المحتوى تم تعبيره تحت الظروف المثلى لأقصى نمو.

ومن المحتمل أن ٦٧% الباقية عبارة عن بروتينات يمكن أن يتم تعبيرها تحت ظروف بيئية مختلفة.

وعموماً فإن تحليلات المحتوى البروتيني تقدم معلومات واسعة المدى عن التعبير الجيني والتي لا يمكن الحصول عليها من التحليلات الجينومية فقط.

بعض المفاهيم الجديدة الناتجة عن التحليلات الجينومية:

Some New Concepts of Post-Genomics

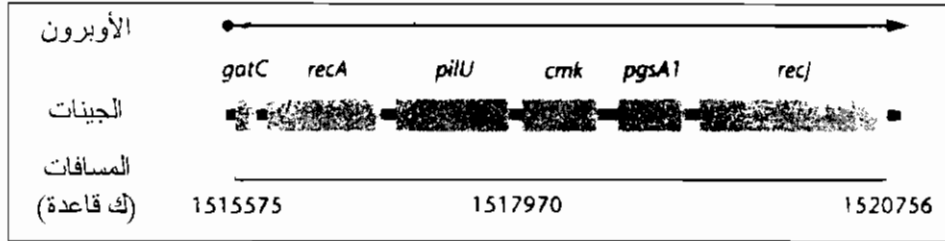
أولاً: جينومات البكتريا الحقيقية Genomes of Eubacteria:

وجد في بكتريا القولون ثلاث جينات متداخلة Overlapping Genes بين وحدات النسخ (الأوبرونات) وهي حالة نادرة إذ أن ذلك شائع فقط في جينومات الفيروس.

وجد في بكتريا القولون أن حوالي ٢٧% من وحدات النسخ تكون في صورة أوبرونات (حوالي ٦٠٠ أوبرون).

وجد في بكتريا *Aguifex aeolicus* أن معظم الجينات تكون في صورة وحدات نسخ متعددة السسترونات Polycistronic والتي درجنا على تسميتها بالأوبرون، إلا أن التعبير السائد بأن الأوبرون يحتوى على جينات تركيبية مرتبطة بعلاقات وظيفية متقاربة وتتحكم في مسار بيوكيماوى واحد لا ينطبق على هذا الكائن. فقد وجد أن احد الأوبرونات يحتوى على ستة جينات تركيبية

لا يربط بينها أى علاقة وظيفية إذ نجد أن جينين مختصين بإعادة اتحاد د.ن.أ. DNA Recombination وجين واحد لبناء الليبيدات، وآخر لبناء الاحماض النووية وواحد لبناء البروتين وجين لحركة الخلية Motility كما فى الشكل (١٣-٢٥).



الشكل (١٣-٢٥): أوبرون فى جينوم بكتريا *Aquifex Aeolicus*. يحتوى هذا الأوبرون على جينات: لبناء البروتين (*gatC*) والإتحادات الجديدة فى جزئ د ن أ (*recA*) ولحركة البروتين (*pilU*) وللبناء الحيوى للنوكليوتيدات (*pgsA1*). ويختلف هذا التنظيم عن الفكرة التقليدية بأن الجينات فى الأوبرون تشفر لبروتينات تتحكم فى مسار بيوكيماوى مشترك

من المعروف أن معظم جينومات غير مميزة النواة تحتوى على كروموسوم واحد حلقى إلا أنه اكتشفت حالات يكون فيها الكروموسوم البكتيرى خطى Linear كما فى بكتيريا *Borrelia Burgdorferi* بالاضافة إلى بعض الانواع من *Streptomyces*.

لا شك أن الاهم أن الاكتشافات الخاصة بالبلازميدات تجعلنا نعيد النظر فى تعريف الجينوم البكتيرى بأنه يتكون من جزئ حلقى واحد من د.ن.أ.

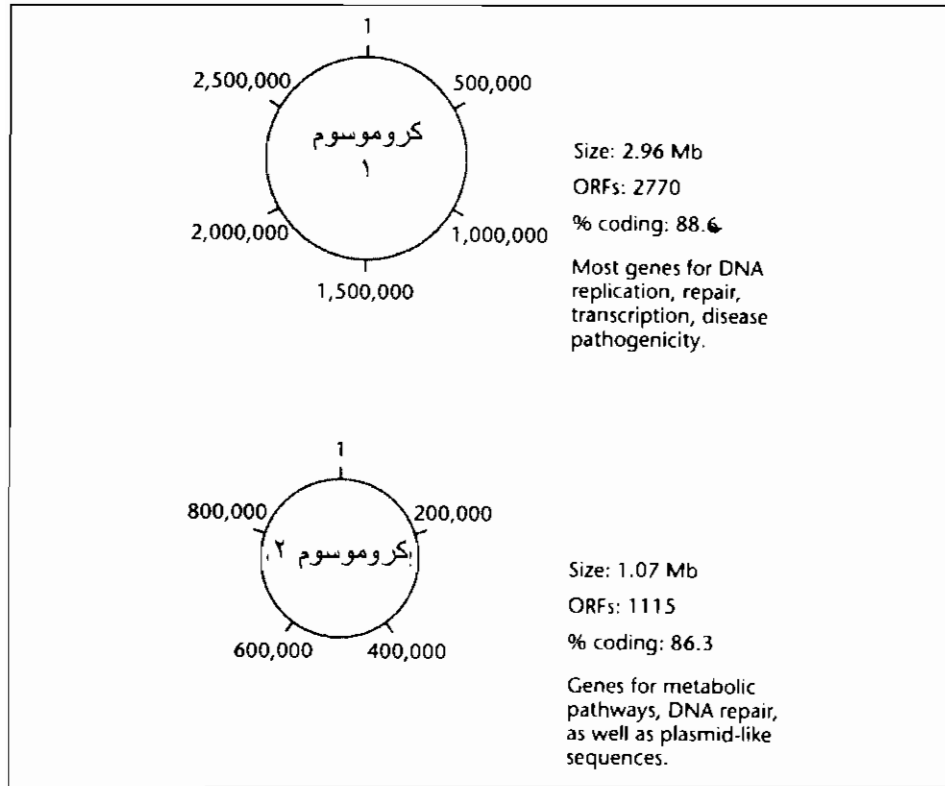
إذ أنه من الشائع أن معظم البلازميدات تحمل جينات غير ضرورية ويمكن نقلها من خلية إلى اخرى، كما أن نفس البلازميد يكون موجود غالباً فى بكتريا تنتمى إلى أنواع مختلفة مما أدى إلى الاعتقاد بأن جينات البلازميدات

لا يجب اعتبارها ضمن الجينوم البكتيري إلا أنه تبين أن بكتريا *B. Bursdorferi* تحتوى على حوالى ١٧ بلازميد والتي تحتوى على ٤٣٠ جين على الأقل ويبدو أن بعضها ضرورى حيث تشمل الجينات الخاصة ببناء البيورينات وبروتينات الغشاء البلازمى.

وقد تبين مؤخراً من تحليل تتابعات جينوم *Vibrio cholerae* المسبب لمرض الكوليرا، وجود كروموسومين حقيقيين فى نفس الخلية البكتيرية (الشكل ١٣-٢٦) وتبين أن الكروموسوم رقم ١ (2.96 Mb) يحتوى على ٢٧٧٠ إطار قراءة مفتوح (ORF) وان الكروموسوم رقم ٢ (1.07 Mb) يحتوى على ١١١٥ إطار (ORF) وبعضها يشفر لجينات ضرورية مثل البروتينات الريبوسومية ويبدو أن الكروموسوم ٢ مشتق من بلازميد اكتسبه نوع ابوى قديم Ancestral Species حيث تبين وجود كروموسومين فى أنواع اخرى من *Vibrio*.

إن إكتشاف وجود جينومات غير مميزة النواة ذات كروموسومات متعددة Multichromosomal بحيث يكون احد الكروموسومات مشتق من بلازميد يؤدي إلى عدة تساؤلات هامة: فمثلاً متى يمكن اعتبار البلازميد كروموسوم، وما هى ميكانيكيات التنظيم التى تتحكم فى التغيير الجينى والمسارات الأيضية فى مثل هذه النظم البكتيرية متعددة الكروموسومات؟

إن الإجابة على هذه الاسئلة قد تؤدي إلى إعادة النظر فى كثير من المفاهيم الخاصة بجينومات غير مميزة النواة وقد تفتح المجال لمعرفة تطور الكروموسومات المتعددة فى جينومات مميزة النواة.



الشكل (١٣-٢٦): يتكون جينوم بكتريا الكوليرا من كروموسومين ويحتوى الكروموسوم الأكبر (١) على معظم الجينات المسؤولة عن الوظائف الضرورية للخلية وإحداث العدوى. بينما تكون معظم الجينات فى الكروموسوم (٢) لم يعرف لها وظيفة.

وقد يدل التحيز فى المحتوى الجينى ووجود تنابعات مشابهة للبلازميد على الكروموسوم ٢ على أن هذا الكروموسوم كان فى الأصل بلازميد ضخم تم إحتوائه بواسطة نوع *Vibrio* قديم

ثانياً: جينومات Archaea:

وهى إحدى ثلاث أقسام رئيسية فى الكائنات الحية (وكانت تسمى سابقاً Archaeobacteria) والقسمان الآخران هما Eubacteria (البكتريا الحقيقية) والتي

لا يوجد لها نواة محاطة بغلاف نووى مثل *Mycoplasma* و *Haemophilus* والقسم الآخر هو Eukaria (وتحتوى على نواة محاطة بغلاف نووى حقيقى).

وكلا من Eubacteria و Archaeobacteria تتبعان غير مميزة النواة Prokaryotes أى انها لا تمتلك نواه وقد اعتبرت Archaeobacteria حديثاً كمملكة منفصلة اعتماداً على تحليل تنابعات د.ن.أ. المشفر لـ ر.ن.أ. الريبوسومى (rDNA) كما تم تأكيد ذلك مؤخراً بتحليل تنابعات البروتينات وتحليلات المسارات الابضية.

ومن جهة اخرى وجد أن جينات Archaea تتشابه كثيراً مع جينات مميزة النواة. فمثلاً وجد أن الجينات المشفرة لبناء ر.ن.أ. وبناء البروتين وبناء د.ن.أ. تتشابه بدرجة كبيرة مع تلك الموجودة فى مميزة النواة .. والمدمش هو أن هذه البكتريا وجد بها بروتينات الهستونات الكروموسومية. وهناك بعض الأدلة على أن د.ن.أ. الكروموسومى ينتظم فى كروماتين. كما أنه على الرغم من عدم وجود انترونات فى الجينات المشفرة للبروتين إلا أنه وجدت انترونات فى جينات tRNA مشابهة لتلك الموجودة فى مميزة النواة.

تبين أنه بكتريا *Methunococcus jannasckii* والتي تعيش فى أعماق البحار وتحت درجة الحرارة العالية والتي تصل إلى ٩٤ م° ويتكون جينومها من ثلاثة كروموسومات: كروموسوم حلقى (1.66 Mb) وكروموسومين حلقين صغيرين مكونين من 58.4Kb و 16.5 Kb. وقد وجد أن ٥٨% من جينات هذا الكائن لا تتشابه مع أى جينات معروفة. وتقوم معظم الجينات بوظائف معينة مثل انتاج الطاقة وانقسام الخلية والمسارات الابضية العامة بحيث تتشابه مع

ما يحدث في *Eubacteria* كما أنها تشبه *Eubacteria* في التنظيم العام وتحتوى لى أوبرونات ولا تحتوى على إنترونات.

ثالثاً: جينومات مميزة النواة *Eucaryotic Genomes*:

يقسم عادة الجينوم النووى لمميزة النواة إلى سلسلة من جزيئات د.ن.أ الخطية بحيث يكون كل كروموسوم محتوى على جزئ واحد من د.ن.أ. بالإضافة إلى ذلك يوجد جينوم آخر صغير فى مميزة النواة وهو جينوم الميتوكوندريا فى صورة جزئ حلقى من د.ن.أ، وفى النبات يوجد جينوم ثالث فى صورة د.ن.أ. حلقى وهو جينوم الكلوروبلاست. وسنقتصر هنا على تلخيص لبعض خصائص الجينوم النووى فى مميزة النواة. وكما سبق الذكر فإنه توجد اختلافات كبيرة فى احجام جينومات مميزة النواة المختلفة.

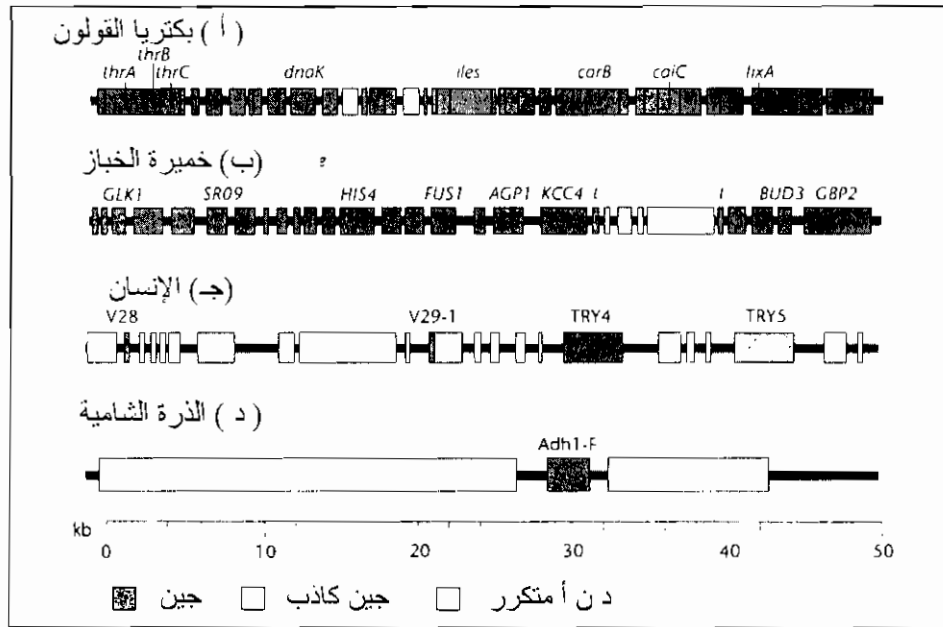
وبالمقارنة بغير مميزة النواة نجد أن مميزة النواة تتميز بكثافة جينية منخفضة *Low Gene Density* (الشكل ١٣-٢٧). وعموماً كلما زاد حجم الجينوم كلما قلت به الكثافة الجينية فلو قارنا بين منطقة من فطر الخميرة (*Lower Eukaryote*) على الكروموسوم III ومنطقة من الجينوم البشرى على الكروموسوم 7 نجد الاختلافات التالية:

١- الكثافة الجينية: تحتوى منطقة الخميرة بطول ٥٠ ك قاعدة على أكثر من ٢٠ جين بينما تحتوى منطقة الجينوم البشرى بنفس الطول على ٦ جينات فقط.

٢- الإنترونات: لاتحتوى الخميرة على أى إنترونات ولكن كل جين بشرى يحتوى على إنترونات عديدة وفى الحقيقة فإن جينوم الخميرة بأكمله

يحتوى على ٢٣٩ انترون فى حين أن بعض الجينات البشرية يحتوى كل منها على أكثر من ١٠٠ انترون.

٣- **التتابعات المتكررة Repetitive Sequences:** يعتبر وجود الانترونات والتتابعات المتكررة من الاسباب الرئيسية للتباين الكبير فى احجام الجينومات فى مميزة النواة. ففى بعض النباتات مثل الذرة الشامية ، وجد أن التتابعات المتكررة هى السمة الغالبة للجينوم حيث أن حجم جينوم الذرة الشامية هو 2500. Mb إلا أن ٨٠% منها مكون من د.ن. أ. متكرر مما يؤدى إلى انخفاض حاد فى الكثافة الجينية فى هذا الجينوم.



الشكل (١٣-٢٧): مقارنة الكثافة الجينية (Gene Density) بين أربعة كائنات

- أ - منطقة طولها ٥٠ كيلو قاعدة فى بداية جينوم بكتريا القولون.
- ب - منطقة من كروموسوم الخميرة رقم III.
- ج - منطقة طولها ٥٠ كيلو قاعدة من كروموسوم ٧ البشري تشفر للمستقبلات السطحية للخلية.
- د - منطقة من جينوم الذرة الشامية تحيط بجين Adh 1-F

وبعكس ما هو شائع من أن مناطق الهيتيروكروماتين لا تحتوى على
أى جينات، تبين وجود ٥٠ جين فى منطقة الهيتيروكروماتين فى حشرة
الدروسفلا.

أثبتت نتائج مشروع الجينوم البشرى أن عدد الجينات البشرية يتراوح من
٣٠-٤٠ ألف جين وهو يقل كثيراً عن العدد الذى كان مقدراً فى السابق بين
٨٠-١٠٠ ألف جين.

الفصل الرابع عشر

تطبيقات تكنولوجيا الجين

Applications of Gene Technology

لقد أدت تكنولوجيا د ن أ المعاد صياغته Recombinant DNA وكلونة الجين Gene Cloning إلى إنطلاق عصر جديد سمي بحق عصر الهندسة الوراثية وتكنولوجيا الجين.

فقد توالى استخدام هذه التقنيات في إنتاج الادوية والفاكسينات والكيماويات الصناعية و الأغذية المعدلة وراثيا.

كما تقوم تكنولوجيا الجين بدور كبير في مجال تشخيص وعلاج الأمراض الوراثية البشرية وتقليل تلوث البيئة وتحسين الانتاج النباتى والحيوانى كما ونوعا.

إنتاج بروتينات معدلة وراثيا:

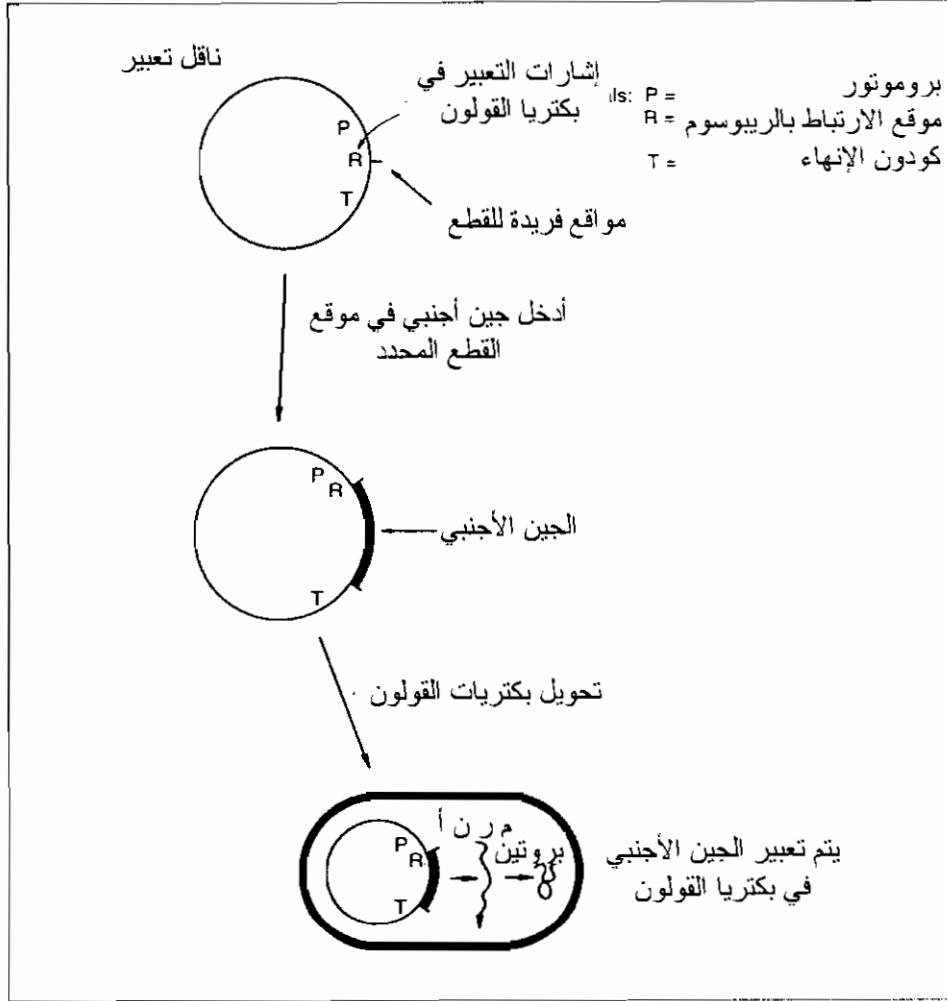
Production of Recombinant Proteins:

سبق الإشارة إلى أهمية تكنولوجيا الجين فى انتاج بروتينات معدلة وراثيا ذات قيمة إقتصادية كبيرة مما ادى إلى نشأة مجال جديد من البيوتكنولوجيا أطلق عليه هندسة البروتينات Protein Engineering.

الا انه قبل ان نتطرق إلى إستعراض بعض الامثلة من البروتينات التى تم إنتاجها بتكنولوجيا الجين فإنه من المفيد ان نفرق بين نوعين من الناقلات وهما: ناقلات الكلونة Cloning Vectors وهذه سبق شرحها بالتفصيل ، وناقلات التعبير Expression Vectors والتى يجب أن تحتوى على بعض التتابعات التى تمكنها من إجراء عمليتي نسخ وترجمة الجين المكلون إلى البروتين المرغوب.

وتشمل هذه التتابعات :

- (١) تتابع المستبدئ Promoter والذي يكون تتابعه قبلى للجين المطلوب .upstream
- (٢) تتابع الانهاء Terminator والذي يحدد النقطة التى تنتهى عندها عملية نسخ الجين.
- (٣) تتابع الارتباط بالريبوسوم Ribosome Binding Site وهو عبارة عن تتابع نيوكليوتيدى قصير يتعرف عليه الريبوسوم كنقطة ارتباط بجزئ م ر ن أ. ويقع كودون البدء (AUG) دائما على بعد نيوكليوتيدات قليلة بعد هذا الموقع Downstream (الشكل ١٤-١).



الشكل (١٤-١): استخدام ناقل تعبير للحصول على تعبير جين أجنبي
في خلية بكتريا القولون

أولاً: الانسولين المعدل وراثياً Recombinant Insulin:

ينتج الانسولين الطبيعي من مجموعة خلايا β في جزر لانجيرهانز في البنكرياس البشري وهو يتحكم في مستوى الجلوكوز في الدم. ويؤدي نقص

الانسولين إلى الإصابة بمرض السكرى Diabetes Mellitus والذي قد تؤدي تعقيداته إلى الموت إذا لم يتم علاجه.

ومن حسن الحظ أنه توجد بعض أنواع مرض السكرى التي يمكن تقليل مضاعفاتها بالعلاج المستمر بالحقن بالانسولين لتعويض النقص في إنتاجه في خلايا الفرد المصاب.

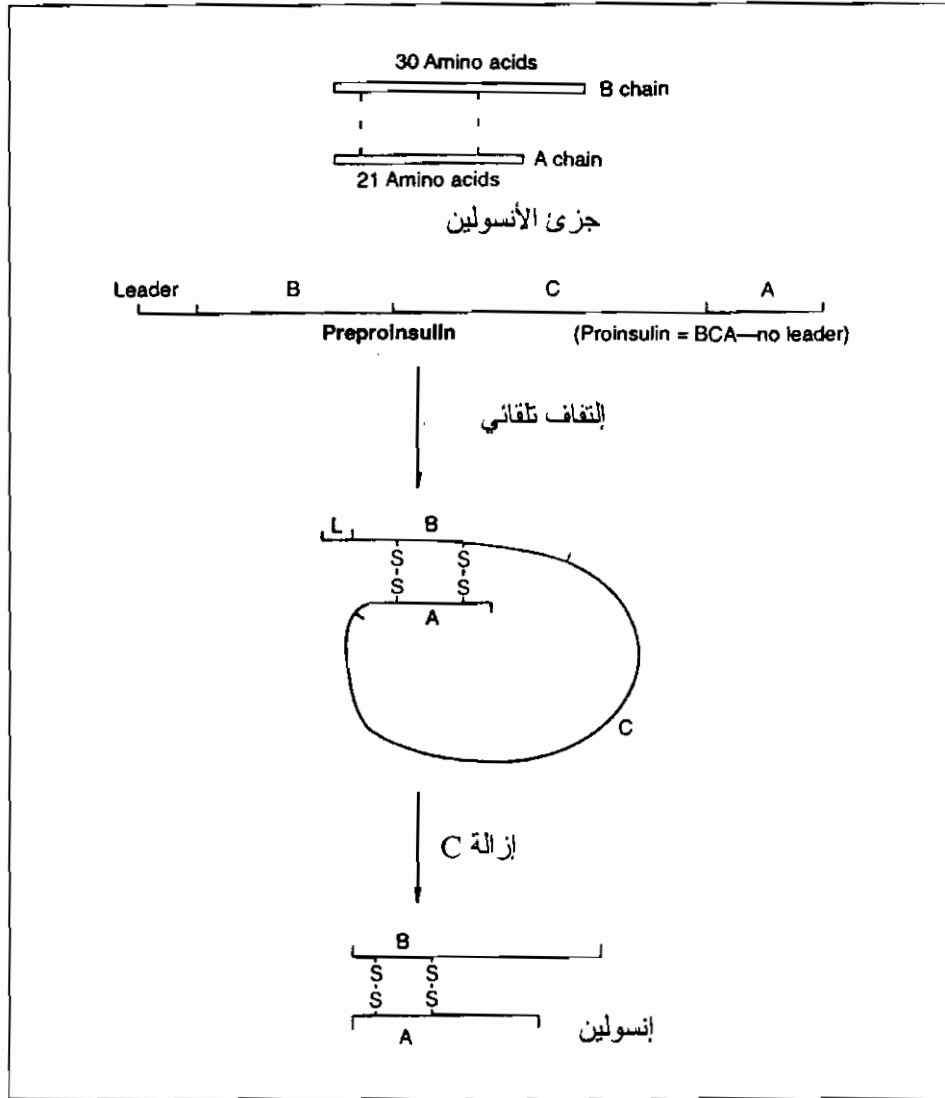
وقد كان مصدر الانسولين في الماضي هو عن طريق إستخلاصه من بنكرياس الخنازير والابقار. وعلى الرغم من أن هذا الانسولين الحيواني أعطى نتائج مقبولة ، إلا أنه قد تنشأ بعض المشاكل الصحية من إستعماله لعلاج مرض البول السكرى في الانسان. إذ أنه نتيجة للاختلاف البسيط بين البروتينات الحيوانية و البشرية قد يؤدي إلى ظهور بعض الاعراض الجانبية مثل الحساسية .Allergy

والمشكلة الثانية تكمن في صعوبة تنقية الانسولين الحيواني وإمكان وجود ملوثات خطيرة يصعب التخلص منها.

ويعتبر بروتين الانسولين مثالي لإنتاجه بتقنية د ن أ المعاد صياغته في خلايا بكتيريا القولون. إذ أن الانسولين البشرى لا يحدث له أى تعديل Modifications بعد الترجمة (أى لا يضاف إليه أى مجموعات إضافية مثل سلاسل الأوليجو السكريه الخ).

كما أن جزئ الانسولين صغير الحجم ويشتمل على سلسلتين ببتيديتين الاولى مكونة من ٢١ حامض أميني (السلسلة A) والآخرى مكونة من ٣٠ حامض أميني (السلسلة B) (الشكل ١٤-٢) و يتم بناء هاتين السلسلتين كبادئ

أنسولين يسمى Preproinsulin والذي يحتوى على سلسلتى A و B مرتبطتين بسلسلة ثالثة (C) و يسبقهم تتابع قائد Leader Sequence.



الشكل (١٤-٢): تركيب جزئ الإنسولين وملخص لبنائه بعملية التجهيز

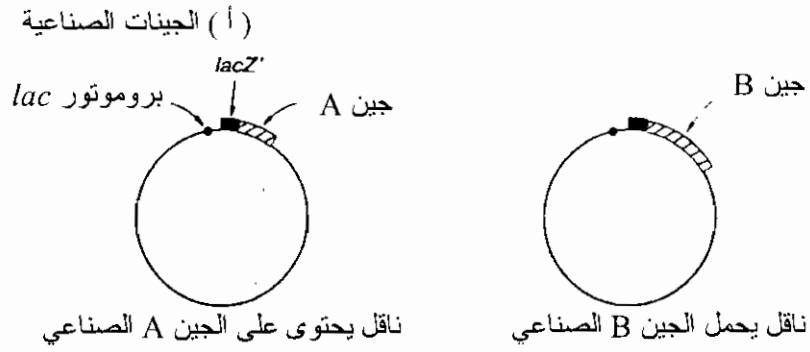
من جزئ الإنسولين القبلى البعدى Preproinsulin

وتتم إزالة التتابع القائد وحذف السلسلة C بعد النسخ ، وتبقى سلسلتى A و B مرتبطتين ببعضها برابطتين كبريتيدين Disulfide Bonds.

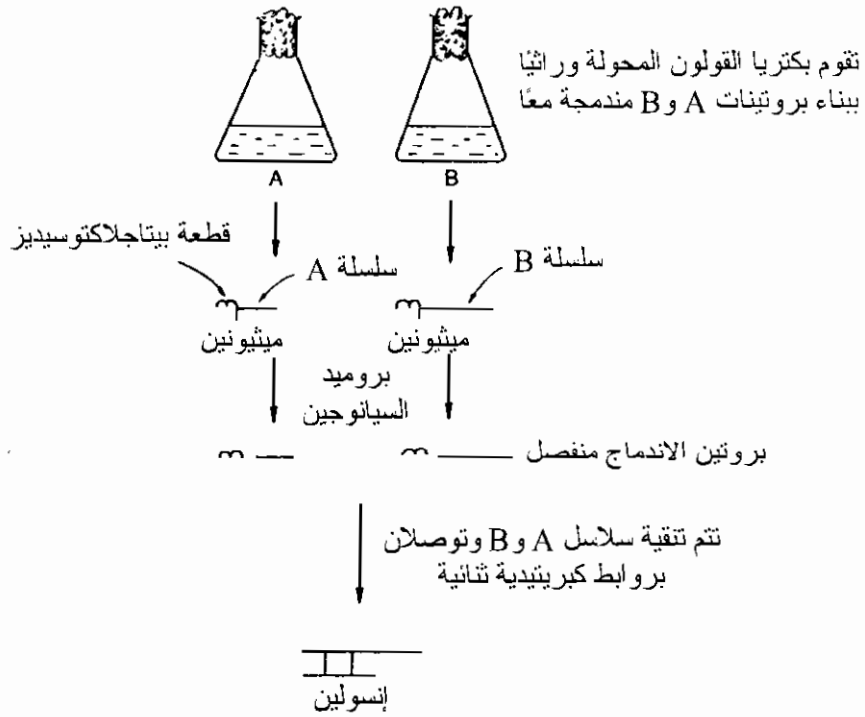
وقد أمكن بناء جين انسولين صناعي وترجمته إلى بروتين الانسولين الفعال. حيث أمكن تكوين بلازميد معاد صياغتهما أحدهما يحتوى على الجين الصناعي الخاص بالسلسلة A والاخر يحتوى على جين السلسلة B. وفي كل حالة تم وصل الجين الصناعي بجين Lacz فى ناقل تعبير Expression Vector من نوع PBR 322 (الشكل ١٤-٣) مما يجعل كل جين صناعي تحت تحكم بروجين Lac القوي. ويتم ترجمة كل منهما كبروتين مندمج Fused Protein يتكون من الاحماض الامينية الاولى من إنزيم β -Galactosidase متبوعة بسلسلة A أو B (الشكل ١٤-٣ ب).

وقد صمم كل جين بحيث يكون الحامض الاميني الميثيونين يفصل بين β -Galac وسلسلة الانسولين مما يمكن معه إزالة جزء β -Galac و فصلها عن سلسلة الانسولين وذلك بالمعاملة بمادة Cyanogen Bromide (CBr) ويتم الارتباط بين سلسلة A و B برابطتين كبريتيدتين تتم فى المعمل. وقد أمكن تطوير عملية إنتاج الانسولين ببناء Synthesis جين Proinsulin بحيث يشمل سلسلة A و B معا وبالكامل.

ويتميز بادىء الهرمون الناتج Prohormone بأنه يلتف ذاتيا Spontaneous Folding ليأخذ التركيب الصحيح بالروابط الكبريتيدية. ويمكن التخلص من سلسلة C بسهولة بتحليلها إنزيميا.



(b) Synthesis of insulin protein



الشكل (١٤-٣): بناء الإنسولين المعاد صياغته باستخدام جينات صناعية

لكل من سلسلتى A و B

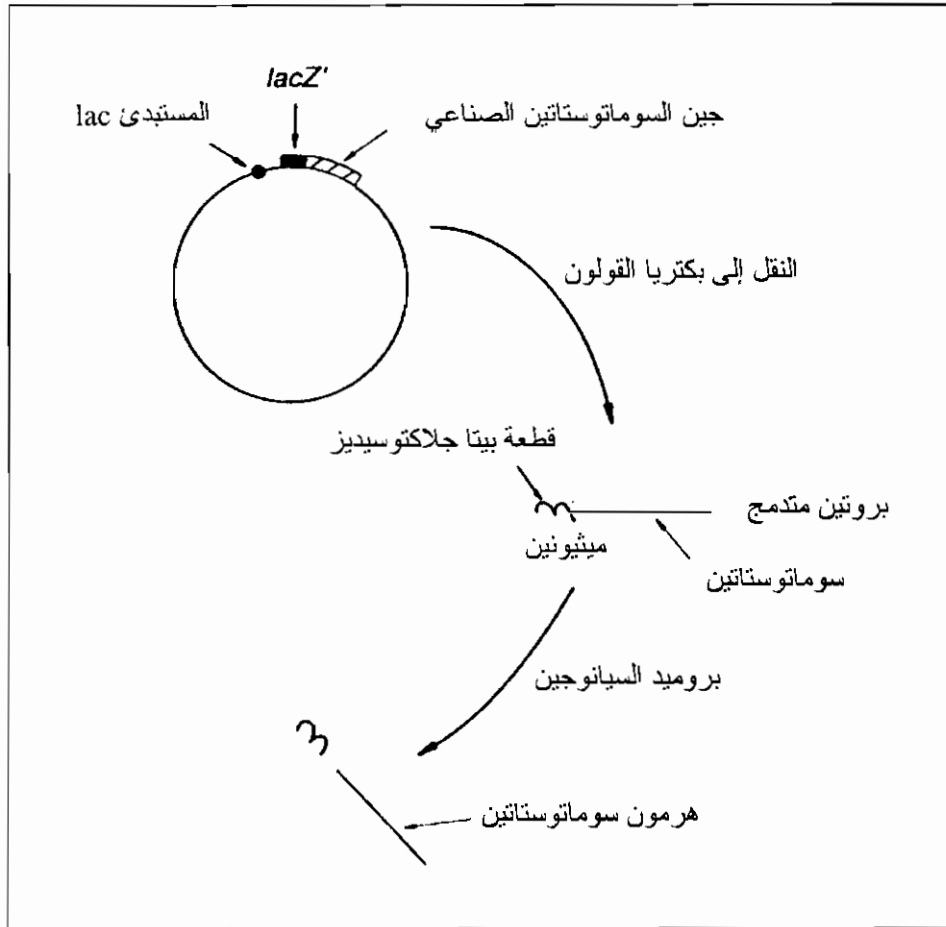
ثانيًا: إنتاج هرمون النمو البشري في خلايا بكتيريا القولون:

Synthesis of Growth Hormones in E.coli:

في نفس الوقت تقريبا الذي إنتاج فيه هرمون الأنسولين في بكتيريا القولون ، كانت مجموعة أخرى من العلماء تعمل في مشروع لإنتاج هرموني النمو البشري سوماتوستاتين Somatostatin وسوماتوتروفين Somatotrophin.

ويعمل هذان الهرمونان بصورة مشتركة للتحكم في عمليات النمو في جسم الانسان ويؤدي نقصها إلى إختلال في نمو العظام Acromegaly والتقزم. وقد كان هرمون سوماتوستاتين أول بروتين بشري يتم تكوينه في بكتيريا القولون (إلا أن هرمون الأنسولين كان أول هرمون بشري يصرح به على نطاق تجارى بعد موافقة هيئة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) US Food and Drug Administration ونظرا لأنه يتكون من سلسلة قصيرة من ١٤ حامض أميني فقط. فقد كان من السهل بناء جين صناعي لهذا الهرمون. واستخدمت في إنتاج هذا الهرمون نفس الاستراتيجية التي سبق وضعها في إنتاج الأنسولين المعاد صياغته بحيث أدخل الجين الصناعي في ناقل التعبير LacZ (الشكل ١٤-٤) وبناء بروتين مندمج Fusion Protein والقطع بمادة بروميد السيانونجين (CBBr).

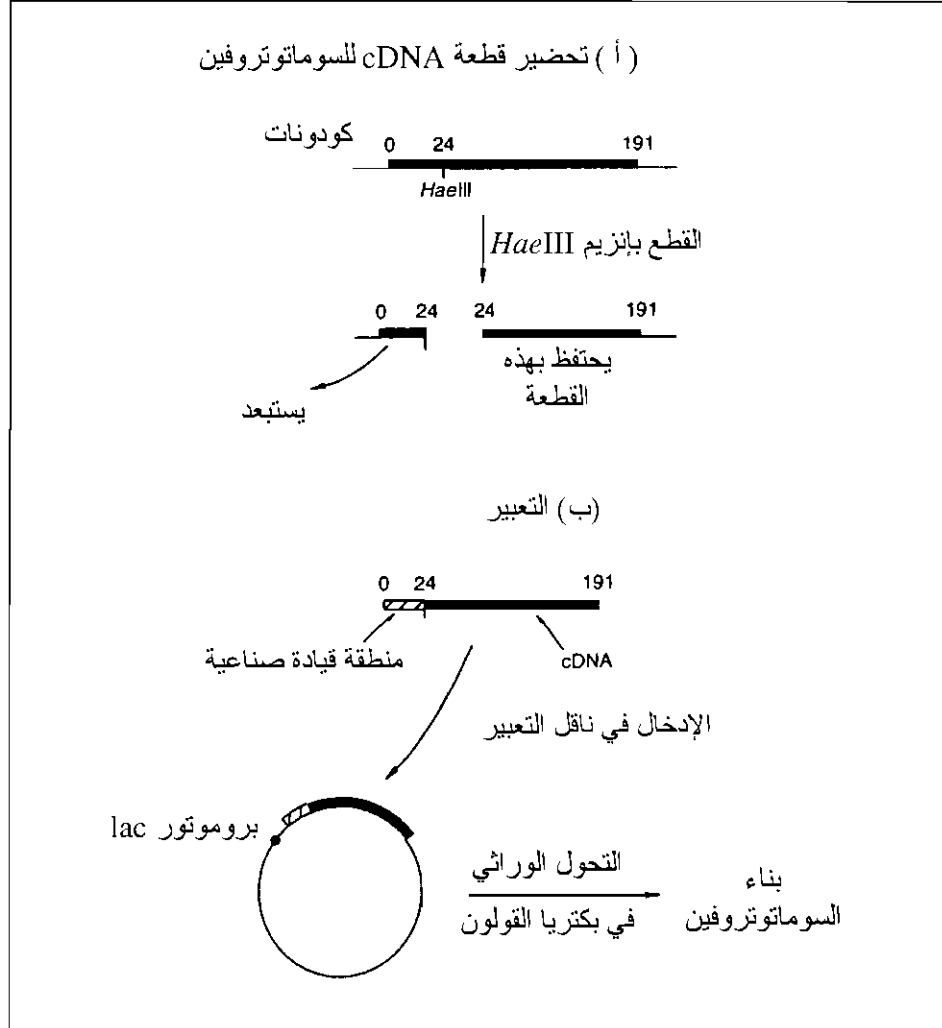
ومن جهة أخرى ونظرا لأن هرمون السوماتوتروفين مكون من سلسلة طويلة نسبيا (١٩١ حامض أميني) مكافئة تقريبا لحوالي ٦٠٠ زوج من القواعد النتروجينية ، فقد كان لابد من استخدام إستراتيجية مختلفة نظرا لأنه كان من الصعب في ذلك الوقت (أواخر السبعينيات) بناء هذا الجين صناعيا بالكامل.



الشكل (١٤-٤): إنتاج هرمون السوماتوستاتين المعاد صياغته

ولذلك تم الاعتماد على cDNA من مرن أ المستخلص من الغدة النخامية التي تنتج هذا الهرمون في جسم الانسان. و تم قطع cDNA الناتج بانزيم القطع المحدد Hae III إلى قطعتين (الشكل ١٤-٥) وكانت القطعة الاطول تحتوي على الكودونات من ٢٤ إلى ١٩١ واستخدمت هذه القطعة لتكون البلازميد المعدل في حين استبدلت القطعة الصغرى بجزئ د ن أ صناعي الذي

إشتمل على نقطة بداية جين السوماتوتروفين ، و إحتوى على الإشارات الصحيحة اللازمة لعملية الترجمة فى بكتيريا القولون (الشكل ١٤-٥) وتم لحام هذا الجين المعدل فى ناقل تعبير يحمل البرموتور Lac.

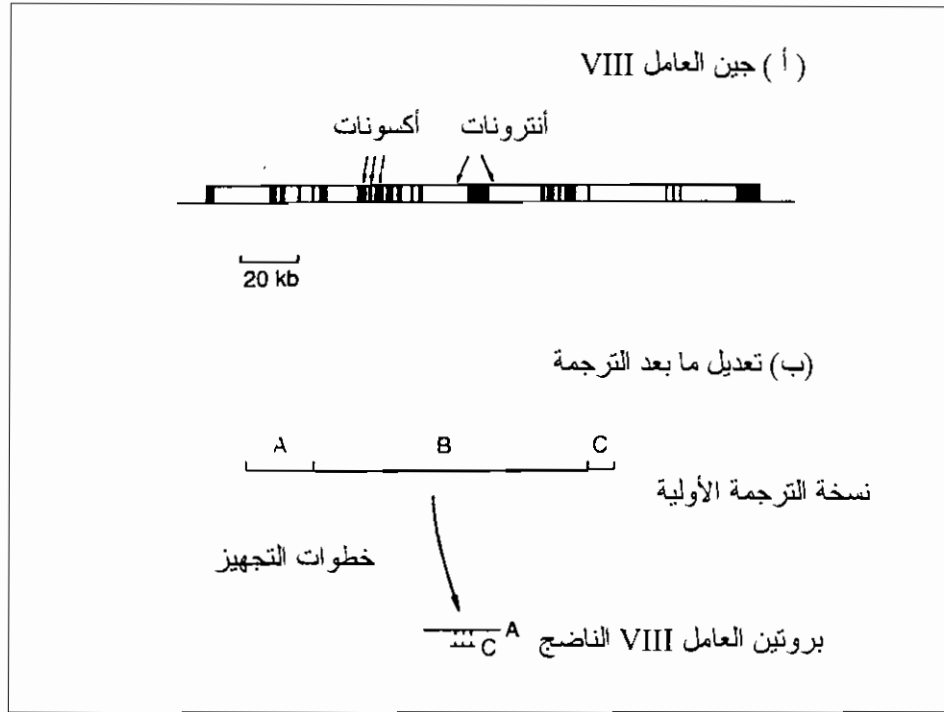


الشكل (١٤-٥): إنتاج هرمون السوماتوتروفين المعاد صياغته

ثالثاً: إنتاج عامل التجلط VIII Recombinant Factor VIII:

يلعب عامل التجلط Factor VIII دوراً رئيسياً في عملية تجلط الدم. ويؤدي عدم قدرة الجسم على بناء هذا العامل (نتيجة لغياب النسخة السائدة من هذا الجين الموجود على كروموسوم الجنس X) إلى صعوبة وقف نزف الدم عند التعرض لجرح قطعي نتيجة عدم قدرة الجسم على تكوين جلطة لوقف النزيف وخاصة في الأفراد المصابين بمرض النازف Haemophilia (هيموفيليا). ويتميز هذا الجين بأنه يتكون من ١٨٦ ك قاعدة و يحتوي على ٢٦ إكسون و ٢٥ إنترون كما أن م ر ن أ يشفر لسلسلة طويلة مكونة من ٢٣٥١ حامض أميني (الشكل ١٤-٦) كما أن بروتين العامل VIII يتم تعديله بصورة معقدة بعد الترجمة Post-Translational Processing بحيث يعطى فى النهاية بروتين ثنائى الجزئ Dimeric مكونا من تحت وحدة كبيرة مشتقة من المنطقة القبلية Upstream لمتعددة الببتيد الاولى وتحت وحدة صغيرة من المنطقة اللاحقة Downstream (الشكل ب) ثنائى الجزئ Dimeric. وتحتوى تحت الوحدات على ١٧ رابطة كبريتيدية Disulphide Bonds وعدد من السلاسل الجليكوسيدية Glycosylated القصيرة.

ومن الواضح أن مثل هذا البروتين المعقد الكبير الحجم لا يمكن للجهاز الوراثى لبكتيريا القولون أن يقوم بإنتاجه لافتقاره إلى كثير من العناصر المسؤولة عن إنتاج مثل هذا البروتين لذلك كان لابد من إستخدام مزارع خلايا ثديية للقيام بهذه العملية.



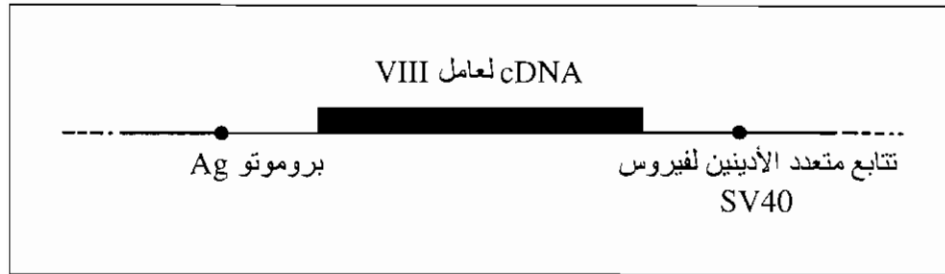
الشكل (١٤-٦): عامل التجلط VIII وناتج ترجمته (البروتين)

وقبل أن نتطرق إلى عملية بناء هذا البروتين المعدل وراثيا في الخلايا الثديية تجدر الإشارة إلى الأسباب التي إقتضت ضرورة إنتاج هذا البروتين بطرق تكنولوجيا الجين إذ أنه حتى وقت قريب كانت الطريقة الوحيدة لعلاج الهيموفيليا هي الحقن ببروتين عامل التجلط VIII النقي والمستخلص من الدماء البشرية لأفراد متبرعين و تعد عملية تنقية هذا البروتين عملية معقدة والعلاج مكلف جدا.

والأخطر من ذلك أنه بالرغم من دقة عمليات التنقية فإنها كانت قاصرة عن التخلص من الفيروسات المرضية التي قد تكون موجودة في دم المتبرع . إذ

تبين أن فيروسات التهاب الكبد الوبائي Hepatitis و فيروس HIV المسئول عن الايدز (AIDS) يمكن أن تمر مع البروتين المستخلص وبالتالي حدثت بالفعل إصابات بهذه الامراض الخطيرة للأفراد المعالجين بالحقن ببروتين عامل التجلط المستخلص بهذه الطريقة. لهذا فإن عامل التجلط المعدل والمنتهج بتكنولوجيا الجين يكون خالي من هذه الملوثات الخطيرة مما يعد إنجازاً مهماً في مجال البيوتكنولوجيا.

وفي المحاولات الاولى لإنتاج هذا البروتين المعدل وراثياً باستخدام خلايا الثدييات ، تمت كلونة جزيء cDNA بأكمله في مزرعة من خلايا الهامستر Hamster Cells إلا أن الكميات المنتجة من البروتين كانت ضئيلة جداً وغير مشجعة وقد يرجع ذلك إلى أن العمليات ما بعد الترجمة Post-Translational ، على الرغم من إنها تحدث بطريقة صحيحة في خلايا الهامستر ، إلا أنها لا تقدر على تحويل كل النتائج الأولية إلى الصورة النشطة مما يؤدي إلى انخفاض حاد في كمية الناتج النهائي. وللتغلب على هذه المشكلة ، إستخدمت قطعتين منفصلتين من cDNA تشفر إحداهما لتحت الوحدة الكبيرة من سلسلة متعددة الببتيد والثانية تشفر لتحت الوحدة الصغيرة وتم إلتحام Ligation كل من قطعتي cDNA في ناقل تعبيرى Expression Vector بحيث تكون تحت تأثير Downstream بروموتور قوى وتسبق Upstream إشارة من متعدد الادينين Poly A من فيروس SV 40 (الشكل ١٤-٧) وتم إدخال البلازميد إلى مزرعة من خلايا الهامستر حيث أنتجت كميات توازى ١٠ أضعاف الكمية المنتجة من الخلايا التى إحتوت على cDNA الكامل الطول كما أن بروتين عامل التجلط الناتج كان فعالاً ولا يختلف في ذلك عن البروتين في صورته الاصلية.



الشكل (١٤-٧): إشارات التعبير المستخدمة في إنتاج العامل VIII المعاد صياغته. يتكون البروموتور من هجين صناعي من تتابعات جين بيتا اكتين للدجاج وبيتا جلوبيين للأرنب وتستخدم إشارة متعدد الأدينين Poly A الخاصة بفيروس SV40 (وهي مهمة للتجهيز الصحيح لجزء مرن أ قبل الترجمة إلى بروتين)

إنتاج بروتينات بشرية معدلة أخرى:

Synthesis of Other Recombinant Human Proteins:

توالت عمليات إنتاج بروتينات معدلة بتكنولوجيا الجين وبيجين
الجدول (١٤-١) بعض الامثلة لهذه البروتينات.

الجدول (١٤-١) ، بعض البروتينات البشرية التي أنتجت من جينات مكلونة في البكتيريا أو في خلايا مميزة النواة أو بواسطة Molecular Pharming

البروتين	الغرض من استخدامه في العلاج
الانسولين	مرض البول السكري
السوماتوستاتين	إختلال النمو
السوماتوتروفين	إختلال النمو
عامل التجلط VIII	هيموفيليا
عامل التجلط IX	مرض Christmas
الفا انترفيرون	اللوكيميا وأنواع أخرى من السرطان
بيتا انترفيرون	السرطان والايذز
جاما انترفيرون	السرطان و الروماتويد
انترليوكين	السرطان و إختلال المناعة
عامل نمو Epidermal	القرحة ulcer
منشط البلازمونيجين النسيجي (tpA) Tissue Plasmonigen Activator	الذبحة الصدرية heart attack
سوبر أوكسيد ديسميوتيز (SOD)	التخلص من التلف الناتج من الشوارد المؤكسدة في عملية زرع الكلية.
البومين السيرم	يستخدم كإضافات للبلازما Plasma Supplement
ريلاكسين Relaxin	يستخدم في المساعدة على الولادة To aid Child birth
إنزيم ديوكسي ريبونوكلييز	لعلاج مرض التليف الحويصلي Cystic Fibrosis

إنتاج فاكسينات بتكنولوجيا الجين Recombinant Vaccines:

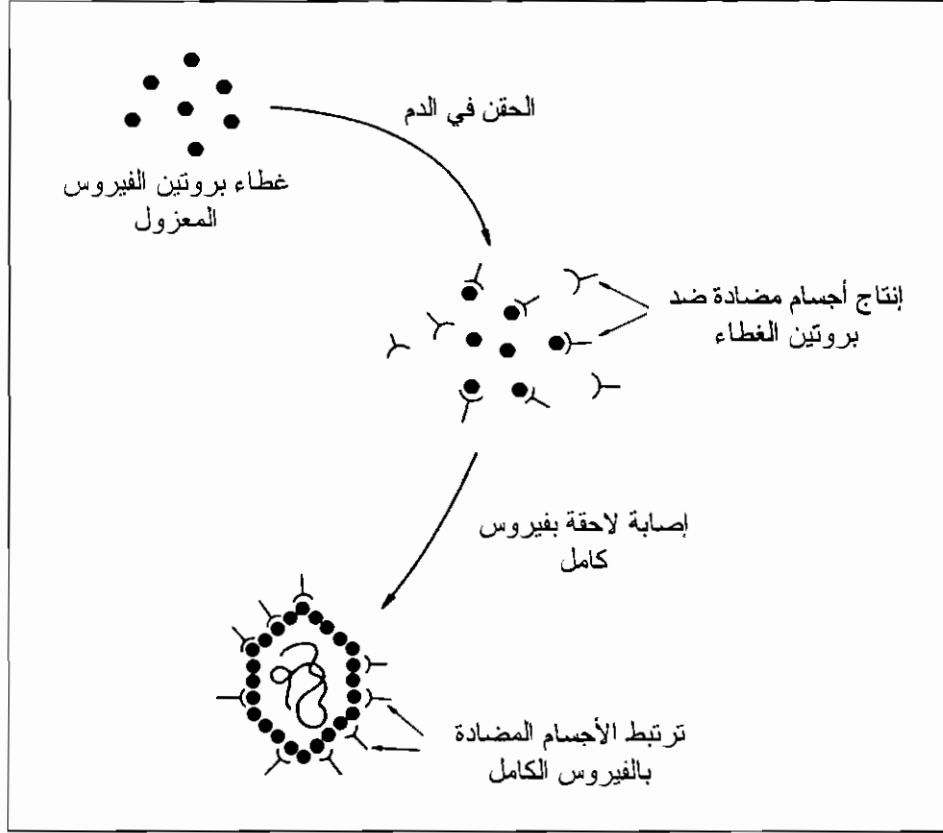
تتلخص عملية التحصين Vaccination ضد مرض معين في حقن الدم بتحضير من الانتجن Antigen الذي يؤدي إلى تحفيز الجهاز المناعي للجسم لبناء

أجسام مضادة Antibodies لحماية الجسم من الإصابة. وقد جرت العادة حتى وقت قريب على استخدام صورة غير نشطة أو ميتة من الميكروب المعدى فى تحضير الفاكسين (الطعوم).

فمثلا الطعوم ضد الفيروس كانت تتكون من وحدات فيروس تم إيقاف نشاطها Attenuated بمعاملات حرارية أو عمليات مماثلة إلا أنه نشأت مشكلتين من استخدام هذه الطعوم :

- ١- لا بد من أن تكون عملية إيقاف النشاط فعالة بنسبة ١٠٠% وإلا فإن وجود حبيبة فيروس واحدة حية فى الطعم المستخدم ستؤدى إلى الإصابة. وقد كانت هذه مشكله فى طعوم الحمى القلاعية فى الابقار.
- ٢- لا بد من الحصول على كميات كبيرة من حبيبات الفيروس لانتاج الطعم وهذه يتم الحصول عليها عادة من مزارع الانسجة. إلا أن بعض الفيروسات وخاصة فيروس التهاب الكبد B لا تنمو فى مزارع الانسجة.

وللتغلب على هذه المشاكل استخدمت تقنية كلونة الجين وخاصة بعد إكتشاف أن تحفيز الجهاز المناعى فى الجسم لانتاج أجسام مضادة يعتمد أساسا على انتجينات موجودة فى بروتينات غطاء الفيروس Coat Proteins (الشكل ١٤-٨).



الشكل (١٤-٨): الفكرة الأساسية لتفسير استخدام تحضير من الغطاء البروتيني للفيروس لإستخدامه كطعم Vaccine

ولذلك يتم تحديد الجين المشفر لهذا البروتين ويكلون في ناقل تعبير مناسب لإنتاج بروتينات معدلة وراثيا تستخدم كطعوم. و تمتاز تلك الطعوم بعدم وجود الفيروس الحى كما يمكن إنتاجها بكميات كبيرة.

وقد أمكن الحصول بهذه التقنية على طعم ضد إلتهاب الكبد B وذلك بكلونته في ناقل للتعبير 2µm وإدخاله إلى خلايا فطر الخميرة. وقد أمكن

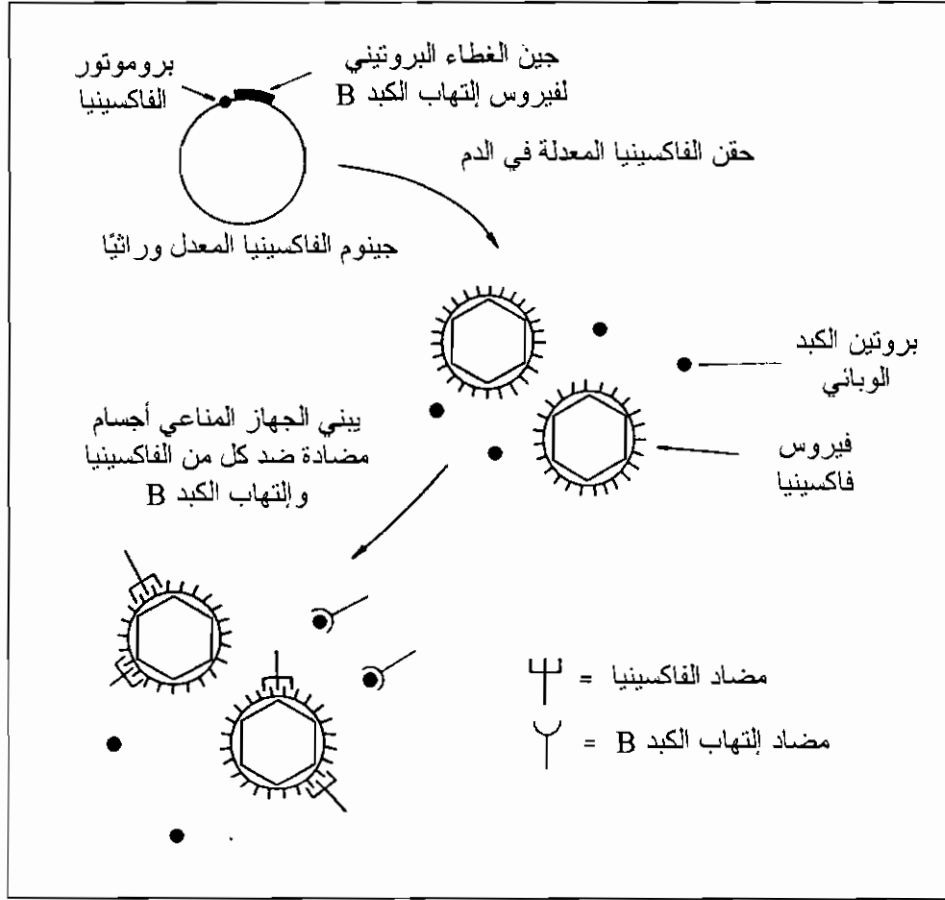
الحصول على كميات كبيرة نسبيا من هذا البروتين المعدل وأثبتت فعاليته عند حقن القردة به. وقد تمت الموافقة على استخدام هذا الفاكسين كطعم فى الانسان.

إستنباط فاكسينات حية معدلة وراثيا:

Live Recombinant Vaccines:

يرجع استخدام فيروس فاكسينيا Vaccinia كطعم ضد فيروس مرض الجدري Smallpox إلى عام ١٧٩٦ حين إكتشف Edward Jenner لأول مرة أن هذا الفيروس ، غير الضار بالانسان ، يمكنه تحفيز الجهاز المناعى ضد فيروس مرض الجدري الخطير. وقد اشتق اسم فاكسين من كلمة فاكسينيا. وقد أدى استخدام هذه التقنية إلى التخلص تماما من مرض الجدري على المستوى العالمى فى عام ١٩٨٠. وقد تطور استخدام فيروس الفاكسينيا مؤخرا بحيث يمكن إستعماله كطعم حى ضد أمراض أخرى. فإذا تم الحاق جين بروتينات الغطاء لفيروس إلتهاب الكبد الوبائى B فى جينوم الفاكسينيا تحت تحكم بروجينوتور الفاكسينيا مما يؤدي إلى تعبير الجين (الشكل ١٤-٩). وبعد الحقن فى الدم سيؤدى تكاثر الفيروس المعدل وراثيا إلى إنتاج حبيبات فاكسينيا جديدة بالإضافة إلى إنتاج كميات كبيرة من انتجن إلتهاب الكبد B. وسيؤدى ذلك إلى إكتساب المناعة ضد الجدري وإلتهاب الكبد الوبائى B معا. وتوجد إمكانيات كثيرة لهذه التقنية، إذ يمكن استخدام جينوم الفاكسينيا الحية لكلونة عدد من الجينات المسؤولة عن إكتساب المناعة ضد عدد من الامراض بحيث أظهرت نتائج هذه التجارب فعالية كبيرة فى الحيوانات المعملية. وعلى سبيل المثال، فإن مثل هذه التجارب أثبتت إحتمال الحصول على طعوم واسعة المدى Broad Spectrum عندما تبين أن فيروس فاكسينيا المعدل وراثيا و الذى يتم فيه

تعبير عدد من الجينات لبروتينات انتجينات مختلفة مثل فيروس الانفلونزا وإلتهاب الكبد B.



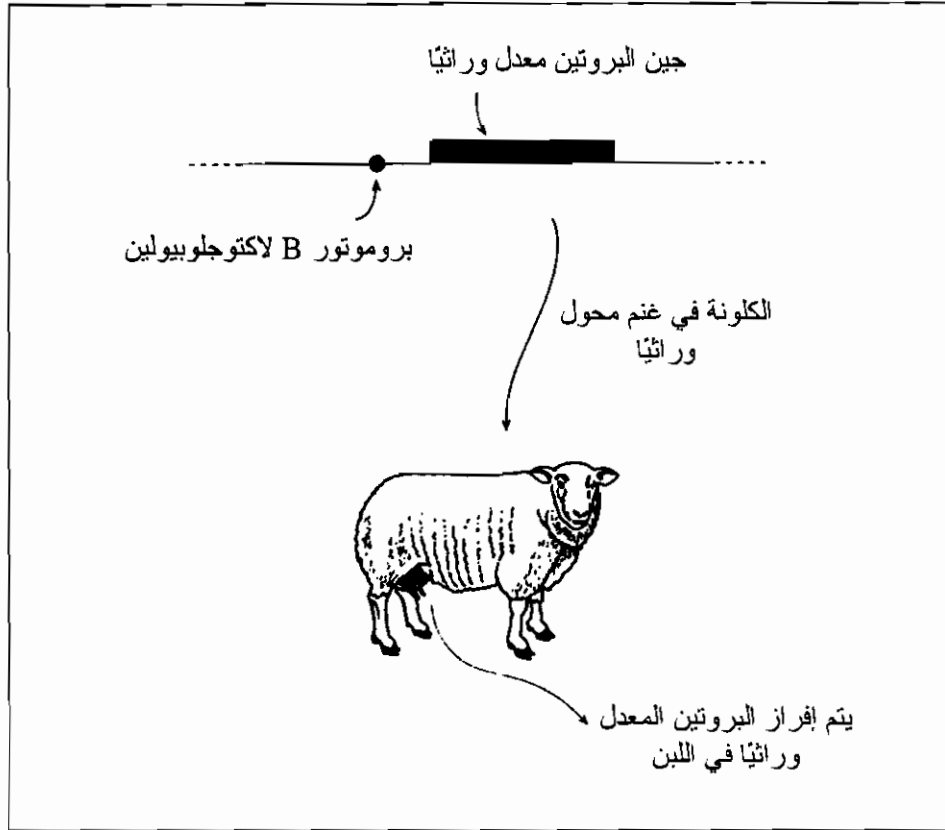
الشكل (٩-١٤): الفكرة الأساسية لتفسير إمكان استخدام فيروس الفاكسينيا المعاد صياغته

والهيربس Herpes Simplex قد أعطى مناعة ضد كل من هذه الأمراض مجتمعه في القروود. إلا أن هناك خوف من أن إطلاق مثل هذه الفاكسينيا المعدلة وراثيًا في البيئة من خلال برنامج تطعيم ، خشية أي مخاطر على سلامة البيئة.

إنتاج بروتينات معدلة وراثيا في الحيوانات الحية:

Recombinant Protein From Live Animals:

أمكن مؤخرا إستخدام الحيوانات الحية مثل الابقار والخنازير والاعنام كمفاعلات بيولوجية Bioreactors لإنتاج بروتينات مهندسة وراثيا. وفي هذه التقنية يتم كلونة جين البروتين المرغوب تحت تحكم البروموتور الخاص بجين B-Lactoglobulin ويتم إدخال ناقل التعبير هذا إلى الحيوان المحول وراثيا Transgenic Animal والذي يتم إنتاجه بالحقن المجهري Microinjection للخلية البويضية المخصبه ويؤدي وجود الجين المرغوب تحت تحكم هذا البروموتور إلى أن يصبح إنتاج البروتين المرغوب قاصرا على أنسجة الضرع فقط بحيث يفرز هذا البروتين مع اللبن (الشكل ١٤-١٠). ويمكن إستخلاص وتنقية البروتين المرغوب من اللبن بسهولة نسبية. وقد أمكن بهذه التقنية إنتاج بروتين عامل التجلط VIII فيما يسمى Molecular Pharming حيث تم الحاق cDNA الخاص بهذا الجين بأكمله تحت تحكم البرموتور اعلاه في الخنزير. وقد أدى ذلك إلى بناء هذا البروتين في خلايا الضرع وإفرازه في اللبن. وقد تبين أن البروتين الناتج له نفس خواص ونفس فاعلية البروتين الطبيعي لعامل التجلط VIII.



الشكل (١٤-١٠): إنتاج بروتين معاد صياغته في لبن الأغنام المحولة وراثيًا

إنتاج بروتينات معدلة وراثيًا في النبات:

Recombinant Proteins From Plants:

كما يحدث في الحيوان فإنه يمكن استخدام النبات كمفاعل بيولوجي لإنتاج بروتينات مرغوبة خاصة وأنه ثبت أن معظم البروتينات الحيوانية التي يتم إنتاجها في خلايا النبات يحدث لها نفس التعديلات لما بعد الترجمة Post-Translational Modifications. ويمكن زراعة النباتات بكثافة عالية في الحقل مما يعطي محصولاً جيداً من البروتين المعدل وإمكان التخزين لبعض

الاجزاء النباتية المحتوية على هذا البروتين مثل الدرنات أو في الفاكهة التي تكون عادة غنية في البروتين. و بصرف النظر عن الطريقة التي يمكن أن يتم فيها إنتاج البروتين المعدل في النبات ، فإن النبات يوفر تقنية رخيصة و غير معقدة للإنتاج الكبير Mass Production من البروتينات المعدلة وراثيا. وقد تم إنتاج بروتينات مختلفة على نطاق تجريبي مثل بعض المنتجات الصيدلانية كالانترليكون والاعسام المضادة كما تجرى بعض التجارب لإنتاج فاكسينات في النبات (مثل الفاكسين ضد الملاريا) مما يعد خطوه كبيره لإستنباط برنامج تطعيم رخيص وفعال.

وقد إستخدم نبات الدخان Tobacco بالفعل لإنتاج أجسام مضادة. وتتخلص الطريقة في إدخال كلون للجين الخاص بالسلسلة الخفيفة في أحد النباتات ، في حين ادخل كلون الجين الخاص بالسلسلة الثقيلة في نبات آخر. وأمكن بالفعل الحصول على كميات لا بأس بها من السلسلتين كل في النبات المعدل وراثيا. ثم تم التهجين بين النباتين وعند حصاد نباتات الجيل الاول الناتجة وجدت كميات معقولة من الاجسام المضادة كاملة حيث حدثت داخل نباتات الجيل الاول عملية تعديل كاملة بحيث أصبح تركيب الاجسام المضادة مشابه للبروتين الاصلى وبنفس الفاعلية.

تحديد الجينات المسؤولة عن الامراض البشرية:

Identification of Genes Responsible for Human Diseases:

لاشك أن الامراض الوراثية كانت وستظل موجودة في العشائر البشرية إلا أنها إكتسبت أهمية أكبر في السنين الاخيرة وذلك لان برامج التطعيم وإستخدام المضادات الحيوية وتحسين النواحي المعيشية و الصحية قد أدت إلى

إنخفاض فى معدلات الإصابة بالأمراض المعدية مثل الجدري والسل والكوليرا والتي كانت السبب الرئيسى فى الوفاة فى أوائل القرن العشرين.

ونتيجة لذلك أصبحت نسب أعلى من أفراد العشيرة تموت من أمراض ذات مكون وراثى وخاصة الأمراض التى تظهر أعراضها فى عمر متأخر من حياة الفرد نتيجة لارتفاع متوسط الأعمار.

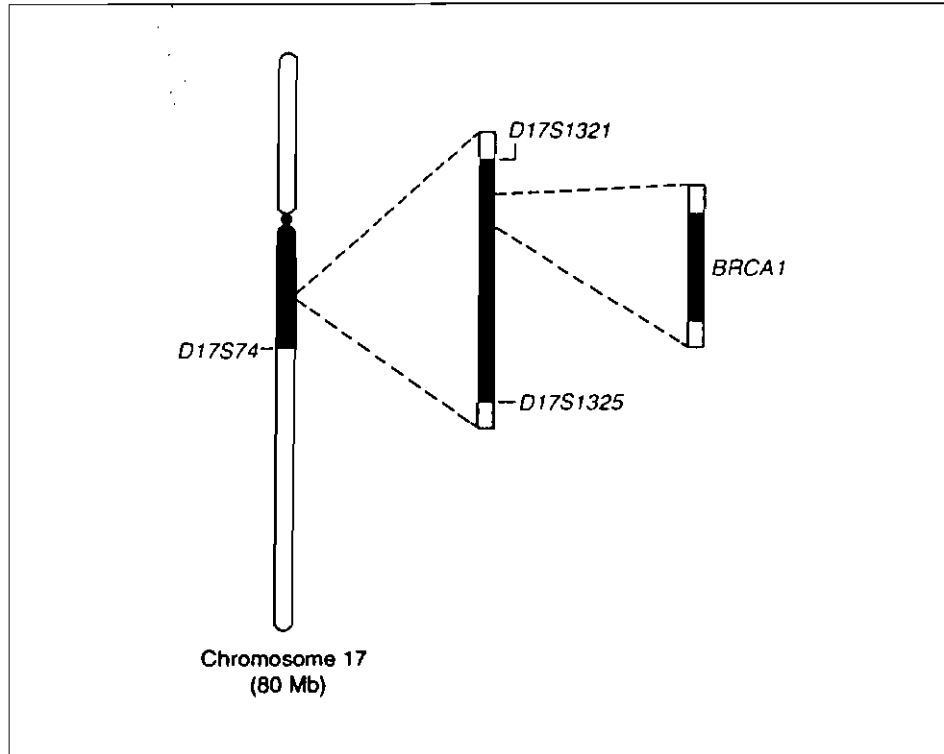
وترجع أهمية التعرف على الجينات المسؤولة عن الأمراض الوراثية إلى ما يأتى:

- ١- قد يعطى تحديد أو تعريف الجين مؤشرا عن الأساس البيوكيماوى للمرض مما يساعد على تصميم إستراتيجيه العلاج.
- ٢- إن تحديد الطفرة الموجودة فى جين معيب Defective يمكن أن يستخدم لاستنباط برنامج للمسح Scanning والمتابعة حتى يمكن التعرف على وجود الجين فى الافراد الحاملة Carriers أو تلك التى لم يظهر بها المرض بعد. و يمكن تقديم إستشارة طبية وراثية Genetic Counselling لحاملى الطفرة لتوعيتهم بفرص توريث المرض لأطفالهم.
- كما أن التعرف المبكر على الطفرة فى الافراد التى لم يظهر فيها المرض بعد تسمح بإتخاذ احتياطات لتقليل مخاطر تقدم المرض فى الجسم.
- ٣- يعتبر تعريف أو تشخيص الجين أحد المتطلبات المبدئية Prerequisite للعلاج بالجينات كما سيأتى بعد.

ولكى يتم تحديد الجين المسئول عن مرض ما فإنه يمكن بالنسبة للعشائر البشرية اللجوء إلى تحليلات شجرة النسب Pedigree Analysis والتي يتم فيها

دراسة توريث الجين المرغوب في عائلات تتميز بمعدلات إصابة عالية بالمرض المطلوب دراسته. ويفضل الحصول على عينات د ن أ مأخوذة من ثلاثة أجيال على الأقل من كل عائلة وكلما زاد عدد أفراد العائلة كلما كان ذلك أفضل. وتتم دراسة الارتباط بين ظهور أو غياب المرض وبين وجود أو عدم وجود كشافات د ن أ DNA Markers في تحليل شجرة النسب. و يمكن توضيح ذلك بإستعراض الخطوات التي اتخذت للتعرف على أحد الجينات المسؤولة عن سرطان الثدي. وقد بدأت التجارب المبشرة في عام ١٩٩٠ عندما تبين أنه في عائلات تتميز بارتفاع نسبة الإصابة بسرطان الثدي وجود عدد من الاناث المصابة ظهر في تحليلات عينات د ن أ الخاصة بهن ظهور الكشاف RFLP (D17S74) والذي كان قد سبق تحديد موقعه على الذراع الطويل للكروموسوم رقم ١٧ (الشكل ١٤-١١). مما يشير إلى أن الجين المراد تحديد موقعه (BRCA1) لابد أن يقع في مكان ما على الذراع الطويل للكروموسوم ١٧. وكانت تلك بداية مبشرة إلا أنها لم تكن كافية لتحديد الموقع الدقيق لهذا الجين إذ تبين أن أكثر من ١٠٠٠ جين آخر تقع في تلك المنطقة نفسها والتي تمتد حوالى ٢٠ مليون قاعدة على كروموسوم ١٧. وقد إستدعى ذلك القيام بتجارب ارتباط أخرى لتحديد موقع الجين BRCA1 بدقة أكثر. وقد تم ذلك بدراسة المنطقة التي تحتوى على BRCA1 والبحث عن وجود كشافات (STS) فيها والتي تفيد في التحديد الدقيق لرسم خريطة هذا الجين. وقد أدى إستخدام هذه الكشافات إلى خفض المسافة التي يقع فيها الجين من ٢٠ مليون قاعدة إلى ٦٠٠ ألف قاعدة فقط وتسمى عملية تحديد مكان الجين بهذه الطريقة الكلونة الموضعية Positional Cloning (الشكل ١٤-١١) ولكي يتم تحديد الجين بدقة

أكثر كان لابد من التعرف على جين BRCA1 من بين ٦٠ جين الموجودة في المنطقة المكونة من ٦٠٠ ألف قاعدة.



الشكل (١٤-١١) : الخريطة الوراثية الفيزيائية لجين سرطان الثدي. تم وضع الجين مبدئياً في قطعة طولها ميجا قاعدة على الكرموسوم رقم ١٧ وأدت تجارب الرسم الإضافي للخريطة إلى تضيق هذه المسافة إلى منطقة طولها ٦٠٠ كيلو قاعدة محاطة بموقعين سبق تعريفها على الخريطة وهما D17S1321 و D17S1325 وتم في النهاية تحديد جين BRCA1 على الكرموسوم ١٧ وذلك بعد دراسة تحليلات تنابعات التعبير

ويمكن استخدام واحدة أو أكثر من التقنيات التالية للوصول إلى

هذا الهدف:

- ١- استخدام cDNA (RT-PCR) المتحصل عليه من إستخلاص mRNA من أنسجة مختلفة وإجراء تجارب Hybridization Probing. فقد تبين مثلاً أن جين BRCA1 يمكن أن يتجهن مع د ن أ من نسيج الثدي و أيضاً مع RNA من المبيض و قد وجد إرتباط بين الإصابة بسرطان المبيض وسرطان الثدي.
 - ٢- تحليلات Southern باستخدام د ن أ مستخلص من أنواع مختلفة Species (وتسمى Zooblots) على اعتبار أن أى جين هام فى الانسان ممكن أن يكون له مثل متطابق معه نسبياً فى الثدييات الأخرى بحيث يمكن التعرف عليه بالكشف بالتجهين Hybridization Probing باستخدام الواسمات المناسبة.
 - ٣- يمكن مقارنة تحليلات التتابعات النيوكليوتيدية فى أفراد سليمه وأفراد مصابة لمعرفة إذا كان الجين فى الافراد المصابة يحتوى على طفرات قد توضح سبب حدوث المرض فيهم.
 - ٤- للتحقق من هوية للجين المحتمل Candidate Gene ، قد يتم إجراء تجارب إسكات تعبير الجين Gene Silencing (أما حذفه) Gene Knockout فى الفئران أو القضاء عليه Gene Knockdown (siRNA) كما سبق، ومتابعة ظهور أعراض مرضية على الفأر مشابهة لما يحدث للمرضى البشرين للحكم على إذا ما كان هذا الجين هو بالفعل الجين المطلوب.
- و قد أدى استخدام هذه التحليلات على المنطقة المحتوية على جين سرطان الثدي إلى تحديد جين بطول ١٠٠ ك قاعدة مكون من ٢٢ إكسون و يشفر لبروتين بطول ١٨٦٣ حامض أميني والذي يعد جين محتمل قوى للجين BRCA1. وقد وجدت نسخ من هذا الجين بالفعل فى أنسجة الثدي والمبيض

ووجدت متشابهات له في الفئران والجردان والارانب والاغنام والخنازير (Zooblots).

وقد تبين وجود عدد من الطفرات (مثل طفرات تحريك الاطار Frame Shift وطفرات عديمة المعنى None Sense) فى العائلات الحساسة للاصابة مما يؤدى إلى إنتاج بروتينات غير فعالة مما يسبب الاصابة بالسرطان. وقد أجمعت هذه النتائج على أن هذا الجين BRCA1 هو المسؤول عن سرطان الثدي.

العلاج بالجينات Gene Therapy:

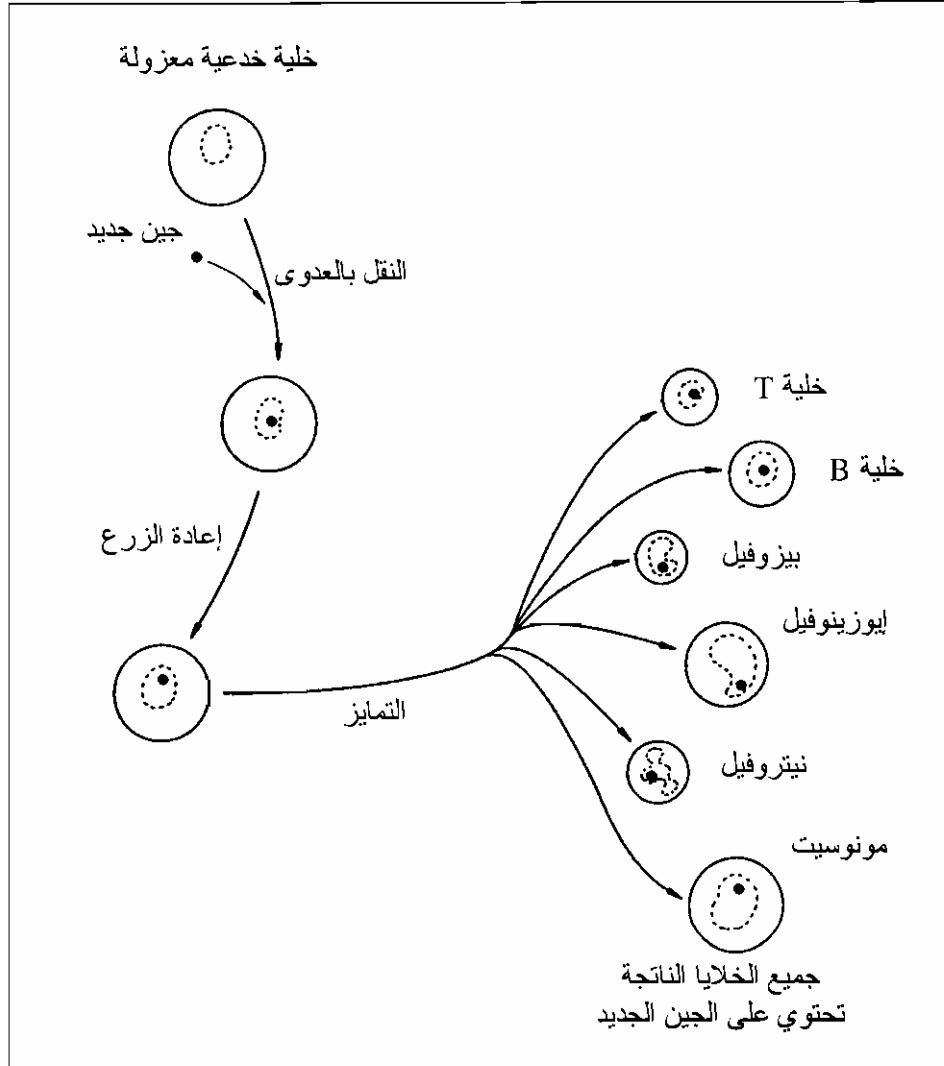
تهدف عملية العلاج بالجينات إلى محاولة التوصل إلى الشفاء من مرض وراثى بإعطاء المريض نسخة سليمة من الجين المعيب. وقد إتسعت طرق العلاج بالجينات لتشمل محاولات لعلاج أى مرض عن طريق إدخال جين مكلون للمريض و توجد طريقتين أساسيتين للعلاج بالجينات:
الأولى : علاج الخلايا الجرثومية (التناسلية) Germline Therapy.
والثانية: علاج الخلايا الجسدية Somatic Cell Therapy.

وفى العلاج الجرثومى Germline يتم إدخال نسخة من الجين السليم فى الخلية البىضية المخصبة بعملية الحقن المجهرى Microinjection ثم إعادة زرعها Reimplanted فى رحم الام. و إذا نجحت العملية فإن الجين سيتم تعبيره فى جميع الخلايا الناتجة عن إنقسام هذه الخلية الاولى والتي يتكون فيها فى النهاية جسم الفرد. ويعيب هذه الطريقة أنها تتطوى على جانب لا اخلاقى Immoral حيث لم تؤخذ موافقة Consent الفرد الناتج بهذه الطريقة على هذا الاجراء كما أنه قد يتسع إستخدام هذه الطريقة ليشمل جينات اخرى غير علاج

الأمراض الوراثية مثل محاولة تجميع جينات سوبرمان فى شخص واحد أو تجميع صفات معينة مثل الذكاء الحاد أو التفوق الرياضى فى عشيرة بشرية معينة مما يعد نوعا من التفرقة العنصرية غير المرغوبة. لذلك فقد تمّ تحريم إستخدام هذه التقنية فى قانون حماية الجينوم البشرى الذى أقرته الامم المتحدة فى أوائل التسعينات من القرن الماضى.

من جهة أخرى ينطوى العلاج بالجينات للخلايا الجسدية على إستخدام الخلايا الجسدية ، حيث يتم أخذ عينة من النسيج الجسدى للفرد ويتم إدخال الجين المرغوب إلى هذه الخلايا معمليا ثم يعاد زرعها فى الجسم. وقد أعطت هذه الطريقة أمالا كبيرة خاصة فى علاج أمراض الدم الوراثية مثل الهيموفيليا والثاليثيميا. إذ يتم إدخال الجين فى الخلايا الجذعية Stem Cells من نخاع العظام والذى يؤدى إنقسامها إلى إنتاج جميع أنواع خلايا الدم المتخصصة.

وتتلخص الطريقة فى تحضير مستخلص من خلايا نخاع العظام يحتوى على عدة بلايين من الخلايا و التى يتم إدخال الجين المكلون فيها بنقل تعبير من نوع ريتروفيروس Retrovirus-Based Vector ثم يعاد زرعها فى نخاع العظام. ويؤدى التكاثر والتمايز Differentiation فى هذه الخلايا إلى اكتساب جميع خلايا الدم الناضجة لهذا الجين المرغوب (الشكل ١٤-١٢) كما تبشر هذه الطريقة فى علاج أمراض الرئة مثل التليف الحويصلى Cystic Fibrosis بإدخال الجين المكلون فى ادينوفيروس Adenovirus أو فى حبيبات الليبوسوم Liposomes بحيث تستخدم "بخاخة" Inhaler لتوصيلها إلى الخلايا الطلائية فى الرئة، إلا أن التعبير الجينى يكون قصير الامد ولا يزيد تأثيره عن أسابيع قليلة.



الشكل (١٤-١٢): يؤدي تمايز الخلايا الجذعية Stem Cells المحولة وراثيًا إلى تعبير الجين الجديد في جميع أنواع خلايا الدم الناضجة

ومن جهة أخرى أمكن إستخدام العلاج بالجينات في عام ١٩٩٠ في علاج فتاة كانت تعاني من مرض نقص المناعة الشديد Severe Combined

(Immunodeficiency Syndrome (SCID وينتج عن الإصابة بهذا المرض أن تتوقف وظائف الجهاز المناعي ويموت المصاب عند تعرضه لأي عدوى ولو بسيطة لانعدام قدرته على المقاومة. وقد تبين أن أحد الطفرات الرئيسية التي تسبب SCID تحدث في الجين المشفر لانزيم أدينوسين دي أمينيز Adenosine Deaminase (ADA). وكانت أول خطوة في العلاج الجيني لهذه الحالة هي فصل خلايا الدم البيضاء من نوع T من المريض والتي تقوم بدور رئيسي في الجهاز المناعي. و تخلط هذا الخلايا مع ريتروفيرس معدل وراثيا ويحمل النسخة الصحيحة من جين ADA. و ينقل الفيروس هذه النسخة الفعالة إلى جينوم الخلايا و تتم تنمية خلايا T المعدلة وراثيا في المعمل للتأكد من أن الجين المنقول يتم تعبيره. ثم يتم حقن المريض بحوالي بليون خلية T المعدلة. و بعدها العلاج يستمر مستوى بروتين ADA الطبيعي في الطفلة في حوالي ٢٥-٣٠% من خلايا T وهي تعيش الآن حياة طبيعية.

العلاج الجيني للسرطان:

تنشأ معظم الأورام السرطانية نتيجة لحدوث طفرات تؤدي إما إلى تنشيط لبعض الجينات المسرطنة الأولية Protooncogenes مما يؤدي إلى تكوين الأورام أو وقف نشاط Inactivation لأحد الجينات المثبطة للسرطان Tumor Suppressor Genes والتي يؤدي نشاطها الطبيعي عادة إلى كبت تكوين الأورام السرطانية. ويمكن اللجوء إلى تقنية إدخال Antisense RNA مضاد المعنى بحيث يكون مكملاً لتتابعات الجين المسرطن فيوقف نشاطه المسرطن (وقد إستحدثت مؤخراً تقنية أكثر فاعلية في وقف نشاط الجين المستهدف وهي تقنية siRNA كما سبق شرحه) وفي حالة حدوث طفرة تؤدي إلى إيقاف نشاط الجين المثبط للسرطان فإن العلاج الجيني في هذه الحالة ينطوي على إدخال نسخة

صحيحة ونشطة من هذا الجين. إلا أن العقبة الرئيسية في هذه الحالات تكمن في صعوبة التوصل إلى الطريقة التي تضمن وصول الجين المكون إلى الخلايا السرطانية والقضاء عليها دون غيرها من الخلايا الطبيعية. ومن الطرق الفعالة لعلاج أنواع كثيرة من السرطان إدخال جين يدمر الخلايا السرطانية إنتقائياً .Selectively

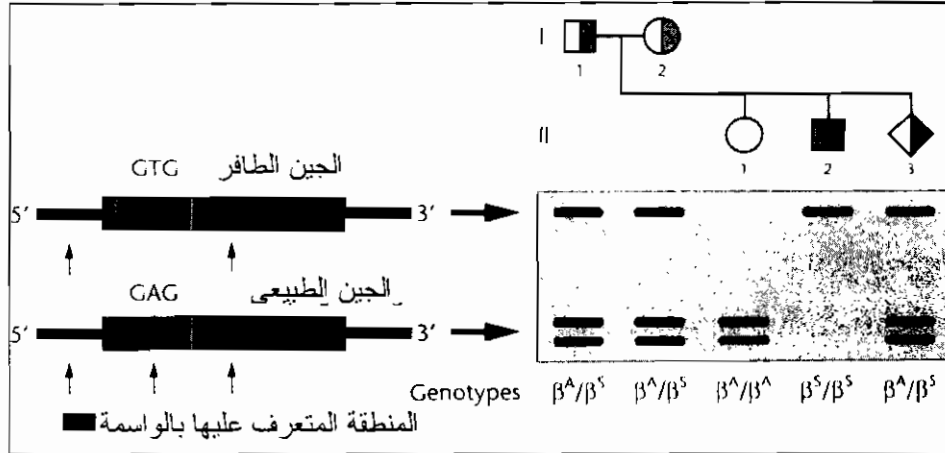
وتوجد كثير من الجينات التي تشفر لبروتينات سامة ولاشك أن إدخال إحداها بنجاح إلى الخلايا السرطانية سيؤدي إلى موتها وشفاء المريض. ولابد من التأكد من أن الجين المكون الذي يشفر لهذا البروتين السام سينتج فقط إلى الخلايا السرطانية بحيث لا يقتل الخلايا السليمة مما يتطلب إستنباط نظم دقيقة لتوصيل هذه الجينات أو التوصل إلى وسيلة للتحقق من أن هذا الجين سيتم تعبيره في الخلايا السرطانية فقط. ويمكن أن يتم ذلك بوضعه تحت تحكم برمونيور متخصص ينشط فقط في هذا النوع من الخلايا Tissue-Specific ومن الطرق المقترحة الأخرى إستخدام العلاج الجيني عن طريق رفع قدرة الجهاز المناعي في قتل الخلايا السرطانية وربما يتم ذلك بكونه جين يسبب بناء انتجينات قوية على سطح الخلايا السرطانية مما يسمح بزيادة فاعلية خلايا الجهاز المناعي في التعرف عليها وقتلها.

تشخيص ومسح العيوب الوراثية:

Diagnosis and Screening Of Genetic Disorders:

يتم تشخيص معظم الأمراض الوراثية قبل الولادة Prenatally. ومن أكثر الطرق إستخداما طريقتي البزل للسائل الأمنيوتي Amniocentesis أو أخذ عينة قسرة Villus Sampling (CVS). في الطريقة الأولى يتم سحب السائل

الأمينوتى بسرنية ويتم تحليل الخلايا للكشف عن حدوث خلل كروموسومى أو طفرة الجين الواحد. وفى طريقة (CVS) يتم إدخال أنبوب الأسطره أو البذل فى الرحم و تؤخذ عينة صغيرة من نسيج مشيمه الجنين. و تجرى إختبارات سيتوراثية Cytogenetic وبيوكيماوية و د ن أ المعاد صياغته على عينة النسيج. وقد أثبتت تحليلات د ن أ المعاد صياغته حساسية كبيرة ودرجة عالية من الدقة فى إكتشاف العيوب الوراثية. وقد أمكن تشخيص مرض الأنيميا المنجلية قبل الولادة بهذه الطرق، ومعروف أن هذا المرض ينتج عن طفرة متحثة تؤدى إلى إستبدال حامض أمينى واحد فى بروتين β -Globin نتيجة طفرة إستبدال لقاعدة واحدة والتى تؤدى إلى غياب موقع القطع الانزيمى القطع المحدد Mst II و Cvn1 مما يؤدى إلى تغير فى طراز RFLP لشطايا القطع المحددة. وتستخدم الإختلافات فى طراز RFLP لتشخيص مرض الانيميا المنجلية قبل الولادة ولتحديد الطرز الوراثية للأباء والأفراد الآخرين فى العائلة اللذين قد يكونوا بتركيب وراثى خليط (حاملين للطفرة Carriers) لهذه الحالة (الشكل ١٤-١٣).



الشكل (١٣-١٤): تشخيص مرض الأنيميا المنجلية بطريقة Southern تمثل الأسهم القصيرة مواقع القطع المحددة في جين الجلوبيين الطافر (β^S). أدت طفرة في نيوكليوتيدة واحدة إلى غياب موقع القطع لأحد الإنزيمات ، مما يؤدي إلى إنتاج شظية واحدة طويلة في الجيل. ينتج الجين الطبيعي (β^A) شظيتين قصيرتين مع إنزيم MstII. وفي شجرة النسب يوجد بالعائلة ابنة واحدة غير مصابة أصيلة ($\beta^A\beta^A$) (11-1) وابن مصاب (11-2) وبنين غير مصاب (11-3) يمكن قراءة الطرز الوراثية من الجيل مباشرة كما هو مبين أسفل الشكل

إستخدام البصمة الوراثية في الأمور الشرعية (القضائية):

Forensic Applications of DNA Fingerprints

أصبح إستخدام البصمة الوراثية من الأمور الهامة التي يلجأ إليها القضاء لاتخاذها كدليل لبراءة أو إدانة المتهمون أمام المحاكم كما أنها تستخدم في مجالات أخرى كثيرة مثل قضايا الهجرة والنزاع على الأبوة وغيرها. وتستخدم في هذه الطريقة تقنية التهجين بالواسمات من نوع Microsatellites نظرا لدقتها. ويبين الشكل (١٤-١٤) بصمة د ن أ لقضية تم اخذ عينات دم من فردين أحدهما المتهم وعمل مطابقة بين طرز بصمات د ن أ مع تلك الناتجة من بقع دم وجدت في مكان الجريمة.



الشكل (١٤-١٤): البصمة الوراثية الجزيئية DNA Fingerprinting في قضية شرعية (قضائية). تتطابق بصمة د ن أ للمتهم (المشتبه به) رقم (٢) (S2) مع تلك الناتجة من عينة الدم المأخوذة من موقع الجريمة (E)

إستخدام تكنولوجيا الجين في الزراعة:

Gene Cloning and DNA Analysis in Agriculture

إستخدم تكنولوجيا الجين فى النبات:

لاشك أن الطرق التقليدية لتربية النبات على مدى القرنين الماضيين قد أدت إلى إستنباط أصناف نباتية عالية المحصول وتتميز بصفات جودة عالية ومقاومة للأمراض والحشرات. إلا أن معظم برامج التربية التقليدية تعتمد بشكل كبير على عنصر الصدفة فى الحصول على إتحادات جديدة فى النسل أو الهجن الناتجة من التلقيح بين الأباء. كما أن إستنباط صنف جديد يستغرق عادة وقتاً طويلاً قد يصل إلى أكثر من عشر سنوات. وفضلاً عن ذلك فإن مربى النبات عادة ما يشكو من وجود تلازم عكسى بين صفات جودة المحصول فى نبات ما وبين كمية هذا المحصول.

ولذلك تقدم تكنولوجيا الجين إسلوبا متطورا فى تربية النبات حيث يمكن من خلالها إحداث تغيرات موجهة و محددة فى الطرز الوراثية للنبات بدلا من الإعتماد على الصدفة. كما أنها تتميز بإختصار كبير فى الوقت والمجهود يصل إلى نصف الوقت الذى تتطلبه طرق التربية التقليدية.

وتستخدم إستراتيجيتين رئيسيتين لتكنولوجيا الجين فى النبات:

- ١- إضافة الجين Gene Addition حيث تستخدم كلونة الجين لتغيير بعض الصفات النباتية بإدخال جين أو جينات جديدة مسؤله عن تحسين هذه الصفات.
- ٢- طرح (حذف) الجين Gene Subtraction: ويؤدى إستخدام تكنولوجيا الجين فيها إلى إيقاف نشاط جين أو أكثر داخل النبات.

أولا: إضافة الجين:

إنتاج نباتات مقاومة للحشرات:

أدت المخاوف الناجمة عن التوسع فى إستخدام المبيدات الكيماوية إلى إتجاه العلماء إلى تبنى إستراتيجية إستنباط أصناف من نباتات المحاصيل الحقلية كالذرة والقمح وغيرها ذات مقاومة ذاتية للحشرات بإدخال جين يشفر لبسروتين سام بحيث تؤدى تغذية الحشرة عليه إلى هلاكها دون أن يؤثر ذلك على النبات نفسه. ومن أهم الجينات التى إستخدمت فى هذا المجال جين δ Endotoxin الموجود فى جينوم بكتيريا *Bacillus thuringiensis* والذى يطلق عليه Bt جين.

وقد وجد أن البروتين الذى يشفر له هذا الجين تصل درجة سميته إلى ٨٠ ألف ضعف سمية المبيدات الكيماوية كما أنه يتميز بأنه إنتقائى Selective بمعنى

وجود سلالات بكتيرية مختلفة يتخصص كل منها في بروتينات فعالة ضد يرقات مجموعات معينة من الحشرات (الجدول ١٤-٢).

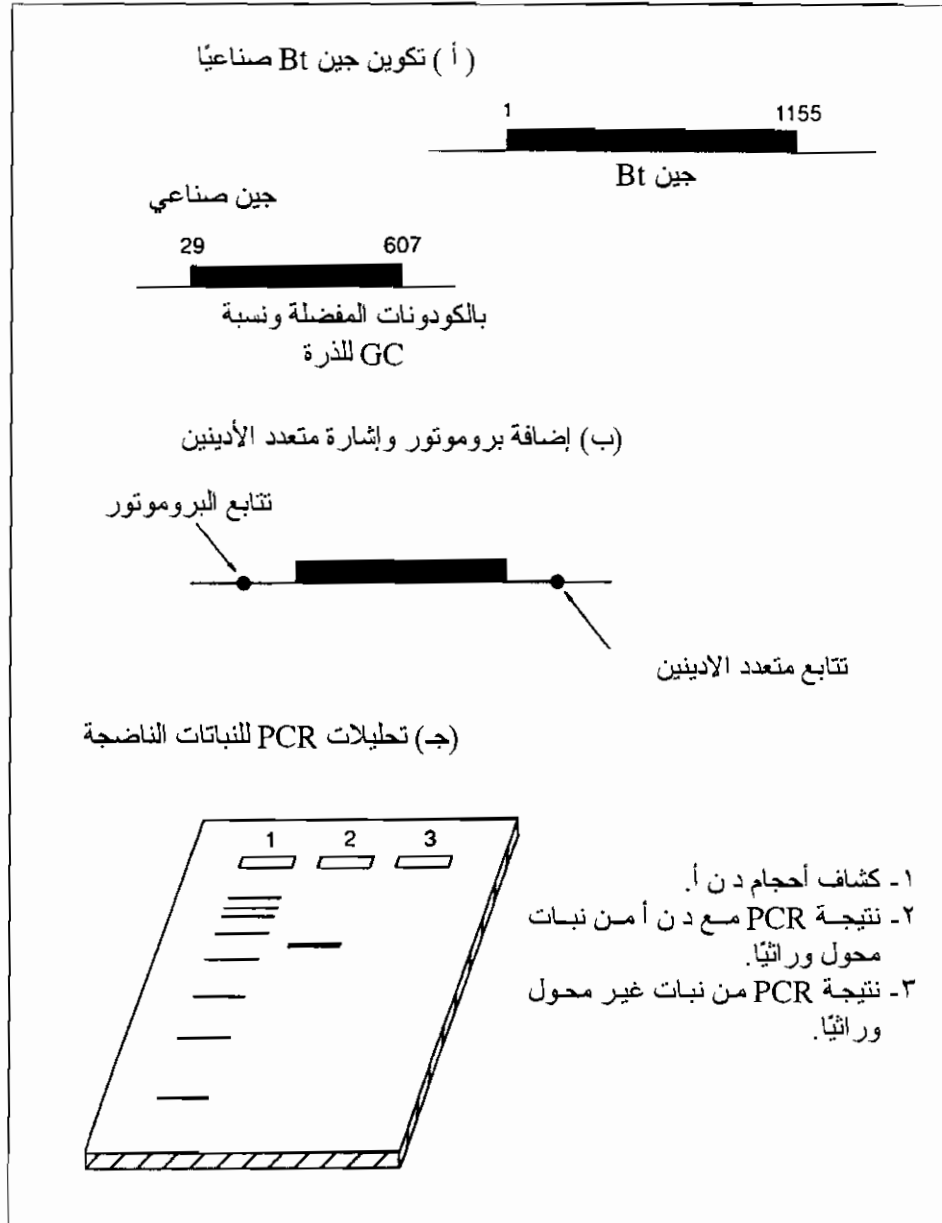
الجدول (١٤ - ٢) التخصص النوعي للبروتينات المنتجة من سلالات بكتيريا Bt في مقاومة لبعض أنواع الحشرات المختلفة:

السلالة	الحشرات المتأثرة
Cry I	يرقات حرشفية الأجنحة Lepidoptera
Cry II	يرقات حرشفية وثنائية الأجنحة Lepidoptera and Diptera
Cry III	يرقات حرشفية الأجنحة Lepidoptera
Cry VI	ثنائية الأجنحة Diptera
Cry V	دودة النيماتودا Nematode
Cry VI	دودة النيماتودا Nematode

وقد أجريت محاولات ناجحة لإنتاج سموم Bt بكميات إقتصادية لإستخدامها عن طريق الرش كمبيدات حيوية Bioinsecticides في محاولة لإستخدامها كمبيدات صديقة للبيئة (المثال المبيد AGRIN) إلا أنه نظرا لأنها تتحلل بسرعة Biodegradable مما يعنى ضرورة تكرار رشها على فترات متقاربة مما يزيد في تكلفه المكافحة. لذلك إتجهت الدراسات إلى إستخدام تكنولوجيا الجين وهندسة البروتينات لتعديل تركيب البروتين السام لجعله أكثر ثباتا كما إهتمت الدراسات بنقل الجين إلى النبات بحيث يقوم النبات نفسه ببناء هذا البروتين السام. إستخدمت تقنية تكنولوجيا الجين في نبات الذرة الشامية لمقاومة حشرة ثاقبات الذرة الأوروبية European Corn Borer وقد إستخدمت السلالة Cry 1A(b) المنتجة للبروتين السام والتي تحتوى على ١١٥٥ حامض

امينى والتي تقع منطقة النشاطسمى فيها فى القطعة الواقعة بين الأحماض
الأمينية رقم ٢٩ الى ٧٠٦.

وقد تم تعديل تركيب الجين ليكون أكثر فاعلية حيث تم بناء سلسلة من
النيوكليوتيدات صناعيا تشمل الكودونات من ٢٩ إلى ٦٠٧ حيث تبين أنها كافية
لإعطاء التعبير الكامل للسمية. كما روعى إستبدال الكودونات الموجودة فى
الجين الأسمى بتلك المفضل إستخدامها فى نبات الذرة (Codon Bias) وتمت
زيادة نسبة GC إلى ٦٥ % بدلا من 38 % وأختير المستبدئ Prmoter القوى
CaMV لقيادة التعبير الجينى. ويتم إدخال الجين المكلون فى أجنة نبات الذرة
بقاذفة الجينات Microprojectile. وتمت تنمية هذه الأجنة إلى النبات الكامل
وأجرى التحقق من حدوث التحول الوراثى بنجاح بتحليلات PCR (الشكل
١٤-١٥) وتأكد نجاح إنتاج البروتين السام بتحليلات النقل الغربى western
blotting كما نجحت تجارب إختبار التأكد من أن نبات الذرة المحول وراثيا
يستطيع بالفعل مقاومة ثاقبات الذرة: وقد أمكن إنتاج نباتات محاصيل أخرى
محولة وراثيا بإدخال هذا الجين لمقاومة الحشرات ذاتيا ومنها القطن والأرز
والبطاطس والطماطم وغيرها. كما لم يقتصر الأمر على إستخدام جين Bt لهذا
الغرض بل إستخدمت بروتينات سامة أخرى من مصادر نباتية مثل مثبطات
إنزيم البروتينيز Proteinase Inhibitors.



الشكل (١٤-١٥): الخطوات الرئيسية في الطريقة المستخدمة للحصول على نباتات ذرة شامية مهندسة وراثيًا يحدث فيها تعبير جين صناعي للبروتين السام (Bt).٥

وقد اتسعت دائرة استخدام تكنولوجيا الجين لإكساب نباتات المحاصيل المختلفة صفات جديدة لتحسين الجودة أو المحصول كما في الجدول (١٤-٣).

الجدول (١٥-٢) بعض الأمثلة لإستخدام كلونة الجينات لإضافة جينات فى النبات

الجين	المصدر	الصفات الجديدة
إندوتوكسين δ	<i>B.thuringiensis</i>	المقاومة للحشرات
مثبطات البروتينيز	نبات cowpea	المقاومة للحشرات
كيتينيز	الأرز	مقاومة الفطريات
جلوكانينيز	البرسيم الحجازى	مقاومة الفطريات
البروتين المثبط للريبوسوم	الشعير	مقاومة الفطريات
أورنوثين كريبومثيل ترانسفيريز	<i>Pseudomonas Syringae</i>	مقاومة البكتيريا
إنزيم بلمره رن أ و هيليكيز	فيروس إنقاف ورقه البطاطس	مقاومة الفيروس
رن أ التابع Satellite RNA	فيروسات متنوعة	مقاومة الفيروس
بروتين غطاء الفيروس	فيروسات متنوعة	مقاومة الفيروس
5'-2 Oligoadenylate Synthetase	الفأر	مقاومة الفيروس
Acetolactate Synthase	نبات الدخان (التبغ)	مقاومة الحشائش
Phosphinothricin Acetyl transferase	أنواع بكتيريا ستربتومييسيس	مقاومة الحشائش
DNA adenine methylase	Streptomysis	العقم الذكري فى النبات
البروتين الغنى فى حامض الميثونين	الفول البرازيلى Brazil nuts	زيادة محتوى الكبريت
Aminocyclopropane Carboxylic Acid Deaminase	أنواع مختلفة	تعديل نضج الثمار
Taumatococcus danelli		زيادة الحلاوة

تعديل محتوى النبات من الزيوت و الدهون	<i>Umbellularia californica</i>	Acyl Carrier Protein Thioesterase
تعديل محتوى النبات من الزيوت و الدهون	فول الصويا	Delta-12desaturase
تحمل الإجهاد البيئي	الشعير	HVA-1
الجفاف في القمح	الخميرة	Cpy /SacB
تحمل الجفاف	بكتيريا	MtLD
تحمل الجفاف والملوحة (في الطماطم و القمح)	الخميرة	HAL-1
زيادة محتوى حامض الليسين في فول الصويا	بكتيريا	d a p A

ثانيًا: الطرح الجيني *Gene Subtraction*:

إن المقصود هنا ليس حذف الجين أو إزالته ولكن إيقاف نشاطه في خلايا النبات الحي. ويعد استخدام تقنية م ر ن أ مضاد المعنى Antisense Technology من أكثر التقنيات نجاحا والتي أدت إلى إنتاج نباتات محولة وراثيا تستخدم حاليا على نطاق تجارى.

إستخدام م ر ن أ مضاد المعنى لتنظيم التعبير الجيني:

Antisense RNA and Regulation of Gene Expression:

تعتمد هذه الطريقة على بناء جزيئات م ر ن أ متكاملة في التتابع مع م ر ن أ المرسل mRNA الناتج من نسخ جين معين . ويطلق على هذا الأخير اسم م ر ن أ ذو المعنى Sense RNA نظرا لأنه يحمل الكودونات التي تتم قراءتها أثناء عملية الترجمة لإنتاج بروتين فعال يحتوى على تتابع نوعى من الأحماض الأمينية . ومن جهة أخرى يطلق على النسخة المكملة م ر ن أ (مضاد

المعنى) Anti Sense نظراً لأن تتابع النيوكليوتيدات بها يكون معكوس بالنسبة للتتابع الموجود على النسخة الأصلية مما يترتب عليه عدم إمكان قراءة كودونات شفرة صحيحة وذات معنى بل تقرأ على أنها كودونات انتهاء الترجمة في أى اطار قراءة من الاطارات الثلاثة لها.

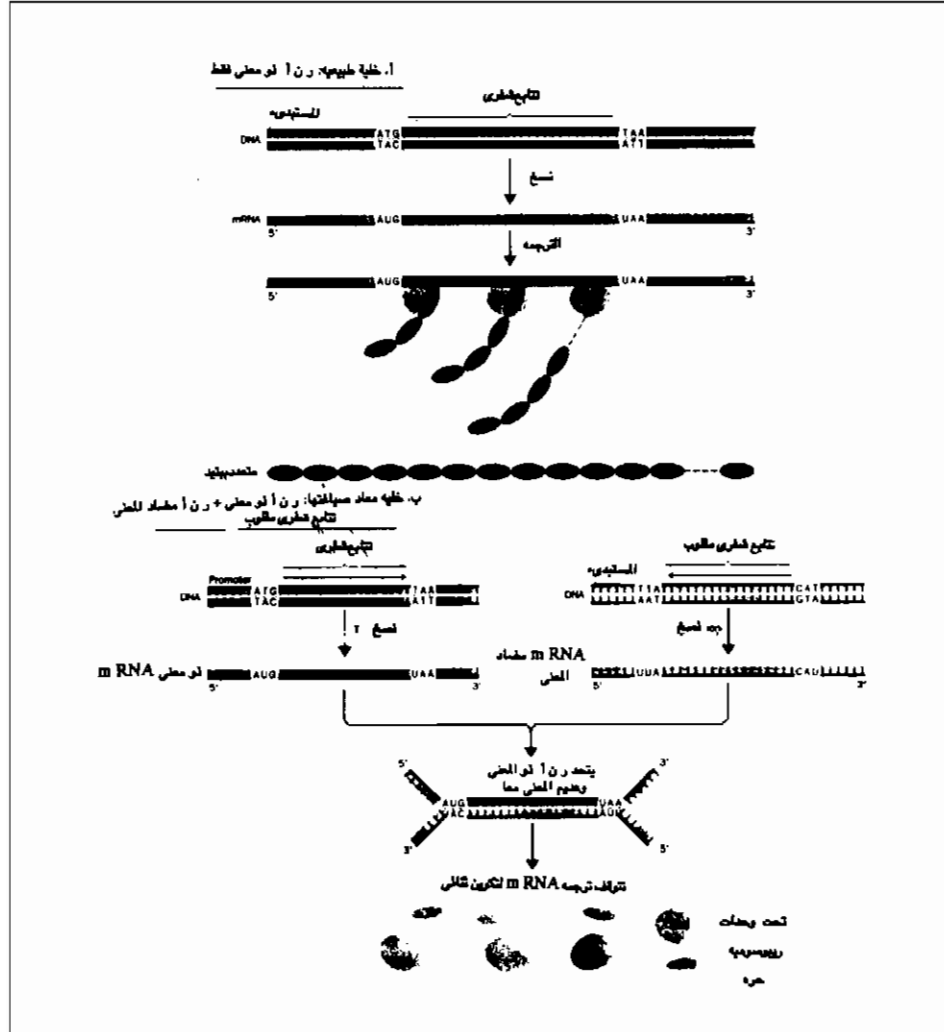
يؤدي وجود ر ن أ مضاد المعنى مع ر ن أ المراسل الطبيعي لنفس الجين في سيتوسول الخلية إلى حدوث تجاذب نوعي بينهما بحيث ينتج جزئ مزدوج هجين من "م ر ن أ". وبديهي أنه لا يمكن ترجمة مثل هذا الجزئ المزدوج مما يعنى عدم الحصول على الناتج النهائي لتعبير هذا الجين (البروتين) وبالتالي يكون بمقدورنا تحديد وظيفة هذا الجين.

وتتلخص طريقة إنتاج ر ن أ مضاد المعنى لجين ما في الخلية في الآتي:

- ١- كلونة الجين المطلوب دراسته.
- ٢- فصل التتابع الشفرة للجين عن منطقة البروموتور الخاص به باستخدام انزيمات القطع المحددة المناسبة.
- ٣- إعادة اتحاد التتابع الشفرة للجين مع نفس البروموتور ولكن في إتجاه معكوس التتابع.
- ٤- إعادة إدخال هذا التتابع المعكوس المتحد بالبروموتور ؛ أى الجين المضاد المعنى ، إلى الخلية المضيفة بإحدى طرق التحول الوراثي.

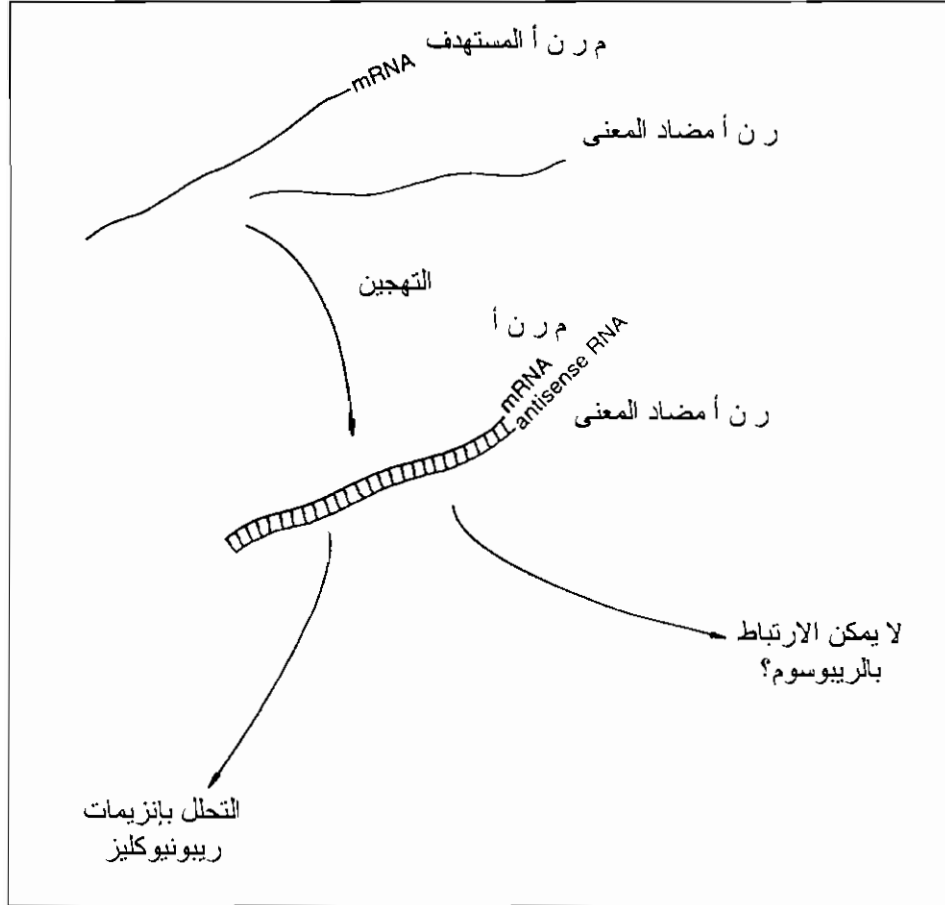
ويبين الشكل (١٤-١٦) خطوات هذه العملية ونتائجها وتكون المحصلة النهائية لهذه العملية هي أن الجين المعكوس التتابع سيتم نسخة إلى نسخ من ر ن أ مضاد المعنى و هذه بدورها عند اصطدامها بالنسخ الطبيعي ل ر ن أ

المراسل لنفس الجين (ذوالمعنى) تتزاوج معها مكونة جزئ ر ن أ مزدوج
لا يمكن ترجمته مما يؤدي إلى توقف إنتاج البروتين الذي يشفر له هذا الجين.



الشكل (١٤-١٦): رسم تخطيطي لإستخدام تقنية ر ن أ مضاد المعنى لإيقاف التعبير الجيني:
(إلى أعلى): خلية طبيعية يتم بها إنتاج سلسلة متعدد الببتيد بعملية النسخ والترجمة. (إلى أسفل):
خلية محتوية على جين مضاد المعنى مع الجين الطبيعي مما يؤدي إلى تكوين جزئ مزدوج من ر ن أ
لا يمكن ترجمته وبذلك لا ينتج بروتين لهذا الجين

ويتلخص تفسير ميكانيكية ر ن أ مضاد المعنى فى وقف أو منع ترجمة mRNA إما إلى أن ر ن أ مزدوج السلسلة الناتج يحدث له تحلل سريع Rapid Degradation بواسطة إنزيمات ريبونوكليز أو أن ر ن أ مضاد المعنى asRNA يمنع الريبوسومات من الارتباط مع م ر ن أ الفعال (الطبيعى) كما فى (الشكل ١٤-١٧).



الشكل (١٤-١٧): الميكانيكيات المقترحة لتثبيط تعبير الجين بواسطة ر ن أ مضاد المعنى Antisense RNA

وقد تم استخدام ر ن أ مضاد المعنى فى إيقاف تعبير عدد كبير من الجينات فى كل من غير مميزة النواة ومميزة النواة. وبالإضافة إلى استخدامه فى إيقاف تعبير الجينات معروفة الوظيفة فإنه يمكن استخدامه أيضا فى التعرف على وظيفة الجينات المجهولة الوظيفة.

إذ يمكن استخدام ر ن أ مضاد المعنى فى إنتاج طفرات وظيفية بحيث يعطى الشكل المظهرى الطافر للكائن الذى حدثت به هذه العملية معلومات هامة عن وظيفة الجين فى الخلية المتأثرة. ولكى نضمن الحصول على إيقاف تام للتعبير الجينى فإنه إما أن يستخدم بروموتور قوى جدا لدفع عملية نسخ التابع الشفرى المعكوس أو أن يتم إدخال عدد كبير من نسخ ر ن أ مضاد المعنى إلى الخلية المضيفة. وقد تم مؤخرا تطوير هذه التقنية بحيث أقتصر طول شظية asRNA على عدد محدود من التابع النيوكليدي المكمل لمنطقة محفوظة فى ر ن أ الطبيعى لا تزيد عن ٢٥-٣٠ نيوكلييدة إلا أنها تؤدي إلى نفس النتيجة.

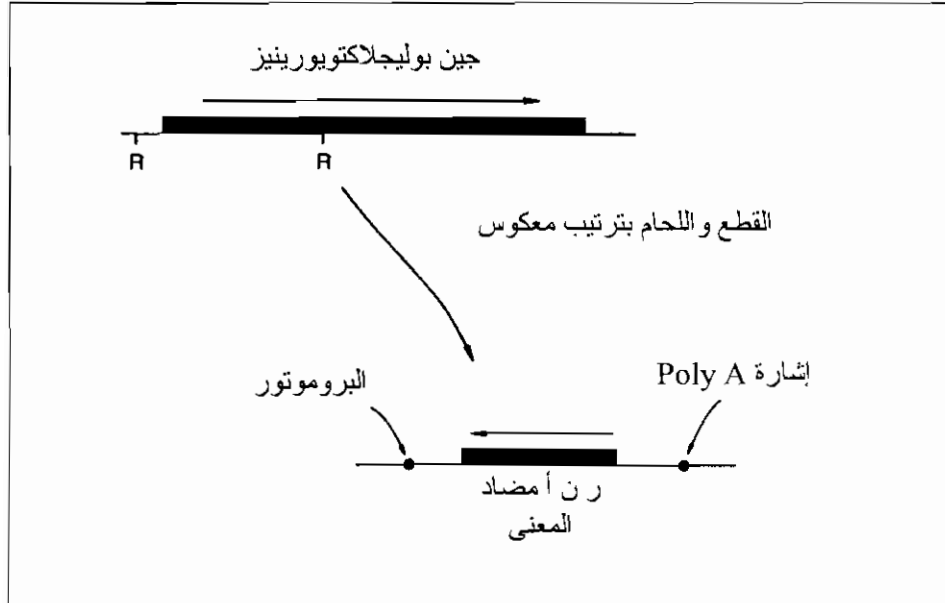
استخدام asRNA لإنتاج ثمار طماطم طويلة العمر:

asRNA and The Engineering of Fruit Ripening in Tomato:

من المعروف أن ثمار الطماطم بعد النضج تكون قصيرة العمر وقابلة للتلف والعطب بعد ايام قليلة من قطفها وقد تبين أن أحد أسباب ذلك يرجع إلى نشاط إنزيم Polygalacturonase الذى يقوم بتحليل حامض Polygalactouronic من جدر خلايا الثمرة مما يؤدي إلى خفض صلابتها بالتدريج وينتهى الأمر بتلف أو عطب ثمار الطماطم وعدم صلاحيتها للاستخدام الأدمى.

ومن هنا نشأت فكرة وقف تعبير الجين المسئول عن هذا الإنزيم بتقنية asRNA مما يؤدي إلى إطالة عمر الثمار قبل فسادها.

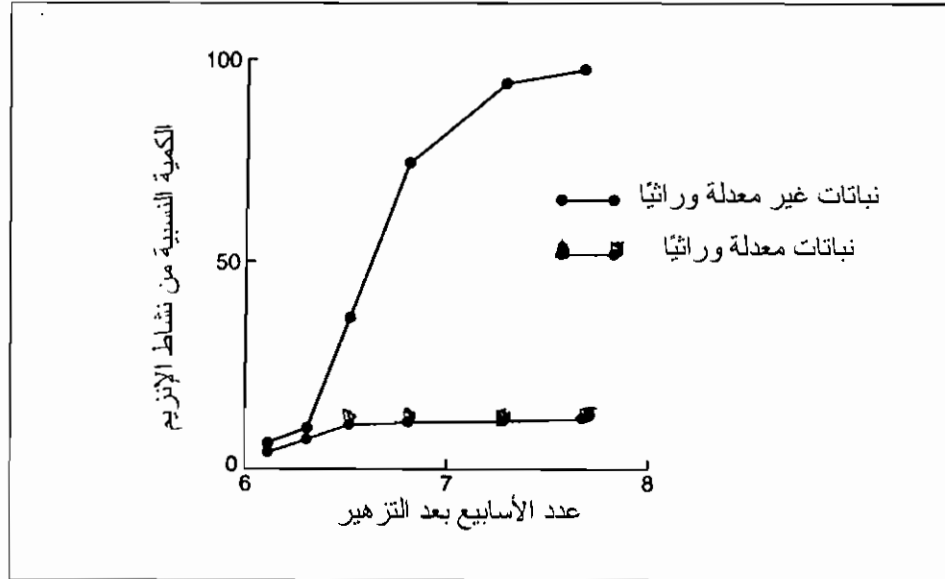
ويبين الشكل (١٤-١٨) تكوين جين Antisense Polygalactourinase حيث تم الحصول على شظية قطع محددة بطول ٧٣٠ قاعدة من النهاية 5' للجين الطبيعي للجلاكتويورينيز والذي يمثل حوالى نصف التتابع الشفرى الكامل.



الشكل (١٤-١٨): تكوين ر ن أ مضاد المعنى للجين المشفر لإنزيم بوليجلاكتويورينيز Polygalactourinase فى الطماطم (R = موقع قطع محدد)

وتم عكس إتجاه هذه الشظية ووضعها مع برموتور CaMV عند بداية تتابع الشظية كما تم إضافة ذيل Poly A فى النهاية 3' لهذه الشظية و تمت عملية التحول الوراثى بواسطة ناقل الكلونة pBIN19T١. وقد تم بالفعل بطرق الوراثة الجزيئية التحقق من دخول الجين وإنتاج نسخ asRNA. تم تقدير مستوى إنزيم Polygalactourinase فى ثمار النبات المحولة ومقارنته بتلك الموجودة فى ثمار النباتات غير المحولة (الطبيعية) حيث تبين أن مستوى بناء الإنزيم كان منخفضا

جدا في النباتات المحولة وراثيا (الشكل ١٤-١٩) والأهم من ذلك أن ثمار الطماطم المحولة وراثيا أمكن تخزينها لمدد طويلة قبل فسادها مما يدل على أن asRNA لم يوقف تماما تعبير جين Polyglacturinase إلا أنه أحدث خفض مؤثر في التعبير الجيني مما أدى إلى تأخير فساد الثمار لفترة أطول.



الشكل (١٩-١٩): إختلاف نشاط إنزيم بوليغلاكتوريناز بين ثمار الطماطم العادية وتلك التي يتم فيها تعبير م ر ن أ مضاد المعنى لنفس الجين

وكان أول صنف تجارى يتم تسويقه تجاريا بهذه التقنية هو الصنف

Flavor Savor.

ويبين الجدول (١٤-٤) بعض الأمثلة لإستخدام asRNA في تعديل بعض

الصفات في النبات.

الجدول (١٤-٤) بعض الأمثلة لإستخدام asRNA فى النبات

الصفة المعدلة	الجين المستهدف
تأخير فساد الثمار فى الطماطم	polygalacturinase
تعديل نضج الثمار فى الطماطم	Aminocyclopropane carboxylic acid synthase
منع تشوه اللون discoloration فى الثمار والخضروات	Polyphenol oxidase
خفض محتوى النشا فى الخضروات	Starch synthase
زيادة نسبة حامض الأوليبيك فى فول الصويا	Delta-12 desaturase
تعديل ألوان الأزهار فى نباتات الزينة	Chalcone synthase

الأمان الحيوى والكائنات المعدلة وراثيا Biosafety and GMO:

لاشك أن الكائنات المعدلة وراثيا سواء كانت نبات أو حيوان أو كائنات دقيقة قد ساهمت بشكل كبير فى تقديم كثير من الحلول غير التقليدية لمشاكل كثيرة سواء بالنسبة للامن الغذائى أو إنتاج مستحضرات دوائية أكثر فاعلية أو الحصول على لقاحات رخيصة وآمنة لعدد من الأمراض المعدية أو فى مقاومة الآفات الزراعية وغيرها. إلا أن البعض يرى أن إستخدام مثل هذه الكائنات المعدلة وراثيا ينطوى على بعض المخاطر. فمثلا فى حالة الطماطم المعدلة وراثيا Flavar Savor يستخدم ناقل تعبير محتوى على نسخة من المضاد الحيوى كاناميسين Kan^R كجين كشف Marker Gene لمتابعة نجاح عملية التحول الوراثى Transformation وهذا المضاد الحيوى ذو مصدر بكتيرى ويشفر لإنزيم نيومايسين فوسفوترانسفيرير Neomycin Phosphotransferase ويوجد هذا الجين والإنزيم الناتج فى جميع خلايا النبات المعدل وراثيا. وقد برزت المخاوف من أن هذا الإنزيم قد يكون ضارا للإنسان وعلى الرغم من أن هذه

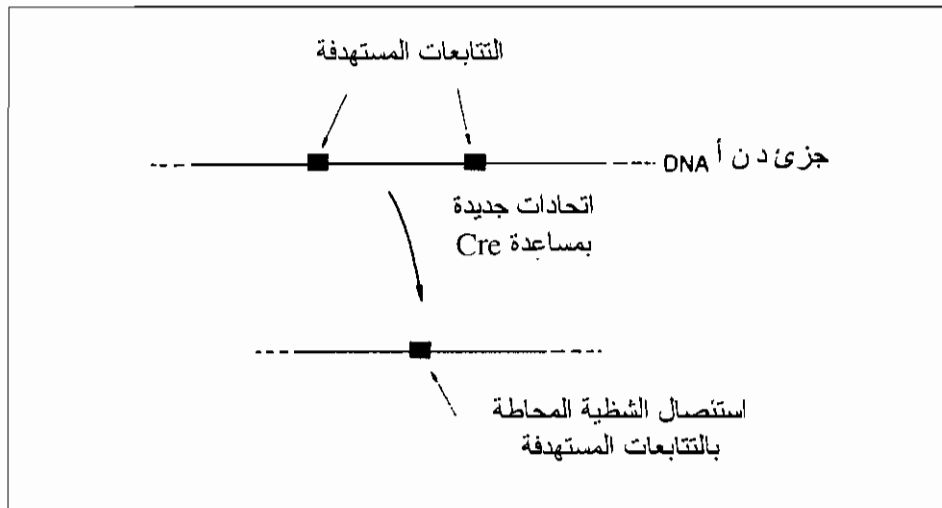
المخاوف لم يعد لها ما يبررها بعد أن ثبت عدم صحتها بتجارب عديدة على نماذج حيوانية إلا أنه مازالت هناك قضيتين متعلقتين بالأمان الحيوى بالنسبة للأغذية المعدلة وراثيا وهما:

١- هل من الممكن لجين KanR الموجود فى هذه الأغذية أن ينتقل إلى البكتيريا الموجودة فى الجهاز الهضمى للإنسان ويحولها إلى بكتيريا مقاومة للكاناميسين وغيره من المضادات الحيوية؟

٢- هل يمكن لجين KanR أن ينتقل إلى كائنات أخرى فى البيئة مما يؤدي إلى الإخلال بالنظام البيئى Ecosystem؟

وحتى الآن مازال النقاش محتدما بين مؤيد ومعارض ، إلا أنه لو أخذنا فى الاعتبار أن عمليات الهضم ستؤدي إلى تحطيم و هدم كامل لجميع جينات Kan^R فى الغذاء المعدل وراثيا قبل أن تصل إلى الفلورا البكتيرية فى القناة الهضمية وأنه حتى لو لم يحدث هدم للجين فإن فرصة إنتقاله لبكتيريا ضئيلة جدا. إلا أن مستوى الخطورة لا يمكن أن يصل إلى الصفر بمعنى أنه لا يوجد معدل لإنعدام الخطوره تماما There is no zero risk factor وبالمثل وعلى الرغم من أن نتائج التجارب أفترضت أن زراعة النباتات المعدلة وراثيا سيكون لها تأثير ضئيل جدا على البيئة نظرا لأن جينات Kan^R شائعة بالفعل فى النظم البيئية الطبيعية إلا أن إمكان حدوث بعض الإختلالات المستقبلية غير المنظورة لايمكن إنكارها. وقد أدت هذه المخاوف من إستخدام Kan^R وغيره من المضادات الحيوية إلى استتباط طرق للتخلص من هذه الجينات من أ ن النبات بعد التحقق من نجاح عملية التحول الوراثى.

ويستخدم فى إحدى التقنيات إنزيم مصدره بكتريوفاج p1 ويسمى Cre والذى يؤدي نشاطه إلى إستئصال شظية د ن أ المحاطه من طرفيها بتتابع تابع التعرف Recognition Sequence مكون من 34 قاعدة (الشكل ١٤-٢٠) وفى هذه الحالة يتم إدخال نوعين من ناقلات التعبير إلى خلايا النبات بحيث يكون الأول محتويا على الجين المرغوب و معه الجين الكشاف Kan^R محاطا بتتابع التعرف Cre بينما يحتوى الناقل Vector الثانى على جين Cre. وبعد التحول الوراثى، سيؤدي تعبير جين Cre إلى إستئصال جين Kan^R من د ن أ النبات المحول.



الشكل (٢٠-١٤): إستئصال د ن أ بواسطة إنزيم Cre ريكومبيناز Recombinase

المخاطر المحتملة على البيئة:

هناك أيضا مخاوف من تأثير إستخدام GMO على البيئة وقد برزت هذه المخاوف بصفة خاصة عند إنتاج نباتات معدلة وراثيا ومقاومة للفيروس إذ أنه فى مثل هذه الحالة تستخدم الجينات المشفرة للغطاء البروتينى للفيروس

المرض. ولا يؤدي تعبير هذه الجينات إلى ظهور أعراض مرضية ولكنه يعطى النبات بعض الحماية من الإصابة بالفيروس الحى.

وهناك مخاوف من أن النبات الذى يبنى بروتين غطاء فيروسى ممرض ربما يهاجم نوع اخر من الفيروس والذى قد يؤدي تكاثره إلى إنتاج نسل هجينى يحتوى على جنينوم الفيروس المعدى معبأ فى الغطاء البروتينى الذى يبنيه النبات. وقد يكون النسل الهجينى محتويا على صفات خطيرة وغير متوقعة. فمثلا من الممكن لبروتين الغطاء الجديد أن يوسع مدى العوائل Host Range للفيروس الثانى مما يمكنه من إصابة نباتات جديدة كانت مقاومة أصلا للمرض الناتج.

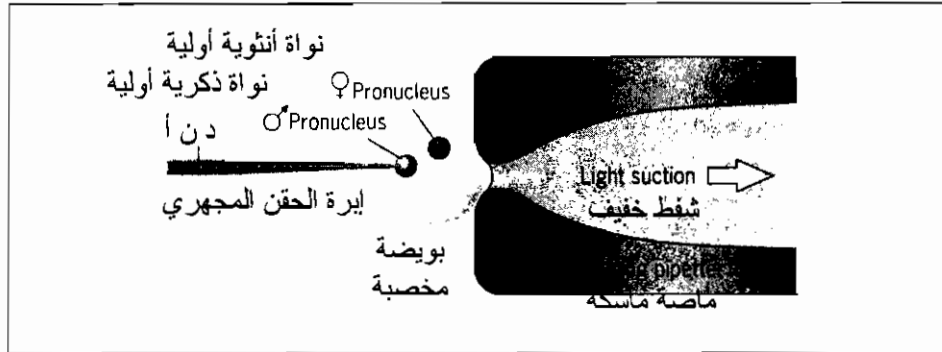
كما أن هناك مخاوف حول ما إذا كان الجين المكلون فى النبات المحول يمكنه الهروب "Escape" والانتقال إلى نباتات برية وإذا حدث ذلك فما هى حجم المخاطر المحتملة على النظام البيئى من جراء ذلك.

وهناك الكثير من البحوث التى تجرى حاليا لإعطاء إجابات كافية لمثل هذه الأسئلة وغيرها سواء بالنسبة لحماية البيئة تحت إشراف وكالة حماية البيئة Environmental Protection Agency (EPA) أو بالنسبة للأغذية المعدلة وراثيا تحت إشراف هيئة الغذاء و الدواء Food and Drug Administration (FDA).

الحيوانات المعدلة وراثيا Transgenic Animals:

تستخدم تقنية الحقن المجهري Microinjection كطريقة أساسية فى نقل الجينات المرغوبة إلى نواة الخلية البىضية الاولى للزيجوت (الشكل ١٤-٢١). وقد أجريت تجارب كثيرة على التحول الوراثى فى الفأر بإعتباره حيوان معملى

متميز حيث يستخدم كأداة لدراسة التعبير الجيني في الثدييات و لإختبار مختلف ناقلات الكلونة و التعبير والطرق المحتملة لإستخدامها في الإنسان.



الشكل (٢١-١٤): إنتاج حيوانات محولة وراثيا بالحقن المجهرى لجزئ د ن أ في بويضات مخصبة

وقد تمت دراسة المئات من الجينات البشرية والتي تم نقلها إلى الفأر حيث تبين في معظم الحالات أن الجينات المنقولة Transgenes أظهرت طرز طبيعية للتوريط مما يدل على أنه قد تم إيلاجها في جينوم العائل.

ومن التجارب الرائدة في هذا الشأن دراسة تأثير كلونة جين هرمون النمو البشرى على زيادة نمو الفأر المحول وراثيا (الشكل ٢٢-١٤) وقد شجعت هذه النتائج مربى الحيوان على محاولة إدخال هرمون النمو إلى حيوانات المزرعة بغرض زيادة إنتاج اللحم فيها.



الشكل (١٤-٢٢): أر محول وراثيا (إلى اليسار) يحمل الجين الكيميرى لهرمون النمو البشرى حيث يبلغ حجمه ضعف حجم فأر المقارنة غيرالمحول وراثيا (إلى اليمين)

وقد تم إنتاج خنازير معدلة وراثيا بجين هرمون النمو على أمل أن زيادة مستوى هرمون النمو قد يؤدي إلى تحسين صفات اللحم وزيادة معدل النمو. كما تمت نفس المحاولات في الأسماك والدواجن لنفس الغرض. وقد أظهرت نتائج الخنازير المعدلة وراثيا أنه لم تطرأ زيادة في معدل النمو عند التغذية على العليقة القياسية ، إلا أنها إرتفعت عند التغذية على عليقة غنية في البروتين. إلا أن الخنازير الناتجة تميزت بتحسين صفات اللحم ، نظرا لأن هرمون النمو يفضل بناء البروتينات بدلا من الدهون. ومن جهة أخرى ظهرت آثار جانبية غير مرغوبة في هذه الحيوانات نتيجة لزيادة هرمون النمو إذ كانت الإناث

عقيمة كما أن الخنازير المعدلة من الجنسين تميزت بضعف العضلات وعدم القدرة على الحركة لثقل وزنها و تعرضها للأمراض.

وعلى الرغم من أن العلماء ما زالوا يحاولون التغلب على المشاكل الناجمة عن زيادة هرمون النمو في الحيوانات المزرعية إلا أنه لم يثبت حتى الآن أن مثل هذه الطريقة قد تكون غير فعالة في زيادة إنتاج اللحم. وتجري حاليا اختبارات على حيوانات معدلة وراثيا لمقاومة الأمراض الفيروسية ومن هذه الأمراض مرض الدواجن (ALV) Avian Leukosis Virus والذي يسبب خسائر كبيرة في مزارع الدواجن.

وكما سبق القول فقد استخدمت الحيوانات المعدلة وراثيا كالأغنام والأبقار لإنتاج بعض البروتينات المرغوبة وإفرازها في اللبن.

تكنولوجيا الجين والأخلاقيات Gene Technology and Ethics:

أدى التقدم الهائل الذي نتج عن استخدام تكنولوجيا الجين سواء في مجال المسح الوراثي والاستشارة الوراثية أو الاختبارات الخاصة بالكشف عن العيوب الوراثية وكذلك إمكان استخدام تكنولوجيا الجين في العلاج بالجينات إلى ظهور بعض القضايا الهامة المتعلقة بالأخلاقيات Ethics ووضع خطوط فاصلة بين ما هو جائز أخلاقيا وما هو مرفوض تماما.

الاختبارات الوراثية والأخلاقيات Genetic Testing and Ethics:

تشتمل الاختبارات الوراثية على نوعين من الاختبارات: التشخيص ما قبل الولادة Prenatal Diagnosis والمسح Screening للأفراد الحاملة الخلية لطفرة متحجرة Genetic Carriers. كما يمكن للاختبارات الوراثية التنبؤ باحتمال ظهور

مرض وراثي Risk of Disease وبالتالي تحديد الأفراد التي تبدو طبيعية حالياً ولكن الإحتمال عالى فى أن يصاب بمرض وراثي فى المستقبل. ونظراً للتقدم التكنولوجي المستمر خاصة فى مجال تقنية DNA Microarray فإنه يمكن إختبار ٥٠-١٠٠ مرض فى وقت واحد والتي تشمل أمراضاً كثيرة التي قد لا تعرف إلا بعد مرور سنوات كثيرة. وسوف يؤثر هذا التقدم بدرجة كبيرة على صحتنا وطرز التكاثُر والرعاية الطبية. ومن جهة أخرى فإن استخدام هذه التقنيات ستؤدي إلى ظهور قضايا قانونية وإجتماعية وأخلاقية من الصعب حلها.

فمثلاً ما الذي يجب أن يعرفه الفرد قبل أن يقرر الموافقة على إجراء إختبار أو فحص وراثي؟ وكيف يمكننا حماية سرية المعلومات الناتجة عن هذه الإختبارات؟ وكيف يمكننا تعريف و منع التفرقة الوراثية Genetic Discrimination؟

وبالنسبة للتفرقة الوراثية، فهل يحق إتخاذ نتائج الإختبار الوراثة ضد الأفراد التي تبين أن إحتمال الخطورة المستقبلية لظهور مرض ما فيها مرتفع سواء فى مجال الوظائف أو التأمين على الحياة؟

ومن المعروف أن الأنيميا المنجلية فى الأفراد الحاملة الخليطة تؤدي إلى مقاومة الملاريا فى هؤلاء الأفراد وقد يكون ذلك صحيحاً فى بعض الأمراض الوراثية الأخرى.

فكيف نحمل مثل هذه المزايا للطفرات فى الوقت الذي نحاول فيه التخلص من الجوانب المدمرة لها؟

لذلك يجب أن تتم مدوالات و مناقشات واسعة يشارك فيها الجمهور العادى مع العلماء المتخصصين للوصول إلى صيغة أخلاقية مقبولة من الجميع.

وقد إنبثقت لجنة من لجان مشروع الجينوم البشرى مهمة بهذا الشأن وتسمى لجنة (ELSI) Ethical, Legal and Social Implications مهمتها تحديد القضايا المتعلقة بالإختبارات الوراثية.

وتختص هذه اللجنة بإصدار التوصيات لتقديمها إلى صانعى القرار ورجال القانون حفاظا على مزايا الإختبارات الوراثية مع التقليل أو إستبعاد المخاطر المحتملة وفضلا عن ذلك فقد تشكلت مجموعات أخرى مكونة من العلماء والمتخصصين فى مجال الرعاية الصحية والقانونيين والمهتمين بأخلاقيات المهنة والمستهلكين لمناقشة هذه القضايا وتكوين رأى عام حولها.

القضايا الأخلاقية و العلاج بالجينات:

Ethical Issues in Gene Therapy:

لاشك أن العلاج بالجينات ينطوى على قضايا أخلاقية كثيرة ويعد مصدرا لمناقشات حامية ولذلك فإن العلاج بالجينات قد أقتصر حاليا على إستخدام الخلايا الجسدية Somatic Cells كهدف للنقل الجينى. وتوجد ضوابط أخلاقية صارمة لإستخدام العلاج الجينى بحيث يسبق العلاج سلسلة من التجارب والمراجعات على مستويات متعددة ويتم إخبار المريض وتوعيته مسبقا بما يمكن أن ينتج عن العلاج سواء سلبا أو إيجابا.

وقد وضعت ضوابط جديدة لضمان حماية أكثر للمريض. ويتم التنسيق مع الوكالات الحكومية المنظمة لتجارب العلاج بالجينات. ويطلق على نقل الجينات إلى الخلايا الجسدية اسم علاج الخلايا الجسدية بالجينات Somatic Gene Therapy. وفي هذا النوع من العلاج تكون النتائج المترتبة عليه قاصرة على الشخص المعالج فقط وبموافقة صريحة منه بعد إبلاغه بأبعاد هذا العلاج وتوعيته بكافة الاحتمالات الناتجة عن هذا العلاج.

وهناك نوعين آخرين من العلاج بالجينات لم تتم الموافقة عليهما نظراً لأنها تنطوي على قضايا أخلاقية هامة.

ويسمى النوع الأول علاج الخلايا الجرثومية (التناسلية) Germ-Line Therapy حيث تكون الخلايا التناسلية (الحيوانات المنوية أو البويضات) هدفاً للنقل الجيني وفي هذه الحالة فإن DNA المصحح للخطأ الوراثي سيصل إلى جميع خلايا الفرد (النسل) الناتج من الجاميطات المعدلة وراثياً بما في ذلك الخلايا الجرثومية. ومعنى ذلك أن أفراد آخرين في الأجيال القادمة يمكن أن تتأثر بهذا العلاج بدون سابق موافقتهم فهل يعد هذا عملاً أخلاقياً؟ هل نملك الحق لإتخاذ هذا القرار للأجيال المقبلة؟ ولذلك فقد تم تحريم مثل هذه البحوث.

ويطلق على النوع الثاني العلاج الجيني التحفيزي (التحسيني) Enhancement Gene Therapy وهو ينطوي على مشاكل وقضايا أخلاقية أخطر من سابقه. وفي هذا النوع يمكن رفع إمكانات الفرد بالنسبة لصفات معينة مرغوبة ويعارض هذا الإتجاه قطاعات كبيرة من المجتمع. فمثلاً لو أن هذه الجينات أمكن تحديدها وكلونتها فهل يمكن إستخدامها لزيادة طول الفرد أو زيادة القدرات الرياضية أو زيادة القدرات العقلية (الذكاء)؟ لذلك فقد تم وقف أي

بحوث في هذا الشأن إلى أن يتم مناقشة القضايا الأخلاقية المرتبطة بنتائجها المحتملة.

التأثير السلبي لتكنولوجيا الجين على الدول النامية:

إن التأثير المحتمل لتطبيقات تكنولوجيا الجين على الدول النامية محل جدل واسع النطاق.

وتوجد ثلاث مخاوف رئيسية محتملة من هذا التطبيقات:

١- قلة التمويل للمشاريع البحثية عالية التكلفة والخاصة بتكنولوجيا الجين بالنسبة للمناطق الإستوائية الهامة في الدول النامية والتي ليس لها قيمة تسويقية تذكر في الدول المتقدمة. ويعتبر محصول نبات الكافا أحد هذه الأمثلة حيث يعتبر ثالث أهم محصول يزرع في المناطق الإستوائية ، ويعد الغذاء الرئيسي لأكثر من ٥٠٠ مليون نسمة وخاصة في المناطق الريفية الفقيرة في إفريقيا الإستوائية ، إلا أنه يعد من المحاصيل "اليتيمة" نظرا لأن نصيب المشاريع البحثية التي تجرى عليه من التمويل الدولي ضئيلة جدا.

٢- هناك مخاوف من أن بعض المنتجات التي تنتج في الدول النامية ستخضع لمشاريع تطبيقات تكنولوجيا الجين في الدول المتقدمة بحيث تستطيع الدول المتقدمة إنتاجها مما يؤدي إلى حرمان الدول النامية ذات الإقتصاد الضعيف من مصدر أساسي للدخل الناتج عن تصدير هذه المنتجات ومثال ذلك إنتاج حامض اللوريك Lauric Acid في نبات الكانولا المعدل وراثيا والذي يزرع في أمريكا الشمالية. بينما كان هذا الحامض يستورد أساسا

من دول جنوب شرق اسيا حيث يستخرج من بذور النخيل وزيت جوز الهند.

٣- مشكلة حقوق الملكية الفكرية Intellectual Property Rights وتمثل خطورة كبيرة على الدول النامية خاصة وأن الشركات العملاقة المنتجة للتقاوى المعدلة وراثيا تقوم بتسجيل كثير من هذه المحاصيل مما يؤدي إلى ما يشبه الإحتكار فى تسويق هذه المحاصيل لحساب هذه الشركات ، مما يؤثر سلبيا على المزارع فى الدول النامية نتيجة إرتفاع أسعار مثل هذه التقاوى بحيث تزيد تكلفة المنتجات الزراعية.

الفصل الخامس عشر

مقدمة فى المعلوماتية الحيوية Bioinformatics

يمكن تعريف المعلوماتية الحيوية بأنها الفرع الحسابى Computational للبيولوجيا الجزيئية. وقبل عصر المعلوماتية الحيوية كانت هناك طريقتين فقط لإجراء التجارب البيولوجية إما داخل الكائن الحى (والتي سميت *In Vivo* أى فى الحى) أو فى بيئة صناعية (التي سميت *In Vitro* أى فى الأنبوب) وقياسا على ذلك فإنه يمكننا القول بأن المعلوماتية الحيوية هى فى الحقيقة *In Silico BIOLOGY* أى البيولوجيا فى السليكون كناية عن أن مكونات الحاسب الآلى ناتجة من رقائق السليكون.

على مدى الحقتين الأخيرتين، حدثت تطورات هائلة فى كفاءة أجهزة الكمبيوتر سواء الكمبيوتر الشخصى أو الكمبيوتر العملاق Super Computer نتيجة إستتباط برامج متقدمة ساعدت الباحثين فى مجال البيولوجيا على الحصول على تفسيرات وإجابات عن أسئلة لم يكن بمقدورهم التوصل إليها ناهيك عن السرعة الفائقة فى تحليل النتائج وإستتباط التفسيرات الصحيحة لها.

وفى تعريف آخر للمعلوماتية الحيوية بأنها تطبيق تقنية المعلوماتية لإدارة Management وتنظيم البيانات البيولوجية ، وتعد من المجالات العلمية الحديثة ذات التطور السريع.

قواعد البيانات Data Bases:

فى السنوات العشرين الماضية أصبح شائعاً تخزين البيانات البيولوجية فى قواعد البيانات العامة Public Databases مما أدى إلى نمو هائل فى كمية المعلومات المخزونة فى هذه القواعد كما زادت أعداد هذه القواعد نفسها لكى تسع الكم الهائل من هذه البيانات التى تتدفق بمعدلات كبيرة جداً كل يوم تقريباً إن لم يكن كل ساعة على مدار الساعة. ونتيجة لذلك فقد أصبح لزاماً على الباحثين أينما كانوا لكى يسترجعوا ما يهمهم من قواعد البيانات هذه الإستعانة بالكمبيوتر وشبكة المعلومات الدولية (www) world wide web.

وفى ضوء ذلك يمكن إضافة تعريف آخر للمعلوماتية الحيوية بأنها التقنية التى تختص بإستخدام الكمبيوتر فى جمع وتنظيم وتحليل وإستخدام وعرض البيانات البيولوجية والمشاركة فى الإستفادة من هذه البيانات مع المجتمع العلمى وذلك من خلال شبكات المعلومات والكمبيوتر الشخصى لكل باحث حيث يمكن فتح نافذه لإنهائية على العالم بمجرد الضغط بأطراف الأصابع على Keyboard وهو جالس أمام الكمبيوتر الشخصى المتصل بتلك الشبكات.

وتعد قواعد البيانات بمثابة القلب للمعلوماتية الحيوية، وتوجد أنواع كثيرة ومختلفة من هذه القواعد حسب طبيعة المعلومات المخزونة (مثل تتابعات القواعد، والتراكيب وشرائح الجيل.....الخ) أو حسب طريقة التخزين

(دوسيهات Flat-Files أو جداول... الخ) وتزداد أعداد قواعد البيانات بطريقة سريعة جدا ، ففي خلال عام ٢٠٠٠ تم إستحداث ٥٥ قاعدة معلومات جديدة بحيث أصبح العدد الكلى للقواعد فى نهاية السنة ٢٨١ قاعدة وهذه القواعد متاحة للجميع.

وتعد قاعدة بيانات Gene Bank فى الولايات المتحدة الأمريكية من المصادر الأساسية لتتابعات د ن أ والبروتينات ، كذلك توجد قاعدة بيانات يابانية (DDBj) Data Bank of Japan ، كما يشرف معمل البيولوجيا الجزيئية الأوروبية على قاعدة بيانات مختصة بتتابعات النيوكليوتيدات (EMBL). ويمكن تخزين أى تتابعات جديدة فى أى من هذه القواعد الثلاثة حيث توجد بينها مشاركة أوتوماتيكية يومية فى هذه البيانات. وإذا كان الغرض من البحث عن جين فى تتابعات د ن أ مميزة النواة فإنه من الأفضل استخدام dbEST وهى قاعدة بيانات مكونة من EST's.

تحليل التتابعات:

بعد تحديد تتابعات قطعة طويلة من د ن أ، فإن أول مهمة هى التعرف على الجينات التى قد توجد فى هذه القطعة وفى حالة غير مميزة النواة تكون الكثافة الجينية Gene Density عادة مرتفعة نظرا لأن معظم الجينات المشفرة لبروتينات لا توجد بها انترونات مما يسهل كثيرا فى عملية تحليل التتابعات ومعرفة الجينات الموجودة فى قطعة د ن أ تحت الدراسة. ولكن الأمر يختلف إذا كانت تتابعات د ن أ خاصة بميزة النواة الراقية حيث نجد أنه من الصعب التعرف على الجين نظرا لأنه قد يكون مكونا من عدد من الإكسونات يتخللها عدد مماثل أو يزيد من الإنترونات. فمثلا فى الجينوم البشرى يكون متوسط

طول الإكسون ١٥٠ زوج من القواعد ومتوسط طول الإنترون عدة كيلو قاعدة وقد يصل طول الجين إلى مئات من كيلو قاعدة.

كما أن م ر ن أ لبعض الجينات قد يحدث له تعديلات بطرق متعددة مما يؤدي إلى تكوين متراكبات مختلفة من نفس الجزيء بحيث يتم بناء سلاسل ببتيدية مختلفة من جين واحد.

وهناك مشكلة إضافية للعثور على الجين وهي نسبة الإشارة Signal إلى الضوضاء Noise أو التشويش، ففي جينوم البكتيريا تشكل الجينات نسبة ٨٠-٨٥ % من د ن أ الكلى ، وفي الخميرة تنخفض هذه النسبة إلى ٧٠% وفي حشرة الدروسفلا ودودة الديدان تكون النسبة ٢٥% في حين تصل هذه النسبة إلى أدنى مستوى لها في الجينوم البشري لتكون ٣ إلى ٥% فقط من د ن أ الكلى.

لذلك نجد أن تحديد موقع بداية ونهاية جين ما وطرز التراكب Splicing في إكسونات من بين جميع التتابعات غير الشفرية يكون في منتهى الصعوبة وبمجرد التعرف على الجين يتم تحويل التتابعات النيوكليوتيدية إلى تتابعات من الأحماض الأمينية المقابلة. ويكون السؤال الآن هو ما هي الوظيفة المحتملة لهذا البروتين؟

وبإجراء مسح لجميع المعلومات المتاحة في قواعد المعلومات المختلفة فقد يكون من الممكن تحديد بروتينات أخرى بتتابعات مشابهة مما قد يساعد في تحديد وظيفته ، ويمكن أيضا استخدام مقارنات التتابعات لتعريف بعض العناصر Motifs في البروتين مثل عناصر الارتباط بجزيء ATP أو بجزيء د ن أ وقد يفيد ذلك في إعطاء معلومات عن وظيفة الجين.

تحديد إطارات القراءة المفتوحة (ORF):

بعد الحصول على التتابعات النيوكليوتيدية لشظية طويلة نسبياً من د ن أ فإن أول مهمة هي تحديد إطار القراءة الصحيح وحيث أن هناك ثلاث إطارات قراءة محتملة على كل سلسلة من جزئ د ن أ فإن ذلك يتطلب إجراء ترجمة لستة إطارات Six Translation Frames وينتج عن ذلك ست تتابعات بروتين محتملة (الشكل ١٥-١) ويفترض في إطار القراءة الصحيحة أن يكون الأطول وأن يكون مستمر وغير متقطع نتيجة لوجود أى من كودونات الإنهاء (TGA, TAA, TAG) وكلما زاد طول ORF كلما زاد احتمال أن تمثل جين لأن ORF الطويلة لا تحدث عادة بالصدفة. إن تحديد نهاية مثل هذه ORF يكون أسهل من تحديد بدايتها. إن النهاية الأمينية N_Terminal للبروتين تكون عادة مكونة من حامض الميثوثيونين لذلك فإن وجود كودون ATG يمكن أن يدل على النهاية 5' للجين إلا أن الميثيونين ليس هو الحامض الأول دائماً فى تتابع البروتين ويمكن أن يتواجد فى أماكن أخرى فى السلسلة ويتطلب ذلك استخدام تقنيات أخرى لتحديد بداية ORF مثل تفضيل استخدام كودونات معينة Codon Bias لكل كائن (الجدول ١٥-١) ووجود تتابع CpG (CpG Islands). إلا أنه يجب الحرس عند مسح تتابعات النيوكليوتيدات لتحديد ORF لأن حدوث أى خطأ قد يعطى سلسلة من الأخطاء فى التتابع النهائى خاصة إذا أدى هذا الخطأ إلى إضافة أو حذف غير صحيح لكودون إنهاء ، كما أن الخطأ قد يحدث نتيجة إضافة أو حذف قاعدة واحدة غير صحيحة مما يجعل التحديد الصحيح للـ ORF أكثر صعوبة.

Query Sequence:

	10	20	30	40	50
0	TCCATIGAGC	CTTATACCAG	TAACATCTAC	ACTCGAAGAT	CTTGTCAGGG
50	GAATTCAGAG	TTGTGAATCC	TCACTTACTG	AAAGATCTTA	CTGAGCGGGG
100	CTTGTGGAAT	GAAGAGATGA	AAAATCAGAT	TATTGCATGC	AATGGCTCCA
150	TTCAGTTTTC	CTTTTTCAGA	GCATACCAGA	AATTCCTGAT	GACCTGAAGC
200	AACTCTATAA	GACCGTGTGG	GAAATCTCTC	AGAAGACTGT	TCTCAAGATG

Six-Frame Amino Acid Translation:

Forward 0

	10	20	30	40	50
0	SIEPYTSNIY	TRRSCQGNFR	L!ILTYIKIL	LSGACGMKR!	KIRLLHAMAP
50	FSFPFSEHTR	NS!!PEATL!	DRVGNLSEDC	SQD	

Forward 1

	10	20	30	40	50
0	PLSLIPVTST	LEDLVRGISD	CESSLTERSY	!AGLVE!RDE	KSDYCMQWLH
50	SVFLFQSIPE	IPDDLKQLYK	TVWEISQKTV	LKM	

Forward 2

	10	20	30	40	50
0	H!ALYQ!HLH	SKILSGEFQI	VNPHLLKDLT	ERGLWNEEMK	NQIIACNGSI
50	QFSFFRAYQK	FLMT!SNSIR	PCGKSLRRLF	SR	

Reverse 0

	10	20	30	40	50
0	HLENSLLRDF	PHGLIELLQV	IRNFWYALKK	EN!MEPLHAI	I!FFISSPHK
50	PRSVRSFSK!	GFTI!NSPDK	IFECRCYWYK	AQW	

Reverse 1

	10	20	30	40	50
0	ILRTVF!EIS	HTVL!SCFRS	SGISGML!KR	KTEWSHCHM!	SDFSSLHSTS
50	PAQ!DLSVSE	DSQSEIPLTR	SSSVDTVIGIR	LNG	

Reverse 2

	10	20	30	40	50
0	S!EQSSERFP	TRSYRVASGH	QEFLVCSEKG	KLNGAIACNN	LIFHLFIPQA
50	PLSKIFQ!VR	IHNLFKFP!QD	LRV!MLLV!G	SM	

الشكل (١٥-١): يوجد لكل جين ستة إطارات مفتوحة للقراءة ORF

إستخدام التناظر لتعريف الجينات:

Using Homology to Find Genes:

يمكن تسهيل عملية تحديد هوية الجينات الموجودة في تتابعات طويلة إذا
 بحثنا عن تتابعات مماثلة (متناظرة) معروف نواتج نسخها (مثل cDNA أو EST

أو حتى لجين في نوع آخر) وقد أدى النمو السريع في بيانات EST إلى تغيير جذري في معدل تحديد الجينات إذ يمكن مسح Screen التتابعات الجينية بسرعة لوجود مواقع EST لتعريف الجينات المحتملة. وتشقق كلونات EST من تتابعات النهاية 3' غير المترجمة UTR 3' والتي يتم الحصول عليها باستخدام بادئ من متعدد T إذا كان مرن أحتويا على ذيل متعدد الأدينين Poly A. وتتميز تتابعات UTR 3' بخاصيتين حيث يندر وجود أنترونات بها كما أنها تحتوي عادة على تتابعات محفوظة أقل مما في المناطق الشفرية وتؤدي الخاصية الأولى إلى الحصول على نواتج PCR قصيرة بحيث يمكن إكثارها في حين تؤدي الظاهرة الثانية إلى سهولة التمييز بين أفراد العائلات الجينية المتشابهة جدا في مناطقها الشفرية. إلا أن تتابعات EST كثيرا ما تمتد في اتجاه النهاية 5' لتصل إلى التتابعات الشفرية وبذلك تتداخل Overlap مع إكسونات محتملة إلا أنه لا يمكن توقع أن تقوم بتحديد و تعريف جميع الإكسونات الشفرية لهذا الجين. ويجب التنويه إلى أنه لا يمكن افتراض أن جميع EST's تعتبر دلائل موثوق بها لجين أو لجزئ مرن أ ناضج ففي بعض الحالات قد تكون مشتقة من تتابعات أنترونات غير معدلة Unprocessed بادئة من مسار Poly A جينومي أو من جينات كاذبة معدلة. ويعد برنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) من أكثر البرامج استخداما لإجراء مسح لمدى التشابه بين التتابع النيوكليدي محل الدراسة Query Sequence مع تلك الموجودة في قواعد بيانات التتابعات. ويبحث البرنامج BLASTN عن درجة التشابه مع قواعد تتابعات النيوكليدات في حين يقوم برنامج BLASTX بترجمة التتابع النيوكليدي محل الدراسة (Query) في الإطارات الستة المحتملة والبحث عن

درجة التشابه مع قواعد بيانات البروتين، ويستخدم برنامج BLASTp الخاص بتتبع البروتين للبحث عن درجة التشابه مع قواعد بيانات البروتينات.

الجدول (١٥-١) النسب المئوية لاستخدام الكودونات الستة للحامض الأميني سيرين في الكائنات المختلفة (تحيز الكودون Codon bias)

الكودون	بكتريا القولون	الدروسفلا	الإنسان	الذرة	الخميرة
AGT	٣	١	١٠	٣	٥
AGC	٢٠	٢٣	٣٤	٣٠	٤
TCG	٤	١٧	٩	٢٢	١
TCA	٢	٢	٥	٤	٦
TCT	٣٤	٩	١٣	٤	٥٢
TCC	٣٧	٤٨	٢٨	٣٧	٣٣

وقبل البدء في البحث عن التشابه فإنه من المهم التخلص من التتابعات المتكررة Repetitive ومن أى تتابعات خاصة بناقل الكلونة التى قد تكون موجودة ضمن الشظية وذلك بإستخدام برامج متخصصة مثل Vec Screen و Repeat Masker التى تقوم بهذه المهمة بالإضافة إلى التعرف على الجين ويستخدم برامج BLASTP, BLASTN كثيرا فى دراسة الجينوميا المقارنة Comparative Genomics.

ومن أهم خواص مطابقة التتابعات قياس ما إذا كانت نتائج المقارنة تمثل دليلا فعليا للتناظر أى ما هو احتمال أن يكون التطابق الناتج يمكن توقعه بمحض الصدفة؟

أسس البحث عن التشابه Principles of Similarity Searching:

لا يعطى تتابع د ن أ أو البروتين في حد ذاته معلومات كافية لتحديد هوية جين ما ولكن لابد من تحليل تلك التتابعات بطرق مقارنة مقابل التتابعات المتاحة في قواعد البيانات حتى يمكن إستنباط فرضيات تتعلق بدرجات التشابه (القاربة) والوظيفة الممكنة. ويتم ذلك بإستخدام أحد البرامج المشار إليها لمقارنة التتابع محل الدراسة (Query) مع جميع التتابعات الأخرى في قواعد البيانات ويتم هذه المقارنات في أزواج Pairwise وتأخذ كل مقارنة درجة Score تعكس درجة التشابه بين التتابع محل الدراسة (Query) والتتابعات التي يجري مقارنتها به وكلما زادت الدرجة كلما دل ذلك على زيادة درجة التشابه.

ويمكن أن تتم دراسة التشابه Alignment إما بطريقة شاملة Global أو محلية Local. وتتضمن الطريقة الشاملة تحديد درجة التشابه على مستوى تتابعات جزئ د ن أ بأكمله مع ما يقابله من تتابعات في قواعد البيانات. أما الطريقة المحلية فتعني بتجزئة التتابعات إلى مناطق صغيرة ودراسة أقصى درجات التشابه لكل منطقة محلية. ويتم التمييز بين التطابقات الحقيقية وتلك الناتجة عن الصدفة بإستخدام تقديرات إحصائية لتحديد إذا كان التطابق راجع للصدفة. وتستخدم معظم برامج مقارنة التتابعات مثل BLAST الطريقة المحلية لتحديد تطابق التتابعات وتبدأ العملية بتقطيع (كسر) التتابع محل الدراسة Query (المجهول) وكذلك تتابعات قواعد البيانات إلى شظايا (كلمات) والبدء في البحث عن الكلمات المتطابقة Word Matches.

ويكون البحث المبدئي لكلمة بطول W والتي تعطى درجة لا تقل عن T عند مقارنتها بالتتابع محل الدراسة (Query) بإستخدام متركس معين من التقييم.

ويستمر تحديد التطابق بين الكلمات ممثداً في أى من الإتجاهين فى محاولة لتكوين درجة تطابق لا تقل عن خمسة درجات كحد أدنى. وتحدد قيم T سرعة وحساسية البحث ويتم التعبير عن كل زوج من التطابقات بدرجة Score ويتم ترتيب الدرجات المختلفة فى رتب Ranks. ويستخدم ماتركس الدرجات لحساب درجة التطابق بين كل قاعدة وقاعدة أو بين كل حامض أميني وحامض أميني ويستخدم ماتركس الوحدة فى حالة د ن أ بحيث تعطى قيمة (+1) إذا كان متطابقاً و القيمة صفر إذا لم يكن هناك تطابق. أما فى حالة مقارنة تتابعات الأحماض الأمينية فيستخدم ماتركس الإستبدال والمبنى على حساب قدرة الأحماض الأمينية النسبية على الطفر $Relative\ Mutability$.

ويتم تقييم كل حامض أميني مستبدل بدرجة تتناسب مع مدى إمكانية أن يكون قريباً فى الوظيفة للحامض الأميني المقابل فى التتابع البروتيني محل الدراسة Query ولا يمثل إلا تغييراً محدوداً بحيث لا يؤثر على تركيب ووظائف البروتين ويطلق على مثل هذه الحالة Conservative Change. ومن جهة أخرى إذا أدى الإستبدال بين حامض أميني صغير مثل الفالين بحامض آخر كبير محتويًا على سلسلة جانبية قطبية مثل حامض الأسبارتيك فإن ذلك سيؤدي إلى تأثير كبير على تركيب و وظيفة البروتين مما يعرف Non-Conservative Substitution ولذلك يجب مقارنة تتابعات الأحماض الأمينية ليس على أساس النسبة المئوية للتطابق Identity فقط ولكن أيضاً على أساس النسبة المئوية للتشابه Similarity. ويحسب التشابه على أساس القدرة النسبية للأحماض الأمينية على الطفر كما سبق القول وعموماً فإن التغيرات المحافظة Conservative Changes تكون أكثر شيوعاً على مدار التطور وتكون الدرجة النهائية للتطابق عبارة عن مجموع درجات كل موقع. وتسمى المواقع التي تقابل

الحرف (الممثل لرمز الحامض الأميني) بفراغ Null بالفجوات Gaps وتكون درجة الفجوة سالبة وحيث أن حدث طفرى واحد قد يؤدي إلى إضافة أو حذف حامض أميني أو أكثر فإن مجرد وجود الفجوة يكون عادة أكثر أهمية عن طول هذه الفجوة. تحسب المعنوية لكل تطابق كدرجة احتمال (p) أو درجة توقع Expectation (E) وهما مجرد طريقتان لتمثيل معنوية التطابق لأن $P=1^{-e}$ وكلما زادت قيمة P لتقترب من (1) كلما زادت معنوية التطابق فى جين كلما إنخفضت قيمة E كلما دل على زيادة المعنوية. ويبين المثال التالى بعض التفاصيل الخاصة بهذه العملية.

إستخدام برنامج BLAST لتحديد تشابه تتابعات البروتين:

لإيجاد تتابعات البروتينات فى قواعد البيانات التى تتشابه مع تتابع البروتين محل الدراسة فإن BLAST يعتبر أفضل برنامج للتعقيب عن البيانات Data Mining ، ويوجد نوعان من هذا البرنامج يمكنهما التعامل مع تتابعات البروتينات وهما:

- ١- Blastp للمقارنة بين تتابعات بروتين ما مع قواعد البيانات للبروتينات.
- ٢- tblastn للمقارنة بين تتابعات البروتين مع قواعد البيانات للتتابعات النيوكليوتيدية.

ويعتمد إختيار أى من النوعين على الغرض من الدراسة ، فإذا كان المطلوب معرفة وظيفة البروتين محل الدراسة فيفضل إستخدام Blastp لمقارنة هذا البروتين مع البروتينات الأخرى الموجودة فى قواعد البيانات ، أما إذا كان الهدف هو إكتشاف جينات جديدة تشفر لبروتينات بسيطة فيستخدم tblastn لمقارنة المدروس مع تتابعات د ن أ فى قواعد البيانات والتى يتم ترجمتها إلى

بروتينات فى ستة إطارت مفتوحة للقراءة ORF. ويقوم برنامج Tblastn بهذه الترجمة أوتوماتيكا بدون تدخل من الباحث وكل ما على الباحث التأكد منه هو أن تكون نتابعات د ن أ محل الدراسة Query فى الإتجاه '3→5' أو إذا كانت بروتين أن تكون النتابعات من النهاية الأمنية إلى النهاية الكربوكسيلية.

تفسير نتائج BLAST:

Understanding BLAST Output:

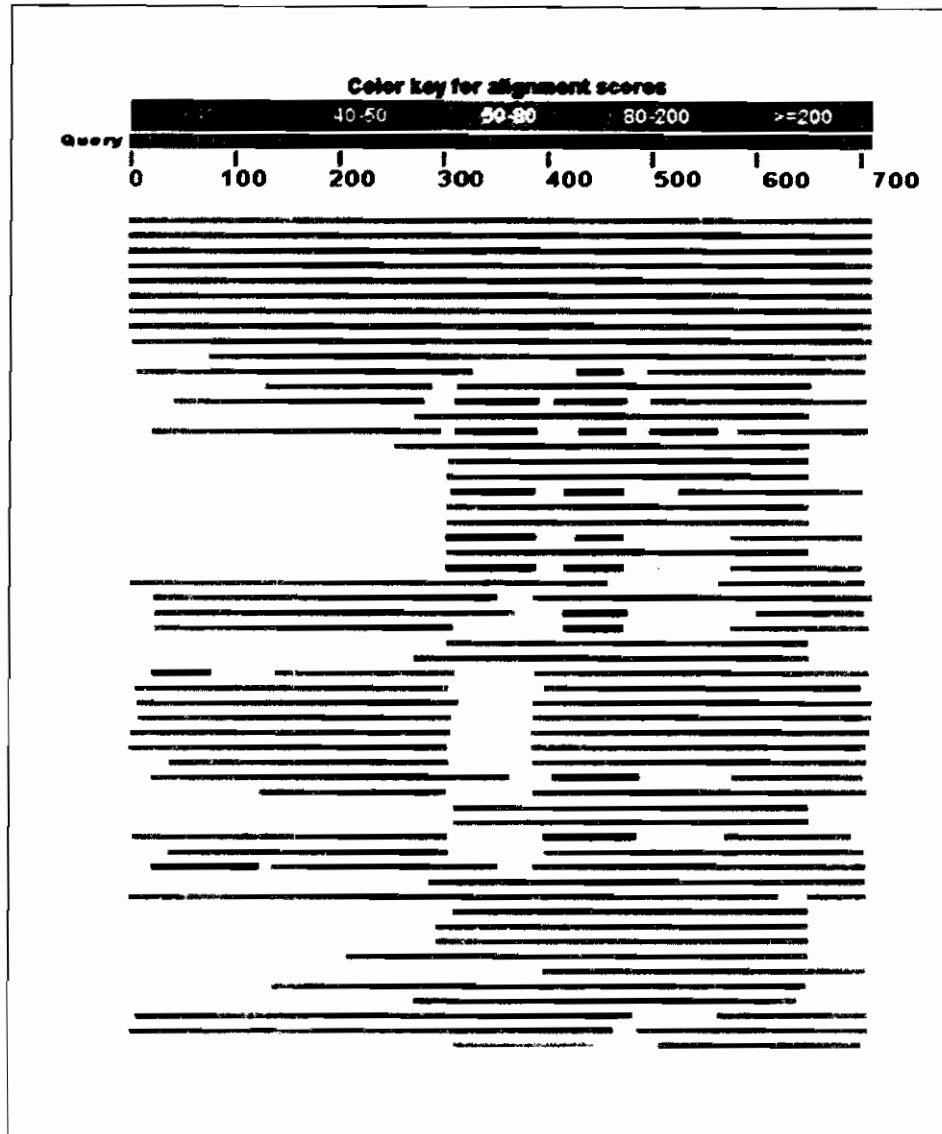
بعد الإنتهاء الدقيق من تنفيذ خطوات إدخال بيانات التتابع المطلوب (المثال هنا بروتين النيوكليولين Nucleolin) إلى الكمبيوتر الشخصى المزود بالبرامج المناسبة والمتصل بشبكة المعلومات ، سنحصل على ثلاث مخرجات (أقسام) تمثل النتائج الرئيسية التى يمكن من خلالها الحكم على درجة التشابه بين البروتين محل الدراسة مع أى من البروتينات الموجودة فى قواعد البيانات.

ويتم ظهور هذه الأقسام بالتتابع كما يلى:

- ١- عرض بيانى Graphic Display: بين مناطق التشابه بين التتابع محل الدراسة مع النتابعات الأخرى.
- ٢- قائمة إصابة الهدف Hit List: وتعطى أسماء النتابعات المشابهة للتتابع تحت الدراسة مرتبة حسب درجات التشابه.
- ٣- المحاذاة Alignment (التطابق): وتبين جميع درجات التوازي بين التتابع تحت الدراسة وتلك المشابهة لها (النجاحات).

أولاً: العرض البياني The Graphic Display:

يساعد العرض البياني (الشكل ١٥-٢) على فهم نتائج البحث. ويشتمل العرض البياني على التتابع المدروس الذي يكون في القمة (أعلى خط أفقي) ويمثل كل خط Bar جزء من تتابع آخر مشابه للتتابع محل الدراسة وتحديد المنطقة التي يحدث بها هذا التشابه. ويوجد كود للألوان للدلالة على درجة التشابه حيث تدل الخطوط الحمراء على أعلى درجات التشابه ، في حين تدل الخطوط الوردية Pink على درجة تشابه أقل جودة ، وتشير الخطوط الخضراء على انخفاض حاد في درجة التشابه ، أما الخطوط الزرقاء أو السوداء فتعني إنعدام التشابه تقريباً.



شكل (١٥-٢): عرض بياني Graphic Display لنتائج بحث المطابقة ببرنامج BLAST بين مناطق التشابه بين التسلسل محل الدراسة مع تتابعات قواعد البيانات المقارنة (اللون الأحمر والوردي يمثلان أعلى درجة تشابه في حين أن اللون الأزرق والأسود يمثلان أقل تشابه أو إعدام التشابه)

وعموما يمكن اعتبار الخطوط الحمراء والوردية Pink والخضراء دلالات جيدة للتشابه. أما الخطوط السوداء فتدل على إنعدام التشابه مع التتابع المدروس ويقال أنها في "المنطقة الرمادية" "Twilight Zone" أى تلك التى تكون نسبة التشابه فيها أقل من ٢٥% كما سيأتى بعد (يمثل ٢٥% بالنسبة لتتابعات الأحماض الأمينية فى البروتين و ٧٠% لتتابعات النيوكليوتيد فى د ن أ الحد الأدنى للتناظر Homology).

ثانياً: قائمة إصابة الهدف (النجاحات) The Hit List:

تعطى هذه القائمة مؤشرات مباشرة للحكم على ما إذا كان التتابع تحت الدراسة يشبه أى من التتابعات الموجودة بالفعل فى قواعد البيانات ومدى الثقة فى مصداقية وجودة هذا التشابه (الشكل ١٥-٣) ويحتوى كل خط على أربعة مكونات هامة:

١- الرقم الكودى للتتابع والإسم The Sequence Accession Number and Name:

مما يعطى الفرصة للوصول إلى قاعدة البيانات المحتوية على هذا التتابع للحصول على المزيد من المعلومات عن هذا التتابع.

٢- التوصيف Description:

يعطى وصف كل تتابع فكرة سريعة عما إذا كان هذا التتابع ذا قيمة مقارنة بالتتابع محل الدراسة.

٣- نقط النجاح The Bit Score:

وهى مقياس للمعنوية الإحصائية للتشابه. وكلما زادت قيمتها (مقدارها) دل ذلك على درجة تشابه عالية. وإذا إنخفضت الدرجة عن ٥٠ نقطة فإن معنى ذلك أنه ليس هناك تشابه يذكر.

٤ - قيمة E (The E-Value) (قيمة التوقع Expectation Value):

وتعطى تقديراً لعدد المرات المتوقعة للحصول على نفس التشابه بمحض الصدفة. وكلما إنخفضت قيمة E كلما دل ذلك على درجة تشابه عالية بين التتابعات مما يعطى ثقة أكبر بأن هذا التتابع مناظر بالفعل للتتابع تحت الدراسة ، إذ أن قيمة E قريبة جداً من الصفر تعنى أن هذه التتابعات متطابقة ، وعموماً فإن أى تشابهات بقيمة E أعلى من (10^{-4}) لا تؤخذ فى الاعتبار حيث أنها تقع فى المنطقة الرمادية Twilight Zone وتدل على إنعدام التشابه تقريباً بين التتابعات.

Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E Value
qi128843 sp P09405 NUCL_MOUSE	Nucleolin (Protein C23)	676	0.0
qi128844 sp P13383 NUCL_RAT	Nucleolin (Protein C23)	627	e-179
qi128842 sp P08199 NUCL_MESAU	Nucleolin (Protein C23)	598	e-171
qi128841 sp P19338 NUCL_HUMAN	Nucleolin (Protein C23)	509	e-144
qi128840 sp P15771 NUCL_CHICK	Nucleolin (Protein C23)	326	1e-88
qi1464252 sp P20397 NUCL_XENLA	Nucleolin (Protein C23)	308	2e-83
qi12229875 sp Q13310 PAB4_HUMAN	Polyadenylate-binding prote...	101	6e-21
qi13183544 sp P11940 PAB1_HUMAN	Polyadenylate-binding prote...	96	2e-19
qi1417441 sp P04147 PABP_YEAST	Polyadenylate-binding protei...	96	3e-19
qi129535 sp P29341 PAB1_MOUSE	Polyadenylate-binding protei...	96	3e-19
qi12229876 sp Q15097 PAB2_HUMAN	Polyadenylate-binding prote...	93	1e-18
qi1171978 sp P42731 PAB2_ARATH	Polyadenylate-binding prote...	92	3e-18
qi11352709 sp P20965 PABP_XENLA	Polyadenylate-binding prote...	89	2e-17
qi13123239 sp P31209 PABP_SCHPO	Polyadenylate-binding prote...	87	1e-16
qi128576 sp P27476 NSR1_YEAST	Nuclear localization sequenc...	81	6e-15
qi1171979 sp Q05196 PAB5_ARATH	Polyadenylate-binding prote...	79	4e-14
qi1585638 sp P21187 PABP_DROME	Polyadenylate-binding protei...	78	7e-14
qi12229883 sp Q9ZQ08 PABX_ARATH	Probable polyadenylate-bin...	74	8e-13
qi133249 sp P19684 ROC5_NICSY	33 kDa ribonucleoprotein, ch...	74	1e-12
qi12643628 sp Q64380 PAB3_ARATH	Polyadenylate-binding prote...	74	1e-12
qi1417556 sp P32588 PUB1_YEAST	Nuclear and cytoplasmic poly...	73	1e-12
qi133247 sp P28644 ROC1_SPTOL	28 kDa ribonucleoprotein, ch...	66	3e-10
qi13124200 sp Q12926 ELV2_HUMAN	ELAV-like protein 2 (Hu-an...	64	8e-10
qi123734 sp P26378 ELV4_HUMAN	ELAV-like protein 4 (Paraneo...	64	8e-10
qi13124206 sp Q60899 ELV2_MOUSE	ELAV-like protein 2 (Hu-an...	64	8e-10
qi1250580 sp Q61701 ELV4_MOUSE	ELAV-like protein 4 (Parane...	64	9e-10

الشكل (١٥-٣): قائمة إصابة الهدف Hit List وتعطى أسماء التتابعات المشابهة للتتابع محل الدراسة Query مرتبة حسب درجات التشابه

ثالثاً: المحاذاه The Alignments (التطابق):

يعتبر عرض نتيجة المحاذاة بمثابة حجر الزاوية في بحث BLAST لأنها تعطي تفاصيل دقيقة عن حقيقة التشابه وأهميته (الشكل ١٥-٤) ويمكن منه استنباط الخواص التالية:

١- نسبة التطابق The Percent Identity:

وهي تعطي بديل قوى لقيمة E وتجدر الإشارة مرة أخرى إلى أن نسبة تطابق أعلى من ٢٥% تعتبر نسبة مشجعة. وتعطي الإشارات الموجبة مقياساً لأجزاء التتابعات المتطابقة أو المتشابهة بشكل كبير وممثلة بالعلامة (+) في الشكل أعلاه ، وتدل أماكن الفجوات على أماكن التتابعات التي تخلو من التشابه.

٢- الطول Length:

وتمثل طول منطقة التشابه والتي تدل على مدى استمرار التشابه بدون إنقطاع بين التتابع محل الدراسة والتتابع المقارن وتمثل نتيجة تشابه كل منطقة بثلاث سطور:

السطر العلوي: يمثل تتابع الشظية محل الدراسة Query.

السطر السفلي: يمثل التتابع المقارن المشتق من قواعد البيانات
The Hit or The Subject.

السطر الأوسط بين التتابعين: ويحتوي على علامة + تمثل الأحماض الأمينية المتشابهة وحرف يمثل الأحماض المتطابقة أو فراغ يمثل عدم وجود تشابه و يدل وجود مناطق ××××× في التتابع محل الدراسة Query على وجود عدد كبير من الأحماض الأمينية المترادفة (من نفس النوع) والتي يقوم BLAST بحجبها أوتوماتيكياً Automatically Masked ويطلق عليها المناطق المنخفضة التعقيد Low-Complexity Segments

وقد يؤدي إظهارها إلى حدوث مشاكل في البحث عن التشابه وإعطاؤها علامات × تجعل BLAST يتجاهل المناطق المقابلة ويحدث هذا في التتابع محل الدراسة فقط.

وتدل الإعداد Numbers على جانبي القطعة المدروسة من التتابعات على عدد الأحماض الأمينية الذي يشمل كل تتابع في التتابع المدروس والتتابع المقابل في قاعدة المعلومات.

ويجب أن لا يحتوي أي تتابع على عدد كبير من الفجوات وأن يتكون من عدد قليل من القطع ذات تشابه مرتفع بدلا من وجود نقاط متطابقة متفرقة هنا وهناك ويكون لذلك أهمية خاصة إذا كان التشابه يقع في المنطقة الرمادية.

تحليل ر ن أ غير الشفري وتتابعات د ن أ غير الجينية:

Analysis of Non-Coding RNA and Extragenic DNA:

يتكون الجينوم في مميزة النواة متعددة الخلايا من تتابعات أكثر بكثير من تلك الخاصة بالتشفير للجينيات فعلى سبيل المثال ، يمكن بتحليل ر ن أ غير الشفري ومناطق تنظيم التعبير الحصول على معلومات هامة. ومن السهل الحصول على rRNA (ر ن أ الريبوسومي) وهو من أكبر أنواع ر ن أ غير الشفري. ويمكن التعرف عليه بتحليل تشابه التتابعات . كما يمكن التعرف على tRNA باستخدام برنامج tRNAscan-SE والذي يمكنه البحث عن تراكيب مميزة مثل قدرة tRNA على تكوين عروات دبوس الشعر Hairpins. وتعد المناطق المختصة بتنظيم تعبير الجينات بصفة خاصة هامة في تتابعات الجينوم وقد تم حتى الآن التعرف على عدد محدود من مواقع الارتباط بعوامل النسخ وذلك بالطرق التقليدية. ويعد وجود مثل هذه المواقع في التتابع محل الدراسة Query مؤشرا لمنطقة التنظيم هذه و لكن هذه التتابعات تتميز بالقصر النسبي ويمكن أن توجد بمحض الصدفة. ويمكن الحصول على أدلة أفضل لإثبات وجود هذه المناطق عن طريق عمل دراسة مقارنة للتتابعات المحفوظة التي تسبق نفس الجين Upstream في جينومين متقاربين مثل الفأر والإنسان.

تحديد وظيفة جين جديد:

Identifying the Function of a New Gene:

إن أبسط طريقة للتعرف على وظيفة جين جديد تتم من خلال البحث عن نظائر Homologues في قواعد بيانات البروتينات وإذا أعطى البروتين الجديد المشفر بإطار قراءة ORF غير مميز درجة تشابه مع بروتين آخر معروف الوظيفة، فإن ذلك يثبت أن ORF محل الدراسة هو في الحقيقة جين

جديد وغالبا ما يتم تحديد وظيفته ويتم ذلك من خلال أحد برامج BLAST مثل BLASTP أو PSI-BLAST أو SWISS-PROT. ويلخص الجدول (١٥-٢) كيفية الاختيار الصحيح لأحد برامج BLAST حسب متطلبات الدراسة.

الجدول (١٥-٢) إختيار برنامج BLAST المناسب للدراسات المختلفة لتشابه التتابعات

نوع الدراسة	البرنامج المناسب
البحث عن وجود جينات في الجينوم Finding Genes in a Genome	يتم قطع تتابعات الجينوم إلى تتابعات متداخلة صغيرة (٢-٥ ك قاعدة) ويستخدم برنامج Blastx لتقدير درجة التشابه مقابل NR (قواعد بيانات البروتين غير المتكررة Non-Redundant) و يعطى ذلك نتائج أفضل إذا لم يكن الجينوم محتويا على أنترونات (مثل البكتريا).
التنبؤ بوظيفة بروتين Predicting a Protein Function	يستخدم SWISS-PROT وعند الحصول على نسبة تشابه جيدة (أعلى من ٢٥% تطابق) على مستوى الطول الكلى للبروتين فإن ذلك يعطى تأكيد على أن البروتين محل الدراسة يقوم بوظيفة مشابهة للبروتين المقارن المشتق من SWISS-PROT.
التنبؤ بالتركيب الثلاثي 3-D للبروتين Predicting a Protein 3-D Structure	يستخدم Blastp مقابل PDB (قاعدة بيانات تركيب البروتين) وعند الحصول على درجة تشابه مناسبة (أعلى من ٢٥% تطابق) فإن معنى ذلك أن البروتين محل الدراسة تركيبه الثلاثي مشابه للبروتين المقارن في قاعدة البيانات.

العثور على أفراد في عائلة من البروتينات Finding Protein Family Members	يستخدم Blastp أو PSI-BLAST ويقارن ببرنامج NR وبعد الحصول على جميع أفراد العائلة يمكن عمل بحث على قواعد البيانات للتشابه بين المتتابعات المتعددة Multiple Sequence Analysis ورسم الشجرة التطورية Phylogenetic Tree.

الفصل السادس عشر

مقدمة في الجينوميا المقارنة Introduction to Comparative Genomic

تعتبر الجينوميا المقارنة مجال حديث في الأبحاث البيولوجية يهتم بمقارنة درجة التشابه (والقاربة) بين التتابعات الجينومية للأنواع المختلفة بدءاً من الإنسان الفأر والشمبانزي مع الخميرة والينماتودا وحشرة الدروسفلا. وبمقارنة تتابعات الجينوم البشرى مع جينومات الكائنات الأخرى يمكن للباحثين تحديد مناطق التشابه والاختلاف. وتساعد هذه الدراسات الباحثين على التوصل إلى مفاهيم أفضل عن تركيب ووظائف جينات الإنسان مما يساهم في إستنباط إستراتيجيات جديدة للتعامل مع الأمراض البشرية. كما تقدم الجينوميا المقارنة أداة فعالة لدراسة التغيرات التطورية التي تحدث بين الكائنات المختلفة وتساعد في تحديد هوية الجينات المحفوظة Conserved (المشتركة) بين الأنواع المختلفة بالإضافة إلى تحديد الجينات النوعية الفريدة والمميزة لكل نوع. ومن فوائد الجينوميا المقارنة ، وبمساعدة المعلوماتية الحيوية يمكن التوصل إلى التحديد الدقيق للمكونات الجينومية المحفوظة بين عدة كائنات على مدى ملايين السنين ، كما يمكن للباحثين تحديد الإشارات Signals التي تتحكم في وظيفة الجين وبالتالي يمكن إستنباط طرق جديدة لعلاج الأمراض البشرية و تحسين صحة الإنسان.

وبالإضافة إلى ذلك يمكن للجينوميا المقارنة أن تعود أيضا بالنفع على عالم الحيوان بحيث يمكن تحديد الفروق الدقيقة بين الأنواع الحيوانية كما أنها قد تؤدي إلى إعادة النظر في مفاهيمنا عن بعض فروع شجرة التطور Evolutionary Tree فضلا عن التوصل إلى إستراتيجيات جديدة للمحافظة على الأنواع النادرة والمعرضة للانقراض.

سبق الإشارة إلى أن التشابه بين الجينات المتناظرة و الموجودة فى كائنات مختلفة قد قدمت طريقة لتحديد وظيفة لجين غير معروف ويعد ذلك مثالا لما يمكن بمعلومية جينوم كائن ما المساعدة فى فهم ودراسة جينوم كائن آخر.

تعتمد الجينوما المقارنة على أن جينومات الكائنات ذات القرابة تكون عادة متشابهة وقد جاء هذا الإقتراض عند دراسة الجينات المتناظرة وحيث أن أى كائنين مشتركين فى أصل واحد حديث نسبيا سيكون بهما جينومان يحتوى كل منهما على إختلافات خاصة بكل نوع Species-Specific فى إطار بناء مشترك مصدره الجينوم الأصلى.

وكلما كان الكائنان شديدي القرابة على المستوى التطورى كلما زادت درجة التشابه بين جينوميهما وفى هذه الحالة يمكن أن تظهر الجينومات قدر كامل أو جزئى من الحفاظ على نفس ترتيب التتابع الجينى Synteny. وفى هذه الحالة يمكن إستخدام المعلومات الخاصة بالخريطة الجينومية لكائن ما لتحديد مواقع الجينات فى جينوم آخر.

لاشك أن تحديد خرائط الجينومات الصغيرة الحجم يكون أسهل بكثير عن تلك الخاصة بالجينومات الكبيرة الحجم ، و يعنى ذلك أنه إذا وجد جينومان متشابهان Syntenic وكان إحداهما أصغر بدرجة كبيرة عن الآخر فإن دراسة خرائط الجينوم الأصغر سيكون أقل تعقيدا وأسهل فى التناول مما يعطى دفعة قوية لإكتشاف خصائص الجينوم الأكبر بمعلومية ما يتوافر من معلومات مشتقة من الجينوم الأصغر. ومن أمثلة ذلك الدراسة التى تمت بين جينوم Puffer Fish مقارنة بالجينوم البشرى إذ إن حجم جينوم هذا الكائن حوالى 400Mb أى لا يتعدى 1/7 من حجم الجينوم البشرى إلا أنه يحتوى تقريبا على نفس العدد من الجينات الخاصة بالجينوم البشرى. وقد أوضحت الخرائط الوراثية التى تمت على Puffer Fish وجود بعض التشابه مع تتابع وترتيب الجينات البشرية على الأقل فى المسافات القصيرة نسبيا.

ويدل ذلك على أنه من الممكن إلى حد ما إستخدام خريطة Puffer Fish لإيجاد جينات بشرية مناظرة لتلك المعروفة بالتتابع فى Puffer Fish والعكس صحيح:

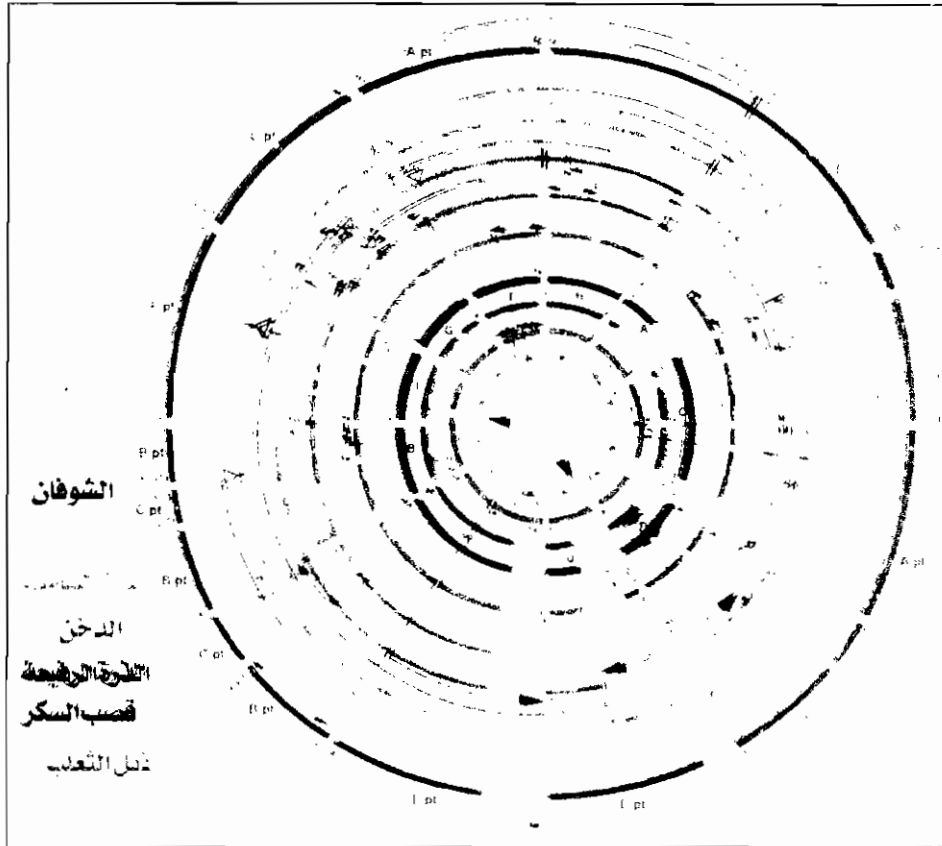
وقد يؤدى ذلك إلى تحديد مواقع جينات بشرية لم يسبق رسم خرائطها والأهم من ذلك المساعدة فى تحديد مواقع تتابعات هامة مثل البروموتور وغيره من إشارات تنظيم التعبير الجينى الموجودة أمام Upstream الجينات البشرية وذلك لأن هذه التتابعات التنظيمية من المحتمل أن تكون متشابهة فى الجينومين ويمكن التعرف عليها نظرا لأنها تكون عادة محاطة بتتابعات د ن أ غير شفرية Non-Coding والتى تباعدت بدرجة كبيرة بفعل سلسلة من الطفرات العشوائية التى تحدث على مدى تطور الجينومين.

استخدام الجينوميا المقارنة في النبات:

من المزايا المؤكدة للجينوميا المقارنة إستخدامها فى رسم الخرائط الوراثية للجينومات النباتية. ويمثل القمح نموذجاً جيداً لذلك حيث يعتبر القمح أهم محصول غذائى للإنسان، حيث يعطى حوالى ٢٠% من السعرات الحرارية اللازمة للإنسان، لذلك إزداد الإهتمام بطرق التحسين الوراثى بهدف زيادة إنتاج محصول الحبوب من هذا النبات. إلا أن هذا الهدف يصطدم بحقيقة أن حجم جينوم القمح كبير جداً أى حوالى 17000 Mb وهو أكبر من حجم الجينوم البشرى بأكثر من خمسة أضعاف ولذلك فإن وجود نموذج لجينوم آخر صغير الحجم يكون فيه ترتيب الجينات متشابه مع القمح سيكون مفيداً فى رسم خريطة الجينات المرغوبة التى قد تكون لها موقع مكافئ (مقابل) فى جينوم القمح. ويتبع القمح وغيره من محاصيل الحبوب مثل الأرز العائلة النجيلية والتى يتبعها عدد كبير من الأنواع وحيث إن حجم جينوم الأرز حوالى 400 Mb وهو أصغر بكثير من حجم جينوم القمح كما أوضحت نتائج المقارنة بين هذين الجينومين وجود درجة كبيرة من التشابه وقد أدى ذلك إلى إمكان عزل الجينات المرغوبة من جينوم القمح عن طريق البدء بتحديد مواقع الجينات المقابلة (المكافئة) فى جينوم الأرز الصغير الحجم. لقد تبين أن محتوى وترتيب الجينات يكون متشابه داخل العائلات التقسيمية على الرغم من وجود إختلافات كبيرة بين الأنواع فى أحجام الجينومات و فى أعداد الكروموسومات.

وقد أظهرت دراسة مواقع كشافات Markers خرائط القطع المحددة فى عدد من أنواع محاصيل الحبوب إمكان تحديد مناطق كروموسومية يكون ترتيب هذه الكشافات فيها متطابق ومحفوظ بدرجة كبيرة.

ومن الممكن حاليا وصف جينومات جميع الأنواع النباتية النجيلية عن طريق علاقتها بجينوم مرجعي Reference Genome وهو جينوم الأرز الأصغر حجما. يطلق على مناطق جينوم الأرز التي تحتوى على مجموعات من الكشافات المتوازية Colinear بين الأنواع النجيلية الأخرى الكتل الارتباطية Linkage Blocks (الشكل ١٦-١). وعلى الرغم من مرور حوالى ٦٠ مليون سنة من التباعد التطورى بين هذه الأنواع إلا أن أقل من ٣٠ كتلة ارتباطية موجودة فى الأرز تكون كافية لتمثيل جميع الجينومات على الرغم من الاختلافات الكبيرة فى أحجام تلك الجينومات. وترجع معظم هذه الاختلافات إلى حدوث تغيرات تركيبية فى الجينومات تشمل الإنتقالات والإنقلابات والتكرارات الكروموسومية ودرجات التضاعف الكروموسومية المختلفة. أى أن الاختلافات بين هذه الأنواع يكون فى صور أو أشكال الجينات Versions of Genes (الأليلات) التى تحملها وليس فى الطرز الأصلية لهذه الجينات.



شكل (١٦-١): خريطة مجمعة لإثنى عشر جينوم للتجليات. تمثل كل دائرة الهيئة الكروموسومية لأحد جينومات التجليات ، تمت محاذاة الدوائر مقارنة بجينوم الأرز بحيث تمر الأقطار على صور مختلفة لنفس الجينات في الأنواع المختلفة ، وتدل الأسهم على الانقلابات والانتقالات بالنسبة لجينوم الأرز والتي تكون ضرورية لوصف الكروموسومات الحالية. تتحدد مواقع النيوميرات (▲) والسنتروميرات (■) في حالة معرفة أماكنها. تدل المناطق المظلمة على مناطق الكروموسومات التي لا تتوفر عنها بيانات مقارنة. L = الذراع الطويل ، S = الذراع القصير ، T = قمة الكروموسوم ، β = قاعدة الكروموسوم ، Pt = جزء

ويمكن بذلك بمعلومية جينوم الأرز الصغير الحجم رسم خرائط لجينومات كبيرة معقدة مثل القمح والذرة الشامية وقصب السكر وغيرها من أنواع النجيليات.

إستخدام الجينوميا المقارنة فى دراسة الأمراض الوراثية البشرية:

لقد قدمت الجينوميا المقارنة نتائج هامة فى مجال التعرف على جينات الأمراض البشرية فقد تبين مثلا بمقارنة جينوم حشرة الدروسفلا بالجينوم البشرى أن حوالى ٦٠% من الجينات تكون محفوظة (متشابهة) بين هذه الحشرة والإنسان. وبمعنى آخر ، يبدو أن الكائنين يشتركان فى مجموعة كبيرة من الجينات كما إتضح أن ثلثي الجينات البشرية التى لها علاقة قوية بالسرطان لها جينات مقابلة فى جينوم حشرة الدروسفلا.

والأكثر من ذلك أنه عندما تم إدخال جين بشرى ذو علاقة بالأعراض المبكرة لمرض باركنسون Parkinson إلى جينوم الدروسفلا أظهرت الحشرة أعراضا مرضية مشابهة لتلك التى تظهر على الإنسان المصاب بهذا المرض مما يشير إلى إمكانية إستخدام هذه الحشرة الصغيرة لإختبارات خاصة بعلاج هذا المرض فى الإنسان.

إن أحد الأهداف الرئيسية لدراسة تحليلات التتابعات النيوكليدية فى جينوم الإنسان تتمثل فى إمكان تحديد التتابعات للجينات المسؤولة عن الأمراض البترية مما قد يؤدى إلى معرفة الأساس البيوكيماوى للأمراض الوراثية والتوصل إلى طريقة لمنع الإصابة بالمرض أو كيفية العلاج.

وتلعب الجينوميا المقارنة دوراً هاماً في دراسة الأمراض الوراثية نظراً لأن إكتشاف جين مناظر في كائن آخر ذو جينوم صغير (مثل: الدروسفلا أو الخميرة أو النماتودا أو حتى الفأر) يمثل مرجعاً هاماً لفهم الوظيفة البيوكيماوية للجين البشرى. حيث تعتبر مثل هذه الجينومات الصغيرة نموذجاً Model Genome للإستدلال منه عن تركيب ووظائف الجينات. في الجينومات الكبيرة الأكثر تعقيداً. وتعطى الدروسفلا آمالاً عريضة في هذا الشأن خاصة وأن الطرز المظهرية لمعظم جينات هذه الحشرة قد تم التعرف عليها بدقة مما يعطى الفرصة لإستخدام البيانات المتاحة بالفعل للإستدلال عن طبيعة فعل الجينات (السؤلة عن أمراض وراثية) بمعلومية نظائرها في جينوم الدروسفلا. وقد تبين أن حوالى ٦٠% من إجمالى ٢٩٨ جين مسئول عن الأمراض البشرية قد وجد لكل منها جين مكافئ (مناظر) في الدروسفلا وأن حوالى ٧٠٠٠ (٥٠%) من جميع بروتينات الحشرة تتشابه مع بروتينات معروفة في الثدييات ومن أمثلة الجينات الموجودة في جينوم هذه الحشرة ولها مقابل في الجينوم البشرى الجين الكابت للسرطان P⁵³ والذي يؤدى طفوره إلى أن تتحول الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية وقد تم تحديد جين P⁵³ في الدروسفلا ووجد أنه ، وكما يحدث في الخلايا البشرية ، عند إطفار هذا الجين تحولت خلايا الدروسفلا إلى خلايا سرطانية. وقد شجعت هذه النتائج الباحثين على إستخدام هذه الحشرة ذات الجينوم البسيط نسبياً لدراسة الأساس الجزيئى للسرطان في الإنسان.

ومن جهة أخرى ، ثبت أن حوالى ٣٠% من البروتينات (حوالى ٦٠٠٠) في ديدان النيماتودا المتناهية الصغر تتشابه مع تلك الموجودة فى الثدييات وتستخدم هذه الديدان حالياً في البحوث الخاصة بإستنباط أدوية جديدة مهندسة وراثياً وإختبار فعاليتها.

من المعروف أن جميع الأدوية الجديدة لابد أن يتم اختبارها أولاً على الثدييات غير الإنسان ، وأن الفأر هو الكائن الثديي المفضل في مثل هذه الاختبارات.

ويعتبر جينوم الفأر الأقرب للجينوم البشري كما وجد أن ٩٠% من بروتينات الفأر التي تم تعريفها مؤخراً تبدو تشابهاً مع بروتينات بشرية معروفة.

إلا أن أهم الإنجازات في مجال استخدام الجينوميا المقارنة في التعرف على الجينات المسببة للأمراض في الإنسان قد حدثت عند مقارنة جينوم خميرة الخباز بالجينوم البشري.

فقد تبين أن جينات عدد من الأمراض الوراثية لها جينات منازرة Homologs في جينوم الخميرة (الجدول ١٦-١) و تشمل هذه الجينات تلك المسببة للسرطان و لمرض التليف الحويصلي Cystic Fibrosis و المتلازمات العصبية Neurological Syndromes وقد وجد في حالات كثيرة أن الجين المناظر في الخميرة له وظيفة معروفة تساعد في التعرف على النشاط البيوكيماوي للجين البشري المقابل. وفي بعض الحالات أمكن إثبات درجة التشابه الفسيولوجي بين نشاط الجين في الإنسان و الخميرة. وعلى سبيل المثال ، تبين أن جين الخميرة SGS1 مناظر لجين بشري مسبب لتنازري بلوم Bloom's ويرنر Werner's والذان يتميزان باختلالات في نمو الفرد. وقد تميزت خلايا الخميرة المحتوية على جين SGS1 الطافر بقصر العمر عن خلايا الخميرة الطبيعية وتظهر سريعاً علامات بدء الشيخوخة المبكرة مثل العقم وقد تبين أن هذا الجين يشفر في الخميرة لواحد من زوج من جينات الهليكيز

DNA Helicases الهامة في نسخ جينات ررن أ r RNA و لتتاسخ دن أ. وقد أدى الربط بين جين SGS1 والجينات الخاصة بتنازري بلوم وويرنز بإستخدام الجينوميا المقارنة إلى إمكان التوصل إلى الأساس البيوكيماوى لبعض الأمراض البشرية.

الجدول (١٦-١): أمثلة لبعض جينات الأمراض البشرية
التي وجد لها جينات منازرة في خميرة الخباز

جينات الأمراض البشرية	الجين المناظر في الخميرة	الوظيفة في الخميرة
أميلوتروفيك لاتيئال سكليريروسيز (O ₂) Amylotrophic Lateral Sclerosis	SOD 1	بروتين مضاد لسوبر أوكسيد
أتاكسيا تيلانجكتاسيا Ataxia Telangiectasia	TEL 1	يشفر لإنزيم بروتين كينيز
سرطان القولون Colon Cancer	MSH2,MLH1	إصلاح دن أ
التليف الحويصلى Cystic Fibrosis	YC F1	المقاومة للمعادن
ميوتونيك ديستروفى (ضمور العضلات) Myotonic Dystrophy	YPK 1	يشفر لإنزيم بروتين كينيز
نيوروفيبروماتوزيز (بطراز ١) Type 1 Neurofibromatosis	IRA 2	يشفر لبروتين تنظيمى
تناذرويرنر Werner's Syndrome	SGS 1	توزيع بروتين النوية
مرض ويلسون Wilson's disease	CCC 2	إنتقال النحاس

نبذة عن المؤلف

الأستاذ الدكتور / فتحى محمد عبد التواب

- حصل على بكالوريوس فى العلوم الزراعية عام ١٩٥٩ من كلية الزراعة جامعة القاهرة.
- حصل على الماجستير فى الوراثة السيتولوجية عام ١٩٦٦ من جامعة ميرلاند بالولايات المتحدة الأمريكية.
- حصل على دكتوراه فلسفة فى الوراثة البيوكيماوية عام ١٩٦٨ من جامعة ميرلاند بالولايات المتحدة الأمريكية.
- تدرج فى وظائف هيئة التدريس بالجامعة إلى أن أصبح رئيسا لقسم الوراثة بكلية الزراعة جامعة عين شمس.
- شارك فى العديد من النشاطات والمؤتمرات المحلية والدولية فى الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية.
- شارك فى تأسيس مختبرات الوراثة الجزيئية فى مصر وفى بعض الجامعات العربية.
- أمين عام الجمعية المصرية للعلوم الوراثية.
- عضو اللجنة القومية للوراثة بأكاديمية البحث العلمى والتكنولوجيا.
- عضو اللجنة الإشرافية للحملة القومية للأصول الوراثية بمركز البحوث الزراعية.
- عضو اللجنة الدائمة لترقية الباحثين بمعهد الهندسة الوراثية الزراعية بمركز البحوث الزراعية.

- عضو اللجنة الدائمة لترقية الباحثين بمعهد بحوث القطن بمركز البحوث الزراعية.
- عضو هيئة تحرير المجلة العربية للتكنولوجيا الحيوية.
- عضو اللجنة العلمية الدائمة للوراثة بالمجلس الأعلى للجامعات المصرية.
- عضو في الجمعية الأمريكية للوراثة.
- نائب رئيس تحرير المجلة المصرية للعلوم الوراثية.
- له أكثر من ثمانين بحثاً منشوراً في المجلات العلمية العالمية والمحلية في مجال الوراثة البيوكيماوية والجزيئية.
- أمين عام الجمعية المصرية لخريجي الجامعات الأمريكية.
- الباحث الرئيسى في عدد من المشاريع البحثية القومية في مجال الوراثة الجزيئية «الهندسة الوراثية».
- شارك في ترجمة ثلاث كتب في الوراثة الحديثة ومعجم المصطلحات الوراثية.
- قام بترجمة ثلاث كتب في الثقافة العلمية.
- قام بتأليف كتاب بيولوجيا ووراثة الخلية عام ١٩٩١.
- قام بتأليف كتاب البيولوجيا الجزيئية (مدخل الهندسة الوراثية) عام ١٩٩٣.
- قام بوضع أول أطلس وراثى بيوكيماوى فى مصر عن طريق إستنباط بصمات وراثية بيوكيماوية لمعظم المحاصيل الرئيسية فى مصر (١٩٩٢).

مراجع مختارة Selected References

- Agrawal, N. et al. (2003). RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications, Microb Molec. Biol. Rev. 67:657-685.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell, 4th edition. Garland Science.
- Ames, B. (1983). "Dietary Carcinogenes and Anticarcinogenes". Science 221:1256-1264.
- Attwood, T. K. and Pary-Smith, D. J. (1999). Introduction to Bioinformatics. Addison Wiley Longman, Harlow.
- Baker, B. S. (1989). Sex in flies: the splice of life. Nature 340:521-524.
- Baltimore, D. (2001). Our genome unveiled. Nature 409:814-816.
- Bassett, D. E.; M.S. Boguski and P. Hieter (1996). Yeast genes and human disease. Nature, 379, 589-590.
- Black, D. L. (2000). Protein diversity from alternative splicing : A challenge for bioinformatics and Post-genomic biology. Cell 103:367-370.

- Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350:569-572.
- Bodnar, A. G. et al. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells *Science* 279:349-352.
- Brown, T. A. (2001). *Gene cloning and DNA analysis*. 4th edition. Blackwell Science Ltd.
- Brown, T. A. (2002). *Genomes-2*. BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford , UK.
- Brown, T. A. (2006). *Gene Cloning and DNA Analysis, an Introduction*. 5th edition. Blackwell Publishing.
- Campbell, J. (1988). Eucaryotic DNA replication: Yeast bears its ARSs. *Trends Biochem. Sci.* 13: 212-217.
- Campbell, J. L. (1986). Eucaryotic DNA Replication. *Ann. Rev. Biochem.* 55:733-71.
- Carter. P. (1986). Site-directed mutagenesis. *Biochem.J.*237:1-7.
- Clark, B. (1980). Elongation step of protein synthesis. *Trends Biochem. Sci.* 5:207-210.
- Claverie, J-M. and C. Notredame (2003). *Bioinformatics for Dummies*. Wiley Publishing Inc.

- Craig, W. J.; R. G. Cook, W. P. Tate and C.T. Caskey (1985).
"Bacterial Peptide Chain Release Factors: Conserved Primary
Structure and Possible Frameshift Regulation of Release Factor 2".
Proc. Nat. Acad.Sci. 82: 3616-3620.
- Crick, F. H. C. (1966). The genetic code III. Sci. Amer. 215:550-562.
- Cullen, B. R. and Malim, H. (1991). The HIV-1 Rev protein: prototype of
a novel class of eukaryotic transcriptional regulators. Trends in
Biochem. Sci. 16:341-348.
- Darnel, J. E. Jr. (1983). "The Processing of RNA". Sci. Amer. 249:89-99.
- Dear, P. H. (1997). Genome Mapping: A Practical Approach Oxford
Univ. Press, N. Y.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R. & Brown, P.O. (1997). Exploring the metabolic
and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science,
278:680-86.
- Devos, K. and M. D. Gale (2000). Genome Relationships: The grass
model in Current research. The plant cell 12:637-646.
- Dynan, W. S. (1988). Modularity in Promoters and enhancers. Cell
58:1-4.

- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
- Fields, S. & Sternglanz, R. (1994). The two hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends in Genetics*, 10, 286-92.
- Fischer, R. & Emans, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research*, 9, 279-99.
- Flavell, R. B., Dart, E., Fuchs, R. L. & Fraley, R. T. (1992). Selectable marker genes: safe for plants? *Biotechnology*, 10, 141-4.
- Friedberg E. C, Walker G. C. and Siede W. (1995). *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, D. C. ASM Press.
- Friedman, D. I; Imperiale, M. J. and S. L. Adhya (1987). 3' end formation in the control of gene expression. *Ann. Rev. Genet.* 21:453-488.
- Gale, M. D. and K. M. Devos (1998). Plant Comparative genetics after 10 year. *Science* 282:656-58.
- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D. & Carter, A. (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, 18. 1151-5.
- Goddlin, O. J. M. and Pen, J. (1995). Plants as bioreactors. *Trends in Biotech.* 13:379-387.

- Goeddel, D. V., Kleid, D. G. Bolivar, F. et al. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76:106-10.
- Goodman, N. (2002). Biological data becomes computer literate: new advances in Bioinformatics. *Current Opinion in Biotechnology* 13:68-71.
- van Hal, N. L. W., Vorst, O., van Houwelingen, A. M. M. L. et al. (2000). The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *Journal of Biotechnology*. 78:271-80.
- Hamedeh, H. and Afshuri, C. (2000). Gene chips and functional genomics. *Am Scientist* 88:508-515.
- Hannig, G. & Makrides, S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 16, 54-60.
- Hartwell L., Hood L. Goldberg ML. and et al. (2002). *genes from genes to genomes*. Boston, McGraw Hill.
- Heiskanen, M., Peltonen. L. & Palotie. A. (1996). Visual mapping by high resolution FISH. *Trends in Genetics*. 12:379-82.

- Hodges, P. and Scott J. (1992). Apolipoprotein β mRNA editing: A new tier for the control of gene expression: Trends in Biotech. Sci. 17:77-81.
- Hunt, S. P. and Livesey R. (Editors) (2000). Functional Genomics: A Practical Approach. Oxford University Press.
- Ioannou. P. A., Amemiya. C. T. Garnes. J. et al. (1994). Pl-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. Nature Genetics. 6:84-9.
- Jiricny, J. (1998). Eukaryotic mismatch repair: An update. Mutation Research. 409:107-121.
- Kim V. N. (2003). RNA interference in functional genomics and medicine. J. Korean Med.Sci. 18:309-318.
- Klug, W. S. and Cummings M. R. (2002). Essentials of Genetics 4th edition. Printice Hall, New Jersey.
- Kornberg A: and Baker T. A. (1992). DNA Replication.2nd edition. New York, WH. Freeman.
- Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryates, eucaryotes, and organelles. Microb. Rev. 47:1-45.

- Krawczak, M. & Schmidtke, J. (1998). DNA Fingerprinting, 2nd edn. BIOS Scientific Publishers. Oxford.
- Krug, R. M. (1993). The regulation of mRNA transport from nucleus to cytoplasm. *Current Opinion in Cell Biology*. 5: 944-949.
- Latchman, D. (1996). Gene Regulation: A eukaryotic Perspective 2nd edition. Chapman and Hill.
- Lee S. K., R. E. Johnson; S. L. Yu; L. Prakash and S. Prakash (1999). Requirement of yeast SGS1 and SRS2 genes for replication and transcription, *Science*, 286:2339-2342.
- Lemoine, N. & Cooper, D. (1998). Gene Therapy. BIOS Scientific Publishers. Oxford.
- Lewin, B. (2000). Genes VII. Oxford University Press.
- Li. L. (2000). Progress in proteomics. *Progress in Biochemistry and Biophysics*. 27:227-31.
- Liu, M. A. (1998). Vaccine developments. *Nature Medicine*, 4:515-19.
- Lodish H., Berk A., Zipursky SL et al (2000). *Molecular Cell Biology* 4th edition. New York, WH Freeman.

- Lu, A. L; S. Clark and P. Modrich (1983). "Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro". Proc. Nat. Acad. Sci. 80: 4639-4643.
- Mazur, B. (1995). Commercializing The Products of Plant Biotechnology Trends. in Biotech. 13:319-323.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck Eidens. D. et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science, 266:66-71.
- Modrich, P. (1987). DNA mismatch correction. Ann. Rev. Bioch. 56:435-466.
- Mol, J. N. M., R. van Blokland, P. DE Lange, M. Stam, AND J. M. Kooter. (1994). Post-translational inhibition of gene expression: sense and antisense genes. In Homologous Recombination and gene Silencing in Plants, pp.309-334, J. Paszkowski, ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Monaco. A. P. & Larin, Z. (1994). YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. Trends in Biotechnology, 12:280-86.
- Mountain, A. (2000). Gene therapy: The first decade. Trends Biotech. 18: 119-128.

- Mullis, K. B. (1990). The unusual origins of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262 (4), 56-65.
- Ogawa,T and T.Okazaki (1980). Discontinuous DNA replication. *Ann. Rev Biochem.* 49:421-457.
- Peltz, S. W. and Jacobson (1992). mRNA stability in trans-it. *Current Opinion in Cell Biology* 4:979-983.
- Primrose, S. B. and R. M. Twyman (2003). *Principies of Genome Analysis and Genomics* 3rd Edition .Blackwell Publishing.
- Rich, A., and Kim, S. H. (1978). The three dimensional Structure of transfer RNA. *Sci Amer.* 238:52-62.
- Roth, J. R. (1974). "Frameshift Mutations". *Ann. Rev. Genet.* 8:319-346.
- Rumsay, G. (1998). DNA chips: state of the art *Nature Biotechnology.* 16:40-4.
- Rushev, G. and R. Hancock (1982). Assembly of new histones into nucleosomes and their distribution in replicating chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 79:3143-3147.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 74:5463-7.
- Schwartz, D. C. and C. R. Cantor (1984). "Separation of Yeast Chromosome-Sized DNA's by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis". *Cell* 37:67-75.
- Sharp, P. A. (1987). Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 235:766-771.
- Sharp, P. A. (1994). Nobel Lecture: Split genes and RNA Splicing *Cell* 77:805-815.
- Singer, M. and P. Berg (1991). *Genes and Geomes*. University Science Books, Mill Valley , California.
- Smith, C. J. S., Watson, C. F., Ray, J. et al. (1988). Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, 334:724-6.
- Smith, T. F. (1998). Functional genomics-bioinformatics is ready for the challenge. *Trends in Genetics*, 14:291-3.
- Snustad, D. P. and M. J. Simmons (2003). *Principles of Genetics* 3rd edition John Wiley and Sons, Inc.

- Spirin, A. S. (1986). Ribosome structure and Protein synthesis, Menlo Park, Ca: Benjamin-Cummings.
- Tepfer, M. (1993). Viral genes and transgenic plants: what are the potential environmental risks? *Biotechnology*, 11:1125-32.
- Toenniessen, G. H. (1995). Plant biotechnology and developing countries . *Trends in Biotech.* 13:404-409.
- Venter J. C. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
- Venter, C. et al. (1998). Shotgun Sequencing of the human genome. *Science* 280:1540-1542.
- Watson J. D.; Hopkins, N.H; Roberts, J. W. Steitz, J.A.and A. M. Weiner (2005). *Molecular Biology of the Gene*, 5th ed., Menlo Park, Ca: Benjamin-Cummings.
- Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller. (1992). *Recombinant DNA*, 2nd ed. Scientific American Books, New York.
- Weintraub, H. M. (1990). Antisense RNA and DNA. *Sci. Amer.* 262(1): 40-46.

- Williams, J. G. K. et al. (1990). DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acide Res.* 18:6531-35.
- Yamamoto, K. and T. Sasaki (1997). Large scale EST sequencing in rice. *Plant Mol. Biol.* 35:135-144.
- Yanisch-Perron. C., Vieira, J. & Messing. J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-19.
- Yanofsky, C. (1981). Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289:751-758.

فضاء العلوم الطبيعية
www.snvdz.com 