البيولوجي الجزيئي

د.نشأت غالب مصطفى

البيولوجي الجزيئي

الدكتور
نشأت غالب مصطفى
أستاذ البيولوجي الجزيئي المساعد

دار الكتاب الجامعي
UNIVERSITY BOOK HOUSE
حيث يبدأ التعليم

دار الكتاب الجامعي
UNIVERSITY BOOK HOUSE

البيولوجي الجزيئي

عنوان الكتاب: البيولوجي الجزيئي
اسم المؤلف : د. نشأت غالب مصطفى
ISBN: 978-614-452-111-3
الناشر
دار الكتاب الجامعي

عضو جمعية الناشرين الإماراتيين
عضو اتحاد الناشرين العرب
عضو المجلس العربي للموهوبين والمتفوقين
دولة الإمارات العربية المتحدة - الجمهورية اللبنانية
ص. ب. 16983 - العين
هاتف (الإمارات) 00971-3-7554845
فاكس (الإمارات) 00971-3-7542102
هاتف (بيروت) 00961-3-31 21 24
هاتف (بيروت) 00961-1-38 26 68
www.bookhous.com
E-mail:bookhous@emirates.net.ae
ubh.leb@gmail.com

الطبعة الأولى

1438هـ - 2018م

© حقوق الملكية الأدبية والفنية جميعها محفوظة لدار الكتاب الجامعي - العين
ويحظر طبع أو تصوير أو ترجمة أو إعادة تنضيد الكتاب كاملا أو مجزأ أو تسجيله على أشرطة تسجيل أو إدخاله على الكمبيوتر أو برمجته على أسطوانات ضوئية إلا بموافقة الناشر خطيا.

البيولوجي الجزيئي

الدكتور

نشأت غالب مصطفى

أستاذ البيولوجي الجزيئي المساعد

جامعة الموصل - العراق

الناشر

دار الكتاب الجامعي

دولة الإمارات العربية المتحدة ـ الجمهورية اللبنانية

2018

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

﴿ رَبِّ اشْرَحْ لِي صَدْرِي ﴿٢٥﴾ وَيَسِّرْ لِي أَمْرِي ﴿٢٦﴾ وَاحْلُلْ عُقْدَةً مِّن لِّسَانِي ﴿٢٧﴾ ﴾

صدق الله العظيم

(سورة طه، الآيات 25-27)

المحتويات

مقدمـــة 19

الفصل الأول: استعراض تاريخي 21

أهم المراجع 42

الفصل الثاني: بيولوجيا الخلية 43

الطاقة الحيوية للخلية CELL BIOENERGETICS 48

تحلل الكلوكوز GLYCOLYSIS 51

الاستتباب الخلوي CELL HOMEOSTASIS 53

أهم المراجع 55

الفصل الثالث: عضيات الخلية 57

النواة NUCLEUS 60

النوية NUCLEOLUS 61

الرايبوسومات RIBOSOMES 62

الحويصلات VESICLES 66

الشبكة الاندوبلازمية ENDOPLASMIC RETICULUM : 68

الشبكة الاندوبلازمية الخشنة ROUGH ENDOPLASMIC RETICULUM 69

الشبكة الاندوبلازمية الملساء SMOOTH ENDOPLASMIC RETICULUM(SER) . 71

جهاز كولجي GOLGI APPARATUS 71

الهيكل الخلوي CYTOSKELETON 73

الخيوط الدقيقة Microfilaments 75

الخيوط الوسطية Intermediate filaments 75
النبيبات الدقيقة Microtubules 75
الهيكل الخلوي في الكائنات بدائية النواة 76
المايتوكوندريا MITOCHONDRIA 77
الغشاء الخارجي External membrane 78
الحيز بين الغشائين Intermembrane space 79
الغشاء الداخلي Inner membrane 79
الأعراف Cristae 80
القالب Matrix 80
السايتوسول CYTOSOL 83
الجسيمات الحالة LYSOSOMES 84
الجسيمات المركزية CENTROSOME 84
الغشاء الخلوي CELL MEMBRANE 86
التركيب الكيميائي للغشاء الخلوي 87
جزيئات الأرتباط الخلوي Cell junction molecules 92
أهم المراجع 95

الفصل الرابع: الإشارات الخلوية 97

أساسيات الإشارة الخلوية 101
الإشارات عن طريق المستقبلات النووية NUCLEAR RECEPTOR SIGNALS .. 103
مستقبلات الغشاء الخلوي عن طريق البروتين جي G PROTEIN 103
نواقل الاشارات الخلوية CELL SIGNALING TRANSPORTERS 107
المراسل الثانوي SECOND MESSENGERS 107
cAMP 107
cGMP 110
الاينوسيتول فوسفات INOSITOL PHOSPHATE (IPS) 111
الكالسيوم CALCIUM 112

التايروسين كاينيز المستقبل RECEPTOR TYROSINE KINASES 114
أهم المراجع 133

الفصل الخامس: الكروموسوم 135

تركيب الكروموسوم 138
النيوكليوسومات NUCLEOSOMES 141
الليف 30 نانومتر 30 NM FIBER 145
الكروماتين CHROMATIN 148
تحويرات الهستونات HISTONE MODIFICATIONS 149
الكاتبات والقارئات والماسحات فوق الجيني 151
EPIGENETIC WRITERS, READERS, AND ERASERS 151
أهم المراجع 155

الفصل السادس: DNA وتضاعفه 157

عملية التضاعف DNA REPLICATION 163
شوكة التضاعف REPLICATION FORK 165
التمييز بين الخيط الجديد والقديم خلال الإصلاح 177
انزيم التوبوايزوميريز DNA TOPOISOMEASES 178
بدء وانتهاء تضاعف DNA 179
تضاعف DNA في الخلايا حقيقية النواة 183
أهم المراجع 191

الفصل السابع: الطفرات وإصلاح DNA 193

تعريف الطفرة 196
آليات حدوث الطفرات 196
الطفرة النقطية POINT MUTATION 197
الحذف والحشر 198

استبدال القواعد 199
أخطاء التدقيق 200
معدل الطفرات 201
الطفرات الصامتة SILENT MUTATIONS 201
الطفرات الهرائية NONSENSE MUTATIONS 203
الطفرات المغلّطة MISSENSE MUTATIONS 203
المواد المطفرة MUTAGENIC AGENTS..... 204
1- المطفرات الحيوية Biological mutagens 204
2- المطفرات الكيميائية CHEMICAL MUTAGENS 205
3- المطفرات الفيزيائية Physical mutagens..... 208
إصلاح DNA 211
انقطاع الحلزون المزدوج DSDNA BREAK..... 216
وجود ضرر في DNA يؤخر دورة الخلية..... 219
أهم المراجع 220

الفصل الثامن: دورة الخليـة.....221

المراحل الأربعة لدورة الخلايا حقيقية النواة 225
دراسة دورة الخلية في أجنة بعض الحيوانات 229
دراسة دورة خلايا اللبائن في الوسط الزرعي 231
السيطرة على دورة الخلية..... 231
نظام السيطرة على دورة الخلية 232
البروتين كاينيز المعتمد على السايكلين CDKS..... 233
تنشيط فعالية CDK 236
نظام السيطرة على دورة الخلية يعتمد على التحلل الدوري للبروتين..... 237
السيطرة على دورة الخلية يعتمد أيضاً على الاستنساخ 238
نظام السيطرة على دورة الخلية يعمل كشبكة كيميائية حياتية..... 239

الطور S 241
تضاعف واحد لـ DNA لكل خلية 242
تضاعف الكروماتين ضروري لتضاعف الكروموسوم..... 245
الكوهسين تساعد في مسك الكروماتيدين الشقيقين مع بعضهما 246
الانقسام الخيطي MITOSIS..... 247
تنشيط M-CDK..... 250
الكوندنسين CONDENSIN وأهميته في دورة الخلية 251
خيوط المغزل ودورة الخلية 253
البروتينات الرئيسية لخيوط المغزل..... 255
تضاعف الجسيم المركزي 256
حركة النبيبات الدقيقة في الانقسام الخيطي 257
الانقسام الاختزالي MEIOSIS..... 259
الانقسام السايتوبلازمي CYTOKINESIS 263
السيطرة على انقسام ونمو الخلية 267
محدثات الانقسام الخيطي المحفزة للانقسام الخلوي 268
توقف أو تأخر الانقسام الخلوي 268
أذى DNA يوقف دورة الخلية 269
الإشارات غير الطبيعية للتكاثر الخلوي قد تسبب أنواع من السرطانات 271
العديد من الخلايا لها القابلية على عدد محدد من الانقسامات 271
نمو الخلايا 272
التنسيق بين الانقسام الخلوي والنمو الخلوي 272
أهم المراجع 274

الفصل التاسع: الجينات.....275

بعض التعاريف المهمة التي تخص الجينات 278
تعريف الجين 279

حجم الجين 279
تسمية الجينات 284
المعلومات التي تحملها الجينات والشفرة الوراثية 284
أنواع الجينات 286
الجينات التركيبية Structural genes 286
جينات الخلايا بدائية النواة 287
جينات الخلايا حقيقية النواة 287
الاكسونات والانترونات 288
الجينات المتداخلة 289
القطع الوراثية القافزة TRANSPOSONS 291
الجينات التنظيمية REGULATORY GENES 293
تركيب الجين في الخلايا حقيقية النواة 294
أنواع جينات الخلايا حقيقية النواة 295
كيف نشأت الانترونات 296
الأكسونات ووظائف البروتينات 297
عوائل الجينات 298
بعض تسلسلات DNA تشفر لأكثر من بروتين 300
الجينات المشفرة لغير البروتينات 301
جينات العضيات الخلوية 301
MTDNA يتوارث سايتوبلازمياً 303
أهم المراجع 305

الفصل العاشر: تنظيم التعبير الجيني 307

أنواع التعبير الجيني 311
ارتباط انزيم البلمرة RNAP مع DNA على المشجع 311
تنظيم بدء الاستنساخ 312

الأوبيرونات OPERONES 315
اللاك أوبيرون 318
السيطرة الموجبة والسالبة على اللاك أوبيرون 318
مكونات اللاك أوبيرون 319
الأدينوسين أحادي الفوسفات الحلقي CAMP 320
البروتين المنشط التقويضي 321
المحث 321
الكابح 323
إنزيم البلمرة RNAP 323
التسلسلات التنظيمية 324
الجينات 324
تحفيز اللاك أوبيرون 325
تنظيم التعبير الجيني للأحماض الأمينية 327
تنظيم تصنيع البروتين بعدد الرايبوسومات 332
بعض الجينات تنظم من خلال إعادة الربط 333
تنظيم التعبير الجيني في الخلايا حقيقية النواة 334
تنظيم المشجعات في الخلايا حقيقية النواة 338
ارتباط المنشطات والمنشطات المساعدة مع DNA 339
الإشارات الداخل والخارج خلوية وتنظيمها للتعبير الجيني 344
فسفرة عوامل الاستنساخ النووية 346
أهم المراجع 348

الفصل الحادي عشر: الاستنساخ 349

عملية الاستنساخ تبدأ بتكوين ما يشبه الفقاعات على DNA 352
المشجع 354
عملية الاستنساخ تقسم إلى ثلاث مراحل 355

إنزيم البلمرة RNAP في البكتريا 357
العامل سيكما Σ SIGMA FACTOR 358
عوامل الاستنساخ TRANSCRIPTION FACTORS 360
أنواع عوامل الاستنساخ 361
عملية الاستنساخ في الخلايا حقيقية النواة 364
إنزيمات البلمرة RNAPS في الخلايا حقيقية النواة 365
التغييرات المرافقة لعملية البدء بالاتنساخ 371
تجمع المكونات عند المشجع 373
الوسيط 376
أهم المراجع 378

الفصل الثاني عشر: RNA 379

MRNA 381
تحطيم MRNA 384
ارتباط MRNA مع البروتينات في الخلايا حقيقية النواة 385
تحطيم MRNA في البكتريا 386
تحطيم mRNA في الخلايا حقيقية النواة 387
مسارات إضافية لتحطيم MRNA في الخلايا حقيقية النواة 389
MIRNA 391
آلية عمل RNAI 394
دور MRNA في تكون الكروماتين المغاير : 397
CRISPR 397
آلية عمل CRISPR 398
CATALYTIC RNA 401
أهم المراجع 403

الفصل الثالث عشر: معاملة RNA 405

RNA PROCESSING 405

تكوين القبعة 409
عملية القطع والوصل SPLICING 410
تكوين الذيل متعدد الأدينيل (A) 417
معاملة RNA يمكن أن تجعل الجين المعين ينتج أكثر من ناتج واحد 420
القطع والوصل البديل 421
معاملة TRNA و RRNA 422
أهم المراجع 427

الفصل الرابع عشر: الشفرة الوراثيـة 429

فرضية التمايل أو التأرجح WOBBLE HYPOTHESIS 436
الأهمية الحيوية لفرضية التأرجح 437
الشفرات الوراثية المختلفة 439
الشفرة الوراثية الموسعة 439
الأحماض الأمينية غير القياسية 440
تطبيقات الشفرة الوراثية الموسعة 441
أهم المراجع 442

الفصل الخامس عشر: تصنيع البروتيـن 443

مراحل تصنيع البروتين 446
1- مرحلة تنشيط الأحماض الأمينية 446
2- مرحلة البدء 453
3- مرحلة الاستطالة 461
4- مرحلة الانتهاء 466
الطاقة المستهلكة في تصنيع وتدقيق متعدد البروتين 469
الترجمة السريعة لـ MRNA مفردة 470
أهم المراجع 472

الفصل السادس عشر : تحويرات ما بعد الترجمة 473
تحويرات النهاية الأمينية والنهاية الكاربوكسيلية 476
تحويرات الأحماض الأمينية 476
إضافة الجزيئات الكاربوهيدراتية إلى البروتين 478
إضافة مجاميع الأيزوبرينيل 478
إضافة مجاميع بديلة PROSTHETIC GROUPS 479
عمليات التقطيع 480
تكوين الآصرة ثنائية الكبريت 480
استهداف وتحطيم البروتينات 481
معظم تحويرات البروتينات تحدث في الشبكة الاندوبلازمية 482
توجيه البروتينات إلى الشبكة الاندوبلازمية 483
إضافة الكاربوهيدرات إلى البروتين ودوره في الاستهداف 484
تسلسلات الإشارة للنقل النووي 487
استهداف البروتين في البكتريا 489
تحطم البروتينات 490
أهم المراجع 494

الفصل السابع عشر : الموت الخلوي المبرمج 495
الموت الخلوي المبرمج يزيل الخلايا غير المرغوب فيها 499
آلية حدوث الموت الخلوي المبرمج 501
1- المسار الخارجي External pathway 504
2- المسار الداخلي Intrinsic pathway 505
تنظيم المسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج 507
آلية العمل : 508
مثبطات الموت الخلوي المبرمج 510
عوامل الحياة والموت الخلوي المبرمج 512

مصير الخلية بعد الموت الخلوي المبرمج 513
الموت الخلوي المبرمج والأمراض 514
أهم المراجع 517

الفصل الثامن عشر: التيلومير والتيلوميريز 519
وظائف التيلومير 523
دور البروتينات المرتبطة بالتيلومير 528
بروتين TRF2 529
إنزيم التيلوميريز 531
مكونات إنزيم التيلوميريز 532
كيف يقوم انزيم التيلوميريز بزيادة طول التيلومير 535
التيلومير والتيلوميريز والأورام 538
أهم المراجع 541

مُقَدِّمَة

بفضل الله تعالى تم الانتهاء من إعداد كتاب البيولوجي الجزيئي، وكانت الحاجة ملحة بسبب افتقار المكتبة العربية لعناوين في هذا التخصص من جهة، فضلاً عن التطور الكبير والمتسارع في علم البيولوجي الجزيئي من جهة أخرى. وكذلك تداخل هذا العلم مع باقي العلوم التطبيقية والسريرية في الطب والصيدلة والطب البيطري والعلوم والتربية والزراعة، وقد وضع الكتاب أساساً ليكون عوناً للباحثين وطلبة الدراسات العليا والأولية في هذه الكليات التي يتم فيها تدريس علم البيولوجي الجزيئي كمادة مستقلة أو ضمن منهج علم الأحياء بشكل علم. إذ غدا علم البيولوجي الجزيئي بتفرعاته الكثيرة أحد أبرز علوم العصر الحديث جنباً إلى جنب مع علوم تكنولوجيا المعلوماتية والحواسيب والبرمجة والتقنيات الدقيقة والطاقة المتجددة.

وسيجد القارئ الكريم والمتابع المهتم بعلم البيولوجي الجزيئي وجود ارتباط وثيق الصلة جلي الوضوح بين علوم مختلفة مثل الكيمياء والفيزياء والرياضيات والمعلوماتية والحواسيب والتقنيات الحديثة والمنطق وبين علم البيولوجي الجزيئي، فأصبح لزاماً اليوم لمن يروم التخصص في هذا المجال الممتع والمعقد أن يكون ملماً بمبادئ مجموعة مترابطة من العلوم المختلفة التي تكمل إحداها الأخرى.

وتم التركيز في فصول هذا الكتاب على الأسس العامة في بداية كل موضوع مع تعاريف موجزة ثم الولوج في التفاصيل الدقيقة والابتعاد قدر الإمكان عن الآراء العلمية الشاذة أو تلك التي لازالت مثار جدل بين العلماء، وذلك بالاعتماد على أمهات الكتب الأجنبية والبحوث الرصينة المنشورة في المجلات المتخصصة. كما تم الاستعانة بالكثير من الصور والأشكال (أكثر من 270 شكل) والجداول (25 جدول) والمعادلات الكيميائية في محاولة

الوصول إلى صورة متكاملة وواضحة لكل موضوع ولتسهيل الفهم، وسيجد القارئ طريقة الإبقاء على المختصرات الشائعة (مثل ATP و DNA و RNA و غيرها) وبعض المصطلحات كما هي (مثل الجين، الانزيم، المايتوكوندريا، التيلومير، الكروماتين وغيرها كثير) وذلك لعدم قناعتنا بكثير من مفردات الترجمة والتعريب التي تكون أحياناً غريبة ويصعب فهمها فتفقد الغاية من استعمالها وتخرج القارئ عن صلب الموضوع.

وختاماً يجب التنبيه إلى أن علم مثل البيولوجي الجزيئي كثير التفرع سريع التطور بشكل شبه يومي من الصعب الإحاطة به أو سرد كل خفاياه وتفاصيله من خلال كتاب واحد أو حتى مجموعة كتب، وأسأل الله أن يكون هذا الكتاب خطوة أولى تتبعه مشاريع أكبر في نشر الوعي وإيصال العلم لكل مهتم وباحث وطالب، كجزء من نهضة بلدنا وأمتنا وأنا على يقين بأن الأجيال الشابة ستكون أهلاً لذلك.

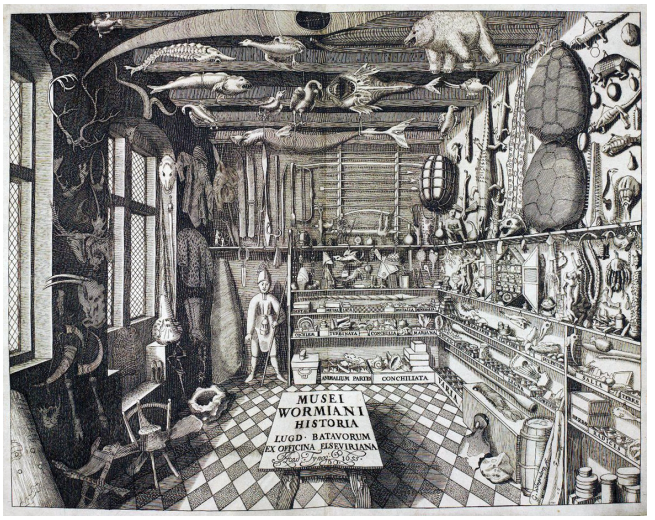
والله من وراء القصد

د. نشأت غالب مصطفى

الفصل الأول

استعراض تاريخي

Historical Review



الفصل الأول

استعراض تاريخي
Hisrorical Review

استعمال مصطلح البيولوجي الجزيئي من قبل وييفر

يعد علم البيولوجي الجزيئي من العلوم الحديثة نسبياً، ويعود تأريخ نشأته إلى بدايات القرن العشرين بينما العلوم الأساسية التي بني عليها علم البيولوجي الجزيئي فهي موغلة في القدم وعلى رأسها الكيمياء الحياتية Biochemistry (بل يعد كثير من العلماء أن البيولوجي الجزيئي هو فرع من فروع علم الكيمياء الحياتية الذي أصبح بحراً زاخراً) وعلم الوراثة Genetics وعلم الأحياء المجهرية (الدقيقة) Microbiology والفيزياء Physics والرياضيات Mathematics.

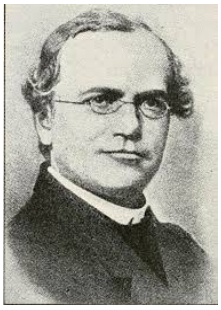
ويعد العالم والمهندس الأمريكي وارن وييفر Warren Weaver (1894-1974) أول من أطلق مصطلح البيولوجي الجزيئي كمحاولة لتفسير فيزيائي وكيميائي للحياة. والبيولوجي الجزيئي كعلم هو من أكثر العلوم تطوراً وتغييراً، حيث طرأت عليه الكثيرات من التطورات لعل أهمها الطفرات النوعية الكبيرة التي شهدها هذا العلم خصوصاً في خمسينيات القرن العشرين وكذلك التقدم التقني الكبير في العقود الخمسة الماضية، والذي

ألقى بظلاله على تطور غير مسبوق في دراسة الخلية الحية وأجزاءها والجزيئات الحيوية ووظائفها و DNA والجينات والجينوم بشكل موسع ومعمق.

وحديثاً فإن مصطلح البيولوجي الجزيئي يعني ذلك العلم الذي هو فرع من علوم الحياة Biology ويهتم بدراسة ظواهر الحياة على المستوى الجزيئي وكيف تؤدي هذه الجزيئات وظائفها وكيف يتكامل عملها مع بعض، مع التركيز على دراسة نوعين من الجزيئات هي الاحماض النووية (DNA و RNA) والبروتينات التي تعد المادة الفعالة للكائنات الحية.

ويمكن تلخيص أبرز الانجازات العالمية في علم البيولوجي الجزيئي كالآتي:

1- كريكور مندل Gregor Mendel:



يعد كريكور مندل (1822-1884) أبو علم الوراثة وهو عالم نبات نمساوي المولد ألماني الأصل، لقب بأبو الوراثة لدوره الكبير في وضع أسس علم الوراثة وقوانينها وسمي فرع من فروع علم الوراثة باسمه وهي الوراثة المندلية Mendelian inheritance، لكن انجازاته بقيت بدون اهتمام حتى كشف عنها في مطلع القرن العشرين من قبل مجموعة من العلماء، وأبرز قوانين مندل الوراثية هي :

مندل
الوراثة تنقل بشكل وحدات

1- القانون الأول (قانون العزل Law of segregation) ونصه "خلال تكوين الأمشاج Gametes، فإن أليلات كل جين تنعزل عن الأخرى وبذلك يحمل كل مشيج أليل واحد فقط لكل جين".

2- القانون الثاني (قانون التفارز المستقل Law of independent assortment) ونصه "أن جينات الصفات المختلفة يمكن أن تنعزل بشكل مستقل خلال تكوين الأمشاج".

3- القانون الثالث (قانون السيادة Law of dominance) ونصه "بعض الأليلات تكون سائدة وأخرى تكون متنحية، والكائن الحي الذي يملك على الأقل أليل واحد سائد سوف يظهر تأثير هذا الأليل".

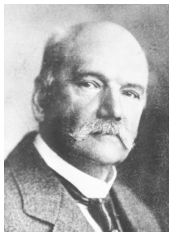
وجدير بالإشارة اليوم أن هناك أمراض يكون سببها جين واحد معروف وتسمى بالإمراض المندلية Mendelian diseases (أو أمراض الجين الأحادي Monogenic diseases) ومن الأمثلة الشهيرة عليها فقر الدم المنجلي Sickle cell anemia، كما أن هناك صفات وراثية تدعى بصفات مندل Mendelian traits مثل لون العين ولون الشعر.

2- جوهانس مسجر Johannes F. Miescher:

طبيب وعام أحياء سويسري (1844-1895) قام بعزل مادة كيميائية غنية بالفوسفات من خلايا الدم البيض وسماها نيوكلين Nuclein (وهو الحامض النووي) لذلك يعد مسجر أول من عزل الحامض النووي وان سماه باسم آخر، كما توقع أن يكون له دور في نقل الصفات الوراثية.

مسجر
أول من عزل الحامض النووي وسماه نيوكلين

3- ألبرت كوسيل Albert Kossel :

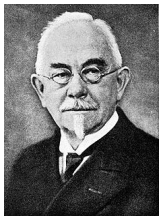


عالم أحياء ألماني ورائد في علم الوراثة (1853-1927) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1910 تقديراً لجهوده في إيجاد التركيب الكيميائي للأحماض النووية، حيث عزل ووصف المركبات العضوية (القواعد النتروجينية) الخمسة المكونة للأحماض النووية وهي الأدنين Adenine (A) والكوانين Guanine (G) والثايمين Thiamine (T) والسايتوسين Cytosine (C) واليوراسيل Uracil (U).

كوسيل
ايجاد التركيب الكيميائي للأحماض النووية

4- ولهيلم جوهانسين Wilhelm Johansen :

عالم نبات ووراثة دنماركي (1857-1927) ويعد أول من أطلق كلمة جين Gene (وتعرب إلى كلمة المورثة لكننا نفضل الابقاء على تسمية جين) لوصف الوحدات الوراثية لمندل، وكذلك أول من استخدم مصطلح الصفة المظهرية (الطراز المظهري) Phenotype والصفة الوراثية (الطراز الوراثي) Genotype.



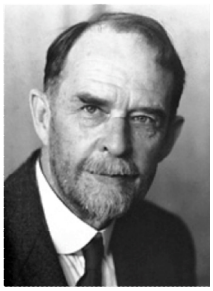
جوهانسين
أول من أستعمل مصطلح جين

5- ثيودور بوفيري Theodore Boveri :

بوفيري - ساتون
الكروموسومات
تحمل المادة الوراثية

عالم أحياء ألماني (1862-1915) كانت معظم بحوث بوفيري على حيوان قنفذ البحر Sea urchin وأثبت أن نمو الجنين يحتاج إلى أن تكون جميع الكروموسومات سليمة ومرتبة بشكل معين، وكان ذلك جزء من نظرية الكروموسوم هي التي تحمل المادة الوراثية، وجدير بالذكر أن بوفيري يعد من أوائل العلماء الذين درسوا الأسس الخلوية لنشوء السرطانات.

6- ثوماس مورغان Thomas H. Morgan :



مورغان
الكروموسومات
تحمل الجينات

عالم أحياء ووراثة وأجنة أمريكي (1866-1945) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1933 تكريماً لأعماله الرائدة في دراسة الكروموسومات ودورها في الوراثة بشكل تفصيلي باستعمال ذبابة الفاكهة Drosophila melanogaster، وبنيت على بحوثه نظريات علم الوراثة الحديثة، وله نتاج علمي وافر يتمثل بـ 22 كتاب و370 بحث خلال حياته العلمية الحافلة، كما يعد بجدارة أول من أدخل ذبابة الفاكهة كنموذج لبحوث علم البيولوجي الجزيئي وعلم الوراثة.

7- والتر ساتن Walter Sutton :

طبيب وعالم وراثة أمريكي (1877-1916) ومن أبرز إسهاماته نظريته التي تقول أنه بالإمكان تطبيق قوانين مندل الوراثية على الكروموسومات وتعرف هذه النظرية بنظرية الكروموسوم بوفيري-ساتن Boveri-Sutton chromosome theory، حيث طرح كل من بوفيري و ساتن وبشكل مستقل أن الكروموسومات هي من تحمل المادة الوراثية.

8- بايتون روز Peyton Rous :

عالم فيروسات أمريكي (1879-1970) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1966 لاكتشافه الفيروسات التي تسبب بعض أنواع السرطانات.

9- أوتو واربيرغ Otto H. Warburg :

عالم فسلجة وطبيب ألماني (1883-1970) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1931 لاكتشافه طبيعة وآلية عمل الإنزيمات التنفسية في الخلية.

10- هيرمان موللر Hermann Muller :

موللر
علم نشوء الطفرات

عالم بيولوجي جزيئي ووراثة أمريكي (1890-1967) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1946 لجهوده الكبيرة في دراسة التأثيرات الفسلجية والجينية للاشعاع (وخاصة أشعة X) وعلى يده بدأ علم نشوء الطفرات Mutagenesis.

11- ألبرت كلاود Albert Claude :

كلاود
استخدام المجهر الالكتروني والتجزئة

طبيب وعالم خلية بلجيكي (1899-1983) نال جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1974 بالاشتراك مع كريستيان دي نوفو و جورج بالاد، تقديراً لجهودهم في دراسة التركيب الدقيق للخلية ومكوناتها ووظائفها، ويعد أول من أستعمل المجهر الالكتروني والتجزئة الخلوية Cell fractionation في دراسة علوم الحياة.

12- هانز كريبس Hans A. Krebs :

عالم كيمياء حياتية وطبيب ألماني المولد (1900-1981)، يعد رائد علم التنفس الخلوي والمسارات الأيضية الخلوية لإنتاج الطاقة، واشتهر باكتشافه لاثنين من الدورات الحيوية في الجسم هما دورة اليوريا Urea cycle ودورة

حامض الستريك Citric acid cycle (أو دورة كريبس أو TCA) وتثميناً لجهوده الكبيرة حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1953 بالاشتراك مع هانز كورنبيرغ.

كريبس
التنفس الخلوي
المسارات الأيضية
دورة كريبس
دورة اليوريا

13- باربارا ماك كلينتوك Barbara McClintock :

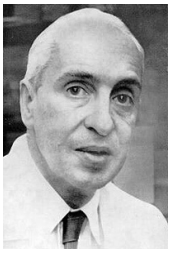
رائدة علوم أمريكية (1902-1992) من أبرز النساء الرائدات في علوم الحياة نالت جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1983 تقديراً لجهودها في دراسة كروموسومات نبات الذرة Maize وتعد أول من وضعت الخارطة الوراثية لنبات الذرة، وأول من بينت أهمية ودور التيلومير Telomere والسنترومير Centromere، ومن أبرز أعمالها هو دراسة تغير مواقع الجينات Transposition (وتدعى الجينات القافزة Jumping genes)، وبقيت هذه النتائج المهمة والمثيرة للجدل حينها مهملة في الأربعينات والخمسينات من القرن العشرين، وصولاً إلى الستينات والسبعينات حيث أكد العديد من العلماء أهمية وصحة ما ذهبت اليه ماك كلينتوك لذلك منحت جائزة نوبل في العام 1983، وتعد المرأة الوحيدة التي تنال هذه الجائزة لوحدها (بدون مشارك)، ويعد الكثير من العلماء ماك كلينتوك بمستوى مندل في انجازاتها بمجال البيولوجي الجزيئي.

ماك كلينتوك
التيلومير
السنترومير
الجينات القافزة

14- جورج بيدل George W. Beadle :

عالم وراثة أمريكي (1903-1989) نال جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1958 بالاشترك مع ادوارد تاتوم لجهودهما في دراسة دور الجينات في تنظيم العمليات الكيميائية الحياتية داخل الخلية. وتركزت جهودهما في أحداث الطفرة الوراثية في العفن من نوع Neurospora crassa باستخدام الأشعة السينية (X-ray) واثبات أن هذه الطفرات سببت تغيرات في إنزيمات معينة تدخل ضمن العمليات الايضية لخلايا العفن، وبذلك وضعا فرضية "كل جين مسؤول عن إنزيم معين" (One gene one enzyme hypothesis)

بيدل – تاتوم
فرضية جين
واحد أنزيم واحد



15- سفيرو اوكوا Severo Ochoa :

عالم كيمياء وفيزياء اسباني (1905-1993) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1959 بالاشتراك مع أرثر كورنبيرغ.

16- ماكس ديلبرك Max Delbruck :

ديلبرك - هيرشي - لوريا
الية تضاعف الحامض النووي

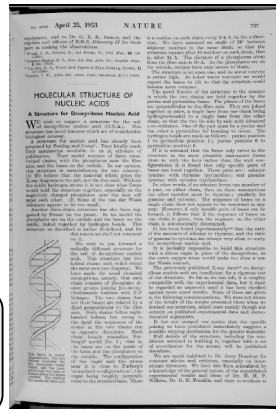
عالم فيزياء حياتية ألماني أمريكي (1906-1981) كان من أوائل من شجع علماء الفيزياء لدراسة علوم الحياة وخاصة علم الجينات، حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1969 بالاشتراك مع الفرد هيرشي وسلفادور لوريا، تثميناً لجهودهم في اكتشاف آلية التضاعف Replication والتركيب الوراثي للفيروسات.

17- ادوارد تاتوم Edward Tatum :

عالم وراثة أمريكي (1909-1975) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1958 بالاشتراك مع جورج بيدل.

18- فرانسيس كريك Francis H.C. Crick :

كريك - واتسون - ولكنز
الظفيرة الثنائية للـ DNA



April 25, 1953 NATURE

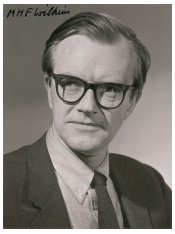
MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

عالم بريطاني (1916-2004) في البيولوجي الجزيئي والفيزياء الحياتية والفسلجة، ويرتبط أسمه (مع كل من واتسون و ولكنز) في الكشف عن التركيب الكيميائي ثنائي الظفيرة (Double helix) لجزيئة DNA وتكريما لجهودهم حصلوا على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1962. وجدير بالذكر أن بحثهما الذي حصلا من خلاله على جائزة نوبل وغيّر وجه علم الأحياء في القرن العشرين والذي نشرته مجلة ناتشر Nature العالمية يوم 25 نيسان/ ابريل

1953 عبارة عن صفحة واحدة وفيها شكل توضيحي واحد وستة مصادر فقط (كما في الشكل).

19- موريس ويلكنس Maurice Wilkins :



عالم أحياء وفيزياء انكليزي الأصل ولد في نيوزلاندا (1916–2004) وله العديد من الانجازات في مجالات مختلفة منها فصل النظائر Isotope separation، تطوير المجاهر الضوئية، انكسار الأشعة السينية X-ray diffraction والمساهمة في تطوير الرادار، شارك جائزة نوبل في الطب والفسلجة للعام 1962 مع واتسون وكريك.

20- روبرت فرجكوت Robert Furchgott :

عالم كيمياء حياتية وأدوية أمريكي (1916–2009) حاصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1998 بالاشتراك مع فريد مراد و لويس ايكنارو، تقديراً لجهودهم في كشف أوكسيد النتريك NO كأحد عوامل الإشارات في خلايا اللبائن.

21- جون فين John Fenn :

عالم كيمياء أمريكي (1917–2010) نال جائزة نوبل في الكيمياء للعام 2002 لجهوده المتميزة في تطوير طرق دراسة الجزيئات الحيوية الكبيرة باستعمال طريقة قياس الطيف الكتلي Mass spectroscopy بالاشتراك مع كل من تاناكا و ووثريج.

22- ادوارد لويس Edward Lewis :

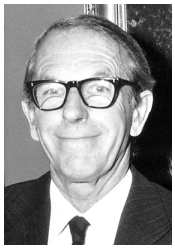
عالم وراثة أمريكي (1918–2004) نال جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1995 بالاشتراك مع كريستيان نسلين فولهارد و اريك ويسجاوس، لاكتشافهم آليات السيطرة الجينية على المراحل المبكرة للنمو الجنيني.

23- أرثر كورنبيرغ Arthur Kornberg :

كورنبيرغ - اوكوا
انزيم بلمرة DNA

عالم كيمياء حياتية أمريكي (1918–2007) من أبرز انجازاته دراسة تضاعف DNA وآلية التصنيع (وخاصة إنزيم البلمرة DNA polymerase) في الفيروسات والبكتريا والنباتات والحيوانات، ونال جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1959 بالاشتراك مع سيفيرو اوكوا.

24- فريدريك سا نجر Fredrick Sanger :

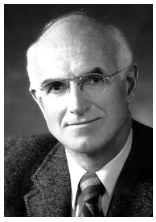


سانجر
حصل على جائزتي نوبل في الكيمياء الاولى في دراسة تركيب الانسولين والثانية في ايجاد تسلسلات الحامض النووي

عالم كيمياء حياتية بريطاني (1918–2013) حصل على جائزة نوبل في الكيمياء مرتين، ومن النادر جداً منح الجائزة مرتين لنفس الشخص، حيث حصل على جائزة نوبل في الكيمياء للعام 1958 تثميناً لجهوده في دراسة تركيب البروتين وخاصة الأنسولين، وجائزة نوبل في الكيمياء للعام 1980 بالاشتراك مع والتر جلبرت وألآن ماكسام، تقديراً لجهودهم في دراسة وإيجاد تسلسلات القواعد النتروجينية ضمن تركيب الحامض النووي، وطريقته في إيجاد تسلسلات DNA لازالت مستعملة إلى يومنا هذا.

25- ينز سكو Jens Skou:

طبيب وكيميائي دنماركي (1918–) حصل على جائزة نوبل في الكيمياء للعام 1997 بالاشتراك مع بوير و والكر لاكتشافهم انزيم Na+ - K+ ATPase.



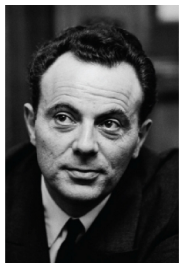
26- جوزيف موراي Joseph Murray :

طبيب جراحة تجميلية أمريكي (1919–2012) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1990 بالاشتراك مع دونال ثوماس، تثميناً لجهودهما في نقل الأعضاء والخلايا كعلاج للأمراض التي تصيب البشر.

27- باروج بيناسيراف Baruj Benacerraf :

عالم مناعة فنزولي أمريكي (1920–2011) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1980 بالاشتراك مع جروج سنيل و جيان داوسيت، تقديراً لجهودهم في اكتشاف جينات التطابق النسجي Major histocompatability complex genes ودورها في تشفير البروتينات (على سطح الخلايا) وأهميتها لعمل الجهاز المناعي في التعرف على الذات واللاذات Self and non-self.

28- فرانكس جاكوب Francois Jacob :



جاكوب = موند - لوف
انتقال المعلومات من DNA **الى السايتوبلازم من خلال** mRNA.
ومثبط اللاك Lac repressor

عالم أحياء فرنسي (1920–2013) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1965 بالاشتراك مع جاكويس موند واندو لوف، وتركزت جهود جاكوب على دراسة التنظيم الانزيمي لعملية الاستنساخ Transcription وخاصة التنظيم التتابعي الذي تقوم به انزيمات وعوامل أخرى صغيرة على جينات معينة فتقوم بتشغيلها أو إطفائها Switch on-switch off، ومنها دراسة مثبط اللاك Lac repressor.

29- ستانلي كوهين Stanley Cohen :

عالم أمريكي متخصص في الكيمياء الحياتية (1922–) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1966 بالاشتراك مع ريتا ليفي مونتالسيني، لاكتشافهما عوامل النمو Growth factors.

30- روبرت ادواردز Robert Edwards :

عالم فسلجة انكليزي (1925–2013) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 2010 لاكتشافه عملية الإخصاب خارج الجسم In vitro fertilization (IVF) والتي تكللت بولادة أول طفل أنابيب يوم 25 تموز 1978 هو لويس براون.

31- آرون كلك Aaron Klug :

عالم بريطاني في الكيمياء الحياتية والكيمياء التركيبية (1926-) حصل على جائزة نوبل في الكيمياء للعام 1982 لابتكاره المجهر الالكتروني البلوري Crystallographic electron microscope والتي أسهمت بشكل كبير في دراسة تركيب معقد الأحماض النووية-البروتينات.

32- مارشال نيرنبرغ Marshall Nirenberg :

كورنبيرغ - اوكوا
انزيم بلمرة DNA

عالم كيمياء حياتية ووراثة أمريكي (1927-2010) نال جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1968 بالاشتراك مع غوبند خورانا و روبرت هولي، تثميناً لجهودهم في وضع أسس الشفرة الوراثية ودورها في تصنيع البروتين.

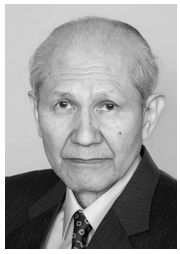
33- سدني برينر Sydney Brenner :

عالم أحياء من جنوب أفريقيا (1927-) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 2002 بالاشتراك مع بوب هورفتز و جون سلتون، وتركزت انجازاته على دراسة الشفرة الوراثية Genetic code، ويعد من أوائل من أدخل الدودة الاسطوانية Caenorhabditis elegans في بحوث البيولوجي الجزيئي والتطوري، كما كانت له إسهامات كبيرة في دراسة آلية نقل mRNA للمعلومات الوراثية من DNA في النواة إلى مصنع البروتين (الرايبوسومات) في السايتوبلازم. ولهذا العالم إسهامات أخرى منها الدراسة المعمقة لبيولوجيا الخلية ووضع نظرية الخطة الأمريكية-الخطة الأوربية في تفسير كيفية قيام الخلايا العصبية بوظائفها. وبإيجاز ففي الخطة الأمريكية فإن وظيفة الخلية العصبية تحدد من قبل الخلايا المجاورة لها، فمثلاً لو هاجرت الخلية العصبية إلى منطقة الشم في الدماغ لأصبحت متخصصة في وظائف الشم وهكذا باقي الخلايا العصبية، ويتم ذلك من خلال إشارات كيميائية ومحورية من الخلايا المجارة بغض النظر عن الأصل الجيني لهذه الخلايا.

برينر - هورفتز - سلتون
الشفرة الوراثية
و mRNA

أما الخطة الأوربية (تدعى أحياناً بالخطة البريطانية) ومفادها أن وظيفة الخلية العصبية تحدد من خلال أصلها الجيني، لذلك فإن الخلية الأم التي لها وظيفة معينة (مثل البصر) ستنتج خلايا بنوية تملك نفس الوظيفة.

34- أوسامو شيمومورا Osamu Shimomura :



عالم كيمياء عضوية وأحياء بحرية ياباني (1928–) فاز بجائزة نوبل في الكيمياء لاكتشافه البروتين المتألق الأخضر Green fluorescent protein (GFP) بالاشتراك مع كل من مارتن جالفي و روجر تسين، حيث عزلوا هذا البروتين لأول مرة من قنديل البحر jellyfish من نوع Aequorea victoria، ويستعمل الجين المسئول عن هذا البروتين في دراسة الخلايا بإدخال هذا الجين إلى الخلايا ومتابعتها ومتابعة التعبير الجيني.

شيمومورا - جالفي - تسين
البروتين المتألق الأخضر
GFP

35- جيمس واتسون James D. Watson :

واتسون
الظفيرة الثنائية لـ DNA
ومشروع الجينوم البشري

عالم أمريكي (1928–) متخصص في البيولوجي الجزيئي والوراثة وعلم الحيوان وأحد رواد شكل جزيئة DNA. ومن انجازاته الأخرى البارزة هو ترأسه لمشروع الجينوم البشري Human genome project (HGP) الذي بدأ في العام 1990 انتهى العمل فيه في العام 2003.

36- ويرنر البرت Werner Albert :

البرت - ناثانس - سميث
الانزيمات القاطعة (RE)

عالم أحياء مجهرية ووراثة سويسري (1929–) يعد أحد مكتشفي الإنزيمات القاطعة Restriction enzymes (RE) والذي أدى إلى تطور تقنية Recombinant DNA والكلونة Cloning، حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1978 بالاشتراك مع كل من دانيال ناثانس و هاميلتون سميث.

37- فرانكلين ستاهل Franklin Stahl :

عالم وراثة وبيولوجي جزيئي أمريكي (1929–) من أبرز انجازاته تجربة مسلسن – ستاهل في إثبات طريقة النصف محافظ عند تضاعف DNA، والذي يعني أن كل خيط من DNA يعمل كقالب لتصنيع خيط جديد.

38- ماثيو مسلسن Mathew Messelson :

عالم وراثة وبيولوجي جزيئي أمريكي (1930–) تركزت جهوده في دراسة تضاعف DNA، إعادة الربط Recombination، الإصلاح Repair، وكيف تتعرف الخلية على DNA الغريب. أما أبرز تجارب مسلسن فكانت مع ستاهل، حيث أثبتا أن DNA يتضاعف بطريقة نصف محافظة Semi-conservative. كما يعود الفضل له (مع مجموعة من العلماء) في الكشف عن RNA المراسل mRNA.

مسلسن - ستاهل
تضاعف DNA
نصف المحافظ

39- والتر جلبرت Walter Gilbert :

جلبرت - ماكسام
ايجاد تسلسلات
DNA

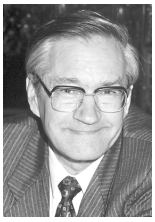
عالم كيمياء حياتية وفيزياء وبيولوجي جزيئي أمريكي (1932–) تمكن مع أحد طلابه(وهو ألآن ماكسام) من ابتكار طريقة إيجاد تسلسلات DNA ولا زالت الطريقة مستعملة لحد الآن، حيث طورا استعمال مواد تعمل على تقطيع DNA في مواقع محددة مع تعليم نشط إشعاعيا Radioactive labeling ومن ثم الترحيل الكهربائي على هلام الاكريل أمايد.

40- جون كوردن John Gurdon :

كردون
نقل الأنوية والكلونة
وإعادة برمجة الخلايا

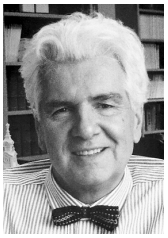
عالم أحياء انكليزي (1933–) أشتهر ببحوثه في مجال نقل الأنوية والكلونة وحصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 2012

بالاشتراك مع شينيا ياماناكا تثميناً لجهودهما في اكتشاف طريقة لإرجاع الخلية الناضجة إلى خلية جذعية عن طريق إعادة برمجته Reprogramming.



41- ريتشارد أرنيست Richard Ernst :

عالم كيمياء سويسري (1933-) نال جائزة نوبل في الكيمياء للعام 1991 تثميناً لجهوده في تطوير مطيافية NMR عالي الدقة Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.



42- كنتر بلوبل Gunter Blobel :

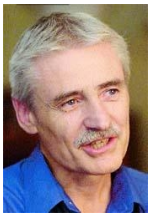
عالم أحياء ألماني (1936-) نال جائزة نوبل في الطب

أو الفسلجة للعام 1999 لاكتشافه أن البروتينات لها إشارات داخلية تضبط حركتها وموقعها داخل الخلية.

43- ماريو كابيكجي Mario Capecchi :

عالم وراثة جزيئي ايطالي (1937-) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 2007 بالاشتراك مع اوليفر سميثيز و مارتن ايفانز، لاكتشافهم طريقة لجعل جينات معينة مغلقة turned off في الفئران والتي عرفت بالفاقدة لجين محدد Knockout (ko) mice، وفتح هذا الاكتشاف من أبواب البحوث العلمية لدراسة وظائف الجينات حيث يتوفر اليوم العشرات من أنواع الفئران من نوع ko فاقدة جين معين (أو عدة جينات) ويتم دراسة تأثير ذلك على مختلف النواحي الفسلجية والخلوية والوراثية والدوائية والسلوكية... وتستعمل هذه الفئران بشكل واسع في بحوث السرطانات وعلاجها والسمنة وداء السكري وأمراض القلب والأوعية الدموية والتهابات المفاصل والإدمان والقلق والشيخوخة وأمراض أخرى كثيرة.

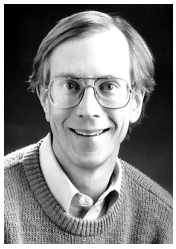
كابيكجي - سميثيز - ايفانز
فئران فاقدة لجين معين
Knockout mice



44- دايفيد بالتيمور David Baltimore :

عالم أحياء أمريكي (1938–) نال جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1975 بالاشتراك مع كل من هوارد تيمين و رينتو دلبيكو، تثميناً لجهودهم في كشف العلاقة بين الفيروسات المسببة الأورام والمادة الوراثية للخلية.

45- ليلاند هارتويل Leland Hrtwell :



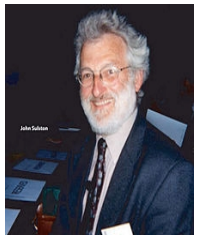
هارتويل
جينات بروتينات الانقسام الخلوي
CDC

عالم أحياء أمريكي (1939–) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 2001 بالاشتراك مع تيم هنت وبأول نيرس لاكتشافهم جينات البروتينات المسيطرة على الانقسام الخلوي Cell division cycle (CDC) genes وان بعض أنواع الطفرات في هذه البروتينات تسبب أنواع معينة من السرطانات.

46- سدني ألتمان Sidney Altman :

عالم بيولوجي جزيئي كندي أمريكي (1939–) حصل على جائزة نوبل في الكيمياء للعام 1989 بالاشتراك مع ثوماس سيج تقديراً لجهودهما في اكتشاف الخصائص التحفيزية Catalytic للـ RNA.

47- الفريد جيلمان Alfred Gilman :



جيلمان - رودبل
G protein

عالم أدوية وكيمياء حياتية أمريكي (1941–) حصل على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1994 بالاشتراك مع مارتن رودبل لاكتشافهما بروتين G protein ودوره في الإشارات الخلوية Cell signaling.

48- جون سالستون John Salston :

جون سالتون
جينوم الديدان و الموت الخلوي المبرمج

عالم كيمياء وبيولوجي بريطاني (1942–) حصل على جائزة نوبل للعام 2002 لجهوده في دراسة جينوم دودة C. elegans وكذلك في لدراساته الرائدة في مجال الموت الخلوي المبرمج.

49- روبرت ليفكويتز Robert Lefkowitz :

عالم كيمياء وفيزياء أمريكي (1943–) حصل على جائزةنوبل في الكيمياء للعام 2012 مشاركة مع برين كوبيلكا تقديراً لجهودهما في دراسة بيولوجيا المستقبلات الخلوية وخاصة G protein couple receptor (GPCR).

50- ريتشارد روبرتز Richard J. Roberts :

روبرتز - شارب
الانترون وتظفير الجينات

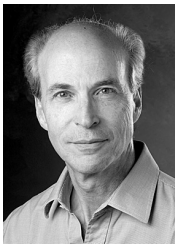
عالم كيمياء حياتية وبيولوجي انكليزي (1943–) نال جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 1993 بالاشتراك مع فيليب شارب، لاكتشافهما الانترون Intron في DNA الخلايا حقيقية النواة وكذلك آلية تظفير الجينات Gene-splicing.

51- كاري موليس Karry Mullis :

موليس
تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

عالم كيمياء حياتية أمريكي (1944–) مكتشف طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) في منتصف ثمانينات القرن العشرين، وهي طريقة لزيادة كمية أو مضاعفة حجم الحامض النووي DNA، ويعد من الانجازات التي أحدثت طفرة نوعية وثورة في البيولوجي الجزيئي وفتحت أفاق ومجالات بحثية كبيرة في التشخيص المرضي ودراسة الجينات والجينوم، وساهمت في وضع علم البيولوجي الجزيئي في مقدمة العلوم وأسرعها تطوراً وتشعباً، وتقديراً لجهوده منح جائزة نوبل في الكيمياء للعام 1993.

52- روجر كورنبرغ Roger Kornberg :



كورنبرغ
عماية الاستنساخ Transcription

عالم كيمياء حياتية وبيولوجي تركيبي أمريكي (1947–) فاز بجائزة نوبل في الكيمياء للعام 2007 لجهوده في دراسة انتقال المعلومات الوراثية من DNA إلى RNA (الأساسيات الجزيئية لعمليات الاستنساخ Transcription).

53- فرانكويز ساينوسي Francoise Sinoussi :

عالمة فيروسات فرنسية (1947-) فازت بجائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 2008 مشاركة مع مونتاغنير لاكتشافهما فيروس عوز المناعة البشري Human Immunodeficiency virus (HIV).

54- اليزابيث بلاكبيرن Elizabeth Blackburn :

عالمة أسترالية أمريكية (1948-) فازت بجائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 2009 بالاشتراك مع جاك سوزتاك و كارول كريدر تثميناً لجهودهم في اكتشاف أنزيم التيلوميريز Telomerase المسئول عن تصنيع التيلومير.

55-بيتر آكري Peter Agre :

طبيب وعالم بيولوجي جزيئي أمريكي (1949-) حصل على جائزة نوبل في الكيمياء للعام 2003 بالاشتراك مع ماكينون تثميناً لجهودهما في اكتشاف Aquaporins وهي عبارة عن بروتينات قنوات الماء والتي تسيطر على حركة جزيئات الماء خلال الغشاء الخلوي.

56- جايمس روثمان James Rothman :

عالم أحياء وخلية أمريكي (1950-) نال جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 2013 بالاشتراك مع كل من ثوماس سودهوف وراندي شيكمان، لجهودهم في اكتشاف تنظيم مسارات الحويصلات الداخل خلوية والتي تعد من أهم طرق النقل الخلوي.

57- فينكاترامان راماكريشنان Venkatraman Ramakrishnan :

عالم أحياء تركيبي هندي (1952-) فاز بجائزة نوبل في الكيمياء للعام 2009 بالاشتراك مع ستيتز و يوناث تقديراً لجهودهم في دراسة تركيب ووظيفة الرايبوسوم.

59- أندرو فايـر Andrew Fire :

فايـر – ميللو
تداخل RNA
(RNAi)

عالم أحياء أمريكي (1959–) يعد من الشباب الذين حصلوا على جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة للعام 2006 بالاشتراك مع كرايج ميللو تثميناً لدورهما في اكتشاف تداخل RNA (RNAi) RNA interference ودورها في السيطرة على العمليات الحيوية داخل الخلوية ومنها التعبير الجيني.

60- اريك بيتزغ Eric Betzig : ==

بيتزغ - هيل - مورنير
المجهر المتألق

عالم فيزياء أمريكي (1960–) حصل على جائزة نوبل في الكيمياء للعام 2014 بالاشتراك مع كل من ستيفان هيل و وليام مورنير لجهودهم في تطوير المجهر المتألق Fluorescence microscope.

61- في العام 1976 تم افتتاح أول شركة للهندسة الوراثية هي شركة Genetech من قبل كل من هربرت بوير و روبرت سوانسون، وتشير الدراسات أن الإنسان أستعمل الهندسة الوراثية منذ 12 ألف سنة قبل الميلاد عندما بدأ الإنسان بتربية الحيوانات وتدجينها. وبعد عام من افتتاح الشركة تمكنت من انتاج بروتين بشري هو السوماتوستاتين Somatostatin داخل بكتريا الايشريشيا القولونية E.coli وتمكنت الشركة أيضاً من إنتاج الأنسولين البشري عام 1978.

62- عام 1972 تمكن باول بيرك من إنتاج أول Recombinant DNA (cDNA) باستعمال الإنزيمات القاطعة (RE) والإنزيمات الرابطة DNA ligases.

63- عام 1973 تم نقل DNA من كائن إلى آخر بنجاح من قبل هربرت بوير و ستانلي كوهين.

64- عام 1973 أستطاع ردولف جينيسج من إنتاج أول فأرة محورة وراثياً من خلال إدخال DNA غريب إلى أجنة الفئران، وكان ذلك أول حيوان محور وراثياً Transgenic animal في العالم. أما أول نبات أنتج بتقنية الهندسة الوراثية فكان نبات التبغ

Tobacco عام 1983 من قبل كل من بيفان و فلافيل و كلايتون.

65- في عام 1996 تم استنساخ أول كائن لبون هي النعجة دوللي (1996–2003) باستعمال تقنية نقل النواة وتم ذلك من قبل لان ويلمت Lan Wilmut و كيث كامبيل Keith Campbell في معهد روسلين التابع لجامعة أدنبرة.

66- في عام 1998 تم للمرة الأولى عزل الخلايا الجذعية البشرية من الجنين. وبعدها تتابعت الدراسات والبحوث في مجال الخلايا الجذعية بشقيه العلوم الأساسية والتطبيقية، ولازال هذا الفرع من علوم الحياة يافعاً وفي بدايته ويرتبط بالبيولوجي الجزيئي من عدة نواحي.

67- في عام 2003 تم الانتهاء من مشروع الجينوم البشري HGP حيث تم إيجاد خارطة وتسلسلات الجينوم البشري المكون من 3.2 مليار تسلسل.

68- في عام 2005 توصل مجموعة من الباحثين إلى آلية جديدة لتحرير الجين Gene editing من خلال نظام كريسبر CRISPRs (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) وسيتم الحديث عنه بالتفصيل فيما بعد.

69- في عام 2015 توصل مجموعة من الباحثين إلى تطوير تقنية PCR فبدلا من استعمال Thermocycler استعمل ضوء صادر من مصباح خاص وبذلك قلل من الوقت اللازم لرفع وخفض درجة الحرارة، واختصر وقت إجراء التقنية إلى دقائق.

70- حصل كل من:

السويدي توماس ليندال
Tomas Lindahl

الأمريكي باول مودريج
Paul Modrich

التركي عزيز سانجار
Aziz Sancar

على جائزة نوبل في الكيمياء للعام 2015 لجهودهم في دراسة آلية إصلاح DNA.

أهم المراجع :

Elizabeth R.C. Cregan. **Pioneers in Cell Biology.** (2008). Teacher Created Materials Publishing.

Magner, Lois N**. A History of the Life Sciences.** 3rd Edition. (2002). Marcel Dekker, Inc. New York.

Morange, Michel. **A History of Molecular Biology.** (1998). translated by Matthew Cobb. Harvard University Press: Cambridge.

https: //www.nobelprize.org/nobel_prizes/lists/all/

الفصل الثاني

بيولوجيا الخلية

Cell Biology

الفصل الثاني

بيولوجيا الخلية
Cell Biology

يعد روبرت هوك Robert Hooke أول من اكتشف الخلية في مقطع الفلين عام 1665، أما ليفنهوك Leeuwenhoek فهو أول من شاهد الخلية (البروتستا) تحت المجهر عام 1673، وفي العام 1838 أقترح عالم النبات الالماني Schleiden أن جميع النباتات مكونة من خلايا، وبعدها بعام أقترح شوان Schwann أن جميع الحيوانات مكونة من خلايا، وفي العام 1855 أقترح فيركو Virchow أن جميع الخلايا تأتي من خلايا.

وعموماً فإن كل الكائنات الحية تتكون من خلية واحدة أو عدة خلايا، والخلية هي وحد البناء الاساسية والوحدة الأصغر في جسم الكائن الحي تقوم بجميع العمليات الحيوية.

ويعرف بيولوجيا الخلية على أنه جزء من فرع علوم الحياة الذي يدرس الخلية بشكل مفصل من ناحية تركيبها وصفاتها الفسلجية ووظائفها المتنوعة ودورة حياتها وانقساماتها وشيخوختها وموتها... ويرتبط هذا العلم بشكل وثيق مع العلوم البيولوجية الأخرى مثل البيولوجي الجزيئي، الوراثة، الكيمياء الحياتية، المناعة، علم الأحياء التطوري، تقنيات دراسة الخلايا، الطب، والعلوم الأخرى.

وهناك عدة تقسيمات للكائنات الحية ربما أهمها هو تقسيمها إلى قسمين كبيرين هما بدائية النواة Prokaryotes وحقيقية النواة Eukaryotes. والكائنات بدائية النواة هي كائنات حية لا تملك نواة محددة (غير محاطة بغلاف نووي) أو أية عضيات مرتبطة بالأغشية، معظم هذه الكائنات وحيدة الخلايا Unicellular ولكن بعضها متعددة الخلايا Multicellular ومن أشهر الأمثلة عليها هي البكتريا.

أما حقيقية النواة فهي كائنات تملك خلايا لها تراكيب معقدة وأهم هذه التراكيب هي النواة التي تحاط بغشاء نووي، ومن أمثلة الكائنات حقيقية النواة هي الحيوانات والنباتات والفطريات والبروتستا. ويمكن تلخيص أهم صفات الكائنات بدائية النواة وحقيقية النواة وكذلك الفرق بينهما من خلال الجدول التالي :

جدول (1) أهم صفات الكائنات حقيقية النواة وبدائية النواة

	حقيقة النواة	بدائية النواة
النواة	موجودة	مفقودة
وجود غلاف نووي يحيط بالنواة	موجودة	مفقودة
عدد الكروموسومات	أكثر من كروموسوم	كروموسوم واحد
نوع الخلايا	متعددة الخلايا	وحيدة الخلايا، باستثناء بعض البكتريا الزرقاء Cyanobacteria يمكن أن تتواجد بشكل متعدد الخلايا
اللايسوسومات والبروكسيسومات	موجودة	مفقودة
المايتوكوندريا	موجودة	مفقودة أو نادرة الوجود
الشبكة الاندوبلازمية	موجودة	مفقودة
الهيكل الخلوي	موجودة	مفقودة

	حقيقة النواة	بدائية النواة
الرايبوسوموات	كبيرة	صغيرة
جهاز كولجي	موجودة	مفقودة
الكلوروبلاست	موجودة (في الخلايا النباتية)	مفقودة، قد توجد أحياناً
السوط	مجهري الحجم، يرتبط بالغشاء الخلوي، ويتكون من تسعة مزدوجات من الألياف	تحت مجهري الحجم (أصغر) ويتكون من ليف واحد

ونظراً لأهمية الخلية الحيوانية والنباتية في دراسات بيولوجيا الخلية فلا بد من التعرف على أهم الفروقات بين نوعي الخلايا من خلال التطرق لأهم صفات الخلايا الحيوانية والنباتية كما في الجدول (2) :

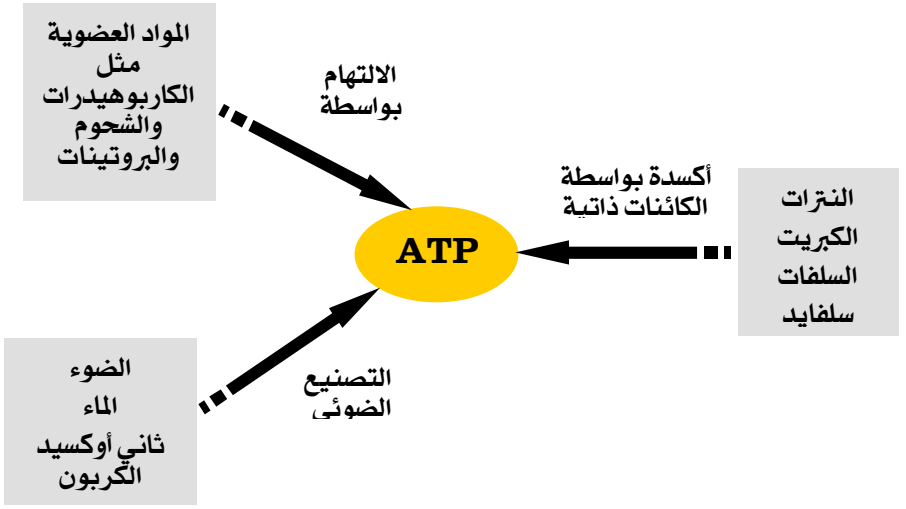
جدول (2) أهم صفات الخلايا الحيوانية والخلايا النباتية

	الخلايا الحيوانية	الخلايا النباتية
النواة	موجودة وتحمل المادة الوراثية	موجودة وتحمل المادة الوراثية
نوع الخلايا	حقيقية النواة وجود غلاف نووي حقيقي يحيط بالنواة	حقيقية النواة وجود غلاف نووي حقيقي يحيط بالنواة
المايتوكوندريا	بيوت الطاقة وعددها كثير	عددها أقل
شكل وحجم الخلايا	صغيرة الحجم نسبياً ومتغيرة الشكل	كبيرة الحجم وثابتة الشكل (عادة سداسية)
جدار الخلية	لا يوجد جدار خلوي و يقوم الغشاء الخلوي بوظيفة الحدود التي تتفاعل مع البيئة الخارجية	لها جدار خلوي وغشاء خلوي، ويعمل الجدار الخلوي على حماية الخلية النباتية ويعطيها الشكل الثابت والمتانة ويتكون من السليلوز والهيمي سليلوز

	الخلايا الحيوانية	الخلايا النباتية
الكلوروبلاست	غير موجودة	موجودة وتقوم بتجهيز الغذاء للخلية عن طريق التركيب الضوئي باستخدام أشعة الشمس، ثاني أوكسيد الكاربون، والماء لتصنيع جزيئات السكريات
الفجوات	يمكن أن تحتوي الخلية الحيوانية أو لا تحتوي على فجوة واحدة أو عدة فجوات	هناك فجوة واحدة كبيرة في كل خلية تحوي الماء والمواد الغذائية وبذلك تعمل كخزين للخلية
المريكزات	تساهم في حركة الكروموسموات خلال الانقسام االخلوي	غير موجودة
الجسيمات الحالة	توجد في السايتوبلازم وتحوي أنزيمات تساهم في تحطيم (هضم) المركبات	غير موجودة
الأحماض الأمينية	يمكن تصنيع بعض الأحماض الأمينية داخل الخلايا الحيوانية	تصنع جميع أنواع الأحماض الأمينية داخل الخلايا النباتية
الانقسام الخلوي	يحدث الانقسام الخلوي بحدوث تخصر مركزي وسط الخلية	خلال الانقسام الخلوي تتكون الصفيحة الخلوية

الطاقة الحيوية للخلية Cell Bioenergetics :

تعرف الطاقة الحيوية على أنها فرع من الكيمياء الحياتية تهتم بدراسة تحولات الطاقة داخل الخلية أو الكائن الحي، وتستعمل عادة هذه الطاقة في بناء وتكسير الأواصر الكيميائية للجزيئات داخل الخلايا لعمليات البناء والنمو والأيض. وبشكل عام فإن الكائنات الحية تحصل على الطاقة بعدة طرق من المواد العضوية واللاعضوية، كما في الشكل (2-1).



شكل (1-2) طرق الحصول على الطاقة في الكائنات الحية المختلفة

تنتج الطاقة بعملية الأكسدة على المواد الغذائية أو المركبات العضوية، وعموماً تنتج معظم الكائنات الحية ATP من مصادر الطاقة عن طريق الفسفرة التأكسدية. و ATP أكتشف لأول مرة من قبل Karl Lohmann عام 1929 وتم تصنيعه لأول مرة مختبرياً عام 1948 من قبل Alexander Todd، ويسمى ATP عادة بالوحدة الجزيئية لتيار نقل الطاقة داخل الخلية، وهو عبارة عن ثلاثي فوسفات الأدينوسين Adenosine triphosphate ويعد ناقل وخازن رئيسي للطاقة في أجسام الكائنات الحية، وتكون الطاقة المخزونة فيه على شكل أصرة غنية بالطاقة بين مجموعة الفوسفات الثالثة ومركب ADP (ثنائي فوسفات الأدينوسين)، ويتكون ATP من قاعدة نتروجينية هي الأدينين Adenine وسكر خماسي هو الرايبوز Ribose وثلاث مجموعات فوسفات Phosphate وينتج تحلل ATP طاقة كالآتي :

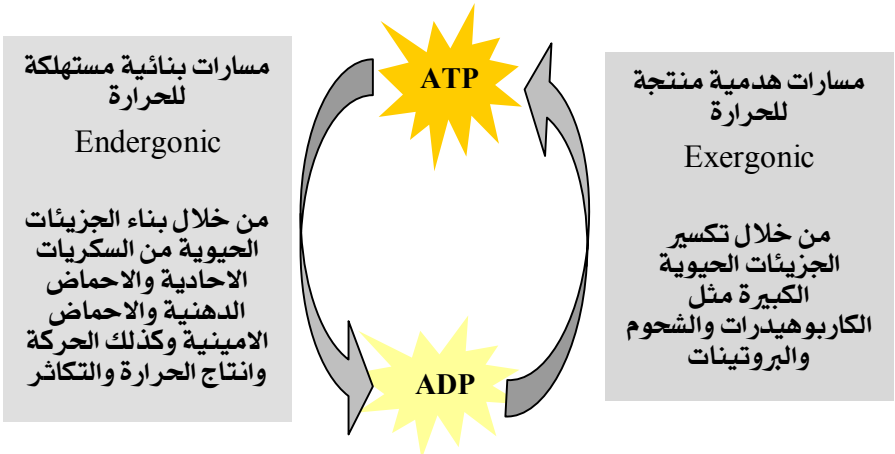
$$ATP + H_2O \xrightarrow{ADP} Pi\ \Delta G^{\circ} (7.3\ Kcal / mol)$$

$$ATP + H_2O \xrightarrow{AMP} PPi\ \Delta G^{\circ} (10.9\ Kcal / mol)$$

$$ADP + H_2O \xrightarrow{AMP} Pi\ \Delta G^{\circ} (7.8\ Kcal / mol)$$

ويحوي جسم الإنسان البالغ حوالي 250 غم من ATP وتستعمل الخلية كمعدل حوالي مليون جزيئة ATP كل ثانية كمصدر للطاقة التي تستعمل في بناء السكريات المتعددة وتصنيع البروتينات وتضاعف DNA والانقسام الخلوي والنقل الفعال خلال الغشاء الخلوي وعمل بعض الإنزيمات وعمليات حيوية كثيرة أخرى. ولـ ATP استخدامات خلوية أخرى غير الطاقة، فهو يستخدم كمادة أساس في مسارات نقل الإشارات الخلوية Cell signaling (سيتم شرحه في فصل لاحق) من خلال مجموعة انزيمات الكاينيز Kinases، كما يستعمل من قبل الادينليت سايكليز Adenylate cyclase الذي يستعمل ATP لإنتاج جزيئة المراسل الثاني cyclic AMP (cAMP).

وتعد نسبة ATP إلى ADP ضرورية للخلية حيث تستخدم الخلية هذه النسبة كدليل أو مؤشر على مدى توافر الطاقة داخل الخلية وعلى أساسه يتم ضبط الأيض الخلوي (زيادة أو نقص) لإنتاج المزيد أو استهلاك المزيد من ATP، وتبقى النسبة في الخلية بحدود 5 ATP: 1 ADP. وتسيطر الخلية على هذا التوازن من خلال زيادة ونقصان في معدلات البناء والهدم وكما في الشكل (2-2).



شكل (2-2) دورة ATP و ADP في الخلية

ويذكر أن بعض الكائنات الحية تحصل على ATP من عملية التخمر Fermentation (وهي عملية تحلل الكلوكوز بغياب الأوكسجين)، أما معظم الكائنات حقيقية النواة (مثل

النباتات والحيوانات) والعديد من البكتريا (التي تعيش تحت الظروف الهوائية) فإنها تعتمد على تحلل الكلوكوز Glycolysis في الحصول على الطاقة.

تحلل الكلوكوز Glycolysis :

يحتل الكلوكوز (C6H12O6) Glucose موقعا مركزياً في عمليات الأيض للنباتات والحيوانات والكثير من الأحياء المجهرية، وهو نسبياً غني بالطاقة لذلك يعد وقود خلوي جيد، حيث أن الأكسدة الكاملة للكلوكوز إلى ثاني أوكسيد الكاربون والماء ينتج طاقة حرة (ΔG°) قياسية تقدر بـ 686 كيلو سعرة \ مول.

$$Glucose + 6\ O_2 \quad 6\ CO2 + 6\ H2O\ \Delta G^{\circ}\ (686\ kcal/mol)$$

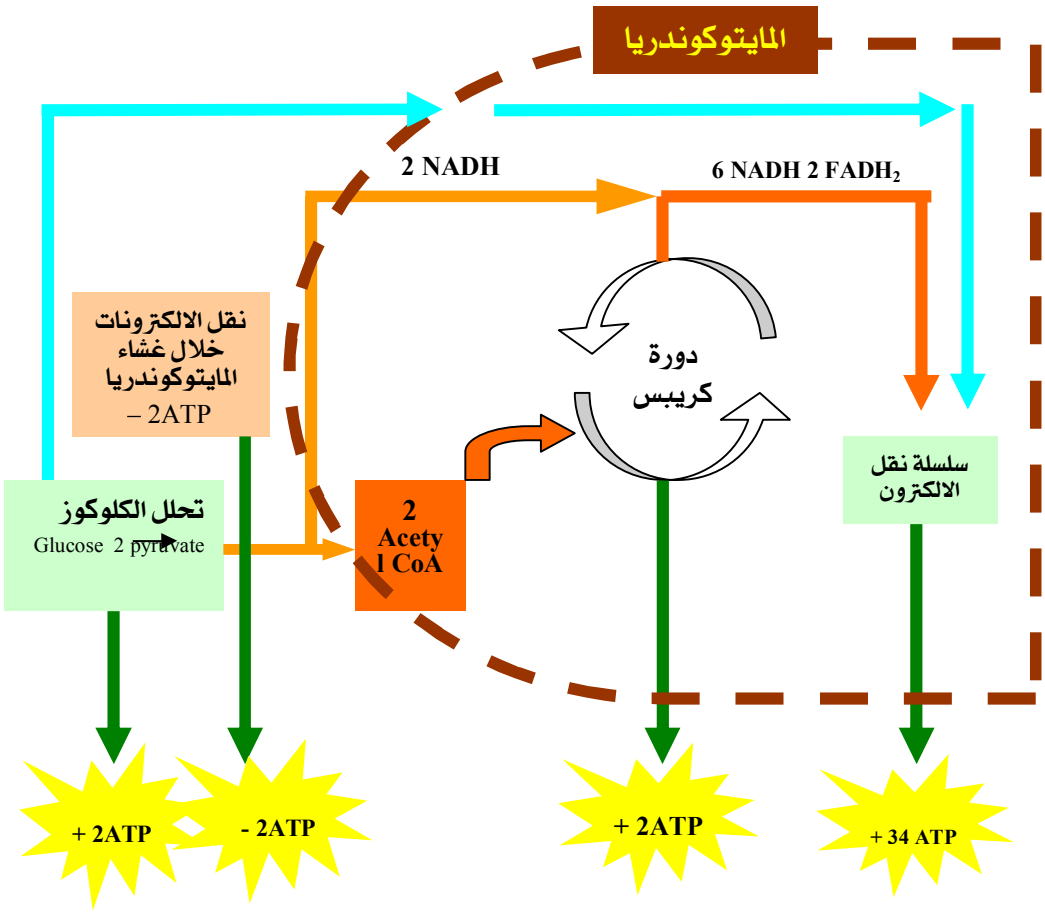
ولذلك تقوم الخلايا بخزن الكلوكوز بشكل سكر متعدد (عادة نشأ Starch في النباتات وكلايكوجين Glycogen في الحيوانات) وعلى هيئة خزين ستراتيجي تلجأ إليها الخلية عند الحاجة للطاقة حيث تؤكسد الكلوكوز (أما هوائياً أو لا هوائياً)، فضلاً عن ذلك فإن العمود الفقري الكاربوني لجزيئة الكوكوز يعد مادة أولية لتصنيع العديد من المركبات الحيوية ومنها الأحماض الأمينية كما في البكتريا، والمرافقات الإنزيمية Coenzymes والنيوكليوتيدات والأحماض الدهنية ومركبات أيضية وسطية ضرورية للنمو.

وعموماً فإن تحلل الكلوكوز هو عبارة عن سلسلة من التفاعلات الإنزيمية المتعاقبة (11 خطوة) تعانيها جزيئة الكلوكوز ليكون الناتج النهائي جزيئتين من البايروفيت Pyruvate (مركب ثلاثي الكاربون) مع إنتاج طاقة على شكل جزيئتين من ATP وجزيئتين من NADH. وتعد عملية تحلل الكلوكوز أهم عملية أيضية تعانيها جزيئة الكلوكوز والمصدر الوحيد لإنتاج الطاقة في بعض خلايا وأنسجة اللبائن مثل كريات الدم الحمر ولب الكلى والدماغ والنطف، وأنواع كثيرة من النباتات تعتمد على تحلل الكلوكوز كمصدر للطاقة، أما الأحياء المجهرية اللاهوائية فتعتمد كلياً على تحلل الكلوكوز في الحصول على الطاقة.

أما البايروفيت فهو مفتاح لدورة كريبس (TCA) حيث يتأكسد البايروفيت ليعطي مجموعة الاستيل لمركب Acetyl-CoA الذي تتأكسد فيه مجموعة الأستيل كلياً إلى ثاني أوكسيد الكاربون والماء وتدعى هذه العملية بالتنفس Respiration. الالكترونات الناتجة من

عمليات الأكسدة خلال دورة كريبس تنقل خلال سلسلة نواقل في المايتوكوندريا (السلسلة التنفسية Respiratory chain) لتكوين الماء والطاقة الناتجة من نقل الإلكترون تستعمل في تصنيع ATP في المايتوكوندريا.

إن عملية التنفس في الكائنات متعددة الخلايا تعني أخذ الأوكسجين وطرح ثاني أوكسيد الكاربون، أما على المستوى الخلوي فعملية التنفس تعني أن الخلية تستهلك الأوكسجين وتنتج ثاني أوكسيد الكاربون لذلك تعرف العملية بالتنفس الخلوي Cellular respiration ويمكن تلخيص هذه العملية بالشكل (2-3) التالي :



شكل (2-3) التنفس الخلوي

وعلى الغشاء الداخلي للمايتوكوندريا تحدث عملية سلسلة نقل الالكترونات Electron transport chain (ETC) حيث يتم نقل 2H مع 2e لإنتاج الماء بوجود O2 ½ مع إنتاج +H ويرافق العملية دخول +3H إلى داخل المايتوكوندريا بفعل إنزيم ATP synthase وبوجود ADP و Pi تتكون جزيئة ATP بعملية الفسفرة التأكسدية Oxidative phosphorylation.

وبالرغم من أن السكريات (الكلوكوز) هي المصدر الرئيسي للطاقة لمعظم الكائنات الحية، لكنها ليست المصدر الوحيد، فمن المعروف أن الشحوم أيضاً تنتج طاقة بكمية لا بأس بها بعملية أكسدة بيتا β-oxidation لإنتاج Acetyl-CoA، وبما أن الشحوم تتكون بشكل أساسي من أحماض دهنية (عبارة عن سلسلة كاربونية) لذلك فإن أكسدة بيتا تعمل في كل دورة على إنقاص طول سلسلة الحامض الدهني بذرتي كاربون وينتج عن ذلك جزيئة NADH وجزيئة FADH2 واللتان تستعملان لانتاج الطاقة بشكل ATP بعملية الفسفرة التأكسدية، وبما أن الأحماض الدهنية تتكون من سلاسل طويلة من الكاربون لذلك تكون الشحوم مصدر وخزين جيد للطاقة وخاصة في الغذاء.

الاستتباب الخلوي Cell homeostasis :

يعرف الاستتباب (أو التوازن الداخلي) على أنه عملية تنظيمية ذاتية للنظام البايولوجي للمحافظة على الثبوتية في مواجهة التغيرات التي تعترضها، نجاح عملية الاستتباب يعني استمرار الحياة وفشلها يسبب أمراض أو موت الكائن الحي، وببساطة يعد الاستتباب صفة للنظام الحيوي لتنظيم تأثير التغييرات الخارجية بما يضمن بقاء البيئة الداخلية ثابتة ومستقرة، ومن الأمثلة عليها تنظيم درجة الحرارة والموازنة بين الحامضية والقاعدية.. ووصفت عملية الاستتباب لأول مرة من قبل عالم الفسلجة الفرنسي Claude Bernard عام 1865.

يحتاج نظام الاستتباب إلى ثلاث مكونات هي الحساس Sensor (وتمثلها في الخلايا المستقبلات) لاكتشاف التغيرات في المحيط، وآلية مؤثرة يمكنها مقاومة أو تعديل التغيرات، واسترجاع سلبي Negative feedback تربط بين الحساس والآلية المؤثرة.

ويذكر أن جميع الكائنات الحية من وحيدة الخلايا إلى النباتات والحيوانات تعتمد على مجموعة متكاملة ومعقدة من التفاعلات الكيميائية الأيضية والتي تضمن الاستتباب داخل

الجسم للمحافظة على استمرارية هذه التفاعلات، وعمليات الاستتباب تعمل على مستوى الخلية والنسج والعضو والكائن الحي ككل، ومن الأمثلة الشهيرة على عمليات الاستتباب هي:

1- تنظيم عدد الخلايا (الموازنة بين الانقسام الخلوي والموت الخلوي المبرمج) وحجم الخلايا للمحافظة على حجم ووظيفة العضو داخل جسم الكائن الحي.
2- تنظيم pH الدم (في دم الإنسان عند 7.365).
3- تنظيم نسبة السكر في دم اللبائن (بشكل أساسي من خلال هرموني الأنسولين والكلوكاكون).
4- تنظيم الكلى لمستوى السوائل والايونات في الدم من خلال الطرح وإعادة الامتصاص.
5- زيادة معدل التنفس عند انخفاض محتوى الدم من الأوكسجين.
6- تنظيم ساعات النوم حسب حاجة الجسم وكذلك اعتماداً على النسق اليومي Circadian rhythm.
7- تنظيم ضغط الدم من خلال مستقبلات على الأوعية الدموية.

إن مكونات الاستتباب الثلاث كما ذكرنا أنفا هي الحساس، ويمثله في الخلية المستقبلات التي ترسل الإشارات إلى مركز السيطرة وهي الجينات على المستوى الخلوي، والجهاز العصبي المركزي والصماوي للبائن على مستوى الكائن الحي. ويرسل مركز السيطرة أوامر إلى المستجيبات Effectors التي يمكن أن تكون أي عضو من أعضاء الجسم أو أي عضية من عضيات الخلية. ويذكر أن عمليات الاستتباب لا يقتصر وجودها على الأنظمة البايولوجية، وربما منها أخذت الفكرة وطبقت في كثير من التقنيات الصناعية ومن الأمثلة على ذلك الثرموستات Thermostat حيث يطفئ ويعمل الجهاز (مثل الهيتر ومكيف الهواء) حسب درجة الحرارة المعينة، وكذلك الطيار الآلي Autopilot الذي يقوم بقيادة الطائرة أو السفينة حسب خارطة الطريق وتستجيب للتغيرات المحيطة، وهناك أمثلة أخرى كثيرة.

أهم المراجع :

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. **Molecular Biology of the Cell.** 6th Edition. (2015). Garland Science.

David L. Nelson and Michael M. Cox. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 6th Edition. **(**2012**).** W.H. Freeman.

Harvey Lodish , Arnold Berk , Chris A. Kaiser , Monty Krieger , Anthony Bretscher , Hidde Ploegh , Angelika Amon , Kelsey Martin. **Molecular Cell Biology.** 8th Edition. (2016). W. H. Freeman.

Keith Wilson and John Walker. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 6th edition. (2005). Cambridge University Press.

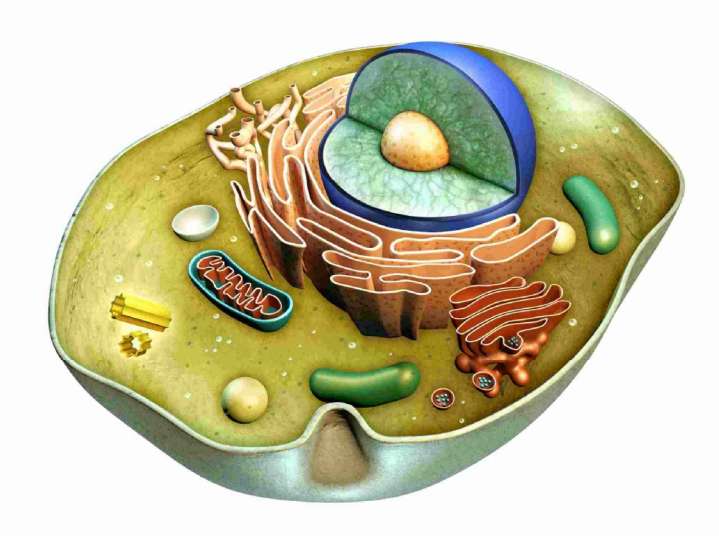
Lee Lerner and Brenda W. Lerner. **Gale Encyclopedia of Science.** 3rd Edition. (2004). Thomson and Gale.

Victor Rodwell, David Bender, Kathleen M. Botham , Peter J. Kennelly , P. Anthony Weil. **Harpers Illustrated Biochemistry.** 30th Edition. (2015). LANGE.

الفصل الثالث

عضيات الخلية

Cell Organelles



الفصل الثالث

عضيات الخلية
Cell Organelles

تعرف عضيات الخلية على أنها وحدات أو تراكيب خلوية متخصصة لها وظائف معينة، وسميت عضيات Organelles (مصغر عضو Organ) اعتقاداً بأنها أعضاء مكونة للخلية (كما أن الجسم يتكون من أعضاء مثل الكبد والكلى والقلب والدماغ...)، ويمكن مشاهدة بعض العضيات باستعمال المجهر الضوئي كما يمكن عزلها وتنقيتها بعملية تجزئة الخلية Cell fractionation.

وأهم عضيات الخلية هي :

1- النواة Nucleus

2- النوية Nucleolus

3- الرايبوسومات Ribosomes

4- الحويصلات Vesicles

5- الشبكة الاندوبلازمية الخشنة Rough endoplasmic reticulum

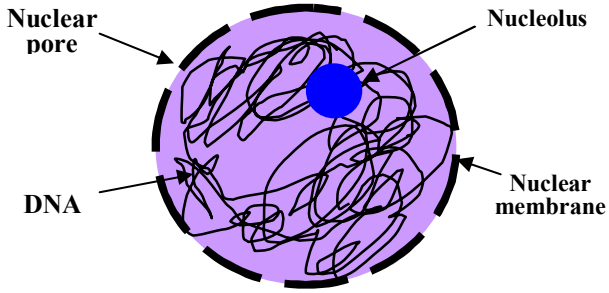
6- الشبكة الاندوبلازمية الملساء Smooth endoplasmic reticulum

7- جهاز (أو جسم) كولجي Golgi apparatus or body
8- الهيكل الخلوي Cytoskeleton
9- المايتوكوندريا Mitochondria
10- الفجوات Vacuoles
11- السايتوسول Cytosol
12- الجسيمات الحالة Lysosomes
13- الجسيمات المركزية Centrosomes
14- الغشاء الخلوي Cell membrane

النواة Nucleus :

هي العضية المركزية في الخلايا حقيقية النواة وتكون محاطة بغشاء (أو غلاف) نووي فيه ثقوب، وعادة تملك الخلية نواة واحدة ونادراً نواتين أو أكثر، أهم ما تحتويه النواة المادة الوراثية DNA التي تترتب مع البروتينات (الهستونات) مكونة الكروموسومات، كما تحوي النواة على هيكل نووي Nucleoskeleton (والتي تتكون من الصفيحات النووية Nuclear lamina) وتوفر دعم ميكانيكي للنواة وبذلك تشبه في الوظيفة الهيكل الخلوي.

أما الثقوب النووية Nuclear pores (الشكل 3-1) فتتكون من بروتينات تدعى Nucleoproteins وهناك حوالي 50– عدة مئات من أنواع البروتينات النووية (حسب نوع الكائن الحي)، ويكون حجم الثقوب النووية صغير جداً بحث يسمح بمرور جزيئات الماء والايونات ويمنع مرور الجزيئات الكبيرة مثل البروتينات والأحماض النووية (من والى النواة)، أما نقل الأحماض النووية (مثل RNA المراسل mRNA) من النواة إلى السايتوبلازم فيتم عن طريق النقل الفعال. ويقدر عدد الثقوب النووية في الخلايا الحيوانية بحدود 3000 ثقب. إن عمليات نقل البروتينات ووحدات الرايبوسومات وبعض جزيئات DNA من خلال الثقوب النووية يسيطر عليها عوامل نقل تدعى Karyopherins ومن هذه العوامل ما هو متخصص في إدخال الجزيئات الكبيرة إلى النواة وتدعى Importins والتي تخرج الجزيئات الكبيرة هي Exportins.



الشكل (3-1) مخطط توضيحي للنواة والنوية

فيما يخص الصفائح النووية فإنها تتكون من اللامين Lamin والذي يصنع في السايتوبلازم ثم ينقل إلى داخل النواة، كما أن الصفائح النووية تتواجد في الغلاف النووي في الجهة الملامسة للسايتوبلازم وبشكل Emerin (وهو بروتين صغير 29 كيلو دالتون ويتكون من 254 حامض أميني) و Nesprin (وهو مختصر لـ Nuclear envelope spectrin repeat proteins وهو بروتين يتواجد بشكل أساسي في الجزء الخارجي من الغلاف النووي)، يرتبط البروتينين أعلاه مع الهيكل الخلوي لتوفير الدعم الميكانيكي للنواة، كما يتواجد اللامين داخل البروتوبلازم النووي Nucleoplasm مكوناً مادة تعرف بستارة البروتوبلازم النووي Nucleoplasmic veil ولا تعرف وظيفتها بالضبط لكنها تظهر واضحة خلال الطور البيني Interphase للانقسام الخلوي.

النوية Nucleolus :

هو تركيب منفصل كثيف يوجد داخل النواة ولا يحاط بأي غشاء (لذلك يدعى أحياناً تحت عضي Suborganelle) ويكون من القطع المكررة من DNA والتي تدعى Tandem repeats وكذلك DNA المشفرة لتكوين rRNA ويدعى هذا الجزء بالجزء المنظم للنوية Nucleolar organizer region (NOR).

الوظيفة الأساسية للنوية هو تصنيع rRNA وتجميع الرايبوسومات، تحت المجهر الالكتروني يمكن تمييز ثلاث مناطق أو طبقات للنوية وهي: المركز الليفي Fibrillar center (FC) (وهو الأكثر تواجداً في الداخل) ويحاط بمكون ليفي كثيف Dense fibrillar components (DFC) وهذا الجزء يحاط بمكون Granular components (GC).

إضافة إلى النوية فإن النواة تحوي على أجسام مبعثرة أهمها :

1- **أجسام كاجال Cajal bodies**: وتتكون من 1-10 تراكيب صلدة تدعى أجسام كاجال أو الأجسام الملتوية Coiled bodies ويتراوح حجمها بين 0.2 – 2 مايكرون حسب نوع الخلية والكائن، وتتكون من بروتين كثيف يدعى كويلين Coilin. وتقوم هذه الأجسام بالعديد من الوظائف الحيوية التي تخص معاملة RNA وخاصة عملية نضج RNA النوية الصغير (snoRNA) و RNA النواة الصغير (snRNA) والتحويرات على الهستونات مع mRNA. وهناك أجسام أخرى تدعى جيميني Gemini أو Gem وهي مشابهة جداً لأجسام كاجال في الشكل والحجم مع بعض الاختلافات في الوظيفة.

2- **أجسام RAFA**: وظيفتها غير واضحة لكنها ترتبط بوظيفة عوامل الاستنساخ من نوع PTF الذي يشجع استنساخ RNA النواة الصغير snRNA.

3- **أجسام PML**: وهي مختصر ابيضاض (سرطان) الدم من نوع الخلايا سليفة النقوية Promyelocytic leukemia bodies (PML) وهي أجسام كروية توجد مبعثرة في المادة النووية بحجم 0.1 – 1 مايكرون كما تعرف بأسماء أخرى Nuclear domain 10 (ND10) أو أجسام كريمر Kremer bodies، تساهم هذه الأجسام في العديد من وظائف النواة ومنها تضاغف DNA والاستنساخ والتصميت فوق الجيني Epigenetic silencing.

الرايبوسومات Ribosomes :

هي عضيات كبيرة ومعقدة تعمل كمصنع للبروتينات (تتم فيها عملية الترجمة Translation) حيث تقوم بربط الأحماض الأمينية مع بعضها بأصرة ببتيدية وبتسلسلات معينة اعتماداً على قراءة الشفرة الوراثية الموجودة على جزيئة mRNA. أكتشفت الرايبوسومات في منتصف الخمسينات من القرن العشرين من قبل عالم الخلية الروماني George Palade باستعمال المجهر الالكتروني.

ويتواجد الرايبوسوم في جميع الخلايا الحية وهو المسئول عن تصنيع البروتين. ويتكون الرايبوسوم عادة من بروتينات و RNA من نوع rRNA، ويتكون الرايبوسوم عادة من

جزأين هما الوحدة الكبيرة Large subunit والوحدة الصغيرة Small subunit والاختلاف بينهما في الحجم.

في الكائنات بدائية النواة يتكون الرايبوسوم من 65٪ من rRNA و35٪ من البروتينات وحجمه 20 نانومتر وهناك سلسلة واحدة أو سلسلتان من rRNA. أما في الكائنات حقيقة النواة فحجمه بحدود 25 – 30 نانومتر ونسبة rRNA والبروتينات متساوية تقريباً (50٪ لكل منها) ويتكون rRNA من سلسلة واحدة أو ثلاث سلاسل كبيرة الحجم.

ويقاس حجم الريبوسوم عادة بوحدة سفيدبيرك Svedberg (رمزها S أو Sv) وهي وحدة معدل الترسب، سميت بهذا الاسم نسبة إلى العالم السويدي Theodor Svedberg، ووحدة سفيدبيرك تقيس عادة معدل الترسب أو الزمن اللازم (وليس الحجم) كي تصل الجزيئة إلى قعر أنبوبة الاختبار خلال عملية النبذ المركزي Centrifugation.

يكون الرايبوسوم في الكائنات بدائية النواة 70S ويتكون من وحدة كبيرة 50S ووحدة صغير 30S، الوحدة الصغيرة تملك rRNA هو 16S (يتكون من 1540 نيوكليوتيد) و 21 بروتين، أما الوحدة الكبيرة لها اثنان من rRNA هما 5S (يتكون من 120 نيوكليوتيد) و 23S (يتكون من 2900 نيوكليوتيد) و 31 بروتين.

بينما في الكائنات حقيقية النواة يكون الرايبوسوم 80S الوحدة الكبيرة 40S والوحدة الصغيرة 60S، وتتكون كل واحدة من :

40S..... 18S rRNA (1900 نيوكليوتيد)

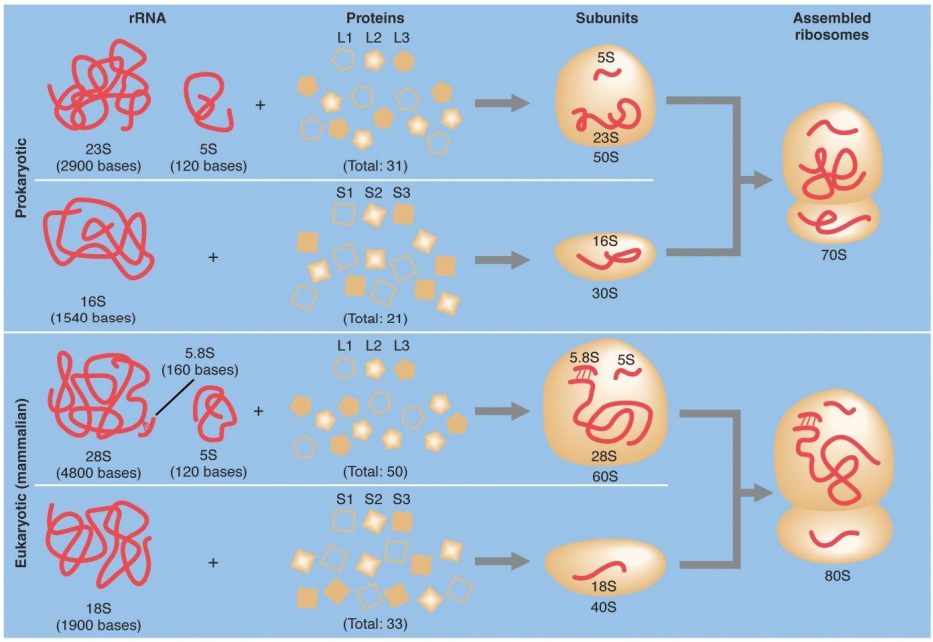
33 بروتين

60S..... 5S rRNA (120 نيوكليوتيد)

28S rRNA (2700 نيوكليوتيد)

5.8S rRNA (160 نيوكليوتيد)

46 بروتين



الشكل (2-3) تركيب ومكونات الرايبوسومات في بدائية وحقيقية النواة

فضلاً عن تواجد الرايبوسومات في سايتوبلازم الخلايا فانها تتواجد أيضاً في البلاستيدات الخضر Chloroplast والمايتوكوندريا ويكون حجمها حوالي 70S ويعد ذلك أحد الأدلة التي يستند إليها من ذهب من العلماء إلى أن هذه العضيات (البلاستيدات الخضر والمايتوكوندريا) هي بقايا بكتريا أثرية (نظرية الاندوسيمبيوتيك Endosymbiotic theory وهي نظرية تطورية تذهب إلى أن أصل الكائنات حقيقية النواة هي الكائنات بدائية النواة).

إن معظم الوظائف التحفيزية للرايبوسومات تقوم بها جزيئات RNA أما البروتينات فتكون إلى الخارج وتعمل على ثبات تركيب الرايبوسوم.

وتجدر الإشارة هنا إلى أن علماء الأدوية استفادوا من الاختلاف في حجم الرايبوسومات بين الكائنات بدائية النواة (مثل البكتريا) والكائنات حقيقية النواة (مثل النباتات والحيوانات) حيث تعمل المضادات الحيوية Antibiotics على قتل أو تثبيط نمو البكتريا دون إحداث "أضرار" على الخلية الحيوانية أو النباتية حيث تكون الرايبوسومات من نوع 70S حساسة لهذه المضادات الحيوية ومن هذه المضادات: الأمينوكلايكوسيدات

Aminoglycosides (مثل الستربتومايسين والنيومايسين والكاناماسين) والتتراسايكلينات Teteracyclines (مثل التتراسايكلين والدوكسيسايكلين والأوكسيتتراسايكلين) والماكرولايدز Macrolides (مثل الارثرومايسين والازثرومايسين والكلاريثرومايسين) والكلارامفينيكول Chloramphenicol، بينما لايتأثر 80S بهذه المضادات الحيوية، وقد يتباذر إلى الذهن سؤال حول رايبوسومات المايتوكوندريا التي هي أيضاً 70S، ولكن المضادات الحيوية تفشل في الوصول إلى داخل المايتوكوندريا لكونها مغلفة بغشاء ثنائي تمنع دخول المضادات الحيوية.

أما تفاصيل وظيفة الرايبوسومات في صنع البروتين وكيفية قراءة الشفرة الوراثية وربط الأحماض الأمينية مع بعضها بتسلسلات معينة اعتماداً على الشفرة الوراثية وكيف تبدأ سلسلة صنع البروتين وكيف تنتهي... كل ذلك سيتم شرحه بالتفصيل في فصل لاحق ضمن موضوع تصنيع البروتين.

من جهة أخرى هناك نوعان من الرايبوسومات في الخلية هما الرايبوسومات الحرة والرايبوسومات المرتبطة بالأغشية، والفرق بين النوعين في التوزيع المكاني فقط، مع عدم وجود فرق في التركيب. حيث يكون الرايبوسوم المرتبط مرتبطاً بأغشية الشبكة الاندوبلازمية عند عملية تصنيع بروتين معين، بينما نفس الرايبوسوم يكون حراً في السايتوبلازم عند تصنيع بروتين أخر وهكذا. ويمكن للرايبوسوم الحر الحركة لأي جزء من السايتوسول لكنها تبتعد عادةً عن النواة والعضيات الأخرى.

عندما تقوم الرايبوسومات بصنع بروتينات تحتاجها بعض العضيات داخل الخلية، يمكن لهذه الرايبوسومات أن تغلف بغشاء ويحدث ذلك في الخلايا حقيقية النواة في منطقة من الشبكة الاندوبلازمية التي تدعى بالشبكة الاندوبلازمية الخشنة Rough endoplasmic reticulum (RER) وهنا يتم إدخال البروتين المصنع إلى داخل الشبكة الاندوبلازمية ثم يتم نقلها إلى وجهتها النهائية خلال مسار إفرازي Secretary pathway، كما أن الرايبوسومات المرتبطة بالشبكة الاندوبلازمية تصنع البروتينات التي تستعمل من قبل الغشاء الخلوي أو التي تطرح خارج الخلية.

أما تصنيع الرايبوسومات نفسها فيتم في النواة (وبالتحديد في النوية) والسايتوبلازم

وتتضمن العملية تعاون وتكامل لعمل أكثر من 200 بروتين و 4 من rRNA، هذا في الخلايا حقيقية النواة، أما في البكتريا فالعملية أبسط من ذلك وتحصل في السايتوبلازم من خلال مشغلات (اوبرونات) جينات الرايبوسوم المتعددMultiple ribosome gene operons.

الحويصلات Vesicles :

هي تراكيب مكونة من غشاء ثنائي الشحوم تحيط بسوائل، يمكن أن تتكون الحويصلات خلال الأفراز الخلوي Exocytosis، الالتهام الخلوي Phagocytosis أو Endocytosis أو الشرب الخلوي Pinocytosis، وكذلك خلال نقل السوائل ضمن السايتوبلازم، وهناك حويصلات يتم تصنيعها في المختبر لغرض إدخال المواد (عادة جينات أو أجزاء من الحامض النووي) إلى داخل الخلايا تدعى الأجسام الشحمية Liposomes.

تقوم الحويصلات بالعديد من الوظائف فهي تدخل في عمليات الأيض، النقل، خزن الإنزيمات، ووظائف أخرى، مع الإشارة إلى أن السوائل داخل الحويصلات يختلف تركيبها وصفاتها عن السايتوبلازم لكونها معزولة عن السايتوبلازم بغشاء شحمي ثنائي. وجدير بالذكر أن هناك العديد من الحويصلات داخل الخلايا ومنها :

1- **الفجوات**: وهي حويصلات تحوي الماء وتتواجد داخل الخلايا النباتية بشكل فجوة مركزية كبيرة Large central vacuole (LCV) ووظيفتها التنظيم الأزموزي وخزن الأغذية، ونوع أخر يوجد في الأوالي Protozoa يدعى الفجوات المتقلصة.

2- **اللايسوسومات** Lysosomes: وهي حويصلات كروية تحوي إنزيمات محللة Hydrolytic enzymes (أكثر من 50 نوع من الأنزيمات) تعمل عند pH مثالي هو 4.5 قادرة على تحطيم جميع الجزيئات الحيوية مثل البروتينات والكاربوهيدرات والشحوم والأحماض النووية وكذلك بقايا الخلاياCell debris والجزيئات الخارج خلوية (مثل الفيروسات والبكتريا).

وتسمى اللايسوسومات أحياناً بالجهاز الهضمي للخلية، حيث تقوم بتجزئة المواد الغذائية إلى مواد أولية يسهل استعمالها من قبل الخلية، كما تقوم بتحطيم العضيات المعطوبة أو التالفة بعملية تدعى الالتهام الخلوي Autophagy. وتتواجد اللايسوسومات في معظم

الخلايا الحيوانية عدا كريات الدم الحمر وبعض أنواع الخلايا الأخرى. فضلاً عن ما سبق فإن للايسوسومات وظائف حيوية مهمة أخرى، فهي تساهم في عمليات الاستتباب الخلوي لدورها في عمليات الإفراز، وإصلاح أذى الغشاء الخلوي، مسارات الإشارات الخلوية، أيض الطاقة في الحالات الطبيعية والمرضية.

ويطلق بعض علماء الحياة تسمية حقائب أو أكياس الانتحار Suicide bags or suicide sacs على اللايسوسومات لدورها الكبير في التحلل الذاتي للخلية Autolysis. ويحمي الغشاء المحيط باللايسوسوم مكونات الخلية من التحلل حيث يمنع تماسها المباشر مع الإنزيمات الحالّة، وهناك آلية حماية أخرى من خطر الاتزيمات الحالة وهي أن pH السايتوسول يكون متعادل أو قريب إلى القاعدية وهو 7.2 حيث يكون هذا الوسط غير ملائم لعمل الانزيمات الحالّة التي تحتاج إلى وسط حامضي كي تكون فعالة.

ويحافظ اللايسوسوم على حامضية الوسط من خلال ضخ البروتون (H+) من السايتوسول إلى الداخل من خلال غشاء اللايسوسوم وعن طريق مضخات البروتون Proton pumps وقنوات أيون الكلوريد Chloride ion channels، حيث يكون معقد+ATPase-H الحويصلي مسئولا عن نقل البروتونات وبذلك يبقى الوسط داخل اللايسوسوم حامضي، وتدعى عملية احتفاظ اللايسوسوم بالوسط الحامضي بانتحاء اللايسوسوم Lysosomotropism أو صيد الحامض Acid trapping حيث يقدر تركيز الحامض داخل اللايسوسوم بـ 100– 1000 مرة أكثر من تركيزه في الخارج.

وتتكون الإنزيمات الحالّة للايسوسومات في الشبكة الاندوبلازمية الخشنة (RER) ثم تحرر الانزيمات من جهاز كولجي على شكل حويصلات صغيرة وفي النهاية تتحد مع حويصلات حامضية تدعى الاندوسومات Endosomes مكونة اللايسوسومات ويذكر أن الإنزيمات المصنعة للايسوسومات تعلّم بجزيئة مانوز 6 فوسفات Mannose-6-phosphate لتمييزها عن الجزيئات الأخرى.

وتصنيع الإنزيمات الحالّة للايسوسومات يسيطر عليها مجموعة من الجينات النووية، وحدوث طفرات في هذه الجينات يؤدي إلى مجموعة من الأمراض (أكثر من 30 مرض في الإنسان) تدعى هذه الأمراض مجتمعةً بأمراض خزن اللايسوسوم Lysosomal storage

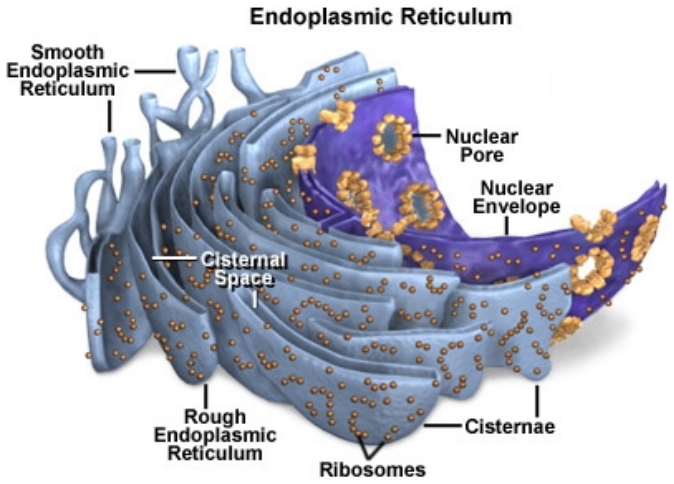
diseases (LSD) وتصنف من ضمن الاضطرابات الأيضية الولادية Inborn errors of metabolism. كما أن طفرات هذه الجينات تكون مرتبطة بشكل أو بآخر بالعديد من الأمراض الشائعة مثل الاضطرابات التنكسية العصبية Neurodegenerative disorders، السرطانات، الأمراض القلبية الوعائية، والأمراض المرافقة للشيخوخة وغيرها.

3- **الحويصلات الناقلة** Transport vesicles: تقوم بنقل الجزيئات بين مواقع متعددة داخل الخلية مثل نقل البروتينات من الشبكة الاندوبلازمية الخشنة (RER) إلى جهاز كولجي، وكذلك نقل البروتينات المخصصة للإفراز خارج الخلية.

4- **الحويصلات الإفرازية**: وتحوي على مواد يراد إفرازها خارج الخلية إما لكون هذه المواد فضلات خلوية يجب التخلص منها أو هي مواد كيميائية متخصصة مثل الهرمونات أو النواقل العصبية Neurotransmitters، حيث تكون هذه الخلية متخصصة بتصنيع وإفراز هذه المواد حسب الحاجة، ومن الأمثلة الأخرى الحويصلات التي تحوي الإنزيمات اللازمة لبناء جدار الخلية (للنباتات والفطريات والبكتريا) أو لبناء القالب الخارج خلوي Extracellular matrix (ECM) للخلايا الحيوانية، الحويصلات الخارج خلوية أو تدعى حويصلات القالب Matrix vesicles لها دور فعّال في تمعدن القالب Matrix mineralization في أنسجة العظام والغضاريف ومادة السنين Dentin. وهناك أنواع أخرى من الحويصلات منها الحويصلات الغازية التي تستعمل من قبل بعض الكائنات (مثل الأحياء المجهرية) للحركة وتحديد الاتجاهات.

الشبكة الاندوبلازمية Endoplasmic reticulum :

أحد عضيات الخلية حقيقية النواة (عدا كريات الدم الحمر والنطف فإنها تفقد الشبكة الاندوبلازمية) وهي عبارة عن شبكة من الأغشية التي تدعى الصهاريج Cisternae (تشبه الكيس) وتوجد في السايتوبلازم وتدعم من قبل هيكل الخلية، وتقوم بوظائف متعددة حسب نوع ووظيفة الخلية، وهناك نوعان من الشبكة الاندوبلازمية هما الخشنة والملساء (الشكل3-3).



الشكل (3-3) الشبكة الاندوبلازمية الخشنة والملساء

الشبكة الاندوبلازمية الخشنة Rough endoplasmic reticulum :

وتدعى أيضاً Ergastoplasm، وسمي خشناً لوجود الرايبوسومات على جداره مما يعطيه مظهراً خشناً، ويرتبط الرايبوسوم مع الشبكة الاندوبلازمية في مواقع متخصصة تدعى Translocon لكونها تقوم بوظيفة تغيير الموقع Translocation لمتعدد الببتيد الذي يحمل الإشارة الهدف إلى داخل (الصهريج أو التجويف) الشبكة الاندوبلازمية من السايتويول. ويتكون هذا التركيب المعقد (الرايبوسوم – الشبكة الاندوبلازمية) عندما يتطلب الأمر بتصنيع معقد بروتين – حامض نووي في السايتوسول، حيث تبدأ أولاً الرايبوسومات الحرة غير المرتبطة بالشبكة الاندوبلازمية بترجمة mRNA، وتشفر أولاً التسلسلات (5 – 30 نيوكليوتيد) لتصنيع ببتيد إشارة Signal peptide وهي رسالة جزيئية يتم التعرف عليها والارتباط معها من قبل جسيمات التعرف على الإشارات Signal recognition particles (SRP) عندها تتوقف الترجمة ثم يرتبط ويتكون معقد الرايبوسوم – الشبكة الاندوبلازمية عند الموقع Translocon عندها تبدأ الترجمة ثانيةً مكونة البروتين وباتجاه تجويف الشبكة الاندوبلازمية حيث تعامل في التجويف من قبل إنزيمات متخصصة (ببتايديز الإشارة Signal peptidase) والذي يقوم بإزالة ببتيد الإشارة، عندها يمكن أن تعود الرايبوسومات

إلى السايتوسول، أما الرايبوسومات التي لا تدخل في عملية الترجمة فتبقى مرتبطة بمواقع Translocons.

وبالرغم من عدم وجود ارتباط غشائي مباشر بين الشبكة الاندوبلازمية وجهاز كولجي، الا أن هناك حويصلات مرتبطة بالغشاء تنقل البروتينات بين الشبكة الاندوبلازمية وجهاز كولجي باستمرار وبالاتجاهين، وتحاط هذه الحويصلات ببروتينات مغلفة تسمى COPI و COPII والتسمية جاءت من البروتين المغلف Coat protein، حيث يقوم COPI بالسيطرة على نقل البروتينات من جهاز كولجي باتجاه الشبكة الاندوبلازمية، أما COPII فتقوم بالسيطرة على نقل البروتينات من الشبكة الاندوبلازمية باتجاه جهاز كولجي، ويتعاون كل من الشبكة الاندوبلازمية وجهاز كولجي في تحديد الوجهة النهائية للبروتين المصنع حديثاً. هناك طريقة أخرى لنقل البروتين وتدعى مواقع تماس الأغشية Membrane contact sites (MCS) حيث تكون أغشية الشبكة الاندوبلازمية وأغشية العضيات الأخرى قريبة جداً من بعضها مما يسمح بانتقال الشحوم وجزيئات أخرى.

فضلاً عن ما ذكر، تقوم الشبكة الاندوبلازمية بالعديد من الوظائف منها طي أو ثني جزيئات البروتينات Protein folding في أكياس أو صهاريج، وعملية طي البروتين المصنع حديثاً يتم من خلال البروتينات المرافقة أو الرقيبة (الجابيرون) Chaperons ومن هذه البروتينات انزيم Protein disulfide isomerase (PDI) و ERp29 و Hsp70 و Clanexin و Clareticulin. ويذكر أن البروتينات التي يتم طيها بشكل صحيح فقط هي التي تنقل من الشبكة الاندوبلازمية إلى جهاز كولجي، وهناك بعض الحالات غير السوية مثل اضطرابات توازن الأكسدة والاختزال و أيض الكالسيوم، استنفاذ الكلوكوز، الاصابة الفيروسية، زيادة تعبير بعض البروتينات، كل ذلك يمكن أن يؤدي إلى بطئ عملية طي البروتينات وتعرف الحالة باستجابة إجهاد الشبكة الاندوبلازمية (ER stress) مما يؤدي إلى زيادة مستوى البروتينات غير المطوية، وهذا النوع من الإجهاد يحدث في كثير من الحالات مثل داء السكري و نقص التروية Ischemia ونقص التأكسج Hypoxia.

وهناك وظائف أخرى للشبكة الاندوبلازمية الخشنة نذكر منها :

- تصنيع إنزيمات اللايسوسوم وتعليمها بالمانوز – 6 – فوسفات.
- تصنيع البروتينات الإفرازية.
- تصنيع البروتينات التي تبقى مطمورة في الغشاء كالحويصلات ومن الأمثلة عليها بروتينات Rab والتي تعد بروتينات مفتاحية للتعرف على الأغشية وتنتمي لمجموعة بروتينات Ras superfamily of monomeric G proteins وهناك حوالي 70 نوع من بروتينات Rab المسجلة لحد الآن في الإنسان.

الشبكة الاندوبلازمية الملساء Smooth endoplasmic reticulum(SER) :

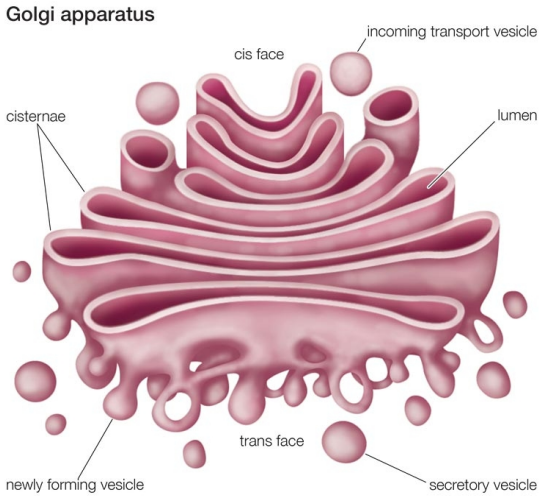
وتقوم الشبكة الاندوبلازمية الملساء بالعديد من الوظائف الحيوية والأيضية ومنها تصنيع الشحوم والشحوم الفوسفاتية Phospholipids وأيض الستيرويدات، وأيض الكاربوهيدرات، إزالة سمية بعض الأدوية، ربط المستقبلات مع بعض بروتينات الغشاء الخلوي، وتمتاز الخلايا المسؤولة عن تصنيع وإفراز هذه المركبات (مثل خلايا الخصى، المبيض، الغدد الزهمية Sebaceous glands) بأنها تمتلك كميات كبيرة من الشبكة الاندوبلازمية الملساء. كما تحوي الشبكة الاندوبلازمية الملساء على انزيم كلوكوز–6– فوسفاتيز الذي يحول الكلوكوز–6– فوسفات إلى كلوكوز (وهي أحد خطوات تصنيع الكلوكوز من مكونات غير كاربوهيدراتية بعملية Gluconeogenesis).

ويذكر أن الشبكة الاندوبلازمية الملساء في الخلايا العضلية تدعى بالشبكة الساركوبلازمية Sarcoplasmic reticulum (SR) ووظيفتها خزن أيونات الكالسيوم وضخها إلى الساركوبلازم (السايتوبلازم العضلي) عندما يتحفز الليف العضلي ويتداخل أيون الكالسيوم مع بروتينات متخصصة (التي تستعمل ATP) لتقليص الليف العضلي.

جهاز كولجي Golgi apparatus :

ويسمى أحياناً جسم كولجي Golgi body أو معقد كولجي Golgi complex نسبة إلى مكتشفه العالم الألماني Camillo Golgi عام 1898. يوجد جهاز كولجي في الخلايا حقيقية

النواة ويختلف شكله بين الأنواع المختلفة وهو عموماً يتكون من سلسلة من الحجرات ويمكن تقسيمها إلى ثلاث أجزاء هي القريبة من الشبكة الاندوبلازمية وتدعى Cis Golgi network (CGN) وشبكة Trans Golgi network (TGN) وبينهما الصهاريج (الوسطية)، وتعد CGN عبارة عن صهاريج أو بروزات تنشأ من الحويصلات المتبرعمة من الشبكة الاندوبلازمية. أما TGN فهي عبارة عن تراكيب نهائية تحوي البروتينات التي تم رزمها كي تتوجه إلى اللايسوسومات، أو كحويصلات إفرازية، أو إلى سطح الخلية (الشكل3-4). تملك خلايا اللبائن جهاز كولجي واحد يقع بالقرب من النواة والجسيم المركزي Centrosome، وفي الخلايا النباتية لا يقع جهاز كولجي قرب الجسيم المركزي، بينما في الخمائر هناك العديد من أجهزة كولجي التي تتواجد مبعثرة داخل الخلية.



الشكل (3-4) جهاز كولجي

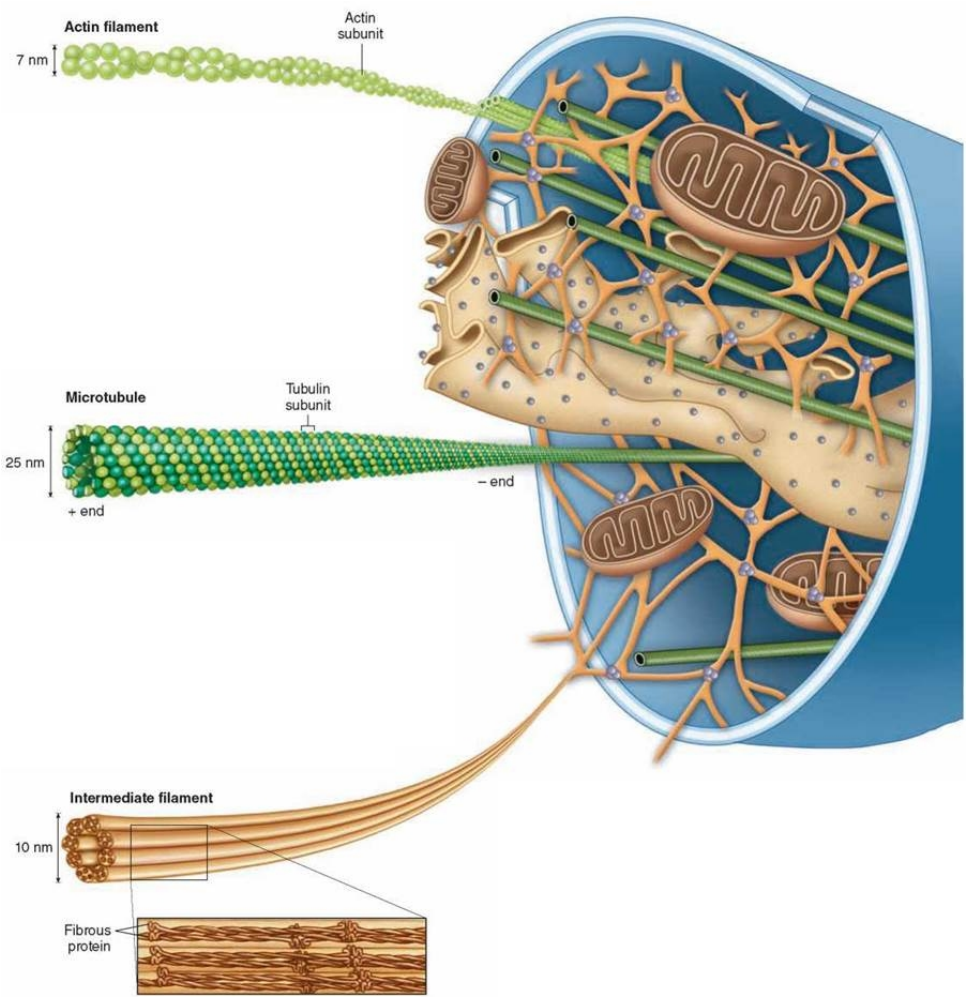
ويكون جهاز كولجي كبير الحجم في الخلايا التي تصنع وتفرز كميات كبيرة من المواد مثل خلايا بلازما B المصنعة للأجسام المضادة. ويذكر أن هناك عدة فرضيات (أكثر من خمس فرضيات) لكيفية قيام جهاز كولجي باستقبال ونقل البروتينات. إن جهاز كولجي يملك إنزيمات تساهم في انجاز وظائفه وتقع هذه الأنزيمات بالقرب من سطح هذا الجهاز (عكس

ما كان في الشبكة الاندوبلازمية حيث كانت الإنزيمات الوظيفية باتجاه التجويف). معظم هذه الإنزيمات في جهاز كولجي تقوم بوظيفة تحوير البروتين ما بعد الترجمة Post-translation modification (PTM) of protein ومن هذه التحويرات فسفرة السكريات القليلة لبروتينات اللايسوسوم في CGN، إضافة الكالاكتوز وحامض السياليك Sialic acid، إضافة السلفات Sulfation للتايروسين وللكاربوهيدرات، وكذلك إضافة الكاربوهيدرات Glycosylation والفوسفات Phosphation للبروتينات ضمن عملية PTM. وأخيراً يقوم جهاز كولجي بتصنيع Proteoglycans وهي بروتينات مرتبطة مع Glycosaminoglycans وهي جزيئات سكر متعددة غير متفرعة تتواجد في القالب خارج الخلية للأنسجة الحيوانية.

الهيكل الخلوي Cytoskeleton :

جميع الخلايا الحية حقيقية وبدائية النواة تملك هيكل خلوي، وهناك اختلافات كبيرة في التركيب والوظيفة اعتماداً على نوع الكائن الحي ونوع الخلية، وعموماً فإن الهيكل الخلوي للخلايا الحيوانية يتكون من ثلاث أجزاء هي الخيوط الدقيقة Microfilaments (والتي تتكون من بروتين الأكتين Actin) والنبيبات الدقيقة Microtubules (وتتكون من بروتين التيوبيولين Tubulin) والخيوط الوسطية Intermediate filaments (ولها حوالي 70 نوع من البروتينات التركيبية) (الشكل3-5). ويقوم الهيكل الخلوي بالعديد من الوظائف منها :

1- تعطي للخلية الشكل والدعم الميكانيكي وبذلك تحافظ (بالتعاون مع القالب الخارج خلوي) على ثبات النسج ككل.
2- يمكن للهيكل الخلوي أن يتقلص وينبسط وبذلك يساهم في حركة الخلية.
3- يساهم في العديد من مسارات الإشارات الخلوية.
4- وكذلك المساهمة في التهام المواد من خارج الخلية Endocytosois.
5- وتساعد في عملية عزل الكروموسومات خلال الانقسام الخلوي.
6- وتساهم في عملية انقسام الخلية الأم إلى خليتين بنويتين بعملية Cytokinesis.



الشكل (3-5) أهم أنواع الهيكل الخلوي

7- كما تساعد في عملية نقل المواد داخل الخلية (حركة الحويصلات والعضيات داخل الخلية).

8- وتكون مسؤولة عن تكوين تراكيب خاصة مثل الأسواط Flagella والأهداب Cilia والأقدام الصفائحية Lamellipoda والجسيمات القدمية Podosomes.

الخيوط الدقيقة Microfilaments:

وهي أدق الخيوط في الهيكل الخلوي (قطرها بحدود 6 نانومتر) وتتكون من وحدات طويلة من أكتين جي G-actin، وتحافظ الخيوط الدقيقة على شكل الخلية، كما أن لها وظيفة أخرى (وخاصة في العضلات) حيث يكون مسار لحركة جزيئات المايوسين Myosin التي ترتبط مع الخيوط الدقيقة "وتمشي عليها" ويحدث ذلك في الألياف العضلية والخلايا الأخرى، وتتم السيطرة على تركيب الأكتين من خلال مجموعة بروتينات Rho protein family ومن البروتينات المرتبطة بـ GTP مثل Rho و Rac و Cdc42.

الخيوط الوسطية Intermediate filaments:

ويكون قطرها بحدود 10 نانومتر وتكون أكثر قوة وثباتاً من الخيوط الدقيقة، وتعمل أيضاً بالمحافظة على شكل الخلية "وتمسك" بالعضيات في مواقعها، كما تساهم في بعض الارتباطات بين خلية وأخرى وبين الخلية والقالب الخارج خلوي. وهناك أنواع مختلفة من الخيوط الوسطية :

1- الكيراتين Keratin: وتتواجد في الخلايا الظهارية.
2- الخيوط العصبية Neurofilaments: التي تتواجد في الخلايا العصبية.
3- اللامنين Laminin: وتقوم بتوفير الدعم التركيبي للغلاف النووي.
4- الدسمين Desmin: وتوفر الدعم التركيبي والميكانيكي للخلايا العضلية.
5- الفايمنتينات Vimentins: وتتواجد عموماً في الخلايا الميزنكيمية.

النبيبات الدقيقة Microtubules:

وهي عبارة عن اسطوانات مجوفة بقطر حوالي 23 نانومتر (قطر التجويف بحدود 15 نانومتر) ويتكون من عدة خيوط (عادةً 13 خيط) وهي عبارة عن بروتين Nubuline من نوع ألفا وبيتا، تتشكل هذه النبيبات الدقيقة بعدة أشكال منها تسعة ثلاثيات (بشكل نجمي) مكونةً Centrioles، أما عندما تكون بشكل تسعة ثنائيات (فضلاً عن نبيبين إضافيين) فتدعى 9+2، ويرتبط كل خيط مع الآخر بواسطة بروتين يدعى Dynein وهو بروتين حركي يحول الطاقة الكيمياوية ATP إلى طاقة ميكانيكية.

فضلاً عن ما ذكر فإن النبيبات الدقيقة لها وظائف أخرى منها :

1- النقل أو الحركة داخل الخلية (بالتعاون مع Dyneins و Kinesins).
2- تقوم بنقل العضيات (مثل المايتوكوندريا والحويصلات) من موقع لآخر داخل الخلية.
3- تكوين Axoneme للأهداب والأسواط.
4- تكوين مغزل الانقسام Mitotic spindles.

ويعد Kinesins بروتين حركي يتحرك "يمشي" فوق النبيبات الدقيقة ويأخذ الطاقة للحركة من تحلل ATP لذلك يعد من ضمن ATPase حيث يحتاج تحلل جزيئة ATP لكل خطوة يخطوها. ويساهم في حركته بوظائف مهمة للخلية مثل الانقسام الاختزالي Meiosis والانقسام الخيطي Mitosis، وكذلك توجيه الجزيئات الصغيرة مثل الغازات والكلوكوز وسط الزحام إلى جهتها (إلى عضية معينة مثلاً) بما يسمى بنقل الحمولة Cargo transport.

ومن البروتينات المرتبطة بالهيكل الخلوي بروتينات Septins، وهي مجموعة من البروتينات المرتبطة بـ GTP تتواجد في الخلايا حقيقية النواة (وأحياناً في الطحالب الخضراء) ولكن لا تتواجد في الخلايا الحيوانية. وتكون مع بعضها معقدات بشكل خيوط، حلقات، أو طبقات، وتعمل على تموضع بروتينات الخلية في أماكنها وتمنع عبور الجزيئات من جزء إلى آخر للمحافظة على مواقع الجزيئات داخل الخلية، كما تساهم في تموضع العمليات الخلوية مثل العمليات المرافقة للانقسام الخلوي، العمليات المرافقة لفعاليات الغشاء الخلوي، ومواقع اتصال الأهداب والأسواط بجسم الخلية.

دراسات حديثة في خلايا البشر تقترح أن بروتينات Septins تكون ما يشبه الأقفاص حول البكتريا المرضية وبذلك تحبسها في مكانها وتمنعها من مهاجمة الخلايا الأخرى.

الهيكل الخلوي في الكائنات بدائية النواة: ومن الأمثلة عليها :

1- FtsZ: أول بروتين تم التعرف عليه من ضمن الهيكل الخلوي للكائنات بدائية النواة، ويشبه Nubuline في كونه يتكون من خيوط بوجود GTP لكن هذه الخيوط لا تتجمع لتكون أنابيب، وخلال الانقسام الخلوي يعد FtsZ أول بروتين يتحرك إلى موقع الانقسام الخلوي ويكون المسئول عن جذب البروتينات الأخرى المسؤولة عن تصنيع

جدار الخلية بين الخليتين.

2- MreB: وهي بروتينات بكتيرية يعتقد أنها تكون بديلاً عن الأكتين في الكائنات الحقيقية النواة، ويلاحظ أن جميع البكتريا غير الاسطوانية الشكل تعتمد على MreB في تحديد شكلها، حيث ينشأ هذا البروتين شبكة من التراكيب الخيطية تحت الغشاء الخلوي مباشرة وتغطي جميع أجزاء الخلية، كما أن هذا البروتين يساهم في تحديد شكل الخلية البكتيرية من جانب آخر عن طريق تحديد موقع وفعالية الإنزيمات المسؤولة عن الببتيدات السكرية Peptidoglycan.

3- Crescentin: ويماثل الخيوط الوسطية للخلايا الحقيقية النواة، ويكون حجم هذه الخيوط بحدود 10 نانومتر ويمتد من طرف الخلية إلى طرفها الآخر ويعطي شكل للخلية حيث يعتقد أن MreB تكون مسؤولة عن الشكل العصوي للبكتريا بينما يقوم Crescentin بثني الشكل العصوي مكوناً الشكل الهلالي Crescent shape.

وهناك أنواع أخرى من مكونات الهيكل الخلوي للكائنات بدائية النواة منها ParM و SopA و Bactofilin و MinCDE system و Crenactin و WAKA (walker A cytoskeletal ATPase) proteins.

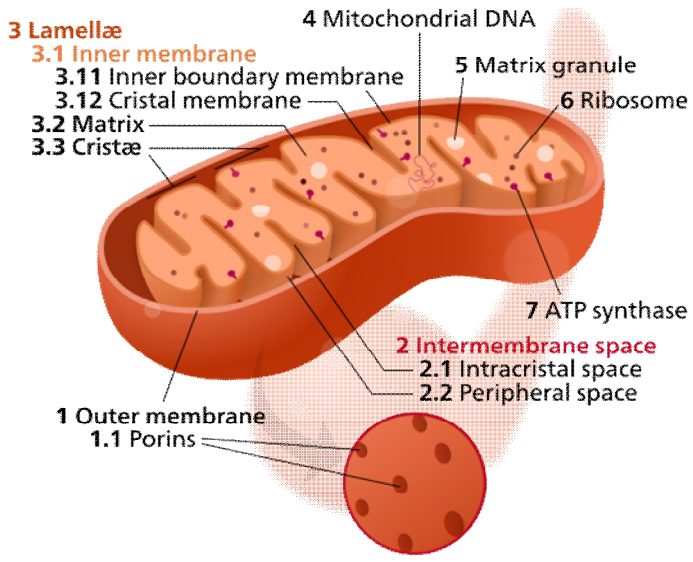
المايتوكوندريا Mitochondria :

من أهم عضيات الخلية بعد النواة ومن أكثرها تعقيداً وإثارة للجدل وتدعى ببيوت الطاقة للخلية Power house of the cell مفردها مايتوكوندريون Mitochondrion ولها العديد من الوظائف الحيوية (تم شرح بعضها عند الحديث عن الطاقة الحيوية)، ويبلغ طول المايتوكوندريا 0.5-1 مايكرون ويختلف تركيبه وحجمه من خلية لأخرى ومن كائن لآخر ويمكن رؤيته تحت المجهر باستعمال صبغات خاصة (مثل صبغة جاينز الخضراء Janus green B). ومن الصفات الفريدة للمايتوكوندريا هو المدى الواسع والمتنوع لوظائفها ولتواجدها في الخلية فمثلاً كريات الدم الحمر تفقد المايتوكوندريا بينما الخلايا الكبدية تمتلك أكثر من 2000 من المايتوكوندريا لكل خلية. وتتكون المايتوكوندريا من عدة حجرات أو أجزاء كل واحدة منها متخصصة بوظيفة معينة، وجدير بالذكر بأنه تم عزل أكثر من 600

بروتين من المايتوكوندريا لخلايا العضلة القلبية في الإنسان، وأكثر من 940 بروتين من مايتوكوندريا خلايا العضلة القلبية للجرذان. وتمتلك المايتوكوندريا جينوم خاص بها يكون مستقل عن النواة، ويشبه جينوم المايتوكوندريا إلى حد كبير جينوم البكتريا. يمكن تقسيم المايتوكوندريا من الناحية التركيبية إلى الأجزاء التالية :

الغشاء الخارجي External membrane:

ويغلف عضية المايتوكوندريا من الخارج بأكملها (كما في الشكل3-6) ويتكون من بروتين وشحوم فوسفاتية بنفس نسبة تواجدهما في الغشاء الخلوي (1: 1) وعلى هذا الغشاء كمية كبيرة من البروتينات التي تدعى Porins والتي تسمح بمرور الجزيئات التي حجمها أصغر من 5000 دالتون بسهولة من خلال الغشاء الخارجي من والى المايتوكوندريا. أما الجزيئات الأكبر حجماً إذا تطلب إدخالها إلى المايتوكوندريا، فيتم ربط تسلسلات الإشارة الخاصة بها مع النهاية N للبروتين الضخم متعدد الوحدات على الغشاء الخارجي للمايتوكوندريا ويدعى هذا البروتين بـ Translocase بعدها يتم إدخال الجزيئات الكبيرة بطريقة النقل الفعال.



الشكل (3-6) تركيب أجزاء المايتوكوندريا

فضلاً عن ذلك فإن للغشاء الخارجي للمايتوكوندريا العديد من الوظائف الحيوية الأخرى منها أنها تحوي على مجموعة كبيرة من الإنزيمات التي تؤدي العديد من الوظائف مثل استطالة الأحماض الدهنية، أكسدة الابنفرين، وتحطيم التربتوفان. إن وجود خلل في هذا الغشاء يؤدي إلى تسرب انزيمات معينة إلى السايتوسول مسببةً موت الخلية. كما يمكن لهذا الغشاء الارتباط بغشاء الشبكة الاندوبلازمية بواسطة تركيب يدعى Mitochondria associated ER-membrane (MAM) وهذا التركيب ضروري في إتمام مسار إشارات الكالسيوم، وكذلك يساهم في نقل الشحوم بين المايتوكوندريا والشبكة الاندوبلازمية. و إلى الخارج من الغشاء الخارجي للمايتوكوندريا هناك جسيمات دقيقة تدعى وحدات بارسون Parson.

الحيز بين الغشائين Intermembrane space:

وهو ذلك الحيز أو الفراغ الموجود بين الغشاء الخارجي والداخلي، ويكون تركيز الجزيئات الصغيرة مثل السكر والأيونات في هذا الحيز مشابه لما موجود في السايتوسول لكون الغشاء الخارجي نفاذ للجزيئات الصغيرة، أما أهم وظائف هذا الحيز فهو احتواءه على السايتوكروم Cytochrome C وهو عبارة عن بروتين هيمي Hemeprotein (يحوي الحديد في تركيبه) صغير الحجم ويقوم بوظيفة سلسلة نقل الإلكترون، كما يساهم في موت الخلية المبرمج Apoptosis، حيث عند تحرر Cytochrome C إلى السايتوبلازم يرتبط السايتوكروم مع عامل البروتيز المنشط لموت الخلية المبرمج Apoptotic protease activity factor-1 (Apof-1) وسيتم شرح ذلك بالتفصيل في فصل لاحق عند الحديث عن موت الخلية المبرمج.

الغشاء الداخلي Inner membrane:

ويحوي أكثر من 150 نوع من البروتينات وفيه نسبة البروتين: الشحوم الفوسفاتية عالي (1: 3) كوزن أي ما يعادل بروتين واحد لكل 15 شحم فوسفاتي، ويشكل الغشاء الداخلي خمس بروتينات المايتوكوندريا. وعلى العكس من الغشاء الخارجي، فإن الغشاء الداخلي لا يحوي بروتينات Porins وتكون غير نفاذة لكل الجزيئات كي تعبر باتجاه القالب أو الخروج منه، أما البروتينات فتدخل باتجاه القالب من خلال معقدات الغشاء الداخلي المسماة

Translocases of inner membrane (TIM) أو معقد Oxa1، فضلاً عن وجود جهد غشاء Membrane potential بفعل سلسلة نقل الإلكترون.

وهناك شحم فوسفاتي نادر الوجود يدعى Cardiolipin ويوجد فقط في الغشاء الداخلي للمايتوكوندريا وفي الغشاء الخلوي لمعظم البكتريا، ويتكون هذا الشحم الفوسفاتي من أربعة أحماض دهنية ويساهم في جعل الغشاء الداخلي غير نفاذ.

الأعراف Cristae:

وهي امتدادات للغشاء الداخلي باتجاه الداخل وتعمل على زيادة المساحة السطحية للغشاء الداخلي، فمثلا في مايتوكوندريا خلايا كبد الجرذان المساحة السطحية للغشاء الداخلي أكثر بخمس مرات من المساحة السطحية للغشاء الخارجي، وتختلف هذه النسبة بين أنواع الخلايا المختلفة وحسب حاجة الخلية إلى الطاقة (ATP) ففي الخلايا العضلية تكون النسبة عالية وهكذا...

الأعراف عادة تكون مرصعة بأجسام كروية تعرف بـ F1 particles أو تسمى Oxysome أو ATP synthase وتستعمل هذه الجسيمات جهد الغشاء الناتج من نقل البروتون بتصنيع ATP. فضلاً عن ما ذكر عن وظائف الغشاء الداخلي فإن بروتينات هذا الغشاء تقوم بوظائف حيوية مهمة منها :

1- تفاعلات الأكسدة والاختزال والفسفرة التأكسدية.
2- تصنيع ATP.
3- بروتينات متخصصة في النقل الذي ينظم مرور المواد الأيضية من والى القالب.
4- مصنع تصدير البروتينات.
5- بروتينات انقسام واندماج المايتوكوندريا.

القالب Matrix:

وهو الحيز الذي يغلف من قبل الغشاء الداخلي ويحوي ثلثي بروتين المايتوكوندريا الكلي، ويساهم القالب في تصنيع ATP، كما يحوي القالب على تراكيز عالية من مئات الإنزيمات (وظيفتها الأساسية أكسدة البايروفيت والأحماض الدهنية والمساهمة في دورة كريبس).

فضلاً عن كل ما ذكر سابقاً من وظائف فإن للمايتوكوندريا وظائف أخرى كثيرة ومنوعة منها :

1- المساهمة في الإشارات الخلوية من خلال أصناف الأوكسجين الفعال.
2- تنظيم جهد الغشاء.
3- المساهمة في موت الخلية المبرمج.
4- تنظيم إشارات الكالسيوم (ومنها موت الخلية المبرمج المحدث بالكالسيوم).
5- تنظيم الأيض الخلوي.
6- تجري فيها بعض تفاعلات صنع أنواع من الهيم Heme.
7- تصنيع الستيرويدات.
8- الإشارات الهرمونية، حيث تكون المايتوكوندريا حساسة وتستجيب للهرمونات مثل مستقبلات المايتوكوندريا للاستروجين (mtERs).
9- بعض الخلايا تمتلك فيها المايتوكوندريا وظائف متخصصة مثل مايتوكوندريا الخلايا الكبدية تملك إنزيمات لها القدرة على إزالة سمية الأمونيا Ammonia detoxification.
10- تنظيم الانقسام الخلوي من خلال إنتاج ATP، حيث يحتاج الانقسام الخلوي إلى كميات هائلة من ATP، وخاصة الخلايا السرطانية لأنها تعاني من الانقسامات السريعة، لذلك اتجه عدد من الباحثين إلى تنظيم إنتاج ATP كأحد محاولات السيطرة على الخلايا السرطانية.

يكون جينوم المايتوكوندريا مسئولا عن تصنيع البروتينات و RNAs الخاصة بالمايتوكوندريا، فمثلاً في الإنسان يتكون جينوم المايتوكوندريا من 16569 زوج من القواعد تشفر لـ 37 جين. وسيتم التطرق إلى جينوم المايتوكوندريا بالتفصيل في فصل لاحق.

عند تكاثر الخلايا تنقسم المايتوكوندريا بطريقة الانشطار الثنائي Binary fission (وتشبه بذلك البكتريا). وفي خلايا اللبائن تقوم المايتوكوندريا بمضاعفة DNA الخاصة بها وتنقسم اعتماداً على حاجة الخلية من الطاقة بغض النظر عما إذا كانت الخلية في انقسام خلوي أم لا، حيث عندما تكون الخلية بحاجة إلى طاقة كبيرة تعاني المايتوكوندريا من انقسامات

ونمو، وعندما تقل الحاجة للطاقة يتم التخلص من المايتوكوندريا الزائدة، أو تبقى بدون فعالية.

ومن الحقائق العلمية المثيرة للجدل حول المايتوكوندريا، أن جينات المايتوكوندريا تأتي من الأم فقط ولا تتوارث مثل جينات النواة، حيث من الثابت أن جينات النواة تأتي من الأبوين (الأب والأم) أما جينات المايتوكوندريا فتأتي من الأم فقط، فمثلاً في الإنسان عندما تلقح البيضة بالنطفة فإن جينات كل واحدة منها تشارك في تكوبن جينوم الفرد الجديد وبشكل متساوي تقريباً بين البيضة والنطفة، أما في حالة المايتوكوندريا فإن جيناتها تأتي من البيضة فقط، بينما مايتوكوندريا النطفة فهي تدخل داخل البيضة لكنها لا تساهم أبداً في جينات المايتوكوندريا، ويتم ذلك من خلال تعليم مايتوكوندريا النطفة بواسطة اليوبكويتين Ubiquitin، وهو بروتين تنظيمي صغير 8.5 كيلو دالتون، ويتواجد في جميع خلايا الكائنات حقيقية النواة (ومنها جاءت التسمية Ubiquitously أي شائع) ويضاف هذا البروتين إلى البروتين المصنع حديثاً لينظم عمله، عموماً فإن المايتوكوندريا القادمة من الأب (النطفة) يتم تحطيمها داخل البيضة المخصبة بعد تعليمها باليوبكويتين، أما البيضة فتكون فيها المايتوكوندريا قليلة العدد لكنها تعاني انقسامات ونمو لتشكل كل مايتوكوندريا الفرد الجديد، وتعرف العملية بالتوارث الأمي Maternal inheritance (عكسها التوارث الأبوي Paternal inheritance) ويلاحظ التوارث الأمي للمايتوكوندريا في معظم الكائنات ومنها الحيوانات، أما في الكائنات التي يكون فيها توارث المايتوكوندريا أبوياً فيكون معدل عمر هذه الكائنات قليلاً، وهذا يدعم ما ذهب إليه بعض العلماء من أن إناث الحيوانات (والإنسان) لها معدل عمر أكثر من الذكور، وربما يكون أحد أسباب ذلك هو بقاء جينات المايتوكوندريا محافظة على نفسها عند الانتقال من جيل إلى آخر حيث لا يحصل لها إعادة توزيع كما يحدث مع جينات النواة.

وأخيراً فإن هناك مجموعة كبيرة من الأمراض التي تحدث بسبب وجود خلل في المايتوكوندريا، وكما ذكر سابقاً فإن المدى الواسع للوظائف التي تقوم بها المايتوكوندريا تجعل تعرضها للأذى سبباً في الكثير من الاضطرابات والأمراض التي تصيب الكائن الحي، ومن هذه الأمراض وجود طفرات في جينات المايتوكوندريا تنتقل من الأم إلى الجنين مثلاً في

الإنسان متلازمة كيرانز-ساير Kerans-Sayre syndrome ومتلازمة ميلز MEALS syndrome ومتلازمة بيرسون Pearson syndrome. وهناك أمراض أخرى تشارك فيها الطفرات الجينية مع العوامل البيئية مثل التعرض للمبيدات الحشرية ومرض باركنسون Parkinson disease (PD).

وبشكل عام هناك مجموعة واسعة من الأمراض الشائعة التي يعتقد أنها ترتبط بوجود خلل في المايتوكوندريا ومن هذه الأمراض: داء السكري Diabetes mellitus (DM)، متلازمة الوهن المزمن Chronic fatigue syndrome (CFS)، الصرع Epilepsy، السكتة الدماغية Stroke، انفصام الشخصية Schizophrenia، مرض الزهايمر (الخرف) Alzheimer's disease، الأمراض القلبية الوعائية، العته Dementia وأمراض كثيرة أخرى. كما أن هناك أدلة تدعم رأي من ذهب من العلماء إلى مساهمة المايتوكوندريا في الشيخوخة، حيث يعتقد أن تسرب الالكترونات من سلسلة نقل الإلكترون في المايتوكوندريا يسبب توليد أصناف الأوكسجين الفعالة Reactive oxygen species (ROS) مما يسبب الإجهاد التأكسدي Oxidative stress في المايتوكوندريا وبالتالي حدوث طفرات في DNA المايتوكوندريا (mtDNA)، حيث لوحظ أن المايتوكوندريا في الشيخوخة لها بروتينات (إنزيمات) أقل فعالية في السلسلة التنفسية، وهذا ما يذهب إليه أصحاب نظرية الشيخوخة بسبب الجذور الحرة للمايتوكوندريا Mitochondrial free radical theory of ageing.

السايتوسول Cytosol :

ويسمى أيضاً بالسائل الداخل خلوي Intracellular fluid (ICF) ويجب التفريق هنا عن السائل بين الخلوي Intercellular fluid الذي يتواجد بين الخلايا، ويشمل السايتوسول السائل الموجود داخل الخلية ويقسم إلى حجرات بواسطة الأغشية، و السايتوسول عبارة عن معقد من المواد الذائبة في الماء حيث يكون الماء الغالبية (حوالي 70٪) من الحجم الكلي للخلية، ومن أهم أيونات السايتوسول هي البوتاسيوم +K والصوديوم +Na والكلوريد -Cl والبيكاربونات -HCO3 والمغنسيوم Mg والكالسيوم +Ca2، ويذكر أن جهد الغشاء يتكون بفعل طرح أيون الصوديوم خارج الخلية وإدخال أيون البوتاسيوم من خلال معقد ATPase +Na+/ K، حيث يخرج أيون البوتاسيوم بفعل الفرق التركيزي من خلال قنوات الأيون،

ويؤدي فقدان الأيون الموجب إلى توليد جهد الغشاء السالب.

فضلاً عن ذلك فإن السايتوسول يحوي على جزيئات كبيرة ذائبة فيها (معظمها بروتينات، والتي تشكل 20–30٪ من حجم السايتوسول) وبكميات كبيرة مكونة ما يدعى بازدحام الجزيئات الكبيرة Macromolecular crowding.

في الكائنات بدائية النواة يحوي السايتوسول على الجينوم ضمن تركيب يعرف بالنيوكليويد Nucleoid. من جانب آخر يعد السايتوسول موقعاً للعديد من الوظائف الحيوية منها:

1- نقل الإشارات الخلوية من الغشاء الخلوي إلى النواة أو العضيات.
2- المساهمة في الانقسام الخلوي.
3- نقل المواد الأيضية من موقع التصنيع إلى موقع الاستعمال.
4- نقل المواد الكارهة للماء من خلال ربطها ببروتينات ناقلة متخصصة.
5- في الكائنات بدائية النواة تحدث معظم العمليات الأيضية في السايتوسول، وكذلك الكثير من العمليات الأيضية للكائنات حقيقة النواة.
6- من أهم العمليات الأيضية التي تحدث في سايتوسول الخلايا الحيوانية هو تصنيع البروتين، مسار البنتوز – فوسفات (PPP)، تحلل الكلوكوز Glycolysis، وتصنيع الكلوكوز من مواد غير كاربوهيدراتية Gluconeogenesis.

الجسيمات الحالة Lysosomes :

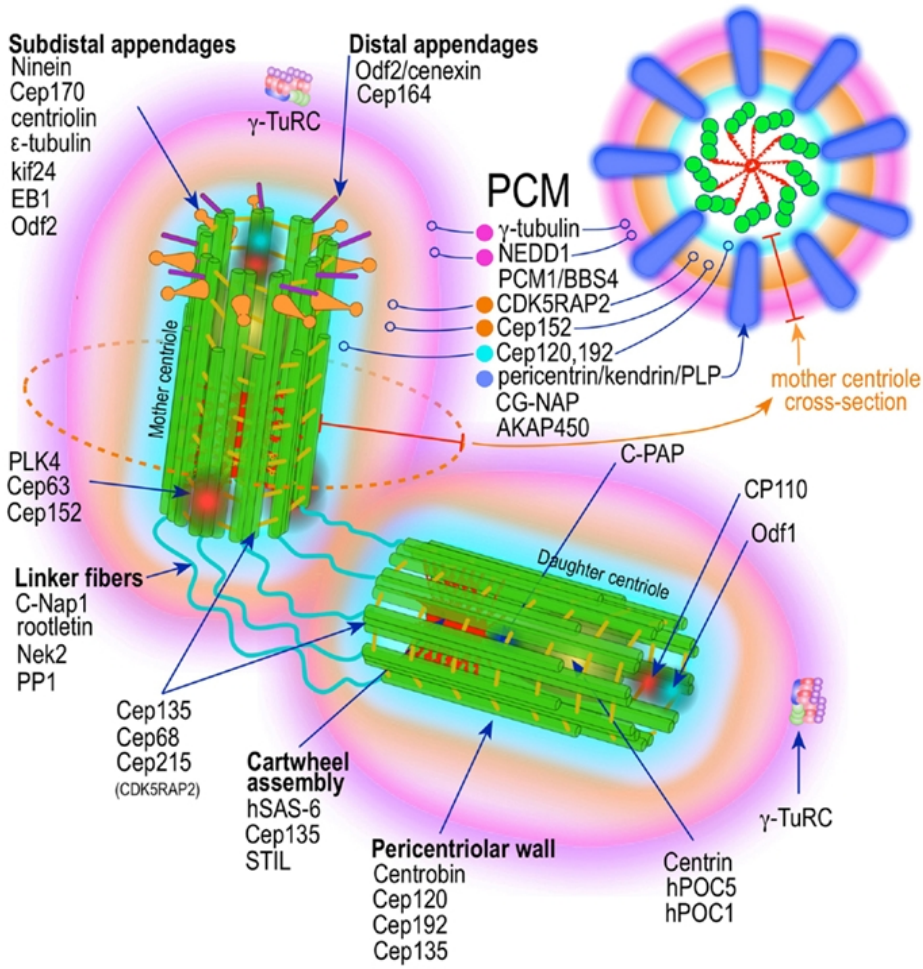
تم التطرق لها عند الحديث عن الحويصلات Vesicles.

الجسيمات المركزية Centrosome :

وهي العضية التي تعمل كمركز لتنظيم النبيبات الدقيقة Microtubule organizing center (MTOC) في الخلايا الحيوانية وكذلك تنظم دورة الخلية Cell cycle. ويتكون الجسيم المركزي من مريكزين Two centrioles متعامدين (أحدهما عمودي على الآخر) محاطين بكتلة عشوائية من البروتينات التي تدعى بالمادة حول المريكز Pericentriolar

material (PCM) وتحوي هذه المادة على بروتينات مسؤولة عن ترتيب النبيبات الدقيقة، (الشكل3-7) ومن هذه البروتينات :

1- كاما – تيوبيولين Gamma(γ)-tubuline: وهو جزء من مجموعة التيوبيولين ويكون مسؤول عن ترتيب اتجاه النبيبات الدقيقة كما يكون معقدات حلقية γ-tubulin ring complex (γ-TuRC).



الشكل (3-7) تركيب الجسيم المركزي

2- بيريسنترين Pericentrin (PCNT): ويدعى أيضاً Kendrin ويتموضع هذا البروتين في السنترومير ويوظف البروتينات إلى المادة حول المريكز (PCM) لضمان تكوين السنتروسوم والياف الانقسام الخلوي Mitotic spindle.

3- ناينين Ninein: وهو بروتين يعمل على تموضع ومسك النهايات السالبة للنبيبات الدقيقة في الخلايا الظهارية.

وبشكل عام فإن كل مريكز من الجسم المركزي يستند إلى تسعة ثلاثيات من النبيبات الدقيقة المجمعة مع بعضها بشكل يشبه العجلة الخشبية Cart wheel ويتكون من البروتينات التالية :

1- سنترين Centrin: يسمى أيضاً Caltractins وهو جزء من الفوسفوبروتينات المرتبطة بالكالسيوم ويتواجد في الجسيم المركزي للخلايا الحقيقية النواة. ويعد هذا البروتين ضروري لتضاعف المريكز، وربما يلعب دور في حركة النبيبات الدقيقة المعتمدة على الكالسيوم.

2- سينكسين Cenexin: ويعرف أيضاً بالبروتين الليفي الخارجي الكثيف Outer dense fiber protein 2 (ODF2) وهو بروتين يحيط بـ Axoneme في القطعة الوسطية والاساسية لذيل النطفة.

3- تكتين Tektin: بروتين يتواجد في الأهداب والأسواط كجزء تركيبي من ضمن النبيبات الدقيقة الخارجية المزدوجة، كما يتواجد هذا البروتين في الجسيم المركزي والأجسام القاعدية، ويعد ضرورياً لتكامل وظيفة النبيبات الدقيقة، وسيتم الحديث بالتفصيل أكثر عن وظائف الجسيم المركزي في فصل دورة الخلية.

الغشاء الخلوي Cell membrane :

ويسمى أيضاً الغشاء البلازمي أو الغشاء السايتوبلازمي، وهو غشاء حيوي يفصل مكونات الخلية عن بيئتها الخارجية، ويكون نفاذ اختياري للأيونات والجزيئات العضوية وبذلك يسيطر على حركتها من والى الخلية.

يلاحظ أن بعض أنواع الخلايا بدائية النواة لها غشاء خلوي فقط أو لها غشاء خلوي

محاط بغشاء خارجي ويفصل بينهما ما يعرف بـ Periplasm (كما في البكتريا السالبة لصبغة كرام) ويكون هذا الغشاء الخارجي غني بالسكريات المعقدة الشحمية Lipopolysaccharides وبذلك تختلف عن الغشاء الخلوي للأحياء المجهرية الأخرى. أو أن لها غشاء خلوي وجدار خلية مكون من السكريات الببتيدية Peptidoglycans (سكريات مع أحماض أمينية)، كما أن بعض الخلايا حقيقية النواة لها جدار خلوي كما في النباتات ولكن لا تحوي أبداً السكريات الببتيدية.

وبشكل عام فإن الغشاء الخلوي يتكون من شحوم ثنائية الطبقة Lipid bilayer حيث تترتب بشكل رأس وذيل، الرأس يكون محباً للماء Hydrophilic ويكون باتجاه داخل وخارج الخلية، أما الذيل فيكون نافراً من الماء Hydrophobic ويكون إلى الداخل (الشكل3-8).

التركيب الكيميائي للغشاء الخلوي :

1- **الشحوم**: ويتكون من ثلاث أنواع وهي الشحوم الفوسفاتية Phospholipids، الشحوم السكرية Glycolipids، الستيرولات Sterols ونسبة كل نوع تكون متغيرة اعتماداً على نوع الخلية. وعموماً فإن الأحماض الدهنية في الغشاء الخلوي تتكون من عدد زوجي even number من الكاربون (وخاصة 16 و 18) ويمكن أن تكون مشبعة أو غير مشبعة ويساهم ذلك في تنظيم مدى "سيولة" الغشاء الخلوي، وفي الخلايا الحيوانية تتواجد جزيئات الكولستيرول في الغشاء موزعة (ولكن بدرجات مختلفة ونمط متنوع حسب نوع الخلية) بين الذيول المحبة للماء حيث تعطي صلابة وقوة للغشاء الخلوي (الشكل3-8).

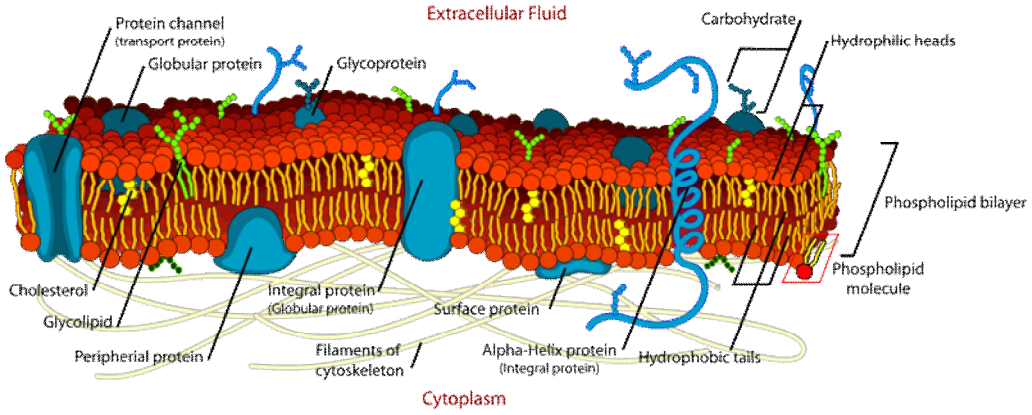
2- **الكاربوهيدرات**: وتتواجد بشكل بروتينات سكرية Glycoproteins والقليل من الشحوم السكرية Glycolipids و Cerebrosides و Gangliosides. وعادة يكون الجزء السكري إلى خارج الغشاء الخلوي ومن السكريات المهمة هو Glycocalyx وهو عبارة عن معقد من بروتينات سكرية مع متعدد السكر Glycoprotein-polysaccharide، ويحيط بالغشاء الخلوي لبعض البكتريا وبعض الخلايا الحيوانية (مثل الخلايا الظهارية)، وتكون بشكل يشبه الشعر المحيط بالخلية، كما أن Glycocalyx يعد ضرورياً في عملية تحديد هوية الخلية وللتمييز بين الخلية الأصلية والغريبة (الدخيلة

أو المهاجمة مثل الأحياء المجهرية) وبين السليمة والمريضة أو المنقولة (المزروعة) Transplant cells.

3- **البروتين**: ويشكل البروتين حوالي نصف حجم الغشاء الخلوي، ويقوم بوظائف حيوية مهمة مثل الإشارات بين الخلايا، وتعمل كمستقبلات أو مستضدات Antigens، وكذلك نقل الإشارات الخلوية إلى داخل الخلية، ونقل المواد خلال الغشاء الخلوي والعديد من الوظائف المهمة الأخرى، وأهم أنواع بروتينات الغشاء الخلوي هي :

- **البروتينات خلال الغشاء الخلوي** Transmembrane proteins: ومن أمثلتها قنوات الأيونات، مضخات البروتين Protein pumps، المستقبلات المزدوجة مع البروتين جي (GPCR) G protein couple receptor.
- البروتينات المثبتة للشحوم ومن أمثلتها G protein.
- البروتينات الطرفية مثل بعض الإنزيمات والهرمونات.

وتكون الشحوم ثنائية الطبقة غير نفاذة للأيونات والجزيئات القطبية (الأحماض الأمينية، الأحماض النووية، الكاربوهيدرات، البروتينات، الأيونات) وبذلك تمنع نفوذها من خلال الغشاء الخلوي.

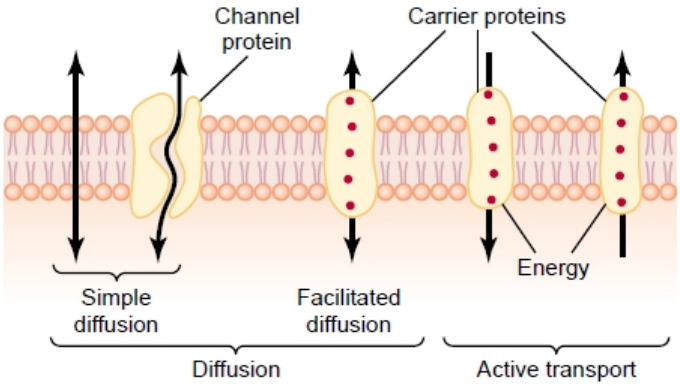


الشكل (8-3) تركيب الغشاء الخلوي المثالي في الخلية الحيوانية

وهناك نظرية أخرى لتركيب الغشاء الخلوي هو النموذج الموزائيكي السائل Fluid mosaic model وهو النموذج الذي اقترح من قبل Singer و Niclson عام 1972، وملخصها أن هناك ما يشبه الجبال الجليدية Iceberg من البروتينات التي تكون مغمورة وتسبح في الشحوم الفوسفاتية، ويعمل الكولستيرول على تحوير سيولة Fluidity الغشاء الخلوي، وان درجة سيولة الغشاء يؤثر بشكل مباشر على وظيفته، فكلما زادت السيولة تزداد نفوذية الغشاء للماء والجزيئات الصغيرة المحبة للماء.

فضلاً عن ما ذكر هناك وظائف مختلفة للغشاء الخلوي ومن هذه الوظائف ما يخص نقل المواد عبر الغشاء الخلوي (الشكل 3-9) وهي :

- **الانتشار** Diffusion: وتعني حركة الجزيئات خلال الغشاء الخلوي من منطقة التركيز العالي إلى منطقة التركيز الواطئ، وعموماً فإن جميع الجزيئات والأيونات في سوائل الجسم بضمنها جزيئات الماء والمواد الذائبة والأوكسجين وثاني أوكسيد الكاربون، تتحرك كل واحدة بطريقة معينة عبر الاغشية الخلوية، ويمكن أن يكون الانتشار بسيط أو ميسر، والانتشار البسيط يمكن أن يكون بعبور المواد خلال الغشاء الخلوي بوجود ناقل (قنوات بروتينية دون الحاجة إلى الطاقة) أو عدم وجود ناقل وذلك من خلال الثقوب والفراغات في الغشاء الخلوي.
- **الترشيح** Filtration: وهي العملية التي من خلالها يجبر السائل على الحركة خلال الغشاء الخلوي استجابة لوجود فرق في الضغط بين جانبي الغشاء.
- الأوزموزية Osmosis: حركة جزيئات الماء خلال الغشاء بفعل وجود اختلاف في التركيز بين جانبي الغشاء.
- **النقل الفعال** Active transport: نقل المواد عبر الغشاء الخلوي بوجود بروتينات ناقلة (مضخات بروتينية) من منطقة التركيز الواطئ إلى منطقة التركيز العالي، وتحتاج العملية إلى طاقة (عادة ATP) لكونها عكس التدرج التركيزي.



الشكل (3-9) أشكال انتقال المواد عبر الغشاء الخلوي

ويعد الغشاء الخلوي تركيب ديناميكي معقد دائم التغير في الشكل والتركيب حسب الوظائف التي يؤديها فضلاً عن وجود تراكيب مهمة ضمن هذا الغشاء ومن هذه التراكيب :

1- الكهيفات Caveola: (مصغر كهف Cave) وهو تركيب شحمي متخصص على شكل انبعاج للغشاء الخلوي يوجد في العديد من خلايا الفقريات مثل الخلايا البطانية Endothelial cells والخلايا الدهنية. وتكوّن شكل يشبه القمع وهي غنية بالبروتينات والشحوم (مثل الكولسترول) والشحوم الأسفنجية Sphigolipids، وللكهيفات العديد من الوظائف الحيوية مثل نقل الإشارات الخلوية، الالتهام الخلوي، التهام البكتريا المرضية وبعض أنواع الفايروسات، ونشوء بعض الاورام.

2- تكثف ما بعد الاشتباك Postsynaptic density (PSD): وهو بروتين متخصص بالارتباط مع الغشاء الخلوي ما بعد الاشتباك ويساهم في نقل الإشارات والايعازات العصبية في منطقة الاشتباك.

3- الجسيم القدمي Podosome: عبارة عن تركيب قمعي غني بالأكتين يوجد على الجزء الخارجي من الغشاء الخلوي للخلايا الحيوانية ودورها الأساسي في الحركة والغزو الخلوي (التحرك باتجاه القالب الخارج خلوي ECM) لذلك تعد مواقع لارتباط وتحطيم القالب الخارج خلوي كما في الخلايا السرطانية، والخلايا الهادمة للعظم

Osteoclasts، والخلايا العضلية الملساء للأوعية الدموية، والخلايا البطانية، وكذلك بعض الخلايا المناعية مثل البلاعم الكبيرة Macrophages.

4- الأقدام الغازية Invadopodium: وهي بروزات من غشاء الخلية غنية بالأكتين تعمل على تحطيم ECM في الغزو السرطاني، وتشبه كثيراً الجسيم القدمي، ويمكن أن تستعمل كعلامة للغزو السرطاني.

5- الالتصاقات البؤرية Focal adhesion (FAs): وهي بروتينات معقدة (أكثر من 100 نوع من البروتينات) مما يدل على المدى الواسع من الوظائف التي يقوم بها هذا التركيب. وتدعى أيضاً التصاقات الخلية – القالب (Cell-matrix adhesions) وتعمل كموقع ربط ميكانيكي وكذلك لنقل الإشارات بين الخلية والقالب ECM.

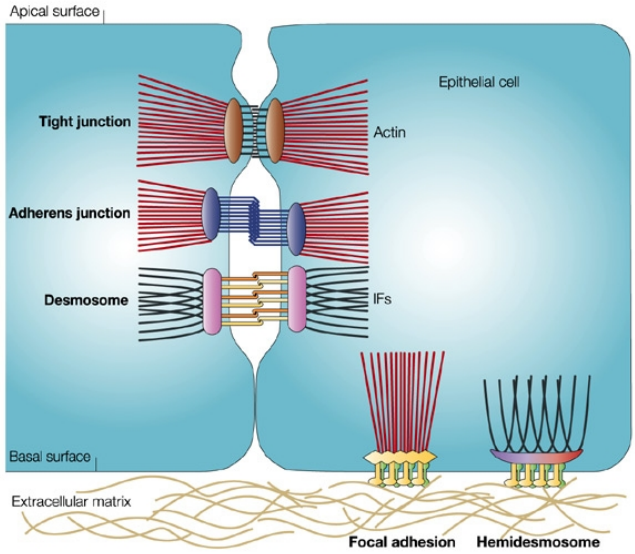
6- الارتباطات الخلوية Cell junctions: وتسمى أحياناً بالجسور بين الخلايا Intercellular bridge ويتواجد في بعض الكائنات متعددة الخلايا مثل الخلايا الحيوانية، وهي معقدات (بروتينية عادةً) توفر الارتباط بين الخلايا وكذلك بين الخلية والقالب ECM وتكون بعدة أنواع منها (الشكل 3-10) :

(أ) **ارتباطات الالتصاق Adherence junctions**: وتشمل Desmosomes (وتعمل على ربط الخلية مع الخلايا الأخرى) وترتبط مع Cadherine. و Hemidesmosomes (وتعمل على ربط الخلية مع القالب ECM) وترتبط مع Integrins. وتؤدي ارتباطات الالتصاق العديد من الوظائف منها :

- تقوم بمسك الخلايا العضلية القلبية مع بعضها وذلك ضروري لسلامة هذه الخلايا خلال عمليات الانقباض والانبساط للعضلة القلبية.
- تشد الخلايا الظهارية مع بعضها.
- يعتقد أنها تقوم بوظيفة التثبيط التلامسي Contact inhibition بين الخلايا.
- بعض ارتباطات الالتصاق تتواجد بشكل أشرطة رفيعة تعمل على ربط الخلايا المتجاورة مع بعضها.
- البعض الآخر منها توجد بشكل بقع تعمل على ربط الخلايا ضمن النسج.

(ب) ارتباطات الفجوة Gap junctions: وتقوم بوظيفة الاتصالات ونقل المعلومات الكيميائية، ويتكون من 6 بروتينات من نوع Connexin وتتفاعل لتكون اسطوانة لها تجويف مركزي وتبرز من غشاء الخلية، وعندما يلتقي هذا التركيب من خلية مع تركيب مماثل للخلية المجاورة يكونان قناة ارتباط ويلعب ذلك دور مهم في نقل المواد والاشارات بين الخلايا دون ملامسة القالب ECM.

(ج) الارتباطات المحكمة Tight junctions: ويتواجد في النسج الظهاري للفقريات وتعمل كحاجز لتنظيم حركة الماء والسوائل الأخرى بين طبقات الظهارة.



الشكل (3-10) أنواع الارتباطات الخلوية.

جزيئات الأرتباط الخلوي Cell junction molecules :

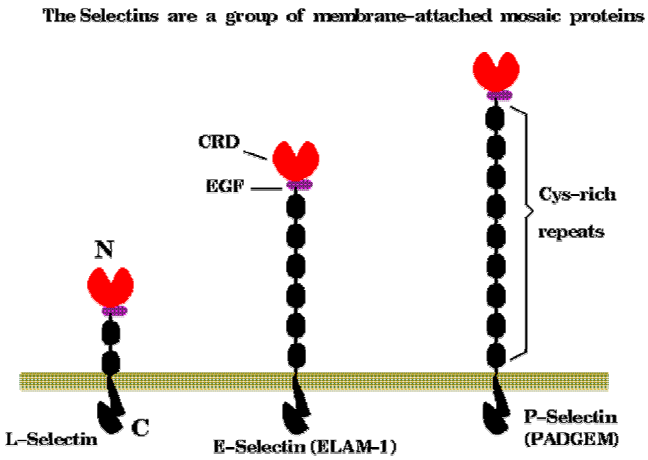
أولا: السليكتين Selectns (CD64):

وهي مجموعة من جزيئات الالتصاق الخلوي Cell adhesion molecules (CAM) وجميعها عبارة عن سلسلة مفردة من البروتينات السكرية Glycoproteins ولها تركيب كيمياوي معقد وتعتمد على ارتباط الكالسيوم بها، وهناك ثلاث أنواع من السليكتين (الشكل 3-11) وهي :

E-selectin ويتواجد في الخلايا البطانية Endothelial cells.

L-selectin ويتواجد في الخلايا اللمفية Lymphocyte.

P-selectin ويتواجد في الصفيحات الدموية Platelets والخلايا البطانية.



الشكل (3-11) أنواع وتركيب السيلكتين

ثانيا: الكادهيرينات Cadherins:

والتسمية مختصر للالتصاقات المعتمدة على الكالسيوم Calcium-dependent adhesion، وتصنع كمتعدد ببتيد ثم تعاني تغيرات ما بعد الترجمة (PTM) كي تكتسب وظيفتها في ربط الخلايا مع بعضها وكذلك التعارف بين الخلايا، وهناك أنواع عديدة جداً من الكادهيرينات وتقسم إلى :

1- الكادهيرين التقليدي Classical cadherins: وتشمل كل من :

- E-cadherin (CDH1) ويتواجد في الأنسجة الظهارية.
- N-cadherin (CDH2) ويتواجد في الأنسجة العصبية.
- P-cadherin (CDH3) ويتواجد في أنسجة المشيمة.
- Cadherin 12 (CDH12).

2- الدسموسومال Desmosomal ويشمل :

- Desmoglein وله أربع أنواع DSG1-4.
- Desmocollin وله ثلاث أنواع DSC1-3.

3- بروتوكادهيرين Protocadherin وله أكثر من 70 نوع.

4- الكادهيرين غير الاعتيادية Unconventional cadherins وله أكثر من 50 نوع.

وأخيراً هناك اعتقاد بأن الكادهيرين ربما يكون مرتبط مع الهيكل الخلوي عن طريق بروتين يدعى الكاتنين Catenins.

ثالثاً: الانتكرين Integrins: هي مستقبلات على عرض الغشاء الخلوي وتعمل كجسور بين الخلايا وبين الخلية والقالب ECM وتساهم في تنظيم العديد من الفعاليات الحيوية ومنها دورة الخلية، شكل الخلية، حركة الخلية، واضافة مستقبلات جديدة إلى الغشاء الخلوي. ويعمل الانتكرين كمستقبل للعديد من الليكاندات Ligands مثل الكولاجين Collagen، اللامنين Laminin، الفايبرونكتين Fibronectin، والفيترونكتين Vitronectin.

يتكون الانتكرين من سلسلتين مختلفتين هما وحدة ألفا و وحدة بيتا، وفي اللبائن هناك 18 وحدة ألفا و8 وحدات ألفا، وهناك حوالي 16 نوع من الانتكرين في الفقريات تختلف في نوع السلسلة ألفا ونوع السلسلة بيتا وكذلك في موقع تواجدها داخل الجسم.

رابعاً: مجموعة الكلوبيولينات المناعية Immunoglobulin superfamily (IgSF): مجموعة كبيرة من بروتينات سطح الخلية والبروتينات الذائبة والتي تساهم في تعرف وارتباط والتصاق الخلايا، وهذه المجموعة غير مرتبطة بالكالسيوم. وسميت بهذا الأسم لمشاركتها مظاهر تركيبية مماثلة للأجسام المضادة Antibodies (الكلوبيولينات المناعية Ig).

بسبب اختلاف تركيب البروتين والشحوم للغشاء الخلوي حسب نوع الخلايا ووظائفها لذلك يأخذ الغشاء الخلوي تسميات متعددة مثل :

- الساركوليما Sarcolemma في الخلايا العضلية.
- الأووليما Oolemma في خلية البيضة.
- الأكسوليما Axolemma في البروزات العصبية (المحور Axon).

أهم المراجع :

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de-Bruijn MH, Coulson AR, et al. (1981). **"Sequence and organization of the human mitochondrial genome".** *Nature.* **290** (5806): 427–465.

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. **Molecular Biology of the Cell.** 6th Edition. (2015). Pub. Garland Science.

Cech T (2000). **"Structural biology. The ribosome is a ribozyme".** *Science.* **289** (5481): 878–9.

Czernilofsky, A; Collatz, E; Stöffler, G; Küchler, E (1974).**"Proteins at transfer-RNA binding-sites of escherichia coli ribosomes"**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. *Nat. Acad Sciences*. **71** (1): 230–234.

David L. Nelson and Michael M. Cox. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 6th Edition. **(**2012**).** Pub. W.H. Freeman.

Day KJ, Staehelin LA, Glick BS (2013). **"A three-stage model of Golgi structure and function."**. *Histochem Cell Biol.* **140** (3): 239–49.

Doherty GJ, McMahon HT (2008). **"Mediation, Modulation and Consequences of Membrane-Cytoskeleton Interactions".** *Ann Rev Biophysics.* **37**: 65–95.

Fletcher DA, Mullins RD (2010). **"Cell mechanics and the cytoskeleton".** *Nature.* **463** (7280): 485–92.

Gray MW, Burger G, Lang BF (1999). **"Mitochondrial evolution"**. *Science.***283** (5407): 1476–81.

Jesse Gray; Shana Groeschler; Tony Le; Zara Gonzalez (2002). **"Membrane Structure"**. Davidson College. Retrieved 2007-01-11.

Korostelev A, Trakhanov S, Laurberg M, Noller HF (2006). **"Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements"**. *Cell.* **126** (6): 1065–77.

McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2006). **"Mitochondria: more than just a powerhouse"**. *Curr. Biol.* **16** (14): R551–60.

Michael H. Ross and Wojciech Pawlina. **Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology.** 7th ed. (2015). LWW. Wolters Kluwer Health.

Mitra K, Schaffitzel C, Shaikh T, et al. (2005).**"Structure of the E. coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome".** *Nature.* **438** (7066): 318–24.

Palade GE (1955). **"A small particulate component of the cytoplasm".** *J Biophys Biochem Cytol.* **1** (1): 59–68.

Rappaport L, Oliviero P, Samuel JL (1998). **"Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function".** *Mol and Cell Biochem.* **184**: 101–105.

Schapira AH (2006). **"Mitochondrial disease"**. *Lancet.* **368** (9529): 70–82.

Selmer M, Dunham CM, Murphy FV, et al. (2006). **"Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA"**. *Science.* **313** (5795): 1935–42.

Shih YL, Rothfield L (2006). **"The bacterial cytoskeleton"**. *Microb Mol Bio Rev.* **70** (3): 729–54.

Singer SJ, Nicolson GL (1972). **"The fluid mosaic model of the structure of cell membranes"**. Science. **175** (4023): 720–31.

Suda Y, Nakano A (2012). **"The yeast Golgi apparatus"**. *Traffic.* **13** (4): 505–10

Tom Misteli and David L. Spector. **The Nucleus**. (2011). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Wickstead B, Gull K (2011). **"The evolution of the cytoskeleton"**. *J Cell Bio.* **194** (4): 513–25.

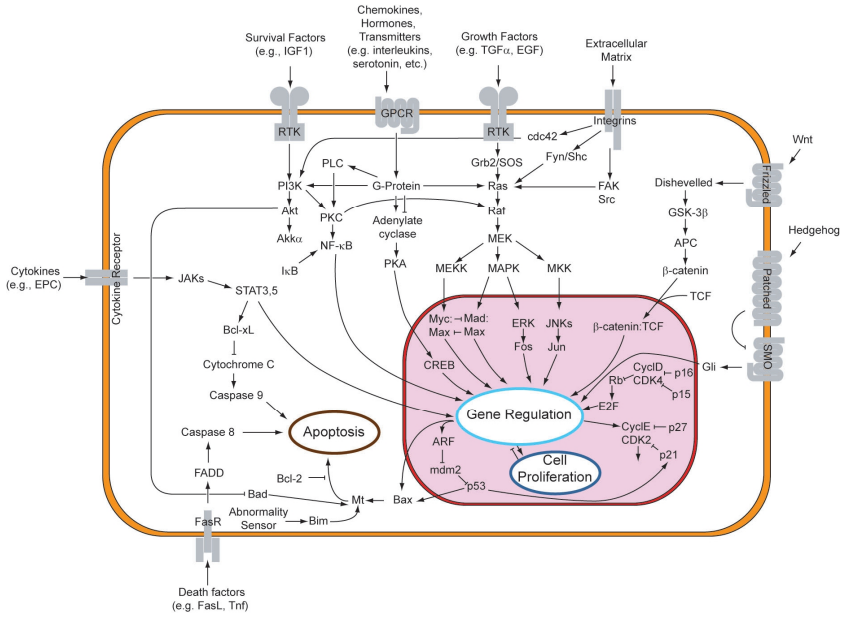
Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM Jr, Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vonrhein C, Hartsch T, Ramakrishnan V (2000). **"Structure of the 30S ribosomal subunit".** *Nature.* **407** (6802): 327–39.

Xu, C; et al. (2005). **"Endoplasmic Reticulum Stress: Cell Life and Death Decisions".** *J. Clin. Invest.* **115** (10): 2656–2664.

الفصل الرابع

الإشارات الخلوية

Cell Signaling



الفصل الرابع

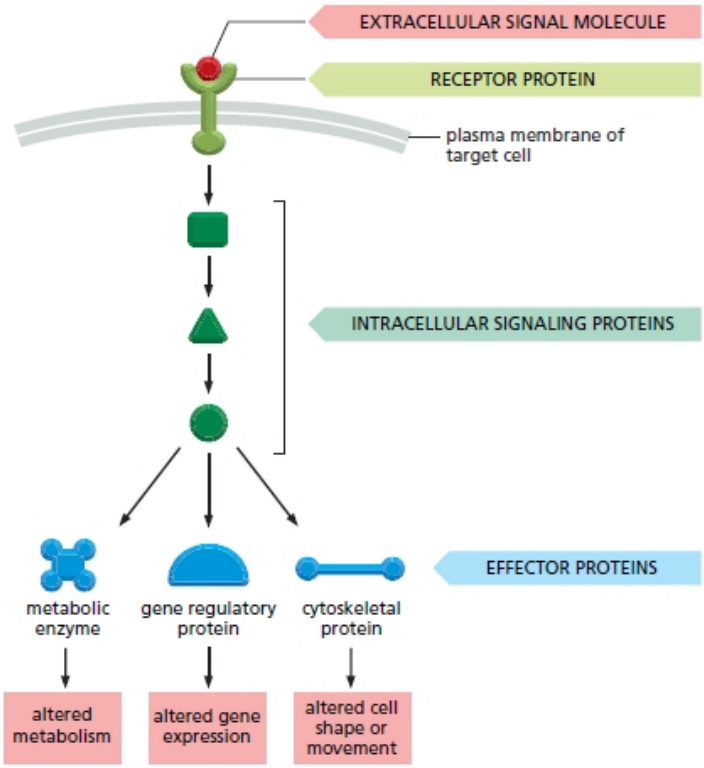
الإشارات الخلويـة
Cell Signaling

كما أن الإنسان يحتاج اللغة والصوت للتواصل مع الأشخاص المحيطين به ضمن المجتمع، كذلك الخلية تتواصل عن طريق الإشارات الخلوية مع باقي الخلايا ضمن الكائن الحي في نظام معقد ودقيق جداً، فضلاً عن ذلك فإن هناك نوع آخر من التواصل يكون عادة بين الكائنات أحادية الخلية (مثل البكتريا) مع خلايا الكائن الحي متعدد الخلايا.

ويعد التواصل بالإشارات الخلوية ضرورية لحياة وبقاء الخلية ولكي تؤدي وظائفها بصورة سليمة، كما تعد الوسيلة الرئيسية التي من خلالها تستجيب الخلية للتغيرات المحيطة بها وتتفاعل مع تلك التغيرات. والإشارات الخلوية ليست مجرد رسائل كيميائية ترسل من خلية وتستقبل من قبل خلية أخرى، بل هي عملية معقدة ودقيقة من ناحية الوقت المناسب ونوع الإشارة وطبيعتها وكيفية الاستجابة لها ونوع وتوقيت هذه الاستجابة.

وعادة يتم إرسال الإشارة الخلوية من خلال رسالة كيميائية (جزيئة إشارة خارج خلوية) من قبل الخلية المرسلة، وتستقبل هذه الرسالة من قبل الخلية المستقبلة عن طريق المستقبلات Receptors (عادةً على الغشاء الخلوي ولكن ليس دائماً)، ارتباط الرسالة مع

المستقبل يحفز المستقبل والذي بدوره يعاني من تغييرات في الشكل و/ أو التركيب تؤدي إلى انجاز الوظيفة أو البدء بأحداث أخرى، أو يؤدي ذلك إلى تحفيز تراكيب (عادةً بروتينات أخرى) إما في الغشاء الخلوي أو داخل الخلية في مجموعة من التغيرات التي تدعى بمسار الإشارة داخل الخلية Intracellular cell signaling pathway وهي مجموعة من التغيرات المتسلسلة التي تحدث داخل الخلية بفعل الإشارة الخلوية تكون محصلتها النهائية أحداث تغيير في وظيفة خلوية معينة عن طريق تغيير فعالية (تحفيز أو تثبيط) بروتين أو بروتينات معينة أو التأثير في وظيفة جزء من الخلية (مثل العضيات) أو تنظيم تعبير جين معين أو مجموعة جينات (تحفيزاً أو تثبيطاً)، أو تغيير فعالية قنوات أو مستقبلات على الغشاء الخلوي، أو تغيير في المسار الأيضي لجزيئات معينة، أو تغيير في الهيكل الخلوي... الخ، في مئات من التغيرات التي يمكن أن تحدث في الخلية حسب وظيفة الإشارة الخلوية (الشكل4-1)،



الشكل (4-1) مسارات الاشارة الخلوية (مأخوذ من Alberts *et al.*, 2015)

ولتسهيل دراسة الإشارات الخلوية ومستقبلاتها تم وضع المتشابه منها في مجاميع، علماً أن هناك تشابه كبير بين الحشرات والديدان واللبائن في الإشارات الخلوية وأن معظم بحوث الإشارات الخلوية تمت في الديدان (C. elegans) وذبابة الفاكهة Drosophila.

أساسيات الإشارة الخلوية :

عموماً هناك مئات الأنواع من الإشارات الخلوية حيث يمكن أن تكون الإشارة مشتق بروتيني أو عامل نمو أو أيون أو متعدد ببتيد أو حامض أميني أو مشتق حامض دهني أو غاز أو سايتوكين أو انترلوكين أو ستيرويد أو مادة دوائية....الخ، ويكون تركيز الإشارة الخلوية قليل جدا (عادةً بحدود 0.00000001 مول)، وعموماً يمكن أن يكون التأثير سريعاً (أجزاء الثانية – دقائق) مثلاً عن طريق تغيير وظيفة بروتينات داخل خلوية، أو بطيئاً (دقائق – ساعات) عن طريق تغيير تعبير جيني وبالتالي تصنيع بروتين معين، وفي كلتا الحالتين تكون النتيجة النهائية تغيير في الخلية أو إحدى وظائفها. ويمكن أن تحدث الإشارة الخلوية بأحد الطرق التالية :

1- إشارة الانتركراين Intracrine signal: حيث تنتج الإشارة وتستقبل داخل الخلية نفسها (دون الخروج منها).

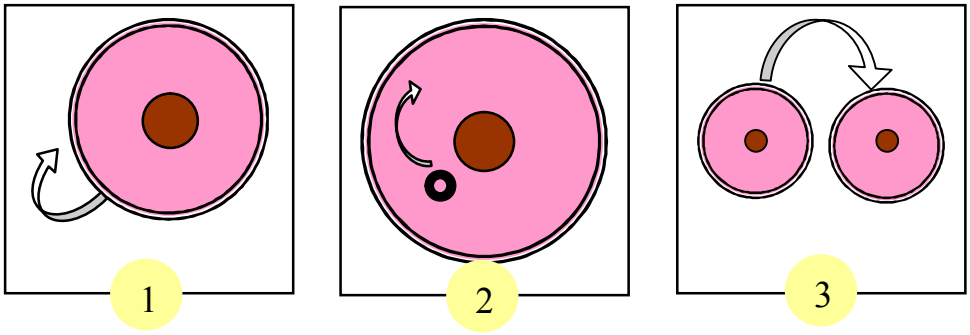
2- إشارة الأوتوكراين Autocrine signal: حيث تكون الإشارة والمستقبل في الخلية نفسها (تنتج ثم تستقبل من قبل الخلية نفسها).

3- إشارة الباراكراين Paracrine signal: حيث تتولد الإشارة من خلية وتؤثر في الخلية المجاورة لها.

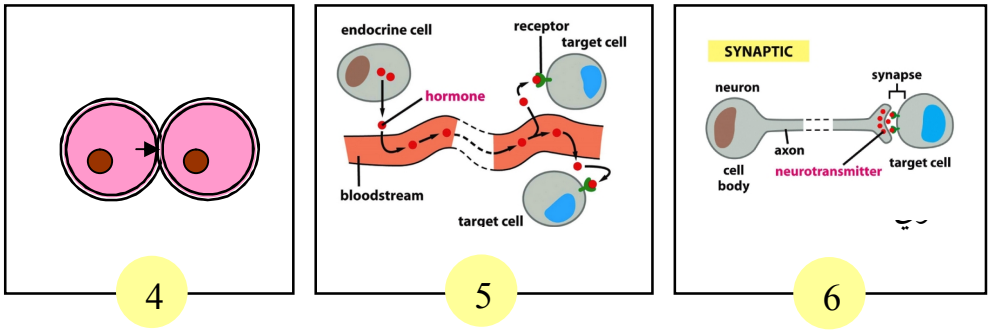
4- الإشارة المعتمدة على التماس contact dependent signal: أو تدعى أحياناً Juxtacrine signal، حيث أن الخلية المولدة للإشارة والمستقبلة لها يكون بينهما تماس مباشر عن طريق أحد جزيئات أو تراكيب الالتصاق أو التماس بين الخلايا.

5- الإشارة الصماوية Endocrine signal: حيث يتم إفراز الإشارة (عادةً هرمون) من خلايا متخصصة (عادةً غدد صماوية Endocrine glands) وتنتقل عبر مجرى الدم وصولاً إلى الخلية الهدف Target cell.

6- الإشارة الاشتباكية Synaptic signal: وتقوم خلية ما قبل الاشتباك Presynaptic بإفراز مادة الإشارة (النواقل العصبية Neurotransmitters) وهناك أنواع متعددة منه، ويتم استقباله من قبل الخلية ما بعد الاشتباك Postsynaptic أو الخلية الهدف.



الشكل (4-1) مسارات الاشارة الخلوية (مأخوذ من Alberts *et al.*, 2015)



الشكل (4-2) أنواع الإشارة الخلوية ؛ 1- Autocraine Intracraine -2
3- Paracrine -4 Juxtacraine -5 Endocrine -6 Synaptic.

وفي الكائنات متعددة الخلايا (وخاصة الحيوانات) يمكن تقسيم الإشارات الخلوية إلى الأنواع الأساسية التالية :

1- الإشارة عن طريق المستقبلات النووية.

2- مسار إشارة البروتين جي G protein عن طريق الغشاء الخلوي.

3- الإشارة عن طريق البروتين كاينيز Protein kinase signal.

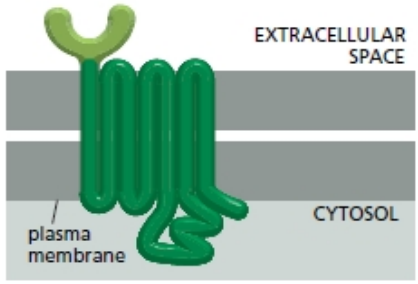
الإشارات عن طريق المستقبلات النووية Nuclear receptor signals :

المستقبلات النووية هي مجموعة من البروتينات داخل الخلية يمكن أن تتواجد في السايتوبلازم أو النواة، وتكون حساسة لبعض الهرمونات المحبة للشحوم Lipophilic hormones ومن أمثلة هذه المجموعة هي: الستيرويدات و T3 والبروستاكلاندينات والليوكوترينز Leukotrienes والأحماض الدهنية، ومشتقات الكولستيرول، وأحماض الصفراء، والبنزوات Benzoates. وعلى العكس من المسارات المعتمدة على مستقبلات الغشاء الخلوي فإن الإشارات عن طريق مستقبلات النواة تكون بسيطة التركيب ومباشرة ولا تحتاج مركبات بروتينية وسطية (بروتينات المسارات) حيث أن الإشارة (وتدعى ليكاند Ligand) تدخل إلى الخلية بسهولة لكونها محبة للدهون، إما عن طريق النقل السلبي (اللافاعل) Passive transport أو النقل الفعال Active transport. إذا كان المستقبل في النواة فبعد الارتباط مع الليكاند ينقل إلى النواة وبعد ارتباط الليكاند مع المستقبل يرتبط هذا المعقد مع عنصر ضمن DNA يدعى العنصر المستجيب للهرمون Hormone response element (HRE) ويؤدي هذا الارتباط إلى تغيير تعبير الجين الهدف. وجدير بالذكر أن هذا المستقبل يعد هدفاً لعقار Tamoxifen في علاج بعض أشكال سرطان الثدي، حيث في أنواع معينة من سرطان الثدي، الانقسام المستمر للخلايا السرطانية يعتمد على الوجود المستمر لهرمون الاستروجين، ويعمل عقار Tamoxifen كصد Antagonist حيث يتنافس مع الاستروجين للارتباط مع مستقبل الاستروجين.

مستقبلات الغشاء الخلوي عن طريق البروتين جي G protein :

عند وصول الإشارة الخلوية إلى الغشاء الخلوي للخلية الهدف يتم التسجيل والتعرف على هذه الإشارة من خلال مستقبلات مزدوجة مع البروتين G protein coupled receptor (GPCR)، وهي مجموعة كبيرة من المسقبلات التي تساهم في نقل الإشارات الخلوية وتستجيب لمدى واسع من الجزيئات، وتتواجد GPCR في خلايا جميع الكائنات حقيقية النواة، وتعد هذه المستقبلات الأكثر تواجداً على سطح الخلية وتساهم في غالبية الاستجابات للإشارات الخاج خلوية من هرمونات ونواقل عصبية ووسائط موضعية Local

mediators، كما تساهم في استقبال إشارات الحواس مثل الرؤية Sight، الشم Smell، والتذوق Taste. في الإنسان هناك حوالي 700 نوع من GPCR وأضعاف هذا العدد من الفئران، و 5٪ من جينوم دودة C. elegans تشفر لمستقبلات GPCR، وتختلف نوع الإشارات التي تحفز هذه المستقبلات مع ملاحظة إمكانية تحفيز أكثر من نوع من GPCR من قبل إشارة واحدة، وبالرغم من المدى الواسع لأنواع GPCR إلا أن لها تركيب عام متشابه يتكون من سلسلة ببتيدية طويلة منطوية على نفسها 7 مرات خلال الغشاء الخلوي، كل طوية تحوي 20–30 حامض أميني، مع بروز جزء منها خارج الغشاء الخلوي وجزء داخله وتستعمل G protein لنقل الإشارة الخلوية إلى داخل الخلية (الشكل 4-3).

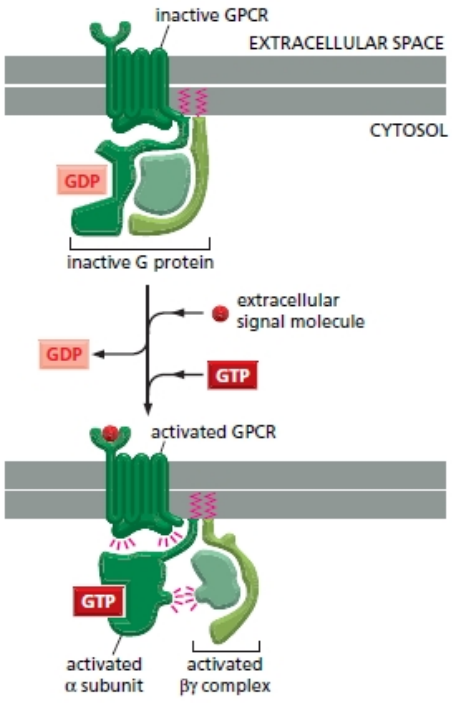


شكل (3-4) شكل مستقبل البروتين جي GPCR (مأخوذ من Alberts *et al.*,

والمثير أن نصف جميع الأدوية المستعملة اليوم تعمل من خلال مستقبل GPCR أو من خلال مسارات الإشارات التي تحفز GPCR، وهناك المئات من الجينات التي تشفر لإنتاج GPCR.

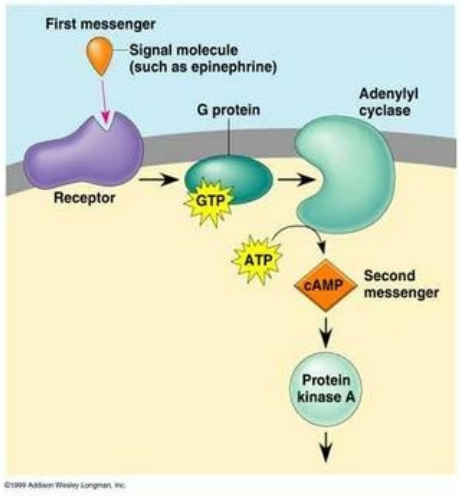
أما آلية العمل فباختصار عند ارتباط جزيئة الإشارة الخارج خلوية مع مستقبل GPCR تحدث تغيرات شكلية في هذا المستقبل تؤدي إلى تحفيز بروتين ثلاثي الأجزاء مرتبط مع GTP (Trimeric GTP binding protein) ويختصر بـ G protein والذي يرتبط مع الغشاء الخلوي من الداخل (من جهة السايتوبلازم) ويرتبط مع الأنزيمات أو القنوات الأيونية للغشاء الخلوي، وهناك أنواع كثيرة من G protein كل نوع متخصص للارتباط مع GPCR معين. ويتكون G protein من ثلاث أجزاء هي ألفا α وبيتا β وكاما γ، وفي حال عدم وجود

تحفيز تكون وحدة ألفا مرتبطة مع GDP، وعند تحفيز GPCR تقوم وحدة ألفا بتحرير GDP والارتباط مع GTP في نفس موقع GDP وهذا يسبب تغير كبير في شكل G protein ويؤدي إلى تحفيزه، ويعتقد أن التحفيز يسبب في تحلل المستقبل GPCR إلى وحدتين فعالتين هما ألفا وبيتا مع كاما، إن وحدة ألفا هي إنزيم GTPase وتحلل GTP ثم ترتبط مع GDP (الشكل4-4).



الشكل (4-4) مسار البروتين جي G protein (مأخوذ من Alberts *et al.*, 2015)

إن مستقبلات GPCR تحفز مسارات إشارات داخل خلوية متعددة منها الأدينوسين أحادي الفوسفات الحلقي Cyclic AMP (cAMP) والذي يعمل كوسيط داخل خلوي في جميع الخلايا بدائية النواة وحقيقية النواة، ويتواجد بتراكيز ضئيلة جداً في سايتوسول الخلية، ولكن وجود التحفيز الخارج خلوي يمكن أن يزيد تركيزه إلى عشرين ضعف خلال ثواني.



الشكل (4-5) مستقبل البروتين جي GPCR ومسار cAMP

إن G protein التي تحفز من قبل GPCR تكون بنوعين هما المحفزة Stimulatory G protein (Gs) والمثبطة Inhibitory G protein (Gi)، الأولى تحفز إنزيم الادينيليل سايكليز وبذلك تزيد من تركيز cAMP، أما Gi فإنها تثبط إنزيم الادينيليل سايكليز ولكن فعلها الرئيسي يكون بتنظيم قنوات الأيونات، ويذكر أن كل من Gs و Gi تكون هدف للعديد من السموم البكتيرية مثل سموم الكوليرا Cholera toxin وتكون نتيجتها النهائية التحفيز المستمر لإنزيم الادينيليل سايكليز مما ينتج عنه الزيادة المستمرة لـ cAMP داخل خلايا ظهارة الأمعاء مسببةً تدفق لأيونات الكلوريد -Cl والماء من هذه الخلايا إلى تجويف الأمعاء مسببةً الإسهال الشديد. و GPCR له علاقة بالعديد من الأمراض التي تصيب الإنسان واللبائن ومن هذه الأمراض أنواع متعددة من فرط الحساسية، الإحباط، العمى، داء السكري، أمراض القلب الوعائي...

ويذكر أن هناك مجموعة من الجينات (على الأقل 150 جين) في الإنسان تشفر لأنواع من GPCR لازالت غير واضحة الوظيفة وتدعى المستقبلات "اليتيمة" Orphan receptors ويذهب بعض العلماء بالاعتقاد إلى أنها ربما ستكون مستقبلات لأدوية ستكتشف في المستقبل!!

نواقل الاشارات الخلوية Cell signaling transporters :

إن الإشارات الخلوية يمكن أن تنقل من الجهة الداخلية للغشاء الخلوي إلى داخل الخلية بطريقتين رئيسيتين، إما بتداخل بروتين – بروتين (وهذه البروتينات يمكن أن تكون مستقبلات أو بروتينات ناقلة أو إنزيمات) أو عن طريق مواد بوزن جزيئي صغير تسمى المراسل الثاني Second messenger ويمكن تقسيم المراسل الثانوي إلى مجموعتين كبيرتين هما :

1- المراسلات الثانوية النافرة من الماء Hydrophobic second messengers: وتنفذ خلال الغشاء الخلوي كي تصل إلى بروتينات مرتبطة بالغشاء الخلوي ومن أمثلة هذا النوع ثنائي أسيل الكليسيرول Diacylglycerol وفوسفاتيديل اينوسيتول فوسفات Phosphatidyl inositol phosphate (PIP).

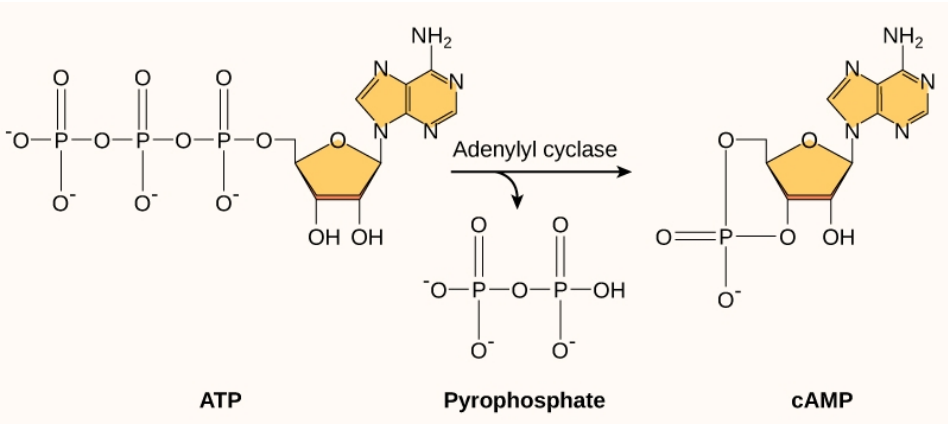
2- المراسلات الثانوية المحبة للماء Hydrophilic second messengers: وتمتاز بقدرتها الجيدة للذوبان في الماء وتتواجد في سايتوسول الخلية وتصل إلى بروتيناتها الهدف في السايتوسول، ومن أمثلتها cAMP و cGMP والاينوسيتول فوسفات Inositol phosphate (IP) والكالسيوم +Ca2.

المراسل الثانوي Second messengers :

ويتميز المراسل الثانوي بأنه يمكن أن يصنع ويحطم بتفاعلات إنزيمية متخصصة، أي أن كمية من المراسل الثانوي يمكن أن تتكون بسرعة وتتحطم بسرعة، والبعض من المراسل الثانوي (مثل الكالسيوم) يخزن في تراكيب متخصصة يمكن أن يتدفق منها بسرعة، كما يمكن أن ينتج المراسل الثانوي بصيغة التخصص الموضعي أي ينتج ويحطم (بعد أداء دوره) في موقع معين من الخلية، ومن أهم المراسلات الثانوية:

cAMP :

ويتم تصنيع cAMP من مركب ATP من خلال إنزيم مرتبط بالغشاء الخلوي هو Adenylyl cyclase (الشكل4-6)، ويتم تحطيم cAMP بسرعة وبشكل مستمر من قبل إنزيم cAMP phosphodiesterse إلى 5'-AMP.

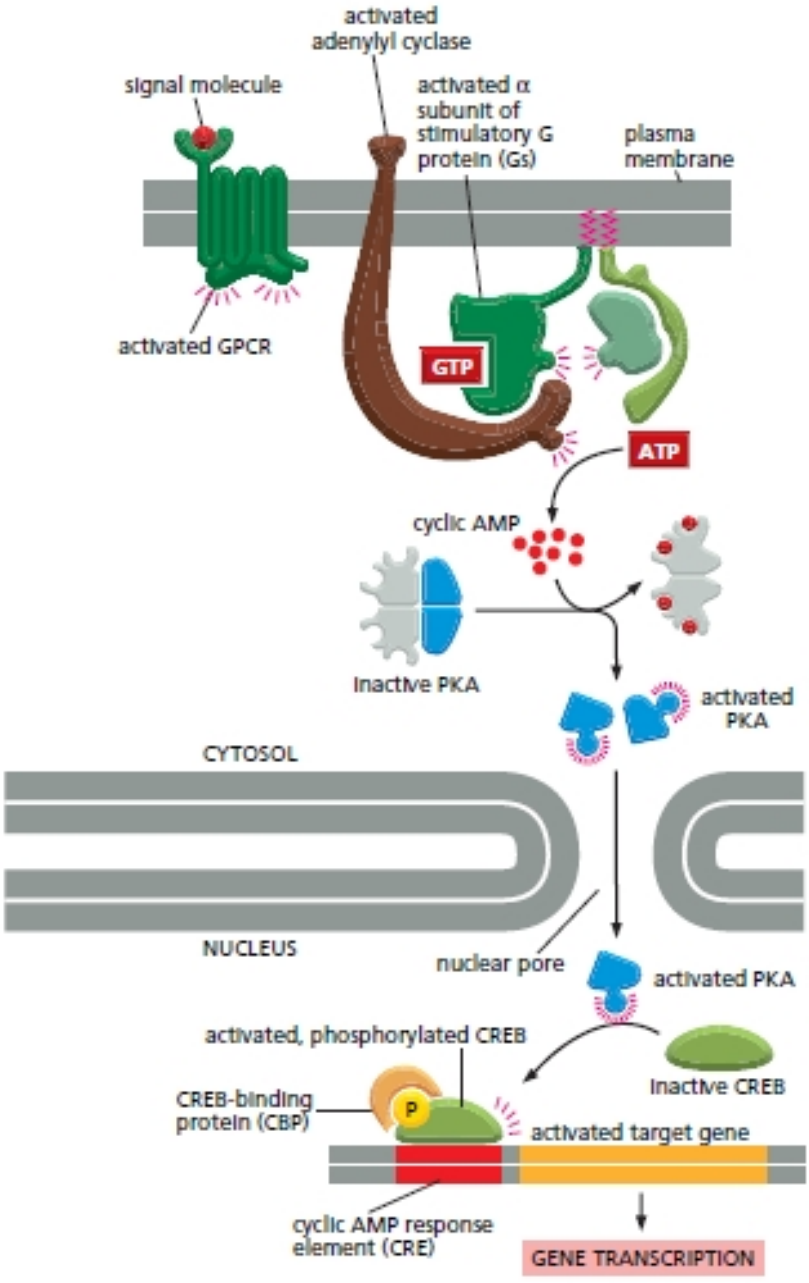


الشكل (4-6) تكون cAMP من ATP

ويعمل cAMP كمراسل ثانوي في العديد من الوظائف الحيوية للخلية مثل تصنيع أو تحلل الكلوكوز، تصنيع الشحوم، التقلص العضلي، الإفراز الغشائي، نقل الأيونات، عمليات التعلم والذاكرة، تنظيم تمايز ونمو الخلايا، الموت الخلوي المبرمج... وهناك عدد كبير من الهرمونات التي تؤدي وظيفتها عن طريق cAMP (في العضو المتخصص) مثل: الهرمون المحفز للدرقية TSH (الغدة الدرقية)، الهرمون المحرض لقشرة الكظر ACTH (قشرة الكظر)، الهرمون اللوتيني LH (المبيض)، الأدرينالين Adrenaline (العضلات والقلب)، الباراثرمون Parathormone (العظام)، الكلوكاكون Glucagon (الكبد)، الفاسوبرسين Vasopressin (الكلى)، والادينالين و ACTH و الكلوكاكون و TSH (الأنسجة الدهنية).

ويرتبط cAMP مع وينشط بروتينات الإشارات الخلوية المختلفة ومنها :

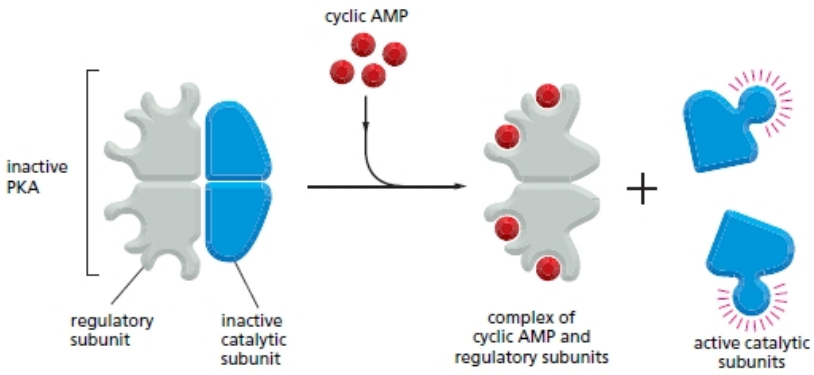
1- قنوات الأيونات المسيطر عليها بـ cAMP (cAMP-gated ion channels) حيث يرتبط cAMP بعناصر السايتوبلازم لهذه القنوات وينظم فتحها وإغلاقها ومن الأمثلة الشهيرة لذلك تنظيم مرور الكالسيوم بواسطة cAMP وكذلك وظيفة حاسة الشم في اللبائن. ويمكن تلخيص آلية عمل مسار cAMP في داخل الخلية وتنظيمه للتعبير الجيني بالشكل (4-7).



الشكل (4-7) آلية مسار cAMP في تنظيم التعبير الجيني

(مأخوذ من Alberts *et al.*, 2015)

2- البروتين كاينيز Protein kinase A (PKA): ويؤدي cAMP معظم وظائفه من خلال PKA، حيث يقوم هذا الإنزيم (PKA) بفسفرة أحماض أمينية معينة (عادةً السيرين والثريونين) في البروتين الهدف وبذلك تنظم فعالية هذا البروتين، ويمكن شرح آلية العمل باختصار بأن PKA في حالة عدم النشاط عبارة عن أربع وحدات، وحدتان تنظيميتان (2 regulatory subunits) ووحدتان تحفيزيتان (2 catalytic subunits)، عملية ارتباط cAMP مع PKA يكون مع الوحدتين التنظيميتين ويؤدي ذلك إلى تحرر الوحدتين التحفيزيتين واللتان تعملان على تحفيز البروتين الهدف (الشكل4-8).



الشكل (4-8) تنشيط البروتين كاينيز PKA المعتمد على cAMP (مأخوذ من Alberts *et al.*, 2015)

cGMP:

ويشابه cAMP في كثرة انتشاره في الأنسجة كمراسل ثانوي، ويتم تكوين cGMP من GTP بفعل إنزيم كوانيليل سايكليز Guanylyl cyclase ويختلف عن إنزيم أدينيليل سايكليز في التركيب والوظيفة، ويمكن تقسيم إنزيم كوانيليل سايكليز إلى ثلاث أجزاء، جزء يضم الأنزيمات ولا يملك هذا الجزء أي عنصر ارتباط مع الغشاء الخلوي ويدعى بالأنزيم الذائب، الجزء الثاني يضم عنصر واحد يمتد خلال الغشاء الخلوي، ويعمل هذا الجزء

كمستقبل ويتم تنظيم عمله من خلال ارتباط الإشارات الخارج خلوية معه، أما الجزء الثالث فله أكثر من عنصر خلال الغشاء الخلوي ولكن وظائفه لا زالت غير واضحة. ويمكن تلخيص وظائف cGMP كمراسل ثانوي من خلال :

1- البروتين كاينيز المعتمد على cGMP (cGMP dependent protein kinase): إن هذا البروتين كاينيز ينشط بالارتباط مع cGMP ويشبه في تركيبه للـ PKA إلى حد ما، ويعمل البربوتين كاينيز المعتمد على cGMPفي العضلات الملساء على قنوات الكالسيوم والفوسفاتيز المتخصص بالمايوسين Myosine-specific phosphatase، حيث أن هاذين العنصرين (قنوات الكالسيوم والفوسفاتيز) من خلال البروتين كاينيز المعتمد على cGMP يعملان على تحوير مستوى الكالسيوم وبالتالي تنظيم عمل العضلات الملساء.

2- قنوات الأيونات الموجبة Cation channels: حيث تملك هذه القنوات مواقع لارتباط cGMP في جزئها الداخل خلوي (الجزء الداخلي من الغشاء الخلوي) وارتباط cGMP يعمل عادة على إعادة فتح هذه القنوات وتدفق الأيونات الموجبة، كما في عملية الرؤية.

3- أنزيم الفوسفودايستريز المتخصص بـ cAMP (cAMP-specific phosphodiesterses): حيث أن بعض أنواع cAMP-specific phosphodiesterses ينظم عملها من خلال cGMP.

وتختلف الرسائل التي يحملها cGMP حسب نوع الأنسجة فمثلاً في الكلى والأمعاء توجه تنظيم نقل الأيونات والماء، أما في العضلات القلبية فتوجه تنظيم الانبساط العضلي، وفي الدماغ توجه تنظيم النمو والوظائف المتقدمة لدماغ البالغ.

الاينوسيتول فوسفات Inositol phosphate (IPs):

هي مجموعة من أحادي إلى متعدد الفسفرة للاينوسيتول ومنها الاينوسيتول الأحادي الفوسفات (IP) وثنائي الفوسفات (IP2) وثلاثي الفوسفات (IP3) وخماسي الفوسفات (IP5) وسداسي الفوسفات (IP6) الذي يعرف بحامض الفايتيك Phytic acid أو الفايتات Phytate.

إن GPCR تنجز كثير من وظائفها من خلال G protein الذي يحفز إنزيم الفوسفولايبيز Phospholipase C-β (PLCβ) المرتبط بالغشاء الخلوي، ويعمل إنزيم الفوسفولايبيز هذا من خلال (IPs) الذي يتواجد في النصف الداخلي من الغشاء الخلوي ويرتبط عمله بتنظيم مستوى الكالسيوم في الخلية.

كما أن تحطم (IPs) ينتج العديد من المركبات منها داي أسيل كلسيرول Diacylglycerol (DAG) والذي له العديد من الوظائف حيث يمكن أن يعمل كوسيط خلوي، أو يعاني عدة تحويرات منتجاً حامض الأراكيدونيك Arachidonic (الذي يعمل هو الآخر كإشارة خلوية) كما يستعمل في تصنيع جزيئات دهنية صغيرة بالغة الأهمية تدعى الأيكوزانويدات Ecosanoids (ومن أنواعها البروستاكلاندينات Prostaglandins) التي تعمل كإشارات خلوية ولها مدى واسع جداً من الوظائف الحيوية في الحالة السوية والمرضية للكائن. وأخيرا فإن أيض (IPs) يتم من خلال إنزيم مفتاحي هو الفوسفولايبيز Phospholipase C (PL-C) وهناك مسارات متعددة لتنظيم فعالية PL-C.

الكالسيوم Calcium :

إن العديد من الإشارات الخارج خلوية تزيد من تركيز الكالسيوم في سايتوسول الخلية، حيث يكون تركيز الكالسيوم في السايتوسول في حالة عدم النشاط قليلاً جداً (حوالي 7-10 مول) بينما تركيزه خارج الخلية 3-10 مول، لذلك يميل الكالسيوم (بفعل التدرج التركيزي) للدخول إلى السايتوسول من خارج الخلية وكذلك من بعض عضيات الخلية مثل الشبكة الاندوبلازمية، وعندما تفعل الإشارات الخلوية فعلها فإنها تفتح قنوات الكالسيوم ويتدفق الكالسيوم إلى السايتوسول ليزيد تركيزه 10–20 ضعف وبذلك تنشط البروتينات والمسارات المعتمدة على الكالسيوم داخل الخلية، وتمتلك جميع الخلايا حقيقية النواة مضخات الكالسيوم في غشائها الخلوي وتستعمل هذه المضخات ATP كطاقة لضخ الكالسيوم خارج الخلية، فضلاً عن ذلك هناك بروتينات أخرى متخصصة لإخراج الكالسيوم إلى الخارج - Na+ driven Ca2+ exchanger كما في الخلايا العضلية والعصبية.

إن الكالسيوم كمراسل ثانوي يعمل على تحفيز العديد من الاستجابات الخلوية مثل الإخراج الخلوي Exocytosis في الخلايا العصبية والصماوية، التقلص في الخلايا العضلية، وترتيب الهيكل الخلوي خلال حركة الخلية.

التغيير في مستوى الكالسيوم داخل الخلية يكتشف من قبل بروتين متخصص يدعى الكالموديولين Calmodulin وهو بروتين حامضي يملك أربع مواقع عالية الألفة للارتباط بالكالسيوم، هذا الارتباط يؤدي إلى حدوث تغيرات في شكل هذا البروتين وبالتالي تحوير في نشاطه، وبما أن هذا البروتين يرتبط بالعديد من المركبات داخل الخلية وينظم عملها لذلك يعد الكالسيوم / الكالموديولين كمراسل ثانوي للعديد من الإشارات الخلوية والعمليات الحيوية ومنها :

- إنزيم الادينيليل سايكليز في الدماغ.
- إنزيمات البروتين كاينيز المعتمدة على الكالسيوم / الكالموديولين (I–IV).
- قناة الصوديوم المعتمدة على الكالسيوم.
- قناة تحرير الكالسيوم من الشبكة الساركوبلازمية.
- الكالسينيورين Calcineurin.
- الفوسفو داي استريز للادينوسين أحادي الفوسفات الحلقي cAMP phosphodiesterase.
- قنوات الشم من نوع cAMP-gated olfactory channels.
- قنوات الصوديوم والكالسيوم في خلايا المخاريط والعصي في شبكية العين cGMP-gated Na+ , Ca2+ channels.
- إنزيم تصنيع أوكسيد النترات NO synthetase.
- أنزيم الكاينيز PI3 kinase.
- معقد Plasma membrane Ca2+ - ATPase.
- أنزيم الهليكايز RNA helicase.

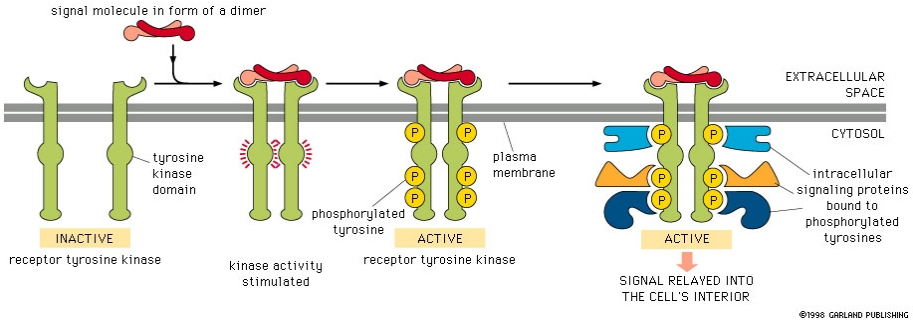
التايروسين كاينيز المستقبل Receptor tyrosine kinases :

مجموعة كبيرة من مستقبلات الغشاء الخلوي ولها فعالية البروتين كاينيز، حيث تتكون عادةً من جزء خارج الغشاء الخلوي (المستقبل) وموقع فعال للانزيم في الجهة السايتوبلازمية من الغشاء الخلوي ويربط الجزئين قطعة واحدة خلال الغشاء الخلوي، الجزء السايتوبلازمي هو البروتين كاينيز الذي يفسفر الحامض الأميني التايروسين ضمن البروتين الهدف (أي Tyrosine kinase) ومن أشهر أمثلة هذا النوع هي :

- مستقبلات الانسولين.
- مستقبلات عامل نمو البشرة Epidermal growth factor (EGF).
- مستقبلات عامل النمو المشتق من الصفيحات الدموية Platelet derived growth factor (PDGF).
- مستقبلات عامل نمو الأرومة الليفية Fibroblast growth factor (FGF).
- مستقبلات عامل النمو المشابه للأنسولين Insulin like growth factor-1 (IGF-1).
- مستقبلات عامل نمو بطانة الأوعية الدموية Vascular endothelial growth factor (VEGF).
- مستقبلات عامل تحفيز مستعمرة البلاعم الكبيرة Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF).
- مستقبلات النيوروتروفين Neurotrophines مثل عامل النمو العصبي Nerve growth factor (NGF).

وهناك أكثر من 20 صنف من RTKs تأخذ الأرقام اللاتينية (I – XX) كل صنف يضم مجموعة من المستقبلات وتشفر من قبل أكثر من 60 جين (في الإنسان) وفي جميع الأنواع فإن ارتباط بروتين الإشارة بالجزء الخارج خلوي للمستقبل يسمح بالجزء الداخل خلوي (وهو Tyrosine kinase) بفسفرة السلاسل الجانبية (التايروسين) للمستقبل نفسه ولبروتينات الإشارة الخلوية الأخرى التي ترتبط مع التايروسينات المفسفرة. إن ارتباط الليكاند مع المستقبل يسبب ديمرة Dimerization المستقبل (ربط جزء الكاينيز لسلسلتي مستقبلين مع

بعضهما) وبذلك تصبح فعالة وتفسفر إحداهما الأخرى في تاروسينات متعددة وتدعى العملية بـ transautophosphorylation والذي يعمل كمفتاح لتحفيز معقد من الإشارات الخلوية التي تنقل الإشارة الخلوية إلى أجزاء مختلفة من الخلية (الشكل4-9).



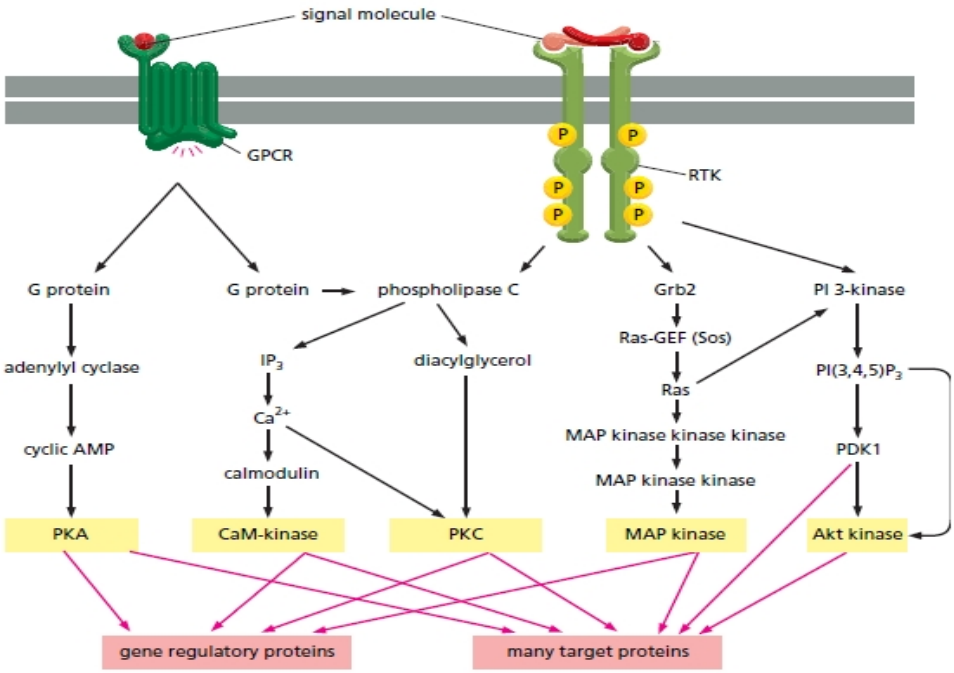
الشكل (4-9) تنشيط مستقبل التيروسين كاينيز (مأخوذ من Alberts *et al.*, 2015).

كما يمكن تلخيص المسارات المرتبطة بكل من GPCR و RTKs بالشكل (4-10).

Ras :

عبارة عن عائلة كبيرة من البروتينات وهي إنزيمات صغيرة من GTPase وترتبط جميعها بالبروتين Ras وهي البروتينات التي تدخل في عملية نقل الإشارات الخلوية، وهناك مئات الأنواع من Ras ويمكن أن تقسم إلى ستة أنواع وحسب الوظيفة :

1- Ras: وتساهم في التكاثر الخلوي وهناك أكثر من 30 نوع منه.
2- Rho: وتساهم في وظائف الهيكل الخلوي وهناك أكثر من 20 نوع منه.
3- Rab: له دور في حركة المواد خلال الأغشية وهناك أكثر من 65 نوع منه.
4- Rap: له دور في الالتصاق الخلوي وله 5 أنواع.
5- Arf: يلعب دور في نقل الحويصلات الخلوية وله حوالي 30 نوع.
6- Ran: ويساهم في النقل النووي وله نوع واحد فقط إضافة إلى أنواع ثانوية أخرى.



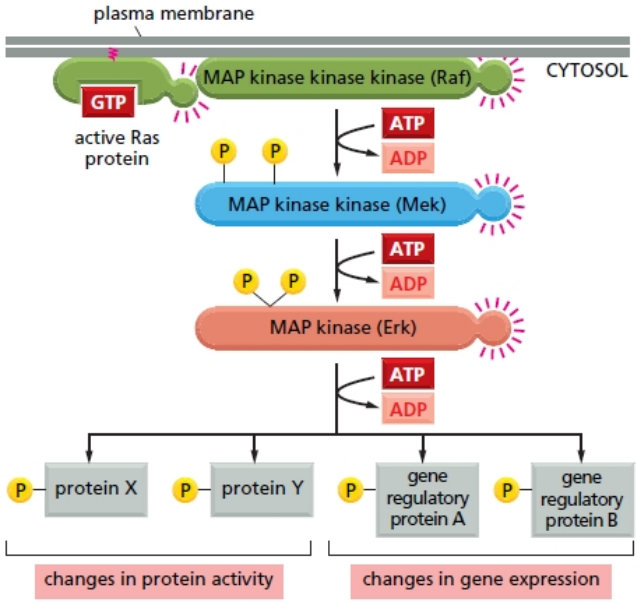
الشكل (4-10) المسارات الخلوية المرتبطة بـ GPCR و RTK (مأخوذ من Alberts *et al.*, 2015)

وبالرغم من كثرة الأنواع فإن Ras و Rho فقط تساهم في نقل الإشارات الخلوية. وعموماً فإن Ras يمكن أن يكون مرتبط مع GTP (فعال) أو مرتبط مع GDP (غير فعال)، عندما يكون Ras فعال يمكنه من تنشيط بروتين كاينيز هو Raf-1 والذي ينشط بروتين كاينيز آخر هو MEK (MAP/ERK kinase) والذي بدوره ينشط بروتين كاينيز ثالث هو ERK (Extracellular regulated kinase)، إن Raf-1 و MEK و ERK هي أعضاء في ثلاث مجاميع كبيرة، فمثلاً أن ERK ينتمي إلى مجموعة MAPK.

MAPK :

وهو مختصر لبروتين كاينيز منشط بالمايتوجين Mitogen activated protein kinase (MAPK) وهي عبارة عن إشارات خارج خلوية تحفز الانقسام الخلوي الخيطي والاختزالي،

وبعد اكتشاف إنزيم MAPK وجد أن هناك بروتين كاينيز آخر هو MAP kinase kinase (MAPKK) ويذكر أن MEK من ضمن هذه المجموعة، وهناك بروتين كاينيز آخر ينشط MAPKK هو MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) ويعد Raf-1 من ضمن هذه المجموعة، وينتج مما سبق سلسلة تدعى MAPK cascades حيث تقوم بإيصال الإشارات التي تنتج بفعل العديد من نواقل النمو (مثل PDGF و EGF) وتسمى أحياناً بمسار MAPK/ERK pathway وهو مسار يعمل على نقل الإشارة الخلوية من مستقبلات على سطح الخلية إلى DNA في النواة عن طريق سلسلة البروتينات كما في الشكل (4-11).



الشكل (4-11) مسار MAPK (مأخوذ من Alberts *et al.*, 2015)

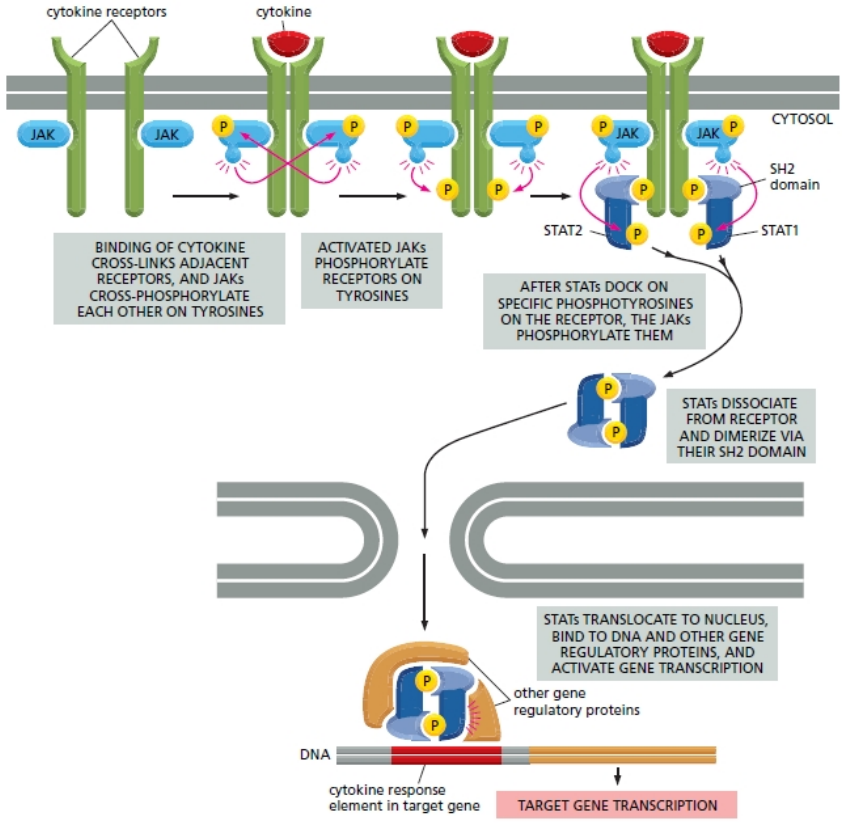
Src :

والكلمة مشتقة من ساركوما Sarcoma وهو السرطان الذي ينشأ من الخلايا الميزنكيمية، و Src عبارة عن Proto-oncogene يشفر لنوع من التايروسين كاينيز ويدعى بالتايروسين كاينيز غير المستقبل Non-receptor protein kinase ويعتقد أنها تلعب دور في تطور الجنين ونمو الخلايا.

JAKs/STAT :

إن أكبر مجموعة وأكثر مجموعة منوعة من المستقبلات التي تستعمل التايروسين كاينيز هي مستقبلات السايتوكينات وهي مجموعة كبيرة من المستقبلات لعدد كبير من الوسائط الخلوية الموضعية (السايتوكينات)، والسايتوكينات Cytokines (محركة الخلايا) عبارة عن مجموعة كبيرة من البروتينات الصغيرة (5–20 كيلو دالتون) ضرورية في الإشارات الخلوية، تفرز من خلية وتؤثر على خلايا أخرى ومن أعضائها الكيموكينات Chemokines والانترفيرونات Interferons والانترلوكينات Interleukines واللمفوكينات Lymphokines وعامل النخر الورمي Tumor necrosis factor (TNF) ولكن ليس الهرمونات أو عوامل النمو.

هناك أنواع كثيرة ومنوعة من مستقبلات السايتوكينات والمهم هنا هي المستقبلات التي ترتبط مع التايروسين كاينيز والتي تدعى الجانس كاينيز Janus kinases (JAKs) و Janus مأخوذة من أسم اله روماني له وجهان، إن JAK يفسفر وينشط بروتينات تنظم جينات معينة تدعى هذه البروتينات بإشارات نقل وتنشيط الاستنساخ Signal transducers and activators transcription (STAT)، وتوجد بروتينات STAT في السايتوبلازم وبعد أن تنشط هذه البروتينات تنتقل إلى النواة وتنظم استنساخ الجينات. وبالرغم من أن كثير من مسارات داخل الخلية تنقل من سطح الخلية إلى النواة حيث تغير من الاستنساخ للجينات، فإن مسار إشارة JAK/STAT توفر احد الطرق المباشرة لذلك. وآلية العمل باختصار أن ارتباط السايتوكين مع المستقبل يعمل على تغيير شكل المستقبل (تقترب أجزائه من بعضها) ويتفسفر JAK في كل جزء، هذه الفسفرة تؤدي إلى فسفرة التايروسين في المستقبل نفسه، الفسفرة الأخيرة تعمل على ربط STAT، يعمل JAK على فسفرة STAT المرتبط بالمستقبل، ثم ينفصل STAT عن المستقبل بشكل مختلف (ثنائي الأجزاء حيث يرتبط STAT مفسفر مع آخر مكوناً Dimer) وينتقل STAT من السايتوبلازم إلى النواة ويتموضع بمواقعه الخاصة في النواة ويرتبط مع أجزاء من DNA (يرتبط مع الممهد Promoter الذي يسطر على تعبير الجينات على DNA) وبروتينات منظمة للجينات وجينات منظمة للاستنساخ وفي نهاية المطاف تؤدي إلى استنساخ الجين الهدف (الشكل4-12).



الشكل (4-12) مسار JAK/STAT (مأخوذ من Alberts et al., 2015)

وبنفس الآلية يمكن أن يكون هذا المسار تثبيطي لجينات معينة، ويعد مسار JAK/STAT الذي يحول الإشارة الكيميائية من خارج الخلية إلى تعبير جيني داخل النواة، يعد مسار رئيسي كبديل عن المراسل الثانوي، كما أن مسار JAK/STAT يتواجد في خلايا الدم البيض WBC لذلك ترتبط مع وظائف الجهاز المناعي للكائن. وجدير بالذكر أن مسار JAK/STAT بقي محافظاً على نفسه في الكائنات المختلفة تطورياً من العفن إلى الديدان إلى اللبائن، ووجد أن حدوث خلل في مسار JAK/STAT يرافقه خلل جيني وراثي أو مكتسب ويؤدي إلى أمراض مختلفة منها الأمراض المناعية والسرطانات. ويذكر أن بعض أنواع STAT مثل 3 و 5 تحفز مسار انزيم Caspase 9 وهو أحد مسارات موت الخلية المبرمج Apoptosis، وذلك من خلال عوامل Bcl-XL و Cytochrome C.

TGF-β :

يعد عامل النمو التحولي بيتا Transforming growth factor β (TGF-β) مجموعة كبيرة من البروتينات (30–40 بروتين في الإنسان) وتكون متشابهة تركيبياً وهي بروتينات تفرز من خلايا وتسيطر على تكاثر وتمايز خلايا أخرى وتعد من ضمن السايتوكينات كما تلعب دوراً في المناعة، السرطانات، الربو القصبي، التليف الرئوي، أمراض القلب، داء السكري، التصلب المتعدد، أمراض الكلى المزمنة، الإيدز، مرض باركنسون، وأمراض أخرى كثيرة، ويعمل TGF-β كهرمون وكوسيط موضعي من خلال مستقبلات سيرين / ثريونين كاينيز Receptor serine threonine kinases وهي نوعان، النوع I والنوع II. يرتبط المستقبل من النوع I مع بروتينات منظمة للجينات تدعى Smad.

Smad :

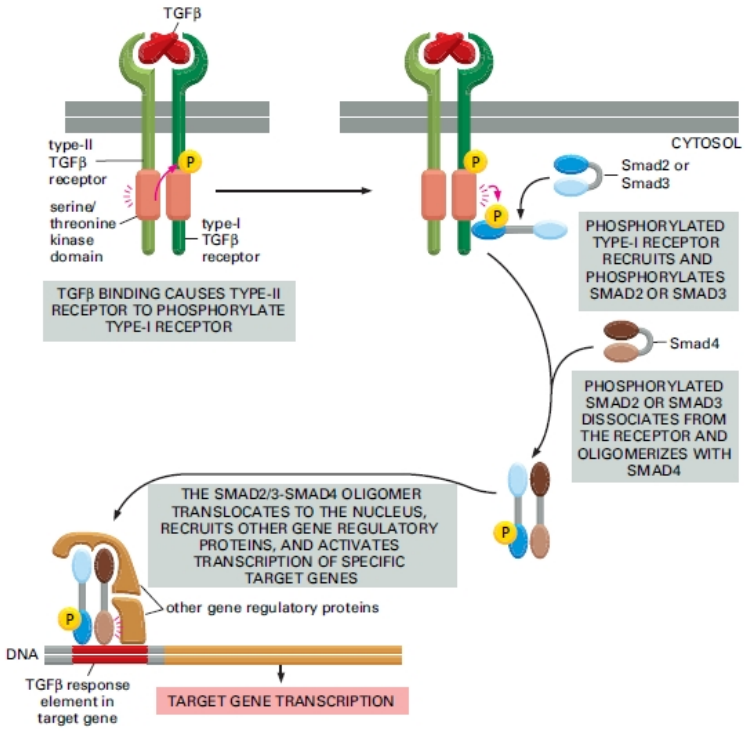
والمصطلح مكون من دمج بروتين Sma الموجود في دودة C. elegans و البروتين Mad الموجود في ذبابة الفاكهة Drosophila، وهي عبارة عن بروتينات داخل خلوية تعمل على نقل الإشارات الخارج خلوية من نوع TGF-β إلى النواة حيث تنظم استنساخ جينات معينة، وهناك ثلاث أنواع رئيسية من Smad هي :

1- 1.المنظمة للمستقبلات (R-Smad) وتشمل Smad1 و Smad2 و Smad3 و Smad5 و Smad8/9.

2- 2.الوسيطة العامة (co-Smad) وتشمل نوع واحد فقط هو Smad4 الذي يتفاعل مع R-Smad في عملية نقل الإشارة.

3- 3.التثبيطي (I-Smad) ويشمل Smad6 و Smad7 اللذان يمنعان تنشيط أنواع R-Smad و co-Smad.

عندما تتفسفر R-Smad فإنها تنفصل عن المستقبل وترتبط مع Smad4 (الذي يمكن أن يكوّن معقد مع أي واحدة من R-Smad الخمسة، بعدها ينتقل معقد Smads إلى النواة حيث يرتبط هناك مع بروتينات مسؤولة عن تنظيم التعبير الجيني للجين الهدف (الشكل 4–13).



الشكل (4-13) مسار TGF−β /Smad (مأخوذ من **Alberts *et al.*, 2015**)

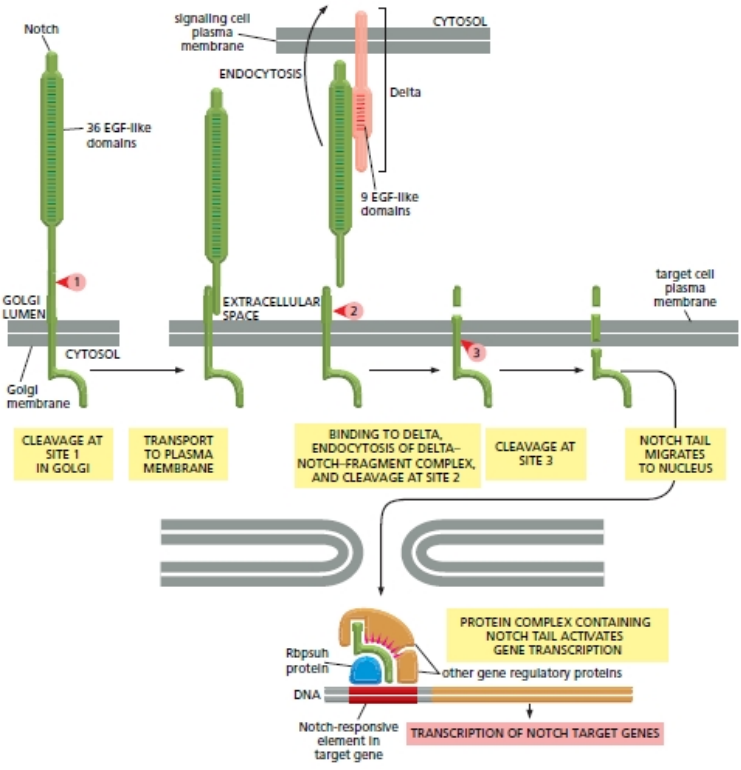
هناك أنواع أخرى من الإشارات الخلوية تختلف عن ما تم شرحه سابقاً في كونها تنقل الإشارات الخلوية من خارج الخلية إلى الداخل بطريقة مختلفة، يعتمد العديد من هذه الإشارات على تحلل البروتين المنظم Regulated proteolysis للسيطرة على البروتينات التي تنظم الجينات الهدف، وسيتم شرح أهم هذه المسارات وهي أربعة: Notch و Wnts و Hedgehog و NFkB.

Notch signaling pathway :

مسار إشارة "الأخدود" Notch signaling pathway، حيث أن مسارات إشارة الخلية من خلال مستقبل Notch ربما تكون الأكثر استعمالاً خلال نمو الحيوانات، وفي اللبائن هناك أنواع مختلفة من مستقبلات Notch، حيث يقوم هذا المسار بالسيطرة على مصير الخلايا وتنظيم تكوين الأنسجة المختلفة والتجدد المستمر لبعض الأنسجة مثل بطانة الأمعاء،

وأكتشف مسار Notch لأول مرة في ذبابة الفاكهة حيث وجد أنه مسئول عن مصير الخلايا العصبية، أما في اللبائن فإن الجين المسئول عن تشفير Notch يدعى الجين Hes حيث يشفر لبروتينات تنظيمية تثبيطية.

وآلية عمل مسار Notch بإيجاز، أن مستقبلات Notch تعاني من ثلاث خطوات متتالية فيها انشطار وتحلل بروتيني، وفي مكان التصنيع (جهاز كولجي) يتم شطر المستقبل ليكون مركب ثنائي غير متجانس والذي ينتقل إلى سطح الخلية كمستقبل ناضج، ارتباط الليكاند الخاص بـ Notch وهو بروتين يدعى دلتا Delta، يحفز الانشطار الثاني في الجزء الخارج خلوي من خلال وسيط هو انزيم محلل بروتيني خارج خلوي، يتبع ذلك وبسرعة الانشطار الثالث والذي يعمل على قطع الذيل الحر للمستقبل في الجهة السايتوبلازمية، هذا الجزء (الذيل) ينتقل إلى النواة ويرتبط بمواقع خاصة على DNA بوجود بروتين متخصص يدعى Rbpsuh كما في الشكل (4-14).



الشكل (4-14) مسار Notch (مأخوذ من Alberts *et al.*, 2015)

ويلاحظ أن مستقبل Notch يختلف عن معظم المستقبلات الأخرى بكون عمله غير عكسي Irreversible حيث عندما يحفز المستقبل بالليكاند، لا يمكن استعمال نفس المستقبل ثانيةً بسبب انشطار أجزائه، وفضلاً عما ذكر سابقاً فإن مسار إشارة Notch تساهم في وظائف خلوية مهمة أخرى منها :

1- وظائف ونمو الخلايا العصبية.

2- ثبات مصير الخلايا البطانية للشرايين وكذلك عملية تكوين الأوعية الدموية Angiogenesis.

3- تنظيم مصير الخلايا في تكوين شغاف القلب Endocardium وعضل القلب Myocardium خلال تمايز ونمو خلايا القلب، وكذلك استتباب خلايا صمامات القلب.

4- نشوء وتخصص خلايا البنكرياس (الصماوية وغير الصماوية).

5- تقرير مصير الخلايا في الجهاز الهضمي مثل الخلايا التي تكون أمام أحد خيارين إما أن تكون خلايا متخصصة بوظائف الامتصاص أو خلايا متخصصة بوظائف الإفراز.

6- توسيع كمية الخلايا الجذعية المكونة للدم Hematopoietic stem cells (HSC) خلال نمو العظام.

7- ضمان تكوين سلالة الخلايا اللمفية التائية T-lymphocytes من الخلايا البادئة اللمفاوية العامة.

8- تنظيم مصير الخلايا في الغدد اللبنية خلال مراحل النمو المختلفة.

كما لوحظ وجود خلل في وظيفة Notch في العديد من السرطانات مثل الليوكيميا من نوع T-cell acute lymphoblastic leukemia، والتصلب المتعدد (MS)، ورباعية فالوت Tetralogy of Fallot وحالات مرضية مختلفة.

Wnt signaling pathway :

مسارات إشارة ونت Wnt وهي مجموعة مسارات بروتينات تنقل الإشارة الخلوية من خارج الخلية عن طريق المستقبلات إلى داخل الخلية، وكلمة Wnt مأخوذة من مقطعين W مأخوذة من اسم جين انعدام الجناح Wingless في ذبابة الفاكهة و nt مأخوذة من جين Int-1

وهو جين في الفئران مسئول عن تشجيع نمو سرطانات الثدي عندما تنشّط بنوع من الفيروسات. كلا الجينين أعلاه يشفران للبروتين Wnt والذي يعد بروتين غريب حيث يمتلك سلسلة حامض دهني مرتبط تساهمياً مع النهاية N لمتعدد الببتيد، ويزيد الحامض الدهني من ألفة ارتباط Wnt مع الغشاء الخلوي.

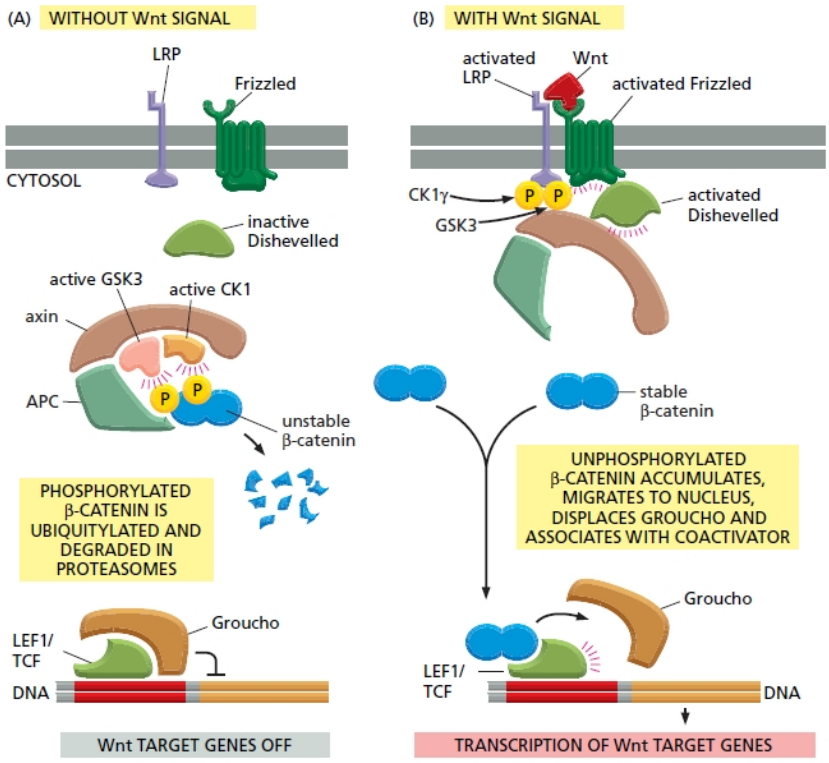
في الإنسان والفئران هناك أكثر من 20 نوع من Wnt لكل منه وظيفة متخصصة لكنها تتداخل أحياناً مع بعضها في الوظائف. و Wnt له دور مهم في نشوء وتطور السرطانات وكذلك النمو الجنيني (حيث يسيطر على نمو محور الجسم، تخصص مصير الخلايا، التكاثر الخلوي، والهجرة الخلوية)، ووجد أن حدوث الطفرات يسبب العديد من الأمراض منها سرطان الثدي وسرطان البروستات والنوع الثاني لداء السكري وأمراض مختلفة أخرى.

وهناك ثلاث مسارات رئيسية للـ Wnt تبدأ عندما يرتبط بروتين Wnt مع مستقبلات من مجموعة Frizzled وهي عبارة عن بروتينات خلال الغشاء الخلوي مطوية 7 مرات (وبذلك تشبه مستقبل GPCR في التركيب) عندما تنشط مستقبلات Frizzled بعد ارتباط Wnt فإن هذه المستقبلات توظف بروتينات أساس Scaffold تدعى Dishevelled والتي تعد ضرورية لنقل الاشارة الخلوية في المسارات الثلاث للـ Wnt وهذه المسارات الثلاث هي:

1- المسار القانوني Canonical pathway:

أو يدعى بمسار Wnt/β-catenin ويتخصص بالبروتين β-catenin المنظم للجينات، و β-catenin عبارة عن بروتين ثنائي الوظيفة حيث ينظم تنسيق التصاق الخلية مع خلية أخرى وكذلك ينظم التعبير الجيني. وعموماً يمكن تلخيص هذا المسار بالشكل (4-15) حيث عند عدم ارتباط Wnt مع المستقبل Frizzled فإن بروتين Dishevelled يكون غير فعال ويكون β-catenin مرتبط مع معقد التحطيم الذي يكسر β-catenin بعد أن تتم فسفرته من خلال CK1 ومن ثم GSK3، ويبقى الجين المسئول عن الاستجابة لإشارة Wnt غير فعالة لاستمرار ارتباط البروتين مثبط هو Grouch co-repressor protein مع بروتينات منظمة للجين هي LEF1/TCF، أما عند ارتباط Wnt مع كل من LRP و Frizzled فإن ذلك يؤدي إلى تقاربهما من بعض وتنشيطهما وهذا يسبب استدعاء معقد التحطيم إلى الغشاء الخلوي

وفسفرة ذيل LRP السايتوبلازمي من قبل GSK3 ومن ثم CK1-γ عندها يرتبط axin مع LRP المفسفرة ويثبط أو يحلل axin، إن فقدان axin من معقد التحطيم يثبط عمل المعقد ويغلق فسفرة β-catenin مما يساهم في تجمع β-catenin غير المفسفرة ويتغير موقعها من السايتوبلازم إلى النواة، وعندما تصل إلى النواة فانها تزيح Grouch وترتبط مع البروتينات LEF1/TCF وبذلك يعمل كمحفز Coactivator لتحفيز الجين أو الجينات الهدف لإشارة Wnt، ويذكر أنه من بين الجينات التي تنشط من قبل β-catenin هو c-myc وهو جين تنظيمي ويشفر للبروتين c-myc وهو عامل استنساخ له العديد من الوظائف منها الفسفرة داخل النواة الذي يلعب دوراً في تقدم دورة الخلية، موت الخلية المبرمج، التحولات الخلوية، ويلاحظ في كثير من السرطانات وجود طفرات في c-myc.



الشكل (4-15) مسار Wnt (مأخوذ من **Alberts *et al.*, 2015**)

2- المسار غير القانوني Noncanonical Wnt pathway:

وهناك نوعان من مسار Wnt غير القانوني أحدهما مسار قطبية الخلية المستوية Planar cell polarity (PCP) pathway حيث لا يتضمن المسار β-catenin، وينشط هذا المسار من خلال ارتباط Wnt مع مستقبل Frizzled والمستقبل المساعد لها co-receptor (LRP) عندها يوظف المستقبل بروتين Dishevelled الذي يستعمل الأجزاء PDZ و DEP ليكون معقد Dishevelled-associated activator of morphogenesis (DAAM1) الذي يقوم بتنشيط G protein Rho الصغيرة التي تنشط كاينيز مرتبط بـ Rho هو Rho-associated kinase (ROCK) والأخير يعد أحد أهم منظمي الهيكل الخلوي.

3- المسار غير القانوني Noncanonical Wnt pathway من نوع ونت/ الكالسيوم Wnt/calcium pathway

هو مسار آخر للـ Wnt لا يستعمل β-catenin وظيفته تنظيم تحرر الكالسيوم من الشبكة الاندوبلازمية ER للسيطرة على مستوى الكالسيوم داخل الخلية، كما في المسارين السابقين للـ Wnt، فبعد ارتباط الليكاند مع مستقبل Wnt فإن مستقبل Frizzled المنشط يتفاعل مع بروتين Dishevelled وينشط أجزاء من Dishevelled والأجزاء التي تدخل في نقل اشارة ونت / كالسيوم هي PDZ و DEP. من ناحية أخرى يختلف هذا المسار عن المسارين السابقين بأن مستقبل Frizzled يكون مواجه بشكل مباشر مع G protein ثلاثي الأجزاء Trimeric، إن تنشيط Dishevelled وG protein يمكن أن يؤدي إلى تنشيط إما PLC أو PDE المتخصص بالـ cGMP.

Hedgehog signaling pathway :

مسار إشارة "القنفذ" والاسم مأخوذ من شكل يرقة ذبابة الفاكهة التي تملك بروزات أبرية وبذلك تشبه القنفذ عند حدوث طفرة في جين Hedgehog المسئول عن التشفير لهذا البروتين.

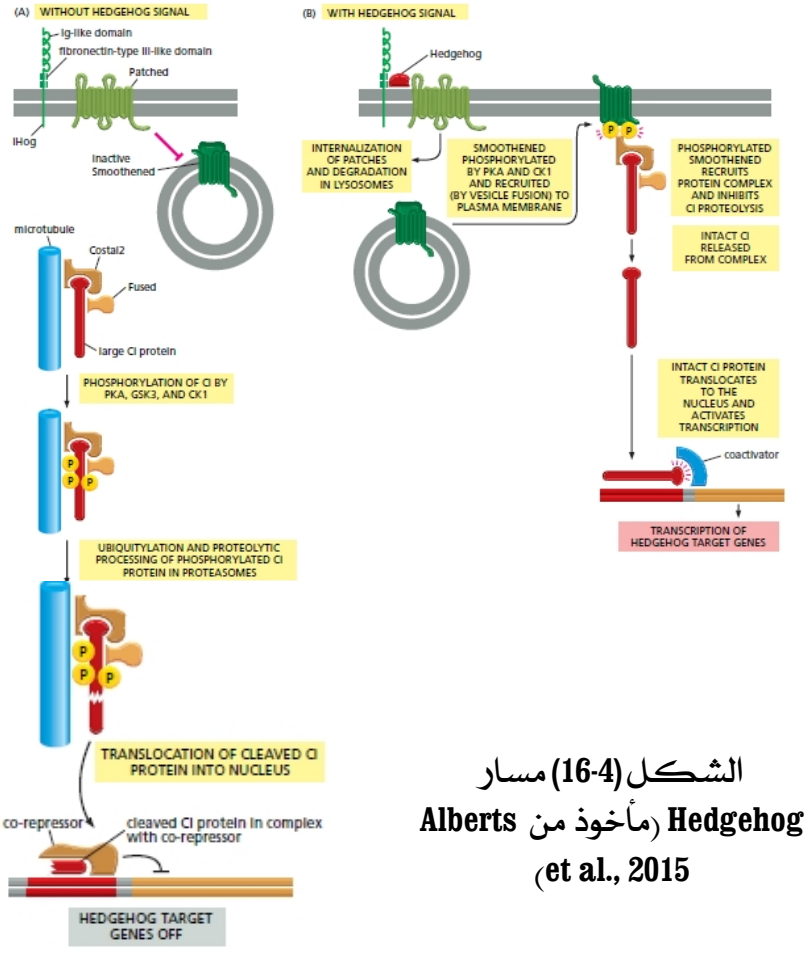
ويعمل مسار Hedgehog بشكل مشابه لمسار Wnt حيث في كلاهما هناك جزيئات إفرازية تعمل كوسيط موضعي في تطور وتشكيل الكائن (الفقريات واللافقاريات) وكلا البروتينين يحوران بالارتباط تساهمياً مع الشحوم لإتمام الوظيفة والتي تتم عن الطريق

الارتباط والتنشيط للبروتينات المنظمة للجينات. إن استمرار إشارة Hedgehog (كما في إشارة Wnt) تسبب أنواع مختلفة من السرطانات، وقد عزل بروتين Hedgehog من ذبابة الفاكهة لأول مرة، وفي الثديات هناك على الأقل ثلاث جينات تنتج بروتينات Hedgehog، ويعد مسار Hedgehog مسار ضروري لنقل الإشارات الخلوية إلى الخلايا الجنينية كي تنمو بشكل سوي، كما لوحظ أن الأجزاء المختلفة للجنين لها تراكيز مختلفة من بروتينات مسار Hedgehog، كما أن للمسار دور في أمراض معينة مثل سرطان الخلية القاعدية Basal cell carcinoma وكذلك دورها في تنظيم عمل الخلايا الجذعية البالغة (ASCs) في المحافظة على وتجديد الأنسجة البالغة، وفي أجنة الفئران ناقصة الجين (ko) لمسار Hedgehog فإن هذه الفئران تفقد النمو الطبيعي لكل من الدماغ والهيكل العظمي والعضلات والرئة والجهاز الهضمي.

ولا زالت تفاصيل هذا المسار غير واضحة في اللبائن لذلك سيتم شرح آلية العمل في الحشرات، حيث هناك ثلاث أنواع من البروتينات خلال الغشاء الخلوي هي: المرقعة Patched والمملسة Smoothened و iHog. البروتين المرقع ينطوي في الغشاء الخلوي 12 مرة وتكون معظم أجزائه داخل خلوية، بروتينات iHog لها 4 أو 5 أجزاء مشابهة للكلوبيولينات المناعية و 2 أو 3 أجزاء مشابهة للفايبرونكتين النوع الثالث Fibronectin type III like domain وتكون جميعها على سطح الخلية ويعتقد أنها تعمل كمستقبل لبروتينات Hedgehog وربما تعمل بالتعاون مع البروتين المرقع، أما البروتين المملس فهو بروتين ينطوي 7 مرات خلال الغشاء الخلوي (تركيبه يشبه كثيراً لبروتين Frizzled).

عند عدم وجود إشارة Hedgehog فإن البروتين المرقع يحجز على البروتين المملس بشكل غير فعال في الحويصلات الداخل خلوية. إن ارتباط بروتين Hedgehog مع iHog والبروتين المرقع يثبط فعالية الأخير ويعمل على تحطيمه مما ينتج عنه تحرر البروتين المملس من الحجز وفسفرته وانتقاله إلى سطح الخلية كي يقوم بنقل الإشارة الخلوية إلى الداخل، ويتم نقل الإشارة باتجاه النواة من خلال بروتين يدعى Cabitus intrruptus (Ci) zinc finger، في حال غياب إشارة Hedgehog فإن بروتين Ci يجزئ بفعل Proteasomes وعملية Ubiquitation، وبدلاً من التحطم الكامل للـ Ci فإنها تجزئ إلى أجزاء بروتينية صغيرة حيث تجتمع في النواة وتعمل كمثبطات للاستنساخ، مما يعمل على إبقاء الجينات المستجيبة للـ Hedgehog خاملة.

إن عملية تحلل بروتين Ci يعتمد على فسفرته من قبل 3 من بروتينات كاينيز من نوع سيرين / ثريونين هي PKA و GSK3 و CK1 (البروتين الثاني والثالث من ضمن مسار Wnt)، تحلل البروتين يحدث في معقد بروتيني متعدد وبروتين تثبيتي هو Costal 2 الذي يكون مرتبط بشكل ثابت مع Ci ويوظف انزيمات الكاينيز الثلاثة ويربط المعقد إلى النبيبات الدقيقة وبذلك يحافظ على Ci غير المعامل بعيداً عن النواة، عندما ينشط مسار Hedgehog ويصبح البروتين المملس طليقاً في الغشاء الخلوي فإنها تستخدم معقدات البروتينات Ci و Costal 2 و كاينيز من نوع سيرين / ثريونين، إن Costal 2 لا يستطيع الارتباط مع إنزيمات الكاينيز الثلاثة لذلك فإن Ci لا ينشطر، Ci غير المعامل هذا يمكنه الدخول إلى النواة وينشط الجينات الهدف بمسار Hedgehog (الشكل 4-16)،



الشكل (4-16) مسار Hedgehog (مأخوذ من Alberts et al., 2015)

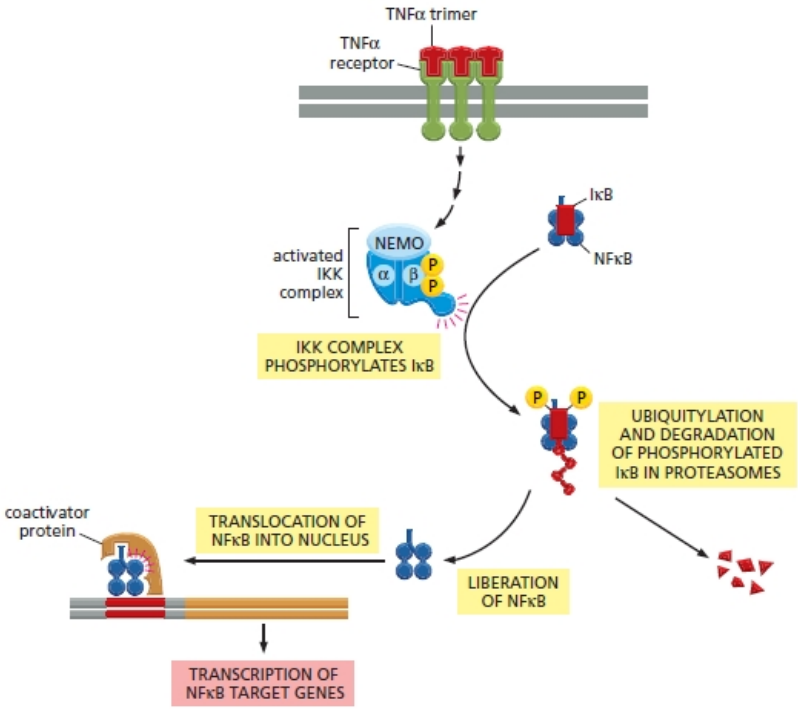
وفي الفقريات تشجع إشارة Hedgehog التكاثر الخلوي، وزيادة فعالية الإشارة يمكن أن تسبب بعض أنواع السرطانات مثل سرطان الجلد من نوع سرطان الخلية القاعدية (وهي من أكثر أنواع السرطانات انتشاراً عند القوقازيين) لذلك يتم توجيه بعض علاجات هذه السرطانات لغلق مسار Hedgehog كما في استعمال جزيئات صغيرة تدعى Cyclopamine التي ترتبط بقوة مع البروتين المملس وتثبط فعاليته وبذلك تغلق مسار Hedgehog.

: NFkB

إن الإشارة الخلوية المعتمدة على NFkB تتم من خلال بروتينات تنظيمية لجينات هدف لها، ومصطلح NFkB هو مختصر للسلسلة الخفيفة للعامل النووي كابا المعزز للخلايا اللمفاوية البائية المنشطة Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells، وتتواجد هذه البروتينات في معظم أو كل الخلايا الحيوانية، ويكون لها دور مركزي في الاستجابة لكل من: الالتهابات، الإجهاد، المناعة الذاتية، السايتوكينات، الجذور الحرة (FR)، التعرض للأشعة فوق البنفسجية UV، الشحوم البروتينية المؤكسدة o-LDL، والمستضدات البكتيرية والفيروسية، ويلعب دوراً في مرونة الاشتباكات العصبية، وعمليات الذاكرة.

إن بروتينات NFkB له دور مهم خلال النمو الطبيعي للحيوان وهناك العديد من مستقبلات سطح الخلية التي تنشط مسار إشارة NFkB، فمثلاً مستقبلات Toll في ذبابة الفاكهة والمستقبلات الشبيهة بها Toll-like في الفقريات تتعرف على الكائنات الممرضة Pathogens وتنشط مسار NFkB ضمن الاستجابة المناعية الذاتية، كأن مستقبلات أخرى مثل مستقبلات TNF و IL-1 (والتي تكون ضرورية ضمن الاستجابة الالتهابية) تنشط مسار إشارة NFkB، وكلمة Toll تعني باللغة الألمانية مدهش أو عظيم للأهمية الكبيرة لهذه الجينات في التكوين الجنيني.

أما آلية العمل (الشكل 4-17) باختصار عند التنشيط تحفز المستقبلات (ما ذكر أعلاه)، فإن عملية Ubiquitation وفسفرة عدة بروتينات متسلسلة تؤدي في النهاية إلى تحرر NFkB من معقد البروتين التثبيطي ويؤدي ذلك إلى تشغيل مئات الجينات التي تساهم منتجاتها في عملية الاستجابة الالتهابية والاستجابة المناعية الذاتية.

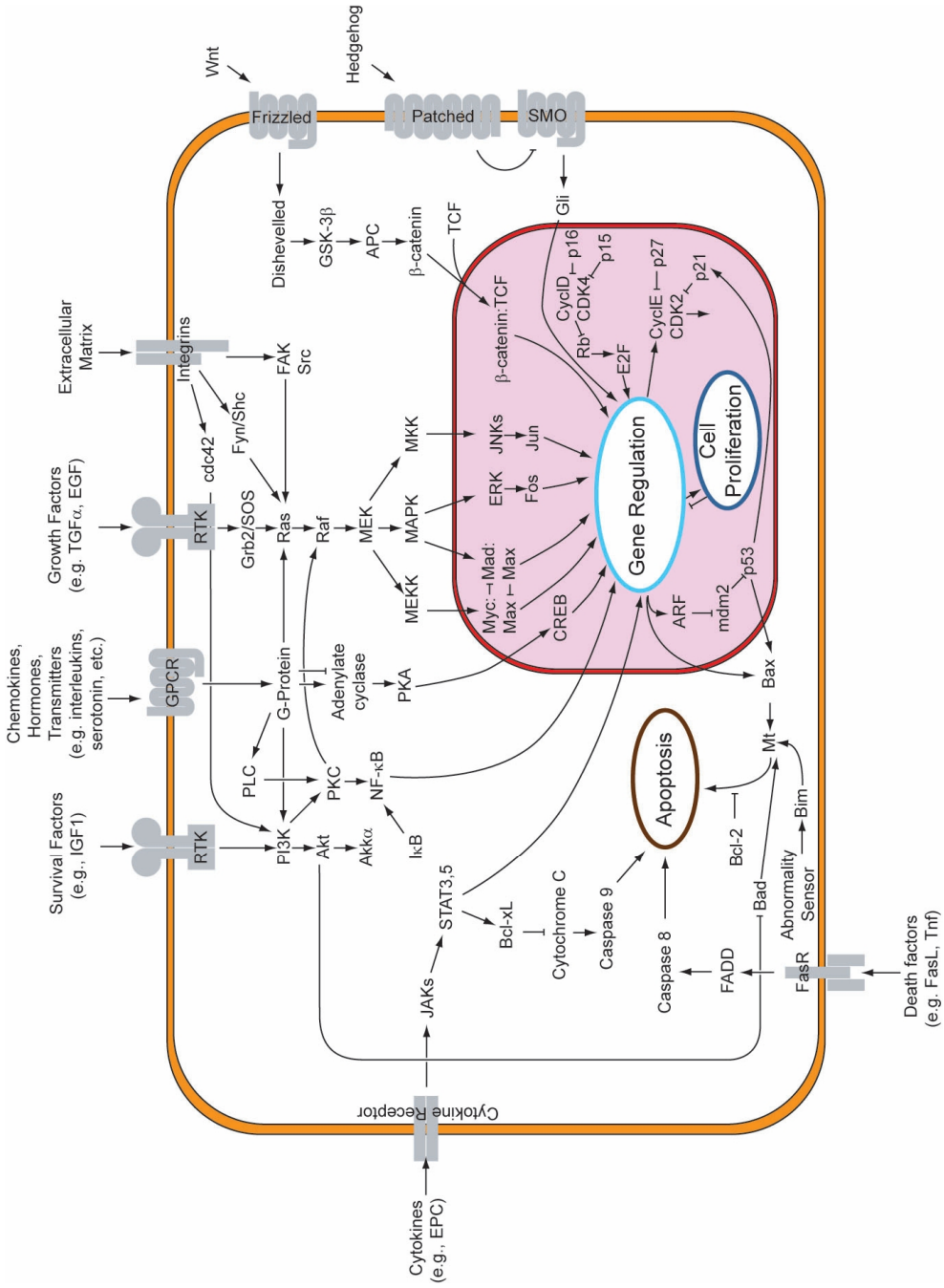


الشكل (4-17) مسار NFkB (مأخوذ من **Alberts *et al.*, 2015**)

وفي اللبائن هناك على الأقل خمسة أنواع من بروتينات NFkB هي: RelA و RelB و c-Rel و NF-kB1 و NF-kB2، تكون هذه البروتينات جزيئات أحادية وثنائية منوعة، كل واحدة تكون مسؤولة عن تنشيط جيناتها الهدف (الشكل 4-17).

ويوضح الشكل التالي (الشكل4-18) ملخصاً مبسط لمعظم مسارات الإشارات الخلوية والتي تم التطرق إليها في هذا الفصل.

وأخيراً فإن فصل ضمن كتاب لا يمكن بأي حال من الأحوال أن يغطي كل جوانب موضوع معقد ومتفرع جداً مثل الإشارات الخلوية وحاولنا جاهدين في الصفحات الماضية التطرق لأهم النقاط وأبرز الآليات الخاصة بأهم الإشارات الخلوية مع التركيز على الخلايا الحيوانية، ولمن أراد التوسع في الموضوع الرجوع إلى المصارد المذكورة في نهاية هذا الفصل وغيرها من المصادر الكثيرة جداً، ولإيضاح مدى التوسع والتطور في مجال الإشارات الخلوية



الشكل (4-18) مسارات الاشارات الخلوية في اللبائن

تم عمل إحصائية بسيطة (الجدول 4-1) لعدد البحوث العلمية المنشورة في موقع Pubmed العلمي الشهير، لكل مجموعة من الإشارات الخلوية.

الإشارة الخلوية	عدد البحوث العلمية لغاية منتصف عام 2016
Signal transduction pathway	490000
MAPK	170000
RTK	137000
NFkB	105000
GPCR	87000
STAT	83000
cAMP	83000
Wnt	50000
Notch	49000
GTPase	45000
Hedgehog	25000
Janus kinase	13000
المجموع التقريبي	أكثر من مليون و 300 ألف بحث

أهم المراجع :

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. **Molecular Biology of the Cell.** 6th Edition. (2015). Garland Science.

David L. Nelson and Michael M. Cox. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 6th Edition. (2012). W.H. Freeman.

Gerald Karp. **Karp's Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments.** 6th Edition. (2009). John Wiley & Sons.

Gerhard Krauss. **Biochemistry of Signal Transduction and Regulation.** 5th Edition.. (2014). Wiley-VCH.

Harvey Lodish , Arnold Berk , Chris A. Kaiser , Monty Krieger , Anthony Bretscher , Hidde Ploegh , Angelika Amon , Kelsey Martin. **Molecular Cell Biology.** 8th Edition. (2016). W. H. Freeman.

Lewis Cantley , Tony Hunter , Richard Sever , Jeremy Thorner**. Signal Transduction: Principles, Pathways, and Processes**. (2014). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Victor Rodwell, David Bender, Kathleen M. Botham , Peter J. Kennelly , P. Anthony Weil. **Harpers Illustrated Biochemistry.** 30th Edition. (2015). LANGE.

الفصل الخامس

الكروموسوم

Chromosome

الفصل الخامس

الكروموسوم
Chromosome

كلمة كروموسوم Chromosome مؤلفة من مقطعين: Chromo وتعني صبغة أو لون، و Some وتعني جسم، لذلك تترجم الكلمة إلى الجسيم الصبغي، وهو عبارة عن تركيب منظم ومعقد يحوي معظم DNA الكائن الحي، ويتكون من المادة الوراثية (DNA) والبروتينات التركيبية (الهستونات) وعوامل الاستنساخ Transcription factors وجزيئات أخرى، ويتكون الكرموسوم عادة من ارتباط كروماتين مع كروماتين آخر في منطقة ربط بروتينية تدعى السنترومير Centromere، ويمكن مشاهدة الكروموسوم تحت المجهر الضوئي عندما تمر الخلية بمراحل الانقسام الخلوي Mitosis فقط (في الحقيقة ليس في كل مراحل الانقسام الخلوي بل في مرحلة الطور Metaphase من الانقسام الخلوي، حيث في هذه المرحلة تترتب الكرموسومات مع بعضها وترتبط مع خيوط المغزل للبدء بانقسام الخلية الأم إلى خليتين بنويتين).

إن DNA الكرموسوم والبروتينات المرافقة لها والجزيئات الكبيرة معها تدعى سويةً بالكروماتين، ويوجد الكروماتين في معظم الخلايا مع بعض الاستثناءات (مثل كريات الدم

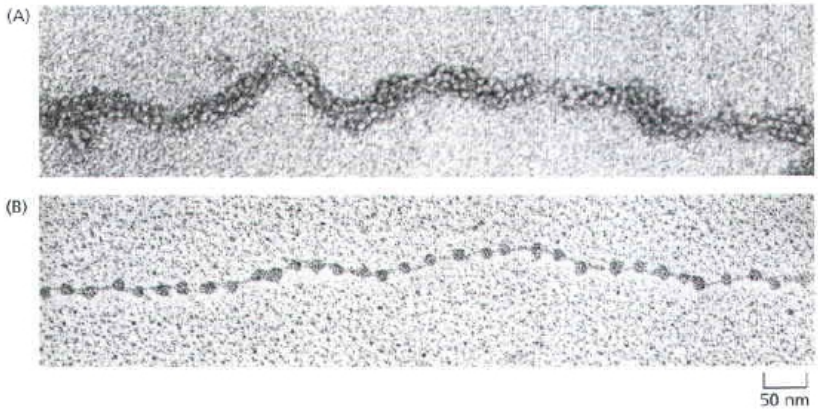
الحمر)، ويتواجد في نواة الخلايا حقيقية النواة ويشكل غالبية المادة الوراثية للكائن الحي (وهناك كمية صغيرة من DNA تتواجد في المايتوكوندريا وتتوارث أمياً وتسمى mtDNA)، بينما في الخلايا بدائية النواة يتواجد الكروماتين حراً في السايتوبلازم لكون هذه الخلايا ليس لها نواة حقيقية أو غلاف نووي. وهذه الخلايا بدائية النواة مثل البكتريا و Archea فإنها تملك كرموسوم حلقي واحد مع وجود بعض الاختلافات النادرة، ويختلف حجم الكرموسوم في الخلايا بدائية النواة من 130000 قاعدة مزدوجة كما في البكتريا التعايشية Symbiotic إلى أكثر من 14000000 في بكتريا التربة والسبايروكيتا، وهناك حالات شاذة كما في بكتريا Borrelia burgdorferi (المسببة لمرض لايم Lyme disease) حيث لهذه البكتريا كروموسوم واحد ولكن يكون بشكل خيطي مستقيم وليس حلقي كباقي البكتريا.

تركيب الكروموسوم :

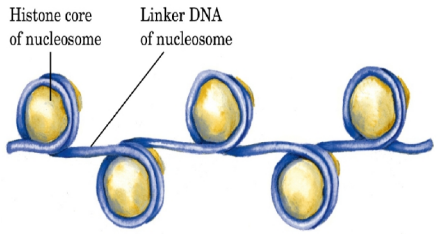
طول DNA يعد كبيراً مقارنة مع حجم النواة وحجم الخلية، حيث يقدر طول DNA الخلية الحيوانية (اللبائن) بحوالي 2 متر (عند افتراض ربط جميع DNA في الخلية على شكل خيط واحد)، عليه يحتاج DNA إلى رزم بطريقة دقيقة كي يكون متناسب مع حجم الخلية وتسمى هذه العملية بمعدل الرص أو الرزم Packing ratio ويمثل طول DNA مقسم على طوله بعد الرزم، ويمكن تشبيه ذلك بخيط رفيع جداً طوله 40 كيلومتر يرزم إلى حجم كرة التنس !! حيث لايتجاوز حجم النواة 6 مايكرومتر يرزم بداخله DNA بطول 2 متر. وفي الانسان فإن أقصر كروموسوم يحوي 46 مليون قاعدة من DNA (وهذا يعادل تقريباً عشرة أضعاف جينوم بكتريا E. coli) ويعادل 14000 مايكرومتر بينما خلال الانقسام الخلوي فإن طول هذا الكروموسوم يكون بحدود 2 مايكرومتر، أي بمعدل رزم يبلغ 14000/ 2 = 7000. وبالرغم من هذا المعدل العالي للرزم فإن أي قطعة من DNA (الجين المعين) يكون جاهز لعملية الاستنساخ عند الحاجة لذلك.

وللحصول على معدل رزم عالي فإن DNA يرزم بعدة مستويات (الشكل5-a1)، أول هذه المستويات هو التفاف DNA حول بروتينات قاعدية تدعى الهستونات Histones مكونةً تراكيب تشبه الخرز المربوط بالخيط (المسبحة) Beads on a string (الشكل5-b1 والشكل 5-2) يدعى النيوكليوسوم Nucleosome والذي يوفر معدل رزم بحدود 6. أما المستوى

الثاني من الرزم فيتم من خلال رص DNA بشكل تركيب حلزوني يدعى الليف 30 نانومتر 30 nanometer fiber ويوفر هذا التركيب معدل رزم بحدود 40، أما المستوى الأخير من الرزم فيكون عندما تنتظم خيوط DNA بشكل حلقات Loops وسكلات Scaffolds ونطاقات Domains، وتعطي هذه التراكيب معدل رزم بحدود 1000 في الكروموسوم في الطور البيني Interphase وبحدود 10000 في الكروموسومات عند الانقسام الاختزالي Mitotic.

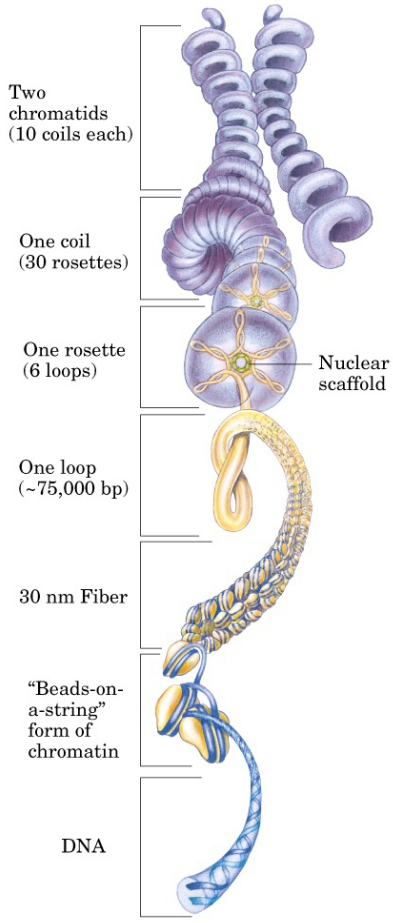


A



B

الشكل (1-5) مأخوذ من Nelson and Cox, 2012)
a . مستويات رزم DNA ضمن الكروموسوم.
b. النيوكليوسوم



الشكل (2-5) خيط DNA والنيوكليوسوم تحت المجهر الالكتروني
(مأخوذ من Nelson and Cox, 2012)

في اللبائن يكون DNA موزع على مجموعة الكروموسومات، فمثلاً في الانسان هناك حوالي 3.2 مليار قاعدة مزدوجة (6.4 مليار نيوكليوتيد) تكون موزعة على 46 كروموسوم، ويتكون كل كروموسوم من DNA واحد طويل جداً، يكون مرتبط مع بروتينات متخصصة تعمل على رزمه في تراكيب معقدة، فضلاً عن العديد من الانزيمات والعوامل التي تنظم وتساهم في عمليات تضاعف DNA، الاستنساخ، الإصلاح...

ويذكر أن تركيب الكروموسوم ديناميكي وليس ثابت، حيث يزال رزم مناطق معينة من الكروموسوم للسماح بتسلسلات معينة من DNA للتعبير الجيني، الإصلاح، والتضاعف، ثم يعاد رزمها بعد إكمال هذه العمليات، لذلك فإن عمليات رزم DNA ينظم بطريقة بحيث تسمح بسرعة تحديد مواقع على DNA التي تجري عليها العمليات أعلاه.

وباستثناء خلايا الأمشاج (النطف والبيوض) وبعض الخلايا المتخصصة غير القادرة على الانقسام الخلوي (مثل كريات الدم الحمر)، فإن كل خلايا اللبائن تحوي نسختين من DNA (أحدهما قادم من الأب والآخر من الأم)، ويدعى زوج الكروموسومات الأبوية والأمية بالكروموسومات المتجانسة Homologous chromosomes (Homologs)، وزوج الكروموسومات الوحيد الذي يكون غير متجانس Nonhomologous هو الكروموسومات الجنسية في الذكور، حيث يأخذ الكروموسوم Y من الأب والكروموسوم X من الأم، لذلك فإن كل خلية جسمية في الإنسان لها 46 كروموسوم، 22 زوج متشابه في الذكور والإناث، فضلاً عن زوج من الكوموسومات الجنسية هي XY في الذكور و XX في الإناث، وعموماً يتم دراسة شكل وأعداد الكروموسومات من خلال Karyotype حيث يكتشف من خلالها زيادة أو نقصان العدد الكلي للكروموسومات وأي كروموسوم يعاني من زيادة أو نقص وكذلك وجود إضافة أو حذف لجزء أو أجزاء من كروموسوم معين من خلال دراسة نمط الأشرطة Banding pattern للكروموسومات ويدعى هذا الفرع من العلوم البيولوجية بعلم وراثة الخلية Cytogenetic.

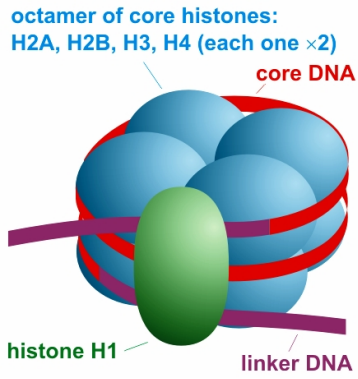
النيوكليوسومات Nucleosomes :

البروتينات التي ترتبط مع DNA لتكون الكروموسومات في الخلايا حقيقية النواة تقسم إلى قسمين هما الهستونات والبروتينات غير الهستونية Nonhistone proteins، توجد الهستونات بكميات كبيرة في الخلية (حوالي 60 مليون جزيئة من كل نوع من أنواع الهستونات لكل خلية) وبذلك تكون كميتها في الكروماتين مقاربة لكمية DNA، تكون الهستونات مسؤولة عن المستوى الأول والأهم من الرزم والذي يدعى بالنيوكليوسوم، وهو عبارة عن DNA وبروتين الهستون، أكتشف لأول مرة عام 1974، وتحت المجهر الالكتروني يمكن مشاهدة النيوكليوسومات (الشكل5-2)، حيث تم دراسة تركيبها بشكل مستفيض بعد

تحطيم DNA الرابط Linker DNA بين كل نيوكليوسومين عن طريق إنزيمات Nucleases.

كل نيوكليوسوم يتكون من 8 بروتينات هستون وهي زوج من كل من: H2A و H2B و H3 و H4، فضلاً عن حلزون مزدوج من DNA بطول 147 زوج من القواعد يلتف حول معقد الهستون. البروتينات الثمانية تدعى الهستون ثماني الأجزاء Histone octamer وتكوّن لب بروتيني Protein core، ويفصل بين هستون وآخر DNA يدعى بالرابط Linker DNA والذي يختلف طوله من بضع نيوكليوتيدات إلى 80 نيوكليوتيد، ويتكرر النيوكليوسوم كمعدل كل 200 نيوكليوتيد، واذا اضفنا 80 إلى 146 نيوكليوتيد، وبالرجوع إلى أن نواة الخلية الجسمية في الانسان تحوي 6.4 مليار من النيوكليوتيدات، يكون عدد النيوكليوسومات في نواة الخلية الجسمية الواحدة حوالي 30 مليون نيوكليوسوم.

التركيب الدقيق للنيوكليوسوم لم يعرف إلا حديثاً (في السنوات العشرين الأخيرة) حيث يعتقد العلماء أن الهستون يكون بشكل قرص يلتف حوله DNA بطول 1.7 لفة وباتجاه عقارب الساعة (لف اليد اليسرى) الشكل (5-3).



الشكل (3-5) تركيب النيوكليوسوم

أنواع الهستونات الاربعة المكونة للب النيوكليوسوم هي بروتينات صغيرة نسبياً (100-135 حامض أميني) ولها تركيب مشترك يدعى طية الهستون Histone fold والذي يتكون من ثلاث حلزونات ألفا Three alpha helices ترتبط مع بعضها من خلال لوبين Two loops.

خلال تجمع الهستونات لتكوين لب النيكليوسوم فإن طيات هذه الهستونات ترتبط مع بعضها مكونة ثنائي الأجزاء Dimers من H3-H4 و H2A-H2B ثم يرتبط ثنائي الأجزاء H2A-H2B ليكون رباعي الاجزاء Tetramers، بعد ذلك يرتبط رباعي الأجزاء مع اثنين من ثنائي الأجزاء (H2A-H2B) مكوناً لب ثماني الأجزاء الصلد Compact octamer core، والذي يلتف حولها DNA.

هناك عدة قوى تعمل على ربط DNA مع الهستونات ومنها :

1- الأواصر الهيدروجينية (142 أصرة هيدروجينية) تتكون بين خيط DNA ولب الهستون في كل نيوكليوسوم، نصف هذه الأواصر تكون بين العمود الفقري (الأحماض الأمينية) للهستونات وبين العمود الفقري (الفوسفات ثنائي الأستر) للـ DNA.

2- تداخلات نافرة من الماء وارتباطات ملحية تعمل أيضاً على ربط DNA مع بروتينات الهستونات ضمن النيوكليوسوم، حيث أن أكثر من خمس الأحماض الأمينية في كل لب هستون هو إما لايسين Lysine أو أرجنين Arginine، وهما من الأحماض الأمينية القاعدية، حيث تعمل الشحنة الموجبة التي تحملها هذه الأحماض الأمينية على جذب ومعادلة الشحنة السالبة لـ DNA، وهذا يفسر لماذا أي قطعة DNA يمكن أن ترتبط مع الهستونات، وجدير بالذكر هنا أن التفاف DNA حول الهستونات لا يكون انسيابي ومستوي بسبب أن سطح الهستونات لا يكون متجانس Non-uniform surface وهذا يحتاج إلى ضغط الحيز الصغير Minor groove من خيط الحلزون المزدوج للـ DNA ويلاحظ أن هناك نيوكليوتيدات ضمن DNA ترتبط مع الهستونات بقوة أكثر من باقي النيوكليوتيدات فضلاً عما ذكر فإن كل هستون له نهاية أمينية N-terminal للحامض الأميني يدعى "ذيل" وتلعب هذه الذيول دوراً في تحويرات تساهمية بأنواع مختلفة وبذلك تسيطر على وظيفة وتركيب الكروماتين، كما يعد الهستون من أكثر البروتينات المحافظة في الكائنات حقيقية النواة، فمثلاً تسلسل الأحماض الأمينية للهستون H4 تكون محافظة على تسلسلاتها في كائنات بعيدة بيولوجيا عن بعضها، فقد لوحظ وجود اختلاف في حامضين أمينيين فقط في H4 بين الفاصوليا والأبقار من بين 102 حامض أميني، هذه المحافظة العالية جداً على التسلسلات ربما تشير إلى أن معظم هذه الأحماض الأمينية ضمن بروتين الهستون لها وظائف حيوية، لذلك حدوث تغيير في أي

موقع لهذه الأحماض الأمينية يسبب الأذى والضرر للخلية ككل، وتم دراسة ذلك في خلايا الخمائر Yeast cells حيث تم إجراء طفرات مختلفة في الجين المسئول عن التشفير لبروتين الهستون، معظم هذه الطفرات أدت إلى موت الكائن، القليل من الطفرات التي لا تسبب الموت لهذه الخمائر تؤدي إلى تغيير في التعبير الجيني وحدوث اضطرابات أخرى.

مقابل هذه المحافظة على بروتينات الهستونات، فإن الخلايا حقيقية النواة تنتج كميات ضئيلة متخصصة من الهستونات التي تختلف في تسلسل الأحماض الأمينية عن الهستونات الرئيسية وهذا يؤدي إلى تحويرات تساهمية تضاف إلى الهستونات في النيوكليوسوم، وربما تكون أحد أسباب الأختلافات الكبيرة في تركيب الكروماتين، ويعد ذلك ضرورياً لإتمام الوظائف المعقدة للـ DNA في الكائنات الحقيقية النواة المتقدمة مثل اللبائن.

ومن الأمور المثيرة أن ارتباط DNA مع الهستونات يكون ديناميكي، حيث كان الاعتقاد السائد لدى العلماء أن النيوكليوسوم يتموضع في مكانه بسبب الارتباط القوي بين DNA والهستونات، لكن تبين فيما بعد أن النيوكليوسوم تركيب ديناميكي حيث بينت بعض التجارب أن الحلزون المزدوج لـ DNA ينفك عن الهستون ومن الجهتين بمعدل 4 مرات في الثانية الواحدة ويبقى منفك جزئياً عن لب الهستونات لمدة 10–15 ملي ثانية ليعود ويرتبط معها مرة أخرى.

يعد ابتعاد DNA عن الهستونات ضرورياً ضمن تركيب الكروماتين، ويتم ذلك من خلال معقدات إعادة تشكيل الكروماتين المعتمدة على (ATP) (ATP dependent chromatin remodeling complexes) الوحدة المكونة لهذه المعقدات والمسئولة عن تحلل ATP لها علاقة مع انزيمات DNA helicases (وهي إنزيمات تقوم بفصل خيطي الحلزون المزدوج عن بعضهما) هذه المعقدات تكون مرتبطة مع كل من الحلزون المزدوج DNA وبروتينات اللب للهستونات، وباستعمال الطاقة الناتجة من تحلل ATP تقوم بتحريك DNA على النيوكليوسوم، كما أن هذه الوحدات تغير بشكل مؤقت تركيب النيوكليوسوم مسببةً ضعف ارتباط DNA مع لب الهستون، وبدورات متكررة من تحلل ATP تقوم معقدات إعادة تشكيل الكروماتين بـ "انزلاق النيوكليوسوم" Nucleosome sliding وبتحريك DNA على الهستونات بهذه الطريقة تجعل DNA النيوكليوسومي عرضة للعديد من

البروتينات والعوامل في الخلية، ومنها البروتينات التي تساهم في عمليات التضاعف والاستنساخ والإصلاح.

فضلاً عن ذلك فإن بعض معقدات إعادة تشكيل الكروماتين وبالتعاون مع بروتينات تحمل شحنة سالبة تعمل كـبروتينات مرافقة (الجابيرونات) Chaperones، تقوم بإزالة كل أو جزء من لب الهستونات من النيوكليوسوم اما بتحفيز استبدال هستونات H2A-H2B أو بإزالة اللب ثماني الأجزاء Octamer.

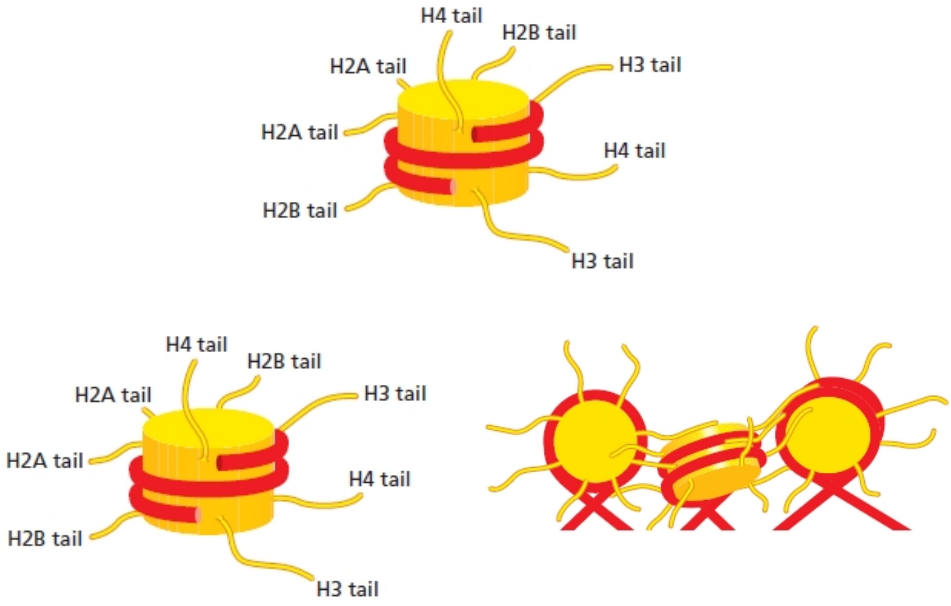
تحوي الخلية العشرات من هذه المعقدات والتي تكون متخصصة لوظائف محددة، كل واحدة تتكون من 10 وحدات تركيبية أو أكثر، فعالية هذه المعقدات يسيطر عليها من قبل الخلية بدقة متناهية. عندما يراد للجين أن يعمل أو يغلق Turned on or off، فإن معقدات إعادة تشكيل الكروماتين تعمل على جزء محدد ومتخصص من DNA الذي هو الجين الهدف أو جزء منه أو أجزاء أخرى تسيطر على فعالية الجين الهدف.

وبالرغم من أن النيوكليوسوم يتكون على أي موقع على طول DNA، إلا أن الباحثين وجدوا أن هناك بروتينات متخصصة تكون مرتبطة مع DNA تعمل على تشجيع تكون النيوكليوسوم في هذه المواقع أو بالعكس حيث تعمل على دفع تكون النيوكليوسوم بعيداً عنها، لذلك فإن موقع تكون النيوكليوسوم على DNA لا يكون عشوائياً بل يحدد من خلال وجود بروتينات (وطبيعة هذه البروتينات) متخصصة مرتبطة مع DNA وبوجود معقدات تحوير الكروماتين فإن ترتيب النيوكليوسوم على طول DNA يكون ديناميكي دائم وسريع التغيير اعتماداً على حاجة الخلية.

الليف 30 نانومتر 30 nm fiber :

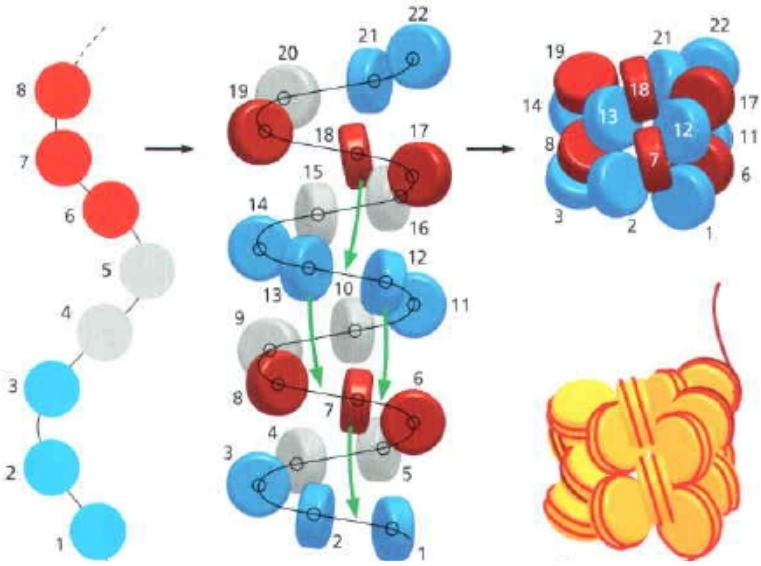
بالرغم من انتشار النيوكليوسوم لكن من النادر أن تجد تركيب الخرز على الخيط بشكل حر في الخلية الحية، وبدلاً من ذلك فإن النيوكليوسومات ترزم مع بعضها واحدة بالقرب من الأخرى مكونةً ليف قطره 30 نانومتر ويمثل مستوى الرزم الثاني لـ DNA. أما آلية رزم النيوكليوسومات لتكون الليف 30 نانومتر فلا زالت غير واضحة بدقة حيث من خلال دراسة التحليل التركيبي الدقيق باستعمال تقنية دراسة البلورات بأشعة اكس X-ray

crystallography فإن الباحثين افترضوا تكوين شكل أو نموذج متعرج Zigzag للنيوكليوسومات مكونةً ما يسمى ليف 30 نانومتر. أما دراسات المجهر الالكتروني التجميدي Cryoelectrone microscope فتشير إلى أشكال مختلفة تماماً هي تراكيب ملفة اسطوانية Solenoids مع نيوكليوسومات بينية (الشكل5-4).

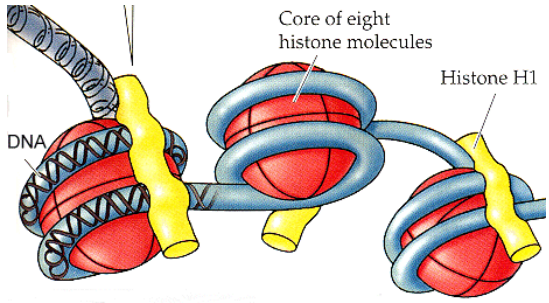


الشكل (5-4) تركيب Solenoid (مأخوذ من **Alberts *et al.*, 2015**).

أما القوى التي تجعل النيوكليوتيدات متراصة مع بعضها لتكون ليف 30 نانومتر فتتمثل بوجود ارتباطات بين النيوكليوسومات تتكون من ذيول الهستونات (ذيل H4) (الشكل5-5) فضلاً عن وجود الهستونات الإضافية التي توجد بنسبة 1: 1 مع هستونات اللب وتعرف بالهستون H1 وتدعى أيضاً بالهستونات الرابطة وتكون أكبر حجماً من هستونات اللب وأقل محافظة منها، جزيئة H1 واحدة ترتبط مع كل من النيوكليوسوم و DNA والبروتين، وتغير من مسار DNA لأنها تبرز خارج النيوكليوسوم كما في الشكل (5-6).



الشكل (5-5) ترتيب النيوكليوسومات مع بعضها لتكوين الليف 30 نانوميتر (مأخوذ من **Alberts *et al.*, 2015**).



الشكل (5-6) دور الهستون H1 في ربط DNA مع النيوكليوسوم

الكروماتين Chromatin :

بعد الحديث عن رزم DNA ضمن الكروماتين يجب ذكر دور التراكيب والأشكال التي يتميز بها والتي لها دور في السيطرة على تنظيم التعبير الجيني، إن بعض تراكيب الكروماتين يمكن أن تورث، أي تنتقل من خلية أبوية إلى بنوية ومن جيل الإباء إلى جيل الأبناء، ولكن هذه الطريقة من الوراثة تعتمد على تراكيب البروتينات وليس تسلسلات DNA لذلك تسمى بالوراثة فوق الجينية Epigenetic inheritance حيث أن الاسابقة Epi تعني فوق (on) وهي تسمية صحيحة حيث تنقل المعلومات الوراثية فوق المعلومات التي تنقل من خلال DNA. إن تركيب الكروماتين يعد ضرورياً جداً ويلعب دوراً مركزياً في عمليات النمو والتطور وبقاء الكائن الحي ذو الخلايا حقيقية النواة على قيد الحياة.

من خلال دراسة تركيب الكروماتين عن طريق المجهر الضوئي وجد أن هناك نوعين من الكروماتين في نواة الخلية التي تمر في الطور البيني من الانقسام الخلوي في الكائنات الحقيقية النواة المتقدمة. النوع الذي يكون أكثر كثافة ويسمى الكروماتين المغاير Heterochromatin والباقي (الأقل كثافة) يدعى الكروماتين الحقيقي Euchromatin، وهناك اختلافات جزيئية بين النوعين، الكروماتين المغاير يمثل نوع الكروماتين المتراص Compact، وبالرغم من انه يتواجد في مواقع مختلفة إلا أن وجوده يتركز في الجسيم المركزي Centromere والتيلومير Telomere، وفي خلايا اللبائن فإن 10٪ من الجينوم يكون في هذا الجزء من الكروماتين.

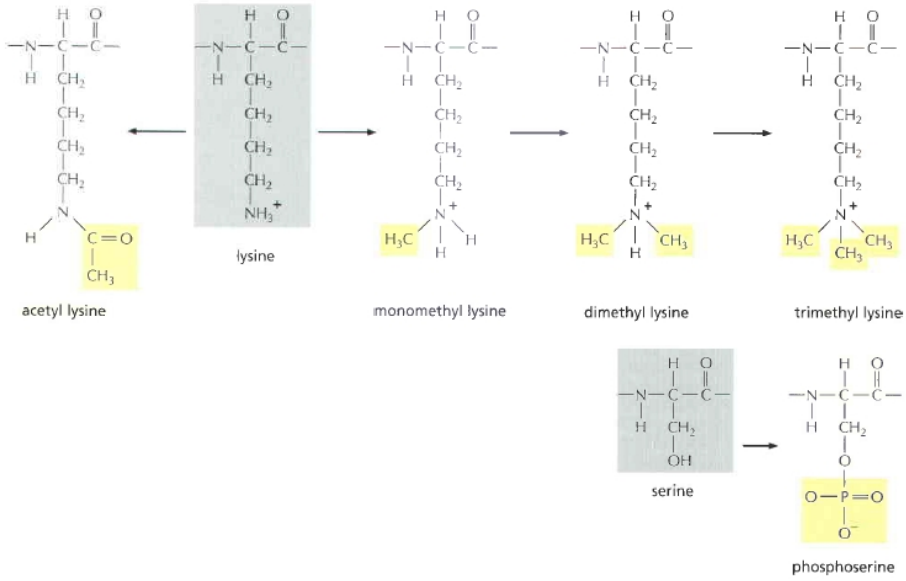
عدد الجينات في الكروماتين المغاير يكون قليلاً جداً وعندما يرزم الكروماتين الحقيقي إلى كروماتين مغاير فإن جينات الكروماتين الحقيقي تطفأ بسبب هذا النوع من الرزم، واليوم معروف أن هناك أنواع متعددة من الكروماتين تدخل تحت مسمى الكروماتين المغاير، تشترك في أن لها درجات رزم عالية، وهنا يجب الانتباه إلى أن الكروماتين المغاير لا يعني أن DNA "ميت" بل هو نوع مختلف في الرزم يعطيه صفة مميزة هي صعوبة تعبير الجينات الواقعة ضمنه، كما وجد من خلال التجارب أن جينات معينة لها تعبير جيني طبيعي ضمن الكروماتين الحقيقي، وعند نقل هذه الجينات إلى الكروماتين المغاير فإن تعبيرها يتوقف ويقال عن هذه الجينات أنها أصبحت صامتة Silenced. هذا الاختلاف في التعبير الجيني هو

مثال لتأثير الموقع على الجينات، ووجد ذلك لأول مرة في ذبابة الفاكهة، ثم تم إثباته في الخمائر والنباتات والإنسان.

تحويرات الهستونات Histone modifications :

من التحويرات الأساسية ضمن الوراثة فوق الجينية هي التحويرات التي تحدث في التركيب الكيميائي للسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية المكونة للهستونات الأربعة المكونة للنيوكليوسوم، وأهم هذه التحويرات هي :

- أستلة اللايسين Acetylation of lysines
- المثيلة الأحادية والثنائية والثلاثية للايسين Mono- , di- , and tri-methylation of lysines
- فسفرة السيرين Phosphorylation of serines كما في الشكل (5-7).



الشكل (5-7) تفاعلات بعض تحويرات الهستونات

معظم هذه التحويرات الكيميائية تحدث في نهايات N لذيول الهستونات والتي تبرز من النيوكليوسوم، كما أن هناك تحويرات متخصصة تحدث للسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية المكونة لهستونات لب النيوكليوسوم. جميع التحويرات أعلاه هي عكسية أي يمكن التخلص

منها والعودة إلى الحالة السابقة، وتتم التحويرات عادة من خلال إنزيمات متخصصة للعمل على موقع واحد أو مواقع قليلة فقط. وهناك إنزيمات أخرى مسؤولة عن إزالة التحويرات، فمثلاً يتم إضافة مجموعة الاستيل من قبل إنزيمات Histone acetyl transferases (HATs) بينما يتم إزالة الاستيل من قبل مجموعة إنزيمات Histone deacetylase complexes (HDACs) وبنفس الطريقة يتم إضافة مجموعة المثيل بإنزيمات Methyl transferases (MTs) وتزال مجموعة المثيل بإنزيمات Histone demethylases (HDMs). كل إنزيم (أو مجموعة إنزيمات) يوظف للعمل في موقع متخصص من الكروماتين في وقت محدد من حياة الخلية. معظم وظائف هذه الإنزيمات تعتمد على البروتينات المنظمة للجينات Gene regulatory proteins والتي ترتبط مع مواقع متخصصة من DNA على طول الكروموسوم. وجود ومواقع هذه البروتينات على DNA يمكن أن يكون ثابت وله علاقة بتطور الكائن الحي، أو متغير حسب حاجة الخلية والجسم.

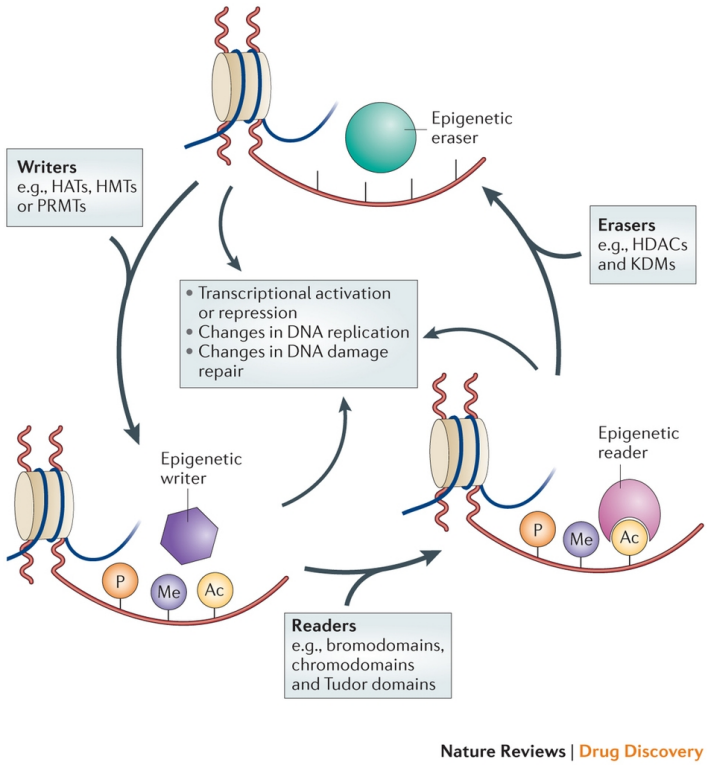
إن تحوير الهستونات يكون مسيطر عليه بدقة لأن ذلك يعني السيطرة على وظائف مهمة، فمثلاً أستلة اللايسين في النهاية N للذيل يعمل على إضعاف تركيب الكروماتين، لان إضافة مجموعة الاسيتيل إلى اللايسين يفقدها شحنتها الموجبة، وبذلك يقلل من ألفة الذيل مع النيوكليوسوم المجاور، ومن نتائج تحويرات الهستونات هو جذب بروتينات متخصصة لتقوم بعمليات تحوير على شكل الكروماتين، وهذه البروتينات تحدد متى وأي الجينات يجب أن تقوم بالتعبير، وهذا يعني السيطرة على وظائف خلوية مهمة.

من جانب أخر هناك نوعان من الهستونات هما الأساسية والضئيلة، الهستونات الأساسية كبروتينات تصنع في الطور S من دورة الخلية وترتب في النيوكليوسوم مع DNA البنوي خلف شوكة التضاعف مباشرة خلال عملية تضاعف DNA. أما الهستونات الضئيلة (المختلفة) فإنها تصنع خلال المرحلة البينية من دورة الخلية وتحشر إلى الكروماتين المتكون حديثاً بمساعدة معقدات إعادة تشكيل الكروماتين المعتمدة على ATP. هذه المعقدات تحوي وحدات متخصصة ترتبط مع مواقع متخصصة على الكروماتين وعلى البروتينات المرافقة Chaperones للهستونات التي تحمل الهستونات الضئيلة المتخصصة، والنتيجة أن كل هستون ضئيل يحشر في الكروماتين بطريقة انتقائية ودقة عالية.

الكاتبات والقارئات والماسحات فوق الجيني

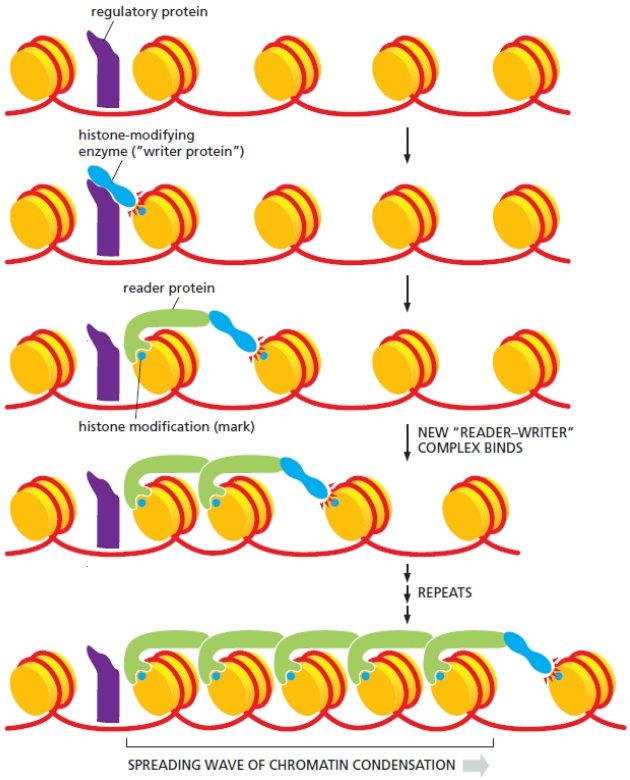
Epigenetic writers, readers, and erasers

تعد عملية التنظيم فوق الجيني عملية ديناميكية من خلال مجاميع من الإنزيمات تدعى القارئات Writers مثل HATs و MTs و arginine methyl transferases (PRMTs) والكاينيز حيث تضيف العلامات فوق الجينية على الأحماض الأمينية لذيول الهستونات، أما القارئات Readers مثل البروتينات التي تحوي أجزاء البرومو Bromodomains وأجزاء الكرومو Chromodomains وأجزاء تودر Tudor domains فإنها ترتبط مع العلامات فوق الجينية، والماسحات Erasers مثل (HDACs) و lysine demethylases (KDMs) والفوسفاتيز phosphatases تحفز عملية إزالة العلامات فوق الجينية (كما موضح في الشكل5-8)، إن هذه العمليات تساهم وبشكل متداخل في السيطرة على تنظيم العمليات المعتمدة على DNA مثل الترجمة وتضاعف وإصلاح DNA.



الشكل (5-8) أهم التغييرات فوق الجين على الهستونات

القراءة والكتابة والمسح وتحتاج علامات مختلفة كي تعمل، كما أن الكثير من هذه البروتينات تحوي أيضاً معقدات إعادة تشكيل الكروماتين، كل هذه البروتينات تعمل على زيادة أو تقليل كثافة قطعة طويلة من الكروماتين ويسير المعقد على طول DNA (الشكل5-9). وهناك حوالي 50 جين على الأقل (في ذبابة الفاكهة) تساهم في تكوين معقدات القراءة-الكتابة-المسح.



الشكل (5-9) حركة معقد القراءة-المسح على طول DNA
(مأخوذ من Alberts et al., 2015)

فضلاً عن ما ذكر فإن هناك آلية أخرى مثيرة تنظم عملية القراءة-الكتابة تتمثل بوجود تسلسلات DNA الحاجز Barrier DNA sequences، حيث أن انتشار معقد القراءة-الكتابة على طول DNA الطويل جداً والمكون للكروماتين سيولد مشكلة تداخل بين أجزاء الكروماتين المختلفة تركيبياً ووظيفياً، وتشير الدراسات إلى وجود تسلسلات متخصصة من

DNA تعمل كحواجز تفصل بين الأجزاء المختلفة من الكروماتين، وباستعمال تقنيات الهندسة الوراثية الحديثة تم التعرف على العديد من هذه "الحواجز" وسمح ذلك بإمكانية حذف أو إضافة قطع معينة من DNA إلى الكروموسومات.

ولتوضيح ذلك نأخذ مثلاً قطعة أو تسلسلات تدعى HS4 وهي طبيعياً تفصل بين جزء فعال من الكروماتين الذي يحوي موقع جين بيتا-كلوبين، يفصلها عن موقع مجاور من كروماتين كثيف هي قطعة صامتة Silenced، عند حذف هذا الحاجز فإن الموقع بيتا-كلوبين سيهاجم من قبل الكروماتين الكثيف مما يسبب تصميت الجين، وينتشر ذلك بمديات مختلفة في الخلايا المختلفة، ينتج عن ذلك خلل في التعبير الجيني للبيتا-كلوبين وحدوث فقر دم شديد. ويذكر هنا أن التسلسلات HS4 تضاف إلى نهايتي الجين الذي يحشر تجريبياً في جينوم الثديات لغرض حماية الجين الذي تم حشره من مهاجمة وانتشار الكروماتين المغاير وبالتالي تصميت الجين.

إن تحليل تسلسلات قطع الحواجز بيّن أنها تحوي تجمعات لمواقع ارتباط لإنزيمات أستلة الهستون، حيث تعمل إنزيمات أستلة وإزالة أستلة الهستونات على تكوين الحاجز على DNA وإيقاف انتشار الأنواع المختلفة من الكروماتين، كما أن هناك أنواع أخرى من تحويرات الكروماتين تعمل على المحافظة على الجينات من التصميت.

وجود الكروموسومات التي تحمل تنوعات الهستونات يعتقد أنها تنتج علامات في الكروماتين وتبقى لفترات طويلة ومن ذلك الكروماتين المكون للجسيم المركزي، وهي تلك التسلسلات أو القطعة من DNA في كل كروموسوم والضرورية لعملية الفصل المنظم للكروموسومات إلى الخلايا البنوية كلما حدث انقسام خلوي، وفي الكائنات المعقدة ومنها الانسان فإن كل جسيم مركزي يكون مغمور في كروماتين مغاير مركزي خاص والذي يبقى محافظاً على نفسه خلال الطور البيني، هذا الكروماتين يحوي تنوعات هستونات H3 متخصصة للجسيم المركزي تعرف بـ CENP-A فضلاً عن بروتينات إضافية تقوم برزم النيوكليوسوم إلى تراكيب كثيفة متخصصة مكونةً ما يعرف بـ Kinetechore وهو تركيب متخصص ضروري للارتباط مع خيوط المغزل.

وفي الكائنات الواطئة من حقيقية النواة مثل الخمائر، يلاحظ أن الجسيم المركزي يتكون من أعداد قليلة من تسلسلات DNA (بحدود 125 زوج من النيوكليوتيدات) وبالرغم من الحجم الصغير لهذا الجسيم المركزي، فإن عشرات البروتينات تتجمع حول تسلسلات DNA للجسيم المركزي. بينما في الكائنات الأكثر تعقيداً مثل الحشرات والإنسان فإن طول الجسيم المركزي يكون بمئات الآلاف ولا تحوي على تسلسلات DNA متخصصة للجسيم المركزي. بينما يحوي الجسيم المركزي هنا على تسلسلات قصيرة من DNA مكررة تعرف في الإنسان بـ alpha satellite DNA ويجب الانتباه إلى أن نفس هذه التسلسلات الفصية المكررة توجد في أماكن أخرى من الكروموسوم غير الجسيم المركزي، مما يشير إلى أنها ليست متخصصة لتكوين الجسيم المركزي فقط.

يلاحظ خلال توارث تركيب الكروماتين أن الأجزاء الرباعية H3-H4 tetramers من كل نيوكليوسوم على حلزون DNA الأبوي، يتم توارثها مباشرةً من قبل حلزونات DNA الخلية البنوية عند شوكة التضاعف. وهذا يفسر لنا كيف أن الجسيم المركزي الحديث ينشأ في نفس الموقع على الكروموسوم البنوي بعد كل دورة خلية عن طريق تجمع مجموعة النيوكليوسومات المحتوية على CENP-A على خيط DNA.

وجدير بالذكر هنا أن الكروماتين المغاير الكلاسيكي الصامت يحوي دائماً على البروتين Heterochromatic protein 1 (HP1)، بينما الكروماتين الحقيقي الذي يحمل الجينات التنظيمية للنمو يحافظ عليها من قبل بروتينات مجموعة Polycomb. إن الكروماتين المغاير هذا يعمل على تصميت الجينات التي تشفر للبروتينات المنظمة للجينات في النمو الجنيني المبكر (والذي يشكل حوالي 2٪ من جينوم الإنسان) ويتم إزالة التصميت عن هذه الجينات (كل جين على حدا) عند الحاجة لكل جين خلال النمو الجنيني.

وأخيراً فإن تكثيف الكروموسومات في الطور البيني يبدأ في الحقيقة في الطور M ويزداد التكثيف بتقدم دورة الخلية وخلال مرحلة الطور M يتم إطفاء تعبير الجينات وتحويرات خاصة للكروماتين، حيث يتم التكثيف بمساعدة مجموعة بروتينات تدعى Condensins والتي تستعمل الطاقة الناتجة من تحلل ATP لحين تكون الكروماتيد.

أهم المراجع :

Benjamin A. Pierce. **Genetics: A Conceptual Approach.** 5th ed. (2013). W. H. Freeman.

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. **Molecular Biology of the Cell.** 6th Edition. (2015). Pub. Garland Science.

Dame RT (2005). **"The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin".** Mol. *Microbiol*. 56 (4): 858–70.

David L. Nelson and Michael M. Cox. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 6th Edition. **(**2012**).** Pub. W.H. Freeman.

Eberhard Passarge. **Color Atlas of Genetics.** 3rd ed. (2007). Georg Thieme Verlag KG.

Edward S. Tobias, Michael Connor, Malcolm Ferguson-Smith. **Essential Medical Genetics.** 6th ed. (2011). Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd.

Ford C.E; Hamerton J.L (1956). **"The Chromosomes of Man"**. *Nature*. **178** (4541): 1020–1023.

Harvey Lodish , Arnold Berk , Chris A. Kaiser , Monty Krieger , Anthony Bretscher , Hidde Ploegh , Angelika Amon , Kelsey Martin. **Molecular Cell Biology.** 8th Edition. (2016). Pub. W. H. Freeman.

Hinnebusch J; Tilly K (1993). **"Linear plasmids and chromosomes in bacteria"**. *Mol Microbiol*. **10** (5): 917–22.

Le TB, Imakaev MV, Mirny LA, Laub MT (2013**). "High-resolution mapping of the spatial organization of a bacterial chromosome"**. *Science*. **342** (6159): 731–4.

Naumova N, Imakaev M, Fudenberg G, Zhan Y, Lajoie BR, Mirny LA, Dekker J (2013). **"Organization of the mitotic chromosome"**. *Science*. **342** (6161): 948–53.

Painter, TS (1928**). "A Comparison of the Chromosomes of the Rat and Mouse with Reference to the Question of Chromosome Homology in Mammals"**. *Genetics*. **13** (2): 180–9.

Pereira SL; Grayling RA; Lurz R; Reeve JN (1997). **"Archaeal nucleosomes"**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **94** (23): 12633–7.

Richard M. Twyman. **Advanced Molecular Biology**. (1998). BIOS Scientific Publishers Limited.

Sandman K, Pereira SL, Reeve JN (1998). **"Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome".** *Cell Mol Life Sci.* 54 (12): 1350–64.

Sandman K; Reeve JN (2000). **"Structure and functional relationships of archaeal and eukaryal histones and nucleosomes".** *Arch. Microbiol.* **173** (3): 165–9.

Thanbichler M; Shapiro L (2006). **"Chromosome organization and segregation in bacteria"**. *J. Struct. Biol*. **156** (2): 292–303.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R **Molecular Biology of the Gene**. 7th ed. (2013). Benjamin Cummings. CSHL Press.

White, M. J. D. **The chromosomes**. 6th ed.(1973). London: Chapman and Hall, distributed by Halsted Press, New York.

الفصل السادس

DNA وتضاعفه

الفصل السادس

DNA وتضاعفه

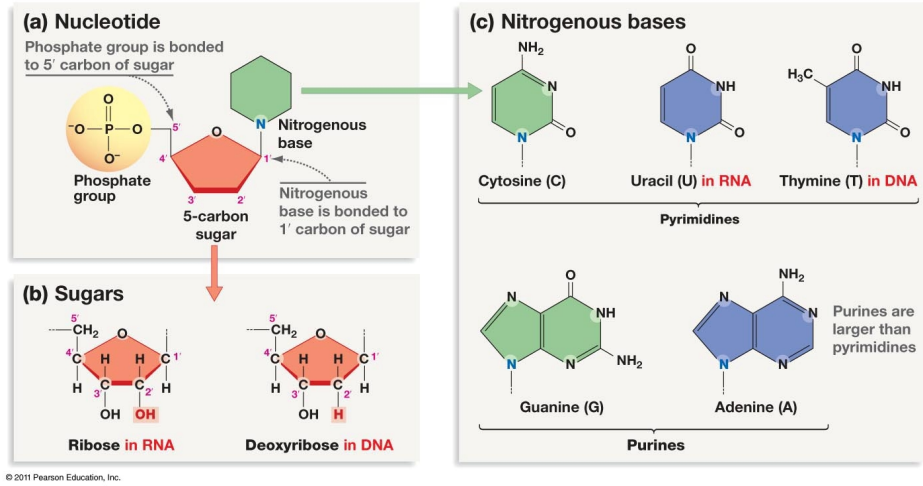
إن التطور الأكبر في اكتشاف تركيب ووظائف DNA كان في أربعينات القرن العشرين، حيث تم البرهنة على أنها تحمل المادة الوراثية، ويعد العام 1953 نقطة تاريخية مفصلية مهمة في تاريخ DNA حيث تم الكشف عن التركيب الدقيق للحلزون المزدوج للـ DNA من قبل جايمس واتسون وفرانسيس كريك (انظر الفصل الأول).

تتكون جزيئة Deoxyribonucleic acid (DNA) من سلسلتين طويلتين من متعدد الأجزاء (النيوكليوتيدات) Polynucleotides والذي يتكون من أربعة وحدات من النيوكليوتيدات، كل سلسلة تعرف بسلسلة أو خيط DNA، ويرتبط الخيطان مع بعضهما بالآواصر الهيدروجينية، ويتكون النيوكليوتيد من ثلاث أجزاء هي :

1- سكر خماسي الكاربون Pentose وهو Ribose (في RNA) أو Deoxyribose (في DNA).

2- قاعدة نايتروجينية وهي اما بيورين Purine أو بايريمدين Pyrimidines.

3- مجموعة فوسفات. (الشكل6-1)



الشكل (6-1) التركيب الكيميائي للنيوكليوتيدات

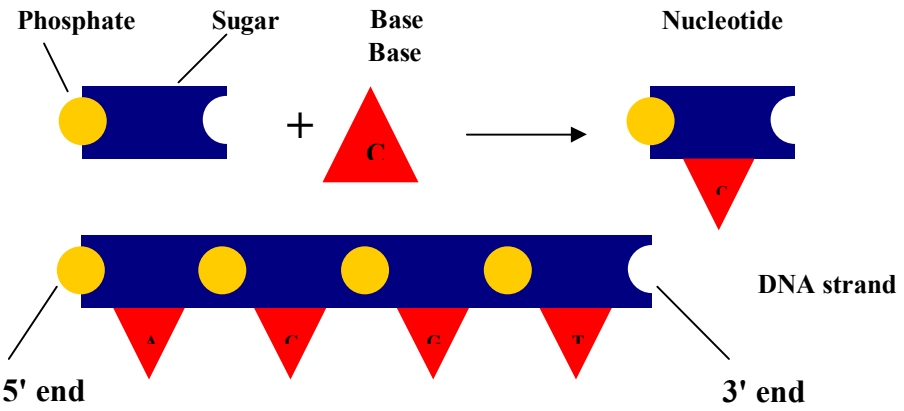
النيوكليوتيدات ترتبط مع بعضها تساهمياً في سلسلة مع السكر والفوسفات مكونةً عمود فقري من السكر–الفوسفات–السكر–الفوسفات...

القواعد النتروجينية الأربعة (في DNA) تختصر بحروف كبيرة (A,G,C,T) وبنفس الطريقة الينوكليوتيدات الأربعة تأخذ نفس الحروف، لأن السكر والفوسفات لا يتغيران بل القواعد النتروجينية فقط هي التي تتغير.

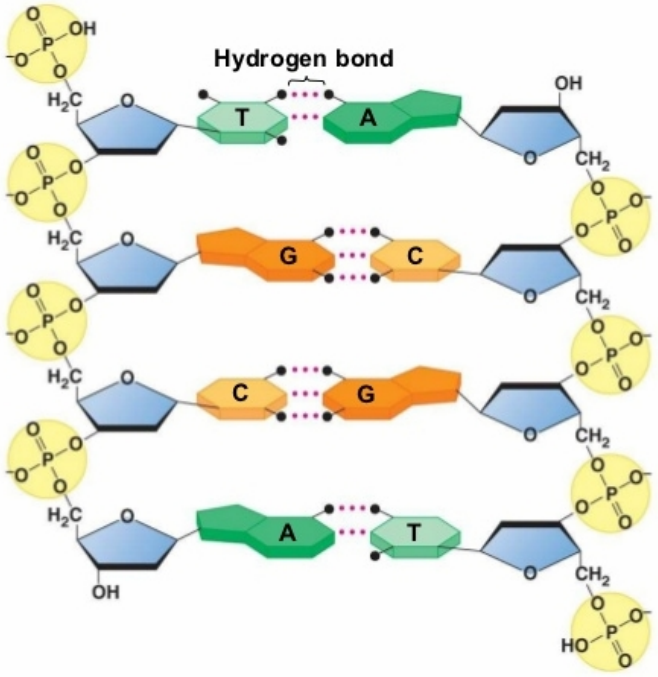
ولتوضيح كيف تتكون السلسلة نفرض أن السكر له جانب يشبه الفجوة هي 3' hydroxyl وجانب بارز هو phosphate 5'، وبذلك تتكون السلسلة من تداخل الفجوة مع البروز وهكذا (الشكل6-2)، وبذلك تكون لكل سلسلة نهايتين، نهاية فجوة هي 3' hydroxyl، ونهاية بارزة هي phosphate 5'، ويسمى ذلك في DNA بالنهاية 3' والنهاية 5'.

أما كيف يتكون الحلزون المزدوج Double helix فهو يعتمد على الطبيعة الكيميائية التركيبية لسلسلتي متعدد النيوكليوتيد، حيث أن السلسلتين يتم ربطهما مع بعض من خلال الآصرة الهيدروجينية بين القواعد النتروجينية إلى داخل الحلزون المزدوج، بينما يكون العمود الفقري المكون من السكر–الفوسفات إلى الخارج، ويلاحظ أن كل بيورين (قاعدة ثنائية الحلقة (A و G)) ترتبط مع بايريمدين (قاعدة أحادية الحلقة (T و C)) وبذلك يبقى عرض

الحلزون المزدوج ثابتاً مكوناً دائماً من حلقتين مع حلقة وحلقة مع حلقتين، حيث يزدوج دائماً A مع T، ويزدوج G مع C (الشكل 6-3).



الشكل (6-2) تكوين النيوكليوتيد ومتعدد النيوكليوتيد



الشكل (6-3) التركيب الكيميائي للحلزون المزدوج DNA

وهذا يسمى ازدواج القواعد التكاملي Complementary base pairing ليكون القواعد المزدوجة Base pairs (bp)، ويلاحظ أن أحد الخيطين في الحلزون المزدوج يكون اتجاهه عكس الخيط الآخر، أي أن أحدهما يكون '5 إلى '3 إلى الأعلى أما الخيط الآخر فيكون '5 إلى '3 باتجاه الأسفل ويدعى ذلك عكس التوازي Antiparallel وبذلك نرى أن هاتين الصفتين (ازدواج القواعد التكاملي و عكس التوازي) يكمل أحدهما الآخر ووجود أحدهما ضروري للآخر، وهما من أهم صفات الحلزون المزدوج DNA.

الجينات التي تحمل المعلومات الوراثية للكائن الحي يجب أن تستنسخ بدقة عالية لنقل هذه المعلومات إلى الذرية كلما حصل انقسام خلوي، وهنا يتباذر إلى الذهن سؤال مهم حول كيفية نقل المعلومات الوراثية عن طريق تراكيب كيميائية (DNA) وبشكل دقيق. إن اكتشاف التركيب الكيميائي الدقيق لـ DNA كان جواباً للسؤال أعلاه، حيث أن المعلومات التي تشفر في DNA تكون بشكل مرتب أو متسلسل من النيوكليوتيدات على طول كل خيط، كل نيوكليوتيد (A,G,C,T) يمكن أن يعتبر حرف في أبجدية مكونة من أربعة حروف والتي تكون الرسالة البيولوجية على شكل تركيب كيميائي لـ DNA، ومعروف أن كل كائن حي يختلف عن الآخر في التركيب الكيميائي لـ DNA وبالتالي الرسائل البيولوجية لذلك الكائن. إن تسلسل الحروف (النيوكليوتيدات) ضمن DNA يكون الجينات والتي تشفر للبروتينات التي أيضاً تتكون من تسلسلات لـ 20 حامض أميني، وعلى أساس هذه التسلسلات تتكون الآف الأنواع من البروتينات.

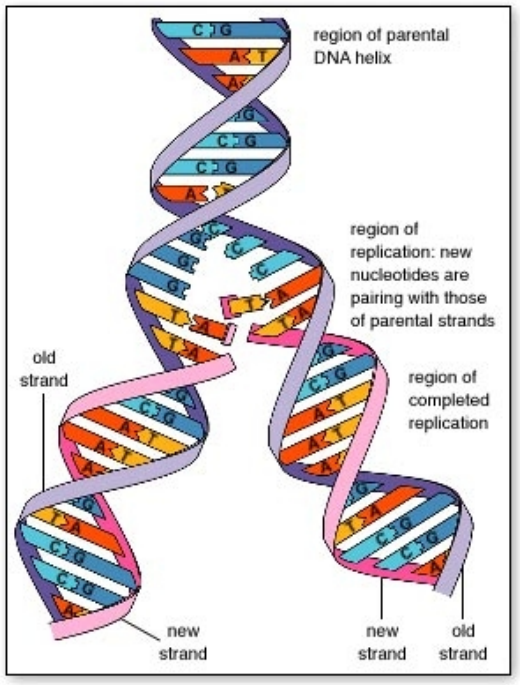
مجموع المعلومات الوراثية في DNA الكائن الحي تدعى الجينوم Genome، وخلال كل انقسام خلوي فإن الخلية تستنسخ جينومها كي تنقلها إلى الخليتين البنويتين، وبما أن DNA يتكون من خيطين أحدهما متمم للآخر لذلك عند الانقسام الخلوي يحدث تضاعف DNA replication، بحيث يعمل كل خيط كقالب Template لتصنيع DNA جديد متمم لـ DNA الأصلي، وبذلك تحافظ الخلية على معلوماتها الوراثية وبدقة عالية.

عملية التضاعف DNA replication :

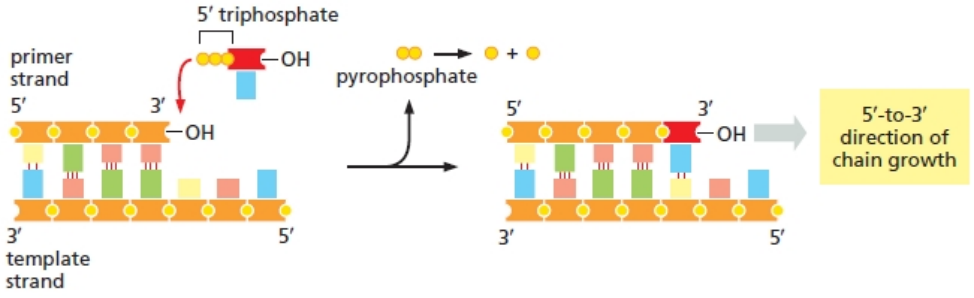
قدرة الكائنات الحية على الاستمرار في الحياة تعتمد على قابليتها على المحافظة على مادتها الوراثية DNA من خلال مضاعفتها ونقلها بعملية التضاعف، والتي يجب أن تتم قبل أن تنقسم الخلية الأبوية إلى خليتين بنويتين متماثلتين. ويجب التفريق هنا بين تضاعف DNA الضروري للانقسام الخلوي وبين استنساخ جزء من DNA (جين واحد أو عدة جينات) خلال عملية التعبير الجيني للتشفير لتصنيع بروتين معين، حيث يتم فك الحلزون المزدوج لمسافة محددة فقط، عكس التضاعف الذي يكون على طول DNA بأكمله.

وعملية بناء خيط DNA جديد تتم بالتعرف على نيوكليوتيدات الخيط القديم أو الأصلي (القالب) من خلال نيوكليوتيدات مفردة حرة (غير مرتبطة مع بعضها) وتحتاج العملية قبل ذلك فك خيطي الحلزون المزدوج عن بعضهما للحصول على خيط منفرد، وذلك من خلال كسر الأواصر الهيدروجينية (المسؤولة عن ربط خيطي الحلزن المزدوج مع بعضهما) بين القواعد النتروجينية، وينتج عن ذلك أن مجاميع واهب ومستقبل الأواصر الهيدروجينية تكون حرة مما يمكنها من تكوين القواعد المزدوجة الجديدة مع النيوكليوتيدات الصحيحة (المتممة) لها والتي تكون بالتعاقب خيط جديد بفعل إنزيمات البلمرة Polymerization enzymes مكونةً خيط DNA الجديد (الشكل 6-4)، وأهم وأول هذه الأنزيمات هو إنزيم البلمرة DNA polymerase (DNAP) وسيتم استعمال المختصر DNAP للإشارة إلى هذا الإنزيم خلال الشرح. وأكتشف DNAP لأول مرة عام 1956 من قبل Kornberg وزملائه. وتعمل النيوكليوتيدات الحرة كمادة أساس لهذا الأنزيم، حيث توجد هذه النيوكليوتيدات بشكل Deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) وعملية البلمرة لها يحتاج إلى قالب DNA أحادي الخيط Single strand (ssDNA) template (الشكل 6-5).

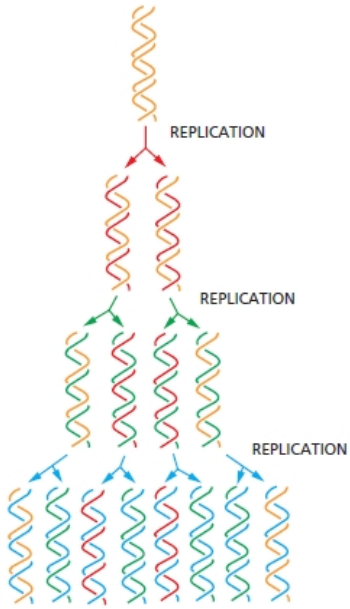
خلال عملية تضاعف DNA داخل الخلية يعمل كل خيط من الخيطين القديمين كقالب لتصنيع خيط جديد، وبما أن كل خلية بنوية ستمتلك خيط قديم وخيط جديد من DNA لذلك توصف عملية تضاعف DNA بنصف المحافظة Semi-conservative replication (الشكل 6-6).



الشكل (6-4) تضاعف DNA



الشكل (6-5) مسار تضاعف DNA (مأخوذ من Alberts et al., 2015)



الشكل (6-6) تضاعف DNA نصف الحافظ

شوكة التضاعف Replication fork :

من دراسات وتجارب أجريت في بداية الستينات من القرن العشرين على الكروموسوم الذي يمر بعملية التضاعف، وجد أن هناك منطقة تدعى بشوكة التضاعف Replication fork والتي تسير بالتقدم على طول الحلزون المزدوج لـ DNA الأبوي وسميت بهذا الاسم لأن شكلها يشبه حرف Y، وفي منطقة شوكة التضاعف تعمل مجموعة معقدة من الإنزيمات والبروتينات لإتمام عملية تصنيع خيطي DNA الجديدين.

وعملية تضاعف DNA ليست بالسهولة التي نتصورها (كما في الشكل أعلاه) بإضافة نيوكليوتيدات من قبل إنزيم DNAP اعتماداً على القالب (الخيط القديم). المشكلة أن كل خيط في الحلزون يسير بعكس اتجاه الخيط الآخر Antiparallel وبذلك فإن أحد الخيطين الجديدين يتكون بالاتجاه 5' ← 3' والخيط الآخـر بالاتجاه 3' ← 5'، لكن من المعروف أن إنزيم DNAP يصنع بالاتجاه 5' ← 3' فقط، إذا كيف يمكن تصنيع خيط جديد بالاتجاه 3' ← 5' ؟

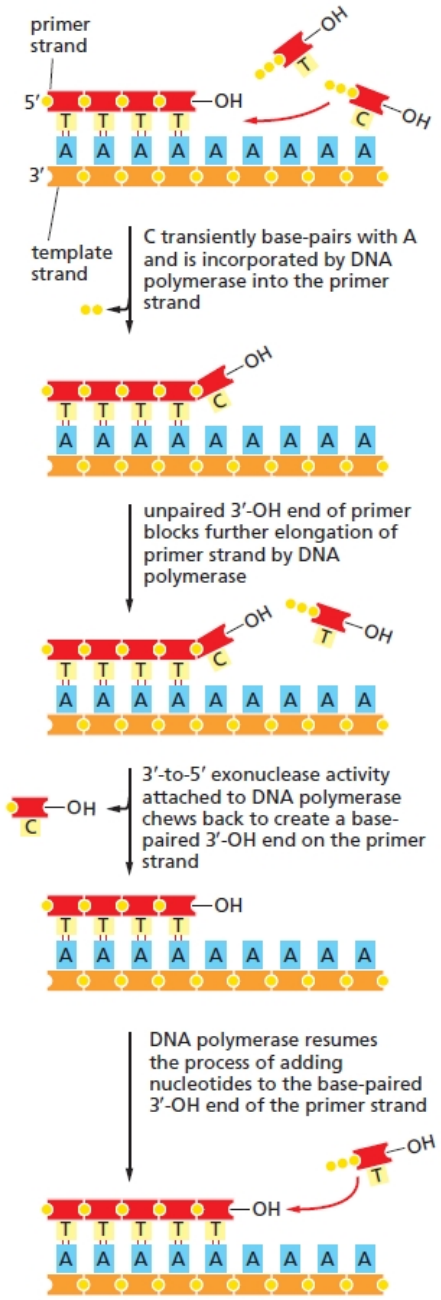
في نهاية الستينات أجريت تجارب على البكتريا، حيث تم إضافة 3H-thymidine ذات الفعالية الإشعاعية العالية إلى البكتريا التي تعاني من انقسامات، ولمدة عدة ثواني فقط وجد أن خيط DNA الجديد خلف شوكة التضاعف تماماً كان فعال إشعاعيا، أثبتت هذه التجربة وجود قطعة مؤقتة من DNA بطول حوالي 1000–2000 نيوكليوتيد، عرفت فيما بعد بقطع أوكازاكي Okazaki fragments، ووجدت نفس القطع في الخلايا حقيقية النواة ولكن بعشر طولها في البكتريا (أي بحدود 100–200 نيوكليوتيد) وثبت أن قطع أوكازاكي تصنع بالاتجاه 5' ← 3' فقط حيث يتم ربط هذه القطع مع بعضها لتكون قطعة أو خيط واحد من DNA الجديد.

من ذلك يمكننا القول أن شوكة التضاعف تكون بشكل تركيب غير متماثل، حيث يتم تصنيع أحد الخيطين بشكل مستمر ويدعى Leading strand بينما الخيط الآخر يكون بشكل قطع يدعى Lagging strand. إن عملية تصنيع DNA في خيط Lagging يكون أيضاً بالاتجاه 5' ← 3' ولكن بعكس اتجاه تصنيع Leading، وبذلك فإن عملية تضاعف DNA تحتاج إلى إنزيم DNAP من نوع 5' ← 3' فقط. تصنيع DNA بهذه الطريقة تكون بدقة عالية جداً وتصل نسبة الخطأ فيها إلى خطأ واحد لكل مليار (1x109) نيوكليوتيد يتم تصنيعه. وأحيانا إذا حدث الخطأ بشكل لا يمكن اكتشافه من خلال إنزيم DNAP فإن عملية التضاعف تستمر، ويدخل النيوكليوتيد الخاطئ ضمن خيط DNA المصنع حديثاً مسبباً الطفرة Mutation وهي على أنواع.

إن دقة تضاعف DNA لا تعتمد فقط على عملية ازدواج القواعد (المتمم) Complementarities بحيث يزدوج A مع T دائماً و G مع C دائماً، بل أن هناك مجموعة من الآليات التي تزيد من دقة التضاعف وتدعى بعمليات التدقيق أو التصحيح Proofreading والتي تعمل على إصلاح أي خطأ يمكن أن ينتج خلال عملية التضاعف، ويذكر أن عملية التدقيق هذه تتم حتى قبل تضاعف DNA، حيث أن إنزيم DNAP يقوم بالخطوة الأولى من عملية التدقيق قبل إضافة النيوكليوتيدات خلال تكوين الخيط الجديد، حيث أن النيوكليوتيدات الصحيحة (المتممة) تكون لها ألفة أعلى من النيوكليوتيدات الخاطئة لتحريك إنزيم DNAP وتصنيع الخيط الجديد، لأن الازدواج الصحيح يكون مفضل من ناحية الطاقة

وكذلك فإن ارتباط النيوكليوتيد الجديد مع متممه وقبل إدخاله إلى الخيط الجديد فإن إنزيم DNAP يعاني من تغيرات شكلية Conformational changes لتدقيق ازدواج القواعد بشكل صحيح من خلال تحسس شكل الازدواج الفراغي الثلاثي الأبعاد قبل إضافة النيوكليوتيد إلى الخيط الجديد وبذلك يكون الفحص مزدوج Double check لوضع النيوكليوتيد الصحيح ضمن الخيط الجديد.

الآلية الأخرى تتم من خلال فعالية إنزيم Exonuclease وتدعى العملية بتدقيق إزالة وتحليل النيوكليوتيدات Exonucleolytic proofreading 3'→5' وتحدث مباشرة بعد ارتباط نيوكليوتيد خاطئ ضمن الخيط الجديد، إن إنزيم DNAP يكون مميز جداً لنوع سلسلة DNA التي يكونها، فهو يحتاج دائماً إلى النهاية 3'-OH لقاعدة مزدوجة صحيحة كي يستمر بعمله، أما عند وجود نهاية 3'-OH غير صحيحة الازدواج فإن تقدم إنزيم DNAP يتوقف وتنشط فعالية إنزيم إزالة النيوكليوتيدات Exonuclease الذي يعمل على إزالة القاعدة الخاطئة ذات النهاية 3'-OH ثم يعاود انزيم DNAP عمله باضافة نيوكليوتيدات جديدة إلى الخيط الجديد (كما في الشكل6-7). لذلك يقال أن إنزيم DNAP يعمل كإنزيم ذاتي التصحيح Self-correcting حيث يزيل أخطاء البلمرة التي يقوم بها خلال التضاعف. وهنا نقطة مهمة يجب الانتباه إليها وهي أن صفات التصحيح الذاتي لإنزيم DNAP يعتمد على البادئ Primer لزوج قواعد صحيحة الازدواج، ولا يمكن لهذا الانزيم العمل بالتصنيع من ذاته عند عدم وجود بادئ، على العكس من إنزيم البلمرة RNA polymerase (RNAP) والذي يدخل في عملية الترجمة والتعبير الجيني، حيث لا يحتاج آلية تدقيق وإزالة النيوكليوتيدات، لأن حدوث الأخطاء خلال تكوين RNA (أي mRNA) لا ينقل إلى الخلية البنوية، بل تقع ضمن تصنيع البروتين وليس تضاعف DNA والانقسام الخلوي، ويكون وجود أخطاء في mRNA أقل أهمية من وجودها في DNA خلال التضاعف لذلك فإن انزيم RNAP يبدأ بالعمل من ذاته دون الحاجة إلى بادئ.



الشكل (6-7) الية تدقيق القراءة خلال التضاعف بفعل انزيم البلمرة DNAP (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

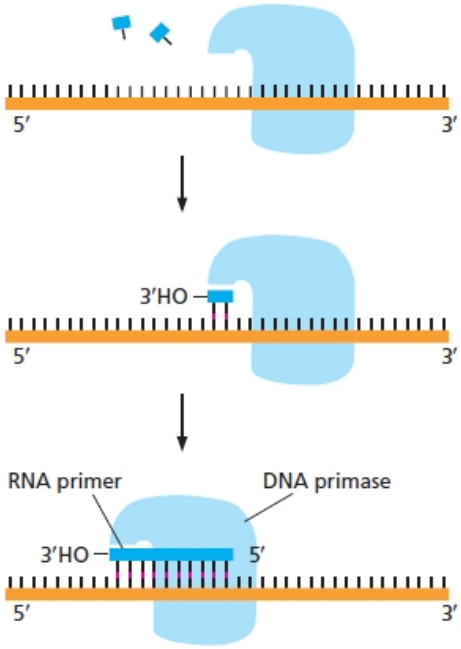
نسبة الأخطاء التي تحدث خلال تكوين mRNA وكذلك عند تصنيع البروتين تكون عالية نسبياً، حيث يكون المعدل خطأ واحد لكل 1000 نيوكليوتيد، وهذا المعدل أكثر بمئة ألف مرة من الخطأ الذي يحدث خلال عملية تضاعف DNA، لوجود عدة آليات تدقيق تقلل من نسبة الخطأ إلى أقل ما يمكن (الجدول6-1).

الجدول (6-1) يوضح الآليات الثلاث المسؤولة عن التدقيق في تصنيع DNA

TABLE 5–1 The Three Steps That Give Rise to High-Fidelity DNA Synthesis	
Replication step	Errors per nucleotide added
5′ → 3′ polymerization	1 in 10^5
3′ → 5′ exonucleolytic proofreading	1 in 10^2
Strand-directed mismatch repair	1 in 10^3
Combined	1 in 10^{10}

وتجدر الإشارة هنا إلى أن انزيم البلمرة DNAP الذي يعمل بالاتجاه '5 ← '3 فقط يزيد من دقة التدقيق، فلو كان يعمل بالاتجاه '3 ← '5 لكانت الإضافة إلى النهاية '5 لا تمر بالتدقيق وبذلك تزيد من فرص الأخطاء، لأن النهاية '5 عندما يضاف لها نيوكليوتيد لا ينتج طاقة عكس النهاية '3 التي باضافة نيوكليوتيد لها تنتج تحطم أصرة عالية الطاقة تزود عملية البلمرة بالطاقة.

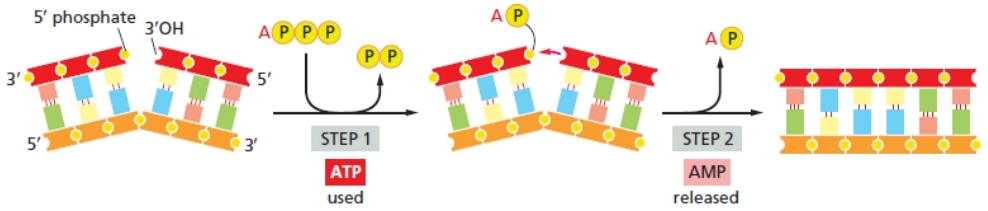
بدأ عملية التضاعف للخيط Leading يحتاج إلى بادئ خاص Primer في بداية التضاعف فقط، وبعد أن تبدأ عملية البلمرة فإنها تستمر بفعل إنزيم DNAP بإضافة نيوكليوتيدات لتكوين خيط DNA جديد. بينما على الخيط Lagging فإن إنزيم البلمرة DNAP يكمل قطع DNA اوكازاكي القصيرة وتستغرق العملية عدة ثواني، وهذه العملية تبدأ كل مرة عندما يكمل DNAP صنع قطعة اوكازاكي فانه يبدأ بصنع قطعة جديدة وهكذا.. وهذا يحتاج إلى آلية خاصة تدخل فيها عدة إنزيمات مثل DNA primase الذي يستعمل رايبونيوكليوساید ثلاثي الفوسفات لصنع بادئات RNA primer على الخيط Lagging (الشكل6-8).



الشكل (6-8) تصنيع RNA primer

وفي الكائنات حقيقية النواة فإن هذه البادئات RNA primers طولها حوالي 10 نيوكليوتيد وتتكرر كل 100–200 نيوكليوتيد على طول خيط Lagging. وبما أن التركيب الكيميائي لـ RNA يكون متشابه مع التركيب الكيميائي لـ DNA لذلك من السهل لـ RNA أن يكون قواعد مزدوجة مع DNA، حيث أن خيط من RNA يزدوج مع خيط من DNA مكوناً حلزوناً مزدوجاً يدعى DNA/RNA hybrid إذا كانت القواعد النتروجينية متممة Complementary لبعضها البعض في RNA و DNA، لذلك فإن نفس مبدأ القالب لتكوين خيط DNA يوجه لتكوين بادئ RNA primer، ولأن البادئ RNA primer يحوي على زوج نيوكليوتيدات مزدوجة بشكل صحيح وفي أحدى نهايتيها مجموعة 3'-OH، لذلك يمكن أن تحدث استطالة للبادئ من هذه النهاية عن طريق إنزيم البلمرة DNAP والذي يستعمل هذه النهاية لإضافة النيوكليوتيدات مكوناً قطعة اوكازاكي. ويتوقف تصنيع كل قطعة اوكازاكي عندما يصل إنزيم البلمرة DNAP إلى البادئ RNA primer المرتبط بالنهاية 5'-OH للقطعة السابقة. ويعقب عملية تكوين قطع اوكازاكي آلية إصلاح خاصة للتغلب

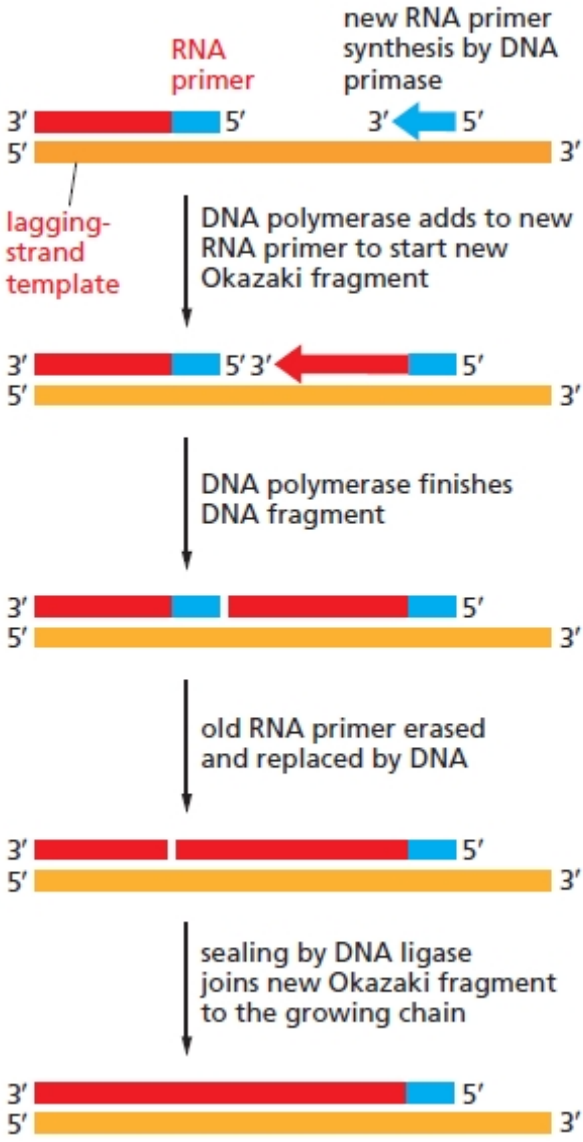
على مشكلة وجود قطع DNA في خيط Lagging، حيث تقوم هذه الآلية بإزالة "مسح" بادئات RNA primers واستبدالها بـ DNA، كما إن إنزيم الربط DNA ligase يقوم بربط النهاية '3 لخيط DNA الجديد مع النهاية '5 للخيط السابق كي تستمر العملية (الشكل 6-9 و 6-10).



الشكل (6-9) آلية عمل إنزيم DNA ligase (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

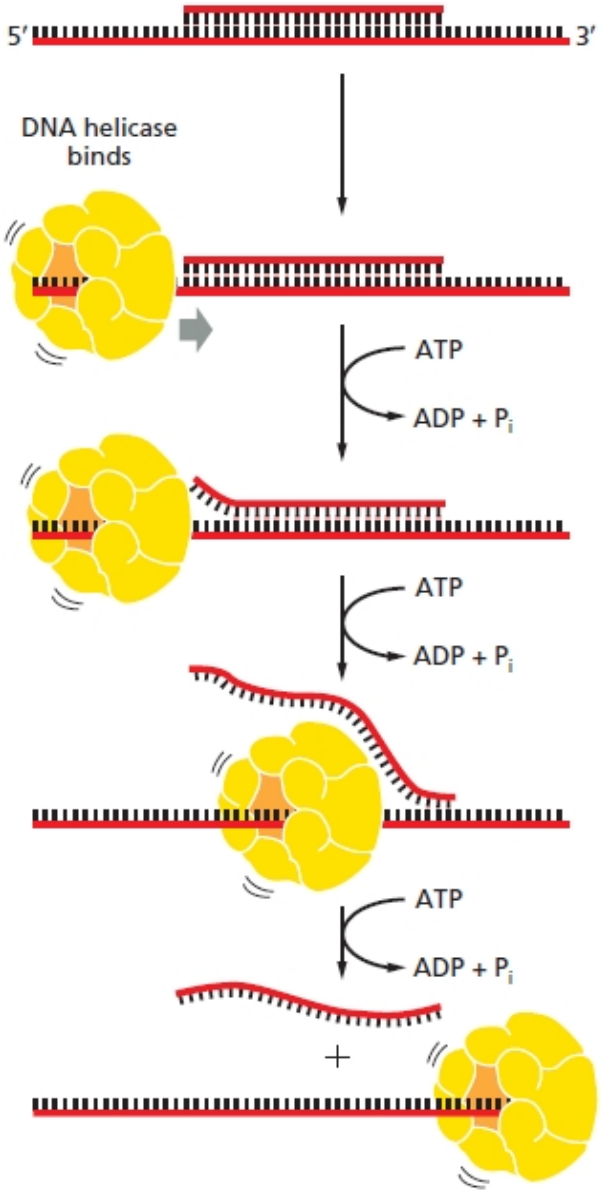
ربما يتبادر إلى الذهن سؤال لماذا قطعة البادئ Primer هي من نوع RNA وليست من نوع DNA، ربما أحد الأسباب أن وجود قطعة RNA في عملية تضاعف DNA يسهل على الخلية التعرف عليها وبالتالي إزالتها واستبدالها لغرض استمرار تصنيع DNA، يجب أن يتم فتح الحلزون المزدوج أمام شوكة التضاعف، ولكن الحلزون المزدوج يربط خيطيه أواصر هيدروجينية ويكون ملتف ويصعب فك الخيط عن الآخر حيث تحتاج إلى ما يقارب درجة غليان الماء لغرض فك الحلزون المزدوج إلى خيطين منفردين، أما خلال التضاعف فإن هناك العديد من البروتينات التي تعمل على فتح الحلزون المزدوج وأهم هذه البروتينات هي إنزيمات DNA ligases والبروتينات المرتبطة بالخيط المنفرد SSB proteins وتعمل هذه البروتينات على فتح الحلزون المزدوج وينتج عنه خيطين منفردين يعمل كل منهما كقالب لتصنيع خيط DNA جديد.

أما انزيمات DNA helicases فهي بروتينات تعمل على التحليل المائي لـ ATP عند ارتباطها مع خيط DNA المنفرد، تحلل ATP يمكن أن يغير من شكل البروتين وبالتالي يمكن لهذا البروتين من انجاز وظيفة ميكانيكية، تعمل إنزيمات DNA helicases بهذه الطريقة حيث تسير على طول DNA وتفتح الحلزون المزدوج مكونةً خيطين منفردين من DNA، وتسير بسرعة تصل إلى 1000 زوج من النيوكليوتيدات كل ثانية (الشكل 6-11).



الشكل (10-6) تصنيع قطع DNA في الخيط Lagging

(مأخوذ من Alberts et al., 2015)

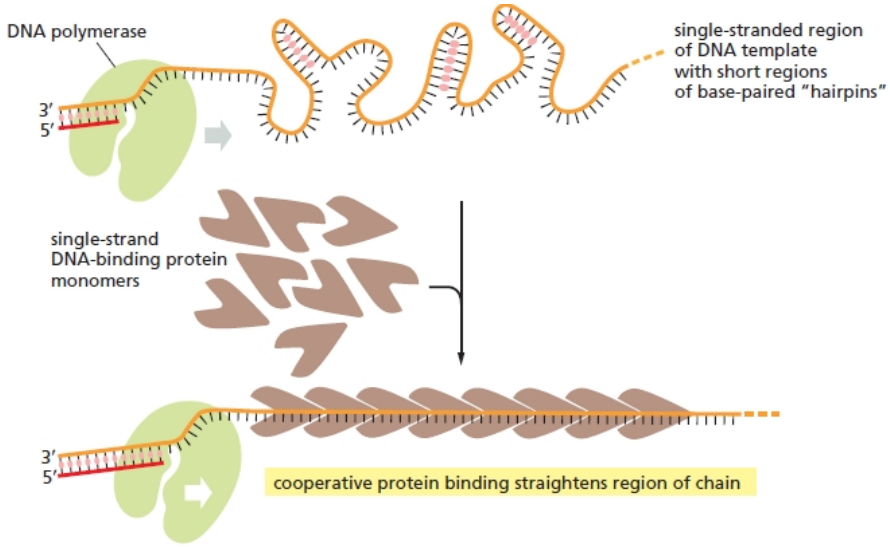


الشكل (6-11) آلية عمل انزيم DNA helicase

(مأخوذ من Alberts et al., 2015)

وبما أن في الحلزون المزدوج كل خيط يسير بعكس الآخر Antiparallel لذلك يحتاج إلى إنزيم DNA helicase يسير بالاتجاه 5' ← 3' والآخر بالاتجاه 3' ← 5'، وفي البكتريا وجد أن إنزيم DNA helicase الذي يتحرك بالاتجاه 5' ← 3' على خيط Lagging يكون هو الشائع. البروتينات المرتبطة مع الخيط المنفرد SSB proteins يدعى أيضاً البروتينات المزيلة لثبوتية الحلزون المزدوج helix destabilizing proteins ويرتبط بقوة مع الخيط المنفرد من DNA بعد تفكك الحلزون المزدوج، إن SSB proteins لا يمكن أن تفتح الحلزون المزدوج لـ DNA لكنها تساعد إنزيم DNA helicase وذلك من خلال ارتباطها مع الخيط المنفرد والمحافظة عليها بشكل منفرد لا يمكنه تكوين الحلزون المزدوج، ويذكر أن هذه البروتينات (SSB) خلال ارتباطها بالخيط المنفرد لا تغطي القواعد النتروجينية المكونة للخيط كي تسمح لها بأن تكون قالب لتصنيع الخيط الجديد.

أما في الخيط المنفرد من نوع Lagging فإن بروتينات SSB تمنعها من انطوائها على نفسها مكونةً انطواءات دبوس الشعر Hair-pin (الشكل 6-12). هذا التركيب (دبوس الشعر) يمكن أن يتداخل مع تصنيع DNA ويوقف عملية التضاعف بأكمله لذلك يعد عمل بروتينات (SSB) ضرورياً لاستمرارية عملية التضاعف.

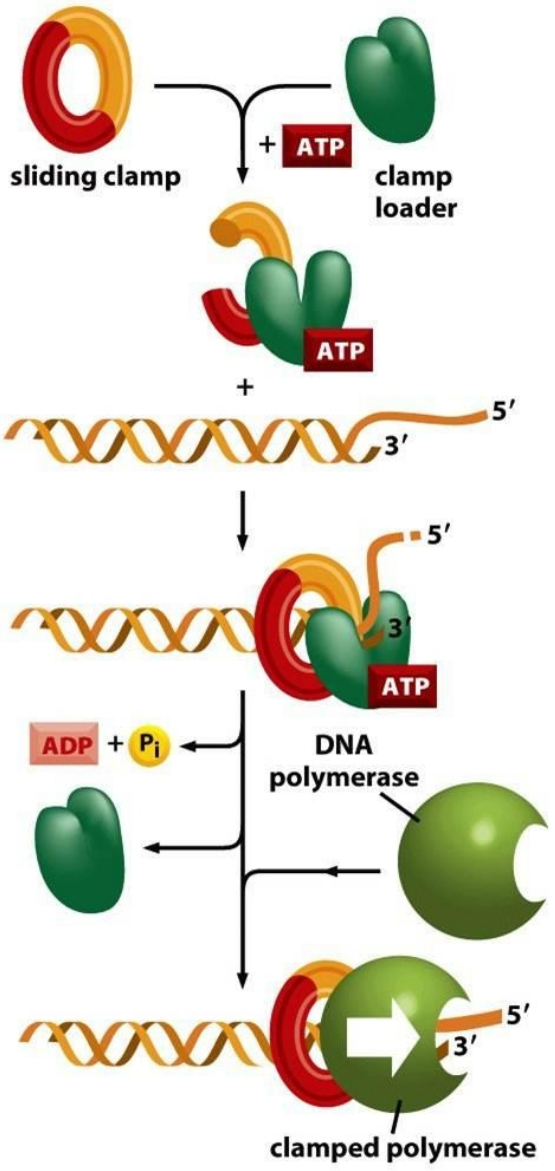


الشكل (6-12) تأثير البروتينات المرتبطة مع الخيط المنفرد SSB على خيط DNA (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

وتميل جزيئات انزيمات البلمرة DNAP للانفصال بسرعة عن خيط DNA وهذا يسهل عملية تصنيع قطع اوكازاكي صغيرة على الخيط Lagging حيث بعد الانتهاء من تصنيع كل قطعة تبدأ بتصنيع قطعة أخرى جديدة وهكذا... ولكن الانفصال المستمر لأنزيم البلمرة له سلبيات، حيث أن إنزيم البلمرة DNAP لا يستطيع تصنيع خيط طويل من DNA، لذلك يستوجب وجود بروتين يعمل على تثبيت إنزيم البلمرة DNAP على DNA خلال حركته على طول خيط DNA ويدعى بمشبك الانزلاق Sliding clamp، كما يعمل مشبك الانزلاق على انفصال إنزيم البلمرة مباشرة عندما تصل إلى منطقة الحلزون المزدوج من DNA.

يوضح التركيب ثلاثي الأبعاد 3D structure لبروتين مشبك الانزلاق أنه عبارة حلقة كبيرة حول الحلزون المزدوج لـ DNA، جهة من الحلقة ترتبط مع الجزء الخلفي من إنزيم البلمرة DNAP، والحلقة بأكملها تسير بحرية على طول DNA كلما تحرك إنزيم البلمرة DNAP، إن تجميع مشبك الانزلاق حول DNA يحتاج طاقة تؤخذ من التحلل المائي لـ ATP ويتم ذلك عن طريق معقد بروتيني يدعى محمل المشبك Clamp loader، والذي يعمل على تحليل ATP لتحرير الطاقة لربط المشبك على DNA (الشكل 6-13).

ويختلف الوضع بين خيطي Leading و Lagging فيما يخص المشبك، حيث في خيط Leading فإن إنزيم البلمرة DNAP (المتحرك على طول DNA) يرتبط بقوة مع المشبك ولفترات طويلة، وعلى العكس من ذلك في الخيط Lagging، فبالرغم من أن DNAP يستعمل أيضاً المشبك لكنه كلما وصل DNAP إلى النهاية '5 لقطعة اوكازاكي، فإن إنزيم البلمرة DNAP يحرر نفسه من المشبك وينفك عن الخيط القالب، جزيئة إنزيم البلمرة DNAP هذه تعود لترتبط مع مشبك جديد والذي يكون قد ارتبط مع بادئ RNA primer في قطعة اوكازاكي التالية وهكذا تستمر السلسلة من التحرر وإعادة الارتباط.



الشكل (6-13) آلية عمل مشبك الانزلاق (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

ويذكر أن البروتينات (الإنزيمات) التي تم التطرق إليها خلال عملية تضاعف DNA تعمل بشكل متناسق مع بعضها مكونةً ما يشبه آلية التضاعف وهو معقد متعدد الإنزيمات ويقوم بتصنيع DNA بدقة وسرعة عالية ويجهز بالطاقة من خلال تحلل ATP.

التمييز بين الخيط الجديد والقديم خلال الإصلاح :

في دراسات أجريت عن طريق إحداث طفرات في بكتريا E. coli أثيرت مشكلة هي كيف يتم التمييز بين الخيط الجديد والخيط القديم ؟ لغرض إصلاح الخطأ خلال عملية التدقيق Proofreading لـ DNA، لأنه في حالة عدم حدوث تعرف على الخيط الجديد المصنع حديثاً عن القالب (الخيط القديم) فربما يتم "تصحيح" النيوكليوتيدات الصحيحة بسبب الاعتماد على خطأ في الخيط الجديد، لذلك يعد التمييز بين الخيط الجديد والقديم أمراً مهماً جداً للخلية، وقد وجد الباحثون أن نظام تمييز وإصلاح الخيط ويدعى آلية تمييز الخيط Strand-distinction mechanism في بكتريا E. coli يعتمد على مثيلة Methylation قواعد الأدنين A في DNA، حيث تضاف مجاميع المثيل إلى جميع القواعد من نوع الأدنين A في التسلسل GATC، ولكن هذه المثيلة لا تحدث إلا بعد مرور بعض الوقت حيث يدخل الأدنين A في تصنيع سلسلة DNA جديدة مما ينتج أن كل تسلسل GATC غير مثيل يكون في الخيط الجديد خلف شوكة التضاعف مباشرة، ويعد ذلك علامة مميزة للخيط الجديد عن القديم (القالب)، عندها يمكن إصلاح الأخطاء (إن وجدت) ضمن الخيط المصنع حديثاً، وعادةً يتم الإصلاح بثلاث خطوات هي :

1- التعرف على عدم التوافق Mismatch.

2- إزالة قطعة DNA التي تحوي على عدم التوافق من الخيط الجديد.

3- إعادة تصنيع بديل للقطعة المزالة باستعمال الخيط القديم كقالب.

إن هذه العملية الإصلاحية والتي تدعى إصلاح عدم توافق الخيط Strand-mismatch repair تقلل من عدد الأخطاء (الطفرات) خلال تضاعف DNA (انظر الجدول 6-1).

عملية تمييز الخيط المصنع حديثاً عن القالب عن طريق المثيلة يكون مميز للكائنات بدائية النواة (البكتريا)، أما في الخلايا حقيقية النواة فلا تحصل نفس العملية، بل أن بعض الكائنات حقيقية النواة مثل الخمائر Yeasts و ذبابة الفاكهة لا يحصل فيها مثيلة لـ DNA أبداً. وعوضاً عن ذلك فإن الخيط المصنع حديثاً من نوع Lagging يحوي مؤقتاً على ثغرات صغيرة قبل أن يتم ملؤها من قبل إنزيم الربط DNA ligase، ووجد أن هذه الثغرات الصغيرة والتي تسمى

بتكسرات الخيط المنفرد Single strand breaks تعمل كإشارة لنظام تدقيق عدم التوافق كي يتم التدقيق والإصلاح في هذا الخيط حصراً لأنه حديث التصنيع. ولكن هذه الفكرة تجابه مشكلة لا زالت غير واضحة الإجابة وهي هل يتم عمل ثغرات أو تكسرات صغيرة في خيط Leading المصنع حديثاً أيضاً كي يتم تمييزها عن الخيط القديم (القالب) ؟ وإذا تم ذلك فكيف ؟ أم هل يتم الاعتماد على آليات أخرى غير مكتشفة لحد الآن في تمييز الخيط الجديد عن القالب في خيط Leading في الخلايا حقيقية النواة ؟

انزيم التوبوايزوميريز DNA topoisomeases :

المعروف أن تقدم شوكة التضاعف خلال الحلزون المزدوج يسبب مشكلة التشابك أو الالتفاف حيث أن كل 10 أزواج قواعد bp تكوّن لفة كامل حول محور الحلزون المزدوج، لذلك وبتقدم شوكة التضاعف سوف يحدث التواء والتفاف لخيوط DNA، وللتغلب على هذه المشكلة تستعمل الخلية استراتيجية متخصصة باستعمال إنزيمات التوبوايزوميريز، ويصنف هذا الإنزيم كأحد إنزيمات النيوكلييز العكسية Reversible nuclease حيث يرتبط مع العمود الفقري لـ DNA ويكسر الآصرة الفوسفاتية ثنائية الأستر Phosphodiester bond ويكون هذا الكسر مؤقتاً حيث يتم إعادة تكوين الآصرة الفوسفاتية ثنائية الاستر بعد حل مشكلة الاشتباك أو الالتواء.

إن أحد إنزيمات التوبوايزوميريز هو التوبوايزوميريز I والذي يعمل على تكوين ثغرات أو تكسرات مؤقتة في الخيط المنفرد مما يتيح المجال لخيطي الحلزون المزدوج الحركة بحرية وعلى جانبي الثغرة، لذلك فإن تضاعف DNA يحدث مع التواءات قليلة قريبة من شوكة التضاعف فقط بفعل إنزيم التوبوايزوميريز الذي يعمل سريعاً لحل مشكلة الالتواء أو الاشتباك، والمثير أن إنزيم التوبوايزوميريز يستخدم نفس الطاقة الناتجة من تكسير الآصرة الفوسفاتية ثنائية الاستر لغرض إعادة الربط لسد الثغرات وبذلك لا تحتاج العملية إلى استهلاك طاقة إضافية.

أما النوع الثاني من إنزيم التوبوايزوميريز (التوبوايزوميريز II) والذي يرتبط مع كلا خيطي الحلزون المزدوج في نفس الوقت، ويحدث ثغرة مؤقتة في الحلزون المزدوج، ويتحفز

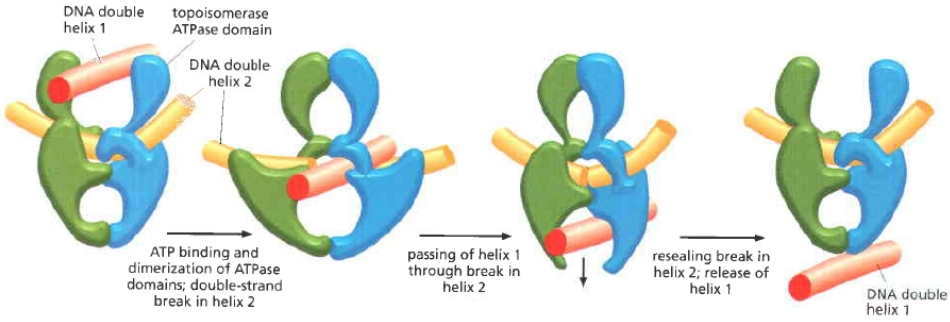
هذا الإنزيم من قبل مواقع كروموسومية تعاني من تشابك مع بعضها، وعندما يرتبط إنزيم التوبوايزوميريز II بموقع الاشتباك فإنه يستعمل الطاقة الناتجة من تحلل ATP لإجراء الخطوات التالية :

1- يقوم بقطع الحلزون المزدوج الأول مكوناً فتحة تسمى بوابة "DNA "gate.

2- يعمل على مرور الحلزون المزدوج الثاني من خلال هذه الفتحة.

3- يعمل على ربط أماكن القطع وينفصل عن DNA (الشكل).

وبهذه الطريقة فإن انزيم التوبوايزوميريز II بامكانه فصل حلزوني DNA قد تشابكا بشكل حلقتين (الشكل 6-14).



الشكل (6-14) نموذج لآلية عمل انزيم التوبوايزوميريز (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

بدء وانتهاء تضاعف DNA :

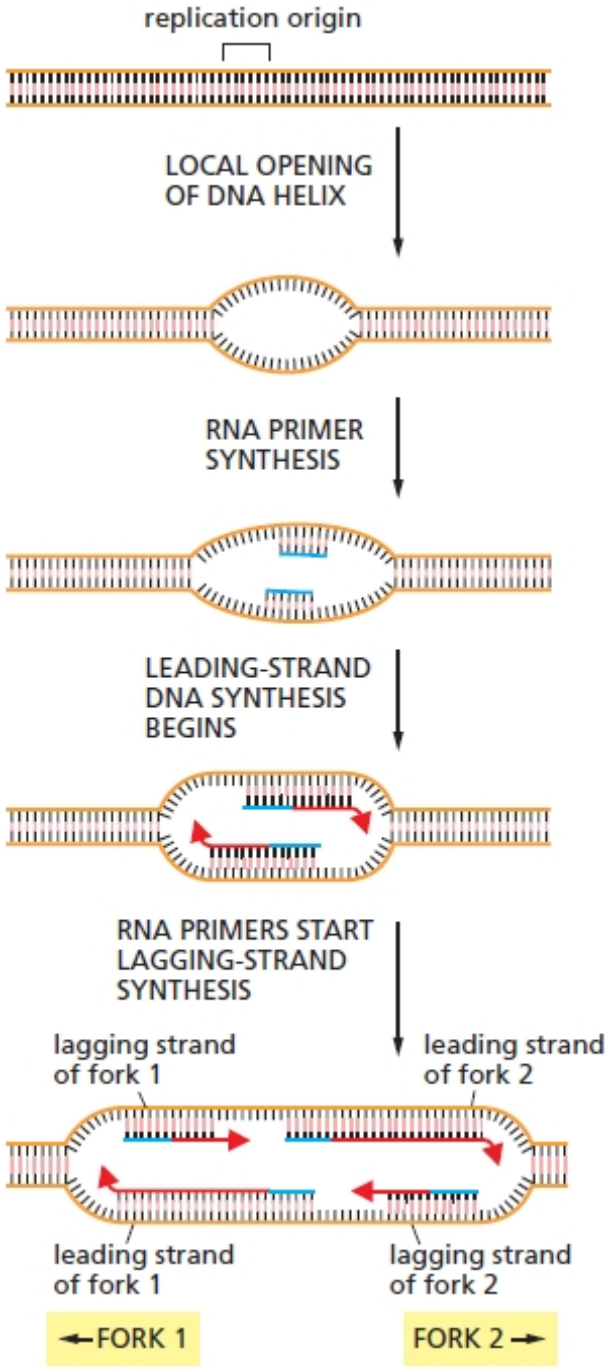
إن تضاعف DNA يجب أن يبدأ بدقة وينظم بدقة لضمان التضاعف السليم في المكان الصحيح من الكروموسوم والزمان المناسب من عمر الخلية. وكما ذكرنا سابقاً فإن خيطي الحلزون المزدوج يكونان مرتبطين بقوة من خلال الأواصر الهيدروجينية التي تتكون بين القواعد النتروجينية من كل خيط، لذلك يجب فك الخيطين عن بعضهما ليتم استعمال كل واحد منهما كقالب لتصنيع خيطين جديدين، وتسمى البروتينات المتخصصة بالبدء بعملية

التضاعف بالبروتينات البادئة Initiator proteins والتي ترتبط بالحلزون المزدوج وتفك ارتباط الخيطين من خلال تكسير الأواصر الهيدروجينية الرابطة بين القواعد النتروجينية.

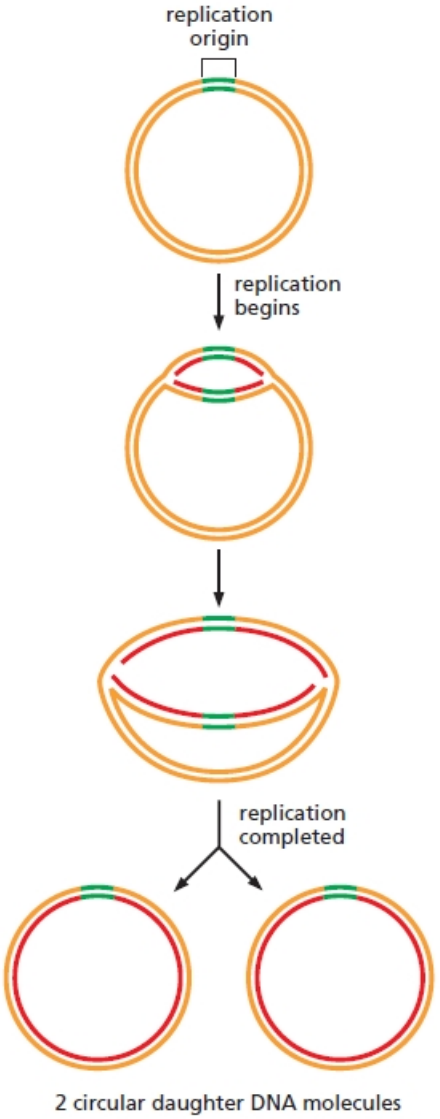
أول موقع (أو مواقع) فتح خيطي DNA عن بعضهما يسمى بمنشأ التضاعف Origin of replication (الشكل 6-15)، في الخلايا البسيطة مثل البكتريا والخمائر يتكون منشأ التضاعف من عدة مئات من القواعد المزدوجة bp، تحوي هذه التسلسلات على قطع صغيرة من تسلسلات النيوكليوتيدات والتي تعمل كعناصر جذب للبروتينات البادئة، وعادة تكون مواقع منشأ التضاعف غنية بالقواعد المزدوجة من نوع A=T لسهولة كسر الآصرة الهيدروجينية الثنائية (مقارنة مع الآصرة الهيدروجينية الثلاثية G C).

وعملية التضاعف بخطوطها العامة تكون متشابهة في البكتريا والخلايا الحقيقية النواة، أما التفاصيل فتختلف ويلاحظ التعقيد في عملية التضاعف بتعقيد الكائن الحي، والشائع عالمياً دراسة التضاعف في البكتريا الأشهر في البيولوجي الجزيئي وهي E. coli للتعرف على الجوانب المختلفة والتفاصيل الدقيقة لعملية التضاعف. حيث أن جينوم هذه البكتريا مكون من كروموسوم حلقي واحد Single circular chromosome ويتكون من 4.6 مليون قاعدة مزدوجة bp (4.6 x 106).

في البكتريا يلاحظ أن هناك منشأ تضاعف واحد فقط وتسير شوكتا التضاعف أحدهما عكس اتجاه الأخر وبسرعة 500-1000 نيوكليوتيد لكل ثانية، حتى يلتقيان ثانيةً تقريباً في منتصف الطريق (الشكل 6-16). كما يلاحظ أن عملية بدأ التضاعف تكون معقدة ومنظمة بدقة عالية جداً وذلك لأنها الخطوة الوحيدة المسيطر عليها، حيث عندما تبدأ عملية التضاعف فإنها تستمر بوتيرة وسرعة واحدة لحين الانتهاء من عملية التضاعف. وتبدأ عملية التضاعف عندما ترتبط البروتينات البادئة مع مواقع متخصصة على DNA في منشأ التضاعف وتعمل على تكوين معقد DNA-protein ويعمل هذا المعقد على جذب إنزيم DNA helicase الذي يرتبط مع حامل الإنزيم Helicase loader وهو مماثل لحامل المشبك الذي تم شرحه سابقاً، كما أن حامل الإنزيم هذا له وظيفة أخرى مهمة هي إبقاء إنزيم Helicase بشكل غير فعال لحين وضعه في شوكة التضاعف، حيث عندما يتم تحميل هذا الإنزيم فانه يبدأ بفك خيطي الحلزون المزدوج،



الشكل (6-15) منشأ التضاعف



الشكل (6-16) منشأ التضاعف في البكتريا

لكي تبدأ عملية التضاعف وتستمر لحين اكتمالها، ويذكر هنا أن تنظيم عملية التضاعف يتداخل فيها عدة عوامل منها الغذائية، فوجود المغذيات في المحيط الذي تعيش فيه البكتريا يعد ضرورياً للبدء بعملية تضاعف DNA، وبما أن حجم جينوم البكتريا صغير نسبياً لذلك فإن عملية التضاعف DNA تكتمل خلال 40 دقيقة.

تضاعف DNA في الخلايا حقيقية النواة :

في الخلايا حقيقية النواة يبدو الأمر مختلف لكبر حجم الجينوم وكذلك لكون شوكة التضاعف تسير ببطء (حيث تسير بسرعة 50 زوج من القواعد bp كل ثانية تقريباً) بسبب التعقيد الناتج من رزم DNA ضمن الكروماتين وهذا يعقد التضاعف في الخلايا حقيقية النواة. فمثلاً تتكون قطع اوكازاكي كل 100–200 زوج من القواعد bp في الخلايا الحقيقية النواة بينما في البكتريا تتكون هذه القطع كل 1000–2000 زوج من القواعد bp، ربما لأنه في الخلايا حقيقية النواة فإن النيوكليوسوم يوجد كل 200 نيوكليوتيد، وربما يعمل النيوكليوسوم كحاجز يقلل من سرعة تضاعف DNA وهذا أحد أسباب كون سرعة التضاعف في الخلايا حقيقية النواة هي بحدود عُشر سرعتها في البكتريا.

ولو فرضنا أن كروموسوم متوسط الحجم في الإنسان يتكون من حلزون مزدوج من DNA مؤلف من 150 مليون زوج من القواعد bp كمعدل، إذا العملية تكون 150 مليون x 0.02 ثانية لكل نيوكليوتيد ينتج عنها 3 ملايين ثانية وتعادل وتعادل حوالي 833 ساعة (أكثر من 33 يوم) لمضاعفة DNA من بدايته إلى نهايته ومن خلال شوكة تضاعف واحدة وهذا غير ممكن. أما في الحقيقة فإن هناك شوكات تضاعف متعددة تسير بشكل متناسق على طول الحلزون المزدوج لكل كروموسوم، ويمكن تلخيص ما يحدث بالنقاط التالية :

1- مناشئ التضاعف تحفز بشكل مجاميع Clusters تدعى وحدات التضاعف Replication units، لكل مجموعة هناك حوالي 20–80 منشأ تضاعف.
2- وجد أن وحدات التضاعف المختلفة تحفز بأوقات مختلفة خلال دورة الانقسام الخلوي وصولاً إلى تضاعف جميع DNA.
3- يبعد كل منشأ تضاعف عن الآخر بحدود 30.000–250.000 زوج من القواعد bp.
4- كما في البكتريا، تسير شوكات التضاعف مبتعدة عن بعضها وتستمر هكذا وصولاً إلى شوكة تضاعف تالية أو إلى نهاية الكروموسوم.
5- بهذه الطريقة تعمل كل شوكة تضاعف بشكل مستقل عن الشوكات الأخرى في كل كروموسوم وتستمر لحين مضاعفة كامل DNA الكروموسومات.

تضاعف DNA في الخلايا حقيقية النواة تحدث فقط في جزء معين من دورة الخلية هو الطور S (S phase) (الطور S مأخوذ من DNA synthesis phase) على العكس من البكتريا، ففي حالة النمو السريع يمكن أن يحدث تضاعف DNA جديد يبدأ قبل انتهاء تضاعف قد بدأ قبله وهكذا، وفي خلايا اللبائن وفي الطور S تأخذ عملية تضاعف DNA حوالي 8 ساعات مقارنة مع 40 دقيقة في البكتريا والخمائر.

وبنهاية عملية التضاعف في خلية اللبائن فإن كل كروموسوم ينتج نسخة منه ويبقى الكروموسوم القديم والحديث مرتبطين مع بعضهما في منطقة السنترومير لحين الوصول إلى مرحلة M (M مأخوذة من الانقسام الخيطي Mitosis) الذي يعقب مرحلة S مباشرة، وسيتم الحديث عن مراحل الانقسام الخلوي في فصل مستقل.

المناطق المختلفة من نفس الكروموسوم تتضاعف في أوقات متفاوتة خلال مرحلة الطور S، فمثلاً في خلايا اللبائن فإن تضاعف DNA بين كل شوكتي تضاعف يستغرق ساعة واحدة، بينما يستغرق الطور S فترة 8 ساعات ! يعتقد أن ذلك يحدث لأن ليس كل شوكات التضاعف تبدأ في وقت واحد.

ويذكر هنا أن الكروماتين المغاير Heterochromatin يكون مكثف وفي حالة رزم، بينما الكروماتين الحقيقي أو المتجانس Euchromatin فيكون اقل كثافة ورزم (كي تسهل عملية الاستنساخ)، لذلك يكون تضاعف الكروماتين المغاير متأخراً في نهاية الطور S (بعد الكروماتين الحقيقي) بسبب الرزم.

بالرغم من أن هناك عدة مواقع لبدء التضاعف في الخلايا حقيقية النواة إلا أنه يتم "تشغيل" كل واحدة في وقت محدد ومنظم من الطور S في دورة الخلية. إن أكثر الدراسات التي أجريت حول مواقع وتوقيت آلية التضاعف في الخلايا حقيقية النواة كانت في الخمائر من نوع S. cerevisiae حيث تم إيجاد موقع كل منشأ تضاعف في كل كروموسوم، ووجد أن معظم هذه المواقع هي ضمن ما يسمى بتسلسلات التضاعف الذاتية Autonomously replicating sequences (ARS)، وجدير بالذكر أن الكثير من الخلايا حقيقية النواة لها مناشئ تضاعف "إضافية" لضمان تضاعف الجينوم خلال الانقسام الخلوي وللتغلب على مشكلة احتمالية وجود خلل في بعض مناشئ التضاعف. وكل موقع كي يعمل كمنشأ

تضاعف يجب أن تتوفر فيه :

1- موقع ارتباط بروتينات معقدة كبيرة متعددة الوحدات تدعى معقد التعرف على المنشأ Origin recognition complex (ORC).

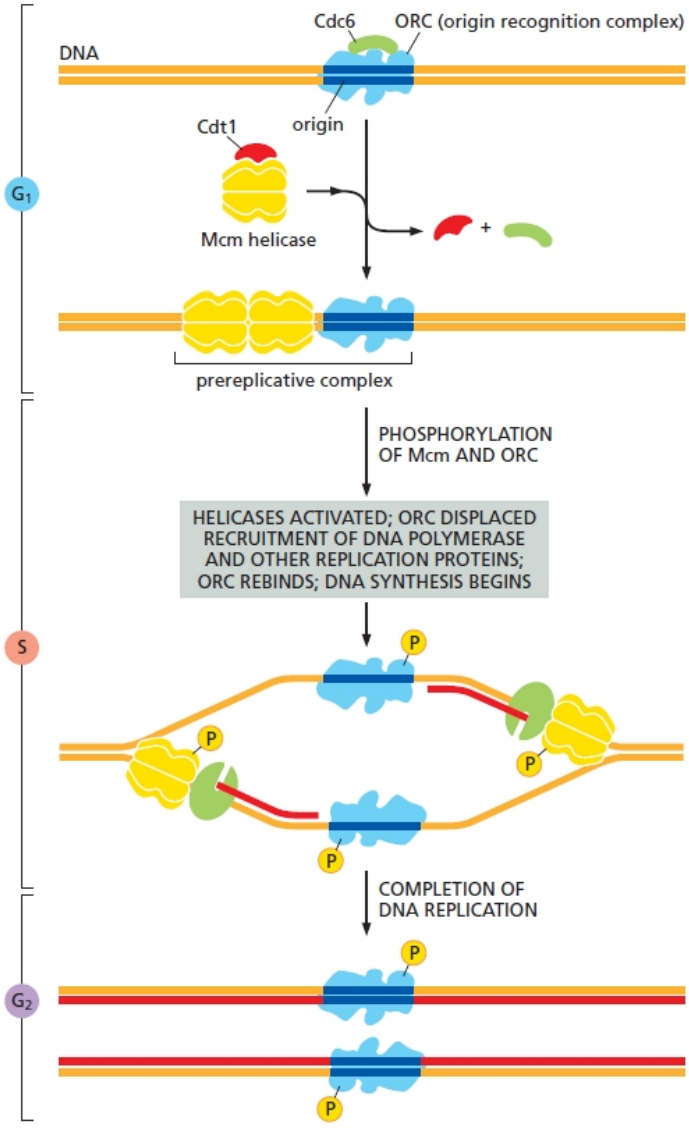
2- تسلسلات DNA تكون غنية بـ A و T كي يسهل فتحها.

3- موقع واحد على الأقل لبروتينات تعمل على جذب ORC إلى موقع التضاعف.

في البكتريا حالما ترتبط البروتينات البادئة مع منشأ التضاعف (الوحيد) بشكل صحيح، سيتم تجميع بروتينات التضاعف تلقائياً، أما في الخلايا حقيقية النواة فالأمر مختلف لوجود عدد كبير من مناشئ التضاعف (حوالي 400 في الخمائر و 1000 في الإنسان) ولكن تبرز هنا مشكلة هي أنه بعد بدء التضاعف ما الذي يضمن أن كل جزء من DNA يتم مضاعفته ؟ وأنه يضاعف مرة واحدة فقط ! والجواب أنه عند ارتباط ORC مع منشأ التضاعف فيتم تنشيط وإزالة تنشيط هذا الارتباط بشكل منظم ودقيق، حيث أن الارتباط بين ORC ومنشأ التضاعف يبقى مستمراً خلال دورة الخلية وينفك لفترة قصيرة بعد تضاعف DNA المنشأ.

تعمل بروتينات تنظيمية على السيطرة على التنشيط وإزالة التنشيط وهذه البروتينات هي انزيم DNA helicase واثنين من البروتينات التي ترتبط مع هذا الإنزيم هما cdc1 و cdc6 (cdc مأخوذة من Cell division cycle وهي بروتينات تنظم الانقسام الخلوي) وتتجمع هذه البروتينات مع معقد DNA-ORC لتكوين معقد ما قبل التضاعفPrereplication complex في كل منشأ تضاعف خلال طور G1 من دورة الخلية (الشكل 6-17).

انتقال الخلية من الطور G1 إلى الطور S يحفز البروتين كاينيز (cdks مأخوذ من Cyclin-dependent protein kinases وهي بروتينات تنظم دورة الخلية) والتي تؤدي إلى انفكاك cdc1 و cdc6 وبالتالي ينشط إنزيم DNA helicase ويفتح خيطي الحلزون المزدوج للبدء بعملية التضاعف.



الشكل (6-17) آلية نشوء تضاعف DNA في الخلايا حقيقية النواة (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

البروتين كاينيز التي تحفز تضاعف DNA في نفس الوقت تمنع تجمع وتكون معقدات ما قبل التضاعف لحين عبور الخلية الطور M. هذه الاستراتيجية تعطي فرصة أولى فقط لتكون معقد ما قبل التضاعف (خلال الطور G1 عندما تكون فعالية cdk منخفضة) وفرصة ثانية

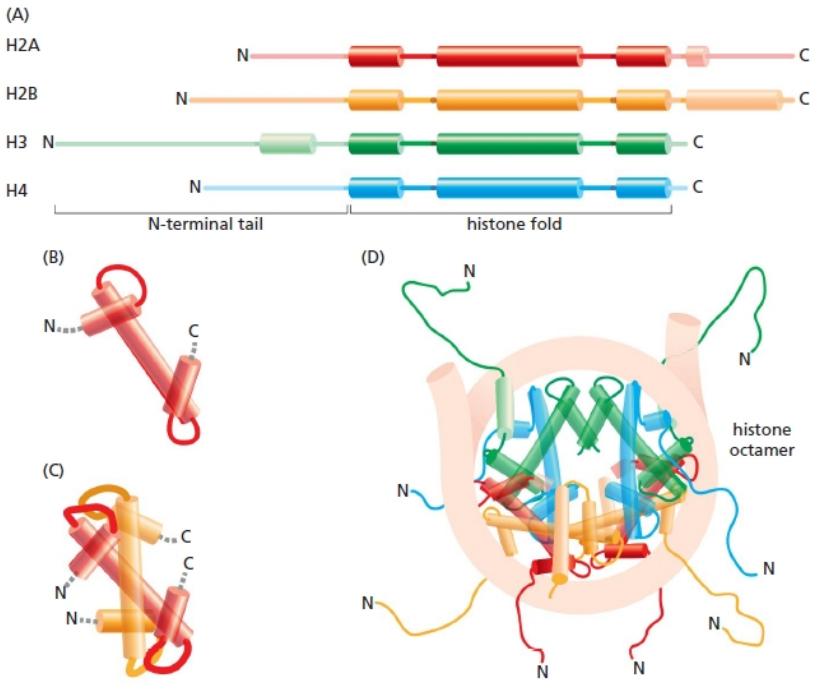
فقط عند زيادة فعالية cdk (في الطور S) وبالتالي تفكك معقد ما قبل التضاعف، وبما أن طوري الخلية G1 و S يكونان منظمين ومتعاقبين لذلك فإن كل منشأ تضاعف يشغل مرة واحدة فقط خلال كل دورة خلية (للمزيد انظر فصل دورة الخلية).

أما في اللبائن فالأمر فيه بعض الاختلاف حيث يلاحظ أن التنظيم لا يعتمد كثيراً على تسلسلات DNA ضمن منشأ التضاعف بل يعتمد أكثر على تركيب الكروماتين.

وكما ذكرنا سابقاً هناك اختلافات أخرى في عملية تضاعف DNA في الخلايا حقيقية النواة مقارنة مع بدائية النواة ومن هذه الاختلافات ما هو معتمد على تركيب الكروموسوم في الخلايا حقيقية النواة حيث يتكون من كميات متساوية تقريباً من البروتينات مع DNA، لذلك فإن عملية تضاعف الكروموسوم تتطلب (فضلاً عن تضاعف DNA) تصنيع وتجميع بروتينات جديدة على DNAخلف شوكة التضاعف، وبالرغم من أن العملية معقدة ولازلنا في بدايات التعرف على تفاصيلها ولكن المعروف أن الخلية التي تستعد للانقسام الخلوي تحتاج كميات كبيرة من بروتينات الهستون بكمية تعادل تقريباً كمية DNA التي تحتاجها، لغرض تصنيع نيوكليوسومات جديدة في كل دورة خلية، لذلك فإن معظم الخلايا حقيقية النواة تملك عدة نسخ من الجينات التي تشفر كل هستون، فمثلاً خلايا الفقريات فيها مجموعة من حوالي 20 جين تشفر لتصنيع الأنواع الرئيسية الخمسة من الهستونات (H1 و H2A و H2B و H3 و H4)، وعلى العكس من معظم البروتينات التي تصنع بشكل مستمر خلال طور البيني Interphase، فإن الهستونات تصنع في الطور S وذلك بزيادة مستوى mRNA المشفر لبروتينات الهستونات خمسين مرة بسبب زيادة الاستنساخ ونقصان تحطيم mRNA الخاصة بالهستونات. وعندما يقف تصنيع DNA في نهاية الطور S فإن mRNA المشفر لتصنيع الهستونات يحطم خلال دقائق على العكس من بروتين الهستون الذي يكون ثابتاً وربما يبقى محافظاً على نفسه طوال عمر الخلية. ويبدو أن هناك علاقة قوية بين تصنيع كل من DNA والهستونات وتنظم العملية بالتغذية الرجعية بحيث تكون نتيجتها تصنيع كميات متساوية من DNA وبروتينات الهستونات.

ولكي تستمر شوكة التضاعف عليها أن تعبر الهستونات القديمة، ويبدو أن شوكة التضاعف من الصعب عليها ذلك دون حدوث انفصال بين DNA والهستونات، لذلك فإن

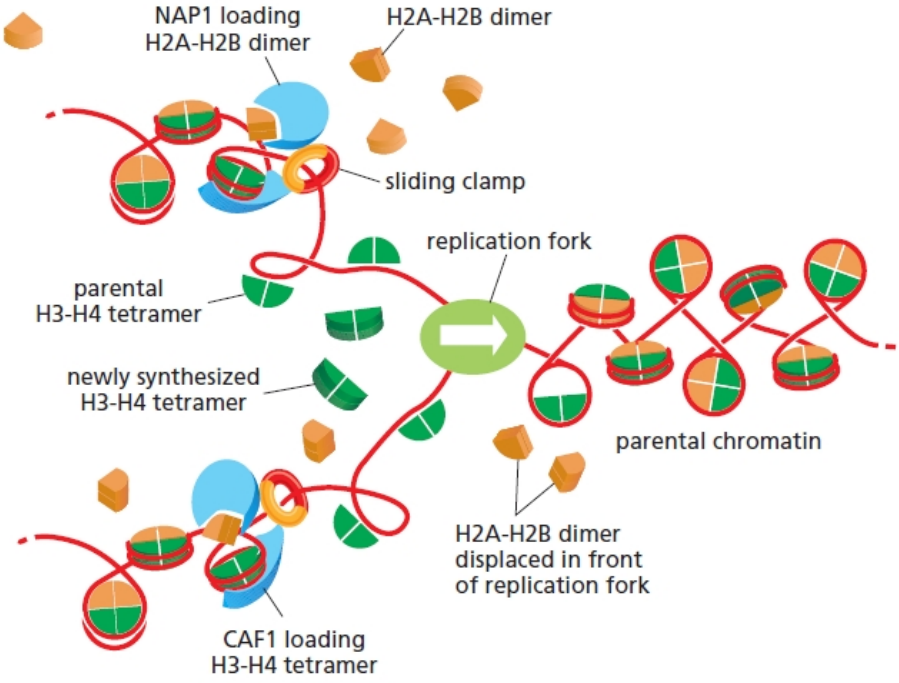
بروتينات تدعى بروتينات إعادة تشكيل الكروماتين Chromatin remodeling proteins (CRP) تعمل على إزالة الثبات بين DNA والهستونات، وبتقدم شوكة التضاعف خلال الكروماتين فإن أغلبية الهستونات القديمة تبقى مرتبطة بـ DNA وتوزع على حلزوني DNA الجديدين خلف شوكة التضاعف، وبما أن كمية DNA تضاعفت (زادت كميتها إلى الضعف) لذلك فإن هناك حاجة إلى تصنيع كمية هستونات جديدة مساوية لكمية الهستونات القديمة لإكمال رزم DNA ضمن الكروماتين، ويذكر أن الهستونات القديمة والحديثة ترتبط بطريقة المشاركة حيث لوحظ أن شوكة التضاعف تعمل على تكسر مؤقت في تركيب النيوكليوسوم منتجةً ثلاث قطع أحدهما رباعي الأجزاء مكون من H4-H3 وأثنين من ثنائي الأجزاء H2A_H2B (الشكل 6-18) رباعي الأجزاء (H4-H3) يبقى مرتبطاً مع DNA بينما ينفصل كلا ثنائي الأجزاء (H2A_H2B) من DNA.



الشكل (6-18) تركيب الهستونات

رباعي الأجزاء (H4-H3) المصنع حديثاً يضاف إلى DNA الجديد، بينما ثنائي الأجزاء (H2A_H2B) نصفه يكون قديم ونصفه حديث يضاف بشكل عشوائي لإكمال تكوين النيوكليوسومات، إن ترتيب وإضافة الأجزاء (ثنائية كانت أم رباعية) خلف شوكة التضاعف تحتاج بروتينات متخصصة هي جابيرونات الهستونات Histone chaperones (تدعى أحياناً عوامل تجميع الكروماتين Chromatin assembly factors حيث ترتبط هذه المعقدات مع الهستونات ذي القاعدية العالية، ومن ثم تحررها لغرض التجميع وبشكل متناسق، هذه الجابيرونات توجه إلى DNA المصنع حديثاً من خلال تفاعلات متخصصة مع حامل الانزلاق Sliding clamp وتدعى بستضدات انوية الخلايا المتكاثرة Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) وهي عبارة عن حامل DNA يعمل كعامل تقدم لإنزيم البلمرة DNAP ويعد ضرورياً لعملية التضاعف، حيث يكون هذا الحامل خلف شوكة التضاعف ويبقى مرتبط مع DNA لفترة كافية لحين تمكن جابيرونات الهستونات من إتمام مهمتها.

آلية تضاعف الكروموسوم في الخلايا حقيقية النواة يكون بالشكل الذي يضمن أن التحويرات في الهستونات تتوارث، وكما ذكرنا سابقاً فإن الهستونات تعاني العديد من التحويرات وهذه التحويرات تؤثر على التعبير الجيني دون إحداث تغييرات في تسلسلات DNA (وهذا ما يسمى بفوق الجينية Epigenetic)، وبما أن هذه التغيرات تكون في بروتينات الهستونات (وليس DNA) لذلك يجب أن تكون هناك آلية محددة لحفظ ونقل هذه التغيرات إلى الخلايا البنوية، وكما لاحظنا أعلاه فإن الأجزاء الرباعية من الهستونات (H3-H4) توزع بشكل عشوائي إلى الكروموسومين البنويين. إن ذيل (وربما أجزاء أخرى) من هذه الهستونات يمكن أن يجري عليها تحويرات، لذلك فإن كل كروموسوم بنوي سوف يحصل على ذاكرة أبوية لنمط تحويرات H3 و H4 (الشكل 6-19). وعندما يكتمل تجمع النيوكليوسوم (خلف شوكة التضاعف) فإن التحويرات الأبوية لـ H3-H4 يمكن أن تستعاد من خلال إنزيمات تحوير الهستون عن طريق معقدات القراءة – الكتابة Reader – writer complexes والتي تميز نوع التحويرات، وهذه الآلية الناجحة والدقيقة في مضاعفة تحويرات الهستونات تكون مسؤولة عن الوراثة فوق الجينية Epigenetic inheritance حيث أنها تحدث تغيرات وراثية في الطراز المظهري للخلية دون حدوث تغيرات في تسلسلات DNA.



الشكل (6-19) تكوين النيوكليوسومات خلف شوكة التضاعف (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

أهم المراجع :

Astbury, W. T., (1947) **"X-ray studies of nucleic acids"** Symposia of the Society for Experimental Biology, 1: 66-76.

Benjamin A. Pierce. **Genetics: A Conceptual Approach**. 5th ed. (2013). W. H. Freeman.

Berg J., Tymoczko J. and Stryer L. **Biochemistry.** (2002). W. H. Freeman and Company.

Cammack R. **Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology**. 2nd ed. (2006). Oxford University Press.

Champoux JJ (2001). **"DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism"**. *Ann Rev Bioch*. 70: 369–413.

Dahm R (2008). **"Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research"**. *Hum. Genet*. 122 (6): 565–81.

Doherty AJ, Suh SW (2000). **"Structural and mechanistic conservation in DNA ligases".** *Nucleic Acids Res*. 28 (21): 4051–8.

Eberhard Passarge. **Color Atlas of Genetics.** 3rd ed. (2007). Georg Thieme Verlag KG.

Hubscher U, Maga G, Spadari S (2002). **"Eukaryotic DNA polymerases".** *Annu Rev Biochem.* 71: 133–63.

Johnson A, O'Donnell M (2005). **"Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork".** *Ann Rev Biochem*. 74: 283–315.

Levene P (1919). **"The structure of yeast nucleic acid".** *J Biol Chem*. 40 (2): 415–24.

Meselson M, Stahl FW (1958). **"The replication of DNA in Escherichia coli"**. *Proc Natl Acad Sci*. USA. 44 (7): 671–82.

Pabo CO, Sauer RT (1984). **"Protein-DNA recognition".** *Ann Rev Biochem*. 53: 293–321.

Peter Paolella. **Introduction to Molecular Biology.** (1998). The McGraw-Hill Companies. Inc.

Richard M. Twyman**. Advanced Molecular Biology.** (1998). BIOS Scientific Publishers Limited.

Saenger, Wolfram. **Principles of Nucleic Acid Structure.** (1984). New York: Springer-Verlag.

Schoeffler AJ, Berger JM (2005). **"Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism".** *Bioch Soc Trans.* 33 (Pt 6): 1465–70.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R **Molecular Biology of the Gene**. 7th ed. (2013). Benjamin Cummings. CSHL Press.

Watson JD, Crick FH (1953). **"A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid"**. *Nature.* 171 (4356): 737–738.

الفصل السابع

الطفـرات

وإصلاح DNA

الفصل السابع

الطفرات
وإصلاح DNA

الذي يميز المادة الوراثية (DNA) هو كون تركيبها ثابت نسبياً للمحافظة على المعلومات الوراثية (الهوية) للكائن الحي، وفي نفس الوقت يجب أن تملك هذه المادة الوراثية بعض المرونة كي يحصل في معلوماتها بعض التغييرات. لذلك فإن DNA يجب أن يكون ثابتاً بدرجة تحفظ المعلومات الوراثية التي تحملها، وقابلة للتغير بدرجة تسمح بإصلاح الأخطاء عند حدوثها وكذلك إضافة معلومات جديدة إلى الجينوم.

التغيير في المادة الوراثية يدعى الطفرة Mutation، وهذا التغيير يختلف من كونه في نيوكليوتيد واحد إلى تغيير في ذراع كامل للكروموسوم يحوي ملايين النيوكليوتيدات، تأثير هذا التغيير على الكائن الحي قد يكون مفيداً، أو غير مؤثر، أو ممرض أو حتى مميت، اعتماداً على حجم وموقع التغيير، وعادةً، ولكن ليس دائماً، التغيير الصغير يسبب تأثيرات قليلة والتغيير الكبير يؤدي إلى تأثيرات كبيرة. ولازالت الأحياء المجهرية هي الأكثر استعمالاً في دراسات الطفرات والإصلاح، لأسباب عديدة ربما أهمها لكونها كائنات بسيطة يسهل ملاحظة تأثير الطفرة فيها ولصغر حجم جينومها وسهولة التعامل مع هذا الجينوم نسبياً.

تعريف الطفرة :

عموماً تعرف الطفرة على أنها أي تغيير في نيوكليوتيدات (تسلسل) المادة الوراثية (سواء أكان DNA أم RNA) للكائن الحي. وبالرغم من أن الطفرة تحدث في الجينوم إلا أنه يستدل عليها عن طريق دراسة الصفات الخارجية والتأثيرات الظاهرة. الطفرة تعني أن هناك تغيير في تركيب الجين مما يؤدي إلى تغيير في RNA أو البروتين، أي أن التغيير في الصفة الوراثية Genotype يؤدي إلى تغيير في الصفة المظهرية Phenotype. إن الكائن الحي يملك عادة جينات تكون مسؤولة عن الانزيمات والمسارات والعمليات الأيضية وحجم ولون الكائن وصفاته الأخرى... الخ، لذلك فإن الطفرة يمكن أن تظهر في أي من هذه الصفات.

وتظهر الطفرة عادة بعد الدورة الثانية من تضاعف DNA، إذ يحدث تغيير في التركيب خلال تضاعف DNA ويظهر هذا التغيير بعد تضاعف ثاني لـ DNA، كما سيتم تفصيل ذلك فيما بعد. ويمكن اكتشاف الطفرة من خلال مقارنة الكائن الحي الذي حدثت فيه الطفرة مع كائن آخر من نفس النوع لا يحمل هذا التغيير، ويدعى الكائن الأخير بالنوع السوي أو البري Wild type.

آليات حدوث الطفرات :

كما أوضحنا سابقاً فإن الطفرة هو أي تغيير في تسلسلات النيوكليوتيدات، مما ينتج عنه تغيير في تسلسلات الأحماض الأمينية ضمن التركيب الأولي للبروتين، ومعلوم أن التغيير في التركيب الأولي للبرويتن سيؤدي عادةً إلى تغيير في باقي مستويات التركيب (أي الثانوي والثالثي والرابعي) مما يسبب تغيير في الصفات الفسلجية أو الكيموحيوية أو الشكلية أو السلوكية... للكائن الحي، وفي اللبائن الطفرة يمكن أن تحدث في الخلايا الجنسية (النطف والبيوض) وبذلك تنتقل هذه الطفرة إلى الجيل التالي، أما الطفرة على مستوى الخلايا الجسمية فيمكن أن تظهر أثاره على الكائن الحي ولكن لا تنتقل هذه الطفرة إلى الأجيال التالية، والجدول (7-1) يوضح أشكال الطفرات وظهورها على الكائن الحي.

الجدول (1-7) بعض أشكال الطفرات وظهورها على الكائن الحي

شكل الطفرة	مثال لظهورها على الكائن
سلوكية Behavioral	تغيير في سلوك التزاوج
شكلية Morphological	تغيير في الصفات الفيزيائية للجسم
هرائية Nonsense	تغير شفرة الحامض الأميني إلى شفرة التوقف
غذائية Nutritional	عدم القدرة على تصنيع أو استعمال المغذيات
تنظيمية Regulatory	الجين يحفز أو يثبط بشكل دائمي
حساسة للحرارة Temperature sensitive	يثبط الجين عند حرارة معينة

الطفرة يمكن أن تصيب أي جزء من الكروموسوم ويمكن أن تكون على شكل تغيير في نيوكليوتيد واحد إلى تغيير في ملايين النيوكليوتيدات، والأخيرة ربما تؤدي إلى تشوه في تركيب وبالتالي وظائف الكروموسوم. ويمكن تصنيف هذا النوع من الطفرات على مستوى الكروموسوم وحسب نوع التغيير الذي يحدث إلى أربع أنواع أساسية هي :

1- الحذف Deletion: حيث يتم فقدان جزء من الكروموسوم.
2- التضاعف Duplication: تضاعف أو تكرار جزء أو أجزاء من الكروموسوم.
3- انقلاب Inversion: تسلسلات نيوكليوتيدات معينة تقلب ضمن الكروموسوم.
4- تحول المكان Translocation: جزء أو أجزاء من الكروموسوم تتحول إلى كرموسوم أخر.

الطفرة النقطية Point mutation :

وهو عبارة عن تغيير في قاعدة نيتروجينية واحدة، وهي من أكثر أنواع الطفرات دراسة لذلك فهي أكثرها وضوحاً، ويمكن أن تحدث في عدة مواقع على طول الجين أو الجينوم، وهنا يجب الانتباه إلى أننا عندما نعرف الطفرة النقطية بـ "تغيير في قاعدة نيتروجينية واحدة" القصد من ذلك أن هذا التغيير هو في خيط DNA الذي يشفر لتصنيع RNA ومن ثم البروتين، ومعروف أن أي تغيير في خيط من DNA يرافقه تغيير في الخيط المتمم له، أي أن

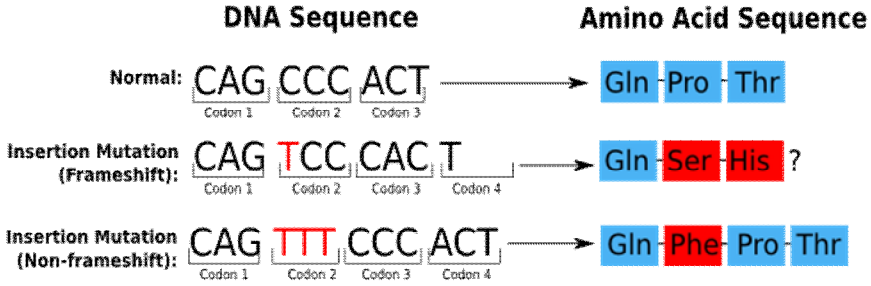
التغيير يكون عادةً بشكل زوج من القواعد bp. وهناك عدة أنواع من الطفرة النقطية يمكن تلخيصها في :

1- حذف القاعدة Base deletion.
2- حشر القاعدة Base insertion.
3- استبدال القاعدة Base substitution.
4- أخطاء التدقيق Proofreading errors.
5- تغييرات كيميائية في القواعد النتروجينية Chemical changes in bases.

الحذف والحشر :

إن الآلية الدقيقة لحدوث الحذف أو الحشر لا زالت غير واضحة، ويعتقد أن القاعدة النتروجينية المكررة عدة مرات يمكن أن تخرج بشكل لولب عند عملية تضاعف DNA، وأن حدوث حذف أم حشر يعتمد على الخيط هل هو أبوي أم بنوي، إن ناتج الطفرة هنا سواء أكانت حذف أم حشر سيكون خطيراً لأنه يؤدي إلى انتقال أو تحول مكاني في القراءة وهذا ما يطلق عليه بطفرات تحول البنية Frameshift mutations، إذ كما هو معروف فإن الشفرة Codon تقرأ كل ثلاث نيوكليوتيدات (أحرف)، فعند حدوث زيادة (حشر) أو نقصان (حذف) في حرف واحد فإن هذا التغيير يستمر على جميع التسلسلات ما بعد موقع الطفرة. وجدير بالذكر هنا أن الحذف والحشر يمكن أن يؤدي إلى طفرة ليست من نوع تحول البنية Non-frameshift mutations، وذلك عندما يكون عدد القواعد المتغيرة (حذفاً أو حشراً) ثلاثة أو مضاعفاتها (6، 9....) لأن التغير سيكون في شفرة واحدة أو شفرتين وبالتالي فقدان أو إضافة حامض أميني واحد أو أثنين وهكذا.. وكما موضح في الشكل (7-1).

ويذكر أن هذا النوع من الطفرات (frameshift mutations) يمكن إصلاحه بطفرة حذف عند وجود حشر، أو طفرة حشر عند وجود حذف. ويختلف تأثير الطفرة حسب موقع وأهمية الحامض الأميني (أو عدد الأحماض الأمينية) ضمن تركيب البروتين، فمثلاً حدوث طفرة في حامض أميني يدخل في تركيب الموقع الفعال للإنزيم يكون تأثيره خطيراً على وظيفة الإنزيم أكثر من طفرة في حامض أميني في موقع آخر بعيداً عن الموقع الفعال.



الشكل (1-7) مثال على طفرة الحشر

وهناك فرق جوهري بين طفرتي الحذف والحشر، حيث في الأولى من الصعب خلال عملية الإصلاح إدخال القاعدة الصحيحة التي فقدت وتكون احتمالية إدخال النيوكليوتيد الصحيح هي 25٪ (باعتبار أن لدينا أربع نيوكليوتيدات تكون DNA)، أما في طفرة الحشر فيمكن الاستدلال بسهولة على وجود نيوكليوتيد إضافي (أو نيوكليوتيدات اضافية) أي النسبة تكون 100٪ لأنها عملية حذف عنصر معين، وبذلك تكون عملية الإصلاح أسهل، عليه فإن طفرة الحذف أكثر خطورة على الخلية والكائن من طفرة الحشر.

استبدال القواعد :

لا زالت الأسباب المباشرة لحدوث طفرة استبدال القواعد غير واضحة لكن يعتقد أن معظمها يحدث تلقائياً خلال تضاعف DNA، وعادةً يكون استبدال القواعد بأحد شكلين هما طفرة انتقال Transition أو طفرة إبدال Transversion.

في طفرة الانتقال Transition وهو الأكثر شيوعاً، يتم استبدال بايريمدين ببايريمدين أو بيورين ببيورين، أي A يستبدل بـ G أو G يستبدل بـ A وكذلك T يستبدل بـ C أو C يستبدل بـ T.

بينما في طفرة الابدال Transversion يتم استبدال بايريمدين ببيورين أو بيورين بايريمدين. إن من أخطر أنواع طفرة الانتقال هي عملية إضافة الألكيل Alkylation وهي عملية إضافة مجموعة الألكيل (مثل المثيل أو الأثيل) إلى موقع الهيدروجين الفعال للكوانين وتؤدي عملية الألكلة إلى إيقاف ازدواج القواعد، هذا الإيقاف يمكن أن يحفز ارتباط G مع

T (بدلاً من C) وفي التضاعف التالي لـ DNA، فإن T تزدوج مع A، وبذلك يقال أن طفرة انتقال Transition قد حصلت.

كما يمكن لعملية ألكلة الكوانين أن تسبب إزالة G من تركيب DNA بعملية تسمى إزالة البيورين Depurination حيث يتم فصل البيورين من ارتباطه بالرايبوز منقوص الأوكسجين تاركاً الموقع بدون بيورين (Apurinic)، هذا التغيير الخطير يسبب توقف تضاعف DNA وتلجأ الخلية إلى آلية إصلاح متخصصة تسمى نظام الطوارئ SOS system الذي يصلح الخلل لضمان استمرار تضاعف DNA، وسيتم شرح هذه الآلية لاحقاً.

أخطاء التدقيق :

الطفرات الذاتية يمكن أن تحدث بسبب وجود طفرات في آلية التدقيق لإنزيم البلمرة DNAP مما يجعل هذا الإنزيم غير فعال في اكتشاف وإصلاح الخلل خلال تضاعف DNA، وتسمى هذه بالجينات المطفرة Mutator genes، وهي في الحقيقة ليست جينات متخصصة بالطفرة، بل هي تلك الجينات التي تشفر للبروتينات المساهمة في عمليات تضاعف وإصلاح DNA. وبسبب هذه الوظائف فإن وجود خلل في هذه الجينات سيزيد من معدل حدوث الطفرات الذاتية. ومن الأمثلة على هذا النوع من الجينات والطفرات :

1- طفرة في فعالية Exonuclease لإنزيم البلمرة الأول DNAPI، يقلل من كفاءة عملية التدقيق.

2- طفرة في إنزيم المثيليز، الذي يعمل على المثيلة لغرض تمييز الخيط الأبوي لـ DNA عن الخيط البنوي، وبذلك يمكن لآليات الإصلاح التمييز بينهما وإصلاح الخلل في الخيط البنوي، إما عند وجود طفرات في إنزيم المثيليز، لا تحصل المثيلة الصحيحة، فلا تستطيع آليات الإصلاح التمييز بين الخيط الأبوي والخيط البنوي، فتزداد نسبة الطفرات الذاتية.

3- وجود طفرات في إنزيم الاستئصال Excision enzyme لنظام إصلاح سوء التطابق Mismatch، بذلك لا تتم عملية الإصلاح.

4- حصول طفرات في نظام إصلاح الطوارئ SOS، وبذلك لا يعمل هذا النظام أو يعمل بشكل غير كفء، أو لا يتم إطفاءه بعد انجاز مهامه وبذلك تسمى الحالة بآلية الإصلاح

المولدة للأخطاء Error-prone repair mechanism حيث بدلاً من إصلاح القاعدة الخاطئة تقوم الآلية باستبدال القاعدة الصحيحة معتمدة على القاعدة الخاطئة كمصدر، ومن هنا جاءت تسمية هذه الآلية.

معدل الطفرات :

معدل الطفرات الذاتية تختلف بين المواقع المختلفة للجينوم ضمن خلايا الكائن الحي، وكذلك بين الكائنات المختلفة. ولا توجد قياسات دقيقة لمعدل حدوث هذه الطفرات، وإذا تم النظر إلى الطفرة كفقدان فعالية الجين، فإن معدل الطفرة يكون إلى حد ما متشابه بين الجينات ذات الحجم المتقارب، أو بمعنى آخر يكون معدل الطفرة متناسباً مع حجم الجين ضمن النوع الواحد، وباعتبار حجم الجين كلما كبر حجم الجين كلما كان عرضة للمطفرات أكثر وحدثت فيه طفرات أكثر.

لكن الأمر ليس بهذه البساطة حيث أنه ليست جميع النيوكليوتيدات تكون عرضة للطفرات بنفس المعدل، إذ توجد نيوكليوتيدات ضمن الجين تكون عرضة للطفرات أكثر من غيرها وبـ 10 – 100 ضعف، هذه المواقع التي تكون أكثر عرضة للطفرات تسمى المواقع (البقع) الساخنة Hotspots، وتكون موقعاً للطفرات الذاتية أو المحدثة، المطفرات المختلفة يمكن أن يكون لها مواقع ساخنة مختلفة، والموقع الساخن لمطفرة معينة ليس شرطاً أن يكون موقعاً ساخناً لمطفرات أخرى.

الطفرات الصامتة Silent mutations :

كما شرح سابقاً فإن الطفرة يمكن التعرف عليها ودراستها من خلال التغييرات المظهرية على الكائن بسبب الطفرة، ولا زال ذلك مستعملاً في دراسة الطفرات وتأثيراتها، ولكن هناك طفرات لا تظهر تغيير مظهري على الكائن وهذه الطفرات تدعى بالطفرات الصامتة، في الحقيقة أن هذه الطفرات إما أنها لا تؤدي إلى تغيير مظهري، أو تسبب تغيير مظهري لا يمكن اكتشافه.

والطفرة الصامتة لا تكتشف من خلال التغيير المظهري لعدة أسباب منها :

1- عندما تؤدي الطفرة إلى نفس الحامض الأميني الأصلي وهذا ما يدعى بالاستبدال المرادف Synonymous substitution، بسبب كون معظم الأحماض الأمينية (العشرين الأساسية) تشفر بأكثر من شفرة واحدة (64 شفرة) وسيتم تفصيل ذلك لاحقاً (انظر فصل الشفرة الوراثية).

2- عندما تؤدي الطفرة إلى تغيير الحامض الأميني "غير المهم" ضمن فعالية البروتين، مثلاً حامض أميني بعيد عن الموقع الفعال للإنزيم.

3- عندما يحدث التغيير في جين لا يتم تعبيره،أو في جزء الانترون Intron غير المشفر من الجين، أو في جين ناتجه ليس ضمن تجربة الكشف عن الطفرة أو الطفرات.

4- عندما لا يتم التعبير عن الطفرة بسبب وجود طفرة أخرى (تسمى بالطفرة الكابحة Suppressor mutation) في نفس الوقت مصححة للطفرة الأولى تعمل على استعادة البروتين لوظيفته الطبيعة رغم وجود طفرتين متتاليتين، بحيث الطفرة الثانية ألغت تأثير الطفرة الأولى.

الكشف عن الطفرة الصامتة يحتاج إلى دراسة وتحليل تسلسلات Sequences النيوكليوتيدات للكرموسوم المشكوك فيه أو ربما للجينوم بأكمله، ويعد ذلك عملاً مكلفاً وشاقاً. وللطفرة الصامتة العديد من الاستعمالات في البحوث الجزيئية والتطبيقات السريرية منها:

1- في مجال الكلونة Cloning حيث يمكن إحداث طفرة صامتة في جين معين لإنشاء أو تعطيل موقع التعرف للإنزيمات القاطعة.

2- كما أن هناك العديد من الاضطرابات العقلية سببها وجود طفرات صامتة.

3- واستعملت الطفرات الصامتة ضمن جينوم بعض الفروسات (مثل فيروس شلل الأطفال Poliomyelitis) لتصنيع اللقاحات ضد هذه الفيروسات.

4- الطفرة الصامتة في جين المقاومة للعديد من الأدوية Multidrug resistance gene 1 (MDR1) يمكن أن يغير من شكل البروتين الذي يشفر له هذا الجين ويقلل من المقاومة ضد الأدوية.

5- الانحراف عن الحساسية المعتدلة للألم APS تكون بسبب طفرة من ATG إلى GTG (طفرة غير مرادفة)، أو بسبب طفرة من CAT إلى CAC (طفرة مرادفة)، هاتان الطفرتان تشتركان في انخفاض الحساسية للألم LPS أو زيادة الحساسية للألم HPS، ويلاحظ أن LPS لديه طفرة صامتة إضافية من CTC إلى CTG، وكما في الجدول (7-2).

الجدول (7-2) طفرة انحراف الحساسية للألم

LPS	APS	HPS
CAC	CAT	CAC
CTC	CTC	CTG
GTG	ATG	GTG

الطفرات الهرائية Nonsense mutations :

وهي تلك الطفرات النقطية في تسلسلات DNA والتي تسبب حدوث شفرة توقف قبل النضج Premature stop codon أو طفرة هرائية في mRNA، مما ينتج عنه بروتين غير فعال وظيفياً. ومن الأمثلة الشهيرة على هذا النوع من الطفرات هو فقر دم الثلاسيميا نوع بيتا beta-Thalassemia ومتلازمات نادرة مثل الاعتلال العضلي Duchenne muscular dystrophy وأمراض أخرى.

الطفرات المغلّطة Missense mutations :

وهي تلك الطفرة النقطية التي تسبب تغير نيوكليوتيد واحد مما ينتج عنه شفرة تشفر لحامض أميني يختلف عن الأصل، ويمكن أن يؤدي ذلك إلى بروتين يفقد فعاليته الوظيفية، ومن الأمثلة على ذلك فقر الدم المنجلي Sickle-cell disease، إذ أن النيوكليوتيد رقم 20 للجين المسئول عن السلسة بيتا للهيموكلوبين يتغير من GAG إلى GTG (في الحقيقة فقط A يستبدل بـ T) مما ينتج عنه أن الحامض الأميني السادس وهو حامض الكلوتاميك ضمن سلسلة بيتا يتغير إلى الحامض الأميني فالين.

المواد المطفرة Mutagenic agents :

هناك العديد من المواد التي يمكن أن تحدث الطفرة، وتختلف هذه المواد فيما بينها في طبيعة ونوعية هذه المواد، وآلية عملها في تغيير النيوكليوتيدات، وقوة تأثيرها، ونوعية الخلايا الأكثر تأثراً بها. وعموماً تقسم المواد المطفرة إلى ثلاث أنواع هي الحيوية والكيميائية والفيزيائية.

1- المطفرات الحيوية Biological mutagens :

وتشمل الفيروسات والعناصر القافزة :

(أ) العناصر القافزة Transposable elements:

وهي مجموعة من تسلسلات DNA وجدت في الخلايا البدائية والحقيقية النواة، وتعد رائدة علوم البيولوجي الجزيئي Barbara McClintock (انظر الفصل الأول) أول من كتبت وبحثت في العناصر القافزة في 1951، وتم تجاهل بحوثها في ذلك الوقت بل قوبلت بالرفض الشديد لكون الاعتقاد السائد في ذلك الوقت كان ((أن الجين له موقع ثابت لا يمكن أن يتغير))، لحين ما تأكد العلماء من صحة ما ذهبت إليه كلينتوك في سبعينات القرن العشرين، وتثميناً للجهود المتميزة لكلينتوك منحت جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة عام 1983.

وعموماً يمكن أن تكون العناصر القافزة بأحد نوعين، إما أن التسلسلات تترك DNA الواهب وتذهب وتنحشر ضمن تسلسلات DNA المستقبل في مكان آخر ضمن الجينوم وهذا ما يعرف بالقفز المحافظ Conservative transposition وتشبه العملية خطوتي القص واللصق Cut and paste عند الطباعة في برنامج مايكروسوفت وورد، أما النوع الآخر والذي يعرف بالقفز التضاعفي Replicative transposition حيث يتم نسخ تسلسلات معينة من DNA الواهب ثم تحشر ضمن تسلسلات DNA المستقبل وتشبه خطوتي النسخ واللصق Copy and paste عند الطباعة، وسيتم الحديث عن العناصر القافزة بتفصيل أكثر في فصل الجينات.

(ب) الفيروسات:

وهناك أنواع مختلفة من الفيروسات التي تسبب الطفرات ومن هذه الفيروسات هو

فيروس Bacteriophage Mu أحياناً يسمى Mutator phage، حيث يسبب الفيروس الطفرات في تسلسلات المضيف بعد أن يحشر الفيروس نفسه ضمن جينوم المضيف، ويصاب الجين الذي يدخل الفيروس ضمن تسلسلاته بفقدان الفعالية، كما يمكن أن يسبب هذا الفيروس العديد من الطفرات الأخرى مثل Inversion و Deletion و Translocation والتحام قطع DNA المستقلة عن بعضها كما في التحام أثنين من البلازميدات.

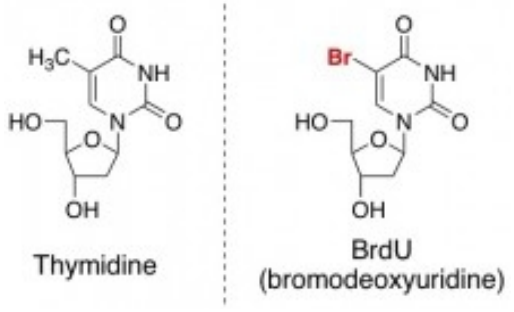
2- المطفرات الكيميائية Chemical mutagens :

هناك مجموعة كبيرة من المواد الكيميائية التي بمقدورها إحداث الطفرات وذلك بإحدى آليتين :

أ- من خلال دخول جزيئة المادة المطفرة ضمن تركيب المادة الوراثية (DNA) خلال عملية التضاعف لكونها مماثلة Analogs تركيبياً للقواعد النتروجينية المكونة للنيوكليوتيدات وبذلك تسبب خلل في قاعدة ازدواج القواعد ومن ثم الطفرة.

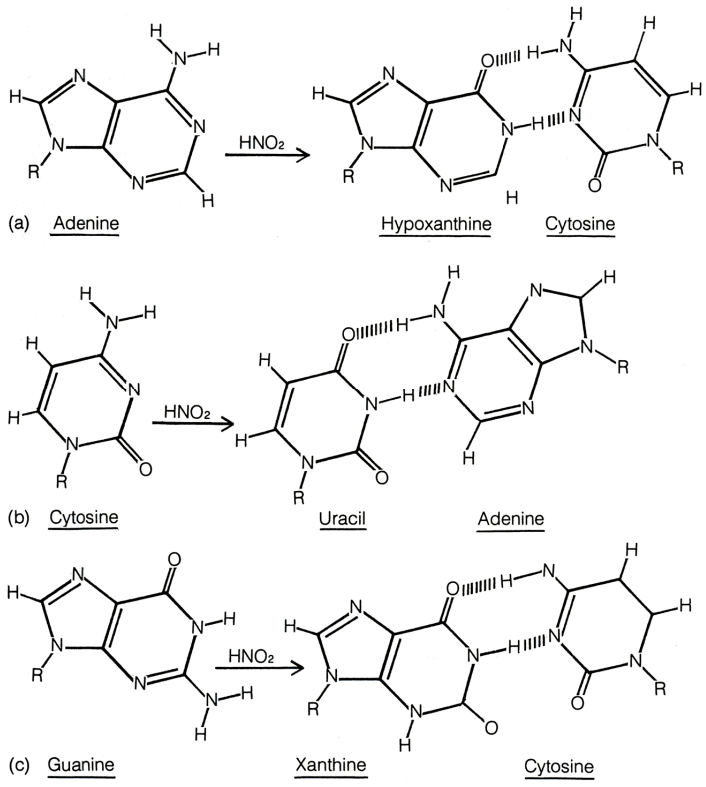
ب- من خلال تغيير في تركيب النيوكليوتيدات مما يسبب اضطراب في تركيب DNA، وفيما يلي أبرز المطفرات الكيميائية وآلية عملها :

1- بروموبوراسيل-5 5-bromouracil (5BU): ويكون مماثل للثايمين تركيبياً وبذلك يتم استعماله خلال تضاعف DNA ويزدوج مع الأدنين A، لكن هذا المركب يميل بشدة إلى التحول إلى شكل اينول Enol عندها سوف يزدوج مع الكوانين G لأنه أصبح شبيه بالسايتوسين C (الشكل 7-2).



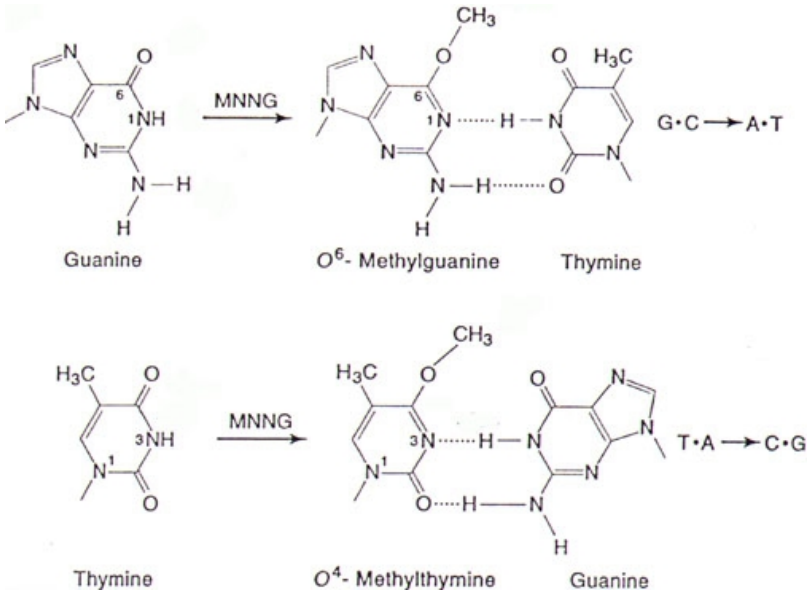
الشكل (7-2) التركيب الكيميائي للثايميدين ومماثله البروموبوراسيل

2- حامض النايترس Nitrous acid: ويعمل على تحويل مجاميع الأمين إلى مجاميع كيتو وذلك من خلال ازالة الأمين الأكسدي Oxidative deamination مما ينتج عنه تغيير في ازدواج القواعد (الشكل 7-3). ويذكر أن مركبات النتريت Nitrites التي تستعمل كمواد حافظة للأغذية يمكن أن يؤيض في الجسم إلى حامض النايترس، لذا يجب توخي الحذر من استعماله.



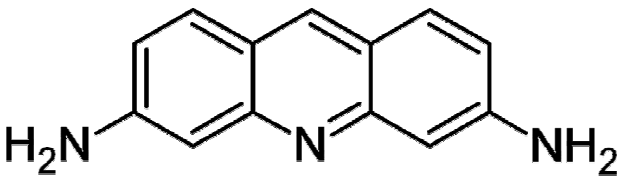
الشكل (7-3) آلية عمل حامض النايترس كمادة مطفرة

3- سلفونات الايثيل ميثان Ethyl methane sulfonate: ويعمل على ألكلة أصرة الهيدروجين- الأوكسجين للكوانين وبدرجة أقل للثايمين، عندها يصبح الكوانين في حالة اينول غير الطبيعية والذي يميل للازدواج مع الثايمين بدلاً من السايتوسين (الشكل 7-4).



الشكل (7-4) آلية عمل سلفونات الايثيل ميثان كمادة مطفرة

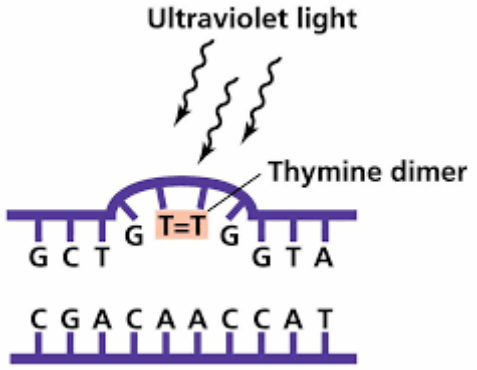
4- صبغات الأكردين Acridine dyes: ان الأكردين البرتقالي والبروفلافين Proflavin لهما تركيب ثلاثي الحلقات بحيث تكون أبعاد هذه التراكيب مشابهة جداً لأبعاد زوج القواعد البيورين-البايريمدين (الشكل 7-5). ومن خلال عملية تدعى الإقحام Intercalation يمكن أن تدخل هذه المركبات ضمن الحلزون المزدوج لـ DNA مما يسبب طفرة من نوع frameshift mutations أو طفرة حذف أو طفرة حشر.



الشكل (7-5) تركيب Proflavin

3- المطفرات الفيزيائية Physical mutagens :

هناك العديد من المطفرات ضمن هذه المجموعة لكن أشهرها هي الأشعة فوق البنفسجية UV (عند الطول الموجي 260 نانومتر) وبالرغم من كونها ضعيفة نسبياً لكنها يمكن أن تسبب أذى DNA التي غالباً ما تكون على شكل Thymine dimer (الشكل 7-6) كما يمكن حدوث Cytosine dimer و Thymine-cytosine dimer و dimer تعني ازدواج اثنين من القواعد النتروجينية المتجاورة من نفس الخيط من DNA وليس بين الخيطين. ويسبب ذلك التواء في خيط DNA موقفاً عملية تضاعف DNA أو عملية الاستنساخ.

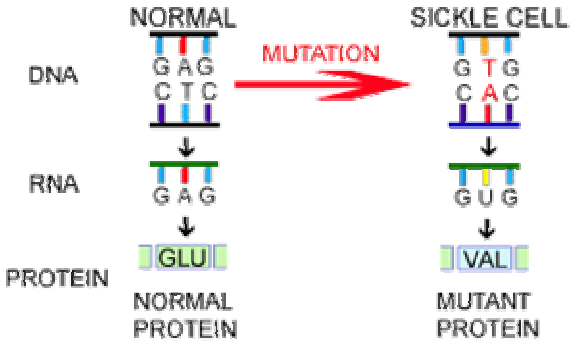


الشكل (7-6) كيفية تكون Thymine dimer

وتكون أشعة كاما Gamma ray وأشعة أكس X-ray أكثر خطورة من الأشعة فوق البنفسجية لكون مستوى الطاقة فيهما أكثر لذلك فإن لها قدرة اختراق أعلى، تسمى هذه الأشعة عادة بالأشعة المؤينة لكونها تنتج جذور حرة بين الجزيئات وخاصة جزيئات الماء والتي تحيط بـ DNA، والجذور الحرة هي مركبات نشطة جداً لاحتوائها على الكترونات غير مزدوجة Unpaired electrons.

وعواقب الطفرات ليست مضرة للخلية والكائن دائماً، بالرغم من أنها تؤدي إلى حالات مرضية ومنها بعض أنواع السرطانات من خلال المواد المسرطنة Carcinogens، كما تسبب أنواع معينة من الطفرات اعتلال الأيض الولادي Inborn errors of metabolism

ويذكر أن هناك الآلاف من الأمراض الوراثية في الإنسان والحيوان تسببها الطفرات. في مقابل ذلك أن الطفرة الضارة نفسها قد تكون مفيدة من أوجه أخرى، وخير مثال على ذلك فقر الدم المنجلي أو فقر دم الخلية المنجلية Sickle-cell anemia ويكون بسبب طفرة نقطية (هي طفرة إبدال Transversion أي تحول GAG إلى GUG) للنيوكليوتيد المشفر للحامض الأميني السادس من سلسلة بيتا هيموكلوبين، في الحالة الطبيعية الحامض الأميني في هذا الموقع هو حامض الكلوتاميك ولكن في هيموكلوبين الخلية المنجلية (HbS) يتم استبدال الحامض الأميني السادس بالحامض الأميني الفالين (الشكل 7-7)،



الشكل (7-7) تكون الطفرة في فقر الدم المنجلي

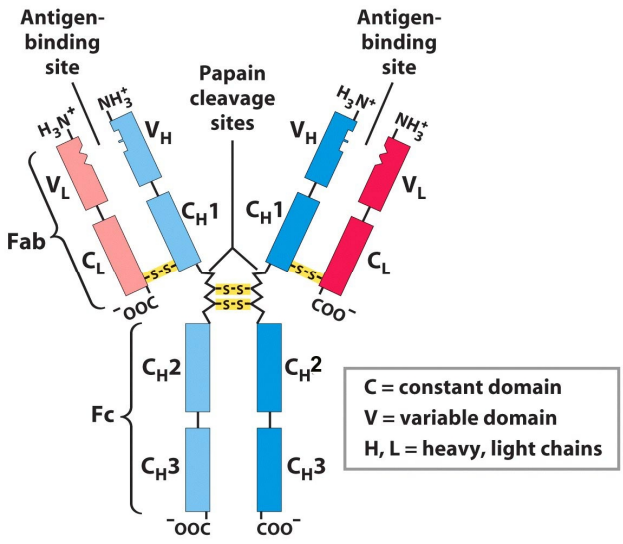
التغيير من الحامض الأميني الحامضي (حامض الكلوتاميك) إلى حامض أميني متعادل (الفالين) يسبب التواء شكلي في البروتين (الهيموكلوبين) مما يعطي شكل طولاني لكرية الدم الحمراء يشبه المنجل ومنها جاءت التسمية، وتنتشر الحالة المرضية في أسيا وأفريقيا، أما الجانب المفيد لهذه الطفرة فقد وجد أن الأشخاص المصابين بفقر الدم المنجلي من نوع Heterozygous (أي يحمل أليل مصاب وأخر سليم) لا تظهر عليهم الأعراض غالباً عكس النوع الثاني Homozygous (يحمل أليلين مصابين) ونادراً ما يبقى الطفل المصاب على قيد الحياة، وجد أن مرضى النوع الأول يكونون مقاومين للإصابة بداء الملاريا (الذي يسببه طفيلي من الأوالي هو Plasmodium falciparum) إذ وجد أن كرية الدم المنجلية ينخفض فيها قيمة pH بنحو 0.4 وحدة كما أن تغيير شكل الكرية وعوامل أخرى تؤدي إلى تغيير

نضوحية الغشاء الخلوي لأيون البوتاسيوم اذ تفقد كرية الدم الحمراء الكثير من البوتاسيوم، بينما في كرية الدم الحمراء السوية يكون تركيز البوتاسيوم أعلى من المحيط، الفقدان المتزايد للبوتاسيوم من قبل كرية الدم الحمراء يؤدي إلى نفاذه عند الطفيلي الذي يعتمد على كريات الدم الحمر في التزود بالعناصر الغذائية ومنها البوتاسيوم فيسبب موت الطفيلي.

هذا فيما يخص الجانب المفيد للطفرات الضارة، وهناك طفرات ضرورية ومفيدة للكائن ومنها التغييرات اللازمة للتأقلم Adaptation والمقاومة Resistance وعمليات حيوية أخرى، ومن الأمثلة الشهيرة على "الطفرات المفيدة" ما يحدث في الجهاز المناعي للفقريات ومنها الإنسان، حيث يكون هذا الجهاز مسئولا عن حماية الجسم والدفاع عنه بأشكال متنوعة جداً من الأجسام المضادة (Immunoglobulins) ضد مجاميع كثيرة من الأجسام الغريبة ومنها الأحياء المجهرية ومنتجاتها من السموم، وتعتمد قابلية المقاومة هذه على الطفرات.

ويمكن إيجاز ذلك بأن اللبائن تملك خلايا مناعية من نوع الخلايا اللمفاوية البائية B lymphocytes (وهي بادئات خلايا بلازما Plasma cells المكونة للأجسام المضادة) هذه الخلايا البائية لها عدد كبير ومنوع من الجينات التي تشفر للبروتينات المكونة للسلسلة المتغايرة من جزيئة الجسم المضاد، السلسلة أو المنطقة المتغايرة تكون مسؤولة عن التعرف على والتعامل مع الأجسام الغريبة (المستضدات Antigens) التي تدخل الجسم (الشكل 7-8)، وبذلك تقوم الأجسام المضادة بمعادلة أو تحطيم هذه الأجسام الغريبة.

وخلال تطور الخلايا البائية تحدث العديد من الطفرات في السلسلة المتغايرة مما ينتج عنه مجاميع متنوعة من الخلايا البائية كل مجموعة أو عدد معين من هذه الخلايا تكون متخصصة لنوع معين من الأجسام الغريبة وهكذا، وعند حدوث إصابة (دخول جسم غريب) يحدث تحفيز لتكاثر الخلايا البائية التي ستكوّن الاجسام المضادة ذات السلسلة المتغايرة المتخصصة لذلك الجسم الغريب.



الشكل (7-8) التركيب العام للجسم المضاد

إصلاح DNA :

هي مجموعة التغييرات والإصلاحات على DNA الذي أصابته طفرة أو تغيير ذاتي خلال فترة حياة الخلية، حيث من الضروري لاستمرارية حياة الخلية وبالتالي الكائن الحي ليس فقط بالمحافظة الدقيقة على المادة الوراثية (DNA) بل بإصلاح ما تعانيه من أخطاء.

والمثير أن من بين ألاف الأخطاء التي تحدث في تسلسلات DNA في خلايا الكائن الحي يومياً بسبب الحرارة، العمليات الأيضية واضطراباتها ونواتجها، السموم الداخلية، الإشعاع، من هذه الأخطاء القليل جداً يبقى ويثبت في تركيب DNA على شكل طفرات، ويعتقد العلماء اليوم أن من بين كل ألف خطأ في تسلسلات DNA واحدة فقط تؤدي إلى الطفرة الدائمية، أما الباقي فيتم إصلاحها بعملية إصلاح DNA.

ونظراً لأهمية إصلاح DNA فإن جزء معتبر من جينوم الكائن (وخاصة البكتريا والخمائر التي كانت الأكثر دراسة في هذا المجال) يكون متخصص للتشفير للبروتينات (الإنزيمات) المتخصصة لإجراء عملية إصلاح DNA. وأهمية إصلاح DNA تبرز من زيادة عدد الطفرات وبالتالي الأمراض عند فقدان فعالية الجينات المسؤولة عن الإصلاح. والجدول

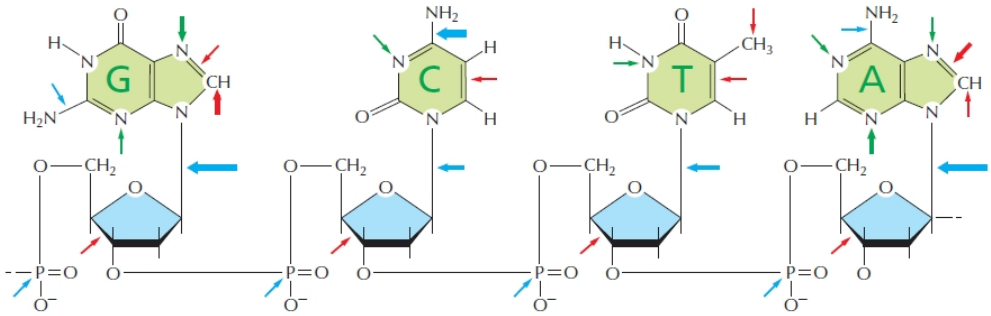
التالي (7-3) يوضح بعض الحالات المرضية في الإنسان التي تنتج بفعل وجود خلل في إنزيمات أو عملية الإصلاح.

الجدول (7-3) بعض الأمثلة للحالات المرضية في الإنسان والناتجة من وجود خلل في عملية إصلاح DNA

الحالة	المظهر	نوع الخلل في الإصلاح
MSH2,3,6, MLH1,MPS2	سرطان القولون	إصلاح سوء التطابق
Xeroderma pigmentosum (X P) groups A-G	سرطان الجلد، حساسية الأشعة فوق البنفسجية، اضطرابات عصبية	إصلاح استئصال النيوكليوتيدات
Ataxia telangiectasia (AT)	اللوكيميا، اللمفوما، اضطرابات الجينوم	بروتين ATM، البروتين كاينيز الذي يحفز بانكسارات الحازون المزدوج
BRCA2	سرطان الثدي والمبيض والبروستات	الإصلاح في إعادة الخلط المتطابق
Werner syndrome	الشيخوخة المبكرة، سرطانات منتشرة، اضطرابات الجينوم	إنزيمات Exonuclease و Helicases
BR 46	فرط الحساسية للمواد المضرة بـ DNA، اضطرابات الجينوم	إنزيم الربط DNA ligase

بالرغم من أن DNA مادة لها ثبوتية عالية جداً، كي تحافظ على المعلومات الوراثية بدقة عالية، لكنها مادة شديدة التعقيد ومعرضة لتغيرات ذاتية حتى عند الظروف الطبيعية مما يسبب حدوث طفرات في حال غياب آلية الاصلاح (الشكل 7-9). في DNA خلايا الإنسان تفقد كل خلية حوالي 5000 من القواعد البيورينية (A و G) يومياً، هذه العملية التلقائية الحدوث تدعى بإزالة البيورين Depurination، وبشكل مشابه تحدث إزالة أمين

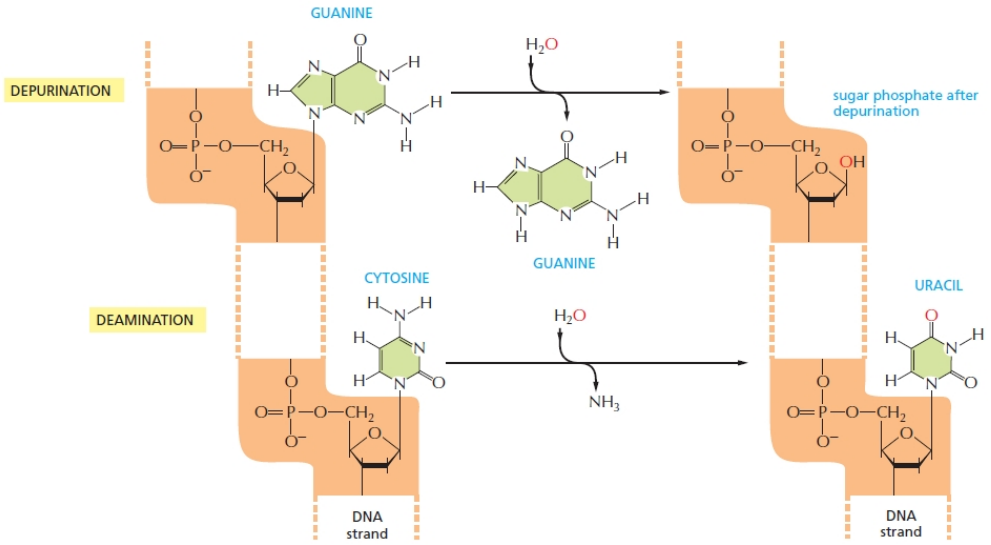
Deamination للسايتوسين C متحولاً إلى يوراسيل U ضمن DNA (الشكل 7-10)، ويحدث هذا التغيير بمعدل 100 زوج من القواعد يومياً.



الشكل (7-9) التغييرات الذاتية التي يمكن أن تحدث في DNA وتحتاج إلى إصلاح.

وتشير الأسهم الحمراء إلى الأذى التأكسدي الذاتي، والأسهم الزرقاء تشير إلى هجوم تحليل مائي، والأسهم الخضراء تمثل مواقع المثيلة غير المسيطر عليها، كما أن حجم السهم مثل نسبة تكرار حدوث الحالة (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

كما تحدث تغيرات كيميائية في تركيب DNA عند تعرضها لمواد أيضية فعالة تنتج داخل الخلية مثل الأصناف الفعالة للأوكسجين، وكذلك عند التعرض للمواد الكيميائية الخارجية، وبطريقة مشابهة فإن التعرض للأشعة فوق البنفسجية UV (خصوصاً الصادرة من الشمس) تؤدي إلى تغيير في التركيب الكيميائي لـ DNA مثل Thymine dimer، وإذا لم يتم إصلاح هذا الخلل فسيتم التغلب عليه إما بحذفه أو استبداله (لكونه تركيب شاذ ضمن DNA) خلال تضاعف DNA، مما ينتج عنه طفرة الحذف أو طفرة الاستبدال على التوالي، في الخيط البنوي الجديد.



الشكل (10-7) ازالة البيورين وازالة الأمين (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

وتبقى هذه الطفرة وتتناقلها الخلايا البنوية بالتعاقب، وتجمع هذه الطفرات يسبب أمراض للكائن قد تكون مميتة.

طبيعة التركيب الكيميائي لـ DNA يسهل من عملية إصلاح الظفيرة المزدوجة، لأن كل خيط من الظفيرة المزدوجة تحمل المعلومات الوراثية "السليمة" والتي تستعمل كمعتمد (قالب) لاستعادة التسلسلات الصحيحة للخيط الآخر الذي حدث فيه الخطأ.

هناك عدة آليات ومسارات لإصلاح الأذى والخلل في DNA باستعمال أنواع مختلفة من الإنزيمات تعمل على أشكال مختلفة من الخطأ. وأحد أشكال الإصلاح هو إصلاح إزالة القواعد Base excision repair والذي تقوم به مجموعة إنزيمات تدعى DNA glycosylases وهناك على الأقل 6 أنواع من هذا الإنزيم، كل إنزيم من هذه الإنزيمات بإمكانه التعرف على نوع من القواعد قد حدث فيه تغيير ويحفز على إزالته. ومن هذه القواعد التي يمكن للإنزيم التعرف عليها :

1- الأدنين A والسايتوسين C مزالة الأمين.

2- القواعد المؤكسدة أو المؤلكلة Alkylated.

3- القواعد مفتوحة الحلقة.

4- التي تحولت فيها الآصرة المزدوجة بين ذرتي كاربون (C=C) إلى أصرة منفردة (C-C).

أما كيف تتعرف هذه الإنزيمات على القواعد المتغيرة فيعتقد العلماء أن الإنزيم يقوم بتقليب وتفحص القواعد المتغيرة ضمن الحلزون المزدوج، وهذا يسمح للإنزيم بفحص كل "أوجه" النيوكليوتيدات وهكذا يسير على طول DNA متفحصاً النيوكليوتيدات، وعندما يجد الإنزيم القاعدة المتأذية يتعرف عليها ويزيل القاعدة من سكره الخماسي.

إزالة القواعد بفعل إنزيم Glycosylase ينتج عنه ما يشبه الأسنان المفقودة ^^^^^ هذا الشكل التركيبي يتعرف عليه إنزيم يدعى AP endonuclease (AP تعني اللابيورين Apurinic أو اللابايريمدين Apyrimidinic). أما إنزيمات Endonucleases فهي مجموعة الإنزيمات التي تقوم بتقطيع الحامض النووي من الداخل حيث يعمل AP endonuclease على تقطيع الآصرة الفوسفاتية ثنائية الأستر، بعدها يتم إزالة الخلل ومن ثم يتم ملئ الفجوة المتولدة جراء العملية.

الآلية الثانية للإصلاح تدعى الإصلاح بفقدان النيوكليوتيد Nucleotide excision repair، وهذه الآلية تعمل عند وجود خلل كبير ضمن DNA مثل وجود الالتفافات، وأيضاً ارتباط هايدروكاربونات كبيرة الحجم مع DNA مثل Benzopyrene المسرطن، وكذلك Pyrimidine dimer (مثل T-T و T-C و C-C) التي تحدث بفعل أشعة UV عادةً، في هذه الحالة مجموعة كبيرة من معقد متعدد الإنزيم Multienzyme complex يقوم بفحص الحلزون المزدوج لإيجاد الالتفافات والأشكال الغريبة، أي وجود تغييرات كبيرة الحجم وليس تغيير في قاعدة نايتروجينية كما في الآلية السابقة، وعندما توجد مثل هذه العيوب يقوم معقد متعدد الإنزيم بقطع DNA على جانبي منطقة الخلل من خلال تكسير الآصرة الفوسفاتية ثنائية الأستر، ويقوم إنزيم DNA helicase بإزالة الجزء المتضرر منه ويأخذه بعيداً، الفجوة الكبيرة الناتجة يتم ملؤها من قبل إنزيم البلمرة DNAP وإنزيم الربط DNA ligase.

كل أجزاء الجينوم يمكن أن يتم فيها الإصلاح عند حدوث خلل في DNA، ولكن كيف يتم توجيه إنزيمات الإصلاح إلى موقع الخلل ؟ يعتقد أن إنزيم بلمرة RNA (RNA

polymerase) الذي يستخدم في الاستنساخ يعمل على توجيه آليات الإصلاح إلى موقع الخلل ضمن DNA، حيث يرتبط RNA polymerase مع موقع الخلل من خلال بروتينات متخصصة ثم يقوم بجذب إنزيمات الإصلاح إلى الموقع، وتدعى هذه الآلية بآلية الإصلاح المقترنة مع الاستنساخ Transcription-coupled repair، إن هذه الآلية وبالتعاون مع الآليات الأخرى المذكورة سابقاً توجه عمليات الإصلاح لمعالجة الأجزاء المهمة من DNA على وجه السرعة وخاصة تلك التي تشفر عند حدوث خلل، أي الأجزاء التي تشفر لإنزيمات الإصلاح.

تعد آلية الإصلاح المقترنة بالاستنساخ ضرورية وخاصة في اللبائن المتقدمة مثل الإنسان، حيث أن جزء ضئيل جداً (حوالي 1٪ فقط) من الجينوم يكون مشفر، وبذلك تتركز آلية الإصلاح في هذا الجزء فقط. ومن الجدير بالذكر عند الحديث عن أنواع الإصلاح أن هناك أنواع مختلفة من إنزيم البلمرة DNAP (حوالي عشرة أنواع) بعض هذه الأنواع لا تعمل بنفس دقة الأنواع الأخرى، هذه الأنواع الأقل دقة تستعملها الخلية عندما تواجه وجود خلل معقد في تركيب DNA ويسبب ذلك حالة طارئة بالنسبة للوقت (خاصة خلال دورة الخلية) فتلجأ الخلية إلى استعمال البلمرة DNAP المتخصصة الأقل دقة لضمان عبور الخلية هذه المرحلة الحرجة.

انقطاع الحلزون المزدوج dsDNA break :

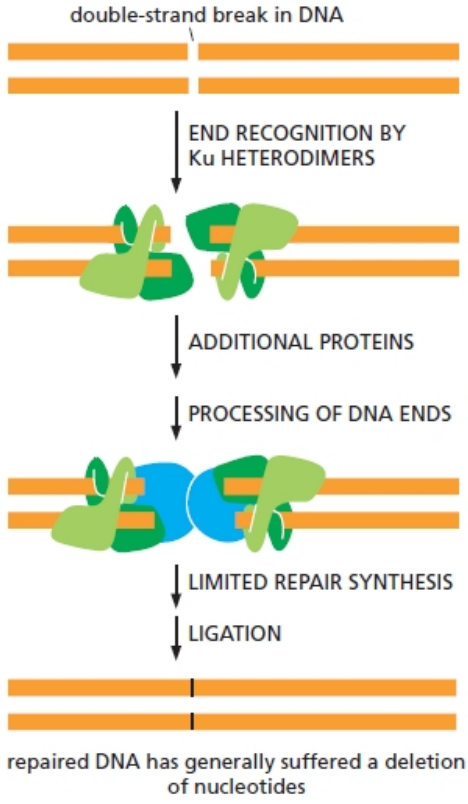
حدوث قطع ضمن الحلزون المزدوج لـ DNA يعد من أخطر أنواع الطفرات والعيوب التي تصيب DNA حيث من الصعب علاج هذا النوع من الأخطاء كما أنها لو تركت فإنها تؤدي إلى تجزئة الكروموسوم إلى قطع صغيرة وبالتالي فقدان جينات في الخلايا البنوية القادمة، وقد يكون هذا النوع من الأخطاء سبباً مباشراً أو غير مباشر في موت الخلية، ومن أهم العوامل المسببة لانقطاع الحلزون المزدوج لـ DNA:

1- الإشعاع المؤين.
2- أخطاء التضاعف.
3- المواد المؤكسدة.
4- المؤيضات الخلوية السامة.

وهناك آليتان لاصلاح تكسر الحلزون المزدوج لـ DNA :

1- ربط النهايات غير المتماثلة Non-homologous end-joining:

حيث يتم ربط النهايات المقطوعة مع بعضها من خلال إنزيم الربط DNA ligase مع فقدان واحد أو أكثر من النيوكليوتيدات في موقع الربط (الشكل 7-11). إن هذه الآلية التي يبدو أنها تأخذ أولوية ربط الحلزون المزدوج في مكان القطع على الدقة لذلك تدعى هذه الآلية "بالسريعة والغبية Quick and dirty"، وتكون شائعة في الخلايا الجسمية للبائن، وبالرغم من حدوث طفرة (فقدان نيوكليوتيد أو أكثر) في موقع الربط إلا أن ذلك لا يكون ذو أهمية كبيرة لأن جينوم اللبائن معظم أجزاءه غير مشفرة، لذلك تعد هذه الآلية (التي لا تخلو من أضرار) مقبولة على مشكلة كبيرة هي بقاء قطع في الحلزون المزدوج.

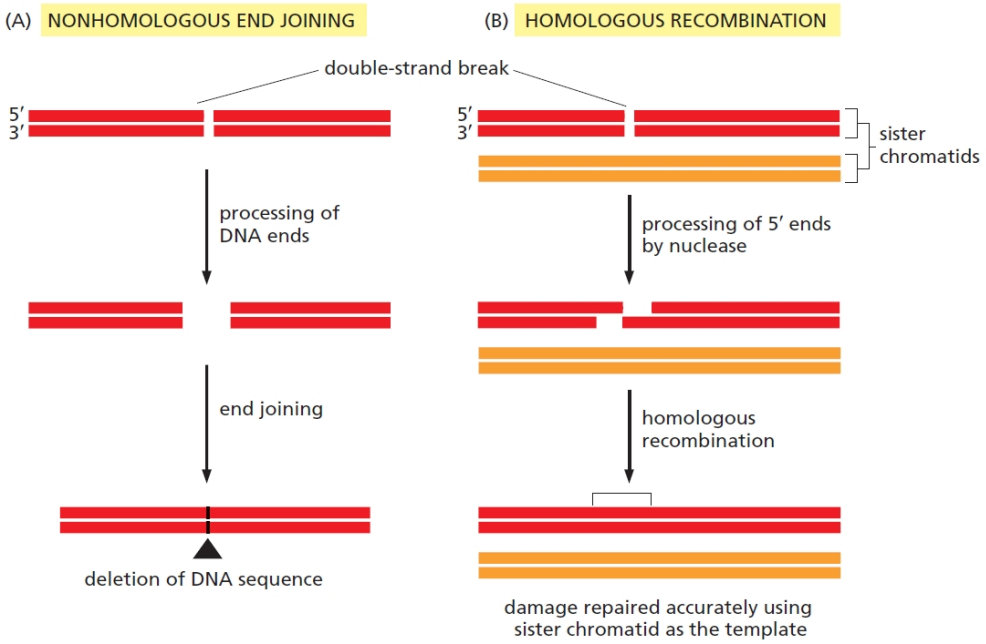


الشكل (7-11) ربط النهايات غير المتماثلة (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

وبتقدم عمر الكائن الحي (مثل الإنسان) فإن هذه الأخطاء (الندب DNA scars) تتجمع وربما تكون أحد أسباب الشيخوخة للخلية وللكائن وهذه أحد نظريات آلية حدوث الشيخوخة حيث يملك الإنسان بعمر 70 سنة حوالي 2000 من هذه الندب في جينومه تكون قد تراكمت خلال سنوات عمره.

2- ربط النهايات المتطابقة Homologous end-joining:

ويعد هذا النوع أكثر دقة من سابقه لإصلاح الحلزون المزدوج المقطوع، حيث تكون نهايات DNA متطابقة (عادةً بعد التضاعف مباشرةً) ويتم الإصلاح اعتماداً على الحلزون المزدوج الآخر لـ DNA (الكروماتيد الشقيق) الذي يستعمل كقالب للإصلاح (الشكل 7-12). وهذا النوع من الإصلاح يحدث فقط بعد تضاعف DNA لكونه يعتمد على وجود الكروماتيد الشقيق كقالب.



الشكل (7-12) طريقتين مختلفتين لاصلاح تكسر الحلزون المزدوج (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

فضلاً عن ما ذكر سابقاً فإن آلية الإصلاح من نوع ربط النهايات المتطابقة والتي تدعى أحياناً أعاد الخلط المتطابق Homologous recombination يمكن أن تؤدي إلى إعادة ترتيب تسلسلات DNA، إعادة الترتيب هذه يمكن أن تغير من طبيعة جين معين ضمن الجينوم وكذلك كيفية ووقت تعبير هذا الجين، ويدخل هذا التغيير ضمن التأقلم والتطور استجابة لما يحيط بالخلية والكائن الحي.

إعادة الخلط المتطابق تعرف أيضا بإعادة الخلط العام General recombination ولها العديد من الوظائف يمكن إجمالها في :

1- إعادة ازدواج صحيحة للحلزون المزدوج الذي يعاني من القطع.
2- تبادل بعض المعلومات الوراثية بين كروموسومين مختلفين لإنشاء تسلسلات جديدة في كل كروموسوم، وهذه العملية أساسية في الخلط الجيني Gene mixing والذي عادةً ينتج عنه جينات مرتبطة "جديدة ومفيدة".
3- في الفقريات والنباتات واللبائن خلال عملية الانقسام الخلوي الاختزالي Meiosis، تضمن عملية إعادة الخلط المتطابق الانفصال الكروموسومي الدقيق.

وجود ضرر في DNA يؤخر دورة الخلية :

فضلاً عن وجود مجاميع كبيرة ومعقدة من إنزيمات الإصلاح في خلايا اللبائن، ولكون العملية مهمة جداً لحياة الكائن، لذلك هناك آليات وعوامل أخرى تعمل على زيادة كفاءة عملية الإصلاح ومن هذه الآليات هو تأخير مرحلة من مراحل دورة الخلية لحين ضمان إكمال عملية الإصلاح، إذ أن تقدم دورة الخلية يكون معتمداً على نقاط تفتيش Checkpoints والتي تضمن إكمال متطلبات المرحلة المعينة كي تسمح للخلية بالتقدم إلى المرحلة التالية، وفي كل مرحلة يمكن أن تتوقف دورة الخلية إذا وجدت نقاط التفتيش خلل أو طفرة في DNA وبذلك يمكن أن يمنع تقدم الخلية من مرحلة G1 إلى مرحلة S، كما يمكنها إبطاء تقدم مرحلة S إذا بدأت، وكذلك منع تقدم الخلية من مرحلة S إلى مرحلة M، هذه التأخيرات تعطي فرصة ووقت لـ DNA كي تقوم بإصلاح نفسها قبل إكمال دورة الخلية، كما أن وجود طفرة أو خلل في DNA يحفز إشارات تنشط تصنيع بعض إنزيمات الإصلاح، وسيتم الحديث بالتفصيل عن الطفرة في DNA ودورة الخلية في فصل دورة الخلية.

أهم المراجع :

Benjamin A. Pierce. **Genetics: A Conceptual Approach.** 5th ed. (2013). W. H. Freeman.

Edward S. Tobias, Michael Connor, Malcolm Ferguson-Smith. **Essential Medical Genetics.** 6th ed. (2011). Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication

Eyre-Walker, Adam; Keightley, Peter D. (2007).**"The distribution of fitness effects of new mutations"**. *Nature Rev. Gen.* **8** (8): 610–618.

Goh, Amanda M.; Coffill, Cynthia R; Lane, David P. (2011). **"The role of mutant p53 in human cancer".** *J Path.* **223** (2): 116–126.

Hoeijmakers JH (2009). **"DNA damage, aging, and cancer"**. *N. Engl. J. Med.* 361 (15): 1475–85.

Lieber, Michael R. (2010). **"The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway"**. *Ann Rev Biochem*. **79**: 181–211.

O'Driscoll M, Jeggo PA (2006). **"The role of double-strand break repair – insights from human genetics".** *Nature Rev. Gen.* 7 (1): 45–54.

Richard M. Twyman. **Advanced Molecular Biology.** (1998). BIOS Scientific Publishers Limited.

Rodgers K, McVey M (2016). **"Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks"**. *J. Cell. Physiol*. **231** (1): 15–24.

Ronald W. Dudek. **High-Yield Cell and Molecular Biology.** (1999). Lippincott Williams and Wilkins.

Stuart, Gregory R.; Oda, Yoshimitsu; de Boer, Johan G.; Glickman, Barry W. (2000). **"Mutation Frequency and Specificity With Age in Liver, Bladder and Brain of *lacI* Transgenic Mice".** *Genetics*.**154** (3): 1291–1300.

Valerie K, Povirk LF (2003). **"Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair"**. *Oncogene.* 22 (37): 5792–812.

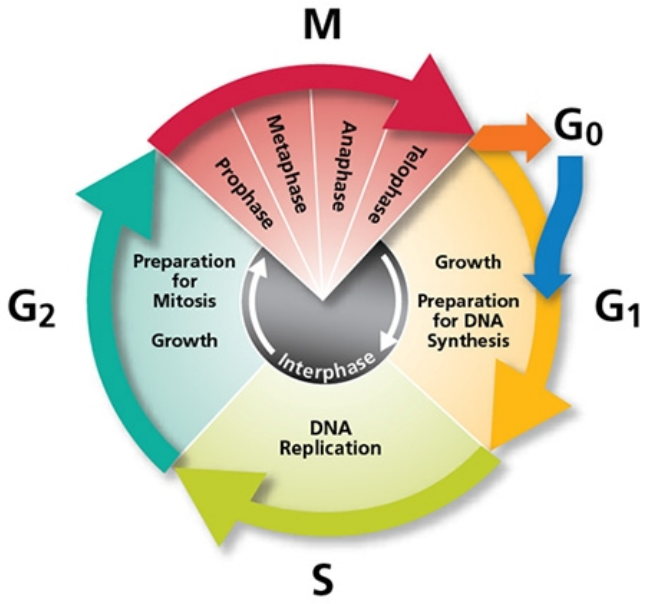
Wang JC (2002). **"Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective"**. *Nature Rev Mol Cell Bio.* 3 (6): 430–40.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R **Molecular Biology of the Gene.** 7th ed. (2013). Benjamin Cummings. CSHL Press.

الفصل الثامن

دورة الخليـة

Cell Cycle



الفصل الثامن

دورة الخليـة
Cell Cycle

جميع الكائنات الحية من البكتريا إلى اللبائن تستمر في الحياة من خلال عملية نمو وانقسام الخلايا، وعرف ذلك منذ أكثر من 150 عام، أما توقف النمو و/ أو الانقسام فهو يعني نهاية حياة الكائن.

وتتكاثر الخلايا بسلسلة من الأحداث والمراحل من خلال مضاعفة (استنساخ) جميع مكوناتها وصولاً إلى انقسامها إلى خليتين، ودورة الخلية Cell cycle تعني دورة التضاعف والانقسام الخلوي. إن دورة الخلية في الكائنات وحيدة الخلايا مثل البكتريا وبعض الخمائر تؤدي إلى إنتاج كائن مستقل جديد، أما في الكائنات متعددة الخلايا والأكثر تعقيداً وصولاً إلى اللبائن فإن عملية إنتاج كائن مستقل تعتمد على كم هائل ومتناسق من دورات الخلايا، والفرق الجوهري الآخر أن الكائنات متعددة الخلايا تحتاج الانقسام الخلوي طيلة فترة حياتها لتعويض الخلايا التي تموت طبيعياً ، لذلك فإن أجسامنا تصنع ملايين الخلايا كل ثانية من الزمن عن طريق دورة الخلية.

تختلف تفاصيل دورة الخلية بين أنواع الكائنات الحية وحتى ضمن نفس الكائن الحي (مثل اللبائن) اعتماداً على نوع الخلايا والمرحلة العمرية للكائن. والنقطة الأهم خلال دورة الخلية هي أن تتم مضاعفة المادة الوراثية بشكل دقيق لتكوين نسختين متطابقتين من الكروموسومات ثم فصلهما عن بعض كي تحصل كل خلية بنوية جديدة على نسخة مطابقة من المادة الوراثية (DNA).

في الخلايا حقيقية النواة هناك شبكة معقدة من البروتينات التنظيمية تدعى نظام السيطرة على دورة الخلية، تسيطر على تنظيم وتقدم دورة الخلية شكل دقيق. وجوهر نظام السيطرة هذا يتمثل في أحداث كيميائية حياتية تكون مسؤولة عن التغييرات في الخلية خلال دورة الخلية، فضلاً عن ذلك هناك آيات أخرى تزيد من دقة وتعقيد دورة الخلية من خلال استجابتها للإشارات الخلوية الداخلية والخارجية.

داخل الخلية يعمل نظام السيطرة على ضمان تقدم دورة الخلية ويؤخر باقي أحداث الانقسام الخلوي في عملية تنظيمية متناسقة تسيطر على توقيت الأحداث، فمثلاً لا تسمح بالتحضير لعملية انعزال الكروموسومات Segregation عن بعضها لحين ضمان إكمال تضاعف DNA. أما الإشارات الخارج خلوية فإنها تحفز الانقسام الخلوي عند وجود حاجة لهذا الانقسام (أي الحاجة لزيادة عدد الخلايا)، وتعمل على إيقاف عملية الانقسام أو تؤخرها عند انتفاء الحاجة لزيادة عدد الخلايا.

لذلك فإن نظام السيطرة على دورة الخلية ينظم عدد الخلايا ضمن أنسجة الجسم، وعندما يعاني هذا النظام من الخلل تحدث زيادة في الانقسامات الخلوية مما يمكن أن يكون بداية للسرطانات.

فضلاً عن تضاعف المادة الوراثية عند الانقسام الخلوي، فإن الخلية تتضاعف فيها العضيات والجزيئات الكبيرة كي تحصل كل خلية بنوية على جميع العضيات والجزيئات الكبيرة، لكن هذه الخلايا البنوية تحتاج إلى نمو كي تصل إلى الحجم الطبيعي، لأنها عند الانقسام الخلوي تكون أصغر حجماً من الخلية الأم (تقريباً نصف حجم الخلية الأم التي انقسمت إلى خليتين).

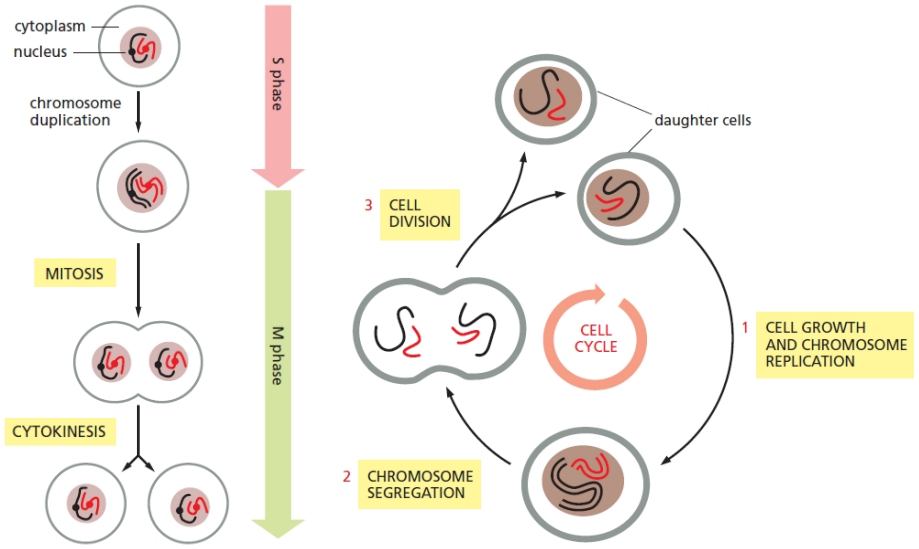
المراحل الأربعة لدورة الخلايا حقيقية النواة :

أكثر المراحل أهمية وتعقيداً في دورة الخلية هي مرحلة مضاعفة DNA بدقة وتوزيعها إلى الخليتين البنويتين من خلال تضاعف ثم عزل الكروموسومات. تضاعف الكروموسومات يحدث في طور يدعى الطور S وهي مأخوذة من تصنيع DNA (DNA synthesis)، وفي خلايا اللبائن يستغرق هذا الطور حوالي 12 ساعة، وهي تقريباً نصف المدة الزمنية اللازمة لدورة الخلية في اللبائن.

يعقب الطور S الطور M وهي مأخوذة من الانقسام الخيطي (Mitosis) حيث يحدث انعزال الكروموسومات والانقسام الخلوي، ويستغرق هذا الطور أقل من ساعة في خلايا اللبائن، ويتميز الطور M بحدثين رئيسيين هما :

1- الانقسام الخيطي Mitosis حيث تتوزع الكروموسومات المتضاعفة إلى النواتين البنويتين.

2- الانقسام السايتوبلازمي Cytokinesis حيث تنقسم الخلية بأكملها إلى خليتين بنويتين (الشكل 8-1).

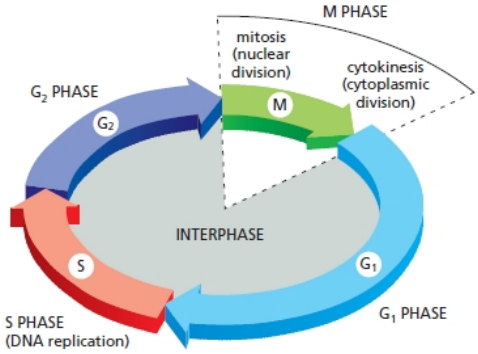


الشكل (8-1) دورة الخلية (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

وفي نهاية الطور S فإن DNA في كل زوج من الكروموسومات التي قد تضاعفت تكون متداخلة ومترابطة مع بعضها من خلال بروتين متخصص، وفي بداية الانقسام الخيطي وفي مرحلة الطور الابتدائي Prophase تبدأ زوج الكروموسومات بالابتعاد عن بعضها تدريجياً وتتكثف مكونةً زوج من التراكيب الصلدة الكثيفة التي تشبه القضبان والتي تدعى هنا بالكروماتيدين الشقيقين Sister chromatids والتي تبقى متصلة مع بعضها من خلال لاصق الكروماتيدين الشقيقين Sister-chromatid cohesion، وفي الأطوار المتقدمة من الانقسام الخيطي عندما يبدأ الغلاف النووي بالتحلل، فإن أزواج الكروماتيدات الشقيقة تصبح مرتبطة مع خيوط مغزل الانقسام الخيطي Mitotic spindle وهي عبارة عن نبيبات دقيقة عملاقة (أنظر الفصل 3).

كل كروماتيد من الكروماتيدين الشقيقين يرتبط مع طرف من خيوط المغزل بينما يرتبط الكروماتيد الآخر مع الخيط المقابل، وعند الوصول إلى مرحلة الطور الوسيط Metaphase من دورة الخلية تكون كل الكروماتيدات الشقيقة مرتبطة مع خيوط مغزل الانقسام الخيطي، وفي طور Anaphase يحدث تحطم لاصق الكروماتيدين الشقيقين مؤدياً إلى انفصال الكروماتيدين الشقيقين عن بعضهما وانسحاب كل واحدة منهما إلى طرف أو قطب من الخلية، بعدها يبدأ تحلل خيوط المغزل ثم يبدأ رزم الكروموسومات المنعزلة داخل النوية ويحدث ذلك في طور Anaphase، يتبع ذلك عملية انقسام سايتوبلازمي Cytokinesis لينتج خليتين حصلت كل واحدة منهما على نوية تحوي العدد الكامل من الكروموسومات.

ويذكر أن معظم الخلايا تحتاج إلى وقت أطول من وقت تضاعف المادة الوراثية (الكروموسومات) وذلك لمضاعفة عضيات وبروتينات الخلية، عليه تحتاج الخلية إلى فترات تسمى أطوار الفجوة Gap phases وهناك أثنين من هذه الأطوار، الأولى هي G1 phase وتقع بين الطور M والطور S بينما الثانية G2 phase فتقع بين الطور S والانقسام الخيطي، لذلك فإن دورة الخلية حقيقية النواة تقسم إلى أربع مراحل متتالية هي G1 وS وG2 وM والمراحل الثلاث الأولى تسمى أحياناً بالطور البيني Interphase (الشكل 8-2).



الشكل (2-8) الأطوار الأربعة لدورة الخلية

معظم خلايا اللبائن في الوسط الزرعي يستغرق الطور البيني حوالي 23 ساعة من أصل 24 ساعة التي تستغرقها دورة الخلية، بينما يستغرق الطور M عادة ساعة واحدة، ويذكر أن النمو الخلوي يحدث في جميع مراحل دورة الخلية عدا مرحلة الانقسام الخلوي. كما أن طوري الفجوة G1 و G2 ليستا فقط وقت مرور الخلية من مرحلة إلى أخرى، بل يمثلان فترة حرجة وخطيرة توفر للخلية الوقت اللازم لرصد ومراقبة البيئة الداخلية والخارجية للخلية لضمان أن الظروف ملائمة وأن التحضيرات مكتملة للمضي قدماً في دورة الخلية والانقسام الخلوي. ويعد الطور G1 أكثر أهمية من الطور G2، وتختلف طول فترة هذا الطور اعتماداً على الظروف المحيطة والإشارات الخلوية من الخلايا الأخرى، وإذا كانت الظروف غير ملائمة أو الإشارات الخلوية غير مشجعة فإن الخلية تؤخر هذا الطور بل ربما تدخل في حالة السكون و "الراحة" والذي يعرف بالطور Go (G zero)ويمكن أن تبقى الخلية في حالة السكون أيام أو أسابيع أو ربما سنين قبل أن تعود مجدداً لإكمال دورة الخلية والانقسام الخلوي، وتبقى أنواع معينة من الخلايا في فترة السكون حتى انتهاء فترة حياتها أو موت الكائن الحي مثل الخلايا العضلية الهيكلية والخلايا العصبية.

أما عندما تكون الظروف المحيطة ملائمة والإشارات الخلوية مشجعة للنمو والانقسام، فإن الخلية في طور G1 أو Go تتقدم وتعبر نقطة التفويض والتي تكون قريبة من نهاية G1 وتسمى هذه النقطة في خلايا الخمائر بنقطة البدء Start point أما في خلايا اللبائن

فتدعى بنقطة التحديد Restriction point، حيث بعد أن تعبر الخلية هذه النقطة فإن الخلية تكون مجبرة على تضاعف DNA حتى لو تم إزالة الإشارات الخارجية المحفزة لنمو وانقسام الخلية، لذلك تسمى أحياناً بمرحلة اللاعودة عن الانقسام الخلوي.

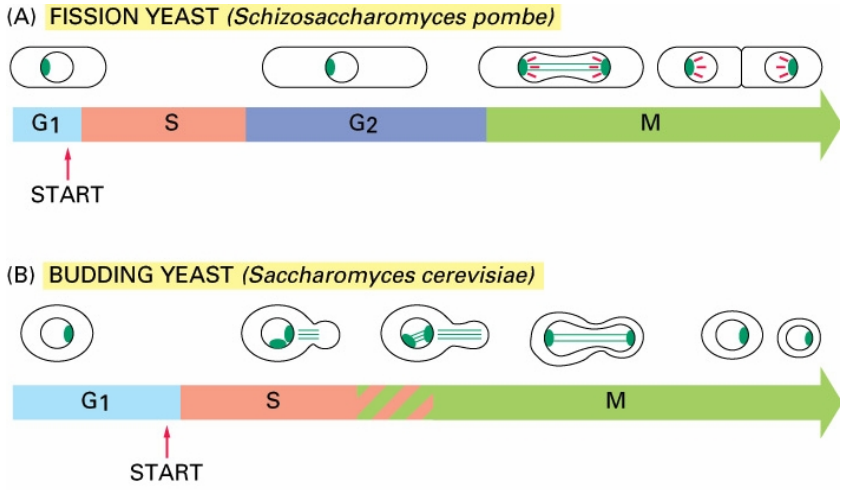
بعض تفاصيل دورة الخلية ومنها الوقت اللازم لكل طور أو مرحلة تختلف من خلية إلى أخرى حتى ضمن نفس الكائن الحي، ولكن عموماً فهي متشابهة في معظم الخلايا حقيقية النواة، ويبدو أن جميع الكائنات حقيقية النواة تستعمل آليات وسيطرات متشابهة لتنظيم أحداث دورة الخلية. والبروتينات المنظمة لدورة الخلية تكون محافظة بدرجة كبيرة بين الكائنات الحية من الخمائر إلى الإنسان، لذلك يمكن دراسة دورة الخلية والسيطرة عليها في كائنات حقيقية النواة مختلفة واستعمال النتائج لرسم صورة موحدة حول تفاصيل وآليات دورة الخلية في الكائنات حقيقية النواة، وعادة في بحوث دورة الخلية تستعمل الخمائر أو أجنة الحيوانات أو خلايا اللبائن في الأوساط الزرعية. ومعظم آليات السيطرة على دورة الخلية تم التعرف عليها من خلال استحداث الطفرات المتخصصة في الخمائر.

والخمائر Yeast هي فطريات دقيقة حقيقية النواة أحادية الخلية لها نظام سيطرة على دورة الخلية يشبه ما موجود عند اللبائن (والانسان)، وأستعمل الباحثون نوعين من الخمائر في دراسة دورة الخلية :

1- الخمائر الانشطارية Fission yeast مثل Schizosaccharomyces pombe وهي خلايا عصوية تنمو باستطالة نهاياتها، ويحدث الانقسام عندما يتكون الحاجز أو الصفيحة الخلوية الذي يتكون في منتصف الشكل العصوي.

2- الخمائر المتبرعمة Budding yeast مثل Saccharomyces cerevisiae ولها شكل بيضوي وتنقسم عن طريق تكون البرعم Bud الذي يظهر في الطور G1 وينفصل في النمو حتى ينفصل عن الخلية الأم (الشكل 8-3).

وبالرغم من وجود الاختلافات فيما بينهما إلا أن نوعي الخمائر يمتلكان صفات مشتركة تعد مفيدة جداً في دراسة دورة الخلية وخاصة من الناحية الجينية، حيث تتكاثر هذه الخمائر بسرعة تكاثر البكتريا وهي تملك جينوم حجمه حوالي 1٪ من حجم جينوم اللبائن.



الشكل (3-8) دورة الخلية في نوعين من الخمائر
(مأخوذ من Alberts et al., 2015).

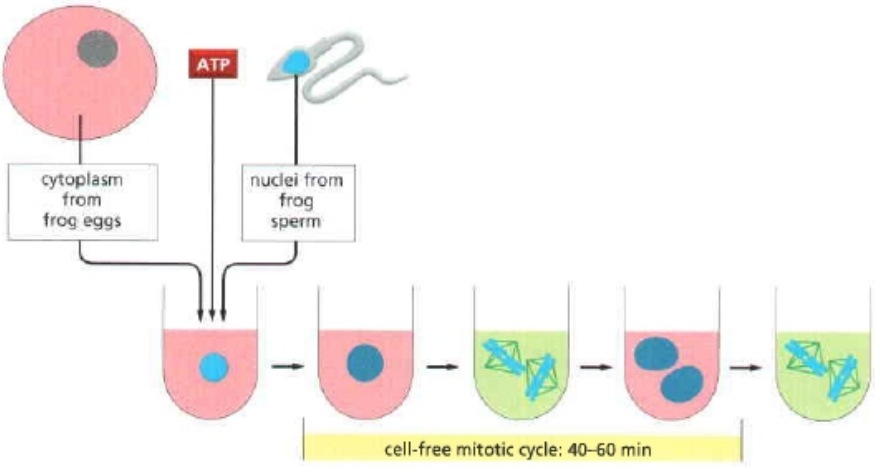
وبذلك يمكن التعامل مع جيناتها من حذف أو إضافة أو استبدال ودراسة تأثير ذلك على دورة الخلية، أما الميزة المفيدة الأخرى أن هذه الكائنات لها قدرة للتكاثر بشكل خلايا أحادية العدد Haploid (أي وجود نسخة واحدة من كل جين في كل خلية) وذلك يسهل عملية عزل ودراسة الجين المطلوب وتجنب التعقيدات الناتجة من وجود نسخة ثانية من كل جين (في خلايا ثنائية العدد Diploid)، وان أهم الاكتشافات التي تخص دورة الخلية نتجت من دراسة الطفرات في الخمائر حيث تم إزالة فعالية جين أو جينات معينة تكون مسؤولة عن مكون أو مكونات متخصصة في السيطرة على دورة الخلية، الجينات التي تتأثر بهذه الطفرات تعرف بجينات دورة الانقسام الخلوي Cell-division-cycle genes (cdc genes) هذه الطفرات تجعل دورة الخلية تقف في نقطة معينة من الدورة.

دراسة دورة الخلية في أجنة بعض الحيوانات :

تم دراسة الأحداث الكيميائية الحياتية في أجنة بعض الحيوانات وتم استعمال الخلايا العملاقة لسهولة دراستها والتعامل معها ومن أشهر هذه الخلايا هي بويضة الضفدع من نوع Xenopus، ويبلغ حجم هذه البويضة حوالي 1 ملم، إخصاب هذه البويضة يحفز انقسام

خلوي متسارع يدعى الانقسامات التفلجية Cleavage divisions حيث تنقسم الخلية المفردة دون أن تنمو مكونةً جنين من آلاف الخلايا الصغيرة، الانقسام الأول الذي يحدث بعد 90 دقيقة يعقبه 11 انقسام يفصل بين كل انقسام وآخر حوالي 30 دقيقة منتجاً 4096 خلية (تضاعف عدد الخلايا 12 مرة أي 212) خلال 7 ساعات، كل دورة خلية تتكون من طور S وطور M (يستغرق كل طور حوالي 15 دقيقة)، ويكاد يكون الطورين G1 و G2 غير موجودين.

هذه الانقسامات الخلوية المبكرة في جنين الضفدع Xenopus (وكذلك الحال في المحار Clam من نوع Spisula وذبابة الفاكهة) تستمر دون وجود نمو أو عوامل السيطرة (التي توجد في الخلايا المعقدة) وهذا يسهل دراسة دورة الخلية في هذه الخلايا. الفائدة الأخرى هي الحجم الكبير لخلية البويضة يجعل من الممكن حقنها بمواد يراد دراسة تأثيرها على دورة الخلية. كما يمكن إجراء نوع متقدم من الدراسات وتدعى Cell-free research حيث يتم أخذ السايتوبلازم من البويضة، والنواة من النطفة ثم تدمج في أنبوبة الاختبار وبذلك يتم دراسة أحداث دورة الخلية والتعامل معها تحت ظروف مسيطر عليها وبطريقة سلسة (الشكل 8-4).



الشكل (8-4) تجربة دورة الخلية Cell free

دراسة دورة خلايا اللبائن في الوسط الزرعي :

ليس من السهل دراسة خلايا اللبائن في أجسامها، لذلك يصار إلى الوسط الزرعي حيث يتم زراعة خلايا طبيعية أو سرطانية في أطباق زرعية تحوي مغذيات وعوامل نمو وتهيئة ظروف خاصة، المشكلة الأبرز أن خلايا اللبائن عندما يتم تنميتها في الوسط الزرعي فإنها تعاني الشيخوخة Senescence والموت بعد عدد معين من الانقسامات، ويسمى هذا بظاهرة (أو محدد) هايفلك Hayflick (limit) phenomenon وهو عدد مرات الانقسام لمجموعة من الخلايا الطبيعية للإنسان وصولاً إلى توقف الانقسام، حيث وجد هايفلك (وهو عالم تشريح أمريكي) عام 1961 أن الخلايا الجنينية الطبيعية للإنسان بإمكانها الانقسام لـ 40–60 مرة فقط (والأورمات الليفية 25–40 مرة) في الوسط الزرعي ثم تدخل مرحلة الشيخوخة وتوقف النمو.

وتعاني بعض خلايا اللبائن من طفرات معينة تؤدي إلى قيامها بانقسامات لا متناهية وتسمى الخلايا "الخالدة" وتتدعى هذه الخلايا بالخط الخلوي Cell line وهي شائعة جداً في دراسات البيولوجي الجزيئي وبيولوجيا الخلية، وبالرغم من كونها خلايا غير طبيعية لكنها توفر مصدر لخلايا متجانسة جينياً ودائمة التكاثر والنمو. إن دراسة خلايا اللبائن في الأوساط الزرعية ليس مهماً فقط لفهم أحداث دورة الخلية والعوامل المسيطرة عليها، بل يعد مهماً أيضاً لفهم تفاصيل السيطرة والتنظيم لدورة الخلية في الخلايا السرطانية.

السيطرة على دورة الخلية :

بالرغم من الكم الهائل من البحوث والدراسات حول دورة الخلية، إلا أن تفاصيل كثيرة ضمن دورة الخلية وكيفية التنظيم والسيطرة عليها لا زالت مثار جدل ونقطة خلاف بين العلماء، ومن هذه النقاط هل أن كل مرحلة أو طور من دورة الخلية لها تنظيم خاص مستقل بحد ذاته ؟ أم أن هناك تداخل في التنظيم والسيطرة في المراحل والأطوار ؟ ومنذ ثمانينات القرن الماضي فقط تم التعرف بشكل مفصل على البروتينات المسيطرة والمنظمة لدورة الخلية، ووجد أنها تختلف عن تلك البروتينات والعوامل المنظمة لتضاعف DNA وانعزال الكروموسومات.

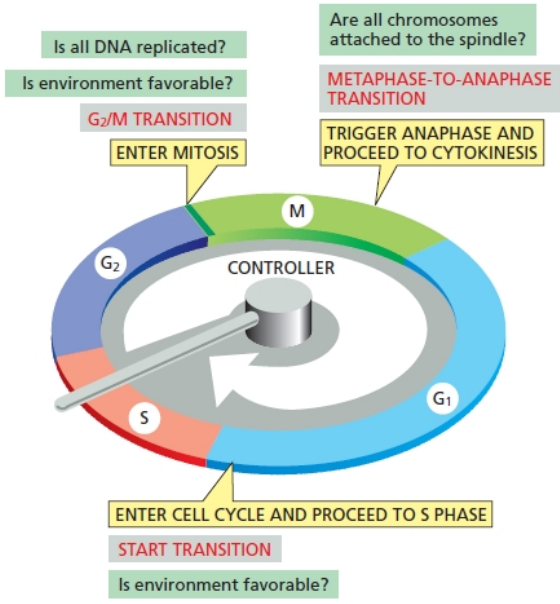
نظام السيطرة على دورة الخلية :

إن نظام السيطرة على دورة الخلية يعمل كمؤقت Timer لتحفيز أحداث دورة الخلية بشكل متعاقب ومنظم، وجدير بالذكر أن نظام السيطرة هذا في الخلايا الجنينية لا يعتمد على الأحداث التي تقوم بتنظيمها، حيث أن آلية التوقيت تستمر بالعمل حتى عند وجود فشل في أحداث مرحلة معينة، أما في معظم الخلايا الجسمية فإن وجود إشارات معينة تحفز نظام السيطرة كي تستجيب لهذه الإشارات، فمثلاً هناك "متحسسات" تستشعر انتهاء تضاعف DNA، أما إذا كان هناك بعض الاضطرابات التي تمنع الإكمال الصحيح لعملية التضاعف فإن هناك إشارات ترسل إلى نظام السيطرة كي تؤخر انتقال الخلية إلى الطور M، هذا التأخير يعطي فرصة لآليات الإصلاح كي تقوم بعملها، وبذلك تمنع من حدوث مشكلة كبيرة إذا استمرت الخلية بدورتها ودخلت في الطور التالي وحدث انعزال لكروموسومات لم يكتمل فيها تضاعف DNA بعد.

وفي معظم الخلايا حقيقية النواة فإن نظام السيطرة يحفز دورة الخلية من خلال ثلاث نقاط تفتيش تنظيمية هي :

1- نقطة التفتيش الأولى وتدعى نقطة تفتيش البدء (أو تسمى نقطة التحديد) وتقع في نهاية الطور G1 عندما تبدأ الخلية بالدخول إلى دورة الخلية وتبدأ بتضاعف الكروموسومات.
2- نقطة التفتيش الثانية هي نقطة تفتيش G2/M حيث تقوم هذه النقطة بتحفيز أحداث الانقسام الخيطي المبكر التي تؤدي إلى ترتيب الكروموسومات على خيوط المغزل.
3- الانتقال من الطور الاستوائي Metaphase إلى طور الانفصالي Anaphase حيث يحفز نظام السيطرة الكروموسومات الشقيقة على الانفصال عن بعضها مؤديةً إلى إكمال الانقسام الخيطي وانقسام السايتوبلازم.

ونظام السيطرة يغلق التقدم في كل نقطة تفتيش من النقاط الثلاث عند اكتشاف وجود مشكلة داخل أو خارج الخلية والانتظار لحين تجاوز هذه المشكلة (الشكل 8-5).



الشكل (8-5) السيطرة على دورة الخلية.

البروتين كاينيز المعتمد على السايكلين cdks :

الجزء الأساسي في نظام السيطرة على دورة الخلية هو مجموعة بروتينات تدعى الكاينيز المعتمد على السايكلين Cyclin-dependent kinases (cdks)، فعالية هذه البروتينات ترتفع وتنخفض بتقدم دورة الخلية مسببةً تغييرات دورية في فسفرة بروتينات داخل خلوية مسؤولة عن بدأ وتنظيم أحداث الخلية. أهم منظمات هذه البروتينات (cdks) هي السايكلينات، إذ أن cdks كما هو واضح من تسميتها تعتمد على السايكلينات في أداء وظيفتها، حيث في حال عدم ارتباطها بالسايكلين فإنها تفقد وظيفتها، أما السايكلينات فإن تسميتها جاءت من تصنيعها وتحطيمها بشكل دوري Cyclical في كل دورة خلية، على العكس من ذلك فإن مستوى cdks ثابت عموماً، لذلك فإن التغيرات الدورية في مستويات السايكلينات يحفز معقدات Cyclin-cdks هذا التحفيز يشجع أحداث دورة الخلية. هناك أربعة أنواع من السايكلينات كل واحدة متخصصة بمرحلة من دورة الخلية وترتبط مع cdks معينة وتؤدي وظيفة متخصصة وهي :

1- سايكلينات G1/S تنشط cdks في نهاية G1 وبذلك تحفز التقدم نحو البدء Start مما ينتج عنه الدخول في دورة الخلية، مستوى هذه السايكلينات يهبط في الطور S.

2- السايكلينات S ترتبط مع cdks مباشرة بعد الوصول إلى البدء وتساهم في تحفيز تضاعف الكروموسومات، ويبقى مستوى هذه السايكلينات مرتفعاً لحين الوصول إلى الانقسام الخيطي، بل أن هذه السايكلينات تساهم في السيطرة على بعض الأحداث المبكرة للانقسام الخيطي.

3- السايكلينات M تنشط cdks التي تحفز الدخول في الانقسام الخيطي عند نقطة التفتيش G2/M، وبوجود آليات متخصصة يتم تحطيم السايكلينات M في منتصف مرحلة الانقسام الخيطي.

4- في معظم أنواع الخلايا هناك نوع رابع من السايكلينات تدعى سايكلينات G1 وتسيطر على فعالية سايكلينات G1/S التي تحفز التقدم نحو البدء في نهاية مرحلة G1 الجدول (1-8).

الجدول (1-8) السايكلينات الرئيسية و cdks في الفقريات والخمائر المتبرعمة

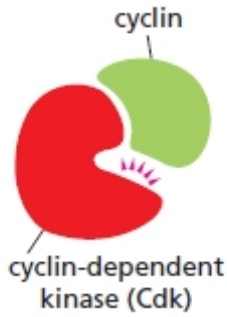
معقدات Cyclin-cdks	الفقريات		الخمائر المتبرعمة	
	السايكلين	Cdk	السايكلين	cdk
G1-cdk	D*	cdk4 و cdk6	cln3	cdk1**
G1/S-cdk	E	cdk2	cln1,2	cdk1
S-cdk	A	cdk2 و cdk1**	cln5,6	cdk1
M-cdk	B	cdk1	cln1,2,3,4	cdk1

* هناك ثلاث أنواع من السايكلين D في اللبائن هي D1 و D2 و D3

** الاسم القديم لـ cdk1 هو cdc2 في الفقريات والخمائر المنشطرة و cdc28 في الخمائر المتبرعمة.

وجدير بالذكر أن cdk واحد في الخمائر يرتبط مع جميع أصناف السايكلينات ويحفز أحداث دورة الخلية المختلفة بتغير السايكلين المشارك معه ضمن المراحل المختلفة لدورة الخلية. كما أن السايكلين لا يقوم فقط بتحفيز cdks المشارك معه، بل يقوم أيضاً بتوجيه هذه cdks إلى البروتينات الهدف المتخصصة، وينتج عن ذلك أن معقد Cyclin-cdk يقوم بفسفرة مجاميع مختلفة من البروتينات. نفس هذه المعقدات بإمكانها إحداث تأثيرات مختلفة في أوقات مختلفة من دورة الخلية.

دراسة التركيب ثلاثي الأبعاد أوضحت بأن الموقع الفعال ضمن تركيب cdk في حال غياب السايكلين يكون مغطى بجزء بروتيني وبذلك يكون هذا الموقع غير فعّال. ارتباط السايكلين يعمل على إزالة هذا الغطاء من الموقع الفعّال مؤدياً إلى تحفيز جزئي لإنزيم cdk (الشكل 8-6).



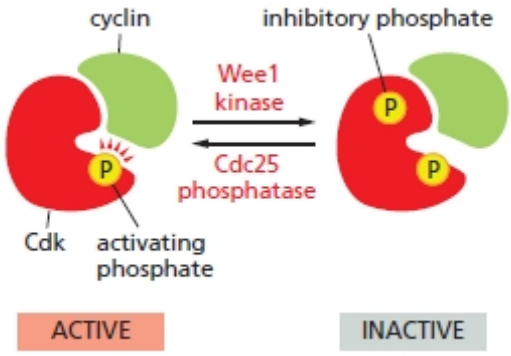
الشكل (8-6) العنصرين الأساسين للسيطرة على دورة الخلية

يتم التحفيز الكلي لمعقد Cyclin-cdk عند فسفرة الأحماض الأمينية القريبة من الموقع الفعال لـ cdk وذلك من خلال إنزيم كاينيز متخصص هو الكاينيز المنشط لـ cdk- cdk activating kinase (CAK) تسبب هذه الفسفرة تغيرات شكلية تزيد من فعالية cdk مما يسمح بقيام المعقد بأداء وظيفته في تحفيز الأحداث المختلفة لدورة الخلية.

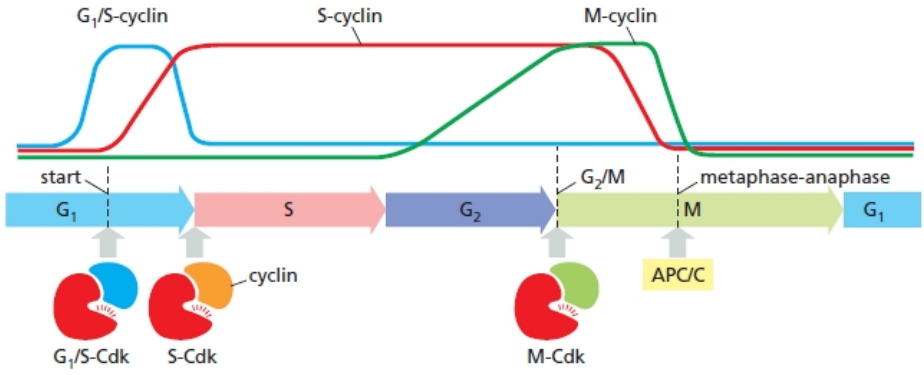
تنشيط فعالية cdk :

إن ارتفاع وانخفاض مستوى السايكلينات خلال المراحل المختلفة لدورة الخلية يعد المسيطر الرئيسي على فعالية cdk، لكن هناك آليات أخرى تساهم في السيطرة على فعالية ووظائف cdk.

فسفرة الأحماض الأمينية في الموقع الفعّال للكاينيز يثبط فعالية المعقد Cyclin-cdk وفسفرة هذه المواقع من خلال بروتين كاينيز يعرف بـ Wee1 يثبط فعالية cdk، بينما ازالة فسفرة هذه المواقع من قبل إنزيم Phosphatase الذي يعرف بـ cdc25 يزيد من فعالية cdk (الشكل 8-7)، كذلك ارتباط البروتينات المثبطة لـ cdk وهي (CKIs) تنظم أيضاً معقدات Cyclin-cdk، والتركيب ثلاثي الأبعاد لمعقد Cyclin-cdk-CKI يُظهر أن ارتباط CKI ينشط تغيرات شكلية كبيرة في تركيب الموقع الفعّال لـ cdk، جاعلاً إياه في حالة غير فعّالة، ويذكر أن الخلايا تستعمل CKIs بشكل أساسي في تنظيم فعاليات G1/S-cdk و S-cdk في بداية دورة الخلية (الشكل 8-8).



الشكل (8-7) تنظيم فعالية cdk عن طريق الفسفرة (مأخوذ من Alberts et al., 2015).



الشكل (8-8) معقدات Cyclin-cdk كنظام سيطرة على دورة الخلية

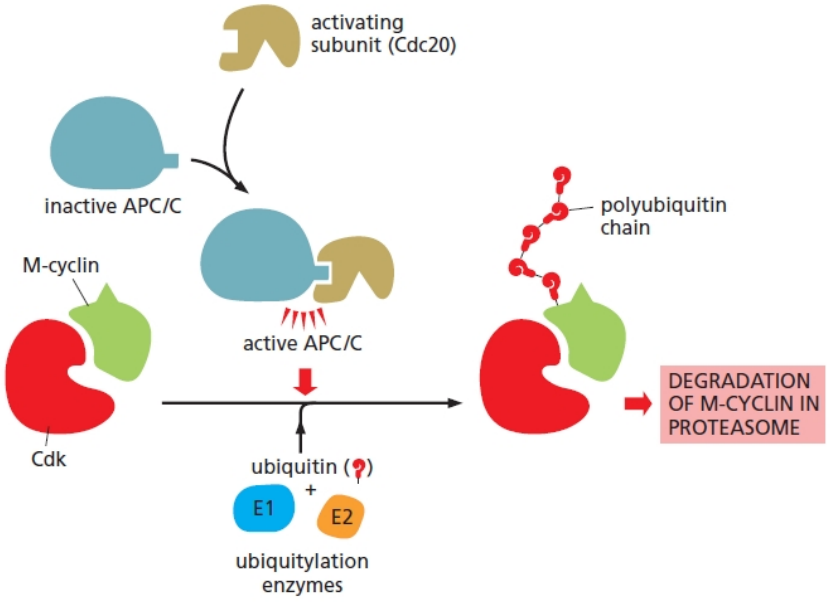
نظام السيطرة على دورة الخلية يعتمد على التحلل الدوري للبروتين :

كما أسلفنا فإن تنشيط المعقدات المتخصصة لـ Cyclin-cdk يعمل على التقدم خلال نقاط البدء و G2/M بينما التقدم خلال الطور الاستوائي Metaphase إلى الطور الانفصالي Anaphase يحفز ليس من خلال فسفرة البروتينات بل من خلال تكسير البروتينات، موصلةً دورة الخلية إلى مراحلها النهائية.

المنظم الرئيسي للانتقال من الطور الاستوائي إلى الطور الانفصالي هو معقد تشجيع الطور الانفصالي Anaphase-promotion complex أو يدعى Cyclosome لذلك يختصر بـ (APC/C) وهو أحد أعضاء الإنزيمات الرابطة للبروتينات الشائعة Ubiquitin ligase وهذه الإنزيمات تستعمل في العديد من الفعاليات الخلوية لتحفيز تكسير بروتينات تنظيمية متخصصة من خلال التحلل البروتيني، حيث يتم نقل نسخ من بروتينات صغيرة من البروتين الشائع Ubiquitin إلى البروتين الهدف مسببةً تحلله، أنواع أخرى من إنزيم ربط البروتين الشائع Ubiquitin ligase تعمل على تأشير البروتينات لأغراض أخرى غير التعليم.

معقد APC/C يحفز تحطم بروتينات مهمة ومنها السكيورين Securin والذي يحمي الارتباط البروتيني الذي يحافظ على ارتباط الكروماتيدين الشقيقين مع بعضهما في بداية

الانقسام الخيطي، لذلك فإن تحطم السكيورين عند الانتقال من الطور الاستوائي إلى الانفصالي يحفز الإنزيمات المحللة للبروتينات Protease الذي يسبب انفصال الكروماتيدين الشقيقين عن بعضهما (الشكل 8-9).



الشكل (8-9) تنظيم التحلل البروتيني بـ APC/C خلال دورة الخلية (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

السيطرة على دورة الخلية يعتمد أيضاً على الاستنساخ :

في دورة خلايا جنين الضفدع لا يحدث استنساخ للجينات وتعتمد السيطرة على دورة الخلية بشكل كامل على آليات ما بعد الاستنساخ والتي تتضمن تنظيم cdks وإنزيم ربط البروتين الشائع Ubiquitin ligase وبروتيناتها الهدف، بينما في الخلايا الأكثر تعقيداً فإن آليات تنظيم الاستنساخ يوفر مستوى إضافي للتنظيم.

وتستعمل عادةً تقنية DNA microarray لدراسة تعبير كل الجينات ضمن الجينوم كلما تقدمت الخلية في دورة الخلية، وأظهرت هذه الدراسات في الخمائر المتبرعمة أن حوالي 10٪ من جينات الجينوم تشفر لـ mRNA يتناوب مستواه خلال المراحل المختلفة لدورة الخلية،

بعض هذه الجينات تشفر لبروتينات معروفة وظائفها خلال دورة الخلية، لكن وظائف الكثير منها لا زالت مجهولة.

نظام السيطرة على دورة الخلية يعمل كشبكة كيميائية حياتية :

البروتينات التي تنظم السيطرة على دورة الخلية تعمل بشكل متداخل مع بعضها بطريقة تشبه الشبكة محفزةً أو متبطةً مجموعة من "المفاتيح" الكيميائية الحياتية المسؤولة عن أحداث دورة الخلية، والجدول (8-2) يبين أهم هذه البروتينات المنظمة لدورة الخلية ووظائف كل منها.

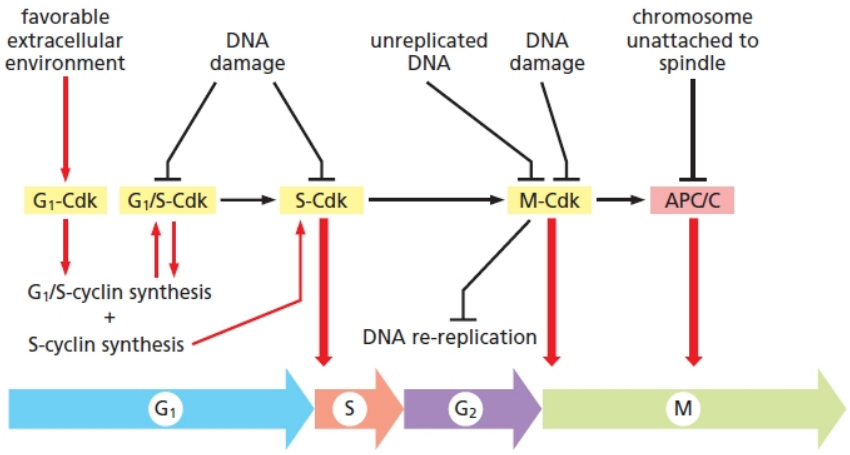
الجدول (8-2) البروتينات المنظمة لدورة الخلية

أسم البروتين	أهم الوظائف
البروتين كاينيز والبروتين فوسفاتيز التي تحور cdks	
Cdk-activating kinase (CAK)	فسفرة المواقع الفعالة لـ cdks
Wee1 kinase	فسفرة المواقع التثبيطية لـ cdks، تساهم بشكل أساسي في كبح فعالية cdk1 قبل الانقسام الخيطي
Cdc25 phosohatase	إزالة الفوسفاتيز التثبيطي من cdks، في اللبائن هناك 3 أنواع منه (cdc25A,B,C)، بشكل أساسي تنظم فعالية cdk1 في بداية الانقسام الخيطي
البروتينات المثبطة لـ cdk (CKIs)	
Sic1 في الخمائر المتبرعمة	تكبح فعالية cdk1 في G1، يحفز تحطمها الفسفرة في نهاية G1
P21 في اللبائن	تكبح فعالية كل من G1-S/cdk و S-cdk عند وجود ضرر في DNA
P27 في اللبائن	تكبح فعالية كل من G1-S/cdk و S-cdk في G1، تساعد في اخراج الخلية من دورة الخلية عندما يحصل لها تمايز نهائي، الففرة بـ cdk2 يسهل من تحطمها بواسطة SCF

أسم البروتين	أهم الوظائف
P16 في اللبائن	تكبح فعالية G1-cdk في G1، عادة تكون غير نشطة في السرطانات
الانزيمات الرابطة البروتينات الشائعة Ubiquitin ligases	
APC/C	تحفز عملية Ubiquitylation للبروتينات التنظيمية التي تساهم في الخروج من الانقسام الخيطي، والتي تشمل السكيورين و سايكلينات S وسايكلينات M
Cdc20	وحدة تنشيط APC/C في جميع الخلايا، تحفز التنشيط البدائي لـ APC/C عند الانتقال من الطور الاستوائي إلى الانفصالي، تحفز من خلال فعالية M-cdk
Cdh1	وحدة تنشيط APC/C وتحافظ على فعالية APC/C بعد الطور الانفصالي وخلال G1، يثبط من خلال فعالية cdk
SCF	تحفز عملية Ubiquitylation للبروتينات التنظيمية التي تساهم في تنظيم سيطرة G1، وتتضمن بعض CKIs، فسفرة البروتينات الهدف يحتاج إلى هذه الفعالية

وباختصار عندما تكون الظروف داخل وخارج الخلية ملائمة للانقسام الخلوي، فإن إشارات مختلفة داخلية وخارجية تحفز تنشيط G1-cdk وهذا يؤدي إلى تحفيز التعبير الجيني لسايكلينات G1/S و S، التنشيط لـ G1/S-cdk يعمل على التقدم خلال مرحلة البدء، كما يقوم G1/S-cdk بتنشيط S-cdk الذي يعمل على تحفيز تضاعف الكروموسومات في الطور S، ويكون مسؤولاً عن بعض أحداث المراحل المبكرة للانقسام الخيطي، تنشيط M-cdk يحفز

التقدم خلال نقطة تفتيش G2/M محفزاً العديد من الأحداث ومنها ترتيب الكروموسومات الشقيقة مع بعضها على خيوط المغزل، أخيراً فإن APC/C مع منشطاتها cdc20 تعمل على تحطيم كل من السكيورين والسايكلينات في الطور الانتقالي من الطور الاستوائي إلى الانفصالي، مسببةً انفصال الكروموسومات الشقيقة عن بعضها وإكمال الانقسام الخيطي (كما في الشكل 8-10)، وبعد اكمال الانقسام الخيطي تتعاون عدة آليات لتثبيط فعالية cdk لتدخل الخلية في مرحلة ثانية هي G1.



شكل (8-10) نظام السيطرة على دورة الخلية

(مأخوذ من Alberts et al., 2015)

الطور S :

تتكون الكروموسومات الخيطية للخلايا حقيقية النواة من DNA وبروتينات مرتبطة معها تساهم في شكل ووظائف DNA، لذلك خلال دورة الخلية ليس فقط DNA يجب مضاعفته بدقة متناهية، بل أن البروتينات المرتبطة معها يجب أيضاً تصنيعها بنفس الكميات والمواقع لضمان أن تأخذ كل خلية بنوية نفس الكروموسومات بكل تفاصيلها التركيبية، إن تضاعف DNA يعد العملية المركزية لمضاعفة الكرموسومات وخلال هذه العملية يجب على الخلية أن تحل أثنين من المشاكل التي تواجه تضاعف DNA وهما :

1- عملية تضاعف DNA يجب أن تتم بدقة متناهية لتقليل إمكانية حدوث الطفرات إلى أقل ما يمكن، لأن ذلك سينقل إلى الخلية البنوية، وإذا كان التضاعف في الخلايا الجنسية فإن الطفرات تنقل إلى الجيل التالي.

2- كل نيوكليوتيد ضمن الجينوم يجب أن يستنسخ مرة واحدة فقط، لضمان عدم حدوث تكرار هذه النيوكليوتيدات في الخلايا البنوية.

وتم شرح آلية تضاعف DNA والسيطرة على دقة وتوقيت هذا التضاعف بالتنسيق مع دورة الخلية ضمن فصل DNA وتضاعفه.

تضاعف واحد لـ DNA لكل خلية :

كما أسلفنا فإن تضاعف DNA يبدأ من منشأ التضاعف الذي يكون موزعاً في مواقع مختلفة من الكروموسوم، وفي الطور S تضاعف DNA ينشأ في هذه المواقع عندما تقوم بروتينات متخصصة (تدعى أحياناً بروتينات المنشأ Initiation proteins) بفك خيطي الحلزون المزدوج لـ DNA في منشأ التضاعف عن طريق إنزيم DNA helicase وتحميل إنزيمات على الخيطين المنفردين اللذين يعملان كقالب لتصنيع خيطين جديدين، ثم تبدأ مرحلة الاستطالة Elongation phase عندما تسير كل شوكة تضاعف بعيداً عن منشأ التضاعف.

ولضمان أن تضاعف كل كروموسوم يحدث مرة واحدة فقط لكل خلية، فإن طور منشأ تضاعف DNA يحدث بمرحلتين منفصلتين من دورة الخلية :

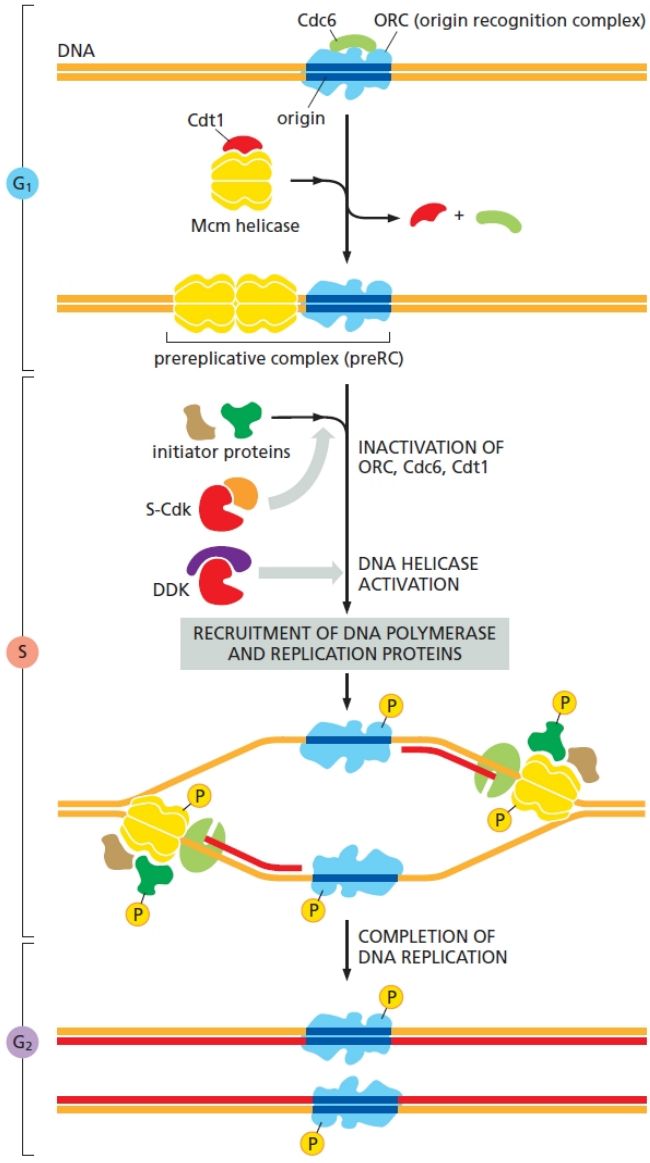
- **المرحلة الأولى**: وتحدث في نهاية الانقسام الخيطي وبداية مرحلة G1 حيث تتجمع معقدات كبيرة من بروتينات المنشأ والتي تدعى معقد ما قبل التضاعف Prereplication complex (preRC) حيث تتجمع هذه البروتينات على مناشئ التضاعف، والبدء بتصنيع DNA يسمح فقط في مناشئ التضاعف الحاوية على preRC.
- **المرحلة الثانية**: تحدث في بداية الطور S، إذ يعمل preRC على تجميع وتكوين معقد بروتيني يدعى معقد ما قبل البدء Preinitiation complex (PIC)، هذا المعقد يفك الحلزون المزدوج لـ DNA ويحمل إنزيم البلمرة DNAP وباقي إنزيمات وبروتينات تضاعف DNA.

عندما ينشط التضاعف ويبدأ فإن معقد preRC يتفكك ولا يمكن إعادة تجميعه في ذلك المنشأ لحين الوصول إلى G1 التالي (في دورة تالية للخلية) وبذلك فإن منشأ كل تضاعف يمكن أن ينشط فقط مرة واحدة في كل دورة خلية.

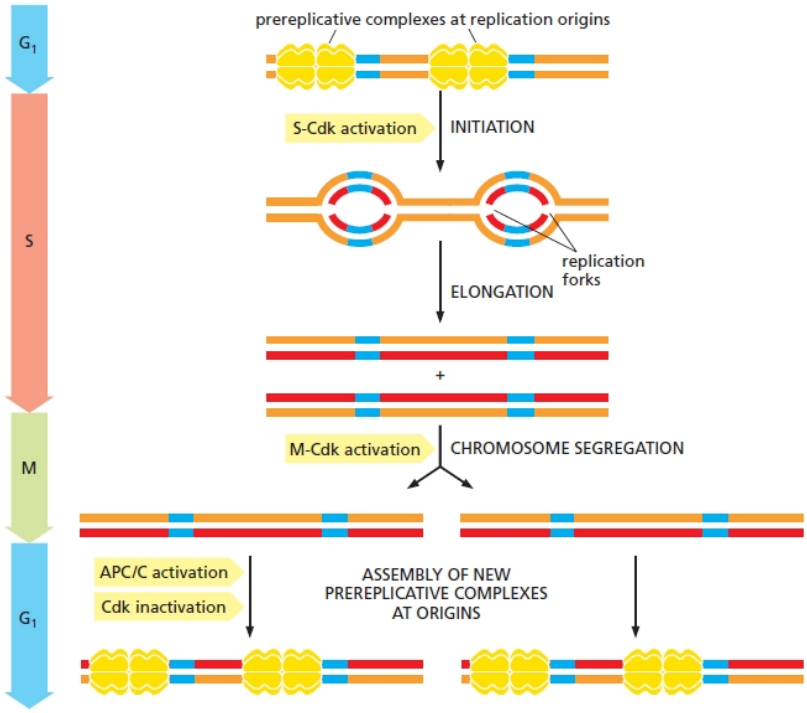
تلعب العديد من البروتينات أدوار مختلفة خلال دورة الخلية ومن هذه البروتينات معقد التعرف على المنشأ Origin recognition complex (ORC) وهو عبارة عن معقد كبير من متعدد البروتين ويرتبط مع منشأ التضاعف خلال دورة الخلية، وفي نهاية الانقسام الخيطي وبداية الطور G1 فإن بروتينات cdc6 و cdt1 ترتبط مع ORC في مناشئ التضاعف، وهذا يعمل على جذب وتحميل ستة بروتينات مرتبطة أخرى تسمى بروتينات Mcm، والمعقد الكبير الناتج من كل هذه البروتينات هو pre-RC، وفي هذه الأثناء يكون منشأ التضاعف خامل لعملية التضاعف. وتكون البروتينات الستة Mcm حلقة حول DNA يعتقد أنها تعمل كإنزيم DNA helicase الرئيسي والذي يفتح حلزون DNA المزدوج في منطقة المنشأ عند بدأ تصنيع DNA وعند تقدم شوكة التضاعف، لذلك فإن الوظيفة للمعقد pre-RC هو تحميل إنزيم Helicase الذي دوراً مركزياً في تضاعف DNA.

بعد بدء تحفيز عملية تضاعف DNA فإن S-cdk تحفز تفكك بعض مكونات pre-RC في المنشأ، ويعمل cdks على فسفرة ORC و cdc6 مسبباً تثبيطها بعدة طرق، كما أن إزالة فعالية APC/C في طور G1 المتأخر يعمل على تثبيط تجمع pre-RC، وفي نهاية الانقسام الخيطي وبداية G1 يعمل APC/C على تحفيز تحطم بروتين الجيمينين Geminin والذي يرتبط مع ويثبط أحد مكونات pre-RC وهو cdt1. لذلك فإن الجيمينين يتراكم ويثبط cdt1 مؤدياً إلى تنشيط S-cdk و M-cdk ويرافق ذلك انخفاض في نشاط APC/C وهذا كله يمنع تكون pre-RC خلال الطور S وما بعده.

والمحصلة أنه في نهاية الانقسام الخيطي فإن تنشيط APC/C يؤدي إلى إزالة فعالية cdks وتحطم الجيمينين، أما مكونات pre-RC فتزال فسفرتها ويزال نشاط cdt1 وهذا يسمح بتجمع pre-RC لتحضير الخلية للطور التالي S الشكل (8-11).



الشكل (8-11) السيطرة على بدأ تضاعف DNA
(مأخوذ من Alberts et al., 2015).



الشكل (8-12) السيطرة على تضاعف الكروموسوم

(مأخوذ من Alberts et al., 2015)

تضاعف الكروماتين ضروري لتضاعف الكروموسوم :

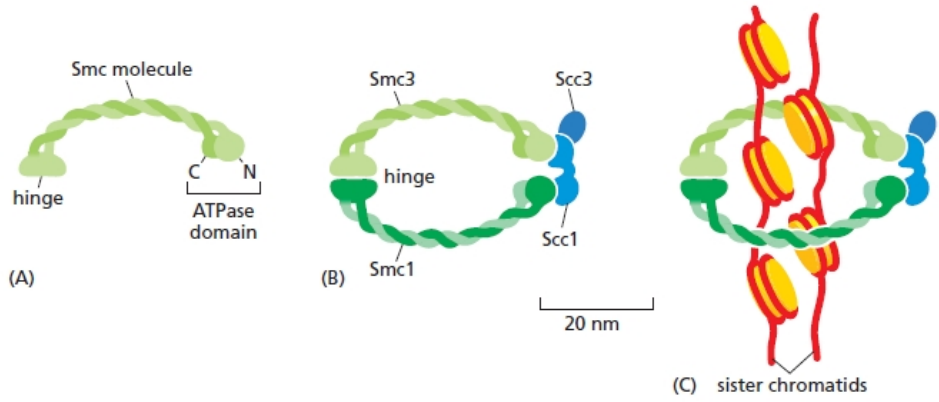
كما ذكرنا سابقاً فإن عملية تضاعف الكروموسومات ليست فقط مضاعفة DNA بل كل البروتينات المرتبطة معها وبنفس الكميات والأشكال والمواقع كي يستمر الاحتفاظ بالتفاصيل الدقيقة لكل كروموسوم من خلوية أبوية إلى بنوية ومن جيل إلى آخر.

وإنتاج بروتينات الكروماتين يزداد في الطور S من دورة الخلية لتوفير الكميات الملائمة لرزم DNA المصنع حديثاً بعد التضاعف. إذ لوحظ زيادة إنتاج وحدات الهستونات الأربعة المكونة لثماني الأجزاء Octamere في مركز كل نيوكليوسوم، هذه الوحدات تتجمع ضمن النيوكليوسوم بتأثير عوامل تجميع متخصصة والتي ترتبط مع شوكة التضاعف وتعمل على توزيع النيوكليوسومات على خيطي DNA كلما تم التصنيع.

يساعد شكل رزم الكروماتين في السيطرة على التعبير الجيني، وكما ذكرنا سابقاً فإن هناك مناطق كثيفة في الكروماتين (الكروماتين المغاير) وأخرى قليلة الكثافة (الكروماتين الحقيقي)، إن هذا الاختلاف في تركيب وشكل الكروماتين سببه آليات متعددة منها التحويرات على الهستونات ووجود البروتينات غير الهستونية، وتكون هذه الآليات مهمة في السيطرة على التعبير الجيني لذلك فإن على الخلية المحافظة على هذه التراكيب بدقة متناهية.

الكوهسين تساعد في مسك الكروماتيدين الشقيقين مع بعضهما :

ارتباط الكروماتيدين الشقيقين يعتمد بشكل كبير على معقد بروتيني كبير يسمى الكوهسين Cohesin والذي في مواقع مختلفة على طول كل كروماتيد، هذا المعقد يكون بشكل تركيب حلقي عملاق يعتقد أنه يحيط بالكروماتيدين الشقيقين، اثنان من البروتينات التي تدخل في تركيب هذا المعقد هما من ضمن البروتينات المحافظة على تركيب الكروموسومات Structural maintenance chromosome (SMC)، وعموماً يتكون معقد الكوهسين من أربع وحدات اثنان منها هما Smc1 و Smc2 وهما من بروتينات الالتفاف الملفوف Coiled-coil وتعمل احدى نهايتيها كانزيم ATPase، وعند ارتباطهما يكونان تركيب حلقي كما موضح في الشكل (8-13).



الشكل (8-13) الكوهيسين

فضلاً عن ما سبق فإن ارتباط الكروماتيدين الشقيقين يكون أيضاً من خلال ما يدعى بالوصلات التسلسلية DNA catenation، حيث عند التقاء شوكتي تضاعف مع بعضهما خلال تضاعف DNA، يحصل تداخل بين جزيئات DNA الكروماتيدين الشقيقين، ولكن بوجود إنزيم Topoisomerase II الذي يحل هذه التداخلات من خلال قطع خيط DNA ثم إخراج الخيط الآخر من هذه الفجوة ثم إعادة ربط ما تم قطعه. عندما تتم إزالة الوصلات التسلسلية فإن الكروماتيدين الشقيقين يعتمدان على تكسير معقد الكوهسين عند الانتقال من الطور الاستوائي إلى الانفصالي.

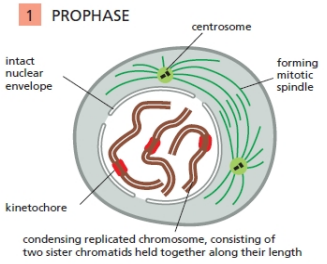
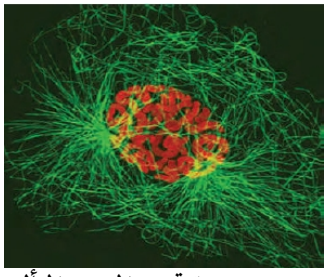
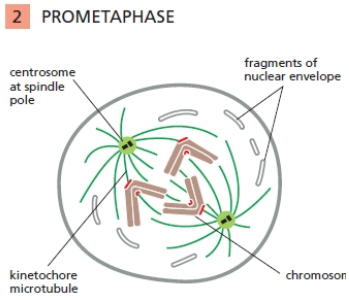
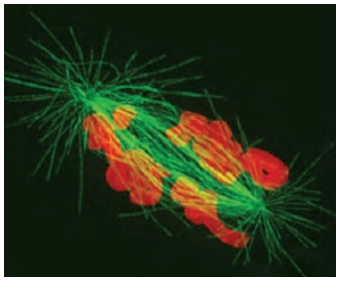
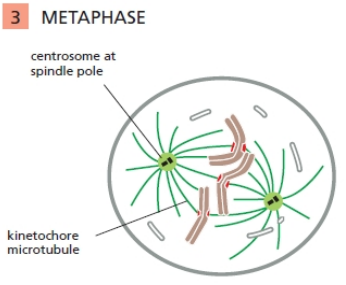
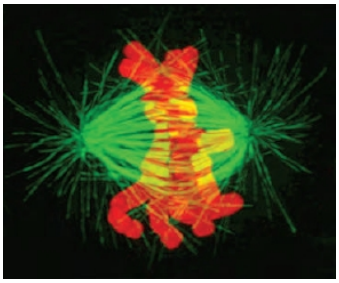
الانقسام الخيطي Mitosis :

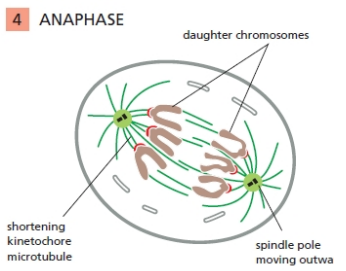
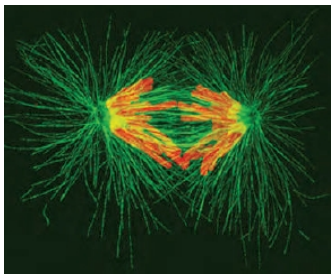
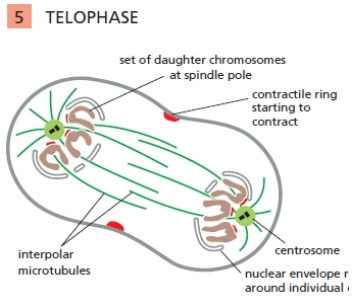
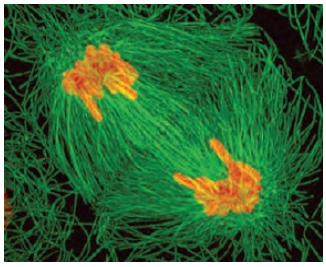
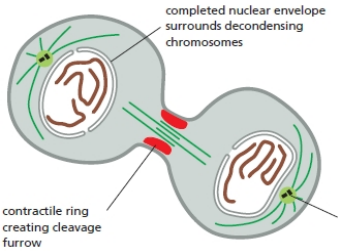
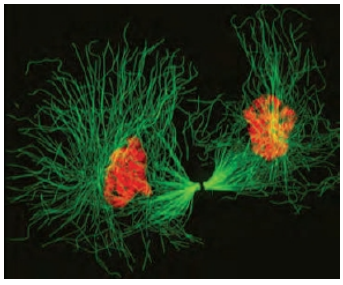
خلال الانقسام الخيطي ينفصل الكروماتيدين الشقيقين عن بعضهما ويذهب كل واحد إلى نواة بنوية، حيث تحمل كل واحدة نسخة من الجينوم، ولتسهيل دراسة الانقسام الخيطي يمكن تقسيمها إلى خمس مراحل هي :

1- الطور التمهيدي Prophase
2- الطور الاستوائي المبكر prometaphase
3- الطور الاستوائي metaphase
4- الطور الانفصالي anaphase
5- الطور النهائي Telophase

وذلك اعتماداً على سلوك الكروموسومات التي يمكن ملاحظتها من خلال المجهر، وبعد اكتمال الانقسام الخيطي فإن الحدث الأبرز الآخر في الطور M هو الانقسام السايتوبلازمي Cytokinesis (انقسام الخلية إلى نصفين كل واحدة لها نواة مماثلة للأخرى). ويمكن تلخيص أهم أحدث الانقسام الخيطي ومراحله في الجدول (8-3).

الجدول (3-8) مراحل الانقسام الخيطي

الطور	صورة توضيحية	صورة مجهرية
الطور التمهيدي: الكروموسومات المتضاعفة تتكون كل واحدة منها من كروماتيدين شقيقين مرتبطين بشدة مع بعضهما، خارج النواة تبدأ خيوط المغزل بالتجمع بين الجسيمين المركزيين		 صورة مجهرية تحت المجهر المتألق تظهر الكروموسومات مصبوغة باللون البرتقالي وخيوط المغزل باللون الأخضر
الطور الاستوائي المبكر: يبدأ بشكل مفاجئ بتحطم الغلاف النووي، ترتبط الكروموسومات بخيوط المغزل من خلال عوامل الحركة kinetochore وتبدأ بالحركة		
الطور الاستوائي: تبدأ الكروموسومات بالاصطفاف في المنطقة الوسطية وترتبط عوامل الحركة kinetochore خيوط المغزل مع الكروماتيدين الشقيقين		

الطور	صورة توضيحية	صورة مجهرية
الطور الانفصالي: تنفصل الكروميتيدات الشقيقة مكونةً كروموسومات جديدة وتبدأ بالانعزال نحو القطبين		
الطور النهائي : تصل كل مجموعة من الكروموسومات إلى قطب من أقطاب الخلية، ويبدأ تكون الغلاف النووي ليحيط بكل مجموعة، وهي نهاية الانقسام الخيطي، وتبدأ حلقة التقلص بالتكون		
الانقسام السايتوبلازمي : ينشطر السايتوبلازم إلى قسمين بمساعدة حلقة التقلص المكونة من خيوط الأكتين والمايوسين، مكوناً خليتين بنويتين		

من أهم مظاهر السيطرة على دورة الخلية أن بروتين كاينيز واحد هو M-cdk يسيطر على معظم الأحداث في بداية الانقسام الخيطي، ومن الوظائف المهمة التي يساهم بها هذا البروتين M-cdk :

1- يحفز تجمع خيوط المغزل.
2- يضمن أن كل كروماتيد من الكروماتيدين الشقيقين يرتبط بخيوط مغزل القطب المقابل.
3- يحفز تكثف الكروموسوم، حيث يتم إعادة تنظيم الكروماتيد إلى تراكيب صلدة عصوية.
4- في الخلايا الحيوانية تعمل على تحطم الغلاف النووي وإعادة ترتيب أكتين الهيكل الخلوي وجهاز كولجي.

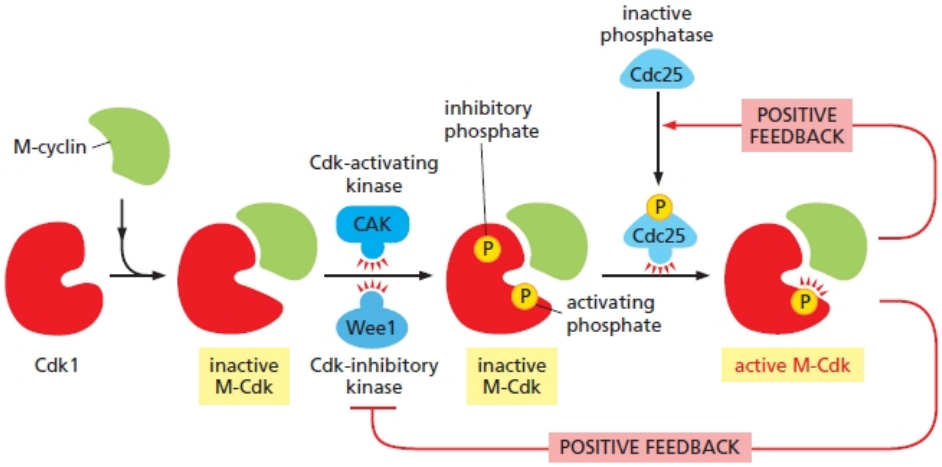
هناك بروتينات أخرى تشارك M-cdk في فسفرة البروتينات المساهمة في بداية عملية الانقسام الخيطي، **ومن هذه البروتينات** :

1- الكاينيز الشبيه ببولو Polo-like kinaes: ويعد ضرورياً للتجمع الطبيعي لخيوط المغزل ثنائية القطب، وذلك من خلال فسفرة البروتينات التي تساهم في انفصال أقطاب المغزل في بداية الانقسام الخيطي.
2- كاينيز أوروا Aurora kinases: ومن أنواعه Aurora-A التي تساعد بروتينات السيطرة على تجمع وثبات خيوط المغزل، بينما Aurora-B تسيطر على ارتباط الكروماتيدين الشقيقين مع خيوط المغزل، ويذكر أن تنشيط كل من PIK وكاينيز أوروا يعتمد على نشاط M-cdk.

تنشيط M-cdk :

تنشيط M-cdk يبدأ بتجمع السايكلين M (في خلايا الفقريات يدعى السايكلين B)، ويزداد صنع السايكلين M خلال الطور G2 والطور M وذلك بفعل زيادة تعبير الجين M-cyclin. زيادة بروتين M-cyclin يؤدي إلى تجمع M-cdk (عبارة عن معقد من cdk1 و السايكلين M) الشكل (8-14).

وبالرغم من أن cdk في هذا المعقد يفسفر في الموقع الفعال من خلال كاينيز منشط cdk-activating kinase (CKA) ولكن البروتين كاينيز Wee1 يبقيه في وضع غير نشط من خلال فسفرة تثبيطية بموقعين مجاورين (الشكل أعلاه)، وبمرور الوقت وعند وصول الخلية إلى نهاية G2، فإن الخلية تملك مخزون كبير من M-cdk الجاهزة للعمل لكنها تكون مكبوحة بفعل إنزيم Phosphatase الذي يغلق الموقع الفعال للكاينيز. ويتم إطلاق فعالية M-cdk



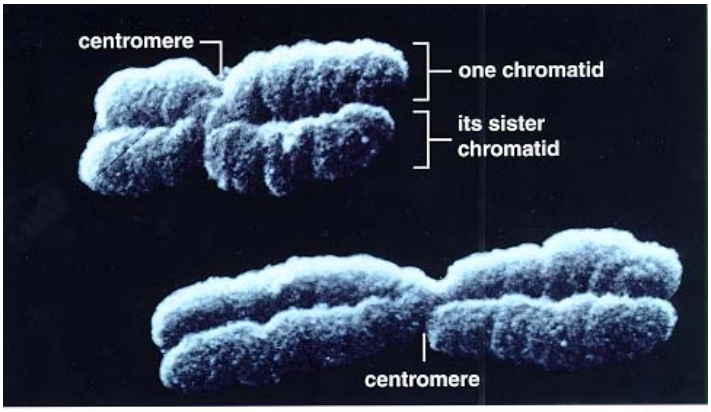
شكل (8-14) تنشيط M-cdk (مأخوذ من **Alberts et al., 2015**).

من خلال تفعيل البروتين فوسفاتيز cdc25 الذي يزيل الفوسفتيز التثبيطي المقيد لـ M-cdk (الشكل أعلاه)، في نفس الوقت يتم كبح الفعالية التثبيطية للكاينيز Wee1 وبذلك تضمن الخلية زيادة فعالية M-cdk. إن cdc25 يمكن أن ينشط من خلال M-cdk، كما أن M-cdk يمكن أن يثبط الكاينيز التثبيطي Wee1. وبذلك فإن قابلية M-cdk على تنشيط منشطه (الذي هو cdc25) وتثبيط مثبطه (الذي هو Wee1) يدل على أن تنشيط M-cdk خلال الانقسام الخيطي يتم من خلال تغذية رجعية موجبة (الشكل أعلاه).

وكما ذكرنا سابقاً فإن آليات مشابهة من التنظيم الجزيئي الدقيق تعمل في مراحل مختلفة من دورة الخلية للانتقال من مرحلة إلى أخرى ومن دورة خلية إلى أخرى وبشكل غاية في الدقة والتنظيم.

الكوندنسين Condensin وأهميته في دورة الخلية :

في نهاية الطور S تكون جزيئة DNA الطويلة متراصة بشكل كبير جداً ومعها البروتينات المرافقة لها (الشكل 8-15).



الشكل (15-8) كروموسومات الانقسام الخيطي ويلاحظ ارتباط الكروماتيدين الشقيقين على طولهما وبشدة

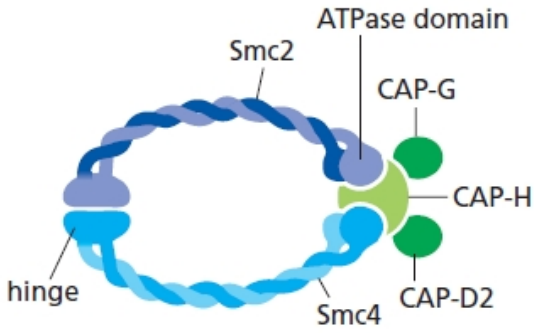
أي محاولة لفصل الكروماتيدين الشقيقين يؤدي إلى كارث للخلية بسبب تكسر الكروموسومات، لذلك تبذل الخلية الكثير من الطاقة لإعادة تشكيل الكروماتيدين الشقيقين في بداية الانقسام الخيطي لتكوين كروماتيدين شقيقين قصيرين يمكن فصلهما عن بعض بسهولة في مرحلة الطور الانفصالي، هذه التغيرات في الكروموسومات يمكن إيجازها في :

1- تكثف الكروموسوم Chromosome condensation حيث تكون الكروماتيدات متراصة ومكثفة بشكل كبير.

2- فصل الكروماتيدين الشقيقين Sister-chromatid resolution إذ يتم فصل الكروماتيدين الشقيقين إلى جزئين منفصلين وينتج الفصل بفعل إزالة الوصلات التسلسلية لـ DNA (DNA decatenation)، مع إزالة جزئية لجزيئات الكوهيسين من أذرع الكروموسومات، وبذلك فإن الخلية عندما تصل إلى الطور الاستوائي تبدو الكروماتيدات الشقيقة تحت المجهر كتراكيب شبه عصوية كثيفة مرتبطة مع بعضها بقوة في منطقة الجسيم المركزي.

تكثيف وفصل الكروماتيدات الشقيقة يعتمد على معقد بروتيني يدعى المكثف Condensin ويرتبط مع معقد الكوهيسين الذي يبقي الكروماتيدين الشقيقين مع بعضهما،

ويتألف المكثف من 5 وحدات، وحدتان من SMC (ويشبه بذلك الكوهيسين) وثلاث وحدات من Non-SMC (الشكل 8-16). إن المكثف يمكن أن يكون تركيب يشبه الحلقة ويستعمل طاقة تحلل ATP لتكثيف وفصل الكروماتيدين الشقيقين.

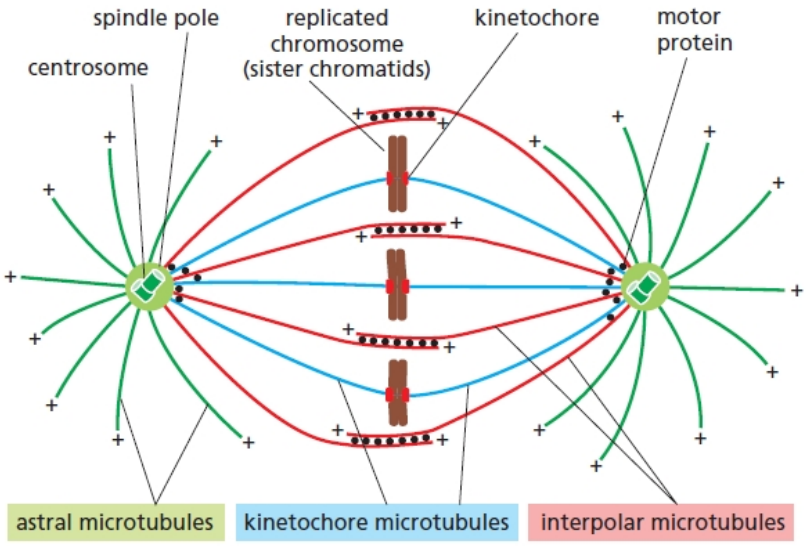


الشكل (8-16) المكثف ويشبه شكل الكوهيسين

خيوط المغزل ودورة الخلية :

الحدث الأكبر في الانقسام الخيطي هو انعزال الكروموسومات والذي يعتمد على تراكيب معقدة ودقيقة هي خيوط مغزل الانقسام الخيطي Mitotic spindle وهي عبارة عن نبيبات دقيقة شعاعية ثنائية القطب، وتعمل على سحب الكروماتيدات الشقيقة بعيداً عن بعضها في الطور الانفصالي، وبذلك تعمل على انفصال الكروموسومات إلى النهايتين المتباعدتين للخلية، حيث يتم رزم كل مجموعة فيما بعد ضمن نواة كل خلية بنوية، ويعمل M-cdk على تحفيز تجمع خيوط المغزل في بداية الانقسام الخيطي بالتوازي مع التغيرات التي تحصل على الكروموسوم خلال هذه الفترة.

خيوط المغزل كونها ثنائية القطب (تملك قطب موجب آخر سالب)، النهايات السالبة تتركز في قطبي المغزل بينهما النهايات الموجبة التي تتوزع بشكل شعاعي بعيداً عن القطب (الشكل 8-17).



الشكل (8-17) خيوط المغزل في الخلايا الحيوانية
(مأخوذ من Alberts et al., 2015)

هناك ثلاث أنواع رئيسية من النهايات الموجبة هي :

1- النبيبات الدقيقة بين القطبية Interpolar microtubules حيث تتداخل مع النبيبات الدقيقة بين القطبية من القطب الآخر مكونةً تراكيب شعاعية غير متوازية في المنطقة الوسطية (الشكل أعلاه).

2- النبيبات الدقيقة العامل الحركي Kinetochore microtubules وترتبط مع الكروماتيدات الشقيقة من خلال تراكيب بروتينية تدعى بالعوامل الحركية Kinetochores التي تقع في منطقة الجسيم المركزي Centromere لكل كروماتيد شقيق.

3- النبيبات الدقيقة النجمية Astral microtubules وتنشأ بشكل شعاعي من الأقطاب وترتبط مع الهيكل الخلوي وبذلك تساهم في الحفاظ على موقع خيوط المغزل ضمن الخلية.

وفي معظم الخلايا الحيوانية، ترتبط خيوط المغزل مع بروتينات عضية الجسيم المركزي Centrosome ويتكون كل جسيم مركزي من مادة غير متجانسة تدعى بالمادة الأساس حول

المريكز Pericentriolar matrix والتي تحيط بالمريكز، إن المادة الأساس حول المريكز تحوي بروتينات متعددة ومنها :

1- البروتينات الحركية المعتمدة على النبيبات الدقيقة.

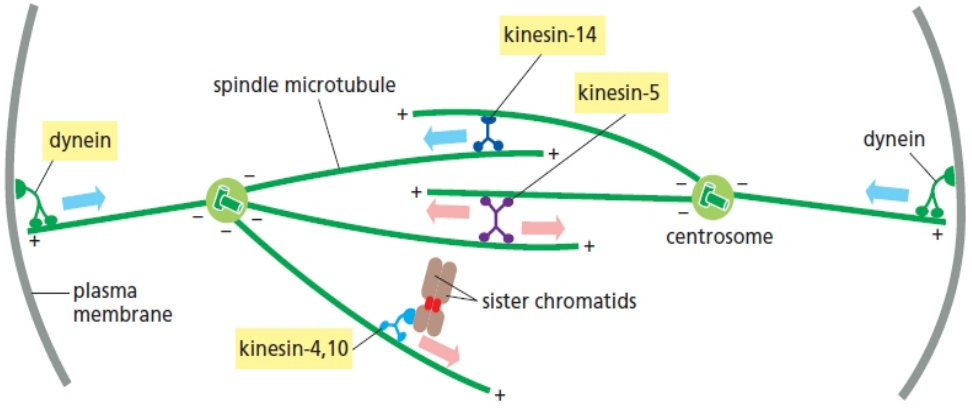
2- بروتينات الالتفاف الملفوف والتي تربط البروتينات الحركية مع الجسيم المركزي.

3- بروتينات تركيبية.

4- مكونات من نظام السيطرة على دورة الخلية.

البروتينات الرئيسية لخيوط المغزل :

هناك أربع مجاميع من البروتينات الحركية المعتمدة على النبيبات الدقيقة تساهم في بناء شكل ووظيفة خيوط المغزل، هذه البروتينات هي: Kinesin-5، Kinesin-14، Kinesin-4,10، Dynein (الشكل 8-18).



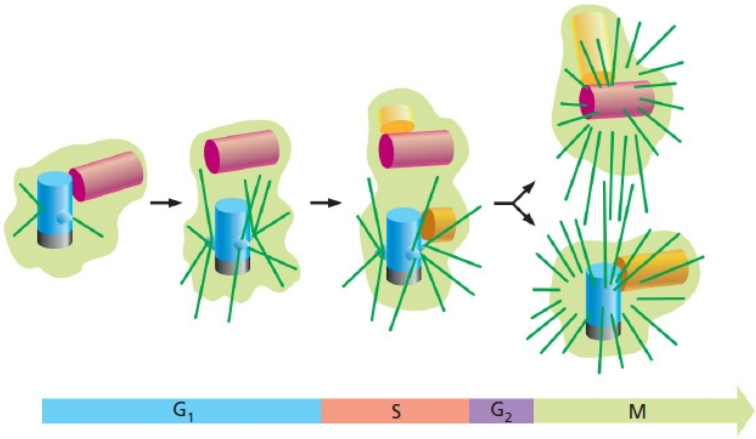
الشكل (8-18) البروتينات الرئيسية لخيوط المغزل

(مأخوذ من Alberts et al., 2015)

تضاعف الجسيم المركزي :

معظم الخلايا الحيوانية تملك جسيم مركزي واحد تتجمع حولها معظم النبيبات الدقيقة للخلية، ويتضاعف الجسيم المركزي عند الدخول إلى دورة الخلية، وبمرور الوقت وعند وصول الخلية إلى مرحلة الانقسام الخيطي يكون للخلية جسيمان مركزيان.

وباختصار فإن G1/S-cdk تنشط تضاعف الجسيم المركزي حيث يبدأ المريكزان بانفصال أحدهما عن الآخر ويتقدم كل مريكز جديد ليكون مريكز مستقل تتجمع حوله خيوط المغزل، وبما أن كل مريكز يكون زوج من المريكزات فالناتج يكون زوجان من المريكزات الجديدة (الشكل 8-19).



الشكل (8-19) تضاعف المريكز

ويبقى زوج المريكزان مع بعضهما في أحد جوانب النواة لحين دخول الخلية إلى مرحلة الانقسام الخيطي، ويذكر أن هناك تشابه بين تضاعف المريكز وتضاعف الكروموسومات حيث يسلك كلاهما سلوك التضاعف نصف المحافظ Semi-conservative replication. حيث يعمل كل نصف كقالب لتصنيع النصف الآخر، كما أن الجسيم المركزي يجب أن يتضاعف مرة واحدة فقط (كالكروموسوم) لكل دورة خلية.

ويذكر أن وجود خلل في تضاعف الجسيم المركزي وعدده يسبب غالباً فقدان وظيفة

خيوط المغزل وبالتالي عملية انعزال الكروموسومات عن بعضهما. أما آلية تحكم الخلية بمضاعفة الجسيم المركزي لمرة واحدة فقط فغير واضحة لحد الآن.

حركة النبيبات الدقيقة في الانقسام الخيطي :

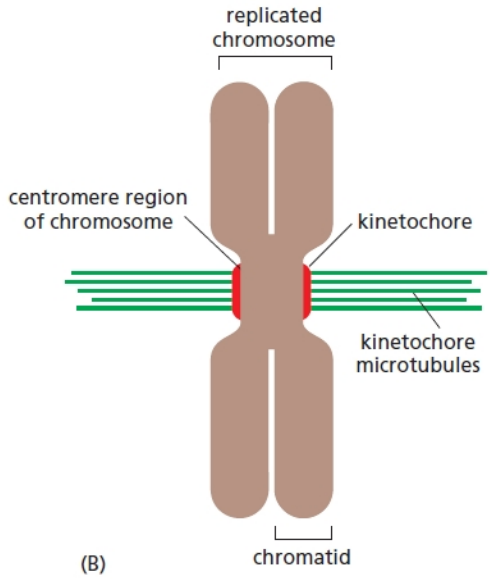
معظم التغيرات في سلوك النبيبات الدقيقة عند مرحلة الانقسام الخيطي تتم بتحفيز من M-cdk ويعتقد أن هذه التغيرات تحدث بفعل فسفرة مجموعتان من البروتينات التي تسيطر على حركة النبيبات الدقيقة هما :

1- البروتينات الحركية المعتمد على النبيبات الدقيقة Microtubule-dependent motor proteins (MDMP).

2- البروتينات المرتبطة بالنبيبات الدقيقة Microtubule-associated proteins (MAPs).

كما يلعب الكروموسوم دوراً مهماً في تشجيع تجمع خيوط المغزل وتناسق وظائفه الأخرى. ويتم ذلك من خلال عامل يدعى عامل تبادل الكوانين Guanine-nucleotide exchange factor (GEF) والذي يرتبط مع الكروماتين، ويعمل GEF على تحفيز GTPase الصغيرة في السايتوبلازم (والتي تدعى Ran) كي ترتبط مع GTP بدلاً من GDP. إن Ran-GTP المنشط (الذي يستعمل في البحوث في عمليات نقل الأنوية) يحرر البروتينات المثبتة للنبيبات الدقيقة من معقداتها في السايتوبلازم وبذلك تحفز التجمع الموضعي للنبيبات الدقيقة وثبوتية هذه النبيبات الدقيقة حول الكروموسومات. أما الخلايا التي تفقد "طبيعياً" الجسيم المركزي مثل بعض النباتات المتقدمة وبويضات العديد من الحيوانات فإنها تستعمل هذه الآلية المعتمد على الكروموسوم في تنظيم عمل خيوط المغزل.

ترتبط خيوط المغزل مع الكروماتيدين الشقيقين في نقطة العامل الحركي (الشكل 8-20) وهو عبارة عن تركيب بروتيني عملاق متعدد الطبقات، في الخلايا الحيوانية هناك حوالي 10-40 موقع ارتباط بينما في خلايا الخمائر موقع واحد فقط. الخلايا التي لها جسيم مركزي تستعمل آلية البحث والمسك "Search and capture" لربط كروموسوماتها مع خيوط المغزل.



الشكل (8-20) ارتباط النبيبات الدقيقة بالكروماتيدين الشقيقين

وهناك عدة قوى تعمل على تحريك الكروموسومات على خيوط المغزل، ومن أبرز هذه القوى :

1- قوة جذب عامل الحركة والكرموسوم المرتبط معها باتجاه القطب من خلال بروتينات موجودة على عامل الحركة، وتعمل هذه القوة على فصل الكروماتيدين الشقيقين كل واحدة باتجاه قطب. ولا تحتاج هذه القوة إلى طاقة ATP بل تستخدم الطاقة المخزونة في النبيبات الدقيقة.

2- بعض الخلايا تستعمل قوى تدفق النبيبات الدقيقة Microtubule flux حيث تتحرك النبيبات الدقيقة باتجاه القطب.

3- قوى القذف القطبي Polar ejection force.

انفصال الكروماتيدين الشقيقين عن بعضهما وتحرك كل واحدة باتجاه قطب من أقطاب الخلايا يسمى انعزال الكرموسومات Chromosome segregation، وفي نهاية الطور الانفصالي تكون الكروموسومات البنوية قد انفصلت إلى مجموعتين متساويتين وفي قطبي

الخلية وعند الطور النهائي (المرحلة الأخيرة من الانقسام الخيطي) فإن مجموعة الكروموسومات يتم رزمها في نواتين بنويتين جديدتين.

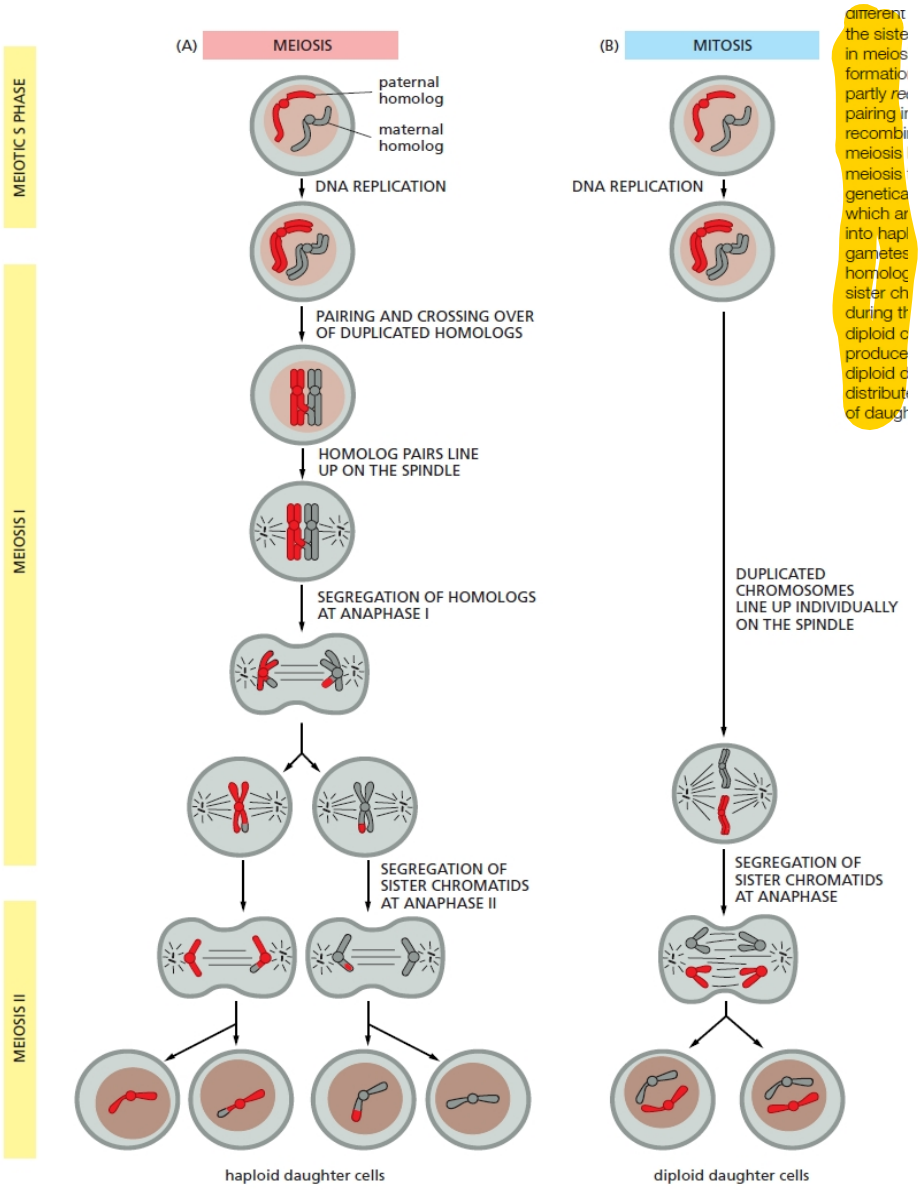
وكما ذكرنا سابقاً فإن فسفرة بروتينات مختلفة من قبل M-cdk في بداية الانقسام الخيطي يعمل على تجمع خيوط المغزل، تكثف الكروموسومات، تحطم الغلاف النووي، لذلك فإن إزالة فسفرة Dephosphorylation نفس تلك البروتينات تعد ضرورياً لإلغاء تجمع خيوط المغزل وإعادة تكون الانوية البنوية في الطور الاستوائي، وتتم هذه الخطوات بشكل أساسي من خلال ازالة نشاط M-cdk عادةً بفعل تحطم السايكلين أو بتنشيط إنزيم الفوسفاتيز Phosohatase أو بكلاهما.

الانقسام الاختزالي Meiosis :

معظم الكائنات حقيقية النواة تتكاثر جنسياً حيث إن الفرد الجديد ينتج من خلط جينوم الأبوين، والفرد الجديد يكون مختلف وراثياً عن أبويه، خلايا هذه الكائنات تكون ثنائية العدد Diploid أي أنها تحوي نسختين مختلفتين "قليلاً" من كل كروموسوم (وتدعى Homologous) كل واحدة قادمة من أحد الأبوين.

التكاثر الجنسي يعتمد على انقسام خلوي متخصص يدعى الانقسام الاختزالي Meiosis وينتج من خلايا تحمل نسخة واحدة فقط من كل كروموسوم (أحادية العدد Haploid)، في العديد من هذه الكائنات فإن الخلايا أحادية العدد تتمايز إلى خلايا جنسية (تكاثرية) متخصصة تدعى الأمشاج Gametes وتشمل الحيامن Sperms والبويضات Ova (مفردها بويضة Ovum)، ومن اتحاد الحيامن والبويضات تتكون البيضة المخصبة Zygote ثنائي العدد Diploid والذي ينمو ليكون كائن جديد.

يبدأ الانقسام الاخزالي بتضاعف الكروموسومات في الطور S، يعقبه دورتين من انعزال الكروموسومات يسميان ؛ الانقسام الاختزالي الأول Meiosis Iو الانقسام الاختزالي الثاني Meiosis II، في الانقسام الاختزالي الأول يتم فصل زوج الكروماتيدات الشقيقة المرتبطة مع بعضهما، أما الانقسام الاختزالي الثاني فانه يشبه الانقسام الخيطي، إذ يتم فصل الكروماتيدين الشقيقين عن بعضهما (الشكل 8-21).

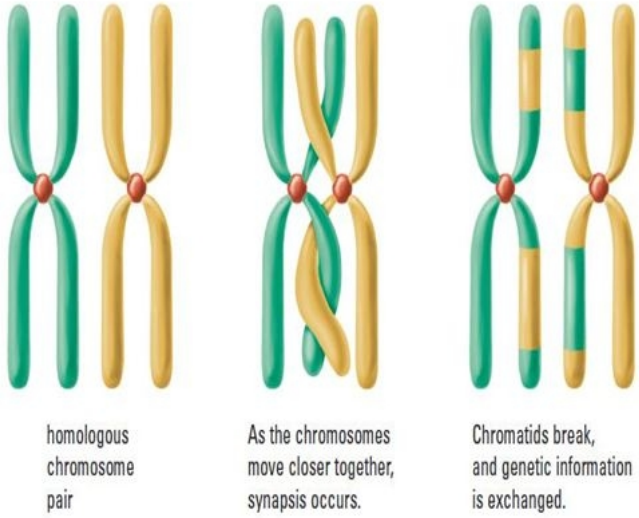


الشكل (8-21) مقارنة بين نوعي الانقسام الخلوي الخيطي والاختزالي.

الانقسام الاختزالي الأول يحل مشكلة كيفية عزل الكروموسومات المتماثلة، وتشبه العملية انفصال الكروماتيدين الشقيقين في الانقسام الخيطي حيث يعتمد فصل الكروموسومات المتماثلة في الانقسام الاختزالي الأول على تكوين ارتباط بين هذه

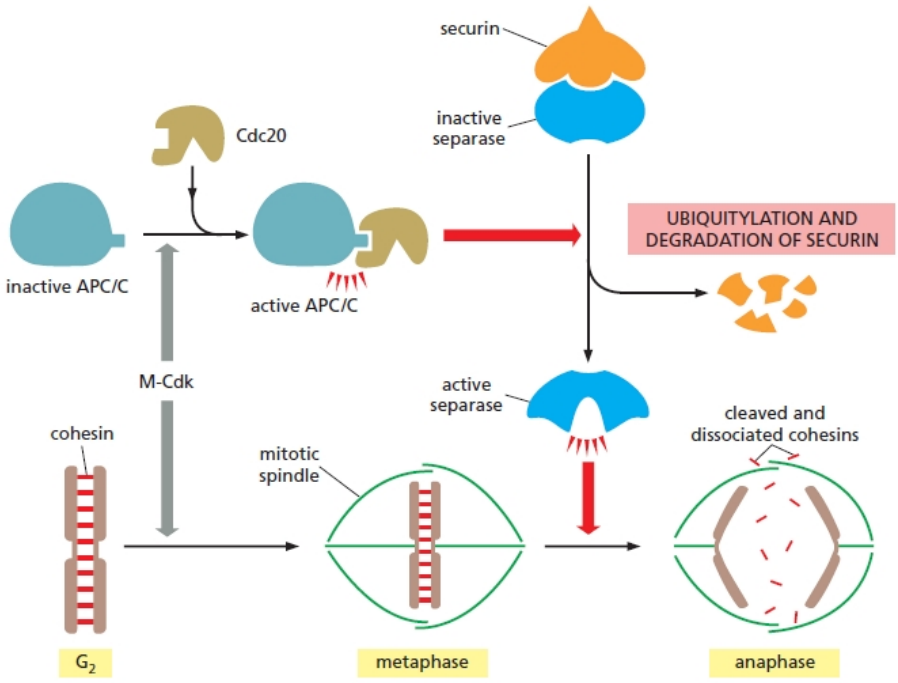
الكروموسومات نفسها، يتكون هذا الارتباط بشكل معقد وبعملية مطولة تبدأ ازدواج الكروموسومات المتماثلة مع بعضهما، ثم يستمران بالاقتراب من بعضهما أكثر بفعل التداخل بين تسلسلات DNA المتممة لبعضها في الكروموسومين المتماثلين.

كما يحصل إعادة اتحاد Recombination بين الكروماتيدين غير الشقيقين في كل زوج متماثل حيث يعاني الحلزون المزدوج لـ DNA من تكسرات في مواقع متعددة في كل كروماتيد شقيق مما ينتج عنه عدد كبير من إعادة اتحاد DNA بين الكروموسومين المتماثلين، بعض هذه الأحداث تكون على شكل تبادل DNA وتدعى العملية بالعبور Crossover حيث أن DNA كروماتيد يعبر ليكون مستمر مع DNA الكروموسوم المتماثل (الشكل 8-22). على الأقل يحدث عبور واحد في كل زوج متماثل وهذا يضمن أن الكروموسومات المتماثلة تكون مرتبطة مع بعضها عند دخول الخلية الانقسام الاختزالي الأول.



الشكل (8-22) عملية العبور بين الكروموسومات المتماثلة

أما فقدان الالتصاق بين أذرع الكروماتيدين الشقيقين فيتم في الطور الانفصالي ويعتمد (في معظم أنواع الخلايا) على تنشيط APC/C والذي يؤدي إلى تحطم السكيورين Securin وتفعيل إنزيم الفصل Separase وبذلك ينفك الالتصاق على طول الأذرع (الشكل 8-23).

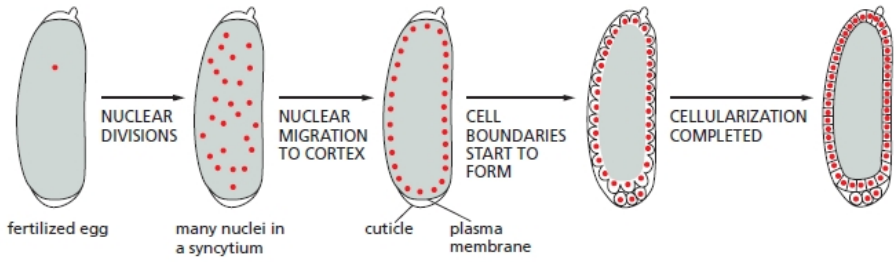


الشكل (23-8) بدأ فصل الكروماتيدين الشقيقين عن طريق APC/C (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

وعلى العكس من الانقسام الخيطي فإن معقد الالتصاق عند الجسيم المركزي يبقى سليماً في الانقسام الخيطي الأول، لأن الكوهيسين في هذه المنطقة يحافظ عليه من فعل انزيم الفصل Separase، لذلك زوج الكروماتيدين الشقيقين مرتبطين عند الجسيم المركزي خلال الانقسام الاختزالي الأول، بينما في مرحلة الانقسام الاختزالي الثاني يتم إزالة الآلية المحافظة على عدم تكسر الكوهيسين، لذلك في الطور الانفصالي المتأخر فإن تنشيط APC/C سوف يحفز تكسر الكوهيسين وبالتالي فصل الكروماتيدين الشقيقين بشكل مشابه لما يحدث في الانقسام الخيطي.

الانقسام السايتوبلازمي Cytokinesis :

وهي الخطوة الأخيرة في دورة الخلية وتمثل انقسام السايتوبلازم، وفي معظم الخلايا فإن الانقسام السايتوبلازمي يرافق الانقسام الخيطي، لكن في بعض الخلايا مثل خلايا الجنين المبكر لذبابة الفاكهة وبعض خلاي الكبد والقلب في اللبائن، تعاني من انقسامات خيطية متعددة دون انقسام السايتوبلازم مما يمنح لهذه الخلايا عدة أنوية، فمثلاً في الخلايا المبكرة لجنين ذبابة الفاكهة يحدث انقسام نووي 13 مرة دون انقسام السايتوبلازم مما ينتج عنه خلية عملاقة تملك عدة آلاف من الأنوية تتموضع بشكل طبقة قرب الغشاء الخلوي وتسمى هذه الخلايا بـ Syncytium، وهذا النوع من الانقسامات يساعد في النمو السريع للخلايا عندما لا تملك الوقت الكافي لإتمام الانقسام السايتوبلازمي لكل انقسام، بعد هذه الانقسامات السريعة والمتعددة للأنوية فإن الخلية تبدأ بتصنيع الغشاء الخلوي حول كل نواة في كل انقسام سايتوبلازمي وبشكل منظم ومتخصص ويسمى ذلك Cellularization حيث يمتد الغشاء الخلوي ويبدأ بالإحاطة بالنواة وبمساعدة حلقة الأكتين-المايوسين (الشكل 8-24).

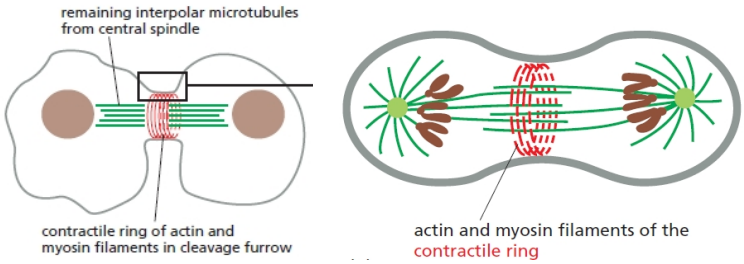


الشكل (8-24) الانقسام الخيطي بدون الانقسام السايتوبلازمي في جنين ذبابة الفاكهة

الانقسام النووي دون الانقسام السايتوبلازمي يحدث أيضاً في بعض خلايا اللبائن مثل خلايا Megakaryocytes التي تنتج الصفيحات الدموية Platelets وكذلك في بعض خلايا الكبد والخلايا العضلية القلبية. معظم هذه الخلايا بعد الانقسام السايتوبلازمي تدخل مرحلة G1 حيث تكون cdk غير فعالة.

ومعظم الخلايا الحيوانية يبدأ فيها الانقسام السايتوبلازمي في الطور الانفصالي وينتهي بفترة قصيرة بعد إكمال الانقسام الخيطي في مرحلة الطور النهائي.

الحدث الأول في الانقسام السايتوبلازمي في الخلايا الحيوانية هو الظهور المفاجئ لثلمة التفلج Cleavage furrow على سطح الخلية، هذه الثلمة أو الحز يزداد عمقاً وينتشر بسرعة حول الخلية إلى أن يشطر الخلية إلى خليتين، وفي معظم الخلايا الحيوانية والعديد من الكائنات حقيقية النواة أحادية الخلية فإن التركيب الذي يقوم بهذه المهمة يدعى بالحلقة المتقلصة (الشكل 8-25).



الشكل (8-25) الانقسام السايتوبلازمي وحلقة التقلص

الانقسام السايتوبلازمي يمكن أن يقسم إلى أربع مراحل هي :

1- البدء Initiation.

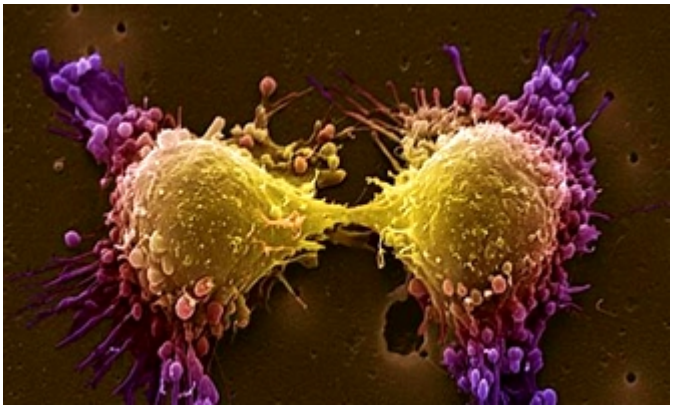
2- التقلص Contraction.

3- حشر الغشاء Membrane insertion.

4- الإنهاء Completion.

إن خيوط الأكتين والمايوسين II يولدان القوة اللازمة لانقسام السايتوبلازم (الشكل السابق). ويتم ذلك بعد انعزال الكروماتيدين الشقيقين عن بعضهما، ومن البروتينات التركيبية والتنظيمية التي تساهم في عمل الأكتين والمايوسن II هي بروتينات الفورمين Formin التي تساعد في تجمع شعاعي متوازي لخيوط الأكتين المستقيمة غير المتفرقة، وبعد الطور الانفصالي فإن تداخل خيوط الأكتين والمايوسين II تتقلص مولدة القوة اللازمة لشطر

السايتوبلازم إلى قسمين، هذه القوة تكون كبيرة نسبياً وهي كافية لثني إبرة زجاجية دقيقة عند حشرها في حلقة التقلص (مختبرياً). ويتغير شكل حلقة التقلص بتقدم دورة الخلية لحين تكون تركيب يدعى الجسيم الوسطي Midbody (الشكل 8-26).



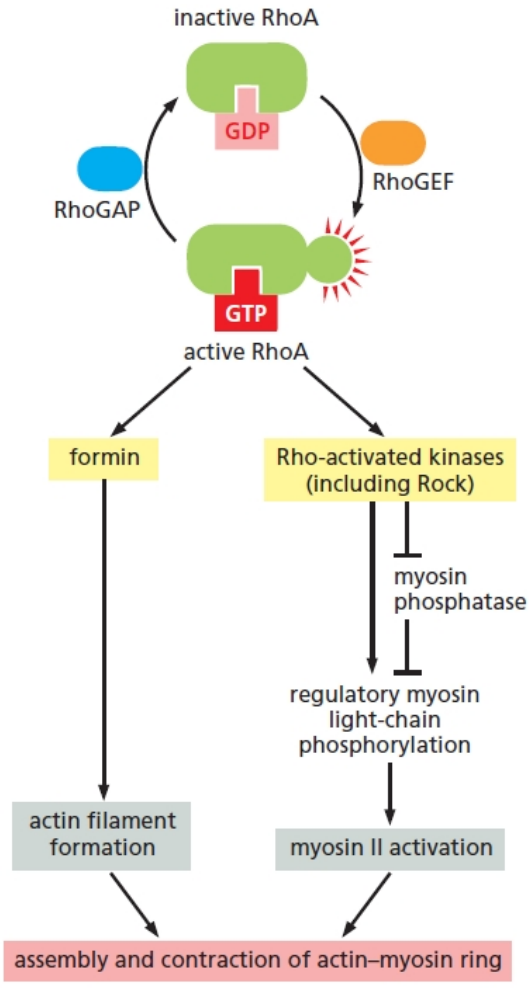
الشكل (8-26) تكون الجسم الوسطي خلال انقسام خلية حيوانية إلى خليتين

بعد انعزال الخليتين البنويتين كلياً عن بعضهما فإن بعض مكونات الجسيم الوسطي يبقى داخل الغشاء الخلوي لكل خلية وربما يلعب دوراً مستقبلياً في توجيه خيوط المغزل والانقسام الخلوي التالي.

والجدير بالذكر أن هناك بروتينات تنظم وتسيطر على الانقسام السايتوبلازمي ومن أهم هذه البروتينات RhoA وهو عبارة عن إنزيم GTPase صغيرة تنتمي إلى مجموعة بروتينات Ras (انظر فصل الإشارات الخلوية)، وتقوم RhoA بالسيطرة على تجمع ووظائف حلقة التقلص في موقع التفلج Cleavage، ويقوم RhoA بتشجيع تكون خيوط الأكتين من خلال تنشيط الفورمين، كما يشجع تجمع وتقلص المايوسين II وذلك عن طريق تنشيط بروتين كاينيز متعدد ومنها ما يسمى Rho-activated kinase rock (الشكل 8-27)، هذا الكاينيز يفسر السلسلة الخفيفة التنظيمية للمايوسين Regulatory myosin light chain (RMLC).

بالرغم من أن انقسام السايتوبلازم يؤدي إلى تكوين خليتين متساويتين في الحجم والمكونات، إلا أن هناك بعض الحالات الاستثنائية حيث يحدث انقسام خلوي يؤدي إلى

خليتين بنويتين تختلفان في الحجم و/ أو المكونات، كما أن الخليتين البنويتين الناتجتين من هذا النوع من الانقسام الخلوي تكون لكل واحدة منهما مصير نمو مختلف، ويلاحظ أن الخلية الأم قبل الانقسام تعاني تغيرات مختلفة منها انعزال مكونات خلوية معينة تدعى محددات مصير الخلية Cell fate determinant إلى أحد جوانب الخلية ثم يحدد مكان الانقسام السايتوبلازمي غير المتساوي،



الشكل (27-8) تنظيم عمل الحلقة المتقلصة من خلال RhoA
(مأخوذ من Alberts et al., 2015).

إذ أن أحد الخليتين البنويتين تحصل على هذه المحددات، ويلاحظ اختلاف في توزيع وحركة خيوط المغزل وكذلك في تموضع أقطاب هذه الخيوط، كما أن عملية انقسام السايتوبلازم غير المتساوي تسيطر عليها بروتينات تنظيمية معقدة.

السيطرة على انقسام ونمو الخلية :

هناك تنوع هائل بين الكائنات الحية وفي جسم الكائن الواحد بين أنواع الخلايا المختلفة، فمثلاً حجم بويضة الإنسان تماثل حجم بويضة الفأرة، بينما هناك اختلاف كبير في الحجم بالنسبة للكائنين البالغين، كذلك ضمن نفس الكائن الحي تكون بعض الخلايا متنوعة جداً ونفس الكلام ينطبق على الأعضاء المكونة لأجسام الحيوانات مثلاً، ومعروف أن حجم العضو أو الكائن الحي يعتمد أساساً على الحجم الكلي للخلايا والذي بدوره يعتمد على كل من العدد الكلي للخلايا وحجم هذه الخلايا، عدد الخلايا بدوره يعتمد على الانقسام الخلوي والموت الخلوي المبرمج، مما سبق يتضح أن الذي يحدد حجم العضو وحجم الكائن الحي هي ثلاث عوامل أساسية :

1- نمو الخلايا Cell growth.
2- انقسام الخلايا Cell division.
3- موت الخلايا Cell death.

كل واحدة من هذه العمليات تنظم بدقة عالية من خلال جزيئات الإشارات الخلوية والأنظمة الداخلية. الجزيئات الخارج خلوية التي تنظم حجم وعدد الخلايا هي عادةً بروتينات ذائبة ترتبط مع مستقبلات على الغشاء الخلوي أو مع مكونات المادة الخارج خلوية ECM، ويمكن أن تقسم هذه الجزيئات إلى ثلاث مجاميع رئيسية :

1- مولدات الانقسام الخيطي Mitogens وتحفز الانقسام الخلوي عادة عن طريق تنشيط G1/S-cdk.
2- عوامل النمو Growth factors وتحفز نمو الخلايا (زيادة كتلة الخلايا Cell mass) بتشجيع تصنيع البروتينات والجزيئات الكبيرة في الخلية وتثبيط تحطمها.
3- عوامل البقاء Survival factors وتحفز بقاء الخلية على قيد الحياة بكبح عملية موت الخلية المبرمج Apoptosis.

محدثات الانقسام الخيطي المحفزة للانقسام الخلوي :

الكائنات وحيدة الخلية (مثل البكتريا) تميل إلى الانقسام والتكاثر بسرعة طالما أن هناك مغذيات في البيئة المحيطة، أما الكائنات متعددة الخلايا فإن خلاياها لا تتكاثر إلا عند الحاجة لذلك، وفي حالة الخلايا الحيوانية فإنها يجب أن تتلقى إشارة من خارج الخلية، عادة محدثات الانقسام الخيطي من الخلايا الأخرى (عادةً المجاورة)، إن مولدات الانقسام الخيطي تحطم آليات إيقاف تقدم دورة الخلية. هناك أكثر من 50 نوع من البروتينات المكتشفة لحد الآن والتي تعمل كمولدات أو محدثات الانقسام الخيطي، معظم هذه البروتينات لها مدى واسع من الخصوصية وتستعمل هذه البروتينات بكثرة في تنمية الخلايا والأنسجة خارج الجسم عند إجراء البحوث.

في معظم الخلايا الحيوانية فإن محدثات الانقسام الخيطي تسيطر على الانقسام الخلوي من خلال مرحلة G1 حيث تعمل على تحطيم الآليات التي تغلق فعالية cdk وبذلك تسمح للخلية بالدخول إلى الطور S. ويتم ذلك من خلال ارتباط محدثات الانقسام الخيطي بمسقبلاتها على الغشاء الخلوي والتي تحفز الإشارات الداخل خلوية ومن أبرز هذه المسارات Ras والتي تنشط مراحل MAPK (لتفاصيل أكثر انظر فصل الإشارات الخلوية).

توقف أو تأخر الانقسام الخلوي :

بغياب إشارة محدث الانقسام الخيطي للتكاثر الخلوي، فإن cdk تكون مثبطة في مرحلة G1 ويتم إيقاف تقدم الخلية إلى دورة خلية جديدة تدعى Go بحيث تبقى الخلية في مرحلة عدم الانقسام والتكاثر ومعظم الخلايا في أجسامنا تكون في حالة Go ولكن التفاصيل الجزيئية الدقيقة تختلف حسب نوع الخلايا، فمثلاً الخلايا العصبية والعضلية الهيكلية تكون في حالة Go متمايزة نهائياً بحيث أن دورة الخلية فيها متوقفة نهائياً وأن الجينات المشفرة لـ cdk والسايكلينات تكون مغلقة بشكل دائمي، ونادراً ما يحدث في هذه الخلايا دورة خلية، باستثناء الخلايا الجذعية العصبية البالغة Adult neural stem cells (ANSC) والخلايا الجذعية العضلية الهيكلية Skeletal muscle stem cells (SMSC) التي ثبت وجودها ضمن أنسجة اللبائن البالغة، ولقد تمكنا في جامعة الموصل من عزل الخلايا الجذعية العصبية من دماغ الفئران البالغة مختبرياً في عام 2012.

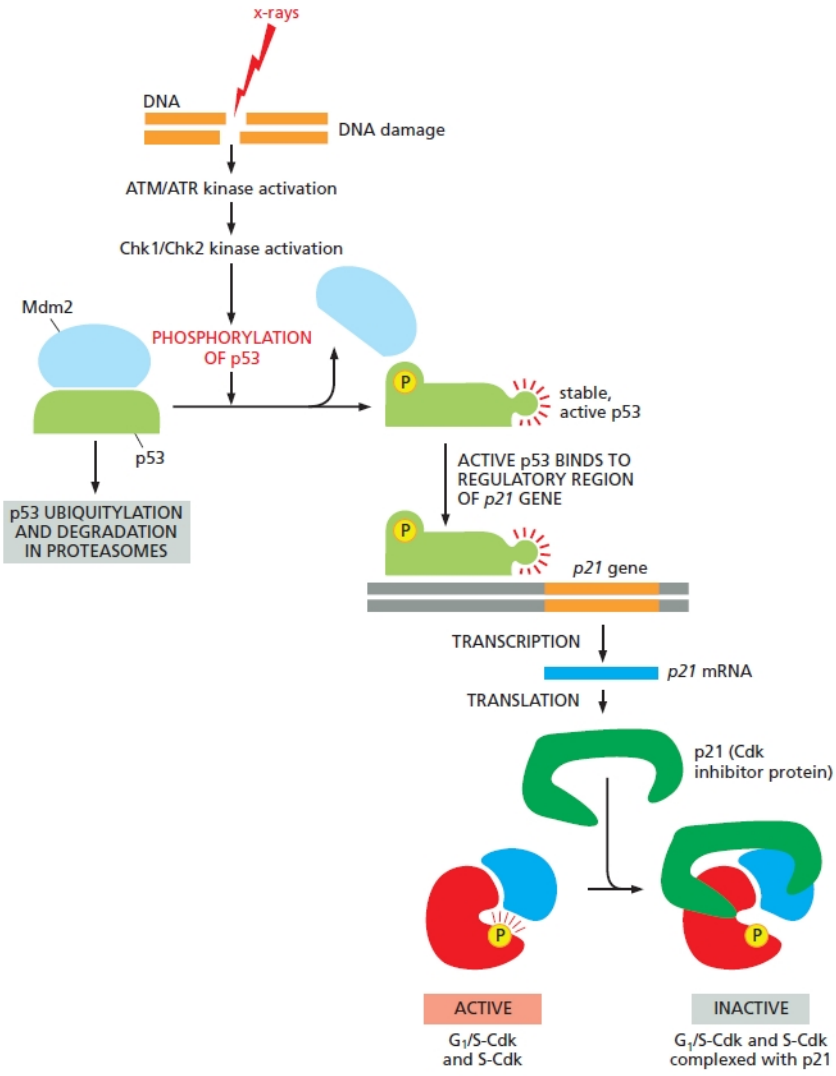
خلايا أخرى تخرج من دورة الخلية بشكل وقتي مع الاحتفاظ بمكونات دورة الخلية حيث بإمكانها العودة إلى دورة الخلية بسهولة وبسرعة، فمثلاً معظم خلايا الكبد تكون في حالة Go، لكنها يمكن أن تدخل في دورة خلية وتبدأ بالانقسام عند إصابة الكبد بالأذى. أما الأورمات الليفية Fibroblasts وبعض الخلايا اللمفية Lymphocytes فإنها تدخل وتخرج من Go بشكل متكرر خلال فترة حياتها، ويذكر أن طول دورة الخلية في الحيوانات البالغة يحدده الوقت الذي تقضيه الخلية في طور G1 و Go، بينما الوقت اللازم لمرور الخلية من بداية طور S مروراً بالانقسام الخيطي، يكون قصير نسبياً (12–24 ساعة) وثابت عادةً.

أذى DNA يوقف دورة الخلية :

التقدم في دورة الخلية لا يسيطر عليه فقط مولدات الانقسام الخيطي بل هناك آليات داخل خلوية وأخرى خارج خلوية تعد ضرورية لإتمام دورة الخلية، ومن أهم هذه المحددات وجود ضرر أو أذى في DNA الذي يمكن أن يحدث بفعل تغيرات كيميائية ذاتية في تركيب DNA، أخطاء في عملية تضاعف DNA، أو التعرض إلى المواد المطفرة، كما تم شرح ذلك بالتفصيل في فصل سابق. ويذكر أن للخلية نقطتي تفتيش تتمكن من خلالهما إيقاف تقدم دورة الخلية عند اكتشاف وجود أذى في DNA، الأولى في نقطة البدء Start في نهاية الطور G1 التي تمنع الدخول في دورة الخلية، والثانية عند G2/M (الشكل 8–10).

أذى DNA يحفز مسار إشارات خلوية من خلال تنشيط بروتين ترنح توسع الشعيرات المطفر Ataxia telangiectasia mutated (atm) و / أو بروتين ترنح توسع الشعيرات–بروتين راد3(atr) Ataxia telangiectasia and Rad3 related protein والتي ترتبط مع مواقع أخرى وتفسفر بروتينات أخرى تؤدي في نهاية المطاف إلى إيقاف دورة الخلية، وأهم هذه البروتينات الهدف هو p53 الذي يحفز تعبير جين هو p21 والذي يشفر لبروتين CKI ويرتبط هذا البروتين مع G1/S-cdk ومعقدات cdk ويثبط فعاليتها وبذلك تساعد في منع الدخول إلى دورة الخلية (الشكل 8–28). أما تحفيز p53 من قبل DNA المتضرر فيكون بشكل غير مباشر، إذ في الحالة السوية فإن p53 تكون غير مستقرة وتوجد بكميات ضئيلة جداً داخل الخلايا، وذلك لتداخلها مع البروتين الشائع المحطم mdm2 الذي عزل من الفئران لأول مرة وهو Mouse double minute 2 homolog (MDM2) ويعمل هذا

البروتين على تكسير p53 بفعل معقدات Proteasomes. وبعد أذى DNA فإن فسفرة p53 يقلل من ارتباطها مع mdm2 مما يقلل من تحطم p53 وبذلك يزداد تركيزه داخل الخلية، كما أن ضعف ارتباط p53 يعزز من نشاطه في تحفيز التعبير الجيني (الشكل 8-28).



الشكل (8-28) آلية إيقاف دورة الخلية بفعل أذى DNA.

الآليات المذكورة أعلاه تعمل في حالة أخرى لإيقاف تقدم الخلية، وذلك عند توقف تقدم شوكة التضاعف لأي سبب كان (مثلاً نفاذ النيوكليوتيدات الحرة اللازمة لبناء DNA الجديد) مما ينشط واحد أو أكثر من الآليات السابقة لمنع محاولة فصل الكروماتيدين الشقيقين عن بعضهما قبل اكتمال تضاعف DNA، ويبقى منع التقدم في دورة الخلية قائماً لحين حل مشكلة التضاعف.

ويذكر أن معظم خلايا الجسم تعاني من بعض المشاكل في مادتها الوراثية (DNA) خلال الانقسامات الخلوية المتكررة، لكن هذه المشاكل تكون طفيفة وغير "محسوسة" للخلية والكائن، ولكن بتقدم الانقسامات الخلوية (تقدم عمر الكائن الحي) تتراكم هذه الأخطاء التي قد تكون على شكل طفرات مشجعة للسرطانات. فمثلاً الطفرات في p53 يحدث في نصف أنواع السرطانات التي تصيب الإنسان، كما أن موت الخلية المبرمج Apoptosis المستحدث بأذى DNA يعتمد على تنشيط p53، لذلك فإن الفعل المنشط لموت الخلية المبرمج الذي يمتلكه p53 يعد مهماً للغاية في المحافظة على أجسامنا ضد السرطانات، وبسبب ذلك يحظى p53 باهتمام الكثير من الباحثين والعلماء.

الإشارات غير الطبيعية للتكاثر الخلوي قد تسبب أنواع من السرطانات :

الجينات المسؤولة عن التشفير لمكونات مسار محدثات الانقسام الخيطي وتسمى بالجينات المسرطنة Oncogenes وسميت بهذا الاسم لأن حدوث طفرات في هذه الجينات تسبب السرطانات، مثل الطفرات في Ras و Myc، ولكن لحسن الحظ عند إحداث فرط تنشيط تجريبي في Ras و Myc في معظم الخلايا الطبيعية، فإن معظم هذه الخلايا تتوقف عن النمو أو تذهب إلى موت الخلية المبرمج، أي أن الخلية الطبيعية بإمكانها اكتشاف تحفيز محدثات الانقسام الخيطي غير الطبيعي ومنع المزيد من التكاثر الخلوي، هذه الاستجابة تمنع استمرارية وتكاثر الخلايا التي تحمل طفرات مشجعة للسرطانات.

العديد من الخلايا لها القابلية على عدد محدد من الانقسامات :

وجد أن معظم خلايا اللبائن لها عدد محدد من الانقسامات قبل أن تتوقف عن الانقسام الخلوي وتدخل مرحلة توقف دورة الخلية الدائمي، فمثلاً الأورمات الليفية Fibroblast

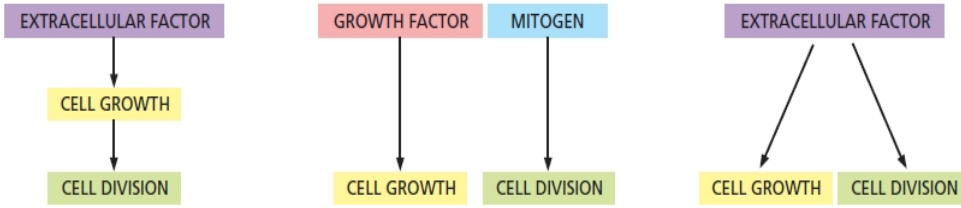
المعزولة من الإنسان تنقسم بحدود 25–50 مرة في وسط زرعي مثالي، بعدها تنخفض قدرتها على الانقسام الخلوي إلى أن تتوقف نهائياً عن الانقسام الخلوي وتدعى الحالة بالشيخوخة التضاعفية للخلية Replicative cell senescence يذكر أن هذه الشيخوخة ليس لها علاقة بشيخوخة الكائن Ageing الذي وضعت عدة فرضيات كأسباب لحدوثه منها تراكم الجذور الحرة في الخلايا، أو تراكم الطفرات في الجينوم بتقدم العمر، أو قصر طول التيلومير Telomeres بتقدم العمر بسبب كثرة تضاعف DNA وسيتم الحديث عن التيلومير والانزيم المصنع له التيلوميريز في فصل مستقل لأهمية الموضوع ولعلاقته بالشيخوخة والسرطانات وأمراض أخرى.

نمو الخلايا :

لو فرضنا استمرار الانقسام الخلوي دون نمو فإن ذلك سيؤدي إلى أن الخلية ستصغر في الحجم عند كل انقسام، لكن الحقيقة أن نمو الخلية يرافق الانقسام الخلوي للمحافظة على حجم الخلايا وبالتالي الكائن. في الكائنات وحيدة الخلايا مثل الخمائر فإن الانقسام الخلوي والنمو الخلوي يحتاجان فقط إلى توافر المغذيات. أما في الحيوانات فإن الخلايا تحتاج جزيئات خارج خلوية تنتج من خلايا أخرى هي محدثات الانقسام الخيطي كي تنقسم، وعوامل النمو Growth factors كي تنمو، عوامل النمو لها مستقبلات على الغشاء الخلوي، ارتباطها بهذه المستقبلات تحفز مسارات داخل خلوية متخصصة تعمل على تحفيز تجمع البروتينات والجزيئات الكبيرة الأخرى وذلك من خلال تحفيز زيادة إنتاجها وتثبيط تحطمها، كما تشجع على أخذ المغذيات وإنتاج الطاقة (ATP).

التنسيق بين الانقسام الخلوي والنمو الخلوي :

انقسام ونمو الخلية يجب أن يكون متوازن ومتناسق وإلا فإن النمو البطء مع وجود الانقسامات سيولد خلايا صغيرة بينما النمو السريع مع وجود الانقسامات الخلوية سيولد خلايا ضخمة. وبالرغم من أن الآلية التفصيلية غير واضحة لهذا التنسيق بين النمو والانقسام إلا أن العلماء يعتقدون وجود آليات متعددة تختلف بين الكائنات وضمن الكائن الحي الواحد بين أنواع الخلايا المختلفة (الشكل 8-29).



الشكل (8-29) آليات التنسيق بين الانقسام الخلوي والنمو الخلوي

هناك بعض الخلايا الحيوانية تكون طبيعياً غير متناسقة في النمو والانقسام، فمثلاً الخلايا العصبية والخلايا العضلية تنمو بشكل كبير بعد خروجها من دورة الخلية بشكل دائمي، وفي المقابل فإن بويضة معظم الحيوانات تستمر في النمو إلى حجم كبير جداً نسبياً دون حدوث أية انقسامات متكررة، ودون حدوث نمو بعد حدوث الإخصاب لهذه البويضة. وأخيراً فإن السيطرة على حجم وعدد الخلايا ضمن النسيج والعضو في الحيوانات يتم من خلال تداخل عوامل معقدة أهمها الخلايا المجاورة والإشارات الناتجة من هذه الخلايا، وكذلك البيئة المحيطة بهذه الخلايا تحدد تمدد هذه الخلايا نمواً وانقساماً، وهناك عوامل أخرى تنظم نمو وانقسام الخلايا حسب الحالة مثل الأورام السرطانية وأنواع الالتهابات ووجود الأذى والهرمونات المتنوعة.

أهم المراجع :

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. **Molecular Biology of the Cell.** 6th Edition. (2015). Garland Science.

David O Morgan. **The Cell Cycle Principles of Control.** (2007). New Science Press Ltd.

De Souza CP, Osmani SA (2007). **"Mitosis, not just open or closed".** *Eukaryotic Cell*. **6** (9): 1521–7.

Lee T; et. al (2002*).* **"Transcriptional Regulatory Networks in Saccharomyces cerevisiae"**. *Science.* **298** (5594): 799–804.

Lilly M, Duronio R (2005). **"New insights into cell cycle control from the Drosophila endocycle"**. *Oncogene.* **24** (17): 2765–75.

Morgan DO. **The Cell Cycle: Principles of Control**. (2007). London: Published by New Science Press in association with Oxford University Press.

Nigg EA (1995). **"Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle".** BioEssays. **17** (6): 471–80.

Norbury C (1995). **"Cdk2 protein kinase (vertebrates)".** In Hardie, D. Grahame; Hanks, Steven. Protein kinase facts Book. Boston: Academic Press.

Orlando DA, Lin CY, Bernard A, Wang JY, Socolar JE, Iversen ES, Hartemink AJ, Haase SB (2008). **"Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators"**. *Nature*. **453** (453): 944–947.

Philipp Kaldis. **Cell Cycle Regulation.** (2006). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Printed in Germany.

Simon I; et. al (2001). **"Serial Regulation of Transcriptional Regulators in the Yeast Cell Cycle".** Cell. **106** (6): 697–708.

Stephen J. Elledge (1996). **"Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis".** *Science*. **274** (5293): 1664–1672.

Ubersax J; et. al (2003). **"Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1"**. *Nature*. **425** (6960): 859–864.

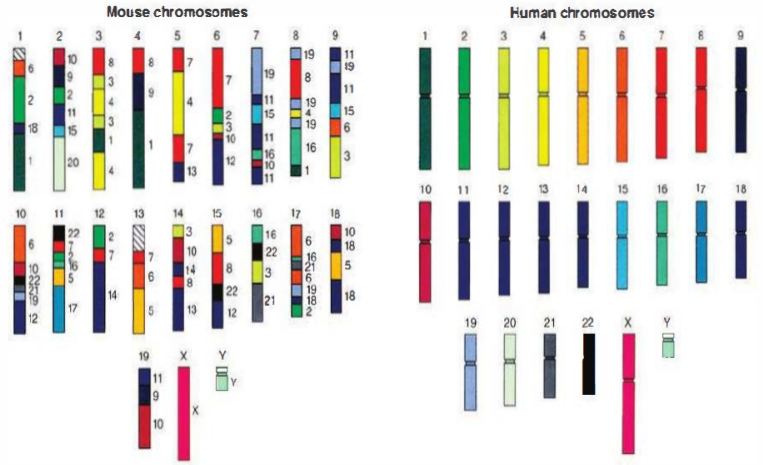
Wang JD, Levin PA (2009). **"Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle".** *Nature Rev. Microbiology*. **7** (11): 822–7.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R **Molecular Biology of the Gene.** 7th ed. (2013). Benjamin Cummings. CSHL Press.

الفصل التاسع

الجينات

Genes



الفصل التاسع

الجينـات
Genes

إن كلمة جين Gene مشتقة من كلمة "Genos" وفي اللغة الاغريقية القديمة تعني الذرية Offspring أو العرق Race.

وأول من أستعمل هذا المصطلح هو عالم النبات الدنماركي Wilhelm Johannsen عام 1909 لوصف الوحدة الوظيفية للوراثة، أو لوصف العوامل الوراثية المسؤولة عن انتقال وتعبير الصفات الحيوية، أما وصف هذه الوحدات الوراثية وكيفية انتقالها فيعود الفضل فيها إلى أبو علم الوراثة كريكور مندل (1822–1884)، وتعد فترة الأربعينات والخمسينات من القرن الماضي هي فترة إيجاد التركيب الكيميائي الدقيق لـ DNA، وتوالت الأبحاث والاكتشافات حول تركيب ووظائف الجينات وصولاً إلى يومنا هذا ولازالت وتيرة الاكتشافات تتسارع بشكل أصبح شبه يومي لكثرة المراكز البحثية والباحثين المهتمين بالجينات مما يوضح أهمية دراسة الجينات وفهم أسرارها في الحالات السوية والمرضية.

بعض التعاريف المهمة التي تخص الجينات :

- **الجين**: وحدة الوراثة التي تحمل المعلومات الوراثية.
- **الجينوم** Genome: هو المادة الوراثية الكاملة للكائن الحي، ويتكون من الجينات المشفرة والمادة الوراثية (DNA و RNA) غير المشفرة.
- **موقع الجين** Gene locus: موقع الجين على الكرموسوم ويشمل أيضاً الوحدات التنظيمية على جانبي تسلسلات الجين. ويستعمل مصطلح موقع الجين للاشارة إلى موقع أي من: الجين، العناصر التنظيمية، منشأ التضاعف...
- **أليل** Allele: تسلسلات متنوعة لنفس الجين مثل: تعدد أشكال أجزاء محددة من DNA وتسمى Restriction fragment length polymorphism (RFLP)، وتنوع تكرار قطع من DNA وتسمى Variable number tandem repeat (VNTR).
- **هيكل القراءة المفتوح** Open reading frame (ORF): قطعة من DNA تشفر لتصنيع بروتين، في البكتريا تمثل الجين، بينما في الخلايا الحقيقية النواة فإن القطع المشفرة (الاكسونات Exons) تفصل عن بعضها بقطع غير مشفرة هي الانترونات Introns.
- **الانترونات** Introns: وتعني التسلسلات المتدخلة Intervening التي تزال خلال معامل mRNA بعملية التضفير (القطع والوصل) Splicing.
- **الاكسونات** Exons: وتعني التسلسلات المعبرة Expressing التي تؤلف mRNA الناضج، وعادة يبدأ الجين وينتهي بالاكسون.
- **السسترون** Cistron: وحدة الوراثة الوظيفية، قطعة من DNA تشفر لمنتج متخصص.
- الجين المنقسم Divided gene: هو الجين الذي تكون اكسوناته في مواقع متباعدة بحيث تترجم بشكل مستقل ثم تربط بعملية خلال القطع والوصل Trans-splicing.
- **الأوبيرون** Operone: موقع ضمن كروموسوم البكتريا يحوي عدة جينات بحيث تعبّر جميعها كنسخة منفردة متعددة السسترون Single polycistronic transcription وكذلك عناصرها التنظيمية العامة.

- **الجين المتقطع** Interrupted gene: هو الجين الحاوي على الانترونات (عادةً في الخلايا حقيقية النواة).
- **وحدة الاستنساخ** Transcription unit: منطقة من DNA تعبر لـ RNA، في الخلايا حقيقية النواة تمثل جين يعبر لتصنيع RNA، أما في البكتريا فربما يكون من ضمن عدة جينات.
- **المنطقة غير المترجمة** Untranslation region (UTR): أي قطعة من وحدة التعبير (RNA) لا تترجم إلى بروتين، وعادة تكون على الجوانب المشفرة للجين.

تعريف الجين :

أبسط تعريف للجين هو وحدة الوراثة التي تحمل المعلومات الوراثية، أو انه تسلسلات من النيوكليوتيدات تشفر لتصنيع متعدد ببتيد أو RNA، وعند الحديث عن الجينات نفضل استعمال مصطلح متعدد ببتيد Polypeptide لأنه متكون من أحماض أمينية مرتبطة مع بعضها بأواصر ببتيدية، بينما مصطلح بروتين فيشير إلى أكثر من سلسلة متعدد ببتيد فضلاً عن وجود جزيئات أخرى (غير بروتينية ضمن تركيبه).

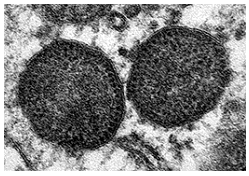
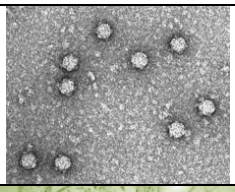
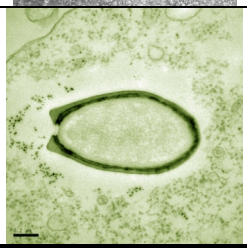
ويحتل الجين موقع معين ضمن الكروموسوم، ويمكن أن يحدث للجين طفرة أو إعادة ارتباط Recombination مع الجينات الأخرى. وجدير بالذكر أن الجين في موقعه لا يمكن أن يفعل أو ينتج أي شيء، بل يقوم فقط بخزن المعلومات على شكل تسلسلات النيوكليوتيدات، وبدون وجود فعل خارجي مؤثر عليه فإن الجين لا يبدأ بأي فعل من تلقاء نفسه.

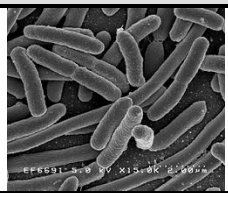
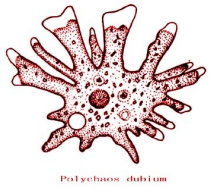
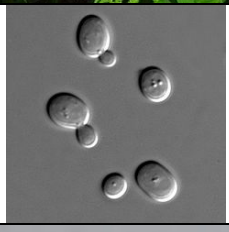
حجم الجين :

هناك عدة طرق لقياس حجم الجين أبسطها الطريقة الحسابية المباشرة بقسمة عدد نيوكليوتيدات كروموسوم معين على عدد الجينات في ذلك الكروموسوم، وعموماً في الكائنات بدائية النواة يكون حجم الجينات صغير نسبياً بحدود 900–1500 زوج من القواعد، أما في الخلايا حقيقية النواة فهناك مدى واسع لحجم الجين يصل إلى عدة مئات من الآلاف من النيوكليوتيدات، كما في بعض جينات الإنسان.

ومن المنطقي أن الكائن الحي كلما كان معقد التركيب شكلياً وفسلجياً سيحتاج إلى المزيد من المعلومات الوراثية، أي المزيد من DNA (أو RNA كما في بعض الفيروسات)، لكن نتائج البحوث تشير إلى أن هذه الفرضية ليست صحيحة دائماً والجدول التالي يوضح بعض الكائنات الحية وطول جزيئة DNA وعدد الجينات فيها. ويلاحظ من الجدول (9-1) وجود تنوع و"مفارقات" في حجم الجينوم وعدد الجينات بين الكائنات الحية المختلفة، ولا زال فهم حدوث هذه الاختلافات مثار جدل بين العلماء المتخصصين بهذا المجال.

الجدول (9-1) أمثلة من كائنات متنوعة على الاختلافات في حجم المادة الوراثية وعدد الجينات

الكائن	حجم المادة الوراثية (DNA أو RNA) (ألف زوج من القواعد)	عدد الجينات	الملاحظات	الشكل التوضيحي
فيروس سيركو الخنزير النوع الاول Porcine circovirus type I	1.8	-	اصغر فيروس يتكاثر داخل الخلايا الحيوانية ويملك أصغر جينوم	
العاثية Ø-X174	4.5	12	أول جينوم تم ايجاد تسلسلاته	
فايروس باندور Pandoravirus salinus	2470	2500	أكبر جينوم فيروسي مكتشف لحد الآن	

الكائن	حجم المادة الوراثية (DNA أو RNA) (ألف زوج من القواعد)	عدد الجينات	الملاحظات	الشكل التوضيحي
الايشيريشيا القولونية E. coli	4600	4288	–	
الأميبيا من نوع Polychaos dubium	670000000 (670 مليار)	–	أكبر جينوم معرف لحد الأن، أكبر بـ 200 مرة من جينوم الانسان	
نبات شجرة الحور Populus trichocarpa	480000	73013	–	
نبات Paris japonica	150000000 (150 مليار)	–	أكبر جينوم نباتي	
فطريات الخميرة Saccharomyces cerevisiae	12100	6294	أول جينوم خلايا حقيقية النواة تم ايجاد تسلسلاته	
ذبابة الفاكهة Drosophila melanogaster	130000	13600	–	

الكائن	حجم المادة الوراثية (DNA أو RNA) (ألف زوج من القواعد)	عدد الجينات	الملاحظات	الشكل التوضيحي
الفئران Mus musculus	2700000	20210	-	
الانسان Homo sapiens	3200000	20000	-	
السمكة من نوع ينفوخ أخضر مسود Tetraodon nigroviridis	390000	-	أصغر جينوم معرف ضمن الفقريات	
السمكة من نوع السمك الرئوي Protopterus aethiopicus	130000000 (130 مليار)		أكبر جينوم معرف ضمن الفقريات	

إن وجود اختلاف أو مفارقات في محتوى DNA الكائن يسمى C-value paradox وتعني أن هناك كائنات متطورة ومعقدة لها محتوى DNA أقل من تلك التي يملكها كائن أقل تطوراً وتعقيداً، فمثلاً C-value للبائن هو بحدود 2–3 بيكوغرام ولكن للبرمائيات فإن المعدل هو 1–100 بيكوغرام، مثال آخر أن خلية نباتات زهرية مثل الزنبق Lily تحوي DNA أكثر من خلية الإنسان.

ويقال أن هذه الكائنات لها DNA أكثر مما تحتاج !! ويكون معظم هذا DNA غير مشفر للبروتين ولا لـ RNA ولا للعوامل التنظيمية، إذا ما فائدتها ؟ لماذا هذه الكائنات لها DNA أكثر مما تحتاج ؟ الإجابة لا زالت غير واضحة وتشبه المفارقة في عدد الكروموسومات بين الكائنات ففي الإنسان عدد الكروموسومات 46 بينما في الكلاب 78 وفي ذبابة الفاكهة 8، وفي البطاطا 48 وفي حيوان السرطان (السلطعون) الناسك Hermit crabs عدد الكروموسومات 250.

ويذكر هنا أن الاختلافات في الجينات يكون على عدة أنواع ومستويات ومنها أن الجينات في الكائنات المتقدمة تتكون من اكسونات قصيرة عادة (تشفر لأقل من 100 حامض أميني) وانترونات قصيرة في الخلايا حقيقية النواة البسيطة، لكنها تكون طويلة (عشرات الآلاف من القواعد المزدوجة) في الخلايا حقيقية النواة المتقدمة. عليه فإن الطول الكلي للجين يحدده عادةً الانترونات وليس الاكسونات، فمثلاً يلاحظ في الخمائر (مثل فطريات الخميرة) أن حوالي 96٪ من الجينات تكون مستمرة (غير متقطعة بالانترونات) وتكون جيناتها مكثفة ونادراً ما نجد جين له أكثر من أربع اكسونات. بينما يلاحظ عكس ذلك في الحشرات واللبائن، إذ نادراً ما نجد جينات غير متقطعة في هذه الكائنات (فقط 4٪ في اللبائن)، كما تمتاز جينات الحشرات بامتلاكها اكسونات قليلة (عادةً أقل من 10 اكسونات)، بينما في اللبائن فإن 50٪ من الجينات لها أكثر من 10 انترونات. ومعدل طول الجين في الخمائر بحدود 1.4 ألف زوج من القواعد بينما معدل طول الجين في الإنسان بحدود 27 ألف زوج من القواعد. وكما ذكرنا سابقاً ففي الكائنات المتقدمة فإن الذي يحدد حجم الجين هي الانترونات وأن الزيادة في حجم الجين تعزى عادةً إلى زيادة طول الانترونات الطويلة ولا تكون النتيجة التشفير لبروتينات كبيرة. لذلك ليس هناك علاقة بين حجم الجين وحجم mRNA في الكائنات المتقدمة، كما أنه لا توجد علاقة بين حجم الجين وعدد الاكسونات، وبشكل عام فإن "معدل" حجم الجين يكون خمسة أضعاف حجم mRNA في كل من اللبائن والحشرات والطيور.

تسمية الجينات :

تأخذ الجينات أسماءها من أنواع الكائنات التي تنتمي إليها وعادة تستعمل حروف مائلة لتسمية الجينات والأليلات والطرز الوراثية و mRNA، بينما تستعمل حروف اعتيادية للبروتينات والطرز المظهرية. المشكلات التي تواجه التسمية حول جين معين له تسمية ما لكن قد تم عزله من عدة أنواع من الكائنات الحية، والمشكلة الأخرى أن الجين الذي تم عزله من قبل عدة باحثين وبعدة طرق وكل باحث أعطى أسم معين لنفس الجين.

وعموماً فإن أسم الجين يتكون من عدة أحرف وأرقام عادةً، وفي بعض الكائنات الشائعة في بحوث البيولوجي الجزيئي مثل ذبابة الفاكهة والايشريشيا القولونية E. coli تستعمل حروف صغيرة للإشارة إلى الجينات المتنحية، وحرف كبير في البداية في الجينات السائدة، في أنواع أخرى مثل جينات الإنسان تكون جميع الحروف كبيرة، والجدول (9-2) التالي يوضح بعض الكائنات الحية وطريقة تسمية الجينات فيها.

المعلومات التي تحملها الجينات والشفرة الوراثية :

المعلومات الوراثية في الخلية توجد بشكل تسلسلات DNA وهنا يجب الانتباه إلى أن المعلومات الوراثية تتمثل في قواعد النيوكليوتيدات وليس في السكر الخماسي أو مجموعة الفوسفات، ويمكن تشبيه المعلومات الوراثية في الخلية باللغة، حيث أن الحروف وتسلسلاتها تكون الكلمات والتي تمثل المعلومات، ترتيب حروف مختلفة يكون كلمات مختلفة بمعاني مختلفة، كذلك الجين يتكون من كلمات حروفها النيوكليوتيدات (أربعة أحرف A و T و G و C) الترتيب المختلف لهذه الحروف يؤلف كلمات مختلفة، في الجينات الكلمات المختلفة تتكون من ثلاث أحرف ليس أقل ولا أكثر ويسمى الشفرة Codon، والجين يقرأ "الجملة أو الجمل" المؤلفة من كلمات كثيرة (شفرات وراثية)، إن المعلومات التي في الجينات (الشفرة) تخبر الخلية؛ إما كيف ترتب الأحماض الأمينية لتكوين أنواع متعددة من متعدد الببتيد، أو كيف ترتب نيوكليوتيدات أخرى لبناء RNA.

الجدول (2-9) تسمية الجينات في الكائنات المختلفة

نوع الكائن	طريقة تسمية الجين
E. coli وباقي انواع البكتريا	ثلاث أحرف صغيرة للاشارة للاوبيرون يليها حرف كبير للاشارة إلى الموقع مثلاً lac operon: المواقع lac A و lac Y و lac Z بينما البروتينات: Lac A و Lac Y و Lac Y
الخمائر	ثلاث حروف تشير إلى وظيفة الجين وعدد يمثل موقع الجين مثلاً جينات خمائر الفطيرة S. cervisiae هي: GAL4 و CDC28 بينما بروتيناتها هي: gal4 و cdc28
دودة C. elegans	ثلاث حروف صغيرة تشير إلى الطراز المظهري تتبعه شخطة ورقم اذا كان هناك أكثر من موقع جيني مثلاً: الجينات: unc-86 و ced-9 وبروتيناتها: UNC-86 و CED-9
ذبابة الفاكهة	الاسم يكون وصف للطراز المظهري المطفر ويمكن أن يكون حروف (من 1-4 أحرف) مثلاً الجينات: الأبيض white (w) وانعدام الذيل tailless (tll) والقنفذ hedgehog (hh) وهكذا...
الفقريات	عادة 1-4 أحرف صغيرة وأرقام تمثل وظيفة الجين مثلاً الجينات: sey و myc بينما البروتينات sey و myc
الانسان	تشابه الفقريات ولكن تستعمل حروف كبيرة مثلاً الجينات: ENO1 و MYC بينما البروتينات ENO1 و MYC

فيما يخص المعلومات التي تشفر خلال تصنيع البروتينات فهناك نوعين من المعلومات :

- الأولى: إن كل ثلاث أحرف من النيوكليوتيدات تمثل حامض أميني معين.
- الثانية: موقع كل حامض أميني ضمن البروتين.

إن نوعي المعلومات أعلاه تحدد التركيب الأولي للبروتين Primary structure وهو الترتيب الخطي للأحماض الأمينية ضمن تركيب البروتين، ويحدد هذا الترتيب في النهاية وظيفة البروتين أو متعدد الببتيد، لأن التركيب الأولي يعد أساساً لتحديد التركيب الثانوي

والثالثي والرابعي، واعتماداً على أنه هل هذه التراكيب صحيحة يحدد هل البروتين فعال أم لا؟

فضلاً عن ما ذكر فإن على جانبي الجين تسلسلات تقوم بوظائف تنظيمية تدعى التسلسلات التنظيمية Regulatory sequence، هذه التسلسلات ليس لها ناتج نهائي وتكون هذه التسلسلات مسؤولة عن إشارات كيميائية تنظيمية، وتختلف هذه الإشارات حسب الظروف الداخلية والخارجية للخلية، كما تقوم بالسيطرة على إنتاج الجين، وهناك أنواع مختلفة ومتنوعة من هذه التسلسلات التنظيمية أهمها :

1- المهدات أو المشجعات Promoters.
2- العاملات Operators.
3- المضعفات (تجعله ضعيفاً) Attenuators.
4- المعززات Enhancers. وسيتم شرح كل واحدة منها بالتفصيل لاحقاً.

أنواع الجينات :

عموماً يمكن تقسيم الجينات إلى مجموعتين هما :

الجينات التركيبية Structural genes :

وهي تلك الجينات التي تشفر لمتعدد ببتيدات أو RNA الأساسية لحياة الخلية مثل الإنزيمات والبروتينات التركيبية والمستقبلات، وتختلف الجينات التركيبية من الفيروسات إلى الخلايا حقيقية النواة حسب ما تحمله من معلومات كما تختلف حسب ثبوتية الجين في الموقع المحدد من DNA، فمثلاً هناك جينات معلوماتها تكون بشكل خيطي متواصل من النيوكليوتيدات كما في الخلايا بدائية النواة.

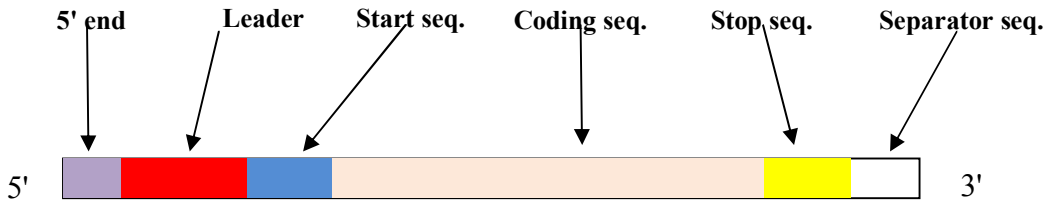
وهناك جينات معلوماتها تكون متقطعة بتسلسلات غير مشفرة من النيوكليوتيدات (الانترونات) كما في كثير من الخلايا حقيقية النواة. نوع ثالث من الجينات التركيبية حيث تؤخذ المعلومات من جينين لتكوين جين ثالث كما في بعض الفيروسات (مثل Ø-X174) وكذلك في بعض خلايا الإنسان، النوع الأخير من الجينات تغير موقعها لمواقع جديدة ضمن الكروموسوم الواحد أو إلى كروموسوم آخر، كما يحدث في بعض الخلايا بدائية وحقيقية النواة.

جينات الخلايا بدائية النواة :

الجينات في معظم الخلايا بدائية النواة تتكون من تسلسلات من النيوكليوتيدات غير المتقطعة بتسلسلات غير مشفرة، مع وجود الاستثناء في بعض الأنواع مثل Eubacteria و Archaebacteria إذ تملك قطع أو تسلسلات غير مشفرة، وعموماً فإن جميع النيوكليوتيدات في الخلايا بدائية النواة تحمل معلومات وراثية تشفر لتصنيع البروتينات و RNA.

وما يميز الجينات التركيبية في الخلايا بدائية النواة أن معظمها تحفز وتعمل بشكل مجاميع Clusters ويدعى ذلك بوحدات الاستنساخ متعددة المجاميع Polycistronic transcription units، أي أن وحدة الاستنساخ تحمل معلومات تشفر لتصنيع أكثر من متعدد ببتيد واحد، وحدة الاستنساخ هي جزيئة mRNA وتتكون من عدة أجزاء تبدأ بالنهاية '5 ثم تسلسلات القائد، تسلسلات البدء، تسلسلات النيوكليوتيدات المشفرة لمتعدد الببتيد، تسلسلات التوقف، وتسلسلات فاصلة (5-20 نيوكليوتيد) تعمل على فصل الجين عن الجين التالي (الشكل 9-1).

جميع هذه التسلسلات تتكرر لكل جين ماعدا تسلسلات القائد فتكون واحدة من هذه التسلسلات لكل وحدة استنساخ متعدد المجاميع، لذلك فإن جزيئة mRNA في الخلايا البدائية النواة تحمل أكثر من رسالة لتكوين أكثر من متعدد ببتيد.



الشكل (9-1) مكونات mRNA

جينات الخلايا حقيقية النواة :

على العكس من الخلايا بدائية النواة، فإن الخلايا حقيقية النواة لها نظام وحدات استنساخ أحادي المجموعة، إذ أن الجينات هنا لا تنشط بشكل مجاميع، بل كل جين يشفر

لوحده. إن mRNA في الخلايا حقيقية النواة يحمل معلومات تشفر لتصنيع متعدد ببتيد واحد فقط. وهناك تشابه في تركيب جينات الخلايا حقيقية النواة من حيث مكوناتها، فضلاً عن وجود مناطق أو تسلسلات غير مشفرة ضمن هذه الجينات لذلك تدعى أحياناً بالجينات المتجزئة Split genes، أي أن أجزاء الجين تكون منتشرة على طول جزيئة DNA، ويلاحظ هنا وجود بعض الحالات الاستثنائية فمثلاً الجين المشفر لبروتينات الهستونات يكون مرزوم أو صلد بينما الجين المشفر للبيتا انترفيرون (البروتين الذي يساعد في الحماية ضد الخمج الفيروسي) فلا يملك تسلسلات غير مشفرة (انترونات) ضمن تركيب الجين.

الاكسونات والانترونات :

في جينات الخلايا حقيقية النواة فإن تسلسلات النيوكليوتيدات التي تشفر للأحماض الأمينية (تسمى أحياناً بالتسلسلات المشفرة) هي الاكسونات Exons، أما القطع أو التسلسلات غير المشفرة فتدعى الانترونات Introns، والجدول (9-3) يوضح بعض جينات الانسان مع حجم الاكسونات والانترونات لكل جين.

الجدول (9-3) بعض جينات الانسان وحجم الاكسون والانترون فيها

ناتج الجين	حجم الاكسون (الف زوج من القواعد)	حجم الانترون (الف زوج من القواعد)	عدد الانترونات
انزيم Adenosine deaminase	1500	30000	11
Apolipoprotein B	14000	29000	28
هرمون الارثروبويتين Erythropoietin	582	31500	5
عامل التخثر الثامن Factor VIII	9000	177000	25
الثايروكلوبيولين Thyroglobulin	8500	40	100000

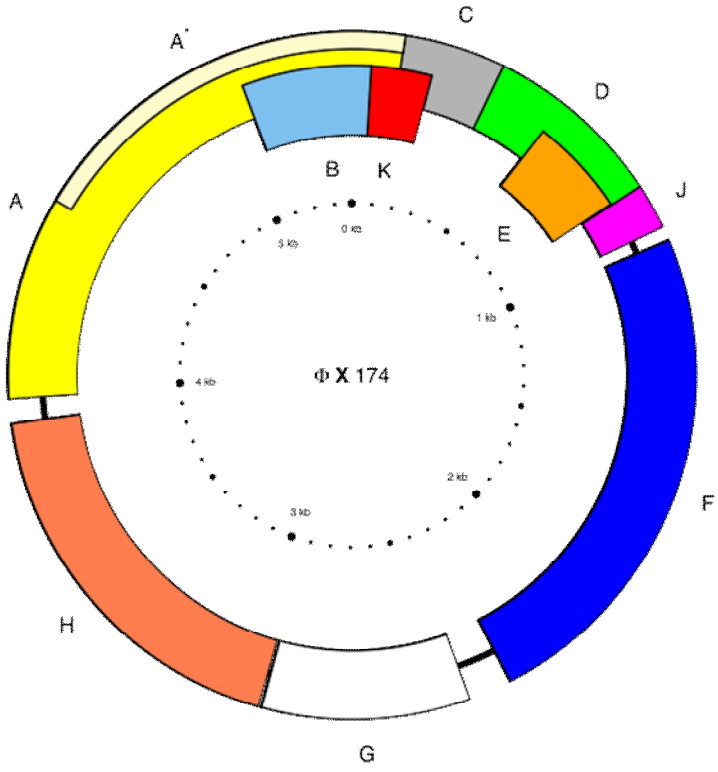
وتختلف الانترونات في الحجم والعدد والموقع وتسلسلات النيوكليوتيدات من جين إلى آخر، وعموماً فإن الطول الكلي للانترونات لجين معين تزيد على الطول الكلي للاكسونات بحدود 2-10 مرات وربما أكثر. ويلاحظ أن حجم الانترونات يزيد بزيادة حجم الجين، كما أن توزيع الانترونات لا يكون بشكل عشوائي ضمن الجين، حيث يلاحظ أنها تقع قريبة من التسلسلات المشفرة للأحماض الأمينية المكونة لمواقع فعّالة وظيفياً أو مهمة تركيبياً ضمن التركيب الجزيئي للبروتين.

كما يلاحظ أنه خلال عملية تصنيع البروتين تتم إزالة الانترونات واعادة ربط الاكسونات بعملية القطع والوصل Splicing خلال معاملة mRNA وسيتم شرح ذلك بالتفصيل لاحقاً.

الجينات المتداخلة :

في الفيروسات الصغيرة جداً مثل Ø-X174 والعاثيات الصغيرة جداً مثل MS2 و F2 و QB وكذلك فيروسات الحيوانات مثل Simian virus 40 (SV40) فإن المادة الوراثية في هذه الكائنات تكون صغيرة جداً ولا تكفي لتمثل كل المعلومات الوراثية اللازمة للتشفير للبروتينات الضرورية لهذه الكائنات، اذ يكون حجم الجينوم في هذه الكائنات أقل من 5400 نيوكليوتيد. فمثلاً Ø-X174 يحتاج 11 بروتين والتي يكون مجموع أحماضها الأمينية بحدود 2300 حامض أميني وبما أن كل حامض أميني يشفر له ثلاث نيوكليوتيدات لذلك فإن طول النيوكليوتيدات يجب أن يكون على الأقل 6900 نيوكليوتيد، ما عدا نيوكليوتيدات البدء والانتهاء والنيوكليوتيدات التنظيمية وما شابه ذلك...

وتتغلب هذه الكائنات على مشكلة الحجم الصغير جداً لمادتها الوراثية عن طريق الجينات المتداخلة Overlapping genes، والشكل (9-2) يوضح جينوم Ø-X174 مبيناً الجينات المتداخلة ضمن جينوم هذا الكائن، حيث يلاحظ أن تسلسلات النيوكليوتيدات لبعض الجينات يكون بالكامل داخل تسلسلات جينات أخرى، مثلاً الجين B يقع ضمن تسلسلات الجين A بينما الجين K يقع ضمن الجينين A و C.



الشكل (2-9) رسم توضيحي لجينوم Ø-X174

وتسمح هذه الآلية بوجود عدد أكبر من الجينات ضمن طول محدد من جزيئة DNA، أي أن الجينات المتداخلة تحتاج طول DNA أقل من تلك المستمرة، والمثير أن الجينات المتداخلة وجدت في الخلايا حقيقية النواة، بل وحتى في الإنسان، فمثلا الجين المسئول عن العامل الثامن Factor VIII (بروتين تخثر الدم) في الإنسان يتواجد على الكروموسوم X وحجمه 186000 زوج من القواعد داخل هذا الجين هناك جين آخر يشفر لبروتين آخر. مثال آخر الجين المشفر لمستقبل هرمون الدرقية بداخل تسلسلات هذا الجين جين آخر له علاقة بجين مستقبل هرمون الدرقية.

ويذكر أن المعلومات لا تتداخل في الجينات المتداخلة، لأن لكل جين تسلسلات بدء خاصة به تميزه عن الجينات الأخرى، ولكن المشكلة عند حدوث طفرة في الجينات المتداخلة فإن كلا الجينين يتأثران وبالتالي يتأثر ناتجهما من RNA أو البروتين.

القطع الوراثية القافزة Transposons :

في الفترة بين 1948–1951 أثبتت رائدة علوم الحياة Barbara McClintock وجود قطع من DNA متحركة أو الجينات القافزة والتي سميت فيما بعد بالقطع الوراثية القافزة الترانسبوسون Transposons. الجينات القافزة موجودة في الخلايا بدائية النواة والخلايا حقيقية النواة مع وجود اختلاف بينهما في تركيب ووظائف هذه الجينات.

الجينات القافزة يمكن أن تسبب تغيرات كثيرة في جينوم الكائن مثل إعادة ترتيب تسلسلات النيوكليوتيدات لأن حركتها يمكن أن تؤدي إلى نشوء تسلسلات جديدة بفعل الحذف أو الإضافة أو تغيير الموقع، كما يمكن أن تسبب الحركة تغيير في وظيفة الجين القافز بعد أن ينتقل إلى موقع فيه تسلسلات تنظيمية جديدة ومختلفة، وهناك أنواع متنوعة من الجينات القافزة أو المتحركة أبسطها تشفر لبروتينات تساعد في حركة هذه الجينات، أما الأكثر تعقيداً ربما تحمل معلومات حول مقاومة الأدوية أو تخمر السكر مثلاً (كما في البكتريا).

معظم الجينات المتحركة تشفر لبروتينات تساهم أو تساعد في حركة هذه الجينات وتسمى هذه البروتينات بـ Transposases وكذلك تشفر لتسلسلات تنظيمية مساعدة. بعض هذه العناصر القافزة يمكن أن تحشر نفسها في كروموسومات جديدة ضمن تسلسلات هدف محددة، البعض الآخر يمكن أن يحشر نفسه ضمن أي من مواقع الأهداف المنتشرة في الكرموسومات، ومن هذه العناصر القافزة في ذبابة الفاكهة عناصر P (P-elements) والتي تسبب العقم في هذه الحشرات. بينما العناصر Ac و Ds في نبات الذرة يمكن أن تغير من فعالية الجينات، ويمكن أن تؤدي إلى اضطرابات في فعالية الجينات المسيطرة على النمو وقد تسبب في نشوء بروتينات غير فعالة حيوياً. ويعتقد بعض العلماء أن العناصر القافزة ربما تلعب دوراً في تطور الكائنات الحية لكن هذه الفرضيات لا زالت مثار جدل إذ لم تثبت صحة هذه الفرضيات من خلال التجارب العملية.

أول ما وجدت القطع الوراثية القافزة كانت في نبات الذرة، إذ أن حوالي 85٪ من جينوم هذا النبات تحوي عناصر وراثية قافزة، أما في البكتريا فيعتقد أن لها دور في المقاومة ضد المضادات الحيوية Antibiotics، إذ يمكن لهذه العناصر القفز من DNA الجينوم إلى DNA البلازميد ثم الرجوع إلى الجينوم، أما في الانسان فإن أكثر أنواع القطع الوراثية القافزة

توجد ضمن تسلسلات ألو Alu sequence، وهي عبارة عن قطع صغيرة من DNA تم التعرف عليها لأول مرة من خلال استخدام النزيمات القاطعة RE المعزولة من Arthrobacter luteus، ويكون طول تسلسلات ألو بحدود 300 نيوكليوتيد وتوجد مكررة بـ 300 ألف – مليون مرة ضمن جينوم الإنسان، وبذلك تشكل 15–17٪ من جينوم الإنسان، وقد تم دراسة هذه التسلسلات بشكل تفصيلي في العديد من الأمراض الوراثية وأنواع السرطانات التي يصاب بها الإنسان.

واعتماداً على آلية حدوث الحركة للقطع الوراثية تقسم إلى عدة أنواع أهمها :

1- النوع الأول:

وهو النوع الذي يعتمد على آلية النسخ واللصق Copy and paste وبذلك فإن حجم الجينوم يكون في توسع وازدياد مستمر بسبب هذه الآلية!! ويتم الاستنساخ على مرحلتين ففي المرحلة الأولى يتم استنساخ قطعة DNA إلى RNA وفي المرحلة الثانية يتم استنساخ RNA إلى DNA بعملية الاستنساخ العكسي Reverse transcription والتي تتم بفعل إنزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcriptase والذي يشفر له قطعة أو جزء من قطعة DNA القافزة نفسها، قطعة DNA القافزة يتم حشرها في موقعها الجديد ضمن الجينوم، لذلك تسمى العملية بالعوامل الوراثية القافزة العكسية Retrotransposons وهي تشبه في خصائصها للفيروسات العكسية Retrovirus (وهي تلك الفايروسات التي تكون مادتها الوراثية RNA وتستعمل إنزيم الاستنساخ العكسي لتصنيع DNA مستعملة مادتها الوراثية (RNA) كقالب) وعموماً يمكن تقسيم العوامل الوراثية القافزة العكسية Retrotransposons إلى ثلاث أنواع أساسية هي :

أ – العوامل الوراثية القافزة التي لها مكررات نهائية طويلة Transposable elements with long terminal repeats (LTRs) وتشفر لإنزيم الاستنساخ العكسي وتشبه الفايروسات العكسية.

ب– العوامل الوراثية القافزة الطويلة النووية المبعثرة Long interspersed nuclear elements (LINEs) وتشفر لإنزيم الاستنساخ العكسي، تفقد LTRs، وتستنسخ من قبل إنزيم البلمرة الثاني RNAPII.

ج- العوامل الوراثية القافزة القصيرة النووية المبعثرة Short interspersed nuclear elements (SINEs) ولا تشفر لإنزيم الاستنساخ العكسي، وتستنسخ من قبل إنزيم البلمرة الثالث RNAPIII.

2- النوع الثاني:

ويسمى بالعوامل الوراثية القافزة DNA (DNA transposons) وتستعمل آلية القطع واللصق Cut and paste أي أن هذه الآلية تحافظ على الحجم الكلي للجينوم (عكس النوع الأول)، كما أن هذا النوع لا يستعمل RNA كوسيط في العملية، وتتم العملية بمساعدة مجموعة من إنزيمات Transposases، بعض هذه الإنزيمات تكون غير متخصصة تقوم بقطع DNA في مواقع عشوائية، والبعض الآخر يكون متخصص بالقطع في مواقع متخصصة.

الجينات التنظيمية Regulatory genes :

هي تلك الجينات التي تشفر لمتعدد ببتيدات تقوم بتنظيم تعبير الجينات التركيبية، وباستثناء الوظيفة فإن الجينات التنظيمية تشبه الجينات التركيبية في كل شيء، هناك مرادفات عديدة للجينات التنظيمية مثل: التسلسلات التنظيمية Regulatory sequences، الوحدات التنظيمية Regulatory units، المناطق التنظيمية Regulatory regions، وحدات السيطرة Control units، تسلسلات السيطرة Control sequences، مناطق السيطرة Control regions، وعموماً يمكن تقسيم الجينات التنظيمية إلى أربعة أنواع هي :

1- الجينات المشجعة Promoters وتتواجد على أحد جانبي الجين التركيبي (حيث تكون باتجاه النهاية '5).

2- الجينات العاملة Operators وتتواجد على أحد جانبي الجين التركيبي (حيث تكون باتجاه النهاية '5).

3- الجينات المضعفة Attenuators (تجعله ضعيفاً) وتتواجد بين التسلسلات التنظيمية (المشجعة-العاملة) وبين الجين التركيبي.

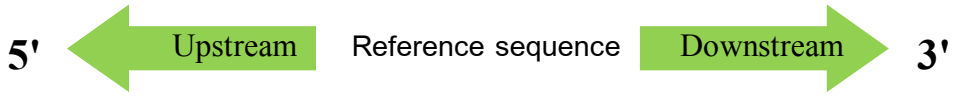
4- الجينات المعززة Enhancers وتتواجد على مسافة معينة من موقع بدء التشفير.

كما لوحظ وجود بعض التسلسلات التنظيمية ضمن الانترونات داخل بعض الجينات

التركيبية. وهنا يجب الانتباه إلى استعمال مصطلحات شائعة عند الحديث عن موقع التسلسلات التنظيمية وهي :

الصعود Upstream: ويعني باتجاه 5' من نقطة البحث أو التسلسل قيد الدراسة.

النزول Downstream: ويعني باتجاه 3' من نقطة البحث أو التسلسل قيد الدراسة. وكما موضح في الشكل (9-3).



الشكل (9-3) اتجاه الصعود والنزول من نقطة البدء

لذلك يمكن أن يقال بأن التسلسلات المشجعة والعاملة تكون باتجاه الصعود لموقع بدء الجين التركيبي، بينما التسلسلات المعززة يمكن أن تكون باتجاه الصعود أو النزول من موقع بدء الجين التركيبي. وتتفاعل التسلسلات التنظيمية الثلاث (ما عدا المضعفة) مع جزيئات بروتينات (أو جزيئات من بروتينات ومركبات غير بروتينية)، بينما التسلسلات المضعفة تتفاعل مع الرايبوسومات، وسيتم شرح كل جزء من الجينات التنظيمية في فصل تنظيم التعبير الجيني.

تركيب الجين في الخلايا حقيقية النواة :

كما ذكرنا سابقاً في البكتريا فإن الجين يشفر لتصنيع عدة بروتينات لذلك يسمى بمتعدد المجاميع Polycistronic، والسسترون هي الوحدة الوراثية المشفرة لتصنيع متعدد ببتيد واحد. بينما معظم جينات الخلايا حقيقية النواة من نوع الأحادي السسترون Monocistronic أي أن كل جزيئة mRNA تشفر لمتعدد ببتيد واحد، هذا الاختلاف ليس فقط في التركيب بل يتعدى إلى عملية الترجمة.

وعلى العكس من جينات البكتريا والخمائر التي تفقد الانترونات، فإن معظم جينات النباتات والحيوانات تملك انترونات والتي تزال عند معاملة RNA داخل النواة قبل انتقالها

إلى السايتوبلازم لعملية الترجمة وتصنيع البروتين، وبالرغم من طول معظم الانترونات بحدود 90 زوج من القواعد فإن معدل طول الانترونات في الإنسان هي بحدود 3.3 زوج من القواعد، ويذكر أن أطول انترون في جينات الإنسان يصل طوله إلى 17106 زوج من القواعد ويقع ضمن جين Titan الذي يشفر لبروتين تركيبي ضمن الخلية العصبية. في المقابل فإن معظم اكسونات جينات الإنسان يكون حجمها بحدود 50–200 زوج من القواعد، والجين النموذجي في الإنسان يكون حجمه حوالي 50000 زوج من القواعد، والمثير أن 95٪ من حجم الجين عبارة عن انترونات وتسلسلات غير مشفرة باتجاهي '5 و '3. ويلاحظ أن هناك العديد من البروتينات الضخمة في الكائنات المتقدمة تشفر من قبل جينات تتكون من اكسونات متشابهة متكررة تفصل عن بعضها بانترونات مختلفة الطول، ومثال على ذلك بروتين الفايبرونكتين Fibronectin أحد مكونات المادة الأساس خارج الخلية (ECM)، حيث يتكون الجين المشفر لهذا البروتين من نسخ متكررة لخمسة أنواع من الاكسونات.

وحديثاُ أكتشف العلماء جينات أطلق عليها تسمية "جينات زومبي Zombie genes" وهي تلك الجينات التي تنشط بعد الموت خلال 48 ساعة تقريباً والسبب في تنشيطها هو تحطم النيوكليوسومات وبذلك ينفك الارتباط بين الهستونات و DNA فتصبح الجينات حرة (غير مغطاة)، بعض هذه الجينات مكبوت منذ الفترة الجنينية (جينات تمايز الخلايا وتكوين الأعضاء Organogenesis genes) والبعض من هذه الجينات مكونة للسرطانات Oncogenes، لذلك يلاحظ زيادة كبيرة في معدل سرطان الكبد في المرضى بعد عمليات نقل وزراعة الكبد Liver transplantation من أشخاص بعد موتهم (التبرع بالأعضاء بعد الموت السريري).

أنواع جينات الخلايا حقيقية النواة :

هناك أنواع متعددة من جينات الكائنات حقيقية النواة ومن هذه الجينات :

1- **الجينات المفردة** Solitary genes: في الكائنات حقيقية النواة فإن 20–25٪ من الجينات المشفرة للبروتينات توجد بشكل منفرد في الجينوم أحادي العدد Haploid genome لذلك سميت بالجينات المنفردة، ومن الأمثلة الشهيرة لهذا النوع من الجينات هو جين

لايزوزايم الدجاج Chicken lysozyme gene، وهو عبارة عن قطعة DNA بطول 15 ألف زوج من القواعد تتكون من منطقة تشفير بسيطة هي أربع اكسونات فضلاً عن ثلاث من الانترونات، والمناطق الجانبية تمتد صعوداً ونزولاً بحدود 20 ألف زوج من القواعد.

2- **الجينات المزدوجة** Duplicated genes: وتمثل نوع آخر من الجينات المشفرة للبروتينات، وتوجد هذه الجينات قريبة من بعضها لكنها تكون غير متماثلة وتبتعد أحدهما عن الأخرى بحدود 5–50 ألف زوج من القواعد، ومجموعة الجينات المزدوجة التي تشفر لبروتينات متشابهة ولكن غير متماثلة في تسلسلات الأحماض الأمينية تدعى بعائلة الجين Gene family، وتشفر لبروتينات ذات صلة وثيقة مع بعضها والتي تدعى بعائلة البروتين Protein family، ومن أمثلة ذلك عائلة البروتين كاينيز، والكلوبيولينات المناعية في الفقريات، ومستقبلات الشم، وتضم كل عائلة مئات–آلاف الأنواع من البروتينات. عوائل بروتينية أخرى تضم عدة بروتينات–30 بروتين في كل عائلة مثل بروتينات الخلايا العضلية الهيكلية، السلسلة الثقيلة للمايوسين.

كيف نشأت الانترونات :

من الأسئلة التي لا زالت مثار جدل بين العلماء هل أن الجينات نشأت تسلسلات متقطعة (بالانترونات) أم أنها كانت غير متقطعة في بداية نشوئها. وهناك مدرستان تطرح كل واحدة منهما نموذج للإجابة على السؤال أعلاه :

1- نموذج الانترون المبكر "Introns early" وتذهب إلى أن الجينات منذ نشوئها كانت تحوي الانترونات في تركيبها، أما الجينات التي لم تحوي الانترونات فإنها فقدتها خلال التطور.

2- نموذج الانترون المتاخر "Introns late" ويرى أصحاب هذا النموذج أن وحدات تشفير البروتينات (الاكسونات) الأصلية عند نشوئها كانت عبارة عن تسلسلات DNA غير متقطعة، وأن الانترونات حشرت فيها فيما بعد.

ومما يزيد من تعقيد الفرضيتين أعلاه، هل أن الاختلاف بين جينات الخلايا بدائية النواة وحقيقية النواة كان لها دور في بقاء الانترونات في الخلايا حقيقية النواة وفقدانها من الخلايا بدائية النواة ؟

ونموذج الانترون المبكر يفترض أن تركيب الجينات بهذا الشكل (أي وجود الانترونات والاكسونات) هي بقايا قديمة لعملية إعادة بناء الجينات لصنع بروتين معين، كما يفترض مناصروا هذا الرأي أن الخلايا في القدم كان لها تسلسلات مستقلة مشفرة للبروتينات، وخلال تطورها قامت بالتعرف على تسلسلات معينة تشفر لمتعدد ببتيدات مختلفة وتقريبها من بعضها لتصنيع بروتينات جديدة.

الأكسونات ووظائف البروتينات :

يلاحظ في تركيب الجينات أن هناك محافظة على هذه الجينات حتى بين أنواع متباعدة من الكائنات، كما أن الاكسونات المرتبطة أو المتقاربة مع بعضها يمكن إيجادها في جينات مختلفة. والعلاقة بين تركيب الجين ووظائف البروتين واضحة وقد درست بشكل تفصيلي في الأجسام المضادة (الكلوبيولينات المناعية)، إذ يشفر لهذه البروتينات من خلال جينات لها اكسونات، كل اكسون مسؤول عن منطقة من البروتين ولها وظيفة متخصصة، فمثلاً يتكون الكلوبيولين المناعي من أربع أجزاء Tetramer أو سلاسل هي سلسلتين خفيفتين وسلسلتين ثقيلتين ويختلفان عن بعضهما في التركيب والوظيفة، وهناك أنواع متعددة من السلاسل الثقيلة، كل نوع يشفر له جين يتكون من مجموعة اكسونات تختلف حسب تركيب البروتين في هذه السلاسل (وبالتالي حسب الوظيفة المتخصصة لكل سلسلة).

في حالات كثيرة تكون اكسونات الجين متخصصة لوظيفة معينة، فمثلاً للبروتينات الإفرازية فإن الاكسون الأول يشفر للنهاية N لمتعدد الببتيد والذي يتخصص كتسلسل إشارة يساهم في الإفراز خلال الغشاء الخلوي كما هو الحال مع هرمون الانسولين.

ويكون حجم الاكسون عادةً صغيراً ويكافئ حجم سلسلة متعدد الببتيد الذي يشفر له (بحدود 20–40 حامض أميني)، إذ يتكون البروتين من أجزاء كثيرة من متعدد الببتيد، وهنا يجب التذكير إلى أنه ليس كل متعدد ببتيد مشفر من قبل اكسون واحد له وظيفة متخصصة،

بل يمكن أن تتآزر عدد من متعدد الببتيدات لانجاز وظيفة متخصصة. كما يلاحظ أن عدد الاكسونات المشفرة لمتعدد الببتيد يزداد كلما زاد حجم البروتين كما هو الحال مع البروتينات متعددة الوظائف.

عوائل الجينات :

العديد من الجينات في جينوم الكائنات حقيقية النواة المتقدمة تكون على علاقة مع باقي الجينات في نفس الجينوم. لذلك يمكن تعريف عائلة الجين Gene family بأنها مجموعة من الجينات التي تشفر لبروتينات متماثلة أو مرتبطة مع بعضها. وتنشأ هذه العوائل عادةً عند حدوث ازدواج للجين Gene duplication، إذ تكون الجينات المزدوجة في البداية متماثلة تماماً ولكن بمرور الزمن يبدأ ظهور الاختلاف بينهما بفعل تراكم الطفرات، زيادة الجينات المزدوجة وزيادة الاختلاف بينهما يعمل على زيادة حجم العائلة، ومن الأمثلة الممتازة لعائلة الجين هي بروتينات الكلوبين، إذ يمكن تقسيم عائلة جينات الكلوبين إلى نوعين رئيسيين هما الفا-كلوبين و بيتا-كلوبين، وجميع أعضاء هذه العائلة لها تركيب أساسي متماثل ووظائف متشابهة، وذهب بعض الباحثين إلى أبعد من ذلك فجمعوا عوائل جينات متشابهة لها أصل مشترك فيما يسمى بفوق العائلة Superfamily. وجينات كل من ألفا-كلوبين وبيتا-كلوبين لها ثلاث اكسونات، واثنان من الانترونات تقع في مواقع ثابتة من تسلسلات التشفير، الاكسون المركزي يشفر لقطعة البروتين المسؤولة عن الارتباط مع الحديد ضمن سلسلة الكلوبين.

وبالعودة إلى مثالنا السابق الكلوبين، يلاحظ وجود علاقة بين جينات في كائنات بعيدة عن بعضها تصنيفيا، فمثلاً المايوكلوبين هو بروتين احادي الوحدة Monomer يرتبط مع الأوكسجين في الحيوانات، تسلسلات الأحماض الأمينية للمايوكلوبين تشير إلى الأصل المشترك مع وحدات الكلوبين. أما "هيموكلوبين البقوليات Leghemoglobin" فهو بروتين نباتي يرتبط مع الأوكسجين ويتواجد في البقوليات ويشبه المايوكلوبين في كونه احادي الوحدة Monomer، ويكون مشابه في التركيب مع باقي البروتينات المرتبطة بالحديد. هذه البروتينات (الكلوبين، المايوكلوبين، هيموكلوبين البقوليات) تكون فوق عائلة، ولها عوائل من جينات تنتمي إلى أصل مشترك واحد.

مثال آخر للجينات المتماثلة المختلفة في التركيب بين الأنواع هو الجين المسئول عن التشفير لهرمون الأنسولين، إذ في اللبائن والطيور هناك جين واحد فقط يشفر لهرمون الأنسولين بينما القوارض لها اثنين من الجينات التي تشفر لهذا الهرمون، وفي الدواجن مثلاً فإن هذا الجين له اثنان من الانترونات، ويماثل هذا الجين أحد جيني الأنسولين في الجرذان، أما جين الأنسولين الآخر للجرذان فله انترون واحد فقط.

جينات أخرى تظهر المزيد من الاختلافات بين الأنواع المختلفة من الكائنات ربما بسبب اضافة أو حذف للانترونات، ومن أمثلة ذلك جينات الأكتين، إذ أن الجين المثالي للأكتين له تركيب يتكون من منطقة قائد Leader غير مشفر (أقل من 100 نيوكليوتيد) ثم منطقة مشفرة (بحدود 1200 نيوكليوتيد) تليها منطقة حامل Trailer (بحدود 200 نيوكليوتيد). معظم جينات الأكتين تكون متقطعة بالانترون، ويختلف عدد وموقع هذه الانترونات بين الكائنات المختلفة، إذ يمكن أن تقع الانترونات في 19 موقع مختلف، ولا يملك جين الأكتين في أي نوع من الكائنات أكثر من 6 انترونات، بل بعض هذه الجينات لها انترون واحد فقط، والمثير في تغير موقع الانترون هو هل يؤثر ذلك على الاكسونات المجاورة لها ؟

ومن الأمثلة لفوق العائلة الجينية هي الصنف الأول والثاني من التطابق النسجي Major histocompatibility (MHC I and II) والتي تمثل مواقع التعرف، والنوع الثالث (MHC III) والتي تمثل مكونات المتمم، والأنواع الخمسة من الأجسام المضادة، ومستقبلات الخلايا التائية T cells، وكذلك CD4 المتواجدة على الخلايا التائية المساعدة T helpers و CD8 المتواجدة على الخلايا التائية الكابحة T suppressors.

خلال تكون ونمو الكائنات الحية متعددة الخلايا مثل الحيوانات يجب أن تتمايز الخلية الواحدة (البيضة المخصبة) إلى أنواع مختلفة من الخلايا (أكثر من 200 نوع من الخلايا في الإنسان) وتختلف هذه الخلايا عن بعضها في الشكل والحجم والوظيفة والنقطة الأهم هنا هو دقة التوقيت Timing، أي التمايز إلى الخلية المعينة في الوقت الدقيق لتكون تلك الخلايا وبالتالي ذلك النسيج، ويعتقد العلماء أنه يتم إطفاء استنساخ جميع الجينات في الخلية عند التمايز عدا الجينات المحددة لنوع الخلية، فمثلاً لو كان المطلوب أن تتمايز الخلية إلى خلية عصبية فيتم إطفاء جميع الجينات ضمن الجينوم وتبقى فقط الجينات التي تعبر لتمايز الخلية إلى

خلية عصبية وهكذا مع باقي أنواع الخلايا، والسؤال الذي يتباذر للذهن هنا ما الذي يسيطر على الخلية ويوجهها لتتمايز إلى ذلك النوع من الخلايا ؟ هناك فرضيتان للإجابة على السؤال السابق ؛ الفرضية الأولى تذهب إلى أن أجزاء من الجينوم (جينات معينة) تسيطر على التمايز في الخلايا خلال النشوء والنمو، أما الفرضية الثانية فتقترح أن الخلايا المجاورة للخلية التي ستتمايز هي التي تسيطر وتنظم التمايز من خلال الإشارات الخلوية، ونحن نميل إلى اقتراح فرضية ثالثة تمزج بين الفرضيتين أعلاه.

عندما تنمو أعضاء أو أجزاء الجسم بشكل صحيح ولكن في الموقع الخاطئ فإن الجينات المسؤولة عن ذلك تدعى Homeotic genes، كما هو الحال في نمو أرجل ذبابة الفاكهة على الرأس، وفي بداية الثمانينات من القرن الماضي تم التعرف على عدد من هذه الجينات ودراسة تسلسلاتها، والمثير أنه تم ايجاد تسلسلات بحدود 180 زوج من القواعد تكون متماثلة في معظم هذه الجينات، هذه التسلسلات سيمت بالجينات متماثلة المحتوى Homeobox genes، هذه 180 زوج من القواعد تشفر لـ 60 حامض أميني ضمن ناتج بروتيني، ويسمى هذا الجزء المكون من 60 حامض أميني بالأجزاء المتماثلة Homeodomain للبروتين، هذه الأجزاء ترتبط مع الحيز الكبير لـ DNA وبذلك تنظم عملية التعبير الجيني. والمثير أن هذه التسلسلات المتماثلة وجدت في كثير من الكائنات مثل الفطريات والبرمائيات والنباتات وحتى الانسان، وفي الفقريات توجد هذه التسلسلات في أربع مجاميع وتسمى جينات هوكس Hox genes (مأخوذة من Homeobox) وتقع هذه المجاميع في الفئران على الكرموسومات 2، 6، 11، 15 بينما في الانسان تقع على الكرموسومات 2، 7، 12، 17، وتملك بعض الفقريات أكثر من ثمان مجاميع من هذه التسلسلات.

وظيفة نواتج الجينات متماثلة المحتوى هي السيطرة على التعبير الجيني للجينات الأخرى، وهي عادة تزيد من التعبير الجيني للجينات الهدف. وخلال النمو الجنيني للكائن فإن البروتينات متماثلة المحتوى تنتج بنسب مختلفة وفي أوقات مختلفة بفعل استجابة جيناتها للاشارات المختلفة في كل فترة زمنية.

بعض تسلسلات DNA تشفر لأكثر من بروتين :

بالرغم من أن معظم الجينات تتكون من تسلسلات DNA تشفر لبرويتن واحد (مع ملاحظة التسلسلات على طرفي أو جهتي الجين وكذلك الانترونات)، لكن هناك بعض الحالات التي يشفر فيها جين معين لأكثر من بروتين، وهناك نوعين رئيسيين من هذه الجينات هما: الجينات المتداخلة Overlapping genes (التي تم شرحها سابقاً)، وعملية القطع والوصل البديل Alternative splicing، وسيتم الحديث عنها في فصل تنظيم التعبير الجيني.

الجينات المشفرة لغير البروتينات :

فضلاً عن الجينات المشفرة لكل من RNA الناقل (tRNA) والرايبوسومي (rRNA)، فإن هناك مئات الجينات الأخرى التي تشفر لـ RNA لا تدخل في تشفير أو تصنيع البروتينات، بعض هذه RNA معروفة الوظائف والبعض الآخر لا زال قيد الدراسة والبحث، والجدول (9-4) التالي يوضح أهم هذه الأنواع وعدد الجينات المشفرة لكل واحدة منها وأبرز وظائفها.

جينات العضيات الخلوية :

بالرغم من أن معظم المادة الوراثية (DNA) للخلايا حقيقية النواة توجد داخل النواة إلا أن هناك كمية من DNA داخل مايتوكوندريا خلايا الحيوانات، الفطريات، والنباتات وكذلك في البلاستيدات الخضر Chloroplasts للخلايا النباتية، هذه العضيات هي مركز تصنيع ATP من خلال الفسفرة التأكسدية في المايتوكوندريا والتصنيع الضوئي في البلاستيدات الخضر، وتذهب نظريات عدة للتطور إلى أن هذه العضيات عبارة عن تطور لبكتريا دخلت هذه الخلايا منذ أزمان سحيقة، إلا أن DNA هذه العضيات لا تحوي الجينات الضرورية المشفرة لتصنيع البروتينات، النيوكليوتيدات، والشحوم والأحماض الأمينية، بل تشفر فقط للبروتينات الضرورية لوظائف هذه العضيات في الخلايا حقيقية النواة. لذلك يقال أن الخلايا حقيقية النواة لها نظام جيني أساسي في النواة ونظام جيني ثانوي في العضيات.

يمكن مشاهدة DNA المايتوكوندريا (mtDNA) تحت المجهر المتألق Fluorescent microscope، وتقع إلى داخل المايتوكوندريا، وعن طريق استخدام تقنية مجهر تصوير الأحداث ببطء ثم عرضها بسرعة Timelapse microscope technique وجد أن تضاعف

mtDNA يكون خلال الطور البيني، وخلال الانقسام الخيطي فإن كل خلية بنوية تستلم عدد متساوي تقريباً من المايتوكوندريا كما وجد أن كل مايتوكوندريا تحوي العديد من جزيئات mtDNA لذلك فإن الحجم الكلي لـ mtDNA داخل الخلية يعتمد على عدد المايتوكوندريا، عدد جزيئات mtDNA داخل كل مايتوكوندريا، وحجم mtDNA نفسه، وكل واحدة من هذه المتغيرات تختلف من خلية إلى أخرى وبين أنواع الخلايا.

الجدول (4-9) أنواع RNA المعروفة لحد الآن التي لا تدخل في تشفير البروتين ووظائفها

نوع RNA	عدد الجينات في جينوم الانسان بشكل تقريبي	الوظيفة
snRNAs	80	عملية القطع والوصل البديل
U7 snRNA	1	معاملة الهستون '3 mRNA
snoRNA	85	معاملة وتحويرات rRNA
miRNA	1000	تنظيم التعبير الجيني
Xist	1	إزالة فعالية الكروموسوم X
7SK	1	تنظيم الاستنساخ
RNAse P	1	معاملة '5 tRNA
7SL RNA	3	إفراز البروتين (مكونات جزيئات التعرف على الإشارات SRP)
RNAse MRP	1	معاملة rRNA
Telomerase RNA	1	قالب لإضافة الجسيمات الطرفية Telomeres
Vault RNA	3	من مكونات بروتينات الريبونيوكليوتيد RNPs ووظيفته لا زالت مجهولة
hY1, hY3, hY4, hY5	30	من مكونات بروتينات الريبونيوكليوتيد RNPs ووظيفته لا زالت مجهولة
H19	1	غير معروف

mtDNA يتوارث سايتوبلازمياً :

من دراسة الخلايا حقيقية أحادية النواة (مثل الخمائر) وجد أن mtDNA تتوارث سايتوبلازمياً لذلك يجب أن تملك نظامها الجيني الضروري لتوارثها إلى الخلايا البنوية، وفي خلايا الفطريات ثنائية العدد التي تتكاثر "بالتزواج" فإن الخلية الأبوية والخلية الأمية يساهم كل منهما في نصف كمية المايتوكوندريا وبالتالي نصف mtDNA للخلية البنوية، لذلك يسمى بالوراثة ثنائية الأبوية. أما في اللبائن فإن النطف تساهم بكميات ضئيلة جداً في تكوين سايتوبلازم البيضة المخصبة، لذلك فإن معظم أو كل المايتوكوندريا (وبالتالي mtDNA) للجنين تؤخذ من البويضة (الأم) وليس النطفة (الأب)، وفي دراسة في الفئران وجد أن 99.99٪ من mtDNA تتوارث أمياً وفقط 0.01٪ تتوارث أبوياً، ويسمى ذلك بالوراثة الأمية Maternal inheritance.

ومن المثير أن حجم mtDNA وعدد ونوع البروتينات التي تشفر لها لا تختلف بين أنواع الكائنات المختلفة، إذ وجد أن mtDNA لمعظم الحيوانات متعددة الخلايا تكون على شكل جزيئة حلقية وبحجم 16 ألف زوج من القواعد، وتحوي جيناتها أقل كمية من الانترونات في الحلزون المزدوج لـ mtDNA. ويشفر mtDNA في الفقريات لـ :

1- أثنين من RNA الرايبوسومي التي تتواجد في رايبوسومات المايتوكوندريا.
2- اثنان وعشرون نوع من RNA الناقل التي تدخل في عملية الترجمة.
3- ثلاثة عشر بروتين تستعمل في نقل الالكترون وتصنيع ATP.

وجميع البروتينات التي تشفر لها جينات mtDNA يتم تصنيعها في رايبوسومات المايتوكوندريا.

ويختلف الأمر في النباتات إذ أن mtDNA يكون كبير الحجم ومعظمه لا يشفر لتصنيع البروتينات، معظم mtDNA في كثير من النباتات يتكون من انترون طويل، جينات كاذبة، عناصر قافزة، وقطع من DNA غريبة. كما أن التسلسلات المزدوجة تشكل حجم كبير من mtDNA في النباتات، ويذكر أن الشفرة الوراثية لـ mtDNA تختلف عن الشفرة الوراثية القياسية للنواة فمثلاً UGA هو شفرة توقف في النواة، بينما في mtDNA الإنسان والفطريات

تشفر للحامض الأميني التربتوفان، أما في mtDNA النباتات فتقرأ UGA كشفرة توقف.

وأخيراً فإن حدوث طفرات في mtDNA يسبب أمراض في الإنسان والحيوان وشدة هذه الأمراض تعتمد على طبيعة وحجم هذه الطفرات، وتذهب البحوث الحديثة إلى وجود علاقة بين تراكم طفرات mtDNA والشيخوخة في اللبائن.

أهم المراجع :

Anderson, S.; Bankier, A. T.; Barrell, B. G.; et al. (1981). **"Sequence and organization of the human mitochondrial genome"**. *Nature.* 290 (5806): 457–465.

Benjamin A. Pierce. **Genetics: A Conceptual Approach.** 5th ed. (2013). W. H. Freeman.

Cammack R. **Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology.** 2nd ed. (2006). Oxford University Press.

Cornel Mulhardt. **Molecular Biology and Genomics.** (2007). Translated by E.W. Beese, Munich, Germany. Elsevier Inc.

Eberhard Passarge. **Color Atlas of Genetics.** 3rd ed. (2007). Georg Thieme Verlag KG.

Edward S. Tobias, Michael Connor, Malcolm Ferguson-Smith. **Essential Medical Genetics.** 6th ed. (2011). Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication

Jeremy W. Dale and Malcolm von Schantz. **From Genes to Genomes.** 2nd Edition. (2007). Concepts and Applications of DNA Technology. John Wiley & Sons Ltd.

Makalowska I, Lin CF, Makalowski W (2005). **"Overlapping genes in vertebrate genomes"**. *Comput Biol Chem.* 29 (1): 1–12.

Pearson H (2006). **"Genetics: what is a gene?".** *Nature.* 441 (7092): 398–401.

Reams, AB; Roth, JR (2015). **"Mechanisms of gene duplication and amplification"**. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 7 (2): a016592

Richard M. Twyman. **Advanced Molecular Biology.** (1998). BIOS Scientific Publishers Limited.

Ridley, M. **Genome.** (2006). New York, NY: Harper Perennial.

Ronald W. Dudek. **High-Yield Cell and Molecular Biology.** (1999). Lippincott Williams and Wilkins.

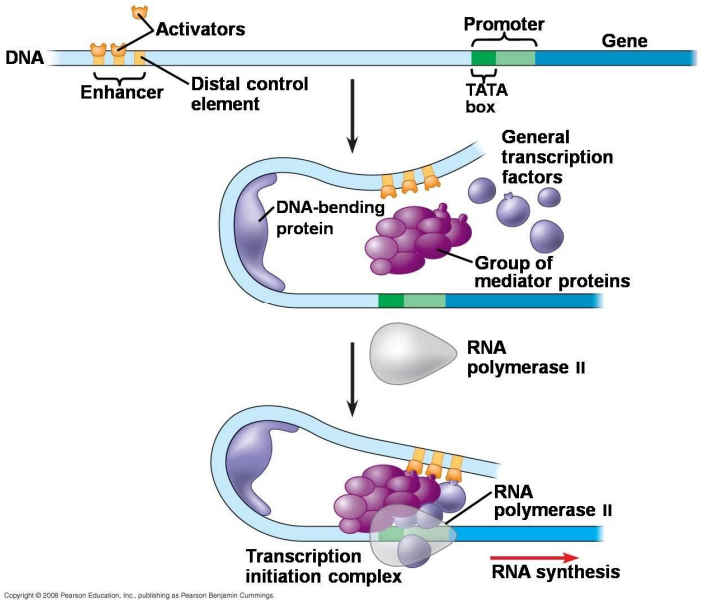
Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. (2001). **"The sequence of the human genome".** *Science.* 291 (5507): 1304–51

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R **Molecular Biology of the Gene**. 7th ed. (2013). Benjamin Cummings. CSHL Press.

الفصل العاشر

تنظيم التعبير الجيني

Regulation of gene Expression



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

الفصل العاشر

تنظيم التعبير الجيني

Regulation of Gene Expression

من آلاف الجينات ضمن جينوم الكائن الحي، جزء معين فقط يعبر عنه في الخلية المعينة وفي وقت معين، إذ تعبر الجينات حسب الحاجة إلى نواتجها، فمثلاً الجينات التي تعبر للإنزيمات التي تدخل في بعض العمليات الأيضية تزداد وتقل حسب توفر أو انعدام المواد الغذائية، نواتج جينات معينة تكون بكميات كبيرة مثل عوامل الاستطالة Elongation factors خلال تصنيع البروتين (وهي البروتينات الأكثر توافراً في البكتريا). بينما نواتج جينات أخرى تحتاجها الخلية في فترة وجيزة من حياتها مثل الجينات المعبرة للتمايز الخلوي في الكائنات متعددة الخلايا خلال فترة النمو الجنيني. في المقابل فإن تخصص الخلية يجعل الحاجة إلى بروتين معين (أو عدة بروتينات) أساسي لعمل هذه الخلية، كما هو الحال مع الهيموكلوبين في كريات الدم الحمر. أي أن التعبير الجيني ينظم اعتماداً على حاجة ووظيفة الخلية في وقت معين، ويعتقد أن الخلية تسيطر على التعبير الجيني في استراتيجية الاستعمال الأمثل للطاقة. وتنظيم الخلية لتركيز بروتين معين يعتمد على التوازن في عدة عوامل وأبرز هذه العوامل هي:

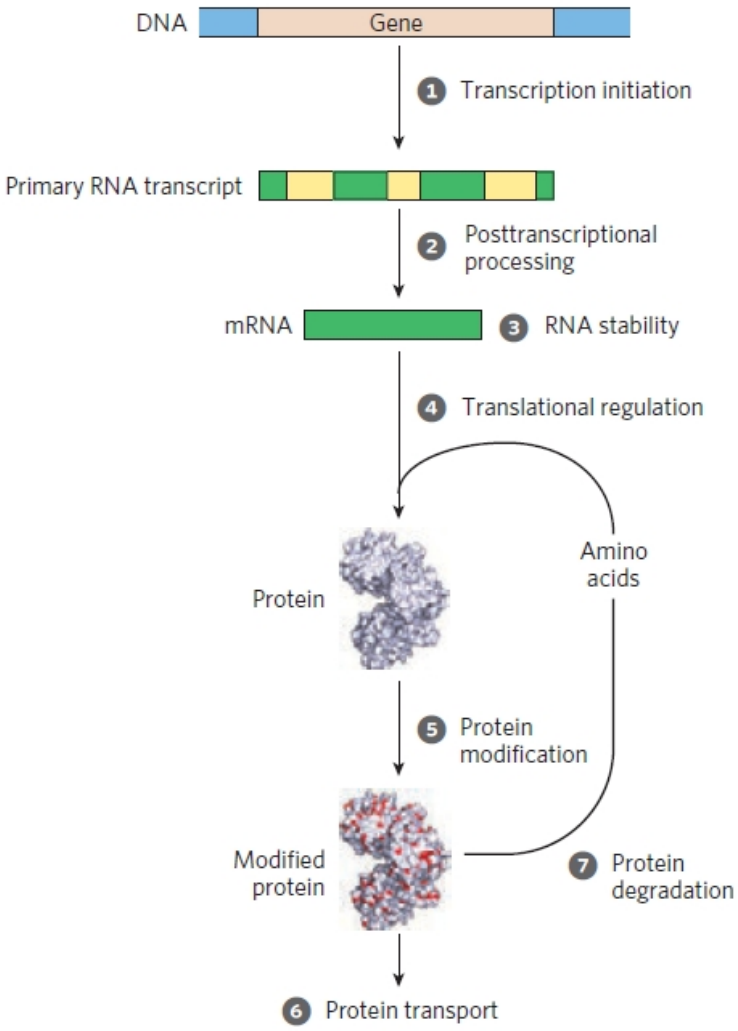
1- عملية الاستنساخ Transcription وتصنيع RNA المراسل (mRNA) الأولي.

2- تحويرات mRNA ما بعد الترجمة.

3- تحطيم mRNA.

4- استهداف ونقل البروتين.

5- تحطيم البروتين. والشكل التالي (10-1) يوضح هذه العوامل.



الشكل (10-1) العوامل المنظمة لتركيز ووجود البروتين (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

أنواع التعبير الجيني :

يختلف التعبير الجيني حسب نوع الجين وحسب الظروف الداخلية للخلية والبيئة المحيطة بالخلية، ويمكن إيجاز أنواع التعبير الجيني في :

1- **تعبير جينات الخدمة** Housekeeping genes: وهي تلك الجينات التي تكون نواتجها ضرورية للخلية دائماً مثل انزيمات المسارات الأيضية الأساسية، حيث تعبر هذه الجينات بشكل دائمي ولكن بمستويات مختلفة حسب الحالة التي تمر بها الخلية.

2- **تعبير الجين التكويني** Constitutive gene expression: إذ يكون تعبير هذه الجينات بشكل ثابت تقريباً بمختلف الظروف والأوقات.

3- **التعبير الجيني المنظم** Regulatory gene expression: وهي الجينات التي يرتفع وينخفض تعبيرها الجيني كاستجابة للإشارات الخلوية الجزيئية.

4- **التعبير الجيني المحدث** Inducible gene expression: وتشير إلى زيادة التعبير الجيني تحت ظروف جزيئية معينة، وعملية زيادة تعبير هذه الجينات تسمى الحث Induction. ومن الأمثلة على هذا النوع من التعبير الجيني هي تلك الجينات التي تشفر لإنزيمات إصلاح DNA حيث تحث هذه الجينات بنظام بروتينات تنظيمية كاستجابة لوجود أذى في تركيب DNA.

5- **التعبير الجيني المكبوح** Repressible gene expression: على العكس من النوع السابق فإن نواتج الجينات هنا تنخفض كاستجابة لإشارات خلوية جزيئية وتدعى العملية بالكبح أو الإخماد Repression.

وعملية الاستنساخ يسيطر عليها وتنظم بعدة مستويات وآليات أهمها تداخلات DNA مع البروتينات وخاصة البروتينات التي تدخل ضمن تركيب إنزيم البلمرة RNAP.

ارتباط انزيم البلمرة RNAP مع DNA على المشجع :

إنزيمات البلمرة RNAPs ترتبط مع DNA على قطعة متخصصة تدعى المشجع Promoter للبدء بالاستنساخ. وهي مواقع توجد بالقرب من نقطة بدء تصنيع RNA على قالب DNA، وتنظيم بدء الاستنساخ يعتمد على كيفية تفاعل إنزيم البلمرة RNAP مع المشجع.

ونظراً لتنوع تسلسلات نيوكليوتيدات المشجع تختلف ألفة ارتباط إنزيمات البلمرة RNAPs وبالتالي البدء بالاستنساخ، فمثلاً بعض جينات الايشريشيا القولونية E. coli تعبر كل ثانية بينما جينات أخرى تعبر في كل دورة خلية مرة واحدة، ومعظم هذا التنوع في التعبير الجيني يشير إلى الاختلافات في تسلسلات المشجع، إذ لوحظ أنه بغياب البروتينات التنظيمية فإن اختلافات تركيب المشجع يؤثر في بدء الاستنساخ بـ 1000 مرة أو أكثر.

تنظيم بدء الاستنساخ :

تتم عملية تنظيم بدء الاستنساخ من خلال بروتينات ترتبط مع أو بالقرب من المشجع، وهناك على الأقل ثلاثة من هذه البروتينات هي :

1- العوامل المتخصصة Specific factors: والتي تعمل على تغيير خصوصية إنزيم البلمرة RNAP للمشجع المعين أو لمجموعة المشجعات.

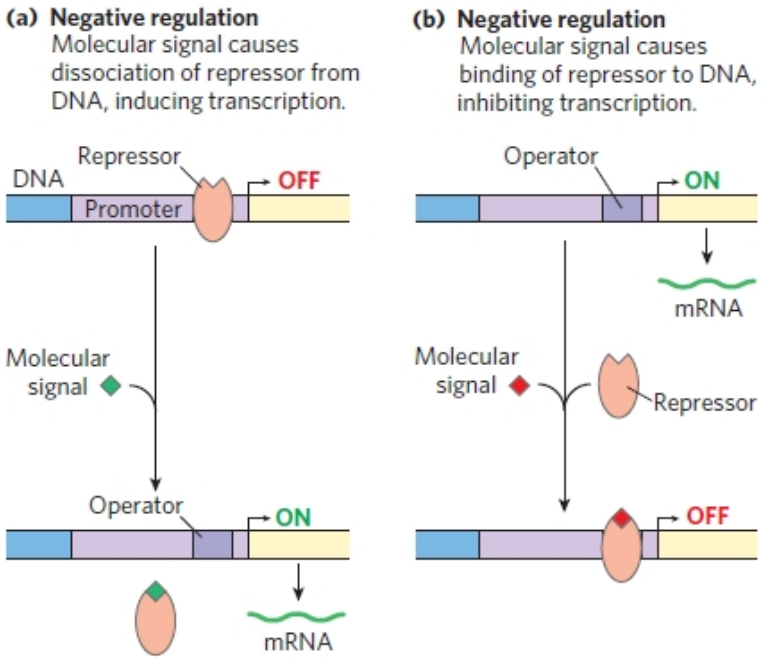
2- الكوابح Repressors: وتعمل على كبح توجه وارتباط إنزيم البلمرة RNAP مع المشجع.

3- المنشطات Activators: وتعمل على تنشيط تفاعل إنزيم البلمرة RNAP مع المشجع.

في الايشريشيا القولونية يعد العامل سيكما (σ) هو المتخصص للتعرف والارتباط بالمشجع، وسيكما هي وحدة من ضمن تركيب الإنزيم الكلي لإنزيم البلمرة RNAP، ويذكر أن أبرز نوع من سيكما هو سيكما 70 (σ^{70}) نسبة إلى وزنها الجزيئي (70000)، وتحت ظروف معينة يمكن استبدال سيكما 70 بعوامل أخرى (معروف منها 6 عوامل لحد الآن)، فمثلاً عند تعرض البكتريا لإجهاد حراري يؤدي إلى استبدال سيكما 70 بسيكما 32 (σ^{32}) (وزنها الجزيئي 32000)، ارتباط إنزيم البلمرة RNAP مع العامل سيكما 32 يؤدي إلى توجهه إلى مجموعة متخصصة من المشجعات وبتسلسلات مختلفة، هذه المشجعات تسيطر على تعبير مجموعة من الجينات التي تشفر لبروتينات متخصصة منها الجابيرون Chaperones والتي هي جزء من النظام المحفز بالإجهاد والمسمى بالاستجابة لصدمة الحرارة Heat shock response، وبذلك تتغير ألفة ارتباط إنزيم البلمرة RNAP إلى مشجعات مختلفة.

في الخلايا حقيقية النواة بعض عوامل الاستنساخ العامة وخاصة البروتينات المرتبطة مع تاتا TATA-binding proteins (TBP) يمكن أن تعتبر عوامل متخصصة.

العومل الكابحة Repressors ترتبط بمواقع متخصصة على DNA، هذه المواقع تدعى في البكتريا بالعاملات Operators وتكون قريبة من المشجعات Operators. إن ارتباط إنزيم البلمرة RNAP مع DNA أو حركتها على DNA يتوقف عند وجود الكابح الذي يغلق عملية الاستنساخ بالتنظيم السالب Negative regulation، كما أن بروتينات الكبح نفسها تنظم من قبل جزيئات إشارة صغيرة (تدعى أحياناً المستفعلة أو المستجيب Effector) وهي عبارة عن جزيئة أو بروتين صغير يرتبط مع الكابح ويسبب له تغيرات شكلية. ارتباط المستجيب مع الكابح يزيد أو يقلل من عملية الاستنساخ، فقد يعمل ارتباط المستجيب مع الكابح على تفكك ارتباط الأخير من DNA (الشكل 10-a2)، أو أن ارتباط المستجيب مع الكابح غير النشط يعمل على تنشيط الكابح ومن ثم تسهيل ارتباطه مع المشجع (الشكل 10-b2).

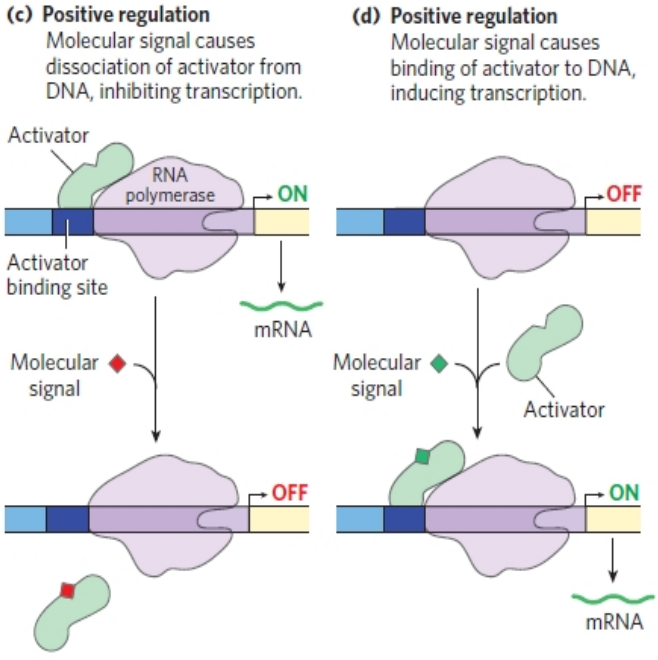


الشكل (10-2) الأشكال العامة لتنظيم بدء الاستنساخ

(مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

أما في حالة التنظيم الايجابي Positive regulation فإن المنشطات Activators ترتبط مع مواقع متخصصة على DNA وتنشط فعالية إنزيم البلمرة RNAP عند المشجع Promoters، في البكتريا مواقع ارتباط المنشطات تكون مجاورة للمشجع إذ أن إنزيم البلمرة RNAP لوحده لا يرتبط معها أو يرتبط بشكل ضعيف، لذلك فإن الاستنساخ لا يحدث أو يحدث بمستوى ضئيل في حال انعدام المنشطات.

العديد من منشطات الخلايا حقيقية النواة ترتبط مع مواقع DNA التي تدعى المعززات enhancers والتي تقع بعيداً عن المشجع. والمنشطات تؤثر على معدل الاستنساخ عن طريق المشجع الذي يقع على بعد آلاف التسلسلات منه، وترتبط بعض المنشطات مع DNA معززة الاستنساخ لحين تفكك ارتباط هذه المنشطات عن DNA بفعل ارتباط جزيئات الإشارة (الشكل 10-c3) بينما في أحيان أخرى فإن المنشط يرتبط مع DNA فقط بعد الارتباط مع جزيئات الإشارة (الشكل 10-d3) مما سبق نلاحظ أن جزيئات الإشارة يمكن أن تزيد أو تقلل الاستنساخ ويعتمد ذلك على كيفية تأثيرها على المنشط.



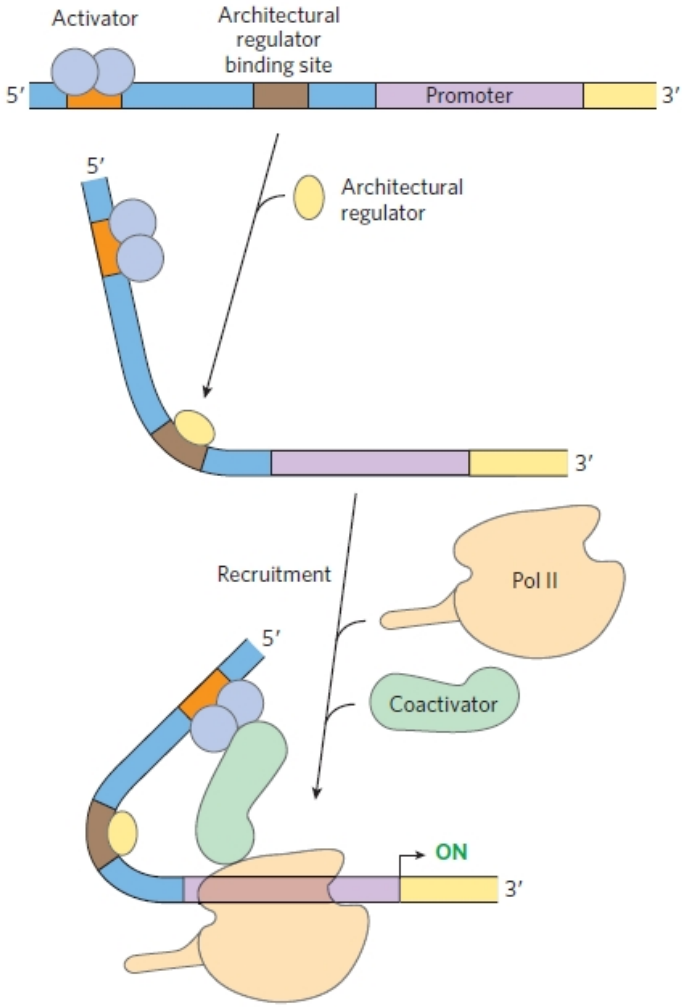
الشكل (10-3) الاشكال العامة لتنظيم بدء الاستنساخ
(مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

في الخلايا حقيقية النواة مشكلة المسافة الكبيرة نسبياً بين مواقع ارتباط المنشطات أو المثبطات وبين المشجع يتم التغلب عليها بعملية تقارب بسبب بروز حلقي Looping out وتحفز هذه العملية ببروتينات تسمى المنظمات المعمارية Architectual regulators، إذ ترتبط بمواقع متخصصة وتسبب بروز DNA بشكل حلقي مؤديةً إلى تقارب المنشطات مع مواقع المشجع (الشكل 10-4). وبعد الاقتراب فإن التفاعل بين المنشطات وأنزيم البلمرة RNAP في موقع المشجع يتم بمساعدة بروتينات تنظيمية تدعى المنشطات المساعدة Coactivators، أحياناً البروتنيات الكابحة Repressors تحل محل المنشطات المساعدة وترتبط بالمنشطات وبذلك تمنع عملية التنشيط.

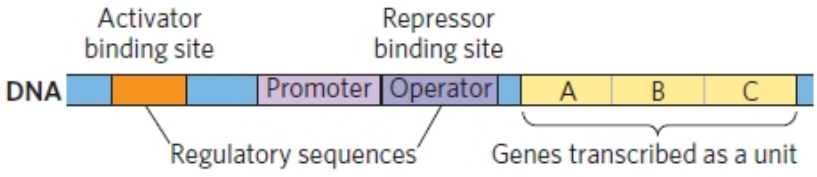
الأوبيرونات Operones :

الأوبيرون عبارة عن ترتيب خطي للجينات بحيث أن فعالية هذه الجينات تنظم بشكل متناسق، وكما ذكرنا سابقاً فإن معظم جينات الخلايا بدائية النواة تميل إلى أن تكون بشكل مجاميع Clusters ونادراً ما يتم التعبير عن هذه الجينات في هذه الخلايا بشكل منفرد. مجموعة الجينات يتم تنشيطها أو تثبيطها على هيئة وحدة واحدة وذلك من خلال تفاعل بروتينات متخصصة مع DNA ويفسر ذلك الاستجابة السريعة للخلايا بدائية النواة (البكتريا) للتغييرات البيئية المحيطة بها، والحقيقة أن التنظيم يكون في تصنيع mRNA من خلال تنظيم عملية الاستنساخ.

بمعنى آخر فإن تنظيم التعبير الجيني في البكتريا يكون أسهل مما في الخلايا حقيقية النواة، إذ أن الجينات تتواجد بشكل مجاميع على الكروموسوم ويتم استنساخها مع بعضها على شكل مجموعة، كما أن غالبية mRNA في البكتريا تكون من نوع Polycistronic وأن أوبيرون واحد يبدأ منه استنساخ مجموعة جينات، ويتم تنظيم تعبير هذه الجينات من موقع واحد. إن مجموعة الجينات والمشجع الخاص بها وكذلك التسلسلات التنظيمية المرافقة لها والتي تدخل في تنظيم التعبير الجيني لهذه المجموعة تسمى مجتمعةً بالاوبيرون (الشكل 10-5).

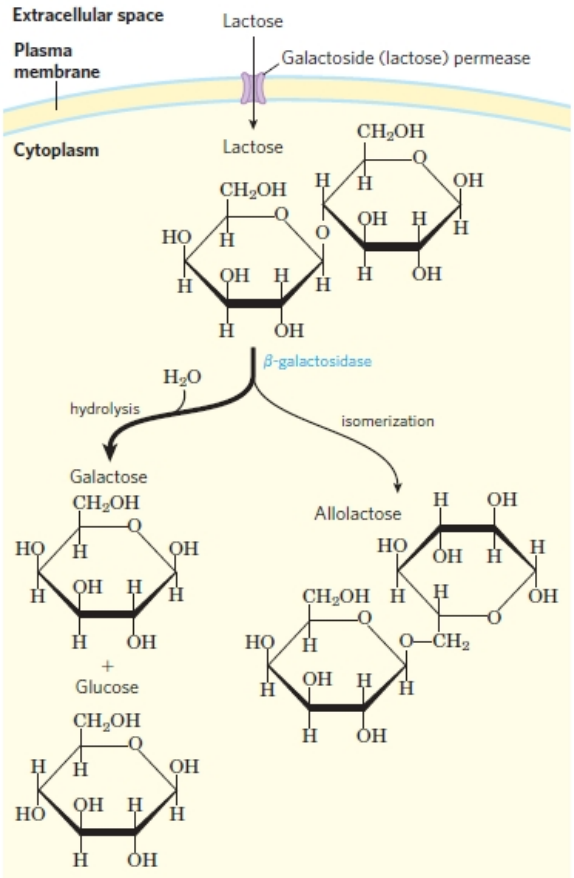


الشكل (10-4) التفاعل بين المنشطات / الكوابح مع انزيم البلمرة RNAP في الخلايا حقيقية النواة (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).



الشكل (10-5) أوبيرون البكتريا

غالبية الأوبيرونات تحوي 2-6 جينات، لكن أحياناً يحوي الأوبيرون 20 أو أكثر من الجينات. ودراسة تنظيم التعبير الجيني تعود إلى بداية الستينات من القرن الماضي، وكانت أولى هذه الدراسات في بكتريا الايشريشا القولونية E. coli ويعود الفضل فيها إلى العالمين Francois Jacob و Jacques Monod، إذ وصف هذان الباحثان لأول مرة آلية تنظيم التعبير الجيني لمجموعة جينات متجاورة تساهم في أيض اللاكتوز، وهذه الجينات هي: الجينات المشفرة للبيتا-كلاكتوسايديز Beta-galactosidase (ويعمل إنزيم البيتا-كلاكتوسايديز على شطر اللاكتوز إلى كلوكوز و كالاكتوز)، والجينات المشفرة لإنزيم كالاكتوساید بيرمييز (ويسمى أحياناً لاكتوز بيرمييز) ويعمل هذا الإنزيم على نقل اللاكتوز إلى الخلية البكتيرية (الشكل 10-6).



الشكل (10-6) أيض اللاكتوز في البكتريا
(مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

اللاك أوبيرون :

قام العالمان جاكوب وموند بتسمية الأوبيرون الخاص باللاكتوز بـ لاك أوبيرون lac operon، إذ قاما بدراسة mRNA الذي عمره النصفي قصير نسبياً (3 دقائق) أي أنه كل 3 دقائق يتم تحطيم نصف mRNA المتبقي، هذا العمر النصفي القصير يسمح بسرعة عكس المؤثرات على عملية الاستنساخ وبالتالي تصنيع البروتين، أي أنه عندما يتم تحفيز اللاك أوبيرون يتم تصنيع البروتينات، كما يمكن بعدها إزالة فعالية اللاك أوبيرون وبسرعة عالية فيتم إيقاف تصنيع البروتينات لفقدان تصنيع mRNA، وبالتالي فإن الخلية تحافظ على الطاقة والأحماض الأمينية بعدم تصنيع البروتينات.

نموذج اللاك أوبيرون هو مثال جيد لنظام الإنزيم المستحث Inducible enzyme system (المستحث هنا يقصد به تلك الإنزيمات التي تنتج فقط عند وجود مادتها الأساس) عكس الإنزيمات التكوينية Constitutive enzymes التي تتواجد بشكل دائمي (مثل الإنزيمات الضرورية لأيض الكلوكوز).

السيطرة الموجبة والسالبة على اللاك أوبيرون :

اللاك أوبيرون، ومعظم إن لم يكن كل الأوبيرونات، تكون تحت سيطرة مزدوجة موجبة وسالبة، ولغرض التنشيط تحتاج إلى وجود كل من الأدينوسين أحادي الفوسفات الحلقي cAMP والمحث Inducer (المحث هنا هو اللاكتوز). والحاجة إلى cAMP يعرف بالسيطرة الموجبة، إذ يرتبط cAMP مع نظام الكبح التقويضي Catabolite repression system ويتناسب تركيز cAMP مع تركيز الكلوكوز بشكل عكسي، إذ عندما يكون تركيز الكلوكوز واطئاً يكون تركيز cAMP عالياً والعكس بالعكس، أما إزالة التنشيط عن اللاك أوبيرون فيدعى بالسيطرة السالبة ويعتمد على فعالية البروتين الكابح.

وهنا يجب التذكير بأن السيطرة الموجبة أو السالبة على اللاك أوبيرون تتم من خلال نوعين من التفاعلات :

أولاً: تفاعلات البروتين–DNA وتتضمن :

1- انزيم البلمرة RNAP الموجه بـ DNA، وهذا الإنزيم ضروري لتصنيع mRNA.

2- بروتين تنشيط المواد التقويضية Catabolite activator protein (CAP) وهو بروتين ضروري لتحضير DNA لعملية الاستنساخ.

3- بروتين كابح Repressor لإزالة التنشيط عن اللاك أوبيرون.

ثانياً: النوع الثاني من التفاعلات تتضمن تلك التي تحدث بين البروتينات والجزيئات مثل المحث Inducer و cAMP، وكلاهما يسببان تغيرات شكلية في البروتينات. النوع الأول والنوع الثاني من التفاعلات يمثلان شكل أساسي للسيطرة على التعبير الجيني.

مكونات اللاك أوبيرون:

لفهم أكثر للاك أوبيرون لابد من معرفة مكوناته بالتفصيل وهي :

1- الأدينوسين أحادي الفوسفات الحلقي cAMP: جزيئة إشارة وتتكون من جزيئة ATP.

2- بروتين تنشيط المواد التقويضية CAP وبروتين مستقبل المواد التقويضية CRP، وهما بروتينات منظمة موجبة تنشط بواسطة cAMP.

3- المحث Inducer: وهو هنا اللاكتوز (الولاكتوز).

4- الكابح Repressor: بروتين يشفر من قبل الجين lac I.

5- إنزيم البلمرة RNAP الموجه بـ DNA: وهو إنزيم الاستنساخ.

6- تسلسلات تنظيمية Regulatory sequences: وتشمل تسلسلات المشجع واللاك أوبيرون وموقع ارتباط كل من إنزيم البلمرة RNAP والبروتين الكابح.

7- الجينات: وتشمل :

- جين اللاك I: ويشفر للبروتين الكابح.
- جين اللاك Z: ويشفر للإنزيم بيتا-كلاكتوسايديز (الانزيم الذي يشطر اللاكتوز إلى كل من الكلوكوز والكالكتوز).
- جين اللاك Y: ويشفر للإنزيم كالكتوسايد بيرمييز (وهو بروتين ناقل).
- جين اللاك A: ويشفر لإنزيم ترانس استيليز Transacetylase (ودوره في أيض اللاكتوز غير واضح).

الأدينوسين أحادي الفوسفات الحلقي cAMP :

في بكتريا الايشريشيا القولونية فإن السكر (مثل الكلوكوز) ينقل إلى الخلية من خلال آلية تغيير الموقع عن طريق أنظمة نقل تعتمد على ATP. ونقل الكلوكوز يرافقه فسفرة السكر، مما يضمن أن السكر (الذي أصبح مفسفر) لا يمكن أن يتسرب من الخلية لأن الغشاء الخلوي يكون غير نفاذ للسكر المفسفر. والطاقة اللازمة للنقل تؤخذ من مركب يدعى الفوسفو اينول بايروفيت Phosphoenol pyruvate (PEP) والذي ينتج خلال عملية تحلل الكلوكوز Glycolysis، والعملية بأكملها تدعى نظام نقل الفوسفات المعتمد على الفوسفو اينول بايروفيت Phosphoenol pyruvate dependent phosphotransferase system (PTS)، ويعتمد PTS على بعض الإنزيمات والبروتينات الأساسية في نقل كل السكريات وكذلك يعتمد على بعض الإنزيمات والبروتينات المتخصصة لنقل سكريات معينة، فمثلاً EIIg هو بروتين خلال الغشاء الخلوي يكون متخصص للكلوكوز، خلال نقل الكلوكوز فإن EIIg يتفسفر بواسطة الفوسفو اينول بايروفيت بعدها تنقل EIIg مجموعة الفوسفات إلى الكلوكوز عند نقله خلال الغشاء الخلوي.

وفي حالة فقدان الكلوكوز من البيئة المحيطة فإن PTS تستعمل بروتين EIIg المفسفر لتنشيط إنزيم الأدينليت الحلقي Adenylate cyclase والذي يعمل على تحويل ATP إلى cAMP وبذلك يزداد تركيز cAMP في الخلية، كما أن اختلاف تركيز cAMP داخل الخلية يعطي إشارات للخلية، إذ يرتفع تركيز cAMP عند انخفاض تركيز الكلوكوز، وينخفض تركيز cAMP عند وجود الكلوكوز بتراكيز عالية في الخلية، أي أن تركيز cAMP يعطي إشارة للخلية بوجود أو عدم وجود الكلوكوز وتوفر أو عدم توفر السكريات الأخرى للنقل إلى داخل الخلية كي تعمل كمصدر للطاقة والكاربون.

وكما هو معروف فإن الكلوكوز له الدور المركزي في الأيض لذلك يعد السكر المفضل لنقله إلى داخل الخلية، وعليه فإن الإنزيمات المؤيضة له تكون تكوينية Constitutive (دائمية)، وعند توفر الكلوكوز ومن خلال التركيز الواطئ لـ cAMP فإن الأوبيرونات الأخرى مثل اللاك أوبيرون تكون في حالة كبح تقويضي Catabolite-repression لذلك فإن الكلوكوز هنا يعمل ككابح أيضي إذ يكبح أوبيرونات السكريات الأخرى، أما التركيز العالي من cAMP بغياب الكلوكوز فانه يتغلب على الكبح الأيضي.

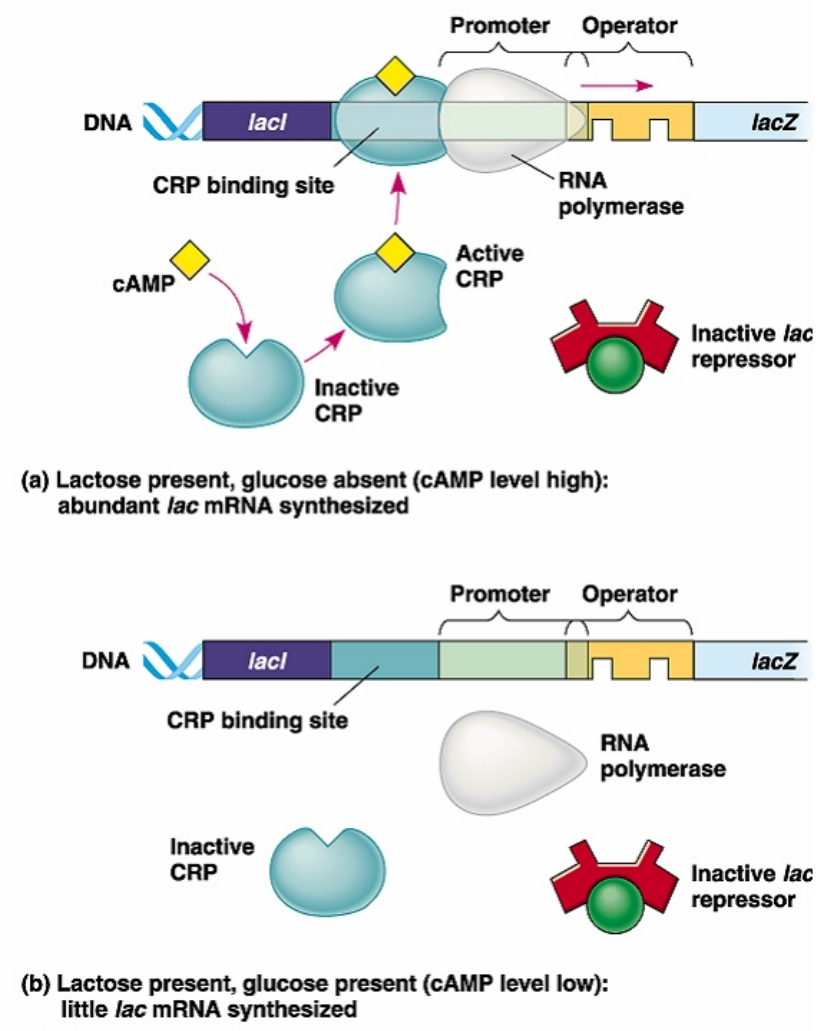
البروتين المنشط التقويضي :

البروتين المنشط التقويضي Catabolite activator protein (CAP) وهو بروتين تسلسلي Allosteric اذ ينشط تغيرات شكلية من خلال ارتباط cAMP أي أن ارتفاع تركيز cAMP يزيد من نسبة CAP المنشطة. و CAP عبارة عن بروتين ثنائي الوحدة من متعدد الببتيد المتماثلة، كل واحدة منها تتكون من 120 حامض أميني، عند ارتباط cAMP فإن CAP تعاني من تغيرات شكلية كبيرة مما يسهل ارتباطها بمواقع متخصصة على DNA. كما أن معقد CAP-cAMP يكون فعال في أوبيرونات أخرى غير اللاك أوبيرون، ويعد CAP من الآليات الشائعة لتحفيز كثير من الجينات.

ويذكر أن كل جزيئة CAP تنشط من قبل جزيئة واحدة من cAMP عندها يرتبط معقد CAP-cAMP مع موقع مؤلف من 22 زوج من القواعد وتقع باتجاه النهاية '5 من تسلسلات مشجع اللاك أوبيرون. إن ارتباط معقد CAP-cAMP مع الموقع تسبب انطواء DNA بشدة، هذا الانطواء يعتقد أنه ضروري لتكوين معقد المشجع المفتوح Open promoter complex (OPC) والذي يتكون عند تحطم الأواصر الهيدروجينية الموجودة بين الحلزونين المزدوجين لـ DNA مما يسمح بارتباط إنزيم البلمرة RNAP مع التسلسلات الخاصة بها ضمن المشجع نزولاً (باتجاه '3) بعد معقد CAP-cAMP مباشرة (الشكل 10-7)، ويعد كل ما ذكر أعلاه أحد الخطوات الضرورية للبدء في عملية الاستنساخ.

المحث :

المحث Inducer عبارة عن جزيئات صغيرة تعد ضرورية للبدء بتصنيع البروتينات، وكما ذكرنا سابقاً فانه في الخلية البكتيرية توجد بروتينات اللاك أوبيرون بتراكيز واطئة جداً بغياب المحث، ولكن بوجود المحث فإن معدل تصنيع هذه البروتينات (مثل بيتا-كلاكتوسايديز) يمكن أن تزيد ألف مرة وتستمر بالزيادة إلى أن ينفذ المحث، عندها يعود تركيز هذه البروتينات إلى مستواها الأساسي قبل تواجد المحث. ومحث اللاك أوبيرون هو سكر الحليب (اللاكتوز)، في الحقيقة فإن اللاكتوز هو المحث الظاهر بينما المحث الحقيقي هو ألولاكتوز Allolactose، والذي يقوم بدور تحويل المحث الظاهر إلى حقيقي هو إنزيم بيتا-كالاكتوسايديز.



الشكل (10-7) آلية تنظيم اللاك أوبيرون

ويقوم هذا الإنزيم بوظيفتين: 1- يحول اللاكتوز إلى ألولاكتوز (وهو ايزومير للاكتوز يختلف عنه فقط في الآصرة التي تربط وحدتي السكر الأحادي الكلوكوز والكالاكتوز، ففي حالة اللاكتوز تكون الآصرة من نوع بيتا 1، 4 كلاكتوسايد بينما في الألولاكتوز تكون الآصرة بيتا 1، 6 كلاكتوسايد. 2- يشطر اللاكتوز إلى كل من كلوكوز وكلاكتوز.

الكابح :

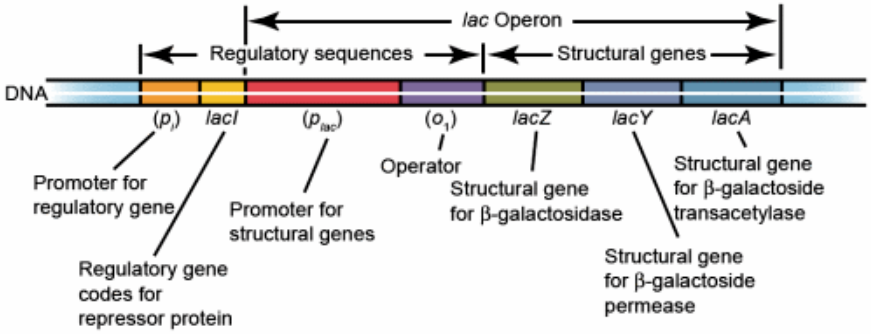
جزيئة الكابح Repressor عبارة عن بروتين يتكون من أربع وحدات متماثلة من متعدد الببتيد، كل سلسلة تتكون من 360 حامض اميني، ويملك الكابح أربع مواقع لارتباط الألولاكتوز (كل سلسلة متعدد ببتيد لها موقع ارتباط)، كما أن كل سلسلة متعدد ببتيد له قطعة متخصصة لغرض الارتباط بـ DNA. وتعد جزيئة الكابح بروتين تسلسلي Allosteric، إذ يمكن أن يتغير شكلها عند الارتباط مع المحث (الألولاكتوز) هذه التغيرات الشكلية بعد الارتباط مع الألولاكتوز تقلل من ألفة الكابح للارتباط مع DNA، أما في حالة غياب المحث فإن الكابح يرتبط مع تسلسلات المشجع والتي تعد عنصر تنظيمي للاك أوبيرون وبذلك تمنع ارتباط إنزيم البلمرة RNAP من الوصول إلى تسلسلات البدء على المشجع وبالتالي توقف عملية الاستنساخ وهنا يقال بأن الجين مطفي، أما عند وجود جزيئة الألولاكتوز (المحث) فإنها ترتبط مباشرة مع الكابح مما ينتج عنه انفكاك ارتباط الكابح مع DNA مما يسمح بتكون معقد المشجع المفتوح OPC وبالتالي حدوث استنساخ لجينات اللاك، وباختصار فإن تفعيل اللاك أوبيرون يحتاج إلى إزالة تفعيل بروتين الكابح.

إنزيم البلمرة RNAP :

عملية الاستنساخ هي تصنيع جزيئة mRNA اعتماداً على قطعة من DNA (الجين) والتي تعمل كقالب Template لعملية التصنيع، وتحتاج عملية التصنيع إلى مواد أولية تتمثل بالرايبونيوكليوتيدات ثلاثي الفوسفات Triphosphate ribonucleotides وتشمل ATP و GTP و CTP و UTP ويقوم بعملية بناء mRNA إنزيم البلمرة RNAP. وجدير بالذكر أن هذا الإنزيم يقوم بنقل المعلومات الوراثية من الجين على DNA إلى الرايبوسومات عن طريق mRNA بعملية الاستنساخ Transcription لغرض تصنيع البروتينات من خلال عملية الترجمة Translation. وهنا يجب التذكير أن إنزيم البلمرة RNAP في الخلايا حقيقية النواة تكون بثلاثة أنواع جميعها ضرورية لتصنيع البروتينات وسيتم شرح ذلك في موضعه، أما البكتريا فتملك نوع واحد فقط من إنزيم البلمرة RNAP.

التسلسلات التنظيمية :

هي تسلسلات النيوكليوتيدات التي لا تكون نواتجها بروتينات أو RNA (أي أنها ليست جينات تركيبية). والتسلسلات التنظيمية من نوع المشجع والعامل للاك أوبيرون يقعان باتجاه النهاية '5 من الأوبيرون، ويكون كل من المشجع والعامل بحدود 82 زوج من القواعد، منها 26 زوج هي تسلسلات العامل، وتعد تسلسلات المشجع موقع لارتباط إنزيم البلمرة RNAP، بينما التسلسلات القليلة للعامل فتمثل موقع لارتباط بروتين الكابح، ويقع كل من المشجع والعامل بين الجين التنظيمي (lac I) وبين الجينات التركيبية (lac A و lac Y و lac Z) ويجب الانتباه إلى أن المشجع له موقعان للارتباط أحدهما لمعقد CAP-cAMP والثاني لإنزيم البلمرة RNAP (الشكل 10-8).



الشكل (10-8) التسلسلات التنظيمية للاك أوبيرون

الجينات :

يقدر حجم اللاك أوبيرون بحوالي 6200 زوج من القواعد (منها 82 زوج من القواعد لتسلسلات المشجع والعامل كما ذكر أعلاه) الباقي يكون أربع جينات تركيبية كل واحدة تشفر لبروتين يكون أحد مكونات اللاك أوبيرون وهذه الجينات موضحة في الجدول (10-1).

الجدول (10-1) جينات اللاك أوبيرون

الجين	الحجم (زوج من القواعد)	البروتين الناتج
lac I	1040	البروتين الكابح
lac Z	3510	بيتا كلاكتوسايديز
lac Y	780	بيرمييز
lac A	825	ترانس أستيليز

ويذكر هنا أن بروتين البرمييز Permease هو بروتين ناقل خلال الغشاء الخلوي يقوم بنقل اللاكتوز إلى داخل الخلية ولا يعده كثير من العلماء إنزيما، بالرغم من أن اسمه يوحي إلى أنه إنزيم لامتلاكه مقطع ase إذ كان يعتقد عند اكتشافه لأول مرة أنه إنزيم، وسمي بهذا الاسم لكونه يسمح بدخول اللاكتوز إلى الخلية.

تحفيز اللاك أوبيرون :

ولسهولة فهم آلية تنظيم اللاك أوبيرون، واستجابة بكتريا الايشريشيا القولونية للتغيرات البيئية المحيطة بها، وخاصة وجود وانعدام الكلوكوز أو اللاكتوز أو كلاهما يجب تفصيل كل حالة على حدا.

الكلوكوز:

عند تواجد الكلوكوز كمصدر وحيد للكاربون والطاقة في الوسط الزرعي لبكتريا الايشريشيا القولونية E. coli فإن الكلوكوز يعمل ككابح تقويضي Catabolite repressor ويبقى اللاك أوبيرون غير فعال أو مكبوح، والمعروف أن أخذ الكلوكوز إلى الخلية يحتاج إلى طاقة لأنه يتم بعملية النقل الفعال، مركب الطاقة هنا هو الفوسفو اينول بايروفيت PEP يعمل على فسفرة بروتين EIIg، وبروتين EIIG المفسفر يستعمل لفسفرة الكلوكوز عند ادخاله إلى داخل الخلية. الكلوكوز الداخل يستعمل فوراً لأن الانزيمات اللازمة لأيض الكلوكوز تكون متوفرة دائماً، بينما لا يتوفر معقد CAP-cAMP للاك أوبيرون، إذ أن فسفرة

الكلوكوز تمنع تنشيط إنزيم الأدينليت الحلقي وبذلك لا يتكون cAMP، وبغياب معقد CAP-cAMP لا يتكون معقد المشجع المفتوح OPC، فلا يرتبط إنزيم البلمرة RNAP مع تسلسلات المشجع للاك أوبيرون، والنتيجة عدم حدوث عملية الاستنساخ (الشكل 10-a9).

اللاكتوز:

نفس بكتريا الايشريشا القولونية أعلاه إذا أخرجت من الوسط الزرعي الحاوي على الكلوكوز، وغسلت لإزالة بقايا الكلوكوز عنها ثم إذا ما وضعت في وسط زرعي يحوي اللاكتوز كمصدر وحيد للطاقة والكاربون، فيكون استعمال اللاكتوز منخفضاً لعدة دقائق ويسمى ذلك بالمستوى الأساسي Basal level لوجود أقل كمية ممكنة من البيرمييز والبيتا كلاكتوسايديز.

على الغشاء الخلوي بروتين EIIg لا يجد كلوكوز كي يفسفره، فيقوم EIIg بفسفرة الأدينليت الحلقي الذي يحول ATP إلى cAMP. وعندما يبدأ اللاكتوز بالدخول إلى الخلية يتحول إلى المحث (ألولاكتوز) بفعل إنزيم بيتا كلاكتوسايديز، عند هذه النقطة يحدث أمران:

1- بزيادة تحول اللاكتوز إلى ألولاكتوز تزداد احتمالية إزالة تنشيط بروتين الكابح.

2- بزيادة تركيز cAMP تزداد احتمالية تنشيط CAP.

وارتباط 4 من جزيئات ألولاكتوز مع البروتين الكابح يؤدي إلى تغيرات شكلية مما يسبب انفصال البروتين الكابح عن تسلسلات العامل على الأوبيرون، أي تزال فعالية الكابح.

من جهة أخرى فإن ارتباط CAP مع cAMP يغير من الشكل الفراغي لـ CAP ويسمح للمعقد CAP-cAMP (في الحقيقة جزء CAP من المعقد) بالارتباط مع DNA مما يؤدي إلى تكوين معقد المشجع المفتوح OPC. تحرر بروتين الكابح من DNA يترك تسلسلات المشجع حرة، بينما ارتباط معقد CAP-cAMP يسرع من ارتباط إنزيم البلمرة RNAP مع تسلسلات المشجع، وبغياب البروتين الكابح في موقع العامل فإن إنزيم البلمرة RNAP يسير بسهولة على طول التسلسلات وصولاً إلى موقع البدء لأول جين تركيبي lac Z.

ثم تتم ترجمة mRNA إلى ثلاث بروتينات هي البيتا كلاكتوسايديز و البيرميز و الترانس أسيتليز، وبذلك تزداد كمية اللاكتوز الداخلة إلى الخلية وتتحول إلى كلوكوز وكلاكتوز. ويذكر هنا أن دخول سكر اللاكتوز إلى الخلية يحفز مسار تحلل الكلوكوز Glycolytic pathway، ويلاحظ أن تحفيز اللاك أوبيرون باللاكتوز يكون تحت السيطرة الموجبة والسالبة، إذ تتمثل السيطرة السالبة بالبروتين الكابح الذي يكون مرتبط مع تسلسلات العامل، ويمنع إنزيم البلمرة من أداء وظيفته. بينما السيطرة الموجبة تكون ضرورية لارتباط معقد CAP-cAMP مع تسلسلات المشجع والذي يسهل من ارتباط إنزيم البلمرة RNAP من خلال معقد المشجع لمفتوح OPC (الشكل 10-d9).

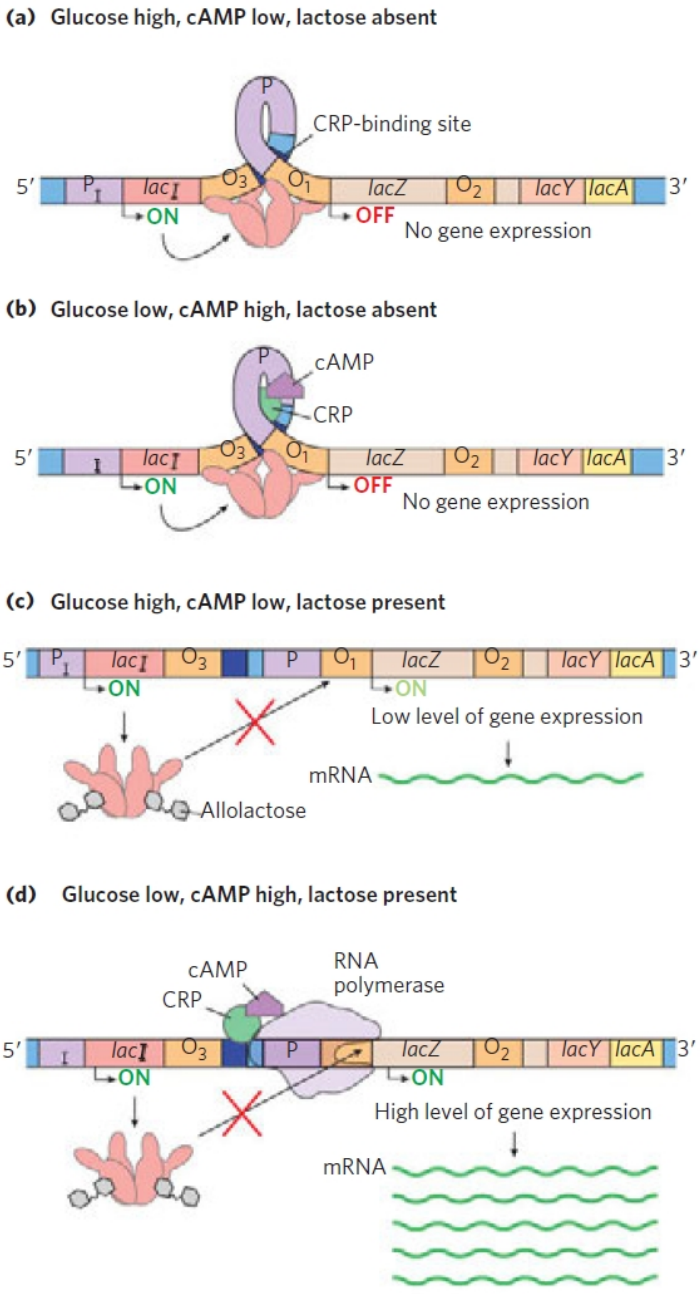
الكلوكوز واللاكتوز:

ربما يتبادر إلى الذهن سؤال مفاده ماذا يحدث إذا ما وضعت بكتريا الايشريشيا القولونية في وسط يحوي كل من الكلوكوز واللاكتوز ؟

يفضل بروتين EIIg فسفرة الكلوكوز إلى كلوكوز -6- فوسفات أكثر من فسفرة إنزيم الأدينليت الحلقي، مما ينتج أن تركيز cAMP يبقى منخفضاً أقل من المستوى اللازم لتحفيز CAP، وبذلك يمنع تكون جزيئة mRNA، ولا يتكون بروتيني البيتا كلاكتوسايديز والبيرميز وبذلك لا يدخل اللاكتوز إلى الخلية لحين استنفاذ الكلوكوز من الوسط المحيط عندها يتفرغ بروتين EIIg لفسفرة الأدينليت الحلقي مما يسمح ببدء الأحداث التي تم شرحها سابقاً والتي تعمل على تنشيط اللاك أوبيرون (الشكل 10-c9).

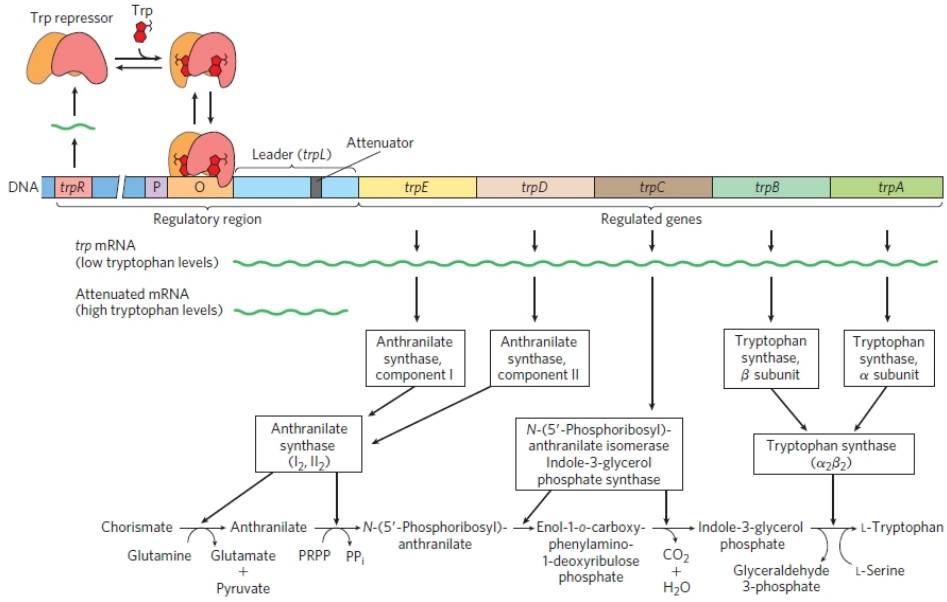
تنظيم التعبير الجيني للأحماض الأمينية :

يمكن لبكتريا الايشريشيا القولونية E. coli من تصنيع الأحماض الأمينية العشرين الأساسية لتصنيع البروتين، الجينات المسؤولة عن التشفير للإنزيمات التي تدخل في تصنيع حامض أميني معين تقع على أوبيرون واحد ويتم تنشيط هذا الأوبيرون عند حاجة الخلية لهذا الحامض الأميني، أما عند توفر الحامض الأميني المعين فإن الإنزيمات لا تصنع ويكون الأوبيرون مكبوح.



الشكل (9-10) التنظيم الموجب للاك أوبيرون من خلال CRP (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

ومن الأمثلة التي درست بشكل جيد هي تريب أوبيرون Treptophan (Trp) operon والذي يتكون من خمس جينات تشفر لإنزيمات تدخل في تصنيع الحامض الأميني التربتوفان، اثنين من هذه الإنزيمات تحفز أكثر من خطوة خلال مسار التصنيع (الشكل 10-10)، ويلاحظ أن العمر النصفي لـ mRNA الناتج من تريب أوبيرون يكون قصير نسبياً (3 دقائق)، مما يعني أن الخلية تستجيب بسرعة لتغييرات الحاجة لهذا الحامض الأميني. يكون كابح تريب أوبيرون ثنائي الأجزاء كما في الشكل (10-10) وعند توفر التربتوفان فانه يرتبط مع كابح تريب أوبيرون مسبباً تغيرات شكلية فيه مما يسمح بارتباط الكابح مع التريب أوبيرون وتثبيط تعبيره، كما أن موقع العامل تريب يتداخل مع المشجع لذلك فإن ارتباط الكابح يمنع ارتباط انزيم البلمرة RNAP.

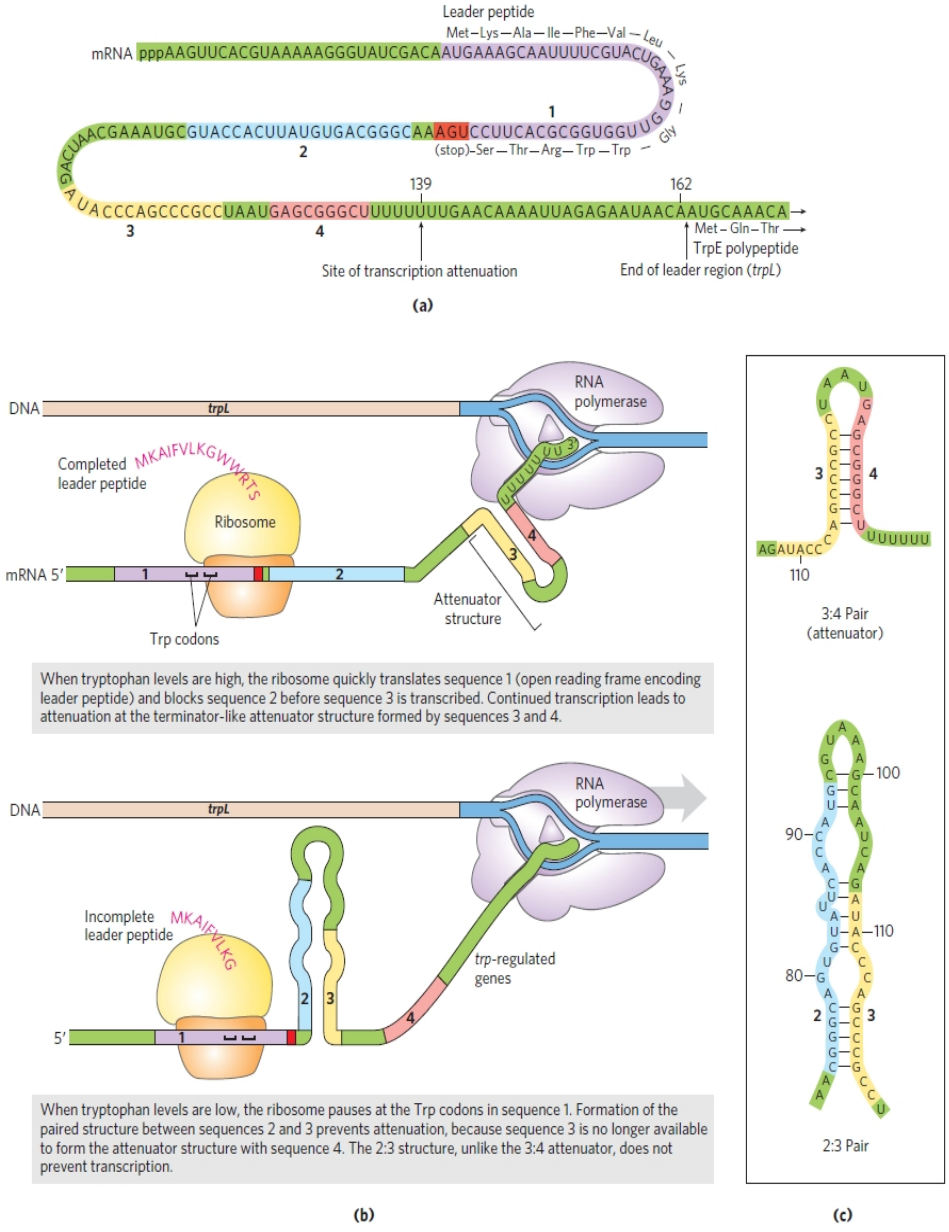


الشكل (10-10) التريب أوبيرون (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

إن ما تم شرحه أعلاه من طريقة تنظيم التعبير الجيني من خلال تشغيل أو إطفاء بواسطة الكابح لا يمثل سوى جزء من عملية التعبير الجيني لأيض التربتوفان، إذ أن التراكيز المختلفة للتربتوفان داخل الخلية يمكن أن يغير من سرعة تصنيع الانزيمات الضرورية لأيضه

بمقدار 700 ضعف، عندما يبدأ الاستنساخ فإن معدل التصنيع يتناسب بدقة مع تركيز التربتوفان داخل الخلية من خلال آلية ثانية تدعى تضعيف الاستنساخ Transcription attenuation وتستعمل هذه الآلية إشارات مشفرة من قبل 4 تسلسلات ضمن منطقة القائد Leader مكونة من 162 نيوكليوتيد باتجاه النهاية '5 من mRNA، هذه التسلسلات تدعى المضعف Attenuator وتتكون من التسلسلات 3 و 4، هذه التسلسلات تزدوج مع بعضها مكونةً تركيب الجذع والعروة Stem-and-loop structure (والتي تكون غنية بالنيوكليوتيدات من نوع GC) تتبعها مباشرة سلسلة من نيوكليوتيد U، ويعمل تركيب المضعف كتركيب انهاء الاستنساخ (الشكل b11-10). ويعد التسلسل 2 متمم بديل للتسلسل 3 (شكل c11-10) أما عند ازدواج التسلسل 2 مع 3، فلا يتكون تركيب المضعف ويستمر استنساخ جينات تصنيع التربتوفان، كما أن الحلقة المتكونة من ازدواج التسلسل 2 مع 3 لا يوقف عملية الاستنساخ. ويعد التسلسل التنظيمي 1 ضرورياً لعمل آلية التحسس للتربتوفان والذي يسمح بازدواج التسلسل 3 مع 2 (مما يسمح بعملية الاستنساخ بالاستمرار) أو بازدواج التسلسل 3 مع 4 (استنساخ المضعف).

يعتمد تكوين مركب الجذع-العروة للمضعف على الأحداث التي تقع خلال الترجمة للتسلسل التنظيمي 1 والتي تشفر للببتيد القائد (سميت بهذا الاسم لأنها تشفر من قبل تسلسلات القائد في mRNA) المكون من 14 حامض أميني، اثنان منها هي الحامض الأميني التربتوفان، الببتيد يترجم بعد استنساخه من قبل الرايبوسوم والذي يقع مباشرة خلف إنزيم البلمرة RNAP، أي أن عملية الترجمة تلي عملية الاستنساخ مباشرة وتكون قريبة جداً منه.



الشكل (10-11) تضعيف الاستنساخ في التريب أبيرون (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

عندما يكون تركيز التربتوفان داخل الخلية عالياً، يكون تركيز tRNA التربتوفان المشحون (Trp-tRNATrp) عالياً أيضاً، ويسمح هذا لعملية الترجمة بالمرور سريعاً وعبور التسلسل 1 وصولاً إلى التسلسل 2 قبل تصنيع التسلسل 3 من قبل إنزيم البلمرة RNAP، في هذه الحالة فإن التسلسل 2 يكون مغطى بالرايبوسوم ولا يستطيع الازدواج مع التسلسل 3 عندما يصنع، فيتكون تركيب المضعف (التسلسلين 3 و 4) ويتوقف الاستنساخ (الشكل 10-b11).

أما عندما يكون تركيز التربتوفان منخفضاً فإن الرايبوسومات تترك شفرات التسلسل 1 لأن Trp-tRNATrp المشحون يكون قليل التوفر، ويبقى التسلسل 2 حراً بينما يتم تصنيع التسلسل 3 مما يسمح بازدواج التسلسلين 2 و 3 وبالتالي السماح بعملية الاستنساخ (الشكل 10-b11)، وبهذه الطريقة فإن نسبة أو تركيز mRNA التي تضعف ستنخفض بانخفاض تركيز التربتوفان. وأخيراً فإن أوبيرونات تصنيع العديد من الأحماض الأمينية تستعمل استراتيجية مشابهة للتربتوفان للسيطرة الدقيقة لتلبية حاجات الخلية.

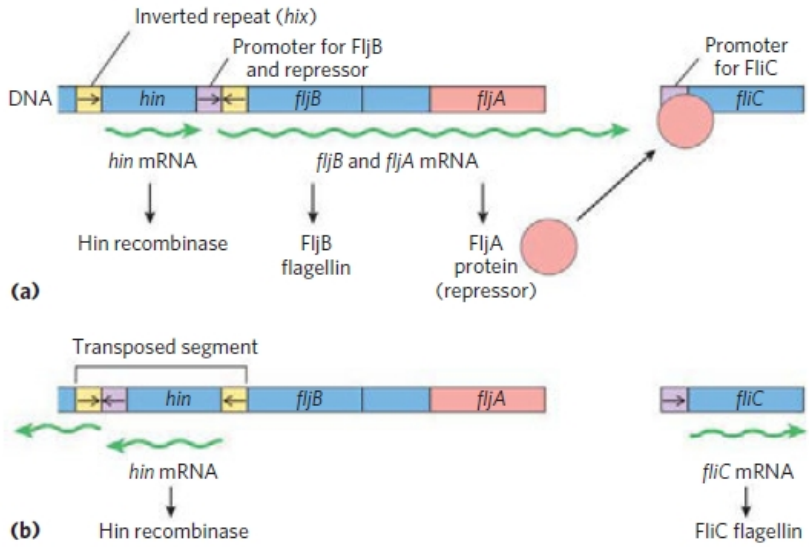
تنظيم تصنيع البروتين بعدد الرايبوسومات :

في البكتريا، زيادة الحاجة لتصنيع البروتين يقابله زيادة في عدد الرايبوسومات وليس زيادة نشاط الرايبوسومات، كما يزداد عدد الرايبوسومات بزيادة معدل النمو الخلوي، وفي معدلات النمو العالية يمكن أن تصل كمية الرايبوسومات داخل الخلية البكتيرية إلى نصف الوزن الجاف للخلية. وزيادة عدد الرايبوسومات (وكذلك الفعالية) يجب أن يرافقه زيادة في تصنيع مكونات الرايبوسومات والتي تشمل بروتينات الرايبوسومات r-protein و RNA الرايبوسومي rRNA، ويذكر أن هناك 52 جين يشفر لبروتينات الرايبوسومات، تقع هذه الجينات في أوبيرونات متعددة (على الأقل 20 أوبيرون، كل واحدة تتكون من 1-11 جين)، تحوي بعض هذه الأوبيرونات جينات تشفر لـ: وحدات انزيم DNA primase، انزيم البلمرة RNAP، وعوامل استطالة تصنيع البروتين، مما يدل على الارتباط الوثيق بين العمليات المختلفة (تضاعف DNA، الاستنساخ، الترجمة، وتصنيع البروتين) خلال النمو البكتيري.

بعض الجينات تنظم من خلال إعادة الربط :

بعض جينات البكتريا يتم تنظيم تعبيرها من خلال أعاد الترتيب DNA rearrangement أو اعادة الربط DNA recombination. ومن الأمثلة التي تم دراستها بشكل مستفيض في هذا المجال هي جينات متخصصة لبكتريا السالمونيلا من نوع Salmonella typhimurium التي تقطن أمعاء الانسان (واللبائن بشكل عام) وتتحرك هذه البكتريا من خلال الأسواط Flagella الموجودة على سطح الخلية، البروتين الأساسي المكون لهذه الأسواط يدعى الفلاجيلين Flagellin ووزنه الجزيئي بحدود 53000 ويعد هذا البروتين هدفاً مهماً للجهاز المناعي للبائن، لكن الخلية البكتيرية تملك آليات هروب من الجهاز المناعي، إذ تناور هذه البكتيريا بين نوعين مختلفين من بروتينات الفلاجيلين هما FljB و FliC وتدعى العملية بطور الاختلاف Variation phase وتحدث عادةً مرة واحدة في كل ألف انقسام خلوي. ويرافق هذا الاختلاف انقلاب دوري لقطعة من DNA تملك مشجع جين الفلاجيلين، والانقلاب في القطعة هو عبارة عن تفاعلات إعادة ربط متخصصة للموقع بواسطة إنزيم Hin recombinase عند التسلسلات المتخصصة 14 زوج من القواعد (والتي تسمى التسلسلات hix) على أحد نهايتي قطعة DNA (الشكل 10-12). عندما تكون قطعة DNA في أحد الاتجاهين يتم التعبير عن الجين المشفر للفلاجيلين FljB والجين المشفر للكابح FljA (الشكل 10-a12) الكابح يغلق تعبير الجين المشفر للفلاجيلين FljC، أما عندما تنقلب قطعة DNA (الشكل 10-b12) فلا يتم استنساخ القطع FljA و FljB، أما إنزيم إعادة الربط Hin recombinase فيشفر له الجين hin في قطعة DNA التي تعاني الانقلاب، ويعبر هذا الجين عندما تكون قطعة DNA بأحد الاتجاهين، لذلك يمكن للخلية أن تعبر من حالة إلى أخرى.

وآلية التنظيم هذه تتميز بكونها مطلقة، أي أن التعبير الجيني يكون غير ممكن عند وجود حاجز بين الجين والمشجع (لاحظ موقع مشجع FliB في الشكل 10-b12)، كما أن تنظيم التعبير الجيني بطريقة إعادة ترتيب DNA التي تعمل على تحريك الجينات و/ أو المشجعات لها أهمية كبيرة في البكتيريا الممرضة، إذ توفر لها هذه الآلية إمكانية تغيير بروتيناتها السطحية كطريقة للهروب من الجهاز المناعي للمضيف.



الشكل (12-10) تنظيم جينات الفلاجيلين في السالمونيلا (طور الاختلاف)

تنظيم التعبير الجيني في الخلايا حقيقية النواة :

بالرغم من وجود آليات متشابهة في تنظيم التعبير الجيني بين البكتيريا والخلايا حقيقية النواة، إلا أن هناك اختلافات جوهرية كثيرة بينهما :

1- ترتبط وظيفة المشجع في الخلايا حقيقية النواة مع تركيب الكروماتين، إذ أن تنشيط عملية الاستنساخ ترافقه تغيرات كبيرة في تركيب الكروماتين في منطقة الاستنساخ.

2- تمتلك الخلايا حقيقية النواة آليتي التنظيم الموجبة والسالبة، إلا أن الشائع فيها هي آلية التنظيم الموجبة، أي أن كل جين في الخلايا حقيقية النواة يجب أن ينشط كي يستنسخ وليس العكس.

3- عملية الاستنساخ Transcription في الخلايا حقيقية النواة تحدث داخل النواة وتكون مفصولة من ناحية الزمان والمكان عن عملية الترجمة Translation التي تحدث في السايتوبلازم.

4- الخلايا حقيقية النواة تمتلك بروتينات تنظيمية كبيرة متعددة الأجزاء ومعقدة.

الاختلاف في تركيب الكروماتين يكون له الأثر الأكبر في تنظيم التعبير الجيني في الخلايا حقيقية النواة، وهذا غير موجود في البكتيريا. وكما ذكرنا في فصل سابق فإن الكروماتين في الخلايا حقيقية النواة يمكن أن يتواجد بأحد شكلين هما: الكروماتين الحقيقية Euchromatin والكروماتين المغاير Heterochromatin، الأخير يكون أكثر كثافة ويشكل حوالي 10٪ من المجموع الكلي للكروماتين ويكون غير فعال من ناحية الاستنساخ، كما يكثر وجوده في مناطق معينة مثل السنترومير Centromere، باقي الكروماتين والذي يكون أقل كثافة يمثل الكروماتين الحقيقي. كما أن استنساخ الجينات في الخلايا حقيقية النواة تكبح بشدة عندما تقع هذه الجينات ضمن الكروماتين المغاير.

أما بعض مناطق الكروماتين الحقيقي (وليس كلها) فتكون فعالة من ناحية الاستنساخ، ويمكن تمييز المناطق الفعالة من ناحية الاستنساخ في الكروماتين الحقيقي عن الكروماتين المغاير بعدة طرق :

1- موقع النيوكليوسومات.

2- وجود تنوعات الهستونات.

3- التحويرات التساهمية للنيوكليوسومات.

هذه التغيرات الشكلية للكروماتين والتي ترتبط مع عملية الاستنساخ تدعى مجتمعة بإعادة تشكيل الكروماتين Chromatin remodeling، وتتضمن عملية إعادة التشكيل الإنزيمات التي تساهم في التغيرات الشكلية للكروماتين، وهناك خمس مجاميع رئيسية معروفة (لحد الآن) من هذه الإنزيمات تقوم بتغييرات في مواقع النيوكليوسومات أو تزيحها من موقعها، وتحتاج العملية إلى طاقة على شكل ATP، ثلاثة من هذه المجاميع تعد ضرورية لعملية الاستنساخ وهي :

1- مجموعة SWI/SNF: إن مختصر SWI جاءت من التشغيل والإطفاء Switching، وSWI عبارة عن بروتين ضروري لتعبير جينات معينة تدخل ضمن تشغيل وإطفاء يكون مرتبط بعملية التزاوج في الخمائر.

أما SNF فهو مختصر لسكر السكروز غير المتخمر Sucrose nonfermenting والذي أكتشف كعامل لتعبير الجينات الضرورية لأيض سكر السكروز في الخمائر.

معقد SWI/SNF له دور مهم في تعبير مدى واسع من الجينات في كثير من الكائنات حقيقية النواة بضمنها الإنسان، ويمتلك هذا المعقد على الأقل 6 سلاسل متعدد ببتيد تعمل على إعادة تشكيل الكروماتين، كما يحفز هذا المعقد عملية ارتباط عوامل الاستنساخ.

ويملك المعقد تركيب يدعى Bromodomain قرب النهاية الكاربوكسيلية لوحدة ATPase النشطة، ويتفاعل هذا التركيب مع ذيول الهستونات Acetylated histone tails.

2- NURF مختصر لعامل إعادة التشكيل النووية Nuclear remodeling factor وتعمل إعادة تشكيل للكروماتين، هذه المعقدات الإنزيمية تعد ضرورية في تحضير قطعة معينة من DNA لغرض الاستنساخ النشط.

3- SWR1 مختصر لـ Swi2/surf2-related ATPase 1 وهي مجموعة بروتينية مهمة ولها دور يختلف عن المجموعتين السابقتين، إذ أن الكروماتين النشط من ناحية الاستنساخ يميل إلى أنه يعاني من نقص في الهستون من نوع H1 (والذي يرتبط مع DNA الرابط بين كرات النيوكليوسوم)، هذه القطعة من الكروماتين تكون أيضاً غنية بالهستون من نوع H3.3 و H2AZ. الاختلاف في مكونات الهستونات يكون بفعل معقدات بروتينية وإنزيمية متخصصة والتي تسمى SWR1.

وكما ذكرنا في فصل سابق فإن هستونات النيوكليوسومات (H2A و H2B و H3 و H4) تحور بتفاعلات كيميائية أهمها مثيلة Methylation للأحماض الأمينية اللايسين والأرجنين، فسفرة Phosphrylation للأحماض الأمينية السيرين والثريونين، وتفاعلات أستلة Acetylation و Ubiquitination و Sumoylation، وعموماً فإن كل هستون له جزئين تركيبيين :

1- جزء مركزي يساهم في تداخل الهستون مع الهستون وكذلك في التفاف حلزون DNA المزدوج حول النيوكليوسوم.

2- جزء النهاية الأمينية الغني بالحامض الأميني اللايسين ويقع عموماً في الجزء الخارجي من تجمع النيوكليوسوم.

وعادة تتركز التحويرات أعلاه في جزء النهاية الأمينية، كما أن بعض التحويرات تعد أساسية للتفاعل مع البروتينات التي تلعب دوراً مركزياً في عملية الاستنساخ. وتعد عمليتي

مثيلة وأستلة الهستونات أساسيتان لتنشيط الكروماتين لعملية الاستنساخ، وخلال عملية الاستنساخ تحصل مثيلة للهستون H3 (من خلال انزيمات مثيلة Methylases متخصصة)، وعند الحامض الأميني اللايسين رقم 4 في النيوكليوسومات قرب النهاية '5 من منطقة التشفير وكذلك اللايسين رقم 36 ضمن منطقة التشفير، وتسهل عملية المثيلة ارتباط إنزيمات Histone acetyltransferases (HATs) (الإنزيمات التي تقوم باستلة الحامض الأميني اللايسين) ويذكر أن هناك نوع آخر من هذه الإنزيمات (النوع B) تتواجد في السايتوبلازم وتعمل على أستلة الهستونات المصنعة حديثاً قبل إدخالها إلى النواة، وتجمع الهستونات ضمن الكروماتين بعد تضاعف DNA يتم من خلال بروتينات جابيرون Chaperones متخصصة هي:

1- عامل تجميع الكروماتين Chromatin assembly factor 1 (CAF1) للهستونات H3 و H4.

2- بروتين تجميع النيوكليوسوم Nucleosome assembly protein 1 (NAP1) للهستونات H2A و H2B.

وعندما ينشط الكروماتين لعملية الاستنساخ فإن الهستونات تعاني المزيد من الأستلة من خلال انزيمات الأستلة HATs النووية (النوع A)، إذ أن أستلة العديد من الحامض الأميني اللايسين في جزء النهاية الأمينية للهستون H3 و H4 يمكن أن يقلل من ألفة النيوكليوسوم ككل للارتباط مع DNA، كما أن أستلة اللايسين في مواقع معينة يعد ضرورياً لتفاعل النيوكليوسومات مع بروتينات تنظيمية خاصة.

أما عند انتفاء الحاجة لتعبير جين معين فيتم تقليل أستلة الهستونات في تلك القطعة من DNA عن طريق إنزيمات إزالة الأستلة Histone deacetylases (HDACs) كجزء من آلية تصميت الجين والتي تعيد الجين إلى حالة انعدام النشاط لعملية الاستنساخ، فضلاً عن إزالة الأستيل هناك تحويرات أخرى لجعل الجين غير فعّال لعملية الاستنساخ منها مثلاً اللايسين رقم 9 للهستون H3 تحصل له مثيلة في جزء الكروماتين مغاير.

مما سبق يتضح أن الهدف من إعادة تشكيل Remodeling الكروماتين فيما يخص عملية الاستنساخ هو جعل قطعة من الكروموسوم معلمة Labeled كيميائياً لتسهيل ارتباط وعمل

عوامل الاستنساخ التي تنظم التعبير الجيني لجين واحد أو لعدة جينات ضمن تلك القطعة من الكروموسوم.

تنظيم المشجعات في الخلايا حقيقية النواة :

إنزيم البلمرة RNAP في الخلايا حقيقية النواة لا يملك (أو يملك القليل من) الألفة للارتباط مع المشجع الخاص به، عليه فإن عملية البدء بالاستنساخ تعتمد كلياً على فعالية العديد من البروتينات المنشطة، وأحد أسباب كون التنظيم الايجابي سائداً هو خزن DNA ضمن الكروموسوم بحيث تكون مشجعاته محصنة Inaccessible، لذلك تكون الجينات صامتة بغياب البروتينات المنظمة، ويذكر هنا أن تركيب الكروماتين يؤثر على وظيفة بعض المشجعات أكثر من غيرها.

عوامل أخرى تلعب دوراً في التنظيم الايجابي وتتركز حول نقطتين: الحجم الكبير لجينوم الخلايا حقيقية النواة و الفعالية الكبيرة للتنظيم الايجابي.

1- الارتباط غير المتخصص للبروتينات التنظيمية مع DNA تصبح مشكلة كبيرة كلما زاد حجم الجينوم في الخلايا حقيقية النواة المتقدمة، كما أن احتمالية وقوع قطعة ارتباط متخصصة من DNA بشكل عشوائي في أي موقع تزداد بزيادة حجم الجينوم. والخصوصية لتفعيل عملية الاستنساخ يمكن أن تكون أفضل وذلك بارتباط العديد من بروتينات التنظيم الموجب مع تسلسلات متخصصة من DNA خلال تنشيط الجين. ويعتقد أن معدل عدد المواقع التنظيمية لكل جين هو 6 في الكائنات متعددة الخلايا.

الحاجة لارتباط العديد من بروتينات التنظيم الموجب مع تسلسلات متخصصة من DNA يقلل بشكل كبير من احتمالية الارتباط العشوائي للمواقع الفعّالة، كما يمكن تقليل العدد الحقيقي للبروتينات التنظيمية التي يجب أن تشفر من قبل الجينوم كي تقوم بتنظيم كل جينات هذا الجينوم، لذلك لا تكون هناك حاجة لمنظمات جديدة لكل جين، وبالرغم من ذلك فإن الخلايا حقيقية النواة تملك عدد هائل من البروتينات التنظيمية والتي تشكل ما مجموعه 5–10٪ من العدد الكلي للبروتينات في هذه الخلايا.

2- التنظيم الموجب للتعبير الجيني يعد الأكثر كفاءة، إذ لو فرضنا أن كل جينات الإنسان (بحدود 25000 جين) تحتاج إلى تنظيم سالب فعلى كل خلية أن تصنع في كل وقت آلاف الأنواع من البروتينات الكابحة كي تمنع تعبير الجينات غير المراد تعبيرها، بينما في التنظيم الموجب معظم هذه الجينات تكون غير فعّالة (إذ لا يرتبط إنزيم البلمرة RNAP مع المشجعات) وتقوم الخلية فقط بتصنيع بروتينات التنشيط كي تفعل تعبير جين أو جينات معينة في وقت ما في الخلية.

ارتباط المنشطات والمنشطات المساعدة مع DNA :

إنزيم البلمرة RNAP الأساسي في تصنيع mRNA في الخلايا حقيقية النواة هو RNAPII ويرتبط مع المشجع الخاص به، معظم مشجعات هذه الإنزيمات (ولكن ليس كلها) تملك تسلسلات متخصصة تدعى TATA box وتسلسلات Inr (البادئ Initiator) وتختلف عن بعضها في عدد ومواقع التسلسلات الأخرى الضرورية لتنظيم عملية الاستنساخ. هذه التسلسلات عادة ترتبط معها منشطات الاستنساخ (المعززات Enhancers) في الخلايا حقيقية النواة المتقدمة و تسلسلات المنشط الصاعدة Upstream activator sequences (UASs) في الخمائر.

المعزز المثالي يمكن أن يتواجد بعيداً عن موقع بدء الاستنساخ صعوداً Upstream بمئات إلى آلاف التسلسلات، أو ربما يقع نزولاً Downstream وضمن تسلسلات الجين نفسه. وعند ارتباط البروتين التنظيمي المناسب فإن المعزز يزيد من الاستنساخ عند المشجعات القريبة بغض النظر عن موقع المعزز ضمن DNA. والاتباط الناجح لإنزيم البلمرة RNAPII الكامل مع مشجعه يحتاج فعالية متكاملة للبروتينات التنظيمية والتي يمكن أن تقسم إلى خمس مجاميع :

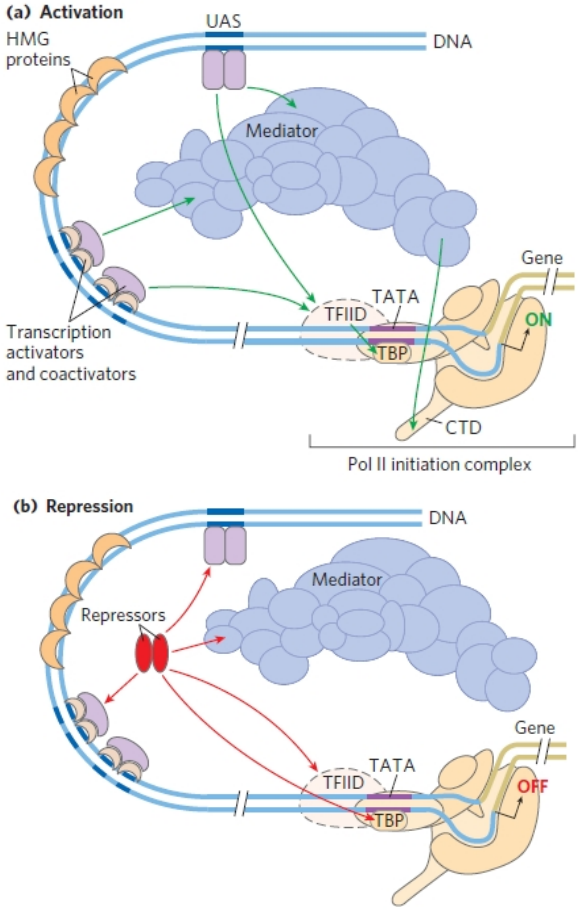
3- منشطات الاستنساخ Transcription activators: وترتبط مع المعززات (أو مع UASs) وتسهل عملية الاستنساخ.

4- المنظمات الفراغية Architectural regulators: والتي تسهل عملية الخروج الحلقي Looping للحلزون المزدوج DNA.

5- بروتينات تحوير وإعادة تشكيل Remodeling الكروماتين: وتم شرحها سابقاً.

6- المنشطات المساعدة Coactivators: وتعد ضرورية لعمل إنزيم البلمرة RNAPII.

7- عوامل الاستنساخ الاساسية Basal transcription factors وتعد ضرورية لعمل مشجعات إنزيم البلمرة RNAPII (الشكل 10-13).



الشكل (10-13) المعززات في الخلايا حقيقية النواة وبروتيناتها التنظيمية

المنشطات المساعدة تعمل بشكل غير مباشر، إذ لا ترتبط مع DNA، وتعد ضرورية لعملية الاتصال بين كل من المنشطات من جهة والمعقد المتكون من إنزيم البلمرة RNAPII وعوامل الاستنساخ الأساسية أو العامة، من جانب آخر يمكن للعديد من البروتينات

الكابحة أن تتداخل بين إنزيم البلمرة والمنشطات مما ينتج عنه كبح عملية الاستنساخ (الشكل 10-b13). وبالعودة إلى الشكل أعلاه نلاحظ:

منشطات الاستنساخ: وتختلف الحاجة إليها من مشجع إلى آخر، بعض المنشطات تسهل عملية الاستنساخ من خلال مئات المشجعات بينما بعضها الآخر يكون متخصص لمشجعات معينة، منشطات أخرى تكون حساسة لارتباط جزيئات الإشارة وبذلك تنشط أو يزال تنشيط عملية الاستنساخ بفعل الإشارات من البيئة الخارج خلوية عن طريق الإشارات. كما أن بعض المعززات ترتبط مع المنشطات وبمسافات بعيدة عن TATA box للمشجع، معززات متعددة (ستة أو أكثر) ترتبط مع عدد مشابه من المنشطات لجين معين مؤدية إلى تنظيم تعبيره بالاستجابة للإشارات المختلفة.

المنظمات الفراغية: إن آلية عمل المنشطات من مسافة بعيدة تتم من خلال عدة طرق أهمها الخروج الحلقي لقطعة من DNA مما يعطي الفرصة للاقتراب من الموقع الهدف للمنشطات، وتتم العملية بوجود بروتينات متخصصة تدعى المنظمات الفراغية والتي تتواجد بكثرة على الكروماتين وترتبط بشكل قليل التخصص مع DNA، وأكثر هذه البروتينات شيوعاً تعرف ببروتينات المجموعة سريعة الحركة High mobility group (HMG) (الاسم مأخوذ من كون هذه البروتينات تتحرك بسرعة خلال الفصل بتقنية الهجرة الكهربائية Electrophoresis بهلام البولي أكريل أمايد) وتلعب هذه البروتينات دوراً محورياً في عمليات إعادة تشكيل الكروماتين وتنشيط الاستنساخ.

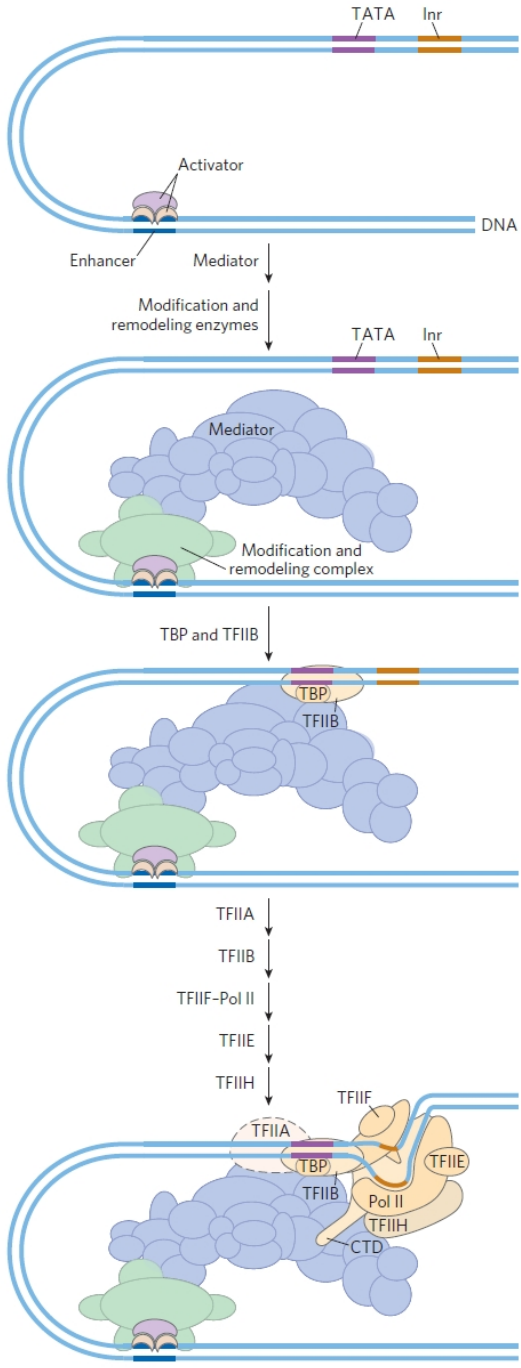
معقدات مساعدات التنشيط: معظم عمليات الاستنساخ تحتاج المزيد من المنظمات ومنها تلك التي تكون وسيطة بين منشطات الاستنساخ ومعقد إنزيم البلمرة RNAPII. في الخلايا حقيقية النواة هناك 20-30 أو أكثر من متعدد الببتيدات والتي توجد كمعقد بروتيني وتسمى الوسيط Mediator (الشكل 10-13)، هذه السلاسل المتعددة تتميز بكونها محافظة بشدة على تركيبها من الخمائر إلى الانسان. يرتبط الوسيط مع معقد إنزيم البلمرة RNAPII بشدة من خلال جزء النهاية الكاربوكسيلة Carboxyl-terminal domain (CTD) للوحدة الكبيرة لإنزيم البلمرة، العديد من عمليات الاستنساخ الاساسية والمنظمة تحتاج إلى معقد الوسيط لارتباط إنزيم البلمرة RNAPII مع المشجعات المتعددة، كما أنها تحفز فسفرة CTD

من خلال عامل الاستنساخ TFIIH. وتتفاعل منشطات الاستنساخ مع معقد وسيط واحد أو أكثر وفي مواقع تختلف من منشط إلى آخر.

البروتينات المرتبطة مع TATA box: عند تجميع معقد ما قبل البدء بالاستنساخ Preinitiation complex (PIC) على موقع TATA box لمشجع إنزيم البلمرة RNAPII فإن أول مكون يرتبط هو البروتين من نوع TATA-binding protein (TBP) والذي هو عبارة عن معقد كبير مكون من حوالي 15 وحدة بنائية تدعى عوامل الاستنساخ TFIID، والمعقد الكامل يحوي أيضا عوامل الاستنساخ الأساسية TFIIB و TFIIE و TFIIF و TFIIH وإنزيم البلمرة RNAPII وأحيانا TFIIA، كل هذه المركبات والمعقدات لا تكون كافية لتنشيط البدء بالاستنساخ إذا كان المشجع غير مخفي ضمن الكروماتين، لذلك فإن المنشط والمنشط المساعد تفعل فعلها عن طريق التنظيم الموجب كي تساهم في البدء بتنشيط الاستنساخ.

سلسلة تنشيط الاستنساخ: إن تفاصيل ارتباط المكونات تختلف وتتنوع لكن بشكل عام فإن العملية تتم كما في الشكل (10–14) ، والعديد من منشطات الاستنساخ لها ألفة قوية لمواقع ارتباطها حتى لو كانت هذه المواقع ضمن الكروماتين المكثف، وتعد خطوة ارتباط المنشط هي المفتاح لباقي الخطوات المتتالية لتنشيط المشجع، كما أن ارتباط منشط واحد يمكن أن يشجع ارتباط منشطات أخرى.

بعد الارتباط يعاني الكروماتين في ذلك الموقع من إعادة تشكيل وعلى مراحل متعددة وتسهل عملية إعادة التشكيل من خلال تفاعل المنشطات مع إنزيمات HATs أو معقدات الإنزيم مثل SWI/SNF أو كلاهما. المنشطات المرتبطة تتفاعل مع معقد الوسيط الكبير، فيما يوفر الوسيط سطحاً للتجميع، إذ يرتبط أول TBP (أو TFIID) ثم يرتبط TFIIB، ثم باقي مكونات PIC ومن ضمنها إنزيم البلمرة RNAPII، ويسهل الوسيط تكوين PIC، كما يعمل على تثبيت ارتباط إنزيم البلمرة RNAPII وعوامل الاستنساخ المرتبطة معه. وتختلف تفاصيل العملية بين الكائنات وحتى بين الأنسجة المختلفة ضمن الكائن الواحد ونظراً لكونها معقدة ومتعددة الخطوات فإنها تستغرق وقتاً طويلاً نسبياً من عدة دقائق إلى أيام كما في جينات معينة لبعض اللبائن.



الشكل (14-10) عناصر تنشيط عملية الاستنساخ (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012)

الإشارات الداخل والخارج خلوية وتنظيمها للتعبير الجيني :

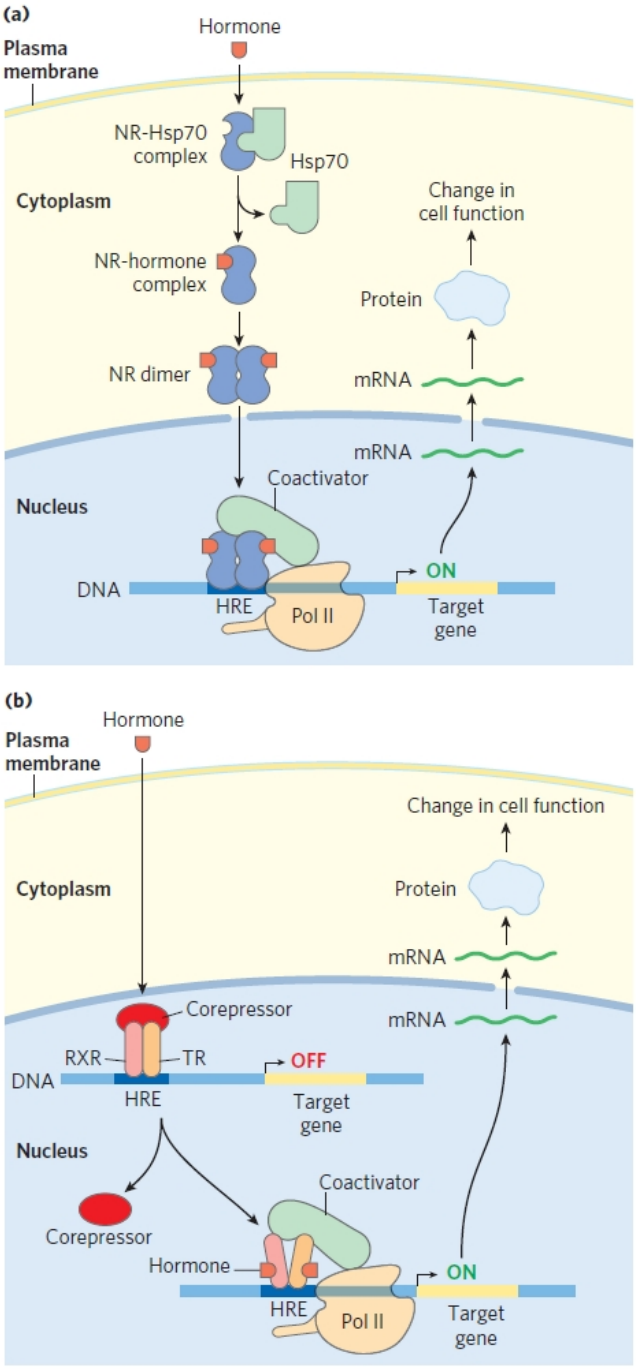
الآلية المتشابهة لبعض الهرمونات مثل الستيرويدات Steroids والثايروويد Thyroid والريتينويد Retinoid قد تمت دراستها بشكل مستفيض كآلية تنظيمية للتعبير الجيني، إذ تمتاز هذه الهرمونات (على العكس من باقي الهرمونات المعروفة) بأنها لا ترتبط بمستقبلات على الغشاء الخلوي، بل تتفاعل مع مستقبلات داخل خلوية هي عوامل أو منشطات الاستنساخ. والمعروف أن الهرمونات الستيرويدية (مثل الاستروجين، البروجستيرون، والكورتيزول) تكون نافرة للماء، لذلك لا تذوب في مصل الدم بل تنقل من قبل بروتينات ناقلة متخصصة من موقع إفرازها إلى النسيج الهدف وبعد أن تدخل إلى الخلية فإنها ترتبط بأحد نوعي مستقبلات الستيرويد الواقعة في النواة (الشكل 10-15)، وفي كلا الحالتين فإن معقد الهرمون-المستقبل يرتبط مع تسلسلات DNA عالية التخصص تدعى عناصر الاستجابة الهرمونية Hormone response elements (HREs)، وبذلك تغير أو تنظم التعبير الجيني، وبهذه الحالة فإن مستقبل الهرمون يعمل كمنشط استنساخ وتوظف كل من المنشط المساعد وإنزيم البلمرة RNAP (وما يرتبط بها من عوامل الاستنساخ) لتشجيع استنساخ الجين الهدف.

HREs عبارة عن قطعة DNA يرتبط معها معقد الهرمون-المستقبل وتكون متساوية في الطول والترتيب ولكن تختلف في التسلسلات بين أنواع الستيرويدات المختلفة، إذ لكل مستقبل هناك HRE خاص به (الجدول 10-2).

الجدول (10-2) عناصر الاستجابة الهرمونية (HREs) التي ترتبط مع المستقبلات

المستقبل	تسلسلات الارتباط
الاندروجين Androgen	GG(A/T)ACAN2TGTTCT
القشرانيات السكرية Glucocorticoid	GGTACAN3TGTTCT
حامض الريتنويك	AGGTCAN5AGGTCA
فيتامين D	AGGTCAN3AGGTCA
هرمون الثايرويد	AGGTCAN3AGGTCA

N تمثل أي نيوكليوتيد



الشكل (10-15) آلية عمل ومستقبلات الهرمونات الستيرويدية

قدرة هرمون معين بالتأثير من خلال معقد الهرمون-المستقبل HRC على تعبير جين معين يعتمد على عدة عوامل :

1- التسلسلات الدقيقة والمتخصصة لـ HRE.

2- موقع HRE نسبة إلى الجين.

3- عدد HRE المرتبطة بالجين.

وموقع ارتباط الهرمون بالمستقبل يختلف بين الهرمونات كما يختلف حجمه من هرمون إلى آخر، فمثلاً لمستقبل فيتامين D هو فقط 25 حامض أميني، بينما لمستقبل القشرانيات المعدنية Mineralocorticoid فهو 603 حامض أميني. ويذكر أن وجود طفرة في شفرة حامض أميني واحد من هذه التسلسلات يمكن أن يسبب في فقدان المستقبل قابلية الاستجابة للهرمون الخاص به، ومن ذلك أن بعض البشر ليست لديهم القدرة على الاستجابة لهرمون الكورتيزول Cortisol أو الشحمون الخصوي Testosterone أو الفيتامين D أو الثايروكسين بسبب وجود مثل هذه الطفرات. وهناك بعض المستقبلات (مثل مستقبل هرمون البروجستيرون Progesterone في الانسان) يتم تنشيط الاستنساخ بوجود المنشط المساعد ويدعى Steroid receptor RNA activator (SAR) وهو عبارة عن RNA (بحجم حوال 700 نيوكليوتيد) ويعمل ضمن معقد الرايبونيوكليوبروتين، وجزء RNA فيه ضروري لعملية الاستنساخ إذ يعمل كمنشط مساعد.

فسفرة عوامل الاستنساخ النووية :

كثير من الهرمونات غير الستيرويدية تقوم بتنظيم التعبير الجيني من خلال سلسلة من التفاعلات التي تنتهي بفسفرة البروتين كاينيز في النواة، هذا البروتين كاينيز بدوره يفسفر بروتينات متخصصة مرتبطة بـ DNA، فمثلاً مسار beta-adrenergic الذي يسبب ارتفاع مستوى cAMP في السايتوبلازم (cAMP يعمل كمراسل ثاني)، cAMP يؤثر على العديد من الجينات والتي تقع بالقرب من تسلسلات DNA متخصصة تدعى عناصر الاستجابة لـ cAMP، cAMP response elements (CRE)، تتحرر الوحدة التحفيزية للبروتين كاينيز A (عندما يرتفع مستوى cAMP) وتدخل النواة وتفسفر بروتين نووي يدعى البروتين

المرتبط بـ CRE، CRE binding protein (CREB) وعندما تفسفر الأخير فإنها ترتبط مع CREs قريبة من جينات معينة وتعمل كعامل استنساخ مشغلةً تعبير هذه الجينات.

وأخيراً فإن تنظيم التعبير الجيني فضلاً عن تعقيده ووجود مستويات مختلفة وأشكال متنوعة منه، فانه يتم أيضاً عند مستوى الترجمة وخاصة في مراحل نمو الكائن وفي بعض الجينات كبيرة الحجم (التي قد تصل تسلسلاتها إلى ملايين من القواعد المزدوجة)، هذا التنظيم قد يكون مقتصراً على مستوى الترجمة أو يكون متكاملاً مع تنظيم التعبير الجيني في مرحلة الاستنساخ، وسيتم التطرق إلى تنظيم التعبير الجيني في مرحلة الترجمة وما بعدها عند الحديث عن الترجمة والتحويرات ما بعد الترجمة لاحقاً.

أهم المراجع :

Bertrand, K; Squires, C; Yanofsky, C (1976). **"Transcription termination in vivo in the leader region of the tryptophan operon of Escherichia coli.".** *J Mol Bio.* 103 (2): 319–37

Bird A (2002). **"DNA methylation patterns and epigenetic memory".** *Genes Dev.* 16 (1): 6–21.

Cornel Mulhardt. **Molecular Biology and Genomics.** (2007). Translated by E.W. Beese, Munich, Germany. Elsevier Inc.

David L. Nelson and Michael M. Cox. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 6th Edition. (2012). W.H. Freeman.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009). **"Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs".** *Genome Res*. 19 (1): 92–105.

Jacob F; Monod J (June 1961). **"Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins".** *J Mol Biol.* 3 (3): 318–56.

Jacob, F. O. (2011). **"The Birth of the Operon".** *Science.* 332 (6031): 767–767.

Jeremy W. Dale and Malcolm von Schantz. **From Genes to Genomes.** 2nd Edition. (2007). Concepts and Applications of DNA Technology. John Wiley & Sons Ltd.

Klose RJ, Bird AP (2006). **"Genomic DNA methylation: the mark and its mediators".** *Trends Biochem Sci.* 31 (2): 89–97.

McKnight, Steven L. **Transcriptional Regulation.** (1992). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Peter Paolella. **Introduction to Molecular Biology.** (1998). The McGraw-Hill Companies. Inc.

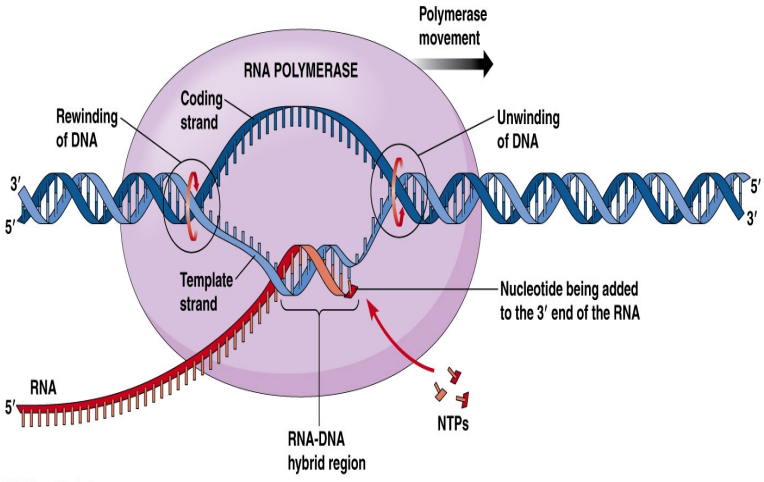
Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R **Molecular Biology of the Gene.** 7th ed. (2013). Benjamin Cummings. CSHL Press.

Yanofsky, C (1981). **"Attenuation in the control of expression of bacterial operons".** *Nature* 289: 751–758.

الفصل الحادي عشر

الاستنساخ

Transcription



© 2012 Pearson Education, Inc.

الفصل الحادي عشر

الاستنساخ
Transcription

تعد عملية الاستنساخ Transcription الخطوة الأولى في التعبير الجيني، إذ يتم استنساخ قطعة من DNA إلى RNA (عادةً mRNA) من خلال إنزيم البلمرة RNA polymerase (RNAP).

عملية الاستنساخ تنتج سلسلة RNA مماثلة في التركيب لأحد خيطي الحلزون المزدوج (DNA)، أما RNA الناتج فيدعى بالمستنسخ الأولي Primary transcript وهو mRNA، خيط DNA الذي يعتمد عليه الاستنساخ يدعى بخيط التشفير Coding strand أو القالب Template strand، والتصنيع يكون بالاتجاه 5' 3' وبشكل متمم Complementary (أي وضع قواعد متممة)، RNA الناتج يكون مماثل للخيط الآخر من الحلزون المزدوج DNA والذي يدعى بغير المتمم Nontemplate strand أو الخيط غير المشفر Noncoding strand، وهنا يجب الانتباه إلى أن الخيط المشفر لجين قد يكون خيط غير مشفر لجين آخر وهكذا، أي أن تسمية خيط مشفر وغير مشفر تكون خاصة بكل جين ولا تنطبق على أحد خيطي الحلزون المزدوج بطوله.

والمحفز لعملية الاستنساخ هو إنزيم البلمرة RNAP، إذ تبدأ عملية الاستنساخ عند ارتباط هذا الانزيم مع منطقة متخصصة على DNA تدعى المشجع Promoter والتي تقع في بداية الجين ومنها يبدأ انزيم البلمرة عمله بتصنيع mRNA وصولاً إلى تسلسلات الانتهاء Termination sequence (أو شفرة التوقف Stop codon) إذ تنتهي عندها عملية الاستنساخ، أي أن "آلة" الاستنساخ (إنزيم البلمرة RNAP وما يرافقها من بروتينات وعوامل) تسير من المشجع إلى تسلسلات الانتهاء.

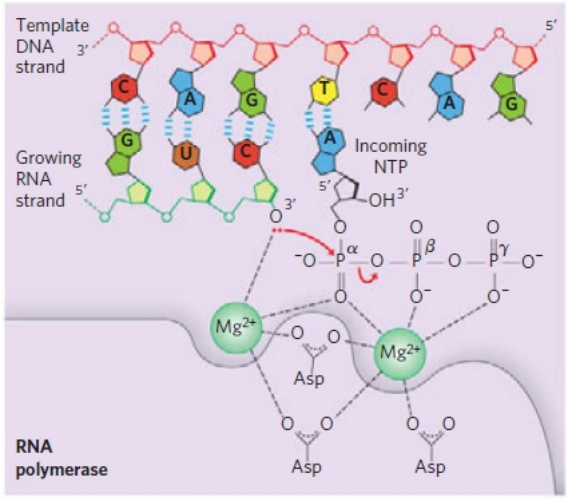
ولسهولة الفهم تصنف التسلسلات قبل نقطة بدء الاستنساخ بالصعود Upstream وبعد نقطة البدء بالنزول Downstream، ويتم التعبير عن الاستنساخ عادةً من اليسار (الصعود) باتجاه اليمين (النزول)، تسلسلات القواعد قبل نقطة البدء تبدأ بالرقم -1 وتزداد سلبياً (-1، -2، -3،...) كلما توجهنا صعوداً، أما تسلسلات القواعد بعد نقطة البدء فتبدأ بالرقم +1 وتزداد ايجابياً (+1، +2، +3،...) كلما توجهنا نزولاً، مع ملاحظة عدم وجود تسلسل رقمه 0.

تثار حول عملية الاستنساخ بعض الأسئلة: كيف يتمكن إنزيم البلمرة RNAP من إيجاد المشجع الخاص به على DNA ؟ وكيف تتفاعل البروتينات التنظيمية مع إنزيم البلمرة ومع بعضها كي تقوم بتنشيط أو تثبيط خطوة أو خطوات معينة خلال مراحل الاستنساخ المختلفة ؟ وسنحاول الإجابة على هذه الأسئلة خلال الصفحات القادمة.

عملية الاستنساخ تبدأ بتكوين ما يشبه الفقاعات على DNA :

الخطوة الأولى لعملية الاستنساخ هو فك ارتباط خيطي الحلزون المزدوج DNA للحصول على خيط منفرد، وهذا يولد ما يشبه الفقاعة Bubble المؤقتة لأنها سرعان ما تعود لتكوين الحلزون المزدوج بتقدم إنزيم البلمرة RNAP باتجاه التصنيع، أي أن الفقاعة تسير طالما هناك تصنيع RNA. وتصنع سلسلة RNA من النهاية '5 باتجاه النهاية '3 من خلال إضافة نيوكليوتيدات جديدة إلى النهاية '3 من السلسلة، إذ أن النهاية '3-OH لآخر نيوكليوتيد تم إضافته للسلسلة يتفاعل مع النيوكليوسيد '5- ثلاثي الفوسفات القادم، والنيوكليوتيد القادم يفقد مجموعتي فوسفات نهائيتين (هما بيتا وكاما) أما مجموعة الفوسفات

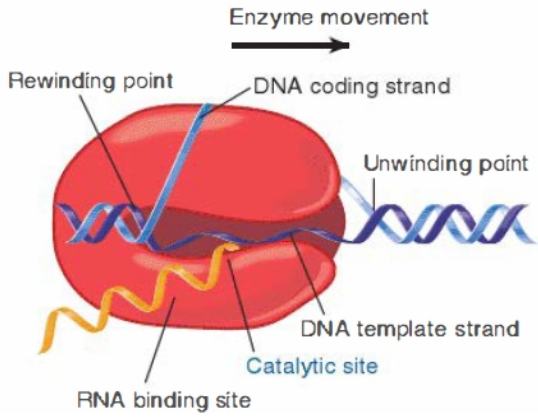
ألفا المتبقية فتدخل في تكوين أصرة الفوسفات ثنائية الأستر Phosphodiester bond وبذلك يدخل النيوكليوتيد ضمن سلسلة RNA (الشكل 11-1).



الشكل (11-1) تصنيع خيط mRNA

تختلف سرعة تكوين RNA خلال الاستنساخ في البكتريا حسب الظروف المحيطة، إذ يمكن أن تبلغ السرعة 40–50 نيوكليوتيد / ثانية عند درجة حرارة 37 م، أما سرعة عملية الترجمة فتكون بحدود 15 حامض أميني / ثانية، والعمليتان أقل بكثير من سرعة تضاعف DNA التي تقدر في البكتريا بحوالي 800–1000 زوج من القواعد / ثانية.

والشكل (11-2) يوضح تركيب الفقاعة ضمن معقد الاستنساخ، اذ كلما تقدم انزيم البلمرة RNAP خلال DNA فانه يفك الحلزون المزدوج أمام الفقاعة (وتسمى هذه المنطقة بنقطة فك الحلزون Unwinding point) ويعود الحلزون المزدوج إلى التكون خلف الفقاعة مباشرة وتسمى المنطقة بنقطة عودة الحلزون Rewinding point، ويكون حجم الفقاعة بحدود 12–14 زوج من القواعد، بينما طول DNA-RNA ضمن الفقاعة بحدود 8–9 زوج من القواعد، ويزداد طول سلسلة RNA المتكونة بتقدم الفقاعة.



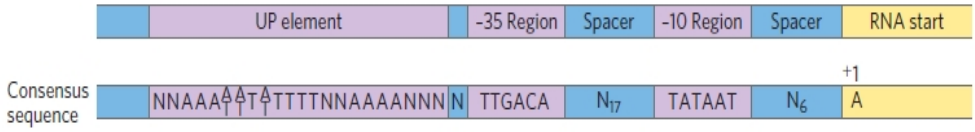
الشكل (11-2) تكون الفقاعة خلال الاستنساخ مأخوذ من (Alberts et al., 2015)

المشجع :

قطعة أو منطقة من DNA حجمها عادة 100–1000 زوج من القواعد ومنها تبدأ عملية الاستنساخ، ويقع المشجع عادة ضمن التسلسلات –70 و +30، ومعظم أنواع المشجعات في البكتريا لديها تشابه في سلسلتين قصيرتين تتركزان في المنطقة الواقعة بين –10 و –30 (الشكل 11–3)، هذه التسلسلات تعد مواقع تفاعل مهمة مع العامل سيكما 70 (σ70)، التسلسلات الشائعة تدعى بتسلسلات الإجماع Consensus sequences، إذ تكون تسلسلات الإجماع :

في منطقة –10 هي 5'TATAAT3'

وفي منطقة –30 هي 5'TTGACA3'

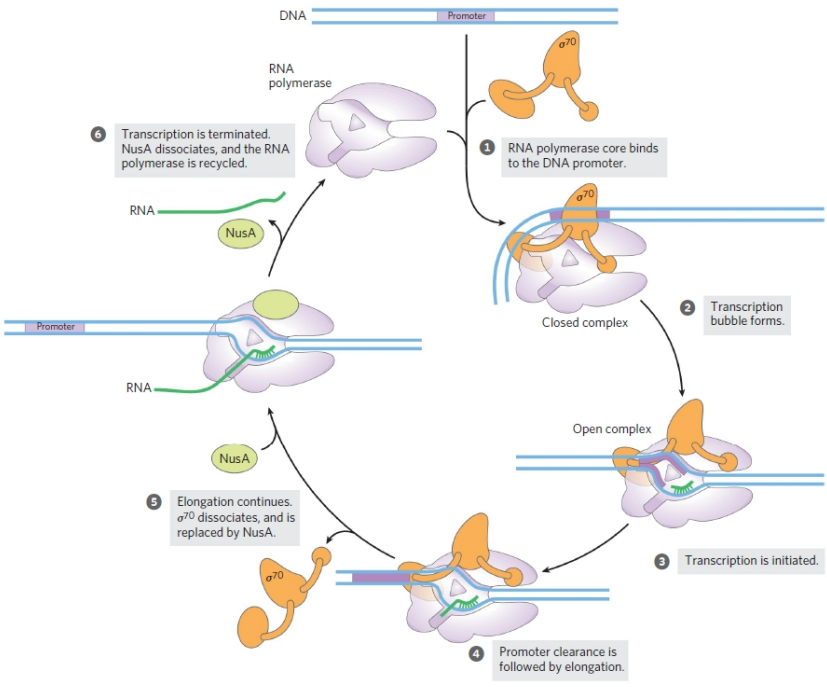


الشكل (11-3) تركيب المشجع المثالي في الايشريشيا القولونية

هناك نوع ثالث من التسلسلات يكون غني بـ AT يدعى UP (صعود من المشجع Upstream promoter) ويقع ضمن التسلسلات -40 إلى -60 ضمن مشجع بعض الجينات عالية التعبير، ويكون عنصر UP متخصص للارتباط مع الوحدة ألفا من إنزيم البلمرة RNAP. كفاءة إنزيم البلمرة RNAP وعامل سيكما σ70 للارتباط مع المشجع الخاص به ومن ثم البدء بالاستنساخ يعتمد على التسلسلات أعلاه، الفاصل بين هذه التسلسلات، وبُعدها عن نقطة بدء الاستنساخ.

عملية الاستنساخ تقسم إلى ثلاث مراحل :

يمكن تقسيم عملية الاستنساخ إلى ثلاث مراحل متتالية هي: مرحلة البدء ؛ إذ يتم التعرف على المشجع، تتكون الفقاعة، ويبدأ تصنيع RNA، مرحلة الاستطالة ؛ حيث تتحرك الفقاعة على طول DNA ويستمر تصنيع RNA، مرحلة الانتهاء ؛ إذ يتحرر RNA المصنع حديثاً وتنتهي الفقاعة (الشكل 11-4).



الشكل (11-4) مرحلتي البدء والاستطالة خلال عملية الاستنساخ في البكتريا (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

1- **مرحلة البدء** Initiation: وتبدأ هذه المرحلة بالتعرف على الخيط المشفر من DNA من قبل إنزيم البلمرة RNAP، ثم ارتباط الأخير مع الخيط المزدوج DNA في موقع متخصص هو المشجع، ويبقى الحلزون المزدوج فترة قصيرة جداً مرتبطاً به إنزيم البلمرة RNAP قبل أن يتم فك الحلزون المزدوج. وتنتهي مرحلة البدء عندما يبدأ إنزيم البلمرة RNAP بتصنيع سلسلة RNA ومغادرة منطقة المشجع.

2- **مرحلة الاستطالة** Elongation: في هذه المرحلة يتم حركة معقد الاستنساخ بما فيها إنزيم البلمرة RNAP من خلال تحطيم الأواصر الهيدروجينية بين خيطي الحلزون المزدوج DNA، وكلما انفك الحلزون المزدوج يستمر إضافة النيوكليوتيدات وزيادة طول سلسلة RNA المتكونة مع استمرار حركة الفقاعة باتجاه النزول، إضافة النيوكليوتيدات تتم إلى النهاية '3 لسلسلة RNA النامية مكونةً هجين DNA-RNA، وخلف هذه المنطقة يعود خيطي DNA للارتباط مع بعضهما لإعادة تكوين الحلزون المزدوج، وتبرز سلسلة RNA المتكونة حديثاً من معقد الاستنساخ (الشكل 11-4). أما البروتين NusA (ووزنه الجزيئي 55 كيلو دالتون) والذي يسمى أحياناً بمضاد الانتهاء Anti-terminator ويساعد في منع الانتهاء المبكر أو غير الناضج لعميلة الاستنساخ، ويرتبط مع إنزيم البلمرة RNAP (وبشكل تنافسي مع العامل سيكما)، وعند اكتمال الاستنساخ ينفصل NusA من إنزيم البلمرة، كما ينفصل إنزيم البلمرة RNAP عن DNA (الشكل 11-4).

في السابق كان يعتقد أن مرحلة الاستطالة عملية مستمرة بنسق واحد، لكن في السنوات الأخيرة تبين أنها غير ذلك، إذ يمكن أن يقف إنزيم البلمرة RNAP عن العمل بشكل مؤقت أو حتى دائمي عند الوصول إلى تسلسلات معينة، ويعتقد أن عملية التوقف الوقتي قد تحدث عند تسلسلات تنظيمية متخصصة وهي جزء من عملية السيطرة على تنظيم الاستنساخ.

3- **مرحلة الانتهاء** Termination: وتبدأ هذه المرحلة عندما يصل معقد الاستنساخ إلى تسلسلات معينة (تدعى هذه التسلسلات المتواجدة على DNAبتسلسلات الانتهاء Terminator sequences) تعطي إشارة إلى إنزيم البلمرة RNAP بالتوقف عن إضافة نيوكليوتيدات جديدة إلى سلسلة RNA النامية. ويذكر هنا أن التوقف المؤقت الطويل

يمكن إن يدخل عملية الاستنساخ في مرحلة الانتهاء، وتنتهي فقاعة الاستنساخ عندما يتم تحطيم الهجين DNA-RNA، ويعاد تكوين الحلزون المزدوج DNA، وينفصل معقد الاستنساخ إلى أجزاءه الأساسية (إنزيم البلمرة RNAP، DNA، سلسلة RNA المصنعة حديثاً، عوامل الاستنساخ، البروتينات المرافقة).

في البكتريا هناك على الأقل نوعين من الانتهاء أو التوقف، أحدهما يتم من خلال العامل رو p (rho) وهو بروتين مسئول في البكتريا عن توقف عملية الاستنساخ، إذ يرتبط هذا العامل مع موقع انتهاء الاستنساخ وهو قطعة حرة من خيط RNA المنفرد تمتد لـ 72 نيوكليوتيد، ويكون حجم عامل رو حوالي 275 كيلو دالتون مكون من ست وحدات متماثلة، كل وحدة بها موقع لارتباط RNA وموقع تحلل ATP. وعامل رو هو جزء من مجموعة تملك فعالية إنزيم Helicase المعتمدة على ATP.

أما النوع الثاني غير المعتمد على العامل رو (يدعى أيضاً الإنهاء الداخلي)، إذ أن وصول إنزيم البلمرة RNAP إلى تسلسلات معينة Pallindromic يؤدي إلى تكون تركيب يدعى دبوس الشعر Hairpin والذي يعمل على انفصال إنزيم البلمرة RNAP عن الخيط القالب DNA وبذلك تنهي عملية الاستنساخ.

وهنا يجب التذكير ببعض الملاحظات المهمة :

1- عملية الاستنساخ تحتاج فضلاً عن قالب DNA إلى رايبونيوكليوسايدات '5- ثلاثي الفوسفات (ATP، GTP، CTP، UTP) كبادئات لتصنيع وحدات نيوكليوتيدات RNA وكذلك تحتاج إلى المغنسيوم +Mg2 وبروتينات ترتبط مع ذرة من +Zn2.

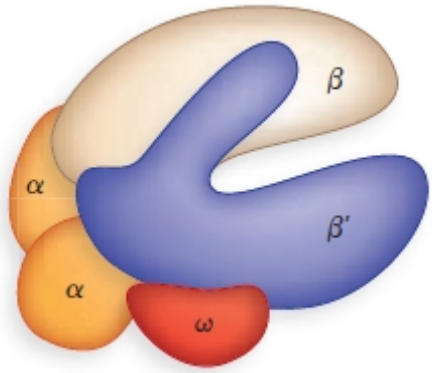
2- يتم إضافة اليوراسيل U عند تصنيع RNA كي يزدوج مع الأدينين A.

3- على العكس من إنزيم البلمرة DNAP فإن إنزيم البلمرة RNAP لا يحتاج إلى بادئ Primer للبدء بالتصنيع.

إنزيم البلمرة RNAP في البكتريا :

إنزيم البلمرة RNAP في البكتريا (E. coli) كبير الحجم (بحدود 390 كيلو دالتون) مكون من عدة وحدات، خمس وحدات منها تكون أساسية وتكوّن معقد، اثنان منها ألفا (α)

واثنان منها بيتا (β' و β) وواحدة أوميغا (ω)، فضلاً عن وحدة سادسة تدعى سيكما (σ)، ترتبط الوحدة سيكما (σ) بشكل مؤقت مع الوحدات الأساسية وتوجه الإنزيم ككل إلى موقع الارتباط على DNA، الوحدات الست تكون الإنزيم الكلي للبلمرة RNAP holoenzyme (الشكل 11-5). ويأخذ إنزيم البلمرة RNAP في بكتريا الايشريشيا القولونية عدة أشكال اعتماداً على نوع الوحدة سيكما (σ)، وأكثرها شيوعاً هي سيكما 70 (σ70) (وزنها الجزيئي 70 كيلو دالتون).



الشكل (11-5) الانزيم الكلي للبلمرة RNAP holoenzyme

العامل سيكما σ Sigma factor :

وهو البروتين الضروري للبدء بعملية تصنيع RNA (الاستنساخ) في البكتريا، ويختلف نوع العامل سيكما حسب نوع المشجع وبالتالي حسب الجين، وتم تقسيم عامل سيكما إلى نوعين رئيسيين هما: عامل سيكما الأساسي Primary sigma factor والذي يوجه لاستنساخ الجينات الدائمية في الخلية Housekeeping genes، وعامل سيكما البديل Alternative sigma factor وهو الذي يوجه لاستنساخ الجينات التي يختلف تعبيرها اعتماداً على المحيط الداخلي للخلية والإشارات الخارجية، وتملك بكتريا الايشريشيا القولونية 7 أنواع من عامل سيكما بينما تصل في بكتريا أخرى (حرة المعيشة) إلى 65 نوع سيكما، كما لوحظ اختلاف نوع العامل سيكما حسب طبيعة الاشارات الخارجية من البيئة المحيطة بالبكتريا، وكل إنزيم بلمرة

له على الأقل عامل سيكما واحد خاص به، ويعتقد أن إنزيم البلمرة RNAP يرتبط بشكل غير قوي مع DNA حيث يسير على طوله من خلال الارتباط والانفكاك وصولاً إلى المشجع الخاص به عندها يقوم العامل سيكما بربط انزيم البلمرة RNAP بقوة مع المشجع الخاص به، وبعد أن يبدأ تصنيع سلسلة RNA (حوالي 5-10 رايبونيوكليوتيدات) ينفك عامل سيكما من انزيم البلمرة RNAP الذي يستمر في تصنيع RNA، عامل سيكما المنفك بإمكانه الارتباط مع انزيم البلمرة RNAP آخر وهكذا. وعوامل سيكما في الايشريشيا القولونية تشمل :

1- عامل سيكما σ70: وهو عامل سيكما الأساسي، ويدخل في تعبير معظم الجينات الاساسية ويتعرف على المشجع في تسلسلات إجماع بموقعين هما (-10 و -35)
2- عامل سيكما σ19: ويدخل في تعبير الجين Fec المسئول عن تصنيع بروتينات نقل الحديد.
3- عامل سيكما σ24: عامل سيكما الخاص بجين بروتينات اجهاد الحرارة.
4- عامل سيكما σ28: وهو عامل سيكما السوط Flagella.
5- عامل سيكما σ32: عامل سيكما بروتينات صدمة الحرارة.
6- عامل سيكما σ38: عامل سيكما الجوع والخمود.
7- عامل سيكما σ54: عامل سيكما تحديد النتروجين.

أما تركيب بروتين سيكما فيتكون من عدة مناطق أهمها :

1- المنطقة 1.1: ويتواجد فقط في عامل سيكما الأساسي ووظيفة هذه المنطقة هو ضمان ارتباط عامل سيكما فقط مع المشجع الخاص بإنزيم البلمرة RNAP المعين.
2- المنطقة 2.4: وتتعرف وترتبط بالقطعة -10 من المشجع (كانت تسمى سابقاً بـ Pribnow box وهو عبارة عن تسلسل لست نيوكليوتيدات (TATAAT) وهو جزء أساسي من تركيب المشجع وضروري لعملية الاستنساخ في البكتريا).
3- المنطقة 4.2: وتتعرف وترتبط بالقطعة -35 من المشجع.

معدل حدوث الأخطاء في عملية الاستنساخ تكون عالية (خطأ لكل 10000-100000 نيوكليوتيد) أي أعلى بكثير مما يحدث في تضاعف DNA، وذلك للاسباب التالية :

1- انزيم البلمرة RNAP تفقد الموقع الفعال للتدقيق Proofreading 3'→5' exonucleae (على عكس انزيم البلمرة DNAP).

2- سلسلة RNA تصنع من جين واحد (خيط واحد) ثم تعامل فيما بعد (RNA processing).

3- الخطأ في RNA أقل خطراً على الخلية من الخطأ في تضاعف DNA.

ولوحظ أن العديد من إنزيمات البلمرة RNAP في البكتريا وفي الخلايا حقيقية النواة تتوقف عن الاستنساخ بشكل مؤقت عند وجود نيوكليوتيدات خاطئة خلال عملية الاستنساخ (تختلف عن التوقف عند الوصول إلى نيوكليوتيدات معينة لأغراض تنظيمية)، ويتم إزالة النيوكليوتيدات الخاطئة من النهاية '3 لسلسلة RNA المصنعة حديثاً، وذلك بعكس فعل إنزيم البلمرة بشكل مباشر، ولازال العلماء غير واثقين هل هذا الفعل من ضمن وظائف تدقيق القراءة ؟ والى أي مدى تساهم هذه العملية في ضمان دقة عملية الاستنساخ ؟

عوامل الاستنساخ Transcription factors :

عوامل الاستنساخ وتسمى أحياناً بعوامل الارتباط بـ DNA المتخصصة بتسلسلات معينة، وهي بروتينات متخصصة ترتبط مع DNA في مواقع أو تسلسلات متخصصة لغرض تنظيم عملية الاستنساخ بالتعاون مع بروتينات وتسلسلات تنظيمية أخرى، والمميز في عوامل الاستنساخ احتوائها على جزء أو أجزاء متخصصة للارتباط بـ DNA- DNA binding domains (DBDs)، ويكون الارتباط بمواقع متخصصة قريبة من الجين المراد تنظيم تعبيره.

ونظراً لأهمية عوامل الاستنساخ فإنها تكون موجودة في جميع الكائنات الحية، وعدد هذه العوامل يزداد كلما زاد حجم جينوم الكائن الحي، إذ أن الجينوم الكبير يحوي عوامل استنساخ أكثر لكل جين، فمثلاً في الإنسان هناك أكثر من 2600 بروتين تعمل كعوامل استنساخ، أي أن حوالي 10٪ من جينات الإنسان تشفر لعوامل الاستنساخ، ولذلك تكون هذه المجموعة أكبر عائلة بروتينات. ومن الحقائق المثيرة حول عوامل الاستنساخ، أن هذه العوامل تنظم تصنيع ووظيفة نفسها، والمعروف في علوم الحياة أن العمليات المعقدة والمهمة

لها عدة مستويات متداخلة من التنظيم وتنطبق هذه الحقيقة على عوامل الاستنساخ، ويلاحظ أن بعض عوامل الاستنساخ تنظم إنتاج وعمل عوامل استنساخ أخرى وهكذا. وتقوم عوامل الاستنساخ بتنظيم التعبير الجيني بشكل دقيق، إذ تضمن تعبير الجين المعين في الوقت المحدد وفي الخلية المعينة وبالكمية المضبوطة، اعتماداً على حاجة الجسم. من جانب آخر فإن عوامل الاستنساخ تعد ضرورية جداً لعملية النمو في الكائنات متعددة الخلايا، إذ تسيطر عوامل الاستنساخ على كون تعبير جينات معينة مشغلة وجينات أخرى مغلقة بحيث توجه فعالية وشكل الخلية وبذلك تحدد مصير الخلية (أو مجموعة الخلايا) وكذلك تمايزها.

أما آلية عمل عوامل الاستنساخ فإنها باختصار ترتبط أما بمنطقة المشجع Promoter أو المعزز Enhancer (حسب نوع عامل الاستنساخ) لـ DNA قريبا من الجين الهدف، وتعمل على زيادة أو خفض تعبير الجين عن طريق آليات منوعة أهمها :

1- تثبيت أو منع ارتباط إنزيم البلمرة RNAP مع DNA.

2- تحفيز أستلة أو إزالة أستلة بروتينات الهستونات، وتقوم عوامل الاستنساخ بهذا الفعل مباشرة أو عن طريق توظيف بروتينات أخرى.

3- توظيف بروتينات المنشطات المساعدة Coactivators أو الكوابح المساعدة Corepressor لمعقد عوامل الاستنساخ – DNA لتسهيل عملها.

أنواع عوامل الاستنساخ :

نظراً لكبر حجم مجموعة بروتينات عومل الاستنساخ، فقد تم تقسيمه بعدة طرق منها:

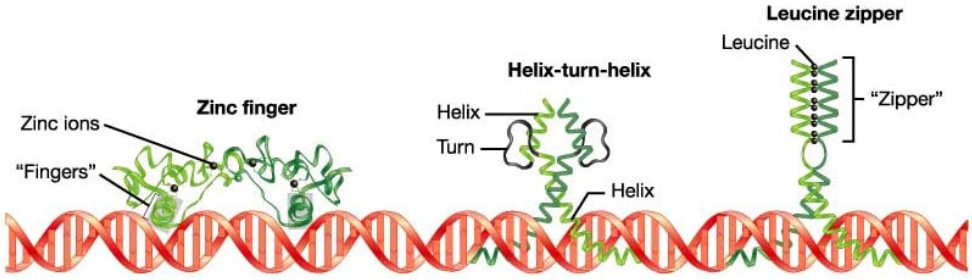
1- قطعة الحلزون – اللفة – الحلزون Helix-turn-helix motif (HTH): وهي أو قطعة تم التعرف على تركيبها كمعقد يرتبط مع DNA، والكثير من بروتينات الخلايا حقيقية النواة التي ترتبط مع DNA تكون من نوع HTH وتتميز باحتوائها على حلزون ألفا يرتبط مع الحيز الكبير لـ DNA (الشكل 11-6).

2- القطعة المرتبطة بالزنك Zinc binding motif (ZBM): ويسمى أحيانا باصبع الزنك Zinc finger (بسبب شكله الشبيه بالإصبع) ويتكون من أيون الزنك +Zn2 المرتبط مع أربعة من السستين و/ أو الهستدين، ويلعب هذا العامل دوراً تركيبياً في ضمان قطعة

الحلزون المزدوج الصحيح للتعبير الجيني وثبوتية هذه القطعة، مع ملاحظة أن أيون الزنك لا يرتبط بشكل مباشر مع الحلزون المزدوج لـ DNA (الشكل 11-6).

3- سحاب الليوسين القاعدي Basic leucine zipper (BLZ): وأسمه مشتق من شكله الشبيه بسحاب الملابس (الشكل 11-6)، ويتكون من أحماض أمينية قاعدية (لتسهيل انجذابها نحو الحامض النووي DNA) وخاصة الحامض الاميني الليوسين، ويكون على شكل حلزون التفاف ملفوف Coiled-coil، ويشابه في عمله HTH.

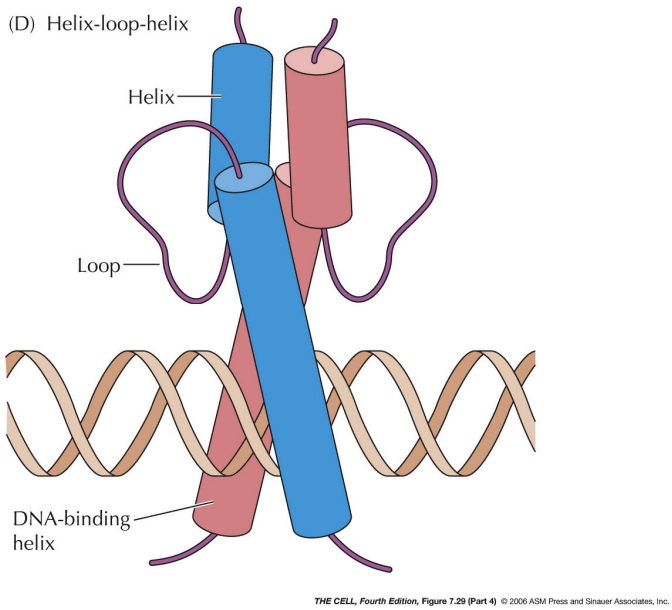
4- قطعة الحلزون – الانثناء – الحلزون Helix-loop-helix motif (HLH): وتشبه قطعة HTH إلا أن الرابط بين الحلزونين هو انثناء بدلاً من اللفة (الشكل 11-7).



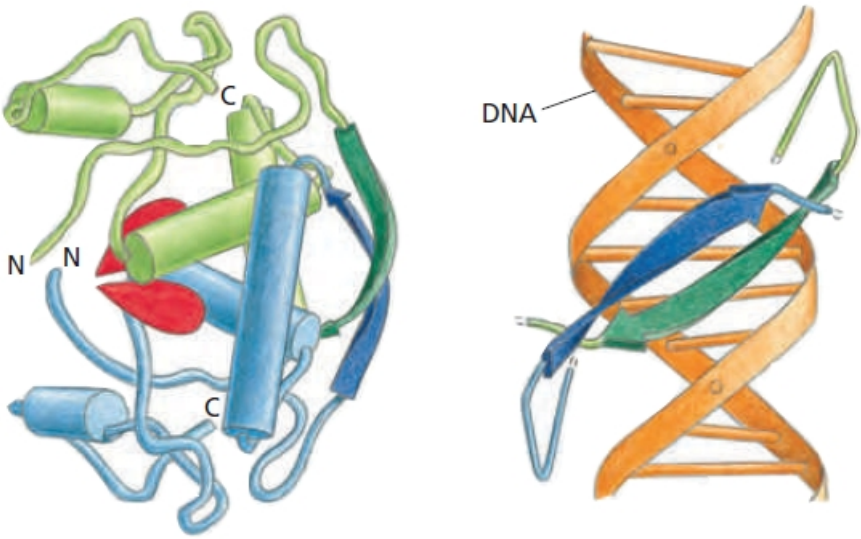
الشكل (11-6) نماذج من عوامل الاستنساخ

5- تركيب صفيحة بيتا المرتبطة مع DNA (DNA binding beta-sheet): تركيب الصفيحة بيتا هي قطعة ارتباط بالحلزون المزدوج DNA في كل من الخلايا بدائية وحقيقة النواة، ويعتقد أن التعرف على عناصر معينة ضمن الحلزون المزدوج DNA يتم من خلال تركيب صفيحة بيتا (الشكل 11-8).

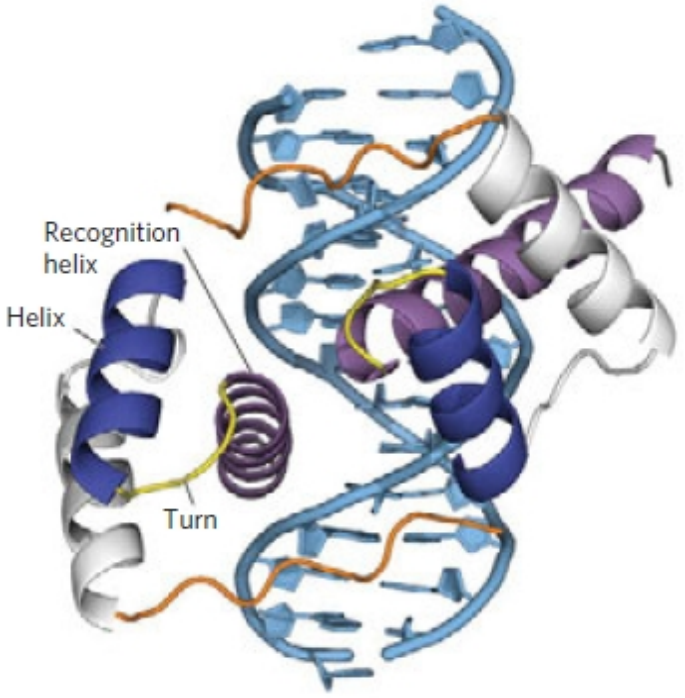
6- قطعة التماثل Homeodomain: وتم ملاحظة هذا النوع من البروتينات عند نمو الخلايا حقيقية النواة، ويتكون من 60 حامض أميني وترجع تسميته لتنظيمه لجينات Homeotic genes وهي الجينات المسؤولة عن تنظيم شكل الجسم، وتتواجد بكل محافظ في مدى واسع جداً من الكائنات بضمنها الإنسان، ويطلق بعض الباحثين تسمية Homeobox على تسلسلات DNA التي تشفر لهذه البروتينات (الشكل 11-9).



الشكل (11-7) قطعة الحلزون – الانثناء – الحلزون



الشكل (11-8) تركيب صفيحة بيتا المرتبطة مع DNA



الشكل (11-9) قطعة التماثل

عملية الاستنساخ في الخلايا حقيقية النواة :

هناك العديد من الفروقات الجوهرية في عملية الاستنساخ بين الخلايا حقيقية النواة وبدائية النواة، ومن هذه الفروقات :

1- في البكتريا الاستنساخ يتم بعد فك الحلزون المزدوج والاعتماد على قالب DNA في التصنيع، بينما في الخلايا حقيقية النواة فإن الاستنساخ يعتمد على قالب الكروماتين ولكن بعد فك الرزم وبعد استبعاد النيوكليوسومات من مكان الاستنساخ وذلك قبل بدء ارتباط إنزيم البلمرة RNAP مع المشجع.

2- في البكتريا يقوم إنزيم البلمرة RNAP وعامل سيكما الخاص به بقراءة تسلسلات DNA لحين إيجاد المشجع الخاص بهما، أما في الخلايا حقيقية النواة فإن إنزيم البلمرة RNAP لا يمكنه قراءة قالب DNA ولا يوجد العامل سيكما، لذلك فإن عملية التعرف والبدء عند

المشجع تحتاج مجموعة كبيرة من عوامل الاستنساخ التي يجب أن ترتبط قبل ارتباط إنزيم البلمرة وتهيئ له الظروف كي يرتبط، وتدعى هذه العوامل بعوامل الاستنساخ الأساسية Basal transcription factors، إذ يرتبط إنزيم البلمرة RNAP مع معقد عوامل الاستنساخ الأساسية – DNA في منطقة المشجع الخاصة به.

وفيما يخص المشجع فانه يختلف بين أنواع الجينات، فمثلاً جينات الخدمة Housekeeping مشجعاتها تنظم بطرق مختلفة، ويرتبط معها إنزيم البلمرة RNAP دون الحاجة إلى منشطات، على العكس من جينات تحتاج الخلية نواتجها في أوقات أو تحت ظروف معينة، فإن مشجعاتها تحتاج إلى منشطات كي يرتبط بها إنزيم البلمرة RNAP.

إنزيمات البلمرة RNAPs في الخلايا حقيقية النواة :

بالنسبة لإنزيم البلمرة الأول RNAPI الذي يتواجد فقط داخل النواة، ويكون الأكثر كمية من بين إنزيمات البلمرة RNAP، أما إنزيم البلمرة الثاني RNAPII فيكون مسئولا عن تصنيع معظم RNA من النوع النووي غير المتجانس Heterogenous nuclear RNA (hnRNA) الذي هو عبارة عن mRNA أولي، ويعرف hnRNA على أنه كل RNA في النواة عدا tRNA و rRNA، أما إنزيم البلمرة من النوع الثالث فيكون أقل فعالية من النوعين السابقين لكنه ينتج أنواع ثابتة وأساسية من RNA.

جميع إنزيمات البلمرة RNAP في الخلايا حقيقية النواة عبارة عن بروتينات ضخمة تعمل كمعقد حجمه بحدود 50 كيلو دالتون، ويتكون عادةً من 12 وحدة بنائية، الإنزيم بعد عملية التنقية (خارج الجسم in vitro) بإمكانه تصنيع RNA اعتماداً على قالب DNA، لكن لا يمكنه إيجاد والارتباط بالمشجع الخاص به. الوحدة الكبيرة في إنزيم البلمرة الثاني RNAPII لديه قطعة النهاية الكاربوكسيلية Carboxy-terminal domain (CTD) والذي يتكون من مكررات متعددة من تسلسلات 7 أحماض أمينية، هذا التسلسل ينفرد به إنزيم البلمرة الثاني RNAPII، ويتكرر هذا التسلسل حوالي 26 مرة في الخمائر و 50 مرة في اللبائن، ويعد عدد التكرار ضرورياً لأن الطفرة التي تعمل على إزالة أكثر من نصف هذه المكررات تكون قاتلة للكائن. وتملك CTD قابلية فسفرة عالية عند الأحماض الأمينية السيرين

والثريونين، كما يدخل CTD في تنظيم تفاعلات البدء في عملية الاستنساخ، الاستطالة، كل معاملات RNA، وكذلك تصدير mRNA إلى السايتوبلازم.

إنزيم البلمرة الأول RNAPI :

ويتواجد كانزيم كامل Holoenzyme والذي يحوي على عوامل إضافية ضرورية لمرحلة البدء، وتوظف من قبل عوامل استنساخها مباشرةً. ويحوي المشجع على منطقتين منفصلتين، المشجع الأساسي وتحيط بنقطة البداية وتمتد من -45 إلى +20 وتكون كافية لبدء الاستنساخ، كما أنها غنية بـ GC، ما عدا منطقة صغيرة غنية بـ AT حول نقطة البداية. كفاءة المشجع الأساسي تزداد بقوة من خلال عنصر المشجع الصاعد Upstream promoter element (UPE) أحياناً يسمى عنصر السيطرة الصاعد Upstream control element (UCE)، إن UPE يكون غنياً بـ GC ويرتبط بتسلسلات المشجع ويقع بين -180 و -107. والتنظيم أعلاه يكون شائع لإنزيم البلمرة الأول RNAI في العديد من أنواع الكائنات الحية بالرغم من وجود اختلاف كبير في التسلسلات بين هذه الأنواع، ويحتاج إنزيم البلمرة الأول RNAI إلى اثنين من عوامل الاستنساخ للتعرف على تسلسلات المشجع :

1- العامل الذي يرتبط بالمشجع الأساسي ويدعى العامل الاختياري الأول Selective factor 1 (SL1) (أو يسمى TF-IB أو Rib1 حسب نوع الكائن الحي) ويتكون من أربع وحدات بروتينية، اثنان منها هي البروتين المرتبط TATA-binding protein (TBP)، إذ أن TBP يعد ضرورياً لعمل كل من إنزيمي البلمرة الثاني RNAPII والثالث RNAPIII.

2- العامل الثاني ويكون مماثل للعامل TFIIB لإنزيم البلمرة الثاني RNAPII.

إن TBP لا يرتبط مباشرة مع DNA الغنية بـ GC بل يتم ذلك من قبل المكونات الأخرى لـ SL1. إن SL1 يضمن أن إنزيم البلمرة الأول RNAI قد تموضع في نقطة البداية، ومن الوظائف الأساسية لـ SL1 هو تجميع معقدات ما قبل بدء الاستنساخ، ويعد SL1 هدفاً للعديد من العلاجات الحديثة للأمراض السرطانية.

ويذكر أن مرحلة البدء في عملية الاستنساخ (في إنزيمات البلمرة الثلاث RNAPs) تعتمد على عامل التموضع أو إيجاد الموقع والتي يقوم بها TBP مرتبطاً مع بروتينات

متخصصة لكل نوع من المشجعات، فمثلاً في مشجع إنزيم البلمرة الأول RNAPI لا يرتبط مع DNA، بينما في المشجعات الحاوية على TATA-box لإنزيم البلمرة الثاني RNAPII فإن وظيفتها الأساسية إيجاد مواضع العوامل على DNA.

عامل الاستنساخ النووي الأول :

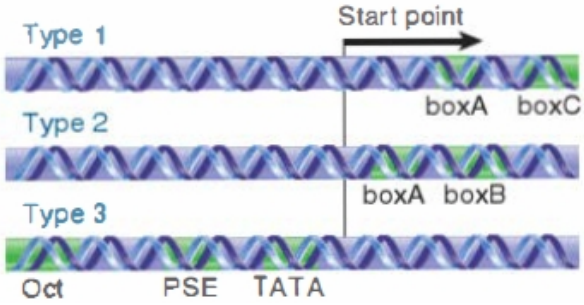
عامل الاستنساخ النووي الأول Nuclear transcription factor 1 هو بروتين يشفر في الإنسان من قبل الجين UBTF، ويسمى أحياناً عامل ارتباط الصعود Upstream binding factor (UBF) وهو عمل استنساخ ضروري لتعبير جينات كل من 18S و 5.8S و 28S من RNA الرايبوسومي، بروتين UBF يتكون من أثنين من متعدد الببتيدات (وزنهما الجزيئي 94 و 97 كيلو دالتون). و UBF له العديد من الوظائف المهمة منها :

1- يعد ضرورياً لمراحل بدء متكررة بكثرة.
2- يعمل على إبقاء الكروماتين كتركيب مفتوح.
3- يمنع ارتباط الهستون H1 وبذلك يمنع تجمع أجزاء الكروماتين بالهستونات.
4- يحفز تحرر المشجع من انزيم البلمرة RNAP ويحفز SL1.

إنزيم البلمرة الثالث RNAPII :

المشجع هنا يقسم إلى ثلاث أصناف عامة تختلف عن بعضها في طريقة التعرف عليها بمجاميع عوامل الاستنساخ المختلفة.

- المشجع للصنف الأول والثاني (جينات 5S و tRNA) تكون داخلية Internal أي تقع نزولاً Downstream من نقطة البدء.
- المشجع للصنف الثالث (جينات RNA النووية الصغيرة snRNA) تقع صعوداً من نقطة البدء. ويمكن توضيح الأصناف الثلاث لمشجعات إنزيم البلمرة الثالث RNAPIII بالشكل (11-10).



الشكل (11-10) لمشجعات إنزيم البلمرة الثالث RNAPIII (مأخوذ من Krebs et al., 2014).

1- يتكون مشجع النوع الأول لجين 5S الرايبوسومي من تسلسلات boxA والمفصولة عن تسلسلات boxC بواسطة عنصر وسطي Intermediate element (IE)، والمنطقة بأكملها (أي boxA-IE-boxC) تسمى منطقة السيطرة الداخلية 5S internal control region (5S ICR). وفي الخمائر فقط عنصر boxC يكون ضرورياً لعملية البدء بالاستنساخ.

2- مشجع النوع الثاني لجين tRNA فيتكون من تسلسلات boxA المفصولة عن تسلسلات boxB.

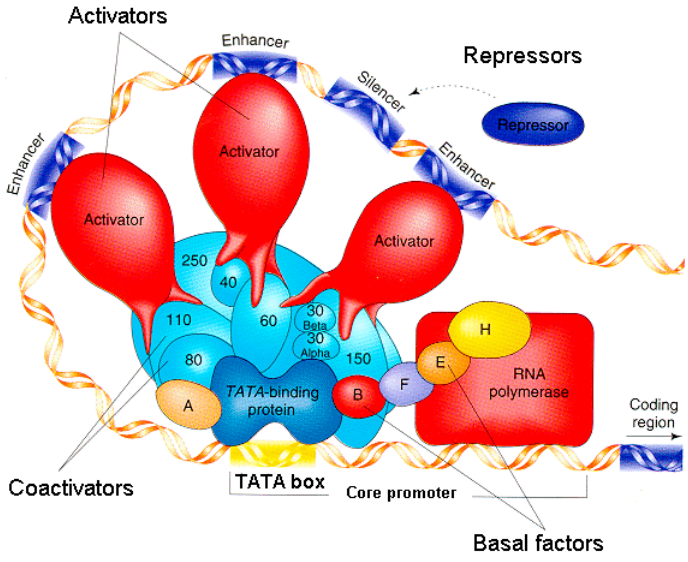
3- أما المشجع من النوع الثالث لجينات تشفر لـ RNAs صغيرة فلديها ثلاث عناصر تسلسلات كلها تقع صعوداً Upstream من نقطة البدء، هذه العناصر نفسها تتواجد في بعض مشجعات إنزيم البلمرة الثاني RNAPII.

إنزيم البلمرة الثاني RNAPII :

من دراسة عمل إنزيم البلمرة الثاني RNAPII تم اكتشاف عوامل الاستنساخ العامة أو الأساسية، وهي ببساطة بروتينات ضرورية للبدء بالاستنساخ من قبل إنزيم البلمرة الثاني RNAPII عند كل المشجعات، وسميت هذه العوامل بـ TFIIX، إذ أن TF مختصر لعوامل الاستنساخ Transcription factors و II تشير إلى إنزيم البلمرة الثاني RNAPII و X عبارة عن حرف كبير (A، B، C، D، E...) حسب نوع العامل (الشكل 11-11)، وفيما يلي جدول (11-1) يوضح أهم عوامل الاستنساخ والوظيفة الأساسية لكل عامل.

جدول (11-1) عوامل استنساخ إنزيم البلمرة الثاني RNAPII

العامل	عدد الوحدات المكونة	الوزن الجزيئي (كيلو دالتون)	الوظيفة الأساسية
TBP	1	38	التعرف على TATA-box بشكل متخصص
TFIIA	3	35،19،12	تثبيت ارتباط TFIIB و TBP مع المشجع
TFIIB	1	35	ترتبط مع TBP وتوظف معقد RNAPII-TFIIF.
TFIIE	2	57 ،34	توظف TFIIH الذي له فعالية إنزيمي ATPase و Helicase
TFIIF	2	74 ،30	ترتبط بقوة بإنزيم البلمرة RNAPII، وترتبط مع TFIIB وتمنع الارتباط غير المتخصص لـ RNAPII مع DNA
TFIIH	12	89–35	تفك الحلزون المزدوج عند المشجع (فعالية إنزيم Helicase) تفسفر إنزيم البلمرة RNAPII (عند CTD)، توظف بعض بروتينات الإصلاح



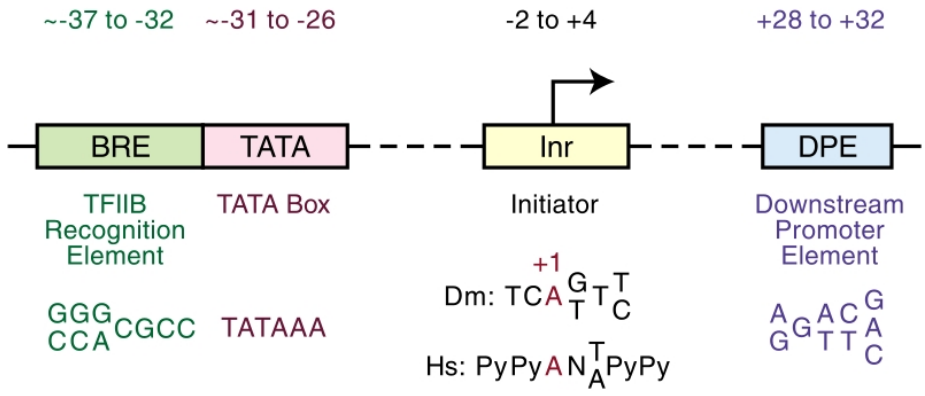
الشكل (11-11) عوامل الاستنساخ وإنزيم البلمرة الثاني RNAPII والمشجع والبروتينات التنظيمية المرافقة

تكون مشجعات إنزيم البلمرة الثاني RNAPII أكثر تنوعاً من مشجعات إنزيمي البلمرة الأول RNAPI والثالث RNAPIII وكذلك أكثر من مشجعات إنزيم البلمرة RNAP في البكتريا. وتتكون مشجعات إنزيم البلمرة الثاني RNAPII عادةً من ثلاث عناصر أساسية فضلاً عن عناصر ثانوية متعددة أخرى، وهذه العناصر الأساسية هي :

1- TATA-box: وتتواجد في العديد من المشجعات وهي تسلسلات تقع عادة عند 25 زوج من القواعد صعوداً Upstream من نقطة البداية، الكائنات حقيقية النواة المتقدمة تتميز بوجود تسلسلات تكون العنصر الأساسي فيها، هذه التسلسلات هي TATAA يتبعها 3 أزواج من القواعد AT، وعادة تحاط TATA-box بتسلسلات غنية بـ GC والتي يمكن أن تلعب دوراً في وظائف TATA-box. المشجعات التي لا تملك TATA-box تسمى مشجعات TATA-less، ويعتقد أن 50٪ أو أكثر من المشجعات هي من نوع TATA-less.

2- عنصر المشجع النازل Downstream promoter element (DPE) ويقع من +28 إلى +32، المشجع المثالي يحوي عادةً TATA-box و Inr، أو Inr و PDE (الشكل 11-12).

3- البادئ Initiator (Inr): وهو من المكونات الأساسية للمشجع ويقع بين التسلسلات – 2 و +4، ويشابه في وظيفته كل من Pribnow box في البكتريا و TATA-box في الخلايا حقيقية النواة. وتسهل ارتباط عامل الاستنساخ TFIID.



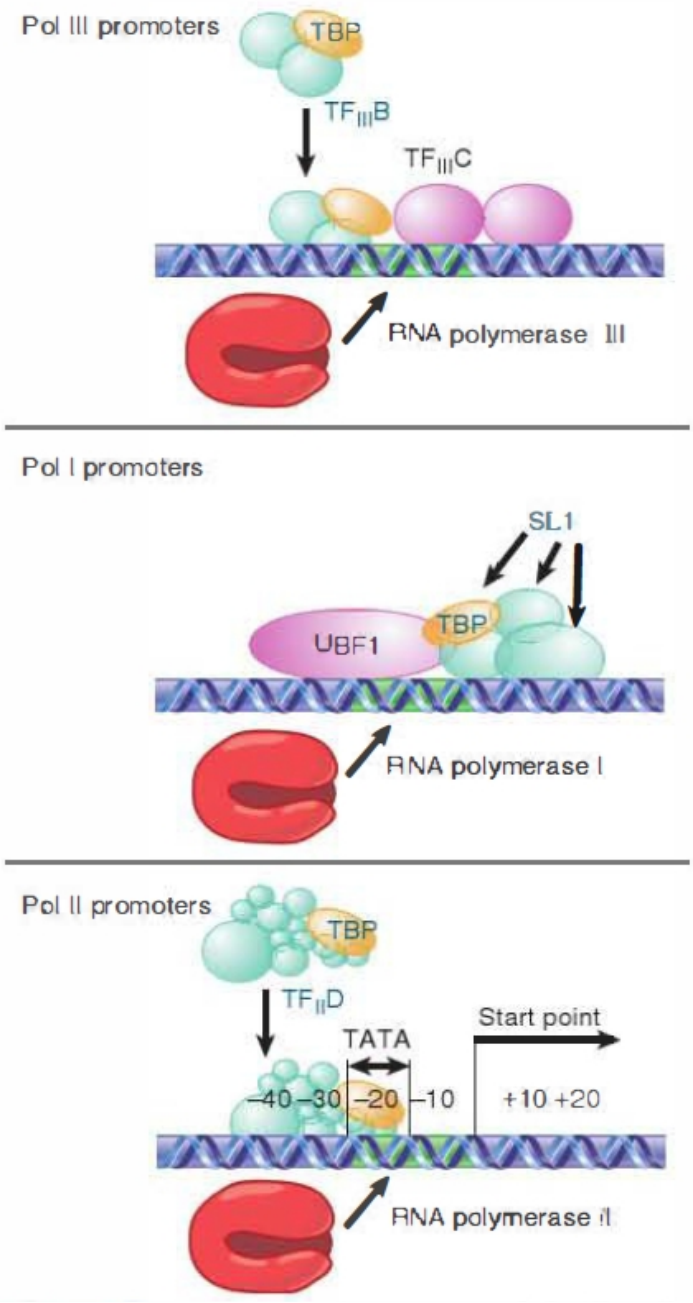
الشكل (11-12) مكونات مشجع انزيم البلمرة الثاني RNAPII المثالي

التغييرات المرافقة لعملية البدء بالاتنساخ :

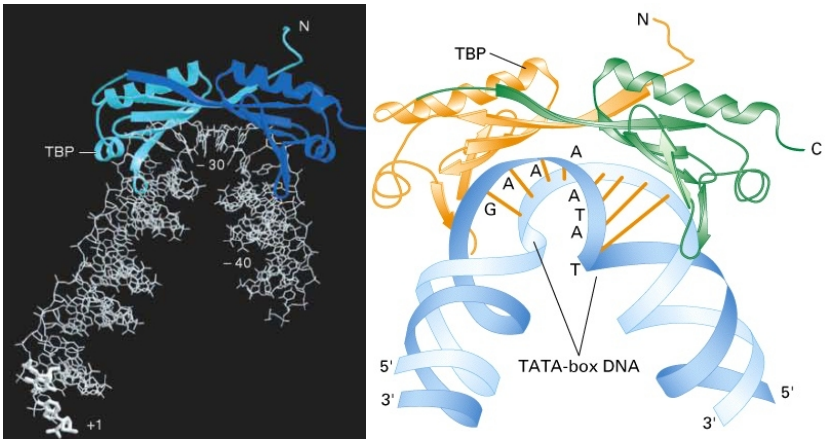
قبل بدء عملية الاستنساخ تحصل عمليات تحوير وإعادة تشكيل للكروماتين، لفك تركيبه، وإزالة أي نيوكليوسوم "يغطي" المشجعات في كل الخلايا حقيقية النواة، عندها فإن عوامل تعيين الموقع ترتبط مع المشجعات، ولكل نوع من المشجعات عواملها الخاصة والتي تحوي عادةً على TBP فضلاً عن مكونات أخرى. و TBP عندما أكتشف لأول مرة كان يعتقد أنه يرتبط فقط بـ TATA-box في الجينات التي يعمل عليها إنزيم البلمرة الثاني RNAPII، ثم وجد أنه جزء من عوامل تعيين الموقع (SL1) لإنزيم البلمرة الأول RNAPI وللعامل TFIIIB لإنزيم البلمرة الثالث RNAPIII، لذلك فإن بعض العلماء يعد الاسم TBP غير معبر، لكنه مازال هو المستعمل، كما أن العديد من مشجعات إنزيم البلمرة الثاني RNAPII تفقد TATA-box لكنها تحتاج العامل TBP (الشكل 11-13).

عامل تعيين الموقع لإنزيم البلمرة الثاني RNAPII هو TFIID (الحجم الكلي لـ TFIID هو حوالي 800 كيلو دالتون) ويتكون من 14 وحدة تركيبية تدعى العوامل المرتبطة بـ TBP، TBP-associated factors (TAFs) وهناك أنواع متعددة من TAFs حسب نوع المشجع، وبعض TAFs لها خصوصية نسجية، وحديثاً تم تسمية TAFs لإنزيم البلمرة الثاني بـ TAF1 و TAF2... وهكذا.

ولبروتين TBP صفة ارتباط غريبة إذ يرتبط مع الحيز الصغير Minor groove لـ DNA عكس الغالبية العظمى من البروتينات التي ترتبط مع DNA فإن ارتباطها يكون مع الحيز الكبير Major groove، ومن دراسات الشكل التركيبي المجسم لـ TBP تم معرفة الآلية الدقيقة للارتباط بينه وبين DNA، إذ وجد أن TBP يحيط بأحد جانبي DNA مكوناً ما يشبه السرج Saddle حول الحيز الصغير، ويقوم TBP بثني الحيز الصغير بشكل كبير بدرجة حوالي o80 كي تكون مناسبة مع السرج مما ينتج عنه ارتباط الجزء الداخلي الصغير من TBP مع DNA، أما الجزء الخارجي الكبير فيبقى حراً للارتباط مع البروتينات التنظيمية الأخرى، كما أن موقع الارتباط مع DNA يحوي على CTD وذيل متنوع من النهاية N والذي يبرز للارتباط مع البروتينات الأخرى (الشكل 11-14).



الشكل (11-13) دور TBP في ارتباط انزيمات البلمرة RNAPs مع مشجعاتها (مأخوذ من Alberts et al., 2015).



الشكل (11-14) ارتباط TBP مع DNA وعملية الثني

ارتباط TBP مع الحيز الصغير لـ DNA وانثناء الحيز الصغير يزيد من عرضه، وهذا التركيب له عدة مهام وظيفية :

1- تغيير شكل خيطي DNA على جانبي TATA-box يعمل على جعل عوامل الاستنساخ وإنزيم البلمرة RNAPII أقرب بكثير مع خيطي DNA مما لو بقي مستقيماً.

2- الانثناء عند TATA-box يعد مفيد من ناحية الطاقة لفك حوالي ثلث لفة من DNA (أقل استهلاكاً للطاقة).

3- وجود TBP على الحيز الصغير من DNA، يجعلها ترتبط مع بروتينات أخرى على الحيز الكبير، مما يؤدي بالنهاية إلى وجود كثافة عالية من البروتينات المرتبطة بـ DNA في هذه المنطقة.

تجمع المكونات عند المشجع :

في الخلايا حقيقية النواة فإن مشجعات الجينات يمكن أن توجد في ثلاث أنواع أو أشكال من الكروماتين :

1- جين غير نشط في كروماتين مغلق.

2- جين نشط بقوة في كروماتين مفتوح ومرتبط معه إنزيم البلمرة RNAP ويسمى الجين

المتوازن Poised gene، وفي هذا النوع يمكن أن تتجمع المكونات الأساسية لكن لا يمكن أن تتقدم نحو عملية الاستنساخ بدون وجود إشارة البدء بالاستنساخ، ومثال عليه هي جينات صدمة الحرارة Heat-shock genes إذ تكون متوازنة ويمكن أن تنشط بسرعة عند ارتفاع درجة الحرارة.

3- جين تم تشغيله في كروماتين مفتوح.

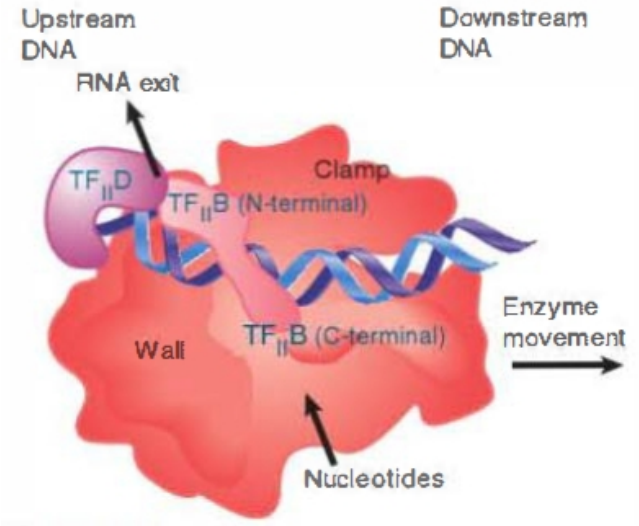
الخطوة الأولى في تنشيط المشجع الحاوي على TATA-box في الكروماتين المفتوح تبدأ عندما يتم توجيه ارتباط العامل TFIID مع TATA-box ويمكن أن تشجع هذه الخطوة من خلال بعض عناصر الصعود Upstream التي تعمل على المنشط المساعد Coactivator. إن TFIID يتعرف أيضاً على تسلسلات البدء Inr عند نقطة البدء و PDE وربما عناصر أخرى من المشجع. ويرتبط TFIID نزولاً Downstream مع TATA-box مجاور TBP وبذلك يزيد من الارتباط على أحد جانبي DNA من −10 إلى +10.

أما TFIIB فأنه يوفر سطح يتم التعرف عليه من قبل إنزيم البلمرة RNAP، لذلك فانه يكون مسئولا عن توجيه ارتباط إنزيم البلمرة RNAP، كما يقوم TFIIB بدور مركزي في تنظيم عمل إنزيم البلمرة الثاني RNAPII مع معقد المشجع−TFIIA−TFIIB وبذلك يساعد في الانتقال من معقد مغلق إلى مفتوح واختيار موقع بدء الاستنساخ Transcription start site (TSS). ومن دراسة التركيب الدقيق لـ TFIIB مع إنزيم البلمرة RNAP وجد أن **هناك ثلاث أجزاء من العامل TFIIB تتفاعل مع إنزيم البلمرة RNAP (الشكل 11-15) وهي :**

1- النهاية N لشريط الزنك من العامل TFIIB يرتبط مع الإنزيم قرب موقع خروج سلسلة RNA، وتساهم في التنظيم من البدء إلى خروج المشجع.

2- النهاية C وتتفاعل مع إنزيم البلمرة والعامل TFIID للحفاظ على خيطي DNA عند المشجع، كما يساهم في إيجاد مسار DNA الذي سيرتبط مع العوامل TFIIE، TFIIF، TFIIH.

3- إصبع متطاول من العامل TFIIB يحشر في المركز الفعال لإنزيم البلمرة RNAPII.



الشكل (11-15) ارتباط TFIIB مع انزيم البلمرة RNAP و DNA (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

أما العامل TFIIF فهو رباعي الوحدات غير المتجانسة يتكون من نوعين من الوحدات ويعد ضرورياً لتجمع معقد ما قبل البدء Preinitiation complex (PIC)، الوحدة الكبيرة (وتدعى RAP74) وله فعالية إنزيم Helicase لـ DNA المعتمد على ATP، إذ يعمل على فصل خيطي DNA عند البدء، والوحدة الصغيرة (RAP38) تماثل العامل سيكما في البكتريا إذ ترتبط مع الجزء الأساس لإنزيم البلمرة RNAP. ويعتقد أن TFIIF يساهم في إبقاء إنزيم البلمرة RNAPII مع معقد الاستنساخ، كما تساهم مع TFIIB في اختيار موقع بدء الاستنساخ.

ويذكر أن آخر العوامل التي ترتبط وبشكل متأخر مع معقد بدء الاستنساخ هي TFIIE و TFIIH، ويعملان في الطور الأخير من مرحلة بدء الاستنساخ. إن ارتباط TFIIE يكون ما يشبه الحدود التي تحمي منطقة البدء لغاية +30. أما العامل TFIIH فهو عامل الاستنساخ العام الوحيد الذي يملك فعالية إنزيمية متعددة ومستقلة، ومن هذه الفعاليات هي ؛ ATPase و Helicase بالاتجاهين، وفعالية الكاينيز الذي يمكن أن يفسفر الذيل CTD لإنزيم البلمرة RNAPII، كما يعد TFIIH عاملاً فريداً من نوعه إذ يمكن أن يلعب دوراً مهماً

في عملية الاستطالة، كما يمكنه القيام بعمليات إصلاح DNA، وبينت التجارب أن كل من TFIIE و TFIIH يساهمان في فك الحلزون المزدوج DNA للسماح لإنزيم البلمرة RNAPII بالبدء بالحركة.

إن عملية تحرر إنزيم البلمرة من المشجع تحتاج إلى عدة خطوات وآليات وتبدأ هذه العملية عند البدء بارتباط أول نيوكليوتيد خلال تصنيع سلسلة RNA وتسمى العملية Promoter clearance وهي خطوة تنظيمية أساسية في تحديد هل يتم استنساخ الجين أم لا، وأهم عامل تنظيمي في هذه الخطوة هي المعززات Enhancers (بينما في البكتريا كانت هذه الخطوة من خلال تحويل المعقد المغلق إلى معقد مفتوح). وتعد فسفرة الذيل CTD ضرورية لتحرر إنزيم البلمرة RNAPII من المشجع وعوامل الاستنساخ، وبذلك تسمح بالانتقال إلى مرحلة الاستطالة.

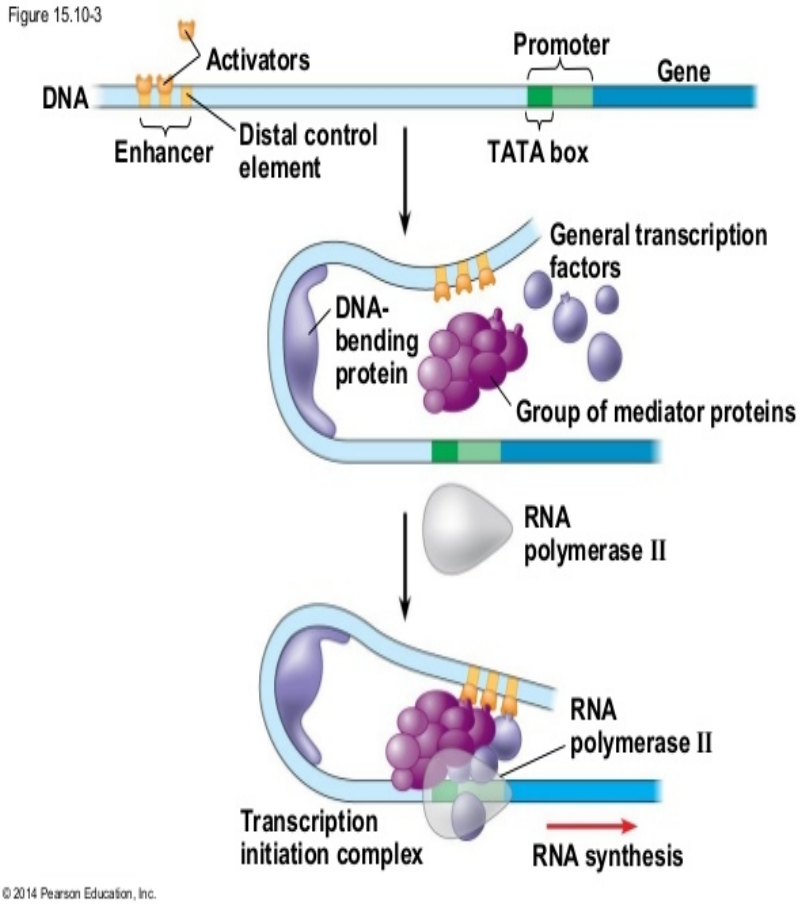
ويذكر أن عوامل الاستنساخ التي ترتبط بالمعزز لا ترتبط مباشرة مع عناصر المشجع بل ترتبط مع المنشط المساعد Coactivator والذي بدوره يرتبط بعناصر المشجع، ومن أهم المنشطات المساعدة هو الوسيط Mediator.

الوسيط :

الوسيط Mediator هو معقد بروتيني ضخم يتكون من وحدات متعددة تصل إلى 30 وحدة أو أكثر في الكائنات حقيقية النواة المتقدمة (في الإنسان 31 وحدة وبحجم 1.2 ألف كيلو دالتون)، وهناك أنواع كثيرة ومنوعة من الوسيط حسب نوع الخلايا والخصوصية للجين، لكن جميعها تملك تركيب أساسي محافظ على تركيبه من الخمائر إلى الإنسان، وتتلقى الإشارات من عوامل الاستنساخ المحيطة بالمعزز، وتحتاج معظم الجينات تفاعل بين عوامل الاستنساخ المرتبطة بالمعزز مع المشجع من خلال ثني قطعة DNA بفعل الوسيط. ويعد معقد الوسيط ضرورياً لعملية الاستنساخ في معظم (إن لم يكن كل) الجينات التي تستنسخ بإنزيم البلمرة الثاني RNAPII في الخمائر، وطريقة عملها في اللبائن تشابه الخمائر، ويرتبط معقد الوسيط مع عوامل الاستنساخ وإنزيم البلمرة الثاني RNAPII، إذ يعمل كمنشط مساعد Coactivator من خلال ارتباطه بالجزء CTD من الإنزيم الكلي للبلمرة RNAPII

Holoenzyme ويعمل كجسر رابط بين إنزيم البلمرة وعوامل الاستنساخ (الشكل 11-16). ويمكن تقسيم معقد الوسيط إلى الأجزاء التالية :

الرأس، القطعة الوسطية، الذيل، والجزء CDK8. وتسمى الأجزاء (في الإنسان) بـ MED وتأخذ الأرقام من 1 إلى 31 (MED32–MED1).



الشكل (11-16) الوسيط وطريقة عمله خلال بدء الاستنساخ (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

أهم المراجع :

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. **Molecular Biology of the Cell.** 6th Edition. (2015). Garland Science.

David L. Nelson and Michael M. Cox. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 6th Edition. (2012). W.H. Freeman.

Edward S. Tobias, Michael Connor, Malcolm Ferguson-Smith. **Essential Medical Genetics.** 6th ed. (2011). Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd.

Harvey Lodish , Arnold Berk , Chris A. Kaiser , Monty Krieger , Anthony Bretscher , Hidde Ploegh , Angelika Amon , Kelsey Martin. **Molecular Cell Biology.** 8th Edition. (2016). W. H. Freeman.

Martinez E (2002). **"Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription".** *Plant Mol Biol.* 50 (6): 925–47.

Myers LC, Kornberg RD (2000). **"Mediator of transcriptional regulation".** *Annu Rev Biochem.* 69: 729–49.

Nudler E; Gottesman ME (2002). **"Transcription termination and anti-termination in E. coli".** *Genes to Cells.* 7 (8): 755–68.

Peter Paolella. **Introduction to Molecular Biology.** (1998). The McGraw-Hill Companies. Inc.

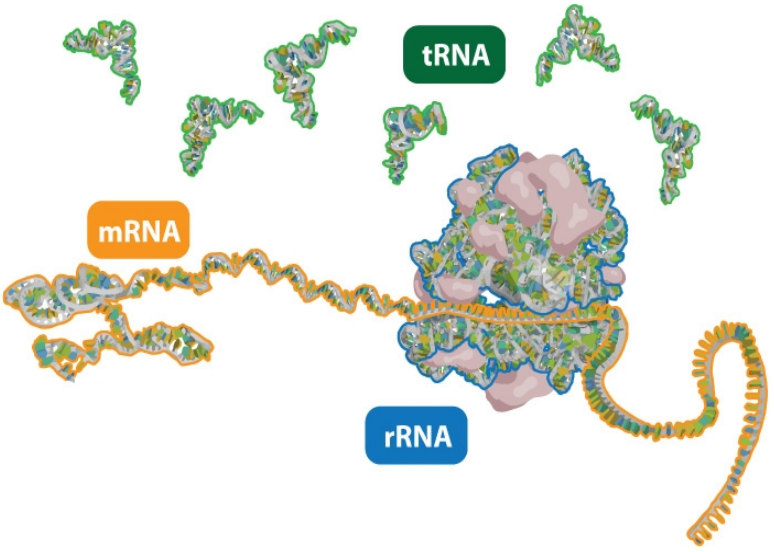
Richard M. Twyman. **Advanced Molecular Biology.** (1998). BIOS Scientific Publishers Limited.

Spiegelman BM, Heinrich R (2004). **"Biological control through regulated transcriptional coactivators".** *Cell.* 119 (2): 157–67.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. **Molecular Biology of the Gene**. 7th ed. (2013). Benjamin Cummings. CSHL Press.

الفصل الثاني عشر

RNA



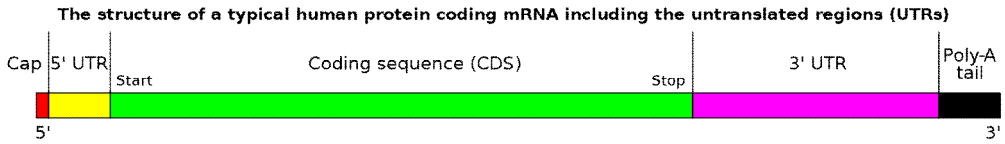
الفصل الثاني عشر

RNA

يلعب RNA دوراً مركزياً في التعبير الجيني، وسابقاً كان يعتقد أنه فقط وسيط لنقل المعلومات من DNA إلى البروتين، ولكن بتقدم البحوث تبين أن أنواع متعددة من RNA تلعب أدواراً مهمة في فعاليات حيوية للخلية ومنها تنظيم التعبير الجيني، ويعد هذا أحد أدلة من يدعمون نظرية نشوء الحياة من RNA (أو ما يسمى بعالم RNA، RNA world) إذ يعتقد هؤلاء أن RNA كانت المادة النووية للكائنات الحية البدائية، ويذكر أن هناك العديد من أنواع RNA تختلف في التركيب والوظيفة وسيتم التركيز في هذا الفصل على الأنواع الأساسية وشرح تركيبها ووظائفها في الصفحات التالية.

mRNA :

يلعب mRNA دوراً محورياً في تعبير الجينات المشفرة للبروتينات، إذ أن كل جزيئة mRNA تحمل المعلومات الوراثية لتصنيع متعدد ببتيد متخصص خلال عملية الترجمة، والشكل (12-1) يوضح التركيب العام لـ mRNA.

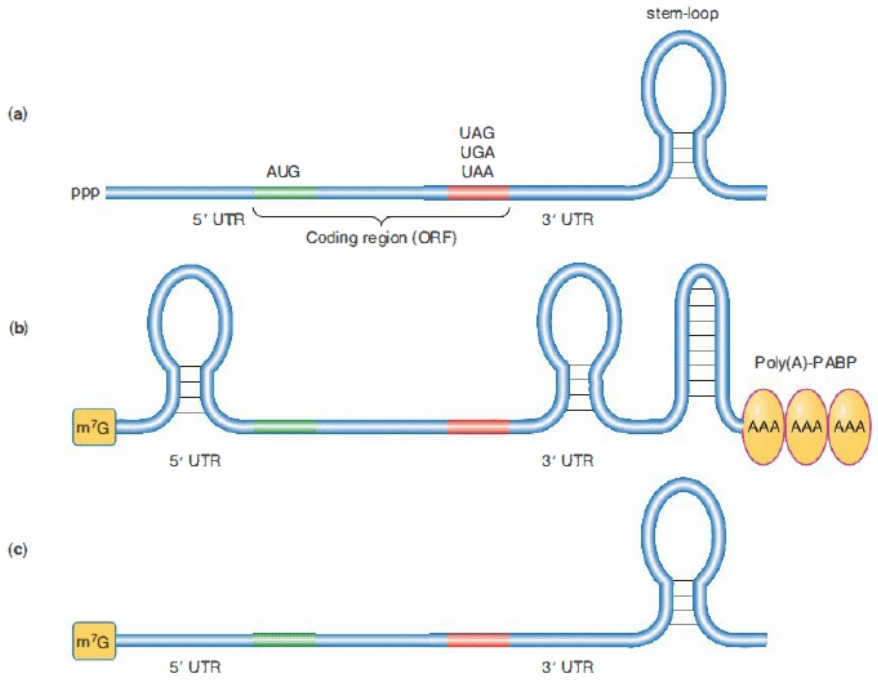


الشكل (12-1) تركيب mRNA في اللبائن

في البكتريا لا يتم تحوير نهايتي mRNA بعد عملية الاستنساخ، إذ تبدأ بالنيوكليوتيد '5- ثلاثي الفوسفات التي تبدأ منها عملية الاستنساخ، وتنتهي بأخر نيوكليوتيد يضيفه إنزيم البلمرة RNAP قبل انتهاء عملية الاستنساخ، والنهاية '3 لمعظم mRNA لبكتريا الايشريشيا القولونية تكوّن تركيب دبوس الشعر Hairpin الذي يدخل ضمن عملية إنهاء الاستنساخ (غير المعتمد على العامل رو rho).

أما في الخلايا حقيقية النواة فإن mRNA يحصل لها عدة عمليات تغيير أهمها إضافة القبعة للنهاية '5 (Capping) وإضافة الذيل متعدد الأدينيل Polyadenyl tail للنهاية '3 وعملية القطع والوصل Splicing، وسيتم شرح العمليات الثلاث في فصل معاملة RNA. معظم المعلومات التي لا تستعمل للتشفير لتصنيع البروتين توجد في منطقتين غير مشفرتين هما النهاية '5 غير المترجمة untranslated region (5'-UTR) -5' و النهاية '3 غير المترجمة -3' untranslated region (3'-UTR) على mRNA، مع ملاحظة وجود بعض العناصر في المنطقة المشفرة، وبالرغم من أن جميع mRNA هي تسلسلات مستقيمة من النيوكليوتيدات لكن التركيب الثانوي Secondary والثالثي Tertiary يمكن أن تتكون بفعل ازدواج القواعد ضمن الجزيئة الواحدة من mRNA، هذه التراكيب يمكن أن تكون بسيطة (مثل حلقة الجذع Stem-loop) (الشكل 12-2)، أو أكثر تعقيداً تحوي تفرعات أو ازدواج قواعد عن بعضها.

واليوم يعتقد أن الشكل الفراغي لـ mRNA وما يطرأ عليه من تغيرات له دور كبير في فعالية mRNA وتنظيم هذه الفعالية في عملية الترجمة وكذلك تنظيم تحطيم mRNA وتموضع mRNA داخل الخلية.



الشكل (2-12) شكل mRNA (a) في البكتريا. (b) في الخلايا حقيقية النواة. (c) الخاصة بالهستونات في اللبائن مأخوذ من (Nelson and Cox, 2012).

جزيئة mRNA تكون غير مستقرة داخل الخلية وتحطم بسرعة (عكس DNA) وذلك بسبب احتواء الخلية على مجموعة كبيرة من الإنزيمات المحطمة لـ RNA والتي تسمى Ribonucleases، وبعض هذه الإنزيمات تكون متخصصة لـ mRNA. والسبب الثاني لعدم استقرار mRNA (مع ملاحظة أن هذا السبب يكون تأثيره أقل من السبب الأول) هو أن الآصرة الفوسفاتية ثنائية الأستر التي تربط الرايبونيوكليوتيدات (أي في RNA) تكون هذه الأواصر أضعف من مثيلاتها التي تربط الديوكسي رايبونيوكليوتيدات (أي في DNA) بسبب وجود مجموعة الهيدروكسيل '2 على سكر الرايبوز.

ولإنزيمات الرايبونيوكليز (أحياناً تدعى نيوكلييز Nucleases) وظائف حيوية مهمة في الخلية، إذ تدخل ضمن عمليات تضاعف DNA، إصلاح DNA، معاملة المستنسخات الجديدة والتي تشمل: pre-mRNAs و tRNAs و rRNA و miRNA و snRNA.

تحطيم mRNA :

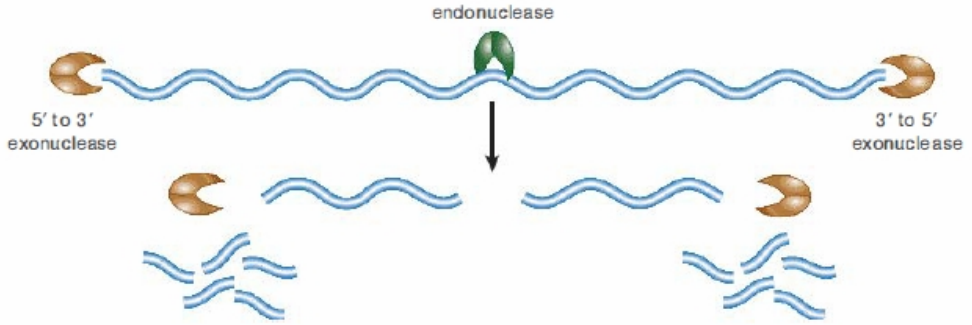
انزيمات الرايبونيوكلييز يمكن تقسيمها إلى :

1- ايندونيوكلييز Endonucleases: وتعمل على تحطيم جزيئة RNA من الداخل وربما تكون ضرورية أو مفضلة لتراكيب أو تسلسلات متخصصة.

2- ايكزونيوكلييز Exonucleases: وتعمل على إزالة النيوكليوتيدات من طرفي RNA، وتكون لديه وجهة عمل معروفة إذ إما أن تعمل '5 إلى '3، أو '3 إلى '5 (الشكل 12-3)، كما أن الايكزونيوكلييز نفسه يقسم عادةً إلى نوعين هما :

أ - المستمرة Processive إذ تستمر إزالة النيوكليوتيدات بشكل مستمر.

ب- المتوزعة Distributive وتعمل على إزالة نيوكليوتيد واحد فقط أو عدة نيوكليوتيدات ثم تنفصل عن المادة الأساس (RNA).



الشكل (12-3) الاندونيوكلييز والايكزونيوكلييز
(مأخوذ من Alberts et al., 2015)

ومعظم mRNA يتحطم بشكل عشوائي، لذلك فإن ثبوتيته يعبر عنها بالعمر النصفي Half-life (t½) (وهو الوقت اللازم كي ينخفض تركيز مادة ما إلى نصف ما كانت عليه في البداية) ويعتمد العمر النصفي على تركيب mRNA (تسلسلات النيوكليوتيدات)، وبذلك فإن أنواع مختلفة من mRNA لها عمر نصفي مختلف قد يصل إلى مئة ضعف أو أكثر، فمثلاً في بكتريا الايشريشيا القولونية فإن العمر النصفي لـ mRNA المثالي هو 3 دقائق، بينما العمر

النصفي لبعض mRNA في الايشريشيا القولونية أقل من 20 ثانية والبعض الآخر أكثر من 90 دقيقة، بينما في الخمائر المتبرعمة يكون العمر النصفي لـ mRNA بحدود 3–100 دقيقة، وفي كائنات راقية أخرى تكون دقائق – ساعات ونادراً ما تصل إلى أيام، أما mRNA الشاذة فيتم التعرف عليها وتحطيمها فوراً.

وهنا يجب الانتباه إلى أن توافر mRNA في الخلية لا يعتمد فقط على التصنيع بل يعتمد على معدل التوازن بين معدل التصنيع (الاستنساخ والمعاملة) ومعدل التحطيم. وعندما تكون هذه العوامل ثابتة فإن مستوى mRNA يصل إلى حالة الاستقرار Steady-state. وأخيراً فإن فعالية الخلية في تصنيع البروتينات يعتمد على توافر mRNA مع الأخذ بعين الاعتبار دور فعالية عملية الترجمة، كما أن عدم السيطرة على استقرار أو ثبوتية mRNA له دور في العديد من الحالات المرضية المعقدة مثل السرطانات والالتهابات المزمنة وأمراض أخرى.

ارتباط mRNA مع البروتينات في الخلايا حقيقية النواة :

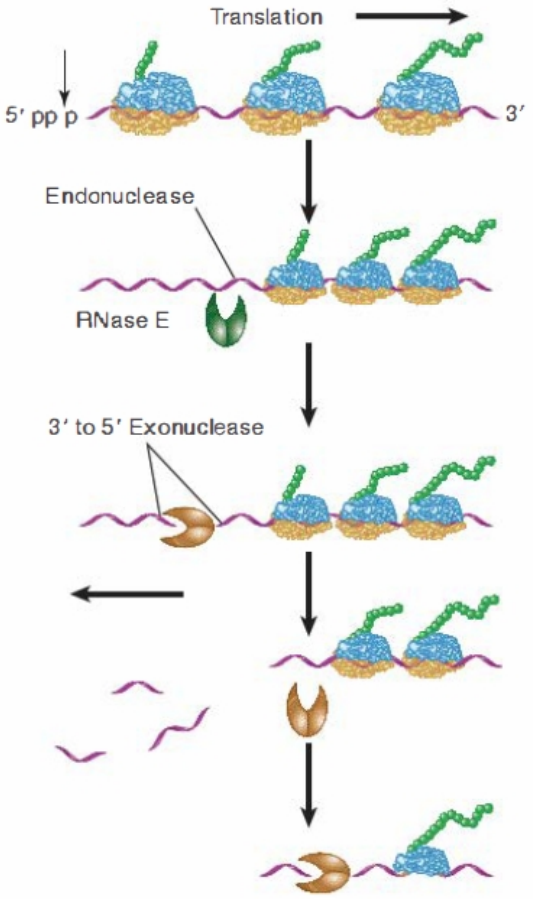
من لحظة تكون pre-mRNA بعملية الاستنساخ في النواة ولحين تحطمها في السايتوبلازم، فإن mRNA في الخلايا حقيقية النواة تكون مرتبطة مع بروتينات متنوعة، ومعقد البروتين – mRNA يدعى بجسيمات الرايبونيوكليوبرتين Ribonucleoprotein particles (RNPs)، العديد من البروتينات التي ترتبط مع pre-mRNA تدخل ضمن عمليات القطع والوصل Splicing ومعاملة mRNA. إن نضج pre-mRNA داخل النواة يتضمن عدة خطوات تنتهي بتغيرات في تسلسلات وشكل mRNA وكذلك في البروتينات المرتبطة، و mRNA الناضج فقط بعد إكمال عمليات المعاملة عليها وارتباطها مع معقد البروتين المتخصص فإنها تصدر من النواة إلى السايتوبلازم. معقد البروتين هذا يشمل أيضاً ما يسمى TREX (مأخوذة من Transcription export) ويتم النقل من خلال مستقبلات الثقوب النووية للتصدير. كما يملك mRNA الناضج عدة موقع ارتباط للبروتينات التنظيمية وأغلب هذه المواقع تقع في 3'-UTR و 5'-UTR. وبالرغم من أن العديد من البروتينات المرتبطة مع mRNA يتم التخلص منها خلال تصدير mRNA من النواة إلى السايتوبلازم، لكن بعض هذه البروتينات يبقى مرتبطاً مع mRNA ويكون له دور سايتوبلازمي.

لقد تم التعرف على العديد من البروتينات المرتبطة بـ RNA (وتدعى أحيانا RNA binding proteins (RBPs))، فمثلاً في الخمائر من نوع S. cerevisiae فإن الجينوم يشفر لـ 600 من هذه البروتينات (وهذا يمثل حوالي عشر عدد الجينات في هذا الكائن)، وفي الإنسان يقدر عدد هذه البروتينات بـ 2000 نوع، وتسمى مجموعة mRNA التي تتشارك في نوع متخصص من بروتينات RBP بـ RNA regulon، ولازال الكثير من الغموض يكتنف الوظائف الدقيقة لهذه البروتينات مقارنةً مع عددها الكبير !!

تحطيم mRNA في البكتريا :

تحطم mRNA في البكتريا يتم خلال عملية الترجمة، إذ أن الرايبوسومات في البكتريا تبدأ بالترجمة قبل نهاية الاستنساخ، كما يمكن أن تقوم عدة رايبوسومات بالترجمة على mRNA واحدة، مكونةً متعدد الرايبوسوم Polyribosome (أو يسمى Polysome) أي mRNA واحدة مع عدة رايبوسومات. وتحطم mRNA في الايشريشيا القولونية يتم بفعل نشاط إنزيمي الايكزونيوكلييز والاندونيوكلييز (كما ذكر سابقاً) ويكون التحطيم عادةً بعدة خطوات (الشكل 12-4).

وتتمثل الخطوة الأولى بإزالة البايورفوسفات من النهاية '5 مما يحول الأخيرة إلى أحادي الفوسفات، والنهاية من النوع أحادي الفوسفات يحفز الفعالية الإنزيمية لإنزيم الاندونيوكلييز (الذي يسمى هنا RNase E) الذي يبدأ بالقطع بالقرب من النهاية '5 لـ mRNA لذلك فإن التحطيم يترك وراءه النهاية '3-OH صعوداً والنهاية '5 أحادي الفوسفات نزولاً، عندها فإن منطقة الصعود تحطم بفعل الإنزيم '3 إلى '5 ايكزونيوكلييز (ويسمى أيضاً إنزيم فسفرة متعدد النيوكليوتيد Polynucleotide phosphorylase (PNPase))، لذلك فإن دورة تحطيم mRNA تكون بخطوتين تتكران بالتعاقب على طول mRNA وبالاتجاه '5 إلى '3 كلما برزت سلسلة mRNA من الرايبوسوم، وعملية التحطيم تكون سريعة جداً إذ من الصعوبة ملاحظة mRNA وهي تخرج من الرايبوسوم حيث يتم التحطيم كلما برز mRNA. ويذكر أن إنزيمات RNase E و PNPase و Helicase والإنزيمات الأخرى والبروتينات المرافقة لها تكون معقد متعدد البروتين يدعى بجسيم التحطيم Degradosome والذي يلعب أكثر من دور في تنظيم تحطيم mRNA وبالتالي في تنظيم التعبير الجيني.



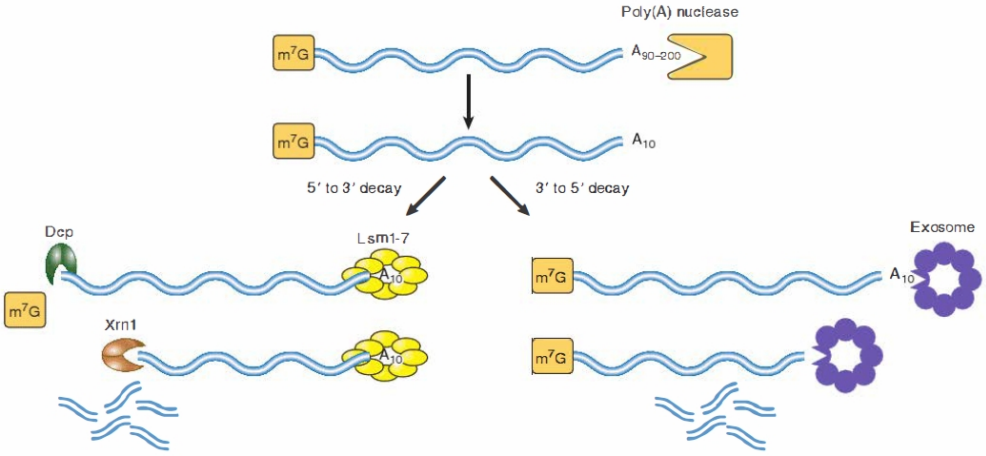
الشكل (12-4) تحطيم mRNA في البكتريا

تحطيم mRNA في الخلايا حقيقية النواة :

إن mRNA في الخلايا حقيقية النواة تكون محمية ضد فعل إنزيمات التحطيم (الايكزونيوكلييز) من خلال وجود تراكيب وتحويرات على نهايتي سلسلة mRNA. القبعة في النهاية '5 والتي تتكون من 7 مثيل كوانوسين يحمي النهاية '5 من هجوم إنزيمات التحطيم، أما الذيل في النهاية '3 والذي هو عبارة عن تكرار من الأدينين فانه يحمي النهاية '3 من هجوم إنزيمات التحطيم. وتحطيم معظم mRNA في الخلايا حقيقية النواة يكون بطريقة تعتمد على إزالة الأدينين Deadenylation من جهة الذيل المتكون حديثاً (متعدد A) ويكون طوله

حوالي 70–90 من نيوكليوتيد الأدينلين في الخمائر وحوالي 200 في اللبائن، هذه النهاية تغطى ببروتين متخصص بالارتباط بمتعدد A هو Poly(A)-binding proteins (PABP)، النهاية متعددة A يقصر طولها بشكل تدريجي بعد دخولها إلى السايتوبلازم من خلال إنزيمات متخصصة هي Poly(A) nucleases (تسمى أيضا بإنزيمات إزالة الادينيل Deadenylases). وعموماً فإن هناك مساران لتحطيم mRNA في الخلايا حقيقية النواة يبدءان بعملية الإزالة من متعدد (A) (الشكل 12-5).

1- في المسار الأول (الجهة اليسرى من الشكل) تحطيم الذيل متعدد (A) يستمر مكوناً Oligo (A) (طوله حوالي 10–12 ادينيل) والذي يشجع إزالة القبعة من النهاية '5 لـ mRNA.



الشكل (12-5) مساري تحطيم mRNA في الخلايا حقيقية النواة
(مأخوذ من Nelson and Cox, 2012)

عملية إزالة القبعة يحفز بمعقد إنزيم إزالة القبعة Decapping enzyme والذي يتكون من بروتينين في الخمائر هما Dcp1 و Dcp2، وفي اللبائن يتكون من معقدات مماثلة لهما فضلاً عن بروتينات أخرى. إزالة القبعة يعرض نهاية '5 مفسفرة لـ RNA وتعد هذه النهاية المادة الأساس لإنزيم '5 إلى '3 ايكزونيوكلييز والذي يحطم mRNA بسرعة. ويذكر أن القبعة تكون طبيعياً مقاومة لعملية إزالة القبعة خلال عملية الترجمة النشطة، لوجود بروتينات

متخصصة ترتبط بالقبعة هي البروتينات السايتوبلازمية المرتبطة بالقبعة Cytoplasm cap-binding proteins (CCBP) وهي أحد مكونات معقد عامل البدء (eIF4F) في الخلايا حقيقية النواة والضرورية لعملية الترجمة. مما سبق يبدو أن عمليتي الترجمة وإزالة القبعة يكونان في تنافس على القبعة. أما تفاصيل آلية إزالة القبعة فلازالت مثار جدل بين الباحثين ويعتقد أن هناك عوامل وبروتينات متخصصة تساهم في عملية تحرر PABP بواسطة إزالة الادينيل والذي يعمل على فقدان ثبوتية ارتباط القبعة – eIF4F مما يجعل القبعة مكشوفة، وبعد تحرر PABP فإن معقد مكون من أكثر من 7 بروتينات (يسمى Lsm1-7) يرتبط مع متعدد (A) وتعد ضرورية لإزالة القبعة.

2- المسار الثاني: الجهة اليمنى من الشكل أعلاه، وفي هذا المسار فإن إزالة الادينيل متعدد (A) يليه تحطم لسلسلة mRNA بفعل إنزيم '5 إلى '3 ايكزونيوكلييز، وخطوة التحطيم تحفز بواسطة الاكسوسوم Exosome وهو معقد شكله حلقي مكون من 9 وحدات أساسية مع بروتينات اضافية مرتبطة بسطحها (الشكل 12-5)، ويلعب الاكسوسوم دوراً مهماً داخل النواة (سيتم شرح ذلك لاحقاً).

مسارات إضافية لتحطيم mRNA في الخلايا حقيقية النواة :

هناك أربع مسارات أخرى لتحطيم mRNA في الخلايا حقيقية النواة (الشكل 12-6) وتكون هذه المسارات متخصصة لأنواع معينة من mRNA والتحطيم يكون بشكل منظم.

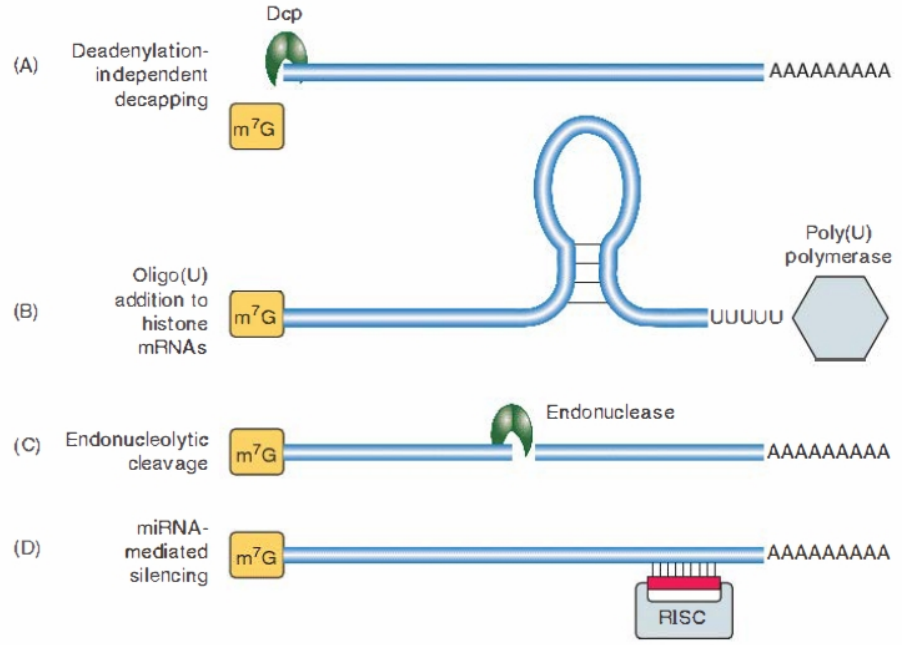
3- إزالة القبعة غير المعتمد على إزالة الادينيل Deadenylation independent decapping أي أن إزالة القبعة يستمر حتى بوجود ذيل متعدد (A) طويل، عملية إزالة القبعة يليها تحطيم بفعل Xrn1. وأحد أنواع mRNA التي تحطم بهذا المسار هي RBS8B mRNA والذي يشفر للبروتين الرايبوسومي S28، وله آلية تنظيم ذاتية إذ أن تركيب حلقة الجذع Stem-loop في منطقة 3'-UTR تساهم في توظيف محفز إزالة القبعة، ويتم التوظيف فقط عندما ترتبط حلقة الجذع مع بروتين S28 لذلك فإن مستوى S28 الحر في الخلية يعمل على زيادة تحطيم mRNA الخاص به.

4- المسار الثاني يكون متخصص لتحطيم mRNA الهستونات المنظمة بدورة الخلية في خلايا

اللبائن، هذه mRNA تكون مسؤولة عن تصنيع كميات هائلة من بروتينات الهستون الضرورية خلال تضاعف DNA، ويزداد تركيز بروتينات الهستون في الخلية بشكل كبير خلال الطور S من دورة الخلية ثم يتم تحطيمها بسرعة كبيرة في نهاية هذا الطور. إن mRNA الهستون التي لها نهاية ليس أدينيل متعدد (A) تكوّن حلقة الجذع مشابه لـ mRNA البكتريا، لذلك فإن عملية التحطيم تكون مشابهة لما في البكتريا، إذ أن إنزيم البلمرة Polymerase يضيف ذيل متعدد اليورنيل Poly (U) tail قصير بدلاً من الذيل المتعدد الادينيل Poly (A) tail، هذا الذيل القصير من متعدد اليورنيل يعمل كموقع ارتباط معقد Lsm1-7 و/ أو الاكسوسوم، محفزاً بذلك عملية التحطيم.

5- المسار الثالث ويبدأ بتسلسلات متخصصة بتحطيم نيوكليوتيدات داخلية Endonucleotic cleavage، التحطيم يتبعه تفتيت القطع بالاتجاه '5 إلى '3 و '3 إلى '5، وكذلك إزالة القبعة، إذ أن أنواع مختلفة من معقد Dcp بإمكانها إزالة القبعة.

6- المسار الرابع والمهم جداً هو العتمد على microRNAs (miRNA)، هذا المسار يؤدي إلى تحطيم النيوكليوتيدات الداخلية بشكل مباشر في خلايا النبات، أما في خلايا الحيوان فانه يؤدي إلى تحطم mRNA بالطريقة المعتمدة على إزالة الأدينيل، وكذلك كبح عملية الترجمة. إن miRNA هي عبارة عن تراكيب صغيرة (بحدود 22 نيوكليوتيد) تتكون من مستنسخ ينتج من جينات miRNA، إذ تنشأ من تحطم RNAs بادئة كبيرة. وفي جميع الحالات فإن mRNA يكون الهدف لـ miRNA كي تقوم بتصميتها Silencing وذلك من خلال ازدواج القواعد لـ miRNA المتممة والموجودة ضمن معقد بروتيني يدعى معقد التصميت بفعل RNA ((RISC) RNA induced silencing complex) (الشكل 12-6)، وازداد الاهتمام بهذا النوع في السنوات الأخيرة إذ وجد أن هناك أكثر من 1000 نوع من miRNA الفعالة في خلايا جسم الإنسان، ويبدو أن حوالي نصف mRNA في الخلية يمكن أن تهاجم من قبل miRNA وبالتالي ينظم التعبير الجيني من خلالها، ولأهمية الموضوع سيتم شرحه بالتفصيل فيما يأتي.



الشكل (12-6) مسار التحطيم المعتمد على miRNA (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

miRNA :

يمكن لجزيئة RNA أن تعمل كجزيئة تنظيمية من خلال استهدافها لجزيئات أخرى، وتسمى جزيئات RNA التي تنظم فعاليتها من قبل جزيئات صغيرة أخرى بـ Riboswitch وإذا كانت الجزيئة الصغيرة التي سترتبط مع RNA من ضمن المواد الأيضية عندها تسمى بـ Aptamer، وارتباطها مع RNA يسبب لها تغيرات شكلية (عادةً في التركيب الثانوي).

الخلايا حقيقية النواة تشبه البكتريا في استعمال أنواع من RNAs لتنظيم التعبير الجيني، مع ملاحظة أن mRNA تكون أكثر ثباتاً في الخلايا حقيقية النواة من البكتريا لوجود فاصل واختلافات بين النواة والسايتوبلازم، بينما في البكتريا تكون عملية الاستنساخ والترجمة متعاقبة مع عدم وجود فاصل مكاني أو زمني أو تركيبي.

تسمى RNA الصغيرة جداً (22 نيوكليوتيد) في الخلايا حقيقية النواة بـ microRNAs (miRNA) وتقوم بتنظيم التعبير الجيني من خلال عملية تداخل RNA (RNA

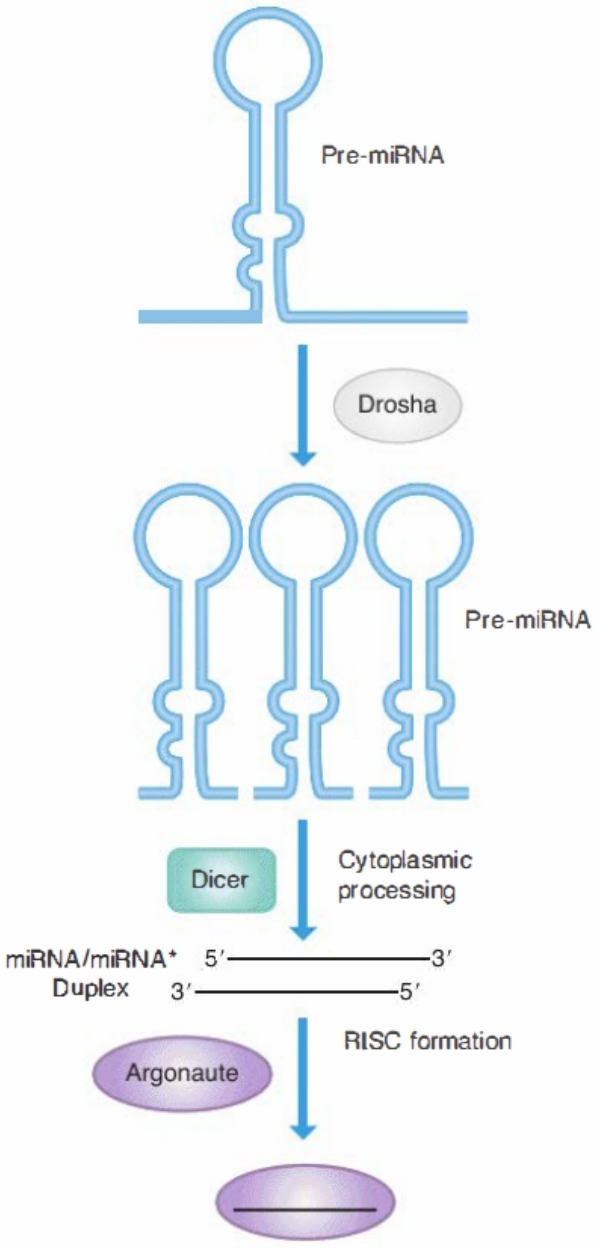
(interference (RNAi) والمثير أن حوالي نصف انترونات الجينات المشفرة تساهم في هذه العملية وكذلك نصف RNA الكبيرة غير المشفرة (ncRNA)، كما وجد أن هناك تسلسلات ليست ضمن الجينات تشفر لهذا النوع من RNA (أي miRNA).

وأطلقت تسميات عدة على miRNA منها RNA القصيرة الوقتية Short temporal RNA (stRNA) عندما تساهم في تنظيم التعبير الجيني خلال الفترات الأولى من نمو الكائن. أما RNAi فتسمى أيضاً تصميت الجين بعد الترجمة Posttranslation gene silencing (PTGS) أو الإخماد Quelling، وقد حصل كل من Andrew Fire و Criag Mello على جائزة نوبل سنة 2006 تثميناً لجهودهما في العمل على كشف آلية حدوث وأهمية RNAi في دودة C. elegans.

البعض الآخر من miRNA وجد أنه يتداخل مع مرحلة البدء من عملية الاستنساخ وذلك من خلال ارتباطه مع مشجع الجينات. ويعتقد أن مئات من miRNA تنظم عمل آلاف من mRNA بنسبة قد تصل إلى أكثر من 90٪ من الجينات خلال حياة الكائن الحي. والمثير أن miRNA معين يمكن أن يكون له مئات الأهداف من mRNA، وكذلك mRNA المعين يمكن أن يستهدف من قبل العديد من miRNA مما يولد ما يشبه الشبكة العنكبوتية من التداخلات في تنظيم التعبير الجيني. وهناك نوع آخر متخصص من RNA يسمى Piwi-associated RNA (piRNA) ويتواجد في الخلايا الجنسية والتسمية جاءت من P-element induced wimpy testis، وتختلف وظيفة piRNA عن miRNA، إذ أن piRNA تؤدي وظائفها داخل النواة وتعمل على: كبح تعبير القطع القافزة، تحافظ على تكامل الجينوم، وتسيطر على تركيب الكروماتين، أما siRNA فهو نوع آخر صغير جداً Small interfering RNA (siRNA) يتواجد عند وجود إصابة فيروسية للخلية. إن كل من piRNA و siRNA بإمكانهما المساهمة في السيطرة على تعبير العناصر القافزة، وفي الحقيقة فإن هذه RNAs لها مناشئ متنوعة وآليات عمل ومعاملة مختلفة وتنتج غالبيتها على شكل RNA كبيرة أولية ثم تعامل وتقطع إلى أحجام مناسبة، عندها تقوم بمهاجمة الجزيئات الهدف.

وبالعودة إلى miRNA فإنها تدخل في عملية RNAi، إذ يتم تصنيعها كـ RNA كبيرة بادئة تسمى pri-miRNA الذي بإمكانه أن يكون متمم لنفسه وبذلك يمكنه أن يكون

تركيب دبوس الشعر Hairpin ثنائي الخيط بالانطواء على نفسه وبشكل ذاتي، مع ملاحظة وجود بعض الازدواج الخاطئ عادةً، ويعامل pri-miRNA بخطوتين (الشكل 12-7) :



الشكل (12-7) معاملة pre-miRNA (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

1- الخطوة الأولى وتتم بفعل إنزيم يدعى Drosha وهو من ضمن إنزيمات RNaseIII التي تعود إلى الاندونيوكلييز في النواة. ويعمل إنزيم Drosha على تقطيع pri-miRNA إلى قطع بادئة تشبه دبوس الشعر طولها حوالي 70 نيوكليوتيد هي pre-miRNA والتي تملك مجموعة فوسفات عند النهاية '5، والخطوة الأولى تحدد النهايتين '3 و '5 للبادئ.

2- الخطوة الثانية، وبعد التصدير من النواة إلى السايتوبلازم فإن الخطوة الثانية تتمثل بتحويل pre-mRNA إلى miRNA بفعل إنزيم يسمى Dicer وهو أيضاً من ضمن إنزيمات RNaseIII ويقوم إنزيم Dicer بإنتاج قطع مزدوجة بطول 32 نيوكليوتيد من خلال عد النيوكليوتيدات ابتداء من النهاية '3 (الشكل 12-7).

جزيئةmiRNA الآن لديها نهاية قصيرة (2 نيوكليوتيد) أحادي الخيط عند النهاية '3، هذا التركيب يحور بإضافة مجموعة المثيل 2'-O-methyl group وذلك لمنح الثبوتية لـ miRNA. يملك Dicer فعالية إنزيم Helicase عند النهاية الأمينية N-terminal والذي يمكنه من فتح مناطق الحلزون المزدوج، كما يملك Dicer جزئين لهما فعالية إنزيم Nuclease، وفي النبات فإن الإنزيمات المشابهة لـ Dicer تقوم بمعاملة كل من pri-mRNA و pre-mRNA في النواة.

بعد ذلك فإن القطع الصغيرة من RNA ثنائية الخيط تحمل على معقد RISC. بروتينات تدعى Argonuate (Ago) تدخل ضمن تركيب هذا المعقد، وتعد بروتينات Ago ضرورية لعمليات المعاملة الأخيرة والتي تنتهي بـ RNA أحادي الخيط هو Passenger RNA والذي يسمى miRNA، عندها يقوم معقد RISC بإيصال miRNA إلى المنطقة 3'-UTR من mRNA الهدف. وتختلف بروتينات Ago فيما بين الكائنات، فمثلاً في الإنسان هناك 8 أنواع منها، وفي ذاباة الفاكهة 5، وفي النباتات 10، وفي دودة C. elegans هناك 26 نوع.

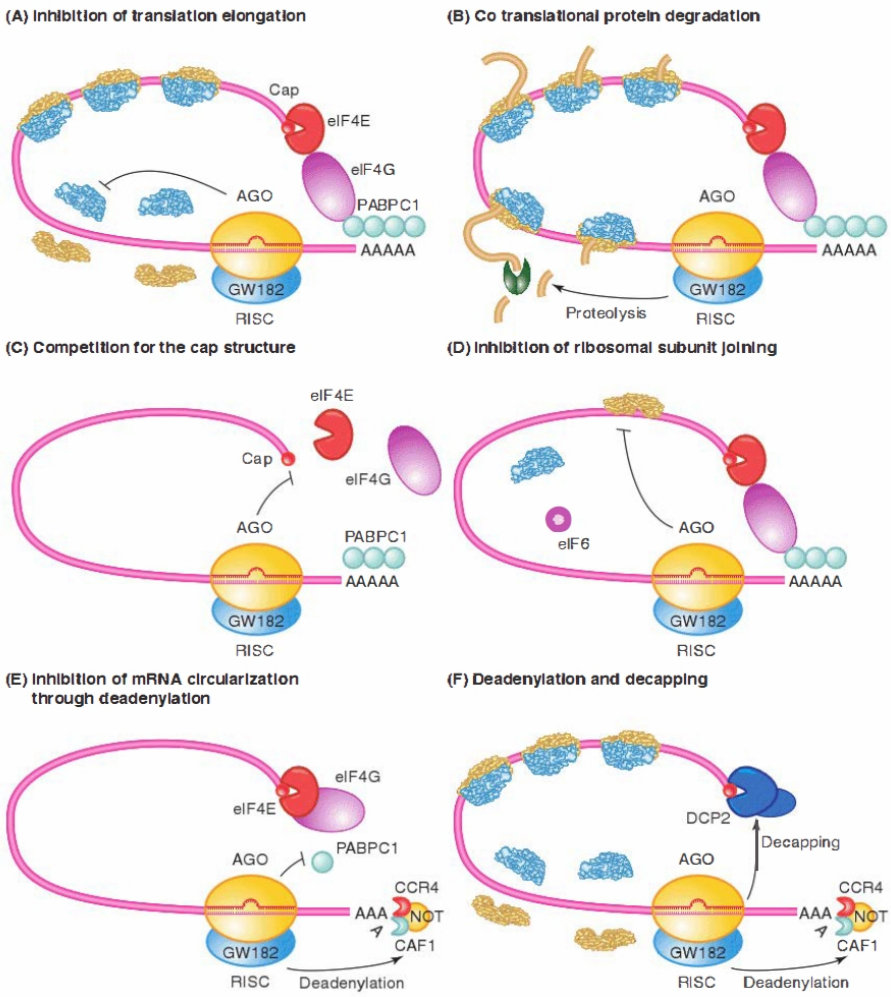
آلية عمل RNAi :

إن معقد RISC يسيطر على عملية الترجمة من خلال إرشادها إلى mRNA الهدف لها في السايتوبلازم عن طريق miRNA المرتبط معها أو الخاص بها، ويسيطر RISC على تعبير mRNA بطريقتين :

1- تحطيم mRNA ويعد الأكثر شيوعاً في الخلايا النباتية.

2- تثبيط ترجمة mRNA وتستعمله عادةً الخلايا الحيوانية.

كما يمكن للخلايا النباتية والحيوانية استعمال كلتا الآليتين ويعتمد ذلك على عدة عوامل لكن أهمها في اختيار أي الآليتين سيتم استعمالها هو مدى تطابق الازدواج بين miRNA و mRNA، إذ كلما زادت نسبة التطابق زادت إمكانية تحطيم mRNA. وبعد أن يتم الارتباط فهناك آليات مختلفة يمكن أن تنتج (الشكل 12-8) وهي :



الشكل (12-8) آليات عمل RNAi

1- إن RISC يمكن أن يتداخل مع عملية الترجمة من خلال إيقاف مرحلة الاستطالة (الشكل 12-8 A).

2- تحفز تحلل بروتيني Proteolysis لمتعدد الببتيد حالما ينتج (الشكل 12-8 B).

3- متعدد الببتيد Ago ضمن معقد RISC يكون مماثل لعامل البدء المرتبط بالقبعة Cap binding initiation factor (وهو eIF4E) (الشكل 12-8 C).

4- منع الوحدة الرايبوسومية الكبيرة 60S من الارتباط (الشكل 12-8 D).

5- كما يمكن أن يقوم RISC من منع استدارة mRNA عن طريق ارتباط القبعة مع الذيل متعدد (A) (الشكل 12-8 E).

6- تشجيع RISC على تحطيم mRNA من خلال تشجيع إزالة الادينين وما يليه من إزالة القبعة عن mRNA (الشكل 12-8 F).

بإمكان RISC نقل mRNA إلى مركز معاملة mRNA والذي يدعى بأجسام P (أجسام المعاملة السايتوبلازمية Cytoplasmic processing bodies) وهي مواقع يمكن أن يخزن فيها mRNA لاستعمالها مستقبلاً، وكذلك يحدث فيها تحطيم mRNA مزالة القبعة. وارتباط RISC مع mRNA الهدف تنظمه مجموعة من العوامل التي أحياناً تمنع ارتباط RISC مع mRNA الهدف أو تحدث تغيير في التركيب الشكلي لـ mRNA بحيث لا يستطيع RISC التعرف عليه.

ويعد RNAi جزءاً حيوياً من الاستجابة المناعية للكائن (وخاصة النباتات) ضد الفيروسات أو ضد أي مادة وراثية غريبة. وكذلك في تنظيم تطور الكائن في الفترة الجنينية من خلال تنظيم التوقيت Timing للتكوين الشكلي Morphogenesis والإبقاء على بعض الخلايا غير متمايزة أو متمايزة بشكل غير كامل كما في بعض أنواع الخلايا الجذعية. كما أن آلية RNAi خارج الجسم تعد من التقنيات المهمة في تنشيط أو كبح جين معين في إجراء البحوث على الخلايا والكائنات الحية من خلال إدخال miRNA مصنعة إلى هذه الخلايا.

دور mRNA في تكون الكروماتين المغاير :

إن الكروماتين المغاير Heterochromatin باعتباره أحد أجزاء الكروموسوم يكون أكثر كثافة من باقي الأجزاء (الكروماتين الحقيقي Euchromatin) ويتضاعف بشكل متأخر خلال تضاعف DNA ويملك عدد قليل من الجينات، و DNA في الكروماتين المغاير عبارة عن تسلسلات DNA بسيطة من نوع Satellite تنظم في تسلسلات مميزة تحوي جينات ضمن الكروماتين المغاير. الجزء الخارجي من التسلسلات المكررة تستنسخ إلى ncRNAs بواسطة إنزيم البلمرة الثاني RNAPII، هذا المستنسخ يتم استنساخه من قبل إنزيم بلمرة RNA المعتمد على RNA ((RNA dependent RNA polymerase (RPRD لتنتج RNA ثنائي الخيط والذي يعامل إلى siRNA وبطريقة مشابهة لآلية RNAi، كما أن RNA يعامل بـ Dicer والمعقد الناتج يدعى تصميت الترجمة بفعل RNA (RNA induced translation silencing (RITS)) ويحوي RITS على وحدة من بروتين Ago I ويكون كل من RITS و RDRP في معقد كبير مع بعضهما، وRITS يستعمل siRNA كآلية هدف لكبح عملية الاستنساخ.

الكروماتين المغاير في التيلومير يستنسخ أيضاً وبشكل مشابه للكروماتين المغاير في السنترومير، التيلومير يتكون أيضاً من تسلسلات DNA مكررة والتي تستنسخ إلى ncRNA كبيرة تدعى Telomere repeat-containing RNA (TERRA) منطقة TERRA الغنية بالكوانين G تنثني مكونة تراكيب رباعية G-quadeuplex، ويرتبط عدد من العوامل (البروتينات) مع TERRA للسيطرة على تضاعف التيلومير، ولأهمية التيلومير وكثرة اهتمام الباحثين حول دوره في العديد من الأمراض المزمنة والسرطانات وكذلك تقدم العمر والشيخوخة، تم تخصيص فصل لشرح التيلومير وتركيبه وأهميته ودور إنزيم التيلوميريز.

CRISPR :

وهو مختصر لـ مكررات بالندرومية قصيرة تنظيمية بشكل تجمعات Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) (وتلفظ كرسبر Crisper) وهي عبارة عن قطع من DNA الخلايا بدائية النواة (البكتريا) تحوي هذه القطع

مكررات قصيرة من التسلسلات، كل مكرر يتبعه قطعة من DNA هو Spacer DNA ناتج من التعرض السابق لفيروس أو بلازميد، ويعد CRISPR جزء من جهاز المناعة للخلايا بدائية النواة والمسئولة عن الدفاع ضد القطع الوراثية الغريبة مثل البلازميدات والعاثيات Phages وبذلك توفر مناعة مكتسبة. قطع CRISPR تتعرف على المادة الوراثية الغريبة وتقطعها بآلية مشابهة لـ RNAi في الخلايا حقيقية النواة، وقد وجد CRISPR في 40٪ من جينوم البكتريا و 90٪ من جينوم الكائنات الأثرية Archaea، أما استعمال CRISPR كتقنية للتحكم بالجين وتنظيمه وهندسة الجينوم فقد تم اختياره كأهم تقنية في البيولوجي الجزيئي منذ العام 2015.

ولـ CRISPR تطبيقات مهمة ومتسارعة الاستعمال في البيولوجي الجزيئي منها تغييرات في الخلايا الجنسية في الإنسان والحيوانات، وتحويرات على المنتجات الغذائية، اذ يمكن قطع جينوم الكائن في أي منطقة مطلوبة، كما تستعمل التقنية في تنظيم تعبير الجينات في معظم الكائنات الحية ولا زال الجدل القانوني والأخلاق قائماً حول حدود استعمالات هذه التقنية.

آلية عمل CRISPR :

إن نظام CRISPR / Cas يعد جزء أساسي لجهاز المناعة (المناعة المكتسبة) للخلايا بدائية النواة، و Cas هو البروتين المرتبط مع CRISPR (CRISPR associated protein) وأشهر نوع فيه هو Cas9، ويقوم هذا النظام بالتعرف على المواد والقطع الوراثية الغريبة عن الخلية وتقطيعها بطريقة مشابهة لآلية عمل RNAi في الخلايا حقيقية النواة، ويتم ذلك بتكون وتحرر Cas9 ويعمل كانزيم النيوكلييز وبوجود RNA المرشد (Guide RNA) يتم تقطيع المادة الوراثية (وحتى الجينوم) في الموقع المطلوب. ودقة اختيار موقع القطع الهدف تعتمد على تكوين معقد متكامل الوظيفة من Cas9 و RNA المرشد، ويقوم بروتين Cas9 بتحديد الموقع بدقة بالغة وتحطيمه ضمن DNA (في كل من نظام CRISPR/Cas9 الطبيعي والتقنية المستعملة في المختبر) وبروتين Cas9 له 6 أجزاء هي :

1- RECI الأكبر حجماً والمسئولة عن ارتباط RNA المرشد.

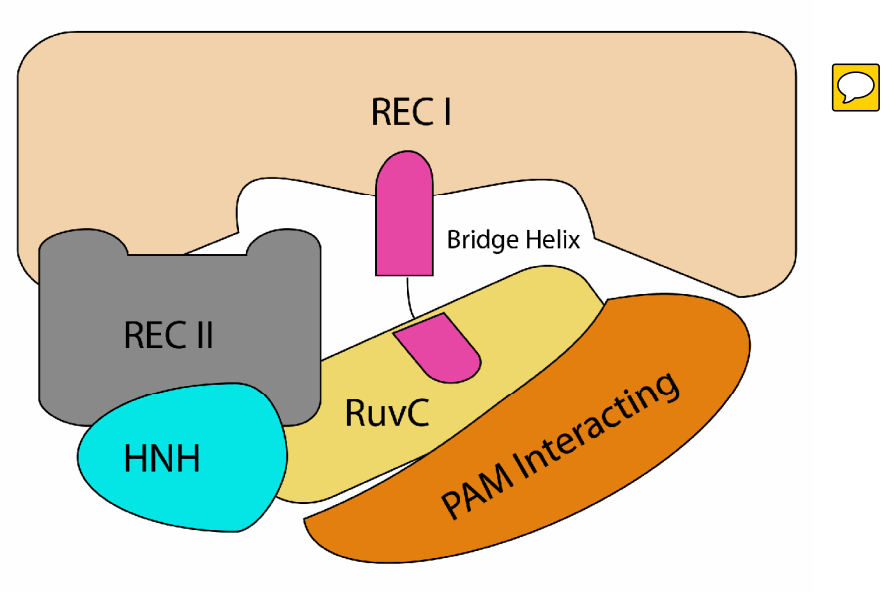
2- RECII لا زالت وظيفتها غير واضحة.

3- حلزون الجسر Bridge helix ويكون غنياً بالارجنين ويعد ضرورياً لبدء فعالية التحطيم عند الارتباط بتسلسلات DNA الهدف.

4- PAM interacting (وهو مختصر لـ Protospacer adjacent motif) ويكون مسئول عن بدء الارتباط بتسلسلات DNA الهدف.

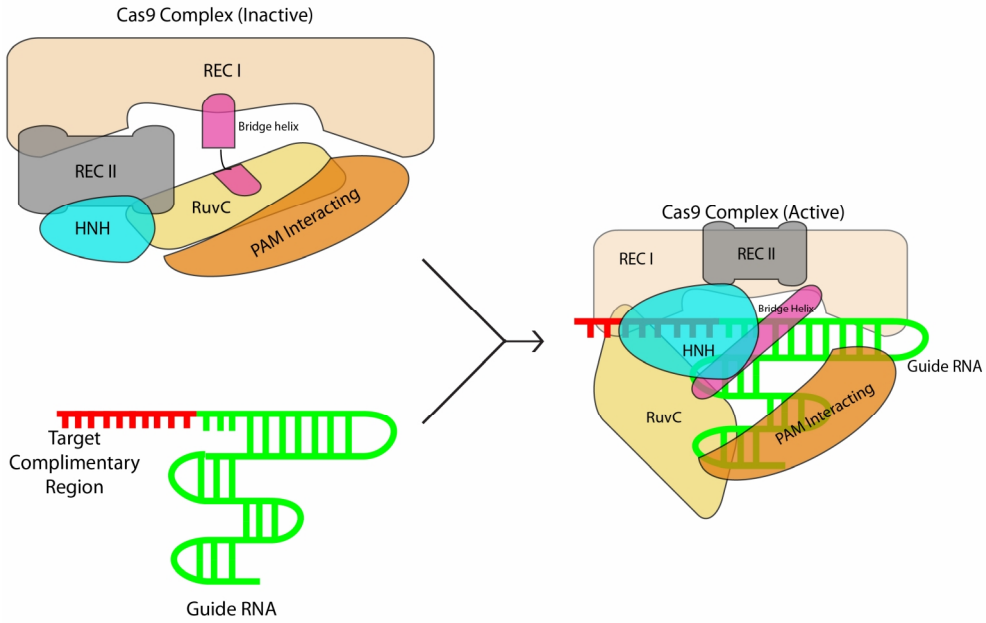
5- HNH.

6- RuvC وهما أجزاء من إنزيم النيوكلييز الذي يقوم بقطع الخيط المنفرد من DNA (الشكل 12-9).



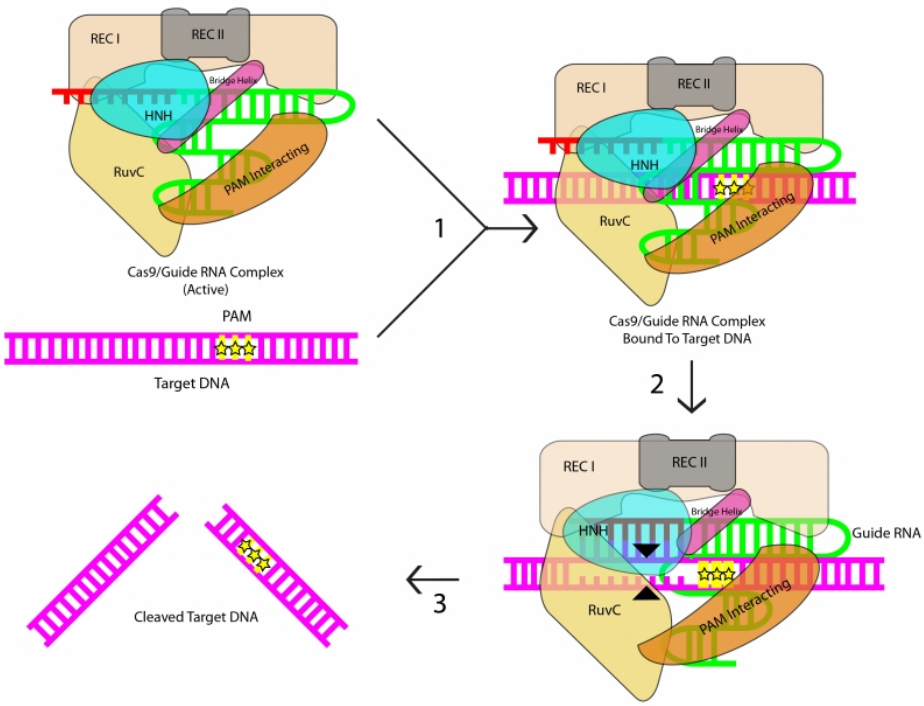
الشكل (12-9) أجزاء بروتين Cas9

ومعقد بروتين Cas9 أعلاه يبقى غير فعال في غياب RNA المرشد، وعند ارتباط RNA المرشد مع برتين Cas9 تحصل تغييرات شكلية في الأخير تحوله إلى الشكل الفعال (الشكل 12-10).



الشكل (12-10) تفعيل برتين Cas9 بفعل ارتباط RNA المرشد

بعد تفعيل Cas9 فإنها تبدأ بالبحث عن تسلسلات DNA الهدف وذلك من خلال ارتباطها بالتسلسلات المطابقة لتسلسلات PAM، ويتكون PAM من تسلسلات 2-3 نيوكليوتيدات وتقع نزولاً بعد نيكليوتيد واحد من التسلسلات المتممة لـ RNA المرشد، عندما يجد برتين Cas9 التسلسلات الهدف في DNA وبدقة عالية ومع تسلسلات PAM المطابقة، فإن بروتين Cas9 يبدأ فوراً بفصل القواعد صعوداً من PAM وتقوم بتسهيل ازدواج هذه القواعد مع التسلسلات المتممة في RNA المرشد، وإذا تم ازدواج التسلسلات الهدف (من DNA) مع التسلسلات المتممة (من RNA المرشد) بدقة وبشكل صحيح عندها يبدأ كل من NHN و RuvC (فعالية إنزيم النيوكلييز) بتقطيع DNA الهدف ما بعد النيوكليوتيد الثالث صعوداً من موقع PAM (الشكل 12-11).



الشكل (12-11) الارتباط بـ DNA الهدف والتقطيع بفعل بروتين Cas9

Catalytic RNA :

كان الشائع عند علماء الكيمياء الحياتية والبيولوجي أن "كل إنزيم بروتين"، لغاية ثمانينيات القرن الماضي إذ أثبت كل من Sidney Altman و Thomas Cech أن RNA يمكن أن يعمل كأنزيم، واليوم فإن الرايبوسومات، معقدات RNA–البروتين، ومتعدد الببتيد الصناعي مع RNA تعرف بالرايبوزايم Ribozyme (وهو مأخوذ من إنزيمات الأحماض الرايبونيوكليك Ribonucleic acid enzymes) ويدخل الرايبوزايم في العديد من التفاعلات منها قطع ووصل RNA (RNA splicing)، تضاعف الفيروسات، التصنيع الحيوي لـ tRNA، كما يدخل ضمن عملية الترجمة بربط الأحماض الأمينية مع بعضها خلال تصنيع البروتين، ومن أنواع الرايبوزايم: الريبوزايم رأس المطرقة Hammerhead ribozyme، و VS ribozyme، و Leadzyme، ورايبوزايم دبوس الشعر Hairpin ribozyme.

ويطلق مصطلح Ribozyme على كل RNA له فعالية إنزيمية، إذ يعمل RNA كإنزيم محفز بينما يعمل البروتين المرتبط معه كحامل أو سقالة Scaffold. ويلاحظ أن الرايبوزايم بإمكانه القيام بالتفاعلات داخل الجزيئات أو بين الجزيئات، وتتضمن هذه التفاعلات عمليات تكسير أو بناء آصرة فوسفاتية ثنائية الأستر، وبالرغم من خصوصية التفاعل والفعالية الأساسية التي تعود إلى RNA، إلا أن البروتين المرتبط معه ضروري كي يكون التفاعل كفء، وهناك محاولات عديدة لتصنيع الرايبوزايم كمادة علاجية تستهدف تسلسلات معينة من RNA وتكسرها، ويسمى ذلك بالحساسات الحيوية Biosensors، وكذلك استخدمت في دراسة الجينوم وظيفياً وفي اكتشاف ودراسة الجينات المختلفة.

أهم المراجع :

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. **Molecular Biology of the Cell.** 6th Edition. (2015). Garland Science.

Batey RT (2006). **"Structures of regulatory elements in mRNAs".** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16 (3): 299–306.

Carthew, RW; Sontheimer, EJ. (2009). **"Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs"**. *Cell.* 136: 642–55.

Davenport RJ (2001). **"Ribozymes. Making copies in the RNA world".** *Science.* 292 (5520): 1278.

David L. Nelson and Michael M. Cox. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 6th Edition. (2012). W.H. Freeman.

Dieter Still, Susumu Nishimura, Peter Moore. **RNA.** (2001). Elsevier Science Ltd.

Eberhard Passarge. **Color Atlas of Genetics.** 3rd ed. (2007). Georg Thieme Verlag KG.

Eddy SR (2001). **"Non-coding RNA genes and the modern RNA world".** *Nat. Rev. Genet.* 2 (12): 919–29.

Edward S. Tobias, Michael Connor, Malcolm Ferguson-Smith. **Essential Medical Genetics.** 6th ed. (2011). Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication

Fatica, A; Bozzoni, I (2014). **"Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development"**. *Nature Rev Gen*. 15 (1): 7–21.

Horvath P; Barrangou R (2010). **"CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea".** *Science.* 327 (5962): 167–70.

Hüttenhofer A, Schattner P, Polacek N (2005). **"Non-coding RNAs: hope or hype?".** *Trends Genet.* 21 (5): 289–97.

I. Tinoco & C. Bustamante (1999). **"How RNA folds".** *J. Mol. Biol.* 293 (2): 271–281.

Kiss-László Z; Henry Y; Bachellerie JP; Caizergues-Ferrer M; Kiss T (1996). **"Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs"**. *Cell.* 85 (7): 1077–88.

Lee JC; Gutell RR (2004). **"Diversity of base-pair conformations and their occurrence in rRNA structure and RNA structural motifs".** *J. Mol. Biol.* 344 (5): 1225–49.

Mattick JS; Gagen MJ (2001). **"The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms"**. *Mol. Biol. Evol.* 18 (9): 1611–30.

Morris, KV; Mattick, JS (2014). **"The rise of regulatory RNA."**. *Nature Rev. Gen.* 15 (6): 423–37.

Nissen P; Hansen J; Ban N; Moore PB; Steitz TA (2000). **"The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis".** *Science.* 289 (5481): 920–30.

Sontheimer EJ; Carthew RW (2005). **"Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs"**. *Cell.* 122 (1): 9–12.

Storz, G (2002). **"An expanding universe of noncoding RNAs"**. *Science.* 296 (5571): 1260–3.

Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, et al. (May 2008). **"Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes".** *Nature.* 453 (7194): 539–43.

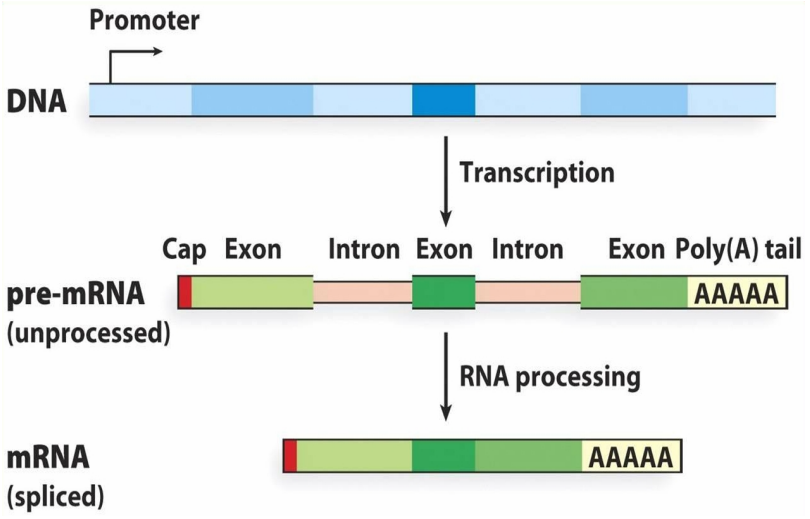
Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R **Molecular Biology of the Gene**. 7th ed. (2013). Benjamin Cummings. CSHL Press.

Wu L; Belasco JG (2008). **"Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs"**. *Mol. Cell.* 29 (1): 1–7.

الفصل الثالث عشر

معاملة RNA

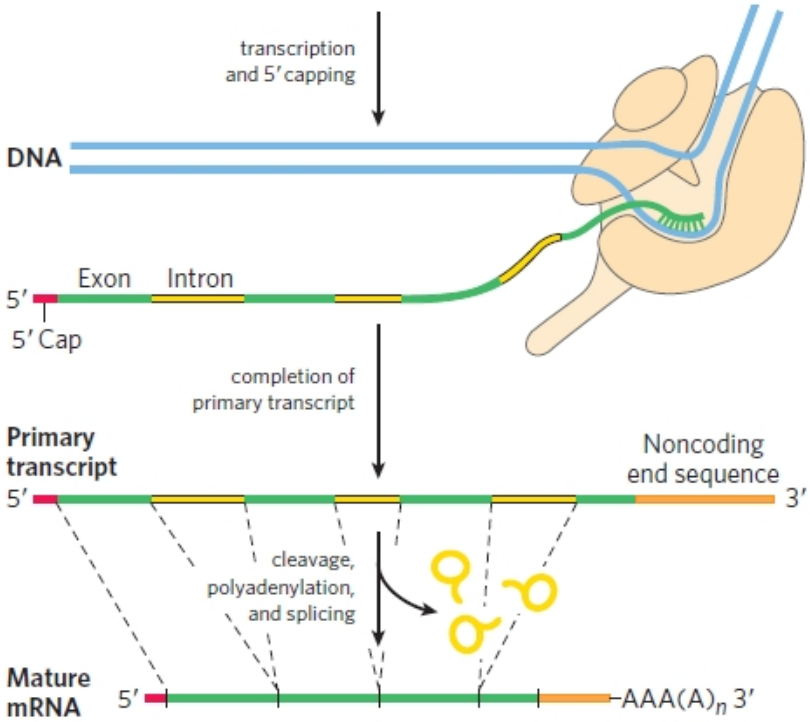
RNA Processing



الفصل الثالث عشر

معاملة RNA
RNA Processing

تعد معاملة RNA (RNA processing) خطوة مهمة ضمن العمليات الحيوية داخل الخلية، إذ أن العديد من جزيئات RNA في البكتريا وجميع RNA في الخلايا حقيقية النواة تتعرض إلى معاملات متعددة بعد تصنيعها، والمثير أن العديد من الإنزيمات المحفزة لهذه المعاملات تملك RNA في تركيبها (رايبوزايم) أكثر من البروتين. RNA المصنع حديثاً في الخلايا حقيقية النواة يدعى بالمستنسخ الأولي Primary transcript ويعاني هذا المستنسخ من المعاملات المتعددة والمتنوعة، والمستنسخ الأولي يحوي تسلسلات مشفرة لجين واحد، مع ملاحظة أن التسلسلات تكون متقطعة (غير مستمرة)، إذ أن تسلسلات غير مشفرة (الانترونات Introns) تفصل التسلسلات المشفرة (الاكسونات Exons)، ويتم التخلص من الانترونات وربط الاكسونات مع بعضها بعملية القطع والوصل RNA splicing لينتج تسلسل مستمر يشفر لمتعدد الببتيد، فضلاً عن ذلك فإن mRNA في الخلايا حقيقية النواة يعاني من تحويرات في نهايتيه، إذ يتم إضافة القبعة cap للنهاية '5، ويتم تقطيع النهاية '3 ويضاف لها مكررات من الأدينين (A) (حوالي 80–250 أدينين) مكوناً الذيل متعدد (A) (Poly (A) tail) (الشكل 13-1).



الشكل (13-1) معاملة المستنسخ الأولي وتكون mRNA الناضج في الخلايا حقيقية النواة (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

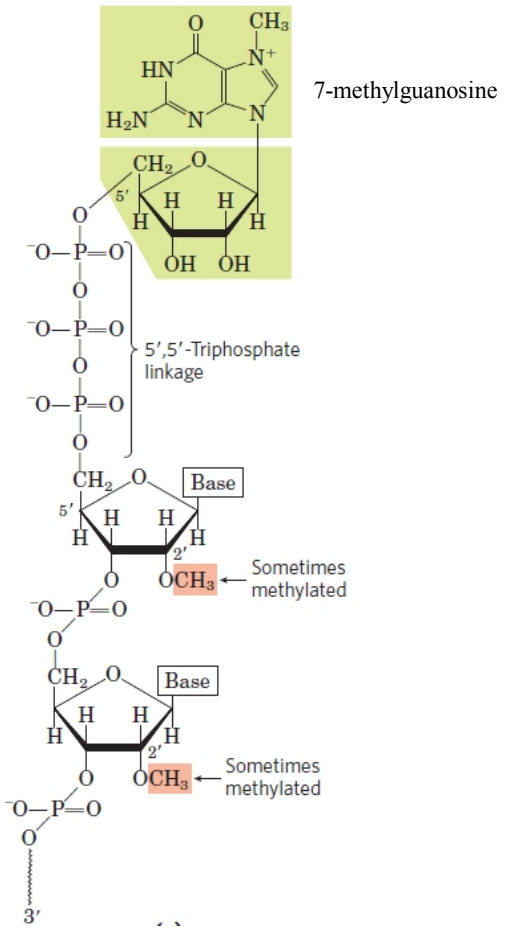
وعادةً فإن معقدات البروتينات التي تساهم في كل عملية من عمليات المعاملة الثلاث أعلاه فإنها لا تعمل بشكل مستقل ومنفصل، بل يبدو أنها ترتبط وتنتظم مع بعضها ومع النهاية CTD المفسفرة لإنزيم البلمرة الثاني RNAPII وكل معقد ينظم ويؤثر على وظيفة المعقد الآخر وهكذا، كما يتداخل مع عمل هذه المعقدات البروتينات المسؤولة عن نقل mRNA من النواة إلى السايتوبلازم.

أما المستنسخ الأولي لـ tRNA في البكتريا والخلايا حقيقية النواة فتعاني هي الأخرى من عمليات تحوير أبرزها إزالة تسلسلات من النهايتين، وأحياناً عملية قطع ووصل Splicing، كما أن العديد من السكريات والقواعد النتروجينية تحور خلال معاملة tRNA، وفي المحصلة فإن tRNA الناضجة تحوي على قواعد نتروجينية "غريبة" غير موجودة في باقي الأحماض

النووية. والمصير النهائي لأي RNAs هو التكسير الكلي والمنظم، وكما ذكرنا سابقاً فإن معدل تحطيم RNAs يلعب الدور الأهم في الحفاظ على مستواه الثابت الضروري للتعبير عن الجين الذي أنتجه.

تكوين القبعة :

معظم mRNA في الخلايا حقيقية النواة لها قبعة 5' cap وهو عبارة عن مثيل كوانوسين 7-methylguanosine مرتبط بالنهاية '5 لـ mRNA من خلال آصرة شاذة هي الآصرة 5',5' ثلاثية الفوسفات (5',5' triphosphate linkage) (الشكل 13-2).



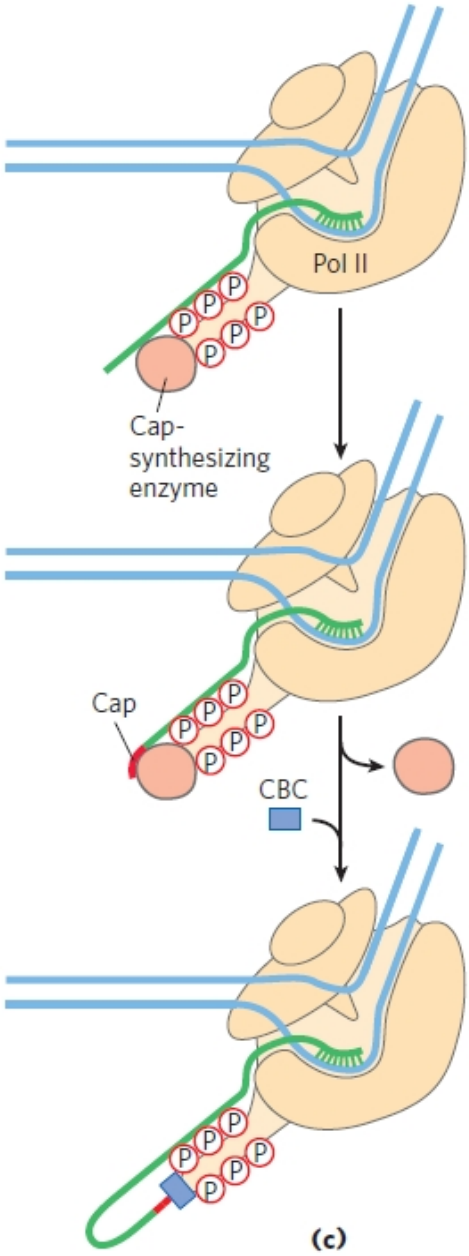
الشكل (13-2) تكون القبعة 5' cap على mRNA

وتعد القبعة 5' cap ضرورية لحماية mRNA من فعل انزيمات التكسير (الرايبونيوكلييز)، كما يرتبط مع القبعة 5' cap بروتينات متخصصة مكونة من معقدات تساهم في ارتباط mRNA مع الرايبوسوم للبدء بعملية الترجمة، وتتكون القبعة 5' cap بتجمع جزيئات GTP مع ثلاثي الفوسفات عند النهاية 5' للمستنسخ الأولي، يلي ذلك مثيلة الكوانين عند N-7، كما يتم إضافة المزيد من مجاميع المثيل عند 2'-hydroxyl للنيوكليوتيد الأول والثاني المجاورين للقبعة (الشكل 13-2). مجاميع المثيل التي تتم إضافتها تؤخذ من S-adenosylmethionine، وجميع هذه التفاعلات تحدث بشكل مبكر جداً خلال عملية الاستنساخ، إن إنزيمات القبعة الثلاث والنهاية 5' للمستنسخ تكون مرتبطة مع النهاية CTD لإنزيم البلمرة الثاني RNAPII إلى أن تتكون القبعة بشكل كامل، بعدها تتحرر القبعة من أنزيماتها وترتبط مع معقدات القبعة (الشكل 13-3).

عملية القطع والوصل Splicing :

على العكس من mRNA في البكتريا التي تكون مستمرة وتشفر لمتعدد الببتيد، فإن mRNA في معظم الخلايا حقيقية النواة (وخاصة في الثديات) تكون مقطعة بالانترونات باستثناء mRNA المشفرة لبعض الهستونات. ويذكر أن العديد من الجينات في الخلايا حقيقية النواة البدائية مثل خميرة S. cervisiae تشفر لـ mRNA ليس فيها انترونات بينما في خمائر أخرى تكون الانترونات شائعة، كما اكتشفت الانترونات في بعض mRNA لبعض البكتريا.

في mRNA الخلايا حقيقية النواة فإن معظم الاكسونات أقل من 1000 نيوكليوتيد (معظمها تكون ضمن 100-200 نيوكليوتيد طولاً) وتشفر لـ 30-60 حامض أميني. بينما الانترونات تختلف في الحجم من 50-20000 نيوكليوتيد، ويلاحظ أنه في الخلايا حقيقية النواة المتقدمة (مثل الإنسان) فإن حجم وعدد الانترونات يكون أكثر من الاكسونات، وهنا ربما يلاحظ القارئ أن عدد وحجم الانترونات والاكسونات وحتى الجينات قد ذكرت عدة مرات خلال فصول هذا الكتاب بقيم مختلفة وذلك نابع من عدم وجود إجماع نهائي بين الباحثين والعلماء حول هذه الأعداد، ويبقى الباب مفتوحاً للمزيد من البحوث والدراسات.

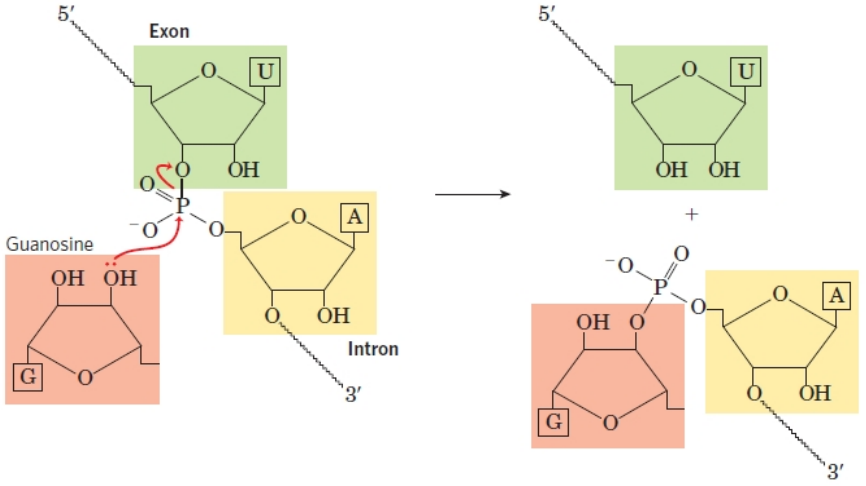


الشكل (3-13) تصنيع القبعة يتم من خلال انزيم يرتبط مع النهاية CTD لإنزيم البلمرة الثاني RNAPII، وتبقى القبعة مرتبطة مع النهاية CTD من خلال الارتباط مع معقد ارتباط مع القبعة (CBC) (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

أما فيما يخص عملية القطع والوصل Splicing فيمكن تقسيم الانترونات إلى 4 أنواع أو مجاميع، المجموعتين الأولى والثانية تختلفان في تفاصيل آلية القطع والوصل لكنهما تشتركان في كون عملية القطع والوصل فيهما يتم ذاتياً (Self-splicing) ولا تحتاجان إلى بروتينات (إنزيمات) لعملية القطع والوصل.

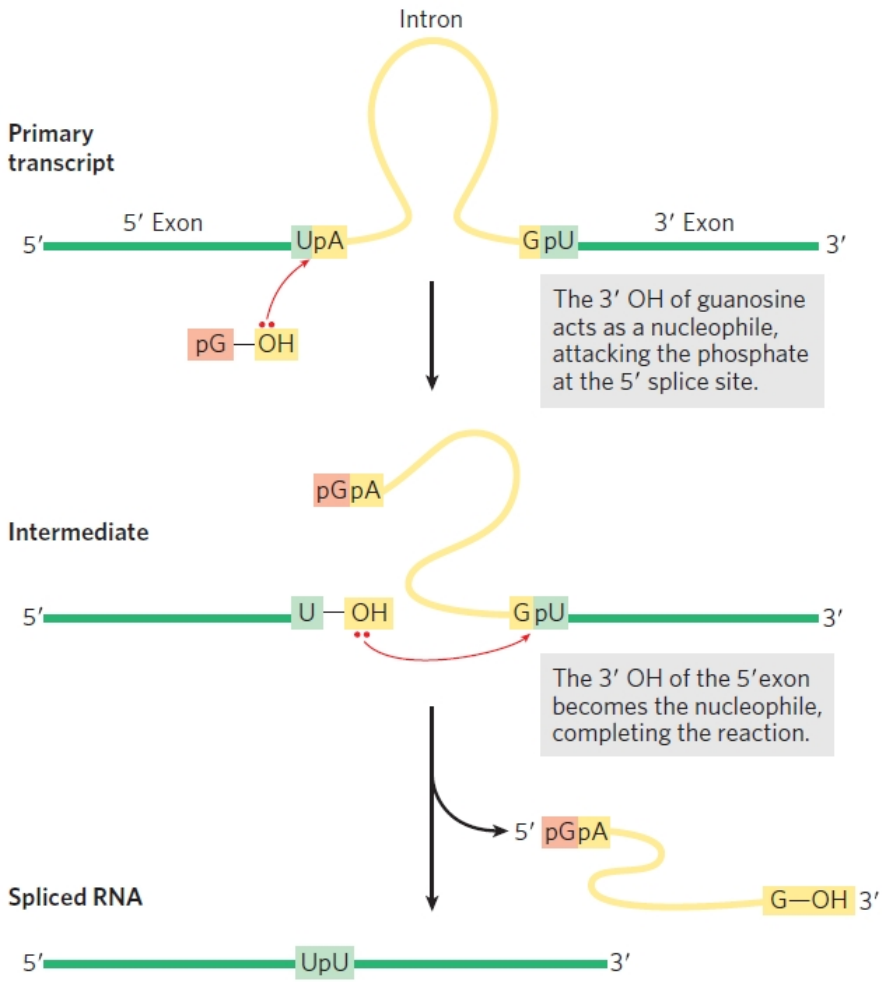
- **المجموعة الأولى**: وتتواجد في بعض جينات: النواة، المايتوكوندريا، والبلاستيدات الخضراء، المشفرة لـ mRNA و rRNA و tRNA.
- **المجموعة الثانية**: وتتواجد في المستنسخ الأولي mRNA للمايتوكوندريا والبلاستيدات الخضر في الفطريات والطحالب والنباتات.

وفي كلتا المجموعتين فإن عملية القطع والوصل تحتاج إلى خطوتين من تفاعلات Transesterification (الشكل 13-4). بحيث أن مجموعة الهيدروكسيل '2 أو '3 تهاجم مجموعة الفوسفات مكونةً آصرة فوسفاتية ثنائية الأستر جديدة بدلاً من القديمة. وتشبه العملية كثيراً عملية قطع وإعادة ربط DNA بفعل انزيمات Topoisomerases. والمجموعة الأولى والثانية تحتاجان إلى عامل مساعد Cofactor (لكنه لا يستعمل كمصدر طاقة) وهو عادةً نيوكليوتيد أو نيوكليوسيد الكوانين.



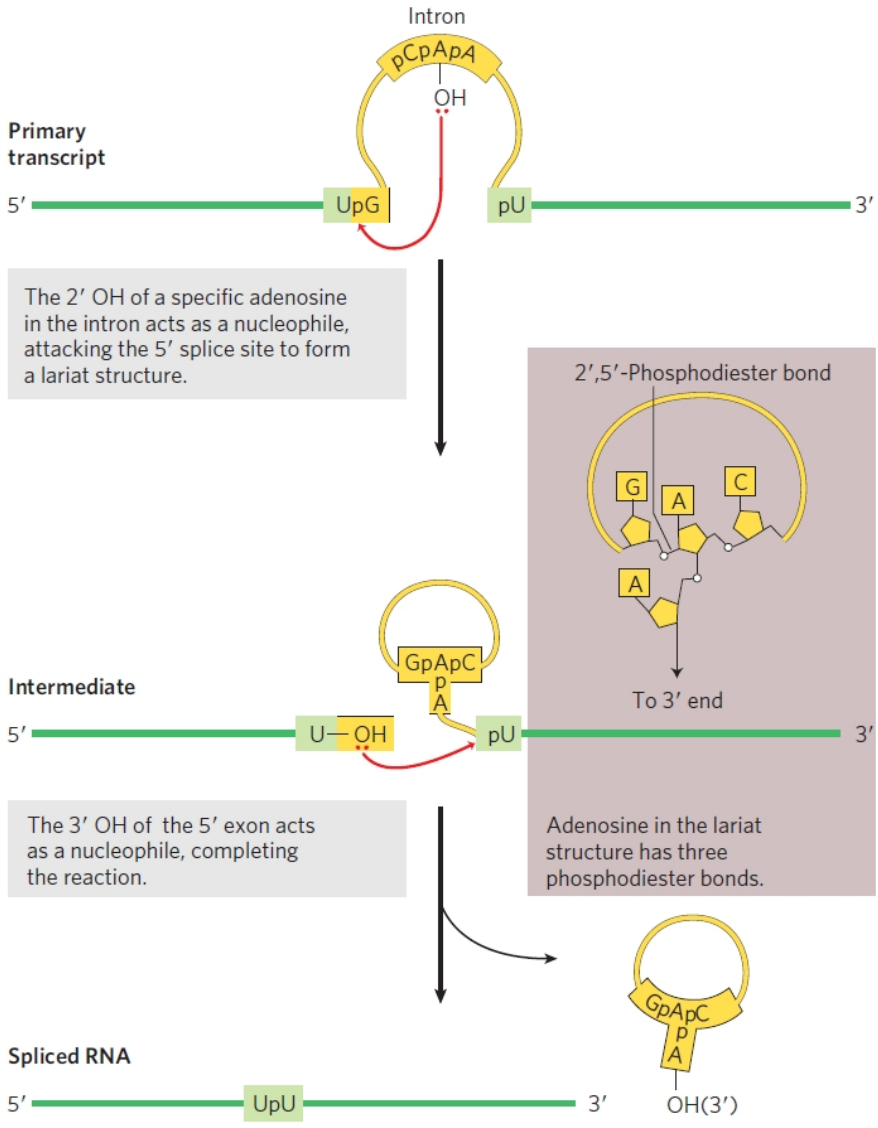
الشكل (13-4) تفاعلات عملية Transesterification

المجموعة '3 الهيدروكسيلية للكوانوسين تستعمل لتكوين الآصرة في الخطوة الأولى لعملية القطع والوصل، هذه المجموعة (الكوانوسين '3 هيدروكسيل) تكون آصرة طبيعية هي الآصرة '5، '3 ثنائية الأستر مع النهاية '5 للانترون (الشكل 13-5)، النهاية '3 هيدروكسيل للاكسون التي تستبدل في هذه الخطوة تعمل لتكوين آصرة بتفاعل مشابه مع النهاية '3 للانترون، الناتج النهائي لهذه التفاعلات هو قطع وإزالة الانترون وإعادة ربط الاكسونات.



الشكل (13-5) آلية القطع والوصل في المجموعة الأولى من الانترونات (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

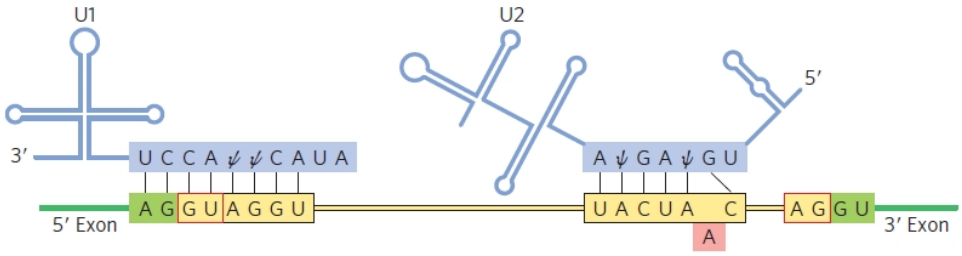
في المجموعة الثانية من الانترونات طبيعة التفاعلات تكون مشابهة للمجموعة الأولى إلا أن الجزء الذي يكون الآصرة في الخطوة الأولى (مجموعة '2 هيدروكسيل) للنيوكليوتيد A تكون ضمن الانترون، كما يتكون تركيب متفرع بشكل مؤقت (الشكل 13-6)



الشكل (13-6) آلية القطع والوصل في المجموعة الثانية من الانترونات (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

- **المجموعة الثالثة:** وهي المجموعة الأكبر من الانترونات وتشمل تلك الموجودة في المستنسخ الأولي لـ mRNA النووي، وتسمى هذه الانترونات بانترونات جسيم القطع والوصل Spliceosomal introns لأن إزالة الانترونات هنا يحفز ويتم من خلال معقد بروتيني كبير يدعى بجسيم القطع والوصل Spliceosome. وداخل هذا الجسيم يتم قطع ووصل الانترونات بطريقة مشابهة للمجموعة الثانية أعلاه، ويكون جسيم القطع والوصل من معقدات بروتين–RNA هي رايبونيوكليوبروتينات نووية صغيرة Small-nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) (وتلفظ سنربس) وكل snRNP تتكون من أحد أنواع RNA و نيوكليوتيدات (بطول 100–200) تسمى RNA النووي الصغير snRNAs. وتساهم خمسة من snRNAs في تفاعلات عملية القطع والوصل وهي U1 و U2 و U4 و U5 و U6 وتتواجد بوفرة في أنوية الخلايا حقيقية النواة.

انترونات جسيم القطع والوصل لها تركيب ثنائي النيوكليوتيد GU عند النهاية '5 و AG عند النهاية '3، وهذه المواقع تعد اشارة تعليم لعملية القطع والوصل. أما U1 فيحوي تسلسلات متممة لتسلسلات قريبة من موقع القطع والوصل '5 لانترونات mRNA النووي (الشكل 13–7).

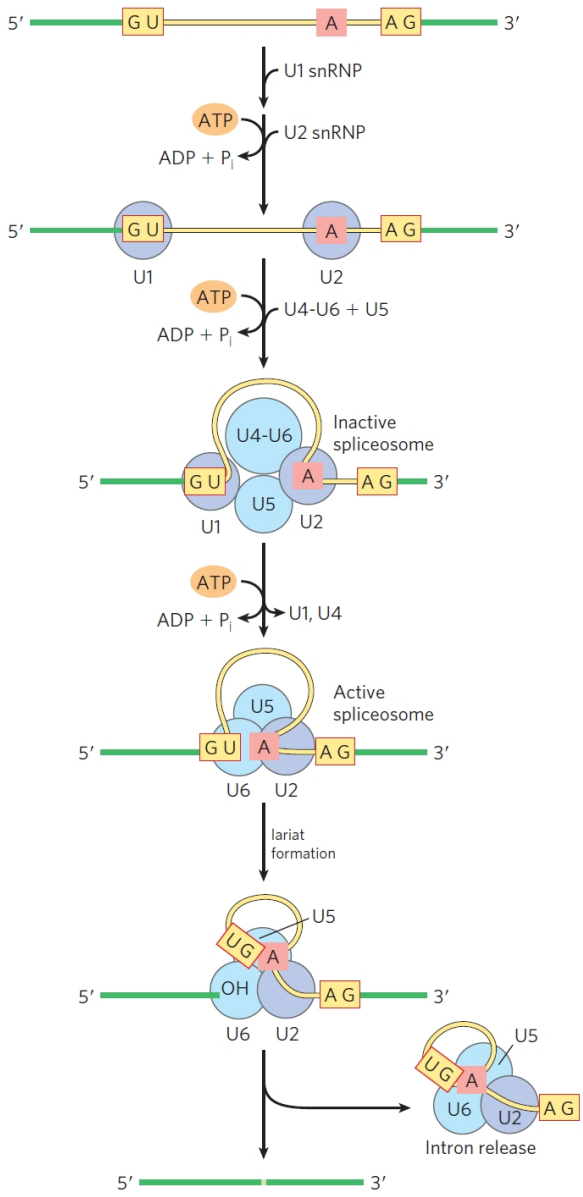


الشكل (13-7) ازدواج RNA لتكوين معقد Spliceosome

ويرتبط U1 مع هذا الموقع في المستنسخ الأولي، واضافة U2 و U4 و U5 و U6 يؤدي إلى تكون جسيم القطع والوصل (الشكل 13–8).

في الحقيقة فإن هذه snRNPs الخمسة مع بعضها تساهم مع حوالي 50 بروتين في تكوين جوهر جسيم القطع والوصل، فضلاً عن أكثر من 50 بروتين آخر يرتبط مع هذا المعقد

بمراحل مختلفة من عملية القطع والوصل، هذه البروتينات تؤدي وظائف مختلفة ضمن عمليات: القطع والوصل، نقل mRNA إلى السايتوبلازم، الترجمة، وتكسير mRNA.



الشكل (8-13) تجمع مكونات جسيم القطع والوصل
(مأخوذ من Nelson and Cox, 2012)

عملية تجمع البروتينات لتكوين جسيم القطع والوصل تحتاج طاقة (ATP). بعض مكونات عملية القطع والوصل تكون مربوطة إلى النهاية CTD لإنزيم البلمرة الثاني RNAPII مما يدل على أن عملية القطع والوصل (حالها حال كل معاملات RNA) تجري بالتناسق مع عملية الاستنساخ (الشكل 13-9). وبعد تصنيع وصلة القطع والوصل الأولى فإنها ترتبط من خلال جسيم القطع والوصل المربوطة، عندها فإن وصلة القطع والوصل الثانية تؤخذ من قبل هذا المعقد، مما يسهل تغيير موقع نهايات الانترون وبالتالي عملية القطع والوصل، وبعد انتهاء عملية القطع والوصل فإن الانترونات تبقى في النواة كي يتم تحطيمها فيما بعد.

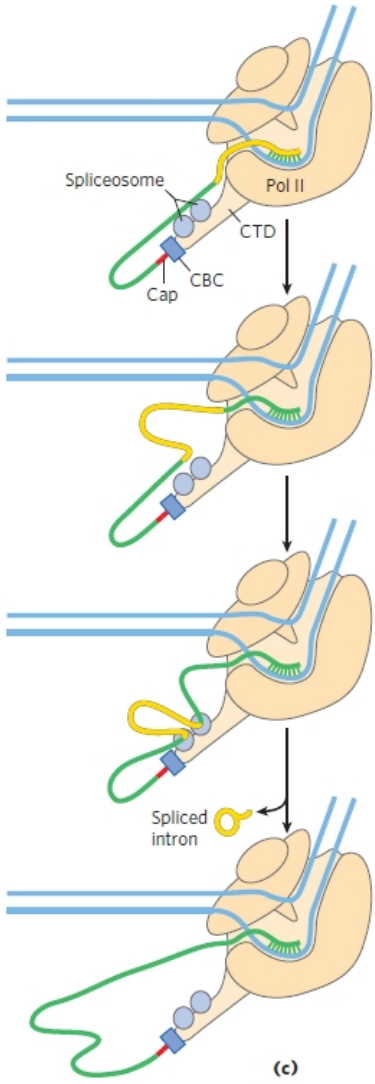
- **المجموعة الرابعة**: من الانترونات توجد في بعض أنواع tRNA وتختلف عن انترونات النوعين الأول والثاني بأنها تحتاج طاقة (ATP) وانزيم الاندونيوكلييز. ويقوم إنزيم الاندونيوكلييز بالقطع والوصل من خلال تكسير الآصرة الفوسفاتية ثنائية الأستر عند نهايتي الانترون، ويتم ربط الاكسونين بعملية مشابهة لربط DNA.

تكوين الذيل متعدد الأدينيل (A) :

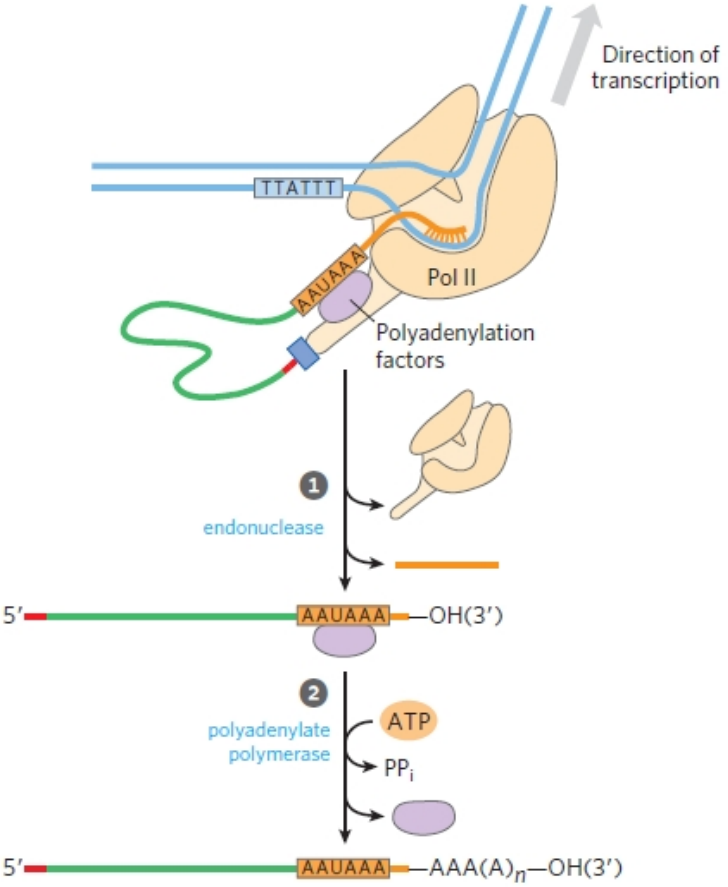
النهاية '3 لمعظم mRNA للخلايا حقيقية النواة يكون لها ذيل مميز يتكون من حوالي 80-250 من نيوكليوتيد الأدينين (A) وهو ما يعرف بالذيل متعدد الأدينيل (A) ويعمل كموقع لارتباط واحد أو أكثر من البروتينات المتخصصة، ويشبه الذيل متعدد (A) القبعة في توفير الحماية لنهاية mRNA من التحطيم بفعل الانزيمات. وفي البكتريا فإن العديد من mRNA تحتاج الذيل متعدد (A) ولكن الذيل هنا يحفز عملية تكسير mRNA بدلاً من توفير الحماية لها.

أما آلية تكوين الذيل متعدد (A) فيتم بعدة خطوات متعاقبة، ويزداد طول المستنسخ بإضافة الذيل متعدد (A) أكثر من موقع إضافة الذيل، أما عند التكسير فإنها تتم في موقع إضافة الذيل من خلال معقد إنزيمي كبير يحوي الاندونيوكلييز ويكون مرتبط مع النهاية CTD لانزيم البلمرة الثاني RNAPII (الشكل 13-10). والموقع الذي يتم فيه التكسير يكون معلم بعنصرين من التسلسلات هما: التسلسلات '5AAUAAA3' و 10-30 نيوكليوتيد

صعوداً (بالاتجاه '5) من موقع التحطيم. وعملية التكسير تنتج مجموعة من هيدروكسيل '3 حرة تعمل كعلامة تعريف للنهاية '3 لـ mRNA بحيث يتم فوراً إضافة متعدد (A) من قبل إنزيم البلمرة متعدد الاديناليت Polyadenylate polymerase وهذا الإنزيم يحتاج نهاية mRNA المحطمة على شكل مجموعة هيدروكسيل '3 حرة.

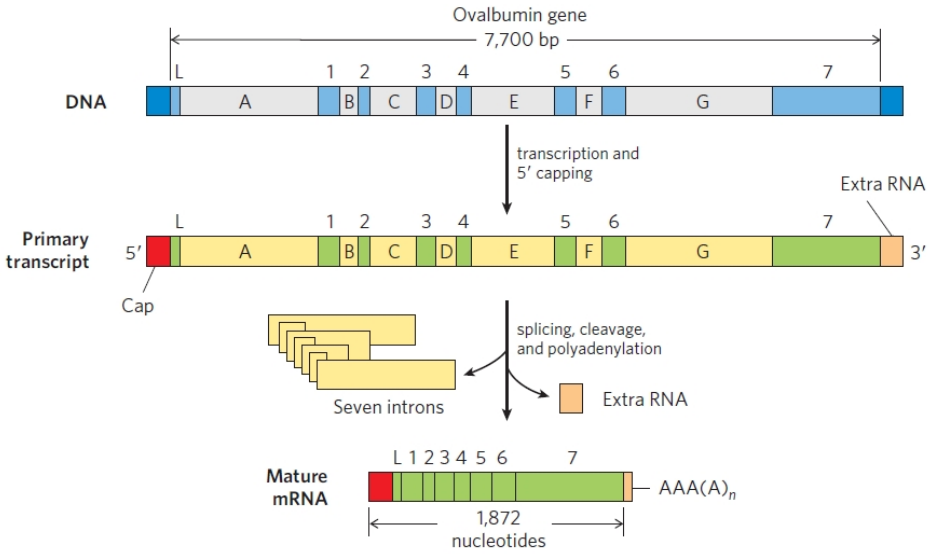


الشكل (9-13) التناسق بين عمليتي القطع والوصل والاستنساخ (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012)



الشكل (13-10) اضافة الذيل متعدد (A) إلى المستنسخ الأولي في الخلايا حقيقية النواة (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

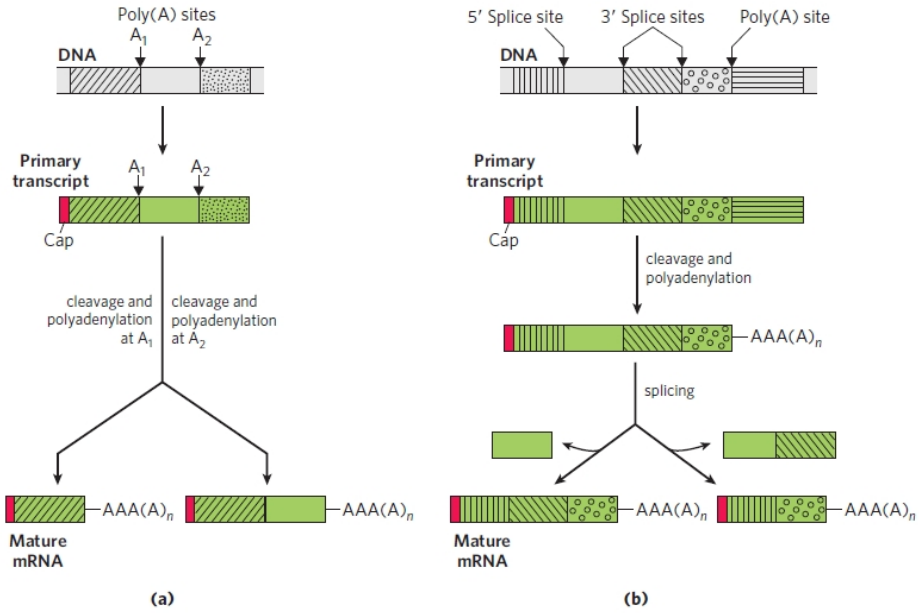
ويلخص (الشكل 13–11) العمليات على mRNA في الخلايا حقيقية النواة بشكل عام، وهنا نذكر بأنه في بعض الحالات فإن تسلسلات التشفير ضمن mRNA قد تعاني بعض التغيرات والتحويرات، إذ يتم إضافة وإزالة بعض النيوكليوتيدات أو تغيير بعض النيوكليوتيدات (مثل إزالة الأمين الانزيمية للسايتوسين (C) يؤدي إلى تكوين اليوراسيل (U)) ومن الأمثلة الشهيرة لذلك أن بعض جينات طفيلي التريبانوسوما Trypanosomes تصنع mRNA لا تحوي يوريدليت (U)، ويتم إضافة (U) فيما بعد.



الشكل (13-11) ملخص لعمليات المعاملة على mRNA في الخلايا حقيقية النواة (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

معاملة RNA يمكن أن تجعل الجين المعين ينتج أكثر من ناتج واحد :

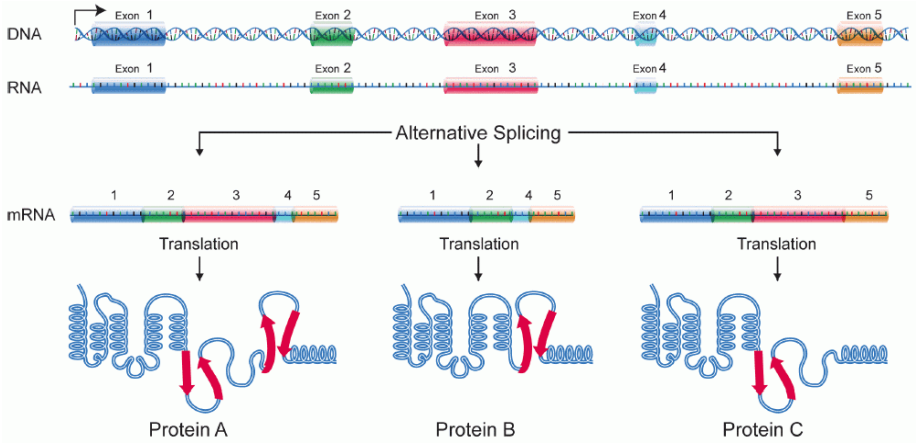
ربما أحد ألغاز علم الجينوم الحديث هو التعقيد الهائل في الجينوم ونواتجه، هذا التعقيد ليس فقط بسبب عدد الجينات المشفرة للبروتينات أو حتى الحجم الهائل للجينوم، بل لكون نواتج هذه الجينات متداخلة بشكل معقد، فمثلاً بعض المستنسخ الأولي لـ mRNA في الخلايا حقيقية النواة تنتج mRNA ناضج واحد يؤدي إلى تصنيع متعدد ببتيد واحد، لكن البعض الآخر منه يمكن أن تؤدي عملية المعاملة إلى إنتاج أكثر من mRNA ناضج، مما يؤدي إلى تصنيع متعدد ببتيدات مختلفة، إذ وجد أن المستنسخ الأولي يحمل اشارات جزيئية لمسارات معاملة بديلة Alternative processing، وعملية تفضيل مسار على آخر في خلية ما وفي الوقت المحدد تنظمه عوامل المعاملة والبروتينات المرتبطة مع RNAs ونواتج جينات تنظيمية. والمستنسخات المعقدة يمكن أن يكون لها أكثر من موقع للقطع والوصل وإضافة الذيل متعدد (A) (الشكل 13-a12)، أو يكون لها أشكال بديلة ومتعددة من القطع والوصل (الشكل 13-b12) وهذا الأخير يسمى بالقطع والوصل البديل.



الشكل (12-13) آليتان للقطع والوصل البديل في الخلايا حقيقية النواة.

القطع والوصل البديل :

وهي عملية منظمة خلال التعبير الجيني بحيث أن جين واحد ينتج أكثر من بروتين، إذ أن اكسون واحد أو عدة اكسونات تدخل في تركيب أو لا تدخل في تركيب mRNA الناضج وبالتالي فإن البروتينات الناتجة بعملية الترجمة تختلف عن بعضها بتسلسلات الأحماض الأمينية مما ينتج اختلافها عن بعضها بالوظيفة (الشكل 13-13).

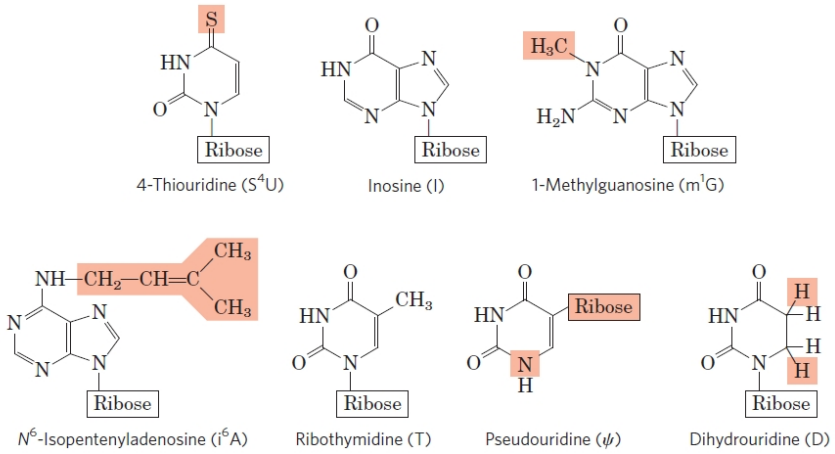


الشكل (13-13) القطع والوصل البديل.

وبسبب آلية القطع والوصل فإن الجينوم ينتج عادة بروتينات أكثر من عدد الجينات، فمثلاً في الإنسان يزيد عدد البروتينات عن 100 ألف مقارنة مع حوالي 25 ألف جين مشفر، وتحدث آلية القطع والوصل كعملية طبيعية في الخلايا حقيقية النواة مما تزيد من التنوع الحيوي Biodiversity، وفي الإنسان يعتقد أن 95٪ من الجينات متعددة الاكسونات Multi-exonic genes تعاني من القطع والوصل البديل، وهناك أشكال متعددة لهذه الآلية وأكثرها شيوعاً هي نموذج تخطي الاكسون Exon skipping mode، وفي هذا النموذج فإن الاكسون المعين يبقى ضمن mRNA الناضج في خلايا وأنسجة معينة، لكنه يغيب في خلايا وأنسجة أخرى، أو تحت ظروف معينة. وهناك نماذج وأشكال جديدة من القطع والوصل البديل لا زالت تكتشف لحد الآن، وآلية القطع والوصل غير الطبيعية تشاهد في العديد من الحالات المرضية ومنها العديد من الأمراض الوراثية في الإنسان وكذلك أنواع مختلفة من السرطانات.

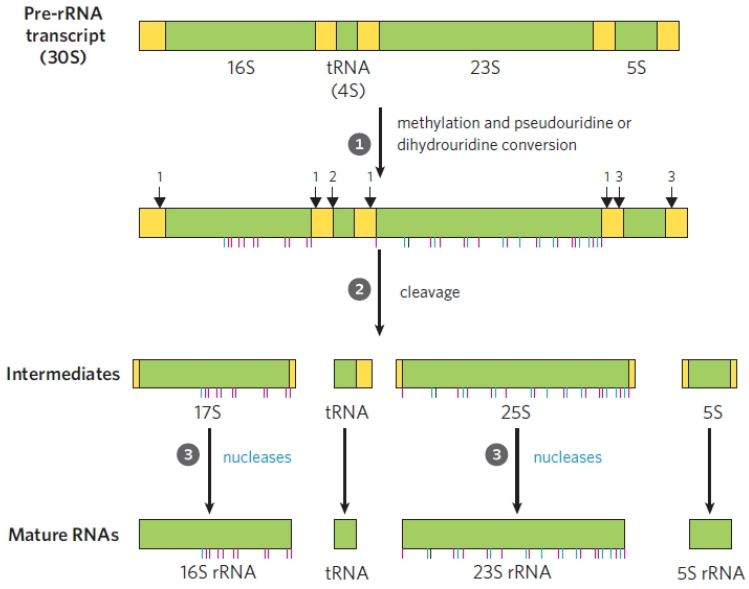
معاملة tRNA و rRNA :

إن معاملة RNA بعد الاستنساخ لا تقتصر على mRNA فقط، فمثلاً في معظم الكائنات فإن RNA الرايبوسومي (rRNA) يصنع من بادئ كبير يدعى Preribosomal RNAs (pre-rRNAs)، وكذلك RNA الناقل tRNA فانه يصنع من بادئ كبير، وهذه RNAs ربما تملك نيوكليوسيدات محورة متنوعة (والشكل 13–14) يظهر بعض هذه الأنواع.



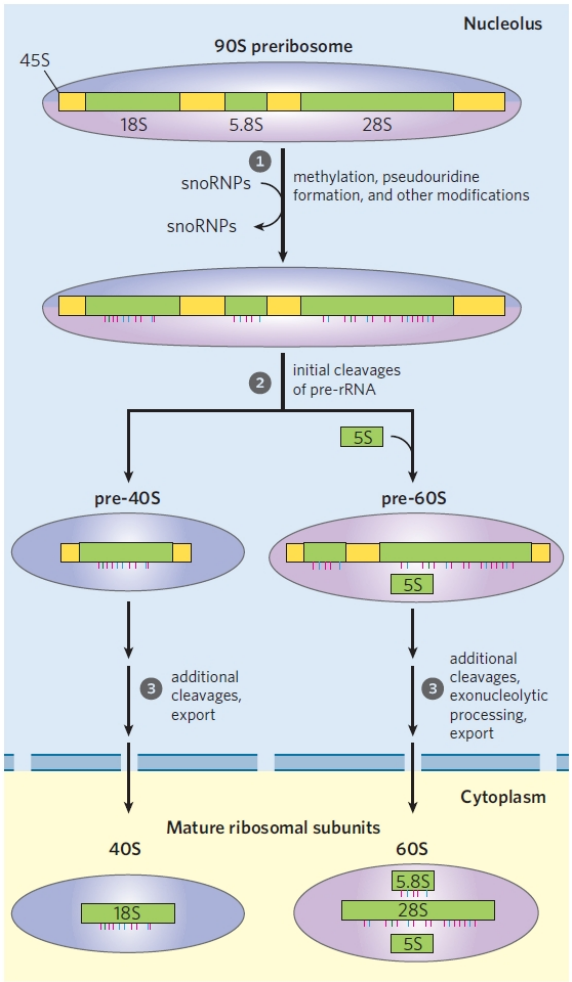
الشكل (13-14) بعض القواعد المحورة في rRNA و tRNA تنتج من تحويرات ما بعد الاستنساخ

في البكتريا ينشأ rRNA من بادئ منفرد هو 30S RNA ويتكون من حوالي 6500 نيوكليوتيد، و RNA على جانبي البادئ 30S RNA والقطع بين rRNA تزال خلال عملية المعاملة (الشكل 13-15).



الشكل (13-15) معاملة مستنسخ pre-rRNA في البكتريا

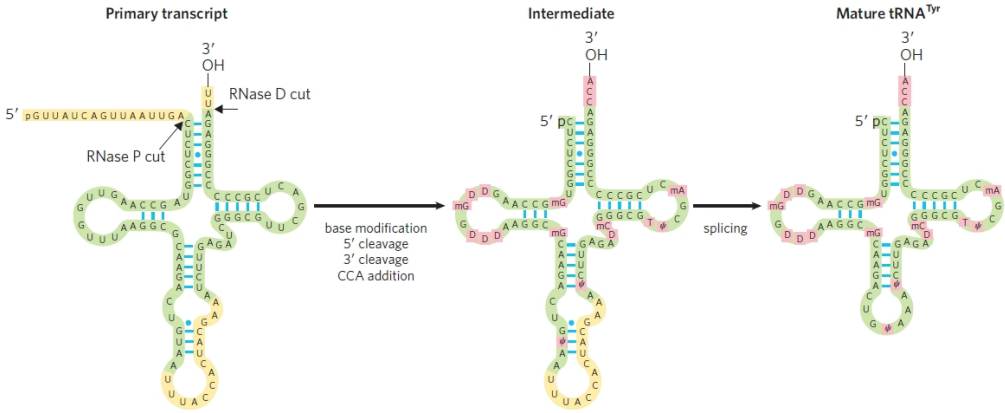
ويشفر جينوم بكتريا الايشريشا القولونية لسبعة من جزيئات pre-rRNA كل هذه الجينات لها منطقة تشفير rRNA متشابهة، لكنها تختلف عن بعضها في القطع الواقعة بين هذه المناطق، أما في الخلايا حقيقية النواة فالأمر أكثر تعقيداً، فمثلاً يصنع مستنسخ 45S rRNA بواسطة انزيم البلمرة الأول RNAPI ويعامل في النواة ليكون rRNA من نوع 18S و 28S و 5.8S المميزة للخلايا حقيقية النواة (الشكل 13–16). وكما في البكتريا فإن عمليات المعاملة تشمل التحطيم بفعل الاندورايبونيوكلييز أو الاكسورايبونيوكلييز وتفاعلات تحوير النويوكليوسايد، كما أن بعض pre-rRNA تملك انترونات يجب إزالتها.



الشكل (13-16) معاملة مستنسخات pre-rRNA في الفقريات

تنشأ المعاملات في النواة أولاً على شكل معقدات ضخمة على بادئ rRNA حالما تصنع من قبل إنزيم البلمرة الأول RNAPI، وهناك ارتباط وثيق بين استنساخ rRNA، نضج rRNA، وتجميع الرايبوسوم في النوية، وكل معقد يحوي ؛ إنزيمات الرايبونيوكلييز التي تحطم بادئ rRNA، الإنزيمات المحورة لقواعد معينة، وعدد كبير من RNAs النوية الصغير Small nucleolar RNAs (snoRNAs) والتي تعمل كمرشد لعملية تحوير النيوكليوسيدات وبعض تفاعلات التحطيم، فضلاً عن وجود بروتينات الرايبوسومات. في الخمائر هناك حوالي 170 بروتين غير رايبوسومي و snoRNAs (حوالي 70 نوع) لتحوير كل نيوكليوسيد، فضلاً عن 78 بروتين رايبوسومي. أما في الانسان فيكون العدد أكبر من النيوكليوسيدات المحورة (بحدود 200) وعدد كبير من snoRNAs المرافقة لها، كما أن مكونات هذه المعقدات يمكن أن تتغير عند تجميع الرايبوسومات. ويكون طول snoRNAs بحدود 60–300 نيوكليوتيد معظمها تشفر من تسلسلات تقع ضمن الانترونات لجينات أخرى، وكل snoRNAs تتكون من تسلسلات طولها 10–21 نيوكليوتيد تكون هذه التسلسلات متممة بالضبط لبعض التسلسلات ضمن rRNA.

أما rRNA من نوع 5S في معظم الخلايا حقيقية النواة فانه يصنع لوحده بشكل كامل من مستنسخ منفصل بفعل إنزيم البلمرة الثالث RNAPIII. وفيما يخص tRNA فإن معظم الخلايا تملك 40–50 نوع منه، والخلايا حقيقية النواة لها نسخ متعددة من جينات tRNA، ويتم الحصول على tRNA عن طريق إزالة النيوكليوتيدات من النهايتين '5 و '3 (الشكل 13–17). أحياناً تتواجد الانترونات في جينات tRNA ويجب أن تزال، وإذا صادف احتواء مستنسخ أولي على أثنين أو أكثر من tRNA فيتم تكسيرها إنزيميا والفصل بينها. إنزيم الاندونيوكلييز من نوع RNase P والذي يتواجد في معظم الكائنات الحية يزيل القطع من النهاية '5 من tRNA، ويتكون هذا الإنزيم من بروتين و RNA (أي رايبوزايم)، أما النهاية '3 فتتم معاملتها بإنزيمات أخرى من النيوكلييز ومنها الايكزونيوكلييز من نوع RNase D. أما المعاملة الأخيرة لـ tRNA فتتضمن تحويرا لبعض القواعد مثل المثيلة، أو إزالة الأمين، أو الاختزال (شكل 13–14).



الشكل (13-17) معاملة tRNA في البكتريا والخلايا حقيقية النواة

أهم المراجع :

Ahlquist P (2002). **"RNA-Dependent RNA Polymerases, Viruses, and RNA Silencing".** *Science.* 296 (5571): 1270–73.

Cammack R. **Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology.** 2nd ed. (2006). Oxford University Press.

David L. Nelson and Michael M. Cox. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 6th Edition. (2012).W.H. Freeman.

Dieter Still, Susumu Nishimura, Peter Moore. **RNA.** (2001). Elsevier Science Ltd.

Kiss T (2001). **"Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs"**. *The EMBO Journal*. 20 (14): 3617–22.

Peter Paolella. **Introduction to Molecular Biology.** (1998). The McGraw-Hill Companies. Inc.

Richard M. Twyman. **Advanced Molecular Biology.** (1998). BIOS Scientific Publishers Limited.

Ronald W. Dudek. **High-Yield Cell and Molecular Biology.** (1999). Lippincott Williams and Wilkins.

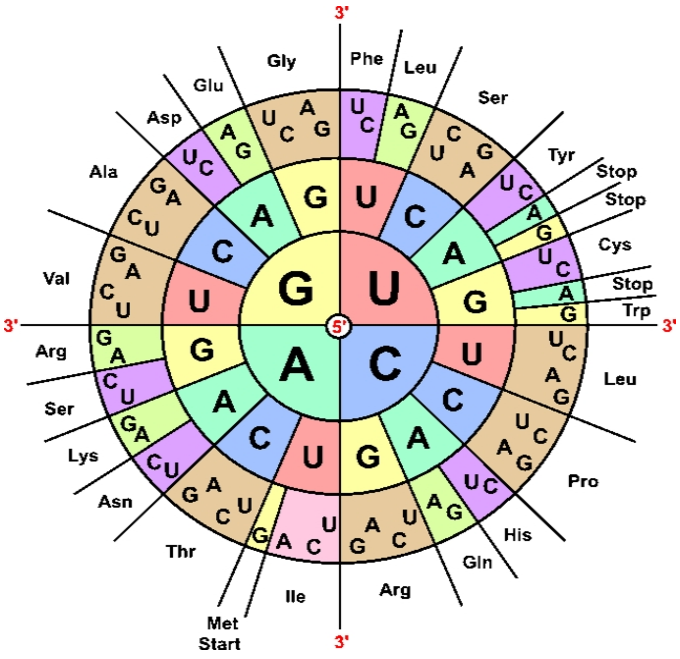
Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N (2008). **"Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs".** *Nature.* 455 (7209): 58–63.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. **Molecular Biology of the Gene.** 7th ed. (2013).. Benjamin Cummings. CSHL Press.

الفصل الرابع عشر

الشفرة الوراثيـة

Genetic Code



الفصل الرابع عشر

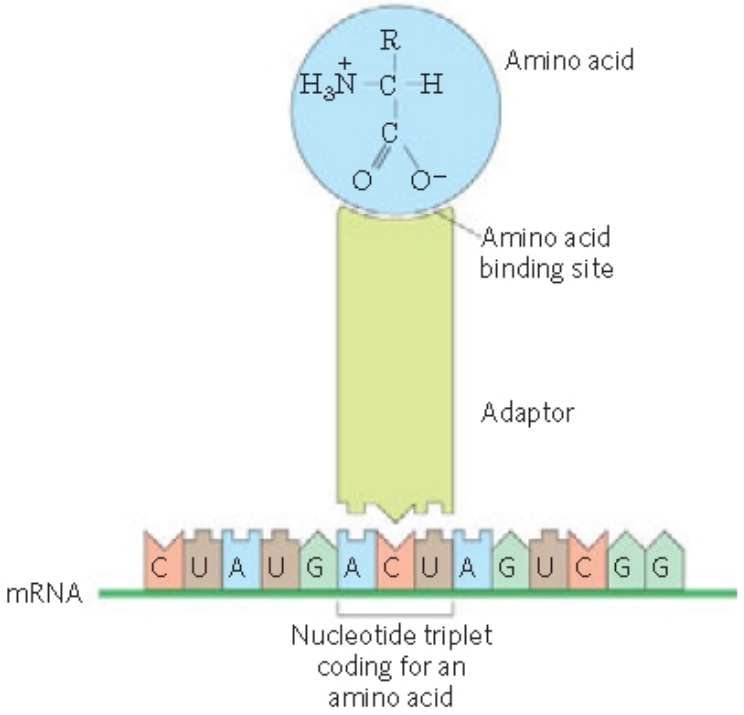
الشفرة الوراثية
Genetic Code

مرت عملية اكتشاف الشفرة الوراثية التي نعرفها اليوم بمراحل عدة منذ بداية الخمسينات من القرن الماضي، إذ قام Paul Zamecnick وزملائه بإجراء مجموعة تجارب لمعرفة أين يتم تصنيع البروتين في الخلية وذلك من خلال حقن أحماض أمينية نشطة شعاعياً في الجرذان ومن ثم الحصول على مزيج متجانس من خلايا كبد هذه الجرذان بعدها عملية فصل الأجزاء (التجزئة) Fractionation للبحث عن الأحماض الأمينية النشطة شعاعياً في مكونات وأجزاء الخلية. وعندما كانت تمر فترة ساعات وأيام بين عمليتي حقن الأحماض الأمينية النشطة شعاعياً وعملية التجزئة كان يتم الحصول على بروتينات معلمة في معظم أجزاء الخلية، في حين عندما كانت تمر دقائق فإن البروتينات المعلمة وجدت فقط في جسيمات صغيرة من الرايبونيوكليوبروتين، ويمكن رؤية هذه الجسيمات تحت المجهر الالكتروني، وعرفت بموقع تصنيع البروتين وسميت فيما بعد بالريبوسومات Ribosomes.

بعدها استمر Zamecnick بالاشتراك مع Mahlon Hoagland بالبحوث، إذ وجد أن الأحماض الأمينية تنشط عندما تحضن مع ATP والسائل السايتوسولي لخلايا الكبد، وتصبح

الأحماض الأمينية المرتبطة مع RNA مقاومة للحرارة، هذا RNA أكتشف نوعه فيما بعد من قبل Robert Holly وسمي tRNA، ارتباط الحامض الأميني مع tRNA يكون aminoacyl-tRNAs والإنزيمات المحفزة لهذه التفاعلات هي إنزيمات aminoacyl-tRNAs synthetases.

بعدهم جاء Francis Crick ليضع نظريته حول كيفية تشفير المعلومات الوراثية في 4 أحرف من الأحماض النووية التي تترجم فيما بعد إلى 20 حامض أميني، إذ اقترح أن جزيئة صغيرة (RNA) يمكن أن تعمل كمحول Adaptor أو حامل للأحماض الأمينية، ويرتبط أحد أطرافه مع حامض أميني متخصص بينما يتعرف جزئه الآخر على تسلسلات النيوكليوتيدات المشفرة لذلك الحامض الأميني (الشكل 14-1).



الشكل (14-1) فرضية كريك لحامل الأحماض الأمينية

وأسهمت هذه البحوث والدراسات في التعرف على الخطوات الأساسية لتصنيع البروتين وبالنهاية معرفة الشفرة الوراثية المتخصصة لكل حامض أميني. إن تسلسلات الخيط المنفرد لـ DNA تتم قراءتها بالاتجاه 5' إلى 3' على شكل نيوكليوتيدات ثلاثية وتسمى الشفرات الوراثية Codons، وبشكل مناظر الأحماض الأمينية يتم تصنيعها من النهاية الأمينية N إلى النهاية الكاربوكسيلية C ضمن سلسلة متعدد الببتيد، وبذلك فإن دراسة تسلسلات البروتين و DNA يجعل من الممكن مقارنة ومعرفة كل حامض أميني مع الشفرة المكونة له.

هناك 64 شفرة وراثية Codons وهي ناتجة من الأنواع الأربع للنيوكليوتيدات التي يمكن أن تشغل المواقع الثلاث للشفرة الوراثية (43 أي 64)، أي أن هناك 64 احتمال ممكن أن يتكون من 4 أحرف ترتب بشكل ثلاثي. وكل واحدة من هذه الشفرات لها معنى في عملية الترجمة، إذ أن 61 منها تشفر للأحماض الأمينية و 3 الباقية هي شفرات انتهاء Termination (stop) codons، والشكل (14-2) يوضح الشفرات الوراثية 64 والحامض الأميني المناظر لكل شفرة.

1st letter	Second Letter: U	Second Letter: C	Second Letter: A	Second Letter: G	3rd letter
U	UUU Phe UUC UUA Leu UUG	UCU UCC Ser UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC UGA Stop UGG Trp	U C A G
C	CUU CUC Leu CUA CUG	CCU CCC Pro CCA CCG	CAU His CAC CAA Gln CAG	CGU CGC Arg CGA CGG	U C A G
A	AUU AUC Ile AUA AUG Met	ACU ACC Thr ACA ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC AGA Arg AGG	U C A G
G	GUU GUC Val GUA GUG	GCU GCC Ala GCA GCG	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU GGC Gly GGA GGG	U C A G

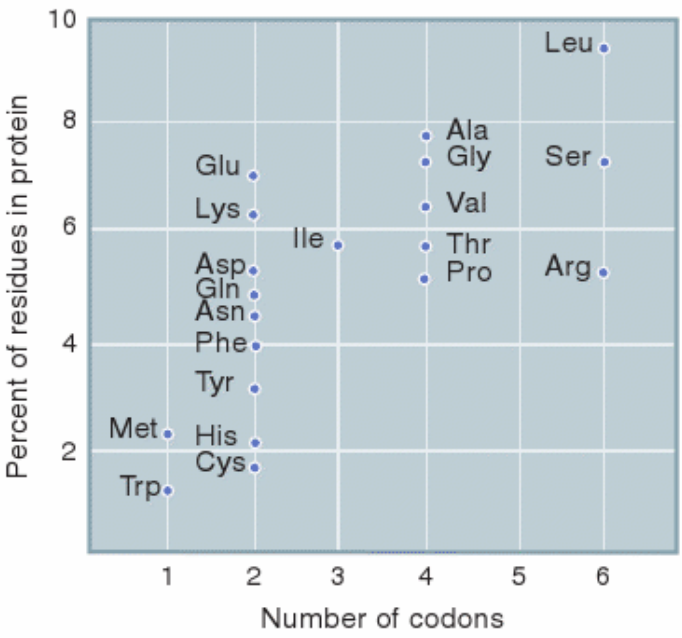
الشكل (14-2) الشفرات الوراثية والأحماض الأمينية التي تشفر لها

وبما أن 64 شفرة وراثية تشفر لـ 20 حامض أميني لذلك فكل حامض أميني له أكثر من شفرة وراثية واحدة عدا الحامضين الأمينيين التربتوفان والمثيوني فلكل واحد منهما شفرة واحدة فقط. قراءة الشفرة الوراثية تتم في mRNA (لذلك تكتب التسلسلات A,G,C,U)، وتسمى الشفرات الوراثية التي تشفر لحامض أميني واحد بالمرادفات Synonymous، وتميل هذه الشفرات التي تشفر لنفس الحامض الأميني (أو للأحماض الأمينية المتشابهة) إلى التشابه في التسلسلات (الشكل 14-2)، كما يلاحظ أن الحرف الثالث في الشفرة الوراثية لا يبدو ذو أهمية لأن اختلافه لا يسبب اختلاف نوع الحامض الأميني، ويسمى هذا بفقدان وظيفة الموقع الثالث Third position degeneracy، ولغرض أن تكون الشفرة الوراثية في mRNA ذات معنى يجب أن تزدوج أولاً مع مضاد الشفرة Anticodon في Aminoacyl-tRNA المناظر له، ويحدث هذا الازدواج في الرايبوسوم.

التدقيق الصارم لـ rRNA لعملية الازدواج تسمح فقط بازدواج A مع U، وازدواج G مع C للموقعين الأول والثاني من الشفرة الوراثية وتسمح بمزيد من الازدواج في الموقع الثالث من الشفرة الوراثية.

عملية تشفير الأحماض الأمينية بأكثر من شفرة وكذلك تشفير عدة شفرات متشابهة لنفس الحامض الأميني وللأحماض الأمينية المتشابهة كيميائياً له العديد من الفوائد ومنها التقليل من تأثيرات الطفرات، إذ أن تغيير في نيوكليوتيد واحد ضمن الشفرة الوراثية يمكن أن لا يؤدي إلى تغيير الحامض الأميني، أو تستبدل بحامض أميني مشابه يملك نفس الخصائص الكيميائية، فمثلاً الطفرة في CUC إلى GUC لا يؤثر على متعدد الببتيد المصنع لأن الحامض الأميني هو اللايسين لكلا الشفرتين، بينما الطفرة في CUU إلى AUU ينتج في استبدال الليوسين إلى أيزوليوسين، وكلاهما من الأحماض الأمينية النافرة من الماء Hydrophobic ويلعبان دور مشابه في البروتين.

ويلاحظ عموماً أن الأحماض الأمينية الأكثر شيوعاً ضمن البروتينات يكون لها أكبر عدد من الشفرات الوراثية، (والشكل 14-3) يوضح نسب تواجد الأحماض الأمينية في البروتينات مقارنة مع عدد الشفرات الوراثية المشفرة لها في بكتريا الايشريشيا القولونية. وهذا يشير إلى وجود علاقة توازن بين استعمال الأحماض الأمينية في البروتينات وبين الشفرة الوراثية.



الشكل (3-14) علاقة نسبة توجد الأحماض الأمينية في البروتينات وعدد الشفرات المشفرة لهذه الأحماض الأمينية (مأخوذ من Krebs et al., 2014).

الشفرات الوراثية الثلاث التي لا تشفر للأحماض الأمينية (واحدة منها) تعمل على إنهاء تصنيع البروتين وتسمى بشفرات الانتهاء وهي UGA و UAG و UAA والمثير (مع وجود بعض الاستثناءات النادرة) أن نفس تسلسلات DNA تشفر لمتعدد الببتيد في البكتريا والخلايا حقيقية النواة، أي أنه لو أخذنا mRNA من نوع من الكائنات الحية فيمكننا ترجمة هذا mRNA بدقة داخل الخلية in vitro وخارجها in vivo في رايبوسوم نوع آخر من الكائنات الحية وهذا ما يدعى بعمومية الشفرة الوراثية Universality of genetic code. ومن الأمثلة على بعض الاستثناءات النادرة لما ذكر أعلاه هو في شفرة الانتهاء لبعض الكائنات، فمثلاً في المايكوبلازما فإن شفرة UGA تشفر للحامض الأميني التربتوفان، أما في أنواع من الهدبيات (مثل التتراهايمينا و البرامسيوم) فإن UAA و UAG تشفران للحامض الأميني الكلوتامين، من جانب آخر فإن الاستثناءات في الشفرات الوراثية المشفرة للأحماض الأمينية أكثر ما تلاحظ في DNA المايتوكوندريا (mtDNA).

فرضية التمايل أو التأرجح Wobble hypothesis :

إن ازدواج التأرجح هو ازدواج بين نيوكليوتيدات ضمن جزيئة mRNA بشكل لا تخضع فيه لقواعد ازدواج واتسون-كريك، وقواعد الازدواج الأربع الأساسية للتأرجح هي:

1- الكوانين-اليوراسيل G-U.

2- الهايبوزانثين-اليوراسيل I-U.

3- الهايبوزانثين-السايتوسين I-C.

4- الهايبوزانثين-الأدنين I-A.

وتوجد قواعد ازدواج التأرجح بشكل رئيسي في التركيب الثانوي لـ RNA وتعد ضرورية للترجمة الصحيحة للشفرة الوراثية. ويلاحظ استعمال الحرف I كمختصر للهايبوزانثين لأن الأخير هو قاعدة مشتقة من الاينوسين Inosine، أما الثبات الحراري لهذه القواعد المزدوجة فتكون مقاربة للقواعد المزدوجة لواتسون-كريك.

وكما ذكرنا سابقاً فإن الشفرة الوراثية لها 64 احتمالية (43) للترجمة، كل شفرة من هذه الشفرات تحتاج جزيئة tRNA لها مضاد شفرة متمم للشفرة، ومع استبعاد شفرات الانتهاء الثلاث (UGA, UAG, UAA) والتي ترتبط بعوامل التحرر Release factors أكثر من ارتباطها مع جزيئات tRNA، لذلك فإن الارتباط القانوني Canonical يحتاج إلى 61 نوع من جزيئات tRNA وبما أن معظم الكائنات لها جزيئات tRNA أقل من 45 نوع، لذلك فإن بعض أنواع tRNA يجب أن يكون لها قابلية الازدواج بأكثر من شفرة وراثية، ولتفسير ذلك وضع فرانسيس كريك عام 1966 فرضية التأرجح Wobble hypothesis، إذ فرض كريك أن القاعدة '5 لمضاد الشفرة Anticodon والتي ترتبط مع القاعدة '3 للشفرة Codon (على mRNA) لا تكون بنفس طريقة ازدواج القاعدتين الآخريتين، أي أنها لا تخضع لقواعد الازدواج المعروفة (واتسون-كريك) وسماها كريك بالقاعدة المتحركة أو المتأرجحة وتمثل موقع القاعدة الثالثة في الشفرة الوراثية.

إن حركة القاعدة على الموقع '5 لمضاد الشفرة يعد ضرورياً لبعض التحويرات المهمة لعملية الازدواج. أدى كل ذلك إلى وضع كريك أساسيات لفرضية التأرجح :

1- القاعدتين الأولى والثانية ضمن الشفرة الوراثية هما من يحددان خصوصية الشفرة الوراثية ويخضعان لقوانين واتسون-كريك في ازدواج القواعد بين الشفرة (على mRNA) ومضاد الشفرة (على tRNA).

2- عندما تقرأ القواعد من '5 إلى '3 فإن القاعدة الأولى في مضاد الشفرة والتي تقابل القاعد الثالثة في الشفرة تحدد أنواع النيوكليوتيدات على tRNA، فمثلاً إذا كانت القاعدة الأولى في مضاد الشفرة هي C أو A فإن الازدواج يكون ضمن قوانين ازدواج واتسون-كريك، أي أن قاعدة واحدة متخصصة تزدوج مع كل واحدة منها. أما إذا كانت القاعدة الأولى في مضاد الشفرة هي U أو G فإن الخصوصية تكون أقل ولا تخضع لقواعد ازدواج واتسون-كريك ويمكن أن تزدوج مع أحد نوعين من القواعد، أما إذا كانت القاعدة الأولى في مضاد الشفرة هي الاينوسين I، عندها أي واحدة من القواعد الثلاث في الشفرة الوراثية يمكن أن تزدوج معها.

3- نظراً لتوارث الخصوصية للنيوكليوتيد الأول والثاني في الشفرة الوراثية، لذلك فلو أن شفرة حامض أميني واحد لها مضادات شفرة متعددة، وهذه الأخيرة تختلف عن بعضها في الموقعين الثاني والثالث (تقابل الموقعين الأول والثاني في الشفرة) عندها تحتاج العملية إلى أنواع مختلفة من مضاد الشفرة (tRNA).

4- أقل عدد ممكن من tRNA كي تلبي حاجة 61 شفرة وراثية (باستبعاد شفرات الانتهاء الثلاث) هي 32 من tRNA، في الحقيقة 31 نوع من tRNA للأحماض الأمينية وواحدة لشفرة البدء. والجدول (14-1) يوضح إحتماليات الازدواج التي وضعها واتسون-كريك ووضعت بحروف غامقة بينما وضعت مزدوجات التأرجح مائلة.

الأهمية الحيوية لفرضية التأرجح :

فضلاً عن ما ذكر سابقاً بأن الكائنات الحية لها عدد محدد من أنواع tRNA وعملية التأرجح تسمح بخصوصية أوسع، فإن عملية التأرجح تساهم في العديد من العمليات

الجدول (1-14) احتمايات ازدواج واتسون-كريك

قواعد '5 مضاد الشفرة (tRNA)	قواعد '3 الشفرة (mRNA)
A	*U*
C	*G*
G	*C* أو *U*
U	*A* أو *G*
I	*A* أو C أو *U*

الحيوية وأكثر ما درست في بكتريا الايشريشيا القولونية وتركزت حول آلية عمل إنزيمات Aminoacyl-tRNA synthetases. كما أن عملية التأرجح تساهم في تقليل أضرار الطفرات فعند حدوث طفرات استبدال في القاعدة الثالثة للشفرة الوراثية فإن التشفير يكون لنفس الحامض الأميني، أي لا يحدث تغيير على مستوى الترجمة ويدعى ذلك بالمرادفات.

ومن الأمور المثيرة في موضوع التأرجح هو الميل أو الانحياز للشفرة الوراثية المعينة ويقصد به أن الحامض الأميني الذي له أكثر من شفرة وراثية واحدة (ومعظم الأحماض الأمينية هي كذلك) فإنه يفضل شفرة وراثية معينة من ضمن هذه الشفرات ويدعى هذا بالميل أو الإنحياز للشفرة الوراثيةCodon bias ، فمثلاً الحامض الأميني الليوسين له 6 شفرات وراثية، واحدة من هذه الشفرات تكون هي المفضلة ضمن الجينوم، وتم في معهد بحوث جامعة Taledo البرهنة على أن الحامضين الأمينيين الكوانين والسايتوسين لهما شفرات وراثية مفضلة ضمن الجينوم، إذ تم في هذه الدراسة قياس دليل تكيف الشفرة الوراثية Codon adaptation index (CAI) وتعني الوزن الرياضي ضمن الجينوم لكل شفرة وراثية لكل حامض أميني مقارنة مع الوزن الرياضي الكلي للجينوم، وتم قياس ذلك للأحماض الأمينية في كل من الانسان، والسمك المخطط Zebra fish، والفئران، والدجاج. وأشارت النتائج إلى أن الشفرات الوراثية التي لها CAI عالية تمثل الشفرة المفضلة أو الانحياز للشفرة الوراثية، و لازالت البحوث في هذا المجال في تقدم مستمر.

الشفرات الوراثية المختلفة :

بالرغم من أن الشفرة الوراثية تكون ثابتة في معظم الكائنات وهو الشائع، إلا أن هناك بعض الاستثناءات التي يجب ذكرها، ومن ذلك :

1- في المايكوبلازما من نوع Mycoplasma capricolum، الشفرة الوراثية من نوع UGA لا يستعمل كشفرة انتهاء بل يشفر للحامض الأميني التربتوفان.

2- في الهدبيات (أوالي لها أهداب) فإن UAA و UAG يشفران للكلوتامين بدلاً من التشفير للانتهاء.

3- في هدبيات أخرى فإن شفرة الانتهاء UAG تشفر للحامض الأميني السيستايين، وفقط الشفرة UAA تعمل كشفرة انتهاء، وتفقد هذه الكائنات شفرة UGA.

4- في فطريات الكانديدا Candida فإن الشفرة الوراثية CUG تشفر للحامض الأميني السيرين بدلاً من الليوسين، ويعد هذا من الحالات النادرة لتغير تشفير شفرة من حامض أميني إلى آخر. كما أن إختلافات الشفرة الوراثية تحدث في المايتوكوندريا في العديد من أنواع الكائنات الحية.

الشفرة الوراثية الموسعة :

الشفرة الوراثية الموسعة Expanded genetic code هي الشفرة الوراثية المحورة مختبرياً بحيث واحدة أو أكثر من الشفرات الوراثية تحور ويعاد تخصيصها لتشفر لأحماض أمينية ليست من ضمن الأحماض الأمينية 20 الأساسية (أي ليست من ضمن الأحماض الأمينية المكونة للبروتينات Proteinogenic amino acids). والشفرة الوراثية الموسعة جزء من بحوث البيولوجي الصناعي الذي يهدف إلى هندسة أنظمة حيوية ذو تطبيقات مفيدة.

الشروط الأساسية للشفرة الوراثية الموسعة هي:

1- التشفير لحامض أميني غير قياسي.

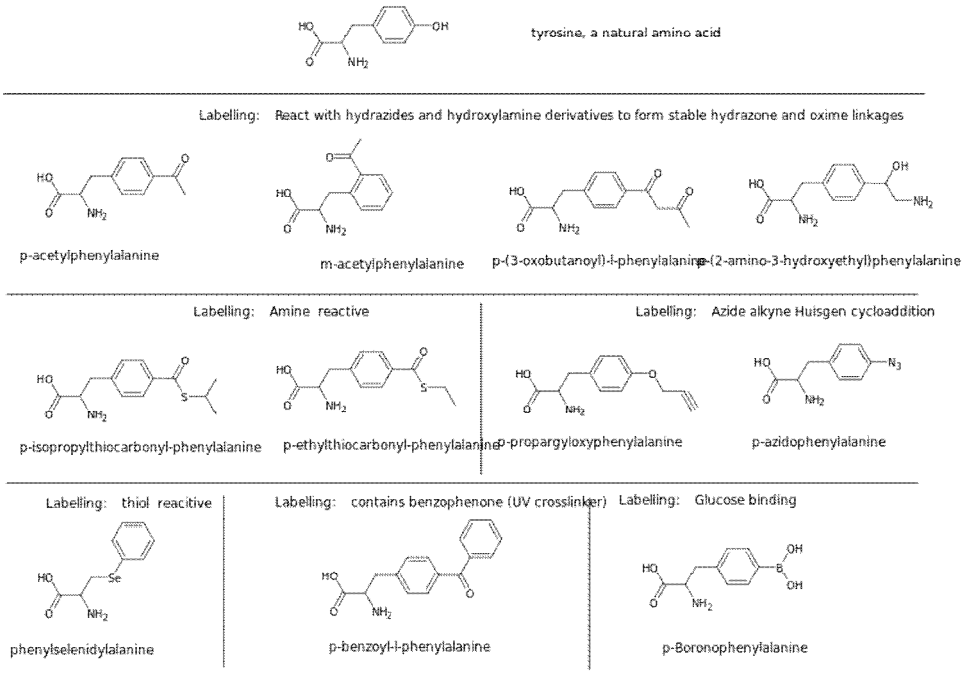
2- اعتماد شفرة غير مستخدم.

3- tRNA يتعرف على هذه الشفرة.

4- إنزيم tRNA synthetase يتعرف على فقط على هذا tRNA وفقط على الأحماض الأمينية غير القياسية.

الأحماض الأمينية غير القياسية :

الأحماض الأمينية غير القياسية Non-standard amino acids (NSAAs) هي تلك الأحماض الأمينية التي لاتدخل ضمن تركيب البروتين، وهناك أكثر من 71 من NSAAs المكتشفة لحد الآن غي بكتريا الايشريشيا القولونية والخمائر والإنسان، وعموماً فإنها تكون أكبر حجماً من الأحماض الأمينية القياسية، ومعظمها تملك لب مشابه للحامض الأميني الفينيل الانين (الشكل 14-4).



الشكل (14-4) بعض الأحماض الأمينية غير القياسية NSAAs.

مع ملاحظة تنوع السلاسل المرتبطة وهذا يسمح بمدى واسع من التحويرات والوظائف مثل التعليم Labeling، أو إنتاج بروتينات محورة، وتحويرات ما بعد الترجمة. ومن الأحماض الأمينية غير القياسية التي تدخل في تركيب البروتين تلك الحاوية على المعادن الثقيلة Heavy metals وهذا يسهل دراسة البروتين بتقنية التصوير البلوري لأشعة أكس X-ray crystallography، وكذلك الحاوية على عناصر فعالة ضوئيا تسهل دراسة تفاعل بروتين-بروتين داخل وخارج جسم الكائن الحي. أما كيفية إدخال هذه الأحماض الأمينية غير القياسية إلى البروتين فتتم بطريقتين رئيسيتين: إما تدخل الأحماض الأمينية غير القياسية إلى الخلية من الوسط المحيط، أو يتم هندسة مسارات معينة في الخلية كي تصنع مثل هذه الأحماض الأمينية.

تطبيقات الشفرة الوراثية الموسعة:

يمكن باستعمال هذه التقنية إدخال أي حامض أميني غير قياسي في أي موقع ضمن تركيب البروتين، وبذلك يمكن السيطرة بدقة وكفاءة عاليتين على التحويرات المرغوبة، كما يمكن بهذه التقنية إجراء التحويرات داخل الجسم، وباستخدام هذه التقنية يمكن إجراء دراسات مهمة منها :

1- التقصي عن تركيب ووظائف البروتينات، وذلك من خلال إدخال أحماض أمينية غير قياسية مماثلة لتلك المحورة ما بعد الترجمة، أو أحمض أمينية غير قياسية معلمة.
2- دراسة دور تحويرات ما بعد الترجمة في تركيب ووظيفة البروتينات.
3- التعرف على وتنظيم فعالية البروتين الهدف.
4- تغيير طريقة عمل البروتين.
5- تحسين مناعية البروتين وما ينتج عنه من تحمل الذات.
6- تحطيم متخصص لأجزاء معينة ضمن الخلية.
7- إنتاج بروتينات "أفضل" من حيث التركيب والوظيفة.

وأخيراً فإن هذه التقنية لازالت في بدايات التعرف على تفاصيلها واستخداماتها وتحتاج المزيد من البحوث والدراسات المستقبلية التي تبشر بفتح أفاق جديدة في علم البروتين وعلم البيولوجي الجزيئي عموماً.

أهم المراجع :

Benjamin A. Pierce. **Genetics: A Conceptual Approach.** 5th ed. (2013). W. H. Freeman.

Cammack R. **Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology.** 2nd ed. (2006). Oxford University Press.

Crick, Francis **The genetic code.** (1962).WH Freeman and Company.

Edward S. Tobias, Michael Connor, Malcolm Ferguson-Smith. **Essential Medical Genetics.** 6th ed. (2011). Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd.

Richard M. Twyman. **Advanced Molecular Biology.** (1998). BIOS Scientific Publishers Limited.

Ronald W. Dudek. **High-Yield Cell and Molecular Biology.** (1999). Lippincott Williams and Wilkins.

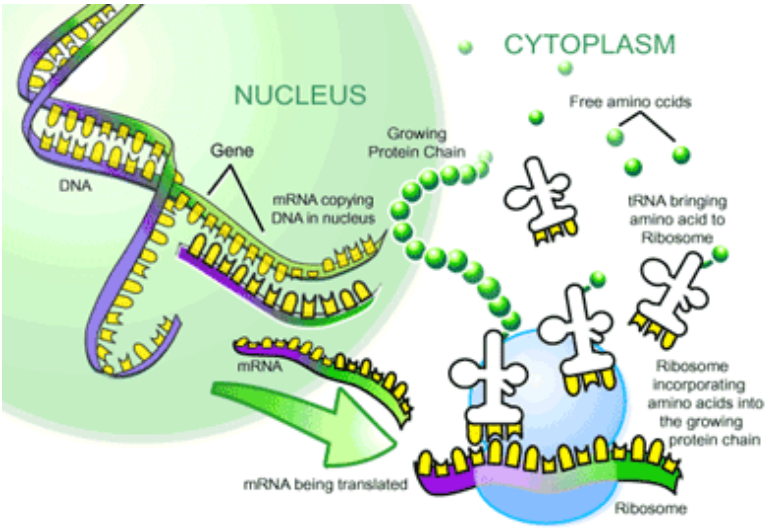
Krebs JE, Goldstein ES, Stephen T. Kilpatrick ST. **Lewin's GENES XI.** 11th Edition. (2014). Jones & Bartlett Learning.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. **Molecular Biology of the Gene.** 7th ed. (2013). Benjamin Cummings. CSHL Press.

الفصل الخامس عشر

تصنيع البروتيـن

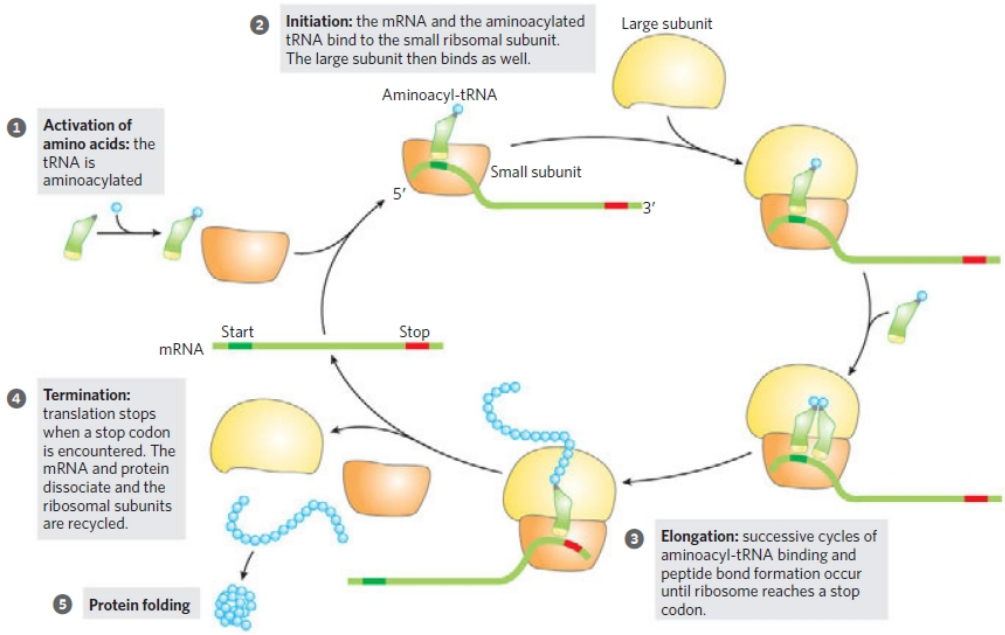
Proteing Synthesis



الفصل الخامس عشر

تصنيع البروتين
Protein Synthesis

كما هو الحال في تصنيع كل من DNA و RNA، فإن تصنيع الجزيئات الحيوية متعددة الأجزاء (البروتينات) يمكن تقسيمه إلى مراحل أساسية هي البدء، الاستطالة، والانتهاء، وفي عملية التصنيع الحيوي للبروتينات هناك خطوات إضافية أهمها تنشيط بادئات التصنيع (الأحماض الأمينية) والتغييرات أو التحويرات ما بعد التصنيع الحيوي للبروتين، بما يضمن دقة التصنيع تركيبياً والحصول على بروتين فعّال وظيفياً، و(الشكل 15-1) يلخص عملية التصنيع الحيوي للبروتين، أما المكونات الخلوية لكل مرحلة من مراحل التصنيع في بكتريا الايشريشيا القولونية فيمكن إجمالها في (الجدول 15-1)، أما في الخلايا حقيقية النواة فلا تختلف المكونات كثيراً وربما تكون أكثر عدداً.



الشكل (1-15) ملخص مراحل التصنيع الحيوي للبروتين (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

مراحل تصنيع البروتين :

1- مرحلة تنشيط الأحماض الأمينية:

تصنيع متعدد الببتيد بتسلسلات معينة يحتاج أمرين: 1- تنشيط النهاية الكاربوكسيلية لكل حامض أميني لتسهيل تكوين الآصر الببتيدية. 2- الآصرة يجب أن تبنى بين حامضين أمينيين، أي إضافة حامض أميني إلى جانب حامض أميني آخر اعتماداً على الشفرة الوراثية (mRNA) وهذا يتطلب أولاً جذب الحامض الأميني إلى tRNA، وعملية جذب الحامض الأميني الصحيح إلى tRNA الصحيح يعد عملية معقدة وتحدث في السايتوسول وليس في الرايبوسوم، كل حامض أميني من الأحماض الأمينية العشرين ترتبط مع tRNA المتخصص لها وتحتاج العملية إلى طاقة ATP وبتحفيز من إنزيم يعتمد على أيون $Mg2+$ هو إنزيم Aminoacyl-tRNA synthetase وعندما يرتبط tRNA مع حامض أميني يقال أن tRNA قد "تم شحنه Charged".

الجدول (15-1) مكونات مراحل تصنيع البروتين في بكتريا الإيشريشيا القولونية (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

Stage	Essential components
1. Activation of amino acids	20 amino acids 20 aminoacyl-tRNA synthetases 32 or more tRNAs ATP Mg^{2+}
2. Initiation	mRNA *N*-Formylmethionyl-$tRNA^{fMet}$ Initiation codon in mRNA (AUG) 30S ribosomal subunit 50S ribosomal subunit Initiation factors (IF-1, IF-2, IF-3) GTP Mg^{2+}
3. Elongation	Functional 70S ribosome (initiation complex) Aminoacyl-tRNAs specified by codons Elongation factors (EF-Tu, EF-Ts, EF-G) GTP Mg^{2+}
4. Termination and ribosome recycling	Termination codon in mRNA Release factors (RF-1, RF-2, RF-3, RRF) EF-G IF-3
5. Folding and posttranslational processing	Chaperones and folding enzymes (PPI, PDI); specific enzymes, cofactors, and other components for removal of initiating residues and signal sequences, additional proteolytic processing, modification of terminal residues, and attachment of acetyl, phosphoryl, methyl, carboxyl, carbohydrate, or prosthetic groups

إنزيمات التصنيع Aminoacyl-tRNA synthetases تجذب الأحماض الأمينية الصحيحة إلى tRNA الخاصة بها:

ضمن المرحلة الأولى لتصنيع البروتين والذي يحدث في سايتوسول الخلية فإن انزيم التصنيع Aminoacyl-tRNA synthetase يأستر Esterify العشرين حامض أميني إلى tRNA الخاصة بكل حامض أميني. هناك انزيم تصنيع Aminoacyl-tRNA synthetase واحد متخصص لكل حامض أميني وتم دراسة هذه الانزيمات في بكتريا الإيشريشيا

القولونية وإيجاد تركيبها وصنفت إلى نوعين رئيسيين كل نوع متخصص بـ 10 أحماض أمينية (الجدول 15-1) وينطبق ذلك على معظم الكائنات الحية.

الجدول (15-1) المجموعتين الرئيسيتين لانزيم التصنيع Aminoacyl-tRNA synthetase والأحماض الأمينية لكل مجموعة

Class I		Class II	
Arg	Leu	Ala	Lys
Cys	Met	Asn	Phe
Gln	Trp	Asp	Pro
Glu	Tyr	Gly	Ser
Ile	Val	His	Thr

والمعادلة العامة للتفاعل المحفز من قبل الإنزيم هي المعادلة التالية :

$$\text{Amino acid} + \text{tRNA} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{aminoacyl-tRNA} + \text{AMP} + PP_i$$

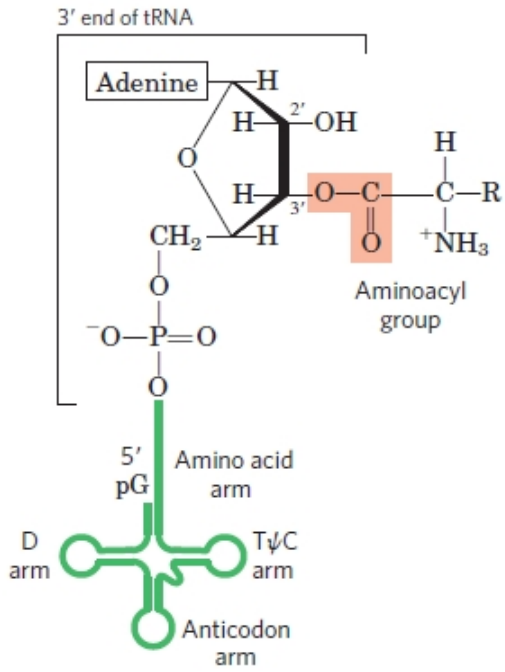
ويحدث التفاعل بخطوتين ضمن الموقع الفعّال للإنزيم :

1- في الخطوة الأولى يتكون المركب الوسطي المرتبط بالإنزيم وهو الأمينوأسيل أديننالیت Aminoacyl adenylate (أو يسمى Aminoacyl-AMP).

2- في الخطوة الثانية تنتقل مجموعة الأمينوأسيل من المركب الوسطي المرتبط بالإنزيم إلى tRNA المماثل أو المقابل له، الأستر الذي يربط بين الحامض الأميني و tRNA (الشكل 15-2) تكون له طاقة حرة سالبة عالية للتحلل المائي (بحدود ΔGo = -29 kj/mol).

البايروفوسفيت المتكون في تفاعل التنشيط يعاني من التحلل المائي إلى الفوسفات من خلال إنزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي Inorganic pyrophosphatase، أي أنه يتم استخدام اثنين من الأواصر الفوسفاتية عالية الطاقة لتنشيط كل جزيئة حامض أميني واحدة وكما في المعادلة :

$$\text{Amino acid} + \text{tRNA} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{aminoacyl-tRNA} + \text{AMP} + 2P_i$$
$$\Delta G'^{\circ} \approx -29 \text{ kJ/mol}$$



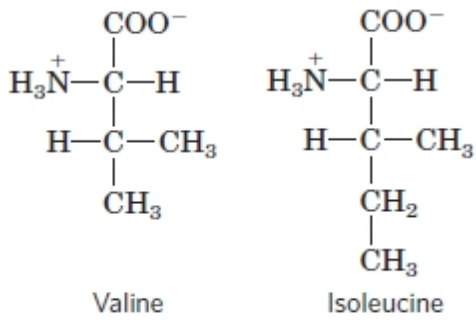
الشكل (15-2) الشكل العام لتركيب الأمينوأسيل tRNA.

عملية التدقيق بواسطة انزيم Aminoacyl-tRNA synthetase :

عملية Aminoacylation لجزيئة tRNA تؤدي غرضين: 1- تنشيط الحامض الأميني لغرض تكوين الآصرة الببتيدية. 2- ضمان الموقع الصحيح للحامض الأميني ضمن سلسلة متعددة الببتيد النامية. إن "هوية" الحامض الأميني المرتبط مع tRNA لا تفحص في الرايبوسوم لذلك فإن ارتباط الحامض الأميني الصحيح مع tRNA الخاص به (في السايتوسول) يعد أساسي لدقة تصنيع البروتين.

ومن معرفتنا السابقة بخصوصية التفاعلات الإنزيمية، فإن خصوصية الإنزيم تحدد بعدة عوامل منها الطاقة الناتجة من تفاعل الإنزيم-المادة الأساس (الصحيحة)، فمثلاً تم دراسة التمييز بين اثنين من الأحماض الأمينية وبالتفصيل وهما الفالين والأيزوليوسين وعلاقتهما مع الإنزيم Ile-tRNA synthetase والذي يميز بين الحامضين الأمينيين اللذان يختلفان فقط بوجود مجموعة مثيلين (CH_2) (الشكل 15-3). إذ يفضل انزيم Ile-tRNA

synthetase تنشيط الأيزوليوسين (كي يكون Ile-AMP) على تنشيط الفالين بـ 200 مرة، لأن وجود مجموعة المثيل تحفز ارتباط المادة الأساس، فضلاً عن ذلك فإن انزيم التصنيع Ile-tRNA synthetase يمتلك كفاءة تدقيق تزيد من عملية التفضيل 10 أضعاف، لذلك فإن الفالين يمكن أن يتواجد مكان الأيزوليوسين في البروتين أقل من 1 لكل 3000.



الشكل (3-15) التركيب الكيميائي للفالين والايزوليوسين

إذا الخط الأول لضمان ارتباط الحامض الأميني الصحيح مع tRNA الخاص به هو ارتباط الحامض الأميني مع الإنزيم الخاص به وتنشيط الحامض الأميني لتكوين Aminoacyl-AMP.

أما الخط الثاني فإن ارتباط نواتج Aminoacyl-AMP الخطأ في الموقع الفعال الثاني على الإنزيم يؤدي إلى تحلل هذه المادة الأساس التي ارتبطت مع الموقع الفعال الثاني للإنزيم. وبالعودة إلى مثالنا السابق فإن مجموعة R للفالين أصغر قليلاً من مجموعة R للأيزوليوسين لذلك فإن معقد Val-AMP يكون مناسب تماماً للارتباط مع الموقع الفعال الثاني المتخصص بالتحليل (موقع التدقيق) ضمن إنزيم التصنيع Ile-tRNA synthetase، بينما لا يرتبط في هذا الموقع الفعال الثاني معقد Ile-AMP لذلك فإن معقد Val-AMP يتحلل مائياً إلى فالين و AMP ضمن موقع التحلل (التدقيق)، وبالنهاية فإن tRNA المرتبط مع إنزيم التصنيع Synthetase لا يعاني أمينوأستلة للحامض الأميني الخاطئ.

والخط الثالث لضمان دقة العملية تتمثل في أن معظم إنزيمات التصنيع Aminacyl-tRNA synthetase بإمكانها تحليل أصرة الأستر بين الحامض الأميني و tRNA في معقد

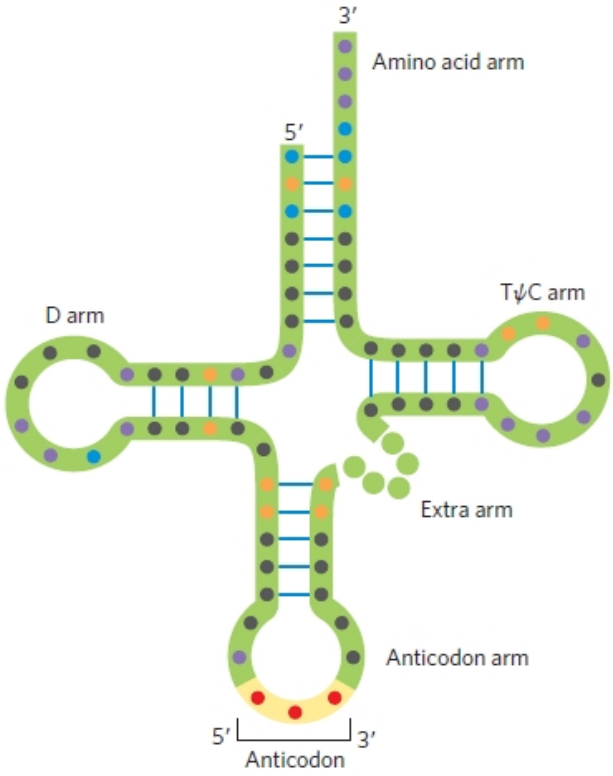
Aminacyl-tRNA، هذا التحليل يسرع بشكل كبير لـ tRNA غير المشحونة بشكل صحيح.

إن المعدل العام للخطأ في تصنيع البروتين هو تقريباً خطأ واحد لكل 10000 حامض أميني وهذا المعدل أقل بكثير من معدل الخطأ خلال تضاعف DNA، والسبب أن الخطأ في البروتين يمكن علاجه بتحطيم البروتين، كما أن الخطأ لا يورث للخلايا والأجيال التالية (كما هو الحال مع DNA)، عليه فإن الخطأ في تصنيع البروتين يعد أقل أهمية من الناحية البايولوجية من الخطأ عند تضاعف DNA. درجة الدقة في تصنيع البروتين تكون كافية لضمان أن معظم البروتينات المصنعة خالية من الأخطاء، وإن الطاقة الكبيرة التي تستهلك في تصنيع البروتين لا يتم هدرها، وأن جزيئة بروتين واحدة تملك خطأ (أو أخطاء) في تركيبها تعد غير مهمة بوجود نسخ كثيرة من البروتين نفسه.

الشفرة الوراثية الثانية :

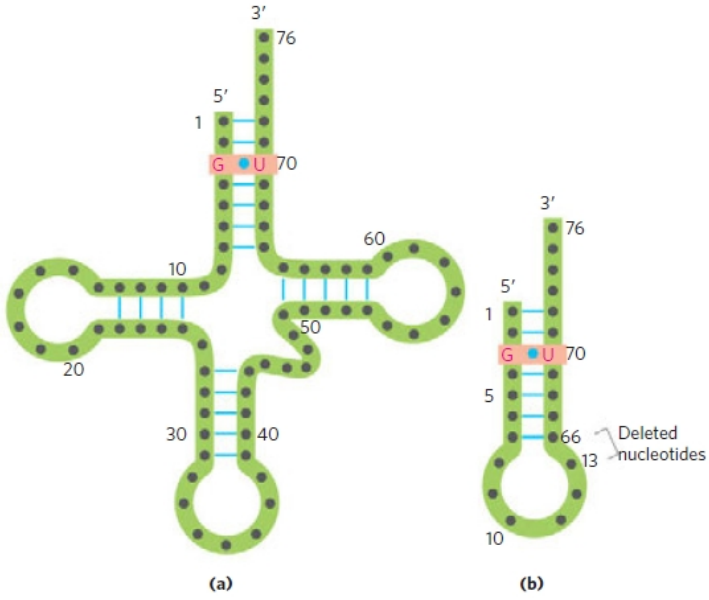
إن انزيم التصنيع Aminoacyl-tRNA synthetase يجب أن تكون له خصوصية ليس فقط لحامض أميني واحد ولكن لـ tRNAs أيضاً، والتمييز بين أنواع tRNAs تعد ضرورية لدقة تصنيع البروتين حالها في ذلك حال التمييز بين الأحماض الأمينية. ويدعى التفاعل بين انزيمات التصنيع Aminoacyl-tRNA synthetases و tRNAs بالشفرة الوراثية الثانية Second genetic code للإشارة إلى أهميتها في دقة تصنيع البروتين، مع ملاحظة أن قواعد التشفير هنا تختلف عن الشفرة الوراثية. و(الشكل 15-4) يوضح النيوكليوتيدات ضمن tRNAs والتي يتم التعرف عليها من قبل إنزيم التصنيع Aminoacyl-tRNA synthetase، بعض هذه النيوكليوتيدات مشتركة بين أنواع tRNAs لذلك لا تستعمل في التمييز.

ومن دراسة تغييرات النيوكليوتيدات ضمن تركيب tRNA والتي تؤدي إلى تغيير خصوصية المادة الأساس تمكن العلماء من التعرف على مواقع هذه النيوكليوتيدات التي تدخل في عملية التمييز من قبل إنزيم التصنيع Aminoacyl-tRNA synthetase، وتتركز هذه النيوكليوتيدات في ذراع الحامض الأميني وذراع مضاد الشفرة (وبضمنها نيوكليوتيدات مضاد الشفرة نفسها) فضلاً عن مواقع أخرى أقل أهمية (الشكل 15-4)، ويعتقد أن 10 أو أكثر من النيوكليوتيدات ربما تدخل في عملية تمييز tRNA من قبل إنزيم التصنيع Aminoacyl-tRNA synthetase



الشكل (4-15) مواقع النيوكليوتيدات ضمن جزيئة tRNA، بعض المواقع (النقاط البنفسجية) هي نفسها في كل أنواع tRNA لذلك ليس هناك حاجة للتمييز بينها، مواقع أخرى تمتلك قدرة تعرف على واحدة (النقاط البرتقالية) أو أكثر (النقاط الزرقاء) من إنزيم Aminoacyl-tRNA synthetases

الخاص به. أحياناً العملية تكون أسهل بكثير فمثلاً المحدد للتعرف على tRNA من قبل إنزيم التصنيع Ala-tRNA synthetase هو قاعدة مزدوجة واحدة (G=C) في ذراع الحامض الأميني لـ tRNAAla (الشكل 15-a5) وينطبق هذا الكلام على الكائنات من البكتريا إلى الإنسان، لذلك فإن RNA المصنع في المختبر يتكون من 7 قواعد مزدوجة ومرتب بشكل دبوس الشعر (الشكل 15-b5) ويمكن أن يحصل له أمينوأستلة من قبل إنزيم التصنيع Ala-tRNA synthetase طالما كانت محتوية على القاعدة المزدوجة (G=C). مما سبق يتضح أن تفاعل إنزيمات التصنيع Aminoacyl-tRNA synthetases و tRNAs الخاصة بها تعد مهمة جداً لقراءة دقيقة للشفرة الوراثية.

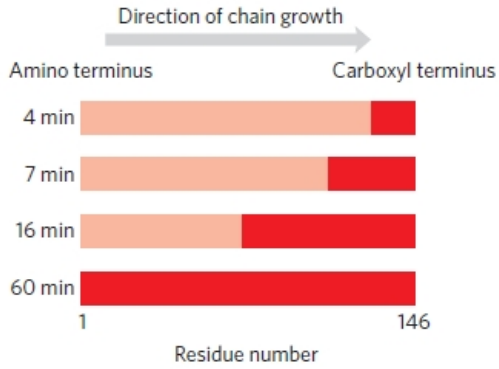


الشكل (5-15) العناصر التركيبية لـ tRNAAla التي تعد ضرورة كي يتم التعرف عليها من قبل انزيم Ala-tRNA synthetase

2- مرحلة البدء:

جزيئة mRNA التي تحمل الشفرة الوراثية لتصنيع متعدد الببتيد ترتبط مع الجزء الصغير من الرايبوسوم ومع Aminoacyl-tRNA، بعدها يرتبط الجزء الكبير من الرايبوسوم بالمعقد مكوناً معقد البدء Initiation complex. ويزدوج Aminoacyl-tRNA أولاً مع شفرة AUG على mRNA مما يعطي إشارة بدء تصنيع متعدد الببتيد، وتحتاج مرحلة البدء إلى طاقة على شكل GTP وعوامل بدء Initiation factors (IFs).

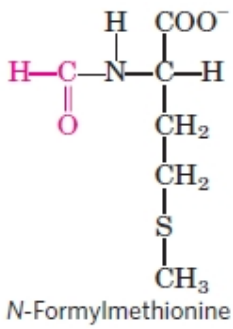
يبدأ تصنيع متعدد الببتيد من النهاية الأمينية ويتقدم بشكل خطوات هي عملية إضافة أحماض أمينية إلى النهاية الكاربوكسيلية، وقد أقترح العالم Howard Dintzis هذه الآلية (الشكل 15-6).



الشكل (15-6) البرهنة على أن متعدد الببتيد يستطيل باضافة الاحماض الأمينية إلى النهاية الكاربوكسيلية (تجربة Dintzis).

شفرة البدء AUG تكون متخصصة لوضع الحامض الأميني المثيونين في النهاية الأمينية لمتعدد الببتيد المراد تصنيعه. وبالرغم من أن المثيونين له شفرة واحدة فقط (AUG) إلا أن كل الكائنات الحية لها اثنين من tRNA للمثيونين، واحدة تستعمل بشكل حصري عندما يكون AUG شفرة بدء لتصنيع متعدد الببتيد، بينما تستعمل الأخرى عندما يكون AUG في مواقع داخلية ضمن متعدد الببتيد، لذلك تعد عملية التمييز بين نوعي tRNA ضرورية.

أما في البكتريا فيتم التمييز بالشكل التالي: الحامض الأميني الذي يقابل AUG يكون من نوع N-formylmethionine (fMet) ويصل إلى الرايبوسوم عن طريق tRNA متخصص له هو N-formylmethionine-tRNAfMet (fMet- tRNAfMet) (الشكل 15-7).



الشكل (15-7) التركيب الكيميائي لـ N-formylmethionine.

والذي يتكون بخطوتين متتاليتين، أولاً ينجذب المثيونين إلى tRNAfMet بواسطة إنزيم التصنيع Met-tRNA synthetase (في بكتريا الإيشريشيا القولونية يعمل الإنزيم على أمينوأستلة كل من tRNAfMet و tRNAMet) وكما في المعادلة :

$$\text{Methionine} + \text{tRNAf}^{\text{Met}} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Met-tRNA}^{\text{fMet}} + \text{AMP} + \text{PP}_\text{i}$$

في الخطوة الثانية يقوم انزيم ناقل الفورميل Transformylase بنقل مجموعة فورميل من N10-formyltetrahydrofolate إلى مجموعة الأمين للحامض الأميني المثيونين كما في المعادلة:

$$N^{10}\text{-Formyltetrahydrofolate} + \text{Met-tRNA}^{\text{fMet}} \longrightarrow \text{tetrahydrofolate} + \text{fMet-tRNA}^{\text{fMet}}$$

ويلاحظ أن انزيم ناقل الفورميل يكون أكثر خصوصية من انزيم التصنيع Met-tRNA synthetase، إذ يكون متخصص للمثيونين المرتبط مع tRNAfMet ويعمل على إعادة ترتيب الشكل التركيبي الفريد لـ tRNA، بينما يقوم Met- tRNAMet بإدخال المثيونين في مواقع داخلية ضمن سلسلة متعدد الببتيد.

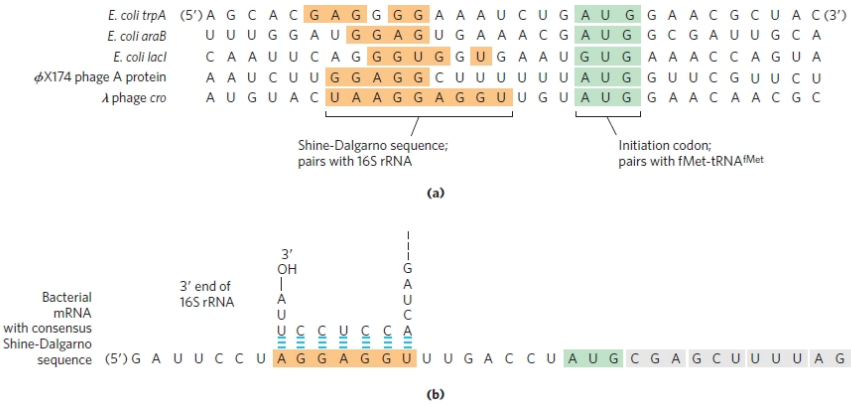
والمثير أن إضافة مجموعة N-formyl إلى مجموعة الأمين للحامض الأميني المثيونين من قبل إنزيم ناقل الفورميل يمنع fMet من الدخول في مواقع داخلية ضمن سلسلة متعدد الببتيد بينما يسمح بارتباط fMet- tRNAfMet في الموقع الرايبوسومي المتخصص للبدء، وهذا الموقع لا يستقبل Met- tRNAMet أو أي نوع من Aminoacyl-tRNA.

في الخلايا حقيقية النواة الأمر يبدو مختلفاً، فكل متعدد الببتيدات التي تصنع في رايبوسومات السايتوبلازم تبدأ بالحامض الأميني المثيونين (وليس fMet) ولكن الخلية تستعمل أيضاً tRNA لبدء متخصص يختلف عن tRNAMet الذي يصنع المثيونين في مواقع داخلية ضمن سلسلة متعدد الببتيد حسب شفرة AUG، بينما متعدد الببتيد المصنع من قبل المايتوكوندريا والبلاستيدات الخضر تشبه البكتريا في استعمال N-formylmethionine.

الخطوات الثلاث لعملية البدء :

مرحلة البدء حالها حال باقي خطوات تصنيع متعدد الببتيد تحتاج إلى مكونات (الجدول 15-1) ويمكن تقسيم مرحلة البدء إلى :

الخطوة الأولى: ترتبط وحدة الرايبوسوم الصغيرة 30S مع اثنين من عوامل البدء هما IF-1 و IF-3، العامل IF-3 يمنع الارتباط المبكر وغير الناضج لوحدتي الرايبوسوم الصغيرة والكبيرة، ويرتبط mRNA مع الوحدة الصغيرة 30S ويتم إرشاد شفرة البدء AUG إلى موقعها الصحيح من خلال تسلسلات شاين-دالكارنو (سميت بهذا الاسم نسبة إلى مكتشف هذه التسلسلات كل من الباحثين John Shine و Lynn Dalgarno) إن تسلسلات الإجماع هذه تعمل كإشارة بدء وهي مكونة من 4-9 نيوكليوتيدات (بيورينات) وتكوّن 8-13 زوج من القواعد في الاتجاه 5' من شفرة البدء (الشكل 15-a8)،



الشكل (15-8) تسلسلات جزيئة mRNA التي تعمل كاشارة للبدء بتصنيع البروتين في البكتريا

هذه التسلسلات تزدوج مع تسلسلات متممة غنية بالبايريمدين قرب النهاية 3' لجزيئة 16S rRNA الذي هو جزء من وحدة الرايبوسوم الصغيرة 30S (الشكل 15-b8)، هذا الإزدواج (rRNA-mRNA) يوجه تموضع شفرة AUG لجزيئة mRNA في الموقع المضبوط على وحدة الرايبوسوم الصغيرة 30S.

الرايبوسومات في البكتريا تملك 3 مواقع متخصصة للارتباط مع tRNA هي:

1- موقع (A) الأمينوأسيل (Aminoacyl (A) site).

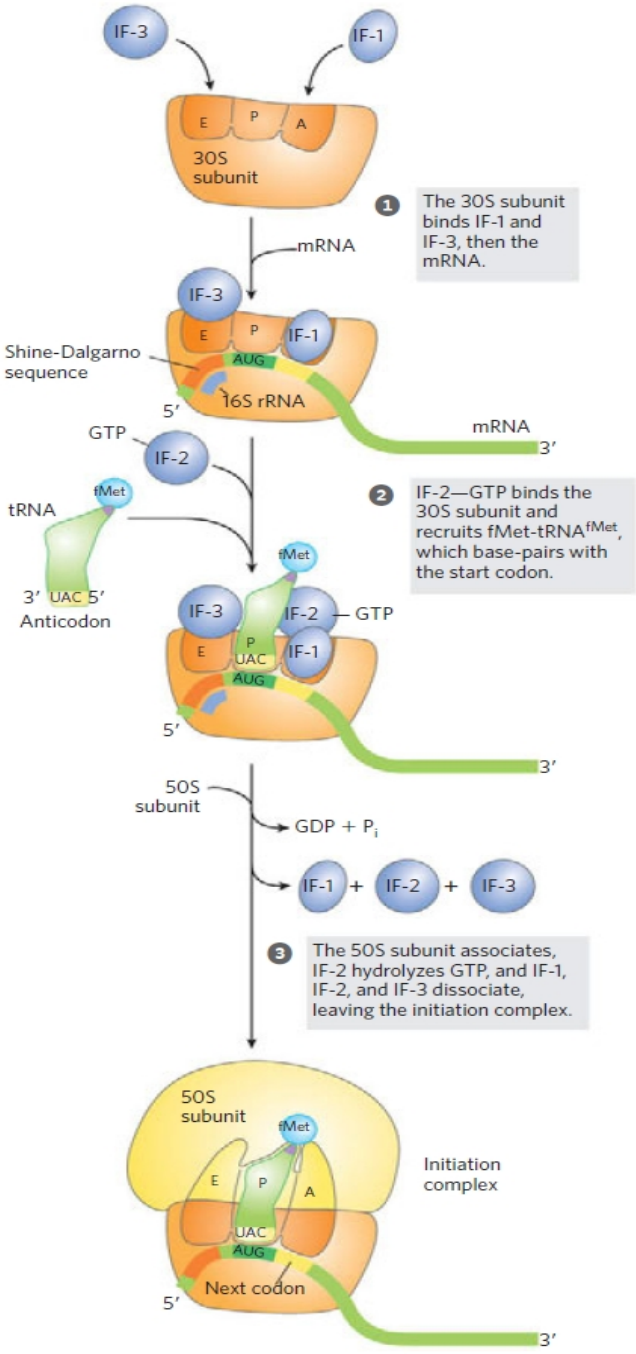
2- موقع (P) الببتيديل (Peptidyl (P) site).

3- موقع (E) الخروج (Exit (E) site).

الموقعان A و P يأخذان معظم خصائصهما من جزئي الرايبوسوم (الكبير 50S والصغير 30S) بينما يساهم الموقع الكبير لوحده في خصائص الموقع E، كما أن الموقعان A و P يرتبطان مع Aminoacyl-tRNAs بينما الموقع E يرتبط فقط مع tRNAs غير المشحونة. وتتموضع شفرة البدء AUG في الموقع P وهو الموقع الوحيد الذي يمكن أن يرتبط به fMet- tRNAfMet (الشكل 15-9)، كما يعد fMet- tRNAfMet هو Aminoacyl-tRNA الوحيد الذي يرتبط أولاً مع الموقع P، أما في المرحلة التالية (الاستطالة) فإن جميع Aminoacyl-tRNAs (وبضمنها Met- tRNAMet التي ترتبط مع المثيونين الذي يدخل ضمن التسلسلات الداخلية لمتعدد الببتيد) ترتبط أولاً مع الموقع A ومن ثم مع الموقع P ثم الموقع E. ويمثل الموقع E الموقع الذي من خلاله تغادر tRNA "غير المشحونة" (التي لا تحمل حامض أميني) خلال مرحلة الاستطالة.

الخطوة الثانية: الخطوة الثانية من مرحلة البدء (15-9) إذ أصبح معقد البدء يتكون من وحدة الرايبوسوم الصغير 30S، عامل البدء IF-3، وجزيئة mRNA المرتبطة مع IF-2 (المرتبط بدوره بـ GTP) و fMet- tRNAfMet في هذه اللحظة فإن مضاد الشفرة لهذا tRNA يزدوج بشكل صحيح مع شفرة البدء على mRNA.

الخطوة الثالثة: المعقد الكبير (في الخطوة الثانية) يرتبط الآن مع الوحدة الكبيرة 50S للرايبوسوم ويرافق ذلك تحلل GTP (المرتبط بـ IF-2) إلى GDP و Pi والتي تتحرر من المعقد، وفي هذه اللحظة جميع عوامل البدء تتفكك عن الرايبوسوم، ارتباط وحدتي الرايبوسوم (الكبيرة 50S والصغيرة 30S) يكون الرايبوسوم الفعال 70S ويسمى عندها بمعقد البدء Initiation complex ويحوي أيضاً mRNA و fMet- tRNAfMet. إن ضمان الارتباط الصحيح لـ fMet- tRNAfMet مع الموقع P في معقد البدء 70S يتم من خلال ثلاث آليات على الأقل للتعرف والارتباط هي :



الشكل (9-15) تكوين معقد البدء في البكتريا (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012)

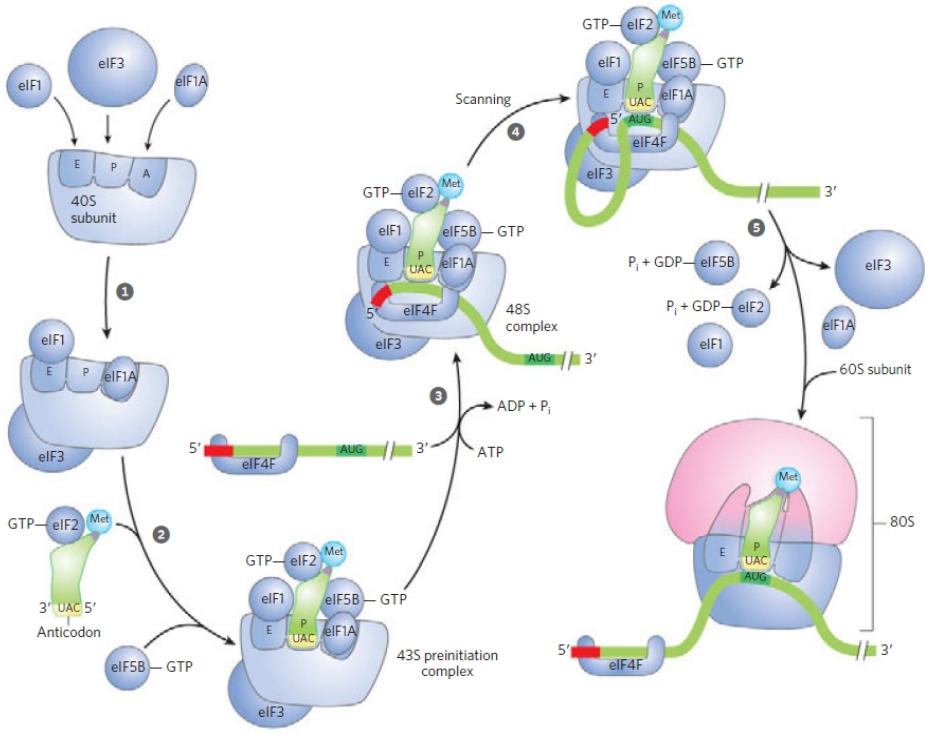
1- تفاعل الشفرة ومضاد الشفرة وبضمنها تثبيت شفرة البدء AUG على الموقع P.

2- التفاعل بين تسلسلات شاين–دالكارنو في mRNA مع 16S rRNA.

3- تفاعل الارتباط بين الموقع P الرايبوسومي و fMet- tRNAfMet ، وفي هذه النقطة يكون معقد البدء جاهزاً للاستطالة.

البدء في الخلايا حقيقية النواة :

عملية الترجمة بشكل عام تكون متشابهة بين البكتريا والخلايا حقيقية النواة، مع وجود بعض الاختلافات، في عدد ونوعية مكونات مراحله وبعض تفاصيل آلية الترجمة. والشكل (10-15) يوضح عملية البدء بشكل عام في الخلايا حقيقية النواة، ويمكن تقسيم العملية إلى الخطوات التالية :

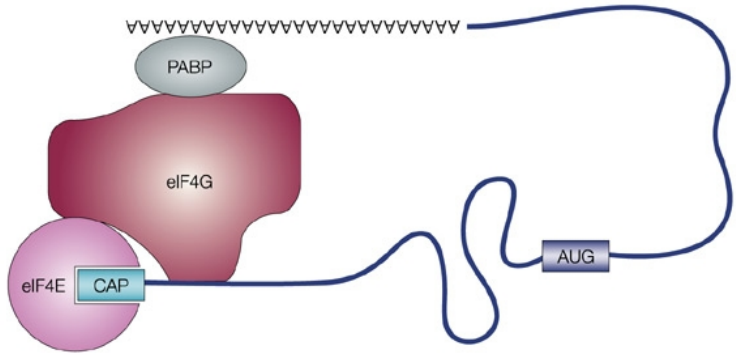


الشكل (10-15) البدء بتصنيع البروتين في الخلايا حقيقية النواة (مأخوذ من Nelson and Cox, 2012).

الخطوة الأولى: يرتبط أولاً mRNA مع الرايبوسوم بوجود عدد من البروتينات المتخصصة، إذ تملك الخلايا حقيقية النواة أكثر من 12 عامل بدء، ويعد العاملان eIF1A و eIF3 مماثلين للعاملين IF-1 و IF-3 في البكتريا. وفي هذه الخطوة يرتبط العاملان eIF1A و eIF3 مع وحدة الرايبوسوم 40S. ويمنع ذلك من ارتباط tRNA مع الموقع A كما تمنع الارتباط المبكر وغير الناضج لوحدتي الرايبوسوم مع بعضهما، يرتبط العامل eIF1 مع الموقع E، أما tRNA البدء المشحونة فيرتبط معها عامل البدء eIF2 (المرتبط مع GTP).

الخطوة الثانية: المعقد السابق يرتبط مع الوحدة الصغيرة للرايبوسوم (40S)، مكوناً معقد ما قبل البدء (43S)، ويرتبط mRNA مع معقد eIF4F.

الخطوة الثالثة: في هذه الخطوة فإن معقد eIF4F يتكون من eIF4F (المرتبط مع القبعة cap 5') و eIF4A (له فعالية ATPase و RNA helicase) وبروتين eIF4G (وهو بروتين رابط) الذي يرتبط مع eIF3 و eIF4E، موفراً بذلك أول ارتباط بين معقد ما قبل البدء 43S وجزيئة mRNA. كما يرتبط eIF4G مع البروتينات المرتبطة مع ذيل متعدد (A) (Poly(A) binding protein (PABP)) في النهاية 3' من جزيئة mRNA وبذلك تحول جزيئة mRNA إلى شكل حلقي (الشكل 15-11) ويسهل من تنظيم التعبير الجيني بالاستنساخ.



الشكل (15-11) تكوين mRNA حلقي في معقد البدء في الخلايا حقيقية النواة.

ارتباط جزيئة mRNA وما يرافقه من عوامل يكون المعقد 48S، ويقوم المعقد الأخير

بفحص جزيئة mRNA بدءاً من القبعة 5' cap لحين الوصول إلى شفرة البدء AUG.

الخطوة الرابعة: عملية الفحص يمكن أن تسهل فعالية إنزيم RNA helicase الذي يملكه eIF4A وعوامل مرتبطة أخرى.

الخطوة الخامسة: عند العثور على شفرة البدء AUG فإن وحدة الرايبوسوم الكبيرة 60S ترتبط مع المعقد 48S ويرافق ذلك تحرر العديد من عوامل البدء، وتحتاج العملية فعالية كل من eIF5 و eIF5B، ويقوم بروتين eIF5 بتشجيع فعالية GTPase الذي يملكه العامل eIF2 منتجاً معقد GDP-eIF2 مع تقليل الانجذاب إلى tRNA البادئة. ويقوم العامل eIF5B بتحليل GTP المرتبط معه ويحفز تفكك معقد GDP-eIF2 وعوامل البدء الأخرى، ويكون كل ذلك مباشرة بعد ارتباط وحدة الرايبوسوم الكبيرة 60S. وهذا يسهل في إتمام تكوين معقد البدء.

أهم عوامل البدء مع وظيفة كل عامل في البكتريا والخلايا حقيقية النواة موضحة في (الجدول 15-2).

3- مرحلة الاستطالة:

المرحلة الثالثة من مراحل تصنيع متعدد الببتيد هي مرحلة الاستطالة Elongation، وتحتاج عملية الاستطالة في البكتريا إلى كل من :

1- معقد البدء الذي تم وصفه سابقاً.
2- Aminoacyl-tRNA.
3- عومال الاستطالة Elongation factors (EF) (في البكتريا هي EF-Tu و EF-Ts و EF-G).
4- GTP.

الجدول (15-2) العوامل البروتينية الضرورية لبدء تصنع البروتين في البكتريا والخلايا حقيقية النواة

العامل	الوظيفة
	في البكتريا
IF-1	تمنع الارتباط غير الناضج لـ tRNA مع الموقع A
IF-2	تسهل من ارتباط معقد fMet-tRNAfMet مع الوحدة الصغيرة 30S للرايبوسوم
IF-3	ترتبط مع الوحدة الصغيرة 30S للرايبوسوم، تمنع الارتباط غير الناضج للوحدة الكبيرة 50S للرليبوسوم، تحسن من خصوصية الموقع P لمعقد fMet-tRNAfMet
	في الخلايا حقيقية النواة
elF1	ترتبط مع الموقع E من الوحدة الصغيرة 40S للرايبوسوم، تسهل التفاعل بين معقد elF2-tRNA-GTP والوحدة الصغيرة 40S للرايبوسوم
elF1A	يماثل عامل IF-1 للبكتريا، تمنع الارتباط غير الناضج لجزيئة tRNA مع الموقع A
elF2	تملك فعالية GTPase، تسهل من ارتباط Met-tRNAMet الوحدة الصغيرة 40S للرايبوسوم
elF2B و elF3	أول عامل يرتبط مع الوحدة الصغيرة 40S للرايبوسوم، ويسهل باقي الخطوات
elF4	معقد يحوي elF4A و elF4E و elF4G
elF4A	له فعالية انزيم RNA helicase، يزيل التركيب الثانوي لـ mRNA للسماح له بالارتباط بوحدة الرايبوسوم الصغيرة 40S، كما أنها جزء من معقد eIF4F
elF4B	ترتبط مع mRNA، تسهل من فحص mRNA لايجاد موقع الشفرة الأولى AUG
elF4E	ترتبط مع القبعة '5 لـ mRNA، كما أنها جزء من معقد eIF4F

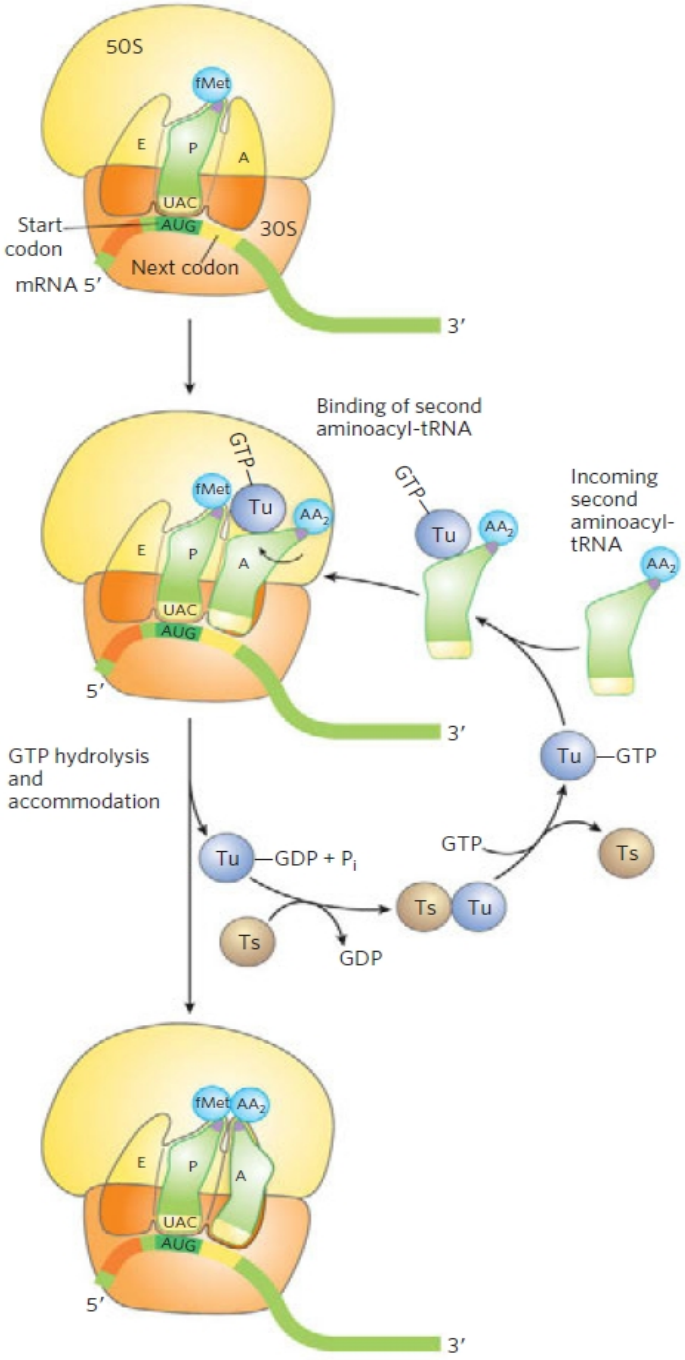
العامل	الوظيفة
elF4G	ترتبط مع eIF4E ومع البروتين المرتبط مع متعدد (A) (PABP)، كما أنها جزء من معقد eIF4F
elF5	تسهل من تفكك العديد من عوامل البدء من وحدة الرايبوسوم الصغيرة 40S كمقدمة للارتباط مع الوحدة 60S لتكوين 80S معقد البدء
elF5b	مماثل GTPase لعامل IF-2 للبكتريا، تشجع تفكك عوامل البدء قبل التجمع النهائي للرايبوسوم.

ويمكن تقسيم عملية الاستطالة إلى ثلاث خطوات هي:

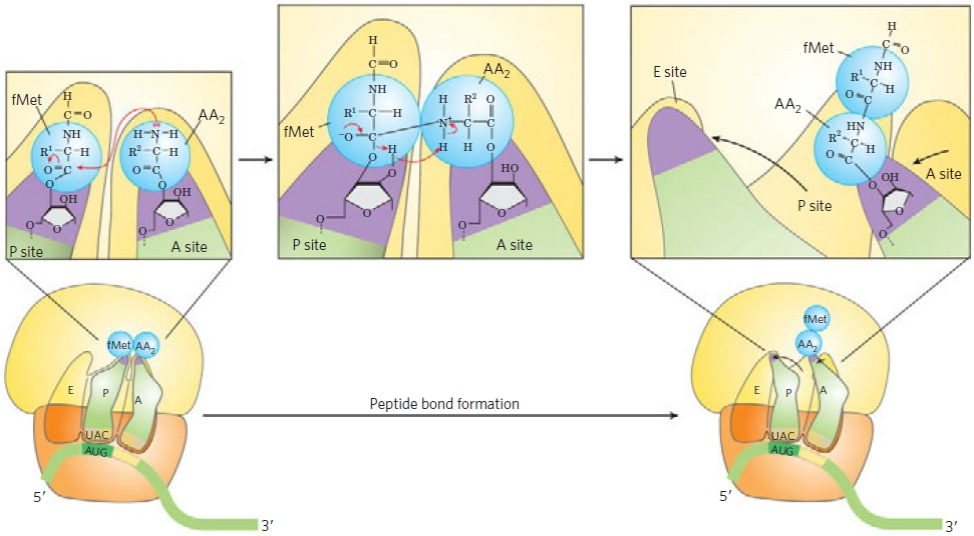
الخطوة الأولى: خطوة ارتباط Aminoacyl-tRNA (الشكل 15-12)، وفي هذه الخطوة يرتبط Aminoacyl-tRNA مع معقد EF-Tu (المرتبط بدوره مع GTP)، هذا المعقد (Aminoacyl-tRNA و EF-Tu و GTP) يرتبط مع معقد البدء 70S، ثم يتحلل GTP ويتحرر معقد EF-Tu-GTP من وحدة الرايبوسوم 70S، ويتم إعادة تكوين معقد EF-Tu-GTP بعملية تتضمن استعمال EF-Ts و GTP.

الخطوة الثانية: خطوة تكون الآصرة الببتيدية (الشكل 15-13)، في هذه الخطوة تتكون الآصرة الببتيدية Peptide bond بين حامضين أمينيين، كل منهما مرتبط مع tRNA الخاص به والمرتبطان على الموقعين A و P على الرايبوسوم،

وتتكون الآصرة بانتقال مجموعة N-formylmethionyl من tRNA الخاصة بها إلى مجموعة الأمين للحامض الأميني الثاني (الذي هو الآن في الموقع A). إن مجموعة ألفا أمينو α-amino للحامض الأميني في الموقع A يعمل كنيوكليوفيل Nucleophile مغيراً موقع tRNA قي الموقع P ومكوناً الآصرة الببتيدية. هذا التفاعل يؤدي إلى تكوين ثنائي الببتيديل-tRNA (Dipeptidyl-tRNA) في الموقع A، ويبقى tRNAfMet "غير المشحون" مرتبطاً مع الموقع P، عندها فإن tRNA يتحول إلى موقع الارتباط الهجين Hybride binding site (لها مكونات كلا الموقعين A و P) (الشكل 15-13). الفعالية الإنزيمية لتكوين الآصرة الببتيدية يشار فيها إلى إنزيم ناقل الببتيديل Peptidyl transferase، أما حديثاً فقد أثبت العلماء دور الرايبوزايم، إذ يقوم 23S rRNA بالفعالية الإنزيمية لتكوين الآصرة الببتيدية.



الشكل (12-15) الخطوة الأولى في مرحلة الاستطالة في تصنيع متعدد الببتيد في البكتريا



الشكل (13-15) الخطوة الثانية في مرحلة الاستطالة في تصنيع متعدد الببتيد في البكتريا

الخطوة الثالثة: خطوة تغيير الموقع، في الخطوة الأخيرة لعملية الاستطالة والتي تدعى بتغيير الموقع Translocation يتحرك الرايبوسوم على الشفرة الوراثية باتجاه النهاية '3 من mRNA (الشكل 15-14) هذا التحرك لمضاد الشفرة لـ tRNA ثنائي الببتيديل الذي لا زال مرتبط مع الشفرة الوراثية الثانية لـ mRNA يحرك مضاد الشفرة من الموقع A إلى الموقع P، ويحرك Diacylated-tRNA من الموقع P إلى الموقع E ومنها يتحرر tRNA إلى السايتوسول. الشفرة الثالثة لـ mRNA الآن أصبحت على الموقع A والشفرة الثانية على الموقع P. حركة الرايبوسوم على mRNA يرافقه تغيرات في الشكل ثلاثي الأبعاد للرايبوسوم كي تسهل عملية الحركة. بعد تغير الموقع فإن الرايبوسوم (ومرتبط معه ثنائي ببتيديل tRNA و mRNA) تكون جاهزة لدورة استطالة تالية والارتباط مع حامض أميني ثالث. وتكون العملية مماثلة تماماً لإضافة الحامض الأميني الثاني (الأشكال 15-12 و 15-13 و 15-14).

إضافة كل حامض أميني إلى سلسلة متعدد الببتيد النامية تحتاج اثنين من GTPs كلما سار معقد الرايبوسوم وما يرافقه من عوامل على طول mRNA وباتجاه النهاية '3، ويبقى متعدد الببتيد مرتبط مع tRNA من خلال أحدث حامض اميني تتم إضافته، وحدة الأستر

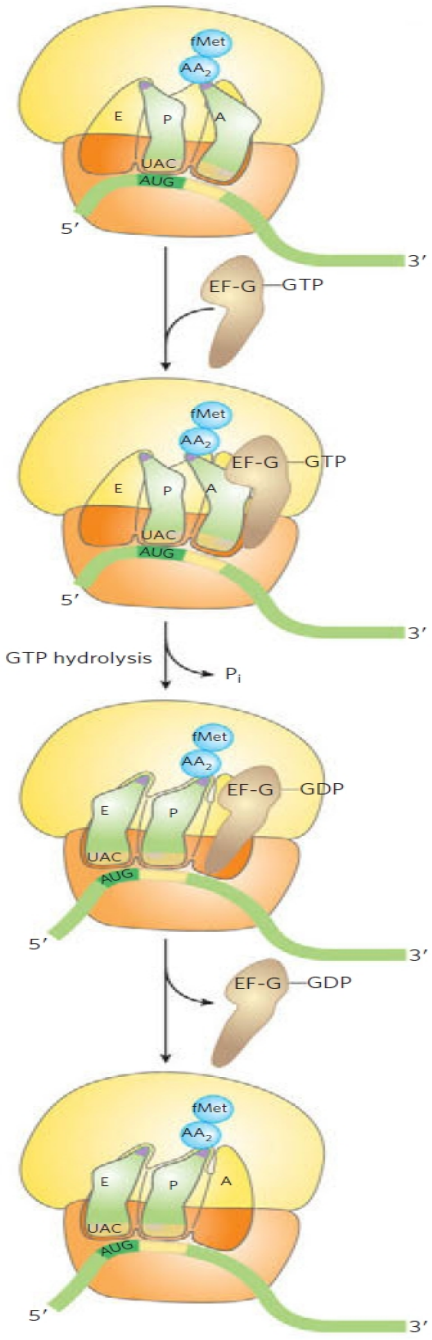
بين tRNA والنهاية الكاربوكسيلية للحامض الأميني حديث الإدخال لسلسلة متعدد الببتيد (الشكل 15-14). عندما يتم تكسير آصرة أستر بين متعدد الببتيد و tRNA، تبقى الآصرة بين متعدد الببتيد و mRNA، الآن كل حامض أميني يضاف حديثاً يكون لازال مرتبط مع tRNA.

إن عملية الاستطالة في الخلايا حقيقية النواة تكون مشابهة تماماً لما تم شرحه أعلاه في البكتريا، مع ملاحظة أن عوامل الاستطالة الثلاث في الخلايا حقيقية النواة هي eEF1α و eEF1βγ و eEF2، وتكون مماثلة وظيفياً لعوامل الاستطالة في البكتريا (EF-Tu و EF-Ts و EF-G على التوالي)، ويلاحظ أن الرايبوسوم في الخلايا حقيقية النواة لا تملك الموقع E، إذ أن tRNA غير المشحونة تترك الرايبوسوم مباشرة من الموقع P.

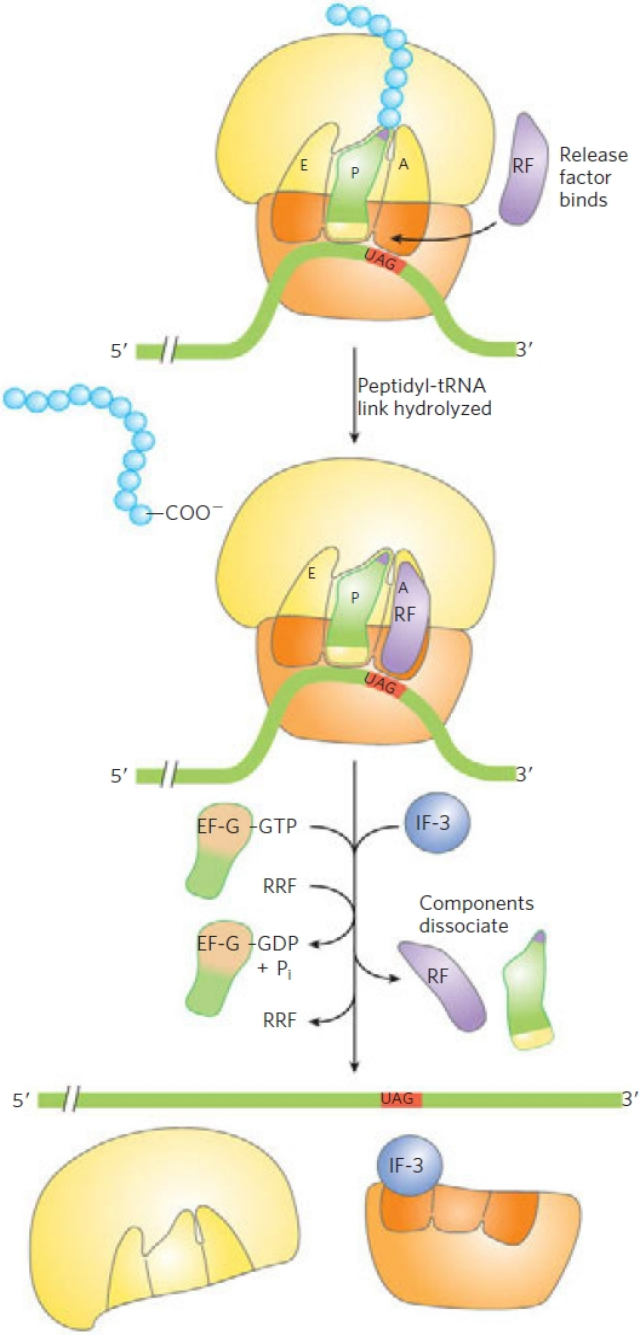
4- مرحلة الانتهاء:

وتستمر مرحلة الاستطالة إلا أن يضيف الرايبوسوم آخر حامض أميني له شفرة على mRNA، عندها تبدأ مرحلة الانتهاء Termination وهي المرحلة الرابعة في التصنيع الحيوي للبروتين، وتبدأ هذه المرحلة بإشارة من أحد شفرات الانتهاء الثلاث (UAA أو UAG أو UGA) والتي تلي شفرة أخر حامض أميني. في البكتريا عندما تصل شفرة الانتهاء إلى الموقع A على الرايبوسوم تقوم عوامل الانتهاء أو التحرر Termination or releasing factors (وهي ثلاث بروتينات RF1 و RF2 و RF3) بعدة مهام :

1- التحلل المائي للآصرة الأخيرة Peptidyl(-tRNA).
2- تحرر سلسلة متعدد الببتيد وأخر tRNA (غير المشحونة) من الموقع P للرايبوسوم.
3- تفكك الرايبوسوم 70S إلى وحدتيه الصغيرة 30S والكبيرة 50S وبذلك يكونان جاهزين للبدء بسلسلة تصنيع متعدد ببتيد جديدة (الشكل 15-15).



الشكل (14-15) الخطوة الثانية في مرحلة الاستطالة في تصنيع متعدد الببتيد في البكتريا



الشكل (15-15) مرحلة الانتهاء في تصنيع متعدد الببتيد في البكتريا

يقوم عامل التحرر RF1 بالتعرف على شفرتي الانتهاء UAG و UAA بينما يكون العامل RF2 متخصص بالشفرتين UGA و UAA، أما الفعالية المتخصصة للعامل RF3 فلازالت مبهمة ويعتقد أنها تساهم في تحرر وحدات الرايبوسوم، بينما في الخلايا حقيقية النواة فإن عامل تحرير واحد (eRF) يتعرف على شفرات الانتهاء الثلاث.

يرتبط عامل التحرر (RF1 أو RF2 اعتماداً على شفرة الانتهاء) مع شفرة الانتهاء ويقوم بتحفيز إنزيم ناقل الببتيديل Peptidyl transferase لنقل متعدد الببتيد النامي إلى جزيئة ماء بدلاً من حامض أميني آخر، ويعتقد أن لعوامل التحرر أجزاء تشبه في تركيبها تركيب tRNA. إن إعادة تدوير الرايبوسوم يؤدي إلى تفكك مكونات عملية تصنيع البروتين، عوامل التحرر تنفصل عن معقد ما بعد الانتهاء وتستبدل بـ EF-G وبروتين يسمى عامل إعادة تدوير الرايبوسوم (Ribosome recycling factor (RRF)) وزنه الجزيئي 20300 ، كما أن تحلل GTP بواسطة EF-G يؤدي إلى تفكك وحدة الرايبوسوم الكبيرة 50S من معقد 30S-tRNA-mRNA ويستبدل EF-G و RRF بعامل البدء IF-3 الذي يشجع تحرر tRNA بعدها يتحرر mRNA، عندها يكون عامل البدء IF-3 ووحدة الرايبوسوم الصغيرة 30S حرة وجاهزة للدخول في دور تصنيع بروتين ثانية (الشكل 15-9).

الطاقة المستهلكة في تصنيع وتدقيق متعدد البروتين :

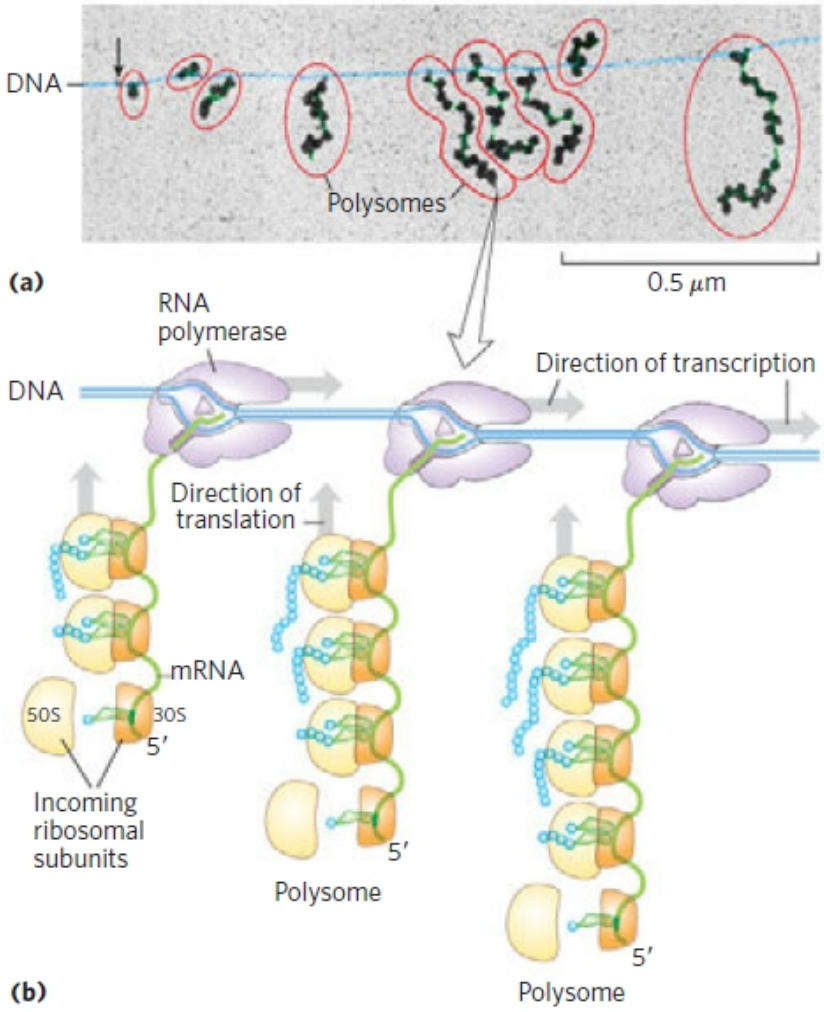
لكون عملية تصنيع البروتين عملية بناء لذلك تحتاج طاقة، وتزداد الحاجة إلى طاقة أكثر لدقة التصنيع وعملية التدقيق، إن تكون كل Aminoacyl-tRNA تحتاج إلى مجموعتي فوسفات عالية الطاقة، كما أن جزيئة ATP واحدة تستهلك عند تحلل ارتباط حامض أميني خاطئ، بفعالية إزالة الأستلة من قبل إنزيم التصنيع Aminacyl-tRNA synthetase كجزء من وظيفتها في التدقيق، كما يتحلل GTP إلى GDP و Pi في الخطوة الأولى لعملية الاستطالة وأخرى عند تغيير الموقع، لذلك كمعدل يتم استهلاك طاقة تحلل أربع من النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات NTPs إلى NDPs عند تكون كل آصرة ببتيدية ضمن سلسلة متعدد الببتيد، أي 4×30.5 كيلوجول/ مول ويساوي 122 كيلوجول/ مول وهي الطاقة اللازمة لتكوين كل آصرة ببتيدية، بينما نفس الآصرة الببتيدية القياسية تعطي طاقة تقدر بـ -21 كيلوجول/ مول،

أي أن معدل تغيير الطاقة خلال تصنيع البروتين هو (122–21 ويساوي 101 كيلوجول/ مول).

إن الغاية الكيموحيوية في تصنيع البرويتن ليس فقط تكوين أواصر ببتيدية بل تكوين آصرة ببتيدية بين حامضين أمينيين معينين وحسب الشفرة الوراثية، أي أن الطاقة المستهلكة العالية تصرف في ضمان دقة تسلسل الأحماض الأمينية ضمن سلسلة متعدد الببتيد بشكل متمم لما موجود في الشفرة الوراثية mRNA، هذه الطاقة تعطي دقة عالية للترجمة الحيوية للمعلومات الوراثية من الشفرة الوراثية على mRNA إلى تسلسلات الأحماض الأمينية ضمن البروتين.

الترجمة السريعة لـ mRNA مفردة :

تجمعات كبيرة من الرايبوسومات (10–100 رايبوسوم) وجدت في البكتريا والخلايا حقيقية النواة وسميت بوليسوم Polysome (الشكل 15–a16)، ومن دراسات المجهر الالكتروني وجد أن هناك ما يشبه الخيط بين الرايبوسومات القريبة من بعضها ضمن التجمع، هذا الخيط تبين فيما بعد أنه جزيئة mRNA منفردة يتم ترجمتها بشكل متعاقب من قبل عدة رايبوسومات قريبة من بعضها وبشكل يضمن الاستغلال الأمثل لـ mRNA. وكما ذكرنا سابقاً في البكتريا تحدث عمليتي الاستنساخ والترجمة معاً، إذ يصنع mRNA ويترجم بالاتجاه 5' إلى 3' ويبدا الرايبوسوم بالترجمة بدءاً من النهاية 5' قبل انتهاء الاستنساخ (الشكل 15–b16)، بينما يختلف الأمر في الخلايا حقيقية النواة إذ يصنع mRNA في النواة ثم يعامل ثم ينقل إلى السايتوبلازم كي تبدأ عملية التصنيع، أما التكسير السريع لـ mRNA في البكتريا فيسمح بالتوقف السريع من إنتاج البروتين عند اكتفاء الحاجة لها.



الشكل (15-16) ازدواج الاستنساخ مع الترجمة في البكتريا
a- صورة مجهر الكتروني تظهر Polysomes خلال الاستنساخ.
b- يتم ترجمة كل mRNA بينما هي لازالت في الاستنساخ

أهم المراجع:

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. **Molecular Biology of the Cell.** 6th Edition. (2015). Garland Science.

Benjamin A. Pierce. **Genetics A Conceptual Approach.** 5th ed. (2013). W. H. Freeman.

Christopher K. Mathews, Kensal E. van Holde, Dean R. Appling , Spencer J. Anthony-Cahill**. Biochemistry.** 4th Edition. (2012). Pearson Pub.

Cammack R. **Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology.** 2nd ed. (2006). Oxford University Press.

Crick, F (1970). **"Central dogma of molecular biology."**. *Nature.* **227** (5258): 561–3.

Crick, F.H.C. (1956): **On Protein Synthesis.** *Symp. Soc. Exp. Biol*. XII, 139-163.

David L. Nelson and Michael M. Cox. Lehninger **Principles of Biochemistry.** 6th Edition. (2012). W.H. Freeman.

Nilsson BL, Soellner MB, Raines RT (2005). **"Chemical Synthesis of Proteins".** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34: 91–118.

Peter Paolella. **Introduction to Molecular Biology.** (1998). The McGraw-Hill Companies. Inc.

Richard M. Twyman. **Advanced Molecular Biology.** (1998). BIOS Scientific Publishers Limited.

Rodnina MV, Beringer M, Wintermeyer W (2007). **"How ribosomes make peptide bonds".** *Trends Biochem. Sci.* 32 (1): 20–6.

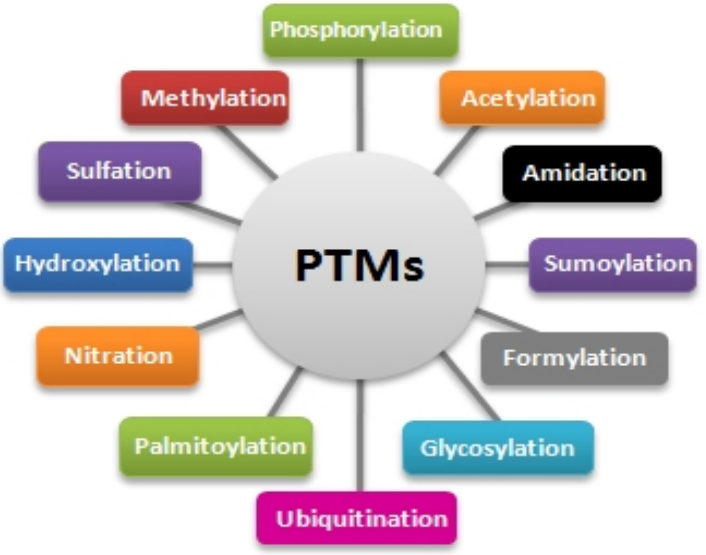
Seiser, R. M. (2000). **"The Fate of Membrane-bound Ribosomes Following the Termination of Protein Synthesis"**. *J Biol Chem.* **275** (43): 33820–33827.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. **Molecular Biology of the Gene**. 7th ed. (2013). Benjamin Cummings. CSHL Press.

الفصل السادس عشر

تحويرات ما بعد الترجمة

Posttranslation Modifications (PTMs)



الفصل السادس عشر

تحويرات ما بعد الترجمة

Posttranslation Modifications (PTMs)

بعد إكمل ترجمة متعدد الببتيد فإنها تعاني من عمليات مختلفة تدعى بتحويرات ما بعد الترجمة(Post-translation modifications (PTMs، وتجري عادة هذه التحويرات بفعل إنزيمات متخصصة "خلال" أو بعد تصنيع متعدد الببتيد كي ينتج في نهاية الأمر بروتين ناضج ذو فعالية ووظيفة، وتعد عمليات تحوير ما بعد الترجمة جزء مهم من ضمن نظام الإشارات الخلوية، التحوير عموماً يمكن أن يكون على النهاية الأمينية (N) أو النهاية الكاربوكسيلية (C) لأي حامض أميني ضمن سلسلة متعدد الببتيد، كما يمكن إضافة وحدات كاربوهيدراتية أو شحمية أو جزيئات حيوية أخرى إلى متعدد الببتيد، ومن ضمن التحويرات تكسير الأواصر الببتيدية أو تكوين أواصر ببتيدية جديدة، أو الانطواء Folding الذي يعد مهماً جداً كي يكتسب البروتين شكله ثلاثي الأبعاد وبالتالي الوظيفة المتخصصة.

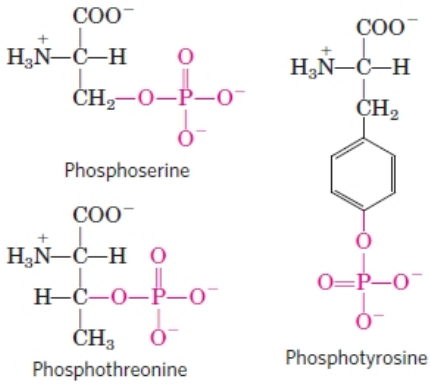
ويلاحظ أن بعض تحويرات ما بعد الترجمة تنتج عند التعرض للإجهاد التأكسدي Oxidative stress.

تحويرات النهاية الأمينية والنهاية الكاربوكسيلية :

كما ذكرنا في الفصل السابق فإن أول حامض أميني لسلسلة متعدد الببتيد في البكتريا هو N-formylmethionine وفي الخلايا حقيقية فهو المثيونين، مجموعة الفورميل والنهاية الأمينية للحامض الأميني المثيونين يمكن أن تزال بفعل إنزيمات متخصصة خلال تكوين البروتين الفعال وظيفياً، كما أن أجزاء أخرى من النهاية الأمينية والكاربوكسيلية يمكن أن تزال بنفس الطريقة. فمثلاً أكثر من 50٪ من بروتينات الخلايا حقيقية النواة يحصل لها أستلة N-acetylation بعد عملية الترجمة. الأحماض الأمينية في النهاية الأمينية لمتعدد الببتيد (حوالي 15–30 حامض أميني) تعمل في توجيه متعدد الببتيد إلى وجهته النهائية داخل الخلية، وتسمى هذه التسلسلات بتسلسلات الإشارة Signal sequences ثم تزال بفعل إنزيمات الببتايديز Peptidases المتخصصة.

تحويرات الأحماض الأمينية :

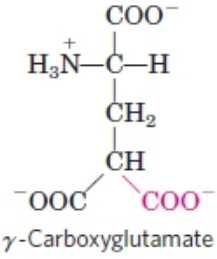
تحصل تحويرات متنوعة على الأحماض الأمينية ضمن سلسلة متعدد الببتيد بعد عملية الترجمة كي تحصل هذه البروتينات على وظيفتها الطبيعية، ومن هذه التحويرات فسفرة مجاميع الهيدروكسيل لبعض الأحماض الأمينية مثل السيرين والثريونين والتايروسين، إذ تفسفر انزيميا بفعل ATP (الشكل 16-1)، إن الأهمية الوظيفية لعملية الفسفرة هذه تختلف من بروتين لآخر، فمثلاً في بروتين الحليب (الكازائين Casein) فإن هناك العديد من مجاميع الفوسفوسيرين والتي ترتبط مع الكالسيوم Ca^{2+} وبذلك يوفر بروتين الكازائين في الحليب الكالسيوم والفسفور فضلاً عن الأحماض الأمينية في نفس الوقت ويعد ذلك مهم جداً من الناحية الغذائية لتلبية متطلبات الرضيع.



الشكل (17-1) تحويرات بعض الأحماض الأمينية (الفسفرة)

من جانب آخر وكما لاحظنا في فصل الإشارات الخلوية، فإن عملية (دورة) الفسفرة وإزالة الفسفرة تنظم عمل العديد من الإنزيمات المهمة والبروتينات التنظيمية في نقل الإشارات والفعاليات الخلوية الأخرى. كما أن إضافة مجاميع كاربوكسيلية إضافية إلى بعض الأحماض الأمينية مثل الكلوتامين لبعض البروتينات له أهمية حيوية كما في بروتين تجلط الدم البروثرومبين Prothrombin الذي يحمل γ-carboxyglutamate في النهاية الأمينية لهذا البروتين. وتتم إضافة هذه المجاميع بفعل إنزيمات متخصصة تحتاج فيتامين K لعملها، مجاميع الكاربوكسيل هذه ترتبط مع الضروري للبدء بآلية التخثر.

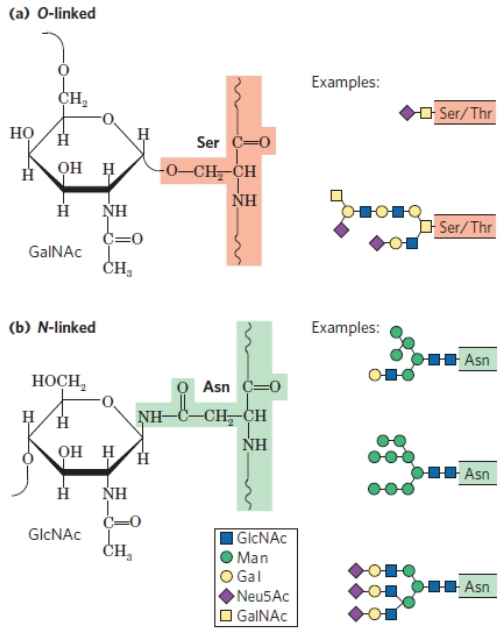
أما إضافة مجاميع المثيل إلى الأحماض الأمينية فتتم غالباً في بروتينات العضلات والسيتوكروم C، إذ يتم اضافة مجموعة مثيل واحدة (مثل المثيل كلوتاميت أو المثيل لايسين) أو مجموعتي مثيل (مثل ثنائي مثيل لايسين) أو ثلاث مجاميع مثيل (مثل ثلاثي مثيل لايسين كما في بروتين الكالموديولين Calmodulin) (الشكل 16-2).



الشكل (16-2) تحوير الحامض الأميني باضافة مجاميع الكاربوكسيل

إضافة الجزيئات الكاربوهيدراتية إلى البروتين :

السلسلة الجانبية الكاربوهيدراتية ضمن البروتينات السكرية (الكلايكوبروتين Glycoprotein) ترتبط بآصرة تساهمية خلال أو بعد تصنيع متعدد الببتيد، أحياناً السلسلة الجانبية الكاربوهيدراتية تضاف انزيمياً إلى الحامض الأميني الاسباراجين (وتكون الآصرة هنا من نوع O قليل السكر) (الشكل 16-3) ويوجد هذا النوع من البروتينات عادة بشكل خارج خلوي، وكذلك البروتينات السكرية المزيتة Lubricating proteoglycans التي تغطي الأغشية المخاطية.



الشكل (16-3) السكر القليل ضمن البروتينات السكرية

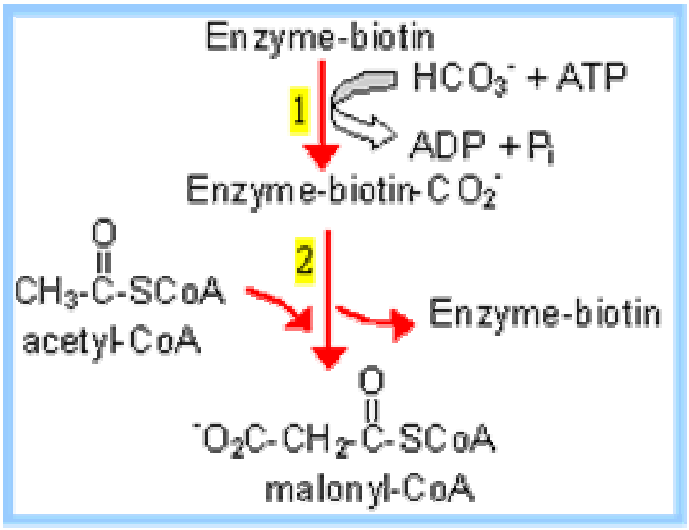
إضافة مجاميع الأيزوبرينيل :

عدد من بروتينات الخلايا حقيقية النواة تحور بإضافة مجاميع تشتق من الأيزوبرين Isoprene (مجاميع الأيزوبرينيل Isoprenyl groups) إذ تتكون آصرة ثايوايثر Thioether بين مجاميع الأيزوبرينيل وبين الحامض الأميني السستين.

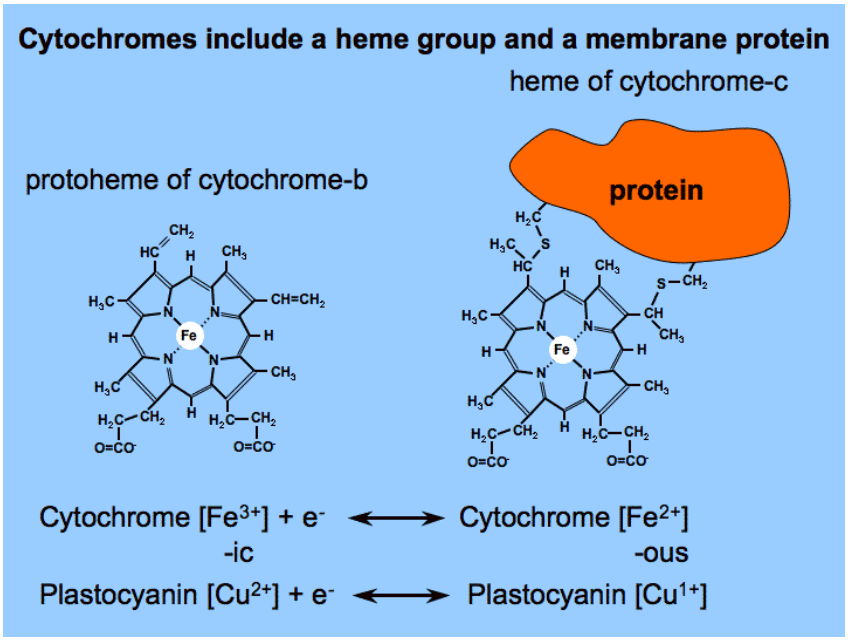
ومن أهم البروتينات التي تحور بهذه الطريقة هي بروتينات Ras (وهي بروتينات G صغيرة) وتنتج من الجينات المكونة للورم ras oncogene وما قبل المنتجة للورم Proto-oncogene، وكذلك بروتينات G من النوع ثلاثي الأجزاء Trimeric وبروتينات اللامينات Lamins التي تتواجد في المادة الأساس للنوية. الفعالية المولدة للورم Carcinogenic activity للجين المكون للورم تفقد عند إيقاف عملية إضافة الأيزوبرينيل Isoprenylation لبروتين Ras، ويعد هذا الأمر مهماً في إيجاد مضادات السرطانات عن طريق مثبطات مسار تحوير ما بعد الترجمة.

إضافة مجاميع بديلة Prosthetic groups :

الكثير من البروتينات تحتاج إضافة مجاميع كي تكتسب وظيفتها ومن الأمثلة الشهيرة على ذلك جزيئة البايوتين ضمن إنزيم Acetyl-CoA carboxylase (4-16) ومجموعة الهيم ضمن الهيموكلوبين والسايتوكروم C (5-16).



الشكل (4-16) البايوتين وانزيم Acetyl-CoA carboxylase



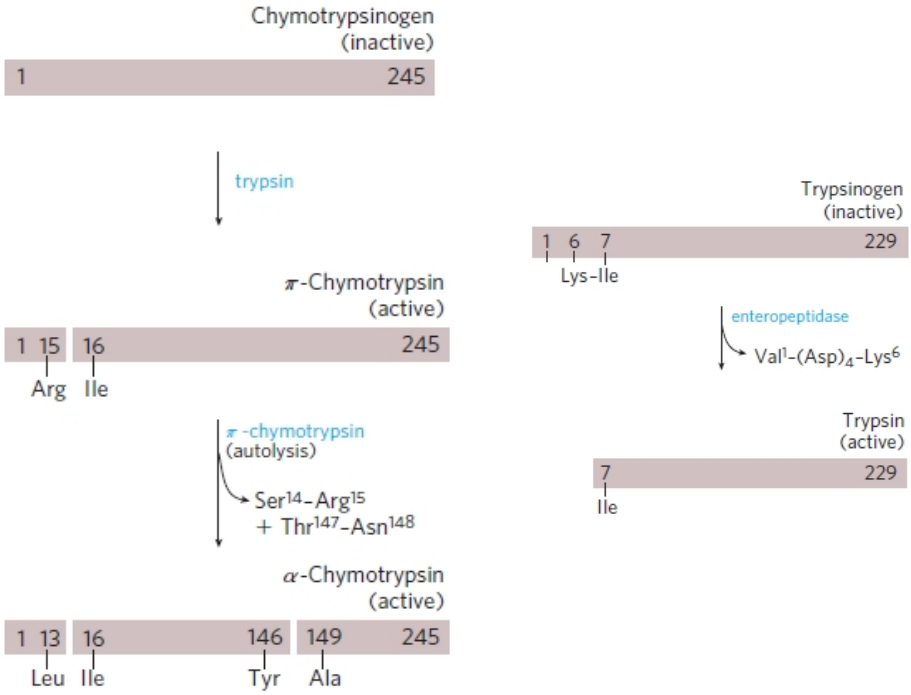
الشكل (16-5) الهيم في السايتوكروم

عمليات التقطيع :

العديد من البروتينات تصنع في البداية بشكل جزيئة كبيرة غير فعّالة من متعدد الببتيد، ومن ثم يحصل لها تكسير أو تقريم Trimming في مواقع متخصصة للحصول على الشكل الفعال للبروتين وهناك أمثلة كثيرة لذلك منها الأنسولين الأولي Proinsulin (الذي يتحول بعد التحوير إلى الأنسولين)، وبعض بروتينات الفيروسات (مثل إنزيمات البروتييز Proteases) كما هو الحال مع الكيموتربسنوجين Chymotrypsinogen (الذي يتحول فيما بعد إلى كيموتربسين Chymotrypsin) (الشكل 16-6).

تكوين الآصرة ثنائية الكبريت :

بعد انثناء البروتين إلى شكله الطبيعي (ثلاثي الأبعاد) فإن بعض البروتينات تكون أواصر داخل سلاسل Interchain أو بين سلاسل Intrachain متعدد الببتيد، وتكون هذه الأواصر عادةً ثنائية الكبريت بين الأحماض الأمينية السستين. في الخلايا حقيقية النواة الآصرة ثنائية الكبريت تكون شائعة في البروتينات التي تصدر إلى خارج الخلية. الارتباطات المتداخلة



الشكل (6-16) تنشيط الزايموجين من خلال تكسير البروتين

الناتجة من هذه الأواصر تساهم في حماية الشكل ثلاثي الأبعاد لجزيئة البروتين من المسخ خارج الخلية، إذ تكون البيئة خارج الخلية مختلفة كثيراً عما في داخلها وتتعرض البروتينات لعوامل مسخ كثيرة أهمها الأكسدة.

استهداف وتحطيم البروتينات :

الخلية حقيقية النواة تتكون من العديد من التراكيب والأجزاء والعضيات وكل واحدة منها لها وظائفها المتخصصة، هذه الوظائف المتخصصة تؤديها اعتماداً على مجاميع متخصصة من البروتينات (وخاصة الإنزيمات) وجميع هذه البروتينات (عدا بروتينات المايتوكوندريا والبلاستيدات الخضر) تصنع في الرايبوسومات، والسؤال هنا كيف توجه هذه البروتينات إلى وجهتها النهائية داخل الخلية ؟

يمكن تقسيم البروتينات حسب وجهتها إلى ثلاث مجاميع أساسية :

1- البروتينات المعدة للإفراز والمكونة للغشاء الخلوي واللايسوسومات تتشارك في الخطوات الأولية لمسارها الذي يبدأ من الشبكة الاندوبلازمية ER.

2- البروتينات المخصصة للمايتوكوندريا والبلاستيدات الخضر أو النواة تستعمل ثلاث آليات منفصلة.

3- البروتينات المخصصة للسايتوسول تبقى في مكان تصنيعها.

إن أهم عنصر في مسارات الاستهداف هذه هي تسلسلات الإشارة Signal sequences (المذكورة سابقاً) وهي تسلسلات قصيرة من الأحماض الأمينية اكتشفت وظائفها لأول مرة من قبل Gunter Blobel وزملائه عام 1970. وتقوم تسلسلات الاشارة بتوجيه البروتين إلى موقعه الصحيح في الخلية، وتزال هذه التسلسلات من معظم البروتينات خلال نقلها إلى وجهتها أو بعد أن تصل إلى موقعها الهدف.

في البروتينات المعدة للنقل إلى المايتوكوندريا والبلاستيدات الخضر أو ER فإن تسلسلات الإشارة تقع على النهاية الأمينية لمتعدد الببتيد حديث التصنيع. والمثير أنه في العديد من الحالات فإن قدرة الاستهداف لتسلسلات الإشارة تزداد من خلال التحام تسلسلات إشارة من بروتين معين مع بروتين آخر، إذ تقوم تسلسلات الإشارة بتوجيه البروتين الثاني إلى الموقع الذي يتواجد فيه البروتين الأول طبيعياً.

معظم تحويرات البروتينات تحدث في الشبكة الاندوبلازمية :

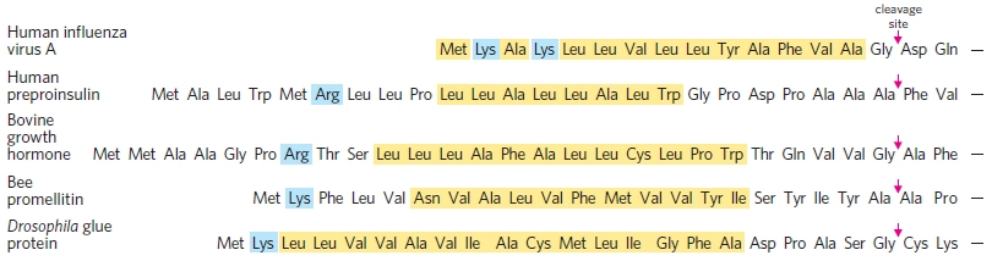
يبدو أن معظم الاستهداف للبروتينات في الخلايا حقيقية النواة تحدث في الشبكة الاندوبلازمية ER، إذ تملك بروتينات اللايسوسوم والغشاء الخلوي أو البروتينات الإفرازية سلسلة إشارة على النهاية الأمينية (الشكل 16-7) هذه التسلسلات تعلم هذه البروتينات كي تنقل إلى تجويف الشبكة الاندوبلازمية، وقد وجدت المئات من تسلسلات الإشارة من هذا النوع، أما النهاية الكاربوكسيلية لتسلسلات الإشارة فيتم التعرف عليها من خلال موقع التكسير Cleavage site، إذ يعمل إنزيم البروتييز على هذا الموقع لإزالة تسلسلات الإشارة بعد وصول البروتين إلى الشبكة الاندوبلازمية (الشكل 16-7) وتختلف تسلسلات الإشارة

في الطول (13–36 حامض أميني) لكن جميعها تشترك في :

1- تمتلك 10–15 من الأحماض الأمينية النافرة من الماء.

2- واحدة أو أكثر من الأحماض الأمينية موجبة الإشارة والتي تقع قرب النهاية الأمينية تعبر عن التسلسلات النافرة من الماء.

3- تسلسل قصير عند النهاية الكاربوكسيلية (قرب موقع التكسير) تكون عادةً قطبية وتتكون من أحماض أمينية بسلاسل جانبية قصيرة (عادةً الألانين) وتقع قريبة جداً من موقع التكسير.



الشكل (7-16) تسلسلات إشارة النهاية الأمينية لبعض بروتينات الخلايا حقيقية النواة التي توجه موقعها إلى ER.

توجيه البروتينات إلى الشبكة الاندوبلازمية :

البروتينات المصنعة التي لها تسلسلات إشارة تصنع في الرايبوسومات المرتبطة مع الشبكة الاندوبلازمية، وتعمل تسلسلات الإشارة نفسها على توجيه ارتباط الرايبوسوم مع الشبكة الاندوبلازمية (كما في الشكل 16–8) وبالخطوات التالية :

1- تبدأ العملية بتصنيع البروتين في الرايبوسومات الحرة (غير المرتبطة بالشبكة الاندوبلازمية).

2- تظهر تسلسلات الإشارة في بداية تصنيع البروتين لأنها تقع على النهاية الأمينية (التي تصنع أولاً).

3- عندما تبرز هذه التسلسلات من الرايبوسوم فإن هذه التسلسلات والرايبوسوم نفسه يرتبطان من خلال جسيم ضخم يسمى جسيم التعرف على الإشارة Signal recognition particle (SRP)، عندها فإن هذا الجسيم يرتبط بـ GTP وتوقف عملية استطالة متعدد الببتيد عندما تصل إلى طول 70 حامض أميني وتخرج تسلسلات الإشارة بشكل كامل من الرايبوسوم.

4- جسيم التعرف على الإشارة (SRP) المرتبط مع GTP يوجه الرايبوسوم (الذي لازال مرتبط mRNA) ويتم استقبال متعدد الببتيد (غير الكامل) مع SRP المرتبط مع GTP من الجهة السايتوبلازمية للشبكة الاندوبلازمية، والذي يمكن أن يتفاعل مع الرايبوسوم مباشرةً.

5- ينفصل SRP من الرايبوسوم ويرافق ذلك تحلل GTP في كل من SRP ومستقبل SRP.

6- يبدأ الآن استئناف عملية استطالة متعدد الببتيد بوجود معقد تغيير الموقع الموجه بـ ATP الذي يغذي نمو سلسلة متعدد الببتيد باتجاه تجويف الشبكة الاندوبلازمية لحين الانتهاء من تصنيع متعدد الببتيد.

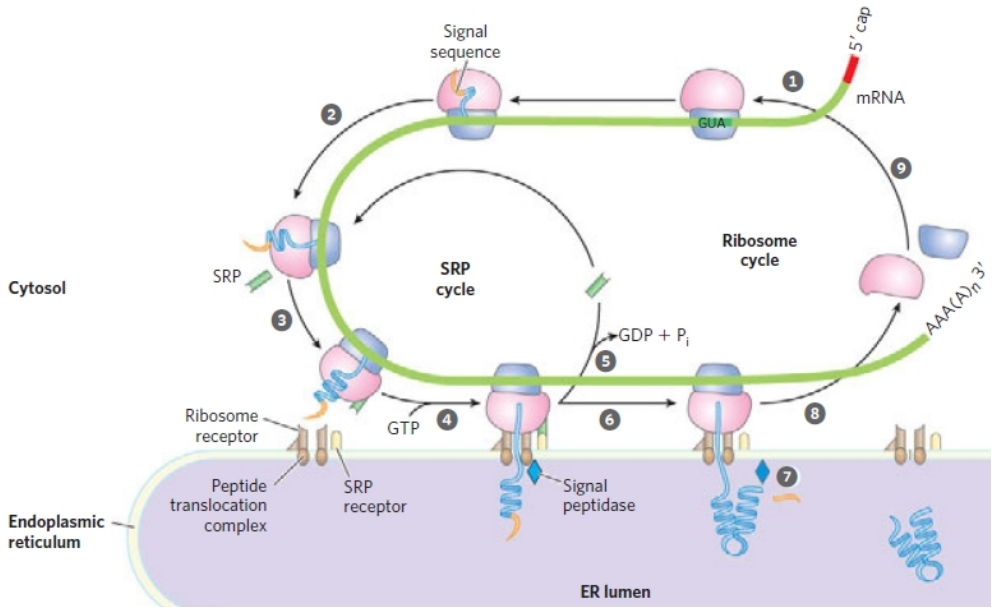
7- تتم إزالة تسلسلات الإشارة بفعل إنزيم الببتايديز داخل تجويف الشبكة الاندوبلازمية.

8- يتفكك الرايبوسوم.

9- تعاد الدورة مرة أخرى (الشكل 16-8).

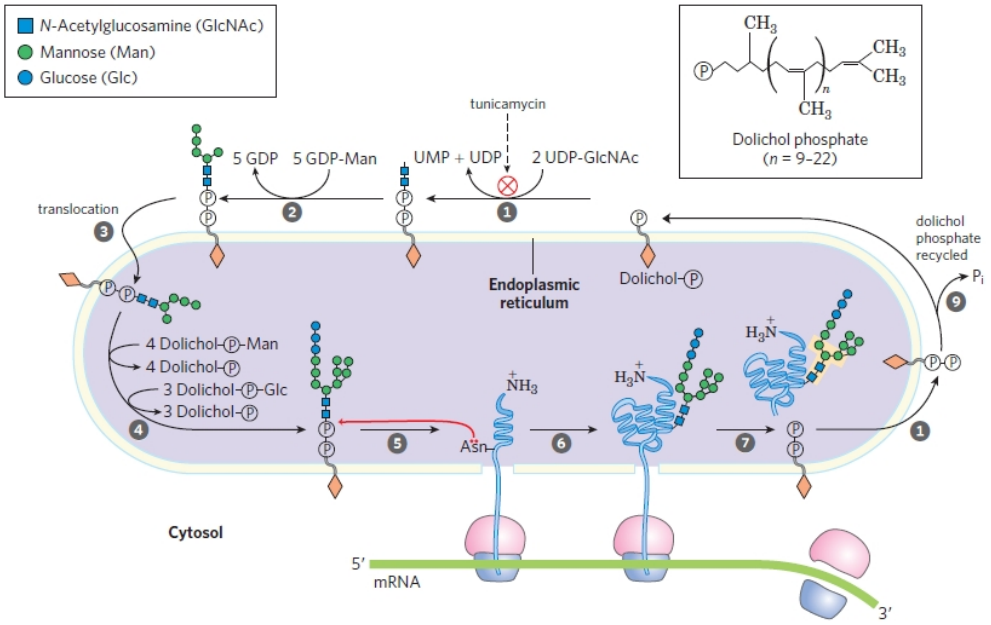
إضافة الكاربوهيدرات إلى البروتين ودوره في الاستهداف :

داخل تجويف الشبكة الاندوبلازمية فإن البروتين المصنع حديثاً يعاني تغيرات وتحويرات متعددة، فبعد إزالة تسلسلات الإشارة، فإن متعدد الببتيد يتم ثنيه وتتكون الأواصر ثنائية الكبريت، وبعض البروتينات يضاف لها جزيئات كاربوهيدراتية لتكون بروتين سكري Glycoprotein وفي العديد من البروتينات السكرية الارتباط يكون عن طريق الحامض الأميني الأسباراجين. إن متعدد السكر القليل الذي يرتبط مع البروتين يتنوع حسب نوع البروتين، ولكن عموماً له مسار تكون واحد، إذ يتم بناء متعدد سكر قليل مكون من 14 وحدة ليكون لب هذا السكر، عندها ينقل السكر إلى الحامض الأميني الأسباراجين في



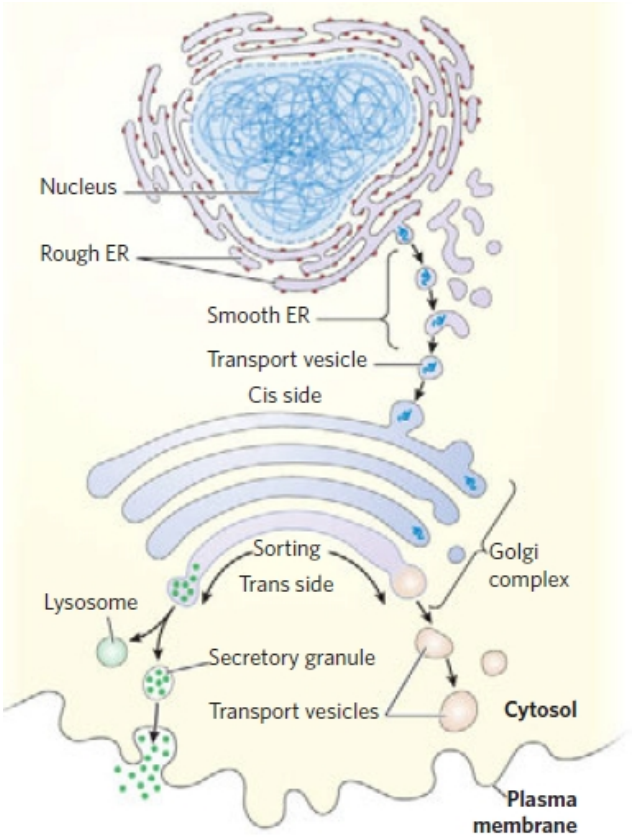
الشكل (8-16) توجيه البروتينات من خلال تسلسلات الإشارة إلى ER.

القليل اللب يجرى له تقليم وتفصيل بعدة طرق حسب نوع البروتين. البروتينات البروتين (الشكل 16-9) ويقع إنزيم النقل Transferase في تجويف من الشبكة الاندوبلازمية لذلك لا تحفز إضافة السكر إلى البروتينات في السايتوسول. بعد النقل فإن متعدد السكر المحورة بشكل صحيح يمكنها الآن الانتقال إلى وجهتها النهائية داخل الخلية، فمثلاً البروتينات التي تنقل من الشبكة الاندوبلازمية إلى معقد كولجي تنقل بواسطة حويصلات ناقلة (الشكل 16-10)، داخل معقد كولجي فإن متعدد السكر القليل يكون آصرة من نوع O مع بعض البروتينات، أما السكريات المتعددة القليلة من نوع الآصرة N فتعاني المزيد من التحويرات، بعدها يقوم معقد كولجي بترتيب البروتينات ورزمها وإرساله إلى وجهتها النهائية. وهنا فإن عمليات تمييز أي البروتينات سيتم إفرازها خارج الخلية وأي منها ستذهب إلى الغشاء الخلوي أو اللايسوسومات يعتمد على تركيب البروتين وشكله وليس الإشارات الخلوية التي أزيلت في الشبكة الاندوبلازمية.



الشكل (16-9) خطوات تصنيع متعدد السكر القليل للبروتين السكري

أما مسارات توجيه البروتينات إلى المايتوكوندريا والبلاستيدات الخضر فتعتمد أيضاً على تسلسلات الإشارة في النهاية الأمينية وبالرغم من أن المايتوكوندريا والبلاستيدات الخضر تملك DNA إلا أن معظم بروتينات هذه العضيات تشفر من قبل DNA النواة وتصنع في السايتوبلازم ثم توجه إلى هذه العضيات. وعلى العكس من المسارات الأخرى فإن مسارات بروتينات المايتوكوندريا والبلاستيدات الخضر تبدأ بعد إكمال تصنيع البروتين الأولي وتحررها من الرايبوسومات. البروتين الأولي الذي يتوجه إلى المايتوكوندريا أو البلاستيدات الخضر يرتبط ببروتينات الجابيرون Chaperones للعضيات، آليات تغيير موقع متخصصة تعمل على نقل هذه البروتينات إلى الجزء الهدف ضمن العضية بعد إزالة تسلسلات الإشارة منها.



الشكل (16-10) مسار البروتين الذي وجهته اللايسوسوم

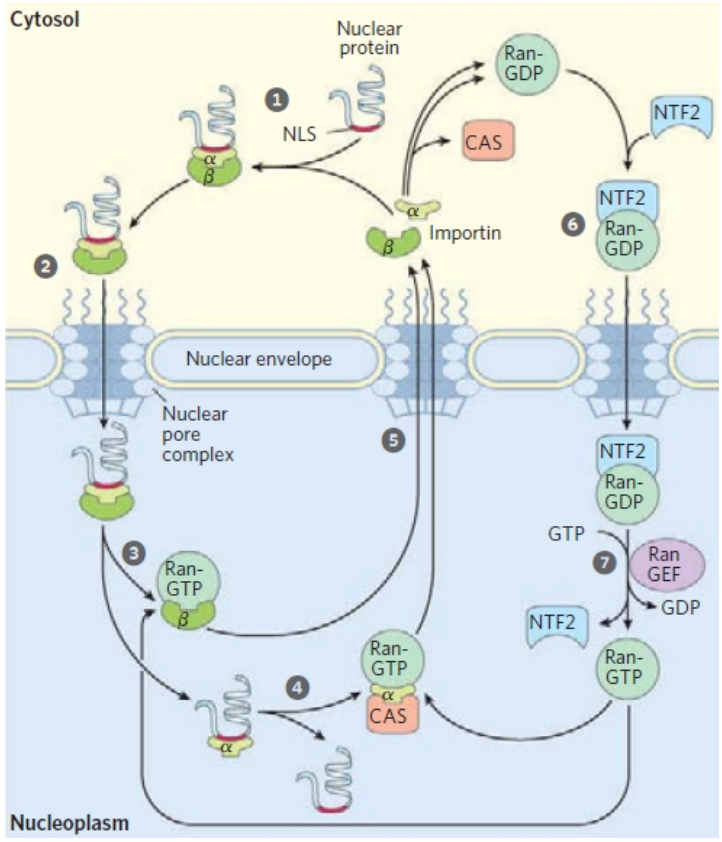
تسلسلات الإشارة للنقل النووي :

انتقال الجزيئات الكبيرة بين النواة والسايتوبلازم يتم من خلال الثقوب النووية، فمثلاً جزيئات RNA تصنع في النواة ثم تنقل إلى السايتوسول، بينما بروتينات معينة تصنع في الرايبوسوم ثم تنقل إلى النواة وتجمع مع وحدات 60S و 40S في النواة، ثم تعاد إلى السايتوسول ثانيةً.

تنظيم نقل البروتينات والجزيئات الأخرى يتم من خلال نظام معقد من الإشارة الجزيئية. والمثير في الخلايا حقيقية النواة أن البروتينات النووية (التي وجهتها النهائية هي النواة) لا تزال منها تسلسلات الإشارة وذلك لأنه عند الانقسام الخلوي يتجزأ الغشاء

النووي وبعد إكمال الانقسام الخلوي يتم إعادة بناء الغشاء النووي، ويتم إعادة إدخال بروتينات النواة إلى داخل النواة ويتم التعرف عليها من خلال تسلسلات الإشارة والتي تدعى هنا بتسلسلات التموضع النووي Nuclear localization sequences (NLS) ولا تزال هذه التسلسلات بعد وصولها إلى وجهتها النهائية (النواة) وعلى العكس من تسلسلات الإشارة الأخرى فإن NLS يمكن أن تقع في أي مكان ضمن التسلسل الأولي للبروتين، وتختلف NLS بشكل كبير بين البروتينات لكن العديد منها تتكون من 4-8 أحماض أمينية وتمتلك العديد من الأحماض الأمينية القاعدية (الأرجنين واللايسين).

عملية إدخال البروتينات إلى النواة تتم من خلال عدد من البروتينات التي تدور بين النواة والسايتوسول (الشكل 16-11) ومنها ألفا وبيتا إمبورتين α and β importin و GTPase الصغيرة التي تعرف بـ Ran (مختصر Ras-related nuclear protein)، ويعمل نوعي الامبورتين ألفا وبيتا كمستقبلين للبروتينات التي تكون وجهتها النواة، إذ أن وحدة ألفا المرتبطة مع البروتينات الحاملة لـ NLS والامبورتين يتجزءان عند الثقوب النووية، ويتغير موقعها خلال الثقب بآلية معتمدة على الطاقة. وفي داخل النواة فإن الإمبورتين بيتا المرتبط بـ Ran GTPase يحرر الإمبورتين بيتا من البروتين الذي تم إدخاله، ثم يرتبط الإمبورتين بيتا بـ Ran و CAS (وهو بروتين القابلية على الموت الخلوي المبرمج Cellular apoptosis susceptibility protein) وينفصل عن البروتين الحامل لـ NLS، الإمبورتين ألفا وبيتا ومعقداتهما Ran و CAS يتم إخراجهما من النواة. Ran يحلل GTP في السايتوسول لتحرير الإمبورتينات، والتي تصبح عندها حرة للبدء بدورة إدخال أخرى، أما Ran فيعاد أيضاً إلى النواة من خلال ارتباط معقد Ran-GDP مع عامل النقل النووي الثاني Nuclear transport factor 2 (NTF2)، وداخل النواة فإن GDP المرتبط مع Ran يستبدل بـ GTP بفعل عامل تبديل هو Ran guanosine nucleotide exchange factor (RanGEF) (الشكل 16-11).

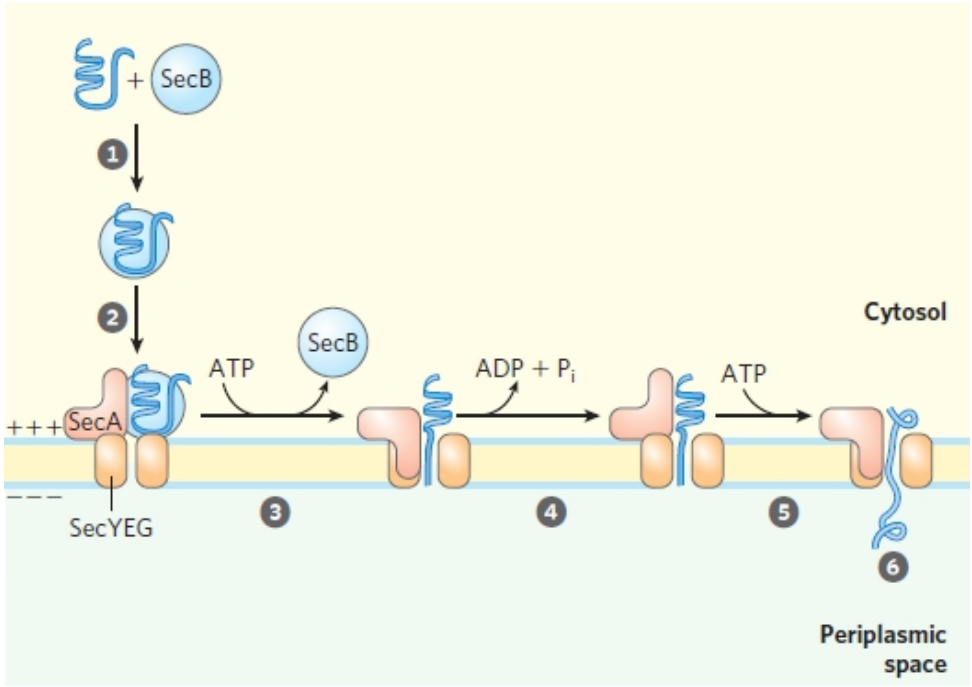


الشكل (16-11) استهداف البروتينات النووية

استهداف البروتين في البكتريا :

في البكتريا يتم توجيه البروتينات إلى الأغشية الداخلية والخارجية أو إلى الحيز بينهما أو إلى الوسط الخارج خلوي. البكتريا تستعمل تسلسلات إشارة في النهاية الأمينية للبروتينات وتشبه كثيراً البروتينات في الخلايا حقيقية النواة والتي وجهتها الشبكة الاندوبلازمية والمايتوكوندريا والبلاستيدات الخضر، وتستعمل معظم البكتريا (ومنها الايشريشيا القولونية) المسار في الشكل التالي (16-12)، فبعد الترجمة فإن البروتين المهيء للتصدير يتم ثنيه قليلاً، تسلسلات الإشارة تكون داخل هذا الانثناء. بروتين جابيرون ذاتي هو secB يرتبط مع تسلسلات الإشارة، بعدها البروتين المرتبط هذا يسلم إلى secA وهو بروتين مرتبط

مع السطح الداخلي للغشاء الخلوي، ويعمل secA كمستقبل ويملك فعالية انزيم ATPase مغير الموضع. البروتين المتحرر من secB والمرتبط مع secA، هذا البروتين يتحول إلى معقد تغيير الموضع في الغشاء الخلوي وهو secY, E, G ويتغير الموقع في الغشاء بخطوات عند معقد secYEG وبطول 20 حامض أميني، كل خطوة تسهل من خلال تحلل ATP الذي يحفز بـ secA، لذلك فإن البروتين المراد تصديره يدفع خلال الغشاء الخلوي من قبل بروتين secA الواقع في السطح السايتوبلازمي للغشاء (الشكل 16-12).



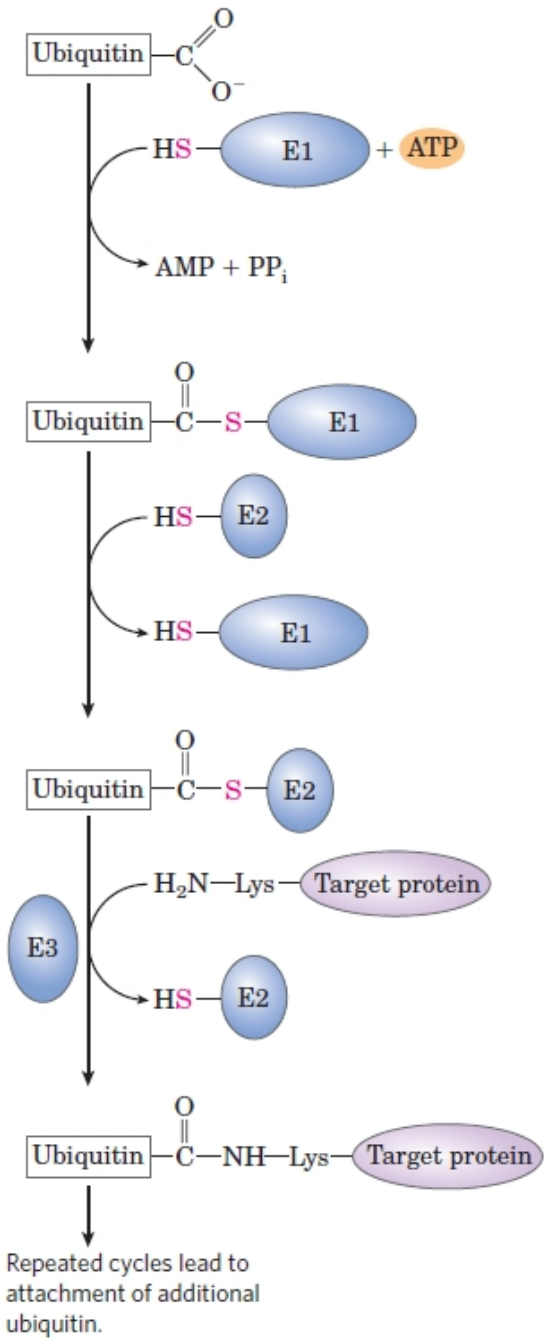
الشكل (16-12) نموذج لتصدير البروتين في البكتريا

تحطم البروتينات :

الغاية من تحطم البروتينات هو منع استخدام البروتينات غير الطبيعية أو غير المرغوب بها، كما يسمح بإعادة استخدام الأحماض الأمينية، ويختلف العمر النصفي لبروتينات الخلايا حقيقية النواة من عدة ثواني إلى عدة أيام، ويلاحظ أن معظم البروتينات تتحطم بسرعة

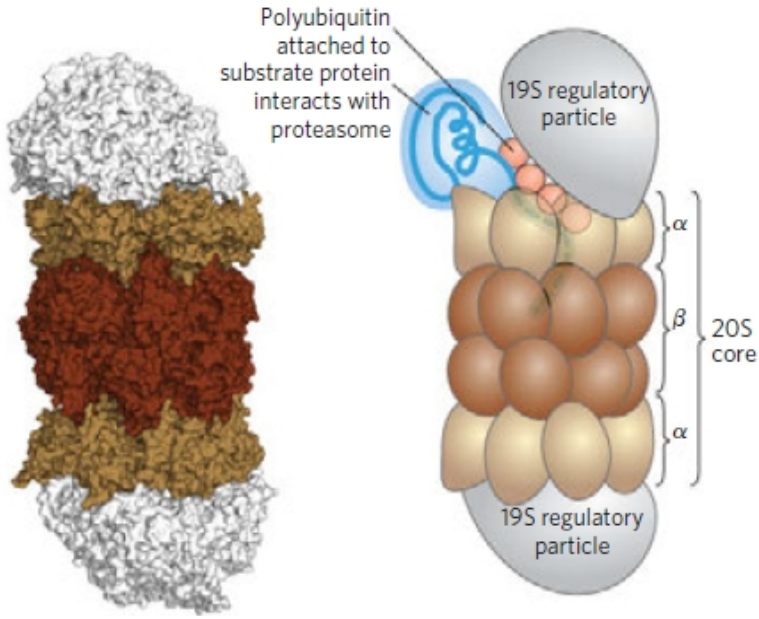
مقارنة مع عمر الخلية، مع وجود بعض الاستثناءات، مثل الهيموكلوبين الذي يستمر طوال عمر الخلية (حوالي 110 يوم عمر كريات الدم الحمر). والبروتينات التي تتحطم بسرعة عادةً تلك التي بها خلل بسبب وجود أحماض أمينية خاطئة أو بسبب خطأ في الشكل ثلاثي الأبعاد للبروتين، كما أن الإنزيمات التي تعمل في الخطوات التنظيمية للعلميات الأيضية يتم تحطمها بسرعة.

البروتينات المراد تحطيمها في البكتريا والخلايا حقيقية النواة يتم تحطميها من خلال نظام سايتوسولي متخصص معتمد على ATP. في الفقريات هناك نظام ثاني يقع في اللايسوسومات مما يعيد استعمال الأحماض الأمينية. في البكتريا العديد من البروتينات تتحطم من خلال إنزيم بروتييز معتد على ATP يدعى Lon (الاسم مأخوذ من "الشكل الطويل Long form")، إنزيم البروتييز ينشط بوجود بروتينات معطوبة أو مهيأة للتحطم بسرعة، وتتحلل جزيئتان من ATP لتكسير كل آصرة ببتيدية. أما في الخلايا حقيقية النواة فإن المسار المعتمد على ATP يختلف تماماً ويعتمد على بروتين اليوبكوتين Ubiquitin (والاسم يشير إلى الشيوع، إذ تتواجد في جميع الخلايا حقيقية النواة) وأشهر هذه البروتينات ذلك المكون من 76 حامض أميني ويتواجد في الكائنات الحية المتنوعة من الخمائر إلى الانسان ويرتبط اليوبكوتين بشكل تساهمي مع البروتينات المهيأة للتحطيم عن طريق مسار معتمد على ATP ويتضمن ثلاث أنواع منفصلة من الإنزيمات وتسمى E1 الإنزيمات المنشطة، و E2 الإنزيمات المرافقة، و E3 الإنزيمات الرابطة (الشكل 16-13). البروتينات المرتبطة مع اليوبكوتين تحطم من قبل معقد كبير يعرف بـ 26S proteasome (الشكل 16-14) وفي الخلايا حقيقية النواة يتكون Proteasome من جزأين متماثلين كل واحدة لها على الأقل 32 من الوحدات المختلفة، Proteasome يتكون عادةً من جزأين هما لب يشبه البرميل وجسيمات تنظيمية في أحد نهايتي اللب، اللب هو 20S ويتكون من 4 حلقات، الحلقات الخارجية تتكون من 7 وحدات ألفا، بينما الحلقات الداخلية تتكون من 7 وحدات بيتا، ثلاثة من وحدات بيتا السبعة لها وظيفة إنزيم البروتييز، كل واحدة لها خصوصية مختلفة للمادة الأساس، الجسيم التنظيمي هو 19S ويتكون من 18 وحدة بعضها يتعرف على ويرتبط بالبروتينات اليوبكويتينية (الشكل 16-14).



الشكل (13-16) مسار خطوات ارتباط اليوبكوتين مع البروتين

ويذكر أن التحطيم المعتد على اليوبكويتين له أهمية خاصة في عمليات حيوية مهمة منها تحطيم السايكلينات خلال دورة الخلية، ووجود خلل في مسار اليوبكوتين يرافقه العديد من المراض، فمثلاً تأخر تحطيم أو عدم قدرة تحطيم بعض البروتينات المنظمة للانقسام الخلوي يسبب نشوء الأورام السرطانية، كما يمكن أن يسبب حدوث الأورام التحطم السريع لبروتينات أخرى تنظم دورة الخلية (البروتينات المثبطة للأورام)، كما أن تأخر أو سرعة تحطيم البروتينات ترافقه العديد من الأمراض الأخرى منها أمراض الكلى، الربو، الاضطرابات العصبية التنكسية (مثل الزهايمر ومرض باركنسون)، التليف الكيسي، وأمراض أخرى كثيرة، وأخيراً فإن الأدوية المصممة لتثبيط فعالية Proteasome ربما تفتح باباً لعلاج العديد من الأمراض أعلاه، ويبقى تحطيم البروتين مهماً للخلية كأهمية تصنيعه.



الشكل (14-16) التركيب ثلاثي الأبعاد لـ Proteasome الخلايا حقيقية النواة

أهم المراجع :

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. **Molecular Biology of the Cell.** 6th Edition. (2015). Garland Science.

David L. Nelson and Michael M. Cox. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 6th Edition. (2012). W.H. Freeman.

Eberhard Passarge. **Color Atlas of Genetics.** 3rd ed. (2007). Georg Thieme Verlag KG.

Edward S. Tobias, Michael Connor, Malcolm Ferguson-Smith. Essential **Medical Genetics.** 6th ed. (2011). Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication

Harvey Lodish , Arnold Berk , Chris A. Kaiser , Monty Krieger , Anthony Bretscher , Hidde Ploegh , Angelika Amon , Kelsey Martin. **Molecular Cell Biology.** 8th Edition. (2016). W. H. Freeman.

Krebs JE, Goldstein ES, Stephen T. Kilpatrick ST. **Lewin's GENES XI.** 11th Edition. (2014). Jones & Bartlett Learning.

Benjamin A. Pierce. **Genetics: A Conceptual Approach.** 5th ed. (2013). W. H. Freeman.

Pratt, Donald Voet; Judith G. Voet; Charlotte W. **Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level.** 2nd ed. (2006). Hoboken, NJ: Wiley.

Richard M. Twyman. **Advanced Molecular Biology.** (1998). BIOS Scientific Publishers Limited.

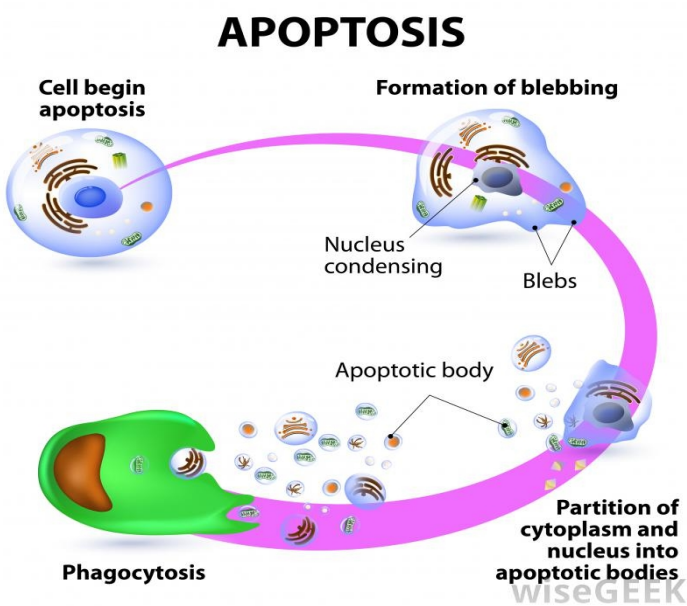
Walsh,, Christopher T. **Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory**. (2006). Englewood: Roberts and Co. Pub.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. **Molecular Biology of the Gene.** 7th ed. (2013). Benjamin Cummings. CSHL Press.

الفصل السابع عشر

الموت الخلوي المبرمج

Apoptosis



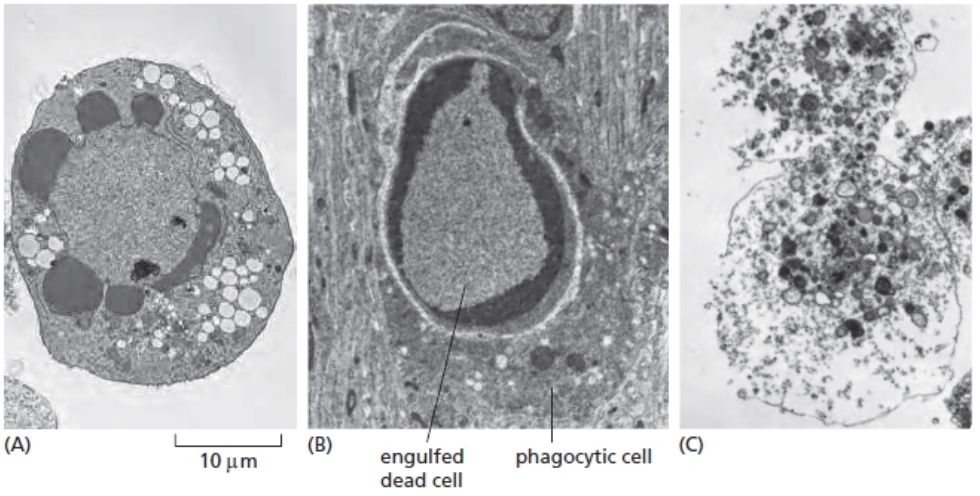
الفصل السابع عشر

الموت الخلوي المبرمج
Apoptosis

إن نمو وبقاء الكائن الحي (متعدد الخلايا) على قيد الحياة لا يعتمد فقط على إنتاج خلايا جديدة، بل يعتمد أيضاً على آلية لتحطيم الخلايا. فمثلاً للحفاظ على حجم الأنسجة يجب أن يكون هناك توازن لمعدل إنتاج الخلايا مع معدل موت الخلايا في هذه الأنسجة، من جانب آخر فإن عملية تكوين الكائن في الفترة الجنينية يرافقه تناغم ودقة في موت الخلايا للحصول على شكل وحجم الأطراف والأنسجة الأخرى، كما أن الخلايا تموت عند تعرضها إلى أذى كبير لا يمكن إصلاحه أو عند إصابتها بالخمج (الكائنات الممرضة) مما يجعل موت الخلية وسيلة دفاعية لمنع انتشار العامل الممرض وبالتالي اعتلال صحة الكائن ككل.

في الحالات أعلاه وحالات متنوعة أخرى فإن موت الخلية لا يكون بشكل عشوائي بل يتم من خلال آليات جزيئية متعاقبة ومنظمة، إذ تقوم الخلية بتحطيم نفسها من الداخل ومن ثم تلتهم من قبل الخلايا المجاورة دون أن تترك أي أثر، ويسمى ذلك بالموت الخلوي المبرمج Apoptosis (وكلمة Apoptosis إغريقية تعني "التساقط" كتساقط الورق من الشجر). الخلية التي تعاني الموت الخلوي المبرمج لها مميزات شكلية منها الانكماش والتكثف، تحطم

الهيكل الخلوي، فقدان تكامل الغلاف النووي، تكثف الكروماتين وتجزئه إلى قطع، بروز سطح الخلية إلى الخارج (الشكل A1-17).

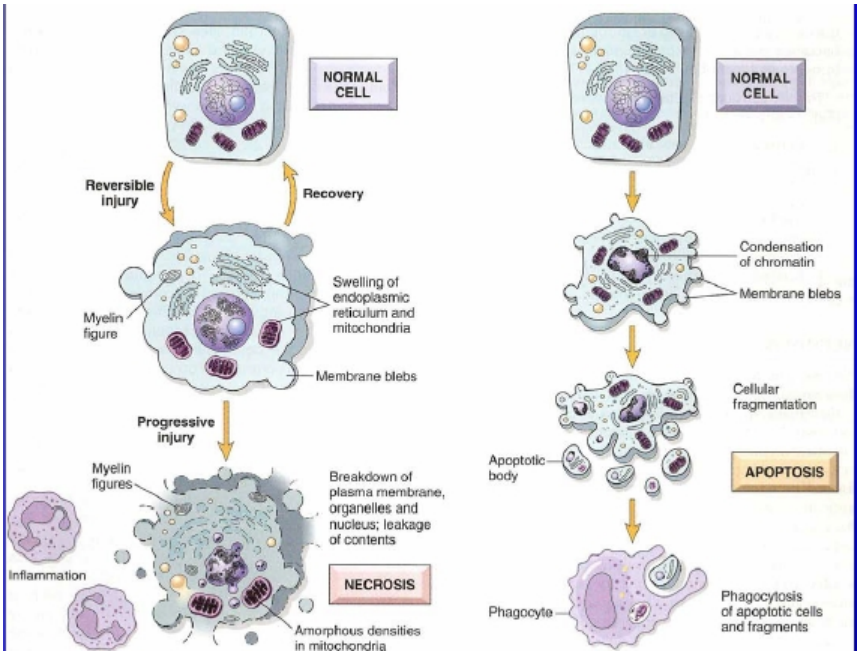


الشكل (1-17) نوعين من موت الخلية. A و B صورة مجهر الكتروني للموت الخلوي المبرمج. C صورة مجهر الكتروني للنخر
(مأخوذ من Alberts et al., 2015).

وإذا كان حجم الخلية كبيراً ستحطم إلى قطع مغلفة بالغشاء الخلوي تدعى بأجسام الموت الخلوي المبرمج Apoptotic bodies، سطح الخلية أو سطح أجسام الموت الخلوي المبرمج تتغير مما يحفز الخلايا المجاورة أو البلاعم الكبيرة (الخلايا الملتهمة في الأنسجة) لالتهامها بسرعة قبل أن تقذف مكوناتها الخلوية (B1-17)، بهذه الطريقة يكون موت الخلية "نظيفاً" دون أن يسبب استجابة التهابية في البيئة المحيطة بها، وبما أن الخلية تلتهم وتهضم بسرعة لذلك لا يمكن رؤية الكثير من الخلايا في مرحلة الموت الخلوي المبرمج تحت المجهر عند فحص المقاطع النسجية.

وعلى العكس من الموت الخلوي المبرمج فإن الخلية تعاني نوع آخر من الموت يدعى النخر Necrosis وينتج عند تعرض الخلية إلى أذى حاد مثل الكدمة Trauma أو فقدان التجهيز الدموي، وما يميز الخلية المتنخرة شكلياً أنها تنتفخ وربما تنفجر وتقذف محتوياتها إلى

الخارج مما تسبب في استجابة التهابية (C1-18)، في العديد من الحالات يمكن أن ينتج النخر من فقدان الطاقة الذي يسبب خلل أيضي وفقدان التوازن الأيوني على جانب الغشاء الخلوي، والجدول (17-1) والشكل (17-2) يوضحان أهم الفروقات بين الموت الخلوي المبرمج والنخر.



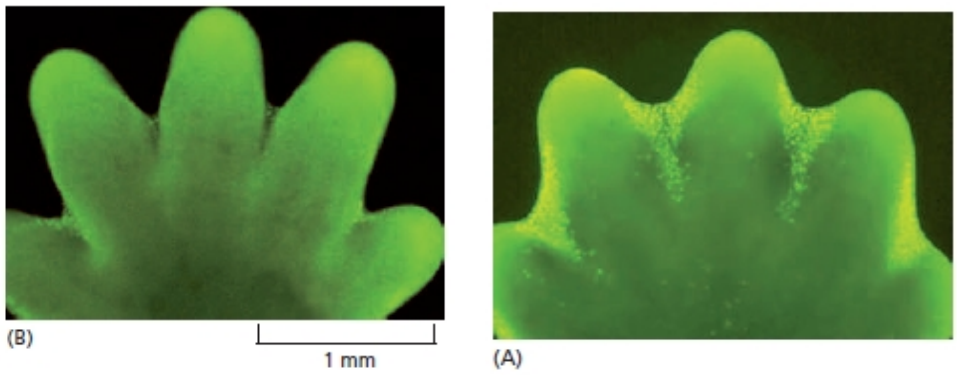
الشكل (17-2) أبرز الفروقات بين الموت الخلوي المبرمج والنخر

الموت الخلوي المبرمج يزيل الخلايا غير المرغوب فيها :

كمية الخلايا التي تزال بآلية الموت الخلوي المبرمج تبدو غير واضحة فمثلاً في الجهاز العصبي لأجنة الفقريات تتم إزالة نصف كمية الخلايا العصبية بعد تكونها مباشرة ويبدو ذلك "إسرافاً" في عملية الإزالة، ولكن أحياناً يكون السبب واضح فمثلاً اليد والقدم في أجنة الفقريات تكون بشكل يشبه المجذاب في بداية تكونها، ولا يتم الفصل بين الأصابع إلا بموت الخلايا الواقعة بينها (الشكل 17-3)، في حالات أخرى الخلية (أو مجموعة الخلايا) تموت لعدم الحاجة لها فمثلاً عندما يتحول الدعموص Tadpole إلى ضفدع بعملية التحول الشكلي Metamorphosis تموت الخلايا في الذيل ويختفي الذيل نهائياً لعدم الحاجة له.

الجدول (17-1) أبرز الفروقات بين الموت الخلوي المبرمج والنخر

الموت الخلوي المبرمج	النخر
تصيب خلية مفردة	تصيب مجموعة خلايا متجاورة
لا توجد مظاهر لاستجابة التهابية	وجود مظاهر الاستجابة الالتهابية بشكل واضح
بروزات من الغشاء الخلوي مع الاحتفاظ بتكامل الغشاء الخلوي	فقدان تكامل الغشاء الخلوي
زيادة نفاذية غشاء المايتوكوندريا يسبب تحرر بروتينات ما قبل الموت الخلوي المبرمج وتكوين أجسام الموت الخلوي المبرمج	انتفاخ العضيات وتحرر مكونات اللايسوسوم
تكثف الكروماتين وتجزئ DNA بشكل غير عشوائي	تحطم عشوائي لـ DNA
أجسام الموت الخلوي المبرمج تلتهم من قبل الخلايا المجاورة	الخلايا المتحللة تلتهم من قبل البلاعم الكبيرة



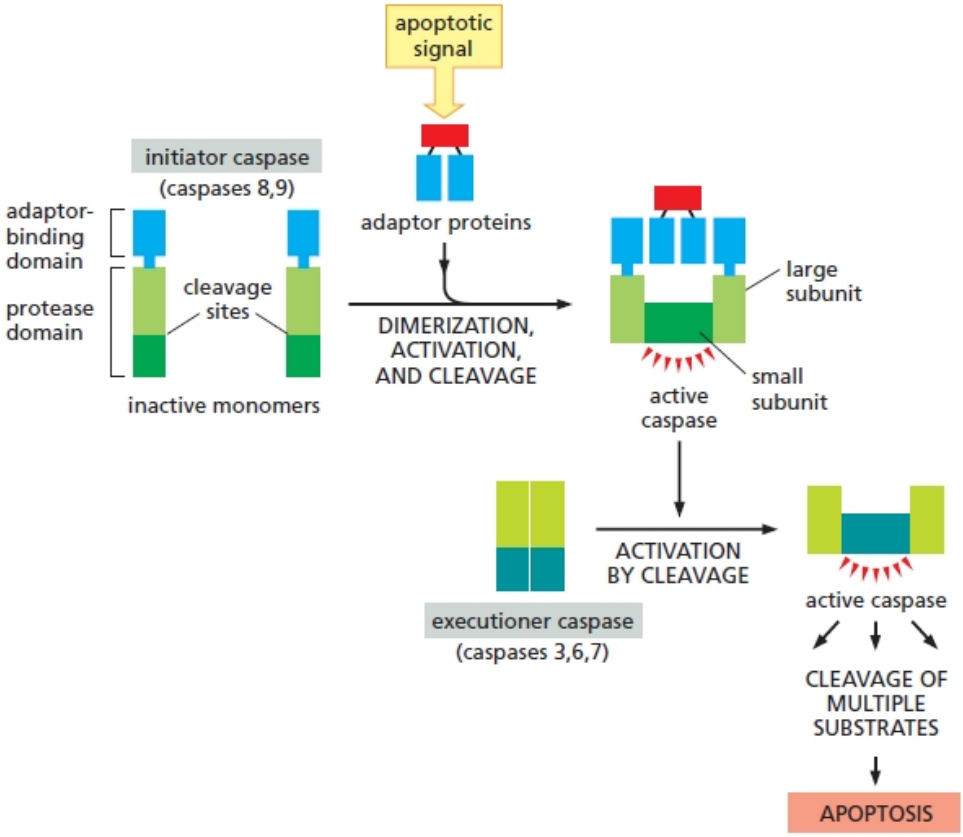
الشكل (17-3) تفرق الاصابع في يد الفأرة بفعل الموت الخلوي المبرمج
(مأخوذ من Alberts et al., 2015)

كما يقوم الموت الخلوي المبرمج بعملية دفاعية وتحسينية خلال نمو الكائن بإزالة الخلايا غير السوية، المتموضعة في مكان خاطئ، غير الفعالة وظيفياً، أو المؤذية للكائن الحي، ومن الأمثلة على ذلك في الفقريات خلايا الجهاز المناعي ؛ إذ أن الموت الخلوي المبرمج يزيل الخلايا اللمفية البائية B والتائية T والتي تفشل في إنتاج مستقبلات متخصصة للمستضدات، أو تلك التي تنتج مستضدات فعالة ضد نفسها والتي تجعل هذه الخلايا خطرة جداً. كما أن الموت الخلوي المبرمج يعمل على إزالة معظم الخلايا اللمفاوية التي نشطت بفعل الخمج وذلك بعد انتهاء مهمة هذه الخلايا بالمساعدة في القضاء على العامل الممرض. وفي أجسام الكائنات البالغة (التي تنمو وتنكمش حسب الفترة العمرية) فإن الموت الخلوي المبرمج يكون بتوازن مع الانقسام الخلوي، ومن الأمثلة الشهيرة لذلك إزالة قطعة من الكبد في الجرذان البالغة يحفز الانقسام الخلوي السريع للخلايا الكبدية لتعويض الجزء المزال، وعلى العكس من ذلك عند حدوث تضخم في كبد الجرذان البالغة (مثلاً بفعل مادة الفينوباربيتال Phenobarbital الذي يحفز الانقسام الخلوي لخلايا الكبد) وبعد إيقاف استخدام هذه المادة يزداد الموت الخلوي المبرمج للخلايا الكبدية لحين عودة الكبد لحجمه الطبيعي (خلال أسبوع تقريباً)، أي أن الكبد يبقى في حالة توازن لموت الخلايا وتكون الخلايا، أما الآليات الدقيقة لتنظيم التوازن بين الموت الخلوي والانقسام الخلوي فلا زالت مواضيع بحث تجذب العلماء.

آلية حدوث الموت الخلوي المبرمج :

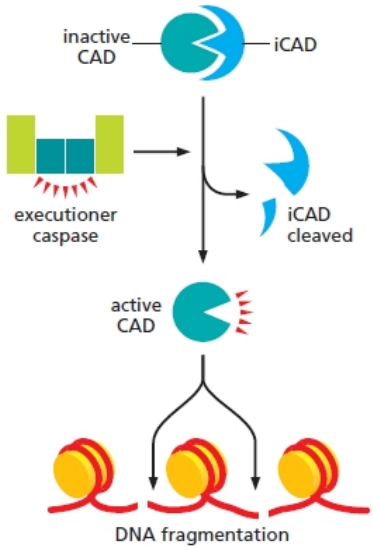
الموت الخلوي المبرمج يحفز من قبل مجموعة من إنزيمات البروتييز Proteases المتخصصة ، والتي تقوم بتكسير تسلسلات متخصصة لبروتينات معينة داخل الخلية مما يؤدي إلى البدء في سلسلة تغيرات دراماتيكية في الخلية تنتهي في نهاية الأمر بموت الخلية والتهام أجزاءها. انزيمات البروتييز هذه تملك في موقعها الفعال الحامض الأميني السستين Cysteine وتهاجم البروتينات الهدف عند الحامض الأميني حامض الأسبارتك Aspartic acid ومن هنا جاءت التسمية كاسبيز Caspases (C من السستين و asp من حامض الأسبارتك)، وإنزيمات الكازبيز هذه تكون غير فعالة عند تصنيعها في الخلية وتحفز فقط عند الموت الخلوي المبرمج، وهناك نوعان من الكازبيز هما الكازبيزات البادئة Initiator caspases و الكازبيزات المنفذة Executioner caspases، الكازبيز البادئ الذي يبدأ بعملية

الموت الخلوي المبرمج، يتواجد طبيعياً بشكل تركيب مكون من جزء واحد غير فعال في السايتوسول، عند وجود إشارة الموت الخلوي المبرمج تحفز هذه الإشارة بتجمع بروتينات كبيرة تعمل كقاعدة تحمل العديد من الكازبيز البادئ مع بعضها مكونةً معقد كبير داخل هذا المعقد يزدوج الكازبيز البادئ مكوناً ثنائي الأجزاء مما يعمل على تنشيط إنزيم البروتيز (الشكل 17-4)، عندها فإن كل كازبيز بادئ يكسر شريكه في جزء إنزيم البروتيز وفي مواقع متخصصة، هذا يؤدي إلى ثبات المعقد الفعال ويعد ضرورياً لوظيفته، بالرغم من ذلك فإن الوظيفة الرئيسية للكازبيز البادئ هو تنشيط الكازبيز المنفذ والذي يتواجد طبيعياً بشكل ثنائي الأجزاء غير فعال، وعندما يكسر الكازبيز المنفذ بفعل الكازبيز البادئ وفي موقع متخصص، فإن هذا الموقع الفعال يعاد ترتيبه من شكل غير فعال إلى شكل فعال،



الشكل (17-4) تنشيط الكازبيز خلال الموت الخلوي المبرمج (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

ويذكر أن معقد كازبيز بادئ واحد بإمكانه تنشيط العديد من جزيئات الكازبيز المنفذ، أي تضخيم أحداث التحلل البروتيني، وعندما ينشط الكازبيز المنفذ فانه يحفز أحداث تكسر أنواع كثيرة من البروتينات مما يسبب موت الخلية. الأنواع الكثيرة هذه تبلغ أكثر من 1000 نوع من البروتينات ولكن ما تم دراسته لحد الآن بالتفصيل قليل جداً ومنها اللامين النووي Nuclear lamins، إذ أن تكسيرها يؤدي إلى تحطيم غير عكسي للغلاف النووي، بروتين آخر هو الذي يحافظ على الاندونيوكلييز المحطم لـ DNA بشكل غير فعال، وعند تحطم هذا البروتين ينشط الاندونيوكلييز ويقطع DNA في نواة الخلية (الشكل 17-5).



الشكل (17-5) تجزئ DNA خلال الموت الخلوي المبرمج
(مأخوذ من Alberts et al., 2015).

بروتينات أخرى تكون هدف للكازبيز المنفذ هي تلك التي تدخل في تركيب الهيكل الخلوي وبروتينات التصاق الخلية مع الخلايا الأخرى، مما يؤدي إلى انفصال الخلية التي تعاني الموت الخلوي المبرمج عن محيطها تسهيلاً لالتهامها من قبل الخلايا المجاورة، أو دفعها إلى الخارج من صفيحة الخلايا كما في الخلايا الظهارية، ويذكر أن سلسلة أحداث الكازبيز ليست فقط تحطيمية ومضخمة للأحداث ولكنها أيضا غير عكسية، إذ عندما تبدأ لا يمكن إيقافها لحين إكمال عمليات الموت الخلوي المبرمج.

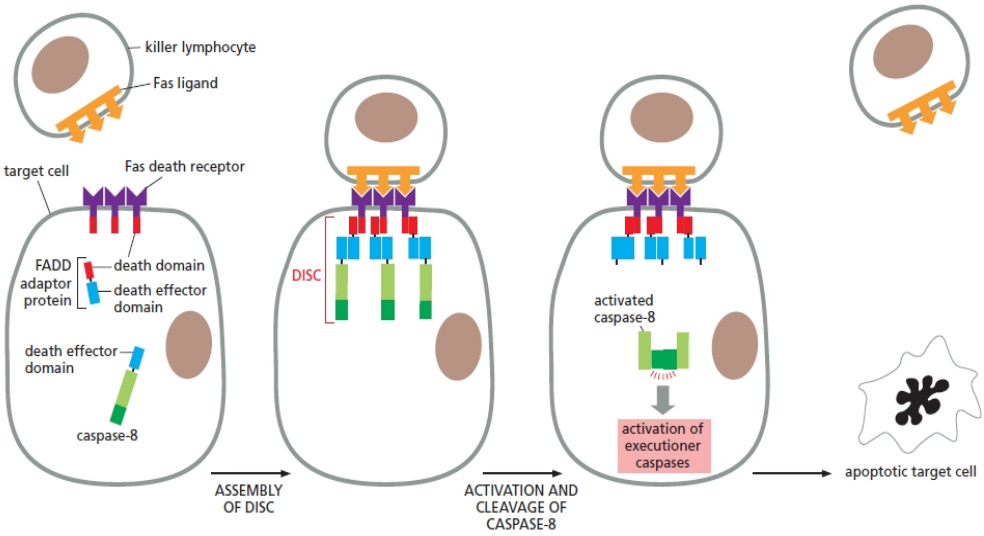
أما كيف تقوم إشارة الموت الخلوي المبرمج بتنشيط الكازبيز البادئ فهناك مساران لحدوث ذلك :

1- المسار الخارجي External pathway:

ويعتمد هذا المسار على ارتباط بروتينات إشارة خارج خلوية مع مستقبلات متخصصة على سطح الخلية تدعى بمستقبلات الموت Death receptors، هذا الارتباط ينشط المسار الخارجي للموت الخلوي المبرمج. ومستقبلات الموت عبارة عن بروتينات خلال الغشاء الخلوي تتكون من جزء خارج خلوي متخصص للارتباط مع بروتينات الإشارة، وجزء خلال الغشاء الخلوي، وجزء داخل خلوي يدعى بجزء الموت Death domain الذي يعد ضورياً لتنشيط سلسلة أحداث الموت الخلوي المبرمج. المستقبل هذا ينتمي إلى عائلة مستقبلات عامل النخر الورمي Tumor necrosis factor (TNF) والذي يتضمن العديد من المستقبلات أهمها مستقبل عامل النخر الورمي TNF receptor ومستقبل الموت من نوع فاز Fas death receptor.

العامل الذي يرتبط مع المستقبل يكون ثلاثي الأجزاء أيضاً ويكون مشابه بشكل أو آخر لبروتينات إشارة عامل النخر الورمي. ومن الأمثلة التي درست بشكل مستفيض لمستقبل الموت وكيفية تنشيطه بالمسار الخارجي هو تنشيط فاز Fas على سطح الخلية الهدف من قبل عامل فاز Fas على سطح الخلية اللمفاوية القاتلة Killer (cytotoxic) lymphocyte.

عند ارتباط عامل فاز Fas مع مستقبله فإن الجزء الذيلي في السايتوسول لمستقبل الموت يرتبط مع بروتينات تكيف داخل خلوية وهذه بدورها ترتبط بالكازبيز البادئ (وبشكل رئيسي الكازبيز-8 (caspase-8)) مكوناً معقد إشارة استحداث الموت Death inducing signaling complex (DISC) وعندما ينشط الكازبيز ضمن هذا المعقد فانه يحفز كازبيز التنفيذ محدثاً عمليات الموت الخلوي المبرمج (الشكل 18-5)، أحياناً في بعض الخلايا المسار الخارجي يوظف المسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج لتضخيم سلسلة الكازبيز وتقتل الخلية.



الشكل (6-17) المسار الخارجي للموت الخلوي المبرمج المنشط بواسطة مستقبل الموت فاز (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

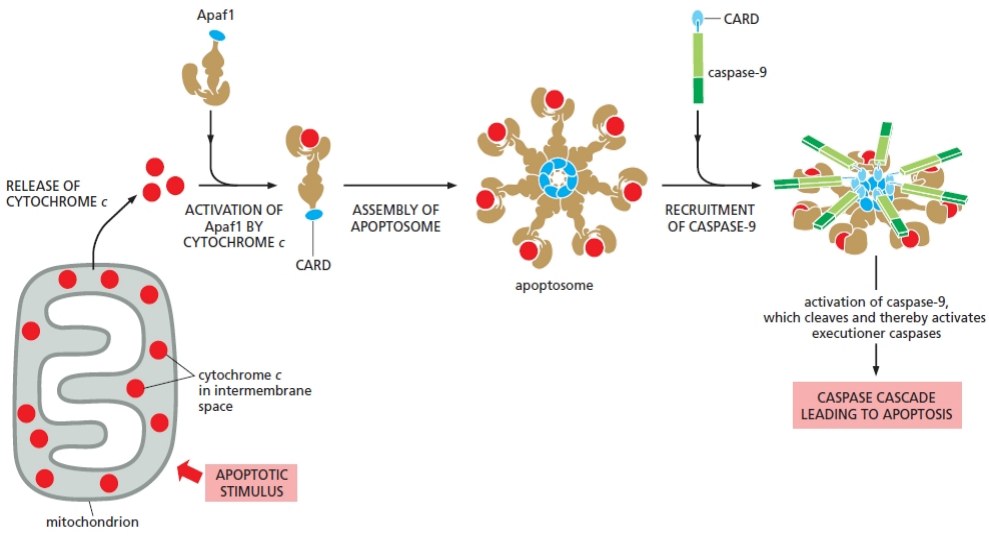
ويذكر أن العديد من الخلايا تنتج بروتينات تثبيطية تعمل على تجميد عمل المسار الخارجي، مثلاً تنتج بعض هذه الخلايا بروتين يدعى FLIP ويشبه الكازبيز البادئ لكنه لا يملك فعالية إنزيم البروتييز بسبب فقدانه للحامض الأميني السستين في الموقع الفعال، ويرتبط FLIP مع الكازبيز-8 ضمن معقد DISC، وبما أن الكازبيز-8 لا يكسر عند الموقع الضروري كي تكون فعاليته ثابتة، لذلك ينتج إقفال إشارة أو مسار الموت الخلوي المبرمج، وربما يكون هذا المسار مفيداً في منع الموت الخلوي المبرمج المعتمد على المسار الخارجي غير الصحيح أو غير المرغوب فيه.

2- المسار الداخلي Intrinsic pathway :

يمكن للخلية أن تنشط مسار الموت الخلوي المبرمج من داخل الخلية نفسها كاستجابة للإجهاد كما في الأذى غير القابل للإصلاح لـ DNA في خلايا الفقريات أو كإشارات نمو. هذه الاستجابة تدعى بالمسار الداخلي أو مسار المايتوكوندريا للموت الخلوي المبرمج، ويعتمد هذا المسار أساساً على تحرر بروتينات المايتوكوندريا إلى السايتوسول والتي تتواجد

طبيعياً داخل المايتوكوندريا فقط، بعض هذه البروتينات المحررة تنشط سلسلة تحلل البروتين بفعل الكازبيز في السايتوبلازم وتنتج في النهاية موت الخلية.

البروتين الرئيسي في المسار الداخلي هو السايتوكروم سي Cytochrome C وهو بروتين ذائب في الماء ويمثل جزء من سلسلة نقل الإلكترون في المايتوكوندريا، عندما يتحرر السايتوكروم سي إلى السايتوسول يقوم بمهمة جديدة هي ارتباطه مع بروتين تكيف يدعى Apaf1 (مختصر للعامل الأول المنشط لبروتييز الموت الخلوي المبرمج Apoptotic protease activity factor-1) هذا يدفع العامل Apaf1 للارتباط مع تركيب يشبه العجلة مكون من 7 أجزاء ويدعى بجسيم الموت الخلوي المبرمج Apoptosome، عامل Apaf1 ضمن هذا الجسيم توظف بروتين الكاينيز-9 البادئ الذي يعتقد أنه ينشط بتقارب أجزاء جسيم الموت الخلوي المبرمج بشكل مشابه لما يحدث بتنشيط الكازبيز-8 ضمن معقد DISC، عندها فإن جزيئات الكازبيز-9 المنشطة تنشط بدورها كازبيز التنفيذ لتحفيز موت الخلية (الشكل 17-7).



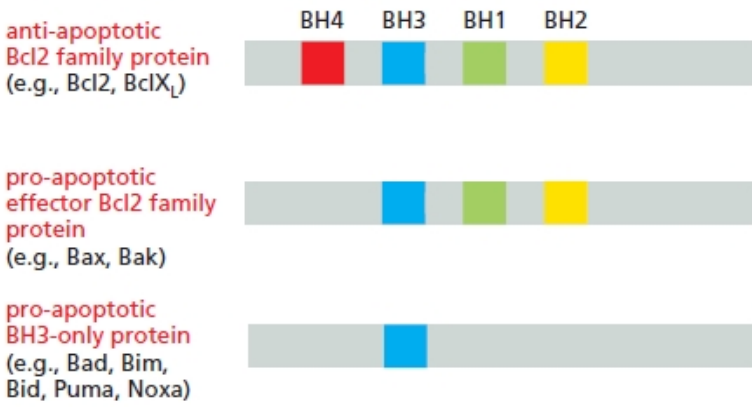
الشكل (17-7) المسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج

(مأخوذ من Alberts et al., 2015).

تنظيم المسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج :

المسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج ينظم بدقة كبيرة لضمان أن الخلية تقتل نفسها عندما يكون ذلك ضرورياً. أهم البروتينات المنظمة الداخل خلوية هي مجموعة بروتينات Bcl2 والتي تشبه مجموعة الكازبيز، وقد وجدت هذه البروتينات في معظم الكائنات من الديدان إلى الإنسان وبشكل محافظ على نفسه، فمثلاً بروتين Bcl2 من الإنسان يمكنه أن يثبط الموت الخلوي المبرمج في ديدان C. elegans.

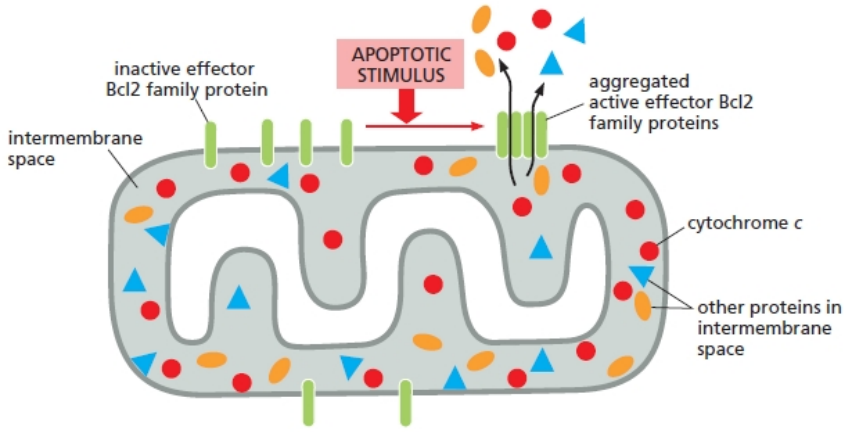
مجموعة Bcl2 في الثديات تقوم بمهامها في تنظيم المسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج من خلال السيطرة على تحرر السايتوكروم سي (وبروتينات المايتوكوندريا الأخرى) ، والمثير أن بعض أفراد مجموعة بروتينات Bcl2 تشجع الموت الخلوي المبرمج وتدعى حينها ما قبل-الموت الخلوي المبرمج Pro-apoptotic من خلال تشجيع تحرر وطرح بروتينات السايتوكروم سي، والبعض الآخر من مجموعة يروتينات Bcl2 تمنع تكرر السايتوكروم سي وتدعى بمضادات الموت الخلوي المبرمج Anti-apoptotic، ويمكن لبروتينات كلا النوعين (ما قبل- ومضاد- الموت الخلوي المبرمج) الارتباط مع بعضهما بارتباطات مختلفة لتكون معقدات ثنائية الأجزاء بحيث كل جزء يثبط عمل الجزء الآخر، والتوازن بين فعالية بروتينات النوعين يحدد هل الخلية تستمر بالحياة أم تموت بالمسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج. وتتضمن بروتينات مضاد- الموت الخلوي المبرمج بروتين Bcl2 نفسه و BclXL التي لها أجزاء تشبه أربعة أجزاء من Bcl2 (وتدعى مماثل Bcl2 ((Bcl2 homology(BH)) وهذه الأجزاء هي BH1-BH4 (الشكل 17-8) بينما بروتينات ما قبل-الموت الخلوي المبرمج فلها نوعين هما بروتينات Bcl2 الفاعلة Effector Bcl2 protein وبروتينات BH3 فقط BH3-only proteins. النوع الأول (الفاعل) فيه بروتينين مهمين هما Bax و Bak ويشبهان Bcl2 ولكن يفقدان جزء BH4، أما BH3 فله تركيب مماثل لـ Bcl2 في جزء BH3-only (الشكل 17-8).



الشكل (17-8) الأصناف الثلاث لبروتينات Bcl2.

آلية العمل :

عندما يحفز المسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج، فإن ما قبل-الموت الخلوي المبرمج الفاعل ينشط ويتجمع مكوناً أجزاء قليلة Oligomers على الغشاء الخارجي للمايتوكوندريا مما يحفز تحرر السايتوكروم سي وبروتينات أخرى في آلية لا زالت غير واضحة (الشكل 17-9).



الشكل (17-9) دور منشط ما قبل-الموت الخلوي المبرمج (Bax و Bak) في تحرير بروتينات داخل غشاء المايتوكوندريا في المسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

في الثديات فإن البروتينات الفاعلة هي Bax و Bak، وعلى الأقل يعد وجود أحدهما ضرورياً لبدء المسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج، إذ وجد أن حدوث طفرات في خلايا الفئران تسبب فقدان هذين البروتينين يؤدي ذلك إلى عدم استجابة هذه الخلايا لكل إشارات ما قبل-الموت الخلوي المبرمج التي تحفز طبيعيا المسار الداخلي. كما لوحظ أن Bak يكون مرتبط بالغشاء الخارجي للمايتوكوندريا حتى عند غياب إشارات الموت الخلوي المبرمج. بينما Bax يقع أساساً في السايتوسول ويتغير موقعه إلى المايتوكوندريا فقط بعد أن ينشط من قبل اشارة الموت الخلوي المبرمج. أما مضاد-الموت الخلوي المبرمج (مثل Bcl2 و BclXL) فهي تقع في الجزء الخارجي للغشاء الخلوي، وتمنع هذه البروتينات التحرر غير المرغوب فيه لبروتينات المايتوكوندريا، كما هذه البروتينات على تثبيط الموت الخلوي المبرمج من خلال ارتباطها مع بروتينات تثبيط ما قبل-الموت الخلوي المبرمج إما على غشاء المايتوكوندريا أو في السايتوسول، على غشاء المايتوكوندريا الخارجي فإنها ترتبط مع Bak وتمنع تكوينها الأجزاء القليلة Oligomers وبذلك تمنع تحرر بروتين السايتوكروم سي والبروتينات الأخرى، وهناك على الأقل 5 أنواع من بروتينات مضاد-الموت الخلوي المبرمج، وكل خلية في اللبائن تحتاج على الأقل واحدة من هذه البروتينات كي تستمر في الحياة.

بروتينات BH3-only تعد أكبر مجموعة ضمن Bcl2، الخلية يمكن أن تنشط هذه المجموعة كاستجابة لإشارة الموت الخلوي المبرمج ويعتقد أن هذه المجموعة من البروتينات تشجع الموت الخلوي المبرمج من خلال تثبيط عمل بروتينات مضاد-الموت الخلوي المبرمج. إذ أن جزء من BH3-only يرتبط مع الحيز الكبير النافر من الماء من بروتين مضاد-الموت الخلوي المبرمج وبذلك يعادل أو يثبط فعاليته، هذا الارتباط والتثبيط يسمح بتجمع Bax و Bak على سطح المايتوكوندريا، والذي يحفز تحرر بروتينات المايتوكوندريا التي تشجع الموت الخلوي المبرمج (الشكل 17-10). إن بروتينات BH3-only توفر ارتباط وثيق بين محفزات الموت الخلوي المبرمج والمسار الداخلي مع وجود محفزات مختلفة تنشط أنواع مختلفة من بروتينات BH3-only، فمثلاً بعض اشارات الحياة الخارجية تثبط الموت الخلوي المبرمج من خلال تثبيط تصنيع أو تفعيل بعض أنواع بروتينات BH3-only (الشكل 17-b10)، مثال آخر عند حدوث أذى لـ DNA لا يمكن اصلاحه فإن البروتين الكابح للأورام من نوع p53 يتجمع وينشط تعبير الجينات Puma و Noxa التي تعبر لبروتينات BH3-only، هذه

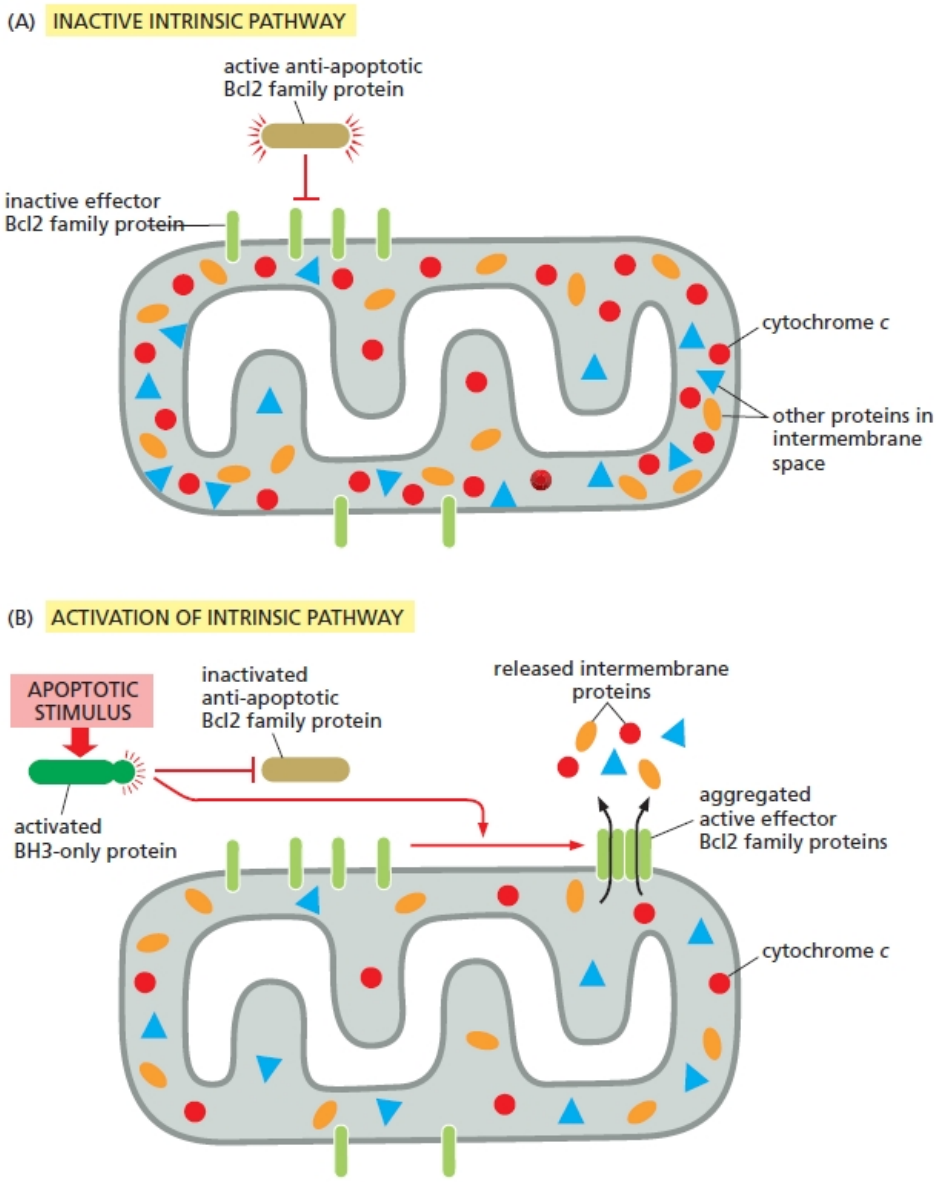
البروتينات تحفز المسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج وبذلك يتم التخلص من خلية خطرة ربما تكون سرطانية.

في بعض أنواع الخلايا فإن المسار الخارجي للموت الخلوي المبرمج يوظف المسار الداخلي لتضخيم أحداث الكازبيز لقتل الخلية، ويبدو أن أحد بروتينات BH3-only وهو Bid ربما يكون الرابط بين المسارين الداخلي والخارجي للموت الخلوي المبرمج، ويكون بروتين Bid غير نشط طبيعياً، وعندما تنشط مستقبلات الموت في بعض الخلايا وتحفز المسار الخارجي، فإن الكازبيز البادئ (الكازبيز-8) يشطر Bid مما ينتج Bid فعال يغير موقعه إلى الغشاء الخارجي للمايتوكوندريا ويثبط بروتينات مضاد-الموت الخلوي المبرمج، وبذلك يضخم إشارة الموت.

مثبطات الموت الخلوي المبرمج :

لكون تنشيط أحداث الكازبيز يسبب موت الخلية، لذلك فإن الخلية توظف العديد من الآليات التي تضمن أن هذا البروتين ينشط فقط في الوقت الصحيح، أحد هذه الآليات الدفاعية ضد الموت الخلوي المبرمج هي مثبطات الموت الخلوي المبرمج Inhibitors of apoptosis (IAPs) واكتشفت هذه البروتينات لأول مرة في فيروسات تصيب الحشرات (فيروسات من نوع باكيولوفيروس baculoviruses)، إذ أن بروتينات IAPs الفيروسية تمنع الخلية المضيفة المصابة بالفيروس من قتل نفسها بالموت الخلوي المبرمج، واليوم قد ثبت بالتجربة وجود IAPs في معظم الخلايا الحيوانية. تملك جميع IAPs واحد أو أكثر من BIR (مكررات IAPs للباكيولوفيروس baculovirus IAPs repeats) والتي تسهل ارتباطها بالكازبيز النشط ومن ثم تثبيط هذا الكازبيز، كما أن بعض IAPs تعمل على تعليم الكازبيز لغرض تحطيمها بفعل Proteasomes.

في ذبابة الفاكهة الحاجز الثبيطي الذي توفره IAPs يمكن أن يقابل ببروتينات متخصصة مضادة لـ IAPs (Anti-IAPs proteins) والتي تنتج كاستجابة للعديد من محفزات الموت الخلوي المبرمج، ويبدو أن التوازن بين IAPs و Anti-IAPs ينظم بشكل كبير للسيطرة على الموت الخلوي المبرمج في هذه الحشرة.

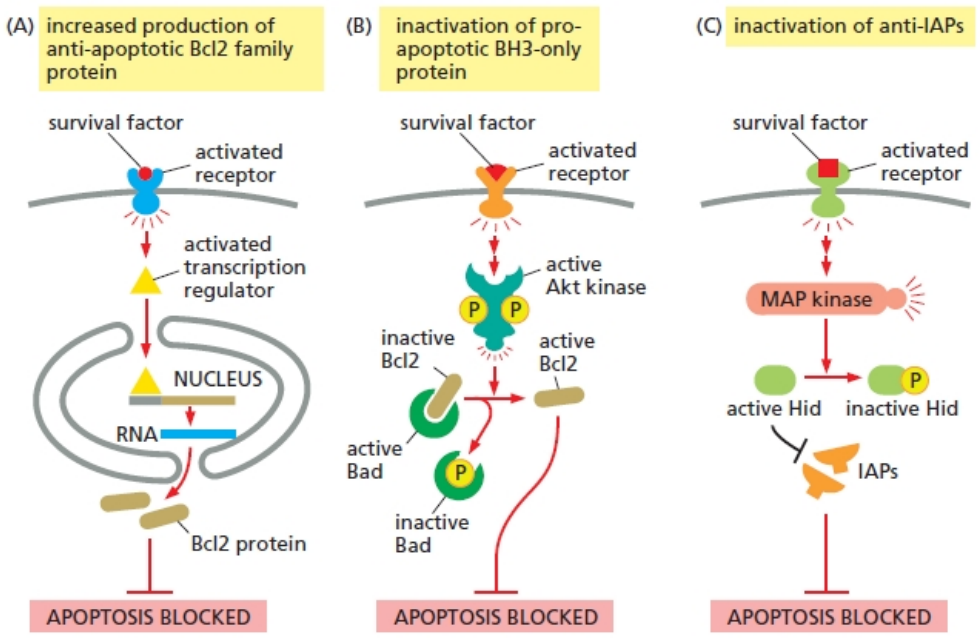


الشكل (10-17) آلية عمل ما قبل الموت الخلوي المبرمج (بروتينات BH3-only وبروتينات مضاد الموت الخلوي المبرمج (بروتينات Bcl2) في تنظيم المسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج. A في حال غياب محفز الموت الخلوي المبرمج. B في حال وجود محفز الموت الخلوي المبرمج (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

أما في اللبائن فإن دور IAPs و Anti-IAPs فلازالت غير واضحة، إذ أن Anti-IAPs تحرر من المايتوكوندريا عند تنشيط المسار الداخلي للموت الخلوي المبرمج، وتعمل على إقفال IAPs في السايتوسول وبذلك تشجع موت الخلية، ولوحظ أن الفئران بإمكانها أن تنمو بشكل طبيعي عند فقدانها لـ IAPs اللبائن الرئيسي (والذي يدعى XIAP)، أو فقدان Anti-IAPs (والمعروف في اللبائن منها اثنان هما Smac/Diablo و omi)، أما الديدان فلا تملك أصلاً بروتينات IAPs المثبطة للكازبيز مما يدل على أن الحيوانات المختلفة تعتمد على آليات مختلفة في السيطرة على فعالية الكازبيز.

عوامل الحياة والموت الخلوي المبرمج :

كما أوضحنا في فصل الإشارات الخلوية (الفصل 4) فإن هذه الإشارات الخارج خلوية تنظم معظم الفعاليات لخلايا الحيوان ومنها الموت الخلوي المبرمج. الإشارات الخارج خلوية هي جزء من نظام عام ينظم ويضمن أن الخلية المعينة "عنصر صالح" ضمن الكائن الحي وذلك بإبقائها حية طالما لزم ذلك وقتلها عند الحاجة لذلك، وكما ذكرنا فإن بعض الاشارات تحفز الموت الخلوي المبرمج والبعض الآخر من هذه الإشارات تثبط الموت الخلوي المبرمج، وتسمى هذه الأخيرة بعوامل البقاء أو الحياة Survival factors، إذ أن معظم خلايا الحيوان تحتاج إشارات مستمرة من الخلايا الأخرى لتجنب الموت الخلوي المبرمج، وتضمن هذه الإشارات بقاء الخلية على قيد الحياة في المكان المناسب والفترة الزمنية المطلوبة، ويبدو أن كمية وتوازن عوامل الحياة تساهم في إبقاء الأنسجة وعدد الخلايا بشكل متوازن خلال فترة النمو وكذلك في الفرد البالغ كما هو الحال مع الخلايا العصبية (الشكل 17-11)، وترتبط عوامل الحياة مع مستقبلات سطح الخلية والذي ينشط مسارات إشارة داخل خلوية والتي تثبط أحداث الموت الخلوي المبرمج من خلال تنظيم عمل بروتينات مجموعة Bcl2، كما وجد أن بعض عوامل الحياة تنشط بتصنيع بروتينات مضاد-الموت الخلوي المبرمج مثل Bcl2 و BclXL، البعض الآخر من عوامل الحياة تعمل من خلال تثبيطها وظائف بروتينات BH3-only (مثل Bad).



الشكل (17-11) ثلاث طرق لتثبيط الموت الخلوي المبرمج من خلال عوامل الحياة. (A) تنشيط تعبير الجينات المشفرة لمضاد-الموت الخلوي المبرمج (بروتينات Bcl2 و BclXL). (B) إزالة تنشيط بروتينات BH3-only. (C) إزالة تنشيط IAPs (ذبابة الفاكهة) (مأخوذ من Alberts et al., 2015).

مصير الخلية بعد الموت الخلوي المبرمج :

الخلية التي تموت بالموت الخلوي المبرمج وأجزائها لا تترك أو يسمح لها بتحرر مكوناتها بل تبقى لحين التهامها من قبل الخلايا المجاورة التي لا تترك أي أثر للخلية الميتة وبذلك لا يحدث تحفيز للعملية الالتهابية، وتعتمد عملية الالتهام على تغييرات كيميائية على سطح الخلية التي ماتت بالموت الخلوي المبرمج، وتطلق إشارات تشجع الالتهام الخلوي، ومن أهم هذه التغييرات الكيميائية هو تغيير في توزيع الإشارة السالبة للشحوم الفوسفاتية من نوع الفوسفاتيديل سيرين Phosphatidylserine المشحونة بالشحنة السالبة. في الخلايا السوية تقع هذه الشحوم الفوسفاتية في الجهة الداخلية من الشحوم ثنائية الطبقة في الغشاء الخلوي،

لكنها تنقلب إلى السطح الخارجي في الخلايا التي عانت من الموت الخلوي المبرمج، ويعتقد أن أنواع مختلفة من بروتينات ذائبة تعمل كجسور مع الفوسفاتيديل سيرين الذي يبرز من الغشاء الخلوي، هذه البروتينات التي تعمل كجسر تتفاعل أيضاً مع مستقبلات متخصصة على سطح الخلايا المجاورة (أو على سطح البلاعم الكبيرة) مما تشجع في عملية الالتهام. أما سبب عدم التهام الخلايا السليمة من قبل البلاعم الكبيرة حتى عند وجود بعض الفوسفاتيديل سيرين على سطح الغشاء الخلوي فيعتقد أن الخلايا السليمة تفرز بروتينات اشارة على سطحها ترتبط مع مستقبلات تثبيط الالتهام على سطح البلاعم الكبيرة، لذلك فإن الخلية التي ماتت بالموت الخلوي المبرمج يجب أن تقدر على إزالة فعالية هذه الإشارات البروتينية التي توجه رسالة إلى الخلايا المبطنة مفادها "لا تلتهمني Don't eat me" فضلاً عن ظهور الفوسفاتيديل سيرين على سطح الغشاء الخلوي.

الموت الخلوي المبرمج والأمراض :

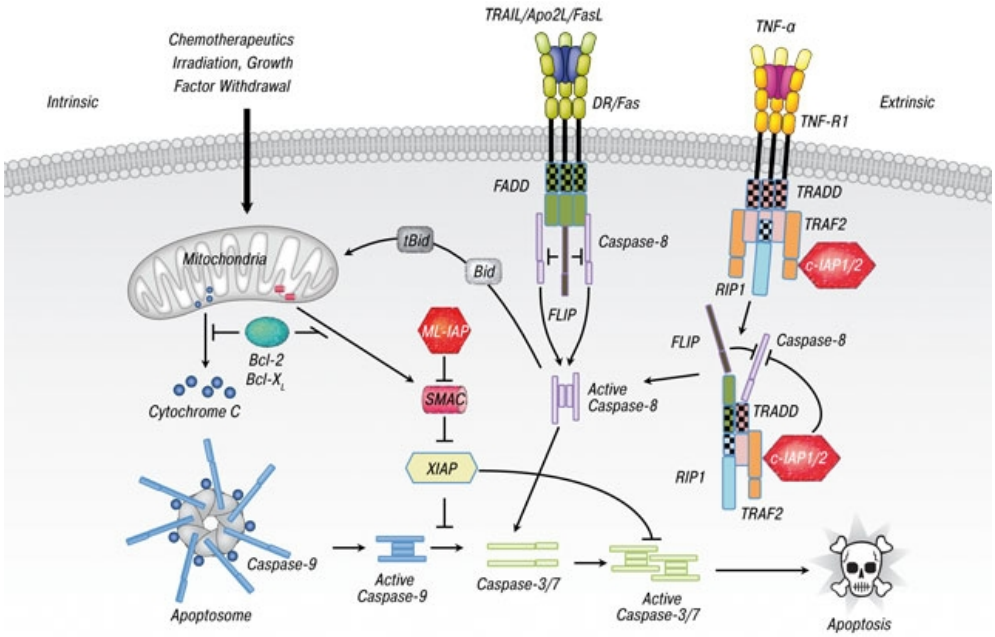
هناك العديد من الأمراض في الإنسان والحيوان التي تعمل على زيادة أو تقليل الموت الخلوي المبرمج وعلى سبيل المثال لا الحصر النوبة القلبية Heart attack والجلطات الدماغية Strokes، إذ في هذه الحالات الحادة يموت عدد كبير من الخلايا بالنخر Necrosis بسبب قلة التجهيز الدموي Ischemia ولكن هناك عدد من الخلايا الأخرى التي تموت بالموت الخلوي المبرمج، ويأمل العلماء إلى أن المثبطات المتخصصة للموت الخلوي المبرمج ربما سيساهم في تحسين هذه الحالات في المستقبل.

من جهة أخرى فإن تقليل الموت الخلوي المبرمج يسبب مشاكل كبيرة للكائن الحي، فمثلاً وجود الطفرات في الجينات المشفرة لمستقبل الموت فاز Fas يمنع الموت الخلوي المبرمج لبعض الخلايا اللمفية (في الإنسان والفئران) مما يسبب في تجمع هذه الخلايا في الطحال والغدد اللمفية، وغالباً ما يؤدي ذلك إلى أمراض ذاتية المناعة Autoimmune diseases.

كما أن انخفاض معدل الموت الخلوي المبرمج قد لوحظ في العديد من أنواع الأورام، إذ أن الخلية السرطانية تنظم موتها الخلوي المبرمج بشكل غير طبيعي وبما يناسبها للهروب من هذا الخط الدفاعي للجسم بالتخلص من الخلايا غير السوية، فمثلاً جين Bcl2 اكتشف لأول

مرة في النوع الشائع من سرطان الخلايا اللمفية في الإنسان، إذ أن تغيير موقع الكروموسوم يؤدي إلى إنتاج كميات إضافية من بروتين Bcl2، ومن هنا أخذ Bcl2 اسمه (ورم الخلية اللمفية البائية B cell lymphoma)، المستوى العالي من بروتين Bcl2 في الخلايا اللمفية التي تحمل كروموسومات قد تغير موقعها تشجع تكون السرطان من خلال تثبيط الموت الخلوي المبرمج عن طريق إطالة عمر الخلية اللمفية وزيادة عددها، كما أنها تقلل من استجابة الخلية اللمفية للأدوية المضادة للسرطان (إذ تعمل الكثير من هذه الأدوية على تشجيع الموت الخلوي المبرمج للخلية السرطانية)، يماثل ذلك وجود طفرة للجين المشفر لبروتين p53 في 50٪ من جميع أنواع السرطانات في الإنسان (p53 بروتين مضاد للسرطان)، لذلك لا تعاني هذه الخلايا الموت الخلوي المبرمج أو توقف دورة الخلية بسبب وجود أذى في DNA، لذلك فإن فقدان وظيفة p53 يمكن الخلية السرطانية من البقاء على قيد الحياة والتكاثر حتى بوجود أذى كبير في DNA، وينتج عن ذلك خلايا يتراكم فيها المزيد من الطفرات والبعض من هذه الطفرات تزيد من خباثة Malignancy الخلية السرطانية.

الكثير من الأدوية المضادة للسرطانات تحفز الموت الخلوي المبرمج وتوقف دورة الخلية عن طريق آليات تعتمد على p53، لذلك فإن فقدان وظيفة p53 يقلل من فائدة وكفاءة هذه الأدوية، ولازالت التجارب والبحوث متواصلة في المراكز العالمية المتخصصة في دراسة بيولوجيا الخلية السرطانية وعلاجها وتحاول هذه الجهود في إيقاف تضاعف الخلية السرطانية وإجبارها على الموت الخلوي المبرمج من خلال آليات منوعة ضمن المسارات التي تم شرح البعض منها بإيجاز في هذا الفصل، والموضوع فيه الكثير من التعقيد والتفصيلات ولمن أراد المزيد الرجوع إلى المصادر الموثوقة. ويوضح الشكل (17–12) مسارات الموت الخلوي المبرمج بشكل عام.



الشكل (12-17) مسارات الموت الخلوي المبرمج وتداخلاتها

أهم المراجع :

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. **Molecular Biology of the Cell.** 6th Edition. (2015). Garland Science.

Braig M, Schmitt CA (2006). **"Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development".** *Cancer Res.* 66 (6): 2881–4.

David A. Gewirtz, Shawn E. Holt, Steven Grant Commonwealth, Richmond, VA Green, Douglas. **Apoptosis, Senescence, and Cancer.** (2011). Means to an End: Apoptosis and other Cell Death Mechanisms. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW (2006). **"Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins".** *Biochim. Biophys. Acta.* 1762 (2): 191–201.

Fesik SW, Shi Y (2001). **"Controlling the caspases".** *Science.* 294 (5546): 1477–8.

Gerard P. Zambetti. **The p53 Tumor Suppressor Pathway and Cancer.** (2005). Springer Science Business Media, Inc.

Green DR (1998). **"Apoptotic pathways: the roads to ruin".** *Cell.* 94 (6): 695–8.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.** 9th ed. (2014). Elsiever.

Savill J, Gregory C, Haslett C. (2003). **"Eat me or die".** *Science.* 302 (5650): 1516–7.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N (1999). **"Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor".** *Nature.* 397 (6718): 441–6.

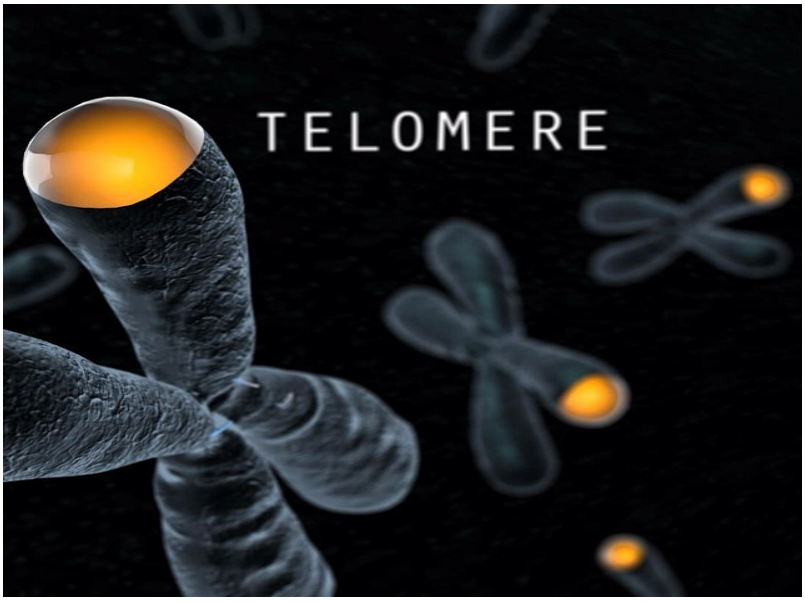
Thompson, CB (1995). "**Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease".** *Science.* 267 (5203): 1456–62.

Wajant H (2002). **"The Fas signaling pathway: more than a paradigm".** *Science.* 296 (5573): 1635–6.

الفصل الثامن عشر

التيلومير والتيلوميريز

Telomere and Telomerase



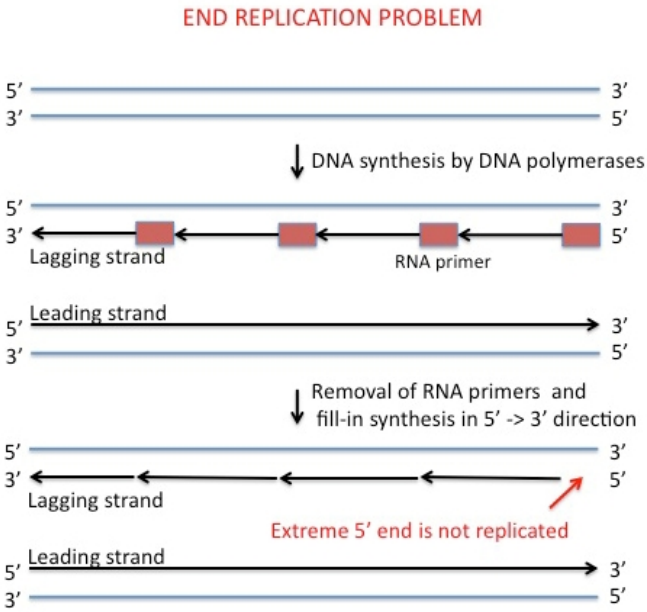
الفصل الثامن عشر

التيلوميز والتيلوميريز
Telomere and Telomerase

في ثلاثينيات القرن الماضي أثبت كل من Muller و Barbara McClintock وبشكل منفصل أن نهايات الكروموسومات الخيطية لها تركيب متخصص تختلف عن النهايات الناتجة عن تكسير الكروموسوم وأطلق عليه أسم التيلومير Telomere وتعني الجزء أو القطعة الطرفية. وتمتلك هذه النهاية المتخصصة صفات معينة تمنع التصاق نهايات الكروموسومات مع بعضها (عكس ما يحدث مع النهايات الناتجة من تكسر الكروموسوم فتميل للالتصاق مع بعضها لذلك تدعى باللزجة Sticky). والتيلومير عبارة عن تسلسلات من DNA وبروتينات متخصصة مرافقة لها، هذه المكررات تكون غنية بالنيوكليوتيدات من نوع الثايمين والكوانين لذلك تدعى GT-rich repeats وتكتب عادةً n(TTAGGG) في الانسان والفقريات الأخرى، مع وجود بروز أحادي الخيط من النهاية 3' (-3' Single stranded end overhang).

تضاعف الكروموسوم الخيطي (وليس الحلقي) يواجه مشكلة من نوع خاص للخلية، وقد لوحظت هذه المشكلة من قبل كل من Watson و Olivnikov كلٌ على حدا، إذ افترضا

أن هناك فقدان مستمر لـ DNA من نهايات الكروموسوم باستمرار الانقسام الخلوي والسبب في ذلك أن انزيم البلمرة DNAP لا يمكنه مضاعفة الخيط المتقطع Lagging strand في النهاية '3 للكروموسومات الخيطية وسمي ذلك بمشكلة تضاعف النهاية The end replication problem (الشكل 18-1) ، ويلاحظ نقصان طول التيلومير خارج الجسم في الوسط الخلوي، وداخل الجسم بتقدم عمر الكائن.



الشكل (18-1) مشكلة تضاعف النهاية في الخلايا حقيقية النواة

الخلايا السوية في اللبائن تنقسم لمرات محددة خارج الجسم، العدد الأكبر لهذا الانقسام الخلوي يدعى بمحدد هايفليك Hayflick limit، ويعتقد أن هذا المحدد يعمل كساعة جزيئية في الخلايا السوية في الثديات تسيطر على تضاعف الخلية، وعند الوصول إلى محدد هايفلك فإن واحدة أو أكثر من التيلومير التي أصبحت قصيرة كفايةً تحفز توقف الخلية الدائمي والذي يعرف بشيخوخة التضاعف Replicative senescence، أما الخلايا التي بإمكانها الهروب من هذه النقطة من خلال إزالة تنشيط الجينات المشفرة لبروتينات تفتيش

(سيطرة) دورة الخلية مثل p53، فإنها تستمر في الانقسام وتفقد المزيد من التيلومير إلى أن تصل إلى نقطة السيطرة الثانية، والتي تمتاز بتحفيز موت الخلية من قبل التيلومير القصير جداً. أما الخلايا التي بإمكانها الهروب من نقطة التفتيش الثانية بإمكانها الإبقاء على طول التيلومير غالباً من خلال نشاط الإنزيم المكون للتيلومير والذي يدعى بالتيلوميريز Telomerase.

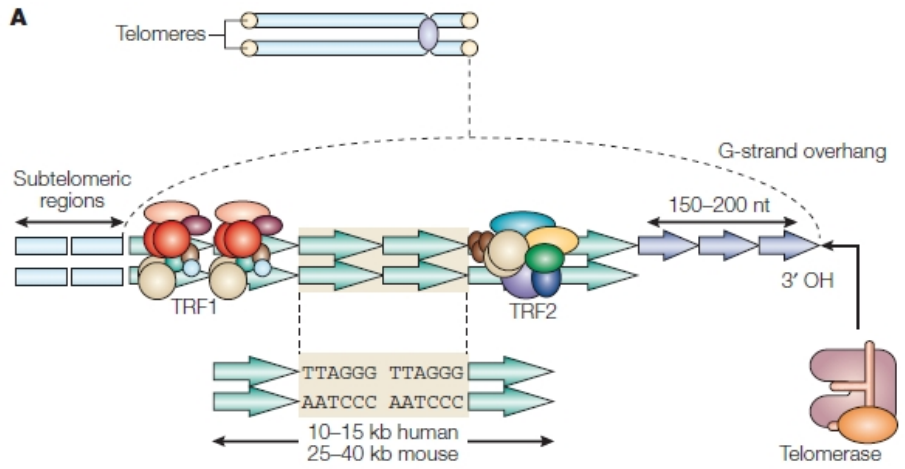
وظائف التيلومير :

يساهم التيلومير في العديد من الوظائف الحيوية الأساسية :

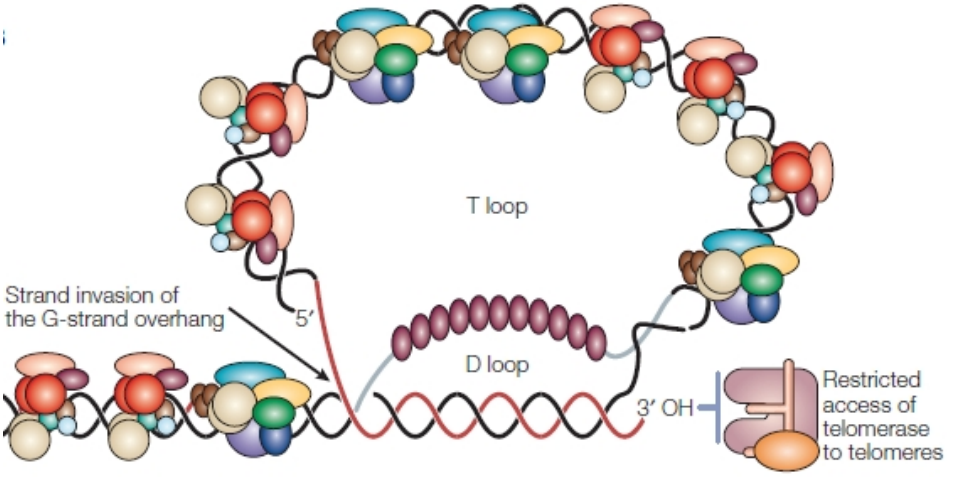
1- تحمي نهايات الكروموسومات من إعادة الربط Recombination، ربط نهاية مع نهاية، والتعرف على DNA المتأذية.
2- توفر تضاعف متكامل للكروموسوم.
3- تساهم في تنظيم التعبير الجيني.
4- لها دور في الترتيب الوظيفي للكروموسومات ضمن النواة.
5- تعمل كساعة بيولوجية جزيئية تسيطر على قابلية الانقسام الخلوي ودخوله في مرحلة الشيخوخة.

تركيب التيلومير :

تعد منطقة التيلومير ضمن الكروموسوم منطقة غير غنية بالجينات وتقع قربها منطقة غنية بالجينات تدعى ما تحت التيلومير Subtelomeric region (الشكل 18-2)، ويكون طولها حوالي 10-15 ألف زوج من القواعد في الإنسان و 20-25 ألف زوج من القواعد في الفئران. أهم البروتينات المرتبطة معها هي عوامل ارتباط بمكررات التيلومير Telomere repeat binding factors (TRF) وتختصر أيضاً (TERF)، وهي نوعان TRF1 و TRF2 (TERF1 و TERF2) وترتبط هذه البروتينات مباشرة مع مكررات التيلومير TTAGGG، وكذلك عوامل وبروتينات أخرى مكوناً معقد بروتيني كبير، كما يتميز التيلومير كما ذكرنا سابقاً بوجود خيط أحادي بارز أو متدلي غني بالنيوكليوتيد الكوانين G (الشكل 18-3)،



الشكل (18-2) تركيب التيلوميز في اللبائن (مأخوذ من Blasco et al., 1997).



الشكل (18-3) التيلوميز في تركيب العروة تي T loop

هذا الخيط البارز يمكن أن ينطوي على نفسه ويزدوج مع TTAGGG ثنائية الخيط مكوناً عروة تيلوميز كبيرة تدعى العروة تي T loop (الشكل 18-3)، ويعتقد أن هذا التركيب يعمل على توفير الحماية لنهاية الكروموسوم وربما تعمل كتركيب لتكامل عمل كل من التيلوميز وانزيم التيلوميريز.

فقدان الحماية من قبل التيلومير ربما يحدث أما بسبب فقدان مكررات TTAGGG أو عوامل الارتباط بالتيلومير، وهذا يؤدي إلى التحام نهايات الكروموسومات مما ينتج في نهاية الأمر بفقدان الخلية لحيويتها، ويعمل إنزيم التيلوميريز على منع فقدان مكررات TTAGGG ومنع حدوث القصر في طولها إلى تلك النقطة الحرجة لحياة الخلية. فضلاً عما ذكر فإن بحوث عديدة تؤكد ارتباط ترتيبات معينة من النيوكليوسوم Nucleosome arrays مع التيلومير، هذه التراكيب تحوي الهستونات التي تكون تحت سيطرة التحوير الجيني المتخصصة، وهذا يكون مميزاً للكروماتين المغاير التركيبي ويشير هذا إلى مستوى عالي ومميز من التنظيم لطول وتركيب التيلومير. ويوجد الكروماتين المغاير التركيبي Constitutive heterochromatin في المناطق غير الفعالة من ناحية الاستنساخ ضمن الجينوم (تدعى أحياناً بالمناطق الصامتة من مكررات DNA)، كما يتميز التيلومير بكونه مهيأ لارتباط بروتينات وعوامل متخصصة مختلفة (الجدول 18-1) ومن هذه العوامل:

1- بروتين الكروماتين المغاير-1 Heterochromatin protein 1 (HP1) وأهم نوع فيه HP1α والذي يعرف أيضاً بمماثل بروتين صندوق الكروموسوم Chromobox protein homologue 5 (CBX5) وكذلك HP1β و HP1γ.

2- مستويات عالية من هستونات ثلاثية المثيلة عند اللايسين-9 (Histone 3 trimethylated at lysine 9 (H3-K9))، و هستونات ثلاثية المثيلة عند اللايسين-20 (H3-K20).

3- الهستونات المحورة من قبل كابح مماثل النقش Suppressor of variegation 3-9 homologue (SUV3-9H) وكذلك (SUV4-20H).

4- ناقلات مثيل الهستون Histone methyltransferases (HMTases). (الشكل 18-4) والجدول 1.

وحديثاً تم إثبات أن بروتينات Retinoblastoma من نوع RB1 والمشابه له من نوع RBL1 و RBL2 تحتاج للمثيلة الثلاثية لـ H4-K20 في كل من التيلومير والسنترومير (وبروتينات Retinoblastoma هي تلك البروتينات التي تعاني من وجود الطفرات في كثير من سرطانات الإنسان)،

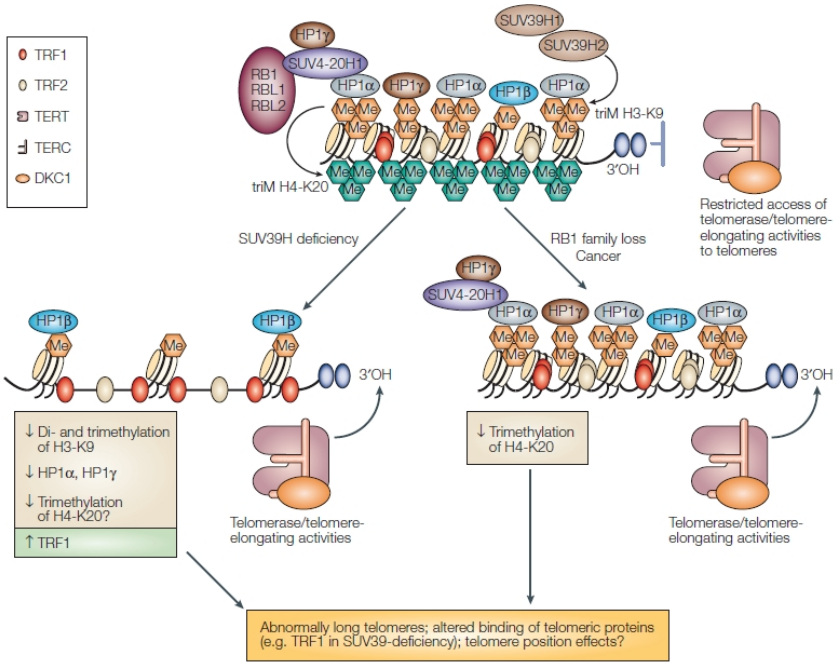
الجدول (18-1) مكونات التيلومير في اللبائن (مأخوذ من Blasco et al., 1997).

المكون	الوظيفة
منظمات الكروماتين	
HP1α و HP1β و HP1γ	تنظيم التيلومير
SUV39H1/H2	تنظيم التيلومير
RB1/RBL1/RBL2	تنظيم التيلومير
Trimethylated H3-K9	تنظيم التيلومير
Trimethylated H4-K20	تنظيم التيلومير
البروتينات المرتبطة بالتيلومير	
RF1	تنظيم التيلومير
RF2	تنظيم التيلومير، إصلاح DNA
POT1	تنظيم التيلومير
TIN2	تنظيم التيلومير، الكروماتين المغاير
TANK1	تنظيم التيلومير، التصاق الكروماتيد
TANK2 و PTOP و RAP1	تنظيم التيلومير
بروتينات إصلاح DNA	
KU70/86 و DNA-PKcs	تنظيم التيلومير
MRE11/NBS1/RAD50	تنظيم التيلومير
PARP2	تنظيم التيلومير
WRN و BLM	تنظيم التيلومير
ATM	تنظيم التيلومير، الاستجابة لأذى DNA
ERCC1/XPF	تنظيم التيلومير، اصلاح ازالة النيوكليوتيد
RAD54	تنظيم التيلومير
RAD51D	تنظيم التيلومير
XRCC3	تنظيم التيلومير

المكون	الوظيفة
MMR genes	اعادة الربط عند التيلومير
FANC genes	تنظيم التيلومير؟
مكونات التيلوميريز	
TERC	المحافظة على طول التيلومير
TERT	المحافظة على طول التيلومير
DKC1	المحافظة على طول التيلومير

المختصرات الواردة في الجدول :

ATLD, ataxia telangiectasia-like disorder; ATM, ataxia telangiectasia mutated; BLM, Bloom syndrome; DKC1, dyskeratosis congenita 1, dyskerin; DNA-PKcs, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit; ERCC1, excision repair cross-complementing 1; FANC, Fanconi anaemia complementation group; H3-K9, histone 3 at lysine 9; H4-K20, histone 4 at lysine 20; HP1α/β/γ, heterochromatin protein 1, α-, β- and γ-isoform; KO, knockout; KU70/86, *Ku* antigen protein 70 and 86; MMR, mismatch repair; MRE11, meiotic recombination 11; NBS, Nijmegen breakage syndrome; NER, nucleotide excision repair; PARP2, poly(ADP-ribose) polymerase family 2; POT1, protection of telomeres 1; PTOP, POT1 and TIN2 organizing protein; RAD50/51D/54, DNA repair protein 50, 51D and 54; RAP1, repressor/activator protein 1; RB1, retinoblastoma 1; RBL1/2, retinoblastoma-like 1 and 2; SUV39H1/2, suppressor of variegation 3-9 homologue 1 and 2; TANK1/2, tankyrase 1 and 2; TERC, telomerase RNA component; TERT, telomerase reverse transcriptase; TIN2, TRF1-interacting nuclear factor 2; TRF1/2, telomere repeat binding factor 1 and 2; WRN, Werner syndrome; XRCC3, X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3; ↓, decreased; ↑, increased.



الشكل (4-18) التنظيم فوق الجيني للتيلومير (مأخوذ من Blasco et al., 1997).

وبغياب مجموعة بروتينات RB فإن تحويرات الهستونات أعلاه تزال بسرعة وعليه يمكن أن تتفاعل هذه التحويرات مباشرة مع SUV4-20H و HMTases موفرةً بذلك آلية تسمح لمجموعة RB في المساهمة في تجمع مكونات الكروماتين المغاير للتيلومير ولمنطقة قرب السنترومير (الشكل 18-4). وربما تشير هذه الدلائل إلى أن مجموعة بروتينات RB تدخل في تنظيم انفصال أو انعزال الكروموسومات (السنترومير) وحماية نهاية الكروموسومات (التيلومير) فضلاً عن مساهمتها في عملية الانقسام الخلوي.

من جانب آخر وجد أن تغيير تركيب وطول التيلومير ربما يساهم في تصميت جينات تقع مجاورة للتيلومير، وتعرف هذه الظاهرة بتأثير موقع التيلومير، وتلاحظ في خلايا كل من الخمائر واللبائن. ففي خلايا اللبائن استطالة التيلومير بسبب إضافة قطع من قبل إنزيم التيلوميريز تؤدي إلى تثبيط استنساخ جينات معينة تقع بالقرب من التيلومير، ويعتقد أن هذا التأثير ينتج من تحفيز كروماتين أكثر صلادة أو تثبيطي عند التيلومير والذي يؤثر على المنطقة المجاورة له، ويؤكد هذه الفرضية أن المواد التي تغير من تركيب الكروماتين (تجعله في حالة أقل صلادة) تزيد من تعبير الجينات قرب التيلومير.

دور البروتينات المرتبطة بالتيلومير:

كما ذكرنا أعلاه فإن عدد كبير من البروتينات والعوامل ترتبط مع التيلومير وتنظم طوله ووظائفه، ويكوّن TRF1 معقد متعدد البروتينات ويتكون من العامل النووي 2 المتفاعل مع TRF1 (TRF1-interacting nuclear factor 2 (TIN2)) وتختصر أيضاً بـ TINF1، وانزيم Tankyrase 1 and 2 (يختصر بـ TANK1 و TANK2) وإنزيم الرايبوسايليز متعدد (ADP) (Poly(ADP)-ribosylase)، وحماية التيلومير Protection of telomeres-1 ومختصره (POT1) والبروتين المنشط/ الكابح (Repressor/activator protein 1) ويختصر بـ (PAR1) ويعرف أيضاً بـ TERFZIP.

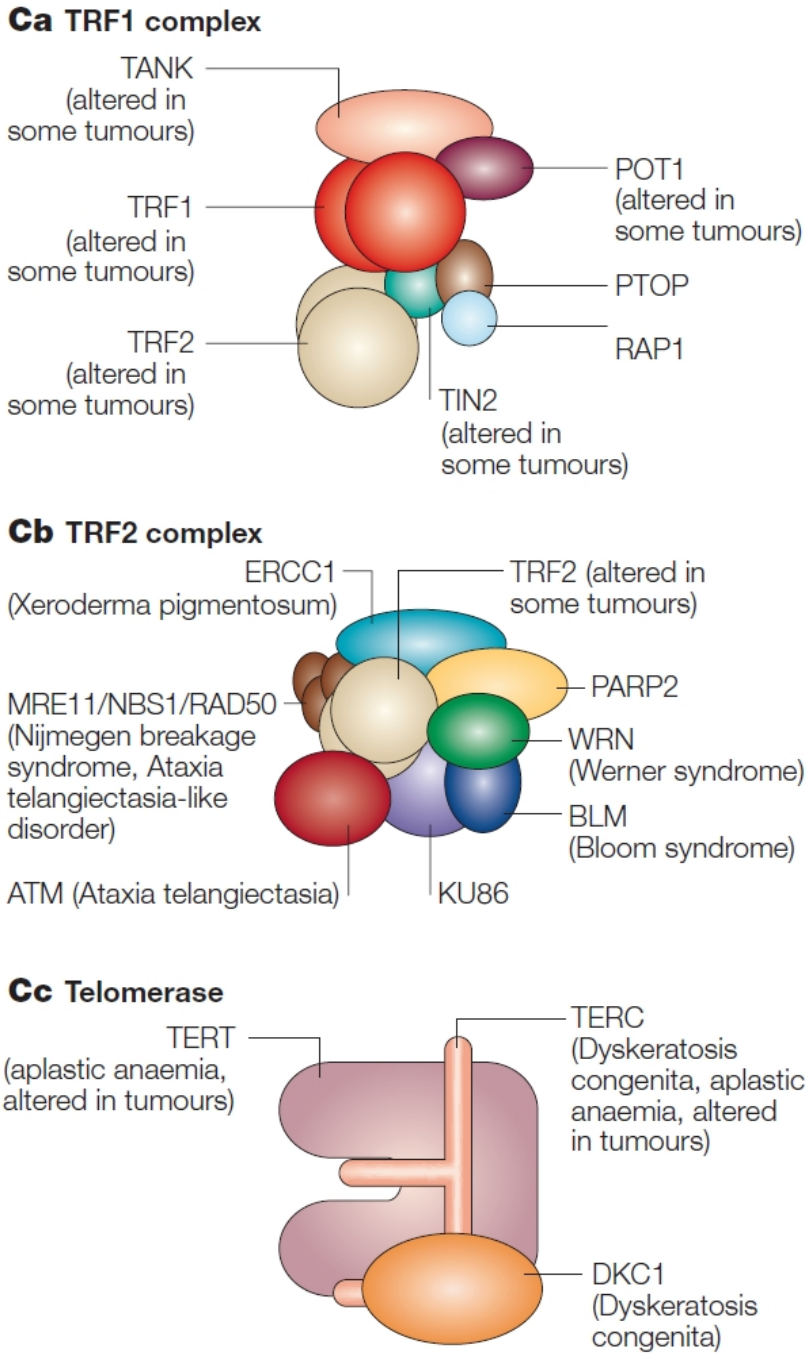
يقوم POT1 و TIN2 بتنظيم عمل بروتين هو PTOP ويعرف أيضاً بمماثل خلل تنسج قشرة الكظر Adrenocortical dysplasia homologue (ACD)، وبروتين TRF2 (من خلال تفاعلها مع TIN2) (الشكل 18-5)، أما TIN2 فإنها تعدل عملية Ribosylation

متعدد ADP المعتمد على TANK1 لـ TRF1، بحيث يغير من ارتباط TRF1 مع مكررات TTAGGG، ويعتقد أن كل هذا ينظم طول التيلومير من خلال تنظيم ارتباط إنزيم التيلوميريز مع التيلومير. كما أن معقد TRF1 ينظم طول التيلومير من خلال بروتين POT1 الذي يرتبط مع الخيط المنفرد للتيلومير والبروتين المتداخل معه (PTOP) وكلا البروتينين (POT1 و PTOP) يعتقد إنهما ينظمان عمل التيلوميريز على التيلومير.

فضلاً عما ذكر أعلاه، فإن الباحثين يعتقدون أن TRF1 له وظائف تتعدى تنظيم تركيب ووظيفة التيلومير، إذ وجد أن فقدان جين Trf1 يسبب الموت في الفترة الجنينية في الفئران، وربما يعزى السبب إلى البروتين التنظيمي لـ TRF1 الذي هو TANK1 والضروري لانفصال تيلوميرات الكروماتيدات الشقيقة خلال الانقسام الخلوي Mitosis والذي يثبت أهمية هذا البروتين في الانقسام الخلوي. تعبير الجينات المشفرة لـ TRF1 و TRF2 و TIN2 و POT1 و TANK1 تتغير في بعض أنواع الأورام في الإنسان وتبقى الآلية التفصيلية غير واضحة حول كيفية تحول هذه البروتينات إلى مولدة للأورام.

بروتين TRF2 :

إن معقد TRF2 له دور أساسي في حماية بروز الخيط المنفرد للتيلومير والغني بالنيوكليوتيد G من التحطم وكذلك من فعالية أنظمة إصلاح DNA وبذلك تمنع من التحام نهايات الكروموسومات، والمثير أن عدد من بروتينات إصلاح DNA التي تدخل في عمليات ومسارات الاصلاح تتموضع على التيلومير (الجدول 18-1) والبعض منها يتفاعل مباشرة مع TRF2 (الشكل 18-5)، وبعض بروتينات إصلاح DNA المتواجدة على التيلومير لها دور مباشر في تنظيم طول التيلومير والمحافظة عليه، وربما يشير ذلك إلى تداخل إصلاح DNA مع وظائف التيلومير وربما تدخل ضمن نظام إصلاح الأذى في DNA في مناطق غير التيلومير. فقد وجد أن TRF2 يتموضع بسرعة في مواقع أذى DNA محدثة بالليزر وكذلك طفرات من أنواع أخرى. فضلاً عن ذلك فإن فقدان حماية التيلومير بسبب الفقدان الخطير في مكررات TTAGGG أو بسبب فقدان وظيفة TRF2 يحفز آلية إصلاح أذى DNA بنفس المسارات التي تنشط عند وجود قطع في خيطي الحلزون المزدوج.



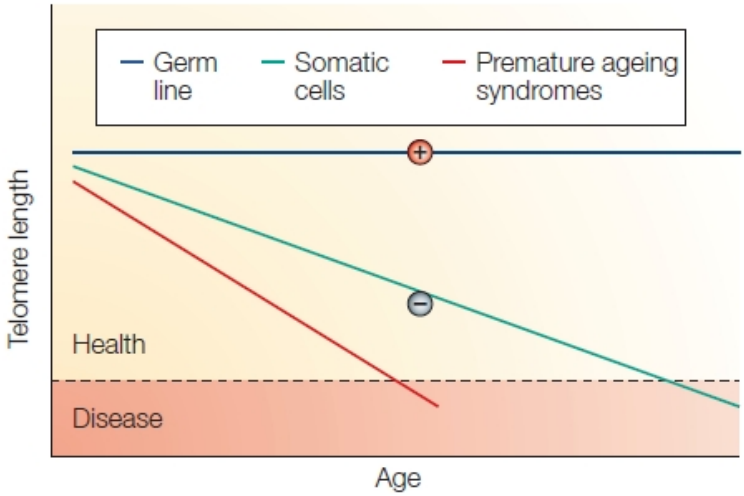
الشكل (5-18) TRF1 و TRF2 و التيلوميريز (مأخوذ من Blasco et al., 1997).

إن التيلومير القصير أو المعطوب يمكن أن يؤدي إلى التحام نهايات الكروموسومات وربما يكون الالتحام مع نهاية ناتجة من قطع خيطي الحلزون المزدوج في مواقع غير التيلومير مما يسبب تغير مواقع كروموسومية، والذي يثبت ذلك أن البروتينات التيلوميرية المتفاعلة مع TRF2 تملك طفرات في متلازمات فقدان استقرار الكروموسومات في الإنسان، ومنها الشيخوخة المبكرة وزيادة نسبة السرطانات.

وفي السنوات الأخيرة هناك توجه لدراسة الأمراض المرافقة للشيخوخة المبكرة وعلاقة ذلك مع التيلومير القصير، والذي يرافقه وجود خلل في آلية إصلاح DNA، كما وجد أن TRF2 نفسه يوجد بكميات غير طبيعية في بعض أنواع الأورام (مثل أورام الرئة والكبد والمعدة).

إنزيم التيلوميريز :

معظم الخلايا الجسمية للإنسان لا تعبر لتصنيع كمية كافية من إنزيم التيلوميريز Telomerase للمحافظة على طول التيلومير عدا الخلايا الجنسية Germ cells، والخلايا الجذعية Stem cells والخلايا السرطانية Cancer cells. لذلك فإن الخلايا الجسمية تعاني من فقدان في طول التيلومير بمرور الوقت أي التقدم بالعمر والشيخوخة (الشكل 18-6). نقصان طول التيلومير بشكل مستمر وصولاً إلى نقطة حرجة ربما يفسر ظهور العديد من الأمراض المرافقة للشيخوخة وكذلك قلة حيوية الخلايا، والمثير أن هناك بعض خطوط الخلايا في الإنسان Human cell lines وبعض أنواع الأورام لها القدرة في استمرار المحافظة على طول التيلومير أو استطالته، وتعرف الظاهرة بالاستطالة البديلة للتيلومير Alternative lengthening of telomeres (ALT). في الخمائر واللبائن فإن مسار الإصلاح من نوع HR يساهم ضمن هذا النوع.



الشكل (18-6) تغير طول التيلوميز بتقدم العمر في أنواع من خلايا اللبائن (مأخوذ من Blasco et al., 1997).

مكونات إنزيم التيلوميريز :

1- RNA إنزيم التيلوميريز: إن جزء RNA لإنزيم التيلوميريز والذي يدعى hTR يعمل كقالب لتصنيع مكررات التيلومير. وفي الإنسان فإن hTR يصنع من قبل إنزيم البلمرة الثاني RNAPII ثم تعامل نهايته '3 كي ينتج مستنسخ ناضج مكون من 451 نيوكليوتيد، قرب النهاية '5 لـ hTR (النيوكليوتيدات 46–53) تكون متخصصة لتصنيع تسلسلات DNA التيلومير أي الاستنساخ المعكوس Reverse transcriptase. وبالرغم من تنوع التسلسلات الأولية لـ RNA لإنزيم التيلوميريز إلا أن hTR له تركيب ثانوي محافظ بين الكثير من أنواع الفقريات مما يشير إلى أهمية دور تركيب RNA في وظائف إنزيم التيلوميريز.

2- الوحدة التحفيزية لانزيم التيلوميريز: وتسمى الوحدة التحفيزية لإنزيم التيلوميريز في الإنسان بـ hTERT ويعتقد أنها تتكون من أربع وحدات ثانوية وينطبق ذلك على الوحدة التحفيزية لانزيم التيلوميريز للفئران، للخمائر، لديدان الأوالي المهدبة، وللنباتات.

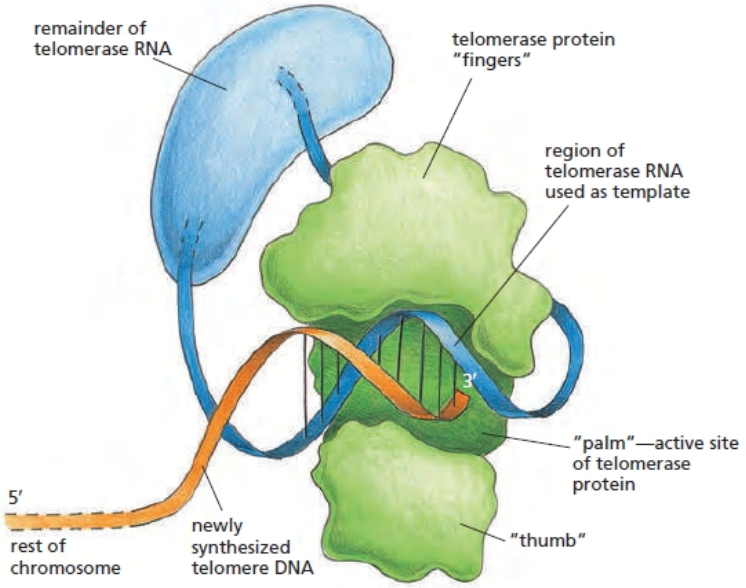
وهناك مميزات عامة للوحدة التحفيزية لإنزيم التيلوميريز :

1- جميع أجزاء الاستنساخ المعكوس تقع في نصف النهاية C للبروتين.

2- المنطقة المحافظة المتخصصة لإنزيم التيلوميريز والتي تسمى الجزء T تقع بالقرب من جزء الاستنساخ المعكوس وبالاتجاه النهاية N.

3- النهاية N الكبيرة تحوي أجزاء محافظة مهمة وظيفياً. (الشكل 18-7) .

التجارب على خلايا الإنسان والخمائر تشير إلى أن إنزيم التيلوميريز ربما يعمل في معقد مكون من أكثر من وحدة تحفيزية واحدة وأكثر من وحدة RNA. هناك عدد كبير من البروتينات والعوامل التي يعتقد أنها تؤثر على طول التيلومير بغياب تغير ملحوظ في فعالية إنزيم التيلوميريز، وربما يشير ذلك إلى أنها منظمات لـ ALT، لكن لم يتم إثبات ذلك لحد الآن، ومن أمثلة ذلك جينات MMR،



الشكل (18-7) تركيب انزيم التيلوميريز

بروتينات إصلاح DNA من نوع RAD54 و RAD51D و XRCC3 والبروتينات التي تحور من حالة كروماتين التيلومير (مثل SUV39H HMTases و مجموعة RB).

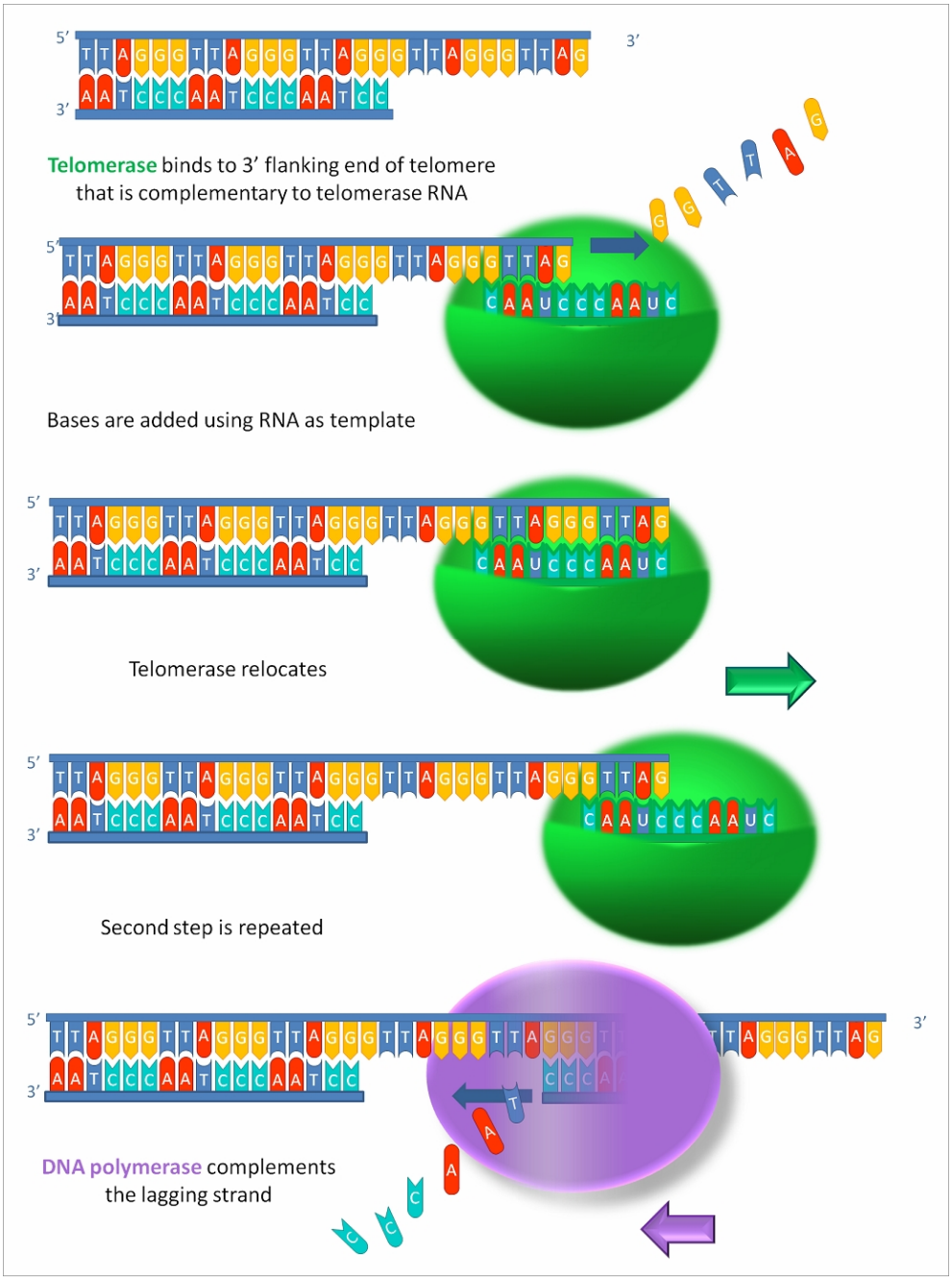
ولدراسة وظائف إنزيم التيلوميريز وكذلك التيلومير القصير وتأثيره على الوظائف الحيوية الأخرى تم استخدام الفئران التي تعاني من نقص التيلومير، إذ تم معاملة هذه الفئران بإزالة جين Terc (وهو الجين المسؤول عن التعبير لجزء RNA في إنزيم التيلوميريز Telomerase RNA component (TERC)، هذه الفئران كانت تموت بأعداد كبيرة وتعاني الكثير من الأمراض منها فقدان القدرة على الإخصاب، عجز القلب، أمراض شيخوخة الجهاز المناعي، ضمور أنسجة متنوعة، انخفاض معدل تجدد الأنسجة للجهاز الهضمي والجلد والجهاز المكون للدم. وسميت هذه السلالة من الفئران بـ -/-Terc وهناك أنواع متعددة منها كل نوع يعاني شكل متخصص من أمراض الشيخوخة وأعراضها، وكشفت دراسات معمقة للأمراض في هذه الفئران تفاصيل مثيرة لأمراض مختلفة في الإنسان تحدث في مرحلة الشيخوخة، والتي تمتاز بخلايا لها تيلومير قصير ربما بسبب الانقسام الخلوي المتكرر، لذلك تعد الفئران الفاقدة لإنزيم التيلوميريز نموذج واعد لدراسة الشيخوخة المرافقة لقصر التيلومير. والمثيرة أن الأمراض التي تحدث في الفئران الفاقدة لإنزيم التيلوميريز يرافقه اختزال في القدرة على الانقسام الخلوي أو زيادة الموت الخلوي المبرمج في الأنسجة المختلفة. ويعزى هذا التأثير إلى زيادة تعبير جين p53 الكابح للأورام. وهذا يتفق مع فكرة أن التيلومير القصير يحفز للاستجابة لأذى DNA، على العكس من ذلك فإن تلك الأمراض التي ترافق الشيخوخة وتمتاز بزيادة الانقسام الخلوي مثل السرطان والتصلب العصيدي Atherosclerosis فيلاحظ انخفاض مستويات حدوثها في الفئران الفاقدة لإنزيم التيلوميريز وهذا يشير إلى أن نشوء وتطور هذه الأمراض يحتاج تحويرات أكثر لغرض عبور إشارة أذى DNA التي تشجع بالتيلومير القصير. كل هذه الحقائق تشير إلى أن التيلومير بأقصر طول يعد ضرورياً للحفاظ على أستتباب الأنسجة السوية في الفئران، والى أن القصر الذي يحدث في طول التيلومير بتقدم العمر (الشيخوخة) في الإنسان يرافقه حدوث أمراض متنوعة، ويؤيد هذه الفكرة أن إعادة إدخال جين Terc إلى جسم الفئران الفاقدة لإنزيم التيلوميريز ولها تيلومير قصير يؤدي إلى منع الاستمرار في قصر طول التيلومير كما يمنع عدم استقرار الكروموسوم وفقدان حيوية الخلية.

كيف يقوم انزيم التيلوميريز بزيادة طول التيلومير :

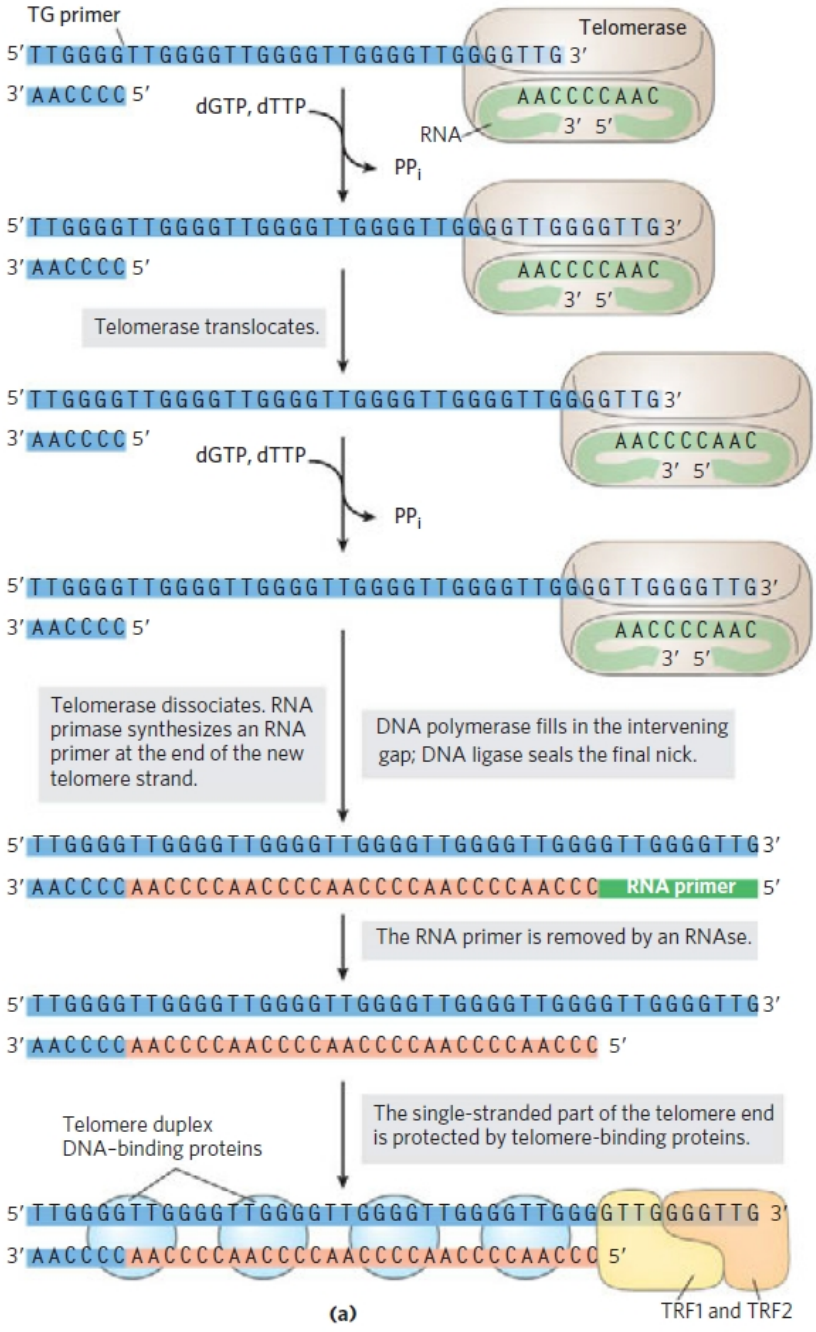
باستخدام كل من TERC فإن TERT بإمكانه إضافة تسلسلات مكررة مؤلفة من 6 نيوكليوتيدات (5'-TAAGGG) في الفقريات (وتختلف التسلسلات في الكائنات الأخرى) إلى النهاية 3' لـ DNA ضمن منطقة تيلومير الكروموسوم، إن منطقة القالب لـ TERC هي تسلسلات 3'-CAAUCCCAAUC-5' ويقوم إنزيم التيلوميريز بربط بعض نيوكليوتيدات القالب مع تسلسلات التيلومير الأخير على الكروموسوم ويقوم بإضافة مكررات من تسلسل (5'-GGTTAG-3') وبذلك يطيل النهاية 3' لـ DNA ثم يعيد العملية ثانيةً وهكذا (الشكل 18-8).

إنزيم التيلوميريز كما تم وصفه سابقاً مؤلف من RNA وبروتينات متخصصة، جزء RNA يكون طوله حوالي 150 نيوكليوتيد، وفيه منطقة متخصصة تكون مؤلفة من تسلسلات CA مكررة، والتي تعمل كقالب لتصنيع خيط التيلومير من تسلسلات TG المكررة، وعلى العكس من فيروسات الريترو Retroviruses، فإن إنزيم التيلوميريز يستنسخ فقط جزء صغير من RNA الذي يحمله ضمن تركيبه. وتحتاج عملية تصنيع التيلومير إلى النهاية 3' للكروموسوم كبادئ Primer وتسير عملية التصنيع بالاتجاه 5' إلى 3'، وبعد تصنيع أول نسخة من المكرر يعود إنزيم التيلوميريز بتغيير موقعه كي يبدأ بدورة جديدة وهكذا يزيد من طول التيلومير (الشكل 18-9). بعد استطالة خيط مكررات TG بواسطة إنزيم التيلوميريز فإن الخيط المتمم لها (أي CA) يتم تصنيعه من قبل إنزيم البلمرة DNAP والذي يبدأ التصنيع من بادئ RNA primer.

ويلاحظ في الخلايا حقيقية النواة الواطئة أن طول التيلومير قصير نسبياً (بضع مئات من القواعد المزدوجة bp) لذلك تحتاج إلى حماية بواسطة بروتينات حماية متخصصة، أما في الخلايا حقيقية النواة المتقدمة فيكون حجم التيلومير آلاف من القواعد المزدوجة bp والنهاية ذات الخيط المنفرد تكون تركيب متخصص هو العروة T (الشكل 18-10) وفي اللبائن فإن العروة T تثبت من خلال بروتينات TRF1 و TRF2، وينظم عمل العروة T من خلال بروتينات متخصصة تدعى Shelterin وهي مجموعة من البروتينات التي توفر الحماية أو القبعة اللازمة لنهاية الكرموسوم.

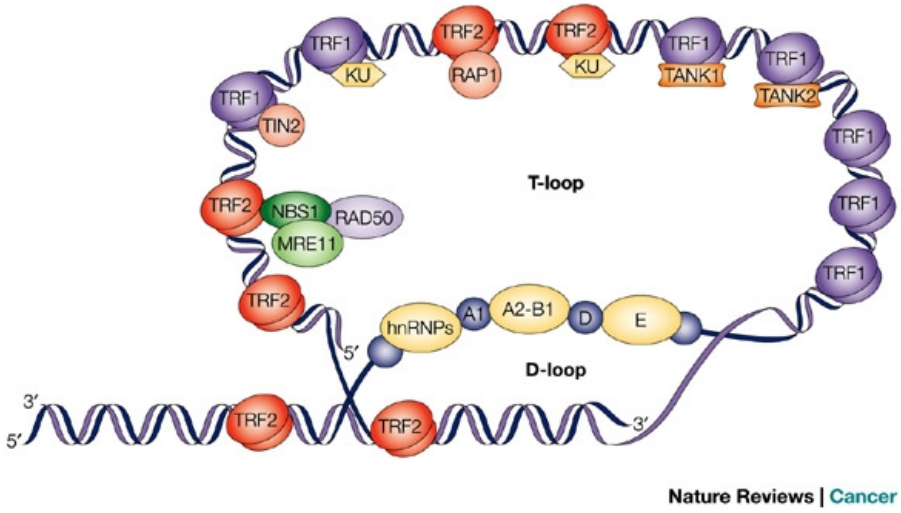


الشكل (8-18) آلية عمل إنزيم التيلوميريز



الشكل (9-18) تصنيع التيلومير وتركيبه

مما سبق نستنتج أن استطالة التيلومير بفعل إنزيم التيلوميريز يكون بعملية متعددة الخطوات وتنظم بدقة، وتضمن النضج، المعاملة، تجمع hTR، النقل النووي، تحويرات ما بعد الترجمة لـ hTERT، تجمع الرايبونيوكليوبروتين، التعرف على المادة الأساس، والتصنيع المتناسق للخيط C، كما أن البروتينات المرتبطة مع إنزيم التيلوميريز والتي تساهم في وظائف كل خطوة من الخطوات أعلاه تكون ضرورية كي يقوم إنزيم التيلوميريز بوظائفه الحيوية بشكل كامل.

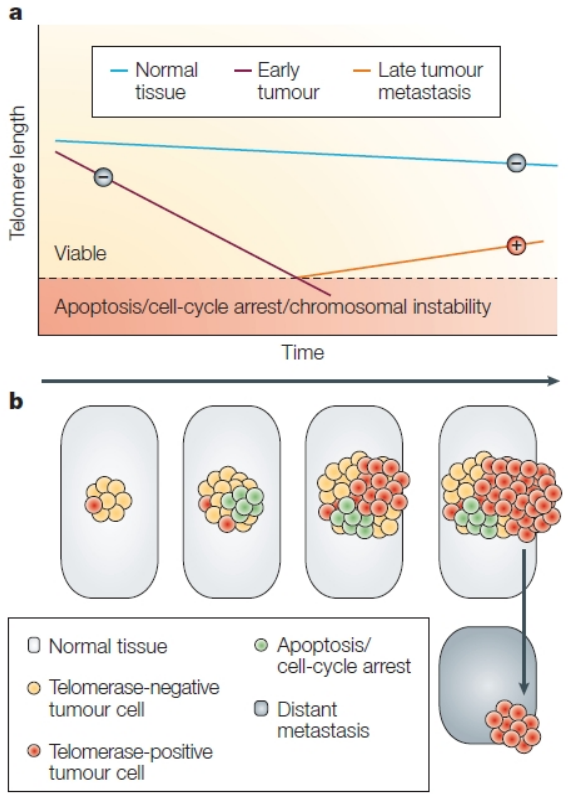


الشكل (18-10) تركيب العروة تي T-loop

التيلومير والتيلوميريز والأورام :

فضلاً عما تم التنويه إليه أعلاه حول دور قصر طول التيلومير في شيخوخة الخلية والكائن، فإن قصر التيلومير يساهم في كبح حدوث الأورام من خلال تقليل الانقسام الخلوي الناتج من فقدان وظيفة التيلومير بسبب قصر طولها (الشكل 18-11) ويلاحظ من الشكل التغيرات في طول التيلومير بمرور الوقت خلال تقدم تكون الورم مقارنةً مع النسج السوية، ويلاحظ أن الخلايا الورمية في البداية تملك تيلوميرات قصيرة تشير إلى سرعة

الانقسام الخلوي مع فقدان فعالية انزيم التيلوميريز، قصر التيلومير هذا ربما يؤدي أحياناً إلى زيادة موت الخلايا (الموت الخلوي المبرمج) وفقدان الخلايا ضمن الورم، ولكن بتقدم الزمن يتم تنشيط إنزيم التيلوميريز (الذي ينشط في أكثر من 90٪ من أنواع الأورام التي تصيب الإنسان)، وبذلك تعيد طول التيلومير ويزداد نشاط وحيوية الخلايا.



الشكل (18-11) انزيم التيلوميريز وطول التيلومير ونشوء الأورام
(مأخوذ من Blasco et al., 1997)

عليه نلاحظ أن معظم الخلايا النقيلة Metastasis (الخلايا التي تنفصل عن الورم وتذهب إلى مكان آخر في الجسم) لها مستويات عالية من إنزيم التيلوميريز والتي تعد ضرورية لاستمرار نمو الورم. حقيقة أن الخلايا الورمية لها تيلومير أقصر ومستويات أعلى من إنزيم التيلوميريز من الخلايا السوية يفتح باباً مهماً لتصميم علاجات مضادة للأورام

يعتمد على تثبيط إنزيم التيلوميريز مما يؤدي إلى موت الخلايا الورمية دون أن يكون لها تأثيرات سمية على الخلايا السوية.

الفئران الفاقدة لجين محدد Knockout لإنزيم التيلوميريز استخدمت لدراسة دور كل من التيلومير و انزيم التيلوميريز في نشوء الأورام. هذه الفئران أظهرت أن التيلومير القصير وبغياب أنزيم التيلوميريز تعمل ككابح قوي للأورام والذي يترافق مع زيادة إنتاج p53، وبشكل مشابه يلاحظ انخفاض نشوء الأورام في الفئران التي تعاني من انخفاض في فعالية إنزيم التيلوميريز والجينات الكابحة للأورام (عدا p53) مثل P19ARF و p16 و Apc، وهذا يقودنا إلى أن التيلومير القصير يكبح تكون الورم حتى بغياب المسارات الرئيسية لكبح الأورام.

أما الفئران التي لها زيادة تعبير لجين Tert في الأنسجة البالغة تؤكد دور التيلومير المهم في كل من الأورام والشيخوخة، والتي يبدو هنا أنها تعمل بآلية لا تعتمد على طول التيلومير، إذ أن هذه الفئران التي لها زيادة تعبير جين Tert وتكون باقي المشجعات تحت السيطرة، فإنها تكون أكثر عرضة لنمو الأورام بتقدم العمر فيها مقارنة مع فئران السيطرة السوية. كل هذه الدلائل تشير إلى أن إنزيم التيلوميريز ربما له تأثيرات كبيرة على الأورام والشيخوخة حتى في المراحل التي يكون فيها طول التيلومير كافياً للحفاظ على حيوية الخلية.

أهم المراجع :

Aubert G, Lansdorp P.M. (2008). **"Telomeres and Aging".** *Physiol. Rev.* 88 (2): 557–579.

Austin, Christopher P.; Battey, James F.; Bradley, Allan; Bucan, Maja; Capecchi, Mario; Collins, Francis S.; Dove, William F.; Duyk, Geoffrey; Dymecki, Susan (2004). **"The Knockout Mouse Project".** *Nature Gen.* 36 (9): 921–924.

Blasco MA. (2005). **Telomerase and human disease: aging , cancer and beyond.** *Nature Rev. Gen.* 6: 611-20.

Blasco, MA; Lee, HW; Hande, MP; Samper, E; Lansdorp, PM; et al. (1997). **"Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA".** *Cell.* 91 (1): 25–34.

Bodnar, A.G.; Ouellette, M.; Frolkis, et al., (1998). **"Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells"**. *Science.* 279 (5349): 349–352.

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. **Molecular Biology of the Cell.** 6th Edition. (2015). Garland Science.

Cong YS. Wright WE. Shay JW. (2002). **Human telomerase and its regulation.** *Micr. Mol. Bio. Rev.* 66(3): 407-25.

Feng J, Funk WD, Wang SS, et al., (1995). **"The RNA component of human telomerase".** *Science.* 269 (5228): 1236–41.

Greider CW, Blackburn EH (1985). **"Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts".** *Cell.* 43 (2 Pt 1): 405–13.

Joeng KS, Song EJ, Lee KJ, Lee J; Song; Lee; Lee (2004). **"Long lifespan in worms with long telomeric DNA".** *Nature Genetics*. 36 (6): 607–11.

Krebs JE, Goldstein ES, Stephen T. Kilpatrick ST. **Lewin's GENES XI.** 11th Edition. (2014). Jones & Bartlett Learning.

Nugent CI, Lundblad V (1998). **"The telomerase reverse transcriptase: components and regulation".** *Genes Dev.* 12 (8): 1073–85.

Olovnikov AM. (1973). **"A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon".** *J. Theor. Biol.* 41 (1): 181–90.

Parkinson GN, Lee MP, Neidle S (2002). **"Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA".** *Nature.* 417 (6891): 876–80.

Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW (1997). **"Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end".** *Genes Dev.* 11 (21): 2801–9.

الغلاف الخلفي للكتاب

البيولوجي الجزيئي علم يهتم بدراسة دقيقة لكل ما في الخلية الحية من تراكيب وتفاعلات وعلى المستوى الجزيئي، والخلية عالم مستقل في تنظيم نفسها بمستويات متعددة ومتداخلة ومعقدة ، وفي الوقت نفسه فإن هذا العالم شديد الحساسية لما يجري حوله من تغييرات مهما كانت طفيفة ، وتستجيب الخلية لهذه التغييرات في محاولة للتغلب عليها أو التكيف معها أو الهروب منها بآليات مختلفة ومسارات متعددة تكمل إحداها الآخر ، ولا مكان فيها للتقاعس أو الاضطراب أو الكسل أو الشذوذ بل يسودها ترابط متجانس بتوزيع المهام والمسؤوليات والعمل الدؤوب والتنظيم الدقيق بشكل مدهش وغاية في الروعة والجمال .