



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

مبادئ الوراثة الجزيئية

Principles of Molecular Genetics

تأليف

د. محمد باقر صاحب الشهيّب

كلية التقانات الحيوية – جامعة القاسم الخضراء

أ. د. علي حمود السعدي

كلية العلوم – جامعة بابل

أ. د. حيدر كامل زيدان

كلية العلوم – جامعة بابل

2013

محتويات الكتاب العامة

الرقم	تفاصيل الفصل	الصفحة
1	الفصل الأول: تركيب الأحماض النووية وتعبئتها	33 - 1
2	الفصل الثاني: مفهوم الجين	62 - 35
3	الفصل الثالث: تضاعف الـ DNA	99 - 63
4	الفصل الرابع: استنساخ الجين	131 - 100
5	الفصل الخامس: ترجمة الجين	170 - 132
6	الفصل السادس: تنظيم التعبير الجيني	213 - 171
7	الفصل السابع: طفرة الـ DNA وإصلاحها	248 - 215
8	الفصل الثامن: إعادة ارتباط الـ DNA والقفز	272 - 249
9	الفصل التاسع: أنظمة انتقال الـ DNA في البكتريا	296 - 273
10	الفصل العاشر: مبادئ كلونة الجين	338 - 297
11	الفصل الحادي عشر: كيفية التعامل مع الجين	382 - 339
	قائمة بتعريف المصطلحات الواردة في الكتاب	390 - 383

محتويات الكتاب المفصلة

المحتويات	تسلسل الفصل
تركيب الأحماض النووية وتعبئتها	الفصل الأول
مقدمة	
كيمائية الأحماض النووية	
ال DNA هو المادة الوراثية	
اكتشاف ال DNA	
تقنية ال DNA X-ray crystallography	
نسب جاركاف Chargaff's ratios	
موديل واطسن وكريك Watson-Crick model	
مسح الدنا DNA denaturation	
أشكال ال DNA	
تعبئة الدنا DNA packaging	
تعبئة الدنا في الكائنات حقيقية النواة	
اكتشاف النيوكليوسوم nucleosome discovery	
تركيب النيوكليوسوم nucleosome structure	
تكثف الكروموسومات chromosomes condensation	
ملحق الفصل الأول: التطبيقات المختلفة لتراكيب الدنا الغير الاعتيادية	
أسئلة الفصل الأول	
للمزيد من الاطلاع	
مفهوم الجين	الفصل الثاني
مقدمة	
حجم الجين	
المعلومات الجينية	
تسريح الجين	
جينات بدائية النواة	
جينات حقيقية النواة	
تسلسلات الدنا الغير مشفرة	
أولاً : التسلسلات المتكررة داخل الجين أو ذات العلاقة بالجين:	
الانترونات (Introns)	
الجينات الكاذبة (Pseudogenes)	
ثانياً : التسلسلات الغير مشفرة خارج الجين	
التسلسلات المتكررة ترادفياً tandemly repeated sequences	
التيلومير والسنترومير (telomere and centromere)	
تدفق المعلومات الوراثية the flow of genetic information	
الاستنساخ المعاكس reverse transcription	
تضاعف ال RNA الذاتي	
تدخل ال DNA في عملية الترجمة	
ملحق الفصل الثاني: تطبيقات البرايون ودوره المثير في مفهوم العقيدة المركزية	
أسئلة الفصل الثاني	
للمزيد من الاطلاع	
تضاعف ال DNA	الفصل الثالث
مقدمة	
الازواج القاعدي base pairing وتضاعف ال DNA	

احتياجات إنزيم DNA polymerase	
قصة الإنزيمين DNA polymerase III و DNA polymerase I	
كيفية عمل إنزيم DNA polymerase I في بكتريا القولون	
كيفية عمل إنزيم التضاعف الرئيس في بكتريا القولون	
مشاكل تواجه إنزيم DNA polymerase في عملية التضاعف	
المشكلة الأولى:	
المشكلة الثانية:	
المشكلة الثالثة:	
المشكلة الرابعة:	
المشكلة الخامسة:	
حل مشكلة فتح الالتفاف unwinding problem	
حل مشكلة البدء Initiation problem	
حل مشكلة الاتجاهية directionality problem	
حل المشكلة الطبولوجية topological problem	
حل مشكلة نهاية التضاعف end replication problem	
خلاصة خطوات التضاعف	
تراكيب تضاعفية أخرى	
موديل الدائرة المتحركة (Rolling Circle Model)	
موديل عروة الإزاحة (D-Loop Model)	
التضاعف في الكائنات حقيقية النواة	
أسئلة الفصل الثالث	
وللمزيد من الاطلاع	
استنساخ الجين	الفصل الرابع
مقدمة	
من الـ DNA إلى الـ RNA	
البروموتر the promoter	
1. في بدائية النواة	
في حقيقية النواة	
إنزيم الـ RNA polymerase	
1. في بدائية النواة	
2. في حقيقية النواة	
وصف عملية الاستنساخ description of transcription	
مرحلة البدء initiation stage	
مرحلة الاستطالة elongation stage	
مرحلة الانتهاء termination stage	
عملية معالجة جزيئات الرنا RNA processing	
معالجة الرنا الرسول (mRNA) processing of messenger RNA	
وصل أطراف الرنا الغير متجانس بالتراكب (Splicing of hnRNA)	
أنواع الـ RNA	
الرنا المراسل (mRNA) Messenger RNA	
الرنا الرسول (tRNA) transfer RNA	
الرنا الريبوسومي (rRNA) Ribosomal RNA	
الرنا الصغير الثابت (ssRNA) Small stable RNA	
ملحق الفصل الرابع: الريبوزايم (The Ribozyme)	
أسئلة الفصل الرابع	
وللمزيد من الاطلاع	

الفصل الخامس	ترجمة الجين
	مقدمة
	الكودونات وتخليق البروتين codons and protein synthesis
	فك رموز الشفرة الوراثية cracking the genetic code
	لماذا يتألف كل كودون من ثلاث نيوكليوتيدات؟
	صفات الشفرة الوراثية
	نسق القراءة reading frame
	كودونات البدء والنهاية start\stop codons
	عملية تخليق البروتين process of protein synthesis
	مرحلة البدء initiation
	فروقات بدء الترجمة بين بدائية وحقيقية النواة
	مرحلة الاستطالة elongation step
	مرحلة الانتهاء termination
	دور الريبوسومات في عملية تخليق البروتين
	هل هناك تدقيق في عملية الترجمة؟
	تركيب البروتين (Protein Structure)
	تحويلات ما بعد الترجمة
	أولاً : تحويل التركيب البروتيني ثلاثي الأبعاد
	ثانياً : التحويل الكيميائي للسلاسل الجانبية للبروتين
	ثالثاً : تحويل العمود الفقري لمتعدد الببتيد
	تخطيط البروتينات
	ملحق الفصل الخامس: مثبطات تخليق البروتين وسيلة للعلاج!
	أسئلة الفصل الخامس
	للمزيد من الاطلاع
الفصل السادس	تنظيم التعبير الجيني
	مقدمة
	تنظيم التعبير الجيني في بدائية النواة
	أولاً : السيطرة الاستثنائية على التعبير الجيني
	اكتشاف الاوبرون
	أوبرون اللاكتوز lac operon
	أوبرون اللاكتوز : الصورة الكاملة
	كابح التريبتوفان tryptophan repressor
	الإضعاف: التوقف المبكر للاستنساخ
	أوبرون التريبتوفان: الصورة الكاملة: الاستنساخ عندما يكون مستوى التريبتوفان عالياً
	الاستنساخ عندما يكون مستوى التريبتوفان واطناً
	وسائل أخرى لتنظيم التعبير الجيني في البكتريا عند مستوى الاستنساخ
	ثانياً : سيطرة الترجمة على التعبير الجيني
	ثالثاً : سيطرة ما بعد الترجمة (تنشيط المردود أو تثبيط الناتج النهائي)
	تنظيم التعبير الجيني في العاثيات البكتيرية
	تنظيم التعبير الجيني في حقيقية النواة
	مستويات التنظيم الجيني في الكائنات حقيقية النواة
	أولاً . تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الجينوم
	ثانياً : تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الاستنساخ
	ثالثاً : تنظيم التعبير الجيني عند مستوى ما بعد الاستنساخ
	رابعاً : تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الترجمة
	خامساً : تنظيم التعبير الجيني عند مستوى ما بعد الترجمة

ملحق الفصل السادس: تحسين نوعية الطماطم بواسطة منع التعبير الجيني لانزيم polygalacturonase	
أسئلة الفصل السادس	
للمزيد من الاطلاع	
الفصل السابع	طفرة الـ DNA واصلاحها
	مقدمة
	أنواع الطفرات
	أولاً: تصنيف الطفرات وفقاً لأنواع الخلية
	ثانياً : تصنيف الطفرات وفقاً للحجم والنوعية
	ثالثاً : تصنيف الطفرات وفقاً لتأثيرها على تسلسل الأحماض الأمينية في البروتين الناتج
	رابعاً : تصنيف الطفرات وفقاً لتأثيرها على الطراز المظهري للكائن
	خامساً : تصنيف الطفرات وفقاً للاتجاه
	سادساً : تصنيف الطفرات وفقاً لمصدرها
	المطفرات mutagenes
	أولاً : المطفرات الفيزيائية (physical mutagenes):
	ثانياً : المطفرات الكيميائية (chemical mutagenes):
	تأثيرات المطفرات الكيميائية على التسلسل النيوكليوتيدي
	أولاً : تبديل الأحماض النووية التي هي ليست في حالة تضاعف
	ثانياً َ: تبديل الأحماض النووية خلال مرحلة التضاعف
	مشاكل التعامل مع المطفرات الكيميائية
	أصلاح الدنا DNA REPAIR
	كيميائية قواعد الـ DNA تسهل الكشف عن الضرر الحاصل فيه
	آليات إصلاح خلل الدنا DNA Repair Mechanisms
	(1) - آلية الاصلاح الاستئصالية Excision Repair
	(2) - آلية إصلاح النيوكليوتيدة المغلوطة Mismatch Repair
	(3) آلية إصلاح إعادة الارتباط أو ما بعد التضاعف
	(4) - آلية إصلاح "استجابة سوس" SOS Response Repair
	(5) آلية الاصلاح المعتمدة على التنشيط الضوئي photoreactivation repair
	(6) إصلاح الكسور المزدوجة الشريط double stranded breakage repair
	ملحق الفصل السابع: السرطان تراكم للطفرات
	أسئلة الفصل الثامن
	للمزيد من الاطلاع
الفصل الثامن	اعادة ارتباط الـ DNA والقفز
	مقدمة
	إعادة الارتباط المتماثل Homologous Recombination
	دور بروتين Rec A في عملية إعادة الارتباط العام
	مفصل هوليدي Holliday junction
	وظائف إعادة الارتباط المتماثل
	إعادة الارتباط ذو الموقع المتخصص site-specific recombination
	القفازات transposones
	صفات القفازات العامة
	تصنيف القفازات في بدائية النواة
	التسلسلات الانغراسية insertion sequences
	القفازات المركبة composite transposons
	تصنيف القفازات في حقيقية النواة
	الصف الأول Class I
	الصف الثاني Class II

آليات القفز (mechanisms of transposition)	
آلية القفز المباشرة	
1. القفز التضاعفي (replicative transposition)	
2. القفز الغير تضاعفي (nonreplicative transposition)	
آلية القفز الغير مباشرة: القفز عن طريق وسائط الـ RNA	
ملحق الفصل الثامن: فائدة القفزات	
أسئلة الفصل الثامن	
للمزيد من الاطلاع	
الفصل التاسع	أنظمة انتقال الـ DNA في البكتيريا
مقدمة	
البلازميدات plasmids	
أولاً : الاقتران conjugation	
آليات الاقتران mechanisms of conjugation	
أهمية الاقتران	
ثانياً : التحول	
آلية التحول	
أهمية التحول	
ثالثاً : النقل transduction	
آليات النقل transduction mechanisms	
أهمية النقل	
ملحق الفصل التاسع: مصير الـ DNA الغريب خطوات نحو الهندسة الوراثية	
أسئلة الفصل التاسع	
للمزيد من الاطلاع	
الفصل العاشر	مبادئ كلونة الجين
مقدمة	
أدوات كلونة الجين المتعاقبة	
أولاً : أدوات عزل الـ DNA الحاوي على الجين المرغوب	
ثانياً : أدوات قطع ولحم الـ DNA	
ثالثاً : أدوات نقل الـ DNA (نواقل الكلونة cloning vehicles)	
رابعاً : أدوات ادخال الجينات الغريبة الى الخلايا	
أ. ادخال الجينات في الخلايا البدائية النواة	
ب. ادخال الجينات في الخلايا حقيقية النواة	
ملحق الفصل العاشر : كلونة النعجة دولي	
أسئلة الفصل العاشر	
للمزيد من الاطلاع	
الفصل الحادي عشر	كيفية التعامل مع الجين
مقدمة	
كيف نحصل على الجين (قطعة الـ DNA المرغوبة)	
كيف نعرف تسلسل الجين	
كيف نضخم الجين	
كيف نكشف عن الجين	
ملحق الفصل الحادي عشر: كيف نكشف عن هوية الشخص الجينية	
أسئلة الفصل الحادي عشر	
للمزيد من الاطلاع	
قائمة بالمصطلحات الواردة في الكتاب ومعناها	

الاهداء

الى من يملئها قسطاً وعدلاً بعدما ملئت ظلماً وجوراً

مقدمة

بسم الله الرحمن الرحيم

اللهم صل على محمد وآله الطاهرين والعن أعدائهم الى قيام يوم الدين

لا يمكن لنا أن نتصور كيف يمكن أن ترتسم البسمة في ثغر محمد وآله البررة عندما تعرض عليهم أعمال العباد ويروا بان أحدهم- حتى لو كان في شقة بعيدة عنهم - قد عمل بنصيحتهم ولو جزئياً وارتمى في حضان العلم وأنحنى عليه بظهره وافترق عن العالم بأسره، نهماً لا يشبع من حوضه الذي كلما ازداد منه شرباً كلما ازداد علواً وامتشاقاً ورفعة وسداداً. ولا يمكن لنا أن نتصور أيضاً كيف هي الحال التي نلقاهم فيها ونحن أصبحنا ذيلاً تجره بقية الأمم وتهش به على من تريد من الدواب والنعم. ترى هل نكتفي باسباغ الوضوء وتجويد القرآن واتمام الصلاة ونعتقد بأنه عندما تجثوا أمة محمد (ص) للحساب أن لا يخبرها ربها عن أسباب سباتها في العلوم الحديثة كهذا العلم وامثاله؟! فكيف يمكن لرسول كمحمد (ص) أن يرض عن مجتمع وهو لم يسهم بأي شئ في علم من العلوم! وكيف يمكن له (ص) الذي طالما أوصانا قائلاً: لو كنت منشغلاً في غرس شجرة وقامت القيامة فأتهم غرسك؟! أنى له (ص) أن يرض عنا؟! وأنى لبركات السماء أن تهطل وفيها قوم لا يحملون من الاسلام الا اسمه! أين هذا العمل في مجتمعنا المترهل الذي أكتفى بالتنظير والتحرير من غير عمل وتدبير! أترى هل نكتفي بالنقد أم نساهم بالتغيير؟! لذا، قمنا بما هو مناظ بنا، وخصصنا بعضاً من الوقت الذي يصعب تخصيصه في وضع مضطرب وغير مستقر، لكننا آلينا على أنفسنا الا أن نكمل ما عزمنا على العمل فيه منذ أكثر من ست سنين خلت.

في الحقيقة، ليست هي قصيرة المدة التي بدأنا بها بتأليف هذا الكتاب، وهي بدأت منذ أن أحسنا بالحاجة الماسة لطلبة البكلوريوس وطلبة الدراسات العليا الى كتاب "بلغتنا" يتماشى مع الكم الهائل من المعلومات المتوفرة حول مبادئ الوراثة الجزيئية، هذا العلم الذي أصبح الشغل الشاغل لكثير من مجتمعاتنا العلمية حتى وصلت ارهاصاته الى عامة المجتمع، فعلى الرغم من الولايات ثم الولايات التي مر بها شعبنا المظلوم المضطهد، فانه ليس غريباً عن مسامعنا أن يسأنا أحدهم - وهو تاجر البسة - عن نعجة "دولي" وعن كيفية كلونتها وعن الاستنساخ البشري! بينما نجد الآخر وهو - مقول بناء - يسألنا أسئلة لا تتم الا عن مهتم بشكل كبير بهذا المجال، وغيره وغيره من الأمثلة الكثيرة التي لا توحى الا عن مجتمع متوقد الذكاء، بارع في المعرفة منذ القدم. لذا، بصفتنا كأفراد في هذا المجتمع العراقي المظلوم، ليس لنا أن نقوم به كي نرفع الحيف عن أبناء جلدتنا سوى تقديم هذا الكتاب الذي مافتتنا نتحسس فيه نبض الطالب ومشاعره قبل عقله وادراكه لمراحل دراسية متعاقبة في عرض هذه المادة، حيث أيقنا فيه هرب الطالب من الأسلوب الرتيب في السرد التقليدي الغائب عن الوعي، وأدركنا حاجة ماسة في معظم طلبتنا الأعزاء الى أي شئ يبعث على السرور، حتى لو كان ذلك السرور هو مادة علمية معقدة لكنها مزدانة بصور ملونة؟! وهذا أحد العوامل التي دفعتنا بقوة الى أن نقدم هذا الكتاب بصورة معززة بمخططات ملونة قد صممناها وجعلناها بصورة متماشية مع ماتوصلت به الكتب المنهجية الحديثة في هذا المجال. وعلى الرغم مما قمنا به في تبسيط مفردات الوراثة الجزيئية الا أن هنالك خط أحمر في هذا الكتاب لاأنتنازل عنه، وهو أن لا يطغى التبسيط على القيمة العلمية للكتاب، وذلك لاننا أحببنا أن من يبدأ بقراءة الوراثة الجزيئية في هذا الكتاب أن لا يتفاجي ولا يرتبك عند مراجعته لشتى المصادر العلمية المعتمدة.... وهذا ما نرجوه.

نرجو من الاساتذة الفضلاء، لا لأجلنا وانما لأجل اعادة الأمل في العراق، أن يفسحوا الطريق لهذا الكتاب بأن يقيّم بشكل موضوعي وشفاف من قبل القراء أنفسهم، فكما كان الطالب مرآة للأستاذ فالقارئ مرآة للكاتب أيضاً.

انه لمن دواعي الشرف لنا أيضاً بأن نجعل هذا الكتاب وسيلة يستخدمها أساتذة المادة الكرام في تدريس طلاب البكالوريوس على أن لا يقدموه كله دفعة واحدة، وانما يعتمدوا على نظام التدريج والتجزئة، بحيث يتناولون الاطار العام للفصل وبعض التفاصيل التي لا يصعب فهمها بين عامة الطلاب. أما الأمور التفصيلية الأكثر تعقيداً، فيمكن لهم أن يتركوها لمراحل متقدمة، وهم بهذا قدموا البسيط من علم الوراثة الجزيئية وفتحوا باباً نحو المتقدم منها للدراسات العليا.

ما بقي لنا وقد أتممنا هذا الكتاب اليوم الأحد المصادف 2012-4-15 الا الاعتذار عن كل خطئ أو سهو أو غفلة أو نسيان.

والحمد لله رب العالمين.

1

الفصل الأول تركيب الأحماض النووية وتعبئتها



علي اليسار: د. فرانسيس كريك وعلي اليمين د. جيمس واطسن في صورة أخذت لهما على انفصال في عام 1976 في معهد ستانك للأول وللتاني في جامعة هارفارد، والذي استمر بعدها في قيادة مختبر Cold Spring Harbor لسنين طويلة.

علي اليسار: د. فرانسيس كريك وعلي اليمين د. جيمس واطسن في صورة أخذت لهما معاً في جامعة كامبرج في الخمسينيات من القرن الماضي، وذلك بعد اكتشافهما للحزون المزدوج، ثم استمر الاثنان بعد ذلك لقيادة الثورة الوراثية لسنوات عديدة

مقدمة

تتكون الجينات أما من DNA وهو الغالب أو من RNA، حيث يعتبر الـ RNA هو المكون الوراثي في بعض الفايروسات، وإلا، فإن الـ DNA هو الذي يوفر المعلومات الوراثية، والتي يجري استنساخها إلى RNA، والذي بدوره – في معظم الحالات – يستخدم لاحقاً في توجيه عملية تخليق البروتين لتكتمل عملية التعبير الجيني على أتم الأوجه. تنعكس

الوظائف المختلفة للحامضين النوويين المختلفين من خلال اختلاف موقعيهما في الخلية، فتواجد الـ DNA في الأعم الأغلب يقتصر على نواة الخلية، بينما تتواجد الأشكال الناضجة من الـ RNA في الساييتوبلازم عموماً، حيث تحدث عملية تخليق البروتين.

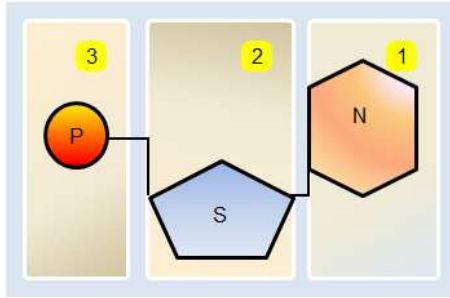
تختلف كمية الـ DNA للخلية الواحدة بشكل واسع بين الكائنات المختلفة. ففي خلايا اللبائن، يكون محتوى الـ DNA في تلك الخلايا أكثر بالآلاف المرات (حوالي بـ 8000 مرة) من محتوى الـ DNA في خلايا البكتيريا. أما العائيات البكتيرية، كما في T-phage والذي يخمج بكتيريا القولون، فإنه يحتوي على عشر أو على 1 إلى 12 من كمية الـ DNA الموجودة في كروموسوم بكتيريا العائل. إن DNA أصغر الفايروسات بدوره يبلغ في كميته عشر كمية الـ DNA الموجودة في أصغر عائتي من نوع T-phage، محتوياً بالكاد على مادة وراثية موزعة على عشرة جينات. هذه المعلومة متوافقة تماماً مع الحقيقة التي تقول بأن الفايروسات لا تحتوي على مادة وراثية كافية تمكنها من النمو المستقل، ولكن يمكن لها أن تنمو فقط بشكل طفيلي على خلايا العائل التي تخمجها. ومن ناحية أخرى، إن كمية الـ DNA بالخلية هي ليست دائماً مقياساً مباشراً لكمية المادة الوراثية في الكائن. هذا لأن الكائنات حقيقية النواة المعقدة تحتوي على كمية كبيرة من الـ DNA غير المعلوماتي (أي الذي لا يشفر عن معلومات وراثية) في كروموسوماتها، والذي وظيفته ما تزال غير واضحة.

بالإضافة إلى الـ DNA الرئيسي الموجود بنواة الخلية أو بالفايروس، فإن هنالك DNA معلوماتي خارج كروموسومي (extrachromosomal elements) يوجد في عضيات organelles معينة كما في الـ chloroplast (أو chDNA) والـ mitochondria (أو mtDNA) ويقدر عدده من ألف إلى ثلاثة آلاف نسخة في كل خلية حقيقية النواة. تشفر الجينات الموجودة في الـ mtDNA إلى 13 بروتين في السلسلة التنفسية. وتبلغ تلك المواقع أهمية بالغة بحيث أن حدوث أية طفرة فيها قد يؤدي ذلك إلى بعض الأمراض الوراثية في البشر. يرتبط الـ mtDNA بالوراثة الأمومية (maternal genetics)، أي أن الفرد الناتج من البيضة المخصبة تحتوي خلاياه على mtDNA ناتج من أمه فقط. لدراسة الـ mtDNA فوائد كبيرة في السلسلة التطورية للكائنات الحية.

كيمائية الأحماض النووية

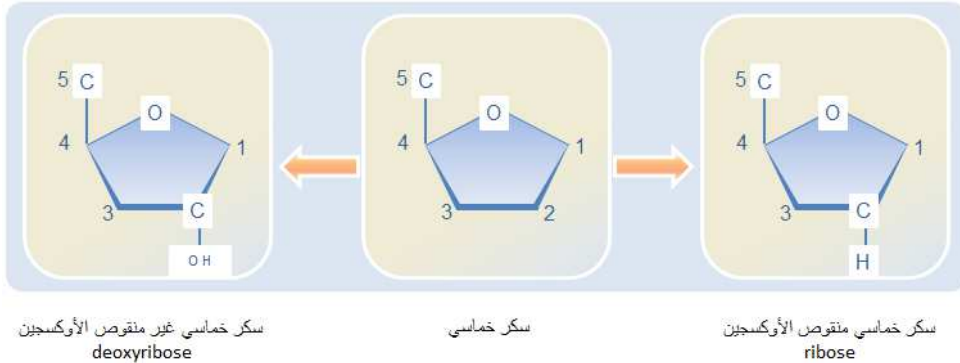
عندما نعرف أن الـ DNA والـ RNA هما المادة الوراثية يجب علينا أن نتقدم نحو التحري عن التركيب الكيميائي لهذه الجزيئات، لأن تركيبها يخبرنا بمقدار كبير حول كيف تعمل هذه الجزيئات. تتكون الأحماض النووية nucleic acids من ارتباط النيوكليوتيدات nucleotides بطريقة متكررة إلى بوليمرات تشبه في شكلها السلسلة. تتكون النيوكليوتيدات من ثلاثة مكونات: الفوسفات phosphate، والسكر sugar، والقاعدة النتروجينية

(nitrogenous base شكل 1.1). عندما تدخل النيوكليوتيدات في تركيب الحامض النووي، تحتوي كل نيوكليوتيدة على مجموعة فوسفات واحدة، ولكن عندما تكون هذه النيوكليوتيدة طافية في مستنقع الخلية بشكل حر، فإن النيوكليوتيدات عادة ما تتواجد بشكل ثلاثي الفوسفات. إن النيوكليوسايد nucleoside هي المكون سكر - قاعدة نتروجينية، أي هي مركب يتكون من سكر وقاعدة نتروجينية فقط. ولهذا فإن النيوكليوتيدات هي نيوكليوسيدات ذات فوسفات (شكل 1.1).



شكل (1.1). مخطط يوضح المكونات الثلاث للنوكليوتيدة التي هي اللبنة الأساسية لبناء الـ DNA. يرمز الحرف N إلى القاعدة النتروجينية للنوكليوتيدة والتي قد تكون إما أدينين أو كوانين أو سايتوسين أو ثايمين أو يوراسيل، ويرمز الحرف S إلى السكر الخماسي والذي إما أن يكون منقوص الأوكسجين أو غير منقوص الأوكسجين، ويرمز الحرف P إلى مجموعة الفوسفات (تصميم المؤلف).

لاحظ إن الـ ATP أي مركب adenosine triphosphate ، والذي هو عملة الطاقة للخلية، هو عبارة عن نيوكليوسايد ثلاثي الفوسفات nucleoside triphosphate. يختلف السكر فقط في وجود الرايبوز ribose في الـ RNA ، لهذا سمي ribonucleic acid الرايبوز منقوص الأوكسجين ولهذا سمي deoxyribonucleic acid، حيث يغيب الأوكسجين في جزيئة الأوكسجين رقم (the 2') position، لاحظ أن ذرات الكربون في السكر رقت من 1' إلى 5'. إن الشخطة أو ما تعرف بالإنكليزية "prime" تستخدم لتجنب الإرباك مع نظام الترقيم للقواعد النتروجينية (شكل 2.1).



سكر خماسي غير منقوص الأوكسجين
deoxyribose

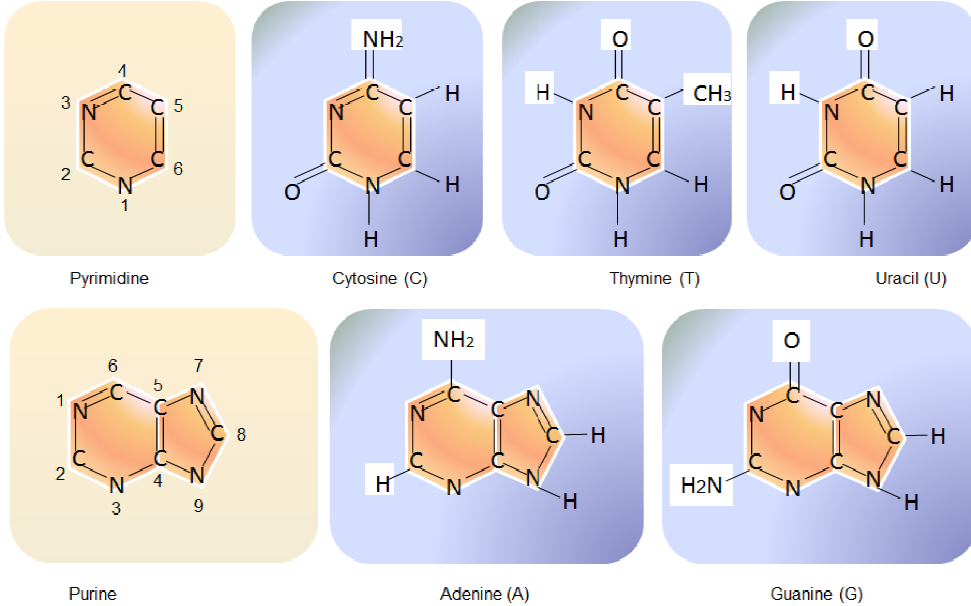
سكر خماسي

سكر خماسي منقوص الأوكسجين
ribose

شكل (2.1). التركيب الكيميائي لجزيئة الرايبوز وجزيئة الرايبوز منقوص الأوكسجين (تصميم المؤلف).

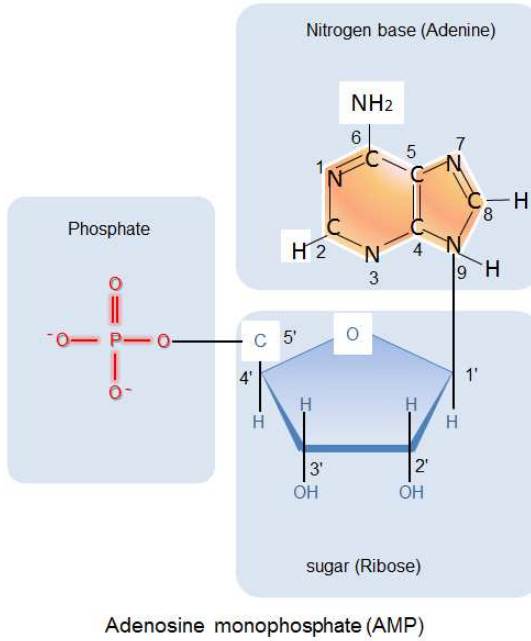
كلا الـ DNA والـ RNA يمتلك أربعة قواعد (اثنان من الـ purine واثان من الـ pyrimidine) في سلسلتهما النيوكليوتيدية (شكل 3.1). كلا الجزيئين تمتلك الـ purines الـ adenine والـ guanine والـ pyrimidine الـ cytosine. يمتلك الـ DNA الـ pyrimidine الـ thymine: يمتلك الـ RNA الـ pyrimidine الـ uracil. وهكذا، فأن ثلاثة من القواعد النتروجينية موجودة في كلا الـ DNA والـ RNA، بينما الـ thymine متفرد بالـ DNA والـ uracil متفرد بالـ RNA (شكل 3.1).

تتكون النيوكليوتيدة بالخلية بربط القاعدة النتروجينية (من ذرة النتروجين رقم 9 بالبيورين، أو من ذرة النتروجين رقم 1 بالبيريميدين) بذرة الكربون رقم 1' في جزيئة السكر sugar بأصرة كلايكوسيدية glycosidic bond، ويربط الفوسفات بنفس جزيئة السكر (شكل 4.1) بأصرة أستر ester bond عند ذرة الكربون رقم 5'. هذا ومن الجدير بالذكر بان النيكليوتيدات تأخذ اسمها من نوع القاعدة (شكل 4.1).



شكل (3.1): التركيب الكيميائي للقواعد النتروجينية الخمس الموجودة في جزيئات الحمض النووي (تصميم المؤلف).

ترتبط النيوكليوتيدات مع بعضها البعض (تتبلر polymerized) وذلك بتكوين أصرة عند ذرة الكربون رقم 5' (5' carbon) للنيوكليوتيدة ومجموعة الهيدروكسيل hydroxyl group (OH) عند ذرة الكربون رقم 3' (3' carbon) للنيوكليوتيدة

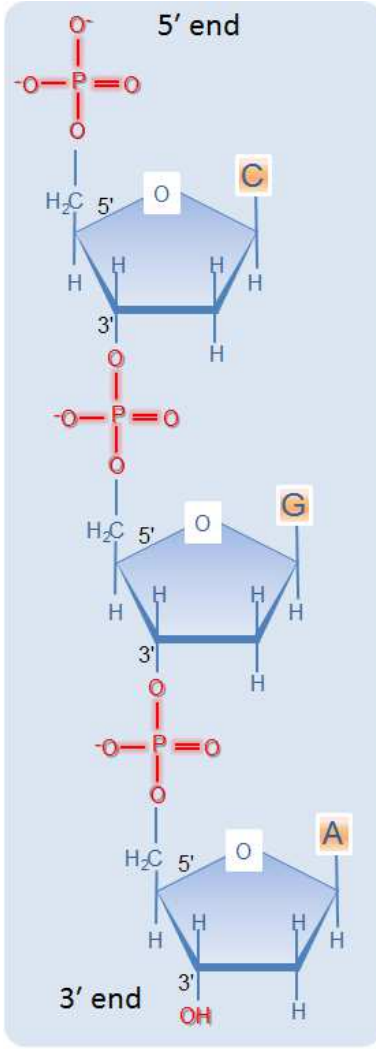


المجاورة، وتسمى هذه الأصرة بأصرة الفوسفات ثنائية الأستر (شكل phosphodiester bonding (5.1).

شكل (4.1): التركيب الكيميائي للنيوكليوتيدة. لاحظ أن القاعدة النيتروجينية (الأدينين هنا) تتصل بالسكر الخماسي المنقوص الأوكسجين عن طريق الأصرة الكلايكوسيدية، بينما يتصل السكر الخماسي المنقوص الأوكسجين بمجموعة الفوسفات بواسطة أصرة الأستر (تصميم المؤلف).

والآن، يبرز السؤال: لماذا اختارت إرادة الباري جل وعلا أن يكون الفوسفات وليس غير الفوسفات هو الرابطة التي عبرها ترتبط النيوكليوتيدات؟ تكمن الإجابة على هذا السؤال بجزيئة الفوسفات التي تمتلك خواصاً عديدة جعلتها مثالية لربط الوحدات الثانوية (النيوكليوتيدات) إلى بوليمر طويل. أولاً، يمكن لمجموعة الفوسفات أن تكون أواصر رابطة – وبهذه الطريقة يمكن لها أن تربط مركبين مع بعضهما البعض كما في الشكل (5.1).

تمتلك تلك الأواصر الرابطة المتكونة من الفوسفات (الأواصر ثنائية الأستر) خاصية إضافية تعطيها ما يكفي من الإستقرار لكي لا تتحطم بسهولة بواسطة التحلل الإنزيمي المائي (enzymatic hydrolysis). وبمعنى آخر، تكون الأواصر مستقرة، ولكن يمكن إزالة المخلفات النيوكليوتيدية للحفاظ عليها خلال عمليات عديدة كما في التضاعف والإصلاح (أنظر الفصل الثامن) وغيرها، بحيث تزال النيوكليوتيدة، فأنها لا تتكسر في العملية. وبعد تكوّن الأصرة ثنائية الأستر، فإن ذرة الأوكسجين التابعة لمجموعة الفوسفات بشكل تلقائي (بسبب مقاومة الشحنة السالبة للهجوم المحب للنواة nucleophilic attack) تعمل خاصية التأين السالب التي يتمتع بها الـ DNA على استبقائه ضمن الأغشية، وخصوصاً الغلاف النووي لحقيقية النواة والغلاف الخلوي لبداية النواة. وبما أن المركبات المشحونة بشكل سالب هي مركبات غير ذائبة في الدهون، لذا تستبقى الفوسفات ضمن

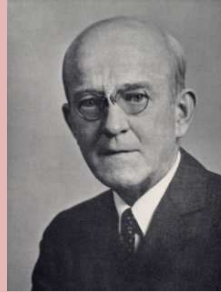


الأغشية بواسطة هذا التآين. وبالنتيجة، كل هذه الظروف قد انطبقت على حامض الفوسفوريك وليس غير حامض الفوسفوريك!

شكل (5.1): التركيب الكيميائي لمتعدد النيكليوتيد polynucleotide. يوضح هذا المخطط كيف أن النهاية 5' تكون فوسفاتية وكيف أن النهاية 3' تكون هيدروكسيلية. ولابد من ملاحظة أن الشريط الآخر (الغير مبين هنا في المخطط) إذا تم رسمه فإنه يمتد بشكل معاكس بالاتجاه لامتداد هذا الشريط وعليه تقع نهايته الفوسفاتية بشكل مجاور للنهاية الهيدروكسيلية لهذا الشريط، بينما تقع نهايته الهيدروكسيلية بجانب النهاية الفوسفاتية لهذا الشريط (تصميم المؤلف).

الـ DNA هو المادة الوراثية

هنالك عدة بدايات تاريخية مهمة لاكتشاف حقيقة أن الـ DNA هو المادة الوراثية، ففي عام 1928 اكتشف Fred Griffith أي كان يدرس آنذاك بكتريا Pneumonia (Streptococcus بكتريا Pneumonia) في بأن السلالات الغير ضارية non-virulent strains يمكن أن ترجع إلى سلالات ضارية بواسطة تعرضها لمستخلص الخلايا الضارية المقتولة. وبعد ستة عشر سنة، أثبت Oswald T. Avery و Macleod و McCarty بعد عشر سنوات من العمل المتواصل بأن عامل التحول "transforming principle" هو الـ DNA.



Oswald Avery



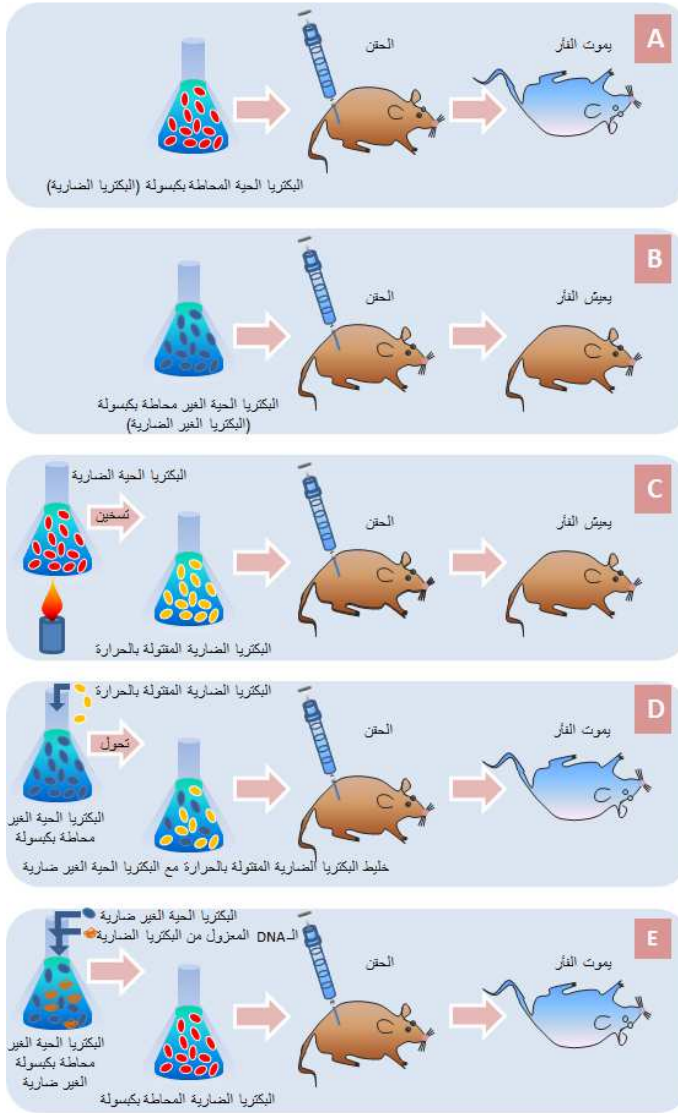
Maclyn McCarty

في تلك السنوات تمكن هؤلاء العلماء من عزل وتنقية العامل المسؤول عن عملية التحول. وتوصلوا بأن طبيعة هذا العامل تشابه طبيعة الـ DNA وتختلف بشكل كامل عن طبيعة البروتين. وللتأكد من ذلك قاموا بإضافة الانزيمات المحللة للبروتين كالتربسين والكيموتربسين ووجدوا بأن تلك الانزيمات ليس لها أي تأثير يذكر على عامل التحول.

اذن أصبح البحث عن طبيعة عامل التحول يقتصر على الأحماض النووية الـ DNA والـ RNA فقط. وعليه، قاموا بإضافة الانزيم المحطم للـ RNA وهو الـ RNase، فلاحظوا أن ليس له تأثير يذكر أيضاً، ولكن عندما أضافوا الانزيم المحطم للـ DNA وهو الـ DNase لاحظوا تحطم الفعالية البايولوجية لعامل التحول.

اذن العامل المسؤول عن التحول هو الـ DNA وليس غير الـ DNA. نشرت هذه النتائج في عام 1944 ولكنها مازالت مرفوضة في المجتمع العلمي آن ذاك حيث أن العديد من المختصين بهذا المضمار مازالوا مصرين على أن البروتين هو المادة الوراثية. وهذا هو الذي أسس لدور الـ DNA كمادة وراثية للخلية البكتيرية. وجد هؤلاء الباحثين بأن الـ DNA المستخلص من السلالة الضارية (المسببة للمرض) لبكتريا الـ *Streptococcus pneumoniae* والمعروفة أيضاً بالـ *pneumococcus* تحول السلالة الغير ضارية وراثياً لهذا الكائن إلى الشكل الضاري (شكل 6.1).

استنتج Avery وجماعته بأن الـ DNA المستخلص من السلالة الضارية قد حمل رسالة وراثية قابلة لتوريث الضراوة بين الأجيال. لم يتقبل أي شخص يتقبل تلك الاستنتاجات، بسبب وجود البروتين الذي يلوث الـ DNA والذي يمكن أن يكون ناقلاً للمعلومات الوراثية. وبعد عدة تجارب، حالما استبعد الباحثون هذه الظاهرة وذلك بمعاملة الـ DNA بالإنزيمات الهاضمة والتي لم تحطم الفعالية التحولية *transforming activity*، ولكن المعاملة بإنزيم الـ DNase (الإنزيم المحطم للـ DNA) قامت بذلك.



شكل (6.1): تجربة Avery-MacLeod-McCarty. (a) عند حقن السلالة المحاطة بكبسولة بالفئران، تموت الفئران نتيجة هذا الحقن، أي توصف هذه السلالة بالقاتلة (b) بينما تكون السلالة الغير محاطة بكبسولة (c) كما هو عليه الحال في السلالة المحاطة بكبسولة والمقتولة بالحرارة غير مؤذية. (d) بين بحث مسبق أجري من قبل Frederick Griffith بان إضافة البكتريا الضارية المقتولة بالحرارة (الغير مؤذية للفئران) إلى السلالة الحية الغير ضارية تحول الأخيرة بشكل مؤقت إلى بكتريا ضارية محاطة بقلنسوة. (e) استخلص Avery وجماعته الـ DNA من بكتريا الـ *Pneumonia* المقتولة بالحرارة، مزيلاً المكون البروتيني قدر المستطاع، وأضاف هذا الـ DNA إلى البكتريا الغير ضارية. إن الـ DNA الداخل إلى البكتريا الغير ضارية، قد حولها تلك السلالة بشكل مؤقت إلى سلالة ضارية (تصميم المؤلف).

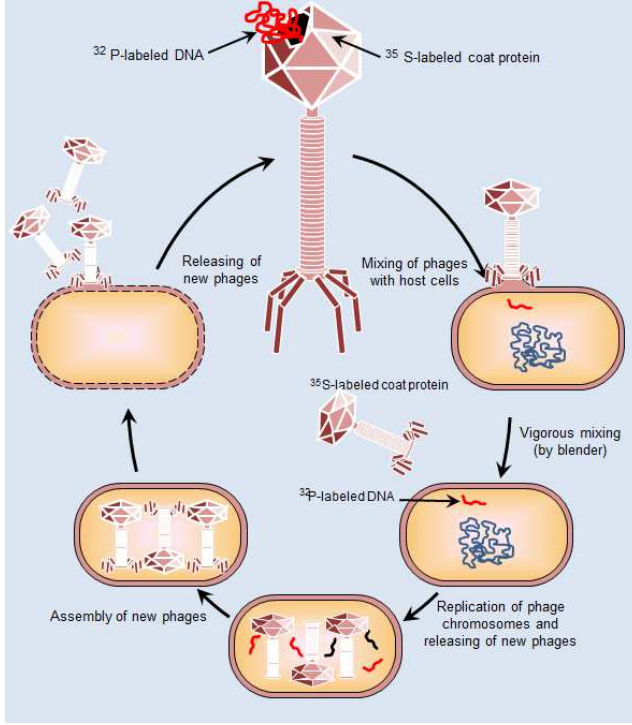


Alfred Hershey

ان الافادة الأخرى التي أكدت على أن الـ DNA هو المادة الوراثية قد أتت من النتائج التي حصل عليها كل من Chase و Hershey من دراستهم لكيفية خمج الفايروس T2 لبكتريا القولون. يتكاثر العاثي T2 عن طريق التصاقه بالغلاف الخارجي للخلية البكتيرية وحقنه لمادته الوراثية داخل الخلية حيث تتضاعف وتوجه الخلية لكي تصنع بروتينات العاثي لتتعبأ المادة الوراثية في النهاية ضمن بروتينات العاثي لتنتقل الى خارج الخلية عن تحللها. وفي الوقت الذي كان فيه هاذين الباحثين يدرسان تلك الظاهرة (حيث نشر بحثهما في عام

1952) لم يكن يدرك الباحثون أن ذاك في علم البايولوجي كيف يتكاثر العاثي بالتفصيل. كل ما يعرفوه هو أن العاثي T2 يتألف من 50% بروتين و 50% حمض نووي، كما أنهم يعلمون بأن العاثي يرتبط بسطح الخلية البكتيرية ليتحرر منها بعد اكتمال دورته. ولكن الشيء الغير معلوم عندهم هو كيفية انتقال المادة الوراثية من جيل الى جيل آخر. لذا قام هذين الباحثين بتتبع مصير البروتين والـ DNA لهذا العاثي باستخدام النظيرين المشعين (isotops) الفسفور والكبريت لأن أي جزيئة مرتبطة بتلك النظائر تصدر اشعاعاً يمكن بسهولة كشفها وبالتالي معرفة موقع الجزيئة المشعة أيضاً. وهنا، تم استخدام نظير الفسفور المشع (^{32}P) في تعليم الـ DNA لأن الفسفور هو أحد مكونات العمود الفقري للـ DNA ونظير الكبريت المشع (^{35}S) في تعليم البروتين، لأن الكبريت هو أحد مكونات بعض الأحماض الأمينية للبروتين. اضعف الى ذلك ، عدم احتواء الـ DNA على كبريت وعدم احتواء البروتين على فسفور، وهذا يضمن عدم تداخل النتائج.

في البداية، قام هذان الباحثان بتنمية بكتريا القولون في وسط يحتوي على نظير الفسفور المشع، ثم خمجوا تلك البكتريا بالعاثي T2 بحيث أن كل العاثيات الجديدة سوف تحتوي على نظير الفسفور المشع. وقامو بتنمية جزء آخر من بكتريا القولون في وسط يحتوي على نظير الكبريت المشع، ثم خمجوا تلك البكتريا بنفس العاثي بحيث أن كل العاثيات الجديدة سوف تحتوي على نظير الكبريت المشع. وبعد ذلك تم خمجوا جزء آخر من بكتريا القولون الغير معلمة اشعاعياً بالعاثيات المعلمة بنظير الفسفور والكبريت المشعين. وبعد السماح لها بخرمج تلك البكتريا لوقت معين، وضعوا خلايا بكتريا القولون في مازج (blender) ونزعوا أغلفة البروتين الفارغة من الجدران الخلوية. ثم فصلوا أغلفة البروتين ونمّوا البكتريا المخموجة، وفي النهاية تحللت الخلايا لتخرج منها العاثيات الجديدة (شكل 7.1).



شكل (7.1): مخطط لتجربة
Hershey و Chase، وفيها تم
اثبات بأن المكون DNA للعائتي T2
هو الذي يحمل المعلومات الوراثية
بينما يعمل الغلاف البروتيني
(protein coat) كقشرة واقية
فحسب (تصميم المؤلف).

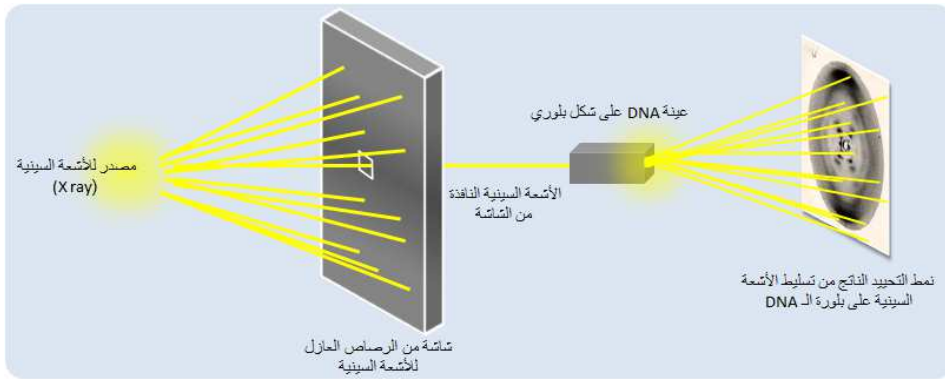
عندما قامت العائثيات المعلمة بنظير الكبريت المشع بجمع البكتريا، فإن معظم الأغلفة البروتينية المفصولة والمعلمة إشعاعياً بقيت في الخلايا. علاوة على ذلك، عندما تحررت العائثيات الجديدة من الخلايا، فلم تحتوي معظمهاً على فعالية إشعاعية. أشارت هذه النتيجة الى الحقيقة التي تقول بأنه على الرغم من أن المكون البروتيني للعائتي يكون ضرورياً لعملية الخمج، ولكنه لا يدخل الخلية ولا ينتقل الى العائثيات البنوية الناتجة. بالتناقض من ذلك، عندما خمج هذان الباحثان البكتريا بالعائثيات المعلمة بنظير الفسفور المشع وأزالوا الأغلفة البروتينية، استمرت البكتريا بفعاليتها الإشعاعية. والشيء الجدير بالاهتمام أكثر من ذلك، هو بعد تحلل الخلايا وتحرر العائثيات البنوية الجديدة فإن العديد من تلك العائثيات أصدرت فعاليات إشعاعية من نظير الفسفور المشع، وهذا يثبت بشكل لا يقبل الالتباس عبور DNA العائثيات الخامجة الى النسل الناتج. أكدت هذه النتائج بأن الـ DNA، وليس البروتين، هو المادة الوراثية.

اكتشاف الـ DNA

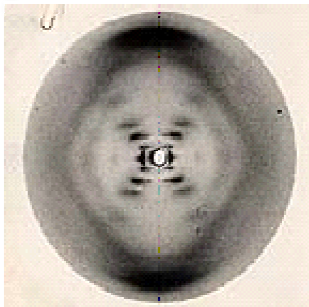
إن هنالك ثلاث خيوط من الأدلة قادت Crick و Watson في نظريتهما المعروفة وهي: الطبيعة الكيميائية لمكونات الـ DNA السابقة الذكر، وتجارب X-ray crystallography، وما يعرف بنسب جاركاف Chargaff's ratios.

تقنية الـ DNA X-ray crystallography

استخدمت Rosalind Franklin، وزملائها في بداية الخمسينات من القرن الماضي طريقة الـ X-ray crystallography (وهي تقنية تستخدم لمعرفة التركيب ذو الأبعاد الثلاثية three dimensional structure للجزيئات) لتحليل تركيب الـ DNA. رتبت جزيئات الـ DNA في البلورة بنمط منظم بحيث عندما تسقط حزمة من أشعة X على البلورة، فإن هذه الأشعة سوف تتبدد بنمط منظم. ويمكن تسجيل نمط التبدد على فيلم فوتوغرافي أو من قبل أجهزة مسيطر عليها من قبل الكمبيوتر. تعتمد طبيعة هذا النمط على تركيب البلورة (شكل 8.1).



شكل (8.1): مخطط يوضح خطوات تقنية DNA X-ray crystallography (تصميم المؤلف).



وجد إن التصلب cross الموجود في مركز الصورة الفوتوغرافية (شكل 9.1) يدل على أن الجزيئة حلزون helix، أما المناطق السوداء في القمة والقعر فإنها تأتي من القواعد bases المتراصة عموديا على المحور الرئيسي للجزيئة.

شكل (9.1): النمط المتبدد لحزمة أشعة X المار خلال الـ DNA المتبلور (Omoto and Larquin, 2004).



Maurice Wilkins



Rosalind Franklin

اقترحت Rosiland

Maurice Wilkins و Franklin من هذه النتائج بأن الـ DNA متألف شريطين ملتقين على بعضهما البعض على شكل حلزوني. إن ملاحظة كون الـ DNA حلزون مزدوج قد وفرت دليلاً رئيسياً قاد Watson و Crick لمعرفة تركيب الـ DNA بشكل قاطع.

نسب جاركاف Chargaff's ratios

إلى الوقت الذي كان Chargaff يعمل في مجال الـ DNA، عانى العلماء الكثير من الجهد المظني تحت ظلال فرضية خاطئة تدعى بفرضية النيوكليوتيدات الرباعية tetra nucleotide hypothesis والتي يعتقد بها بأن الـ DNA يتكون من كميات متساوية من القواعد الأربع، ولهذا، فإن أصغر وحدة DNA تتألف من DNA متكون من نسخة واحدة من هذه القواعد الأربع. حلل Chargaff بعناية المكونات القاعدية للـ DNA في أنواع مختلفة للكائنات الحية. لقد وجد وعلى الرغم من أن الكميات النسبية للنيوكليوتيدات المعطاة تختلف بين الكائنات، إلا أن كمية الـ adenine مساوية لكمية الـ thymine، وكمية الـ guanine مساوية لكمية الـ cytosine. وعلى سبيل المثال، إذا كان DNA الإنسان يحتوي

على نسبة 30% لكل من الأدينين والثايمين، فتكون نسبة كل من الكوانين والسيتوسين 20%. هذا يعني، أن الـ DNA في كل الكائنات المدروسة فإن هنالك تطابق بنسبة 1 إلى 1 ما بين قواعد الـ purine والـ pyrimidine. وهذا يعرف بقاعدة Chargaff.



Erwin Chargaff



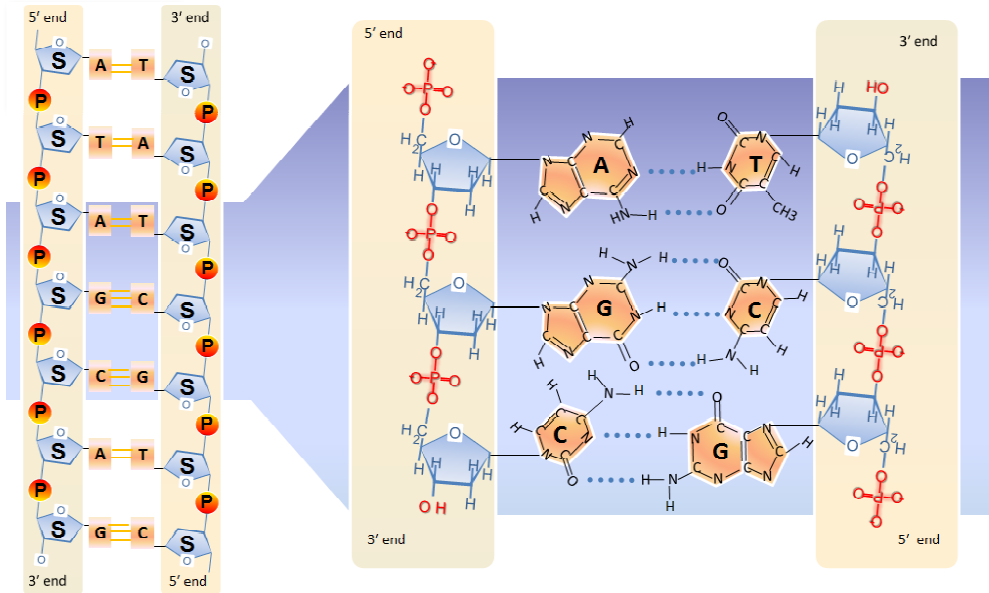
فرضية tetranucleotide hypothesis

لكن ملاحظات Chargaff نفسه لم تثبت فرضية النيوكليوتيدات الأربع، حيث لا حظ بأن القواعد الأربع للـ DNA بأنها ليست بنسبة 1:1:1:1. إن هذه النتائج قد أعطت لمحة من التبصر لكل من Watson و Crick لتطوير الموديل اللذان ما زالا عاكفين على تطويره منذ ذلك الوقت. وعلى الرغم مما ساقه Erwin Chargaff في فرضيته، إلا أنه حل

لغز الازدواج القاعدي جزئياً، لأنه بين بأن نسبة الأدنين تكون عادة مساوية لنسبة الثايمين، وكذلك الحال بالنسبة للكوانين والساييتوسين.

موديل واطسن وكريك Watson-Crick model

بعد تلك التجارب المذكورة آنفاً، تراكمت لدى Watson الكثير من المعلومات التي مكنته من تخيل كيفية حدوث الازدواج القاعدي. وفي شهر فبراير عام 1953، برقت له Watson ومضة من التبصر عندما رأى بأن أصرة الأدنين والثايمين هي بطول أصرة الكوانين والساييتوسين تماماً. وإذا ما ازدوجت الأواصر بهذه الطريقة، فإن الدرجة الواحدة من السلم الحلزوني سوف تكون بطول مساوي للدرجات الأخرى. باعتماد كل من Watson و Crick على تلك المعطيات سابقة الذكر، تمكنا من معرفة تركيب الـ DNA في جامعة Cambridge عام 1953، ثم حصل كلاهما على جائزة نوبل Nobel Prize في عام 1962. وضمن المعلومات المتاحة، بدأ Watson و Crick بعمل موديلاتهم الجزيئية. لقد وجدوا بأن تركيب الـ DNA المعقول هو حلزونان ملتقان على بعضهما البعض (حلزون مزدوج double helix) ذو عمود فقري متكون من سكر فوسفات sugar-phosphate backbone إلى الخارج بينما تقع القواعد النتروجينية إلى الداخل (شكل 10.1).

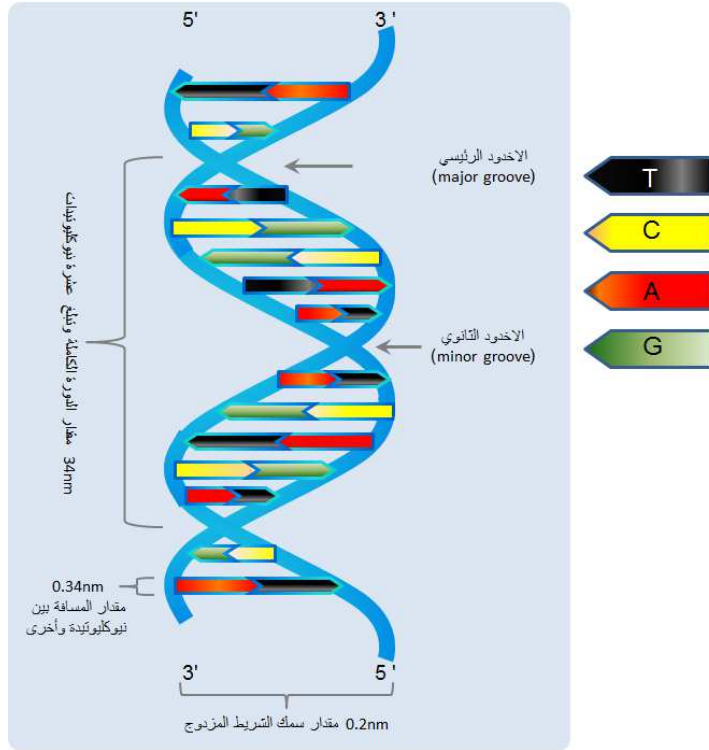


شكل (10.1): حلزون الـ DNA المزدوج: التركيب الكيميائي للـ DNA حيث تتجه في القواعد النتروجينية إلى الداخل بينما تتجه فيه السكر والفوسفات إلى الخارج مؤلفاً للعمود الفقري للجزيئة. في يسار الشكل يبرز الهيكل الخارجي (السكر - فوسفات) إلى الخارج بينما ترتبط القواعد النتروجينية مع بعضها البعض بواسطة الأواصر الهيدروجينية. في يمين الشكل توضح تفاصيل تلك الارتباطات (تصميم المؤلف)

يتناسب هذا التركيب مع أبعاد الـ DNA المقترحة في تقنية X-ray crystallography إذا كانت القواعد من شريطين معاكسة واحدة للأخرى وكونت أدراج السلم الحلزوني. إن أبعاد الحلزون المزدوج هي 20 انكستروم تقريباً (10 انكستروم تساوي نانوميتر واحد) إذا كان هنالك قاعدة purine واحدة وقاعدة pyrimidine واحدة للشعاع العرضي الواحد (شكل 11.1). أن اثنان من الـ purines سوف تكونان كبيرتان جداً، كما أن اثنان من الـ pyrimidines سوف تكونان صغيرتان جداً.

وبعد تجارب أخرى مع هذه الموديلات، وجد Watson و Crick بأن الازدواج الهيدروجيني hydrogen bonding ضروري لتكوين أدراج السلم الحلزوني والذي من الممكن أن يحدث بسهولة بين أزواج قاعدية معينة (تلك الأزواج التي وجدها Chargaff بتكرارات متساوية). تتسم الأواصر الهيدروجينية بأنها أواصر ضعيفة جداً، وتتكون بين ذرتين سالبتين الشحنة، كما في ذرة الأوكسجين وذرة النتروجين. وللأواصر الهيدروجينية قوة تقدر بـ 3-5% من قوة الأواصر التساهمية. يثبت الازدواج الهيدروجيني ثرموديناميكية بين الـ thymine والـ adenine وبين الـ cytosine والـ guanine (شكل 11.1). تدعى هذه العلاقة بالمتكاملية complementarity. هنالك اثنان من الأواصر الهيدروجينية بين الـ adenine والـ thymine وثلاثة بين الـ cytosine والـ guanine. وعلى أية حال، بما أن $A=T$ و $C=G$ (حسب قاعدة Watson و Crick)، لذا فإن الكمية الإجمالية للـ purine مساوية للكمية الإجمالية للـ pyrimidine، كما في المعادلة الآتية $A + G = T + C$.

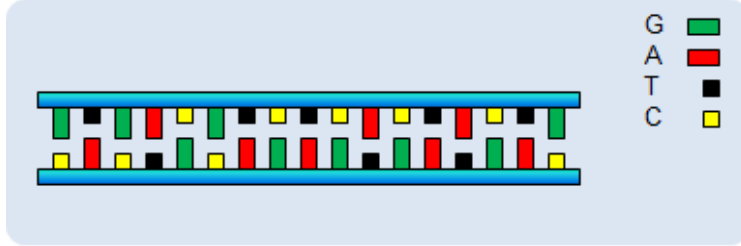
هنالك نوعين من الأخاديد على طول سطح جزيئة الـ DNA : أحدهما واسع وعميق – الأخدود الرئيسي major groove – والآخر ضيق وضحل – الأخدود الثانوي minor groove – كلتا هاتين الأخاديد كبيرة بما يكفي وذلك لكي تسمح للجزيئات البروتينية بالارتباط مع القواعد (شكل 11.1). في كل حالة، تزوج القاعدة النتروجينية الأضخم، أي ذات الحلقتين (البورين) بالقاعدة النتروجينية ذات الحلقة الواحدة (البريميدين)، حيث – وكما هو موضح في أعلاه – يزدوج الأدينين مع الثايمين، والكوانين مع الساييتوسين (شكل 11.1). ولزيادة كفاءة رص الأزواج القاعدية، التفّ العمودين الفقريين المتكونين من السكر والفوسفات المتعاقبين على بعضهما البعض بشكل حلزوني ليكونان حلزوناً مزدوجاً double helix، والذي تصنع كل عشرة أزواج قاعدية منه دورة كاملة (لفة كاملة بمقدار 180 درجة) (شكل 11.1).



شكل (11.1): مخطط لـ DNA المزدوج حيث يوضح فيه أبعاد أكثر أشكال الحلزونات المزدوجة شيوعاً في الخلايا، وفيه الاخدودين الرئيسيين والثانوي. يشير اللون الأخضر للكوانين والأصفر للسايتوسين والأسود للثايمين والأحمر للأدينين (تصميم المؤلف)

ارتبطت النيوكليوتيدات تساهمياً مع بعضها البعض في السلسلة من خلال مجاميع السكر والفوسفات، وبهذا تكون "عموداً فقرياً" من مجاميع "سكر - فوسفات - سكر - فوسفات - سكر - فوسفات" متعاقبة. ولكن سلسلة الـ DNA الطويلة تتكون من نيوكليوتيدات كثيرة لا تختلف إلا في قواعد النتروجينية التي يبلغ عددها أربع، لذا، فمن المعقول تشبيه سلسلة الـ DNA بالقلادة necklace المتكونة من خرز بأربعة ألوان. ومن المهم أن نلاحظ بأن سلسلة الـ DNA ذات نهايتين، أحدهما تنتهي بمجموعة فوسفات 5' phosphate، والأخرى تنتهي بمجموعة هيدروكسيل 3' hydroxyl، ومن المهم أن نلاحظ أيضاً بأن اتجاه تخليق النيوكليوتيدات هو من 5' إلى 3'، لذا أصبح لزاماً علينا أن نقرأ تسلسل القواعد في الـ DNA أو حتى في الـ RNA من 5' إلى 3' (أنظر الفصل الثالث). وهناك نقطة أخرى حول تركيب الـ DNA تتعلق بحقيقة وجود ما يعرف بالقطبية polarity في كل شريط. هذا يعني، أن نهاية واحدة من أحد الشريطين تمتلك 5' phosphate والنهية الأخرى

تمتلك مجموعة 3' hydroxyl ووجد Crick و Watson بأن الازدواج الهيدروجيني سوف يحدث إذا كان قطبية الشريطين تتجه نحو اتجاهين متعاكسين، هذا يعني، بأن الشريطين متضادي الاتجاه (antiparallel شكل 12.1)، ولنفرض غياب صفة تضادية الاتجاه لكلا الشريطين فان هذا يعني عدم وجود الأواصر الهيدروجينية بينهما، أي وبمعنى آخر، لتكوين الأواصر الهيدروجينية بين الشريطين، فلا بد من أن يكونا متضادي الاتجاه.



شكل (12.1): مخطط يوضح حلزون الـ DNA المزدوج الذي تظهر فيه صفة ازدواجية الاتجاه بين شريطيه. يشير اللون الأخضر للكوانين والأصفر للسايتوسين والأسود للثايمين والأحمر للأدينين (تصميم المؤلف).

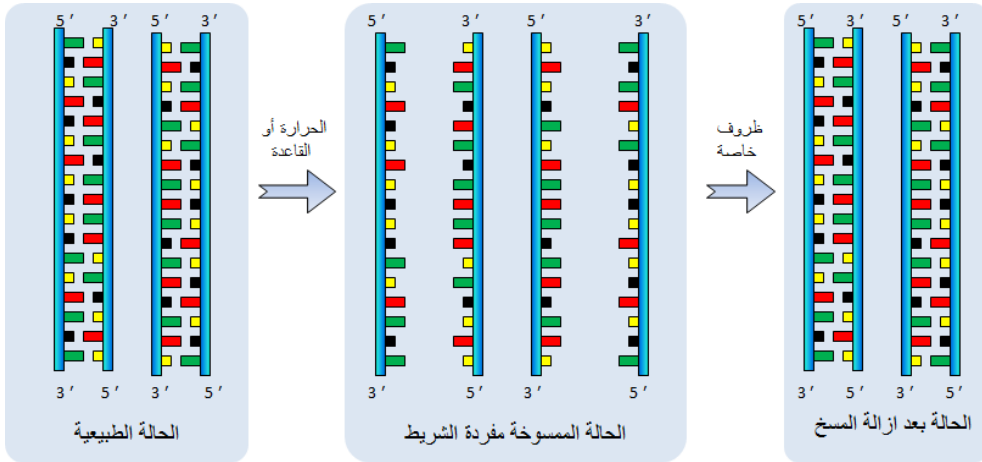
إنّ العلة من وجود الازدواج القاعدي بين القواعد النتروجينية المتممة تكمن في كون أن أحد شريطي الـ DNA ممكن أن يعمل كقالب template لتخليق الشريط المكمل الثاني. وهكذا، فإن الأحماض النووية لها قابلية متفردة على توجيه تضاعفها الخاص بها، ومن هنا امتلكت الأحماض النووية صفة السيادة على جزيئات الخلية (لا توجد أية جزيئة أخرى في الخلية تحمل هذه الصفات) حيث تحمل المعلومات المحمولة في الـ DNA عادة إلى الـ RNA ومنه إلى البروتينات proteins وتسيطر الأخيرة على معظم فعاليات الخلية.

من الجدير بالذكر ان الحلزون المزدوج ربما يجسّد وذلك بتخيّل الشكل الذي سوف يظهر عندما يأخذ أحدها سلماً ويلويه إلى شكل حلزوني بينما يبقى سلّمه بوضعه العمودي. تكوّن جزيئات السكر والفوسفات سياج (العمود الفقري) السلّم والذي يتعاقب فيه السكر مع الفوسفات. أما درجات السلّم فأنها تتكون من قبل purine واحد و pyrimidine واحد. وضمن كل سلسلة (السياج)، فمن الممكن أن تتواجد القواعد النتروجينية الأربع بأي نسب وبأي نظام. هذا ولابد من الإشارة الى أننا قد قمنا بدراسة التركيب الأولي والثانوي لجزيئة الـ DNA فقط، حيث يشير التركيب الأولي primary structure للـ DNA الى كيفية ارتباط النيوكليوتيدات ببعضها البعض، بينما يشير التركيب الثانوي secondary structure للـ DNA الى التركيب الثلاثي الأبعاد (three dimensional configuration) للتركيب الحلزوني المكتشف من قبل Crick و Watson، أما التركيب الثالثي tertiary structure للـ DNA فيشير الى كيفية تعبئة الـ DNA الى كروموسومات (أنظر أدناه).

مسح الدنا DNA denaturation

أشارت دراسات المسح إلى أن الازدواج الهيدروجيني في الـ DNA يحدث في الطريقة المقترحة من قبل Watson و Crick. ولو أن الأواصر الهيدروجينية ضعيفة جدا بشكل منفرد، إلا أنها تعطي إستقرارية تركيبية للجزيئة عندما يزداد عددها. وعلى أية حال، فمن الممكن كسر الأواصر الهيدروجينية وفصل شريطي الـ DNA وذلك بتسخين جزيئة الـ DNA في الماء. وعند زيادة التسخين إلى نقطة معينة، فإن التهييج الحراري thermal agitation يتغلب على الازدواج الهيدروجيني وتصبح الجزيئة ممسوخة denatured، أو منصهرة melted (شكل 13.1).

ومن المنطقي القول انه كلما ازدادت الأواصر الهيدروجينية التي يحتوي عليها الـ DNA، كلما ازدادت الحرارة المطلوبة لمسحه. أي كلما ازدادت نسبة المكون G-C في جزيئة الـ DNA، كلما ازدادت الحرارة المطلوبة لمسح ذلك الـ DNA. هذا ومن الجدير بالذكر بأن الحرارة وحدها هي ليست الماسخ الوحيد لجزيئة الـ DNA وإنما تقوم بعض المعاملات الكيميائية – كما في القاعدة والـ formamide واليوريا وغيرها – بنفس هذا الدور في مسح جزيئة الـ DNA. يمكن لجزيئات الـ DNA مفردة الشريط الناتجة من أن تتحد مع مكملاتها لكي ترجع إلى حالتها مزدوجة الشريط مجدداً، وهذا هو عكس لعملية المسح عموماً كما في رجوع الحرارة إلى درجة حرارة المختبر، وتدعى هذه العملية بالـ (renaturation شكل 13.1).



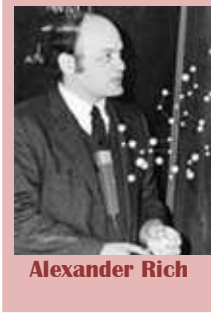
شكل (13.1) : مخطط يبين حدوث عملية المسح والمسخ المعاكس لجزيئة الـ DNA (تصميم المؤلف)

أشكال الـ DNA :

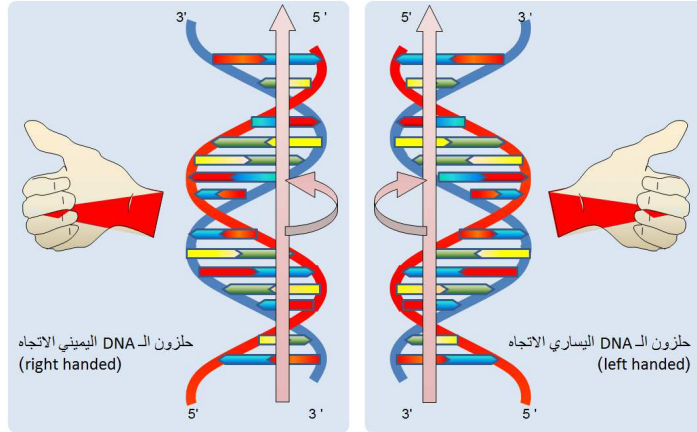


إن شكل الـ DNA الذي وصف لحد الآن يدعى B DNA. أنه حلزون يتجه من اليسار نحو اليمين right-handed helix، حيث أنه يدور مع عقارب الساعة clockwise manner عند استعراض محوره. وتكون قواعده مترابطة بشكل عمودي تماما على المحور الرئيسي، وتصنع كل عشرة أزواج قاعدية لفة كاملة بقدر 34 أنكستروم (شكل 14.1). إن شكل B هو الشكل الأكثر شيوعا. وعلى أية حال، يمكن أن يتواجد الـ DNA بأشكال أخرى، فإذا كان محتوى الماء أكثر من 75%، عند ذلك فإن حلزونات الـ DNA المزدوجة تندفع نحو بعضها البعض وتكوّن تركيبا جديدا يدعى A DNA، والذي يمتاز بوجود 11 زوج قاعدي للفة الواحدة. وبهذا الشكل A DNA تتحني القواعد قليلا بالنسبة للمحور الرئيسي. إن هذا الشكل وأشكال معروفة أخرى لا مجال لذكرها هنا هي تغيرات ثانوية نسبيا من الشكل B ذو الدوران اليميني الشائع.

شكل (14.1) : مخطط يبين تركيب الـ DNA الشائع والمعروف بـ B DNA (تصميم المؤلف).

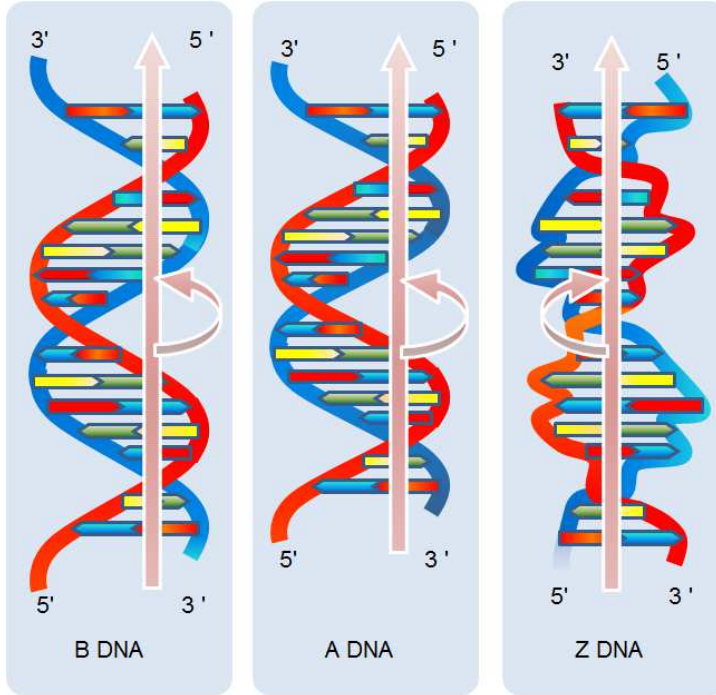


لكن الشئ الجدير بالذكر في هذا المضمار هو اكتشاف Rich وزملائه في جامعة MIT في عام 1979 حلزوننا يساري الاتجاه left-handed helix (شكل 15.1)، وأطلقوا عليه اسم Z DNA لأن عموده الفقري يكون تركيبا متعرجا zigzag structure.



شكل (15.1): شكل يوضح الاتجاه التقليدي (اليميني أو مع عقارب الساعة) للـ DNA وهو نفس الاتجاه الملاحظ في B DNA ومشتقاته، والاتجاه الآخر للـ DNA النادر الحدوث (اليساري أو ضد عقارب الساعة) وهو نفس الاتجاه الملاحظ في Z DNA (تصميم المؤلف).

لقد اكتشف الـ Z DNA بطريقة X-ray crystallography لجزيئات DNA صغيرة جدا تتألف من تسلسلات G-C المتكررة في شريط، وتسلسلات C-G المتكررة المتممة في الشريط المقابل له. يبدو أن Z DNA مشابه لـ B DNA من حيث أن قواعده تلتف لـ 180 درجة أيضاً، ولكن التفافها هنا ينتج في شكل متعرج، ذو تركيب يساري الاتجاه (شكل 16.1).

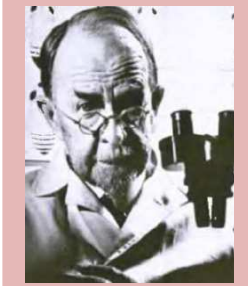


شكل (16.1): التركيب ثلاثي الأبعاد لجزيئة الـ DNA المتعرجة والمعروفة بـ Z DNA مقارنة بتركيب الـ A DNA والـ B DNA (تصميم المؤلف).

ان تركيب Z DNA يكون أنحف بشكل ملحوظ مقارنة بـ B DNA ويحتوي على 12 زوج قاعدي للفة الواحدة بدلا من 10. يعتقد أن تركيب Z DNA أصلا أنه تركيب لا يستحق أن يكون محطا لاهتمام علماء الـ Biology كثيرا (مقارنة بنظيره B DNA) لأنه يحتاج إلى تركيز عال من الأملاح ليصبح مستقرا، كما ان وظيفته البايولوجية غير واضحة لحد الآن في ذلك الوقت. ولكن بعد اجراء العديد من التجارب تم اثبات أن Z DNA يمكن أن يستقر في الظروف الفسيولوجية الطبيعية اذا ما أضيفت مجاميع المثل الى مخلفات السايكوسين. والآن، أصبح من الواضح دخول الـ Z DNA في تنظيم التعبير الجيني في الكائنات حقيقية النواة (أنظر الفصل السادس). وعلى أية حال، فعلى الرغم من أن كلا الـ Z DNA و B DNA يشتركان بكونهما يشكلان حلزوناً مزدوجاً، وكليهما يتألفان من أشرطة نيوكليوتيدية متعكسة، بالإضافة إلى أبدائهما نفس النمط في ارتباط القواعد

النتروجينية الكوانين مع السائتوسين ، إلا ان مقدار الاختلافات المذكورة في أعلاه يفوق التشابهات بكثير.

تعبئة الدنا DNA packaging



Thomas Morgan

في بداية عام 1902 لا حظ بعض الباحثين انفصال الكروموسومات خلال الانقسام الاختزالي meiosis بالطريقة التي افترضها مندل. ولكن ارتباط جين محدد بالكروموسوم لم يكتشف إلى حين عام 1910 وذلك عندما أثبت ثوماس موركان Thomas Morgan الوراثة المرتبطة بالجنس في طفرة العين البيضاء white-eye mutation في ذبابة الدروسوفيلا. وفي بداية عمل موركان، كان من المعروف آنذاك بوجود الكروموسومات في الخلايا، ولكن أهميتها غير معروفة ولم يهتم فيها. وقد افترض بعض الباحثين بأن الكروموسومات تحمل

المادة الوراثية ولكنهم لم يمتلكوا الأدلة الكافية لدعم هذه الفرضية المهمة، لذا وفر موركان الدليل الذي يؤكد بأن الكروموسومات هي الدقائق المسؤولة عن التوريث، حيث صمم موركان نظرية الكروموسوم للتوريث، والتي عاملت الجينات كدقائق غير قابلة للانقسام مصطفة على شكل خرز على حبل لتكون الكروموسوم. وفرت تلك الأنماط الارتباطية أدلة لمعرفة نظام الترتيب الطولي على الكروموسومات ولفهم عملية إعادة الارتباط وإعادة الترتيب الكروموسومية (أنظر الفصل التاسع).

سوف نرى كيف تنتظم الجينات في الكروموسومات (أنظر الفصل الثاني)، ولكن ولكي نكون كروموسوم وظيفي، يجب أن تكون جزيئة الـ DNA لها القدرة على أن تتضاعف، أما النسخ المتضاعفة فيجب أن تنفصل وتوزع بشكل متساوي إلى الخلايا البنية daughter cells في كل تضاعف تجريه الخلية. تحدث هذه العملية من خلال سلسلة من المراحل، والمعروفة بأجمعها بدورة الخلية cell cycle.

تعبئة الـ DNA في الكائنات بدائية النواة Prokaryotes

تعد البكتريا كائنات أحادية النواة unicellular organisms والتي تفتقد للغلاف النووي. يكون شكل الكروموسوم البكتيري دائري عادة والذي يحتوي على جزيئة DNA مفردة مؤلفة من عدة ملايين من الأزواج القاعدية. وعلى سبيل المثال يبلغ طول جينوم بكتريا القولون حوالي 4.6×10^6 (4.6 مليون زوج قاعدي من الـ DNA).

لا تعد جينات الكائنات حقيقية النواة أكثر تعقيدا بكثير من تلك التي في بدائية النواة فقط ، ولكن ينتظم DNA الكائنات حقيقية النواة بشكل مختلف عن الـ DNA في بدائية النواة.

يتكون الجينوم في الكائنات بدائية النواة من كروموسوم مفرد، والذي تكون عادة عبارة عن جزيئة DNA دائرية circular DNA molecule. وبالتناقض مع ذلك، يتألف جينوم حقيقية النواة من كروموسومات متعددة، كل منها عبارة عن جزيئة خطية linear molecule من الـ DNA. وكما تم مناقشة ذلك، يرتبط DNA الخلايا حقيقية النواة بإحكام ببروتينات قاعدية صغيرة تدعى بالهستونات histones، والتي تضطلع بتعبئة الـ DNA بأسلوب منظم داخل نواة الخلية. تعد هذه الوظيفة في غاية الأهمية في معظم الكائنات حقيقية النواة. كذلك تعد عملية التعبئة في الكائنات بدائية النواة مشكلة أيضاً، ولكن طريقة التعبئة هنا مختلفة عن تلك التي في حقيقية النواة، كما سيتضح ذلك.

معظم البكتيريا تحتوي على مادة وراثية تتألف من جزيئة DNA دائرية عادة. في الكروموسومات البكتيرية الدائرية، لا يوجد الـ DNA بشكل دائرة مرتخية أو مفتوحة لعدم قدرة تلك الدائرة على الولوج الى داخل الخلية البكتيرية. لا يرتبط الـ DNA في البكتيريا بالبروتينات الهستونية (كما في البروتينات الهستونية التي سيتم مناقشتها في كروموسومات حقيقة النواة الخطية الشكل). وبالتالي، يدعى الكروموسوم البكتيري لهذا السبب "الـ DNA العاري"، ولكن هذا المصطلح غير صحيح، لأن الكروموسوم البكتيري يكون معقدات مع عدد من البروتينات التي ترتبط معه لتساعده على التكثف. وعند رؤية الكروموسوم البكتيري تحت المجهر الإلكتروني، فإنه يظهر على شكل كتل مميز، وهذا يدعى بالـ nucleoid، والذي يكون مقيداً بمنطقة محددة من السايكوبلازم (أنظر أدناه). وإذا تم تحطيم الخلية البكتيرية بعناية، ينهمر منها الـ DNA كسلسلة من الانشوطات الملتفة (شكل 17.1). أما نهايات الانشوطات فتستبقى في وضعها بواسطة البروتينات. تحتوي العديد من البكتيريا على DNA اضافي بشكل جزيئات دائرية صغيرة تدعى بالبلازميدات، ستتم مناقشتها في الفصل التاسع.



شكل (17.1): شكل يوضح كيفية انطواء الكروموسوم البكتيري الدائري الى سلسلة من الانشوطات أو العروات الملتفة كما هو ملاحظ تحت المجهر الإلكتروني (Pierce, 2002).

يرتبط الـ DNA البكتيري ببروتينات تعبئه وتكثفه الـ DNA في الخلايا البكتيرية، أي إن لها وظيفة تشبه وظيفة الهستونات، إلا أنها تختلف عنها من حيث عدم امتلاكها لنفس التركيب. هذا ولم يعرف الكثير عن كيفية تعبئة الـ DNA البكتيري، إلا أنه من المتوقع عليه إن طول جزيئة الـ DNA لـكروموسوم بكتريا القولون المحتوى ضمن الخلايا التي هي بطول $2 \mu m$ تقريباً. إن جزيئة الـ DNA الحرة بهذا الحجم تحتاج إلى أن تتكثف لألف مرة حتى تصل إلى حجم خلية بكتريا القولون. وعلى أية حال، تعمل آليات عديدة لرص الـ DNA الكروموسومي لبكتريا القولون بشكل كافٍ ليتلائم مع الخلية البكتيرية. وعلى أية حال، ففي الكائنات بدائية النواة لا يمكن رؤية تركيب "الخرز على الحبل" beads on a string المشاهد في الكائنات حقيقية النواة (أنظر أدناه). وبما أن الكائنات بدائية النواة لا تمتلك غللاً نووياً nuclear envelope لذا، تضطجع الكروموسومات المتكثفة مع بروتيناتها المرتبطة بها بشكل حر في الساييتوبلازم مكونة منطقة تدعى بالـ nucleoid وهي المنطقة الواقعة في الخلية البكتيرية والتي تحتوي على الكروموسوم البكتيري وذلك لكي تؤكد على نوع من التشابه الوظيفي مع النواة الموجودة في الكائنات حقيقية النواة.

لا يمكن لجزيئة الـ DNA في بكتريا القولون من التواجد بشكل عارٍ، وعلى سبيل المثال، وإذا ما ألغينا تأثير الإنزيمات الهاضمة للـ DNA وافترضنا بأن جزيئة الـ DNA في بكتريا القولون غير مرتبطة بجزيئات أخرى، فلا يمكن لها إطلاقاً من أن تكثف نفسها وتدخل إلى الخلية، لأن عملية التكثف تحتاج إلى انطواء النيوكليوتيدات على بعضها البعض وهذا لا يمكن أن يحدث بسبب تنافر الشحنة charge repulsion ما بين مجاميع الفوسفات سالبة الشحنة. ولكن هذا لا يحدث حيث يتم صد هذا التأثير داخل الخلية وذلك بارتباط الـ DNA مع المجاميع متعددة الأمين موجبة الشحنة positively charged polyamines، كما في الـ spermine والـ spermidine، والتي تحجب الشحنات السالبة لمجاميع الفوسفات في الـ DNA بسبب شحنتها الموجبة.

بالإضافة إلى ذلك، هنالك العديد من جزيئات البروتين الصغيرة التي ترتبط مع الـ DNA الكروموسومي، مسببة لها بأن تنطوي إلى تركيب أكثر اندماجاً. إن أكثر هذه البروتينات وفرة، هو H-NS (وهو مختصر لـ histone-like nucleoid structuring)، والذي يرتبط بالـ DNA بإحكام ويقوم برصه بشكل ملحوظ، كما قد تم إثبات ذلك من خلال زيادة معدل ترسيب ولزوجة الـ DNA المرتبط بالبروتين H-NS مقارنة بالـ DNA الحر. وأخيراً، يلتف الـ DNA الكروموسومي لبكتريا القولون بشكل فائق محكم tightly supercoiled— هذا يعني، يلتف حول نفسه. يوجد في بكتريا القولون إنزيماً يدعى DNA gyrase والذي يستخدم الطاقة من التحلل المائي للـ ATP لكي يصنع لفاً

فائقا سالباً بالـ DNA (أنظر الفصل الثالث). تساهم اللفات الفائقة supercoils في عملية الرص الفائق الضرورية لجعل الـ DNA الكروموسومي ملائماً لحجم الخلية.

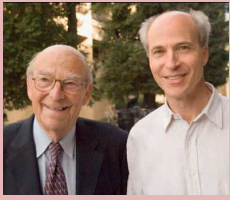
تعبئة الدنا في الكائنات حقيقية النواة

تنقسم البروتينات التي ترتبط بالـ DNA في الكائنات الراقية إلى صنفين رئيسيين: الهستونات histones، والبروتينات الكروموسومية الغير هستونية nonhistone chromosomal proteins. إن المعقد الذي يتكون من ارتباط كلا هذين الصنفين البروتينيين مع الـ DNA النووي في الخلايا حقيقية النواة يدعى بالكروماتين chromatin.

يحتوي الكروماتين نموذجياً على كمية بروتين مساوية لكمية الـ DNA. إن البروتينات الأساسية في الكروماتين هي الهستونات histones، والتي هي عبارة عن بروتينات صغيرة تحتوي على نسب عالية من الأحماض الأمينية القاعدية basic amino acids (وهي arginine و lysine) والتي تسهل الارتباط بجزيئة الـ DNA ذات الشحنة السالبة negatively charged DNA. إن طبيعة هذا الارتباط هو ارتباط الكترولستاتيكي electrostatic attraction، حيث تتجذب الهستونات ذات الشحنة الموجبة positively charged بسبب وجود الأحماض الأمينية الموجبة إلى جزيئة الـ DNA ذات الشحنة السالبة negatively charged بسبب وجود مجاميع الفسفور وتعمل بكفاءة على معادلة شحنة الـ DNA. لكن طبيعة هذا الارتباط غير مستقرة، لذا تعمل هنا بروتينات متخصصة على تثبيت هذا الارتباط بين الهستونات والـ DNA، وتدعى هذه البروتينات بالنيوكليوبلازمين nucleoplasmin، والتي وبمساعدها ترتبط الهستونات بالـ DNA لتكون تركيب النيوكليوزوم nucleosome. وعلى الرغم من توسط هذه البروتينات في تلك العملية، إلا إنها لا ترتبط بالـ DNA ولا بالكروماتين. أما البروتينات الكروموسومية غير الهستونية nonhistonic chromosomal proteins فهي على الرغم من كميتها القليلة مقارنة بكمية الهستونات إلا أنها تتواجد بأنواع مختلفة، وهي ذات طبيعة حامضية acidic، تساهم تلك البروتينات في فعاليات كثيرة منها تضاعف الـ DNA والتعبير الجيني gene expression (أنظر الفصل السادس).

أما بالنسبة إلى المكون الـ DNA، فيحتوي مجين الكائنات الراقية على كميات DNA أكثر من تلك المطلوبة للجينات لأن معظم الـ DNA لا يحتوي على وظائف مشفرة (أنظر الفصل الثاني).

اكتشاف النيوكليوسوم

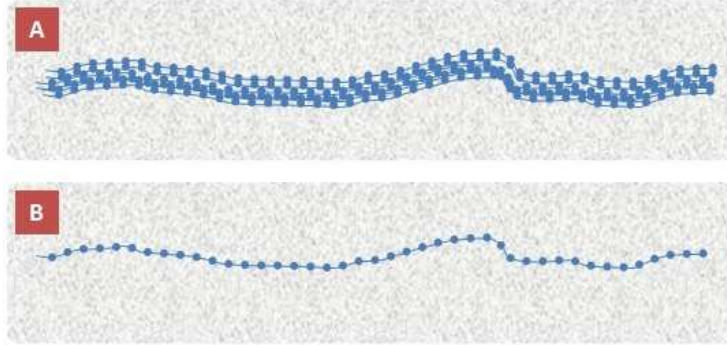


The father Arthur Kornberg (left)
The son Roger Kornberg (right)

إن الوحدة التركيبية الأساسية للكروماتين هي النيوكليوسوم nucleosome، والذي أول من وصفها هو العالم Roger Kornberg في عام 1974. لقد قاد هذا العالم نوعان من التجارب التي أدت إلى وضع موديل لها. أولاً، تجارب الهضم الجزئي partial digestion (إن معنى الهضم الجزئي هو المعاملة المؤقتة للعينة بالإنزيم، والذي يعطي نتائج مختلفة عن الهضم الكامل complete digestion أحياناً) للكروماتين باستخدام إنزيم micrococcal nuclease (وهو إنزيم يحطم الـ DNA)، نتج من إضافة هذا الإنزيم إلى الكروماتين بظهور قطع DNA بطول 200 زوج قاعدي تقريباً. وبالتناقض مع ذلك، عرّض Kornberg جزيئة الـ DNA العارية (غير المرتبط مع البروتينات) إلى نفس ظروف الهضم من قبل نفس الإنزيم، ولكن كانت النتيجة مختلفة، إذ تكونت مساحة مستمرة من قطع بأحجام عشوائية. اقترحت هذه النتائج بأن ارتباط البروتينات بالـ DNA الكروماتين يحمي مناطق من الـ DNA من الهضم من قبل الإنزيم المحطم للـ DNA أي إنزيم nuclease، وبالتالي يمكن للإنزيم أن يهجم فقط على الـ DNA عند مواقع محددة مفصولة بمائتي زوج قاعدي 200 bp.

بالتناغم مع هذه الملاحظة، كشف المجهر الإلكتروني عن أن خيوط الكروماتين لها مظهر خرزي beaded appearance. بسبب وجود خرز اتخذت لها مواضع مفصولة عن بعضها البعض بمسافة 200 bp. وعندما حطمت أنوية الطور البيني بلطف شديد وفحص محتواها تحت المجهر الإلكتروني، لوحظ بأن معظم الكروماتين يكون بشكل ألياف بقطر 30 nm (شكل A18.1). وإذا ما عرّض الكروماتين إلى المعاملات التي تفتح التفافه جزئياً، فيمكن رؤيتها هنا تحت المجهر الإلكتروني كسلسلة من "خرز على حبل" (شكل B18.1). إن الحبل هو الـ DNA، وكل خرزة هي "جسيم النيوكليوسوم الصميمي nucleosome core particle" والتي تتألف من DNA ملتف حول البروتين الصميمي المتكون من الهستونات. إن الخرزة المتكونة على الحبل تمثل أول مستوى من مستويات تعبئة الـ DNA الكروموسومي.

وهكذا، اقترحت كلتا الدراستين (الهضم بإنزيم الـ nuclease، و فحوصات المجهر الإلكتروني) بأن الكروماتين يتألف من وحدات متكررة من 200 bp، والتي أطلق عليها بالنيوكليوسومات nucleosomes.



شكل (18.1) : النيوكليوسومات كما هي مبيّنة كمخطط تحت المجهر الإلكتروني. (A) الكروماتين المعزول مباشرة من نواة الطور البيني والذي يبدو تحت المجهر الإلكتروني كخيوط بسمك 30 nm. (B) يبين هذا المجهر الإلكتروني طول الكروماتين والذي قد أزيل تكثفه تجريبياً بعد الفصل ما بين النيوكليوسومات (تصميم المؤلف).

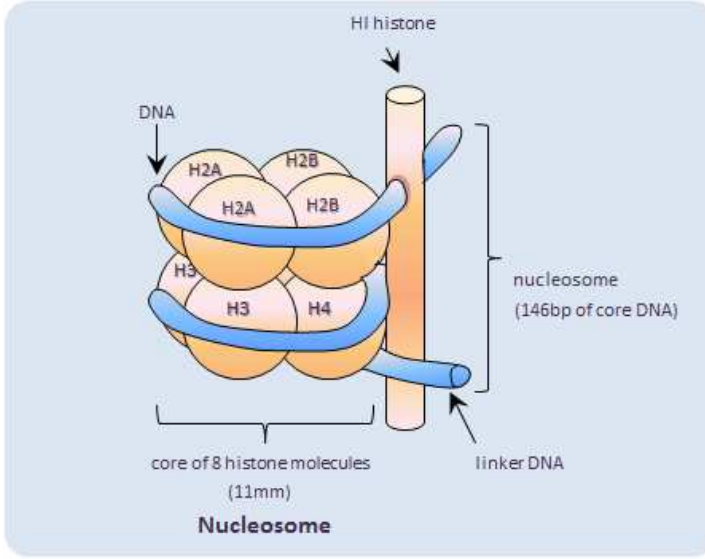
تركيب النيوكليوسوم nucleosome structure

بينت التحليلات المفصلة بأن هنالك دقائق في صميم النيوكليوسوم nucleosome core particles والتي تبين بأنها تحتوي على 146 bp من الـ DNA ملتف 1.75 مرة حول صميم هستون histone core ويتألف من جزيئتين من كل من H2A و H2B و H3 و H4 (الهستونات الصميمة core histones). بقي النوع الخامس من الهستونات والذي هو عبارة عن جزيئة واحدة وهي H1 والذي يرتبط بمدخل ومخرج النيوكليوسوم الصممي. إن هذا يكون وحدة كروماتين ثانوية تدعى بالـ chromatosome والتي تتألف من 166 bp من الـ DNA ملتفة حول الهستونات الصميمة وتحمل في مكانها بواسطة هستون H1 والذي يسمى بالهستون الرابط linker histone (شكل 19.1).

نتجت عملية تعبئة الـ DNA بالهستونات ليف كروماتيني بقطر 10-nm والذي يتألف من الـ chromatosome مفصولة بقطع الـ DNA الرابط linker DNA segments. إن تعبئة الـ DNA إلى ليف كروماتيني بقطر 10nm يقصر طوله بمعدل ستة مرات. ويمكن للكروماتين أن يتكثف لأكثر من ذلك، وذلك بواسطة التفاف coiling ستة نيوكليوسومات إلى ليف بطول 30-nm.

يلعب التداخل الحادث بين جزيئات الهستون H1 مع النيوكليوسومات المجاورة دوراً مهماً في مراحل تكثف الكروماتين. يلاحظ من هذا إن عملية التكثف الحاصلة في الكروماتين تستغل كون إن الهستون H1 هو أقل الهستونات إحكاماً في ارتباطه بالكروماتين، لذا من السهولة إزالته بعد ارتباطه، ومن هنا دخل دور هذا الهستون في عملية التكثف. أما آلية عمل الهستون H1، فهي آلية تعتمد على إضافة وإزالة مجاميع الفوسفات hyper-hypo

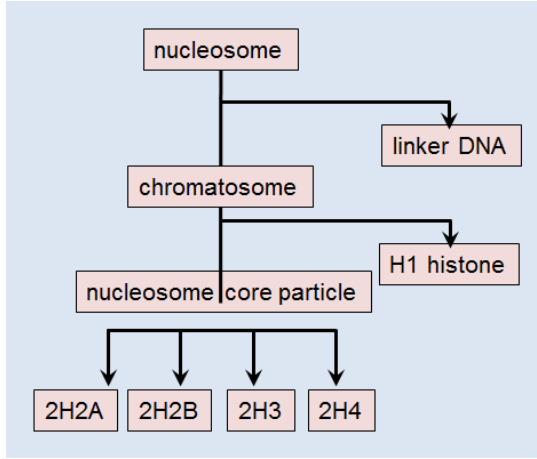
phosphorylation إلى الهستون H1 ، فعلى سبيل المثال، عندما تضاف مجموعة فوسفات إلى الهستون H1 فإنه ينفك عن مكانه مؤدياً إلى تقليل تكثف الكروماتين، والعكس بالعكس.



شكل (19.1) : دور الهستون H1 في رص الـ DNA حول دقات النيوكليوسوم الصميمة nucleosome core particles (تصميم المؤلف)

تتألف كل جزيئة نيوكليوسوم صميمة من معقد من 8 من البروتينات الهستونية – جزيئتان من كل من H2A و H2B و H3 و H4 – وحلزون DNA مزدوج والذي يكون بطول 146 زوج نيوكليوتيدي. يكون الهستون الثماني *histone octamer* بروتينصممي والذي تلتف حوله جزيئة الـ DNA مزدوجة الشريط (شكل 19.1). تنفصل كل جزيئة نيوكليوسوم صميمة عن الجزيئة اللاحقة بمنطقة الـ DNA الرابط، والذي يتنوع في الطول من عدة نيوكليوتيدات قليلة إلى 80 نيوكليوتيدة. (يشير مصطلح nucleosome تقنياً إلى جزيئة النيوكليوسوم الصميمة nucleosome core particle زائداً جزيئة الهستون H1 زائداً واحدة من جزيئات الـ DNA الرابطة linker DNA) (شكل 20.1).

تم التوصل في سنة 1997 إلى التركيب الجزيئي لجزيئة النيوكليوسوم الصميمة والتي تتألف من صميم هستوني histone core يشبه اقرص يلتف حوله الـ DNA بإحكام ويصنع تقريباً لفّة ونصف باتجاه اليسار (راجع الشكل 19.1). إن كل الهستونات الأربع التي تؤلف صميم النيوكليوسوم تمتاز بأنها بروتينات صغيرة نسبياً (مئة ونيّف من الأحماض الأمينية).



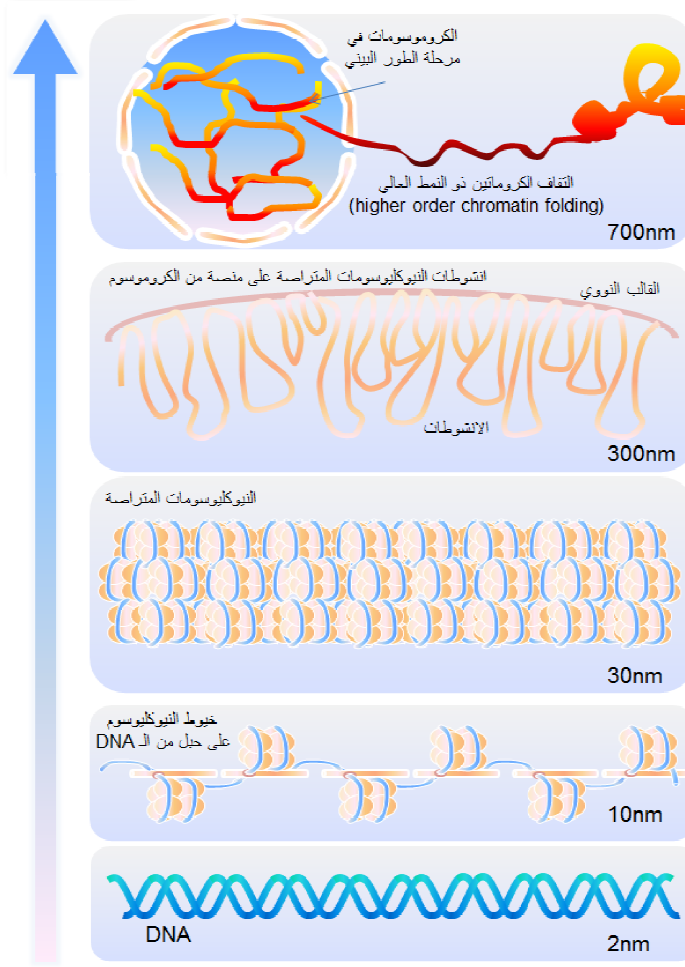
شكل (20.1): مخطط يوضح فيه تشريح النيوكليوسوم (تصميم المؤلف)

تكثف الكروموسومات

هناك تحديات جديّة في مسألة تعبئة الـ DNA لآبد للقارئ من أن يفهمها. كل خلية بشرية تحتوي على ما يقارب مترين من الـ DNA وذلك إذا ما تم مد الـ DNA من النهاية إلى النهاية، علماً أن نواة الخلية البشرية والتي تحتوي على الـ DNA تكون بقطر 6 مايكرومتر فقط. إن هذا مكافئ هندسياً لتعبئة 40 km من خيط رفيع جداً إلى كرة مضرب! تنجز تلك المهمة الصعبة في تعبئة الـ DNA من قبل بروتينات متخصصة والتي ترتبط بالـ DNA وتطويه، مولدة سلسلة من الحلزونات والانشوطات والتي توفر مستويات متصاعدة أعلى من التنظيم، مانعة الـ DNA من أن يصبح مشربك بشكل لا يمكن تخيله. والذي يؤثر الاهتمام هو على الرغم من كون أن الـ DNA منطوي بشكل محكم، ولكنه متراس بطريقة تسمح له بأن يكون متوفراً للعديد من الإنزيمات المتشارك في تضاعفه وإصلاحه ولإستخدام جيناته لإنتاج البروتينات عند الحاجة (شكل 21.1). عندما تدخل الخلية في الانقسام الاعتيادي mitosis، تصبح كروموسوماتها متكثفة بشكل كبير بحيث يمكن لها أن تتوزع إلى الخلايا البنية daughter cells. إن الانشوطات التي هي بقطر 30-nm من الألياف الكروماتينية يعتقد بأنها تنطوي على نفسها أكثر من ذلك لتكون كروموسومات الطور الاستوائي المدمجة في الخلايا الانقسامية، والتي قد تكثف فيها الـ DNA لعشرة الآلاف مرة (شكل 21.1). إن هذا الكروماتين المتكثف لا يمكن أن يستخدم كقالب لتخليق الـ RNA، وبذلك يتوقف الاستنساخ خلال عملية الـ mitosis. أشارت دراسات المجهر الإلكتروني إلى أن الـ DNA في كروموسومات الطور الاستوائي يمكن أن ينتظم إلى إنشوطات طويلة وذلك من خلال ارتباطها بمنصة البروتين protein scaffold (شكل 21.1)، لكن نحن في الوقت الحاضر لا نفهم بالضبط التراكيب المشاركة في هذه العملية ولا الآلية الجزيئية المضطلة بها.

كل الكائنات حقيقية النواة لها وسائل معقدة وطويلة في كيفية تعبئة الـ DNA في الكروموسومات. فعلى سبيل المثال يحتوي الكروموسوم البشري رقم 22 على ما يقارب 48 مليون زوج نيوكليوتيدي، والتي إذا ما مدّ من النهاية إلى النهاية سيبلغ طوله 1.5 cm. وعندما يتواجد الكروموسوم 22 الانقسام لا يتعدى طوله 2 μm ، حيث يبلغ مقدار التكثف 10,000 مرة تقريباً. ينجز هذا الانضغاط الخرافي لجزيئة الـ DNA من قبل بروتينات

خاصة تضطلع بلف وبطي الـ DNA يشكل متعاقب إلى مستويات أعلى وأعلى من التنظيم.



شكل (21.1): تعبئة الكروماتين، هذا الشكل يبين بعض من مستويات عديدة من الكروماتين المعبئة ليعطي كروموسوم انقسامي متكثف بشكل عال highly condensed mitotic chromosome (تصميم المؤلف).

عندما نقرأ هذا الفصل يجب علينا أن نضع في حسابنا بأن تركيب الكروموسوم هو تركيب ديناميكي أي أنه في حركة دؤوبة غير متوقفة. لا تتكثف كل الكروموسومات بالتوافق

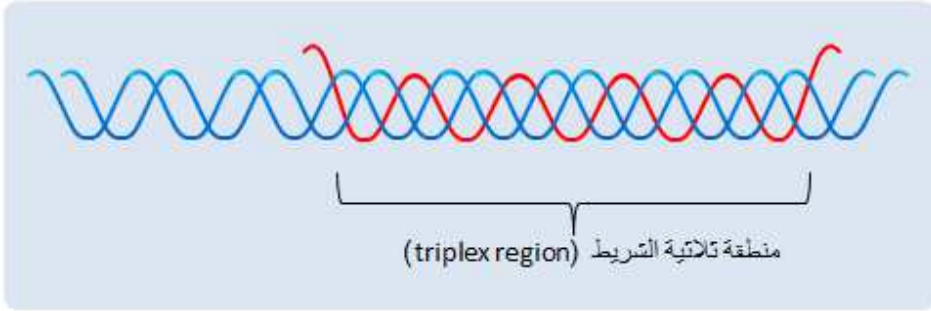
مع دورة الخلية، ولكن تتكثف condense مناطق مختلفة من الـ DNA بينما تزيل مناطق أخرى تكثفها decondense وذلك حسب نوع التعبير الجيني للخلية، (راجع الفصل السادس) وحسب حالتها التضاعفية، وحسب نوعية المناطق المتضررة التي هي بحاجة إلى إصلاح في كروموسوم الخلية.

ملحق الفصل الأول

التطبيقات المختلفة لتراكيب الدنا الغير الاعتيادية

لابد من الإشارة الى أنه تحت الظروف الطبيعية فان الـ DNA ذو الشريط المزدوج هو القاعدة. على أية حال، في ظروف مختبرية معينة من الممكن أن يتم حث شريط ثالث من الـ DNA لكي يحشر نفسه في الأخدود الكبير للحلزون المزدوج للـ DNA الطبيعي بنمط يوصف بأنه ذو تسلسل متخصص (sequence specific). وهذا يعني، ان شريط الـ DNA الثالث لا يقوم بحشر نفسه في أي مكان، ولكنه سوف يكون حلزون ثلاثي الشريط (triplex) مستقر بتسلسل متخصص (شكل 21.1). ان قواعد الارتباط هذه تكون أقل دقة قليلاً من الطبيعية، حيث لا يتم تمييز كل التسلسلات، بل بدلاً من ذلك يعتمد التمييز على التسلسلات المحيطة. وعلى أية حال، يميز الثايمين في الشريط الثالث عادة الأدينين في مزدوج أدينين - ثايمين القاعدي (T - A•T)، بينما يقوم السايتوسين في الشريط الثالث بتمييز الكوانين في مزدوج كوانين - سايتوسين القاعدي (C - G•C).

ان أول مرة فيها تم اكتشاف سلاسل النيوكليوتيدات الثلاثية الشريط كان في 1957 من قبل ثلاث علماء وهم Alexander Rich و David Davis و Gary Felsenfeld. ويبدو أن لمثل هكذا تركيب وظائف متعددة في المجال المختبري والسريري كذلك. وقد برز Rich من بين هؤلاء بسبب اكتشافه لتركيبة الـ Z DNA والذي أعتقد في البداية بأن مجرد شئ غريب، ولكن في المستقبل أصبح محط اهتمام العلماء بعد ذلك لأن مجرد تحول الـ B DNA الى Z DNA له أهمية كبيرة في تغيير سلوك الحمض النووي في التعبير الجيني. لا تتبع طبيعة الازدواج الحاصل في شريط الـ triplex قواعد واطسن وكريك في ارتباطها، ولهذا تدعى بدلاً من ذلك بمزدوجات هوكستين (Hoogsteen pairing)، نسبة الى مكتشفها Karst Hogsteen والذي ميز تلك الأواصر غير الاعتيادية لأول مرة عام 1963. اذن تسمح تلك الأواصر غير الطبيعية بتكوين الـ triplex DNA.



شكل (21.1) تركيب الحلزون الثلاثي (triplex) (تصميم المؤلف).

لا يعد تركيب الـ Z DNA ولا حتى triplex DNA هما التركيبات الغريبان الوحيدان للـ DNA، وإنما يمكن لأربعة أشرطة من الـ DNA من أن تزوج أيضاً لتكون تركيب الـ tetraplex أو quadraplex، ولكن هذا يحدث بسهولة فقط لتسلسلات الـ DNA ذات النسبة العالية من الكوانين. وهناك تركيب غريب للـ DNA يعرف بالـ H DNA، ويوجد عند تكرار البيورين (polypurine) أو عند تكرار البيريميدين (polypyrimidine)، وينتج هذا التركيب انحناء حاد في الـ DNA. تتواجد هكذا تراكيب ضمن المناطق الداخلة لتنظيم التعبير الجيني. وكما بينا أعلاه، صممت تلك الأشرطة كي تزوج مع تلك التسلسلات لتكون هذه التراكيب التي تعيق التعبير الجيني. تتزايد الأهمية التجارية لهذه الطريقة التي تسيطر على الأيض الخلوي في الطب والزراعة. علاوة على ذلك، هنالك تطبيقات عديدة للـ triplex DNA، حيث أن مجرد انحشار شريط ثالث ليكون نمطاً ذو ثلاث أشرطة في أي جين كاف لكي يعطل تعبير هذا الجين (أنظر الفصل السادس). وليس هي تلك الأهمية الوحيدة للـ triplex حيث يمكن أن يستخدم في العلاج الجيني وذلك بنفس الأسلوب المذكور آنفاً لتعطيل أي جين ذو وظيفة ممرضة.

أسئلة الفصل الأول

السؤال الأول: علل مايلي:

1. يمكن لسلالة البكتريا الضارية المقتولة بالحرارة خمج السلالة البكتيرية الطبيعية
2. أكتشف Avery وجماعته بأن الـ DNA هو المادة السؤولة عن التحول (transforming principle) وليس الـ RNA أو البروتين
3. لا يمكن للفايروسات عموماً إلا أن تنمو بشكل متطفل على خلايا العائل الذي تخمجه؟
4. ان كمية الـ DNA في الخلية هي ليست دائماً مقياساً مباشراً لكمية المادة الوراثية في ذلك الكائن الحي؟
5. تستخدم الشخطة (prime) في ترقيم ذرات كاربون السكر الخماسي الموجود في الـ DNA؟
6. يدخل الفوسفات في ربط نيوكليوتيدات الحمض النووي ببعضها البعض؟
7. لابد من وجود الأحاديث في جزيئة الـ DNA؟
8. أصبح لزاماً علينا أن نقرأ التسلسل النيوكليوتيدي في كل الأحماض النووية بالاتجاه 5' إلى 3'؟

9. يتجه كلا شريطي الـ DNA بشكل متعاكس (antiparallel) لبعضها البعض؟
10. لابد من وجود الازدواج القاعدي بين القواعد النتروجينية في جزيئة الحمض النووي؟
11. إن الحرارة المطلوبة لصهر مزدوج كوانين – ساينوسين هي أكثر من تلك الحرارة المطلوبة لصهر مزدوج ثايمين – أدنين؟
12. عندما تروم الخلية الانقسام لابدلكروموسوماتها من أن تتكشف بشكل عال؟
13. تحتوي الهستونات على نسب عالية من الارجنين واللايسين؟
14. يعد الهستون H1 هو الهستون الأقل احكاماً في ارتباطه مع الـ DNA؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

1. قام Chargaff وجماعته وعلى طيلة أربع سنوات بالعمل تحت ظلال فرضية خاطئة تدعى بالـ
a. mono-nucleotide hypothesis b. di-nucleotide hypothesis c. tri-nucleotide hypothesis d. tetra-nucleotide hypothesis
2. كلما ازدادت نسبة المكون في جزيئة الـ DNA، كلما قلت الحرارة المطلوبة لمسخها.
a. A-T b. G-C c. "a" or "b" d. all
3. يتجه الشكل الشائع من الحلزون المزدوج (B DNA) نحو الاتجاه
a. right b. left c. anti-clockwise d. zigzag
4. إذا سلطت حزمة من X-ray على جزيئة الـ DNA وفقاً لتقنية X-ray crystallography تكون صورة هذه الجزيئة الناتجة هنا مشابهة للرمز
a. "θ" b. "-" c. "x" d. "φ"
5. بالإضافة إلى الـ DNA الرئيسي الموجود بنواة الخلية أو بالفايروس، فإن هناك DNA معلوماتي يوجد في عضيات organelles معينة كما في
a- Golgi apparatus b- chloroplast c- cellular vesicles d- ribosomes e- endoplasmic reticulum
6. ترتبط النيوكليوتيدات ببعضها البعض بواسطة
a- covalent bond b- phosphodiester bond c- glycosidic bond d- hydrogen bonds e- ester bond
7. إذا كان DNA الإنسان يحتوي على نسبة 20% لكل من الأدنين والثايمين، فتكون نسبة كل من الكوانين والساينوسين
a- 30% b- 40% c- 50% d- 60%
8. حصل Thomas Morgan على جائزة نوبل في وذلك لاكتشافاته المتعلقة بدور الكروموسومات في التوريث.
a. chemistry b. biology c. biochemistry d. physics and medicine
9. عندما يكون الكروموسوم مشابهاً للحرف x فإنه يكون عادة في طور
a. interphase b. prophase c. metaphase d. anaphase
10. تحتوي الهستونات على نسب عالية من الأحماض الأمينية
a. histidine & asparagine b. glutamate & aspartate c. lysine & argentine d. glycine & praline
11. تكون بروتينات الكروموسومات الغير هستونية (nonhistonic proteins) ذات طبيعة وهي تكون بذلك عكس بروتينات الكروموسومات الهستونية ذات الشحنة المعاكسة لشحنة الـ DNA.
a. basic b. acidic c. neutral d. non
12. اكتشف العالم النيوكليوسومات (nucleosomes).
a. Arthur Korenberg b. Roger Korenberg c. Evan Korenberg d. Schneider Korenberg
13. إن تمثل أول مستوى من مستويات تعبئة الـ DNA الكروموسومي في حقيقية النواة.

- a. beads on thread b. looped domains c. condensed chromosomes d. solenoid structure
14. ان أقل الهستونات احكاماً في ارتباطه بالـ DNA هو
a. H2A b. H2B c. H3 d. H1
15. يتألف الـ nucleosome core particle من
a. 2H2A & 2H2B b. 2H2A, 2H2B & 2H3 c. 2H2A, 2H2B, 2H3 & 2H4 d. 2H2A, 2H2B, 2H3, 2H4 & H1
16. في طور لا يمكن رؤية الكروموسومات بشكل مميز وتكون كخيوط مشبكة نحيفة وطويلة في النواة.
a. interphase b. prometaphase c. metaphase d. anaphase
17. أحد الأحماض الأمينية الشائعة في الهستونات هي وهي المسؤولة عن شحنته الموجبة القوية.
a. methionine b. argenine c. alanine d. glycine
18. تدعى البروتينات التي تساهم في الارتباط ما بين الـ DNA والـ nucleosome بالـ
a. actins b. myocins c. tubulins d. nucleoplasmins
19. يبلغ أبسط مستوى من مستويات تعبئة الكروماتين حوالي نانومتر.
a. 10 b. 30 c. 300 d. 700
20. في طور لا يمكن رؤية الكروموسومات بشكل مميز وتكون كخيوط مشبكة نحيفة وطويلة في النواة.
a. interphase b. prometaphase c. metaphase d. anaphase e. telophase

السؤال الثالث: عرف مايلى:

Tetranucleotide hypothesis, renaturation, DNA secondary structure, DNA backbone, triplex, nucleoplasmin, linker DNA, chromatosome

السؤال الرابع: افترض أنه لديك ثلاث أشرطة مفردة من ثلاث جزيئات لحلزون الـ DNA المزدوجة وكالاتي:

- A 5'- GCCGACTCGTCGATCAGCCAG - 3'
B 5'- ATCGAATCATCGATTAGACAT - 3'
C 5'- TCCAGACCAACGGATATCGAA - 3'

أي تلك الأشرطة أسهل مسخاً؟ ولماذا؟ وأيها يلتف الى اليسار؟ ولماذا؟

السؤال الخامس: صل المفردات في الموجودة في اليمين مع ما يناسبها في اليسار

T₂ DNA
H DNA
B DNA
mt DNA
Z DNA

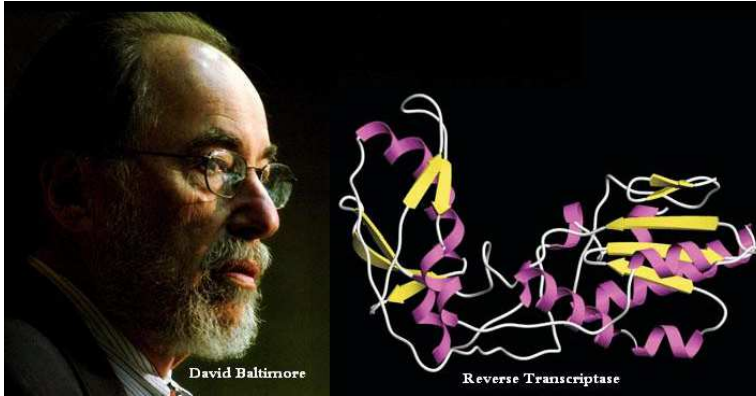
متعرج
شائع
انحناء حاد
مايتوكوندريا
عائى

للمزيد من الاطلاع اقراء:

- Alberts B.**, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fourth edition, Garland Science/USA. 2002.
- Alberts B.**, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.
- Bloomfield**, V. Crothers, D., Tinoco, I. and Hearst, J., 2000. *Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions*. University Science Books.
- Bolsover S.**, Hyams J., Shephard E., White H., Wiedemann C. Cell biology. Second edition, Jhon Wiley and Sons, 2004.
- Cooper G.**, and Hausman R. The Cell; a molecular Approach. Fourth edition, ASM Press, 2007.
- Darnell J.** 1985. RNA *Sci. Am.* 253: (4) 68-78.
- Dickerson R.** 1983. The DNA helix and how it is read *Sci. Am.* 249: (6) 94-111.
- Dickerson R.**, Drew H., Conner B., Wing R., Fratini A., and Kopka M. 1982. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA *Science* 216: 475-485.
- Felsenfeld G.** 1985. DNA *Sci. Am.* 253: (4) 58-67.
- Koolman J.**, and Roehm K. Color Atlas of Biochemistry. Second edition, Thieme, 2005.
- Lodish, H.**, Berk, A., Zipursky, L., and Matsudaira, P., Molecular Cell Biology (fifth edition). W. H. Freeman and Company, 2000.
- Luger K.**, Mader A. Richmond R., Sargent D., and Richmond T. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution *Nature* 389: 251-260.
- Nelson DL**, Lehninger AL, Cox MM. Lehninger Principles of biochemistry. Chapter 14. In: Principles of Bioenergetics. New York: Worth, 2000.
- Omoto C.**, and Lurquin P., Genes and DNA; A Beginner's Guide to Genetics and its Applications. Columbia University Press, 2004.
- Passarge E.** Color atlas of Genetics. Third edition, Thieme, 2007.
- Pierce B.** Genetics: A conceptual approach. 2002.
- Saenger, W.**, Principles of Nucleic Acid Structure. Springer Verlag, 1984.
- Singer, M.**, Berg, P. *Genes and Genomes: A Changing Perspective*. University Science Books, 1991.
- Tamarin**. Principles of genetics. Seventh edition. The McGraw-Hill. 2001.
- Verma P.**, and Agarwal V. molecular biology. First Edition Schandgoup, India (2004).

2

الفصل الثاني مفهوم الجين



علي اليسار: ديفد بالتيمور أحد مكتشفي انزيم الـ reverse transcriptase. على اليمين: انزيم reverse transcriptase.

مقدمة

يوصف الجين بأنه الوحدة الوراثية التي تحوي على المعلومات التي تكون على شكل تسلسلات خطية من النيوكليوتيدات (الـ DNA) الضرورية للتشفير عن متعدد ببتيد polypeptide محدد أو للتشفير عن جزيئة RNA محددة. إن متعدد الببتيد هو ترتيب خطي من أحماض أمينية مرتبطة ببعضها البعض بواسطة آصرة ببتيدية. ولهذا، يشير مصطلح "متعدد الببتيد" إلى العديد من الأواصر الببتيدية في الجزيئة. وربما ترتبط سلسلة متعددة

الببتيد مع متعددات ببتيدية أخرى لتكوين جزيئة البروتين الفعالة بايولوجياً. عادة ما تكون متعددات الببتيد غير فعالة بايولوجياً. يستخدم مصطلحي متعدد الببتيد والبروتين بكثرة بشكل متبادل، ولكن من المهم أن نفهم بأنه عادة ما تتكون البروتينات من أكثر من سلسلة واحدة. تنسب الجينات عادة إلى واحد من صنفين وظيفيين واسعين: وهما أما الجينات التركيبية structural genes أو الجينات التنظيمية regulatory genes. يعتمد هذا التصنيف على الوظيفة البايولوجية للنتاج النهائي لهذه الجينات.

1. الجينات التركيبية: والتي تشفر لمتعدد الببتيدات أو الـ RNA الضروري للعمليات الأيضية الطبيعية للخلية، كما في الإنزيمات والبروتينات التركيبية والمستقبلات. وبهذا فإن الجينات التركيبية هي كمية من الـ DNA أو الـ RNA في بعض الفيروسات، والتي تحتوي على المعلومات الضرورية لتشفير عن جزيئات tRNA أو rRNA أو لمتعدد الببتيد.

2. الجينات التنظيمية: والتي تشفر لمتعدد الببتيدات المكونة للبروتينات التي تكون وظيفتها هي السيطرة على تعبير الجينات التركيبية. وتشبه تلك الجينات في تركيبها للجينات التركيبية.

إن القضية التي لا بد من أن توضع في أذهاننا هي أن الجين بالتأكيد لا يخلق أو يصنع أو ينتج أي شيء. لهذا، فهو مجرد مستودع للمعلومات. ولكنه ليس بالمستودع الخامل البعيد عن الأحداث الخلوية المثيرة، وإنما هو مكان تعمل عليه الكثير من الجزيئات الأخرى، كما في إنزيم RNA polymerase أو DNA binding proteins وغيرها لتأدية الكثير من الأدوار الخلوية في التعبير الجيني (أنظر الفصل السادس). ولهذا، لا يبدي هذا المستودع أي فعل ويبقى في انتظار دائم لمن يقوم بالفعل عليه. وعلى أية حال، عندما يحتل الجينعادة موقعاً محدداً ضمن الكروموسوم، يمكن له أن يمتلك تأثير محدد ضمن هذا الموقع على الشكل الخارجي للكائن الحي أو على فسلجة ذلك الكائن. ويمكن تطفير هذا الجين (أنظر الفصل السابع) أو يمكن له أن يعيد ارتباطه مع الجينات الأخرى (أنظر الفصل الثامن).

يطلق على المجموعة الكاملة لجينات الكائن الحي بالتكوين الوراثي للصيغة (genotype). بينما يطلق على الإظهار الكيميائي أو الفيزيائي أو تعبير الـ genotype بالصفة الظاهرة (phenotype) كما في مظهر الخلية وحالتها الفسلجية. وعلى سبيل المثال، إن الجينات التي تنظم لون العين في الحيوانات وبما فيها البشر هي جزء من التكوين الوراثي لصيغة الحيوان (animal genotype). إن لون العين سواء أكان أزرق أم أسود أم بني ماهو إلا إظهاراً كيميائياً أو فيزيائياً أو نتيجة لتعبير تلك الجينات، وتعرف تلك النتيجة بالـ phenotype.

وفي حالة محددة، كما في لون العين البني مثلاً والتي تعتبر جزءاً من الـ phenotype، وهذا يعني، لأنه إذا عبر هذا الجين المسؤول عن هذه الصفة عندها يمكن القول بأن الكائن يمتلك جين تلك الصفة. أما إذا لم يتم التعبير عن تلك الصفة المحددة، عندها لا يمكن لأحد ما أن يستنتج بغياب ذلك الجين. وباستخدام صفة لون العين مرة ثانية كمثال، يمكن لنا أن نقول بأن الشخص ذو العين البنية يمتلك جينات العين البنية، ولكن لا نستطيع أن نقول بأن ذلك الشخص لا يمتلك جينات العين الزرقاء. وبسبب إمكانية كبح التعبير الجيني كما يحدث في البكتريا والكائنات الراقية كما في الحيوانات (أنظر الفصل السادس)، عندها يمكن أن يكون الجين متنحيًا (recessive)، أي غير معبر كما في العين الزرقاء، والآخر سائدًا (dominant) أي معبر كما في العين البنية.

يمكن أن تقع الجينات على كلا شريطي حلزون الـ DNA المزدوج. ولكن، وبصرف النظر عن أي شريط يحتوي على الجين المحدد، تقرأ الجينات من الاتجاه 5' إلى 3'، ويشار إلى الشريط الذي يحتوي على الجين المحدد بالشريط المشفر coding strand (أنظر الفصل الرابع).

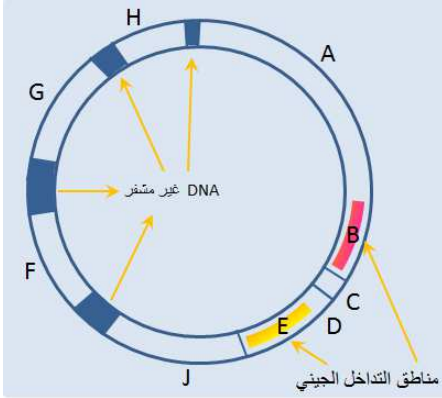
حجم الجين

لقد استخدم الباحثون تقنيات متنوعة تمكنوا من خلالها تحديد حجم الجين. هناك طريقة مباشرة تتلخص ببساطة بتقسيم عدد النيوكليوتيدات في الكروموسوم على عدد الجينات المعروف بوجودها في الكائن. وهناك طريقة أخرى غير مباشرة والتي تتم باستخدام الخرائط الوراثية (genetic mapping) وتكرار عملية التعابر الوراثي (crossing over frequency). تعتمد هذه الطريقة على افتراض أن تكرارات التعابر تكون مساوية تقريباً للكروموسوم كاملاً. إن المشكلة هي أن تردد التعابر الوراثي يمكن أن يفسر بتلك المسافة الواقعة بين الجينات قيد الدراسة هو أكبر من حدوث تلك الحالة، لأنه كلما تباعدت الجينات عن بعضها البعض كلما ازداد احتمال حدوث التعابر الوراثي بينها. ومن ناحية أخرى ربما تكون المسافة بين الجينات التي تبدي مستوى واطئ من التعابر الوراثي أصغر مما هو عليه الحال من مسافتها الحقيقية من بعضها البعض. إن معدل التعابر الواطئ بين الجينات ذات المسافة القصير بين بعضها البعض يحدث لأسباب غير معروفة. وبالتالي، فإن تقديرات حجم الجين وأعداد الجينات ربما تكون أكبر أو أصغر من حقيقتها. وعموماً، بينت نتائج قياس حجم الجينات بأن معدل ما يحتوي الجين الموجود في بدائية النواة هو من 900 إلى 1500 زوج قاعدي. أما معدل ما يحتوي جين حقيقية النواة من أزواج قاعدية فمن الصعوبة تحديد ذلك، ولكن، وجد بأنه عادة ما يكون حجم الجينات المكتشفة في حقيقية النواة هو مئات الآلاف من الأزواج القاعدية. وكما هو متوقع، توجد هناك علاقة بين تعقيد الكائن الحي وعدد الجينات في جينومها. وعلى سبيل المثال، يتنوع عدد الجينات بين الكائنات بدائية النواة

والكائنات حقيقية النواة من أقل من 500 جين للبكتيريا البسيطة إلى حوالي 30,000 جين في البشر.

على الرغم من أن ازدياد حجم الجين هو دليل واضح على ازدياد المعلومات الوراثية فيه، ولكن هذا لا يعني أن صغر حجم الجين يعني بالضرورة قلة المعلومات الوراثية المخزونة فيه. ففي العديد من فيروسات الـ DNA الصغيرة جداً، كما في $\Phi X174$ والتي يحتاج فيها الفايروس $\Phi X174$ إلى 11 بروتين والتي يبلغ مجموع أحماضها الأمينية 2300 حامض أميني. وبما أن كل حامض أميني قد تم تشفيره من قبل ثلاث نيوكليوتيدات، فإن طول DNA $\Phi X174$ يجب أن يكون على الأقل 9600 نيوكليوتيدة هذا بصرف النظر عن التسلسل البادئ والتسلسل الموقوف وماشابهها.

حلت هذه الكائنات الدقيقة تلك المشكلة وذلك من خلال تطوير ما يعرف بالجينات المتداخلة. يشير الشكل (1.2) إلى الخارطة الوراثية للفايروس $\Phi X174$ وفيها تتضح صفة التداخل بشكل جلي. ويتضح من هذا الشكل بأن التسلسلات النيوكليوتيدية في بعض الجينات تتدرج بشكل كامل ضمن تسلسلات جينات أخرى. لاحظ، على سبيل المثال أن الجين B يقع ضمن تسلسل الجين A، بينما يقع الجين E ضمن الجين D. تسمح هذه الإستراتيجية باحتواء كمية كبيرة من المعلومات ضمن طول محدد للـ DNA وهذا الذي يسمح في هذه الحالة لكل جين بأن يقع ضمن طول مميز للجينوم. وبمعنى آخر، تحتاج الجينات المتجاورة إلى كمية DNA أكثر من تلك التي تحتاجها الجينات المتداخلة.



شكل (1.2): خارطة الجينات التسع للعائى $\Phi X174$. لاحظ أن الجين B يقع كلياً ضمن الجين A، بينما يقع الجين E كلياً ضمن الجين D (تصميم المؤلف).

يوجد ضمن الجينات المتداخلة معلومات متداخلة أيضاً، ولكن كل جين سواء أكان متداخلاً أم لا يمتلك نقطة بدايته الخاصة به. وعلى الرغم من أهمية نظام التداخل في اختزال كمية الـ DNA المطلوبة للتشفير عن الجينات إلا أن هنالك بعض المشاكل التي تعترض هذا النظام، وتتمثل بالطفرة التي تحدث في منطقة التداخل، والتي يمكن أن تؤثر ليس

فقط على جين واحد وإنما جينين اثنين معاً وبالتالي سيتضرر بروتينين من طفرة واحدة في هذا النظام بدلاً من بروتين واحد. إذن، للطفرة خطر مضاعف على الجينات المتداخلة مقارنة بنظيراتها الغير متداخلة.

المعلومات الجينية

لوحظ بأن المعلومات الموجودة في الـ DNA الذي يعمل دور المادة الوراثية تكون على شكل أجزاء خطية تدعى الجينات. تستقر تلك المعلومات على شكل تسلسلات نيوكليوتيدية محددة. ماهو المهم الآن هو حقيقتان:

1. تعتبر القواعد النيتروجينية (nitrogen bases) في نيوكليوتيدات الـ DNA وليس السكر فوسفات (sugar-phosphate) هي المعلومات الممثلة للجين.
2. إن التسلسل الخطي للقواعد النيتروجينية هو النقطة الجوهرية في تحديد هوية الجين.

يمكن توضيح ذلك بتشبيه نظام ترتيب القواعد النيتروجينية في الـ DNA لتكوين جين محدد بنظام ترتيب الحروف في اللغة لتكوين كلمة محددة. إن مزيج الحروف المختلفة يكون كلمات مختلفة (معلومات مختلفة) ومزيج الكلمات المختلفة تكون جمل مختلفة (جينات مختلفة).

إذن تتألف الجينات من "كلمات" والتي تتكون من "حروف". وكما بينا في الفصل الأول بأن النيوكليوتيدات المختلفة تتمثل بحروف مختلفة A و G و C و T. يكون مزيج تلك الحروف المختلفة كلمات مختلفة. وباختلاف تمازجها تعطي تلك الحروف معلومات مختلفة في الخلية. دعنا ننظر إلى كلمات الجين ونحدث بعيداً شيئاً ما عن كلمات اللغة. عندها نلاحظ أن الكلمة في الجين تتكون من ثلاثة أحرف وليس أكثر أو أقل.

بعد أن عرفنا مم تتكون الجينات، دعنا نركز أكثر على سلوك الجينات في تعاملها مع الخلية. بما أن الجين يحتوي على التسلسلات المتمثلة بالقواعد النيتروجينية، تخبر تلك التسلسلات الخلية أما كيفية تنظيم أحماضها الأمينية لكي تنتج تغيرات لا حصر لها من البروتينات أو كيفية تنظيم تسلسلات أخرى لتنتج rRNA أو tRNA.

توفر التسلسلات الجينية نوعين من المعلومات خلال تخليق البروتين. النوع الأول هي ماهية الحامض الأميني الذي يشفر له من قبل الكلمة الجينية ذات الحروف الثلاث. النوع الثاني هو الموقع الذي يحتله كل حامض أميني في البروتين الناتج. تحدد هذه المعلومات ما

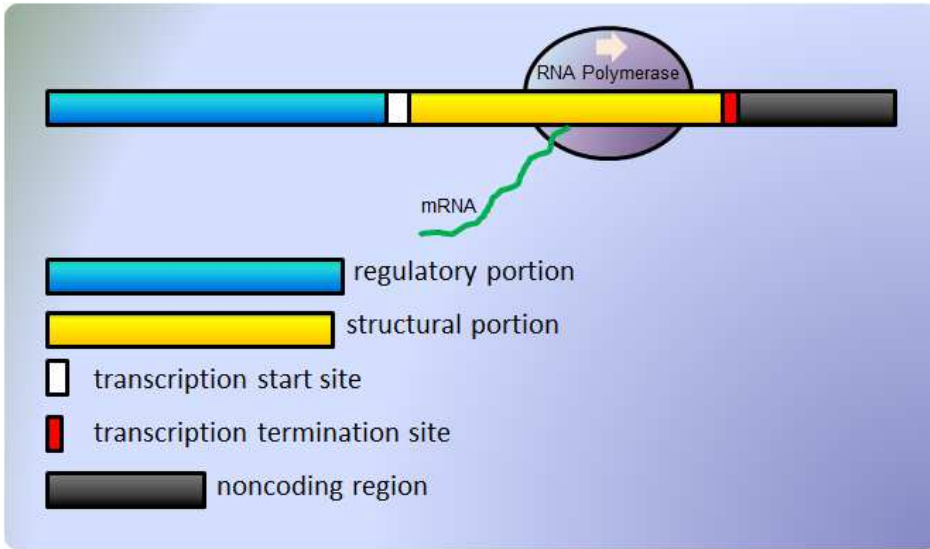
يعرف بالتركيب الأولي (primary structure) للمتعدد الببتيد (الاصطفاف الخطي للأحماض الأمينية). ويحدد التركيب الأولي لمتعدد الببتيد بالنهاية الفعالية البايولوجية للبروتين الذي يحتوي على هذا المتعدد الببتيدي. يحدد التركيب الأولي التركيب الثانوي أو الثالثي (tertiary) أو الرابعي (quaternary) والذي هو الشكل الفيزيائي للجزيئة، وشكل متعدد الببتيد والذي بالنتيجة يحدد كيف ترتبط الجزيئة بمتعددات ببتيدية أخرى. ويحدد فيما إذا كان التركيب الأولي أو الثانوي أو الثالثي أو الرابعي صحيحاً أو غير صحيح، ويحدد فيما إذا كان البروتين الناتج له فعالية بايولوجية أم لا (أنظر الفصل الخامس). إذن، النتيجة النهائية التي تتمخض عن ترتيب وامتزاج التسلسلات المعلوماتية في الجين هي الفعالية البايولوجية، وهي المראה التي تعكس مدى نجاح تلك التسلسلات في إظهار صورة صحيحة للبروتين الناتج.

تقع التسلسلات التنظيمية (regulatory sequences) عند النهاية 5' للجين. تستجيب تلك التسلسلات النيوكليوتيدية للإشارات الكيميائية أو الفيزيائية الناشئة من داخل أو من خارج الخلية. وبتغيير الظروف الداخلية أو الخارجية أو كلاهما، تستجيب تلك الخلية لتلك الإشارات الكيميائية عبر التداخل مع تلك التسلسلات التنظيمية، وتنشط هذه التداخلات أو لا تنشط الجينات التركيبية. وفي هذا الحال، ينتظم نوع وكمية ومعدل تخليق البروتين. ربما تكون هذه البروتينات ضرورية داخل الخلية أو على سطحها أو ربما تصدر إلى خارج الخلية (كما في الإنزيمات الخارجية exoenzymes للبكتريا). لا يوجد نواتج نهائية (end products) للتسلسلات التنظيمية، ولكن وظيفتها بدلاً من ذلك هو توفير تسلسل تمييز (recognition sequence) لجزيئات الإشارة (signal molecules)، ونتيجة تداخل التسلسلات التنظيمية مع جزيئات الإشارة يتم السيطرة على فعالية الجينات التركيبية. تسمى تلك التسلسلات التنظيمية حسب وظيفتها: كما في تسلسلات البروموتر (promoters) والمسرعات (enhancers) (أنظر الفصل الرابع) والمشغلات (operators) والمضعفات (attenuators) (أنظر الفصل السادس).

تختلف الجينات التركيبية في كائنات حية متنوعة والتي تمتد من الفايروسات إلى الكائنات بدائية النواة إلى الكائنات حقيقية النواة بالنظر إلى مكوناتها المعلوماتية وحتى بالنسبة إلى ثباتيتها وموقعها ضمن جزيئة الـ DNA. وعلى سبيل المثال، هنالك جينات تكون معلوماتها محتواة ضمن تسلسل خطي مستمر من النيوكليوتيدات، كما هو عليه الحال في بدائية النواة. بينما هنالك جينات أخرى تحتوي على معلومات معترضة من قبل تسلسلات غير مشفرة كما يحدث في حقيقية النواة. بينما تحتوي جينات أخرى على معلومات مشتركة مع المعلومات الآتية من جينات أخرى لتكون جيناً ثالثاً، كما يحدث في فايروس ΦX174 والبشر. هنالك حتى جينات يمكن لها أن تنتقل من موقع إلى موقع آخر مختلف بنفس الكروموسوم أو إلى كروموسوم آخر كما يحدث في بدائية وحقيقية النواة (أنظر الفصل الثامن).

تشريح الجين

يتألف الجين تشريحاً وبشكل عام من قسمين، أحدهما تركيبى structural part، وهو الجزء الذي يمثل العنصر التي يعبر عنه جينياً، كما في جزيئات الـ RNA بأنواعها المختلفة والناشئة من شريط الـ DNA القالب، ويبدأ هذا الجزء من نقطة بداية الاستنساخ transcription start point، وينتهي بانتهاء الاستنساخ (شكل 2.2). أما الجزء التنظيمي regulatory part فيشمل تلك القطع التي تضطلع بتنظيم الجزء التركيبى (كما في عملية الاستنساخ مثلاً) فقط، وتدعى بالعناصر الغير وراثية وذلك لعدم التعبير عنها جينياً، وتصنف تلك التسلسلات إلى ثلاث أصناف رئيسية في الكائنات حقيقية النواة وهي تسلسلات البروموتر والمضعفات والمسرعات، وإلى صنفين رئيسيين في الكائنات بدائية النواة وهي المشغلات والكوابح والتي سندرسها بشكل مفصل في الفصول القادمة (أنظر الفصل الرابع والخامس والسادس).



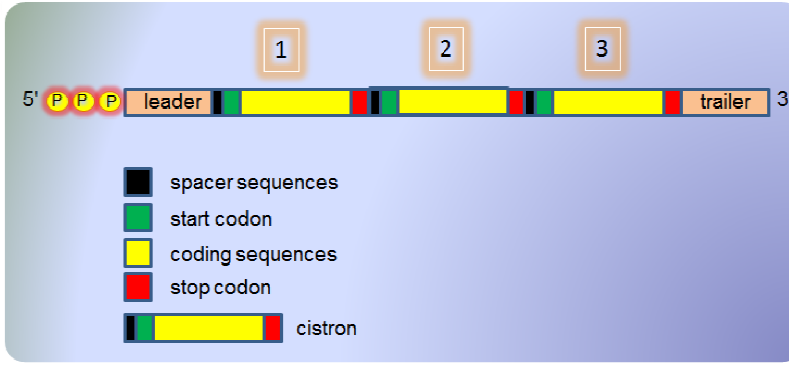
شكل (2.2): تشريح الجين. لاحظ بان الجين يتكون من قسمين القسم التنظيمي والذي لا يعبر جينياً عن نفسه والقسم التركيبى الذي يعبر جينياً عن نفسه (من تصميم المؤلف).

جينات بدائية النواة

تتألف العديد من جينات بدائية النواة من تسلسلات نيوكليوتيدية غير معترضة من قبل التسلسلات الغير مشفرة. وعلى الرغم من وجود التسلسلات الغير مشفرة (noncoding)

sequences) في كل من *Eubacteria* و *Archaeobacteria* ولكن عموماً، وجد بأن التسلسلات النيوكليوتيدات المشفرة الموجودة في بدائية النواة غير معترضة من قبل التسلسلات الغير مشفرة. يتم تنشيط الجينات التركيبية في بدائية النواة على شكل مجاميع أو عناقيد (clusters) والتي يصطلح عليها بالوحدات الاستنساخية متعددة السسترون polycistronic transcription units أي أن وحدة الاستنساخ الواحدة هنا تحتوي على معلومات تشييد أكثر من متعدد ببتيدي واحد (شكل 3.2).

تمتلك وحدات الاستنساخ والتي هي عبارة عن جزيئات mRNA الترتيب النيوكليوتيدي الآتي مبتدأ من النهاية 5': التسلسل القائد (leader sequence)، وتسلسل البداية (start sequence)، التسلسل النيوكليوتيدي المشفر عن متعدد الببتيد (coding sequence)، وتسلسل الفاصل (spacer sequence) والذي يتكون من 5 إلى 20 نيوكليوتيدة والذي يفصل بين الجين والجين الذي يليه. تتكرر كل تلك التسلسلات لكل جين مشفر في الوحدة الاستنساخية متعددة السسترون ماعدا التسلسل القائد والذي يظهر لمرة واحدة فقط لكل وحدة استنساخية متعددة السسترون. إذن، في الكائنات بدائية النواة، يحمل الـ mRNA أكثر من رسالة، وفي النتيجة يمتلك الـ mRNA معلومات تؤدي إلى تخليق أكثر من متعدد ببتيدي واحد.



شكل (3.2): جزيئة mRNA المتعددة السسترون والمكونة من ثلاث سسترونات (1 و 2 و 3 على التوالي). تبدأ هذه الجزيئة من التسلسل القائد من النهاية 5' في يمين الشكل الى التسلسل المتذي (trailer) ذو النهاية 3' في يسار الشكل (تصميم المؤلف).

جينات حقيقية النواة

بالتناقض من بدائية النواة، تستخدم الكائنات حقيقية النواة نظام الوحدات الاستنساخية أحادية السسترون (monocistronic transcription units). لا تنشط جينات تلك

الكائنات بشكل مجاميع ولكنها بدلاً من ذلك تعمل ككيانات منفردة. وهنا يحمل الـ mRNA المعلومات التي تشفر لمتعدد ببتيدي مفرد.

عادة ما يكون الجين في حقيقة النواة متالفاً من تسلسلات مشابهة لتلك الموجودة في بدائية النواة من احتوائها على التسلسل القائد والبادئ الخ، ولكن لهذه الجينات تسلسلات نيوكليوتيدية مشفرة وغير مشفرة. وبالتالي، يدعى جين حقيقة النواة أحياناً بالجين المنقسم أو المنشق (split gene)، وفيه تتشتت المعلومات على طول جزيئة الـ DNA. وهناك بعض الاستثناءات المتمثلة ببعض الجينات الغير محتوية على تسلسلات غير مشفرة على الرغم من كونها جينات لحقيقة النواة وهي الجينات المشفرة لبروتينات الهستون الضرورية لتعبئة الـ DNA في حقيقة النواة، بالإضافة إلى الجينات الضرورية لتخليق بروتينات الانترفيرون من نوع ألفا وبيتا (تساعد هذه البروتينات في حماية الخلايا من الخمج الفايروسي).

يمكن تصنيف الجينات حسب التخصص الى جينات تدبير شؤون المنزل housekeeping genes وجينات الترف luxury genes، تشفر الأولى للبروتينات الأساسية والتي ربما تعبر في كل خلية، بينما تشفر الجينات المتخصصة بالخلية cell specific genes أو جينات الترف luxury genes أو التي تدعى أيضاً بالجينات الذكية smart genes للبروتينات الموجودة فقط في الخلايا المتخصصة، كما في بروتين globin و crystalline و fibroin و ovalbumin و casein و immunoglobulin تعطي دليلاً على الكبح الكامل في كل الخلايا ما عدا الأنسجة المتخصصة المتميزة بوجودها.

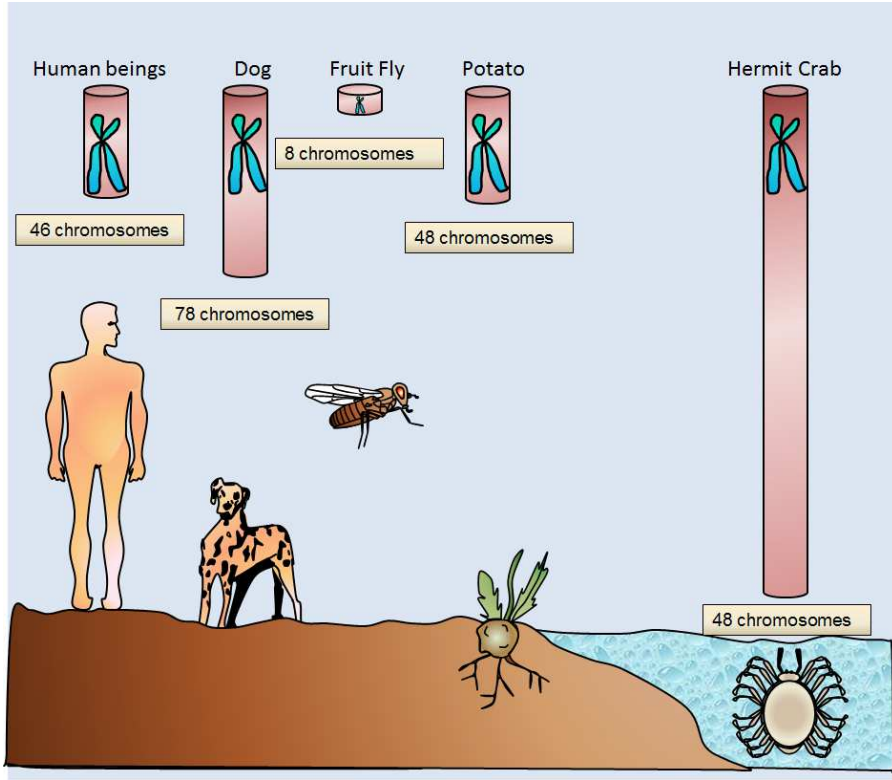
تسلسلات الدنا الغير مشفرة non-coding DNA sequences

كلما كانت الكائنات معقدة أكثر من المنطقي أن تكون معلوماتها الوراثية أكبر، ولهذا، فلابد من وجود DNA (أو RNA في بعض حالات الفايروسات) أكثر لكي يخزن المعلومات. ولكن استبعدت الإفادات المختبرية هذه الافتراضات. وعلى سبيل المثال، يمتلك فايروس ΦX174 كروموسوم بطول 1.8 μm ويحتوي على دزينة من الجينات. يمتلك العاثي لامدا DNA أطول بعشر مرات من ذلك الموجود في فايروس ΦX174 ويحتوي على 50 جين تقريباً. تمتلك بكتريا القولون ما يقرب من 4700 جين محتواة في جزيئة DNA بطول 1.36 cm (يقدر هذا الطول بألف مرة أكبر من الخلية). بينما يبلغ طول DNA خلايا البشر ثنائية المجموعة الكروموسومية (human diploid cells) إذا وضعت من نهاية إلى نهاية مترين وتحتوي على كروموسومات تتكون من 50000 إلى 100000 جين. ويقدر طول كروموسومات البشر كلمنها على حدة من 1.5 إلى 8.5 سنتمتر طولاً.

وعلى أية حال، يوجد بعض الاستثناءات في تلك المعطيات، تدعى تلك الاستثناءات بالتناقض بنسبة سي C value paradox (الحرف C هي مختصر لكلمة content والتي تعني محتوى ومن هنا جاءت التسمية). إن نسبة سي C-value هي كمية الـ DNA في الجينوم الأحادي المجموعة الكروموسومية للأنواع. وكما لا حظنا في أعلاه، هنالك علاقة بين محتوى الـ DNA وتعقيد الكائن. ولكن، بالتناقض من ذلك، يبدو أنه ليس هنالك علاقة في بعض الكائنات الحية. وعلى الرغم من عدم ازدياد نسبة C الصغرى للكائنات الحقيقية النواة بازدياد تعقيد تلك الكائنات، يبدو أن في بعض الكائنات DNA أكبر بكثير من حاجتها. وعلى سبيل المثال، مدى وزن الـ DNA الموجود في اللبائن يكون بين 2 إلى 3 بيكوغرام (الببيكوغرام الواحد يساوي 10⁻¹² غرام أو واحد مقسوماً على تريليون غرام). ولكن في حالة البرمائيات يكون هذا المدى من واحد إلى مئة بيكوغرام، وفي بعض النباتات كما في الزنبق (lily) على سبيل المثال، يكون محتوى الـ DNA في هذا النبات أكثر بمئة مرة من محتواه في البشر، وكذلك الحال بالنسبة للأسماك الرئوية (lungfishes).

إن التفسير الدارج لهذه الظاهرة هو أن العديد من الكائنات الحية ومنهم البشر ببساطة يمتلكون كمية من الـ DNA أكثر من حاجتهم. إن الـ DNA الإضافي يعتبر DNA غير مشفر (noncoding). وهذا يعني بأن نسبة كبيرة من الـ DNA الخلوي لا يشفر للبروتين أو الـ RNA أو للمعلومات التنظيمية التي تسيطر على فعالية الجين. إن هذه المعلومة تجعلنا نسأل أنفسنا السؤال التالي: ماهي وظيفة تلك التسلسلات؟ ما هو السبب لكل تلك التسلسلات الغير مشفرة؟ لما راكمت الكائنات الحية على ما يبدو أكثر من التي تحتاجها في تخليق الـ RNA والبروتين؟

بالإضافة إلى تغير كمية الـ DNA من نوع إلى آخر تتغير كذلك الأعداد الزوجية للكروموسومات (diploid number of chromosomes). وعلى سبيل المثال، يمتلك البشر 46 كروموسوم، بينما يمتلك الكلاب 78 كروموسوم، و تمتلك ذبابة الفاكهة 8 كروموسومات، بينما يمتلك سرطان الناسك البحري (hermit crab) 250 كروموسوم، و تمتلك البطاطا 48 كروموسوم. يتضح من هذا بأنه لا يشترط بالضرورة أن تكون الكائنات الحية الأكثر تعقيداً هي الكائنات التي تحتوي على كروموسومات أكثر (شكل 4.2). وعلى أية حال، يوجد الكثير من الأمثلة تبين لنا انتشار تلك التسلسلات الغير مشفرة في الكائنات الراقية لعل أهمها هو الانتروونات والتسلسلات المتكررة ترادفياً والتيلومير والسنترومير والجينات الكاذبة.



شكل (4.2). مخطط يوضح عدم وجود علاقة مباشرة بين المكون الكروموسومي ومستوى تعقيد الكائن. يتضح من هذا الشكل أنه ليس بالضرورة أن يكون الكائن أكثر تعقيداً لكي يكون عدد كروموسوماته كبير. يشير طول الاسطوانات الوردية الى عدد الكروموسومات الموجودة في الكائن المعني (تصميم المؤلف).

التسلسلات الغير مشفرة

أولاً:

التسلسلات الغير مشفرة داخل الجين أو ذات العلاقة بالجين:

توجد تلك التسلسلات ضمن تسلسل الجين أو أنها جينات أصلاً ولكنها لا تعمل لسبب ما، ولعل أشهر الأمثلة في توضيح تلك التسلسلات هي:

أ. الانترونات (Introns)

في البكتيريا، تشفر سلسلة متعدد الببتيد من قبل تسلسل DNA متوافق مع تسلسل الأحماض الأمينية، مستمرة على طول الـ DNA القالب من دون انقطاع إلى أن تكتمل المعلومات المطلوبة للتشفير لمتعدد الببتيد. ولكن ملحوظة كون أن كل الجينات مستمرة قد تم نقضها في عام 1977 عندما اكتشف كل من Phillip Sharp و Richard Roberts كل منهما بشكل مستقل بأن العديد من الجينات التي تشفر لمتعدد الببتيد في الكائنات حقيقية النواة معاقبة من قبل تسلسلات غير مشفرة تدعى بالانترونات.



Phillip Sharp



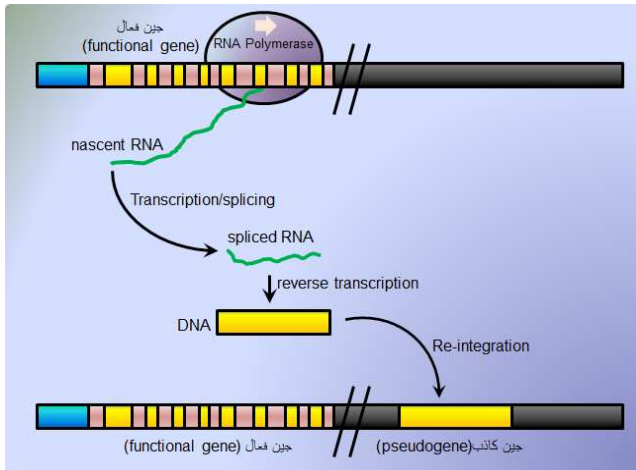
Richard Roberts

يطلق على التسلسلات النيوكليوتيدية المشفرة للأحماض الأمينية (التسلسلات المشفرة) في جينات حقيقية النواة بالاكسونات (exons) والتي قد أتت من كلمة معبرة "expressed". أما التسلسلات النيوكليوتيدية الغير مشفرة والمعروفة بالانترونات (introns) فقد أتت من كلمة التسلسلات التخللية "intervening sequences". ومن الواضح الآن بأن هنالك تسلسلات طويلة غير مشفرة من الـ DNA (لا تشارك في المادة الوراثية التي تترجم في النهاية إلى تسلسل حامض أميني في جزيئة البروتين) تتخلل التسلسلات التي تشفر لأحماض أمينية (الاكسونات exons) في العديد من الجينات في الكائنات حقيقية النواة. وكما بيّنا في أعلاه، توجد هذه التسلسلات التخللية أو الانترونات ضمن معظم وليس كل جينات الكائنات حقيقية النواة الراقية. تحتوي النسخ الأولية للـ RNA في حقيقية النواة على التسلسلات المتخللة أي الانترونات، بالإضافة إلى الاكسونات، ولهذا تدعى "بالنسخ ما قبل الرنا" pre-RNA. وعلى أية حال، تقطع الانترونات من المستنسخ الأولي (pre-RNA)، وترتبط الاكسونات exons مع بعضها البعض قبل أن تظهر جزيئة الـ RNA الناتجة في الساييتوبلازم لغرض الترجمة وذلك في عملية تسمى وصل الأطراف بالتراكب splicing (أنظر الفصل الرابع). إذن لماذا تزال الانترونات بعد أن كانت موجودة في تركيب الـ DNA؟ أراد الباحثون التحقق من ذلك عندما أزالوا الانترونات من فايروس القردة (SV40) simian virus 40 (فايروس يصيب الحيوانات ذو DNA مزدوج الشريط وصغير ودائري الشكل وهو من السهولة دراسته والتلاعب به إذا ما قورن بالكروموسومات الكبيرة)، وعندما تزال الانترونات من mRNA ذلك الفايروس، وجد بأن الـ mRNA الناضج غير ثابت unstable ولا ينتقل من النواة إلى الساييتوبلازم.

لم تعرف وظيفة الانترونات لحد الآن على وجه التحديد ولكن بعض المهتمين بهذا المجال يشبهون الانترونات ببعض الأغراض المخزونة في البيت والتي لا يستعملها أحد، ولكن لا يرميها أحد، ولا يوجد بيت يخلو من تلك الأغراض.

ب. الجينات الكاذبة (Pseudogenes)

إن الجينات الكاذبة هي تسلسلات DNA والتي لها تشابه ملفت للنظر في تسلسلاتها مع الجينات "الحقيقية" التي قد اشتقت منها. يعتقد بأن الجينات الكاذبة يمكن أن تشفر إلى بروتينات، ولكنها تحتوي على تغييرات في تسلسلها جعلتها غير وظيفية. تفتقد الجينات الكاذبة للانترونات وتحتوي على العديد من إشارات الإيقاف ولهذا يقبل إنزيم RNA polymerase بالحركة لمسافات طويلة عليها. وحتى لو نجحت عملية الاستنساخ لبعض هذه الجينات وأنتجت جزيئات الـ mRNA، ولكن لا يمكن لتلك الجزيئات أن تترجم إلى بروتينات فعالة. مقارنة بالجينات الطبيعية المشفرة للـ mRNA تحتوي هذه القطع المنحشرة المتمثلة بالجينات الكاذبة على طفرات متعددة، والتي يعتقد بأنها قد تراكمت منذ أول جزيئة mRNA مستنسخة بشكل معاكس وانحشرت في جينوم الخلية الجرثومية في الأسلاف القديمة. يشار إلى تلك النسخ الجينية الغير فعالة بالجينات الكاذبة المعالجة (processed pseudogenes). تحاط معظم الجينات الكاذبة بتكرارات مباشرة قصيرة (short inverted repeats)، وهذا يدعم فرضية كونها قد تولدت بواسطة أحداث قفزية (أنظر الفصل الثامن) المتضمنة للـ mRNA الخلوي. تنشأ الجينات الكاذبة من عمل إنزيم reverse transcriptase (أنظر أدناه) الذي يستنسخ الـ RNA إلى حزون الـ DNA المزدوج (والذي يشار إليه بالـ DNA المكمل أو cDNA) ولكنه يعمل فقط في أنواع معينة من الفايروسات (كما في retroviruses) وبعد استنساخ الـ mRNA المعاكس وتحوله إلى DNA ينحشر الـ DNA الناتج في الكروموسوم بمعدل واطئ. إن تلك النسخ المنحشرة لا يتم التعبير عنها لافتقادها للتسلسل الصحيح الذي يقود تعبيرها (شكل 5.2).



شكل (5.2): الجينات الكاذبة المعالجة والناشئة من انحشار جزيئات الـ mRNA المستنسخة بشكل معاكس. عندما يوجد إنزيم reverse transcriptase في الخلية، يقوم بنسخ جزيئات الـ mRNA إلى جزيئات DNA مزدوجة الشريط في حالات نادرة، يمكن لهذه الجزيئات أن تنحشر في الجينوم مولدة للجينات الكاذبة. وبسبب إزالة الانترونات بسرعة من جزيئات الـ RNA المستنسخة حديثاً، تمتلك تلك الجينات الصفة العامة المتمثلة بفقدان الانترونات. إن هذا يميز الجين الكاذب عن نسخة الجين التي اشتقت منها. بالإضافة إلى ذلك، تفتقد الجينات الكاذبة لتسلسلات

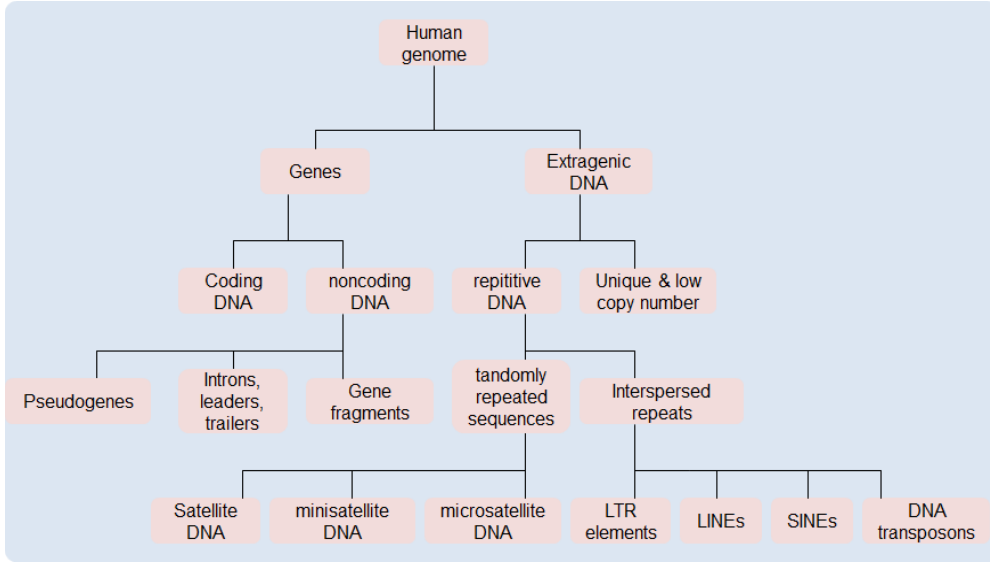
البروموتر الملائمة التي توجه استنساخها وكأنها ليست جزء من الـ mRNA التي اشتقت منه (تصميم المؤلف).

ثانياً: التسلسلات الغير مشفرة خارج الجين: وأهم أمثلة تلك التسلسلات هي:

أ. التسلسلات المتكررة ترادفياً Tandemly repeated sequences

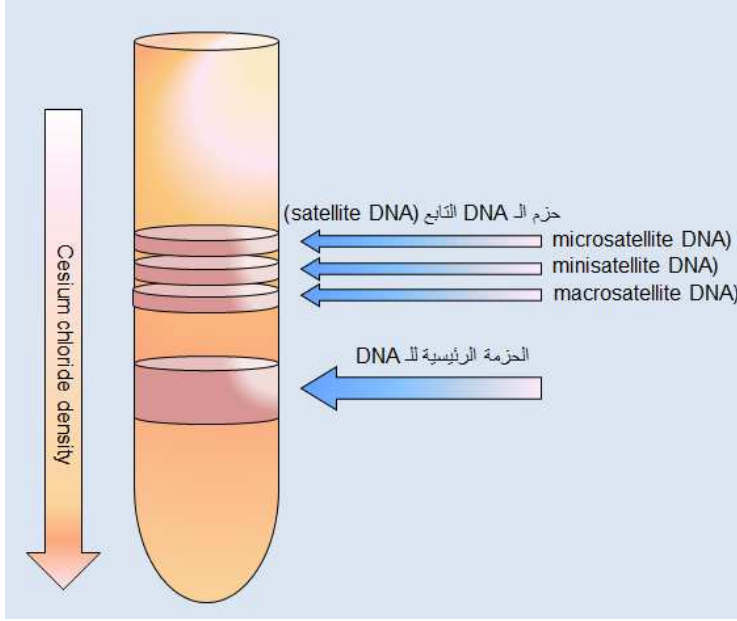
يحتوي جينوم الكائنات الراقية على كمية من الـ DNA أكبر بكثير من الكمية الضرورية منه لتكوين الجينات حيث أن معظم هذا الـ DNA لا يشفر عن أي وظيفة جينية، أي يعتبر كعناصر غير وراثية (noncoding elements). وكمثال على ذلك الجينوم البشري والذي هو جينوم عملاق يتألف من 3 بليون زوج قاعدي (3×10^9 bp) لكل مجموعة مفردة (haploid) من الكروموسومات. حيث تبلغ نسبة الـ DNA اللبائن ذات العلاقة مع الجينات بـ 30% فقط، بينما الـ 70% الباقية فهي غير مشفرة أصلاً. وتبلغ نسبة الـ DNA المشفر في الجينات 3% فقط من الكمية الاجمالية للـ DNA. يتألف الـ DNA ذو النسبة العالية (70%) من تسلسلات تكرارية لعدة مرات (repetitive DNA). وهناك انواع مميزة من تلك التسلسلات التكرارية هي عبارة عن تكرارات معكوسة (tandem repeats). وبالاعتماد على حجمها ونمطها، صنف تلك التكرارات الى عدة أنواع (شكل 6.2)، وهي الدنا التابع (satellite DNA) التقليدي، والتتابع الصغيرة (minisatellites)، والتتابع الصغيرة جداً (microsatellites). وكلها تؤلف 14% فقط من الـ DNA الاجمالي. يتألف أكثر من نصف الـ DNA للانسان من تكرارات منحصرة في جميع أنحاء الجينوم. ان أكثر تلك الأنواع أهمية هي التكرارات الطرفية الكبيرة (long terminal repeats: LTRs)، و العناصر النووية المنحصرة الطويلة (long interspersed nuclear elements: LINES)، و العناصر النووية المنحصرة الصغيرة (short interspersed nuclear elements: SINEs)، والقفازات (transposons) (أنظر الفصل الثامن).

عند تعرض الـ DNA للانسان الى النبذ المركزي ذو الكثافة المتدرجة باستعمال مادة كلوريد السيليوم، تكون النسبة العظمى من الـ DNA حزمة بكثافة نوعية معينة، ولكن تظهر ثلاث حزم (تتابع أو satellites) اضافية بكثافات أقل بسبب اختلاف محتوى الكوانين – سايتوسين فيها مقارنة بالـ DNA الرئيسي (شكل 7.2). تحتوي تلك الحزم الثلاث على الـ DNA التابع التقليدي (أو الـ DNA التابع الكبير (macro-satellite DNA) والذي يتألف من تكرارات بطول 100-6500 زوج قاعدي. ويتألف الـ DNA التابع الصغيرة من تكرارات بطول 10-20 زوج قاعدي. أما الـ DNA التابع الصغيرة جداً من تكرارات بطول 2-5 زوج قاعدي. هذا وتعد التتابع الصغيرة (microsatellites) هي أكثر أنواع التتابع تكراراً.



شكل (6.2): مخطط يوضح مكونات جينوم الإنسان النووي (تصميم المؤلف).

أما العناصر النووية المنحشرة الطويلة LINEs، وهي نوع من أنواع القفزات الموجودة في اللبائن والتي تقفز بآلية تشبه الآلية التي تقفز بها الفايروسات الاسترجاعية (retrotransposition) ولكنها تختلف عن الفايروسات الاسترجاعية في أنها لا تحتوي في تركيبها على التكرارات الطرفية الطويلة LTRs. تُولف تلك التكرارات أكثر من 70% من جينوم الإنسان بالوزن. وكما بينا، يزيد طولها عن 6500 زوج قاعدي وهي غنية بالأدينين عند نهاياتها من نوع 3' فقط. بينما تتألف العناصر النووية المنحشرة القصيرة SINEs من قطع تكرارية متوسطة الحجم بتسلسل نيوكليوتيدي متشابه بمعدل 300 زوج قاعدي. يتألف تركيبها الأساسي من تكرارات مترادفة من قطع غنية بالكوانين – سايتوسين مفصولة بقطع غنية بالأدينين. يدعى أكثر تسلسل تواجداً من هذه التكرارات في الإنسان بعائلة ألو (Alu family). وسميت كذلك بسبب امتلاكها لموقع حساس للانزيم القاطع ألو (Alu restriction enzyme).

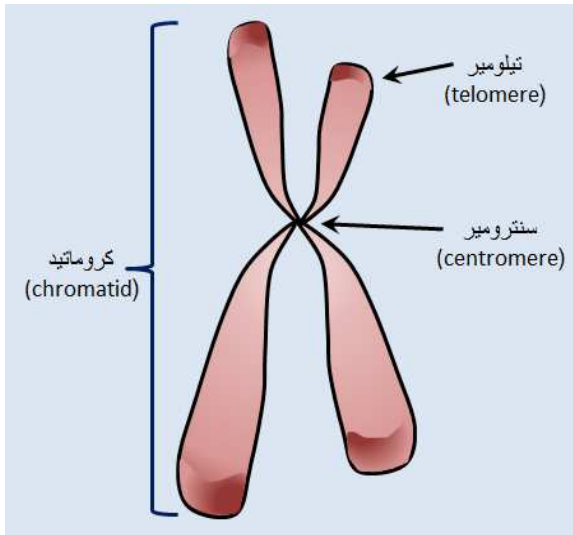


شكل (7.2): مخطط يوضح التسلسلات التكرارية التابعة المكتشفة في جينوم الإنسان وفقاً للنبيذ المركزي المتدرج الكثافة (تصميم المؤلف).

ب. التيلومير والسنترومير (telomere and centromere)

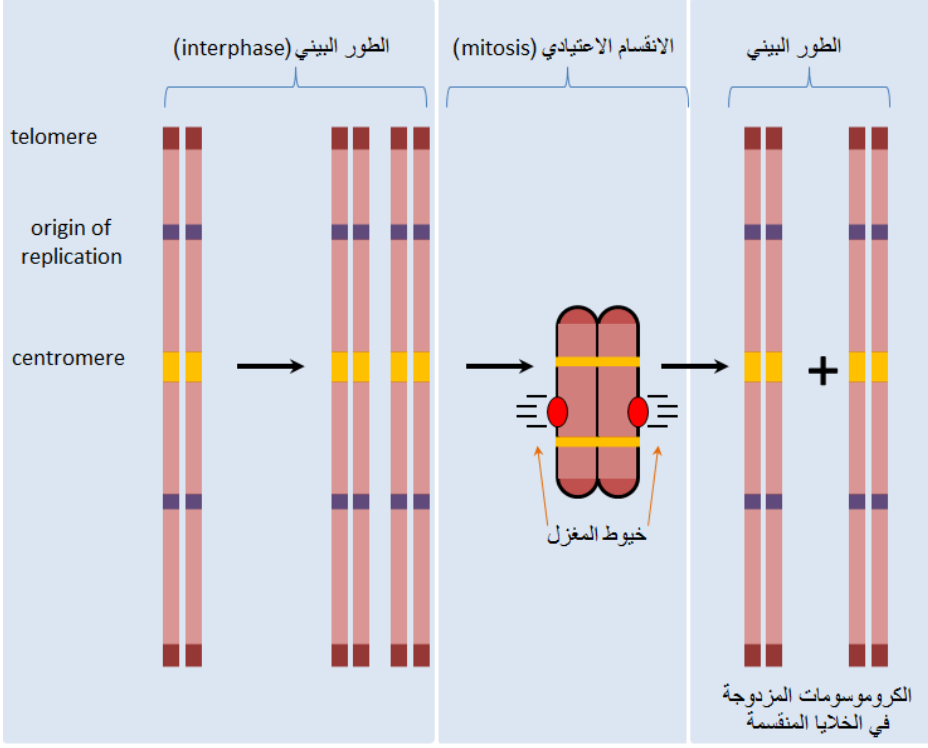
كل جزيئة DNA تكون كروموسوم خطي يجب أن تحتوي على الجزء الوسطي (سنترومير centromere)، واثنان من الأجزاء الطرفية (التيلوميرات telomeres)، وأصول التضاعف (replication origins). ولكن قبل أن نوضح معنى التيلومير والسنترومير لا بد لنا من إعطاء أساسيات بسيطة حول الحالات المختلفة للكروموسومات خلال دورة الخلية، حيث تتضاعف الكروموسومات خلال الطور البيني interphase، وتصبح خلال الانقسام الخلوي mitosis متكتفة بشكل عالٍ ويمكن فصلها وتوزيعها إلى نواتين بنويتين two daughter nuclei. تعرف الكروموسومات المتكتفة بشكل عالٍ في الخلية المنقسمة بالكروموسومات الانقسامية mitotic chromosomes (شكل 8.2)، ويعتبر هذا الشكل من الكروموسومات هو أكثر شكل كروموسومي يمكن رؤيته بسهولة، وفي الحقيقة، فإن كل صور الكروموسومات المبينة في الكتب المختلفة هي كروموسومات في طور الانقسام الخلوي mitosis، ولكن في حقيقة الأمر، إن مظهر الكروموسومات بهذا الشكل لا يدوم طويلاً، إذ إن هذه الحالة المتكتفة هي مهمة في السماح للكروموسومات المتضاعفة بأن تنفصل بواسطة خيوط المغزل الانقسامية mitotic spindles خلال انقسام

الخلية، وهذه المرحلة لا تستغرق نصف ساعة تقريباً في دورة حياة الخلية البشرية البالغة يوم كامل أما الثلاث وعشرين الساعة والنصف المتبقية فيكون فيها الـ DNA بشكل خيوط متشابكة. وخلال أطوار دورة الخلية عندما لا تكون الخلية في حالة انقسام (الطور البيني interphase)، تمتد الكروموسومات ويوجد الكثير من الكروماتين كخيوط مشربة نحيفة وطويلة في النواة بحيث لا يمكن رؤية الكروموسومات بسهولة بشكل مميز. تدعى الكروموسومات بهذه الحالة الممتدة بالكروموسومات البينية interphase chromosomes.



شكل (8.2): مظهر كروموسوم الطور الاستوائي (metaphase chromosome) النموذجي تحت المجهر. يتألف كل كروموسوم من كروماتيدين، كل كروماتيد يحتوي على إحدى جزيئي الـ DNA المتمثلين. أما السنترومير، حيث يعتبر المكان الذي يرتبط فيه الكروماتيدين، فيعد ضرورياً لفصلهما في المراحل الأخيرة من الانقسام الخلوي. وتعمل التسلسلات التيلوميرية على حماية الأطراف الكروموسوم النهائية ووظائف أخرى (تصميم المؤلف).

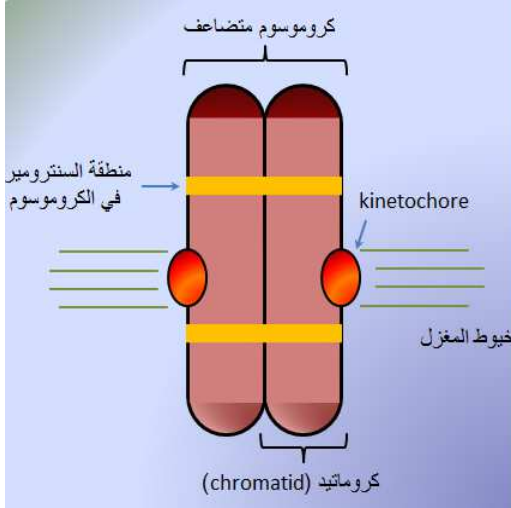
يعمل الكروموسوم كوحدة تركيبية مميزة وذلك لكي تعبر نسخة واحدة منه لكل خلية بنوية عند الانقسام، كل كروموسوم يجب أن يكون قادراً على أن يتضاعف، والنسخ المتضاعفة حديثاً يجب أن تنفصل لاحقاً وتتجزأ بشكل صحيح إلى خليتين بنويتين. هذه الوظائف الرئيسية، يتم التحكم بها من قبل ثلاث أنواع مختلفة للتسلسلات النيوكليوتيدية المتخصصة في الـ DNA، يرتبط كل منها ببروتينات متخصصة والتي تفقد الآلة التي تضاعف وتفصل الكروموسومات (شكل 9.2).



شكل (9.2): ضرورة وجود ثلاث أنواع من تسلسلات الـ DNA لإنتاج كروموسوم حقيقي النواة والذي يمكن له أن يتضاعف وينفصل عند الانقسام الخيطي. كل كروموسوم يمتلك عدة أصول للتضاعف، وسنترومير واحد، واثنان من التراكيب التيلوميرية. يبين هنا تسلسل الأحداث لكروموسوم نموذجي خلال دورة الخلية. يبدأ تضاعف الـ DNA في الطور البيني عند أصول التضاعف ويستمر باتجاهين. وفي طور الانقسام الخيطي، يرتبط الكروموسوم المتضاعف بخيوط المغزل ولهذا توزع نسخة واحدة لكل خلية بنوية خلال الانقسام الخيطي. يساعد السنترومير على حمل الكروموسومات المتضاعفة مع بعضها البعض إلى أن تستعد بأن تزال على حدة. تكون التيلوميرات قلنسوات خاصة في كل نهاية كروموسوم (تصميم المؤلف).

يعمل النوع الأول من التسلسل النيوكليوتيدي كأصل تضاعف replication origin، وهو الموقع الذي تبدأ به عملية تضاعف الـ DNA. تحتوي كروموسومات حقيقية النواة على العديد من أصول التضاعف وذلك لتضمن بأن كل الكروموسوم كاملاً يمكن له من أن يتضاعف بسرعة. وبعد التضاعف، تبقى الكروموسومات البنوية متصلة إحداها بالأخرى، وباستمرار دورة الخلية بالسير قدماً تتكثف الكروموسومات أكثر لتنتج الكروموسومات الانقسامية. إن وجود تسلسل DNA متخصص ثاني يدعى بالـ centromere، يسمح لنسخة واحدة من كل كروموسوم متضاعف ومتكثف بأن ينسحب إلى كل خلية بنوية عندما تنقسم الخلية. يدعى معقد البروتين الذي يتكون عند الـ centromere بالـ kinetochore، والذي

يربط الكروموسومات المتضاعفة بخيوط المغزل الانقسامية، ليسمح لها بأن تنسحب كل على حدة (شكل 10.2).



شكل (10.2): مخطط يوضح ارتباط معقد الـ kinetochore ما بين الأجزاء الوسطية للكروموسوم centromeres وخيوط لمغزل الانقسامية mitotic spindles (تصميم المؤلف).

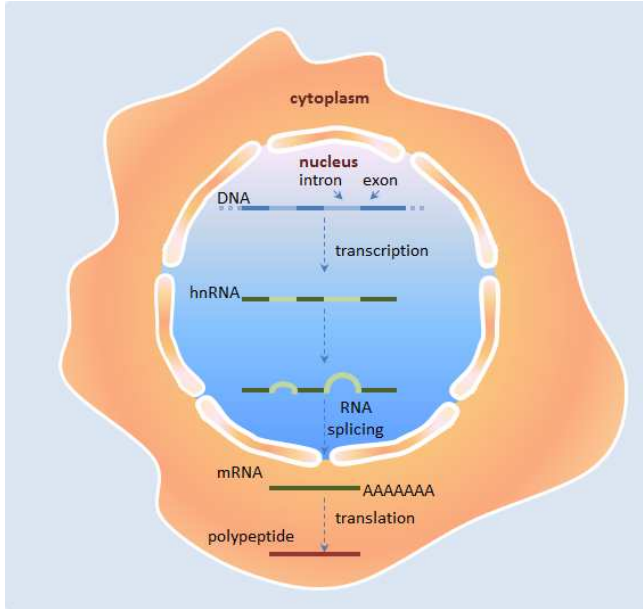
يكون النوع المتخصص الثالث من تسلسلات الـ DNA ما يعرف بالـ telomeres (إن كلمة *telo* هي كلمة إغريقية تعني "طرف"، ومعنى *"mero"* هو جزء، ولهذا فمعنى telomeres هو الأجزاء الطرفية)، وهي النهايات الطرفية للكروموسومات. يحتوي الـ telomere على تسلسلات نيوكليوتيدية تمكن نهايات الكروموسومات من أن تتضاعف بشكل كفوء. تنجز الـ telomeres كذلك وظيفة أخرى، حيث إنها وبالتعاون مع بروتينات معينة ترتبط بها تكون تراكيب تحمي نهاية الكروموسومات من أن تتميز من قبل الخلية كجزيئة DNA مكسورة تحتاج إلى إصلاح. عموماً، عندما يرتبط الـ telomere مع هكذا بروتينات يتكون معقد بروتيني نووي nucleoprotein complex يشبه العقدة وذلك لجعل الإنزيمات الهاضمة يائسة من كسر النهاية الطرفية للكروموسومات. وذلك مما حدا ببعض المختصين في مجال الوراثة الجزيئية من تشبيه تلك الأجزاء الطرفية بالقطعة للماعة الموجودة في طرف رباط الحذاء (قيطان الحذاء).

تدفق المعلومات الوراثية the flow of genetic information

إذا كان تسلسل الأحماض الأمينية الموجودة في البروتين محكومة من قبل تسلسل الأحماض النووية الموجودة في الـ DNA، فكيف يمكن لجزيئة مثل الـ DNA أن تتحكم بتخليق البروتينات في الساييتوبلازم وهي قابعة في مكانها في النواة؟ إذن لا بد من وجود جزيئات صغيرة لها القابلية على الانتقال من النواة (مكان الـ DNA الذي هو مصدر

المعلومات) إلى الرايبوسومات في السايٲوبلازم (حيث يخلق البروتين). وبما أن جزيئة الـ RNA تقع أساسا في السايٲوبلازم، لذا، يبدو من المنطقي أن نعتبر الـ RNA كمادة وسطية تحمل المعلومات الوراثية من الـ DNA إلى الرايبوسومات. إذن هنالك مسلك لجريان المعلومات الوراثية يعرف بالعقيدة المركزية لعلم الأحياء الجزيئي central dogma of molecular biology والذي يمكن تلخيصه بالشكل (11.2).

طبقاً لهذا المفهوم، تخلق جزيئات الـ RNA من الـ DNA القالب في عملية تدعى الاستنساخ transcription، ويخلق البروتين من الـ RNA القالب بعملية تدعى الترجمة translation. تستنسخ المعلومات الوراثية الموجودة في الـ DNA المتمركز في النواة، إلى تسلسل نيوكليوتيدي متخصص في جزيئة الـ mRNA، وتترجم تلك المعلومات الموجودة في جزيئة الـ mRNA في السايٲوبلازم إلى تسلسل أحماض أمينية متخصصة في البروتين.



(11.2): العقيدة المركزية لعلم الأحياء الجزيئي. لاحظ هنا تدفق المعلومات التقليدي من الـ DNA إلى الـ RNA عبر الاستنساخ إلى البروتين عبر الترجمة (تصميم المؤلف)

الاستنساخ المعاكس reverse transcription

تحتوي الخلايا على كلا الـ DNA والـ RNA وذلك حسب قانون العقيدة المركزية لعلم الأحياء الجزيئي، حيث أن هنالك مسلك واحد لجريان المعلومات الوراثية من الـ DNA إلى الـ RNA، وتدعى العملية بالاستنساخ transcription، ومن الـ RNA إلى البروتين بعملية تدعى بالترجمة translation. وكان يعتقد خلال الخمسينيات والستينيات من القرن الماضي بأن المعلومات الوراثية يمكن لها فقط أن تنتقل من الـ DNA إلى الـ RNA وليس

من الـ RNA إلى الـ DNA. تحتوي الفايروسات (التي تختلف عن الخلايا) أما على الـ DNA أو على الـ RNA. وتلك الفايروسات التي تحتوي على الـ DNA، فإن القاعدة أعلاه في الطريق الواحد لجريان المعلومات الوراثية يمكن تطبيقها بدون صعوبة. وهنا يبرز السؤال: ما ذا يحدث في حالة تلك الفايروسات الحاوية على RNA؟

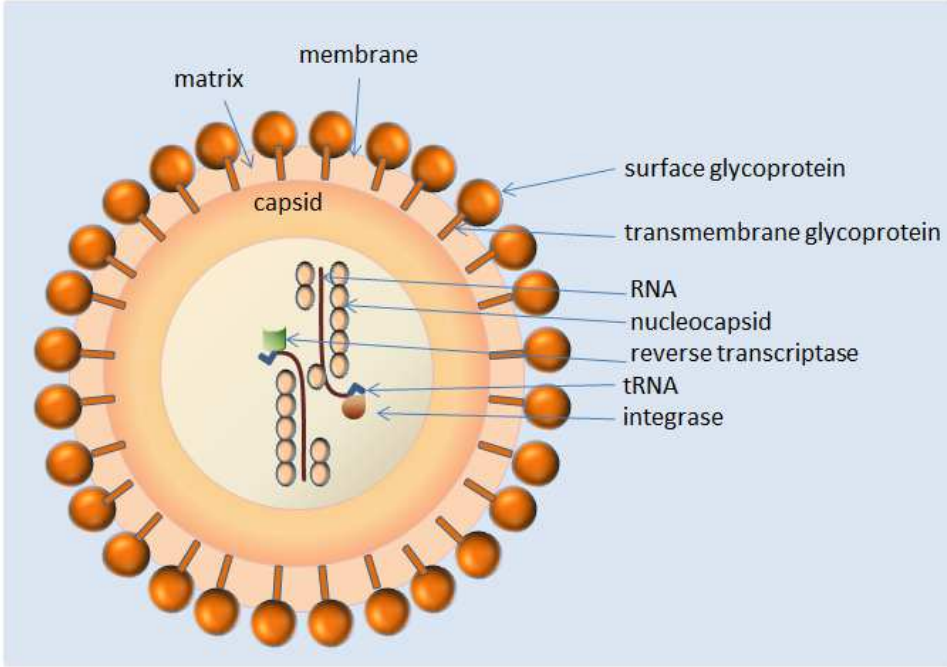
إن أحد المجاميع المهمة للفايروسات الحيوانية تتضمن الـ retroviruses والتي تحتوي مادتها الوراثية على RNA مفرد الشريط والتي يمكن لها أن تعمل كـ mRNA ولكنها لا تعمل كذلك وإنما بدلاً من ذلك تعمل كقالب لتخليق الـ DNA المزدوج الشريط. وبمعنى آخر، تبدي هذه الفايروسات جريان المعلومات الوراثية باتجاه معاكس، هذا يعني، من الـ mRNA إلى الـ DNA.



في عام 1963 بين Howard Temin بأن تضاعف الفايروسات الارتجاعية retroviruses التي تحتوي دقائقتها على جينوم الـ RNA، تنتبط باستخدام المضاد الحيوي actinomycin D، والذي يرتبط بالـ DNA فقط، بينما لا ينتبط تضاعف فايروسات الـ RNA الأخرى باستخدام هذا العقار. وبما أن هذه المعلومة مربكة للمجتمع العلمي آن ذاك

لأنها لا تتوافق مع العقيدة المركزية لذا قوبلت بالتجاهل إلى عام 1970، عندما نشر كل من Temin و David Baltimore ملاحظة احتواء دقائق الفايروسات الارتجاعية على إنزيم DNA polymerase المعتمد على الـ RNA (RNA dependent DNA polymerase) أو المعروف بالـ reverse transcriptase. ويشار إلى هذا النوع من الجريان المعاكس للمعلومات الوراثية أحياناً بالـ "Teminism" نسبة إلى أحد مكتشفيه وهو Temin. إن نوع الجريان المعاكس للمعلومات، يكون ضد قاعدة العقيدة المركزية، وهذا قد اكتشف من قبل Temin و Baltimore كل على حدة عام 1970. استلم Temin و Baltimore جائزة نوبل لاكتشافهما لهذا الإنزيم. يدخل هذا الإنزيم في عملية خمج الفايروس الورمي للخلية الطبيعية وتحول تلك الخلية إلى خلية سرطانية. عندما يدخل الـ RNA الفايروسي إلى الخلية يكون محملاً بهذا الإنزيم معه (شكل 12.2). يقوم الإنزيم بتخليق حلزون مزدوج هجين يتكون من DNA و RNA معاً (DNA-RNA double helix)، والذي يتحول إنزيمياً إلى حلزون مزدوج أصيل أي أن كلا الشريطين هما من الـ DNA (DNA-DNA double helix) والذي يستطيع أن ينحشر في كروموسوم العائل.

وبعد الانحشار، يستنسخ الـ DNA إلى نسخ من الـ RNA الفايروسي، والذي تتم ترجمته وتعبئته بدقائق فايروسية جديدة والتي تتحرر من الخلية وتعيد عملية الخمج من جديد.



شكل (12.2): تركيب الفايروسات الارتجاعية retrovirus structure. إن RT يعني إنزيم reverse transcriptase. يقوم الـ retrovirus بتحويل الـ RNA إلى DNA بمعونة إنزيم reverse transcriptase المحمول من قبل الفايروس نفسه. ويقوم إنزيم integrase بحشر الفايروس في جينوم العائل. أما NC فتعني غلاف الـ nucleocapsid الذي يحيط بالمادة الوراثية للفايروس. ويشير TM إلى البروتين السكري العابر للغشاء (تصميم المؤلف). transmembrane glycoprotein.

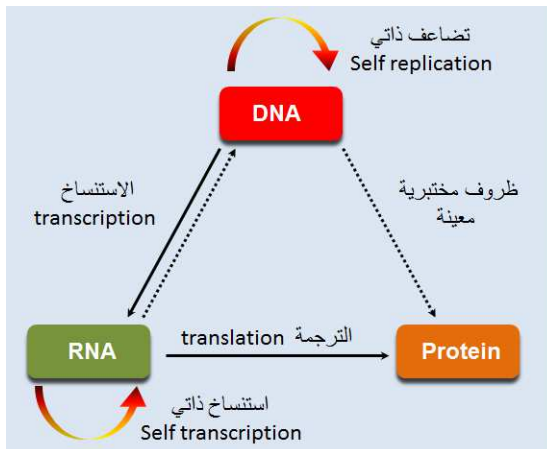
تضاعف الـ RNA الذاتي

إن التحويل الثاني في العقيدة المركزية الأصلية هو حقيقة اكتشاف قابلية الـ RNA على أن يعمل كقالب لتضاعفه الخاص به. لقد لوحظت هذه العملية بصنف صغير من عاثيات الرنا (RNA phages)، كما في R17 و MS2 وغيرها. يحتوي عاثي MS2 على 3500 نيوكليوتيدة والتي تشفر لثلاث بروتينات فقط، وهي بروتين الغلاف (coat protein) وبروتين الاتصال (attachment protein) والمسؤول عن الاتصال وما يتلوه من اقتحام العائل) والوحدة الثانوية لإنزيم RNA replicase، حيث ترتبط الوحدة الثانوية لإنزيم RNA replicase بثلاث بروتينات خلوية لكي تكون RNA replicase، والذي

يسمح بالـ RNA المفرد الشريط للعائي بأن يضاعف نفسه وبما أن البروتين الجديد الضروري لتشييد إنزيم RNA replicase يجب أن يخلق قبل أن يتمكن العائي من مضاعفة الـ RNA التابع له، إن RNA العائي يجب أن يعمل في البداية كمراسل عندما يخلج الخلية. وهكذا، يحدث تخليق البروتين بدون أن يسبق بعملية الاستنساخ. تستخدم المادة الوراثية للفايروس، أي الـ RNA التابع له، في البداية كمراسل في عملية الترجمة ومن ثم تستخدم كقالب لتضاعف الـ RNA.

تدخل الـ DNA في عملية الترجمة

و صصفي منتصف الستينيات، بين B. J. McCarthy و J. J. Holland بأنه يمكن للـ DNA المفرد الشريط (الممسوخ) تحت ظروف مختبرية معينة أن يرتبط بالرايبوسومات وأن يترجم إلى بروتينات. تضمنت تلك الظروف المختبرية إضافة المضادات الحيوية التي لها القابلية على التداخل مع الـ DNA أو مع الرايبوسوم. ولم يعرف هل من الممكن حصول ترجمة مباشرة للـ DNA بشكل طبيعي. أما بالنسبة لقدرة البروتين الذاتية، فلا توجد حتى في العقيدة المركزية المحدثة (شكل 13.2) أسهم تبدأ من البروتين. وبمعنى آخر، لا يمكن للبروتين من أن يضاعف نفسه، ولا حتى أن يستخدم معلومات تسلسل الأحماض الأمينية ليشيد الـ RNA أو الـ DNA. ولكن، ربما يستحدث هناك تحويراً إضافياً على العقيدة المركزية وذلك نظراً لوجود بروتين استثنائي يدعى بالبرايون والتي أشارت البحوث على قدرته في عكس اتجاه العقيدة المركزية. لذا، يعلق Reed Wickner وهو أحد المختصين في مجال البرايون على هذا الموضوع قائلاً: " كما أن الأحماض النووية يمكن لها أن تعمل كمحفزات للتفاعلات الانزيمية (أنظر ملحق الفصل الرابع)، يمكن للبروتينات أن تعمل كجينات" وهنا يبرز استثناء آخر وهو دور بعض البروتينات كالبرايون مثلاً (أنظر ملحق هذا الفصل) في إضافة أرباك آخر إلى العقيدة المركزية لجريان المعلومات الوراثية



شكل (13.2): النمط المحدث للعقيدة المركزية لـ Crick، والتي تبين كل المسالك المعروفة في نقل المعلومات الوراثية. إن المسالك القديمة للعقيدة المركزية منذ أن افترضها Crick مبينة باللون الأحمر المتقطع (الاستنساخ العكسي و مضاعفة الـ RNA الذاتية وترجمة الـ DNA المباشرة). تم التعرف على ترجمة الـ DNA المباشرة فقط تحت الظروف المختبرية، ولكن يبدو أن هذه العملية لا تحدث في الطبيعة. لا يوجد هناك معلومات تبين بأن تدفق المعلومات الوراثية يبدأ بالبروتين (تصميم المؤلف).

ملحق الفصل الثاني

تطبيقات البرايون ودوره المثير في مفهوم العقيدة المركزية



Stanely Prusiner

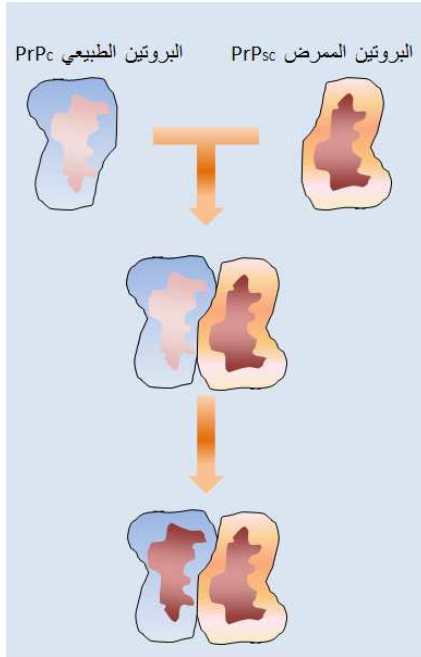
سميت البرايون (prion) بهذا الاسم من قبل Stanley B. Prusiner في عام 1984 وقد منح نفس العالم على جائزة نوبل في الفلسفة والطب عام 1997 لاكتشافه لخواص بروتينات البرايون، حيث اشتق مصطلح برايون (prion) من عبارة "proteinaceous infectious particles" والتي تعني "الدقائق البروتينية الخامجة"، وهي عناصر معدية يعتقد بأنها تتكون من نوع مفرد من الجزيئات البروتينية بدون أي حمض نووي، ويمكن لها أن تقاوم الحرارة والأشعة فوق بنفسجية والأشعة المتأينة بالإضافة إلى مقاومتها للمعاملات الكيميائية المحطمة للفايروسات (كما في المقاومة للفينول أو الإنزيمات الهاضمة للأحماض النووية). يبلغ الوزن الجزيئي لبروتين البرايون 50000 إلى 100000 دالتون، ويكون هذا الوزن أصغر بمئة مرة من أصغر فايروس.

ترتبط هذه العناصر المعدية مع الأمراض الفايروسية "البطيئة" كما في Creutzfeldt-Jakob disease في البشر ومرض scrapie في الخرفان ومرض bovine spongiform encephalopathy (BSE) (أو مرض جنون البقر) disease في الماشية. كل هذه الأمراض تكون مهلكة، وكلها يعتقد بأنها تسببت من هضم بروتين الشخص المريض أو من طفرة في الجين الطبيعي. ولا يوجد لأي من تلك الأمراض علاج يذكر. ان أهم خاصية في مرض الـ scrapie هو أنه لم يتمكن أي شخص من أن يحصل على افادة كيميائية بأنه يحتوي على حمض نووي. وفي البدء، جوبه افتراض Prusiner بتألف بروتينات البرايون كلياً من بروتين مفتقداً لأي أثر للحمض النووي وبأنها تتضاعف بدون أي جينات بالنقد الشديد. وذلك لأن أحد أساسيات علم البايولوجيا الحديث هو امتلاك كل الأشياء الحية معلومات موروثية بشكل DNA أو RNA، إذن، كيف يمكن للبرايون من أن يتكاثر بدون الحمض النووي، أو بمعنى آخر كيف يمكن للبروتين الذي يبدو أنه لا يحتوي على مادة وراثية من أن يسبب مرضاً قابلاً للنقل transmissible disease حينما يتناوله الكائن الحي من اللبائن والبشر؟ افترض Prusiner عدة آليات يمكن من خلالها للبروتين الخامج (infective protein) من أن يحث نسخ البروتين الطبيعي على تحولها الى بروتينات خامجة. تتضمن واحدة من تلك الآليات سلسلة متتالية من الأحداث والتي فيها يرتبط البروتين الخامج PrPSc بالبروتين الطبيعي PrPc، وينتج هذا في بروتينين خامجين

من نوع PrP^{Sc}. ينتج أحد ذلكما البروتينين من هذا المعقد بروتينين أيضاً، والاثنان ينتجان لأربع وهكذا.

ينشأ نوع من الإرباك من حقيقة وجود ذلك البروتين والجين الذي يشفر عنه في الخلايا الطبيعية "الغير مخموجة". فعلى الرغم من عدم معرفة الدور الذي يلعبه بروتين PrP الطبيعي (PrP^C) إلا أنه يعبر عنه بشكل ملحوظ من قبل جين PrnP الذي يشفر عنه. وعندما يوجد PrP^{Sc} (وهو الشكل الخامج) فإنه يتداخل مع PrP^C ويسبب انطواء الأخير إلى الشكل البروتيني المسبب للمرض (شكل 14.2)، وبالتالي، فإن الخمج بالبرايون الممرض PrP^{Sc} يحول بروتين PrP الطبيعي إلى بروتين PrP الغير طبيعي والذي يكون البرايون.

يبدو أن تراكم PrP^{Sc} في الدماغ يكون مسؤولاً عن الأمراض العصبية المنتسبة من قبل البرايون. يدعى هذا التفسير لأمراض البرايون بفرضية "البروتين فقط" (protein only hypothesis) والتي أكدت العديد من التجارب صحتها بعد ذلك. وعلى الرغم من عدم وضوح آلية تضاعف وتكاثر البرايون، ولكن يعتقد بأن بروتين البرايون يعمل بطريقة ما كقالب (template) لإنجاز عملية الترجمة العكسية (reverse translation)، أي عملية التحول من بروتين إلى RNA إلى DNA. وبهذه الطريقة، يقلب العقيدة المركزية للبايولوجيا الجزيئية رأساً على عقب!



شكل (14.2): التغيرات التركيبية في البرايون الطبيعي PrP^C بواسطة البرايون الممرض PrP^{Sc} حيث يقوم البرايون الممرض المطوي بشكل غير مرغوب بإعادة طي البرايون الطبيعي بعد الارتباط معه. حيث تبدل هيئة البرايون الطبيعي من حلزون ألفا إلى صفيحة بيتا. وهناك ميلًا للهيئة الثانية البديلة في التجمع مع بعضها البعض، وهذا يكون تجلطات تضر بالدماغ (تصميم المؤلف).

أسئلة الفصل الثاني

السؤال الأول: علل مايلي

- على الرغم من وجود الانترونات كجزء أساسي في تركيب جينات حقيقية النواة الا انه يتم ازالتها بعد عملية الاستنساخ؟
- تعد ظاهرة الجينات المتداخلة overlapping genes خطرة على النظام الجيني؟
- إذا كان تسلسل الأحماض الأمينية الموجودة في البروتين محكومة من قبل تسلسل الأحماض النووية الموجودة في الـ DNA، فكيف يمكن لجزيئة مثل الـ DNA أن تتحكم بتخليق البروتينات في السايكوبلازم وهي قابعة في مكانها في النواة؟
- تحتوي كروموسومات حقيقية النواة على العديد من أصول التضاعف؟
- شبيه بعض المختصين في مجال الوراثة الجزيئية بتشبيه التيلومير بقيطان الحذاء (shoe lace)؟

السؤال الثاني: أختار الجواب الصحيح

- تصنف الجينات إلى صنفين وهما جينات تركيبية structural genes وجينات تنظيمية regulatory genes على أساس
 - a. function b. shape c. size d. structure
- لا بد من أن نفهم من أن الجين هو ليس
 - a. بالمستودع الفعال b. بالمستودع الخامل c. بالمستودع القريب من الأحداث الخلوية d. بمستودع أصلاً
- يعتبر في نيوكليوتيدات الـ DNA هي المعلومات الممثلة للجين.
 - a. genotype b. phenotype c. both d. neither a nor b
- يمكن لنا أن نشبه الجين بـ
 - a. letter b. word c. sentence d. paragraph
- يسمى الاصطفاغ الخطي للأحماض الأمينية بالـ
 - a. primary structure b. secondary structure c. tertiary structure d. quaternary structure
- تحتوي جزيئة على الانترونات (introns).
 - a. mRNA b. snRNA c. pre-RNA d. none
- تتكون الجينات عادة من
 - a. DNA b. RNA c. protein d. "a" or "b" e. none
- تتألف جينات بدائية النواة من تسلسلات نيوكليوتيدية غير معترضة من قبل الانترونات ماعدا
 - a. Archaeobacteria b. Eubacteria c. Helicobacteriad. Mycobacteria e. only "a" & "b"
- يحتوي العاثي ΦX174 على
 - a. 1000 genes b. split genes c. overlapping genes d. only "a" & "b" e. none
- من أهم أسباب شهرة الـ retroviruses في علم البايولوجي الجزيئي هو احتوائها على إنزيم
 - a. DNA polymerase b. DNase c. RNA polymerase d. RNase e. Reverse transcriptase
- تسمى الفرضية التي تفسر سبب مرض جنون البقر بفرضية
 - a. DNA only hypothesis b. RNA only hypothesis c. Protein only hypothesis d. only "a" & "b" e. none

السؤال الثالث: عرف ما يلي:

gene, polypeptide, phenotype, split genes, Teminism, central dogma of molecular biology, smart genes, structural genes, housekeeping genes, pseudogenes, C value paradox, polycistron, kinetochore, mitotic chromosomes

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

- Alberts B.**, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fourth edition, Garland Science/USA. 2002.
- Alberts B.**, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.
- Bolsover S.**, Hyams J., Shephard E., White H., Wiedemann C. Cell biology. Second edition, John Wiley and Sons, 2004.
- Branden, C.**, Tooze, J., 1999. Introduction to Protein Structure (2d ed.). Garland, 1999.
- Cann A.** Principles of Molecular Virology. Fourth edition, Elsevier Academic Press, 2005.
- Carter J.**, and Suanders V. Virology: principles and applications. John Wiley and Sons, 2007.
- Clark D.** Molecular biology: understanding the genetics revolution. Elsevier, 2005.
- Cochet, F.** Gannon, R. Hen, L. Maroteaux, F. Perrin, and P. Chambon. 1979. Organization and sequence studies of the 17-piece chicken conalbumin gene. *Nature* 282: 567-574.
- Creighton, T. E.** Proteins: Structures and Molecular Principles (2d ed.). W. H. Freeman and Company, 1992.
- Davis T.**, and Kipling D. Telomeres and Telomerase in Aging, Disease, and Cancer. Molecular Biology of Human Cancers An Advanced Student's Textbook - Wolfgang A. Schulz, 2008.
- Dorit, R.** Schoenbach, L. and Gilbert. W. 1990. How big is the universe of exons? *Science* 250: 1377-1382.
- Krishna R.**, and Wold. F. 1993. Post-translational modification of proteins *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 67: 265-298.
- Lewis R.** Human Genetics: concepts and applications. Ninth edition, McGraw-Hill, 2009.
- Lodish, H.**, Berk, A., Zipursky, L., and Matsudaira, P., Molecular Cell Biology (fifth edition). W. H. Freeman and Company, 2000.
- Lupsky J. R.**, and Stankiewicz P. Genomic Disorders. 2006, Humana Press Inc.
- McCarthy B.**, and Holland J. (1965). Denatured DNA as a direct template for in vitro protein synthesis. *PNAS USA* 54: 880 – 886.
- Paolella. P.** Introduction to molecular biology. First edition, WCB/McGrawHill, 1998.
- Passarge E.** Color atlas of Genetics. Second edition, Thieme, 2001.
- Pierce B.** Genetics: A conceptual approach, 2002.
- Schultz, G. E.**, and Schirmer, R. H., Principles of Protein Structure. Springer-Verlag, 1979.
- Sharp. P.** 1988. RNA splicing and genes *J. Am. Med. Assoc.* 260: 3035-3041.
- Tamarin.** Principles of genetics. Seventh edition. The McGraw-Hill. 2001.

Tilghman, S. Tiemeier, D. Seidman, J. Peterlin, B. Sullivan, M. Maizel, J. and Leder.P. 1978. Intervening sequence of DNA identified in the structural portion of a mouse b -globin gene *PNAS USA* 75: 725- 729.

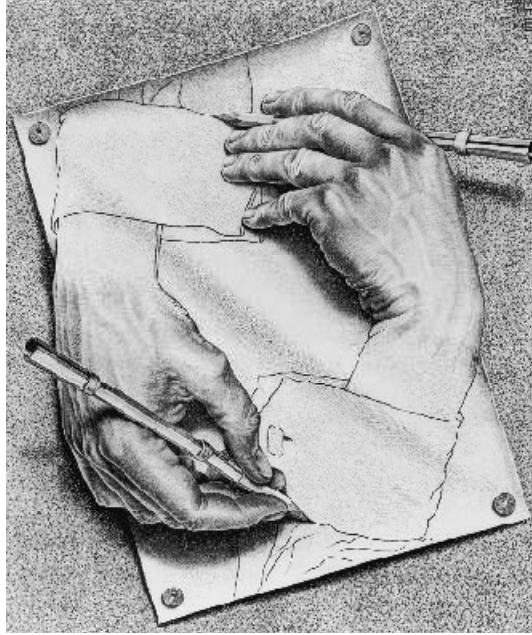
VermaP., and Agarwal V. molecular biology. First Edition Schandgoup, India 2004.

Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R. Molecular biology of the gene. Fifth edition, Pearson Prentice Hall, 2004.

3

الفصل الثالث

تضاعف الـ DNA



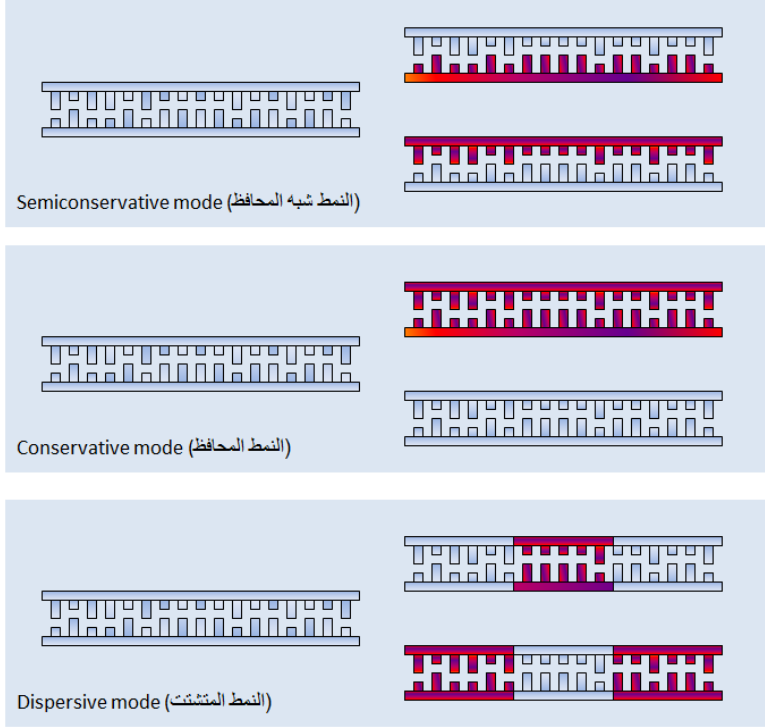
لوحة تناظرية توضح عملية التضاعف: هاتين اليدين تكمّلان بعضهما البعض وكذلك هي الحال بالنسبة لجزيئة الـ DNA الحاوية على شريطين يكملان بعضهما البعض، ليكونا فقاعة التضاعف ليمتد عليهما شريطي القالب ويرسمان طريقتهما الى الأمام كما في هذه اللوحة (Lewis, 2009).

مقدمة

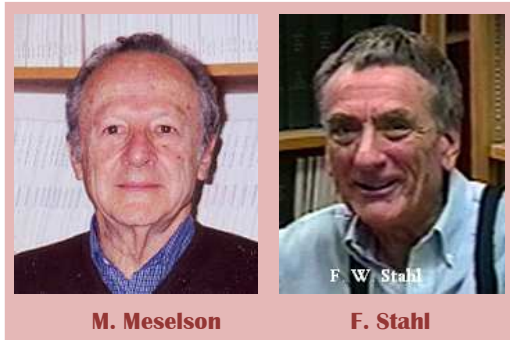
على كل الكائنات أن تضاعف الـ DNA التابع لها بدقة لا متناهية قبل كل انقسام خلوي. في هذا الفصل سوف ندرس كيف تنجز "آلية التضاعف" هذه المهمة بتلك الدقة، وذلك عند تضاعف الـ DNA بمعدل سرعة يقدر بأكثر من 1000 نيوكليوتيدة بالثانية الواحدة. تعد عملية فتح النفاذ unwinding حلزون الـ DNA المزدوج خطوة أساسية في عملية التضاعف replication والاستنساخ transcription. وعندما يتضاعف حلزون الـ DNA المزدوج، فإن كل سلسلة تعمل كقالب template لتخليق السلسلة المكملة complementary chain. اقترحت هنا آلية الازدواج القاعدي base-pairing بأن شريطي الـ DNA الجديدين يستنسخان من الشريطين القديمين. ولو أن هذه الآلية توفر نسخا دقيقا للمعلومات الوراثية، ولكنها أثارت تساؤلا حول: هل إن التضاعف محافظ أو شبه محافظ؟

في الآلية الأولى، الآلية المحافظة (conservative mode)، فإن الشريطين الأبويين يكونا حلزوناً مزدوجاً جديداً بينما يبقى الحلزون المزدوج القديم سليماً، بينما في الآلية الثانية، الآلية شبه المحافظة (semiconservative mode)، يزدوج كل شريط قديم مع الشريط الجديد المستنسخ منه، وسميت بهذا الاسم وذلك بسبب المحافظة على شريط واحد فقط في الـ DNA الأبوي في كل حلزون مزدوج ناتج، أي نصف الحلزون من أحد الشريطين القديمين، ونصفه من أحد الشريطين الجديدين الناتجين.

أما في الآلية الثالثة، الآلية المتشتتة (dispersive mode)، يتحطم كلا شريطي النيوكليوتيدات (يتشتت disperse) إلى قطع، والتي تعمل كقوالب لتخليق قطع جديدة من الـ DNA، ثم وبطريقة ما يعاد تكوينها من جديد إلى جزيئتي DNA كاملتين. وفي هذه الآلية، تتشتت كل جزيئة DNA مع قطع الـ DNA القديمة والجديدة، وفي هذه الحالة، لا يحافظ على أي من القطع الأصلية (شكل 1.3).

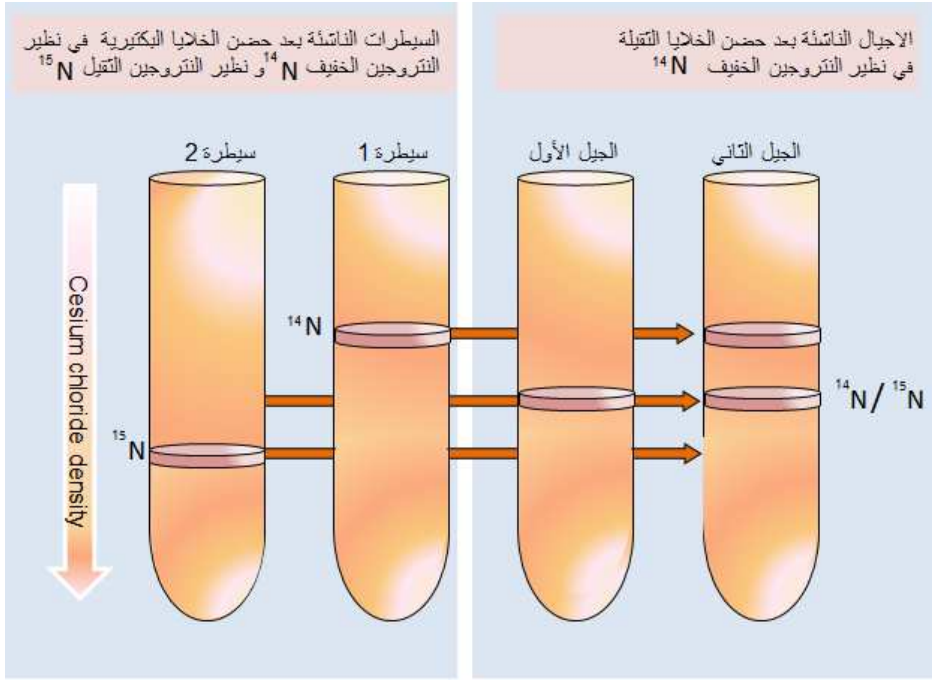


شكل (1.3): مخطط يوضح الفرضيات الثلاثة لتضاعف الـ DNA ، والتي تشمل الآلية شبه محافظة، والآلية المحافظة، والآلية المتشتتة. يشير اللون الأزرق الى الأشرطة الأبوية بينما يشير اللون الأحمر الى الأشرطة البنوية (تصميم المؤلف).



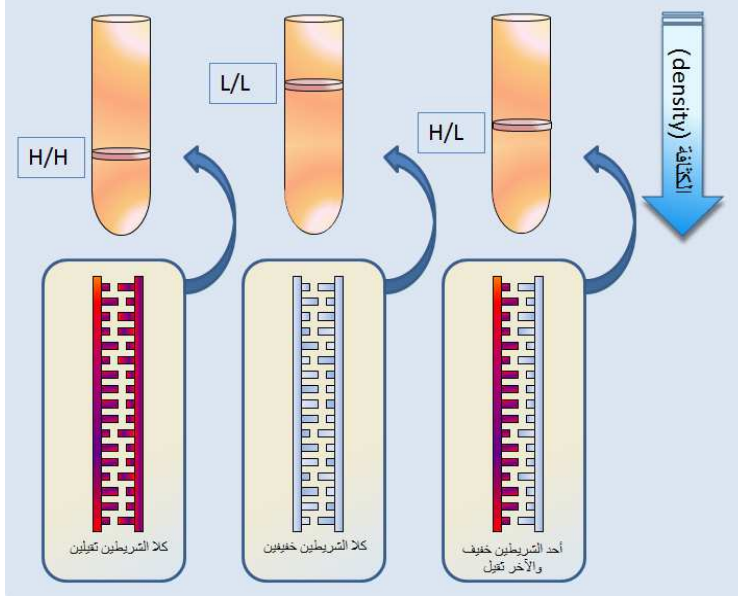
على الرغم من عدم احتياج التضاعف شبه المحافظ إلى آلية تكنولوجية لتضاعف جزيئة الـ DNA، ولكنه يحتاج إلى مقدار كبير من البراعة لابتكار تجربة تثبت ذلك للمرة الأولى. وكان هذا الابتكار من نصيب كل من Meselson و Stahl في عام 1958 حيث تصورا طريقة لإثبات الآلية شبه المحافظة في تضاعف المادة الوراثية (الجينوم) لبكتريا القولون.

اعتمد عمل طريقتهم إلى استخدام النظائر المشعة isotopes التي سوف تنتج في DNA ذو كثافات محورة بعد التضاعف. ولهذا السبب قاموا بتنمية خلايا بكتريا القولون لعدة أجيال على وسط يتكون من أيونات الأمونيوم (NH_4) كمصدر للنتروجين الذي يحتاجه الـ DNA (بالإضافة إلى البروتين) في تخليقه والذي يكون فيه كل النتروجين من نوع النظير المشع الثقيل ^{15}N (إن النتروجين الطبيعي هو ^{14}N). وبعد تنمية بكتريا القولون لعدة أجيال في هذا الوسط، وجدوا بأن DNA خلايا القولون أثقل من الـ DNA الطبيعي، بسبب وجود ذرات ^{15}N فيه، حيث اندمج النظير ^{15}N في قواعد الـ DNA خلال التضاعف. وكننتيجة، فإن الـ DNA في الخلايا الناتجة progeny cells ذات كثافة أكبر من الكثافة الطبيعية. وبعد ذلك، قاموا بنقل البكتريا المنتشعة بالوسط ^{15}N لكي تنمو في وسط يحتوي على النتروجين ^{14}N الطبيعي، وسمحوا للخلايا بأن تتضاعف جيل واحد فقط في البداية. وبعد ذلك قاموا بعزل الـ DNA من الخلايا وحلّوه بواسطة تقنية تسمح بمعرفة كثافة الـ DNA تدعى بتقنية النبذ المركزي المعتمد على تدرج الكثافة density gradient centrifugation والمنجزة باستخدام محلول كلوريد السيزيوم cesium chloride (CsCl). حيث يوضع المحلول في جهاز النبذ المركزي فائق السرعة ultra-centrifuge والذي يدور بسرعات عالية لساعات طويلة. وفي النهاية يحدث هناك توازن بين قوة النبذ المركزي والانتشار diffusion، إن مثل هذا التدرج في الكثافة يحصل في أنبوب تتضح به زيادة تركيز كلوريد السيزيوم (CsCl) من قمة الأنبوب إلى قعره. وإذا ما أضيف الـ DNA أو أية مادة أخرى فإنها تتركز وتكون حزمة في الأنبوب عند نقطة عندما تكون كثافتها نفس كثافة كلوريد السيزيوم. وإذا كان هناك عدة أنواع من الـ DNA بكثافات مختلفة، فإنها ستكون حزما مختلفة. وفي هذه التجربة، حيث ينتج DNA ^{15}N النقي حزمة مفردة من الـ DNA، ونفس الشيء بالنسبة للـ DNA ^{14}N . يكمن الفرق الوحيد في كون أن الـ DNA الأكثر كثافة ينتج في حزمة واقعة إلى أسفل أنبوب النبذ المركزي. وهكذا فإن موقع الـ DNA في الأنبوب جعل من المعقول أن نتعقب أو نراقب كثافة الـ DNA، ومن الممكن الكشف عن الحزم وذلك بملاحظة الأنابيب تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي 260 نانوميتر، والذي به تدمص الأحماض النووية بقوة). وعلى أية حال، فعند تحليل DNA الجيل الجديد وجد بأنه يحتل موقعا وسطا بالضبط بين الحزمة الخفيفة (حزمة الجيل الجديد) والحزمة الثقيلة (حزمة الجيل السابق). إن هذا بنفسه، ليس بمفاجئة، لأن هذا يخبرنا بأنه ليس أكثر من أن نصف ذرات النتروجين في الـ DNA الجديد هي ^{14}N والنصف الآخر هي ^{15}N ، حيث إن الحزمة الوحيدة المرئية في الـ DNA المعزول هي تلك المطابقة للهجين ^{14}N ، ^{15}N -DNA (شكل 2.3)، وذلك لأن التضاعف شبه محافظ semiconservative. وإذا كان التضاعف محافظا conservative، فسوف يظهر لدينا حزمتين في الجيل الأول من التضاعف والتي تمثلان حزمة DNA ^{15}N الأصلية وحزمة DNA ^{14}N الجديدة.



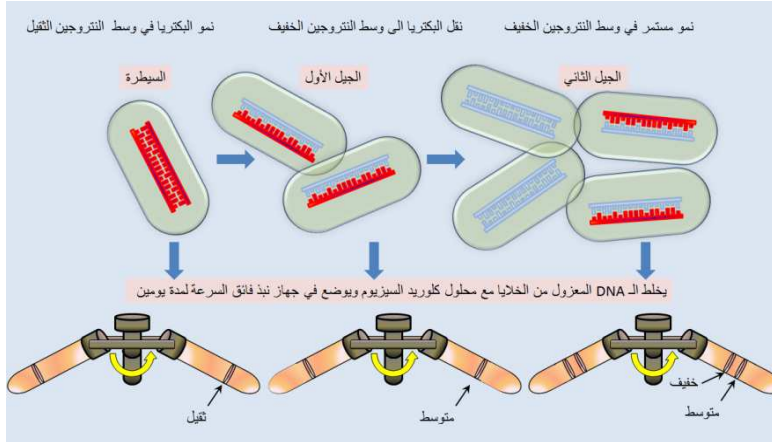
شكل (2.3): مخطط يوضح مواقع حزم الـ DNA الناتجة عن الاختلاف في كثافة النروجين في الجيلين الأول والثاني ومقارنتهما مع سيطرة النروجين الثقيل وسيطرة النروجين الخفيف (تصميم المؤلف).

ليس هذا فحسب، وإنما وخلال الأجيال المتعاقبة، إذا كانت طريقة التضاعف محافظة، فإن الـ DNA الأصيل سوف يستمر بالظهور ممثلاً بالحزمة ^{15}N . وهذا بالطبع لم يحدث. وإذا كانت طريقة التضاعف متفرقة *dispersive*، فإن النتيجة ستكون ظهور نمط ذو حزم متعددة، وذلك اعتماداً على درجة التفرق. إن النتائج المبينة في الشكل (3.3) هي متوافقة تماماً مع آلية التضاعف شبه المحافظ فقط الآلية شبه المحافظة، لأن النتائج في الأجيال المتعاقبة قد اتفقت مع هذا الطرح. وهكذا، فإن نتيجة تحليل الـ DNA للجيل الثاني النامي في وسط الواسم الخفيف ^{14}N بين كميات متساوية من كثافة الـ DNA الهجين وكثافة الـ DNA الخفيف، أما الجيل الثالث والأجيال الأخرى فبين زيادة في نسبة ^{14}N على نسبة ^{15}N ، وتتمثل هذه النسبة بزيادة سمك حزمة ^{14}N .



شكل (3.3): مخطط يوضح طبيعة أشربة الـ DNA الممتلئة لمواقع الحزم المختلفة في أنبوب الطرد المركزي (تصميم المؤلف)

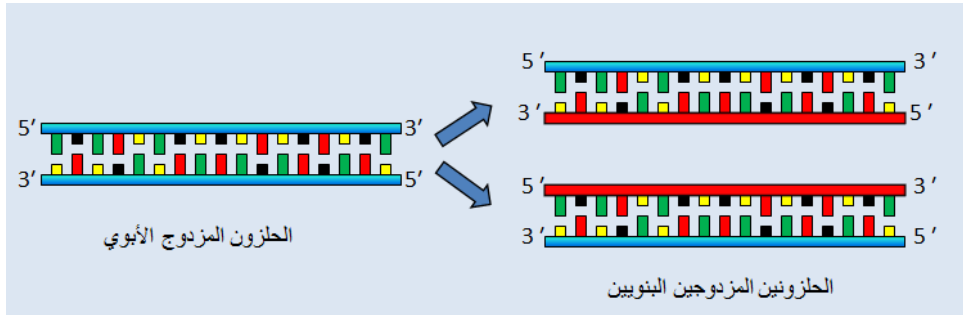
وبعد اجراء تلك التجارب عرف وبشكل واضح بأن الـ DNA في الكائنات بدائية وحقيقية النواة يتضاعف بشكل شبه محافظ. ومن الجدير بالذكر إن بعض المؤرخين والفلاسفة في مجال الوراثة قد اعتبروا هذه التجربة (شكل 4.3) من أكثر التجارب العلمية المنجزة روعة.



شكل (4.3): مخطط شامل لتجربة Meselson و Stahl عام 1958 والتي يوضح فيها الخطوات العملية للتجربة التي من خلالها تم معرفة الفرضية الصحيحة لتضاعف الـ DNA (تصميم المؤلف).

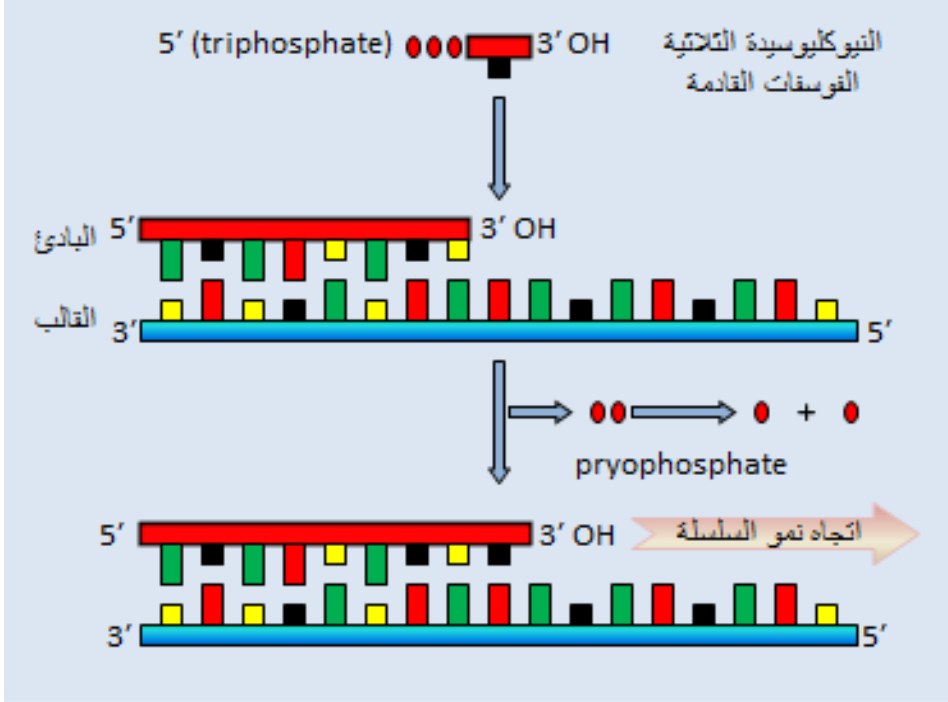
الازدواج القاعدي وتضاعف الـ DNA

كما تم الإشارة إليه سابقاً، يعد قالب الـ DNA أساس ومبدأ عملية التضاعف فضلاً عن عملية الاستنساخ، حيث أن كل شريط مكمل للشريط المقابل له (A with T, and G with C) حيث تستلزم عملية المتممة complementarity بين أشرطة الـ DNA أن تميز كل نيوكليوتيدة في شريط القالب template النيوكليوتيدة الحرة المكمل لها لترتبط بها بأواصر هيدروجينية (شكل 5.3).



شكل (5.3): حلزون الـ DNA المزدوج الذي يعمل كقالب لتضاعفه. بما أن النيوكليوتيدة A سوف تزدوج وينجاح مع النيوكليوتيدة T، و G فقط مع C، فإن كل شريط DNA من الممكن أن يعمل كقالب لكي يحدد تسلسل النيوكليوتيدات في شريطه المكمل وذلك بواسطة الازدواج القاعدي. وبهذه الطريقة، جزيئة الـ DNA ذات الحلزون المزدوجة يمكن أن تستنسخ بدقة. يدل اللون الأزرق على الأشرطة الأبوية بينما يدل اللون الأحمر على الأشرطة البنوية (تصميم المؤلف).

وهكذا تستمر عملية البلمرة polymerization بالاتجاه 5' إلى 3' وبتحفيز من قبل إنزيم DNA polymerase، والذي اكتشف سنة 1957. أن النيوكليوتيدات الحرة التي تعمل كمادة أساس substrate لهذا الإنزيم وجد بأنها تكون على هيئة deoxyribonucleoside triphosphates، أن سبب وجودها بهيئة ثلاثية الفوسفات هو لإعطائها الطاقة اللازمة للوصول إلى النيوكليوتيدات المكملة والواقعة في الشريط القالب. وتكون كل النيوكليوتيدات المندمجة في سلسلة الـ DNA أو الـ RNA بشكل أحادي الفوسفات، يستثنى من ذلك النيوكليوتيدة الطرفية في النهاية 5' حيث تكون بشكل ثلاثي الفوسفات، وهنا تحتوي بالإضافة إلى مجموعة الفوسفات α على مجموعتي الفوسفات β و γ (شكل 6.3).



شكل (6.3): عملية تخليق الـ DNA المحفزة من قبل إنزيم DNA polymerase. كما مبين، يحفز إنزيم DNA polymerase عملية إضافة النوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات التدريجية للنهاية من نوع 3' OH المتكشفة لشريط البادئ، والذي يزدوج بالشريط القالب الثاني. ولهذا يتبلر شريط الـ DNA المصنع بالاتجاه من 5' إلى 3' كما هو مبين في الشكل السابق. ولأن كل نوكليوتيدة ثلاثية الفوسفات deoxyribonucleoside triphosphate قادمة يجب أن تزدوج مع الشريط القالب لكي يتم تمييزها من قبل إنزيم الـ DNA polymerase، فإن هذا الشريط هو الذي يحدد أي من النوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات (A, C, G, or T) هي التي تضاف. يقاد التفاعل من قبل تحرير ذرتي فوسفات pyrophosphate من قبل كل نوكليوتيدة ثلاثية الفوسفات أثناء اندماجها في سلسلة الـ DNA الحديثة التكوين (تصميم المؤلف).

احتياجات إنزيم DNA polymerase

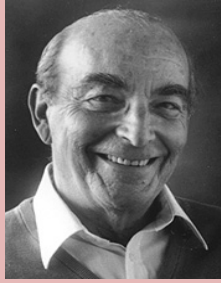
يحتاج إنزيم DNA polymerase في حالته النقية إلى:

- 1- دنا قالب DNA template
- 2- أربعة نوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات deoxynucleoside triphosphate
- 3- أيونات المغنسيوم لتخليق الـ DNA
- 4- بادئ يوفر مجموعة هيدروكسيل (3' OH end) متكشفة، وذلك لعدم قدرة إنزيم DNA polymerase على بدء التضاعف بنفسه. وعند وجود نهاية الهيدروكسيل

المتكشفة فقط هنا يتسنى للإنزيم التقدم بالتفاعل بالاتجاه من 5' إلى 3' بالاستناد على شريط القالب.

يحفز الإنزيم إضافة نيوكليوتيدات أحادية mononucleotides للنهاية الهيدروكسيلية 3' لسلسلة الـ DNA النامية. وفي نفس الوقت، ينكسر الربط بين ذرتي الفوسفات α و β ، محررة مجموعة البايروفوسفات (PPi) الغير عضوية. ان تكوين الأصرة ثنائية الفوسفات ربما يحدث كهجوم محب للنواة nucleophilic attack، بواسطة مجموعة 3' OH، على ذرة الفوسفات α للنيوكليوسيدة ثلاثية الفوسفات الداخلة في السلسلة. يسبب هذا الهجوم إزاحة مجموعة الـ pyrophosphate وتكوين رابطة داخل نيوكليوتيدية intra-nucleotide linkage.

قصة الإنزيمين DNA polymerase I و DNA polymerase III



Arthur Kornberg

في عام 1957، عزل آرثر كورنبرغ Arthur Kornberg هو وزملائه من خلايا بكتريا القولون إنزيماً قادراً على تخليق الـ DNA على شريط القالب المتعدد النيوكليوتيدات polynucleotide template. أطلق على هذا الإنزيم اسم DNA polymerase لقدرته على بلمرة شريط DNA جديد مستخدماً الشريط القالب، كذلك أطلق عليه اسم Kornberg enzyme نسبة إلى مكتشفه.

وبالطبع، اعتقد آنذاك بأن هذا الإنزيم هو الإنزيم المسؤول عن تضاعف الـ DNA في الخلايا البكتيرية. ولكن، ولسوء الحظ، عندما درست تلك الإنزيمات بتعمق أكثر توصل الباحثون إلى نتائج غير متوقعة مع تلك التي توصل إليها Kornberg، ان أكثر هذه التجارب شهرة هي تلك التي جرت عام 1969 في خلايا بكتريا القولون، حيث حذف فيها الجين الذي يشفر عن الإنزيم الذي اكتشفه Kornberg والذي يعرف الآن باسم DNA polymerase I، ولكن على الرغم من حذف هذا الجين إلا ان خلايا بكتريا القولون ما زالت قادرة على مضاعفة الـ DNA التابع لها. وفي النهاية توصل الباحثون إلى الآتي: ولو أن إنزيم DNA polymerase يدخل في عملية التضاعف، ولكنه ليس الإنزيم المضاعف الرئيسي. أما الإنزيم الذي يعتقد بأن له دور أساسي في عملية التضاعف هو إنزيم DNA polymerase III. ان تعقيد الدور الذي يلعبه في الخلية منعكسة في تعقيد تركيبه الذي يتكون من عشر وحدات ثانوية subunits (أنظر أدناه).

إنّ يوجد إنزيم DNA polymerase في خلايا بكتريا القولون بثلاثة أنواع، DNA polymerase III وهو إنزيم التضاعف الرئيسي، و DNA polymerase II، يعمل إنزيم DNA polymerase II في آليات الإصلاح المستحثة والتي تعرف بـ SOS response (أنظر الفصل السابع)، حيث يسهّل هذا الإنزيم عملية تخليق الـ DNA في أشرطة القالب المتضررة. و DNA polymerase I، والذي يتألف من وحدة ثانوية subunit واحدة، والذي يدخل في عملية تضاعف الـ DNA من خلال إزالة بواديء الـ RNA في النهاية 5' لكل قطعة أوكازاكي واستبدالها بالـ DNA، فضلاً عن دوره الرئيسي في عملية إزالة الضرر الحادث بالـ DNA والذي يعرف بإصلاح الـ DNA (DNA repair). سنتركز مناقشتنا على إنزيم DNA polymerase III، والذي يحفز استطالة سلسلة الـ DNA في شوكة تضاعف بكتريا القولون.

كيفية عمل إنزيم DNA polymerase I في بكتريا القولون

يتكون هذا الإنزيم من وحدة ثانوية واحدة (one subunit)، ويمكن شق تلك الوحدة المفردة وذلك بمعاملة هذا الإنزيم من قبل معاملة هاضمة للبروتين (proteolytic treatment). يدعى ناتج الشق الأكبر بقطعة كينو (Klenow fragment) والتي يمكن أن تستخدم في التفاعلات التخليقية خارج جسم الكائن الحي. تحتوي قطعة Klenow على فعاليتين، هما الفعالية المبلمرة (polymerizing activity) ذات الاتجاه 3' → 5' وفعالية تصحيح الخطأ (proofreading activity) ذات الاتجاه 5' → 3' وهي فعالية مزيلة للنيوكليوتيدات الخاطئة. أما الشق الثاني لهذا الإنزيم فيحتوي على الفعالية المزيلة للنيوكليوتيدات (exonuclease activity) ذات الاتجاه 3' → 5'، حيث يوجد فصل في الموقع مابين اضافة النيوكليوتيدة وازالتها.

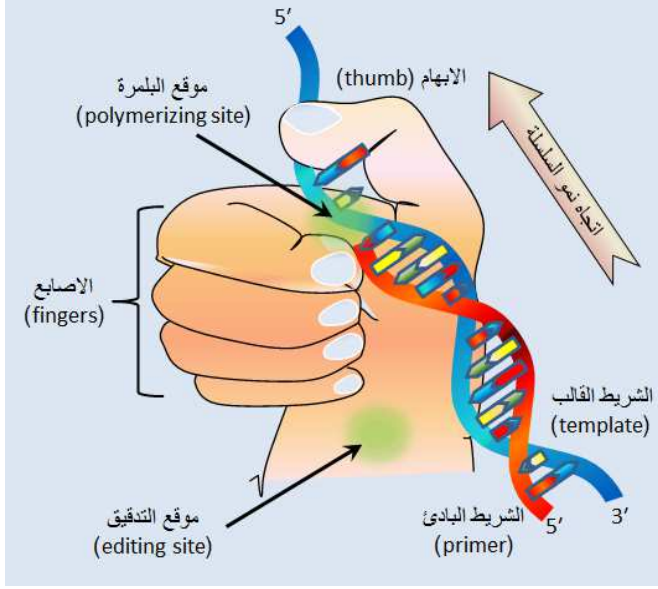
تتعاون تلك الفعاليات الثلاث مع بعضها البعض حيث توفر لإنزيم DNA polymerase I خاصية فريدة، وهي تجمع ثلاث فعاليات في وحدة ثانوية واحدة، وهذا بدوره يعطي قابلية لهذا الإنزيم لكي يشارك في فعاليات عديدة داخل وخارج جسم الكائن الحي بالإضافة الى عملية التضاعف كما في عملية اصلاح خلل الـ DNA (أنظر الفصل السابع) وعملية اعادة الارتباط (أنظر الفصل الثامن)، كما أن قدرة هذا الإنزيم على امتداد ثلثة (nick) صغيرة في الـ DNA نتيجة لتعاون فعالياته المتنوعة أعطت دوراً كبيراً لهذا الإنزيم لكي يشارك العديد من تجارب الهندسة الوراثية (أنظر الفصل الحادي عشر). من هذا نستنتج بأن Arthur Kornberg لم يتصور جزافاً بأن هذا الإنزيم هو إنزيم التضاعف الرئيس في الخلية، ولكنه لم يدرك حينها بأن هنالك إنزيماً اعقد من ذلك، وهو DNA polymerase III.

كيفية عمل إنزيم التضاعف الرئيس في بكتريا القولون

سنركز الاهتمام على إنزيم DNA polymerase III بوصفه إنزيم التضاعف الرئيسي في الخلية. إن هذا الإنزيم هو بروتين في غاية التعقيد ذو وزن جزيئي عالي (600 KDa) ، ويتألف من عشرة وحدات ثانوية 10 different subunits. إن ما يعرف بإنزيم البوليمريز الصميمي core polymerase يتألف من ثلاث وحدات ثانوية. تحتوي وحدة ألفا الثانوية α subunit (التي تمثل أصابع اليد fingers) على الموقع الفعال لإضافة النيوكليوتيدات بسبب امتلاكها الفعالية المبلمرة من 5' إلى 3'، ووحدة ابسلون الثانوية ϵ subunit (التي تمثل راحة اليد palm) والتي تضطلع بإزالة النيوكليوتيدات المغلوطة mismatched nucleotides (المضافة بشكل خاطيء) بواسطة آلية معينة تعرف بآلية إصلاح الخطأ proofreading mechanism السابقة الذكر. تقوم هذه الوحدة الثانوية بهذا الدور بسبب امتلاكها الفعالية الإنزيمية المزيلة للنيوكليوتيدات والتي تعرف بـ exonuclease activity ذات الاتجاه المعاكس لعملية البلمرة والذي هو من 3' إلى 5'. أما الوحدة الثانوية الثالثة والتي تعرف بثيتا θ subunit (والتي تمثل الإبهام thumb) فهي على أية حال غير معروفة الوظيفة (شكل 7.3).

يتقدم إنزيم DNA polymerase III – كما نوقش سابقاً – بالاتجاه من 5' إلى 3' وذلك بسبب امتلاكه لوحدة α ذات الفعالية المبلمرة من 5' إلى 3'. ولا يمكن له من أن يتقدم بالاتجاه المعاكس بسبب عدم امتلاكه لوحدة ثانوية أخرى ذات فعالية بلمرة من 3' إلى 5'. ولكن، يحدث في بعض الأحيان أن تندمج نيوكليوتيدة مغلوطة في سلسلة الـ DNA النامية، وفي هذه الحالة، يتوقف إنزيم DNA polymerase III عن العمل، ثم ينقل النهاية 3' للسلسلة النامية من وحدة α المبلمرة (أصابع اليد)، إلى وحدة ϵ الهاضمة ذات الاتجاه المعاكس. وهكذا تزال النيوكليوتيدة المغلوطة بالاتجاه من 3' إلى 5'. وحالما تنتهي عملية إزالة النيوكليوتيدة المغلوطة بآلية تصحيح الخطأ المعاكسة لاتجاه عملية البلمرة، ترجع النهاية 3' لسلسلة الـ DNA النامية إلى موقع البلمرة في وحدة α ، وتستأنف عملية البلمرة بالاتجاه من 5' إلى 3' (شكل 7.3).

أما الدور الرئيسي للوحدات الثانوية المتبقية (6 وحدات ثانوية) هو تحويل إنزيم البوليمريز الصميمي من إنزيم تفريقي distributive (غير تقدمي)، أي الإنزيم الذي يسقط من الشريط القالب بعد تخليقه من عشر إلى خمسين نيوكليوتيدة، إلى إنزيم تقدمي processive والذي يمكن له تخليق امتدادات طويلة من الـ DNA تصل إلى أكثر من 500 ألف نيوكليوتيدة بدون أن يسقط من الشريط القالب. إن الفعالية الأخيرة تكون ضرورية للتخليق الكفء لكلا شريطي الـ leading مع شريط الـ lagging.



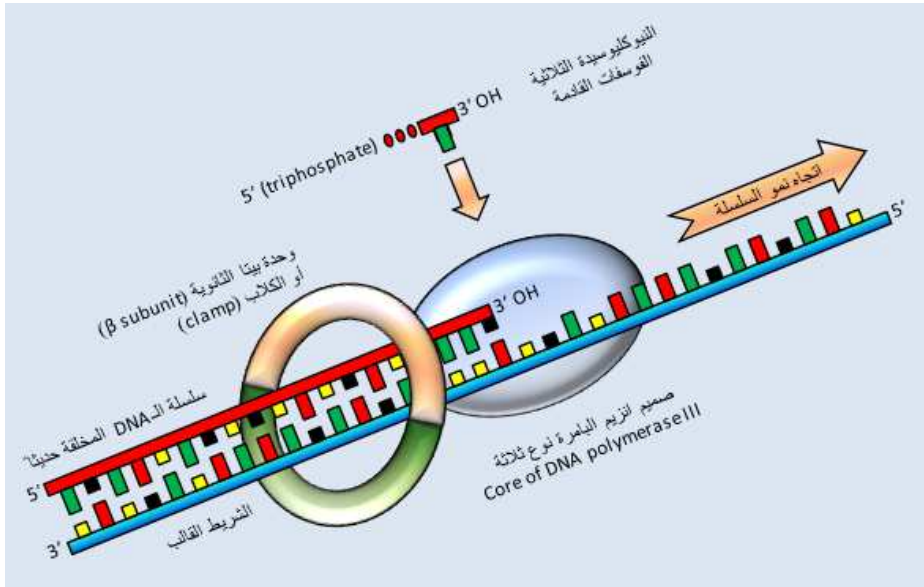
شكل (7.3): تركيب إنزيم البوليمريز الصممي core DNA polymerase في بكتريا القولون حسب معطيات تقنية X-rays crystallography. وببساطة، يشبه إنزيم DNA polymerase اليد اليمنى نصف المفتوحة، حيث يلاحظ إن كل من راحة اليد palm، والأصابع fingers، والإبهام thumb يقبض على الـ DNA، بالإضافة الى ذلك، يبرز موقعين منفصلين مكانياً عن بعضهما وهما موقع البلمرة وموقع التدقيق في الانزيم (تصميم المؤلف).

إن أساس الطبيعة التقدمية لإنزيم DNA polymerase III هو قابلية وحدة بيتا الثانوية β subunit على تكوين شكل يشبه الكعكة أو الحلقة حول الحلزون المزدوج وذلك لربط وحمل الإنزيم الصممي (شكل 8.3). وهنا تبرز أحد الاجابات الرئيسية عن التساؤل عن سبب تدخل انزيم معقد كأنزيم DNA polymerase III في عملية التضاعف على الرغم من امتلاك انزيم DNA polymerase I لنفس الفعالية المبلمرة التي يمتلكها الانزيم III، بسبب عدم قدرة الانزيم I على اطالة سلسلة الـ DNA لمسافات طويلة كما هو عليه الحال في الانزيم III، وهذا هو أحد الأسباب الرئيسية في تعقيد الانزيم III مقارنة بالانزيم I، حيث احتاج الانزيم III الى عدة وحدات ثانوية لتقوم بهذا الدور.

تعد جزيئات DNA polymerase core لوحدها قادرة على تخليق امتداد قصير فقط من النيوكليوتيدات قبل تتهاوى عن الشريط القالب. ولكن هذا لن يحصل للإنزيم بسبب وجود تركيب يعرف بالكلاب clamp والذي يحافظ على إنزيم الـ polymerase مرتبطاً بقوة على شريط الـ DNA وذلك من خلال ارتباط هذا الكلاب بالـ DNA من جهة وبالإنزيم الصممي من جهة أخرى.

إن وجود الكلاب المنزلق sliding clamp جعل لإنزيم DNA polymerase خاصيتين متناقضتين، (شكل 8.3)، فعلى الرغم من اتصاله المحكم بالـ DNA وعلى امتدادات طويلة، إلا انه رخو بشكل كاف لكي يتحرك بشكل انزلاقي متسلسل من نيوكليوتيدة

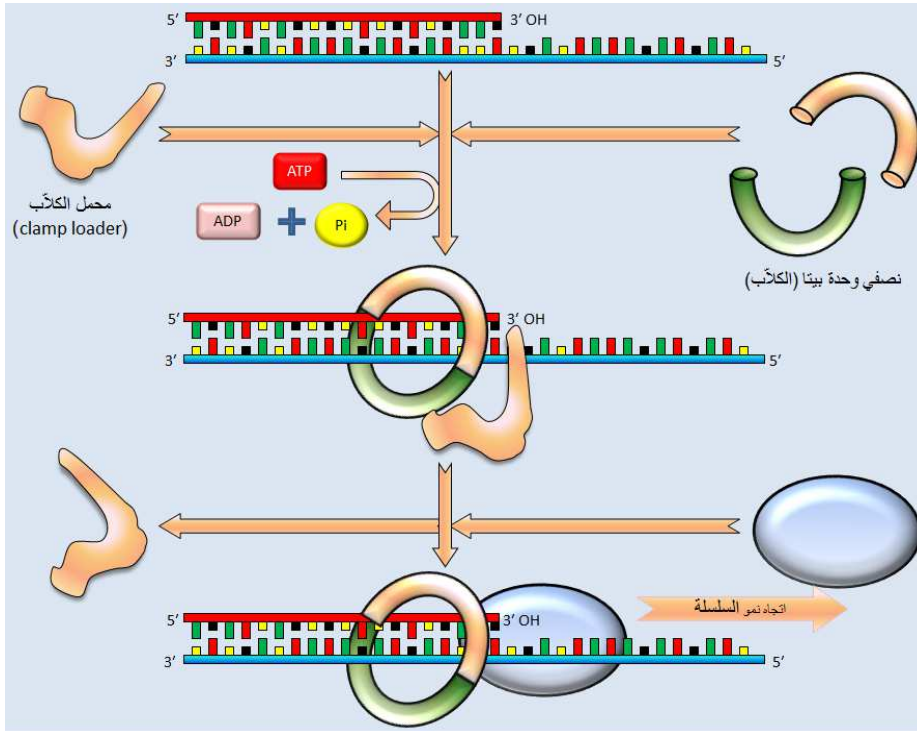
إلى أخرى. يرجع سبب وجود هذه الخواص المتناقضة إلى شكل وحدة β الثانوية التي تشبه الكعكة المحيطة بالـ DNA، أو التي تشبه الحلقة التي تنزلق على الحبل (شكل 8.3).



شكل (8.3): وحدة بيتا الثانوية المزدوجة β -subunit dimer تقيد إنزيم E. coli DNA polymerase III الصممي بالـ DNA، وبهذه الطريقة، تزيد من صفة التقديمية processivity لهذا الإنزيم لأكثر من ألف مرة (تصميم المؤلف).

كيف يمكن لهذا الكلاب منع إنزيم الـ polymerase من الانفصال وبنفس الوقت بدون عرقلة حركة إنزيم الـ polymerase السريعة على طول جزيئة الـ DNA؟ توصلت الدراسات الجارية على هذا الكلاب إلى انه يكون حلقة كبيرة حول حلزون الـ DNA المزدوج. ولوحظ إن جانب واحد من الحلقة يرتبط بالجزء الخلفي من إنزيم الـ polymerase، بينما تنزلق الحلقة كاملة وبشكل حر على طول الـ DNA كلما تحرك الإنزيم. لا يتصل الكلاب من تلقاء نفسه بإنزيم الـ DNA polymerase ، إذ لا بد من وجود محمّل الكلاب clamp loader أو ما يعرف بمعقد كما γ complex، والذي يشبه حمالة البنطلون ويتألف من خمسة وحدات ثنائية، والذي وبمساعدة التحلل المائي للـ ATP يقوم بربط الكلاب بإنزيم الـ DNA polymerase (شكل 9.3). وبهذه الطريقة، تزداد صفة تقديمية الإنزيم .

يتوسط معقد كما γ complex وظيفتين مهمتين: (1) تحميل load كلاب وحدة بيتا الثانوية β -subunit clamp بالإنزيم الصممي عند بداية تخليق شريط الـ DNA، في تفاعل يحتاج إلى طاقة الـ ATP. (2) تفريغ تحميل unload كلاب وحدة بيتا الثانوية بعد اكتمال تخليق شريط الـ DNA (شكل 9.3).



شكل (9.3): مخطط يوضح كيفية تراكب الكلاب لكي تبقى من إنزيم الـ DNA polymerase متحركاً على الـ DNA وذلك في التفاعل المبسط المبين في أعلاه. إن محمّل الكلاب clamp loader ينفصل حال تراكب الكلاب على إنزيم الـ polymerase (تصميم المؤلف).

مشاكل تواجه إنزيم DNA polymerase في عملية التضاعف

لعله من الطرق الناجعة للتوغل في تفاصيل عملية التضاعف هو أن نشبه الإنزيم المضاعف الرئيسي DNA polymerase III بمهندس معماري، والذي يطلب منه مضاعفة الحمض النووي، ومن ثم ينظر هذا المهندس إلى شريط الـ DNA ونرى ماذا يطلب منا لفعل ذلك. وبالطبع لا تعتبر عملية تضاعف الـ DNA بالعملية السهلة، لذا تبرز

أمام هذا المهندس الفذ عدة مشاكل أساسية إذا تغلب عليها يمكن له الشروع في تلك العملية، ولعله يمكن إبرازها بخمس مشاكل أساسية:

المشكلة الأولى: ويمكن تسميتها بمشكلة فتح الالتفاف (unwinding problem) وفيها لا يقدر إنزيم DNA polymerase على صهر حلزون الـ DNA المزدوج (هذا يعني: كسر الأواصر الهيدروجينية) لكي يفصل الشريطين المراد نسخهما.

المشكلة الثانية: وهي مشكلة البدء (initiation problem) وتتمثل بعدم قدرة إنزيمات الـ DNA polymerases عموماً على تخليق سلسلة الـ DNA أو الـ RNA أنياً (de novo synthesis) وذلك لحاجتها إلى شريط DNA أو RNA موجود مسبقاً يعرف بالبادئ (primer).

المشكلة الثالثة: وتسمى بمشكلة الاتجاهية (directionality problem) وتتمثل بعدم مقدرة كل إنزيمات DNA polymerase على تحفيز إضافة النيوكليوتيدات بكلا الاتجاهين، أي من 5' إلى 3'، ومن 3' إلى 5'. وبما إن شريطي حلزون الـ DNA المزدوج هما متعاكسان (من 5' إلى 3'، ومن 3' إلى 5') بالاتجاه الكيميائي، وبما أن كل إنزيمات DNA polymerases تحفز إضافة النيوكليوتيدات عند النهاية 3' الهيدروكسيلية لسلسلة الـ DNA النامية وليس عند النهاية 5'، وبالتالي يمكن لأشرطة الـ DNA أن تنمو في الاتجاه من 5' إلى 3' فقط وعدم قدرتها على النمو بالاتجاه المعاكس.

المشكلة الرابعة: وتتعلق بطبوغرافية الـ DNA لذا سأسمّيها هنا بالمشكلة الطبولوجية (topological problem). وتتمثل هذه المشكلة بحدوث حالة اللف الفائق (supercoiling) عند تقدم فقاعة التضاعف replication fork إلى الإمام. ويمكن فهم هذه المشكلة عند تشبيه الـ DNA بحبل ذ جديلتين، مثبت بمسمار من أحد طرفيه بالحائط والطرف الآخر يمسكه شخص ما ليفتل جديلتيه ليتقدم باتجاه الحائط. وهنا تبرز المشكلة، حيث يصل هذا الشخص إلى مرحلة يتعذر فيه تقدمه نحو الحائط أكثر من ذلك وذلك بسبب "اللف الفائق" أمام نقطة الفتل (أمام شوكة التضاعف). وهذا يعيق التقدم ويوقف العملية كنتيجة نهائية.

المشكلة الخامسة: وتدعى بمشكلة نهاية التضاعف (end replication problem) وهي تختص بالكائنات حقيقية النواة عموماً لاحتوائها على كروموسومات خطية بدلاً من تلك الدائرية الموجودة في بدائية النواة كالبكتيريا مثلاً.

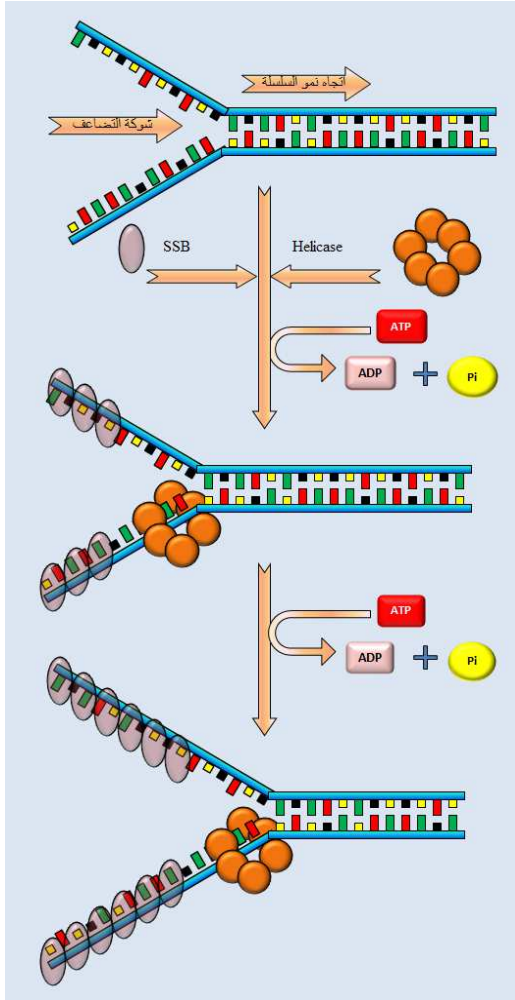
وفي هذا الفصل، سوف نصف حلول الخلايا للمشاكل السابقة الذكر والناجمة من تركيب الـ DNA وخواص إنزيمات الـ DNA polymerases، كمسكلة فتح الالتفاف unwinding problem، ومشكلة تخليق البادئ priming problem، ومشاكل الاتجاه directionality problems والمشاكل الطوبولوجية topological problems ومشكلة نهاية التضاعف end replication problem.

حل مشكلة فتح الالتفاف unwinding problem

لكي تتقدم عملية تخليق الـ DNA، فإن حلزون الـ DNA المزدوج يجب أن يتم فتحه قبل شوكة التضاعف لكي تتمكن الـ deoxyribonucleoside triphosphates من أن تكون أزواجاً قاعدية مع الشريط القالب. وعلى أية حال، يعتبر حلزون الـ DNA المزدوج ثابت جداً في الظروف الطبيعية، حيث تتغلق الأزواج القاعدية على بعضها البعض بقوة كبيرة بحيث يجب أن تصل درجة حرارة الماء إلى الغليان لفصلها عن بعضها البعض في أنبوب التفاعل test tube (راجع الفصل الأول - مسخ الـ DNA). ولهذا السبب، فإن إنزيم DNA polymerase III يمكن له أن ينسخ حلزون الـ DNA المزدوج فقط عندما يكشف الشريط القالب عند فصله عن شريطة المكمل. لذا لابد من وجود بروتينات تضاعفية أخرى لتساعد على فتح الحلزون المزدوج لتوفر شريط DNA قالب مفرد الشريط single stranded DNA template لكي يستنسخ من قبل إنزيم DNA polymerase III. وهناك نوعان من البروتينات تساهم في هذه العملية - DNA helicase والبروتينات المرتبطة بالـ DNA ذو الشريط المفرد single stranded DNA binding proteins.

1 - إنزيمات الـ DNA helicases: إن إنزيم الـ helicase هو مركب ذو ستة وحدات ثنائية متماثلة hexamere of identical subunits وله القدرة على أن يلتف حول كلا شريطي الـ DNA المفردين في تفاعل يحتاج إلى ATP. ويشكل إنزيم الـ helicase صنفاً من الإنزيمات التي تتحرك على طول حلزون الـ DNA المزدوج مستغلة طاقة التحلل المائي للـ ATP لتفصل الشريطين (شكل 10.3).

يرتبط إنزيم الـ helicase بمنطقة مفردة الشريط من الـ DNA، ثم يتحرك على طول ذلك الشريط صاهراً الأواصر الهيدروجينية hydrogen bonds التي تربطه بشريطه المكمل. حيث تستخدم إنزيمات الـ DNA helicases آلية التحلل المائي للـ ATP والذي يمكنها من تغيير شكلها بصورة تسمح لها بأداء وظيفتها المتمثلة بفتح شريطي الـ DNA، وبواسطة هذه الآلية يدفع هذا الإنزيم نفسه إلى الأمام بسرعة على طول شريط الـ DNA المفرد الشريط. وعندما يلاقي هذا الإنزيم منطقة الحلزون المزدوجة، فإنه يستمر بالحركة على طول الشريط، فاصلاً شريطي الحلزون عن بعضهما البعض بمعدل 1000 نيوكليوتيدة بالثانية الواحدة (وهذه هي نفس سرعة عملية التضاعف في بكتريا القولون).



إن إنزيم الـ helicase، كما هو الحال بالعديد من البروتينات التي تعمل على الـ DNA، فإنه يوصف بالتقدمية (أنظر معنى صفة التقدمية في إنزيم DNA polymerase III). ولكونه يكون كلاباً clamp حول شريط الـ DNA المفرد، فإن إنزيم الـ helicase "لا يسقط" إلى أن يصل إلى نهاية ذلك الشريط، أو إلى أن يفرغ تحميله unloaded من الـ DNA من قبل بروتين آخر.

شكل (10.3): آلية عمل إنزيم DNA helicase وبروتينات SSB (تصميم المؤلف).

2 - البروتينات المرتبطة بالـ DNA المفرد الشريط single stranded DNA (SSB) binding proteins: والتي تدعى أيضا بالبروتينات المزيل لثنائية الحلزون المزدوج، وترتبط بقوة وبشكل تعاوني cooperatively (أي إن ارتباط إحداها يمهّد لارتباط الأخرى) بأشرطة الـ DNA المفردة المكشوفة بدون تغطية القواعد النيتروجينية، ولهذا السبب تبقى القواعد جاهزة لتعمل عمل القوالب templates. هذه البروتينات (SSB) غير قادرة على فتح حلزون الـ DNA المزدوج الطويل بشكل مباشر (شكل 10.3)، ولكنها تساعد إنزيمات الـ helicases بتنشيط الحالة الغير ملتفة unwinding وذلك بواسطة منع

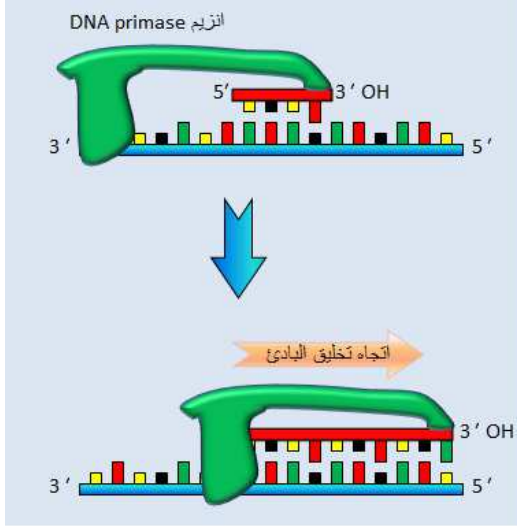
حدوث عملية إعادة الالتفاف rewinding ، وبذلك فأنها تقدم الشريط القالب لإنزيم الـ DNA polymerase.

بالإضافة إلى ذلك، فإن ارتباطها التعاوني يغطي ويقوي مناطق الـ DNA مفردة الشريط على شريط الـ lagging القالب، وبهذه الطريقة فإنها تمنع من تكوين جزيئات DNA صغيرة تشبه الدبوس hairpin structures والتي تعيق تخليق الـ DNA المحفز من قبل إنزيم الـ DNA polymerase. إن ارتباط بروتينات الـ SSB بشريط الـ DNA المفرد يعمل على حمايته من هجوم الإنزيمات الهاضمة الداخلية endogenous nucleases.

حل مشكلة البدء Initiation problem:

كما تم الإشارة إليه قبل قليل، لا يمكن لإنزيم الـ DNA polymerase من أن يطيل أشرطة الـ DNA إلا بوجود بواديء مجهزة له مسبقاً من قبل إنزيمات أخرى. إن البواديء المستخدمة خلال عملية تضاعف الـ DNA في بدائية وحقيقية النواة هي جزيئات RNA صغيرة والذي يحفز تخليقها من خلال إنزيم الـ primase والذي هو نوع من أنواع إنزيمات الـ RNA polymerase. لا يؤدي إنزيم الـ RNA primase دوره وحيداً اعتماداً على نفسه فقط، وإنما بارتباطه بإنزيم الـ helicase المرتبط في ذلك الحين في منطقة الـ DNA المراد تضاعفها. يستخدم مصطلح الـ primosome الآن بشكل عام للدلالة على المعقد المتكون بين إنزيمي الـ primase والـ helicase. يقوم إنزيم الـ RNA primase بعد ارتباطه بتخليق بواديء RNA قصيرة مكملة لكلا شريطي حلزون الـ DNA المزدوج، وحالما ينهي الإنزيم عمله، فإنه ينفك عن الشريط القالب المفرد الشريط.

لماذا يفضل أن يخلق هنا RNA من قبل إنزيم الـ DNA primase (الإنزيم الذي يخلق بواديء RNA صغيرة على شريط الـ lagging والذي لا يمتلك فعالية تصحيح الخطأ) ثم يمحي بدلاً من أن يخلق DNA مباشرة؟ وذلك لأن إنزيم الـ DNA polymerase الذي له قابلية على تصحيح الخطأ في تخليق الـ DNA ذاتياً لا يستطيع أن يبدأ تخليق السلسلة تلقائياً (de novo) لأنه يحتاج إلى نهاية هيدروكسيلية من نوع 3' ، وتوفر هذه النهاية من قبل باديء الـ RNA الذي يخلقه إنزيم الـ DNA primase (شكل 11.3)، والذي له القابلية – حاله في ذلك حال إنزيم الـ RNA polymerase – على تخليق السلسلة تلقائياً (أنظر الفصل الرابع). وعلى أية حال، لابد من الإشارة إلى أن الإنزيمين يشاركان معاً في تخليق بواديء الـ RNA في البكتيريا، فبينما يقوم إنزيم الـ DNA primase بإضافة البواديء على شريط الـ lagging، يقوم إنزيم الـ RNA polymerase بإضافة تلك البواديء على شريط الـ leading.



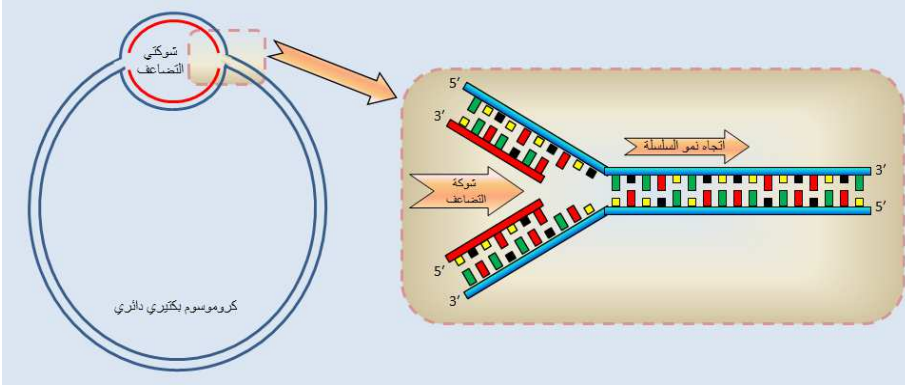
شكل (11.3): تخليق بادئ الـ RNA. مخطط توضيحي يبين التفاعل المحفز من قبل إنزيم DNA primase. يقف الإنزيم الـ primase لمتعدد نيوكليوتيدي صغير ليوفر نهاية 3' OH متكشفة لكي يقوم إنزيم DNA polymerase باطالتها بعد ذلك (تصميم المؤلف).

حل مشكلة الاتجاهية directionality problem

قبل أن ندخل هنا إلى حل هذه المشكلة لا بد لنا من فهم تفاصيلها أولاً ليتسنى لنا التفكير في كيفية حلها بعد ذلك. وتفهم التفاصيل خلال تضاعف الـ DNA داخل الخلية بواسطة إنزيم DNA polymerase، حيث يعمل كل شريط DNA قديم (أبوي) كقالب لتكوين شريط جديد كامل. ولأن كل من الخليتين البنويتين daughter cells ترث حلزون الـ DNA جديد محتو على شريطين أحدهما قديم والآخر جديد، لذا يدعى تضاعف حلزون الـ DNA المزدوج بأنه شبه محافظ semi-conservative. كيف ينجز هذا العمل البطولي الفذ؟ يكمن جوهر العمل يكمن في الشريط القالب template strand والذي هو الشريط الذي يستنسخ ليكون شريطاً جديداً. تحفظ المعلومات في الشريط القالب على الرغم من أن النسخة الأولى ذات تسلسل مكمل complementary، وليست ذات تسلسل مماثل، حيث تنتج نسخة النسخة التسلسل القالب الأصلي من جديد. وعندما ينتهي النسخ، فإن كل من الحلزونين المزدوجين الناتجين يتألفان من واحد من الأشرطة الأصلية زائداً نسخته، منفصلين عن بعضهما البعض.

توصلت التحليلات الجارية في بداية الستينيات بأن هنالك مناطق تضاعفية صغيرة تتحرك بصورة دوّوبة على طول حلزون الـ DNA المزدوج الأبوي. ولأن شكلها يشبه الحرف Y لذا سمّيت هذه المنطقة الفعالة بشوكة التضاعف replication fork (شكل 12.3). وهي منطقة متخصصة بشكل عالي من الـ DNA، والتي يقوم عندها إنزيم DNA polymerase بإضافة النيوكليوتيدات. تبدأ تلك الشوكة التضاعفية بالتكون عند

نقطة بداية التضاعف *OriC*، ثم تستمر بالنمو وتكبير بالشكل كلما استمرت بالنمو. لا يقتصر وجود تلك التراكييب على الجينوم الكروموسومي وإنما توجد في أي جزيئة تمتلك تسلسلات أصول التضاعف (لذا تدعى كل جزيئة حاوية على تلك التسلسلات بالكيانات التضاعفية أو الـ *replicons*).



شكل (12.3): اثنان من شوكتا التضاعف يتحركان باتجاهين متعاكسين في كروموسوم دائري (تصميم المؤلف).

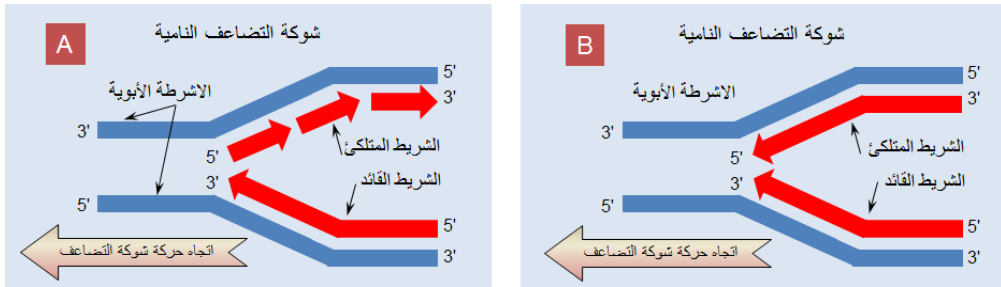
مبدئياً، إن أبسط ميكانيكية لتضاعف الـ DNA هي النمو المستمر لكلا الشريطين الجديدين، نيوكليوتيدة بعد نيوكليوتيدة، حيث تتحرك شوكة التضاعف من إحدى نهايتي الـ DNA إلى النهاية الأخرى، ولكن بسبب طبيعة شريطي الـ DNA ذات الاتجاه المتعاكس antiparallel orientation فان هذه الآلية ستحتاج إلى شريط بنوي واحد لكي يتبلمر بالاتجاه من 5' إلى 3' والآخر يتبلمر بالاتجاه المعاكس. مثل هكذا شوكة تضاعف ستحتاج إلى نوعين مختلفين من إنزيمات الـ DNA polymerase. أحدهما يتبلمر بالاتجاه من 5' إلى 3'، أما الآخر، فانه يتحرك بالاتجاه المعاكس (من 3' إلى 5' شكل 5.13.3). ولكن هكذا نوع من البلمرة لا يحصل في عملية التضاعف، حيث لا يوجد إنزيم DNA polymerase يمتلك الفعالية المبلمرة ذات الاتجاه من 3' إلى 5'. إذن، كيف يتم إنجاز نمو سلسلة DNA بالاتجاه من 3' إلى 5'؟



Reiji Okazaki

تم إجابة هذا السؤال من خلال سلسلة من التجارب التي أجراها Reiji Okazaki في نهاية الستينيات، حيث لاحظ وجود قطع صغيرة بطول 1000-2000 نيوكليوتيدة، تعرف هذه القطع الآن بقطع أوكازاكي Okazaki fragments، والتي يبلغ طولها في الكائنات حقيقية النواة (كما في البشر) 100-200 نيوكليوتيدة. تبين بأن قطع أوكازاكي تتبلمر عموماً في الاتجاه من 3' إلى 5' كما أنها ترتبط مع بعضها البعض بعد تخليقها لتكوين سلسلة طويلة من الـ DNA.

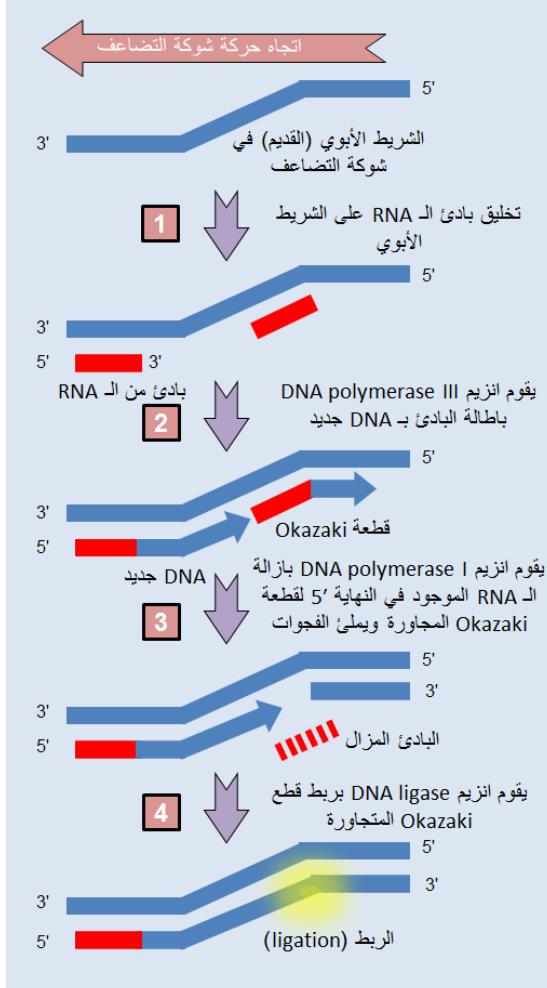
يعرف شريط الـ DNA البنوي الذي يخلق بشكل مستمر continuously من باديء RNA مفرد بالشريط الأمامي leading strand، ويكون اتجاه تخليقه من 5' إلى 3'، وذلك هو نفس اتجاه حركة شوكة التضاعف. إن تخليق هذا الشريط يسبق قليلا تخليق الشريط البنوي الآخر والذي يخلق بصورة غير مستمرة discontinuously، والذي يعرف بالشريط الخلفي lagging strand والذي يكون تخليقه أكثر تعقيدا. وبالنسبة للـ lagging strand، فإن اتجاه بلمرة النيوكليوتيدات هو معاكس بطريقة ما لاتجاه حركة شوكة التضاعف. يتأخر تخليق الـ DNA في شريط الـ lagging لأنه يجب أن ينتظر شريط الـ leading لكي يكشف الشريط القالب لكي يتسنى لقطع أوكازاكي أن تتخلق عليه. إن طبيعة تخليق شريط الـ lagging الغير مستمرة هي الآلية الوحيدة المعقولة والمتناسبة مع الفعالية المبلمرة polymerizing activity لإنزيمات DNA polymerase ذات الاتجاه من 5' إلى 3'. وهي آلية تعتبر معقدة مقارنة بشريط الـ leading (شكل B.13.3).



شكل (3 . 13): (A) الموديل الصحيح لتضاعف الـ DNA، والذي يتضمن التخليق غير المستمر لقطع أوكازاكي في شريط الـ lagging. (B) موديل غير صحيح لتضاعف الـ DNA. ولو أن هذا الموديل يبدو بأنه أبسط موديل معقول لتضاعف الـ DNA، ولكن الآلية المبينة بشكل مخطط هنا هي ليست تلك التي تستخدمها الخلايا في تضاعفها. وفي هذا المخطط، فإن كلا الشريطين البنويين سوف ينموان بشكل مستمر. إن هذا يحتاج إلى نمو سلسلة الـ DNA البنوية في كلا الاتجاهين من 3' إلى 5'، ومن 5' إلى 3'. ولكن في الحقيقة لا يوجد إنزيم يمتلك الفعالية المبلمرة من 3' إلى 5' ليحفز التفاعل بهذا الاتجاه. (تصميم المؤلف).

إذن أصبح لدينا – بعد اكتشاف قطع أوكازاكي - من الواضح كيف هي الآلية التي تحل هذه المشكلة. فبالنسبة لشريط الـ leading، فإن باديء واحد ضروري فقط عند بداية عملية التضاعف، فحالما تتكون شوكة التضاعف replication fork، يقوم إنزيم DNA polymerase III وبشكل مستمر بإضافة نيوكليوتيدات جديدة إلى نهاية سلسلة الـ DNA النامية. أما على جانب شريط الـ lagging من شوكة التضاعف، فإن كل مرة ينهي بها إنزيم DNA polymerase قطع أوكازاكي القصيرة (والتي تستغرق بضع ثواني)، فإنه يجب أن يبدأ بتخليق قطعة جديدة كلياً في موقع أبعد على طول الشريط القالب (شكل 14.3). هذا وتستخدم آلية خاصة لإنتاج بواديء ضرورية لهذا الغرض.

في الخطوة الأولى: يقوم إنزيم RNA primase والذي يستخدم ribonucleoside triphosphates بدلا من deoxyribonucleoside triphosphates بتخليق بواديء RNA صغيرة short RNA primers على شريط الـ (lagging شكل 14.3).



في الخطوة الثانية: فبسبب احتواء بواديء الـ RNA على نهاية هيدروكسيلية متكشفة من نوع OH 3' end ، لذا فمن الممكن إطالتها بواسطة إنزيم DNA polymerase III في بكتريا القولون ليبدأ الأخير إضافة deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs) إلى النهاية 3' للبواديء. وهكذا ينمو كل شريط lagging باتجاه معاكس للاتجاه الذي تتحرك به شوكة التضاعف. تدعى القطع الصغيرة النامية، والمحتوية على الـ RNA المرتبط تساهمياً بالـ DNA بقطع أوكازاكي، نسبة إلى مكتشفها العالم الياباني Reiji Okazaki. وفي البكتريا والعائيات البكتيرية يبلغ طولها 1000 إلى 2000 نيوكليوتيدة، كما إن دورة تخليق قطعة أوكازاكي تستغرق ثانيتين لتتكمّل. وفي الخلايا حقيقية النواة، تكون قطع أوكازاكي أصغر بكثير (من 100 إلى 200 نيوكليوتيدة). ينتهي تخليق كل قطعة أوكازاكي ينتهي عندما يصل إنزيم الـ DNA polymerase III إلى النهاية 5' لقطعة أوكازاكي السابقة.

شكل (14.3) : كيفية تخليق قطع أوكازاكي في الشريط الـ lagging والمتألّفة من أربع خطوات: وهي خطوة (1) تخليق البادئ (2) إطالة البادئ و (3) إزالة الـ RNA و ملئ الفجوات و (4) لحم قطع Okazaki المتولدة ببعضها البعض (تصميم المؤلف).

في الخطوة الثالثة: ، يعمل نظام خاص وسريع لإصلاح الـ DNA وذلك لإنتاج سلسلة مستمرة من قطع الـ DNA على شريط الـ lagging من خلال إزالة بواديء الـ

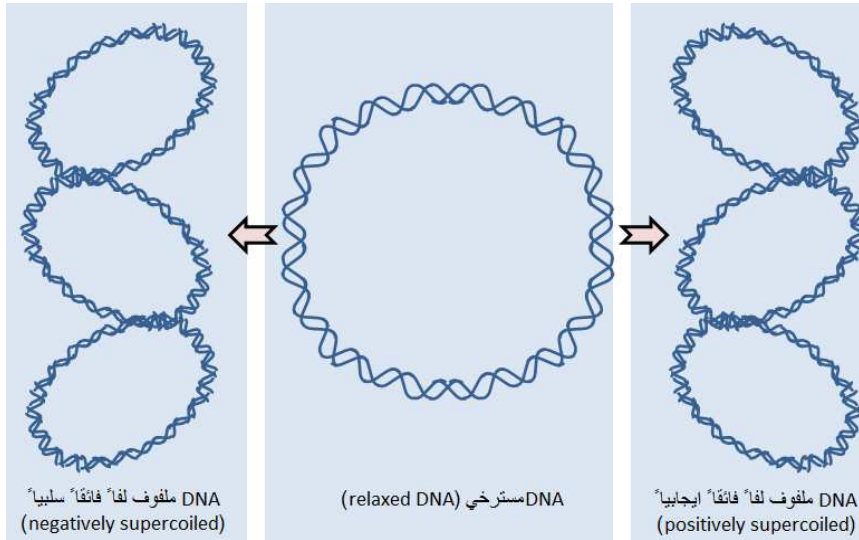
RNA واستبدالها بتسلسلات الـ DNA. يتم ذلك في بكتريا القولون بواسطة إنزيم DNA polymerase I.

في الخطوة الرابعة: يربط إنزيم يدعى DNA ligase النهاية 3' لقطعة الـ DNA بالنهاية 5' للقطعة السابقة لإكمال العملية (شكل 14.3).

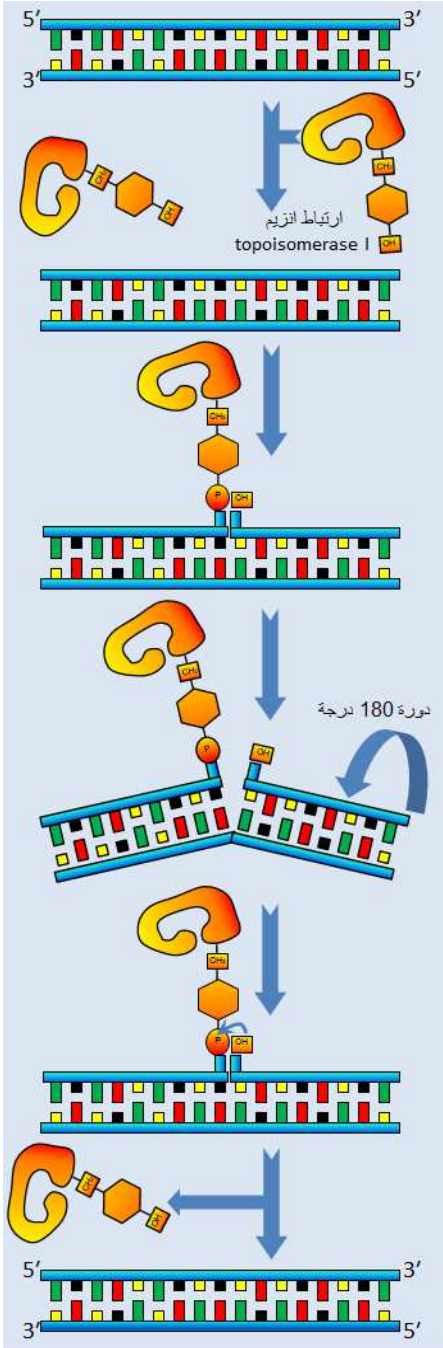
حل المشكلة الطوبولوجية topological problem

بما أن جزيئة الـ DNA تتكون من شريطين يلتفان حول بعضهما البعض، تواجه بعض العمليات الخاصة كما في تضاعف الـ DNA وإنهاءه بالإضافة إلى عملية الاستنساخ مشكلات طوبولوجية. تسبب إنزيمات معينة في الخلية حصول حالة اللف المبالغ فيه overcoiling (اللف الفائق الموجب positive supercoiling) أو حالة اللف الأقل من اللازم undercoiling (اللف الفائق السالب negative supercoiling).

يحدث اللف الفائق الموجب (شكل 15.3) عندما يلتف الحلزون المزدوج الدائري حول نفسه بنفس اتجاه التفاف الحلزون المزدوج (يميني الاتجاه right-handed)، بينما يحدث اللف الفائق السالب عندما يلتف الحلزون المزدوج حول نفسه باتجاه معاكس لاتجاه التفاف الحلزون المزدوج (يساري الاتجاه left-handed).



شكل (15.3): اللفات الفائقة السالبة والموجبة لجزيئة DNA دائرية. يمكن أن تعمل إنزيمات الـ topoisomerases على الـ DNA المرتخي (في المركز) وتعطيه لفات فائقة سالبة (إلى اليسار) أو لفات فائقة موجبة (إلى اليمين) (تصميم المؤلف).

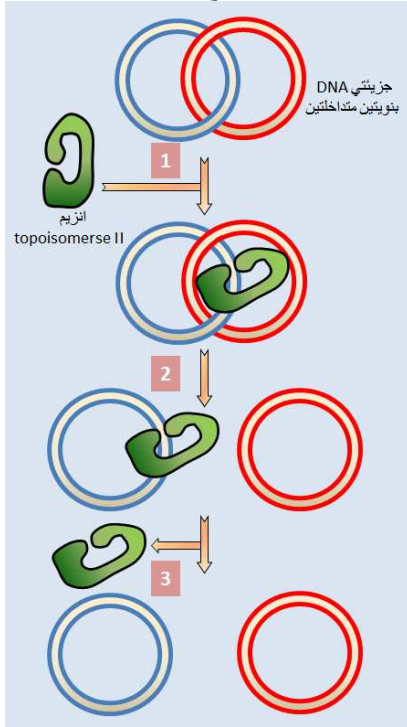


يزيد اللف الفائق السالب من عدد لفات حلزون مزدوج واحد حول الآخر (يدعى هذا بعدد الربط linking number أو L)، بينما يقللها اللف الفائق الموجب. تحتوي كل الأشكال الثلاثة الملاحظة في الشكل 14.3 على نفس التسلسل، ولكنها تختلف في عدد الربط. ووفقاً لذلك، تدعى هذه بالآيزوميرات الطوبولوجية (topological isomers) أو بالـ topoisomers. تدعى الإنزيمات التي تخلق أو تقلل من هذه الحالات بالـ topoisomerases. تؤثر إنزيمات الـ topoisomerases على اللف الفائق بإحدى الطريقتين، فأما أن يقوم النوع رقم واحد من إنزيم topoisomerase والمعروف بـ topoisomerase type I بكسر إحدى شريطي الحلزون المزدوج، وبينما هو في حالته الارتباطية بالنهايات المكسورة، يعبر الشريط الآخر خلال الكسر، ثم يلحم الكسر (شكل 16.3).

شكل (16.3): دور لإنزيم topoisomerase I في اختزال لف الـ DNA الفائق وذلك بكسر شريط من الحلزون المزدوج وعبور الشريط الآخر من خلاله. لا يمكن لكل نهاية من الحلزون المزدوج بمفردها القيام بالدوران حول نفسها من دون التدخل الإنزيمي الموضح في الخطوات من 1 إلى 5. في الخطوة 1 يميز الإنزيم topoisomerase type I المحمل بالحمض الأميني التايروسين في موقعه الفعال (active site) مجموعة الفوسفات في الحلزون المزدوج أولاً. ثم يقوم (في الخطوة 2) بالارتباط تساهمياً بتلك المجموعة. وبهذه الطريقة يكسر رابطة الفوسفات ثنائية الأستر في شريط واحد فقط. وهنا (الخطوة 3) يمكن لنهايتي الحلزون المزدوج أن تدور كل منهما بالنسبة للآخرى محررة الضغط المتراكم نتيجة للف الفائق. وبما أن طاقة أصرة الفوسفات ثنائية الأستر قد تم حفظها من قبل الإنزيم عن طريق ربط الفوسفات بالحمض الأميني التايروسين، لذا يمكن للتفاعل هنا أن ينعكس بهجوم مجموعة الهيدروكسيل على مجموعة الفوسفات لتسحبها إلى موقعها الأصلي ثنائية (الخطوة 4). وأخيراً (الخطوة 5)، تتكون مجموعة الفوسفات ثنائية الأستر من جديد لتعيد نفس الإنزيم دون تغيير ونفس الحلزون المزدوج مع اختزال اللف الفائق لدرجة واحدة (تصميم المؤلف).

تقوم إنزيمات الـ *topoisomerase* النوع الثاني والمعروفة بالـ *topoisomerase type II* (كما في إنزيم *DNA gyrase* في بكتيريا القولون) بطريقة العمل نفسها، ولكنها بدلاً من كسر شريط واحد من الحلزون المزدوج فأنها تكسر كليهما وتعتبر الحلزون المزدوج الآخر خلال الفجوة المؤقتة. وكلما تقدم تضاعف الـ *DNA* يتكون لفافاً فائقة موجباً قبل تركيب المضاعف. يتم التخلص من هكذا لف فائق بواسطة إنزيمات *topoisomerases* والتي هنا يأتي دورها والتي أما أن تخلق لفافاً فائقة سالباً قبل المضاعف لكي يحضر للتضاعف أو لكي يخفف من وطأة اللف الفائقة الموجب بعد تخليقه.

بالإضافة إلى أهمية إنزيمات *topoisomerases* في عملية التضاعف السابقة الذكر، فإنها تعد ذات أهمية بصورة عامة في أوجه أخرى، وتتضح هذه الأهمية من خلال التجارب الجارية على الجينات التي تشفر لهذه الإنزيمات. تبين أن تطهير هذه الجينات يؤدي إلى إن البكتيريا التي تتعرض إلى هكذا تطهير تنمو بشكل فقير جداً. تقوم إنزيمات الـ *topoisomerases* بإزالة الـ *DNA* المشربك *tangled DNA* كما في عملية تكثف الكروموسوم *chromosome condensation* (راجع الفصل الثاني). كما تؤدي إنزيم الـ *topoisomerase II* دوراً مهماً في المرحلة النهائية لتضاعف الجزيئات الدائرية، فعندما يكتمل تضاعف جزيئة الـ *DNA* الدائرية تتكون حلقتين متداخلتين مع بعضهما البعض،



وهنا تعمل إنزيمات *DNA topoisomerase* على فصل تلك الجزيئتين المتداخلتين عن بعضهما البعض (شكل 17.3). يعمل هذا الانزيم بطريقة مشابهة لانزيم *topoisomerase I* ولكنه يسبب كسراً مؤقتاً في كل من شريطي الحلزون المزدوج، وبهذه الطريقة يرتبط الانزيم *topoisomerase II* بأحد الدائرتين المتولدتين من التضاعف ذات الشريط المزدوج ويسبب كسر مؤقت ذو شريط مزدوج والذي يعمل "كبوابة" يمكن من خلالها أن تعبر دائرة الـ *DNA* (شكل 17.3). ثم يقوم انزيم *topoisomerase II* بإعادة لحم الأشرطة المكسورة.

شكل (17.3): دور انزيم *topoisomerase II* في إنهاء تضاعف جزيئات الـ *DNA* الدائرية. في الخطوة (1) يرتبط انزيم *topoisomerase II* بالارتباط بجزيئي الـ *DNA* الدائريتين المتداخلتين المنقسمتين للتو، في الخطوة رقم (2) يقوم نفس الانزيم بالتسبب بكسر في كلا شريطي الـ *DNA* لجزيئة دائرية واحدة ليسمح بعبور الجزيئة الأخرى خلال الكسر، وفي الخطوة رقم (3) يعيد الانزيم لحم الشريطين المكسورين لنفس الجزيئة الدائرية المكسورة من قبله (تصميم المؤلف).

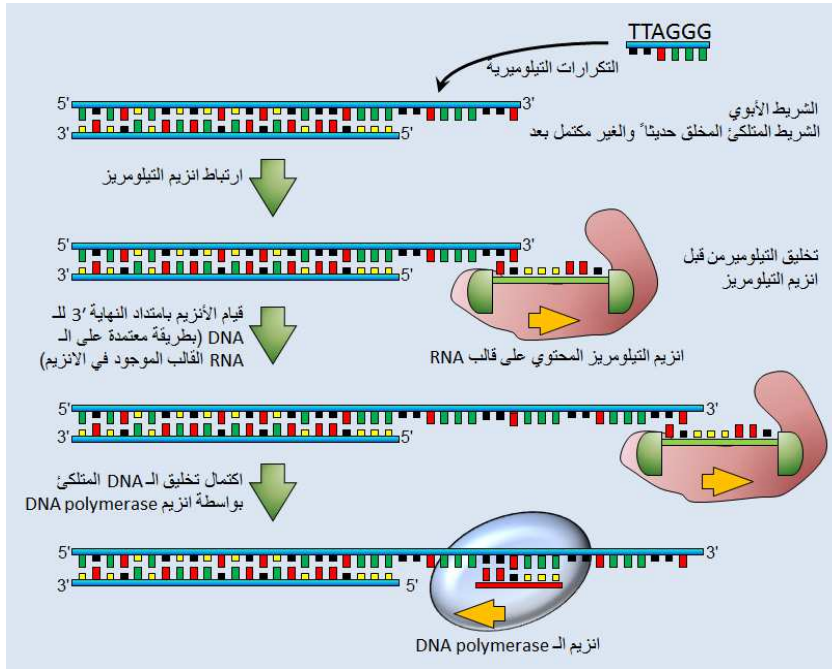
حل مشكلة نهاية التضاعف end replication problem

تواجه جزيئات الـ DNA الدائرية والخطية مواقف مختلفة عند نهاية عملية تخليق الـ DNA. ففي حالة الجزيئات الدائرية فإنها تمتلك مواقع DNA تسمى مواقع الانتهاء (ter) regions of termination في كروموسوم بكتريا القولون، وتبعد 180 درجة عن منشأ التضاعف origin of *Escherichia coli* chromosome (OriC) بالكروموسوم الدائري. وهناك ستة تسلسلات أخرى، تتركز على كلا جانبي نقطة اللقاء وتعمل هذه التسلسلات كمنهيات terminators عندما ترتبط ببروتين الانتهاء termination protein وتؤمر هذه المواقع المضاعف replisome بأن يقف ويكف عن القيام بعمله.

في حالة الجزيئات الدائرية، فإن شوكتنا التضاعف تترك منشأ التضاعف وتنتقل إلى الاتجاهات المتقابلة بعيداً عن بعضها البعض وحتماً تتقابلان في منتصف الطريق حول الدائرة. وإذا كانت إحدى الشوكتان متأخرة بالنسبة للأخرى فإنها سوف تقف عندما تصل موقع الانتهاء التابع لها وتنتظر وصول شريكها. إن بروتين الانتهاء يقوم بتنشيط إنزيم الـ helicase المستخدم خلال عملية تخليق الـ DNA ولهذا يتعثر تقدم الشوكتان. وعندما تلتقي الشوكتان فهذا يعني انتهاء عملية التضاعف. أما في حالة الجزيئات الخطية، ففي الكائنات حقيقية النواة كما في البشر والحيوانات، والنباتات، والخمائر، والفطريات فكلها تمتلك كروموسومات خطية، لا تستطيع عملية التضاعف بمفردها أن تضاعف نهايات الكروموسومات الخطية بشكل كامل. وهناك طريقة خاصة تتعلق بسلوك التيلومير telomere استخدمت لضمان عدم فقدان المعلومات من نهايات الكروموسومات الخطية.

توصف عملية تضاعف الـ DNA بأنها شبه أو نصف غير مستمرة semi-discontinuous وهذا يوضح اختلاف آلية تضاعف الـ DNA الحاصلة في الشريط القائد leading strand عن تلك الحاصلة في الشريط المتلكئ lagging strand. إن الشريط القائد يتضاعف بشكل مستمر. ولكي يتضاعف الشريط المتلكئ فإن عملية بلمرة الـ DNA polymerization تبدأ من عدة بوادئ من نوع الـ RNA والتي تستطيل لتخلق قطع اوكازاكي وأخيراً تتكسر هذه البوادئ وتستبدل بتسلسلات من الـ DNA. أن إزالة أي بادئ من نوع RNA في الشريط القائد يؤدي إلى ترك فجوة والتي تملأ عادة بامتداد قطعة اوكازاكي التالية، وفي اللبائن هنالك مشكلة في تضاعف النهايات القاصية extreme ends للكروموسومات الخطية، ففي بداية السبعينات من القرن الماضي اكتشف Watson عام 1972 بأن خواص عملية تضاعف الـ DNA تمنع الخلية من نسخ نهايات الـ DNA الخطي بشكل كامل، والتي تدعى بالتيلوميرات. وبسبب طبيعة تخليق شريط الـ lagging، فإن أنزيم بوليمريز الـ DNA لا يستطيع أن يضاعف النهاية 3' لشريط الـ DNA الخطي ذو الحلزون المزدوج بشكل كامل. عندما استنتج Watson هذه المشكلة في عام 1972، أوضح بأنه عندما يصل إنزيم بوليمريز الـ DNA إلى نهاية جزئية الـ DNA الخطية فسوف

تكون هنالك مشكلة في إكمال التضاعف (شكل 18.3). عند غياب التيلومير، فإن تضاعف الـ DNA الشبه غير مستمر سوف يسبب في إنتاج جزيئة خطية والتي تصبح أقصر وأقصر مع كل تضاعف. لقد بين Watson هذا التقصّر بشكل غير مباشر إذ لاحظ حجب جزء من التيلومير عن فعالية إنزيم بوليمريز الـ DNA وبتلك الوسيلة يتم اعتراض القمم عن التضاعف مع كل انقسام خلوي متعاقب، وبمعنى آخر ينقص طول التيلوميرات مع كل دورة تضاعف، ولسنوات عديدة لوحظ بأن فقدان المتدرج للتيلوميرات ربما يعمل كآلية محفزة أساسية لبدء الشيخوخة. ولكن تنشيط إنزيم التيلوميريز (وهو عبارة عن معقد من البروتينات والـ RNA، حيث يعمل المكون RNA الدور الأساسي في تحفيز إضافة التسلسلات التيلوميرية في كل دورة تضاعف بينما يقتصر دور البروتينات الأخرى على مساعدة الـ RNA في هذه العملية) في الخلايا السرطانية غالباً يعمل على تعويض ذلك الخلل بإضافة تسلسلات متلاحقة متكررة ترادفياً (TTAGGG) بعد كل عملية تضاعفية وبالتالي تحافظ الخلايا السرطانية على ديمومتها (شكل 18.3).



شكل (18.3): تضاعف التيلومير. يلخص الشكل التفاعلات الداخلة في تكوين التسلسلات الغنية بالكوانين المتكررة -G-rich sequences والتي تكون نهايات الكروموسومات (التيلوميرات) لعدة كائنات حقيقية النواة. ان الشريط الغير كامل المصنع حديثاً هو الشريط المصنع في الجانب المتخلف lagging side لشوكة التضاعف. وكما هو موضح في أعلاه، يتألف إنزيم التيلوميريز من معقد RNA-protein والذي يحمل الـ RNA القالب لتخليق تسلسل الـ DNA التيلوميري الغني بالكوانين والتي هي TTAGGG في البشر. ولقد افترض في هذا التصميم أن شريط الـ lagging يتم إكماله بواسطة إنزيم DNA polymerase α والذي يحمل فعالية الـ primase في إحدى وحداته الثانوية (تصميم المؤلف)

إن هنالك عدة تجارب مهدت لاكتشاف إنزيم الـ telomerase بدأت مع ملاحظة إن فقدان التسلسلات الجينومية في كل دورة تضاعف من الممكن إن تعوض عن طريق إضافة تسلسلات طرفية، وعلاوة على ذلك تمتلك الكائنات الحية القابلة على نقل تسلسلات طرفية مختصة بالنوع إلى الـ DNA.



Elizabeth Blackburn

لقد اكتشف كل من Blackburn Elizabeth و Carol Greider في سنة 1985 بأن هنالك فعالية في مستخلصات الطفيلي *Tetrahymena* وتقوم هذه الفعالية بإضافة التكرارات التيلوميرية لبوادي الـ DNA التيلوميرية قليلة النيوكليوتيدات المفردة الشريط، ووجدوا أيضا بأن هذه العملية تثببط بمعاملة المستخلص بالإنزيم المحطم للـ RNA، ولهذا تسمى هذه الفعالية المعتمدة على الـ DNA بأنزيم terminal transferase أو بالتيلوميريز ، حيث تحدث العملية بواسطة نسخ تسلسل الشريط القالب والذي هو جزء من المكون رنا بهذا الإنزيم. وفيما بعد وجد

بأن هذا الإنزيم يتكون من المكون رنا، والفعالية الإنزيمية لهذا الإنزيم تحتاج إلى كل من المكون رنا والمكونات البروتينية. درس هذا الإنزيم بشكل مفصل باستخدام الكائن الهديي *T. thermophila* لأن خلية مفردة لهذا الكائن الحي تمتلك أكثر من 40,000 تيلومير. وعموماً، يمكن تلخيص آلية تفاعل إنزيم التيلوميريز الرئيسية بالآتي: تمييز البادئ ، إضافة النيوكليوتيدات ، والانتقال من مكان إلى آخر (شكل 18.3) وبهذه الطريقة يقوم هذا الإنزيم بدمد النتوء المنتهي بالنهاية 3' الغني بالكوانين والموجود بنهايات التيلوميرات.

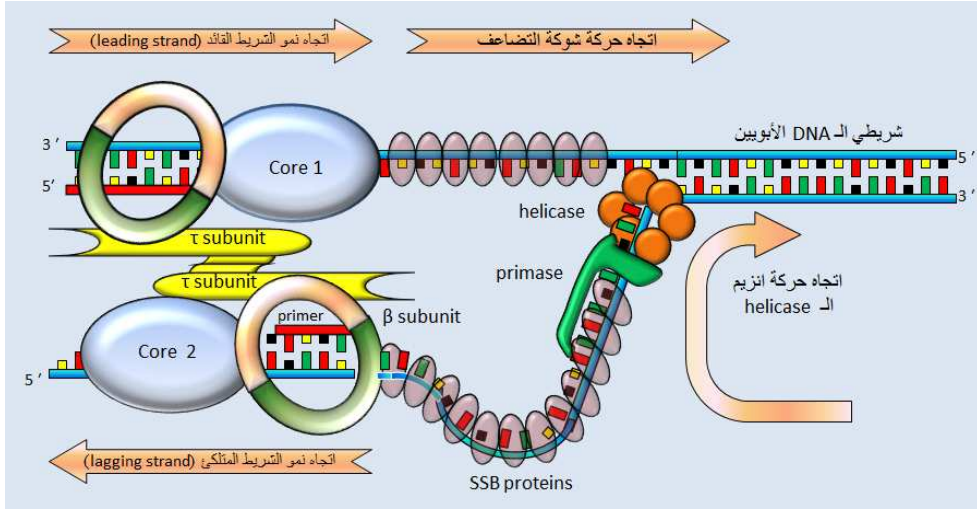
خلاصة خطوات التضاعف:

يبدأ تضاعف الـ DNA عند تسلسل من النيوكليوتيدات يدعى بأصل التضاعف origin of replication. يقوم إنزيم helicase بفتح التقاف unwind حلزون الـ DNA المزدوج، وترتبط بروتينات SSB بمناطق الـ DNA مفردة الشريط وتعمل على الحفاظ على حالتها الغير ملتفة.

يعد إنزيم DNA polymerase III إنزيم التضاعف الرئيسي في بكتريا القولون. يمكن لهذا الإنزيم أن يضيف النيوكليوتيدة للنهاية 3' للسلسلة الموجودة مسبقاً من النيوكليوتيدات، ولكن لا يمكن له من أن يبتدأ تخليق السلسلة أنياً *de novo synthesis*. ولهذا السبب، يقوم إنزيم RNA primase، وهو أحد أنواع إنزيم RNA polymerase، بتخليق بادئ الـ RNA، وهو تسلسل يتألف من حوالي 10 أزواج قاعدية مكتملة للـ DNA الأبوي. وبعد تخليق البادئ، يقوم إنزيم DNA polymerase III بإضافة النيوكليوسيدات منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات dNTP لخلق سلسلة جديدة من الـ DNA. وبما أن

شريطي الـ DNA متضادي الاتجاه antiparallel، لذا يجب أن تتم عملية إطالتهما بواسطة آليتين مختلفتين، حيث يقوم شريط الـ leading بالاستطالة باتجاه شوكة التضاعف، وذلك بإضافة النيوكليوتيدات بشكل مستمر للنهاية 3' النامية. وبالتناقض، فإن شريط الـ lagging، والذي يستطيل بعيداً عن (عكس) شوكة التضاعف، يتم تخليقه بصورة غير مستمرة عن طريق سلسلة من القطع والتي تدعى بقطع أوكازاكي Okazaki fragments. عندما يصل إنزيم DNA polymerase III إلى باديء الـ RNA في شريط الـ lagging، فإنه يستبدل بإنزيم DNA polymerase I، والذي يزيل الـ RNA ويستبدله بالـ DNA. يرتبط بعد ذلك إنزيم DNA ligase ويلحم الشقوق المتبقية. يفتح التفاف الـ DNA بعد ذلك أكثر، وتضاف بواديء جديدة في شريط الـ lagging، بينما يقفز إنزيم DNA polymerase III إلى الأمام لبدء تخليق قطعة أوكازاكي أخرى. وللسهولة، يتكون إنزيم DNA polymerase III من جزئيتين منفصلتين، إحداهما تعمل على شريط الـ leading، والأخرى تعمل على شريط الـ lagging، وهما يعملان معاً بشكل متزامن، ويرجع الفضل في ذلك إلى وحدة "تاو" الثانوية τ -subunit. تعمل هذه الوحدة على ازدواج جزئتي الـ DNA polymerase الصميتين ببعضهما البعض عند شوكة التضاعف وهي التي يرجع إليها الفضل في جعل تخليق كل من شريط الـ leading مع الـ lagging يحصل بشكل متزامن. وهكذا، فإن بروتينات التضاعف ترتبط ببعضها البعض في وحدة كبيرة مفردة، وتحرك بسرعة على طول الـ DNA معطية الإمكانية للـ DNA لكي يتخلق في كلا اتجاهي شوكة التضاعف في نمط منسق وكفوء.

إن عملية تضاعف الـ DNA هي عملية تتضمن خليط من البروتينات نوقش كل منها على حدة، ولكن في الحقيقة، إن معظم البروتينات تحمل مع بعضها البعض بمعقد إنزيمي متعدد كبير large multi-enzyme complex والذي يعرف بالـ replisome، والذي يتحرك بسرعة على طول الـ DNA. هذا المعقد يمكن تخيله كماكنة خياطة صغيرة متألّفة من أجزاء بروتينية وتستمد الطاقة من عملية التحليل المائي hydrolysis للـ nucleoside triphosphate. ولو أن معقد التضاعف قد تمت دراسته بشكل مكثف في بكتريا القولون والعديد من الفايروسات، ولكن هذا التركيب يشابه في عمله كثيراً التركيب الموجود في الكائنات حقيقية النواة. إن وظائف وحدات هذا التركيب ملخصة بالشكل 19.3.



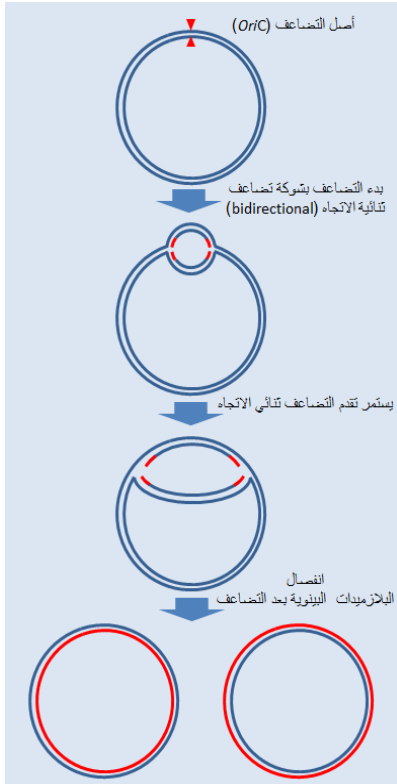
شكل (19.3) : مخطط يبين علاقة بروتينات التضاعف المختلفة مع بعضها البعض عند شوكة التضاعف (تصميم المؤلف)

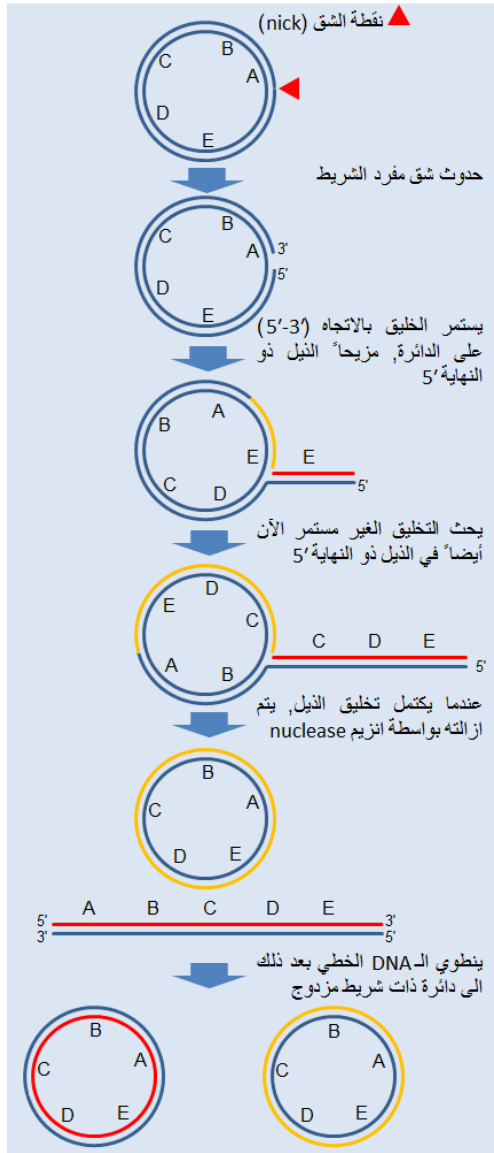
تراكيب تضاعفية أخرى

إن موديل تضاعف بكتريا القولون المناقش سلفاً هنا هو تركيب ثيتا θ structure. ويحدث هذا الموديل النموذجي في جزيئات الـ DNA الخطية والدائرية على حد سواء. ويحدث في الجزيئات الكبيرة كالجينوم البكتيري وفي بعض البلازميدات (شكل 20.3).

ويتقدم التضاعف هنا من منشأ واحد باتجاه واحد unidirectional أو باتجاهين bidirectional إلى أن يتم نسخ البلازميد كاملاً.

شكل (20.3): تضاعف البلازميدات بشكل مستقل عن الكروموسوم البكتيري: يبدأ التضاعف عند منشأ التضاعف ($oriC$) ويستمر حول الدائرة. وفي هذا المخطط، يحدث التضاعف في كلا الاتجاهين، وفي بعض البلازميدات يحدث التضاعف في اتجاه واحد فقط (تصميم المؤلف).





يوجد هنالك موديلين آخرين للتضاعف في الكروموسومات الدائرية، ويتمثلان بأسلوبين آخرين للتضاعف في الكروموسومات الدائرية وهما: الدائرة المتحركة (rolling circle) وعروة الإزاحة (D-loop).

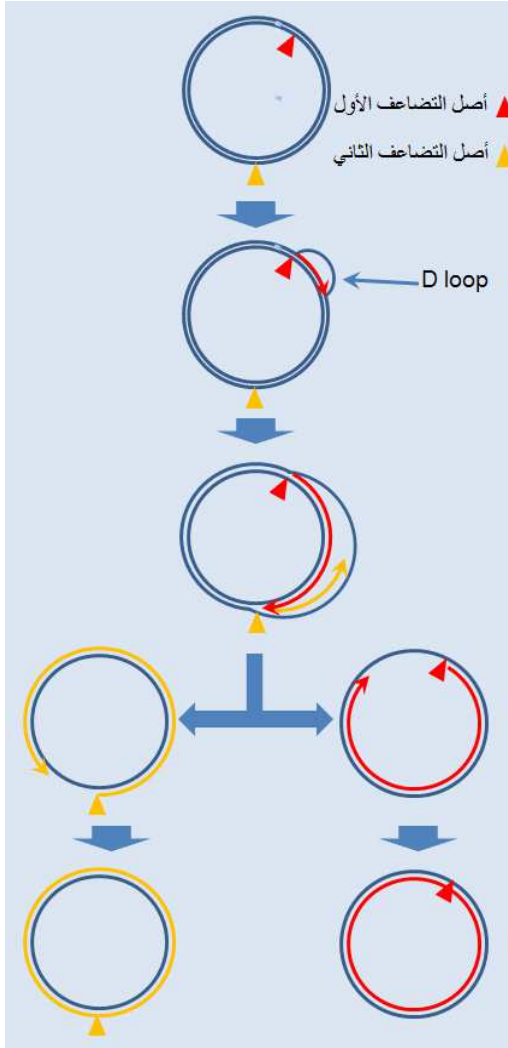
موديل الدائرة المتحركة Rolling Circle Model

يحدث هكذا نوع من التضاعف في الـ DNA الفايروسي، حيث تستخدم العديد من العاثيات هذه الطريقة بحيث تملئ رؤوسها بالـ DNA الخطي المتضاعف من الجزيئة الأبوية الدائرية. كذلك يحدث أيضاً في بكتريا القولون خلال عملية الجماع كما في بلازميد الخصوبة F plasmid أو في كروموسوم بكتريا القولون ذو تردد إعادة الارتباط العالي Hfr chromosome (أنظر الفصل التاسع). ووفقاً لموديل الدائرة المتحركة للتضاعف، يتم عمل الشق (كسر في إحدى أصرتي الفوسفات ثنائية الأستر) في أحد شريطي جزيئة الـ DNA الدائرية، ويمتلك هذا الشق طبعاً نهايتين أحدهما هي نهاية هيدروكسيلية من نوع 3' ونهاية فوسفات من نوع 5' (شكل 21.3).

شكل (21.3): موديل الدائرة المتحركة للتضاعف. تعد الحروف من A إلى E معلمات كروموسومية لتبين اتجاه الحركة (تصميم المؤلف).

وتحت تأثير بروتينات الـ helicase والـ SSBs تتولد شوكة التضاعف. وهنا يكون تخليق الشريط البادئ (primer) غير ضروري بسبب توفر النهاية الهيدروكسيلية من نوع

3'، وبالتالي يستمر تخليق الشريط القائد (leading strand) وذلك باطالة تلك النهاية الهيدروكسيلية المتكشفة. وفي نفس الوقت، يتم إزالة قالب الأبوي لتخليق الشريط المتخلف (lagging strand). ان نوع الانزيم المبلمر المستخدم في هذه العملية هو DNA polymerase III. هذا ويتضاعف الشريط الأبوي المزاح بطريقة اعتيادية من قبل البادئ. ينتج هكذا موديل تضاعفي عن دائرة بامتداد خطي، وهذا يشبه الحرف الاغريقي سكما (σ) ومن هنا جاء الاسم تضاعف سكما sigma replication أو تضاعف الدائرة المتدحرجة rolling circle replication.



موديل عروة الإزاحة (D-Loop Model)

يحتوي الكلوروبلاست والميتوكوندريا (في الخلايا حقيقية النواة) على جزيئات DNA دائرية والتي تتضاعف بآلية مختلفة قليلاً. يحتل أصل التضاعف في هذه الجزيئات نقطة مختلفة لكل من شريطي القالب الأبويين. يبدأ التضاعف عند أحد الشريطين، مزيجاً الشريط الآخر في نفس الوقت الذي يكون فيه عروة الإزاحة (displacement loop) أو D-structure (شكل 22.3).

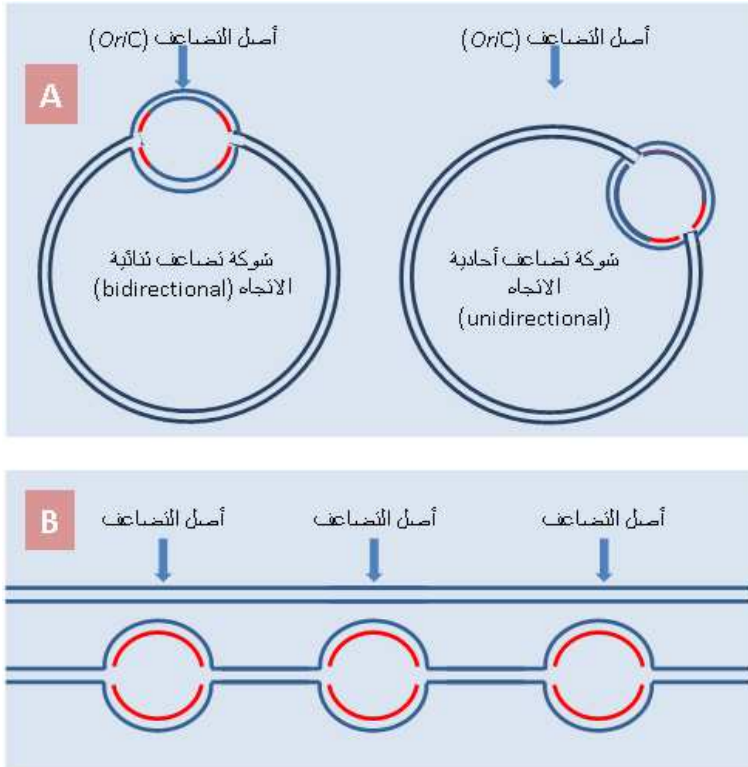
يستمر التضاعف إلى أن تصل العملية إلى منشأ التضاعف في الشريط الآخر. ثم يبدأ التضاعف على الشريط الآخر وباتجاه معاكس. ولكن يمكن حدوث الموديل الأول (تركيب ثيتا) في DNA الميتوكوندريا تحت ظروف نمو معينة.

شكل (22.3): موديل عروة الحرف D في تضاعف الميتوكوندريا والكلوروبلاست. تتكون عروات الإزاحة من تضاعف الميتوكوندريا والكلوروبلاست عند مناطق مختلفة في شريطي الحلزون المزدوج (تصميم المؤلف).

ملحق الفصل الثالث

التضاعف في الكائنات حقيقية النواة

على الرغم من تشابه الخواص العامة لتضاعف الـ DNA في الخلايا حقيقية النواة مع تلك التي في بدائية النواة، إلا إن هنالك بعض الفروق المهمة. إن كروموسومات الكائنات حقيقية النواة كبيرة جداً، وفي بعض الحالات تكون أكبر بالآلاف المرات من نظيراتها في بدائية النواة. ولكي تتضاعف هذه الكتل الضخمة الخطية من الـ DNA بوقت معقول، يجب عليها أن تحتوي على عدّة مناطق لبداية عملية التضاعف والتي تعرف بأصول التضاعف (origins of replication, *OriC*). وهي عادة ما يزيد عددها عن 100 أصل للتضاعف. بينما لا يوجد في جينوم genome بكتيريا القولون الدائري سوى أصل تضاعفي واحد (شكل 23.3).



شكل (23.3): أصول وشوكات التضاعف. في الفرع A شوكات التضاعف في الـ DNA الدائري الصغير في بدائية النواة. في الفرع B جزء من الـ DNA الخطي الطويل جداً في حقيقية النواة (تصميم المؤلف).

إن سرعة إنزيمات DNA polymerases في اللبائن (حقيقية النواة) أقل من عشرة إلى مئة مرة من سرعة إنزيمات DNA polymerases في البكتريا (بدائية النواة). وتبلغ سرعة البلمرة في اللبائن بما يقارب 100 نيوكليوتيدة في الثانية الواحدة. إن وجود النيوكليوسومات nucleosomes والتي تعيق من حركة الإنزيمات هو الذي سبب هذا البطء. ومن المعروف بأن إنزيمات البلمرة تقوم "بمفاوضة" النيوكليوسومات بطريقة ما أثناء عملية البلمرة، ولكن عندما يلاقي إنزيم DNA polymerase النيوكليوسوم يحتاج بالضرورة إلى فك الارتباط بين الهستونات والـ DNA في تركيب النيوكليوسوم، وهذا هو الذي يسبب البطء في كل الأحوال.

من الملاحظ بأن طول قطع أوكازاكي يختلف أيضاً بين الكائنات حقيقية وبدائية النواة، حيث تكون هذه القطع – كما ذكر سابقاً – بطول 100 إلى 200 نيوكليوتيدة في اللبائن وبتول 1000 إلى 2000 نيوكليوتيدة في البكتريا. أما إنزيمات الـ DNA polymerases المشاركة في عملية التضاعف في اللبائن، فإنها بأربعة أنواع رئيسية وهي α و β و γ و δ . يعد إنزيم DNA polymerase (delta) δ هو إنزيم التضاعف الرئيسي في اللبائن. ويوجد في النواة، وهو يتصرف بنفس الطريقة التي يتصرف بها إنزيم DNA polymerase III في بكتريا القولون، حيث يتكون من جزئيتين، أحدهما تخلق شريط الـ leading، والأخرى تخلق قطع أوكازاكي في شريط الـ lagging. يوجد إنزيم DNA polymerase α في النواة، ويدخل في عملية التضاعف ولكنه ليس الإنزيم الرئيسي في عملية التضاعف (وهو في ذلك يشبه إنزيم DNA polymerase I). ويوجد إنزيمي DNA polymerase β and ϵ في النواة أيضاً ولكن ليس لهما دور في عملية التضاعف الاعتيادية، وربما يدخلان في عملية إصلاح ضرر الـ DNA. أما إنزيم DNA polymerase γ ، فيوجد في الماييتوكوندرية، ويكون مسؤولاً عن تضاعف جينومها mitochondrial genome (يكون شكل جينوم الماييتوكوندرية دائري، لذا فهو يحاكي جينوم بكتريا القولون الدائري أيضاً).

أسئلة الفصل الثالث

السؤال الأول: علل مايلي

- وجد بأن النيوكليوتيدات الحرة التي تعمل كمادة أساس substrate لإنزيم الـ DNA polymerase وجد بأنها تكون على هيئة ثلاثية الفوسفات deoxyribonucleoside triphosphates؟
- يحتاج إنزيم DNA polymerase إلى بادئ دائماً؟
- تتقدم إنزيمات DNA polymerase بالاتجاه من 5' إلى 3' وليس بالاتجاه المعاكس؟
- على الرغم من الاتصال المحكم لإنزيم DNA polymerase III بالـ DNA وعلى امتدادات طويلة، إلا أنه رخوا بشكل كاف لكي يتحرك بشكل انزلاقي متسلسل من نيوكليوتيدة إلى أخرى؟

- لا تتمكن إنزيمات DNA polymerases بدء عملية التضاعف أنياً؟
- يخلق الـ RNA من قبل إنزيم RNA primase الذي لا يمتلك فعالية تصحيح الخطأ ثم يمحي بعد ذلك بدلاً من أن يخلق الـ DNA مباشرة؟
- سمي شريط الـ lagging بهذا الاسم؟
- توصف عملية التضاعف بنصف غير مستمرة (semi-discontinuous)؟
- لا يتشربك الـ DNA لو وضعت منه مترين مثلاً في حيز صغير جداً في الخلية بينما لو وضعت نفس الكمية من أي خيط اعتيادي فانه سرعان ما يتشربك؟
- لا تحدث مشكلة نهاية التضاعف end replication problem في البكتيريا بينما تحدث في البشر مثلاً؟
- يتخلق شريط الـ leading بشكل متزامن مع شريط الـ lagging؟
- "لا يسقط" إنزيم DNA helicase إلى أن يصل إلى نهاية شريط الـ DNA، أو إلى أن يفرغ تحميله unloaded من الـ DNA من قبل بروتين آخر؟
- تتحرر مجموعة pyrophosphate في كل خطوة من خطوات البلمرة؟
- إن سرعة إنزيمات DNA polymerases في اللبائن (حقيقية النواة) أقل بعشر مرات من سرعة إنزيمات DNA polymerases في البكتيريا (بدائية النواة)؟
- سمي التضاعف rolling circle بهذا الاسم؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

- في كل خطوة من خطوات التضاعف عندما تضاف كل نيوكليوتيدة إلى شريط الـ DNA المخلق لابد من تحرر
a. nucleotide b. nucleoside c. monophosphate d. pyrophosphate
- قام العالم Arthur Kornberg في عام 1957 بعزل إنزيم وأطلق عليه اسمه.
a. DNA polymerase I b. DNA polymerase III c. DNA polymerase III d. DNA polymerase VI
- وتتمثل هذه المشكلة بحدوث حالة اللف الفائق (supercoiling) عند تقدم فقاعة التضاعف replication fork إلى الإمام.
a. unwinding problem b. initiation problem c. directionality problem d. topological problem
- يبلغ طول قطع أوكازاكي في البشر نيوكليوتيدة تقريباً.
a. 10 b. 100 c. 1000 d. 10000
- استخدمت Elizabeth Blackburn في تجاربها لاكتشاف انزيم telomerase الكائن الحي
a. Tetrahymena th. b. hippopotamus c. Salmonella typhi d. Neanderthal
- إن الموديل السائد في عملية التضاعف هو
a. theta b. rolling circle c. strand displacement d. non
- يحدث تضاعف الدائرة المتدرجة rolling circle replication في
a. F plasmids b. R plasmids c. Mega plasmids d. mitochondria
- إذا احتوى أحد الشريطين الأبوين على أصل تضاعفي واحتوى الشريط الأبوي الآخر المكمل له على أصل تضاعفي مختلف عن الأول عندها يسمى هذا التضاعف بـ
a. theta replication b. rolling circle replication c. strand displacement replication d. conservative replication
- يناظر عمل إنزيم DNA polymerase III في بدائية النواة عمل إنزيم في حقيقية النواة.
a. DNA polymerase α b. DNA polymerase β c. DNA polymerase γ d. DNA polymerase δ

- تعد فرضية هي الفرضية الصحيحة بدون شك لتضاعف الـ DNA حسب Meselson و Stahl.
a. conservative mode b. semi-conservative mode c. dispersive mode d. only "a" and "b"
- يعمل إنزيم دوراً رئيسياً في آلية الإصلاح المعروفة بـ SOS response.
a. DNA polymerase I b. DNA polymerase II c. DNA polymerase III d. primase
- توجد فعالية تصحيح الخطأ 3' - 5' في وحدة الثانوية لانزيم DNA polymerase III
a. α b. β c. γ d. ϵ
- إن سرعة إنزيمات DNA polymerases في اللبائن (حقيقية النواة) أقل بعشر مرات من سرعة إنزيمات DNA polymerases في البكتيريا (بدائية النواة)، وذلك بسبب وجود الـ ----- والتي تعيق حركة إنزيمات DNA polymerases.
a- nucleosomes b- nucleotides c- helicases d- replication fork
- عندما يستخدم شريط الـ DNA الحاوي على التسلسل 5' GACTAACGATGC 3' كقالب في عملية التضاعف، فإن تسلسل شريط الـ DNA البنوي الناتج من هذا الشريط القالب سيكون:
a. 3'CTGATTGCTACG 5'b. 5'GCATCGTTAGTC 3'c. 5'CTGATTGCTACG 3'
d. 3'CGTAGCAATCAG 5' e. 3'CGUAGCAAUCAG 5'
- لا يمكن للـ من أن يلعب دوراً في عملية التضاعف
a. SSBs b. OriC c. telomerase d. e. nucleosomes
- يقوم انزيم ببدء عملية تضاعف شريط الـ leading.
a. DNA polymerase I b. DNA polymerase III c. primase d. RNA polymerase

السؤال الثالث: عرف ما يلي

Dispersive mode of DNA replication, Primosome, Replication fork, Replisome, D structure, OriC, SSBs, DNA polymerase γ

وللمزيد من الاطلاع اقرء

- Alberts B.**, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.
- Arezi B.**and Kuchta. R. 2000. Eukaryotic DNA primase *Trends Biochem. Sci.* 25: 572-576.
- Beese L.** Derbyshire V. and Steitz T. 1993. Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA *Science* 260: 352-355.
- Berk A.**, Zipursky S., Baltimor D., Darnell J., and Lodish H. Molecular Biology. Fourth edition. Paul Matuataira, USA, 1998.
- Blackburn, E. H.** (1999). The Telomere and Telomerase, How they are Interact? *Mount Sinal Journal of Medicine* 66: 292- 400.
- Bolsover S.**, Hyams J., Shephard E., White H., Wiedemann C. Cell biology. Second edition, Jhon Wiley and Sons, 2004.
- Brandy, C.** Elizabeth Blackburn and the story of telomeres – deciphering the ends of DNA. The MIT Press Cambridge, Massachusetts London, England, 2007.
- Brautigam C.**and SteitzT. 1998. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA

polymerases and their substrate complexes *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 54-63.

Cooper J. and Hausman R. The cell, A Molecular Approach. Fourth edition, Sinauer Associates, 2007.

Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. L., Weinrich, A. A., Avilion, C. P., Chiu, R. R., Adams, E., Chang, R. C., Allsopp, J. and Yu, H. (1995). The RNA Component of Human Telomerase. *Science* 269: 1246-1241.

Fitzgerald-Hayes M. and Reichsman F. DNA and Biotechnology. Third edition, Elsevier/ 2010.

Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1987). The Telomere Terminal Transferase of Tetrahymena Is a Ribonucleoprotein Enzyme With Two Kinds of Primer Specificity. *Cell* 51: 887- 98.

Greider, C. W. (1998). Telomeres and Senescence, The History, The Experiment, The Future *Current Biology* 8: 178- 181.

Hames B., and Hooper N. Instant notes in biochemistry. Third edition, BIOS Scientific Publishers Limited, 2005.

Hübscher U., Nasheuer H., and Syväoja J. 2000. Eukaryotic DNA polymerases: A growing family *Trends Biochem. Sci.* 25: 143-147.

Kornberg, A., and Baker, T. A., *DNA Replication* (2d ed.). W. H. Freeman and Company, 1992.

Lewin B. Genes. VII, Oxford University Press, 2000.

Lewis R. Human Genetics: concepts and applications. Ninth edition, McGraw-Hill, 2009.

Murray R., Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell V., Weil P. Harper's Illustrated Biochemistry. 28th edition, McGraw Hill Medical, 2009.

Steitz T. 1999. DNA polymerases: Structural diversity and common mechanisms *J. Biol. Chem.* 274: 17395-17398.

Tamarin . Principles of genetics. Seventh edition. The McGraw-Hill. 2001.

Verma P., and Agarwal V. molecular biology. First Edition Schandgoup, India 2004.

Watson J. A Passion for DNA; genes, genomes and society. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

4

الفصل الرابع استنساخ الجين



راهب ينسخ مخطوطة: مؤلف معجزات نوتردام في مكتبه مستخدماً سكيناً رسم و ريشة (مكتبة صور ماري أيفان/لندن)

مقدمة

ان عملية تخليق الـ RNA من الـ DNA القالب تدعى بالاستنساخ transcription، وهي مفهومة بشكل أفضل في الكائنات بدائية النواة. ولو ان تنظيم تخليق الـ RNA في خلايا اللبائن هو مختلف عنه في بدائية النواة، ولكن عملية تخليق الـ RNA في

بدائية النواة سوف يكون قابل للتطبيق على حقيقة النواة حتى ولو كانت الإنزيمات والإشارات المنظمة للعملية مختلفة.

ان تسلسل الـ ribonucleotides في جزيئة الـ RNA هو مكمل لتسلسل الـ deoxyribonucleotides في شريط واحد في حلزون الـ DNA المزدوج. يكون الـ RNA مماثلاً في تسلسله لأحد شريطي الـ DNA باستثناء وجود اليوراسيل بدلاً عن الثايمين، والذي يدعى بالشريط المشفر coding strand. بينما يكون مكماً للشريط الآخر، والذي يوفر القالب template لتخليقه.

إن الإنزيم الأساسي المسؤول عن عملية الاستنساخ هو RNA polymerase . ان إنزيم DNA dependent RNA polymerase أو ما يعرف بـ RNA polymerase هو إنزيم مسؤول عن بلورة الـ ribonucleotides إلى تسلسل مكمل للشريط المشفر في الجين (شكل 1.4). يرتبط الإنزيم بمناطق متخصصة تعرف بالبروموتر promoter ، الواقعة على الشريط المشفر. يتبع هذا بدء تخليق الـ RNA عند نقطة بدء الاستنساخ transcription starting point ، وتستمر العملية حتى يتم الوصول إلى تسلسل الانتهاء termination sequence . تعرف وحدة الاستنساخ transcription unit بأنها المنطقة التي تمتد بين البروموتر promoter والمنهي terminator. ان الـ RNA الناتج، والذي يخلق بالاتجاه من 5' إلى 3' يدعى بالمنتج الأولي primary transcript . وفي الكائنات بدائية النواة، فان هذا المنتج الأولي يمثل ناتج عدة جينات، بينما في خلايا اللبائن، فانه يمثل عادة ناتج جين مفرد.

من الـ DNA إلى الـ RNA

ان الاستنساخ transcription والترجمة translation، هما وسائل تستطيع من خلالها الخلية أن تعبر عن المحتوى الوراثي لجيناتها. ولان العديد من نسخ الـ RNA النموذجية يمكن لها أن تصنع من نفس الجين، ولأن جزيئة الـ RNA يمكن لها أن توجه تخليق العديد من جزيئات البروتين المماثلة، لذا يمكن للخلايا أن تخلق كميات كبيرة من البروتينات بسرعة عند الضرورة. ولكن كل جين يمكن له أيضا أن يستنسخ ويترجم بكفاءة مختلفة مانحاً الخلية القدرة على صنع كميات كبيرة من بعض البروتينات وكميات قليلة من بروتينات أخرى. وعلاوة على ذلك، وكما سنرى ذلك لاحقاً، يمكن للخلية أن تغير (أو تنظم) كل من جيناتها حسب الحاجة – ويتم ذلك بالأعم الأغلب من خلال التحكم بإنتاج الـ RNA التابع لها (أنظر الفصل السادس).

ان الخطوة الأولى التي تتخذها الخلية هو نسخ مكان محدد من الـ DNA – الجين – إلى تسلسل من RNA. ولو ان المعلومات في الـ DNA، تستنسخ إلى شكل كيميائي آخر (RNA)، ولكنها ما تزال مكتوبة أساسا بنفس اللغة التي كانت عليها – وهي لغة التسلسل النيوكليوتيدي. ومن هنا سميت هذه العملية بالاستنساخ.

وكما هو عليه الحال في الـ DNA، فان الـ RNA هو بوليمر خطي يكون من أربعة أنواع مختلفة من النيوكليوتيدات المرتبطة مع بعضها البعض بأواصر فوسفات ثنائية الأستر phosphodiester bonds. يختلف الـ RNA عن الـ DNA بأربعة فروقات أساسية: (1) إن النيوكليوتيدات في الـ RNA هي ribonucleotides – هذا يعني بأنها تحتوي على سكر رايبوز ribose (ومن هنا جائت تسميتها بالـ ribonucleic acid) بدلا من deoxyribose، (2) ولو ان الـ RNA، كما هو الحال في الـ DNA، يحتوي على القواعد A و G و C ولكنه يحتوي على اليوراسيل U بدلا من الثايمين T الموجود في الـ DNA. (3) وعلى الرغم من هذه الاختلافات الصغيرة، يختلف كل من الـ DNA والـ RNA عن بعضهما بشكل مثير تماما في تركيبهما العام. فبينما يتواجد الـ DNA في الخلايا بصورة حلزون مزدوج، يتواجد الـ RNA بصورة مفردة الشريط. ولهذا تنطوي سلاسل الـ RNA إلى أشكال متعددة، كما سنرى ذلك لاحقا. (4) بما أن جزيئة الـ RNA هي مفردة الشريط ومكملة لشريط واحد فقط من شريطي الجين، فليس من الضرورة أن يكون محتوى الكوانين يساوي محتوى السايانوسين، ولا محتوى الأدينين يساوي محتوى اليوراسيل. وهنا يبرز لنا سؤال مهمين، أولهما: لماذا يحتوي الـ RNA على يوراسيل بدلا عن الثايمين بدلا عن الثايمين بينما تكون الحالة معاكسة في الـ DNA؟ والسؤال الثاني هو: لماذا تكون الـ DNA منقوص الأوكسجين في الموقع 2' والـ RNA غير منقوص الأوكسجين في نفس هذا الموقع؟ لإجابة السؤال الأول راجع الفصل السابع، أما إجابة السؤال الثاني فهي ربما يمكن إجمالها بسببين: الأول يستخدم هذا الموقع كواسم طبيعي قد وفرتة الخلية لكل الإنزيمات الخلوية التي تتداخل مع هذه الأحماض النووية، وهذا يعطي بالتالي وظائف خلوية مختلفة ومتخصصة لكل من هذين الحمضين النوويين. أما السبب الثاني من وجود ذرة الأوكسجين الإضافية هذه في الـ RNA يعمل على زيادة تفاعليتها (reactivity) وفي نفس الوقت الإقلال من استقرارها مقارنة بجزيئة الـ DNA (لاحظ إذا وضعت جزيئة الـ RNA في درجة حرارة الغرفة لفترة قصيرة قد يؤدي ذلك إلى تحللها الذاتي autolysis، بينما لا تحدث مثل هذه الظاهرة في جزيئة الـ DNA إذا ما وضعت في نفس الظروف). ولهذا السبب، وكقارنة بالـ RNA، يعد الـ DNA أكثر ملائمة لكي يعمل كمستودع للمعلومات الوراثية على المدى الطويل.

تخلق كل أشكال الـ RNA في الخلية بواسطة استنساخ الـ DNA، وهي عملية تمتلك مشتركات عديدة مع عملية تضاعف الـ DNA. يبدأ الاستنساخ بفتح التفاف unwinding جزء صغير في حلزون الـ DNA المزدوج لكي يكشف القواعد النتروجينية

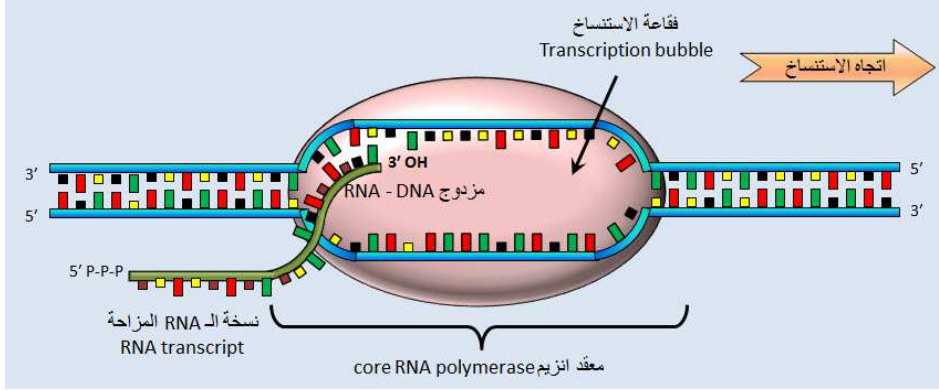
في كل شريط DNA. وكما هو الحال في عملية تضاعف الـ DNA، يتحدد التسلسل النيوكليوتيدي في سلسلة الـ RNA من قبل الأزواج القاعدي حسب قاعدة Watson – Crick بين النيوكليوتيدات القادمة وقالب الـ DNA. وعندما تكون النيوكليوتيدة القادمة مناسبة للنيوكليوتيدة القالب، فإنها ترتبط تساهمياً بسلسلة الـ RNA النامية وذلك بواسطة تفاعل محفز إنزيمياً يفقد به pyrophosphate عند إضافة كل نيوكليوتيدة. وبهذا تكون السلسلة النامية مكتملة تماماً لشريط الـ DNA المستخدم كقالب.

يختلف الاستنساخ، على أية حال، عن عملية تضاعف الـ DNA بعدة طرق مهمة. وبشكل مغاير عن شريط الـ DNA المتكون حديثاً، لا يبقى شريط الـ RNA مرتبط بهيدروجينياً بشريط الـ DNA القالب. ولكن بدلاً من ذلك، وخلف المنطقة التي تضاف بعدها النيوكليوتيدات، تزال سلسلة الـ RNA وتستبدل بحلزون الـ DNA المزدوج. وهكذا، تتحرر جزيئات الـ RNA المنتجة من قبل الاستنساخ من الـ DNA القالب بصورة أشرطة مفردة (شكل 1.4)، بالإضافة إلى ذلك، ولأن جزيئات الـ RNA تستنسخ من منطقة محدودة من الـ DNA، تكون جزيئات الـ RNA أصغر بكثير من جزيئات الـ DNA. إن جزيئة الـ DNA في كروموسوم اللبائن من الممكن أن تكون أكثر من عدة ملايين نيوكليوتيدة طولاً، وبالتناقص، فإن معظم جزيئات الـ RNA ليست في طولها أكثر من عدة الآلاف من النيوكليوتيدات، والعديد منها أقصر بشكل ملحوظ.

إن العديد من جزيئات الـ RNA من الممكن أن تصنع من نفس الجين بوقت قصير، حيث يبدأ تخليق جزيئات RNA إضافية قبل أن يكتمل تخليق أول جزيئة RNA. عندما تتبع إنزيمات RNA polymerase بجد أعقاب بعضها البعض بهذه الطريقة، فإن كل منها يتحرك بسرعة كبيرة، وفي النتيجة، تخلق الآلاف النسخ من جين مفرد في وقت قصير كما سنرى ذلك لاحقاً.

على الرغم من كون إنزيم RNA polymerase يحفز أساساً نفس التفاعل الكيميائي الذي يحفزه إنزيم DNA polymerase، حيث يحفز كلا الإنزيمان تفاعل البلمرة من الاتجاه 5' إلى 3'، لكن هنالك بعض الاختلافات بين الإنزيمين. أولاً، وبشكل أكثر وضوحاً، يحفز إنزيم RNA polymerase بلمرة الـ ribonucleotides، وليس الـ deoxyribonucleotides. ثانياً، وبشكل مغاير لإنزيم DNA polymerase الداخل في عملية تضاعف الـ DNA، يمكن لإنزيم RNA polymerase أن يبتدأ بلمرة سلسلة الـ RNA بدون باديء. وبدلاً من ذلك، يبدأ إنزيم الـ RNA polymerase الاستنساخ أنياً *de novo* عند نقاط محددة في بداية الجين (البروموتر). يمكن أن يوجد مثل هذا الاختلاف لأن الاستنساخ لا يتصف بالدقة التي يتصف بها التضاعف. وخلافاً للـ DNA، ففي الاستنساخ لا تخزن المعلومات الوراثية في الخلايا، ولهذا، يخطأ إنزيم RNA polymerase بمعدل

خطأ واحد لكل عشرة الآلاف نيوكليوتيدة مستنسخة إلى الـ RNA (مقارنة بالخطأ الذي يرتكبه إنزيم DNA polymerase بمعدل نيوكليوتيدة واحدة لكل عشرة ملايين نيوكليوتيدة)، ويتضح من هذا أن الخطأ الحاصل في عملية الاستنساخ هو أقل أهمية من ذلك الحاصل أثناء عملية التضاعف.



شكل (1.4): إزالة سلسلة الـ RNA المتولدة حديثاً بحلزون الـ DNA المزدوج. تزال نسخة الـ RNA الحديثة بعد تولدها خلف بصيلة الاستنساخ (transcription bubble). يشير اللون الأخضر للنوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات الغير منقوصة الأوكسجين إلى الكوانين والأصفر للساييتوسين والأحمر للأدينين والبنفسجي لليوراسيل (تصميم المؤلف).

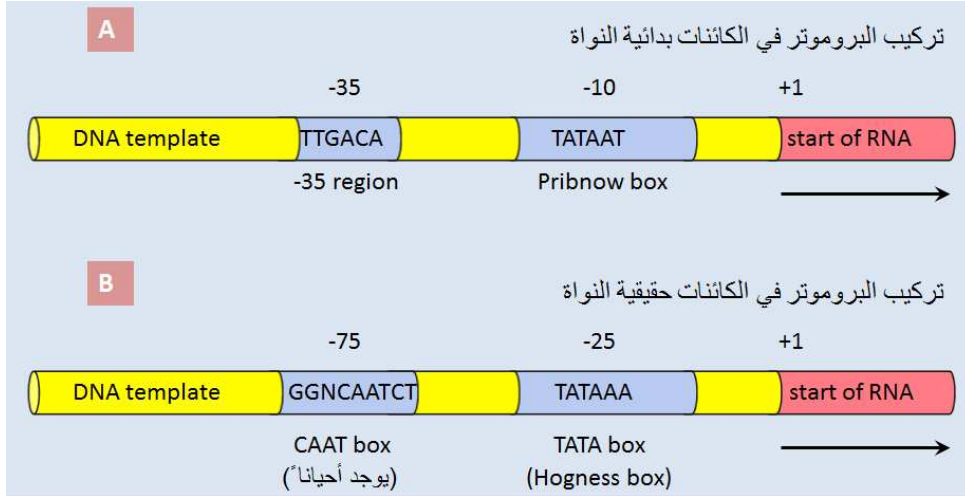
البروموتر the promoter

إن البروموتر هو تسلسل قصير، ومتميز، يقع فقط قبل (upstream) نقطة بداية الاستنساخ، ويكون ضروري لعملية الاستنساخ. ويبلغ من الأهمية بمكان بحيث أن استبدال قاعدة مفردة بصندوق TATA (وهو من أهم تسلسلات البروموتر في حقيقية النواة) يعمل كطفرات قوية قاتلة. إن منطقة البروموتر تحتوي على المعلومة التي تخبر إنزيم RNA polymerase متى يبدأ، وكما مرة يصنع سلسلة الـ RNA، وكيف يرتبط بعناية.

1. في بدائية النواة:

إن البروموتر المثالي في بدائية النواة ذو مكونين: المكون الأول يتألف من تسلسل سداسي hexamere الواقع في المكان 35- قبل نقطة بداية الاستنساخ (إن الإشارة السالبة تدل على المناطق الواقعة قبل نقطة بدأ الاستنساخ upstream of the transcription start point، حيث كلما اقتربت التسلسلات من هذه النقطة كلما قل الرقم الذي تحملها وصولاً إلى نقطة الصفر أي إلى نقطة بداية الاستنساخ transcription start point).

وهذا يعني أن الموقع -10 هو أقرب إلى نقطة بداية التضاعف من الموقع -35. والمكون الثاني هو تسلسل سداسي آخر يقع -10 قبل نقطة بداية الاستنساخ (شكل 2.4).



شكل (2.4): مناطق البروموتر الضرورية لبدء الاستنساخ في كلا A بدائية النواة و B حقيقية النواة. يبين هذا الشكل التسلسلات المتفق عليها consensus sequences. ترقيم أول نيوكليوتيدة تستنسخ بالرقم +1. أما النيوكليوتيدة المجاورة على الجانب 5' منها فترقم بالرقم 1-، يشير الخط الأخضر إلى تخليق شريط الـ RNA (تصميم المؤلف).

إن وظيفة التسلسل الواقع -35 هو لكي يوفر الإشارة والتي تمكن إنزيم RNA polymerase من تمييز تسلسل البروموتر، لذا تدعى هذه المنطقة بمقاطعة التمييز recognition domain. أما وظيفة التسلسل -10 أو الذي يعرف أيضاً بـ Pribnow box نسبة إلى مكتشفه فتنضح من خلال ملاحظة انفتاح unwinding شريط الـ DNA عند هذا الموقع وذلك عند وصول إنزيم RNA polymerase إليه، لذا تدعى هذه المنطقة بمقاطعة فتح الشريط unwinding domain. يتألف الموقع -10 حصراً من الأزواج القاعدية A=T والتي تساعد على صهر الـ DNA المزدوج إلى شريطين مفردين، حيث أن الطاقة الضرورية لتحطيم الأزواج القاعدي A=T تكون واطئة مقارنة بطاقة تحطيم الأزواج القاعدي CG ≡ ، إذن، إن ازدواج A=T يحتاج إلى الحد الأدنى من الطاقة لتحطيمه.

2. في حقيقة النواة:

أما تسلسلات البروموتر في الخلايا حقيقية النواة، فإنها أكبر، وأكثر تعقيداً، ومتنوعة أكثر مقارنة بتلك الموجودة في بدائية النواة. تحتوي جينات حقيقية النواة على مواقع بروموتر تدعى بالـ TATA box أو بالـ Hogness box ذو التسلسل TATAAA المتفق عليه والذي يتمركز بالموقع -25. أي الموقع الذي يقع على بعد 25 زوج قاعدي قبل نقطة بداية الاستنساخ (شكل 2.4). تحتوي مواقع البروموتر في حقيقية النواة كذلك على CAAT box ذو التسلسل المتفق عليه GGNCAATCT والذي يتمركز بالموقع -75.

مما يزيد من تعقيد مواقع البروموتر في الكائنات حقيقية النواة هو وجود تركيب آخر يدعى بالمسرّع enhancer. يحتوي DNA الفقرات على العناصر المسرّعة enhancers ، والتي تنشّط البروموتر، حيث تزداد فعالية الأخير بشكل هائل بوجود الـ enhancer والذي يزيد من تركيز عوامل الاستنساخ بالقرب من البروموتر. تتواجد المسرّعات enhancers عند كلا الموقعين: قبل upstream وبعد downstream نقطة بداية الاستنساخ، ولها تأثير كبير على الاستنساخ يصل إلى بعد 10 كيلو زوج قاعدي (الكيلو زوج = ألف زوج) بعيداً عن البروموتر، أي للـ enhancer القدرة على تشغيل مسافات بعيدة من الـ DNA.

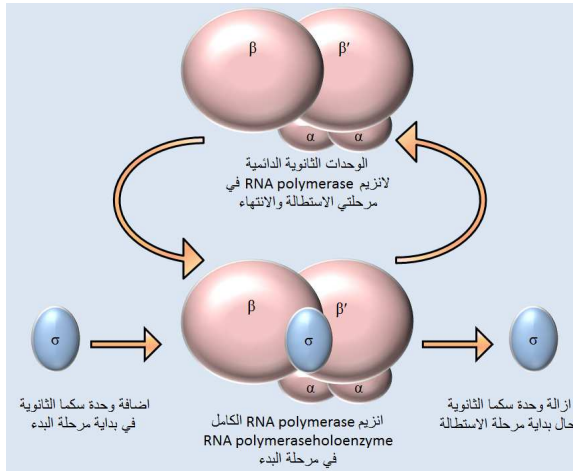
إن الفرق بين الـ enhancer والـ promoter هو ليس بالآلية mode of action ، وإنما الفرق هو تشغيلي operational ، حيث يستطيع الـ enhancer أن يحفّز الاستنساخ لمسافات ضخمة، بينما لا يستطيع الـ promoter أن يحفّز إلا المسافات القريبة منه وبشكل فوري. كما تمتاز المسرّعات بقدرتها على تحفيز استنساخ الجين في كلا الاتجاهين، أي سواء كان وقعها قبل الجين upstream أو بعد الجين downstream، حيث تم إثبات ذلك مختبرياً، فعندما أزيلت المسرّعات ووضعت باتجاه معاكس لاتجاهها التي كانت عليه، لوحظ بأنها تعمل بنفس الكفاءة. ومن الملاحظ عدم امتلاك البروموتر لهذه الخواص الفريدة، فليس له القدرة على تحفيز استنساخ الجين إلا إذا كان واقعاً قبله (upstream only). لكن توصف الـ enhancers بأنها مشوشة (موجودة في كل مكان) promiscuous ، وذلك لأنها بالإضافة إلى وظيفتها الرئيسية عبر تحفيز مناطق بعيدة جداً عنها، فإنها تستطيع أن تحفز الـ promoter حتى في المناطق المجاورة. إن آلية عمل العديد من المسرّعات هي غير معروفة، ولكن يقترح البعض بأن ارتباط البروتينات المنشطة (activator proteins) للاستنساخ بالمسرّعات يسبب بتكوين عروة إلى الخارج (looping out) بين المسرع من جهة والبروموتر من جهة أخرى، وهذا هو الذي يجلبهما معاً ليصبحا قريبين جداً من بعضهما البعض، وبهذا تستطيع البروتينات المنشطة للاستنساخ من التداخل بشكل مباشر مع جهاز الاستنساخ الواقع على البروموتر.

ومما زاد تعقيد عملية التنظيم الجيني في الكائنات حقيقية النواة، هو احتوائها (كما في اللبائن) على عناصر تدعى بالمسكتات silencers، والتي تعمل عكس عمل المسرعات تماماً، وهي تتشابه مع المسرعات في كونها تعمل بشكل مستقل عن الموقع وعن الاتجاه.

إنزيم الـ RNA polymerase:

1. في بدائية النواة:

إن إنزيم RNA polymerase في بكتريا القولون يحفز على تصنيع كل أنواع الـ RNA، والتي تشمل: mRNA وهو مختصر لـ messenger RNA، و tRNA وهو مختصر لـ transfer RNA، و rRNA وهو مختصر لـ ribosomal RNA، يستثنى من ذلك الباديء RNA primer والذي يرتبط عند النهاية 5' لقطع أوكازاكي حيث أنه يصنع بواسطة نوع مختلف من إنزيمات RNA polymerases يطلق عليه RNA primase (راجع الفصل الثالث). لا يوجد هنالك أنواع متعددة من إنزيمات RNA polymerases على غرار إنزيمات DNA polymerases وإنما هنالك نوعية واحدة من هذا الإنزيم تضطلع بتصنيع أنواع الـ RNA الثلاثة. يتألف إنزيم بوليمريز الرنا الكامل RNA polymerase holoenzyme من خمسة وحدات ثانوية. إن كل من وحدتي β و β' هما وحدتان كبيرتان جداً. أما وحدتي α فهما وحدتان متماثلتان. ويطلق على الوحدات التي تولف الإنزيم الصممي core enzyme بالوحدات الدائمة permanent subunits والتي يحتاجها الإنزيم ولا يستغني عنها في كل مراحل الاستنساخ الثلاثة (مرحلة البدء والإطالة والنهاية)، وهذا يختلف بالنسبة للعامل σ حيث يحتاجه الإنزيم في مرحلة البدء فقط (شكل 3.4).



شكل 3.4: مكونات إنزيم RNA polymerase في بكتريا القولون. يحفز إنزيم RNA polymerase بلمرة النيوكليوتيدات إلى تسلسل الـ RNA المكمل للشريط القالب في الجين. يتألف إنزيم RNA polymerase في بكتريا القولون من المعقد الصممي core complex والذي يتألف بدوره من الوحدتين الثانويتين β و β' . يتألف الإنزيم الكامل holoenzyme من وحدة σ الثانوية المرتبطة بالصميم β (تصميم المؤلف).

على الرغم من عدم التوصل إلى معرفة الدور الدقيق للعديد من وحدات الإنزيم الصميمي، ولكن وبشكل أساسي يمكن القول بأن:

1- وحدة بيتا برايم β subunit : ذات الشحنة الموجبة (positively charged)، وهي عبارة عن متعدد ببتيدي polypeptide يعتقد بأنه يدخل في الارتباط الحاصل مع الـ DNA.

2- وحدة بيتا β subunit : هو موقع الارتباط بالعديد من مثبطات الاستنساخ transcription inhibitors، ويعتقد بأنه يحتوي على أغلب أو كل المواقع الفعالة active sites لتكوين أصرة الفوسفات ثنائية الأستر phosphodiester bond، ولها القابلية على تكوين ارتباط عرضي مع الـ DNA. إن كل من وحدتي β و β' يؤلفان مركز الحفز catalytic center، والذي يأخذ على عاتقه انشطار شريطي الـ DNA.

3- وحدتي ألفا α subunit : تكون ضرورية لإعادة تركيب الإنزيم من وحدات منفصلة، أي أنها ضرورية لتحمي الإنزيم الصميمي core enzyme . ومن المقترح بأن هذه الوحدة تلعب دوراً في تمييز البروموتر promoter، وذلك لأنه عندما يخمج العاثي T4 خلايا بكتريا القولون، فإن وحدة α تتحول من قبل العاثي، إن هذا التحوير يؤدي إلى اختزال ألفة إنزيم بكتريا القولون في تمييز الـ promoter. وبهذه الطريقة، خدع العاثي T4 بكتريا القولون، (فبدلاً من أن يرتبط بروموتر بكتريا القولون بإنزيم RNA polymerase البكتيري ليخلق من الجينات البكتيرية، فإنه ارتبط بإنزيم T4 RNA polymerase وخلق الجينات الفايروسية). وبالإضافة إلى ذلك، تمثل وحدة α الثانوية موقعاً للاتصال بعدد من عوامل الاستنساخ transcription factors الضرورية لحدوث عملية الاستنساخ.

4- أما وحدة سكما σ subunit : لكي نتعرف على وظيفة هذه الوحدة لابد من معرفة ماذا يحدث عند غيابها. يتميز الإنزيم الصميمي الغير حاوي على وحدة سكما بإمكانيته الكاملة على تحفيز بلمرة النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات إلى الـ RNA، وهذا يعني بأن الإنزيم لا يحتاج هذه الوحدة في تفاعلاته الحفزية catalytic activity الأساسية. ولكن من المثير للاهتمام هو أنه على الرغم من قدرة الإنزيم الصميمي على الارتباط بالـ DNA، إلا أن هذا الارتباط غير متخصص، أي ليس للإنزيم القدرة على تمييز التسلسلات المتخصصة التي يبدأ عندها الاستنساخ. تم معرفة ذلك عندما أزيلت وحدة سكما الثانوية من إنزيم RNA polymerase، حيث لوحظ بأن هذا الإنزيم يرتبط بشكل غير متخصص بتسلسلات الـ DNA وبألفة واطئة low affinity. ولهذا السبب، يعد عامل سكما ضروري لتشخيص المناطق الصحيحة لبدء الاستنساخ، وهي مناطق الـ promoter التي يعجز الإنزيم الصميمي عن تشخيصها. فعند ارتباط وحدة سكما الثانوية بالإنزيم الصميمي فإنها تعمل على توجيه الإنزيم الصميمي إلى البروموتر، وذلك بواسطة الارتباط بشكل متخصص بتسلسلات البروموتر 10- و 35-، وهذا يؤدي إلى بدء عملية الاستنساخ عند بداية الجين.

هناك أكثر من صنف من عامل سكما، كل منها يتخصص لنوع مختلف من البروموتر. وتظهر التغيرات في عامل سكما في بعض الحالات. وعلى سبيل المثال، خلال تغيير نمط الحياة (مثلاً زيادة درجات الحرارة)، حيث أن بكتريا القولون لا تعاني من تغيرات مثيرة، ولكنها بدلاً من ذلك، تستخدم فقط عوامل سكما بديلة لكي تستجيب للتغيرات البيئية العامة. ومن الملاحظ هو طريقة تسمية عوامل سكما، حيث أنها تسمى أما بواسطة الوزن الجزيئي MW ، أو تسمى باسم الجين الذي ينتجها). إن عامل سكما من نوع $\sigma 70$ هو المسؤول عن استنساخ معظم الجينات في الظروف الاعتيادية. إن عوامل سكما البديلة هي $\sigma 32$ و $\sigma 54$ و σE وغيرها، والتي يتم تنشيطها لكي تستجيب للتغيرات البيئية المختلفة. نلاحظ عند زيادة درجات الحرارة (الصدمة الحرارية heat shock) يقف تصنيع البروتينات الاعتيادية، وفي نفس الوقت، تصنع مجموعة جديدة من البروتينات وتنتج من جينات يطلق عليها بجينات الصدمة الحرارية heat shock proteins، حيث إنها تلعب دوراً مهماً في حماية الخلية من الضغط البيئي. إن الجين $rpo H$ هو عبارة عن منظم مفيد في الاستجابة للصدمة الحرارية. إن ناتج هذا الجين هو العامل $\sigma 32$ والذي يعمل كعامل سكما بديل، والذي يسبب استنساخ جينات الصدمة الحرارية بزيادة كمية $\sigma 32$ عندما تزداد الحرارة، وتقل فعاليته عندما ينعكس التغيير الحراري الحادث. إن الإشارة الأساسية التي تحت إنتاج العامل $\sigma 32$ هو تراكم البروتينات الممسوخة جزئياً partially denatured proteins وهي البروتينات الناتجة عن زيادة الحرارة. يمتاز بروتين العامل $\sigma 32$ بأنه غير ثابت unstable ، إن هذا يسمح بنقصان أو زيادة كميته بسرعة. إن العاملين $\sigma 32$ و $\sigma 70$ من الممكن أن يتنافسان على الإنزيم الصميمي الموجود في كل الحالات.

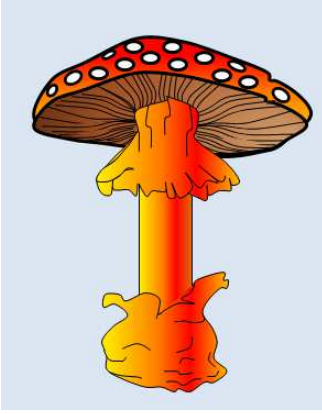
وبهذا، فإن مجموعة الجينات المستخدمة خلال الصدمة الحرارية تعتمد على التوازن الحادث بينهما. وهناك مجموعة أخرى من الجينات المنظمة للحرارة، والتي تنظم بواسطة العامل σE والذي يستجيب لزيادات حرارية أكبر من العامل $\sigma 32$ ، والذي ينتج عن تراكم البروتينات الممسوخة جزئياً والموجودة في الفراغ ما بين البلازما periplasmic space والغشاء الخارجي outer membrane . وقليل هي المعلومات المتوفرة عن هذا العامل وعن الجينات التي تنظمه. هناك عامل سكما آخر ينتج تحت ظروف التجويع النيتروجيني nitrogen starvation . تحتوي خلايا بكتريا القولون على كمية صغيرة من العامل $\sigma 54$ والذي ينتشط عندما تغيب الأمونيا عن الوسط الزراعي، وفي هذه الظروف تسمح الجينات بالانتفاع من مصادر النيتروجين البديلة. هناك حالة أخرى من الحفاظ التطوري لعوامل سكما ممثلة بالعامل σF والذي يوجد بكميات قليلة ويسبب قيام إنزيم RNA polymerase باستنساخ الجينات التي تدخل في الانسمام الكيميائي chemotaxis والتركيب السوطي.

2. في حقيقة النواة:

في الكائنات حقيقية النواة، تبدو المسألة أكثر تعقيداً، حيث يوجد أصنافاً ثلاثة هنالك بالإضافة إلى إنزيم RNA polymerase التابع للميتوكوندريا، وهذه الأصناف هي كالآتي:

- 1- إنزيم RNA polymerase I والذي يقوم باستنساخ معظم أنواع الـ rRNA
- 2- إنزيم RNA polymerase II والذي يقوم باستنساخ mRNA
- 3- إنزيم RNA polymerase III والتي تكون وظيفته الرئيسية هي استنساخ الـ tRNA.

وضحت خواص إنزيمات RNA polymerases في اللبائن بالجدول (1.4). كل من تلك الإنزيمات تكون مسؤولة عن استنساخ مجموعة مختلفة من الجينات (أنظر أعلاه). إن تلك الإنزيمات أكثر تعقيداً بكثير من إنزيمات بوليميريز الرنا الموجودة في بدائية النواة. حيث تمتلك كلها وحدتين ثانويتين كبيرتين وعدداً من الوحدات الأصغر (توجد 14 وحدة ثانوية صغيرة على سبيل المثال في إنزيم RNA polymerase II). وهناك سم ببتيدي peptide toxin قد تم استخلاصه من العرّهون *Amanita phalloides* (شكل 4.4)، حيث تعتبر مادة الـ amanitin مثبط تفريقي لإنزيمات الـ RNA polymerases الموجودة في حقيقة النواة وبهذا تعتبر أداة بحثية ذات أهمية كبيرة في التفريق بينها.



شكل (4.4). عرّهون *Amanitaphalloides* الذي تستخلص منه سم الـ amanitin والذي يستخدم للتفريق بين إنزيمات الـ RNA polymerase الرئيسية الثلاث في حقيقة النواة (تصميم المؤلف).

اعتبر إنزيم RNA polymerase II الإنزيم الأكثر حساسية لمادة الـ amanitin التي تمنع انتقال الإنزيم خلال عملية الاستنساخ.

جدول (1.4): تسمية وخواص إنزيمات RNA polymerases الموجودة في أنوية اللبائن (المؤلف).

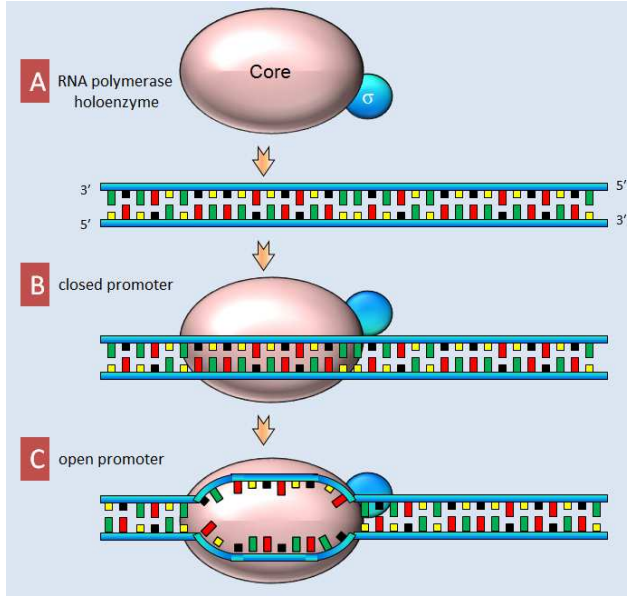
نوع الـ RNA polymerase	الحساسية للـ α amanitin	النواتج الرئيسية
I	غير حساس	rRNA
II	حساس بشكل عال	mRNA
III	حساس بشكل متوسط	tRNA/5S rRNA

وصف عملية الاستنساخ

لتسهيل دراسة عملية الاستنساخ تم تقسيمها إلى ثلاثة مراحل وكالاتي:

مرحلة البدء initiation stage

يبدأ الاستنساخ عندما يرتبط الإنزيم RNA polymerase مع عامل "سكما" لكي ينتج الإنزيم الكامل holoenzyme. يسمح عامل "سكما" لإنزيم RNA polymerase من أن يرتبط بشكل متخصص بتسلسل البروموتر للجين. إن عملية تخليق الـ RNA المبينة في الشكل (5.4) تتضمن ارتباط إنزيم RNA polymerase holoenzyme بالشريط القالب المشفر عند منطقة البروموتر. فعند ارتباط وحدة سكما الثانوية بالإنزيم الصممي فإنها تعمل على توجيه الإنزيم الصممي إلى البروموتر، وذلك بواسطة الارتباط بشكل متخصص بتسلسلات البروموتر 10- و 35- وهذا يؤدي إلى بدء عملية الاستنساخ عند بداية الجين. يدعى الارتباط الأولي بين إنزيم RNA polymerase holoenzyme والبروموتر بمعقد البروموتر المقفل closed promoter complex بسبب عدم فتح النفاذ الـ DNA. ثم يبدأ إنزيم RNA polymerase holoenzyme بفتح النفاذ الحلزون المزدوج بمعدل 15 زوج قاعدي حول منطقة بداية الاستنساخ ليكون معقد البروموتر المفتوح open promoter complex ، ان انفتاح شريطي الحلزون المزدوج يوفر شريط DNA قالب لكي يعمل عليه إنزيم RNA polymerase في عملية الاستنساخ.

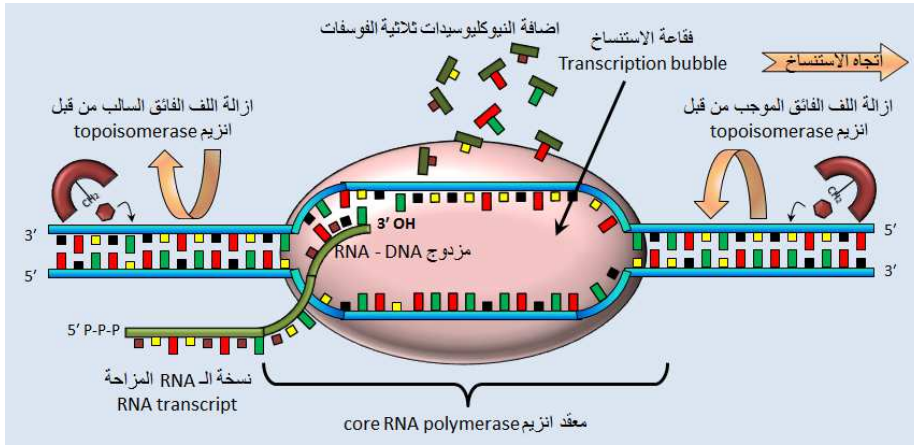


شكل (5.4) a و b و c: ارتباط إنزيم RNA polymerase زائدا عامل "سكما" بالـ DNA. تتكسر الأواصر الهيدروجينية التي تربط شريطي الـ DNA ويتكون معقد البروموتر استعداداً لتخليق الـ RNA (تصميم المؤلف).

مرحلة الاستطالة elongation stage

تبدأ مرحلة الاستطالة عند تحرر عامل سكما. بعد إضافة أول نيوكليوسيدة ثلاثية الفوسفات (والتي تكون من نوع purine عادة)، يترك إنزيم RNA polymerase البروموتر ويتحرك إلى الأمام على طول شريط الـ DNA القالب ويستمر بإطالة سلسلة الـ RNA. وعند حركته، يفتح إنزيم RNA polymerase الالتفاف unwind الحلزون المزدوج أمامه ويسد الالتفاف rewind الحلزون المزدوج خلفه. بينما تقوم إنزيمات topoisomerases - وكما هو الحال في عملية التضاعف - بتخفيف اللف الفائض الموجب المتولد أمام فقاعة الاستنساخ، وتخفيف اللف الفائض السالب المتولد خلف فقاعة الاستنساخ (شكل 6.4).

تتبلر النيوكليوتيدات بتسلسل متخصص ملقن من قبل الشريط المشفر ويفسر من قبل قوانين Watson - Crick. تجهز الطاقة الضرورية لتخليق الـ RNA من قبل النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات ribonucleoside triphosphates، حيث تعتبر هي مصدر الطاقة وهي أحجار البناء building blocks بالإضافة إلى كونها تشكل المكونات المعلوماتية في سلسلة الـ RNA الناتج (تذكر إن هذا ما يحدث في حالة التضاعف، ما عدا كون النيوكليوتيدات منقوصة الأوكسجين dNTPs بدلاً من NTPs المضافة هنا). يتحرر الـ pyrophosphate من تفاعل البلمرة كما هو الحال في عملية تخليق الـ DNA. وفي خطوة الاستطالة، يستمر فتح unwinding الحلزون المزدوج حيث يتكون ما يعرف بفقاعة الاستنساخ transcription bubble بواقع 17 نيوكليوتيدة متحركة بالاتجاه من 5' إلى 3'. قدر الباحثين معدل تخليق جزيئة الـ mRNA فوجدوا أنها تتخلق بسرعة 20 إلى 50 نيوكليوتيدة بالثانية، وبمعدل خطأ يقدر بنيوكليوتيدة واحدة لكل مئة ألف. إن معدل الخطأ هذا هو عالي نسبياً لما هو موجود في عملية التضاعف، ولكن "يمكن تحمل" معدل الخطأ في تخليق جزيئة الـ mRNA بسبب: (1) إن معظم الجينات تستنسخ بشكل متكرر، وبهذا فإن احتمالية أن نفس الخطأ سوف يتكرر هي احتمالية صغيرة. (2) هنالك بعض الشفرات الوراثية الفائضة عن الحاجة redundant genetic code والتي فيها تشفر أكثر من شفرة لنفس الحامض الأميني (صفة الانحلال أو التفسخ degeneracy في الشفرة الوراثية) فعلى الرغم من التغيير النيوكليوتيدي إلا أن الحامض الأميني الناتج قد لا يتغير، وحتى لو تغير، فغالباً ما يكون استبدال الأحماض الأمينية في سلسلة متعدد الببتيد لا تغير من الفعالية البايولوجية (أنظر الفصل السابع).

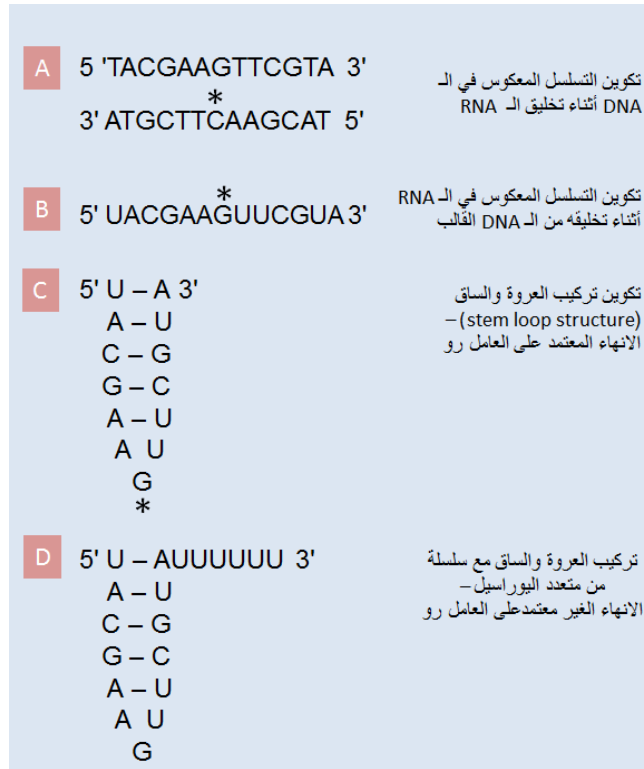


شكل (6.4) : ملخص لمرحلة الاستطالة elongation في عملية الاستنساخ، (تذكر بأن إنزيم RNA polymerase المشار إليه في الشكل هو الإنزيم الصميمي core enzyme وليس الإنزيم الكامل holoenzyme بسبب ازالة وحدة سكما حال بدء مرحلة الاستطالة) (تصميم المؤلف).

مرحلة الانتهاء termination stage

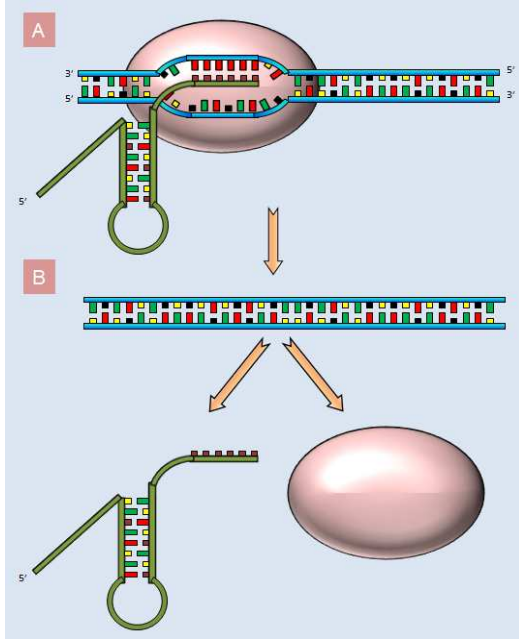
إن آخر مرحلة في تخليق الـ RNA هي مرحلة إنهاء نمو السلسلة. ينتهي تخليق الـ RNA وذلك بواسطة طريقتين مختلفتين واللذين سيرد ذكرهما في أدناه. إن ما يعرف بتسلسلات الـ DNA المنهية أو بمنهيات الاستنساخ transcription terminators أما أن تكون معتمدة على العامل رو rho-dependent (ρ dependent) أو غير معتمدة على العامل "رو" rho-independent. وفي كلتا الحالتين، يتكون ما يعرف بتركيب العروة والساق hairpin loop structure أو بتركيب دبوس الشعر stem-loop structure. ينتهي تخليق الـ RNA بعد تكوين هذا التركيب بقليل. يتكون تركيب العروة والساق عند النهاية 3' لجزيئة الـ RNA ، لأنه عند النهاية 5' لشريط الـ DNA القالب يوجد تسلسل غير اعتيادي من النيوكليوتيدات. يعرف هذا التسلسل بالتكرار المعكوس inverted repeat. سميت هذه التكرارات بالمعكوسة لأنه إذا قرئت من الاتجاه 5' إلى 3' في كلا شريطي الـ DNA فانهما يعطيان نفس القراءة. تشير النجمة إلى أن ازدواج الكوانين بالسايروسين G-C هو نقطة التناظر (شكل A7.4). وعندما يستنسخ الـ RNA من شريط الـ DNA القالب (ذو الاتجاه من 3' إلى 5')، يكون التسلسل الناتج هو تسلسل معكوس أيضاً (شكل B7.4). وهذا التناظر يؤدي الى أن تكون الجزيئة الناتجة (جزيئة الـ RNA) ذات تكامل ذاتي self-complementary حول نقطة التناظر G* (شكل C7.4). وبهذا، يمكن أن يتكون تركيب الدبوس، أو تركيب العروة والساق. وبسبب الالتفاف الحادث في قاع

تركيب العروة والساق، فإن آخر ازدواج بين A – U سوف لا يتكون ، ولكن تتكون العروة رغمًا عن ذلك. وفي الإنهاء الغير معتمد على العامل رو rho-independent termination ، يتبع شريط الـ DNA القالب بسلسلة من الأدنين. تنتج هذه السلسلة دفقا يتكون من نصف دزينة من مخلفات اليوراسيل في جزيئة الـ RNA (شكل D7.4).



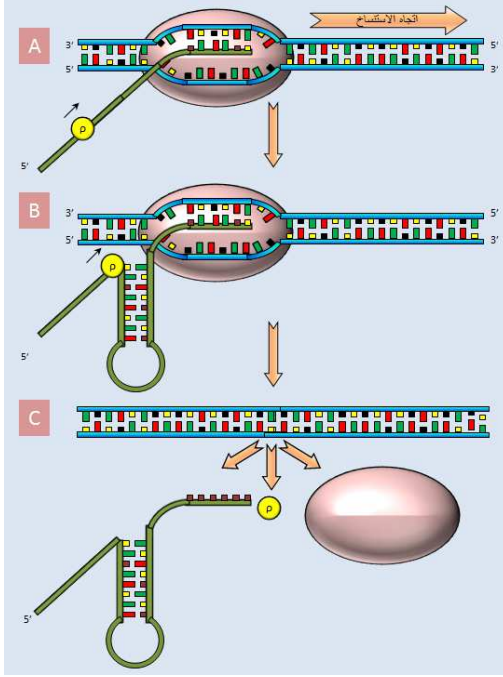
شكل (7.4): دور التسلسلات المعكوسة في إنهاء عملية تخليق الـ RNA (تصميم المؤلف).

عند النقطة التي يرتبط بها تسلسل متعدد اليوراسيل poly-U sequence بتسلسل الـ DNA يكون هجين RNA – DNA المتكون ضعيف بشكل غير اعتيادي (تكون روابط A – U ضعيفة) ، وتحتاج إلى طاقة قليلة جداً لكسر الأواصر الهيدروجينية الماسكة للشريطين مع بعضهما البعض. وعندها تحدث عملية الفصل ليتوقف تخليق الـ RNA. يكون هذا النوع من الإنهاء مستقل عن العامل "رو" ، حيث لا يحتاج هذا النوع من الإنهاء إلى أي عامل إنهاء (شكل 8.4).



شكل (8.4): عملية انتهاء تخليق الـ RNA المستقلة عن العامل "رو". (a) يخلق إنزيم RNA polymerase متعدد اليوراسيل عند النهاية 3' لسلسلة الـ RNA. (b) ينسحب الـ RNA المخلق حديثاً والإنزيم عن الشريط القالب (تصميم المؤلف)

أما عملية الإنهاء المعتمدة على العامل "رو" (شكل 9.4) والتي هي أقل شيوعاً وأبعد من الإنهاء الغير معتمد على العامل "رو"، فإنها تستخدم كذلك تكوين دبوس الشعر، ولكن انفكاك هجين DNA – RNA يحتاج إلى تعاون البروتين "رو"، كما لا تتبع تكرارات متعدد اليوراسيل تركيب دبوس الشعر كما في الطريقة السابقة. يبدو أن العامل "رو" والذي يمتلك فعالية فتح التفاف الحلزون المزدوج (helicase activity) يربط نفسه بالـ RNA الذي ما زال قيد التشبيد، ويحدث هذا الارتباط بعد تحرر العامل "سكما". يتحرك العامل "رو" على طول شريط الـ RNA وخلف إنزيم RNA polymerase (ويحتاج العامل "رو" في حركته هذه إلى التحلل المائي للـ ATP، والذي يوفر الطاقة اللازمة لحركة هذا العامل على طول شريط الـ RNA). إن تكوين هذا الدبوس يعيق إنزيم RNA polymerase عند العروة أو بعد تكوين العروة بقليل. تسمح هذه الإعاقة للعامل "رو" بأن يصل إلى الإنزيم. وعند وجود هذا العامل، وباستخدام فعالية الـ helicase التي يمتلكها فإنه يفك ارتباط الـ RNA من الحلزون المزدوج وهكذا، يتسبب العامل "رو" بتحرر إنزيم RNA polymerase وجزيئة الـ RNA المخلقة حديثاً من الـ DNA القالب. وفي هذا النوع من الإنهاء يكون العامل "رو" ضروري بسبب عدم وجود تسلسل متعدد اليوراسيل.

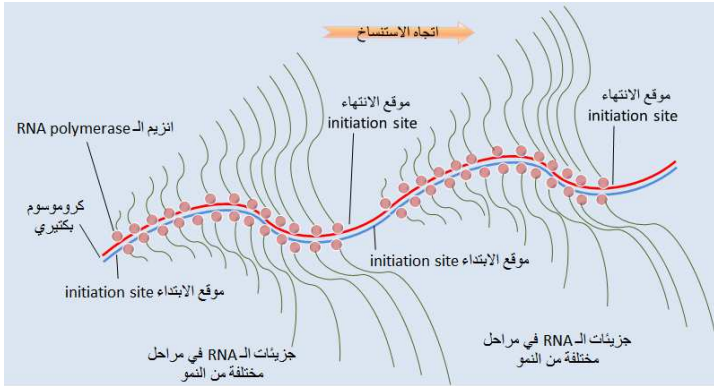


شكل (9.4): عملية انتهاء تخليق الـ RNA المعتمدة على العامل "رو". (a) يرتبط العامل "رو" بالـ RNA وهو ما زال في مرحلة التخليق. (b) يتوقف إنزيم RNA polymerase بعد تخليق الدبوس، سامحاً للعامل "رو" بأن يلتقطه. (c) بواسطة آلية معينة، يتسبب العامل "رو" بتحرر الـ RNA والإنزيم (تصميم المؤلف)

بعد انتهاء تخليق جزيئة الـ RNA ينفصل الإنزيم الصميمي عن شريط الـ DNA القالب، وبمساعدة عامل سكما آخر، يميز الإنزيم الصميمي البروموتر والذي تبدأ عنده تخليق جزيئة RNA جديدة.

ان أكثر من جزيئة RNA polymerase ربما تستنسخ نفس الشريط المشفر للجين بصورة متزامنة، ولكن العملية ذات أطوار زمنية وفراغات مكانية، بحيث في أية لحظة كل RNA

polymerase يستنسخ جزء مختلف من تسلسل الـ DNA. فكلما يترك إنزيم RNA polymerase بروموتر يرتبط به إنزيم RNA polymerase آخر. إن هذا يعطي شكلاً يشبه النصل (10.4).



شكل (10.4): مخطط يوضح عدة نسخ من جينات rRNA البرمائية وهي ما زالت في طور الاستنساخ. لاحظ ازدياد طول الشريط المستنسخ بزيادة تقدم إنزيم RNA polymerase على طول جينات الـ rRNA. يكون بإنزيم polymerase الغير مبين هنا، عند قاعدة شريط الـ RNA المتولد حديثاً، وهكذا، فإن النهاية القريبة

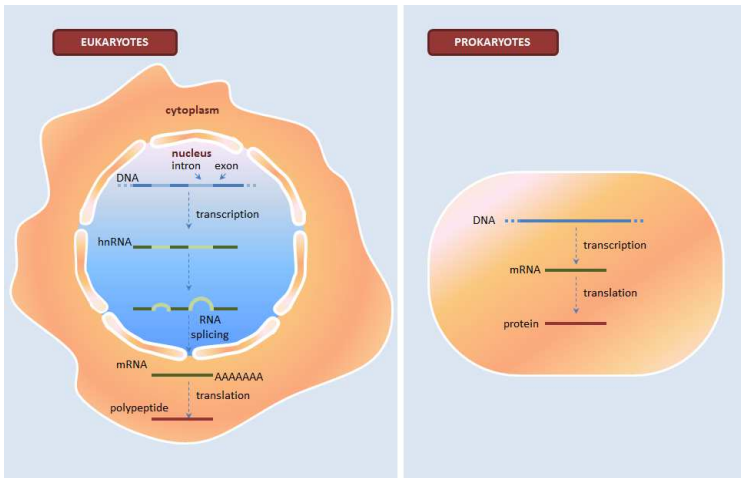
لـ الجين المستنسخ تكون بها جزيئات الـ RNA قصيرة، بينما ترتبط جزيئات الـ RNA الأكثر طولاً بالنهاية القاصية للجين. توضح الأسهم اتجاه عملية الاستنساخ والتي تتقدم من 5' إلى 3'. ويبين هذا الشكل أيضاً إمكانية تخليق الـ RNA بشكل متسلسل وبكميات كبيرة عند الحاجة (تصميم المؤلف).

عملية معالجة جزيئات الرنا RNA processing

إن معظم جزيئات الـ RNA المخلقة حديثاً يجب أن تتحول بأساليب متغيرة لكي تتحول إلى أشكالها الوظيفية. ما عدا الـ mRNA البكتيري والذي يمثل استثناء لهذه القاعدة، حيث انه يستخدم فوراً كقالب لتخليق البروتين بينما ما تزال عملية الاستنساخ جارية عليه. أما النسخ الأولية من tRNA و rRNA في خلايا الكائنات حقيقية وبدائية النواة يجب أن تعاني سلسلة من خطوات المعالجة (الطهي). إن النسخ الأولية لـ mRNA حقيقية النواة يعاني أيضاً تحويلات مكثفة، والتي تتضمن إزالة الانترونات بواسطة عملية وصل الأطراف بالتراكب splicing. ثم تنتقل من النواة إلى السايوبلازم لتعمل كقالب لتخليق البروتين. وهنا سنركز على عمليات المعالجة الجارية في mRNA حقيقية النواة بدلاً من tRNA و rRNA وذلك لكون جزيئة الـ mRNA هي التي تحمل المعلومات الوراثية الضرورية لترجمتها في عملية تخليق البروتين.

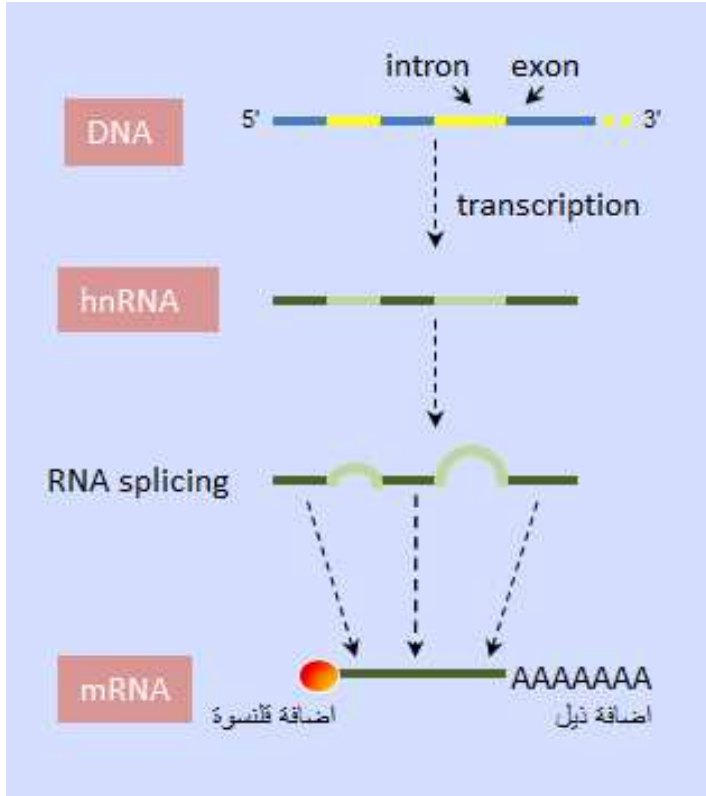
معالجة الرنا الرسول processing of messenger RNA (mRNA)

بالتناقض مع عمليات معالجة rRNA و tRNA ، فإن معالجة mRNA يمثل فرقاً رئيسياً بين الخلايا حقيقية وبدائية النواة. ففي البكتيريا، يمتلك الرايبوسوم القدرة في العمل على جزيئة الـ mRNA مباشرة، حيث تبدأ الترجمة على سلسلة الـ mRNA الناشئة في الوقت الذي ما زال فيه الاستنساخ يعمل على أجزاء أخرى من جزيئة الـ mRNA الغير مكتملة. وهكذا، تزدوج عمليتي الاستنساخ والترجمة معاً في آن واحد، (شكل 11.4).



شكل (11.4): ازدواج عملية الترجمة مع عملية الاستنساخ في بدائية النواة (يمين الشكل) وانفصالها في حقيقية النواة (يسار الشكل) (تصميم المؤلف)

وفي الكائنات حقيقية النواة، يجب أن تنتقل جزيئة الـ mRNA المخلقة في النواة إلى السايوبلازم قبل أن يتم استخدامها كقالب لعملية تخليق البروتين. علاوة على ذلك، يتم تحويل منتجات الاستنساخ الأولية في الخلايا حقيقية النواة (pre-mRNA) بشكل مكثف قبل أن يتم تصديرها من النواة إلى السايوبلازم (شكل 12.4).



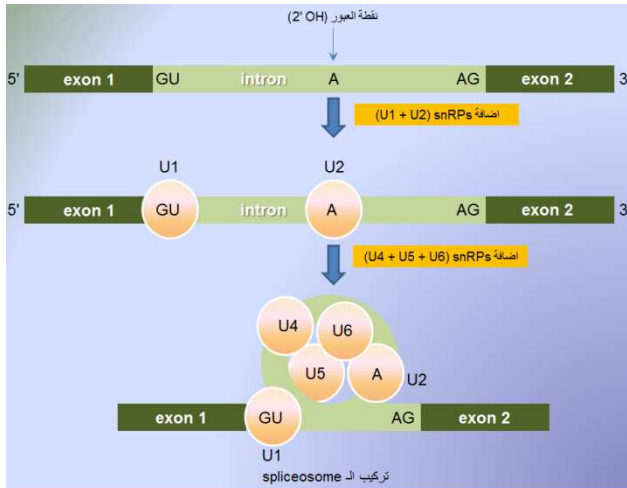
شكل (12.4): مخطط لعملية معالجة الـ mRNA في الكائنات حقيقية النواة: يتضح من الشكل أنه بعد أن ينتهي إنزيم RNA polymerase II من عملية استنساخ النيوكليوتيدة الأولى للاكسون الأول من الجين، تضاف قلنسوة إلى النهاية 5' للـ RNA. ينهي إنزيم RNA polymerase II عند مناطق الانتهاء لآخر اكسون نهائي، يصل إلى موقع يدعى بمتعدد الأدينين poly (A) site ، والذي يقع بالنهاية 3' من النسخة الأولية، يضاف هنالك امتداد من الأدينين. يحتوي ذيل الأدينين على 250 نيوكليوتيدة في اللبائن. ثم تزال الانترونات وترتبط الاكسونات ببعضها البعض في عملية الـ splicing (تصميم المؤلف)

تتحور النهاية 5' لجزيئة pre-mRNA حالاً بعد تخليقها وذلك بإضافة قلنسوة. تقوم هذه القلنسوة بتسهيل ارتباط جزيئات الـ mRNA حقيقية النواة بالرايبوسوم عند عملية بدء الترجمة (أنظر الفصل الخامس). كما إنها تعمل في تثبيت جزيئة الـ mRNA ، حيث لوحظ ان جزيئات الـ mRNA عديمة القلنسوة ذات عمر نصف half life أقل. كما تحتوي النهاية 3' لمعظم mRNA حقيقية النواة على ذيل متعدد الأدينين poly-A tail (شكل 12.4)، والذي يضاف بتفاعل معالجة يدعى تفاعل إضافة متعدد الأدينين polyadenylation. حيث يقوم إنزيم يدعى poly A polymerase- والذي لا يحتاج إلى قالب – بإضافة ذيل متعدد الأدينين بطول 200 إلى 250 نيوكليوتيدة إلى نهاية هذا المستنسخ. يبدأ هذا الإنزيم بإضافة متعدد الأدينين قرب التسلسل ...AAUAAA... الواقع قرب النهاية 3' لجزيئة الـ

mRNA الناشئة. ولم تعرف وظيفة هذا الذيل على وجه التحديد، ولكن تبين انه بعد انتقال جزيئة الـ mRNA الناضجة mature mRNA إلى السايوبلازم، يتقصر الذيل بطريقة ما ليصبح طوله 100 إلى 150 نيوكليوتيدة فقط. من هذا يتبين دور الذيل الحساس في حماية المادة الوراثية من هجوم إنزيمات التفسير الداخلية والخارجية exonucleases and endonucleases أثناء انتقاله من النواة إلى السايوبلازم. إن التحوير الأكثر إثارة لجزيئة الـ pre-mRNA هو إزالة الانترونات بواسطة عملية وصل الأطراف بالتراكب splicing. وكما هو مناقش سلفاً، فإن التسلسلات المشفرة لمعظم الجينات حقيقية النواة تكون متخللة بتسلسلات غير مشفرة (انترونات)، والتي يتم قصّها من جزيئة الـ mRNA الناضجة. ثم تربط الأجزاء الغير مقصوفة (الاكسونات) مع بعضها البعض لتكون ما يعرف بجزيئة mRNA الناضجة (راجع شكل 12.4).

وصل أطراف الرنا الغير متجانس بالتراكب (Splicing of hnRNA)

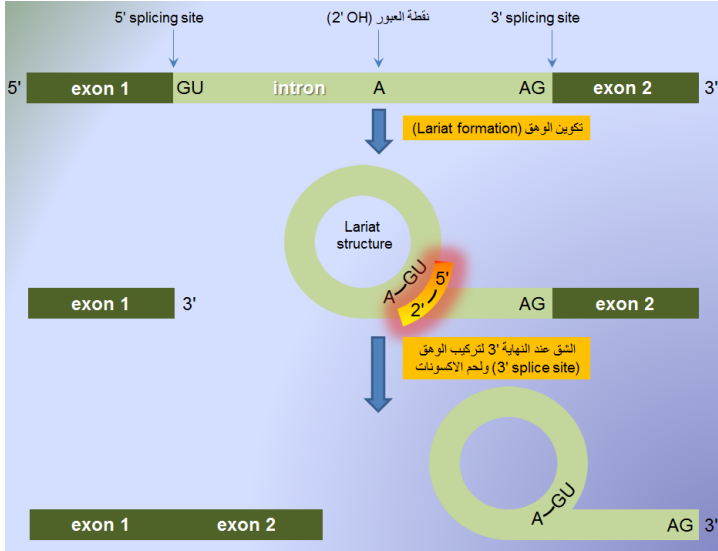
تزال الانترونات من جزيئة hnRNA بعد عملية الاستنساخ فوراً وترتبط الاكسونات مع بعضها البعض لكي تكون تسلسل مشفر مستمر. تدعى هذه العملية بوصل الأطراف بالتراكب أو splicing، والتي تتم بواسطة معقدات من نوع بروتين - رنا protein-RNA complexes في النواة، وتعرف تلك المكنائ العملاقة بالـ spliceosomes. يكون نوع الـ RNA الذي يرتبط مع البروتينات ليكون الـ spliceosomes بـ small nuclear RNA snRNA (أنظر أنواع الـ RNA). والذي يتواجد بخمسة أشكال مختلفة (U1، U2، U4، U5، و U6). وتتألف كل منها من بروتينات متعددة وجزيئة واحدة من snRNA (شكل 13.4).



شكل (13.4): كيفية تكوين معقد الـ spliceosome (تصميم المؤلف)

لضمان عدم تدمير رسالة الـ mRNA، تحدث عملية وصل الأطراف بالتراكب بنمط دقيق جداً، حيث تميز بداية ونهاية كل انترون في جزيئة الـ hnRNA بتسلسلات محددة عند النهاية 5' و 3'. وهناك تركيب آخر يدعى بنقطة العبور branching point داخل الانترون ولكن تسلسله غير ثابت ولكنه يحتوي مخلفة ادينوسين واحدة (A) دائماً، وتلعب نقطة العبور هذه دوراً مهماً أيضاً في هذه العملية، فخلال عملية وصل الأطراف بالتراكب، تهاجم مجموعة OH 2' لمخلفات الأدينوسين لنقطة العبور بمساعدة معقد الـ spliceosome مجموعة الفوسفات ثنائية الأستر عند النهاية 5' للانترون وتشطرها (شكل 13.4 خطوة a وخطوة b). وفي نفس الوقت، تتكون أصرة غير اعتيادية (5' → 2') داخل الانترون، والتي بهذه الطريقة تتخذ شكل الوهق (حبل في طرفه عروة) lasso shape (شكل 13.4).

وكنتيجة لعملية وصل الأطراف بالتراكب، تهاجم النهاية 3' للانترون. وبالنهاية، يرتبط الاكسونين مع بعضهما ويتحرر الانترون، والذي ما زال بشكل الوهق. أما الخطوة الأخيرة فهي انحلال الوهق وتلاشيته.



شكل (14.4): عملية وصل الأطراف بالتراكب و يحدث فيها splicing: إزالة الانترونات وربط بعضها ببعض وتتم عن طريق تكوين شكل الوهق (حبل) في طرفه عروة) في كل انترون قبل عملية ازالته (تصميم المؤلف).

أنواع الـ RNA:

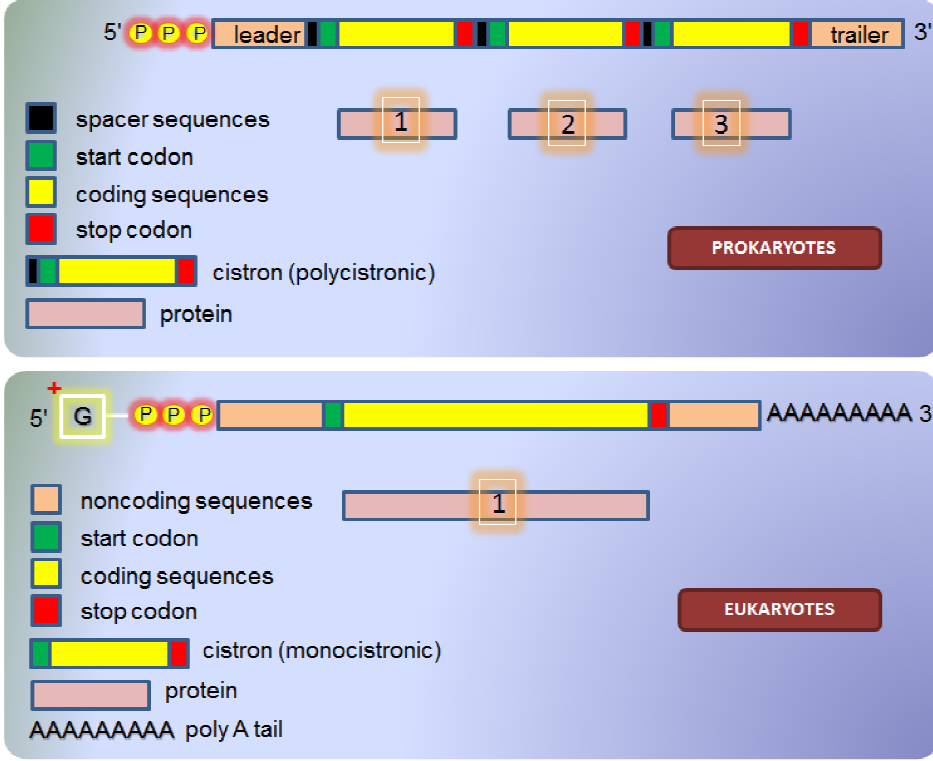
إن هنالك ثلاث أنواع رئيسية من الـ RNA الخلوي تدخل في تخليق البروتين وهي: mRNA و tRNA و rRNA. بالإضافة إلى أن هنالك أنواع RNA أخرى تعمل كمواد أولية primers لتخليق الـ DNA، والتي يتم تخليقها من قبل إنزيم RNA primase (راجع الفصل الثالث)، وأنواع أخرى أهمها هو snRNA.

الرسالة المراسلة (mRNA)

يحتوي تسلسل الـ mRNA على المعلومات الوراثية التي تترجم إلى تسلسلات الأحماض الأمينية في البروتين. تمتلك الخلايا بدائية النواة جزيئات mRNA غير ثابتة والتي تنتهي بمتوسط عمري يبلغ 3 - 1 دقيقة، بينما في الخلايا حقيقية النواة، يتميز الـ mRNA بثنائية أكبر حيث يصل عمر الـ mRNA النموذجي في الكائنات حقيقية النواة إلى ثلاث ساعات، لماذا؟ يجب على جزيئة mRNA حقيقية النواة من أن تنتقل من النواة إلى الشبكة الاندوبلازمية الداخلية في السايكوبلازم حيث تخليق البروتين. تستوجب هذه العملية استصحاب بروتينات أخرى مع جزيئة الـ mRNA لتعينها في عملية الانتقال هذه. تستغرق هذه العملية بعض الوقت مقارنة بـ mRNA بدائية النواة، والذي تبدأ ترجمته في الوقت الذي مازالت عملية الاستنساخ جارية عليه. يشكل الـ mRNA ما يقارب الـ 5% فقط من الـ RNA الإجمالي الموجود في الخلية.

على الرغم من التباين في أطوال الـ mRNA، ولكن يمكن القول بأن مقدار المعلومات الوراثية التي يحملها الـ mRNA في بدائية النواة يكون كافياً لأن يشفر لأكثر من جين واحد، بينما تكفي تلك المعلومات الوراثية التي يحملها mRNA حقيقية النواة لأن تشفر لجين واحد فقط (شكل 15.4). وبالطبع إذا كانت جزيئة الـ mRNA لجين واحد (كما في حقيقية النواة)، فإن هذا يؤدي بالضرورة إلى إنتاج بروتين واحد، وتدعى هذه الحالة بالسسترون المفرد monocistronic. أما إذا كانت جزيئة الـ mRNA لجينات متعددة (كما في بدائية النواة)، فإن هذه تؤدي إلى إنتاج عدة بروتينات، وتدعى هذه الحالة بالسسترون المتعدد polycistronic.

وفي الكائنات بدائية النواة، وكما أوضحنا ذلك سابقاً، ينشغل الـ mRNA في عملية تخليق البروتين حتى قبل أن يتم الانتهاء من تخليق جزيئة الـ mRNA بالكامل. إن الاستفادة السريعة من مستنسخ الـ mRNA الناشئ يقلل من فرصة معالجته. وبالتناقض مع ذلك، ففي الكائنات حقيقية النواة، حيث تنفصل عملية الاستنساخ عن عملية الترجمة بشكل حاد، يعاني مستنسخ الـ mRNA الناشئ نظام مسهب من المعالجة، قبل أن يتم نقله إلى السايكوبلازم لكي يستخدم كقالب لعملية الترجمة.



شكل (15.4): مقارنة بين تركيب جزيئة الـ mRNA في بدائية وحقيقية النواة. ولو أن كلا جزيئتي الـ mRNA قد تم تخليقهما بنهاية 5' ثلاثية الفوسفات، إلا أن جزيئة الـ mRNA حقيقية النواة تحتاج إلى قلنسوة من نوع 5' ، والتي هي جزءاً من التركيب المميز من قبل وحدة الرايبوسوم الثانوية الصغير small ribosomal subunit. ولهذا يبدأ تخليق البروتين في كودون البدء start codon قرب النهاية 5' لجزيئة الـ mRNA. أما في بدائية النواة يحدث التناقض، بحيث لا تمتلك النهاية 5' فائدة محددة، ويمكن أن يوجد عدة مناطق للارتباط بالرايبوسوم (تسلسلات Shine-Dalgarno) في داخل سلسلة الـ mRNA، ينتج كل منها في تخليق بروتين مختلف (تصميم المؤلف).

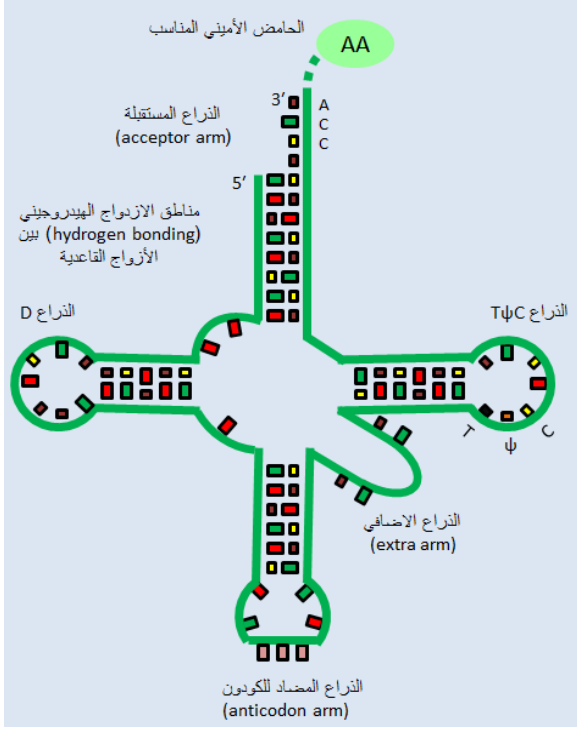
الـ RNA الرسول (tRNA) transfer RNA

إن النوع الأساسي الثاني من الـ RNA هو الـ tRNA، وهو أقصر أنواع الـ RNA طولاً، حيث يبلغ طوله 76 نيوكليوتيدة في الكائنات بدائية النواة. وتتلخص وظيفته بحمل الأحماض الأمينية إلى قالب الـ mRNA ، حيث ترتبط الأحماض الأمينية بنمط خاص. أن ما يؤهل هذه الجزيئة لحمل أعباء هذه المهمة الخطرة والتي تتوسط بها بين الأحماض النووية الموجودة في الـ mRNA والأحماض الأمينية الموجودة في البروتينات هو أنها تحتوي على كلا الموقعين، موقع الارتباط بالأحماض الأمينية والذي يعرف بالذراع

المستقبل acceptor arm والذي يوجد في النهاية 3' ، وموقع أو ذراع الشفرة المضادة anticodon arm ، والذي يميز الكودون codon (أنظر الفصل الخامس) المطابق ثلاثي القواعد الموجود في جزيئة الـ mRNA (شكل 16.4).

إن هنالك ما يقارب 20 نوع مختلف من الـ tRNA في كل خلية. كل حامض أميني يرتبط إنزيمياً بالنهاية 3' لواحد أو أكثر من جزيئات الـ tRNA وذلك بواسطة تفاعل إنزيمي سيأتي ذكره في الفصل القادم. وعلى الرغم من اختلاف جزيئات الـ tRNA عن بعضها البعض بتسلسلها النيوكليوتيدي، لكن تجمعها العديد من الصفات المشتركة. كل جزيئات الـ tRNA تتطوي على نفسها بصورة متشابهة لتعطي تركيباً يشبه ورقة البرسيم (الجت) cloverleaf (شكل 16.4). تشكل جزيئات الـ tRNA أكثر من 15% من الـ RNA الإجمالي الموجود في الخلية.

كل أنواع الـ tRNA تتألف من أربعة أذرع رئيسية. يتألف الذراع المستقبل acceptor arm من ساق stem ذو قواعد نتروجينية مرتبطة ببعضها البعض، وينتهي هذا الذراع بالتسلسل (5' to 3') CCA ، حيث ترتبط مجموعة الكربوكسيل carboxyl group للأحماض الأمينية بمجموعة الهيدروكسيل hydroxyl group الموجودة في مخلفات الأدنين A في النهاية 3' للذراع المستقبل في جزيئة الـ tRNA. أما الأذرع الأخرى فتحتوي على قدم قواعد نتروجينية مزدوجة ببعضها البعض بالإضافة إلى إنشوية غير مزدوجة unpaired loop (شكل 16.4). يضطلع ذراع الشفرة المضادة anticodon arm بتمييز الكودون (النيوكليوتيدات الثلاثية) الموجودة في جزيئة الـ mRNA. أما الذراع الثالثة فيطلق عليها الاسم D arm ، وسميت بهذا الاسم بسبب وجود القاعدة النتروجينية dihydrouridine ، وهي الذراع التي يرتبط بها إنزيم aminoacyl-tRNA synthetase وذلك عند إضافته الحامض الأميني المناسب لجزيئة الـ tRNA (أنظر الفصل الخامس)، وسميت الذراع الرابعة بالاسم TψC arm وذلك بسبب وجود التسلسل ثايمين T و pseudouridine والسيتوسين C ، وتدخل هذه الذراع في ربط جزيئة الـ tRNA المحملة بالحامض الأميني (aminoacyl tRNA) بسطح الرايبوسوم خلال عملية تخليق البروتين. وهناك ذراع إضافي extra arm ويعد من أكثر الصفات المتغايرة ما بين جزيئات الـ tRNA لذا، فإنه يوفر أساساً للتصنيف، لذا فإنه يدعى لهذا السبب أحياناً بالذراع المتغاير variable arm.



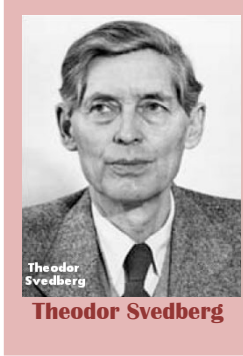
شكل (16.4): تركيب الحامض النووي المراسل tRNA (تصميم المؤلف)

يلاحظ من المناقشة أعلاه، بأن هنالك صفة مميزة لتركيب جزيئة الـ tRNA ، إلا وهي تلك النسبة العالية من الـ ribonucleotide bases التي تختلف عن القواعد الأربعة الاعتيادية كما في قواعد الـ dihydrouridine و pseudouridine والتي نتجت بسبب التحويل الإنزيمي المكثف الذي تعرضت له جزيئة الـ tRNA من قبل العديد من الإنزيمات المشتركة في معالجة هذه الجزيئة. ولقدرة هذه الجزيئة على تكوين تركيب ثانوي secondary وثالثي tertiary من خلال طياته الكثيرة المشابهة نسبياً لطيات البروتين، جعل العالم Francis Crick يعلق على هذه الجزيئة قائلاً: " هو RNA يحاول أن يكون بروتين". ويمكن قول نفس الشيء حول جزيئة الـ rRNA (أنظر ملحق هذا الفصل).

الـ RNA الريبوسومي (rRNA) Ribosomal RNA

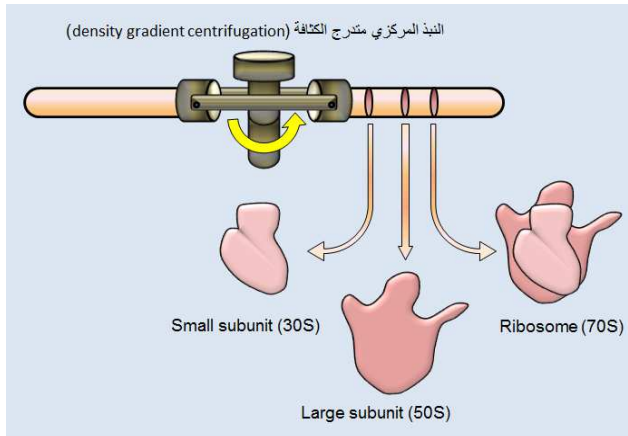
تعد جزيئات الـ rRNA هي المكون التركيبي والوظيفي للريبوسومات، والريبوسومات أجسام كبيرة من معقدات rRNA وبروتينات والتي تشكل الماكينة التي تأوي معظم التفاعلات المرتبطة بتخليق البروتين.

للرايبوسوم تركيب معروف جيدا سواء في الكائنات بدائية وحقيقية النواة وهو وحدتان ثانويتان two subunits كل منهما يتألف من RNA وبروتين. كل من الوحدات الثانوية الكبيرة والصغيرة يتألف من RNA يعرف بالـ ribosomal RNA (rRNA) والعديد من البروتينات الرايبوسومية ribosomal proteins. تحتوي الوحدة الثانوية الكبيرة



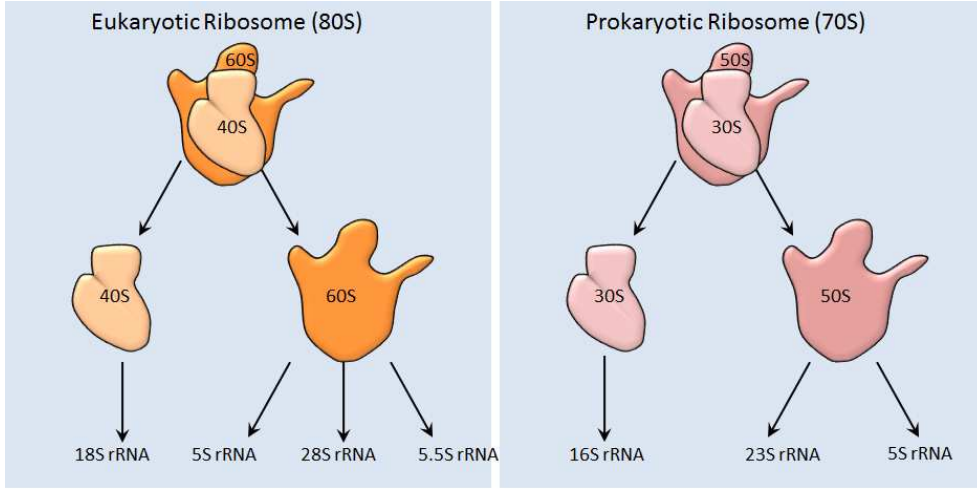
على مركز إنزيم الـ peptidyl transferase ، والذي هو مسؤول عن تكوين الأواصر الببتيدية. تحتوي الوحدة الثانوية الصغيرة على مركز فك الشفرة decoding center وفيه تقوم جزيئات الـ tRNA بقراءة أو بفك شفرة وحدات الكودون بالـ mRNA. وكما هو دارج، تسمى وحدات الرايبوسوم بالكبيرة والصغيرة على أساس سرعة ترسيبها عند تعرضها الى قوة نبذ مركزية. تعرف الوحدة المستخدمة لقياس سرعة الترسيب تعرف بوحدة سفيدبيرغ Svedberg unit والتي سميت على اسم مخترع جهاز النبذ المركزي ذو السرعة الفائقة Theodor Svedberg (شكل 17.4).

في البكتيريا، ان الوحدة الثانوية التي تمتلك سرعة ترسيب بقدر 50 Svedberg units تعرف الوحدة الثانوية على هذا الاساس بـ 50S، بينما تعرف الوحدة الثانوية الصغيرة بـ 30S. يشار الى الرايبوسوم البكتيري الكامل بـ 70S ribosome. لاحظ أن 70S ribosome هو أقل من مجموع 50S زائداً 30S ! ان تفسير ما يبدو من تناقض ظاهر في هذه المسألة الأخيرة هو أن سرعة الترسيب تحدد من قبل الشكل والحجم وهنا هي ليست قياساً للكتلة. ان الرايبوسوم في حقيقية النواة هو نوعا ما أكبر من ذلك الذي في بدائية النواة، حيث يتألف من الوحدات الثانوية 60S و 40S والتي تؤلف مع بعضها البعض 80S ribosome. هذا يعني بأن أكثر أنواع الـ RNA تواجداً في الخلية هو rRNA.



شكل (17.4): الترسيب بواسطة جهاز النبذ المركزي الفائق السرعة وذلك لفصل وحدات الرايبوسوم الثانوية والرايبوسوم الكامل في بدائية النواة (تصميم المؤلف)

تتألف الوحدة الثانوية الكبيرة 50S subunit بدورها في رايبوسومات بدائية النواة من 23S و 5S من جزيئات الـ rRNA. بينما تحتوي الوحدة الثانوية الصغيرة 30S subunit على جزيئات rRNA من نوع 16S فقط. أما رايبوسومات حقيقية النواة، فإنها مشابهة بالتركيب لتلك التي في بدائية النواة، ولو أنها أكبر نسبياً (80S)، وتحتوي على rRNA أطول وتشمل 25S rRNA و 18S rRNA و 5S rRNA وغيرها. إذن هنالك ثلاثة أنواع مميزة من جزيئات الـ rRNA في خلايا بدائية النواة (23S و 16S و 5S)، بينما في الخلايا حقيقية النواة (شكل 18.4) هنالك أربعة أنواع أو أحجام من الـ rRNA (28S و 18S و 5.8S و 5S). تشكل جزيئات الـ rRNA 80% من الـ RNA الإجمالي الموجود في الخلية، إذن هي أكثر أنواع الـ RNA تواجداً في الخلية.



شكل (18.4): مقارنة بين تركيب الرايبوسومات بدائية وحقيقية النواة. صنفت المكونات الرايبوسومية عموماً على أساس قيم S والتي تدل على معدل ترسيبها. على الرغم من الاختلاف الموجود في عدد وحجم المكونات البروتينية والـ rRNA. كلا نوعي الرايبوسوم لهما نفس التركيب وتعمل بأساليب متشابهة جداً (تصميم المؤلف).

الـ RNA الصغير الثابت (ssRNA) Small stable RNA

وهي جزيئات RNA صغيرة توجد في خلايا الكائنات حقيقية النواة. إن معظم هذه الجزيئات تكون معقدات مع البروتينات لتكون ما يعرف بالـ ribonucleoproteins، والتي تتوزع في النواة، أو في السايوبلازم، أو في كليهما.

إن ما يعرف بالـ small nuclear RNA (snRNA) هي مجموعة ثانوية من ذلك النوع من الـ RNA والتي تدخل في عملية معالجة الـ mRNA وفي التنظيم الجيني. وهو على عدة أنواع (أنظر أعلاه) تدخل تلك الأنواع في عملية إزالة ومعالجة جزيئة hnRNA

إلى جزيئة mRNA. وكما هو موضح في هذا الفصل، يكون هذا النوع من الـ RNA مع البروتينات المصاحبة معقد الـ spliceosome والذي يقوم كما بينا بإزالة الانترونات وربط الأكسونات ببعضها، وفي هذا المعقد لا تلعب به بروتينات المعقد دوراً أساسياً وإنما دوراً مساعداً فقط، بينما يتمثل الدور الرئيسي في تحفيز هكذا تفاعلات إنزيمية بالمكون RNA، تسمى تلك الجزيئات بالرايبوزايم (أنظر ملحق هذا الفصل)

ملحق الفصل الرابع

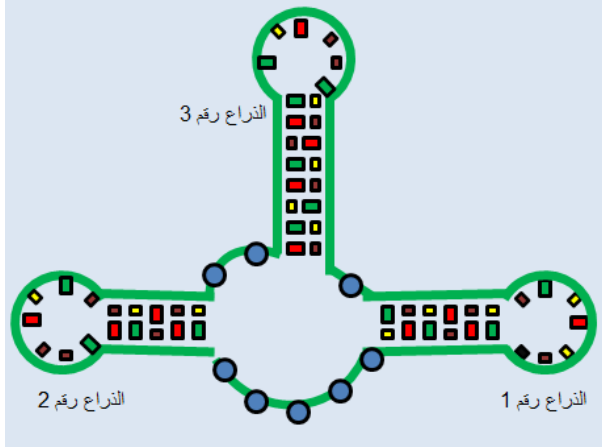
الرايبوزايم (The Ribozyme)

كان يعتقد منذ العديد من السنوات بأن البروتينات فقط يمكن لها أن تكون إنزيمات. يجب أن يكون الإنزيم قادراً على الارتباط بالمادة الأساس substrate والقيام بالتفاعل الكيميائي وتحرير الناتج وإعادة هذا التسلسل من الأحداث للعديد من المرات. تعتبر البروتينات جزيئات مناسبة جداً لمثل هكذا مهمة لأنها متألّفة من أنواع مختلفة من الأحماض الأمينية والتي يبلغ عددها العشرون عموماً ويمكن لها أن تنطوي لتكون تراكيب ثلاثية معقدة مع مواقع ارتباطية بالمادة الأساس وأخرى للعوامل المساعدة cofactors وموقع فعال لتحفيز التفاعل. والآن نحن نعرف بأن جزيئات الـ RNA يمكن لها وبشكل مشابه من أن تتبنى تراكيب ثلاثية معقدة complex tertiary structures ويمكن لها أيضاً أن تعمل كمحفزات بايولوجية. كما في إنزيمات الـ RNA المعروفة بالـ ribozymes. تبدي هذه التركيبات العديد من الخواص الموجودة في الإنزيم التقليدي، كما في الموقع الفعال وموقع الارتباط بالمادة الأساس وموقع الارتباط بالعامل المساعد كما في الأيون المعدني. ان أول ribozyme تم اكتشافه هو الـ RNase P، وهو عبارة عن إنزيم محلل للـ RNA الذي يدخل في توليد جزيئات الـ tRNA الناضجة من مولداتها الأصل precursor RNAs الأكبر حجماً.

يتألف الرايبوزايم RNase P من RNA وبروتين. وعلى الرغم من وجود البروتين إلا أن الـ RNA وحده هو المحفز، أما الجزء البروتيني في الرايبوزايم RNase P فانه يسهل التفاعل وذلك بواسطة الحفاظ على بقاء الشحنات السالبة بالـ RNA.

تقوم عدة جزيئات RNA أخرى بالتفاعلات الداخلة في إزالة الانترونات من الجزيئات البادئة precursor molecules لكل من mRNA والـ tRNA والـ rRNA بعملية إزالة الأطراف بالتراكيب السالفة الذكر في هذا الفصل. يتخذ الرايبوزايم الذي يضطلع بهكذا تفاعلات شكلاً مميزاً يطلق عليه برأس المطرقة (hammerhead ribozyme) والذي يتألف من ثلاث أرجل مزدوجة قاعدياً محاطة بجزء مركزي يتألف من

نيوكليوتيدات غير مكتملة لبعضها البعض وهي التي تكون ضرورية للتحفيز (شكل 19.4). وهناك أمثلة كثيرة على وجود جزيئات RNA لها مقدرة حفزية كما في تفاعل إضافة التيلوميرات المحفز من قبل المكون RNA في إنزيم التيلوميريز (أنظر الفصل الثالث) وتفاعل الاستطالة والمذكور المحفز من قبل إنزيم terminal transferase (أنظر الفصل الخامس).



شكل (19.4): تركيب رأس المطرقة ، تشير الكرات الزرقاء الى نيوكليوتيدات متنوعة (تصميم المؤلف)

غير اكتشاف الرايبوزايم نظرة العلماء عن كيفية نشوء الحياة. يمكن لنا أن نتخيل بأن هنالك شكل بدائي للحياة اعتمد بشكل كامل على الـ RNA. في هذا العالم، يعمل الـ RNA كمادة وراثية وكآلة إنزيمية. ان عالم الـ RNA هذا ربما قد سبق الحياة التي نعرفها اليوم، والتي يعتمد فيها نقل المعلومات على الـ DNA ثم الـ RNA ثم البروتين. أما الفرضية التي تقول بأن عالم البروتين قد نشأ من عالم الـ RNA فقد تجذرت من اكتشاف ان المكون الرايبوسومي المسؤول عن تكوين الأصرة الببتيدية، وهو الـ peptidyl transferase عبارة عن جزيئة RNA (أنظر الفصل الخامس). وبشكل غير مشابه للرايبوزايم RNase P ورأس المطرقة والرايبوزومات المعروفة الأخرى والتي تعمل على المراكز الفسفورية phosphorous centers، يعمل الرايبوزايم peptidyl transferase على المركز الكربوني لكي يخلق الأصرة الببتيدية. وبهذه الكيفية، يرتبط كيمياء الـ RNA بأكثر التفاعلات أهمية في عالم البروتينات، ألا وهو تكوين الأصرة الببتيدية. وربما يعد رايبوزايم الرايبوسوم مجرد رفات لشكل للحياة ممعن في القدم والتي تكون كل الإنزيمات فيه هي عبارة عن جزيئات RNA.

أسئلة الفصل الرابع

السؤال الأول: علل ما يلي

- تنطوي جزيئة الـ RNA إلى أشكال متعددة بينما لا تحدث هذه الحالة عادة لجزيئة الـ DNA؟

- ليس من الضرورة أن يكون محتوى الكوانين مساوياً للسايتوسين ولا الثايمين مساوياً للأدينين في جزيئة الـ RNA؟
- هنالك آلية تصحيح الخطأ في معظم إنزيمات DNA polymerases بينما لا توجد هذه الآلية في إنزيمات RNA polymerases؟
- تدعى منطقة 35 bps - recognition domain في بروموتور بدائية النواة بينما تدعى المنطقة 10 bps - unwinding domain في نفس البروموتر؟
- في بروموتر بدائية النواة لماذا تتألف المنطقة 10 bps - من adenine و thymine حصراً؟
- البروموتر في حقيقية النواة يكون أعقد بكثير من نظيره في بدائية النواة؟
- تمتلك الخلايا بدائية النواة جزيئات mRNA غير ثابتة والتي تنتهي بمتوسط عمري يبلغ 3 - 1 دقيقة، بينما في الخلايا حقيقية النواة، يتميز الـ mRNA بثباتية أكبر؟
- توصف عملية الاستنساخ بأنها عملية ذات أطوار زمنية وفراغات مكانية؟
- توصف تسلسلات الـ enhancers بأنها مشوشة أو موجودة في كل مكان (promiscuous)؟
- يحتاج إنزيم core RNA polymerase إلى وحدة سكما الثانوية في عملية بدء الاستنساخ؟
- تتحول معظم جزيئات الـ RNA المخلقة حديثاً بأساليب متغيرة لكي تتحول إلى أشكالها الوظيفية ما عدا الـ mRNA البكتيري والذي يمثل استثناء لهذه القاعدة؟
- يستخدم التسلسل poly A في الـ DNA كوسيلة لإنهاء عملية الاستنساخ؟
- في عملية إنهاء الاستنساخ، هنالك علاقة وثيقة بين تركيب العروة والساق stem loop structure وبين احتياج الخلية للعامل رو (rho subunit) من عدمه؟
- تسمى جزيئات الـ tRNA بالجزئيات الوسيطة أو بالمتكيفات adaptors؟
- يبلغ مجموع 30S مع 50S هو 70S وليس 80S؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

- يدعى إنزيم RNA polymerase بـ أيضاً
 - a. DNA dependent DNA polymerase b. DNA dependent RNA polymerase c. RNA dependent DNA polymerase d. RNA dependent RNA polymerase
- يرتكب عادة إنزيم RNA polymerase خطأً واحداً لكل نيوكليوتيدة.
 - a. 100 b. 1000 c. 10000 d. 100000
- إن أقرب موقع لنقطة بداية الاستنساخ transcription start point هي
 - a. -100 bps b. -10 bps c. +1000 bps d. +9 bps
- يوجد التسلسل TATAAA في بروموتر حقيقية النواة ويسمى بـ
 - a. Pribnow box b. Hogness box c. CAAT box d. Recognition box
- إن عدد إنزيمات الـ RNA polymerase التي يمكن لها أن تحفز تخليق كل من rRNA و tRNA mRNA في بدائية النواة هي
 - a. only one type b. two types c. three types d. four types
- هي مكونات إنزيم RNA polymerase في مرحلة البدء في عملية الاستنساخ.
 - a. $\alpha\beta$ b. $\alpha\beta\beta'$ c. $\alpha\beta\beta' \sigma$ d. Only σ
- هي مكونات إنزيم RNA polymerase في مرحلة الاستطالة في عملية الاستنساخ.
 - a. $\alpha\beta$ b. $\alpha\beta\beta'$ c. $\alpha\beta\beta' \sigma$ d. Only σ
- تحتوي وحدة في إنزيم RNA polymerase على أغلب أو كل المواقع الفعالة لتكوين phosphodiester bond.
 - a. α b. β c. γ d. σ
- إن وظيفة إنزيم RNA polymerase III هي تخليق
 - a. rRNA b. mRNA c. tRNA d. snRNA

- يعد إنزيم RNA polymerase II لمادة α -amanitin المستخرجة من العرهمون *Amanita phalloides*.
 - a. insensitive b. intermediately sensitive c. highly sensitive d. may be sensitive
- يعطي الشريط القالب template strand ذو التسلسل 5'-GATCG-3' شريط RNA بتسلسل -----
 - a. 5'-GATCG-3' b. 5'-CTAGC-3' c. 3'-CUAGC-5' d. 3'-CTAGC-5'
- يكون إنزيم ----- هو المسؤول عن فتح التقاف الحلزون المزدوج أمامه وسد التقاف خلفه أثناء عملية الاستنساخ.
 - a. helicase b. DNA polymerase c. RNA polymerase d. topoisomerase
- يبلغ عدد العوامل المساعدة التي تحتاجها عملية الإنهاء الغير معتمدة على ρ -----
 - a. one b. two c. three d. none
- يدعى أحد أنواع العامل سكما ب ----- والذي ينتج تحت ظروف التجويع النتروجيني nitrogen starvation
 - a. $\sigma 70$ b. $\sigma 32$ c. $\sigma 54$ e. $\sigma 45$
- تدخل الذراع ----- في ربط جزيئة الـ tRNA المحملة بالحامض الأميني (aminoacyl tRNA) بسطح الريبوسوم خلال عملية تخليق البروتين.
 - a- extra arm b- amino acid arm c- acceptor arm d- T ψ C arm
- كل جزيئات الـ tRNA تنطوي على نفسها بصورة متشابهة لتعطي تركيباً يشبه ورقة الـ -----
 - a- banana b- orange c- cloverleaf d- strawberry
- يحتوي تركيب العروة والساق على ----- مخلفات يوراسيل تقع بعده مباشرة.
 - a- 5 b- 6 c- 7 d- 8
- إن كل من وحتتي ----- يؤلفان مركز الحفز catalytic center، في إنزيم RNA polymerase.
 - a. β and β' b. α and α' c. α and β d. β and α'
- أكثر جزيئات الـ RNA امتلاكاً للنيوكليوتيدات المحورة هي -----
 - a. mRNA b. rRNA c. tRNA d. ssRNA
- تستخدم أحد أذرع الـ tRNA وهي ----- كأساس لتصنيف الأنواع المختلفة لجزيئات الـ tRNA
 - a. T ψ C arm b. D arm c. acceptor arm d. extra arm
- تتميز عملية الإنهاء الغير معتمدة على العامل ρ بوجود ----- بالإضافة إلى تركيب الـ stem-loop في جزيئة الـ RNA والتي يحتاج إلى طاقة قليلة جداً لكسره.
 - a. poly A c. poly C d. poly G d. poly U
- إن أكثر أنواع الـ RNA تواجداً في الخلية هو -----
 - a. mRNA b. tRNA c. rRNA d. ssRNA
- لا تتحور جزيئة ----- بعد عملية استنساخها.
 - a. prok. tRNA b. euk. tRNA c. prok. mRNA d. euk. mRNA
- بسبب -----، أصبح من السهولة عزل جزيئات الـ mRNA عن جزيئات الـ rRNA والـ tRNA الشائعة الموجودة في مستخلص الخلية
 - a. T ψ C arm b. acceptor arm c. D arm d. polyA tail

السؤال الثالث: عرف ما يلي

promoter, Pribnow box, spliceosome, polyadenylation, poly A polymerase, monocistronic.

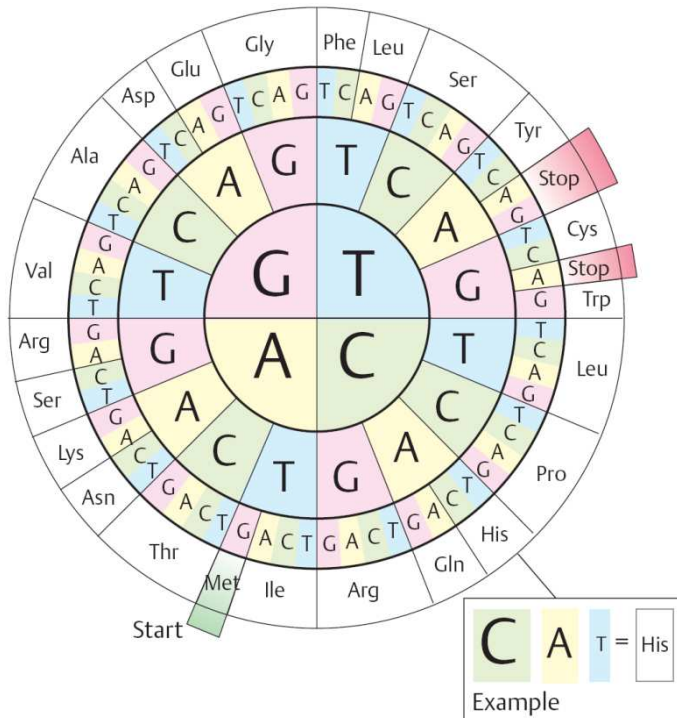
وللمزيد من الاطلاع اقراء:

- Alberts** B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science, USA. 2008.
- Berg** J., Tymoczko J., Stryer L. Biochemistry. Fifth edition, W. H. Freeman and company and Sumanas, Inc. , 2005.
- Bloomfield** V., Crothers, D. M., Tinoco, I., and Hearst, J., 2000. Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions. University Science Books.
- Brenner** S., Jacob F., and Meselson M. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis *Nature* 190: 576-581.
- Cooper** J. and Hausman R. The cell, A Molecular Approach. Fourth edition, Sinauer Associates, 2007.
- Fiering** S. Whitelaw E., and Martin D. 2000. To be or not to be active: The stochastic nature of enhancer action *Bioessays* 22: 381-387.
- Gesteland**, R. F., Cech, T., and Atkins, J. F. (Eds.), The RNA World (2d ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- Gilbert** H. Basic Concepts in Biochemistry. A student survival guide. Second edition, McGraw-Hill Companies, 2000.
- Gott** J. and Emeson R. 2000. Functions and mechanisms of RNA editing. *Annu. Rev. Genet.* 34: 499-531.
- Jacob** F. and Monod J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins *J. Mol. Biol.* 3: 318-356.
- Hall** B., and Spiegelman S. 1961. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 47: 137-146.
- Koolman** J., and Roehm K. Color Atlas of Biochemistry. Second edition, Thieme, 2005.
- Lewin** B. Genes. VII, Oxford University Press, 2000.
- Paolella**. P. Introduction to molecular biology. First edition, WCB/McGrawHill, 1998.
- Passarge** E. Color atlas of Genetics. Third edition, Thieme, 2007.
- Murray** R., Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell V., Weil P. Harper's Illustrated Biochemistry. 28th edition, McGrawHill Medical, 2009.
- Newman** A. 1998. RNA splicing. *Curr. Biol.* 8: R903-R905.
- Pierce** B. Genetics: A conceptual approach. 2002.
- Ro-Choi** T. 1999. Nuclear snRNA and nuclear function (discovery of 5 cap structures in RNA) *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr.* 9: 107-158.
- Shatkin** A. and Manley J. 2000. The ends of the affair: Capping and polyadenylation *Nat. Struct. Biol.* 7: 838-842.
- Snyder** L., and Champness W. Molecular genetics of bacteria. Third edition, ASM Press, Washington D C, 2007.
- Watson** J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R. Molecular biology of the gene. Fifth edition, Pearson Prentice Hall, 2004.

5

الفصل الخامس

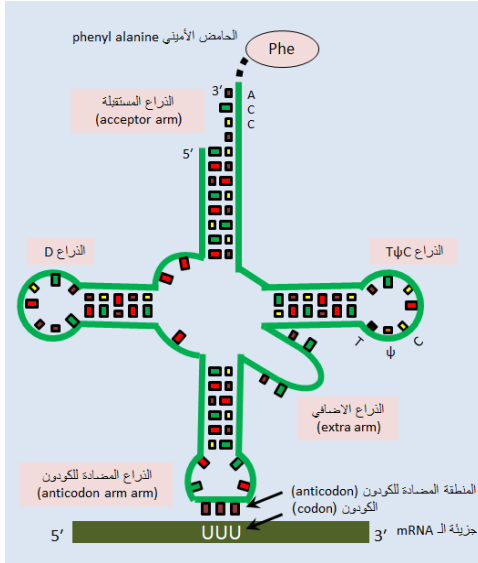
ترجمة الجين



جدول الشفرة الوراثية بعد فك رموزها (Koolman and Roehm, 2005)

مقدمة

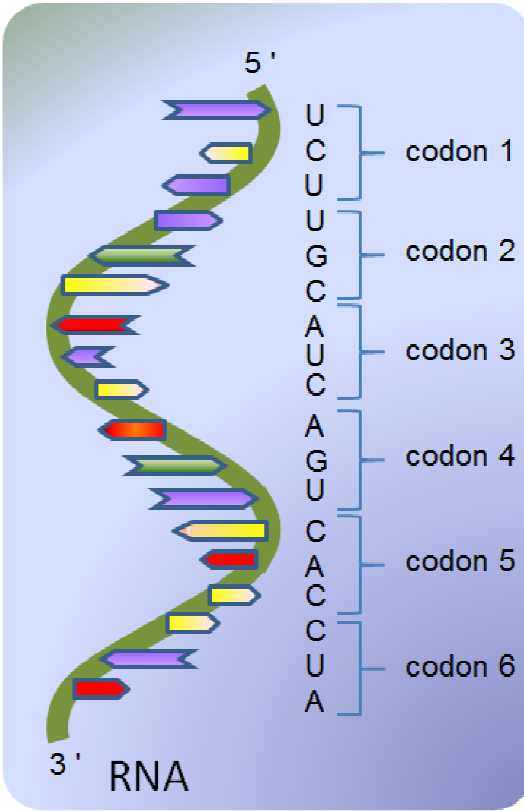
تتألف لغة الحياة من حروف أبجدية أربعة: A و G و T و C. تتطابق هذه الحروف مع النيوكليوتيدات الموجودة في الـ DNA. وتنظم هذه النيوكليوتيدات إلى شفرة ذات ثلاثة حروف تدعى بالكودون codon ، ويؤلف مجموع هذه الكودونات ما يعرف بالشفرة الوراثية genetic code. تشفر الكودونات المنتظمة خطياً (الجينات) إلى تخليق عدّة جزيئات RNA ، معظمها تدخل في بعض مظاهر تخليق البروتين. يحدث تخليق البروتين في ثلاث خطوات رئيسية: وهي البدء initiation، والاستطالة elongation ، والانتهاء termination. تشابه هذه العملية عمليتي التضاعف replication والاستنساخ transcription في صفاتها العامة، وفي كون أن اتجاه حدوثها من 5' إلى 3'. يجب أن تمتلك الخلية الماكينة الضرورية التي تترجم المعلومات بكفاءة وبدقة من التسلسل النيوكليوتيدي في الـ RNA إلى تسلسل أحماض أمينية في البروتين المطابق. هذا وأدرك الباحثون مبكراً بأن جزيئات الـ mRNA بنفسها لا تمتلك ألفة للأحماض الأمينية، ولهذا، فإن ترجمة المعلومات الوراثية الموجودة في تسلسل الـ mRNA إلى تسلسل أحماض أمينية في البروتين يحتاج إلى جزيئة وسيطة لها قابلية التكيف ما بين الأحماض النووية والأحماض الأمينية. يجب أن تميز هذه الجزيئات المتكيفة adaptor molecules التسلسل النيوكليوتيدي المتخصص من جهة، وتسلسل الأحماض الأمينية المطابق من جهة أخرى (راجع صفات جزيئة الـ tRNA). وبوجود هكذا جزيئات متكيفة، تستطيع الخلية أن توجه الحامض الأميني المتخصص إلى مكانه الصحيح في البروتين حسب التسلسل كما هو مقرر في التسلسلات النيوكليوتيدية الموجودة في جزيئة الـ mRNA (شكل 1.5).



شكل (1.5) : يوضح قدرة جزيئة الـ tRNA على الربط بين الأحماض النووية عن طريق ذراع الشفرة المضادة anticodon arm من جهة، والأحماض الأمينية عن طريق الذراع المستقبلية acceptor arm من جهة أخرى. تتألف المنطقة المضادة للشفرة anticodon region على تسلسل من سبع نيوكليوتيدات: وهي N أي المتغيرة و Pu* أي البيورين المحور والنيوكليوتيدات الثلاثة X,Y,Z والتي هي AAA كمثال في هذا الشكل واثنان من Pyr أي من قواعد البيريميدين من الاتجاه 3' إلى 5' (تصميم المؤلف)

يقوم الـ tRNA بوصفه كجزيئة متكيفة adaptor molecule باستخدام ذراع مضاد الشفرة anticodon arm في تمييز الكودونات الموجودة في جزيئة الـ mRNA، باعتماد قواعد Watson و Crick في الازدواج القاعدي. كل جزيئة من الـ tRNA تحتوي على تسلسل معين متمم للكودون، والتي يصطلح عليها بالشفرة المضادة (anticodon). وبما أن كل جزيئة من الـ tRNA تعلم بنوع واحد فقط من الأحماض الأمينية، لذا فإن كل كودون متخصص بحامض أميني واحد.

الكودونات وتخليق البروتين codons and protein synthesis

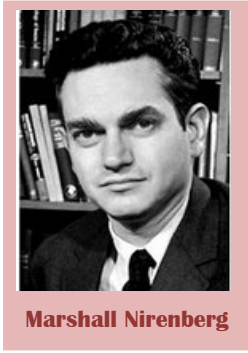


إن التسلسلات الموجودة في جزيئات الـ mRNA توجد في كل حامض أميني (شكل 2.5). إن الجزيئات المتكيفة التي تترجم الكودونات إلى تسلسل أحماض أمينية في البروتين هي جزيئات الـ tRNA. إن الرايوسومات هي مكونات خلوية والتي تتأثر عليها الكيانات الوظيفية المختلفة لكي تخلق جزيئة البروتين. تتراكم العديد من الرايوسومات على بعضها البعض لتلقائياً لتترجم جزيئة mRNA مفردة، وتكون ما يعرف بمتعدد الرايوسوم polyribosome (راجع الشكل 9.4). أما الشبكة الاندوبلازمية الداخلية هي حبرات يرتبط متعدد الرايوسوم على سطوحها.

شكل (2.5): كيفية تمثيل تسلسلات الـ RNA إلى كودونات مختلفة لها القابلية على الترجمة. إن كل ثلاث أحماض نووية تشكل كودوناً واحداً والذي يشفر بدوره لحامض أميني واحد (تصميم المؤلف).

فك رموز الشفرة الوراثية cracking the genetic code

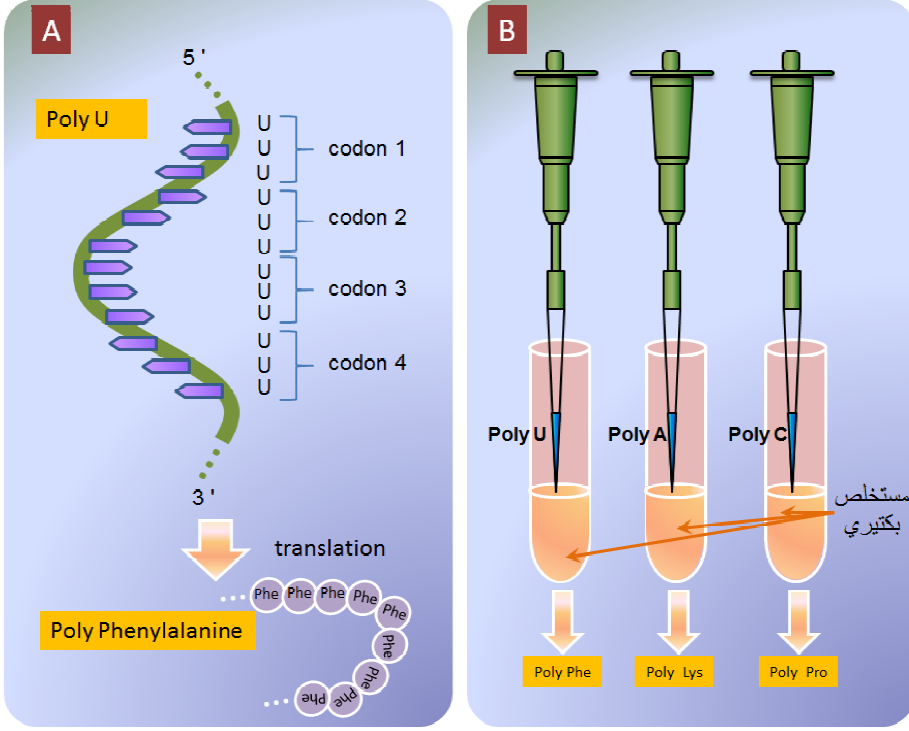
استطاع العلماء في نهاية الخمسينات وبداية الستينات من القرن الماضي من حل سر من أسرار الحياة المهمة، وهو كيف تعمل الجينات. إن المشكلة التي حاول الباحثون حلها هي كيف أن التسلسل الخطي للنوكليوتيدات الأربع (A و G و C و U) يحدد تسلسل الأحماض الأمينية في البروتين المتألف من 20 حاض أميني مختلف. بعد اكتشاف تركيب الـ DNA من قبل James Watson و Francis Crick و Rosalind Franklin، انبثقت محاولات جادة لفهم طبيعة التشفير للبروتين.



Marshall Nirenberg

تم أول تفسير للشفرة الوراثية على يد العالمين Nirenberg و Mathaei عام 1961. أن المجتمع العلمي في مجال تفسير الشفرة الوراثية يعد مديناً لأعمال Nirenberg و Mathaei الذين جرت تجربتهم على مستخلصات بكتريا القولون المزال منها الـ DNA باستعمال الإنزيم الهاضم له (الـ DNase) لكي لا يتداخل مع نتائج التجربة. وعندما استخدموا متعدد نيوكليوتيدي polynucleotide مصنع مختبرياً من اليوراسيل فقط (poly U) باستخدام الإنزيم polynucleotide phosphorylase (الذي يبلمر النيوكليوتيديات عشوائياً دون الاعتماد على شريط قالب، وهو بهذا يختلف عن كافة إنزيمات الـ polymerases والتي لا تعمل إلا بوجود شريط قالب يحدد لها مسارها)، وأضافاه إلى الوسط، تم الحصول على متعدد ببتيد polypeptide يحتوي على متعدد الحامض الأميني phenylalanine فقط (poly-phenylalanine) (شكل 3.5 A).

وبشكل مشابه، وباستخدام نفس الإنزيم مع تغيير مادة التفاعل، كَوّن متعدد الأدينين poly (A) متعدد الحامض الأميني lysine فقط (poly-lysine)، و كَوّن متعدد السايروسين poly (C) متعدد الحامض الأميني proline فقط (poly-proline). ولذلك، يشفر متعدد اليوراسيل UUU للحامض الأميني phenylalanine، ويشفر AAA للحامض الأميني lysine، ويشفر CCC للحامض الأميني proline (شكل 3.5 B).



شكل (3.5) : (A) تحديد الشفرة الوراثية باستخدام جزيئة mRNA مصنعة مختبرياً باستخدام رايبونوكليوتيدة من نفس النوع وهي متعدد اليوراسيل poly U. إضافة هكذا mRNA مخلتق إلى المستخلص البكتيري يؤدي إلى تخليق أحماض أمينية من نوع واحد وهي متعدد الفينيل الانين poly-phenylalanine. (B) تحديد الشفرة الوراثية باستخدام جزيئة mRNA مصنعة مختبرياً باستخدام رايبونوكليوتيدة من عدة أنواع، وهذا يؤدي إلى تخليق أحماض أمينية من عدة أنواع (تصميم المؤلف).

ظلت مجموعة Nirenberg عاجزة عن فك كل رموز الشفرة الوراثية، بسبب عدم توصلها إلى طريقة تمكنها من تخليق متعدد نيوكليوتيدي يتألف من مزيج من النيوكليوتيدات ذو تسلسل معروف. وبقيت الحال هكذا إلى أن وسّعت التجارب باستخدام متعددات نيوكليوتيدية مختلطة mixed polynucleotides وكشفت الشفرة الوراثية genetic code بأكملها (شكل 4.5)، وكان هذا من نصيب العالم الهندي Khorana والذي شخّص بقية الشفرة، وذلك من خلال تطويره لوسائل كيميائية مكنته من تخليق متعدد النيوكليوتيد الثنائي poly-dinucleotide ومتعدد النيوكليوتيد الثلاثي poly-trinucleotide من تسلسلات الـ DNA والتي يمكن لها من أن تترجم إلى بروتين. وعندما خلق العالم Khorana وجماعته التسلسل CUCUCUC... على سبيل المثال، نتج عن هذا التسلسل تكوين متعدد ببتيدي polypeptide متكون من leu-ser-leu-ser...، وهذا لا يؤكد فقط بأن الكودون CUC يشفر للحامض الأميني leucine فقط، والكودون UCU يشفر للحامض الأميني serine،



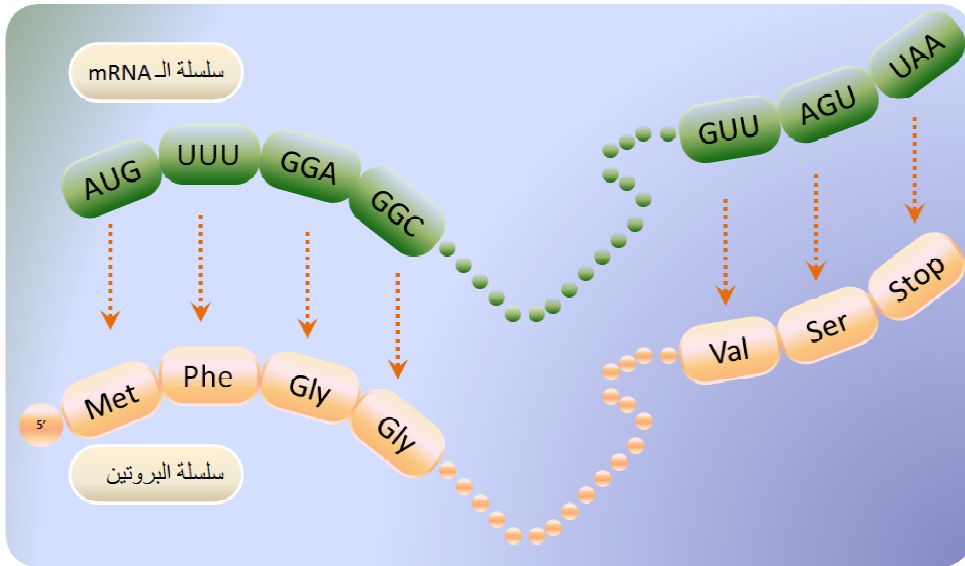
Har G. Khorana



Robert Holley

وإنما يثبت في نفس الوقت بأن الشفرة الوراثية ذات طبيعة ثلاثية. وإذا كانت الشفرة ذات طبيعة ثنائية CU CU CU CU... أو رباعية CUCU CUCU CUCU... فإنها سوف تؤدي إلى إنتاج متعدد ببتيدي يحتوي على حامض أميني من نوع واحد.

ولكن حتى لو تمكن كل من Khorana و Nirenberg من فك رموز الشفرة الوراثية، ولكن الطريقة التي بواسطتها يمكن للـ RNA من أن يتحول إلى بروتين لم تعرف على وجه التحديد، حتى استطاع Holley بعد فترة قصيرة من تشخيص تسلسل جزيئة الـ tRNA ، وهي الجزيئة المتكيفة التي تسهل عملية الترجمة، ليحصل كل من Khorana و Nirenberg و Holley جائزة نوبل في الفلسفة أو الطب تقديراً لعملهم البارِع. وذلك في عام 1968.



شكل (5. 4): ترجمة الكودونات المختلفة في جزيئة الـ mRNA إلى أحماض أمينية مختلفة في جزيئة البروتين. تدل كلمة stop على كودون الانهاء stop codon (تصميم المؤلف).

لماذا يتألف كل كودون من ثلاث نيوكليوتيدات؟

يجب أن يتوفر 20 نوع من الأحماض الأمينية لتخليق البروتينات، وهكذا، لا بد من وجود 20 كودون مختلف ليؤلف الشفرة الوراثية. وبما أن هنالك أربعة أنواع فقط من الأحماض النووية في جزيئة الـ mRNA ، لذا، فإن كل كودون يجب أن يتألف من أكثر من نيوكليوتيدة واحدة. وإذا فرضنا بأن الكودونات تحتوي على اثنان من النيوكليوتيدات، فإنها لا تستطيع أن توفر أكثر (4²) كودون متخصص، بينما إذا احتوى الكودون على ثلاث نيوكليوتيدات فيمكن له أن يوفر (4³) أي 64 كودون متخصص، وعندما وجد الباحثين بأن عدد الكودونات هو 64 لذا فإن الفرضية التي تقول بأن الكودونات ثلاثية triple هي الفرضية الصحيحة.

صفات الشفرة الوراثية

يمكن إجمال الموصفات العامة للشفرة الوراثية بالآتي:

- التشفير الثلاثي triple coding: وكما نوقش سابقاً، تكون الشفرة الوراثية ثلاثية triple، أي ذات ثلاث نيوكليوتيدات، حيث يقرأ التسلسل النيوكليوتيدي كتلاثيات تعرف بالكودونات، ولكن أول نيوكليوتيدتين في الكودون الثلاثي triple codon هما الأكثر أهمية.
- التخصص specificity: تعد الشفرة الوراثية متخصصة (غير غامضة unambiguous)، هذا يعني، أن الشفرة المتخصصة عادة ما تشفر لنفس الحامض الأميني.
- العمومية universality: تعد الشفرة الوراثية عمومية افتراضياً، هذا يعني، أن تخصص الشفرة الوراثية قد حوفظ على منذ المراحل المبكرة للتطور مع تغيرات طفيفة جداً في أسلوب ترجمة الشفرة الوراثية. تكون الشفرة الوراثية متشابهة في كل الكائنات. أما الآن نحن نعلم بأن الشفرة الوراثية هي نفسها غالباً في كل الكائنات الحية ولكن هنالك اختلافات طفيفة. يشفر الجينوم في الماييتوكوندرية من 10 إلى 20 بروتين. وهنا، بعض كودونات الماييتوكوندرية تمتلك معاني مختلفة من نظيراتها الموجودة في الساييتوبلازم. فمثلاً، تشفر الكودون AUA في الماييتوكوندرية إلى الحامض الأميني methionine بدلاً من isoleucine.
- الغزارة redundancy: تتصف الشفرة الوراثية بالوفرة (تدعى في بعض الأحيان بالتفسخ أو الانحطاط degenerative). معظم الأحماض الأمينية في تسلسل البروتين يشفر لها من أكثر من كودون واحد. وعلى سبيل المثال تمثل بعض الأحماض الأمينية بأكثر من كودون واحد، يشفر للحامض الأميني أرجينين من قبل

سنة كودونات مختلفة، ولكن كل كودون يمثل حامض أميني واحد. ان الأحماض الأمينية التي تشفر من قبل كودون واحد لا تسمى degenerative وإنما synonyms أي مترادفية والتي تختلف فقط في الموقع الثالث، الموقع المهتز wobble position، حيث يعتبر الازدواج القاعدي مع الموقع الثالث في الكودون المضاد أقل تشدداً من الموقعين الأول والثاني في الكودون. وبالتالي، يسمح هذا الاهتزاز لبعض جزيئات الـ tRNA من أن تميز أكثر من كودون واحد

- تداخل نسق القراءة والفواصل overlapping reading frames and commas: ان معنى نسق القراءة reading frame هو التسلسل النيوكليوتيدي من كودون البدء إلى كودون النهاية. يحتوي الفاصل الواقع بين كودون البدء والنهاية على معلومات وراثية تدعى بنسق القراءة المفتوح (ORF) open reading frame. ان نسق القراءة الاعتيادي لا يتداخل. عندما نقول بأن الشفرة الوراثية غير متداخلة nonoverlapping وليست ذات فواصل comma less يعني هذا بأن الشفرة تقرأ من نقطة بداية ثابتة كتسلسل مستمر من القواعد ثلاثة ثلاثة بدون أي توقف بين الكودونات. عموماً، ان قراءة الشفرة الوراثية خلال عملية تخليق البروتين لا تحتاج إلى أي تداخل في الكودونات. وكذا، فالشفرة الوراثية هي غير متداخلة. وعلاوة على ذلك، حال بداية القراءة عند كودون متخصص، لا يوجد هنالك تنقيط punctuation بين الكودونات ويتم قراءة الرسالة بشكل مستمر من النيوكليوتيدات الثلاثية لحين الوصول الى كودون الإيقاف.

كما ذكر سابقاً، إن عدد الكودونات هو 64 كودون، هذه الكودونات كلها تشفر إلى أحماض أمينية ما عدا 3 منها فقط، لذا أصطلح على تسميتها بالكودونات العبثية nonsense codons (أنظر أدناه). ويستخدم منها اثنان على الأقل في الخلية كإشارات إنهاء termination signals، حيث تبدأ بالتشفير عندما تشارف عملية بلمرة الأحماض النووية إلى جزيئة بروتين على الانتهاء. هذا وتشفر بقية الكودونات الـ 61 لعشرين حامض أميني. ويبين الجدول أدناه بأن هنالك 64 كودون تنتظم في 16 عائلة، تحتل كل عائلة عمود مفرد بين الخطوط الأفقية. وعلى سبيل المثال، ان كودونات CCN، حيث N يمكن أن تكون U أو C أو A أو G، تعرّف العائلة الواقعة في العمود الثاني للصندوق الثاني من القمة. وفي بعض العوائل، تشفر كل الكودونات الأربع لنفس الحامض الأميني، كما هو الحال بالنسبة لأعضاء العائلة CC المذكورة توفاً في أعلاه. يشار إلى هذه العوائل، بالعوائل الغير مختلطة unmixed families. وتشكل هذه العوائل 8 من أصل 16 عائلة من عوائل الكودونات (جدول 1.5).

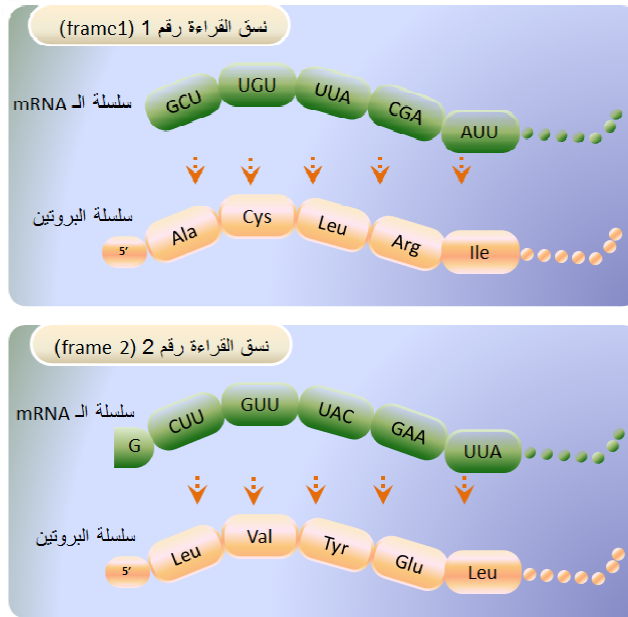
جدول (1.5): كيفية اصطاف الكودونات ضمن شفرة وراثية موحدة، تحتوي الشفرة الوراثية على 64 كودون، 61 منها تشفر و 3 منها لا تشفر للأحماض الأمينية.

First nucleotide	Second nucleotide				Third nucleotide
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Term	Term ²	A
	Leu	Ser	Term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile ²	Thr	Lys	Arg ²	A
	Met	Thr	Lys	Arg ²	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

أما العائلتين الباقيتين – عائلة UG، وعائلة AU – فإنها لا تبدي أي نمط آخر وتوصف بأنها متفرّدة. وهكذا، وبشكل عام، ان النيوكليوتيدة الثالثة في الكودون هي أقل أهمية من النيوكليوتيدة الأولى والثانية في تحديد نوعية الحامض الأميني الذي يندمج في سلسلة البروتين. أما العوائل التي تشفر لأكثر من حامض أميني واحد يطلق عليها بالعوائل المختلطة mixed families. وفي 6 من تلك العوائل المختلطة، فان الكودونات ذات ال pyrimidine أي اليوراسيل U أو السايروسين C، عند الموقع الثالث، تشفر لحامض أميني واحد، بينما أعضاء تلك العائلة ذات ال purine أي الأدينين A أو الكوانين G، عند الموقع الثالث، تشفر لحامض أميني آخر، أو تشفر لما يعرف بإشارة إنهاء السلسلة chain termination signal.

نسق القراءة reading frame

بما ان تسلسل جزيئة الـ mRNA يتم قراءته في مجاميع من ثلاث نيوكليوتيدات (كودونات) من النهاية 5' ، لذا يمكن يمكن أن يقرأ هذا التسلسل بثلاث أنساق قراءة مختلفة، اعتماداً على ماهية النيوكليوتيدة المستخدمة أولاً في الكودون الأول. وعادة ما ينتج نسق قراءة واحد بروتين وظيفي بينما النسقين الآخرين سوف تشتمل على عدة كودونات إيقاف متنوعة. وفي بعض العاثيات البكتيرية، يوجد ما يعرف بالجينات المتداخلة (راجع الفصل الثاني) والتي تستخدم أنساق قراءة مختلفة، حيث تستخدم العاثيات البكتيرية فضلاً عن الكثير من الفايروسات الأخرى هذا الأسلوب كوسيلة لعمل أكبر قدر من الفائدة من الجينوم الفايروسي الصغير. وبما أن الشفرة الوراثية هي ليست ذات فواصل وليست متداخلة وثلاثية، لذا يمكن نظرياً للـ mRNA من أن يترجم إلى ثلاثة أنساق للقراءة. وتبين احتواء بعض جزيئات mRNA على معلومات متداخلة يمكن أن تترجم إلى أنساق قراءة مختلفة، لتعطي متعددات ببتيدية مختلفة (شكل 5.5).



شكل (5.5): كيفية قيام الشفرة الوراثية – الغير متداخلة والتي هي ليست ذات فواصل والثلاثية – بقراءة أنساق قراءة مختلفة. إذا بدأت ترجمة تسلسل الـ mRNA عند موقعي بداية مختلفين (غير مبينين في الشكل)، عندها يمكن وجود نسقين للقراءة. وفي هذا المثال، تنتقل الكودونات بمسافة قاعدة واحدة إلى اليمين في النسق الأسفل. وكنتيجه لذلك، يشفر نفس التسلسل النيوكليوتيدي لأحماض أمينية مختلفة مختلفة خلال عملية الترجمة. وعلى الرغم من ندرة هذه العملية، فإن العديد من الحالات التداخلية قد تم اكتشافها في الجينات الفايروسية والخلوية في الكائنات بدائية وحقيقية النواة. ويكن – نظرياً – للـ mRNA من أن يحتوي على نسق قراءة ثالث (تصميم المؤلف).

تقرأ معظم جزيئات الـ mRNA بنسق قراءة واحد بسبب مواجهة نسقي القراءة الآخرين لعدة كودونات إيقاف تنهي الترجمة وذلك قبل إنتاج البروتين الفعال. يحدث ترتيب غير اعتيادي آخر في ترتيب الشفرة بسبب تغيير نسق القراءة (frame shifting). وفي هذه الحالة، تقوم ماكينة تخليق البروتين بقراءة أربع نيوكليوتيدات كحامض أميني واحد وتستمر بقراءة الكودونات بشكلها الثلاثي المعتاد، أو ربما تتجاهل قاعدة نيوكليوتيدية واحدة وتقرأ كل الكودونات الثلاثية المتعاقبة بنسق قراءة جديد إلى حين الوصول إلى نهاية السلسلة. وعلى الرغم من عدم شيوع هكذا حالة ولكن توجد عدة أمثلة تؤكد حدوثها.

كودونات البدء والنهية start\stop codons

تبدأ عملية الترجمة بكودون البدء start codon أو initiation codon. وبشكل مغاير لكودونات الانتهاء، فإن هذا الكودون لوحده غير قادر على بدء عملية تخليق البروتين، وإنما يحتاج إلى التسلسلات القريبة وعوامل البدء initiation factors لبدء العملية. يعد التسلسل AUG أكثر كودون بدء شيوعاً، والذي يشفر للحامض الأميني methionine فيما إذا لو وجد في مكان آخر.



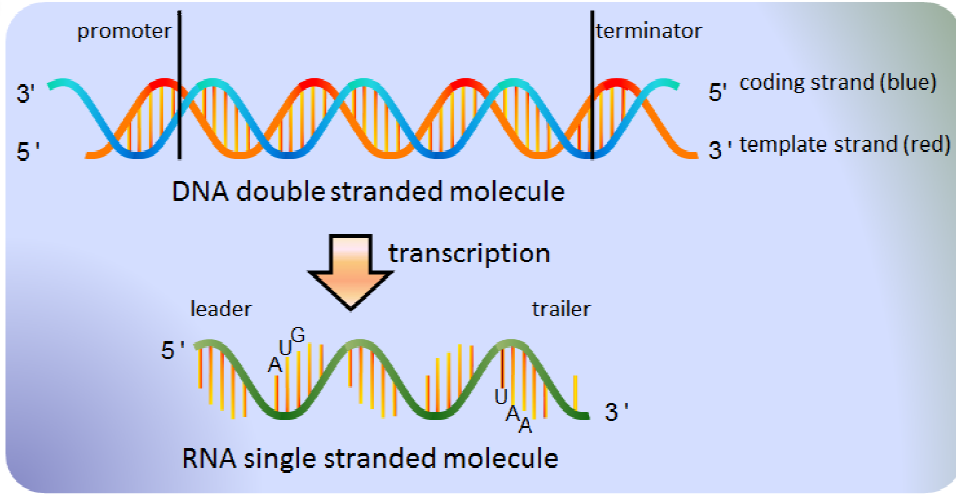
Harris Bernstein

أما كودونات الإيقاف stop codons، فهي ثلاث: وهي UAG والذي يدعى amber، و UAA والذي يدعى ochre و UGA والذي يدعى opal. سمي الكودون UAG بـ amber بسبب مكتشفه Harris Bernstein، ويعني اسمه الأخير في اللغة الألمانية بـ "amber". أما كودوني الإيقاف الآخرين فسميا بـ ochre و opal وذلك للحفاظ على سياق التسمية. وتدعى بكودونات الإيقاف بكودونات الإنهاء termination codons وتقوم بإعطاء إشارة بتحرر متعدد الببتيد الناشئ nascent polypeptide من الرايوسوم ويحدث هذا بسبب ارتباط عوامل التحرر release factors بغياب الـ tRNA ذو الصلة cognate tRNA والذي يحمل شفرة مضادة anticodon مكملية لكودونات الإيقاف.

عملية تخليق البروتين process of protein synthesis

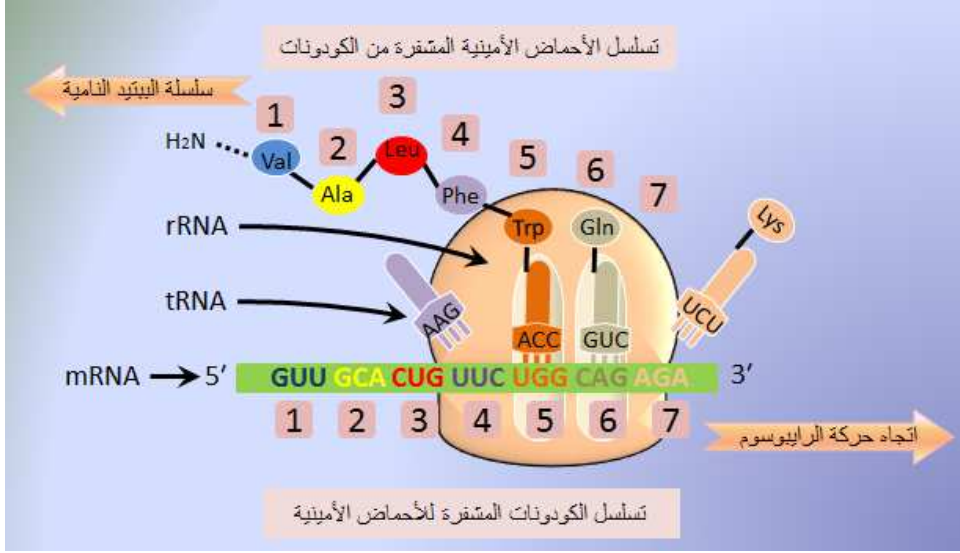
قبل أن نتطرق إلى مراحل عملية الترجمة لا بد لنا من توضيح أن التسلسلات الواقعة بعد نقطة بداية الاستنساخ وهي التسلسلات التي تعطي نسخة RNA أو الـ RNA transcript توجد على ثلاثة مناطق. تدعى منطقة نسخة الـ RNA التي تبدأ عند بداية الاستنساخ وتنتهي عند كودون البدء (AUG) بالقيادة أو القاطرة (leader) أو بالمنطقة 5' الغير قابلة للترجمة. بينما تدعى المنطقة الثالثة والغير قابلة للترجمة أيضاً والتي تمتد من

كودونات الإنهاء (UAA أو UAG أو UGA) إلى آخر نيوكليوتيدة بالمقطورة (trailer)، أو التسلسل 3' الغير قابل للترجمة. تلعب هذه التسلسلات دوراً في تمييز الـ mRNA وضمان ثباتيته على الرايبوسوم خلال مرحلة الترجمة. يمكن للمنطقة القائدة أن تلعب دوراً في تنظيم التعبير الجيني (أنظر الفصل السادس). إذن المنطقة الوحيدة القابلة للترجمة (في حالة التشفير إلى بروتين) هي المنطقة الثانية والواقعة بين المنطقة الأولى والمنطقة الثالثة أي بين كودون البدء وكودون النهاية. وهذا يعني أن ليس كل الـ RNA المخلق في عملية الاستنساخ وحتى بعد عملية المعالجة كما في حقيقية النواة سوف يترجم من أقصاه إلى أقصاه (شكل 6.5).



شكل (6.5): قطعة من RNA بدائية النواة قد استنسخت من منطقة الـ DNA القالب العائدة لها. لا حظ مناطق البروموتر (المبدئ) والمنهي على الـ DNA ومناطق القاطرة والمقطورة على الـ RNA. يقوم الرايبوسوم بقراءة شفرتي بدء ونهاية تخليق البروتين المبيتان في هذا الشكل (تصميم المؤلف).

في الفصل السابق قدمنا الجزيئات الرئيسية المشاركة في تخليق البروتين – وهي جزيئة الـ mRNA وجزيئات الـ tRNAs والرايبوسومات المحتوية على جزيئات الـ rRNAs الكبيرة والصغيرة. وهنا، سوف نأخذ نظرة مفصلة حول كيفية تداخل هذه المكونات مع بعضها البعض لتصنع لوحة فنية كيميائية (شكل 7.5) تؤدي بالنهاية إلى تكوين البروتينات.

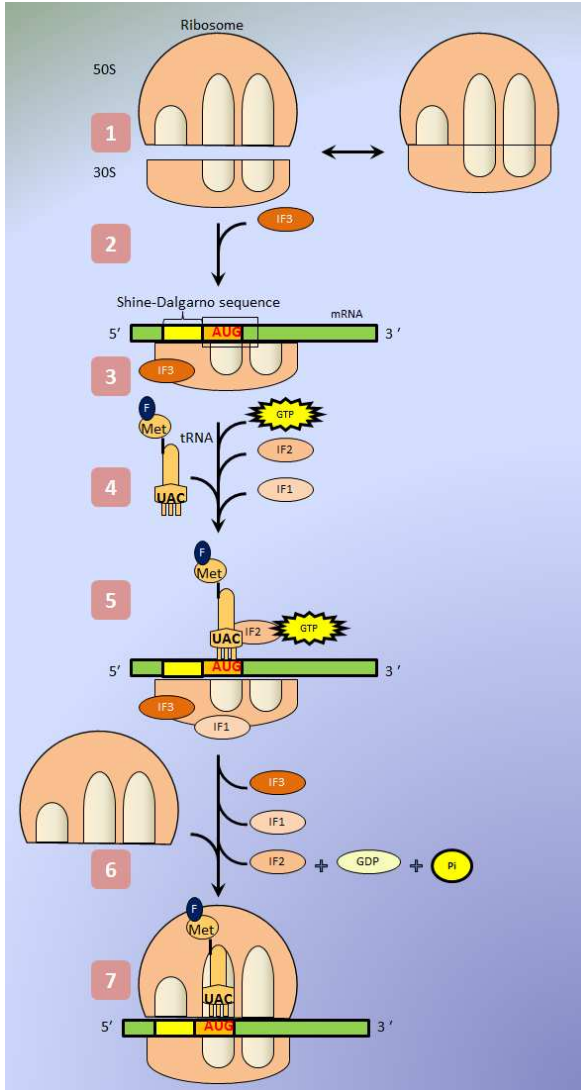


شكل (7.5): ثلاثة أدوار يقوم بها الـ RNA خلال تخليق البروتين. يترجم الـ mRNA إلى بروتين بمساعدة كل من الـ tRNA الرايبوسوم، والذي يتألف من بروتينات عديدة متنوعة ومن نوعين من جزيئات rRNA. لاحظ أن جزيئات الـ rRNA تؤلف مع البروتينات الرايبوسومية تركيب الرايبوسومات (تصميم المؤلف).

تعمل الرايبوسومات كماكنة يترجم عليها تسلسل الأحماض النووية في جزيئة الـ mRNA إلى تسلسل أحماض أمينية في البروتين المطابق لذلك الـ mRNA كما نوقش ذلك سابقاً. تبدأ ترجمة الـ mRNA قرب النهاية 5' ، حيث تقرأ الرسالة من الاتجاه 5' إلى 3'. وهذا يعني بدأ تكوين النهاية الأمينية N-terminus لسلسلة متعدد الببتيد، والتي تخلق حال صنع أول حامض أميني، وهي بهذا تمثل النهاية 5' للبروتين. أما النهاية الأمينية C-terminus، فهي النهاية التي تتكون بعد صنع آخر حامض أميني في سلسلة متعدد الببتيد، وهي بهذا تمثل النهاية 3' للبروتين. ومن جديد، ظهر مفهوم القطبية كذلك. إذن تشبه عملية تخليق البروتين عملية تضاعف الـ DNA واستنساخ الجين ليس في قطبيتها فحسب وإنما من حيث انقسامها إلى ثلاثة أطوار هي البدء initiation، والاستطالة elongation، والانهاء termination كما تم مناقشة ذلك سابقاً.

مرحلة البدء initiation

تتضمن مرحلة ابتداء الترجمة كل المكونات الضرورية لتخليق البروتين، والتي تتألف من:



(1) جزيئة mRNA و (2) الوحدات الثانوية الصغيرة والكبيرة للرايبوسوم و (3) ومجموعة من ثلاث بروتينات تدعى بعوامل الأبتداء و (4) وجزيئة tRNA الابتدائية المرتبطة بمجموعة N-formylmethionine و التي تدعى بالـ fMet-tRNA (5) والكوانوسين ثلاثي الفوسفات GTP. تتألف مرحلة البدء من ثلاث خطوات. أولاً، يرتبط الـ mRNA بوحدة الرايبوسوم الصغيرة. ثانياً، ترتبط جزيئة الـ tRNA الابتدائية بالـ mRNA من خلال الازدواج القاعدي بين الكودون ومضاد الكودون. ثالثاً، ترتبط وحدة الرايبوسوم الكبيرة بمعقد البدء. دعنا نرى الآن ماذا يحدث في كل خطوة بتفصيل أكثر. يوجد الرايبوسوم الفعال بهيئة وحدتين (راجع الفصل الرابع) وهما وحدتي 30S و 50S في الخلايا البكتيرية. وعندما تكون كلتا الوحدتين غير فعاليتين في عملية الترجمة، تتواجد كلتا الوحدتان بهيئة توازن ديناميكي، والتي ترتبط وتنفصل ديناميكياً عن بعضها البعض (شكل 8.5 a). ولا يمكن لجزيئة الـ mRNA أن ترتبط بوحدة

الرايبوسوم الصغيرة إلا عندما تكون الأخيرة مفصولة عن الوحدة الثانوية الكبيرة.

شكل (8.5): مرحلة بدء تخليق البروتين في الخلايا البكتيرية. (1) ترتبط وتنفصل الوحدة الريبوسومية الصغيرة والكبيرة مع بعضهما البعض بشكل ديناميكي، (2) يرتبط عامل الأبتداء رقم 3 (IF-3) بوحدة الرايبوسوم الصغيرة، مانعاً من ارتباط الوحدة الكبيرة، (3) وهذا يسمح لوحدة الرايبوسوم الصغيرة للارتباط بالرايبوسوم، (4) تكون جزيئة الـ tRNA المحملة بالحامض الأميني الميثيونين الموسوم بالفورميل (N-formylmethionine) معقداً مع عامل الاستطالة رقم اثنان GTP والـ IF-2، (5) ويرتبط بوحدة الرايبوسوم الصغيرة وبالـ mRNA، (6) ينفك كل من عامل الأبتداء الأول والثاني والثالث من المعقد ويتحلل الـ GTP إلى GDP، (7) وترتبط الوحدة الثانوية الكبيرة لتخلق معقد الأبتداء 70S. اذن في نهاية مرحلة الأبتداء يتجمع الرايبوسوم على الـ mRNA ويرتبط أول tRNA بكودون الأبتداء (تصميم المؤلف).

يرتبط عامل البدء رقم ثلاثة IF-3 بالوحدة الثانوية الصغيرة ويمنع الوحدة الكبيرة من الارتباط خلال مرحلة البدء (شكل 8.5 b). يرتبط الرايبوسوم مع تسلسل شاين دلكارنو الموضح في أعلاه والذي يكمل لجزيئة 16S rRNA والتي تشكل جزءاً من الوحدة الثانوية للرايبوسوم، وهذا يسمح للوحدة الصغيرة بالارتباط مع الـ mRNA بحيث يتمركز الرايبوسوم مباشرة فوق كودون البدء. بعد ذلك، يرتبط جزيئة fMet-tRNA بكودون البدء (شكل 8.5 c). تحتاج هذه الخطوة إلى عامل البدء رقم اثنان، والذي يكون معقد مع مركب GTP.

يقوم العامل الثالث، وهو عامل البدء رقم واحد بتسريع انفكاك وحدات الرايبوسوم الكبيرة والصغيرة. وعند هذه النقطة، يتألف معقد البدء من (1) وحدة الرايبوسوم الثانوية الصغيرة و (2) جزيئة الـ mRNA و (3) جزيئة الـ tRNA البائدة مع حامضها الأميني ميثيونين fMet-tRNA و (4) مركب الـ GTP و (5) عوامل البدء رقم واحد واثنان وثلاثة. تعرف هذه المكونات بمجموعها بمعقد البدء نوع "ثلاثين أس" 30S initiation complex (شكل 8.5 c).

وفي آخر خطوة من البدء، ينفك عامل البدء رقم ثلاثة من وحدة الرايبوسوم الثانوية وهذا يسمح لوحدة الرايبوسوم الثانوية الكبيرة من الانضمام لمعقد البدء. يتحلل مركب GTP (المجهز من قبل عامل البدء رقم اثنان) تتحلل إلى GDP ، وبعدها يهاجر كل من عامل البدء رقم واحد ورقم اثنان (شكل 8.5 d). وعندما ترتبط وحدة الرايبوسوم الكبيرة بمعقد البدء يتحول معقد البدء من نوع "ثلاثين أس" إلى معقد الابتداء من نوع "سبعين أس" 70S initiation complex.

فروقات بدء الترجمة بين بدائية وحقيقية النواة

على الرغم من أن السياق العام لعملية بدء الترجمة في بدائية النواة يشابه ذلك الذي يحدث في حقيقية النواة، إلا إن هنالك فروقا مهمة لا بد من ملاحظتها.

لعل من أهم الفروق هو وجود تسلسل Shine Dalgarno في بدائية النواة وعدم وجود تسلسل مكافئ له في حقيقية النواة. إن العديد من mRNA بدائية النواة هو متعدد السسترون polycistronic، أي، تشفر جزيئة الـ mRNA أكثر من سلسلة ببتيديدة واحدة (كما نوقش ذلك سلفاً). يجب أن يحتوي الـ mRNA متعدد السسترون على عدة كودونات بداية.

وعلى أية حال، يجب أن يحتوي متعدد الببتيد على أكثر من حامض أميني من نوع methionine لا ترد في موقع البداية non-initiating methionine. وفي الشفرة الوراثية

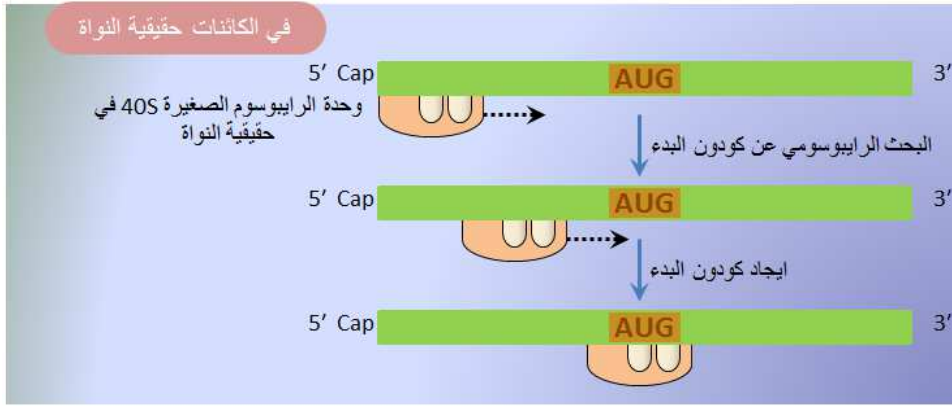
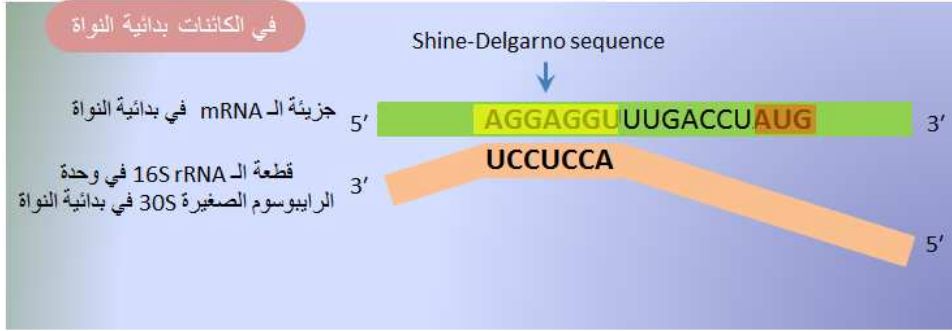
المثالية، فإن كودون ميثيونين البدء initiating codon والميثيونين الذي لا يرد في البداية non-initiating methionine هو AUG.

وللتمييز بينهما تستخدم الكائنات بدائية النواة تسلسل متخصص يقع 5 إلى 10 زوج قاعدي قبل كودون البدء AUG، في منطقة غير قابلة للترجمة un-translated region (UTR) تقع 5' من النقطة القابلة للترجمة لجزيئة الـ mRNA. يدعى هذا التسلسل المتخصص بتسلسل Shine-Dalgarno نسبة إلى مكتشفه. إن هذا التسلسل الغني بالبيورين يكمل التسلسل الصميمي UCCU للنهاية 3' لجزيئة 16S rRNA (التي تقع في وحدة 30 الثانية الصغيرة 30 S subunit للرايبوسوم).

تتأثر فعالية موقع الارتباط بالرايبوسوم (RBS) ribosome binding site والذي يمتلكه أحد جزئي هذا التسلسل بالطول وبالمحتوى النيوكليوتيدي للجزء الآخر، وهو الجزء الفاصل spacer الذي يفصل بين موقع الارتباط بالرايبوسومات وكودون البدء AUG.

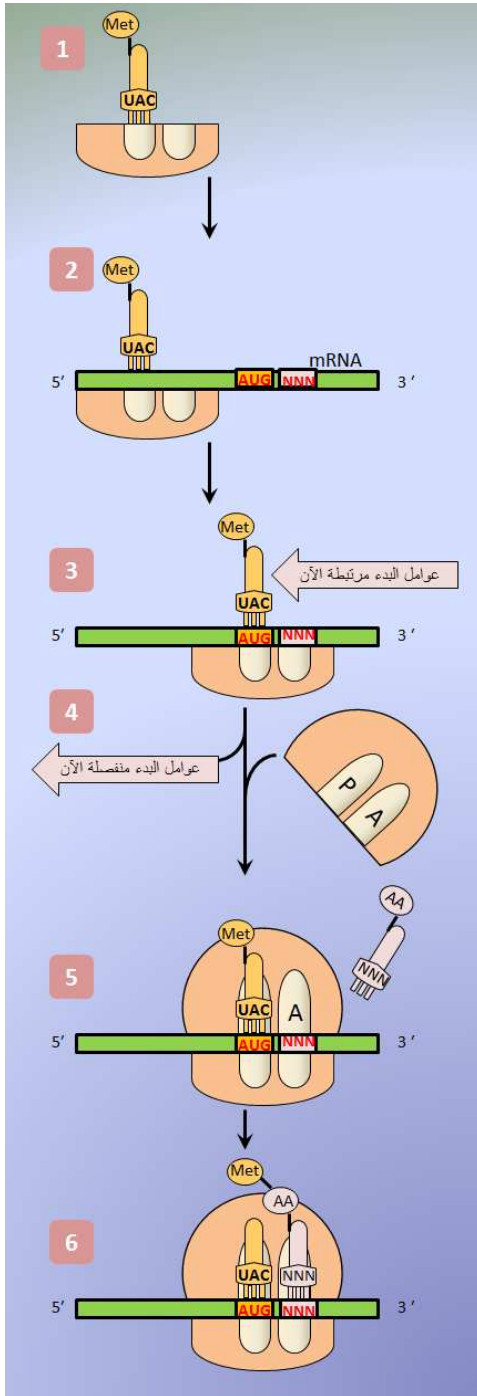
يتضح من هذا بأن تسلسل Shine-Dalgarno يعمل على اصطافاف جزيئة الـ mRNA على الرايبوسوم في بداية عملية الترجمة وذلك باستخدام الازدواج القاعدي base pairing مع التسلسل المكمل complementary sequence قرب النهاية 3' لجزيئة الـ rRNA (شكل 9.5). إن هذا التداخل عن طريق الازدواج القاعدي تمكن الرايبوسومات البكتيرية من بدء عملية تخليق البروتين قرب النهاية 5' لجزيئة الـ mRNA.

وبالتناقض من ذلك، ففي الكائنات حقيقية النواة، تميز الرايبوسومات الـ mRNA بواسطة الارتباط بقلنسوته ذات التركيب 7-methylguanosine عند النهاية 5' لجزيئة الـ mRNA (شكل 9.5). ثم يبدأ الرايبوسوم بفحص دقيق للـ mRNA منطلقاً من النهاية 5'، إلى أن يصل إلى التسلسل AUG والذي يمثل هنا كودون البدء initiation codon.



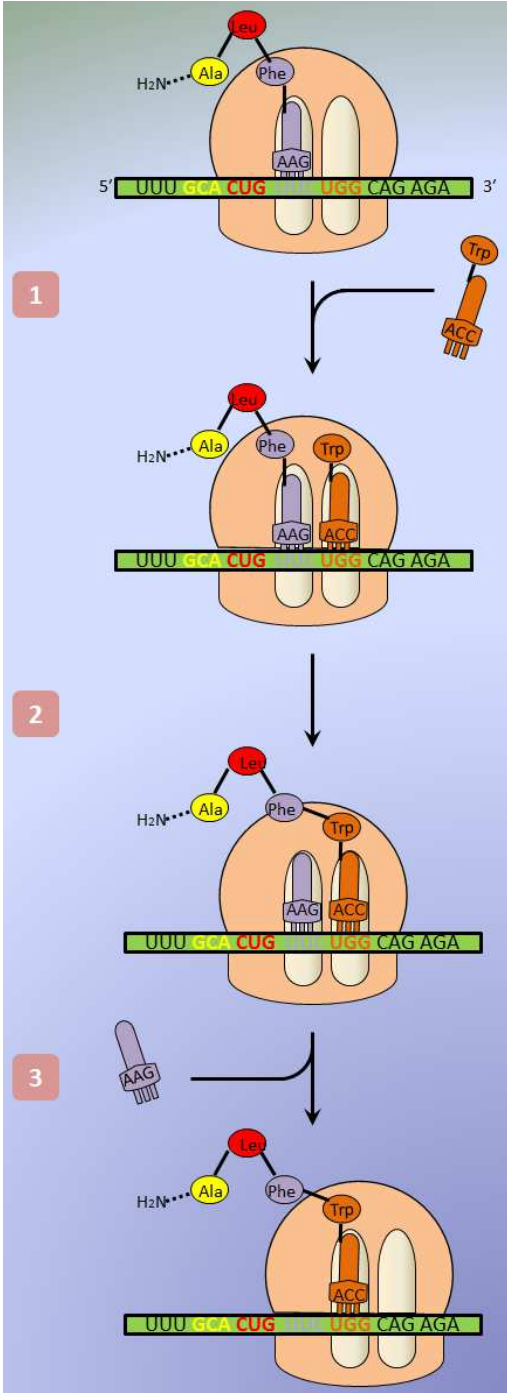
شكل (9.5): كيفية تمييز كودون البدء في رايبوسومات الخلايا بدائية وحقيقية النواة (تصميم المؤلف)

إن الآلية المستخدمة من قبل الكائنات حقيقية النواة لتمييز كودون البداية AUG ليست واضحة بشكل كامل، ولكن تقترح البحوث بأن رايبوسومات الكائنات حقيقية النواة وببساطة تفحص جزيئة الـ mRNA المرتبطة بها فحصاً دقيقاً (scanning) من قلنسوتها ذات النهاية 5' وتشخص أول كودون من نوع AUG حال عثورها عليه وتعتبره كموقع لبدء عملية الترجمة. إن هذه الآلية توصف بالمعقولة، لأن كل جزيئات mRNA حقيقية النواة تقريباً هي أحادية السسترون (والتي تشفر لببتيد مفرد). يتم تسهيل تشخيص كودون البدء بواسطة وجود تسلسل متفق عليه (يدعى بتسلسل كوزاك) والذي يحيط كودون البدء، ويتكون مما يقارب من 13 زوج قاعدي (GCCGCCACCAUGG)، والذي يقع معظمه ضمن منطقة 5' الغير قابلة للترجمة ليقوم بالارتباط وابتداء عملية الترجمة.



يتمثل الفرق الهام الآخر باحتياجات عملية بدء الترجمة في حقيقية النواة إلى عوامل بدء أكثر. والتي هي الأقل عشرة عوامل مختلفة كل منها يؤدي دور متميز في تسهيل عملية بدء الترجمة مقارنة بعوامل البدء الثلاث فقط الموجودة في الخلايا البكتيرية. بينما يتعلق الفرق الثالث بإضافة مجموعة الفورميل إلى أول ميثيونين. ففي معظم البكتيريا تبدأ الترجمة بالحامض الأميني methionine المحور بالفورميل formyl-modified methionine، بينما في اللبائن (شكل 10.5)، يستخدم الحامض الأميني methionine بصورته الغير محورة (ما عدا الماييتوكوندرية والكلوروبلاست، والتي رايبوسوماتها تشبه تلك الموجودة في البكتيريا). وفي الكائنات بدائية النواة، فإن إضافة الفورميل إلى الـ methionine في جزيئة الـ tRNA يبدو انه يخدم موقع الببتيد P-site في الرايبوسوم وذلك لأن إضافة الفورميل إلى الـ methionine يجعله يبدو كأصرة ببتيدي، وبما أن الموقع الببتيدي يتقبل الأواصر الببتيدي، لذا، تستقر جزيئة N-formylmethionyl- tRNA في الموقع الببتيدي. تحدث هذه العملية طبعاً لمرة واحدة فقط عند تصنيع البروتين.

شكل (10.5): مرحلة بدء عملية الترجمة في الخلايا حقيقية النواة. (1) ارتباط وحدة الرايبوسوم الصغيرة بعوامل البدء، (2) ارتباط الـ mRNA، (3) بسمح المسح "scanning" بتمييز كودون البدء عن طريق الارتباط بجزيئة الـ tRNA البادئة، (4) انفصال عوامل البدء وارتباط وحدة الرايبوسوم الثانوية الكبيرة بنظيرتها الصغيرة - يشير الحرف P الى الموقع الببتيدي ويظهر الحرف A الى الموقع الأميني، (5) ارتباط جزيئة الـ tRNA المحملة بالحامض الأميني والذي يرمز له AA، (6) تكوين أول أصرة ببتيدي (تصميم المؤلف).



تؤثر التسلسلات التي تحيط الكودون AUG على كفاءة هذا الكودون في هذا الموقع للتشفير عن الميثيونين، ولهذا، وفي العديد من الحالات، يتم تجاهل أول كودون من نوع AUG في جزيئة الـ mRNA حيث يعتبر هنا هذا الكودون هو كودون يؤذن لمرحلة البداية فقط دون أن يعبر عن أي حامض أميني، بينما إذا وقع هذا الكودون في مكان آخر يقرأ كبقية الكودونات الـ 61 لذا، يشفر عن الحامض الأميني methionine.

مرحلة الاستطالة elongation step

بعد أن يتكون معقد البدء، تتقدم عملية الترجمة وذلك بإطالة سلسلة متعدد الببتيد. إن آلية الاستطالة في الخلايا بدائية وحقيقية النواة متشابهة جداً. يمتلك الرايبوسوم ثلاث مواقع لارتباط الـ tRNA، وهي الموقع الببتيدي peptidyl site ويختصر P-site والموقع الأميني aminoacyl site ويختصر A-site وموقع المخرج exit-site ويختصر E-site. يرتبط الـ tRNA البدء initiator methionyl tRNA بالموقع الببتيدي P-site.

شكل (11.5): ملخص مرحلة الاستطالة في عملية تخليق البروتين في الكائنات حقيقية النواة (تصميم المؤلف).

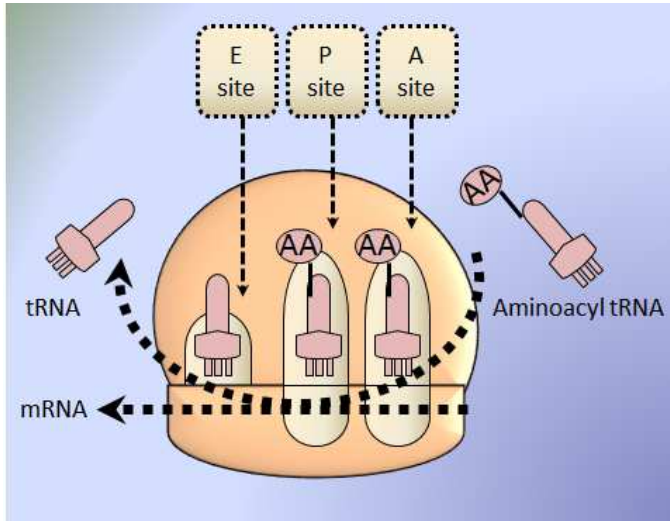
تذكر بأن جزيئة الـ tRNA المبدئة للعملية والمحملة بالحامض الأميني methionine مرتبطة حينها بالموقع الببتيدي P-site ومزدوجة قاعدياً مع كودون البدء AUG. فإذا كانت الشفرة المضادة anticodon لجزيئة aminoacyl-tRNA القادمة (الثانية) تطابق وبشكل صحيح ذلك الكودون في الـ mRNA ينشأ ارتباطاً قوياً عند موقع الحامض الأميني A-site. وإذا لم تطابق جزيئة aminoacyl-tRNA القادمة ذلك الكودون في جزيئة الـ mRNA، يؤدي ذلك إلى انفكاكها. بوجود جزيئة الـ tRNA الأولى المحملة بالحامض الأميني methionine عند الموقع الببتيدي P-site وجزيئة aminoacyl-tRNA القادمة المرتبطة بقوة بموقع الحامض الأميني A-site، تتفاعل مجموعة الأمين ألفا α amino group في الحامض الأميني الثاني مع الـ methionine المنشط في جزيئة الـ tRNA الأولى، مكوناً أصرة ببتيدية. إن الثورة الحادثة في مجال الكيمياء الحيوية أكدت بأن هذا التفاعل ينشط بواسطة إنزيم يدعى peptidyl transferase في حقيقة النواة، والذي يؤثر على انتقال سلسلة الببتيد النامية في جزيئة الـ tRNA الموجودة في الموقع الببتيدي إلى الحامض الأميني المنشط في جزيئة الـ aminoacyl-tRNA والموجود في الموقع الأميني A-site. إن عملية إطالة سلسلة متعدد الببتيد على الرايبوسوم هي دورة من ثلاث خطوات مميزة (شكل 11.5):

في الخطوة رقم 1 ، ترتبط جزيئة الـ aminoacyl-tRNA في الموقع الأميني الشاغر (المجاور لموقع الببتيد P-site المشغول) بواسطة تكوين أزواج قاعدية مع نيوكليوتيدات الـ mRNA الثلاث (الكودون) المتكشفة عند ذلك الموقع الأميني.

في الخطوة رقم اثنين، ينتهي ازدواج النهاية الكربوكسيلية لسلسلة متعدد الببتيد من جزيئة الـ tRNA في الموقع الببتيدي لتتصل بواسطة أصرة ببتيدية بالحامض الأميني المرتبط بجزيئة الـ tRNA في الموقع الأميني. وذلك لأن مجموعة الأمين ألفا α amino group في جزيئة الـ aminoacyl-tRNA الجديدة تقوم بالهجوم على (نوع الهجوم محب للنواة nucleophilic attack) على المجموعة الكربوكسيلية لجزيئة tRNA الببتيدية (peptidyl- tRNA) المحتلة للموقع الببتيدي P-site. يحفز هذا التفاعل الأساسي في تخليق البروتين من قبل إنزيم الـ peptidyl transferase، وهو مكون لمنطقة متخصصة من جزيئة الـ rRNA في الوحدة الثانوية الصغيرة للرايبوسوم. إن الفعالية الإنزيمية لهذه المنطقة هو أحد الأمثلة الحية لفعالية الرايبوزايم الحفزية ribozyme catalytic activity التي تتمتع بها بعض جزيئات الـ RNA (أنظر ملحق الفصل الرابع). ينتج التفاعل في ارتباط السلسلة الببتيدية النامية بجزيئة الـ tRNA عند الموقع الأميني A-site.

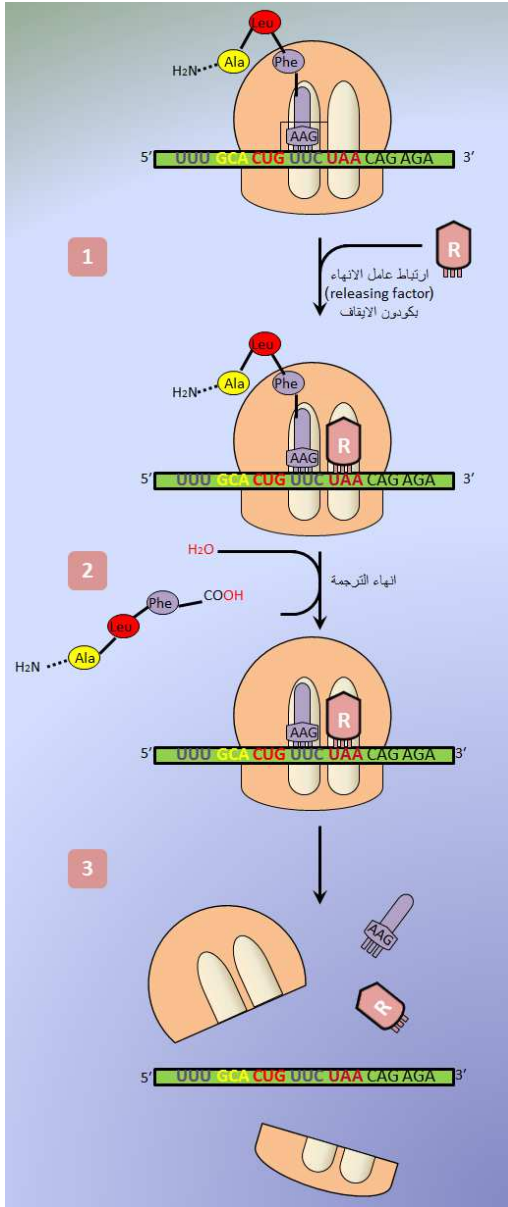
في الخطوة رقم 3، ينتقل الـ tRNA الببتيدي الجديد (new peptidyl tRNA) من

الموقع الأميني الى الموقع الببتيدي وذلك بحركة الرايبوسوم ثلاثة نيوكليوتيدات بالضبط على طول جزيئة الـ mRNA. تحتاج هذه الخطوة الى الطاقة والتي تؤدي الى استحداث سلسلة من التغيرات الفراغية في واحدة من المكونات الرايبوسومية وذلك بواسطة التحلل المائي لجزيئة الـ GTP بالإضافة الى دور عامل الاستطالة elongation factor الذي يجب أن لا يغفل في هذه العملية (وهو لتبسيط العملية غير موضح في الشكل 10.5). وبعد إزالة المجموعة الببتيدية من جزيئة الـ tRNA ، في الموقع الببتيدي P-site، تنفك جزيئة الـ tRNA المزالة بسرعة من الموقع الببتيدي P-site. وفي البكتيريا، يترك الـ tRNA الفارغ (المفرغة حمولته) الرايبوسوم عبر موقع آخر يدعى بموقع الخروج E-site، بينما في الكائنات حقيقية النواة فإنه يلفظ مباشرة الى الساييتوبلازم. وبعد اكتمال الخطوة رقم 3، يكون الموقع الأميني الغير مشغول حراً لكي يستقبل جزيئة الـ tRNA الجديدة المرتبطة بالحامض الأميني الجديد، والذي يبدأ الدورة من جديد. وفي البكتيريا كل دورة تحتاج الى حوالي جزء الى 20 جزء من الثانية تحت الظروف المثالية، ولهذا، يكتمل التخليق الكامل لبروتين بمعدل طول 400 حامض أميني بغضون 20 ثانية. تتحرك الرايبوسومات على طول جزيئة الـ mRNA في الاتجاه من 5' الى 3' ، وهو نفس اتجاه تخليق البروتين كما تم مناقشة ذلك سلفاً (راجع شكل 6.5). تنتقل جزيئة الـ tRNA الببتيدية (peptidyl-tRNA) المتكونة حديثاً مع الكودون المطابق لها الى الموقع الببتيدي P-site ليصبح الموقع الأميني A-site مستعداً لاستقبال دورة جديدة من جزيئات الـ aminoacyl- tRNA. يتضح من هذا ان تدفق الـ tRNA هو عبر موقع A، مروراً بموقع P، والى الخارج من خلال موقع E (في بدائية النواة). يقارن الشكل (12.5) بين حركة الـ tRNA والـ mRNA وعلى الرغم من اختلاف سلوكهما الواضح إلا أن لهما نفس الاتجاه في الحركة.



شكل (12.5): حركة الـ tRNA والـ mRNA وينفس الاتجاه خلال الرايبوسوم (تصميم المؤلف)

مرحلة الانتهاء termination



عندما تصل السلسلة إلى كودون الإيقاف لجزيئة الـ mRNA فأنها تقع ويتحرر البروتين المتكون. يعرف هذا بالانتهاء termination. ومن المهم أن نعرف بأنه خلال هذه العملية، بأن العديد من الإنزيمات أما أن تساعد أو تسهل من العملية بأكملها. فيعد عدة دورات من الاستطالة للبرمة الأحماض الأمينية إلى جزيئة بروتين، يظهر كودون الإنهاء في الموقع الأميني A-site anticodon مضاد للشفرة للانتهاء قادرة على تمييز إشارة الانتهاء termination signal. ولكن ما يعرف بعوامل التحرير releasing factors فإنها تكون قادرة على تمييز إشارة الانتهاء الواقعة في الموقع الأميني A-site (شكل 13.5).

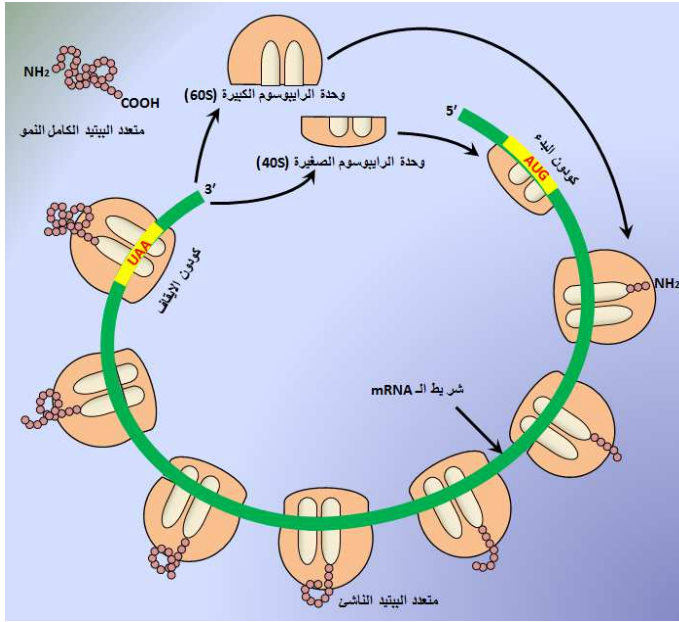
شكل (13.5): مرحلة الانتهاء في عملية تخليق البروتين في الكائنات بدائية وحقيقية النواة. (1) ارتباط العامل المحرر على كودون الإيقاف ينهي عملية الترجمة، (2) يتحرر الببتيد الذي قد تم تخليقه، (3) ينفك الرايبوسوم إلى وحدتيه المنفصلتين (تصميم المؤلف).

يحث عامل التحرير، وبالارتباط مع مصدر الطاقة GTP وإنزيم peptidyl transferase على التحلل المائي للأصرة بين الببتيد وجزيئة الـ tRNA الذي ما زال محتلا الموقع الببتيدي P-site. يحرر هذا التحلل المائي البروتين وجزيئة الـ tRNA من الموقع.

بعد التحلل المائي والتحرر، ينفك الرايبوسوم إلى وحدتيه الثانويتين الكبيرة والصغيرة، والتي سوف يعاد الاستفادة منها في عمليات تخليق بروتينية لاحقة. ولهذا، فإن عوامل التحرر هي بروتينات تحلل آصرة جزيئة peptidyl- tRNA مائياً وذلك عندما يحتل كودون الانتهاء الموقع الأميني A-site.

دور الرايبوسومات في عملية تخليق البروتين

تستطيع العديد من الرايبوسومات أن تترجم نفس جزيئة الـ mRNA بوقت متزامن. ولكن، وبسبب حجمها الكبير نسبياً، لا تقدر جزيئات الرايبوسوم على الارتباط بالـ mRNA بمسافة أقصر من 80 نيوكليوتيدة عن بعضها البعض (أي أن أصغر مسافة بين رايبوسومين يعملان على نفس جزيئة الـ mRNA هي 80 نيوكليوتيدة). وعندما تعمل الرايبوسومات معاً على نفس جزيئة الـ mRNA، تعمل على تكوين ما يعرف بمتعدد الرايبوسوم polysome، أو يطلق عليه اختصاراً polysome، والتي يتناسب عددها طردياً بزيادة طول جزيئة الـ mRNA (شكل 14.5).



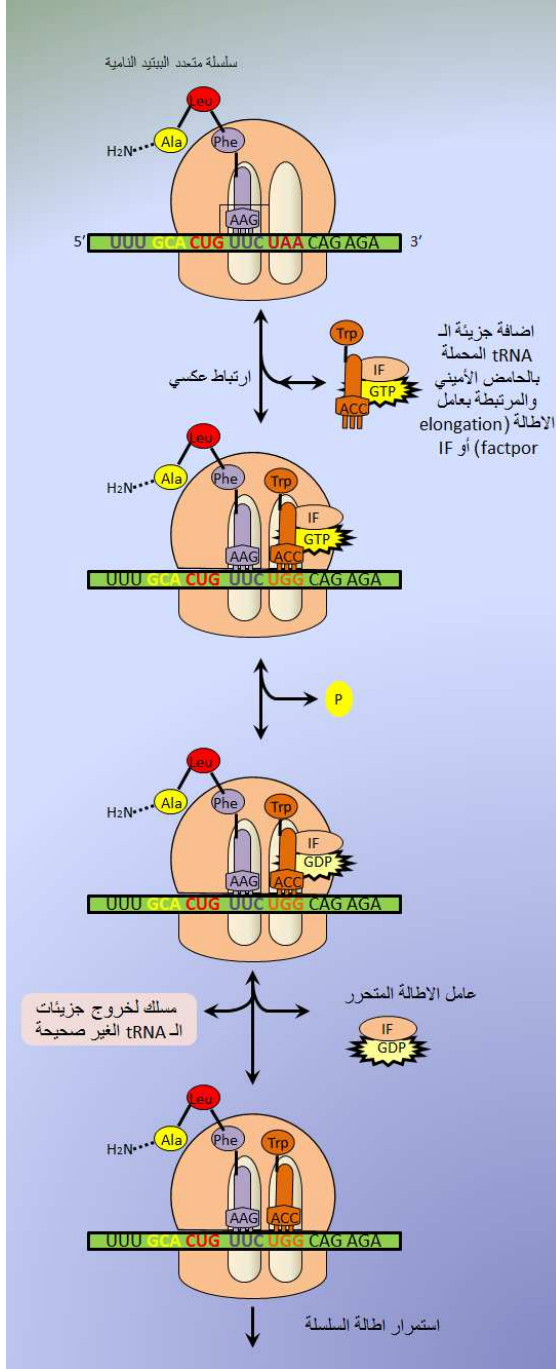
شكل (14.5): معقد الـ polyribosome. يبين هذا المخطط كيف يمكن لسلسلة من الرايبوسومات من أن تحفز ترجمة نفس جزيئة الـ mRNA بشكل متزامن (تصميم المؤلف).

يستطيع الرايبوسوم الواحد في اللبائن من تخليق ما يقارب 100 آصرة ببتيدية في كل دقيقة. ويقوم متعدد الرايبوسومات وبفعالية بتخليق بروتينات ممكن أن توجد كدقائق حرة في السايوبلازم، أو ربما ترتبط بلفائف مادة غشائية سايتوبلازمية تدعى بالشبكة الاندوبلازمية الداخلية endoplasmic reticulum. ان ارتباط متعدد الرايبوسومات بالشبكة الاندوبلازمية

الداخلية يكون مسؤولاً عن المظهر "الخشن" الذي تتميز به بعض مناطق هذه الشبكة في المجهر الإلكتروني electron microscopy. ينبثق البروتين المنتج من متعدد الرايبوسوم المرتبطة على الشبكة الاندوبلازمية الداخلية إلى حيز مفتوح يدعى بفراغ السسترنال cisternal space والذي يتواجد بين لفائف الشبكة الاندوبلازمية، ويتم تصديره من هناك. تبعاً لبعض نواتج بروتينات الشبكة الاندوبلازمية الداخلية بواسطة جهاز كولجي Golgi apparatus ومن ثم إلى دقائق الزايموجين zymogen particles وذلك لغرض التصدير النهائي. تستخدم كلمة زايموجين لوصف مولدات البروتين (protein precursors) أي البروتينات الأولية والتي فيما بعد تتحول إلى بروتينات ناضجة بعدة وسائل.

هل هنالك تدقيق في عملية الترجمة؟

لوحظ وجود معدلات خطأ في عملية تخليق البروتين مقارنة لحمض أميني واحد لكل 10000 حمض أميني متبلر، وهذا يعني أن جزيئة بروتينية واحدة بمعدل 400 حمض أميني لا بد من أن تحتوي على خلل. لهذا، طورت الخلايا آليات تدقيق proofreading mechanisms لتقليل عدد الأخطاء في تلك الخطوات الأساسية في تخليق البروتين. استخدمت الخلية آليتين مختلفتين من الإصلاح، كلاهما يصرف طاقة، لأنه ثمناً لا بد له من أن يدفع لأي زيادة حادثة في النشاط البروتيني للخلية. تستخدم آلية بسيطة نسبياً وذلك لتحسن كفاءة ارتباط الحامض الأميني بالـ tRNA. وهذا يتضح من وجود موقعين فعالين لإنزيم aminoacyl tRNA synthetase بدلاً من موقع واحد. فبينما يقوم الموقع الأول بعملية تحميل الحامض الأميني يميز الموقع الآخر الحامض الأميني المرتبط بشكل خاطئ بجزيئة الـ tRNA ويزيله بواسطة التحلل المائي. وتعد هذه الخطوة مكلفة من ناحية الطاقة حالها في ذلك حال عملية التدقيق المستخدمة في تضاعف الـ DNA (راجع الفصل الثالث). أما الآلية الأخرى المستخدمة لتحسين أمانة ازدواج الـ codon - anticodon فتتمثل بتكوين معقد مع بروتين متوفر في الخلية يدعى عامل الاستطالة (EF) elongation factor حال اكتساب جزيئات الـ tRNA الحامض الأميني. يرتبط هذا البروتين بإحكام بكلا الحامض الأميني والـ tRNA الذي يزدوج مع الكودون الملائم في جزيئة الـ mRNA. يسمح عامل الاستطالة المرتبط بحدوث ازدواج الكودون مع الكودون المضاد ولكنه يمنع من انحشار الحامض الأميني في سلسلة متعدد الببتيد النامية. ان تمييز الكودون الأولي، على أية حال، يؤدي إلى أن يحلل مائياً مركب الـ GTP (إلى GDP و فوسفات غير عضوية)، بينما ينفك عامل الإطالة من الرايبوسوم بدون جزيئة الـ tRNA المرتبط بها سمحاً بتقدم عملية تخليق البروتين.



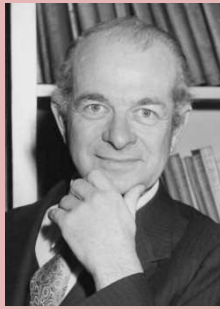
وبهذه الطريقة يؤدي عامل الاستطالة إلى تأخر قصير في الازدواج القاعدي بين الكودون ومضاد الكودون وفي استطالة متعدد الببتيد، وهذا يؤدي إلى خلق فرصة لجزيئة الـ tRNA لكي تخرج من الريبوسوم، وربما تكون هذه الخطوة هي المسؤولة عن بطئ عملية الترجمة (40 حامض أميني بالثانية تقريباً) مقارنة بالتضاعف (1000 نيوكليوتيدة أو أكثر بالثانية الواحدة).

شكل (15.5): عملية تدقيق جزيئة الـ RNA الصحيحة على الريبوسوم أثناء عملية الترجمة (تخليق البروتين). توجد تفاصيل أكثر في الخطوة 1 في مرحلة الاستطالة لتخليق البروتين والتي تبين كيف يمكن في عملية الارتباط الأولية لجزيئة الـ aminoacyl-tRNA من أن يرتبط بشكل مؤقت بالكودون عند موقع الأميني في الريبوسوم A-site. هذا الازدواج يحفز التحلل المائي لجزيئة الـ GTP بواسطة عامل الاستطالة ممكناً من إنفكاك عامل الاستطالة من جزيئة الـ aminoacyl-tRNA ، والتي يمكن لها الآن من أن تشارك في عملية إطالة السلسلة. التأخر بين ارتباط الـ aminoacyl-tRNA ووفرتة لتخليق البروتين ولهذا السبب يدخل في آلية تخليق البروتين. ونتيجة، فقط جزيئات الـ tRNAs ذات الكودون المضاد الصحيح يمكن لها أن تبقى مزدوجة بالـ mRNA بما يكفي من الوقت لكي تضاف لسلسلة متعدد الببتيد النامية. ان عامل الاستطالة، والذي هو عبارة عن بروتين متوفر، والذي يدعى بـ EF-Tu في بدائية النواة وef-1 في حقيقية النواة (تصميم المؤلف).

تكون جزيئة الـ tRNA الغير صحيحة عدداً أقل من الأواصر الهيدروجينية بين الكودون ومضاد الكودون مقارنة بجزيئة الـ tRNA الصحيحة: ولهذا ترتبط بصورة أضعف بالرايبوسوم ويحتمل أكثر من أن ينفك خلال هذه المرحلة. وبسبب التأخر المتسبب من قبل عامل الاستطالة تغادر جزيئات tRNA للرايبوسوم المرتبطة به بشكل غير صحيح من دون أن تستخدم في عملية تخليق البروتين، حيث يزيد هذا العامل من معدل الأحماض الأمينية الصحيحة إلى الغير صحيحة المندمجة في البروتين (شكل 15.5).

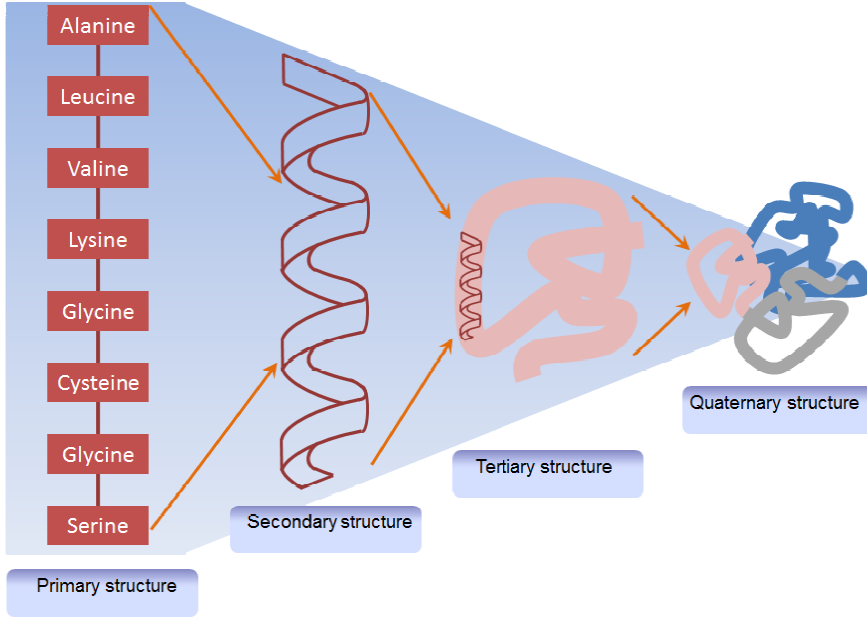
تركيب البروتين (Protein Structure)

تعد البروتينات جزيئات ثلاثية الأبعاد والتي تتجر معظم الوظائف الخلوية. فبينما يحدد الـ DNA الصبغة الوراثية genotype، فإن الصبغة المظهرية phenotype للخلية هي نتيجة فعل البروتين. كل حامض أميني يحتوي على مجموعة وظيفية متفردة (والتي تسمى أيضاً R group) والتي تؤسس لفعاليتها الكيميائية. ومع تقدم عملية الترجمة، تبدأ المجاميع الفعالة في الأحماض الأمينية لمتعدد الببتيد بالتداخل مع بعضها البعض. وعند حدوث هذا، يبدأ البروتين بالانحناء إلى شكله ذو الأبعاد الثلاثية. إن هنالك أربع مستويات من تركيب البروتين (شكل 16.5). التركيب الابتدائي للبروتين يمثل التسلسل الخطي للأحماض الأمينية كما هو محدد من قبل التسلسل النيوكليوتيدي في جزيئة الـ mRNA. وهذه هي المعلومة المحتواة ضمن اكسون الجين (راجع الفصل الثاني). إن الجين المفرد ينتج ربما متعددات ببتيدية بتراكيب أولية مختلفة. هذا ولا تستطيع معظم البروتينات أن تبقى بتركيبها الابتدائي وذلك لأن المجاميع الوظيفية لسلسلة متعدداتها الببتيدية المتكونة خلال الترجمة تبدأ بالتداخل مكونة للتراكيب الثانوية (secondary structures) والثالثية (tertiary structures). يشير



Linus Pauling

التركيب الثانوي إلى الاصطفافات المستقرة تحديداً لمخلفات الأحماض الأمينية والتي تعطي أنماط تركيبية متكررة. وهكذا يتألف المستوى الثاني من تركيب البروتين من سلسلة من الطيات ضمن سلسلة متعدد الببتيد. إن هذه الأنماط هي نتيجة الأواصر الهيدروجينية بين المجاميع الفعالة لأحماض أمينية معينة. تنتج أنماط معينة من الأحماض الأمينية في تكوين التركيب الحلزوني الذي يدعى بالحلزون ألفا (α -helix) والمكتشف من قبل العالم Linus Pauling. وهذا التركيب لا يشبه جزيئة حلزون الـ DNA المزدوج بل بدلاً من ذلك تتميز بنمط حلزوني متفرد يختلف عن ذلك الملاحظ في حلزون الـ DNA المزدوج.



شكل (16.5): أربع مستويات من تركيب البروتين، مرتبة من اليسار (التركيب الأولي) إلى اليمين (التركيب الرابعي)، في يسار الشكل تكون الأصرة الوحيدة الرابطة في التركيب الأولي تقتصر على الأواصر الببتيدية بين الأحماض الأمينية، ثم تتنوع وتتعدد تلك الأواصر إلى أن تصل إلى التركيب الرابعي (تصميم المؤلف).

هنالك مجاميع أخرى من الأحماض الأمينية يمكن أن تكون شكل يشبه الصفحة المتعرجة في متعدد الببتيد. ويدعى هذا الشكل بصفحة بيتا (β -sheet). ويمكن لمتعدد الببتيد من أن يصنع كلا المظهرين حلزون ألفا وصفحة بيتا في نفس جزيئة البروتين، وليس لمرة واحدة فقط، بل لعدة مرات لكل مظهر. أما التركيب الثالثي tertiary structure فيصف كل مظاهر الطيات ثلاثية الأبعاد three dimensional folding في متعدد الببتيد. ويمكن أن يتكون التركيب الثانوي والثالثي في متعدد الببتيد بشكل متزامن. ويتكون التركيب الثالثي، يصنع متعدد الببتيد معقد بشكل ثلاثي الأبعاد والذي يحدد وظيفة البروتين في الخلية. تنجز العديد من البروتينات وظيفتها عند هذا المستوى من التنظيم. أما عندما يحتوي البروتين على أكثر من وحدة ثانوية (subunit) واحدة، فيدعى اصطفاؤها في الفضاء يدعى بالتركيب الرابعي quaternary structure (حيث يطلق على سلاسل متعدد الببتيد للبروتين ذو التركيب الرابعي بالوحدات الثانوية). يدعى ارتباط هذه الببتيدات المتعددة أو الوحدات الثانوية المتعددة بالمستوى الرابعي لتركيب البروتين (شكل 16.5). ليست كل البروتينات تستغل التركيب الرابعي، ولكن تلك التي يمكن لها أن تقوم بذلك فانها تستطيع أن تكون تراكيب كبيرة جداً. وعلى أية حال، تتعرض البروتينات بعد تخليقها وطبها إلى تحويلات معينة الهدف

منها اضافة البصمة الأخية على تلك البروتينات لكي تؤدي الدور المناط بها في الخلية أو في خارج الخلية. تدعى تلك التحويرات بالتحويرات مابعد الترجمة post-translational modifications.

تحويرات ما بعد الترجمة Post-transcriptional Modifications

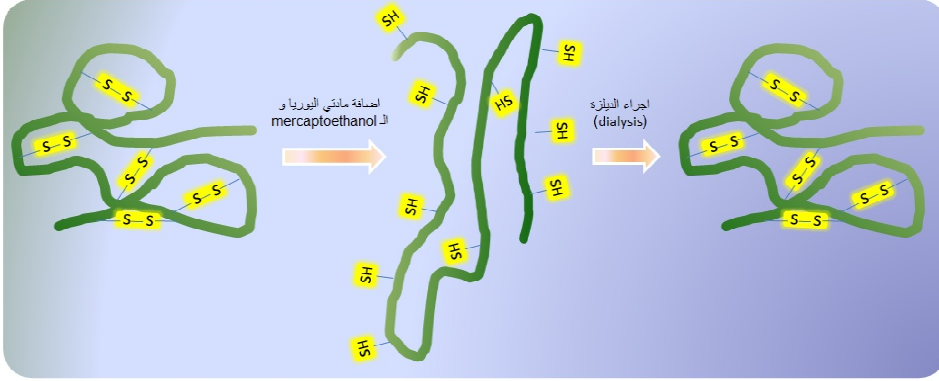
يمكن تعريف معنى السيطرة ما بعد الترجمة بتلك الآليات التي يمكن بواسطتها معالجة البروتين بعد عملية الترجمة، وقد تتم هذه المعالجة بتحويل التركيب الثلاثي للبروتين أو بتحويل السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية أو بتحويل العمود الفقري للبروتين نفسه كما سيوضح ذلك في أدناه. وبما أن البروتين يتألف من سلسلة من الأحماض الأمينية التي يبلغ عددها عشرين، لذا، فإن كلا ترتيب وهوية تلك الأحماض الأمينية يكونان مهمين في تحديد الدور الذي يلعبه ذلك البروتين في الخلية. ويمكن هذه التغيرات من أن تغير في تركيب ووظيفة البروتين، أو يمكن لها من أن تحدد عمر البروتين نفسه.

أولاً: تحويل التركيب البروتيني ثلاثي الأبعاد (Three dimensional structure modifications)

تنتهي عملية الترجمة جريان المعلومات الوراثية ضمن الخلية. إن تسلسل النيوكليوتيدات في الـ DNA قد تحول الآن إلى تسلسل أحماض أمينية في البروتينات. إن تخليق متعدد الببتيد polypeptide، على أية حال، ليس كافياً لإنتاج بروتين فعال. ولكي يكون متعدد الببتيد الناتج من عملية الترجمة مفيداً، فلا بد من أن ينطوي إلى هيئة ثلاثية الأبعاد متميزة distinct 3 dimensional conformation. لذا، تعاني العديد من البروتينات تحويرات أخرى، والتي هي ضرورية لوظيفة وموضع تلك البروتينات في الخلية. إن المثال التقليدي لطبي البروتينات هو أن كل المعلومات الضرورية للبروتين لكي يتخذ هيئته الثلاثية الأبعاد الصحيحة مجهزة من قبل تسلسل أحماضه الأمينية. إن هذا قد تم إثباته من قبل تجارب Christian Anfinsen والتي أجراها على بروتين الـ RNase، وحصل على جائزة نوبل في الكيمياء سنة 1972 نتيجة لهذا الاكتشاف، حيث أثبت العالم Anfinsen بأن بروتين الـ RNase الممسوخ يمكن له أن يعد طيه تلقائياً خارج جسم الكائن الحي *in vitro* ليرجع إلى هيئته الفعالة (شكل 17.5).



Christian Anfinsen



شكل (17.5): عملية الـ renaturation التلقائية بعد عملية الـ denaturation في بروتين الـ RNase (تصميم المؤلف).

إن اكتشاف قدرة انزيم الـ RNase على أن يرجع حالة الطي الطبيعية فيه (عملية الـ renaturation التلقائية) من دون اضافة عوامل خلوية إضافية، جعلت العلماء يظنون بأن ما يحصل لبروتين RNase ينطبق على بقية البروتينات الأخرى. ولكن معظم التجارب الحديثة قد بينت حاجة عملية الطي الصحيح للبروتينات ضمن الخلية إلى توسط فعاليات بروتينات أخرى. في البكتريا تساهم بروتينات معينة (أنظر أدناه) تدعى بالوصيفات chaperones في طي 85% من البروتينات، بينما في الكائنات حقيقية النواة يوجد نسبة حتى أعلى من ذلك من تلك البروتينات التي تعتمد بشكل كبير على الوصيفات في عملية طيها.

يطلق على البروتينات التي تسهل عملية طي بروتينات أخرى بالوصيفات الجزيئية molecular chaperones. ان مصطلح chaperones أو "وصيفات" قد استخدم للمرة الأولى لوصف بروتين الـ nucleoplasmin الضروري لتراكب النيوكليوسومات من DNA و histone (راجع الفصل الثاني). يرتبط بروتين الـ nucleoplasmin بالهستونات ويساعد على تراكبها إلى نيوكليوسومات، ولكن تركيب الـ nucleoplasmin نفسه لا يندمج في تركيب النيوكليوسوم النهائي. وهكذا تعمل الوصيفات الجزيئية على تسهيل عملية التراكب من دون أن تكون جزءاً من المعقد المتراكب. وبينت تجارب لاحقة بأن للوصيفات الجزيئية دوراً أساسياً في تسهيل عملية طي البروتينات. تقع الوصيفات في كل ردة خلوية، وترتبط بمدى واسع من البروتينات، والتي تعمل في آلية الطي العامة للبروتينات. هذا وميز الباحثين عائلتين أساسيتين للوصيفات:

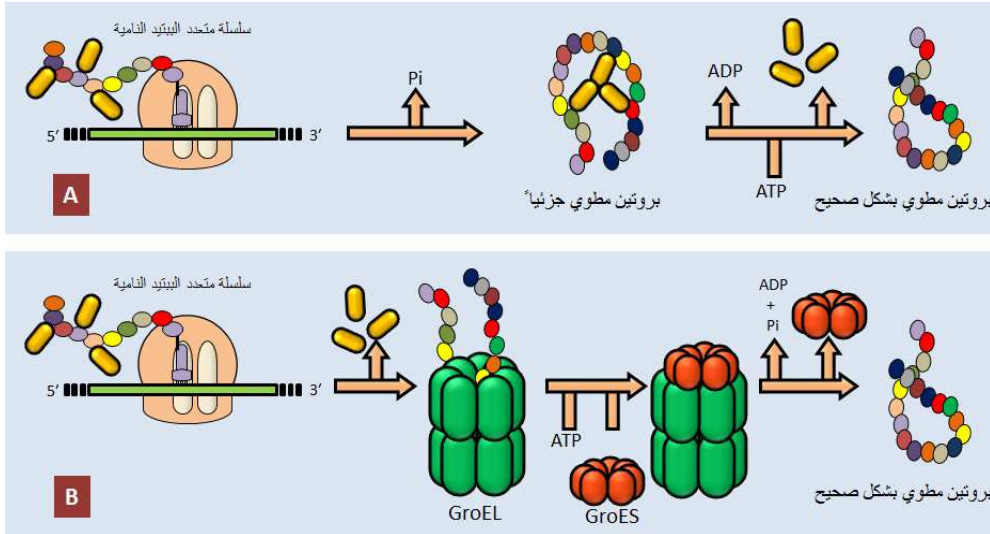
- الوصيفات الجزيئية molecular chaperones، والتي ترتبط وتثبت البروتينات الغير مطوية أو المطوية جزئياً، وبهذه الطريقة تمنع تلك البروتينات من التراكب والتحطم.

• الوصيفات المصغرة chaperonins، والتي تسهل طي البروتينات مباشرة.

تتألف الوصيفات الجزيئية من بروتينات الصدمة الحرارية heat shock proteins (Hsp70) و 70 ونظيراته المماثلة له: كما في الـ Hsp70 في السايكوزول cytosol وقلب المايكوتونديريا mitochondrial matrix ، الـ BiP في الشبكة البلازمية الداخلية endoplasmic reticulum ، والـ DnaK في البكتيريا. شخّصت تلك البروتينات لأول مرة وذلك بسبب ظهورها السريع بعد إجهاد الخلية بدرجات حرارية عالية، ومن هنا جاء الاسم. إن الـ Hsp70 ونظيراته من البروتينات الأخرى هي الوصيفات الرئيسية في كل الكائنات. عندما يرتبط الـ Hsp70 أو نظيراته المماثلة له بمركب الـ ATP تبدي تلك البروتينات شكلاً مفتوحاً والذي به يرتبط الجيب الكارهة للماء المتكشف بشكل مؤقت بالمناطق المتكشفة الكارهة للماء للبروتين الهدف الغير مطوي. يسبب التحلل المائي للـ ATP المرتبط أن تصنع الوصيفات الجزيئية شكلاً مغلقاً والذي ينطوي فيه البروتين الهدف. إن آلية عمل الوصيفات الجزيئية هو أنها تمنع تكوين التراكيب الغير صحيحة بدلاً من تحفيز تكوين التراكيب الصحيحة. وعلى سبيل المثال، ترتبط الوصيفات الجزيئية في بدائية النواة بسلسلة متعددة الببتيد الناشئة nascent polypeptide chain والتي مازالت في طور الترجمة من قبل الرايبوسومات، وبهذا تمنع الطي الغير صحيح incorrect folding لسلسلة متعددة الببتيد منذ بداية تخليقها. إن استبدال مركب الـ ADP وحله محل الـ ATP يلعب دوراً أساسياً في تحرير البروتين الهدف. تسرع هذه الدورة من قبل بروتين معين يعرف بمصاحب الوصيفات Hsp40 co-chaperone في الكائنات حقيقية النواة والذي يصاحب في عمله للوصيف Hsp70، و بروتين co-chaperone DnaJ في البكتيريا المصاحب في عمله للوصيف DnaK حيث يعتقد بأن الوصيفات الجزيئية ترتبط بكل سلاسل متعددة الببتيد الناشئة وهي مازالت في طور التخليق في الرايبوسوم.

إن الطي الصحيح لأنواع عديدة من البروتينات المخلفة حديثاً أو البروتينات المنقولة يحتاج الى مساعدة الوصيفات الصغيرة chaperonins. تتكون تلك التراكبات من حلقتين من السلاسل الببتيدية المتعددة oligomeres. يتألف الوصيف الصغير TriC في الكائنات حقيقية النواة من 8 وحدات ثانوية لكل حلقة. أما في البكتيريا والمايكوتونديريا والكلوروبلاست هنالك وصيف صغير يدعى بالـ GroEL الذي يتكون من حلقتين، كل حلقة تتألف من سبع وحدات ثانوية. تعمل آلية طي وصيف الـ GroEL (والتي هي مفهومة بشكل أكبر مقارنة بالآلية المتوسطة من قبل وصيف TriC الصغير في حقيقة النواة) كموديل عام. في البكتيريا، يتم حشر متعدد الببتيد الغير مطوي unfolded أو المطوي بشكل خاطئ misfolded في تجويف الـ GroEL ، والذي يرتبط بالجدار الداخلي وينطوي الى الهيئة الطبيعية الصحيحة. وفي خطوة معتمدة على الـ ATP، يعاني الوصيف الصغير GroEL تغييراً في هيئته

الفراغية conformational change ويحرر البروتين المطوي في خطوة معتمدة على وجود الوصيف المصاحب GroES كمشغل لهذا عملية، حيث يعمل الأخير كقلنسوة تسد نهايات الوصيف GroEL. يكون الـ GroES تركيباً يشبه القبة dome like structure والذي يرتبط بسطح واحد للحلقة المزدوجة، وهكذا فإنه يغطي فتحة الاسطوانة. يمكن لنا أن نفرق (كما في الشكل 18.5) بين حلقتي الـ GroEL، حيث نطلق على الأولى بالحلقة القريبة proximal ring (المرتبطة بـ GroES) والحلقة الثانية بالحلقة البعيدة distal ring (الغير مرتبطة بـ GroES). إن سبب تسمية الـ GroEL بالـ chaperonin، والـ GroES بـ GroES بمراقف الـ chaperonin (co-chaperonin)، وذلك لأن الـ GroEL يلعب دوراً أساسياً في قيادة عملية الطي folding process، أما الـ GroES فيساعده على أداء عمله فقط.



شكل (18.5): عملية طي البروتين المتوسطة من قبل الوصيفات - الوصيفات الصغيرة chaperone-chaperonin mediated. تنطوي العديد من البروتينات بتهيئتها الصحيحة ثلاثية الأبعاد بمساعدة المناظرات المماثلة للـ Hsp70 (في أعلى الشكل). تلك الوصيفات الجزيئية ترتبط مؤقتاً بسلسلة متعدد الببتيد الناشئة وذلك عند خروجها من الرايبوسوم. أما الطي الصحيح للبروتينات الأخرى (في أسفل الشكل) فيعتمد على الوصيفات الصغيرة كما في الـ GroEL في بدائية النواة، والذي هو عبارة عن معقد برميلي الشكل ذو اسطوانة مجوفة يتألف من 14 وحدة ثنائية مصطفة على شكل حلقتين الواحدة فوق الأخرى. يتم إغلاق إحدى نهايتي الـ GroEL بشكل مؤقت من قبل الوصيف الجزيئي GroES (تصميم المؤلف).

أما دور بروتينات Hsp70 فيتلخص في مساعدة البروتين الناشئ في عملية الطي نسبياً ريثما تسلمه إلى تركيب الـ GroEL لاكتمال عملية الطي فيه. ثم ترتبط مادة التفاعل substrate المتمثلة بالبروتين الناشئ حديثاً بالحلقة البعيدة في تركيب الـ GroEL مسببة انتفاخ التجويف المركزي central cavity فيه. وعندما ينغلق GroES على الـ GroEL،

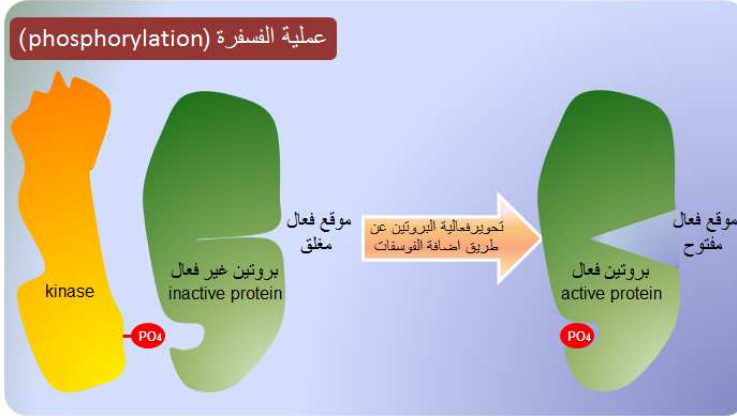
فانه يسبب تغيير في هيئة حلقة GroEL القريبة، مسبباً زيادة في تجويفها المركزي بينما ، وفي نفس الوقت، يقل فيه انتفاخ التجويف المركزي في الحلقة البعيدة. إن الطاقة التي تقود هذا التفاعل هي التحلل المائي hydrolysis للـ ATP. لذا، وبعد اكتمال عملية معالجة البروتين داخل معقد GroEL\GroES تقل ألفة GroEL لـ GroES بسبب التحلل المائي للـ ATP، وهذا يؤدي بدوره إلى تحرر البروتين المعالج. بالإضافة إلى ذلك، فإن التحلل المائي للـ ATP في الحلقة البعيدة يكون ضرورياً لقذف البروتين المعالج من قبل هذا المعقد، تحدث هذه الخطوة عند اكتمال معالجة البروتين. لكن إذا لم يكن البروتين قد عولج بشكل كاف، يتنبه هذا المعقد إلى ذلك، ويعمل على إعادة الكرة عليه من جديد إلى أن يصل ذلك البروتين إلى هيئته الناضجة mature conformation، وعندها سوف لا يجد معقد GroEL\GroES مادة تفاعل يعمل عليها، ليتحرر البروتين حينها من سطوة معقد GroEL\GroES عليه، ثم يذهب إلى تأدية وظيفته المحددة.

ثانياً: تحويل سلاسل الأحماض الأمينية الجانبية للبروتين (Amino acids side chains modifications)

تحتوي العديد من البروتينات، كما في انزيمات الـ RNase A والكيموتريبسين مثلاً، على أحماض أمينية فقط ولا تحتوي على أي مركبات كيميائية أخرى، وتدعى تلك البروتينات بالبروتينات البسيطة simple proteins. ولكن بعض البروتينات تحتوي على بشكل دائم على مكونات كيميائية إضافة إلى الأحماض الأمينية، ولذلك تدعى بالبروتينات المقترنة conjugated proteins. ويدعى المكون الكيميائي الذي هو ليس بالحامض الأميني بالـ prosthetic group. تصنف البروتينات المقترنة على أساس الطبيعة الكيميائية للـ prosthetic group إلى عدة أصناف، كما في البروتينات الدهنية lipoproteins، أي الحاوية على مجموعة دهنية، وبروتينات سكرية glycoproteins، أي الحاوية على مجموعة سكر، وبروتينات معدنية metalloproteins، أي الحاوية على معدن معين. كما تحتوي العديد من البروتينات على أكثر من prosthetic group. وفي الحقيقة، تلعب تلك المجموع دوراً مهماً في وظيفة البروتينات البايولوجية. وعلى أية حال، يمكن انجاز السيطرة ما بعد الترجمة لوظيفة البروتين أو تركيبه بواسطة عدة طرق منها التحويل الكيميائي المذكور للسلسلة الجانبية للحامض الأميني amino acid side chain. على الرغم من وجود العديد من التحويلات الكيميائية للسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية كما هو مبين في أعلاه، لكن نكتفي هنا بإيضاحاً لنموذجيين لمثل تلك التحويلات (شكل 19.5):

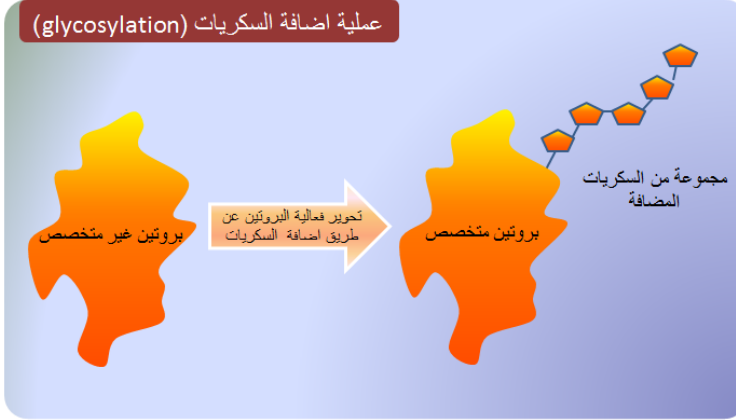
(أ). الفسفرة phosphorylation: تتضمن الفسفرة إضافة الفوسفات إلى السلسلة الجانبية للحامض الأميني، وهي إما أن تكون مجموعة الهيدروكسيل في الحامض الأميني serine أو الـ threonine أو الـ tyrosine. تنتج هذه التحويلات من عمل بروتين يعرف بالـ

kinase والذي يستخدم الـ ATP كمصدر للفوسفات. ويمكن للفوسفات من أن تزال بواسطة إنزيم آخر يعرف بالـ phosphatase. يمكن للفسفرة من أن تحور وظيفة البروتين، ونتيجة هذا التحوير هو تغير في دور البروتينات الطبيعي ذات العلاقة في مسالك الإشارات الخلوية cellular signaling pathways. ويمكن للفسفرة الشاذة من أن تؤدي الى تحطم في دورة الخلية وحث السرطان.



شكل (19.5): آلية السيطرة ما بعد الترجمة بواسطة فسفرة البروتينات (تصميم المؤلف)

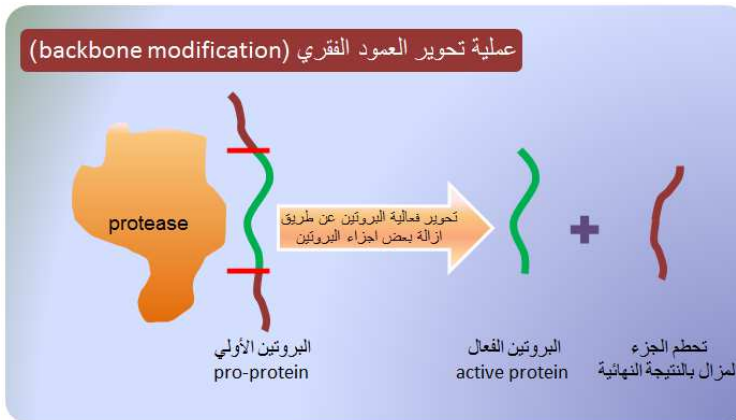
(ب). الـ glycosylation والتي يمكن أن تتضمن إضافة واحدة أو أكثر من السكريات إلى السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية، ويتم ذلك أما خلال الترجمة أو بعدها، وذلك لتكوين ما يعرف بالـ glycoprotein (بروتين يحتوي على مجموعة سكر مرتبطة به). تربط مجاميع السكر أما بسلسلة النتروجين الجانبية للحامض الأميني asparagines، أو بمجموعة الهيدروكسيل الموجودة بالحامض الأميني الـ serine أو الـ threonine. يمكن أن يكون تركيب هذه الكربوهيدرات معقد ومتنوع وغالباً لا يؤثر على وظيفة البروتين بشكل مباشر. وعلى أية حال، يمكن للـ glycosylation من أن يؤثر على ذوبانية البروتين، أو لاستهدافه لمكان محدد في الخلية، أو على طياته في تكوين تركيب ثلاثي الأبعاد، أو على فترة حياته، أو على تداخله مع بروتينات أخرى. إن البروتينات التي تعد مثلاً نموذجياً لهذا النوع من التحويرات هو بروتينات الـ glycoprotein الموجودة على السطح الخارجي للغلاف البلازمي للخلية والتي تعمل كمستقبلات متخصصة لجزيئات مختلفة (شكل 20.5).



شكل (20.5): آلية السيطرة ما بعد الترجمة بواسطة اضافة مجاميع السكريات (تصميم المؤلف)

ثالثاً: تحويل العمود الفقري لمتعدد الببتيد (Polypeptide Backbone modifications)

ربما تحدث السيطرة على وظيفة البروتين أيضاً بواسطة تحويل نظام ترتيب الأحماض الأمينية في العمود الفقري للبروتين. أما أن يتم تحفيز هذه التحويلات بواسطة بروتينات أخرى أو أنها تدار من قبل البروتين نفسه. يمكن لبروتينات متعددة من أن تخلق كبروتينات بادئة كبيرة large precursor proteins ثم يتم تنشيطها بواسطة انشقاق عمودها الفقري الببتيدي بواسطة الإنزيمات الهاضمة للبروتين proteases (شكل 21.5).

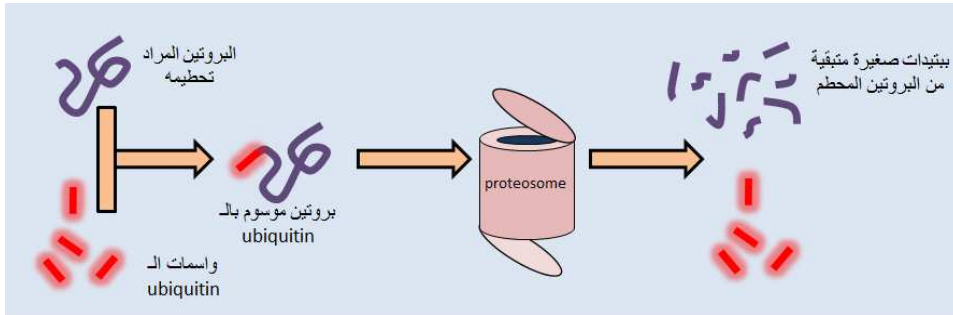


شكل (21.5): تحويل العمود الفقري لمتعدد الببتيد المخلق حديثاً (البروتين الأولي) بواسطة ازالة بعض الأحماض النووية والتي بازالتها في بعض الحالات يتكون البروتين الفعال (تصميم المؤلف).

تدعى العديد من البودائ الكبيرة للبروتينات بالـ zymogens أو بالبروتينات الأولية pro-proteins والتي تحتوي على تسلسل عند نهايتها الأمينية والذي يعطي معلومات للخلية بأن تصدر البروتين. ثم تنشق تلك النهاية الأمينية المعروفة بـ N-terminal signal sequence ، ولكن البروتين المصدر ربما لا يزال غير فعال الى أن ينشق من جديد بواسطة إنزيم آخر هاضم للبروتين. تتضمن البروتينات المنشطة بواسطة هذه الآلية بعض الإنزيمات الهاضمة للبروتين والموجودة في الجهاز الهضمي كما في التربسين والتي يجب أن تنظم فعاليتها قبل أن تصدر من الخلية. يعالج ألبومين المصل serum albumin بتلك الوسيلة أيضاً ، وكذلك الحال بالنسبة للأنسولين والـ vasopressin والـ oxytocin.

تحطيم البروتينات

ان الخلايا الحية لا تصنع البروتينات فحسب، وانما تقوم بتحطيمها كذلك. وعلى الرغم من أن عملية تحطيم البروتين ليس بتعقيد عملية تخليقه، الا ان هذه العملية مسيطر عليها بدقة. ان انزيمات الـ proteases هي تلك التي تحطم البروتينات. وهي لهذا خطرة على الكائن الذي يصنعها ويجب أن يتم السيطرة عليها بشكل حذر. ليست بروتينات الـ proteases هي المسلك الوحيد المسؤول عن تحطيم البروتينات، وانما هنالك تراكيب أكثر تعقيداً منها تعرف بالـ proteosomes. وهي تراكيب اسطوانية، تحتوي في داخلها على مواقع الـ protease الفعالة. تغطي قمة وقعر الاسطوانة من قبل معقدات بروتينية والتي تميز وترتبط بالبروتينات المتضررة والغير مطلوبة. ان البروتينات المقدر عليها أن تتحطم يمكن تمييزها لأنها موسومة بالـ ubiquitin. وهو بروتين صغير مخصص للبروتينات المحطمة أو البروتينات الغير مطوية بشكل صحيح، بالإضافة الى ذلك، فهي مخصصة أيضاً لبروتينات معينة ضرورية لفترة محدودة فقط (شكل 22.5). ينفث طي البروتينات الموسومة بالـ ubiquitin ويتم تلقيح برميل الـ proteosome بها. حيث أنها تتحطم الى ببتيدات صغيرة. ولا بد من الإشارة الى أن واسمات الـ ubiquitin نفسها تنشط ويعاد تدويرها.



شكل (22.5): آلية عمل الـ proteosome. يتم تشخيص البروتينات المحطمة بواسمات الـ ubiquitin ، ثم تتحول تلك البروتينات متعددة ببتيدية صغيرة (تصميم المؤلف).

ملحق الفصل الخامس مشبّطات تخليق البروتين وسيلة للعلاج!

يختلف الرايبوسوم البكتيري عن الرايبوسوم في الخلايا حقيقية النواة، حيث يكون الرايبوسوم البكتيري أصغر (70S بدلاً من 80S). هذا الاختلاف قد تم استغلاله للأغراض السريرية، وذلك لأن العديد من المضادات الحيوية الفعالة تتداخل بشكل حيوي مع البروتينات التي تعمل عليها رايبوسومات بدائية النواة فقط وهكذا تثبط تخليق البروتين فيها.

تبدى عدة مضادات حيوية تأثيرها من خلال استهدافها عملية الترجمة في البكتيريا. إنها تستغل الفروقات في آليات الترجمة بين الكائنات حقيقية وبدائية النواة، وذلك لكي تثبط تخليق البروتين بشكل انتقائي في البكتيريا دون أن تؤثر على العائل. تتضمن الأمثلة: المضاد الحيوي streptomycin، والذي يسبب خطأ في قراءة الشفرة الوراثية في البكتيريا بتركيز واطئة نسبياً، ويثبط عملية بدء ترجمة البروتين initiation وذلك بالارتباط بوحدة الرايبوسوم الثانوية الصغيرة 30S. بينما يمنع المضاد الحيوي kanamycin ارتباطات أخرى في نهاية مرحلة البدء، ويسبب خطأ في قراءة الشفرة الوراثية.

يقوم المضاد الحيوي puromycin، والذي يمتلك تركيب مشابه لجزيئة tyrosinyl aminoacyl tRNA بالارتباط بالموقع الرايبوسومي A ويشارك في تكوين الأصرة الببتيدية، منتجاً لمعقد peptidyl-puromycin. وعلى أية حال، فإنه لا يدخل في عملية الانتقال وينفك بسرعة من الرايبوسوم مسبباً إنهاء مبكر لتخليق متعدد الببتيد. إن المضاد الحيوي puromycin يثبط وبكفاءة عملية تخليق البروتين في الكائنات بدائية وحقيقية النواة. أما المضاد الحيوي Diphtheria toxin، وهو ذيفان خارجي exotoxin لبكتيريا الخناق *Corynebacterium diphtherium* المخموجة بعائي تحلطي lysogenic phage متخصص والذي يحفز عملية ADP ribosylation لعامل الاستطالة EF-2 في خلايا اللبائن. يثبط هذا التحويل العامل EF-2 وبهذا فإنه يثبط عملية تخليق البروتين بشكل متخصص. إن العديد من الحيوانات (كما في الفأر) تكون مقاومة لذيفان بكتيريا الخناق. هذه المقاومة تعزى إلى عدم قدرة ذيفان بكتيريا الخناق على عبور الغشاء الخلوي فضلاً عن عدم حساسية العامل EF-2 في الفأر لذيفان بكتيريا الخناق. يسد المضاد الحيوي tetracycline موقع الحامض الأميني في الرايبوسوم A site، مانعاً ارتباط جزيئات الـ tRNA المحملة بالحامض الأميني aminoacyl tRNAs به. بينما يسد المضاد الحيوي chloramphenicol خطوة النقل الببتيدي peptidyl transfer step الحادثة في مرحلة الاستطالة في الوحدة الثانوية الكبيرة للرايبوسوم البكتيري 50S.

أسئلة الفصل الخامس

السؤال الأول: علل ما يلي:

- إن ترجمة المعلومات الوراثية الموجودة في تسلسل الـ mRNA إلى تسلسل أحماض أمينية في البروتين يحتاج إلى جزيئات وسيطة
- إن الفرضية التي تقول بأن الكودونات ثلاثية triple هي الفرضية الصحيحة
- لا يشفر الكودون AUG للحامض الأميني methionine دائماً.
- يعد المضاد الحيوي tetracycline مثبط كفاءة لعملية تخليق البروتين في البكتيريا
- توصف الشفرة الوراثية بصفة العمومية universality؟
- يمكن لبعض جزيئات الـ tRNA المحملة بحامض أميني معين من تمييز أكثر من كودون واحد؟
- تقرأ معظم جزيئات الـ mRNA بنسق قراءة واحد؟
- ينتهي ترجمة سلسلة متعدد الببتيد من جزيئة الـ mRNA حال الوصول إلى التسلسل UAA؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

- أول من خلق التسلسل CUCUCUC هو العالم
a- Nirenberg b- Khorana c- Watson d- Crick e- Holley
- تبدأ الترجمة في معظم البكتيريا، بالحامض الأميني methionine المحور، بينما في اللبائن، يستخدم الحامض الأميني methionine بصورته الغير محورة (ما عدا -----)، والتي رايبوسوماتها تشبه تلك الموجودة في البكتيريا).
a- Golgi apparatus b- endoplasmic reticulum c- nucleotides d- mitochondria and chloroplast e- nuclear envelope
- يثبط المضاد الحيوي puromycin عملية تخليق البروتين من خلال -----
a- مشابهته c- tyrosinyl aminoacyl tRNA تحوير عامل الاستطالة EF-2 b- خطأ في قراءة الشفرة الوراثية
سد خطوة النقل الببتيدي d- لجزئية
- يطلق على الرايبوسومات الموجودة في البكتيريا ب-----
a- 40 S ribosomes b- 50 S ribosomes c- 60 S ribosomes d- 70 S ribosomes e- 80 S ribosomes
- يعمل تسلسل ----- على اصطفاف جزيئة الـ mRNA على الرايبوسوم في بداية عملية الترجمة وذلك باستخدام الأزواج القاعدي base pairing مع التسلسل المكمل قرب النهاية 3' لجزيئة الـ rRNA.
a. Enhancer sequence b. 5' Cap sequence c. Shine-Dalgarno sequence d. promoter sequence e. operon sequence
- تدعى جزيئة الـ tRNA البادئة لعملية الترجمة ب----- في بدائية النواة
a. Met-tRNA b. uncharged tRNA c. fMet-tRNA d. (a) & (c) e. none
- يقوم العامل ----- بمنع ارتباط وحدة الرايبوسوم الثانوية الكبيرة بالوحدة الصغيرة في بدائية النواة
a. IF11 b. IF2 c. IF3 d. IF4 e. IF5
- إن أول خطوة من خطوات بدء ترجمة الـ DNA هو ارتباط الـ mRNA بال----- في بدائية النواة
a. large ribosomal subunit b. 5' cap of mRNA c. met-tRNA d. initiation factors e. none
- يحتاج البروتين الذي هو بطول 400 حامض أميني إلى 20 ثانية لتخليفه تحت الظروف المثالية، لذا فإن الوقت اللازم لتخليق حامض أميني واحد يبلغ ----- جزء من الثانية.
a. Ten b. twenty c. thirty d. forty e. fifty
- إن اتجاه تتدفق الـ tRNA أثناء عملية الترجمة في الرايبوسوم هو -----
a. (E-A-P) sites b. (E-P-A) sites c. (A-E-P) sites d. (P-A-E) sites e. (A-P-E) sites

- لا تقدر جزيئات متعدد الرايبوسوم على الارتباط بالـ mRNA بمسافة أقصر من ----- نيوكلوتيدة عن بعضها البعض.
a. 60 b. 70 c. 80 d. 90 e. 100
- ينبثق البروتين المنتج من متعدد الرايبوسوم المرتبطة على الشبكة الاندوبلازمية الداخلية إلى حيز مفتوح يدعى -----
a. Golgi apparatusb. cisterna spacec. zymogen particled. cytosole. peroxisome
- عندما نقول بأن الشفرة الوراثية متخصصة (specific) أي أنها -----
a. ubiquitousb. non-ubiquitous c. ambiguous d. unambiguous e. promiscuous
- يقوم الإنزيم ----- بلمرة النيوكليوتيدات عشوائياً دون الاعتماد على شريط قالب
a. primase b. topoismerase c. DNase d. polynucleotide phosphorylase e. DNA dependent DNA polymerase
- ان العامل هو المسؤول عن بطئ عملية الترجمة.
a. IF1 b. EF1 c. IF2 d. EF2 e. RF

السؤال الثالث: عرف ما يلي:

polysomes, nonsense codons, chaperons, heat shock proteins, wobble hypothesis, reading frame, Shine-Dalgarno sequence, Kozak sequence, zymogen, chaperonins

السؤال الثالث: صل القائمة باليمين لما يناسبها بالقائمة لانزيمات بكتريا القولون الموجودة باليسار:

انزيم مبلمر يحتاج الى قالب ويحتاج الى بادئ	RNA polymerase
انزيم مبلمر يحتاج الى قالب ولايحتاج الى بادئ	DNA polymerase
انزيم مبلمر لايتحتاج الى قالب ويحتاج الى بادئ	None
انزيم مبلمر لايتحتاج الى قالب ولايتحتاج الى بادئ	Polynucleotide phosphorylase

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

- Alberts B.**, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science, USA. 2008.
- Anfinsen.** C. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230.
- Berk A.**, Zipursky S., Baltimor D., Darnell J., and Lodish H. Molecular Biology. Fourth edition. Paul Matuataira, USA, 1998.
- Clark D.** Molecular biology: understanding the genetics revolution. Elsevier, 2005.
- Garret, R.**, Douthwaite, S. R., Liljas, A., Matheson, A. T, Moore, P. B., and Noller, H. F., The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions. The American Society for Microbiology.2000.
- Gesteland, R. F.**, Cech,T., and Atkins, J. F. (Eds.) *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- Glazer A.**, DeLange, R., and Sigman, D. *Chemical Modification of Proteins* .North-Holland, 1975.
- Hames B.**, and Hooper N. Instant notes in biochemistry. Third edition, BIOS Scientific Publishers Limited, 2005.
- Ibba M.**, Becker H., Stathopoulos C., Tumbula D., and Söll D. 2000. The adaptor hypothesis revisited *Trends Biochem. Sci.* 25: 311-316.
- KoolmanJ.**, and Roehm K. Color Atlas of Biochemistry. Second edition, Thieme, 2005.
- Lodish, H.**, Berk, A., Zipursky, L., and Matsudaira, P., Molecular Cell Biology (fifth edition). W. H. Freeman and Company, 2000.
- Murray R.**, Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell V., Weil P. Harper's Illustrated Biochemistry. 28th edition, McGrawHill Medical, 2009.
- Passarge E.** Color atlas of Genetics. Second edition, Thieme, 2001.
- Pierce B.** Genetics: A conceptual approach,2002.
- Robinson R.** Genetics. Volume 3. Thomson Gale, 2003.
- Schultz, G. E.**, and Schirmer, R. H., 1979.Principles of Protein Structure.Springer-Verlag.
- Tamarin** .Principles of genetics.Seventh edition.The McGraw-Hill. 2001.
- Watson J.**, Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R. Molecular biology of the gene.Fifth edition, Pearson Prentice Hall, 2004.

6

الفصل السادس تنظيم التعبير الجيني



زيادة مفرطة في التعبير عن هرمون
النمو في أطول رجل في العالم يجانبه
نقصان حاد في التعبير عن نفس
الهرمون في أقصر رجل في العالم

مقدمة



George Beadle



Edward Tatum

ناقش الباحثين كيفية إبراز الجينات لتأثيراتها، ولعل أشهر الباحثين في هذا المضمار هما George Beadle و Edward Tatum ، حيث قاما بدراسة الكائن المجهرى *Neurospora* وذلك بتنميته على وسط بمكونات كيميائية مختلفة. تمكن Beadle و Tatum بتصميم نظام للكشف عن تغيرات محددة في القابليات الكيموحيوية للكائن قيد الدراسة. إن الدراسة الدقيقة لطافرات الـ *Neurospora* أدت الباحثين إلى افتراض نظرية "جين واحد إنزيم واحد"، والتي تربط الجينات بإنزيمات محددة وبالتفاعل الكيميائي التي تحفزها.

وبعد ذلك اكتشف الباحثون بأن العديد من البروتينات هي ليست إنزيمات، ولكن بدلاً من ذلك هي ربما تكون جزيئات للإشارة signaling molecules أو مستقبلات receptors، أو ربما تلعب أدواراً تركيبية. وهكذا، تم حورت نظرية "جين واحد إنزيم واحد" إلى "جين واحد بروتين واحد". وكذلك، اكتشف الباحثون بأن العديد من البروتينات الوظيفية تتألف من العديد من سلاسل الأحماض الأمينية (متعدد الببتيدات) المميزة المطابقة لتسلسلات الـ DNA لا توجد بالضرورة بشكل قريب

من بعضها البعض أو حتى على نفس الكروموسوم، وهذا أدى إلى تكوين نظرية "جين واحد متعدد ببتيدي واحد" في تعريف الجين. لذا ربما أصبح تعريف الجين بأنه قطعة من الـ DNA تحتوي على المعلومات الضرورية لصنع متعدد ببتيدي محدد (أو وحدة ثانوية محددة) ذو وظيفة محددة (بدلاً من بروتين محدد).

تنظيم التعبير الجيني في بدائية النواة

تكمن الأهمية البيولوجية من دراسة التعبير الجيني في عدة أسباب أهمها هو في أن فهمنا لآليات التعبير الجيني يقودنا إلى تطوير العوامل المثبطة أو الموقفة لنمو الكائنات الامراضية. وعليه، تم دراسة آليات تنظيم الجين في البداية في الخلايا البكتيرية، وبسبب وفرة الطافرات فيها وسهولة التلاعب بها مختبرياً جعل من المنطقي إمادة اللثام عن هذه الآليات فيها. وعندما بدأ دراسة هذه الآليات في الكائنات حقيقية النواة، بدا من الواضح بأن التنظيم الجيني في حقيقية النواة يختلف بشكل كبير عن بدائية النواة.

منذ أكثر نصف قرن، ومع فهم كيفية جريان المعلومات الوراثية من الجين وخلال الرنا المراسل mRNA إلى جزيئة بروتين محددة. ومنذ ذلك الوقت، تطورت مفاهيم معقدة حول كيفية تنظيم التعبير الجيني في البكتيريا. وقبل أن يتم التطرق إلى تفاصيل تنظيم التعبير الجيني، لا بد لنا من معرفة معنى بعض المصطلحات ذات الصلة بهذا الموضوع، ولعل أهمها هو الـ *cistron* هو الوحدة الوراثية التي تشفر لتكوين الوحدة الثانوية لجزيئة البروتين، عاملاً وكأنه أصغر وحدة في التعبير الجيني. وهكذا، فإن فكرة جين واحد، إنزيم واحد يجب تسميتها للحصول على دقة أكبر بالسسترون الواحد، أي مفهوم الوحدة الثانوية الواحدة *one subunit concept*. كما يجب علينا أن نعرف حقيقة أن ليست كل الجينات قابلة للحث حيث يكون بعضها بعيداً عن هيمنة تنظيم التعبير الجيني. وعلى أية حال، يعرف الجين القابل للاستحثاث *inducible gene* بالجين الذي يزداد تعبيره استجابةً إلى إشارة منظمة متخصصة تعرف بالحث *inducer*. أما تلك الجينات العيدة عن التأثير الجيني السلبى أو الإيجابى عليها تعرف بالجينات ذات التعبير التكويني *constitutive*، *expression*، وذلك يعني أنها تعبر بمعدل ثابت ومن غير المعروف أنها عرضة للتنظيم.

أولاً: السيطرة الاستنساخية على التعبير الجيني

لقد درست بكتريا القولون بشكل مفصل وعبر سنوات طويلة لفهم كيفية تنظيم التعبير الجيني. تحتوي بكتريا القولون على كروموسوم مفرد بـ 4.5×10^6 bp إن هذه الكمية كافية للتشفير عن حوالي 3000 جين. وتحت ظروف النمو الفعّال، يستنسخ فقط 5% من الكروموسوم بشكل فعّال في أي وقت من تلك الظروف، أما الباقي، فأما أن يكون صامتاً *silent* أو يستنسخ بمعدل واطئ جداً. وعندما تتغير ظروف النمو، تتوقف بعض الجينات الفعّالة بينما تعمل الجينات غير الفعّالة. ومن المهم الإشارة إلى أن الخلية تستجيب للتغيرات الحادثة بالبيئة وذلك بتغيير الإنتاج الجيني، لذا، وضمن وقت قصير، - ثواني إلى دقائق في معظم الحالات - فيمكن لأي جين أن يقف كلياً عن العمل، أو أن يعمل كلياً.

وفي بكتريا القولون، ينتظم إنتاج معظم الـ RNA والبروتين عند مستوى الاستنساخ *at transcription level*. وتدعم الاستجابة السريعة لتغير الظروف جزئياً من قبل دورة حياة قصيرة لجزيئة الـ mRNA - بحيث تكون بمعدل دقيقة إلى ثلاث دقائق لمعظم جزيئات الـ mRNA. تمتلك بعض جزيئات الـ mRNA دورات حياة أطول (10 دقائق أو أكثر)، وهذا يعني معدلات إنتاج أكبر للبروتينات لكل جزيئة mRNA. إن هذه الجزيئات الغير نموذجية من الـ mRNA ربما تتعرض أيضاً إلى سيطرة على مستوى الترجمة *at translational level*.

اكتشاف الأوبرون



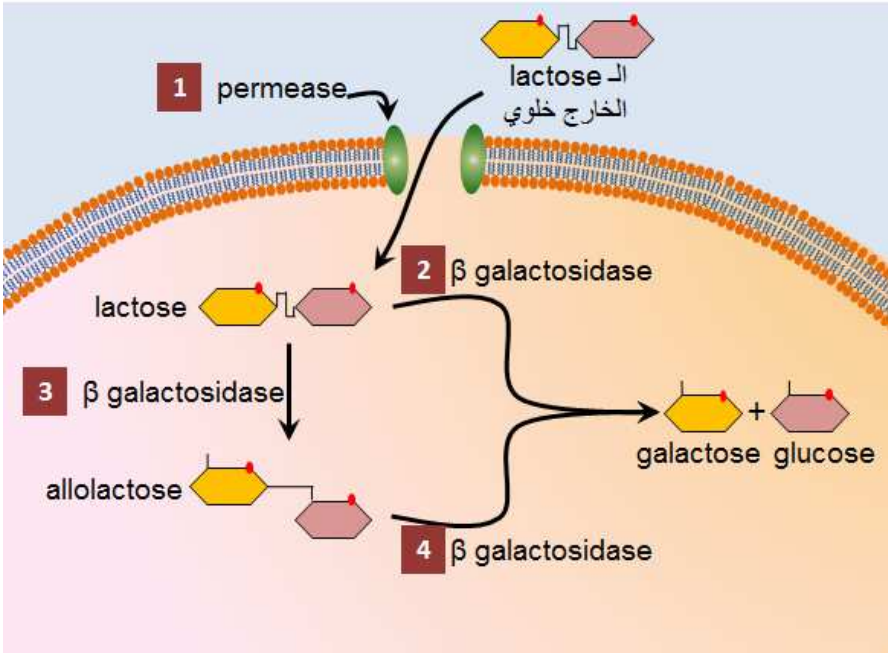
Francis Jacob



Jacques Monod

ناقش Jacob و Monod عام 1961 موديليهما المعروف بالأوبرون operon في بحث تقليدي. اعتمدت فرضيتهما على مدى بعيد على ملاحظات تنظيم أيض اللاكتوز lactose metabolism بواسطة بكتريا القولون. إن الآليات الجزيئية المسؤولة عن تنظيم الجينات في أيض اللاكتوز هي الآن من أكثر الآليات فهماً في أي كائن حي. يحلل إنزيم β galactosidase اللاكتوز مائياً إلى مكونيه الـ glucose و galactose. فلكي تقوم بكتريا القولون باستغلال اللاكتوز كمصدر للطاقة، فإنها تقوم بتعطيم اللاكتوز في البداية إلى كلوكوز وكاللاكتوز، في تفاعل محفز من قبل إنزيم الـ β -galactosidase. هذا الإنزيم يمكن أن يحول اللاكتوز lactose إلى اللؤلؤلاكتوز allolactose، وهو مركب يلعب دوراً مهماً في تنظيم أيض اللاكتوز، فعندما يتولد مركب الـ allolactose والنتائج من تفاعل جانبي يقوم به إنزيم β -galactosidase وارتباطه بالكابح فإنه يعمل على اختزال ألفة الكابح للارتباط بموقع المشغل لألف مرة تقريباً. وفي النتيجة، ينفك الكابح من المشغل ويبدأ الاستنساخ (شكل 1.6).

يرتبط الجين التركيبي لإنزيم β galactosidase (المعروف بـ lac Z gene) مع الجين التركيبي لبروتين β galactoside permease المسؤول عن تخلل أو نفاذ اللاكتوز في الخلية (lac Y gene) ومع الجين التركيبي لإنزيم thiogalactoside transacetylase (lac A gene) والذي تتلخص وظيفته بإزالة المركبات المشابهة لللاكتوز lactose like compounds والتي لا يمكن لبروتين β galactosidase من أن يحطمها. ترتبط الجينات التركيبية لهذه الإنزيمات الثلاثة فيزيائياً لتشكل أوبرون اللاكتوز lac operon كما هو مبين في الشكل (1.6). يسمح هذا التركيب الوراثي للجينات التركيبية وجيناتها التنظيمية بالتعبير المنسق coordinate expression للإنزيمات الثلاثة الداخلة بإيض اللاكتوز، بحيث تستنسخ كل من هذه الجينات المرتبطة إلى جزيئة mRNA كبيرة واحدة والتي تحتوي على عدة مناطق لبداية الترجمة (AUG) وكودونات الإيقاف (UAA) لكل سسترون cistron. يدعى هذا النوع من جزيئة الـ mRNA بالـ polycistronic mRNA والتي توجد بشكل دائم في الكائنات بدائية النواة.



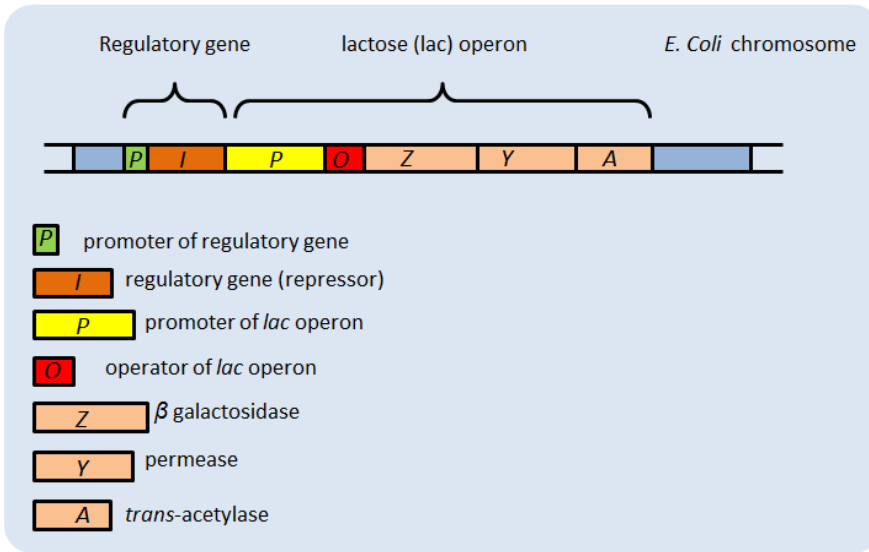
شكل (1.6): كيفية تحطيم اللاكتوز من قبل إنزيمات بكتريا القولون وذلك للاستفادة منه كمصدر للطاقة وفي ذلك عدة خطوات: (1) ينقل بروتين الـ permease اللاكتوز الخارج خلوي، (2) عندما يدخل اللاكتوز يقوم إنزيم β galactosidase بتحطيمه إلى كلوكوز وكاللاكتوز، (3) كذلك يحول إنزيم β galactosidase إلى مركب ذو علاقة باللاكتوز يدعى بالـ allolactose، (4) يتحول مركب الـ allolactose بواسطة إنزيم β galactosidase إلى لاكتوز وكلوكوز (تصميم المؤلف).

لقد قادت بحوث Jacob و Monod إلى ما يعرف الآن بفرضية الأوبرون operon hypothesis. الأوبرون هو مجموعة من الجينات والتي تقع تحت سيطرة موقع مشغل operator site واحد في نفس شريط الـ DNA (*in cis*).

أوبرون اللاكتوز lac operon:

يتألف أوبرون اللاكتوز من نوعين من الجينات: الجينات التركيبية structural genes (وهي ببساطة تلك الجينات التي تشفر لبروتينات (أو RNA) والتي تكون ضرورية للوظائف الطبيعية للخلية)، وهي ثلاثة جينات في حالة أوبرون اللاكتوز: lacZ gene والذي يشفر لإنزيم β -galactosidase و lacY gene والذي يشفر لبروتين- β galactoside permease و lacA gene والذي يشفر لإنزيم thiogalactoside transacetylase. تنتظم هذه الجينات التركيبية الثلاث كوحدة unit وهي lacZ-lacY-lacA ويتم التعبير عنها كوحدة واحدة من lacZ إلى lacA (شكل 2.6).

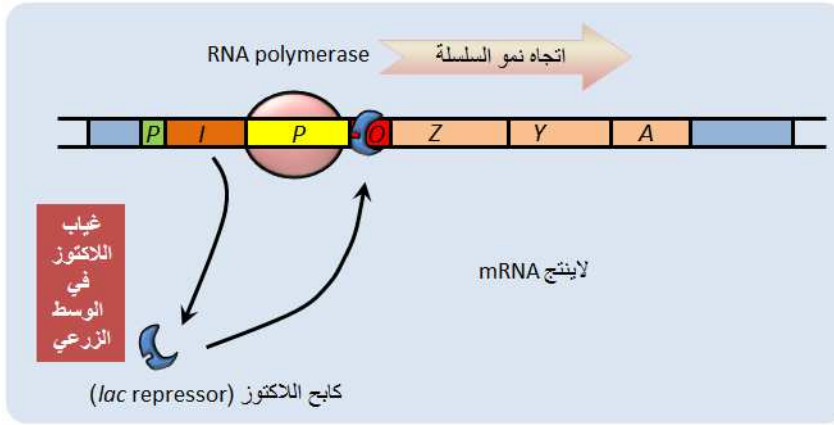
الجينات التنظيمية regulatory genes: وهي الجينات التي تشفر لبروتينات (أو RNA) والتي تكون وظيفتها تنظيم تعبير الجينات الأخرى. ويمكن لمثل هذا النوع من الجينات أن تنتج في مكان وتعمل في مكان آخر (in trans). تدعى بعض البروتينات المنظمة الناتجة من هذه الجينات بالكوابح repressors، أما مواقع الـ DNA التي ترتبط به فتدعى بالمشغلات operator. وفي غياب الكابح، يمكن لإنزيم RNA polymerase أن يرتبط بالبروموتر ويبدأ استنساخ الأوبرون. وعند وجود الكابح، يكون إنزيم RNA polymerase غير قادر على استنساخ الأوبرون.



شكل (2.6): التركيب الجيني لأوبرون اللاكتوز في بكتيريا القولون (تصميم المؤلف).

يقع الجين التنظيمي *lacI* بشكل مجاور وقبل upstream الجينات التركيبية *lacZ-lacY-lacA*. هذا وليس بالضرورة من هذا الجين التنظيمي من أن يقع في منطقة مجاورة جداً للجينات التي ينظمها، حيث يمكن له من أن يؤثر عليها في بعض الحالات حتى لو كان موقعه بعيداً عنها، ولهذا سمي بالجين التنظيمي، وهو يختلف في هذه الصفة عن تلك الجينات التركيبية التي لا تتدخل في تنظيم عمل جينات أخرى، حتى لو كانت في موقع قريب لها. ويوصف تعبير الجين I الطبيعي في كابح اللاكتوز بالتعبير التكويني constitutional expression، حيث يتم التعبير عنه بمعدل ثابت، وهذا ينتج في تكوين وحدات كابح اللاكتوز lac repressor الثانوية. تتسم جزيئة البروتين الكابح repressor protein molecule، والتي هي ناتج الجين I، بألفة عالية لموقع المشغل operator site، الذي

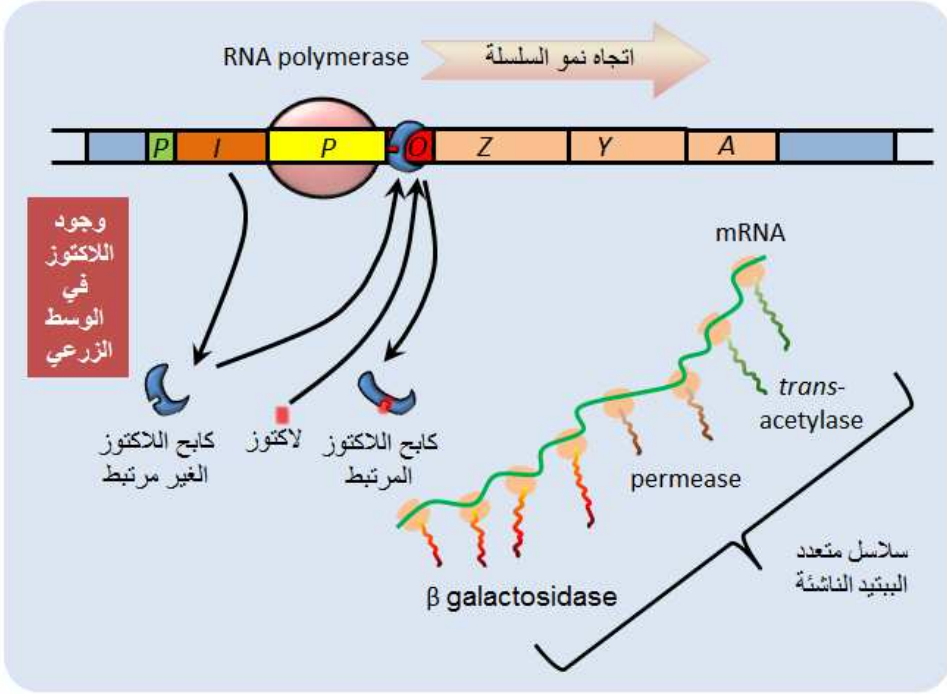
ترتبط به عادة. يقع موقع المشغل بين منطقة البروموتر والتي يرتبط بها إنزيم RNA polymerase ليبدأ عملية الاستنساخ، ومنطقة بداية الاستنساخ transcription start site للجين Z، وهو الجين التركيبي لإنزيم β galactosidase (شكل 3.6). عندما ترتبط الجزيئة الكابحة بموقع المشغل، فإنها تمنع استنساخ الموقع المشغل بالإضافة إلى الجينات التركيبية والمتمثلة بـ Z و Y و A. وهكذا، فإن الجزيئة الكابحة هي منظم سلبي negative regulator، وعند وجودها (وعند غياب المحث inducer، أنظر أدناه) يمنع تعبير الجينات Z و Y و A.



شكل (3.6): دور كباح اللاكتوز lac repressor في إعاقه استنساخ جينات كباح اللاكتوز Z و Y و A وذلك عند غياب الجزيئة الحاثية (اللاكتوز). ملاحظة: تتحدث هذه الصورة عن تأثير غياب اللاكتوز فقط على أوبرون اللاكتوز بصرف النظر عن الكلوكوز (تصميم المؤلف).

عندما يطفر الجين I بحيث يكون البروتين المنتج من قبله (كباح اللاكتوز lac repressor) غير قادر على الارتباط بالـ DNA المشغل، عندها سوف يبدي الكائن الحي تعبيراً تكوينياً constitutive expression لمشغل اللاكتوز. وبالتناقض، فإن الكائن الحي الذي يحتوي على طفرة في الجين I والذي يمنع ارتباط الحاث بالكباح سوف يبقى مكبوحاً حتى عند وجود الجزيئة الحاثية، لأن الحاث لا يمكن له الارتباط بالكباح على موقع المشغل لكي يزيل من كبح الأوبرون. أمّا عند إضافة كميات صغيرة من اللاكتوز، فإن تلك الكميات تكون قادرة على دخول الخلية حتى عند غياب إنزيم permease. إن كلتا الجزيئات الكابحة، أي تلك التي تتصل بمواقع المشغل operator site وتلك التي تكون حرة في الساييتوبلازم، تمتلك ألفة كبيرة للحاث inducer. إن ارتباط الحاث بالجزيئة الكابحة المتصلة بموقع المشغل سوف يعمل على حدوث تغيرات في هيئة الكباح (conformational changes) ويؤدي إلى انفصاله عن الـ DNA (شكل 4.6). وإذا ما اتصل إنزيم RNA polymerase بالشريط المشفر coding strand عند موقع البروموتر، عندها سوف يبدأ الاستنساخ. يولد إنزيم RNA polymerase ما يعرف بالـ RNA المتعدد السسترون polycistronic mRNA.

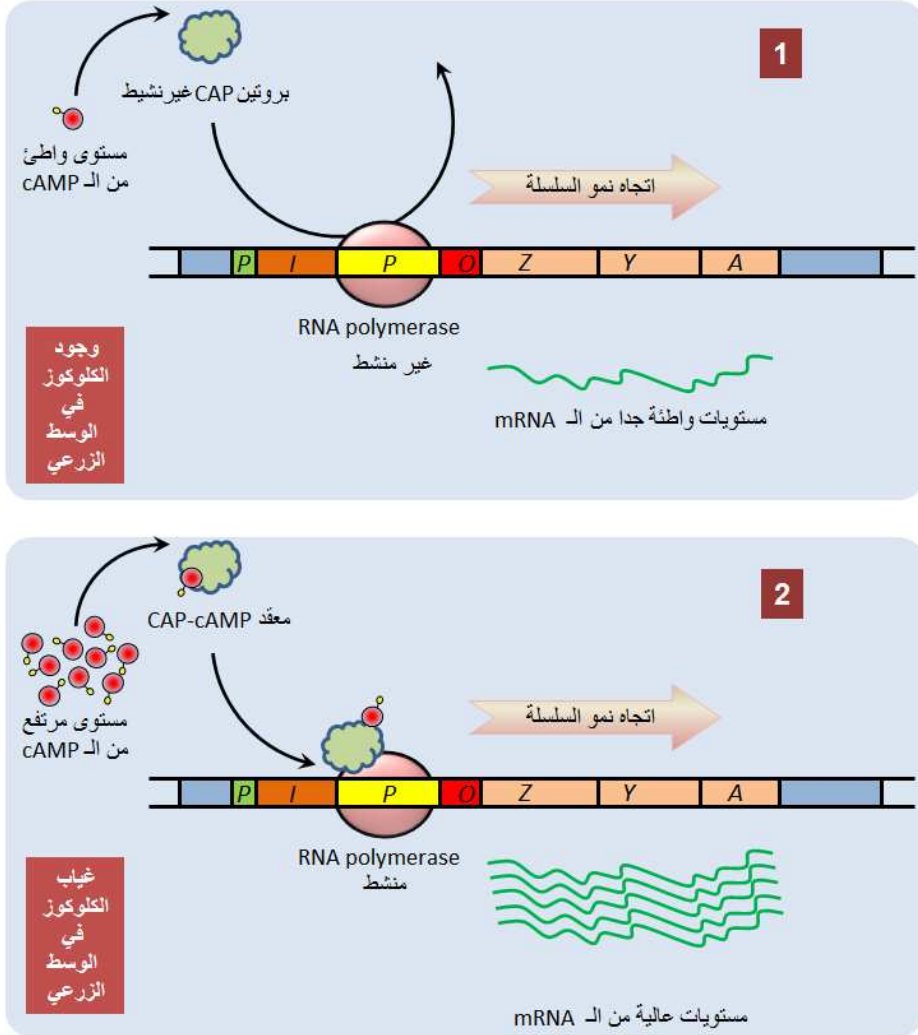
وفي هذا النمط، يقوم الحاث (اللاكتوز هنا) بإزالة كبح مشغل اللاكتوز ويسمح باستنساخ الجينات التركيبية للإنزيمات β galactosidase و galactoside permease و galactoside transacetylase. إذن، إن إزالة كبح مشغل اللاكتوز يمنح الخلية القدرة على تخليق الإنزيمات الضرورية لهدم اللاكتوز كمصدر للطاقة.



شكل (4.6): تثبيط دور كبح اللاكتوز في إعاقه استنساخ جينات أوبرون اللاكتوز وذلك عند وجود الجزيئة الحاثية (اللاكتوز) ملاحظة: تتحدث هذه الصورة عن تأثير وجود اللاكتوز فقط على أوبرون اللاكتوز بصرف النظر عن الكلوكوز (تصميم المؤلف).

هنالك بروتين تنظيمي من نوع آخر يدعى بروتين CAP، والذي يبرز دوره عندما تعرّض بكتريا القولون إلى كلا اللاكتوز والكلوكوز كمصادر للكربون، تبدأ الكائنات بتأيض الكلوكوز ومن ثم وقف النمو بشكل مؤقت إلى إن تصبح جينات lac operon مستحثة لتعطي قابلية على تأييض اللاكتوز. على الرغم من وجود اللاكتوز منذ بداية طور النمو البكتيري، إلا أن الخلية لا تحت تلك الإنزيمات لهدم اللاكتوز إلى أن يستنفذ الكلوكوز. تعزى هذه الظاهرة إلى كبت repression أوبرون اللاكتوز بواسطة بعض مهدمات الكلوكوز، ومن هنا، اصطلح على هذه العملية بعملية كبح المهدمات catabolite repression، حيث

يقوم بروتين منشط الجينات المهذمة (CAP) catabolite gene activator protein (CAP) بالإضافة مع cyclic AMP (cAMP) بالتوسط في هذه العملية (شكل 5.6).



شكل (5.6): دور بروتين CAP والمركب cAMP في تنظيم أوبرون اللاكتوز lac operon. المخطط في (1) يشير إلى الأحداث الوقعة عند وجود الكلوكوز في الوسط الزرع، أما المخطط في (2) يشير إلى الأحداث الوقعة عند غياب الكلوكوز عن الوسط الزرع. ملاحظة: تتحدث هذه الصورة عن تأثير وجود أو غياب الكلوكوز فقط على أوبرون اللاكتوز بصرف النظر عن اللاكتوز (تصميم المؤلف).

ولكي يتصل إنزيم RNA polymerase بموقع البروموتر، فلا بد من وجود البروتين CAP، والذي يرتبط به المركب cAMP. وبواسطة آلية مستقلة، تقوم البكتيريا بتراكم المركب cAMP فقط عندما يتم تجويعها عن الكلوكوز. وعند وجود الكلوكوز بتراكيز كافية للنمو، سوف تفتقد البكتيريا مركب cAMP لكي يرتبط بمركب CAP. وهكذا، فعند وجود الكلوكوز، يقل مستوى مركب الـ cAMP بشكل حاد بحيث لا يجد بروتين CAP ما ينشطه، وهكذا يفقد بروتين CAP قابليته على أن يرتبط بمنطقة الارتباط بالمنشط activator binding site، وبالتالي، لا يتمكن إنزيم RNA polymerase من بدء استنساخ مشغل اللاكتوز. وعند غياب الكلوكوز، يزداد مستوى مركب cAMP بشكل كبير جداً، عندها ينتشط بروتين CAP ليتكوّن معقد CAP-cAMP، والذي يرتبط بالـ DNA قبل منطقة البروموتر بقليل، هنا يمكن أن يحدث الاستنساخ بعدها (شكل 6.7). وهكذا، يعمل معقد CAP-cAMP كمنظم إيجابي، لأن وجوده ضروري لحدوث عملية التعبير الجيني. أما البروتين CAP، فهو عبارة عن منشط يحفز الارتباط بنفس البروموتر. ولكن عندما نريد أن نتوخى الدقة، لا بد من أن نشير إلى بروتين CAP بـ apoactivator بدلاً من activator، لأنه يحدث على الاستنساخ فقط عندما يكون معقد مع جزيئة صغيرة تدعى 3-coactivator cyclic AMP (cAMP). إذن، يتعرض مشغل اللاكتوز لكلا التنظيمين الإيجابي والسلبي. ولكن كلا التنظيمين لا يعملان بمعزل عن بعضهما البعض، وإنما يتعرض أوبرون اللاكتوز إلى تأثيريهما معاً بشكل متزامن، وبهذا، لا يمكن أن نأخذ تأثير كل منهما على حدة.

أوبرون اللاكتوز: الصورة الكاملة

تنمو العديد من الأنواع البكتيرية على الكلوكوز قبل أن تستفيد من مركبات أخرى كاللاكتوز كمادة تفاعل لغرض النمو growth substrate، وذلك عند وجود كلا المصدرين (الكلوكوز واللاكتوز) في الوسط.

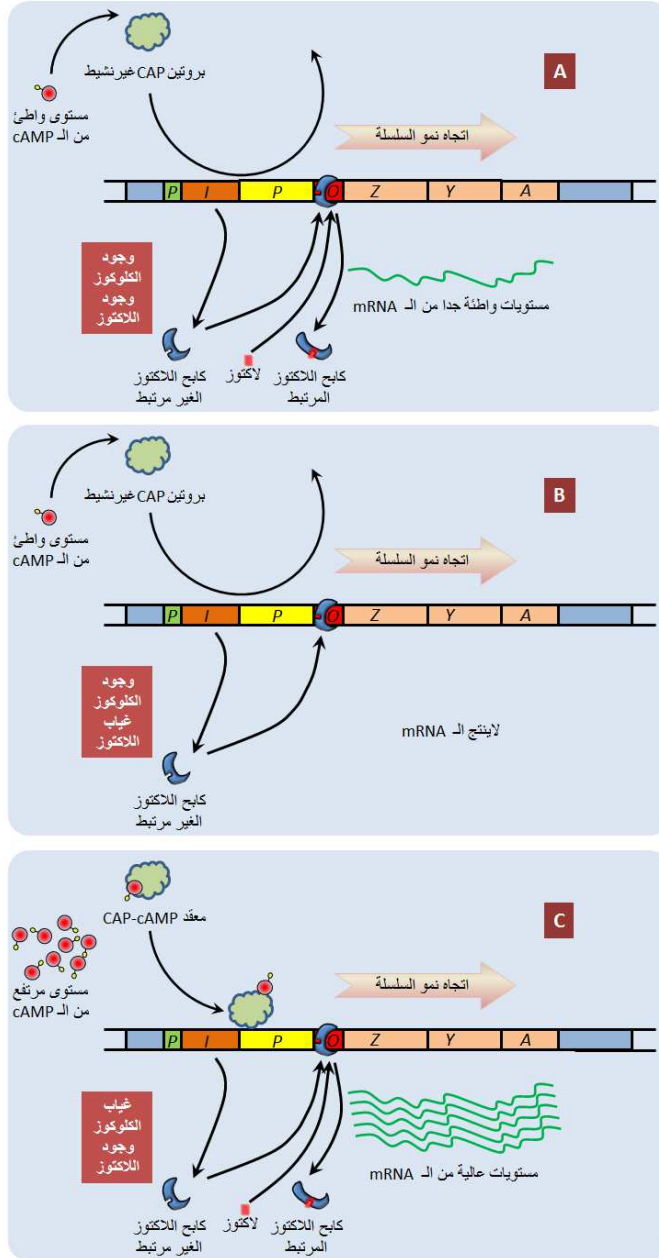
يتنظم استنساخ أوبرون اللاكتوز من قبل اثنين من البروتينات التنظيمية، وهما البروتين CAP و بروتين كابح اللاكتوز lac repressor، والذان يعملان معاً لضمان إنتاج البروتينات الثلاث الضرورية للنمو على اللاكتوز عند غياب الكلوكوز (مادة التفاعل الكفوءة). يمكن للبروتين CAP من أن يرتبط بمنطقة من الـ DNA قريبة من البروموتر تدعى بموقع الارتباط بالمنشط activator binding site ويسهل من عملية الاستنساخ، ويمكن لبروتين كابح اللاكتوز lac repressor من أن يرتبط بموقع المشغل operator site ويوقف الاستنساخ.

وكما ناقشنا ذلك في أعلاه، يمكن لبروتين CAP أن يرتبط بموقع الارتباط بالمنشط activator binding site فقط إذا كان المركب cAMP بتركيز عالٍ، ولا يوجد الأخير بمستويات عالية إلا عند غياب الكلوكوز. وعندما يرتبط بروتين CAP بالمركب cAMP، يرتبط المعقد الناتج بدوره بموقع الارتباط بالمنشط activator binding site ويسمح لإنزيم RNA polymerase من أن يرتبط بالبروموتر. وكما هو مناقش أيضاً، إذا لم يوجد اللاكتوز في الوسط الزرع، يرتبط كاجح اللاكتوز بموقع المشغل operator site وهذا يوقف الاستنساخ. إذن، كيف يتداخل كل من المنظم الايجابي والمتمثل بمعقد cAMP-CAP والمنظم السلبي والمتمثل بكاجح اللاكتوز لإعطاء الصورة الكاملة لحدث أوبرون اللاكتوز؟ للجواب على هذا السؤال لابد لنا من استعراض أربع حالات رئيسية لتداخل الكلوكوز مع اللاكتوز وتأثير تلك التداخلات على حث أوبرون اللاكتوز.

الحالة الأولى: عندما يوجد كلا الكلوكوز واللاكتوز، فسوف لا يكون هنالك تركيزاً كافياً لمركب cAMP لكي يرتبط بالبروتين CAP، ولهذا، فإنه لا يمكن له الارتباط بموقع الارتباط بالمنشط activator binding site. وبدون ارتباط البروتين المنشط CAP، فلا يمكن لإنزيم RNA polymerase من أن يقوم بعملية الاستنساخ بشكل ملحوظ حيث تنتج كميات صغيرة جداً من الـ mRNA في هذه الحالة حتى ولو ارتبط اللاكتوز بكاجحه (lac repressor) ومنعه من الارتباط بموقع المشغل operator site (شكل 6.6 a).

الحالة الثانية: عندما يوجد الكلوكوز ويغيب اللاكتوز من الوسط لا تتوفر الكمية الكافية من مركب cAMP لترتبط مع بروتين CAP بسبب وجود الكلوكوز، لذا لا يتسنى للبروتين CAP الارتباط بالمنشط وبالتالي لا يستطيع إنزيم RNA polymerase بدء استنساخ أوبرون اللاكتوز لغياب المنظم الايجابي. وبسبب غياب اللاكتوز، يبقى كاجح اللاكتوز مرتبطاً بإحكام بمشغل أوبرون اللاكتوز، وهذا يشكل عائقاً آخرًا لحدث أوبرون اللاكتوز (شكل 6.6 b).

الحالة الثالثة: عندما يغيب الكلوكوز ويتواجد اللاكتوز في الوسط، عندها يرتبط مركب cAMP بالبروتين CAP والذي يرتبط بدوره بموقع الارتباط بالمنشط ويسهل عملية الاستنساخ. يرتبط اللاكتوز بالكاجح ليتحول الكاجح إلى شكل لا يمكن به أن يرتبط ببروموتر اللاكتوز lac promoter، وبهذه الطريقة يمنع من الارتباط بموقع المشغل. ويمكن لإنزيم RNA polymerase الآن من أن يرتبط بالبروموتر وينفذ عملية الاستنساخ (شكل 6.6 c).



شكل (6.6): التأثير المزدوج لكل من الكلوكون واللاكتوز في تنظيم أوبرون اللاكتوز *lac* operon والذي يشمل (a) وجود كل من الكلوكون واللاكتوز، (b) وجود الكلوكون وغياب اللاكتوز و (c) غياب الكلوكون ووجود اللاكتوز (تصميم المؤلف).

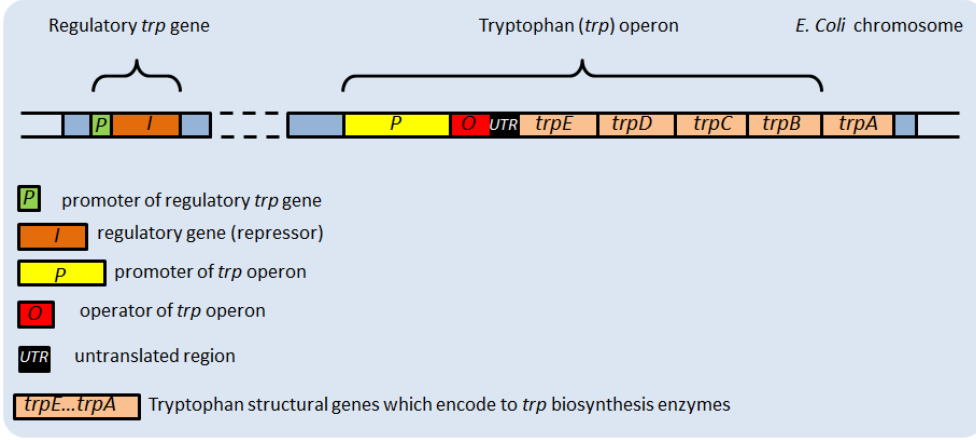
الحالة الرابعة: عندما لا يوجد كل من الكلوكوز واللاكتوز يكون تركيز مركب cAMP مرتفعاً ويرتبط بروتين CAP بموقع الارتباط بالمنشط activator binding site. عندها يمكن لإنزيم RNA polymerase من أن يرتبط بالبروموتر ولكنه يوقف من قبل كابح اللاكتوز lac repressor المرتبط في موقع التشغيل operator site.

إذن، مما اتضح في أعلاه يتبين لنا بأن عملية حث أوبرون اللاكتوز هي عملية تداخلية بين المنظمات الايجابية والسلبية معاً والتي تتأثر بشكل مختلف في وجود أو غياب الكلوكوز واللاكتوز في حث أوبرون اللاكتوز. لهذا لا يمكن لنا أن ننظر إلى حث أوبرون اللاكتوز بصورة منفردة.

كابح التربتوفان tryptophan repressor

بما أن كل أوبرون يحتوي على موقع مشغل واحد، لذا يمكن أن يرتبط بروتين تنظيمي يدعى بالكابح repressor بهذا الموقع ويمنع الاستنساخ. وعندما يغيب التربتوفان من البيئة، يكون الكابح غير فعال. يرتبط إنزيم RNA polymerase بموقع البروموتر، ثم يمضي قدماً على شريط الـ DNA القالب مستنسخاً جينات إنزيمات التخليق الحيوي للتربتوفان (tryptophan biosynthesis enzymes). وعندما يوجد التربتوفان في البيئة، عندها لا يحتاج الكائن الحي أن يخلق تربتوفان أكثر. عندها يرتبط التربتوفان بالكابح وينشطه. وعندما يرتبط الكابح المنشط بالمشغل operator، الواقع ضمن بروموتر التربتوفان ويوقف الاستنساخ.

يحتوي أوبرون التربتوفان على خمس جينات تركيبية (*trpE* و *trpD* و *trpC* و *trpB* و *trpA*) تشترك هذه الجينات الخمس في إنتاج مكونات تركيبية لثلاثة إنزيمات. تحول هذه الإنزيمات مركب الـ chorismate إلى تربتوفان. يحتوي أول جين تركيبية *trpE* على منطقة 5' الغير قابلة للترجمة untranslated region - 5' والتي تختصر 5-UTR وهي المنطقة التي على الرغم من استنساخها إلا أنها لا تشفر لأي من تلك الإنزيمات (شكل 7.6). وبدلاً من ذلك، تلعب منطقة 5-UTR دوراً مهماً في آلية تنظيمية أخرى، والتي ستناقش في أدناه.

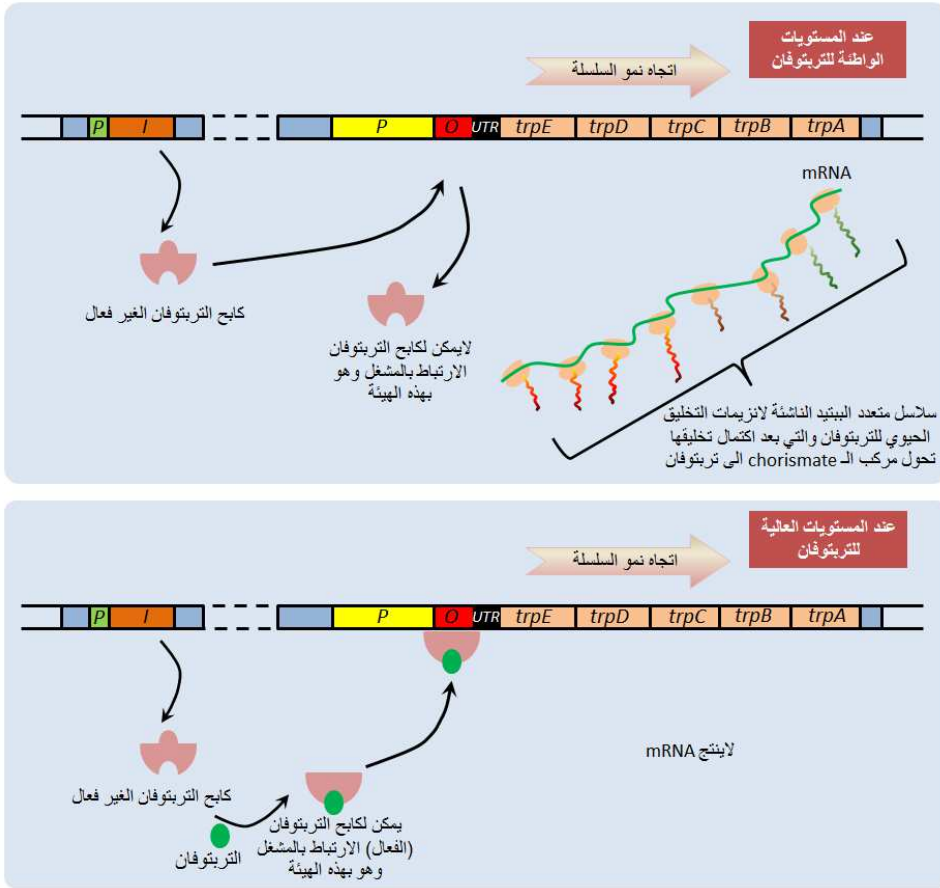


شكل (7.6): التركيب الجيني لأوبرون التربتوفان في بكتريا القولون (تصميم المؤلف).

يقع بروموتر التربتوفان قبل upstream الجينات التركيبية للتربتوفان. عندما يكون مستوى التربتوفان واطئاً، يرتبط إنزيم الـ RNA polymerase بالبروموتر ويستنسخ خمس جينات تركيبية إلى جزيئة mRNA مفردة، والتي يتم ترجمتها بعد ذلك إلى الإنزيمات التي تحول الـ chorismate إلى تربتوفان. يقع الجين التنظيمي *trpR* بمسافة معينة بعيداً عن أوبرون التربتوفان، والذي يشفر عن الكابح والذي لا يستطيع لوحده أن يرتبط بالـ DNA (شكل 8.6).

وكما هو الحال بالنسبة لكابح اللاكتوز، يمتلك كابح التربتوفان موقعين للارتباط، الأول يرتبط بالموقع المشغل operator site بينما يرتبط الثاني بالتربتوفان (المنشط). يسبب الارتباط بالتربتوفان تغييراً في هيئة الكابح بحيث يجعله قادراً على الارتباط بالـ DNA عند الموقع المشغل، وهذا يتداخل مع البروموتر ليكبح استنساخ جينات أوبرون التربتوفان. وعندما ينشغل البروموتر بكابح التربتوفان، لا يمكن لإنزيم RNA polymerase من أن يرتبط بالبروموتر ولا يمكن استنساخ الجينات التركيبية. ولهذا السبب، عندما تقل المستويات الخلوية للتربتوفان، يحدث الاستنساخ ويتم تخليق المزيد من التربتوفان. وعندما تزداد المستويات الخلوية للتربتوفان، يتثبط تخليق التربتوفان ولا يمكن أن يحدث تخليق المزيد منه.

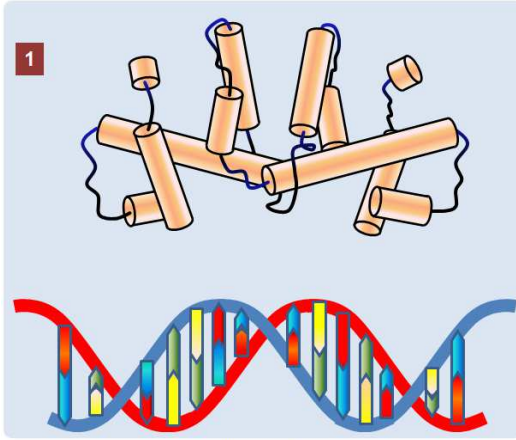
إن كايح الـ tryptophan هو بروتين تنظيمي يتخذ هيئة تدعى helix-turn-helix. إن لهذه الهيئة دور أساسي في تنظيم عمل الكايح، فعندما يغيب الـ tryptophan من البيئة، يكون الكايح بهيئة غير فعالة (inactive conformation)، ولا يمكن أن يرتبط بالـ DNA لمنع الاستنساخ. وعندما يكون الـ tryptophan متوفراً، ترتبط جزيئتان منه بجزيئة الكايح. إن هذا يبدّل من اتجاه هيئة الكايح (helix-turn-helix motif) بشكل يجعلها مؤهلة للارتباط بالأخاديد الـ DNA الكبيرة major grooves المتجاورة، وهكذا يحدث تخليق الـ tryptophan عند الحاجة، ولكنه يكبح عندما يتوفر الـ tryptophan (شكل 9.6).



شكل (8.6): السيطرة على تخليق الحامض الأميني ترېتوفان في بكتريا القولون من خلال السيطرة على أوبرون الترېتوفان في كلا مستويي الترېتوفان الواطئ والعالي (تصميم المؤلف).

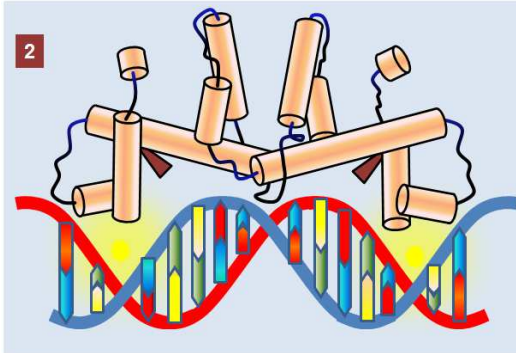
وكما هو الحال في كايح اللاكتوز lac repressor، يرتبط كايح ال-tryptophan بموقع يتداخل بها مع موقع الارتباط بالإنزيم RNA polymerase binding site.

إن الفرق الأساسي بين عمل كايح اللاكتوز lac repressor وكايح التربتوفان tryptophan repressor يتعلق بوظيفة الجزيئة المؤثرة الصغيرة small effector molecule. ففي حالة اللاكتوز، فإن الجزيئة المؤثرة المتمثلة باللاكتوز lactose تعمل كمضاد للكايح antirepressor مسببة في تحرر الكايح من المشغل operator. وفي حالة التربتوفان، فإن الجزيئة المؤثرة والمتمثلة بالتربتوفان tryptophan تعمل كمساعد للكايح corepressor، حاثّة على ارتباط الكايح repressor بالمشغل operator.



ارتباط جزيئين من التربتوفان

شكل (9.6): ارتباط التربتوفان بالبروتين الكايح للتربتوفان (tryptophan repressor protein) يغير من هيئة الأخير. يمكن هذا التغيير التركيبي من ارتباط البروتين المنظم للجين بأحكام بتسلسلات المشغل (operator)، في الحالة رقم (1) يقوم الكايح بمنع استنساخ الجينات المشفرة للانزيمات الضرورية لإنتاج التربتوفان (trp operon). ويساعده في ذلك تركيبه الثلاثي الأبعاد والذي هو من نوع helix-turn-helix. وفي الحالة رقم (2) يقوم الارتباط بالتربتوفان بزيادة المسافة الحاصلة بين منطقتي التمييز في حلزوني هذا البروتين، وهذا يسمح للكايح من أن يتوافق بشكل مريح مع المشغل وهذا يسمح بعمل الجينات المكبوحة في الحالة السابقة (تصميم المؤلف).



الإضعاف: التوقف المبكر للاستنساخ
Attenuation: the () premature termination (of transcription)

بالإضافة إلى وجود تنظيم بين

السيطرة الموجبة والسالبة على بدء الاستنساخ في نظام الأوبرون، تمتلك بعض أنواع الأوبرون مستوى إضافي من السيطرة والذي يؤثر على استمرارية الاستنساخ بدلاً من



Charles Yanofsky

التأثير على ابتداءه. وفي الإضعاف أو التضعيف (attenuation) يبدأ الاستنساخ عند موقع البدء start site، ولكن يحدث الإنهاء مبكراً و حتى قبل أن يصل إنزيم RNA polymerase إلى الجينات التركيبية. يحدث التضعيف في عدة أنواع من الأوبرون والتي تشفر للإنزيمات المشاركة في التخليق الحيوي للأحماض الأمينية. يمكن لنا فهم عملية الإضعاف بصورة أسهل وذلك بالنظر إلى الأمثلة المدروسة بشكل كبير، كما في أوبرون التربتوفان. بينت العديد من الدراسات التي أجريت في السبعينيات من القرن المنصرم من قبل Charles Yanofsky وجماعته بأن كبح الموقع المشغل هي ليست الطريقة الوحيدة لتنظيم كايح التربتوفان. قام الباحثين بعزل سلسلة من الطافرات التي تمتلك حذفات deletions للمنطقة المستنسخة من الأوبرون. تبدي بعض من تلك الطافرات مستويات متزايدة من الاستنساخ، مع ذلك، لا تتأثر السيطرة على موقع المشغل. علاوة على ذلك، لاحظ الباحثون استنساخ جزيئتان من الـ mRNA بأحجام مختلفة من أوبرون التربتوفان: يحتوي تسلسل الـ mRNA على الجينات التركيبية و mRNA أصغر يتكون من 140 نيوكليوتيدة فقط. قادت هذه الملاحظات Yanofsky إلى افتراض آلية أخرى – والتي تتسبب بالإيقاف المبكر أو premature termination للاستنساخ – والذي ينظم الاستنساخ في أوبرون التربتوفان.

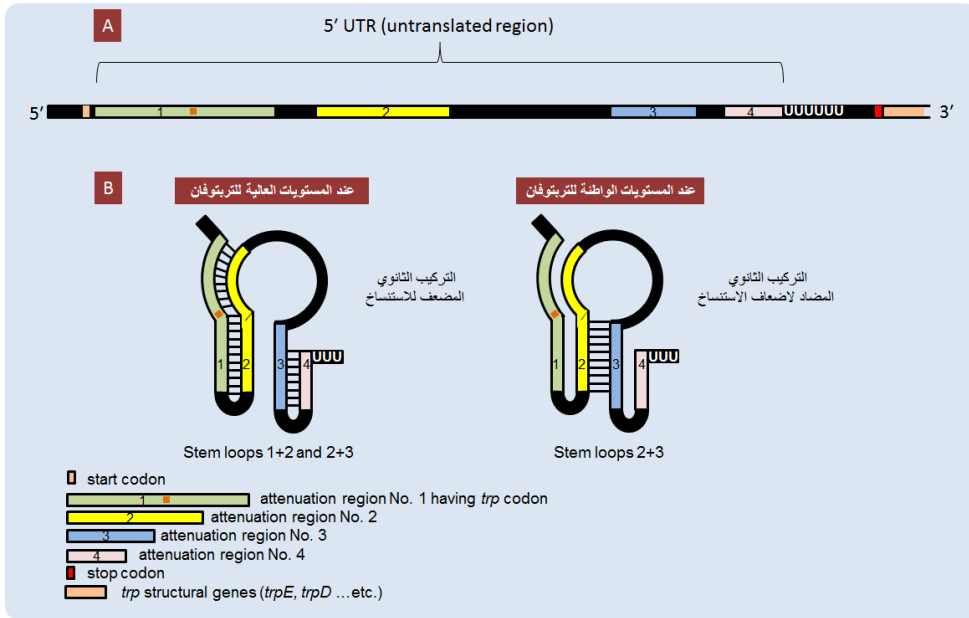
اكتشف الفحص المفصل لأوبرون اللاكتوز بوجود منطقة تتألف من 162 نيوكليوتيدة والتي تطابق المنطقة 5-UTR من جزيئة الـ mRNA (المذكور في البداية) المستنسخة من أوبرون التربتوفان (شكل 10.6a). تحتوي منطقة 5-UTR (والمعروفة أيضاً بالقائد) على أربعة مناطق: منطقة 1 وهي مكملة للمنطقة 2، منطقة 2 وهي مكملة للمنطقة 3، والمنطقة 3 وهي مكملة للمنطقة 4. إن وجود صفة التكامل بين تلك المناطق تسمح للمنطقة 5-UTR بالانطواء إلى تركيبان ثانويان معروفان (شكل 10.6b). افترض الباحثون حدوث ظاهرة الإضعاف في مثل هذا التركيب الثانوي.

أن أحد هذه التركيبات الثانوية تحتوي على تركيب يشبه دبوس الشعر نتج عن الازدواج القاعدي بين المنطقة 1 و 2 ودبوس شعر آخر نتج عن الازدواج القاعدي بين المنطقة رقم 3 و 4. لاحظ وجود حبل من نيوكليوتيدات اليوراسيل تتبع دبوس الشعر الناتج عن الازدواج القاعدي بين المنطقة 3 و 4. وبشكل غير متزامن، يحتوي تركيب المنهي البكتيري الفعلي على دبوس الشعر المتبوع بحبل من نيوكليوتيدات اليوراسيل: هذا التركيب الثانوي في منطقة 5-UTR في أوبرون اللاكتوز هو المنهي حقيقةً ويدعى بالمضعف attenuator. وعندما تكون المستويات الخلوية للتربتوفان عالية، تزودج المنطقة 3 و 4 للازدواج القاعدي لمنطقة 5-UTR، منتجاً تركيباً يدعى بتركيب المضعف attenuator

structure، يسبب هذا الازدواج القاعدي إنهاء الاستنساخ قبل استنساخ جينات الترتوفان التركيبية. ينتج التركيب الثانوي البديل لمنطقة 5-UTR بواسطة الازدواج القاعدي بين منطقة رقم 2 ومنطقة رقم 3 (شكل 10.6 b).

ينتج هذا الازدواج القاعدي بين دبوس الشعر، ولكن هذا الدبوس لا يتبع بحبل نيوكليوتيدات اليوراسيل: ولهذا لا يعمل هذا التركيب كمنهي. عندما تكون المستويات الخلوية للترتوفان واطئة، تزوج منطقة رقم 2 ومنطقة رقم 3 ولا ينتهي استنساخ الجينات التركيبية للترتوفان. يستمر إنزيم RNA polymerase بعد منطقة 5-UTR إلى القسم المشفر للجينات التركيبية، وينتج الإنزيم الذي يخلق الترتوفان. وبما أن تركيب منطقة 2-3 يمنع إنهاء الاستنساخ، لذا يطلق عليه بمضاد الإنهاء antiterminator. وهذا يعني قدرة منطقة 5-UTR الالتفاف إلى إحدى التركيبين. عندما يكون مستوى الترتوفان عالياً يتكون تركيب 3-4 وينتهي الاستنساخ ضمن منطقة 5-UTR، ولا يخلق ترتوفان إضافي. وعندما يكون الترتوفان واطئاً، يتكون تركيب 2-3 ويستمر الاستنساخ خلال الجينات التركيبية ويخلق الترتوفان. السؤال المحوري إذن، لم يزداد تكوين تركيب 3-4 عندما يكون تركيب الترتوفان عالياً بينما يزداد تكوين تركيب 2-3 عندما يكون الترتوفان واطئاً؟

للإجابة على هذا السؤال، يجب أن ننظر بشكل أقرب إلى التسلسل النيوكليوتيدي لمنطقة 5-UTR. وعند النهاية 5'، قبل المنطقة رقم 1، موقع يدعى بموقع ارتباط الريبوسوم ribosome binding site. تشفر المنطقة رقم 1 لبروتين صغير معين (شكل 10.6 b). ضمن التسلسل المشفر لهذا البروتين يوجد هنالك اثنان من الكودونات من نوع UGG، والتي تشفر للحامض الأميني ترتوفان، ولهذا يعد الترتوفان ضرورياً لترجمة تسلسل منطقة 5-UTR. هذا ولم يتم عزل البروتين المشفر من قبل منطقة 5-UTR ويفترض بأنه غير ثابت. ويبدو أن وظيفته هي السيطرة على التضخيم. وعلى الرغم من ملاحظة أن منطقة 5-UTR لم تترجم إلى بروتين، تتعرض أوبرونات منطقة 5-UTR إلى التضخيم وهي استثناء لتلك القاعدة. يتم تنظيم تكوين دبوسات الشعر في منطقة 5-UTR لأوبرون الترتوفان وذلك بتداخل كل من الاستنساخ والترجمة والحادثه قرب النهاية 5' لجزيئة الـ mRNA. ولا بد لنا من تذكر ما درسناه في الفصل الخامس في حقيقة ازدواج الاستنساخ والترجمة في الخلايا بدائية النواة: عندما يحدث الاستنساخ عند النهاية 3' لجزيئة الـ mRNA، تبدأ الترجمة عند النهاية 5'. إن التوقيت الدقيق لتداخل هاتين العمليتين في منطقة 5-UTR يحدد حدوث أو عدم حدوث ظاهرة الإضعاف.

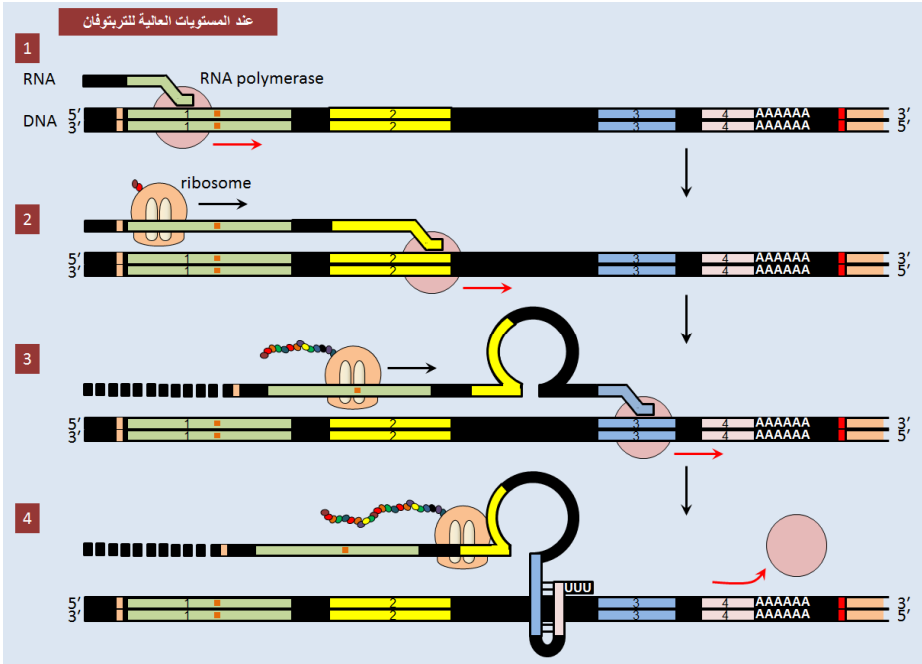


شكل (10.6): تركيب المضعف في أوبرون الترتوفان (a) تركيب المنطقة الغير قابلة للترجمة الواقعة قبل الجينات التركيبية لأوبرون الترتوفان (b) تكوين اثنان من المركبات الثانوية بواسطة منطقة 5-UTR لجزيئة mRNA المستنسخة من أوبرون الترتوفان، فعندما يرتفع مستوى الترتوفان تزودج المنطقة رقم 3 مع المنطقة رقم 4 وهذا التركيب ينهي الاستنساخ، بينما عندما يكون مستوى الترتوفان منخفضاً تزودج المنطقة رقم 2 مع المنطقة رقم 3 وهذا التركيب لاينهي الاستنساخ (تصميم المؤلف).

أوبرون الترتوفان: الصورة الكاملة الاستنساخ عندما يكون مستوى الترتوفان عالياً:

دعنا نعرف ماذا يحدث في المستوى الداخلي خلوي عندما يكون مستوى الترتوفان عالياً. يبدأ إنزيم RNA polymerase باستنساخ الـ DNA، منتجاً منطقة رقم 1 في 5-UTR (شكل 11.6 الخطوة 1). بعد عمل إنزيم RNA polymerase يرتبط الرايبوسوم بمنطقة 5-UTR (عند تسلسل Shine-Dalgarno في الفصل الخامس) ويبدأ بترجمة المنطقة المشفرة. وفي تلك الأحيان، يستنسخ إنزيم RNA polymerase المنطقة رقم 2 (شكل 11.6 الخطوة 2). إن المنطقة رقم 2 هي مكملية للمنطقة رقم 1 ولكن ولأن الرايبوسوم في طور ترجمة المنطقة رقم 1، فإن النيوكليوتيدات في المناطق 1 و 2 لا يمكن لها الازدواج القاعدي. وكما يبدأ إنزيم RNA polymerase باستنساخ المنطقة رقم 3، يستمر الرايبوسوم بترجمة المنطقة رقم 1 (شكل 11.6 الخطوة 3). عندما يصل الرايبوسوم إلى الكودونين UGG اللذان يشفران للترتوفان، فلا يمكنه أن يبطئ أو يقف، بسبب وفرة الترتوفان ووفرة الـ tRNA المحمل بالترتوفان. إن النقطة المهمة هنا التي لا بد من

ملاحظتها هي: بما أن الترتبوتوفان متوفر يمكن للترجمة أن يتواصل مع الاستنساخ. وبحركة الرايبوسوم بعد المنطقة رقم 1 إلى أن يصل إلى كودون الإيقاف، يغطي الرايبوسوم جزئياً المنطقة رقم 2 (شكل 11.6 الخطوة 4) ، وفي هذا الوقت، يكمل إنزيم RNA polymerase استنساخ المنطقة رقم 3. على الرغم من تكامل المنطقتين 2 و3، تغطي المنطقة رقم 2 جزئياً بالرايبوسوم، وبهذا لا يمكن أن تزود هذه المنطقة مع المنطقة رقم 3. يستمر إنزيم RNA polymerase بالحركة على طول جزيئة الـ DNA، وفي النهاية يستنسخ المنطقة رقم 4 في 5'-UTR. بما أن المنطقة رقم 4 هي مكمل للمنطقة رقم 3 ولأن المنطقة رقم 3 لا يمكن لها أن تزود قاعدياً مع المنطقة رقم 2، فأنها تزود قاعدياً مع المنطقة رقم 4. يؤدي ازدواج المناطق 3 و 4 إلى إنتاج تركيب مزدوج دبوس الشعر – المضعف (attenuator – hairpin) المتبوع بحبل من نيوكليوتيدات اليوراسيل – وينتهي الاستنساخ حالاً بعد المنطقة رقم 4. لا تستنسخ الجينات و لا تترجم الإنزيمات المنتجة للتربتوفان، ولا يخلق المزيد من ترتبوتوفان.



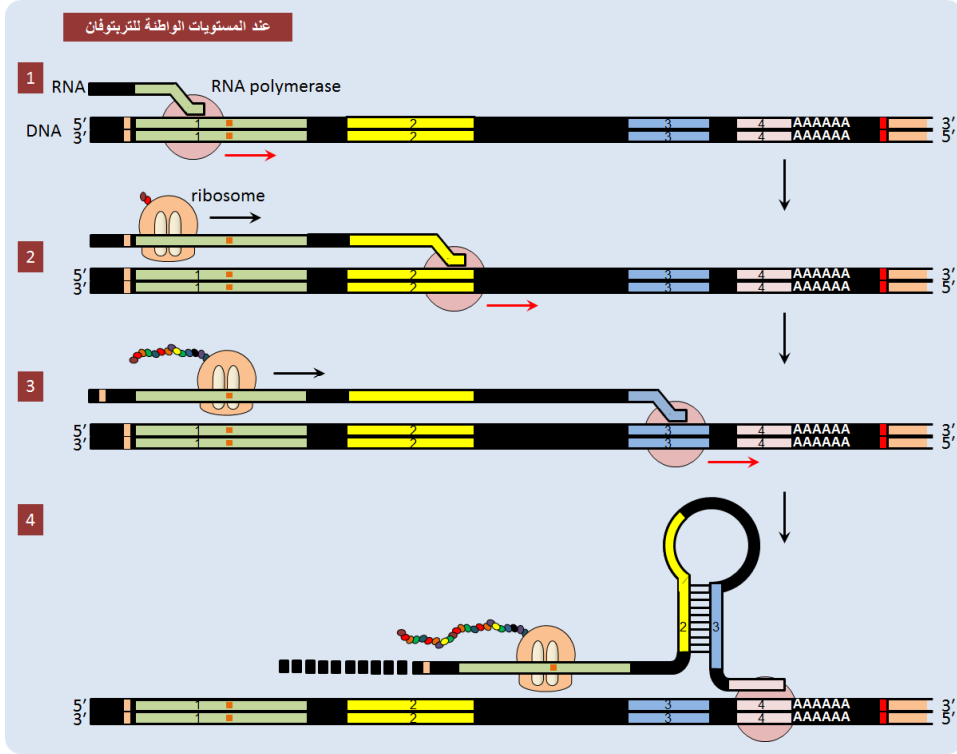
شكل (11.6): موقف الإضعاف في أوبرون الترتبوتوفان عند ارتفاع المستوى الخلوي للتربتوفان والذي يتلخص بأربع خطوات: (1) يبدأ إنزيم RNA polymerase باستنساخ المنطقة رقم 1 في تركيب 5'UTR، (2) يرتبط الرايبوسوم بالنهاية 5' لتركيب 5'UTR ويبدأ بترجمة المنطقة رقم 1 بينما مازالت منطقة رقم 2 في طور الاستنساخ، (3) يترجم الرايبوسوم منطقة رقم 1 بينما يستنسخ إنزيم RNA polymerase منطقة رقم 3، لاحظ عدم توقف الرايبوسوم عند كودونات الترتبوتوفان بسبب وفرة، (4) تغطي حافة الرايبوسوم الأمامية جزءاً من المنطقة رقم 2 مانعة إياها من الارتباط مع المنطقة رقم 3. ثم تستنسخ المنطقة رقم 4 وتزدوج مع المنطقة رقم 3. ينتج ازدواج المناطق 3 و 4 تركيب المضعف (attenuator) والذي ينهي الاستنساخ (تصميم المؤلف).

الاستنساخ عندما يكون مستوى الترتوفان واطناً

ماذا يحدث عندما يكون مستوى الترتوفان واطناً؟ مرة أخرى، يبدأ إنزيم RNA polymerase باستنساخ المنطقة رقم 1 لـ 5-UTR (شكل 12.6 الخطوة 1)، ويرتبط الرايوسوم بالنهاية 5' لمنطقة 5-UTR ويبدأ بترجمة منطقة رقم 1 بينما يقوم إنزيم RNA polymerase بالاستمرار في استنساخ المنطقة رقم 2 (شكل 12.6 الخطوة 2). وعندما يصل الرايوسوم إلى كودونات UGG المشفرة للترتوفان، فإنه يتعثر في تلك المنطقة (شكل 12.6 الخطوة 3) لأن مستوى الترتوفان يكون واطناً، و يكون الـ tRNA المحمل بالترتوفان نادراً أو غير متوفر بالمرة.

يجلس الرايوسوم على كودونات الترتوفان، منتظراً وصول الـ tRNA المحمل بالترتوفان. إن تعثر الرايوسوم، لا يمكن أن يعيق الاستنساخ، لذا يستمر إنزيم RNA polymerase بالحركة على طول جزيئة الـ DNA، ويستمر الاستنساخ والترجمة. وبما أن الرايوسوم يتعثر عند مواقع الترتوفان في المنطقة رقم 1، عندها لا تغطي المنطقة رقم 2 من قبل الرايوسوم عندما يتم استنساخ المنطقة رقم 3. ولهذا، تزودج النيوكليوتيدات في المنطقتين رقم 2 و3 قاعدياً مكونة دبوس شعر بين تلك المنطقتين (2-3 hairpin) (شكل 12.6 الخطوة 4). لا يسبب هذا الدبوس الانتهاء، ولهذا يستمر الاستنساخ. ولأن المنطقة رقم 3 قد ازدوجت عادة بالمنطقة رقم 2، لذا لا يتكون الدبوس المتكون بين المنطقتين 3 و4 (3-4 hairpin) أو المعروف بالمضعف، ولهذا، لا يحدث التضخيف. يستمر إنزيم RNA polymerase على طول جزيئة الـ DNA، خلف منطقة 5-UTR، مستنسخاً كل الجينات التركيبية إلى mRNA، والذي يترجم إلى الإنزيمات المشفرة من قبل أوبرون الترتوفان، ثم تخلق هذه الإنزيمات ترتوفان أكثر.

إن العامل الأساسي المنظم للتضخيف هو عدد من جزيئات tRNA المحملة بالترتوفان، لأن المقدار المتوفر منه هو الذي يحدد تعثر الرايوسوم عند كودونات الترتوفان. تتمثل أهمية النقطة الثانية في تزامن الاستنساخ والترجمة، والتي هي مهمة للتضخيف. ينجز التزامن خلال موقع الإيقاف المؤقت الواقع في المنطقة رقم 1 في 5-UTR. بعد بدء الاستنساخ، يقف إنزيم RNA polymerase مؤقتاً في ذلك الموقع، والذي يوفر وقتاً للرايوسوم لكي يرتبط بالنهاية 5' لجزيئة mRNA ولهذا يمكن للترجمة أن يتبع الاستنساخ عن كثب. إن النقطة الثالثة التي لا تجتاز فيها الرايوسومات الدبابيس الملفوفة عند منطقة 5-UTR لترجمة الجينات التركيبية. الرايوسومات التي ترتبط بموقع الارتباط بالرايوسوم عند النهاية 5' لجزيئة mRNA والتي تلاقي نهاية المنطقة رقم 1. إن الرايوسومات المترجمة للجينات التركيبية المرتبطة بموقع ارتباط بالرايوسوم مختلف الواقعة قرب بداية جين الترتوفان نوع ي trpE.



شكل (12.6): موقف الإضعاف في أوبرون التريتوفان عند انخفاض المستوى الخلوي للتريتوفان والذي يتلخص بأربع خطوات: (1) يبدأ انزيم RNA polymerase باستنساخ المنطقة رقم 1 في تركيب 5'UTR، (2) يرتبط الرايوسوم بالنهاية 5' لتركيب 5'UTR ويبدأ بترجمة المنطقة رقم 1 بينما مازالت منطقة رقم 2 في طور الاستنساخ، (3) يتعثر الرايوسوم بكدونات التريتوفان في المنطقة رقم 1 بسبب انخفاض مستوى التريتوفان، وبسبب تعثر التريتوفان لاتغطي المنطقة رقم 2 بالرايوسوم عندما تستنسخ المنطقة رقم 3، (4) عند استنساخ المنطقة رقم 3 فانها تزوج مع المنطقة رقم 2، وعندما تستنسخ المنطقة رقم 4 فانها لايمكن لها أن تزوج مع المنطقة رقم 3، لأن المنطقة رقم 3 هي عادة مازتزوج بالمنطقة رقم 2، وعندها لايمكن لتركيب المضعف (attenuator) أن يتكون ويستمر الاستنساخ (تصميم المؤلف).

بقي لنا أن نسأل: لماذا يحدث الإضعاف؟ لماذا تحتاج البكتيريا إلى الإضعاف في أوبرون التربتوفان؟ الا يمكن للكبح الحاصل في الموقع المشغل أن يمنع حدوث الاستنساخ عندما يكون مستوى التربتوفان عالياً في الخلية؟ لماذا تمتلك الخلية نوعان من السيطرة؟ إن جزء من الجواب هو أن الكبح لا يمكن أن يكتمل، تبدأ بعض الاستنساخات حتى عندما يكون كابح التربتوفان فعالاً، ويختزل الكبح من حدوث الاستنساخ بقر 70 مرة. يمكن للتضعيف أن يختزل الاستنساخ أكثر من ذلك بقدر ثمان إلى عشر مرات، وبهذا فإن كلتا العمليتان قادرتان على اختزال استنساخ أوبرون التربتوفان إلى أكثر من 600 مرة. توفر كلا الآليتين درجة أدق لبكتيريا القولون للسيطرة على تخليق التربتوفان مقارنة بعمل إحدهما فقط دون الآخر. السبب الآخر للسيطرة المزدوجة هو أن الإضعاف والكبح يستجيبان لإشارتين

مختلفتين: حيث يستجيب الكبح إلى المستويات الخلوية للتربتوفان، بينما يستجيب التضعيف لعدد من جزيئات الـ tRNA المشحونة بالتربتوفان. إن عملية الإضعاف هي ليست عملية قابلة للفهم بصورة سلسلة، وإنما تعتبر عملية معقدة لأنها يجب أن نتصور كيف يمكن لعمليتين ديناميكيتين – وهما الاستنساخ والترجمة – من أن يتفاعلا بصورة متزامنة، لذا، وهذا يبعث على الإرباك بطبيعة الحال. لا بد لنا أن نتذكر بأن الإضعاف هو العملية التي تؤدي إلى الإيقاف المبكر للاستنساخ وليس الترجمة. غالباً ما يسبب الإضعاف الإرباك لأننا نعرف بأن الاستنساخ يجب أن يسبق الترجمة. لذا نحن نرتاح للفكرة التي تقول بأن الاستنساخ يؤثر على الترجمة، ولكنه من الصعب علينا تخيل أن الترجمة يمكن أن تؤثر على الاستنساخ، كما هو عليه الحال في الإضعاف. إن حقيقة كون أن الاستنساخ والترجمة هما عمليتان مزدوجتان بشكل كبير في الخلايا بدائية النواة، والأحداث الحاصلة في إحدهما يمكن وبسهولة أن تؤثر على الأحداث الجارية في العملية الأخرى.

وسائل أخرى لتنظيم التعبير الجيني في البكتريا عند مستوى الاستنساخ

إن معظم الأساليب المعروفة في تنظيم التعبير الجيني في البكتريا هي السيطرة على معدل بدء العملية. لقد وصفنا آليات الاستنساخ في الفصل الرابع، وعندما نستدعي بعض المعلومات الواردة في ذلك الفصل، نجد بأن إنزيم RNA polymerase holoenzyme يتصل بقطعة من الـ DNA تدعى بالبروموتر. تقوم تلك التسلسلات بالسيطرة على مقدار الألفة بين الـ DNA وإنزيم RNA polymerase. وهناك منطقتين متميزتين للاتصال، أحدهما متمركزة على المنطقة 35- من البروموتر، بالتسلسل TTGACA، والأخرى متمركزة بالمنطقة 10- ذات التسلسل TATAAT. ويشار إلى تلك المنطقتين السداسيتين بالموقع الارتباطي الإنزيمي الأول (BS1) polymerase binding site 1، والموقع الارتباطي الإنزيمي الثاني (BS2) polymerase binding site 2 على التوالي.

يمكن أن يتغير معدل بدء الاستنساخ وذلك بالتغيرات الحاصلة في تركيب إنزيم RNA polymerase (راجع الفصل الرابع). وتتضمن هذه التغيرات: استبدال الوحدات الثانوية subunit replacement، و تحويل الوحدات الثانوية تساهمياً subunit covalent modification.

استبدال الوحدات الثانوية subunit replacement: عندما ترتفع الحرارة من 30 إلى 42 درجة مئوية، تستبدل وحدة سكما الثانوية 70 و 32 وحدة 32، وبما أن وحدة 32 الثانوية تقوم بتمييز بروموتر يختلف عن ذلك الموجود في الظروف الاعتيادية، لذا،

يخضع إنزيم الـ polymerase هنا عند ارتباطه مع هذه الوحدة الثانوية، والتي تقوده إلى بروموتير آخر لينتج بروتين آخر (راجع الفصل الرابع).

تحويل الوحدات الثانوية تساهمياً subunit covalent modification: عند قيام العائلي T4 بدمج بكتريا القولون، تصبح الوحدات الثانوية لإنزيم RNA polymerase محوّرة، حيث يضاف لها مجاميع أدنين إلى تركيب الرايبوز (ribose-adenylated)، مقللاً ألفة الإنزيم لتسلسلات البروموتير البكتيرية bacterial promoters (التابعة لبكتريا القولون المعرضة للدمج من قبل العائلي)، مزيداً للألفة للإنزيم لتسلسلات بروموتير العائلي phage promoters. وعلى سبيل المثال، عندما يدمج العائلي البكتريا، فإن بعض جينات العائلي يتم التعبير عنها حالاً بعد دخولها للبكتريا، بينما تعبّر مجموعة أخرى من الجينات بعد 5 إلى 10 دقائق وتدعى بالجينات المتأخرة delayed genes، أما المجموعة الثالثة من الجينات، والتي تدعى بالجينات الأخيرة late genes، فتعبّر خلال تعبئة دقائق العائلي وتدوم خلال تحلل الخلية cell lysis. تمتلك الجينات المبكرة نوعية من تسلسلات البروموتير يمكن تمييزها من قبل عامل سكما البكتيري. ومن ضمن هذه الجينات، هو جين عامل سكما الجديد، والذي يستبدل عامل سكما البكتيري على إنزيم RNA polymerase ويجعل الإنزيم قادراً على تمييز بروموتير الجينات المتأخرة promoters of delayed genes. ومن ضمن الجينات المتأخرة، يخلق عامل ثالث يشبه عامل سكما البكتيري أيضاً، والذي يستبدل عامل سكما المتأخر σ delayed ويسمح باستنساخ الجينات الأخيرة late genes.

وأخيراً، يمكن تنظيم معدل ابتداء تخليق الـ RNA وذلك بواسطة بروتينات تنظيمية مساعدة auxiliary regulatory proteins: والتي تؤثر على معدل تكوين معقد البروموتير المفتوح أما بإسلوب إيجابي أو سلبي، تعرف مثل هذه البروتينات المنشطة activator أو الكابحة repressors، على التوالي. كل بروموتير يمتلك ألفة طبيعية لإنزيم RNA polymerase وهذا يتحدد من قبل تسلسل البروموتير نفسه. تزيد البروتينات المنشطة ألفة الإنزيم، وبهذه الطريقة تزيد من معدل الاستنساخ. أما البروتينات الكابحة، فلها فعل معاكس. وعلى سبيل المثال كابح اللاكتوز والذي قد تمت مناقشته في أعلاه.

ثانياً: سيطرة الترجمة على التعبير الجيني

ربما يعتمد تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الترجمة على تحديد نصف العمر لجزيئة mRNA وراثياً. التحطيم الإنزيمي للـ mRNA يكون من النهاية 5' إلى 3' وهذا يعني أن نهاية الـ RNA التي تخلق في البداية هي التي تحطم في البداية. إن معدل عمر العديد من جزيئات الـ RNA لبكتريا القولون هو دقيقتين فقط بدرجة حرارة 37 °C. وربما يؤثر التسلسل النيوكليوتيدي المتخصص عند النهاية 5' على حساسيته للتحطيم الإنزيمي. علاوة على ذلك، لا يسمح للإنزيمات التقويضية catabolic enzymes بأن تقترب من الـ

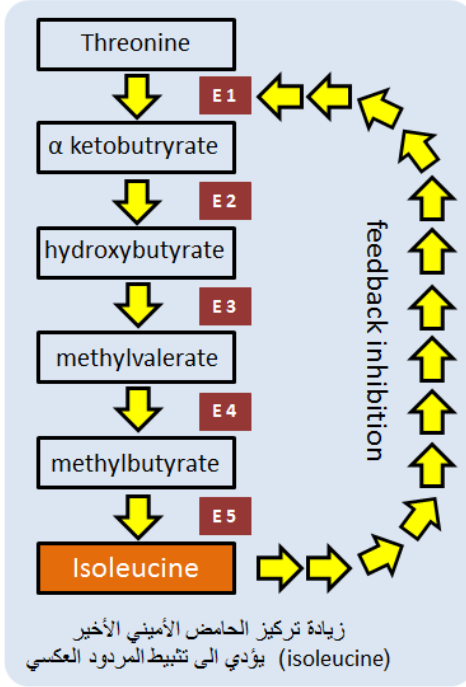
mRNA عندما تغطي جزيئات الـ mRNA عند نهايتها 5' (كما في حالة متعدد الرايبوسوم). وهنا، ربما يتعلق عمر النصف لجزيئات الـ mRNA بعدد الرايبوسومات المتوفرة في أية لحظة لترجمة جزيئات الـ mRNA. يتراوح معدل تخليق البروتين بتعدد الرايبوسومات المرتبطة بجزيئة الـ mRNA قيد الترجمة بدلاً من تغاير معدل الترجمة. ومثال ذلك، هو نظام اللاكتوز في بكتريا القولون، هنالك ثلاث جينات تحت سيطرة الموقع المشغل، لذا، يتحدد إنتاج تلك الإنزيمات الثلاثة الواقعة تحت تأثيره أيضاً. تنتج تلك البروتينات بمعدلات مختلفة مشيراً إلى مسافتها من النهاية 5' (موقع المشغل) للـ mRNA متعدد السسترون والتي تشفر منه تلك الإنزيمات (إن هذه الاختلافات هي أمثلة للتنظيمات الحاصلة في عملية الترجمة). إذن، هنالك تدرج في القطبية ضمن جزيئة الـ mRNA متعددة السسترون حيث يقل معدل ترجمة السسترون كلما ابتعد عن النهاية 5'. لقد افترض بأن الرايبوسومات ترتبط بنقاط بداية مختلفة (مواقع الارتباط بالرايبوسوم) على طول الـ mRNA متعدد السسترون عند معدلات مختلفة وهذا هو الذي انعكس على كمية البروتينات المخلقة.

هنالك نوع مثير من السيطرة على الترجمة هو تنظيم تعبير عامل التحرر release factor2 (RF2) في بكتريا القولون. يتم إنجاز هذا التنظيم بما يعرف بعملية تغيير إطار الترجمة translational frameshifting. يحتوي mRNA على عامل التحرر RF2 على كودون الإيقاف UGA بعد الحامض الأميني 25 (ليوسين leucine). وهكذا، وعند وجود ما يكفي من بروتين RF2، تنتهي ترجمة mRNA RF2 قبل أوانها. وعلى أية حال، إذا لم يكن هنالك ما يكفي من بروتين RF2 في الخلية، تحدث عملية تغيير إطار الترجمة translational frameshift، والتي يتم فيها القفز على مخأف اليوراسيل في كودون الإيقاف UGA ويقرأ الكودون التالي كـ GAC (أسبارجين asparagine). تؤسس عملية تغيير الإطار frameshift هذه إلى إطار قراءة مفتوح open reading frame للترجمة الكاملة لبروتين RF2.

ثالثاً: سيطرة ما بعد الترجمة (تثبيط المردود أو تثبيط الناتج النهائي) Post-Translational control (Feedback or End Production inhibition)

ينظم تعبير الجينات أيضاً بعد تخليق البروتين. يدعى هذا بسيطرة ما بعد الترجمة على عمل الجين. إن سيطرة المردود هي آلية تنظيمية والتي لا تؤثر على تخليق الإنزيم، ولكنها بدلاً من ذلك فإنها تثبط من فعالية الإنزيم. وفي هذه الحالة يتحد الناتج النهائي لمسلك التخليق الحيوي (إذا كان بتركيز عال) بالإنزيم الأول في المسلك. لا يحدث هذا الاتحاد في الموقع الحفزي catalytic site، ولكنه يحور من التركيب الرباعي tertiary structure

للإنزيم، وهنا، فانه يثبط الموقع الحفزي. يثبط هذا الانتقال اللأوستيري allosteric transition الفعالية الإنزيمية لجزيئة البروتين ويمنع الإنتاج المفرط للنواتج النهائية ونواتجها الأيضية الوسطية. ويوجد مثال واضح يصف هذه الظاهرة يتعلق بتخليق الحامض الأميني isoleucine (الناتج النهائي للخطوات الخمس لتحول الـ threonine) إلى الوسط الذي تنمو عليه البكتريا والذي ينتج في إيقاف مباشر لمسلك threonine – isoleucine. وعند وجود الـ isoleucine المضاف، تفضل الخلية أن تستخدم الناتج النهائي للحامض الأميني isoleucine الخارج خلوي وينتهي تخليق الـ isoleucine خاصتها. علاوة على ذلك، لا يتداخل إنتاج الإنزيمات الخمس، ولكن يثبط فعل الإنزيم المسؤول عن إزالة الأمين من الـ threonine إلى α -ketobutyrate من قبل الناتج النهائي ألا وهو isoleucine (شكل 13.6).



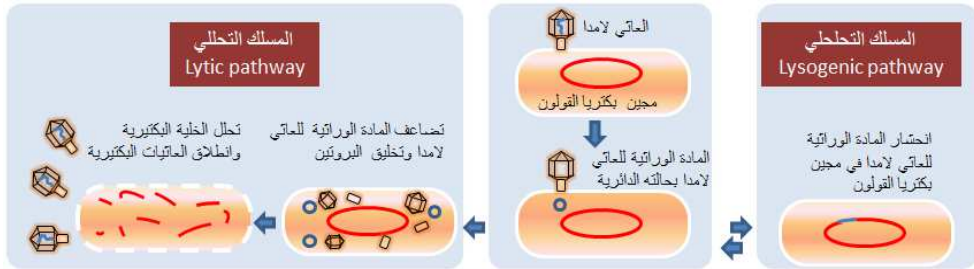
شكل (13.6): تثبيط المردود feedback inhibition في بكتريا القولون، تدل الحروف E1, E2 ... الخ على الانزيمات التي تقوم بتحويل الاحماض الأمينية من شكل الى آخر. وعند زيادة تركيز الحامض الأميني isoleucine يثبط الانزيم الأول (E1) في العملية (تصميم المؤلف).

تنظيم التعبير الجيني في العاثيات البكتيرية

تأوي بعض البكتريا فايروسات يمكن لها أن تبقى في حالة خاملة dormant state ضمن الكروموسوم البكتيري أو يمكن أن تتضاعف ضمن البكتريا وتؤدي بالنهاية إلى تحلل وقتل المضيف البكتيري. بعض أنواع بكتريا القولون تأوي فايروسات مؤقتة temperate

viruses، كما هو الحال في العائلي لامدا (λ) lambda. عندما يجمع هذا العائلي بكتريا القولون الحساسة له، فإنه يحقن الكروموسوم الخطي المزدوج الشريط التابع له والمتألف من 45000 زوج قاعدي (الشكل 14.6). واعتماداً على الحالة الغذائية للخلية، أما أن يندمج lambda DNA بالكروموسوم البكتيري (المسلك التحللي lysogenic pathway) ويبقى خاملاً إلى أن يتم تنشيطه (أنظر أدناه)، أو أن يصنع عدد كبير من النسخ قد تصل إلى حوالي 100 نسخة من الفايروسات الكاملة المعبأة بتركيب بروتينية خاصة، وعند تلك النقطة، يحلل العائلي العائل (المسلك التحللي lytic pathway). ويمكن لدقائق الفايروس virus particles المتكونة حديثاً من خمج عوائل حساسة أخرى.

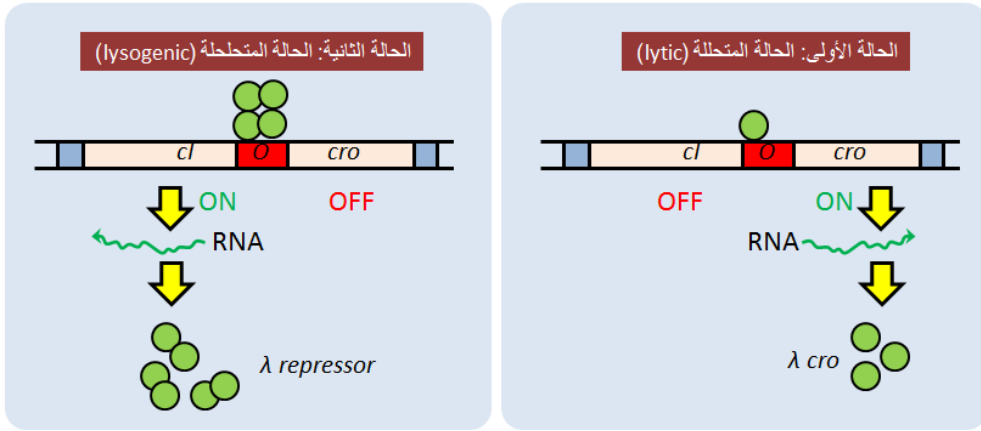
عندما يدخل العائلي في كروموسوم العائل بحالته الخاملة، سيبقى lambda بتلك الحالة إلى أن يتم تنشيطه من قبل تعرض عائله البكتيري إلى العوامل المحطمة للـ DNA. واستجابة لحافز مؤذ كهذا، تصبح العائيات الخاملة مستحثة "induced" وتبدأ باستنساخ وترجمة تلك الجينات الموجودة على الكروموسوم التابع لها والتي تكون ضرورية لقصها من كروموسوم العائل، بالإضافة إلى جينات أخرى لها دور رئيسي في تضاعف الـ DNA، والجينات التي تشفر عن بروتينات تخليق أغلفة البروتين للعائلي، والجينات التي تشفر عن إنزيمات التحلل. أن هذا الانتقال الذي هو بين طور الخمول dormancy أو حالة العائلي الأولي prophage state إلى حالة الخمج التحللي lytic infection قد فهم بشكل واضح على المستوى الجزيئي وسوف يتم مناقشته بالتفاصيل هنا. بعد قيام العائلي بجمع البكتيريا، يتم اتخاذ القرار سواء هل يتضاعف العائلي، وينتج عائيات جديدة والتي تؤدي بالنهاية إلى تحلل الخلية cell lysis، أو فيما إذا ينحسر العائلي في الكروموسوم البكتيري ويصبح مكبوح وراثياً genetically repressed (الحالة المتحللة lysogenic state). يتخذ القرار بين هاتين الحالتين للعائلي لامدا من قبل اثنان من الكوابح، وهما *ci* و *cro*، واللذان تتنافس على نفس منطقة المشغل operator region في DNA العائلي لامدا (شكل 14.6).



شكل (14.6): الانتقال الوراثي genetic switch للعائلي لامدا. يشير السهمين المتعاكسين الى الطبيعة الانعكاسية للمسلك التحللي، أي إمكانية تحرر DNA العائلي لامدا بعد انحصاره في مجين بكتريا القولون حال تعرض البكتيريا الى الظروف البيئية المناسبة لحدوث ذلك كالأشعة فوق بنفسجية (تصميم المؤلف).

يتركز نشاط الانتقال للعائلي lambda حول منطقة تتكون من 80 زوج قاعدي في جزيئة الـ DNA الحلزونية المزدوجة والتي يطلق عليها بالمشغل الأيمن right operator (OR) (شكل 15.6). يحد المشغل الأيمن من جهته اليسرى بجين تركيبي لكابح العائلي lambda وبجانبه الأيمن بجين تركيبي لبروتين تنظيمي آخر يدعى بـ *cro*. وعندما يكون العائلي lambda بحالته الأولية *prophage state*، أي عندما يكون مندمجاً بـ كروموسوم العائل، يعبر عن الجين الكابح *repressor gene* والذي هو جين العائلي lambda الوحيد الذي يتم التعبير عنه في الحالة الخاملة للعائلي والذي يكبح تعبير كل الجينات الأخرى ما عداه.

وعندما يخضع العائلي إلى النمو التحلي *lytic growth*، لا يتم التعبير عن الجين الكابح، ولكن يتم التعبير عن جين *cro*، بالإضافة إلى العديد من الجينات الأخرى في العائلي lambda. هذا يعني، عندما يعمل الجين الكابح، يقف عمل جين *cro*، وعندما يعمل جين *cro*، يقف عمل الجين الكابح. إن هذا القرار بين استنساخ الجين الكابح *repressor gene* واستنساخ جين *cro* هو مثال عن عملية التحول الجزيئي *molecular switch* بين نهجين مختلفين.



شكل (15.6): التفسير الجزيئي للانتقال الوراثي للعائلي لامدا. ففي الحالة الأولى (الحالة المتحللة) يصنع فيها البروتين الكابح *cro* وفي الحالة الثانية (الحالة المتحللة) يصنع فيها البروتين الكابح *lambda repressor*. يدل الحرف *O* على المشغل (تصميم المؤلف).

هنالك اختلافات جوهرية في عملية التنظيم الجيني بين الكائنات حقيقية وبدائية النواة. فبالإضافة إلى عملية الاستنساخ، توظف الخلايا حقيقية النواة آليات متنوعة لتنظيم التعبير الجيني. يفصل الغلاف النووي *nuclear membrane* للخلايا حقيقية النواة فيزيائياً عملية استنساخ الجين عن عملية ترجمته، مادامت الرايوسومات توجد فقط في الساييتوبلازم. وفي

الكائنات حقيقية النواة، تدخل العديد من الخطوات الأخرى الإضافية، وخصوصاً عند معالجة الـ RNA، في تعبير الجينات حقيقية النواة مقارنة بتلك الجينات الموجودة في بدائية النواة، توفر هذه الخطوات مواقع إضافية للتأثيرات التنظيمية التي لا يمكن أن توجد في بدائية النواة. تتضمن خطوات معالجة الـ RNA في الكائنات حقيقية النواة إضافة القلنسوة capping للنهاية 5' للمستنسخ الأولي، إضافة الذيل متعدد الأدنين polyadenylated tail إلى النهاية 3' لنفس الجزيئة، بالإضافة إلى قص excision مناطق الانترون لتوليد اكسونات ملتحمة مع بعضها البعض في جزيئة الـ mRNA الناضجة.

تنظيم التعبير الجيني في حقيقية النواة

تعتبر دراسة عملية التعبير الجيني في الكائنات حقيقية النواة دراسة معقدة جداً ومفهومة بصورة أقل على المستوى الجزيئي مقارنة ببداية النواة، وذلك لأسباب عديدة منها التعداد الهائل لجينات حقيقية النواة مقارنة في بدائية النواة. لذا سنغطي أمثلة قليلة عما يجري من تنظيم للتعبير الجيني في الخلايا حقيقية النواة، لكنها على الرغم من قلتها فإنها تعطي صورة واقعية عن النمط التي تسلكه الخلايا حقيقية النواة في السيطرة على التعبير الجيني.

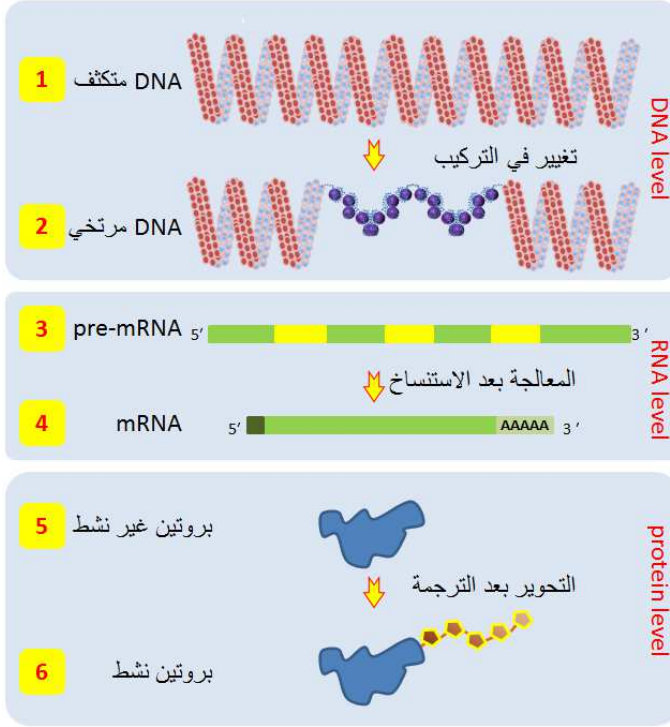
تمتلك اللبائن مادة وراثية أكبر بـ 8000 مرة من تلك الموجودة في بكتريا القولون. إن الكثير من تلك المواد الوراثية الإضافية تدخل في تنظيم التعبير الجيني خلال تمايز الأنسجة وتنوع العمليات البايولوجية المختلفة في الكائن ذو الخلايا المتعددة، وذلك لضمان إمكانية استجابة الكائن للتحديات البيئية المعقدة وببساطة، إن هنالك نوعان من التنظيم الجيني: التنظيم الإيجابي positive regulation والتنظيم السلبي negative regulation. عندما يزداد تعبير المعلومات الوراثية كمياً عند وجود عامل تنظيمي معين، يمكن القول على التنظيم بأنه إيجابي، بينما عندما يقل التعبير الجيني للمادة الوراثية عند وجود عامل تنظيمي معين، يمكن القول على التنظيم بأنه سلبي. يطلق على العامل أو الجزيئة التي تتوسط التنظيم السالب بالمنظم السلبي negative regulator، بينما تلك التي تتوسط التنظيم الموجب فيطلق عليها بالمنظمات الموجبة positive regulators. وعلى أية حال، يعد التنظيم السالب المزدوج double negative يمتلك تأثير المنظم الموجب في عمله. وبالتالي، فالمنظم الذي يثبط وظيفة المنظم السلبي يعتبر كتنظيم إيجابي.

مستويات التنظيم الجيني في الكائنات حقيقية النواة

يتم تنظيم العديد من الجينات عند عدد من النقاط على طول مسلك تدفق المعلومات الوراثية من الطراز الوراثي genotype المتمثل عادةً بالـ DNA إلى الطراز المظهري phenotype المتمثل عادةً بالبروتين (شكل 16.6).

أولاً، وهي تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الجينوم. ربما يكون التنظيم عبر تحويل تركيب الجين. ربما تؤثر تحويلات الـ DNA أو كيفية تعبئته على هوية التسلسلات المتوفرة لحدوث عملية الاستنساخ أو المعدل الذي عنده يتم إستنساخ تلك التسلسلات. إن مثيلة الدنا DNA methylation والتغيرات الحاصلة في الكروماتين هما عمليتان تلعبان دوراً حيوياً في تنظيم التعبير الجيني.

إن النقطة الثانية التي يتنظم فيها التعبير الجيني هي مستوى الاستنساخ. ولكي تقتصد الخلية في خسارتها للطاقة فإنها تتحسس أي زيادة في إنتاج البروتين الخلوي فوق الحد المقرر. يتم تنفيذ هذا التحسس من خلال نقطة الاستنساخ. يستخدم هذا النمط من التنظيم في كلا الخلايا بدائية وحقيقية النواة. أما النقطة الثالثة لتنظيم التعبير الجيني في حقيقية النواة فتحدث في مستوى ما بعد الاستنساخ، وتتضمن معالجة الـ mRNA (mRNA processing)، حيث تحول جزيئة mRNA حقيقية النواة بشكل كبير قبل أن تتم عملية ترجمتها، حيث تضاف الفلنسوة عند النهاية 5' ويضاف ذيل متعدد الأدنين إلى النهاية 3' وتزال الانترونات (راجع الفصل الرابع). يحدد هذا التحويل من ثباتية الـ mRNA، ويؤثر على ترجمته ومعدل ترجمته وعلى محتوى الحامض الأميني للبروتين الناتج. وهناك إفادات كثيرة تؤكد بأن عدد من الآليات التنظيمية في الكائنات حقيقية النواة تعمل عند مستوى معالجة الـ mRNA. بالإضافة إلى معالجة الـ RNA تلعب عملية تنظيم ثباتية الـ RNA دوراً رئيسياً أحياناً في تنظيم التعبير الجيني. لا تعتمد كمية البروتين المنتجة على كمية الـ mRNA المخلقة، ولكنها تعتمد أيضاً على المعدل التي يتحطم فيه الـ mRNA. وبهذا، تلعب ثباتية الـ RNA دوراً مهماً في التعبير الجيني. النقطة الرابعة في تنظيم التعبير الجيني تحدث بمستوى الترجمة، وهي عملية معقدة تحتاج إلى عدد كبير من الإنزيمات والعوامل البروتينية وجزيئات الـ RNA (راجع الفصل الخامس). كل هذه العوامل، فضلاً عن وفرة الأحماض الأمينية وطبيعة تسلسلات الـ mRNA تؤثر على معدل البروتينات المنتجة وبهذا فهي توفر نقاطاً ربما يحدث عندها تنظيم ما لعملية التعبير الجيني. وأخيراً، ففي النقطة الخامسة تتحول العديد من البروتينات بعد عملية تخليقها (أنظر الفصل الخامس). تؤثر هذه التحويلات على فعالية البروتينات، وبهذا يمكن تنظيم الجينات من خلال العمليات التي تؤثر على التحويلات الجارية ما بعد الترجمة post-translational modification. لهذا، يمكن أن يتأثر الجين بالفعاليات التنظيمية عند أي من تلك النقاط السالفة الذكر.



شكل (16.6): تنظيم التعبير الجيني عند مستويات متعددة (تصميم المؤلف)

أولاً . تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الجينوم

في الخلايا حقيقية النواة، يبدوا هنالك أصنافاً معينة من الجينات تستنسخ بشكل أكثر أو أقل استمرارية على مستوى الجينوم،

وتكبح فعاليتها في حالات شاذة. ربما يكون نمط التعبير التمايزي الحاضر على مستوى الترجمة أو الاستنساخ يوجد أيضاً عند مستوى الجينوم (كما في الـ DNA). وقبل أن نعرض بعض الأمثلة المتعلقة بهذا المستوى من التنظيم لابد لنا من معرفة مصطلحين مهمين وهما الكروماتين الحقيقي *euchromatin* والكروماتين المتغير *heterochromatin*، ويكون الأول فعال استنساخياً ويحتوي على جينات بحالة فعالة، بينما يكون الكروماتين المتغير على العكس من ذلك. يتضاعف الكروماتين الحقيقي بشكل عام قبل الكروماتين المتغير. كما يصطبغ الكروماتين المتغير بصورة غير متجانسة في المجهر، ومن هنا جاءت تسميته بالمتغير، بينما يصطبغ الكروماتين الحقيقي بصورة متجانسة. هنالك نوعان من الكروماتين المتغير، الكروماتين المتغير التكويني *constitutive heterochromatin*، والكروماتين المتغير الاختياري *facultative heterochromatin*. عادة ما يتكثف الكروماتين المتغير التكويني، وهكذا فهو غير فعال. ويوجد هذا النوع من الكروماتين عادة في المناطق الأقرب إلى الأجزاء المركزية في الكروموسوم (centromeres)، بالإضافة إلى المناطق الطرفية للكروموسوم (telomeres). أما الكروماتين المتغير الاختياري، فانه يتكثف أحياناً، ولكن، في أحيان أخرى، يبدو وكأنه كروماتين حقيقي. ويمكن توضيح معنى الكروماتين المتغير الاختياري، من خلال كروموسوم X، والذي عادة ما يكون غير فعال

إستنساخياً بشكل كامل، وبالتالي، فهو متغاير الكروماتين heterochromatinic. وعلى أية حال، يقل تكثف كروموسوم X خلال عملية تكوين الأمشاج gametogenesis، ويصبح فعال استنساخياً خلال مرحلة النشوء الجنيني embryogenesis المبكرة، ولهذا، فهو هنا كروماتين متغاير اختياري facultative heterochromatin.

تتنوع شدة تكثف الكروماتين خلال دورة الخلية. ففي مرحلة الطور البيني interphase (الخلايا غير المنقسمة)، يدعى معظم الكروماتين بالكروماتين الحقيقي euchromatin والذي يكون منتشراً في جميع أنحاء النواة. وخلال هذه المرحلة من دورة الخلية، تستنسخ الجينات ويتم تضاعف الـ DNA استعداداً لانقسام الخلية. يبدو أن معظم الكروماتين الحقيقي في خلايا الطور البيني بشكل ألياف بقطر 30-nm. وهكذا يرتبط الكروماتين بالتعبير الجيني gene expression. وعلى أية حال، يمتلك كروموسوم اللبائن تناظر من وجهين في مرحلة الطور الاستوائي metaphase، مع كروماتيدات شقيقة متماثلة مرتبطة عند السنترومير. كل كروماتيد شقيق يحتوي على جزيئة DNA ذات شريط مزدوج، وخلال الطور البيني interphase، تكون تعبئة جزيئة الـ DNA أقل كثافة من الكروموسوم المتكثف في الطور الاستوائي، ولهذا تكون كروموسومات الطور الاستوائي غير فعالة استنساخياً. وهنا، عندما نستعرض بعض الأمثلة حول السيطرة على تنظيم الجين عند مستوى الجينوم سيتضح لنا كيف يقوم كل من الكروماتين الحقيقي والمتغاير بتبديل التعبير الجيني.

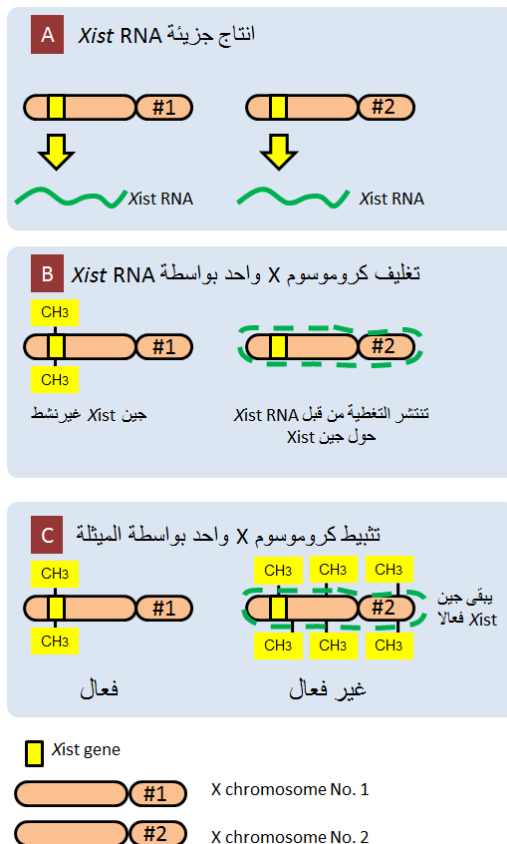
(أ). نمط تعليق العمل الوراثي بشكل كلي (genetic shutdown expression pattern). وهناك عدة أمثلة لهذا النمط، ومن أهمها: 1. خلال طور الانقسام الاعتيادي mitotic division لدورة الخلية، يتكثف الكروماتين بشكل كبير لكي يكون الكروموسومات، وتعلق الفعالية الاستنساخية لكل الجينات. 2. أما المثال الآخر هو على الرغم من احتواء خلايا النطف بشكل واضح على محتوى وراثي كامل ولكن لا يحدث الاستنساخ في هذا المحتوى الوراثي بأكمله إلى أن يتم تنشيط نواة النطفة ضمن سايتوبلازم البيضة بعد حدوث عملية الإخصاب. 3. نمط كبح الكروموسوم الأنثوي (X-inactivation): يتعلق هذا النمط بالتكثف والإغلاق التام للتعبير الجيني لأحد كروموسومي X في خلايا اللبائن الأنثوية، حيث تمتلك الإناث كروموسومين من نوع X، بينما يمتلك الذكور كروموسوم X واحد بالإضافة إلى كروموسوم Y أصغر. وبالتالي، تمتلك الأنثى نسختين من معظم الجينات والتي تحملها الكروموسومات X، بينما تمتلك الذكور نسخة واحدة فقط. ففي اللبائن، عموماً، يتم إسكات كروموسوم واحد من نوع X في كل خلية أنثوية. أما الآلية التي تضطلع بتنشيط كروموسوم X في اللبائن تتضمن تدخل جزيئة RNA غير مشفرة تقوم بتنشيط كروموسوم X واحد. يتم تنظيم هذا التنشيط بواسطة مثيلة جين معين يسمى Xist gene، والذي يقع في كروموسوم X. يبقى جين Xist التابع لكروموسوم X بحالته الفعالة إلى أن يتم تثبيطه من قبل المثيلة. وعادة ما يورث نمط المثيلة هذا عند

الأجسام
أحياناً في
التأكد من
الأنوثة
الوراثية
للمشارك
في
الرياضات
الأولمبية.



(ب). نمط التعبير المستمر أو التكويني
(constitutive expression)

203



هكذا جينات بعدم تكتنفها بشكل دائم. وعلى الرغم من استنساخ تلك الجينات بمعدل قليل، إلا أنها تعبر بشكل دائم (أنظر الفصل الثاني). وهناك أمثلة أخرى ولكنها خارج استيعاب هذا الكتاب.

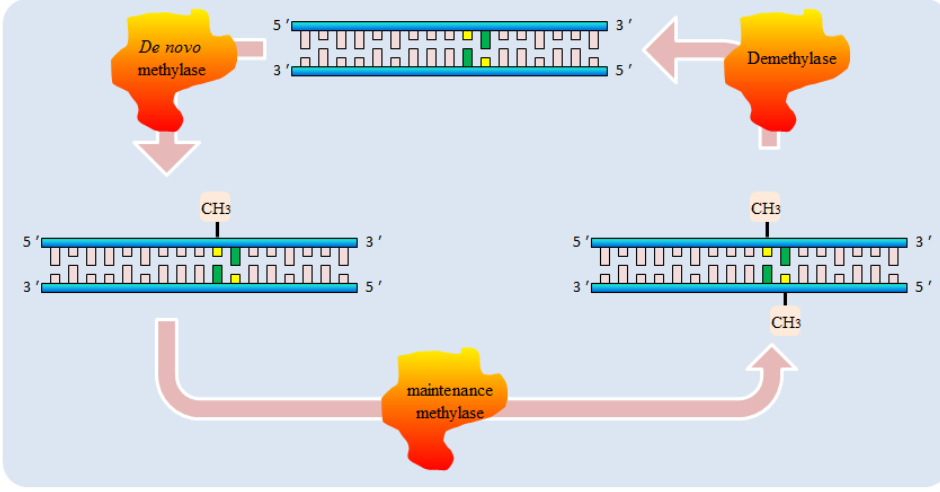
(ج). نمط التعبير الجيني المتخصص (specific expression pattern): تعبر العديد من الجينات بأنسجة معينة فقط وهناك عدة أمثلة تبين هذه الحقيقة. ويوفر ضفدع *Xenopus* مثلاً جيداً حول تنظيم حول تنظيم جينات 5S، حيث ينتج بعض أنواع هذا الضفدع 19000 نسخة من جينات 5S rRNA المتخصصة بالخلايا البيضية (oocyte specific)، تكون تلك الجينات فعالة فقط في الخلية البيضية وليس في خلية أخرى.

(د). نمط العناصر الغير وراثية (non-genetic elements expression pattern): بعض الـ DNA لا يستنسخ أبداً في أي خلية. يتألف بعض الـ DNA في الخلايا حقيقية النواة من تسلسلات قصيرة مكررة ترادفياً (tandemly repeated sequences) والتي تتركز فقط في الكروماتين المتغاير (heterochromatin) كما في مناطق السنتروميير الموجودة في الكروموسومات والكروموسوم Y. لا تستنسخ معظم هذه المناطق من الـ DNA في أي خلية أبداً، أي أنها لا تعبر جينياً عن نفسها ولهذا تدعى أحياناً بالعناصر الغير وراثية. بالإضافة إلى هذا، توجد تسلسلات معينة تقع ما بين الجينات والتي يطلق عليها بالتسلسلات المباعدة (spacer sequences)، وعادة لا يمكن استنساخ مثل هذه التسلسلات المباعدة. إن حجم الجينوم الكبير جداً في الكائنات حقيقية النواة يشير بالتحديد إلى أن الكثير من الـ DNA يوجد بحالة تكرارية وربما لا يستغل كتسلسل تشفيري أو كتسلسل تنظيمي. وهناك مثال آخر توفره الجينات الكاذبة (راجع الفصل الثاني).

(هـ). وصل أطراف الـ DNA مع بعضها البعض بعد كسرها (gene rearrangement expression pattern): تحدث ظاهرة وصل الأطراف بالتراكب splicing الموصوفة في الفصل الرابع لتسبب حدوث حالة إعادة الترتيب الجيني. تحدث مثل هذه الآلية خلال تعبير جينات الكلوبولينات المناعية (immunoglobulin Ig genes). إن عملية وصل الأطراف بالتراكب هنا تختلف عن تلك العملية الموصوفة في الفصل الثاني لأن الأخيرة تحدث لجزيئات الـ RNA وهي لا تؤدي إلى إعادة ترتيب تسلسلات الـ DNA. وبالتالي، قد تعطي هذه الآلية تفسيراً معقولاً عن كثرة التغيرات على المستوى الجيني الملاحظة في بعض جينات اللبائن والتي تنعكس إلى مناطق متغيرة جداً على المستوى البروتيني، وهذا ينعكس بطبيعة الحال على وظيفة الاجسام المضادة الناتجة.

ثانياً: تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الاستنساخ

(أ). تحويل تسلسلات الـ DNA (ميثلة الـ DNA). توجد ظاهرة الميثلة في كلا بدائية وحقيقية النواة، ولكن الغرض الذي لأجله وجدت هذه العملية مختلف تماماً، حيث تستخدم الكائنات بدائية النواة الميثلة لغرض تمييز الـ DNA المخلق حديثاً. أما في الكائنات حقيقية النواة، يتم تمييز الـ DNA المخلق حديثاً بآليات مختلفة مازال غير واضحة إلى الآن. مع ذلك، تضيف الكائنات حقيقية النواة مجاميع الميثيل للـ DNA كي تعتبره واسماً لتنظيم التعبير الجيني. حيث يستخدم ميثلة الـ DNA في هذه الكائنات المعقدة كما بينا كواسم لتلك الجينات التي يدخل تعبيرها في تمايز الأنسجة (tissue differentiation). وتكون تسلسلات التمييز في هذه الحالة قصيرة للغاية، حيث أنها تتألف من CG بالحيوانات. وهناك نوعين من انزيمات الـ methylase. النوع الأول، انزيمات الـ methylases المحافظة (maintenance methylase)، والتي تضيف مجاميع ميثيل إلى الـ DNA المصنوع حديثاً عند مواقع معاكسة لمجاميع الميثيل في شريط الـ DNA الأبوي القديم. وهذا يضمن وراثة نمط الميثلة خلال انقسام الكروموسوم. إن تغير نمط الميثلة يتضمن انزيمات methylases الأنسية (de novo methylases) والتي تضيف مجاميع الميثيل الجديدة وانزيمات demethylases التي تزيل مجاميع الميثيل (شكل 18.6). وفي عملية الميثلة هنا، يتمثل التغير الحادث في تركيب الكروماتين الذي يرتبط مع الاستنساخ بميثلة قواعد الساييتوسين، والذي ينتج 5-methylcytosine. يرتبط الـ DNA الممethyl بشكل كبير مع كبح الاستنساخ، حيث يكون الـ DNA الفعال استنساخياً غير ممethyl في تلك الكائنات. تحدث ميثلة الـ DNA عادة على قواعد الساييتوسين المجاورة لنيوكلوتيدات الكوانين في نفس الشريط (CpG)، ولهذا تجلس قاعدتي الساييتوسين المميثلتين بشكل مائل عبر بعضها البعض على الشريطين المتعاكسين: تدعى مناطق الـ DNA التي تحتوي على العديد من تسلسلات CpG بجزر الكوانين والساييتوسين (CpG islands) وتوجد عادة قرب مواقع بدء الاستنساخ. بينما الجينات التي هي ليست ضمن طور الاستنساخ عادة ما تكون مواقع جزر الكوانين والساييتوسين فيها مميثلة، ولكن تزال مجاميع الميثيل قبل بدء الاستنساخ.

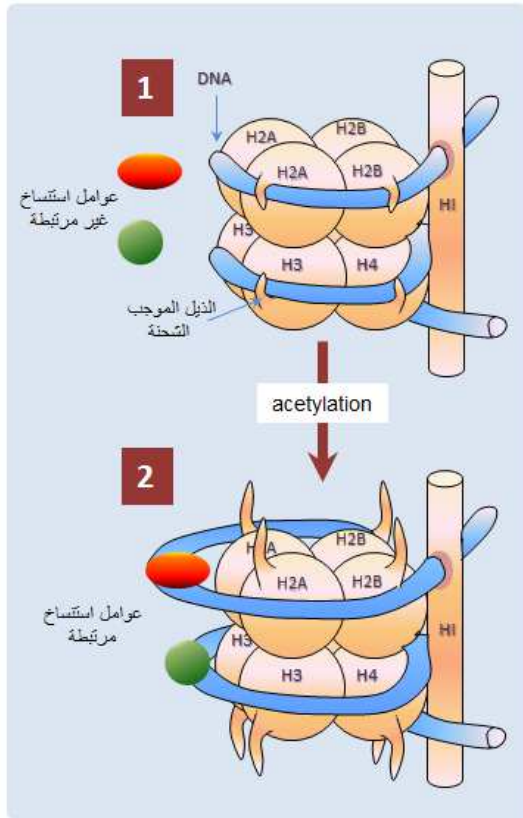


شكل (18.6): كيفية السيطرة على مثيلة الـ DNA من قبل ثلاث انزيمات. يضيف انزيم *de novo* methylase مجاميع الميثيل على جزر الكوانين - سايتوسين. يضيف انزيم *maintenance methylase* مجموعة ميثيل ثانية على الشريط المعاكس للمواقع النصف ممثلة. يقوم انزيم *demethylase* بإزالة مجاميع الميثيل. يشير اللون الأصفر إلى السايتوسين، بينما يشير اللون الأخضر إلى الكوانين (تصميم المؤلف).

تقوم عملية الميثلة في الكائنات حقيقية النواة بإسكات التعبير الجيني. والدليل العملي على ذلك، بأن جينات "تدبير شؤون المنزل" (راجع الفصل الثاني)، والتي تعبر في كل الأنسجة، تمتلك جزر كوانين - سايتوسين غير ممثلة. وبالتناقض مع ذلك، تكون هذه الجزر في الجينات المتخصصة بالأنسجة بحالة غير ممثلة في تلك الأنسجة المحددة حيث تعبر الجينات. ولهذا السبب، فإن المحافظة على نمط الميثلة يضمن بأن نمط التعبير الجيني يبقى ثابتاً بين الخلايا في أنسجة محددة. وتشير البحوث الحديثة إلى أن الارتباط الحادث بين ميثلة الـ DNA وإزالة تخلل الهستونات (*deacetylation of histones*) كلاهما يكبح الاستنساخ. تقوم بروتينات معينة ترتبط بإحكام بتسلسلات الكوانين والسايتوسين الممثلة بتكوين معقدات مع بروتينات أخرى والتي تعمل كمزيلات لتخلل الهستون *histone* *deacetylases*، والتي تزيل مجاميع الخل من ذيول الهستون، لتثبت تركيب النيوكليوسوم وتكبح الاستنساخ.

(ب). تحويل الهستونات. يتعرض المكون الهستوني للكروماتين لثلاث أنواع من تحويلات ما بعد التخليق والتي إما أن يكون لها تأثير مباشر أو غير مباشر على تنظيم الجين في حقيقية النواة. 1. تؤثر ميثلة الهستون histone methylation على هستونات H3 و H4 والتي تدخل في الميثلة الغير عكسية على مخلفات اللايسين القليلة وهذا الذي يحور من الطبيعة الكارهة للماء للسلاسل الجانبية لهذه الهستونات. 2. تتضمن فسفرة الهستون histone phosphorylation الهستون H1. تؤثر الفسفرة على السيرين والمثيونين، مغيرة إياها من حالة الشحنة المتعادل إلى واحدة من الشحنة السالبة وهذا التفاعل هو تفاعل عكسي. تتغير حالة فسفرة الهستون H1 خلال دورة حياة الخلية حقيقية النواة، وبعد فسفرة الهستون H1، والتي يتكثف بشكل أكبر، كما يحدث من تكثف في الكروموسومات التي هي في طور الانقسام. يكون تنشيط إنزيم histone kinase هو المسؤول عن فسفرة الهستون H1 وهذا ربما يكون الخطوة الأولى في سلسلة الأحداث التي تقود إلى تكثف الكروماتين النهائي قبل حصول الانقسام الخلوي للخلية. 3. أحد العوامل الذي يؤثر على تركيب الكروماتين هو التخلل acetylation، وهو إضافة مجاميع الخل (أو الأسيل) وهي CH_3CO إلى بروتينات الهستون.

يملك الهستون في صميم النيوكليوسوم حقلين أو مقاطعتين (two domains) (1) المقاطعة الكروية والتي ترتبط بالهستونات الأخرى والـ DNA و (2) مقاطعة الذيل الموجبة الشحنة التي يعتقد أنها تتداخل مع مجاميع الفوسفات السالبة الشحنة في عمود الـ DNA الفقري (شكل 19.6).



شكل (19.6): دور إضافة مجاميع الخل acetylation لبروتينات الهستون بتحويل تركيب الكروماتين والسماح لبعض عوامل الاستنساخ بالارتباط بالـ DNA، (1) الذيل الموجبة الشحنة لبروتينات الهستون النيوكليوسومية والتي تتداخل مع مجاميع الفوسفات السالبة الشحنة في الـ DNA، (2) إضافة مجاميع الخل إلى الذيل الموجبة الشحنة يقوم بإضعاف تداخل هذه الذيل مع الـ DNA والسماح لبعض عوامل الاستنساخ بالارتباط بالـ DNA (تصميم المؤلف).

تضاف مجاميع الخل إلى بروتينات الهستون بواسطة إنزيمات acetyltransferase ، تقوم مجاميع الخل بزعزعة استقرار التركيب النيوكليوسومي، وهذا ربما يعادل من الشحنات الموجبة في ذيول الهستونات ويسمح للـ DNA بأن ينفصل عن الهستونات. تدعى إنزيمات أخرى بالـ deacetylases والتي تجرد الهستونات من مجاميع الخل وتعيد حالة الكبح الكروماتيني إلى حالتها.

تمتلك عوامل استنساخ معينة وبروتينات أخرى منظمة للاستنساخ فعالية acetyltransferase. يمكن لبعض عوامل الاستنساخ والبروتينات المنظمة الأخرى بتحويل تركيب الكروماتين بدون تخليل بروتينات الهستون. ترتبط تلك المعقدات المعدلة للكروماتين بشكل مباشر بمواقع محددة على الـ DNA وتعيد من تمركز النيوكليوسومات، سامحة بارتباط عوامل الاستنساخ بالبروموتر وابتداء الاستنساخ.

ثالثاً: تنظيم التعبير الجيني عند مستوى ما بعد الاستنساخ

توصف الخطوات التي تتعلق بمعالجة الـ RNA بعد انتهاء الاستنساخ وقبل بدء الترجمة بالتحويلات ما بعد الاستنساخ "post-transcriptional modifications". إن أي تحويل لتلك الخطوات يؤدي إلى تحويل في شكل المنتج النهائي. ويمكن توضيح ذلك بالمثل الذي يعرف بعملية وصل الأطراف بالتراكب التفريقية (differential splicing). إن إزالة الانترونات ووصل الأطراف بالتراكب معاً لبقية الاكسونات خلال معالجة الـ RNA الغير متجانس يجب أن تكون بمنتهى الدقة. لقد تم هندسة ذلك جزئياً من قبل مجموعة مميزة من جزيئات sn RNA المحتوية على جزيئات الـ RNA من نوع U1 و U2 و U3 و U4 و U5 و U6 (راجع الفصل الرابع). وعلى سبيل المثال، تستخدم عملية وصل الأطراف بالتراكب التفريقية في خلايا لمفاوية مختلفة لتنتج بروتينات مختلفة من نفس جزيئة الـ RNA الغير متجانس (hnRNA). اكتشف بعض العلماء إنتاج نوعين من جزيئات الـ mRNA وذلك بحذف انترون من واحدة من جزيئات الـ mRNA ولكنها محتوية ضمن الـ exon splice المستخدم لإنتاج جزيئة mRNA أخرى. وهذا يسمح بإنتاج بروتينين مميزين من الكلوبولينات المناعية (Ig)، ولكن أحدهما ذو شريط طويل من الأحماض الأمينية الكارهة للماء عند النهاية الكربوكسيلية، والبروتين الآخر ذات شريط قصير من الأحماض الأمينية المحبة للماء نسبياً. ترتبط جزيئات Ig ذات الببتيد الطويل الكارهة للماء بالغلاف الخلوي الموجود بالخلايا الفمية، بينما تفرز الجزيئة ذات الببتيد الطرفي المحب للماء من الخلية. هذا التغيير في عملية وصل الأطراف بالتراكب ضمن حياة الخلية للمفاوية المفردة يشرح بشكل واضح الملاحظة الآتية: تستبقي الخلايا للمفاوية الجسم المضاد وتحشر جزيئات Ig بغلافها البلازمي، بينما عند التحفيز الآتي بالجسم الغريب antigen، تصبح نفس تلك الخلايا للمفاوية خلايا إفرازية، محررة جزيئات الجسم المضاد

إلى الدورة الدموية. من هذا المثال يتضح الدور المحوري الذي تلعبه عملية وصل الأطراف بالترابك التقريبية في تغيير وظائف العديد من الخلايا.

رابعاً: تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الترجمة

يتم ترجمة معظم جزيئات الـ mRNA في البكتيريا بنفس العدد وبنفس الوقت مع تغيرات صغيرة من جين إلى آخر. وفي الكائنات حقيقية النواة، يتمثل التنظيم عند مستوى الترجمة بعدم ترجمة جزيئة الـ mRNA بأكملها إلى أن يتم استقبال الإشارة. وسنكتفي في تبيان هذا النوع من التنظيم بآلية واحدة وهي آلية إطالة فترة حياة الـ mRNA. إن المثال المهم حول تنظيم الترجمة يتمثل بما يعرف بالـ *informosomes* أو بجزيئات الرنا المراسل الممتكرة (masked mRNA). توصف البيضة الغير مخصبة بالمستقرة بايولوجياً، ولكن وبعد فترة قصيرة من إخصابها تتخلق العديد من البروتينات، وعلى سبيل المثال، بروتينات الجهاز الانقسامي وأغشية الخلية الهستونات الضرورية لتكوين النيوكليوسومات والكثير من البروتينات الأخرى. تختزن بويض قنفذ البحر (sea urchin) الغير مخصبة كميات كبيرة من الـ mRNA لعدة أشهر على شكل دقائق مكونة من mRNA متحدة مع البروتينات (mRNA-protein particles) (وهذا هو الذي يعرف بالرنا المراسل الممتكر). يكون هذا الـ mRNA غير فعال استنساخياً، ولكن في غضون دقائق بعد الإخصاب، يبدأ ترجمة تلك الجزيئات. وهنا، ينتظم توقيت الترجمة.

خامساً: تنظيم التعبير الجيني عند مستوى ما بعد الترجمة

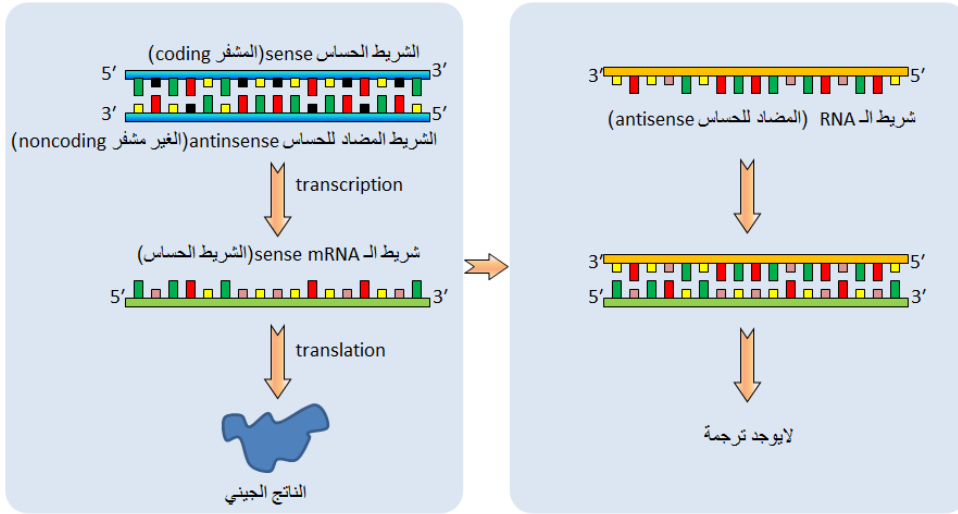
تتحور بعض البروتينات بعد تخليقها، وعادة ما يتم ذلك أما بتحويل التركيب ثلاثي الأبعاد، أو من خلال تحويل سلاسله الجانبية كيميائياً، أو من خلال تحويل عموده الفقري (أنظر الفصل الخامس). إن أي تغيير في تلك التحويلات الحادثة للبروتينات بعد عملية الترجمة يؤدي إلى عواقب سريرية خطيرة.

ملحق الفصل السادس

تحسين نوعية الطماطم بواسطة منع التعبير الجيني لانزيم polygalacturonase

يحدث في نضج الثمار العديد من التغيرات الكيموحيوية والفسيلولوجية والتي تعتبر عوامل أساسية تؤثر على الصفات النوعية، كما في اللون والنكهة ونسجة المنتج. يحدث تلين الثمار خلال النضج كنتيجة لتصلب الجدار الخلوي منقبل مجموعة من الانزيمات. وأحد تلك الانزيمات الرئيسية هي انزيم polygalacturonase أو PG، والذي يقوم بتحطيم البكتين،

والبكتين هو بوليمر من أحماض الـ galacturonic والتي تكون جزء من الدعم التركيبي للجدار الخلوي لثمرة الطماطم. تعد نسيجة ثمرة الطماطم من الاعتبارات الأساسية في النوعية التجارية لكل من السوق والتسويق التجاري. تقتطف الطماطم التي تباع في الأسواق عندما يكون ذات لون أخضر، وتخزن بدرجة منخفضة، ثم يضاف لها غاز الايثيلين لكي تلون الثمرة ونضجها. ولكن المشكلة التي تتعرض لها الطماطم هو تلين جدارها الغير مرغوب خلال هذه المرحلة، فطالما يكون تليين الجدار الغير مرغوب مصاحباً لاضفاء النكهة واللون المرغوبين للثمرة. استطاعت تقنيات الـ DNA الحديثة الآن في هندسة الطماطم بحيث لا يتلين جدارها أثناء حصولها على اللون والنكهة المرغوبين، وذلك من خلال تثبيط تعبير الجين الذي يشفر لانزيم PG بواسطة تقنية antisense RNA. ان الفكرة الأساسية لهذه التقنية هو أن يتم ادخال جزيئة RNA الى النبات مكملة لجزيئة الـ mRNA الناتج عن استنساخ الجين PG. وبهذه الطريقة تمكن العلماء في تقنية antisense RNA من ادخال قطعة من الـ RNA مكملة في تسلسلها لجزيئة mRNA PG. ان قطعة الـ RNA المدخلة هذه يمكن لها أن ترتبط بالـ mRNA ل تمنع ترجمته، وبالتالي، تمنع انتاج هذا الانزيم (شكل 20.6). وبما أن أن تعبير جين PG يتم تثبيطه، يفقد النبات قابليته على انتاج انزيم PG الذي يسبب التلين الغير مرغوب في جدران ثمار الطماطم.



شكل (20.6): دور الآلية التثبيطية لجزيئة الـ antisense RNA في منع تخليق انزيم PG (تصميم المؤلف).

أسئلة الفصل السادس

السؤال الأول: علل مايلي

- عندما يوجد كل من الكلوكون واللاكتوز في الوسط الغذائي لبكتريا القولون فإنها تستنفذ الكلوكون فقط
- لا يعمل أوبرون اللاكتوز عندما يوجد الكلوكون ولا يوجد اللاكتوز في وسط بكتريا القولون ؟
- يوصف بروتين CAP المنظم للتعبير الجيني لأوبرون اللاكتوز بالـ apoactivator بدلاً من activator؟
- تعد فرضية جين واحد إنزيم واحد غير صحيحة؟
- تستخدم تقنية antisense RNA technology لمنع تخليق إنزيم polygalacturonase في الطماطم؟
- يقتصر تواجد أجسام بار (Barr bodies) على الاناث فقط دون الذكور في البشر؟
- أن الارتباط الحادث بين مثيلة الـ DNA وإزالة تخلل الهستونات (deacetylation of histones) كلاهما يكبح الاستنساخ؟
- يمكن للـ mRNA أن يعيش - كما في قنفذ البحر - لمدة تتجاوز شهرين كاملين؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

- إن كبح الـ tryptophan هو بروتين تنظيمي يتخذ هيئة تدعى -----.
- a- helix-turn helix b- helix-loop helix c- helix-up helix d- helix-to helix e- helix-and helix
- ----- وهو المسلك الذي تبقى به عاثيات لامدا في حالة خاملة
- a- lysogenic pathway b- temperate pathway c- lytic pathway d- dormant pathway e- protein synthesis pathway
- إن الأوبرون هو عبارة عن مجموعة من الجينات والتي تقع تحت سيطرة ----- واحد.
- a- promoter b- cistrone c- protein d- polypeptide e- operator
- يطلق على الجزيئة المؤثرة (التربتوفان) في نظام أوبرون الترتوفان أحياناً ب-----.
- a. antirepressor b. pararepressor c. corepressor d. (a) and (c) e. non
- في أوبرون اللاكتوز، يعبر أوبرون اللاكتوز بمستوى واطي جداً في حالة -----.
- a. glucose and lactose presence b. glucose presence & lactose absence c. glucose absence & lactose presence d. glucose and lactose absence e. none
- اعتماداً على، أما أن يندمج العاثي لامدا بالكروموسوم البكتيري ويبقى خاملاً، أو أن يصنع عدد كبير من النسخ ليحلل الخلية البكتيرية.
- a. temperature b. nutrition c. DNA sequence d. species e. behavior
- إن، هي الحالة التي يكون بها كل جينات العاثي معطلة ماعدا جين واحد هو ci والذي يمنع عمل بقية جينات العاثي.
- a. temperate stage b. lytic state c. prophage state d. none
- تعزى مقدرة الأجسام المضادة في الجسم في الارتباط بعدد كبير جداً من المستضدات الى ظاهرة في التعبير الجيني.
- a. genetic breakdown b. DNA methylation c. histone acetylation d. DNA rearrangement
- تحدث ظاهرة الاضعاف عندما يكون مستوى الترتوفان عالياً، حيث يتكون تركيب وينتهي الاستنساخ ضمن منطقة 5-UTR
- a. 1-2 structure b. 2-3 structure c. 3-4 structure d. 2-4 structure
- تحتوي في العاثي T4 عادة على تسلسلات بروموتر يمكن تمييزها من قبل عامل سكما البكتيري.
- a. early genes b. delayed genes c. late genes d. overlapping genes

- يتم تنظيم تعبير جين *Xist* في كروموسوم X الأنثوي بواسطة antisense-RNA، والذي يسمى، والذي يتم استنساخه من نفس الجين، ولكن باتجاه معاكس.
a. istX b. Xsti c. tisX d. tsiX e. Xtis
- ترتبط عملية مع كبح الاستنساخ بشكل كبير.
a. DNA acetylation b. DNA glycosylation c. DNA phosphorylation d. DNA methylation
- يدعى الكروماتين الذي يتكثف أحياناً والذي يبدو في أحيان أخرى بشكل غير متكثف بالـ
a. euchromatin b. constitutive heterochromatin c. facultative heterochromatin d. only "b" & "c"

السؤال الثالث: عرف ما يلي

lac repressor, constitutive genes, antisense RNA technology, temperate phages, translational frameshifting, spacer sequences

السؤال الرابع: صل المفردات الموجودة في اليمين مع ما يناسبها في اليسار

genetic breakdown	Ovalbumin gene
constitutive expression	sn RNA
specific expression	mRNA-protein particles
non-genetic elements	Housekeeping genes
gene rearrangement	X- inactivation
DNA methylation	GpC islands
Differential splicing	Telomeres
informosomes	Luxury genes

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

- Alberts B.**, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science/USA, 2008.
- Bell C.** and Lewis M. 2001. The lac repressor: A second generation of structural and functional studies *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 19-25.
- Berk A.**, Zipursky S., Baltimor D., Darnell J., and Lodish H. Molecular Biology. Fourth edition. Paul Matuataira, USA, 1998.
- Bird A.** and Wolffe A. 1999. Methylation-induced repression: Belts, braces, and chromatin *Cell* 99: 451-454.
- Busby S.** and Ebright R. 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP) *J. Mol. Biol.* 293: 199- 213.
- Cairns B.** 1998. Chromatin remodeling machines: Similar motors, ulterior motives *Trends Biochem. Sci.* 23: 20-25.
- Calladine, C. R.** Understanding DNA: The Molecule and How It Works. New York: Academic Press, 1997.
- Clark D.** Molecular biology: understanding the genetics revolution. Elsevier, 2010.
- Dale J.**, and Schantz M. From genes to genomes, concepts and applications in gene technology. Jhon Wiley and Sons, 2002.
- Kolter R.** and Yanofsky C. 1982. Attenuation in amino acid biosynthetic operons *Annu. Rev. Genet.* 16: 113-134.
- Kramer, M.**, Sanders, R. A., Sheehy, R. E., Melis, M., Kuehn, M., and Hiatt, W. R. Field evaluation of tomatoes with reduced polygalacturonase by antisense RNA. In: *Horticultural Biotechnology*, eds. A. B. Bennett and S. D. O'Neil, Wiley-Liss Inc., New York, 1990.
- Lewis M.**, Chang G., Horton N., Kercher M., Pace H., Schumacher M., Brennan R., and Lu P. 1996. Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer *Science* 271: 1247-1254.
- Lodish, H.**, Berk, A., Zipursky, L., and Matsudaira, P., Molecular Cell Biology (fifth edition). W. H. Freeman and Company, 2000.
- Niu W.**, Kim Y., Tau G., Heyduk T., and Ebright R. 1996. Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: Two interactions between CAP and RNA polymerase *Cell* 87: 1123-1134.
- Robinson R.** Genetics. Volume 3, MacMillan Reference USA, 2003.
- Schultz S.**, Shields G., and Steitz T. 1991. Crystal structure of a CAP-DNA complex: The DNA is bent by 90 degrees *Science* 253: 1001-1007.
- Verma P.**, and Agarwal V. molecular biology. First Edition Schand group, India 2004.
- Watson J.**, Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R. Molecular biology of the gene. Fifth edition, Pearson Prentice Hall, 2004.
- Wong D.W.S.** The ABCs of gene cloning. Second edition, Springer, 2006.

7

الفصل السابع

طفرة الـ DNA واصلاحها



طفرة الجمجمة رقم واحد (التقليدية)، عام 2007، رصيد الصورة ميتو

مقدمة

هنالك عدة أنواع وأشكال للخلل الحادث للمادة الوراثية لعل أهمها وأكثرها شيوعاً هي الطفرات. إن خلل الـ DNA الذي لا تستطيع الخلية إصلاحه قد يؤدي إلى طفرة. وسواء أكانت تلك الأسباب المؤدية إلى التطفر هي أسباب تلقائية (طبيعية) أو مختلقة فيمكن معرفة الطفرات بمفهومها العام الشامل بالآتي:

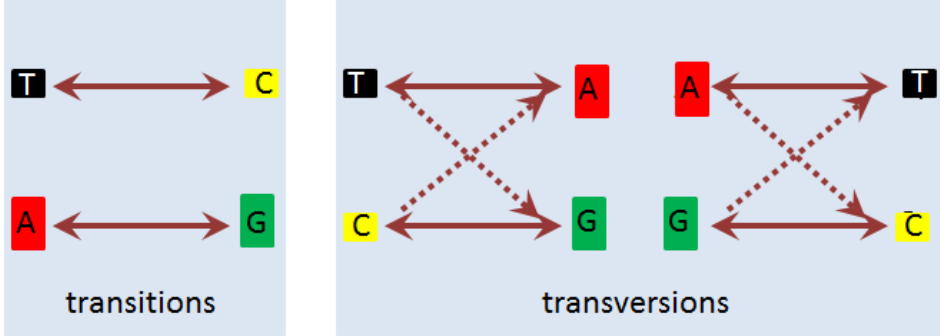
الطفرة هي تغيير دائم وموروث في التسلسل القاعدي للمادة الوراثية (الـ DNA) للكائن الحي. إن هذا التسلسل المتبدل من الممكن أن ينعكس بتغيرات في التسلسل القاعدي للـ mRNA وفي بعض الأحيان بتغيرات في تسلسل الحامض الأميني للبروتين. يمكن للطفرات أن تسبب أمراضاً وراثية. كما أنها تسبب كذلك تغيرات في العديد من خواص الخلية. وتوفر الطفرات دليلاً يبين أن الـ DNA هو المادة الوراثية. حيث يسبب التغيير في تسلسل الـ DNA تبديلاً في تسلسل البروتين، وهنا دليل إضافي يبين لنا بأن الـ DNA هو الذي يشفر للبروتين. علاوة على ذلك، فإن التغيير في شكل الكائن ربما يسمح لنا بأن ن شخص وظيفة البروتين. إن وجود طفرات عديدة في جين معين ربما يسمح بمقارنة العديد من الأشكال المتغايرة للبروتين.

أنواع الطفرات

إن هنالك الكثير من النقاشات بين العلماء حول أنواع الطفرات. وعليه، صنفت الطفرات بشكل متنوع على أساس معايير مختلفة كما سيأتي ذكره.

أولاً: تصنيف الطفرات وفقاً لأنواع الخلية: هنا تم تصنيف الطفرات حسب تواجدها في الخلايا الجرثومية والجسمية إلى طفرات جسمية somatic mutations وطفرات الخلايا الجرثومية gametic mutations. تعرف الطفرات الجسمية بتلك الطفرات الموجودة في خلايا الجسم الغير تكاثرية. إن العواقب الوراثية والتطورية للطفرات الجسمية تكون غير ملموسة، وذلك بسبب شمول خلية مفردة وخلاياها البنيوية. وإذا، على أية حال، وجدت الطفرة الجسمية بشكل مبكر خلال الحياة الجنينية، فربما تشكل الخلايا الطافرة نسبة كبيرة من خلايا الجسم، لذا تتسم خلايا الجسم المحتوية على هكذا نوع من الطفرات بأنها ذات نمط فسيفسائية (mosaic) في خلايا مختلفة منها. يتعلق وجود الطفرات الجسمية غالباً بحدوث النمو الخبيث (أنظر ملحق هذا الفصل). أما الطفرات الجرثومية، فتحدث في الخلايا الجرثومية (كما في خلايا النطف والخلايا البويضات). تكون طفرات الخلايا الجرثومية طفرات قابلة للتوريث (heritable).

ثانياً: تصنيف الطفرات وفقاً للحجم والنوعية: على أساس الحجم، هنالك نوعان من الطفرات قد تم اكتشافهما، وهما الطفرات النقطية (point mutations). حيث تحدث تبديلات موروثية في قطعة صغيرة جداً من الـ DNA ، كما هو الحادث بحجم نيوكليوتيدة مفردة أو بزواج نيوكليوتيدي، أما الطفرات الغير نقطية، والتي تشمل قطع أكبر من الـ DNA، وهي طفرات كبيرة على مستوى الكروماتين أو الكروموسوم كاملاً، لذا فهي خارج نطاق هذا الكتاب. تقسم الطفرة النقطية الى ثلاثة أنواع وهي طفرات الحذف (deletion mutations) وتحدث نتيجة فقدان أو حذف بعض أجزاء (زوج نيوكليوتيدي مفرد) من الكودون الثلاثي من الجين، وقد لوحظت هذه الطفرة ببعض العاثيات البكتيرية. أما طفرة الحشر أو الاضافة (insertion or addition mutation) فانها تحدث نتيجة اضافة نيوكليوتيدة اضافية أو أكثر الى الجين. ويمكن حث حدوث هكذا طفرات عن طريق بعض المواد الكيميائية والتي تسمى بالمطفرات (mutagens) كما في صبغة الأكريدين (acridine) وصبغة بروفلافين (proflavin). يعتقد بأن حشر قاعدتين متتابعيتين من شريط الـ DNA يمدد من طول الشريط. وفي عملية التضاعف، سوف يسمح هذا الوضع بحشر نيوكليوتيدة اضافية في السلسلة المكتملة في الموقع المحجوز من قبل جزيئة البروفلافين. ان الطفرات الناتجة من حشر أو حذف نيوكليوتيدات مفردة ربما تسبب في تبديل قراءة بقية الرسالة بعد الطفرة (downstream)، وهذا يدعى بطفرات الـ frameshift. تنتج طفرات الـ frame shift من حذف أو انحشار النيوكليوتيدات في الجين. إن حذف نيوكليوتيدة واحدة من الشريط المشفر للجين ينتج في نسق قراءة متبدل altered reading frame في جزيئة الـ mRNA. إن الماكنة التي تترجم الـ mRNA لا تميز بأن تلك القاعدة قد فقدت، لأنه لا يوجد هنالك نظام تنقيط في قراءة الكودونات. وبهذا يحصل تبديل جوهري في تسلسل الأحماض الأمينية المتبلمرة. هذا ولم يتشوه تسلسل الأحماض الأمينية الواقعة بعد موقع هذه الطفرة فقط ، وإنما يتغير قراءة الرسالة من حيث ظهور الكودون العبثي قبل أوانه. وهكذا، فأن هذا يؤدي إلى ظهر متعدد ببتيدي مشوش ومنتهى قبل نضوجه. أما النوع الثالث من الطفرات النقطية فيسمى بطفرات الاستبدال (substitution mutations). تؤثر تلك الطفرات في كودون محدد واحد. ويؤدي ذلك الكودون المحور الى التفسير عن حامض أميني مختلف، وهذا يؤدي بالنتيجة الى استبدال الحامض الأميني الطبيعي بأخر طافر. تبدل تلك الطفرات على الصبغة المظهرية (phenotype) للكائن الحي بشكل متنوع وهي ذات أهمية وراثية عظيمة. تعد طفرة التبدل في قاعدة مفردة من أكثر أنواع الطفرات شيوعاً، وهي تغير في زوج قاعدي مفرد والتي يمكن أن تكون transition أو transversion. وفي النوع الأول، يتغير الـ pyrimidine إلى pyrimidine آخر، أو يتغير الـ purine إلى purine آخر. أما طفرات الـ transversion فهي تغيرات من الـ purine إلى نوع من نوعي الـ pyrimidine، أو تغير من الـ pyrimidine إلى نوع من نوعي الـ purine ، وكما هو مبين في الشكل (1.7). ان وجود طفرات الـ transverse لأول مرة قد تم اكتشافه سنة 1959 من قبل E. Freese.

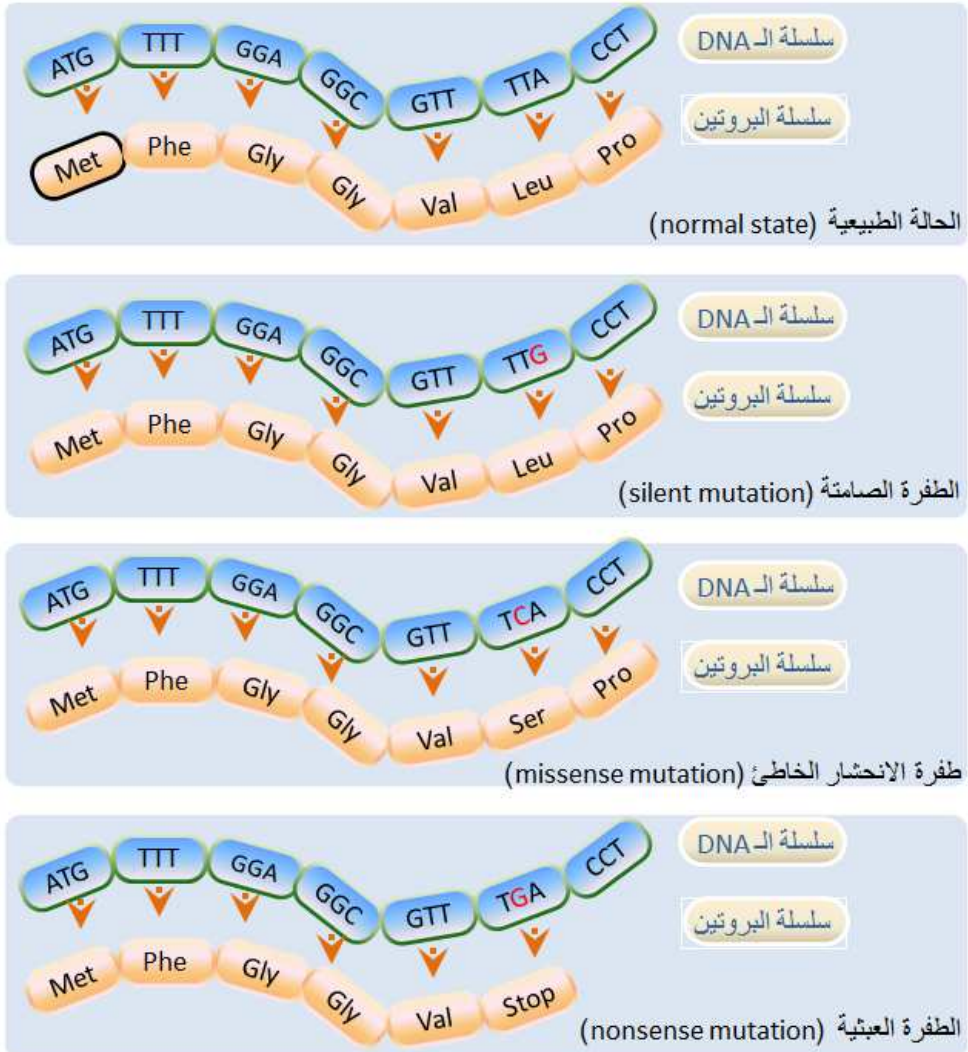


شكل (1.7): مخطط يوضح الفرق بين طفرة الـ transition وطفرة الـ transversion (تصميم المؤلف)

ثالثاً: تصنيف الطفرات وفقاً لتأثيرها على تسلسل الأحماض الأمينية في البروتين الناتج: إن تغيير زوج قاعدي مفرد في جزيئة الـ mRNA ربما يمتلك تأثير من عدة تأثيرات متنوعة عند ترجمته إلى بروتين:

(1) الطفرات الصامتة (silent mutations): وفيها لا يوجد هنالك تأثير قابل للكشف no detectable effect، ويحدث هذا بسبب صفة الـ degeneracy للشفرة الوراثية (كل حامض أميني يمكن أن يشفر له من أكثر من شفرة واحدة بينما كل شفرة تشفر لحامض أميني واحد). فمثلاً، الحامض الأميني leucine والذي يشفر عنه من قبل ست شفرات وراثية مختلفة فعندما يتغير الكودون UUA إلى الشفرة UUG، فكلتا الشفرتان تشفران لنفس الحامض الأميني ألا وهو leucine، وهذا ما حدا البعض إلى تسمية هذا التأثير بالتأثير الغير قابل للكشف.

(2) طفرات الانحشار الخاطئ (missense mutations): والتي تحدث عندما يندمج حامض أميني مختلف في الموقع المقابل في جزيئة البروتين. إن هذا الحامض الأميني المغلوط mistaken amino acid أو الـ missense، يعتمد على موقعه في البروتين المحدد، والذي أما أن يكون مقبول acceptable، مقبول جزئياً partially acceptable، أو غير مقبول unacceptable بالنسبة لوظيفة جزيئة البروتين. يكون التأثير مقبولا عندما يؤدي التغيير القاعدي المفرد إلى استبدال حامض أميني بحامض أميني آخر ذو مجاميع وظيفية مشابهة للحامض الأميني الأصلي. وبهذا يتم تجنب تغييرات قاسية في خواص جزيئة البروتين الناتجة. وإذا حدث تأثير الـ missense المقبول، عندها ربما لا يمكن تمييز جزيئة البروتين الناتجة عن ذلك التأثير عن الجزيئة الطبيعية. أما التأثير المقبول جزئياً فإنه سوف ينتج جزيئة بروتين ذات فعالية جزئية أو غير طبيعية. وإذا حدث تأثير الـ missense الغير مقبول، عندها سوف لا تكون جزيئة البروتين قادرة على العمل بدورها المعهود.



شكل (2.7): تصنيف الطفرات وفقاً لتأثيرها على تسلسل الأحماض الأمينية في البروتين الناتج (تصميم المؤلف).

3) الطفرات العيثية (nonsense mutations): وتحدث عندما يظهر الكودون العيثي nonsense codon في تسلسل جزيئة الـ mRNA فجأة، وهذا يؤدي إلى ما يعرف بالإيقاف ما قبل النضوج premature termination للأحماض الأمينية المندمجة في سلسلة الببتيد، وإنتاج مجرد قطعة غير كاملة من جزيئة البروتين المطلوب إنتاجها. وهذا بالطبع ينتج في أن يكون البروتين غير فعال عادة.

4) الطفرات الحساسة للحرارة (temperature sensitive mutations): وتحدث عندما يؤدي التبديل الحاصل في الكودون الى انتاج بروتين فعالاً في درجة حرارية معينة (عادة 30°C) وغير فعالاً في درجات حرارية أعلى (عادة 40-42°C). إن هذا التغيير في تركيب البروتين الناتج عن هكذا طفرات قد تم الإشارة اليه باستخدام الشكل (2.7) والجدول (1.7).

جدول (1.7): تأثير بعض الأنواع الشائعة من الطفرات على تركيب البروتين

نوع الطفرة	التأثير على البروتين
silent: يشفر الكودون الجديد إلى نفس الحامض الأميني	لا شيء
missense: يشفر الكودون الجديد إلى حامض أميني مختلف	اختزال محتمل في الوظيفة، تأثيرات متنوعة
nonsense: الكودون الجديد هو كودون إيقاف stop codon	أقصر من الطول الطبيعي، عادة غير فعال

رابعاً: تصنيف الطفرات وفقاً لتأثيرها على الطراز المظهري للكائن: وعليه،

تتواجد عدة أنواع من الطفرة وكالاتي:

1. الطفرات السائدة (dominant mutations): وهي الطفرات التي عند حصولها تؤثر بشكل واضح على الطراز المظهري للكائن.
2. الطفرات المتنحية (recessive mutations): إن معظم أنواع الطفرات هي متنحية في الطبيعة، وبالتالي فهي لا تضيف تأثيراً يذكر على الطراز المظهري بشكل مباشر. ولكي تبدي تأثيرها، فإنها بحاجة الى طفرة متنحية أخرى في نفس (أليل) الجين.
3. طفرات الأليلات المتناظرة (isoallele mutations): تؤثر بعض الطفرات بشكل طفيف جداً على الطراز المظهري للكائن الحي، لذا فإنها تحتاج الى تقنيات خاصة للكشف عنها. وفي هذه الحالة، يعطي الجين الطافر طراز مظهري مختلف قليلاً يسمى بالأليل المتناظر (isoallele).
4. الطفرات القاتلية (lethal mutations): وهي تصنف "بالقاتلة" وفقاً لتأثيرها على الطراز المظهري، وتنتج في موت الخلايا أو الكائن الحي الذي حصلت فيه.

خامساً: تصنيف الطفرات وفقاً للاتجاه: يمكن تصنيف الطفرات أيضاً على

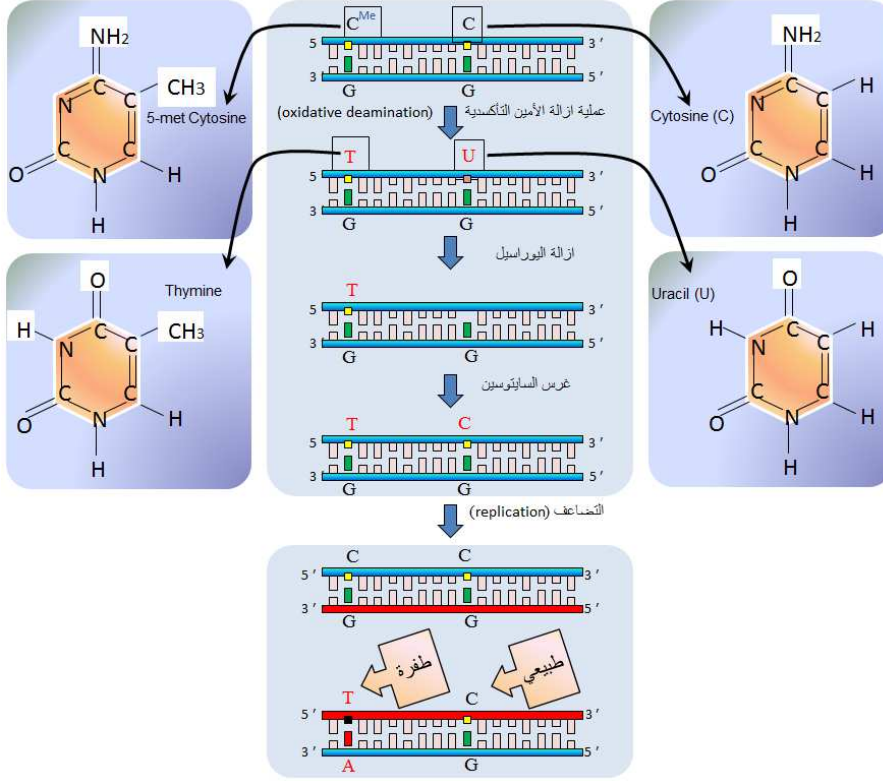
أساس نمط اتجاهها الى الأنواع الآتية:

1. الطفرات الأمامية (forward mutations): وتحدث في الكائنات عندما تخلق الطفرات تغييراً من النوع البري (wild type) الى الطراز المظهري الغير طبيعي (abnormal phenotype). إن معظم الطفرات هي ذات نمط أمامي.

2. الطفرات الراجعة أو العكسية (backward mutations): وهي التي يمكن تصحيحها عن طريق آلية تصحيح الخطأ، وبالتالي، فإن الطراز المظهري الغير طبيعي يرجع الى الطراز المظهري البري.

سادساً : تصنيف الطفرات وفقا لمصدرها: وهنا يتم تصنف الطفرات الى نوعين فقط:

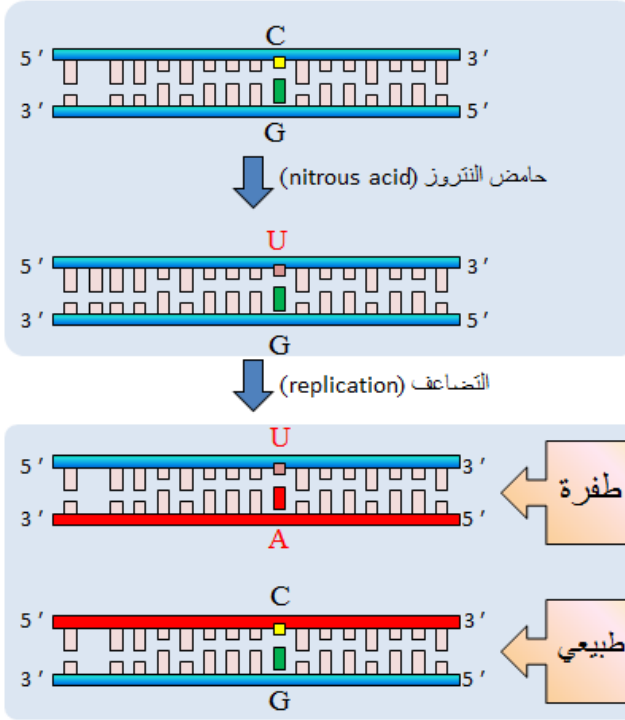
1. الطفرات التلقائية (spontaneous mutation): وتحدث بشكل فجائي في الطبيعة، كما أن أصلها غير معروف. وهي تسمى أيضاً بالطفرات ذات الخلفية الاجتماعية أو الخلفية البيئية (background mutations)، وقد تقرر وجودها في العديد من الكائنات، ولكنها قد فهمت بشكل جيد في بدائية النواة، حيث إن السبب الرئيسي للطفرة التلقائية في بكتريا القولون نتج من وجود قاعدة غير اعتيادية في الـ DNA. بالإضافة إلى الأربعة قواعد المنحشرة بالـ DNA عند تخليقه، توجد في بعض الأحيان ما يسمى بالقواعد المحورة modified bases. يعكس هذا الاسم أصلها: تنتج تلك القواعد بالتحويل الكيميائي لواحد من القواعد الأربع الموجودة أصلاً في الـ DNA. إن القاعدة المحورة الأكثر شيوعاً هي 5-methylcytosine، والمتولدة بفعل إنزيم الـ methylase والذي يضيف مجموعة مثيل إلى نسبة صغيرة من مخلفات السائتوسين في مواقع متخصصة من الـ DNA (راجع الفصل السادس). توفر المواقع المحتوية على 5-methylcytosine مناطق أخاذا (hotspot) لحدوث الطفرة النقطية التلقائية. لا يمكن أن توجد مناطق الـ hotspot في سلالات بكتريا القولون التي لا يمكن لها مثيلة السائتوسين. إن سبب وجود مناطق الـ hotspot هو أن 5-methylcytosine يعاني من عملية إزالة أمين تلقائية spontaneous deamination بتكرار ملحوظ. إن استبدال مجموعة الأمين بمجموعة كيتو يحول 5-methylcytosine إلى thymine. شكل 3.7 يبين لماذا تسبب إزالة الأمين للـ 5-methylcytosine النادرة طفرة، بينما إزالة الأمين للـ cytosine الأكثر شيوعاً لا يمتلك هذا التأثير.



شكل (3.7): عملية إزالة الأمين لمجموعة 5-methylcytosine المنتجة للـ thymine (طفرة transition من $C \equiv G$ إلى $T = A$)، بينما إزالة الأمين للـ cytosine تنتج uracil (والذي يزال عادة ويستبدل بالـ cytosine) (تصميم المؤلف).

إن عملية إزالة مجموعة الأمين من السايتوسين تولد يوراسيل. على أية حال، تحتوي بكتريا القولون على إنزيم يدعى بـ uracil DNA glycosylase والذي يقوم بإزالة مخلفات اليوراسيل من الـ DNA (عمليات الشقبة حول القواعد: أنظر إصلاح خلل الدنا DNA repair). يترك هذا العمل مخلف كوانين غير مزدوج، ويقوم "نظام الإصلاح" بعد ذلك بحشر سايتوسين كشريك للكوانين. إن حصيلة تلك التفاعلات هو لإعادة التسلسل الأصيل للـ DNA. ربما يعمل هذا النظام في حماية الـ DNA ضد عواقب عملية إزالة الأمين التلقائية من السايتوسين. ولكن عملية إزالة الأمين من 5-methylcytosine تترك الثايمين. ولكون هذه القاعدة هي مكون محترم للـ DNA، فلا يمكن للنظام من أن يميز التغيير، لذا تنشأ الطفرة. يخلق هذا التحول كوانين مزدوج

بشكل خاطيء مع الثايمين، والذي تنتج عاقبة فصلهما ازدواج $G \equiv C$ طبيعي من جهة وازدواج $A = T$ طافر من جهة أخرى (شكل 4.7).



شكل (4.7): إمكانية استحداث الطفرات بواسطة التحويل الكيميائي للقاعدة (base modification) (تصميم المؤلف)

إن عمل هذا النظام يسلط ضوء هاماً حول استخدام الثايمين في الـ DNA مقارنة باليوراسيل في الـ RNA. ربما يرتبط هذا بحاجة الـ DNA للثباتية في تسلسله: إن استخدام الثايمين يعني القدرة على التمييز الفوري لأي عملية لإزالة الأمين للسايتوسين، وذلك لأنها تولد قاعدة (يوراسيل) والتي هي غير موجودة عادة في الـ DNA. إذن، ربما هنالك عدة أسباب رئيسية تفسر لماذا يمتلك الـ RNA يوراسيل بدلاً من الثايمين، بينما يمتلك الـ DNA ثايمين بدلاً عن اليوراسيل. عند إزالة مجموعة الأمين من السايتوسين بشكل تلقائي ليتكون اليوراسيل، عادة مئة فعل تلقائي لكل خلية لبونة mammalian cell في اليوم الواحد، وهذا المعدل عالي جداً. يميز إنزيم الإصلاح (uracil DNA glycosylase) هذه "الطفرات" ويستبدل قواعد اليوراسيل هذه بقواعد السايتوسين، ولكن ليس له القابلية على التمييز بين اليوراسيل الطبيعي واليوراسيل الطافر. وبسبب أهمية الـ DNA، تقوم الخلايا بحل هذه المعضلة

باستخدام الثايمين (والذي هو عبارة عن 5-methyl uracil) بدلاً عن اليوراسيل في الـ DNA. هذا ويمكن أن توجد عملية إزالة الأمين للسايتوسين في الـ RNA، وعلى أية حال، كل جين له عدد كبير من نسخ الـ mRNA، لذا فإن الطفرة العشوائية في أي نسخة من الـ RNA لا يمكن لها أن تتسبب بأثر كبير. إضافة إلى ذلك، تحدث عملية إزالة الأمين للأدينين والكوانين بمعدل مئة مرة أبطأ من عملية إزالة الأمين للسايتوسين.

2. الطفرات المستحثة (induced mutations): بالإضافة إلى وجود الطفرات التلقائية، فإن الطفرات يمكن أن تستحث بشكل مصطنع في الكائنات الحية عن طريق تعريضها إلى ظروف بيئية غير اعتيادية، كما في تعرضها إلى الإشعاع، أو لبعض الظروف الفيزيائية كما في الحرارة الغير طبيعية، وبعض المواد الكيميائية. وتسمى تلك المواد أو العوامل التي تحث على تكوين تلك الطفرات المصطنعة بالمطفرات (mutagenes).

المطفرات mutagenes

تقسم المطفرات عموماً إلى صنفين رئيسيين وهما:

أولاً: المطفرات الفيزيائية (physical mutagenes): والتي أما أن تكون مواد مشعة متأينة (ionizing radiation) ذات الطاقة العالية كما في أشعة أكس وأشعة كاما والتي تؤدي إلى حدوث أضرار في الجزيئة الهدف. ويمكن أن تسبب هكذا مطفرات تغييرات كيميائية مكثفة للـ DNA، والتي تتضمن كسور في الشريط وتحطيم في السكر الخماسي والقواعد النيتروجينية. أو تكون تلك المطفرات مواد مشعة غير متأينة (non-ionizing radiation) والتي تسبب اهتزاز جزيئي أو حث الإلكترونات إلى مستويات طاقة أعلى ضمن الجزيئة الهدف ويسمى بالتهيج (excitation). عندما تحدث الطفرة في الجزيئة المتهيجة يمكن أن تسمى حينها بالنواتج الضوئية (photoproducts). بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن يؤدي التعرض إلى الأشعة الغير متأينة إلى تكوين أواصر كيميائية جديدة. إن أكثر الأشكال أهمية والتي تسبب ضرر الـ DNA هو مصدر الأشعة فوق بنفسجية (UV light) والذي ينتج مزدوجات البيريميدين (pyrimidine dimers) وذلك من أزواج البيريميدين المتجاورة.

ثانياً: المطفرات الكيميائية (chemical mutagenes): هنالك مدى واسع من المواد الكيميائية العضوية وغير العضوية، الطبيعية منها والمصنعة والتي يمكن لها أن تتفاعل مع الـ DNA وتحوّر من خواصه. ويمكن للمطفرات الكيميائية التسبب بالطفرة فقط عند دخولها نواة الخلية، ويمكن لها حينئذ من أن تؤثر على الـ DNA الكروموسومي

بطريقتين. تدعى الطريقة الأولى بالتغيير الجيني المباشر (direct gene change): حيث تؤثر المطفرات الكيميائية على الـ DNA بشكل مباشر. وتقوم بالتأثير على محتوى الـ DNA فقط عندما يكون الـ DNA بحالة غير متضاعفة. وعلى سبيل المثال، حامض النتروز (nitrous acid)، والذي يحول الأدنين الى هايپوكزانثين (hypoxanthine) والسايٲوسين الى يوراسيل بواسطة ازالة الأمين (deamination). وكما هو الحال بحامض النتروز، يقوم خردل النتروجين (nitrogen mustard) والفورمالديهايد (formaldehyde)، والايوكسيد (epoxide)، و nitrosoguanidine وغيرها من المطفرات الكيميائية المشابهة لها تأثير تطفيري مباشر على جزيئة الـ DNA. تدعى الطريقة الأخرى بالخطأ في النسخ (copy error): حيث تدعى بعض المواد الكيميائية بمناظرات القواعد (base analogues) كما في مادة 5-bromouracil و 2-aminopurine وغيرها والتي تشبه بعض قواعد الـ DNA النتروجينية، ولهذا السبب تدعى بالمطفرات أيضاً. وخلال تضاعف الـ DNA، فانها تتحشر بدلاً من قواعد الـ DNA الطبيعية. لا تقتصر مناظرات القواعد على المادتين المذكورتين تواء، وانما هنالك مناظرات قواعد أخرى كما في الكافاين (caffeine) والتي توجد في القهوة والشاي وبعض المشروبات الغير كحولية، اضافة الى الفينول والمسرطنات والأكريدين وغيرها حيث أن تمتلك مفعول تطفيري أيضاً.

تأثيرات المطفرات الكيميائية على التسلسل النيوكليوتيدي

يمكن تقسيم التأثيرات التي تقوم بها المطفرات الكيميائية والتي تؤثر على طبيعة التسلسلات النيوكليوتيدية عموماً الى الآتي:

أولاً: تبديل الأحماض النووية التي هي ليست في حالة تضاعف: ويحدث هذا بالاشكال الآتية:

1. ازالة الأمين (deamination): بعض المواد الكيميائية كما في حامض النتروز يسبب ازالة أمين تأكسدية (oxidative deamination)، حيث تستبدل مجموعة الأمين (NH_2) في إحدى قواعد الـ DNA بمجموعة هيدروكسيل (OH) وذلك عن طريق المطفر الكيميائي حامض النتروز. وبهذه الطريقة، تزال مجموعة الأمين من الأدنين ليتحول الى هايپوكزانثين (hypoxanthine). وبواسطة خطوة معينة يتحول الـ hypoxanthine الى شكل معين يمكن له أن يزدوج فيه مع السايٲوسين. وبهذه الطريقة، يتحول زوج A:T الى زوج G:C. وبنفس الطريقة، تقوم عملية ازالة الأمين

بتحويل السائتوسين الى يوراسيل، والذي يمتلك خواص ازدواجية مشابهة للثايمين في كون أن زوج G:C يتغير الى زوج A:T.

2. اضافة الهيدروكسيل (hydroxylamination): عندما يعامل الـ DNA بمادة الهيدروكسيل أمين (hydroxyl amine)، تتفاعل قاعدة السائتوسين بشكل قوي جداً. يسبب الهيدروكسيل أمين اضافة الهيدروكسيل الى مجموعة الأمين للسائتوسين ليعطي hydroxylcytosine، والتي تزوج بعد ذلك مع الأدنين. وبهذه الطريقة، يحدث الهيدروكسيل أمين على تحويل زوج G:C الى زوج A:T في طفرة نقطية من نوع transition.

3. تحطيم حلقات البريميدين (pyrimidine rings breaking): يؤثر الهيدرأزين (hydrazine) على تكسير حلقات اليوراسيل والسائتوسين ليعطي تركيباً يسمى بالـ pyrazolone و 3-aminopyrasole على التوالي. على العموم تعد معاملة الـ RNA أو الـ DNA بالهيدرأزين اللامائي تنتج في تحطم حلقات الـ pyrimidine التابعة لهما.

4. اضافة الألكيل (alkylation): تحمل بعض تلك العناصر مجموعتين أو أكثر من مجاميع الألكيل بشكل فعال وتعمل كمطفرات قوية نتيجة لذلك. ومعظم تلك العناصر التي قد تم دراستها بشكل مكثف هي بعض مشتقات الكبريت كما في dimethyl sulphate و diethyl sulphate و methyl methane sulphate و ethyl methane sulphonate و ethyl ethane sulphonate. وعلى أية حال، تنتج هذه المطفرات الطفرات بعدة طرق، كما في اضافة مجموعة مثيل الى الكوانين. وهذا يجعل الكوانين مناظراً (base analog) للأدنين. أو أنها تزيل مجموعة الألكيل من الكوانين، في تفاعل يعرف بإزالة البيورين (depurination). ان فقدان القواعد النتروجينية في سلسلة الـ DNA والتي ربما تمتلئ بالقاعدة الخاطئة، وبهذه الطريقة، تنتج الطفرة.

ثانياً: تبديل الأحماض النووية خلال مرحلة التضاعف: ويحدث هذا بالاشكال الآتية:

1. مناظرات القواعد (base analogues): تمتلك بعض المواد الكيميائية تركيب جزيئي مشابه لقواعد الـ DNA الاعتيادية، بحيث يمكن لها أن تتحشر في شريط الـ DNA المتضاعف. وعلى سبيل المثال، تعد مادة 5-bromouracil هي نظير تركيبى للثايمين (5-methylcytosine) لأنها تحتوي على ذرة برومين bromine atom بدلاً من مجموعة المثيل في الثايمين ولذلك لها القدرة على أن تحل محل الثايمين.

وبهذه الطريقة، يتحول زوج A:T الى A:BU. وهذا يحول زوج A:T الى زوج G:C. يبين شكل (5.7) مثالاً لهذه الحالة المتمثل بمادة البرومويوراسيل bromouracil (BrdU)، والتي هي منازرة للثايمين ينحشر البرومويوراسيل في الـ DNA بدلاً من الثايمين. ولكنه يمتلك خواص ارتباط غامضة، بسبب وجود ذرة البرومين والتي تسمح بحدوث خدعة والتي تقوم فيها القاعدة بتغيير التركيب من شكل "كينو" إلى شكل "أينول". ويمكن لشكل الاينول الازدواج مع الكوانين، والذي يؤدي إلى استبدال الأدينين الأصلي المزدوج مع الثايمين A=T إلى G≡C. إن الخطأ في الازدواج من الممكن أن يحصل أما خلال الانحشار الأصل للقاعدة أو في دورة التضاعف المقبلة. يتم حث طفرة الـ transition باحتمالية معينة في كل دورة تضاعف، حيث يمتلك اندماج البرومويوراسيل تأثيرات مستمرة على تسلسل الـ DNA.

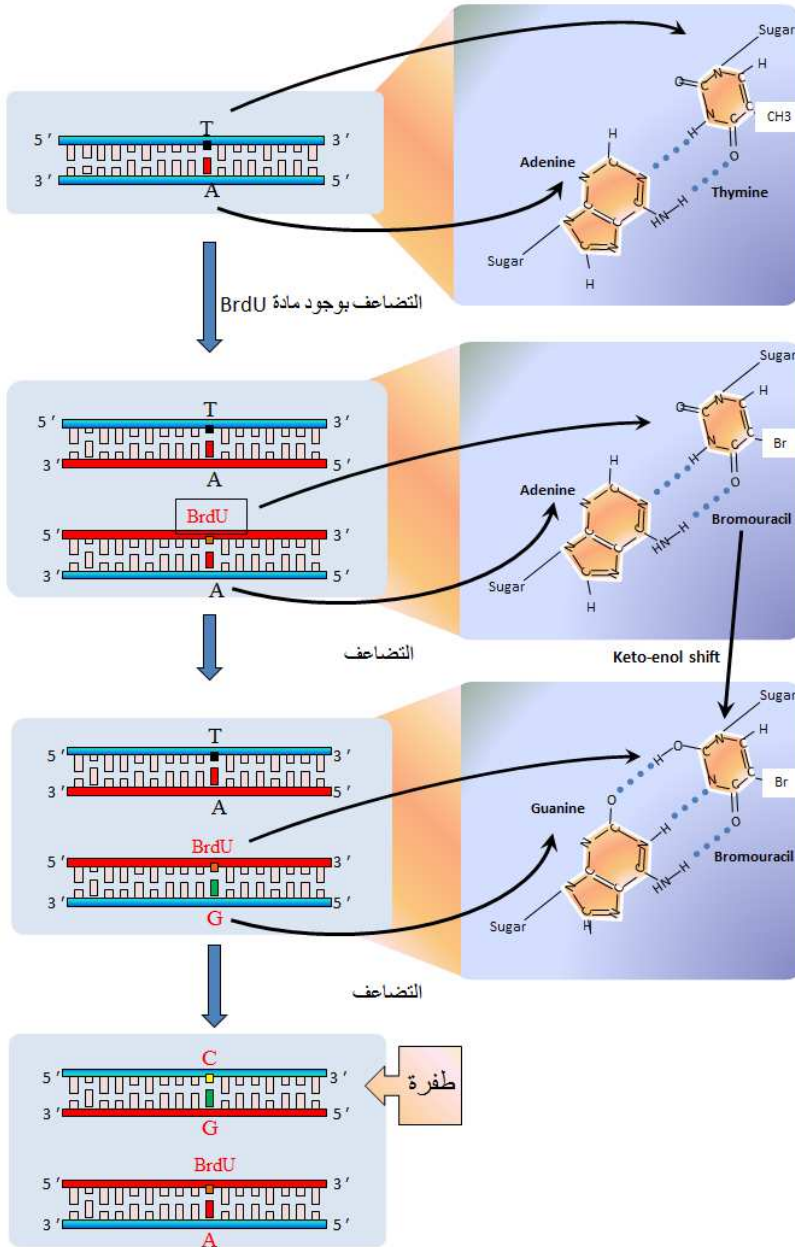
2. تثبيط مولدات الأحماض النووية: هنالك بعض المطفرات تتداخل مع تخليق قواعد النروجين للأحماض النووية سواء كانت بيورين أو بريميدين. أما أن يسبب فقدان قاعدة واحدة في حدوث أخطاء في عملية الازدواج. وعلى سبيل المثال، مادة الـ azaserine والتي تحطم تخليق البيورين والـ urethane والذي يحطم تخليق البريميدين.

3. طفرة الـ transversion: (راجع تصنيف الطفرات حسب الحجم والنوعية) عادة ما تتضمن طفرة الاستبدال في استبدال البيورين محل البريميدين أو العكس بالعكس. وتحتاج هذه الطفرة الى التضاعف لحدوثها.

مشاكل التعامل مع المطفرات الكيميائية:

تعاني التجارب التي تستخدم المطفرات الكيميائية من عدة محاذير منها السلامة والذي يعتبر ذو أهمية في هذا المضمار، حيث تعتبر هذه المواد المطفرة مواداً مسرطنة carcinogens أيضاً وهي ذات سمية عالية وبشكل ملحوظ وتكرر. يتعلق المحذور الثاني بجرعة المطفر والتي يجب أن يتم اختيارها بعناية لتعطي معدل 0.1 طفرة للجينوم، والا، فإن الجينوم الناتج سوف يعطي طفرات متعددة والتي يمكن أن تعقد تفسير الطراز المظهري الناتج. ولهذا السبب، معظم المادة الوراثية الناتجة لا تحتوي على أي طفرة، وهذا الأمر يعد غير كفوء ومجهد جداً في الكشف عن الطافرات.

أما تحديد مكان الطفرة، فلا يوجد هنالك سيطرة على المكان الذي تحدث به الطفرات، وهذا في بعض الأحيان يؤدي الى صعوبة أو استحالة عزل الطفرات في الجين محدد أو المنطقة المرادة.



شكل (5.7):
إمكانية التسبب
بالطفرات عن
طريق اندماج
مماثلات
القاعدة
في DNA
(تصميم
المؤلف)

ولهذه الأسباب، تعد طرق البايولوجيا الجزيئية المتخصصة بالموقع site-specific كما في طريقة التطفير المعتمدة على متعدد النيوكليوتيدات oligonucleotide-directed mutagenesis أو طريقة التطفير المعتمدة على سلسلة تضاعف الدنا PCR-based mutagenesis هي الطرق الشائعة الاستخدام في الوقت الحاضر للعديد من المزايا المتوفرة بها فهي تتميز بتخصصها وقلة خطورتها وقدرتها على إعطاء نتائج يعول عليها في عمليات إعادة ترتيب الدنا DNA rearrangement experiments.

أصلاح الدنا DNA REPAIR

كلما تتقدم الحياة وتتعدد، لا بد للخلايا من مواجهة المطفرات بشتى الوسائل التي وهبها الله تعالى لها. ولكنه من الضروري المحافظة على معدل الطفرة ضمن حدود معينة لا يتعداها، وهذا يحصل من خلال اصلاح الضرر الحادث في الـ DNA الغير متضاعف بين الفينة والأخرى وكذلك للـ DNA أثناء التضاعف.

يتبعاً الـ DNA ضمن الكروموسومات بطبيعة الحال، والكروموسومات هي جزيئات كبيرة من الممكن أن تكون هدفاً سهلاً للكسر. إن ضرر مفرد في جزيئة الـ DNA يمكن أن يمنع الكروموسوم كاملاً عن التضاعف، وهكذا يمكن أن يسبب موت الخلية. إذن، وبشكل واضح، انه من غاية الأهمية للنظام الحي من أن يصلح الخلل. لقد توجه الاهتمام نحو أنظمة تصليح الـ DNA لأن معظم أنواع الأضرار القابلة للإصلاح هي مطفرة mutagenic أو مسرطنة carcinogenic.

وعلى الرغم من أن الـ DNA هو مادة مستقرة جداً - وهذه هي الصفة المطلوبة لخزن المعلومات الوراثية - ولكنه جزيئة عضوية معقدة والتي هي معرضة، حتى في الظروف الخلوية الطبيعية إلى تغييرات تلقائية والتي تؤدي إلى طفرات إذا ما تركت بحالتها الغير مصالحة. وعلى سبيل المثال، فإن قواعد الـ DNA تتضرر أحياناً بالإشعاع الفوق بنفسجي لتكون على سبيل المثال، أزواج الثايمين thymine dimers. وإذا تركت غير مصححة عند تضاعف الـ DNA، فإن هذه التغييرات من المتوقع بأنها تؤدي إما إلى حذف deletion واحد أو أكثر من الأزواج القاعدية أو إلى استبدال substitution الزوج القاعدي في سلسلة الـ DNA البنوية. هذه الطفرات سوف تنتشر بعد ذلك في الأجيال الخلوية اللاحقة كلما يتضاعف الـ DNA. إن هكذا نوع من التغييرات العشوائية في تسلسل الـ DNA تمتلك عواقب وخيمة على الكائن الحي.

كيمائية قواعد الـ DNA تسهل الكشف عن الضرر الحاصل فيه:

يبدو أن حلزون الـ DNA المزدوج قد تم تشييده بشكل مثالي لحصول عملية الإصلاح فيه. وكما نوقش سابقاً، يحتوي الـ DNA على نسخة احتياطية من المعلومات الوراثية، وبالتالي، إذا تضرر أحد الشريطين، فإن الشريط الآخر الغير متضرر يمكن أن يستخدم كقالب للإصلاح. إن طبيعة القواعد النتروجينية تسهل أيضاً التمييز بين القواعد المتضررة وغير المتضررة. وهكذا، وعلى سبيل المثال، فإن كل عملية إزالة أمين deamination محتملة في الـ DNA تنتج قواعد نتروجينية غير طبيعية، ولهذا، يمكن تمييزها مباشرة وإزالتها بإنزيم DNA glycosylase متخصص.

آليات إصلاح خلل الدنا DNA Repair Mechanisms

إن أهم آليات إصلاح الـ DNA الرئيسية هي:

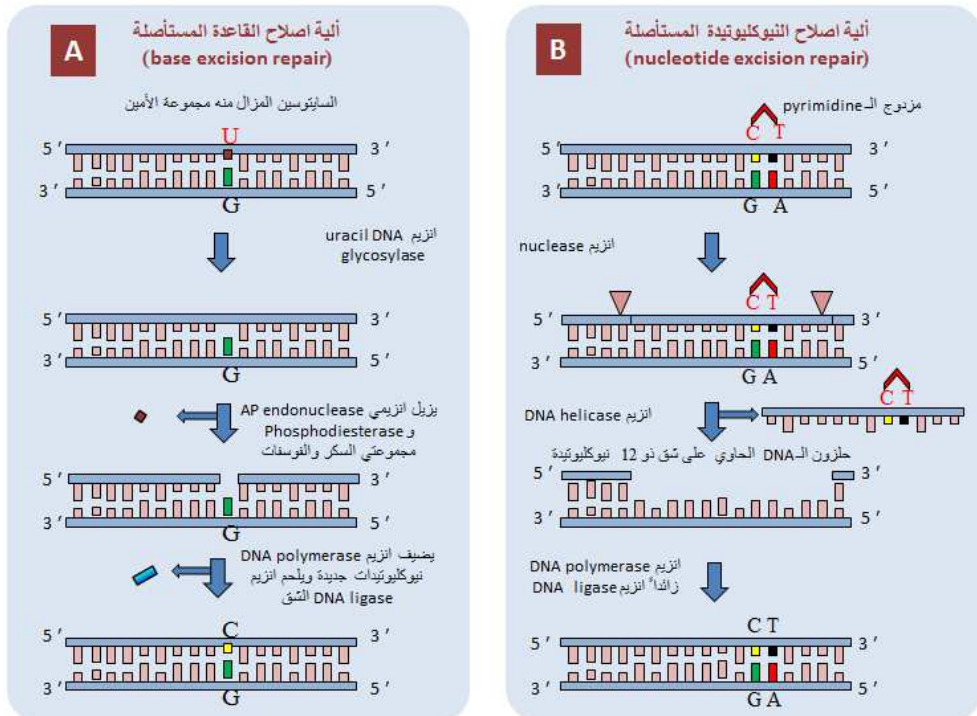
1- آلية الإصلاح الاستئصالية Excision Repair

إن هنالك مسلكين أساسيين لإصلاح الـ DNA، تتم باستخدام إنزيمات مختلفة تعمل على أنواع مختلفة من الألفات. وفي كليهما، يتم قص الأذى، ثم يتم استعادة تسلسل الـ DNA الأصلي بواسطة إنزيم DNA polymerase والتي تستخدم الشريط الغير متضرر كقالب لها، ويلحم الكسر المتبقي بالشريط بواسطة إنزيم DNA ligase (شكل 6.7).

يختلف المسلكان عن بعضهما بطريقة إزالة الضرر من الـ DNA. يدعى المسلك الأول بالـ base excision repair، والذي يتضمن مجموعة من الإنزيمات تدعى بـ DNA glycosylases. وكمثال للآلية العامة للـ excision repair، هو إزالة السايكوسين منزوع الأمين deaminated cytosine بواسطة إنزيم uracil DNA glycosylase المبين في الشكل (A) 6.7. كيف يمكن للقاعدة المبدلة من أن تكتشف ضمن سياق الحلزون المزدوج؟ يكمن الجواب في قدرة الإنزيم على الحركة الاهتزازية العنيفة flipping-out التي تشبه الشقلبة في الهواء حول النيوكليوتيدة المتبدلة من الحلزون المزدوج، والتي تسمح للإنزيم بأن يجس كل وجوه الضرر للقاعدة النتروجينية. يعتقد بأن إنزيم DNA glycosylase ينتقل على طول الـ DNA مستخدماً الشقلبة والاهتزاز حول القواعد ليقيم حالة كل زوج قاعدي. وحالما يتم التعرف على القاعدة المتضررة، يخلق إنزيم DNA glycosylase سكر رايبوزي منقوص الأوكسجين مفقداً لقاعدته النتروجينية. وهذا يولد ما يعرف بالسنس المفقود missing tooth والذي يتم تمييزه من قبل إنزيم يدعى بالـ AP endonuclease، والذي يقطع العمود الفقري المتألف من الفوسفات ثنائية الأستر بمساعدة

إنزيمات phosphodiesterase، ثم يزال الضرر بواسطة إنزيم DNA polymerase I ويصلح باستخدام إنزيم DNA ligase (شكل A 6.7).

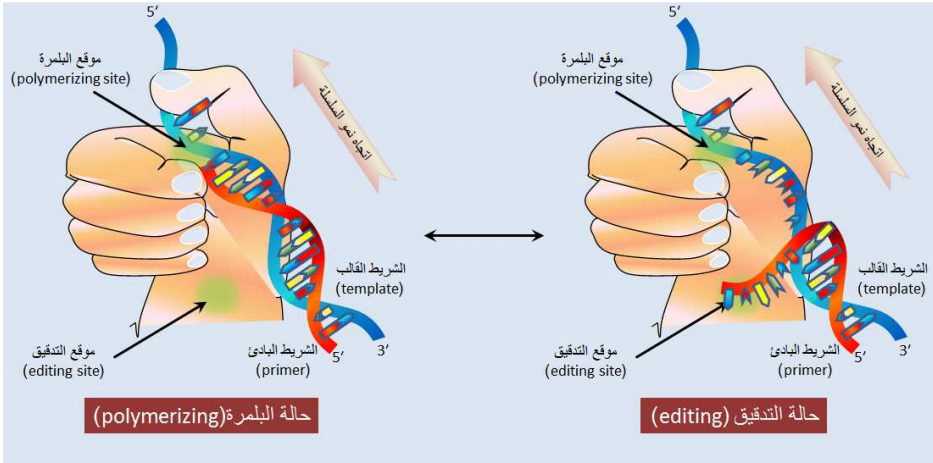
وهناك مسلك إصلاح رئيسي ثاني يدعى بـ nucleotide excision repair. هذه الآلية يمكن لها أن تصلح الضرر المتسبب من أي تغيير كبير في تركيب حلزون الـ DNA. إن هكذا "أضرار ضخمة" تتضمن تلك التي خلقت بواسطة التفاعل التساهمي بين مزدوجات البريميدين كما في (T-T, T-C, and C-C) والمتسببة بواسطة ضوء الشمس (التعرض للأشعة فوق البنفسجية). بهذا المسلك، يفحص معقد متعدد الإنزيم الكبير الـ DNA للتشوه الحاصل في حلزون الـ DNA المزدوج، بدلاً من تغيير قاعدة نتروجينية معينة. وحالما توجد منطقة الضرر الضخمة، يشق عمود الـ DNA الفقري المتكون من الفوسفات ثنائية الأستر في كلا جانبي التشوه، و يسحب متعدد النيوكليوتيدات المحتوي على الأذى بعيداً من حلزون الـ DNA المزدوج بواسطة إنزيم DNA helicase. تصلح الفجوة الكبيرة الناتجة في حلزون الـ DNA المزدوج بعد ذلك بواسطة إنزيم DNA polymerase I وإنزيم DNA ligase (شكل B 6.7).



شكل (6.7) آلية الإصلاح الاستثنائية. (a) آلية الإصلاح القاعدة (base excision repair)، (b) آلية إصلاح النيوكليوتيدة (nucleotide excision repair) (تصميم المؤلف).

(2)- آلية إصلاح النيوكليوتيدة المغلوطة Mismatch Repair

قبل أن نتكلم عن هذه الآلية لابد لنا من تسليط الضوء من جديد على إنزيم DNA polymerase III بوصفه مثال نموذجي للإنزيم الذي يستطيع أن يصحح الخطأ بسبب امتلاكه الفعالية exonuclease activity 3' - 5' والموجودة في وحدة ϵ الثانوية (أنظر الفصل الثالث). بما أن تخصص إضافة النيوكليوتيدة بواسطة إنزيم DNA polymerase قد تحدد بواسطة قاعدة Watson-Crick، إلا أن لهذا المبدأ نسبة من الخطأ، حيث تغرس قاعدة مغلوطة (كما في الأدنين بدلاً من الكوانين) أحياناً خلال تضاعف الـ DNA. وفي الحقيقة، تنتج وحدة α الثانوية المسؤولة عن البلمرة في إنزيم *E. coli* DNA polymerase III حوالي قاعدة خاطئة من مجموع مئة ألف خلال تضاعف الـ DNA. ولكن معدل الطفرات في الخلايا البكتيرية هو أقل بكثير، ويبلغ حوالي خطأ واحد من مجموع 10^9 نيوكليوتيدة. إن زيادة الكفاءة تدل في البداية على وظيفة تصحيح الخطأ proofreading function في إنزيمات *E. coli* DNA polymerases. وفي إنزيم DNA polymerase III، تكمن هذه الوظيفة في وحدة ϵ الثانوية في إنزيم البوليمريز الصممي core polymerase. وعندما تندمج نيوكليوتيدة خاطئة خلال تضاعف الـ DNA، يتوقف إنزيم البوليمريز مؤقتاً، ثم ينقل النهاية 3' لسلسلة الـ DNA النامية إلى الموقع الهاضم 3' - 5' exonuclease activity حيث تزال القاعدة المزدوجة بشكل خاطيء. وبعدها تنقل النهاية 3' إلى الخلف إلى موقع البلمرة 3' - 5' polymerizing site (شكل 7.7)، حيث يتم إضافة النيوكليوتيدات بشكل متتالي أثناء البلمرة (راجع الفصل الثالث).



شكل (7.7): عملية التصحيح بواسطة إنزيم الـ DNA polymerase. يكون إنزيم DNA polymerase معقداً مع الـ DNA القالب في الصورة المبلمرة (اليسار) والصورة المصححة (اليمن)، حيث يشير E إلى الموقع الحفزي الذي يمتلك الفعالية الهاضمة للأحماض النووية Exonucleolytic site، بينما يشير P إلى الموقع الحفزي الذي يمتلك الفعالية المبلمرة للأحماض النووية Polynucleolytic site (تصميم المؤلف).

على الرغم من القدرة الفائقة لإنزيم DNA polymerase III في عمليات التدقيق إلا أنه يحدث أحياناً أن تفلت منه قاعدة ما قد انحسرت بشكل خاطئ والتي إذا لم تعالج بطريقة ما يؤدي ذلك إلى حدوث الطفرة. وهنا يستدعى نظام ال mismatch repair والذي هو أبسط الأنظمة الإصلاحية والتي تقوم وبفعالية بإزالة هكذا انحسار مغلوط واستبداله بالنيوكليوتيدة الصحيحة. ولكي تقوم الخلية بذلك، يجب أن تعرف أي الشريطين القديم وأيهما الجديد، وذلك من خلال قدرتها على التمييز بين الشريط الذي يمتلك المعلومات الصحيحة (الشريط القديم أو الأب) عن ذلك الآخر ذو المعلومات المغلوطة (الشريط الجديد) من خلال وجود مجموعة مثيل في الشريط القديم. لذا يقوم النظام بإزالة القواعد المغلوطة في منطقة صغيرة من الشريط الجديد (الذي لم تضاف له مجموعة مثيل بعد) ويستبدلها بأخرى جديدة غير مغلوطة من خلال ملئ الفجوة الناتجة بواسطة الإنزيمات المتخصصة وهي DNA polymerase I و DNA ligase. ولهذا تدعى هذه العملية بإصلاح القاعدة المغلوطة المتوسط من قبل المثيل methyl-directed mismatch repair.

إن إصلاح النيوكليوتيدة المغلوطة أو ال mismatch repair هو قد يكون شكل متخصص من آلية الإصلاح الاستثنائية (excision repair) والتي تتعامل مع أي ازدواج قاعدي غير صحيح والحادوث خلال عملية التضاعف بعد هربه من آلية التدقيق (proofreading) لإنزيمات التضاعف. وفي هذه الحالة، تتمثل القاعدة المغلوطة بالشريط البنوي (daughter strand). ولهذا السبب، يمتلك هذا النظام وسيلة للتفريق بين الأشرطة الأبوية والأشرطة البنوية بعد عبور شوكة التضاعف لضمان إزالة القاعدة المغلوطة فقط من الشريط البنوي. وفي الكائنات بدائية النواة، تضاف مجاميع المثيل للأدنين في التسلسل GATC في كلا الشريطين. تتأخر مثيلة الأشرطة البنوية لعدة دقائق خلف شوكة التضاعف. وبهذه الطريقة، يعد ال DNA المتضاعف للتو جزيئة نصف ممثلة (hemimethylated) حيث تكون الأشرطة الأبوية ممثلة والأشرطة البنوية ليست ممثلة، وبالتالي، يمكن التفريق بينها بسهولة. يمكن تمييز الزوج القاعدي المغلوط (كما في التسلسل GT أو CA) ليرتبط بمعد بروتينات تعرف بـ MutS و MutL والتي ترتبط بعد ذلك بإنزيم MutH endonuclease والذي يقوم بقطع الشريط البنوي بشكل متخصص قرب الموقع GATC. يقوم الشق ببدء عملية استئصال المنطقة المحتوية على القواعد الخاطئة. أما آلية التفريق في الكائنات حقيقية النواة فما زالت غير معروفة على وجه التحديد.

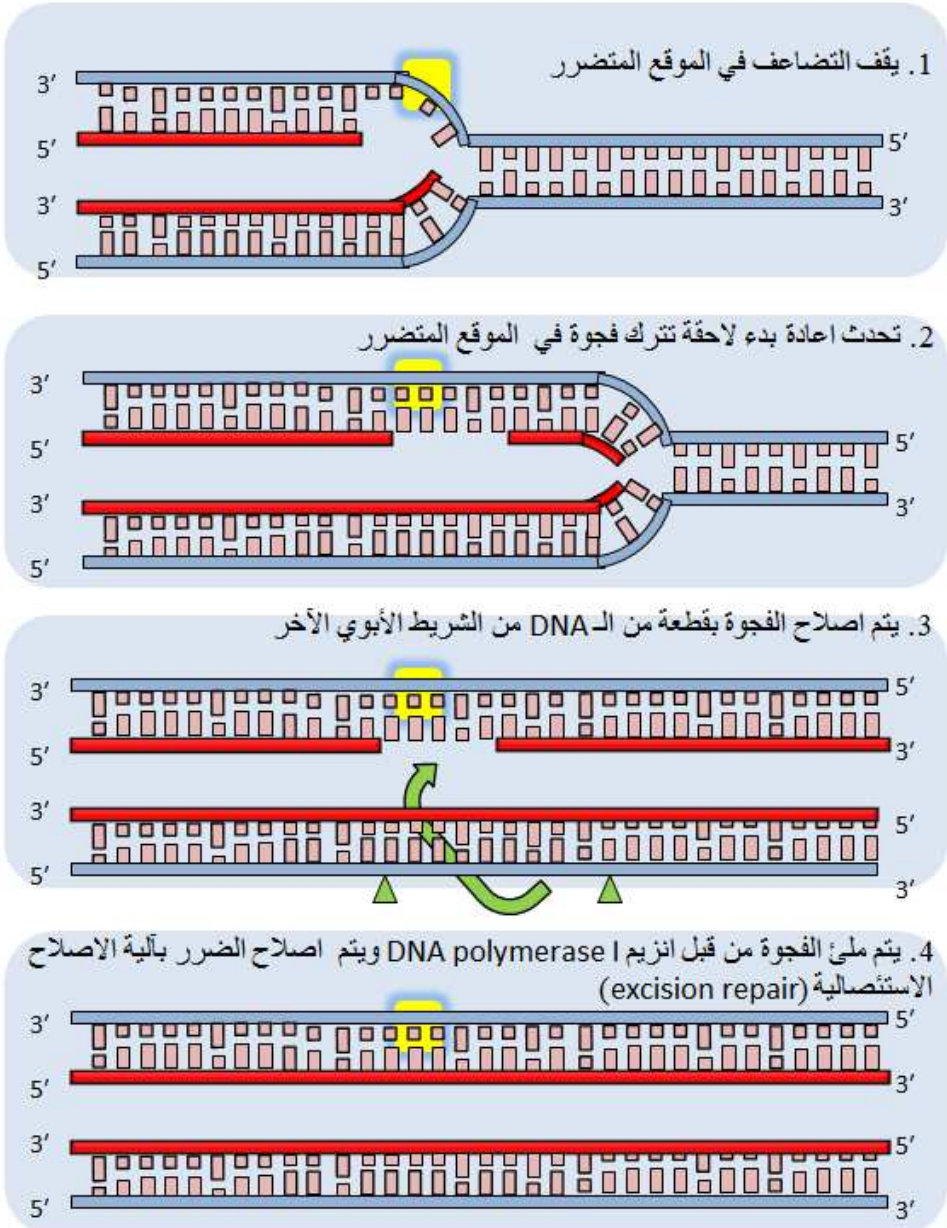
(3) آلية إصلاح إعادة الارتباط أو ما بعد التضاعف Recombination (Post-Replication) Repair

هنالك طافرات بكتيرية حساسة بشكل غير اعتيادي للأشعة فوق بنفسجية، على الرغم من امتلاكها آلية إصلاح فعالة من نوع excision repair. تتميز هذه البكتيريا بفقدان الجين الذي يشفر عن الناتج البروتيني *recA* والذي يكون مسؤول – إضافة إلى بروتينات أخرى – عن عملية إعادة الارتباط العمومية general recombination (أنظر الفصل الثامن). ان هذا يشير الى أن آلية الـ excision repair هي ليست الآلية الوحيدة التي تتعامل مع الخلل الحاصل نتيجة التعرض للأشعة فوق بنفسجية، ولكن هنالك آلية إصلاح أخرى والتي تتضمن عملية إعادة الارتباط المتماثل (شكل 8.7).

إن أشكال الـ DNA المتضررة التي تتداخل مع الازدواج القاعدي بين الأشرطة سوف تمنع التضاعف، وهذا يدل وبشكل جزئي على احتياجات إنزيم DNA polymerase للتضاعف (راجع الفصل الثالث)، ولهذا السبب تتوقف شبكة التضاعف مؤقتاً.

وعلى أية حال، سوف يبدأ التضاعف من جديد بعد هذا التوقف المؤقت الناتج من الضرر الحاصل في تلك المنطقة من الـ DNA، يؤدي هذا التضاعف إلى إحداث فجوة في الشريط المخلق حديثاً. لا يمكن إصلاح هذه المنطقة بواسطة الـ excision repair، لأنها تحتاج إلى وجود شريط سليم. ولهذا يمكن ملئ الفجوة باستخدام منطقة من الـ DNA من أزواج أخرى من الأشرطة الغير متضررة عن طريق عملية إعادة الارتباط، وهي عملية قطع ثم ربط الـ DNA (أنظر الفصل الثامن).

ولو أن هذه العملية تعيد من تجانس الخلل بدلاً من اصطلاحه ولكنها تجعل من الشريط المتضرر والغير قابل للإصلاح شريطاً قابلاً للإصلاح بواسطة آلية الـ excision repair التقليدية حيث تملئ الفجوة في جزيئة الـ DNA الأخرى بواسطة إنزيم الـ DNA polymerase I وإنزيم DNA ligase.

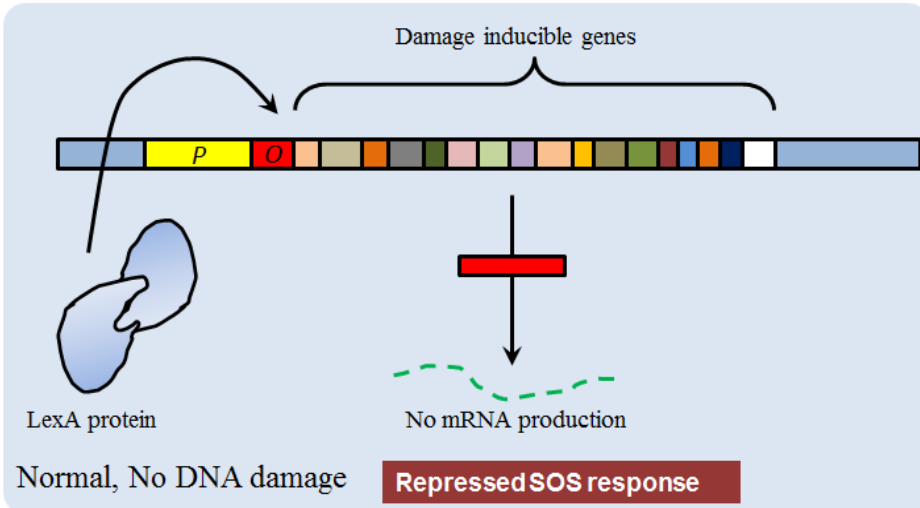


شكل (8.7): آلية إصلاح ما بعد التضاعف. بعدما يَقف التضاعف في الموقع المتضرر (1)، فإن عملية إعادة البدء من جديد تترك فجوة في الشريط الجديد (2). إن هذا يمكن إصلاحه بواسطة تبادل الـ DNA (3)، سامحاً للمنطقة المتضررة الأصلية من أن يتم إصلاحها، (4) والذي يتم بواسطة آلية الـ excision repair (تصميم المؤلف).

4- آلية إصلاح "استجابة سوس" SOS Response Repair

وهي نوع من أنواع آليات الاستجابة الخلوية المعقدة، ويتم تنشيطها من قبل أنواع معينة من ضرر الـ DNA. وبما أن هذا النوع من الإصلاح يتم بغياب معلومات الشريط القالب الصحيحة، لذا تتكون العديد من الأخطاء، ولهذا السبب يوصف النظام بالآلية القابلة للخطأ (error prone mechanism)، ولهذا السبب لا تعد هذه الآلية آلية إصلاح بالمعنى الدقيق. يتم تحفيز آلية استجابة SOS عن طريق ضرر الـ DNA الموقف لتضاعفه (كما في مزدوج الثايمين). تستخدم هذه الاستجابة الخلوية عند مواجهة مستويات ساحقة من ضرر الـ DNA والتي تمنع من التضاعف الطبيعي لتقوم بتحويل الـ DNA مؤقتاً أو تقوم بإلغاء تخصص إنزيم DNA polymerase. وبالنتيجة، تمكن هذه الطريقة من الاستجابة في الاستمرار في صنع شريط DNA جديد على الرغم من غياب الدقة اللازمة للتضاعف. إن آلية إصلاح SOS هي سبب الطفرات الناشئة من التشعيع بالأشعة فوق بنفسجية.

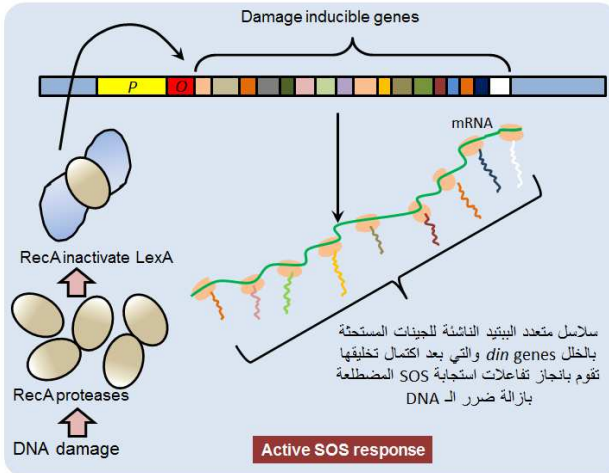
تعد آلية إصلاح SOS في بكتريا القولون هي من أفضل الأمثلة المدروسة حول آليات الإصلاح الناجمة عن الاستجابة الطارئة للضرر الحاد في الـ DNA. يوجد في قلب نظام SOS هنالك جينين، وهما *lexA* و *recA*. وتحت الظروف الطبيعية يعمل بروتين *lexA* ككبح وذلك بارتباطه بما يقارب 17 جين والتي تشفر عن بروتينات تدخل في أنواع شتى من آليات إصلاح الـ DNA. وتدعى هذه الجينات بمجموعها بالجينات المستحثة بالضرر (damage inducible genes (*din*) (شكل 9.7).



شكل (9.7): آلية كبح أوبرون SOS (يدل مختصر *din* على damage inducible genes أي الجينات المستحثة بالضرر) (تصميم المؤلف).

وفي هذه البكتيريا، يؤدي أي إيقاف في تضاعف الـ DNA بسبب ضرر الـ DNA إلى تولد إشارة معينة، تقوم هذه الإشارة (والتي هي عبارة عن زيادة في الـ DNA المفرد الشريط) بتنشيط بروتين *recA* في البداية، يقوم هذا البروتين بتعطيم بروتين *lexA* من خلال تسببه في شق بروتين (proteolytic cleavage) فيه. حيث إن تفاعل شق البروتين *lexA* ليس بالطبيعي تماماً: إن *lexA* بروتين لديه فعالية كامنة محللة للبروتين latent protease activity والتي سرعان ما تنتشط عند تعرضها لبروتين *recA*. وتقوم هذه الفعالية البروتينية بتحليل البروتين الذي ينتجها - أي *lexA* - ذاتياً وهذا يعمل على تهديم الوظيفة الكابحة repressor function لبروتين *lexA*، وهذا يحدث كل البروتينات التي يرتبط معها البروتين *lexA* (كما في الشكل 9.7). وهذا يؤدي إلى تعبير الجينات التي كانت مكبوحة من قبل بروتين *lexA* من قبل بروتين *recA* المنشط. وبعد تحرر تلك البروتينات تقوم بزيادة معدل الطفرات مؤقتاً وذلك عن طريق زيادة عدد الأخطاء في نسخ تسلسلات الـ DNA. نتجت تلك الأخطاء بسبب انتاج انزيمات DNA polymerases ذات قابلية تدقيقية واطئة والتي يمكن لها أن تستخدم الـ DNA المتضرر كقالب لتخليق الـ DNA.

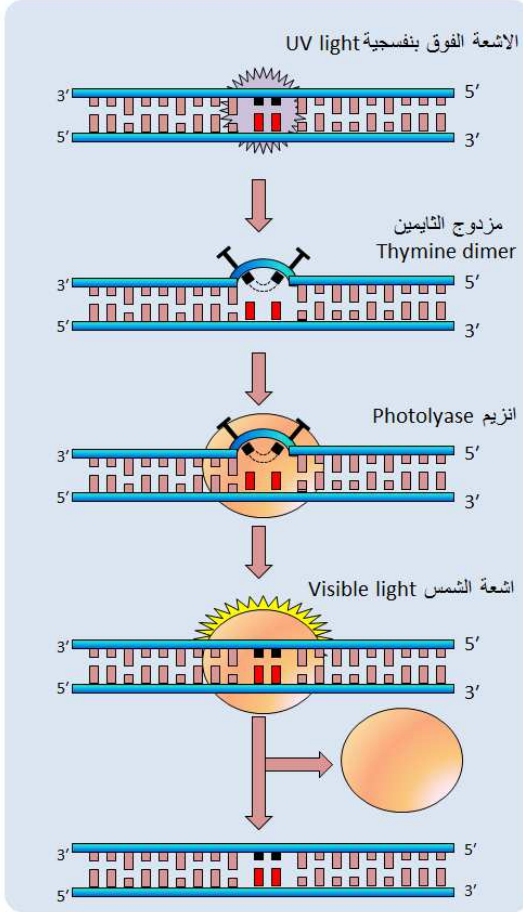
لم تنتهي القصة هنا، حيث إن SOS responses كظاهرة هو دائرة circuit تكمن أهميتها في قابليتها على العودة بسرعة إلى الحالة الطبيعية. فعندما تزال الإشارة الحادثة inducing signal، يفقد بروتين *recA* قابليته على زعزعة بروتين *lexA*. وفي تلك اللحظة، يتم التعبير عن جين *lexA* بمستوى عالي، وعند غياب بروتين *recA* المنشط، يتراكم بروتين *lexA* بشكله الغير مشقوق بسرعة ويقفل جينات SOS (شكل 10.7). إن هذا يفسر لماذا يوصف نظام SOS بالمعكوس. وعلى الرغم من امكانية هكذا آلية اصلاح "قابلة للخطأ" في أن تكون مضرّة للخلايا البكتيرية، لكنها مفيدة على المدى البعيد لأننتاجها عدد هائل من التغيرات الوراثية في البكتيريا والتي تزيد من احتمالية زيادة قابلية الخلايا لطفرة الناتجة عن استجابة SOS للبقاء في البيئات القاسية.



شكل (10.7): آلية تنشيط أوبرون SOS (يدل مختصر din على damage inducible genes أي الجينات المستحثة بالضرر) (تصميم المؤلف).

5) آلية الإصلاح المعتمدة على التنشيط الضوئي photoreactivation repair

لا يمكن أن يتم إصلاح تأثير الأشعة فوق البنفسجية على الـ DNA بآلية مفردة. فعندما تكوّن قواعد الـ pyrimidine المجاورة في شريط الـ DNA مزدوجات بكفاءة عالية بعد امتصاص الأشعة فوق البنفسجية تدعى بـ cyclobutane pyrimidine dimer (شكل 11.7) يوجد هنالك آلية أخرى لإصلاح هذا الضرر غير آلية الـ excision repair. يقتصر وجود هذه المزدوجات على قواعد البريميدين فقط، حيث تعد قواعد البيورين في غاية المقاومة للضرر المتسبب بالأشعة فوق البنفسجية. من الممكن أن تزال مزدوجات البيريميدين أو أشكال أخرى من ضرر الـ DNA بواسطة آلية الـ excision repair. وبهذا الشكل من الإصلاح، يزال الضرر من الـ DNA ويصلح.



شكل (11.7): آلية إعادة التفعيل الضوئي photoreactivation mechanism المسؤولة عن إصلاح الخلل المتسبب عن التعرض للأشعة فوق بنفسجية (تصميم المؤلف).

إن الـ excision repair هو نظام متعدد الخطوات، ولكن هنالك نظام يصلح هذا الخلل في خطوة واحدة، حيث من الممكن أن تصلح المزدوجات بشكل مباشر وذلك بواسطة إعادة تفعيل إنزيمي ضوئي. إن مثال الخطوة الواحدة هو العكس المباشر direct reversal والذي من الممكن أن يتم بواسطة إنزيم الـ photolyase البكتيري، حيث ترتبط إنزيمات إعادة التنشيط الضوئي photoreactivation enzymes بالـ DNA المحتوي على مزدوج البيريميدين

pyrimidine dimer وتستخدم الضوء المرئي لشق المزدوج بدون كسر أي أصرة فوسفات ثنائية الأستر phosphodiester bond، ليتم التخلص من المزدوج cyclobutane pyrimidine المتكون بين قاعدتي البيريميدين وترجع تلك القاعدتين المتجاورتين إلى الحال الذي كانتا عليه قبل تعرضهما للأشعة فوق البنفسجية، وبهذه الطريقة يتم إصلاح الضرر.

أما في البشر، يرتبط عدم قابلية إصلاح خلل الـ DNA بمتلازمات وراثية نادرة، كما في (XP) xeroderma pigmentosum، فإن الأشخاص المصابين به يمتلكون حساسية مفرطة لإشعاع الأشعة فوق البنفسجية ultraviolet radiation وذلك لأنهم غير قادرين على إصلاح منتجات ضوئية معينة للـ DNA ناتجة من الإشعاع، حيث تتكون مناطق متضررة تشبه النمش عند تعرض جلودهم إلى أشعة الشمس (أنظر الشكل 12.7)، و هنالك زيادة تقدر بألف مرة للإصابة بسرطان الجلد skin cancer لهؤلاء الأشخاص مقارنة بالأشخاص الطبيعيين. إن هذا الخلل في الإصلاح ينتج في زيادة في معدل الطفرة وهذا يؤدي إلى زيادة في الاستعداد للإصابة بسرطانات معينة.



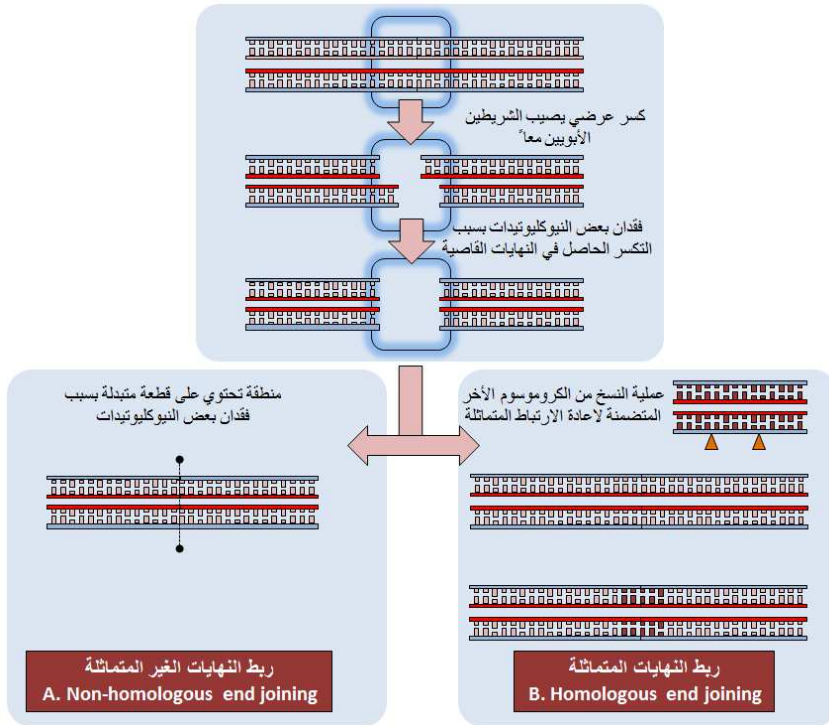
تحدث آلية الإصلاح المعتمدة على التنشيط الضوئي في اللبان بتردد واطي، لذا فعند تضرر كلا شريطي الـ DNA، فإن احتمال ظهور عواقب وخيمة لذلك وارد جداً. لذلك لا بد من وجود آلية أخرى تعنى بإصلاح الضرر في كلا الشريطين.

شكل (12.7): أعراض المريض المصاب بمتلازمة (Google image) xeroderma pigmentosum

6) إصلاح الكسور المزدوجة الشريط double stranded breakage repair:

فيما سبق تم مناقشة الكسور الحادثة في شريط واحد من أشرطة الـ DNA وكيفية إصلاحها. وفي كل الآليات السالفة الذكر يتم استخدام الشريط السليم في إصلاح الشريط المتضرر. ولكن، ماذا يحصل إذا تضرر كلا شريطي الـ DNA في وقت واحد كما في التعرض للأشعة المتأينة ionizing radiation، وبعض النواتج الأيضية في الخلية؟ وإذا تركت هذه الأضرار غير مصلحة، فإنها سوف تؤدي بسرعة إلى تكسر الكروموسومات إلى قطع اصغر.

هنالك آليتين متميزتين لإصلاح هذا النوع من الضرر. أسهل آلية قابلة لفهم تعرف بربط النهايات غير المتماثلة nonhomologous end-joining، والتي بواسطتها تتراصف النهايات المكسورة ويعاد ربطها ببعضها بواسطة عمليات لحم الـ DNA (DNA ligation). وبشكل عام، يؤدي ذلك إلى فقدان نيوكليوتيدة أو أكثر في موقع الربط (شكل 13.7 A). إن آلية ربط النهايات end joining mechanism، والتي يمكن تصور ها كحل طارئ لإصلاح الكسور مزدوجة الشريط، هي آلية حل شائعة في خلايا اللبائن. وهنالك نوع أكثر كفاءة في إصلاح الكسر المزدوج الشريط يستغل حقيقة إن الخلايا diploid تحتوي على نسختين من كل حلزون مزدوج. يدعى مسلك الإصلاح الثاني بربط النهايات المتماثل homologous end joining. وهنا تستدعى آليات إعادة الارتباط العامة general recombination mechanisms لتقوم بنقل معلومات التسلسل النيوكليوتيدي من حلزون الـ DNA المزدوج الصحيح إلى مكان كسر حلزون الـ DNA المزدوج المكسور (شكل 13.7 B).



شكل
(13.7): آلية
لحم كسور
الـ DNA
مزدوجة
الشريط
(تصميم
المؤلف).

يحتاج هكذا نوع من التفاعل بروتينات إعادة ارتباط خاصة والتي تميز مناطق ذات تسلسلات DNA متطابقة بين الكروموسومات وتربطهما مع بعضهما. ثم تستخدم عملية

تضاعف الكروموسوم غير المتضرر كقالب لنقل المعلومات الوراثية للكروموسوم المكسور، مصلحة إياه دون أي تغيير في تسلسله.

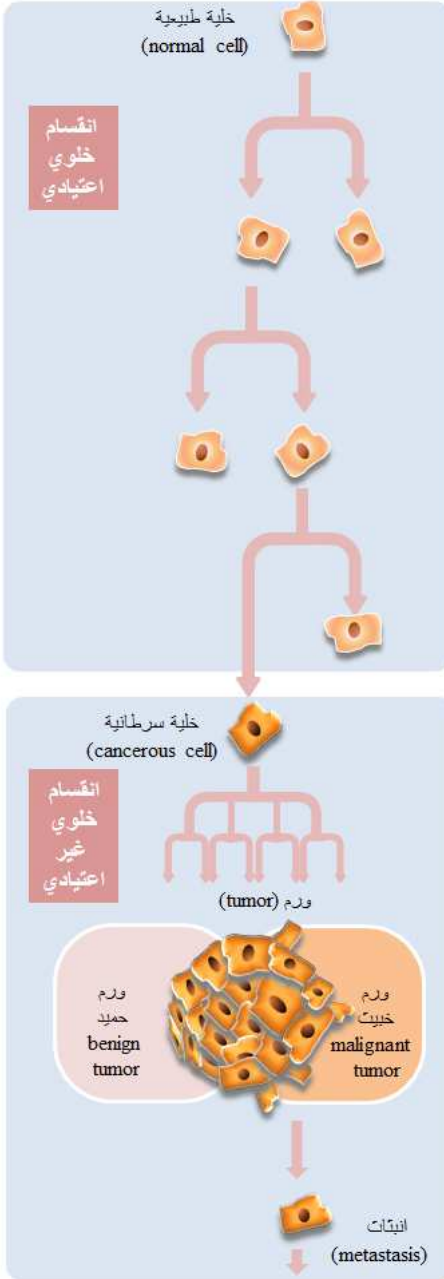
ملحق الفصل السابع

السرطان تراكم للطفرات

السرطان هو مرض يبدأ عندما تهرب الخلية من تنظيم انقسامها الخلوية. ان انقسام الخلية هي العملية التي تقوم بها الخلية لكي تصنع نسخ من نفسها. يتم تنظيم هذا الانقسام بشكل طبيعي بحيث تنقسم الخلية فقد عندما تكون هناك حاجة الى خلايا أخرى، وعندما تكون الظروف ملائمة للانقسام.

الخلية السرطانية هي خلية متمرده تنقسم بدون تلقي أي تعليمات من الجسم. يؤدي انقسام الخلية الغير منظم الى تكوين الورم (tumor). والورم هو كتلة من الانسجة والتي ليس لها وظيفة واضحة في الجسم. تسمى الأورام التي تظل قابعة مكانها من دون التأثير على الأنسجة المتاخمة بالأورام الحميدة (benign tumors). وتبقى بعض الأورام الحميدة حميدة، بينما تتحول الأخرى الى مسرطنة، حيث تغزو الأنسجة المجاورة، عندها لا يمكن تسميتها بالحميدة بعد ذلك، وتعدى تلك الأورام بالأورام الخبيثة (malignant tumors). وتشكل تلك الأورام الخبيثة المختلفة لسرطانات مختلفة. وتدعى تلك الخلايا التي تنشأ من ورم ما وتهرب من ذلك الورم وتبدأ بانشاء سرطانات في مكانات بعيدة في الجسم بالخلايا المنبثة، وتدعى تلك العملية بالانبثاث (metastasis) (شكل 14.7). وبينما كان من الممكن إزالة الورم الحميد جراحياً، فان انتشار الورم الخبيث لمناطق الجسم البعيدة يجعلها بشكل متكرر مقاومة لتلك العلاجات الموضعية.

إن هنالك عدة عوامل مسرطنة (carcinogens) قد نشأت من الغذاء والملوثات الكيميائية. بالإضافة إلى ذلك، تعتبر الإشعاعات المتأينة عوامل مسرطنة أيضاً. وعلى سبيل المثال، هنالك أدلة قوية تثبت بأن الأشعة المتأينة القادمة من الشمس هي سبب أساسي لسرطان الجلد. وبالنتيجة، تعد نسبة حدوث سرطان الجلد في القسم الشمالي من الولايات المتحدة الأمريكية مثلاً هو أعلى منه في القسم الجنوبي. كما أن الجرعة العالية من المواد الفعالة إشعاعياً (radioactive materials) أو الأشعة السينية (X-rays) قد ارتبطت بشكل وثيق مع حدوث العديد من أشكال السرطان.

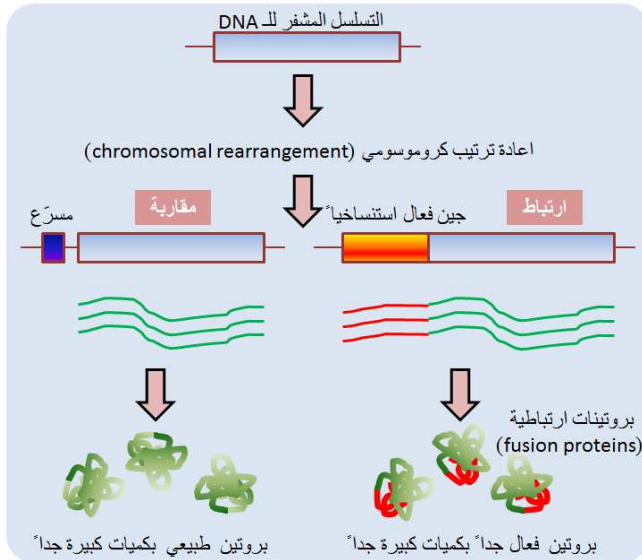


شكل (14.7): ماهية السرطان على المستوى الخلوي. إن الورم هو مجموعة من الخلايا عديمة الوظيفة. ربما تبقى الأورام حميدة وربما تغزو الأنسجة المحيطة وتصبح خبيثة (تصميم المؤلف).

في العديد من الحالات، يرتبط التعرض إلى فيروسات معينة بأنواع معينة من السرطانات. وعلى سبيل المثال، سرطان الكبد (liver cancer) والذي هو أكثر شيوعاً بثلاث مئة مرة بالأشخاص الذين قد خمجوا مسبقاً بفيروس الكبد نوع B، حيث أن الخمج أو الإصابة بفيروس الكبد نوع B هو في الأعم الأغلب السبب الرئيسي لسرطان الكبد البشري. أما آليات تحول الجينات المسرطنة الأولية إلى جينات مسرطنة، فسوف نناقش أربع آليات والتي تبدل تعبير أو تركيب الجينات المسرطنة الأولية لكي تتحول إلى جينات مسرطنة. ولأجل التبسيط، تسمى العملية التي بواسطتها يزداد استنساخ الجين (من الصفرة أو من المستوى القليل نسبياً) بالتنشيط "activation". وهنا توضيح مبسط لتلك الآليات الأربع المختلفة التي تساهم في عملية التسرطن.

(1) – إعادة الترتيب الكروموسومي أو الانتقال الكروموسومي من مكان إلى آخر (chromosomal translocation): تبدي العديد من الخلايا الورمية تشوهات

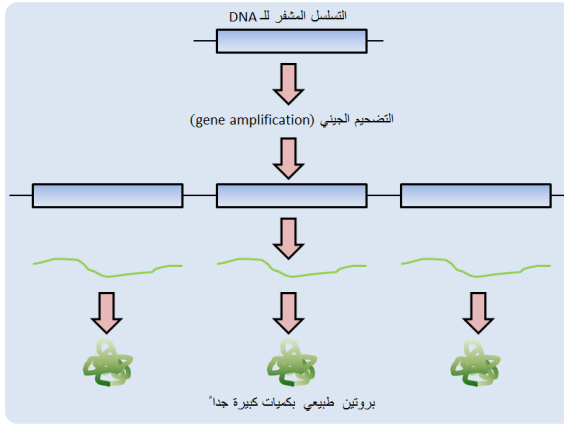
كروموسومية (chromosomal abnormalities). تعرف أحد أنواع تلك التغيرات الكروموسومية والملاحظة في الخلايا بالانتقال من مكان إلى آخر. وأساس عملية الانتقال هذا هو انشقاق قطعة كروموسومية واحدة وارتباطها بعد ذلك بكروموسوم آخر. إذا منح الكروموسوم الثاني أي جزء معين منه للكروموسوم الأول فيمكن وصف عملية التحول تلك بالمتبادلة (reciprocal). لقد وجدت خاصية الانتقال في عدد من الخلايا الورمية. يعتبر "كروموسوم فيلادلفيا" من أهم أنواع الانتقالات، والذي يشمل حدوث عملية الانتقال بين الكروموسومين 22 و 9 ويحدث في أحد أنواع سرطانات الدم (شكل 15.7). تحدث عملية الانتقال أيضاً في "سرطان الأوعية اللمفاوية بوكيت" (Burkett's lymphoma) والذي هو عبارة عن سرطان ينمو بسرعة من خلايا B اللمفاوية للبشر. وفي حالات معينة، يحدث تنشيط لبعض الجينات السرطانية عندما يحدث هذا الانتقال المتبادل بين الكروموسومين 8 و 14، حيث تنكسر قطعة الكروموسوم رقم 8 الحاوي على الجين *myc* الخلوي المنشأ، وتحرك إلى الكروموسوم رقم 14 قرب موقع بعض الجينات المناعية. يضع القفز الحاصل في عملية الانتقال جين *myc* الغير فعال مسبقاً تحت تأثير تسلسلات المسرع (enhancer sequences) في الجينات المشفرة للسلاسل الثقيلة للكلوبيولينات المناعية (immunoglobulins). ينتج هذا التقارب في تنشيط استنساخ جين *myc*. وعلى ما يبدو، يعمل التخليق المزايد للبروتين المشفر من قبل جين *myc* والذي له خاصية الارتباط بالدنا (DNA binding protein) على "قيادة" أو "إجبار" الخلية لكي تصبح خبيثة، ربما بتأثيره على الانقسام الخلوي. تشابه هذه الآلية لانحشار المسرع (enhancer insertion) باستثناء إن عملية الانتقال الكروموسومي (بدلاً من حشر الفايروس الأولي) تكون مسؤولة عن حشر الجين المسرطن الأولي (كما في جين *myc*) تحت تأثير المسرع.



شكل (15.7): أحد وسائل تحويل الجين المسرطن الأولي إلى جين مسرطن بواسطة إعادة الترتيب الكروموسومي. في يمين الشكل أعلاه حدث هناك ارتباط بين الجين الفعال استنساخياً مع الجين المسرطن الأولي، أدى هذا الارتباط إلى إنتاج بروتينات فعالة جداً وبكميات كبيرة. أما في يسار الشكل أعلاه حدث هناك اقتراب بين مسرع قوي (strong enhancer) مع الجين المسرطن الأولي وهذا هو الذي سبب في إنتاج بروتينات طبيعية ولكنها بكميات كبيرة جداً وهذا قد يؤدي إلى السرطان في الحالتين (تصميم المؤلف).

(2) – آلية إعادة الارتباط بين DNA الـ retrovirus والجين المسرطن الأولي، تتشابه هذه الآلية مع آلية إعادة الارتباط المذكورة سابقاً من حيث المبدأ (شكل 15.7). وهي على نوعين: يتضمن النوع الأول انحشار البروموتر (promoter insertion). تختلف الـ retroviruses في قدرتها على استحثاث التسرطن، فتلك التي تفتقد لجينات المسرطنة (كما في avian leukemia virus) على القابلية على التسبب بالسرطان بعد فترة طويلة من الوقت – أشهر بدلاً من أيام – مقارنة بتلك التي تحتوي على الجينات المسرطنة. أما بالنسبة للـ retroviruses الأخرى، فعندما تخمج تلك الفايروسات الخلايا، تنحشر نسخة الـ cDNA الناتجة منها والتي تخلق بواسطة إنزيم reverse transcriptase في جينوم العائل. يسمى الـ cDNA ذو الشريط المزدوج المنحشر بالفايروس الأولي (provirus). تحاط نسخ الـ cDNA للـ retroviruses من كلا نهايتيها بتسلسلات سميت بالكرارات الطرفية الطويلة (long terminal repeats or LTR)، وكما في تسلسلات قفازة (transposons) معينة (الجينات القفازة) الموجودة في البكتريا والنباتات (أنظر الفصل الثامن). يبدو أن تسلسلات LTR لها أهمية في حشر الفايروس الأولي، كما أنها من الممكن أن تعمل كتسلسلات بروموتر لعمليات استنساخ بعد خمج الخلايا اللمفية نوع B للدجاج بواسطة avian leukemia virus (ALV)، والتي تكون فايروس أولي منحشراً قرب جين myc. يتم تنشيط جين myc بواسطة تسلسلات LTR الفايروسية الواقعة قبله والتي تعمل كبروموتر ناتجة عن استنساخ كلا الـ myc mRNA المطابق وترجمة ناتجة في هذه الخلايا. وينجم عن ذلك ورم في الخلايا B. أما النوع الثاني فهو انحشار المسرع (enhancer insertion): ينحسر الفايروس الأولي في بعض الحالات بعد (downstream) منطقة الجين myc أو قبل (upstream) هذه المنطقة، ولكن يكون اتجاه الفايروس الأولي بشكل معاكس، مع ذلك، يصبح جين myc منشطاً. لا يمكن أن يدل مثل هذا التنشيط على انحشار البروموتر، لأن تسلسل البروموتر يجب أن يكون قبل الجين الذي يزداد استنساخه والتسلسل يجب أن يكون بالاتجاه من 5' إلى 3' الصحيح. ويمكن لأحد أو لكلا الأليتين (انحشار البروموتر والمسرّع) من أن تفسر عملية التسرطن ذات المنشأ الفايروسي.

(3) – التضخيم الجيني (Gene Amplification): وجد حدوث تضخيم لجينات معينة في عدد من الأورام. وأحد أمثلة التضخيم الجيني في الأورام هو المعاملة بالأدوية المضادة للسرطان (anticancer drugs) كما في عقار methotrexate، وهو عبارة عن مثبط للإنزيم dihydrofolate reductase. ومن الممكن أن تصبح خلايا الورم مقاومة لفعل هذا الدواء. إن أساس هذه الظاهرة هو أن الجين الذي يشفر لإنزيم dihydrofolate reductase يصبح متضخماً، ونتج هذا التضخم في زيادة فعالية لإنزيم (أكثر من 400 مرة) (شكل 16.7). تشخص تلك المناطق المتضخمة باصطباجها بشكل متجانس (homogeneously staining regions). وبدلاً عن ذلك، تشخص تلك المناطق

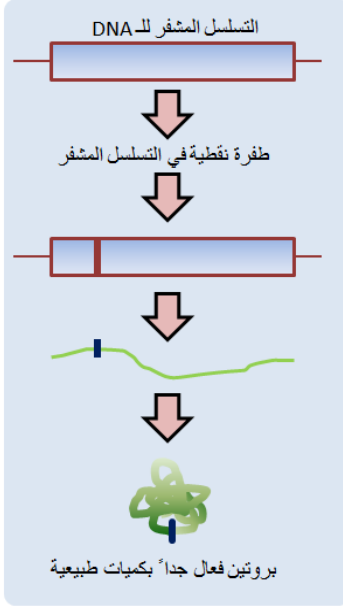


المتضخمة كـ double-minute chromosomes والتي هي عبارة عن كروموسومات صغيرة تفتقد للسنتروميرات.

شكل (16.7): أحد وسائل تحويل الجين المسرطن الأولي إلى جين مسرطن بواسطة التضخيم الجيني (تصميم المؤلف).

(4) – الطفرة النقطية المفردة (single point mutation): لقد تم اكتشاف الجين المسرطن v-ras أصلاً في كائنات حية معينة (كما في الجرذان والفئران). يدعى ناتج هذا الجين بـ p21 والذي سمي على أساس وزنه الجزيئي، ويبدو أن له علاقة ببروتينات G التي تقوم بتعديل فعالية إنزيم adenylylase cyclase ، وهكذا تلعب دوراً كبيراً في الاستجابات الخلوية للعديد من الهرمونات والأدوية. بينت نتائج تحليل تسلسلات الـ DNA لجينات ras الخلوية المسرطنة الابتدائية المعزولة من خلايا البشر الطبيعية وجينات ras الخلوية المسرطنة المعزولة من سرطان المثانة للبشر باختلافها في قاعدة واحدة فقط، ناتجة عن استبدال حامض أميني في الموقع 12 لبروتين p21. والدليل على ذلك هو أن الجين المعزول من الورم قد أبدى طفرة نقطية واحدة فقط مقارنة بجين ras المسرطن الابتدائي الخلوي المعزول من الخلايا الطبيعية. يبدو أن هذه الطفرة والحادثة في بروتين p21 تؤثر على هيئته وتلغي فعاليته كـ GTPase. وينتج تقليل فعالية GTPase البروتينية في تحفيز مستمر لفعالية إنزيم adenylylase cyclase، والتي عادة ما تلغى عندما يتكون مركب GDP من GTP. من الممكن أن ينتج التحفيز الناتج لفعالية GTPase في مجموعة من التأثيرات على الأيض الخلوي الحادث بسبب الكميات المتزايدة من مركب cAMP مؤثراً على عدة إنزيمات من نوع kinase والمعتمدة في فعاليتها على مركب cAMP (-cAMP dependent protein kinases). ربما تساعد هذه الأحداث في اضطراب توازن الأيض الخلوي نحو حالة التحول الورمي الخبيث (شكل 17.7).

في الآليات الأربع المناقشة في أعلاه تدخل الآليات الثلاث الأولى (إعادة الارتباط بين الـ DNA الـ retrovirus والجين المسرطن الأولي والانتقال الكروموسومي من مكان إلى آخر والتضخيم الجيني) في زيادة كمية الناتج للجين المسرطن دلالة على زيادة الاستنساخ ولكن ليس في تعديل تركيب ناتج الجين المسرطن. إذن، ربما تكون الكميات المتزايدة من ناتج الجين المسرطن كافية لدفع الخلية نحو التسرطن. أما الآلية الرابعة، أي الطفرة النقطية،



فهي تتضمن تغييراً في تركيب ناتج الجين المسرطن وليس بالضرورة تغيير في كميته. تشير هذه الملاحظة إلى أن وجود البروتين المنظم المهم الغير طبيعي تركيبياً (structurally abnormal key) (regulatory protein) في الخلية ربما يعد كافياً أيضاً في دفع الخلية نحو التسرطن.

شكل (17.7): أحد وسائل تحويل الجين المسرطن الأولي إلى جين مسرطن بواسطة الطفرة النقطية (تصميم المؤلف).

عندما ندقق النظر بدور الجينات المسرطنة فمن المهم أن نضع في الحسبان بأن تنشيط الجينات المسرطنة ليس هو بالمسلك الوحيد المسؤول عن حدوث عملية التسرطن، بل أن اجتماع تشيطنها مرتبطاً بكبح تنشيط (inactivation) جينات أخرى تعرف بالجينات الكابحة للورم (tumor suppressor genes) يدخل في عملية التسرطن في معظم الحالات السريرية.

أسئلة الفصل السابع

السؤال الأول: علل ما يلي:

- توفر المواقع المحتوية على 5-methylcytosine مناطق أخاذا (hotspot) لحدوث الطفرة النقطية التلقائية؟
- يحتوي الـ DNA على ثايمين، بينما يحتوي الـ RNA على يوراسيل؟
- تعد طريقة التطهير المعتمدة على الـ PCR أفضل من استخدام المطفرات التقليدية؟
- يعتبر حلزون الـ DNA جزيئة مثالية بحيث تستطيع اصلاح الخلل الحادث فيها؟
- توصف آلية الـ mismatch repair بأنها آلية متوسطة من قبل المثلث (methyl directed mechanism)؟
- لا تعد آلية الـ SOS response بأنها آلية اصلاح بالمعنى الدقيق؟
- توصف آلية الـ SOS response بأنها تشبه الدائرة؟
- تفقد أحيانا بعض النيوكليوتيدات عند اصلاح الـ DNA المتضرر في كلا شريطيه؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح:

لا يتغير نسق القراءة في.....

- a. deletion mutation d. insertion mutation c. addition mutation d. none

- يمكن أن تتحرر سلسلة متعدد الببتيد قبل اكتمال عملية الترجمة وذلك بسبب تغيير نسق القراءة في.....
- a. deletion mutation d. insertion mutation c. addition mutation d. all
- لا يوجد هنالك تأثير قابل للكشف في الطفرة الصامتة بسبب صفة في الشفرة الوراثية.
- a. unambiguity b. universality c. overlapping d. degeneracy
- قد يؤدي التغيير القاعدي المفرد في طفرة الانحشار الخاطئ (missense mutation) إلى استبدال حامض أميني بحامض أميني آخر ذو مجاميع وظيفية مشابهة للحامض الأميني الأصلي، وتسمى هذه الحالة بـ.....
- a. acceptable b. partially acceptable c. unacceptable d. a and b
- تحدث طفرة الـ transversion بواسطة تحول
- a. purine to purine b. pyrimidine to pyrimidine c. pyrimidine to purine d. prine to pyrimidine e. "c" and "d"
- تولد عملية ازالة مجموعة الأمين من السابتوسين
- a. adenine b. guanine c. cytosine d. thymine e. uracil
- يحدث حامض النتروز الطفرة من خلال آلية
- a. base analogue c. copy error c. direct gene change d. hydroxylation e. alkylation
- عادة ما تحدث حالة إيقاف سلسلة متعدد الببتيد قبل نضوجها في
- a. silent mutation b. accepted missense mutation c. partially accepted missense mutation d. non-accepted missense mutation e. nonsense mutation
- يبلغ معدل الطفرات في الخلايا البكتيرية حوالي خطأ واحد لكل نيوكليوتيدة
- a. 10^3 b. 10^5 c. 10^7 d. 10^9 e. 10^{12}
- تستخدم الخلية آلية في التمييز بين الشريط الأبوي والشريط البنوي.
- a. mismatch repair b. base excision repair c. nucleotide excision repair d. post-replication repair e. photoreactivation repair, cyclobutane pyrimidine
- تعد آلية الإصلاح هي أكثر آليات الإصلاح القابلة للخطأ.
- a. mismatch repair b. excision repair c. SOS response repair d. post-replication repair e. photoreactivation repair
- الأشخاص المصابين بمتلازمة xeroderma pigmentosum (XP)، يمتلكون حساسية مفرطة للأشعة—
- a. chemicalb. physicalc. cosmicd. ultra violete. laser

السؤال الثالث: عرف ما يلي:

Transversion mutation, temperature sensitive mutation, backward mutation, depurination, isoallele mutation, photolyase.

السؤال الرابع: صل المفردات الموجودة في اليمين مع ما يناسبها في اليسار

Mutagen	Missing tooth
Xeroderma pigmentosum	Stop codon
Base excision repair	Mosaic
Double stranded breakage repair	Proflavin
Nonsense mutation	Flipping out
Somatic mutation	Skin cancer
Uracil DNA glycosylase	X-ray
lexA	Damage inducible genes

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

- Alberts B.**, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.
- Aravind**, L. Walker D. and Koonin E. 1999. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems *Nucleic Acids Res.* 27: 1223-1242.
- Belk C.** and Borden V. Biology Science for life. Printed in USA, 2007.
- Berk A.**, Zipursky S., Baltimor D., Darnell J., and Lodish H. Molecular Biology. Fourth edition. Paul Matuataira, USA, 1998.
- Berneburg M.** and Lehmann A. 2001. Xeroderma pigmentosum and related disorders: Defects in DNA repair and transcription *Adv. Genet.* 43: 71-102.
- Cann A.** Principles of Molecular Virology. Fourth edition, Elsevier Academic Press, 2005.
- Cooper J.** and Hausman R. The cell, A Molecular Approach. Fourth edition, Sinauer Associates, 2007.
- Dale J.**, Park S. Molecular Genetics of Bacteria. Fourth edition, Wiley and Sons, 2004.
- Friedberg**, E. C., Walker, G. C., Siede, W., 1995. *DNA Repair and Mutagenesis*. American Society for Microbiology.
- Guttmann B.**, Griffiths A., Suzuki D., Cullis T. Genetics: a beginner guide. Oneworld Oxford, 2004.
- Hanson B.**, and Jorde L. Kaplan USML Step 1 lecture notes. Kaplan Incorporation, 2001.
- Kresina T.** An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. Wiley-Liss, 2001.
- Lewin B.** Genes. VII, Oxford University Press, 2000.
- Michelson R.** and Weinert. T. 2000. Closing the gaps among a web of DNA repair disorders *Bioessays* 22: 966-969.
- Mol C.** Parikh S. Putnam C. Lo T. and Tainer J. 1999. DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28: 101-128.
- Murray R.**, Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell V., Weil P. Harper's Illustrated Biochemistry. 28th edition, McGrawHill Medical, 2009.
- Paolella P.** Introduction to molecular biology. First edition, WCB/McGrawHill, 1998.
- Parikh S.** Mol C. and Tainer J. 1997. Base excision repair enzyme family portrait: Integrating the structure and chemistry of an entire DNA repair pathway *Structure* 5: 1543-1550.
- Turner P.**, McLennan A., Bates A., White M. Instant notes in molecular biology. Third edition, Taylor & Francis Group/UK. 2005.
- Verma P.**, and Agarwal V. molecular biology. First Edition Schand group, India 2004.

8

الفصل الثامن إعادة ارتباط الـ DNA والقفز



لب الذرة المبقعة بسبب الجينات القفازة. (Pierce, 2002)

مقدمة

في البدء، لا يمكن أن نعتبر جزيئات الـ DNA كجزيئات ستاتيكية، أي جزيئات ساكنة بدون حركة، بل على العكس من ذلك، حيث تمتلك تلك الجزيئات فعالية ديناميكية

ملموسة (أنظر الفصل الثاني). يتغير الـ DNA بشكل مستمر، واحدى الآليات التي تضطلع بذلك هي آلية عادة الارتباط (recombination). وإعادة الارتباط هي عملية إعادة ترتيب لتسلسلات الـ DNA بين جزيئتي DNA تحتويان على تسلسلات متماثلة (homologous sequences). توفر عملية إعادة الارتباط الوسائل التي يمكن من خلالها إعادة صياغة المعلومات الوراثية. وهذا بالطبع يمنح فائدة تطويرية في التخلص من الطفرات الغير مرغوبة، ولكي يحافظ على انتشار الطفرات المرغوبة. كما أن له الدور الكبير في منح كل شخص مجموعة متفردة من المعلومات الوراثية. لابد لإعادة الارتباط من أن يحدث بين تسلسلات متطابقة بدقة لكي يضمن عدم فقدان أو اضافة أي زوج قاعدي. هذا ويجب أن تستبقي امتدادات الـ DNA التي أعيد ارتباطها للتو تركيبها الاصلي كي تعمل بشكل صحيح. وهناك نوعين من إعادة الارتباط. النوع الأول هو إعادة الارتباط المتماثل homologous recombination (والذي يدعى أيضاً بإعادة الارتباط العام general recombination) والذي يتضمن حصول تبادلات وراثية genetic exchanges بين جزيئتي DNA مختلفين عادة، والتي تتشارك بمناطق واسعة ذات تسلسلات متماثلة. أما النوع الثاني فيسمى بإعادة الارتباط ذو الموقع المتخصص site specific recombination، وهنا يحدث التبادل فقط عند مناطق ذات تسلسلات DNA متماثلة قصيرة جداً. أما عملية قفز الدنا DNA transposition فتشترك مع الصنفين الأولين في حدوث عملية إعادة الارتباط بين موقعين من الـ DNA، حيث تنتقل قطعة صغيرة من الـ DNA من موقع إلى موقع آخر لنفس الكروموسوم أو لكروموسوم آخر، ولكنها تختلف عن إعادة الارتباط في عدم ضرورة وجود مناطق ذات تسلسلات متماثلة بين قطعتي الـ DNA المراد إعادة ارتباطهما معاً (أنظر أدناه). وهكذا، فإن الخاصية المهمة للـ DNA في الخلايا هي قابليته على القيام بعملية إعادة الترتيب rearrangement والتي يمكن أن تتغير حسب المجاميع الجينية الموجودة في جينوم أي كائن. وبهذه الطريقة، تتسبب عمليات إعادة الترتيب البالغة الأهمية في حياة الكائنات الحية من قبل عملية إعادة الارتباط الوراثية.

إعادة الارتباط المتماثل Homologous Recombination



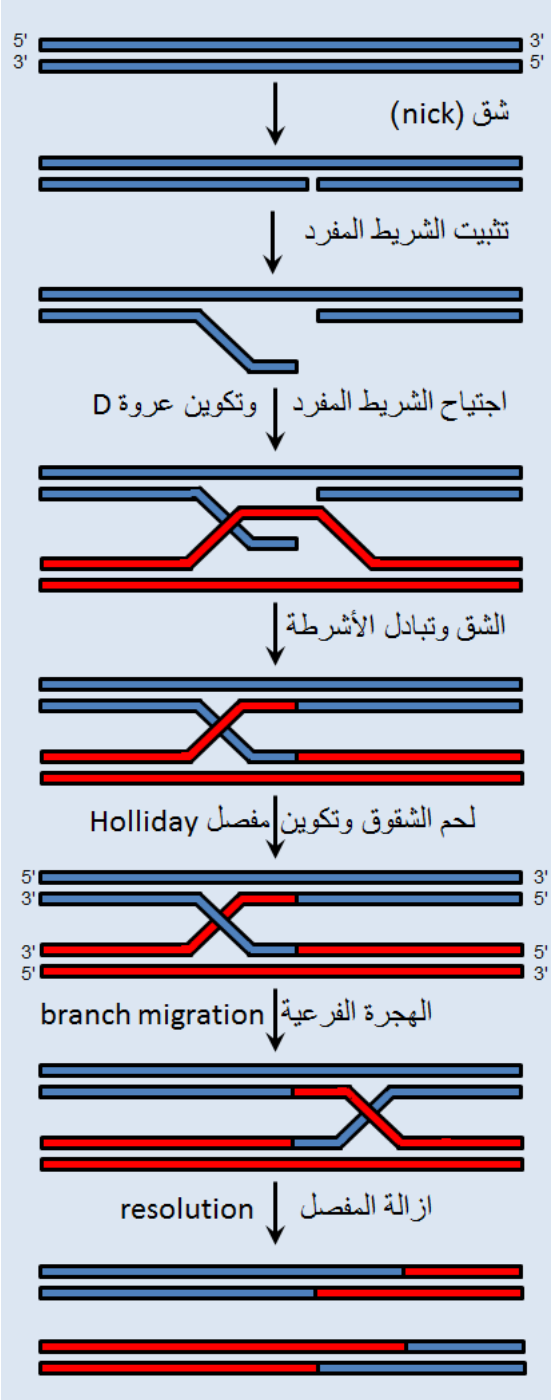
Robin Holliday

قام العالم Holliday عام 1964 بشرح الآلية الجزيئية لعملية إعادة الارتباط المتماثل. تبدأ عملية إعادة الارتباط المتماثل بحدوث شق nick في آصرة الـ phosphodiester بنفس الموقع في جزيئتي الـ DNA المتماثلتين (الـ DNA الواهب والمستلم على التوالي). ثم تحصل عملية التبادل بعد ذلك، والتي تلحق بلحم الشقوق باستخدام إنزيم DNA ligase. إن تبادل أشرطة الـ DNA الواهبة والمستلمة يؤدي إلى تكوين مفصل هوليداي Holliday junction - وهو التركيب التي تربط فيه أشرطة الـ DNA المتعابرة جزيئات الـ DNA الواهبة والمستلمة. ثم يعاني

مفصل هوليدي ما يعرف بالهجرة الفرعية branch migration ، مؤدياً إلى حدوث إعادة ارتباط إضافي بين أشرطة جزيئات الـ DNA المختلفة. وفي النهاية، زوال هذا المفصل يعطي جزيئات DNA معاد ارتباطها. ومن ثم تم تطوير هذا الموديل من قبل علماء آخرين ليعطي الشكل المبسط المبين في الشكل (1.8) أدناه. وفيه يحدث تكوين مفصل هوليدي وزوالها. أما بروتينات بكتريا القولون المعروفة التي تدخل في العملية فيمكن توضيحها بالآتي:

- تولد الشق بواسطة معقد RecBCD ، والذي يقوم بشق أشرطة الـ DNA عند تسلسلات تدعى مواقع كاي chi (χ) sites وهي ذات التسلسل (-GCTGGTGG- 5' 3')
- يتحفز اجتياح الشريط strand invasion من قبل بروتين RecA ، إضافة إلى بروتينات SSBs ، والتي تثبت من شريط الـ DNA المفرد الحر.
- تنقطع عروة دي "D loop" المتكونة بعد اجتياح الشريط من جديد بواسطة معقد RecBCD.
- تحدث عملية تبادل الأشرطة وتلحم النهايات باستخدام إنزيم DNA ligase. هذا يكون مفصل هوليدي.
- يتبع تكوين مفصل هوليدي بالهجرة الفرعية، والمحفزة من قبل البروتينين RuvA و RuvB.
- يحتاج زوال مفصل هوليدي إلى بروتين RuvC ، والذي يشق شريطين من الـ DNA. ثم يقوم إنزيم DNA ligase بلحم الأشرطة بعد قطعها.

وبعد نهاية تلك العمليات، سوف تمتلك الخلية جزيئين بـ DNA بتسلسل متبادل. إن نفس العملية الموضحة أعلاه تحدث في الكائنات حقيقية النواة، باستعمال أنواع مماثلة من الفعالية الإنزيمية. ومن الجدير بالذكر أن عمليات القطع والربط الحادثة هنا تكون دقيقة جداً بحيث لا يتم الحصول على أو فقدان ولو نيوكليوتيدة واحدة. ولكن، وعلى الرغم من هذه الدقة، تقوم عملية إعادة الارتباط المتماثل بخلق جزيئات DNA بتسلسلات جديدة.



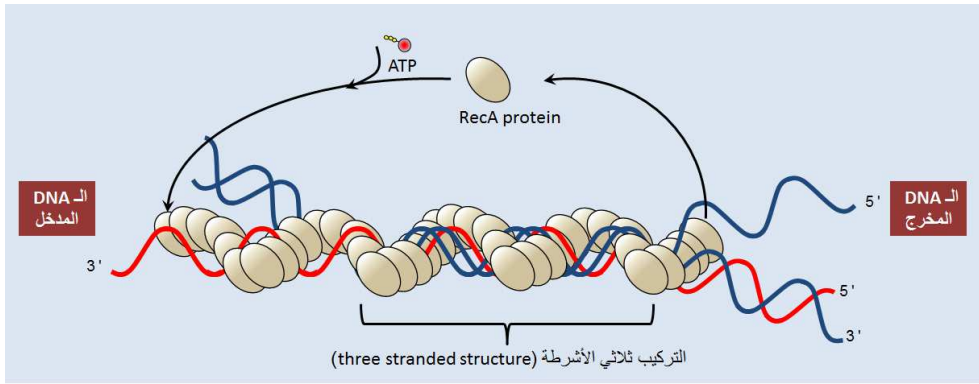
شكل (1.8): موديل مبسط لعملية إعادة الارتباط المتماثلة homologous recombination (تصميم المؤلف)

دور بروتين Rec A في عملية إعادة الارتباط العام

تحتاج عملية إعادة الارتباط إلى أنواع متعددة من بروتينات متخصصة. وبالأخص، بروتين Rec A في بكتريا القولون (أو بروتيناته المشابهة له في الخمائر والفئران والبشر) والذي له دور رئيسي في إعادة الارتباط بين الكروموسومات (شكل 2.8). وكما هو الحال مع بروتينات SSBs (أنظر الفصل الرابع)، يرتبط بروتين Rec A بشدة وبشكل تعاوني بالـ DNA المفرد الشريط ليكون خيط بروتيني نووي nucleoprotein filament. وبما أن كل جزيئة مفردة من هذا البروتين (Rec A monomere) تملك أكثر من موقع واحد للارتباط بالـ DNA، لذا يمكن لخيط Rec A من حمل الشريط المفرد والحلزون المزدوج معاً. إن هذا يسمح للـ RecA بأن يحفز تفاعل DNA multistep إيثاقي متعدد الخطوات بين DNA synapsis reaction حلزون الـ DNA المزدوج والمنطقة المماثلة لشريط الـ DNA المفرد.

ويتم تمييز منطقة التماثل قبل أن يفتح حلزون الـ DNA المزدوج الهدف، من خلال مركب وسطي ثلاثي الأشرطة three-stranded intermediate والذي فيه يقوم الـ DNA المفرد الشريط بتكوين أزواج قاعدية مؤقتة مع قواعد خارجة flip out من الحلزون المزدوج وذلك بالأخدود الرئيسي لجزيئة الـ DNA ذات الحلزون المزدوج (شكل 2.8). يبدأ هذا التفاعل بالازدواج المبين مسبقاً في الشكل 2.8، وبهذه الطريقة يبدأ تبادل الأشرطة بين حلزوني الـ DNA المزدوجين الجاري بينهما عملية إعادة ارتباط. حالما يحدث الإيثاق في الـ DNA، تبدأ منطقة حلزون الـ DNA المزدوج المتغيرة بالتوسع من خلال عملية تدعى الهجرة الفرعية branch migration.

فبالإضافة إلى احتواء بروتين RecA على موقعين للارتباط بالـ DNA، يمتلك فعالية تحليل ATP معتمدة على الـ DNA والتي تعرف بـ DNA-dependent ATPase، مع موقع إضافي للارتباط مع مركب ATP وتحليله مائياً. يرتبط البروتين بقوة أكبر بالـ DNA وذلك عند امتلاكه مركب ATP متحد معه مقارنة بالقوة التي يكون مرتبطاً بها عندما يكون متحداً مع مركب ADP. إن خيوط RecA والتي تكونت من الأكتين أو التيوبولين tubulin يمكن لها أن تقود تفاعل الهجرة الفرعية والحادثة عادة أثناء عملية إعادة الارتباط.



شكل (2.8): إيثاق الـ DNA المحفز من قبل بروتين RecA. بينت التجارب بوجود عدة أنواع من المعقدات المتكونة بين شريط الـ DNA المفرد المغطى ببروتين RecA وحلزون الـ DNA المزدوج (الأزرق اللون فقط على يسار الشكل). يتكون أولاً معقد غير مزدوج قاعدياً والذي يتحول مؤقتاً إلى تركيب ذو ثلاث أشرطة حالما تتكون المنطقة ذات التسلسل المتماثل. هذا المعقد غير ثابت لأنه يتكون من شكل غير اعتيادي من الـ DNA إضافة إلى شريط مفرد مزاح من الحلزون المزدوج الأصلي. إن هذا التركيب المبين في هذا المخطط يهاجر إلى اليسار. إن محصلة هذه الهجرة هي تبادل أشرطة الـ DNA (تصميم المؤلف).

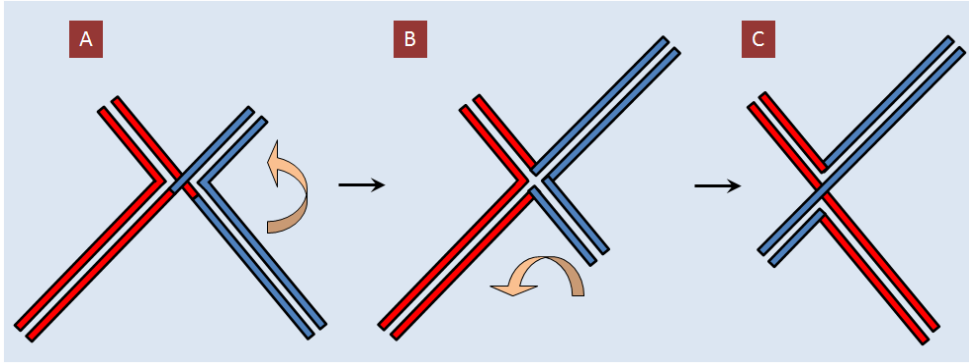
مفصل هوليدي Holliday junction

ان الخطوة الصعبة والبطيئة حقاً في عملية إعادة الارتباط المتماثل هي خطوة تكوين مفصل هوليدي. وبعد تلك الخطوة، تمتد منطقة الازدواج ويكون هنالك تبادل أكبر في الأشرطة بين حلزوني الـ DNA المزدوجين. وحل تكونه يتقدم مفصل هوليدي بسرعة. وفي معظم الحالات، يتكون مفصل هوليدي والذي يعد هو الوسيط والمفتاح في عملية إعادة الارتباط (والذي يدعى أيضاً بتبادل الأشرطة التعابري cross-strand exchange).

وفي مفصل هوليدي، يحمل حلزوني الـ DNA المتماثلين المزدوجين بواسطة عملية تبادل عكسي reciprocal exchange لشريطين من أربع أشرطة موجودة، واحد ناشيء من كل حلزون مزدوج. كما مبين في الشكل 3.8 A، يمكن أن يحتوي مفصل هوليدي على زوجين من الأشرطة: زوج من الأشرطة العابرة crossing strands وزوج من الأشرطة الغير عابرة non-crossing strands. يمكن لها التركيب من أن يتناظر isomerizes، وعلى أية حال، وذلك بواسطة سلسلة من الحركات الدورانية rotational movements، والمحفزة من قبل بروتينات متخصصة، ليكون تركيب مفتوح أكثر والذي فيه يحتل كلا زوجي الشريطين مواقع متكافئة (شكل 3.8). يمكن لهذا التركيب بدوره أن يتناظر isomerize لهيئة تشبه بشكل كبير المفصل الأصلي، ماعدا بأن الأشرطة العابرة تتحول إلى أشرطة غير عابرة، والعكس بالعكس (شكل C3.8).

حالما يكون مفصل هوليدي تركيب مفتوح، يمكن لمجموعة خاصة للبروتينات من أن تدخل في المفصل: واحد من تلك البروتينات يستخدم طاقة تحلل الـ ATP ليحرك نقطة التعابر (النقطة التي عندها يرتبط عندها حلزوني الـ DNA المزدوجين) بسرعة على طول الحلزونين، عاملاً على امتداد منطقة حلزون الـ DNA المزدوج المتغاير heteroduplex DNA (شكل 3.8).

لكي يتولد حلزوني DNA منفصلين، لتنتهي عملية التبادل، يجب أن تقطع الأشرطة التي تربط الحلزونين المزدوجين في مفصل هوليدي، في عملية تعرف بالانحلال resolution. ان هنالك طريقتين يتم فيها انحلال مفصل هوليدي. في أحدهما، يقطع الزوج الأصلي للأشرطة المتعابرة (الشريط المهاجم invading strand أو الداخلي المبين في الشكل 3.8A). وفي هذه الحالة، ينفصل حلزوني الـ DNA الأصليين عن بعضهما البعض، مبادلين شريط DNA مفرد والذي كون الحلزون المزدوج المتغاير. وبطريقة أخرى، يقطع الزوج الأصلي من الأشرطة الغير متعابرة noncrossing strands (الشريط الداخلي في الشكل C3.8). الآن النتيجة هي أكثر تعقيداً: يتكون اثنان من الكروموسومات الهجينة، يمتلكان قطع أساسية متبادلة مع بعضها البعض من حلزون الـ DNA المزدوج من خلال عملية التعابر (شكل 3.8).



شكل (3.8): مفصل هوليدي وعملية الـ isomerization الحاصلة فيه (تصميم المؤلف).

توصلت التحليلات الوراثية إلى أن مناطق حلزون الـ DNA المزدوج ذات الآلاف من الأزواج القاعدية قد تكونت بسهولة خلال عملية إعادة الارتباط. وكما سيناقش في الآتي، فإن معالجة هذه الحلزونات المزدوجة المتغايرة – والتي تتألف من أشرطة مزدوجة مكملية لبعضها البعض – يمكن أن تغير المعلومات في كل حلزون DNA ناتج.

وظائف إعادة الارتباط المتماثل

في البكتيريا تعتبر إعادة الارتباط المتماثل مبدئياً كعملية إصلاح للـ DNA وفي هذا السياق يشار إلى هذه العملية بإصلاح الدنا لإعادة ارتباطية recombinational DNA repair. يقوم هذا النوع من إعادة الارتباط بتشديد شوكلات التضاعف المعاقة stalled replication forks عند موقع تضاعف الـ DNA (أنظر الفصل السابع). يمكن أن يحدث هذا النوع من إعادة الارتباط خلال الاقتران conjugation أو الجماع mating، وذلك عندما ينقل DNA كروموسومي من الخلية البكتيرية الواهبة إلى الخلية البكتيرية المستلمة (أنظر الفصل التاسع). ولو أن إعادة الارتباط خلال الاقتران هي عملية نادرة الحدوث، إلا أنها تساهم بالتنوع الوراثي genetic diversity في الخلايا البكتيرية ذات النوع البري wild type.

وفي حقيقية النواة، يبدو أن إعادة الارتباط المتماثل له عدة أدوار في التضاعف وانقسام الخلية، وإصلاح شوكلات التضاعف المعاقة عند موقع الخل في الـ DNA. تحدث عملية إعادة الارتباط بأعلى تردد لها خلال الانقسام الاختزالي، العملية التي بواسطتها تنقسم خلايا الخط الجرثومي الثنائية المجموعة الكروموسومية diploid germ-line cells لتعطي كميات أحادية المجموعة الكروموسومية haploid gametes – خلايا نطفية أو

بيوض في الكائنات حقيقية النواة الراقية – كل كميته يحتوي على عضو واحد فقط لكل زوج كروموسومي. يبدأ الانقسام الاختزالي بتضاعف الـ DNA في خلية الخط الجرثومي وبالتالي توجد كل جزيئة DNA بأربع نسخ. ثم تذهب الخلية بجولتين من انقسام الخلية بدون جولة بينية من تضاعف الـ DNA. إن هذا يختزل محتوى الـ DNA إلى المستوى الأحادي haploid level في كل كميته.

بعد تضاعف الـ DNA خلال الطور التمهيدي للانقسام الاختزالي الأول، تبقى الكروماتيدات الشقيقة الناتجة مرتبطة بالمناطق المركزية centromeres العائدة لها. وفي تلك المرحلة، يوجد كل صنف من الكروموسومات المتماثلة كزوجين من الكروماتيدات. المعلومات الوراثية الآن قد تم تبادلها بين الكروماتيدات المتماثلة المرتبطة بصورة كبيرة مع بعضها البعض بواسطة إعادة ارتباط متماثل، في عملية تتضمن كسر وإعادة ربط الـ DNA. هذا التبادل، يشار إليه كذلك بإعادة التعابر crossing over، والذي يمكن أن يلاحظ تحت المجهر الضوئي. يربط التعابر الوراثي زوجي الكروماتيدات الشقيقة مع بعضها البعض في مناطق تدعى بالـ chiasmata (مفردتها chiasma).

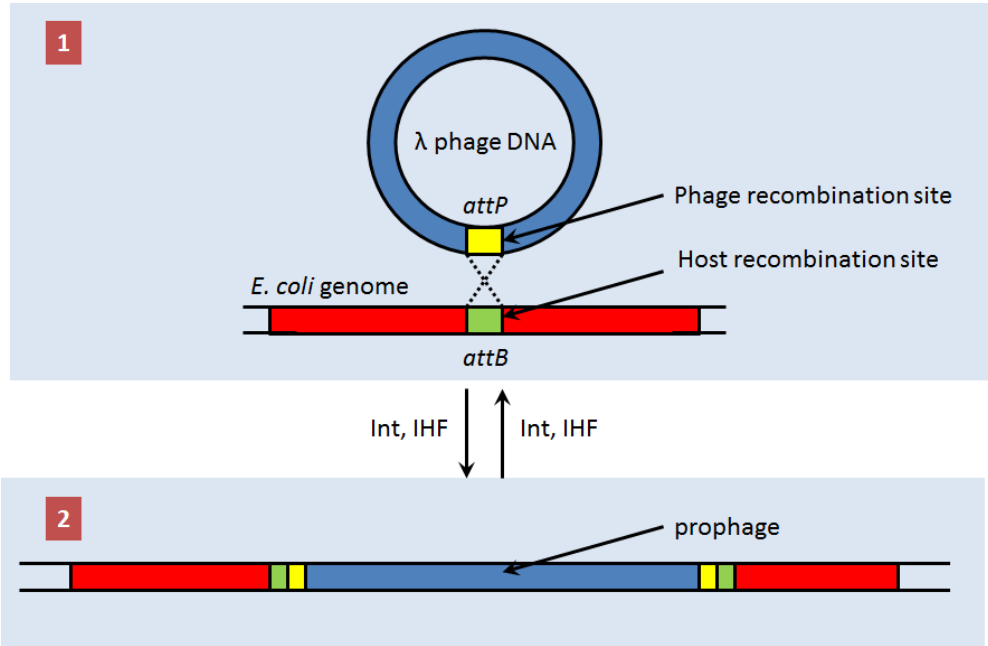
اذن، يقوم إعادة الارتباط المتماثل على الأقل بثلاث وظائف جديدة بالاهتمام: (1) المساهمة في الإصلاح في العديد من أنواع ضرر الـ DNA ، و (2) توفير، في الخلايا حقيقية النواة، ربط فيزيائي مؤقت بين الكروماتيدات والذي يسرع من الانفصال المنتظم للكروموسومات في الانقسام الاختزالي الأول، و (3) تسريع التنوع الوراثي genetic diversity في الكائنات الحية.

إعادة الارتباط ذو الموقع المتخصص site-specific recombination

بالتناقض مع عملية إعادة الارتباط المتماثل، تحدث عملية إعادة الارتباط ذات الموقع المتخصص site-specific recombination عندما تمتلك جزيئة DNA محددة ، والتي هي ليست مماثلة البنية لجزيئة الـ DNA الأخرى، تسلسلاً والذي يعمل كهدف لإعادة الارتباط بجزيئة الـ DNA الأخرى. وفي الكائنات بدائية النواة، تحدث الحالة نفسها عندما يحشر العاثي البكتيري λ الـ DNA التابع له في كروموسوم بكتريا القولون، والذي يبقى في الحالة التحليلية lysogenic state. تحدث عملية إعادة الارتباط هذه بين مواقع الـ DNA العاثي (attP) والتي تمتلك تسلسلاً مماثلاً بمواقع في الـ DNA البكتيري (attB)، حتى ولو أن جزيئتي الـ DNA تكون مختلفة تماماً في كل التسلسلات الأخرى (شكل 4.8).

يدعى الإنزيم الذي يحفز هذا التفاعل بالـ integrase ويدعى اختصاراً بـ (Int)، وهو نوع متخصص من انزيمات topoisomerase type I وهو يعمل مع بروتين العائل

الإنحشاري الذي يدعى integration host factor والذي يدعى اختصاراً (IHF). ولكن ما تزال عملية إعادة الارتباط ذات الموقع المتخصص بحاجة إلى الأزواج القاعدي لمنطقة متماثلة قصيرة (مواقع attP مع مواقع attB)، ولكنها لا تتضمن أيّاً من البروتينات المشتركة في عملية إعادة الارتباط المتماثل.



شكل (4.8): إعادة الارتباط ذو الموقع المتخصص (site specific recombination) للعائلي لاما في جينوم بكتريا القولون. في الخطوة رقم (1) تتقابل التسلسلات المتخصصة لموقع إعادة الارتباط التابع للعائلي لتسلسلاتها المكملة لإعادة الارتباط التابعة للعائل. وفي الخطوة رقم (2) ينحشر جينوم العائلي في جينوم العائل. يقوم عامل الاندماج بالعائل (host integration factor) أو HIF وعامل الانحشار (integrase) أو Int بتسهيل خطوة انحشار العائلي أو تحرره من جينوم العائل (تصميم المؤلف).

القفازات transposones

القفازات transposons، أو ما يعرف بالعناصر النقلة transposable elements، هي عناصر وراثية متنقلة والتي تميز عموماً وبشكل انتقائي موقع هدف "متواضعة"، بحيث يمكن لها أن تحشر نفسها بالعديد من مواقع الـ DNA المختلفة. وفي عملية القفز، يعمل إنزيم متخصص، والذي عادة ما يشفر من قبل القفاز ويدعى بإنزيم الـ trasposase على تسلسل DNA متخصص على كلا نهايتي القفاز – والذي يقوم بالبداية

بفصل ارتباطه عن الـ DNA المتاخم flanking DNA ومن ثم يحشره بموقع هدف جديد. وليس هنالك ضرورة لوجود تماثل بين نهايات العنصر النقال وموقع الغرس insertion site. وتتحرك معظم القفزات بشكل نادر جداً فقط، ولهذا السبب غالباً ما يكون من الصعب من أن نميزها من الأجزاء الغير متحركة في الكروموسوم. وفي معظم الحالات، فمن غير المعروف ما هو العامل الذي يحفز حركتها. دعنا هنا نميط اللثام عن تلك الوحدات الوراثة المثيرة.



Barbara McClintock

استخدم مصطلح "قفاز" أو "transposon" لأول مرة في عام 1974 من قبل R. W. Hedge و A. E. Jacob لوصف العناصر الوراثة والتي يمكن لها أن تتحرك من جزيئة الى أخرى والتي تحمل المقاومة للمضاد الحيوي الأمبسلين في الخلايا البكتيرية. ولكن هذا لا يعني اطلاقاً بأن تلك القفزات قد تم اكتشافها لأول مرة في السبعينات، حيث اكتشفت Barbara McClintock عام 1951 العناصر النقالة، والتي أسمتها حينها بعناصر السيطرة (controlling elements)، وتم ذلك في الذرة. وعلى الرغم من ان McClintock لم تكن تعرف حينها التركيب الدقيق للمادة الوراثة، لكنها كانت قادرة على توثيق من خلال ملاحظات دقيقة حركة القفزات في جينوم الذرة، وذلك استنادا الى طريقة تصبغ بذور الذرة. وعلى الرغم من نشرها بحثاً يتحدث عن هذه القفزات في عام 1948، الا أن عملها لم يسلط عليه الضوء لحين حلول الحقبة الذهبية للوراثة الجزيئية وذلك في السبعينات من القرن المنصرم. ونتيجة لهذا العمل، استحققت McClintock جائزة نوبل في عام 1983. أما الآن، فقد ازداد الاهتمام بالقفزات، ويبرز هذا الاهتمام من خلال تسمية القفزات بعدة مصطلحات مختلفة كالجينات القفازة (jumping genes)، والعناصر المتنقلة (mobile elements)، والعناصر القفازة (transposable elements) والتسلسلات الانغراسية (insertion sequences). تدعى القفزات أيضاً بالدنا الخردة junk DNA ، لأنه ليس لها وظيفة مفيدة معروفة، وبالدنا الأناني selfish DNA وذلك لأنها تستثمر الآليات الوراثة للخلية، حيث تنتشر ضمن الجينوم بدون أن تساهم في تطور الكائن الحي.

لابد من أن نعرف بأنه ليس كل DNA له القابلية على القيام بعملية القفز، فقط القفزات transposons وهي قادرة على دمج أنفسها في مواقع جديدة من دون مساعدة الإنزيمات أو النواتج الجينية لعملية إعادة الارتباط المتماثل homologous recombination (كما في النواتج الجينية *recA* و *recBC*). إن موقع الهدف للقفاز، والذي هو التسلسل الذي يدمج القفاز نفسه به، لا يحتاج أن يمتلك أية تماثل مع القفاز. ومن ناحية تركيبية، تعتبر القفزات عبارة عن تسلسلات نيوكليوتيدية محاطة من كلا الجانبين

بتسلسلات متكررة معكوسة inverted repeat sequences والتي تكون محاطة بدورها بتسلسلات متكررة مباشرة direct inverted repeats ، وعلى سبيل المثال التسلسل الآتي:

```
5' ATGCA/CCGTAA[GGTTCCATTT]AATGCC/ATGCA 3'
3' TACGT/GGCATT[CCAAGGTAAA]TTACGG/TACGT 5'
```

نحن عندنا الآن قفاز باتجاه قراءة من 5' إلى 3' بين هلالين [GGTTCCATTT] والذي يكون محاطاً بتسلسل متكرر معكوس من CCGTAA والمعكوس إلى AATGCC ، والذي يحاط بعد ذلك بتسلسل تكراري مباشر من ATGCA.

إن القفازات لا تحتوي عادة على الجينات التي تشفر إلى التضاعف الذاتي المستقل. إنها ممكن أن تعتبر كعناصر DNA "طفيلية" لأنها تعتمد وبشكل محدد على تضاعف المضيف في تضاعفها. وهي ليست كالمضاعفات البكتيرية bacterial replicons التي تحتوي على الجينات المشفرة لوظائف مضاعفة الـ DNA وكذلك الحال بالنسبة لمضاعفات الكروموسومات والبلازميدات والعائيات.

عندما ينحشر القفاز في موقع هدف جديد، فإنه يتحرك كقطعة منفصلة من الـ DNA . إن القفاز لا يتغير في الحجم. وغالباً ما يقال بأن القفازات "تقفز" من مكان إلى آخر، وفي بعض الحالات يكون هذا التعبير صحيحاً.

صفات القفازات العامة

عموماً، تمتلك معظم القفازات الصفات العامة الآتية:

1. وجد بأنها تسلسلات DNA تشفر لانزيمات تقوم بحشر نسخة مماثلة لنفسها في موقع DNA جديد.
2. تتضمن عملية القفز عمليتين اثنتين: وهما إعادة الارتباط والتضاعف، وهذا يولد نسختين بنويتين للعناصر القفازة الأصلية. وتبقى نسخة واحدة بالموقع القديم والذي يعرف بالموقع الأب (parent site)، بينما يظهر الآخر بالموقع الجديد والذي يعرف بالموقع الهدف (target site).
3. يعد انحشار العناصر القفازة معيقاً لاستمرارية الجينات الموجودة في الموقع الهدف عادة. وعلى سبيل المثال، إذا انحشر قفاز معين في أوبرون ما، فإنه يعيق التسلسل المشفر ويحبط تعبير الجين الهدف المنحشر فيه فضلاً عن أي جين بعد (downstream) ذلك الأوبرون. يحدث هذا لأن القفاز قد يحتوي على اشارات إيقاف

- الاستنساخ أو الترجمة والتي يكبح تعبير الجينات الأخرى بعد ذلك الأوبرون. يعرف هذا التأثير التطفيري "ذو الاتجاه الواحد" بالطفرة القطبية (polar mutation).
4. لا يشترط أن يكون تأثير القفزات سلبياً على تعبير الموقع الهدف، وإنما قد تؤدي إلى تنشيط الجينات الموجودة في موقع الهدف، ويعزى السبب في ذلك إلى احتواء القفزات على الاشارات الضرورية لبدء عملية تخليق الـ RNA.
5. لا يمكن اعتبار القفزات كيان تضاعفي أو replicon، وذلك لعد احتواء تسلسلاته على أصل التضاعف (OriC)، أي المنطقة التي يبدأ عندها التضاعف (أنظر الفصل الرابع)، وبهذه الطريقة، لا يمكن للقفزات أن تتضاعف بعيداً عن كروموسوم العائل كما تفعل البلازميدات والعاثيات (أنظر الفصل التاسع).
6. لا يوجد هناك أي تماثل بين القفزات والموقع الهدف المراد انحسار القفز فيه. يمكن للعديد من القفزات أن تحشر نفسها افتراضياً عند أي موقع في كروموسوم العائل أو في البلازميد. يبدو أن بعض القفزات تحشر نفسها في مواقع معينة، ولكنها نادراً ما تحشر نفسها في المواقع الهدف بنمط ذو تسلسل متخصص.
7. إن تسلسلات الـ DNA في كلا نهايتي القفز تكون متماثلة أو تقريباً متماثلة (كما مبين في أعلاه)، وتكون مقلوبة inverted. هذه التسلسلات الطرفية تدعى بالتسلسلات المقلوبة (المعكوسة) أو IR. (والشاذ الوحيد لهذه الصفة العامة هو العاثي القفز ميو Mu). إن IR تنتوع في الحجم من 9 إلى 40 زوج قاعدي.

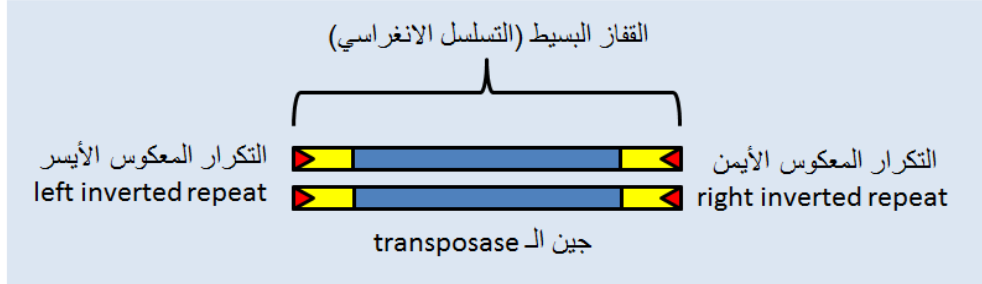
تصنيف القفزات في بدائية النواة

تصنف القفزات على أساس تعقيدها في بدائية النواة إلى قفزات بسيطة (simple transposons) أو ما يعرف بالتسلسلات الانغراسية (insertion sequences: IS) وقفزات مركبة (composite transposons).

التسلسلات الانغراسية insertion sequences

تدعى أبسط القفزات بالتسلسلات الانغراسية insertion sequences، وهي عبارة عن قطع صغيرة من الـ DNA، عادة بطول 1 كيلو زوج قاعدي في الحجم، تشفر كل منها فقط للبروتينات المطلوبة لكي يضمن قفزها ولا تشفر إلى وظائف إضافية لعملية القفز (شكل 5.8).

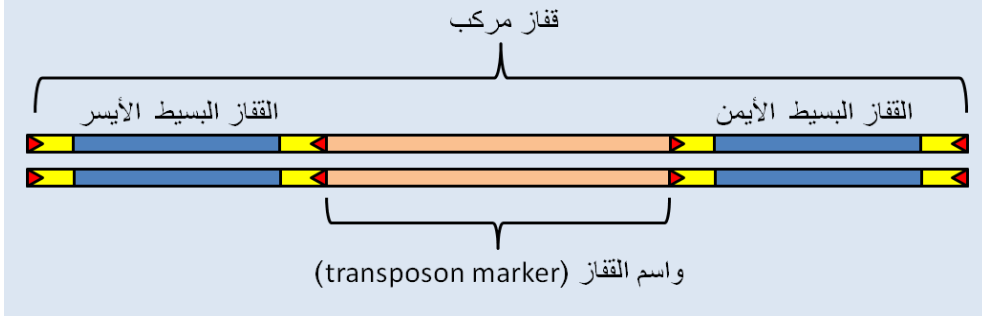
كل عنصر IS هو مختلف في التسلسل، ولكن هنالك بعض العناصر العامة في التنظيم. عناصر IS تنتهي بتكرارات طرفية معكوسة terminal inverted repeats؛ والتي عادة ما تكون نسختين للتكرار وهي- من حيث التسلسل - قريبة لبعضها جداً وليست متماثلة.



شكل (5.8): تركيب القفاز البسيط: يتألف القفاز البسيط من جين الـ transposase المحاط من كلا الجانبين بتكرارات معكوسة (inverted repeats) (تصميم المؤلف).

يبدو أن معظم عناصر IS تقفز عبر طريقة محافظة. تشفر عناصر IS لوظائف إنزيم الـ transposase والتي تكون مسؤولة عن ازدواج الموقع الهدف وعن تمييز نهايات القفاز. وعندما تقفز عناصر IS، يزدوج تسلسل الـ DNA العائل في موقع الغرس. تم التوصل إلى طبيعة الازدواج وذلك من خلال مقارنة تسلسل الموقع الهدف قبل وبعد حدوث الانغراس. يبين شكل 6.8 بأنه عند موقع الانغراس، عادة ما يحاط الـ IS DNA عادة بتسلسلات مباشرة قصيرة جداً. (وفي هذا السياق، "مباشرة" تشير إلى أن نسختي التسلسل تتكرر بنفس الاتجاه) ولكن الموقع الهدف في الجين المستقبل recipient gene (الذي يسبق الانغراس)، يمتلك تسلسل واحد فقط من تلك التكرارات. وفي الشكل، يتألف الموقع الهدف من التسلسل. وبعد القفز، فإن نسخة من هذا التسلسل موجودة في كلا جانبي القفاز (شكل 5.8).

وكما ذكر في أعلاه؛ تبدي عناصر IS تركيب متميز والذي تكون نهاياته متماثلة بواسطة التكرارات الطرفية المعكوسة، بينما النهايات المجاورة للـ DNA العائل المحيط من الجانبين تكون متماثلة بواسطة التكرارات القصيرة المباشرة.

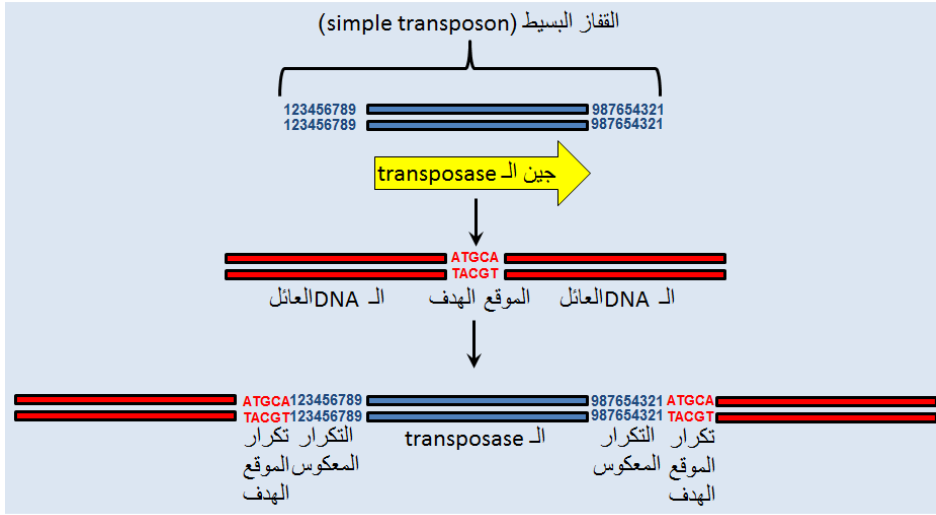


شكل (6.8): تداخل تسلسلات القفازمع الموقع الهدف في تسلسلات العائل: تمتلك القفازات تكرارات طرفية معكوسة وتولد تكرارات مباشرة من الـ DNA المحيط في الموقع الهدف. في هذا المثال، الهدف هو تسلسل من 5 أزواج قاعدية. تتألف نهايات القفاز من تكرارات معكوسة من 9 أزواج قاعدية، حيث أن الرقم من 1 إلى 9 يشير إلى تسلسل الأزواج القاعدية (تصميم المؤلف).

القفازات المركبة composite transposons

تحتوي القفازات المركبة على نسختين من عناصر IS والتي تحد قطعة DNA ليست ذات علاقة. وقد تكون هذه القطعة الغريبة مقاومة للعقاقير أو قد تكون واسم آخر تحمل في المنطقة المركزية لهذه القفازات بالإضافة إلى عناصر IS التي تشفر لوظائف القفز والتي تكون بمثابة "أذرع" تحيط بها من كلا الجانبين والتي قد تكون بنفس الاتجاه أو (الأكثر شيوعاً) باتجاهين متعاكسين. إن مثل هذه الترتيبات تقفز كوحدة واحدة، حيث يمكن لعنصري IS في الحقيقة أن تقفز أي تسلسل قابع بينهما، بالإضافة إليها. وتسمى هذه القفازات بالرمز Tn متبوعاً برقم (شكل 7.8).

على الرغم من أن القفازات المركبة تحتوي على نسختين من جين الـ transposase ، فإن نسخة واحد منها فقط تكون ضرورية لعملية القفز. وعلى سبيل المثال، في الـ Tn10 يكون فقط عناصر الـ IS في المنطقة اليمنى تحتوي على جين الـ transposase: أما إنزيم الـ trasposase المشفر من قبل عناصر الـ IS اليسرى فهو جين معاب (defective). ولأجل أن ينتقل القفاز المركب، فإن التسلسلات الـ IR الخارجية لكلا عنصري الـ IS تكون ضرورية لهذه العملية. وكما هو الحال بالنسبة لعناصر IS والتي قد اشتقت منها القفازات المركبة، فإن القفازات المركبة يبدو بأنها تقفز عبر آلية محافظة (غير تضاعفية).



(شكل 7.8): تركيب القفزات المركبة (composite transposons): يمتلك القفاز المركب منطقة وسطية تحمل الواسمات (كما في المقاومة للعقاقير) وتكون محاطة بالسلسلات الانغراسية (القفزات البسيطة) من كلا الجانبين (تصميم المؤلف).

تصنيف القفزات في حقيقية النواة

تصنف القفزات في الكائنات حقيقية النواة الى صنفين، وذلك على أساس الآلية التي من خلالها يعبر القفاز من الجزيئة الواهبة الى الجزيئة المستلمة. يقفز الصنف الأول من خلال نسخة من الـ RNA، بينما يقفز الصنف الثاني بشكل مباشر.

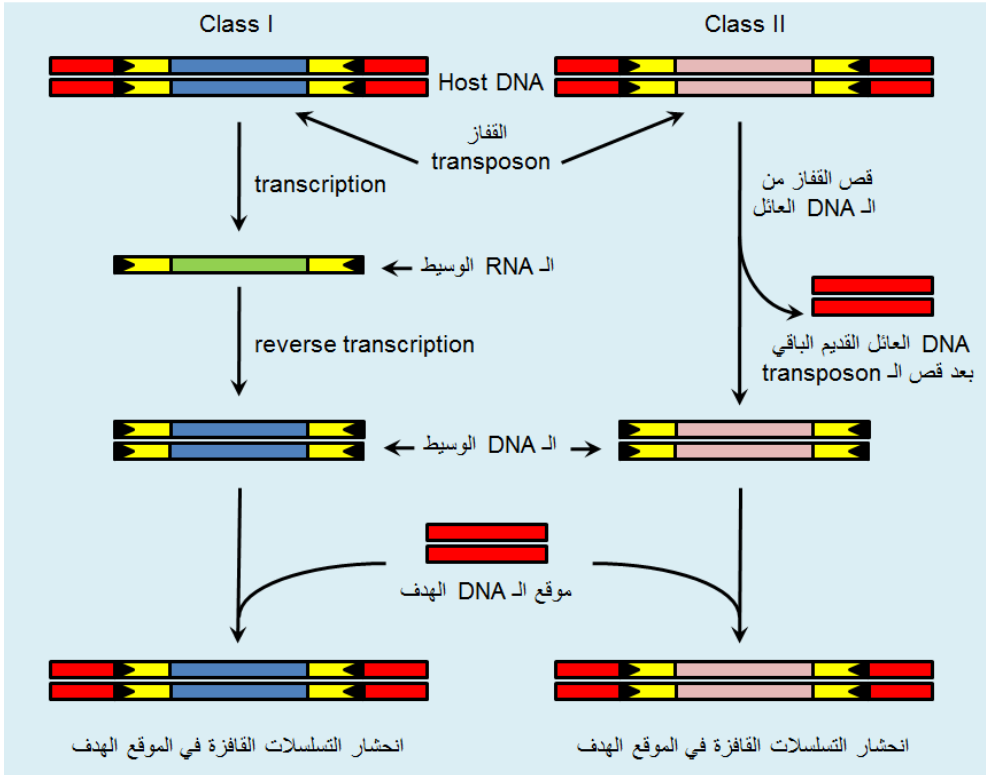
الصنف الأول Class I

يمكن تسمية الصنف الأول بعناصر الرنا (RNA elements) بسبب استنساخ الـ DNA الموجود في الموقع الواهب في الجينوم الى نسخة RNA. تتحول نسخة الـ RNA عكسياً الى نسخة DNA من جديد ولكن تلك النسخة تنحشر في موقع مستلم (موقع الهدف) (شكل 8.8). كما يمكن تسمية قفزات الصنف الأول بالعناصر الارتكاسية (-retro elements) وذلك بسبب تميز حركتها بالجريان العكسي للمعلومات الوراثية، من الـ RNA الى الـ DNA في عملية تدعى بالنقل الارتكاسي أو retrotransposition. ويوجد عدد مهول من نسخ الصنف الأول في جينوم العائل. وعلى سبيل المثال، هنالك ملايين النسخ من قفزات الصنف الأول التي تدعى بعائلة *Alu* في الجينوم البشري (أنظر الفصل الثاني). وبما أن قفزات الصنف الأول تستعين بنسخة من الـ mRNA كجزيئة وسيطة في عملية قفزها، بينما لا تقوم هي بعملية القفز بنفسها، لذا، يمكن ملاحظة ديمومة انحشار تلك القفزات

في الجينوم. وهذا يعني، بأنها لا يمكن أن يتم قصها من الموقع الواهب. مع ذلك، تعتبر هذه التسلسلات بالقفازة لقدرة نسخها على الانحشار في أماكن جديدة. كما تعد عناصر تاي (Ty elements) الموجودة في الخمائر مثالا نموذجياً أيضاً حول هذه الصنف من القفازات.

الصنف الثاني Class II

بالتناقض مع الصنف الأول، تسمى قفازات الصنف الثاني بعناصر الدنا (DNA elements) لأن تلك القفازات تتحرك بنفسها من موقع جينومي الى موقع جينومي آخر (شكل 8.8). وبالتناقض أيضاً مع قفازات الصنف الأول، يمكن لقفازات الصنف الثاني أن يتم قصها من الموقع الواهب. ومن الجدير بالذكر أن أول قفاز قد تم اكتشافه في الذرة يعود الى هذا الصنف. يؤدي هذا القفاز الى ظهور بذور مبقعة غير اعتيادية بسبب ازلتها أو قصها من الجين المسؤول عن انتاج الصبغة في بذور الذرة.



شكل (8.8): مخطط يوضح صنفين من القفازات في حقيقية النواة. تبقى قفازات الصنف الأول دائمية الوجود حال انحشارها. يمكن تسمية تسلسلات الصنف الأول بالقفازة لأن نسخ الـ RNA الناتجة منها تعاني استنساخاً معاكساً الى DNA والذي ينحشر في موقع جديد بالجينوم. يتحرك الصنف الثاني وذلك بازالة نفسه من موقع وإعادة حشر نفسه في موقع آخر (تصميم المؤلف).

آليات القفز (mechanisms of transposition)

عموماً، هنالك آليتين تستعملهما القفازات، سواء أكانت في بدائية أو حقيقية النواة، في عملية قفزها من مكان إلى آخر وهي:

1. آلية القفز المباشرة: وتحدث أما بصورة تضاعفية (replicating or cointegrate-forming)، أو بصورة غير تضاعفية (conservative (non-replicative) (محافظة). وفيما يخص عملية القفز الحادثة في القفازات المعتمدة على وسائط الـ DNA فهي إما أن تكون تضاعفية (replicative) أو غير تضاعفية (non-replicative). وفي القفز التضاعفي، تدخل نسخة جديدة في موقع جديد في الوقت الذي ماتزال النسخة القديمة في الموقع الأصلي، وبالتالي: يزداد عدد نسخ العنصر القفاز. وفي القفز الغير تضاعفي، ينقص العنصر القفاز من الموقع القديم وينغرس في موقع جديد من دون أي زيادة في عدد نسخه. يحتاج القفز الغير تضاعفي تضاعف نيوكليوتيدات قليلة بحيث تشكل تكرارات مباشرة (direct repeats) (أنظر أدناه).

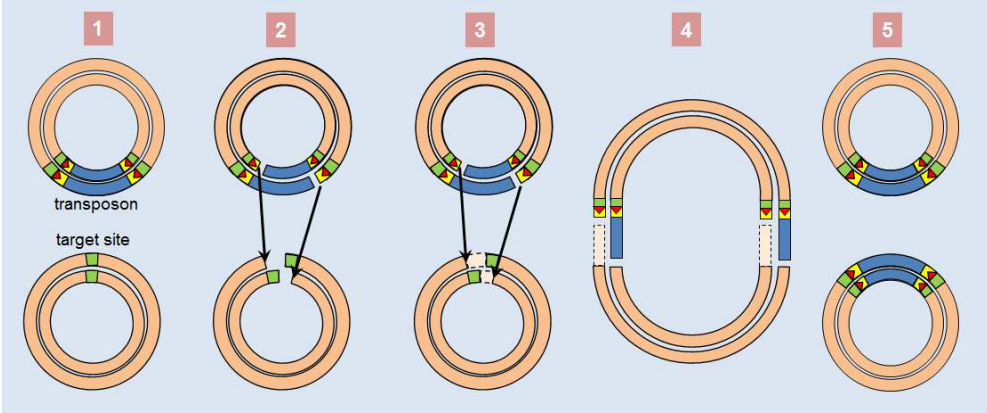
2. آلية القفز الغير مباشرة: وهي آلية القفز عن طريق جزيئات الـ RNA الوسيطة (RNA intermediate) (أنظر أدناه).

آلية القفز المباشرة

1. القفز التضاعفي (replicative transposition): ويدعى أحياناً بقفز النسخ واللقص (copy and paste transposition)، ويمكن أن يتم بين جزيئات الـ DNA المختلفة أو بين موقعين تابعين لنفس جزيئة الـ DNA. يوضح الشكل (9.8) خطوات القفز بين جزيئتي DNA. وقبل القفز، يكون عنصر النقل في موقع واحد. وفي الخطوة الأولى، ترتبط جزيئتا الـ DNA مع بعضهما، ويتضاعف العنصر القفاز، منتجاً تركيباً مندمجاً (cointegrate structure) والذي يتألف من الموقعين الواهب والمستلم بشكل ملتحم مع بعضها (شكل 9.8). بعد تكوين التركيب المندمج، تنتج عملية التعابر في مناطق واقعة ضمن العناصر القفازة جزيئتين، تعرف هذه الخطوة بحل التركيب المندمج (resolution of cointegrate). وهنا يأتي السؤال: كيف يتكون وينحل التركيب المندمج؟ يحتاج تكوين هذا التركيب بدوره إلى أربعة خطوات: الأولى، يصنع انزيم transposase (المشفر من قبل العنصر القفاز) قطوعات مفردة الشريط في كل نهاية للعنصر القفاز وفي كلا جانبي التسلسل الهدف حيث ينغرس العنصر القفاز. ثانياً، ترتبط النهايات الحرة للعنصر القفاز بالتسلسل الهدف. ثالثاً، يحدث التضاعف في أشرطة القالب المفردة الشريط، ابتداءً من النهايات 3' للأشرطة المفردة ويتقدم خلال العنصر القفاز. يخلق هذا التضاعف التركيب المندمج، بنسختيه على كلا طرفي العنصر القفاز وتسلسل الموقع الهدف، والذي هو الآن في موقع

واحد من كل نسخة (شكل 9.8). ان الانزيمات التي تنجز وظائف التضاعف والالصق هي انزيمات خلوية والتي تعمل في التضاعف واصلاح الـ DNA. رابعاً، بعد تكوين التركيب المندمج، يعاني من الانحلال، ويحتاج هذا الحل أو الانحلال الى اعادة ارتباط بين المواقع الموجودة في العنصر القفاز. يعطي القفز نسختين من العنصر القفاز في النهاية. وتنفذ خطوة الانحلال من قبل انزيم resolvase (المشفر في بعض الحالات من العنصر القفاز وفي حالات أخرى من جين خلوي) والتي تعمل في اعادة الارتباط المتماثلة. وفي هذه الآلية التضاعفية، والتي يزدوج فيها القفاز خلال عملية القفز: تتحرك نسخة واحدة، ولكن أيضاً تبقى نسخة واحدة ولهذا لا ينتشوه DNA العائل الأصلي.

شكل (9.8). القفز التضاعفي. يحدث في هذا النوع من الآليات نسخاً لتسلسلات الـ DNA في القفاز عن طريق تضاعف الـ DNA. تتمثل النواتج النهائية بجزيئة DNA مماثلة للواهب الأصلي ولجزيئة الـ DNA الهدف التي انحسر فيها القفاز، ويتضمن الخطوات: (1) يقوم انزيم transposase بجلب تسلسل القفاز مع تسلسل الموقع الهدف

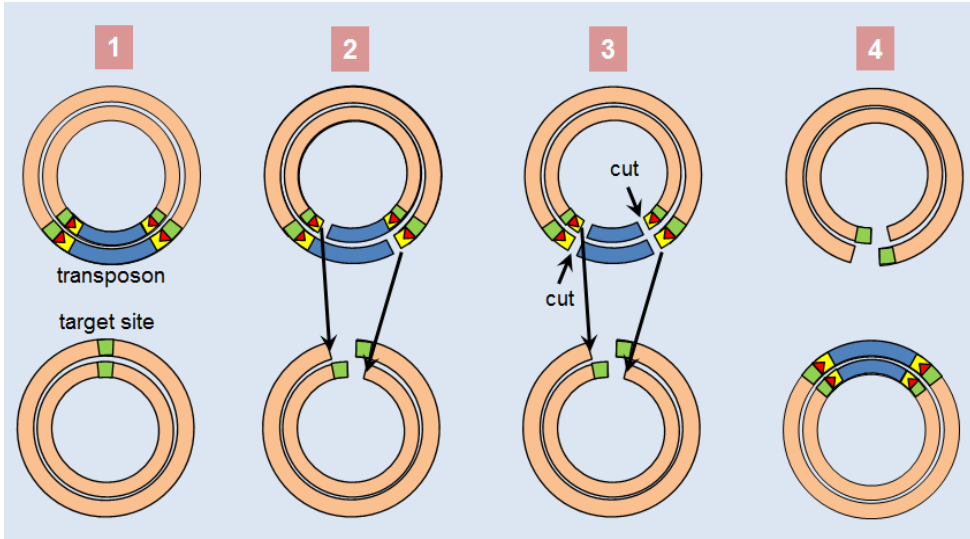


معاً بشكل متقابل، (2) يقوم هذا الانزيم بعمل قطوعات مترنحة (staggered cuts – أنظر الفصل العاشر) لكلا القفاز والموقع الهدف، (3) يبدأ انزيم الـ DNA polymerase بتخليق شريط جديد في الموقع الهدف، (4) يستمر تخليق الـ transposon من قبل انزيم DNA polymerase بعد تكوين التركيب المندمج (cointegrate)، (5) أخيراً يقوم انزيم الـ resolvase بحل هذا التركيب المندمج لتنتج جزيئتين كلاهما تحتوي على القفاز (تصميم المؤلف).

وفي هذه الحالة، لا تتكون قطوعات ثنائية، ولكن بدلاً من ذلك يبقى شريط القفاز الثاني لكي يتم استنساخه من قبل إنزيم DNA polymerase، والذي يبدأ عند نهاية القطع الأول. يدعى التركيب الناتج بالـ cointegrate، حيث يعتبر وجوده دليل قوي لمثل هذا المسلك لعملية القفز. ثم ينحل بعد ذلك هذا التركيب وذلك بواسطة فعل إنزيم آخر مشفر من قبل القفاز يدعى بالـ resolvase. ومن الممكن لإنزيم الـ resolvase من أن يحفز عملية site specific recombination عبر نسختي القفاز في تفاعل يشبه انحسار العاثي λ، منتجاً جزيئات DNA منفصلة، كل منها بنسخة قفاز واحدة. إن نواتج تفاعل القفز هذا الخطوتين تتضمن نسختين من القفاز، واحدة في موقعه الأصيل على المضاعف المانح،

والأخرى على المضاعف الهدف. إن أعضاء عائلة Tn 3 (والتي تدعى بالقفزات البسيطة) و Tn1 و Tn501 هي من أمثلة هذه المجموعة.

2. القفز الغير تضاعفي (nonreplicative transposition): وفي هذا النوع من القفز، يتحرك العنصر القفاز من موقع إلى آخر بدون تضاعف العنصر القافز كلياً (شكل 10.8)، على الرغم من تضاعف تسلسلات قصيرة في الـ DNA الهدف، مولدة تكرارات مباشرة متاخمة.



شكل (10.8). القفز الغير تضاعفي (قفز القطع واللصق). تتمثل النواتج النهائية بجزيئة DNA مماثلة للواهب الأصلي وجزيئة الـ DNA الهدف التي انحسر فيها القفاز، ويتضمن الخطوات: (1) يقوم انزيم transposase بجلب تسلسل القفاز مع تسلسل الموقع الهدف معاً بشكل متقابل، (2) يقوم هذا الانزيم بعمل قطوعات مترنحة (staggered cuts) - أنظر الفصل العاشر) لكلا القفاز والموقع الهدف، (3) تقوم مجموعة ثانية من القطوعات بالتكفل بفصل القفاز نهائياً عن تسلسله القديم، (4) أخيراً تُفقد الجزيئة الحاوية على القفاز للقفاز لينحسر في التسلسل الهدف الجديد (تصميم المؤلف).

على الرغم من قدرة انزيم الـ transposase على قطع أشربة الـ DNA، إلا أنه يقطع الـ DNA بطريقة متفردة مختلفة عن ماتقوم به انزيمات القطع الداخلي (endonucleases) المستخدمة في تجارب الهندسة الوراثية، حيث يربط انزيم الـ transposase كلا نهايتي القفاز بالإضافة إلى تسلسل الـ DNA الهدف الذي سوف ينحسر فيه، ثم يعمل الإنزيم بعد ذلك قطوعات متعرجة staggered cuts بنفس الطريقة التي تقوم فيها الإنزيمات القاطعة بذلك في موقع الهدف بالإضافة إلى قطعه لكلا نهايتي القفاز بشكل متزامن، ولكن الشيء المختلف هنا هو أن انزيم transposase يصنع هكذا قطع على أشربة مختلفة، أي شريط من الـ DNA الواهب وشريط من الـ DNA المستلم. بينما تقوم

الانزيمات القاطعة المستخدمة في الهندسة الوراثية تعمل تلك القطوعات في جزيئة DNA واحدة ، أي في كلا شريطي الجزيئة الواحدة (أنظر الفصل العاشر). تقوم قفازات الصنف الثاني في الكائنات حقيقية النواة بهذه الآلية. أما في بدائية النواة، تقوم القفازات Tn5 و Tn9 و Tn10 بالاعتماد على هذه الطريقة أيضاً.

آلية القفز الغير مباشرة

القفز عن طريق وسائط الـ RNA: تعرف العناصر القفازة الموجودة في الكائنات حقيقية النواة والمنتقلة عبر وسائط الـ RNA بالقفازات الارتكاسية (retrotransposons). يتم استنساخ القفاز الارتكاسي في الـ DNA أولاً إلى تسلسل من الـ RNA (أنظر شكل 8.8)، والذي ربما يتعرض إلى المعالجة بعد ذلك. يعاني الـ RNA المعالج الاستنساخ المعاكس من قبل انزيم reverse transcriptase لانتاج نسخة DNA مزدوجة الشريط منه. تتكون قطوعات متعرجة (staggered cuts) في الـ DNA الهدف، وتنغرس نسخة من الـ retrotransposon في الجينوم (أنظر شكل 8.8). ويقوم التضاعف بملي الفراغات القصيرة المتكونة من قبل القطوعات المتعرجة، مولداً تكرارات متاخمة مباشرة (flanking direct repeats) على كلا جانبي الـ retrotransposon.

هنالك عدة أمثلة لهذه الآلية، فقد بينت البحوث العديدة بأن بعض القفازات للكائنات الراقية، وخصوصاً تلك التي تعود إلى فايروسات الارتكاسية retroviruses، تتحرك بطريقة مختلفة جداً عن القفازات البكتيرية كما في Tn3. وبهذه الطريقة، فإن عناصر تاي (Ty elements) للخمائر سوف تستنسخ أولاً إلى RNA، والذي يستنسخ إلى DNA بواسطة إنزيم reverse transcriptase ، ثم يعاد ارتباط نسخة الـ DNA إلى موقع جديد في كروموسوم العائل. ليست عناصر Ty هي الوحيدة التي تقفز بهذه الآلية وإنما تمتلك الفايروسات الارتكاسية جينوم ذو RNA مفرد الشريط single stranded RNA والذي يتضاعف من خلال وسيط الـ DNA ذو الشريط المزدوج. تتضمن دورة حياة الفايروس مرحلة اجبارية والتي ينحسر فيها حلزون الـ DNA المزدوج في جينوم العائل بواسطة عملية تشبه القفز والتي تولد تسلسلات قصيرة مباشرة من الـ DNA الهدف. إن الخطوات المهمة هي أن الـ RNA الفايروسي يتحول إلى DNA، ثم ينحسر الـ DNA بجينوم العائل، ثم يستنسخ DNA العائلي الأولي إلى RNA. إن الإنزيم المسؤول على توليد نسخة DNA بدائية للـ RNA هو إنزيم الـ reverse transcriptase. ويقوم هذا الإنزيم بتحويل الـ RNA إلى حلزون الـ DNA المزدوج في سايتوبلازم الخلية الممخوجة. يقوم الـ DNA الخطي بصنع طريقه إلى النواة. يمكن لنسخة أو أكثر من الـ DNA من أن تنحسر في جينوم العائل. وهنا يدخل إنزيم مفرد يدعى بالـ integrase ويكون مسؤولاً عن الانحشار.

بقي لنا أن نعرف بعض الحقائق المتعلقة بآلية القفز العامة ومنها: أولاً أن القفزات تتحرك بدقة، بحيث تحمل كل التسلسلات المنحشرة في الموقع القديم وليس الـ DNA المجاور. يميز إنزيم الـ transposase بنفسه كلتا نهايتي القفز. وتلك النهايتين غالباً ما تكون متماثلة لأنها هي المواقع الارتباطية الشائعة لإنزيم الـ transposase. ثانياً، يتكون تضاعف دقيق من 3 إلى 12 قاعدة من الـ DNA الهدف (اعتماداً على نوع القفز) في موقع الانحشار، حيث تبقى نسخة واحدة من تسلسل قصير في موقع الهدف على جانبي القفز المنحشر (أنظر شكل 8.8). ربما يعزى هذا إلى نمط القطع الذي يقوم به إنزيم الـ transposase (أنظر أدناه). ولهذا السبب، تحدث بعض عمليات تخليق الـ DNA خلال القفز لتؤدي إلى تضاعف الموقع الهدف، وهذا فرق واضح عن عملية إعادة الارتباط المتخصص site specific recombination للعائتي λ والتي لا يحدث فيها تضاعف للموقع الهدف. ثالثاً، ولو أن معظم القفزات تتحرك لأي منطقة في الجينوم الجديد، ولكنها لا تتحرك بشكل عشوائي كامل، مفضلة بدلاً عن ذلك اجتياح تسلسلات DNA معينة. وبعضها يهاجم تسلسلات متناظرة متخصصة رباعية أو سداسية، كما يفعل الإنزيم القاطع (أنظر الفصل العاشر).

ملحق الفصل الثامن

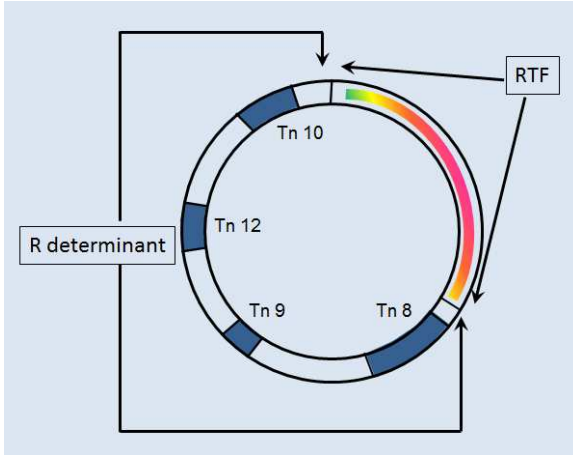
فائدة القفزات

عندما اكتشفت العناصر النقلة transposable elements من قبل Barbara McClintock في الخمسينيات من القرن الماضي فإنها اعتبرت كعناصر وراثية والتي يمكن أن تسبب طفرات غير ثابتة، وتنتج شذوذ كروموسومي chromosomal aberrations (والتي تتضمن حدوث كسور breaks) والتي تغير الموقع في الجينوم. وعندما أعيد اكتشافها في البكتيريا في السبعينيات "كتسلسلات انغراسية insertion sequences"، لوحظ بأنها تتحرك من موقع وراثي إلى آخر وتسبب إنهاء الاستنساخ قبل اكتماله premature transcriptional termination في أوبرونات البكتيريا.

إن القفزات الأكبر غالباً ما تحتوي على جينات تمنح فائدة انتخابية للخلية الحاملة للقفز وهي: المقاومة للمضادات الحيوية وهي الأكثر شيوعاً، والمقاومة للزئبق Hg، كما وجدت جينات إنتاج السموم toxin production genes وجينات التخمر fermentation genes. تسهل العناصر القفازة أيضاً نقل الجين الأفقي horizontal gene transfer بين كائنات ليست ذات صلة. أما عندما تسبب القفزات في البكتيريا طفرة، فإنها تقوم بذلك أما بواسطة انحشارها بالمنطقة المشفرة للجين، فاقداً بعض من الجين في العملية، أو بانحشارها قبل upstream المنطقة المشفرة للجين في منطقة مهمة في تحديد تعبير الجين، كما في

منطقة ارتباط عامل الاستنساخ بالـ DNA. إن الانحشار في الجين من الممكن أن يسبب splicing بديل مؤدياً إلى تنوع أعظم في البروتينات المنتجة من جين مفرد. يمكن أن تسبب القفزات تضاعف قطع من الـ DNA، وهي المرحلة الأولى المهمة في تطور معلومات جديدة evolution of new information. يمكن أن تسبب القفزات زيادة في حجم الجينوم، لأنها تترك نسخ متعددة منها في الجينوم. وقد تلعب القفزات دوراً في التسبب بالأمراض المشتملة على السرطان ونزف الدم الوراثي (الهيموفيليا).

إن تطور البلازميدات ذات المقاومة المتعددة multiple resistance plasmids والذي أصبح سهلاً وذلك بقابلية القفزات على إعادة الارتباط بدون تماثل في التسلسل، وهكذا تجمع مع بعضها البعض في بلازميد مفرد، والتي تضمن قابليتها على الحياة وذلك بالاستخدام المتكرر لعدة مضادات حيوية مع بعضها البعض. إن بلازميد المقاومة R1 plasmids الموجود في الطبيعة والناشئ من القفزات المشفرة للمقاومة إلى الكلورومفينيكول (Cm) والكاناميسين (Km)، كما أنه يحتوي على القفاز الكامل intact transposon Tn4 والتي تحمل المقاومة للـ streptomycin (Sm)، والـ sulfonamide (Su)، والـ ampicillin (Ap) (شكل 11.8). يحتوي Tn4 بنفسه على المقاومة للأمبيسلين. إن التراكب الكامل للجينات المقاومة (an r-determinants) ترتبط بقطع أخرى محتوية على جينات لتضاعف البلازميد ولوظائف النقل transfer function، والتي تحت الارتباط الاقتراني conjugal contact للخلية البكتيرية للعائل مع بكتريا أخرى، وهذا يمنح البلازميد القدرة بأن ينتقل بسرعة بين الخلايا. إن الطبيعة المطوعة plastic nature لهذا التراكب يعطي تغيرات بلازميدية عديدة، في كلا المختبر وفي الطبيعة.



شكل (11.8): تركيب R plasmid: إن RTF تعني resistance transfer factor والذي يعني (عامل نقل المقاومة)- والذي يحمل جينات النقل. يحمل المحدد (R) determinant جينات المقاومة (تصميم المؤلف).

إن معظم العناصر المتنقلة من الممكن أن تنغرس في الكروموسوم البكتيري عند مواقع عديدة. إذا انحشر القفاز ضمن الجين، فإن الاستمرارية الخطية لذلك الجين تنتشت وتفق وظيفته. وهكذا فإن القفزات من

الممكن أن تعتبر "كمطفرات بايولوجية" بالتناقض مع "المطفرات الكيمياوية" كما في الـ nitrosoguanidine. ان الشيء الذي يميز هذه المطفرات البايولوجية هو أن كل طافر من النادر أن يعاني أكثر من طفرة واحدة. وهكذا فمن الممكن تجنب مشكلة الطفرات المتعددة المرتبطة بالمطفرات الكيمياوية. وبالتالي تكون هذه المطفرات ذات فائدة كبيرة في أنواع متعددة من التلاعبات الوراثية في البكتيريا.

أسئلة الفصل الثامن

السؤال الأول: علل ما يلي

يمكن لبروتين RecA أن يقود تفاعل الهجرة الفرعية في عملية إعادة الارتباط؟
لاحتوي الخلية النطفية أو البيضية الناضجة على نفس المعلومات الوراثية من جسم الكائن الناتجة منه؟
توصف المواقع التي تميزها القفزات لكي ترتبط بها بأنها مواقع هدف "متواضعة"؟
يتضاعف تسلسل الموقع الهدف على كلا جانبي القفز؟
يعد تكون مركب يعرف بالـ cointegrate دليلاً على حدوث القفز التضاعفي؟
توصف الفايروسات الارتجاعية (retroviruses) بأنها ثنائية المجموعة الكروموسومية (diploid)؟
تسهل العناصر القفازة نقل الجين الأفقي horizontal gene transfer بين كائنات ليست ذات صلة؟
تسمى القفزات أحياناً بالمطفرات البايولوجية، وتفضل على المطفرات الكيمياوية؟
كل من الـ transposase والانزيم القاطع يصنعان قطوعات مترنحة (staggered cuts) في الـ DNA لكن يستخدم الانزيم الأول في عملية قفز الـ DNA بينما يستخدم الانزيم الثاني في عملية قطع الـ DNA؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

لضمان حدوث عملية إعادة الارتباط بين أي من جزيئي الـ DNA، لابد من وجود
a. insertion sequences b. inverted sequences c. heterologous sequences d. homologous sequences
تسمى عملية إعادة ارتباط بين جزيئين من الـ DNA مع نقصان زوج نيوكليوتيدي أو أكثر بـ
a. homologous recombination b. non-homologous recombination c. site specific recombination d. general recombination
لا يقتصر تكوين D-loop أثناء عملية إعادة الارتباط فحسب، وإنما يمكن ملاحظته في تراكيب تضاعفية معينة كما في
a. chloroplast b. Golgi apparatus c. plasmids d. mitochondria
تعد خطوة هي أكثر خطوات إعادة الارتباط إثارة، وذلك لما تحتاجه من الحركات الدورانية لحدوثها.
a. strand invasion b. D-loop formation c. Holliday junction d. single stranded stabilization
تحدث عملية إعادة الارتباط ذات الموقع المتخصص بين العائلي لأمدا وبكتريا القولون وذلك عندما يكون العائلي في
a. lytic stage b. lysogenic stage c. both lytic and lysogenic stages d. non
تشارك بروتينات في عملية إعادة الارتباط ذات الموقع المتخصص.
a. RecBCD c. RecA b. RuvB d. all
لكي تنتقل القفزات من مكان إلى آخر، وهي تحتاج بذلك عادة إلى تسلسلات ذات
a. long region of homology b. intermediate region of homology c. short region of homology d. no region of homology
يشترك عادة نوع متخصص من انزيمات type I topoisomerase في عملية

- a. homologous recombination b. site specific recombination c. transposition d. non
تمتلك كل القفزات تسلسلات معكوسة (inverted repeats) في كلا نهايتها ماعدا
a. Mu phage b. Tn 10 c. Tn 9 d. Ty elements
ان الآلية التي يميز فيها القفز الموقع الهدف تكون
a. completely random b. completely specific c. similar to restriction enzymes d. all
..... وهو أحد آليات القفز، وفيه يتشوه الـ DNA الواهب.
a. non-replicative transposition b. replicative transposition c. retrotransposition d. non

السؤال الثالث: عرف ما يلي

Holliday junction, Chi sequence, chiasmata, junk DNA, reverse transcriptase

السؤال الرابع: صل المفردات الموجودة في اليمين مع ما يناسبها في اليسار

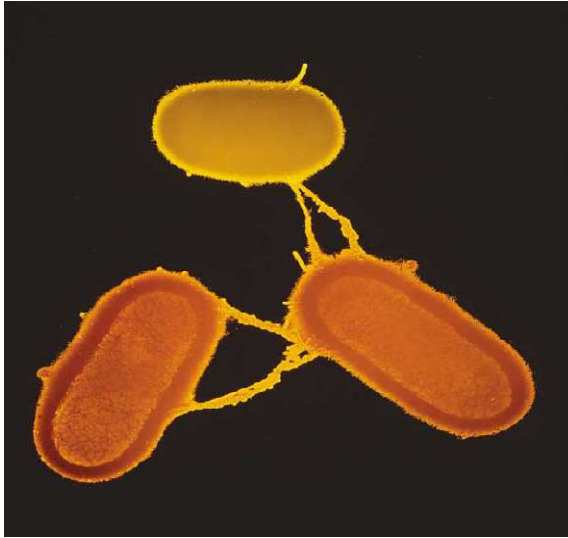
RecA	nick
RuvC	strand invasion
RecBCD	D loop
RuvA	single stranded stabilization
DNA ligase	Holliday junction
SSBs	Branch migration
RuvB	resolution

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

- Alberts** B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.
- Craig** N. Transposition, in *Escherichia coli* and *Salmonella*, Washington, DC: ASM Press, 1996.
- Craig** N. (1997). Target site selection in transposition *Annu. Rev. Biochem.* 66: 437-474.
- Gopaul** D., Guo F. and Van Duyne G. 1998. Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site specific recombination *EMBO J.* 17: 4175-4187.
- Griffiths** A., Wessler S., Lewontin R., Gelbart W., Suzuki D., Miller J. An Introduction to Genetic Analysis. Eighth edition, 2004.
- Kumar** H. D. Molecular genetics and biotechnology. Second edition, Vikas Publishing House, India, 1997.
- Lewin** B. Genes. VIII, Pearson Prentice Hall, 2004.
- Mizuuchi** K. (1992). Transpositional recombination: mechanistic insights from studies of mu and other elements *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1011-1051.
- Murray et al.** Medical Microbiology. Third edition, 2005.
- Pierce** B. Genetics: A conceptual approach. 2002
- Passarge** E. Color atlas of Genetics. Second edition, Thieme, 2001.
- Reece** R.J. Analysis of genes and genomes. John Wiley & Sons, 2004.
- Schleif** R. Genetics and molecular biology. Second edition, The Johns Hopkins University Press, 1993.
- Turner** P., McLennan A., Bates A., White M. Instant notes in molecular biology. Third edition, Taylor & Francis Group/UK. 2005.
- Verma** P., and Agarwal V. molecular biology. First Edition Schandgoup, India (2004).
- Watson** J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R. Molecular biology of the gene. Fifth edition, Pearson Prentice Hall, 2004.
- Robinson** R. Genetics. Volume 3, MacMillan Reference USA, 2003.

9

الفصل التاسع أنظمة انتقال الـ DNA في البكتريا

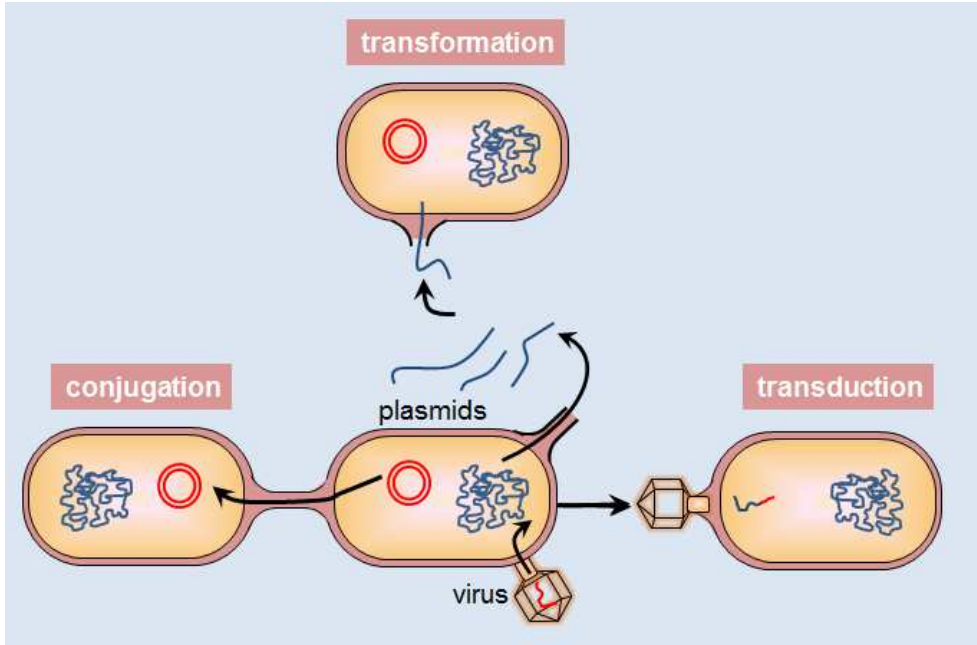


صورة مكبر لأكثر من أحد عشر مرة أخذت بواسطة المجهر الإلكتروني العابر (TEM) والتي يبين فيها خلايا مقترنة في بكتريا القولون حيث تقترن هنا خلية ذكورية واحدة (أسفل اليمين) مع خليتين أنثويتين معاً (Griffiths et al., 2004).

مقدمة

لم يكن عالم البكتيريا وفايروساتها بعيدا عن علم الوراثة الجزيئية، حيث اضطلع جزء كبير من هذا العلم بدراسة تلك الكائنات بدائية النواة بصورة مكثفة وتوصل الى العديد من الأساسيات التي بني عليها علم البايولوجيا الجزيئية اليوم. وعلى الرغم من احتواء البكتيريا على DNA موزع على هيئة امتدادات طويلة على شكل "كروموسوم"، ولكن مادتها الوراثية غير منظمة بنفس الكيفية التي هي عليه في الكائنات حقيقية النواة (أنظر الفصل الأول). تعود البكتيريا الى صنف من الكائنات يعرف بالكائنات بدائية النواة. وعلى الرغم من اختلاف الفايروسات عن هكذا كائنات بشكل كبير، الا أن لها بعض صفات تلك الكائنات، وعلى سبيل المثال، تكون مادتها الوراثية أما DNA أو RNA، مؤلفة "كروموسم صغير". وعلى أية حال، يعد العديد من المختصين بالبايولوجي الفايروسات كائنات غير حية، لعدم قدرتها على النمو أو التكاثر بشكل مستقل. ولكي تتكاثر، يجب أن تتطفل على الخلايا الحية وتستخدم الماكنة الجزيئية لهذه الخلايا لهذا الغرض. تدعى الفايروسات التي تتطفل على البكتيريا بالعاثيات البكتيرية (bacteriophages)، أو ببساطة تسمى بالعاثيات فقط. سوف يركز هذا الفصل على فهم المبادئ الأساسية للوراثة البكتيرية، ويتم ذلك من خلال التركيز على كيفية انتقال المادة الوراثية بين تلك الكائنات، والتي هي التحول (transformation) و الاقتران (conjugation) و النقل (transduction) كما في (شكل 1.9). لأن تلك العمليات هي مصدر أساسي للتغاير الوراثي الكبير الحادث في البكتيريا، فعلى الرغم من عدم حدوث الانقسام الاختزالي (meiosis) في البكتيريا كما هو الحال في الكائنات حقيقية النواة، الا ان التغاير الوراثي الحاصل في البكتيريا قد نجم عن واحدة من تلك العمليات. لذا، تقوم البكتيريا بتنويع مادتها الوراثية بواسطة نقل الجين أفقياً (horizontal gene transfer) وفيه تأخذ البكتيريا الـ DNA من كائنات أخرى وذلك بواسطة تلك الوسائل، وهذا يعتبر طريقة مهمة جداً في التطور البكتيري.

ترتبط في عملية الاقتران الخلية البكتيرية بخلية أخرى بشكل مباشر. وفي عملية التحول، يمكن أن تأخذ الخلية البكتيرية قطعة DNA من البيئة وتدمجها بالكروموسوم بعد دخولها. أما في عملية النقل، تلتقط عاثيات معينة الـ DNA من خلية بكتيرية وتحقنه في خلية أخرى، حيث يمكن لتلك القطعة أن تنحشر في الكروموسوم (شكل 1.9).



شكل (1.9): مخطط يوضح الطرق الثلاث التي ينتقل بها الـ DNA بين الخلايا البكتيرية. طريقة التحول موضحة في الجزء الأعلى من الشكل وطريقة النقل والمتوسطة من قبل العاثي فهي موضحة في الجزء الأيمن من الشكل، أما طريقة الاقتران فهي موضحة بيسار الشكل (تصميم المؤلف).

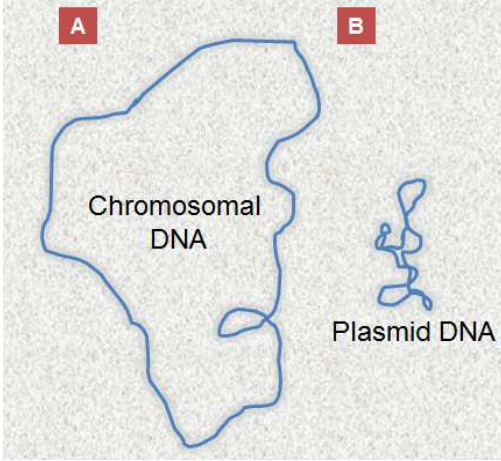
قبل التطرق الى الطرق الثلاث الرئيسية التي ينتقل فيها الـ DNA بين الخلايا البكتيرية لا بد لنا من معرفة مفهوم مهم في وراثة الأحياء المجهرية له صلة وثيقة بهذا الموضوع وهو البلازميدات.

البلازميدات plasmids

يتألف جينوم البكتيريا من كروموسوم بهيئة جزيئة دائرية مفردة. إضافة إلى الكروموسوم، تمتلك العديد من البكتيريا جزيئات DNA دائرية صغيرة تعرف بالبلازميدات. إن مصطلح "بلازميد" قد استخدم أصلاً من قبل Lederberg عام 1952 ليصف عناصر وراثية خارج كروموسومية والذي تطور ليصبح:

عناصر وراثية خارج كروموسومية extra-chromosomal elements، لها القابلية على التضاعف ذاتياً أي أنها وحدات مستقلة autonomous units، وتورث بشكل

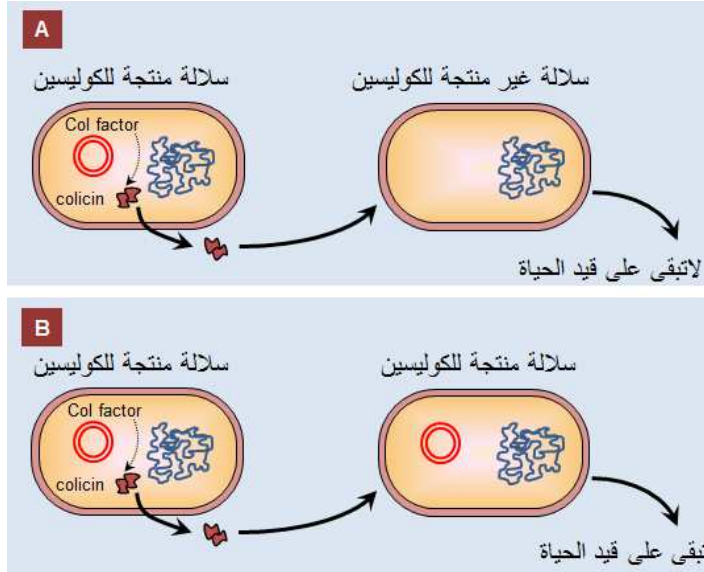
ثابت. توجد هذه الجزيئات في البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام بالإضافة إلى بعض الخمائر والفطريات. معظم البلازميدات هي جزيئات DNA مزدوجة الشريط دائرية مغلقة تساهمياً covalently closed circular double stranded DNA molecules (شكل 2.9).



شكل (2.9): (A) كروموسوم بكتيري (الدائرة الكبيرة مع (B) بلازميده (الدائرة الصغيرة) كما يبدوان تحت المجهر الإلكتروني (تصميم المؤلف)

توجد بعض البلازميدات بنسخة واحدة بالخلية، بينما توجد الأخرى بعدة نسخ. يدعى النوع الأول من السيطرة بنظام السيطرة مفرد النسخة single copy control: والذي يشبه الكروموسوم البكتيري ويتضاعف لمرة واحدة لكل جيل. إن بلازميد النسخة الواحدة single copy plasmid يحافظ وبكفاءة على تماثله مع الكروموسوم البكتيري. تسمح أنظمة السيطرة متعددة النسخ لعدة تضاعفات للجيل الواحد، وهذا ينتج في عدة نسخ للبلازميد لكل بكتيريا. توجد البلازميدات متعددة النسخ multicopy plasmids بعدد ملحوظ (نموذجياً 10 إلى 20 نسخة) لكل كروموسوم بكتيري. ولابد من ملاحظة أن البلازميدات قليلة النسخ تقع تحت تنظيم أكثر تشدداً لتضاعفها من تلك البلازميدات متعددة النسخ. تنتقل بعض البلازميدات والـ episomes بين الخلايا بواسطة عملية اقترانية conjugative process (والتي تتضمن اتصال مباشر بين الخلايا الواهية donor cells والخلايا المستلمة recipient cells). إن خاصية عملية النقل في بعض الحالات يحدث فيها في بعض الأحيان أن تنتقل جينات العائل البكتيرية مع DNA البلازميد (أو DNA الـ episomes)، وهكذا تلعب هذه الأحداث دوراً رئيسياً في تبادل المادة الوراثية بين البكتيريا. بشكل عام، تحمل البلازميدات الجينات التي هي ليست أساسية لوظيفة البكتيريا ولكنها تلعب دور مهم في دورة الحياة ونمو العوائل البكتيرية. تسرع بعض البلازميدات عملية الجماع بين البكتيريا، وتدعى بعوامل الخصوبة F factors (أنظر أدناه)، بينما تحمل الأخرى جينات تقتل بكتيريا أخرى،

والتي تدعى بـ Col factors (تنتج بعض السلالات البكتيرية البكتريوسين bacteriocin والذي يمكن له أن يقتل السلالات المنافسة) (شكل 3.9).



شكل (3.9): إنتاج الـ colicin النادر الذي يسمم البيئة بالنسبة للخلايا الخالية من هكذا بلازميد. ولو أن تخليق وتحرر الـ colicin هو عملية مميتة حتماً (A)، ولكن الخلايا المحتوية على هكذا بلازميدات تكون منيعة للـ colicin الخارجي (B) (تصميم المؤلف).

إن البكتريوسين والذي يقتل سلالات بكتريا القولون يدعى بالكوليسين colicin، والذي ينتج فقط من قبل تلك السلالات التي تحمل بلازميدات متخصصة: تدعى هذه السلالات بالـ colicinogenic وتدعى البلازميدات بـ Col factors. ويمكن لبعض البلازميدات، كما في Col E1، أن تنتقل لخلايا عائلة أخرى وذلك عبر الاقتران conjugation.

بعض البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية تحتوي على بلازميدات، تدعى بالـ R-factors، والتي تحمل جينات المقاومة لعدة مضادات حيوية كما في streptomycin والـ sulphonamide والـ tetracycline. إن واحدة من الصفات التي تجعل البلازميدات في طليعة علم الأحياء المجهرية هو قابليتها على حمل ونقل الجينات المشفرة إلى المقاومة للمركبات المضادة للأحياء المجهرية. ينتشر هذا النوع من البلازميدات في البكتريا ويمكن أن ينتقل بين أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية، وهذه هي الخاصية الوراثية التي تمثل مشكلة طبية خطيرة جداً في البشر والحيوانات. تدعى هذه البلازميدات بـ R plasmids، والتي تحتوي على العديد من الجينات والتي تشفر لمقاومة مدى واسع من المركبات المضادة للأحياء المجهرية، والتي تحتوي على المضادات الحيوية antibiotics، المعادن الثقيلة

heavy metals، المقاومة للعناصر المطفرة mutagenic agents كما في بروميد الاثديوم. أما بالنسبة لتركيبها، فإن R plasmids هي بلازميدات اقترانية حيث تقع جينات التضاعف والنقل في جزء معين منها، بينما تقع جينات المقاومة بجزء آخر (أنظر ملحق هذا الفصل). ان أهم ما يذكر في المجال التطبيقي هو استخدام بعض البلازميدات وبشكل واسع في تجارب الهندسة الوراثية (أنظر الفصل الحادي عشر). على الرغم من احتواء بعض البلازميدات على مئات الآلاف من الأزواج القاعدية إلا أن معظم البلازميدات تكون دائرية الشكل وبطول عدة الآلاف من الأزواج القاعدية فقط. إن امتلاك البلازميدات لمنشأ التضاعف origin of replication جعلها قادرة على أن تتضاعف بشكل مستقل عن الكروموسومات البكتيرية (راجع الفصل الثالث).

أولاً: الاقتران conjugation

وهو نقل الـ DNA من الواهب إلى المستلم بواسطة الاتصال الفيزيائي المباشر بين الخلايا. في البكتيريا هنالك نوعان من الجماع بين الواهب (الذكر) والمستلم (الأنثى)، كما أن اتجاه نقل المادة الوراثية هو اتجاه واحد فقط، وهو نقل الـ DNA من الواهب إلى المستلم. يختلف الاقتران عن التكاثر الجنسي في اعتبارين أساسيين: أولهما، المساهمة الوراثية من الآباء هي غير متساوية. ولهذا يشار إلى الآباء بالخلايا الواهبة donor cells والمستلمة recipient cells. أما الاعتبار الثاني، فهو أن النسل الناتج يشبه الخلية المستلمة فقط وليس الخلية الواهبة في معظم الصفات.

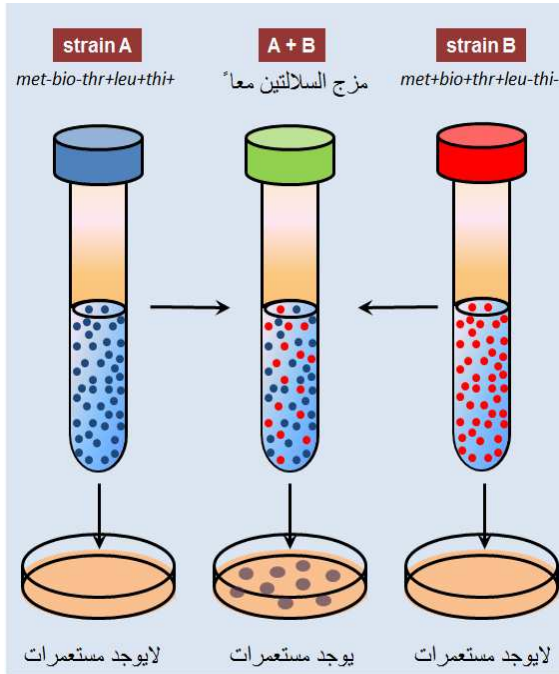


Joshua Lederberg



Edward Tatum

لقد أجابت التجربة المثيرة التي قام بها كل من Joshua Lederberg و Edward Tatum في عام 1946 على التساؤل الذي يثار بين الفينة والأخرى في مصداقية احتواء البكتيريا أي عملية تشبه التكاثر الجنسي من عدمه، حيث أكتشفا في بكتيريا القولون عملية مشابهة للعملية الجنسية التقليدية. تتلخص التجربة ببساطة باستخدام سلالتين من بكتيريا القولون يمتلك كل منهما طفرة غذائية (auxotrophic mutation) تختلف عن الأخرى. حيث يمكن للسلالة A أن تنمو فقط إذا كان الوسط مجهزاً بالميثيونين والبايوتين، بينما تنمو السلالة B فقط عندما يكون الوسط مجهزاً بالثريونين والليوسين والثايمين. وعليه، تم تسمية السلالة A بـ (met- bio-thr+ leu+ thi+) والسلالة B بـ (met+ bio+ thr-leu-thi-). يوضح الشكل (4.9) تفاصيل تلك التجربة.

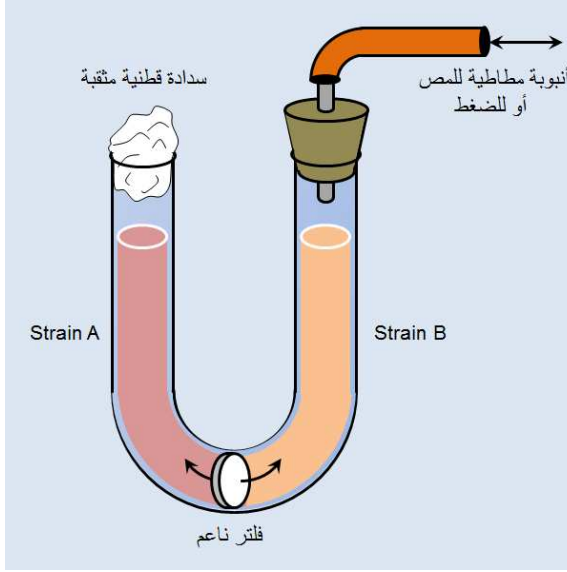


شكل (4.9): مخطط يوضح تجربة Lederberg و Tatum والتي استنتجوا فيها حدوث إعادة الارتباط الوراثي بين الخلايا البكتيرية. والتي فيها لا يمكن لخلايا النوع A أو B أن تنمو في وسط متطلبات النمو الدنيا، لأن كل من السلالة A و B تحمل طفرات تسبب عدم المقدرة في تخليق العناصر الضرورية لنمو الخلية. وعندما تخط السلالة A و B لمدة ساعتين ثم تزرع بعد ذلك، لوحظ ظهور عدة مستعمرات على طبق الأكار. اشتقت هذه المستعمرات من خلية واحدة والتي حدث فيها تبادل في المادة الوراثية، وهي لهذا السبب قادرة على تخليق كل العناصر الضرورية للأبيض (تصميم المؤلف).

تتلخص التجربة بخلط السلالة A والسلالة B مع بعضها البعض، ثم تحضن لفترة معينة، ثم تزرع على وسط ذو متطلبات نمو دنيا (minimum medium)، والذي لا تنمو فيه أي من السلالتين الطافرتين. لاحظ Lederberg و Tatum قدرة نسبة صغيرة (خلية من أصل عشرة ملايين) من تلك الخلايا على النمو، وتسمى تلك الخلايا بالـ *prototrophs*، وهذا يدل على استعادتها للنوع البري طافر من دون اضافة المغذيات المطلوبة. هذا ولم يلاحظ أي نمو يذكر سواء للسلالة A أو للسلالة B عند تنميتها بدون خلط مسبق مع بعضها البعض (شكل 2.10). استنتج Lederberg و Tatum الى حدوث شكل معين من إعادة الارتباط بين جينات السلالتين لتنتج خلايا الـ *prototrophs*.

1 ثم لوحظ Bernard Davis ان السلالتين لا تتبادل الجينات مع بعضها البعض بالشكل الغير مباشر الذي تصوره Lederberg و Tatum ولكن، بدلاً من ذلك، لاحظ وجود مواد معينة ترتبط بها الخلايا هي التي تقوم بذلك. وقد أثبت ذلك بتصميمه انبوبا يشبه الحرف U وفيه ينفصل ذراعيه بواسطة مرشح دقيق. وتكون ثقوب ذلك المرشح صغيرة جداً ولا تسمح للبكتيريا بالمرور خلالها، ولكنها كبيرة بما يكفي لتسمح بمرور أي مواد مذابة أصغر (شكل 5.9). تم وضع السلالة A في جهة، والسلالة B في جهة أخرى. وبعد حضن

السلالتين لفترة معينة، قاس Davis محتويات كل ذراع ليرى ان كان هنالك أي خلايا من نوع الـ prototrophs، ولكن لم يجد أيًا منها. وهذا يعني ضرورة وجود اتصال فيزيائي بين السلالتين لتكوين خلايا الـ prototrophs. هذا وتم تأكيد هذا الاتحاد الفيزيائي المباشر في المجهر الإلكتروني. أما الآن، تطور هذا المفهوم على المستوى الجزيئي، وأصبحت تسمى تلك العملية بالاقتران.



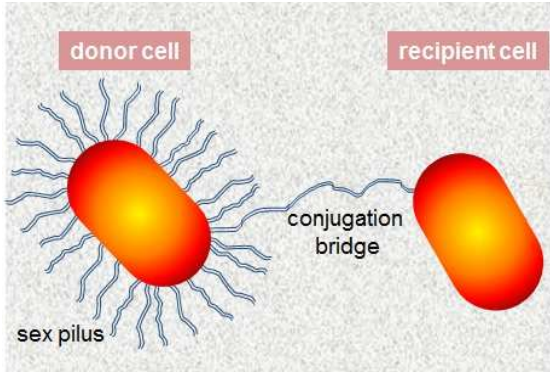
شكل (5.9): تجربة Davis في اثبات ضرورة الاتصال الفيزيائي المباشر بين الخلية البكتيرية لحدوث إعادة الارتباط الوراثي. السلالة البكتيرية A في أحد ذراعي أنبوب U، بينما السلالة البكتيرية B في ذراع أنبوب U الآخر. يمكن أن يعبر السائل بين ذراعي الأنبوب عند تليط ضغط أو بالمص، بينما لا يمكن للبكتيريا أن تقوم بذلك من خلال هذا المرشح. وبعد الحضان والزرع، لم يتم الحصول على خلايا الـ prototrophs البرية على وسط متطلبات النمو الدنيا (تصميم المؤلف).

تتم عملية الاقتران البكتيري من قبل بلازميدات الخصوبة F plasmids، والتي هي مثال تقليدي للـ episomes، العنصر الذي ربما يوجد كبلازميد دائري حر، أو ذلك الذي ينحسر بالكروموسوم البكتيري كتسلسل خطي (كما في العاثي لامدا التحلطي lysogenic bacteriophage). يمكن أن ينحسر العامل F في عدة مواقع في كروموسوم بكتيريا القولون، وعندما يكون العامل (البلازميد) حراً، يتم المحافظة عليه بمستوى نسخة واحدة لكل كروموسوم بكتيري. وعندما يكون منحسراً، بالكروموسوم البكتيري، تتعرض جينات البلازميد إلى الكبح، ويتضاعف DNA العامل (F DNA) كجزء من الكروموسوم.

عند وجود بلازميد الخصوبة (F plasmid)، سواء كان حراً أو منحسراً، يمتلك عواقب مهمة لبكتيريا العائل، إن البكتيريا الحاوية على عامل الخصوبة F^+ تكون قادرة على أن تقترن (أو تتزاوج) مع البكتيريا الفاقدة لهذا العامل F^- . يتضمن الاقتران حدوث اتصال مباشر بين البكتيريا المانحة (F^+) والبكتيريا المستقبلة (F^-)، يتبع الاتصال انتقال العامل F. وإذا وجد العامل F كبلازميد حر في البكتيريا الواهبة، حينها ينتقل كبلازميد، وتحول هذه

العملية الخلوية المستقبلية الغير حاوية على عامل الخصوبة F^- bacterium إلى خلية مستقبلية حاوية على عامل الخصوبة F^+ bacterium.

هنالك منطقة كبيرة من بلازميد الخصوبة، والتي تدعى منطقة النقل *transfer region*، وتختصر بـ *tra region* والتي هي ضرورية لعملية الاقتران. تحتوي منطقة النقل هذه على 40 جين ضرورية لنقل الـ DNA. تمتلك البكتيريا الحاوية على عامل الخصوبة لوازم سطحية تدعى بالأهلاب *pili* والتي هي مشفرة من قبل العامل F^- . وهنالك 12 جين من منطقة *tra* تتدخل في تحويل وتراكب الأهلاب التي تشبه الشعر بتركيبها. تبدأ عملية الاقتران بقمة تركيب الـ *pilus* والذي يلتصق بقمة سطح الخلية المستقبلية (شكل 6.9).



شكل (6.9): مخطط لعملية الاقتران البكتيري حسب معطيات المجهر الالكتروني (تصميم المؤلف)

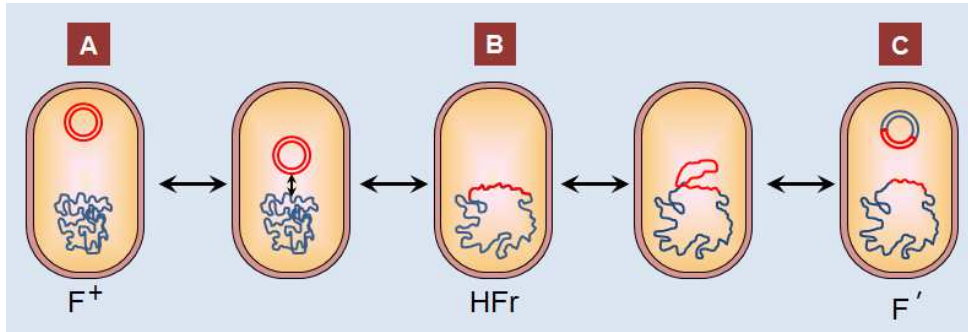
إن قابلية البكتيريا على أن تكون واهب هو نتيجة لوجود قطعة DNA إضافية في الخلية تدعى بعامل الخصوبة أو F factor أو عامل الجنس *sex factor*. إن عامل الخصوبة هو قطعة دائرية من الـ DNA والتي يمكن أن تتضاعف بشكل ذاتي في الخلية، ولهذا تعتبر متضاعف مستقل *independent replicon*. يمتلك عامل الخصوبة عدة جينات والتي تكون ضرورية لتضاعفه ولقابليته على نقل الـ DNA إلى المستلم. أحد جينات عامل الخصوبة تشفر لقابليته على إنتاج الهلب الجنسي *sex pilus* أو هلب الخصوبة F^- *pilus* على سطح البكتيريا. إن هذا الهلب مهم في عملية الاقتران. إن عامل الخصوبة هو ليس البلازميد الوحيد الذي يتوسط عملية الاقتران ولكنه يستخدم بشكل عام كنموذج لتوضيح هذه العملية. إن قابلية المستلم على أن يعمل كمستقبل للمعلومة الوراثية هو نتيجة لفقدانه لعامل الخصوبة.

هنالك ثلاث حالات فلسجية يمكن أن توجد فيها الخلية الواهبة، والتي لابد من التطرق لها لفهم تلك العملية من آلياتها المختلفة، وهي:

1. عامل الخصوبة المستقل (F^+) autonomous: في هذه الحالة يحمل عامل الخصوبة فقط تلك الجينات الضرورية لتضاعفه ولنقل الـ DNA. لا يوجد هنالك جينات كروموسومية مرتبطة مع عامل الخصوبة في سلالات F^+ . وفي التضريب $F^+ \times F^-$ يتحول F^- إلى F^+ بينما F^+ تبقى F^+ . وهكذا، يوصف عامل الخصوبة بالمعدي. بالإضافة إلى ذلك، هنالك فقط مستوى واطئ من النقل بين الجينات الكروموسومية.

2. عامل الخصوبة المندمج (Hfr) integrated: في هذه الحالة انحسر عامل الخصوبة في الكروموسوم البكتيري عبر عملية إعادة الارتباط كما هو موضح في الشكل 10.9. وفي التضريب $Hfr \times F^-$ نادراً ما يتحول عامل الخصوبة إلى Hfr بينما يبقى Hfr على حاله. بالإضافة إلى ذلك، هنالك تردد عالي من النقل لجينات الكروموسومات الواهبة.

3. عامل الخصوبة المستقل مع الجينات الكروموسومية autonomous fertility (F') factor with chromosomal genes: يوصف عامل الخصوبة في هذه الحالة بالمستقل ولكنه يحمل بعض الجينات الكروموسومية. تنتج عوامل F' عن طريق قص عامل الخصوبة F factor من بكتريا الـ Hfr كما هو موضح في الشكل (7.9). أحياناً، عندما يقص عامل الخصوبة من كروموسوم Hfr يمكن قص الجينات الواهبة الواقعة على كلا جانبي عامل الخصوبة مع عامل الخصوبة مولدة عامل الخصوبة المستقل مع الجينات الكروموسومية والمعروف بـ F' . وفي التضريب من نوع $F' \times F^-$ يتحول F^- إلى F' بينما يبقى F' على حاله. بالإضافة إلى ذلك، هنالك تردد عالي لنقل الجينات الكروموسومية الواهبة الأخرى.



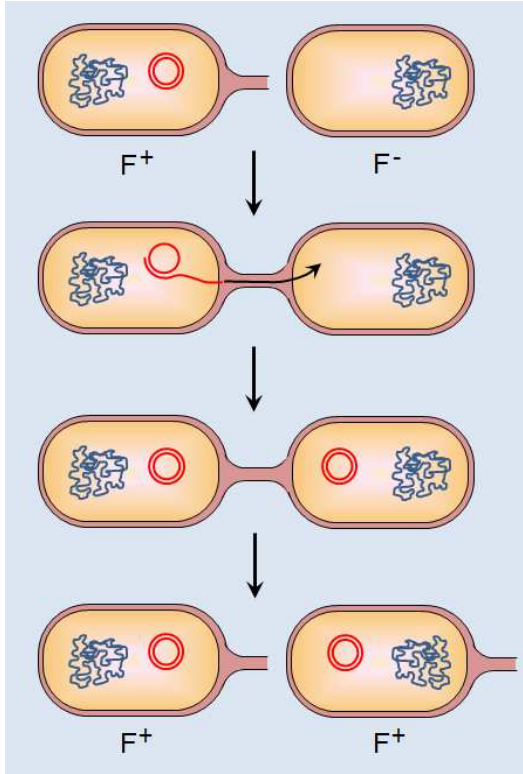
شكل (7.9): الحالات الفسيولوجية الثلاث لعوامل الخصوبة F ، وهي حالة F^+ الذاتي و (B) حالة Hfr المنحسر في الكروموسوم و (C) حالة F' الذاتي الذي يحمل بعض الجينات الكروموسومية (تصميم المؤلف).

آليات الاقتران mechanisms of conjugation

بما أن الخلية الواهبة يمكن لها أن توجد بثلاث حالات مختلفة، اذن هنالك ثلاث آليات مختلفة تحدد الخلية الواهبة على الخلية المستلمة، وهي كالآتي:

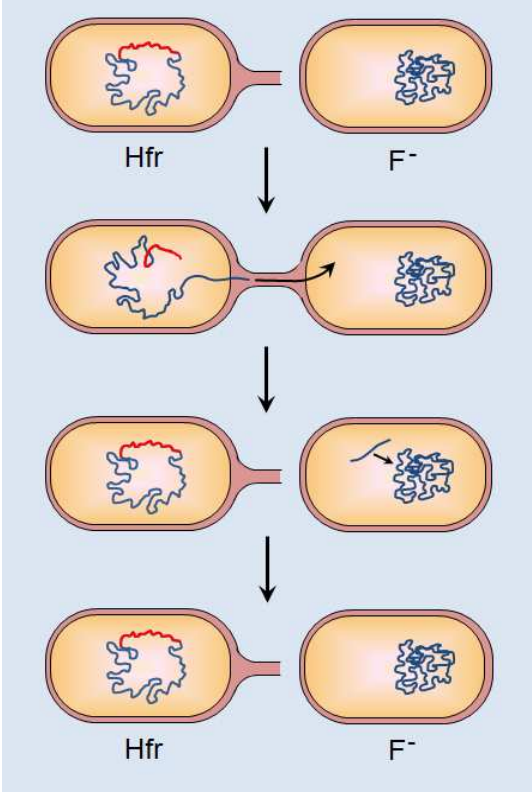
1. آلية تضريب نوع $F^+ \times F^-$ (شكل 8.9): وتتضمن خطوتين أولهما تكوين الهلب *pilus formation* حيث ترتبط قمة الهلب الجنسي مع المستلم ويتكون جسر الاقتران *conjugation bridge* بين الخلية الواهبة والمستلمة. يعتقد إن هذا الجسر هو الممر الذي يعبر من خلاله الـ DNA من الواهب إلى المستلم. وهكذا، يتم حماية الـ DNA من الإنزيمات الهاضمة للأحماض النووية الموجودة في البيئة. يمكن أن يحدث إعاقة في الاقتران حيث يفصل زوج الجماع بواسطة قوى ميكانيكية. وهكذا تستمر عملية الاقتران إلى أن يتم تحطيم الاتصال بين الخلايا المقترنة. إن نقل الكروموسوم البكتيري كاملاً بواسطة عملية الاقتران يستغرق 100 دقيقة تقريباً، وتحت الظروف الاعتيادية ينكسر الاتصال قبل اكتمال النقل. وبالنسبة، لا يبقى زوج الجماع مرتبطاً إلا لفترة قصيرة من الزمن. تتضمن

الخطوة الثانية انتقال الـ DNA وفيها ينشق DNA البلازميد عند موقع متخصص يطلق عليه أصل النقل *oriT* أو *origin of transfer*، ثم يتضاعف بواسطة آلية الدائرة المتدحرجة *rolling circle replication* (راجع الفصل الثالث). يعبر شريط مفرد من الـ DNA من خلال جسر الاقتران ويدخل في الخلية المستلمة حيث يتضاعف الشريط الأول ليتكون شريطه الآخر المكمل له.



شكل (8.9): آلية تضريب نوع $F^+ \times F^-$ (تصميم المؤلف).

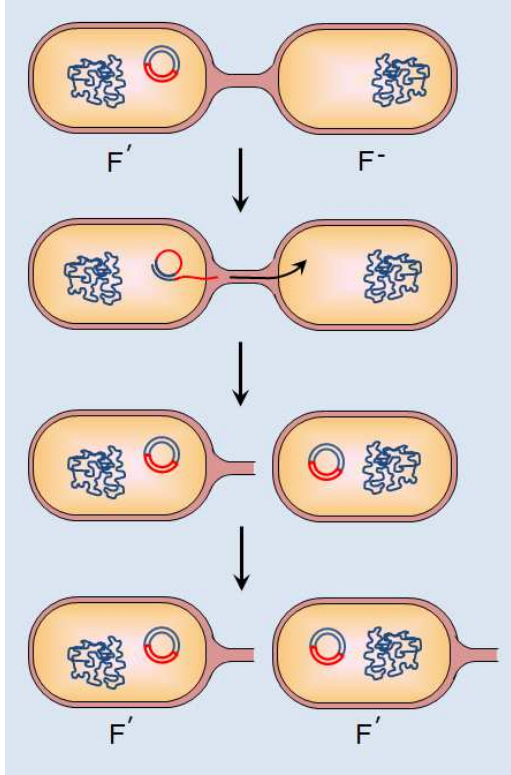
تفسر هذه العملية خواص التضريب من النوع $F^+ \times F^-$. هنا يتحول المستلم إلى F^+ ، بينما يبقى الواهب F^+ وهناك تردد واطئ من نقل جينات الكروموسومات الواهبة. وفي الحقيقة، كما هو مبين في أعلاه لا يوجد هناك نقل لجينات الكروموسومات الواهبة. وفي الواقع العملي، هناك مستوى قليل لنقل جينات الكروموسومات الواهبة في مثل هكذا حالات.



2. آلية تضريب نوع $Hfr \times F^-$ (شكل 9.9): (يطلق على سلالة بكتريا القولون ذات عامل الخصوبة المنحسر التي توفر عمليات إعادة ارتباط وبتردد عالي بـ high frequency recombination (Hfr): ويتضمن هذا النوع من التضريب ثلاث خطوات: أولها تكوين الهلب (أنظر أعلاه). ينتقل الـ DNA في الخطوة الثانية حيث ينشق الـ DNA عند أصل النقل ويتضاعف البلازميد بواسطة آلية الدائرة المتحركة. ولكن الـ DNA الذي ينتقل أولاً هو الكروموسوم. واعتماداً على الموقع والاتجاه الذي انحسر فيه عامل الخصوبة في الكروموسوم، تنتقل جينات كروموسومية مختلفة وبأوقات مختلفة. عموماً، يبقى نظام النقل والمسافات بين الجينات ثابتة.

شكل (9.9): آلية تضريب نوع $Hfr \times F^-$ (تصميم المؤلف).

أ. لحالة الوحيدة التي ينتقل فيها عامل الخصوبة هي حالة انتقال الكروموسوم البكتيري بأكمله. وبهذا، لا تأخذ الخلية المستلمة عامل الخصوبة F factor في حالة حدوث التضريب من نوع $Hfr \times F^-$. أما الخطوة الثالثة، فهي إعادة الارتباط المتماثل، وفيها تحدث عملية إعادة الارتباط بين الـ DNA المنقول والكروموسوم والتي تنتج في تبادل المادة الوراثية بين الواهب والمستلم. تفسر هذه الآلية المواصفات التي يتمتع بها التضريب من نوع $Hfr \times F^-$ ، حيث تبقى الخلية المستلمة كما هي F^- ، ويبقى الواهب Hfr ويوجد هناك تردد عالي للنقل لجينات الكروموسومات الواهبة.



3. آلية تضريب نوع $F' \times F^-$ (شكل 10.9): ويتضمن ثلاث خطوات: أولها تكوين الهلب. الخطوة الثانية هي انتقال الـ DNA وهي مشابهة للتضريب من نوع $F^+ \times F^-$. وعلى أية حال، بما أن عامل الخصوبة نوع F' محمل ببعض الجينات الكروموسومية فإن الأخيرة سوف تنتقل معه. أما الخطوة الثالثة وهي عملية إعادة الارتباط المتمائل فهي غير ضرورية على الرغم من إمكانية حدوثها. تفسر هذه الآلية الموصفات التي تميز التضريب من نوع $F' \times F^-$ ، حيث يتحول F^- إلى F' ويبقى F' على حاله دون تغيير، كما أن هنالك تردد عالي لنقل جينات كروموسومية واهبة أخرى.

شكل (10.9): آلية تضريب نوع $F' \times F^-$ (تصميم المؤلف).

أهمية الاقتران

تعد طريقة الاقتران هي الطريقة الأساسية لنقل الجينات بين البكتريا السالبة لصبغة غرام. يمكن أن يحدث النقل بين أنواع مختلفة من البكتريا.

إن نقل عدة مقاومات للمضادات الحيوية يمكن أن يتم بواسطة عملية الاقتران والتي قد أصبحت مشكلة أساسية في علاج أمراض بكتيرية معينة. وبما إن الخلية المستلمة أصبحت واهبة بعد انتقال البلازميد فمن السهولة رؤية سبب تحول المستعمرة الحساسة إلى مقاومة بعد انتقال الجين المقاوم للمضاد الحيوي على البلازميد إليها.

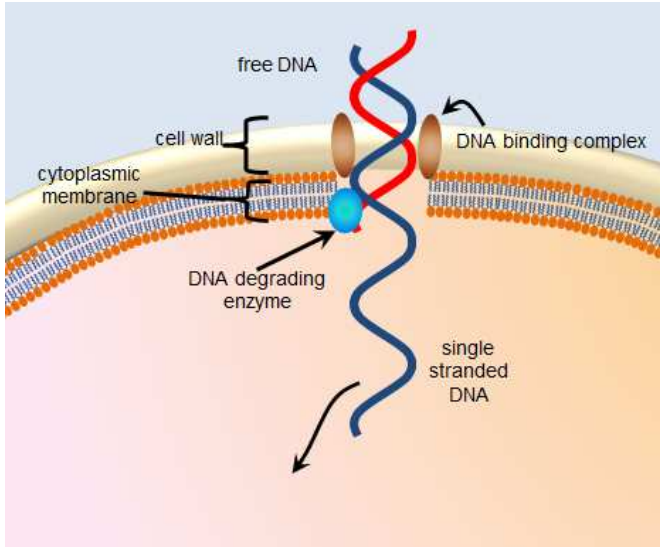
ثانياً: التحول transformation



Frederick Griffith

التحول هو النقل الجيني الناتج من أخذ الـ DNA العاري من قبل الخلية المستلمة. يمكن لبعض البكتيريا أن تستلم قطع من الـ DNA من الوسط الخارجي. ويمكن أن يكون مصدر هذا الـ DNA خلايا أخرى من نفس النوع أو من أنواع أخرى. وفي بعض الحالات، يمكن للـ DNA أن يتحرر من الخلايا الميتة. وعلى أية حال، يمكن للـ DNA المستلم أن ينحشر في كروموسوم الخلية المستلمة. وإذا كان هذا الـ DNA يعود إلى طراز جيني مختلف عن الخلية المستلمة، فيمكن للطراز الجيني للخلية المستلمة أن يتحول بشكل دائم في عملية التحول (transformation). وكما بينا سابقاً (راجع الفصل الأول)، استطاع العالم

Frederick Griffith اكتشاف تلك العملية في بكتيريا *Streptococcus pneumonia* عام 1928. ومن الجدير بالذكر هنا، إن الطريقة التي ينحشر فيها الـ DNA بالكروموسوم البكتيري في عملية التحول هي مماثلة لتضريب من نوع Hfr X F-، ولكن في الاقتران، ينتقل الـ DNA من خلية حية إلى أخرى من خلال الاتصال المباشر، بينما في التحول، يتم استلام قطع DNA خارجية معزولة من خلال الجدار الخلوي والغشاء البلازمي. يوضح الشكل (11.9) طريقة عامة لكيفية حدوث هذه العملية.



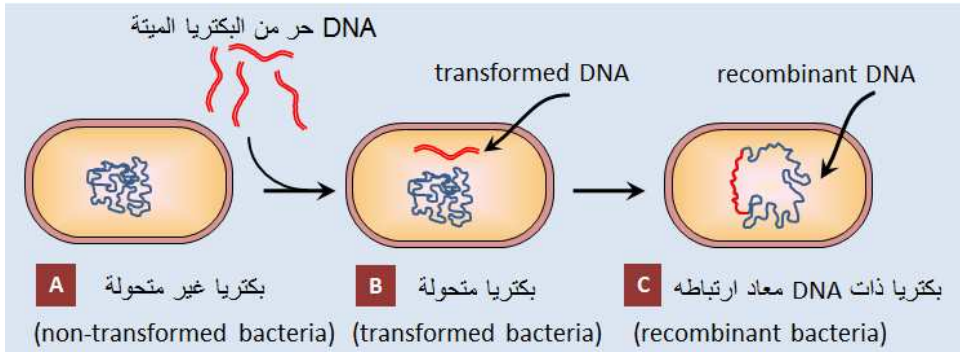
شكل (11.9): كيفية حدوث التحول في البكتيريا الموجبة لصيغة غرام. وفيه مخطط لكيفية التقاط الـ DNA المتحرر من الخلايا البكتيرية الميتة. وفي الوقت الذي تقوم به المعقدات المرتبطة بالـ DNA على سطح الخلية البكتيرية باستلام الـ DNA، تقوم انزيمات معينة بتقطيع شريط DNA مفرد إلى نيوكليوتيدات، أما الشريط الآخر فيحتمل أن ينحشر بالكروموسوم البكتيري (تصميم المؤلف).

هنالك عاملين أساسيين يؤثران على التحول: العامل الأول هو حجم الـ DNA وحالته، حيث أن حجم حلزون الـ DNA المزدوج المثالي لإجراء عملية التحول هو 5×10^5 دالتون، ويجب أن يمتلك هذا الـ DNA الغريب مواصفات معينة لكي ينحشر في كروموسوم العائل (أنظر ملحق هذا الفصل). كما يوصف التحول بحساسيته للإنزيمات الهاضمة للأحماض النووية nucleases في البيئة. يتمثل العامل الثاني بكفاءة الخلية المستلمة أو بجهوزية الخلية المستلمة لإجراء التحول. تتميز بعض البكتيريا بقدرتها على أخذ الـ DNA بصورة طبيعية. وعلى أية حال، تأخذ هذه البكتيريا الـ DNA فقط في وقت محدد في دورة نموها، يتمثل هذا الوقت بقدرتها على إنتاج بروتين يطلق عليه بعامل الكفاءة competence factor. وعند تلك المرحلة، يمكن أن يطلق على تلك البكتيريا وصف "كفوءة". إن أنواع بكتيرية أخرى لا يمكن لها أن تأخذ الـ DNA بشكل طبيعي. وعلى أية حال، في تلك البكتيريا يمكن استحثاث البكتيريا خارج جسم الكائن الحي بواسطة بعض المواد الكيميائية (كما في كلوريد الكالسيوم CaCl_2).

آلية التحول

بشكل عام، يمكن اختصار خطوات التحول البكتيري بخطوتين، الأولى استلام الـ DNA الغريب والثانية انحشاره في كروموسوم الخلية المستلمة (شكل 12.9).

1. أخذ الدنا DNA uptake: يختلف أخذ الـ DNA من قبل البكتيريا الموجبة لصبغة غرام Gram positive bacteria عن تلك البكتيريا السالبة للصبغة Gram negative bacteria. يؤخذ الـ DNA في البكتيريا الموجبة لصبغة غرام بشكل جزيئة مفردة الشريط بينما يصنع شريطه المكمل في خلية المستلم. وبالتناقض، تأخذ البكتيريا السالبة لصبغة غرام جزيئة الـ DNA بشكل مزدوج الشريط.



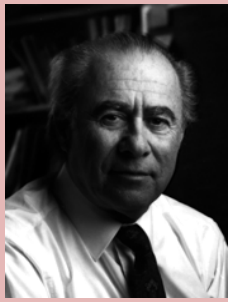
شكل (12.9): عملية التحول: تأخذ البكتيريا تحت الظروف الملائمة قطعاً من الـ DNA العاري من البيئة الخارجية. وربما تعبر قطعة الـ DNA خلال أغلفة الخلية الخارجية بدون مساعدة بروتينية أو فيروسية. وحال دخول تلك القطعة في الخلية البكتيرية، يجب أن يحدث إعادة ارتباط بينها وبين الكروموسوم لمنع تحطّمها بالإنزيمات المحطمة الخارجية والداخلية (تصميم المؤلف).

2. إعادة الارتباط المتماثل homologous recombination: بعد أخذ الـ DNA، تحدث عملية إعادة الارتباط المتبادل reciprocal recombination بين الكروموسوم والـ DNA الواهب. تحتاج عملية إعادة الارتباط هذه إلى وجود مناطق متماثلة بين الـ DNA الواهب والكروموسوم وتنتج في استبدال الـ DNA بين الواهب والمستلم كما هو في الشكل (12.9). ويمكن أن ينتقل بنجاح فقط الـ DNA بين الخلايا البكتيرية ذات الصلة القريبة جداً من بعضها، بسبب وجود مناطق التماثل بين التسلسلات الواهبة والتسلسلات المستلمة.

أهمية التحول

بين الباحثون بأن لعملية التحول أهمية تتمثل بزيادة الضراوة. وقد استخدمت عملية التحول كأداة أساسية في العديد من الأبحاث البكتيرية بسبب إمكانية تحول الطراز الوراثي للسلالة البكتيرية بشكل متعمد وبشكل متخصص جداً عن طريق التحول. وعلى سبيل المثال، استخدم الباحثون التحول بشكل واسع في تجارب الهندسة الوراثية وفي عمليات كلونة الجينات منذ مراحلها التطورية الأولى (أنظر الفصل الحادي عشر).

ثالثاً: النقل transduction



Norton Zinder

أن النقل أو الـ transduction هو انتقال المعلومات الوراثية من البكتيريا الواهبة إلى البكتيريا المستلمة بواسطة العاثيات البكتيرية، حيث تمثل العاثيات البكتيرية نواقل للمادة الوراثية في هذه العملية. يقوم غلاف العاثي بحماية العاثي البكتيري من الظروف القاسية المتواجدة في المحيط الخارجي، وبهذا، يختلف النقل transduction عن التحول transformation في أن الأول لا يتأثر بالإنزيمات الهاضمة للأحماض النووية nucleases. في عام 1951، استطاع Jashua Lederberg و Norton Zinder من اكتشاف عملية النقل من خلال دراستهما لعملية إعادة الارتباط

في بكتيريا *Salmonella typhimurium* وأيضاً قاموا باستخدام نفس الأسلوب المتبع في اكتشاف ظاهرة الاقتران، حيث استخدموا سلالتين طافرتين غذائياً لا ينمو كل من السلالتين عند تنميته في وسط متطلبات التغذية الدنيا، وعند خلط السلالتين معاً ظهرت سلالة الـ prototroph البرية بنسبة خلية واحدة إلى عشرة الآلاف (لحد الآن هذه الطريقة مشابهة تماماً لتجربة الاقتران الجارية في بكتيريا القولون). بعد ذلك، قاما بتنمية السلالتين بنفس الأسلوب الذي عمله Davis في تجربته التي أثبت حدوث الاقتران فيها (تجربة U tube)، ولكن حدثت المفاجئة هنا حيث على الرغم من فصل كل السلالتين بنفس الراشح الذي

استعمله Davis في أنبوب U، إلا أنه تكونت خلايا الـ prototroph البرية. وهذا يعني عدم حصول اقتران بين السلالتين. وبتحوير حجم ثقب ذلك الأنبوب وجد Lederberg و Zinder العامل المسؤول عن الانتقال الجيني هو بنفس حجم العاثي P22 الذي يصيب بكتريا السالمونيلا. وتم تأكيد هذا الاستنتاج بعد عدة تجارب مناعية. وبهذا يعد Lederberg و Zinder أول من وصف تلك العملية بالنقل (transduction). وقيل التطرق في تفاصيل آليات النقل لأبد لنا من معرفة بعض المصطلحات المهمة في وراثة العاثيات البكتيرية (bacteriophages genetics). يطلق مصطلح عاثي بكتيري (bacteriophage) على الفايروسات التي تصاب بها البكتريا حصراً. وتسلك العاثيات البكتيرية عند اصابتها للبكتريا العائل سلوكين، فأما أن تقوم بالتضاعف وقتل وتحليل خلية المضيف والتحرر بعد فترة وجيزة ويطلق عليها في هنا بالعاثيات الضارية (virulent phages)، أو أنها تنحسر في الكروموسوم البكتيري بواسطة إعادة الارتباط المتخصص (راجع الفصل السابع) لمدة معينة بدون قتل العائل ليطلق عليها بالعاثيات الغير ضارية (non-virulent phages) أو بالعاثيات المؤنثة (temperate phages). ويطلق على العاثي المنحسر بالكروموسوم البكتيري بالعاثي الأولي (prophages) وذلك لأنه يتصرف وكأنه فرد من العائلة الكروموسومية. ويطلق على البكتريا الحاوية على تلك العاثيات الكامنة بالمتحللة (lysogenic) وذلك لأن العاثي تحت الظروف الملائمة ربما يتحرر من الكروموسوم البكتيري وتتحول الخلية إلى المرحلة الحالة (lytic). ويمكن حث تحول الخلية البكتيرية من المتحللة إلى الحالة إما بواسطة الأشعة فوق بنفسجية أو الأشعة السينية أو عن طريق بعض المواد الكيميائية.

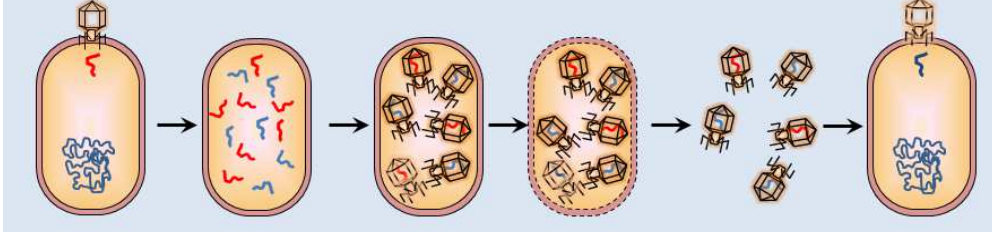
آليات النقل transduction mechanisms

إن قدرة العاثي على أن يتوسط عملية النقل تتعلق بدورة حياة العاثي. وهذا ينعكس بطبيعة الحال على الآلية التي من خلالها يمكن لهذا العاثي نقل المادة الوراثية.

1. النقل العمومي generalized transduction: وهو النقل الذي بواسطته يحتمل أن ينتقل "أي جين" من الواهب إلى المستلم عن طريق بعض العاثيات البكتيرية. يحتاج هذا النوع من النقل إلى عاثيات ضارية تحلل خلايا المضيف. إن آلية النقل العمومي مبينة في الشكل (13.9).

أثناء تضاعف تلك العاثيات، عادة ما يتعرض الـ DNA إلى التحطم إلى قطع أصغر. تتعقب بعض من تلك القطع الكروموسومية أحياناً إلى رأس العاثي بدلاً من جينات العاثي نفسه بالية تعرف "بالآلية الرأس الممتليء head-full mechanism". أحياناً، تعقب أحد قطع DNA العائل عشوائياً في غلاف العاثي. وبهذه الطريقة، يمكن لأي جين واهب من أن ينتقل ولكن على شرط أن يشكل ما يكفي من الـ DNA ليلائم رأس العاثي. إذا تعرضت

الخلايا المستقبلية للخمج من قبل العاثيات التي تحتوي على الـ DNA الواهب، يمكن للـ DNA الواهب أن يدخل إلى الخلايا المستلمة. وفي داخل تلك الخلايا، يمكن لعملية إعادة الارتباط المتماثل أن تحدث والتي تستبدل الـ DNA الواهب بالـ DNA المستقبل (أنظر الشكل 13.9).

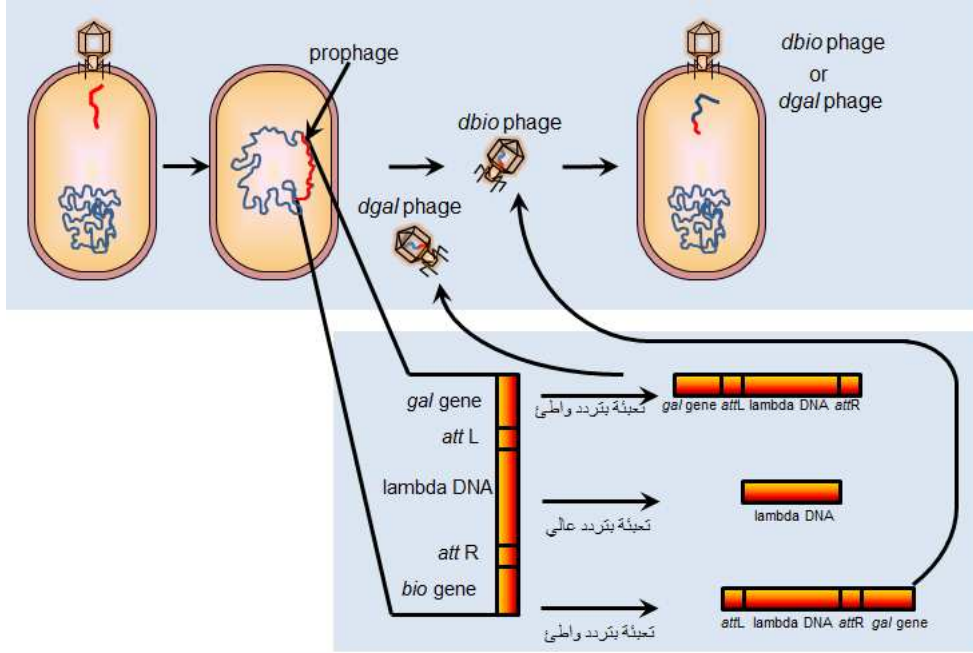


شكل (13.9): آلية النقل العمومي للجينات البكتيرية بواسطة العاثي (تصميم المؤلف).

وبهذه الطريقة، يجمع العاثي الذي يحمل الـ DNA البكتيري خلية بكتيرية أخرى. ويمكن لهذا الـ DNA البكتيري أن ينحسر في كروموسوم الخلية المستلمة بواسطة إعادة الارتباط المتماثل. تعتمد عدة عاثيات هذه الآلية في النقل ولكن العاثي P22 يعد مثالاً نموذجياً لهذه الآلية. ولعل الذي يتتبع كيفية حدوث النقل العمومي لابد له من أن يدرك أن تلك العملية نادرة الحصول لأنها تستوجب توفر ثلاث شروط في العاثي لكي يكون قادراً على ذلك وهي: أن يكون له المقدرة على تحطيم كروموسوم المضيف، وأن لا تحدث آلية دقيقة لتعبئة كل الـ DNA التابع له في رأس العاثي وذلك لاستيعاب الـ DNA العائل، وأن تكون الجينات المنقولة من قبل العاثي قادرة على إعادة الارتباط مع كروموسوم الخلية المستقبلية.

2. النقل الخصوصي specialized transduction: النقل الخصوصي هو عملية النقل والتي بواسطتها يمكن "للجينات المتاخمة لانشطار العاثي فقط" أن تنتقل إلى الخلايا المستلمة. يحتاج هذا النوع من النقل إلى عاثيات غير ضارية أو مؤقتة تندمج في كروموسوم المضيف. أن الجينات التي تنتقل تعتمد على أين يحشر العاثي الأولي (prophage) نفسه في الكروموسوم، ولكن تعد آلية النقل الخصوصي الموضحة في الشكل (14.9) في العاثي لأمدا مثلاً نموذجياً لهذه الآلية. تحدث هذه الحالة أحياناً عندما يروم العاثي قص نفسه ليخرج من الكروموسوم البكتيري حينما ينتشط، حيث يحدث أحياناً قص غير طبيعي في الكروموسوم البكتيري. وهذا ينتج في أن العاثي الناتج يحمل الجينات المتاخمة له ويترك بعض جيناته بسبب استيعابه المحدود للمادة الوراثية. يؤدي ذلك إلى إنتاج عاثي معاب (defective phage) بسبب تركه لبعض الجينات خلفه في كروموسوم العائل. ولكنه في نفس الوقت قد اكتسب جينات بكتيرية كما في الجين *gal* أو *bio*. تدعى هذه العاثيات بالـ *dgal phages* أو بالـ *dbio phages*. ويمكن لهذا الـ DNA الغير طبيعي الحامل للجينات المتاخمة من أن

يتعبأ برأس العائى وأن يخمج خلايا بكتيرية أخرى. وبهذه الطريقة، يمكن أن تنتقل جينات الخلية الواهبة الى الخلية المستلمة. كما يمكن أن تحصل عملية إعادة الارتباط المتماثل بين الجينات الواهبة والمستلمة.



شكل (14.9): آلية النقل المتخصص: عندما يدخل العائى لامدا في الدورة التحليلية ويكون دقائق العائى، يقوم بتعبئة الـ DNA خاصته (lambda DNA) بين موقعي ارتباطه الأيسر (attR) والأيمن (attL). أحياناً يحدث خطأ، ويتعبأ جزء من DNA الكروموسوم البكتيري. وبما أن العائى لامدا ينحسر بين جيني gal و bio لكروموسوم بكتيريا القولون، فغالباً ما يحتوي رأس العائى المعاب على احدى الجينين (تصميم المؤلف).

أهمية النقل

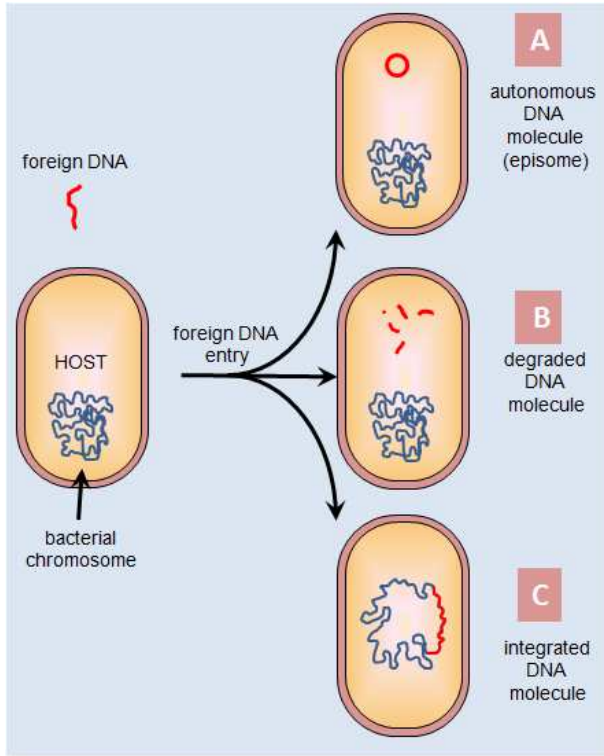
لعملية النقل أهمية ملموسة تتمثل بحصول تحول للعائيات المتحللة في الطبيعة كما أنها تعتبر مصدراً للسلالات البكتيرية الضارية. تستخدم العائيات في تجارب الهندسة الوراثية كنواقل حيث يحشر فيها الـ DNA الغريب المعزول من أي كائن (أنظر الفصل الحادي عشر). هذا وقد استغللت قدرة العائيات على حمل قطع صغيرة من الـ DNA واستخدمت كأداة طيعة في معرفة خرائط الجينات البكتيرية وفي معرفة تسلسل الواسمات البكتيرية.

ملحق الفصل التاسع

مصير الـ DNA الغريب في النظام البكتيري

بصرف النظر عن الآلية التي يسلكها الـ DNA في دخوله الى الخلية البكتيرية، فإن له ثلاث احتمالات مختلفة. حيث يمكن أن يبقى كجزيئة DNA مستقلة، أو يمكن أن يتحطم بشكل كامل، أو يبقى جزء منه بعد انحشاره أو بواسطة اعادة ارتباطه من كروموسم العائل قبل أن تتحطم بقية أجزاءه (شكل 15.9). ولكي يبقى الـ DNA القادم داخل الخلية البكتيرية كجزيئة DNA ذات تضاعف ذاتي، فإنه يجب أن يكون جزيئة قادرة على التضاعف الذاتي (replicon)، وبمعنى آخر، يجب أن يمتلك أصل التضاعف ويجب أن يفتقد للنهايات المكشوفة، أي يجب أن تكون الجزيئة دائرية عادة في معظم الأنواع البكتيرية. كما في البلازميد والذي يمتلك أصل التضاعف بالإضافة الى شكله الدائري، ومن هنا، تعد عملية اعادة الارتباط غير ضرورية لبقاء البلازميد. ولهذا، استغلت هذه الظاهرة في تجارب الهندسة الوراثية حيث يتم حشر الجين المرغوب في جزيئة البلازميد (أنظر الفصل الحادي عشر).

أما ان لم تكن تمتلك تلك الخواص كأن تكون خطية الشكل فإنها عادة ما تتحطم عن طريق الانزيمات المحطمة الخارجية exonucleases والتي تهاجم النهايات المكشوفة. لذا، يجب عليها كي تبقى أن تنحشر في كروموسوم الخلية المستقبلة بواسطة اعادة الارتباط (أنظر الفصل التاسع). ولكي تحصل عملية اعادة الارتباط، يجب أن يكون يحتوي الـ DNA الغريب مناطق متماثلة التسلسل مع كروموسوم الخلية البكتيرية المستقبلة لكي تتعابر معها. وبالنتيجة، تنحشر الجينات القادمة من الـ DNA الغريب وتحل محل الجينات الأصلية للخلية المستقبلة. لكن لا تحصل عملية اعادة الارتباط المتماثل الا بين جزيئات الـ DNA قريبة الصلة من بعضها البعض، كما في الـ DNA لسلاطين مختلفتين يعودان لنوع بكتيري واحد. ويمكن للـ DNA بعيد الصلة أن ينحشر أيضاً بواسطة اعادة الارتباط ان كان محاطاً بتسلسلات ذات صلة بالخلية المستلمة. أما اذا احتوى الـ DNA الغريب على عناصر قفازة، يمكن لها أن تتركه وتقفز في كروموسوم العائل الجديد.



شكل (15.9). المصير الذي تواجهه جزيئات الـ DNA الغريبة بعد دخولها في الخلايا البكتيرية. ففي الحالة (A) يتصرف الـ DNA الغريب بشكل مستقل بسبب عدم احتوائه على النهايات الحرة الموجودة في الجزيئات الخطية. أو في الحالة (B) يتحطم الـ DNA الغريب من قبل الانزيمات الهاضمة، أو في الحالة (C) ينحسر الـ DNA الغريب في كروموسوم العائل بواسطة عملية إعادة الارتباط المتماثل.

بالإضافة إلى الهجوم الذي تشنه الانزيمات الهاضمة الخارجية والذي تتعرض له جزيئة الـ DNA الغريبة، فإنها تعد عرضة أيضاً للتقطيع من قبل صنف آخر من الانزيمات الهاضمة وهي انزيمات الهضم الداخلية وتدعى بالانزيمات القاطعة (أنظر الفصل الحادي عشر). صمم الباري جل وعلا تلك الآلية الوقائية لتحطيم جزيئة الـ DNA الغريبة القادمة. تقوم البكتيريا بتلك العمليات الصارمة وذلك لافتراضها المسبق أن كل DNA غريب هو DNA عائد لعدو ما، كما في الفايروسات مثلاً، لذا، يجب أن يتم تقطيعه إلى أجزاء صغيرة بتلك الانزيمات القاطعة. ولكن يمكن لبعض العاثيات أن تنجو من هذا العمل الصارم وذلك عن طريق مثيلة (methylation) تسلسلاتها المستقبلية، لذا، تتقبلها البكتيريا وتعتبرها كجزء لا يتجزء من مادتها الوراثية. وقد استغلت هذه الظاهرة في الهندسة الوراثية أيضاً في حماية الـ DNA الغريب بعد ادخاله إلى خلية المضيف. يتضح لنا هنا، أن دراسة الأحياء المجهرية، وبالأخص تتبع مصير الـ DNA الغريب الداخل بواسطة عمليات الاقتران أو التحول أو النقل قد قدم خدمة كبيرة في وضع الأعمدة الأساسية لتجارب كلونة الجين كما سيتضح لنا ذلك في الفصل القادم.

أسئلة الفصل التاسع

السؤال الأول: علل ما يلي

يكون نقل المادة الوراثية في البكتيريا ذو اتجاه واحد فقط؟
 بدلاً من أن يطلق على خليتين بكتيريتين مقترنيتين بالذكر والأنثى يطلق عليهما بالواهب والمستلم؟
 لا يمكن (عملياً) نقل الكروموسوم كاملاً أثناء عملية الاقتران البكتيري؟
 أحياناً عند تناول المريض للمضاد الحيوي، لا يؤدي هذا المضاد دوره المانط به في قتل البكتيريا الحساسة له؟
 يطلق على البكتيريا الحاوية على العاثيات الكامنة بالبكتيريا المتحللة (lysogenic)؟
 يمكن لأي جين أن ينتقل عبر النقل العمومي ولكن لا يمكن إلا لجينات محدودة من أن تنتقل عبر النقل الخصوصي؟
 تنجح بعض العاثيات البكتيرية في خمج بعض الأنواع البكتيرية على الرغم من المعاملة الصارمة التي تتلقاها العاثيات أو أي قوة غازية أخرى من قبل البكتيريا؟
 قد ينجح الـ DNA الغريب بعد دخوله الخلية البكتيرية في الانحشار في الكروموسوم على الرغم من عدم امتلاكه أي تسلسل متماثل مع ذلك الكروموسوم؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

- عندما يحصل اتصال مباشر، يتم حماية الـ DNA المنتقل من الخلية الواهبة الى المستلمة عن طريق
- a. DNA binding proteins b. conjugation bridge c. cell membrane of competent cells d. cell wall of competent cells
- تعتبر طريقة أحد الوسائل التي تتمكن من خلالها البكتيريا بتنوع محتواها الوراثي.
- a. horizontal gene transfer b. vertical gene transfer c. only "a" and "b" d. cell division
- عند حصول الاقتران، ينتقل بلازميد الخصوبة بواسطة آلية التضاعفية من الخلية الواهبة الى الخلية المستلمة.
- a. unidirectional theta b. bidirectional theta c. rolling circle d. D loop
- يمكن للخلية البكتيرية أن تستلم DNA متحرر من خلايا ميتة وذلك في عملية تدعى بالـ
- a. transformation b. conjugation c. transduction d. non
- يطلق على العاثي المنحشر بالكروموسوم البكتيري بـ وذلك لأنه يتصرف وكأنه فرد من العائلة الكروموسومية.
- a. virulent phage b. non-virulent phage c. temperate phage d. prophage
- عندما تدخل جزيئة DNA دائري حاوية على منشأ التضاعف، فإنها بواسطة الخلية البكتيرية عادة.
- a. treated like episome b. degraded by exonuclease c. degraded by restriction enzyme d. only "b" and "c"
- ان الطريقة التي ينحشر فيها الـ DNA بالكروموسوم البكتيري في عملية التحول هي مماثلة لتضريب من نوع
- a. $F^+ \times F^-$ b. $Hfr \times F^-$ c. $F' \times F^-$ d. non
- يطلق على الخلايا البكتيرية التي لها القدرة على استلام الـ DNA الغريب بالـ
- a. natural cells b. compenent cells c. transformed cells d. transfected cells
- عندما تتعرض البكتيريا الى عملية النقل العمومي من قبل عاث ما، لا بد لها أن تسلك مسلك الـ
- a. only lytic b. only lysogenic c. both lytic and lysogenic d. non

السؤال الثالث: عرف ما يلي

prototrophs, episome, *tra* region, pili, Hfr, F', *oriT*, full head mechanism, *dbio* phage

السؤال الرابع: صل المفردات الموجودة في اليمين مع ما يناسبها في اليسار

F ⁺ X F ⁻	Bacteriophage
Hfr X F ⁻	Direct cell contact
F' X F ⁻	F ⁻ converted to F'
Generalized transduction	High frequency transfer of chromosomes
Specialized transduction	Error during excision
Transformation	Error during packaging
Conjugation	F ⁻ converted to F ⁺
Transduction	Naked DNA transfer

وللمزيد من الاطلاع اقرء:

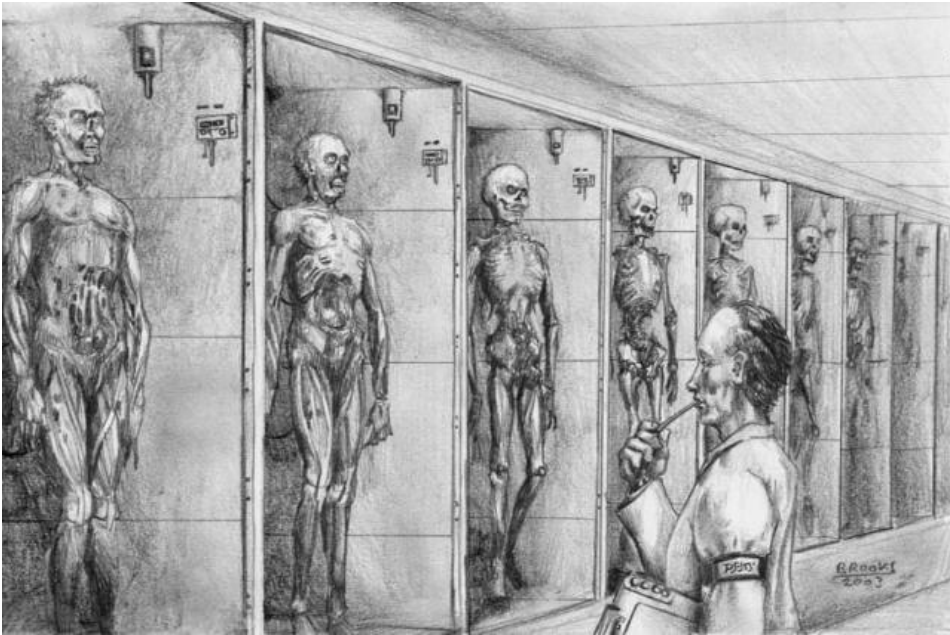
- Alberts B.**, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.
- Clark D.** Molecular biology: understanding the genetics revolution. Elsevier, 2010.
- Griffiths A.**, Wessler S., Lewontin R., Gelbart W., Suzuki D., Miller J. An Introduction to Genetic Analysis. Eighth edition, 2004.
- Guttmann B.**, Griffiths A., Suzuki D., Cullis T. Genetics: a beginner guide. Oneworld Oxford, 2004.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557- 580.
- Kayser F.**, Bienz K., Eckert J., Zinkernagel R. Medical microbiology. 2005, Thieme.
- Kresina T.**, F. (2001). An introduction to molecular medicine and gene therapy. Wiley-Liss, Inc.
- Miller, R. V.** 1998. Bacterial gene swapping in nature. *Scientific American* 278(1):66–71.
- Murray et al.** medical Microbiology. Third edition, 2005.
- Novick, R. P.** 1980. Plasmids. *Scientific American* 243(6):103–124.
- Pace, N. R.** 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734–740.
- Passarge E.** Color atlas of Genetics .Second edition, Thieme, 2007.
- Pierce B.** Genetics: A conceptual approach. 2002
- Syvanen M.**, Kado C. Horizontal gene transfer. Second edition, AP academic press, 2002.
- Summers D.** The biology of Plasmid. Blackwell science, 1996.
- Talaro, K.** and Talaro, A. Foundation in microbiology. Fourth edition. The McGraw–Hill, 2002.
- Verma P.**, and Agarwal V. molecular biology. First Edition Schand group, India (2004).

Wollman, E. L., F. Jacob, and W. Hayes. 1962. Conjugation and genetic recombination in *Echerichia coli* K-12. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 21:141–162.

10

الفصل العاشر

مبادئ كلونة الجين



هل سنستيقظ في يوم ما لنرى بأن هذا المشهد أصبح روتينياً؟ هل يمكن أن نصل إلى "انتقاء النسل" بحيث نختار
مانريد من الجينات وننبذ مالا نريد؟

مقدمة

تعرف الهندسة الوراثية genetic engineering أو التلاعب الوراثي genetic manipulation بالتخليق الخارج خلوي لأشكال جديدة أو لاصطفافات جديدة من الـ DNA بحيث تسمح هذه التشكيلات أو الاصطفافات باستمرار الظروف الوراثية المحورة في الطبيعة. ويطلق على عملية التلاعب بالـ DNA خارج جسم الكائن الحي *in vitro* بمصطلح تقنية الدنا الهجين أو recombinant DNA technology. وبشكل واسع، تعني الهندسة الوراثية التلاعب بالجينات تحت ظروف مختبرية مسيطر عليها. وتبرز أهمية الهندسة الوراثية كتقنية حديثة من عدة أسباب رئيسية، منها إنها تسمح بعزل ودراسة جينات مفردة بكميات كبيرة وبنقاوة كاملة. تلك الجينات من الممكن أن يعبر عنها ومن الممكن إعادة استخدامها بالخلايا سواء أكانت من نوع واحد أو من أنواع مختلفة.

حققت تجارب الهندسة الوراثية عدة أهداف عززت الكثير من حقول البيولوجيا عنها كما في حث البكتريا على صنع الهرمونات والنواتج البيولوجية المكلفة والنادرة. إن أفضل مثال معروف لهذا مركبات ثمينة هو الأنسولين insulin وهرمون النمو البشري human growth hormone والرنين rennin. كل هذه المركبات الثلاثة كانت تستخلص قبل اكتشاف الهندسة الوراثية من الحيوانات، كما في الأبقار والخنازير والعجول، أو من جثث البشر. كما أن الأمل يحذو المشغلين في مجال الهندسة الوراثية لاستخدام هذه التجارب في المستقبل لتصحيح بعض الاختلالات الناشئة عن بعض الطفرات كما في فقر الدم المنجلي sickle cell anemia وفقر الدم الوراثي thalasemia (العلاج الجيني gene therapy) وذلك لتقديم خواص جديدة كما في المبيدات العشبية herbicides أو مقاومة النباتات للتلوج frost resistance for plants أو لإنتاج حيوانات مزرعية أكبر وأفضل. جل تلك الانجازات الكبيرة لهذا العلم أتت من التطور الهائل في مجال كلونة الجين بنجاح في الخلايا المستلمة. لذا سنتعرض في هذا الفصل الى الوسائل الأساسية التي تبين لنا كيف نكلون (نستنسل) جيناً ما خطوة خطوة وصولاً الى تعبير ذلك الجين بنجاح في الخلايا المضيفة.

أدوات كلونة الجين المتعاقبة

هنالك عدة خطوات بايولوجية تستخدم لتنفيذ التلاعب في المادة الوراثية للقيام بكلونة جين محدد. لكن قبل التطرق لها لابد لنا من معرفة أن العديد من تجارب التلاعب بالـ DNA تحتاج كميات (أو نسخ) غزيرة من قطعة DNA محددة. ولأجل الحصول على كميات غزيرة من تلك النسخ علينا أن نضع جزيئة الـ DNA تلك في الخلية البكتيرية، ثم نسمح

الخلية المستقبلية بمضاعفة تلك القطعة. وتسمى هذه الخطوات "بكلونة الجين"، بسبب انتاج نسخ متماثلة من قطعة الـ DNA الأصلية. ولأجل القيام بذلك عملياً، عادة ما يحشر الجين في ناقل (vector) ما لتكوين جزيئة DNA هجينة. ويعمل الناقل كمركبة لتقديم الجين الى خلية العائل ولتوجيه تضاعفه بالشكل المطلوب ولتمكينه من التعبير عن نفسه في بعض الحالات لانتاج البروتين الهجين (شكل 1.10). تنتج الخلية العائل التي أدخل إليها الناقل الهجين جيلاً يحتوي كله على الجين المحشور. تدعى تلك الخلايا المتماثلة بخلايا النسيطة أو "clones". وفي خلية العائل المتحولة وفي نساقلها، يقوم الجين المحشور بالتعبير عن نفسه في بعض الحالات حيث يستنسخ ويترجم الى البروتينات الهجينة.

اذن، لكلونة جين ما بشكل تقليدي، يجب توفر أدوات يتم بواسطتها عزل المادة الوراثية الحاوية على ذلك الجين، وتتوفر الآن عدة وسائل يمكن للباحث من خلالها عزل المادة الوراثية وبسهولة. وبعد ذلك، يجب فصل ذلك الجين عن بقية الجينات الموجودة في المادة الوراثية المعزولة، وللقيام بذلك تتوفر عدة انزيمات قاطعة التي تقص الجين المعني من كلا جانبيه، ثم يجب توفر أدوات لازمة تربط ذلك الجين بالناقل الجيني المناسب، (كما في الانزيمات اللاحمة) وذلك بعد قطع الناقل الجيني بنفس الانزيم القاطع الذي استخدم لعزل الجين المعني عادة. وبعد تكوين جزيئة الناقل الهجينة يجب توفر أدوات أخرى تتكفل بادخال تلك الجزيئة الهجينة داخل خلايا العائل. وفي النهاية، لابد من توفر الأدوات التي تمكن الباحث من معرفة أو انتقاء النساقل الحاوية على تلك الجزيئات الهجينة. تشكل تلك الأدوات الدعام الأساسية في كلونة الجين والتي هي ليست صعبة على الفهم لدى القارئ المبتدئ، ولهذا سنستعرض تلك الأدوات تباعاً لتكتمل لنا الصورة حول كيفية كلونة الجين.

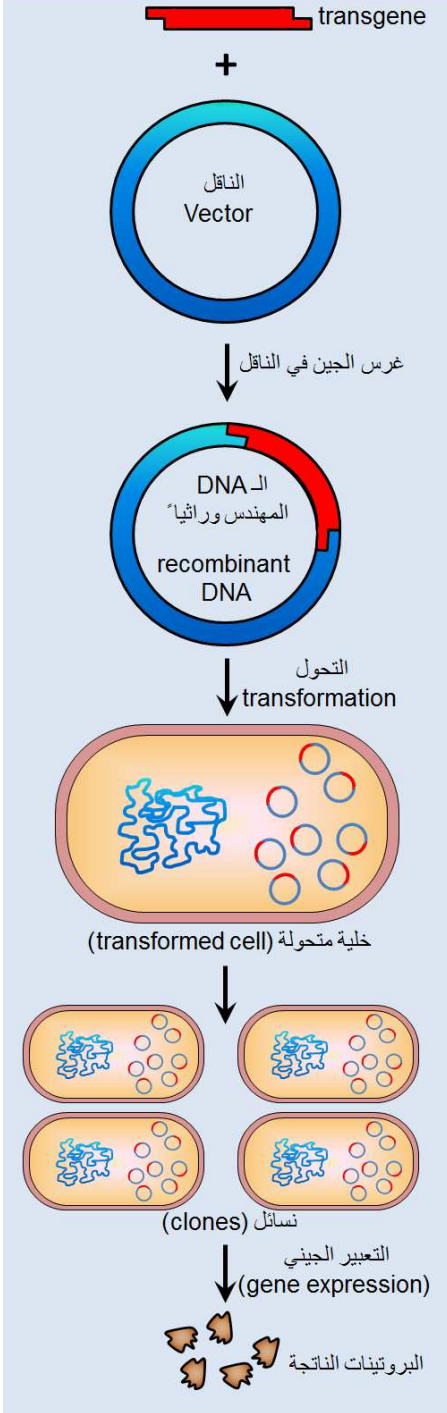
أولاً : أدوات عزل الـ DNA الحاوي على الجين المرغوب

قبل كلونة أي جين في تجارب الهندسة الوراثية لابد لنا من الحصول عليها أولاً بكميات كافية. يتم ذلك من خلال ثلاث طرق تختلف باختلاف مواصفات قطعة الـ DNA المرغوبة والغرض من كلونتها. في الطريقة الأولى، يمكن للباحث فيها أن يستخلص كل الـ DNA من الكائن، ثم يقطع ذلك الـ DNA الى قطع متعددة، ويعزل القطعة المراد دراستها، ثم يقوم بكلونتها بالنهاية. أو، يمكن كلونة كل القطع بواسطة ناقل ملائم، ثم تختبر كل نسيطة (clone) بالنسبة لوجود الجين المرغوب من عدمه. أو يمكن تخليق قطعة الـ DNA المرغوبة بشكل مباشر، ليتم كلونتها بعد ذلك (أنظر الفصل الحادي عشر).

ثانياً: أدوات قطع ولحم الـ DNA

بعد الحصول على المادة الوراثية الحاوية على الجين المرغوب وبنقاوة عالية، نحتاج الآن الى عزل ذلك الجين عن بقية المادة الوراثية للخلية الواهبة. ولأجل ذلك، لابد من توفر وسيلة تقوم "بقص" ذلك الجين من طرفيه. ربما كان مجرد التفكير بوجود انزيمات معينة يمكن لها أن تعمل "كمقصات خلوية" لقطعة الجين المرغوبة شيئاً من الخيال.

شكل (1.10). مخطط عام لعملية الكلونة الجينية التقليدية. بعد عزل الجين أو قطعة الـ DNA المراد كلونتها، يتم ربط تلك القطعة مع الناقل الجيني المناسب لتكوين جزيئة DNA هجينة. يتم ادخال تلك الجزيئة الهجينة الى الخلايا المستلمة بواسطة عملية التحول. تقوم الخلية المستلمة بالتعبير عن نواتج الجين المكون فيها (تصميم المؤلف).





Werner Arber



Hamilton Smith



Daniel Nathans



Herbert Boyer



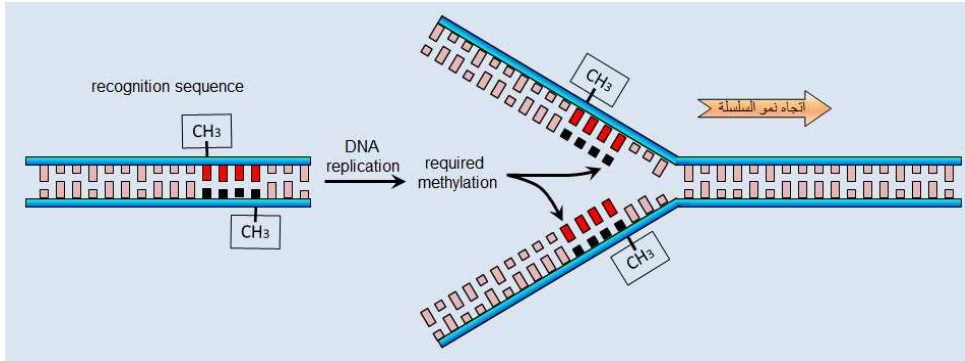
Stanley Cohen



Berg

بدأ هذا الخيال يتحول الى واقع في الخمسينيات من القرن المنصرم بملاحظة أن بكتريا القولون يمكنها أن تقاوم بطريقة ما خمج العاثيات البكتيرية عن طريق "تقييد" (أي تثبيط) تضاعف العاثي الغازي. وفي العام 1962 وجد العالم Werner Arber وجماعته نظام انزيمي يمكن له تثبيط تضاعف العاثي عن طريق شق DNA العاثي حال دخوله الخلية. قام هذا الفريق البحثي بعزل هذا الانزيم من خلايا بكتريا القولون واعتبروه انزيمًا هاضمًا. ولا بد من معرفة أن هنالك عدة أنواع من الانزيمات الهاضمة للأحماض النووية، فانزيمات الـ RNases تقوم بمهاجمة الـ RNA، بينما تقوم انزيمات الـ DNases بمهاجمة الـ DNA. وهنالك نوع من التخصص عموماً في عمل تلك الانزيمات الهاضمة، فبعضها يهاجم الأحماض النووية مفردة الشريط فقط، وتقوم الانزيمات الأخرى بمهاجمة الأحماض النووية مزدوجة الشريط، بينما تقوم نسبة قليلة فقط بمهاجمة كلا النوعين. تقوم الانزيمات الهاضمة الخارجية (exonucleases) بمهاجمة جزيئة الحمض النووي من نهايتها. ومن الجدير بالذكر أن أي نوع من الانزيمات الهاضمة الخارجية يقوم بمهاجمة إحدى نهايتي جزيئة الحمض النووي، أما النهاية 3' أو النهاية 5'، وليس كليهما. وعلى الرغم من أن الانزيمات المكتشفة من قبل Arber وجماعته هي انزيمات هاضمة أيضاً، إلا أنها لا تهضم جزيئة الحمض النووي من الجزء الطرفي، بل تقوم "بشق" جزيئة الحمض النووي داخلياً، وبالتالي اعتبر هذا الانزيم انزيمًا هاضمًا داخلياً (endonucleases)، لأن هذا الانزيم يشق (cleave) الأحماض النووية، وبالطبع تحدث عملية "الشق" ضمن جزيئة الـ DNA. وفي حالة الإصابة بالعاثيات البكتيرية، تقوم انزيمات بكتريا القولون الداخلية تلك بشق DNA العاثي الغازي ولكنها لا تقطع DNA العائل البكتيري. تعتبر عملية "التقييد" تلك جزءاً مما نعرفه الآن بنظام التقييد - التحوير البكتيري (bacterial restriction - modification system)، والذي يحمي البكتريا من خمج العاثيات عن طريق التمييز بين DNA العائل والـ DNA الغريب. وهذا يعني، أن كل الـ DNA البكتيري، ومن ضمنه الـ DNA البلازميد هو DNA يتم حمايته عادة من قبل الميثلة. إن السبب الذي من أجله سميت هذه الإنزيمات بإنزيمات التقييد restriction enzymes هو أن وجودها في البكتريا يقيّد نمو العاثيات البكتيرية (bacteriophages). إذن، وظيفتها التي وجدت من أجلها في الطبيعة تتمثل بحماية العائل البكتيري من DNA الكائنات الحية الغريبة (كما في العاثيات الخاملة infective phages)، فهي بذلك تعتبر إنزيمات دفاعية (defensive enzymes). وهنا لابد لنا من أن نسأل هذا السؤال: إذا واجه نظام التقييد - التحوير الحاي على

انزيمات ميثلة مزدوجة مع انزيمات التقطيع، شريطي DNA غير ميثيلين أحدهما خلوي والآخر غريب، فكيف يتسنى له التفريق بينهما بحيث يحور الأول ويقطع الثاني؟
للإجابة على هذا السؤال لابد لنا من معرفة أن هذا النظام، أي نظام التقييد - التحوير، ينتج تعقيدات إضافية على عملية تضاعف الـ DNA والتي لم تذكر في الفصل الثالث وذلك لغرض التبسيط. يحتوي الـ DNA مزدوج الشريط الخلوي على مجاميع مثيل على كلا شريطي الـ DNA في موقع تمييز الانزيم القاطع. وعندما يخلق التضاعف شريطين جديدين، يفقد هنا أحد الشريطين في كل حلزون مزدوج بنوي لمجاميع المثيل في البداية. إن هذا الـ DNA النصف ميثيل يجب أن لا يميز من قبل الخلية كـ "DNA غريب" ويقطع، وإنما يتم تمييزه كـ "DNA ذاتي" ويحور بواسطة نظام التقييد والتحوير بإضافة المثيل (شكل 2.10). ولهذا السبب، يعمل نظام التقييد - التحوير هذا بشكل بحيث يميز ثلاث حالات مختلفة من ميثلة تسلسلات التمييز وتتخذ واحد من ثلاث أفعال مختلفة. فإذا كان التسلسل غير ميثيل (unmethylated)، يقوم الانزيم القاطع في نظام التقييد بقطعه. وإذا كان الـ DNA ميثيل في أحد شريطيه فقط (hemi-methylated)، يقوم الانزيم المحور (الميثيل) في نظام التحوير بإضافة مجاميع مثيل إلى الشريط الآخر الغير ميثيل (شكل 2.10). أما إذا كان الـ DNA ميثلاً في كلا شريطيه، فإن انزيمات نظام التقييد - التحوير لاتقوم بعمل أي شيء يذكر. وبهذه الطريقة، يعتبر هذا الواسم الميثلي كنقطة تمييز بين DNA العائل والـ DNA الغازي. وبما أن DNA بكتريا القولون هو DNA ميثيل، تعتبره الانزيمات القاطعة لهذا السبب كروموسوماً أصيلاً، وتحمله من شق الانزيمات القاطعة الموجودة في الخلية. أما DNA العائي فهو غير ميثيل، فيعتبر لهذا السبب هدفاً للانزيمات القاطعة لتقييده أو لتقطيعه لمنع بهذه الطريقة تضاعف العائي الغازي داخل الخلية البكتيرية العائل.



شكل (2.10). ميثلة التسلسل التمييز بالاندرومي يستوجب تمييز وميثلة تسلسلين مختلفين على أشرطة الـ DNA البنوية في تضاعف الـ DNA، يشير اللون الأسود إلى الـ تايمين ويشير اللون الأحمر إلى الأدينين (تصميم المؤلف).

في نهاية السبعينيات من القرن المنصرم – وهي الحقبة الذهبية في تطور علم الوراثة الجزيئية – تمكن Hamilton Smith وجماعته من عزل انزيم قاطع جديد وأسموه *HindIII* واشتق هذا الاسم من البكتريا التي عزل منها الانزيم وهي *Haemophilus influenza*. وبعد العزل، استخدمه Daniel Nathans في قطع الـ DNA الفايروسي SV40. اكتشف Smith قدرة انزيم *HindIII* القاطع على قطع كل جينوم SV40 بموقع واحد فقط، حتى لو وجدت كمية كبيرة منه. ولقد دهش المجتمع العلمي أن ذاك عندما ذكر Smith بأن هذا الانزيم يقطع "بالضبط" عند نفس الموقع لكل جزيئة SV40 معرضة له. وعليه، منح كل من العلماء Arber و Smith و Nathans جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة في عام 1978 تمييزاً لذلك الانجاز. وليس هذا فحسب، بل حدث هناك انجازان عظيمان في مجال الهندسة الوراثية، أولهما قيام Herbert Boyer بعزل الانزيم القاطع *EcoRI*، وهو الانزيم الذي يترك نهايات لزجة بعد قطعه لقطعة الـ DNA. وقبل هذا الاكتشاف بقبول واسع في الأوساط العلمية آنذاك لأن النهايات اللزجة الناجمة عن قطع ذلك الانزيم تمتاز بسهولة ارتباطها ببعضها البعض بسبب تكميل بعضها للبعض الآخر في التسلسل وهذا يسهل ارتباطها ببعضها البعض. كما كان للعالم Stanley Cohen الفضل الكبير في توافر معلومات كثيرة حول البلازميدات مكنت الباحثين من استخدامها كناقول كلونة في المستقبل. وفي عام 1980 حصل Paul Berg على جائزة نوبل بسبب تمكنه من تخليق أول جزيئة هجينة وهي عبارة عن عاثي بكتيري يحتوي على قطعة DNA مشتقة من الفايروس SV40.

وبعد تلك المرحلة، أدرك العلماء أن تلك الانزيمات يمكن لها أن تقطع أي جزيئة DNA بصرف النظر عن مصدرها (ماعدا حماية الـ DNA عن طريق تحويله كيميائياً)، أي أنها تقطع الـ DNA إلى قطع صغيرة بنمط ذو تسلسل متخصص، وهذا يحدث بالتناقص مع معظم الطرق الإنزيمية والكيميائية والفيزيائية الأخرى التي تحطم الـ DNA بشكل عشوائي. وعلى سبيل المثال، يمكن للانزيم القاطع *HindIII* أن يشق أي جزيئة DNA تحتوي على موقع التمييز خاصته، بغض النظر عن مصدر تلك الجزيئة سواء أكانت من فايروس أو نبات أو حيوان أو حتى من البشر. ومن هنا يتضح لماذا أصبحت تلك الانزيمات القاطعة أدوات أساسية لأي نوع من البحث الجيني. وبتقدم السنين، تطور استخدام تلك الانزيمات في تجارب الهندسة الوراثية شائعاً إلى الحد الذي أصبح فيه للباحث المشتغل في هذا المجال في التسعينيات من القرن المنصرم مقدار واسع من الاختيار يصل إلى الآلاف الانزيمات القاطعة ذات النقاوة العالية والمتوفرة تجارياً لقطع جزيئته في أي موقع مرغوب. وقبل أن يصل العدد إلى هذا الحد، قام الباحثون بايجاد طريقة ناجعة لتجنب الارباك في تسميتها، حيث اشتقت تلك التسمية من أسم البكتريا التي عزل منها الانزيم القاطع. وعلى سبيل المثال، إنزيم *Eco RI* من بكتريا القولون *Escherichia coli*، وإنزيم *Bam HI* من بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* (جدول 1.10). إن الحروف الثلاث الأولى

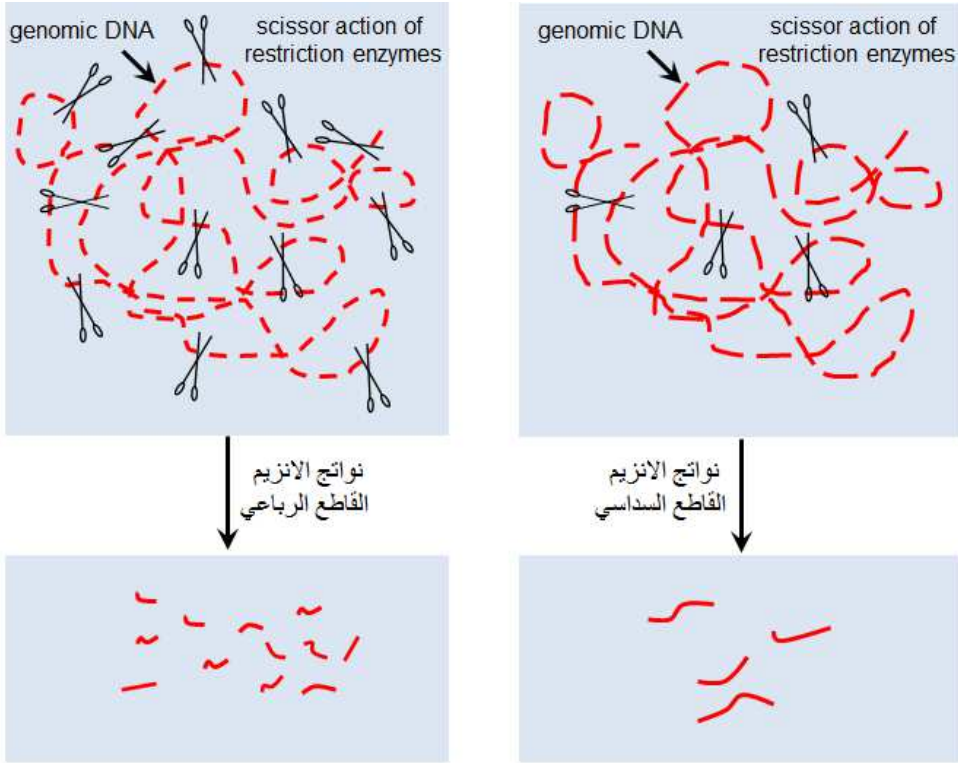
في اسم إنزيم التقييد تتألف من الحرف الأول والذي يشتق من الحرف الأول من اسم الجنس (E)، والحرف الثاني والذي يشتق من أول حرفين لاسم النوع (co). ربما تتبع هذه باسم السلالة (R) والعدد الروماني (I) للإشارة إلى تسلسل الاكتشاف (كما في *Eco RI* أو *Eco* (RII). هذا ويتم مراعاة كتابة الحروف الثلاث الأولى من اسم الإنزيم بشكل مائل (*Italic*).(style

يقطع كل إنزيم تقييد الـ DNA بتسلسل قاعدي محدد يدعى بتسلسل التمييز (recognition sequence) كما في جدول 1.10، والذي يتنوع من 4 إلى 16 أو 20 زوج قاعدي. وكلما طال عدد الأزواج القاعدية في موقع التمييز كلما قل عدد القطوعات المعمولة في الـ DNA عادة. وإذا ما افترضنا توزيع الـ DNA بشكل عشوائي في جزيئة الـ DNA، عندها يمكن لنا أن نحسب كم مرة يمكن للإنزيم أن يقطع جزيئة الـ DNA.

جدول (1.10): نظام تسمية إنزيمات التقييد restriction enzymes كما هو موضح في عدة أمثلة (يشير الرمز / إلى الموقع الذي يقطع فيه الإنزيم القاطع، والرمز N إلى أي قاعدة، والرمز R إلى أي Purine، والرمز Y إلى أي Pyrimidine).

Enzyme	Source organism	Recognition sequence
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C/CGG GGC/C
<i>MboI</i>	<i>Moraxella bovis</i>	/GATC CTAG/
<i>NdeII</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>	/GATC CTAG/
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	G/AATTC CTTAA/G
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	/CC(A or T)GG GG(T or A)CC/
<i>EcoRV</i>	<i>Escherichia coli</i> J62/Pgl74	GAT/ATC CTA/TAG
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GAT/ATC CCTAG/G
<i>SauI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	CC/TNAGG GGANT/CC
<i>BglI</i>	<i>Bacillus globigii</i>	GCCNNNN/NGGC CGGN/NNNCCG
<i>NotI</i>	<i>Nocardia atitidis-caviarum</i>	GC/GGCCGC CGCCGG/CG

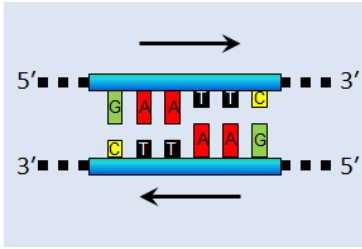
لابد من معرفة ملاحظة مهمة وهي أن لكل موقع في جزيئة الـ DNA هناك أربع احتمالات، (A أو C أو G أو T)، ولهذا، فإن إنزيم التقييد الذي يميّز تسلسل ذو أربع أزواج قاعدية 4-bp فأنها سوف تقطع، كمعدل، مرة واحدة لكل 256-bp أي 4^4 ، بينما تميز إنزيمات أخرى 6 أزواج قاعدية 6-bp أي أنها تقطع مرة واحدة لكل 4096-bp أي 4^6 (شكل 3.10).



شكل (3.10): تناسب تكرار قطع أشربة الـ DNA من قبل الإنزيمات القاطعة عكسياً مع عدد النيوكليوتيدات المميزة في موقع الشق. فإنزيم التقييد الذي يميز تسلسل ذو أربع نيوكليوتيدات يقطع الـ DNA بتكرار أكثر وينتج قطع أصغر مقارنة بالإنزيم القاطع الذي يميز تسلسل ذو ست نيوكليوتيدات.

بعد أن تعرفنا على ماهية الإنزيمات القاطعة، لابد لنا أن نعرف على كيفية تعرف الإنزيمات القاطعة على تسلسلات التمييز الموجودة في الـ DNA كي تقطعها. وجد العلماء أن تلك الإنزيمات تتبنى أشكالاً ثلاثية الأبعاد محددة والتي تتقدم على طول تسلسلات الـ DNA غير المتخصصة في حلزون الـ DNA المزدوج "ماسحة" إياه إلى أن تصل إلى

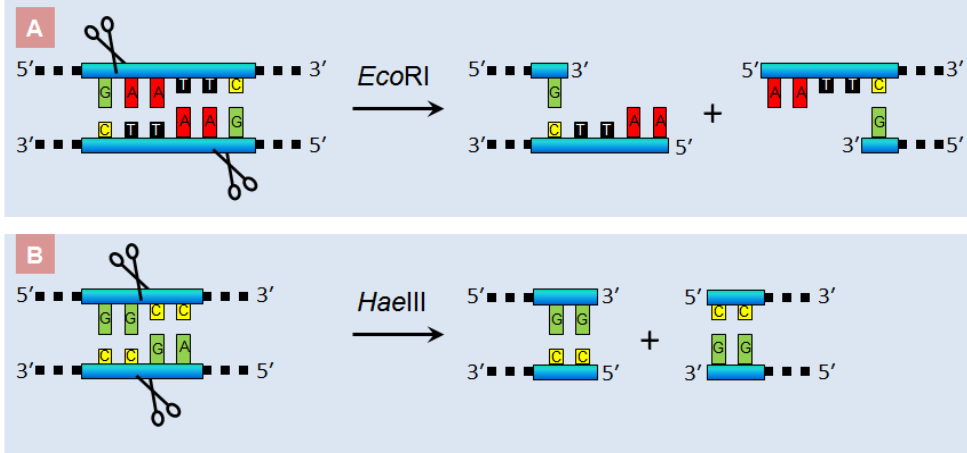
تسلسلاتها المميزة المتخصصة. وهي التي تمثل مواد التفاعل المتعرضة للهجوم من قبل إنزيمات القطع الداخلي، وهي تسلسلات DNA بالندرومية palindromic DNA sequences. إن مصطلح بالندروم palindrome يشير إلى مجموعة من الحروف والتي تكون نفس الكلمة عندما تقرأ سواء من الأمام أو من الخلف. فعلى سبيل المثال "MADAM, I'M ADAM"، أو العبارة "MA IS A NUN, AS I AM". أما في الـ DNA، يدعى موقع بالندروم palindrome site بتسلسل من الأزواج القاعدية بـ DNA الحلزون المزدوج والذي يقرأ بنفس القراءة سواء من الأمام أو من الخلف (من 5' إلى 3' أو العكس). وعلى سبيل المثال، يعد تسلسل الأزواج القاعدية GAATTC بالـ "بالندروم" لأن كلا تسلسلي الشريطين يقرأ بنفس القراءة سواء عندما تتم القراءة من النهاية G أو من النهاية C (شكل 4.10).



شكل (4.10): مثال حول التسلسل بالندرومي palindromic sequence (وهو التسلسل الذي يقطعه إنزيم EcoRI (تصميم المؤلف).

إن من أكثر الأمثلة المعروفة على الإنزيمات القاطعة هو إنزيم Eco RI، والمخلق من قبل بكتريا *E. coli* من سلالة RY13. يقوم هذا الإنزيم بمهاجمة التسلسل النيوكليوتيدي GAATTCCTTAAG. ربما يمكن لك أن تلاحظ بأن هذا بالندروم متناظر حول مركزه. يقوم إنزيم Eco RI بصنع قطوع مفردة الشريط تدعى بالشقوق "nicks"، بين قاعدة الأدينين وقاعدة الكوانين من كلا الشريطين وهذا يفتح جزيئة الـ DNA الدائرية.

هنالك أنواع معروفة مختلفة من إنزيمات القطع الداخلي، والتي تقطع مناطق مختلفة من جزيئة الـ DNA. وعلى أساس كيفية قطع تسلسل الـ DNA المتخصص هنالك نوعين من إنزيمات التقطيع: حيث تقطع المجموعة الأولى بشكل مستقيم عبر حلزون الـ DNA المزدوج، لينتج DNA ذو نهاية مستوية blunt end DNA. يقطع النوع الآخر من إنزيمات التقطيع شريط الـ DNA من مركز الموقع بالندرومي ولكن بين نفس القاعدتين النتروجينيتين على الشريطين المتعاكسين. وهذا يترك قاعدة أو أكثر متدلّية من كل شريط وتدعى هكذا نهايات بالنهايات اللزجة sticky ends (شكل 5.10). وسميت بهذا الاسم بسبب تكوينها لأواصر هيدروجينية مع مكملاتها المقطوعة بنفس الإنزيم. وتكون النهايات اللزجة مهمة بالخصوص في تشبيد جزيئات الـ DNA الهجينة recombinant DNA molecules



شكل (5.10): أنواع إنزيمات التقطيع حسب نوع القطع (A) مثال حول الانزيمات القاطعة من نوع النهايات اللزجة (sticky ends)، (B) مثال حول الانزيمات القاطعة من نوع النهايات المستوية (blunt ends) (تصميم المؤلف).

وبما أن النهايتين المفردتي الشريط المتولدتين في مواقع الشق هما متكاملتين، لذا يمكن لها أن تصلح مع بعضها البعض. وهكذا، فإن قطع الـ DNA المتولدة بواسطة نفس إنزيم القطع الداخلي يمكن لها أن توصل مع بعضها بسهولة بتكوينها للأزواج القاعدية (شكل 6.10).

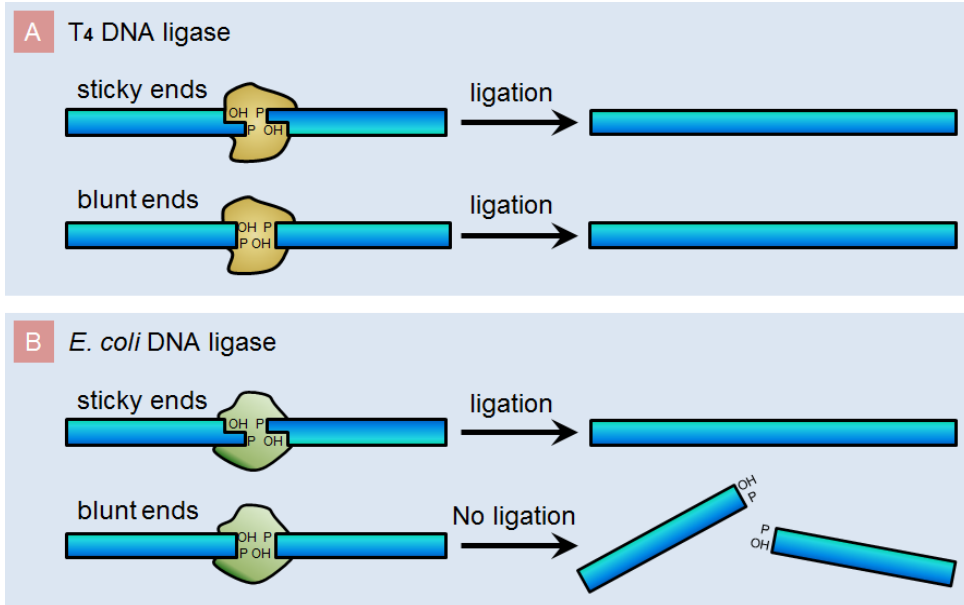


Martin F. Gellert

بعد قطع جزيئات الـ DNA الغريبة بواسطة الانزيمات القاطعة المناسبة لابد من ربطها بالنواقل الجينية الملائمة عادة، ويتم ذلك بواسطة الإنزيمات اللاصقة ligase أو DNA ligases. تتم عملية ربط الشريطين بواسطة إنزيم اللحم sealing enzyme الذي يعرف بـ DNA ligase، والمكتشف في عام 1967 من قبل Martin F. Gellert، والذي يقوم بالعمل كعامل لصق "gluing" agent لربط الأحماض النووية المفصولة ببعضها. يقوم هذا الإنزيم اللاصق بربط قطع الـ DNA تساهمياً. ويعمل إنزيم DNA ligase خلال تضاعف الـ DNA، حيث يقوم بربط قطع أوكازاكي ببعضها البعض لكي يشيد الشريط المتكامل lagging strand (راجع الفصل الثالث).

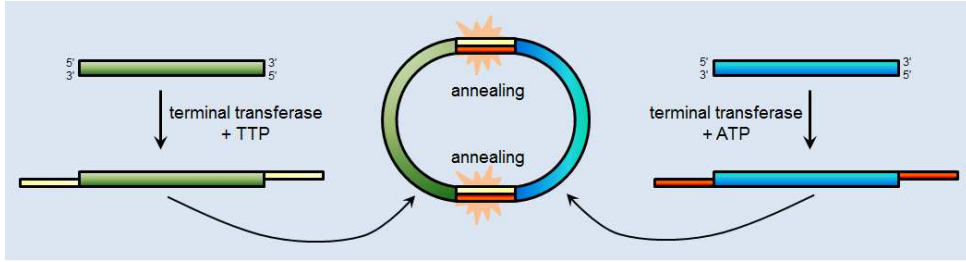
يحتاج إنزيم DNA ligase إلى شرطين ليقوم بعمله. الأول، يجب أن تكون الجزيئات مواد تفاعل صحيحة، أي يجب أن تمتلك مجاميع هيدروكسيلية من نوع 3' ومجاميع فوسفاتية من نوع 5'. ثانياً، يجب أن توضع تلك المجاميع في الجزيئات المراد ربطها

بمواضع صحيحة بالنسبة لبعضها البعض. وببساطة، اذا وجد انزيم DNA ligase قطعتي DNA تلمسان بعضهما البعض من نهايتيهما، فانه يلحمهما معاً. وفي تجارب الهندسة الوراثية، تميل قطع الـ DNA ذات النهايات اللزجة أن تبقى مرتبطة ببعضها الآخر لفترة طويلة، ونتيجة لذلك، يقوم انزيم DNA ligase برطها بشكل كفوء. وبما ان قطع الـ DNA ذات النهايات المستوية ليس لها أي طريقة كي ترتبط ببعضها الآخر، فانها تكون مبتعدة عن بعضها البعض لمعظم الوقت. وبالتالي، تعتبر عملية لحم النهايات المستوية عملية بطيئة جداً وتحتاج الى تركيز عال من انزيم DNA ligase، فضلاً عن التركيز العالي لقطع الـ DNA المراد لحمها. ومن الجدير بالذكر، أن انزيمات DNA ligases البكتيرية لا يمكن لها أن تربط النهايات المستوية. لذا، يتم استخدام انزيم T4 DNA ligase الذي اشتق أصلاً من العاثي البكتيري T4 في ربط قطع الـ DNA ذات النهايات المستوية (شكل 6.10).



شكل (6.10). لحم نهايات قطع الـ DNA بواسطة انزيم DNA ligase في تفاعل يحتاج الى الطاقة (A) نجاح لحم الـ DNA ذو النهايات المستوية أو النهايات اللزجة بواسطة انزيم T4 DNA ligase (B) نجاح لحم نهايات الـ DNA بواسطة انزيم bacterial DNA ligase وفشل لحم الـ DNA ذو النهايات المستوية بواسطة نفس الانزيم (تصميم المؤلف).

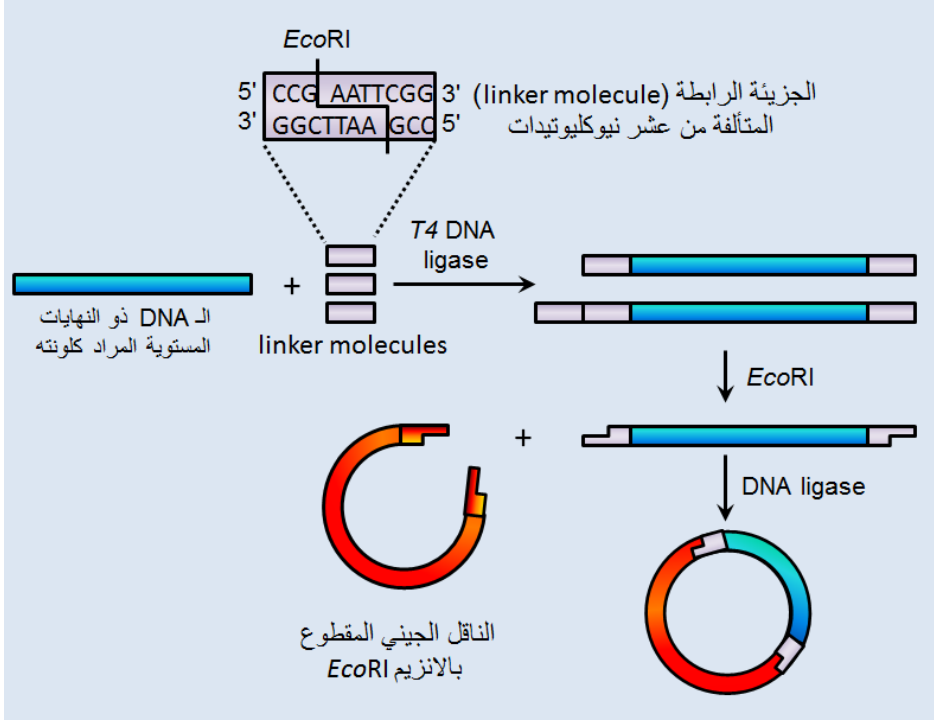
ويمكن أن تستخدم طريقة ثانية لتخليق الجزيئات المهندسة وراثياً مع قطع الـ DNA والناقل الفاقدة للنهايات للزجة، بسبب قطعها بانزيم قاطع ينتج نهايات مستوية. فبعد قطع الناقل (كالبلازميد مثلاً) والـ DNA الواهب، يمكن إضافة متعدد الأدينين (polyA) مثلاً للنهاية 3' لـ DNA البلازميد باستخدام انزيم الناقل الطرفي أو terminal transferase (شكل 7.10). وبشكل مماثل أيضاً، يتم إضافة متعدد الثايمين (polyT) الى النهاية 3' لقطع الـ DNA الواهب. وهنا يمكن للنهايات أن ترتبط ببعضها البعض بواسطة انزيم ligase لتكوين الجزيئة أو الناقل الهجين. وإذا كان الذيل المضاف من قبل انزيم terminal transferase طويلاً جداً، عندها يمكن أن يدخل مباشرة الى الخلايا، حيث يمكن للفجوات والشقوق أن تملأ وتلحم من قبل الانزيمات الخلوية. و يدعى هذا الإجراء بالتذييل ذو البوليمر المتجانس homopolymer tailing. على الرغم من أن هذه التقنية تعد أكثر صعوبة من لحم النهايات للزجة ولكنها تمتلك فائدة في ربط أي زوج من النهايات. ولكن هنالك مضاراً لهذه الطريقة والتي تتمثل بعدم السيطرة على اتجاه انحسار الجزيئات المرتبطة مع بعضها باستخدام هذه الطريقة، كما لا يوجد هنالك طريقة سهلة لاسترداد الـ DNA المنحسر بعد اندماجه في الجزيئة الناقلة.



شكل (7.10): التذييل ذو البوليمر المتجانس homopolymer tailing. يمكن استخدام تقنية التذييل بمتعدد الأدينين والثايمين في تشييد نهايات لزجة في جزيئة الـ DNA المرغوبة وتوليد جزيئات DNA هجينة (تصميم المؤلف).

يمكن أن يستخدم ما يعرف بالواصلات (linkers) أيضاً لتوليد جزيئات DNA ذات نهايات لزجة مكاملة لبعضها البعض (شكل 8.10).

تعد الواصلات جزيئات DNA صغيرة ذات نهايات مستوية تحتوي على تسلسل تمييز لانزيم قاطع ينتج نهايات لزجة. يمتاز لحم الواصلات بقطع الـ DNA بكفاءة عالية، وذلك بسبب سهولة الحصول على تراكيز عالية من الواصلات. وبعد ربط الواصلات بقطعة الـ DNA، يتم هضم المزيج بالانزيم القاطع، والذي يقطع الواصلات ويولد النهايات للزجة. وبهذه الطريقة، تتحول الجزيئة ذات النهاية المستوية الى جزيئة ذات نهايات لزجة والتي من السهولة ربطها بجزيئات DNA أخرى.



شكل (8.10). عملية ربط الجزيئات الرابطة والمحتوية على موقع *EcoRI* بواسطة الانزيم T4DNA ligase بجزيئات الـ DNA الغريبة ذات النهايات المستوية. وبالنسبة، تتكون جزيئات DNA ذات نهايات لاصقة بواسطة الانزيم القاطع *EcoRI*. يدمج هذا الـ DNA بالناقل المعامل بنفس الانزيم القاطع (تصميم المؤلف).

إن ما ذكر أعلاه لا ينبغي أن يفسر بأن عملية كلونة الجين هي مجرد تقنية سهلة. لكن في الحقيقة، يعد إنتاج وتشخيص خلية بكتيرية تمتلك نسخة مدمجة فعالة من الجين المرغوب مهمة توصف بالهائلة.

ثالثاً: أدوات نقل الـ DNA (نواقل الكلونة cloning vehicles)

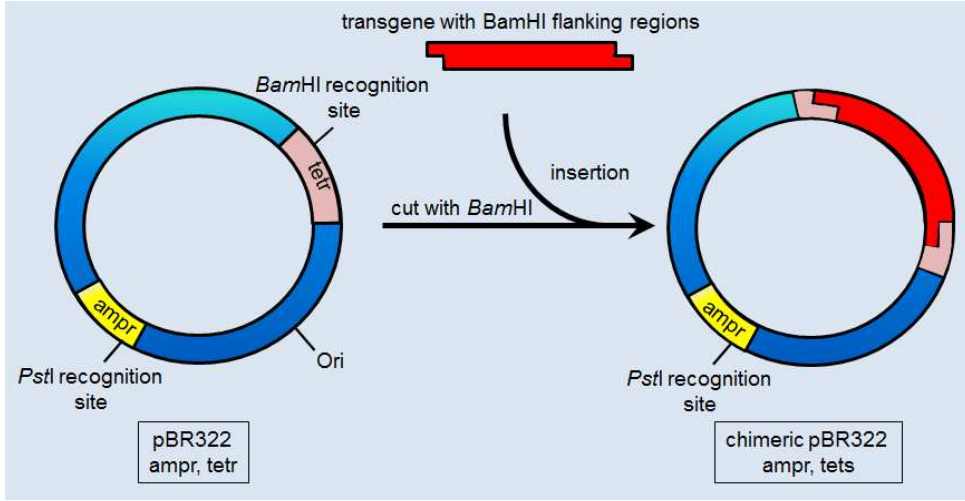
تعد كلونة الجين جزء لا يمكن الاستغناء عنه في أي تلاعب وراثي ويتضمن ارتباط قطعة الـ DNA المرغوبة بالجزيئة الناقلة vector molecule والتي تعمل على انتشار قطعة الـ DNA تلك في البكتيريا. ويتميز كل نوع من تلك النواقل بصفات ربما لا توجد في النواقل الأخرى. ومن الجدير بالذكر أن لكل نوع من نواقل الكلونة فوائد معينة يتميز بها عن النواقل الأخرى. وعلى أية حال، تعد البلازميدات هي الجزيئات الأبسط عند التعامل معها. أما العاثيات البكتيرية والفايروسات الأخرى فيمكن أن تخزن بشكل ملائم ولفترات طويلة. أما الكوزميدات والكروموسومات الاصطناعية، فيمكن كلونة قطع أكبر من الـ DNA فيهما.

ومن الجدير بالذكر الى أن كل النواقل تشترك بعدة صفات عامة: حيث تكون صغيرة نموذجياً، وعملية نقل الناقل الجيني من الخلية الواهبة الى الخلية المستلمة سهلة نسبياً، وتكون ذات تسلسلات DNA معروفة، وتحتوي على الأقل أصل تضاعفي واحد ويمكن أن تتضاعف في العائل الملائم حتى عند احتوائها للـ DNA الغريب. وأخيراً، تشفر تلك النواقل الى صفة مظهرية والتي يمكن أن تستخدم لتشخيص وجودها، كما يمكن تشخيص النواقل الأبوية (الغير حاوية على DNA غريب) من النواقل الهجينة (الحاوية على الـ DNA الغريب). أن أهم أنواع نواقل الكلونة تلك هي:

أ:نواقل البلازميدات: تمتلك البلازميدات خواص عديدة جعلها مفيدة بشكل استثنائي كنواقل كلونة cloning vehicles، حيث توجد بعض البلازميدات بعدة نسخ multicopy ضمن البكتيريا الواحدة ويمكن لها أن تتضاعف بشكل مستقل عن الـ DNA البكتيري. كما تم معرفة التسلسل الكامل للبلازميدات، ومن هنا، عرفت أماكن تواجد مواقع شق إنزيمات التقيد restriction enzymes cleavage sites. كما إن البلازميدات أصغر من كروموسوم العائل ولهذا فمن الممكن وبسهولة فصلها عن الأخير، كما يمكن للـ DNA المرغوب من أن يزال بسهولة بواسطة قطع البلازميد بواسطة إنزيم متخصص لموقع التقيد الذي حشرت فيه قطعة الـ DNA الأصلية.

تعتبر البلازميدات أول جزيئات قد تم استخدامها في عملية الكلونة. ويمكن عزلها وتنقيتها بسهولة، ويمكن اعادة تقديمها الى البكتيريا بواسطة عملية التحول (راجع الفصل التاسع). تحمل البلازميدات عادة الجينات المقاومة للمضادات الحيوية، والتي تستخدم في تشخيص العوائل البكتيرية. ويسمى البلازميد الهجين (recombinant plasmid) الحاوي على الـ DNA الغريب بالكايмира (chimera) وهو حيوان اغريقي أسطوري والذي له رأس أسد، وذنب تنين، وجسم ثور. أكثر البلازميدات المستخدمة بشكل واسع هو pBR322. يمتلك البلازميد pBR322 الجينات المقاومة لكلا الامبسلين والنتراسايكلين والعديد من مواقع التقيد والموجودة لمرة واحدة فقط في البلازميد وتقع ضمن الجين المقاوم للمضاد الحيوي (شكل 9.10). يساعد هذا الترتيب في الكشف عن البلازميدات الهجينة بعد القيام بعملية التحول. وعلى سبيل المثال، اذا انحسر الـ DNA الغريب في الجين المقاوم للأمبسلين، سوف لا يكون البلازميد قادراً على منح المقاومة للأمبسلين بعد ذلك الانحسار. وبهذه الطريقة، تحتوي المتحولات التي تفقد المقاومة للأمبسلين على بلازميد هجين "كايميري". وكما قد تمت الإشارة إليه مسبقاً (راجع الفصل التاسع)، لا يشفر DNA البلازميدات عادة لأي وظيفة أساسية، ويمكن للخلايا التي تفقد البلازميدات أن تنقسم طبيعياً. وتوجد البلازميدات عادة بعدة نسخ، ويمكن لها أن تشكل وسائل لتضخيم عدد أي جين يوجد بنسخة مفردة وذلك عندما ينغرس فيها. وعلى سبيل المثال، يمكن أن تؤدي عملية الغرس في البلازميد إلى تضخيم سريع للجينات الضرورية لإنجاز مقاومة عالية للمضادات

الحيوية. إن فائدة ما ذكر أعلاه في الهندسة الوراثية هو أن أي جين محمول من قبل بلازميد صغير يوجد بأعداد كبيرة، وبهذه الطريقة، ربما تتكون أعداد كبيرة من الناتج البروتيني لهذا الجين. إن مثل هكذا بلازميدات توفر مركبات مثالية لحمل العديد من الجينات الضرورية لإنجاز مقاومة عالية للمضادات الحيوية مثلاً عند الحاجة.



شكل (9.10): تركيب بلازميد pBR322 وكيفية غرس الجين المراد كلونته فيه (تصميم المؤلف).

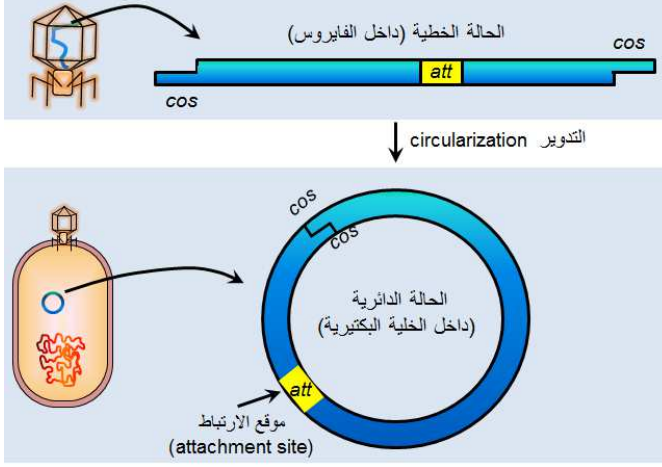
إن معظم النواقل البلازميدية هي من نوع متعدد النسخ multicopy plasmids وأقدمها هو الناقل pBR322 وهو واحد من أكثر النواقل البلازميدية المعروفة لأنه كما بينا يحمل جينات المقاومة لـ ampicillin والتetracycline والتي تعمل كواسمات لانتقاء وتشخيص للهجائن الحاوية على ذلك البلازميد بالإضافة إلى احتوائه على مناطق متفرقة لعدة إنزيمات قاطعة والمتوفرة لحشر قطع الـ DNA. وعلى سبيل المثال، دعنا نرى ماذا سيحصل عندما تحشر قطعة إنزيم *Pst I* في موقع الإنزيم *Pst I* في الناقل pBR322، والذي يقع ضمن جين مقاومة الأمبسلين ampicillin resistant gene، إن مثل هكذا انحشار سوف يحطم وظيفة الجين عادة وبالتالي سوف لا يخلق بروتين β -lactamase فعال بعد ذلك. ولهذا، يمكن أن يتم الكشف عن البلازميدات الهجينة بواسطة قابليتها على منح المقاومة للتetracycline وليس للampicillin. أما بالنسبة للإنزيم *Bam HI* تبقى نفس العواقب، فإذا انحشرت قطعة الـ DNA الغريبة في موقع الإنزيم *Bam HI*، سوف يحطم الانحشار الجين الذي يوفر المقاومة للتetracycline للعائل البكتيري. وبعد تحول العائل البكتيري بالبلازميد الهجين، توضع البكتيريا على وسط نمو يحتوي على الـ ampicillin. ويتم تنمية نسخة أخرى منها على وسط يحتوي على الـ tetracycline لاختبار حساسيتها للـ

tetracycline. وهذا يسهل الحصول على الجين قيد الدراسة وذلك من خلال التخلص من تلك البكتيريا التي لا تمتلك بلازميد على الإطلاق أو تلك التي تحتوي على بلازميد أصيل دون إضافة.

ب: نواقل العاثيات البكتيرية. تمتلك العاثيات جزيئات DNA خطية يمكن للـ DNA أن ينحشر بها عبر عدة مواقع تقييد. يتجمع الـ DNA الهجين بعدما يتقدم العاثي خلال دورته التحليلية lytic cycle وينتج دقائق العاثي الناضجة mature phage particles. إن الفائدة الأساسية لنواقل العاثيات على نواقل البلازميدات هو قدرتها على نقل جزيئات DNA أطول، فعندما يتقبل البلازميد قطعة DNA يصل طولها إلى 6-9 kp ، يمكن للعاثي أن يتقبل قطعة DNA قد يصل طولها إلى 9-20 kb.

يستخدم العاثي لامدا بشكل واسع في تجارب كلونة الجين، يجمع هذا العاثي بكتيريا القولون، وله القابلية على أن يتخذ شكلين مميزين، وهما الشكل الحال (lytic)، والشكل المتحلل (lysogenic) يتبادلان مع بعضهما البعض في دورة حياة الفايروس (راجع الفصل السادس). وعلى الرغم من قدرة المادة الوراثية للعاثي لامدا على أن يتخذ الشكل الدائري لأجل التضاعف والانحشار في كروموسوم بكتيريا القولون، ولكن المادة الوراثية تكون خطية (شكل 10.10). ويوجد في طرفي تلك الجزيئة الخطية قطعة من 12 زوج قاعدي ذات نهايات متدلية (cohesive ends)، وتكون كل نهاية مكملية للنهاية الأخرى، تعرف هذه التسلسلات بتسلسلات كوز (cos sequences)، وسميت بتلك التسمية بسبب وجود النهايات اللزجة (cohesive ends) لتلك التسلسلات. وحال دخول العاثي لامدا داخل بكتيريا القولون، تلتحم تلك النهايتين مع بعضهما البعض بواسطة انزيمات العائل مكونة شكلاً دائرياً من جينوم العاثي لامدا. يمكن تعبئة جزيئات DNA بطول 37kb إلى 52kb في رأس العاثي. ويمكن أحياناً لجزيئات DNA صغيرة أن تتعبئ في جينوم العاثي لامدا من دون تضرر التعبئة. ولأجل حشر جزيئات DNA أكبر، فمن الضروري إزالة بعض المادة الوراثية من جينوم العاثي. تمتلك المنطقة اليسرى لجينوم العاثي جينات ضرورية للبروتينات التركيبية وتمتلك المنطقة اليمنى الجينات الضرورية للتضاعف والتحلل.

أما المنطقة الوسطى، فهي ليس ضرورية لحياة العاثي ويمكن استبدالها بـ DNA غريب يصل طوله إلى 23kb. وبما أن المنطقة الوسطى تمتلك جينات لانحشار العاثي وإعادة ارتباطه، لذا لا يمكن لنواقل الاستبدال المشتقة من العاثي أن تنحشر في كروموسوم العاثي لتكون الحالة المتحللة.

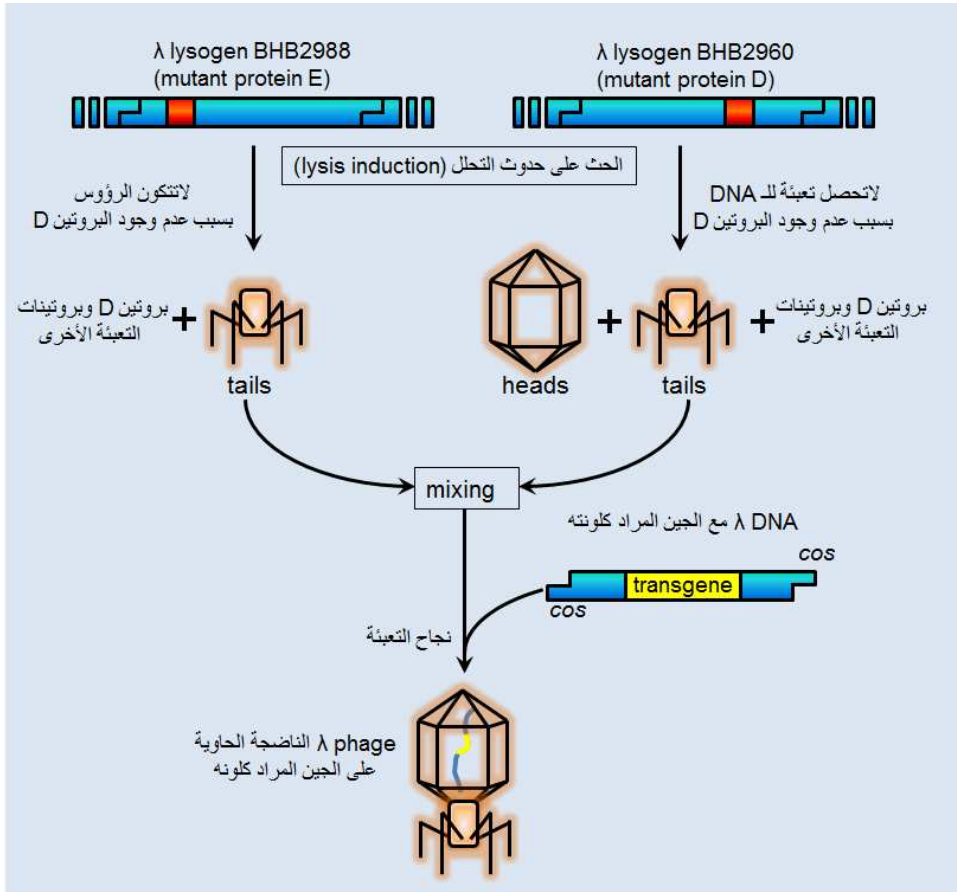


شكل (10.10): المادة الوراثية في العاثي لامدا، والمتمثلة بجزيئة DNA خطية ذات تسلسلات كوز في كل نهاية. وعندما يقوم العاثي بحقن مادته الوراثية في العائل البكتيري، يتحول مادته الوراثية من الشكل الخطي الى الشكل الدائري. تزدوج كلتا النهايتين اللزجتين وتلتحم مع بعضها بواسطة الانزيمات البكتيرية (تصميم المؤلف).

ان عملية تكوين جزيئة هجينة بين الـ DNA الغريب والعاثي لامدا هي أكثر تعقيداً من تلك الحاصلة في النواقل البلازميدية. فهي لا تقتصر على انحشار الـ DNA الغريب في وسط العاثي لتكوين جزيئة DNA هجينة خطية ذات نهايتين لزجتين. وانما يجب تعبئة تلك الجزيئة الهجينة في رأس العاثي بشكل كفوء وتكوين عاثي هجين له القدرة في خمج الخلايا البكتيرية ، وهنا تحتاج خلية بكتريا القولون العائل الى ما يعرف بالتعبئة الخارجية (*in vitro packaging*) (شكل 11.10). وفي هذه التقنية، يخلط مزيج بروتينات العاثي لامدا مع DNA العاثي الهجين خارج جسم الكائن الحي لتكوين دقائق العاثي.

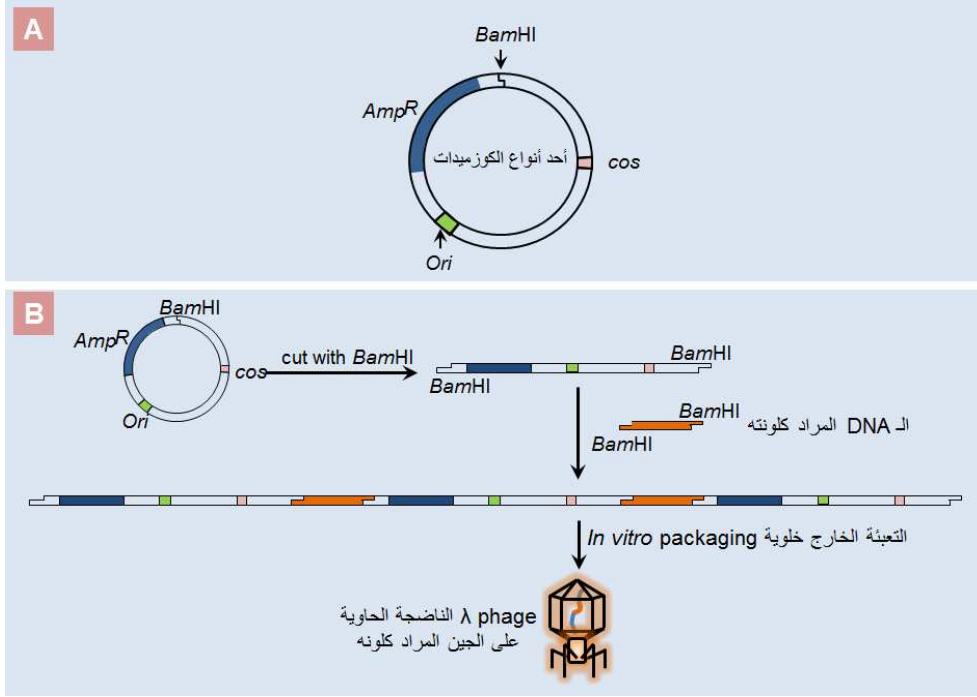
وعند خمج مزرعتين من بكتريا القولون كل مزرعة تحتوي على طفرة مختلفة عن المزرعة الأخرى لا يمكنها من توليد بروتينات لامدا الضرورية. كل من المزرعتين الطافرتين تفتقد لأحد البروتينات الضرورية لتكوين رأس العاثي ولهذا لا يمكن لها تكوين رأس العاثي المتضمن للـ DNA في داخله. ولكن خلط كلتا مستخلصي المزرعتين يتكفل بتوفير كل بروتينات الرأس الضرورية وعند خلطها مع DNA العاثي الهجين يمكن لها أن تعطي العاثي الهجين القادر على خمج خلايا جديدة لبكتريا القولون (شكل 11.10).

استخدمت هذه العاثيات المزدوجة الشريط غالباً في توليد المكاتب الجينومية. أما العاثيات مفردة الشريط (كما في العاثي M13) فقد تم استخدامها في معرفة تسلسل الـ DNA (أنظر الفصل الحادي عشر).



شكل (11.10): التعبئة الخارجية (*in vitro* packaging) لنواقل الاستبدال للعائلي لامدا. يجب أن يتم تعبئة ناقل الكلوثة لامدا المحتوي على الـ DNA المكون في رأس العائلي قبل أن يجمع بكتريا القولون. وقبل تعبئة الـ DNA، يجب عزل بروتينات رأس العائلي التي تتكفل بذلك. وللقيام بهذا، تم خمج بكتريا القولون بالعائلي لامدا الطافر والذي يفقد للجين الذي يشفر عن بروتين الرأس E. ثم تم خمج بكتريا القولون بطافر لامدا من نوع آخر، والذي يفقد بروتين رأس العائلي D. ثم تم تنمية كلتا المزرعتين مع لامدا الهجينة، وتم حث الفايروساتكي تدخل في الدورة التحليلية. ولو أن البكتريا قد حلت من قبل العائلي، إلا أنها لا يمكن لها أن تكون رؤوساً كاملة. وبدلاً من ذلك، يعزل مزيج بروتينات العائلي. يحتوي كل مزيج على ذيول العائلي، بروتينات التعبئة، ومكونات الرأس، ماعدا البروتين D أو E. يخلط هذين المزيجين مع الناقل لامدا المحتوي على الـ DNA الغريب. وعلى الرغم من حدوث عملية الخلط خارج جسم الكائن الحي، يمكن لتلك المكونات أن تتراكم ذاتياً لتكون عائلي وظيفي يمكنه أن يجمع بكتريا القولون (تصميم المؤلف).

ج: الكوزميدات Cosmids. الكوزميدات هي بلازميدات متعددة النسخ تحتوي مواقع *cos* المشتقة من العاثي لامدا ويمكن تعبئتها في رؤوس العاثي (شكل 12.10 A). يحتوي جينوم العاثي لامدا على تسلسل تمييز (recognition sequence) تدعى بالموقع *cos* (أو النهاية اللزجة cohesive end). وعندما يتعبأ الجينوم في رأس العاثي، ينشق في موقع *cos* واحد وينحشر الـ DNA في رأس العاثي إلى أن يدخل موقع *cos* الثاني. وبهذه الطريقة، يتعبأ أي DNA محشور بين مواقع *cos* في رأس العاثي. ويمكن يحتوي الكوزميد على عدة مواقع تقييد وعلى عدة جينات مقاومة للمضادات الحيوية.



شكل (12.10). كيفية استخدام الكوزميدات في عملية الكلونة: (A) تركيب الكوزميد، يحتوي الكوزميد على مواقع *cos* المشتقة من العاثي لامدا وعلى أصل التضاعف وجين المقاومة لأحد المضادات الحيوية مشتقة من البلازميد. (B) آلية كلونة الـ DNA في الكوزميدات. لكلونة قطع كبيرة من الـ DNA إلى نواقل الكوزميد، يجب أن تكون كلتا الـ DNA والنواقل ذات نهايات لزجة. يتم أولاً تحويل النواقل إلى الشكل الخطي بحيث يحتوي على موقع *cos*. ثم يتم قطع الكوزميد بالانزيم القاطع. ويتم قطع DNA الجينوم من المصدر المرغوب أيضاً. ثم تقطع DNA الجينوم بنفس الانزيم القاطع أو بانزيم قاطع يولد نفس النهايات. تخلط هذه القطع مع نصف الكوزميد وترتبط باستخدام انزيم DNA ligase. تعبأ الجزيئة الهجينة النهائية في رؤوس العاثي خارج جسم الكائن الحي وتستخدم بعدها في خمج بكتريا القولون (تصميم المؤلف).

ان الاحتياج الوحيد لتعبئة الـ DNA خارجياً في العاثي لأمدا هو وجود موقعين من مواقع cos مفصولة بـ 37-51kp من التسلسلات المتخللة. وعلى هذا الأساس تم تطوير الكوزميدات. وبعد حدوث تفاعل التعبئة، تستخدم دقائق العاثي لأمدا المتكونة حديثاً لتخمج خلايا بكتريا القولون. يقوم العاثي بحقن الـ DNA في البكتريا وكأنه DNA λ طبيعي ويتم تدويره خلال تكامله مع نهايات مواقع cos. لكن حفظ الـ DNA المتدور في خلايا بكتريا القولون يكون على شكل بلازميد. ولهذا السبب، فإن انتقاء الخلايا المتحولة يكون على أساس المقاومة للمضادات الحيوية، حيث أن المستعمرات البكتيرية المتحولة (بدلاً من البقع plaques المكونة في حالة العاثي لأمدا) سوف تحتوي على الكوزميد الحاوي على الجين الغريب. وبما أن دقائق العاثي لأمدا يمكن أن تتقبل ما بين 37-51kp من الـ DNA، ومعظم الكوزميدات تكون بطول 5kp في الحجم فقط، لذا، يمكن كلونة 32-47kp من الـ DNA في هذه النواقل. وهذا يمثل كمية DNA أكبر من تلك التي تقبلها الناقل لأمدا نفسه. لذا، عند استعمال كوزميد صغير، ولنقل بطول 4kb، يمكن بهذه الطريقة حشر قطعة DNA بأكثر من 45kb طولاً. إن الكوزميدات، كما هو الحال في البلازميدات، تكون مستقرة جداً، ولكن حشر قطع DNA كبيرة يمكن أن يعني صعوبة الحفاظ على الكوزميدات الناتجة في الخلية البكتيرية. ولابد من ملاحظة أن الصعوبة الأساسية الكامنة من وراء التعقيد في التعامل مع الكوزميدات تتمثل بانتاج قطع DNA خطية ملتحمة والتي يكون فيها الكوزميد والجين المنحشر فيه يصنعان تسلسلات متكررة (concatameres) مع بعضها البعض (شكل 12.10 B).

تستخدم نواقل العاثيات لأمدا أو الكوزميدات في بناء المكاتب الجينية. عموماً، مكتبة الـ DNA، هي مجموعة من قطع الـ DNA المكلونة في ناقل كلونة ممكن أن يستخدم في البحث عن قطعة الـ DNA المرغوبة. وهناك نوعين من تلك المكاتب تستخدمان في الحصول على قطعة الـ DNA المرغوبة. يدعى النوع الأول بمكاتب الدنا الجينومية (genomic DNA libraries). وتصنع تلك المكتبة من جينوم الكائن المعني. وعلى سبيل المثال، تصنع مكتبة الفأر الجينومية بواسطة هضم DNA الفأر النووي هضماً جزئياً بالانزيم القاطع لانتاج عدد كبير من قطع DNA مختلفة ولكن كلها تمتلك نهايات لزجة متماثلة (أنظر أدناه). وبعد ذلك، يتم لحم قطع الـ DNA بالنواقل المشتقة من العاثيات لأمدا أو بنواقل الكوزميدات المقطوعتين بنفس الانزيم القاطع. تحتوي هذه المكتبة على كل تسلسلات الـ DNA النووية للفأر ويمكن البحث فيها عن أي جين مرغوب في الفأر. هذا وليس كل نسيلة سوف تحتوي على جين كامل لأنه - وفي العديد من الحالات - تقوم الانزيمات القاطعة بعمل قطوعاتها ضمن الجين. وهكذا، سوف تحتوي بعض النواقل على جزء من جين بدلاً من جين كامل. أما النوع الثاني من مكاتب الـ DNA فتدعى بمكاتب الدنا المكمل (cDNA libraries). ويتم صنع مكتبة الـ cDNA بواسطة استخدام انزيم

reverse transcriptase المشتق من الفايروسات الارتكاسية (retroviruses) (أنظر أدناه).

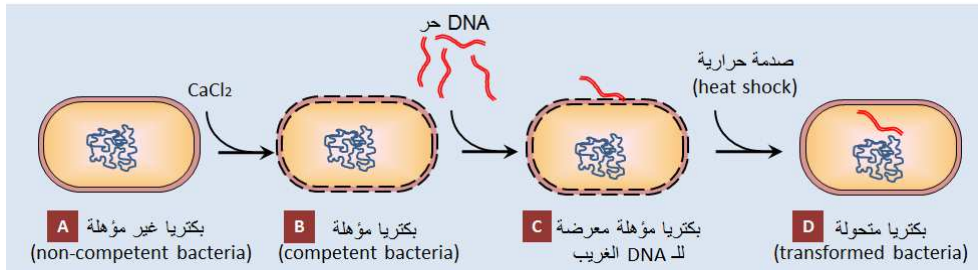
د: الكروموسومات الاصطناعية artificial chromosomes. بالإضافة الى الأنواع الثلاث الرئيسية من النواقل وهي البلازميدات، والعاثيات البكتيرية، والكوزميدات cosmids، تعد الكروموسومات الاصطناعية artificial chromosomes نوعاً رابعاً مهماً لنواقل الكلونة. تعد الكروموسومات الاصطناعية وسيلة شائعة في النقل الجيني لأنها تحمل كميات كبيرة من المادة الوراثية. ويعد كروموسوم الخمائر الاصطناعي (yeast artificial chromosome) أو YAC واحداً من أوسع الكروموسومات الاصطناعية استخداماً. ان الـ YACs هي امتدادات DNA تحتوي على كل العناصر الضرورية لانتشار الكروموسوم في الخمائر، وهي أصل التضاعف، والسنتروميير والتيلوميير (راجع الفصل الثاني). وتمتلك كذلك مواقع لانزيمات التقيد وواسمات وراثية بحيث يمكن أن يتم تعقبها وانتقائها. ينشق الـ YAC بانزيم تقيد ملائم، والذي يفتح ويسمح بانحشار قطعة من الـ DNA الغريب بين السنتروميير والتيلوميير. وبهذه الطريقة، تحتوي الـ YACs على قطع DNA بين 100Kb و 200Kb في الحجم ويمكن أن توضع في خلايا خميرة *Saccharomyces cerevisiae* ويمكن له أن يتضاعف بجانب الكروموسومات الحقيقية. أما الكروموسوم الاصطناعي البكتيري (BAC) هو ناقل كلونة بديل يزداد استخدامه شيوعاً. تعد الـ BACs نواقل كلونة معتمدة على بلازميد الخصوبة في بكتريا القولون (راجع بلازميدات الخصوبة في الفصل التاسع). وتحتوي على مواقع ملائمة لانزيمات التقيد وواسم كما في المقاومة للكلورومفينيكول. ينشق البلازميد المحور في موقع التقيد، ويتم ربط قطعة الـ DNA الغريب والتي يبلغ طولها أكثر من 300Kb باستخدام الانزيم اللاحم DNA ligase. يتكاثر الـ BAC في بكتريا القولون بعد عملية ادخاله بواسطة جهاز مولد الصدمات الكهربائية أو electroporator (أنظر أدناه). ويمكن لهذا الناقل أن يتكاثر ويتحور بسهولة ولا يعاني اعادة ارتباط كما هو ملاحظ في الـ YACs. يمتلك عدم حدوث عملية اعادة الارتباط فائدة تكمن في أن الـ DNA المنحشر لا يمكن عادة أن يحدث فيه اعادة ترتيب بحيث يحافظ على تسلسله كما هو. وبما أن نواقل الـ BACs يمكن لها أن تحمل قطع كبيرة من الـ DNA، تعد الكروموسومات الاصطناعية مهمة بالتحديد في معرفة تسلسل الجينوم.

رابعاً: أدوات ادخال الجينات الغريبة الى الخلايا

بعد نجاح تشييد جزيئات الـ DNA الهجينة، والمتكونة عادة من الـ DNA المرغوب محشوراً في ناقل الكلونة المناسب، لابد من ادخال هذا الناقل الى المضيف الملائم لكي ينتج كميات كبيرة منه حتى يتسنى دراستها من قبل المختصين في مجال الهندسة الوراثية. وبشكل عام، تقسم المضائف الى نوعين رئيسيين: بدائية النواة وحقيقية النواة.

أ. ادخال الجينات في الخلايا البدائية النواة

يمكن، في الحقيقة، ادخال جينات بدائية وحقيقية النواة في البكتيريا على حد سواء، ولكن الوسيلة المستخدمة في كل منهما تختلف عن الأخرى. ففي بدائية النواة، كما في البكتيريا مثلاً، بعد عزل قطعة الـ DNA المرغوب، وربطها بالنقل بواسطة انزيم قاطع مناسب، وتكوين جزيئة الناقل الهجينة، تدخل تلك الجزيئة الى مضيف ملائم بواسطة عملية التحول عادة (راجع الفصل التاسع). وتتم بوضع الخلايا النامية بشكل فعال للبكتيريا المعنية، كما في بكتيريا القولون، في محلول مخفف من كلوريد الكالسيوم calcium chloride في وسط محاط بالتلج، الذي يزيد نوعاً ما من قابلية خلايا البكتيريا لأخذ الـ DNA الغريب (شكل 13.10). إن التعرض لكلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ يكون عادة نصف ساعة والتي بعدها يضاف الـ DNA إلى عالق البكتيريا لمدة نصف ساعة. إن حضن هذا الوسط لمدة قصيرة يسمح للخلايا بأن تأخذ الـ DNA الغريب وتكوين الخلايا المتحولة transformants.



شكل (13.10). التحول البكتيري كيميائياً. معاملة الخلايا بأيونات الكالسيوم ممكن ان تجعل الخلايا مؤهلة لأخذ الـ DNA. ربما يلتصق الـ DNA على سطح الخلية البكتيرية وبواسطة صدمة حرارية تحدث عملية دخول الـ DNA الغريب (تصميم المؤلف).

بعد ادخال جزيئات الناقل الهجينة الى خلايا العائل المستلمة، لا بد من الإشارة الى تحول نسبة صغيرة من الخلايا فقط، أما الأخريات فتفشل في أخذ الـ DNA الغريب (البلازميد الجديد). وهنا انبثقت الحاجة لوجود بعض الطرق التي تمكننا من معرفة الخلايا التي قد تحولت فعلاً. ولهذا السبب، فإن النواقل (كما في البلازميدات) المستخدمة في حشر الـ DNA يجب أن تحتوي على بعض الواسمات القابلة للكشف selectable markers في المقاومة لبعض المضادات الحيوية antibiotic resistance.

بعد عزل الجين المرغوب وربطه مع ناقل الكلونة المناسب وادخاله الى الخلية العائل بوسيلة ما، بقيت الخطوة الأخيرة وهي تهيئة الأجواء الملائمة لذلك الجين كي يعبر

عن نفسه وينتج جزيئة البروتين المرغوبة. ولا بد من معرفة أن الجين المكون لا يتم التعبير عنه عادة في الخلية العائل بدون وجود تحويرات معينة تضمن تعبير ذلك الجين في الخلية العائل. ولكي يتم استنساخه، يجب أن يحتوي الجين الغريب المنحشر في الناقل الهجين على بروجين لآبد من تمييزه من قبل انزيم RNA polymerase العائل. أما ترجمة نسخة الـ mRNA، فتعتمد على وجود تسلسلات القائد (leader sequences) وعلى تحويرات الـ mRNA الملائمة لضمان ارتباطه بالريبوسوم. وكما نوقش هذا سلفاً (راجع الفصل الخامس)، تعد تلك العمليات المتنوعة في بدائية النواة مختلفة بشكل كبير عن الموجودة في حقيقية النواة. فعندما يتم ادخال الـ DNA الغريب في خلايا الكائنات بدائية النواة كما في البكتيريا، لا بد له من أن يجهز بالتسلسل القائد هنا وذلك للمساعدة في تخليق البروتينات في البكتيريا. وفي النهاية، يجب أن تزال الانترونات من جينات حقيقية النواة وذلك لأن العائل البدائي النواة لا يقص الانترونات بعد استنساخ الـ mRNA، وبالتالي، لا يمكن للبروتين الحقيقي النواة أن يكون فعالاً بدون أن يتم إزالة انتروناته قبل الترجمة.

تم التغلب على مشاكل تعبير الجينات الغريبة في الخلايا العائل بشكل كبير بمساعدة نواقل كلونة خاصة تدعى نواقل التعبير (expression vectors). عادة تشتق تلك النواقل من البلازميد pBR322 وتحتوي على اشارات بدء الاستنساخ والترجمة الضرورية. وتمتلك كذلك مواقع تقييد مفيدة لهذه التسلسلات بحيث يمكن للـ DNA الغريب أن ينحشر فيها. تحتوي بعض نواقل التعبير على أجزاء من أوبرون اللاكتوز (راجع الفصل السادس)، والذي يمكن أن ينظم وبكفاءة تعبير الجينات المكونة بنفس أسلوب الأوبرون. أما فيما يتعلق بادخال الجينات حقيقية النواة في البكتيريا، فمُنذ بدايات علم الهندسة الوراثية، تحمس الكثير من الباحثين بعد أن نجحت بعض جينات بدائية النواة في التعبير في الخلايا البكتيرية وبعد اكتشاف صفة العمومية (universality) في الشفرة الوراثية حيث تعطي الشفرة الوراثية نفس الحامض الأميني سواء في بدائية أو في حقيقية النواة (راجع الفصل الخامس)، وحاولوا - لهذا السبب - ادخال جينات حقيقية النواة في البكتيريا بنفس الطريقة التي تستعمل في ادخال الجينات بدائية النواة آن ذاك، على أمل أن تنجح تلك الجينات في التعبير عن نفسها في تلك البكتيريا، ولكن شيئاً من هذا لم يحصل. واستمرت تلك المحاولات الفاشلة الى أن اكتشفت حقيقة الانترونات في الجينات حقيقية النواة دون تلك البدائية منها عموماً (راجع الفصل الثاني). وبما أنه لا يوجد في البكتيريا نظام يمكن أن يزيل الانترونات ويربط الاكسونات مع بعضها (راجع الفصل الرابع)، لذا، لا بد من البحث عن طريقة تمكن الباحثين إزالة الانترونات الغير مرغوبة قبل ادخال الجين الحقيقي النواة في البكتيريا.

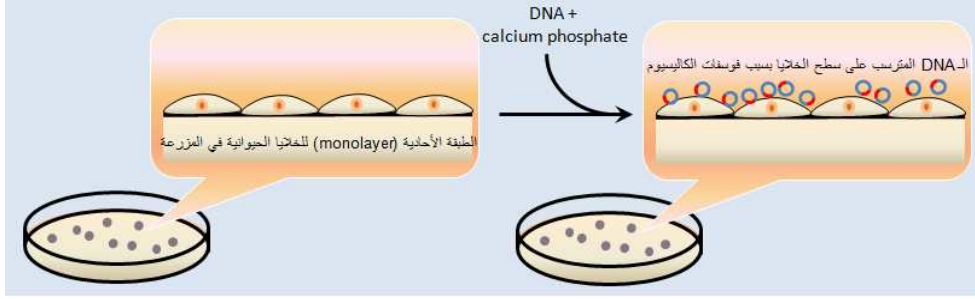
في الكائنات الراقية، تستنسخ العديد من الجينات إلى mRNA فقط بأنواع خلوية متخصصة. وعلى سبيل المثال، توجد جزيئات الـ mRNA التي تشفر إلى بروتينات الكلوبين في الخلايا الشبكية reticulocytes فقط. وبالمثل، ينتج الـ mRNA الذي يشفر للألبومين، البروتين الأساسي في المصل، من خلايا الكبد فقط عند تخليق الألبومين. ويمكن

كلونة تسلسلات الـ DNA المتخصصة التي تعبر لجزيئات الـ mRNA في الخلية المعنية وذلك عن طريق تخليق نسخ DNA لجزيئات الـ mRNA معزولة من ذلك النوع من الخلايا، ثم تحشر نسخ الـ DNA تلك في البلازميد أو في نوافل الكلونة الأخرى. تدعى نسخ الـ DNA من جزيئات الـ mRNA بالـ DNA المكمل (cDNA) complementary DNA. بالإضافة إلى تمثيله فقط التسلسلات المعبرة لجزيئات الـ mRNA في نوع الخلية المحدد، ولكن يفتقد الـ cDNA الانترونات الغير مشفرة noncoding introns الموجودة في تسلسلات جينوم الـ DNA. وهذا، فمن الممكن تحديد تسلسل الأحماض الأمينية للبروتين مباشرة من التسلسل النيوكليوتيدي للـ cDNA المطابق له. إن العديد من جينات الكائنات الراقية تعد كبيرة جداً ولا يمكن أن تحشر في البلازميدات ولا حتى عاثيات لامدا، بسبب انترونها الطويلة التي تتخلل اكسونات تلك الجينات. وهذا هو الذي حدا الباحثين في هذا المجال إلى تشييد الـ cDNA للجينات المرغوب كلونها (أنظر الفصل الحادي عشر).

ب. ادخال الجينات في الخلايا حقيقية النواة

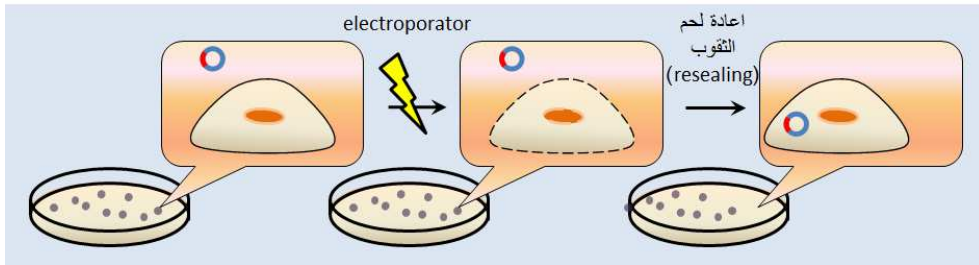
كرس الباحثين جل جهودهم في تطوير تقنيات ادخال الجينات الى الخلايا حقيقية النواة وذلك لما تمتلكه تلك العملية من أهمية تطبيقية، حيث تتمتع تلك الخلايا الراقية بنمط معالجة متفردة لايمكن توفيرها في الخلايا بدائية النواة. استخدمت العديد من تلك التقنيات أيضاً وبنجاح في تحول العديد من الخلايا حقيقية النواة. وهي تحتاج الى معاملات خاصة كل حسب نوعه، حيث تحتوي بعض الخمائر والفطريات والخلايا النباتية على سبيل المثال على جدران خلايا (cell wall) والتي تحتاج إلى أن تهضم لكي تنتج البروتوبلاست (الخلية ناقص الجدار الخلوي) قبل أن يتم التقاط الـ DNA، بينما لا تحتوي الخلايا الحيوانية على أي جدار سميك يحيط بها، وهذا بدوره يسهل عملية دخول الجين من هذه الناحية. وهنا يبرز التباين في معاملة تلك الخلايا الحقيقية النواة ذات الأصول المختلفة حسب طبيعتها الفيزيائية. وهناك طرق كثيرة لإدخال الـ DNA الغريب إلى الخلايا حقيقية النواة بشكل عام يمكن إجمال أهمها بالآتي:

- 1- طريقة أخذ الـ DNA الغريب أو الترسيب المشترك (co-precipitation): إن الطريقة العامة لإدخال الـ DNA الغريب إلى خلايا اللبائن تتضمن الترسيب المشترك co-precipitation للـ DNA مع فوسفات الكالسيوم، ثم يقدم المزيج إلى الخلايا في الوسط الزراعي (شكل 14.10). ينحشر الـ DNA عادة كنسخ محددة في الجينوم الخلوي.



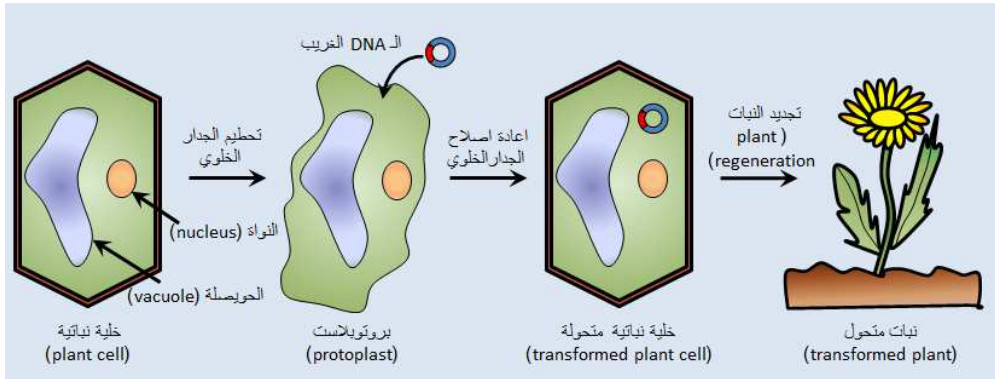
شكل (14.10). استراتيجية ادخال الـ DNA الغريب عن طريق ترسيبه في الخلايا الحيوانية (تصميم المؤلف).

2- طريقة التثقيب الكهربائي electroporation: لزيادة كفاءة أخذ الـ DNA تستخدم تقنية الـ electroporation بشكل متكرر. تطبق هذه التقنية في الخمائر والفطريات وفي الخلايا النباتية، وبشكل أقل في الخلايا الحيوانية. وفي هذه التقنية، تعرض الخلايا إلى نبضة كهربائية مقتضبة brief electrical pulse عن طريق جهاز مولد النبضات (pulsar device)، والتي تسبب تحطم موضعي مؤقت وسوء تنظيم disorganization في الجدار الخلوي، جاعلاً إياه منفذاً permeable لانتشار جزيئات الـ DNA الهجينة (شكل 15.10). هنالك عدة فوائد "لمموسة" من هذه التقنية الفيزيائية لعل أبرزها هو سرعتها، وقلة تكلفتها مقارنة بتقنيات الحقن المجهرية، بالإضافة إلى قدرة هذه التقنية على إنتاج نسبة عالية من الخلايا المهندسة الوراثية. وعلى الرغم من قدرتها العالية تلك، إلا أن تلك المجالات الكهربائية ذات الطاقة العالية لها تأثيرات فيزيائية ضارة على حياة الخلايا المتعرضة لها. لذا، يحتاج الباحث إلى جعل ظروف استخدام هذه التقنية مثالية قدر الإمكان لتجنب تضرر الخلايا المراد هندستها وراثياً.



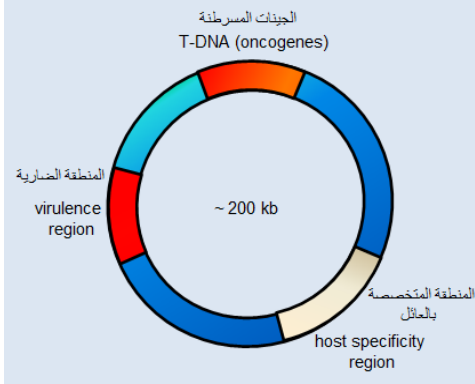
شكل (15.10). تقنية التثقيب الكهربائي (electroporation). يقوم جهاز مولد النبضة الكهربائية بتسليط نبضات كهربائية محسوبة على الخلايا المتعرضة للـ DNA الغريب. يؤدي هذا إلى تكوين ثقب مؤقتة في أغشية الخلايا مما قد يؤدي إلى دخول ذلك الـ DNA داخل الخلايا لتكوين الخلايا الهجينة (تصميم المؤلف).

3- طريقة تكوين البروتوبلاست (protoplast generation method): وتتم هذه الطريقة في الخلايا المحاطة بجدران الخلايا، حيث تتم إزالة جدران تلك الخلايا عن طريق إضافة عدد من الانزيمات المتوفرة لتوليد ما يعرف بالبروتوبلاست في الظروف المثالية (شكل 16.10). بعد هذه المرحلة تتم إضافة الـ DNA الغريب الى البروتوبلاست، ثم تتم إعادة البروتوبلاست الى حالته الطبيعية عند توفر الظروف المناسبة. تعاني هذه الطريقة من صعوبة عودة البروتوبلاست الى الحالة الخلوية الطبيعية.



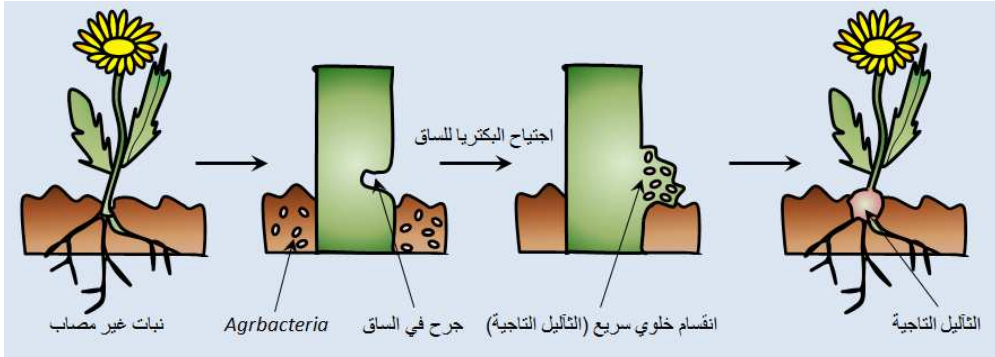
شكل (16.10). إدخال الـ DNA الغريب الى خلايا البروتوبلاست (تصميم المؤلف).

4- حقن بكتريا العقد الجذرية *Agrobacterium injection*: وفيها تستخدم بلازميدات تاي Ti plasmids للخلايا النباتية. إن واحد من أكثر النواقل المستخدمة في الهندسة الوراثية في النباتات هو "Ti plasmid" والذي يعني "البلازميد الحاث للورم tumor inducing plasmid". والموجود في بكتريا *Agrobacterium tumefaciens*. في ذوات الفلقتين dicotyledons، ينتج هذا البلازميد خلايا ورمية تعرف بالمرارة التاجية crown galls. يمكن لهذا البلازميد أن يتبدل بحيث يحمل DNA مسافر passenger DNA إلى النباتات من دون تحويل الخلايا إلى أورام. توجد ضمن Ti plasmid جينات في قطعة تدعى بالـ T DNA والتي تعني الدنا الناقل transfer DNA. تحتوي هذه المنطقة على الجينات التي تشفر للإنزيمات الضرورية لتخليق الأحماض الأمينية الغير طبيعية والـ opines ومواد أخرى والتي تسبب نمو خلوي غير منظم (الورم) (شكل 17.10).



شكل (17.10): تركيب Ti plasmid الطبيعي الموجود في بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* (تصميم المؤلف).

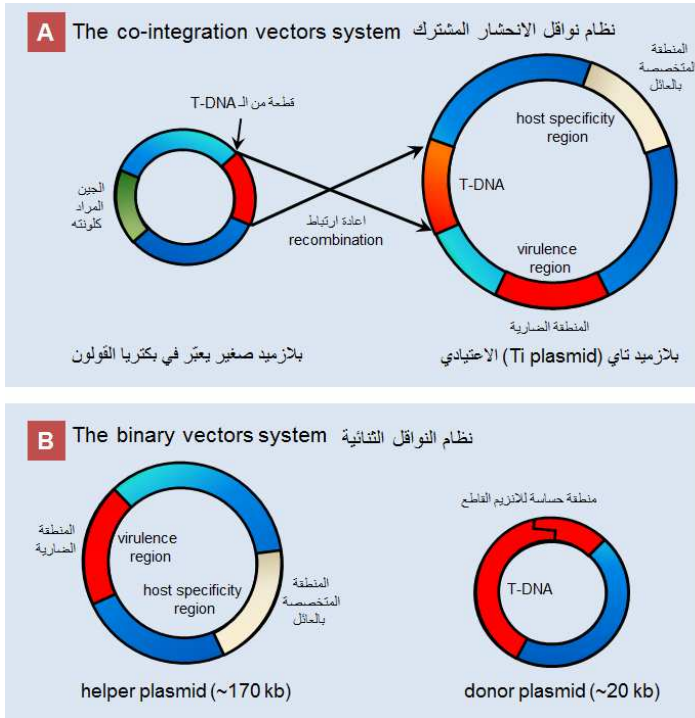
عزل هذا البلازميد من بكتريا *Agrobacterium tumefaciens*، وهي بكتريا تعيش في التربة وتدمج النباتات مسببة لتكوين مرضاً ورمياً يسمى بالمرارة التاجية crown galls disease (شكل 18.10). وفي حالة الخمج، تنتقل قطعة صغيرة (حوالي 20 kb) تدعى T DNA والموجودة في Ti plasmid وتنحسر بالكروموسوم النباتي. يتم التحكم في عملية النقل من قبل جين الضراوة *vir* (virulence) gene والواقع في Ti plasmid.



شكل (18.10): طريقة خمج الخلايا النباتية ببكتريا *Agrobacterium tumefaciens* والاصابة بمرض الثآليل التاجية (تصميم المؤلف).

إن حجم Ti plasmid جعله غير ملائم لأن يكون كناقل كلونة وذلك لسببين على الأقل: (1) عندما تدمج الخلايا النباتية بـ Ti plasmid تتحول إلى خلايا ورمية والتي لا يمكن أن تتحول إلى نباتات سوية. (2) إن حجم Ti plasmid هو 150-200 kb جعله من الصعب جداً أن يتم إجراء عمليات التلاعب الجيني فيه. ولذلك، تم تطوير طريقتين لأجل كلونة الجينات باستعمال هذا الناقل النباتي، تعرف الطريقة أو الاستراتيجية الأولى بنواقل الانحشار المشترك (co-integration vectors) والاستراتيجية الثانية بالنواقل الثنائية (binary vectors). ففي الاستراتيجية الأولى، ينتج انحشار الـ DNA الجديد في Ti

plasmid من عملية اعادة ارتباط (recombination) لبلازميد ناقل صغير، كما في نوافل بكتريا القولون، مع Ti plasmid الموجود في الـ *Agrobacterium*. وتحدث عملية اعادة الارتباط بين المنطقة المتماثلة الموجودة في كلا البلازميدين (شكل A 19.10).

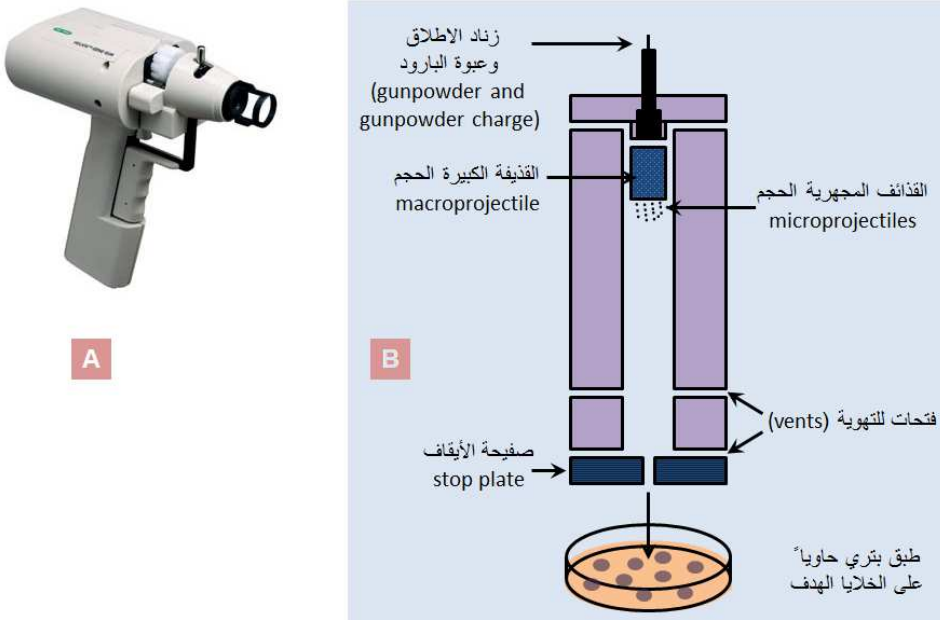


شكل (19.10): استراتيجية الكلونة باستخدام نواقل الكلونة المشتقة من Ti plasmid (A) نظام نواقل الانحشار المشترك (co-integration vectors)، وفيه يحمل البلازميد الصغير الجين المراد كلونه بشكل مباشر وينتقل الجين بواسطة عملية اعادة الارتباط مع Ti plasmid الطبيعي، (B) نظام الناقل المزوج binary cloning system. ان البلازميد الواهب و المساعد يكملان بعضهما البعض في حالة وجودهما في نفس خلية الـ *Agrobacterium tumefaciens*. وينتقل الـ T-DNA المحمول في البلازميد B الى الـ DNA الكروموسومي في النبات بواسطة البروتينات المشفرة من قبل الجينات المحمولة على البلازميد A (تصميم المؤلف).

في الاستراتيجية الثانية، صمم ما يعرف بنظام الناقل المزدوج binary vector system، والذي يتألف من بلازميد مساعد (helper plasmid) وبلازميد واهب (donor plasmid). ان البلازميد المساعد هو عبارة عن Ti plasmid ولكن بشكل "مزال الأسلحة" بسبب حذف قطعة الـ T-DNA (الحاملة للجينات المسببة للورم) بشكا كامل منه. أما البلازميد الواهب (donor plasmid) فهو عبارة عن بلازميد يعبر في بكتريا القولون ويحمل قطعة مقتضبة من الـ T-DNA. وهذا يعني أن البلازميدين يعملان معاً بصورة مكملية لبعضهما البعض، حيث يحمل البلازميد الواهب الجين المنحشر محاطاً بالتسلسلات الطرفية للـ T-DNA الخاصة بالقص، بينما يوفر البلازميد المساعد الانزيمات الضرورية (المشفرة من قبل جينات الضراوة vir genes) لتوجيه نقل الـ T-DNA الهجين (المحمل بالجين المنحشر المراد كلونته). وتم تطبيق هذا عملياً وذلك بحمل سلالة *Agrobacterium*

البلازميد المساعد المزال الأسلحة، بينما يحقن البلازميد الواهب بنفس البكتيريا وهذا يؤدي الى تكوين نظام الكلونة الثنائي (شكل B 19.10).

5- تقنية القذائف البايولوجية (biolistic technique): أتى اسم هذه التقنية من الكلمة biological ballistic والتي تعني القذائف البايولوجية. أن السلاح الجيني هو جهاز والذي يقوم "حرفياً" بقذف الـ DNA في الخلايا الهدف. وهي طريقة فيزيائية مباشرة لتحويل الخلايا وراثياً. وفي هذه العملية، يودع غلظاً رقيقاً من الـ DNA بسطح مصنوع من معدن الـ tungsten أو من خرز الذهب الدقيقة والذي يقدر بـ $0.5 - 1.5 \mu m$. يتم تحميل الخرز المحملة بالـ DNA وتطلق بواسطة "السلاح الجيني" (gene gun) وذلك بواسطة فعل انفجاري، أو كهربائي، أو شحنة ضاغطة يقوم بها هذا السلاح. تقذف الخرز المغطاة بالـ DNA بالأنسجة النباتية وتدخل الخلايا وتنحسر ضمن الـ DNA الكروموسومي بشكل عشوائي. (شكل a 20.10 &).

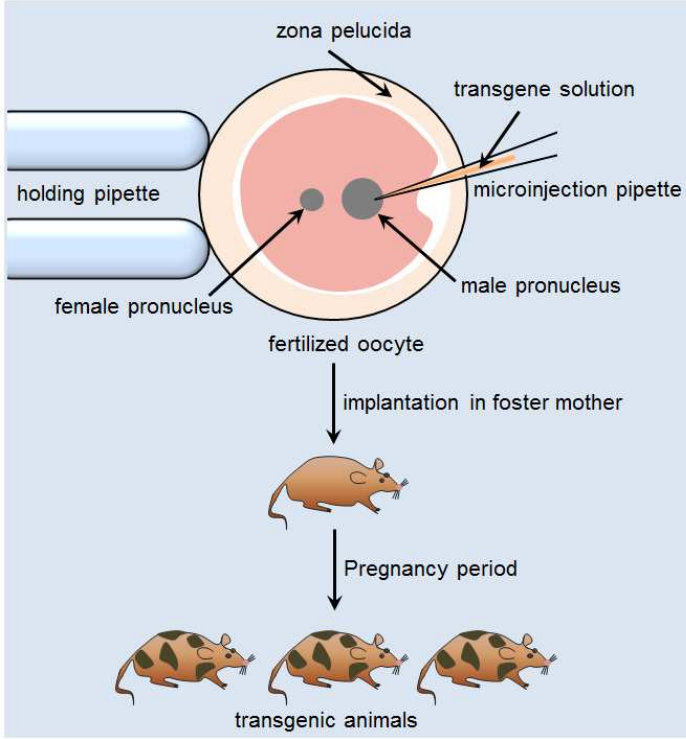


شكل (20.10): السلاح الجيني (جهاز اطلاق القذيفة البايولوجية) الذي يستخدم لإطلاق خرز الـ DNA المغلف بالخلايا النباتية. (a) جهاز السلاح الجيني (Bio-Rad corporation, USA) مخطط يوضح كيفية اطلاق القذيفة البايولوجية من قبل الجهاز. يغلف الـ DNA بالقذيفة المجهرية الحجم (microprojectile)، والذي يتم تسريعها بواسطة القذيفة الكبيرة الحجم (macroprojectile) عند اطلاق هذا السلاح. وفي صفحة الأيقاف، تسترجع القذيفة الكبيرة الحجم الى غرفة الاطلاق بينما تقوم القذيفة المجهرية الحجم بالاطلاق على النسيج الهدف (تصميم المؤلف).

يستخدم السلاح الجيني بالتحديد لخمج الخلايا التي يصعب خمجها بالحمض النووي بطرق أخرى كما في الخلايا النباتية. ولو أن هذه التقنية قد طورت أصلاً للخلايا النباتية، فأنها يمكن لها أن تطبق بالخلايا الحيوانية والأنسجة والعضيات والخمائر حتى والبكتريا والميكروبات الأخرى.

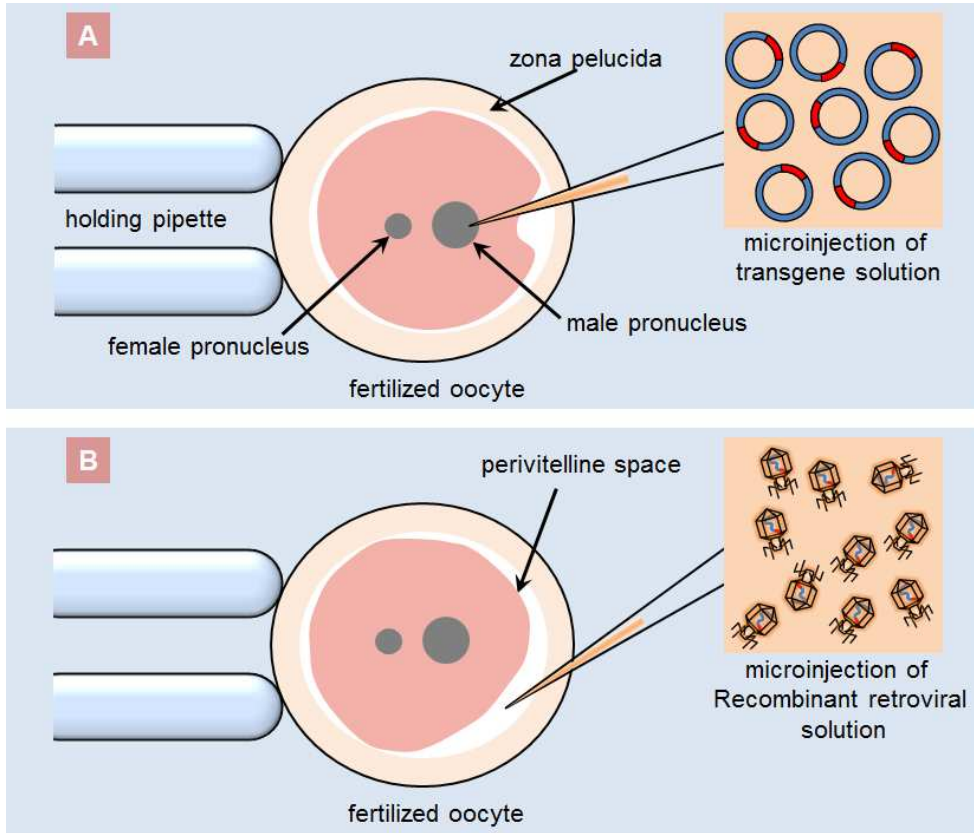
6- تقنية الحقن المجهرى في النواة الأولية pronuclear micro-injection: كانت تعد هذه الطريقة واحدة من أكفأ الطرق التي يتم بواسطتها انتاج بعض الحيوانات المهندسة وراثياً. وتتم من خلال حقن الـ DNA بالنواة الابتدائية الذكرية male pronucleus للبيضة المخصبة باستخدام micropipette مخصصة لهذا الغرض (شكل 21.10). يعزى السبب الذي يكمن وراء حقن الجين الغريب في النواة الأولية الذكرية دون الأنثوية لحقيقة كبر حجم النواة الأولية الذكرية مقارنة بنظيرتها الأنثوية، وبالطبع، يسهل هذا من مهمة الباحث الذي يروم حقن الجين بشكل صحيح. ولأغراض التعبير الجيني، فإن الجين قيد الدراسة يجب أن يشيد بشكل صحيح مع منطقة بروموتر وعناصر تنظيم أخرى لتوجه الانتاج البروتيني المتخصص بالنسيج tissue specific production. تغرس الزيجة المتحولة بأمر بديلة surrogate mother لتعطي نسلًا محوور وراثياً. تعتبر هذه التقنية الوسيلة الأكثر مباشرة في هذا المضمار في انتاج الحيوانات المهندسة وراثياً، حيث تحقن المادة الوراثية في الخلايا الحيوانية بشكل مباشر كما في الخلايا البيضية المخصبة وأحياناً ينحسر الـ DNA الغريب بثبات بجينوم العائل لينتج حيوان مهندس وراثياً transgenic animal. وتستخدم ماصة زجاجية دقيقة جداً في هذا النوع من النقل، حيث يحقن الحين الغريب من خلالها الى الخلية البيضية المخصبة حديثاً والمثبتة في محلها بواسطة ماصة ماسكة.

لابد من الإشارة الى اقتصار هذه التقنية على النقل العمودي للجين حصراً (vertical gene transfer)، ومعنى النقل العمودي للجين هو انتقال الجين من جيل الى آخر (من الآباء الى الأبناء)، وهذا لا يحدث الا بواسطة التلاعب بالخلايا الجرثومية (germ cells)، ويؤدي في حالة نجاحه الى تكوين حيوانات وليدة مهندسة وراثياً (transgenic animals)، وبما أن هذه التقنية تتخصص في حقن الجين الغريب في النواة الذكرية الأولية للخلايا البيضية، وهي بالطبع خلايا جرثومية، لذا لا يمكن استخدامها في نقل الجين الأفقي (horizontal gene transfer) أي نقل الجين عبر الخلايا الجسمية (somatic cells)، والذي يحدث أما خارج جسم الكائن الحي (in vitro) كما في الخلايا النامية في أطباق بترى، أو حقن الجين داخل الجسم مباشرة (in vivo) للأغراض العلاج الجيني (gene therapy) كما في حقن الجين المعبأ بالغلاف الفايروسي، أو الممزوج باللايوزوم على سبيل المثال (أنظر أدناه).



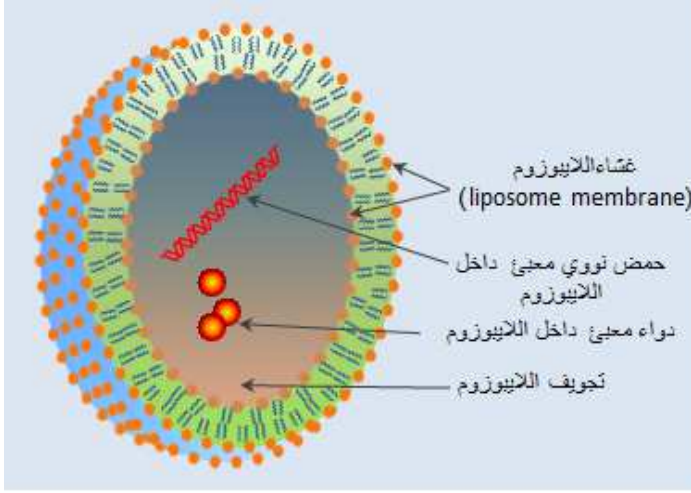
شكل (21.10): مخطط لعملية الحقن المجهرى في النواة الأولية. يتم حقن الـ DNA المرغوب بالنواة الأولية الذكرية بواسطة الماصة الدقيقة التي تستخدم لتقب الخلية البيضية. بعد سحب الماصة الدقيقة، تغرس الخلايا البيضية التي ماتزال على قيد الحياة في القناة البيضية للأنث ذات الحمل الكاذب كي تنتج ربما حيوانات وليدة مهندسة وراثياً (تصميم المؤلف).

7- تقنية الخمج الفايروسي (viral transfection) أو تقنية الـ transfection: توفر الطريقة المتوسطة من قبل الفايروسات وسائل ملائمة وكفوءة في إدخال جينات الكائنات حقيقية النواة إلى الخلايا الحيوانية. تتضمن هذه الطريقة استخدام عدد من الفايروسات، كما في (SV40) simian virus 40 و Epstein-Barr virus (EBV) و retrovirus. يستخدم كذلك baculovirus وبعض خلايا الحشرات كعائل في هذا النظام. تشتق نواقل تعبير اللبائن لهذا الغرض من التسلسل التنظيمي (أي الـ promoter والـ enhancer) التابع لـ DNA الفايروسات. وباستخدام هذه التقنية، يمكن حقن الجين عمودياً (شكل 22.10)، أو أفقياً في الخلايا الجسمية مباشرة لأغراض العلاج الجيني كما بينا في أعلاه. لعل أهم المشاكل المتعلقة بنقل الجين بهذه الطريقة تتمثل بالخطر البايولوجي (biohazard) الناجم من التعامل العملي مع تلك الفايروسات. وعلى الرغم من اجتهد العديد من الباحثين في حذف الجينات البيايولوجية الخطرة، كالجينات المسرطنة الفايروسية، من تلك النواقل الفايروسية إلا أن احتمال الخطر البايولوجي على صحة العاملين وعلى صحة المرضى المستلمين لتلك العلاجات يبقى وارداً. وهذا يستوجب العمل في تطوير طريقة نقل غير فايروسية (nonviral gene delivery techniques) كما في اللابيوزمات.



شكل (22.10). مقارنة بين تقنية الحقن المجهرى في النواة الأولية (A) والنقل الجيني المتوسط من قبل الفايروسات الارتكاسية (B)، وهنا دقائق الفايروسات الارتكاسية قد تم حقنها في الفراغ البيني (perivitelline space) والواقع بين الـ zona pellucida، وهو غشاء الحماية الخارجي للجنين والذي يمنع دخول الفايروسات الهجينة، والغشاء البيضي (oocyte membrane) (تصميم المؤلف).

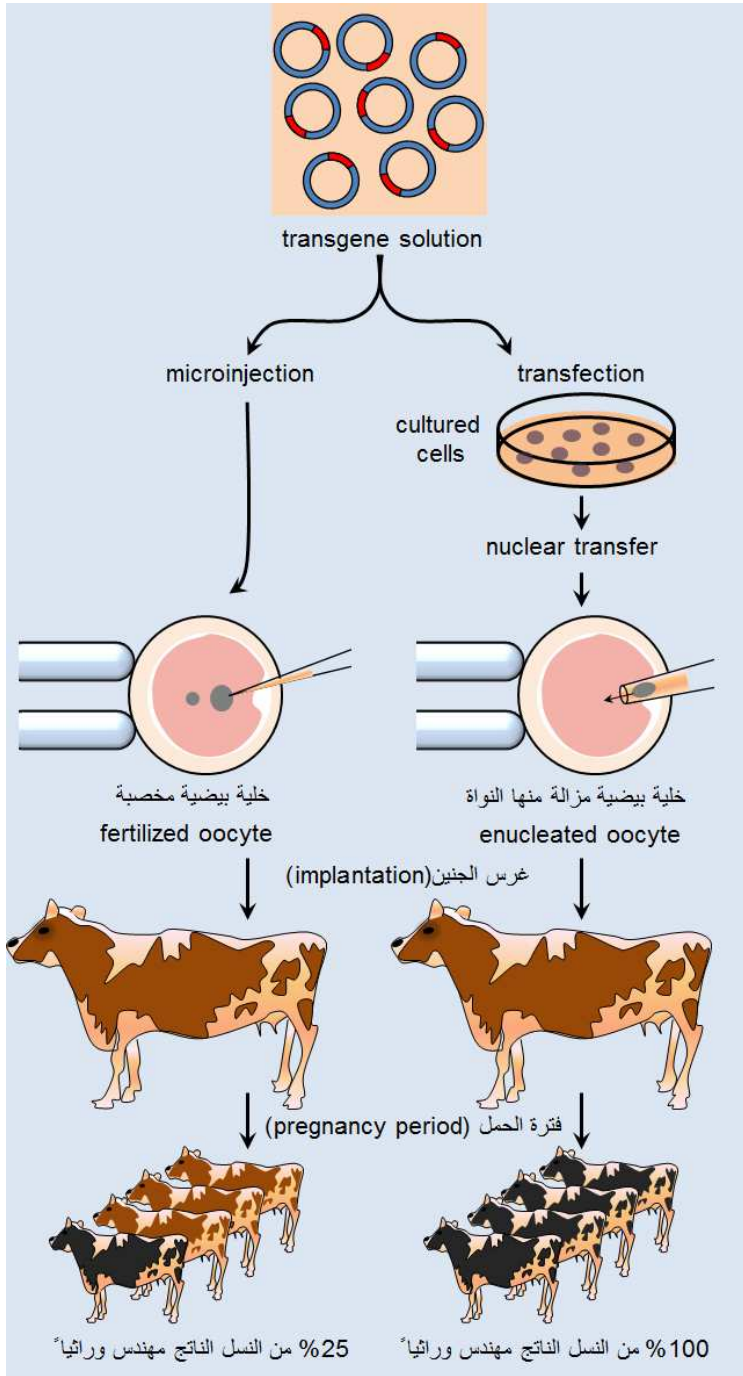
8- تقنية نقل الـ DNA المتوسطة من قبل اللايبوزوم (liposome mediated DNA transfer). وهي تقنية كيميائية بحتة لنقل الجين تعتمد على ارتباط الـ DNA باللايبوزومات، ويمكن أن تستخدم – كما هو الحال في الناقلات الفايروسية – في نقل الجين أفقياً وعمودياً. واللايبوزومات هي عبارة عن كرات مجوفة محاطة بأغشية مصنوعة من جزيئات تشبه الدهون تسمى بالدهون الفسفورية (phospholipids) (شكل 23.10).



شكل (23.10). مخطط يوضح إمكانية قيام اللايبوزوم بحمل الجينات. في العديد من الخلايا حقيقية النواة، يحاط اللايبوزوم بأغشية دهون فوسفاتية ثنائية (phospholipids bilayer). تحمل اللايبوزومات الجينات العلاجية أو الأدوية بشكل ما بحيث يمكن للجينات أو للأدوية الاندماج في الغشاء البلازمي للخلية حقيقية النواة وذلك لتطلق محتوياتها في داخل الخلية (تصميم المؤلف).

بعد خلط الـ DNA المهندس وراثياً (المغروس في الناقل الجيني المناسب) مع تلك الكرات، يتم ادخاله الى الخلايا المستقبلة أما بواسطة حقن تلك المعقدات معها (خارج جسم الكائن الحي)، أو بواسطة الحقن المباشر لتلك المعقدات في جسم الكائن (داخل جسم الكائن الحي). وعند اندماج اللايبوزوم مع الغشاء الخلوي يقوم بتحرير الـ DNA الى السائتوبلازم. وبواسطة آلية غير معروفة، يقوم ذلك الـ DNA بالانتقال الى النواة حيث يتم التعبير ربما عن الجين المرغوب. تعد اللايبوزومات بالاضافة الى كفاءتها، غير خطيرة من الناحية البايولوجية، وهي بهذه الصفة قد تتغلب عن النواقل الفايروسية المعروفة. ولهذا، تم تجريب العديد من أنواع اللايبوزومات في تجارب العلاج الجيني للعديد من الأمراض وهي مازالت قيد التطوير الى الآن.

9- النقل النووي من الخلايا الجسمية somatic cell nuclear transfer أو SCNT: وتعرف تلك التقنية في معناها الأصيل، التقنية التي يمكن أن تستخدم في تخليق نسخة وراثية متماثلة وراثياً (نسيطة أو كلون) من الحيوان. تتضمن تقنية النقل النووي إزالة النواة من البويضة الغير مخصبة (خلية البويضة oocyte) المأخوذة من حيوان مباشرة بعد التبويض ovulation وذلك باستخدام إبرة خاصة لهذا الغرض تعمل تحت مجهر ذو طاقة عالية high power microscope. الخلية الببيضية النامية الآن، والخالية من المواد الوراثية، تدمج مع النواة المأخوذة من الخلية الواهبة donor cell. ثم تتطور الخلية الببيضية المندمجة وكأنها جنين طبيعي، ثم تغرس بالنهاية رحم الأم البديلة (surrogate mother) لينتج النسل (شكل 24.10). أن اهم أمثلة هذه التقنية والتي وجدت صدى اعلامي كبير هو استئصال النعجة دوللي، وهي نسخة طبق الأصل من الحيوان الواهب الأم (أنظر ملحق هذا الفصل).



شكل (24.10): مخطط يوضح مقارنة بسيطة بين تقنية الحقن النواة الأولية (يسار الشكل) وتقنية النقل النووي من الخلايا الجسمية (يمين الشكل). وفي تقنية النقل النووي من الخلايا الجسمية المحورة وراثياً، كل النسل الناشئ يكون مهندس وراثياً لأنه لا يوجد نواة ماعدا تلك التي تمثل النواة الواهبة، والتي تؤخذ من المزرعة الخلوية الجسمية المخموجة بالـ DNA الغريب (تصميم المؤلف).

يمكن انتاج بعض حيوانات مهندسة وراثياً بواسطة تقنية SCNT. وتدعى هنا بالمهندسة وراثياً (transgenic animals) وذلك لأن النواة الواهة قد نشأت من خلية تحمل بعض التحويلات الوراثية. وعلى هذا الأساس، أي حيوان نشأ بواسطة هذه التقنية يعتبر "مهندس وراثياً" أو transgenic بسبب حمله لنفس التحويلات الموجودة في الخلايا الجسمية التي أخذت منها النواة الواهة. وببساطة، تتولد الحيوانات المهندسة وراثياً بواسطة تقنية SCNT عن طريق خمج الخلايا بقطعة الـ DNA الغريب بعد أخذها من الحيوان الواهب وقبل حقن نواتها المحورة وراثياً في الخلية البيضية المزالة نواتها (شكل 24.10).

إن إخصاب الببضة بواسطة النطفة ينتج عن تكوين زيجة zygote والتي تعطي بالنهاية كل خلايا الجسم الناضج – والتي يبلغ عددها أكثر من مئة ترليون خلية بتراكيب وبوظائف متنوعة – من خلال تغييرات تطورية مضطربة. تبدأ الزيجة بعملية الانشطار cleavage وهي العملية التي تعاني عندها الزيجة انقساماً سريعاً من خلية مفردة إلى خليتين بنويتين، 4، 8، 16، وهلم جرا. إلى أن يصل الجنين إلى مرحلة الـ blastula، وحالما يدخل الجنين تلك المرحلة، تصبح الخلايا متميزة differentiated. إن التمايز يعرف بالعملية التي بها تتبع الخلايا ذات الأصل الواحد مسالك تطورية مختلفة different developmental pathways وصولاً إلى الخلايا المتخصصة specialized cells، وعلى سبيل المثال، الخلايا العصبية، الخلايا العضلية، ... الخ. – والتي بالنهاية تكون أنسجة متنوعة وأعضاء الجسم. كل العملية يتم التحكم بها من خلال جينات متنوعة في مجموعة محددة من الخلايا. إن الخلية المنتجة من أول انقسامات قليلة بعد الإخصاب تكون غير متميزة، وهذا يعني بأنها يمكن لها أن تتطور إلى أي نوع من الخلايا. إن الخلايا الجنينية الأولية الغير متميزة قد تم استخدامها كمصدر للكلونة باستخدام تقنيات النقل النووي nuclear transfer techniques، وذلك قبل كلونة النعجة دولي من خلايا جسمية متميزة (أنظر ملحق هذا الفصل).



Ian Wilmut



Dolly the sheep

ملحق الفصل العاشر

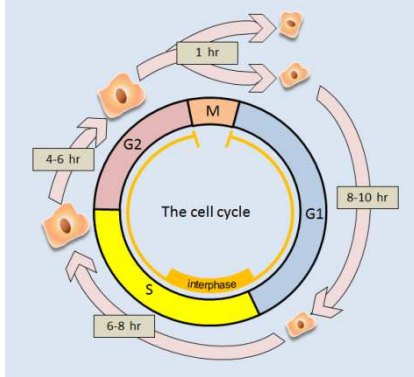
كلونة النعجة دولي Cloning Dolly the sheep

حدث هنالك إنجاز تطوري عظيم في مجال البايولوجي والطب في عام 1996 وذلك عندما نجح العلماء في معهد روزلين Roslin institute في اسكتلندا بقيادة العالم أيان ويلموت (Ian Wilmut) في كلونة حيوانات من خلايا مزروعة مأخوذة من نعجة ناضجة (mature ewe). إن دولي (1996 – 2003) هي أول نسخة من

اللبائن تم تخليقها وذلك بنقل النواة من خلية "ناضجة" إلى خلية بيضية غير مخصبة (المزال منها نواتها). وقد تم إنتاج كائنات مستنسخة من خلايا الفئران و الماشية والنعاج والخنازير وحيوانات أخرى.

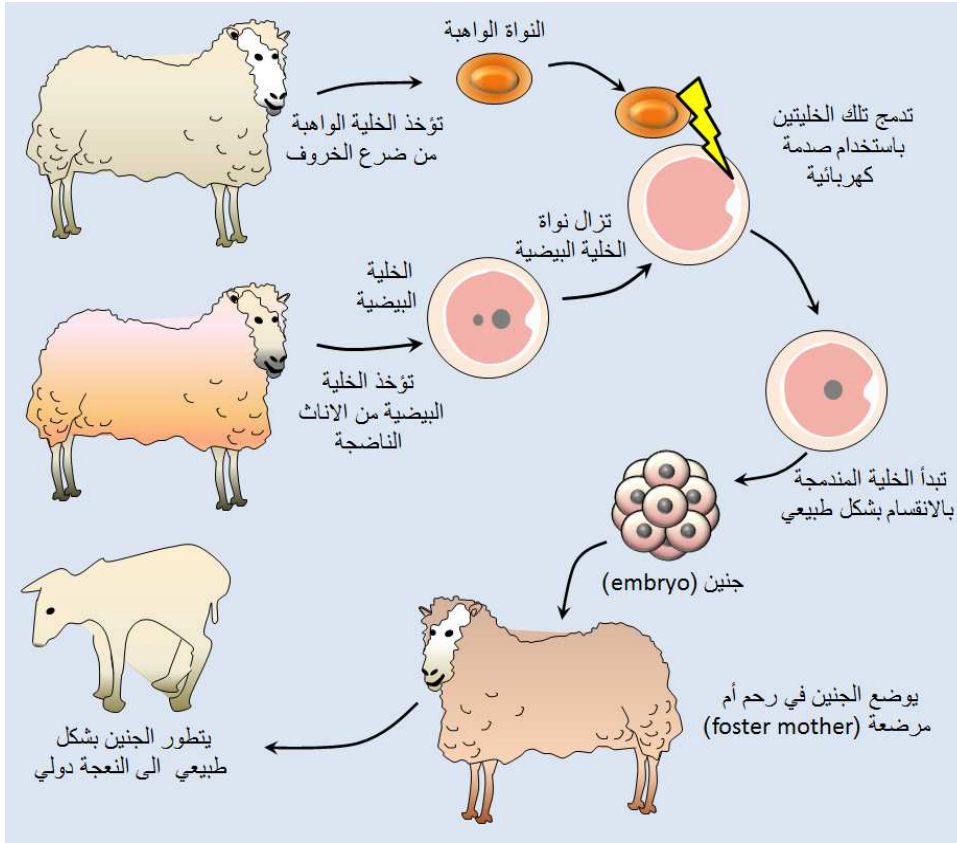
طبقت تقنية النقل النووي لأول مرة لكلونة الضفادع عام 1952، ولكن الخلايا لم تتطور إلى بعد مرحلة الـ tadpole. وفي منتصف الثمانينات، نجحت الكثير من المراجع البحثية في إنتاج نعاج وأبقار عن طريق تقنية النقل النووي باستخدام الخلايا الجنينية المبكرة. وفي بعض الدراسات اللاحقة، استخدمت خلايا الأجنة التي عبرت إلى مرحلة 64 إلى 128 خلية في إنتاج العجول. إن التقدم الرئيسي الذي مهد لكلونة نعجة دولي هو عندما أنتج الباحثون في معهد روزلين بنجاح عجولاً بواسطة تقنية النقل النووي من خلايا مأخوذة من الأجنة المبكرة المزروعة منذ عدة أشهر في المختبر. إن التجربة المستخدمة للخلايا الجنينية المزروعة أدت إلى كلونة النعجة دولي باستخدام خلايا ناضجة (متمايزة)، والتي اختلفت عن كل المحاولات السابقة في توظيف الخلايا الجنينية (الغير متمايزة) في عملية الكلونة. إن النجاح في كلونة الخلايا الناضجة أثبتت بأن تمايز الخلايا هو عملية عكسية، وأن الوقت هو كفيلاً بتطوير التلاعب الجيني وإعادة برمجة تمايز الخلايا. إن السر في نجاح كلونة النعجة دولي هو التنسيق الحذر في دورة الخلية cell cycle للخلية الواهبة (شكل 25.10). إن الخلايا المستخدمة كواهبات للنقل النووي تكون في مرحلة في دورة الخلية يطلق عليها بمرحلة الخمود quiescence- وهو الطور الذي عنده تعطلت الخلية وتتوقف عن الانقسام لمعظم الخلايا، ويمكن تمثيل تأريخ الحياة كدورة متكررة من الطور الاستوائي metaphase (M phase) والطور البييني interphase. يتضاعف DNA الخلايا خلال جزء خاص من الطور البييني يطلق عليه بالـ S phase. يحتوي الطور البييني كذلك على فجوتين زمنييتين: G1 والواقعة بين نهاية الانقسام الخيطي mitosis وبداية الـ S phase، و G2 والذي يفصل بين الـ S phase وبداية الانقسام الخيطي M phase. ولا يصنع DNA خلال طوري الـ G1 و الـ G2، وعلى أية حال، يحدث تخليق البروتين في كل أنحاء الطور البييني. وللتبسيط، يمكن ملاحظة دورة الخلية بأنها تتألف من طورين أساسيين - طور للانقسام النووي لتكوين

خليتين بنويتين (الانقسام الخيطي)، و طور آخر لتخليق الـ DNA والبروتين. إن الخلايا التي لا تنقسم هي عادة ما تعطلت (يتوقف نموها) في طور الـ G1.



شكل (25.10): دورة الخلية النموذجية في الكائنات حقيقية النواة كاللبنائن (تصميم المؤلف)

ولأجل كلونة النعجة دولي، تشتق الخلية الواهبة المستخدمة من غدة الضرع mammary gland لنعجة عمرها ستة سنوات في آخر ثلاث أشهر من الحمل. يوقف نمو الخلايا وذلك بتميمتها على وسط ذو تراكيز قليلة من المغذيات لخمسة أيام. تستحصل البيوض المخصبة من عجول اسكوتلاندية معينة بين 28 إلى 33 ساعة بعد حقن الهرمون المطلق للجونادوتروبين gonadotropin releasing hormone، ثم تزال الأنوية (شكل 26.10).



شكل (26.10). خطوات كلونة النعجة دولي. أزيلت النواة الواهبة من الخلية الجلدية للنعجة الناضجة وادخلت الى السايوبلازم الفارغ في بيضة النعجة الفارغة وذلك لتكوين الجنين المكلون. تقوم بروتينات سايتوبلازم البيضة باعادة برمجة جينوم النعجة الناضجة الواهبة، وبعدها يقوم الجينوم المعاد برمجته بتوجيه الخلية لكي تصبح أقل تخصصاً. تغرس النسيلة (الكلون) الناتجة والواصلة الى مرحلة الـ blastocyst في رحم الانثى المرضع، لتولد نعجة "دولي" (تصميم المؤلف).

تتمثل الخطوة القادمة بنقل النواة من خلية ضرع واهبة إلى خلية بيضة مزالة منها النواة. هنا يتم تسليط نبضة كهربائية لحث اندماج الخلايا الواهبة بخلية البيضة عديمة النواة ولتنشيط الخلية على التطور. ومن مجموع 277 خلية مندمجة مستحصل عليها، تم تطوير 29 منها إلى أجنة (في مرحلة الـ morula أو الـ blastocyst). لقد قام Ian Wilmut وزملائه بزرع 13 نعجة، وهذا أنتج في نسل واحد على قيد الحياة يدعى دولي. اذن، لانتجاوز نسبة نجاح العملية بكاملها الـ 0.4% ليس الا !

أسئلة الفصل العاشر

السؤال الأول: علل ما يلي

يعبر عن الانزيمات القاطعة بالنظام المناعي في البكتريا؟
يمكن للبكتريا من أن تميز بين الـ DNA التابع لها والـ DNA الغريب عنها؟
يعتبر ربط النهايات للزجة لجزيئات الـ DNA أسهل من ربط النهايات المستوية لنفس تلك الجزيئات؟
لا بد من اضافة الوصلات في بعض التطبيقات عندما يكون المراد هو كلونة قطع DNA ذات نهايات مستوية؟
تعد طريقة التذييل ذو البوليمر المتجانس (homopolymer tailing) أقل شيوعاً من الطرق الأخرى في ربط نهايات جزيئات الـ DNA ببعضها؟
يمكن تحويل العاثي لأمدا بنجاح عن طريق حذف منطقته الوسطى بالذات؟
تعد عملية استخدام النواقل الجينية المشتقة من العاثي لأمدا أكثر تعقيداً من استخدام النواقل البلازميدية في نقل الجين؟
لا تستخدم البلازميدات عادة في عملية تشييد المكاتب الجينية للكائنات الراقية؟
عندما يكون المراد تشييد المكتبة الجينية يفضل أن تقطع قطع الـ DNA بشكل جزئي بالانزيم القاطع؟
يفضل استخدام الخلايا الراقية على خلايا بكتريا القولون كمضيف للـ DNA الغريب في بعض التطبيقات؟
عند قطع جين حيواني ما بانزيم قاطع وربطه في ناقل مناسب وادخال ذلك الناقل في بكتريا القولون، فانه يفشل في التعبير عن هذا الجين؟
ان Ti plasmid الطبيعي غير ملائم لكي يستخدم في تجارب الكلونة؟
على الرغم من كفاءة طريقة نقل الجين عن طريق الفايروسات المهندسة وراثياً الا أن المجتمع العلمي يفضل نقل الجينات طريقة لاتعتمد على الفايروسات؟
اكتسبت تجارب كلونة العجة دولي صدى اعلامي كبير على الرغم من أن "دولي" هي ليست أول كائن مستنسل في العالم؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

يعد انزيم EcoRI أحد أنواع انزيمات

a. endonucleases b. RNases c. Dnases d. polymerases

يعمل نظام التحويل في البكتريا على شريط الـ DNA الـ

a. methylated b. non-methylated c. hemimethylated d. none

لعل العلة من وجود الانزيمات القاطعة في البكتريا هو للمشاركة في عملية الـ

a. infection b. protection c. metabolism d. endocytosis

إذا افترضنا بأن تلك التسلسلات الحساسة الثمانية النيوكليوتيدات التي يميزها الانزيم القاطع *NotI* بأنها تتوزع بشكل متساوي ضمن الجينوم، فيمكن لهذا الانزيم أن يقص موقع واحد لكل زوج قاعدي.

- a. 256 b. 4026 c. 65536 d. 1048576

ان التسلسل هو تسلسل غير بالندرومي.

- a. 5'-GAATTC-3' b. 5'-GAATTCCTTAAG-3' c. 5'-GGCC-3' d. 5'-GCTACT-3'

لا تشارك انزيمات الـ DNA ligases بتفاعلات داخل الخلية.

- a. lagging strand synthesis b. excision nucleotide repair c. photoreactivation d. non-homologous end joining

يحتاج الانزيم terminal transferase الى لتأدية عمله بنجاح.

- a. primer only b. primer + template c. template + dNTPs d. primer + dNTPs

تعد صفة غير شائعة في النواقل الجينية عادة.

- a. low copy number b. completely sequenced c. presence of one origin of replication d. easy mode of gene transfer

إذا انحشرت قطعة DNA ما في البلازميد المقاوم للـ ampicillin، يكون البلازميد الهجين الناتج للـ ampicillin.

- a. highly resistant b. moderately resistant c. not resistant d. none

تستخدم في تجارب معرفة تسلسل الـ DNA.

- a. M13 b. λ phages c. cosmids d. pBR322

إذا احتوت قطعة الـ DNA على أصل التضاعف مع سنتروميير وتيلوميير عندها يمكن تسميتها بالـ

- a. plasmid b. λ phages c. cosmids d. artificial chromosome

تعد طريقة هي تقنية فيزيائية مباشرة لتحويل الخلايا جينياً.

- a. viral transfection b. liposome mediated transfer c. biolistic transfer d. none

تقتصر طريقة على النقل العمودي للجين حصراً.

- a. biolistic transfer b. nuclear microinjection c. electroporation d. viral transfection

السؤال الثالث: عرف ما يلي

cloning, clone, palindromic DNA, cos sequences, *in vitro* packaging, cosmids, DNA library, T DNA, chimeric DNA, liposomes, quiescence stage of the cell cycle

السؤال الرابع: صل المفردات الموجودة في اليمين مع ما يناسبها في اليسار

DNA transfer of 5 kb capacity	λ phages
DNA transfer of 20 kb capacity	Plasmids
DNA transfer of 50 kb capacity	Bacterial artificial chromosomes
DNA transfer of 200 kb capacity	Yeast artificial chromosomes
DNA transfer of 350 kb capacity	Cosmids

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

- Alberts B.**, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science, USA. 2008.
- Al-Shuhaib M**, Al-Saady A., Mahanem N. Study of rabbits transgenesis efficiency by sperm mediated gene transfer technique. PhD thesis presented to college of science, university of Babylon, 2011.
- Berk A.**, Zipursky S., Baltimor D., Darnell J., and Lodish H. Molecular Biology. Fourth edition. Paul Matuataira, USA, 1998.
- Brown T. A.** gene cloning and DNA analysis. Sixth edition, Wiley-Blackwell, 2010.
- Clark D.** Molecular biology: understanding the genetics revolution. Elsevier, 2010.
- Dale J.**, and Schantz M. From Genes to Genomes; concepts and applications of DNA technology. John Wiley and Sons, 2002.
- Dunn, L. C.** *A Short History of Genetics*. New York: McGraw-Hill. 1965.
- Fitzgerald-Hayes M.** and Reichsman F. DNA and Biotechnology. Third edition, Elsevier, 2010.
- Hanson B.**, and Jorde L. Kaplan USML Step 1 lecture notes. Kaplan Incorporation, 2001.
- Houdebine L.** Animal transgenesis and cloning. 2003, John Wiley & Sons Ltd.
- Klotzko A.** The cloning source book. Oxford University press/2001.
- Kumar H. D.** Molecular genetics and biotechnology. Second edition, Vikas Publishing House, India, 1997.
- Koolman J.** and Roehm K. Color Atlas of biochemistry. Second edition, Thieme, Stuttgart-New York – 2005.
- Lanza, R. P.**, Dresser, B. L., and Damiani, P. 2000. Cloning Noah's Ark. *Sci. Am.* 283(5), 84-89.
- Matthew, J. E.**, Gutter, C, Loike, J. D., Wilmut, 1., Schnieke, A. E., and Schon, E. A. 1999. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer- derived cloned sheep. *Nature Genetics* 23, 90-93.
- Nicholl D. S. D.** An introduction to genetic engineering. Third edition, Cambridge university press, 2008.
- Paterson, L. A.**, Wells, D. N., and Young, L. E. 2002.Somatic cell nuclear transfer. *Nature* A19, 583-586.
- Primrose S.B**, Twyman R.M., Old R.W. Principles of gene manipulation. Blackwell science. 2001.
- Prescott L.M.** Microbiology. Fifth edition, The McGraw-Hill Companies 2002.
- Reece R.J.** Analysis of genes and genomes. John Wiley & Sons, 2004.
- Robinson, R.** Genetics. Volume 3.Thomson™ Gale/USA/2003.
- Schleif, R.** Genetics and molecular biology. Second edition, Addison-Wesley Publishing Company, 1993.
- Tamarin.** Principles of genetics. Seventh edition. The McGraw-Hill. 2001.

Verma P., and **Agarwal V.** molecular biology. First Edition Schand group, India 2004.
Wilmot, 1. 1998. Cloning for medicine. *Scientific America* 279(6), 58-63.
Wilmot, 1., **Beaujean**, N., **de Sousa**, P. A., **Dinnyes**, A., **King**, T. J.,
Wong D.W.S. The ABCs of gene cloning. Second edition, Springer, 2006. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419, 583-586.

11

الفصل الحادي عشر

كيفية التعامل مع الجين



عينات DNA مقطعة بانزيمات قاطعة ومرحلة على هلام الأكاروز وموضوعة تحت مصدر للأشعة فوق بنفسجية لرؤية الحزم المنفلورة بسبب اصطبغها بمادة بروميد الاثديوم (Fitzgerald-Hayes and Reichsman, 2010).

مقدمة

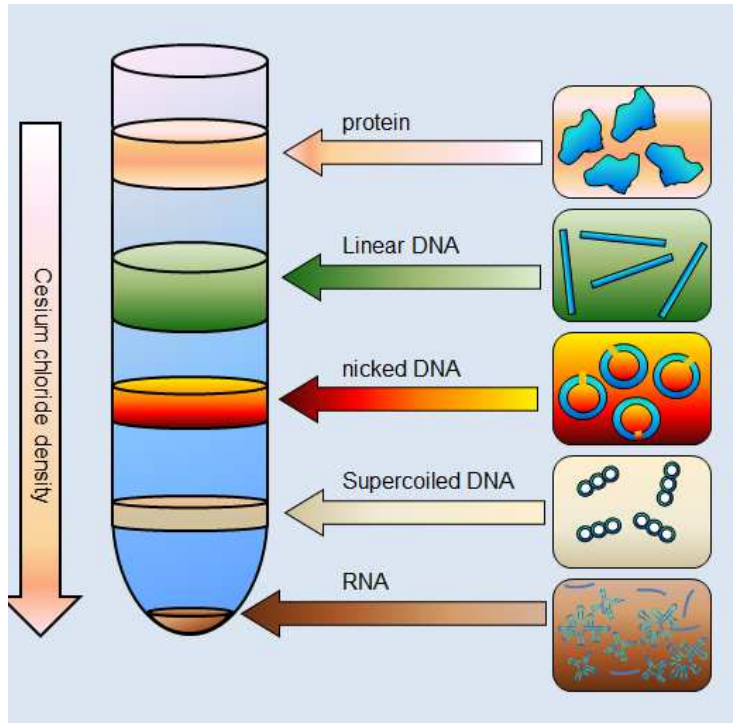
عرضنا في الفصل السابق خطوات كلونة الجينات الأساسية، وعرضنا كيفية ادخال الجينات سواء في الكائنات بدائية النواة أو في الكائنات حقيقية النواة. ولكننا لم نتناول كيفية التعامل مع الجين على النطاق العملي. حيث أننا لم نركز على مصير الـ DNA الغريب أو الجين بعد دخوله الى تلك الخلايا وكيف نكشف عن ذلك المصير، لأن هذا الكشف يتطلب تقنيات مختلفة، فقد تقوم تقنية ما بالكشف عن وجود أو عدم وجود الجين فقط، بينما تقوم تقنية أخرى بالتحري عن احتمالية انحشار ذلك الجين في الجينوم من عدمه، بينما تقوم تقنية أخرى بكشف قدرة ذلك الجين على اعطاء نسخ RNA منه وعلى كمية تلك النسخ، والأبعد من ذلك، هو استخدام تقنيات معينة في الكشف عن قدرة ذلك الجين في التعبير عن نفسه واعطاء بروتين مهندس وراثياً. ولابد من الإشارة الى أن هذا الفصل يعد من أكثر فصول الكتاب أهمية من الناحية التطبيقية، لأنه يسلط النظر على جوانب مختلفة من علم الهندسة الوراثية. ويبين عدم اقتصر هذا العلم على كلونة جين ما فقط، وإنما يسلط الضوء على مناح أخرى في تقنية الجينات لابد من ادراجها في الوقت الراهن واعتبارها أساساً حديثاً يضع في نصب عين القارئ الكريم كيفية تعامل الباحثين عملياً مع الجين. ولعل هذا يبدو واضحاً عند استعراض أهم التقنيات المستخدمة في هذا المضمار في الوقت الحاضر.

كيف نحصل على الجين (قطعة الـ DNA المرغوبة)

لعل أهم الأمور ذات الأهمية الكبيرة في كلونة الجين تتعلق في كيفية ايجاد التسلسل المرغوب للـ DNA، لأن هنالك الملايين أو البلايين من الأزواج القاعدية للـ DNA في الخلية. وللحصول على جزيئة الـ DNA أو الجين المرغوب يوجد عدة طرق لانجاز ذلك.

الطريقة الأولى: عزل المادة الوراثية والتقطيع الانزيمي. بعد عزل كل المادة الوراثية، يصار الى فصل الجين المعني عن بقية المادة الوراثية بواسطة انزيم قاطع مناسب. ولاتعد تلك الطريقة، أي عزل الـ DNA، هي الطريقة الوحيدة في الحصول على الجين ولكنها الطريقة الأقدم في ذلك. تعتبر جزيئات الـ DNA جزيئات طويلة وخطية وسهلة الكسر والتحطم بمجرد تمرير عالق الـ DNA في "زارقة ابر" أو syringe عدة مرات. لذا، لابد من توفر وسائل مناسبة للحصول على المادة الوراثية المحتوية على الجين المرغوب. وبعد التأكد من وجود ذلك الجين في المادة الوراثية لكائن معين، يصار الى استخلاص المادة الوراثية من ذلك الكائن. وبعد الحصول على الـ DNA ككل، بفصل الجين المرغوب عادة بواسطة انزيم قاطع مناسب ثم يربط بالناقل المناسب له (راجع الفصل العاشر). بعد الحصول على الـ DNA سواء أكان من الكروموسوم أو غير الكروموسوم (من البلازميدات) نقطة البدء للعديد من تجارب الهندسة الوراثية. وكان الـ DNA يستخلص وينقى عن طريق التقنيات التقليدية من تفجير مستخلصات الخلية بوجود المنظفات وعن طريق استخدام الفينول

(مادة عضوية لا تمتزج جيداً مع الماء) في إزالة البروتينات، حيث ترتبط معها البروتينات الخلوية وتتمسخ بينما تبقى الأحماض النووية في المحلول المائي (aqueous solution) ليتم سحبها بواسطة ماصة دقيقة. ويمكن التخلص من الـ RNA بواسطة انزيم الـ RNase. تعاني تلك الطرق القديمة من مشكلة أساسية تتمثل باستخدام الفينول والذي هو مادة ذات خطر بايولوجي شديد على صحة البشر، ويحتل تسببها بالسرطان بعد تراكمها في الجسم البشري. ان الذي حدا بالباحثين في استخدام هكذا مواد خطرة هو احتياج تجارب الهندسة الوراثية - كما في تجارب التقطيع الانزيمي والكلونة - الى DNA ذو نقاوة عالية وذلك لتجنب الانزيمات الهاضمة للحمض النووي (nucleases)، وكذلك للتخلص من التثبيط المحتمل للانزيمات القاطعة بسبب تلوث عينات الـ DNA المستخلصة. وهناك تقنية أخرى تقوم بتنقية الـ DNA بشكل كامل وذلك باستخدام جهاز النذب المركزي الفائق السرعة باستخدام مواد متدرجة الكثافة (density gradient centrifugation) (شكل 1.11).



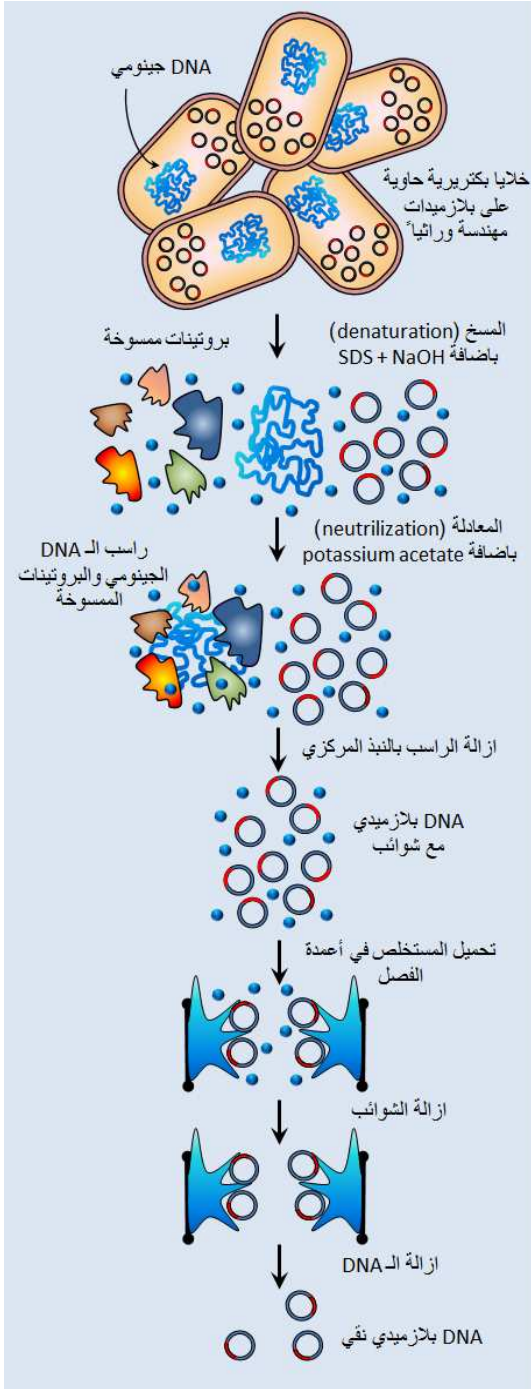
شكل (1.11). مخطط يوضح آلية نذب جزيئات الـ DNA خلال متدرج الكثافة بكلوريد السيزيوم - بروميد الاثيديوم. تخلط عينة الـ DNA بكلوريد السيزيوم وبروميد الاثيديوم وتنبذ مركزياً بسرعة عالية لمدة 48 ساعة. يصنع كل مكون حزمة عند كثافته الخاصة به وهذا، بالنسبة للـ DNA، يتأثر بمقدار تصبغ الجزيئة ببروميد الاثيديوم، فالجزيئة المسترخية قابلية أكبر على التصبغ ببروميد الاثيديوم وذلك للمقدرة العالية لهذه الصبغة على الانحشار في الجزيئة المسترخية مقارنة بتلك الملفوفة لفاً فانقاً، وهذا ينعكس على مقدار تألقها. بشكل طردي (تصميم المؤلف).

على الرغم من دقة هذه التقنية العالية في استخلاص الـ DNA الا انها تتطلب وجود جهاز النذب المركزي الفائق السرعة والذي هو غال الثمن جدا ويصعب توفره لهذا

السبب في أي مختبر، كما تتطلب هذه الطريقة عن نبذ مركزي مستمر لمدة لا تقل عن 48 ساعة لفصل الحزم بشكل كاف. ولهذا، تكون هذه الطريقة منهكة اذا ماقورنت بالتقنيات قليلة التكلفة والكفاءة والتي تستخدم حالياً بشكل كبير في عزل وتنقية الـ DNA.

أما الآن، فتتوفر العديد من العدد التي تضطلع باستخلاص وتنقية الدنا (DNA extraction and purification kits). والتي توفر وسيلة غير مكلفة وبسيطة وسريعة لعزل الـ DNA من مصادر مختلفة سواء أكان من خلايا تعود الى أحياء مجهرية أو الى فطريات أو نباتات أو لبائن. وقد تم تبسيط خطوات عمل تلك العدد في السنوات الأخيرة بحيث يتم استغلال أعمدة خاصة (spin columns) بعدة مواصفات لعزل أي DNA مرغوب والتخلص من أية ملوثات أخرى، وقد أثبتت تلك الأعمدة قليلة التكلفة كفاءتها في اعطاء DNA عالي النقاوة (high pure DNA yield). وعلى سبيل المثال، تلعب أعمدة الفصل دور كبير في تنقية الـ DNA البلازميدي، حيث تحل تلك الأعمدة مشكلة كبيرة في تجارب الكلونة تتمثل بتلوث عينات الـ DNA البلازميدي بـ DNA كروموسومي. ان المبدأ التي تعتمد عليها غالبية العدد المستعملة في تنقية الـ DNA البلازميدي هو نفسه المعتمد على طريقة Brinboim and Dolly عام 1979 والتي تدعى بطريقة التحلل القاعدي (alkaline lysis) ولكن بتحويلات مختلفة سهلت هذه العملية باستخدام أعمدة الفصل. تعتمد هذه الطريقة على حقيقة مسخ جزيئات الـ DNA الخطية، وليس الدائرية، بعد تعرضها الى pH قاعدي (بين 12 و 12.5). وعلى الرغم من أن كروموسوم بكتريا القولون هو كروموسوم دائري ولكنه كبير الحجم مقارنة بالبلازميدات الصغيرة الحجم الدائرية، فيمجرد تحطيم جدران الخلايا البكتيرية يؤدي ذلك الى تكسر ذلك الكروموسوم وتحواله الى أشكال خطية، وبما أن الأشكال الخطية لا تعود الى حالتها الطبيعية بعد مسخها بالمحلول القاعدي مقارنة بالأشكال الدائرية (البلازميدات)، لذا استغلت هذه الظاهرة في فصل الـ DNA البلازميدي عن نظيره الكروموسومي (شكل 2.11). وبعد فصل البلازميدات يتم تنقيتها بأعمدة الفصل الحاوية على المصفوفات الملائمة للالتصاق بالـ DNA المطلوب والمتداولة في الوقت الحاضر.

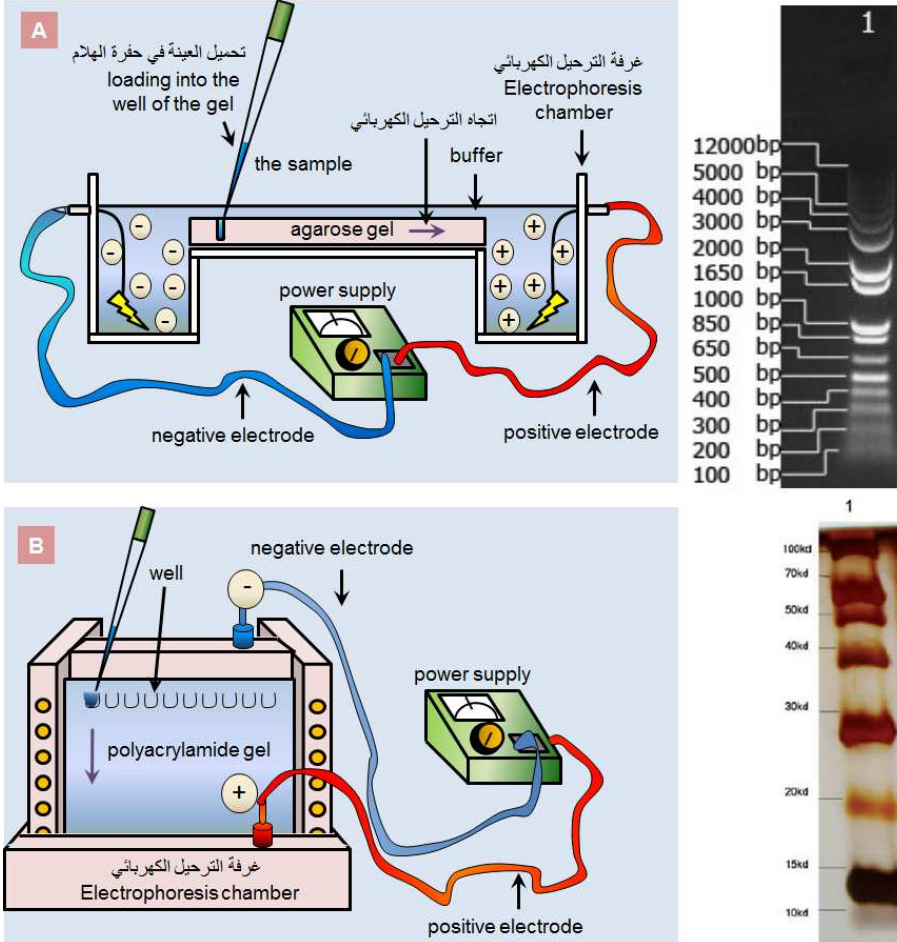
مهما كانت الطريقة المستخدمة في استخلاص الـ DNA، توجد هنالك عدة طرق يمكن من خلالها تحديد كمية الـ DNA المستخلص، تتمثل أبرزها في قراءة امتصاص الـ DNA على طول موجي 280 نانوميتر، كما يمكن معرفة نقاوة الـ DNA المستخلص عن طريق تقسيم ناتج القراءة في الطول الموجي 280 على ناتج قراءة نفس العينة عند طول موجي 260 نانوميتر، فإذا كانت النتيجة 1.8 فيعني ذلك ان هذا الـ DNA المستخلص يتمتع بنقاوة عالية جداً، اما اذا كان أقل فهو ملوث بالبروتينات وان كان أكثر فهو ملوث بالـ RNA عادة. أما لمعرفة حجم الـ DNA المستخلص، فتستخدم عادة تقنية الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز. ويمكن أيضاً استخدام هذه التقنية لدى ذوي الخبرة في معرفة نقاوة وكمية الـ DNA بالإضافة الى حجمه.



شكل (2.11). تنقية الـ DNA البلازميدي. تكسر الخلايا البكتيرية الحاوية على البلازميدات باستخدام دارئ يحتوي على مادة SDS. يعمل وجود هيدروكسيد الصوديوم على ضمان مسخ الـ DNA الجينومي. وبعد اضافة دارئ التعادل (neutralization buffer) ينكثل الـ DNA الجينومي لكي يكون راسب مع البروتينات المكونة معقدات مع مادة SDS. يمكن ازالة تلك المعقدات بالنبذ المركزي. ثم يربط الـ DNA البلازميدي بالمصفوفة (matrix) الواقعة في أسفل أعمدة الفصل التي لا يمكن للمواد الملوثة الالتصاق بها. ثم يصار الى ازالة البلازميد النقي من المصفوفة (تصميم المؤلف).

وفي تقنية الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز، تنفصل الجزيئات العملاقة عن بعضها البعض اعتماداً على حجمها، فالجزيئات الكبيرة تتحرك ببطء بينما تتحرك الجزيئات الخفيفة بسرعة كبيرة، ويمكن تحديد حجم تلك الجزيئات في الهلام بواسطة واسم حجمي (size marker) أو سلم (ladder) ملائم لهذا الغرض (شكل 3.11-a). هذا وليس كل الجزيئات العملاقة يمكن فصلها في هلام الأكاروز، لأن هذا الهلام مناسب لفصل جزيئات الأحماض النووية الـ DNA والـ RNA، أما البروتينات، فيمكن فصلها باستعمال الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الأكريلاميد مباشرة (polyacrylamide gel electrophoresis) أو PAGE بعد مسخها بمادة sodium dodecyl sulphate (SDS). ان السبب الرئيسي لاستخدام هذه الطريقة في

فصل البروتينات هو عدم امكانية استخدام صفة الشحنة الكهربائية في فصل البروتينات، حيث تمتلك بعض البروتينات "محصلة" شحنة موجبة أو سالبة في pH معين وتفقد هذه الشحنة عند تغير الـ pH بينما تتميز بروتينات أخرى بمحصلة متعادلة. لذا قام Laemmli عام 1970 بإلغاء الاعتماد على الشحنة البروتينية والاعتماد على الوزن الجزيئي حصراً للبروتينات المفصولة وذلك بمسح البروتينات بمادة الـ SDS. وقد اكتسبت تلك التقنية شهرة كبيرة بسبب فوائدها الكبيرة والتي أهمها يتمثل بقوة الفصل العالية لهذه الطريقة التي تسمى أيضاً بطريقة SDS-PAGE (شكل 3.11-b).



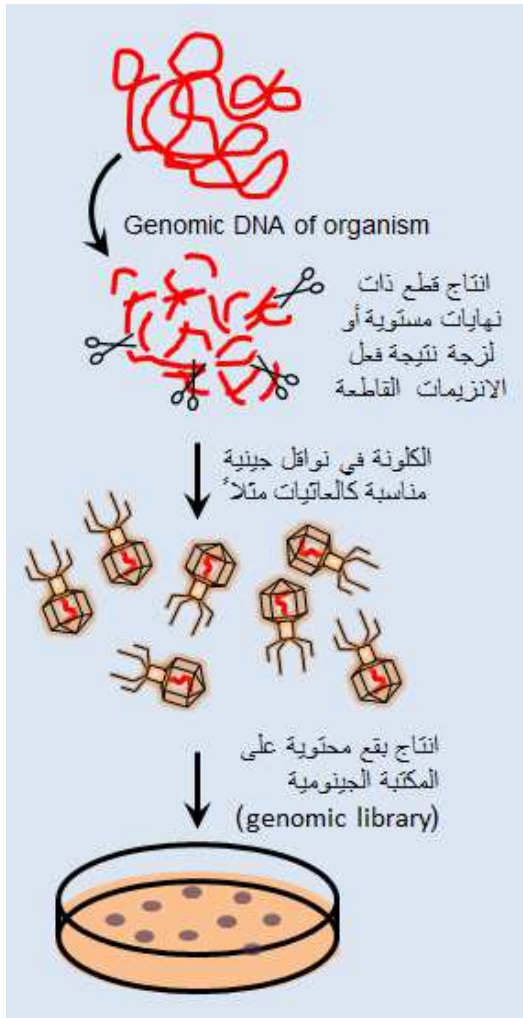
شكل (3.11): مخطط للترحيل الكهربائي (A) الترحيل الكهربائي الأفقي في هلام الأكاروز وحزم DNA مفصولة في هلام الأكاروز المصبغ ببروميد الإيثيديوم (ethidium bromide)، المسار 1 يمثل واسم الـ DNA الحجمي. (B) الترحيل الكهربائي العمودي في هلام متعدد لأكريلاميد وحزم البروتينات المفصولة في هلام متعدد الأكريلاميد الممسوخ (SDS-PAGE) والمصبغة بنترات الفضة، المسار 1 هو الواسم الحجمي البروتيني (تصميم المؤلف).

الطريقة الثانية: تشييد المكتبة الجينية. على الرغم من قدرة الباحث على عزل قطع الـ DNA المنتخبة كما هو مناقش سلفاً، يكون من المفضل أحياناً تقطيع كل الجينوم واستئصال كل القطع بواسطة استخدام الناقل. وبعدها، يمكن تشخيص النسيلة المرغوبة. ولكي نتأكد من أن كل الجينوم قد تم تمثيله في هذه المجموعة من النسايل، أي المكتبة الجينية، يجب المحافظة على أكثر من ألف سلالة بكتيرية متحولة، حيث كلما كان الجينوم كبيراً، كلما زادت الحاجة إلى نسايل أكثر. يدعى مجموع النسايل المحتوية على كل قطع الـ DNA من مصدر واحد بمكتبة الـ DNA. وعلى سبيل المثال، عندما يتم عزل DNA الجينوم من خلايا البشر، ويصار إلى تقطيعه إلى قطع عديدة، تدعى تلك القطع عندها بمكتبة الجينوم

البشرية (human genome library)، والتي تحتوي على كل تسلسلات الـ DNA الموجودة في جينوم البشر.

مكتبة الجينوم (genomic library): لتخليق مكتبة الجينوم، تجمع الخلايا وتحطم، ويعزل منها الـ DNA، ثم يقطع الـ DNA إلى قطع أصغر بواسطة انزيم قاطع بشكل جزئي (partial digestion). يتم التقطيع الانزيمي بشكل جزئي وذلك بتعريض الـ DNA إلى ذلك الانزيم لفترة محدودة، حيث تتقطع "بعض" المناطق الحساسة في كل جزيئة DNA. وبما أن تقطيع تلك المواقع يكون تقطيعاً عشوائياً، تتقطع جزيئات الـ DNA المختلفة بمواقع مختلفة، وهذا يؤدي إلى إنتاج مجموعة من جزيئات الـ DNA المتداخلة (شكل 4.11).

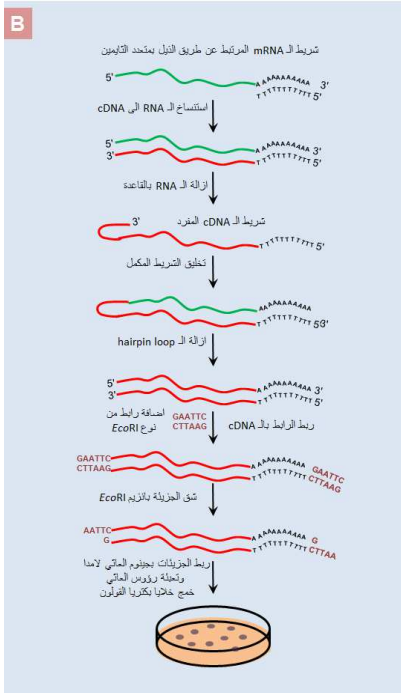
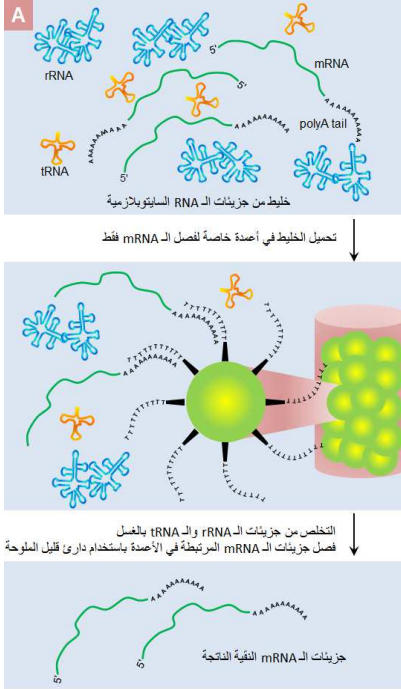
شكل (4.11): تكوين المكتبة الجينومية . في البداية، يتم تقطيع الجينوم، ثم يتم كلونة تلك القطع الناتجة عشوائياً في نواقل مناسبة. يدعى مجموع تلك العاثيات بالمكتبة الجينومية (تصميم المؤلف).



بعد ربط تلك القطع بناقل جيني ملائم، كما في العاثيات أو الكوزميدات، والتي يتم نقلها الى البكتيريا. تنتج تلك العملية مجموعة من الخلايا بكتيرية التي تحتوي على قطع الـ DNA الجينومية المتداخلة. وبهذه الطريقة، تحتوي نساقل قليلة على الجين المرغوب بشكل كامل. هذا ويجب أن تحتوي المكتبة الجينومية على عدد كبير من النساقل لضمان تمثيل كل تسلسلات الـ DNA الموجودة في الجينوم. وبما أن المكتبات الجينومية قد تم تحضيرها من قطع عشوائية من الجينوم، لذا فإن تلك المكتبات ربما تعد غير كفوءة في إيجاد الجين وخصوصاً في الكائنات حقيقية النواة حيث يكون الكثير من تسلسلات الـ DNA غير مشفرة. وبالتناقص من ذلك، تتصف مكتبات جينية بديلة تدعى بمكتبات الـ DNA المكمل (cDNA libraries) بالكفاءة في كلونة الجين المعني.

مكتبة الدنا المكمل (cDNA library): لا تتكون المكتبات الجينية بواسطة تشييد مكتبات الجينوم فقط، وإنما تتكون بوسيلة أخرى تتمثل بتشيد مكتبة متألفة من تسلسلات DNA قد تم استنساخها الى mRNA. وتدعى بمكتبة الـ DNA المكمل أو cDNA library لأن كل الـ DNA في هذه المكتبة يكون "مكملاً" (أو complementary) لجزيئة الـ mRNA. بما أن معظم الـ DNA في الكائنات حقيقية النواة يتألف من تسلسلات متكررة تدعى بالتسلسلات الغير وراثية بسبب عدم قابليتها على أن تصنع نسخة من نفسها عن طريق التحول الى mRNA (أنظر الفصل الثاني)، لذا، لا يمكن تمثيل تلك التسلسلات في هكذا نوع من المكتبات الجينية. ولهذا السبب، تمتلك مكتبة الـ DNA المكمل فائدتين أساسيتين: أما الأولى، هو أنها مكتبة غنية بالقطع الناجمة عن الجينات النشطة استنساخياً، أي أنها تمثل الجينات التي تعطي نسب عالية من الـ mRNA الناضج في ذلك المكان المعني من الجسم، وهذا هو الذي حدا الباحثين الى استهداف الانسجة التي تكون بها الجينات المرغوبة بفعالية استنساخية عالية (أنظر أدناه)، وثانياً، لا تستطيع الانترونات أن تتداخل مع التسلسلات الجينية في مكتبات الـ DNA المكمل، أي أن هكذا نوع من المكتبات لا يحتوي على انترونات الجين، وقد استغلت هذه النقطة في تمكين الكثير من الجينات حقيقية النواة في التعبير الى البروتينات في البكتيريا بعد أن عجز الباحثون في ذلك بسبب عدم امتلاك البكتيريا لنظام إزالة الانترونات (راجع الفصل الرابع). أما مشكلة مكتبة الـ DNA المكمل هو احتوائها على التسلسلات الموجودة فقط في جزيئات الـ mRNA الناضجة (بسبب امتلاكها لذيل متعدد الأدنين (poly A tail) والذي تتم اضافته بعد إزالة الانترونات)، حيث يقوم هذا النوع من المكتبات بكونته للجين نفسه وليس للمنطقة المحيطة به. وهنا، تخفي الانترونات والعديد من التسلسلات الأخرى كما في البروموتر والمسرات، والتي لا تستنسخ أيضاً الى RNA، وهذا قد يفقد الجين هويته الكاملة. ومن الجدير بالذكر، أن هذه المكتبة تمثل فقط تلك التسلسلات الجينية التي يتم التعبير عنها في الانسجة التي عزل منها الـ RNA. إضافة الى ذلك، يعتمد تردد جين معين في مكتبة الـ DNA المكمل على وفرة الـ mRNA المعني في النسيج المعزول منه. وبالتناقص من ذلك، توجد معظم الجينات بنفس التردد في مكتبة الـ DNA الجينومية بصرف النظر عن قدرتها في التعبير الجيني.

مبادئ الوراثة الجزيئية



mRNA في المصدر النسيجي المستخدم (يحتوي الـ cDNA على تسلسلات معبرة مستمرة أو اكسونات exons بدون انترونات introns).

ثم يستخدم إنزيم يدعى بـ reverse transcriptase لخلق شريط من الـ DNA مكمل لجزيئة الـ mRNA. يمكن لهذا الإنزيم بلمرة النيوكليوسيدات منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات (dNTPs) deoxynucleoside triphosphates بشريط الـ DNA المكمل (cDNA) باستخدام جزيئة الـ mRNA الأصلية كقالب لحدوث عملية البلمرة وذلك بالاتجاه المعتاد من 5' إلى 3'. وكما هو الحال مع إنزيمات بلمرة الـ DNA الأخرى، يمكن لإنزيم reverse transcriptase من أن يضيف نيوكليوتيدات إلى النهاية 3' فقط للباديء الموجود مسبقاً والمزدوج قاعدياً مع الشريط القالب. تؤدي نهايات متعدد الثايمين المضافة (TTTTT ...) هذه الوظيفة وذلك بازدواجها مع ذيل متعدد الأدينين الموجود في النهاية 3' لكل mRNA قالب.

بعد تخليق نسخ cDNA من جزيئات الـ mRNA المعزولة، تزال جزيئات الـ mRNA بواسطة معاملتها بمحلول قاعدي (محلول NaOH)، والذي يحلل الـ RNA مائياً وليس الـ DNA. ثم يحول الـ cDNA المفرد للشريط إلى جزيئات DNA مزدوجة الشريط. وهنا يبرز دور إنزيم DNA polymerase I والذي يستغل حقيقة أن إنزيم reverse transcriptase يترك نهاية معقوفة تشبه دبوس الشعر hairpin loop عند اكتماله من تخليق شريط الـ DNA أي عند النهاية 3'. تستخدم هذه النهاية كباديء من قبل إنزيم DNA polymerase I لخلق شريط الـ DNA المكمل للشريط الأول المخلق من قبل إنزيم reverse transcriptase. يعامل شريط الـ DNA المزدوج بإنزيم S1 nuclease ، والذي يزيل دبوس الشعر (شريط الـ DNA المفرد)، ليولد جزيئة cDNA مزدوجة الشريط ذات نهاية مستوية blunt ended double stranded cDNA molecule (شكل 5.11-b).

ولكي تحضر جزيئات cDNA مزدوجة الشريط لغرض الكلونة، تلتصق روابط (linkers) لكلا النهايتين. على شرط أن تحتوي تلك الروابط على أماكن تمييز لإنزيمات التقطيع الداخلية recognition sites for restriction endonucleases. وعندما تعامل جزيئات الـ cDNA الناتجة والحاوية على مواقع التمييز هذه والموجودة في الروابط الملتصقة بكلتا طرفيها بإنزيمات تقطيع متخصصة لتلك الروابط ، تولد تلك المعاملة جزيئات cDNA ذات نهايات لاصقة sticky ends بكل نهاية. أما الخطوة الأخيرة في تشييد الـ cDNA فتتمثل بلصق قطع الـ cDNA المزدوجة الشريط ذات النهايات اللاصقة بنواقل العاثي لأمدا ذات النهايات اللاصقة والمقطوعة بنفس الإنزيم القاطع. ثم يتم إدخال نواقل الكلونة الهجينة في خلايا بكتريا القولون، بحيث تحتوي كل خلية على cDNA مشتق من mRNA مفرد.

تدعى كل نسيلة في المكتبة بنسيلة الدنا المكمل (cDNA clone). وبالتناقض من مكتبة الجينوم الكاملة والتي تحتوي على كل تسلسلات الـ DNA النووية للكائن، تحتوي مكتبة الـ cDNA على التسلسلات التي أعطت mRNA. وبهذه الطريقة، فإن عدة انسجة في جسم الحيوان، والمعروف بأنها تعبر لبعض الجينات المختلفة سوف تعطي مكاتب cDNA مختلفة. ويمكن عادة توليد مكاتب الجينات المكلونة عن طريق استخدام العاثي لامدا أو الكوزميد كناقل (أنظر أدناه). ثم يتم تشخيص النسيلة الحاوية على الجين المرغوب في هذه المكتبة عن طريق واسم معلم اشعاعيا أو معلم بطريقة غير اشعاعية، ويتم ذلك باستعمال طريقة استنساخ الصب (replica plating) على أوراق النايتروسيليلوز (nitrocellulose papers) الحاوية على هذا الواسم المعلم، حيث تمثل البقع الناتجة النسايل الموجودة في الطبقة الأصلي الحاوية على قطعة الـ DNA المرغوبة. وإذا كان الجين المرغوب الكشف عنه قادراً على التعبير عن نفسه، يتم الكشف عن الناتج البروتيني لذلك الجين بوسيلة مناعية ملائمة كما في وصمة Western (أنظر أدناه).

الطريقة الثالثة: التخليق المباشر للقطعة المرغوبة. على الرغم من عدم اضطرار القارئ الكريم في أي كتاب منهجي للوراثة الجزيئية الى الاستعانة بالكيمياء العضوية، إلا أن هنالك صلة وثيقة بين الاختصاصين فيما يتعلق بكيفية تخليق النيوكليوتيدات (oligonucleotides) كيميائياً، فلا بد للقارئ من معرفة - ولو بشكل موجز - كيف يتم تصنيع متعدد النيوكليوتيدات التي يرغب الدراسة عليها حيث تعتبر متعددات النيوكليوتيدات المخلفة كيميائياً هي الوقود الذي يحرك ماكينة الوراثة الجزيئية. ولعله ليس من المبالغة إذا نقول أن أي تقنية تستخدم اليوم في الوراثة الجزيئية توظف تلك النيوكليوتيدات المخلفة كيميائياً. ويمكن الآن استخدام آلة تخليق الدنا (oligonucleotide synthesizer machine) في تخليق التسلسلات المرغوبة من تلك المتعددات النيوكليوتيدية (شكل 6.11)، حيث يمكن تخليق الجين مبدئياً تخليقاً كيميائياً عضوياً (organo-chemical synthesis) وذلك عند معرفة تسلسله. ويمكن معرفة تسلسل الجين من خلال معرفة تسلسل ناتجه البروتيني. وعلى سبيل المثال، إذا كان الجين مسؤولاً عن انتاج سلسلة متعدد ببتيد معينة ذات تسلسل معروف، عندها، وباستخدام قاموس الشفرة الوراثية يمكن التنبؤ بتسلسل الجين بسهولة.

مرت عملية تخليق الأحماض النووية بعدة محطات تاريخية (يمكن ملاحظتها في الفصل الخامس)، وذلك عندما أراد الباحثون حينها التنبؤ بالشفرة الوراثية للأحماض النووية مما قادهم الى ايجاد وسيلة كيميائية لتخليق الأحماض النووية لتأدية ذلك الغرض. وأتت الانجازات الأولى في عمليات التخليق الكيميائي للأحماض النووية من أعمال Holley و Khorana، والتي قد استخدم فيها جزيئات الـ tRNA لأنها صغيرة جداً في حجمها

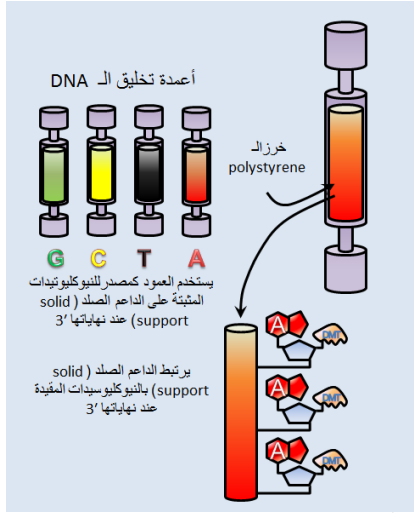
(حوالي 76 نيوكليوتيدة)، حيث يعتبر من الصعوبة جداً في بدايات عمليات تخليق الأحماض النووية في العالم تخليق الجينات كاملة لأنها طويلة جداً كي يتم تخليقها كيميائياً، حيث يبلغ معدل ما يحتوي الجين من أزواج قاعدية حوالي 1500 زوج قاعدي.



شكل (6.11). آلة تخليق الـ DNA. ويمكن بهذه الآلة تخليق تسلسلات الـ DNA المختلفة وحسب الغرض من البحث، كما في بواضع الـ PCR والجينات وغيرها (الجهاز من إنتاج شركة Applied Biosystems الأمريكية).

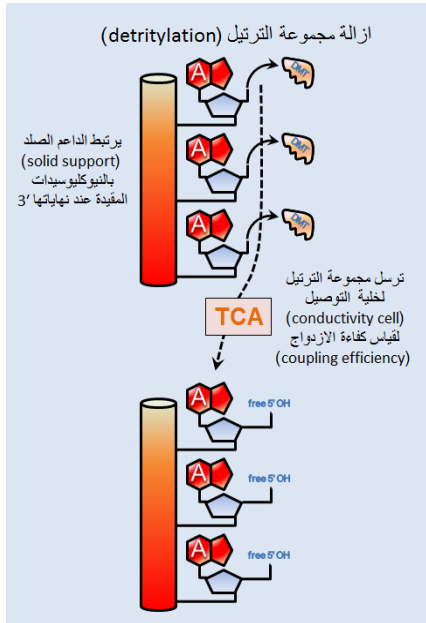
على الرغم من النجاحات التي حققها باحثون كـ Khorana، فإن التخليق الكيميائي لمتعدد النيوكليوتيدات بقي عملاً مضمناً وغير كفوء لغاية عام 1983، والتي تم فيها زيادة كفاءة تلك العملية. وهنا تعتمد عملية التخليق الجديدة على استخدام أحاديات الفسفورأميد (phosphoramidite monomers) وعلى استخدام محفز التترازول (tetrazole catalysis). وتعتبر مادة phosphoramidite monomer وحدة تخليق متفردة ساهمت بشكل ملفت بتطور هذا المضمار. ففي بداية التخليق، تستخدم مجموعة تسمى trityl group كمجموعة حماية قابلة للإزالة. أما الربط بدعامة صلبة فيتم من خلال ذرة الكربون ذات النهاية 3'. وهنا يبدأ التخليق بالاتجاه 3' إلى النهاية 5' بدلاً من الاتجاه 5' إلى 3' المستخدم في الطبيعة عادة. إن الدعامة الصلبة المستخدمة في تخليق متعدد الحمض النووي تتألف عادة من خرزة زجاجية ذات ثقوب منتظمة (controlled pore glass or CPG) بحجم 5 مايكرون. تحتوي هذه الخرزة على سطوح ذات ثقوب وقنوات والتي ترتبط بها النيوكليوتيدات المحمية.

تعد طريقة الـ phosphoramidite في تخليق النيوكليوتيدات هي الطريقة الأمثل لمعظم المختبرات في الحصول على التسلسلات النيوكليوتيدية التي يرغبون فيها بسبب كفاءة وسرعة ازدواج النيوكليوتيدات بهذه الطريقة وبسبب ثباتية مادة البدء التي تجري عليها إضافة النيوكليوتيدات بشكل متتابع. يتم تخليق متعدد النيوكليوتيدات بالاعتماد على مادة البدء والتي هي مادة كيميائية صلبة، بحيث يمكن إزالة الفائض من الكواشف الكيميائية القاسية



بواسطة الترشيح. ولهذا السبب، لا يوجد خطوات تنقية ما بين الدورات المتلاحقة. وتتألف مادة البدء (starting material) أو المادة الساندة (supporting material) من سليكا أو من خرز متعدد الاستيرين (polystyrene beads) (شكل 7.11). وقد تم تصميم حجم الدقائق وحجم الثقوب بعناية فائقة بحيث تسمح للسوائل بحرية الحركة وفي نفس الوقت تكون ذات قوة ميكانيكية كافية تحافظ عليها من عدم الانهيار في خطوات التخليق المتعاقبة.

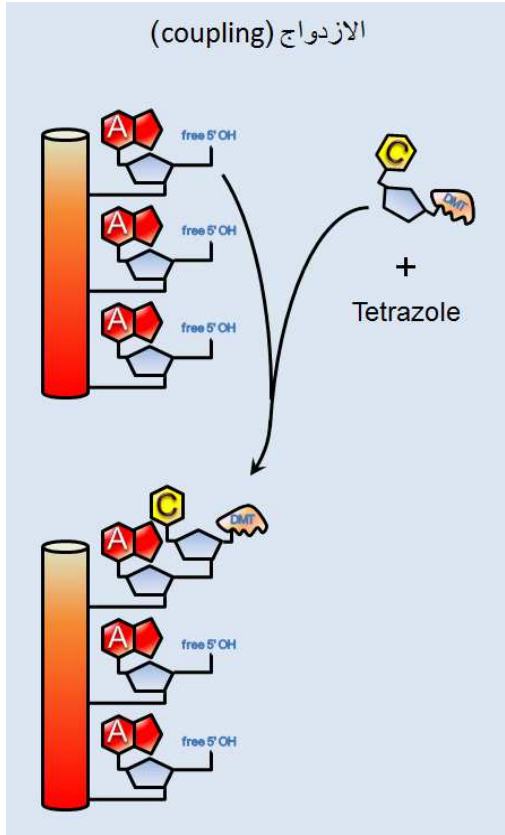
شكل (7.11): مخطط يوضح الأعمدة المستخدمة في تخليق الأحماض النووية كيميائياً. تثبت النيوكليوتيدات من نهايتها 3' على سطح صلد متألف من مادة الـ polystyrene الموضوعة في أعمدة ملائمة لهذا الغرض. يشير كل لون إلى أحد القواعد النيتروجينية الأربع (تصميم المؤلف).



يبدأ تخليق الـ phosphoramidites من النهاية 3' لأول نيوكليوتيدة مرتبطة ويتقدم من خلال سلسلة من الدورات المتألفة من أربع خطوات والتي تتكرر الى أن تلتصق النيوكليوتيدة الأخيرة بنهايتها 5'. تدعى هذه الخطوات الأربع بازالة الحماية (deprotection)، الاقتران (coupling)، والتثبيت (stabilization). وهي كالآتي: خطوة ازالة الحماية (deprotection) وتسمى أيضاً بخطوة ازالة مجموعة التريتيل (detritylation step)، وهي الخطوة الأولى في عملية تخليق الحمض النووي كيميائياً. وفيها يتم ازالة مجموعة الـ DMT المرتبطة بالنهاية 5' في السكر الخماسي للنوكليوتيدة المستقبلية بواسطة اضافة مادة trichloroacetic acid (أو TCA) تاركة مجموعة هيدروكسيلية نشطة (reactive hydroxyl group) مستعدة للخطوة اللاحقة.

شكل (8.11): مخطط يوضح الخطوة الأولى في عملية تخليق الأحماض النووية والتي يقوم بها حامض الـ trichloroacetic acid (TCA) بدور محوري في هذه الخطوة. حيث يقوم بازالة مجموعة الحماية (مجموعة الـ DMT) الحساسة للحوامض والواقعة على النهاية الهيدروكسيلية 5' للنوكليوتيدة المرتبطة بالمادة الساندة (تصميم المؤلف).

وبما أن النيوكليوسيدة ترتبط عبر نهايتها الهيدروكسيلية 3' بالمادة الساندة من خلال رابط (linker) متصل بتلك النهاية، لذا، يكون اتجاه اضافة النيوكليوتيدات هو من النهاية 5' بدلاً من النهاية 3' (شكل 8.11). وهذا يعني سيرورة عملية تخليق الـ DNA بالاتجاه المعاكس لها في الطبيعة (راجع الفصل الثالث).

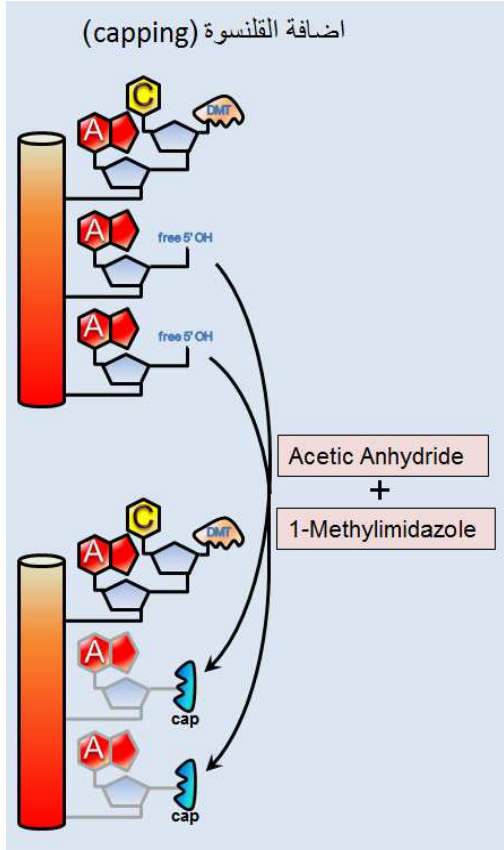


خطوة الازدواج (coupling step):
وفي هذه الخطوة، يتم اضافة الـ phosphoramidite القادم مع حامض ضعيف يسمى بالـ tetrazole ويقوم هذا الحامض باضافة مجاميع بروتون لذرة النتروجين في جزيئة الـ phosphoramidite، والذي يجعلها عرضة للهجوم المحب للنواة (nucleophilic attack). يكون هذا المركب الوسيطى تفاعلي بشكل كبير جداً بحيث يكمل هذه العملية في غضون ثلاثين ثانية، حيث يقوم هذا التركيب بالتفاعل مع مجموعة الهيدروكسيل للجزيئة المستقبلية وتتكون أصرة بالاتجاه من 5' الى 3' (شكل 9.11). ويتم حماية أو "سد" جزيئة الـ phosphoramidite المضافة عند نهايتها 5' عن طريق مجموعة DMT أيضاً. ومن الجدير بالذكر ان اضافة الـ tetrazole تزيد من كفاءة الازدواج الى أكثر من 99%، وبهذه الطريقة، فإن الطريق مفتوح لتخليق أحماض نووية أطول وأطول.

شكل (9.11): مخطط يوضح الخطوة الثانية في عملية تخليق الأحماض النووية والتي يقوم بها التترازول بدور محوري في زيادة كفاءة هذه الخطوة (تصميم المؤلف).

على الرغم من الزيادة المتحققة في كفاءة تخليق الأحماض النووية، فلا تزال هذه العملية "لوحدها" تعاني من نسبة معينة من الفشل في عملية الازدواج، والمتأتية بسبب استمرارية احتواء متعدد النيوكليوتيدات على مجموعة هيدروكسيل قابلة للتفاعل (reactive hydroxyl group) عند نهايتها 5'. وإذا كانت تلك النهاية قابلة للتفاعل، فإن

لها القابلية على الازدواج في الجولة القادمة لينتج هذا في فقدان نيوكليوتيدة في عملية التخليق. لذا لابد من وجود خطوة مبتكرة لتعالج هذه المشكلة.

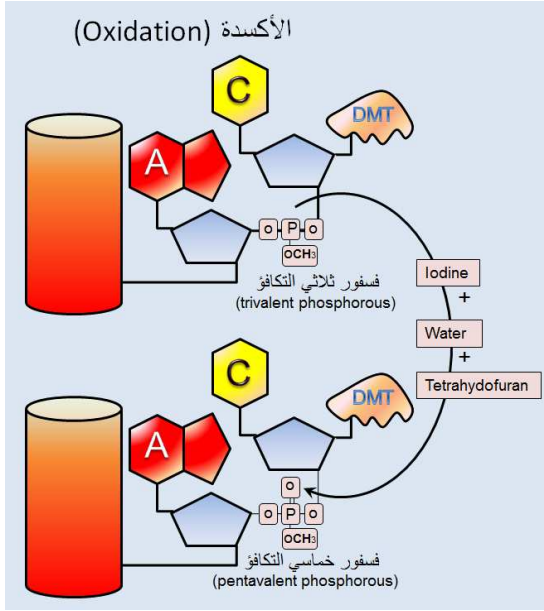


خطوة التغطية (capping step):

صممت هذه الخطوة لازالة الفشل الحادث في عملية الازدواج لكي لا يشارك بعد ذلك في عملية التخليق. يتم في هذه الخطوة انهاء كل السلاسل التي لم تحدث فيها خطوات اضافة. وبما أن السلاسل الغير متفاعلة تحتوي على نهاية هيدروكسيلية حرة من نوع 5'، فيمكن انهائها أو تغطيتها بواسطة اضافة مجاميع الأسيل (acetylation) من قبل كاشف يضيف مجموعة الأسيتيل (acetylating reagent) والذي يتألف من مادتي الـ N-methyl imidazole و acetic anhydride. يتفاعل هذا الكاشف مع مجاميع الهيدروكسيل الحرة فقط كي يغطي متعددات النيوكليوتيدات بشكل غير معكوس والتي فشل بها الازدواج. تدعى تلك النهايات الغير متفاعلة " بالنواتج الفاشلة". وتتم عملية التغطية باضافة مادة acetic anhydride و مادة 1-methylimidazole (شكل 10.11).

شكل (10.11): مخطط يوضح الخطوة الثالثة في تخليق الأحماض النووية والتي صممت لكي تتغلب على المشكلة المتمثلة بعدم تفاعل أقل من 2% من مجاميع الهيدروكسيل من نوع 5'، مع جزيئة الـ phosphoramidite المضافة، وهذا يؤدي الى فقدان قاعدة نتروجينية. ولا يمكن السماح بنمو هذه التسلسلات الفاشلة، وبالتالي، لابد من تغطيتها. يتم اضافة احجام متساوية من مادتي acetic anhydride و 1-methylimidazole لكي تعمل كعوامل acetylation ذات قدرة فائقة. وبعد اضافة تلك العوامل، تتحول النهايات الهيدروكسيلية الى النوع الغير نشط (تصميم المؤلف).

وبما أن السلاسل التي تفاعلت مع الـ phosphoramidite في الخطوة السابقة ما تزال مسدودة من قبل مجموعة DMT، لذا فلا يمكن لها أن تتأثر بهذه الخطوة. وعلى الرغم من أن خطوة الاحاطة هي خطوة لاتحتاجها عملية تخليق الـ DNA، لكن تلك الخطوة تكون مرغوبة جداً هنا لأنها تقوم بتقليص طول الشوائب وبالتالي تسهل من تعريف الناتج وتنقيته.



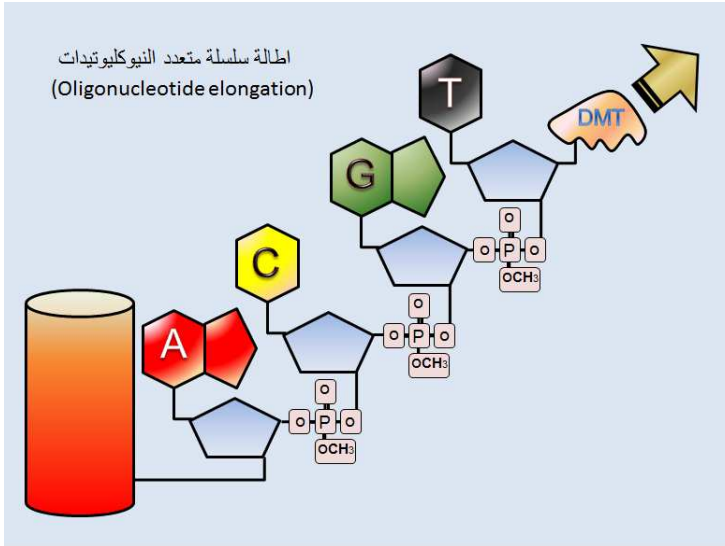
خطوة التثبيت (stabilization step):
 حال اكتمال خطوة التغطية، تبدأ الخطوة الأخيرة في الدورة والتي تسمى بخطوة التثبيت (stabilization step) أو الأكسدة (oxidation step) والتي تقوم بتثبيت ارتباط الفوسفات بين سلسلة متعدد النيوكليوتيدات النامية والقاعدة القادمة للنمو. ومن جديد، في التخليق الـ phosphoramidite التقليدي، يتم اجراء هذه الخطوة بوجود مادة اليود (iodine) والذي يعتبر كمادة مؤكسدة معتدلة (mild oxidant) والمخلوطة مع مادة الـ tetrahydrofuran (FHF) والماء (شكل 11.11).

شكل (11.11): مخطط يوضح الخطوة الرابعة في تخليق الأحماض النووية. تعد أصرة ما بين النيوكليوتيدة المتكونة حديثاً وهي أصرة الفوسفات ثلاثية الأستر غير ثابتة. لذا، لابد من تثبيتها عن طريق أكسدتها. وهنا يستخدم الفوسفات كعامل مؤكسد مع الماء، حيث يعمل اليود هنا كواهب للأوكسجين (تصميم المؤلف).

ويعمل الماء كواهب للأوكسجين ويكون اليود رابطة مع الفسفور. يتم ازالة تكثف هذه الرابطة من قبل الماء تاركة أصرة فوسفات ثلاثية الأستر (phosphotriester bond) بشكل مثبت.

بعد اكتمال الخطوة النهائية يتم اعادة الدورة لكل نيوكليوتيدة في التسلسل (شكل 12.11). وفي نهاية عملية التخليق، يكون متعدد النيوكليوتيد متكوناً من عدد من النيوكليوتيدات، ولتكن على سبيل المثال 25 نيوكليوتيدة كما هو في بوادي الـ PCR (أنظر أدناه) مع نهاية 3' ماتزال مرتبطة بالمادة الأساس بينما تكون النهاية 5' محمية من قبل مجموعة trityl، بالإضافة الى مجاميع الحماية لقواعد الكوانين والسايوتوسين والأدينين عدا الثايمين الغير محمي. وعند انتهاء التخليق، يتم ازالة ارتباط كل متعدد نيوكليوتيدي من المادة الأساس ومن ثم تزال مجموعة الـ trityl منها، تاركة مجموعة هيدروكسيل على كلا النهايتين 3' و 5'. وعند هذه النقطة، تعد متعدد النيوكليوتيد جزيئة DNA مفردة الشريط فعالة وظيفياً. وعلى الرغم من ازالة الحماية (deprotection) ولكنها تبقى مع متعدد النيوكليوتيد كأملح عضوية يجب ازلتها بعملية تدعى بازالة الأملاح (desalting). وفي حالة رغبة الباحث في الحصول على متعددات نيوكليوتيدة أطول أو متعددات نيوكليوتيدة

محورة أو موسومة، فلا تعد عملية إزالة الأملاح كافية في هذا الصدد، حيث يتم تعريض متعدد النوكليوتيدات المخلفة كيميائياً الى تنقية اضافية أما بواسطة متعدد الأكريلاميد polyacrylamide gel electrophoresis أو PAGE أو بواسطة تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC).



شكل (12.11): مخطط يوضح اطالة الأحماض النووية. فبعد اكتمال خطوة التثبيث، في الدورة الواحدة، تستمر عملية تخليق الـ DNA بواسطة ازالة مجموعة DMT وإعادة دورة أخرى من اضافة القاعدة. وتستمر هذه الدورات لحين التخليق الكامل للطول المطلوب للمتعدد النوكليوتيدات القيد الدراسة(تصميم المؤلف).

هنالك تطبيقات عديدة للمتعددات النوكليوتيدية كما سيتبين أدناه، حيث تستخدم هذه النوكليوتيدات المصنعة عادة كبوادئ في تقنية الـ PCR ، أو كمجسات للكشف عن الجين من خلال التهجين معه. وفي الحالة الثانية، لا بد من وسم تلك المجسات بواسم مناسب. وهنالك عدة وسائل لتوسيم تلك المجسات لا بد من استخدامها كي تقوم تلك المجسات بواجبها المناط بها في هذا المضمار. فمثلاً، كي يستطيع أي باحث معرفة موقع أي جين ضمن كومة من قطع الـ DNA المهضومة بالانزيمات القاطعة لا بد له من استخدام مجس (probe) متخصص له. والمجس هو أحماض نووية ذات تسلسلات مكملية بالضبط لتسلسلات الـ DNA الهدف لأجل أن ترتبط بها بواسطة التهجين. ويتم وسم تلك المجسات بحيث يمكن أن يتم تشخيصها بعد ذلك بواسطة التصوير الاشعاعي الذاتي (autoradiography) أو بواسطة تقنيات كيميائية حساسة (chemiluminescent techniques).

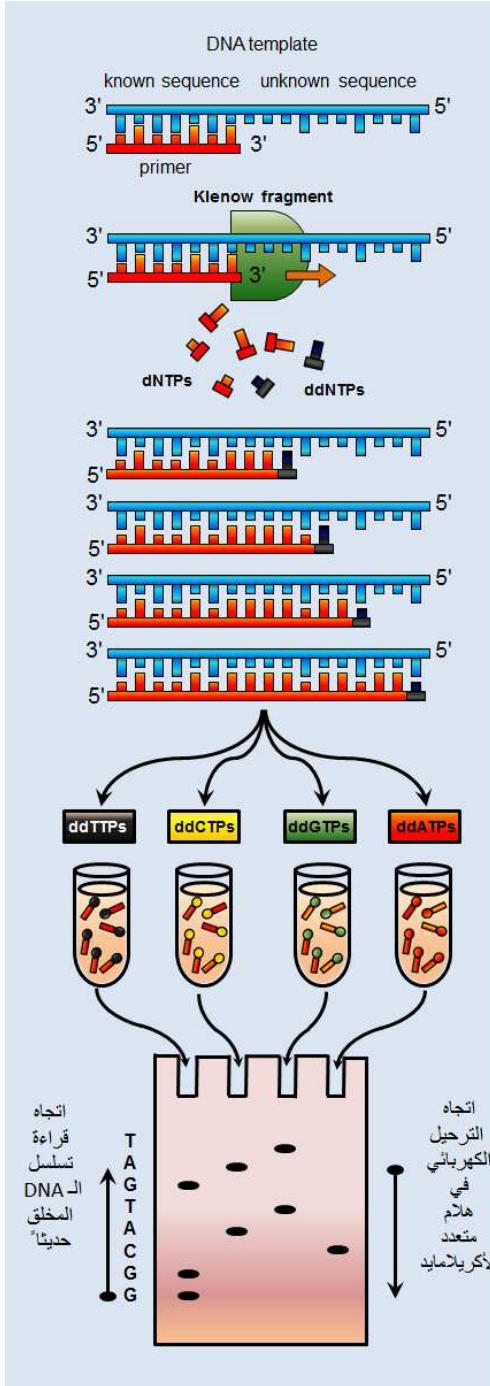
كيف نعرف تسلسل الجين



Frederick Sanger

بعد عزل الجين بأية طريقة كانت، لابد من معرفة التسلسل الكامل للجين في حالة توفر معلومات محدودة عنه. وكما بينا، في حالة معرفة تسلسل الأحماض الأمينية للناتج الجيني، فلا بد من تحليل القطعة النهائية للجين المعزول. وبعد كل هذا، فمن الضروري تأكيد أن الجين المعزول يمتلك التسلسل المتوقع. علاوة على ذلك، يجب معرفة تسلسل النهاية 5' وذلك للتشديد الجيني الدقيق ولغرس الجين في ناقل جيني ملائم. ولأجل معرفة تسلسل الجين أو قطعة الـ DNA المطلوبة فيجب تحويلها إلى الشكل المفرد الشريط (ssDNA)، ويتم ذلك بواسطة ربطها بنواقل جينية

خاصة تتحرر من الخلية المضيف بصورة مفردة الشريط ناقله لقطعة الـ DNA المرغوبة معها بهذه الهيئة أيضاً، تعرف تلك النواقل بـ M13 vectors. وتعتبر طريقة إنهاء السلسلة منقوصة الأوكسجين المزدوجة (dideoxy chain termination method) أو طريقة Sanger و Coulson هي الطريقة الأكثر استخداماً لهذا الغرض. لقد قاما بابتكار ذاك البروتوكول في منتصف السبعينيات من القرن المنصرم. وهناك طريقة أخرى لمعرفة تسلسل الـ DNA تعرف بالطريقة الكيميائية أو طريقة Maxam و Gilbert ولكنها أقل استخداماً بكثير من الطريقة الأولى، لذا سنقتصر في مناقشتنا على الطريقة الأولى فقط. تبدأ الطريقة بتخليق الشريط المكمل لشريط الـ DNA المفرد باستخدام قطعة كلينو (Klenow fragment) التابعة لانزيم DNA polymerase I من بكتريا القولون (أو باستخدام الانزيم المحور T7 DNA polymerase)، وخليط من النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). ويستعمل بادئ خاص لهذه العملية يرتبط في الناقل M13 بالطبع في منطقة قبل (upstream) منطقة انحشار قطعة الـ DNA المراد معرفة تسلسلها. وعند بدء التخليق، تضاف النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات في تسلسل مكمل للـ DNA المراد معرفة تسلسله. وعلى أية حال، إذا أضيفت ddNTP أو نيوكليوسيدة ثلاثية الفوسفات ذات سكر خماسي منقوص الأوكسجين في الذرتين 2' و 3' (-2',3') ddTTP أو ddATP (سواء أكانت dideoxyribonucleoside triphosphate) والتي تفتقد لمجموعة الهيدروكسيل الحرة في ذرة الكربون 3' في خليط التفاعل، تنتهي البلمرة إذا تم اندماج ddNTP بدلاً من dNTP في أي وقت خلال عملية التخليق تلك (شكل 13.11).

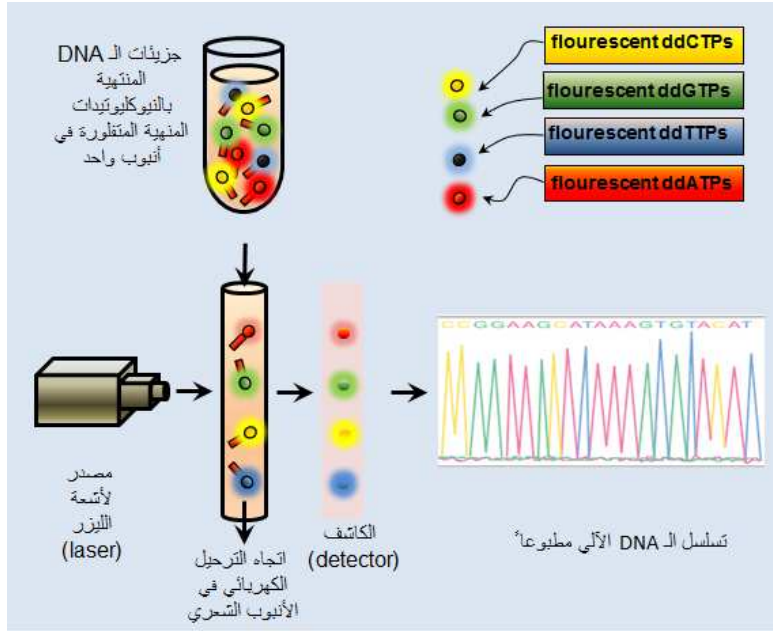


في تخليق الـ DNA، تحدث بلورة
أشرطة الـ DNA بسرعات مختلفة.
وبالنتيجة، ينتج خليط غير متجانس من
أشرطة الـ DNA وبأطوال متعددة والتي
تمثل لكل التسلسلات المتوقعة. اعتماداً
على أي ddNTP مستخدمة في أنبوب
التفاعل، تكون نيوكليوتيدة الانهاء إما A أو
T أو G أو C. وفي الحقيقة، تحدث كل
التفاعلات الأربع بشكل منفصل عن
بعضها مولدة أربع مجاميع من التسلسلات،
حيث تنتهي مجموعة كاملة بالـ ddATP،
ومجموعة بالـ ddCTP ومجموعة بالـ
ddGTP ومجموعة بالـ ddTTP.

يمكن فصل قطع الـ DNA في كل
مجموعة في الترحيل الكهربائي في هلام
متعدد الأكريلاميد. وعلى أية حال، لا بد
من كشف الحزم المفصولة. وهناك طريقة
بسيطة للقيام بذلك وهو استخدام التوسيم
الاشعاعي وذلك عن طريق انحشار
النيوكليوتيدات الموسومة اشعاعياً، كما في
dATP الموسوم اشعاعياً بالفسفور
([$\alpha^{33}\text{P}$]dATP) في مزيج التفاعل،
وبالتالي كل القطع تكون موسومة
اشعاعياً. ومن ثم يصار للكشف الحزم
المفصولة بالتصوير الاشعاعي الذاتي
بالأشعة السينية.

شكل (13.11). مخطط يوضح طريقة انتهاء
السلسلة (طريقة سانكر) في معرفة تسلسل
الـ DNA. لاحظ ان الحزم الموجودة في أعلى الهلام
تمثل النهاية 5' وهكذا تمثل الحزم الموجودة في أسفل
الهلام النهاية 3' (تصميم المؤلف).

يتم قراءة الحزم من الأسفل الى الأعلى، أي بالاتجاه من 5' الى 3'. وعادة تكون الحزم في الأسفل باهتة جداً والحزم في الأعلى مضغوطة جداً على القراءة. وهناك عدد محدود فقط من الحزم (حوالي 200 قاعدة) والتي يمكن أن يتم قرائتها بسهولة. ولكي نحدد التسلسل الكلي للجين، يجب تكرار هذا الاجراء لعدة مرات بتحريك موقع ارتباط البادئ على طول التسلسل. وفي العقد الأخير، تمت الاستعاضة عن هذه الاجراءات الروتينية لمعرفة التسلسل بشكل كبير باجراءات آلية (automated sequencing). ويتمثل التغيير الكبير في هذا البروتوكول استخدام الواسمات المتفلورة (fluorescent labels) بدلاً من الواسمات الاشعاعية (radiolabels). وقد تم استخدام أربع صبغات متفلورة، كل واحدة تمثل أحد الـ dNTPs. فالسلسلة المنتهية بالأدينين توسم بصبغة متفلورة معينة، والسلسلة المنتهية بالثايمين توسم بصبغة ثانية، والسلسلة المنتهية بالكوانين توسم بصبغة ثالثة، والسلسلة المنتهية بالسايروسين توسم بصبغة رابعة. وهكذا، وعند استخدام أربع واسمات متفلورة، أصبح من المنطقي انجاز أربع تفاعلات تسلسلية كما في البروتوكول اليدوي في مسار واحد في أنبوب منفرد، وتحميل مزيج التفاعل هذا في مسار واحد في هلام متعدد الأكريلاميد. ويقوم كاشف التفلور المزود مع جهاز قراءة التسلسل الآلي بمسح الحزم المفصولة، بحيث يميز بين الواسمات المتفلورة الأربع، ويترجم النتائج الى كروماتوغرام يمكن قراءته يتألف من قمم (peaks) متميزة عن بعضها البعض لونياً: فمثلاً الأخضر للسايروسين، والأحمر للكوانين، والبرتقالي للأدينين، والأزرق للثايمين (شكل 14.11).



شكل (14.11): قراءة التسلسل المتولد بواسطة بروتوكول إنهاء السلسلة لـ Sanger و Coulson بطريقة آلية تعتمد على الصبغات المتفلورة. يتم توسيم كل ddNTP بصبغة متفلورة ذات لون مميز، بحيث يتم تشخيص نوع السلسلة المنتهية وذلك بمرارها على كاشف التفلور لينطبع التسلسل بطريقة آلية معتمد على التفلور (تصميم المؤلف).

ان بروتوكول معرفة التسلسل الآلي في المختبر الاعتيادي يمكن له أن يقرأ أكثر من 600 زوج قاعدي في ترحيل واحد. هذا وصممت أنظمة قراءة تسلسل الـ DNA الحديثة لتوليد أكثر من نصف مليون قاعدة نتروجينية في اليوم الواحد باستخدام هلام التسلسل المحتوى في عدة أنابيب شعرية (capillary tubes) بدلاً من النوع اللوحى (slab format) المعتاد. ومن الجدير بالذكر أن تحضير وتحميل العينات في الهلام الشعري يتم بصورة آلية من قبل "روبوت" بينما يتم تحليل النتائج آلياً أيضاً بنفس الطريقة.

على الرغم من التحويلات الكثيرة الحاصلة في معرفة التسلسل النيوكليوتيدي للأحماض النووية، إلا أنها تستند على نفس المبادئ التي ابتكرها Sanger. ولكن في الآونة الأخيرة برزت طريقة لتحليل تسلسل الـ DNA، تمتاز هذه الطريقة بطاقة انتاجية عالية إلا أنها لا تعتمد على مبادئ Sanger في تحليل تسلسل الـ DNA وتدعى بالـ pyrosequencing وتسمح هذه الطريقة بتحليل سريع لتسلسل الجينوم كاملاً، وسميت هذه الطريقة بهذا الاسم استناداً إلى تحرر مركب الـ pyrophosphate، والذي يتحرر في كل مرة تضاف فيها نيوكليوتيدة إلى سلسلة الـ DNA النامية (راجع الفصل الثالث). وتستثمر هذه الطريقة تحرر الـ pyrophosphate كعلامة لإضافة نيوكليوتيدة إلى سلسلة الـ DNA النامية، ويتوقع أن يزداد شيوع استخدام هذه الطريقة في المستقبل القريب.

كيف نضخم الجين

بعد معرفة تسلسل الجين، يحتاج الباحث إلى توفر كمية كبيرة منه جاهزة لتجارب الوراثة الجزيئية اللاحقة، لذا يمكن تصميم بوادي متخصصة لهذا الجين من كلا طرفيه لتضخيمه إلى مئات الآلاف أو إلى ملايين النسخ في تقنية تدعى تقنية سلسلة بوليميريز الدنا (PCR). ناقشنا في الفصل العاشر كيف يمكن للبكتريا أن تستخدم لكي تضخم قطعة من الـ DNA المكون فيها، ولكن هذه التقنية مملة ومكلفة للوقت مقارنة بتقنية الـ PCR. والآن سنناقش تقنية تضخيم تجري خارج جسم الكائن الحي لتخليق العديد من نسخ الـ DNA. تستخدم تلك التقنية - والتي تستغرق ساعات بدلاً من أيام - نفس الانزيم الذي تستخدمه بكتريا القولون، وهو الـ DNA polymerase، ولكن هذا التفاعل يجري في أنبوب اختبار.

تقنية سلسلة بوليميريز الدنا (polymerase chain reaction): إن الـ PCR

هو عبارة عن تقنية مختبرية "التضخيم" تسلسل DNA بشكل متخصص. يعد الـ PCR كفاء بشكل كبير جداً وحساس. انه يعمل ملايين أو بلايين النسخ من أي تسلسل متخصص من الـ DNA، حتى لو كان التسلسل موجود ضمن مزيج معقد من تسلسلات أخرى مختلفة. وبسبب القوة التي تتمتع بها تقنية الـ PCR، استطاع الباحثين استخدامه ليضخموا التسلسل المطلوب حتى لو كان يمتلك نسبة صغيرة جداً من الـ DNA. وعلى سبيل المثال، يحتوي جدر شعرة

مفرد، أو قطرة دم مجهرية متروكة على مسرح الجريمة كميات وفيرة من الـ DNA لغرض إجراء تقنية الـ PCR.



Kary Mullis

قامت تقنية الـ PCR بعمل ثورة في حقل علم الأحياء الجزيئي، فقد مكنت الباحثين من إنجاز تجارب كانت تعتبر سابقاً غير معقولة. قبل منتصف الثمانينيات من القرن الماضي، وذلك عندما طورت تقنية الـ PCR، فإن المختصين بالأحياء الجزيئي كان لا بد لهم من أن يستخدموا طرق مجهدة ومكلفة للوقت وذلك لكي يتم كشف وكلونة وتنقية تسلسلات الـ DNA المراد دراستها. لقد منح العالم Kary Mullis جائزة نوبل عام 1993 في الكيمياء وذلك لابتكاره تقنية الـ PCR.

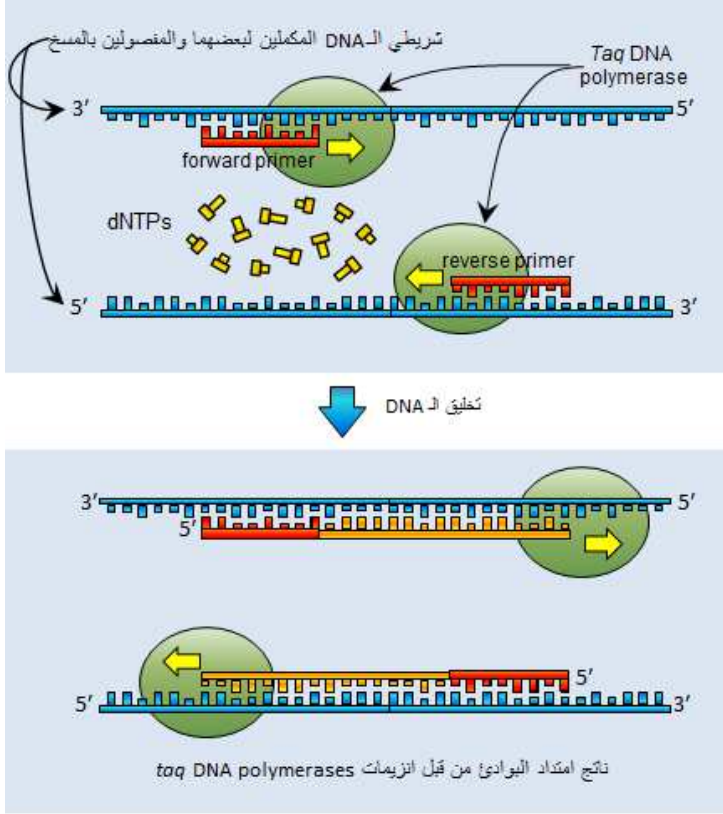
تستند تقنية الـ PCR على الطريقة التي تضاعف بها الخلايا الـ DNA التابع لها. فخلال تضاعف الـ DNA، ينفصل شريطي الـ DNA عن بعضهما، ويقوم إنزيم الـ DNA polymerase بلمرة النيوكليوتيدات وذلك لتكوين شريطين بنويين جديدين لكل من الشريطين الأبويين. يعمل الشريطين الأبويين كقالب templates لتخليق الشريطين البنويين. يتراكم الشريطين الجديدين بحيث تتحدد كل نيوكليوتيدة في الشريطين الجديدين من قبل النيوكليوتيدة المكملة الموجودة في الشريط القالب، بحيث أن الأدينين يكمل الثايمين والكوانين يكمل السايتوسين. وبسبب هذا التخصص في الأزواج القاعدي، أحد الشريطين البنويين المخلقين حديثاً يمتلك نفس تسلسل أحد الشريطين الأبويين، والشريط الآخر يمتلك نفس تسلسل الشريط الأبوي الآخر، هكذا ينتج التضاعف نسختين مماثلتين للنسخة الأصلية من حلزون الـ DNA المزدوج (راجع الفصل الثالث).

إن النسخة التي يريد الباحثون تضخيمها في تقنية الـ PCR تدعى بالتسلسل الهدف target sequence ، والتي تعاني ما يقارب ثلاثون دورة من التضاعف في أنبوب تفاعل صغير. وخلال كل دورة تضاعف، تزدوج عدد من جزيئات التسلسل الهدف لأن كل النواتج والقالب لدورة واحدة من التضاعف تصبح قالب للدورة الأخرى من التضاعف نفسه. وبعد عدد من دورات التضاعف التي يرمز لها (n) تنتج نسختين من التسلسل الهدف نظرياً. وبعد ثلاثين دورة، يمكن أن تنتج تقنية الـ PCR أكثر من عشرة بلايين نسخة من التسلسل الهدف. إن هذا هو ما يدعى بسلسلة بوليمريز الدنا أو بالـ PCR ، لأن إنزيم DNA polymerase هو الذي يحفز تضاعف السلسلة chain reaction في عملية التضاعف.

تصميم البوادي primer design: لكي يضاعف الـ DNA، يحتاج إنزيم DNA polymerase لا إلى القالب فقط ، وإنما يحتاج إلى البوادي primer أيضاً. إن البوادي هو تسلسل من DNA مفرد الشريط single stranded DNA والذي يتلدن anneal أو يرتبط

بالشريط القالب بواسطة ازدواج قاعدي متخصص. هذا ويمكن لجهاز مخلق النيوكليوتيدات الصغيرة oligonucleotide synthesizer أن ينتج بوادئ لأي تسلسل مرغوب (أنظر تخليق الجين المباشر). ان بوادئ تقنية الـ PCR هي تسلسلات قصيرة وعادة ما تكون بطول حوالي 15 الى 25 نيوكليوتيدة. إن تسلسلات هذه البوادئ الصغيرة هي التي تكون مسؤولة عن ذلك التخصص العالي في هذه التقنية. صمم الباحثون بوادئ يمكن لها أن ترتبط بالتسلسلات الواقعة على كلا جانبي التسلسل الهدف. لقد قاموا بذلك بواسطة جعل البوادئ مكملة للتسلسلات الهدف. وكذلك بواسطة جعلها طويلة كفاية لكي لا ترتبط بموقع آخر (شكل 15.11).

كلما كان البادئ طويلاً، كلما زادت احتمالية كون ذلك البادئ مكمل للتسلسل الهدف فقط دون غيره من التسلسلات. وبما أن أي موقع مفرد في تسلسل الـ DNA من الممكن أن يحتله أما الأدينين أو الكوانين أو السايتوسين أو الثايمين، لذا، فهناك احتمال من أربع احتمالات أن هذا الموقع سوف يحتوي على الأدينين على سبيل المثال. (ان هذا على أساس التقريب لأنه لا يمكن للنيوكليوتيدات من أن تتوزع بشكل متساوي أو عشوائي في الـ DNA. ولهذا السبب، فان احتمالية وجود أي تسلسل معين من الـ DNA والذي طوله هو عدد معين من النيوكليوتيدات (n) في أي بقعة من تسلسل الـ DNA هي 1 إلى 4 كما هي مناقشة في الفصل العاشر. أن احتمالية أن تسلسل بطول 20 نيوكليوتيدة (وهو الطول النموذجي لبوادئ الـ PCR) في أن يوجد في أية منطقة معطاة من تسلسل الـ DNA بشكل عشوائي هو أقل من واحد إلى ترليون 10^{-12} . ويبلغ طول الجينوم البشري 3×10^9 نيوكليوتيدة، وبالتالي، فان أي تسلسل بطول 20 نيوكليوتيدة من غير المحتمل أن يوجد لأكثر من مرة واحدة ربما في الجينوم البشري. صمم الباحثون اثنين من البوادئ التي يمكن لها أن ترتبط بالأشرطة المتعكسة للـ DNA على كلا جانبي التسلسل الهدف. لقد صممت تلك البوادئ لكي "تصوب" على الطريق الصحيح، بحيث أن قطعة الـ DNA الواقعة بينها وليس خارجها هي التي تستنسخ. إن تصميم البوادئ لكي "تصوب" على الهدف الصحيح ببساطة يحتاج إلى بنائها بحيث أن نهاياتها من نوع 3' تمتد نحو التسلسل الهدف، بينما تمتد نهاياتها ذات النوع 5' بعيداً عنه. تدعى أحد النهايات بالنهاية 5' بينما تدعى النهاية الأخرى بالنهاية 3'. وفي عملية التضاعف، تضاف النيوكليوتيدات عادة إلى النهاية 3' للشريط النامي من الـ DNA. وهكذا، تتقدم عملية تخليق الـ DNA بالاتجاه من 5' إلى 3'. وكما نوقش في الفصل الثالث، يكون شريطي الـ DNA المتكاملين متضادي الاتجاه anti-parallel، وهذا يعني بأنهما يسيران باتجاهين متعاكسين، لذا تم استغلال هذه الحقيقة لتكوين نواتج الـ PCR ذات الأطوال المحددة (شكل 15.11).



شكل (15.11) طريقة بدء سلسلة بوليمريز الدنا (PCR) لتضخيم تسلسلات نيوكليوتيدية معينة خارج جسم الكائن الحي. يتم تخزين الـ DNA المعزول من الخلايا لفصل الأشرطة الكاملة لبعضها البعض. ثم تربط تلك الأشرطة بوجود كميات كبيرة من متعددة نيوكليوتيدية صغيرة والتي قد تخليقها كيميائياً لكي تكمل التسلسلات الهدف الموجودة في الأشرطة الكاملة والمفصلة بالحرارة. تعمل تلك النيوكليوتيدات الصغيرة كبوادي متخصصة لتخليق الـ DNA خارج جسم الكائن الحي والمحفز من قبل انزيم DNA polymerase، والذي يقوم بتخليق الـ DNA بين موقعي البادئين الأمامي والخلفي (تصميم المؤلف).

تألف تفاعل الـ PCR النموذجي من عدة مكونات، مختلطة مع بعضها البعض بمحلول ذو حجم 25 إلى 100 مايكروليتر. يجب أن يحتوي المحلول على الـ DNA القالب، والبوادي primers، والنيوكليوتيدات nucleotides لكي تعمل كأحجار بناء building blocks للـ DNA المتكون حديثاً، وإنزيم DNA polymerase الذي يحفز على تخليق الـ DNA، بالإضافة إلى الدارر buffer والأملاح salts، والتي تحتوي عادة على المغنيسيوم الضروري للفعالية المثالية لإنزيم DNA polymerase. هذا ويمكن أن يكون الشريط القالب غير نقي، كما في مسحة الـ DNA المأخوذة من مسرح الجريمة. ولكي تجري تفاعل الـ PCR، يوضع الأنبوب المحتوي على المحلول في ماكينة تدعى بدوار الدنا الحراري DNA thermal cycler (شكل 16.11). إن الدورات الحرارية أساساً هي كتل تسخين قابلة للبرمجة. إنها تحتوي عادة على كتلة سميكة من الألمنيوم مكونة من ثقوب والتي توضع فيها أنابيب تفاعل الـ PCR. يمكن لهذه الكتلة من أن تبرد أو تسخن بسرعة إلى درجات حرارية معينة ولأوقات معينة تحت سيطرة منظمة من

جهاز الحاسوب. يتم السيطرة على كل دورة من تفاعل الـ PCR وذلك بواسطة تغيير حرارة كتلة الألمنيوم هذه، وبالتالي تتغير حرارة مزيج التفاعل.



شكل (16.11). جهاز الدوار الحراري لتسخيم الجين (PCR Thermocycler) المصنع من قبل شركة ايندورف الألمانية (Eppendorf - Germany). صمم هذا الجهاز بشكل محبب للباحث بحيث يمكن التحكم به عن طريق اللمس المباشر على شاشته (touch screen).

إن الخطوة الأولى في تفاعل الـ PCR هو تسخين المزيج إلى درجة حرارة عالية، عادة 94°C إلى 95°C ، لحوالي خمس دقائق. تنكسر الأواصر الهيدروجينية التي تحمل الشريطين المتقابلين مع بعضهما البعض في الحلزون المزدوج عند التعرض إلى تلك الدرجات الحرارية. وينفصل الـ DNA إلى أشرطة مفردة. تدعى تلك العملية بالمسخ .denaturation

في الخطوة الثانية، يبرد مزيج الـ PCR إلى حرارة أوطأ، والتي تكون نموذجياً ما بين 50°C إلى 65°C . إن هذا يسمح للبواقي بأن ترتبط بتسلسلات DNA مكملة متخصصة في شريط الـ DNA القالب. يتم اختيار درجة الحرارة في هذه الخطوة بعناية لكي تكون قليلة بشكل كاف لكي تسمح للبواقي من أن يرتبط ، ولكن ليس أبرد من تلك الدرجة. ربما تسمح درجات حرارة الارتباط الأقل للبواقي بأن ترتبط بمناطق بشريط الـ DNA القالب والتي لا تكون مكملة لها بشكل كامل، وهذا من الممكن أن يؤدي إلى تضخيم تسلسلات غير متخصصة. ويمكن أن تحدد حرارة الارتباط المثالية لعدد من البواقي من قبل الصيغة الكيميائية المعتمدة على المكون النيوكليوتيدي للبواقي ، ولكنها مسألة تجريبية (try and error) لكي نجد أفضل درجة حرارية للارتباط. تستغرق خطوة ارتباط البواقي

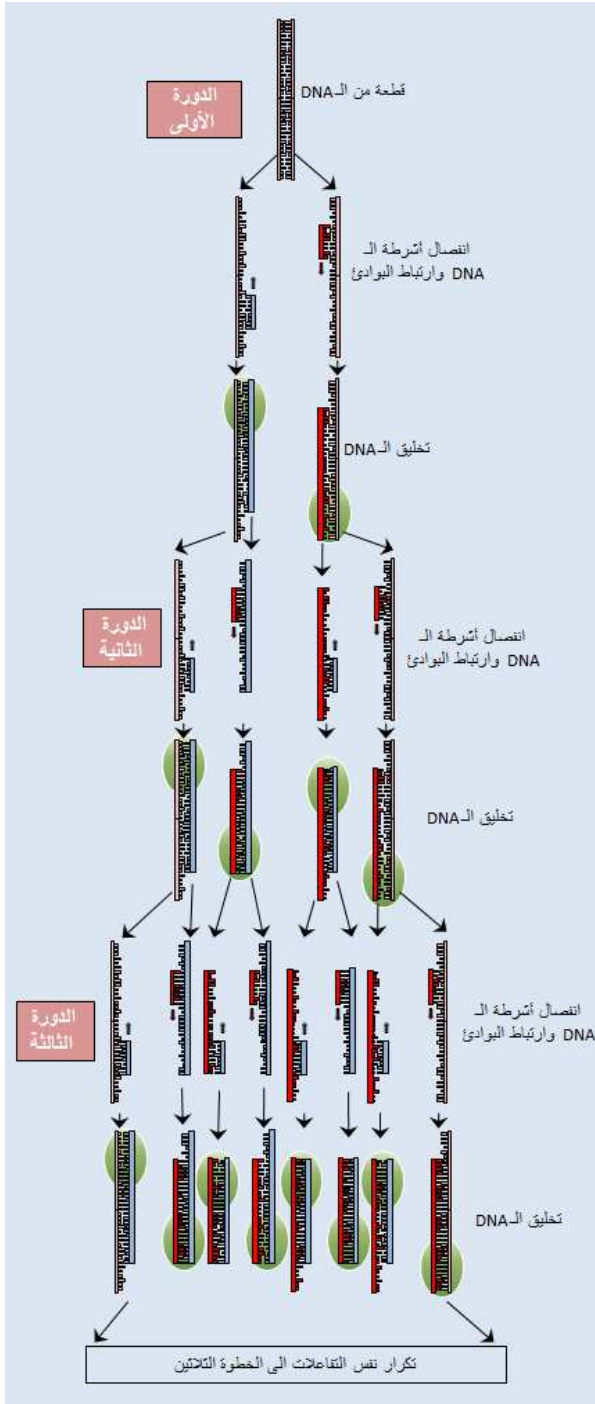
annealing step من 15 إلى 30 ثانية، وهو وقت قصير بشكل مدهش باعتبار أن البادئ يجب أن "يمسح" تسلسلات الـ DNA بحثاً عن الشريط القالب.

في الخطوة الثالثة (شكل 17.11)، يسخن التفاعل من جديد، ليصل إلى 72°C ، وهي الحرارة التي يكون فيها إنزيم DNA polymerase أكثر فعالية، تتحطم معظم الإنزيمات عند هذه الدرجة الحرارية، ففي الأيام الأولى من اكتشاف تقنية الـ PCR، استخدم العلماء إنزيم الـ DNA polymerase المشتق من بكتريا القولون *Escherichia coli*، والذي يكون بفعالية أكبر عند درجة حرارة جسم الإنسان والتي هي 37°C . ولكن إنزيمات بكتريا القولون قد تحطمت عند درجات الحرارة العالية المطلوبة لتفاعلات المسخ والربط، ولهذا فإن إنزيم الـ polymerase يجب أن يضاف من جديد في كل تفاعل خلال كل خطوة من خطوات الـ PCR.

ولحل هذه المشكلة، قام العلماء بتقنية إنزيمات DNA polymerases من الأحياء المجهرية التي تعيش في الينابيع الحارة، أو في الفجوات الحرارية العميقة في البحار. تكون إنزيمات هذه الكائنات أكثر فعالية في درجات الحرارة العالية. إن أكثر إنزيم مستخدم في تقنية الـ PCR يدعى بـ *Taq DNA polymerase*، والذي قد تمت تنقيته أصلاً من بكتريا الينابيع الحارة المعروفة بـ *Thermus aquaticus*. في درجة حرارة 72°C ، يضيف إنزيم *Taq DNA polymerase* النيوكليوتيدات إلى نهايات الـ 3' للبادئ المرتبطة وبمعدل حوالي ألفين نيوكليوتيدة بالدقيقة الواحدة. ولهذا السبب، ولكي نضخم التسلسل الذي هو بطول ألف نيوكليوتيدة، فإن خطوة امتداد البادئ يجب أن تدوم لثلاثين ثانية عند الدرجة الحرارية 72°C . وبنهاية تلك الخطوة، يمتلك كل شريط قالب شريط مكمل جديد. إن هذا يكمل أول دورة من دورات الـ PCR. يمكن أن تعاد الدورة، عند تلك النقطة، وذلك بواسطة إعادة خطوة المسخ من جديد.

في الخطوة التالية، يمكن أن يعمل شريطي الـ DNA من جديد كقوالب، كما سيحدث للشريطين المخلّقين حديثاً. وبهذه الطريقة، تزدوج عدد من القوالب، وهكذا تزدوج من جديد في كل خطوة PCR ناجحة. عند نهاية التضاعف، يحتوي أنبوب التفاعل على قطع DNA تكون معظمها عبارة عن نسخ من التسلسل الهدف. أن شريط الـ DNA القالب الأصلي مازال موجود، ولكنه يوجد بكميات مهمة مقارنة بكميات نواتج الـ PCR (شكل 17.11). هذا ويكشف عن كميات الـ DNA المضخمة في جهاز الدوار الحراري بالترحيل الكهربائي بالهلام عادة. ويمكن استخدام تقنية الـ الـ enzyme linked immune adsorbent assay مع بواضع الـ PCR الموسومة بمادة غير اشعاعية كالبايوتين مثلاً.

بما أن تقنية الـ PCR هي تقنية قوية وسهلة وغير مكلفة، طور المختصين في مجال الوراثة الجزيئية أساليب يمكنهم من خلالها توسيع تطبيقات تقنية الـ PCR في الأبحاث المختلفة. وقد برزت في الآونة الأخيرة العديد من التحويرات في تقنية الـ PCR الأصلية منها:



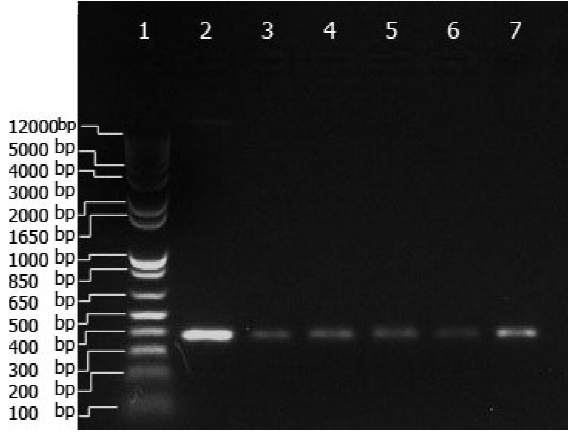
شكل (17.11). تضخيم الـ DNA باستخدام تقنية الـ PCR. ينتج الـ PCR كمية من الـ DNA يمكن تزوج في كل دورة من دورات تخليق الـ DNA وتحتوي على أنواع الـ DNA بأحجام متفرقة. تتألف كل دورة من ثلاث خطوات، وهي المسخ والارتباط والبلورة. وبعد عدة دورات من التفاعل، يتسبب مزيج التفاعل ذو قطع الـ DNA المختلفة قطعة الـ DNA مفردة، تبدأ بالبائى الأمامي وتنتهي بالبائى الخلفي. وفي هذا المخطط، تتوضح ثلاث دورات من التفاعل والتي هي كفيّة بانتاج 16 سلسلة من الـ DNA، ثمان منها تمتلك الطول المحدد للقطعة الهدف (ذات اللون الأصفر)، ولكن بعد ثلاث دورات أخرى، يكون عدد تلك القطع ذات الطول المحدد هو 240 من أصل 256 سلسلة الـ DNA (تصميم المؤلف).

الـ PCR ذو البداية الحارة (hot start PCR):
 حال مزج كل مكونات خليط تفاعل الـ PCR مع بعضها البعض، يمكن أن يقوم انزيم الـ DNA polymerase ببداية التخليق. ويمكن أن يحدث هذا عند الشروع بتسخين خليط التفاعل للمرة الأولى، حيث تكون الحرارة صغيرة بما يكفي لتسمح بحدوث ارتباط ولكنه قد يكون غير دقيق (non-specific annealing) بين البائى وال قالب، مولدة عدة نواتج غير متخصصة. ويمكن منع هذه المشكلة إذا لم يحدث تخليق الـ DNA لحين الوصول إلى أول دورة إلى حرارتها القصوى. ويدعى هذا بالـ PCR ذو البداية الحارة. ويمكن الحصول على

هكذا ظروف عن طريق حشر خرز من الشمع أما مع انزيم الـ polymerase الموجود أو مع أملاح المغنسيوم الموجودة في التفاعل والضرورية لفعالية الانزيم، سامحة للتفاعل بالبدء فقط عند ارتفاع درجات الحرارة الى الدرجة التي يضيف فيها انزيم الـ polymerase النيوكليوتيدات بشكل متخصص. كما يمكن استبدال الشمع بالأجسام المضادة، فعند ارتفاع الحرارة الى درجة معينة، تنمسخ الأجسام المضادة سامحة لانزيم الـ polymerase بالعمل.

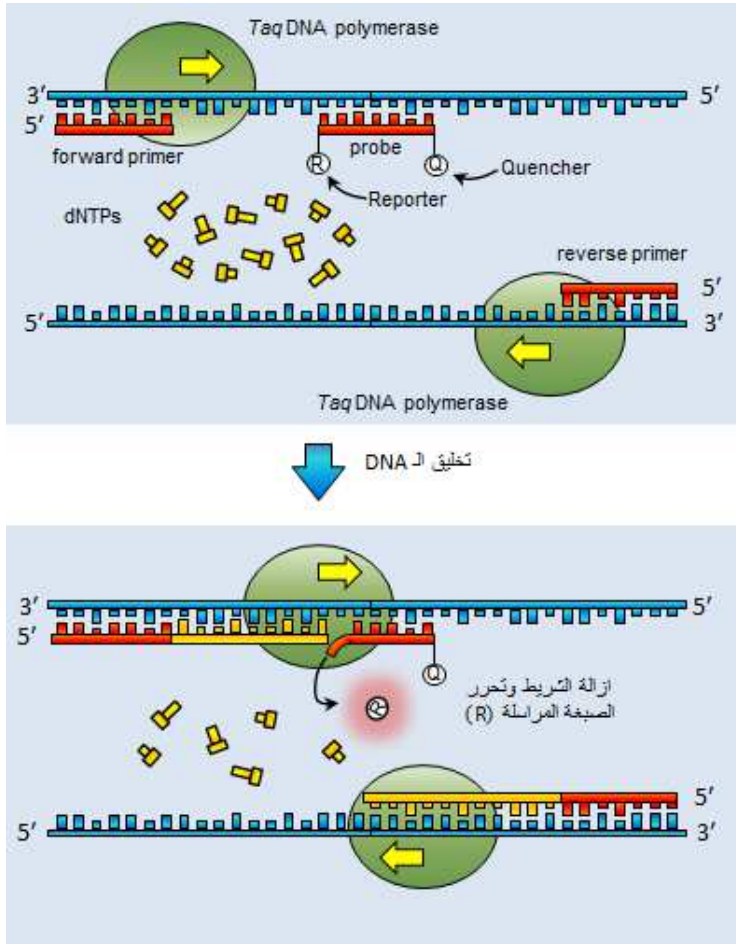
الـ PCR ذو الاستنساخ المعاكس (RT-PCR): ابتكر الباحثون تقنية ليست بعيدة عن تقنية الـ PCR التقليدية وانما هي امتداد لها أو هي أحد مشتقاتها، وتدعى بتقنية reverse transcription PCR أو اختصاراً RT-PCR. تشتمل هذه التقنية بداية على نسخ الـ RNA إلى DNA ، وذلك باستخدام إنزيم reverse transcriptase ، ثم تستخدم تقنية الـ PCR التقليدية لتضخم تلك التسلسلات المكملة والمعروفة بالـ cDNA. وبما أن المكون mRNA في الخلية أو في النسيج يتمثل بالجينات التي تستنسخ بشكل فعال، لذا، فإن هذه التقنية توفر طريقة جبارة لتحليل التعبير الجيني في النسيج قيد الدراسة. أصبح باستخدام تقنية RT-PCR يمكن تضخيم جزيئة الـ RNA وذلك لأجل تقدير وفرة نسخة ذلك الجين في العينة. يتم ذلك بواسطة انزيم reverse transcriptase وبادئ مفرد، وذلك لتكوين جزيئة cDNA مفردة الشريط قبل الشروع بتفاعل الـ PCR نفسه. ويتألف بادئ الاستنساخ المعاكس من متعدد الثايمين وذلك لبدء تخليق جزيئة الـ cDNA من الذيل متعدد الأدينين.

الـ PCR المتزامن الكمي (quantitative Real time PCR): على الرغم من حساسية تقنية الـ PCR التقليدية في الكشف عن التسلسل الهدف، إلا ان ليس لها القدرة على اعطاء نتائج "كمية" أو حقيقية عن وفرة التسلسل الهدف، فعلى سبيل المثال، عندما يقوم الباحث باستخدام هذه التقنية التقليدية لغرض الكشف عن جين ما، ويستخدم في ذلك تفاعلات تضخيمية في أنابيب PCR مختلفة، فإنه ليس من الضرورة أن تكون كثافة حزمة الـ PCR الناتجة هي دلالة على وفرة نسخ ذلك الجين لأننا ليست لدينا الوسيلة الملائمة لإجبار البوادي على تضاعف الجين الهدف من أول دورة (شكل 18.11). وعندما يكون المراد هو المعرفة الكمية لعدد نسخ التسلسلات الهدف يصار الى تقنية تدعى بالـ PCR الواقعي الكمي.



شكل (18.11): عدم مقدرة تقنية الـ PCR التقليدية في إعطاء توصيف كمي حقيقي عن عدد نسخ التسلسل الهدف. على الرغم من وجود التسلسل الهدف في حسب الحزم المبينة في المسارات من 3 إلى 7، إلا أنها وجدت بكثافات مختلفة، لا تعكس تلك الاختلافات في الكثافة بالضرورة اختلافات في عدد نسخ التسلسل الهدف (Al-Shuhaib *et al.*, 2011).

ان هنالك العديد من تطبيقات الـ PCR والتي تكون ذات أهمية في المعرفة الكمية للمادة البادئة. نظرياً، هنالك علاقة كمية بين مقدار المادة البادئة (التسلسل الهدف) ومقدار ناتج الـ PCR في أي دورة من دورات الـ PCR. ولكن عملياً، تعطي تفاعلات الـ PCR كميات مختلفة من الناتج، وهذا يجعل المعرفة الكمية متعذرة. ان أول تجربة مهدت الطريق في استخدام التحليل الكمي في الـ PCR نشرت عام 1993، حيث استخدم فيها صبغة بروميد الايثيديوم (ethidium bromide) للمعرفة الكمية بنواتج الـ PCR اثناء تراكمها. يقوم التضخيم بانتاج كميات متزايدة من الـ DNA ثنائي الشريط، والذي يرتبط بصبغة بروميد الايثيديوم، وهذا ينتج في زيادة في التفلور. واذا ماوضع مخطط يوضح الزيادة في التفلور مقابل رقم الدورة يكون من المعقول تحليل تفاعلات الـ PCR بشكل متزامن (real time). وتعد هذه الكيفية أكثر ارضاءاً من تحليل النواتج بعد عدد ثابت من الدورات. ان العائق الأساسي في استخدام صبغة بروميد الايثيديوم هو ان كلا النواتج المتخصة وغير المتخصصة تولد اشارة. لقد تمكن الباحثون من التغلب على هذا باستخدام طرائق معتمدة على المجسات لتحليل تراكم النواتج. ان المجسات المستخدمة هي متعددات نيوكليوتيدية ذات صبغة متفلورة مراسلة (reporter fluorescent dye) مرتبطة بنهاياتها من نوع 5' وصبغة خامدة (quencher dye) عند النهاية 3'. عندما يكون المجس كاملاً، يعمل القرب من الصبغة الخامدة على اختزال التفلور الصادر من الصبغة المراسلة. وعندما يوجد التسلسل الهدف، يرتبط المجس بعد أحد مواقع البوادي. وبامتداد البادي، يتم شق المجس بفعالية 5' exonuclease activity لانزيم Taq polymerase (شكل 19.11).



شكل (19.11): تفاعل real time PCR الكمي (تصميم المؤلف).

يعمل هذا الشق على فصل صبغة المراسل من الصبغة الخامدة، وبهذه الطريقة يزيد من إشارة الصبغة المراسلة. يقوم الشق بإزالة المجس من الشريط الهدف، وهذا يسمح باستمرار امتداد البادئ إلى نهاية الشريط البادئ. يتم شق جزيئات صبغية مراسلة إضافية من نظيراتها من الواسمات مع كل دورة، وهذا يؤثر في زيادة كثافة التفلور مقارنة بكمية الناتج المضخم. هذا وتم تطوير أجهزة تعمل على دمج التدوير الحراري (thermal cycling) المعتاد مع قياس التفلور، وذلك لكي تمكن من متابعة تفاعل الـ PCR بشكل واقعي. وهذا هو الذي عمل ثورة في التقنيات المعتمدة على المعرفة الكمية لتفاعلات الـ PCR. أي ان التفاعلات يتم وصفها منذ الخطوة الأولى عند ملاحظة أول ناتج تضخيمي بدلاً من كمية الـ PCR المتراكمة بعد عدد ثابت من الدورات. وهذا يعني كلما كان عدد

النسخ البادئة أكبر من التسلسل الهدف، كلما يتم كشف تفلور ملموس بصورة أقرب. ويتم معرفة كمية الهدف في العينات الغير معروفة بتحضير منحنى قياسي (standard curve)، وذلك باستعمال نسخ بأعداد مختلفة من التسلسلات البادئة.

تم تطوير طريقة معينة تسمح بتعقب تفاعلات الـ PCR وذلك من خلال زيادة الاشعاع الصادر من المجسات المتفلورة (fluorescent probes). إن الأجهزة التي لها القدرة على مزج تفاعل الـ PCR والكشف عن التفلور يمكن إجرائها في أنابيب زجاجية شعيرية. وهذا يسمح باختراق الضوء لتنشيط مايعرف بالفلوروفور (flourophore) وبمتابعة اشعاع التفلور أثناء إجراء تفاعل الـ PCR. ويمكن للأجهزة الحديثة متابعة عدة صبغات متفلورة مختلفة بشكل متزامن، سامحة بإجراء عدة تفاعلات في أنبوب واحد. أما المجسات المتفلورة ذات الطبيعة الارتباطية بالـ DNA والتي يزداد تفلورها بعد الارتباط بالـ DNA فتوضع ضمن نفس خليط تفاعل الـ PCR. وبازدياد كمية الـ DNA الهدف الحديث التصنيع، يزداد ارتباط المجس بالـ DNA الهدف، ويزداد الاشعاع المتفلور بدوره. إن أبسط المجسات الارتباطية بالـ DNA هي ذات طبيعة غير متخصصة بتسلسل معين عند ارتباطها مع الـ DNA. وعلى سبيل المثال، صبغة SYBR Green I، ذات الاشعاع المتفلور عند الطول الموجي 520 نانوميتر. تتفلور هذه الصبغة حال ارتباطها بالـ DNA المزدوج فقط. تتعقب هذه الصبغة الكمية الكلية للـ DNA المزدوج الشريط ولكن ليس لها القابلية على أن تميز بين التسلسلات المختلفة. ولكي نتأكد بأن التسلسل الهدف الصحيح هو قيد التضخيم، يستخدم مجس متفلور متخصص بالتسلسل.

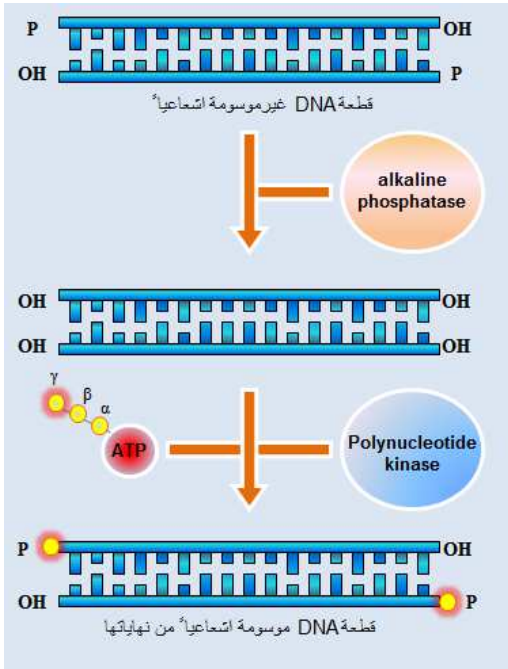
يمكن ضرب مثال لتوضيح الفكرة المناقشة في أعلاه، كما في المجس المعروف "بناك مان" (TaqMan[®] probe). ويتألف هذا المجس من اثنان من الصبغات المتفلورة (flourophores) مرتبطة بتسلسل DNA يزدوج في وسط الـ DNA الهدف. ويقوم نظام نقل الطاقة الرنيني المتفلور (fluorescence resonance energy transfer) أو FRET بنقل الطاقة من الصبغة المتفلورة ذات الطول الموجي الصغير في نهاية واحدة من الطول الموجي الكبير للصبغة المتفلورة للنهية الأخرى. وهذا يخمد من تفلور اشعاع الموجة الصغيرة.

وخلال تفاعل الـ PCR، يرتبط مجس TaqMan بالتسلسل الهدف بعد خطوة المسخ والتي تفصل شريطي الـ DNA. وبقيام انزيم Taq polymerase بمد البادئ خلال خطوة الـ PCR القادمة، فإنه يقوم بالنهاية بالاصطدام بمجس TaqMan. هذا ولايعتبر انزيم Taq polymerase هو الانزيم الوحيد القادر على اراحة الأشرطة التي تعترض تقدمه الى الأمام، ولكنه يمتلك الفعالية الهاضمة nuclease activity 3' - 5' والتي تحطم شريط المجس المتكون من تسلسل DNA طبعاً. وهذا يحطم الرابطة بين الصبغتين المتفلورتين

ويزمق الـ FRET. ان الصبغة المتفلورة ذات الطول الموجي الصغير هي الآن غير متعرضة للاخماد ويزداد تفلورها. وفي هذه الحالة، تتعلق الزيادة في التفلور بشكل مباشر بكمية التسلسل الهدف المتخصص الذي قد تم تضخيمه في هذه التقنية الكمية.

طرق توسيم المجسات (labeling of probes) للكشف عن الجين الهدف

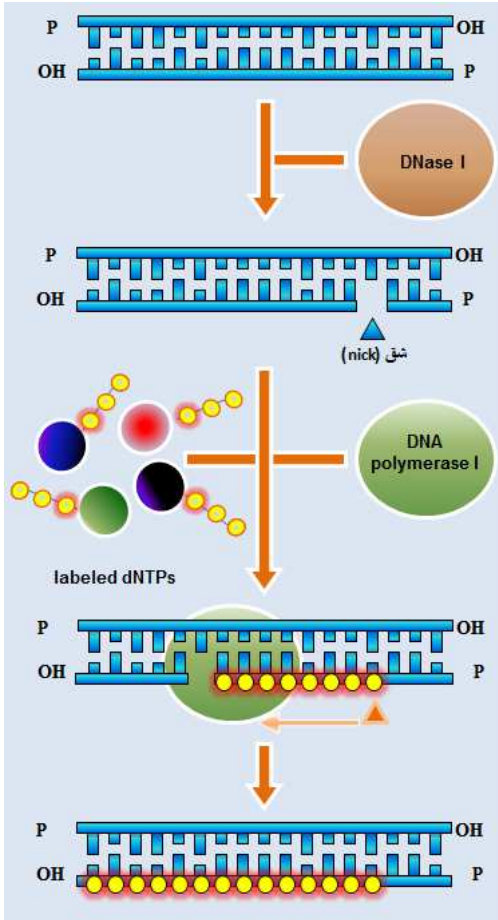
قبل التطرق الى الكشف عن الجين لابد للقارئ من معرفة كيفية توسيم المجسات المخصصة للكشف عن تسلسل الجين الهدف. هنالك عدة طرق لوسم المجسات كما في طريقة التوسيم الطرفي (end labeling)، والتي يستخدم فيها انزيم polynucleotide kinase لنقل مجموعة الفوسفات الطرفية في جزيئة الـ ATP الى المجموعة الهيدروكسيلية الطرفية من نوع 5' في جزيئات الأحماض النووية. واذا كان الـ ATP الواهب موسوم اشعاعياً ينتج هذا في حمض نووي معلم اشعاعياً من النهاية 5' (شكل 20.11).



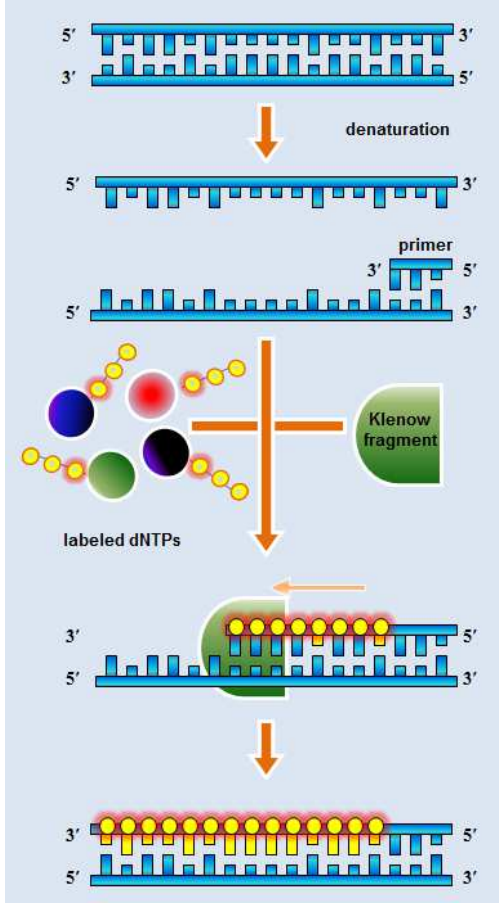
شكل (20.11): التوسيم الطرفي للـ DNA باستخدام انزيم polynucleotide kinase والذي يختصر بـ PNK. في الخطوة الأولى تزال مجموعة الفوسفات بواسطة انزيم الـ phosphatase لتوليد مجاميع هيدروكسيل من نوع 5'. وفي الخطوة الثانية تنقل الفوسفات الطرفية $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (الدائرة الصلدة) بعد ذلك الى النهاية 5' بواسطة انزيم PNK (تصميم المؤلف).

ويمكن توليد حمض نووي موسوم من نهايته الهيدروكسيلية من نوع 3' وذلك عن طريق انزيم terminal transferase وهو نفس الانزيم المستخدم في التذييل المتجانس (homopolymer tailing) (راجع الفصل العاشر). ويعتبر التوسيم من النهاية 5' أو 3' هما الطريقتان الشائعتان لتوسيم البوادي أو متعددات النيوكليوتيدات القليلة

(oligonucleotides) لأن تلك الطريقتان يمكن استخدامهما بالاشربة المفردة اضافة الى الاشربة المزدوجة، أما اذا كانت جزيئات الحمض النووي ذات شريط مزدوج، فتوجد طرق أخرى لتوسيمها بالاضافة الى الطريقتين السابقتين. كما في انتقال الثلمة (nick translation)، والتي وتعول على قابلية انزيم DNA polymerase I على نقل الثلمة المخلقة في أصرة الفوسفات ثنائية الأستر (على طول الـ DNA) في العمود الفقري لحلزون الـ DNA المزدوج (راجع الفصل الثالث). ربما تحدث الثلمات بشكل طبيعي أو ربما تتسبب عن طريق وجود حتى ولو تركيز واطئ من الانزيم الهاضم DNase في خليط التفاعل. يحفز انزيم DNA polymerase I تفاعل ازالة الشريط (strand displacement reaction) والذي يدمج نيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات (dNTPs) جديدة في سلسلة الـ DNA، وهنا اذا تم تجهيز خليط التفاعل بأحد أنواع الـ dNTPs الأربعة بشكل موسوم اشعاعياً، فالنتيجة تكون DNA موسوم اشعاعياً بشكل كبير (شكل 21.11).



شكل (21.11). وسم الـ DNA بواسطة الانتقال الثلمة. في البداية يتكون الشق أحادي الشريط في أصرة الفوسفات ثنائية الأستر في العمود الفقري في قطعة الـ DNA باستخدام انزيم DNase I. ثم يقوم DNA polymerase I بتخليق نسخة من الشريط القالب، محطماً الشريط غير القالب بفعاليته المحطمة 5'-3' exonuclease activity. وإذا تم تجهيز أحد النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات [α-32P]dNTP الموسومة اشعاعياً يؤدي هذا الى اندماج الاشعاع الى الشريط الجديد المخلق حديثاً (تصميم المؤلف).



هنالك طريقة أخرى للتوسيم تتم بواسطة امتداد البادئ (labeling by primer extension) وتسمى أيضاً بالتوسيم ذو النيوكليوتيدات المتعددة الصغيرة (oligolabelling)، والتي تستخدم نيوكليوتيدات متعددة عشوائية (نيوكليوتيدات سداسية عادة) لبدء تخليق شريط الـ DNA بواسطة انزيم DNA polymerase. يتم مسخ الـ DNA المراد توسيمه بالحرارة، ومن ثم ترتبط البوادي بالـ DNA المفرد الشريط.

ويمكن لقطعة كينو (Klenow fragment) لانزيم الـ DNA polymerase من أن تخلق نسخة من الشريط القالب، والذي يبتدئ من النهاية الهيدروكسيلية 3' للنيوكليوتيدات المتعددة. وإذا اندمجت أحد أنواع الـ dNTP الموسومة، يتم عندها انتاج DNA موسوم (شكل 22.11). ويتم تنفيذ هذه الطريقة بواسطة تقنية الـ PCR (أنظر أعلاه).

شكل (22.11). توسيم الـ DNA بواسطة امتداد البادئ. أولاً يمسح الـ DNA لاعطاء نيوكليوتيدات مفردة الشريط. ثم يضاف البادئ ليعطى منطقة صغيرة مزدوجة الشريط ذات نهاية هيدروكسيلية حرة من نوع 3'. ثم تقوم قطعة كينو التابعة لانزيم DNA polymerase I بتخليق نسخة من الشريط القالب امتداداً من البادئ، وذلك بدمجها أحد أنواع النيوكليوسيدات الموسومة اشعاعياً $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ مثلاً لانتاج جزيئة موسومة (تصميم المؤلف).

مهما اختلفت طريقة التوسيم، لابد من فصل الـ DNA الموسوم عن الـ DNA الغير موسوم الموجود في مزيج التفاعل. لابد من ملاحظة ان في معظم تفاعلات التوسيم لا تنحشر كل الـ dNTPs الموسومة اشعاعياً في التسلسل الهدف، لذا لابد من ايجاد طريقة ما لفصل النواتج الموسومة عن نظيراتها الغير موسومة. وهنالك طريقة بسيطة لانجاز ذلك تتلخص باستخدام الترشيح بالهلام (gel filtration) باستخدام وسط ملائم. ويمكن اتمام كل هذه العملية بماصة باستور، حيث يصل الـ DNA الموسوم الى العمود أولاً، ويتبع بعد ذلك بالنيوكليوتيدات الحرة. يتم جمع الاجزاء (fractions) ومراقبة قوة الاشعاع فيها.

كيف نكشف عن الجين



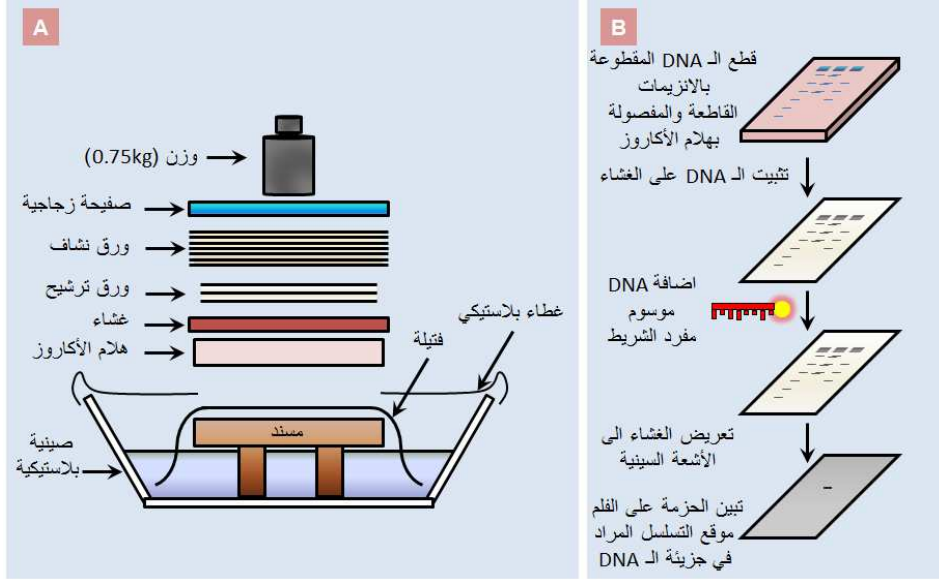
Edwin M. Southern

بعد الحصول على المجسات بواسطة تخليقها كيميائياً وتوسيمها، يمكن للباحث بعد ذلك أن يهجنها بطريقة ما بحيث يبحث بواسطتها عن التسلسل الهدف. وقد وظفها الباحث Southern عام 1975 واستخدمها بطريقة رائعة لمعرفة وجود موقع التسلسل الهدف. وبما أن مجرد تقطيع الحمض النووي بالانزيمات القاطعة وترحيله كهربائياً لا يكفي لمعرفة تسلسل صغير في معقد كبير من المادة الوراثية لأن النتيجة لا تعدو كونها عبارة عن مسحة (smear) على الهلام عند تصفيفه ببروميد الاثيديوم مثلاً، لذا ابتكر Southern طريقة سميت باسمه يمكن من خلالها الكشف عن التسلسل المطلوب، وقد احتلت هذه التقنية موقع كبير في تجارب الهندسة الوراثية، لأن هذه التقنية لا تعطي اجابة لسؤال واحد "هل يوجد الجين" ولكن يمكن لها تعطي اجابة لسؤال آخر وهو "أين يقع الجين".

أما فيما يخص خطوات العمل بوصمة ساوثرن فسنتناولها بشئ من التفصيل لأهميتها الكبيرة في الكشف عن وجود وانحشار الجين وحتى موقع الجين ولاعتماد عدة طرق كشف أخرى على هذه الطريقة. تتمثل أول خطوة من خطوات هذه الوصمة بتقطيع الـ DNA المراد معرفة وجود التسلسل الهدف فيه بانزيم قاطع أو عدة انزيمات قاطعة، ثم يصار الى ترحيل قطع الـ DNA تلك في هلام الأكاروز. يوضع هلام الأكاروز هذا على طبقة من ورق الترشيح والتي انغمست في مستودع يحتوي على دارئ النقل. أما الغشاء المعد للتهجين (hybridization membrane) فيوضع بين الهلام وحزمة أوراق التنشيف (towel papers) والتي تعمل على سحب دارئ النقل خلال الهلام بواسطة الخاصية الشعرية. وبهذا الوضع، ينتقل الـ DNA من الهلام مع جريان الدارئ ويتثبت على غشاء التهجين (شكل 11.23-a). وفي المراحل الأولية من وصمة ساوثرن كان نوع الأغشية المستخدمة هو النتروسلسلوز (nitrocellulose). لكن المشكلة في هكذا نوع من الأغشية هو طبيعتها الهشة. لذا تم تطوير نوع آخر من الأغشية، وهي أغشية البلاستيك المدعمة والتي تمتلك قابلية أكبر على الارتباط مع الأحماض النووية بالإضافة الى قابليتها للشد من دون تهشمها. ولأجل أن تنفيذ وصمة ساوثرن بشكل كفوء، فإن من المهم معاملة الهلام بشكل مسبق. تحتاج جزيئات الـ DNA الكبيرة (الأكبر من 10kb) الى وقت نقل أكبر مقارنة بالقطع الصغيرة. ولكي نسمح بانتقال متجانس لأحجام مختلفة من قطع الـ DNA يتم تعريض الـ DNA المرحل كهربائياً الى معاملة ازالة بيورين (depurination) لمدة قصيرة، وتتبع تلك المعاملة باضافة القاعدة لأن اضافة القاعدة تمسخ قطع الـ DNA قبل

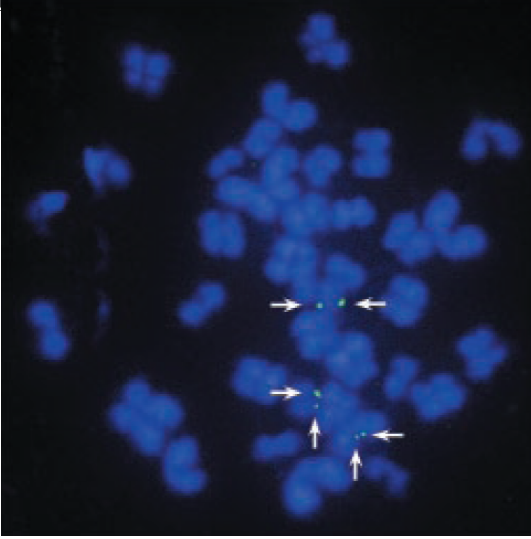
نقلها، وهذا يضمن انتقالها بشكل أشرطة مفردة وبشكل مناسب لاضافة الواسم اليها. وأخيراً، يتم معادلة الهلام باضافة محلول التعادل (neutralization solution) قبل اجراء وصمة ساوثرن. وهناك طريقة بديلة تستخدم أغشية ذات شحنة موجبة، والتي تنفي الحاجة الى معاملة الهلام معاملة مطولة. وعندما ينتقل الـ DNA بشكله الطبيعي (الغير ممسوخ) ومن ثم يتم مسخه بالقاعدة على الغشاء. وبعد النقل، تحتاج الأحماض النووية الى تثبيتها بالغشاء وتتوفر عدة طرق لتنفيذ هذا المطلب كما في الخبز بدرجة حرارة 80 درجة مئوية كما هو الحال في أغشية النتروسيليلوز وأغشية البلاستيك أيضاً. ولكن للطبيعة الاحتراقية للنتروسيليلوز، فانه من المهم أن يخبز في فرن حراري بالتفريغ (vacuum oven). وهناك طريقة بديلة للتثبيت تسلط فيها الاشعة فوق بنفسجية من قبل جهاز يسمى UV cross linker بشكل نموذجي. وتعتمد تلك الطريقة على تكوين أواصر عرضية (cross links) بين مخلفات التايامين في الـ DNA والأحماض الأمينية الموجبة الشحنة الموجودة على سطح الغشاء البلاستيكي. وبعد خطوة التثبيت، يوضع الغشاء في محلول يحتوي على واسم (RNA أو DNA مفرد الشريط أو oligonucleotide) معلم (بشكل اشعاعي أو غير اشعاعي) والذي يكون مكملاً لتسلسل لحزمة أو حزم الـ DNA المنقول على الغشاء. ويتم اختيار ظروف معينة بحيث تتجهز الأحماض النووية مع الـ DNA على الغشاء. وبما أن هذه الأحماض النووية الموسومة تستخدم في كشف وتعيين موقع التسلسل المكمل، لذا يطلق عليها بالمجسات (probes). وبعد اكتمال التهجين، يتم غسل الغشاء لازالة النشاط الاشعاعي الغير مرتبط ويتم الكشف عن مناطق التهجين بواسطة الـ autoradiography وذلك بوضع الغشاء بالارتباط مع فلم أشعة أكس (X ray film) (شكل 11.23-b).

تعتبر خطوات عمل وصمة ساوثرن حساسة للغاية، ويمكن تطبيقها في معرفة خرائط التقييد (restriction maps)، وهي الخرائط المستخدمة في معرفة المواقع الجينية عن طريق المعاملة بعدة انزيمات قاطعة، حيث يمكن معرفة موقع جين واحد ضمن مئات الآلاف من الجينات ذات التسلسلات المختلفة. ولوصمة Southern تطبيقات أخرى كثيرة منها استخدامها وبنجاح في التحليلات الجنائية (forensic analysis)، حيث تمكن الباحثون بمعية هذه التقنية، وباستخدام مجاس خاصة لهذا الغرض، من معرفة الكثير من تفاصيل الجريمة التي أدت الى معرفة الجاني (انظر ملحق هذا الفصل). ليس هذا فحسب، وانما يمكن استخدام نفس الخطوات الأساسية في وصمة الأحماض النووية في نقل الـ RNA من الهلام الى أغشية مشابهة. ويسمح هذا بتشخيص تسلسلات mRNA متخصصة ذات طول محدد عن طريق التهجين مع مجسات متخصصة موسومة، ويعرف هذا بوصمة نوثرن (Northern blotting). بالإضافة الى ذلك، توجد هناك تقنية أخرى مشتقة من تقنية Southern أيضاً وهي تقنية مناعية، والتي لا تعتمد على وجود تسلسلات مكملية بين الأحماض النووية، وانما تستخدم مجسات متخصصة للنواتج البروتينية للجين الهدف تعرف بوصمة وسترن (Western blotting) (أنظر أدناه).



شكل (23.11) وصمة Southern. (a) مخطط نموذجي لوصمة Southern يوضح فيه آلية الانتقال الشعري (capillary action) للأحماض النووية مفردة الشريط. (b) مخطط يوضح كيفية إيجاد التسلسل الهدف في وصمة ساوثرن. بعد فصل قطع الـ DNA على هلام الأكاروز ونقلها إلى الغشاء بفعل الخاصية الشعرية. ويتحول الـ DNA إلى الحالة المفردة الشريط قبل إضافة المجس الموسوم. يمكن اكتشاف ارتباط المجس بالغشاء وذلك بتعرض الأخير إلى مصدر للأشعة السينية. يكون المجس الموسوم إشعاعياً حزمة على الفيلم في الموقع الملائم للتسلسل المكمل على الغشاء (تصميم المؤلف).

على الرغم من الفوائد المتعددة لتقنية Southern، إلا أن هذه التقنية تعتمد على ترحيل الـ DNA المقطع المستخلص والمعامل بالانزيمات القاطعة، لذا، لا يمكنها معرفة موقع ذلك الجين في أي كروموسوم هو. لذا، تستخدم تقنية بديلة تقي بهذا الغرض تسمى بتقنية التهجين التفلوري الموقعي (fluorescent *in situ* hybridization) أو FISH اختصاراً، ومن الممكن بهذه التقنية حضان مجسات الحمض النووي الموسومة إشعاعياً أو الوسومة بالاشعاع مع قطع الأنسجة أو حتى الكروموسومات، وبعد إزالة المجسات الفائضة يتم الكشف عن احتمالية تهجين المجس مع تسلسله الهدف. وتم إثبات الكفاءة الكبيرة التي تتمتع بها هذه التقنية في تحديد ماهية الخلايا التي تعبر عن جين محدد في نسيج ما، وليس هذا فحسب، وإنما ذهبت هذه التقنية إلى أبعد من هذا وهو تحديد موقع جينات معينة في الكروموسومات مندون الحاجة إلى تحطيم هيئة تلك الكروموسومات وعزل الـ DNA منها، لأن الاستبقاء على شكل الكروموسومات الطبيعي يعني القدرة على تحديد موقع الجين الهدف في الكروموسوم شكل (24.11)

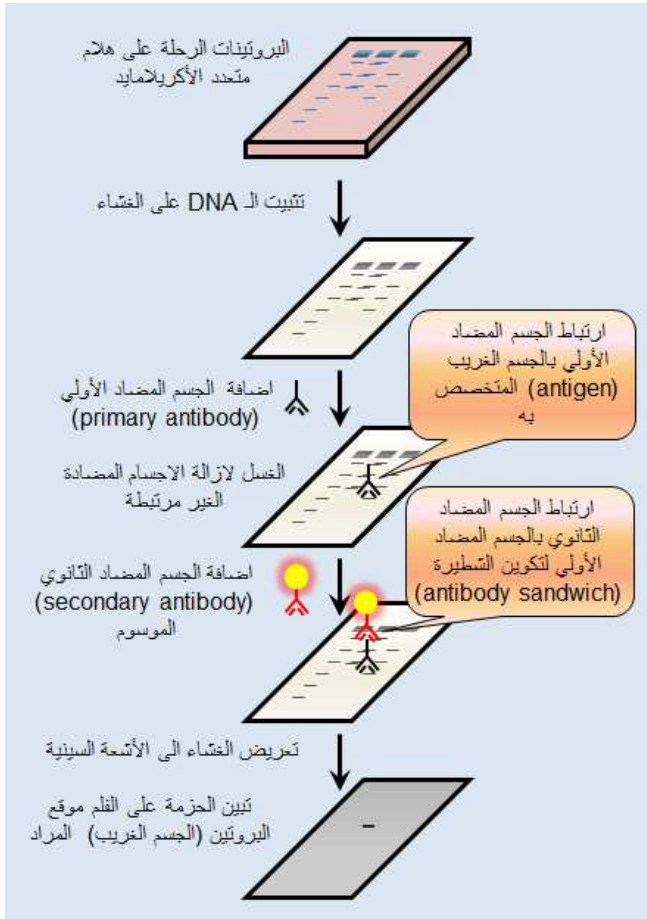


شكل (24.11). استعمال تقنية التهجين التفلوري الموقعي في تحديد موقع الجينات الهدف عن طريق تهجين مجس موسوم بمادة متفلورة متخصص بتلك التسلسلات الجينية. (أخذت الصورة من بحث نشرته الباحثة Lavitrano et al., 2002).

سميت عدة وصمات مشتقة من وصمة Southern هكذا جرياً على السياق ببساطة، ومنها وصمة Northern ووصمة Western. واللذان لاتستخدمان في الكشف المباشر عن الجين وانما قد تستخدمان في الكشف عن نسخة الجين (وصمة Northern) وبروتين الجين (وصمة Western). في وصمة Northern تستخدم نفس الخطوات الأساسية في وصمة Southern الا ان الهدف منها هو ليس الكشف عن الـ DNA بل الكشف عن الـ RNA. وهنا يفصل الـ RNA على هلام الأكاروز وينقل الى الغشاء بنفس الطريقة المناقشة سلفاً. ويتم الكشف عن جزيئات الـ RNA الهدف بواسطة التهجين مع مجسات DNA مكمل لتسلسل الـ RNA الهدف.

أما وصمة Western، فتعنى بكشف البروتين الهدف وذلك باستخدام أجسام مضادة (antibodies). وتفصل البروتينات على هلام متعدد الأكريلاميد المحتوي على المادة الماسخة (SDS) وذلك للمحافظة على البروتينات بصورة غير مطوية (ممسوخة). تنقل البروتينات من الهلام الى الغشاء أيضاً بنفس الطريقة المناقشة سلفاً لوصمة Southern. ومن ثم يتم كشف البروتينات الهدف باستخدام الأجسام المضادة المتخصصة بها. ان التداخل المتخصص بين الأجسام المضادة (antibodies) وهدفها البروتيني الذي يعتبر كمستضد (antigens) المثبتة على الغشاء، هي الطريقة التي يتم من خلالها الكشف عن موقع الجسم المضاد. في البدء، استخدم الباحثون أجسام مضادة موسومة اشعاعياً، ولكن غالباً ماينطفئ وميض تلك الأجسام المضادة الموسومة اشعاعياً عند حصرها بنظام الفطيرة (sandwich)

المستخدم في وصمة Western. ويعمل نظام الفطيرة من خلال ارتباط الجسم المضاد الغير موسوم (الجسم المضاد الأولي) بالمستضد على الغشاء. ثانياً، يستخدم الجسم المضاد الموسوم (الجسم المضاد الثانوي) بعد ذلك لكشف وجود الجسم المضاد الأولي. ويمتلك هذا عدة فوائد، أولاً تعني الطبيعة المتعددة الارتباط للجسم المضاد انجاز زيادة ضخمة في الحساسية، وثانياً، يمكن أن يستخدم جسم مضاد ثانوي واحد لكشف عدد من الأجسام المضادة الأولية المختلفة (شكل 25.11).



شكل (25.11). وصمة Western المستخدمة للأجسام المضادة لكشف البروتينات الهدف. تفصل البروتينات في هلام متعدد الأكريلاميد، وذلك باستخدام مادة SDS للحفض على الطبيعة الممسوخة لها، وذلك قبل وصمها بالاعشبة. يتم منع المواقع الارتباطية للبروتينات الغير مستهدفة على الغشاء باستخدام مسحوق الحليب المذوب وذلك قبل اضافة الجسم المضاد الأولي. يرتبط الجسم المضاد الأولي بشكل متخصص بالمستضد الذي نشأ لأجله. ثم يستخدم الجسم المضاد الثانوي الموسوم لكشف موقع الجسم المضاد الأولي، وتنتج فطيرة الأجسام المضادة هذه في تضخيم الإشارة. وغالباً ما يوسم الجسم المضاد الثانوي بانزيم تنتج فعاليته، بوجود مادة التفاعل المناسبة، بظهور أما تغير لوني على الغشاء أو اشعاع ضوئي يمكن كشفه باستخدام فيلم الأشعة السينية (تصميم المؤلف).

ملحق الفصل الحادي عشر

كيف نكشف عن هوية الشخص الجينية

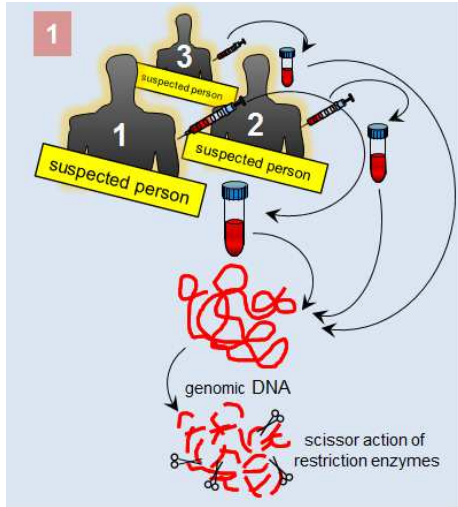
في كل سنة في القضايا الجنائية وغيرها في المحاكم في انحاء العالم تعد القابلية على معرفة هوية المجرم مسألة أساسية في قرار المحكمة. وقد قدمت الوراثة الجزيئية طوق النجاة للمحاكم وجعلت من الممكن جواب الأسئلة الروتينية الآتية في المحاكم: (1) هل تعود قطرة الدم الموجودة في مسرح الجريمة الى المشتبه به في المحاكمة؟ (2) من هو أب ذلك الطفل؟ ولحد وقت قريب، لا يوجد دليل كامل لاثبات ذلك. ويمكن لفحوص الدم تحديد من هو ليس أباً لذلك الطفل، ولكن ليس لها القدرة على تحديد من هو الأب. ولذلك تم تطوير فحص يمكن أن يوفر فحص ذو دقة متكاملة مئة في المئة. يدعى ذلك الفحص ببصمة الـ DNA (DNA fingerprinting). ويمكن لهذا الفحص بالذات أن يبين فيما اذا كانت المادة الوراثية في قطرة من الدم تطابق ذلك المشتبه به دون غيره أم لا، أو يمكن أن تستعمل لحل قضايا الأبوة دون شك.



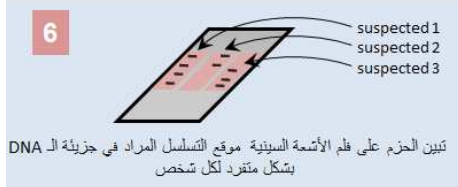
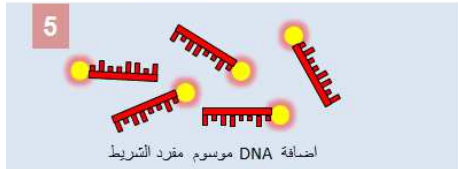
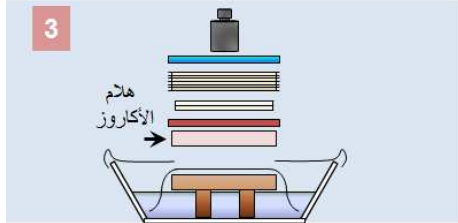
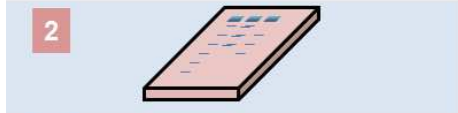
Alec Jeffreys

تستند تقنية بصمة الـ DNA عملياً على التطور الهائل الحاصل في تقنيات الهندسة الوراثية ويسمح بفحص المادة الوراثية لكل شخص على حدة بوصفه كيان وراثي مستقل. يرجع فضل اكتشاف هذه التقنية الى الانكليزي Alec Jeffreys. وتعتمد هذه التقنية على استغلال حقيقة تخلل المادة الوراثية لكل كائن من قبل سلسلة من تسلسلات الـ DNA المتماثلة التي تدعى بالـ DNA التكراري (tandem repeats) أو التكرارات المتلاحقة (tandem repeats) واستخدمها كمجسات لتشخيص الهوية الوراثية (راجع الفصل الثاني). ان نمط وطول وعدد هذه

التكرارات تكون متفردة لكل شخص. طور العالم Jeffrey سلسلة من مجسات الـ DNA المتخصصة التي يمكن لها أن تكشف أنماط DNA متميزة لكل شخص. أما خطوات عمل بصمة الـ DNA فهي: (1) تنقية الـ DNA من عينة صغيرة من الدم أو المني أو أي خلية حاوية على DNA، يقطع الـ DNA الى قطع أصغر بالانزيمات القاطعة. (2) تفصل القطع بالترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز. (3) تنتقل القطع المفصولة الى غشاء بلاستيكي بوصمة Southern. (4) تضاف مجسات الـ DNA الموسومة بالمادة المشعة الى المحلول المحتوي على غشاء البلاستيك. (5) تلتصق المجسات في أي موقع يحتوي على التسلسلات المتكررة المكتملة لها مكونة لحزمة مميزة. (6) يمرر فلم من الأشعة السينية على الـ DNA الموجود في الغشاء البلاستيكي، ويتم بواسطة طريقة التصوير الاشعاعي الذاتي رؤية الحزم المشعة. وتكون انماط الحزم المتحصل عليها من هذه الافلام هي 100% متفردة لكل



شخص، ماعدا التوائم المتماثلة والتي تمتلك نفس النمط. ان التطبيق الجنائي لبصمة الـ DNA يتضمن مقارنة بين بصمة الـ DNA المستحصلة من الخلايا الموجودة في موقع الجريمة مع بصمة الـ DNA التابعة للمشتبه به. واذا كان نمط الـ DNA متماثل بالضبط، يكون التشخيص هنا حتمياً (شكل 26.11). ولتحديد نمط الأبوة، يتم مقارنة بصمة الـ DNA للأم والطفل والأب المزعوم. ويجب أن تتطابق كل الحزم الأبوية في بصمة الـ DNA للطفل مع الأب المزعوم لأجل اثبات أحقية الحاق الطفل بأبيه.



شكل (26.11). الخطوات التقليدية لبروتوكول معرفة بصمة الـ DNA (تصميم المؤلف).

أسئلة الفصل الحادي عشر

السؤال الأول: علل ما يلي

على الرغم من دقة طريقة النبذ المركزي متدرج الكثافة في تنقية الأحماض النووية إلا أنها قد تم الاستعاضة عنها بطرق بديلة أخرى؟

على الرغم من كفاءة الحصول على الجين بطريقة cDNA library إلا أن هذه الطريقة تفقد هوية الجين الكاملة؟
لا يمكن تشييد cDNA library للجين الذي لا يعبر عن نفسه أبداً؟

تقوم آلة تخليق الـ DNA بتخليقه بعكس الاتجاه الذي يخلق به في الطبيعة (من 3' إلى 5')؟
تستخدم طريقة التحلل القاعدي (alkaline lysis) في استخلاص البلازميدي عادة؟

تسمى طريقة Sanger و Coulson في معرفة تسلسل الـ DNA بطريقة إنهاء السلسلة (chain termination method)؟

لا حاجة لفصل عينات الـ DNA المراد معرفة تسلسلها في أربعة مسارات في الهلام عند استخدام الواسمات المتفلورة؟
يفضل استخدام الأغشية البلاستيكية على أغشية النتروسيلولوز في تجارب تهجين الأحماض النووية كما في وصمة ساوثرن؟

يفضل في وصمة Western استخدام الطرق المناعية على الطرق الإشعاعية في توسيم الأجسام المضادة؟
عندما نريد في تفاعل الـ PCR تضخيم تسلسل بطول 1000 نيوكليوتيدة يجب أن تستمر خطوة امتداد البادئ لثلاثين ثانية في درجة حرارة 72°C؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

يعد شكل الـ DNA الأكثر تفلوراً في تقنية density gradient centrifugation هو.....

a. linear form b. covalently closed circular form c. open circle form d. none

ان الطريقة هي الطريقة الأسهل في استخلاص الـ DNA وتنقيته

a. phenol based methods b. density gradient centrifugation c. spin column d. both a and b

عند إجراء تجربة في معرفة نقاوة الـ DNA لعينة ماء، وجد بأن نقاوتها هي 1.05 فقط، وهذا يعني أن تلك العينة
يستخدم الطول الموجي 260 نانومتر في معرفة تركيز في العينة.

a. pure b. contaminated with RNA c. contaminated with protein d. both b and c

a. proteins b. RNA and DNA c. DNA only d. RNA only

تعد تقنية من أكثر التقنيات الشائعة في معرفة حجم جزيئات الـ DNA.

a. HPLC b. FISH c. SDS-PAGE d. agarose gel electrophoresis

يمكن عزل جزيئات الـ mRNA في حقيفة النواة وتفريقها عن بقية الجزيئات الأخرى في الأنسجة وذلك بسبب امتلاكه
للـ

a. 5' cap b. 3' tail c. intervening sequences d. codons

يقوم انزيم بتوليد نهايات مستوية من النهايات المتدللة.

a. HindIII b. primase c. EcoRI d. SI nuclease

ان الوحدات الأساسية في تخليق أشرطة الـ DNA خارج جسم الكائن الحي وبأستخدام أجهزة تخليق الـ DNA هي
.....

a. nucleotides b. nucleosides monophosphates c. nucleoside diphosphates d. phosphoramidites

عند تخليق متعدد نيوكليوتيدي معين في آلة تخليق الـ DNA، يقوم مركب TCA بخطوة

a. deprotection b. coupling c. capping d. stabilization

بعد تخليق المتعددات النيوكليوتيدة في الأجهزة المخصصة لها، يقوم الباحث بتنقيتها بواسطة

a. gel filtration b. agarose gel electrophoresis c. HPLC d. in vitro packaging

يمكن إجراء طريقة التوسيم المعروفة بالـ في تقنية الـ PCR.

a. 5' end labeling method b. 3' end labeling method c. nick translation method d. primer extension method

بعد اكتمال عملية التوسيم لابد من فصل الـ DNA الموسوم عن الـ DNA الغير موسوم، ويتم ذلك عن طريق

a. agarose gel electrophoresis b. gel filtration c. SDS-PAGE d. UV-visible spectrophotometer

بعد فصل عينات الـ DNA المراد معرفة تسلسلها في الهلام، قرأ الباحث المعني الحزم G و C و A و T من الأعلى الى الأسفل على التوالي، وهذا يعطي التسلسل

a. 5'-GATC-3' b. 3'-GATC-5' c. 5'-CTAG-3' d. 3'-CTAG-5'

اذا كانت درجة الحرارة التي يرتبط بها البادئ بالـ DNA القالب هي اقل من الدرجة المثلى، ربما سوف يؤدي ذلك الى توليد نواتج PCR..... الغير مرغوبة.

a. false positive results b. false negative results c. positive results d. negative results

لا يمكن لتقنية تضخيم الانترونات مطلقاً.

a. conventional PCR b. real time PCR c. jumping PCR d. RT-PCR

السؤال الثالث: عرف ما يلي:

Genomic library, probe, nick translation, pyrosequencing, jumping PCR, quencher dye, DNA fingerprinting

السؤال الرابع: صل المفردات الموجودة في اليمين مع ما يناسبها في اليسار:

To amplify the gene	PCR
To detect the location of the gene in the genome	RT-PCR
To detect the location of the gene in the chromosome	FISH
To detect the ability of the gene to give RNA copy	Real time PCR
To detect the ability of the gene to give protein	Southern blotting
To detect to whom this gene belong	Western blotting

للمزيد من الاطلاع اقرء:

Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.

Applied biosystems technical bulletin, 2012.

Baker, Catherine. Your genes, your choice: Exploring the Issues Raised by Genetic Research.

- Behleke** M.A. and Devor E.J. Chemical Synthesis of Oligonucleotides. Integrated DNA Technologies (IDT) 2005.
- Birnboim** HC, Doly J. (1982) *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1523.
- Brown** T. A. Gene cloning and DNA analysis. Sixth edition, Wiley-Blackwell, 2010.
- Carey**, L., and Mitnik, L. 2002. Trends in DNA forensic analysis. *Electrophoresis* 23, 1386-1397.
- Debenham**, P. G. 1992. Probing identity: The changing face of DNA fingerprinting. *Trends Biotechnol.*10,96-102.
- Eppendorf** catalogue, 2012 – 2013.
- Fitzgerald-Hayes** M. and Reichsman F. DNA and Biotechnology. Third edition, Elsevier, 2010.
- Gasser**, C. S., and R. T. Fraley. 1992. Transgenic crops. *Scientific American* 266(6):62–69.
- Higuchi** R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*. 1993;11(9):1026-30.
- Howe**, Christopher. Gene cloning and manipulation. Second edition, Cambridge University Press, 2007.
- Jeffreys**, A. J., Turner, M., and Debenham, P. 1991. The efficiency of multi-locus DNA fingerprint probes for individualization and establishment of family relationships, determined from extensive casework. *Am. J. Hum. Genet* 48, 824-840.
- Lavitrano** M, Bacci ML, Forni M, Lazzereschi D, Di Stefano C, Fioretti D, Giancotti P, Marfe´ G, Pucci L, Renzi L, Wang H, Stoppacciaro A, Stassi G, Sargiacomo M, Sinibaldi P, Turchi V, Giovannoni R, Della Casa G, Seren E, Rossi G. 2002. Efficient production by sperm mediated gene transfer of hDAF transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Nat Acad Sci USA* 99:14230–14235.
- Lodge** J., Lund P., and Minchin S. Gene cloning; principles and applications. Taylor and Francis group, 2007.
- Mullis**, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262(4):56–65.
- Nowak**, R. 1994. Forensic DNA goes to court with O. J. *Science* 265:1352–1354.
- Nicholl** D. S. An Introduction to Genetic Engineering. Third edition, Cambridge University Press, 2008.
- Prescott** L.M. Microbiology. Fifth edition, The McGraw–Hill Companies 2002.
- Primrose** S.B, Twyman R.M., Old R.W. Principles of gene manipulation. Blackwell science. 2001.
- Reece** R.J. Analysis of genes and genomes. John Wiley & Sons, 2004.
- Tamarin** .Principles of genetics. Seventh edition. The McGraw–Hill. 2001.
- Turner** P., McLennan A., Bates A., White M. Instant notes in molecular biology. Third edition, Taylor & Francis Group/UK. 2005.
- U.S. Congress**, Office of Technology Assessment, *Genetic Witness: Forensic Uses of DNA Tests, OTA-BA-438* (Washington, DC: U.S. Government Printing Office, July 1990).
- Venter**, J. C, Smith, H. O., and Hood, L. 1996. A new strategy for genome sequencing. *Nature* 381, 364-366.
- Wong** D.W.S. The ABCs of gene cloning. Second edition, Springer, 2006.

قائمة بتعريف المصطلحات الواردة في الكتاب

المصطلح	المعنى
alpha helix (α helix)	حلزون ألفا: نمط شائع من أنماط طي البروتينات والتي ينطوي فيها التسلسل الخطي للأحماض الأمينية إلى حلزون مطوي إلى اليمين مثبت عن طريق الأزواج القاعدية بين ذرات عموده الفقري. نهاية سلسلة متعدد الببتيد والتي تحمل مجموعة أمين "ألفا" حرة.
amino terminus (N terminus)	
aminoacyl tRNA	شكل منشط من الحامض الأميني يستخدم في تخليق البروتين. ويتألف من حامض أميني مرتبط خلال أصرة استر من مجموعة الكربوكسيل التابعة لمجموعة الهيدروكسيل في جزيئة ال-tRNA.
antibiotic	مادة معينة كالبنسلين أو الستربتوميسين والذي هو سام للأحياء المجهرية. ونواتج لكائن مجهري معين أو نبات معين.
antibody	بروتين ناتج من خلايا B استجابة للجزيئة الغريبة أو الكائن المجهري الغازي. ويرتبط عادة بالجزيئة الغريبة أو بالخلية بشكل شديد، وبهذه الطريقة يقوم بتنظيمها أو بتوسيمها لكي تتحطم بواسطة عملية البلعمة أو عن طريق المتمم.
anticodon	تسلسل من ثلاث نيوكليوتيدات في جزيئة ال-tRNA والتي هي مكملة للكودون ثلاثي النيوكليوتيدات في جزيئة ال-mRNA.
antigen	جزيئة قادرة على إثارة الاستجابة المناعية.
antisense RNA	جزيئة RNA مكملة لنسخة RNA محددة للجين والتي يمكن أن تزود مع RNA محدد وتوقف عمله.
autoradiography	تقنية والتي ينتج فيها شيء مشع صورة لنفسه في فيلم فوتوغرافي. وتدعى الصورة الناتجة بال- autoradiograph أو بال- autoradiogram.
bacterial artificial chromosome (BAC)	ناقل كلونة يمكن أن يحتوي على قطع طويلة من ال-DNA لأكثر من مليون زوج قاعدي.
bacteriophage (phage)	أي فايروس يخمج البكتيريا. وهي أول كيانات مستخدمة في دراسة الوراثة الجزيئية والآن تستخدم بشكل واسع كنواقل كلونة.
base pair	اثنان من النيوكليوتيدات في جزيئة ال-DNA أو ال-RNA المحمولتين معاً عن طريق الأواصر الهيدروجينية كما في أزواج الكوانين مع السايوسين، والأدينين مع الثايمين أو اليوراسيل.
beta sheet (β sheet)	هيئة تركيبية شائعة في البروتينات والتي تتواصل أقسام مختلفة من سلسلة متعدد الببتيد بمحاذات بعضها البعض، مرتبطة ببعضها عن طريق الأواصر الهيدروجينية بين ذرات العمود الفقري لمتعدد الببتيد. ويعرف هذا التركيب أيضاً بصفيحة بيتا المطوية.
biotin	مركب ذو وزن جزيئي واطئ يستخدم كواسم تساهمي للبروتينات، سامحاً لها بأن تكشف بواسطة بروتين البيض ال-avidin، والذي يرتبط بشدة كبيرة بالبايوتين.
blotting	تقنية كيموجوية تنقل فيها الجزيئات المفصولة في هلام الأكاروز أو في هلام متعدد الأكريلاميد لغشاء بلاستيكي أو لحزمة من الورق، وبهذه الطريقة يتم تقييدها للتحاليل اللاحقة. (أنظر وصمة Southern ووصمة Northern ووصمة Western).
carcinogen	Any agent, such as a chemical or a form of radiation, that causes cancer. أي عنصر، كما في أية مادة كيميائية أو شكل من أشكال الإشعاع يتسبب بالسرطان.
carcinogenesis	تولد السرطان.
cDNA	جزيئة DNA مصنوعة من نسخة من ال-RNA ولهذا يفقد للانترونات الموجودة في ال-DNA الجينومي. تمثل نساقل ال-cDNA ال-DNA المكون من ال-cDNA، كما أن مجموع تلك النساقل، والممثلة للجينات التي يتم التعبير عنها في نوع خلوي أو نسيج محدد، تمثل مكتبة ال-cDNA.
cell cycle	دورة تكاثرية للخلية: تسلسل منظم من الأحداث يقوم الخلية بواسطته بمضاعفة مكوناتها والانقسام إلى خليتين.
cell wall	مصفوفة خارج خلوية قوية مستقرة فوق الغشاء البلازمي. يوجد الجدار الخلوي في معظم النباتات والبكتيريا والطحالب والفطريات. وهو غير موجود في معظم الخلايا الحيوانية.
centromere	منطقة متقلصة من الكروموسوم الانقسامي والتي تحمل كروماتيدات شقيقة مع بعضها البعض. وهي موقع على ال-DNA حيث يتكون فيها تركيب ال-kinetochore والذي يستحوذ على التيببات الدقيقة (microtubules) من خيوط المغزل الانقسامية (mitotic spindle).
chaperone	بروتين يساعد بروتينات أخرى لتجنب المسالك التي تؤدي إلى إنتاج متعددات ببتيدية غير فعالة أو متراكمة.
chromatin	معقد من ال-DNA و الهستونات والبروتينات الغير هستونية موجود في نواة الخلية الحقة النواة.
chromatography	تقنية كيموجوية والتي تنفصل فيها مجموعة من المواد بواسطة الشحنة أو الحجم أو بعض الخواص الأخرى وذلك لكي تفصل بين الطور المتحرك والطور الثابت (أنظر كروماتوغرافي الألفة).

high performance affinity chromatography (liquid chromatography)	
تركيب يتألف من جزيئة DNA طويلة جداً وبروتينات مرتبطة تحمل جزء من (أو كل) المعلومات الوراثية للكائن. وهذا واضح خصوصاً في الخلايا الحيوانية والنباتية التي تعاني من الانقسام الخيطي أو الانقسام الاختزالي، حيث يتكثف كل كروموسوم إلى شكل صلد يشبه العصا مرني تحي المجهر الضوئي.	chromosome
عملية بواسطتها تتحول الكروموسومات إلى تركيب أكثر صلابة قبل انقسامها في دورة الخلية.	chromosome condensation
حجرة ذات غشاء مسنوي موجودة في الشبكة الاندوبلازمية جهاز كولجي.	cisterna (cisternae)
مجموعة من الخلايا أو الكائنات الحية المتكونة بواسطة الانقسامات المتلاحقة (الغير جنسية) من خلية أو كائن. ويمكن أن تستخدم كفعل: وتعني هنا "كلونة الجين" وتعني إنتاج نسخ عديدة من الجين وذلك بإعادة دورات التضاعف.	clone
أصغر وحدة تشفر للـ mRNA والتي تترجم بعد ذلك إلى متعدد ببتيدي مفرد أو يتم التعبير عنها بشكل مباشر (إلى tRNA أو rRNA)	cistron
جزيئة DNA صغيرة مشتقة عادة من العاثي البكتيري أو البلازميد والتي تستخدم لحمل قطعة من الـ DNA لغرض كلونتها في الخلية المستقبلة، وهذا يمكن في تضاعف قطعة الـ DNA.	cloning vector
تسلسل من ثلاث نيوكليوتيدات في جزيئة الـ DNA أو mRNA والتي تمثل معلومات انماج حامض أميني معين في سلسلة متعدد الببتيد النامية.	codon
أيون غير عضوي أو انزيم مساعد يكون ضروري لفعالية الانزيم	cofactor
مكون بالخلية يوجد ضمن الغشاء البلازمي ولكنه في حالة الكائنات حقيقية النواة يوجد خارج النواة.	cytoplasm
مصطلح ليس ذو مغزى معين ولكنه صفة تستخدم لوصف حالات متعددة تعطي نفس النتيجة: وكمثال مجموعات ثلاثية مختلفة من القواعد النيوكليوتيدية (الكودونات) والتي تشفر لنفس الحامض الأميني.	degenerate
نوع من الطفرات والتي تزال بواسطتها نيوكليوتيدة مفردة أو تسلسل من النيوكليوتيدات من الـ DNA.	deletion
تغيير مثير في هيئة البروتين أو الحمض النووي بسبب التسخين أو التعريض لمواد كيميائية وهذا ينتج في فقدان الوظيفة البيولوجية.	denaturation
الطريقة القياسية لمعرفة تسلسل الـ DNA.	dideoxy chain termination method
العملية التي بواسطتها تعاني الخلية تغييراً لكي تتخصص إلى نوع معين.	differentiation
متعدد نيوكليوتيدي يتكون من وحدات نيوكليوتيدية مرتبطة تساهمياً. ويعمل كمستودع لحزن المعلومات ضمن الخلية وحامل لتلك المعلومات من جيل إلى جيل آخر.	DNA (deoxyribonucleic acid)
انزيم يعمل على فتح حلزون الـ DNA إلى أشرطة مفردة لتضاعف الـ DNA.	DNA helicase
مجموعة من جزيئات الـ DNA الممثلة للجينوم كاملاً (مكتبة الجينوم genomic library) أو نسخ الـ DNA للـ mRNA الناتج من الخلية (مكتبة الـ cDNA).	DNA library
الانزيم الذي يربط نهايات شريطي الـ DNA ببعضهما بواسطة أصرة تساهمية لعمل شريط DNA مستمر.	DNA ligase
إضافة مجموعة مثيل للـ DNA. تستخدم المثيلة المستمرة لقاعدة السايوسين في تسلسلات GC في الفقرات للحفاظ على الجينات في حالة غير مستقرة.	DNA methylation
انزيم يخلق الـ DNA عن طريق ربط النيوكليوتيدات ببعضها البعض باستخدام DNA قالب كدليل لهذه العملية.	DNA polymerase
انزيم يخلق شريط قصير من الـ RNA على الـ DNA القالب، لينتج بادئ لتخليق الـ DNA.	DNA primase
اسم يطلق على تلك العمليات الكيموحيوية التي تصلح التغييرات الطارئة على جزيئة الـ DNA.	DNA repair
تحديد نظام ترتيب النيوكليوتيدات في جزيئة الـ DNA.	DNA sequencing
لف إضافي في حلزون الـ DNA المزدوج يحدث كاستجابة للضغط الحلزوني الفائق المتخلق كنتيجة، مثلاً، لفتح الالتفاف الجزئي لجزيئة الـ DNA الدائرية.	DNA supercoiling
انزيم يرتبط بالـ DNA ويكسر أصرة الفوسفات ثنائية الأستر في شريط أو شريطين، سامحاً بدوران الـ DNA عند تلك النقطة. ويمنع الـ DNA من تشربك الـ DNA خلال التضاعف.	DNA topoisomerase
التركيب الثلاثي للـ DNA، والذي ترتبط فيه سلسلتي الـ DNA مع بعضهما البعض بواسطة الأزواج القاعدي بين القواعد الملتفة إلى حلزون.	double helix
نوع من المجاهر يستخدم حزمة من الإلكترونات لتخليق صورة.	electron microscope
بروتين ضروري في إضافة الأحماض الأمينية لسلاسل متعددة الببتيد النامية على الريبوسومات.	elongation factor
بروتين يحفز تفاعل كيميائي محدد.	enzyme
بكتريا عصبية الشكل توجد عادة في قولون البشر واللبائن الأخرى وتستخدم بشكل واسع في البحث الكيموحيوي.	Escherichia coli (E. coli)
كائن حي يتألف من نواة مميزة وسايوبلازم، ويؤلف كل أشكال الحياة ماعدا الفايروسات والكائنات	eucaryote (eukaryote)

بدائية النواة.

منطقة من كروموسوم الطور البيني (interphase chromosome) تصطبغ بشكل كثيف	euchromatin
قطعة من الجين حقيقي النواة تتألف من تسلسل من النيوكليوتيدات ممثلة في الـ mRNA أو في الـ tRNA النهائي أو في الـ rRNA. تُشفّر الاكسونات الى أحماض أمينية في البروتين. ويوجد الاكسون عادة بقرب قطعة DNA غير مشفرة تسمى بالانترون (intron).	exon
فايروس أو بلازميد يحمل تسلسل من الـ DNA الى ناقل كلونة مناسب ويوجه هناك تخليق البروتين المشفر من التسلسل المحمول فيه.	expression vector
انتاج صفة مظهرية مرئية بواسطة جين عادة بواسطة توجيه تخليق البروتين.	expression
نوع من تنظيم الأيض يعمل فيه الانزيم مبكراً في مسلك تفاعلي مثبط من قبل الناتج النهائي لذلك المسلك.	feedback inhibition
اندماج الكميّ (المشيّج) الذكري مع الكميّ الأنثوي (كلاهما أحادي المجموعة الكروموسومية haploid) لتكوين زيجة ثنائية المجموعة الكروموسومية، والتي تتطور الى كائن جديد.	fertilization
تقنية تستخدم لتتبع قرب جزيئين موسومتين بشكل تفلوري (وتداخلهما) في الخلايا.	fluorescent resonance energy transfer (FRET)
مرحلة الانسحاب من دورة الخلية الانقسامية في حقيقة النواة وذلك بالدخول في طور السكون في الـ G1.	G0 (G-"zero" phase)
مرحلة الفجوة رقم واحد في الدورة الانقسامية للخلية حقيقية النواة، وتحدث بين نهاية الانقسام السايكلوبلازمي (cytokinesis) وبداية تخليق الـ DNA.	G1 phase
مرحلة الفجوة رقم اثنين في الدورة الانقسامية للخلية حقيقية النواة، وتحدث بين نهاية تخليق الـ DNA وبداية الانقسام الخيطي (mitosis).	G2 phase
خلية متخصصة أحادية المجموعة الكروموسومية، وأما أن تكون نطفة أو تكون بيضة، وتعمل في التكاثر الجنسي.	gamete
بروتين تنظيمي للجين والذي عند ارتباطه بتسلسله المنظم في الـ DNA يعمل على تنشيط الاستنساخ.	gene activator protein
منطقة من الـ DNA تسيطر على صفة موروثية مميزة، وعادة ما تطابق بروتين مفرد أو RNA مفرد. يتضمن هذا التعريف الوحدة الوظيفية (التركيبية والتنظيمية) بأسرها، والمكونة من تسلسلات الـ DNA المشفرة وتسلسلات الـ DNA الغير مشفرة والتسلسلات التنظيمية والانترونات.	gene
اعادة الارتباط الحادث بين كروموسومين متماثلين (كما في الانقسام الاختزالي).	general recombination
مجموعة من الأوامر التي تخصص التطابق بين الكودونات (ثلاثية النيوكليوتيدات) في الـ DNA أو الـ RNA والأحماض الأمينية في البروتينات الناتجة.	genetic code
مجموع المعلومات الوراثية العائدة للخلية أو للكائن الحي. وبالتحديد، الـ DNA الذي يحمل هذه المعلومات.	genome
الـ DNA الذي يؤلف الجينوم في الخلية أو في الكائن الحي. وغالباً ما يستخدم بالتناقض مع الـ cDNA (الـ DNA المحضر بواسطة الاستنساخ المعاكس من جزيئة الـ mRNA).	genomic DNA
يمثل DNA مكلون بشكل مباشر من الـ DNA الكروموسومي، ويؤلف مجموع هكذا نساقل (كلونات) من الجينوم المعني مكتبة الـ DNA الجينومية.	Genomic DNA clones
المكون الوراثي لـ خلية الكائن الحي أو للكائن الحي.	genotype
أي بروتين ذو شكل مدور تقريباً. تتناقض تلك البروتينات مع البروتينات الليفية الممدودة كما في الكولاجين.	globular protein
منطقة من الكروموسوم تستبقي حالة الالتكثف فيها عادة، وهي غير فعالة استنساخياً خلال الطور البيني..	heterochromatin
نوع من الكروماتوغرافي يستخدم أعمدة مرصوفة بخرز دقيقة مصفوفة ، تقاوم تلك الخرز حركة السائل بسرعة كبيرة وتحت ضغط عالي جداً.	high-performance liquid chromatography (HPLC)
نوع من مجاميع البروتينات الصغيرة الغنية بالأرجنين واللايسين، وتكون أربع منها النيوكليوسوم على الـ DNA في الكروموسومات حقيقية النواة.	histone
تركيب يشبه الحرف X شوه في الـ DNA الذي يعاني اعادة الارتباط، وتحمل فيه جزيئا الـ DNA في موقع التعابر crossing-over.	Holliday junction
الجينات التي تعمل في وظائف ضرورية في كل أنواع الخلايا في الكائن الحي، بصرف النظر عن دورها الذي تخصصت فيه.	housekeeping gene
في الوراثة الجزيئية، العملية التي بواسطتها يقوم شريطي الـ DNA المكملين لبعضهما بتكوين الحلزون المزدوج. وهذا يشكل الأساس الذي استندت عليه تقنيات كفاءة جداً في الكشف عن التسلسلات النيوكليوتيدية.	hybridization
أصرة غير تساهمية والتي تكون فيها ذرات الهيدروجين ذات الشحنة الموجبة مشتركة جزئياً مع الذرات ذات الشحنات السالبة	hydrogen bond
شق في الأصرة التساهمية مع اضافة الماء، حيث يضاف الهيدروجين لأحد نواتج الشق	hydrolysis

والهيدروكسيل للناتج الآخر.	
تعني حرفياً "محب للماء". يصف هذا المصطلح جزيئة قطبية أو جزء من تلك الجزيئة التي تكون تداخلات مفصلة من حيث الطاقة مع جزيئات الماء لتتوب مباشرة في الماء.	hydrophilic
تعني حرفياً "كاره للماء". يصف هذا المصطلح جزيئة غير قطبية أو جزء من تلك الجزيئة التي لا يمكن لها تكوين تداخلات مفصلة من حيث الطاقة مع جزيئات الماء ولهذا لا تتوب في الماء.	hydrophobic (lipophilic)
تقنية يستخدم فيها مجس من الـ DNA أو الـ RNA لمعرفة موقع الجين أو جزيئة الـ mRNA في الخلية أو في النسيج بواسطة التهجين.	in situ hybridization
مصطلح يستخدم من قبل المختصين في مجال الكيمياء الحيوية لوصف العملية الحاصلة في المستخلصات المعزولة والغير حاوية على خلايا. ويستخدم أيضاً من قبل المختصين ببيولوجية الخلية للإشارة إلى الخلايا النامية في المزرعة (in vitro)، وهو عكس المصطلح (in vivo) الذي يستخدم داخل جسم الكائن الحي. (تعني in vitro في اللاتينية "داخل الزجاج").	in vitro
يتم في الخلية الكاملة أو في داخل الكائن الحي. (تعني in vivo في اللاتينية "في الحياة").	in vivo
بروتين بحث الاتصال الصحيح بين الريبوسومات والـ mRNA وهو ضروري لبدء تخليق البروتين.	initiation factor
فترة طويلة من دورة الخلية بين الانقسام الاختزالي الأول والثاني. ويتضمن طور G1 و S و G2. منطقة غير مشفرة منالجين الحقيقي النواة والتي تستنسخ إلى جزيئة RNA ولكنه يتم قصها بواسطة الـ RNA splicing خلال انتاج الـ mRNA أو أي RNA آخر.	interphase intron
نوع من الطفرات والتي تنعكس فيها قطعة من الكروموسوم.	inversion
تركيب معقد متكون من البروتينات الموجودة في الكروموسوم الانقسامى والذي يرتبط به النيبيات الدقيقة والتي تلعب دوراً نشطاً في حركة الكروموسومات إلى الأقطاب. يكون الـ kinetochore جزءاً من الكروموسوم يعرف بالسنترومير.	kinetochore
مجموعة كيميائية، وهي أما أن تكون ذرة ذات نشاط اشعاعي أ، صبغة متفلورة تضاف إلى جزيئة لكي تتبعتها من خلال تفاعل كيمو حيوي أو لكي تحدد موقعها. وتعني "كفل" إضافة مجموعة أو ذرة إلى خلية أو جزيئة.	label
واحد من أشرطة الـ DNA المخلفة حديثاً للـ DNA الموجود في شوكة التضاعف. يصنع الشريط الملتكى (lagging strand) بشكل غير مستمر عن طريق تكوين قطع أوكازاكي وارتباطها ببعضها بشكل تساهمى.	lagging strand
فايروس يخمج بكتريا القولون. يستخدم بشكل واسع كناقل كلونة.	lambda bacteriophage
أحد أشرطة الـ DNA المخلفة حديثاً للـ DNA الموجود في شوكة التضاعف. يصنع الشريط القائد (leading strand) بواسطة التخليق المستمر بالاتجاه من النهاية 5' إلى النهاية 3'.	leading strand
طفرة تسبب موت الخلية أو الكائن الحي الذي يحتويها.	lethal mutation
انزيم يربط (يلحم) جزيئتين ببعضهما بنمط يعتمد على الطاقة. وعلى سبيل المثال، ربط نهاية جزيئة DNA بنهاية أخرى من خلال أو أصر الفوسفات ثنائية الأستر.	ligase
حويصلة اصطناعية ثنائية الأغشية من الدهون الفوسفاتية (phospholipids) متكونة من المزيج المائي لجزيئات الدهون الفوسفاتية.	liposome
تمزيق الغشاء البلازمي للخلية، مؤدياً إلى تحرر الساييتوبلازم وموت الخلية.	lysis
حالة بكتيرية والتي تحمل فيها الخلايا البكتيرية الـ DNA الفايروسي الغير نشط بشكل منحشر في الجينوم التابع لها. ويمكن للفايروس أن يتنشط بعد هذا لكي يضاعف الخلية المنحلة.	lysogeny
مرحلة من دورة الخلية حقيقية النواة ينقسم خلالها النواة والساييتوبلازم.	M phase
جزيئة كما في البروتين أو الحمض النووي أو متعدد السكر ذو حجم جزيئي أكبر من عدة الآلاف قليلة من وحدة الدالتون.	macromolecule
نوع متخصص من الانقسام الخلوي تنتج فيه الخلايا البيضية والنطفية. يتألف من انقسامين نوويين متعاقبين بدورة واحدة من تضاعف الـ DNA، وهذا ينتج خلايا بنوية من خلية ثنائية المجموعة الكروموسومية أبدأء.	meiosis
دهن ثنائي الأغشية مع بروتينات مرتبطة به والتي تحيط بكل الخلايا، وفي الخلايا الحقيقية النواة، وبالعديد من العضيات أيضاً.	membrane
جزيئة mRNA تضطلع بتخصيص تسلسل الحامض الأميني في البروتين. تنجت هذه الجزيئة من انشلاق الـ RNA (RNA spicing) في الكائنات حقيقية النواة من جزيئة RNA أكبر صنعت بواسطة انزيم RNA polymerase كنسخة مكمل للـ DNA. ويتم ترجمتها إلى بروتين في عملية مخفزة من قبل الريبوسومات.	messenger RNA (mRNA)
مجموع العمليات الكيميائية الحادثة في الخلايا الحية.	metabolism
حقن الجزيئات في الخلية باستخدام ماصة دقيقة خاصة.	microinjection
عملية اصلاح الـ DNA التي تصحح النيوكليوتيدات المنشرة بشكل مغلوخل خلال تضاعف الـ DNA. يتم إزالة الامتداد القصير للـ DNA المخلق حديثاً والذي يتضمن نيوكليوتيدة مغلوطة واستبداله بالتسلسل الصحيح نسبة إلى الشريط القالب.	mismatch repair
عضية مرتبط بالغشاء، وهي بحجم البكتيريا، وتقوم بعملية الفسفرة التأكسدية وتنتج معظم الـ ATP	mitochondrion (mitochondria)

مبادئ الوراثة الجزيئية

في الخلايا حقيقية النواة.	
انقسام النواة في الخلية حقيقية النواة، متضمنة لتكثف الـ DNA الى كروموسومات مرئية، وانفصال الكروموسومات المتضاعفة لتكوين مجموعتين مماثلتين. (تعني في الاغريقية <i>mitos</i> خيط، وهذا يسير الى المظهر الذي يشبه الخيط في الكروموسومات المتكثفة).	mitosis
كروموسومات متكثفة بشكل كبير بحيث يحمل كل كروموسومين جديدين مع بعضهما البعض بالسنترومير ككروماتيدات شقيقة.	mitotic chromosome
صف من النيبات الدقيقة والجزيئات المرتبطة بها والتي تتكون بين الأقطاب المتقابلة للخلية الحقيقية النواة خلال الانقسام الخيطي وتعمل على تحريك الكروموسومات المزوجة كل على حدة.	mitotic spindle
تغيير موروث في التسلسل النيوكليوتيدي للكروموسوم.	mutation
نوع من التنظيم الجيني والذي يوقف فيه شكل الارتباط النشط للبروتين التنظيمي بالـ DNA من عمل الجين.	negative control
تقنية يتم فيها تقييد قطع الـ RNA المفصولة بواسطة الترحيل الكهربائي على ورق. ثم يتم الكشف عن الـ RNA بواسطة التهجين بمجس موسوم من الأحماض النووية.	Northern blotting
غشاء مزدوج يحيط بالنواة، ويتألف من غشاء خارجي وداخلي وهو مثقب بالثقبوب النووية.	nuclear envelope
جزيئة علاقة (macromolecule) متألقة من سلسلة من النيوكليوتيدات المرتبطة ببعضها البعض بواسطة أصرة فوسفات ثنائية الأستر.	nucleic acid (DNA or RNA)
جزيئة متألقة من قاعدة الـ purine أو الـ pyrimidine المرتبطة تساهمياً بالسكر الرايبوزي أو السكر الرايبوزي منقوص الأوكسجين.	nucleoside
تركيب يشبه الخرز في الكروماتين حقيقي النواة. يتألف من DNA بطول قصير ملف حول لب من البروتينات الهستونية، وهو وحدة التركيب الأساسية للكروماتين.	nucleosome
نيوكليوسيد مع مجموعة فوسفات أو أكثر مرتبطة برابطة أستر مع الجزء السكر فيها. يعد الـ DNA والـ RNA هي متعددات من النيوكليوتيدات.	nucleotide
عضية مرتبط بالغشاء في الخلية حقيقية النواة، تحتوي على DNA ينظم الى كروموسومات. قطع قصيرة من الـ DNA تنتج في شريط الـ lagging خلال تضاعف الـ DNA. ترتبط هذه القطع بواسطة انزيم DNA ligase لتكون شريط DNA مستمر.	nucleus
جين محور يمكن أن يعمل ناتجه في المساعدة على تسرطن الخلية. نموذجياً، يعد الجين المسرطن (oncogene) شكل طافر من الجين الطبيعي (proto-oncogene) الداخل في تنظيم نمو أو انقسام الخلية.	Okazaki fragments
البويضة في طور النمو. وهي عادة ما تكون كبيرة وغير متحركة.	oocyte
منطقة صغيرة من الـ DNA في الكروموسوم البكتيري تسيطر على استنساخ الجين المجاور.	operator
في الكروموسوم البكتيري، مجموعة من الجينات التي تقع تحت سيطرة operator واحد.	operon
تقنية لتضخيم مناطق متخصصة من الـ DNA بواسطة استخدام بوادئ ذات تسلسلات متخصصة وعدة دورات من تخليق الـ DNA، تتبع كل دورة بحرارة ماسخة للـ DNA لفصل الأشرطة المكتملة عن بعضها البعض.	PCR (polymerase chain reaction)
أصرة كيميائية بين مجموعة الكاربونيل لحمض أميني معين ومجموعة الأمين لحامض أميني ثاني. تربط الأصرة الببتيدية الأحماض الأمينية مع بعضها البعض في جزيئة البروتين.	peptide bond
الغشاء الذي يحيط بالخلية الحية.	plasma membrane
جزيئة DNA دائرية صغيرة والتي تتضاعف بشكل مستقل عن الجينوم. تستخدم البلازميدات المحورة بشكل واسع كناقل لكلونة الـ DNA.	plasmid
تغير في نيوكليوتيدة مفردة في الـ DNA، وخصوصاً في منطقة الـ DNA المشفرة للبروتين.	point mutation
بوليمر خطي يتألف من أحماض أمينية متعددة. تعد البروتينات عبارة عن متعددات ببتيدية كبيرة، كما يمكن استخدام المصطلحين (البروتينات ومتعددات الببتيد) بشكل قابل للتبادل.	polypeptide
جزيئة mRNA يرتبط بها عدد من الرايبوسومات الداخلة في عملية تخليق البروتين.	polyribosome (polysome)
التغيير المحفز انزيمياً الحاصل في البروتين بعد عملية تخليقه. كما في اضافة مجاميع الأسيل (acetylation) والشق (cleavage) واطافة السكريات (glycosylation) والفسفرة (phosphorylation).	posttranslational modification
تسلسل من الوحدات المفردة في البوليمر الخطي، كما في تسلسل الأحماض الأمينية في البروتين.	primary structure
معد نتج من ارتباط انزيم DNA primase مع انزيم DNA helicase والمكون في شريط الـ lagging خلال تضاعف الـ DNA، ويقوم بزيادة كفاءة التضاعف.	primosome
شكل معدني غير طبيعي من بروتين طبيعي والذي تضاعف في العائل وذلك باجبار البروتينات الطبيعية لنفس النوع على تبني التركيب الغير طبيعي.	prion
التهابات دماغية قابلة للنقل كما في مرض Kreutzfeldt Jacob في البشر، والـ scrapie في النعاج والـ bovine spongiform encephalopathy (BSE) في الأبقار، والتي يبدو أنها قد تكونت نتيجة انتقال الأشكال الغير طبيعية من بروتينات الـ prion.	prion disease
قطعة محددة من الـ RNA أو الـ DNA موسومة اشعاعياً أو كيميائياً، وتستخدم في تحديد تسلسلات نيوكليوتيدية متخصصة بواسطة التهجين معها.	probe

تسلسل نيوكليوتيدي في الـ DNA يرتبط بها انزيم RNA polymerase لكي يبدأ الاستنساخ.	promoter protein
المكون الرئيسي ذو الجزيئات العملاقة للخلايا. يرتبط البوليمر الخطي للأحماض الأمينية ببعضها البعض بواسطة أو أصر ببتيدية بتسلسل متخصص.	protein glycosylation
إضافة سلاسل جانبية من متعدد السكريات بعد عملية الترجمة إلى البروتين.	protein phosphorylation
إضافة تساهمية لمجموعة فوسفات للسلسلة الجانبية للبروتين والمحفزة من قبل الانزيم protein kinase.	proto-oncogene
جين طبيعي، يدخل عادة في تنظيم دورة الخلية ويمكن أن يتحول إلى جين مسرطن حاث للسرطان بواسطة طفرة.	pseudogene
جين يحتوي على عدة طفرات متراكمة جعلته غير فعال وغير وظيفي.	quaternary structure (protein)
العلاقة ثلاثية الأبعاد لسلاسل ببتيدية مختلفة للبروتين متعدد الوحدات الثانوية (multisubunit) أو لمعقد البروتين.	radioactive isotope
شكل من الذرة ذو نواة غير مستقرة يصدر إشعاعاً عند انصهاره.	RecA protein
نموذج لصنف من البروتينات الارتباطية بالـ DNA والذي يحفز إيثاق (synapsis) أشرطة الـ DNA خلال إعادة الارتباط الوراثي.	recombinant DNA
أي جزيئة DNA مكونة من ربط قطع الـ DNA من مصادر مختلفة، ويستخدم بشكل واسع في كلونة الجينات وفي التحويل الوراثي للكائنات الحية وفي علم الأحياء الجزيئي عموماً.	recombination
العملية التي بواسطتها تنكسر جزيئات الـ DNA ويعاد ارتباطها في اتحادات جديدة. ويمكن أن تحدث في الخلية الحية على سبيل المثال خلال التعابر في الانقسام الاختزالي أو خارج جسم الكائن الحي باستخدام DNA منقى وانزيمات تعمل على كسر ولحم أشرطة الـ DNA.	replication fork
منطقة تشبه الحرف Y منجزيئة الـ DNA المتضاعفة والتي تتكون فيها الأشرطة البنوية وتنفصل.	replication origin
موقع في جزيئة الـ DNA يبدأ عنده ازدواج الـ DNA.	restriction enzyme
أحد أنواع الانزيمات الهاضمة الكثيرة والتي يمكن لها أن تنشق جزيئة الـ DNA في أي موقع يحتوي على تسلسل قصير محدد من النيوكليوتيدات، وتستخدم بشكل واسع في تجارب الهندسة الوراثية.	retrotransposon
نوع من أنواع العناصر القابلة للقفز والتي تتحرك بواسطة استنساخها أولاً إلى نسخة من الـ RNA ثم يعاد تحويلها إلى DNA بواسطة انزيم reverse transcriptase وتندمج في مكان آخر في الكروموسومات.	retrovirus
فايروس يحتوي على الـ RNA ويتضاعف في الخلية بواسطة صنع وسيط DNA مزدوج الشريط.	reverse transcriptase
انزيم اكتشف لأول مرة في الـ retroviruses ويقوم بصنع نسخة DNA مزدوجة الشريط من جزيئة RNA قالب مفردة الشريط.	ribonuclease (RNase)
انزيم يقطع جزيئة الـ RNA بواسطة التحليل المائي لأصرة أو أكثر من أواصر الفوسفات ثنائية الأستر.	ribosome
جزيئة مؤلفة من جزيئات rRNAs وبروتينات رايبوسومية ترتبط مع الـ mRNA وتحفز تخليق البروتين.	ribozyme
جزيئة RNA ذات فعالية حفزية.	RNA (ribonucleic acid)
بوليمر مكون من أحاديات نيوكليوتيدية مرتبطة تساهمياً.	RNA polymerase
انزيم يحفز تخليق جزيئة RNA بالاعتماد على قالب DNA من مولدات نيوكليوسيدية ثلاثية الفوسفات.	RNA primer
امتداد قصير من الـ RNA تم تخليقه على شريط DNA قالب. وهو ضروري من قبل انزيمات الـ DNA polymerases لبدء تخليقها للـ DNA.	RNA splicing
عملية يحدث فيها قص تسلسلات الإنترون من جزيئات الـ RNA المستنسخة في النواة خلال تكوين الـ mRNA وأنواع أخرى من الـ RNA.	rough endoplasmic reticulum (rough ER)
الشبكة الإندوبلازمية ذات الرايبوسومات الموجودة على سطحها، وتدخل في تخليق البروتينات الارتباطية بالغشاء والبروتينات الإفرازية.	S phase
أحد مراحل دورة الخلية الحقيقية النواة يتم فيها تخليق الـ DNA.	satellite DNA
مناطق من الـ DNA عالي التكرار من الكروموسوم حقيقي النواة، وعادة ما يتم تمييزها بمكونها النيوكليوتيدي الغير طبيعي. ولا يتم استنساخ هذا النوع من الـ DNA وليس له وظيفة معروفة.	SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
نوع من أنواع الترحيل الكهربائي والذي يتم فيه ترحيل مزيج البروتينات المرغوب فصلها في هلام يحتوي على المنظف SDS والذي يفتح انطواء البروتينات ويحررها من الارتباط بجزيئات أخرى.	secondary structure
نمط من الطي الموقعي المنظم لجزيئة البوليمر. كما في الحازونات وصفائح بيتا في البروتينات.	sex chromosome
كروموسوم ربما يكون موجود أو غير موجود، أو موجود بعدد متنوع من النسخ وفقاً لجنس الفرد، كما في كروموسومي X و Y في اللبائن.	site-directed mutagenesis
تقنية يمكن بواسطتها عمل طفرة في موقع محدد من الـ DNA.	

مبادئ الوراثة الجزيئية

نوع من اعادة الارتباط لاحتاج الى تماثل كبير بين تسلسلي الـ DNA اللذان ينجزان العملية. ويمكن أن يحدث بين جزيئي DNA مختلفين أو ضمن جزيئة DNA مفردة.	site-specific recombination
جزيئات DNA صغيرة تصنع معقدات مع البروتينات لتكون دقات من RNA وبروتين (ribonucleoprotein particles) والتي تدخل في عملية الـ RNA splicing.	small nuclear RNA (snRNA)
منطقة من الشبكة الاندوبلازمية لارتبط معها الـ raibiosومات، وتدخل في تخليق الدهون.	smooth endoplasmic reticulum (smooth ER)
تقنية يمكن بواسطتها تقييد قطع الـ DNA المفصولة في الترحيل الكهربائي على حزمة ورقية. ويمكن الكشف عن قطع خاصة بمجس موسوم. (سميت على اسم مبتكرها (E. M. Southern).	Southern blotting
كميت ذكري نضج في الحيوانات، وهو متحرك وصغير مقارنة بالبليضة.	sperm (spermatozoon, spermatozoa)
تجمع كبير لجزيئات الـ RNA والبروتين والذي ينجز عملية الـ splicing للـ mRNA في حقيقة النواة.	spliceosome
منطقة من الـ DNA تشفر لبروتين أو لجزيئة RNA والتي تكون جزءاً من تركيب أو لها وظيفة انزيمية، وتتميز عن مناطق الـ DNA التي تنظم التعبير الجيني.	structural gene
جزيئة يعمل عليها الانزيم.	substrate
مكون من معقد ذو مكونات متعددة (multicomponent complex)، كما في بروتين واحد من مجموع معقد بروتيني أو سلسلة متعدد ببتيد من بروتين متعدد السلاسل (multichain protein).	subunit
منطقة من الـ DNA يلتف فيها الحلزون المزدوج على نفسه أكثر.	supercoiled DNA
تسلسل متعارف عليه في منطقة البروموتر للعديد من الجينات حقيقية النواة والذي يرتبط بعامل الاستنساخ العام، ومن هنا فانه يخصص موقع بدء الاستنساخ.	TATA box
انزيم يطيل تسلسلات التيلومير في الـ DNA.	telomerase
نهاية الكروموسوم، المرتبطة مع تسلسل DNA مميز والذي يتضاعف بشكل خاص، ويقوم بصد رغبة الكروموسوم بأن يتقصّر مع كل جولة من جولات التضاعف (في الاغريقية تعني telo نهاية).	telomere
الكائن الحي الذي يحمل بروتين محور وراثياً (أو جزيئة RNA) والذي يعمل عادة في درجة حرارية معينة ولكنه غير طبيعي في درجة حرارية (عادة أعلى) أخرى.	temperature-sensitive (ts) mutant
شريط مفرد من الـ DNA أو الـ RNA والذي تعمل نيوكليوتيدات كدليل لتخليق الشريط المكمل.	template
إشارة في الـ DNA البكتيري توقف الاستنساخ.	terminator
شكل معقد ثلاثي الأبعاد من سلسلة بوليمر مطوية، وخاصة ماتكون جزيئة بروتين أو RNA.	tertiary structure
انزيم يقوم بعمل قطوعات عكسية في جزيئة الـ DNA ذات الحلزون المزدوج لأجل إزالة العقد أو لفتح التفاف الانحناءات الزائدة.	topoisomerase (DNA topoisomerase)
الـ RNA الناتج من استنساخ الـ DNA.	transcript
نسخ شريط واحد من الـ DNA الى تسلسل RNA مكمل بواسطة الانزيم RNA polymerase.	transcription (DNA transcription)
تنشيط التعبير الجيني في البكتريا بواسطة انتهاء الاستنساخ قبل أوانه.	transcription attenuation
مصطلح يستخدم لأي بروتين ضروري في بدء أو في تنظيم الاستنساخ في الكائنات حقيقية النواة، ويتضمن كلا البروتينات المنظمة للجين بالإضافة الى عوامل الاستنساخ العامة.	transcription factor
ادخال جزيئة الـ DNA الغريبة في الخلية حقيقية النواة، وعادة مايتبع هذا الادخال تعبير جين واحد أو عدة جينات في الـ DNA الداخل حديثاً.	transfection
مجموعة من جزيئات الـ RNA التي تستخدم في تخليق البروتين كوسائط (adaptor) بين الـ mRNA والأحماض الأمينية. يرتبط كلنوع من جزيئات الـ RNA تساهمياً بحامض أميني معين.	transfer RNA (tRNA)
وهو الكائن الذي حصل على معلومة وراثية جديدة عن طريق اكتسابه للـ DNA الغريب	Transgenic animal
عملية يقوم بواسطتها التسلسل الموجود في جزيئة الـ mRNA بتوجيه اندماج الأحماض الأمينية في البروتين، وتحدث في الرايبوسوم.	translation (RNA translation)
نوع من الطفرات والتي ينكسر فيها جزء من الكروموسوم ويرتبط في جزء آخر.	translocation
حركة تسلسل من الـ DNA من موقع الى موقع آخر ضمن الجينوم.	transposition
يبدو أن هذا الجين يمنع تكوين السرطان. كما ان فقدان وظيفته تؤدي الى زيادة الاستعداد في الإصابة بالسرطان.	tumor suppressor gene
بروتين صغير متفكك عليه بشكل كبير في الكائنات حقيقية النواة ويبدو بأنه يرتبط تساهمياً بالأحماض الأمينية lysines لبروتينات أخرى. ان ارتباط سلسلة قصيرة من الـ ubiquitins بمثل تلك الأحماض الأمينية يعمل على وضع إشارة على البروتين لكي يتم تحطيمه داخل الخلية بواسطة الـ proteasome.	ubiquitin
جسيمة متألّفة من حمض نووي (DNA أو RNA) معيّن ضمن بروتين وقادر على التضاعف ضمن خلية العائل وينتشر من خلية الى أخرى. تسبب العديد من الفيروسات أمراضاً مختلفة.	virus
تقنية يتم فيها تقييد البروتينات المفصولة على هلام متعدد الأكريلاميد في حزمة ورقية وتحليلها عادة	Western blotting

بواسطة جسم مضاد موسوم.	
تثبيط نسخة واحدة من الكروموسوم X في الخلايا الجسمية في اناث اللبائن.	X-inactivation
خلية ثنائية المجموعة الكروموسومية تكونت بدمج الكميّات الذكري مع الأنثوي.	zygote