فضاء العلوم الطبيعية
www.snvdz.com

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

مبادئ الوراثة الجزيئية

Principles of Molecular Genetics

تأليف

د. محمد باقر صاحب الشهيّب

كلية التقانات الحيوية – جامعة القاسم الخضراء

أ. د. علي حمود السعدي

كلية العلوم – جامعة بابل

أ. د. حيدر كامل زيدان

كلية العلوم – جامعة بابل

2013

محتويات الكتاب العامة

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

محتويات الكتاب المفصّلة

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

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

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

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

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

الاهداء

الى من يملئها قسطاً وعدلاً بعدما ملئت ظلماً وجورا

مقدمة

بسم الله الرحمن الرحيم

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

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

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

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

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

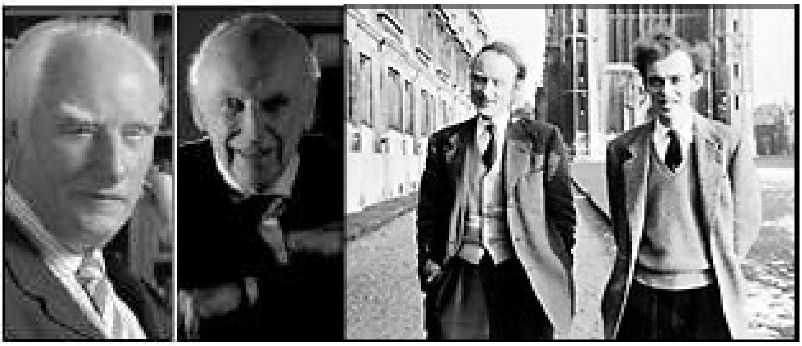
ما بقي لنا وقد أتممنا هذ االكتاب اليوم الأحد المصادف 15-4-2012 الا الاعتذار عن كل خطئ أو سهو أو غفلة أو نسيان.

والحمد لله رب العالمين.

1

الفصل الأول

تركيب الأحماض النووية وتعبئتها



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

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

مقدمة

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

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

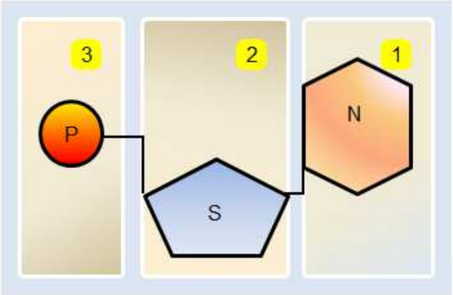
تختلف كمية الـ DNA للخلية الواحدة بشكل واسع بين الكائنات المختلفة. ففي خلايا اللبائن، يكون محتوى الـ DNA في تلك الخلايا أكثر بالآلاف المرات (حوالي بـ 8000 مرة) من محتوى الـ DNA في خلايا البكتريا. أما العاثيات البكتيرية، كما في T-phage والذي يخمج بكتريا القولون، فانه يحتوي على عشر أو على 1 إلى 12 من كمية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

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

كيميائية الأحماض النووية

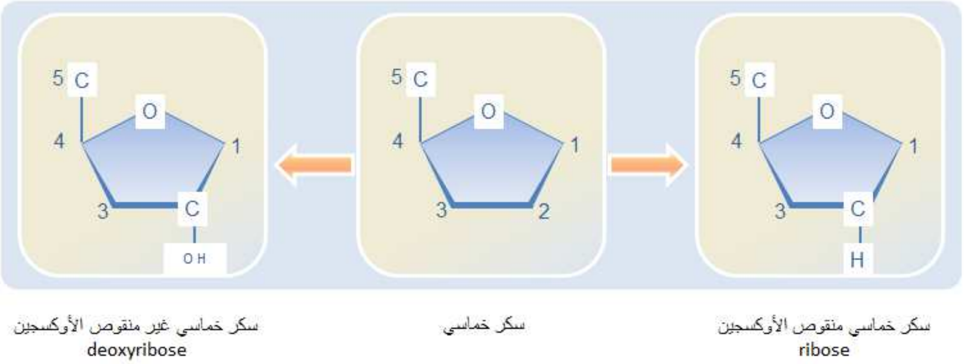
عندما نعرف ان الـ DNA والـ RNA هما المادة الوراثية يجب علينا ان نتقدم نحو التحري عن التركيب الكيميائي لهذه الجزيئات، لأن تركيبها يخبرنا بمقدار كبير حول كيف تعمل هذه الجزيئات.تتكون الأحماض النووية nucleic acids من ارتباط النيوكليوتيدات nucleotides بطريقة متكررة إلى بوليمرات تشبه في شكلها السلسلة. تتكون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

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



شكل (1.1). مخطط يوضح المكونات الثلاث للنيوكلويتيدةوالتي هي اللبنة الأساسية لبناء الـ DNA. يرمز الحرفN الى القاعدة النتروجينية للنيوكليوتيدة والتي قد تكون أما أدنين أو كوانين أو سايتوسين أو ثايمين أو يوراسيل، ويرمز الحرفS الى السكر الخماسي والذي أما أن يكون منقوص الأوكسجين أو غير منقوص الأوكسجين، ويرمز الحرفP الى مجموعة الفوسفات (تصميم المؤلف).

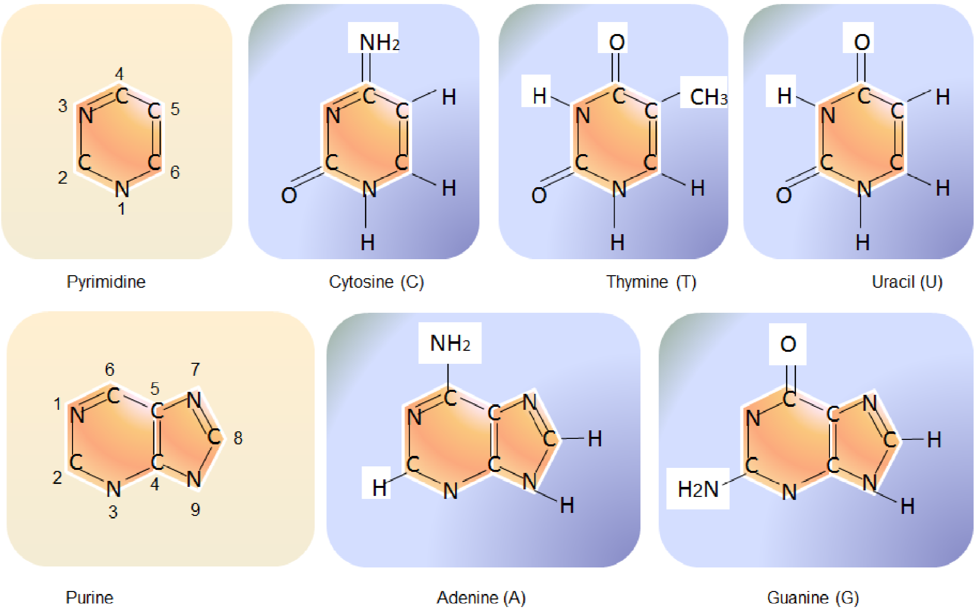
لاحظ إن الـ ATP أي مركب adenosine triphosphate ، والذي هو عملة الطاقة للخلية، هو عبارة عن نيوكليوسايد ثلاثي الفوسفات nucleoside triphosphate. يختلف السكر فقط في وجود الرايبوز ribose في الـ RNA ، لهذا سمي ribonucleic acidالرايبوز منقوص الأوكسجين ولهذا سمي deoxyribonucleic acid، حيث يغيب الأوكسجين في جزيئة الأوكسجين رقم position (the 2´)، لاحظ أن ذرات الكاربون في السكر رقمت من 1´ إلى 5´. إن الشخطة أو ما تعرف بالإنكليزية "*prime*" تستخدم لتجنب الإرباك مع نظام الترقيم للقواعد النتروجينية(شكل2.1).



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

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

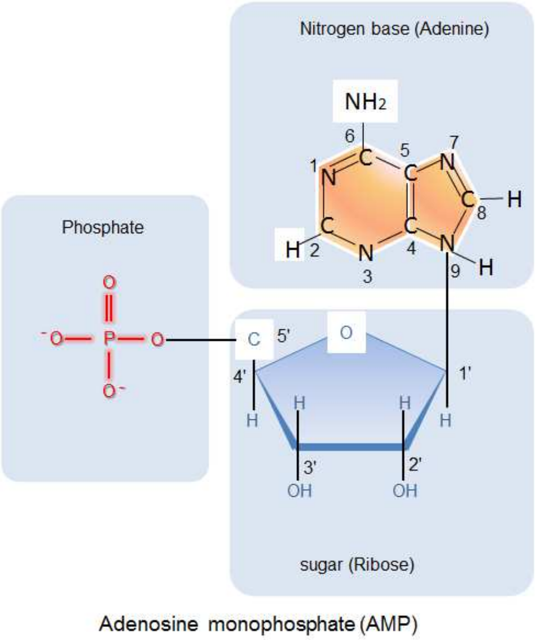
تتكون النيوكليوتيدة بالخلية بربط القاعدة النتروجينية (من ذرة النتروجين رقم 9 بالبيورين، أو من ذرة النتروجين رقم 1 بالبيريميدين) بذرة الكاربون رقم ´1 في جزيئة السكر sugar بآصرة كلايكوسيدية glycosidic bond، وربط الفوسفات بنفس جزيئة السكر (شكل 4.1) بآصرة أستر ester bond عند ذرة الكاربون رقم ´5. هذا ومن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



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

ترتبط النيوكليوتيدات مع بعضها البعض(تتبلمر polymerized) وذلك بتكوين آصرة عند ذرة الكاربون رقم ´ (5´5 carbon) للنيوكليوتيدة ومجموعة الهيدروكسيل (OH) hydroxyl group عند ذرة الكاربون رقم ´ (3´3 carbon) للنيوكليوتيدة

المجاورة، وتسمى هذه الآصرة بآصرة الفوسفات ثنائية الأستر phosphodiester bonding (شكل 5.1).

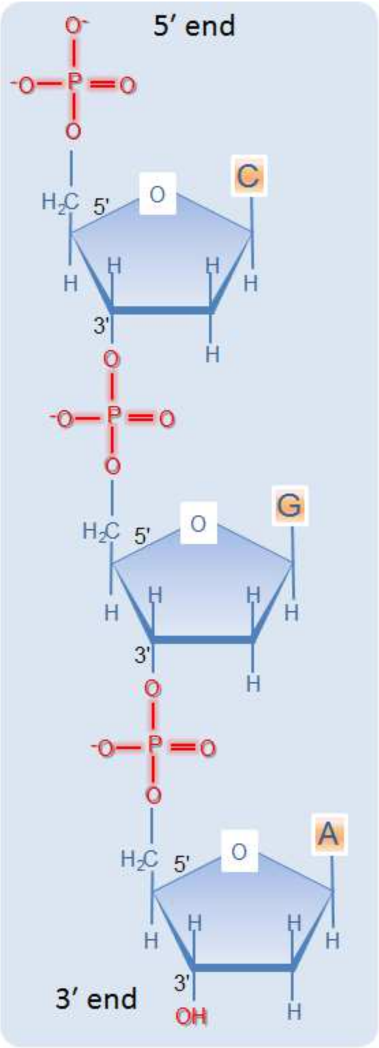


شكل (4.1): التركيب الكيميائي للنيوكليوتيدة. لاحظ أن القاعدة النتروجينية (الأدنين هنا) تتصل بالسكر الخماسي المنقوص الأوكسجين عن طريق الآصرة الكلايكوسيدية، بينما يتصل السكر الخماسي المنقوص الأوكسجين بمجموعة الفوسفات بواسطة آصرةالأستر (تصميم المؤلف).

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

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

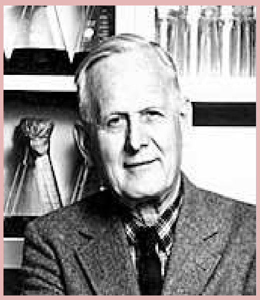
الأغشية بواسطة هذا التأين. وبالنتيجة، كل هذه الظروف قد انطبقت على حامض الفوسفوريك وليس غير حامض الفوسفوريك!



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

الـ DNA هو المادة الوراثية

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



Maclvn McCartv

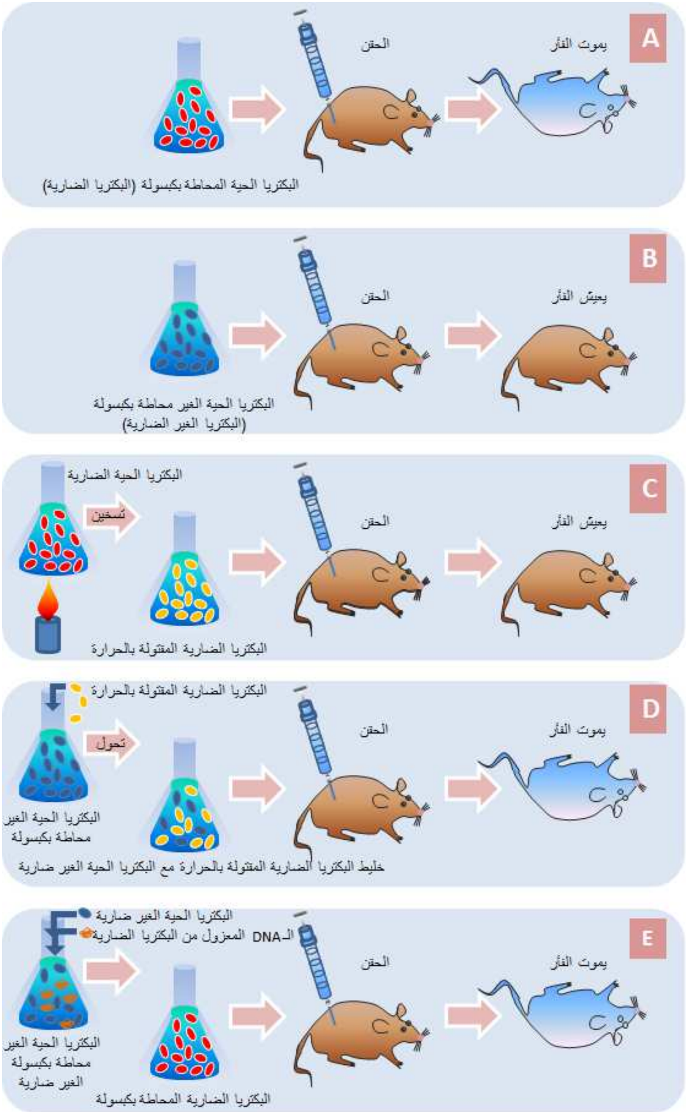
Oswald Averv

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

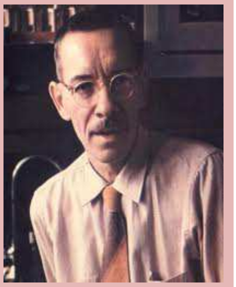
اذن أصبح البحث عن طبيعة عامل التحول يقتصر على الأحماض النووية الـ DNA والـ RNA فقط. وعليه، قاموا باضافة الانزيم المحطم للـ RNA وهو الـ RNase، فلاحظوا أن ليس له تأثير يذكر أيضاً، ولكن عندما أضافوا الانزيم المحطم للـ DNA وهو الـ DNase لاحظوا تحطم الفعالية البايولوجية لعامل التحول.

اذن العامل المسؤول عن التحول هو الـ DNA وليس غير الـ DNA. نشرت هذه النتائج في عام 1944 ولكنها مازالت مرفوضة في المجتمع العلمي آن ذاك حيث أن العديد من المختصين بهذا المضمار مازالوا مصرين على أن البروتين هو المادة الوراثية.وهذا هو الذي أسس لدور الـ DNA كمادة وراثية للخلية البكتيرية. وجد هؤلاء الباحثين بأن الـ DNA المستخلص من السلالة الضارية (المسببة للمرض) لبكتريا الـ *Steptococcus pneumoniae* والمعروفة أيضاً بالـ *pneumonoccus* تحول السلالة الغير ضارية وراثياً لهذا الكائن إلى الشكل الضاري (شكل6.1).

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

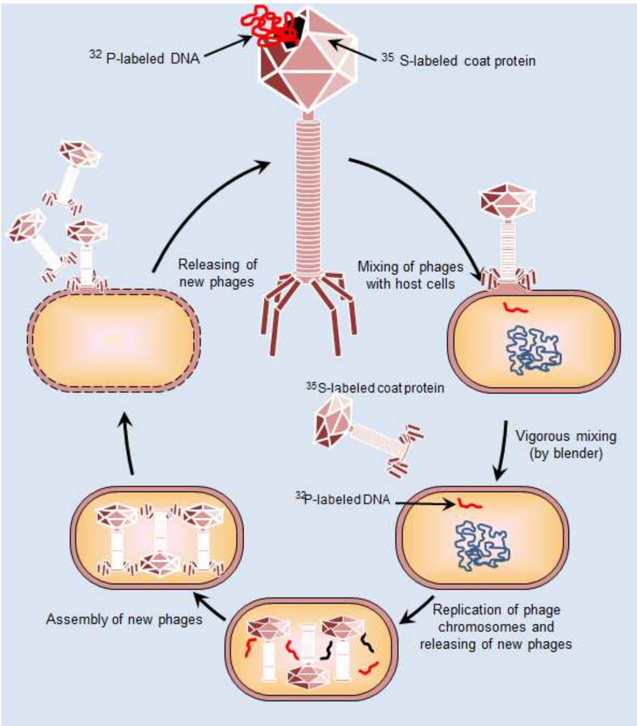


شكل (6.1): تجربة Avery-MacLeod-McCarty. (a) عند حقن السلالة المحاطة بكبسولة بالفئران، تموت الفئران نتيجة هذا الحقن، أي توصف هذه السلالة بالقاتلة (b) بينما تكون السلالة الغير محاطة بكبسولة (c) كما هو عليه الحال في السلالة المحاطة بكبسولة والمقتولة بالحرارة غير مؤذية. (d) بين بحث مسبق أجري من قبل Frederick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


Alfred Hershey

ان الافادة الأخرى التي أكدت على أن الـ DNA هو المادة الوراثية قد أتت من النتائج التي حصل عليها كل من Hershey و Chase من دراستهم لكيفية خمج الفايروس T2 لبكتريا القولون. يتكاثر العاثي T2 عن طريق التصاقه بالغلاف الخارجي للخلية البكتيرية وحقنه لمادته الوراثية داخل الخلية حيث تتضاعف وتوجه الخلية لكي تصنع بروتينات العاثي لتتعبأ المادة الوراثية في النهاية ضمن بروتينات العاثي لتنطلق الى خارج الخلية عن تحللها. وفي الوقت الذي كان فيه هاذين الباحثين يدرسان تلك الظاهرة (حيث نشر بحثهما في عام 1952) لم يكن يدرك الباحثون آن ذاك في علم البايولوجي كيف يتكاثر العاثي بالتفصيل. كل ما يعرفوه هو أن العاثي T2 يتألف من 50% بروتين و 50% حمض نووي، كما أنهم يعلمون بأن العاثي يرتبط بسطح الخلية البكترية ليتحرر منها بعد اكتمال دورته. ولكن الشيء الغير معلوم عندهم هو كيفية انتقال المادة الوراثية من جيل الى جيل آخر. لذا قام هذين الباحثين بتتبع مصير البروتين والـ DNA لهذا العاثي باستخدام النظيرين المشعين (isotops) الفسفور والكبريت لأن أي جزيئة مرتبطة بتلك النظائر تصدر اشعاعاً يمكن بسهولة كشفها وبالتالي معرفة موقع الجزيئة المشعة أيضاً. وهنا، تم استخدام نظير الفسفور المشع (^{32}P) في تعليم الـ DNA لأن الفسفور هو أحد مكونات العمود الفقري للـ DNA ونظير الكبريت المشع (^{35}S) في تعليم البروتين، لأن الكبريت هو أحد مكونات بعض الأحماض الأمينية للبروتين. اضف الى ذلك ، عدم احتواء الـ DNA على كبريت وعدم احتواء البروتين على فسفور، وهذا يضمن عدم تداخل النتائج.

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



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

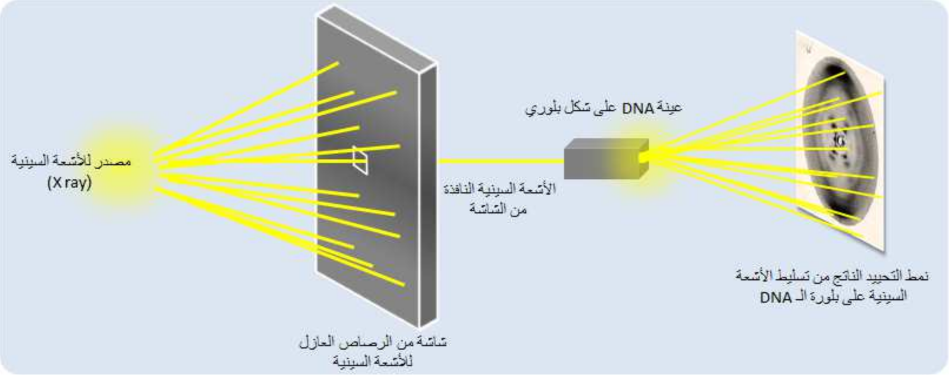
عندما قامت العاثيات المعلمة بنظير الكبريت المشع بخمج البكتريا، فان معظم الأغلفة البروتينية المفصولة والمعلمة اشعاعياً بقيت في الخلايا. علاوة على ذلك، عندما تحررت العاثيات الجديدة من الخلايا، فلم تحتوي معظمها ً على فعالية اشعاعية. أشارت هذه النتيجة الى الحقيقة التي تقول بأنه على الرغم من أن المكون البروتيني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

اكتشاف الـ DNA

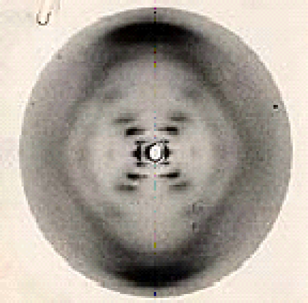
إن هنالك ثلاث خيوط من الأدلة قادت Watson و Crick في نظريتهما المعروفة وهي: الطبيعة الكيميائية لمكونات الـ DNA السابقة الذكر، وتجارب X-ray crystallography، وما يعرف بنسب جاركاف Chargaff's ratios.

تقنية الـ DNA X-ray crystallography

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



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



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

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

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

Maurice Wilkins

Rosalind Franklin

نسب جاركاف Chargaff's ratios

إلى الوقت الذي كان Chargaff يعمل في مجال الـ DNA، عانى العلماء الكثير من الجهد المظني تحت ظلال فرضية خاطئة تدعى بفرضية النيوكليوتيدات الرباعية tetra nucleotide hypothesis والتي يعتقد بها بأن الـ DNA يتكون من كميات متساوية من القواعد الأربع، ولهذا، فان أصغر وحدة DNA تتألف من DNA متكون من نسخة واحدة من هذه القواعد الأربع. حلل Chargaff بعناية المكونات القاعدية للـ DNA في أنواع مختلفة للكائنات الحية. لقد وجد وعلى الرغم من أن الكميات النسبية للنيوكليوتيدات المعطاة تختلف بين الكائنات، إلا أن كمية الـ adenine مساوية لكمية الـ thymine، وكمية الـ guanine مساوية لكمية الـ cytosine. وعلى سبيل المثال، إذا كان DNA الإنسان يحتوي على نسبة 30% لكل من الأدنين والثايمين، فتكون نسبة كل من الكوانين والسايتوسين 20%. هذا يعني، أن الـ DNA في كل الكائنات المدروسة فان هنالك تطابق بنسبة 1 إلى 1 ما بين قواعد الـ purine والـ pyrimidine. وهذا يعرف بقاعدة Chargaff.

Erwin Chargaff

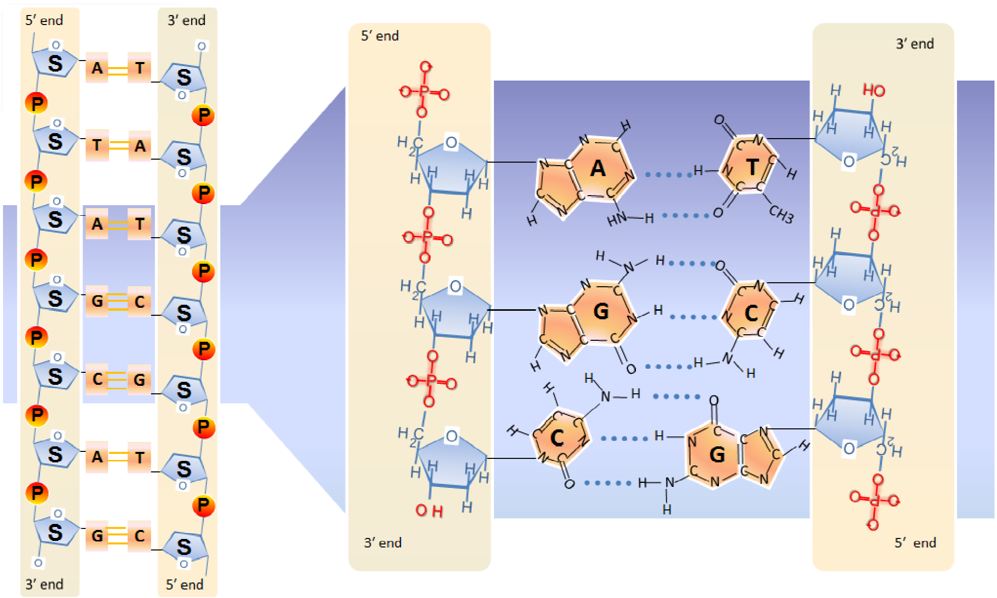
فرضية tetranucleotide hypothesis

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

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

موديل واطسن وكريك Watson-Crick model

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

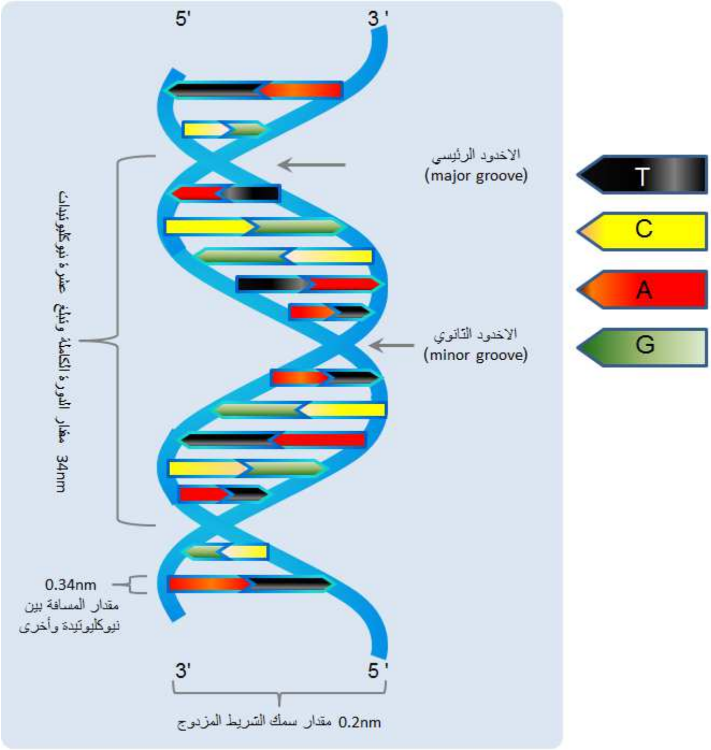


شكل (10.1): حلزون الـ DNA المزدوج: التركيب الكيميائي للـ DNA حيث تتجه في القواعد النتروجينية إلى الداخل بينما تتجه فيه السكر والفوسفات إلى الخارج مؤلفاً للعمود الفقري للجزيئة. في يسار الشكل يبرز الهيكل الخارجي (السكر – فوسفات) الى الخارج بينما ترتبط القواعد النتروجينية مع بعضها البعض بواسطة الأواصر الهيدروجينية.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

يتناسب هذا التركيب مع أبعاد الـ DNA المقترحة في تقنية X-ray crystallography إذا كانت القواعد من شريطين معاكسة واحدة للأخرى وكونت أدراج السلم الحلزوني. إن أبعاد الحلزون المزدوج هي 20 انكستروم تقريباً (10 انكستروم تساوي نانوميتر واحد) إذا كان هنالك قاعدة purine واحدة وقاعدة pyrimidine واحدة للشعاع العرضي الواحد (شكل1.11). أن اثنان من الـ purines سوف تكونان كبيرتان جدا،كما أن اثنان من الـ pyrimidines سوف تكونان صغيرتان جدا.

وبعد تجارب أخرى مع هذه الموديلات، وجد Watson و Crick بأن الازدواج الهيدروجيني hydrogen bonding ضروري لتكوين أدراج السلم الحلزوني والذي من الممكن أن يحدث بسهولة بين أزواج قاعدية معينة (تلك الأزواج التي وجدها Chargaff بتكرارات متساوية). تتسم الأواصر الهيدروجينية بأنها أواصر ضعيفة جدا، وتتكون بين ذرتين سالبتي الشحنة، كما في ذرة الأوكسجين وذرة النتروجين. وللأواصر الهيدروجينية قوة تقدر بـ 3–5% من قوة الأواصر التساهمية. يثبت الازدواج الهيدروجيني ثرموديناميكيا بين الـ thymine والـ adenine وبين الـ cytosine والـ guanine) شكل11.1). تدعى هذه العلاقة بالمتمم complementarity. هنالك اثنان من الأواصر الهيدروجينية بين الـ adenine والـ thymine وثلاثة بين الـ cytosine والـ guanine. وعلى أية حال، بما أن A=T و (C=G حسب قاعدة Watson و Crick)، لذا فان الكمية الإجمالية للـ purine مساوية للكمية الإجمالية للـ pyrimidine، كما في المعادلة الآتية)A + G = T + C(.

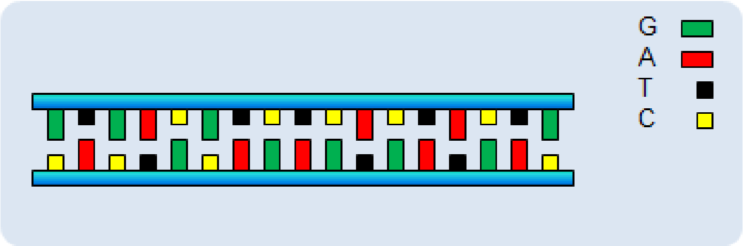
هنالك نوعين من الأخاديد على طول سطح جزيئة الـ DNA : أحدهما واسع وعميق – الأخدود الرئيسي major groove– والآخر ضيق وضحل – الأخدود الثانوي minor groove– كلتا هاتين الأخاديد كبيرة بما يكفي وذلك لكي تسمح للجزيئات البروتينية بالارتباط مع القواعد (شكل 11.1).في كل حالة، تزدوج القاعدة النتروجينية الأضخم، أي ذات الحلقتين (البيورين) بالقاعدة النتروجينية ذات الحلقة الواحدة (البريميدين)، حيث – وكما هو موضح في أعلاه – يزدوج الأدنين مع الثايمين، والكوانين مع السايتوسين (شكل11.1). ولزيادة كفاءة رص الأزواج القاعدية، التفّ العمودين الفقريين المتكونين من السكر والفوسفات المتعاقبين على بعضهما البعض بشكل حلزوني ليكونان حلزوناً مزدوجاً double helix، والذي تصنع كل عشرة أزواج قاعدية منه دورة كاملة (لفة كاملة بمقدار 180 درجة) (شكل 11.1).



شكل (11.1): مخطط لحلزون الـ DNA المزدوج حيث يوضح فيه أبعادأكثر أشكال الحلزونات المزدوجة شيوعاً في الخلايا، وفيه الاخدودين الرئيسي والثانوي. يشير اللون الأخضر للكوانين والأصفر للسايتوسين والأسود للثايمين والأحمر للأدنين (تصميم المؤلف)

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

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



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

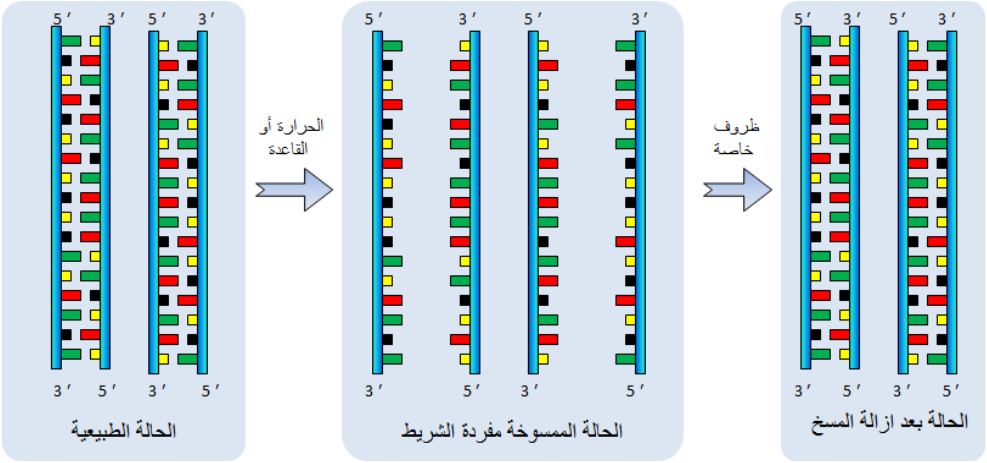
إنّ العلة من وجود الازدواج القاعدي بين القواعد النتروجينية المتممة تكمن في كون أن أحد شريطي الـ DNA ممكن أن يعمل كقالب template لتخليق الشريط المكمل الثاني. وهكذا، فان الأحماض النووية لها قابلية متفردة على توجيه تضاعفها الخاص بها ، ومن هنا امتلكت الأحماض النووية صفة السيادة على جزيئات الخلية (لا توجد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

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

مسخ الدنا DNA denaturation

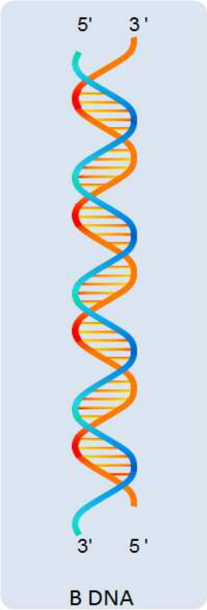
أشارت دراسات المسخ إلى أن الازدواج الهيدروجيني في الـ DNA يحدث في الطريقة المقترحة من قبل Watson و Crick. ولو أن الأواصر الهيدروجينية ضعيفة جدا بشكل منفرد، إلا أنها تعطي إستقرارية تركيبية للجزيئة عندما يزداد عددها. وعلى أية حال، فمن الممكن كسر الأواصر الهيدروجينية وفصل شريطي الـ DNA وذلك بتسخين جزيئة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

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



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

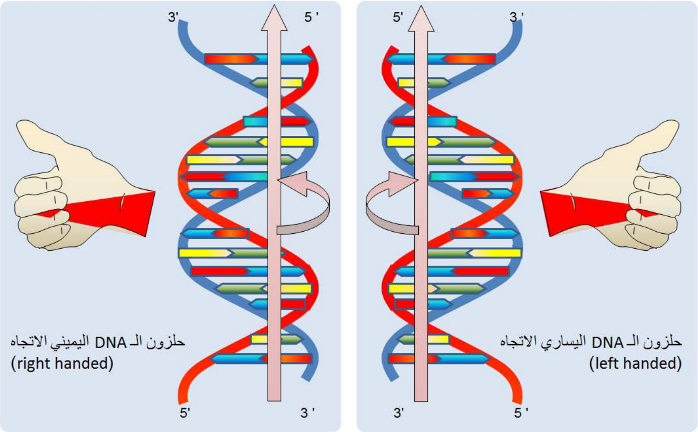
أشكال الـ DNA :



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

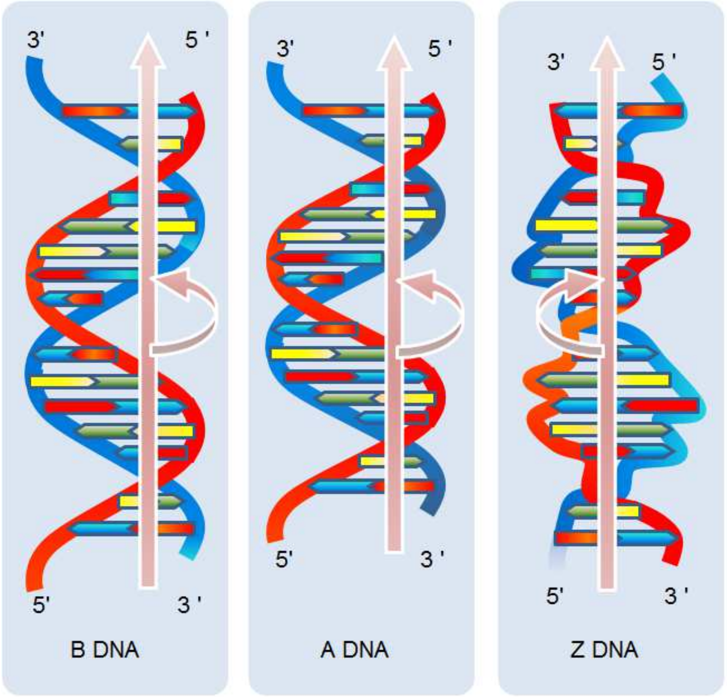
شكل (14.1) : مخطط يبين تركيب الـ DNA الشائع والمعروف بـ B DNA (تصميم المؤلف).

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



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

لقد اكشف الـ Z DNA بطريقة X-ray crystallography لجزيئات DNA صغيرة جدا تتألف من تسلسلات G-C المتكررة في شريط، وتسلسلات C-G المتكررة المتممة في الشريط المقابل له. يبدو أن Z DNA مشابه لـ B DNA من حيث ان قواعده تلتف لـ 180 درجة أيضا، ولكن التفافها هنا ينتج في شكل متعرج، ذو تركيب يساري الاتجاه (شكل16.1).

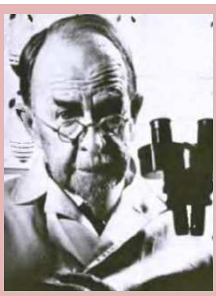


شكل (16.1): التركيب ثلاثي الأبعاد لجزيئة الـ DNA المتعرجة والمعروفة بـ Z DNAمقارنة بتركيب الـ B DNA والـ A DNA (تصميم المؤلف).

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

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

تعبئة الدنا DNA packaging



Thomas Morgan

في بداية عام 1902 لا حظ بعض الباحثين انفصال الكروموسومات خلال الانقسام الاختزالي meiosis بالطريقة التي افترضها مندل. ولكن ارتباط جين محدد بالكروموسوم لم يكتشف إلى حين عام 1910 وذلك عندما أثبت توماس موركان Thomas Morgan الوراثة المرتبطة بالجنس في طفرة العين البيضاء white-eye mutation في ذبابة الدروسوفيلا. وفي بداية عمل موركان، كان من المعروف آنذاك بوجود الكروموسومات في الخلايا، ولكن أهميتها غير معروفة ولم يهتم فيها. وقد افترض بعض الباحثين بأن الكروموسومات تحمل المادة الوراثية ولكنهم لم يمتلكوا الأدلة الكافية لدعم هذه الفرضية المهمة، لذا وفر موركان الدليل الذي يؤكد بأن الكروموسومات هي الدقائق المسؤولة عن التوريث، حيث صمم موركان نظرية الكروموسوم للتوريث، والتي عاملت الجينات كدقائق غير قابلة للانقسام مصطفة على شكل خرز على حبل لتكون الكروموسوم. وفرت تلك الأنماط الارتباطية أدلة لمعرفة نظام الترتيب الطولي على الكروموسومات ولفهم عملية إعادة الارتباط وإعادة الترتيب الكروموسومية (أنظر الفصل التاسع).

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

تعبئة الـ DNA في الكائنات بدائية النواة Prokaryotes

تعد البكتريا كائنات أحادية النواة unicellular organisms والتي تفتقد للغلاف النووي. يكون شكل الكروموسوم البكتيري دائري عادة والذي يحتوي على جزيئة DNA مفردة مؤلفة من عدة ملايين من الأزواج القاعدية. وعلى سبيل المثال يبلغ طول جينوم بكتريا القولون حوالي 4.6($4.6x10^6$) مليون زوج قاعدي من الـ DNA.

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

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

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

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

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

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

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

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

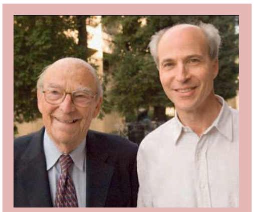
تعبئة الدنا في الكائنات حقيقية النواة

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

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

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

اكتشاف النيوكليوسوم

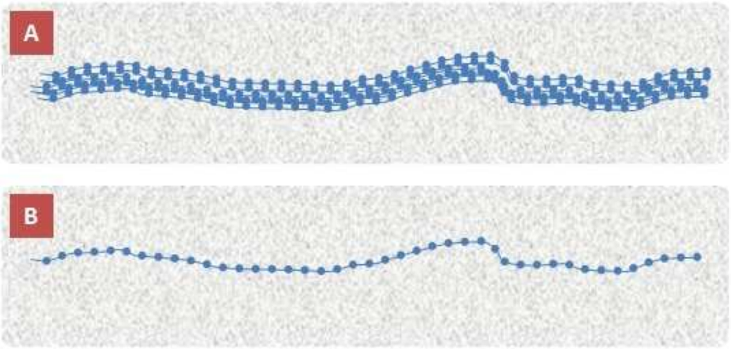


The father Arthur Korenberg (left) The son Roger Korenberg (right)

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

بالتناغم مع هذه الملاحظة، كشف المجهر الالكتروني عن أن خيوط الكروماتين لها مظهر خرزي beaded appearance. بسبب وجود خرز اتخذت لها مواضع مفصولة عن بعضها البعض بمسافة 200 bp. وعندما حطمت أنوية الطور البيني بلطف شديد وفحص محتواها تحت المجهر الالكتروني، لوحظ بأن معظم الكروماتين يكون بشكل ألياف بقطر 30 nm (شكلA18.1). وإذا ما عرّض الكروماتين إلى المعاملات التي تفتح التفافه جزئياً، فيمكن رؤيتها هنا تحت المجهر الالكتروني كسلسلة من "خرز على حبل" (شكلB18.1). إن الحبل هو الـ DNA، وكل خرزة هي "جسيم النيوكليوسوم الصميمي nucleosome core particle" والتي تتألف من DNA ملتف حول البروتين الصميمي المتكون من الهستونات. إن الخرز المتكونة على الحبل تمثل أول مستوى من مستويات تعبئة الـ DNA الكروموسومي.

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



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

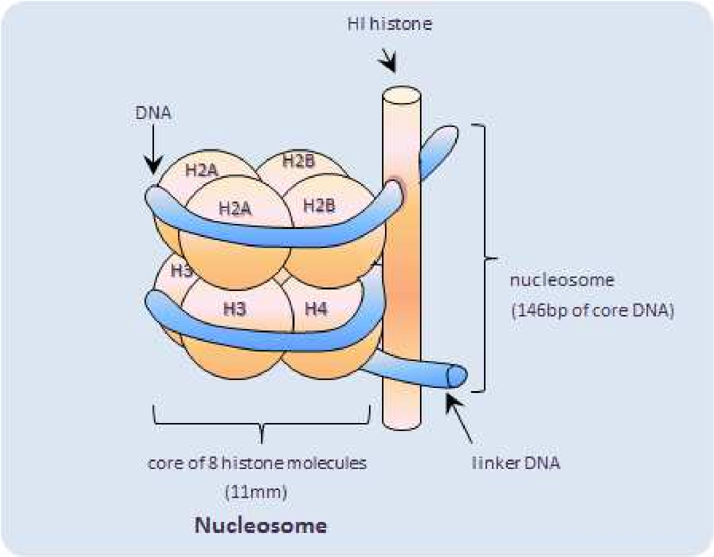
تركيب النيوكليوسوم nucleosome structure

بينت التحليلات المفصّلة بأن هنالك دقائق في صميم النيوكليوسوم nucleosome core particles والتي تبين بأنها تحتوي على 146 bp من الـ DNA ملتف 1.75 مرة حول صميم الهستون histone core ويتألف من جزيئتان من كل من H2A وH2B و H3 و H4 (الهستونات الصميمية core histones). بقي النوع الخامس من الهستونات والذي هو عبارة عن جزيئة واحدة وهي H1والذي يرتبط بمدخل ومخرج النيوكليوسوم الصميمي. إن هذا يكون وحدة كروماتين ثانوية تدعى بالـ chromatosome والتي تتألف من 166 bp من الـ DNA ملتفة حول الهستونات الصميمية وتحمل في مكانها بواسطة هستون H1والذي يسمى بالهستون الرابط linker histone (شكل19.1).

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

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

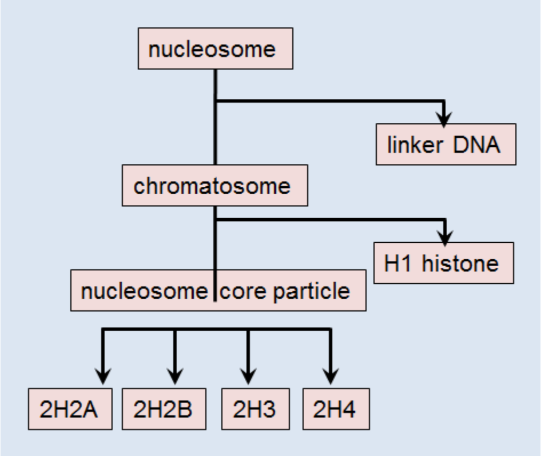
phosphrylation إلى الهستون H1 ، فعلى سبيل المثال، عندما تضاف مجموعة فوسفات إلى الهستون H1 فانه ينفك عن مكانه مؤدياً إلى تقليل تكثف الكروماتين، والعكس بالعكس.



شكل (19.1) : دور الهستون H1 في رص الـ DNA حول دقائق النيوكليسوم الصميمية nucleosome core particles (تصميم المؤلف)

تتألف كل جزيئة نيوكليوسوم صميمية من معقد من 8 من البروتينات الهستونية – جزيئتان من كل من H2A و H2B و H3 و H4– وحلزون DNA مزدوج والذي يكون بطول 146 زوج نيوكليوتيدي. يكون الهستون الثماني *histone octamer*بروتينصميمي والذي تلتف حوله جزيئة الـ DNA مزدوجة الشريط (شكل 19.1).تنفصل كل جزيئة نيوكليوسوم صميمية عن الجزيئة اللاحقة بمنطقة الـ DNA الرابط، والذي يتنوع في الطول من عدة نيوكليوتيدات قليلة إلى 80 نيوكليوتيدة. (يشير مصطلح nucleosome تقنياً إلى جزيئة النيوكليوسوم الصميمية nucleosome core particle زائداً جزيئة الهستون H1 زائداً واحدة من جزيئات الـ DNA الرابطة linker DNA) (شكل20.1).

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

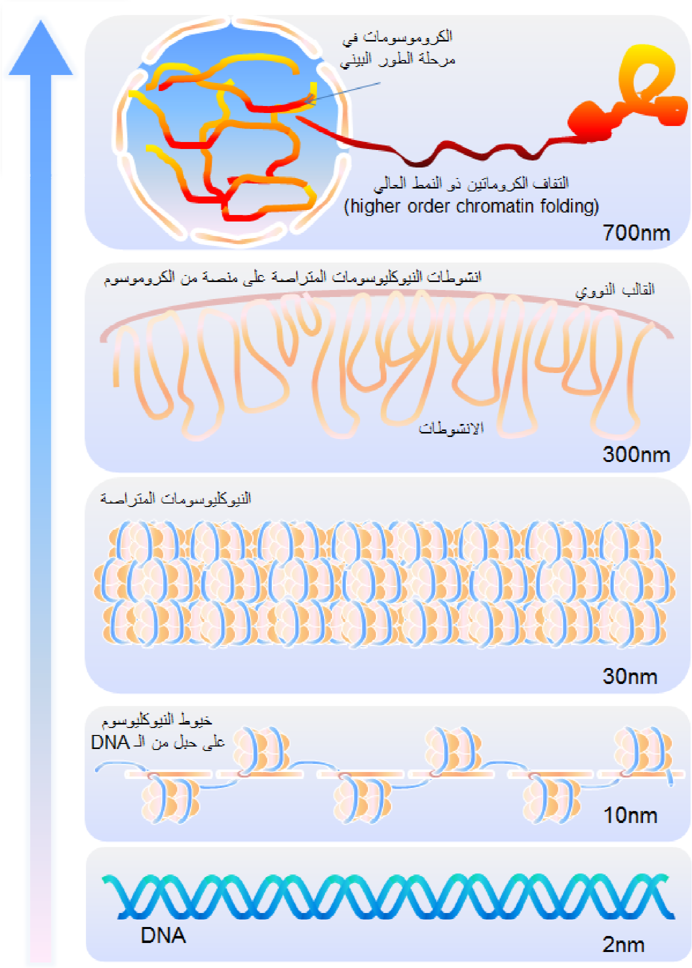


شكل (20.1): مخطط يوضح فيه تشريح النيوكليوسوم (تصميم المؤلف)

تكثف الكروموسومات

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

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



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

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

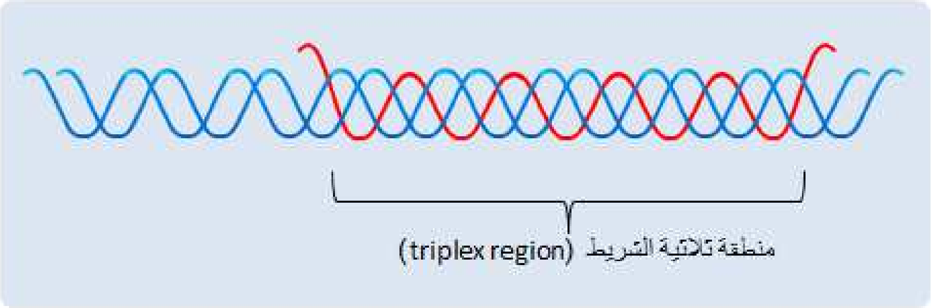
مع دورة الخلية، ولكن تتكثف condense مناطق مختلفة من الـ DNA بينما تزيل مناطق أخرى تكثفها decondense وذلك حسب نوع التعبير الجيني للخلية،(راجع الفصل السادس) وحسب حالتها التضاعفية، وحسب نوعية المناطق المتضررة التي هي بحاجة إلى إصلاح في كروموسوم الخلية.

ملحق الفصل الأول

التطبيقات المختلفة لتراكيب الدنا الغير الاعتيادية

لابد من الاشارة الى أنه تحت الظروف الطبيعية فان الـ DNA ذو الشريط المزدوج هو القاعدة. على أية حال، في ظروف مختبرية معينة من الممكن أن يتم حث شريط ثالث من الـ DNA لكي يحشر نفسه في الأخدود الكبير للحلزون المزدوج للـ DNA الطبيعي بنمط يوصف بأنه ذو تسلسل متخصص (sequence specific). وهذا يعني، ان شريط الـ DNA الثالث لا يقوم بحشر نفسه في أي مكان، ولكنه سوف يكون حلزون ثلاثي الشريط (triplex) مستقر بتسلسل متخصص (شكل21.1). ان قواعد الارتباط هذه تكون أقل دقة قليلاً من الطبيعية، حيث لا يتم تمييز كل التسلسلات، بل بدلاً من ذلك يعتمد التمييز على التسلسلات المحيطة. وعلى أية حال، يميز الثايمين في الشريط الثالث عادة الأدنين في مزدوج أدنين – ثايمين القاعدي (T – A•T)، بينما يقوم السايتوسين في الشريط الثالث بتمييز الكوانين في مزدوج كوانين – سايتوسين القاعدي (C – G•C).

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



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

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

أسئلة الفصل الأول

السؤال الأول: علل مايلي:

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

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

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

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

a. beads on thread b. looped domains c. condensed chromosomes d. solenoid structure

14. ان أقل الهستونات احكاماً في ارتباطه بالـ DNA هو ....

a. H2A b. H2B c. H3 d. H1

15. يتألف الـ nucleosome core particle من ....

a. 2H2A & 2H2B b. 2H2A, 2H2B & 2H3 c. 2H2A, 2H2B, 2H3 & 2H4 d. 2H2A, 2H2B, 2H3, 2H4 & H1

16. في طور ...... لا يمكن رؤية الكروموسومات بشكل مميز وتكون كخيوط مشربكة نحيفة وطويلة في النواة.

a. interphase b. prometaphase c. metaphase d. anaphase

17. أحد الأحماض الأمينية الشائعة في الهستونات هي .... وهي المسؤولة عن شحنته الموجبة القوية.

a. methionine b. argenine c. alanine d. glycine

18. تدعى البروتينات التي تساهم في الارتباط ما بين الـ DNA والـ nucleosome بالـ ......

a. actins b. myocins c. tubulins d. nucleoplasmins

19. يبلغ أبسط مستوى من مستويات تعبئة الكروماتين حوالي .... نانومتر.

a. 10 b. 30 c. 300 d. 700

20. في طور ...... لا يمكن رؤية الكروموسومات بشكل مميز وتكون كخيوط مشربكة نحيفة وطويلة في النواة.

a. interphase b. prometaphase c. metaphase d. anaphase e. telophase

السؤال الثالث: عرف مايلي:

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

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

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

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

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

متعرج	T_2 DNA
شائع	H DNA
انحناء حاد	B DNA
مايتوكوندريا	mt DNA
عاثي	Z DNA

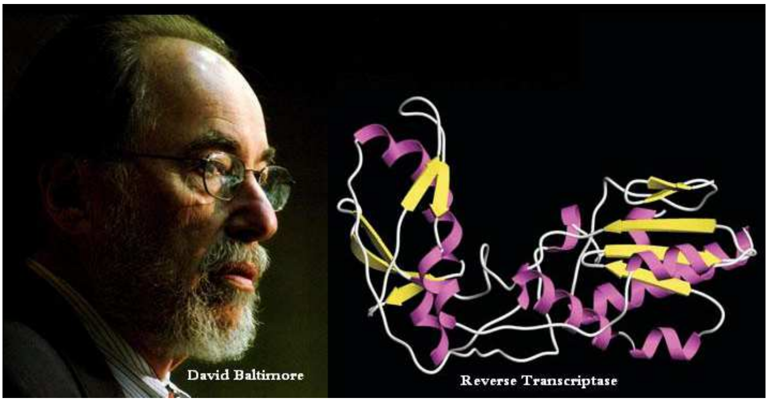
للمزيد من الاطلاع اقراء:

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

2

الفصل الثاني

مفهوم الجين



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

مقدمة

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

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

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

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

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

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

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

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

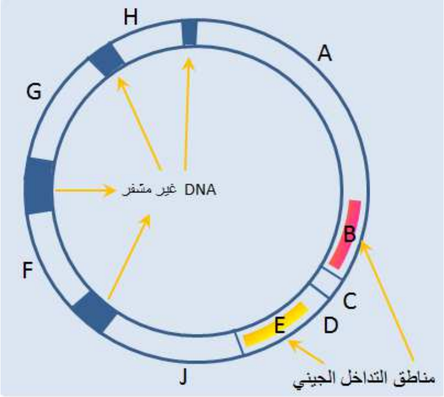
حجم الجين

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

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

على الرغم من أن ازدياد حجم الجين هو دليل واضح على ازدياد المعلومات الوراثية فيه، ولكن هذا لا يعني أن صغر حجم الجين يعني بالضرورة قلة المعلومات الوراثية المخزونة فيه. ففي العديد من فايروسات الـ DNA الصغيرة جداً، كما في ΦX174 والتي يحتاج فيها الفايروس ΦX174 إلى 11 بروتين والتي يبلغ مجموع أحماضها الأمينية 2300 حامض أميني. وبما أن كل حامض أميني قد تم تشفيره من قبل ثلاث نيوكليوتيدات، فان طول ΦX174 DNA يجب أن يكون على الأقل 9600 نيوكليوتيدة هذا بصرف النظر عن التسلسل البادئ والتسلسل الموقف وماشابهها.

حلّت هذه الكائنات الدقيقة تلك المشكلة وذلك من خلال تطوير ما يعرف بالجينات المتداخلة. يشير الشكل (1.2) إلى الخارطة الوراثية للفايروس ΦX174 وفيها تتضح صفة التداخل بشكل جلي. ويتضح من هذا الشكل بأن التسلسلات النيوكليوتيدية في بعض الجينات تندرج بشكل كامل ضمن تسلسلات جينات أخرى. لاحظ، على سبيل المثال أن الجين B يقع ضمن تسلسل الجين A، بينما يقع الجين E ضمن الجين D. تسمح هذه الإستراتيجية باحتواء كمية كبيرة من المعلومات ضمن طول محدد للـ DNA وهذا الذي يسمح في هذه الحالة لكل جين بأن يقع ضمن طول مميز للجينوم. وبمعنى آخر، تحتاج الجينات المتجاورة إلى كمية DNA أكثر من تلك التي تحتاجها الجينات المتداخلة.



شكل (1.2): خارطة الجينات التسع للعاثي ΦX174. لاحظ أن الجين B يقع كلياً ضمن الجين A، بينما يقع الجين E كلياً ضمن الجين D (تصميم المؤلف).

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

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

المعلومات الجينية

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

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

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

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

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

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

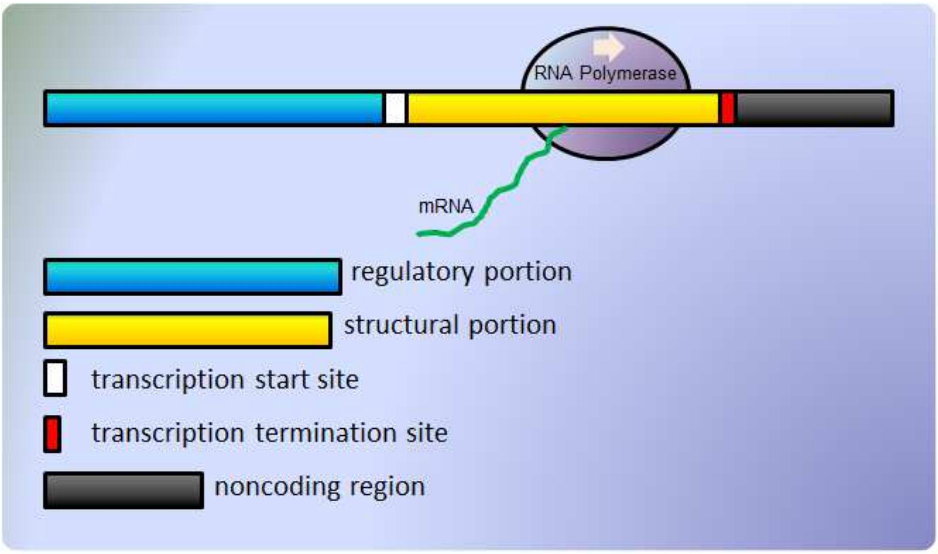
يعرف بالتركيب الأولي (primary structure) للمتعدد الببتيد (الاصطفاف الخطي للأحماض الأمينية). ويحدد التركيب الأولي لمتعدد الببتيد بالنهاية الفعالية البايولوجية للبروتين الذي يحتوي على هذا المتعدد الببتيدي. يحدد التركيب الأولي التركيب الثانوي أو الثالثي (tertiary) أو الرابعي (quaternary) والذي هو الشكل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

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

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

تشريح الجين

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



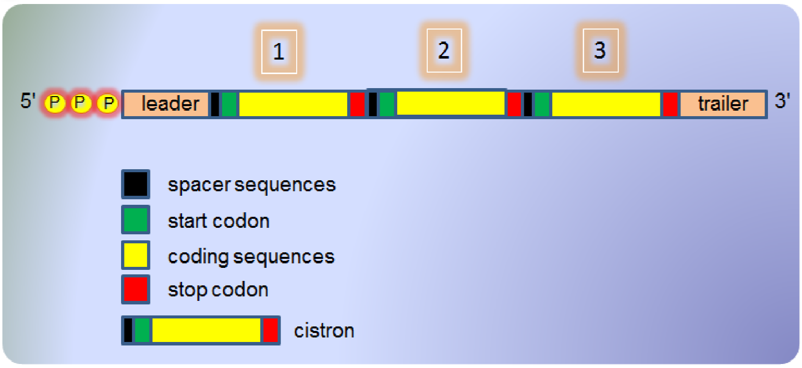
شكل (2.2): تشريح الجين. لاحظ بان الجين يتكون من قسمين القسم التنظيمي والذي لا يعبر جينياً عن نفسه والقسم التركيبي الذي يعبر جيناً عن نفسه (من تصميم المؤلف).

جينات بدائية النواة

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

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

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



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

جينات حقيقية النواة

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

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

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

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

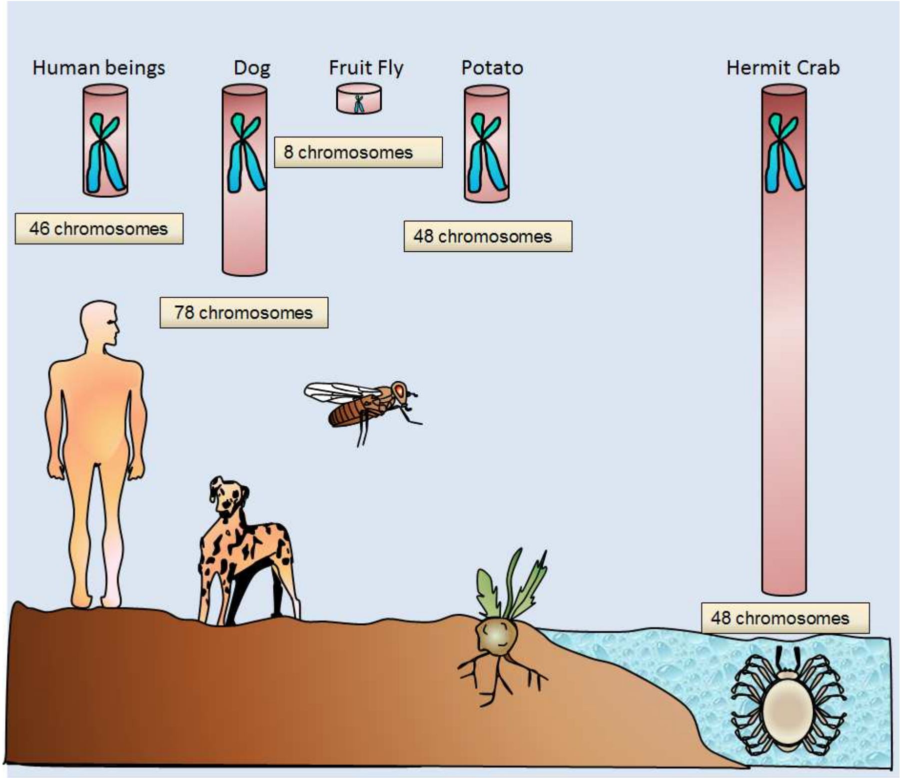
تسلسلات الدنا الغير مشفرة non-coding DNA sequences

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

وعلى أية حال، يوجد بعض الاستثناءات في تلك المعطيات، تدعى تلك الاستثناءات بالتناقض بنسبة سي C value paradox (الحرف C هي مختصر لكلمة content والتي تعني محتوى ومن هنا جاءت التسمية). إن نسبة سي C-value هي كمية الـ DNA في الجينوم الأحادي المجموعة الكروموسومية للأنواع. وكما لا حظنا في أعلاه، هنالك علاقة بين محتوى الـ DNA وتعقيد الكائن. ولكن، بالتناقض من ذلك، يبدو أنه ليس هنالك علاقة في بعض الكائنات الحية. وعلى الرغم من عدم ازدياد نسبة C الصغرى للكائنات الحقيقية النواة بازدياد تعقيد تلك الكائنات، يبدو أن في بعض الكائنات DNA أكبر بكثير من حاجتها. وعلى سبيل المثال، مدى وزن الـ DNA الموجود في اللبائن يكون بين 2 إلى 3 بيكوغرام (البيكوغرام الواحد يساوي 1012 غرام أو واحد مقسوماً على تريليون غرام). ولكن في حالة البرمائيات يكون هذا المدى من واحد إلى مئة بيكوغرام، وفي بعض النباتات كما في الزنبق (lily) على سبيل المثال، يكون محتوى الـ DNA في هذا النبات أكثر بمئة مرة من محتواه في البشر، وكذلك الحال بالنسبة للأسماك الرئوية (lungfishes).

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

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



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

التسلسلات الغير مشفرة

أولاً:

التسلسلات الغير مشفرة داخل الجين أو ذات العلاقة بالجين:

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

أ. الانترونات (Introns)

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

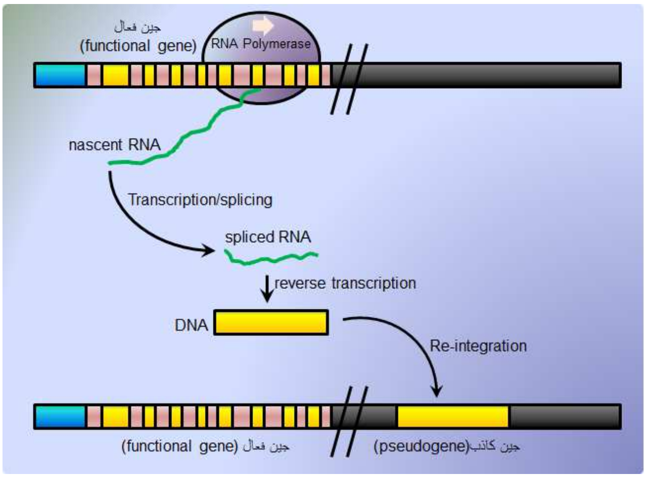
Philip Sharp　　Richard Roberts

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

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

ب. الجينات الكاذبة (Pseudogenes)

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



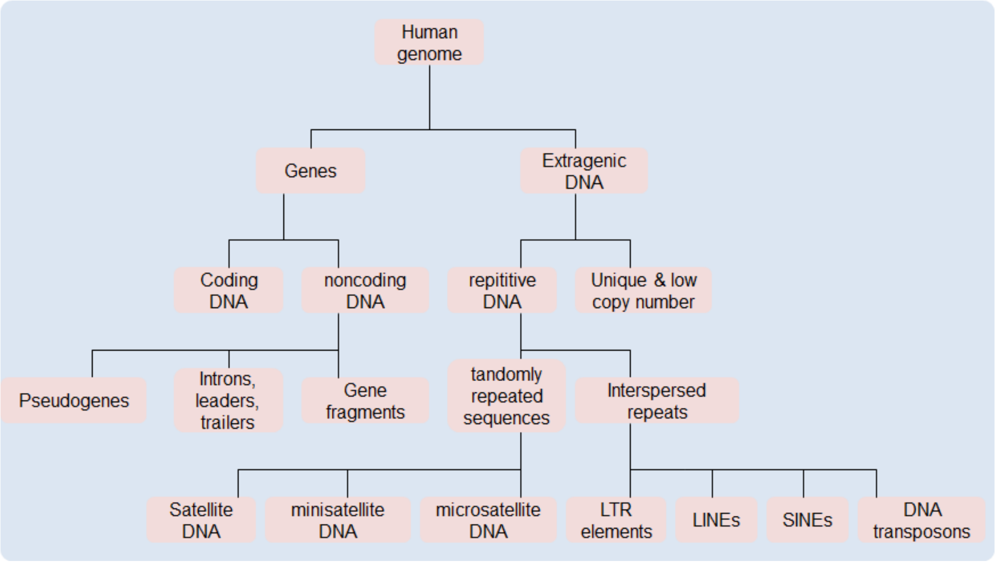
شكل (5.2): الجينات الكاذبة المعالجة والناشئة من انحشار جزيئات الـ mRNA المستنسخة بشكل معاكس. عندما يوجد إنزيم reverse transcriptase في الخلية، يقوم بنسخ جزيئات الـ mRNA إلى جزيئة DNA مزدوجة الشريط في حالات نادرة، يمكن لهذه الجزيئات أن تنحشر في الجينوم مولدة للجينات الكاذبة. وبسبب إزالة الانترونات بسرعة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

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

أ. التسلسلات المتكررة ترادفياً
Tandemly repeated sequences

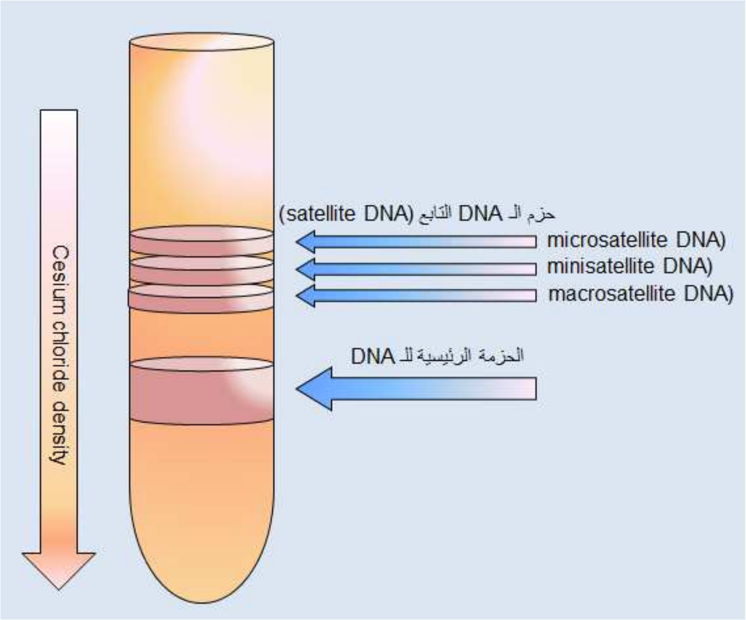
يحتوي جينوم الكائنات الراقيةعلى كمية من الـ DNA أكبر بكثير من الكمية الضرورية منه لتكوين الجينات حيث أن معظم هذا الـ DNA لايشفر عن أي وظيفة جينية، أي يعتبر كعناصر غير وراثية (noncoding elements).وكمثال على ذلك الجينوم البشري والذي هو جينوم عملاق يتألف من 3 بليون زوج قاعدي ($3x10^9$bp) لكل مجموعة مفردة (haploid) من الكروموسومات. حيث تبلغ نسبة DNA اللبائن ذات العلاقة مع الجينات بـ 30% فقط، بينما الـ 70% الباقية فهي غير مشفرة أصلاً. وتبلغ نسبة الـ DNA المشفر في الجينات 3% فقط من الكمية الاجمالية للـ DNA. يتألف الـ DNA ذو النسبة العالية (70%) من تسلسلات تكرارية لعدة مرات (repetitive DNA). وهنالك انواع مميزة من تلك التسلسلات التكرارية هي عبارة عن تكرارات معكوسة (tandem repeats). وبالاعتماد على حجمها ونمطها، صنفت تلك التكرارات الى عدة أنواع (شكل 6.2)، وهي الدنا التابع (satellite DNA) التقليدي، والتوابع الصغيرة (minisatellites)، والتوابع الصغيرة جداً (microsatellites). وكلها تؤلف 14% فقط من الـ DNA الاجمالي. يتألف أكثر من نصف الـ DNA للانسان من تكرارات منحشرة في جميع أنحاء الجينوم. ان أكثر تلك الأنواع أهمية هي التكرارات الطرفية الكبيرة (long terminal repeats: LTRs)، و العناصر النووية المنحشرة الطويلة (long interspersed nuclear elements: LINEs)، و العناصر النووية المنحشرة الصغيرة (short interspersed nuclear elements: SINEs)، والقفازات (transposons) (أنظر الفصل الثامن).

عند تعرض DNA الانسان الى النبذ المركزي ذو الكثافة المتدرجة باستعمال مادة كلوريد السيليوم، تكون النسبة العظمى من الـ DNA حزمة بكثافة نوعية معينة، ولكن تظهر ثلاث حزم (توابع أو satellites) اضافية بكثافات أقل بسبب أختلاف محتوى الكوانين – سايتوسين فيها مقارنة بالـ DNA الرئيسي (شكل7.2). تحتوي تلك الحزم الثلاث على الـ DNA التابع التقليدي (أو الـ DNA التابع الكبير macrosatellite DNA) والذي يتألف من تكرارات بطول 100-6500 زوج قاعدي. ويتألف DNA التوابع الصغيرة من تكرارت بطول 10-20 زوج قاعدي. أما DNA التوابع الصغيرة جداً من تكرارات بطول 2-5 زوج قاعدي. هذا وتعد التوابع الصغيرة (microsatellites) هي أكثر أنواع التوابع تكراراً.



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

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

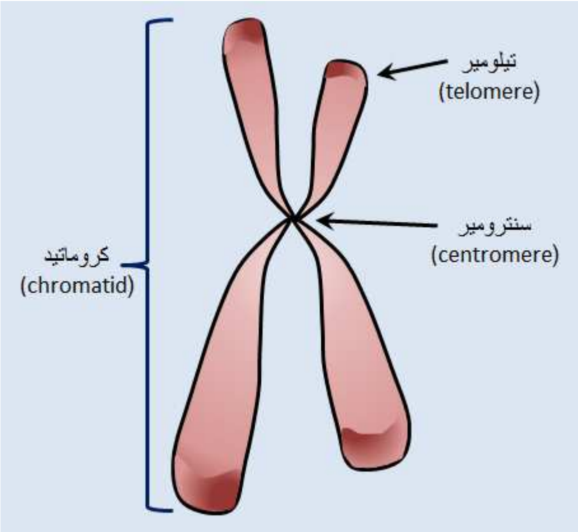


شكل (7.2): مخطط يوضح التسلسلات التكرارية التابعةالمكتشفة في جينوم الانسان وفقاً للنبذ المركزي المتدرج الكثافة (تصميم المؤلف).

ب. التيلومير والسنترومير (telomere and centromere)

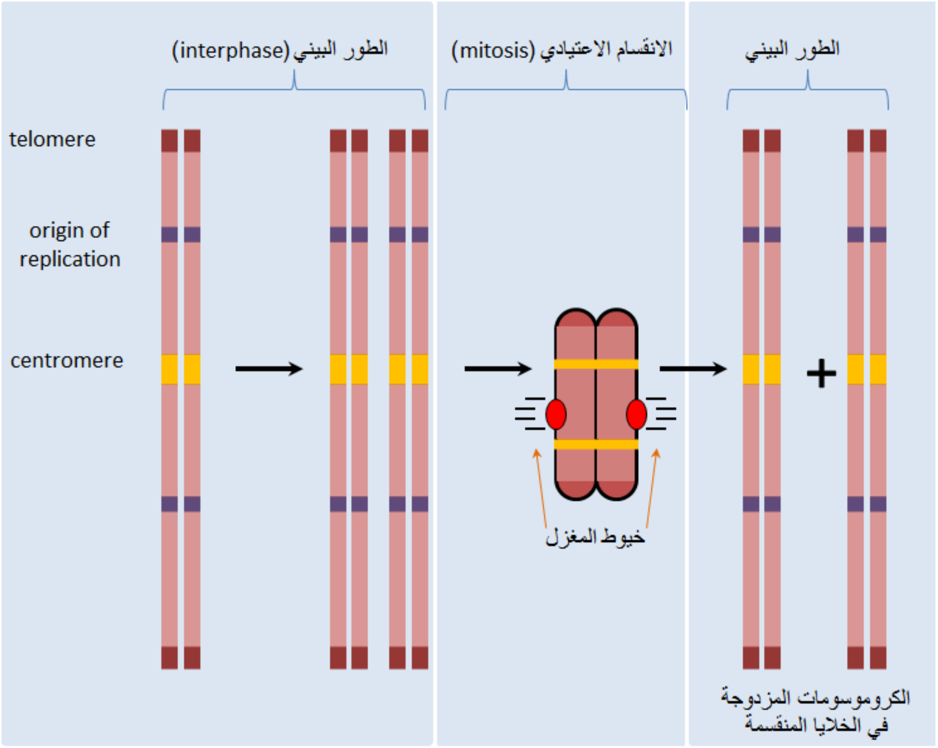
كل جزيئة DNA تكون كروموسوم خطي يجب أن تحتوي على الجزء الوسطي (سنترومير centromere)، واثنان من الأجزاء الطرفية (التيلوميرات telomeres)، وأصول التضاعف (replication origins). ولكن قبل أن نوضح معنى التيلوير والسنترومير لا بد لنا من اعطاء أساسيات بسيطة حول الحالات المختلفة للكروموسومات خلال دورة الخلية، حيث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

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



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

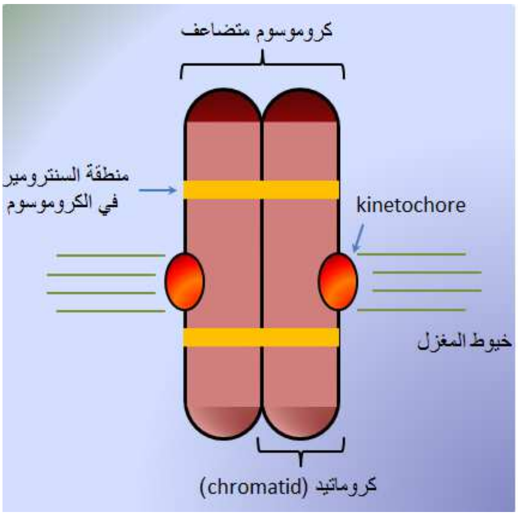
يعمل الكروموسوم كوحدة تركيبية مميزة وذلك لكي تعبر نسخة واحدة منه لكل خلية بنوية عند الانقسام، كل كروموسوم يجب أن يكون قادراً على أن يتضاعف، والنسخ المتضاعفة حديثاً يجب أن تنفصل لا حقاً وتتجزأ بشكل صحيح إلى خليتين بنويتين. هذه الوظائف الرئيسية، يتم التحكم بها من قبل ثلاث أنواع مختلفة للتسلسلات النيوكليوتيدية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



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

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

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



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

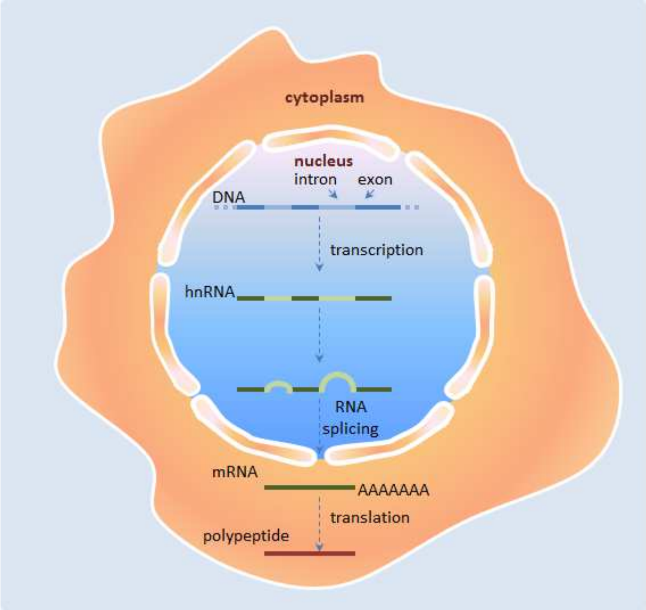
يكون النوع المتخصص الثالث من تسلسلات الـ DNA ما يعرف بالـ telomeres (إن كلمة *telo* هي كلمة إغريقية تعني "طرف"، ومعنى *"mero"* هو جزء، ولهذا فمعنى telomeres هو الأجزاء الطرفية)، وهي النهايات الطرفية للكروموسومات. يحتوي الـ telomere على تسلسلات نيوكليوتيدية تمكن نهايات الكروموسومات من أن تتضاعف بشكل كفوء.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

تدفق المعلومات الوراثية the flow of genetic information

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

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

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



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

الاستنساخ المعاكس reverse transcription

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

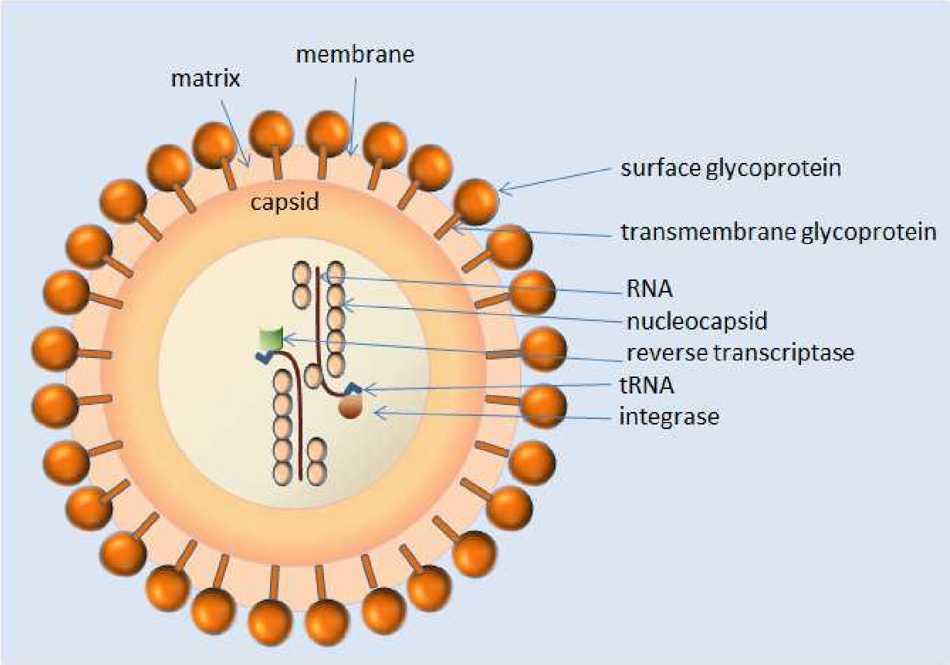
من الـ RNA إلى الـ DNA. تحتوي الفايروسات (التي تختلف عن الخلايا) أما على الـ DNA أو على الـ RNA. وتلك الفايروسات التي تحتوي على الـ DNA، فان القاعدة أعلاه في الطريق الواحد لجريان المعلومات الوراثية يمكن تطبيقها بدون صعوبة. وهنا يبرز السؤال: ما ذا يحدث في حالة تلك الفايروسات الحاوية على RNA؟

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

Howard Temin   David Baltimore

في عام 1963 بين Howard Temin بأن تضاعف الفايروسات الارتجاعية retroviruses التي تحتوي دقائقها على جينوم الـ RNA، تتثبط باستخدام المضاد الحيوي actinomycin D، والذي يرتبط بالـ DNA فقط، بينما لا يتثبط تضاعف فايروسات الـ RNA الأخرى باستخدام هذا العقار. وبما أن هذه المعلومة مربكة للمجتمع العلمي آن ذاك لأنها لا تتوافق مع العقيد المركزية لذا قوبلت بالتجاهل إلى عام 1970، عندما نشر كل من Temin و David Baltimore ملاحظة احتواء دقائق الفايروسات الارتجاعية على إنزيم DNA polymerase المعتمد على الـ RNA (RNA dependent DNA polymerase) أو المعروف بالـ reverse transcriptase. ويشار إلى هذا النوع من الجريان المعاكس للمعلومات الوراثية أحياناً بالـ "Teminism" نسبة إلى أحد مكتشفيه وهو Temin. إن نوع الجريان المعاكس للمعلومات، يكون ضد قاعدة العقيدة المركزية، وهذا قد اكتشف من قبل Temin و Baltimore كل على حدة عام 1970. استلم Temin و Baltimore جائزة نوبل لاكتشافهما لهذا الإنزيم. يدخل هذا الإنزيم في عملية خمج الفايروس الورمي للخلية الطبيعية وتحول تلك الخلية إلى خلية سرطانية. عندما يدخل الـ RNA الفايروسي إلى الخلية يكون محملاً بهذا الإنزيم معه (شكل12.2). يقوم الإنزيم بتخليق حلزون مزدوج هجين يتكون من DNA و RNA معاً (DNA-RNA double helix)، والذي يتحول إنزيمياً إلى حلزون مزدوج أصيل أي أن كلا الشريطين هما من الـ DNA (DNA-DNA double helix) والذي يستطيع أن ينحشر في كروموسوم العائل.

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



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

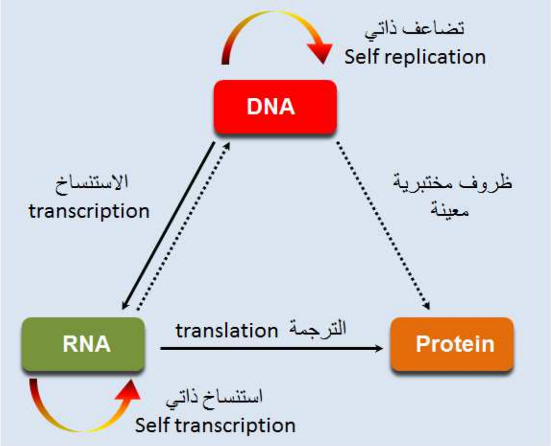
تضاعف الـ RNA الذاتي

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

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

تدخل الـ DNA في عملية الترجمة

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



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

ملحق الفصل الثاني

تطبيقات البرايون ودوره المثير في مفهوم العقيدة المركزية

Stanely Prusiner

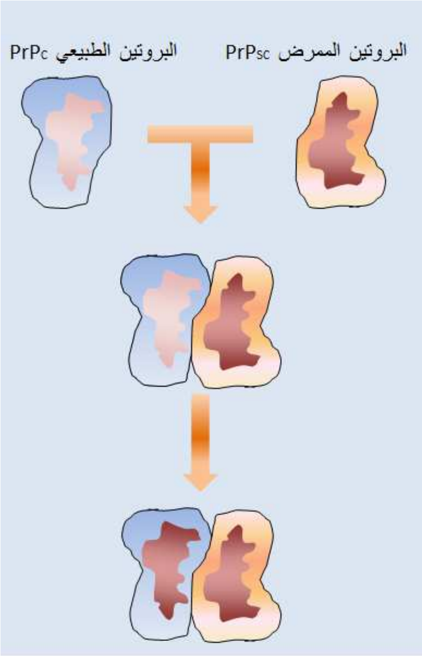
سميت البرايون (prion) بهذا الاسم من قبل Stanley. B. Prusiner في عام 1984 وقد منح نفس العالم على جائزة نوبل في الفسلجة والطب عام 1997 لاكتشافه لخواص بروتيات البرايون، حيث اشتق مصطلح برايون (prion) من عبارة "*p*roteinaceous *in*fectious *p*articles" والتي تعني "الدقائق البروتينية الخامجة"، وهي عناصر معدية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

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

من نوع PrPSc. ينتج أحد ذلكما البروتينين من هذا المعقد بروتينين أيضاً، والاثنان ينتجان لأربع وهكذا.

ينشأ نوع من الإرباك من حقيقة وجود ذلك البروتين والجين الذي يشفر عنه في الخلايا الطبيعية "الغير مخموجة". فعلى الرغم من عدم معرفة الدور الذي يلعبة بروتين PrP الطبيعي (PrPc) الا أنه يعبر عنه بشكل ملحوظ من قبل جين PrnP الذي يشفر عنه. وعندما يوجد PrPSc (وهو الشكل الخامج) فانه يتداخل مع PrPc ويسبب انطواء الأخير إلى الشكل البروتيني المسبب للمرض (شكل 14.2)، وبالتالي، فان الخمج بالبرايون الممرض PrPSc يحوّل بروتين PrP الطبيعي إلى بروتين PrP الغير طبيعي والذي يكون البرايون.

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



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

أسئلة الفصل الثاني

السؤال الأول: علل مايلي

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

السؤال الثاني: أختر الجواب الصحيح

- تصنف الجينات إلى صنفين وهما جينات تركيبية structural genes وجينات تنظيمية regulatory genes على أساس ....

a. function b. shape c. size d. structure

- لابد من أن نفهم من أن الجين هو ليس ....

a. بالمستودع الفعال b. بالمستودع الخامل c. بالمستودع القريب من الأحداث الخلوية d. بمستودع أصلاً

يعد لون العين مثالاً للـ ....

a. genotype b. phenotype c. both d. neither a nor b

- تعتبر .... في نيوكليوتيدات الـ DNA هي المعلومات الممثلة للجين.

a. phosphate b. sugar c. nitrogen base d. all

يمكن لنا أن نشبه الجين بـ ....

a. letter b. word c. sentence d. paragraph

يسمى الاصطفاف الخطي للأحماض الأمينية بالـ ....

a. primary structure b. secondary structure c. tertiary structure d. quadernary structure

تحتوي جزيئة .... على الانترونات (introns).

a. mRNA b. snRNA c. pre-RNA d. none

تتكون الجينات عادة من ....

a. DNA b. RNA c. protein d. "a" or "b" e. none

- تتألف جينات بدائية النواة من تسلسلات نيوكليوتيدية غير معترضة من قبل الانترونات ماعدا ......

a. *Archaebacteria*b. *Eubacteria* c. *Helicobacteria*d. *Mycobacteria* e. only “a” & “b”

- يحتوي العاثي ΦX174 على ....

a. 1000 genesb. split genesc. overlapping genesd. only “a” & “b”e. none

- من أهم أسباب شهرة الـ retroviruses في علم البايولوجي الجزيئي هو احتوائها على إنزيم ....

a. DNA polymerase b. DNase c. RNA polymerase d. RNase e. Reverse transcriptase

تسمى الفرضية التي تفسر سبب مرض جنون البقر بفرضية ....

a. DNA only hypothesis b. RNA only hypothesis c. Protein only hypothesis d. only “a” & “b” e. none

السؤال الثالث: عرف ما يلي:

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

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fourth edition, Garland Science/USA. 2002.

Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.

Bolsover S., Hyams J., Shephard E., White H., Wiedemann C. Cell biology. Second edition, Jhon Wiley and Sons, 2004.

Branden, C., Tooze, J., 1999. Introduction to Protein Structure (2d ed.). Garland, 1999.

Cann A. Principles of Molecular Virology. Fourth edition, Elsievier Academic Press, 2005.

CarterJ., and Suanders V. Virology: principles and applications. John Wiley and Sons, 2007.

Clark D. Molecular biology: understanding the genetics revolution. Elsevier, 2005.

Cochet, F. Gannon, R. Hen, L. Maroteaux, F. Perrin, and P. Chambon. 1979. Organization and sequence studies of the 17-piece chicken conalbumin gene. *Nature* 282: 567-574.

Creighton, T. E. Proteins: Structures and Molecular Principles (2d ed.). W. H. Freeman and Company, 1992.

Davis T., and Kipling D. Telomeres and Telomerase in Aging, Disease, and Cancer. Molecular Biology of Human Cancers An Advanced Student's Textbook - Wolfgang A. Schulz, 2008.

Dorit, R. Schoenbach, L.and Gilbert. W. 1990. How big is the universe of exons? *Science* 250: 1377-1382.

Krishna R., and Wold. F. 1993. Post-translational modification of proteins *Adv. Enzymol.Relat.Areas. Mol. Biol.* 67: 265-298.

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

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., and Matsudaira, P., Molecular Cell Biology (fifth edition). W. H. Freeman and Company, 2000.

Lupsky J. R., and Stankiewics P. Genomic Disorders. 2006, Humana Press Inc.

McCarthy B., and Holland J. (1965). Denatured DNA as a direct template for in vitro protein synthesis. *PNAS USA* 54: 880 – 886.

Paolella. P. Introduction to molecular biology. First edition, WCB/McGrowHill, 1998.

Passarge E. Color atlas of Genetics. Second edition, Thieme, 2001.

Pierce B. Genetics: A conceptual approach, 2002.

Schultz, G. E., and Schirmer, R. H., Principles of Protein Structure.Springer-Verlag, 1979.

Sharp. P.1988. RNA splicing and genes *J. Am. Med. Assoc.* 260: 3035-3041.

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

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

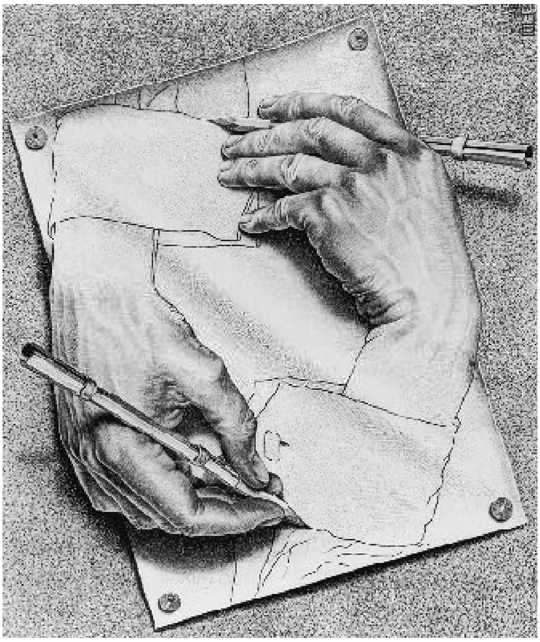
VermaP., and Agarwal V. molecular biology. First Edition Schandgoup, India 2004.

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

3

الفصل الثالث

تضاعف الـ DNA



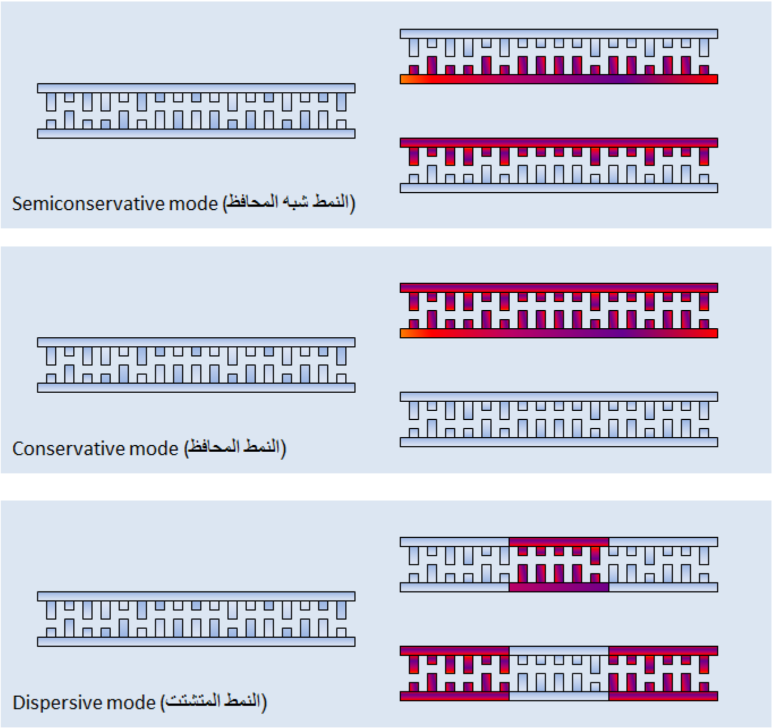
لوحة تناظرية توحي عملية التضاعف: هاتين اليدين تكملان بعضهما البعض وكذلك هي الحال بالنسبة لجزيئة الـ DNA الحاوية على شريطين يكملان بعضهما البعض، ليكونا فقاعة التضاعف ليمتد عليهما شريطي القالب ويرسمان طريقهما الى الأمام كما في هذه اللوحة (Lewis, 2009).

مقدمة

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

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

أما في الآلية الثالثة، الآلية المتشتتة (dispersive mode)، يتحطم كلا شريطي النيوكليوتيدات (يتشتت disperse) إلى قطع، والتي تعمل كقوالب لتخليق قطع جديدة من الـ DNA، ثم وبطريقة ما يعاد تكوينها من جديد إلى جزيئتي DNA كاملتين. وفي هذه الآلية، تتشتت كل جزيئة DNA مع قطع الـ DNA القديمة والجديدة، وفي هذه الحالة، لا يحافظ على أي من القطع الأصيلة (شكل1.3).

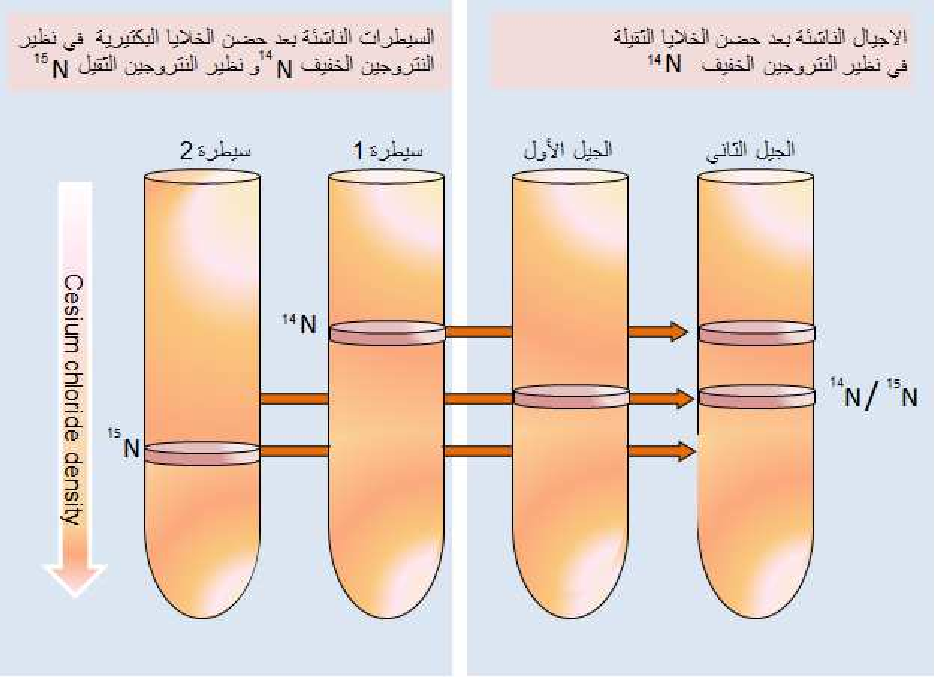


شكل (1.3): مخطط يوضح الفرضيات الثلاثة لتضاعف الـ DNA ، والتي تشمل الآلية الشبه محافظة، والآلية المحافظة، والآلية المتشتتة.يشير اللون الأزرق الى الأشرطة الأبوية بينما يشير اللون الأحمر الى الأشرطة البنوية (تصميم المؤلف).

M. Meselson   F. Stahl

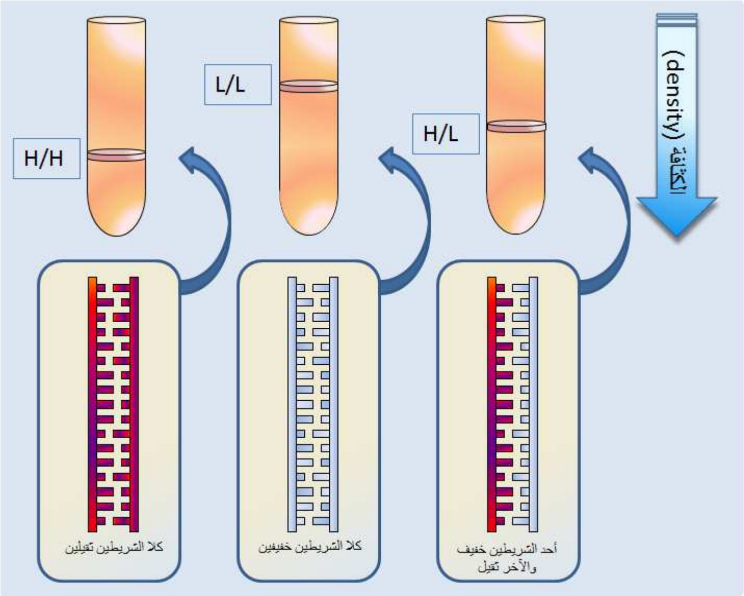
على الرغم من عدم احتياج التضاعف شبه المحافظ إلى آلية تكهنية لتضاعف جزيئة الـ DNA، ولكنه يحتاج إلى مقدار كبير من البراعة لابتكار تجربة تثبت ذلك للمرة الأولى. وكان هذا الابتكار من نصيب كل من Meselson و Stahl في عام 1958 حيث تصوروا طريقة لإثبات الآلية شبه المحافظة في تضاعف المادة الوراثية (الجينوم) لبكتريا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

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



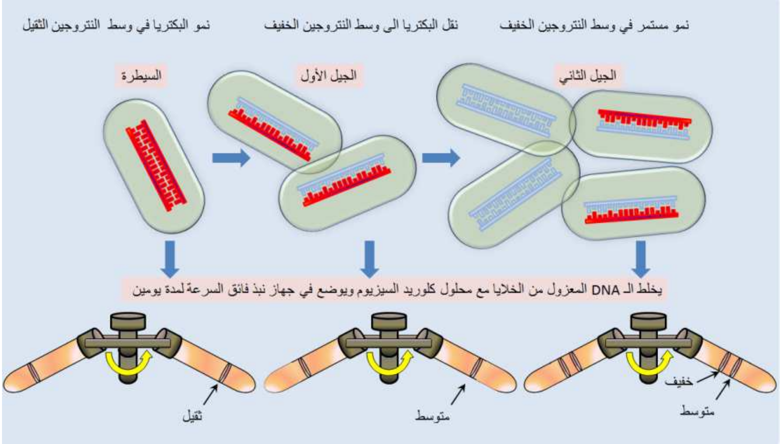
شكل (2.3): مخطط يوضح مواقع حزم الـ DNA الناتجة عن الاختلاف في كثافة النتروجين في الجيلين الأول والثاني ومقارنتهما مع سيطرة النتروجين الثقيل وسيطرة النتروجين الخفيف (تصميم المؤلف).

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



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

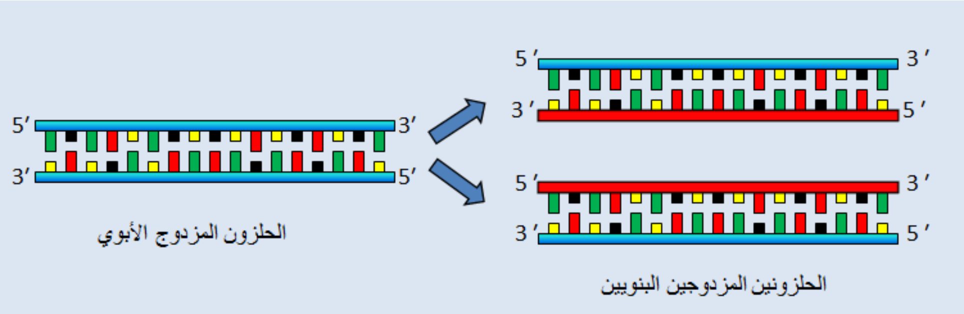
وبعد اجراء تلك التجارب عرف وبشكل واضح بأن الـ DNA في الكائنات بدائية وحقيقية النواة يتضاعف بشكل شبه محافظ. ومن الجدير بالذكر إن بعض المؤرخين والفلاسفة في مجال الوراثة قد اعتبروا هذه التجربة (شكل 4.3)من أكثر التجارب العلمية المنجزة روعة.



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

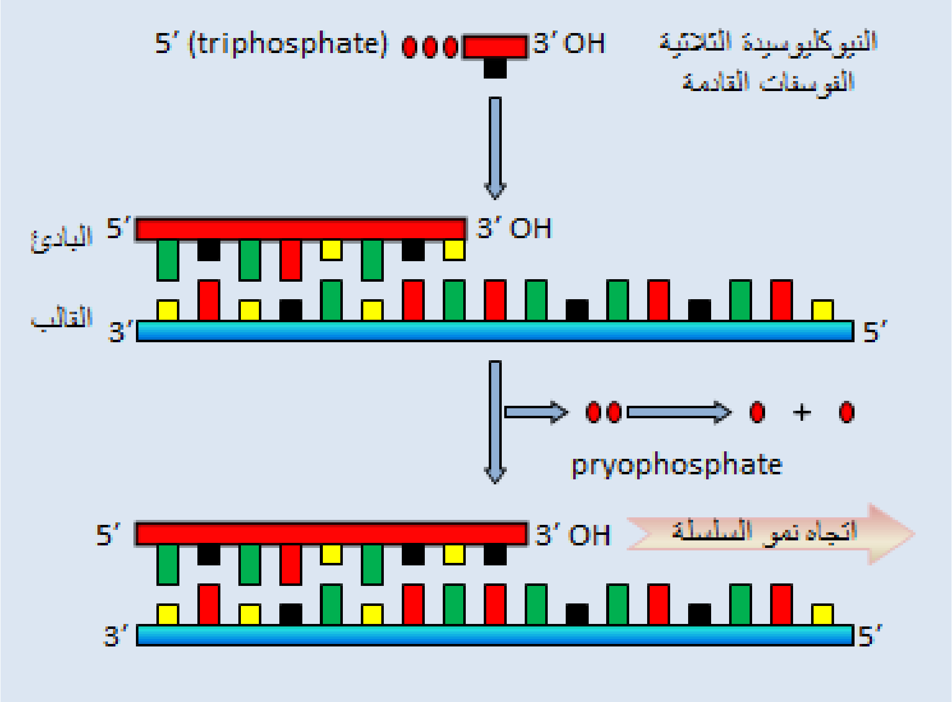
الازدواج القاعدي وتضاعف الـ DNA

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



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

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



شكل (6.3): عملية تخليق الـ DNA المحفزة من قبل إنزيم DNA polymerase: كما مبين، يحفز إنزيم DNA polymerase عملية إضافة النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات التدريجية للنهاية من نوع 3′ OH المتكشفة لشريط الباديء، والذي يزدوج بالشريط القالب الثاني. ولهذا يتبلمر شريط الـ DNA المصنع بالاتجاه من 5´ إلى 3´ كما هو مبين في الشكل السابق. ولأن كل نيوكليوتيدة ثلاثية الفوسفات deoxyribonucleoside triphosphate قادمة يجب أن تزدوج مع الشريط القالب لكي يتم تمييزها من قبل إنزيم الـ DNA polymerase، فان هذا الشريط هو الذي يحدد أي من النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات (A, C, G, or T) هي التي تضـاف. يقاد التفاعل من قبل تحرير ذرتي فوسفات pyrophosphate من قبل كل نيوكليوتيدة ثلاثية الفوسفات أثناء اندماجها في سلسلة الـ DNA الحديثة التكوين (تصميم المؤلف).

احتياجات إنزيم DNA polymerase

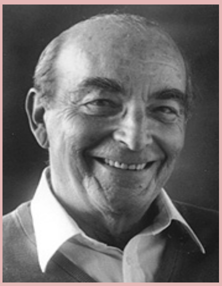
يحتاج إنزيم DNA polymerase في حالته النقية إلى:

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

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

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

قصة الإنزيمين DNA polymerase III و DNA polymerase I



Arthur Kornberg

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

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

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

كيفية عمل إنزيم DNA polymerase I في بكتريا القولون

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

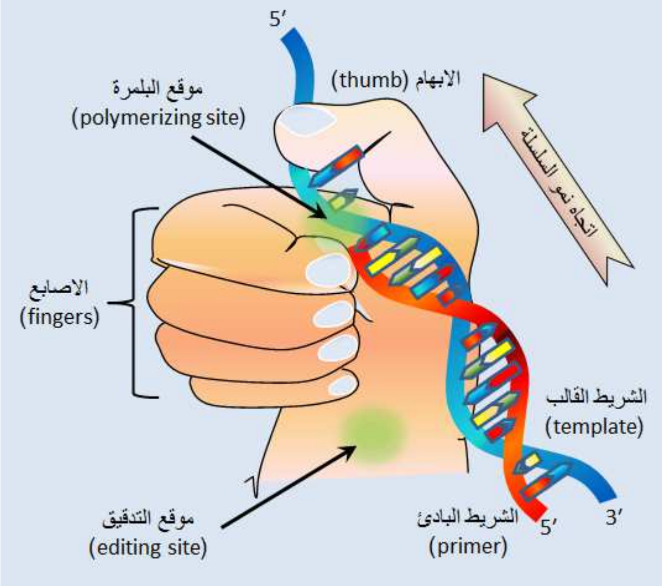
تتعاون تلك الفعاليات الثلاث مع بعضها البعض حيث توفر لانزيم DNA polymerase I خاصية فريدة، وهي تجمع ثلاث فعاليات في وحدة ثانوية واحدة، وهذا بدوره يعطي قابلية لهذا الانزيم لكي يشارك في فعاليات عديدة داخل وخارج جسم الكائن الحي بالاضافة الى عملية التضاعف كما في عملية اصلاح خلل الـ DNA (أنظر الفصل السابع)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

كيفية عمل إنزيم التضاعف الرئيس في بكتريا القولون

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

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

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



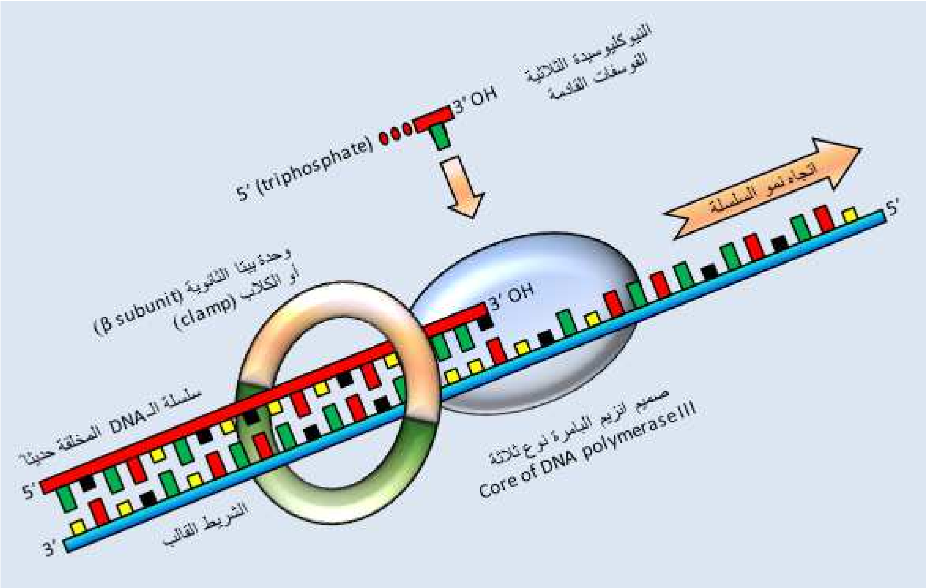
شكل (7.3): تركيب إنزيم البوليمريز الصميمي core DNA polymerase في بكتريا القولون حسب معطيات تقنية X-rays crystallography. وببساطة، يشبه إنزيم DNA polymerase اليد اليمنى نصف المفتوحة، حيث يلاحظ إن كل من راحة اليد palm، والأصابع fingers، والإبهام thumb يقبض على الـ DNA. بالاضافة الى ذلك، يبرز موقعين منفصلين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

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

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

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

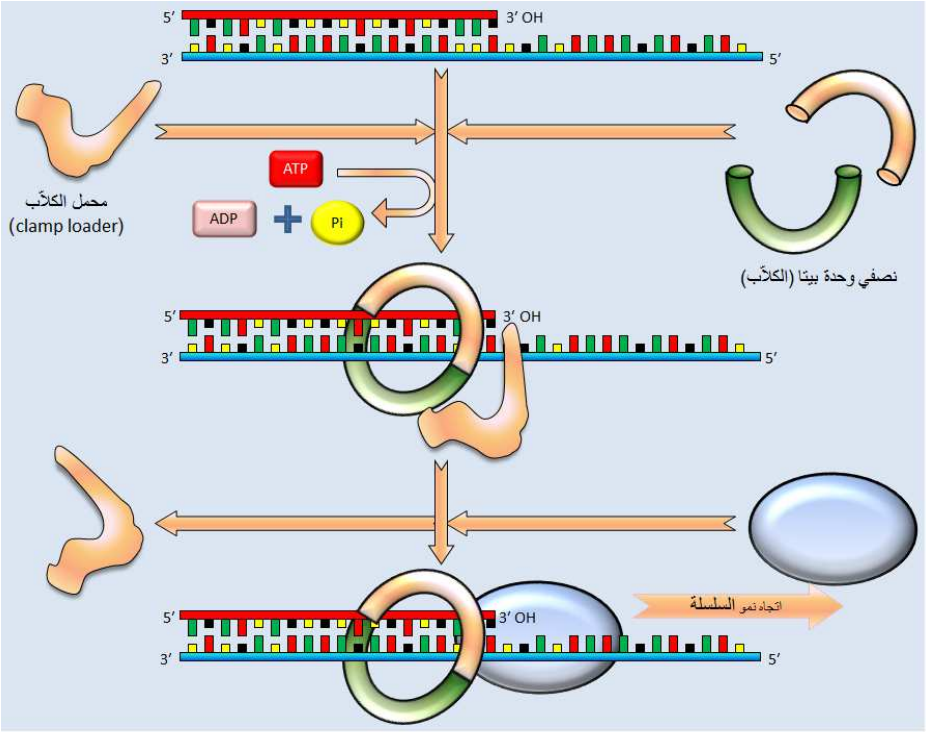
إلى أخرى. يرجع سبب وجود هذه الخواص المتناقضة إلى شكل وحدة β الثانوية التي تشبه الكعكة المحيطة بالـ DNA، أو التي تشبه الحلقة التي تنزلق على الحبل (شكل 8.3).



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

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

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



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

مشاكل تواجه إنزيم DNA polymerase في عملية التضاعف

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

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

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

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

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

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

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

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

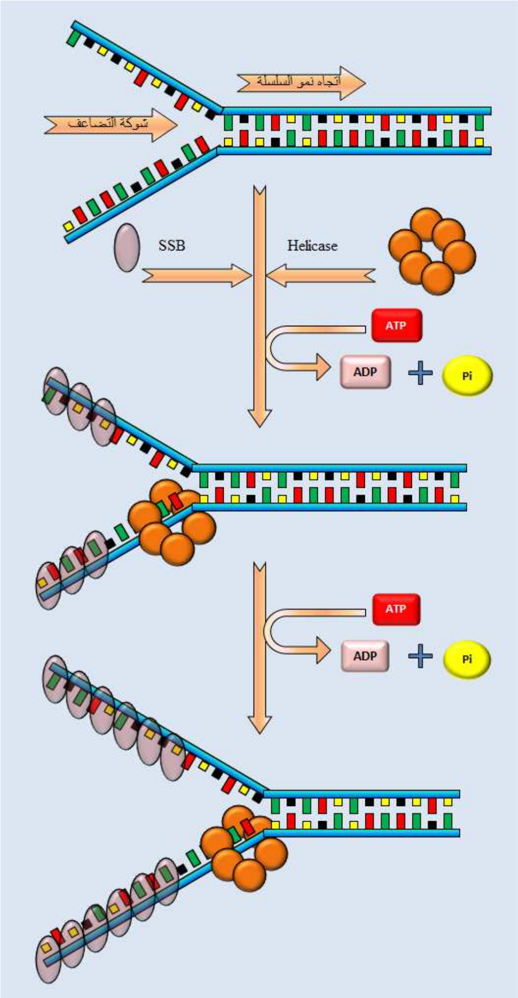
حل مشكلة فتح الالتفاف unwinding problem

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

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

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

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



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

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

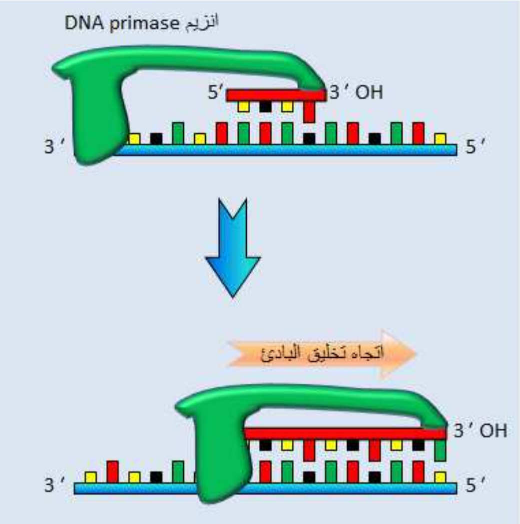
حدوث عملية إعادة الالتفاف rewinding ، وبذلك فأنها تقدم الشريط القالب لإنزيم الـ DNA polymerase.

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

حل مشكلة البدء Initiation problem:

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

لماذا يفضل أن يخلّق هنا RNA من قبل إنزيم DNA primase (الانزيم الذي يخلق بوادئ RNA صغيرة على شريط الـ lagging والذي لا يمتلك فعالية تصحيح الخطأ) ثم يمحى بدلا من أن يخلّق DNA مباشرة؟ وذلك لأن إنزيم DNA polymerase الذي له قابلية على تصليح الخطأ في تخليق الـ DNA ذاتياً لا يستطيع أن يبدأ تخليق السلسلة تلقائياً (*de novo*) لأنه يحتاج إلى نهاية هيدروكسيلية من نوع 3′ ، وتوفر هذه النهاية من قبل باديء الـ RNA الذي يخلقه إنزيم DNA primase (شكل 11.3)، والذي له القابلية – حاله في ذلك حال انزيم الـ RNA polymerase– على تخليق السلسلة تلقائياً (أنظر الفصل الرابع). وعلى أية حال، لابد من الاشارة الى أن الانزيمين يشاركان معاً في تخليق بوادئ الـ RNA في البكتريا، فبينما يقوم انزيم DNA primase باضافة البوادئ على شريط الـ lagging، يقوم انزيم RNA polymerase باضافة تلك البوادئ على شريط الـ leading.



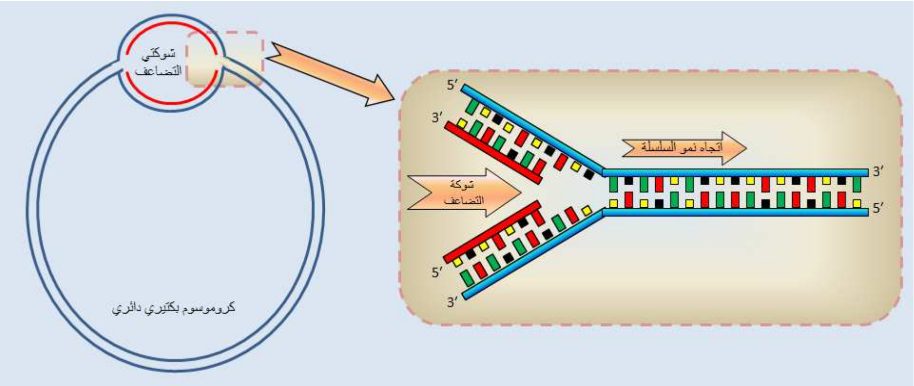
شكل (11.3): تخليق بادئ الـ RNA. مخطط توضيحي يبين التفاعل المحفز من قبل انزيم DNA primase. يقف انزيم الـ primase بعد تخليقه لمتعدد نيوكليوتيدي صغير ليوفر نهاية 3′ OH متكشفة لكي يقوم انزيم DNA polymerase باطالتها بعد ذلك (تصميم المؤلف).

حل مشكلة الاتجاهية directionality problem

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

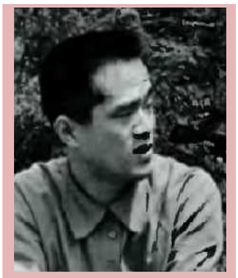
توصلت التحليلات الجارية في بداية الستينات بأن هنالك مناطق تضاعفية صغيرة تتحرك بصورة دؤوبة على طول حلزون الـ DNA المزدوج الأبوي. ولأن شكلها يشبه الحرف Y لذا سمّيت هذه المنطقة الفعالة بشوكة التضاعف replication fork (شكل12.3). وهي منطقة متخصصة بشكل عالي من الـ DNA، والتي يقوم عندها إنزيم DNA polymerase بإضافة النيوكليوتيدات. تبدأ تلك الشوكات التضاعفية بالتكون عند

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



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

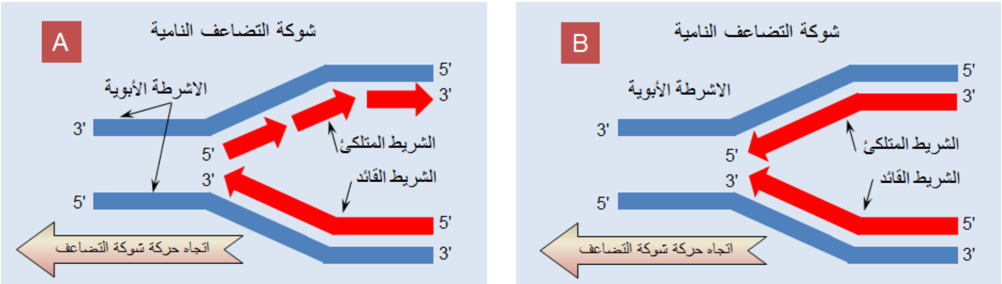
مبدئياً، إن أبسط ميكانيكية لتضاعف الـ DNA هي النمو المستمر لكلا الشريطين الجديدين، نيوكليوتيدة بعد نيوكليوتيدة، حيث تتحرك شوكة التضاعف من إحدى نهايتي الـ DNA إلى النهاية الأخرى، ولكن بسبب طبيعة شريطي الـ DNA ذات الاتجاه المتعاكس antiparallel orientation فان هذه الآلية ستحتاج إلى شريط بنوي واحد لكي يتبلمر بالاتجاه من ´5 إلى ´3 والآخر يتبلمر بالاتجاه المعاكس. مثل هكذا شوكة تضاعف ستحتاج إلى نوعين مختلفين من إنزيمات الـ DNA polymerase . أحدهما يتبلمر بالاتجاه من ´5إلى ´3 ، أما الآخر، فانه يتحرك بالاتجاه المعاكس (من ´3 إلى ´5 شكل A.13.3). ولكن هكذا نوع من البلمرة لا يحصل في عملية التضاعف، حيث لا يوجد إنزيم DNA polymerase يمتلك الفعالية المبلمرة ذات الاتجاه من ´3 إلى ´5. إذن، كيف يتم إنجاز نمو سلسلة DNA بالاتجاه من ´3 إلى ´5؟



Reiji Okazaki

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

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

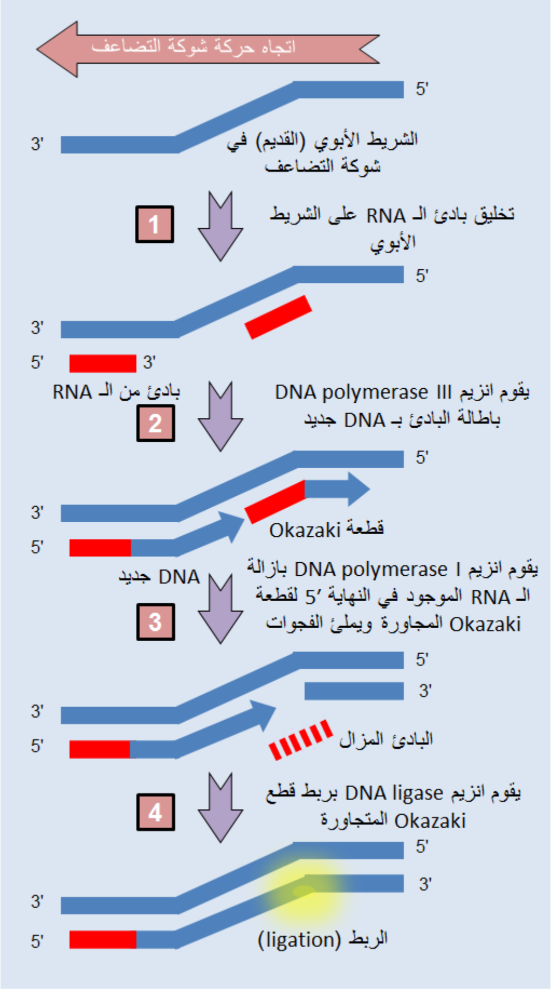


شكل (3 . 13): (A) الموديل الصحيح لتضاعف الـ DNA، والذي يتضمن التخليق غير المستمر لقطع أوكازاكي في شريط الـ lagging. (B) موديل غير صحيح لتضاعف الـ DNA. ولو أن هذا الموديل يبدو بأنه أبسط موديل معقول لتضاعف الـ DNA، ولكن الآلية المبينة بشكل مخطط هنا هي ليست تلك التي تستخدمها الخلايا في تضاعفها. وفي هذا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

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

<u>ففي الخطوة الأولى:</u> يقوم إنزيم RNA primase والذي يستخدم ribonucleoside triphosphates) بدلا من deoxyribonucleoside triphosphates) بتخليق بواديء RNA صغيرة short RNA primers على شريط الـ lagging) شكل 14.3).

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



شكل (14.3) : كيفية تخليق قطع أوكازاكي في الشريط الـ laggingوالمتألفة من أربع خطوات: وهي خطوة (1) تخليق البادئ (2) اطالة البادئ و (3) ازالة الـ RNA وملئ الفجوات و (4) لحم قطع Okazaki المتولدة ببعضها البعض (تصميم المؤلف).

<u>في الخطوة الثالثة:</u> ، يعمل نظام خاص وسريع لإصلاح الـ DNA وذلك لإنتاج سلسلة مستمرة من قطع الـ DNA على شريط الـ lagging من خلال إزالة بوادىء الـ

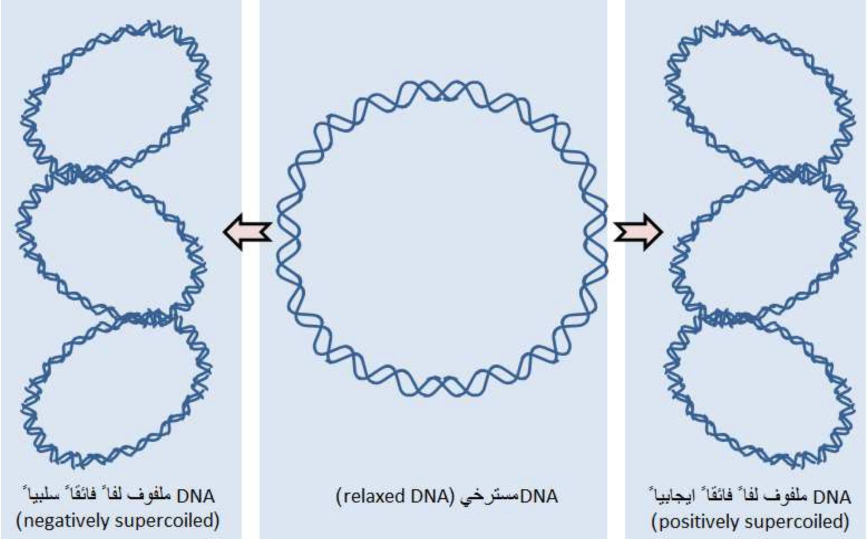
RNA واستبدالها بتسلسلات الـ DNA. يتم ذلك في بكتريا القولون بواسطة إنزيم DNA polymerase I.

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

حل المشكلة الطبولوجية topological problem

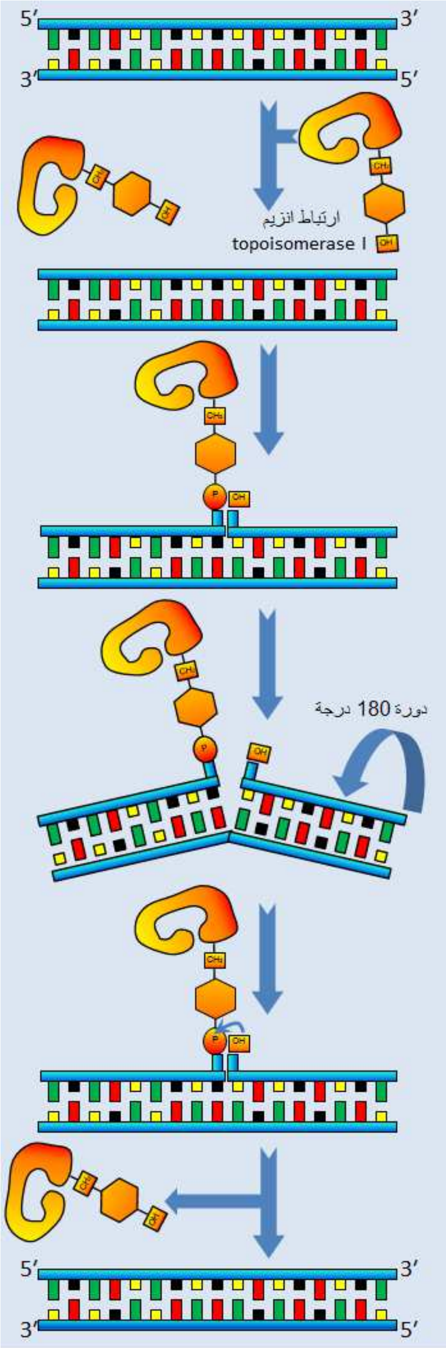
بما أن جزيئة الـ DNA تتكون من شريطين يلتفان حول بعضهما البعض، تواجه بعض العمليات الخاصة كما في تضاعف الـ DNA وإنهاءه بالإضافة إلى عملية الاستنساخ مشكلات طوبولوجية. تسبب إنزيمات معينة في الخلية حصول حالة اللف المبالغ فيه overcoiling (اللف الفائق الموجب positive supercoiling) أو حالة اللف الأقل من اللازم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

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



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

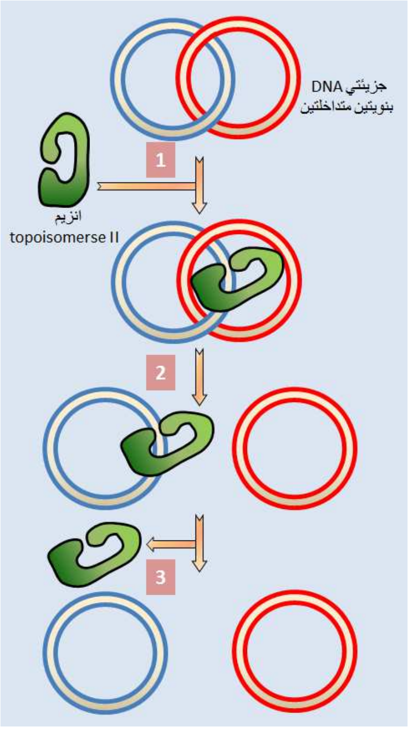
يزيد اللف الفائق السالب من عدد لفات حلزون مزدوج واحد حول الآخر (يدعى هذا بعدد الربط linking number أو L)، بينما يقللها اللف الفائق الموجب. تحتوي كل الأشكال الثلاثة الملاحظة في الشكل 14.3 على نفس التسلسل، ولكنها تختلف في عدد الربط. ووفقاً لذلك، تدعى هذه بالآيزوميرات الطوبولوجية (topological isomers) أو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



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

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

بالإضافة إلى أهمية إنزيمات topoisomerases في عملية التضاعف السابقة الذكر، فإنها تعد ذات أهمية بصورة عامة في أوجه أخرى، وتتضح هذه الأهمية من خلال التجارب الجارية على الجينات التي تشفر لهذه الإنزيمات. تبين أن تطفير هذه الجينات يؤدي إلى إن البكتريا التي تتعرض إلى هكذا تطفير تنمو بشكل فقير جداً. تقوم إنزيمات الـ topoisomerases بإزالة الـDNA المشربك tangled DNA كما في عملية تكثف الكروموسوم chromosome condensation (راجع الفصل الثاني). كما تؤدي إنزيم الـ topoisomerase II دوراً مهماً في المرحلة النهائية لتضاعف الجزيئات الدائرية، فعندما يكتمل تضاعف جزيئة الـ DNA الدائرية تتكون حلقتين متداخلتين مع بعضهما البعض، وهنا تعمل إنزيمات DNA topoisomerase على فصل تلك الجزيئتين المتداخلتين عن بعضهما البعض (شكل 17.3). يعمل هذا الانزيم بطريقة مشابهة لانزيم topoisomerase I ولكنه يسبب كسراً مؤقتاً في كل من شريطي الحلزون المزدوج، وبهذه الطريقة يرتبط الانزيم topoisomerase II بأحد الدائرتين المتولدتين من التضاعف ذات الشريط المزدوج ويسبب كسر مؤقت ذو شريط مزدوج والذي يعمل "كبوابة" يمكن من خلالها أن تعبر دائرة الـ DNA (شكل 17.3). ثم يقوم انزيم topoisomerase II باعادة لحم الأشرطة المكسورة.



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

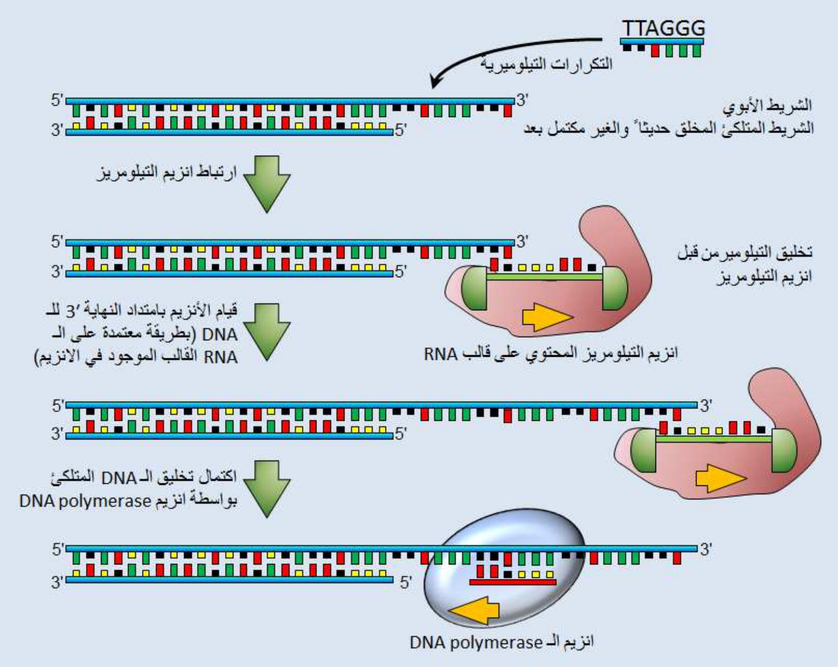
حل مشكلة نهاية التضاعف end replication problem

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

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

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

تكون هنالك مشكلة في إكمال التضاعف (شكل 18.3). عند غياب التيلومير، فأن تضاعف الـ DNA الشبه غير مستمر سوف يسبب في أنتاج جزئية خطية والتي تصبح أقصر وأقصر مع كل تضاعف. لقد بين Watson هذا التقصّر بشكل غير مباشر إذ لاحظ حجب جزء من التيلومير عن فعالية إنزيم بوليمريز الـ DNA وبتلك الوسيلة يتم اعتراض القمم عن التضاعف مع كل انقسام خلوي متعاقب ، وبمعنى آخر ينقص طول التيلوميرات مع كل دورة تضاعف، ولسنوات عديدة لوحظ بأن الفقدان المتدرج للتيلوميرات ربما يعمل كآلية محفزة أساسية لبدء الشيخوخة. ولكن تنشيط إنزيم التيلومريز (وهو عبارة عن معقد من البروتينات والـ RNA، حيث يعمل المكون RNA الدور الأساسي في تحفيز إضافة التسلسلات التيلوميرية في كل دورة تضاعف بينما يقتصر دور البروتينات الأخرى على مساعدة الـ RNA في هذه العملية) في الخلايا السرطانية غالباً يعمل على تعويض ذلك الخلل بإضافة تسلسلات متلاحقة متكررة ترادفيا (TTAGGG) بعد كل عملية تضاعفية وبالتالي تحافظ الخلايا السرطانية على ديمومتها (شكل18.3).



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

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

Elizabeth Blackburn

لقد اكتشف كل من Blackburn Elizabeth و Carol Greider في سنة 1985 بأن هنالك فعالية في مستخلصات الطفيلي *Tetrahymena* وتقوم هذه الفعالية بإضافة التكرارات التيلوميرية لبوادئ الـ DNA التيلوميرية قليلة النيوكليوتيدات المفردة الشريط، ووجدوا أيضا بأن هذه العملية تثبيط بمعاملة المستلخص بالإنزيم المحطم للرنا، ولهذا تسمى هذه الفعالية المعتمدة على الـ DNA بأنزيم terminal transferase أو بالتيلومريز ، حيث تحدث العملية بوساطة نسخ تسلسل الشريط القالب والذي هو جزء من المكون رنا بهذا الإنزيم. وفيما بعد وجد بأن هذا الإنزيم يتكون من المكون رنا، والفعالية الإنزيمية لهذا الإنزيم تحتاج إلى كل من المكون رنا والمكونات البروتينية. درس هذا الإنزيم بشكل مفصل باستخدام الكائن الهدبي *T. thermophila* لأن خلية مفردة لهذا الكائن الحي تمتلك أكثر من 40,000 تيلومير. وعموماً، يمكن تلخيص آلية تفاعل إنزيم التيلومريز الرئيسية بالآتي: تمييز البادئ ، إضافة النيوكليوتيدات ، والانتقال من مكان إلى آخر(شكل18.3) وبهذه الطريقة يقوم هذا الإنزيم بمد النتوء المنتهي بالنهاية ′3 الغني بالكوانين والموجود بنهايات التيلوميرات.

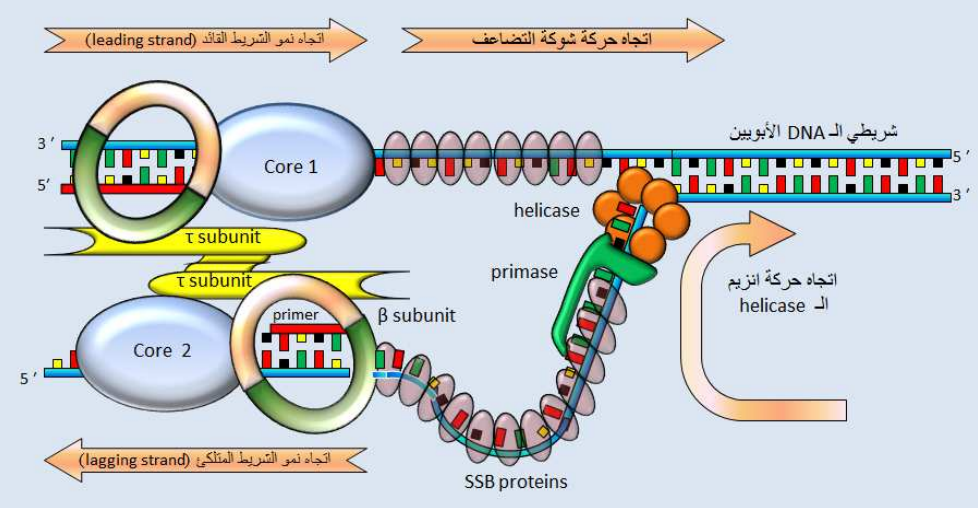
خلاصة خطوات التضاعف:

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

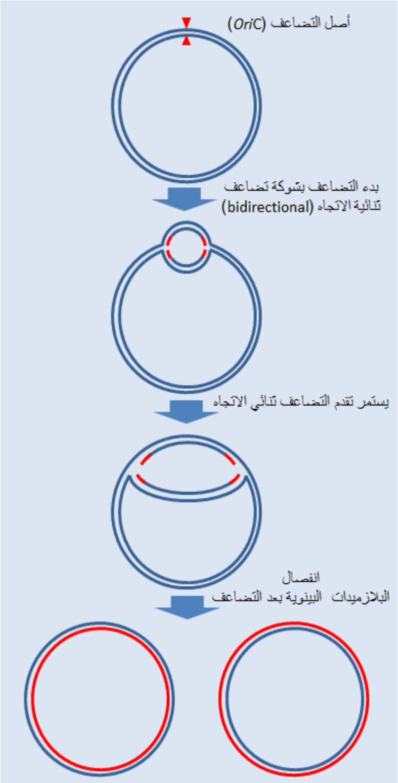
يعد إنزيم DNA polymerase III إنزيم التضاعف الرئيسي في بكتريا القولون. يمكن لهذا الإنزيم أن يضيف النيوكليوتيدة للنهاية ′3 للسلسلة الموجودة مسبقاً من النيوكليوتيدات، ولكن لا يمكن له من أن يبتدأ تخليق السلسلة آنياً *de novo* synthesis. ولهذا السبب، يقوم إنزيم RNA primase، وهو أحد أنواع إنزيم RNA polymerase،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

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

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



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



تراكيب تضاعفية أخرى

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

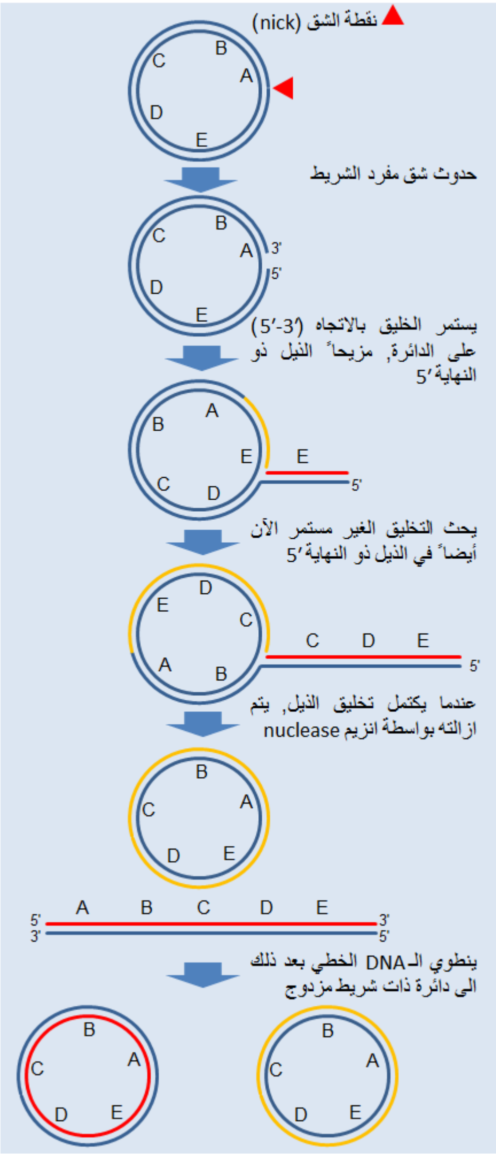
ويتقدم التضاعف هنا من منشأ واحد باتجاه واحد unidirectional أو باتجاهين bidirectional إلى أن يتم نسخ البلازميد كاملاً.

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

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

موديل الدائرة المتحرجة Rolling Circle Model

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



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

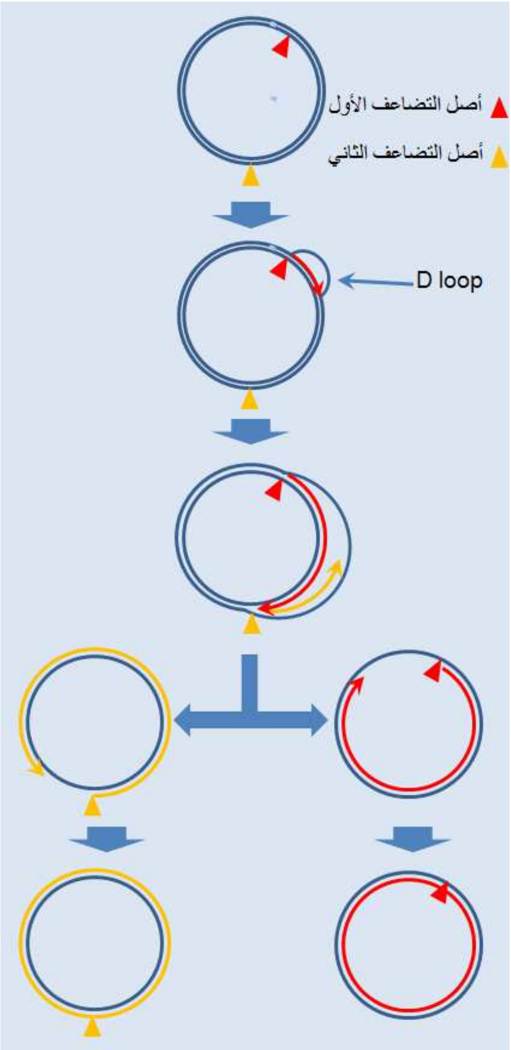
وتحت تأثير بروتينات الـ helicase والـ SSBs تتولد شوكة التضاعف. وهنا يكون تخليق الشريط البادئ (primer) غير ضروري بسبب توفر النهاية الهيدروكسيلية من نوع

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

موديل عروة الإزاحة (D-Loop Model)

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

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

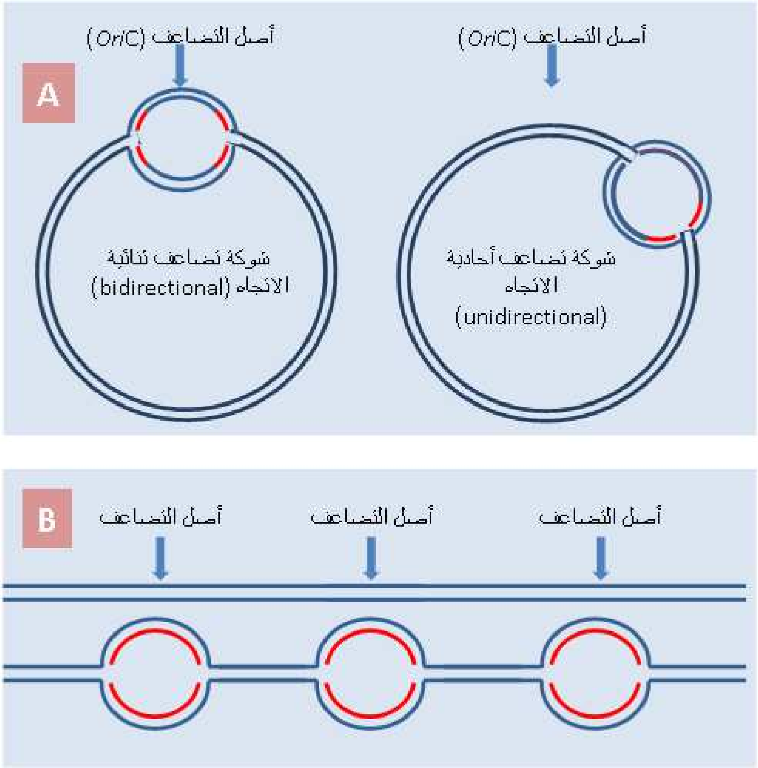


شكل (22.3): موديل عروة الحرف D في تضاعف المايتوكوندريا والكلوروبلاست. تتكون عروات الإزاحة من تضاعف المايتوكوندريا والكلوروبلاست عند مناطق مختلفة في شريطي الحلزون المزدوج (تصميم المؤلف).

ملحق الفصل الثالث

التضاعف في الكائنات حقيقية النواة

على الرغم من تشابه الخواص العامة لتضاعف الـ DNA في الخلايا حقيقية النواة مع تلك التي في بدائية النواة، إلا إن هنالك بعض الفروق المهمة. إن كروموسومات الكائنات حقيقية النواة كبيرة جداً، وفي بعض الحالات تكون أكبر بالالآف المرات من نظيراتها في بدائية النواة. ولكي تتضاعف هذه الكتل الضخمة الخطية من الـ DNA بوقت معقول، يجب عليها أن تحتوي على عدّة مناطق لبداية عملية التضاعف والتي تعرف بأصول التضاعف origins of replication (*Ori*C). وهي عادة ما يزيد عددها عن 100 أصل للتضاعف. بينما لا يوجد في جينوم genome بكتريا القولون الدائري سوى أصل تضاعفي واحد (شكل23.3).



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

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

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

أسئلة الفصل الثالث

السؤال الأول: علل مايلي

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

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

السؤال الثاني: أختر الجواب الصحيح

- في كل خطوة من خطوات التضاعف عندما تضاف كل نيوكليوتيدة إلى شريط الـ DNA المخلق لابد من تحرر ....

a. nucleotide b. nucleoside c. monophosphate d. pyrophosphate

- قام العالم Arthur Kornberg في عام 1957 بعزل إنزيم .... وأطلق عليه اسمه.

a. DNA polymerase I b. DNA polymerase III c. DNA polymerase III d. DNA polymerase VI

- ....: وتتمثل هذه المشكلة بحدوث حالة اللف الفائق (supercoiling) عند تقدم فقاعة التضاعف replication fork إلى الإمام.

a. unwinding problem b. initiation problem c. directionality problem d. topological problem

- يبلغ طول قطع أوكازاكي في البشر .... نيوكليوتيدة تقريباً.

a. 10 b. 100 c. 1000 d. 10000

- استخدمت Elizabeth Blackburn في تجاربها لاكتشاف انزيم telomerae الكائن الحي ....

a. *Tetrahymena th.* b. hippopotamus c. *Salmonella typhi* d. Neanderthal

- إن الموديل السائد في عملية التضاعف هو ....

a. theta b. rolling circle c. strand displacement d. non

- يحدث تضاعف الدائرة المتدحرجة rolling circle replication في ....

a. F plasmids b. R plasmids c. Mega plasmids d. mitochondria

- إذا احتوى أحد الشريطين الأبويين على أصل تضاعفي واحتوى الشريط الأبوي الآخر المكمل له على أصل تضاعفي مختلف عن الأول عندها يسمى هذا التضاعف بـ..........

a. theta replication b. rolling circle replication c. strand displacement replication d. conservative replication

- يناظر عمل إنزيم DNA polymerase III في بدائية النواة عمل إنزيم .... في حقيقية النواة.

a. DNA polymerase α b. DNA polymerase β c. DNA polymerase γ d. DNA polymerase δ

- تعد فرضية .... هي الفرضية الصحيحة بدون شك لتضاعف الـ DNA حسب Meselson و Stahl.

a. conservative mode b. semi -conservative mode c. dispersive mode d. only “a” and “b

- يعمل إنزيم .... دوراً رئيسياً في آلية الإصلاح المعروفة بـ SOS response.

a. DNA polymerase I b. DNA polymerase II c. DNA polymerase III d. primase

- توجد فعالية تصحيح الخطأ 5´ - 3´ في وحدة .... الثانوية لانزيم DNA polymerase III

a. α b. β c. γ d. ε

- إن سرعة إنزيمات DNA polymerases في اللبائن (حقيقية النواة) أقل بعشر مرات من سرعة إنزيمات DNA polymerases في البكتريا (بدائية النواة)، وذلك بسبب وجود الـ ------- والتي تعيق حركة إنزيمات DNA polymerases.

a- nucleosomes b- nucleotides c- helicases d- replication fork

- عندما يستخدم شريط الـ DNA الحاوي على التسلسل 5′ GACTAACGATGC 3′ كقالب في عملية التضاعف، فان تسلسل شريط الـ DNA البنوي الناتج من هذا الشريط القالب سيكون:

a. 3′CTGATTGCTACG 5′b. 5′GCATCGTTAGTC 3′c. 5′CTGATTGCTACG 3′
d. 3′CGTAGCAATCAG 5′ e. 3′CGUAGCAAUCAG 5′

- لا يمكن لـ .... من أن يلعب دوراً في عملية التضاعف

a. SSBs b. OriC c. telomerase d. e. nucleosomes

- يقوم انزيم .... ببدأ عملية تضاعف شريط الـ leading.

a. DNA polymerase I b. DNA polymerase III c. primase d. RNA polymerase

السؤال الثالث: عرف ما يلي

Dispersive mode of DNA replication, Primosome, Replication fork, Replisome, D structure, *Ori*C, SSBs, DNA polymerase γ

وللمزيد من الاطلاع اقراء

Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.

Arezi B.and Kuchta. R. 2000. Eukaryotic DNA primase *Trends Biochem. Sci.* 25: 572-576.

Beese L. Derbyshire V. and Steitz T. 1993. Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA *Science* 260: 352-355.

Berk A., Zipursky S., Baltimor D., Darnell J., and Lodish H. Molecular Biology.Fourth edition. Paul Matuataira,USA, 1998.

Blackburn, E. H. (1999). The Telomere and Telomerase, How they are Interact? *Mount Sinal Journal of Medicine* 66: 292- 400.

Bolsover S., Hyams J., Shephard E., White H., Wiedemann C. Cell biology. Second edition, Jhon Wiley and Sons, 2004.

Brandy, C. Elizabeth Blackburn and the story of telomeres – deciphering the ends of DNA. The MIT Press Cambridge, Massachusetts London, England, 2007.

Brautigam C.and SteitzT. 1998. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA

polymerases and their substrate complexes *Curr. Opin.Struct. Biol.* 8: 54-63.
Cooper J. and Hausman R.The cell, A Molecular Approach.Fourth edition, Sinauer Associates, 2007.
Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. L., Weinrich, A. A., Avilion, C. P., Chiu, R. R., Adams, E., Chang, R. C., Allsopp, J. and Yu, H. (1995).The RNA Component of Human Telomerase. *Science* 269: 1246-1241.
Fitzgerald-Hayes M. and Reichsman F. DNA and Biotechnology.Third edition, Elsevier/ 2010.
Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1987). The Telomere Terminal Transferase of Tetrahymena Is a Ribonucleoprotein Enzyme With Two Kinds of Primer Specifity. *Cell* 51: 887- 98.
Greider, C. W. (1998). Telomeres and Senescence, The History, The Experiment, The Future Current Biology 8: 178- 181.
HamesB., and Hooper N. Instant notes in biochemistry. Third edition, BIOS Scientific Publishers Limited, 2005.
Hübscher U., Nasheuer H., and Syväoja J. 2000. Eukaryotic DNA polymerases: A growing family *Trends Biochem. Sci.* 25: 143-147.
Kornberg, A., and Baker, T. A., *DNA Replication* (2d ed.).W. H. Freeman and Company, 1992.
Lewin B. Genes. VII, Oxford University Press, 2000.
Lewis R. Human Genetics: concepts and applications. Ninth edition, McGrow-Hill, 2009.
Murray R., Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell V., Weil P. Harper's Illustrated Biochemistry. 28th edition, McGrow Hill Medical, 2009.
Steitz T. 1999. DNA polymerases: Structural diversity and common mechanisms *J. Biol. Chem.* 274: 17395-17398.
Tamarin .Principles of genetics. Seventh edition.The McGraw−Hill. 2001.
VermaP., and Agarwal V. molecular biology. First Edition Schandgoup, India 2004.
Watson J. A Passion for DNA; genes, genomes and society. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

4

الفصل الرابع

استنساخ الجين

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

مقدمة

ان عمليـــة تخليـــق الـــ RNA مـــن الـــ DNA القالـــب تـــدعى بالاستنســـاخ transcription،وهي مفهومة بشكل أفضل في الكائنات بدائية النواة. ولو ان تنظيم تخليق الـ RNA في خلايا اللبائن هو مختلف عنه في بدائية النواة، ولكن عملية تخليق الـ RNA في

بدائيـة النـواة سـوف يكـون قابـل للتطبيـق علـى حقيقيـة النـواة حتـى ولـو كانـت الإنزيمـات والإشارات المنظمة للعملية مختلفة.

ان تسلسـل الــ ribonucleotides فـي جزيئـة الــ RNA هـو مكمـل لتسلسـل الــ deoxyribonucleotides فـي شـريط واحـد فـي حلـزون الــ DNA المـزدوج. يكـون الــ RNA ممـاثلاً فـي تسلسـله لأحـد شـريطي الــ DNA باسـتثناء وجـود اليوراسيل بـدلاً عـن الثايمين، والذي يدعى بالشريط المشفر coding strand. بينما يكون مكملاً للشريط الآخر، والذي يوفر القالب template لتخليقه.

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

من الـ DNAإلى الـ RNA

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

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

وكما هو عليه الحال في الـ DNA، فان الـ RNA هو بوليمر خطّي يكون من أربعة أنواع مختلفة من النيوكليوتيدات المرتبطة مع بعضها البعض بأواصر فوسفات ثنائية الأستر phosphodiester bonds . يختلف الـ RNA عن الـ DNA بأربعة فروقات أساسية: 1) إن النيوكليوتيدات في الـ RNA هي ribonucleotides – هذا يعني بأنها تحتوي على سكر رايبوز ribose (ومن هنا جائت تسميتها بالـ ribonucleic acid) بدلا من deoxyribose ، 2) ولو ان الـ RNA، كما هو الحال في الـ DNA ، يحتوي على القواعد A و G و C ولكنه يحتوي على اليوراسيل U بدلا من الثايمين T الموجود في الـ DNA. 3) وعلى الرغم من هذه الاختلافات الصغيرة، يختلف كل من الـ DNA والـ RNA عن بعضهما بشكل مثير تماماً في تركيبهما العام. فبينما يتواجد الـ DNA في الخلايا بصورة حلزون مزدوج، يتواجد الـ RNA بصورة مفردة الشريط. ولهذا تنطوي سلاسل الـ RNA إلى أشكال متعددة، كما سنرى ذلك لاحقا. 4) بما أن جزيئة الـ RNA هي مفردة الشريط ومكملة لشريط واحد فقط من شريطي الجين، فليس من الضرورة أن يكون محتوى الكوانين يساوي محتوى السايتوسين، ولا محتوى الأدنين يساوي محتوى اليوراسيل. وهنا يبرز لنا سؤالين مهمين، أولهما: لماذا يحتوي الـ RNA على يوراسيل بدلاً عن الثايمين بدلاً عن الثايمين بينما تكون الحالة معاكسة في الـ DNA؟ والسؤال الثاني هو: لماذا تكون الـ DNA منقوص الأوكسجين في الموقع ′2 والـ RNA غير منقوص الأوكسجين في نفس هذا الموقع؟ لإجابة السؤال الأول راجع الفصل السابع، أما إجابة السؤال الثاني فهي ربما يمكن إجمالها بسببين: الأول يستخدم هذا الموقع كواسم طبيعي قد وفرته الخلية لكل الإنزيمات الخلوية التي تتداخل مع هذه الأحماض النووية، وهذا يعطي بالتالي وظائف خلوية مختلفة ومتخصصة لكل من هذين الحمضين النوويين. أما السبب الثاني من وجود ذرة الأوكسجين الإضافية هذه في الـ RNA يعمل على زيادة تفاعليتها (reactivity) وفي نفس الوقت الإقلال من استقرارها مقارنة بجزيئة الـ DNA (لاحظ إذا وضعت جزية الـ RNA في درجة حرارة الغرفة لفترة قصيرة قد يؤدي ذلك إلى تحللها الذاتي autolysis، بينما لا تحدث مثل هذه الظاهرة في جزيئة الـ DNA إذا ما وضعت في نفس الظروف). ولهذا السبب، وكمقارنة بالـ RNA، يعد الـ DNA أكثر ملائمةً لكي يعمل كمستودع للمعلومات الوراثية على المدى الطويل.

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

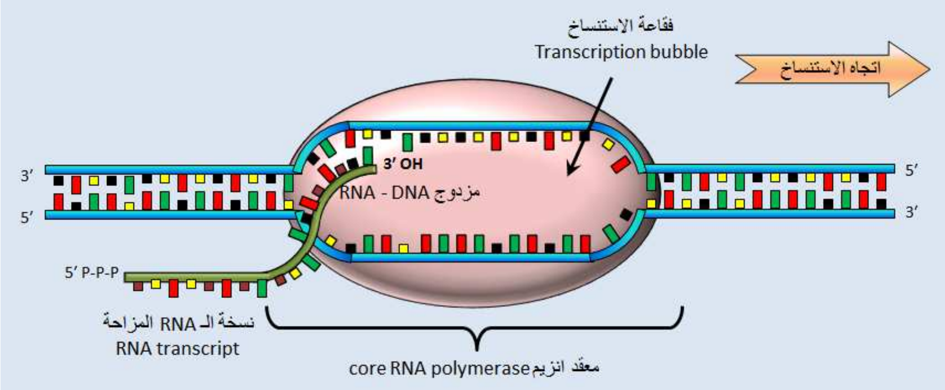
في كل شريط DNA. وكما هو الحال في عملية تضاعف الـ DNA، يتحدد التسلسل النيوكليوتيدي في سلسلة الـ RNA من قبل الازدواج القاعدي حسب قاعدة Watson – Crick بين النيوكليوتيدات القادمة وقالب الـ DNA. وعندما تكون النيوكليوتيدة القادمة مناسبة للنيوكليوتيدة القالب، فإنها ترتبط تساهميا بسلسلة الـ RNA النامية وذلك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

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

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

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

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



شكل (1.4): إزالة سلسلة الـ RNA المتولدة حديثاً بحلزون الـ DNA المزدوج. تزال نسخة الـ RNA الحديثة بعد تولدها خلف بصيلة الاستنساخ (transcription bubble).يشير اللون الأخضر للنويكليوسيدات ثلاثية الفوسفات الغيرمنقوصة الأوكسجين الى الكوانين والأصفر للسايتوسين والأحمر للأدنين والبنفسجي لليوراسيل (تصميم المؤلف).

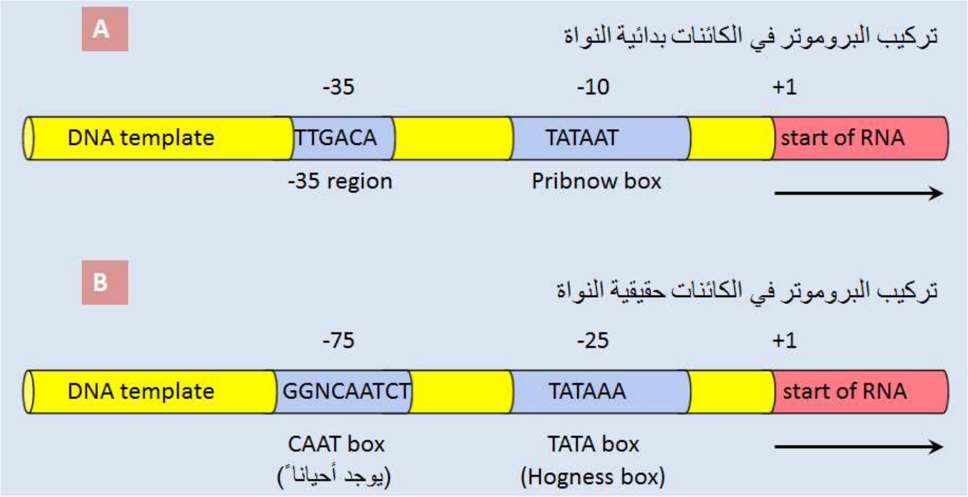
البروموتر the promoter

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

1. في بدائية النواة:

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

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



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

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

2. في حقيقية النواة:

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

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

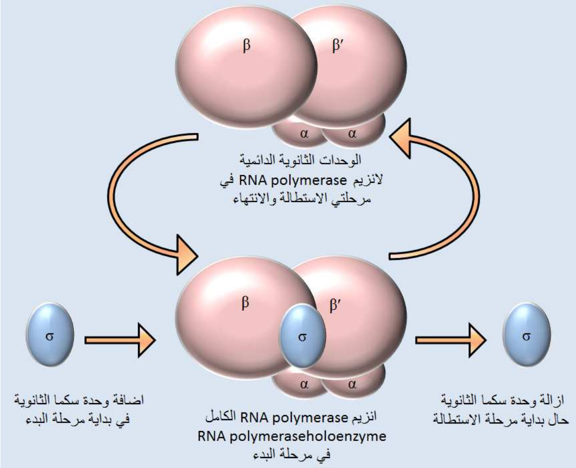
إن الفرق بين الـ enhancer والـ promoter هو ليس بالآلية mode of action ، وإنما الفرق هو تشغيلي operational ، حيث يستطيع الـ enhancer أن يحفّز الاستنساخ لمسافات ضخمة، بينما لا يستطيع الـ promoter أن يحفّز إلا المسافات القريبة منه وبشكل فوري. كما تمتاز المسرعات بقدرتها على تحفيز استنساخ الجين في كلا الاتجاهين،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

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

إنزيم الـ RNA polymerase:

1. في بدائية النواة:

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



شكل 3.4: مكونات إنزيم RNA polymerase في بكتريا القولون. يحفز إنزيم RNA polymerase بلمرة النيوكليوتيدات إلى تسلسل الـ RNA المكمل للشريط القالب في الجين. يتألف إنزيم RNA polymerase في بكتريا القولون من المعقد الصميميcore complex والذي يتألف بدوره من الوحدتين الثانويتين β و ´β. يتألف الإنزيم الكامل holoenzyme من وحدة σ الثانوية المرتبطة بالصميم β α2(تصميم المؤلف).

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

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

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

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

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

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

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

2. في حقيقية النواة:

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

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

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

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

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

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

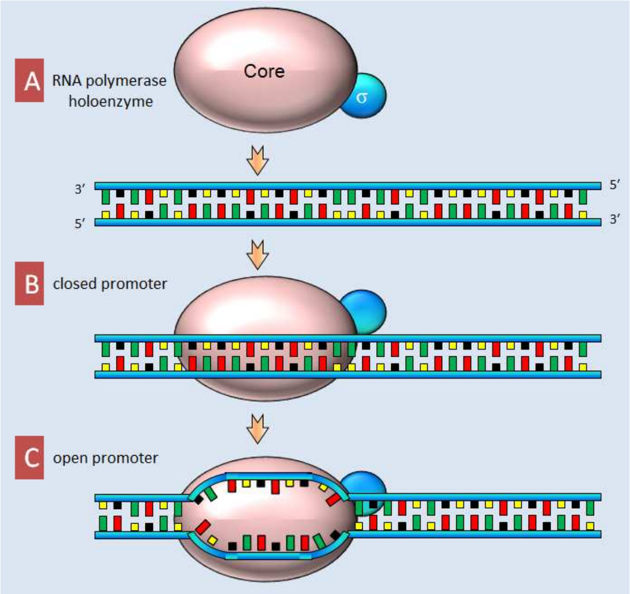
نوع الـ RNA polymerase	الحساسية للـ α amanitin	النواتج الرئيسية
I	غير حساس	rRNA
II	حساس بشكل عال	mRNA
III	حساس بشكل متوسط	tRNA/5S rRNA

وصف عملية الاستنساخ

لتسهيل دراسة عملية الاستنساخ تم تقسيمها إلى ثلاثة مراحل وكالآتي:

مرحلة البدء initiation stage

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

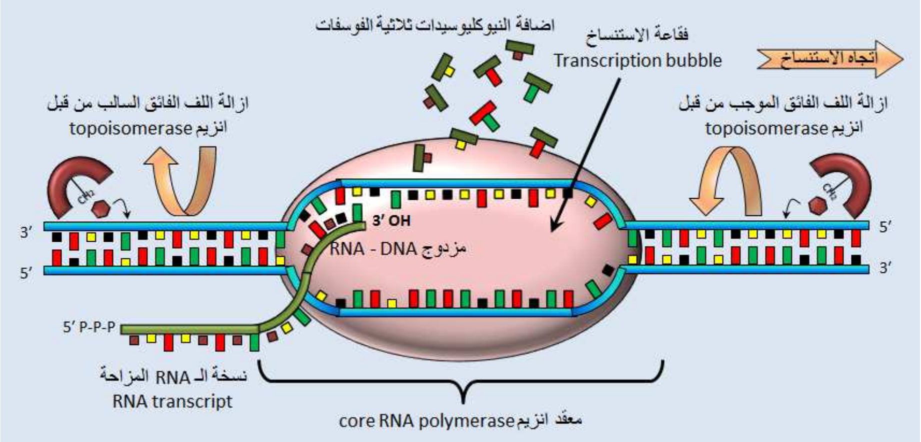


شكل (5.4)a و b و c: ارتباط إنزيم RNA polymerase زائدا عامل "سكما" بالـ DNA. تتكسر الأواصر الهيدروجينية التي تربط شريطي الـ DNA ويتكون معقد البرومتر استعداداً لتخليق الـ RNA (تصميم المؤلف) .

مرحلة الاستطالة elongation stage

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

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

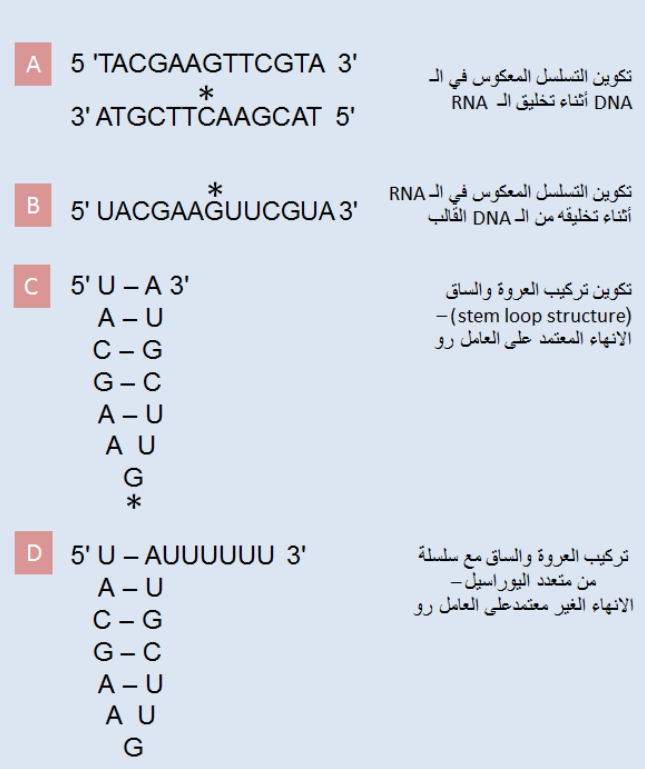


شكل (6.4) : ملخص لمرحلة الاستطالة elongation في عملية الاستنساخ، (تذكر بأن إنزيم RNA polymerase المشار إليه في الشكل هو الإنزيم الصميمي core enzyme وليس الإنزيم الكامل holoenzyme بسبب ازالة وحدة سكما حال بدء مرحلة الاستطالة) (تصميم المؤلف).

مرحلة الانتهاء termination stage

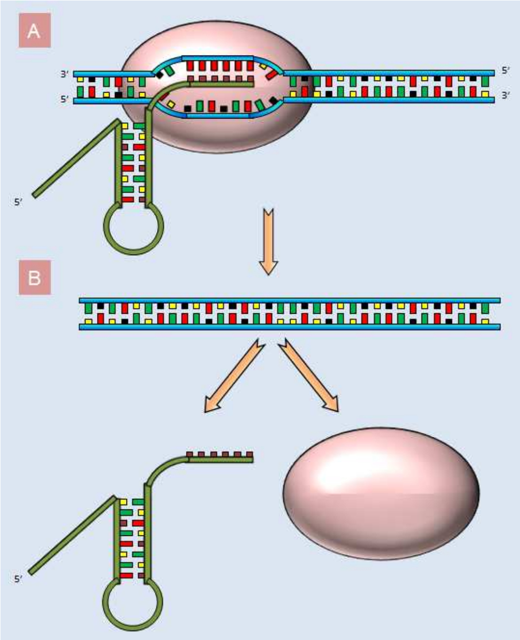
إن آخر مرحلة في تخليق الـ RNA هي مرحلة إنهاء نمو السلسلة. ينتهي تخليق الـ RNA وذلك بواسطة طريقتين مختلفتين واللذين سيرد ذكرهما في أدناه. إن مايعرف بتسلسلات الـ DNA المنهية أو بمنهيات الاستنساخ transcription terminators أما أن تكون معتمدة على العامل رو rho-dependent (ρ dependent) أو غير معتمدة على العامل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

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



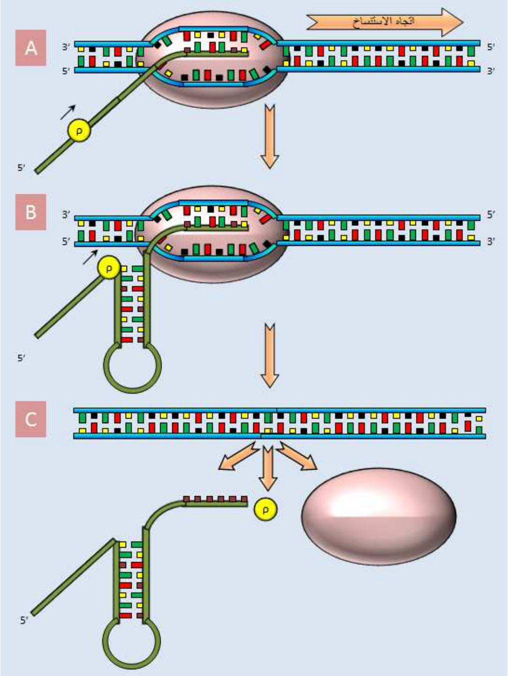
شكل (7.4): دورالتسلسلات المعكوسة في انهاء عملية تخليق الـ RNA (تصميم المؤلف).

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



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

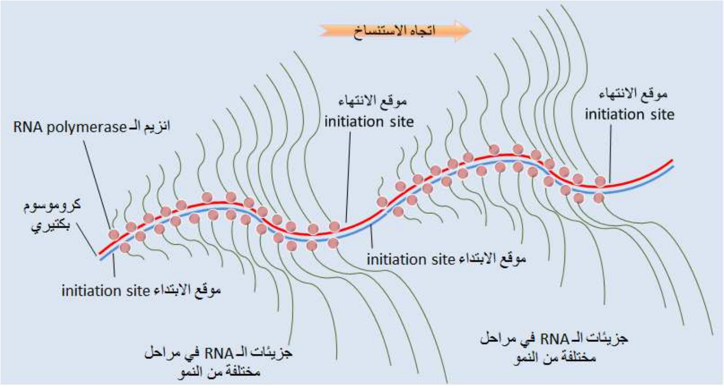
أما عملية الإنهاء المعتمدة على العامل "رو" (شكل 9.4) والتي هي أقل شيوعاً وأعقد من الانهاء الغير معتمد على العامل "رو"، فإنها تستخدم كذلك تكوين تركيب دبوس الشعر، ولكن انفكاك هجين RNA – DNA يحتاج إلى تعاون البروتين "رو" ، كما لا تتبع تكرارات متعدد اليوراسيل تركيب دبوس الشعر كما في الطريقة السابقة. يبدو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



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

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

ان أكثر من جزيئة RNA polymerase ربما تستنسخ نفس الشريط المشفر للجين بصورة متزامنة، ولكن العملية ذات أطوار زمنية وفراغات مكانية، بحيث في أية لحظة كل RNA polymerase يستنسخ جزء مختلف من تسلسل الـ DNA.فكلما يترك إنزيم RNA polymerase بروموتر يرتبط به إنزيم RNA polymerase آخر. إن هذا يعطي شكلا يشبه النصل (10.4).



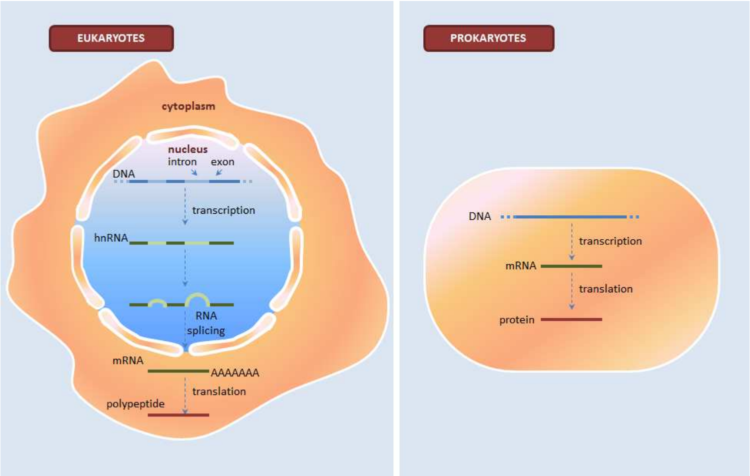
شكل (10.4):مخطط يوضح عدة نسخ من جينات rRNA البرمائيات وهي ما زالت في طور الاستنساخ. لاحظ ازدياد طول الشريط المستنسخ بزيادة تقدم إنزيم RNA polymerase على طول جينات الـ rRNA. يكون بإنزيم RNA polymerase الغير مبين هنا، عند قاعدة شريط الـ RNA المتولد حديثاً، وهكذا، فان النهاية القريبة للجين المستنسخ تكون بها جزيئات الـ RNA قصيرة، بينما ترتبط جزيئات الـ RNA الأكثر طولاً بالنهاية القاصية للجين. توضح الأسهم اتجاه عملية الاستنساخ والتي تتقدم من 5´ إلى 3´. ويبين يبين هذا الشكل ايضاً إمكانية تخليق الـ RNA بشكل متسلسل وبكميات كبيرة عند الحاجة (تصميم المؤلف).

عملية معالجة جزيئات الـرنا RNA processing

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

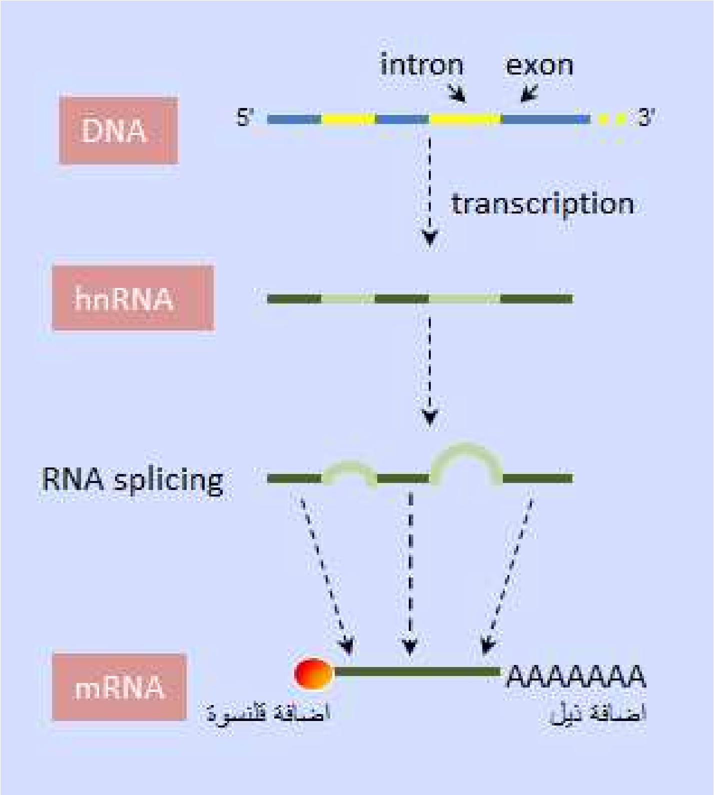
معالجة الرنا الرسول processing of messenger RNA (mRNA)

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



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

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



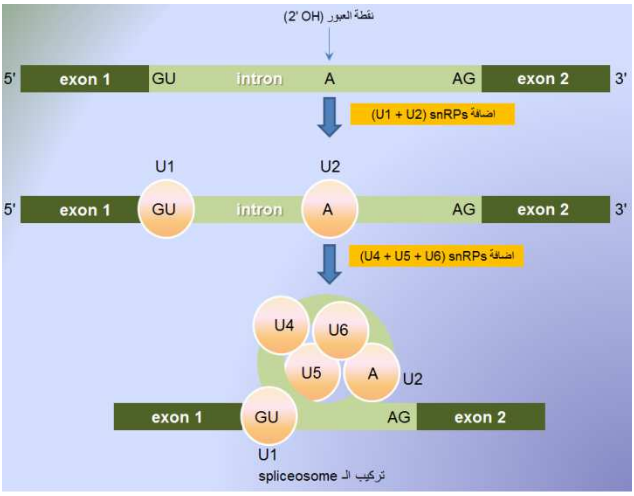
شكل (12.4): مخطط لعملية معالجة الـ mRNA في الكائنات حقيقية النواة: يتضح من الشكل انه بعد أن ينتهي إنزيم RNA polymerase II من عملية استنساخ النيوكليوتيدة الأولى للاكسون الأول من الجين، تضاف قلنسوة إلى النهاية ′5 للـ RNA. ينهي إنزيم RNA polymerase II عند مناطق الانتهاء لآخر اكسون نهائي، يصل إلى موقع يدعى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

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

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

وصل أطراف الرنا الغير متجانس بالتراكب (Splicing of hnRNA)

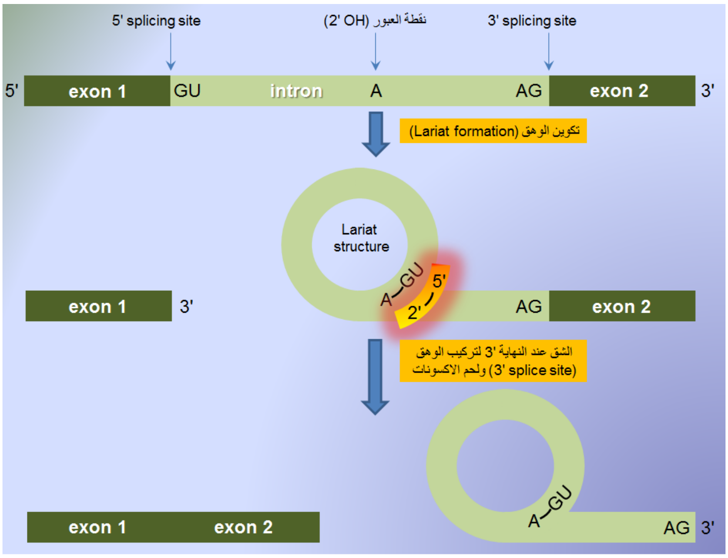
تزال الانترونات من جزيئة hnRNA بعد عملية الاستنساخ فوراً وترتبط الاكسونات مع بعضها البعض لكي تكون تسلسل مشفر مستمر. تدعى هذه العملية بوصل الأطراف بالتراكب أو splicing، والتي تتم بواسطة معقدات من نوع بروتين – رنا protein-RNA complexes في النواة، وتعرف تلك المكائن العملاقة بالـ spliceosomes. يكون نوع الـ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



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

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

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



شكل (14.4): عملية وصل الأطراف بالتراكيب splicing: ويحدث فيها إزالة الانترونات وربط الاكسونات ببعضها البعض وتتم عن طريق تكوين شكل الوهق (حبل في طرفه عروة) في كل انترون قبل عملية ازالته (تصميم المؤلف).

أنواع الـ RNA:

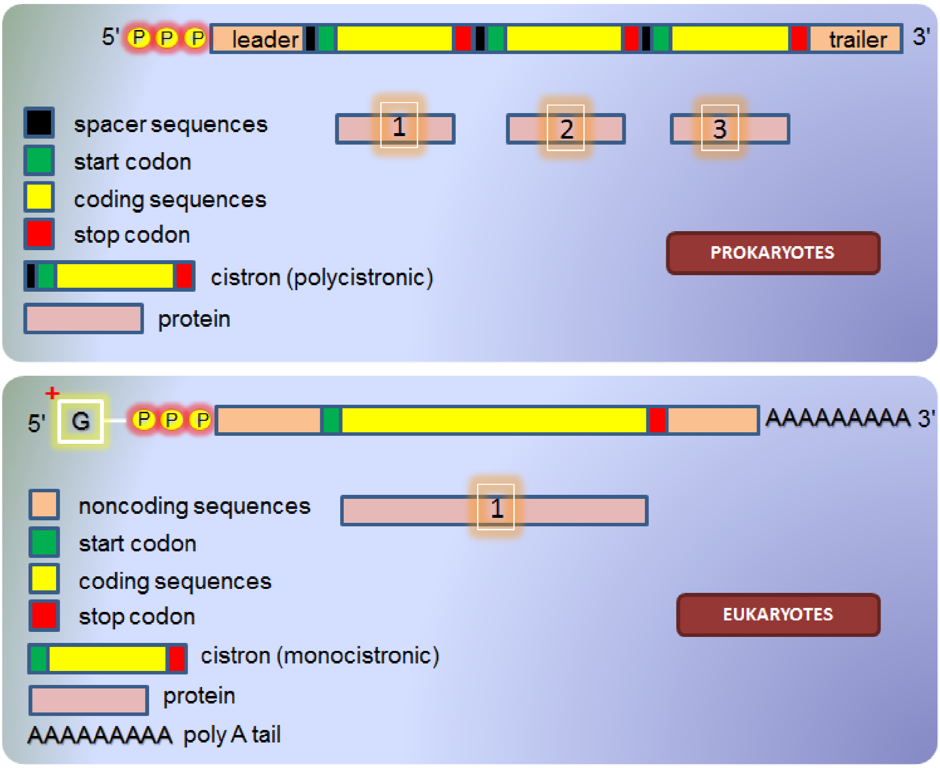
إن هنالك ثلاث أنواع رئيسية من الـ RNA الخلوي تدخل في تخليق البروتين وهي: mRNA و tRNA و rRNA . بالإضافة إلى ان هنالك أنواع RNA أخرى تعمل كبوادىء primers لتخليق الـ DNA، والتي يتم تخليقها من قبل إنزيم RNA primase (راجع الفصل الثالث)، وأنواع أخرى أهمها هو snRNA.

الرنا المراسل Messenger RNA (mRNA)

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

على الرغم من التغاير في أطوال الـ mRNA، ولكن يمكن القول بأن مقدار المعلومات الوراثية التي يحملها الـ mRNA في بدائية النواة يكون كافياً لأن يشفر لأكثر من جين واحد، بينما تكفي تلك المعلومات الوراثية التي يحملها mRNA حقيقية النواة لأن تشفر لجين واحد فقط (شكل15.4). وبالطبع إذا كانت جزيئة الـ mRNA لجين واحد (كما في حقيقية النواة)، فأن هذا يؤدي بالضرورة إلى إنتاج بروتين واحد، وتدعى هذه الحالة بالسسترون المفرد monocistronic. أما إذا كانت جزيئة الـ mRNA لجينات متعددة (كما في بدائية النواة)، فان هذه يؤدي إلى إنتاج عدة بروتينات، وتدعى هذه الحالة بالسسترون المتعدد polycistronic.

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



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

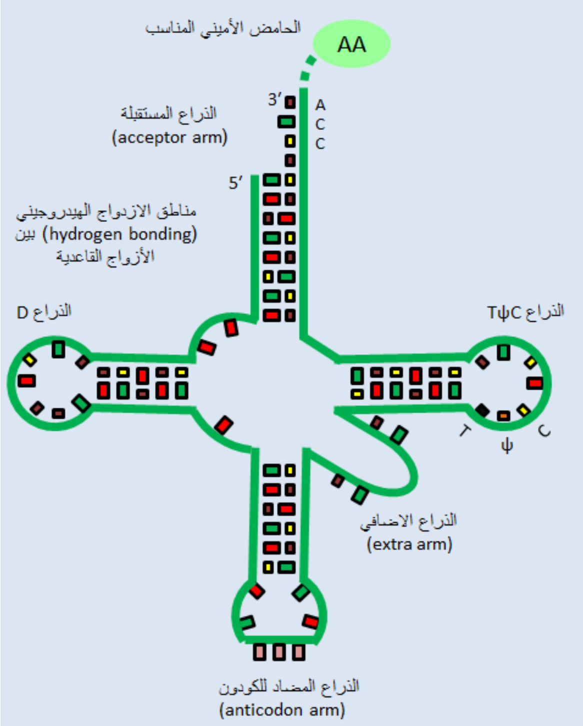
الرنا الرسول (transfer RNA (tRNA

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

المستقبل acceptor arm والذي يوجد في النهاية ′3 ، وموقع أو ذراع الشفرة المضادة anticodon arm ، والذي يميز الكودون codon (أنظر الفصل الخامس) المطابق ثلاثي القواعد الموجود في جزيئة الـ mRNA (شكل16.4).

إن هنالك ما يقارب 20 نوع مختلف من الـ tRNA في كل خلية. كل حامض أميني يرتبط إنزيمياً بالنهاية ′3 لواحد أو أكثر من جزيئات الـ tRNA وذلك بواسطة تفاعل إنزيمي سيأتي ذكره في الفصل القادم. وعلى الرغم من اختلاف جزيئات الـ tRNA عن بعضها البعض بتسلسلها النيوكليوتيدي، لكن تجمعها العديد من الصفات المشتركة. كل جزيئات الـ tRNA تنطوي على نفسها بصورة متشابهة لتعطي تركيباً يشبه ورقة البرسيم (الجت) cloverleaf (شكل16.4). تشكل جزيئات الـ tRNA أكثر من 15% من الـ RNA الإجمالي الموجود في الخلية.

كل أنواع الـ tRNA تتألف من أربعة أذرع رئيسية. يتألف الذراع المستقبل acceptor arm من ساق stem ذو قواعد نتروجينية مرتبطة ببعضها البعض، وينتهي هذا الذراع بالتسلسل (′3 to ′5) CCA ، حيث ترتبط مجموعة الكاربوكسيل carboxyl group للأحماض الأمينية بمجموعة الهيدروكسيل hydroxyl group الموجودة في مخلفات الأدنين A في النهاية ′3 للذراع المستقبل في جزيئة الـ tRNA. أما الأذرع الأخرى فتحتوي على قدم بقواعد نتروجينية مزدوجة ببعضها البعض بالإضافة إلى إنشوطة غير مزدوجة unpaired loop (شكل 16.4). يضطلع ذراع الشفرة المضادة anticodon arm بتمييز الكودون (النيوكليوتيدات الثلاثية) الموجودة في جزيئة الـ mRNA . أما الذراع الثالثة فيطلق عليها الاسم D arm ، وسميت بهذا الاسم بسبب وجود القاعدة النتروجينية dihydrouridine ، وهي الذراع التي يرتبط بها إنزيم aminoacyl-tRNA synthetase وذلك عند إضافته الحامض الأميني المناسب لجزيئة الـ tRNA (أنظر الفصل الخامس)، وسميت الذراع الرابعة بالاسم TψC arm وذلك بسبب وجود التسلسل ثايمين T و pseudouridine والسايتوسين C ، وتدخل هذه الذراع في ربط جزيئة الـ tRNA المحملة بالحامض الأميني (aminoacyl tRNA) بسطح الرايبوسوم خلال عملية تخليق البروتين. وهنالك ذراع إضافي extra arm ويعد من أكثر الصفات المتغايرة ما بين جزيئات الـ tRNA لذا، فانه يوفر أساساً للتصنيف، لذا فانه يدعى لهذا السبب أحيانا بالذراع المتغاير variable arm.



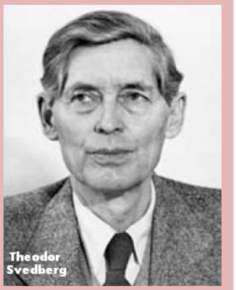
شكل (16.4): تركيب الحامض النووي المراسل tRNA (تصميم المؤلف)

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

الرنا الرايبوسومي Ribosomal RNA (rRNA)

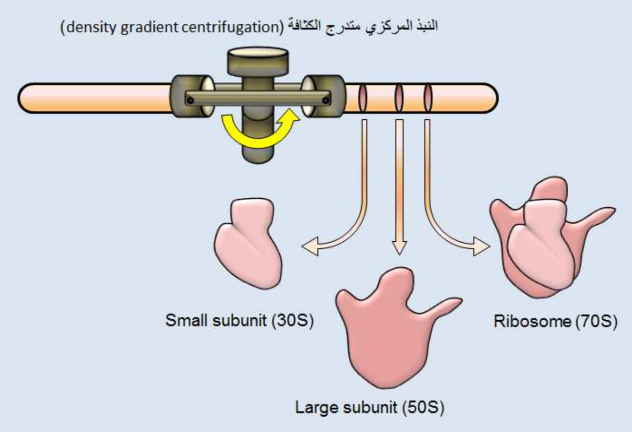
تعد جزيئات الـ rRNA هي المكون التركيبي والوظيفي للرايبوسومات، والرايبوسومات أجسام كبيرة من معقدات rRNA وبروتينات والتي تشكل الماكنة التي تأوي معظم التفاعلات المرتبطة بتخليق البروتين.

للرايبوسوم تركيب معروف جيدا سواء في الكائنات بدائية وحقيقية النواة ً وهو وحدتان ثانويتان two subunits كل منهما يتألف من RNA وبروتين. كل من الوحدات الثانوية الكبيرة والصغيرة يتألف من RNA يعرف بالـ ribosomal RNA (rRNA) والعديد من البروتينات الرايبوسمية ribosomal proteins. تحتوي الوحدة الثانوية الكبيرة على مركز إنزيم الـ peptidyl transferase ، والذي هو مسؤول عن تكوين الأواصر البتيدية. تحتوي الوحدة الثانوية الصغيرة على مركز فك الشفرة decoding center وفيه تقوم جزيئات الـ tRNA بقراءة أو بفك شفرة وحدات الكودون بالـ mRNA. وكما هو دارج، تسمى وحدات الرايبوسوم بالكبيرة والصغيرة على أساس سرعة ترسيبها عند تعرضها الى قوة نبذ مركزية. تعرف الوحدة المستخدمة لقياس سرعة الترسيب تعرف بوحدة سفيدبيرغ Svedberg unit والتي سميت على اسم مخترع جهاز النبذ المركزي ذو السرعة الفائقة Theodor Svedberg (شكل 17.4).



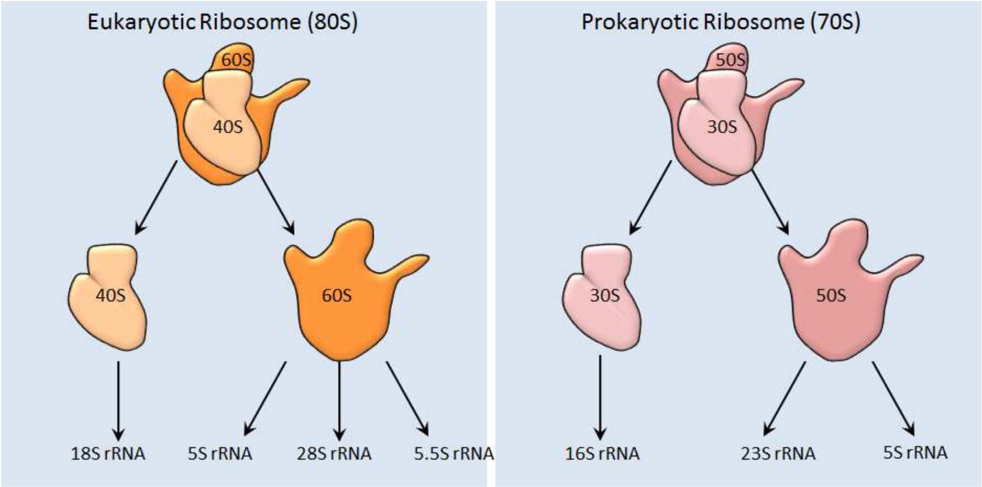
Theodor Svedberg

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



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

تتألف الوحدة الثانوية الكبيرة 50S subunit بدورها في رايبوسومات بدائية النواة من 23S و 5S من جزيئات الـ rRNA. بينما تحتوي الوحدة الثانوية الصغيرة 30S subunit على جزيئات rRNA من نوع 16S rRNA فقط. أما رايبوسومات حقيقية النواة، فإنها مشابهة بالتركيب لتلك التي في بدائية النواة، ولو أنها أكبر نسبيا (80S)، وتحتوي على rRNA أطول وتشمل 25S rRNA و 18S rRNA و 5S rRNA وغيرها. إذن هنالك ثلاثة أنواع مميزة من جزيئات الـ rRNA في خلايا بدائية النواة (23S و 16S و 5S)، بينما في الخلايا حقيقية النواة (شكل 18.4) هنالك أربعة أنواع أو أحجام من الـ rRNA (28S و 18S و 5.8S و 5S). تشكل جزيئات الـ rRNA80% من الـ RNA الإجمالي الموجود في الخلية، إذن هي أكثر أنواع الـ RNA تواجداً في الخلية.



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

الرنا الصغير الثابت Small stable RNA (ssRNA)

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

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

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

ملحق الفصل الرابع

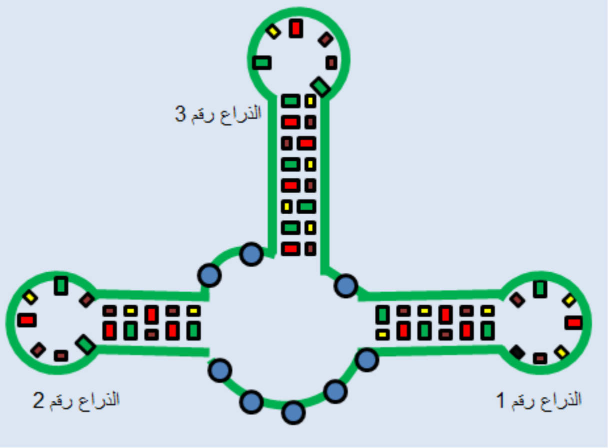
الرايبوزايم (The Ribozyme)

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

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

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

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



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

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

أسئلة الفصل الرابع

السؤال الأول: علل ما يلي

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

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

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

- يدعى انزيم RNA polymerase بـ................. أيضاً
  a. DNA dependent DNA polymerase b. DNA dependent RNA polymerase c. RNA dependent DNA polymerase d. RNA dependent RNA polymerase
- يرتكب عادة إنزيم RNA polymerase خطأً واحداً لكل .... نيوكليوتيدة.
  a. 100 b. 1000 c. 10000 c. 100000
- إن أقرب موقع لنقطة بداية الاستنساخ transcription start point هي ....
  a. -100 bps b. -10 bps c. +1000 bps d. +9 bps
- يوجد التسلسل TATAAA في بروموتر حقيقية النواة ويسمى بـ ....
  a. Pribnow box b. Hogness box c. CAAT box d. Recognition box
- إن عدد إنزيمات الـ RNA polymerase التي يمكن لها أن تحفز تخليق كل من rRNA و tRNA و mRNA في بدائية النواة هي ....
  a. only one type b. two types c. three types d. four types
- .... هي مكونات إنزيم RNA polymerase في مرحلة البدء في عملية الاستنساخ.
  a. $\alpha 2\beta$ b. $A2\beta\beta'$ c. $A2\beta\beta'\sigma$c.Only σ
- .... هي مكونات إنزيم RNA polymerase في مرحلة الاستطالة في عملية الاستنساخ.
  a. $\alpha 2\beta$ b. $A2\beta\beta'$ c. $A2\beta\beta'\sigma$c.Only σ
- تحتوي وحدة .... في إنزيم RNA polymerase على أغلب أو كل المواقع الفعالة لتكوين phosphodiester bond.
  a. α b. β c. γ d. σ
- إن وظيفة إنزيم RNA polymerase III هي تخليق ....
  a. rRNA b. mRNA c. tRNA d. snRNA

- يعد إنزيم RNA polymerase II .... لمادة *α-amanitin المستخرجة من العرهون Amanita phalloides.*
  a. insensitive b. intermediately sensitive c. highly sensitive d. may be sensitive
- يعطي الشريط القالب template strand ذو التسلسل ´5´-GATCG-3 شريط RNA بتسلسل ---------
  a. 5´-GATCG-3´ b. 5´-CTAGC-3´ c. 3´-CUAGC-5´ d. 3´-CTAGC-5´
- يكون إنزيم --------- هو المسؤول عن فتح التفاف الحلزون المزدوج أمامه وسد التفافه خلفه أثناء عملية الاستنساخ.
  a. helicase b. DNA polymerase c. RNA polymerase d. topoisomerase
- يبلغ عدد العوامل المساعدة التي تحتاجها عملية الإنهاء الغير معتمدة على ρ ---------
  a. one b. two c. three d. none
- يدعى أحد أنواع العامل سكما بـ --------- والذي ينتج تحت ظروف التجويع النتروجيني nitrogen starvation
  a. σ 70 b. σ 32 c. σ 54 e. σ 45
- تدخل الذراع ------- في ربط جزيئة الـ tRNA المحملة بالحامض الأميني (aminoacyl tRNA) بسطح الرايبوسوم خلال عملية تخليق البروتين.
  a- extra arm b- amino acid arm c- acceptor arm d- TψC arm
- كل جزيئات الـ tRNA تنطوي على نفسها بصورة متشابهة لتعطي تركيباً يشبه ورقة الـ -------.
  a- banana b- orange c- cloverleaf d- strawberry
- يحتوي تركيب العروة والساق على ----- مخلفات يوراسيل تقع بعده مباشرة.
  a- 5 b- 6 c- 7 d- 8
- إن كل من وحدتي -------------- يؤلفان مركز الحفز catalytic center، في إنزيم RNA polymerase.
  a. βandβ´ b. α and α´ c. α and β d. β and α´
- أكثر جزيئات الـ RNA امتلاكاً للنيوكليوتيدات المحورة هي -----------
  a. mRNA b. rRNA c. tRNA d. ssRNA
- تستخدم أحد أذرع الـ tRNA وهي ---------- كأساس لتصنيف الأنواع المختلفة لجزيئات الـ tRNA
  a. TψC arm b. D arm c. acceptor arm d. extra arm
- تتميز عملية الإنهاء الغير معتمدة على العامل ρ بوجود---- بالإضافة إلى تركيب الـ stem-loop في جزيئة الـ RNA والي يحتاج إلى طاقة قليلة جداً لكسره.
  a. poly A c. poly C d. poly G d. poly U
- إن أكثر أنواع الـ RNA تواجداً في الخلية هو ....
  a. mRNA b. tRNA c. rRNA d. ssRNA
- لا تتحور جزيئة ---------- بعد عملية استنساخها.
  a. prok. tRNA b. euk. tRNA c. prok. mRNA d. euk. mRNA
- بسبب --------، أصبح من السهولة عزل جزيئات الـ mRNA عن جزيئات الـ rRNA والـ tRNA الشائعة الموجودة في مستخلص الخلية
  a. TψC armb. acceptor arm c. D arm d. polyA tail

السؤال الثالث: عرف ما يلي

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

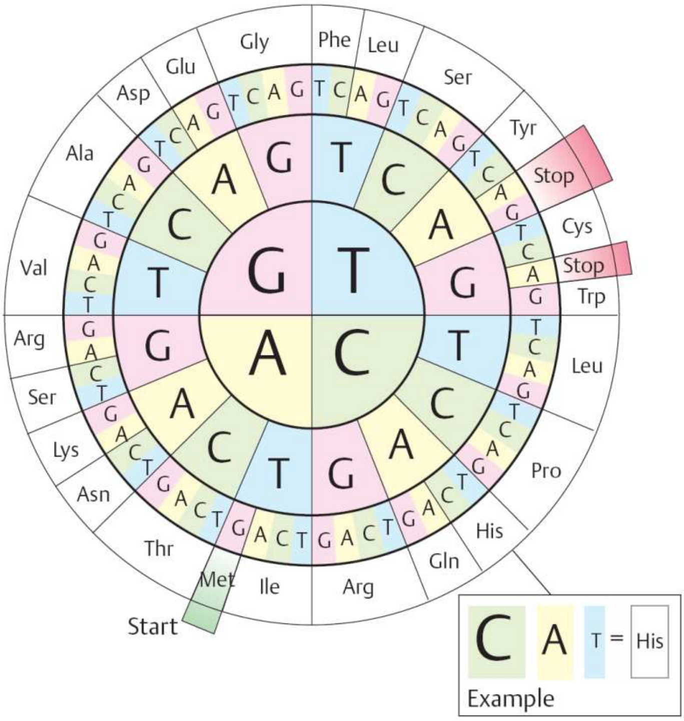
وللمزيد من الاطلاع اقراء:

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

5

الفصل الخامس

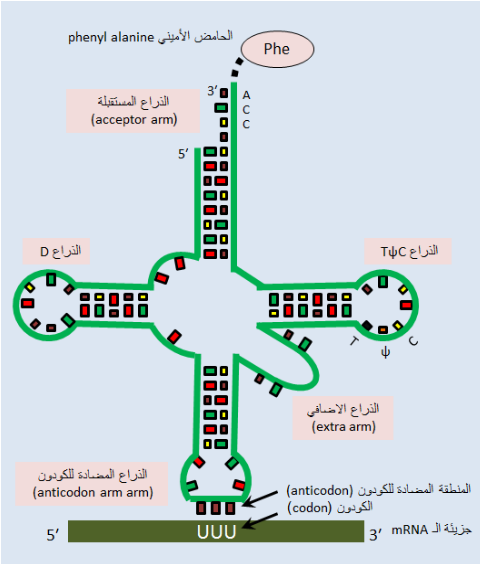
ترجمة الجين



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

مقدمة

تتألف لغة الحياة من حروف أبجدية أربعة: A و G و T و C. تتطابق هذه الحروف مع النيوكليوتيدات الموجودة في الـ DNA. وتنتظم هذه النيوكليوتيدات إلى شفرة ذات ثلاثة حروف تدعى بالكودون codon ، ويؤلف مجموع هذه الكودونات ما يعرف بالشفرة الوراثية genetic code. تشفرّ الكودونات المنتظمة خطياً (الجينات) إلى تخليق عدّة جزيئات RNA ، معظمها تدخل في بعض مظاهر تخليق البروتين. يحدث تخليق البروتين في ثلاث خطوات رئيسية: وهي البدء initiation، والاستطالة elongation ، والانتهاء termination. تشابه هذه العملية عمليتي التضاعف replication والاستنساخ transcription في صفاتها العامة، وفي كون أن اتجاه حدوثها من 5′ إلى 3′. يجب أن تمتلك الخلية الماكنة الضرورية التي تترجم المعلومات بكفاءة وبدقة من التسلسل النيوكليوتيدي في الـ RNA إلى تسلسل أحماض أمينية في البروتين المطابق. هذا وأدرك الباحثون مبكرا بأن جزيئات الـ mRNA بنفسها لا تمتلك ألفة للأحماض الأمينية، ولهذا، فان ترجمة المعلومات الوراثية الموجودة في تسلسل الـ mRNA إلى تسلسل أحماض أمينية في البروتين يحتاج إلى جزيئة وسيطة لها قابلية التكيف ما بين الأحماض النووية والأحماض الأمينية. يجب أن تميز هذه الجزيئات المتكيفة adaptor molecules التسلسل النيوكليوتيدي المتخصص من جهة، وتسلسل الأحماض الأمينية المطابق من جهة أخرى (راجع صفات جزيئة الـ tRNA). وبوجود هكذا جزيئات متكيفة، تستطيع الخلية أن توجه الحامض الأميني المتخصص إلى مكانه الصحيح في البروتين حسب التسلسل كما هو مقرر في التسلسلات النيوكليوتيدية الموجودة في جزيئة الـ mRNA (شكل 1.5).

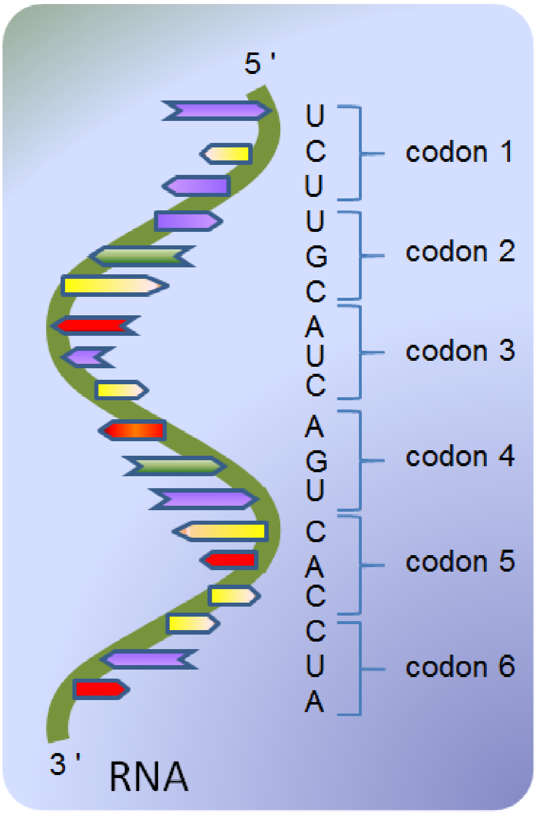


شكل (1.5) : يوضح قدرة جزيئة الـ tRNA على الربط بين الأحماض النووية عن طريق ذراع الشفرة المضادة anticodon arm من جهة، والأحماض الأمينية عن طريق الذراع المستقبلة acceptor arm من جهة أخرى. تتألف المنطقة المضادة للشفرة anticodon region على تسلسل من سبع نيوكليوتيدات: وهي N أي المتغايرة و *Pu أي البيورين المحور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

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

الكودونات وتخليق البروتين codons and protein synthesis

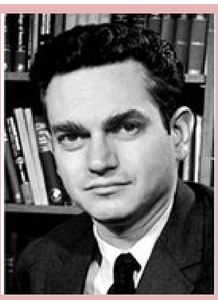
إن التسلسلات الموجودة في جزيئات الـ mRNA توجد في كل حامض أميني (شكل 2.5). إن الجزيئات المتكيفة التي تترجم الكودونات إلى تسلسل أحماض أمينية في البروتين هي جزيئات الـ tRNA . ان الرايبوسومات هي مكونات خلوية والتي تتآثر عليها الكيانات الوظيفية المختلفة لكي تخلق جزيئة البروتين. تتراكب العديد من الرايبوسومات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



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

فك رموز الشفرة الوراثية cracking the genetic code

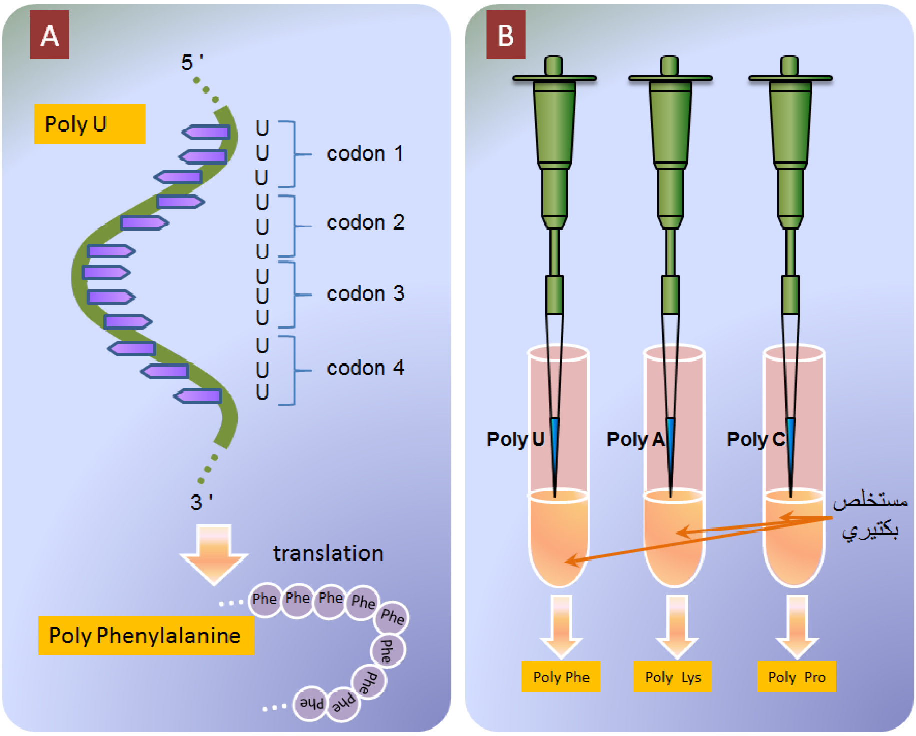
استطاع العلماء في نهاية الخمسينات وبداية الستينات من القرن الماضي من حل سر من أسرار الحياة المهمة، وهو كيف تعمل الجينات. إن المشكلة التي حاول الباحثون حلها هي كيف أن التسلسل الخطي للنيوكليوتيدات الأربع (A و G و C و U) يحدد تسلسل الأحماض الأمينية في البروتين المتألف من 20 حاض أميني مختلف. بعد اكتشاف تركيب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



Marshall Nirenberg

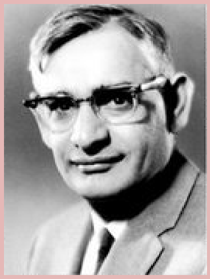
تم أول تفسير للشفرة الوراثية على يد العالمين Nirenberg و Mathaei عام 1961. أن المجتمع العلمي في مجال تفسير الشفرة الوراثية يعد مديناً لأعمال Nirenberg و Mathaei الذين جرت تجربتهم على مستخلصات بكتريا القولون المزال منها الـ DNA باستعمال الإنزيم الهاضم له (الـ DNase) لكي لا يتداخل مع نتائج التجربة. وعندما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

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



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

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

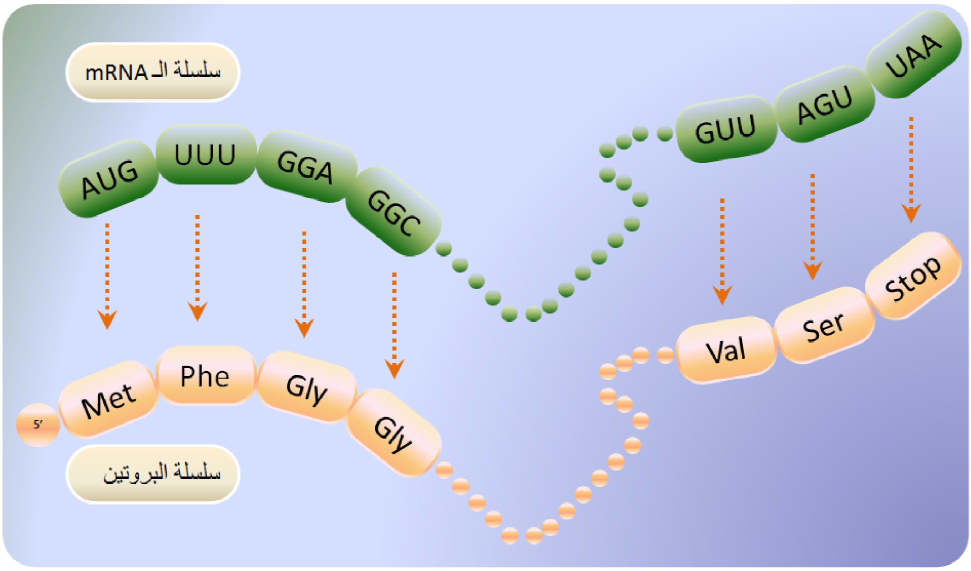


Har G. Khorana

Robert Holley

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

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



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

لماذا يتألف كل كودون من ثلاث نيوكليوتيدات؟

يجب أن يتوفر 20 نوع من الأحماض الأمينية لتخليق البروتينات، وهكذا، لا بد من وجود 20 كودون مختلف ليؤلف الشفرة الوراثية. وبما أن هنالك أربعة أنواع فقط من الأحماض النووية في جزيئة الـ mRNA ، لذا، فان كل كودون يجب أن يتألف من أكثر من نيوكليوتيدة واحدة. وإذا فرضنا بأن الكودونات تحتوي على اثنان من النيوكليوتيدات، فإنها لا تستطيع أن توفر أكثر(4^2) كودون متخصص، بينما إذا احتوى الكودون على ثلاث نيوكليوتيدات فيمكن له أن يوفر(4^3) أي 64 كودون متخصص، وعندما وجد الباحثين بان عدد الكودونات هو 64 لذا فان الفرضية التي تقول بان الكودونات ثلاثية triple هي الفرضية الصحيحة.

صفات الشفرة الوراثية

يمكن إجمال المواصفات العامة للشفرة الوراثية بالآتي:

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

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

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

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

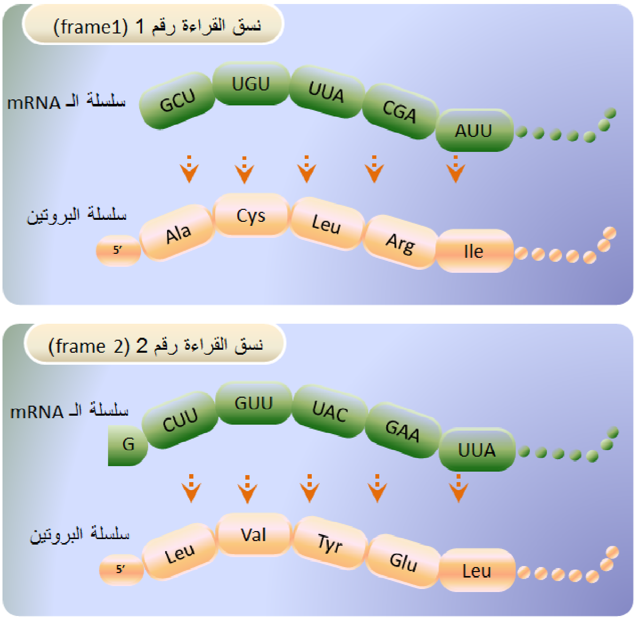
جدول (1.5) : كيفية اصطفاف الكودونات ضمن شفرة وراثية موحدة، تحتوي الشفرة الوراثية على 64 كودون، 61 منها تشفر و 3 منها لا تشفر للأحماض الامينية.

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

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

نسق القراءة reading frame

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



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

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

كودونات البدء والنهاية start\stop codons

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

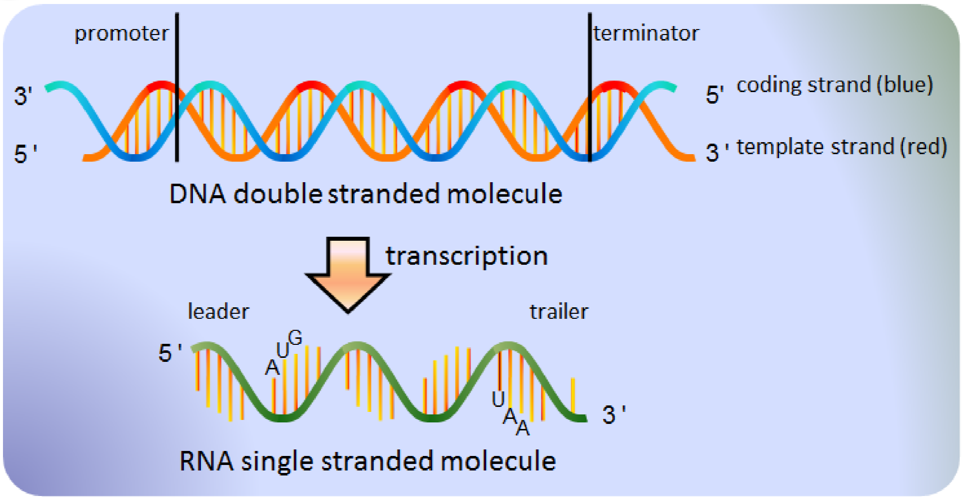
Harris Bernstein

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

عملية تخليق البروتين process of protein synthesis

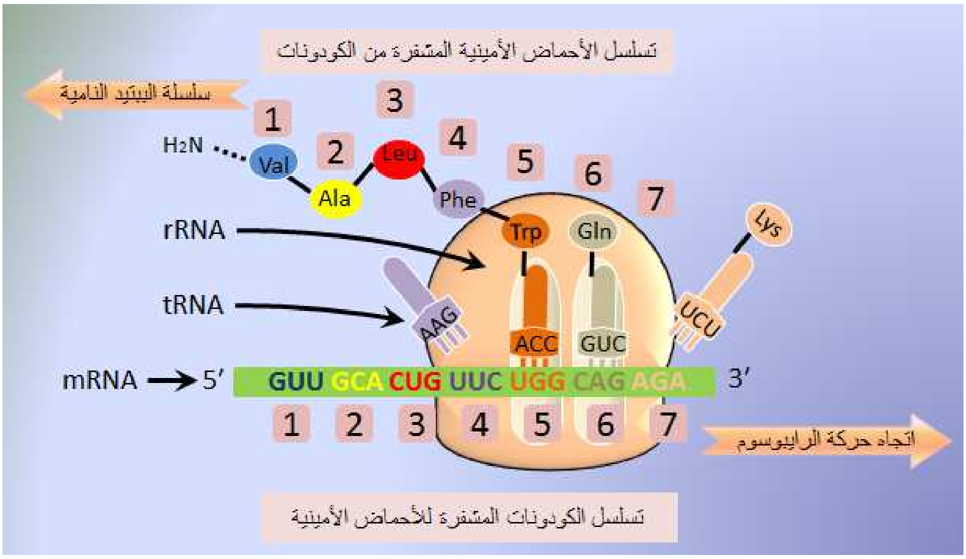
قبل أن نتطرق إلى مراحل عملية الترجمة لا بد لنا من توضيح أن التسلسلات الواقعة بعد نقطة بداية الاستنساخ وهي التسلسلات التي تعطي نسخة RNA أو الـ RNA transcript توجد على ثلاثة مناطق. تدعى منطقة نسخة الـ RNA التي تبدأ عند بداية الاستنساخ وتنتهي عند كودون البدء (AUG) بالقائدة أو القاطرة (leader) أو بالمنطقة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

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



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

في الفصل السابق قدمنا الجزيئات الرئيسية المشاركة في تخليق البروتين – وهي جزيئة الـ mRNA وجزيئات الـ tRNAs والرايبوسومات المحتوية على جزيئات rRNAs الكبيرة والصغيرة. وهنا، سوف نأخذ نظرة مفصلة حول كيفية تداخل هذه المكونات مع بعضها البعض لتصنع لوحة فنية كيموحيوية (شكل7.5) تؤدي بالنهاية إلى تكوين البروتينات.

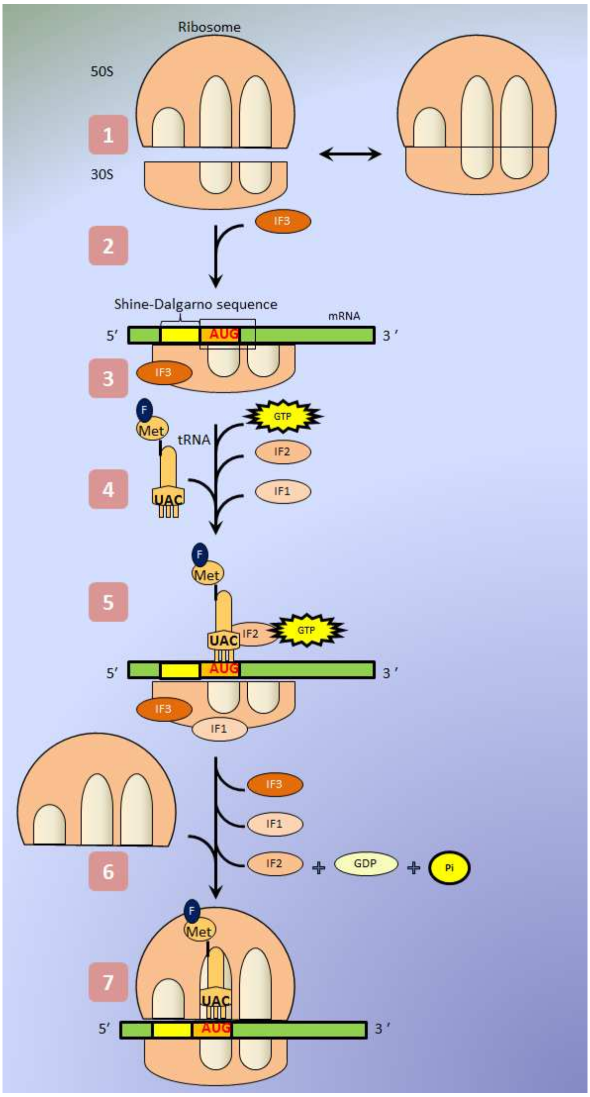


شكل (7.5): ثلاثة أدوار يقوم بها الـ RNA خلال تخليق البروتين. يترجم الـ mRNA إلى بروتين بمساعدة كل من الـ tRNA الرايبوسوم، والذي يتألف من بروتينات عديدة متنوعة ومن نوعين من جزيئات rRNA. لاحظ أن جزيئات الـ rRNA تؤلف مع البروتينات الرايبوسومية تركيب الرايبوسومات (تصميم المؤلف).

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

مرحلة البدء initiation

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



(1) جزيئة mRNA و (2) الوحدات الثانوية الصغيرة والكبيرة للرايبوسوم و (3) ومجموعة من ثلاث بروتينات تدعى بعوامل الأبتداء و (4) وجزيئة tRNA الابتدائية المرتبطة بمجموعة N-formylmethionine و التي تدعى بالـ fMet-tRNA (5) والكوانوسين ثلاثي الفوسفات GTP. تتألف مرحلة البدء من ثلاث خطوات. أولاً، يرتبط الـ mRNA بوحدة الرايبوسوم الصغيرة. ثانياً، ترتبط جزيئة الـ tRNA الابتدائية بالـ mRNA من خلال الازدواج القاعدي بين الكودون ومضاد الكودون. ثالثاً، ترتبط وحدة الرايبوسوم الكبيرة بمعقد البدء. دعنا نرى الآن ماذا يحدث في كل خطوة بتفصيل أكثر. يوجد الرايبوسوم الفعال بهيئة وحدتين (راجع الفصل الرابع) وهما وحدتي 30S و 50S في الخلايا البكتريا. وعندما تكون كلتا الوحدتين غير فعالتين في عملية الترجمة، تتواجد كلتا الوحدتان بهيئة توازن ديناميكي، والتي ترتبط وتنفصل ديناميكياً عن بعضها البعض (شكل8.5 a). ولا يمكن لجزيئة الـ mRNA أن ترتبط بوحدة الرايبوسوم الصغيرة إلا عندما تكون الأخيرة مفصولة عن الوحدة الثانوية الكبيرة.

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

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

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

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

فروقات بدء الترجمة بين بدائية وحقيقية النواة

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

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

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

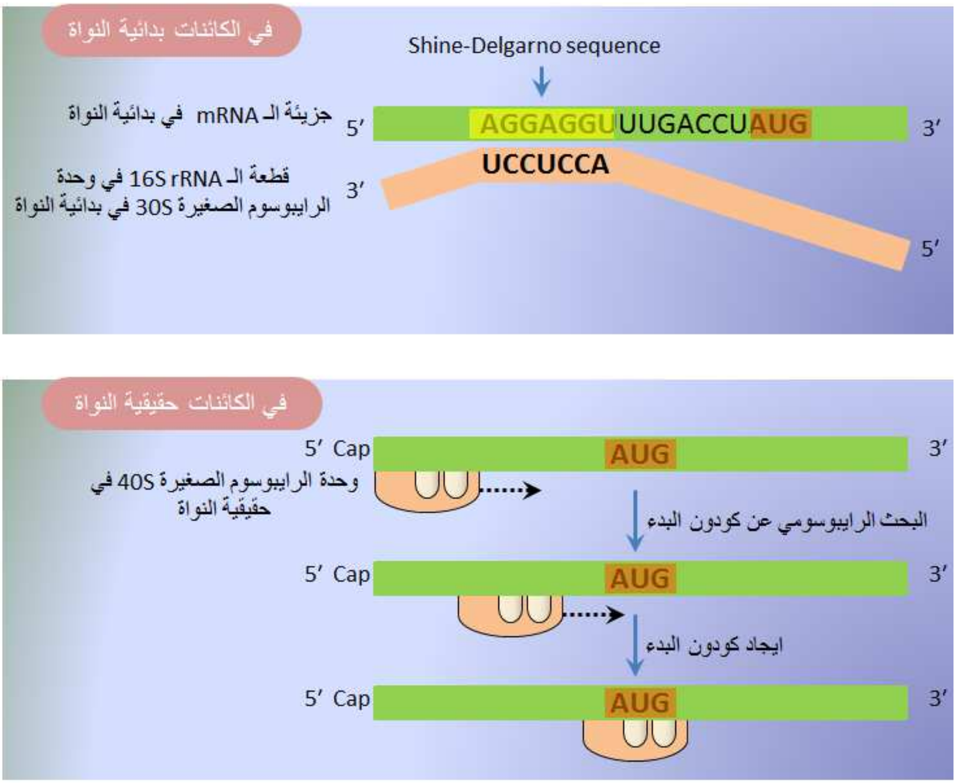
المثالية، فان كودون مثيونين البدء initiating codon والمثيونين الذي لا يرد في البداية non-initiating methionine هو AUG.

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

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

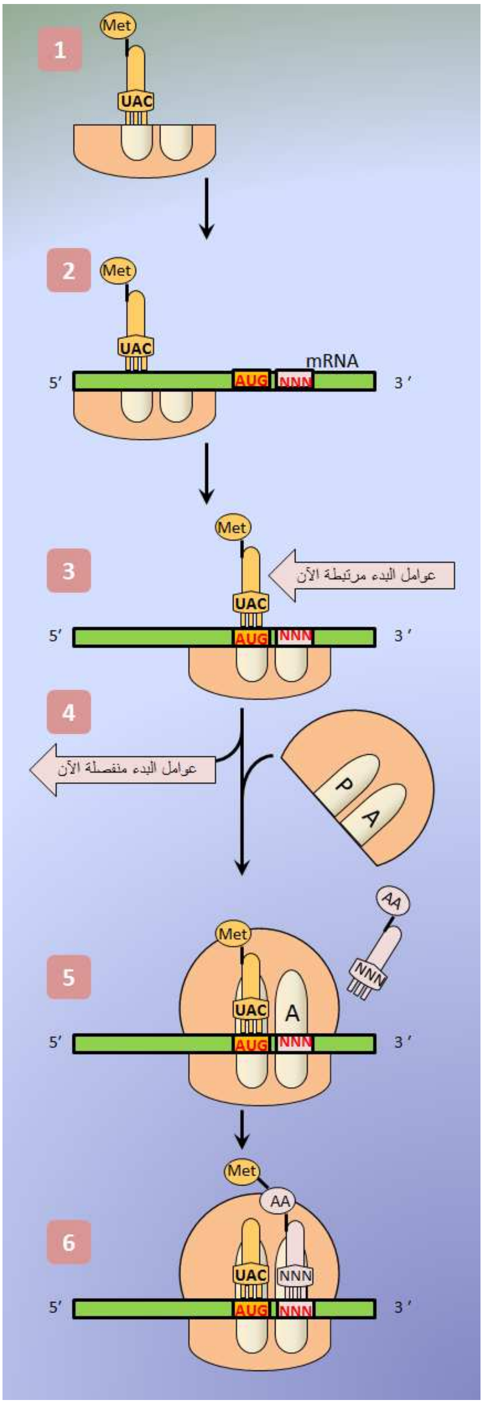
يتضح من هذا بأن تسلسل Shine-Dalgarno يعمل على اصطفاف جزيئة الـ mRNA على الرايبوسوم في بداية عملية الترجمة وذلك باستخدام الازدواج القاعدي base pairing مع التسلسل المكمل complementary sequence قرب النهاية ′3 لجزيئة الـ rRNA (شكل 9.5). إن هذا التداخل عن طريق الازدواج القاعدي تمكن الرايبوسومات البكتيرية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

وبالتناقض من ذلك، ففي الكائنات حقيقية النواة، تميز الرايبوسومات الـ mRNA بواسطة الارتباط بقلنسوته ذات التركيب 7-methylguanosine عند النهاية ′5 لجزيئة الـ mRNA (شكل9.5). ثم يبدأ الرايبوسوم بفحص دقيق للـ mRNA منطلقاً من النهاية ′5، إلى أن يصل إلى التسلسل AUG والذي يمثل هنا كودون البدء initiation codon.



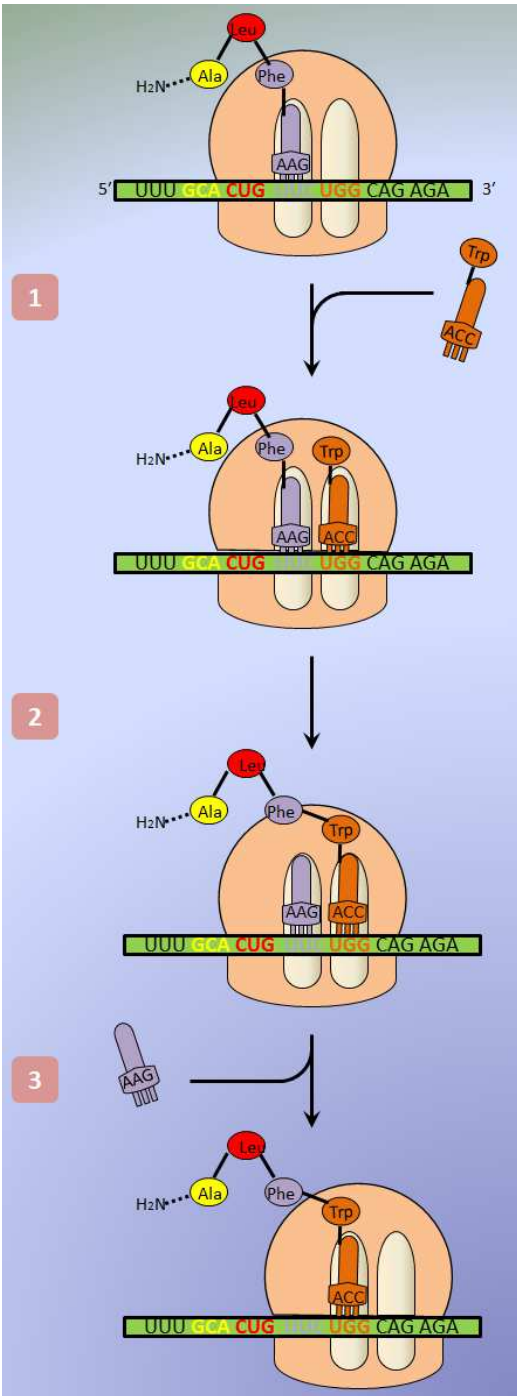
شكل (9.5): كيفية تمييز كودون البدء في رايبوسومات الخلايا بدائية وحقيقية النواة (تصميم المؤلف)

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



يتمثل الفرق الهام الآخر باحتياجات عملية بدء الترجمة في حقيقية النواة إلى عوامل بدء أكثر. والتي هي الأقل عشرة عوامل مختلفة كل منها يؤدي دور متميز في تسهيل عملية بدء الترجمة مقارنة بعوامل البدء الثلاث فقط الموجودة في الخلايا البكتيرية. بينما يتعلق الفرق الثالث بإضافة مجموعة الفورميل إلى أول مثيونين. ففي معظم البكتريا تبدأ الترجمة بالحامض الأميني methionine المحور بالفورميل formyl-modified methionine، بينما في اللبائن (شكل10.5)، يستخدم الحامض الأميني الـ methionine بصورته الغير محوّرة (ما عدا المايتوكوندريا والكلوروبلاست، والتي رايبوسوماتها تشبه تلك الموجودة في البكتريا). وفي الكائنات بدائية النواة، فان إضافة الفورميل إلى الـ methionine في جزيئة الـ tRNA يبدو انه يخدع موقع الببتيد P-site في الرايبوسوم وذلك لأن إضافة الفورميل إلى الـ methionine يجعله يبدو كآصرة ببتيدية، وبما أن الموقع الببتيدي يتقبل الأواصر الببتيدية، لذا، تستقر جزيئة N-formylmethionyl- tRNA في الموقع الببتيدي. تحدث هذه العملية طبعاً لمرة واحدة فقط عند تصنيع البروتين.

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



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

مرحلة الاستطالة elongation step

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

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

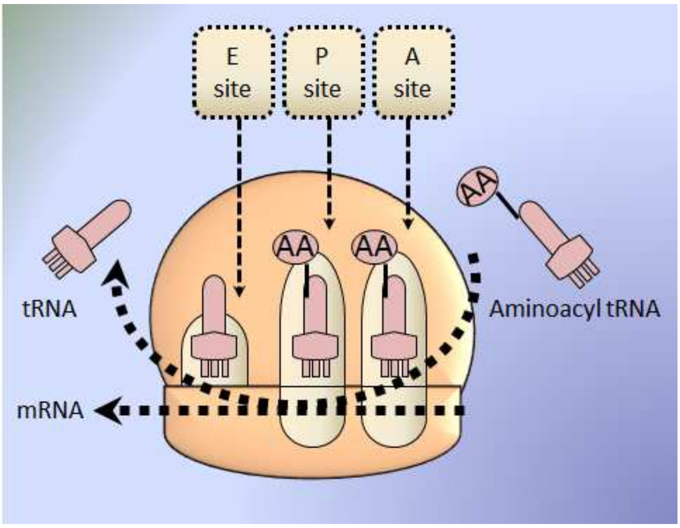
تذكّر بأن جزيئة الـ tRNA المبدئة للعملية والمحملة بالحامض الأميني methionine مرتبطة حينها بالموقع الببتيدي P-site ومزدوجة قاعدياً مع كودون البدء AUG. فإذا كانت الشفرة المضادة anticodon لجزيئة aminoacyl-tRNA القادمة (الثانية) تطابق وبشكل صحيح ذلك الكودون في الـ mRNA ينشأ ارتباطاً قوياً عند موقع الحامض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

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

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

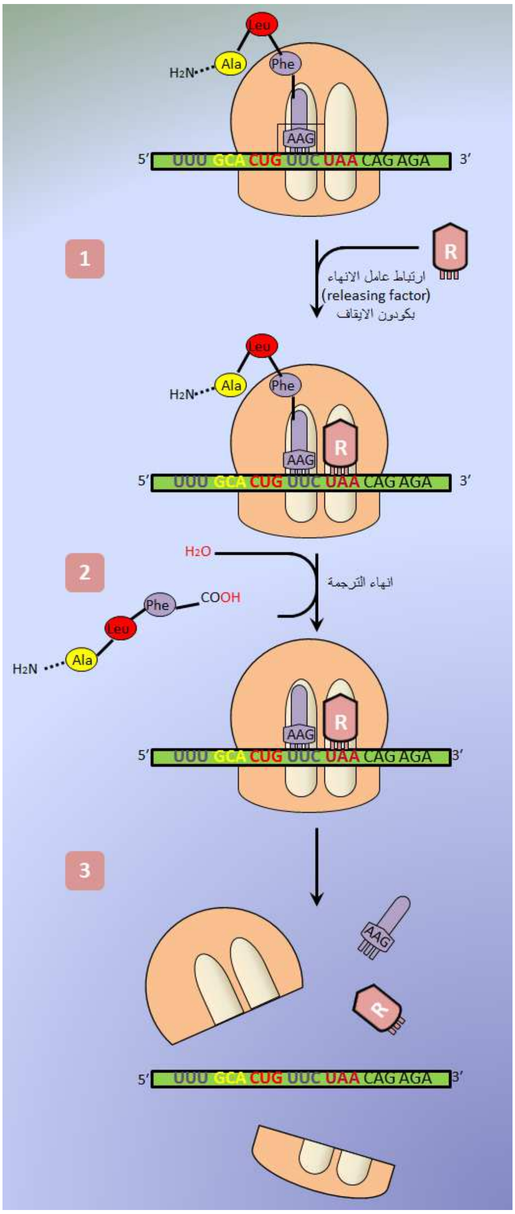
في الخطوة رقم 3، ينتقل الـtRNA الببتيدي الجديد (new peptidyl tRNA) من

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



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

مرحلة الانتهاء termination



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

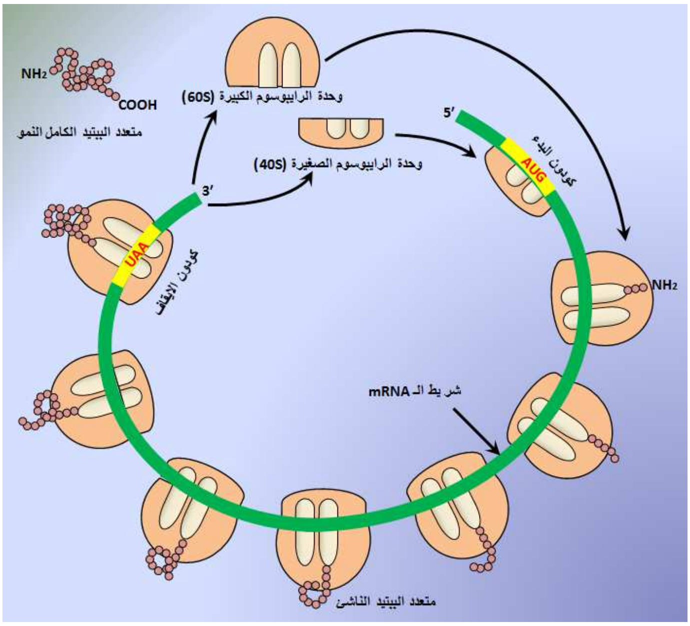
شكل (13.5): مرحلة الانتهاء في عملية تخليق البروتين في الكائنات بدائية وحقيقية النواة. (1) ارتباط العامل المحرر على كودون الإيقاف ينهي عملية الترجمة، (2) يتحرر الببتيد الذي قد تم تخليقه، (3) ينفك الرايبوسوم إلى وحدتيه المنفصلتين (تصميم المؤلف).

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

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

دور الرايبوسومات في عملية تخليق البروتين

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



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

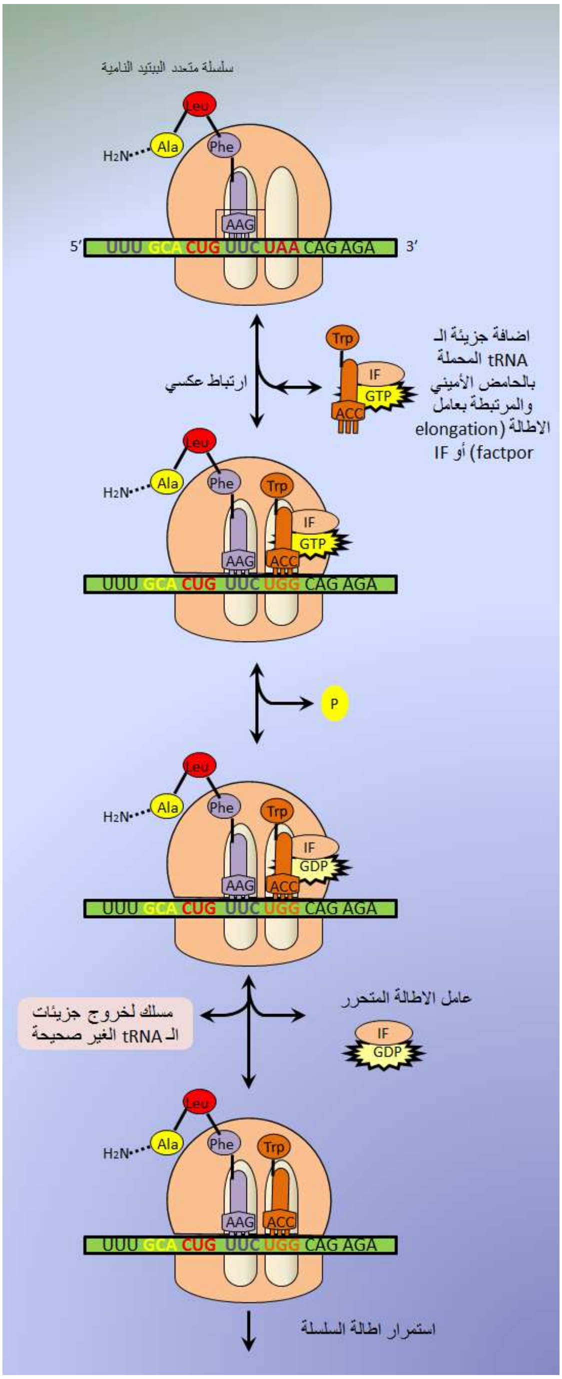
يستطيع الرايبوسوم الواحد في اللبائن من تخليق ما يقارب 100 آصرة ببتيدية في كل دقيقة. ويقوم متعدد الرايبوسومات وبفعالية بتخليق بروتينات ممكن أن توجد كدقائق حرة في السايتوبلازم، أو ربما ترتبط بلفائف مادة غشائية سايتوبلازمية تدعى بالشبكة الاندوبلازمية الداخلية endoplasmic reticulum. ان ارتباط متعدد الرايبوسومات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

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

هل هنالك تدقيق في عملية الترجمة؟

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

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

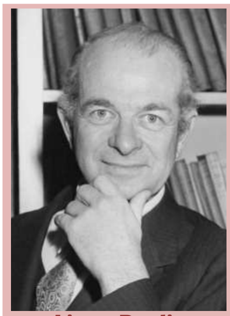


شكل (15.5): عملية تدقيق جزيئة الـ RNA الصحيحة على الرايبوسوم أثناء عملية الترجمة (تخليق البروتين). توجد تفاصيل أكثر في الخطوة 1 في مرحلة الاستطالة لتخليق البروتين والتي تبين كيف يمكن في عملية الارتباط الأولية لجزيئة الـ aminoacyl-tRNA من أن يرتبط بشكل مؤقت بالكودون عند موقع الأميني في الرايبوسوم A- site.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

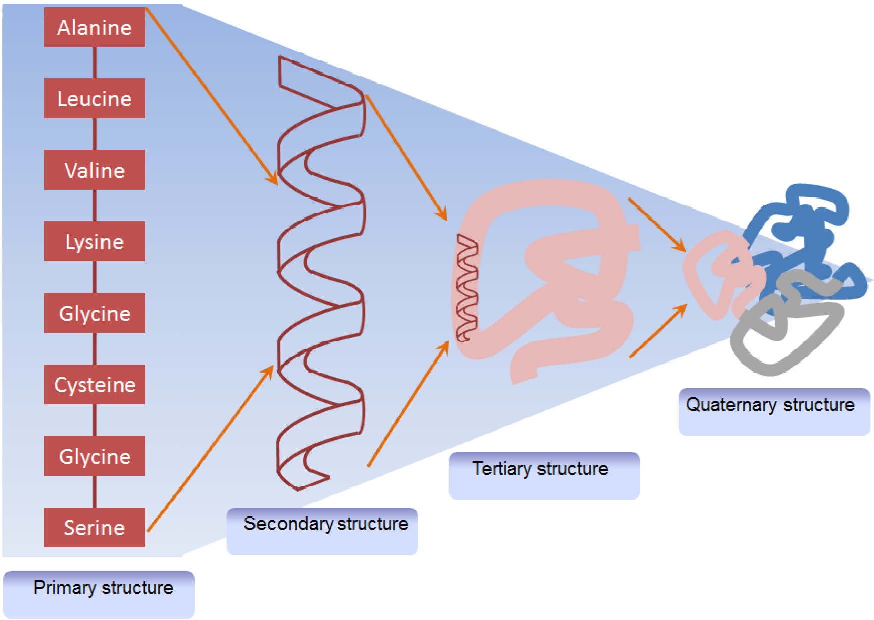
تكون جزيئة الـ tRNA الغير صحيحة عدداً أقل من الأواصر الهيدروجينية بين الكودون ومضاد الكودون مقارنة بجزيئة الـ tRNA الصحيحة: ولهذا ترتبط بصورة أضعف بالرايبوسوم ويحتمل أكثر من أن ينفك خلال هذه المرحلة. وبسبب التأخر المتسبب من قبل عامل الاستطالة تغادر جزيئات tRNA للرايبوسوم المرتبطة به بشكل غير صحيح من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

تركيب البروتين (Protein Structure)

تعد البروتينات جزيئات ثلاثية الأبعاد والتي تنجز معظم الوظائف الخلوية. فبينما يحدد الـ DNA الصبغة الوراثية genotype، فان الصبغة المظهرية phenotype للخلية هي نتيجة فعل البروتين. كل حامض أميني يحتوي على مجموعة وظيفية متفردة (والتي تسمى أيضاً R group) والتي تؤسس لفعاليتها الكيميائية. ومع تقدم عملية الترجمة، تبدأ المجاميع الفعالة في الأحماض الأمينية لمتعدد الببتيد بالتداخل مع بعضها البعض. وعند حدوث هذا، يبدأ البروتين بالانحناء الى شكله ذو الأبعاد الثلاثية. ان هنالك أربع مستويات من تركيب البروتين (شكل 16.5). التركيب الابتدائي للبروتين يمثل التسلسل الخطي للأحماض الأمينية كما هو محدد من قبل التسلسل النيوكليوتيدي في جزيئة الـ mRNA. وهذه هي المعلومة المحتواة ضمن اكسون الجين (راجع الفصل الثاني). ان الجين المفرد ينتج ربما متعددات ببتيدية بتراكيب أولية مختلفة. هذا ولا تستطيع معظم البروتينات أن تبقى بتركيبها الابتدائي وذلك لأن المجاميع الوظيفية لسلسلة متعدداتها الببتيدية المتكونة خلال الترجمة تبدأ بالتداخل مكونة للتراكيب الثانوية (secondary structures) والثالثية (tertiary structures). يشير التركيب الثانوي الى الاصطفافات المستقرة تحديداً لمخلفات الأحماض الأمينية والتي تعطي انماط تركيبية متكررة. وهكذا يتألف المستوى الثاني من تركيب البروتين من سلسلة من الطيات ضمن سلسلة متعدد الببتيد. ان هذه الأنماط هي نتيجة الأواصر الهيدروجينية بين المجاميع الفعالة لأحماض أمينية معينة. تنتج أنماط معينة من الأحماض الأمينية في تكوين التركيب الحلزوني الذي يدعى بالحلزون ألفا (α-helix) والمكتشف من قبل العالم Linus Pauling. وهذا التركيب لا يشبه جزيئة حلزون الـ DNA المزدوج بل بدلاً من ذلك تتميز بنمط حلزوني متفرد يختلف عن ذلك الملاحظ في حلزون الـ DNA المزدوج.



Linus Pauling



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

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

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

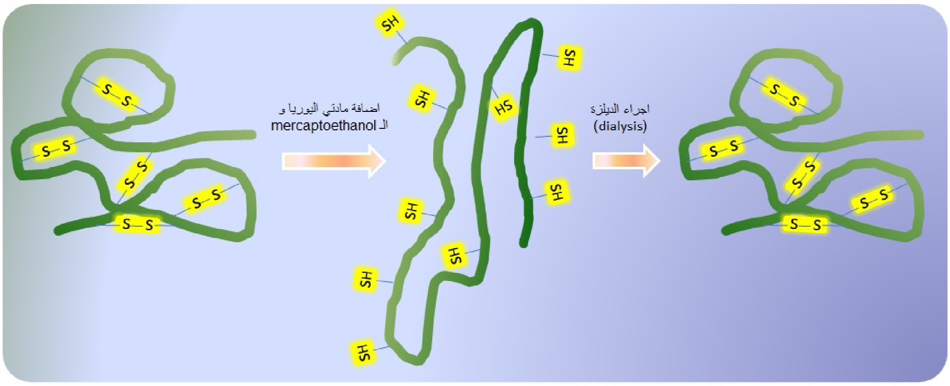
تحويرات ما بعد الترجمة
Post-transcriptional Modifications

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

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

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

Christian Anfinsen



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

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

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

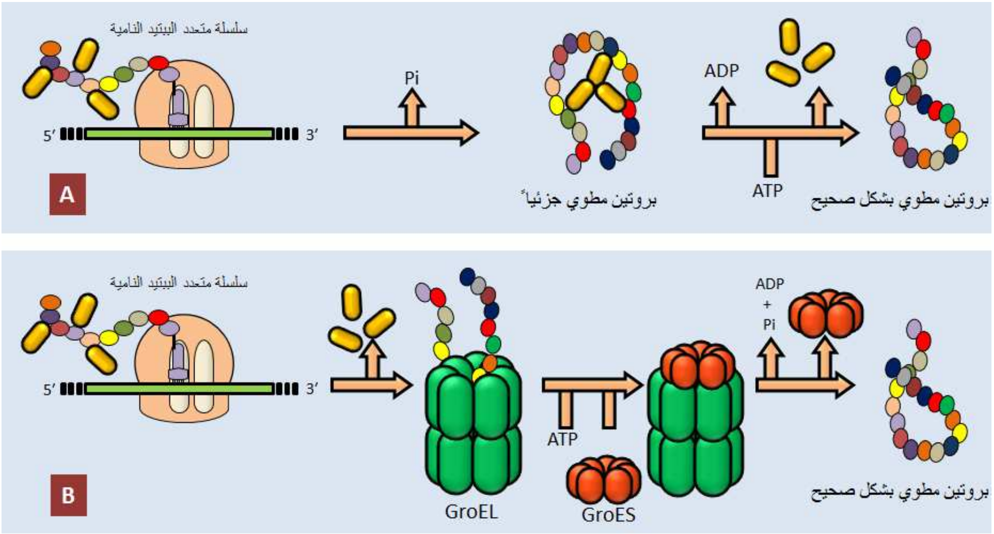
- الوصيفت الجزيئية molecular chaperones، والتي ترتبط وتثبت البروتينات الغير مطوية أو المطوية جزئياً، وبهذه الطريقة تمنع تلك البروتينات من التراكم والتحطم.

● الوصيفات المصغرة chaperonins، والتي تسهل طي البروتينات مباشرة.

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

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

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



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

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

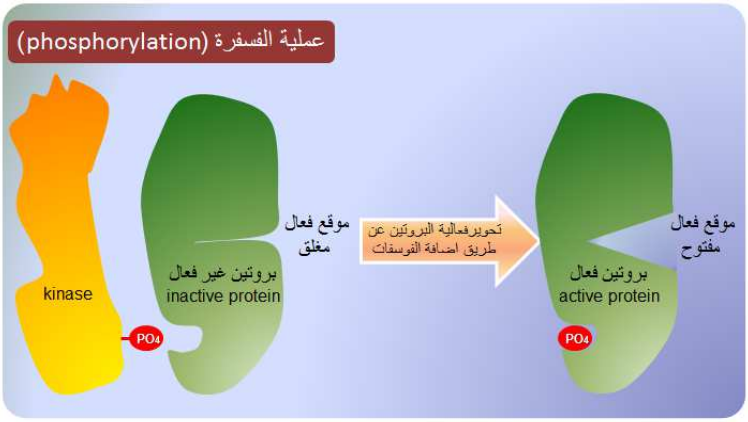
فانه يسبب تغيير في هيئة حلقة GroEL القريبة، مسبباً زيادة في تجويفها المركزي بينما ، وفي نفس الوقت، يقل فيه انتفاخ التجويف المركزي في الحلقة البعيدة. إن الطاقة التي تقود هذا التفاعل هي التحلل المائي hydrolysis للـ ATP. لذا، وبعد اكتمال عملية معالجة البروتين داخل معقد GroEL\GroES تقل ألفة GroEL لـ GroES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

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

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

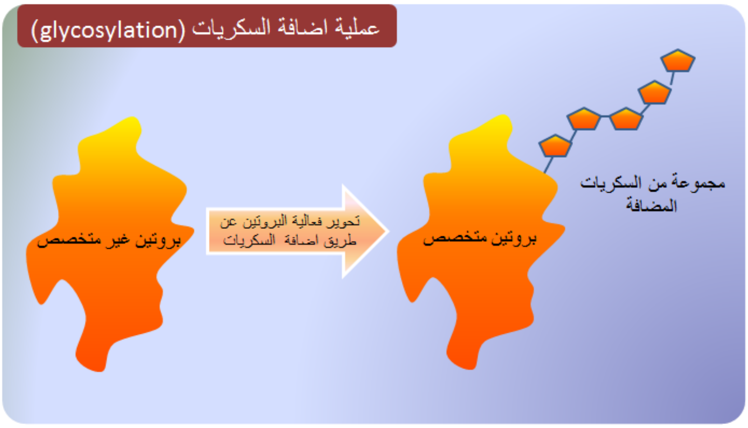
(أ). الفسفرة phosphorylation: تتضمن الفسفرة إضافة الفوسفات الى السلسلة الجانبية للحامض الأميني، وهي أما أن تكون مجموعة الهيدروكسيل في الحامض الأميني serine أو الـ threonine أو الـ tyrosine. تنتج هذه التحويرات من عمل بروتين يعرف بالـ

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



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

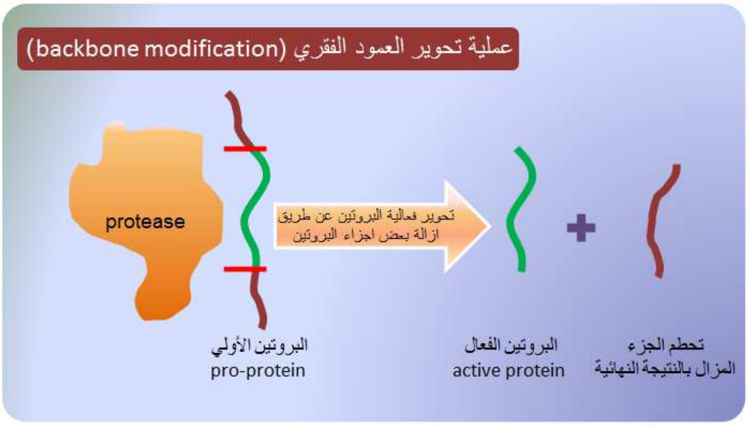
(ب). الـ glycosylation والتي يمكن أن تتضمن إضافة واحدة أو أكثر من السكريات إلى السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية، ويتم ذلك أما خلال الترجمة أو بعدها، وذلك لتكوين ما يعرف بالـ glycoprotein (بروتين يحتوي على مجموعة سكر مرتبطة به). تربط مجاميع السكر أما بسلسلة النتروجين الجانبية للحامض الأميني asparagines،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



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

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

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

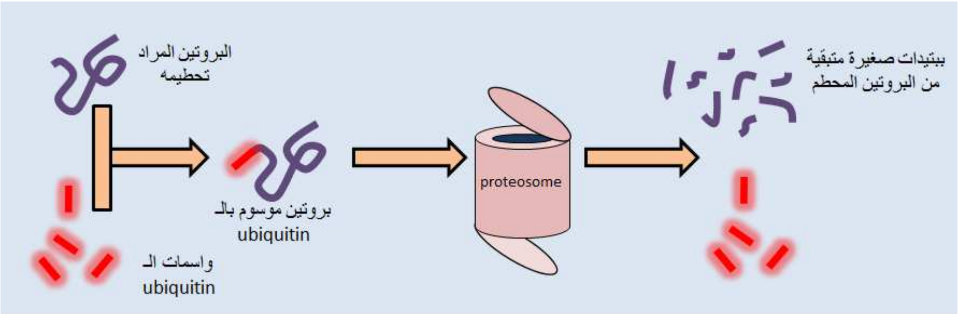


شكل (21.5): تحوير العمود الفقري لمتعدد الببتيد المخلق حديثا (البروتين الأولي) بواسطة ازالة بعض الأحماض النووية والتي بازالتها في بعض الحالات يتكون البروتين الفعال (تصميم المؤلف).

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

تحطيم البروتينات

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



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

ملحق الفصل الخامس
مثبطات تخليق البروتين .... وسيلة للعلاج!

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

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

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

أسئلة الفصل الخامس

السؤال الأول: علل ما يلي:

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

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

- أول من خلّق التسلسل CUCUCUC هو العالم ....

a- Nirenberg b- Khorana c- Watson d- Crick e- Holley

- تبدأ الترجمة في معظم البكتريا، بالحامض الأميني methionine المحور، بينما في اللبائن، يستخدم الحامض الأميني الـ methionine بصورته الغير محوّرة (ما عدا ---------------، والتي رايبوسوماتها تشبه تلك الموجودة في البكتريا).

a- Golgi apparatus b- endoplasmic reticulum c- nucleotides d- mitochondria and chloroplast e- nuclear envelope

- يثبط المضاد الحيوي puromycin عملية تخليق البروتين من خلال ------

a- خطأ في قراءة الشفرة الوراثية b- تحوير عامل الاستطالة EF-2 c- مشابهته لجزيئة tyrosinyl aminoacyl tRNA d- سد خطوة النقل الببتيدي

- يطلق على الرايبوسومات الموجودة في البكتريا بـ -------.

a- 40 S ribosomes b- 50 S ribosomes c-60 S ribosomes d- 70 S ribosomes e- 80 S ribosomes

- يعمل تسلسل ---------- على اصطفاف جزيئة الـ mRNA على الرايبوسوم في بداية عملية الترجمة وذلك باستخدام الازدواج القاعدي base pairing مع التسلسل المكمل قرب النهاية 3′ لجزيئة الـ rRNA.

a. Enhancer sequence b. 5′ Cap sequence c. Shine-Dalgarno sequence d. promoter sequence e. operon sequence

- تدعى جزيئة الـ tRNA البادئة لعملية الترجمة بـ ------------ في بدائية النواة

a. Met-tRNA b. uncharged tRNA c. fMet-tRNA d. (a) & (c) e. none

- يقوم العامل -------- بمنع ارتباط وحدة الرايبوسوم الثانوية الكبيرة بالوحدة الصغيرة في بدائية النواة

a. IF11 b. IF2 c. IF3 d. IF4 e. IF5

- إن أول خطوة من خطوات بدء ترجمة الـ DNA هو ارتباط الـ mRNA بالـ ---------- في بدائية النواة

a. large ribosomal subunit b. 5´ cap of mRNA c. met-tRNA d. initiation factors e. none

- يحتاج البروتين الذي هو بطول 400 حامض أميني إلى 20 ثانية لتخليقه تحت الظروف المثالية، لذا فان الوقت اللازم لتخليق حامض أميني واحد يبلغ --------- جزء من الثانية.

a. Ten b. twenty c. thirty d. forty e. fifty

- إن اتجاه تتدفق الـ tRNA أثناء عملية الترجمة في الرايبوسوم هو --------------

a. (E-A-P) sitesb. (E-P-A) sitesc. (A-E-P) sitesd. (P-A-E) sitese. (A-P-E) sites

- لا تقدر جزيئات متعدد الرايبوسوم على الارتباط بالـ mRNA بمسافة أقصر من ------ نيوكليوتيدة عن بعضها البعض.

a. 60 b. 70 c. 80 d. 90 e. 100

- ينبثق البروتين المنتج من متعدد الرايبوسوم المرتبطة على الشبكة الاندوبلازمية الداخلية إلى حيز مفتوح يدعى -------

a. Golgi apparatusb. cisterna spacec. zymogen particled. cytosole. peroxisome

- عندما نقول بأن الشفرة الوراثية متخصصة (specific) أي أنها -------------

a. ubiquitousb. non-ubiquitous c. ambiguous d. unambiguous e. promiscous

- يقوم الإنزيم ---------- ببلمرة النيوكليوتيدات عشوائياً دون الاعتماد على شريط قالب

a. primase b. topoismerase c. DNase d. polynucleotide phosphorylase e. DNA dependent DNA polymerase

- ان العامل .... هو السؤول عن بطئ عملية الترجمة.

a. IF1 b. EF1 c. IF2 d. EF2 e. RF

السؤال الثالث: عرف ما يلي:

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

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

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

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

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

6

الفصل السادس
تنظيم التعبير الجيني

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

مقدمة

George Beadle

Edward Tatum

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

وبعد ذلك اكتشف الباحثون بأن العديد من البروتينات هي ليست إنزيمات، ولكن بدلاً من ذلك هي ربما تكون جزيئات للإشارة signaling molecules أو مستقبلات receptors، أو ربما تلعب أدواراً تركيبية. وهكذا، تم حورت نظرية "جين واحد إنزيم واحد" إلى "جين واحد بروتين واحد". وكذلك، اكتشف الباحثون بأن العديد من البروتينات الوظيفية تتألف من العديد من سلاسل الأحماض الأمينية (متعدد الببتيدات) المميزة المطابقة لتسلسلات الـ DNA لا توجد بالضرورة بشكل قريب من بعضها البعض أو حتى على نفس الكروموسوم، وهذا أدى إلى تكوين نظرية "جين واحد متعدد ببتيدي واحد" في تعريف الجين. لذا ربما أصبح تعريف الجين بأنه قطعة من الـ DNA تحتوي على المعلومات الضرورية لصنع متعدد ببتيد محدد (أو وحدة ثانوية محددة ذو وظيفة محددة (بدلاً من بروتين محدد).

تنظيم التعبير الجيني في بدائية النواة

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

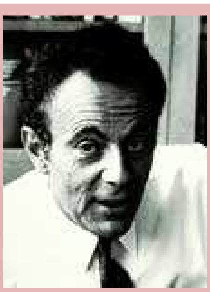
منذ أكثر نصف قرن، ومع فهم كيفية جريان المعلومات الوراثية من الجين وخلال الرنا المراسل mRNA إلى جزيئة بروتين محددة. ومنذ ذلك الوقت، تطورت مفاهيم معقدة حول كيفية تنظيم التعبير الجيني في البكتريا. وقبل أن يتم التطرق إلى تفاصيل تنظيم التعبير الجيني، لا بد لنا من معرفة معنى بعض المصطلحات ذات الصلة بهذا الموضوع،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

أولاً: السيطرة الاستنساخية على التعبير الجيني

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

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

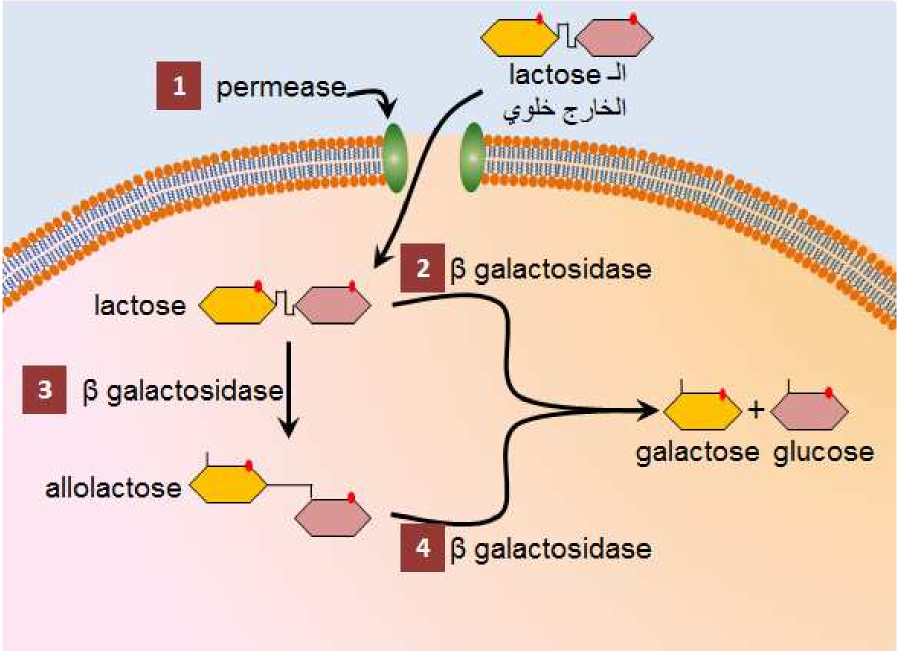
اكتشاف الأوبرون


Francis Jacob

Jacques Monod

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

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



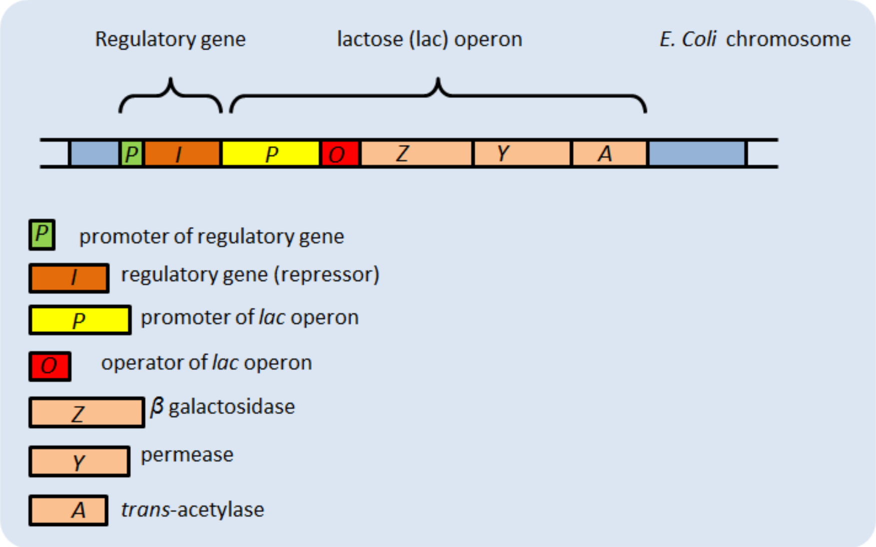
شكل (1.6): كيفية تحطيم اللاكتوز من قبل إنزيمات بكتريا القولون وذلك للاستفادة منه كمصدر للطاقة وفي ذلك عدة خطوات: (1) ينقل بروتين الـ permease اللاكتوز الخارج خلوي، (2) عندما يدخل اللاكتوز يقوم انزيم β galactosidase بتحطيمه الى كلوكوز وكالاكتوز، (3) كذلك يحول انزيم β galactosidase الى مركب ذو علاقة باللاكتوز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

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

أوبرون اللاكتوز lac operon:

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

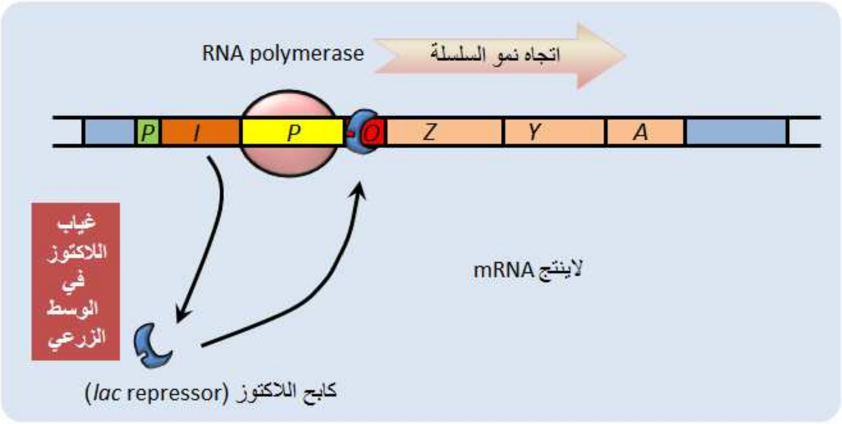
الجينـات التنظيميـة regulatory genes: وهـي الجينـات التـي تشـفر لبروتينـات (أو RNA) والتـي تكـون وظيفتهـا تنظيـم تعبيـر الجينـات الأخـرى. ويمكـن لمثـل هـذا النـوع مـن الجينـات أن تنـتج فـي مكـان وتعمـل فـي مكـان آخـر(*in trans*). تـدعى بعـض البروتينـات المنظمـة الناتجـة من هذه الجينـات بالكوابح repressors، أما مواقع الـ DNA التـي تـرتبط بـه فتدعى بالمشـغلات operator. وفـي غيـاب الكـابح، يمكن لإنـزيم RNA polymerase أن يـرتبط بـالبروموتر ويبـدأ استنسـاخ الأوبـرون. وعنـد وجـود الكـابح، يكـون إنـزيم RNA polymerase غير قادر على استنساخ الأوبرون.



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

يقع الجين التنظيمـي *lac*I بشكل مجـاور وقبل upstream الجينـات التركيبيـة *lacZ-lacY-lacA*. هذا وليس بالضرورة من هذا الجين التنظيمـي من أن يقع في منطقة مجاورة جداً للجينات التي ينظمها، حيث يمكن له من أن يؤثر عليها في بعض الحـالات حتـى لـو كـان موقعـه بعيـداً عنهـا، ولهذا سمـي بـالجين التنظيمـي، وهـو يختلـف فـي هذه الصفة عن تلـك الجينات التركيبية التي لا تتدخل في تنظيم عمل جينات أخرى، حتى لو كانت في موقع قريـب لها. ويوصف تعبير الجين I الطبيعي في كابح اللاكتوز بـالتعبير التكوينـي constitutional expression، حيـث يـتم التعبيـر عنـه بمعدل ثابـت، وهـذا ينـتج فـي تكـوين وحـدات كـابح اللاكتـوز lac repressor الثانويـة. تتسم جزيئـة البـروتين الكـابح repressor protein molecule، والتـي هـي نـاتج الجـين I، بألفـة عاليـة لموقـع المشـغل operator site، الـذي

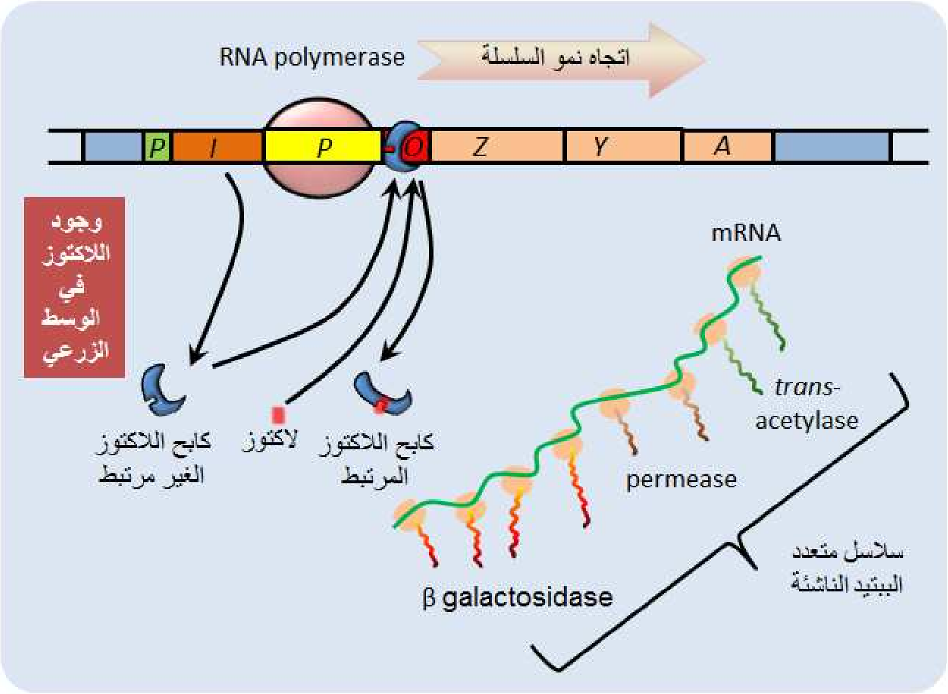
ترتبط به عادة. يقع موقع المشغل بين منطقة البروموتر والتي يرتبط بها إنزيم RNA polymerase ليبدأ عملية الاستنساخ، ومنطقة بداية الاستنساخ transcription start site للجين Z، وهو الجين التركيبي لإنزيم galactosidase β (شكل 3.6). عندما ترتبط الجزيئة الكابحة بموقع المشغل، فإنها تمنع استنساخ الموقع المشغل بالإضافة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



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

عندما يطفر الجين I بحيث يكون البروتين المنتج من قبله (كابح اللاكتوز lac repressor) غير قادر على الارتباط بالـ DNA المشغل، عندها سوف يبدي الكائن الحي تعبيراً تكوينياً constitutive expression لمشغل اللاكتوز. وبالتناقض، فان الكائن الحي الذي يحتوي على طفرة في الجين I والذي يمنع ارتباط الحاث بالكابح سوف يبقى مكبوحاً حتى عند وجود الجزيئة الحاثة، لأن الحاث لا يمكن له الارتباط بالكابح على موقع المشغل لكي يزيل من كبح الأوبرون.أمّا عند إضافة كميات صغيرة من اللاكتوز، فان تلك الكميات تكون قادرة على دخول الخلية حتى عند غياب إنزيم permease. إن كلتا الجزيئات الكابحة، أي تلك التي تتصل بمواقع المشغل operator site وتلك التي تكون حرة في السايتوبلازم، تمتلك ألفة كبيرة للحاث inducer. إن ارتباط الحاث بالجزيئة الكابحة المتصلة بموقع المشغل سوف يعمل على حدوث تغيرات في هيئة الكابح (conformational changes) ويؤدي إلى انفصاله عن الـ DNA (شكل4.6).وإذا ما اتصل إنزيم RNA polymerase بالشريط المشفر coding strand عند موقع البروموتر، عندها سوف يبدأ الاستنساخ. يولد إنزيم RNA polymerase ما يعرف بالرنا المتعدد السسترون plycistronic mRNA.

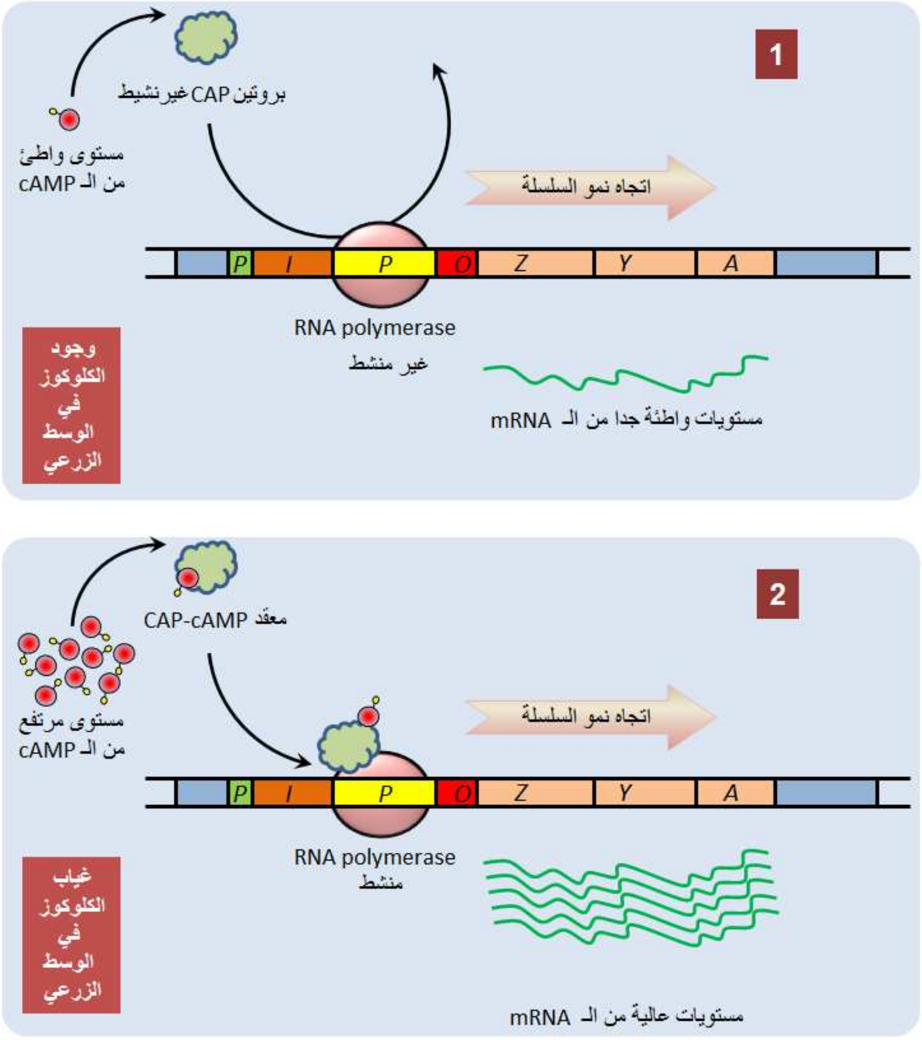
وفي هذا النمط، يقوم الحاث (اللاكتوز هنا) بإزالة كبح مشغل اللاكتوز ويسمح باستنساخ الجينات التركيبية للإنزيمات galactosidase β و permease galactoside و galactoside transacetylase. إذن، إن إزالة كبح مشغل اللاكتوز يمنح الخلية القدرة على تخليق الإنزيمات الضرورية لهدم اللاكتوز كمصدر للطاقة.



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

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

يقوم بروتين منشط الجينات المهدمة catabolite gene activator protein (CAP) بالإضافة مع cyclic AMP (cAMP) بالتوسط في هذه العملية (شكل5.6).



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

ولكي يتصل إنزيم RNA polymerase بموقع البروموتر، فلابد من وجود البروتين CAP، والذي يرتبط به المركب cAMP. وبواسطة آلية مستقلة، تقوم البكتريا بتراكم المركب cAMP فقط عندما يتم تجويعها عن الكلوكوز. وعند وجود الكلوكوز بتراكيز كافية للنمو، سوف تفتقد البكتريا مركب cAMP لكي يرتبط بمركب CAP. وهكذا، فعند وجود الكلوكوز، يقل مستوى مركب الـ cAMP بشكل حاد بحيث لا يجد بروتين CAP ما ينشطه، وهكذا يفقد بروتين CAP قابليته على أن يرتبط بمنطقة الارتباط بالمنشّط activator binding site، وبالتالي، لا يتمكن إنزيم RNA polymerase من بدء استنساخ مشغل اللاكتوز. وعند غياب الكلوكوز، يزداد مستوى مركب cAMP بشكل كبير جداً، عندها يتنشّط بروتين CAP ليتكوّن معقد CAP-cAMP، والذي يرتبط بالـ DNA قبل منطقة البروموتر بقليل، هنا يمكن أن يحدث الاستنساخ بعدها (شكل 6.7). وهكذا، يعمل معقد CAP-cAMP كمنظم ايجابي، لأن وجوده ضروري لحدوث عملية التعبير الجيني. أما البروتين CAP، فهو عبارة عن منشط يحفز الارتباط بنفس البروموتر. ولكن عندما نريد أن نتوخى الدقة، لابد من أن نشير إلى بروتين CAP بـ apoactivator بدلا من activator ، لأنه يحث على الاستنساخ فقط عندما يكون معقد مع جزيئة صغيرة تدعى 3- coactivator .5 cyclic AMP (cAMP). إذن، يتعرض مشغل اللاكتوز لكلا التنظيمين الايجابي والسلبي. ولكن كلا التنظيمين لا يعملان بمعزل عن بعضهما البعض، وإنما يتعرض أوبرون اللاكتوز إلى تأثيريهما معاً بشكل متزامن، وبهذا، لا يمكن أن نأخذ تأثير كل منهما على حدة.

أوبرون اللاكتوز: الصورة الكاملة

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

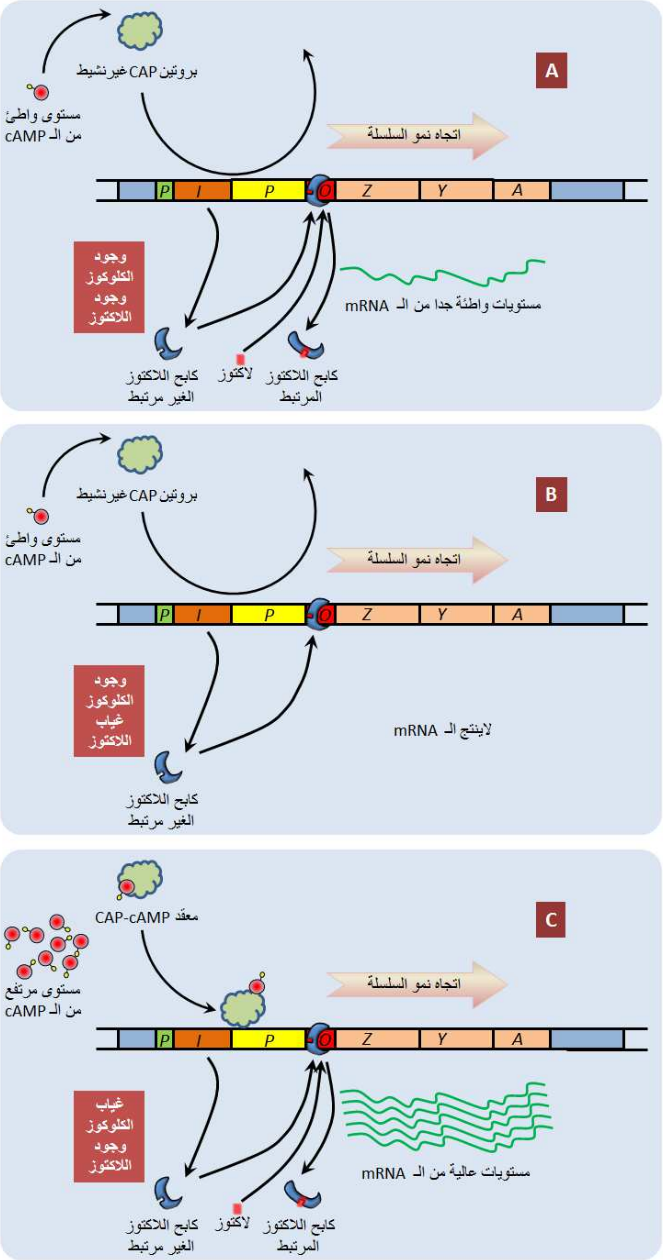
يتنظم استنساخ أوبرون اللاكتوز من قبل اثنين من البروتينات التنظيمية، وهما البروتين CAP و بروتين كابح اللاكتوز lac repressor، واللذان يعملان معاً لضمان إنتاج البروتينات الثلاث الضرورية للنمو على اللاكتوز عند غياب الكلوكوز (مادة التفاعل الكفوءة). يمكن للبروتين CAP من أن يرتبط بمنطقة من الـ DNA قريبة من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

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

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

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

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



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

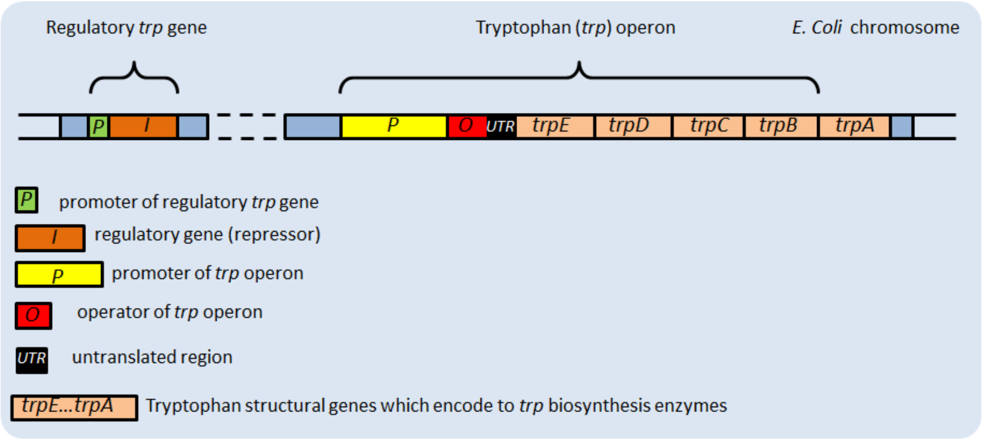
الحالة الرابعة: عندما لا يوجد كل من الكلوكوز واللاكتوز يكون تركيز مركب cAMP مرتفعاً ويرتبط بروتين CAP بموقع الارتباط بالمنشط activator binding site. عندها يمكن لإنزيم RNA polymerase من أن يرتبط بالبروموتر ولكنه يوقف من قبل كابح اللاكتوز lac repressor المرتبط في موقع التشغيل operator site.

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

كابح التربتوفان tryptophan repressor

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

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

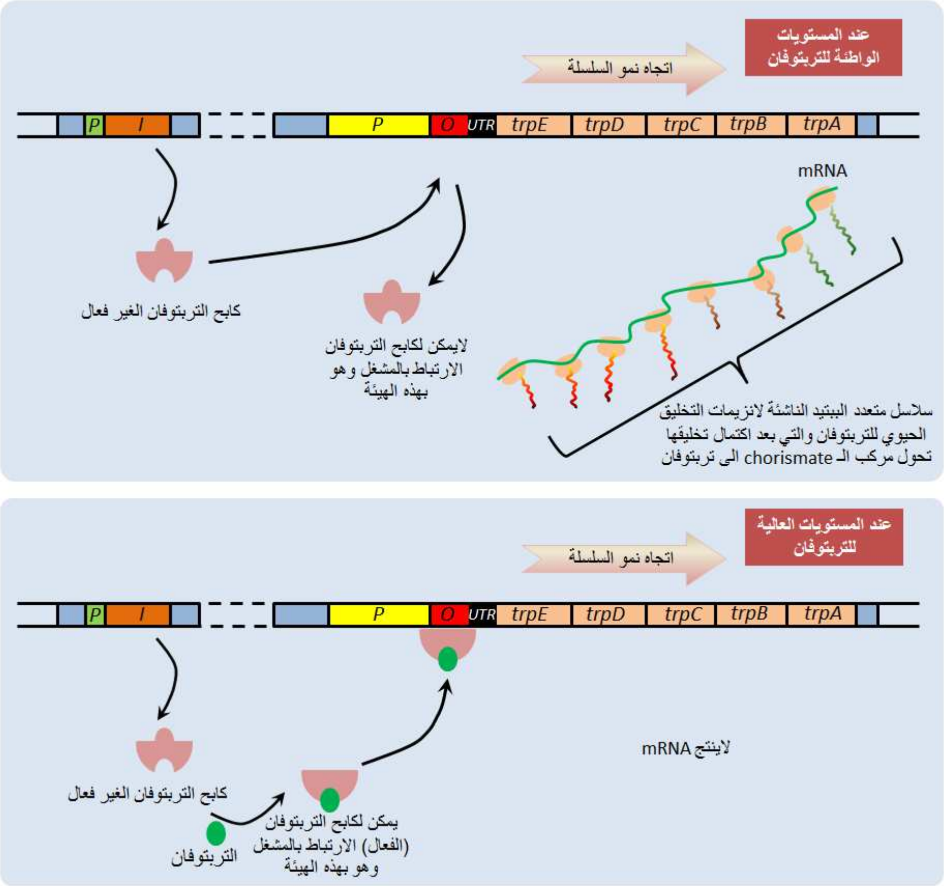


شكل (7.6): التركيب الجيني لأوبرون التربتوفان في بكتريا القولون (تصميم المؤلف).

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

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

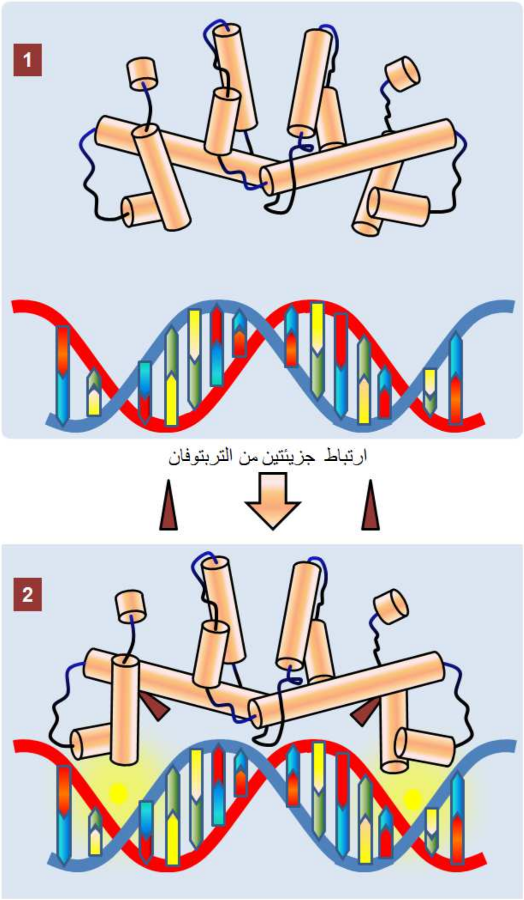
إن كابح الـ tryptophan هو بروتين تنظيمي يتّخذ هيئة تدعى helix-turn-helix. إن لهذه الهيئة دور أساسي في تنظيم عمل الكابح، فعندما يغيب الـ tryptophan من البيئة، يكون الكابح بهيئة غير فعالة (inactive conformation)، ولا يمكن أن يرتبط بالـ DNA ليمنع الاستنساخ. وعندما يكون الـ tryptophan متوفراً، ترتبط جزيئتان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



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

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

إن الفرق الأساسي بين عمل كابح اللاكتوز lac repressor وكابح التربتوفان tryptophan repressor يتعلق بوظيفة الجزيئة المؤثرة الصغيرة small effecter molecule. ففي حالة اللاكتوز، فان الجزيئة المؤثرة المتمثلة باللاكتوز lactose تعمل كمضاد للكابح antirepressor مسببة في تحرر الكابح من المشغّل operator. وفي حالة التربتوفان، فان الجزيئة المؤثرة والمتمثلة بالتربتوفان tryptophan تعمل كمساعد للكابح corepressor، حاثة على ارتباط الكابح repressor بالمشغّل operator.



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

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

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

Charles Yanofsky

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

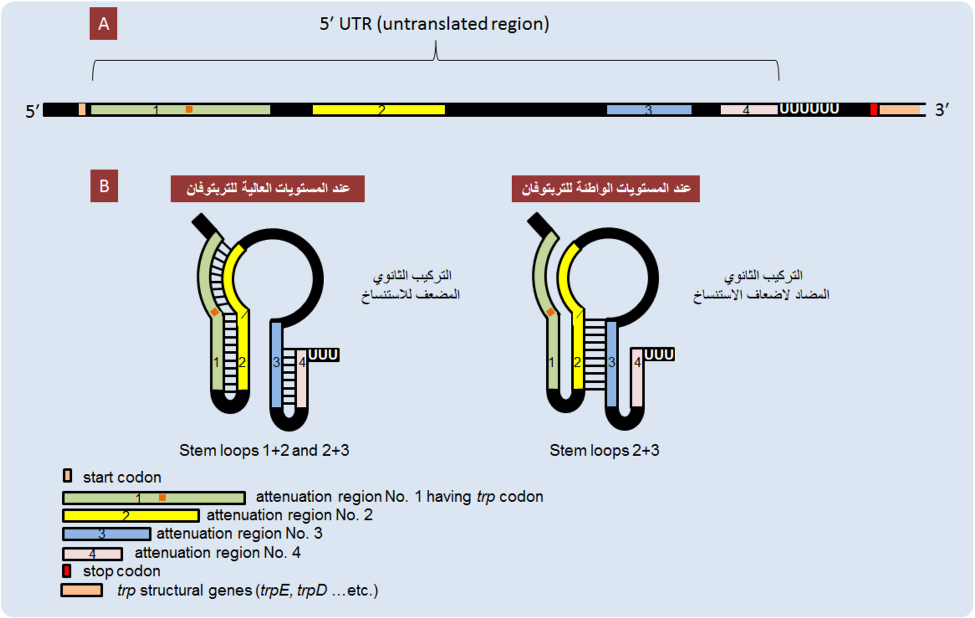
اكتشف الفحص المفصل لأوبرون اللاكتوز بوجود منطقة تتألف من 162 نيوكليوتيدة والتي تطابق المنطقة 5-UTR من جزيئة الـ mRNA (المذكور في البداية) المستنسخة من أوبرون التربتوفان (شكل a10.6).تحتوي منطقة 5-UTR (والمعروفة أيضاً بالقائد) على أربعة مناطق: منطقة 1 وهي مكملة للمنطقة 2، منطقة 2 وهي مكملة للمنطقة 3، والمنطقة 3 وهي مكملة للمنطقة 4. إن وجود صفة التكامل بين تلك المناطق تسمح للمنطقة 5-UTR بالانطواء إلى تركيبان ثانويان معروفان (شكل b10.6). افترض الباحثون حدوث ظاهرة الإضعاف في مثل هذا التركيب الثانوي.

أن أحد هذه التركيبات الثانوية تحتوي على تركيب يشبه دبوس الشعر نتج عن الازدواج القاعدي بين المنطقة 1 و 2 ودبوس شعر آخر نتج عن الازدواج القاعدي بين المنطقة رقم 3 و 4. لا حظ وجود حبل من نيوكليتيدات اليوراسيل تتبع دبوس الشعر الناتج عن الازدواج القاعدي بين المنطقة 3 و4. وبشكل غير متزامن، يحتوي تركيب المنهي البكتيري الفعلي على دبوس الشعر المتبوع بحبل من نيوكليوتيدات اليوراسيل: هذا التركيب الثانوي في منطقة 5-UTR في أوبرون اللاكتوز هو المنهي حقيقةً ويدعى بالمضعف attenuator. وعندما تكون المستويات الخلوية للتربتوفان عالية، تزدوج المنطقة 3 و 4 للازدواج القاعدي لمنطقة 5-UTR ، منتجاً تركيباً يدعى بتركيب المضعف attenuator

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

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

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

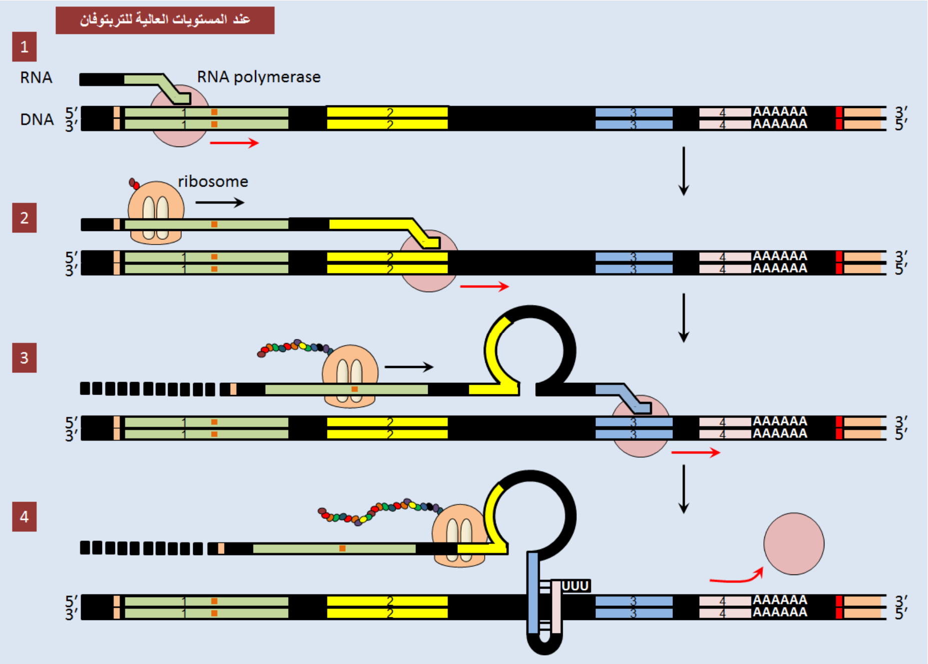


شكل (10.6): تركيب المضعف في أوبرون التربتوفان(a) تركيب المنطقة الغير قابلة للترجمة الواقعة قبل الجينات التركيبية لأوبرون التربتوفان (b) تكوين اثنان من المركبات الثانوية بواسطة منطقة 5-UTR لجزيئة mRNA المستنخة من أوبرون التربتوفان، فعندما يرتفع مستوى التربتوفان تزدوج المنطقة رقم 3 مع المنطقة رقم 4 وهذا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

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

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

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



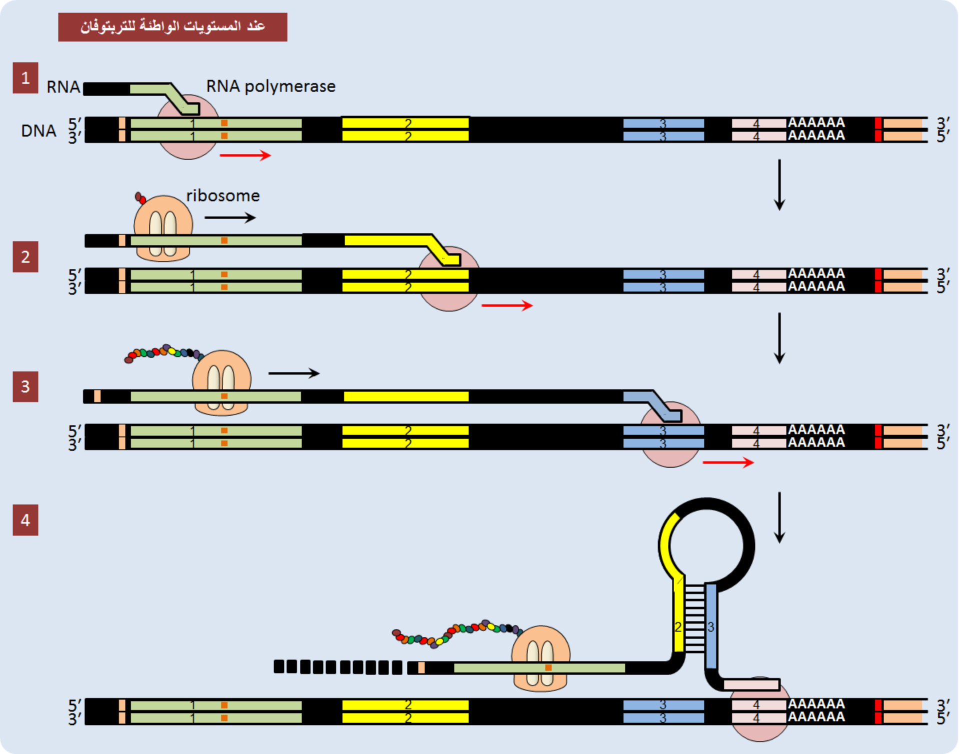
شكل (11.6): موقف الإضعاف في أوبرون التربتوفان عند ارتفاع المستوى الخلوي للتربتوفان والذي يتلخص بأربع خطوات: (1) يبدأ انزيم RNA polymerase باستنساخ المنطقة رقم 1 في تركيب 5′UTR، (2) يرتبط الرايبوسوم بالنهاية 5′ لتركيب 5′UTR ويبدأ بترجمة المنطقة رقم 1 بينما مازالت منطقة رقم 2 في طور الاستنساخ، (3) يترجم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

الاستنساخ عندما يكون مستوى التربتوفان واطئاً

ماذا يحدث عندما يكون مستوى التربتوفان واطئاً؟ مرة أخرى، يبدأ إنزيم RNA polymerase باستنساخ المنطقة رقم 1 لـ 5-UTR (شكل 12.6 الخطوة 1)، ويرتبط الرايبوسوم بالنهاية 5′ لمنطقة 5-UTR ويبدأ بترجمة منطقة رقم 1 بينما يقوم إنزيم RNA polymerase بالاستمرار في استنساخ المنطقة رقم 2 (شكل 12.6الخطوة 2). وعندما يصل الرايبوسوم الى كودونات UGG المشفرة للتربتوفان، فانه يتعثر في تلك المنطقة (شكل 12.6 الخطوة 3) لأن مستوى التربتوفان يكون واطئاً، و يكون الـ tRNA المحمل بالتربتوفان نادراً أو غير متوفر بالمرة.

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

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



شكل (12.6):موقف الإضعاف في أوبرون التربتوفان عند انخفاض المستوى الخلوي للتربتوفان والذي يتلخص بأربع خطوات: (1) يبدأ انزيم RNA polymerase باستنساخ المنطقة رقم 1 في تركيب 5′UTR، (2) يرتبط الرايبوسوم بالنهاية 5′ لتركيب 5′UTR ويبدأ بترجمة المنطقة رقم 1 بينما مازالت منطقة رقم 2 في طور الاستنساخ، (3) يتعثر الرايبوسوم بكودونات التربتوفان في المنطقة رقم 1 بسبب انخفاض مستوى التربتوفان، وبسبب تعثر التربتوفان لاتغطى المنطقة رقم 2 بالرايبوسوموعندما تستنسخ المنطقة رقم 3، (4) عند استنساخ المنطقة رقم 3 فانها تزدوج مع المنطقة رقم 2، وعندما تستنسخ المنطقة رقم 4 فانها لايمكن لها أن تزدوج مع المنطقة رقم 3 ، لأن المنطقة رقم 3 هي عادة ماتزدوج بالمنطقة رقم 2، وعندها لايمكن لتركيب المضعف (attenuator) أن يتكون ويستمر الاستنساخ (تصميم المؤلف).

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

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

وسائل أخرى لتنظيم التعبير الجيني في البكتريا عند مستوى الاستنساخ

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

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

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

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

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

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

ثانياً: سيطرة الترجمة على التعبير الجيني

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

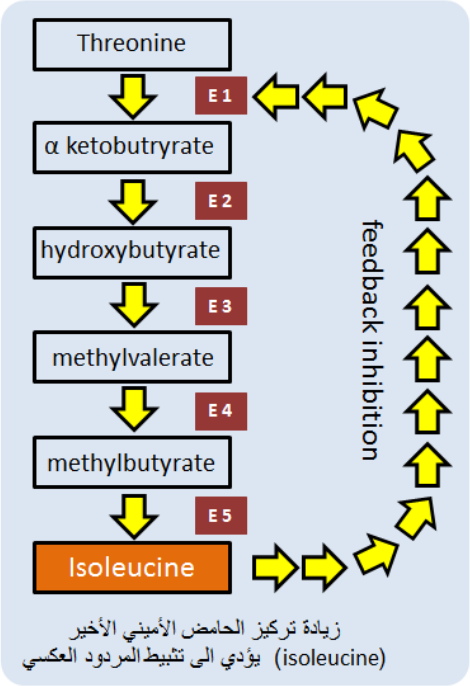
mRNA عندما تغطى جزيئات الـ mRNA عند نهايتها 5′ (كما في حالة متعدد الرايبوسوم). وهنا، ربما يتعلق عمر النصف لجزيئات الـ mRNA بعدد الرايبوسومات المتوفرة في أية لحظة لترجمة جزيئات الـ mRNA. يتراوح معدل تخليق البروتين بتعدد الرايبوسومات المرتبطة بجزيئة الـ mRNA قيد الترجمة بدلاً من تغاير معدل الترجمة. ومثال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

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

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

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

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



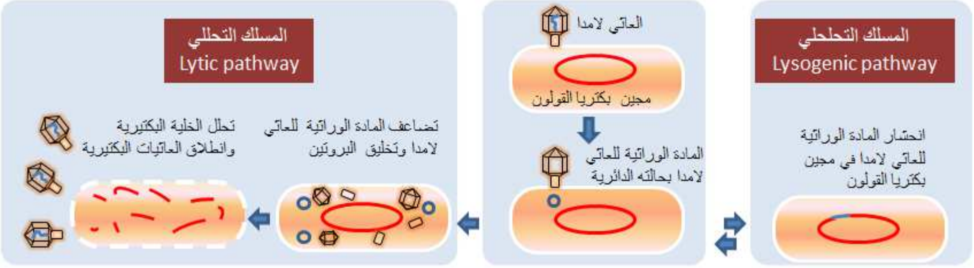
شكل (13.6): تثبيط المردود feedback inhibition في بكتريا القولون، تدل الحروف E1, E2 ... الخ على الانزيمات التي تقوم بتحويل الاحماض الأمينية من شكل الى آخر. وعند زيادة تركيز الحامض الأميني isoleucine يتثبط الانزيم الأول (E1) في العملية (تصميم المؤلف).

تنظيم التعبير الجيني في العاثيات البكتيرية

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

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

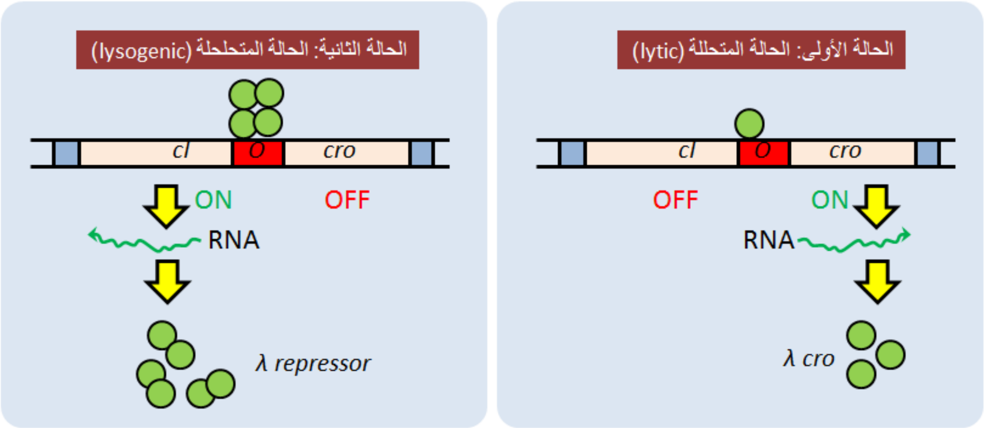
عندما يدخل العاثي في كروموسوم العائل بحالته الخاملة، سيبقى lambda بتلك الحالة إلى أن يتم تنشيطه من قبل تعرض عائله البكتيري إلى العوامل المحطمة للـ DNA. واستجابة لحافز مؤذ كهذا، تصبح العاثيات الخاملة مستحثة "induced" وتبدأ باستنساخ وبترجمة تلك الجينات الموجودة على الكروموسوم التابع لها والتي تكون ضرورية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



شكل (14.6): الانتقال الوراثي genetic switch للعاثي لامدا. يشير السهمين المتعاكسين الى الطبيعة الانعكاسية للمسلك التحلحلي، أي امكانية تحرر DNA العاثي لامدا بعد انحشاره في مجين بكتريا القولون حال تعرض البكتريا الى الظروف البيئية المناسبة لحدوث ذلك كالأشعة الفوق بنفسجية (تصميم المؤلف).

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

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



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

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

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

تنظيم التعبير الجيني في حقيقية النواة

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

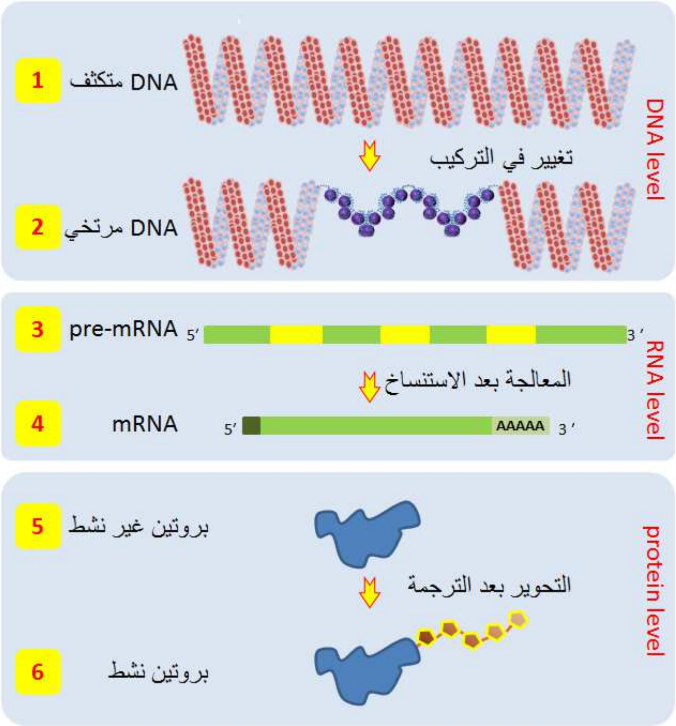
تمتلك اللبائن مادة وراثية أكبر بـ 8000 مرة من تلك الموجودة في بكتريا القولون. إن الكثير من تلك المواد الوراثية الإضافية تدخل في تنظيم التعبير الجيني خلال تمايز الأنسجة وتنوع العمليات البايولوجية المختلفة في الكائن ذو الخلايا المتعددة، وذلك لضمان إمكانية استجابة الكائن للتحديات البيئية المعقدة.وببساطة،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

مستويات التنظيم الجيني في الكائنات حقيقية النواة

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

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

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



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

أولاً . تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الجينوم

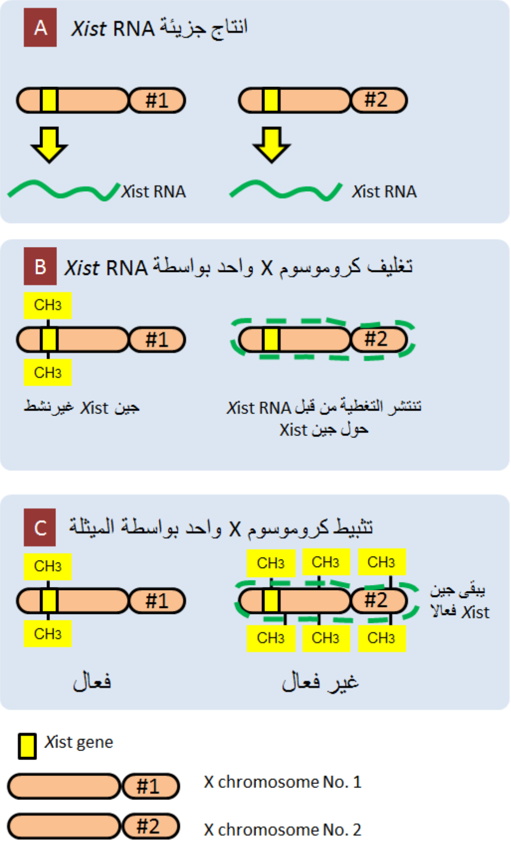
في الخلايا حقيقية النواة، يبدوا هنالك أصنافاً معينة من الجينات تستنسخ بشكل أكثر أو أقل استمرارية على مستوى الجينوم، وتكبح فعالياتها في حالات شاذة. ربما يكون نمط التعبير التمايزي الحاضر على مستوى الترجمة أو الاستنساخ يوجد أيضاً عند مستوى الجينوم (كما في الـ DNA). وقبل أن نعرض بعض الأمثلة المتعلقة بهذا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

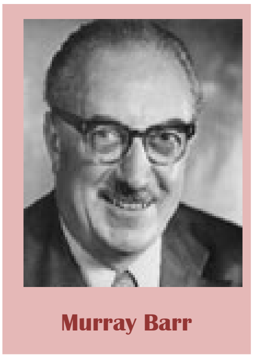
إستنساخياً بشكل كامل، وبالتالي، فهو متغاير الكروماتين heterochromatinic. وعلى أية حال، يقل تكثف كروموسومX خلال عملية تكوين الأمشاج gametogenesis، ويصبح فعال استنساخيا خلال مرحلة النشوء الجنيني embryogenesis المبكرة، ولهذا، فهو هنا كروماتين متغاير اختياري facultative heterochromatin.

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

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

انقسام الخلية. وهكذا، سيكون كروموسوم X واحد من زوج كروموسومي X فعالاً في الخلايا البنوية. وبدوره، يتم تنظيم تعبير جين *Xist* بواسطة مكمل شريط الرنا (antisense-RNA)، والذي يسمى *Tsix*، والذي يتم استنساخه من موقع *Xist*، ولكن باتجاه معاكس. يتسبب الجين *Xist* بتثبيط كروموسوم X، الذي يحمله. هذا ويتم استنساخ جزيئة RNA غير قابلة للترجمة من جين *Xist*. لتغطي هذه الجزيئة كروموسوم X الغير فعال. وتبدأ من جين *Xist* وتتقدم على طول كروموسوم X في كلا الاتجاهين (شكل 17.6)، ثم يتحول الـ DNA الى الحالة المتكثفة الغير ملائمة للاستنساخ أو الـ heterochromatin (راجع الفصل الثاني). ويمكن رؤية كروموسومات X المتكثفة بشكل عال في خلايا اناث اللبائن، وهي تدعى بأجسام بار (Barr bodies)، نسبة الى مكتشفها Murray Barr، والذي أماط اللثام عنها في عام 1948. ومن الجدير بالذكر يستخدم وجود أو عدم وجود تلك الأجسام أحياناً في التأكد من الأنوثة الوراثية للمشاركات في الرياضات الأولمبية.





شكل (17.6): ظاهرة تثبيط الكروموسوم X والتي تتضمن جين Xist و جزيئة Xist RNA. (a) في الأصل، يستنسخ كلا كروموسوم X جزيئة Xist RNA من جين Xist. (b) يتعرض كروموسوم X الذي لازال فعالاً الى عملية ميثلة في منطقة الجين Xist، وهذا يثبط الجين Xist. تغطي جزيئة Xist RNA كروموسومات X وتثبطها. (c) كروموسوم X الغير فعال والذي قد تم ميثلة معظمه كلياً، ماعدا الجين Xist. وهذا يسبب نقل حالة كروموسوم X الى الحالة المتكثفة، ليبقى جين Xist هو الوحيد فعالاً. (تصميم المؤلف)

(ب). نمط التعبير المستمر أو التكويني constitutive expression pattern): نقتصر هنا بضرب مثالا واحداً عن حدوث هذا النمط من التعبير الجيني في "جينات تدبير شؤون المنزل"، حيث تتميز مواقع الكروماتين التي يتواجد بها

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

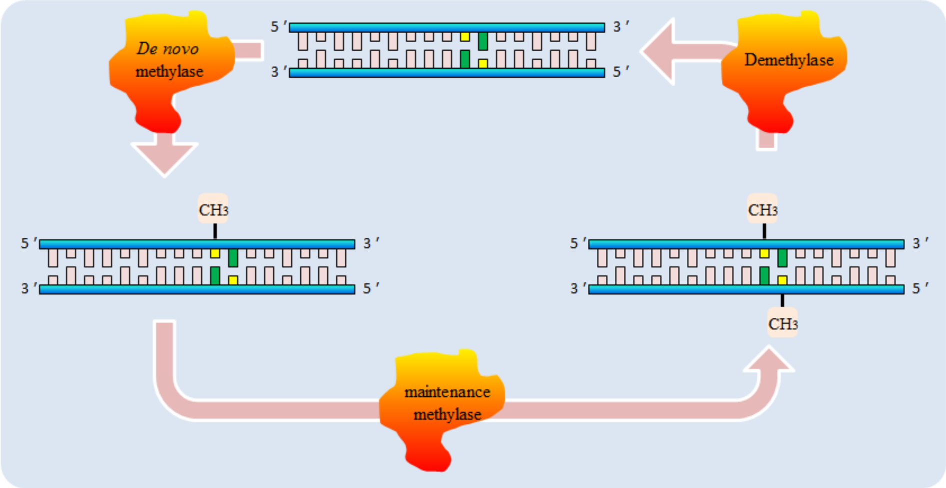
(ج). نمط التعبير الجيني المتخصص (specific expression pattern): تعبر العديد من الجينات بأنسجة معينة فقط وهنالك عدة أمثلة تبين هذه الحقيقة. ويوفر ضفدع *Xenopus* مثالاً جيداً حول تنظيم جينات 5S، حيث ينتج بعض أنواع هذا الضفدع 19000 نسخة من جينات 5S rRNA المتخصصة بالخلايا البيضية (oocyte specific) ، تكون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

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

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

ثانياً: تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الاستنساخ

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

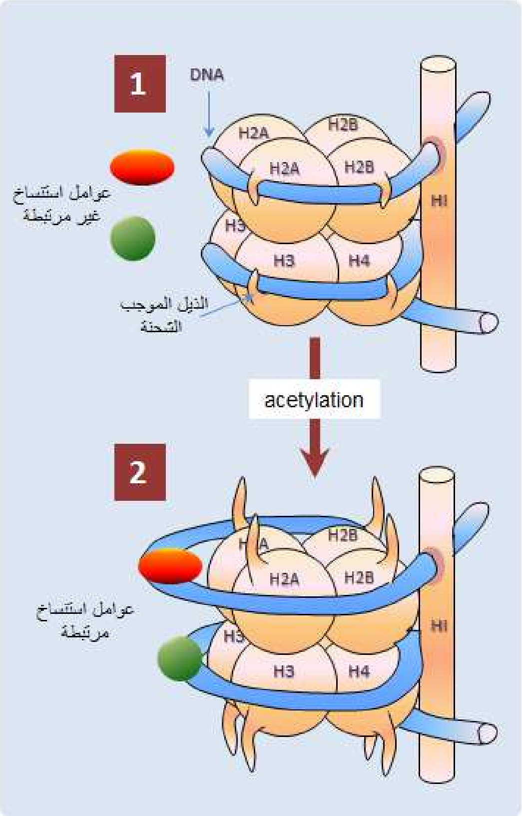


شكل (18.6): كيفية السيطرة على ميثلة الـ DNA من قبل ثلاث انزيمات. يضيف انزيم *de novo* methylase مجاميع المثيل على جزر الكوانين – سايتوسين. يضيف انزيم maintenance methylase مجموعة مثيل ثانية على الشريط المعاكس للمواقع النصف مميثلة. يقوم انزيم demethylase بازالة مجاميع المثيل. يشيراللون الأصفر الى السايتوسين، بينما يشير اللون الأخضر الى الكوانين (تصميم المؤلف).

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

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

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



شكل (19.6): دور اضافة مجاميع الخل acetylation لبروتينات الهستون بتحوير تركيب الكروماتين والسماح لبعض عوامل الاستنساخ بالارتباط بالـ DNA، (1) الذيول الموجبة الشحنة لبروتينات الهستون النيوكليوسومية والتي تتداخل مع مجاميع الفوسفات السالبة الشحنة في الـ DNA، (2) اضافة مجاميع الخل الى الذيول الموجبة الشحنة يقوم باضعاف تداخل هذه الذيول مع الـ DNA والسماح لبعض عوامل الاستنساخ بالارتباط بالـ DNA(تصميم المؤلف).

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

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

ثالثاً: تنظيم التعبير الجيني عند مستوى ما بعد الاستنساخ

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

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

رابعاً: تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الترجمة

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

خامساً: تنظيم التعبير الجيني عند مستوى ما بعد الترجمة

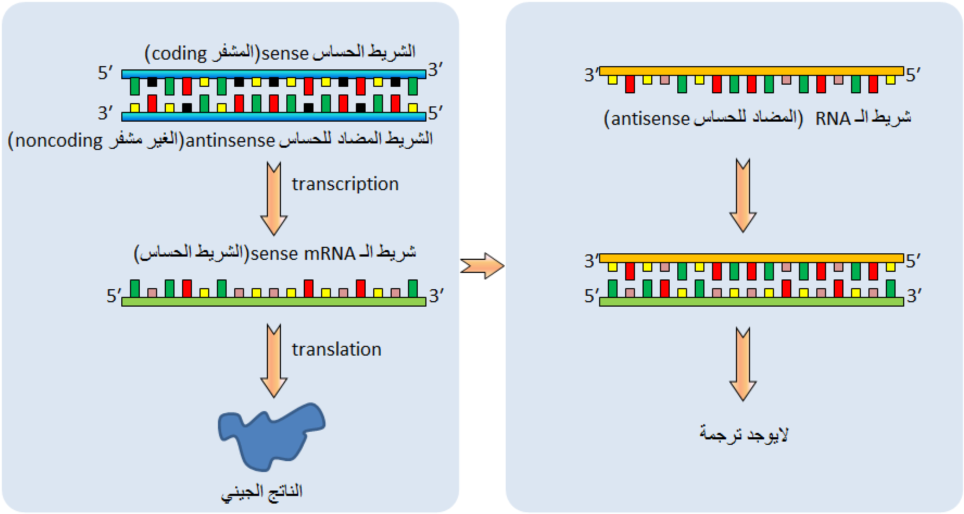
تتحور بعض البروتينات بعد تخليقها، وعادة ما يتم ذلك أما بتحوير التركيب ثلاثي الأبعاد، أو من خلال تحوير سلاسله الجانبية كيميائياً، أو من خلال تحوير عموده الفقري (أنظر الفصل الخامس). ان أي تغيير في تلك التحويرات الحادثة للبروتينات بعد عملية الترجمة يؤدي الى عواقب سريرية خطيرة.

ملحق الفصل السادس

تحسين نوعية الطماطم بواسطة منع التعبير الجيني لانزيم polygalacturonase

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

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



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

أسئلة الفصل السادس

السؤال الأول: علل مايلي

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

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

- إن كابح الـ tryptophan هو بروتين تنظيمي يتّخذ هيئة تدعى -------------.

a- helix-turn helix b- helix-loop helix c- helix-up helix d- helix-to helix e- helix-and helix

- -------------- وهو المسلك الذي تبقى به عاثيات لامدا في حالة خاملة

a- lysogenic pathway b- temperate pathway c- lytic pathway d- dormant pathway e- protein synthesis pathway

- إن الأوبرون هو عبارة عن مجموعة من الجينات والتي تقع تحت سيطرة ----------- واحد.

a- promoter b- cistrone c- protein d- polypeptide e- operator

- يطلق على الجزيئة المؤثرة (التربتوفان) في نظام أوبرون التربتوفان أحياناً بـ --------.

a. antirepressor b. pararepressor c. corepressor d. (a) and (c) e. non

- في أوبرون اللاكتوز، يعبر أوبرون اللاكتوز بمستوى واطي جداً في حالة ....

a. glucose and lactose presence b. glucose presence & lactose absence c. glucose absence & lactose presence d. glucose and lactose absence e. none

- اعتماداً على ....، أما أن يندمج العاثي لامدا بالكروموسوم البكتيري ويبقى خاملاً، أو أن يصنع عدد كبير من النسخ ليحلل الخلية البكتيرية.

a. temperature b. nutrition c. DNA sequence d. species e. behavior

- ان ....، هي الحالة التي يكون بها كل جينات العاثي معطلة ماعدا جين واحد هو ci والذي يمنع عمل بقية جينات العاثي.

a. temperate stage b. lytic state c. prophage state d. none

- تعزى مقدرة الأجسام المضادة في الجسم في الارتباط بعدد كبير جدا من المستضدات الى ظاهرة .... في التعبير الجيني.

a. genetic breakdown b. DNA methylation c. histone acetylation d. DNA rearrangement

- تحدث ظاهرة الاضعاف عندما يكون مستوى التربتوفان عالياً، حيث يتكون تركيب .... وينتهي الاستنساخ ضمن منطقة 5-UTR

a. 1-2 structure b. 2-3 structure c. 3-4 structure d. 2-4 structure

- تحتوي .... في العاثي T4 عادة على تسلسلات بروموتر يمكن تمييزها من قبل عامل سكما البكتيري.

a. early genes b. delayed genes c. late genes d. overlapping genes

- يتم تنظيم تعبير جين *Xist* في كروموسوم X الأنثوي بواسطة antisense-RNA، والذي يسمى ....، والذي يتم استنساخه من نفس الجين،ولكن باتجاه معاكس.

a. istX b. Xsti c. tisX d. tsiX e. Xtis

- ترتبط عملية .... مع كبح الاستنساخ بشكل كبير.

a. DNA acetylation b. DNA glycosylation c. DNA phosphoylation d. DNA methylation

- يدعى الكروماتين الذي يتكثف أحياناً والذي يبدو في أحيان أخرى بشكل غير متكثف بالـ ....

a. euchromatin b. constitutive heterochromatin c. facultative heterochromatin d. only “b” & “c”

السؤال الثالث: عرف ما يلي

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

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

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

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

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

7

الفصل السابع

طفرة الـ DNA واصلاحها

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

مقدمة

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

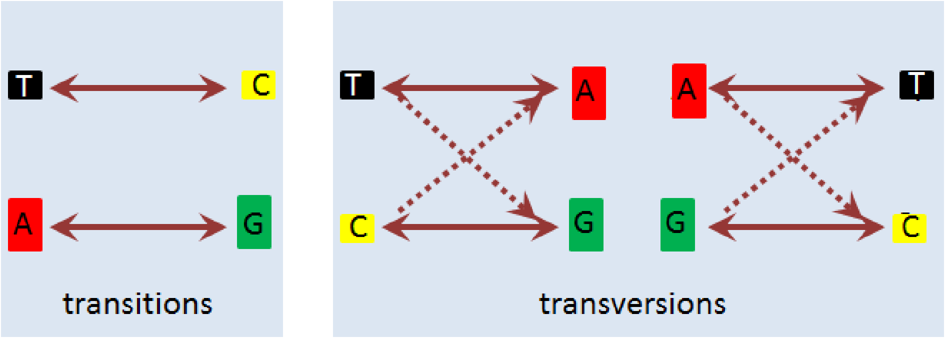
الطفرة هي تغيير دائمي وموروث في التسلسل القاعدي للمادة الوراثية (الـ DNA) للكائن الحي. إن هذا التسلسل المتبدل من الممكن أن ينعكس بتغيرات في التسلسل القاعدي للـ mRNA وفي بعض الأحيان بتغيرات في تسلسل الحامض الأميني للبروتين. يمكن للطفرات أن تسبب أمراضاً وراثية. كما أنها تسبب كذلك تغييرات في العديد من خواص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

أنواع الطفرات

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

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

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

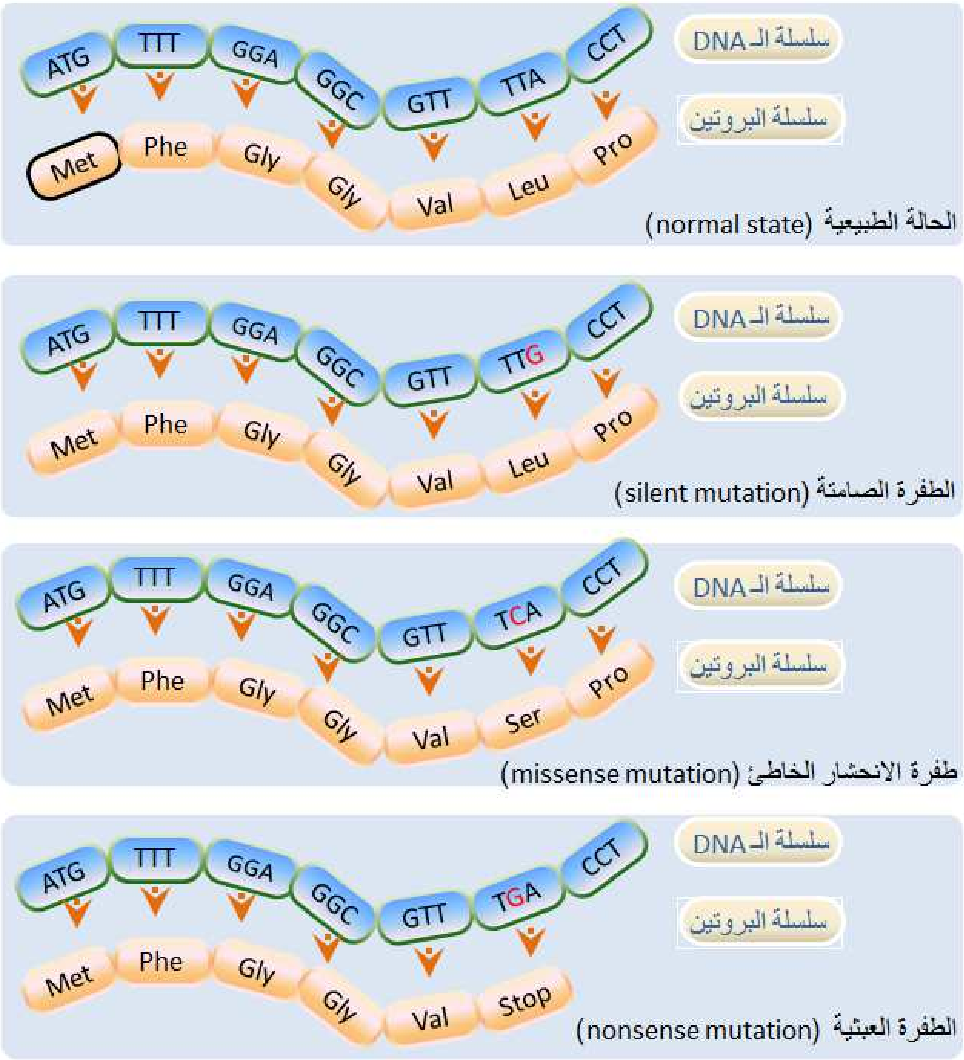


شكل (1.7): مخطط يوضح الفرق بين طفرة الـ transition وطفرة الـ transversion (تصميم المؤلف)

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

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

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



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

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

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

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

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

رابعاً: تصنيف الطفرات وفقا لتأثيرها على الطراز المظهري للكائن: وعليه، تتواجد عدة أنواع من الطفرة وكالآتي:

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

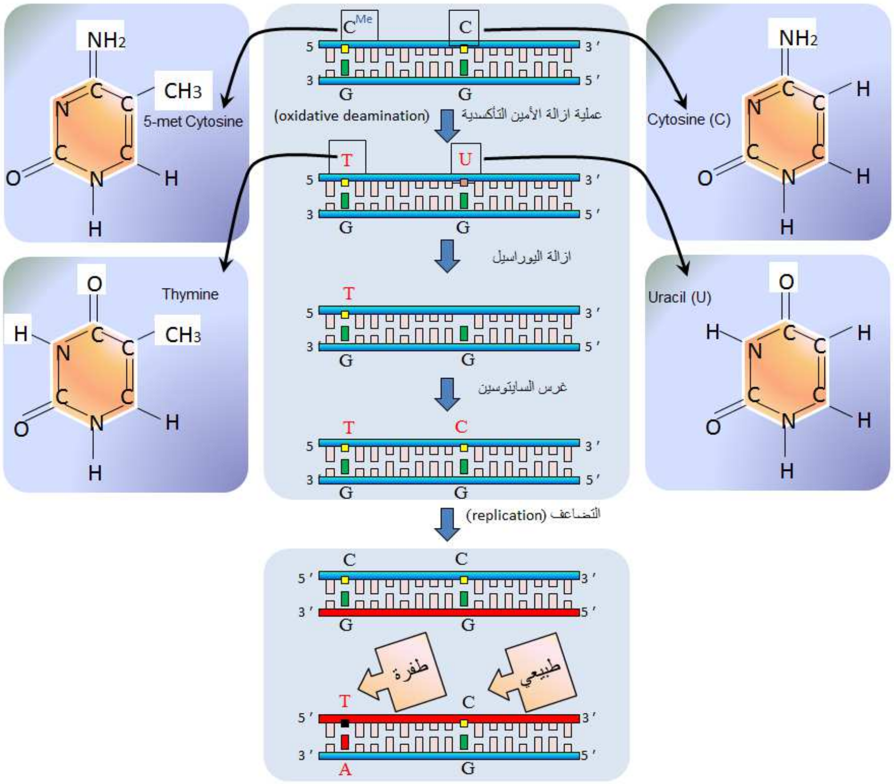
خامساً: تصنيف الطفرات وفقا للاتجاه: يمكن تصنيف الطفرات أيضاً على أساس نمط اتجاهها ال الأنواع الآتية:

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

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

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

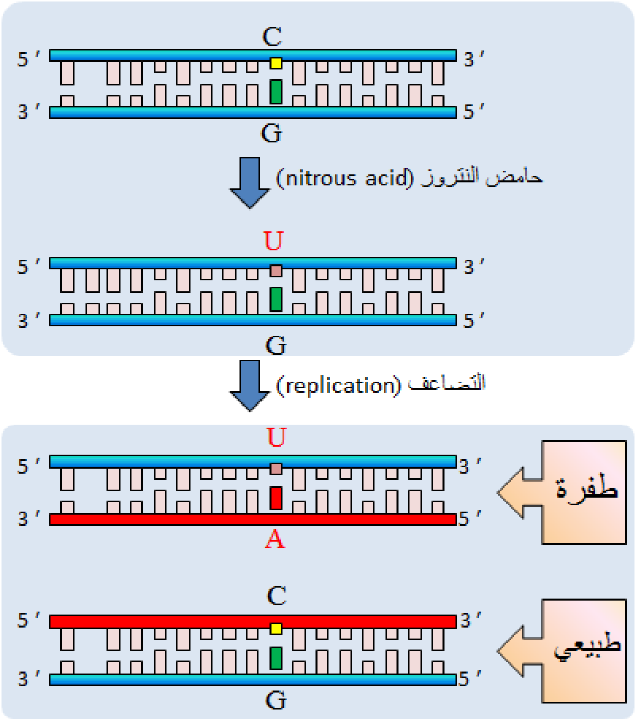
1. الطفرات التلقائية (spontaneous mutation): وتحدث بشكل فجائي في الطبيعة، كما أن أصلها غير معروف. وهي تسمى أيضاً بالطفرات ذات الخلفية الاجتماعية أو الخلفية البيئية (background mutations)، وقد تقرر وجودها في العديد من الكائنات، ولكنها قد فهمت بشكل جيد في بدائية النواة، حيث إن السبب الرئيسي للطفرة التلقائية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



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

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

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



شكل (4.7): امكانية استحداث الطفرات بواسطة التحوير الكيميائي للقاعدة base modification (تصميم المؤلف)

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

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

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

المطفرات mutagenes

تقسم المطفرات عموماً الى صنفين رئيسيين وهما:

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

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

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

تأثيرات المطفرات الكيميائية على التسلسل النيوكليوتيدي

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

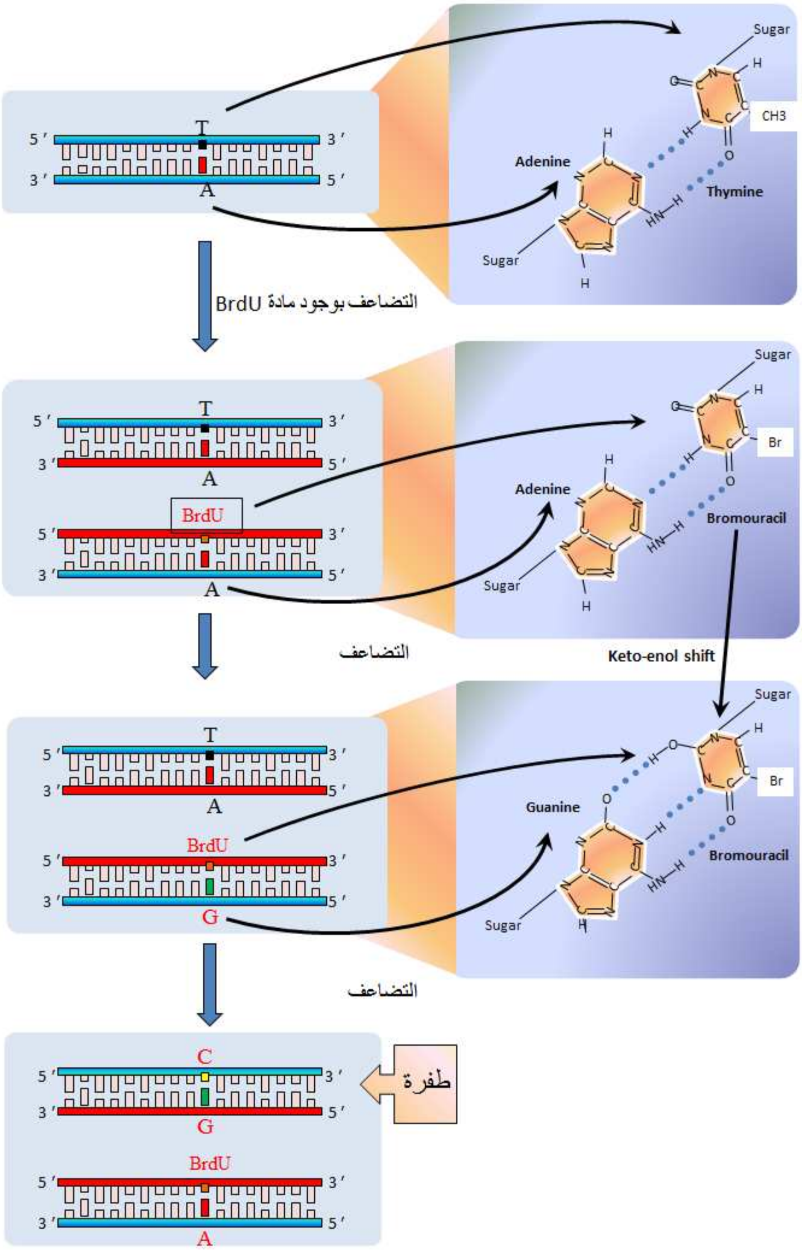
2. تثبيط مولدات الأحماض النووية: هنالك بعض المطفرات تتداخل مع تخليق قواعد النتروجين للأحماض النووية سواء كانت بيورين أو بريميدين. أما أن يسبب فقدان قاعدة واحدة في حدوث أخطاء في عملية الازدواج. وعلى سبيل المثال، مادة الـ azaserine والتي تحطم تخليق البيورين والـ urethane والذي يحطم تخليق البريميدين.

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

مشاكل التعامل مع المطفرات الكيميائية:

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

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



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

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

أصلاح الدنا DNA REPAIR

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

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

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

كيميائية قواعد الـ DNA تسهل الكشف عن الضرر الحاصل فيه:

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

آليات إصلاح خلل الدنا DNA Repair Mechanisms

ان أهم آليات إصلاح الـ DNA الرئيسية هي:

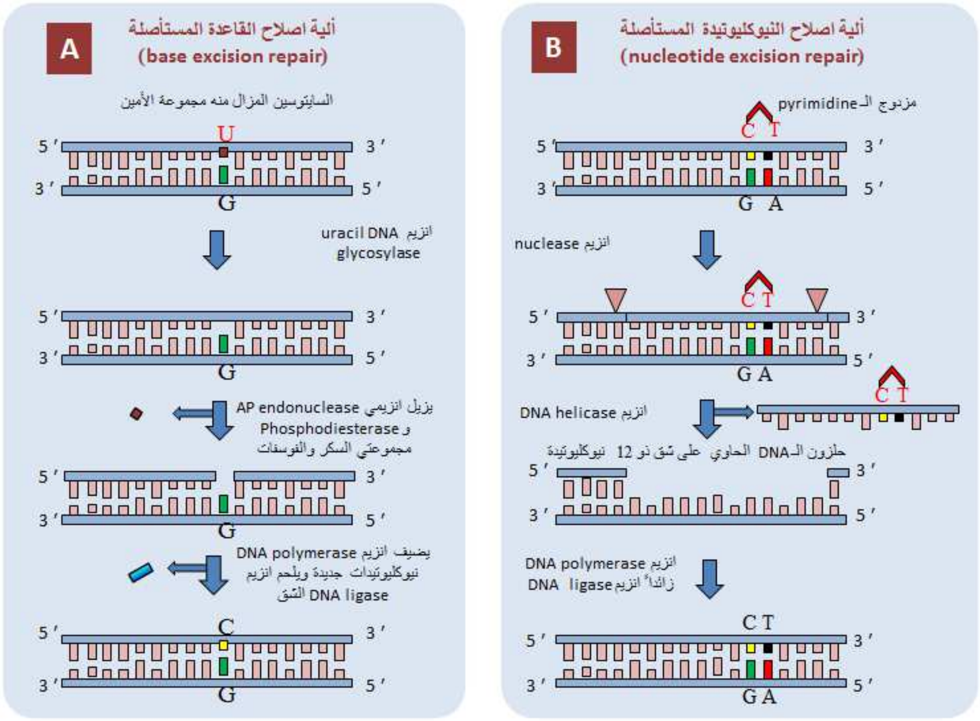
1)- آلية الاصلاح الاستئصالية Excision Repair

إن هنالك مسلكين أساسيين لإصلاح الـ DNA، تتم باستخدام إنزيمات مختلفة تعمل على أنواع مختلفة من الآلافات. وفي كلتيهما، يتم قص الأذى، ثم يتم استعادة تسلسل الـ DNA الأصلي بواسطة إنزيمDNA polymerase والتي تستخدم الشريط الغير متضرر كقالب لها، ويلحم الكسر المتبقي بالشريط بواسطة إنزيمDNA ligase (شكل6.7).

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

إنزيمات phosphodiesterase، ثم يزال الضرر بواسطة إنزيم DNA polymerase Iويصلح باستخدام إنزيم DNA ligase (شكل6.7 A).

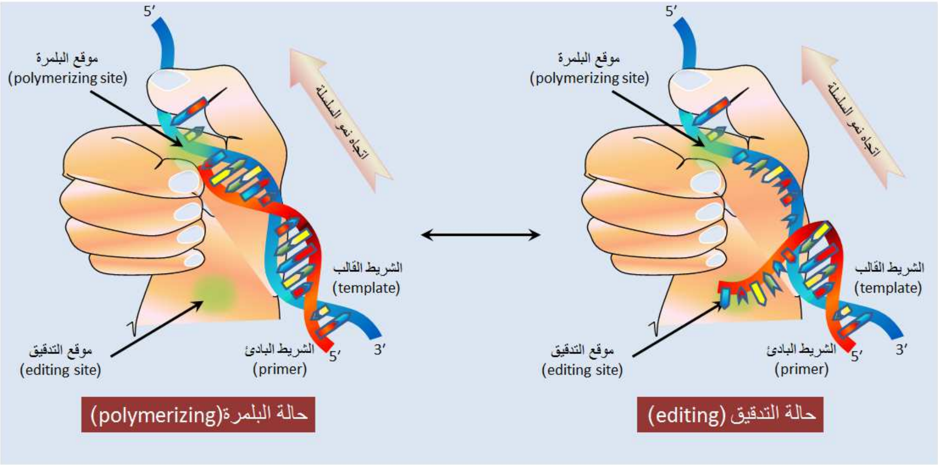
وهنالك مسلك إصلاح رئيسي ثاني يدعى بـ nucleotide excision repair. هذه الآلية يمكن لها أن تصلح الضرر المتسبب من أي تغيير كبير في تركيب حلزون الـ DNA. إن هكذا "أضرار ضخمة" تتضمن تلك التي خلـّقت بواسطة التفاعل التساهمي بين مزدوجات البريميدين كما في (T-T, T-C, and C-C) والمتسببة بواسطة ضوء الشمس (التعرض للأشعة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



شكل (6.7)آلية الاصلاح الاستئصالية. (a) آلية الاصلاح القاعدة (base excision repair)، (b) آلية اصلاح النيوكليوتيدة (nucleotide excision repair) (تصميم المؤلف).

2)- آلية إصلاح النيوكليوتيدة المغلوطة Mismatch Repair

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



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

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

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

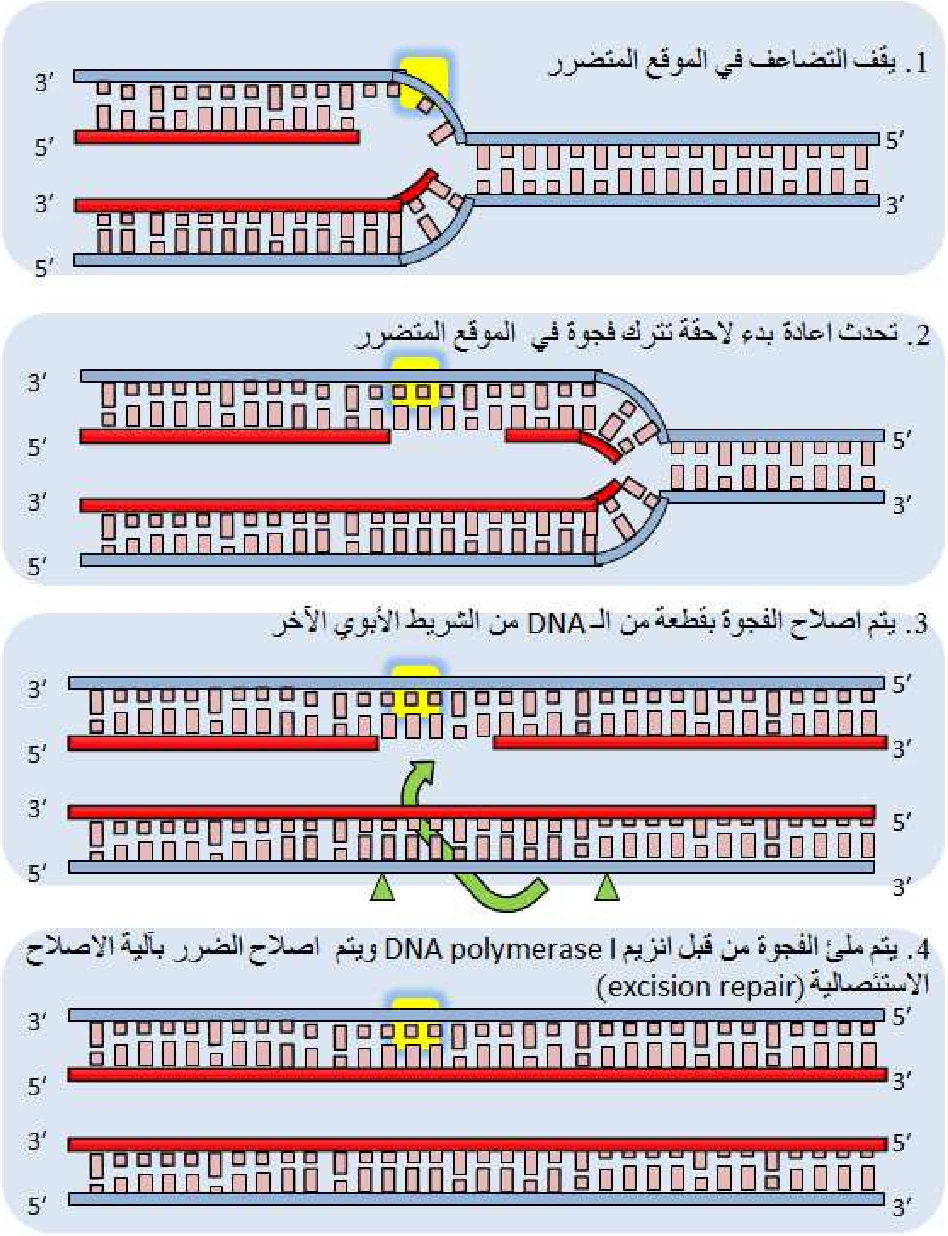
3) آلية إصلاح إعادة الارتباط أو ما بعد التضاعف
Recombination (Post-Replication) Repair

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

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

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

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

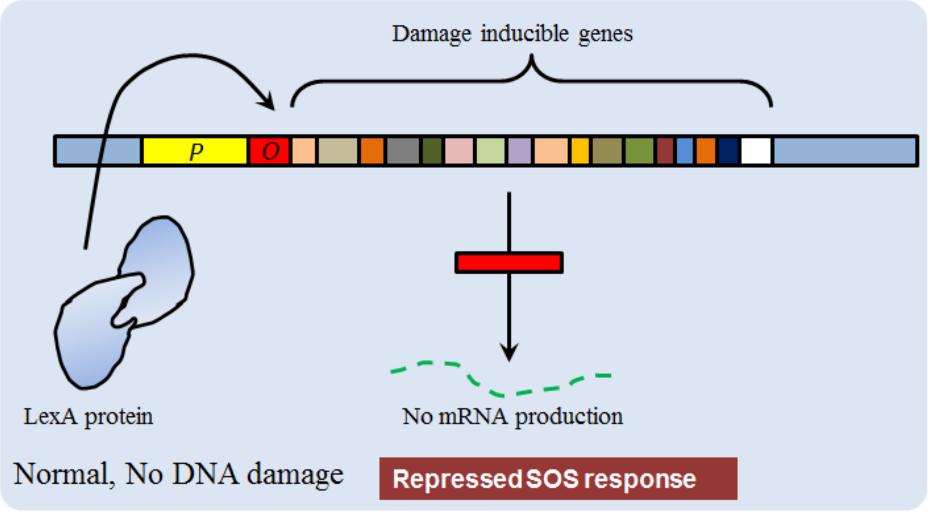


شكل (8.7): آلية إصلاح ما بعد التضاعف. بعدما يقف التضاعف في الموقع المتضرر (1)، فان عملية إعادة البدء من جديد تترك فجوة في الشريط الجديد (2). إن هذا يمكن إصلاحه بواسطة تبادل الـ DNA (3)، سامحاً للمنطقة المتضررة الأصلية من أن يتم إصلاحها، (4) والذي يتم بواسطة آلية الـ excision repair (تصميم المؤلف).

4)- آلية إصلاح "استجابة سوس" SOS Response Repair

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

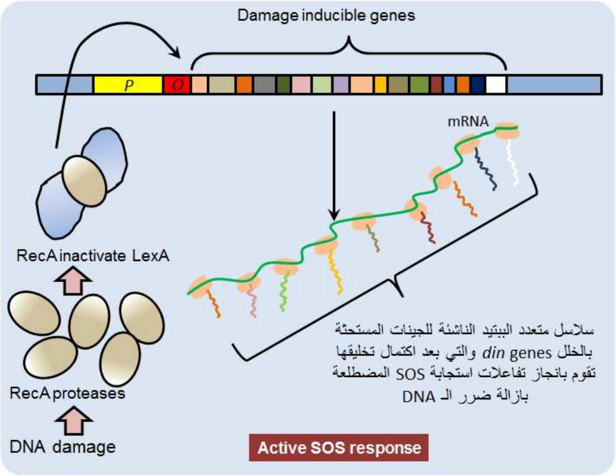
تعد آلية اصلاح SOS في بكتريا القولون هي من أفضل الأمثلة المدروسة حول أليات الاصلاح الناجمة عن الاستجابة الطارئة للضرر الحاد في الـ DNA. يوجد في قلب نظام SOS هنالك جينين، وهما *lex*A و *rec*A. وتحت الظروف الطبيعية يعمل بروتين *lex*A ككابح وذلك بارتباطه بما يقارب 17 جين والتي تشفر عن بروتينات تدخل في أنواع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



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

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

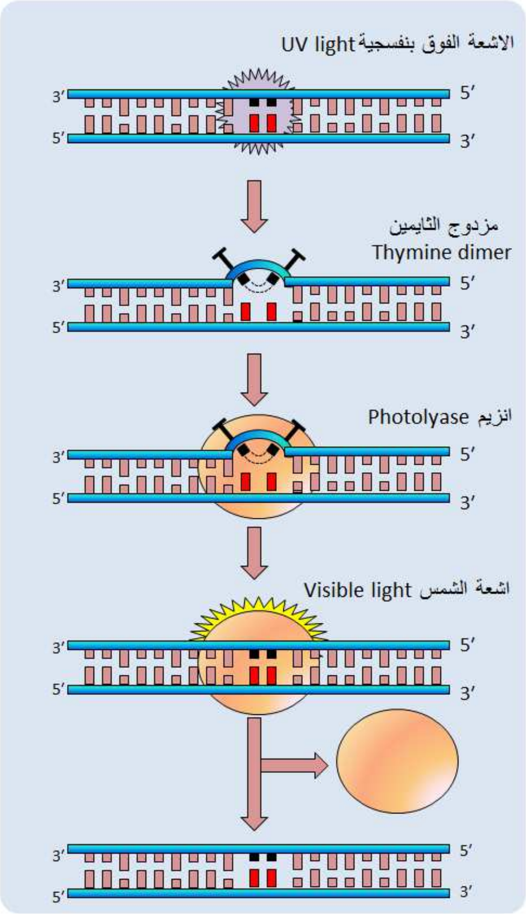
لم تنتهي القصة هنا، حيث إن SOS responses كظاهرة هو دائرة circuit تكمن أهميتها في قابليتها على العودة بسرعة إلى الحالة الطبيعية. فعندما تزال الإشارة الحاثة inducing signal، يفتقد بروتين *rec*A قابليته على زعزعة بروتين *lex*A. وفي تلك اللحظة، يتم التعبير عن جين *lex*A بمستوى عالي، وعند غياب بروتين *rec*A المنشّط ، يتراكم بروتين *lex*A بشكله الغير مشقوق بسرعة ويقفل جينات SOS (شكل 10.7). إن هذا يفسّر لماذا يوصف نظام SOS بالمعكوس. وعلى الرغم من امكانية هكذا آلية اصلاح "قابلة للخطأ" في أن تكون مضرة للخلايا البكتيرية، لكنها مفيدة على المدى البعيد لأنتاجها عدد هائل من التغايرات الوراثية في البكتريا والتي تزيد من احتمالية زيادة قابلية الخلايا لطافرة الناتجة عن استجابة SOS للبقاء في البيئات القاسية.



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

5) آلية الاصلاح المعتمدة على التنشيط الضوئي photoreactivation repair

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



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

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

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

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

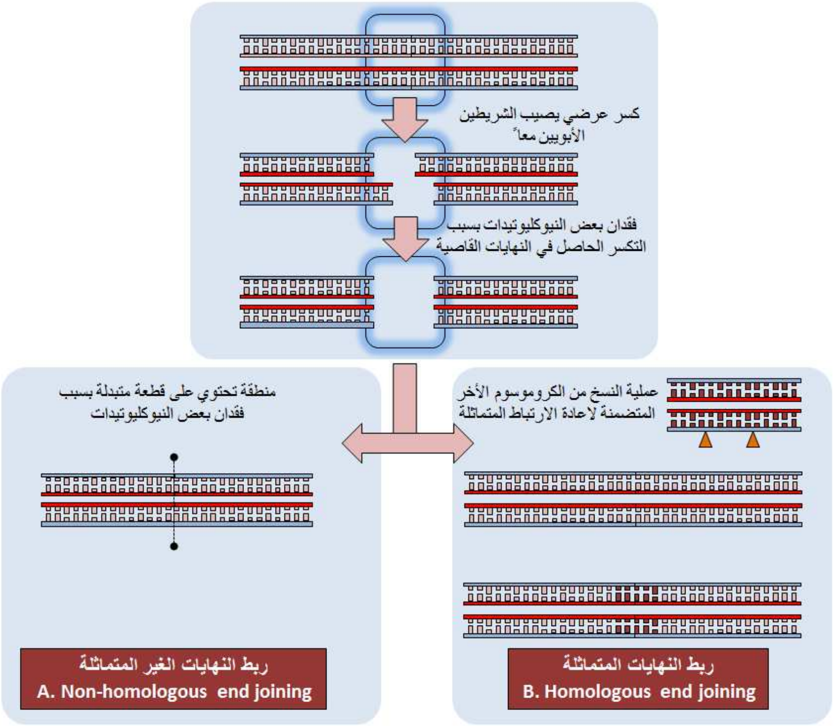
تحدث آلية الاصلاح المعتمدة على التنشيط الضوئي في اللبان بتردد واطئ، لذا فعند تضرر كلا شريطي الـ DNA، فان احتمال ظهور عواقب وخيمة لذلك وارد جداً. لذلك لا بد من وجود آلية أخرى تعنى باصلاح الضرر في كلا الشريطين.

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

6) إصلاح الكسور المزدوجة الشريط double stranded breakage repair:

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

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



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

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

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

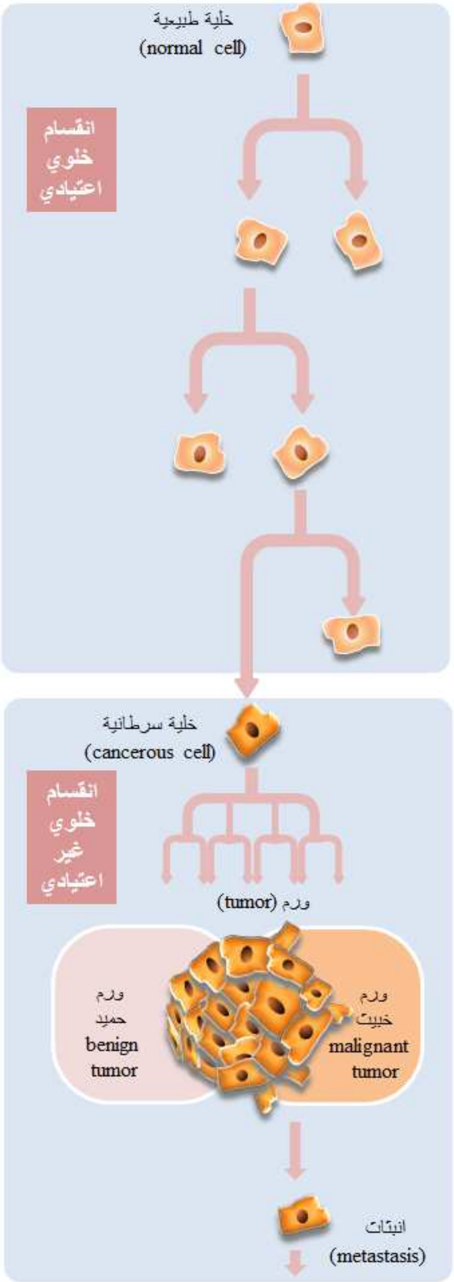
ملحق الفصل السابع

السرطان ..... تراكم للطفرات

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

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

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

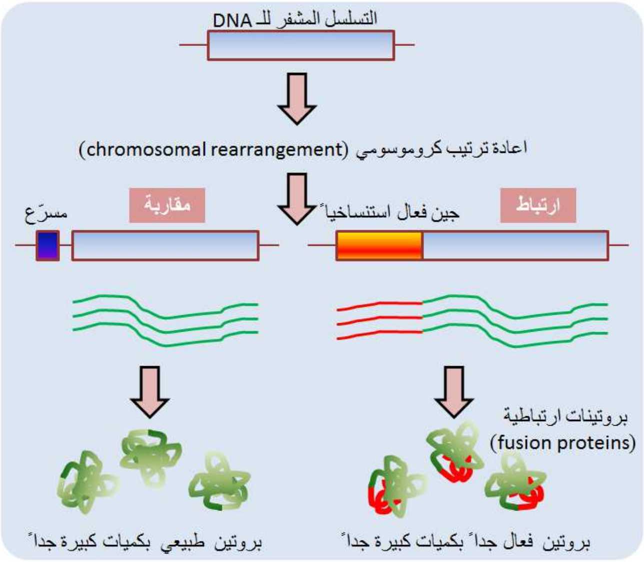


شكل (14.7): ماهية السرطان على المستوى الخلوي. ان الورم هو مجموعة من الخلايا عديمة الوظيفة. ربما تبقى الأورام حميدة وربما تغزو الأنسجة المحيطة وتصبح خبيثة (تصميم المؤلف).

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

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

كروموسومية (chromosomal abnormalities). تعرف أحد أنواع تلك التغيرات الكروموسومية والمشاهدة في الخلايا بالانتقال من مكان إلى آخر. وأساس عملية الانتقال هذا هو انشقاق قطعة كروموسومية واحدة وارتباطها بعد ذلك بكروموسوم آخر. إذا منح الكروموسوم الثاني أي جزء معين منه للكروموسوم الأول فيمكن وصف عملية التحول تلك بالمتبادلة (reciprocal). لقد وجدت خاصية الانتقال في عدد من الخلايا الورمية. يعتبر "كروموسوم فيلادلفيا" من أهم أنواع الانتقالات، والذي يشمل حدوث عملية الانتقال بين الكروموسومين 22 و 9 ويحدث في أحد أنواع سرطانات الدم (شكل15.7). تحدث عملية الانتقال أيضاً في "سرطان الأوعية اللمفاوية بوكت" (Burkett's lymphoma) والذي هو عبارة عن سرطان ينمو بسرعة من خلايا B اللمفاوية للبشر. وفي حالات معينة، يحدث تنشيط لبعض الجينات السرطانية عندما يحدث هذا الانتقال المتبادل بين الكروموسومين 8 و 14 ، حيث تتكسر قطعة الكروموسوم رقم 8 الحاوي على الجين *myc* الخلوي المنشأ، وتتحرك إلى الكروموسوم رقم 14قرب موقع بعض الجينات المناعية. يضع القفز الحاصل في عملية الانتقال جين *myc* الغير فعال مسبقاً تحت تأثير تسلسلات المسرع (enhancer sequences) في الجينات المشفرة للسلاسل الثقيلة للكلوبيولينات المناعية (immunoglobulins). ينتج هذا التقارب في تنشيط استنساخ جين *myc*. وعلى ما يبدو، يعمل التخليق المزايد للبروتين المشفر من قبل جين *myc* والذي له خاصية الارتباط بالدنا (DNA binding protein) على "قيادة" أو "إجبار" الخلية لكي تصبح خبيثة، ربما بتأثيره على الانقسام الخيطي. تشابه هذه الآلية لانحشار المسرع (enhancer insertion) باستثناء إن عملية الانتقال الكروموسومي (بدلاً من حشر الفايروس الأولي) تكون مسؤولة عن حشر الجين المسرطن الأولي (كما في جين *myc*) تحت تأثير المسرع.

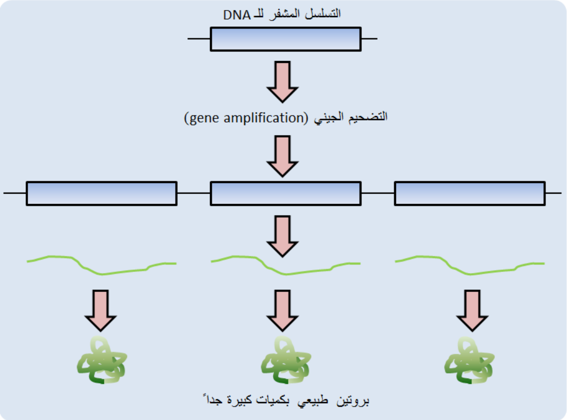


شكل (15.7): أحد وسائل تحويل الجين المسرطن الأولي إلى جين مسرطن بواسطة اعادة الترتيب الكروموسومي. في يمين الشكل أعلاه حدث هنالك ارتباط بين الجين الفعال استنساخياً مع الجين المسرطن الأولي، أدى هذا الارتباط الى انتاج بروتينات فعالة جداً وبكميات كبيرة.أما في يسار الشكل أعلاه حدث هنالك اقتراب بين مسرع قوي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

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

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

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

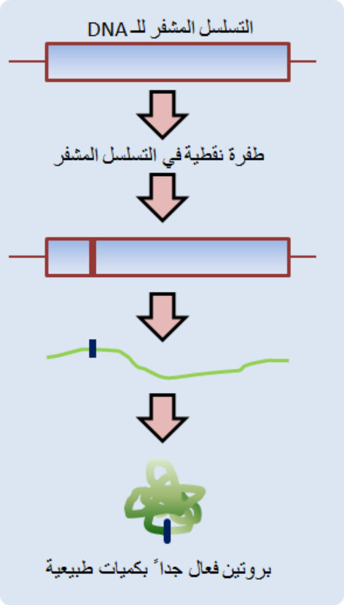


شكل (16.7): أحد وسائل تحويل الجين المسرطن الأولي إلى جين مسرطن بواسطة التضخيم الجيني (تصميم المؤلف).

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

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

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



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

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

أسئلة الفصل السابع

السؤال الأول: علل ما يلي:

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

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح:

لايتغير نسق القراءة في.............

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

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

السؤال الثالث: عرف ما يلي:

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

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

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

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.

Aravind, L. Walker D. and Koonin E. 1999. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems *Nucleic Acids Res.* 27: 1223-1242.

Belk C. and Borden V. Biology Science for life.Printed in USA, 2007.

Berk A., Zipursky S., Baltimor D., Darnell J., and Lodish H. Molecular Biology.Fourth edition. Paul Matuataira,USA, 1998.

Berneburg M. and Lehmann A. 2001. Xeroderma pigmentosum and related disorders: Defects in DNA repair and transcription *Adv. Genet.* 43: 71-102.

Cann A. Principles of Molecular Virology. Fourth edition, Elsievier Academic Press, 2005.

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

Dale J., Park S. Molecular Genetics of Bacteria.Fourth edition, Wiley and Sons, 2004.

Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., 1995. *DNA Repair and Mutagenesis.*American Society for Microbiology.

Guttman B., Griffiths A., Suzuki D., Cullis T. Genetics: a beginner guide. Oneworld Oxford, 2004.

HansonB., and Jorde L. Kaplan USML Step 1 lecture notes. Kaplan Incorporation, 2001.

Kresina T. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy.Wiley-Liss, 2001.

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

Michelson R.and Weinert. T. 2000. Closing the gaps among a web of DNA repair disorders *Bioessays* 22: 966-969.

Mol C. Parikh S. Putnam C. Lo T. and Tainer J. 1999. DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases *Annu. Rev. Biophys. Biomol.Struct.*28: 101-128.

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

Paolella. P. Introduction to molecular biology. First edition, WCB/McGrowHill, 1998.

Parikh S. Mol C. and Tainer J. 1997. Base excision repair enzyme family portrait: Integrating the structure and chemistry of an entire DNA repair pathway *Structure* 5: 1543-1550.

Turner P., McLennan A., Bates A., White M.Instant notes in molecular biology. Third edition, Taylor & Francis Group/UK. 2005.

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

8

الفصل الثامن
اعادة ارتباط الـ DNA والقفز

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

مقدمة

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

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

إعادة الارتباط المتماثل Homologous Recombination

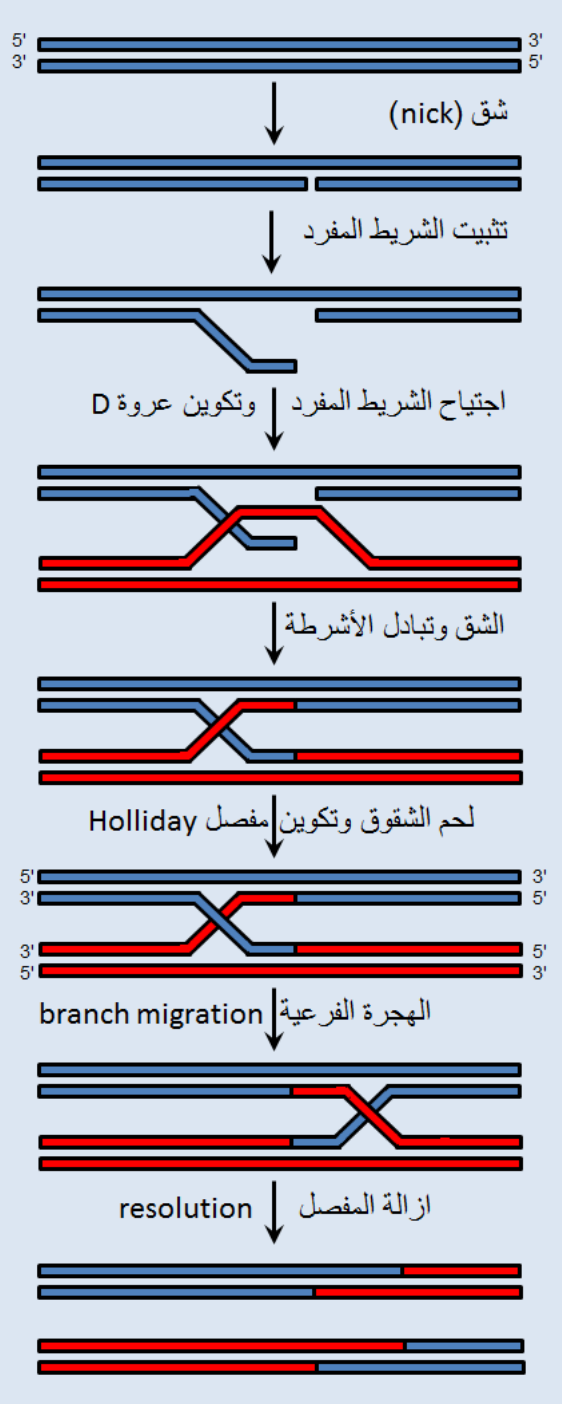
Robin Holliday

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

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

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

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



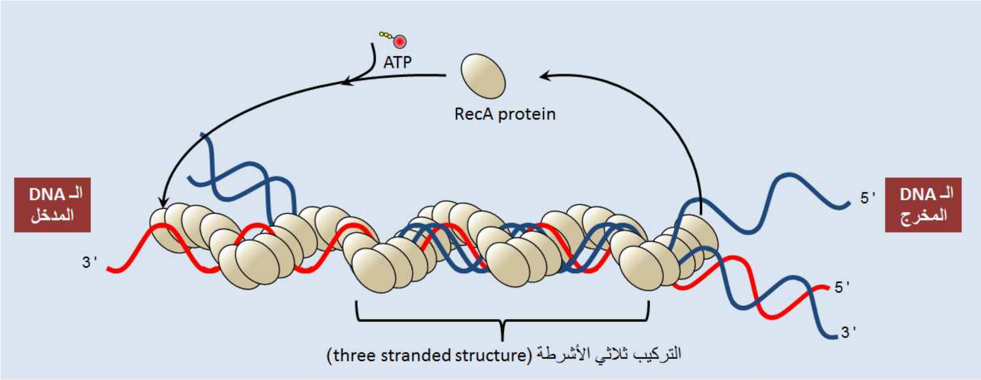
شكل (1.8): موديل مبسط لعملية إعادة الارتباط المتماثلة homologous recombination (تصميم المؤلف)

دور بروتين Rec A في عملية إعادة الارتباط العام

تحتاج عملية إعادة الارتباط إلى أنواع متعددة من بروتينات متخصصة. وبالأخص، بروتين Rec A في بكتريا القولون (أو بروتيناته المشابهة له في الخمائر والفئران والبشر) والذي له دور رئيسي في إعادة الارتباط بين الكروموسومات (شكل 2.8).وكما هو الحال مع بروتينات SSBs (أنظر الفصل الرابع)، يرتبط بروتين Rec A بشدة وبشكل تعاوني بالـ DNA المفرد الشريط ليكون خيط بروتيني نووي nucleoprotein filament. وبما أن كل جزيئة مفردة من هذا البروتين (Rec A monomere) تملك أكثر من موقع واحد للارتباط بالـ DNA، لذا يمكن لخيط Rec A من حمل الشريط المفرد والحلزون المزدوج معاً. إن هذا يسمح لـ RecA بأن يحفّز تفاعل DNA إيثاقي متعدد الخطوات multistep DNA synapsis reaction بين حلزون الـ DNA المزدوج والمنطقة المماثلة لشريط الـ DNA المفرد.

ويتم تمييز منطقة التماثل قبل أن يفتح حلزون الـ DNA المزدوج الهدف، من خلال مركب وسطي ثلاثي الأشرطة three-stranded intermediate والذي فيه يقوم الـ DNA المفرد الشريط بتكوين أزواج قاعدية مؤقتة مع قواعد خارجة flip out من الحلزون المزدوج وذلك بالأخدود الرئيسي لجزيئة الـ DNA ذات الحلزون المزدوج (شكل 2.8). يبدأ هذا التفاعل بالازدواج المبين مسبقاً في الشكل 2.8، وبهذه الطريقة يبدأ تبادل الأشرطة بين حلزوني الـ DNA المزدوجين الجاري بينهما عملية إعادة ارتباط. حالما يحدث الإيثاق في الـ DNA، تبدأ منطقة حلزون الـDNA المزدوج المتغايرة بالتوسع من خلال عملية تدعى الهجرة الفرعية branch migration.

فبالإضافة إلى احتواء بروتين RecA على موقعين للارتباط بالـ DNA، يمتلك فعالية تحلل ATP معتمدة على الـ DNA والتي تعرف بـ DNA-dependent ATPase، مع موقع إضافي للارتباط مع مركب ATP وتحليله مائياً. يرتبط البروتين بقوة اكبر بالـ DNA وذلك عند امتلاكه مركب ATP متحد معه مقارنة بالقوة التي يكون مرتبطاً بها عندما يكون متحداً مع مركب ADP. إن خيوط RecA والتي تكونت من الأكتين أو التيوبيولين tubulin يمكن لها أن تقود تفاعل الهجرة الفرعية والحادثة عادة أثناء عملية اعادة الارتباط.



شكل (2.8): إيثاق الـ DNA المحفز من قبل بروتين RecA. بينت التجارب بوجود عدة أنواع من المعقدات المتكونة بين شريط الـ DNA المفرد المغطى ببروتين RecA وحلزون الـ DNA المزدوج (الأزرق اللون فقط على يسار الشكل). يتكون أولاً معقد غير مزدوج قاعدياً والذي يتحول مؤقتاً إلى تركيب ذو ثلاث أشرطة حالما تتكون المنطقة ذات التسلسل المتماثل. هذا المعقد غير ثابت لأنه يتكون من شكل غير اعتيادي من الـ DNA إضافة إلى شريط مفرد مزاح من الحلزون المزدوج الأصلي. إن هذا التركيب المبين في هذا المخطط يهاجر إلى اليسار. إن محصلة هذه الهجرة هي تبادل أشرطة الـ DNA (تصميم المؤلف).

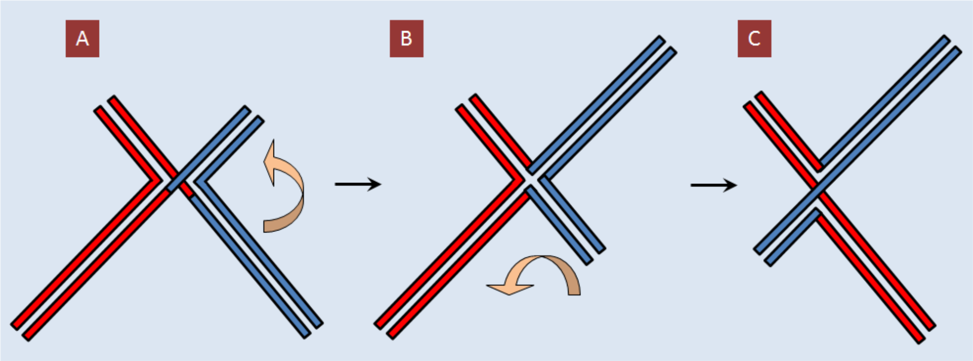
مفصل هوليدي Holliday junction

ان الخطوة الصعبة والبطيئة حقاً في عملية اعادة الارتباط المتماثل هي خطوة تكوين مفصل هوليدي. وبعد تلك الخطوة، تمتد منطقة الازدواج ويكون هنالك تبادل أكبر في الأشرطة بين حلزوني الـ DNA المزدوجين. وحل تكونه يتقدم مفصل هوليدي بسرعة. وفي معظم الحالات، يتكون مفصل هوليدي والذي يعد هو الوسيط والمفتاح في عملية إعادة الارتباط (والذي يدعى أيضاً بتبادل الأشرطة التعابري cross-strand exchange).

وفي مفصل هوليدي، يحمل حلزوني الـ DNA المتماثلين المزدوجين بواسطة عملية تبادل عكسي reciprocal exchange لشريطين من أربع أشرطة موجودة، واحد ناشيء من كل حلزون مزدوج. كما مبين في الشكل 3.8 A ، يمكن أن يحتوي مفصل هوليدي على زوجين من الأشرطة: زوج من الأشرطة العابرة crossing strands وزوج من الأشرطة الغير عابرة non-crossing strands. يمكن لها التركيب من أن يتناظر isomerizes، وعلى أية حال، وذلك بواسطة سلسلة من الحركات الدورانية rotational movements، والمحفزة من قبل بروتينات متخصصة، ليكون تركيب مفتوح أكثر والذي فيه يحتل كلا زوجي الشريطين مواقع متكافئة (شكل 3.8). يمكن لهذا التركيب بدوره أن يتناظر isomerize لهيئة تشبه بشكل كبير المفصل الأصلي، ماعدا بأن الأشرطة العابرة تتحول إلى أشرطة غير عابرة، والعكس بالعكس (شكل C3.8).

حالما يكون مفصل هوليدي تركيب مفتوح، يمكن لمجموعة خاصة للبروتينات من أن تدخل في المفصل: واحد من تلك البروتينات يستخدم طاقة تحلل الـ ATP ليحرك نقطة التعابر (النقطة التي عندها يرتبط عندها حلزوني الـ DNA المزدوجين) بسرعة على طول الحلزونين، عاملاً على امتداد منطقة حلزون الـ DNA المزدوج المتغاير heteroduplex DNA (شكل 3.8).

لكي يتولد حلزوني DNA منفصلين، لتنتهي عملية التبادل، يجب أن تقطع الأشرطة التي تربط الحلزونين المزدوجين في مفصل هوليدي، في عملية تعرف بالانحلال resolution. ان هنالك طريقتين يتم فيها انحلال مفصل هوليدي. في أحدهما، يقطع الزوج الأصلي للأشرطة المتعابرة (الشريط المهاجم invading strand أو الداخلي المبين في الشكل 3.8A). وفي هذه الحالة، ينفصل حلزوني الـ DNA الأصليين عن بعضهما البعض، مبادلين شريط DNA مفرد والذي كون الحلزون المزدوج المتغاير. وبطريقة أخرى، يقطع الزوج الأصلي من الأشرطة الغير متعابرة noncrossing strands (الشريط الداخلي في الشكل C3.8). الآن النتيجة هي أكثر تعقيداً: يتكون اثنان من الكروموسومات الهجينة، يمتلكان قطع أساسية متبادلة مع بعضها البعض من حلزون الـ DNA المزدوج من خلال عملية التعابر (شكل 3.8).



شكل (3.8): مفصل هوليدي وعملية الـ isomerization الحاصلة فيه (تصميم المؤلف).

توصلت التحليلات الوراثية إلى أن مناطق حلزون الـ DNA المزدوج ذات الآلاف من الأزواج القاعدية قد تكونت بسهولة خلال عملية إعادة الارتباط. وكما سيناقش في الآتي، فان معالجة هذه الحلزونات المزدوجة المتغايرة – والتي تتألف من أشرطة مزدوجة مكملة لبعضها البعض يمكن أن تغير المعلومات في كل حلزون DNA ناتج.

وظائف اعادة الارتباط المتماثل

في البكتريا تتعتبر إعادة الارتباط المتماثل مبدئياً كعلمية إصلاح للـ DNA وفي هذا السياق يشار إلى هذه العملية بإصلاح الدنا الإعادة ارتباطية recombinational DNA repair. يقوم هذا النوع من إعادة الارتباط بتشييد شوكات التضاعف المعاقة stalled replication forks عند موقع تضاعف الـ DNA (أنظر الفصل السابع). يمكن أن يحدث هذا النوع من إعادة الارتباط خلال الاقتران conjugation أو الجماع mating، وذلك عندما ينقل DNA كروموسومي من الخلية البكتيرية الواهبة إلى الخلية البكتيرية المستلمة (أنظر الفصل التاسع). ولو أن إعادة الارتباط خلال الاقتران هي عملية نادرة الحدوث، إلا أنها تساهم بالتنوع الوراثي genetic diversity في الخلايا البكتيرية ذات النوع البري wild type.

وفي حقيقية النواة، يبدو أن إعادة الارتباط المتماثل له عدة أدوار في التضاعف وانقسام الخلية، وإصلاح شوكات التضاعف المعاقة عند موقع الخلل في الـ DNA. تحدث عملية إعادة الارتباط بأعلى تردد لها خلال الانقسام الاختزالي، العملية التي بواسطتها تنقسم خلايا الخط الجرثومي الثنائية المجموعة الكروموسومية diploid germ-line cells لتعطي كميات أحادية المجموعة الكروموسومية halploid gametes– خلايا نطفية أو

بيوض في الكائنات حقيقية النواة الراقية – كل كميت يحتوي على عضو واحد فقط لكل زوج كروموسومي. يبدأ الانقسام الاختزالي بتضاعف الـ DNA في خلية الخط الجرثومي وبالتالي توجد كل جزيئة DNA بأربع نسخ. ثم تذهب الخلية بجولتين من انقسام الخلية بدون جولة بينية من تضاعف الـ DNA. إن هذا يختزل محتوى الـ DNA إلى المستوى الأحادي haploid level في كل كميت.

بعد تضاعف الـ DNA خلال الطور التمهيدي للانقسام الاختزالي الأول، تبقى الكروماتيدات الشقيقة الناتجة مرتبطة بالمناطق المركزية centromeres العائدة لها. وفي تلك المرحلة، يوجد كل صنف من الكروموسومات المتماثلة كزوجين من الكروماتيدات. المعلومات الوراثية الآن قد تم تبادلهما بين الكروماتيدات المتماثلة المرتبطة بصورة كبيرة مع بعضها البعض بواسطة إعادة ارتباط متماثل، في عملية تتضمن كسر وإعادة ربط الـ DNA. هذا التبادل، يشار إليه كذلك بإعادة التعابر crossing over، والذي يمكن أن يلاحظ تحت المجهر الضوئي. يربط التعابر الوراثي زوجي الكروماتيدات الشقيقة مع بعضها البعض في مناطق تدعى بالـ chiasmata (مفردها chiasma).

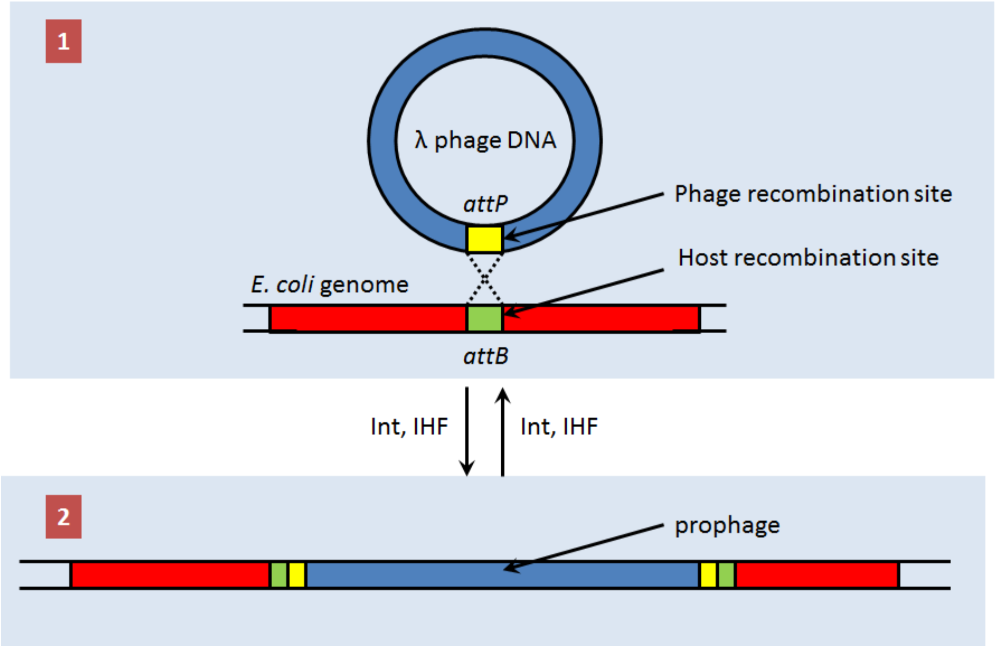
اذن، يقوم إعادة الارتباط المتماثل على الأقل بثلاث وظائف جديرة بالاهتمام: (1) المساهمة في الإصلاح في العديد من أنواع ضرر الـ DNA ، و (2) توفير، في الخلايا حقيقية النواة، ربط فيزيائي مؤقت بين الكروماتيدات والذي يسرع من الانفصال المنتظم للكروموسومات في الانقسام الاختزالي الأول، و (3) تسريع التنوع الوراثي genetic diversity في الكائنات الحية.

إعادة الارتباط ذو الموقع المتخصص site-specific recombination

بالتناقض مع عملية إعادة الارتباط المتماثل، تحدث عملية إعادة الارتباط ذات الموقع المتخصص site-specific recombination عندما تمتلك جزيئة DNA محددة ، والتي هي ليست مماثلةً البتة لجزيئة الـ DNA الأخرى، تسلسلاً والذي يعمل كهدف لإعادة الارتباط بجزيئة الـ DNA الأخرى. وفي الكائنات بدائية النواة، تحدث الحالة نفسها عندما يحشر العاثي البكتيري λ الـ DNA التابع له في كروموسوم بكتريا القولون، والذي يبقى في الحالة التحلحلية lysogenic state. تحدث عملية إعادة الارتباط هذه بين مواقع DNA العاثي (attP) والتي تمتلك تسلسلاً مماثلاً بمواقع في الـ DNA البكتيري (attB)، حتى ولو أن جزيئتي الـ DNA تكون مختلفة تماماً في كل التسلسلات الأخرى (شكل 4.8).

يدعى الإنزيم الذي يحفز هذا التفاعل بالـ integrase ويدعى اختصاراً بـ (Int)، وهو نوع متخصص من انزيمات topoisomerase type I وهو يعمل مع بروتين العائل

الإنحشاري الذي يدعى integration host factor والذي يدعى اختصاراً (IHF). ولكن ما تزال عملية إعادة الارتباط ذات الموقع المتخصص بحاجة إلى الازدواج القاعدي لمنطقة متماثلة قصيرة (مواقع attP مع مواقع attB)، ولكنها لا تتضمن أياً من البروتينات المشتركة في عملية إعادة الارتباط المتماثل.



شكل (4.8): إعادة الارتباط ذو الموقع المتخصص (site specific recombination) للعاثي لامدا في جينوم بكتريا القولون. في الخطوة رقم (1) تتقابل التسلسلات المتخصصة لموقع اعادة الارتباط التابع للعاثي لتسلسلاتها المكملة لاعادة الارتباط التابعة للعائل. وفي الخطوة رقم (2) ينحشر جينوم العاثي في جينوم العائل. يقوم عامل الاندماج بالعائل (host integration factor) أو HIF وعامل الانحشار(integrase) أو Int بتسهيل خطوة انحشار العاثي أو تحرره من جينوم العائل(تصميم المؤلف).

القفازات transposones

القفازات transposons، أو ما يعرف بالعناصر النقالة transposable elements، هي عناصر وراثية متنقلة والتي تميز عموماً وبشكل انتقائي موقع هدف "متواضعة"، بحيث يمكن لها أن تحشر نفسها بالعديد من مواقع الـ DNA المختلفة. وفي عملية القفز، يعمل إنزيم متخصص، والذي عادة ما يشفر من قبل القفاز ويدعى بإنزيم الـ trasposase على تسلسل DNA متخصص على كلا نهايتي القفاز – والذي يقوم بالبداية

بفصل ارتباطه عن الـ DNA المتاخم flanking DNA ومن ثم يحشره بموقع هدف جديد. وليس هنالك ضرورة لوجود تماثل بين نهايات العنصر النقال وموقع الغرس insertion site. وتتحرك معظم القفازات بشكل نادر جداً فقط، ولهذا السبب غالباً ما يكون من الصعب من أن نميزها من الأجزاء الغير متحركة في الكروموسوم. وفي معظم الحالات، فمن غير المعروف ما هو العامل الذي يحفز حركتها. دعنا هنا نميط اللثام عن تلك الوحدات الوراثية المثيرة.

Barbara McClintock

استخدم مصطلح "قفاز" أو "transposon" لأول مرة في عام 1974 من قبل R. W. Hedge و A. E. Jacob لوصف العناصر الوراثية والتي يمكن لها أن تتحرك من جزيئة الى أخرى والتي تحمل المقاومة للمضاد الحيوي الأمبسيلين في الخلايا البكتيرية. ولكن هذا لا يعني اطلاقاً بأن تلك القفازات قد تم اكتشافها لأول مرة في السبعينات، حيث اكتشفت Barbara McClintock عام 1951 العناصر النقالة، والتي أسمتها حينها بعناصر السيطرة (controlling elements)، وتم ذلك في الذرة. وعلى الرغم من ان McClintock لم تكن تعرف حينها التركيب الدقيق للمادة الوراثية، لكنها كانت قادرة على توثيق من خلال ملاحظات دقيقة حركة القفازات في جينوم الذرة، وذلك استنادا الى طريقة تصبيغ بذور الذرة. وعلى الرغم من نشرها بحثاً يتحدث عن هذه القفازات في عام 1948، الا أن عملها لم يسلط عليه الضوء لحين حلول الحقبة الذهبية للوراثة الجزيئية وذلك في السبعينات من القرن المنصرم. ونتيجة لهذا العمل، استحقت McClintock جائزة نوبل في عام 1983. أما الآن، فقد ازداد الاهتمام بالقفازات، ويبرز هذا الاهتمام من خلال تسمية القفازات بعدة مصطلحات مختلفة كالجينات القفازة (jumping genes)، والعناصر المتنقلة (mobile elements)، والعناصر القفازة (transposable elements) والتسلسلات الانغراسية (insertion sequences). تدعى القفازات أيضاً بالدنا الخردة junk DNA ، لأنه ليس لها وظيفة مفيدة معروفة، وبالدنا الأناني selfish DNA وذلك لأنها تستثمر الآليات الوراثية للخلية، حيث تنتشر ضمن الجينوم بدون أن تساهم في تطور الكائن الحي.

لابد من أن نعرف بأنه ليس كل DNA له القابلية على القيام بعملية القفز، فقط القفازات transposons وهي قادرة على دمج أنفسها في مواقع جديدة من دون مساعدة الإنزيمات أو النواتج الجينية لعملية إعادة الارتباط المتماثل homologous recombination (كما في النواتج الجينية *recA* و *recBC*). إن موقع الهدف للقفاز، والذي هو التسلسل الذي يدمج القفاز نفسه به، لا يحتاج أن يمتلك أية تماثل مع القفاز.ومن ناحية تركيبية، تعتبر القفازات عبارة عن تسلسلات نيوكليوتيدية محاطة من كلا الجانبين

بتسلسلات متكررة معكوسة inverted repeat sequences والتي تكون محاطة بدورها بتسلسلات متكررة مباشرة direct inverted repeats ، وعلى سبيل المثال التسلسل الآتي:

5´ ATGCA/CCGTAA[GGTTCCATTT]AATGCC/ATGCA 3´
3´ TACGT/GGCATT[CCAAGGTAAA]TTACGG/TACGT 5´

نحن عندنا الآن قفاز باتجاه قراءة من ´5 إلى ´3 بين هلالين [GGTTCCATTT] والذي يكون محاطاً بتسلسل متكرر معكوس من CCGTAA والمعكوس إلى AATGCC ، والذي يحاط بعد ذلك بتسلسل تكراري مباشر من ATGCA.

إن القفازات لا تحتوي عادة على الجينات التي تشفر إلى التضاعف الذاتي المستقل. إنها ممكن أن تعتبر كعناصر DNA "طفيلية" لأنها تعتمد وبشكل محدد على تضاعف المضيف في تضاعفها. وهي ليست كالمضاعفات البكتيرية bacterial replicons التي تحتوي على الجينات المشفرة لوظائف مضاعفة الـ DNA وكذلك الحال بالنسبة لمضاعفات الكروموسومات والبلازميدات والعاثيات.

عندما ينحشر القفاز في موقع هدف جديد، فانه يتحرك كقطعة منفصلة من الـ DNA . إن القفاز لا يتغير في الحجم. وغالبا ما يقال بأن القفازات " تقفز" من مكان إلى آخر، وفي بعض الحالات يكون هذا التعبير صحيحاً.

صفات القفازات العامة

عموماً، تمتلك معظم القفازات الصفات العامة الآتية:

1. وجد بأنها تسلسلات DNA تشفر لانزيمات تقوم بحشر نسخة مماثلة لنفسها في موقع DNA جديد.
2. تتضمن عملية القفز عمليتين اثنتين: وهما اعادة الارتباط والتضاعف، وهذا يولد نسختين بنويتين للعناصر القفازة الأصلية. وتبقى نسخة واحدة بالموقع القديم والذي يعرف بالموقع الأب (parent site)، بينما يظهر الآخر بالموقع الجديد والذي يعرف بالموقع الهدف (target site).
3. يعد انحشار العناصر القفازة معيقاً لاستمرارية الجينات الموجودة في الموقع الهدف عادة. وعلى سبيل المثال، اذا انحشر قفاز معين في أوبرون ما، فانه يعيق التسلسل المشفر ويحبط تعبير الجين الهدف المنحشر فيه فضلاً عن أي جين بعد (downstream) ذلك الأوبرون. يحدث هذا لأن القفاز قد يحتوي على اشارات ايقاف

الاستنساخ أو الترجمة والتي يكبح تعبير الجينات الأخرى بعد ذلك الأوبرون. يعرف هذا التأثير التطفيري "ذو الاتجاه الواحد" بالطفرة القطبية (polar mutation).

4. لا يشترط أن يكون تأثير القفازات سلبياً على تعبير الموقع الهدف، وانما قد تؤدي الى تنشيط الجينات الموجودة في موقع الهدف، ويعزى السبب في ذلك الى احتواء القفازات على الاشارات الضرورية لبدء عملية تخليق الـ RNA.
5. لا يمكن اعتبار القفاز كيان تضاعفي أو replicon، وذلك لعد احتواء تسلسلاته على أصل التضاعف (*Ori*C)، أي المنطقة التي يبدأ عندها التضاعف (أنظر افصل الرابع)، وبهذه الطريقة، لا يمكن للقفازات أن تتضاعف بعيداً عن كروموسوم العائل كما تفعل البلازميدات والعاثيات (أنظر الفصل التاسع).
6. لا يوجد هنالك أي تماثل بين القفاز والموقع الهدف المراد انحشار القفاز فيه. يمكن للعديد من القفازات أن تحشر نفسها افتراضياً عند أي موقع في كروموسوم العائل أو في البلازميد. يبدو أن بعض القفازات تحشر نفسها في مواقع معينة، ولكنها نادراً ما تحشر نفسها في المواقع الهدف بنمط ذو تسلسل متخصص.
7. إن تسلسلات الـ DNA في كلا نهايتي القفاز تكون متماثلة أو تقريبا متماثلة (كما مبين في أعلاه)، وتكون مقلوبة inverted . هذه التسلسلات الطرفية تدعى بالتسلسلات المقلوبة (المعكوسة) أو IR . (والشاذ الوحيد لهذه الصفة العامة هو العاثي القفاز ميو Mu). إن IR تتنوع في الحجم من 9 إلى 40 زوج قاعدي.

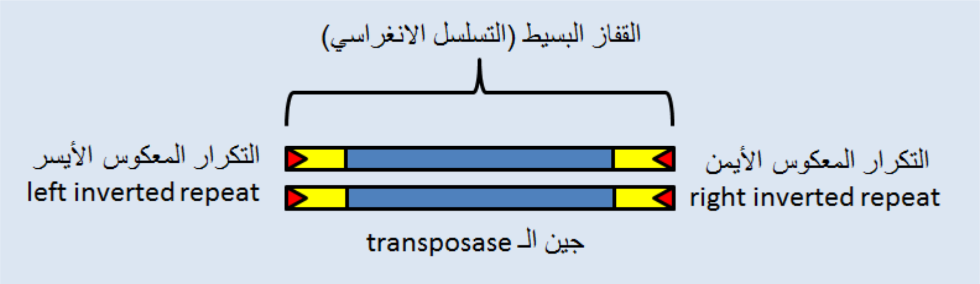
تصنيف القفازات في بدائية النواة

تصنف القفازات على أساس تعقيدها في بدائية النواة الى قفازات بسيطة (simple transposons) أو ما يعرف بالتسلسلات الانغراسية (insertion sequences: IS) وقفازات مركبة (composite transposons).

التسلسلات الانغراسية insertion sequences

تدعى أبسط القفازات بالتسلسلات الانغراسية insertion sequences ، وهي عبارة عن قطع صغيرة من الـ DNA ، عادة بطول 1 كيلو زوج قاعدي في الحجم، تشفر كل منها فقط للبروتينات المطلوبة لكي يضمن قفزها ولا تشفر إلى وظائف إضافية لعملية القفز (شكل 5.8).

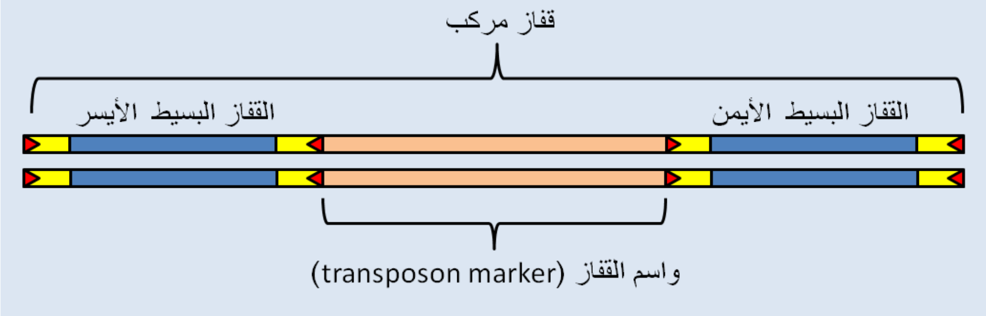
كل عنصر IS هو مختلف في التسلسل، ولكن هنالك بعض العناصر العامة في التنظيم. عناصر IS تنتهي بتكرارات طرفية معكوسة terminal inverted repeats؛ والتي عادة ما تكون نسختين للتكرار وهي– من حيث التسلسل - قريبة لبعضها جداً وليست متماثلة.



شكل (5.8):تركيب القفاز البسيط: يتألف القفاز البسيط من جين الـ transposaseالمحاط من كلا الجانبين بتكرارات معكوسة (inverted repeats) (تصميم المؤلف).

يبدو أن معظم عناصر IS تقفز عبر طريقة محافظة. تشفر عناصر IS لوظائف إنزيم الـ transposase والتي تكون مسؤولة عن ازدواج الموقع الهدف وعن تمييز نهايات القفاز. وعندما تقفز عناصر IS، يزدوج تسلسل الـ DNA العائل في موقع الغرس. تم التوصل إلى طبيعة الازدواج وذلك من خلال مقارنة تسلسل الموقع الهدف قبل وبعد حدوث الانغراس. يبين شكل 6.8 بأنه عند موقع الانغراس، عادة ما يحاط الـ IS DNA عادة بتسلسلات مباشرة قصيرة جداً. (وفي هذا السياق، "مباشرة" تشير إلى أن نسختي التسلسل تتكرر بنفس الاتجاه) ولكن الموقع الهدف في الجين المستقبل recipient gene (الذي يسبق الانغراس)، يمتلك تسلسل واحد فقط من تلك التكرارات. وفي الشكل، يتألف الموقع الهدف من التسلسل ATGCA TACGT. وبعد القفز، فان نسخة من هذا التسلسل موجودة في كلا جانبي القفاز (شكل 5.8).

وكما ذكر في أعلاه؛ تبدي عناصر IS تركيب متميز والذي تكون نهاياته متماثلة بواسطة التكرارات الطرفية المعكوسة، بينما النهايات المجاورة للـ DNA العائل المحيط من الجانبين تكون متماثلة بواسطة التكرارات القصيرة المباشرة.

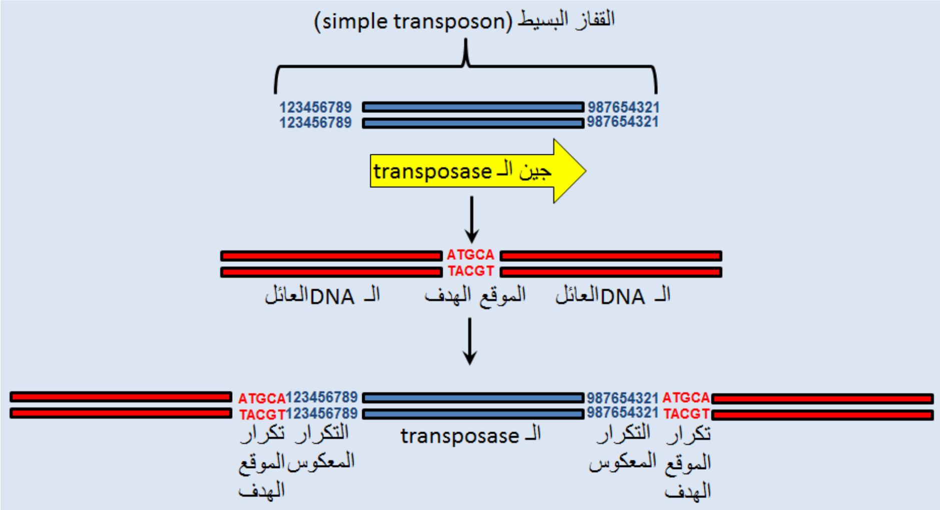


شكل (6.8): تداخل تسلسلات القفازمع الموقع الهدف في تسلسلات العائل: تمتلك القفازات تكرارات طرفية معكوسة وتولد تكرارات مباشرة من الـ DNA المحيط في الموقع الهدف. في هذا المثال، الهدف هو تسلسل من 5 أزواج قاعدية. تتألف نهايات القفاز من تكرارات معكوسة من 9 أزواج قاعدية، حيث أن الرقم من 1 إلى 9 يشير إلى تسلسل الأزواج القاعدية (تصميم المؤلف).

القفازات المركّبة composite transposons

تحتوي القفازات المركبة على نسختين من عناصر IS والتي تحد قطعة DNA ليست ذات علاقة. وقد تكون هذه القطعة الغريبة مقاومة للعقاقير أو قد تكون واسم آخر تحمل في المنطقة المركزية لهذه القفازات بالإضافة إلى عناصر IS التي تشفر لوظائف القفز والتي تكون بمثابة "أذرع" تحيط بها من كلا الجانبين والتي قد تكون بنفس الاتجاه أو (الأكثر شيوعاً) باتجاهين متعاكسين. إن مثل هذه الترتيبات تقفز كوحدة واحدة، حيث يمكنلعنصري IS في الحقيقة أن تقفّز أي تسلسل قابع بينهما، بالإضافة إليها. وتسمى هذه القفازات بالرمز Tn متبوعاً برقم (شكل 7.8).

على الرغم من أن القفازات المركبة تحتوي على نسختين من جين الـ transposase ، فان نسخة واحد منها فقط تكون ضرورية لعملية القفز. وعلى سبيل المثال، في الـ Tn10 يكون فقط عناصر الـ IS في المنطقة اليمنى تحتوي على جين الـ transposase: أما إنزيم الـ trasposase المشفر من قبل عناصر الـ IS اليسرى فهو جين معاب (defective). ولأجل أن ينتقل القفاز المركب، فان التسلسلات الـ IR الخارجية لكلا عنصري الـ IS تكون ضرورية لهذه العملية. وكما هو الحال بالنسبة لعناصر IS والتي قد اشتقت منها القفازات المركبة، فان القفازات المركبة يبدو بأنها تقفز عبر آلية محافظة (غير تضاعفية).



(شكل 7.8): تركيب القفازات المركبة (composite transposons): يمتلك القفاز المركب منطقة وسطية تحمل الواسمات (كما في المقاومة للعقاقير) وتكون محاطة بالتسلسلات الانغراسية (القفازات البسيطة) من كلا الجانبين (تصميم المؤلف).

تصنيف القفازات في حقيقية النواة

تصنف القفازات في الكائنات حقيقية النواة الى صنفين، وذلك على أساس الآلية التي من خلالها يعبر القفاز من الجزيئة الواهبة الى الجزيئة المستلمة. يقفز الصنف الأول من خلال نسخة من الـ RNA، بينما يقفز الصنف الثاني بشكل مباشر.

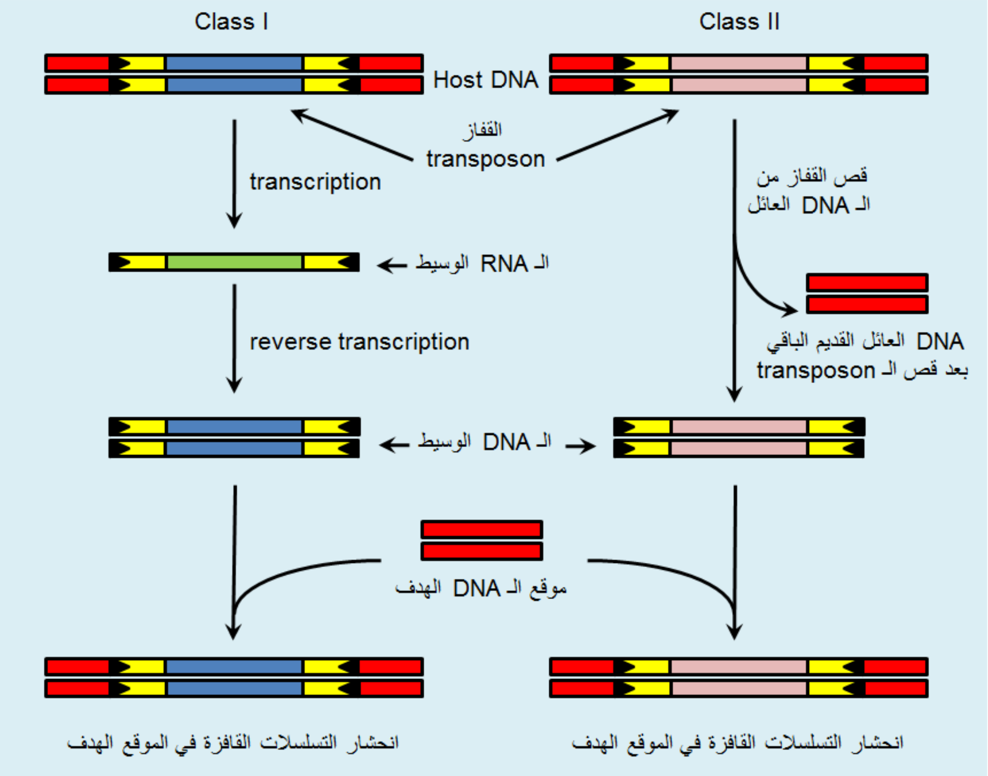
الصنف الأول Class I

يمكن تسمية الصنف الأول بعناصر الرنا (RNA elements) بسبب استنساخ الـ DNA الموجود في الموقع الواهب في الجينوم الى نسخة RNA. تتحول نسخ الـ RNA عكسياً الى نسخة DNA من جديد ولكن تلك النسخة تنتشر في موقع مستلم (موقع الهدف) (شكل 8.8). كما يمكن تسمية قفازات الصنف الأول بالعناصر الارتكاسية (retro-elements) وذلك بسبب تميز حركتها بالجريان العكسي للمعلومات الوراثية، من الـ RNA الى الـ DNA في عملية تدعى بالنقل الارتكاسي أو retrotransposition. ويوجد عدد مهول من نسخ الصنف الأول في جينوم العائل. وعلى سبيل المثال، هنالك ملايين النسخ من قفازات الصنف الأول التي تدعى بعائلة *Alu* في الجينوم البشري (أنظر الفصل الثاني). وبما أن قفازات الصنف الأول تستعين بنسخة من الـ mRNA كجزيئة وسيطة في عملية قفزها، بينما لاتقوم هي بعملية القفز بنفسها، لذا، يمكن ملاحظة ديمومة انحشار تلك القفازات

في الجينوم. وهذا يعني، بأنها لا يمكن أن يتم قصها من الموقع الواهب. مع ذلك، تعتبر هذه التسلسلات بالقفازة لقدرة نسخها على الانحشار في أماكن جديدة. كما تعد عناصر تاي (Ty elements) الموجودة في الخمائر مثالا نموذجياً أيضاً حول هذه الصنف من القفازات.

الصنف الثاني Class II

بالتناقض مع الصنف الأول، تسمى قفازات الصنف الثاني بعناصر الدنا (DNA elements) لأن تلك القفازات تتحرك بنفسها من موقع جينومي الى موقع جينومي آخر(شكل 8.8). وبالتناقض أيضاً مع قفازات الصنف الأول، يمكن لقفازات الصنف الثاني أن يتم قصها من الموقع الواهب. ومن الجدير بالذكر أن أول قفاز قد تم اكتشافه في الذرة يعود الى هذا الصنف. يؤدي هذا القفاز الى ظهور بذور مبقعة غير اعتيادية بسبب ازالتها أو قصها من الجين المسؤول عن انتاج الصبغة في بذور الذرة.



شكل (8.8): مخطط يوضح صنفين من القفازات في حقيقية النواة. تبقى قفازات الصنف الأول دائمية الوجود حال انحشارها. يمكن تسمية تسلسلات الصنف الأول بالقفازة لان نسخ الـ RNA الناتجة منها تعاني استنساخاً معاكساً الى DNA والذي ينحشر في موقع جديد بالجينوم. يتحرك الصنف الثاني وذلك بازالة نفسه من موقع واعادة حشر نفسه في موقع آخر (تصميم المؤلف).

آليات القفز (mechanisms of transposition)

عموماً، هنالك آليتين تستعملها القفازات، سواء أكانت في بدائية أو حقيقية النواة، في عملية قفزها من مكان الى آخر وهي:

1. آلية القفز المباشرة: وتحدث أما بصورة تضاعفية replicating or cointegrate-forming، أو بصورة غير تضاعفية (محافظة) conservative (non-replicative). وفيما يخص عملية القفز الحادثة في القفازات المعتمدة على وسائط الـ DNA فهي أما أن تكون تضاعفية (replicative) أو غير تضاعفية (non-replicative). وفي القفز التضاعفي، تدخل نسخة جديدة في موقع جديد في الوقت الذي ماتزال النسخة القديمة في الموقع الأصلي، وبالتالي: يزداد عدد نسخ العنصر القفاز. وفي القفز الغير تضاعفي، ينقص العنصر القفاز من الموقع القديم وينغرس في موقع جديد من دون أي زيادة في عدد نسخه. يحتاج القفز الغير تضاعفي تضاعف نيوكلويتيدات قليلة بحيث تشكل تكرارات مباشرة (direct repeats) (أنظر أدناه).

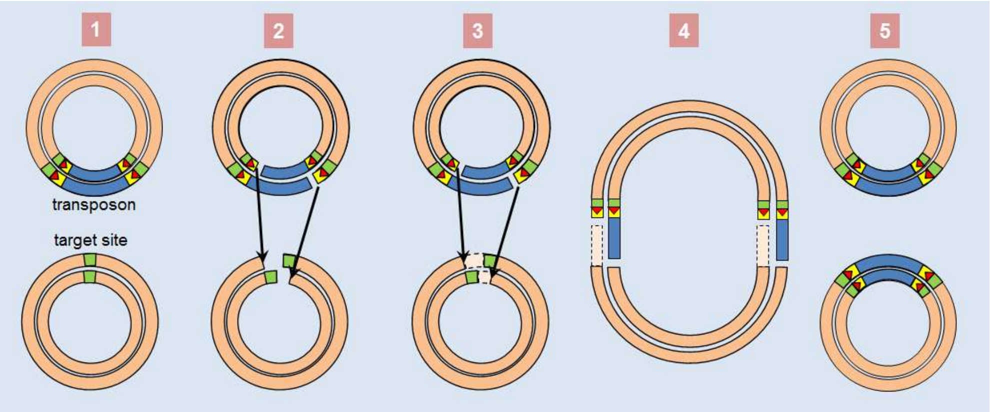
2. آلية القفز الغير مباشرة: وهي آلية القفز عن طريق جزيئات الـ RNA الوسيطة (RNA intermediate) (أنظر أدناه).

آلية القفز المباشرة

1. القفز التضاعفي (replicative transposition): ويدعى أحياناً بقفز النسخ واللصق (copy and paste transposition)، ويمكن أن يتم بين جزيئات الـ DNA المختلفة أو بين موقعين تابعين لنفس جزيئة الـ DNA. يوضح الشكل (9.8) خطوات القفز بين جزيئتي DNA. وقبل القفز، يكون عنصر النقل في موقع واحد. وفي الخطوة الأولى، ترتبط جزيئتا الـ DNA مع بعضهما، ويتضاعف العنصر القفاز، منتجاً تركيباً مندمجاً (cointegrate structure) والذي يتألف من الموقعين الواهب والمستلم بشكل ملتحم مع بعضها (شكل 9.8). بعد تكوين التركيب المندمج، تنتج عملية التعابر في مناطق واقعة ضمن العناصر القفازة جزيئتين، تعرف هذه الخطوة بحل التركيب المندمج (resolution of cointegrate). وهنا يأتي السؤال: كيف يتكون وينحل التركيب المندمج؟ يحتاج تكوين هذا التركيب بدوره الى أربعة خطوات: الأولى، يصنع انزيم transposase (المشفر من قبل العنصر القفاز) قطوعات مفردة الشريط في كل نهاية للعنصر القفاز وفي كلا جانبي التسلسل الهدف حيث ينغرس العنصر القفاز. ثانياً، ترتبط النهايات الحرة للعنصر القفاز بالتسلسل الهدف. ثالثاً، يحدث التضاعف في أشرطة القالب المفردة الشريط، ابتداءً من النهايات 3′ للأشرطة المفردة ويتقدم خلال العنصر القفاز. يخلق هذا التضاعف التركيب المندمج، بنسختيه على كلا طرفي العنصر القفاز وتسلسل الموقع الهدف، والذي هو الآن في موقع

واحد من كل نسخة (شكل 9.8). ان الانزيمات التي تنجز وظائف التضاعف واللصق هي انزيمات خلوية والتي تعمل في التضاعف واصلاح الـ DNA. رابعاً، بعد تكوين التركيب المندمج، يعاني من الانحلال، ويحتاج هذا الحل أو الانحلال الى اعادة ارتباط بين المواقع الموجودة في العنصر القفاز. يعطي القفز نسختين من العنصر القفاز في النهاية. وتنفذ خطوة الانحلال من قبل انزيم resolvase (المشفر في بعض الحالات من العنصر القفاز وفي حالات أخرى من جين خلوي) والتي تعمل في اعادة الارتباط المتماثلة. وفي هذه الآلية التضاعفية، والتي يزدوج فيها القفاز خلال عملية القفز: تتحرك نسخة واحدة، ولكن أيضاً تبقى نسخة واحدة ولهذا لا يتشوه DNA العائل الأصلي.

شكل (9.8). القفز التضاعفي. يحدث في هذا النوع من الآليات نسخاً لتسلسلات الـ DNA في القفاز عن طريق تضاعف الـ DNA. تتمثل النواتج النهائية بجزيئة DNA مماثلة للواهب الأصلي ولجزيئة الـ DNA الهدف التي انحشر فيها القفاز، ويتضمن الخطوات: (1) يقوم انزيم transposase بجلب تسلسل القفاز مع تسلسل الموقع الهدف

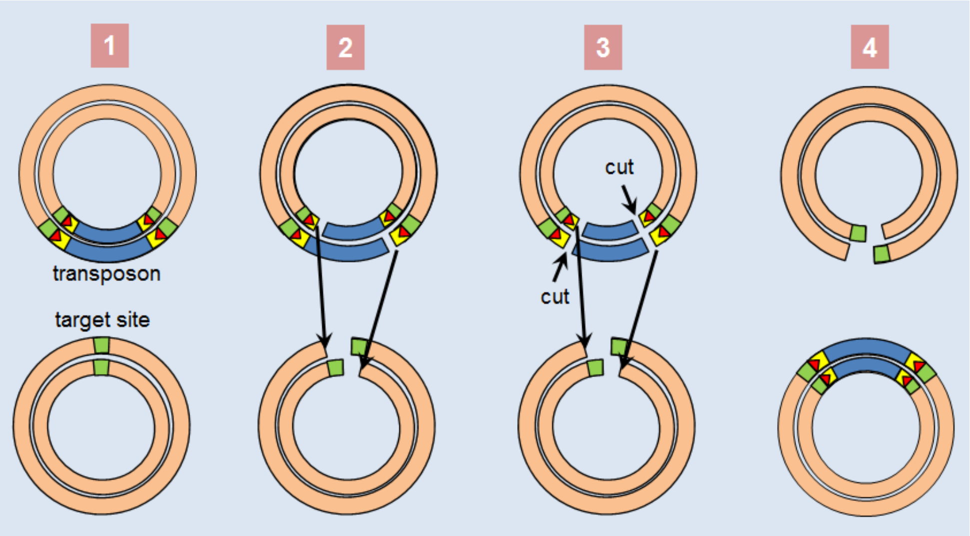


معاً بشكل متقابل، (2) يقوم هذا الانزيم بعمل قطوعات مترنحة (staggered cuts– أنظر الفصل العاشر) لكلا القفاز والموقع الهدف، (3) يبدأ انزيم الـ DNA polymerase بتخليق شريط جديد في الموقع الهدف، (4) يستمر تخليق الـ transposon من قبل انزيم DNA polymerase بعد تكوين التركيب المندمج (cointegrate)، (5) أخيراً يقوم انزيم الـ resolvase بحل هذا التركيب المندمج لتنتج جزيئتين كلاهما تحتوي على القفاز (تصميم المؤلف).

وفي هذه الحالة، لا تتكون قطوعات ثانية، ولكن بدلاً من ذلك يبقى شريط القفاز الثاني لكي يتم استنساخه من قبل إنزيم DNA polymerase، والذي يبدأ عند نهاية القطع الأول. يدعى التركيب الناتج بالـ cointegrate، حيث يعتبر وجوده دليل قوي لمثل هذا المسلك لعملية القفز. ثم ينحل بعد ذلك هذا التركيب وذلك بواسطة فعل إنزيم آخر مشفر من قبل القفاز يدعى بالـresolvase. ومن الممكن لإنزيم الـ resolvase من أن يحفز عملية site specific recombination عبر نسختي القفاز في تفاعل يشبه انحشار العاثي λ ، منتجاً جزيئات DNA منفصلة، كل منها بنسخة قفاز واحدة. إن نواتج تفاعل القفز هذا ذا الخطوتين تتضمن نسختين من القفاز، واحدة في موقعه الأصيل على المضاعف المانح،

والأخرى على المضاعف الهدف. إن أعضاء عائلة Tn 3 (والتي تدعى بالقفازات البسيطة) و Tn1 و Tn501 هي من أمثلة هذه المجموعة.

2. القفز الغير تضاعفي (nonreplicative transposition): وفي هذا النوع من القفز، يتحرك العنصر القفاز من موقع الى آخر بدون تضاعف العنصر القافز كلياً (شكل 10.8)، على الرغم من تضاعف تسلسلات قصيرة في الـ DNA الهدف، مولدة تكرارات مباشرة متاخمة.



شكل (10.8). القفز الغير تضاعفي (قفز القطع واللصق). تتمثل النواتج النهائية بجزيئة DNA مماثلة للواهب الأصلي ولجزيئة الـ DNA الهدف التي انحشر فيها القفاز، ويتضمن الخطوات: (1) يقوم انزيم transposase بجلب تسلسل القفاز مع تسلسل الموقع الهدف معاً بشكل متقابل، (2) يقوم هذا الانزيم بعمل قطوعات مترنحة (staggered cuts– أنظر الفصل العاشر) لكلا القفاز والموقع الهدف، (3) تقوم مجموعة ثانية من القطوعات بالتكفل بفصل القفاز نهائياً عن تسلسله القديم، (4) أخيراً تفقد الجزيئة الحاوية على القفاز للقفاز لينحشر في التسلسل الهدف الجديد (تصميم المؤلف).

على الرغم من قدرة انزيم الـ transposase على قطع أشرطة الـ DNA، الا انه يقطع الـ DNA بطريقة متفردة مختلفة عن ماتقوم به انزيمات القطع الداخلي (enonucleases) المستخدمة في تجارب الهندسة الوراثية، حيث يربط انزيم الـ transposase كلا نهايتي القفاز بالإضافة إلى تسلسل الـ DNA الهدف الذي سوف ينحشر فيه، ثم يعمل الإنزيم بعد ذلك قطوعات متعرجة staggered cutsبنفس الطريقة التي تقوم فيها الإنزيمات القاطعة بذلك في موقع الهدف بالاضافة الى قطعه لكلا نهايتي القفاز بشكل متزامن، ولكن الشئ المختلف هنا هو ان انزيم transposase يصنع هكذا قطع على أشرطة مختلفة، أي شريط من الـ DNA الواهب وشريط من الـ DNA المستلم. بينما تقوم

الانزيمات القاطعة المستخدمة في الهندسة الوراثية بعمل تلك القطوعات في جزيئة DNA واحدة ، أي في كلا شريطي الجزيئة الواحدة (أنظر الفصل العاشر). تقوم قفازات الصنف الثاني في الكائنات حقيقية النواة بهذه الآلية. أما في بدائية النواة، تقوم القفازات Tn5 و Tn9 و Tn10 بالاعتماد على هذه الطريقة أيضاً.

آلية القفز الغير مباشرة

القفز عن طريق وسائط الـ RNA: تعرف العناصر القفازة الموجودة في الكائنات حقيقية النواة والمنتقلة عبر وسائط الـRNA بالقفازات الارتكاسية (retrotransposons). يتم استنساخ القفاز الارتكاسي في الـ DNA أولاً الى تسلسل من الـ RNA (أنظر شكل 8.8)، والذي ربما يتعرض الى المعالجة بعد ذلك. يعاني الـ RNA المعالج الاستنساخ المعاكس من قبل انزيم reverse transcriptase لانتاج نسخة DNA مزدوجة الشريط منه. تتكون قطوعات متعرجة (staggered cuts) في الـ DNA الهدف، وتنغرس نسخة من الـ retrotransposon في الجينوم (أنظر شكل 8.8). ويقوم التضاعف بملئ الفراغات القصيرة المتكونة منقبل القطوعات المتعرجة، مولداً تكرارات متاخمة مباشرة (flanking direct repeats) على كلا جانبي الـ retrotransposon.

هنالك عدة أمثلة لهذه الآلية، فقد بينت البحوث العديدة بأن بعض القفازات للكائنات الراقية، وخصوصاً تلك التي تعود إلى فايروسات الارتكاسية retroviruses، تتحرك بطريقة مختلفة جداً عن القفازات البكتيرية كما في Tn3. وبهذه الطريقة، فان عناصر تاي (Ty elements) للخمائر سوف تستنسخ أولاً إلى RNA، والذي يستنسخ إلى DNA بواسطة إنزيم reverse transcriptase ، ثم يعاد ارتباط نسخة الـ DNA إلى موقع جديد في كروموسوم العائل. ليست عناصر Ty هي الوحيدة التي تقفز بهذه الآلية وانما تمتلك الفايروسات الارتكاسية جينوم ذو RNA مفرد الشريط single stranded RNA والذي يتضاعف من خلال وسيط الـ DNA ذو الشريط المزدوج. تتضمن دورة حياة الفايروس مرحلة اجبارية والتي ينحشر فيها حلزون الـ DNA المزدوج في جينوم العائل بواسطة عملية تشبه القفز والتي تولد تسلسلات قصيرة مباشرة من الـ DNA الهدف. إن الخطوات المهمة هي أن الـ RNA الفايروسي يتحول إلى DNA، ثم ينحشر الـ DNA بجينوم العائل، ثم يستنسخ DNA العاثي الأولي إلى RNA. إن الإنزيم المسؤول على توليد نسخة DNA بدائية لـ RNA هو إنزيم الـ reverse transcriptase. ويقوم هذا الإنزيم بتحويل الـ RNA إلى حلزون الـ DNA المزدوج في سايتوبلازم الخلية المخموجة. يقوم الـ DNA الخطي بصنع طريقه إلى النواة. يمكن لنسخة أو أكثر من الـ DNA من أن تنحشر في جينوم العائل. وهنا يدخل إنزيم مفرد يدعى بالـ integrase ويكون مسؤولاً عن الانحشار.

بقي لنا أن نعرف بعض الحقائق المتعلقة بآلية القفز العامة ومنها: أولاً أن القفازات تتحرك بدقة، بحيث تحمل كل التسلسلات المنحشرة في الموقع القديم وليس الـ DNA المجاور. يميز إنزيم الـ transposase بنفسه كلتا نهايتي القفاز. وتلك النهايتين غالباً ما تكون متماثلة لأنها هي المواقع الارتباطية الشائعة لإنزيم الـ transposase. ثانياً، يتكون تضاعف دقيق من 3 إلى 12 قاعدة من الـ DNA الهدف (اعتماداً على نوع القفاز) في موقع الانحشار، حيث تبقى نسخة واحدة من تسلسل قصير في موقع الهدف على جانبي القفاز المنحشر (أنظر شكل 8.8). ربما يعزى هذا الى نمط القطع الذي يقوم به انزيم الـ transposase (أنظر أدناه). ولهذا السبب، تحدث بعض عمليات تخليق الـ DNA خلال القفز لتؤدي إلى تضاعف الموقع الهدف، وهذا فرق واضح عن عملية إعادة الارتباط المتخصص site specific recombination للعاثي λ والتي لا يحدث فيها تضاعف للموقع الهدف. ثالثاً، ولو أن معظم القفازات تتحرك لأي منطقة في الجينوم الجديد، ولكنها لا تتحرك بشكل عشوائي كامل، مفضلة بدلاً عن ذلك اجتياح تسلسلات DNA معينة. وبعضها يهاجم تسلسلات متناظرة متخصصة رباعية أو سداسية، كما يفعل الإنزيم القاطع (أنظر الفصل العاشر).

ملحق الفصل الثامن

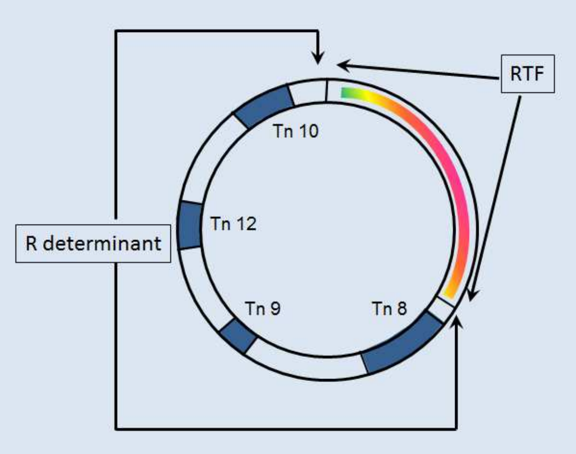
فائدة القفازات

عندما اكتشفت العناصر النقالة transposable elements من قبل Barbara McClintock في الخمسينيات من القرن الماضي فانها اعتبرت كعناصر وراثية والتي يمكن أن تسبب طفرات غير ثابتة، وتنتج شذوذ كروموسومي chromosomal aberrations (والتي تتضمن حدوث كسور breaks) والتي تغير الموقع في الجينوم. وعندما أعيد اكتشافها في البكتريا في السبعينيات "كتسلسلات انغراسية insertion sequences" ، لوحظ بأنها تتحرك من موقع وراثي إلى آخر وتسبب إنهاء الاستنساخ قبل اكتماله premature transcriptional termination في أوبرونات البكتريا.

إن القفازات الأكبر غالباً ما تحتوي على جينات تمنح فائدة انتخابية للخلية الحاملة للقفاز وهي: المقاومة للمضادات الحياتية وهي الأكثر شيوعاً، والمقاومة للزئبق Hg، كما وجدت جينات إنتاج السموم toxin production genes وجينات التخمر fermentation genes. تسهل العناصر القفازة أيضاً نقل الجين الأفقي horizontal gene transfer بين كائنات ليست ذات صلة. أما عندما تسبب القفازات في البكتريا طفرة، فإنها تقوم بذلك أما بواسطة انحشارها بالمنطقة المشفرة للجين، فاقداً بعض من الجين في العملية، أو بانحشارها قبل upstream المنطقة المشفرة للجين في منطقة مهمة في تحديد تعبير الجين، كما في

منطقة ارتباط عامل الاستنساخ بالـ DNA. إن الانحشار في الجين من الممكن أن يسبب splicing بديل مؤدياً إلى تنوع أعظم في البروتينات المنتجة من جين مفرد. يمكن أن تسبب القفازات تضاعف قطع من الـ DNA، وهي المرحلة الأولى المهمة في تطور معلومات جديدة evolution of new information. يمكن أن تسبب القفازات زيادة في حجم الجينوم، لأنها تترك نسخ متعددة منها في الجينوم. وقد تلعب القفازات دوراً في التسبب بالأمراض المشتملة على السرطان ونزف الدم الوراثي (الهيموفيليا).

إن تطور البلازميدات ذات المقاومة المتعددة multiple resistance plasmids والذي أصبح سهلاً وذلك بقابلية القفازات على إعادة الارتباط بدون تماثل في التسلسل، وهكذا تجمع مع بعضها البعض في بلازميد مفرد، والتي تضمن قابليتها على الحياة وذلك بالاستخدام المتكرر لعدة مضادات حيوية مع بعضها البعض. إن بلازميد المقاومة R1 plasmids الموجود في الطبيعة والناشئ من القفازات المشفرة للمقاومة إلى الكلورومفنيكول (Cm) والكانامايسين (Km)، كما انه يحتوي على القفاز الكامل intact transposon Tn4 والتي تحمل المقاومة للـ streptomycin (Sm)، والـ sulfonamide (Su)، والـ ampicillin (Ap) (شكل 11.8). يحتوي Tn4 بنفسه على المقاومة للأمبيسيلين. إن التراكب الكامل للجينات المقاومة (an r-determinants) ترتبط بقطع أخرى محتوية على جينات لتضاعف البلازميد ولوظائف النقل transfer function، والتي تحث الارتباط الاقتراني conjugal contact للخلية البكتيرية للعائل مع بكتريا أخرى، وهذا يمنح البلازميد القدرة بأن ينتقل بسرعة بين الخلايا. إن الطبيعة المطواعة plastic nature لهذا التراكب يعطي تغايرات بلازميدية عديدة، في كلا المختبر وفي الطبيعة.



شكل (11.8): تركيب R plasmid: إن RTF تعني resistance transfer factor والذي يعني (عامل نقل المقاومة)- والذي يحمل جينات النقل. يحمل المحدد R (R determinant) جينات المقاومة (تصميم المؤلف).

إن معظم العناصر المتنقلة من الممكن أن تنغرس في الكروموسوم البكتيري عند مواقع عديدة. إذا انحشر القفاز ضمن الجين، فان الاستمرارية الخطية لذلك الجين تتشتت وتفقد وظيفته. وهكذا فان القفازات من

الممكن أن تعتبر "كمطفرات بايولوجية" بالتناقض مع "المطفرات الكيمياوية" كما في الـ nitrosoguanidine. ان الشيء الذي يميز هذه المطفرات البايولوجية هو أن كل طافر من النادر أن يعاني أكثر من طفرة واحدة. وهكذا فمن الممكن تجنب مشكلة الطفرات المتعددة المرتبطة بالمطفرات الكيمياوية. وبالتالي تكون هذه المطفرات ذات فائدة كبيرة في أنواع متعددة من التلاعبات الوراثية في البكتريا.

أسئلة الفصل الثامن

السؤال الأول: علل ما يلي

يمكن لبروتين RecA أن يقود تفاعل الهجرة الفرعية في عملية اعادة الارتباط؟
لاتحتوي الخلية النطفية أو البيضية الناضجة على نفس المعلومات الوراثية من جسم الكائن الناتجة منه؟
توصف المواقع التي تميزها القفازات لكي ترتبط بها بأنها مواقع هدف "متواضعة" ؟
يتضاعف تسلسل الموقع الهدف على كلا جانبي القفاز؟
يعد تكون مركب يعرف بالـ cointegrate دليلاً على حدوث القفز التضاعفي؟
توصف الفايروسات الارتجاعية (retroviruses) بأنها ثنائية المجموعة الكروموسومية (diploid)؟
تسهل العناصر القفازة نقل الجين الأفقي horizontal gene transfer بين كائنات ليست ذات صلة؟
تسمى القفازات أحياناً بالمطفرات البايولوجية، وتفضل على المطفرات الكيمياوية؟
كل من الـ transposase والانزيم القاطع يصنعان قطوعات مترنحة (staggered cuts) في الـ DNA لكن يستخدم الانزيم الأول في عملية قفز الـ DNA بينما يستخدم الانزيم الثاني في عملية قطع الـ DNA؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

لضمان حدوث عملية اعادة الارتباط بين أي من جزيئتي الـ DNA، لابد من وجود ....
a. insertion sequences b. inverted sequences c. heterologous sequences d. homologous sequences
تسمى عملية اعادة ارتباط بين جزيئتين من الـ DNA مع نقصان زوج نيوكليوتيدي أو أكثر بـ ....
a. homologous recombination b. non-homologous recombination c. site specific recombination d. general recombination
لايقتصر تكوين D-loop أثناء عملية اعادة الارتباط فحسب، وانما يمكن ملاحظته في تراكيب تضاعفية معينة كما في ....
a. chloroplast b. Golgi apparatus c. plasmids d. mitochondria
تعد خطوة .... هي أكثر خطوات اعادة الارتباط اثارة، وذلك لما تحتاجه من الحركات الدورانية لحدوثها.
a. strand invasion b. D-loop formation c. Holliday junction d. single stranded stabilization
تحدث عملية اعادة الارتباط ذات الموقع المتخصص بين العاثي لامدا وبكتريا القولون وذلك عندما يكون العاثي في ....
a. lytic stage b. lysogenic stage c. both lytic and lysogenic stages d. non
تشترك بروتينات .... في عملية اعادة الارتباط ذات الموقع المتخصص.
a. RecBCD c. RecA c. RuvB d. all e. non
لكي تنتقل القفازات من مكان الى آخر، وهي تحتاج بذلك عادة الى تسلسلات ذات ....
a. long region of homology b. intermediate region of homology c. short region of homology d. no region of homology
يشترك عادة نوع متخصص من انزيمات topoisomerase type I في عملية ....

a. homologous recombination b. site specific recombination c. transposition d. non

تمتلك كل القفازات تسلسلات معكوسة (inverted repeats) في كلا نهايتيها ماعدا ....

a. Mu phage b. Tn 10 c. Tn 9 d. Ty elements

ان الآلية التي يميز فيها القفاز الموقع الهدف تكون ....

a. completely random b. completely specific c. similar to restriction enzymes d. all

.... وهو أحد آليات القفز، وفيه يتشوه الـ DNA الواهب.

a. non-replicative transposition b. replicative transposition c. retrotransposition d. non

السؤال الثالث: عرف ما يلي

Holliday junction, Chi sequence, chiasmata, junk DNA, reverse transcriptase

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

RecA	nick
RuvC	strand invasion
RecBCD	D loop
RuvA	single stranded stabilization
DNA ligase	Holliday junction
SSBs	Branch migration
RuvB	resolution

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell.Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.

Craig N. Transposition, in *Escherichia coli* and *Salmonella*,.Washington, DC: ASM Press, 1996.

CraigN. (1997). Target site selection in transposition *Annu. Rev. Biochem.*66: 437-474.

GopaulD.GuoF. and Van DuyneG. 1998. Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxPsitespecificrecombination *EMBO J.* 17: 4175-4187.

Griffiths A., Wessler S., Lewontin R., Gelbart W., Suzuki D., Miller J.An Introduction to Genetic Analysis.Eighth edition, 2004.

Kumar H. D..Molecular genetics and biotechnology.Second edition, Vikas Publishing House, India, 1997.

Lewin B. Genes. VIII, Pearson Prentice Hall, 2004.

MizuuchiK.. (1992). Transpositional recombination: mechanistic insightsfrom studies of mu and other elements *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1011-1051.

Murray*et al.* Medical Microbiology.Third edition, 2005.

Pierce B. Genetics: A conceptual approach. 2002

Passarge E. Color atlas of Genetics.Second edition, Thieme, 2001.

Reece R.J. Analysis of genes and genomes. John Wiley & Sons, 2004.

Schleif R. Genetics and molecular biology.Second edition, The Johns Hopkins University Press, 1993.

Turner P., McLennan A., Bates A., White M.Instant notes in molecular biology. Third edition, Taylor & Francis Group/UK. 2005.

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

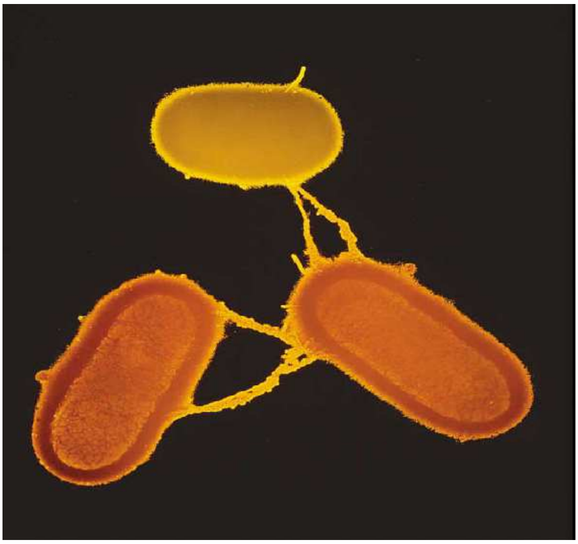
Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R. Molecular biology of the gene.Fifth edition, Pearson Prentice Hall, 2004.

Robinson R. Genetics. Volume 3, MacMillan Reference USA, 2003.

9

الفصل التاسع

أنظمةانتقال الـ DNA في البكتريا

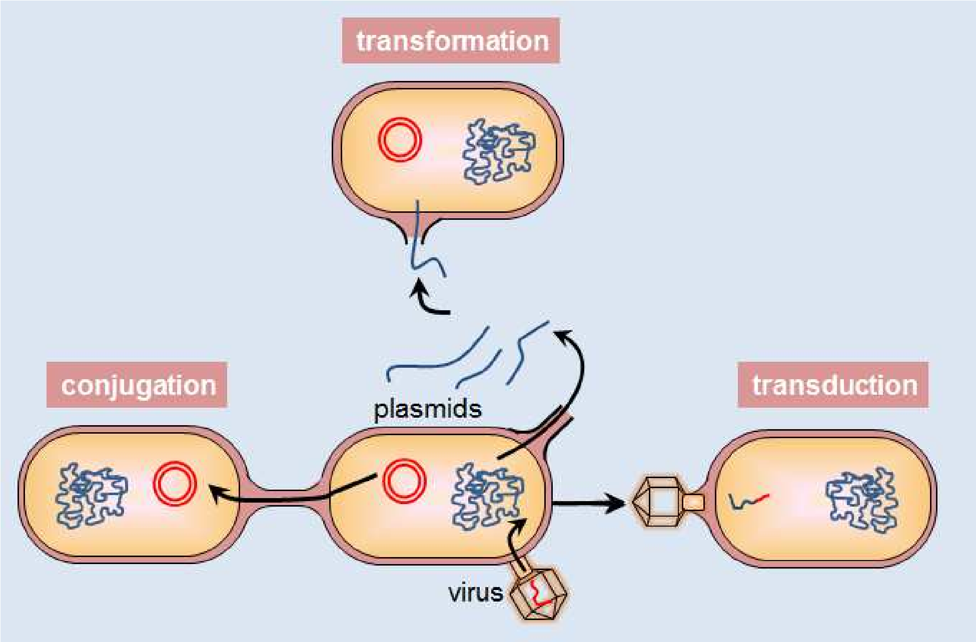


صورة مكبر لأكثر من أحد عشر مرة أخذت بواسطة المجهر الالكتروني العابر (TEM) والتي يبين فيها خلايا مقترنة في بكتريا القولون حيث تقترن هنا خلية ذكرية واحدة (أسفل اليمين) مع خليتين أنثويتين معاً (Griffiths *et al.*, 2004).

مقدمة

لم يكن عالم البكتريا وفايروساتها بعيدا عن علم الوراثة الجزيئية، حيث اضطلع جزء كبير من هذا العلم بدراسة تلك الكائنات بدائية النواة بصورة مكثفة وتوصل الى العديد من الأساسيات التي بني عليها علم البايولوجيا الجزيئية اليوم. وعلى الرغم من احتواء البكتريا على DNA موزع على هيئة امتدادات طويلة على شكل "كروموسوم"، ولكن مادتها الوراثية غير منظمة بنفس الكيفية التي هي عليه في الكائنات حقيقة النواة (أنظر الفصل الأول). تعود البكتريا الى صنف من الكائنات يعرف بالكائنات بدائية النواة. وعلى الرغم من اختلاف الفايروسات عن هكذا كائنات بشكل كبير، الا أن لها بعض صفات تلك الكائنات، وعلى سبيل المثال، تكون مادتها الوراثية أما DNA أو RNA، مؤلفة "كروموسم صغير". وعلى أية حال، يعد العديد من المختصين بالبايولوجي الفايروسات كائنات غير حية، لعدم قدرتها على النمو أو التكاثر بشكل مستقل. ولكي تتكاثر، يجب أن تتطفل على الخلايا الحية وتستخدم الماكنة الجزيئية لهذه الخلايا لهذا الغرض. تدعى الفايروسات التي تتطفل على البكتريا بالعاثيات البكتيرية (bacteriophages)، أو ببساطة تسمى بالعاثيات فقط. سوف يركز هذا الفصل على فهم المبادئ الأساسية للوراثة البكتيرية، ويتم ذلك من خلال التركيز على كيفية انتقال المادة الوراثية بين تلك الكائنات، والتي هي التحول (transformation) و الاقتران (conjugation) و النقل (transduction) كما في (شكل 1.9). لأن تلك العلميات هي مصدر أساسي للتغاير الوراثي الكبير الحادث في البكتريا، فعلى الرغم من عدم حدوث الانقسام الاختزالي (meiosis) في البكتريا كما هو الحال في الكائنات حقيقية النواة، الا ان التغاير الوراثي الحاصل في البكتريا قد نجم عن واحدة من تلك العمليات. لذا، تقوم البكتريا بتنويع مادتها الوراثية بواسطة نقل الجين أفقياً (horizontal gene transfer) وفيه تأخذ البكتريا الـ DNA من كائنات أخرى وذلك بواسطة تلك الوسائل، وهذا يعتبر طريقة مهمة جداً في التطور البكتيري.

ترتبط في عملية الاقتران الخلية البكتيرية بخلية أخرى بشكل مباشر. وفي عملية التحول، يمكن أن تأخذ الخلية البكتيرية قطعة DNA من البيئة وتدمجها بالكروموسوم بعد دخولها. أما في عملية النقل، تلتقط عاثيات معينة الـ DNA من خلية بكتيرية وتحقنه في خلية أخرى، حيث يمكن لتلك القطعة أن تنحشر في الكروموسوم (شكل 1.9).



شكل (1.9): مخطط يوضح الطرق الثلاث التي ينتقل بها الـ DNA بين الخلايا البكتيرية. طريقة التحول موضحة في الجزء الأعلى من الشكل وطريقة النقل والمتوسطة من قبل العاثي فهي موضحة في الجزء الأيمن من الشكل، أما طريقة الاقتران فهي موضحة بيسار الشكل (تصميم المؤلف).

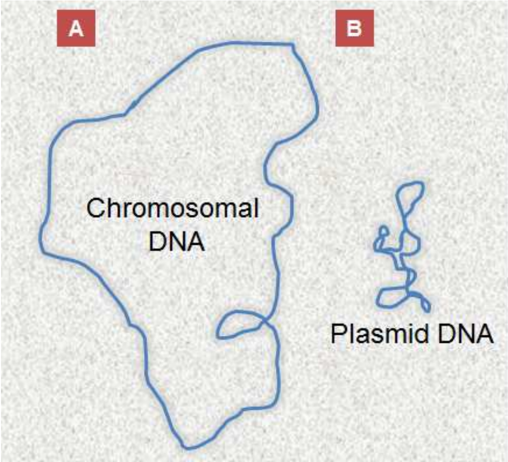
قبل التطرق الى الطرق الثلاث الرئيسية التي ينتقل فيها الـ DNA بين الخلايا البكتيرية لا بد لنا من معرفة مفهوم مهم في وراثة الأحياء المجهرية له صلة وثيقة بهذا الموضوع وهو البلازميدات.

البلازميدات plasmids

يتألف جينوم البكتريا من كروموسوم بهيئة جزيئة دائرية مفردة. إضافة إلى الكروموسوم، تمتلك العديد من البكتريا جزيئات DNA دائرية صغيرة تعرف بالبلازميدات. إن مصطلح "بلازميد" قد استخدم أصلاً من قبل Lederberg عام 1952 ليصف عناصر وراثية خارج كروموسومية والذي تطور ليصبح:

عناصر وراثية خارج كروموسومية extra-chromosomal elements، لها القابلية على التضاعف ذاتياً أي أنها وحدات مستقلّة autonomous units، وتورث بشكل

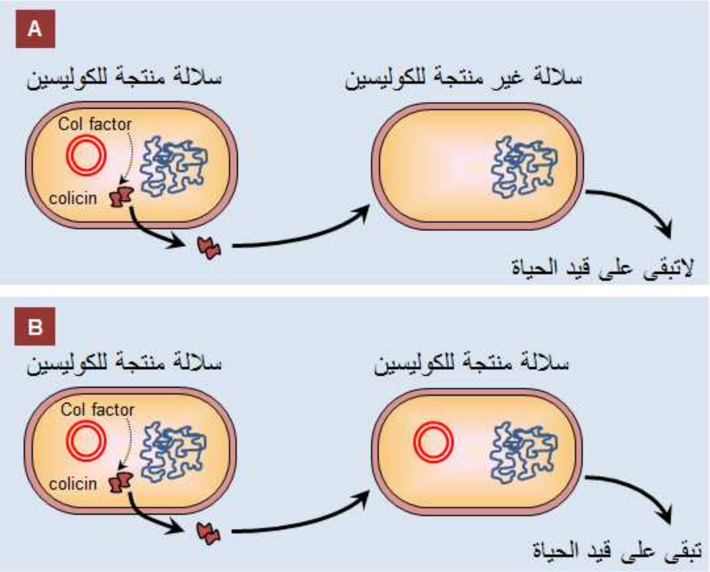
ثابت. توجد هذه الجزيئات في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام بالإضافة إلى بعض الخمائر والفطريات. معظم البلازميدات هي جزيئات DNA مزدوجة الشريط دائرية مغلقة تساهمياً covalently closed circular double stranded DNA molecules (شكل 2.9).



شكل (2.9):(A) كروموسوم بكتيري (الدائرة الكبيرة مع (B) بلازميده (الدائرة الصغيرة) كما يبدوان تحت المجهر الالكتروني (تصميم المؤلف)

توجد بعض البلازميدات بنسخة واحدة بالخلية، بينما توجد الأخرى بعدة نسخ. يدعى النوع الأول من السيطرة بنظام السيطرة مفرد النسخة single copy control: والذي يشبه الكروموسوم البكتيري ويتضاعف لمرة واحدة لكل جيل. إن بلازميد النسخة الواحدة single copy plasmid يحافظ وبكفاءة على تماثله مع الكروموسوم البكتيري. تسمح أنظمة السيطرة متعددة النسخ لعدة تضاعفات للجيل الواحد، وهذا ينتج في عدة نسخ للبلازميد لكل بكتريا. توجد البلازميدات متعددة النسخ multicopy plasmids بعدد ملحوظ (نموذجياً 10 إلى 20 نسخة) لكل كروموسوم بكتيري. ولابد من ملاحظة أن البلازميدات قليلة النسخ تقع تحت تنظيم أكثر تشددا لتضاعفها من تلك البلازميدات متعددة النسخ. تنتقل بعض البلازميدات والـ episomes بين الخلايا بواسطة عملية اقترانية conjugative process (والتي تتضمن اتصال مباشر بين الخلايا الواهبة donor cells والخلايا المستلمة recipient cells). إن خاصية عملية النقل في بعض الحالات يحدث فيها في بعض الأحيان أن تنتقل جينات العائل البكتيرية مع DNA البلازميد (أو DNA الـ episomes)، وهكذا تلعب هذه الأحداث دوراً رئيسياً في تبادل المادة الوراثية بين البكتريا. بشكل عام، تحمل البلازميدات الجينات التي هي ليست أساسية لوظيفة البكتريا ولكنها تلعب دور مهم في دورة الحياة ونمو العوائل البكتيرية. تسرع بعض البلازميدات عملية الجماع بين البكتريا، وتدعى بعوامل الخصوبة F factors (أنظر أدناه)، بينما تحمل الأخرى جينات تقتل بكتريا أخرى،

والتي تدعى بـ Col factors (تنتج بعض السلالات البكتيرية البكتريوسين bacteriocin والذي يمكن له أن يقتل السلالات المنافسة) (شكل 3.9).



شكل (3.9): إنتاج الـ colicin النادر الذي يسمم البيئة بالنسبة للخلايا الخالية من هكذا بلازميد. ولو أن تخليق وتحرر الـ colicin هو عملية مميتة حتماً (A)، ولكن الخلايا المحتوية على هكذا بلازميدات تكون منيعة للـ colicin الخارجي (B) (تصميم المؤلف).

إن البكتريوسين والذي يقتل سلالات بكتريا القولون يدعى بالكوليسين colicin، والذي ينتج فقط من قبل تلك السلالات التي تحمل بلازميدات متخصصة: تدعى هذه السلالات بالـ colicinogenic وتدعى البلازميدات بـ Col factors. ويمكن لبعض البلازميدات، كما في Col E1، أن تنتقل لخلايا عائلة أخرى وذلك عبر الاقتران conjugation.

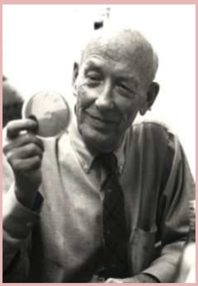
بعض البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية تحتوي على بلازميدات، تدعى بالـ R-factors، والتي تحمل جينات المقاومة لعدة مضادات حيوية كما في streptomycin والـ sulphonamide والـ tetracycline. إن واحدة من الصفات التي تجعل البلازميدات في طليعة علم الأحياء المجهرية هو قابليتها على حمل ونقل الجينات المشفرة إلى المقاومة للمركبات المضادة للأحياء المجهرية. ينتشر هذا النوع من البلازميدات في البكتريا ويمكن أن ينتقل بين أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية، وهذه هي الخاصية الوراثية التي تمثل مشكلة طبية خطيرة جداً في البشر والحيوانات. تدعى هذه البلازميدات بـ R plasmids، والتي تحتوي على العديد من الجينات والتي تشفر لمقاومة مدى واسع من المركبات المضادة للأحياء المجهرية، والتي تحتوي على المضادات الحيوية antibiotics، المعادن الثقيلة

heavy metals، المقاومة للعناصر المطفرة mutagenic agents كما في بروميد الاثيديوم. أما بالنسبة لتركيبها، فان R plasmids هي بلازميدات اقترانية حيث تقع جينات التضاعف والنقل في جزء معين منها، بينما تقع جينات المقاومة بجزء آخر (أنظر ملحق هذا الفصل). ان أهم مايذكر في المجال التطبيقي هو استخدام بعض البلازميدات وبشكل واسع في تجارب الهندسة الوراثية (أنظر الفصل الحادي عشر). على الرغم من احتواء بعض البلازميدات على مئات الآلاف من الأزواج القاعدية إلا أن معظم البلازميدات تكون دائرية الشكل وبطول عدة الآلاف من الأزواج القاعدية فقط. إن امتلاك البلازميدات لمنشأ التضاعف origin of replication جعلها قادرة على أن تتضاعف بشكل مستقل عن الكروموسومات البكتيرية (راجع الفصل الثالث).

أولاً: الاقتران conjugation

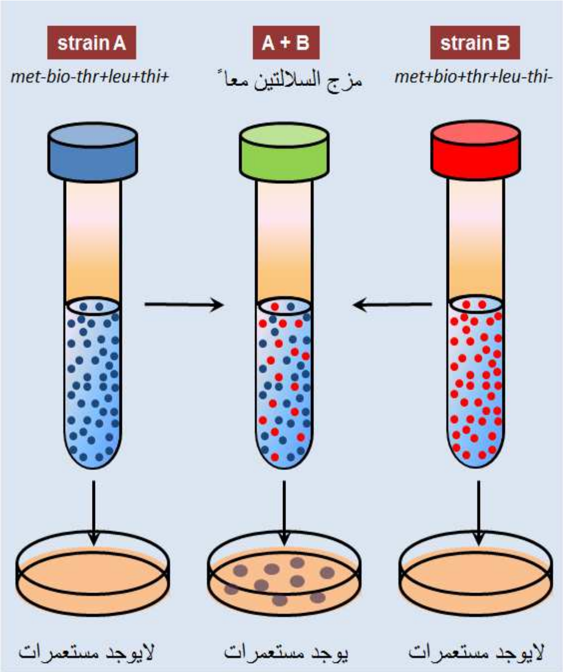
وهو نقل الـ DNA من الواهب إلى المستلم بواسطة الاتصال الفيزيائي المباشر بين الخلايا. في البكتريا هنالك نوعان من الجماع بين الواهب (الذكر) والمستلم (الأنثى)، كما أن اتجاه نقل المادة الوراثية هو اتجاه واحد فقط، وهو نقل الـ DNA من الواهب إلى المستلم. يختلف الاقتران عن التكاثر الجنسي في اعتبارين أساسيين: أولهما، المساهمة الوراثية من الآباء هي غير متساوية. ولهذا يشار إلى الآباء بالخلايا الواهبة donor cells والمستلمة recipient cells. أما الاعتبار الثاني، فهو أن النسل الناتج يشبه الخلية المستلمة فقط وليس الخلية الواهبة في معظم الصفات.

Joshua Lederberg



Edward Tatum

لقد أجابت التجربة المثيرة التي قام بها كل من Joshua Lederberg و Edward Tatum في عام 1946على التساؤل الذي يثار بين الفينة والأخرى في مصداقية احتواء البكتريا أي عملية تشبه التكاثر الجنسي من عدمه، حيث أكتشفا في بكتريا القولون عملية مشابهة للعملية الجنسية التقليدية. تتلخص التجربة ببساطة باستخدام سلالتين من بكتريا القولون يمتلك كل منهما طفرة غذائية (auxotrophic mutation) تختلف عن الأخرى. حيث يمكن للسلالة A أن تنمو فقط اذا كان الوسط مجهزاً بالمثيونين والبايوتين، بينما تنمو السلالة B فقط عندما يكون الوسط مجهزا بالثريونين والليوسين والثايمين. وعليه، تم تسمية السلالة A بـ (*met- bio-thr+ leu+ thi+*) والسلالة B بـ (*met+bio+thr-leu-thi-*). يوضح الشكل (4.9) تفاصيل تلك التجربة.

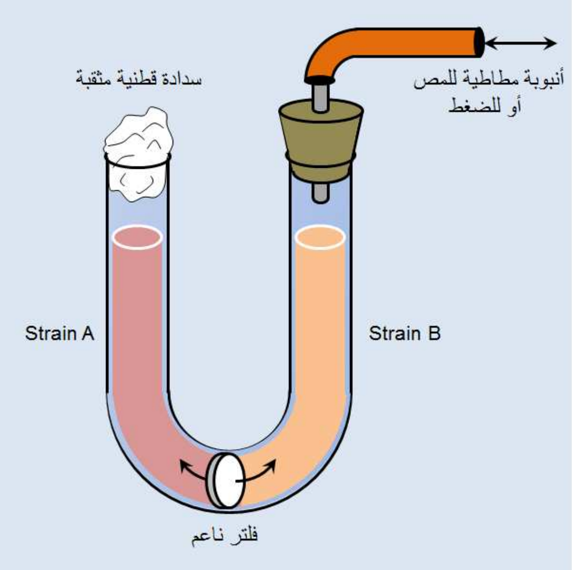


شكل (4.9): مخطط يوضح تجربة Lederberg و Tatum والتي استنتجوا فيها حدوث اعادة الارتباط الوراثي بين الخلايا البكتيرية. والتي فيها لا يمكن لخلايا النوع A أو B أن تنمو في وسط متطلبات النمو الدنيا، لأن كل من السلالة A و B تحمل طفرات تسبب عدم المقدرة في تخليق العناصر الضرورية لنمو الخلية. وعندما تخلط السلالة A و B لمدة ساعتين ثم تزرع بعد ذلك، لوحظ ظهور عدة مستعمرات على طبق الأكار. اشتقت هذه المستعمرات من خلية واحدة والتي حدث فيها تبادل في المادة الوراثية، وهي لهذا السبب قادرة على تخليق كل العناصر الضرورية للأيض (تصميم المؤلف).

تتلخص التجربة بخلط السلالة A والسلالة B مع بعضها البعض، ثم تحضن لفترة معينة، ثم تزرع على وسط ذو متطلبات نمو دنيا (minimum medium)، والذي لا تنمو فيه أي من السلالتين الطافرتين. لاحظ Lederberg و Tatum قدرة نسبة صغيرة (خلية من أصل عشرة ملايين) من تلك الخلايا على النمو، وتسمى تلك الخلايا بالـ prototrophs ، وهذا يدل على استعادتها للنوع البري الغير طافر من دون اضافة المغذيات المطلوبة. هذا ولم يلاحظ أي نمو يذكر سواء للسلالة A أو للسلالة B عند تنميتها بدون خلط مسبق مع بعضها البعض (شكل 2.10). استنتج Lederberg و Tatum الى حدوث شكل معين من اعادة الارتباط بين جينات السلالتين لتنتج خلايا الـ prototrophs.

1ثم لوحظ Bernard Davis ان السلالتين لاتتبادل الجينات مع بعضها البعض بالشكل الغير مباشر الذي تصوره Lederberg و Tatum ولكن، بدلاً من ذلك، لا حظ وجود مواد معينة ترتبط بها الخلايا هي التي تقوم بذلك. وقد أثبت ذلك بتصميمه انبوبا يشبه الحرف U وفيه ينفصل ذراعيه بواسطة مرشح دقيق. وتكون ثقوب ذلك المرشح صغيرة جداً ولا تسمح للبكتريا بالمرور خلالها، ولكنها كبيرة بما يكفي لتسمح بمرور أي مواد مذابة أصغر (شكل 5.9). تم وضع السلالة A في جهة، والسلالة B في جهة أخرى. وبعد حضن

السلالتين لفترة معينة، قاس Davis محتويات كل ذراع ليرى ان كان هنالك أي خلايا من نوع الـ prototrophs، ولكن لم يجد أياً منها. وهذا يعني ضرورة وجود اتصال فيزيائي بين السلالتين لتكوين خلايا الـ prototrophs. هذا وتم تأكيد هذا الاتحاد الفيزيائي المباشر في المجهر الالكتروني. أما الآن، تطور هذا المفهوم على المستوى الجزيئي، وأصبحت تسمى تلك العملية بالاقتران.



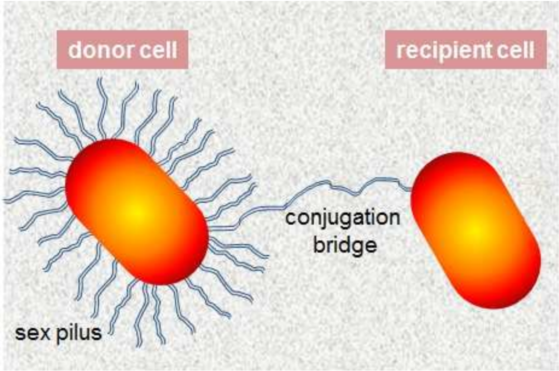
شكل (5.9): تجربة Davis في اثبات ضرورة الاتصال الفيزيائي المباشر بين الخلاي االبكتيرية لحدوث اعادة الارتباط الوراثي. السلالة البكتيرية A في أحد ذراعي أنبوب U، بينما السلالة البكتيرية B في ذراع أنبوب U الآخر. يمكن أن يعبر السائل بين ذراعي الأنبوب عند تليط ضغط أو بالمص، بينما لا يمكن للبكتريا أن تقوم بذلك من خلال هذا المرشح. وبعد الحضن والزرع، لم يتم الحصول على خلايا الـ prototrophs البرية على وسط متطلبات النمو الدنيا (تصميم المؤلف).

تتم عملية الاقتران البكتيري من قبل بلازميدات الخصوبة F plasmids، والتي هي مثال تقليدي للـ episomes، العنصر الذي ربما يوجد كبلازميد دائري حر، أو ذلك الذي ينحشر بالكروموسوم البكتيري كتسلسل خطي (كما في العاثي لامدا التحللي lysogenic bacteriophage). يمكن أن ينحشر العامل F في عدة مواقع في كروموسوم بكتريا القولون، وعندما يكون العامل (البلازميد) حراً، يتم المحافظة عليه بمستوى نسخة واحدة لكل كروموسوم بكتيري. وعندما يكون منحشراً، بالكروموسوم البكتيري، تتعرض جينات البلازميد إلى الكبح، ويتضاعف DNA العامل (F DNA) كجزء من الكروموسوم.

عند وجود بلازميد الخصوبة (F plasmid)، سواء كان حراً أو منحشراً، يمتلك عواقب مهمة لبكتريا العائل، إن البكتريا الحاوية على عامل الخصوبة F^+ تكون قادرة على أن تقترن (أو تتزاوج) مع البكتريا الفاقدة لهذا العامل -F. يتضمن الاقتران حدوث اتصال مباشر بين البكتريا المانحة (F^+) والبكتريا المستقبلة (F^-)، يتبع الاتصال انتقال العامل F. وإذا وجد العامل F كبلازميد حر في البكتريا الواهبة، حينها ينتقل كبلازميد، وتحول هذه

العملية الخلية المستقبلة الغير حاوية على عامل الخصوبةF^- bacterium إلى خلية مستقبلة حاوية على عامل الخصوبة bacterium F^+ .

هنالك منطقة كبيرة من بلازميد الخصوبة، والتي تدعى منطقة النقل transfer region، وتختصر بـ *tra* region والتي هي ضرورية لعملية الاقتران. تحتوي منطقة النقل هذه على 40 جين ضرورية لنقل الـ DNA. تمتلك البكتريا الحاوية على عامل الخصوبة لوازم سطحية تدعى بالأهلاب pili والتي هي مشفرة من قبل العامل F. وهنالك 12 جين من منطقة *tra* تتدخل في تحوير وتراكب الأهلاب التي تشبه الشعر بتركيبها. تبدأ عملية الاقتران بقمة تركيب الـ pilus والذي يلتصق بقمة سطح الخلية المستقبلة (شكل 6.9).



شكل (6.9):مخطط لعملية الاقتران البكتيري حسب معطيات المجهر الالكتروني (تصميم المؤلف)

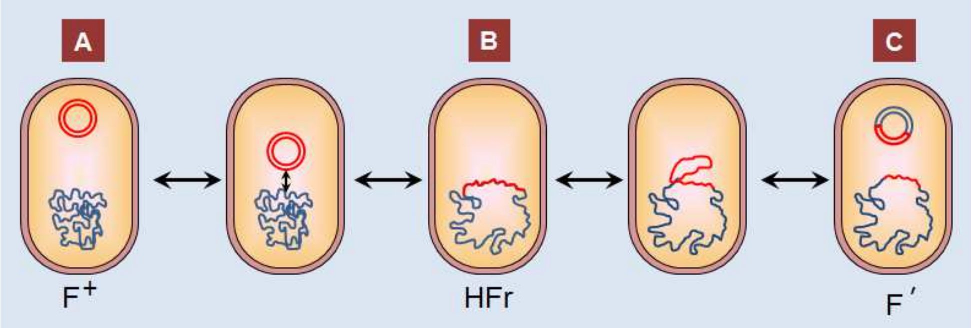
إن قابلية البكتريا على أن تكون واهب هو نتيجة لوجود قطعة DNA إضافية في الخلية تدعى بعامل الخصوبة أو F factor أو عامل الجنس sex factor. إن عامل الخصوبة هو قطعة دائرية من الـ DNA والتي يمكن أن تتضاعف بشكل ذاتي في الخلية، ولهذا تعتبر متضاعف مستقل independent replicon. يمتلك عامل الخصوبة عدة جينات والتي تكون ضرورية لتضاعفه ولقابليته على نقل الـ DNA إلى المستلم. أحد جينات عامل الخصوبة تشفر لقابليته على إنتاج الهلب الجنسي sex pilus أو هلب الخصوبة F pilus على سطح البكتريا. إن هذا الهلب مهم في عملية الاقتران. إن عامل الخصوبة هو ليس البلازميد الوحيد الذي يتوسط عملية الاقتران ولكنه يستخدم بشكل عام كنموذج لتوضيح هذه العملية. إن قابلية المستلم على أن يعمل كمستقبل للمعلومة الوراثية هو نتيجة لفقدانه لعامل الخصوبة.

هنالك ثلاث حالات فسلجية يمكن أن توجد فيها الخلية الواهبة، والتي لابد من التطرق لها لفهم تلك العملية من آلياتها المختلفة، وهي:

1. عامل الخصوبة المستقل (F^+) autonomous: في هذه الحالة يحمل عامل الخصوبة فقط تلك الجينات الضرورية لتضاعفه ولنقل الـ DNA. لا يوجد هنالك جينات كروموسومية مرتبطة مع عامل الخصوبة في سلالات F^+. وفي التضريب F^+ X F^- يتحول F^- إلى F^+ بينما F^+ تبقى F^+. وهكذا، يوصف عامل الخصوبة بالمعدي. بالإضافة إلى ذلك، هنالك فقط مستوى واطئ من النقل بين الجينات الكروموسومية.

2. عامل الخصوبة المندمج (Hfr) integrated: في هذه الحالة انحشر عامل الخصوبة في الكروموسوم البكتيري عبر عملية إعادة الارتباط كما هو موضح في الشكل 10.9 . وفي التضريب F^- X Hfr نادراً ما يتحول عامل الخصوبة إلى Hfr بينما يبقى Hfr على حاله. بالإضافة إلى ذلك، هنالك تردد عالي من النقل لجينات الكروموسومات الواهبة.

3. عامل الخصوبة المستقل مع الجينات الكروموسومية autonomous fertility factor with chromosomal genes (F') : يوصف عامل الخصوبة في هذه الحالة بالمستقل ولكنه يحمل بعض الجينات الكروموسومية. تنتج عوامل 'F عن طريق قص عامل الخصوبة F factor من بكتريا الـ Hfr كما هو موضح في الشكل (7.9). أحياناً، عندما يقص عامل الخصوبة من كروموسوم Hfr يمكن قص الجينات الواهبة الواقعة على كلا جانبي عامل الخصوبة مع عامل الخصوبة مولدة عامل الخصوبة المستقل مع الجينات الكروموسومية والمعروف بـ 'F. وفي التضريب من نوع F^- X 'F يتحول F^- إلى 'F بينما يبقى 'F على حاله. بالإضافة إلى ذلك، هنالك تردد عالي لنقل الجينات الكروموسومية الواهبة الأخرى.

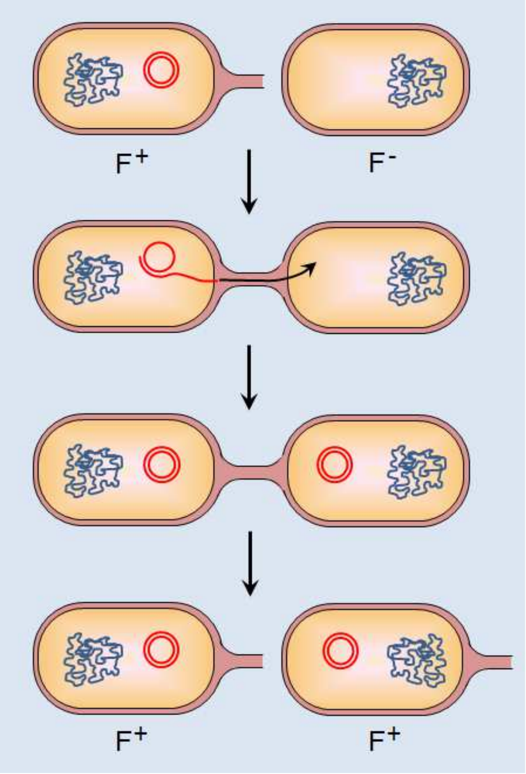


شكل (7.9): الحالات الفسيولوجية الثلاث لعوامل الخصوبة F، وهي (A) حالة F^+ الذاتي و (B) حالة Hfr المنحشر في الكروموسوم و (C) حالة 'F الذاتي الذي يحمل بعض الجينات الكروموسومية (تصميم المؤلف).

آليات الاقتران mechanisms of conjugation

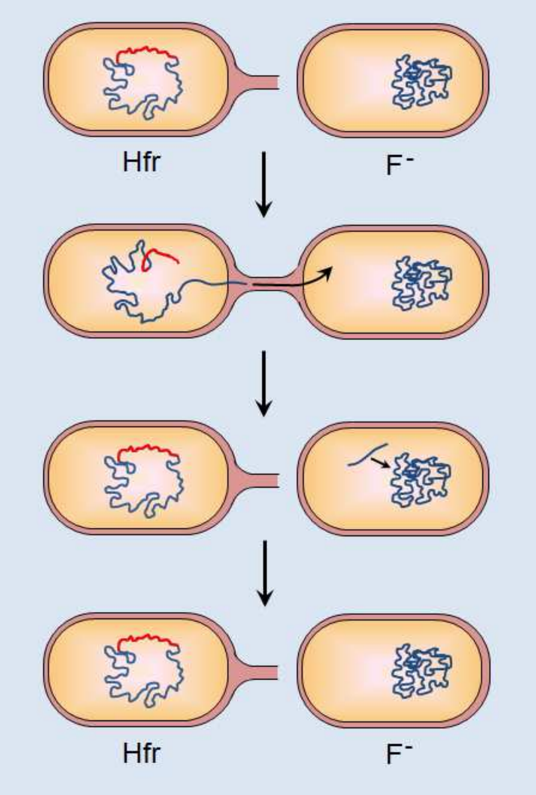
بما أن الخلية الواهبة يمكن لها أن توجد بثلاث حالات مختلفة، اذن هنالك ثلاث آليات مختلفة تحددها الخلية الواهبة على الخلية المستلمة، وهي كالآتي:

1. آلية تضريب نوع F^+ X F^- (شكل 8.9): وتتضمن خطوتين أولهما تكوين الهلب pilus formation حيث ترتبط قمة الهلب الجنسي مع المستلم ويتكون جسر الاقتران conjugation bridge بين الخلية الواهبة والمستلمة. يعتقد إن هذا الجسر هو الممر الذي يعبر من خلاله الـ DNA من الواهب إلى المستلم. وهكذا، يتم حماية الـ DNA من الإنزيمات الهاضمة للأحماض النووية الموجودة في البيئة. يمكن أن يحدث إعاقة في الاقتران حيث ينفصل زوج الجماع بواسطة قوى ميكانيكية. وهكذا تستمر عملية الاقتران إلى أن يتم تحطيم الاتصال بين الخلايا المقترنة. إن نقل الكروموسوم البكتيري كاملاً بواسطة عملية الاقتران يستغرق 100 دقيقة تقريباً، وتحت الظروف الاعتيادية ينكسر الاتصال قبل اكتمال النقل. وبالنتيجة، لا يبقى زوج الجماع مرتبطاً إلا لفترة قصيرة من الزمن. تتضمن الخطوة الثانية انتقال الـ DNA وفيها ينشق DNA البلازميد عند موقع متخصص يطلق عليه أصل النقل origin of transfer أو *ori*T، ثم يتضاعف بواسطة آلية الدائرة المتدحرجة rolling circle replication (راجع الفصل الثالث). يعبر شريط مفرد من الـ DNA من خلال جسر الاقتران ويدخل في الخلية المستلمة حيث يتضاعف الشريط الأول ليتكون شريطه الأخر المكمل له.



شكل (8.9): آلية تضريب نوع F^+ X F^- (تصميم المؤلف).

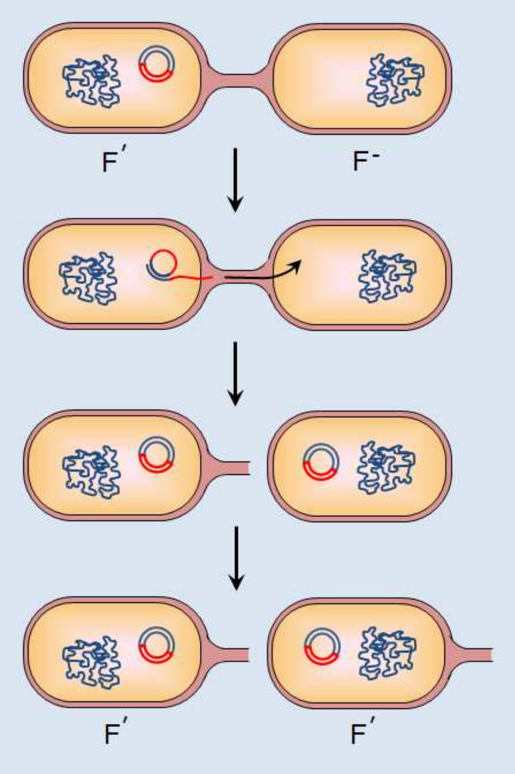
تفسر هذه العملية خواص التضريب من النوع $F^+ X F^-$. هنا يتحول المستلم إلى F^+ ، بينما يبقى الواهب F^+ وهنالك تردد واطئ من نقل جينات الكروموسومات الواهبة. وفي الحقيقة، كما هو مبين في أعلاه لا يوجد هنالك نقل لجينات الكروموسومات الواهبة. وفي الواقع العملي، هنالك مستوى قليل لنقل جينات الكروموسومات الواهبة في مثل هكذا حالات.



2. آلية تضريب نوع $Hfr X F^-$ (شكل 9.9): (يطلق على سلالة بكتريا القولون ذات عامل الخصوبة المنحشر التي توفر عمليات إعادة ارتباط وبتردد عالي بـ high frequency (Hfr) recombination): ويتضمن هذا النوع من التضريب ثلاث خطوات: أولها تكوين الهلب (أنظر أعلاه). ينتقل الـ DNA في الخطوة الثانية حيث ينشق الـ DNA عند أصل النقل ويتضاعف البلازميد بواسطة آلية الدائرة المتدحرجة. ولكن الـ DNA الذي ينتقل أولاً هو الكروموسوم. واعتماداً على الموقع والاتجاه الذي انحشر فيه عامل الخصوبة في الكروموسوم، تنتقل جينات كروموسومية مختلفة وبأوقات مختلفة. عموماً، يبقى نظام النقل والمسافات بين الجينات ثابتة.

شكل (9.9): آلية تضريب نوع $Hfr X F^-$(تصميم المؤلف).

الحالة الوحيدة التي ينتقل فيها عامل الخصوبة هي حالة انتقال الكروموسوم البكتيري بأكمله. وبهذا، لا تأخذ الخلية المستلمة عامل الخصوبة F factor في حالة حدوث التضريب من نوع $Hfr X F^-$. أما الخطوة الثالثة، فهي إعادة الارتباط المتماثل، وفيها تحدث عملية إعادة الارتباط بين الـ DNA المنقول والكروموسوم والتي تنتج في تبادل المادة الوراثية بين الواهب والمستلم. تفسّر هذه الآلية المواصفات التي يتمتع بها التضريب من نوع $Hfr X F^-$ ، حيث تبقى الخلية المستلمة كما هي F^- ، ويبقى الواهب Hfr ويوجد هنالك تردد عالي للنقل لجينات الكروموسومات الواهبة.



3. آلية تضريب نوع $F' \times F^-$ (شكل 10.9): ويتضمن ثلاث خطوات: أولها تكوين الهلب. الخطوة الثانية هي انتقال الـ DNA وهي مشابهة للتضريب من نوع $F^+ \times F^-$. وعلى أية حال، بما أن عامل الخصوبة نوع F' محمّل ببعض الجينات الكروموسومية فان الأخيرة سوف تنتقل معه. أما الخطوة الثالثة وهي عملية إعادة الارتباط المتماثل فهي غير ضرورية على الرغم من إمكانية حدوثها. تفسّر هذه الآلية المواصفات التي تميز التضريب من نوع F' X F-، حيث يتحول F^- إلى F' ويبقى F' على حاله دون تغيير، كما أن هنالك تردد عالي لنقل جينات كروموسومية واهبة أخرى.

شكل (10.9): آلية تضريب نوع $F' \times F^-$ (تصميم المؤلف).

أهمية الاقتران

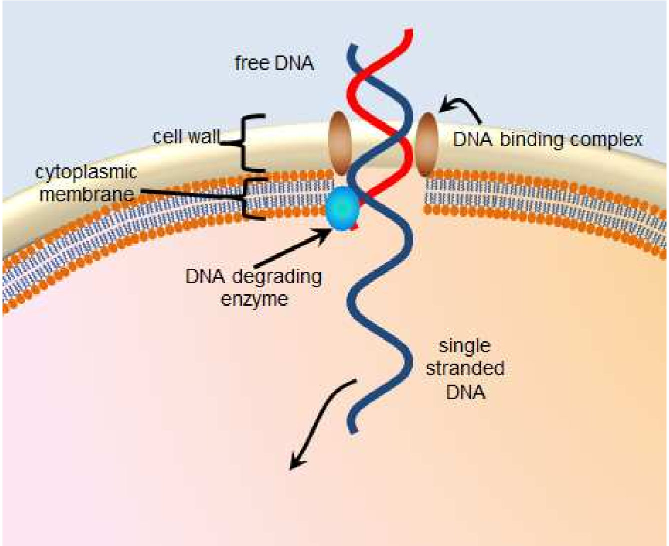
تعد طريقة الاقتران هي الطريقة الأساسية لنقل الجينات بين البكتريا السالبة لصبغة غرام. يمكن أن يحدث النقل بين أنواع مختلفة من البكتريا.

إن نقل عدة مقاومات للمضادات الحيوية يمكن أن يتم بواسطة عملية الاقتران والتي قد أصبحت مشكلة أساسية في علاج أمراض بكتيرية معينة. وبما إن الخلية المستلمة أصبحت واهبة بعد انتقال البلازميد فمن السهولة رؤية سبب تحول المستعمرة الحساسة إلى مقاومة بعد انتقال الجين المقاوم للمضاد الحيوي على البلازميد إليها.

ثانياً: التحول transformation

Frederick Griffith

التحول هو النقل الجيني الناتج من أخذ الـ DNA العاري من قبل الخلية المستلمة. يمكن لبعض البكتريا أن تستلم قطع من الـ DNA من الوسط الخارجي. ويمكن أن يكون مصدر هذا الـ DNA خلايا أخرى من نفس النوع أو من أنواع أخرى. وفي بعض الحالات، يمكن للـ DNA أن يتحرر من الخلايا الميتة. وعلى أية حال، يمكن للـ DNA المستلم أن ينحشر في كروموسوم الخلية المستلمة. واذا كان هذا الـ DNA يعود الى طراز جيني مختلف عن الخلية المستلمة، فيمكن للطراز الجيني للخلية المستلمة أن يتحول بشكل دائم في عملية التحول (transformation). وكما بينا سابقاً (راجع الفصل الأول)، استطاع العالم Frederick Griffith اكتشاف تلك العملية في بكتريا *Streptococcus pneumonia* عام 1928. ومن الجدير بالذكر هنا، ان الطريقة التي ينحشر فيها الـ DNA بالكروموسوم البكتيري في عملية التحول هي مماثلة لتضريب من نوع -Hfr X F. ولكن في الاقتران، ينتقل الـ DNA من خلية حية الى أخرى من خلال الاتصال المباشر، بينما في التحول، يتم استلام قطع DNA خارجية معزولة من خلال الجدار الخلوي والغشاء البلازمي. يوضح الشكل (11.9) طريقة عامة لكيفية حدوث هذه العملية.



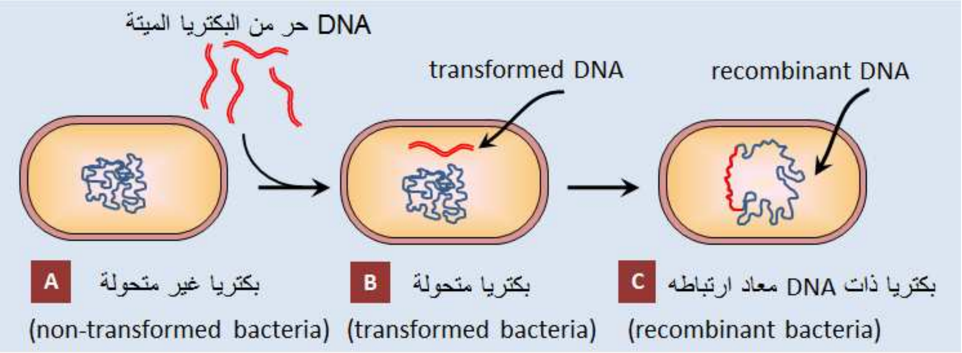
شكل (11.9): كيفية حدوث التحول في البكتريا الموجبة لصبغة غرام. وفيه مخطط لكيفية التقاط الـ DNA الحر المتحرر من الخلايا البكتيرية الميتة. وفي الوقت الذي تقوم به المعقدات المرتبطة بالـ DNA على سطح الخلية البكتيرية باستلام الـ DNA، تقوم انزيمات معينة بتقطيع شريط DNA مفرد الى نيوكليوتيدات، أما الشريط الآخر فيحتمل أن ينحشر بالكروموسوم البكتيري (تصميم المؤلف).

هنالك عاملين أساسيين يؤثران على التحول: العامل الأول هو حجم الـ DNA وحالته، حيث أن حجم حلزون الـ DNA المزدوج المثالي لإجراء عملية التحول هو 5×10^5 دالتون، ويجب أن يمتلك هذا الـ DNA الغريب مواصفات معينة لكي ينحشر في كروموسوم العائل (أنظر ملحق هذا الفصل). كما يوصف التحول بحساسيته للإنزيمات الهاضمة للأحماض النووية nucleases في البيئة. يتمثل العامل الثاني بكفاءة الخلية المستلمة أو بجهوزية الخلية المستلمة لإجراء التحول. تتميز بعض البكتريا بقدرتها على أخذ الـ DNA بصورة طبيعية. وعلى أية حال، تأخذ هذه البكتريا الـ DNA فقط في وقت محدد في دورة نموها، يتمثل هذا الوقت بقدرتها على إنتاج بروتين يطلق عليه بعامل الكفاءة competence factor. وعند تلك المرحلة، يمكن أن يطلق على تلك البكتيريا وصف "كفوءة". إن أنواع بكتيرية أخرى لا يمكن لها أن تأخذ الـ DNA بشكل طبيعي. وعلى أية حال، في تلك البكتريا يمكن استحثاث البكتريا خارج جسم الكائن الحي بواسطة بعض المواد الكيميائية (كما في كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$).

آلية التحول

بشكل عام، يمكن اختصار خطوات التحول البكتيري بخطوتين، الأولى استلام الـ DNA الغريب والثانية انحشاره في كروموسوم الخلية المستلمة (شكل 12.9).

1. أخذ الدنا DNA uptake: يختلف أخذ الـ DNA من قبل البكتريا الموجبة لصبغة غرام Gram positive bacteria عن تلك البكتريا السالبة للصبغة Gram negative bacteria. يؤخذ الـ DNA في البكتريا الموجبة لصبغة غرام بشكل جزيئة مفردة الشريط بينما يصنّع شريطه المكمل في خلية المستلم. وبالتناقض، تأخذ البكتريا السالبة لصبغة غرام جزيئة الـ DNA بشكل مزدوج الشريط.



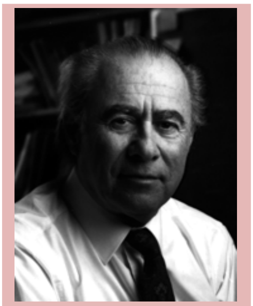
شكل (12.9): عملية التحول: تأخذ البكتريا تحت الظروف الملائمة قطعاً من الـ DNA العاري من البيئة الخارجية. وربما تعبر قطعة الـ DNA خلال أغلفة الخلية الخارجية بدون مساعدة بروتينية أو فايروسية. وحال دخول تلك القطعة في الخلية البكتيرية، يجب أن يحدث اعادة ارتباط بينها وبين الكروموسوم لمنع تحطمها بالانزيمات المحطمة الخارجية والداخلية (تصميم المؤلف).

2. إعادة الارتباط المتماثل homologous recombination: بعد أخذ الـ DNA، تحدث عملية إعادة الارتباط المتبادل reciprocal recombination بين الكروموسوم والـ DNA الواهب. تحتاج عملية إعادة الارتباط هذه إلى وجود مناطق متماثلة بين الـ DNA الواهب والكروموسوم وتنتج في استبدال الـ DNA بين الواهب والمستلم كما هو في الشكل (12.9). ويمكن أن ينتقل بنجاح فقط الـ DNA بين الخلايا البكتيرية ذات الصلة القريبة جداً من بعضها، بسبب وجود مناطق التماثل بين التسلسلات الواهبة والتسلسلات المستلمة.

أهمية التحول

بين الباحثون بأن لعملية التحول أهمية تتمثل بزيادة الضراوة. وقد استخدمت عملية التحول كأداة أساسية في العديد من الأبحاث البكتيرية بسبب امكانية تحول الطراز الوراثي للسلالة البكتيرية بشكل متعمد وبشكل متخصص جداً عن طريق التحول. وعلى سبيل المثال، استخدم الباحثون التحول بشكل واسع في تجارب الهندسة الوراثية وفي عمليات كلونة الجينات منذ مراحلها التطورية الأولى (أنظر الفصل الحادي عشر).

ثالثاً: النقل transduction



Norton Zinder

أن النقل أو الـ transduction هو انتقال المعلومات الوراثية من البكتريا الواهبة إلى البكتريا المستلمة بواسطة العاثيات البكتيرية، حيث تمثل العاثيات البكتيرية نواقل للمادة الوراثية في هذه العملية. يقوم غلاف العاثي بحماية العاثي البكتيري من الظروف القاسية المتواجدة في المحيط الخارجي، وبهذا، يختلف النقل transduction عن التحول transformation في أن الأول لا يتأثر بالإنزيمات الهاضمة للأحماض النووية nucleases. في عام 1951، استطاع Jashua Lederberg و Norton Zinder من اكتشاف عملية النقل من خلال دراستهما لعملية اعادة الارتباط في بكتريا *Salmonella typhimurium* وأيضا قاموا باستخدام نفس الأسلوب المتبع في اكتشاف ظاهرة الاقتران، حيث استخدما سلالتين طافرتين غذائياً لاينمو كل من السلالتين عند تنميته في وسط متطلبات التغذية الدنيا، وعند خلط السلالتين معاً ظهرت سلالة الـ prototroph البرية بنسبة خلية واحدة الى عشرة الآلاف (لحد الآن هذه الطريقة مشابهة تماماً لتجربة الاقتران الجارية في بكتريا القولون). بعد ذلك، قاما بتنمية السلالتين بنفس الأسلوب الذي عمله Davis في تجربته التي أثبت حدوث الاقتران فيها (تجربة U tube)، ولكن حدثت المفاجئة هنا حيث على الرغم من فصل كل من السلالتين بنفس الراشح الذي

استعمله Davis في أنبوب U، الا انه تكونت خلايا الـ prototroph البرية. وهذا يعني عدم حصول اقتران بين السلالتين. وبتحوير حجم ثقوب ذلك الأنبوب وجد Lederberg و Zinder العامل المسؤول عن الانتقال الجيني هو بنفس حجم العاثي P22 الذي يصيب بكتريا السالمونيلا. وتم تأكيد هذا الاستنتاج بعد عدة تجارب مناعية. وبهذا يعد Lederberg و Zinder أول من وصف تلك العملية بالنقل (transduction). وقبل التطرق في تفاصيل آليات النقل لابد لنا من معرفة بعض المصطلحات المهمة في وراثة العاثيات البكتيرية (bacteriophages genetics).يطلق مصطلح عاثي بكتيري (bacteriophage) على الفايروسات التي تصاب بها البكتريا حصراً. وتسلك العاثيات البكتيرية عند اصابتها للبكتريا العائل سلوكين، فأما أن تقوم بالتضاعف وقتل وتحليل خلية المضيف والتحرر بعد فترة وجيزة ويطلق عليها في هنا بالعاثيات الضارية (virulent phages)، أو أنها تنحشر في الكروموسوم البكتيري بواسطة اعادة الارتباط المتخصص (راجع الفصل السابع) لمدة معينة بدون قتل العائل ليطلق عليها بالعاثيات الغير ضارية (non-virulent phages) أو بالعاثيات المؤثثة (temperate phages). ويطلق على العاثي المنحشر بالكروموسوم البكتيري بالعاثي الأولي (prophages) وذلك لأنه يتصرف وكأنه فرد من العائلة الكروموسومية. ويطلق على البكتريا الحاوية على تلك العاثيات الكامنة بالمتحلحلة (lysogenic) وذلك لأن العاثي تحت الظروف الملائمة ربما يتحرر من الكروموسوم البكتيري وتتحول الخلية الى المرحلة الحالة (lytic). ويمكن حث تحول الخلية البكتيرية من المتحلحلة الى الحالة أما بواسطة الأشعة الفوق بنفسجية أو الأشعة السينية أو عن طريق بعض المواد الكيميائية.

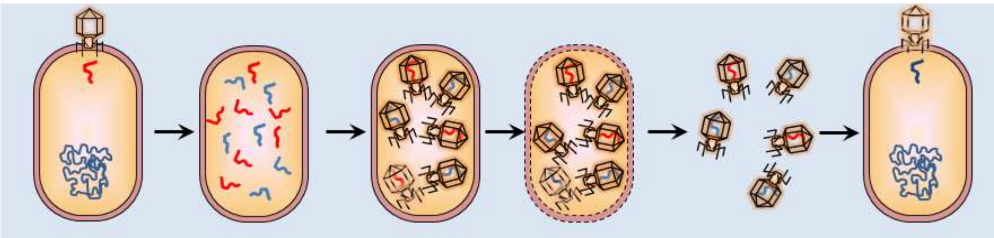
آليات النقل transduction mechanisms

إن قدرة العاثي على أن يتوسط عملية النقل تتعلق بدورة حياة العاثي. وهذا ينعكس بطبيعة الحال على الآلية التي من خلالها يمكن لهذا العاثي نقل المادة الوراثية.

1. النقل العمومي generalized transduction: وهو النقل الذي بواسطته يحتمل أن ينتقل "أي جين" من الواهب إلى المستلم عن طريق بعض العاثيات البكتيرية. يحتاج هذا النوع من النقل الى عاثيات ضارية تحلل خلايا المضيف. إن آلية النقل العمومي مبينة في الشكل (13.9).

اثناء تضاعف تلك العاثيات، عادة ما يتعرض الـ DNA الى التحطم الى قطع أصغر. تتعبئ بعض من تلك القطع الكروموسومية أحياناً إلى رأس العاثي بدلاً من جينات العاثي نفسه بآلية تعرف "بآلية الرأس الممتلىء head-full mechanism". أحياناً، تعبئ أحد قطع DNA العائل عشوائياً في غلاف العاثي. وبهذه الطريقة، يمكن لأي جين واهب من أن ينتقل ولكن على شرط أن يشكل ما يكفي من الـ DNA ليلائم رأس العاثي. إذا تعرضت

الخلايا المستقبلة للخمج من قبل العاثيات التي تحتوي على الـ DNA الواهب، يمكن للـ DNA الواهب أن يدخل إلى الخلايا المستلمة. وفي داخل تلك الخلايا، يمكن لعملية إعادة الارتباط المتماثل أن تحدث والتي تستبدل الـ DNA الواهب بالـ DNA المستقبل (أنظر الشكل 13.9).

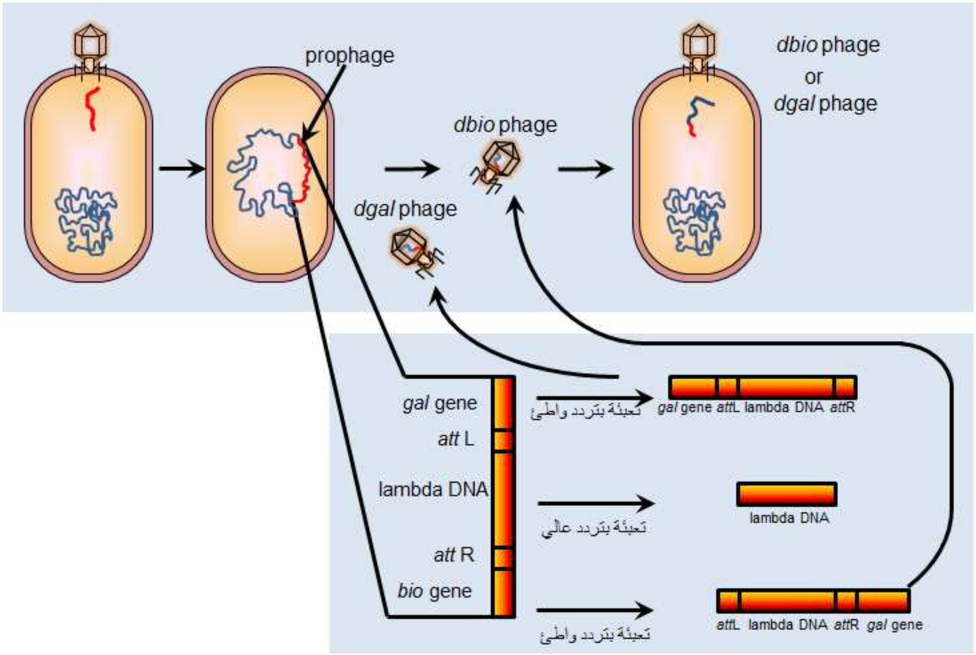


شكل (13.9): آلية النقل العمومي للجينات البكتيرية بواسطة العاثي (تصميم المؤلف).

وبهذه الطريقة، يخمج العاثي الذي يحمل الـ DNA البكتري خلية بكتيرية أخرى. ويمكن لهذا الـ DNA البكتيري أن ينحشر في كروموسوم الخلية المستلمة بواسطة اعادة الارتباط المتماثل. تعتمد عدة عاثيات هذه الآلية في النقل ولكن العاثي P22 يعد مثالاً نموذجياً لهذه الآلية. ولعل الذي يتتبع كيفية حدوث النقل العمومي لابد له من أن يدرك أن تلك العملية نادرة الحصول لأنها تستوجب توفر ثلاث شروط في العاثي لكي يكون قادراً على ذلك وهي: أن يكون له المقدرة على تحطيم كروموسوم المضيف، وأن لا تحدث آلية دقيقة لتعبئة كل الـ DNA التابع له في رأس العاثي وذلك لاستيعاب الـ DNA العائل، وأن تكون الجينات المنقولة من قبل العاثي قادرة على اعادة الارتباط مع كروموسوم الخلية المستقبلة.

2. النقل الخصوصي specialized transduction: النقل الخصوصي هو عملية النقل والتي بواسطتها يمكن "للجينات المتاخمة لانحشار العاثي فقط" أن تنتقل إلى الخلايا المستلمة. يحتاج هذا النوع من النقل الى عاثيات غير ضارية أو مؤقتة تندمج في كروموسوم المضيف. أن الجينات التي تنتقل تعتمد على أين يحشر العاثي الأولي (prophage) نفسه في الكروموسوم، ولكن تعد آلية النقل الخصوصي الموضحة في الشكل (14.9) في العاثي لامدا مثالاً نموذجياً لهذه الآلية. تحدث هذه الحالة أحياناً عندما يروم العاثي قص نفسه ليخرج من الكروموسوم البكتيري حينما يتنشط، حيث يحدث أحياناً قص غير طبيعي في الكروموسوم البكتيري. وهذا ينتج في أن العاثي الناتج يحمل الجينات المتاخمة له ويترك بعض جيناته بسبب استيعابه المحدود للمادة الوراثية. يؤدي ذلك الى انتاج عاثي معاب (defective phage) بسبب تركه لبعض الجينات خلفه في كروموسوم العائل. ولكنه في نفس الوقت قد اكتسب جينات بكتيرية كما في الجين *gal* أو *bio*. تدعى هذه العاثيات بالـ *dgal* phages أو بالـ *dbio* phages. ويمكن لهذا الـ DNA الغير طبيعي الحامل للجينات المتاخمة من أن

يتعبأ برأس العاثي وأن يخمج خلايا بكترية أخرى. وبهذه الطريقة، يمكن أن تنتقل جينات الخلية الواهبة الى الخلية المستلمة. كما يمكن أن تحصل عملية إعادة الارتباط المتماثل بين الجينات الواهبة والمستلمة.



شكل (14.9): آلية النقل المتخصص: عندما يدخل العاثي لامدا في الدورة التحللية ويكون دقائق العاثي، يقوم بتعبئة الـ DNA خاصته (lambda DNA) بين موقعي ارتباطه الأيسر (*att*R) والأيمين (*att*L). أحياناً يحدث خطأ ، ويتعبأ جزء من DNA الكروموسوم البكتيري. وبما أن العاثي لامدا ينحشر بين جيني gal و bio لكروموسوم بكتريا القولون، فغالباً ما يحتوي رأس العاثي المعاب على احدى الجينين (تصميم المؤلف).

أهمية النقل

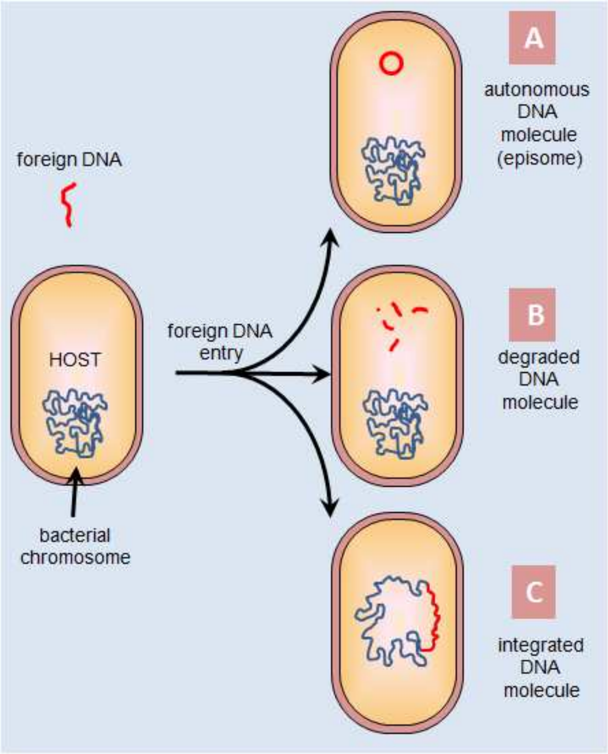
لعملية النقل أهمية ملموسة تتمثل بحصول تحول للعاثيات المتحلحلة في الطبيعة كما أنها تعتبر مصدراً للسلالات البكتيرية الضارية. تستخدم العاثيات في تجارب الهندسة الوراثية كنواقل حيث يحشر فيها الـ DNA الغريب المعزول من أي كائن (أنظر الفصل الحادي عشر). هذا وقد استغلت قدرة العاثيات على حمل قطع صغيرة من الـ DNA واستخدمت كأداة طيعة في معرفة خرائط الجينات البكتيرية وفي معرفة تسلسل الواسمات البكتيرية.

ملحق الفصل التاسع

مصير الـ DNA الغريب في النظام البكتيري

بصرف النظر عن الآلية التي يسلكها الـ DNA في دخوله الى الخلية البكتيرية، فان له ثلاث احتمالات مختلفة. حيث يمكن أن يبقى كجزيئة DNA مستقلة، أو يمكن أن يتحطم بشكل كامل، أو يبقى جزء منه بعد انحشاره أو بواسطة اعادة ارتباطه من كروموسم العائل قبل أن تتحطم بقية أجزاءه (شكل 15.9). ولكي يبقى الـ DNA القادم داخل الخلية البكتيرية كجزيئة DNA ذات تضاعف ذاتي، فانه يجب أن يكون جزيئة قادرة على التضاعف الذاتي (replicon)، وبمعنى آخر، يجب أن يمتلك أصل التضاعف ويجب أن يفتقد للنهايات المكشوفة، أي يجب أن تكون الجزيئة دائرية عادة في معظم الأنواع البكتيرية. كما في البلازميد والذي يمتلك أصل التضاعف بالاضافة الى شكله الدائري، ومن هنا، تعد عملية اعادة الارتباط غير ضرورية لبقاء البلازميد. ولهذا، استغلت هذه الظاهرة في تجارب الهندسة الوراثية حيث يتم حشر الجين المرغوب في جزيئة البلازميد (أنظر الفصل الحادي عشر).

أما ان لم تكن تمتلك تلك الخواص كأن تكون خطية الشكل فانها عادة ما تتحطم عن طريق الانزيمات المحطمة الخارجية exonucleases والتي تهاجم النهايات المكشوفة. لذا، يجب عليها كي تبقى أن تنحشر في كروموسوم الخلية المستقبلة بواسطة اعادة الارتباط (أنظر الفصل التاسع). ولكي تحصل عملية اعادة الارتباط، يجب أن يكون يحتوي الـ DNA الغريب مناطق متماثلة التسلسل مع كروموسوم الخلية البكتيرية المستقبلة لكي تتعابر معها. وبالنتيجة، تنحشر الجينات القادمة من الـ DNA الغريب وتحل محل الجينات الأصلية للخلية المستقبلة. لكن لا تحصل عملية اعادة الارتباط المتماثل الا بين جزيئات الـ DNA قريبة الصلة من بعضها البعض، كما في الـ DNA لسلالتين مختلفتين يعودان لنوع بكتيري واحد. ويمكن للـ DNA بعيد الصلة أن ينحشر أيضاً بواسطة اعادة الارتباط ان كان محاطاً بتسلسلات ذات صلة بالخلية المستلمة. أما اذا احتوى الـ DNA الغريب على عناصر قفازة، يمكن لها أن تتركه وتقفز في كروموسوم العائل الجديد.



شكل (15.9). المصير الذي تواجهه جزيئات الـ DNA الغريبة بعد دخولها في الخلايا البكتيرية. ففي الحالة (A) يتصرف الـ DNA الغريب بشكل مستقل بسبب عدم احتوائه على النهايات الحرة الموجودة في الجزئات الخطية. أو في الحالة (B) يتحطم الـ DNA الغريب من قبل الانزيمات الهاضمة، أو في الحالة (c) ينحشر الـ DNA الغريب في كروموسوم العائل بواسطة عملية اعادة الارتباط المتماثل.

بالاضافة الى الهجوم الذي تشنه الانزيمات الهاضمة الخارجية والذي تتعرض له جزيئة الـ DNA الغريبة، فانها تعد عرضة أيضاً للتقطيع من قبل صنف آخر من الانزيمات الهاضمة وهي انزيمات الهضم الداخلية وتدعى بالانزيمات القاطعة (أنظر الفصل الحادي عشر). صمم الباري جل وعلا تلك الآلية الوقائية لتحطيم جزيئة الـ DNA الغريبة القادمة. تقوم البكتريا بتلك العمليات الصارمة وذلك لافتراضها المسبق أن كل DNA غريب هو DNA عائد لعدو ما، كما في الفايروسات مثلاً، لذا، يجب أن يتم تقطيعه الى أجزاء صغيرة بتلك الانزيمات القاطعة. ولكن يمكن لبعض العاثيات أن تنجو من هذا العمل الصارم وذلك عن طريق ميثلة (methylation) تسلسلاتها المستقبلة، لذا، تتقبلها البكتريا وتعتبرها كجزء لا يتجزء من مادتها الوراثية. وقد استغلت هذه الظاهرة في الهندسة الوراثية أيضاً في حماية الـ DNA الغريب بعد ادخاله الى خلية المضيف. يتضح لنا هنا، أن دراسة الأحياء المجهرية، وبالأخص تتبع مصير الـ DNA الغريب الداخل بواسطة عمليات الاقتران أو التحول أو النقل قد قدم خدمة كبيرة في وضع الأعمدة الأساسية لتجارب كلونة الجين كما سيتضح لنا ذلك في الفصل القادم.

أسئلة الفصل التاسع

السؤال الأول: علل ما يلي

يكون نقل المادة الوراثية في البكتريا ذو اتجاه واحد فقط؟
بدلاً من أن يطلق على خليتين بكتيريتين مقترنتين بالذكر والأنثى يطلق عليهما بالواهب والمستلم؟
لا يمكن (عملياً) نقل الكروموسوم كاملاً أثناء عملية الاقتران البكتيري؟
أحياناً عند تناول المريض للمضاد الحيوي، لا يؤدي هذا المضاد دوره المانط به في قتل البكتريا الحساسة له؟
يطلق على البكتريا الحاوية على العاثيات الكامنة بالبكتريا المتحللة (lysogenic)؟
يمكن لأي جين أن ينتقل عبر النقل العمومي ولكن لا يمكن الا لجينات محدودة من أن تنتقل عبر النقل الخصوصي؟
تنجح بعض العثيات البكتيرية في خمج بعض الأنواع البكتيرية على الرغم من المعاملة الصارمة التي تتلقاها العاثيات أو أي قوة غازية أخرى من قبل البكتريا؟
قد ينجح الـ DNA الغريب بعد دخوله الخلية البكترية في الانحشار في الكروموسوم على الرغم من عدم امتلاكه أي تسلسل متماثل مع ذلك الكروموسوم؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

عندما يحصل اتصال مباشر، يتم حماية الـ DNA المنتقل من الخلية الواهبة الى المستلمة عن طريق ....
a. DNA binding proteins b. conjugation bridge c. cell membrane of competent cells d. cell wall of competent cells
تعتبر طريقة .... أحد الوسائل التي تتمكن من خلالها البكتريا بتنويع محتواها الوراثي.
a. horizontal gene transfer b. vertical gene transfer c. only "a" and "b" d. cell division
عند حصول الاقتران، ينتقل بلازميد الخصوبة بواسطة آلية التضاعفية................... من الخلية الواهبة الى الخلية المستلمة.
a. unidirectional theta b. bidirectional theta c. rolling circle d. D loop
يمكن للخلية البكتيرية أن تستلم DNA متحرر من خلايا ميتة وذلك في عملية تدعى بالـ ....
a. transformation b. conjugation c. transduction d. non
يطلق على العاثي المنحشر بالكروموسوم البكتيري بـ .... وذلك لأنه يتصرف وكأنه فرد من العائلة الكروموسومية.
a. virulent phage b. non-virulent phage c. temperate phage d. prophage
عندما تدخل جزيئة DNA دائري حاوية على منشأ التضاعف، فانها .... بواسطة الخلية البكترية عادة.
a. treated like episome b. degraded by exonuclease c. degraded by restriction enzyme d. only "b" and "c"
ان الطريقة التي ينحشر فيها الـ DNA بالكروموسوم البكتيري في عملية التحول هي مماثلة لتضريب من نوع ....
a. $F^+ X F^-$ b. $Hfr X F^-$ c. $F' X F^-$ d. non
يطلق على الخلايا البكتيرية التي لها القدرة على استلام الـ DNA الغريب بالـ ....
a. natural cells b. comptenet cells c. transformed cells d. transfected cells
عندما تتعرض البكتريا الى عملية النقل العمومي من قبل عاث ما، لابد لها أن تسلك مسلك الـ ....
a. only lytic b. only lysogenic c. both lytic and lysogenic d. non

السؤال الثالث: عرف ما يلي

prototrophs, episome, *tra* region, pili, Hfr, F′, *ori*T, full head mechanism, *dbio* phage

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

F^+ X F^-	Bacteiophage
HfrX F^-	Direct cell contact
F' X F^-	F^- converted to F′
Generalized transduction	High frequency transfer of chromosomes
Specialized transduction	Error during excision
Transformation	Error during packaging
Conjugation	F^- converted to F^+
Transduction	Naked DNA transfer

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell.Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.

Clark D. Molecular biology: understanding the genetics revolution. Elsevier, 2010.

Griffiths A., Wessler S., Lewontin R., Gelbart W., Suzuki D., Miller J. An Introduction to Genetic Analysis. Eighth edition, 2004.

Guttman B., Griffiths A., Suzuki D., Cullis T. Genetics: a beginner guide. Oneworld Oxford, 2004.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166:** 557- 580.

Kayser F., Bienz K., Eckert J., Zinkernagel R. Medical microbiology. 2005, Thieme.

Kresina T., F. (2001). An introduction to molecular medicine and gene therapy. *Wiley-Liss, Inc.*

Miller, R. V. 1998. Bacterial gene swapping in nature.*Scientific American* 278(1):66–71.

Murray et al. medical Microbiology. Third edition, 2005.

Novick, R. P. 1980. Plasmids. *Scientific American* 243(6):103–124.

Pace, N. R. 1997.A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734–740.

Passarge E. Color atlas of Genetics .Second edition, Thieme, 2007.

Pierce B. Genetics: A conceptual approach. 2002

Syvanen M., Kado C. Horizontal gene transfer. Second edition, AP academic press, 2002.

Summers D. The biology of Plasmid. Blackwell science, 1996.

Talaro, K. and Talaro, A. Foundation in microbiology. Fourth edition. The McGraw−Hill, 2002.

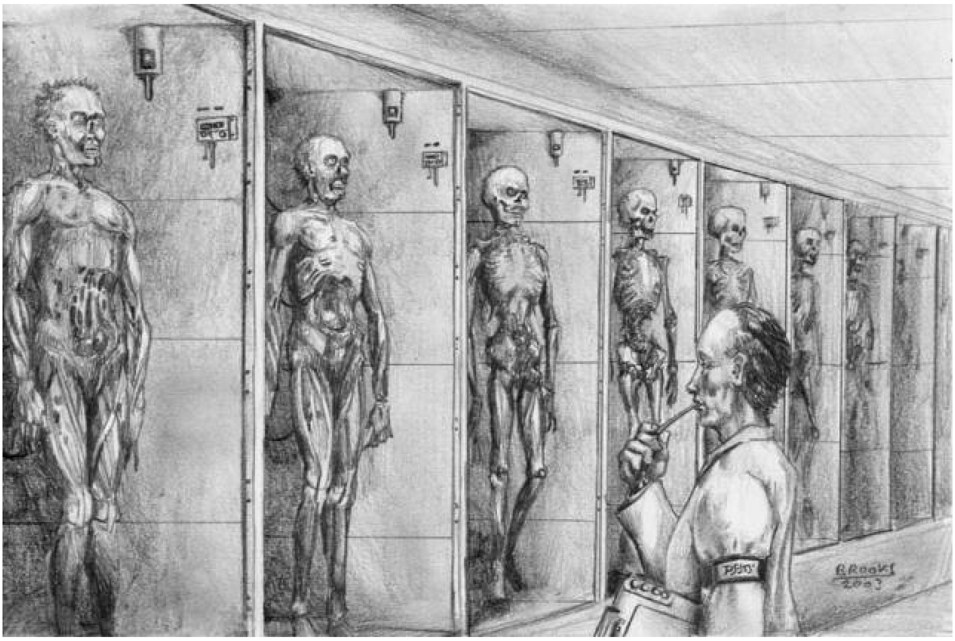
VermaP., and Agarwal V. molecular biology. First Edition Schand group, India (2004).

Wollman, E. L., F. Jacob, and W. Hayes. 1962. Conjugation and genetic recombination in *Echerichia coli* K-12. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 21:141–162.

10

الفصل العاشر

مبادئ كلونة الجين



هل سنستيقض في يوم ما لنرى بأن هذا المشهد أصبح روتينياً؟ هل يمكن أن نصل الى "انتقاء النسل" بحيث نختار مانريد من الجينات وننبذ مالا نريد؟

مقدمة

تعرف الهندسة الوراثية genetic engineering أو التلاعب الوراثي genetic manipulation بالتخليق الخارج خلوي لأشكال جديدة أو لاصطفافات جديدة من الـ DNA بحيث تسمح هذه التشكيلات أو الاصطفافات باستمرار الظروف الوراثية المحورة في الطبيعة. ويطلق على عملية التلاعب بالـ DNA خارج جسم الكائن الحي *in vitro* بمصطلح تقنية الدنا الهجين أوrecombinant DNA technology. وبشكل واسع، تعني الهندسة الوراثية التلاعب بالجينات تحت ظروف مختبرية مسيطر عليها. وتبرز أهمية الهندسة الوراثية كتقنية حديثة من عدة أسباب رئيسية، منها إنها تسمح بعزل وبدراسة جينات مفردة بكميات كبيرة وبنقاوة كاملة.تلك الجينات من الممكن أن يعبّر عنها ومن الممكن إعادة استخدامها بالخلايا سواء أكانت من نوع واحد أو من أنواع مختلفة.

حققت تجارب الهندسة الوراثية عدة اهداف عجزت الكثير من حقول البايولوجيا عنها كما في حث البكتريا على صنع الهرمونات والنواتج البايولوجية المكلفة والنادرة. إن أفضل مثال معروف لهكذا مركبات ثمينة هو الأنسولين insulin وهرمون النمو البشري human growth hormone والرنين rennin. كل هذه المركبات الثلاثة كانت تستخلص قبل اكتشاف الهندسة الوراثية من الحيوانات، كما في الأبقار والخنازير والعجول، أو من جثث البشر. كما أن الأمل يحذو المشتغلين في مجال الهندسة الوراثية لاستخدام هذه التجارب في المستقبل لتصحيح بعض الاختلالات الناشئة عن بعض الطفرات كما في فقر الدم المنجلي sickle cell anemia وفقر الدم الوراثي thalasemia (العلاج الجيني gene therapy) وذلك لتقديم خواص جديدة كما في المبيدات العشبية herbicides أو مقاومة النباتات للثلوج frost resistance for plants أو لإنتاج حيوانات مزرعية أكبر وأفضل. جل تلك الانجازات الكبيرة لهذا العلم أتت من التطورالهائل في مجال كلونة الجين بنجاح في الخلايا المستلمة. لذا سنتعرض في هذا الفصل الى الوسائل الأساسية التي تبين لنا كيف نكلون (نستنسل) جيناً ما خطوة خطوة وصولاً الى تعبير ذلك الجين بنجاح في الخلايا المضيف.

أدوات كلونة الجين المتعاقبة

هنالك عدة خطوات بايولوجية تستخدم لتنفيذ التلاعب في المادة الوراثية للقيام بكلونة جين محدد. لكن قبل التطرق لها لابد لنا من معرفة أن العديد من تجارب التلاعب بالـ DNA تحتاج كميات (أو نسخ) غزيرة من قطعة DNA محددة. ولأجل الحصول على كميات غزيرة من تلك النسخ علينا أن نضع جزيئة الـ DNA تلك في الخلية البكتيرية، ثم نسمح

للخلية المستقبلة بمضاعفة تلك القطعة. وتسمى هذه الخطوات "بكلونة الجين"، بسب انتاج نسخ متماثلة من قطعة الـ DNA الأصلية. ولأجل القيام بذلك عملياً، عادة ما يحشر الجين في ناقل (vector) ما لتكوين جزيئة DNA هجينة. ويعمل الناقل كمركبة لتقديم الجين الى خلية العائل ولتوجيه تضاعفه بالشكل المطلوب ولتمكينه من التعبير عن نفسه في بعض الحالات لانتاج البروتين الهجين (شكل 1.10). تنتج الخلية العائل التي أدخل اليها الناقل الهجين جيلاً يحتوي كله على الجين المحشور. تدعى تلك الخلايا المتماثلة بخلايا النسيلة أو "clones". وفي خلية العائل المتحولة وفي نسائلها، يقوم الجين المحشور بالتعبير عن نفسه في بعض الحالات حيث يستنسخ ويترجم الى البروتينات الهجينة.

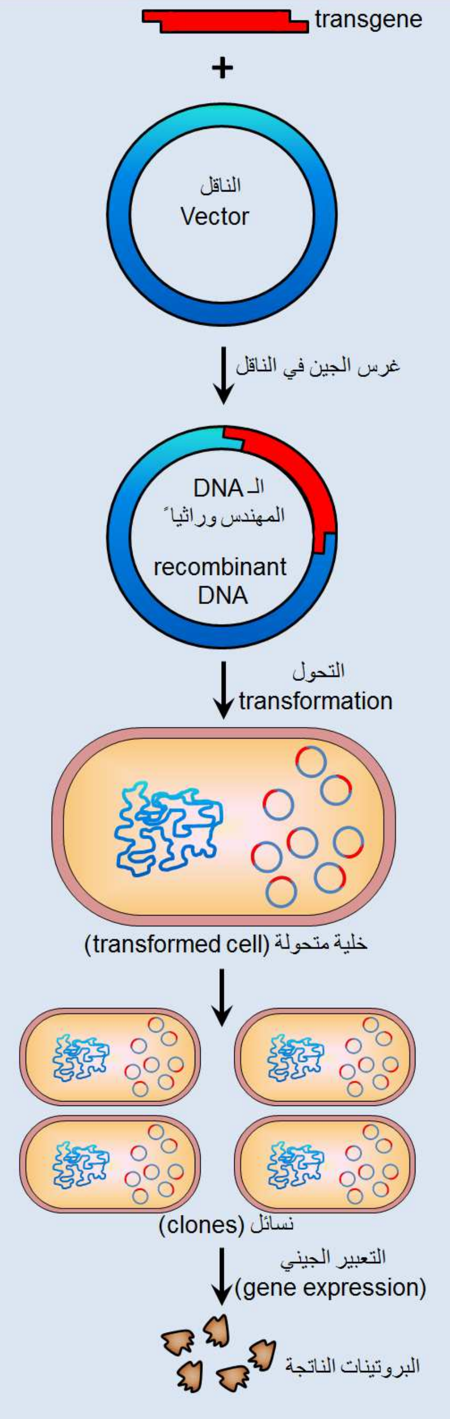
اذن، لكلونة جين ما بشكل تقليدي، يجب توفر أدوات يتم بواسطتها عزل المادة الوراثية الحاوية على ذلك الجين، وتتوفر الآن عدة وسائل يمكن للباحث من خلالها عزل المادة الوراثية وبسهولة. وبعد ذلك، يجب فصل ذلك الجين عن بقية الجينات الموجودة في المادة الوراثية المعزولة، وللقيام بذلك تتوفر عدة انزيمات قاطعة التي تقص الجين المعني من كلا جانبيه، ثم يجب توفر أدوات لازمة تربط ذلك الجين بالناقل الجيني المناسب، (كما في الانزيمات اللاحمة) وذلك بعد قطع الناقل الجيني بنفس الانزيم القاطع الذي استخدم لعزل الجين المعني عادة. وبعد تكوين جزيئة الناقل الهجينة يجب توفر أدوات أخرى تتكفل بادخال تلك الجزيئة الهجينة داخل خلايا العائل. وفي النهاية، لابد من توفر الأدوات التي تمكن الباحث من معرفة أو انتقاء النسائل الحاوية على تلك الجزيئات الهجينة. تشكل تلك الأدوات الدعائم الأساسية في كلونة الجين والتي هي ليست صعبة على الفهم لدى القارئ المبتدئ، ولهذا سنستعرض تلك الأدوات تباعاً لتكتمل لنا الصورة حول كيفية كلونة الجين.

أولا : أدوات عزل الـ DNA الحاوي على الجين المرغوب

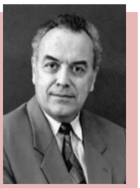
قبل كلونة أي جين في تجارب الهندسة الوراثية لابد لنا من الحصول عليها أولاً بكميات كافية. يتم ذلك من خلال ثلاث طرق تختلف باختلاف مواصفات قطعة الـ DNA المرغوبة والغرض من كلونتها. في الطريقة الأولى، يمكن للباحث فيها أن يستخلص كل الـ DNA من الكائن، ثم يقطع ذلك الـ DNA الى قطع متعددة، ويعزل القطعة المراد دراستها، ثم يقوم بكلونتها بالنهاية. أو، يمكن كلونة كل القطع بواسطة ناقل ملائم، ثم تختبر كل نسيلة (clone) بالنسبة لوجود الجين المرغوب من عدمه. أو يمكن تخليق قطعة الـ DNA المرغوبة بشكل مباشر، ليتم كلونتها بعد ذلك (أنظر الفصل الحادي عشر).

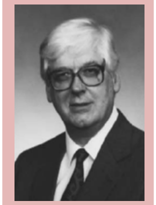
ثانياً :ادوات قطع ولحم الـ DNA

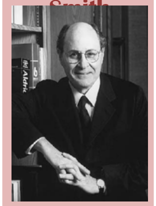
بعد الحصول على المادة الوراثية الحاوية على الجين المرغوب وبنقاوة عالية، نحتاج الآن الى عزل ذلك الجين عن بقية المادة الوراثية للخلية الواهبة. ولأجل ذلك، لابد من توفر وسيلة تقوم "بقص" ذلك الجين من طرفيه. ربما كان مجرد التفكير بوجود انزيمات معينة يمكن لها أن تعمل "كمقصات خلوية" لقطعة الجين المرغوبة شيئاً من الخيال.

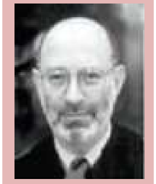


شكل (1.10). مخطط عام لعملية الكلونة الجينية التقليدية. بعد عزل الجين أو قطعة الـ DNA المراد كلونتها، يتم ربط تلك القطعة مع الناقل الجيني المناسب لتكوين جزيئة DNA هجينة. يتم ادخال تلك الجزيئة الهجينة الى الخلايا المستلمة بواسطة عملية التحول. تقوم الخلية المستلمة بالتعبير عن نواتج الجين المكلون فيها (تصميم المؤلف).

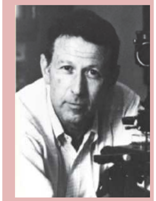

Werner Arber


Hamilton Smith


Daniel Nathans


Herbert Boyer

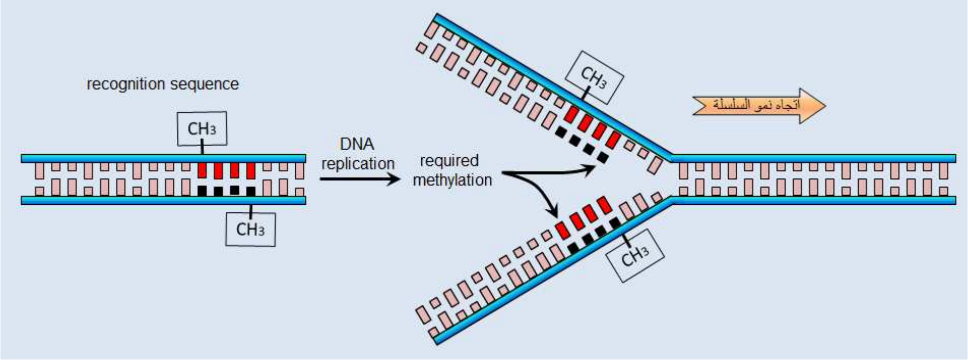
Stanley Cohen


Berg

بدأ هذا الخيال يتحول الى واقع في الخمسينيات من القرن المنصرم بملاحظة أن بكتريا القولون يمكنها أن تقاوم بطريقة ما خمج العاثيات البكتيرية عن طريق "تقييد" (أي تثبيط) تضاعف العاثي الغازي. وفي العام 1962 وجد العالم Werner Arber وجماعته نظام انزيمي يمكن له تثبيط تضاعف العاثي عن طريق شق DNA العاثي حال دخوله الخلية. قام هذا الفريق البحثي بعزل هذا الانزيم من خلايا بكتريا القولون واعتبروه انزيما هاضما. ولا بد من معرفة أن هنالك عدة أنواع من الانزيمات الهاضمة للاحماض النووية، فانزيمات الـ RNases تقوم بمهاجمة الـ RNA، بينما تقوم انزيمات الـ DNases بمهاجمة الـ DNA. وهنالك نوع من التخصص عموماً في عمل تلك الانزيمات الهاضمة، فبعضها يهاجم الأحماض النووية مفردة الشريط فقط، وتقوم الانزيمات الأخرى بمهاجمة الأحماض النووية مزدوجة الشريط، بينما تقوم نسبة قليلة فقط بمهاجمة كلا النوعين. تقوم الانزيمات الهاضمة الخارجية (exonucleases) بمهاجمة جزيئة الحمض النووي من نهايتها. ومن الجدير بالذكر أن أي نوع من الانزيمات الهاضمة الخارجية يقوم بمهاجمة احدى نهايتي جزيئة الحمض النووي، أما النهاية 3′ أو النهاية 5′، وليس كلتيهما. وعلى الرغم من ان الانزيمات المكتشفة من قبل Arber وجماعته هي انزيمات هاضمة أيضاً، الا انها لاتهضم جزيئة الحمض النووي من الجزء الطرفي، بل تقوم "بشق" جزيئة الحمض النووي داخلياً، وبالتالي اعتبر هذا الانزيم انزيما هاضماً داخليا (endonucleases)، لأن هذا الانزيم يشق (cleave) الأحماض النووية، وبالطبع تحدث عملية "الشق" ضمن جزيئة الـ DNA. وفي حالة الاصابة بالعاثيات البكتيرية، تقوم انزيمات بكتريا القولون الداخلية تلك بشق DNA العاثي الغازي ولكنها لاتقطع DNA العائل البكتيري. تعتبر عملية "التقييد" تلك جزءا مما نعرفه الآن بنظام التقييد - التحوير البكتيري (bacterial restriction - modification system)، والذي يحمي البكتريا من خمج العاثيات عن طريق التمييز بين DNA العائل والـ DNA الغريب. وهذا يعني، أن كل الـ DNA البكتيري، ومن ضمنه DNA البلازميد هو DNA يتم حمايته عادة من قبل الميثلة. ان السبب الذي من أجله سميت هذه الإنزيمات بإنزيمات التقييد restriction enzymes هو أن وجودها في البكتريا يقيّد نمو العاثيات البكتيرية (bacteriophages). اذن، وظيفتها التي وجدت من أجلها في الطبيعة تتمثل بحماية العائل البكتيري من DNA الكائنات الحية الغريبة (كما في العاثيات الخامجة infective phages)، فهي بذلك تعتبر إنزيمات دفاعية (defensive enzymes). وهنا لابد لنا من أن نسأل هذا السؤال: اذا واجه نظام التقييد - التحوير الحاوي على

انزيمات ميثلة مزدوجة مع انزيمات التقطيع، شريطي DNA غير مميثلين أحدهما خلوي والآخر غريب، فكيف يتسنى له التفريق بينهما بحيث يحور الأول ويقطع الثاني؟

للاجابة على هذا السؤال لابد لنا من معرفة أن هذا النظام، أي نظام التقييد - التحوير، ينتج تعقيدات اضافية على عملية تضاعف الـ DNA والتي لم تذكر في الفصل الثالث وذلك لغرض التبسيط. يحتوي الـ DNA مزدوج الشريط الخلوي على مجاميع مثيل على كلا شريطي الـ DNA في موقع تمييز الانزيم القاطع. وعندما يخلق التضاعف شريطين جديدين، يفتقد هنا أحد الشريطين في كل حلزون مزدوج بنوي لمجاميع المثيل في البداية. ان هذا الـ DNA النصف مميثل يجب أن لا يميز من قبل الخلية كـ "DNA غريب" ويقطع، وانما يتم تمييزه كـ "DNA ذاتي" ويحور بواسطة نظام التقييد والتحوير باضافة المثيل (شكل 2.10). ولهذا السبب، يعمل نظام التقييد – التحوير هذا بشكل بحيث يميز ثلاث حالات مختلفة من ميثلة تسلسلات التمييز وتتخذ واحد من ثلاث أفعال مختلفة. فاذا كان التسلسل غير مميثل (unmethylated)، يقوم الانزيم القاطع في نظام التقييد بقطعه. واذا كان الـ DNA مميثل في أحد شريطيه فقط (hemi-methylated)، يقوم الانزيم المحور (المميثل) في نظام التحوير باضافة مجاميع مثيل الى الشريط الآخر الغير مميثل (شكل 2.10). أما اذا كان الـ DNA مميثلاً في كلا شريطيه، فان انزيمات نظام التقييد – التحوير لاتقوم بعمل أي شئ يذكر. وبهذه الطريقة، يعتبر هذا الواسم المثيلي كنقطة تمييز بين DNA العائل والـ DNA الغازي. وبما أن DNA بكتريا القولون هو DNA مميثل، تعتبره الانزيمات القاطعة لهذا السبب كروموسوماً أصيلاً، وتحميه من شق الانزيمات القاطعة الموجودة في الخلية. أما DNA العاثي فهو غير مميثل، فيعتبر لهذا السبب هدفاً للانزيمات القاطعة لتقييده أو لتقطيعه لتمنع بهذه الطريقة تضاعف العاثي الغازي داخل الخلية البكتيرية العائل.



شكل (2.10). ميثلة التسلسل التمييز البالندرومي يستوجب تمييز وميثلة تسلسلين مختلفين على أشرطة الـ DNA البنوية في تضاعف الـ DNA، يشير اللون الأسود الى الى الثايمين ويشير اللون الأحمر الى الأدنين (تصميم المؤلف).

.

في نهاية السبعينيات من القرن المنصرم – وهي الحقبة الذهبية في تطور علم الوراثة الجزيئية – تمكن Hamilton Smith وجماعته من عزل انزيم قاطع جديد وأسموه *Hind*III واشتق هذا الاسم من البكتريا التي عزل منها الانزيم وهي *Haemophilus influenza*. وبعد العزل، استخدمه Daniel Nathans في قطع الـ DNA الفايروسي SV40. اكتشف Smith قدرة انزيم *Hind*III القاطع على قطع كل جينوم SV40 بموقع واحد فقط، حتى لو وجدت كمية كبيرة منه. ولقد دهش المجتمع العلمي آن ذاك عندما ذكر Smith بأن هذا الانزيم يقطع "بالضبط" عند نفس الموقع لكل جزيئة SV40 معرضة له. وعليه، منح كل من العلماء Arber و Smith و Nathans جائزة نوبل في الطب أو الفسلجة في عام 1978 تثميناً لذلك الانجاز. وليس هذا فحسب، بل حدث هنالك انجازان عظيمان في مجال الهندسة الوراثية،أولهما قيام Herbert Boyer بعزل الانزيم القاطع *Eco*RI، وهو الانزيم الذي يترك نهايات لزجة بعد قطعه لقطعة الـ DNA. قوبل هذا الاكتشاف بقبول واسع في الأوساط العلمية آنذاك لأن النهايات اللزجة الناجمة عن قطع ذلك الانزيم تمتاز بسهولة ارتباطها ببعضها البعض بسبب تكميل بعضها للبعض الآخر في التسلسل وهذا يسهل ارتباطها ببعضها البعض. كما كان للعالم Stanley Cohen الفضل الكبير في توافر معلومات كثيرة حول البلازميدات مكنت الباحثين من استخدامها كنواقل كلونة في المستقبل. وفي عام 1980 حصل Paul Berg على جائزة نوبل بسبب تمكنه من تخليق أول جزيئة هجينة وهي عبارة عن عاثي بكتيري يحتوي على قطعة DNA مشتقة من الفايروس SV40.

وبعد تلك المرحلة، أدرك العلماء أن تلك الانزيمات يمكن لها أن تقطع أي جزيئة DNA بصرف النظر عن مصدرها (ماعدا حماية الـ DNA عن طريق تحويره كيميائياً)، أي أنهاتقطع الـ DNA إلى قطع صغيرة بنمط ذو تسلسل متخصص، وهذا يحدث بالتناقض مع معظم الطرق الإنزيمية والكيميائية والفيزيائية الأخرى التي تحطم الـ DNA بشكل عشوائي. وعلى سبيل المثال، يمكن للانزيم القاطع *Hind*III أن يشق أي جزيئة DNA تحتوي على موقع التمييز خاصته، بغض النظر عن مصدر تلك الجزيئة سواء أكانت من فايروس أو نبات أو حيوان أو حتى من البشر. ومن هنا يتضح لماذا أصبحت تلك الانزيمات القاطعة أدوات أساسية لأي نوع من البحث الجيني. وبتقادم السنين، تطور استخدام تلك الانزيمات في تجارب الهندسة الوراثية شائعاً الى الحد الذي أصبح فيه للباحث المشتغل في هذا المجال في التسعينيات من القرن المنصرم مقدار واسع من الاختيار يصل الى الآلاف الانزيمات القاطعة ذات النقاوة العالية والمتوفرة تجارياً لقطع جزيئته في أي موقع مرغوب. وقبل أن يصل العدد الى هذا الحد، قام الباحثون بايجاد طريقة ناجعة لتجنب الارباك في تسميتها، حيث اشتقت تلك التسمية من أسم البكتريا التي عزل منها الانزيم القاطع. وعلى سبيل المثال، إنزيم *Eco* RI من بكتريا القولون *Escherichia coli*، وإنزيم *Bam* HI من بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* (جدول 1.10). إن الحروف الثلاث الأولى

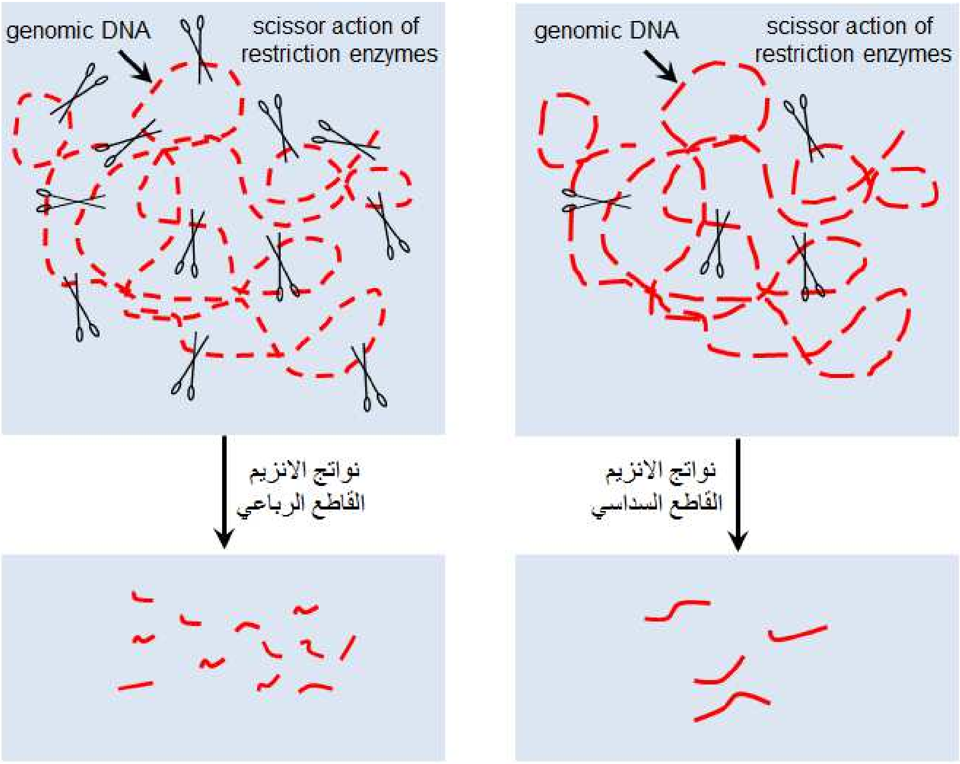
في اسم إنزيم التقييد تتألف من الحرف الأول والذي يشتق من الحرف الأول من اسم الجنس (E)، والحرف الثاني والذي يشتق من أول حرفين لاسم النوع (co). ربما تتبع هذه باسم السلالة (R) والعدد الروماني (I) للإشارة إلى تسلسل الاكتشاف (كما في *Eco* RI أو *Eco* RII). هذا ويتم مراعاة كتابة الحروف الثلاث الأولى من اسم الإنزيم بشكل مائل (*Italic style*).

يقطع كل انزيم تقييد الـ DNA بتسلسل قاعدي محدد يدعى بتسلسل التمييز (recognition sequence) كما في جدول 1.10، والذي يتنوع من 4 الى 16 أو 20 زوج قاعدي. وكلما طال عدد الازواج القاعدية في موقع التمييز كلما قل عدد القطوعات المعمولة في الـ DNA عادة. وإذا ما افترضنا توزيع الـ DNA بشكل عشوائي في جزيئة الـ DNA، عندها يمكن لنا أن نحسب كم مرة يمكن للإنزيم أن يقطع جزيئة الـ DNA.

جدول (1.10): نظام تسمية إنزيمات التقييد restriction enzymes كما هو موضح في عدة أمثلة (يشير الرمز / الى الموقع الذي يقطع فيه الانزيم القاطع، والرمز N الى أي قاعدة، والرمز R الى أي purine، والرمز Y الى أي pyrimidine).

Enzyme	Source organism	Recognition sequence
*Hpa*II	*Haemophilus parainfleunzae*	C/CGG GGC/C
*Mbo*I	*Moraxella bovis*	/GATC CTAG/
*Nde*II	*Neisseria denitrificans*	/GATC CTAG/
*Eco*RI	*Escherichia coli* RY13	G/AATTC CTTAA/G
*Eco*RII	*Escherichia coli* RY13	/CC(A or T)GG GG(T or A)CC/
*Eco*RV	*Escherichia coli* J62/Pgl74	GAT/ATC CTA/TAG
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	GAT/ATC CCTAG/G
*Sau*I	*Staphylococcus aureus*	CC/TNAGG GGANT/CC
*Bgl*I	*Bacillus globigii*	GCCNNNN/NGGC CGGN/NNNNCCG
*Not*I	*Nocardia atitidis-caviarum*	GC/GGCCGC CGCCGG/CG

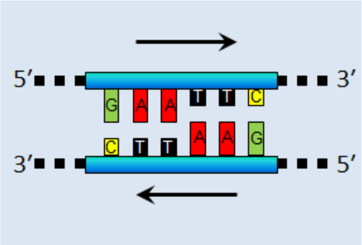
لابد من معرفة ملاحظة مهمة وهي أن لكل موقع في جزيئة الـ DNA هناك أربع احتمالات، (A أو C أو G أو T)، ولهذا، فان إنزيم التقييد الذي يميّز تسلسل ذو أربع أزواج قاعدية 4-bp فأنها سوف تقطع، كمعدل، مرة واحدة لكل 256-bp أي 4^4، بينما تميز إنزيمات أخرى 6 أزواج قاعدية 6-bp أي أنها تقطع مرة واحدة لكل 4096-bp أي 4^6(شكل 3.10).



شكل (3.10): تتناسب تكرار قطع أشرطة الـ DNA من قبل الإنزيمات القاطعة عكسياً مع عدد النيوكليوتيدات المميزة في موقع الشق. فإنزيم التقييد الذي يميز سلسل ذو أربع نيوكليوتيدات يقطع الـ DNA بتكرار أكثر وينتج قطع أصغر مقارنة بالإنزيم القاطع الذي يميز تسلسل ذو ست نيوكليوتيدات.

بعد أن تعرفنا على ماهية الانزيمات القاطعة، لابد لنا أن نعرف على كيفية تعرف الانزيمات القاطعة على تسلسلات التمييز الموجودة في الـ DNA كي تقطعها. وجد العلماء أن تلك الانزيمات تتبنى أشكالاً ثلاثية الأبعاد محددة والتي تتقدم على طول تسلسلات الـ DNA غير المتخصصة في حلزون الـ DNA المزدوج "ماسحة" اياه الى أن تصل الى

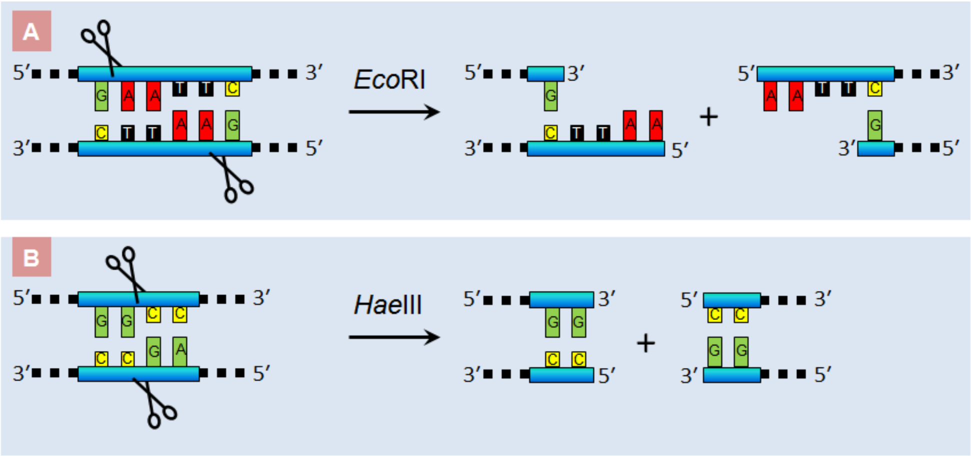
تسلسلاتها المميزة المتخصصة. وهي التي تمثل مواد التفاعل المتعرضة للهجوم من قبل إنزيمات القطع الداخلي، وهي تسلسلات DNA بالندرومية palindromic DNA sequences. إن مصطلح بالندروم palindrome يشير إلى مجموعة من الحروف والتي تكون نفس الكلمة عندما تقرأ سواء من الأمام أو من الخلف. فعلى سبيل المثال "MADAM, I'M ADAM"؛ أو العبارة "MA IS A NUN, AS I AM"; . أما في الـ DNA، يدعى موقع البالندروم palindrome site بتسلسل من الأزواج القاعدية بـ DNA الحلزون المزدوج والذي يقرأ بنفس القراءة سواء من الأمام أو من الخلف (من 5′ إلى 3′ أو العكس). وعلى سبيل المثال، يعد تسلسل الأزواج القاعدية GAATTC بالـ "بالندروم" لأن كلا تسلسلي الشريطين يقرآن بنفس القراءة سواء عندما تتم القراءة من النهاية G أو من النهاية C (شكل 4.10).



شكل (4.10): مثال حول التسلسل البالندرومي palindromic sequence (وهو التسلسل الذي يقطعه انزيم *EcoRI*) (تصميم المؤلف).

إن من أكثر الأمثلة المعروفة على الإنزيمات القاطعة هو إنزيم *Eco* RI، والمخلق من قبل بكتريا *E. coli* من سلالة RY13. يقوم هذا الإنزيم بمهاجمة التسلسل النيوكليوتيدي GAATTCCTTAAG. ربما يمكن لك أن تلاحظ بأن هذا البالندروم متناظر حول مركزه. يقوم إنزيم *Eco* RI بصنع قطوع مفردة الشريط تدعى بالشقوق "nicks"، بين قاعدة الأدنين وقاعدة الكوانين من كلا الشريطين و هذا يفتح جزيئة الـ DNA الدائرية.

هنالك أنواع معروفة مختلفة من إنزيمات القطع الداخلي، والتي تقطع مناطق مختلفة من جزيئة الـ DNA. وعلى أساس كيفية قطع تسلسل الـ DNA المتخصص هنالك نوعين من انزيمات التقييد: حيث تقطع المجموعة الأولى بشكل مستقيم عبر حلزون الـ DNA المزدوج، لينتج DNA ذو نهاية مستوية blunt end DNA. يقطع النوع الآخر من انزيمات التقييد شريط الـ DNA من مركز الموقع البالندرومي ولكن بين نفس القاعدتين النتروجينيتين على الشريطين المتعاكسين. وهذا يترك قاعدة أو أكثر متدلية من كل شريط وتدعى هكذا نهايات بالنهايات اللزجة sticky ends (شكل 5.10). وسميت بهذا الاسم بسبب تكوينها لأواصر هيدروجينية مع مكملاتها المقطوعة بنفس الإنزيم. وتكون النهايات اللزجة مهمة بالخصوص في تشييد جزيئات الـ DNA الهجينة recombinant DNA molecules



شكل (5.10): أنواع إنزيمات التقييد حسب نوع القطع (A) مثال حول الانزيمات القاطعة من نوع النهايات اللزجة (sticky ends)، (B) مثال حول الانزيمات القاطعة من نوع النهايات المستوية (blunt ends) (تصميم المؤلف).

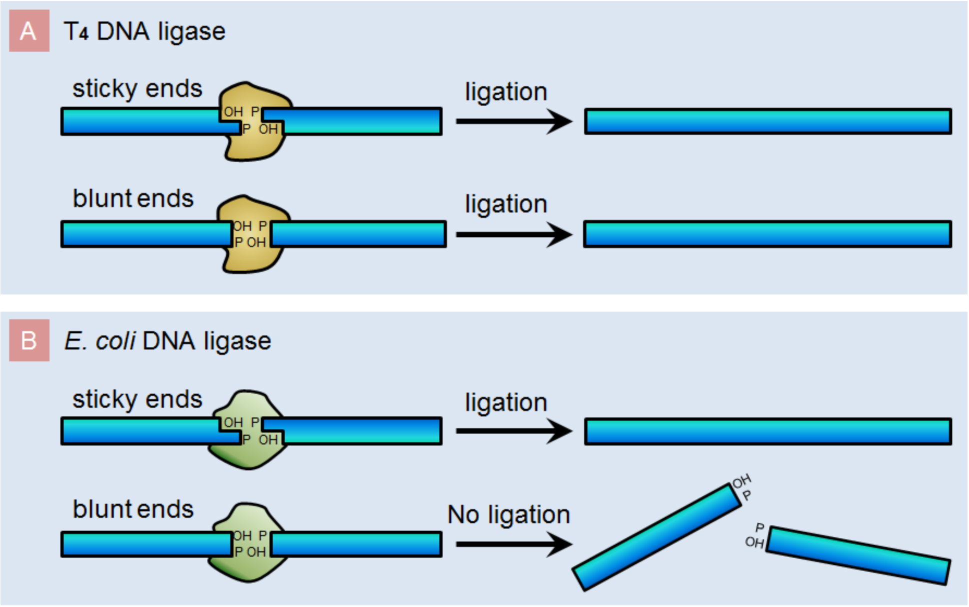
وبما أن النهايتين المفردتي الشريط المتولدتين في مواقع الشق هما متكاملتين، لذا يمكن لها أن تصلّح مع بعضها البعض. وهكذا، فان قطع الـ DNA المتولدة بواسطة نفس إنزيم القطع الداخلي يمكن لها أن توصل مع بعضها بسهولة بتكوينها للأزواج القاعدية (شكل 6.10).

Martin F. Gellert

بعد قطع جزيئات الـ DNA الغريبة بواسطة الانزيمات القاطعة المناسبة لابد من ربطها بالنواقل الجينية الملائمة عادة، ويتم ذلك بواسطة الإنزيمات اللاحمة ligation enzymes أو DNA ligases. تتم عملية ربط الشريطين بواسطة إنزيم اللحم sealing enzyme الذي يعرف بـ DNA ligase، والمكتشف في عام 1967 من قبل Martin F. Gellert، والذي يقوم بالعمل كعامل لصق agent "gluing" لربط الأحماض النووية المفصولة ببعضها. يقوم هذا الإنزيم اللاحم بربط قطع الـ DNA تساهمياً. ويعمل انزيم DNA ligase خلال تضاعف الـ DNA، حيث يقوم بربط قطع أوكازاكي ببعضها البعض لكي يشيد الشريط المتلكئ lagging strand (راجع الفصل الثالث).

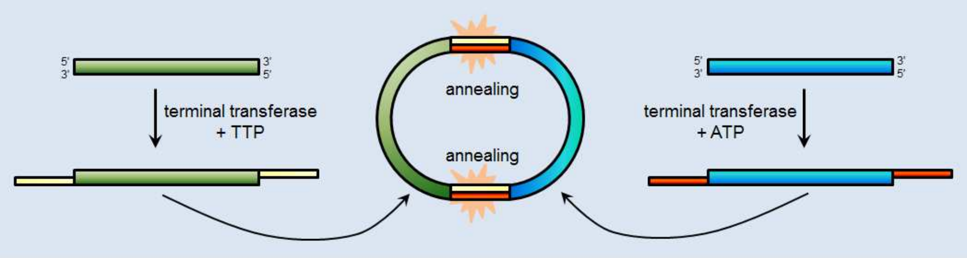
يحتاج انزيم DNA ligase الى شرطين ليقوم بعمله. الأول، يجب أن تكون الجزيئات مواد تفاعل صحيحة، أي يجب أن تمتلك مجاميع هيدروكسيلية من نوع ′3 ومجاميع فوسفاتية من نوع ′5. ثانياً، يجب أن توضع تلك المجاميع في الجزيئات المراد ربطها

بمواضع صحيحة بالنسبة لبعضها البعض. وببساطة، اذا وجد انزيم DNA ligase قطعتي DNA تلمسان بعضهما البعض من نهايتيهما، فانه يلحمهما معاً. وفي تجارب الهندسة الوراثية، تميل قطع الـ DNA ذات النهايات اللزجة أن تبقى مرتبطة ببعضها الآخر لفترة طويلة، ونتيجة لذلك، يقوم انزيم DNA ligase بربطها بشكل كفوء. وبما ان قطع الـ DNA ذات النهايات المستوية ليس لها أي طريقة كي ترتبط ببعضها الآخر، فانها تكون مبتعدة عن بعضها البعض لمعظم الوقت. وبالتالي، تعتبر عملية لحم النهايات المستوية عملية بطيئة جداً وتحتاج الى تركيز عال من انزيم DNA ligase، فضلاً عن التركيز العالي لقطع الـ DNA المراد لحمها. ومن الجدير بالذكر، أن انزيمات DNA ligases البكتيرية لايمكن لها أن تربط النهايات المستوية. لذا، يتم استخدام انزيم T4 DNA ligase الذي اشتق أصلاً من العاثي البكتيري T4 في ربط قطع الـ DNA ذات النهايات المستوية (شكل 6.10).



شكل (6.10). لحم نهايات قطع الـ DNA بواسطة انزيم DNA ligaseفي تفاعل يحتاج الى الطاقة (A) نجاح لحم الـ DNA ذو النهايات المستوية أو النهايات اللزجة بواسطة انزيم T4 DNA ligase (B) نجاح لحم نهايات الـ DNA بواسطة انزيم bacterial DNA ligaseوفشل لحم الـ DNA ذو النهايات المستوية بواسطة نفس الانزيم (تصميم المؤلف).

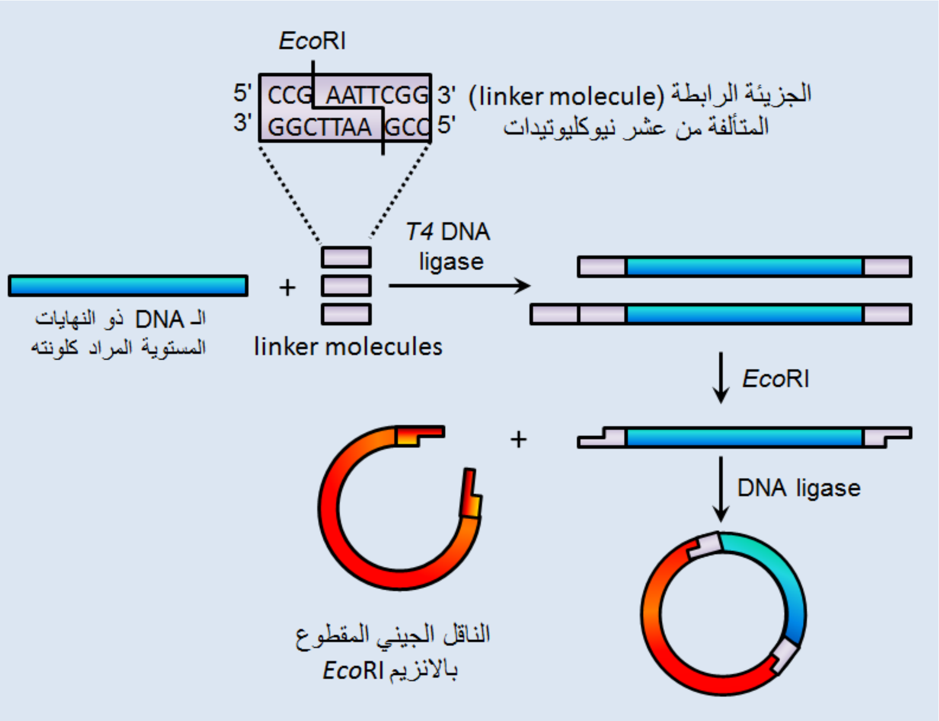
ويمكن أن تستخدم طريقة ثانية لتخليق الجزيئات المهندسة وراثياً مع قطع الـ DNA والنواقل الفاقدة للنهايات اللزجة، بسبب قطعها بانزيم قاطع ينتج نهايات مستوية. فبعد قطع الناقل (كالبلازميد مثلاً) والـ DNA الواهب، يمكن اضافة متعدد الأدنين (polyA) مثلاً للنهاية ′3 لـ DNA البلازميد باستخدام انزيم الناقل الطرفي أو terminal transferase (شكل 7.10). وبشكل مماثل أيضاً، يتم اضافة متعدد الثايمين (polyT) الى النهاية ′3 لقطع الـ DNA الواهبة. وهنا يمكن للنهايات أن ترتبط ببعضها البعض بواسطة انزيم DNA ligase لتكوين الجزيئة أو الناقل الهجين. واذا كان الذيل المضاف من قبل انزيم terminal transferase طويلاً جداً، عندها يمكن أن يدخل مباشرة الى الخلايا، حيث يمكن للفجوات والشقوق أن تملئ وتلحم من قبل الانزيمات الخلوية. و يدعى هذا الإجراء بالتذييل ذو البوليمر المتجانس homopolymer tailing. على الرغم من أن هذه التقنية تعد أكثر صعوبة من لحم النهايات اللزجة ولكنها تمتلك فائدة في ربط أي زوج من النهايات. ولكن هنالك مضاراً لهذه الطريقة والتي تتمثل بعدم السيطرة على اتجاه انحشار الجزيئات المرتبطة مع بعضها باستخدام هذه الطريقة، كما لا يوجد هنالك طريقة سهلة لاسترداد الـ DNA المنحشر بعد اندماجه في الجزيئة الناقلة.



شكل (7.10): التذييل ذو البوليمر المتجانس homopolymer tailing. يمكن استخدام تقنية التذييل بمتعدد الأدنين والثايمين في تشييد نهايات لزجة في جزيئة الـ DNA المرغوبة وتوليد جزيئات DNA هجينة (تصميم المؤلف).

يمكن أن يستخدم ما يعرف بالواصلات (linkers) أيضاً لتوليد جزيئات DNA ذات نهايات لزجة مكملة لبعضها البعض (شكل 8.10).

تعد الواصلات جزيئات DNA صغيرة ذات نهايات مستوية تحتوي على تسلسل تمييز لانزيم قاطع ينتج نهايات لزجة. يمتاز لحم الواصلات بقطع الـ DNA بكفاءة عالية، وذلك بسبب سهولة الحصول على تراكيز عالية من الواصلات. وبعد ربط الواصلات بقطعة الـ DNA، يتم هضم المزيج بالانزيم القاطع، والذي يقطع الواصلات ويولد النهايات اللزجة. وبهذه الطريقة، تتحول الجزيئة ذات النهاية المستوية الى جزيئة ذات نهايات لزجة والتي من السهولة ربطها بجزيئات DNA أخرى.



شكل (8.10). عملية ربط الجزيئات الرابطة والمحتوية على موقع *EcoRI* بواسطة الانزيم اللاحم T4DNA ligase بجزيئات الـ DNA الغريبة ذات النهايات المستوية. وبالنتيجة، تتكون جزيئات DNA ذات نهايات لاصقة بواسطة الانزيم القاطع *EcoRI*. يدمج هذا الـ DNA بالناقل المعامل بنفس الانزيم القاطع (تصميم المؤلف).

إن ما ذكر أعلاه لا ينبغي أن يفسر بأن عملية كلونة الجين هي مجرد تقنية سهلة. لكن في الحقيقية، يعد إنتاج وتشخيص خلية بكتيرية تمتلك نسخة مندمجة فعالة من الجين المرغوب مهمة توصف بالهائلة.

ثالثا :أدوات نقل الـ DNA (نواقل الكلونة cloning vehicles)

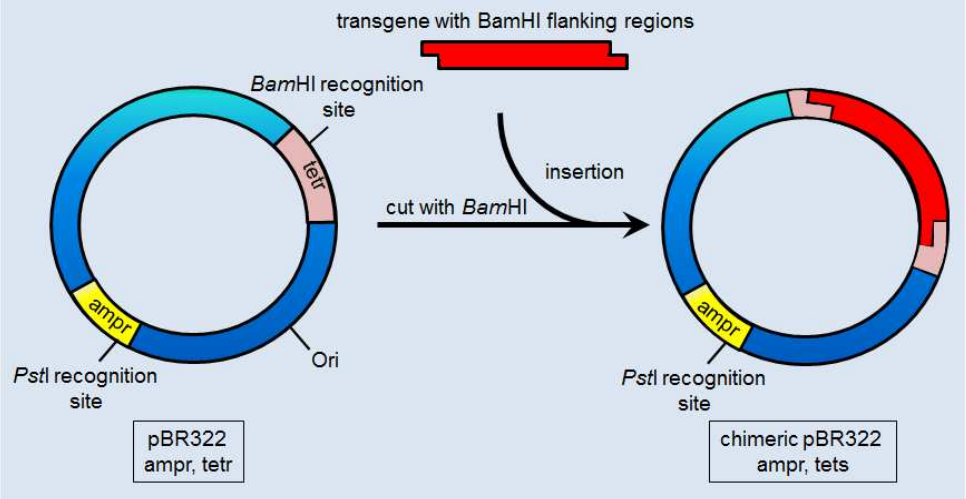
تعد كلونة الجين جزء لا يمكن الاستغناء عنه في أي تلاعب وراثي ويتضمن ارتباط قطعة الـ DNA المرغوبة بالجزيئة الناقلة vector molecule والتي تعمل على انتشار قطعة الـ DNA تلك في البكتريا. ويتميز كل نوع من تلك النواقل بصفات ربما لاتوجد في النواقل الأخرى. ومن الجدير بالذكر أن لكل نوع من نواقل الكلونة فوائد معينة يتميز بها عن النواقل الأخرى. وعلى أية حال، تعد البلازميدات هي الجزيئات الأبسط عند التعامل معها. أما العاثيات البكتيرية والفايروسات الأخرى فيمكن أن تخزن بشكل ملائم ولفترات طويلة. أما الكوزميدات والكروموسومات الاصطناعية، فيمكن كلونة قطع أكبر من الـ DNA فيهما.

ومن الجدير بالذكر الى أن كل النواقل تشترك بعدة صفات عامة: حيث تكون صغيرة نموذجياً، وعملية نقل الناقل الجيني من الخلية الواهبة الى الخلية المستلمة سهلة نسبياً، وتكون ذات تسلسلات DNA معروفة، وتحتوي على الأقل أصل تضاعفي واحد ويمكن أن تتضاعف في العائل الملائم حتى عند احتوائها للـ DNA الغريب. وأخيراً، تشفر تلك النواقل الى صفة مظهرية والتي يمكن أن تستخدم لتشخيص وجودها، كما يمكن تشخيص النواقل الأبوية (الغير حاوية على DNA غريب) من النواقل الهجينة (الحاوية على الـ DNA الغريب). أن أهم أنواع نواقل الكلونة تلك هي:

أ:نواقل البلازميدات: تمتلك البلازميدات خواص عديدة جعلها مفيدة بشكل استثنائي كنواقل كلونة cloning vehicles، حيث توجد بعض البلازميدات بعدة نسخ multicopy ضمن البكتريا الواحدة ويمكن لها أن تتضاعف بشكل مستقل عن الـ DNA البكتيري. كما تم معرفة التسلسل الكامل للبلازميدات، ومن هنا، عرفت أماكن تواجد مواقع شق إنزيمات التقييد restriction enzymes cleavage sites. كما إن البلازميدات أصغر من كروموسوم العائل ولهذا فمن الممكن وبسهولة فصلها عن الأخير، كما يمكن للـ DNA المرغوب من أن يزال بسهولة بواسطة قطع البلازميد بواسطة إنزيم متخصص لموقع التقييد الذي حشرت فيه قطعة الـ DNA الأصلية.

تعتبر البلازميدات أول جزيئات قد تم استخدامها في عملية الكلونة. ويمكن عزلها وتنقيتها بسهولة، ويمكن اعادة تقديمها الى البكتريا بواسطة عملية التحول (راجع الفصل التاسع). تحمل البلازميدات عادة الجينات المقاومة للمضادات الحيوية، والتي تستخدم في تشخيص العوائل البكتيرية. ويسمى البلازميد الهجين (recombinant plasmid) الحاوي على الـ DNA الغريب بالكايميرا (chimera) وهو حيوان اغريقي أسطوري والذي له رأس أسد، وذنب تنين، وجسم ثور. أكثر البلازميدات المستخدمة بشكل واسع هو pBR322. يمتلك البلازميد pBR322 الجينات المقاومة لكلا الامبسلين والتتراسايكلين والعديد من مواقع التقييد والموجودة لمرة واحدة فقط في البلازميد وتقع ضمن الجين المقاوم للمضاد الحيوي (شكل 9.10). يساعد هذا الترتيب في الكشف عن البلازميدات الهجينة بعد القيام بعملية التحول. وعلى سبيل المثال، اذا انحشر الـ DNA الغريب في الجين المقاوم للأمبسيلين، سوف لا يكون البلازميد قادراً على منح المقاومة للأمبسيلين بعد ذلك الانحشار. وبهذه الطريقة، تحتوي المتحولات التي تفتقد المقاومة للأمبيسلين على بلازميد هجين "كايميري". وكما قد تمت الإشارة إليه مسبقاً (راجع الفصل التاسع)، لا يشفر DNA البلازميدات عادة لأي وظيفة أساسية، ويمكن للخلايا التي تفتقد البلازميدات أن تنقسم طبيعياً. وتوجد البلازميدات عادة بعدة نسخ، ويمكن لها أن تشكل وسائل لتضخيم عدد أي جين يوجد بنسخة مفردة وذلك عندما ينغرس فيها. وعلى سبيل المثال، يمكن أن تؤدي عملية الغرس في البلازميد إلى تضخيم سريع للجينات الضرورية لإنجاز مقاومة عالية للمضادات

الحيوية. إن فائدة ما ذكر أعلاه في الهندسة الوراثية هو أن أي جين محمول من قبل بلازميد صغير يوجد بأعداد كبيرة، وبهذه الطريقة، ربما تتكون أعداد كبيرة من الناتج البروتيني لهذا الجين. إن مثل هكذا بلازميدات توفر مركبات مثالية لحمل العديد من الجينات الضرورية لإنجاز مقاومة عالية للمضادات الحيوية مثلاً عند الحاجة.



شكل (9.10): تركيب بلازميد pBR322 وكيفية غرس الجين المراد كلونته فيه (تصميم المؤلف).

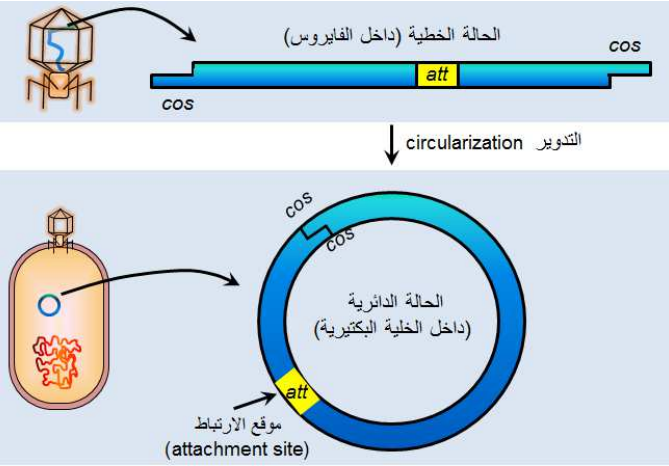
إن معظم النواقل البلازميدية هي من نوع متعدد النسخ multicopy plasmids: وأقدمها هو الناقل pBR322 وهو واحد من أكثر النواقل البلازميدية المعروفة لأنه كما بينا يحمل جينات المقاومة لـ ampicillin والـ tetracycline والتي تعمل كواسمات لانتقاء وتشخيص للهجائن الحاوية على ذلك البلازميد بالاضافة الى احتوائه على مناطق متفردة لعدة إنزيمات قاطعة والمتوفرة لحشر قطع الـ DNA. وعلى سبيل المثال، دعنا نرى ماذا سيحصل عندما تحشر قطعة إنزيم *Pst* I في موقع الإنزيم *Pst* I في الناقل pBR322، والذي يقع ضمن جين مقاومة الأمبسلين ampicillin resistant gene، إن مثل هكذا انحشار سوف يحطم وظيفة الجين عادة وبالتالي سوف لا يخلق بروتين β-lactamase فعال بعد ذلك. ولهذا، يمكن أن يتم الكشف عن البلازميدات الهجينة بواسطة قابليتها على منح المقاومة لـ tetracycline وليس لـ ampicillin. أما بالنسبة للإنزيم *Bam* HI تبق نفس العواقب، فإذا انحشرت قطعة الـ DNA الغريبة في موقع الإنزيم *Bam* HI ، سوف يحطم الانحشار الجين الذي يوفر المقاومة لـ tetracycline للعائل البكتيري. وبعد تحول العائل البكتيري بالبلازميد الهجين، توضع البكتريا على وسط نمو يحتوي على الـ ampicillin. ويتم تنمية نسخة أخرى منها على وسط يحتوي على الـ tetracycline لاختبار حساسيتها للـ

tetracycline. وهذا يسهّل الحصول على الجين قيد الدراسة وذلك من خلال التخلص من تلك البكتريا التي لا تمتلك بلازميد على الإطلاق أو تلك التي تحتوي على بلازميد أصيل دون إضافة.

ب: نواقل العاثيات البكتيرية. تمتلك العاثيات جزيئات DNA خطية يمكن للـ DNA أن ينحشر بها عبر عدة مواقع تقييد. يتجمع الـ DNA الهجين بعدما يتقدم العاثي خلال دورته التحللية lytic cycle وينتج دقائق العاثي الناضجة mature phage particles. إن الفائدة الأساسية لنواقل العاثيات على نواقل البلازميدات هو قدرتها على نقل جزيئات DNA أطول، فعندما يتقبل البلازميد قطعة DNA يصل طولها إلى 6-9 kp ، يمكن للعاثي أن يتقبل قطعة DNA قد يصل طولها إلى 9-20 kb.

يستخدم العاثي لامدا بشكل واسع في تجارب كلونة الجين، يخمج هذا العاثي بكتريا القولون، وله القابلية على أن يتخذ شكلين مميزين، وهما الشكل الحال (lytic)، والشكل المتحلحل (lysogenic) يتبادلان مع بعضهما البعض في دورة حياة الفايروس (راجع الفصل السادس). وعلى الرغم من قدرة المادة الوراثية للعاثي لامدا على أن يتخذ الشكل الدائري لأجل التضاعف والانحشار في كروموسوم بكتريا القولون، ولكن المادة الوراثية تكون خطية (شكل 10.10). ويوجد في طرفي تلك الجزيئة الخطية قطعة من 12 زوج قاعدي ذات نهايات متدلية (cohesive ends)، وتكون كل نهاية مكملة للنهاية الأخرى، تعرف هذه التسلسلات بتسلسلات كوز (*cos* sequences)، وسميت بتلك التسمية بسبب وجود النهايات اللزجة (cohesive ends) لتلك التسلسلات. وحال دخول العاثي لامدا داخل بكتريا القولون، تلتحم تلك النهايتين مع بعضهما البعض بواسطة انزيمات العائل مكونة شكلاً دائرياً من جينوم العاثي لامدا. يمكن تعبئة جزيئات DNA بطول 37kb الى 52kb في رأس العاثي. ويمكن أحياناً لجزيئات DNA صغيرة أن تتعبئ في جينوم العاثي لامدا من دون تضرر التعبئة. ولأجل حشر جزيئات DNA أكبر، فمن الضروري ازالة بعض المادة الوراثية من جينوم العاثي. تمتلك المنطقة اليسرى لجينوم العاثي جينات ضرورية للبروتينات التركيبية وتمتلك المنطقة اليمنى الجينات الضرورية للتضاعف والتحلل.

أما المنطقة الوسطى، فهي ليس ضرورية لحياة العاثي ويمكن استبدالها بـ DNA غريب يصل طوله الى 23kb. وبما أن المنطقة الوسطى تمتلك جينات لانحشار العاثي واعادة ارتباطه، لذا لا يمكن لنواقل الاستبدال المشتقة من العاثي أن تنحشر في كروموسوم العاثي لتكون الحالة المتحلحلة.

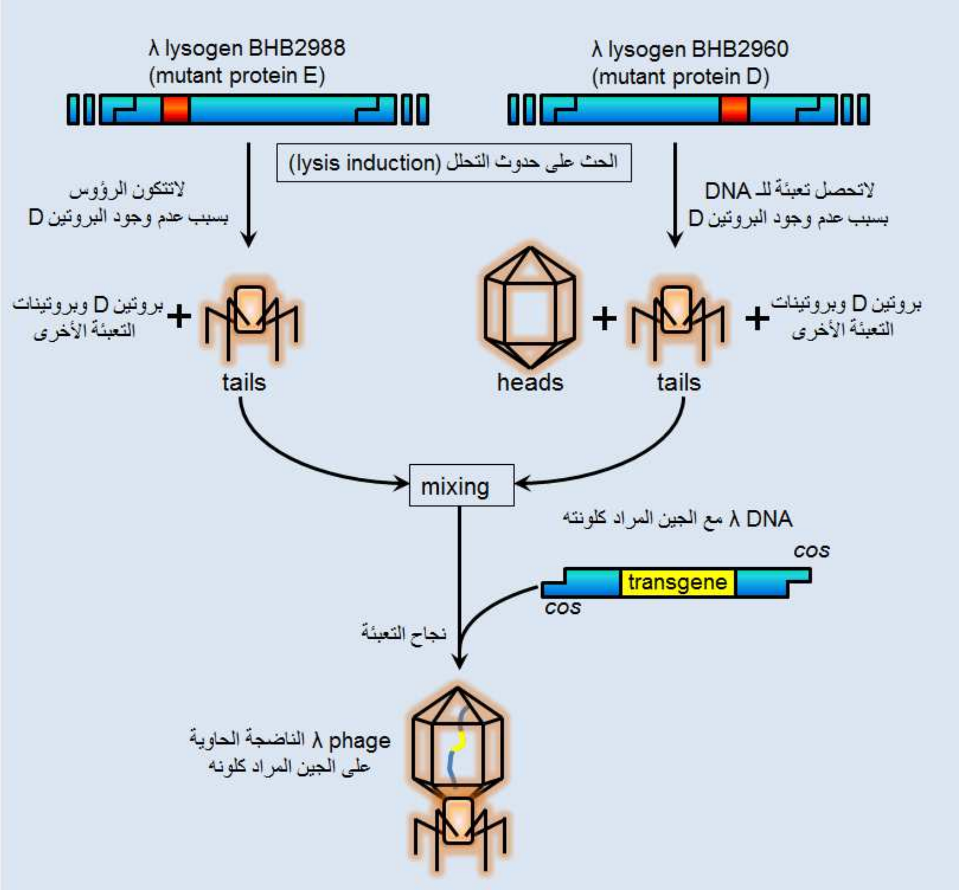


شكل (10.10): المادة الوراثية في العاثي لامدا، والمتمثلة بجزيئة DNA خطية ذات تسلسلات كوز في كل نهاية. وبعدما يقوم العاثي بحقن مادته الوراثية في العائل البكتيري، يتحول مادته الوراثية من الشكل الخطي الى الشكل الدائري. تزدوج كلتا النهايتين اللزجتين وتلتحم مع بعضها بواسطة الانزيمات البكتيرية (تصميم المؤلف).

ان عملية تكوين جزيئة هجينة بين الـ DNA الغريب والعاثي لامدا هي أكثر تعقيداً من تلك الحاصلة في النواقل البلازميدية. فهي لاتقتصر على انحشار الـ DNA الغريب في وسط العاثي لتكوين جزيئة DNA هجينة خطية ذات نهايتين لزجتين. وانما يجب تعبئة تلك الجزيئة الهجينة في رأس العاثي بشكل كفوء وتكوين عاثي هجين له القدرة في خمج الخلايا البكتيرية ، وهنا تحتاج خلية بكتريا القولون العائل الى ما يعرف بالتعبئة الخارجية (*in vitro* packaging) (شكل 11.10). وفي هذه التقنية، يخلط مزيج بروتينات العاثي لامدا مع DNA العاثي الهجين خارج جسم الكائن الحي لتكوين دقائق العاثي.

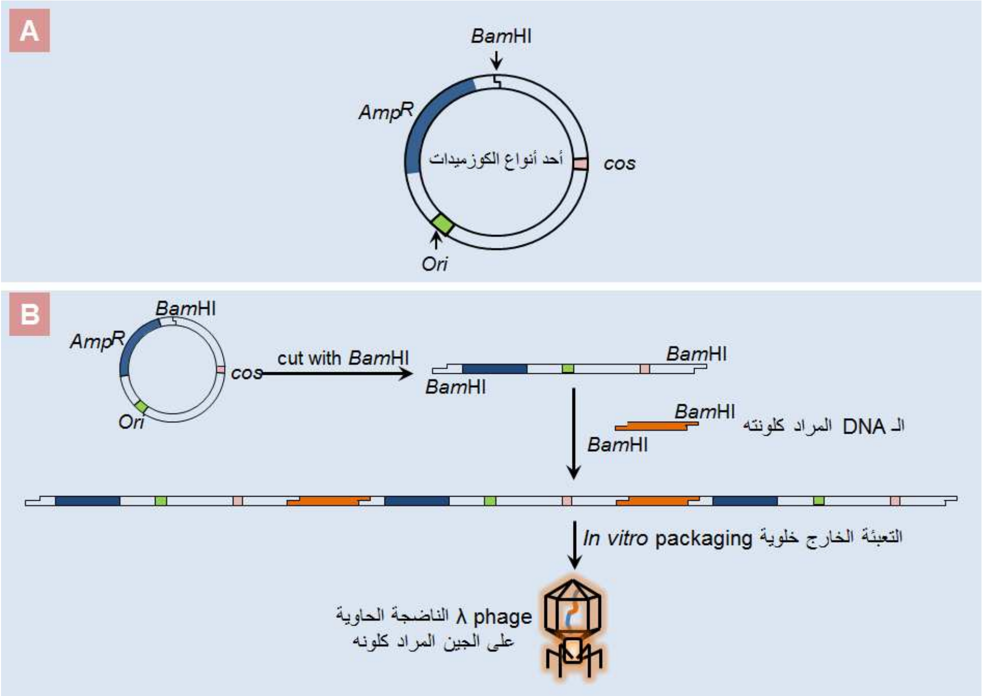
وعند خمج مزرعتين من بكتريا القولون كل مزرعة تحتوي على طفرة مختلفة عن المزرعة الأخرى لاتمكنها من توليد بروتينات لامدا الضرورية. كل من المزرعتين الطافرتين تفتقد لأحد البروتينات الضرورية لتكوين رأس العاثي ولهذا لا يمكن لها تكوين رأس العاثي المتضمن للـ DNA في داخله. ولكن خلط كلتا مستخلصي المزرعتين يتكفل بتوفير كل بروتينات الرأس الضرورية وعند خلطها مع DNA العاثي الهجين يمكن لها أن تعطي العاثي الهجين القادر على خمج خلايا جديدة لبكتريا القولون (شكل 11.10).

استخدمت هذه العاثيات المزدوجة الشريط غالباً في توليد المكاتب الجينومية. أما العاثيات مفردة الشريط (كما في العاثي M13) فقد تم استخدامها في معرفة تسلسل الـ DNA (أنظر الفصل الحادي عشر).



شكل (11.10): التعبئة الخارجية (*in vitro* packaging) لنواقل الاستبدال للعاثي لامدا. يجب أن يتم تعبئة ناقل الكلونة لامدا المحتوي على الـ DNA المكلون في رأس العاثي قبل أن يخمج بكتريا القولون. وقبل تعبئة الـ DNA، يجب عزل بروتينات رأس العاثي التي تتكفل بذلك. وللقيام بهذا، تم خمج بكتريا القولون بالعاثي لامدا الطافر والذي يفتقد للجين الذي يشفر عن بروتين الرأس E. ثم تم خمج بكتريا القولون بطافر لامدا من نوع آخر، والذي يفتقد بروتين رأس العاثي D.ثم تم تنمية كلتا المزرعتين مع لامدا الهجينة، وتم حث الفايروساتكي تدخل في الدورة التحللية. ولو أن البكتريا قد حللت من قبل العاثي، الا أنها لا يمكن لها أن تكون رؤوساً كاملة. وبدلاً من ذلك، يعزل مزيج بروتينات العاثي. يحتوي كل مزيج على ذيول العاثي، بروتينات التعبئة، ومكونات الرأس، ماعدا البروتين D أو E. يخلط هذين المزيجين مع الناقل لامدا المحتوي على الـ DNA الغريب. وعلى الرغم من حدوث عملية الخلط خارج جسم الكائن الحي، يمكن لتلك المكونات أن تتراكب ذاتياً لتكون عاثي وظيفي يمكنه أن يخمج بكتريا القولون (تصميم المؤلف).

ج: الكوزميدات Cosmids. الكوزميدات هي بلازميدات متعددة النسخ تحتوي مواقع *cos* المشتقة من العاثي لامدا ويمكن تعبئتها في رؤوس العاثي (شكل 12.10 A). يحتوي جينوم العاثي لامدا على تسلسل تمييز (recognition sequence) تدعى بالموقع *cos* (أو النهاية اللزجة cohesive end). وعندما يتعبأ الجينوم في رأس العاثي، ينشق في موقع *cos* واحد وينحشر الـ DNA في رأس العاثي الى أن يدخل موقع *cos* الثاني. وبهذه الطريقة، يتعبأ أي DNA محشور بين مواقع *cos* في رأس العاثي. ويمكن يحتوي الكوزميد على عدة مواقع تقييد وعلى عدة جينات مقاومة للمضادات الحيوية.



شكل (12.10). كيفية استخدام الكوزميدات في عمليةالكلونة: (A) تركيب الكوزميد، يحتوي الكوزميدعلى مواقع *cos* المشتقة من العاثي لامدا وعلى أصل التضاعف وجين المقاومة لأحد المضادات الحيوية مشتقة من البلازميد. (B) آلية كلونة الـ DNA في الكوزميدات. لكلونة قطع كبيرة من الـ DNA الى نواقل الكوزميد، يجب أن تكون كلتا الـ DNA والنواقل ذات نهايات لزجة. يتم أولاً تحويل النواقل الى الشكل الخطي بحيث يحتوي على موقع *cos*. ثم يتم قطع الكوزميد بالانزيم القاطع. ويتم قطع DNA الجينوم من المصدر المرغوب أيضاً. تم تقطيع DNA الجينوم بنفس الانزيم القاطع أو بانزيم قاطع يولد نفس النهايات. تخلط هذه القطعمع نصفي الكوزميد وتربط باستخدام انزيم DNA ligase. تعبئ الجزيئة الهجينة النهائية في رؤوس العاثي خارج جسم الكائن الحي وتستخدم بعدها في خمج بكتريا القولون (تصميم المؤلف).

ان الاحتياج الوحيد لتعبئة الـ DNA خارجياً في العاثي لامدا هو وجود موقعين من مواقع cos مفصولة بـ 37-51kp من التسلسلات المتخللة. وعلى هذا الاساس تم تطوير الكوزميدات. وبعد حدوث تفاعل التعبئة، تستخدم دقائق العاثي لامدا المتكونة حديثاً لتخمج خلايا بكتريا القولون. يقوم العاثي بحقن الـ DNA في البكتريا وكأنه DNA λ طبيعي ويتم تدويره خلال تكامله مع نهايات مواقع cos. لكن حفظ الـ DNA المتدور في خلايا بكتريا القولون يكون على شكل بلازميد. ولهذا السبب، فان انتقاء الخلايا المتحولة يكون على أساس المقاومة للمضادات الحيوية، حيث أن المستعمرات البكتيرية المتحولة (بدلاً من البقع plaques المكونة في حالة العاثي لامدا) سوف تحتوي على الكوزميد الحاوي على الجين الغريب. وبما أن دقائق العاثي لامدا يمكن أن تتقبل مابين 37-51kp من الـ DNA، ومعظم الكوزميدات تكون بطول 5kp في الحجم فقط، لذا، يمكن كلونة 32-47kp من الـ DNA في هذه النواقل. وهذا يمثل كمية DNA أكبر من تلك التي تقبلها الناقل لامدا نفسه. لذا، عند استعمال كوزميد صغير، ولنقل بطول 4kb، يمكن بهذه الطريقة حشر قطعة DNA بأكثر من 45kb طولا.ان الكوزميدات،كما هو الحال في البلازميدات، تكون مستقرة جداً، ولكن حشر قطع DNA كبيرة يمكن أن يعني صعوبة الحفاظ على الكوزميدات الناتجة في الخلية البكتيرية. ولابد من ملاحظة أن الصعوبة الأساسية الكامنة من وراء التعقيد في التعامل مع الكوزميدات تتمثل بانتاج قطع DNA خطية ملتحمة والتي يكون فيها الكوزميد والجين المنحشر فيه يصنعان تسلسلات متكررة (concatameres) مع بعضها البعض (شكل 12.10 B).

تستخدم نواقل العاثيات لامدا أو الكوزميدات في بناء المكاتب الجينية. عموماً، مكتبة الـ DNA، هي مجموعة من قطع الـ DNA المكلونة في ناقل كلونة ممكن أن يستخدم في البحث عن قطعة الـ DNA المرغوبة. وهنالك نوعين من تلك المكاتب تستخدمان في الحصول على قطعة الـ DNA المرغوبة. يدعى النوع الأول بمكاتب الدنا الجينومية (genomic DNA libraries). وتصنع تلك المكتبة من جينوم الكائن المعني. وعلى سبيل المثال، تصنع مكتبة الفأر الجينومية بواسطة هضم DNA الفأر النووي هضماً جزئياً بالانزيم القاطع لانتاج عدد كبير من قطع DNA مختلفة ولكن كلها تمتلك نهايات لزجة متماثلة (أنظر أدناه). وبعد ذلك، يتم لحم قطع الـ DNA بالنواقل المشتقة من العاثيات لامدا أو بنواقل الكوزميدات المقطوعتين بنفس الانزيم القاطع. تحتوي هذه المكتبة على كل تسلسلات الـ DNA النووية للفأر ويمكن البحث فيها عن أي جين مرغوب في الفأر. هذا وليس كل نسيلة سوف تحتوي على جين كامل لأنه – وفي العديد من الحالات – تقوم الانزيمات القاطعة بعمل قطوعاتها ضمن الجين. وهكذا، سوف تحتوي بعض النسائل على جزء من جين بدلاً من جين كامل. أما النوع الثاني من مكاتب الـ DNA فتدعى بمكاتب الدنا المكمل (cDNA libraries). ويتم صنع مكتبة الـ cDNA بواسطة استخدام انزيم

reverse transcriptase المشتق من الفايروسات الارتكاسية (retroviruses) (أنظر أدناه).

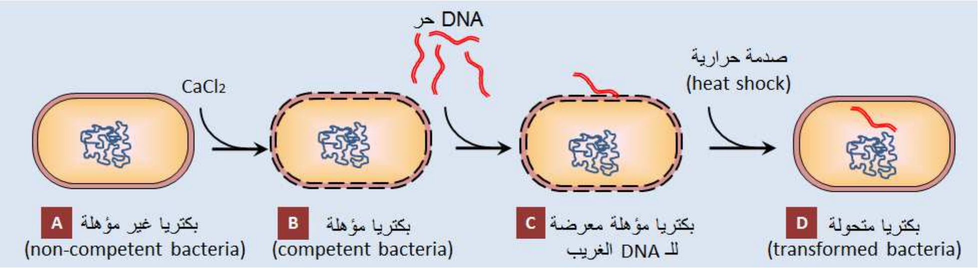
د: الكروموسومات الاصطناعية artificial chromosomes. بالاضافة الى الأنواع الثلاث الرئيسية من النواقل وهي البلازميدات، والعاثيات البكتيرية، والكوزميدات cosmids، تعد الكروموسومات الاصطناعية artificial chromosomes نوعاً رابعاً مهماً لنواقل الكلونة. تعد الكروموسومات الاصطناعية وسيلة شائعة في النقل الجيني لأنها تحمل كميات كبيرة من المادة الوراثية. ويعد كروموسوم الخمائر الاصطناعي (yeast artificial chromosome) أو YAC واحداً من أوسع الكروموسومات الاصطناعية استخداماً. ان الـ YACs هي امتدادات DNA تحتوي على كل العناصر الضرورية لانتشار الكروموسوم في الخمائر، وهي أصل التضاعف، والسنترومير والتيلومير (راجع الفصل الثاني). وتمتلك كذلك مواقع لانزيمات التقييد وواسمات وراثية بحيث يمكن أن يتم تعقبها وانتقائها. ينشق الـ YAC بانزيم تقييد ملائم، والذي يفتحه ويسمح بانحشار قطعة من الـ DNA الغريب بين السنترومير والتيلومير. وبهذه الطريقة، تحتوي الـ YACs على قطع DNA بين 100Kb و 200Kb في الحجم ويمكن أن توضع في خلايا خميرة *Saccharomyces cerevisiae* ويمكن له أن يتضاعف بجانب الكروموسومات الحقيقية. أما الكروموسوم الاصطناعي البكتيري (BAC) هو ناقل كلونة بديل يزداد استخدامه شيوعاً. تعد الـ BACs نواقل كلونة معتمدة على بلازميد الخصوبة في بكتريا القولون (راجع بلازميدات الخصوبة في الفصل التاسع). وتحتوي على مواقع ملائمة لانزيمات التقييد وواسم كما في المقاومة للكلورومفنيكول. ينشق البلازميد المحور في موقع التقييد، ويتم ربط قطعة الـ DNA الغريب والتي يبلغ طولها أكثر من 300Kb باستخدام الانزيم اللاحم DNA ligase. يتكاثر الـ BAC في بكتريا القولون بعد عملية ادخاله بواسطة جهاز مولد الصدمات الكهربائية أو electroporator (أنظر أدناه). ويمكن لهذا الناقل أن يتكاثر ويتحور بسهولة ولا يعاني اعادة ارتباط كما هو ملاحظ في الـ YACs. يمتلك عدم حدوث عملية اعادة الارتباط فائدة تكمن في أن الـ DNA المنحشر لا يمكن عادة أن يحدث فيه اعادة ترتيب بحيث يحافظ على تسلسله كما هو. وبما أن نواقل الـ BACs يمكن لها أن تحمل قطع كبيرة من الـ DNA، تعد الكروموسومات الاصطناعية مهمة بالتحديد في معرفة تسلسل الجينوم.

رابعا :أدوات ادخال الجينات الغريبة الى الخلايا

بعد نجاح تشييد جزيئات الـ DNA الهجينة، والمتكونة عادة من الـ DNA المرغوب محشوراً في ناقل الكلونة المناسب، لابد من ادخال هذا الناقل الى المضيف الملائم لكي ينتج كميات كبيرة منه حتى يتسنى دراستها من قبل المختصين في مجال الهندسة الوراثية. وبشكل عام، تقسم المضائف الى نوعين رئيسيين: بدائية النواة وحقيقية النواة.

أ. ادخال الجينات في الخلايا البدائية النواة

يمكن، في الحقيقة، ادخال جينات بدائية وحقيقية النواة في البكتريا على حد سواء، ولكن الوسيلة المستخدمة في كل منهما تختلف عن الآخرى. ففي بدائية النواة، كما في البكتريا مثلاً، بعد عزل قطعة الـ DNA المرغوب، وربطها بالناقل بواسطة انزيم قاطع مناسب، وتكوين جزيئة الناقل الهجينة، تدخل تلك الجزيئة الى مضيف ملائم بواسطة عملية التحول عادة (راجع الفصل التاسع). وتتم بوضع الخلايا النامية بشكل فعال للبكتريا المعنية، كما في بكتريا القولون، في محلول مخفف من كلوريد الكالسيوم calcium chloride في وسط محاط بالثلج، الذي يزيد نوعاً ما من قابلية خلايا البكتريا لأخذ الـ DNA الغريب (شكل 13.10). إن التعرض لكلوريد الكالسيوم CaCl2 يكون عادة نصف ساعة والتي بعدها يضاف الـ DNA إلى عالق البكتريا لمدة نصف ساعة. إن حضن هذا الوسط لمدة قصيرة يسمح للخلايا بأن تأخذ الـ DNA الغريب وتكوين الخلايا المتحولة transformants.



شكل (13.10). التحول البكتيري كيميائياً. معاملة الخلايا بأيونات الكالسيوم ممكن ان تجعل الخلايا مؤهلة لأخذ الـ DNA. ربما يلتصق الـ DNA على سطح الخلية البكتيرية وبواسطة صدمة حرارية تحدث عملية دخول الـ DNA الغريب (تصميم المؤلف).

بعد ادخال جزيئات الناقل الهجينة الى خلايا العائل المستلمة، لابد من الاشارة الى تحول نسبة صغيرة من الخلايا فقط ، أما الأخريات فتفشل في أخذ الـ DNA الغريب (البلازميد الجديد). وهنا انبثقت الحاجة لوجود بعض الطرق التي تمكننا من معرفة الخلايا التي قد تحولت فعلاً. ولهذا السبب، فان النواقل (كما في البلازميدات) المستخدمة في حشر الـ DNA يجب أن تحتوي على بعض الواسمات القابلة للكشف selectable markers كما في المقاومة لبعض المضادات الحياتية antibiotic resistance.

بعد عزل الجين المرغوب وربطه مع ناقل الكلونة المناسب وادخاله الى الخلية العائل بوسيلة ما، بقيت الخطوة الأخيرة وهي تهيئة الأجواء الملائمة لذلك الجين كي يعبر

عن نفسه وينتج جزيئة البروتين المرغوبة. ولابد من معرفة أن الجين المكلون لا يتم التعبير عنه عادة في الخلية العائل بدون وجود تحويرات معينة تضمن تعبير ذلك الجين في الخلية العائل. ولكي يتم استنساخه، يجب أن يحتوي الجين الغريب المنحشر في الناقل الهجين على بروموتر لابد من تمييزه من قبل انزيم RNA polymerase العائل. أما ترجمة نسخة الـ mRNA، فتعتمد على وجود تسلسلات القائد (leader sequences) وعلى تحويرات الـ mRNA الملائمة لضمان ارتباطه بالرايبوسوم. وكما نوقش هذا سلفاً (راجع الفصل الخامس)، تعد تلك العمليات المتنوعة في بدائية النواة مختلفة بشكل كبير عن الموجودة في حقيقية النواة. فعندما يتم ادخال الـ DNA الغريب في خلايا الكائنات بدائية النواة كما في البكتريا، لابد له من أن يجهز بالتسلسل القائد هنا وذلك للمساعدة في تخليق البروتينات في البكتريا. وفي النهاية، يجب أن تزال الانترونات من جينات حقيقية النواة وذلك لأن العائل البدائي النواة لايقص الانترونات بعد استنساخ الـ mRNA، وبالتالي، لا يمكن للبروتين حقيقي النواة أن يكون فعالاً بدون أن يتم ازالة انتروناته قبل الترجمة.

تم التغلب على مشاكل تعبير الجينات الغريبة في الخلايا العائل بشكل كبير بمساعدة نواقل كلونة خاصة تدعى نواقل التعبير (expression vectors). عادة تشتق تلك النواقل من البلازميد pBR322 وتحتوي على اشارات بدء الاستنساخ والترجمة الضرورية. وتمتلك كذلك مواقع تقييد مفيدة لهذه التسلسلات بحيث يمكن للـ DNA الغريب أن ينحشر فيها. تحتوي بعض نواقل التعبير على أجزاء من أوبرون اللاكتوز ،(راجع الفصل السادس)، والذي يمكن أن ينظم وبكفاءة تعبير الجينات المكلونة بنفس أسلوب الأوبرون. أما فيما يتعلق بادخال الجينات حقيقية النواة في البكتريا، فمنذ بدايات علم الهندسة الوراثية، تحمس الكثير من الباحثين بعد أن نجحت بعض جينات بدائية النواة في التعبير في الخلايا البكتيرية وبعد اكتشاف صفة العمومية (universality) في الشفرة الوراثية حيث تعطي الشفرة الوراثية نفس الحامض الأميني سواء في بدائية أو في حقيقية النواة (راجع الفصل الخامس)، وحاولوا – لهذا السبب – ادخال جينات حقيقية النواة في البكتريا بنفس الطريقة التي تستعمل في ادخال الجينات بدائية النواة آن ذاك، على أمل أن تنجح تلك الجينات في التعبير عن نفسها في تلك البكتريا، ولكن شيئاً من هذا لم يحصل. واستمرت تلك المحاولات الفاشلة الى أن اكتشفت حقيقة الانترونات في الجينات حقيقية النواة دون تلك البدائية منها عموماً (راجع الفصل الثاني). وبما أنه لا يوجد في البكتريا نظام يمكن أن يزيل الانترونات ويربط الاكسونات مع بعضها (راجع الفصل الرابع)، لذا، لابد من البحث عن طريقة تمكن الباحثين ازالة الانترونات الغير مرغوبة قبل ادخال الجين الحقيقي النواة في البكتريا.

في الكائنات الراقية، تستنسخ العديد من الجينات إلى mRNA فقط بأنواع خلوية متخصصة. وعلى سبيل المثال، توجد جزيئات الـ mRNA التي تشفر إلى بروتينات الكلوبين في الخلايا الشبكية reticulocytes فقط. وبالمثل، ينتج الـ mRNA الذي يشفّر للألبومين، البروتين الأساسي في المصل، من خلايا الكبد فقط عند تخليق الألبومين. ويمكن

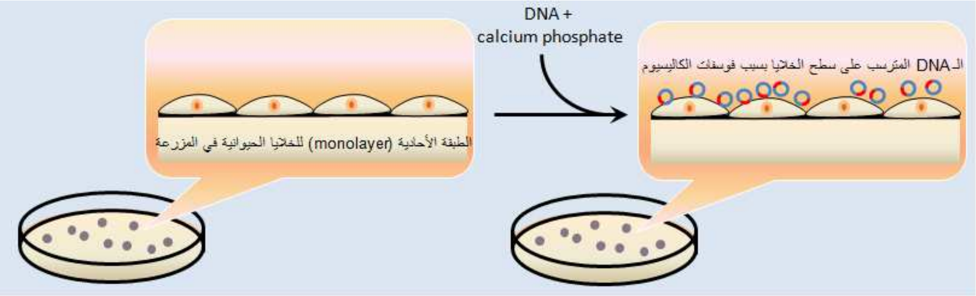
كلونة تسلسلات الـ DNA المتخصصة التي تعبر لجزيئات الـ mRNA في الخلية المعنية وذلك عن طريق تخليق نسخ DNA لجزيئات الـ mRNA معزولة من ذلك النوع من الخلايا، ثم تحشر نسخ الـ DNA تلك في البلازميد أو في نواقل الكلونة الأخرى.

تدعى نسخ الـ DNA من جزيئات الـ mRNA بالـ DNA المكمل (cDNA) complementary DNA. بالإضافة إلى تمثيله فقط التسلسلات المعبرة لجزيئات الـ mRNA في نوع الخلية المحدد، ولكن يفتقد الـ cDNA الانترونات الغير مشفرة noncoding introns الموجودة في تسلسلات جينوم الـ DNA. وهذا، فمن الممكن تحديد تسلسل الأحماض الأمينية للبروتين مباشرة من التسلسل النيوكليوتيدي للـ cDNA المطابق له. إن العديد من جينات الكائنات الراقية تعد كبيرة جداً ولا يمكن أن تحشر في البلازميدات ولا حتى عاثيات لامدا، بسبب انتروناتها الطويلة التي تتخلل اكسونات تلك الجينات. وهذا هو الذي حدا الباحثين في هذا المجال إلى تشييد cDNA للجينات المرغوب كلونتها (أنظر الفصل الحادي عشر).

ب. ادخال الجينات في الخلايا حقيقية النواة

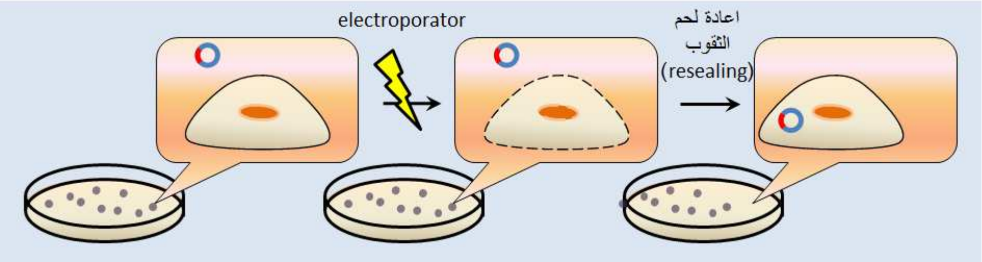
كرس الباحثين جل جهودهم في تطوير تقنيات ادخال الجينات الى الخلايا حقيقية النواة وذلك لما تمتلكه تلك العملية من أهمية تطبيقية، حيث تتمع تلك الخلايا الراقية بنمط معالجة متفردة لايمكن توفيرها في الخلايا بدائية النواة. استخدمت العديد من تلك التقنيات أيضاً وبنجاح في تحول العديد من الخلايا حقيقية النواة. وهي تحتاج الى معاملات خاصة كل حسب نوعه، حيث تحتوي بعض الخمائر والفطريات والخلايا النباتية على سبيل المثال على جدران خلايا (cell wall) والتي تحتاج إلى أن تهضم لكي تنتج البروتوبلاست (الخلية ناقص الجدار الخلوي) قبل أن يتم التقاط الـ DNA، بينما لاتحتوي الخلايا الحيوانية على أي جدار سميك يحيط بها، وهذا بدوره يسهل عملية دخول الجين من هذه الناحية. وهنا يبرز التغاير في معاملة تلك الخلايا الحقيقية النواة ذات الأصول المختلفة حسب طبيعتها الفيزيائية. وهنالك طرق كثيرة لإدخال الـ DNA الغريب إلى الخلايا حقيقية النواة بشكل عام يمكن إجمال أهمها بالآتي:

1- طريقة أخذ الـ DNA الغريب أو الترسيب المشترك (co-precipitation): إن الطريقة العامة لإدخال الـ DNA الغريب إلى خلايا اللبائن تتضمن الترسيب المشترك co-precipitation للـ DNA مع فوسفات الكالسيوم، ثم يقدم المزيج إلى الخلايا في الوسط الزرعي (شكل 14.10). ينحشر الـ DNA عادة كنسخ محددة في الجينوم الخلوي.



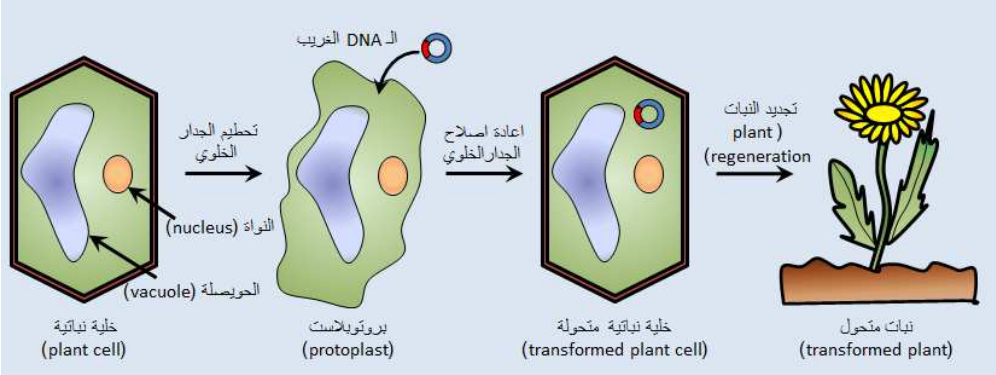
شكل (14.10). ستراتيجية ادخال الـ DNA الغريب عن طريق ترسيبه في الخلايا الحيوانية (تصميم المؤلف).

2- طريقة التثقيب الكهربائي electroporation: لزيادة كفاءة أخذ الـ DNA تستخدم تقنية الـ electroporation بشكل متكرر. تطبق هذه التقنية في الخمائر والفطريات وفي الخلايا النباتية، وبشكل أقل في الخلايا الحيوانية. وفي هذه التقنية، تعرض الخلايا إلى نبظة كهربائية مقتضبة brief electrical pulse عن طريق جهاز مولد النبضات (pulser device)، والتي تسبب تحطم موضعي مؤقت وسوء تنظيم disorganization في الجدار الخلوي، جاعلاً إياه منفذاً permeable لانتشار جزيئات الـ DNA الهجينة (شكل 15.10). هنالك عدة فوائد "ملموسة" من هذه التقنية الفيزيائية لعل أبرزها هو سرعتها، وقلة تكلفتها مقارنة بتقنيات الحقن المجهري، بالاضافة الى قدرة هذه التقنية على انتاج نسبة عالية من الخلايا المهندسة الوراثية. وعلى الرغم من قدرتها العالية تلك، الا أن تلك المجالات الكهربائية ذات الطاقة العالية لها تأثيرات فيزيائية ضارة على حياة الخلايا المتعرضة لها. لذا، يحتاج الباحث الى جعل ظروف استخدام هذه التقنية مثالية قدر الامكان لتجنب تضرر الخلايا المراد هندستها وراثياً.



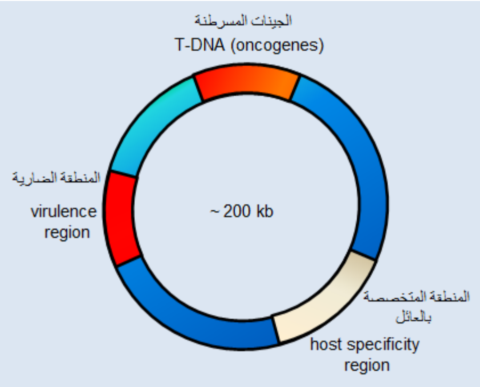
شكل (15.10). تقنية التثقيب الكهربائي (electroporation). يقوم جهاز مولد النبضة الكهربائية بتسليط نبضات كهربائية محسوبة على الخلايا المتعرضة للـ DNA الغريب. يؤدي هذا الى تكوين ثقوب مؤقتة في أغشية الخلايا مما قد يؤدي الى دخول ذلك الـ DNA داخل الخلايا لتكوين الخلايا الهجينة (تصميم المؤلف).

3- طريقة تكوين البروتوبلاست (protoplast generation method): وتتم هذه الطريقة في الخلايا المحاطة بجدران الخلايا، حيث تتم ازالة جدران تلك الخلايا عن طريق اضافة عدد من الانزيمات المتوفرة لتوليد ما يعرف بالبروتوبلاست في الظروف المثالية (شكل 16.10). بعدهذه المرحلة تتم اضافة الـ DNA الغريب الى البروتوبلاست، ثم تتم اعادة البروتوبلاست الى حالته الطبيعية عند توفر الظروف المناسبة. تعاني هذه الطريقة من صعوبة عودة البروتوبلاست الى الحالة الخلوية الطبيعية.



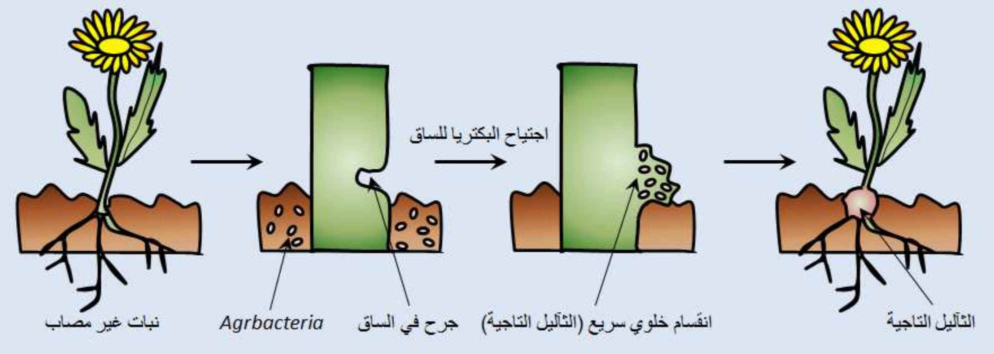
شكل (16.10).ادخال الـ DNA الغريب الى خلايا البروتوبلاست (تصميم المؤلف).

4- حقن بكتريا العقد الجذرية *Agrobacterium* injection: وفيها تستخدم بلازميدات تاي Ti plasmids للخلايا النباتية. إن واحد من أكثر النواقل المستخدمة في الهندسة الوراثية في النباتات هو "Ti plasmid" والذي يعني "البلازميد الحاث للورم tumor inducing plasmid". والموجود في بكتريا *Agrobacterium tumefaciens*. ففي ذوات الفلقتين dicotyledons، ينتج هذا البلازميد خلايا ورمية تعرف بالمرارة التاجية crown galls. يمكن لهذا البلازميد أن يتبدل بحيث يحمل DNA مسافر passenger DNA إلى النباتات من دون تحويل الخلايا إلى أورام. توجد ضمن Ti plasmid جينات في قطعة تدعى بالـ T DNA والتي تعني الدنا الناقل transfer DNA. تحتوي هذه المنطقة على الجينات التي تشفر للإنزيمات الضرورية لتخليق الأحماض الأمينية الغير طبيعية والـ opines ومواد أخرى والتي تسبب نمو خلوي غير منظم (الورم) (شكل 17.10).



شكل (17.10): تركيب Ti plasmid الطبيعي والموجود في بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* (تصميم المؤلف).

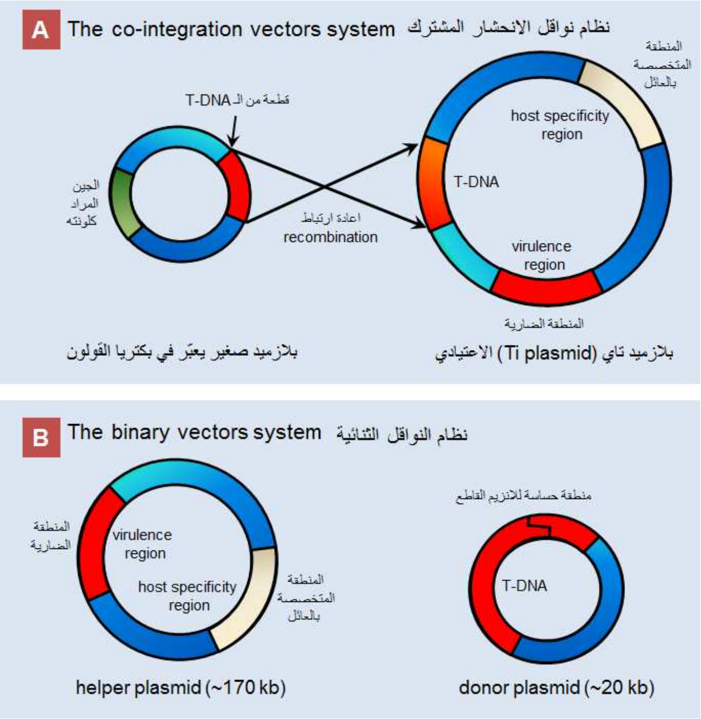
عزل هذا البلازميد من بكتريا *Agrobacterium tumefaciens*، وهي بكتريا تعيش في التربة وتخمج النباتات مسببة لتكوين مرضاً ورمياً يسمى بالمرارة التاجية crown galls disease (شكل 18.10). وفي حالة الخمج، تنتقل قطعة صغيرة (حوالي 20 kb) تدعى T DNA والموجودة في Ti plasmid وتنتشر بالكروموسوم النباتي. يتم التحكم في عملية النقل من قبل جين الضراوة vir (virulence) gene والواقع في Ti plasmid.



شكل (18.10): طريقة خمج الخلايا النباتية ببكتريا *Agrobacterium tumefaciens* والاصابة بمرض الثأليل التاجية (تصميم المؤلف).

إن حجم Ti plasmid جعله غير ملائم لأن يكون كناقل كلونة وذلك لسببين على الأقل: (1) عندما تخمج الخلايا النباتية بـ Ti plasmid تتحول إلى خلايا ورمية والتي لا يمكن أن تتحول إلى نباتات سوية. (2) إن حجم Ti plasmid هو 150-200 kb جعله من الصعب جداً أن يتم إجراء عمليات التلاعب الجيني فيه. ولذلك، تم تطوير طريقتين لأجل كلونة الجينات باستعمال هذا الناقل النباتي، تعرف الطريقة أو الاستراتيجية الأولى بنواقل الانحشار المشترك (co-integration vectors) والاستراتيجية الثانية بالنواقل الثنائية (binary vectors). ففي الاستراتيجية الأولى، ينتج انحشار الـ DNA الجديد في Ti

plasmid من عملية اعادة ارتباط (recombination) لبلازميد ناقل صغير، كما في نواقل بكتريا القولون، مع Ti plasmid الموجود في الـ Agrobacterium. وتحدث عمليةاعادة الارتباط بين المنطقة المتماثلة الموجودة في كلا البلازميدين (شكل 19.10 A).

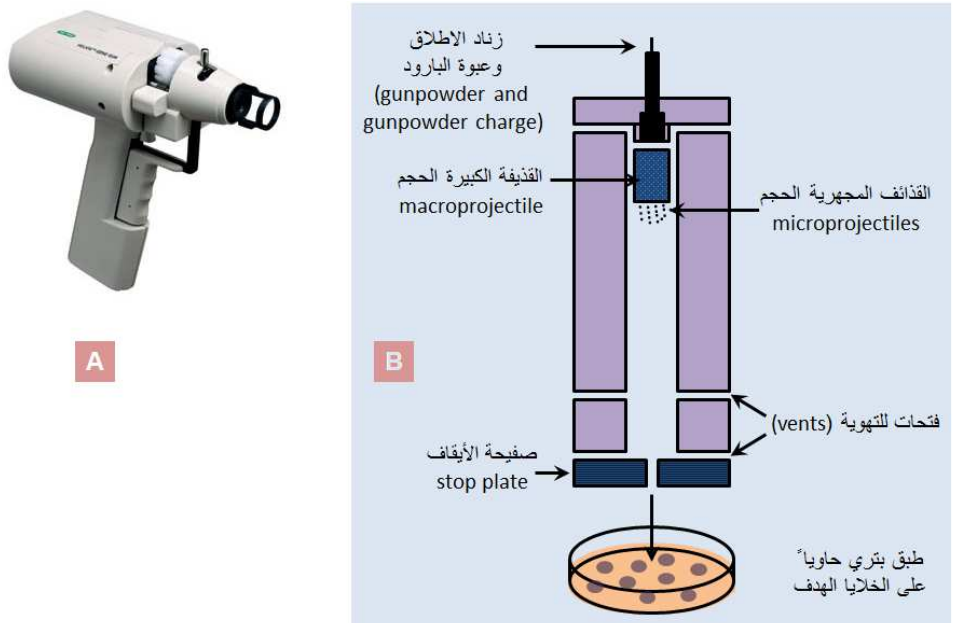


شكل (19.10): ستراتيجية الكلونة باستخدام نواقل الكلونة المشتقة من Ti plasmid: (A) نظام نواقل الانحشار المشترك (co-integration vectors)، وفيه يحمل البلازميد الصغير الجين المراد كلونته بشكل مباشر وينتقل الجين بواسطة عملية اعادة الارتباط مع Ti plasmid الطبيعي، (B) نظام الناقل المزدوج binary cloning system. ان البلازميدين الواهب و المساعد يكملان بعضهما البعض في حالة وجودهما في نفس خلية الـ *Agrobacterium tumefaciens*. وينتقل الـ T-DNA المحمول في بلازميد B الى الـ DNA الكروموسومي في النبات بواسطة البروتينات المشفرة من قبل الجينات المحمولة على البلازميد A (تصميم المؤلف).

في الاستراتيجية الثانية، صمم ما يعرف بنظام الناقل المزدوج binary vector system، والذي يتألف من بلازميد مساعد (helper plasmid) وبلازميد واهب (donor plasmid). ان البلازميد المساعد هو عبارة عن Ti plasmid ولكن بشكل "مزال الأسلحة" بسبب حذف قطعة الـ T-DNA (الحاملة للجينات المسببة للورم) بشكا كامل منه. أما البلازميد الواهب (donor plasmid) فهو عبارة عن بلازميدد يعبر في بكتريا القولون ويحمل قطعة مقتضبة من الـ T-DNA. وهذا يعني أن البلازميدين يعملان معاً بصورة مكملة لبعضهما البعض، حيث يحمل البلازميد الواهب الجين المنحشر محاطاً بالتسلسلات الطرفية للـ T-DNA الخاصة بالقص، بينما يوفر البلازميد المساعد الانزيمات الضرورية (المشفرة من قبل جينات الضراوة *vir* genes) لتوجيه نقل الـ T-DNA الهجين (المحمل بالجين المنحشرالمراد كلونته). وتم تطبيق هذا عملياً وذلك بحمل سلالة *Agrobacterium*

البلازميد المساعد المزال الأسلحة، بينما يحقن البلازميد الواهب بنفس البكتريا وهذا يؤدي الى تكوين نظام الكلونة الثنائي (شكل 19.10 B).

5- تقنية القذائف البايولوجية (biolistic technique): أتى اسم هذه التقنية من الكلمة biological ballistic والتي تعني القذائف البايولوجية. أن السلاح الجيني هو جهاز والذي يقوم "حرفياً" بقذف الـ DNA في الخلايا الهدف. وهي طريقة فيزيائية مباشرة لتحوير الخلايا وراثياً. وفي هذه العملية، يودع غلافاً رقيقاً من الـ DNA بسطح مصنوع من معدن الـ tungsten أو من خرز الذهب الدقيقة والذي يقدر بـ 0.5 – 1.5 µm. يتم تحميل الخرز المحملة بالـ DNA وتطلق بواسطة "السلاح الجيني" (gene gun) وذلك بواسطة فعل انفجاري، أو كهربائي، أو شحنة ضاغطة يقوم بها هذا السلاح. تقذف الخرز المغطاة بالـ DNA بالأنسجة النباتية وتدخل الخلايا وتنحشر ضمن الـ DNA الكروموسومي بشكل عشوائي. (شكل b20.10 a &).

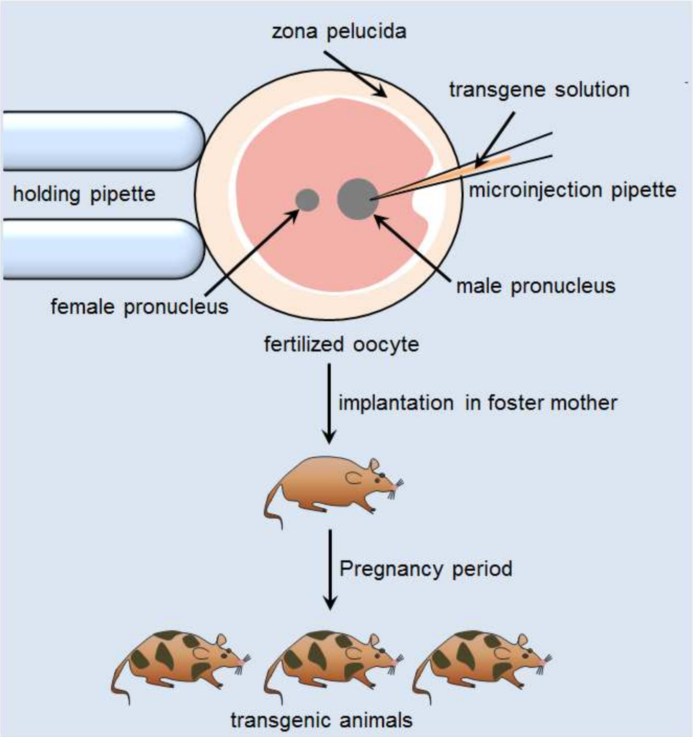


شكل (20.10): السلاح الجيني (جهاز اطلاق القذيفة البايولوجية) الذي يستخدم لإطلاق خرز الـ DNA المغلف بالخلايا النباتية. (a) جهاز السلاح الجيني (Bio-Rad corporation, USA) (b) مخطط يوضح كيفية اطلاق القذيفة البايولوجية من قبل الجهاز. يغلف الـ DNA بالقذيفة المجهرية الحجم (microprojectile)، والذي يتم تسريعها بواسطة القذيفة الكبيرة الحجم (macroprojectile) عند اطلاق هذا السلاح. وفي صفيحة الايقاف، تسترجع القذيفة الكبيرةالحجم الى غرفة الاطلاق بينما تقوم القذيفة المجهرية الحجم بالاطلاق على النسيج الهدف (تصميم المؤلف).

يستخدم السلاح الجيني بالتحديد لخمج الخلايا التي يصعب خمجها بالحمض النووي بطرق اخرى كما في الخلايا النباتية. ولو أن هذه التقنية قد طورت أصلاً للخلايا النباتية، فأنها يمكن لها أن تطبّق بالخلايا الحيوانية والأنسجة والعضيات والخمائر حتى والبكتريا والمايكروبات الأخرى.

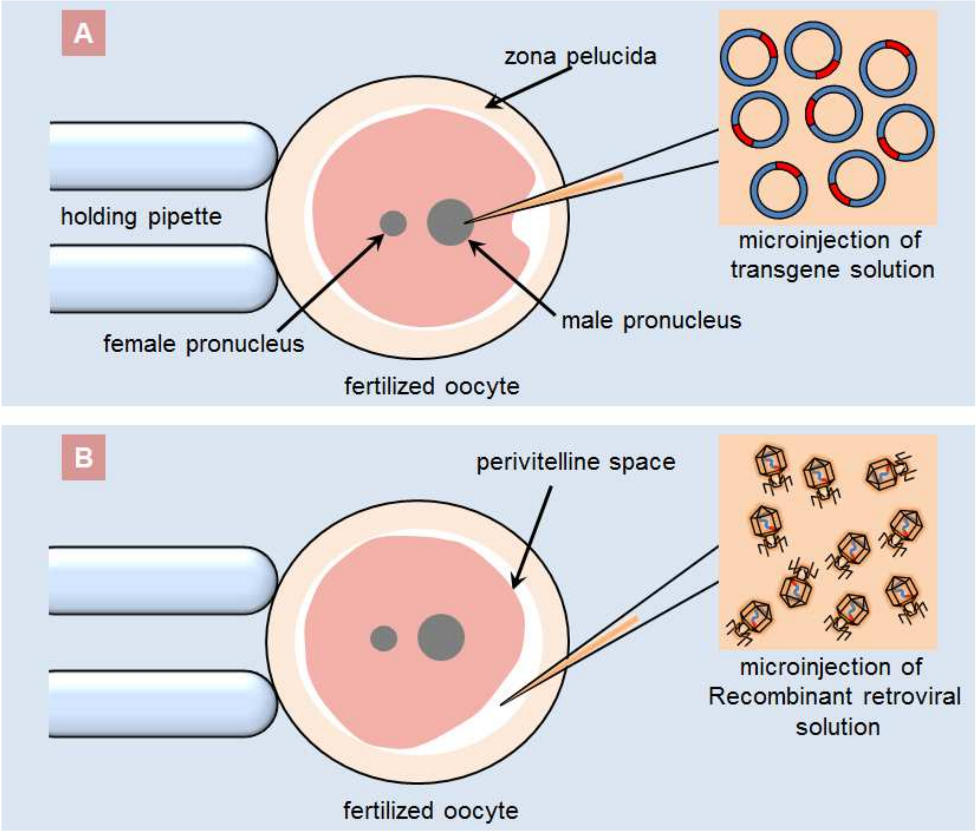
6- تقنية الحقن المجهري في النواة الأولية pronuclear micro-injection: كانت تعد هذه الطريقة واحدة من أكفأ الطرق التي يتم بواسطتها انتاج بعض الحيوانات المهندسة وراثياً. وتتم من خلال حقن الـ DNA بالنواة الابتدائية الذكرية male pronucleus للبيضة المخصبة باستخدام micropipette مخصصة لهذا الغرض (شكل 21.10). يعزى السبب الذي يكمن وراء حقن الجين الغريب في النواة الأولية الذكرية دون الأنثوية لحقيقة كبر حجم النواة الأولية الذكرية مقارنة بنظيرتها الأنثوية، وبالطبع، يسهل هذا من مهمة الباحث الذي يروم حقن الجين بشكل صحيح. ولأغراض التعبير الجيني، فان الجين قيد الدراسة يجب أن يشيّد بشكل صحيح مع منطقة بروموتر وعناصر تنظيم أخرى لتوجه الانتاج البروتيني المتخصص بالنسيج tissue specific production. تغرس الزيجة المتحولة بأم بديلة surrogate mother لتعطي نسلاً محور وراثياً. تعتبر هذه التقنية الوسيلة الأكثر مباشرة في هذا المضمار في انتاج الحيوانات المهندسة وراثياً، حيث تحقن المادة الوراثية في الخلايا الحيوانية بشكل مباشر كما في الخلايا البيضية المخصبة وأحياناً ينحشر الـ DNA الغريب بثبات بجينوم العائل لينتج حيوان مهندس وراثياً transgenic animal. وتستخدم ماصة زجاجية دقيقة جداً في هذا النوع من النقل، حيث يحقن الحين الغريب من خلالها الى الخلية البيضية المخصبة حديثاً والمثبتة في محلها بواسطة ماصة ماسكة.

لابد من الاشارة الى اقتصار هذه التقنية على النقل العمودي للجين حصرا (vertical gene transfer)، ومعنى النقل العمودي للجين هو انتقال الجين من جيل الى آخر (من الآباء الى الأبناء)، وهذا لا يحدث الا بواسطة التلاعب بالخلايا الجرثومية (germ cells)، ويؤدي في حالة نجاحه الى تكوين حيوانات وليدة مهندسة وراثياً (transgenic animals)، وبما أن هذه التقنية تتخصص في حقن الجين الغريب في النواة الذكرية الأولية للخلايا البيضية، وهي بالطبع خلايا جرثومية ، لذا لا يمكن استخدامها في نقل الجين الأفقي (horizontal gene transfer) أي نقل الجين عبر الخلايا الجسمية (somatic cells)، والذي يحدث أما خارج جسم الكائن الحي (*in vitro*) كما في الخلايا النامية في أطباق بتري، أو حقن الجين داخل الجسم مباشرة (*in vivo*) للأغراض العلاج الجيني (gene therapy) كما في حقن الجين المعبأ بالغلاف الفايروسي، أو الممزوج باللاييوزوم على سبيل المثال (أنظر أدناه).



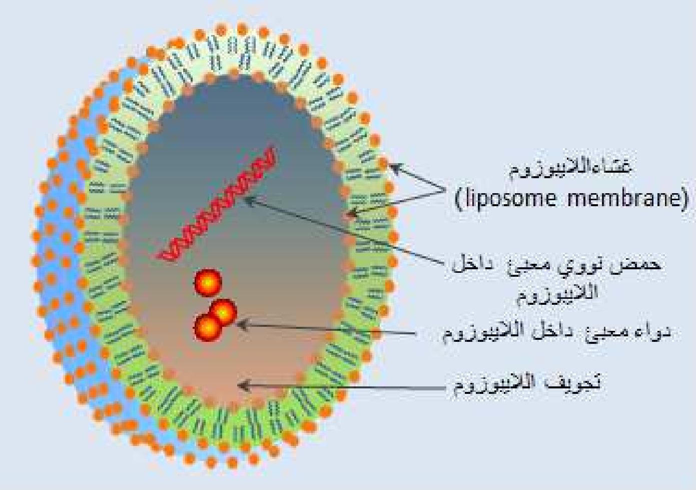
شكل (21.10): مخطط لعملية الحقن المجهري في النواة الأولية. يتم حقن الـ DNA المرغوب بالنواة الأولية الذكرية بواسطة الماصة الدقيقة التي تستخدم لثقب الخلية البيضية. بعد سحب الماصة الدقيقة، تغرس الخلايا البيضية التي ماتزال على قيد الحياة في القناة البيضية للاناث ذات الحمل الكاذب كي تنتج ربما حيوانات وليدة مهندسة وراثياً (تصميم المؤلف).

7- تقنية الخمج الفايروسي (viral transfection) أو تقنية الـ transfection:
توفر الطريقة المتوسطة من قبل الفايروسات وسائل ملائمة وكفوءة في إدخال جينات الكائنات حقيقية النواة إلى الخلايا الحيوانية. تتضمن هذه الطريقة استخدام عدد من الفايروسات، كما في simian virus 40 (SV40) وEpstein-Barr virus (EBV) و retrovirus. يستخدم كذلك baculovirus وبعض خلايا الحشرات كعائل في هذا النظام. تشتق نواقل تعبير اللبائن لهذا الغرض من التسلسل التنظيمي (أي الـ promoter والـ enhancer) التابع لـDNA الفايروسات. وباستخدام هذه التقنية، يمكن حقن الجين عمودياً (شكل 22.10)، أو أفقياً في الخلايا الجسمية مباشرة لأغراض العلاج الجيني كما بينا في أعلاه. لعل أهم المشاكل المتعلقة بنقل الجين بهذه الطريقة تتمثل بالخطر البايولوجي (biohazard) الناجم من التعامل العملي مع تلك الفايروسات. وعلى الرغم من اجتهاد العديد من الباحثين في حذف الجينات البيايولوجية الخطرة، كالجينات المسرطنة الفايروسية، من تلك النواقل الفايروسية الا أن احتمال الخطر البايولوجي على صحة العاملين وعلى صحة المرضى المستلمين لتلك العلاجات يبقى وارداً. وهذا يستوجب العمل في تطوير طريقة نقل غير فايروسية (nonviral gene delivery techniques) كما في اللايبوزومات.



شكل (22.10). مقارنة بين بين تقنية الحقن المجهري في النواة الأولية (A)والنقل الجيني المتوسط من قبل الفايروسات الارتكاسية (B)، وهنا دقائق الفايروسات الارتكاسية قد تم حقنها في الفراغ البيني (perivitelline space) والواقع بين الـ zona pellucida، وهو غشاء الحماية الخارجي للجنين والذي يمنع دخول الفايروسات الهجينة، والغشاء البيضي (oocyte membrane) (تصميم المؤلف).

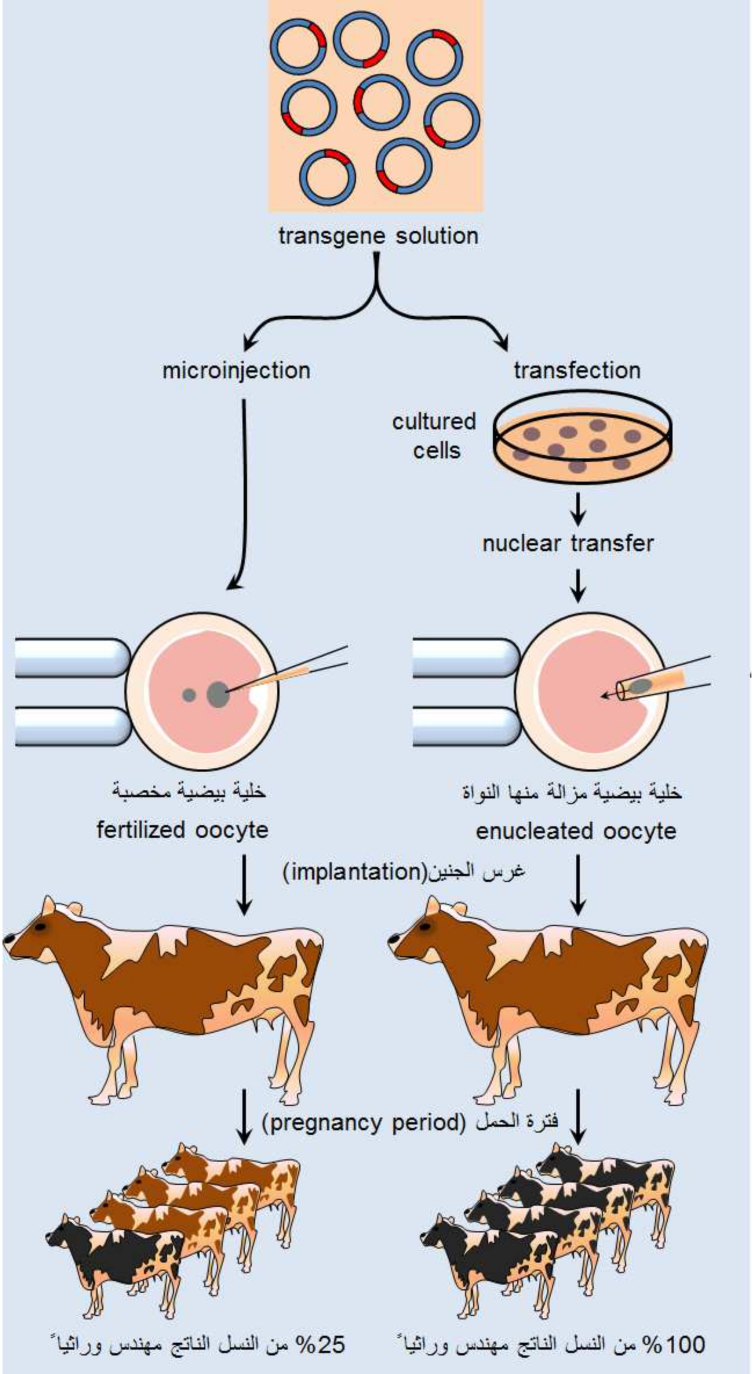
8- تقنية نقل الـ DNA المتوسطة من قبل اللايبوزوم (liposome mediated DNA transfer). وهي تقنية كيميائية بحتة لنقل الجين تعتمد على ارتباط الـ DNA باللايبوزومات، ويمكن أن تستخدم – كماهو الحال في الناقلات الفايروسية – في نقل الجين أفقياً وعمودياً. واللايبوزومات هي عبارة عن كرات مجوفة محاطة بأغشية مصنوعة من جزيئات تشبه الدهون تسمى بالدهون الفسفورية (phospholipids) (شكل 23.10).



شكل (23.10). مخطط يوضح امكانية قيام اللايبوزوم بحمل الجينات. في العديد من الخلايا حقيقية النواة، يحاط اللايبوزوم بأغشية دهون فوسفاتية ثنائية (phospholipids bilayer). تحمل اللايبوزومات الجينات العلاجية أو الأدوية بشكل ما بحيث يمكن للجينات أو للأدوية الاندماج في الغشاء البلازمي للخلية حقيقية النواة وذلك لتطلق محتوياتها في داخل الخلية (تصميم المؤلف).

بعد خلط الـ DNA المهندس وراثياً (المغروس في الناقل الجيني المناسب) مع تلك الكرات، يتم ادخاله الى الخلايا المستسقبلة أما بواسطة حضن تلك المعقدات معها (خارج جسم الكائن الحي)، أو بواسطة الحقن المباشر لتلك المعقدات في جسم الكائن (داخل جسم الكائن الحي). وعند اندماج اللايبوزوم مع الغشاء الخلوي يقوم بتحرير الـ DNA الى السايتوبلازم. وبواسطة آلية غير معروفة، يقوم ذلك الـ DNA بالانتقال الى النواة حيث يتم التعبير ربما عن الجين المرغوب. تعد اللايبوزومات بالاضافة الى كفائتها، غير خطرة من الناحية البايولوجية، وهي بهذه الصفة قد تتغلب عن النواقل الفايروسية المعروفة. ولهذا، تم تجريب العديد من أنواع اللايبوزومات في تجارب العلاج الجيني للعديد من الأمراض وهي مازالت قيد التطوير الى الآن.

9- النقل النووي من الخلايا الجسمية somatic cell nuclear transfer أو SCNT: وتعرف تلك التقنية في معناها الأصيل، التقنية التي يمكن أن تستخدم في تخليق نسخة وراثية متماثلة وراثيا (نسيلة أو كلون) من الحيوان. تتضمن تقنية النقل النووي إزالة النواة من البيضة الغير مخصبة (خلية البيضة oocyte) المأخوذة من حيوان مباشرة بعد التبييض ovulation وذلك باستخدام إبرة خاصة لهذا الغرض تعمل تحت مجهر ذو طاقة عالية high power microscope. الخلية البيضية النامية الآن، والخالية من المواد الوراثية، تدمج مع النواة المأخوذة من الخلية الواهبة donor cell. ثم تتطور الخلية البيضية المندمجة وكأنها جنين طبيعي، ثم تغرس بالنهاية رحم الأم البديلة (surrogate mother) لينتج النسل (شكل24.10). ان اهم أمثلة هذه التقنية والتي وجدت صدى اعلامي كبير هو استنسال النعجة دوللي، وهي نسخة طبق الأصل من الحيوان الواهب الأم (أنظر ملحق هذا الفصل).



شكل (24.10): مخطط يوضح مقارنة بسيطة بين تقنية الحقن النواة الأولية (يسار الشكل) وتقنية النقل النووي من الخلايا الجسمية (يمين الشكل). وفي تقنية النقل النووي من الخلايا الجسمية المحورة وراثيا، كل النسل الناشئ يكون مهندس وراثياً لأنه لا يوجد نواة ماعدا تلك التي تمثل النواة الواهبة، والتي تؤخذ من المزرعة الخلوية الجسمية المخموجة بالـ DNA الغريب (تصميم المؤلف).

يمكن انتاج بعض حيوانات مهندسة وراثياً بواسطة تقنية SCNT. وتدعى هنا بالمهندسة وراثياً (transgenic animals) وذلك لأن النواة الواهبة قد نشأت من خلية تحمل بعض التحويرات الوراثية. وعلى هذا الأساس، أي حيوان نشأ بواسطة هذه التقنية يعتبر"مهندس وراثياً" أو transgenic بسبب حمله لنفس التحويرات الموجودة في الخلايا الجسمية التي أخذت منها النواة الواهبة. وببساطة، تتولد الحيوانات المهندسة وراثياً بواسطة تقنية SCNT عن طريق خمج الخلايا بقطعة الـ DNA الغريب بعد أخذها من الحيوان الواهب وقبل حقن نواتها المحورة وراثياً في الخلية البيضية المزالة نواتها (شكل 24.10).

إن إخصاب البيضة بواسطة النطفة ينتج عن تكوين زيجة zygote والتي تعطي بالنهاية كل خلايا الجسم الناضج – والتي يبلغ عددها أكثر من مئة ترليون خلية بتراكيب وبوظائف متنوعة – من خلال تغييرات تطورية مضطردة. تبدأ الزيجة بعملية الانشطار cleavage وهي العملية التي تعاني عندها الزيجة انقساماً سريعاً من خلية مفردة إلى خليتين بنويتين، 4، 8، 16، وهلم جراً. إلى أن يصل الجنين إلى مرحلة الـ blastula، وحالما يدخل الجنين تلك المرحلة، تصبح الخلايا متمايزة differentiated. إن التمايز يعرف بالعملية التي بها تتبع الخلايا ذات الأصل الواحد مسالك تطورية مختلفة different developmental pathways وصولا إلى الخلايا المتخصصة specialized cells، وعلى سبيل المثال، الخلايا العصبية، الخلايا العضلية، ... الخ. – والتي بالنهاية تكون أنسجة متنوعة وأعضاء الجسم. كل العملية يتم التحكم بها من خلال جينات متنوعة في مجموعة محددة من الخلايا. إن الخلية المنتجة من أول انقسامات قليلة بعد الإخصاب تكون غير متمايزة، وهذا يعني بأنها يمكن لها أن تتطور إلى أي نوع من الخلايا.

إن الخلايا الجنينية الأولية الغير متمايزة قد تم استخدامها كمصدر للكلونة باستخدام تقنيات النقل النووي nuclear transfer techniques، وذلك قبل كلونة النعجة دولي من خلايا جسمية متمايزة (أنظر ملحق هذا الفصل).

Ian Wilmot

Dolly the sheep

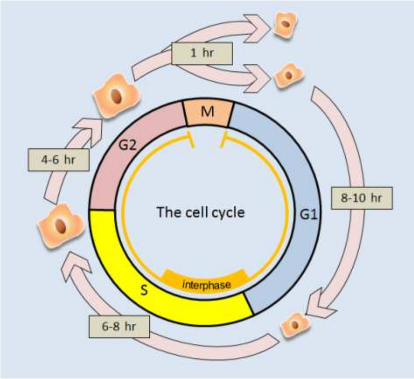
ملحق الفصل العاشر

كلونةالنعجة دولي Cloning Dolly the sheep

حدث هنالك إنجاز تطوري عظيم في مجال البايولوجي والطب في عام 1996 وذلك عندما نجح العلماء في معهد روزلين Roslin institute في اسكتلندا بقيادة العالم أيان ويلموت (Ian Wilmot) في كلونة حيوانات من خلايا مزروعة مأخوذة من نعجة ناضجة (mature ewe). إن دولي (1996 – 2003) هي أول نسخة من

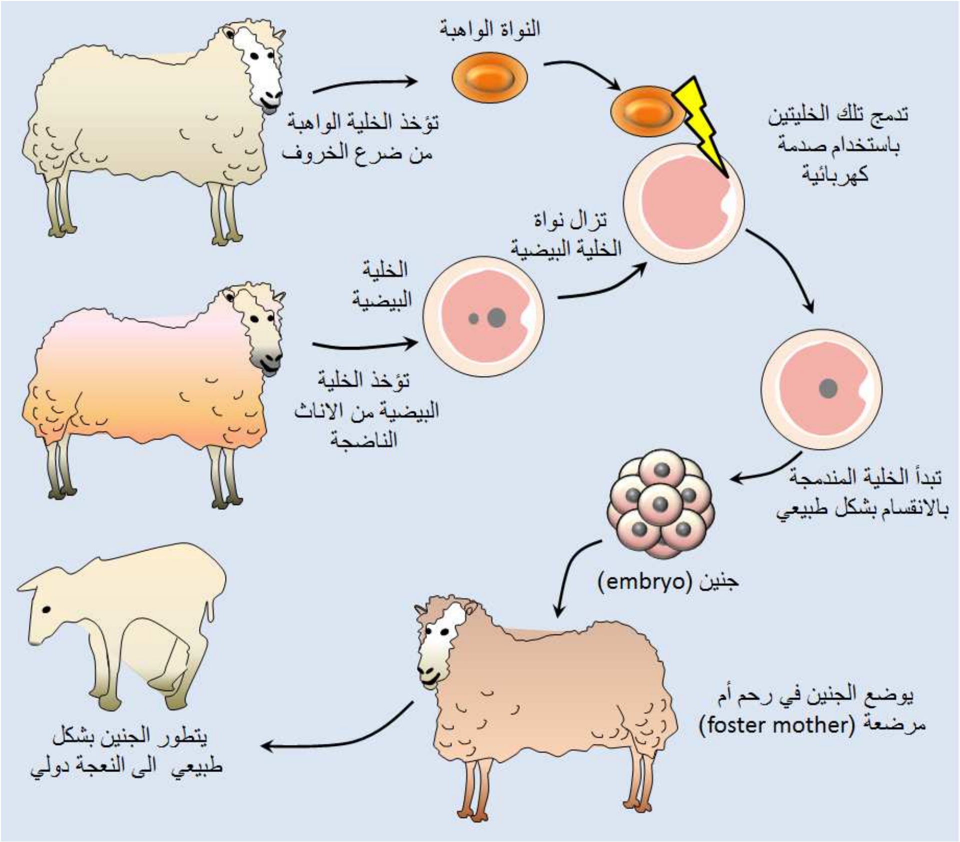
اللبائن تم تخليقها وذلك بنقل النواة من خلية "ناضجة" إلى خلية بيضية غير مخصبة (المزال منها نواتها). وقد تم إنتاج كائنات مستنسخة من خلايا الفئران و الماشية والنعاج والخنازير وحيوانات أخرى.

طبقت تقنية النقل النووي لأول مرة لكلونة الضفادع عام 1952، ولكن الخلايا لم تتطور إلى بعد مرحلة الـ tadpole. وفي منتصف الثمانينات، نجحت الكثير من المجاميع البحثية في إنتاج نعاج وأبقار عن طريق تقنية النقل النووي باستخدام الخلايا الجنينية المبكرة. وفي بعض الدراسات اللاحقة، استخدمت خلايا الأجنة التي عبرت إلى مرحلة 64 إلى 128 خلية في إنتاج العجول. إن التقدم الرئيسي الذي مهد لكلونة نعجة دولي هو عندما أنتج الباحثون في معهد روزلين بنجاح عجولاً بواسطة تقنية النقل النووي من خلايا مأخوذة من الأجنة المبكرة المزروعة منذ عدة أشهر في المختبر. إن التجربة المستخدمة للخلايا الجنينية المزروعة أدت إلى كلونة النعجة دولي باستخدام خلايا ناضجة (متمايزة)، والتي اختلفت عن كل المحاولات السابقة في توظيف الخلايا الجنينية (الغير متمايزة) في عملية الكلونة. إن النجاح في كلونة الخلايا الناضجة أثبتت بأن تمايز الخلايا هو عملية عكسية، وان الوقت هو كفيل بتطوير التلاعب الجيني وإعادة برمجة تمايز الخلايا. إن السر في نجاح كلونة النعجة دولي هو التنسيق الحذر في دورة الخلية cell cycle للخلية الواهبة (شكل 25.10). إن الخلايا المستخدمة كواهبات للنقل النووي تكون في مرحلة في دورة الخلية يطلق عليها بمرحلة الخمود quiescence– وهو الطور الذي عنده تعتقل الخلية وتتوقف عن الانقسام لمعظم الخلايا، ويمكن تمثيل تأريخ الحياة كدورة متكررة من الطور الاستوائي metaphase (M phase) والطور البيني interphase. يتضاعف DNA الخلايا خلال جزء خاص من الطور البيني يطلق عليه بالـ S phase. يحتوي الطور البيني كذلك على فجوتين زمانيتين: G1 والواقعة بين نهاية الانقسام الخيطي mitosis وبداية الـ S phase، و G2 والذي يفصل بين الـ S phase وبداية الانقسام الخيطي M phase. ولا يصنع DNA خلال طوري الـ G1 و الـ G2، وعلى أية حال، يحدث تخليق البروتين في كل أنحاء الطور البيني. وللتبسيط، يمكن ملاحظة دورة الخلية بأنها تتألف من طورين أساسيين – طور للانقسام النووي لتكوين خليتين بنويتين (الانقسام الخيطي)، وطور آخر لتخليق الـ DNA والبروتين. إن الخلايا التي لا تنقسم هي عادة ما تعتقل (يتوقف نموها) في طور الـ G1.



شكل (25.10): دورة الخلية النموذجية في الكائنات حقيقية النواة كاللبائن (تصميم المؤلف)

ولأجل كلونة النعجة دولي، تشتق الخلية الواهبة المستخدمة من غدة الضرع mammary gland لنعجة عمرها ستة سنوات في آخر ثلاث أشهر من الحمل. يوقف نمو الخلايا وذلك بتنميتها على وسط ذو تراكيز قليلة من المغذيات لخمسة أيام. تستحصل البيوض المخصبة من عجول اسكوتلاندية معينة بين 28 إلى 33 ساعة بعد حقن الهرمون المطلق للجونادوتروبين gonadotropin releasing hormone، ثم تزال الأنوية (شكل 26.10).



شكل (26.10). خطوات كلونة النعجة دولي.أزيلت النواة الواهبة من الخلية الجلدية للنعجة الناضجة وادخلت الى السايتوبلازم الفارغ في بيضة النعجة الفارغة وذلك لتكوين الجنين المكلون. تقوم بروتينات سايتوبلازم البيضة باعادة برمجة جينوم النعجة الناضجة الواهبة، وبعدها يقوم الجينوم المعاد برمجته بتوجيه الخلية لكي تصبح أقل تخصصاً. تغرس النسيلة (الكلون) الناتجة والواصلة الى مرحلة الـ blastocyst في رحم الانثى المرضع، لتولد نعجة "دوللي" (تصميم المؤلف).

تتمثل الخطوة القادمة بنقل النواة من خلية ضرع واهبة إلى خلية بيضة مزالة منها النواة. هنا يتم تسليط نبضة كهربائية لحث اندماج الخلايا الواهبة بخلية البيضة عديمة النواة ولتنشيط الخلية على التطور. ومن مجموع 277 خلية مندمجة مستحصلعليها، تم تطوير29 منها إلى أجنة (في مرحلة الـ morula أو الـ blastocyst). لقد قام Ian Wilmot وزملائه بزرع 13 نعجة، وهذا أنتج في نسل واحد على قيد الحياة يدعى دولي. اذن، لاتتجاوز نسبة نجاح العملية بكاملها الـ0.4% ليس الا !

أسئلة الفصل العاشر

السؤال الأول: علل ما يلي

يعبر عن الانزيمات القاطعة بالنظام المناعي في البكتريا؟
يمكن للبكتريا من أن تميز بين الـ DNA التابع لها والـ DNA الغريب عنها؟
يعتبر ربط النهايات اللزجة لجزيئات الـ DNA أسهل من ربط النهايات المستوية لنفس تلك الجزيئات؟
لابد من اضافة الواصلات في بعض التطبيقات عندما يكون المراد هو كلونة قطع DNA ذات نهايات مستوية؟
تعد طريقة التذييل ذو البوليمرالمتجانس (homopolymer tailing) أقل شيوعاً من الطرق الأخرى في ربط نهايات جزيئات الـ DNA ببعضها؟
يمكن تحوير العاثي لامدا بنجاح عن طريق حذف منطقته الوسطى بالذات؟
تعد عملية استخدام النواقل الجينية المشتقة من العاثي لامدا أكثر تعقيداً من استخدام النوقل البلازميدية في نقل الجين؟
لاتستخدم البلازميدات عادة في عملية تشييد المكاتب الجينية للكائنات الراقية؟
عندما يكون المراد تشييد المكتبة الجينية يفضل أن تقطع قطع الـ DNA بشكل جزئي بالانزيم القاطع؟
يفضل استخدام الخلايا الراقية على خلايا بكتريا القولون كمضيف للـ DNA الغريب في بعض التطبيقات؟
عند قطع جين حيواني ما بانزيم قاطع وربطه في ناقل مناسب وادخال ذلك الناقل في بكتريا القولون، فانه يفشل في التعبير عن هذ االجين؟
ان Ti plasmid الطبيعي غير ملائم لكي يستخدم في تجارب الكلونة؟
على الرغم من كفاءة طريقة نقل الجين عن طريق الفايروسات المهندسة وراثياً الا أن المجتمع العلمي يفضل نقل الجينات طريقة لاتعتمد على الفايروسات؟
اكتسبت تجارب كلونة العجة دولي صدى اعلامي كبير على الرغم من أن "دولي" هي ليست أول كائن مستنسل في العالم؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

يعد انزيم *Eco*RI أحد أنواع انزيمات ....

a. endoonucleases   b. RNases   c. Dnases   d. polymerases

يعمل نظام التحوير في البكتريا على شريط الـ DNA الـ ....

a. methylated   b. non-methylated   c. hemimethylated   d. none

لعل العلة من وجود الانزيمات القاطعة في البكتريا هو للمشاركة في عملية الـ................

a. infection   b. protection   c. metabolism   d. endocytosis

اذا افترضنا بأن تلك التسلسلات الحساسة الثمانية النيوكليوتيدات التي يميزها الانزيم القاطع *Not*I بأنها تتوزع بشكل متساوي ضمن الجينوم، فيمكن لهذا الانزيم أن يقص موقع واحد لكل .... زوج قاعدي.

a. 256 b. 4026 c. 65536 d. 1048576

ان التسلسل .... هو تسلسل غير بالندرومي.

a. 5′-GAATTC-3′ b. 5′-GAATTCCTTAAG-3′ c. 5′-GGCC-3′ d. 5′-GCTACT-3′

لاتشارك انزيمات الـ DNA ligases بتفاعلات .... داخل الخلية.

a. lagging strand synthesis b. excision nucleotide repair c. photoreactivation d. non-homologous end joining

يحتاج الانزيم terminal transferase الى .... لتأدية عمله بنجاح.

a. primer only b. primer + template c. template + dNTPs d. primer + dNTPs

تعد صفة .... غيرشائعة في النواقل الجينية عادة.

a. low copy number b. completely sequenced c. presence of one origin of replication d. easy mode of gene transfer

اذا انحشرت قطعة DNA ما في البلازميد المقاوم للـ ampicillin، يكون البلازميد الهجين الناتج .... للـ ampicillin.

a. highly resistant b. moderately resistant c. not resistant d. none

تستخدم .... في تجارب معرفة تسلسل الـ DNA.

a. M13 b. λ phages c. cosmids d. pBR322

اذا احتوت قطعة الـ DNA على أصل التضاعف مع سنترومير وتيلومير عندها يمكن تسميتها بالـ...............

a. plasmid b. λ phages c. cosmids d. artificial chromosome

تعد طريقة .... هي تقنية فيزيائية مباشرة لتحوير الخلايا جينياً.

a. viral transfection b. liposome mediated transfer c. biolistic transfer d. none

تقتصر طريقة.................... على النقل العمودي للجين حصراً.

a. biolistic transfer b. nuclear microinjection c. electroporation d. viral transfection

السؤال الثالث: عرف ما يلي

cloning, clone, palindromic DNA, cos sequences, *in vitro* packaging, cosmids, DNA library, T DNA, chimeric DNA, liposomes, quiescence stage of the cell cycle

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

DNA transfer of 5 kb capacity	λ phages
DNA transfer of 20 kb capacity	Plasmids
DNA transfer of 50 kb capacity	Bacterial artificial chromosomes
DNA transfer of 200 kb capacity	Yeast artificial chromosomes
DNA transfer of 350 kb capacity	Cosmids

وللمزيد من الاطلاع اقراء:

Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science, USA. 2008.

Al-Shuhaib M, Al-Saady A., Mahanem N. Study of rabbits transgenesis efficiency by sperm mediated gene transfer technique. PhD thesis presented to college of science, university of Babylon, 2011.

Berk A., Zipursky S., Baltimor D., Darnell J., and Lodish H. Molecular Biology. Fourth edition. Paul Matuataira, USA, 1998.

Brown T. A. gene cloning and DNA analysis. Sixth edition, Wiley-Blackwell, 2010.

Clark D. Molecular biology: understanding the genetics revolution. Elsevier, 2010.

Dale J., and Schantz M. From Genes to Genomes; concepts and applications of DNA technology. John Wiley and Sons, 2002.

Dunn, L. C. *A Short History of Genetics.* New York: McGraw-Hill. 1965.

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

Hanson B., and Jorde L. Kaplan USML Step 1 lecture notes. Kaplan Incorporation, 2001.

Houdebine L. Animal transgenesis and cloning. 2003, John Wiley & Sons Ltd.

Klotzko A. The cloning source book. Oxford University press/2001.

Kumar H. D. Molecular genetics and biotechnology. Second edition, Vikas Publishing House, India, 1997.

Koolman J. and Roehm K. Color Atlas of biochemistry. Second edition, Thieme, Stuttgart-New York – 2005.

Lanza, R. P., Dresser, B. L., and Damiani, P. 2000. Cloning Noah's Ark. *Sci. Am.* 283(5), 84-89.

Matthew, J. E., Gutter, C, Loike, J. D., Wilmut, 1., Schnieke, A. E., and Schon, E. A. 1999. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer- derived cloned sheep. *Nature Genetics* 23, 90-93.

Nicholl D. S. D. An introduction to genetic engineering. Third edition, Cambridge university press, 2008.

Paterson, L. A., Wells, D. N., and Young, L. E. 2002.Somatic cell nuclear transfer. *Nature A\9*, 583-586.

Primrose S.B, Twyman R.M., Old R.W. Principles of gene manipulation. Blackwell science. 2001.

Prescott L.M. Microbiology. Fifth edition, The McGraw−Hill Companies 2002.

Reece R.J. Analysis of genes and genomes. John Wiley & Sons, 2004.

Robinson, R. Genetics. Volume 3.Thomson™ Gale/USA/2003.

Schleif, R. Genetics and molecular biology. Second edition, Addison-Wesley Publishing Company, 1993.

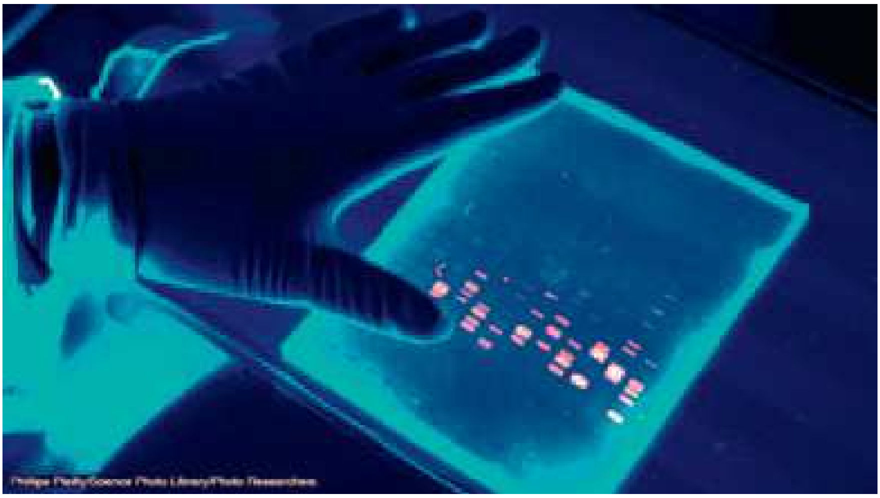
Tamarin. Principles of genetics. Seventh edition. The McGraw−Hill. 2001.

Verma P., and Agarwal V. molecular biology. First Edition Schand group, India 2004.
Wilmut, 1. 1998. Cloning for medicine. *Scientific America* 279(6), 58-63.
Wilmut, 1., Beaujean, N., de Sousa, P. A., Dinnyes, A., King, T. J.,
Wong D.W.S. The ABCs of gene cloning. Second edition, Springer, 2006.Somatic cell nuclear transfer. *Nature A\9*, 583-586.

11

الفصل الحادي عشر

كيفية التعامل مع الجين



عينات DNA مقطعة بانزيمات قاطعة ومرحلة على هلام الأكاروز وموضوعة تحت مصدر للأشعة الفوق بنفسجية لرؤية الحزم المتفلورة بسبب اصطباغها بمادة بروميد الاثيديوم (Fitgerald-Hayes and Reichsman, 2010).

مقدمة

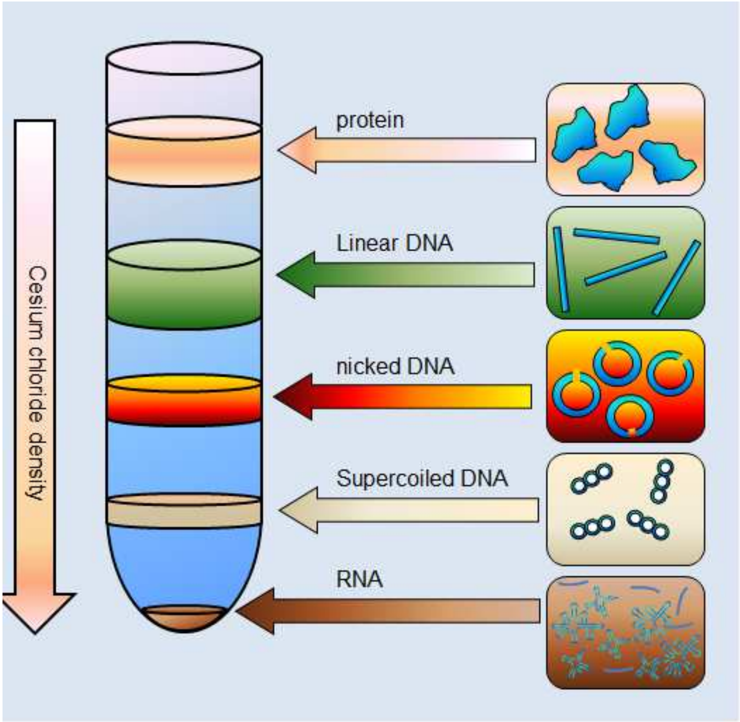
عرضنا في الفصل السابق خطوات كلونة الجينات الأساسية، وعرضنا كيفية ادخال الجينات سواء في الكائنات بدائية النواة أو في الكائنات حقيقية النواة.ولكننا لم نتناول كيفية التعامل مع الجين على النطاق العملي. حيث أننا لم نركز على مصير الـ DNA الغريب أو الجين بعد دخوله الى تلك الخلايا وكيف نكشف عن ذلك المصير، لأن هذا الكشف يتطلب تقنيات مختلفة، فقد تقوم تقنية ما بالكشف عن وجود أو عدم وجود الجين فقط، بينما تقوم تقنية أخرى بالتحري عن احتمالية انحشار ذلك الجين في الجينوم من عدمه، بينما تقوم تقنية أخرى بكشف قدرة ذلك الجين على اعطاء نسخ RNA منه وعلى كمية تلك النسخ، والأبعد من ذلك، هو استخدام تقنيات معينة في الكشف عن قدرة ذلك الجين في التعبير عن نفسه واعطاء بروتين مهندس وراثياً. ولابد من الاشارة الى أن هذا الفصل يعد من أكثر فصول الكتاب أهمية من الناحية التطبيقية، لأنه يسلط النظر على جوانب مختلفة من علم الهندسة الوراثية. ويبين عدم اقتصار هذا العلم على كلونة جين ما فقط، وانما يسلط الضوء على مناح أخرى في تقنية الجينات لابد من ادراجها في الوقت الراهن واعتبارها أساساً حديثاً يضع في نصب عين القارئ الكريم كيفية تعامل الباحثين عملياً مع الجين. ولعل هذا يبدو واضحاً عند استعراض أهم التقنيات المستخدمة في هذا المضمار في الوقت الحاضر.

كيف نحصل على الجين (قطعة الـ DNA المرغوبة)

لعل أهم الأمور ذات الأهمية الكبيرة في كلونة الجين تتعلق في كيفية ايجاد التسلسل المرغوب للـ DNA، لأن هنالك الملايين أو البلايين من الأزواج القاعدية للـ DNA في الخلية. وللحصول على جزيئة الـ DNA أو الجين المرغوب يوجدعدة طرق لانجاز ذلك.

الطريقة الأولى: عزل المادة الوراثية والتقطيع الانزيمي. بعد عزل كل المادة الوراثية، يصار الى فصل الجين المعني عن بقية المادة الوراثية بواسطة انزيم قاطع مناسب. ولاتعد تلك الطريقة، أي عزل الـ DNA، هي الطريقة الوحيدة في الحصول على الجين ولكنها الطريقة الأقدم في ذلك. تعتبر جزيئات الـ DNA جزيئات طويلة وخطية وسهلة الكسر والتحطم بمجرد تمرير عالق الـ DNA في "زارقة ابر" أو syringe عدة مرات. لذا، لابد من توفر وسائل مناسبة للحصول على المادة الوراثية المحتوية على الجين المرغوب. وبعد التأكد من وجود ذلك الجين في المادة الوراثية لكائن معين، يصار الى استخلاص المادة الوراثية من ذلك الكائن. وبعد الحصول على الـ DNA ككل، بفصل الجين المرغوب عادة بواسطة انزيم قاطع مناسب ثم يربط بالناقل المناسب له (راجع الفصل العاشر). يعد الحصول على الـ DNA سواء أكان من الكروموسوم أو غير الكروموسوم (من البلازميدات) نقطة البدء للعديد من تجارب الهندسة الوراثية. وكان الـ DNA يستخلص وينقى عن طريق التقنيات التقليدية من تفجير مستخلصات الخلية بوجود المنظفات وعن طريق استخدام الفينول

(مادة عضوية لا تمتزج جيداً مع الماء) في ازالة البروتينات، حيث ترتبط معها البروتينات الخلوية وتنمسخ بينما تبقى الأحماض النووية في المحلول المائي (aqueous solution) ليتم سحبها بواسطة ماصة دقيقة. ويمكن التخلص من الـ RNA بواسطة انزيم الـ RNase. تعاني تلك الطرق القديمة من مشكلة اساسية تتمثل باستخدام الفينول والذي هو مادة ذات خطر بايولوجي شديد على صحة البشر، ويحتمل تسببها بالسرطان بعد تراكمها في الجسم البشري. ان الذي حدا الباحثين في استخدام هكذا مواد خطرة هو احتياج تجارب الهندسة الوراثية - كما في تجارب التقطيع الانزيمي والكلونة - الى DNA ذو نقاوة عالية وذلك لتجنب الانزيمات الهاضمة للحمض النووي (nucleases)، وكذلك للتخلص من التثبيط المحتمل للانزيمات القاطعة بسبب تلوث عينات الـ DNA المستخلصة. وهنالك تقنية أخرى تقوم بتنقية الـ DNA بشكل كامل وذلك باستخدام جهاز النبذ المركزي الفائق السرعة باستخدام مواد متدرجة الكثافة (density gradient centrifugation) (شكل1.11).



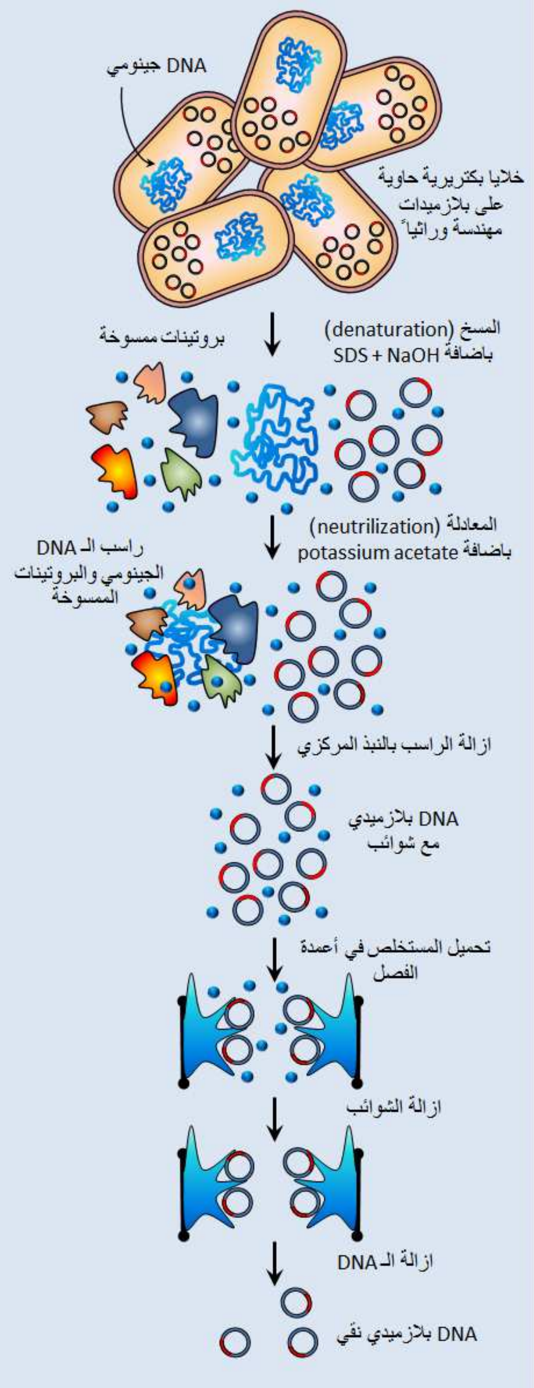
شكل (1.11). مخطط يوضح آلية نبذ جزيئات الـ DNA من خلال متدرج الكثافة بكلوريد السيزيوم - بروميد الاثيديوم. تخلط عينة الـ DNA بكلوريد السيزيوم وبروميد الاثيديوم وتنبذ مركزياً بسرعة عالية لمدة 48 ساعة. يصنع كل مكون حزمة عند كثافته الخاصة به وهذا، بالنسبة للـ DNA، يتأثر بمقدار تصبغ الجزيئة ببروميد الاثيديوم، فالجزيئة المسترخية قابلية أكبر على التصبغ ببروميد الاثيديوم وذلك للمقدرة العالية لهذه الصبغة على الانحشار في الجزيئة المسترخية مقارنة بتلك الملفوفة لفاً فائقاً، وهذا ينعكس على مقدار تألقها بشكل طردي (تصميم المؤلف).

على الرغم من دقة هذه التقنية العالية في استخلاص الـ DNA الا انها تتطلب وجود جهاز النبذ المركزي الفائق السرعة والذي هو غال الثمن جدا ويصعب توفره لهذا

السبب في أي مختبر، كما تتطلب هذه الطريقة عن نبذ مركزي مستمر لمدة لا تقل عن 48 ساعة لفصل الحزم بشكل كاف. ولهذا، تكون هذه الطريقة منهكة اذا ماقورنت بالتقنيات قليلة التكلفة والكفوءة والتي تستخدم حالياً بشكل كبير في عزل وتنقية الـ DNA.

أما الآن، فتتوفر العديد من العدد التي تضطلع باستخلاص وتنقية الدنا (DNA extraction and purification kits). والتي توفر وسيلة غير مكلفة وبسيطة وسريعة لعزل الـ DNA من مصادر مختلفة سواء أكان من خلايا تعود الى أحياء مجهرية أو الى فطريات أو نباتات أو لبائن. وقد تم تبسيط خطوات عمل تلك العدد في السنوات الأخيرة بحيث يتم استغلال أعمدة خاصة (spin columns) بعدة مواصفات لعزل أي DNA مرغوب والتخلص من أية ملوثات أخرى، وقد أثبتت تلك الأعمدة قليلة التكلفة كفائتها في اعطاء DNA عالي النقاوة (high pure DNA yield). وعلى سبيل المثال، تلعب أعمدة الفصل دور كبير في تنقية الـ DNA البلازميدي، حيث تحل تلك الأعمدة مشكلة كبيرة في تجارب الكلونة تتمثل بتلوث عينات الـ DNA البلازميدي بـ DNA كروموسومي. ان المبدأ التي تعتمده غالبة العدد المستعملة في تنقية الـ DNA البلازميدي هو نفسه المعتمد على طريقة Brinboim and Dolly عام 1979 والتي تدعى بطريقة التحلل القاعدي (alkaline lysis) ولكن بتحويرات مختلفة سهلت هذه العملية باستخدام اعمدة الفصل. تعتمد هذه الطريقة على حقيقة مسخ جزيئات الـ DNA الخطية، وليس الدائرية، بعد تعرضها الى pH قاعدي (بين 12 و 12.5). وعلى الرغم من أن كروموسوم بكتريا القولون هو كروموسوم دائري ولكنه كبير الحجم مقارنة بالبلازميدات الصغيرة الحجم الدائرية، فبمجرد تحطيم جدران الخلايا البكتيرية يؤدي ذلك الى تكسر ذلك الكروموسوم وتحوله الى أشكال خطية، وبما أن الأشكال الخطية لا تعود الى حالتها الطبيعية بعد مسخها بالمحلول القاعدي مقارنة بالاشكال الدائرية (البلازميدات)، لذا استغلت هذه الظاهرة في فصل الـ DNA البلازميدي عن نظيره الكروموسومي (شكل2.11). وبعد فصل البلازميدات يتم تنقيتها باعمدة الفصل الحاوية على المصفوفات الملائمة للالتصاق بالـ DNA المطلوب والمتداولة في الوقت الحاضر.

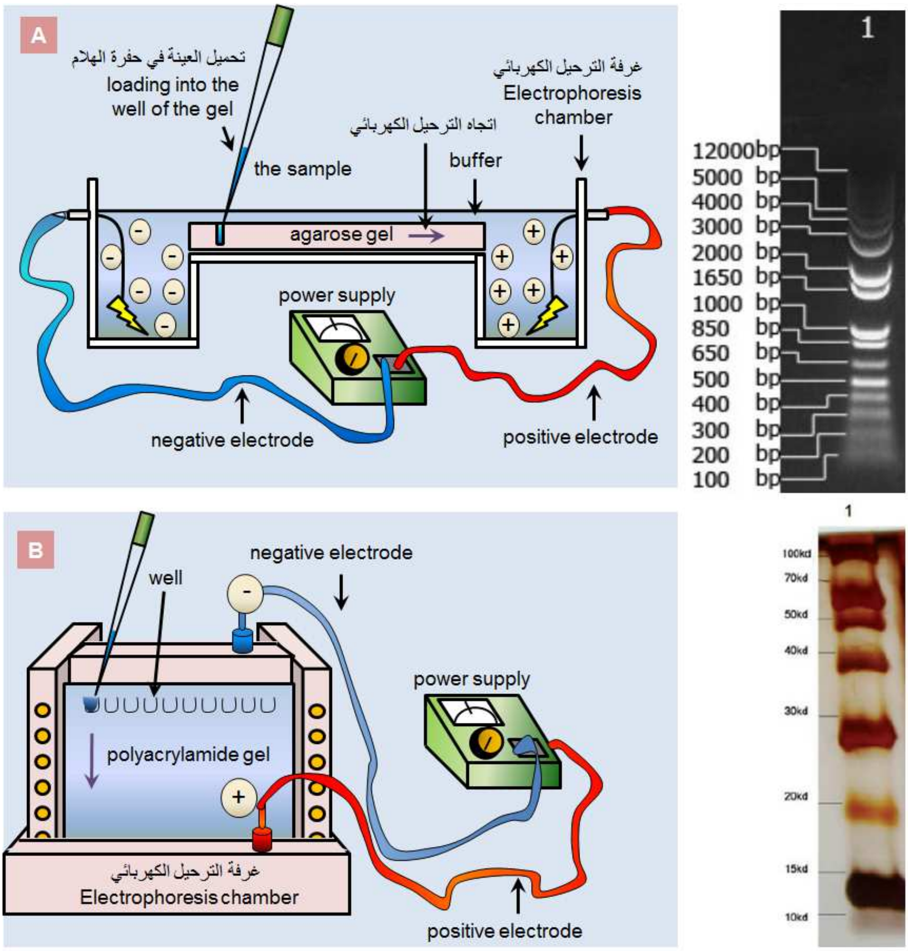
مهما كانت الطريقة المستخدمة في استخلاص الـ DNA، توجد هنالك عدة طرق يمكن من خلالها تحديد كمية الـ DNA المستخلص، تتمثل أبرزها في قراءة امتصاص الـ DNA على طول موجي 280 نانوميتر، كما يمكن معرفة نقاوة الـ DNA المستخلص عن طريق تقسيم ناتج القراءة في الطول الموجي 280 على ناتج قراءة نفس العينة عند طول موجي 260 نانوميتر، فاذا كانت النتيجة 1.8 فيعني ذلك ان هذا الـ DNA المستخلص يتمتع بنقاوة عالية جداً، اما اذا كان أقل فهو ملوث بالبروتينات وان كان أكثر فهو ملوث بالـ RNA عادة. أما لمعرفة حجم الـ DNA المستخلص، فتستخدم عادة تقنية الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز. ويمكن أيضا استخدام هذه التقنية لدى ذوي الخبرة في معرفة نقاوة وكمية الـ DNA بالاضافة الى حجمه.



شكل (2.11). تنقية الـ DNA البلازميدي. تكسر الخلايا البكتيرية الحاوية على البلازميدات باستخدام دارئ يحتوي على مادة SDS. يعمل وجود هيدروكسيد الصوديوم على ضمان مسخ الـ DNA الجينومي. وبعد اضافة دائ التعادل (neutralization buffer) يتكتل الـ DNA الجينومي لكي يكون راسب مع البروتينات المكونة معقدات مع مادة SDS. يمكن ازالة تلك المعقدات بالنبذ المركزي. ثم يربط الـ DNA البلازميدي بالمصفوفة (matrix) الواقعة في أسفل أعمدة الفصل التي لايمكن للمواد الملوثة الالتصاق بها. ثم يصار الى ازالة البلازميد النقي من المصفوفة (تصميم المؤلف).

وفي تقنية الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز، تنفصل الجزيئات العملاقة عن بعضها البعض اعتمادا على حجمها، فالجزيئات الكبيرة تتحرك ببطئ بينما تتحرك الجزيئات الخفيفة بسرعة كبيرة، ويمكن تحديد حجم تلك الجزيئات في الهلام بواسطة واسم حجمي (size marker) أو سلّم (ladder) ملائم لهذا الغرض (شكل 3.11-a). هذا وليس كل الجزيئات العملاقة يمكن فصلها في هلام الأكاروز، لأن هذا الهلام مناسب لفصل جزيئات الأحماض النووية الـ DNA والـ RNA، أما البروتينات، فيمكن فصلها باستعمال الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الأكريلامايد مباشرة (polyacrylamide gel electrophoresis) أو PAGE بعد مسخها بمادة sodium dodecyl sulphate (SDS). ان السبب الرئيسي لاستخدام هذه الطريقة في

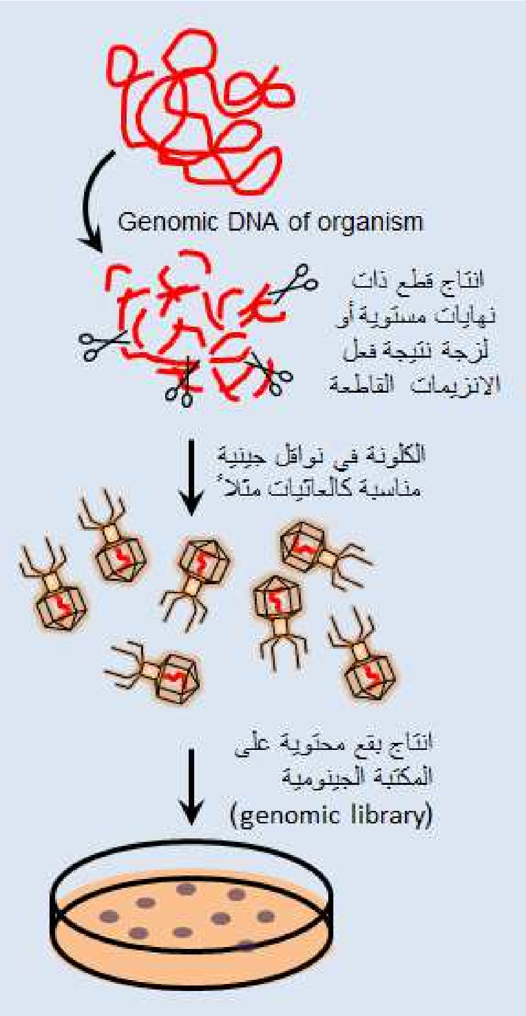
فصل البروتينات هو عدم امكانية استخدام صفة الشحنة الكهربائية في فصل البروتينات، حيث تمتلك بعض البروتينات "محصلة" شحنة موجبة أو سالبة في pH معين وتفقد هذه الشحنة عند تغير الـ pH بينما تتميز بروتينات أخرى بمحصلة متعادلة. لذا قام Laemmli عام 1970 بالغاء الاعتماد على الشحنة البروتينية والاعتماد على الوزن الجزيئي حصراً للبروتينات المفصولة وذلك بمسخ البروتينات بمادة الـ SDS . وقد اكتسبت تلك التقنية شهرة كبيرة بسبب فوائدها الكبيرة والتي أهمها يتمثل بقوة الفصل العالية لهذه الطريقة التي تسمى أيضاً بطريقة SDS-PAGE (شكل 3.11-b).



شكل (3.11): مخطط للترحيل الكهربائي (A) الترحيل الكهربائي الأفقي في هلام الأكاروز وحزم DNA مفصولة في هلام الأكاروز المصطبغ ببروميد الاثيديوم (ethidium bromide). المسار 1 يمثل واسم الـ DNA الحجمي. (B) الترحيل الكهربائي العمودي في هلام متعدد لأكريلامايد وحزم البروتينات المفصولة في هلام متعدد الأكريلامايد الممسوخ (SDS-PAGE) والمصطبغة بنترات الفضة، المسار 1هو الواسم الحجمي البروتيني (تصميم المؤلف).

الطريقة الثانية: تشييد المكتبة الجينية.على الرغم من قدرة الباحث على عزل قطع الـ DNA المنتخبة كما هو مناقش سلفاً، يكون من المفضل أحياناً تقطيع كل الجينوم واستنسال كل القطع بواسطة استخدام الناقل. وبعدها، يمكن تشخيص النسيلة المرغوبة. ولكي نتأكد من أن كل الجينوم قد تم تمثيله في هذه المجموعة من النسائل، أي المكتبة الجينية، يجب المحافظة على أكثر من ألف سلالة بكتيرية متحولة، حيث كلما كان الجينوم كبيراً، كلما زادت الحاجة الى نسائل أكثر. يدعى مجموع النسائل المحتوية على كل قطع الـ DNA من مصدر واحد بمكتبة الـ DNA. وعلى سبيل المثال، عندما يتم عزل DNA الجينوم من خلايا البشر، ويصارالى تقطيعه الى قطع عديدة، تدعى تلك القطع عندها بمكتبة الجينوم البشرية (human genome library)، والتي تحتوي على كل تسلسلات الـ DNA الموجودة في جينوم البشر.

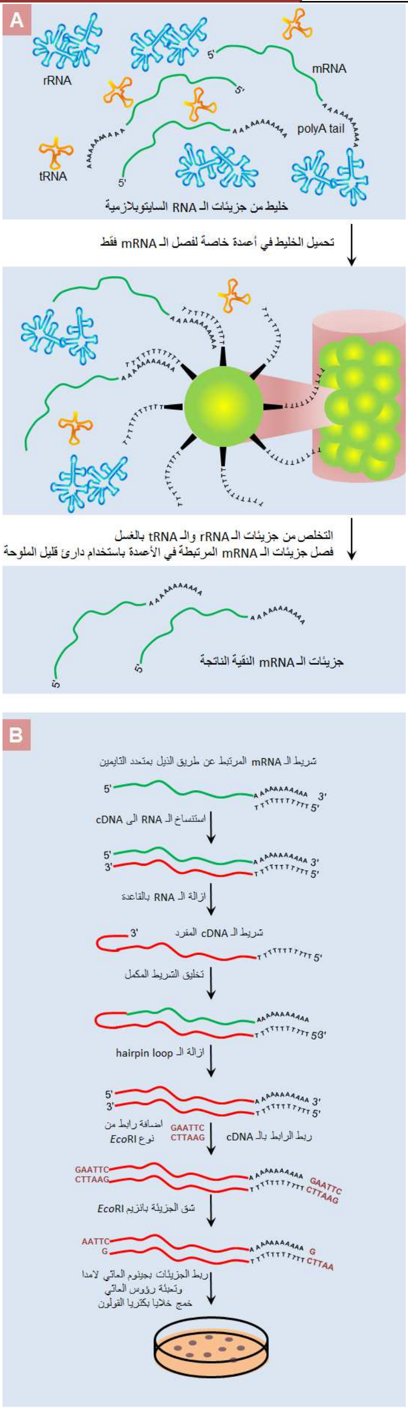
<ins>مكتبة الجينوم (genomic library):</ins> لتخليق مكتبة الجينوم، تجمع الخلايا وتحطم، ويعزل منها الـ DNA، ثم يقطع الـ DNA الى قطع أصغر بواسطة انزيم قاطع بشكل جزئي (partial digestion). يتم التقطيع الانزيمي بشكل جزئي وذلك بتعريض الـ DNA الى ذلك الانزيم لفترة محدودة، حيث تتقطع "بعض" المناطق الحساسة في كل جزيئة DNA. وبما أن تقطيع تلك المواقع يكون تقطيعاً عشوائياً، تتقطع جزيئات الـ DNA المختلفة بمواقع مختلفة، وهذا يؤدي الى انتاج مجموعة من جزيئات الـ DNA المتداخلة (شكل4.11).



شكل (4.11): تكوين المكتبة الجينومية . في البداية، يتم تقطيع الجينوم، ثم يتم كلونة تلك القطع الناتجة عشوائياً في نواقل مناسبة. يدعى مجموع تلك العاثيات بالمكتبة الجينومية (تصميم المؤلف).

بعد ربط تلك القطع بناقل جيني ملائم، كما في العاثيات أو الكوزميدات، والتي يتم نقلها الى البكتريا. تنتج تلك العملية مجموعة من الخلايا بكتيرية التي تحتوي على قطع الـ DNA الجينومية المتداخلة. وبهذه الطريقة، تحتوي نسائل قليلة على الجين المرغوب بشكل كامل. هذا ويجب أن تحتوي المكتبة الجينومية على عدد كبير من النسائل لضمان تمثيل كل تسلسلات الـ DNA الموجودة في الجينوم. وبما أن المكاتب الجينومية قد تم تحضيرها من قطع عشوائية من الجينوم، لذا فان تلك المكاتب ربما تعد غير كفوءة في ايجاد الجين وخصوصاً في الكائنات حقيقية النواة حيث يكون الكثير من تسلسلات الـ DNA غير مشفرة. وبالتناقض من ذلك، تتصف مكاتب جينية بديلة تدعى بمكاتب الـ DNA المكمل (cDNA libraries) بالكفاءة في كلونة الجين المعني.

<u>مكتبة الدنا المكمل (cDNA library):</u>لاتتكون المكاتب الجينية بواسطة تشييد مكاتب الجينوم فقط، وانما تتكون بوسيلة أخرى تتمثل بتشييد مكتبة متألفة من تسلسلات DNA قد تم استنساخها الى mRNA. وتدعى بمكتبة الـ DNA المكمل أو cDNA library لأن كل الـ DNA في هذه الكتبة يكون "مكملاً" (أو complementary) لجزيئة الـ mRNA. بما أن معظم الـ DNA في الكائنات حقيقية النواة يتألف من تسلسلات متكررة تدعى بالتسلسلات الغير وراثية بسبب عدم قابليتها على أن تصنع نسخة من نفسها عن طريق التحول الى mRNA (أنظر الفصل الثاني)، لذا، لا يمكن تمثيل تلك التسلسلات في هكذا نوع من المكاتب الجينية. ولهذا السبب، تمتلك مكتبة الـ DNA المكمل فائدتين أساسيتين: أما الأولى، هو أنها مكتبة غنية بالقطع الناجمة عن الجينات النشطة استنساخياً، أي أنها تمثل الجينات التي تعطي نسب عالية من الـ mRNA الناضج في ذلك المكان المعني من الجسم، وهذاهو الذي حدا الباحثين الى استهداف الانسجة التي تكون بها الجينات المرغوبة بفعالية استنساخية عالية (أنظر أدناه)، وثانياً، لاتستطيع الانترونات أن تتداخل مع التسلسلات الجينية في مكاتب الـ DNA المكمل، أي أن هكذا نوع من المكاتب لا يحتوي على انترونات الجين، وقد استغلت هذه النقطة في تمكين الكثير من الجينات حقيقية النواة في التعبير الى البروتينات في البكتريا بعد أن عجز الباحثون في ذلك بسبب عدم امتلاك البكتريا لنظام ازالة الانترونات (راجع الفصل الرابع). أما مشكلة مكتبة الـ DNA المكمل هو احتوائها على التسلسلات الموجودة فقط في جزيئات الـ mRNA الناضجة (بسبب امتلاكها لذيل متعدد الأدنين (poly A tail) والذي تتم اضافته بعد ازالة الانترونات)، حيث يقوم هذا النوع من المكتبات بكلونته للجين نفسه وليس للمنطقة المحيطة به. وهنا، تختفي الانترونات والعديد من التسلسلات الأخرى كما في البروموتر والمسرعات، والتي لاتستنسخ أيضاً الى RNA، وهذا قد يفقد الجين هويته الكاملة. ومن الجدير بالذكر، أن هذه المكتبة تمثل فقط تلك التسلسلات الجينية التي يتم التعبير عنها في الانسجة التي عزل منها الـ RNA. اضافة الى ذلك، يعتمد تردد جين معين في مكتبة الـ DNA المكمل على وفرة الـ mRNA المعني في النسيج المعزول منه. وبالتناقض من ذلك، توجد معظم الجينات بنفس التردد في مكتبة الـ DNA الجينومية بصرف النظر عن قدرتها في التعبير الجيني.



يمكن تشييد مكتبة الـ DNA المكمل بعدة خطوات. إن أول خطوة في تحضير الـ cDNA هي عزل جزيئات الـ mRNA إجمالاً من الخلية أو من النسيج قيد الدراسة. سهلت طبيعة جزيئة الـ mRNA للكائنات حقيقية النواة بشكل كبير جداً عملية عزلها عن بقية الجزيئات الأخرى. تتألف النهاية ′3 لكل جزيئات الـ mRNA حقيقية النواة تقريباً من حبل من 50 إلى 250 من مخلفات الأدنين والمعروفة بمتعدد الأدنين poly (A) tail. وبسبب هذا الذيل، أصبح من السهولة عزل جزيئات الـ mRNA عن جزيئات الـ rRNA والـ tRNA الشائعة الموجودة في مستخلص الخلية وذلك باستخدام عمود يحتوي على خرز ترتبط بها حبال قصيرة من متعدد الثايمين (TTTTTT ...etc) (شكل 5.11-a).

شكل (5.11): مكتبة الـ cDNA (a) كيفية عزل جزيئات الـ mRNA للجين المعني بواسطة استخدام الخرز ذات متعددالنيوكليوتيدات المتعددة الثايمين. (b) خطوات تخليق الـ cDNA خارج جسم الكائن الحي *in vitro* باستخدام انزيم reverse transcriptase (تصميم المؤلف).

وعندما يمرر مستخلص الخلية عبر هذا العمود، تزدوج ذيول متعدد الأدنين poly (A) tails قاعدياً مع متعدد الثايمين المرتبط بالخرز، وبهذه الطريقة، ترتبط جزيئات الـ mRNA بالعمود. وبما أن جزيئات الـ tRNA والـ rRNA ، والجزيئات الأخرى لا ترتبط بالعمود، فمن الممكن إزالتها بعيداً. ويتم هذا استرجاع جزيئات الـ mRNA وذلك عن طريق غسلها بداريء واطيء الملوحة. وبما إن الـ cDNA قد تم اشتقاقه من الـ mRNA ، فانه يحتوي على التسلسلات المعبرة للـ

mRNA في المصدر النسيجي المستخدم (يحتوي الـ cDNA على تسلسلات معبرة مستمرة أو اكسونات exons بدون انترونات introns).

ثم يستخدم إنزيم يدعى بـ reverse transcriptase ليخلّق شريط من الـ DNA مكمل لجزيئة الـ mRNA. يمكن لهذا الإنزيم بلمرة النيوكليوسيدات منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات (dNTPs) deoxynucleoside triphosphates بشريط الـ DNA المكمل (cDNA) باستخدام جزيئة الـ mRNA الأصلية كقالب لحدوث عملية البلمرة وذلك بالاتجاه المعتاد من 5′ إلى3′. وكما هو الحال مع إنزيمات بلمرة الـ DNA الأخرى، يمكن لإنزيم reverse transcriptase من أن يضيف نيوكليوتيدات إلى النهاية 3′ فقط للبادىء الموجود مسبقاً والمزدوج قاعدياً مع الشريط القالب. تؤدي نهايات متعدد الثايمين المضافة (TTTTTT ...) هذه الوظيفة وذلك بازدواجها مع ذيل متعدد الأدنين الموجود في النهاية 3′ لكل mRNA قالب.

بعد تخليق نسخ cDNA من جزيئات الـ mRNA المعزولة، تزال جزيئات الـ mRNA بواسطة معاملتها بمحلول قاعدي (محلول NaOH)، والذي يحلل الـ RNA مائياً وليس الـ DNA. ثم يحول الـ cDNA المفرد الشريط إلى جزيئات DNA مزدوجة الشريط. وهنا يبرز دور إنزيم DNA polymerase I والذي يستغل حقيقة أن إنزيم reverse transcriptase يترك نهاية معقوفة تشبه دبوس الشعر hairpin loop عند اكتماله من تخليق شريط الـ DNA أي عند النهاية 3′.تستخدم هذه النهاية كبادىء من قبل إنزيم DNA polymerase I ليخلق شريط الـ DNA المكمل للشريط الأول المخلق من قبل إنزيم reverse transcriptase. يعامل شريط الـ DNA المزدوج بإنزيم S1 nuclease ، والذي يزيل دبوس الشعر (شريط الـ DNA المفرد)، ليولد جزيئة cDNA مزدوجة الشريط ذات نهاية مستوية blunt ended double stranded cDNA molecule (شكل 5.11-b).

ولكي تحضر جزيئات cDNA مزدوجة الشريط لغرض الكلونة، تلصق روابط (linkers) لكلا النهايتين. على شرط أن تحتوي تلك الروابط على أماكن تمييز لإنزيمات التقييد الداخلية recognition sites for restriction endonucleases. وعندما تعامل جزيئات الـ cDNA الناتجة والحاوية على مواقع التمييز هذه والموجودة في الروابط الملصقة بكلتا طرفيها بإنزيمات تقييد متخصصة لتلك الروابط ، تولد تلك المعاملة جزيئات cDNA ذات نهايات لاصقة sticky ends بكل نهاية. أما الخطوة الأخيرة في تشييد الـ cDNA فتتمثل بلصق قطع الـ cDNA المزدوجة الشريط ذات النهايات اللاصقة بنواقل العائل لامدا ذات النهايات اللاصقة والمقطوعة بنفس الإنزيم القاطع. ثم يتم إدخال نواقل الكلونة الهجينة في خلايا بكتريا القولون، بحيث تحتوي كل خلية على cDNA مشتق من mRNA مفرد.

تدعى كل نسيلة في المكتبة بنسيلة الدنا المكمل (cDNA clone). وبالتناقض من مكتبة الجينوم الكاملة والتي تحتوي على كل تسلسلات الـ DNA النووية للكائن، تحتوي مكتبة الـ cDNA على التسلسلات التي أعطت mRNA. وبهذه الطريقة، فان عدة انسجة في جسم الحيوان، والمعروف بأنها تعبر لبعض الجينات المختلفة سوف تعطي مكاتب cDNA مختلفة. ويمكن عادة توليد مكاتب الجينات المكلونة عن طريق استخدام العاثي لامدا أو الكوزميد كناقل (أنظر أدناه). ثم يتم تشخيص النسيلة الحاوية على الجين المرغوب في هذه المكتبة عن طريق واسم معلم اشعاعيا أو معلم بطريقة غير اشعاعية، ويتم ذلك باستعمال طريقة استنساخ الصب (replica platting) على أوراق النايتروسليلوز (nitrocellulose papers) الحاوية على هذا الواسم المعلم، حيث تمثل البقع الناتجة النسائل الموجودة في الطبق الأصلي الحاوية على قطعة الـ DNA المرغوبة. واذا كان الجين المرغوب الكشف عنه قادرا ً على التعبير عن نفسه، يتم الكشف عن الناتج البروتيني لذلك الجين بوسيلة مناعية ملائمة كما في وصمة Western (أنظر أدناه).

الطريقة الثالثة: التخليق المباشر للقطعة المرغوبة.على الرغم من عدم اضطرار القارئ الكريم في أي كتاب منهجي للوراثة الجزيئية الى الاستعانة بالكيمياء العضوية، الا أن هنالك صلة وثيقة بين الاختصاصين فيما يتعلق بكيفية تخليق النيوكليوتيدات (oligonucleotides) كيميائيا ً، فلابد للقارئ من معرفة – ولو بشكل موجز – كيف يتم تصنيع متعدد النيوكليوتيدات التي يرغب الدراسة عليها حيث تعتبر متعددات النيوكليوتيدات المخلقة كيميائيا ً هي الوقود الذي يحرك ماكنة الوراثة الجزيئية. ولعله ليس من المبالغة اذا نقول أن أي تقنية تستخدم اليوم في الوراثة الجزيئية توظف تلك النيوكليوتيدات المخلقة كيميائيا ً. ويمكن الآن استخدام آلة تخليق الدنا (oligonucleotide synthesizer machine) في تخليق التسلسلات المرغوبة من تلك المتعددات النيوكليوتيدية (شكل 6.11)، حيث يمكن تخليق الجين مبدئيا ً تخليقا ً كيميائيا ً عضويا ً (organo-chemical synthesis) وذلك عند معرفة تسلسله. ويمكن معرفة تسلسل الجين من خلال معرفة تسلسل ناتجه البروتيني. وعلى سبيل المثال، اذا كان الجين مسؤولا ً عن انتاج سلسلة متعدد ببتيد معينة ذات تسلسل معروف، عندها، وباستخدام قاموس الشفرة الوراثية يمكن التنبؤ بتسلسل الجين بسهولة.

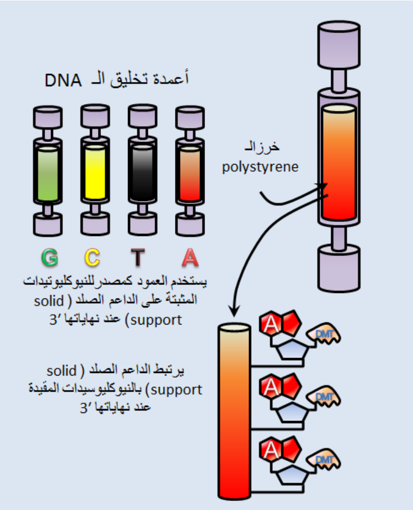
مرت عملية تخليق الأحماض النووية بعدة محطات تأريخية (يمكن ملاحظتها في الفصل الخامس)، وذلك عندما أراد الباحثون حينها التنبؤ بالشفرة الوراثية للأحماض النووية مما قادهم الى ايجاد وسيلة كيميائية لتخليق الأحماض النووية لتأدية ذلك الغرض. وأتت الانجازات الأولى في عمليات التخليق الكيمائي للأحماض النووية من أعمال Holley و Khorana، والتي قد استخدم فيها جزيئات الـ tRNA لأنها صغيرة جدا ً في حجمها

(حوالي 76 نيوكليوتيدة)، حيث يعتبر من الصعوبة جداً في بدايات عمليات تخليق الأحماض النووية في العالم تخليق الجينات كاملة لأنها طويلة جداً كي يتم تخليقها كيميائياً، حيث يبلغ معدل مايحتوي الجين من ازواج قاعدية حوالي 1500 زوج قاعدي.

شكل (6.11). آلة تخليق الـ DNA. ويمكن بهذه الآلة تخليق تسلسلات الـ DNA المختلفة وحسب الغرض من البحث، كما في بوادئ الـ PCR والجينات وغيرها (الجهاز من انتاج شركة Applied Biosystems الأمريكية).

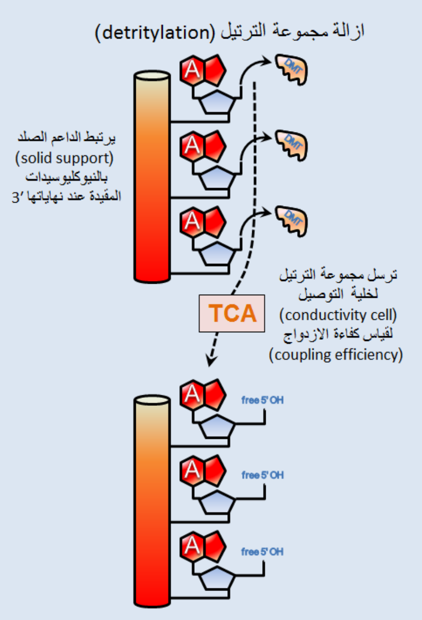
على الرغم من النجاحات التي حققها باحثون كـ Khorana، فان التخليق الكيميائي لمتعدد النيوكليوتيدات بقي عملاً مضنياً وغير كفوء لغاية عام 1983، والتي تم فيها زيادة كفاءة تلك العملية. وهنا تعتمد عملية التخليق الجديدة على استخدام احاديات الفسفورأمايد (phosphoramidite monomers) وعلى استخدام محفز التترازول (tetrazole catalysis). وتعتبر مادة phosphoramidite monomer وحدة تخليق متفردة ساهمت بشكل ملفت بتطور هذا المضمار. ففي بداية التخليق، تستخدم مجموعة تسمى trityl group كمجموعة حماية قابلة للازالة. أما الربط بدعامة صلبة فيتم من خلال ذرة الكاربون ذات النهاية′3. وهنا يبدأ التخليق بالاتجاه ′3 الى النهاية′5 بدلا من الاتجاه ′5 الى ′3 المستخدم في الطبيعة عادة. ان الدعامة الصلبة المستخدمة في تخليق متعدد الحمض النووي تتألف عادة من خرزة زجاجية ذات ثقوب منتظمة (controlled pore glass or CPG) بحجم 5 مايكرون. تحتوي هذه الخرزة على سطوح ذات ثقوب وقنوات والتي ترتبط بها النيوكليوتيدات المحمية.

تعد طريقة الـ phosphoramidite في تخليق النيوكليوتيدات هي الطريقة الأمثل لمعظم المختبرات في الحصول على التسلسلات النيوكليوتيدية التي يرغبون فيها بسبب كفاءة وسرعة ازدواج النيوكليوتيدات بهذه الطريقة وبسبب ثباتية مادة البدء التي تجري عليها اضافة النيوكليوتيدات بشكل متتابع. يتم تخليق متعدد النيوكليوتيدات بالاعتماد على مادة البدء والتي هي مادة كيميائية صلبة ، بحيث يمكن ازالة الفائض من الكواشف الكيميائية القاسية



بواسطة الترشيح. ولهذا السبب، لا يوجد خطوات تنقية مابين الدورات المتلاحقة. وتتألف مادة البدء (starting material) أو المادة الساندة (supporting material) من سليكا أو من خرز متعدد الاستيرين (polysterene beads) (شكل 7.11). وقد تم تصميم حجم الدقائق وحجم الثقوب بعناية فائقة بحيث تسمح للسوائل بحرية الحركة وفي نفس الوقت تكون ذات قوة ميكانيكية كافية تحافظ عليها من عدم الانهيار في خطوات التخليق المتعاقبة.

شكل (7.11): مخطط يوضح الأعمدة المستخدمة في تخليق الأحماض النووية كيميائياً. تثبت النيوكليوتيدات من نهايتها 3′ على سطح صلد متألف من مادة الـ polysterene الموضوعة في أعمدة ملائمة لهذا الغرض. يشير كل لون الى أحد القواعد النتروجينية الأربع (تصميم المؤلف).

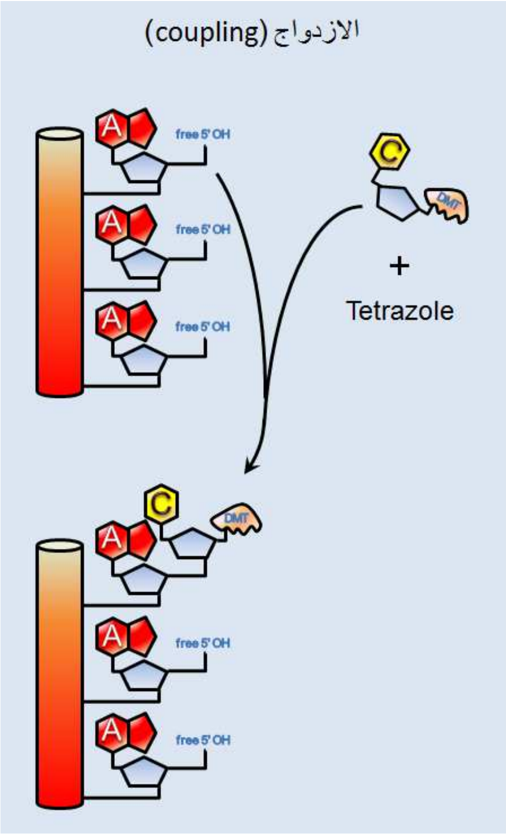


يبدأ تخليق الـ phosphoramidites من النهاية 3′ لأول نيوكليوتيدة مرتبطة ويتقدم من خلال سلسلة من الدورات المتألفة من أربع خطوات والتي تتكرر الى أن تلتصق النيوكليوتيدة الأخيرة بنهايتها 5′. تدعى هذه الخطوات الأربع بازالة الحماية deprotection، الازدواج coupling، التغطئة capping، والتثبيت stabilization. وهي كالآتي:

<u>خطوة ازالة الحماية (deprotection step):</u> وتسمى أيضاً بخطوة ازالة مجموعة الترتيل (detritylation step)، وهي الخطوة الأولى في عملية تخليق الحمض النووي كيميائياً. وفيها يتم ازالة مجموعة الـ DMT المرتبطة بالنهاية 5′ في السكر الخماسي للنيوكليوتيدة المستقبلة بواسطة اضافة مادة trichloroacetic acid (أو TCA) تاركة مجموعة هيدروكسيلية نشطة (reactive hydroxyl group) مستعدة للخطوة اللاحقة.

شكل (8.11): مخطط يوضح الخطوة الأولى في عملية تخليق الأحماض النووية والتي يقوم بها حامض الـ trichloroacetic acid (TCA) بدور محوري في هذه الخطوة. حيث يقوم بازالة مجموعة الحماية (مجموعة الـ DMT) الحساسة للحوامض والواقعة على النهاية الهيدروكسيلية 5′ للنيوكليوتيدة المرتبطة بالمادة الساندة (تصميم المؤلف).

وبما أن النيوكليوسيدة ترتبط عبر نهايتها الهيدروكسيلية ′3 بالمادة الساندة من خلال رابط (linker) متصل بتلك النهاية، لذا، يكون اتجاه اضافة النيوكليوتيدات هو من النهاية ′5 بدلاً من النهاية ′3 (شكل 8.11). وهذا يعني سيرورة عملية تخليق الـ DNA بالاتجاه المعاكس لها في الطبيعة (راجع الفصل الثالث).

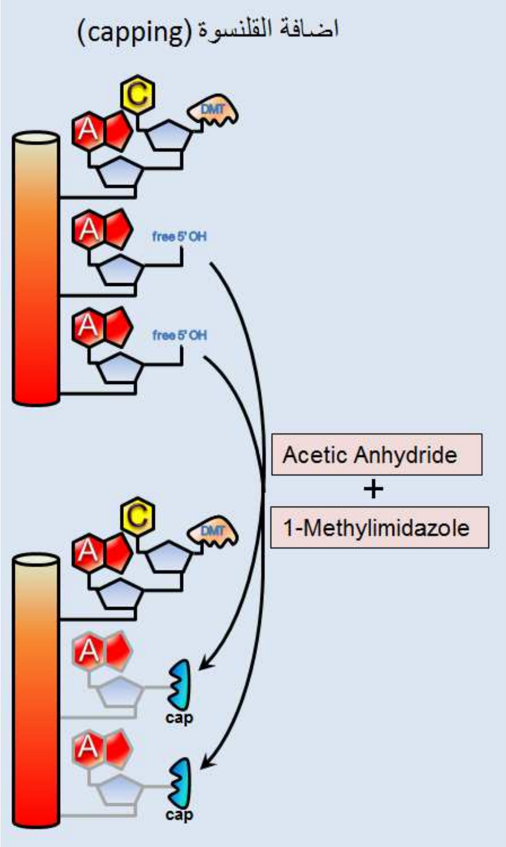


__خطوة الازدواج (coupling step):__
وفي هذه الخطوة، يتم اضافة الـ phosphoramidite القادم مع حامض ضعيف يسمى بالـ tetrazole ويقوم هذا الحامض باضافة مجاميع بروتون لذرة النتروجين في جزيئة الـ phosphoramidite، والذي يجعلها عرضة للهجوم المحب للنواة (nucleophilic attack). يكون هذا المركب الوسطي تفاعلي بشكل كبير جداً بحيث يكمل هذه العملية في غضون ثلاثين ثانية، حيث يقوم هذا التركيب بالتفاعل مع مجموعة الهيدروكسيل للجزيئة المستقبلة وتتكون آصرة بالاتجاه من ′5 الى ′3 (شكل 9.11). ويتم حماية أو "سد" جزيئة الـ phosphoramidite المضافة عند نهايتها ′5 عن طريق مجموعة DMT أيضاً. ومن الجدير بالذكر ان اضافة الـ tetrazole تزيد من كفاءة الازدواج الى أكثر من 99%، وبهذه الطريقة، فان الطريق مفتوح لتخليق أحماض نووية أطول وأطول.

شكل (9.11): مخطط يوضح الخطوة الثانية في عملية تخليق الأحماض النووية والتي يقوم بها التترازول بدور محوري في زيادة كفاءة هذه الخطوة (تصميم المؤلف).

على الرغم من الزيادة المتحققة في كفاءة تخليق الأحماض النووية، فلا تزال هذه العملية "لوحدها" تعاني من نسبة معينة من الفشل في عملية الازدواج، والمتأتية بسبب استمرارية احتواء النيوكليوتيدات على مجموعة هيدروكسيل قابلة للتفاعل (reactive hydroxyl group) عند نهايتها ′5. واذا كانت تلك النهاية قابلة للتفاعل، فان

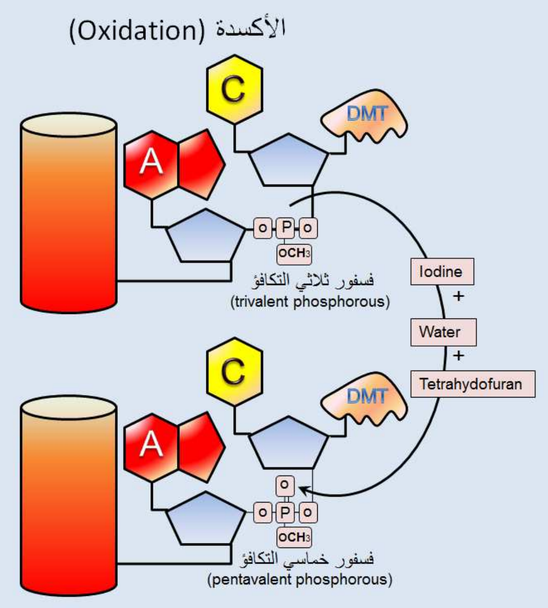
لها القابلية على الازدواج في الجولة القادمة لينتج هذا في فقدان نيوكليوتيدة في عملية التخليق. لذا لابد من وجود خطوة مبتكرة لتعالج هذه المشكلة.



خطوة التغطية (capping step): صممت هذه الخطوة لازالة الفشل الحادث في عملية الازدواج لكي لا يشارك بعد ذلك في عملية التخليق. يتم في هذه الخطوة انهاء كل السلاسل التي لم تحدث فيها خطوات اضافة. وبما أن السلاسل الغير متفاعلة تحتوي على نهاية هيدروكسيلية حرة من نوع 5′، فيمكن انهائها أو تغطيتها بواسطة اضافة مجاميع الأسيل (acetylation) من قبل كاشف يضيف مجموعة الأستيل (acetylating reagent) والذي يتألف من مادتي الـ acetic anhydride و N-methyl imidazole. يتفاعل هذا الكاشف مع مجاميع الهيدروكسيل الحرة فقط كي يغطي متعددات النيوكليوتيداتبشكل غير معكوس والتي فشل بها الازدواج. تدعى تلك النهايات الغير متفاعلة " بالنواتج الفاشلة". وتتم عملية التغطية باضافة مادة acetic anhydride و مادة 1-methylimidazole (شكل 10.11).

شكل (10.11): مخطط يوضح الخطوة الثالثة في تخليق الأحماض النووية والتي صممت لكي تتغلب على المشكلة المتمثلة بعدم تفاعل أقل من 2% من مجاميع الهيدروكسيل من نوع 5′، مع جزيئة الـ phosphoramidite المضافة، وهذا يؤدي الى فقدان قاعدة نتروجينية. ولا يمكن السماح بنمو هذه التسلسلات الفاشلة، وبالتالي، لابد من تغطيتها. يتم اضافة احجام متساوية من مادتي acetic anhydride و 1-methylimidazole لكي تعمل كعوامل acetylation ذات قدرة فائقة. وبعد اضافة تلك العوامل، تتحول النهايات الهيدروكسيلية الى النوع الغير نشط (تصميم المؤلف).

وبما أن السلاسل التي تفاعلت مع الـ phosphoramidite في الخطوة السابقة ما تزال مسدودة من قبل مجموعة DMT، لذا فلا يمكن لها أن تتأثر بهذه الخطوة. وعلى الرغم من أن خطوة الاحاطة هي خطوة لاتحتاجها عملية تخليق الـ DNA، لكن تلك الخطوة تكون مرغوبة جداً هنا لأنها تقوم بتقليص طول الشوائب وبالتالي تسهل من تعريف الناتج وتنقيته.



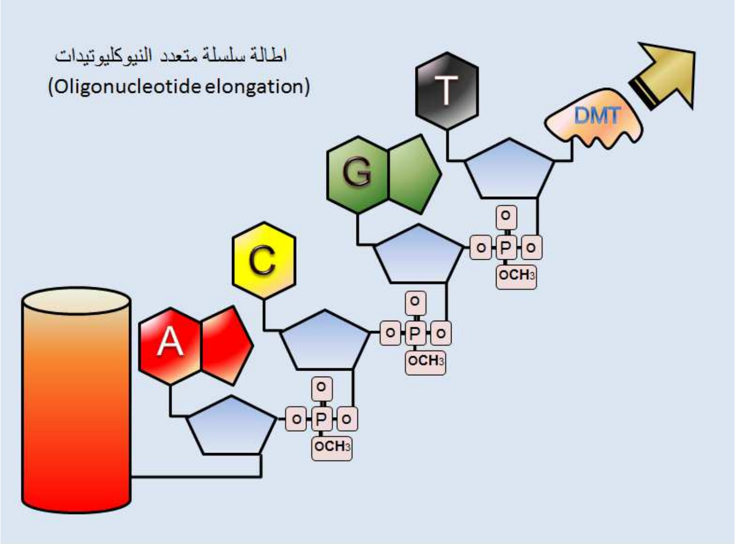
خطوة التثبيت (stabilization step):
حال اكتمال خطوة التغطية، تبدأ الخطوة الأخيرة في الدورة والتي تسمى بخطوة التثبيت (stabilization step) أو الأكسدة (oxidation step) والتي تقوم بتثبت ارتباط الفوسفات بين سلسلة متعدد النيوكليوتيدات النامية والقاعدة القادمة للتو. ومن جديد، في التخليق الـ phosphoramidite التقليدي، يتم اجراء هذه الخطوة بوجود مادة اليود (iodine) والذي يعتبر كمادة مؤكسدة معتدلة (mild oxidant) والمخلوطة مع مادة الـ tetrahydrofuran (FHF) والماء (شكل 11.11).

شكل (11.11): مخطط يوضح الخطوة الرابعة في تخليق الأحماض النووية. تعد آصرة مابين النيوكليوتيدة المتكونة حديثاً وهي آصرة الفوسفات ثلاثية الأستر آصرة غير ثابتة. لذا، لابد من تثبيتها عن طريق أكسدتها . وهنا يستخدم الفوسفات كعامل مؤكسد مع الماء، حيث يعمل اليود هنا كواهب للأوكسجين (تصميم المؤلف).

ويعمل الماء كواهب للأوكسجين ويكون اليود رابطة مع الفسفور. يتم ازالة تكثف هذه الرابطة من قبل الماء تاركة آصرة فوسفات ثلاثية الأستر (phosphotriester bond) بشكل مثبت.

بعد اكتمال الخطوة النهائية يتم اعادة الدورة لكل نيوكليوتيدة في التسلسل (شكل 12.11). وفي نهاية عملية التخليق، يكون متعدد النيوكليوتيد متكوناً من عدد من النيوكليوتيدات، ولتكن على سبيل المثال 25 نيوكليوتيدة كما هو في بوادي الـ PCR (أنظر أدناه) مع نهاية ′3 ماتزال مرتبطة بالمادة الأساس بينما تكون النهاية ′5 محمية من قبل مجموعة trityl، بالاضافة الى مجاميع الحماية لقواعد الكوانين والسايتوسين والأدنين اعدا الثايمين الغير محمي. وعند انتهاء التخليق، يتم ازالة ارتباط كل متعدد نيوكليوتيدي من المادة الأساس ومن ثم تزال مجموعة الـ trityl منها، تاركة مجموعة هيدروكسيل على كلا النهايتين ′3 و ′5. وعند هذه النقطة، تعد متعدد النيوكليوتيد جزيئة DNA مفردة الشريط فعالة وظيفياً. وعلى الرغم من ازالة الحماية (deprotection) ولكنها تبقى مع متعدد النيوكليوتيد كأملاح عضوية يجب ازالتها بعملية تدعى بازالة الأملاح (desalting). وفي حالة رغبة الباحث في الحصول على متعددات نيوكليوتيدة أطول أو متعددات نيوكليوتيدة

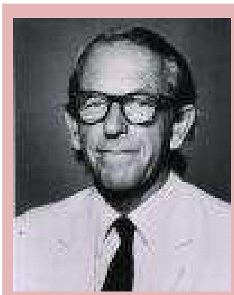
محورة أو موسومة، فلا تعد عملية ازالة الأملاح كافية في هذا الصدد، حيث يتم تعريض متعدد النويكليوتيدات المخلقة كيميائياً الى تنقية اضافية أما بواسطة متعدد الأكريلامايد polyacrylamide gel electrophoresis أو PAGE أو بواسطة تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء high performance liquid chromatography (HPLC).



شكل (12.11): مخطط يوضح اطالة الأحماض النووية. فبعد اكتمال خطوة التثبيت، في الدورة الواحدة. تستمر عملية تخليق الـ DNA بواسطة ازالة مجموعة DMT واعادة دورة أخرى من اضافة القاعدة. وتستمر هذه الدورات لحين التخليق الكامل للطول المطلوب للمتعدد النيوكليوتيدات القيد الدراسة(تصميم المؤلف).

هنالك تطبيقات عديدة للمتعددات النيوكليوتيدية كما سيتبين أدناه، حيث تستخدم هذه النيوكليوتيدات المصنعة عادة كبوادئ في تقنية الـ PCR ، أو كمجسات للكشف عن الجين من خلال التهجين معه. وفي الحالة الثانية، لا بد من وسم تلك المجسات بواسم مناسب. وهنالك عدة وسائل لتوسيم تلك المجسات لابد من استخدامها كي تقوم تلك المجسات بواجبها المناط بها في هذا المضمار. فمثلاً، كي يستطيع أي باحث معرفة موقع أي جين ضمن كومة من قطع الـ DNA المهضومة بالانزيمات القاطعة لابد له من استخدام مجس (probe) متخصص له. والمجس هو أحماض نووية ذات تسلسلات مكملة بالضبط لتسلسلات الـ DNA الهدف لأجل أن ترتبط بها بواسطة التهجين. ويتم وسم تلك المجسات بحيث يمكن أن يتم تشخيصها بعد ذلك بواسطة التصوير الاشعاعي الذاتي (autoradiography) أو بواسطة تقنيات كيميائية حساسة (chemiluminescent techniques).

كيف نعرف تسلسل الجين

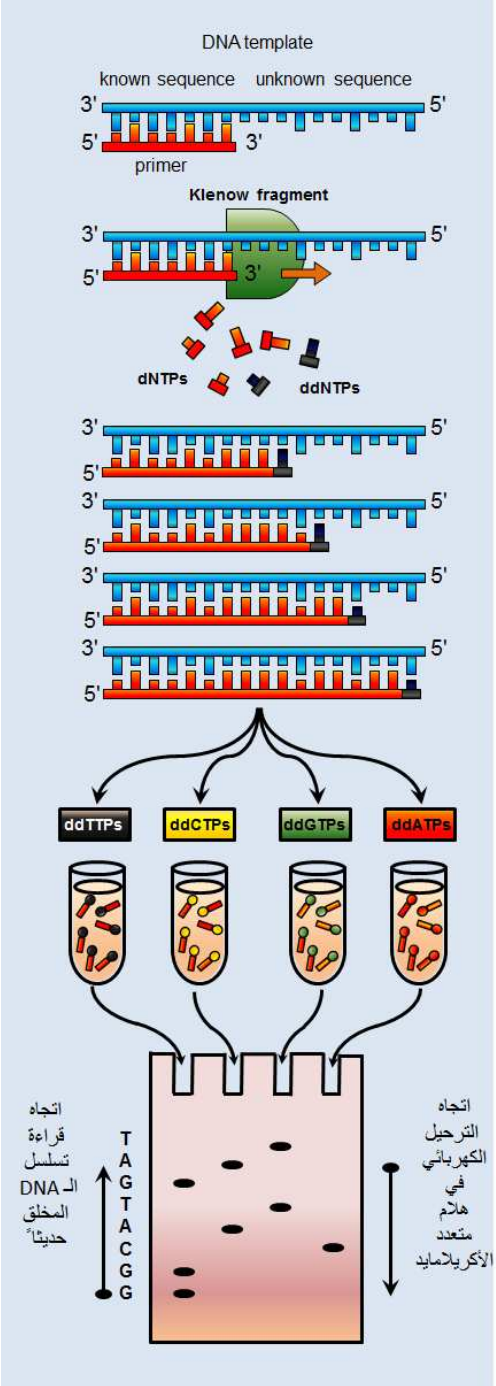


Frederick Sanger

بعد عزل الجين بأية طريقة كانت، لابد من معرفة التسلسل الكامل للجين في حالة توفر معلومات محدودة عنه. وكما بينا، في حالة معرفة تسلسل الأحماض الأمينية للناتج الجيني، فلا بد من تحليل القطعة النهائية للجين المعزول. وبعد كل هذا، فمن الضروري تأكيد أن الجين المعزول يمتلك التسلسل المتوقع. علاوة على ذلك، يجب معرفة تسلسل النهاية ′5 وذلك للتشييد الجيني الدقيق ولغرس الجين في ناقل جيني ملائم. ولأجل معرفة تسلسل الجين أو قطعة الـ DNA المطلوبة فيجب تحويلها الى الشكل المفرد الشريط (ssDNA)، ويتم ذلك بواسطة ربطها بنواقل جينية خاصة تتحرر من الخلية المضيف بصورة مفردة الشريط ناقلة لقطعة الـ DNA المرغوبة معها بهذه الهيئة أيضاً، تعرف تلك النواقل بـ M13 vectors. وتعتبر طريقة انهاء السلسلة منقوصة الأوكسجين المزدوجة (dideoxy chain termination method) أو طريقة Sanger و Coulson هي الطريقة الأكثر استخداماً لهذا الغرض. لقد قاما بابتكار ذاك البروتوكول في منتصف السبعينيات من القرن المنصرم. وهنالك طريقة أخرى لمعرفة تسلسل الـ DNA تعرف بالطريقة الكيميائية أو طريقة Maxam و Gilbert ولكنها أقل استخداماً بكثير من الطريقة الأولى، لذا سنقتصر في مناقشتنا على الطريقة الأولى فقط. تبدأ الطريقة بتخليق الشريط المكمل لشريط الـ DNA المفرد باستخدام قطعة كلينو (Klenow fragment) التابعة لانزيم DNA plolymerase I من بكتريا القولون (أو باستخدام الانزيم المحور T7 DNA polymerase)، وخليط من النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). ويستعمل بادئ خاص لهذه العملية يرتبط في الناقل M13 بالطبع في منطقة قبل (upstream) منطقة انحشار قطعة الـ DNA المراد معرفة تسلسلها. وعند بدء التخليق، تضاف النيوكلويتيدات ثلاثية الفوسفات في تسلسل مكمل للـ DNA المراد معرفة تسلسله. وعلى أية حال، اذا أضيفت ddNTP أو نيوكلويسيدة ثلاثية الفوسفات ذات سكر خماسي منقوص الأوكسجين في الذرتين ′2 و ′3 (-2',3' dideoxyribonucleoside triphosphate) (سواء أكانت ddATP أو ddTTP أو ddGTP أو ddCTP) والتي تفتقد لمجموعة الهيدروكسيل الحرة في ذرة الكاربون ′3 في خليط التفاعل، تنتهي البلمرة اذا تم اندماج ddNTP بدلاً من dNTP في أي وقت خلال عملية التخليق تلك (شكل 13.11).

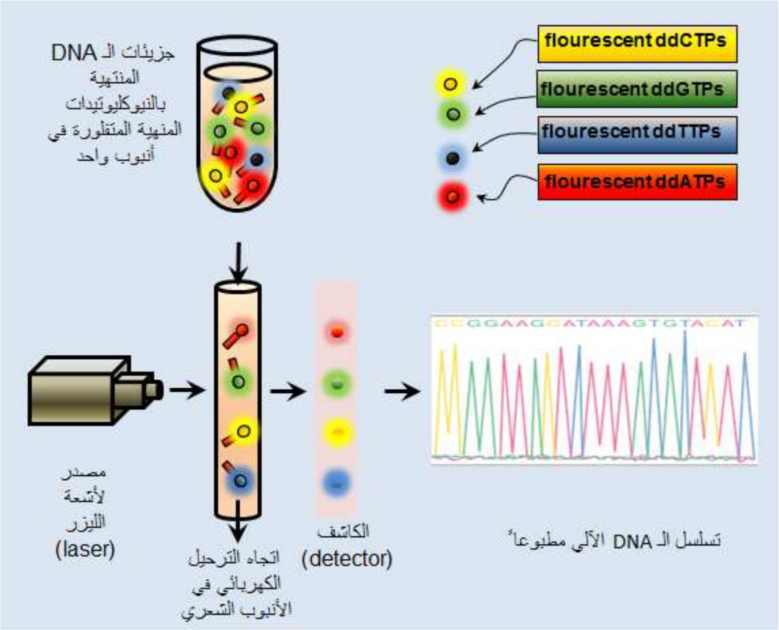
في تخليق الـ DNA، تحدث بلمرة أشرطة الـ DNA بسرع مختلفة. وبالنتيجة، ينتج خليط غير متجانس من أشرطة الـ DNA وبأطوال متعددة والتي تمثل لكل التسلسلات المتوقعة. اعتماداً على أي ddNTP مستخدمة في أنبوب التفاعل، تكون نيوكليويدة الانهاء أما A أو T أو G أو C. وفي الحقيقة، تحدث كل التفاعلات الأربع بشكل منفصل عن بعضها مولدة أربع مجاميع من التسلسلات، حيث تنتهي مجموعة كاملة بالـ ddATP، ومجموعة بالـ ddCTP ومجموعة بالـ ddGTP ومجموعة بالـ ddTTP.

يمكن فصل قطع الـ DNA في كل مجموعة في الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الأكريلامايد. وعلى أية حال، لابد من كشف الحزم المفصولة. وهنالك طريقة بسيطة للقيام بذلك وهو استخدام التوسيم الاشعاعي وذلك عن طريق انحشار النيوكلويتيدات الموسومة اشعاعياً، كما في dATP الموسوم اشعاعياً بالفسفور ($[\alpha^{33}P]dATP$) في مزيج التفاعل، وبالتالي كل القطع تكون موسومة اشعاعياً. ومن ثم يصار الكشف الحزم المفصولة بالتصوير الاشعاعي الذاتي بالأشعة السينية.



شكل (13.11). مخطط يوضح طريقة انتهاء السلسلة (طريقة سانكر) في معرفة تسلسل الـDNA.لاحظ ان الحزم الموجودة في أعلى الهلام تمثل النهاية ′5 وهكذا تمثل الحزم الموجودة في أسفل الهلام النهاية ′3 (تصميم المؤلف).

يتم قراءة الحزم من الأسفل الى الأعلى، أي بالاتجاه من 5′ الى 3′. وعادة تكون الحزم في الأسفل باهتة جداً والحزم في الأعلى مضغوطة جداً على القراءة. وهنالك عدد محدود فقط من الحزم (حوالي 200 قاعدة) والتي يمكن أن يتم قرائتها بسهولة. ولكي نحدد التسلسل الكلي للجين، يجب تكرار هذا الاجراء لعدة مرات بتحريك موقع ارتباط البادئ على طول التسلسل. وفي العقد الأخير، تمت الاستعاضة عن هذه الاجراءات الروتينية لمعرفة التسلسل بشكل كبير باجراءات آلية (automated sequencing). ويتمثل التغيير الكبير في هذا البروتوكول استخدام الواسمات المتفلورة (fluorescent labels) بدلاً من الواسمات الاشعاعية (radiolabels). وقد تم استخدام أربع صبغات متفلورة، كل واحدة تمثل أحد الـ dNTPs. فالسلسلة المنتهية بالأدنين توسم بصبغة متفلورة معينة، والسلسلة المنتهية بالثايمين توسم بصبغة ثانية، والسلسلة المنتهية بالكوانين توسم بصبغة ثالثة، والسلسلة المنتهية بالسايتوسين توسم بصبغة رابعة.وهكذا، وعند استخدام أربع واسمات متفلورة، أصبح من المنطقي انجاز أربع تفاعلات تسلسلية كما في البروتوكول اليدوي في مسار واحد في أنبوب منفرد، وتحميل مزيج التفاعل هذا في مسار واحد في هلام متعدد الأكريلامايد. ويقوم كاشف التفلور المزودج مع جهاز قراءة التسلسل الآلي بمسح الحزم المفصولة، بحيث يميز بين الواسمات المتفلورة الأربع، ويترجم النتائج الى كروماتوغرام يمكن قراءته يتألف من قمم (peaks) متميزة عن بعضها البعض لونياً: فمثلاً الأخضر للسايتوسين، والأحمر للكوانين، والبرتقالي للأدنين، والأزرق للثايمين (شكل 14.11).



شكل (14.11): قراءة التسلسل المتولد بواسطة بروتوكول انهاء السلسلة لـ Sanger و Coulson بطريقة آلية تعتمدعلى الصبغات المتفلورة. يتم توسيم كل ddNTP بصبغة متفلورة ذات لون مميز، بحيث يتم تشخيص نوع السلسلةالمنتهية وذلك بامرارها على كاشف التفلوريلنطبع التسلسل بطريقة آلية معتمدة على التفلور (تصميم المؤلف).

ان بروتوكول معرفة التسلسل الآلي في المختبر الاعتيادي يمكن له أن يقرأ أكثر من600 زوج قاعدي في ترحيل واحد. هذا وصممت أنظمة قراءة تسلسل الـ DNA الحديثة لتوليد أكثر من نصف مليون قاعدة نتروجينية في اليوم الواحد باستخدام هلام التسلسل المحتوى في عدة أنابيب شعرية (capillary tubes) بدلاً من النوع اللوحي (slab format) المعتاد. ومن الجدير بالذكر أن تحضير وتحميل العينات في الهلام الشعري يتم بصورة آلية من قبل "روبوت" بينما يتم تحليل النتائج آلياً أيضاً بنفس الطريقة.

على الرغم من التحويرات الكثيرة الحاصلة في معرفة التسلسل النيوكليوتيدي للأحماض النووية، الا أنها تستند على نفس المبادئ التي ابكترها Sanger. ولكن في الآونة الأخيرة برزت طريقة لتحليل تسلسل الـ DNA، تمتاز هذه الطريقة بطاقة انتاجية عالية الا أنها لاتعتمد على مبادئ Sanger في تحليل تسلسل الـ DNA وتدعى بالـ pryosequencing وتسمح هذه الطريقة بتحليل سريع لتسلسل الجينوم كاملاً، وسميت هذه الطريقة بهذا الاسم استناداً الى تحرر مركب الـ pyrophosphate، والذي يتحرر في كل مرة تضاف فيها نيوكليوتيدة الى سلسلة الـ DNA النامية (راجع الفصل الثالث). وتستثمر هذه الطريقة تحرر الـ pyrophosphate كعلامة لاضافة نيوكليوتيدة الى سلسلة الـ DNA النامية، ويتوقع أن يزداد شيوع استخدام هذه الطريقة في المستقبل القريب .

كيف نضخم الجين

بعد معرفة تسلسل الجين، يحتاج الباحث الى توفر كمية كبيرة منه جاهزة لتجارب الوراثة الجزيئية اللاحقة، لذا يمكن تصميم بوادي متخصصة لهذا الجين من كلا طرفيه لتضخيمه الى مئات الآلاف أو الى ملايين النسخ في تقنية تدعى تقنية سلسلة بوليمريز الدنا (PCR). ناقشنا في الفصل العاشر كيف يمكن للبكتريا أن تستخدم لكي تضخم قطعة من الـ DNA المكلون فيها، ولكن هذه التقنية مملة ومكلفة للوقت مقارنة بتقنية الـ PCR. والآن سنناقش تقنية تضخيم تجري خارج جسم الكائن الحي لتخليق العديد من نسخ الـ DNA. تستخدم تلك التقنية - والتي تستغرق ساعات بدلاً من أيام - نفس الانزيم الذي تستخدمه بكتريا القولون، وهو الـ DNA polymerase، ولكن هذا التفاعل يجري في أنبوب اختبار.

تقنية سلسلة بوليمريز الدنا (polymerase chain reaction): إن الـ PCR هو عبارة عن تقنية مختبرية "لتضخيم" تسلسل DNA بشكل متخصص. يعد الـ PCR كفوء بشكل كبير جداً وحساس. انه يعمل ملايين أو بلايين النسخ من أي تسلسل متخصص من الـ DNA، حتى لو كان التسلسل موجود ضمن مزيج معقد من تسلسلات أخرى مختلفة. وبسبب القوة التي تتمتع بها تقنية الـ PCR، استطاع الباحثين استخدامه ليضخموا التسلسل المطلوب حتى لو كان يمتلك نسبة صغيرة جداً من الـ DNA. وعلى سبيل المثال، يحتوي جذر شعرة

مفرد، أو قطرة دم مجهرية متروكة على مسرح الجريمة كميات وفيرة من الـ DNA لغرض إجراء تقنية الـ PCR.

Kary Mullis

قامت تقنية الـ PCR بعمل ثورة في حقل علم الأحياء الجزيئي، فقد مكّنت الباحثين من إنجاز تجارب كانت تعتبر سابقاً غير معقولة. قبل منتصف الثمانينيات من القرن الماضي، وذلك عندما طورت تقنية الـ PCR، فان المختصين بالأحياء الجزيئي كان لا بد لهم من أن يستخدموا طرق مجهدة ومكلفة للوقت وذلك لكي يتم كشف وكلونة وتنقية تسلسلات الـ DNA المراد دراستها. لقد منح العالم Kary Mullis جائزة نوبل عام 1993 في الكيمياء وذلك لابتكاره تقنية الـ PCR.

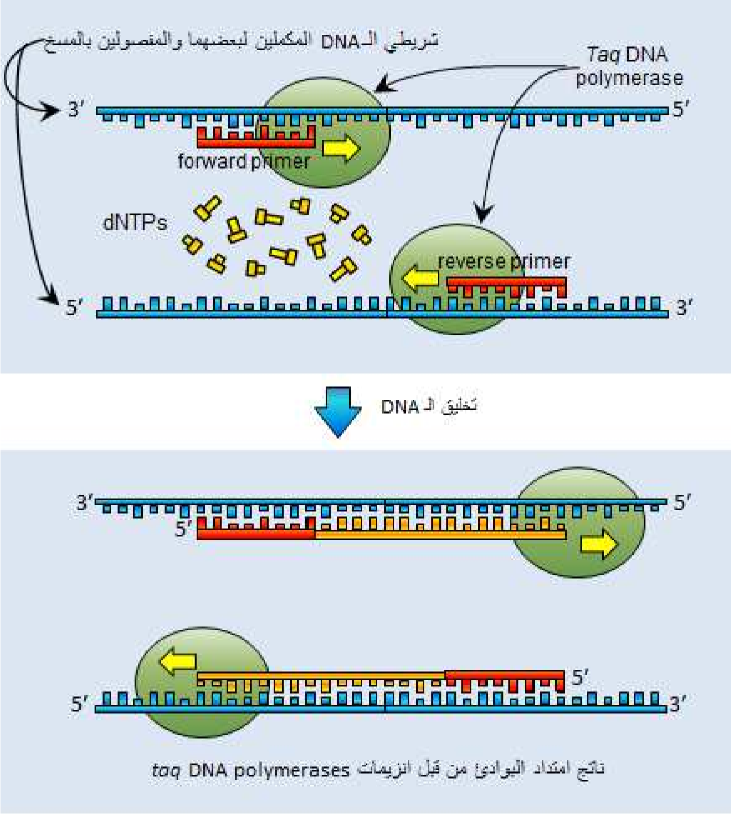
تستند تقنية الـ PCR على الطريقة التي تضاعف بها الخلايا الـ DNA التابع لها. فخلال تضاعف الـ DNA، ينفصل شريطي الـ DNA عن بعضهما، ويقوم إنزيم الـ DNA polymerase ببلمرة النيوكليوتيدات وذلك لتكوين شريطين بنويين جديدين لكل من الشريطين الأبويين. يعمل الشريطين الأبويين كقوالب templates لتخليق الشريطين البنويين. يتراكب الشريطين الجديدين بحيث تتحدد كل نيوكليوتيدة في الشريطين الجديدين من قبل النيوكلوتيدة المكملة الموجودة في الشريط القالب، بحيث أن الأدنين يكمل الثايمين والكوانين يكمل السايتوسين. وبسبب هذا التخصص في الازدواج القاعدي، أحد الشريطين البنويين المخلقين حديثاً يمتلك نفس تسلسل أحد الشريطين الأبويين، والشريط الآخر يمتلك نفس تسلسل الشريط الأبوي الآخر، هكذا ينتج التضاعف نسختين مماثلتين للنسخة الأصلية من حلزون الـ DNA المزدوج (راجع الفصل الثالث).

إن النسخة التي يريد الباحثون تضخيمها في تقنية الـ PCR تدعى بالتسلسل الهدف target sequence ، والتي تعاني ما يقارب ثلاثون دورة من التضاعف في أنبوب تفاعل صغير. وخلال كل دورة تضاعف، تزدوج عدد من جزيئات التسلسل الهدف لأن كل النواتج والقوالب لدورة واحدة من التضاعف تصبح قوالب للدورة الأخرى من التضاعف نفسه. وبعد عدد من دورات التضاعف التي يرمز لها (n) تنتج نسختين من التسلسل الهدف نظرياً. وبعد ثلاثين دورة، يمكن أن تنتج تقنية الـ PCR أكثر من عشرة بلايين نسخة من التسلسل الهدف. إن هذا هو ما يدعى بسلسلة بوليمريز الدنا أو بالـ PCR ، لأن إنزيم DNA polymerase هو الذي يحفز تضاعف السلسلة chain reaction في عملية التضاعف.

تصميم البوادئ primer design: لكي يضاعف الـ DNA، يحتاج إنزيم DNA polymerase لا إلى القالب فقط ، وإنما يحتاج إلى البادئ primer أيضاً. إن البادئ هو تسلسل من DNA مفرد الشريط single stranded DNA والذي يتلدن anneal أو يرتبط

بالشريط القالب بواسطة ازدواج قاعدي متخصص. هذا ويمكن لجهاز مخلق النيوكليوتيدات الصغيرة oligonucleotide synthesizer أن ينتج بوادئ لأي تسلسل مرغوب (أنظر تخليق الجين المباشر). ان بوادئ تقنية الـ PCR هي تسلسلات قصيرة وعادة ما تكون بطول حوالي 15 الى 25 نيوكليوتيدة. إن تسلسلات هذه البوادئ الصغيرة هي التي تكون مسؤولة عن ذلك التخصص العالي في هذه التقنية. صمم الباحثون بوادئ يمكن لها أن ترتبط بالتسلسلات الواقعة على كلا جانبي التسلسل الهدف. لقد قاموا بذلك بواسطة جعل البوادئ مكملة للتسلسلات الهدف. وكذلك بواسطة جعلها طويلة كفاية لكي لا ترتبط بموقع آخر (شكل15.11).

كلما كان البادئ طويلا ً كلما زادت احتمالية كون ذلك البادئ مكمل للتسلسل الهدف فقط دون غيره من التسلسلات. وبما أن أي موقع مفرد في تسلسل الـ DNA من الممكن أن يحتله أما الأدنين أو الكوانين أو السايتوسين أو الثايمين، لذا، فهنالك احتمال من أربع احتمالات أن هذا الموقع سوف يحتوي على الأدنين على سبيل المثال. (ان هذا على أساس التقريب لأنه لا يمكن للنيوكليوتيدات من أن تتوزع بشكل متساوي أو عشوائي في الـ DNA. ولهذا السبب، فان احتمالية وجود أي تسلسل معين من الـ DNA والذي طوله هو عدد معين من النيوكليوتيدات (n) في أي بقعة من تسلسل الـ DNA هي 1 إلى 4 كما هي مناقشة في الفصل العاشر. أن احتمالية أن تسلسل بطول 20 نيوكليوتيدة (وهو الطول النموذجي لبوادئ الـ PCR) في أن يوجد في أية منطقة معطاة من تسلسل الـ DNA بشكل عشوائي هو أقل من واحد إلى ترليون 10^{-12}. ويبلغ طول الجينوم البشري 3×10^{9} نيوكليوتيدة، وبالتالي، فان أي تسلسل بطول 20 نيوكليوتيدة من غير المحتمل أن يوجد لأكثر من مرة واحدة ربما في الجينوم البشري. صمم الباحثون اثنين من البوادئ التي يمكن لها أن ترتبط بالأشرطة المتعاكسة للـ DNA على كلا جانبي التسلسل الهدف. لقد صممت تلك البوادئ لكي "تصوب" على الطريق الصحيح، بحيث أن قطعة الـ DNA الواقعة بينها وليس خارجها هي التي تستنسخ. إن تصميم البوادئ لكي "تصوب" على الهدف الصحيح ببساطة يحتاج إلى بنائها بحيث أن نهاياتها من نوع ´3 تمتد نحو التسلسل الهدف، بينما تمتد نهاياتها ذات النوع ´5 بعيداً عنه. تدعى أحد النهايات بالنهاية ´5 بينما تدعى النهاية الأخرى بالنهاية ´3. وفي عملية التضاعف، تضاف النيوكليوتيدات عادة إلى النهاية ´3 للشريط النامي من الـ DNA. وهكذا، تتقدم عملية تخليق الـ DNA بالاتجاه من´5 إلى ´3. وكما نوقش في الفصل الثالث، يكون شريطي الـ DNA المتكاملين متضادي الاتجاه anti-parallel، وهذا يعني بأنهما يسيران باتجاهين متعاكسين، لذا تم استغلال هذه الحقيقة لتكوين نواتج الـ PCR ذات الأطوال المحددة (شكل15.11).



شكل (15.11) طريقة بدء سلسلة بوليمريز الدنا (PCR) لتضخيم تسلسلات نيوكليوتيدية معينة خارج جسم الكائن الحي. يتم تسخين الـ DNA المعزول من الخلايا لفصل الأشرطة المكملة لبعضها البعض. ثم تربط تلك الأشرطة بوجود كميات كبيرة من متعددات نيوكليوتيدية صغيرة والتي قد تخليقها كيميائياً لكي تكمل التسلسلات الهدف الموجودة في الأشرطة المكملة والمفصولة بالحرارة. تعمل تلك النيوكليوتيدات الصغيرة كبوادئ متخصصة لتخليق الـ DNA خارج جسم الكائن الحي والمحفز من قبل انزيم DNA polymerase، والذي يقوم بتخليق الـ DNA بين موقعي البادئين الأمامي والخلفي (تصميم المؤلف).

تألف تفاعل الـ PCR النموذجي من عدة مكونات، مختلطة مع بعضها البعض بمحلول ذو حجم 25 إلى 100 مايكروليتر. يجب أن يحتوي المحلول على الـ DNA القالب DNA template، والبوادئ primers، والنيوكليوتيدات nucleotides لكي تعمل كأحجار بناء building blocks للـ DNA المتكون حديثاً، وإنزيم DNA polymerase الذي يحفز على تخليق الـ DNA، بالإضافة إلى الدارئ buffer والأملاحsalts، والتي تحتوي عادة على المغنيسيوم الضروري للفعالية المثالية لإنزيم DNA polymerase. هذا ويمكن أن يكون الشريط القالب غير نقي، كما في مسحة الـ DNA المأخوذة من مسرح الجريمة. ولكي نجري تفاعل الـ PCR، يوضع الأنبوب المحتوي على المحلول في ماكنة تدعى بدوار الدنا الحراري DNA thermal cycler (شكل 16.11). إن الدوارات الحرارية أساساً هي كتل تسخين قابلة للبرمجة. إنها تحتوي عادة على كتلة سميكة من الألمنيوم مكونة من ثقوب والتي توضع فيها أنابيب تفاعل الـ PCR. يمكن لهذه الكتلة من أن تبرد أو تسخن بسرعة إلى درجات حرارية معينة ولأوقات معينة تحت سيطرة منظمة من

جهاز الحاسوب. يتم السيطرة على كل دورة من تفاعل الـ PCR وذلك بواسطة تغيير حرارة كتلة الألمنيوم هذه، وبالتالي تتغير حرارة مزيج التفاعل.

شكل (16.11). جهاز الدوار الحراري لتضخيم الجين (PCR Thermocycler) المصنع من قبل شركة ابندورف الألمانية (Eppendorf – Germany). صمم هذا الجهاز بشكل محبب للباحث بحيث يمكن التحكم به عن طريق اللمس المباشر على شاشته (touch screen).

إن الخطوة الأولى في تفاعل الـ PCR هو تسخين المزيج إلى درجة حرارية عالية، عادة 94C° إلى 95C° ، لحوالي خمس دقائق. تنكسر الأواصر الهيدروجينية التي تحمل الشريطين المتقابلين مع بعضهما البعض في الحلزون المزدوج عند التعرض إلى تلك الدرجات الحرارية. وينفصل الـ DNA إلى أشرطة مفردة. تدعى تلك العملية بالمسخ denaturation.

في الخطوة الثانية، يبرد مزيج الـ PCR إلى حرارة أوطأ، والتي تكون نموذجياً مابين 50C° إلى 65C°. إن هذا يسمح للبوادئ بأن ترتبط بتسلسلات DNA مكملة متخصصة في شريط الـ DNA القالب. يتم اختيار درجة الحرارة في هذه الخطوة بعناية لكي تكون قليلة بشكل كاف لكي تسمح للبادئ من أن يرتبط ، ولكن ليس أبرد من تلك الدرجة. ربما تسمح درجات حرارة الارتباط الأقل للبوادئ بأن ترتبط بمناطق بشريط الـ DNA القالب والتي لا تكون مكملة لها بشكل كامل، وهذا من الممكن أن يؤدي إلى تضخيم تسلسلات غير متخصصة. ويمكن أن تحدد حرارة الارتباط المثالية لعدد من البوادئ من قبل الصيغة الكيميائية المعتمدة على المكون النيوكليوتيدي للبوادئ ، ولكنها مسألة تجريبية (try and error) لكي نجد أفضل درجة حرارية للارتباط. تستغرق خطوة ارتباط البادئ

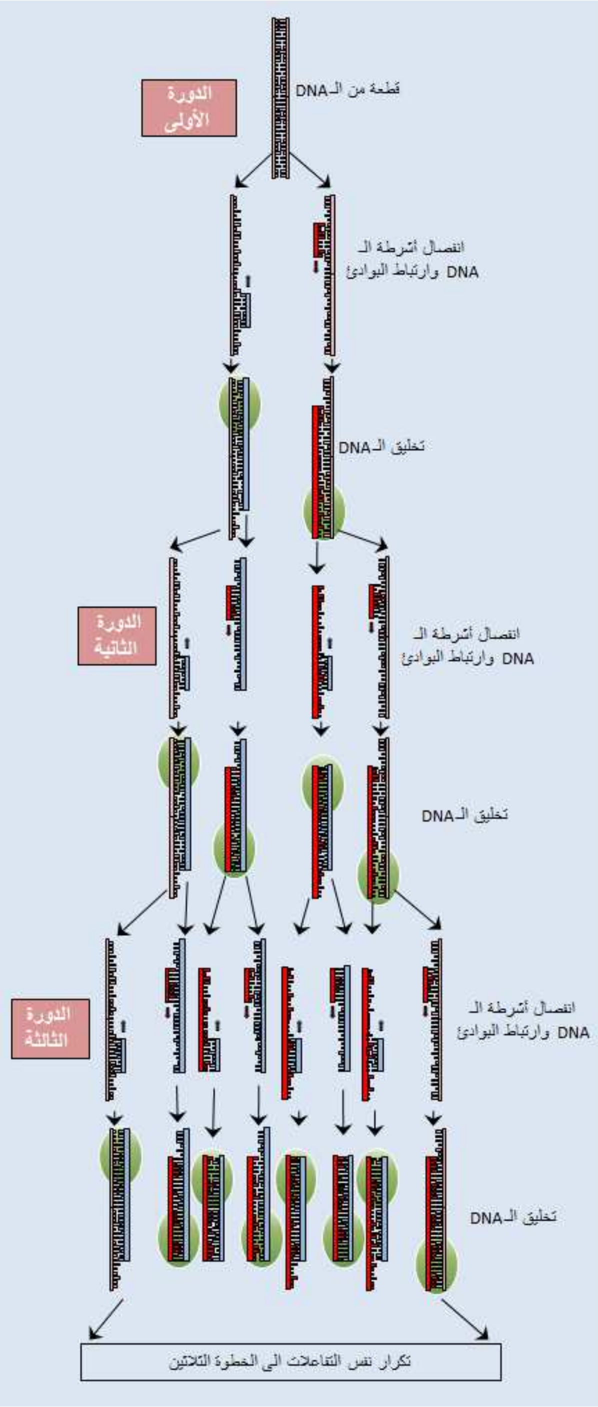
annealing step من 15 إلى 30 ثانية، وهو وقت قصير بشكل مدهش باعتبار أن البادئ يجب أن "يمسح" تسلسلات الـ DNA بحثاً عن الشريط القالب.

في الخطوة الثالثة (شكل17.11)، يسخن التفاعل من جديد، ليصل إلى 72C° ، وهي الحرارة التي يكون فيها إنزيم DNA polymerase أكثر فعالية، تتحطم معظم الإنزيمات عند هذه الدرجة الحرارية، ففي الأيام الأولى من اكتشاف تقنية الـ PCR، استخدم العلماء إنزيم الـ DNA polymerase المشتق من بكتريا القولون *Escherichia coli*، والذي يكون بفعالية أكبر عند درجة حرارة جسم الإنسان والتي هي 37C°. ولكن إنزيمات بكتريا القولون قد تحطمت عند درجات الحرارة العالية المطلوبة لتفاعلات المسخ والربط، ولهذا فان إنزيم الـ polymerase يجب أن يضاف من جديد في كل تفاعل خلال كل خطوة من خطوات الـ PCR.

ولحل هذه المشكلة، قام العلماء بتنقية إنزيمات DNA polymerases من الأحياء المجهرية التي تعيش في الينابيع الحارة، أو في الفجوات الحرارية العميقة في البحار. تكون إنزيمات هذه الكائنات أكثر فعالية في درجات الحرارة العالية. إن أكثر إنزيم مستخدم في تقنية الـ PCR يدعى بـ *Taq* DNA polymerase ، والذي قد تمت تنقيته أصلاً من بكتريا الينابيع الحارة المعروفة بـ *Thermus aquaticus*. في درجة حرارة 72C° ، يضيف إنزيم *Taq* DNA polymerase النيوكليوتيدات إلى نهايات الـ 3′ للبوادئ المرتبطة وبمعدل حوالي ألفين نيوكليوتيدة بالدقيقة الواحدة. ولهذا السبب، ولكي نضخم التسلسل الذي هو بطول ألف نيوكليوتيدة، فان خطوة امتداد البادئ يجب أن تدوم لثلاثين ثانية عند الدرجة الحرارية 72C°. وبنهاية تلك الخطوة، يمتلك كل شريط قالب شريط مكمل جديد. إن هذا يكمل أول دورة من دورات الـ PCR. يمكن أن تعاد الدورة، عند تلك النقطة، وذلك بواسطة إعادة خطوة المسخ من جديد.

في الخطوة التالية، يمكن أن يعمل شريطي الـ DNA من جديد كقوالب، كما سيحدث للشريطين المخلّقين حديثاً. وبهذه الطريقة، تزدوج عدد من القوالب، وهكذا تزدوج من جديد في كل خطوة PCR ناجحة. عند نهاية التضاعف، يحتوي أنبوب التفاعل على قطع DNA تكون معظمها عبارة عن نسخ من التسلسل الهدف. أن شريط الـ DNA القالب الأصلي مازال موجود، ولكنه يوجد بكميات مهملة مقارنة بكميات نواتج الـ PCR (شكل 17.11). هذا ويكشف عن كميات الـ DNA المضخمة في جهاز الدوار الحراري بالترحيل الكهربائي بالهلام عادة. ويمكن استخدام تقنية الاليزا (enzyme linked immune adsorbent assay) مع بوادئ الـ PCR الموسومة بمادة غير اشعاعية كالبايوتين مثلاً.

بما أن تقنية الـ PCR هي تقنية قوية وسهلة وغير مكلفة، طور المختصين في مجال الوراثة الجزيئية أساليب يمكنهم من خلالها توسيع تطبيقات تقنية الـ PCR في الأبحاث المختلفة. وقد برزت في الآونة الأخيرة العديد من التحويرات في تقنية الـ PCR الأصلية منها:



شكل (17.11). تضخيم الـ DNA باستخدام تقنية الـ PCR. ينتج الـ PCR كمية من الـ DNA يمكن تزدوج في كل دورة من دورات تخليق الـ DNA وتحتوي على أنواع DNA بأحجام متفردة. تتألف كل دورة من ثلاث خطوات، وهي المسخ والارتباط والبلمرة. وبعد عدة دورات من التفاعل، يتسيد مزيج التفاعل ذو قطع الـ DNA المختلفة قطعة DNA مفردة، تبدأ بالبادئ الأمامي وتنتهي بالبادئ الخلفي. وفي هذا المخطط، تتوضح ثلاث دورات من التفاعل والتي هي كفيلة بانتاج 16 سلسلة من الـ DNA، ثمان منها تمتلك الطول المحدد للقطعة الهدف (ذات اللون الأصفر)، ولكن بعد ثلاث دورات أخرى، يكون عدد تلك القطع ذات الطول المحدد هو 240 من أصل 256 سلسلة DNA (تصميم المؤلف).

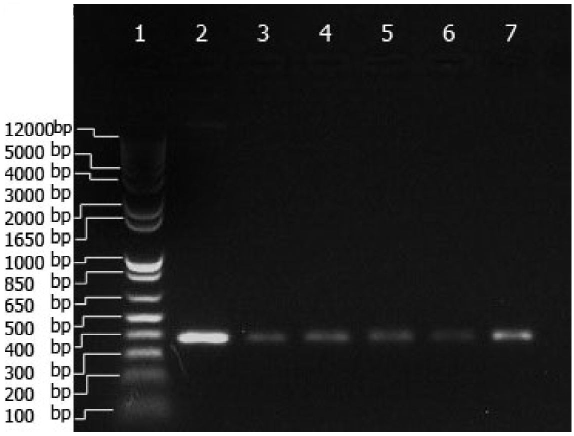
الـ PCR ذو البداية الحارة (hot start PCR):

حال مزج كل مكونات خليط تفاعل الـ PCR مع بعضها البعض، يمكن أن يقوم انزيم DNA polymerase أحياناً ببدء التخليق. ويمكن أن يحدث هذا عند الشروع بتسخين خليط التفاعل للمرة الأولى، حيث تكون الحرارة صغيرة بما يكفي لتسمح بحدوث ارتباط ولكنه قد يكون غير دقيق (non-specific annealing) بين البادئ والقالب، مولدة عدة نواتج غير متخصصة. ويمكن منع هذه المشكلة اذا لم يحدث تخليق الـ DNA لحين الوصول الى أول دورة الى حرارتها القصوى. ويدعى هذا بالـ PCR ذو البداية الحارة. ويمكن الحصول على

هكذا ظروف عن طريق حشر خرز من الشمع أما مع انزيم الـ polymerase الموجود أو مع أملاح المغنسيوم الموجودة في التفاعل والضرورية لفعالية الانزيم، سامحة للتفاعل بالبدء فقط عند ارتفاع درجات الحرارة الى الدرجة التي يضيف فيها انزيم الـ polymerase النيوكليوتيدات بشكل متخصص. كما يمكن استبدال الشمع بالأجسام المضادة، فعند ارتفاع الحرارة الى درجة معينة، تنمسخ الأجسام المضادة سامحة لانزيم الـ polymerase بالعمل.

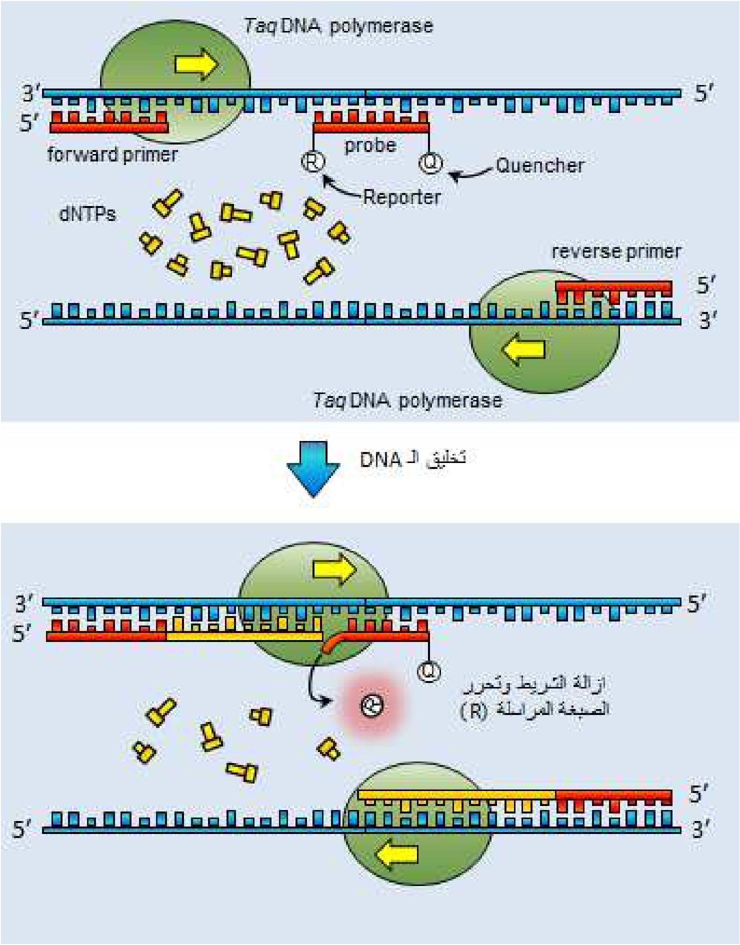
الـ PCR ذو الاستنساخ المعاكس (RT-PCR): ابتكر الباحثون تقنية ليست بعيدة عن تقنية الـ PCR التقليدية وانما هي امتداد لها أو هي أحد مشتقاتها، وتدعى بتقنية reverse transcription PCR أو اختصاراً RT-PCR. تشتمل هذه التقنية بداية على نسخ الـ RNA إلى DNA ، وذلك باستخدام إنزيم reverse transcriptase ، ثم تستخدم تقنية الـ PCR التقليدية لتضخم تلك التسلسلات المكملة والمعروفة بالـ cDNA. وبما أن المكون mRNA في الخلية أو في النسيج يتمثل بالجينات التي تستنسخ بشكل فعال، لذا، فان هذه التقنية توفر طريقة جبارة لتحليل التعبير الجيني في النسيج قيد الدراسة. اصبح باستخدام تقنية RT-PCR يمكن تضخيم جزيئة الـ RNA وذلك لأجل تقدير وفرة نسخة ذلك الجين في العينة. يتم ذلك بواسطة انزيم reverse transcriptase وبادئ مفرد، وذلك لتكوين جزيئة cDNA مفردة الشريط قبل الشروع بتفاعل الـ PCR نفسه. ويتألف بادئ الاستنساخ المعاكس من متعدد الثايمين وذلك لبدء تخليق جزيئة الـ cDNA من الذيل متعدد الأدنين.

الـ PCR المتزامن الكمي (quantitative Real time PCR): على الرغم من حساسية تقنية الـ PCRالتقليدية في الكشف عن التسلسل الهدف، الا ان ليس لها القدرة على اعطاء نتائج "كمية" أو حقيقية عن وفرة التسلسل الهدف، فعلى سبيل المثال، عندما يقوم الباحث باستخدام هذه التقنية التقليدية لغرض الكشف عن جين ما، ويستخدم في ذلك تفاعلات تضخيمية في أنابيب PCR مختلفة، فانه ليس من الضرورة أن تكون كثافة حزمة الـ PCR الناتجة هي دلالة على وفرة نسخ ذلك الجين لأننا ليست لدينا الوسيلة الملائمة لاجبار البوادئ على تضاعف الجين الهدف من أول دورة (شكل 18.11). وعندما يكون المراد هو المعرفة الكمية لعدد نسخ التسلسلات الهدف يصار الى تقنية تدعى بالـ PCR الواقعي الكمي.



شكل (18.11): عدم مقدرة تقنية الـ PCR التقليدية في اعطاء توصيف كمي حقيقي عن عدد نسخ التسلسل الهدف. على الرغم من وجود التسلسل الهدف في حسب الحزم المبينة في المسارات من 3 الى 7، الا أنها وجدت بكثافات مختلفة، لا تعكس تلك الاختلافات في الكثافة بالضرورة اختلافات في عدد نسخ التسلسل الهدف (Al-Shuhaib *et al*., 2011).

ان هنالك العديد من تطبيقات الـ PCR والتي تكون ذات أهمية في المعرفة الكمية للمادة البادئة. نظرياً، هنالك علاقة كمية بين مقدار المادة البادئة (التسلسل الهدف) ومقدار ناتج الـ PCR في أي دورة من دورات الـ PCR. ولكن عملياً، تعطي تفاعلات الـ PCR كميات مختلفة من الناتج، وهذا يجعل المعرفة الكمية متعذرة. ان أول تجربة مهدت الطريق في استخدام التحليل الكمي في الـ PCR نشرت عام 1993، حيث استخدم فيها صبغة بروميد الاثيديوم (ethidium bromide) للمعرفة الكمية بنواتج الـ PCR اثناء تراكمها. يقوم التضخيم بانتاج كميات متزايدة من الـ DNA ثنائي الشريط، والذي يرتبط بصبغة بروميد الاثيديوم، وهذا ينتج في زيادة في التفلور. واذا ماوضع مخطط يوضح الزيادة في التفلور مقابيل رقم الدورة يكون من المعقول تحليل تفاعلات الـ PCR بشكل متزامن (real time). وتعد هذه الكيفية أكثر ارضاءاً من تحليل النواتج بعد عدد ثابت من الدورات. ان العائق الأساسي في استخدام صبغة بروميد الاثيديوم هو ان كلا النواتج المتخصصة وغير المتخصصة تولد اشارة. لقد تمكن الباحثون من التغلب على هذا باستخدام طرائق معتمدة على المجسات لتحليل تراكم النواتج. ان المجسات المستخدمة هي متعددات نيوكليوتيدية ذات صبغة متفلورة مراسلة (reporter fluorescent dye) مرتبطة بنهاياتها من نوع 5′ وصبغة خامدة (quencher dye) عند النهاية 3′. عندما يكون المجس كاملاً، يعمل القرب من الصبغة الخامدة على اختزال التفلور الصادر من الصبغة المراسلة. وعندما يوجد التسلسل الهدف، يرتبط المجس بعد أحد مواقع البوادئ. وبامتداد البادئ، يتم شق المجس بفعالية 5′ exonuclease activity لانزيم *Taq* polymerase (شكل 19.11).



شكل (19.11): تفاعل real time PCR الكمي (تصميم المؤلف).

يعمل هذا الشق على فصل صبغة المراسل من الصبغة الخامدة، وبهذه الطريقة يزيد من اشارة الصبغة المراسلة. يقوم الشق بازالة المجس من الشريط الهدف، وهذا يسمح باستمرار امتداد البادئ الى نهاية الشريط البادئ. يتم شق جزيئات صبغية مراسلة اضافية من نظيراتها من الواسمات مع كل دورة، وهذا يؤثر في زيادة كثافة التفلور مقارنة بكمية الناتج المضخم. هذا وتم تطوير اجهزة تعمل على دمج التدوير الحراري (thermal cycling) المعتاد مع قياس التفلور، وذلك لكي تمكن من متابعة تفاعل الـ PCR بشكل واقعي. وهذا هو الذي عمل ثورة في التقنيات المعتمدة على المعرفة الكمية لتفاعلات الـ PCR. اي ان التفاعلات يتم وصفها منذ الخطوة الأولى عند ملاحظة أول ناتج تضخيمي بدلاً من كمية الـ PCR المتراكمة بعد عدد ثابت من الدورات. وهذا يعني كلما كان عدد

النسخ البادئة أكبر من التسلسل الهدف، كلما يتم كشف تفلور ملموس بصورة أقرب. ويتم معرفة كمية الهدف في العينات الغير معروفة بتحضير منحنى قياسي (standard curve)، وذلك باستعمال نسخ بأعداد مختلفة من التسلسلات البادئة.

تم تطوير طريقة معينة تسمح بتعقب تفاعلات الـ PCR وذلك من خلال زيادة الاشعاع الصادر من المجسات المتفلورة(fluorescent probes).ان الأجهزة التي لها القدرة على مزج تفاعل الـ PCR والكشف عن التفلور يمكن اجرائها في أنابيب زجاجية شعرية. وهذا يسمح باختراق الضوء لتنشيط مايعرف بالفلوروفور (flourophore) وبمتابعة اشعاع التفلور اثناء اجراء تفاعل الـ PCR. ويمكن للأجهزة الحديثة متابعة عدة صبغات متفلورة مختلفة بشكل متزامن، سامحة باجراء عدة تفاعلات في أنبوب واحد. أما المجسات المتفلورة ذات الطبيعة الارتباطية بالـ DNA والتي يزداد تفلورها بعد الارتباط بالـ DNA فتوضع ضمن نفس خليط تفاعل الـ PCR. وبازدياد كمية الـ DNA الهدف الحديث التصنيع، يزداد ارتباط المجس بالـ DNA الهدف، ويزداد الاشعاع المتفلور بدوره. ان أبسط المجسات الارتباطية بالـ DNA هي ذات طبيعة غير متخصصة بتسلسل معين عند ارتباطها مع الـ DNA. وعلى سبيل المثال، صبغة SYBR Green I، ذات الاشعاع المتفلور عند الطول الموجي 520 نانوميتر. تتفلور هذه الصبغة حال ارتباطها بالـ DNA المزدوج فقط. تتعقب هذه الصبغة الكمية الكلية للـ DNA المزدوج الشريط ولكن ليس لها القابلية على أن تميز بين التسلسلات المختلفة. ولكي نتأكد بأن التسلسل الهدف الصحيح هو قيد التضخيم، يستخدم مجس متفلور متخصص بالتسلسل.

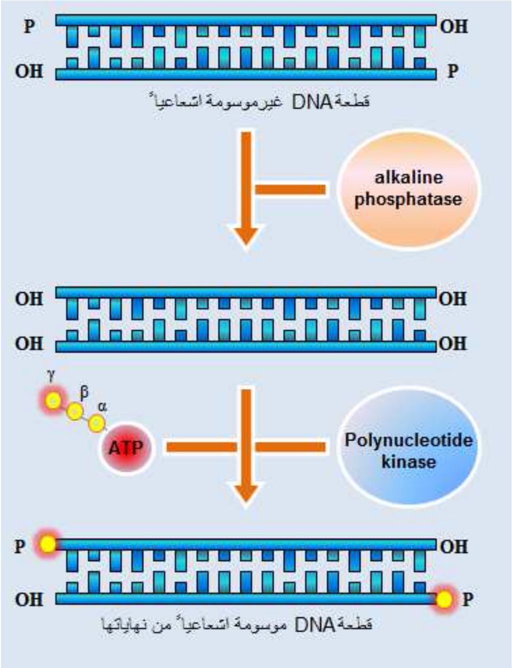
يمكن ضرب مثال لتوضيح الفكرة المناقشة في أعلاه، كما في المجس المعروف "بتاك مان" (TaqMan®probe). ويتألف هذا المجس من اثنان من الصبغات المتفلورة (flourophores) مرتبطة بتسلسل DNA يزدوج في وسط الـ DNA الهدف. ويقوم نظام نقل الطاقة الرنيني المتفلور (fluorescence resonance energy transfer) أو FRET بنقل الطاقة من الصبغة المتفلورة ذات الطول الموجي الصغير في نهاية واحدة من الطول الموجي الكبير للصبغة المتفلورة للنهاية الأخرى. وهذا يخمد من تفلور اشعاع الموجة الصغيرة.

وخلال تفاعل الـ PCR، يرتبط مجس TaqMan بالتسلسل الهدف بعد خطوة المسخ والتي تفصل شريطي الـ DNA. وبقيام انزيم Taq polymerase بمد البادئ خلال خطوة الـ PCR القادمة، فانه يقوم بالنهاية بالاصطدام بمجس TaqMan. هذا ولايعتبر انزيم Taq polymerase هو الانزيم الوحيد القادر على ازاحة الأشريطة التي تعترض تقدمه الى الأمام، ولكنه يمتلك الفعالية الهاضمة 5′ - 3′ nuclease activity والتي تحطم شريط المجس المتكون من تسلسل DNA طبعاً. وهذا يحطم الرابطة بين الصبغتين المتفلورتين

ويمزق الـ FRET. ان الصبغة المتفلورة ذات الطول الموجي الصغير هي الآن غير متعرضة للاخماد ويزداد تفلورها. وفي هذه الحالة، تتعلق الزيادة في التفلور بشكل مباشر بكمية التسلسل الهدف المتخصص الذي قد تم تضخيمه في هذه التقنية الكمية.

طرق توسيم المجسات (labeling of probes) للكشف عن الجين الهدف

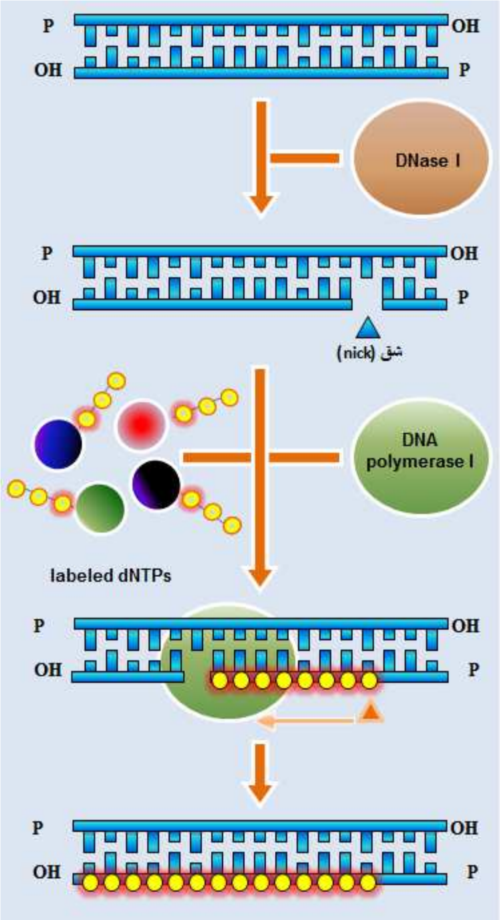
قبل التطرق الى الكشف عن الجين لابد للقارئ من معرفة كيفية توسيم المجسات المخصصة للكشف عن تسلسل الجين الهدف. هنالك عدة طرق لوسم المجسات كما في طريقة التوسيم الطرفي (end labeling)، والتي يستخدم فيها انزيم polynucleotide kinase لنقل مجموعة الفوسفات الطرفية في جزيئة الـ ATP الى المجموعة الهيدروكسيلية الطرفية من نوع 5′ في جزيئات الأحماض النووية. واذا كان الـ ATP الواهب موسوم اشعاعياً ينتج هذا في حمض نووي معلم اشعاعياً من النهاية 5′ (شكل 20.11).



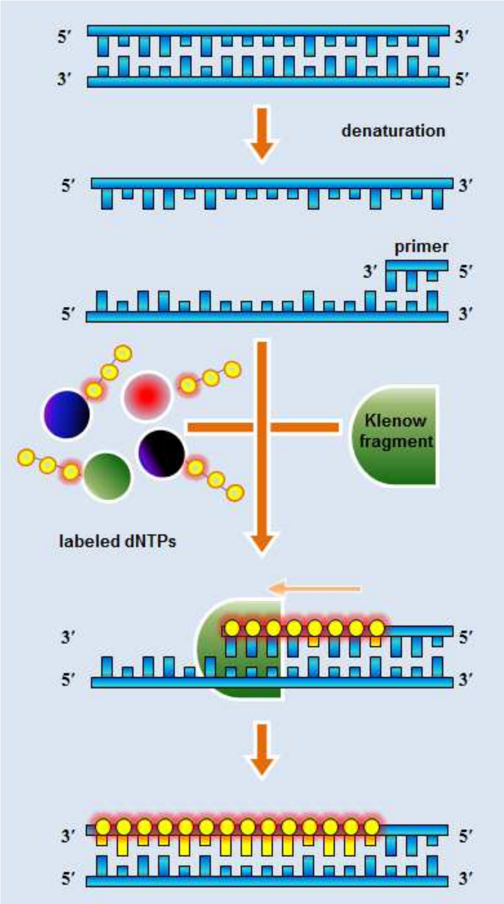
شكل (20.11): التوسيم الطرفي للـ DNA باستخدام انزيم polynucleotide kinase والذي يختصر بـ PNK. في الخطوة الأولى تزال مجموعة الفوسفات بواسطة انزيم الـ phosphatase لتوليد مجاميع هيدروكسيل من نوع 5′. وفي الخطوة الثانية تنقل الفوسفات الطرفية $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ (الدائرة الصلدة) بعد ذلك الى النهاية 5′ بواسطة انزيم PNK (تصميم المؤلف).

ويمكن توليد حمض نووي موسوم من نهايته الهيدروكسيلية من نوع 3′ وذلك عن طريق انزيم terminal transferase وهو نفس الانزيم المستخدم في التذييل المتجانس (homopolymer tailing) (راجع الفصل العاشر). ويعتبر التوسيم من النهاية 5′ أو 3′ هما الطريقتان الشائعتان لتوسيم البوادئ أو متعددات النيوكليوتيدات القليلة

(oligonucleotides) لأن تلك الطريقتان يمكن استخدامهما بالاشرطة المفردة اضافة الى الاشرطة المزدوجة، أما اذا كانت جزيئات الحمض النووي ذات شريط مزدوج، فتوجد طرق أخرى لتوسيمها بالاضافة الى الطريقتين السابقتين. كما في انتقال الثلمة (nick translation)، والتي وتعول على قابلية انزيم DNA polymerase I على نقل الثلمة المخلقة في آصرة الفوسفات ثنائية الأستر (على طول الـ DNA) في العمود الفقري لحلزون الـ DNA المزدوج (راجع الفصل الثالث). ربما تحدث الثلمات بشكل طبيعي أو ربما تتسبب عن طريق وجود حتى ولو تركيز واطئ من الانزيم الهاضم DNase في خليط التفاعل. يحفز انزيم DNA polymerase I تفاعل ازالة الشريط (strand displacement reaction) والذي يدمج نيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات (dNTPs) جديدة في سلسلة الـ DNA، وهنا اذا تم تجهيز خليط التفاعل بأحد أنواع الـ dNTPs الأربعة بشكل موسوم اشعاعياً، فالنتيجة تكون DNA موسوم اشعاعياً بشكل كبير (شكل 21.11).



شكل (21.11). وسم الـ DNA بواسطة انتقال الثلمة. في البداية يتكون الشق أحادي الشريط في آصرة الفوسفات ثنائية الأستر في العمود الفقري في قطعة الـ DNA باستخدام انزيم DNase I. ثم يقوم DNA polymerase I بتخليق نسخة من الشريط القالب، محطماً الشريط غير القالب بفعاليته المحطمة 5′-3′ exonuclease activity. واذا تم تجهيز أحد النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات [α-32P]dNTP الموسومة اشعاعياً يؤدي هذا الى اندماج الاشعاع الى الشريط الجديد المخلق حديثاً(تصميم المؤلف).



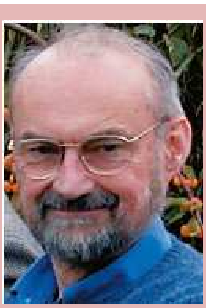
هنالك طريقة أخرى للتوسيم تتم بواسطة امتداد البادئ (labeling by primer extension) وتسمى أيضاً بالتوسيم ذو النيوكليوتيدات المتعددة الصغيرة (oligolabelling)، والتي تستخدم نيوكليوتيدات متعددة عشوائية (نيوكليوتيدات سداسية عادة) لبدء تخليق شريط الـ DNA بواسطة انزيم DNA polymerase. يتم مسخ الـ DNA المراد توسيمه بالحرارة، ومن ثم ترتبط البوادئ بالـ DNA المفرد الشريط.

ويمكن لقطعة كلينو (Klenow fragment) لانزيم الـ DNA polymerase من أن تخلق نسخة من الشريط القالب، والذي يبتدئ من النهاية الهيدروكسيلية ′3 للنيوكليوتيدات المتعددة. واذا اندمجت أحد أنواع الـ dNTP الموسومة، يتم عندها انتاج DNA موسوم (شكل 22.11). ويتم تنفيذ هذه الطريقة بواسطة تقنية الـ PCR (أنظر أعلاه).

شكل (22.11). توسيم الـ DNA بواسطة امتداد البادئ. أولاً يمسخ الـ DNA لاعطاء نيوكليوتيدات مفردة الشريط. ثم يضاف البادئ ليعطى منطقة صغيرة مزدوجة الشريط ذات نهاية هيدروكسيلية حرة من نوع ′3. ثم تقوم قطعة كلينو التابعة لانزيم DNA polymerase I بتخليق نسخة من الشريط القالب امتداداً من البادئ، وذلك بدمجها أحد أنواع النيوكليوسيدات الموسومة اشعاعياً [α-32P]dNTP مثلاً لانتاج جزيئة موسومةً(تصميم المؤلف).

مهما اختلفت طريقة التوسيم، لابد من فصل الـ DNA الموسوم عن الـ DNA الغير موسوم الموجود في مزيج التفاعل. لابد من ملاحظة ان في معظم تفاعلات التوسيم لاتنحشر كل الـ dNTPs الموسومة اشعاعياً في التسلسل الهدف، لذا لابد من ايجاد طريقة ما لفصل النواتج الموسومة عن نظيراتها الغير موسومة. وهنالك طريقة بسيطة لانجاز ذلك تتلخص باستخدام الترشيح بالهلام (gel filtration) باستخدام وسط ملائم. ويمكن اتمام كل هذه العملية بماصة باستور، حيث يصل الـ DNA الموسوم الى العمود أولاً، ويتبع بعد ذلك بالنيوكليوتيدات الحرة. يتم جمع الاجزاء (fractions) ومراقبة قوة الاشعاع فيها.

كيف نكشف عن الجين



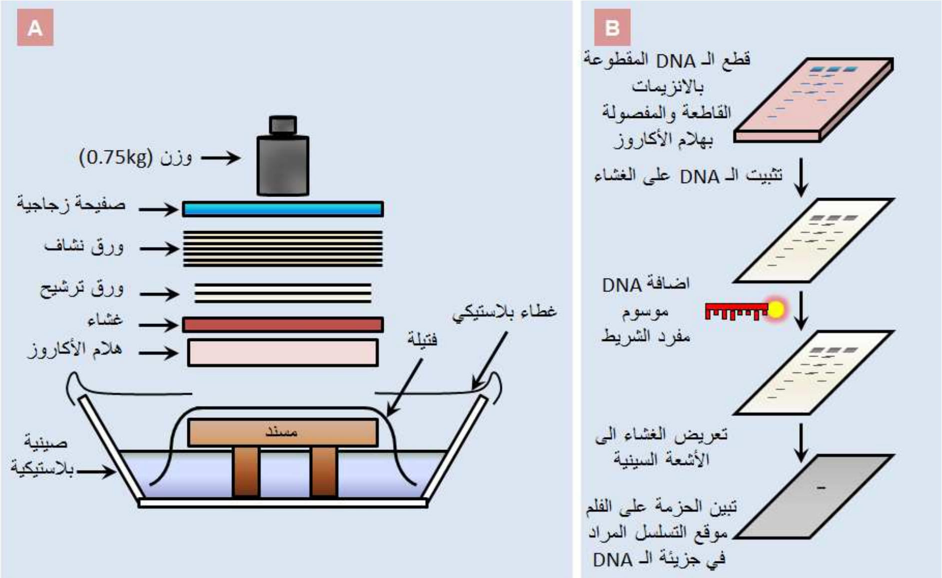
Edwin M. Southern

بعد الحصول على المجسات بواسطة تخليقها كيميائياً وتوسيمها، يمكن للباحث بعد ذلك أن يهجنها بطريقة ما بحيث يبحث بواسطتها عن التسلسل الهدف. وقد وظفها الباحث Southern عام 1975 واستخدمها بطريقة رائعة لمعرفة وجود وموقع التسلسل الهدف. وبما أن مجرد تقطيع الحمض النووي بالانزيمات القاطعة وترحيله كهربائياً لا يكفي لمعرفة تسلسل صغير في معقد كبير من المادة الوراثية لأن النتيجة لا تعدو كونها عبارة عن مسحة (smear) على الهلام عند تصبيغه ببروميد الاثيديوم مثلا، لذا ابتكر Southern طريقة سميت باسمه يمكن من خلالها الكشف عن التسلسل المطلوب، وقد احتلت هذه التقنية موقع كبير في تجارب الهندسة الوراثية، لأن هذه التقنية لا تعطي اجابة لسؤال واحد "هل يوجد الجين" ولكن يمكن لها تعطي اجابة لسؤال آخر وهو "أين يقع الجين".

أما فيما يخص خطوات العمل بوصمة ساوثرن فسنتناولها بشئ من التفصيل لأهميتها الكبيرة في الكشف عن وجود وانحشار الجين وحتى موقع الجين ولاعتماد عدة طرق كشف أخرى على هذه الطريقة. تتمثل أول خطوة من خطوات هذه الوصمة بتقطيع الـ DNA المراد معرفة وجود التسلسل الهدف فيه بانزيم قاطع أو عدة انزيمات قاطعة، ثم يصار الى ترحيل قطع الـ DNA تلك في هلام الأكاروز. يوضع هلام الأكاروز هذا على طبقة من ورق الترشيح والتي انغمست في مستودع يحتوي على دارئ النقل. أما الغشاء المعد للتهجين (hybridization membrane) فيوضع بين الهلام وحزمة أوراق التنشيف (towel papers) والتي تعمل على سحب دارئ النقل خلال الهلام بواسطة الخاصية الشعرية. وبهذا الوضع، ينتقل الـ DNA من الهلام مع جريان الدارئ ويتثبط على غشاء التهجين (شكل 11.23-a). وفي المراحل الأولية من وصمة ساوثرن كان نوع الأغشية المستخدمة هو النتروسلسلوز (nitrocellulose). لكن المشكلة في هكذا نوع من الأغشية هو طبيعتها الهشة. لذا تم تطوير نوع آخر من الأغشية، وهي أغشية البلاستك المدعمة والتي تمتلك قابلية أكبر على الارتباط مع الأحماض النووية بالاضافة الى قابليتها للشد من دون تهشمها. ولأجل أن تنفيذ وصمة ساوثرن بشكل كفوء، فان من المهم معاملة الهلام بشكل مسبق. تحتاج جزيئات الـ DNA الكبيرة (الأكبر من 10kb) الى وقت نقل أكبر مقارنة بالقطع الصغيرة. ولكي نسمح بانتقال متجانس لأحجام مختلفة من قطع الـ DNA يتم تعريض الـ DNA المرحل كهربائياً الى معاملة ازالة بيورين (depurination) لمدة قصيرة، وتتبع تلك المعاملة باضافة القاعدة لأن اضافة القاعدة تمسخ قطع الـ DNA قبل

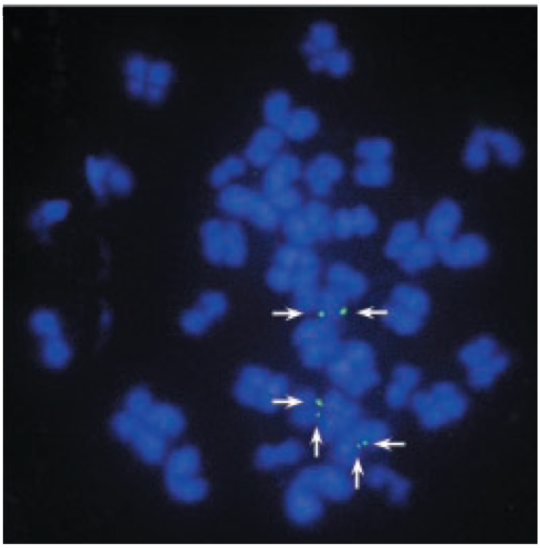
نقلها، وهذا يضمن انتقالها بشكل أشرطة مفردة وبشكل مناسب لاضافة الواسم اليها. وأخيراً، يتم معادلة الهلام باضافة محلول التعادل (neutralization solution) قبل اجراء وصمة ساوثرن. وهنالك طريقة بديلة تستخدم أغشية ذات شحنة موجبة، والتي تنفي الحاجة الى معاملة الهلام معاملة مطولة. وعندما ينتقل الـ DNA بشكله الطبيعي (الغير ممسوخ) ومن ثم يتم مسخه بالقاعدة على الغشاء. وبعد النقل، تحتاج الأحماض النووية الى تثبيتها بالغشاء وتتوفر عدة طرق لتنفيذ هذا المطلب كما في الخبز بدرجة حرارة 80 درجة مئوية كما هو الحال في أغشية النتروسليلوز وأغشية البلاستك أيضاً. ولكن للطبيعة الأحتراقية للنتروسليلوز، فانه من المهمان يخبز في فرن حراري بالتفريغ (vacuum oven). وهنالك طريقة بديلة للتثبيت تسلط فيها الاشعة الفوق بنفسجية من قبل جهاز يسمى UV cross linker بشكل نموذجي. وتعتمد تلك الطريقة على تكوين أواصر عرضية (cross links) بين مخلفات الثايمين في الـ DNA والأحماض الأمينية الموجبة الشحنة الموجودة على سطح الغشاء البلاستيكي. وبعد خطوة التثبيت، يوضع الغشاء في محلول يحتوي على واسم (RNA أو DNA مفرد الشريط أو oligonucleotide) معلم (بشكل اشعاعي أو غير اشعاعي) والذي يكون مكملاً لتسلسل لحزمة أو حزم الـ DNA المنقول على الغشاء. ويتم اختيار ظروف معينة بحيث تتهجن الأحماض النووية مع الـ DNA على الغشاء. وبما أن هذه الأحماض النووية الموسومة تستخدم في كشف وتعيين موقع التسلسل المكمل، لذا يطلق عليها بالمجسات(probes). وبعد اكتمال التهجين، يتم غسل الغشاء لازالة النشاط الاشعاعي الغير مرتبط ويتم الكشف عن مناطق التهجين بواسطة الـ autoradiography وذلك بوضع الغشاء بالارتباط مع فلم أشعة أكس (X ray film) (شكل 11.23-b).

تعتبر خطوات عمل وصمة ساوثرن حساسة للغاية، ويمكن تطبيقها في معرفة خرائط التقييد (restriction maps)، وهي الخرائط المستخدمة في معرفة المواقع الجينية عن طريق المعاملة بعدة انزيمات قاطعة، حيث يمكن معرفة موقع جين واحد ضمن مئات الآلاف من الجينات ذات التسلسلات المختلفة. ولوصمة Southern تطبيقات أخرى كثيرة منها استخدامها وبنجاح في التحليلات الجنائية (forensic analysis)، حيث تمكن الباحثون بمعية هذه التقنية، وباستخدام مجاس خاصة لهذا الغرض، من معرفة الكثير من تفاصيل الجريمة التي أدت الى معرفة الجاني (انظر ملحق هذا الفصل). ليس هذا فحسب، وانما يمكن استخدام نفس الخطوات الأساسية في وصمة الأحماض النووية في نقل الـ RNA من الهلام الى أغشية مشابهة. ويسمح هذا بتشخيص تسلسلات mRNA متخصصة ذات طول محدد عن طريق التهجين مع مجسات متخصصة موسومة، ويعرف هذا بوصمة نورثرن (Northern blotting). بالاضافة الى ذلك، توجد هنالك تقنية أخرى مشتقة من تقنية Southernأيضاً وهي تقنية مناعية، والتي لاتعتمد على وجود تسلسلات مكملة بين الأحماض النووية، وانما تستخدم مجسات متخصصة للنواتج البروتينية للجين الهدف تعرف بوصمة وسترن (Western blotting) (أنظر أدناه).



شكل (23.11) وصمة Southern. (a) مخطط نموذجي لوصمة Southern يوضح فيه آلية الانتقال الشعري (capillary action) للأحماض النووية مفردة الشريط. (b) مخطط يوضح كيفية ايجاد التسلسل الهدف في وصمة ساوثرن. بعد فصل قطع الـ DNA على هلام الأكاروز ونقلها الى الغشاء بفعل الخاصية الشعرية. ويتحول الـ DNA الى الحالة المفردة الشريط قبل اضافة المجس الموسوم. يمكن اكتشاف ارتباط المجس بالغشاء وذلك بتعريض الأخير الى مصدر للأشعة السينية. يكون المجس الموسوم اشعاعياً حزمة على الفيلم في الموقع الملائم للتسلسل المكمل على الغشاء (تصميم المؤلف).

على الرغم من الفوائد المتعددة لتقنية Southern، الا ان هذه التقنية تعتمد على ترحيل الـ DNA المقطع المستخلص والمعامل بالانزيمات القاطعة، لذا، لا يمكنها معرفة موقع ذلك الجين في أي كروموسوم هو. لذا، تستخدم تقنية بديلة تفي بهذا الغرض تسمى بتقنية التهجين التفلوري الموقعي (fluorescent *in situ* hybridization) أو FISH اختصاراً، ومن الممكن بهذه التقنية حضن مجسات الحمض النووي الموسومة اشعاعياً أو الوسومة بالاشعاع مع قطع الأنسجة أو حتى الكروموسومات، وبعد ازالة المجسات الفائضة يتم الكشف عن احتمالية تهجين المجس مع تسلسله الهدف. وتم اثبات الكفاءة الكبيرة التي تتمتع بها هذه التقنية في تحديد ماهية الخلايا التي تعبر عن جين محدد في نسيج ما، وليس هذا فحسب، وانما ذهبت هذه التقنية الى أبعد من هذا وهو تحديد موقع جينات معينة في الكروموسومات مندون الحاجة الى تحطيم هيئة تلك الكروموسومات وعزل الـ DNA منها، لأن الاستبقاء على شكل الكروموسومات الطبيعي يعني القدرة على تحديد موقع الجين الهدف في الكروموسوم شكل (24.11)

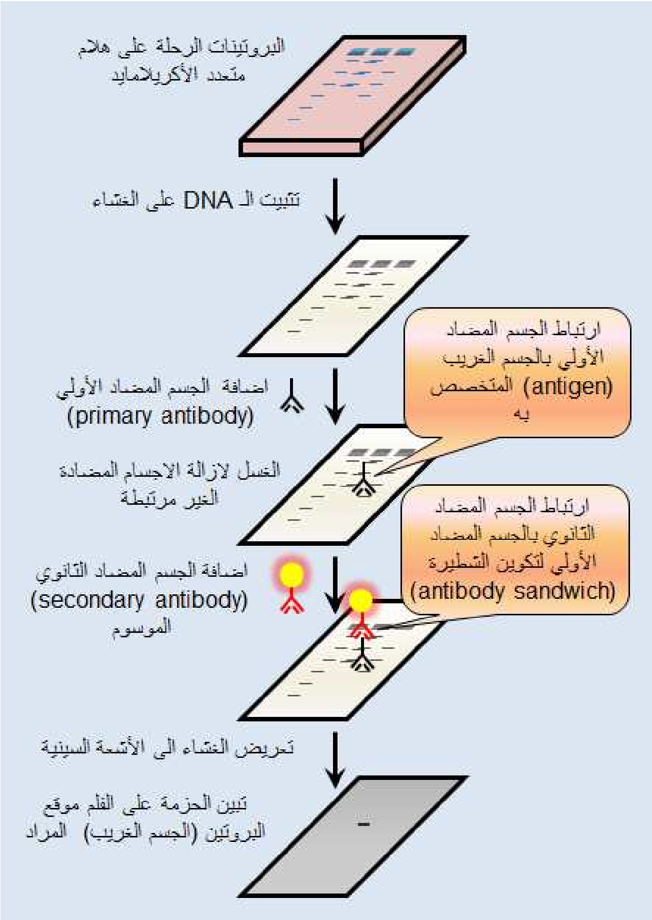


شكل (24.11). استعمال تقنية التهجين التفلوري الموقعي في تحديد موقع الجينات الهدف عن طريق تهجين مجس موسوم بمادة متفلورة متخصص بتلك التسلسلات الجينية. (أخذت الصورة من بحث نشرته الباحثة Lavitrano *et al*., 2002).

سميت عدة وصمات مشتقة من وصمة Southern هكذا جرياً على السياق ببساطة،ومنها وصمة Northern ووصمة Western. واللتان لاتستخدمان في الكشف المباشرعن الجين وانما قد تستخدمان في الكشف عن نسخة الجين (وصمة Northern) وبروتين الجين (وصمة Western). في وصمة Northern تستخدم نفس الخطوات الأساسية في وصمة Southern الا ان الهدف منها هو ليس الكشف عن الـ DNA بل الكشف عن الـ RNA. وهنا يفصل الـ RNA على هلام الأكاروز وينقل الى الغشاء بنفس الطريقة المناقشة سلفاً. ويتم الكشف عن جزيئات الـ RNA الهدف بواسطة التهجين مع مجسات DNA مكملة لتسلسل الـ RNA الهدف.

أما وصمة Western، فتعنى بكشف البروتين الهدف وذلك باستخدام أجسام مضادة (antibodies). وتفصل البروتينات على هلام متعدد الأكريلامايد المحتوي على المادة الماسخة (SDS) وذلك للمحافظة على البروتينات بصورة غير مطوية (ممسوخة). تنقل البروتينات من الهلام الى الغشاء أيضاً بنفس الطريقة المناقشة سلفاً لوصمة Southern. ومن ثم يتم كشف البروتينات الهدف باستخدام الأجسام المضادة المتخصصة بها. ان التداخل المتخصص بين الأجسام المضادة (antibodies) وهدفها البروتيني الذي يعتبر كمستضد (antigens) المثبتة على الغشاء، هي الطريقة التي يتم من خلالها الكشف عن موقع الجسم المضاد.في البدء، استخدم الباحثون أجسام مضادة موسومة اشعاعياً، ولكن غالباً ماينطفئ وميض تلك الأجسام المضادة الموسمة اشعاعياً عند حصرها بنظام الفطيرة (sandwich)

المستخدم في وصمة Western. ويعمل نظام الفطيرة من خلال ارتباط الجسم المضاد الغير موسوم (الجسم المضاد الأولي) بالمستضد على الغشاء. ثانياً، يستخدم الجسم المضاد الموسوم (الجسم المضاد الثانوي) بعد ذلك لكشف وجود الجسم المضاد الأولي. ويمتلك هذا عدة فوائد، أولاً تعني الطبيعة المتعددة الارتباط للجسم المضاد انجاز زيادة ضخمة في الحساسية، وثانياً، يمكن أن يستخدم جسم مضاد ثانوي واحد لكشف عدد من الأجسام المضادة الأولية المختلفة (شكل 25.11).



شكل (25.11). وصمة Western المستخدمة للأجسام المضادة لكشف البروتينات الهدف. تفصل البروتينات في هلام متعددالأكريلامايد، وذلك باستخدام مادة SDS للحفض على الطبيعة الممسوخة لها، وذلك قبل وصمها بالاغشية. يتم منع المواقع الارتباطية للبروتينات الغير مستهدفة على الغشاء باستخدام مسحوق الحليب المذوب وذلك قبل اضافة الجسم المضاد الأولي. يرتبط الجسم المضاد الأولي بشكل متخصص بالمستضد الذي نشأ لأجله. ثم يستخدم الجسم المضاد الثانوي الموسوم لكشف موقع الجسم المضاد الأولي. وتنتج فطيرة الأجسام المضادة هذه في تضخيم الاشارة. وغالباً ما يوسم الجسم المضاد الثانوي بانزيم تنتج فعاليته، بوجود مادة التفاعل المناسبة، بظهور أما تغير لوني على الغشاء أو اشعاع ضوئي يمكن كشفه باستخدام فيلم الأشعة السينية (تصميم المؤلف).

ملحق الفصل الحادي عشر

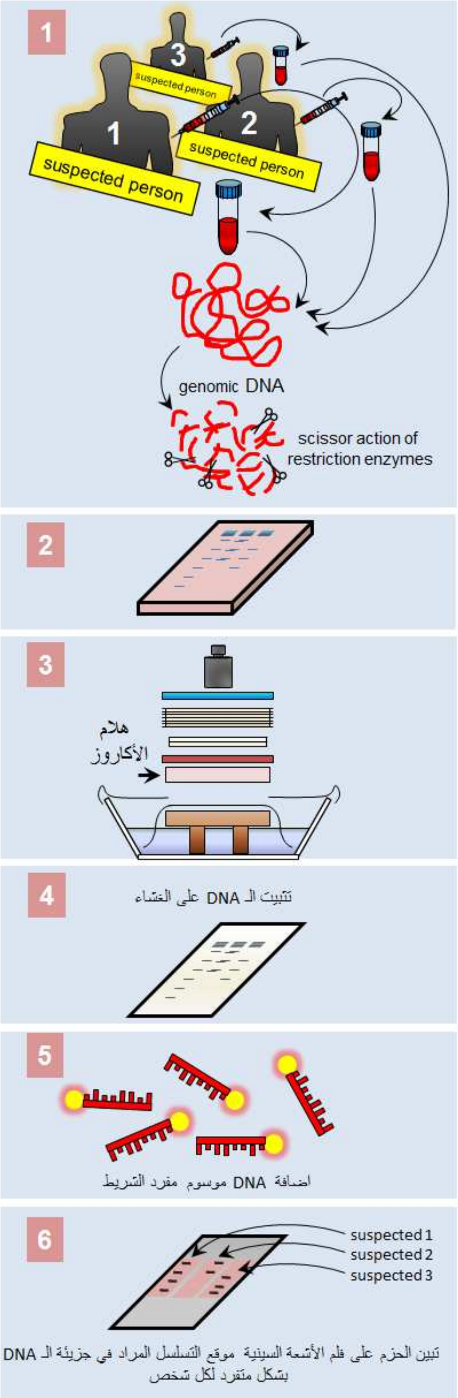
كيف نكشف عن هوية الشخص الجينية

في كل سنة في القضايا الجنائية وغيرها في المحاكم في انحاء العالم تعد القابلية على معرفة هوية المجرم مسألة أساسية في قرار المحكمة. وقد قدمت الوراثة الجزيئية طوق النجاة للمحاكم وجعلت من الممكن جواب الأسئلة الروتينية الآتية في المحاكم: (1) هل تعود قطرة الدم الموجودة في مسرح الجريمة الى المشتبه به في المحاكمة؟ (2) من هو أب ذلك الطفل؟ ولحد وقت قريب، لايوجد دليل كامل لاثبات ذلك. ويمكن لفحوص الدم تحديد من هو ليس أباً لذلك الطفل، ولكن ليس لها القدرة على تحديد من هو الأب. ولذلك تم تطوير فحص يمكن أن يوفر فحص ذو دقة متكاملة مئة في المئة. يدعى ذلك الفحص ببصمة الـ DNA (DNA fingerprinting). ويمكن لهذا الفحص بالذات أن يبين فيما اذا كانت المادة الوراثية في قطرة من الدم تطابق ذلك المشتبه به دون غيره أم لا، أو يمكن أن تستعمل لحل قضايا الأبوة دون شك.

Alec Jeffreys

تستند تقنية بصمة الـ DNA عملياً على التطور الهائل الحاصل في تقنيات الهندسة الوراثية ويسمح بفحص المادة الوراثية لكل شخص على حدة بوصفه كيان وراثي مستقل. يرجع فضل اكتشاف هذه التقنية الى الانكليزي Alec Jeffreys. وتعتمد هذه التقنية على استغلا حقيقة تخلل المادة الوراثية لكل كائن من قبل سلسلة من تسلسلات الـ DNA المتماثلة التي تدعى بالـ DNA التكراري (tandem repeats) أو التكرارات المتلاحقة (tandem repeats) واستخدلمها كمجسات لتشخيص الهوية الوراثية (راجع الفصل الثاني). ان نمط وطول وعدد هذه التكرارات تكون متفردة لكل شخص. طور العالم Jeffrey سلسلة من مجسات الـ DNA المتخصصة التي يمكن لها أن تكشف أنماط DNA متميزة لكل شخص. أما خطوات عمل بصمة الـ DNAفهي: (1) تنقية الـ DNA من عينة صغيرة من الدم أو المني أو أي خلية حاوية على DNA، يقطع الـ DNA الى قطع أصغر بالانزيمات القاطعة. (2) تفصل القطع بالترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز. (3) تنقل القطع المفصولة الى غشاء بلاستيكي بوصمة Southern. (4) تضاف مجسات الـ DNA الموسومة بالمادة المشعة الى المحلول المحتوي على غشاء البلاستك. (5) تلتصق المجسات في أي موقع يحتوي على التسلسلات المتكررة المكملة لها مكونة لحزمة مميزة. (6) يمرر فلم من الأشعة السينية على الـ DNA الموجود في الغشاء البلاستيكي، ويتم بواسطة طريقة التصوير الاشعاعي الذاتي رؤية الحزم المشعة. وتكون انماط الحزم المتحصل عليها من هذه الافلام هي 100% متفردة لكل

شخص، ماعدا التوائم المتماثلة والتي تمتلك نفس النمط. ان التطبيق الجنائي لبصمة الـ DNA يتضمن مقارنة بين بصمة الـ DNA المستحصلة من الخلايا الموجودة في موقع الجريمة مع بصمة الـ DNA التابعة للمشتبه به. واذا كان نمط الـ DNA متماثل بالضبط، يكون التشخيص هنا حتمياً (شكل 26.11). ولتحديد نمط الأبوة، يتم مقارنة بصمة الـ DNA للأموالطفل والأب المزعوم. ويجب أن تتطابق كل الحزم الأبوية في بصمة الـ DNA للطفل مع الأب المزعوم لأجل اثبات أحقية الحاق الطفل بأبيه.



شكل (26.11). الخطوات التقليدية لبروتوكول معرفة بصمة الـ DNA (تصميم المؤلف).

أسئلة الفصل الحادي عشر

السؤال الأول: علل ما يلي

على الرغم من دقة طريقة النبذ المركزي متدرج الكثافة في تنقية الأحماض النووية الا أنها قد تم الاستعاضةعنها بطرق بديلة أخرى؟

على الرغم من كفاءة الحصول على الجين بطريقة cDNA library الا ان هذه الطريقة تفقد هوية الجين الكاملة؟

لايمكن تشييد cDNA library للجين الذي لايعبر عن نفسه أبداً؟

تقوم آلة تخليق الـ DNA بتخليقه بعكس الاتجاه الذي يخلق به في الطبيعة (من 3′ الى 5′)؟

تستخدم طريقة التحلل القاعدي (alkaline lysis) في استخلاص البلازميدي عادة؟

تسمى طريقة Sanger و Coulson في معرفة تسلسل الـ DNA بطريقة انهاء السلسلة (chain termination method)؟

لاحاجة لفصل عينات الـ DNA المراد معرفة تسلسلها في أربعة مسارات في الهلام عند استخدام الواسمات المتفلورة؟

يفضل استخدام الأغشية البلاستيكية على أغشية النتروسليلوز في تجارب تهجين الأحماض النووية كما في وصمة ساوثرن؟

يفضل في وصمة Western استخدام الطرق المناعية على الطرق الاشعاعية في توسيم الأجسام المضادة؟

عندما نريد في تفاعل الـ PCR تضخيم تسلسل بطول 1000 نيوكليوتيدة يجب أن تستمر خطوة امتداد البادئ لثلاثين ثانية في درجة حرارة 72°C؟

السؤال الثاني: اختر الجواب الصحيح

يعد شكل الـ DNA الأكثر تفلوراً في تقنية density gradient centrifugation هو...............

a. linear form   b. covalently closed circular form   c. open circle form   d. none

ان الطريقة .... هي الطريقةالأسهل في استخلاص الـ DNA وتنقيته

a. phenol based methods   b. density gradient centrifugation   c. spin column   d. both a and b

عند اجراء تجربة في معرفة نقاوة الـ DNA لعينة ما، وجد بأن نقاوتها هي 1.05 فقط، وهذا يعني أن تلك العينة ....

a. pure   b. contaminated with RNA   c. contaminated with protein   d. both b and c

يستخدم الطول الموجي 260 نانوميتر في معرفة تركيز .... في العينة.

a. proteins   b. RNA and DNA   c. DNA only   d. RNA only

تعد تقنية .... من أكثر التقنيات الشائعة في معرفة حجم جزيئات الـ DNA.

a. HPLC   b. FISH   c. SDS-PAGE   d. agarose gel electrophoresis

يمكن عزل جزيئات الـ mRNA في حقيقية النواة وتفريقها عن بقية الجزيئات الأخرى في الأنسجة وذلك بسبب امتلاكه للـ ....

a. 5′ cap   b. 3′ tail   c. intervening sequences   d. codons

يقوم انزيم .... بتوليد نهايات مستوية من النهايات المتدلية.

a. HindIII   b. primase   c. EcoRI   d. SI nuclease

ان الوحدات الأساسية في تخليق أشرطة الـ DNA خارج جسم الكائن الحي وبأستخدام أجهزة تخليق الـ DNA هي ....

a. nucleotides   b. nucleosides monophosphates   c. nucleoside diphosphates   d. phosphoramididtes

عند تخليق متعدد نيوكليوتيدي معين في آلة تخليق الـ DNA، يقوم مركب TCA بخطوة ....

a. deprotection   b. coupling   c. capping   d. stabilization

بعد تخليق المتعددات النيوكليوتيدة في الأجهزة المخصصة لها، يقوم الباحث بتنقيتها بواسطة ....

a. gel filtration   b. agarose gel electrophoresis   c. HPLC   d. *in vitro* packaging

يمكن اجراء طريقة التوسيم المعروفة بالـ .... في تقنية الـ PCR.

a. 5′ end labelingmethod   b. 3′ end labelingmethod   c. nick translationmethod   d. primer extension method

بعد اكتمال عملية التوسيم لابد من فصل الـ DNA الموسوم عن الـ DNA الغير موسوم، ويتم ذلك عن طريق ....

a. agarose gel electrophoresis   b. gel filtration   c. SDS-PAGE   d. UV-visible spectrophotometer

بعد فصل عينات الـ DNA المراد معرفة تسلسلها في الهلام، قرأ الباحث المعني الحزم G و C و A و T من الأعلى الى الأسفل على التوالي، وهذا يعطي التسلسل.................

a. 5′-GATC-3′   b. 3′-GATC-5′   c. 5′-CTAG-3′   d. 3′-CTAG-5′

اذا كانت درجة الحرارة التي يرتبط بها البادئ بالـ DNA القالب هي اقل من الدرجة المثلى، ربما سوف يؤدي ذلك الى توليد نواتج PCR........... الغير مرغوبة.

a. false positive results   b. false negative results   c. positive results   d. negative results

لايمكن لتقنية .... تضخيم الانترونات مطلقاً.

a. conventional PCR   b. real time PCR   c. jumping PCR   d. RT-PCR

السؤال الثالث: عرف ما يلي:

Genomic library, probe, nick translation, pryosequencing, jumping PCR, quencher dye, DNA fingerprinting

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

To amplify the gene	PCR
To detect the location of the gene in the genome	RT-PCR
To detect the location of the gene in the chromosome	FISH
To detect the ability of the gene to give RNA copy	Real time PCR
To detect the ability of the gene to give protein	Southern blotting
To detect to whom this gene belong	Western blotting

للمزيد من الاطلاع اقراء:

Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. Fifth edition, Garland Science/USA. 2008.

Applied biosystems technical bulletin, 2012.

Baker, Catherine. Your genes, your choice: Exploring the Issues Raised by Genetic Research.

Behleke M.A. and Devor E.J. Chemical Synthesis of Oligonucleotides. Integrated DNA Technologies (IDT) 2005.
Birnboim HC, Doly J. (1982) Nucleic Acids Research 7, 1513-1523.
Brown T. A. Gene cloning and DNA analysis. Sixth edition, Wiley-Blackwell, 2010.
Carey, L., and Mitnik, L. 2002. Trends in DNA forensic analysis. *Electrophoresis* 23, 1386-1397.
Debenham, P. G. 1992. Probing identity: The changing face of DNA fingerprinting. *Trends Biotechnol.*10,96-102.
Eppendorf catalogue, 2012 – 2013.
Fitzgerald-Hayes M. and Reichsman F. DNA and Biotechnology. Third edition, Elsevier, 2010.
Gasser, C. S., and R. T. Fraley. 1992. Transgenic crops. *Scientific American* 266(6):62–69.
Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (NY). 1993;11(9):1026-30.
Howe, Christopher. Gene cloning and manipulation. Second edition, Cambridge University Press, 2007.
Jeffreys, A. J., Turner, M., and Debenham, P. 1991. The efficiency of multi-locus DNA fingerprint probes for individualization and establishment of family relationships, determined from extensive casework. *Am. J. Hum. Genet* 48, 824-840.
Lavitrano M, Bacci ML, Forni M, Lazzereschi D, Di Stefano C, Fioretti D, Giancotti P, Marfe´ G, Pucci L, Renzi L, Wang H, Stoppacciaro A, Stassi G, Sargiacomo M, Sinibaldi P, Turchi V, Giovannoni R, Della Casa G, Seren E, Rossi G. 2002. Efficient production by sperm mediated gene transfer of hDAF transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Nat Acad Sci USA* 99:14230–14235.
Lodge J., Lund P., and Minchin S. Gene cloning; principles and applications. Taylor and Francis group, 2007.
Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262(4):56–65.
Nowak, R. 1994. Forensic DNA goes to court with O. J. *Science* 265:1352–1354.
Nicholl D. S.An Introduction to Genetic Engineering. Third edition, Cambridge University Press, 2008.
Prescott L.M. Microbiology. Fifth edition, The McGraw−Hill Companies 2002.
Primrose S.B, Twyman R.M., Old R.W. Principles of gene manipulation. Blackwell science. 2001.
Reece R.J. Analysis of genes and genomes. John Wiley & Sons, 2004.
Tamarin .Principles of genetics. Seventh edition. The McGraw−Hill. 2001.
Turner P., McLennan A., Bates A., White M. Instant notes in molecular biology. Third edition, Taylor & Francis Group/UK. 2005.
U.S. Congress, Office of Technology Assessment, *Genetic Witness: Forensic Uses of DNA Tests, OTA-BA-438* (Washington, DC: U.S. Government Printing Office, July 1990).
Venter, J. C, Smith, H. O., and Hood, L. 1996.A new strategy for genome sequencing. *Nature* 381, 364-366.
Wong D.W.S. The ABCs of gene cloning. Second edition, Springer, 2006.

قائمة بتعريف المصطلحات الواردة في الكتاب

المصطلح	المعنى
alpha helix (α helix)	حلزون ألفا: نمط شائع من أنماط طي البروتينات والتي ينطوي فيها التسلسل الخطي للأحماض الأمينية الى حلزون مطوي الى اليمين مثبت عن طريق الازدواج القاعدي بين ذرات عموده الفقري.
amino terminus (N terminus)	نهاية سلسلة متعدد الببتيد والتي تحمل مجموعة أمين "ألفا" حرة.
aminoacyltRNA	شكل منشط من الحامض الأميني يستخدم في تخليق البروتين. ويتألف من حامض أميني مرتبط خلال آصرة استر من مجموعة الكاربوكسيل التابعةله بمجموعة الهيدروكسيل في جزيئة الـ tRNA.
antibiotic	مادة معينة كالبنسلين أوالستربتومايسين والذي هو سام للأحياء المجهرية. وهوناتج لكائن مجهري معين أو نبات معين.
antibody	بروتين ناتج من خلايا B استجابة للجزيئة الغريبة أو الكائن المجهري الغازي. ويرتبط عادة بالجزيئة الغريبة أو بالخلية بشكل شديد، وبهذه الطريقة يقوم بتثبيطها أو بتوسيمها لكي تتحطم بواسطة عملية البلعمة أو عن طريق المتمم.
anticodon	تسلسل من ثلاث نيوكليوتيدات في جزيئة الـ tRNA والتي هي مكملة للكودون ثلاثي النيوكليوتيدات في جزيئة الـ mRNA.
antigen	جزيئة قادرة على اثارة الاستجابة المناعية.
antisense RNA	جزيئة RNA مكملة لنسخة RNA محددة للجين والتي يمكن أن تزدوج مع RNA محدد وتوقف عمله.
autoradiography	تقنية والتي ينتج فيها شئ مشع صورة لنفسه في فيلم فوتوغرافي. وتدعى الصورة الناتجة بالـ autoradiograph أو بالـ autoradiogram.
bacterial artificial chromosome (BAC)	ناقل كلونة يمكن أن يحتوي على قطع طويلة من الـ DNA لأكثر من مليون زوج قاعدي.
bacteriophage (phage)	أي فايروس يخمج البكتريا. وهي أول كيانات مستخدمة في دراسة الوراثة الجزيئية والآن تستخدم بشكل واسع كنواقل كلونة.
base pair	اثنان من النيوكليوتيدات في جزيئة الـ DNA أو الـ RNA المحمولتين معاً عن طريق الأواصر الهيدروجينية كما في ازدواج الكوانين مع السايتوسين، والأدنين مع الثايمينأو اليوراسيل.
beta sheet (β sheet)	هيئة تركيبية شائعة في البروتينات والتي تتواصل أقسام مختلفة من سلسلة متعدد الببتيد بمحاذات بعضها البعض، مرتبطة ببعضها عن طريق الأواصر الهيدروجينية بين ذرات العمود الفقري لمتعدد الببتيد. ويعرف هذا التركيب أيضاً بصفيحة بيتا المطوية.
biotin	مركب ذو وزن جزيئي واطئ يستخدم كواسم تساهمي للبروتينات، سامحاً لها بأن تكشف بواسطة بروتين البيض الـ avidin، والذي يرتبط بشدة كبيرة بالبايوتين.
blotting	تقنية كيموحيوية تنقل فيها الجزيئات المفصولة في هلام الأكاروز أو في هلام متعددالأكريلامايد لغشاء بلاستيكي أو لحزمة من الورق، وبهذه الطريقة يتم تقييدها للتحليلات اللاحقة. (أنظر وصمة Southern ووصمة Northern ووصمة Western).
carcinogen	Any agent, such as a chemical or a form of radiation, that causes cancer. أي عنصر، كما في أية مادة كيميائية أو شكل من أشكال الاشعاع يتسبب بالسرطان.
carcinogenesis	تولد السرطان.
cDNA	جزيئة DNA مصنوعة من نسخة من الـ RNA ولهذا يفتقد للانترونات الموجودة في الـ DNAالجينومي. تمثل نسائل الـ cDNA الـ DNA المكلون من الـ cDNA، كما أن مجموع تلك النسائل، والممثلة للجينات التي يتم التعبير عنها في نوع خلوي أو نسيج محدد، تمثل مكتبة الـ cDNA.
cell cycle	دورة تكاثرية للخلية: تسلسل منظم من الأحداث يقوم الخلية بواسطته بمضاعفة مكوناتها وبالانقسام الى خليتين.
cell wall	مصفوفة خارج خلوية قوية مستقرة فوق الغشاء البلازمي. يوجد الجدار الخلوي في معظم النباتات والبكتريا والطحالب والفطريات. وهو غيرموجود في معظم الخلايا الحيوانية.
centromere	منطقة متقلصة من الكروموسوم الانقسامي والتي تحمل كروماتيدات شقيقة مع بعضها البعض. وهي موقع على الـ DNA حيث يتكونفيها تركيب الـ kinetochore والذي يستحوذ على النبيبات الدقيقة (microtubules) من خيوط المغزل الانقسامية (mitotic spindle).
chaperone	بروتين يساعد بروتينات أخرى لتجنب المسالك التي تؤدي الى انتاج متعددات ببتيدية غير فعالة أو متراكمة.
chromatin	معقد من الـ DNA و الهستونات والبروتينات الغير هستونية موجود في نواة الخلية الحقيقة النواة.
chromatography	تقنية كيموحيوية والتي تنفصل فيها مجموعة من المواد بواسطة الشحنة أو الحجم أو بعض الخواص الأخرى وذلك لكي تفصل بين الطور المتحرك والطور الثابت (أنظر كروماتوغرافي الألفة

	affinity chromatography والكروماتوغرافي السائل العالي الأداء high performance (liquid chromatography.
chromosome	تركيب يتألف من جزيئة DNA طويلة جداً وبروتينات مرتبطة تحمل جزء من (أو كل) المعلومات الوراثية للكائن. وهذا واضح خصوصاً في الخلايا الحيوانية والنباتية التي تعاني من الانقسام الخيطي أو الانقسام الاختزالي، حيث يتكثف كل كروموسوم الى شكل صلد يشبه العصا مرئي تحي المجهر الضوئي.
chromosome condensation	عملية بواسطتها تتحول الكروموسومات الى تركيب أكثر صلادة قبل انقسامها في دورة الخلية.
cisterna (cisternae)	حجرة ذات غشاء مستوي موجودة في الشبكة الاندوبلازمية جهاز كولجي.
clone	مجموعة من الخلايا أو الكائنات الحية المتكونة بواسطة الانقسامات المتلاحقة (الغير جنسية) من خلية أو كائن. ويمكن أن تستخدم كفعل: وتعني هنا "كلونة الجين" وتعني انتاج نسخ عديدة من الجين وذلك باعادة دورات التضاعف.
cistron	أصغر وحدة تشفر لـ mRNA والتي تترجم بعد ذلك الى متعدد ببتيدي مفرد أو يتم التعبير عنها بشكل مباشر (الى tRNA أو rRNA)
cloning vector	جزيئة DNA صغيرة مشتقة عادة من العاثي البكتيري أو البلازميد والتي تستخدم لحمل قطعة من الـ DNA لغرض كلونتها في الخلية المستقبلة، وهذا يمكن في تضاعف قطعة الـ DNA.
codon	تسلسل من ثلاث نيوكليوتيدات في جزيئة الـ DNA أو mRNA والتي تمثل معلومات انماج حامض أميني معين في سلسلة متعدد الببتيد النامية.
cofactor	أيون غير عضوي أو انزيم مساعد يكون ضروري لفعالية الانزيم
cytoplasm	مكون بالخلية يوجد ضمن الغشاء البلازمي ولكنه في حالة الكائنات حقيقية النواة يوجد خارج النواة.
degenerate	مصطلح ليس ذو مغزى معين ولكنه صفة تستخدم لوصف حالات متعددة تعطي نفس النتيجة: وكمثال مجموعات ثلاثية مختلفة من القواعد النيوكليوتيدية (الكودونات) والتي تشفر لنفس الحامض الأميني.
deletion	نوع من الطفرات والتي تزال بواسطتها نيوكليوتيدة مفردة أو تسلسل من النيوكليوتيدات من الـ DNA.
denaturation	تغيير مثير في هيئة البروتين أو الحمض النووي بسبب التسخين أو التعريض لمواد كيميائية وهذا ينتج في فقدان الوظيفة البايولوجية.
dideoxy chain termination method	الطريقة القياسية لمعرفة تسلسل الـ DNA.
differentiation	العملية التي بواسطتها تعاني الخلية تغييراً لكي تتخصص الى نوع معين.
DNA (deoxyribonucleic acid)	متعدد نيوكليوتيدي يتكون من وحدات نيوكليوتيدية مرتبطة تساهمياً. ويعمل كمستودع لخزن المعلومات ضمن الخلية وحامل لتلك المعلومات من جيل الى جيل آخر.
DNA helicase	انزيم يعمل على فتح حلزون الـ DNA الى أشرطة مفردة لتضاعف الـ DNA.
DNA library	مجموعة من جزيئات الـ DNA الممثلة للجينوم كاملاً (مكتبة الجينوم genomic library) أو نسخ الـ DNA لـ mRNA الناتج من الخلية (مكتبة الـ cDNA).
DNA ligase	الانزيم الذي يربط نهايات شريطي الـ DNA ببعضهما بواسطة أصرة تساهمية لعمل شريط DNA مستمر.
DNA methylation	اضافة مجموعة مثيل لـ DNA. تستخدم الميثلة المستمرة لقاعدة السايتوسين في تسلسلات GC في الفقريات للحفاظ على الجينات في حالة غير مستقرة.
DNA polymerase	انزيم يخلق الـ DNA عن طريق ربط النيوكليوتيدات ببعضها البعض باستخدام DNA قالب كدليل لهذه العملية.
DNA primase	انزيم يخلق شريط قصير من الـ RNA على الـ DNA القالب، لينتج بادئ لتخليق الـ DNA.
DNA repair	اسم يطلق على تلك العمليات الكيموحيوية التي تصلح التغييرات الطارئة على جزيئة الـ DNA.
DNA sequencing	تحديد نظام ترتيب النيوكليوتيدات في جزيئة الـ DNA.
DNA supercoiling	لف اضافي في حلزون الـ DNA المزدوج يحدث كاستجابة للضغط الحلزوني الفائق المتخلق كنتيجة ، مثلاً، لفتح الالتفاف الجزئي لجزيئة الـ DNA الدائرية.
DNA topoisomerase	انزيم يرتبط بالـ DNA ويكسر آصرة الفوسفات ثنائية الأستر في شريط أو شريطين، سامحاً بدوران الـ DNA عند تلك النقطة. ويمنع الـ DNA من تشربك الـ DNA خلال التضاعف.
double helix	التركيب الثلاثي لـ DNA، والذي ترتبط فيه سلسلتي الـ DNA مع بعضهما البعض بواسطة الازدواج القاعدي بين القواعد الملتفة الى حلزون.
electron microscope	نوع من المجاهر يستخدم حزمة من الالكترونات لتخليق صورة.
elongation factor	بروتين ضروري في اضافة الأحماض الأمينية لسلاسل متعددات الببتيد النامية على الرايبوسومات.
enzyme	بروتين يحفز تفاعل كيميائي محدد.
Escherichia coli (*E. coli*)	بكتريا عصوية الشكل توجد عادة في قولون البشر واللبائن الأخرى وتستخدم بشكل واسع في البحث الكيموحيوي.
eucaryote (eukaryote)	كائن حي يتألف من نواة مميزة وسايتوبلازم، ويؤلف كل أشكال الحياة ماعدا الفايروسات والكائنات

بدائية النواة.

euchromatin	منطقة من كروموسوم الطور البيني (interphase chromosome) تصطبغ بشكل كثيف
exon	قطعة من الجين حقيقي النواة تتألف من تسلسل من النيوكليوتيدات ممثلة في الـ mRNA أو في الـ tRNA النهائي أو في الـ rRNA. تشفر الاكسونات الى أحماض أمينية في البروتين. ويوجد الاكسون عادة بقرب قطعة DNA غير مشفرة تسمى بالانترون (intron).
expression vector	فايروس أو بلازميد يحمل تسلسل من الـ DNA الى ناقل كلونة مناسب ويوجه هناك تخليق البروتين المشفر من التسلسل المحمول فيه.
expression	انتاج صفة مظهرية مرئية بواسطة جين عادة بواسطة توجيه تخليق البروتين.
feedback inhibition	نوع من تنظيم الأيض يعمل فيه الانزيم مبكراً في مسلك تفاعلي مثبط من قبل الناتج النهائي لذلك المسلك.
fertilization	اندماج الكميت (المشيج) الذكري مع الكميت الأنثوي (كلاهما أحادي المجموعة الكروموسومية haploid) لتكوين زيجة ثنائية المجموعة الكروموسومية، والتي تتطور الى كائن جديد.
fluorescent resonance energy transfer (FRET)	تقنية تستخدم لتتبع قرب جزيئين موسومتين بشكل تفلوري (وتداخلهما) في الخلايا.
G0 (G-"zero" phase)	مرحلة الانسحاب من دورة الخلية الانقسامية في حقيقة النواة وذلك بالدخول في طور السكون في الـ G1.
G1 phase	مرحلة الفجوة رقم واحد في الدورة الانقسامية للخلية حقيقية النواة، وتحدث بين نهاية الانقسام السايتوبلازمي (cytokinesis) وبداية تخليق الـ DNA.
G2 phase	مرحلة الفجوة رقم اثنين في الدورة الانقسامية للخلية حقيقية النواة، وتحدث بين نهاية تخليق الـ DNA وبداية الانقسام الخيطي (mitosis).
gamete	خلية متخصصة أحادية المجموعة الكروموسومية، وأما أن تكون نطفة أو تكون بيضة، وتعمل في التكاثر الجنسي.
gene activator protein	بروتين تنظيمي للجين والذي عند ارتباطه بتسلسله المنظم في الـ DNA يعمل على تنشيط الاستنساخ.
gene	منطقة من الـ DNA تسيطر على صفة موروثة مميزة، وعادة ماتطابق بروتين مفرد أو RNA مفرد. يتضمن هذا التعريف الوحدة الوظيفية (التركيبية والتنظيمية) بأسرها، والمتكونة من تسلسلات الـ DNA المشفرة وتسلسلات الـ DNA الغير مشفرة والتسلسلات التنظيمية والانترونات.
general recombination	اعادة الارتباط الحادث بين كروموسومين متماثلين (كما في الانقسام الاختزالي).
genetic code	مجموعة من الأوامر التي تخصص التطابق بين الكودونات (ثلاثية النيوكليوتيدات) في الـ DNA أو الـ RNA والأحماض الأمينية في البروتينات الناتجة.
genome	مجموع المعلومات الوراثية العائدة للخلية أو للكائن الحي: وبالتحديد، الـ DNA الذي يحمل هذه المعلومات.
genomic DNA	الـ DNA الذي يؤلف الجينوم في الخلية أو في الكائن الحي. وغالباً مايستخدم بالتناقض مع الـ cDNA (الـ DNA المحضر بواسطة الاستنساخ المعاكس من جزيئة الـ mRNA).
Genomic DNA clones	يمثل DNA مكلون بشكل مباشر من الـ DNA الكروموسومي، ويؤلف مجموع هكذا نسائل (كلونات) من الجينوم المعني مكتبة الـ DNA الجينومية.
genotype	المكون الوراثي لخية الكائن الحي أو للكائن الحي.
globular protein	أي بروتين ذو شكل مدور تقريباً. تتناقض تلك البروتينات مع البروتينات الليفية الممدودة كما في الكولاجين.
heterochromatin	منطقة من الكروموسوم تستبقي حالة اللاتكثف فيها عادة، وهي غير فعالة استنساخياً خلال الطورالبيني..
high-performance liquid chromatography (HPLC)	نوع من الكروماتوغرافي يستخدم أعمدة مرصوصة بخرز دقيقة مصفوفة ، تقاوم تلك الخرز حركة السائل بسرعة كبيرة وتحت ضغط عالي جداً.
histone	نوع من مجاميع البروتينات الصغيرة الغنية بالأرجنين واللايسين، وتكون أربع منها النيوكليوسوم على الـ DNA في الكروموسومات حقيقية النواة.
Holliday junction	تركيب يشبه الحرف X شوهد في الـ DNA الذي يعاني اعادة الارتباط، وتحمل فيه جزيئتا الـ DNA في موقع التعابر crossing-over.
housekeeping gene	الجينات التي تعمل في وظائف ظرورية في كل أنواع الخلايا في الكائن الحي، بصرف النظر عن دورها الذي تخصصت فيه.
hybridization	في الوراثة الجزيئية، العملية التي بواسطتها يقوم شريطي الـ DNA المكملين لبعضهما بتكوين الحلزون المزدوج. وهذا يشكل الأساس الذي استندت عليه تقنيات كفوءة جداً في الكشف عن التسلسلات النيوكليوتيدية.
hydrogen bond	آصرة غير تساهمية والتي تكون فيها ذرات الهيدروجين ذات الشحنة الموجبة مشتركة جزئياً مع الذرات ذات الشحنات السالبة
hydrolysis	شق في الأصرة التساهمية مع اضافة الماء، حيث يضاف الهيدروجين لأحد نواتج الشق

	والهيدروكسيل للناتج الآخر.
hydrophilic	تعني حرفياً "محب للماء". يصف هذا المصطلح جزيئة قطبية أو جزء من تلك الجزيئة التي تكوّن تداخلات مفضلة من حيث الطاقة مع جزيئات الماء لتذوب مباشرة في الماء.
hydrophobic (lipophilic)	تعني حرفياً "كاره للماء". يصف هذا المصطلح جزيئة غير قطبية أو جزء من تلك الجزيئة التي لايمكن لها تكوين تداخلات مفضلة من حيث الطاقة مع جزيئات الماء ولهذا لاتذوب في الماء.
in situ hybridization	تقنية يستخدم فيها مجس من الـ DNA أو الـ RNA لمعرفة موقع الجين او جزيئة الـ mRNA في الخلية أو في النسيج بواسطة التهجين.
in vitro	مصطلح يستخدم من قبل المختصين في مجال الكيمياء الحيوية لوصف العملية الحاصلة في المستخلصات المعزولة والغير حاوية على خلايا. ويستخدم أيضاً من قبل المختصين ببايولوجية الخلية للاشارة الى الخلايا النامية في المزرعة (*invitro*)، وهو عكس المصطلح (*invivo*) الذي يستخدم داخل جسم الكائن الحي. (تعني *invitro* في اللاتينية "داخل الزجاج").
in vivo	يتم في الخلية الكاملة أو في داخل الكائن الحي. (تعني *invivo* في اللاتينية "في الحياة").
initiation factor	بروتين يحث الاتصال الصحيح بين الرايبوسومات والـ mRNA وهو ضروري لبدء تخليق البروتين.
interphase	فترة طويلة من دورة الخلية بين الانقسام الاختزالي الأول والثاني. ويتضمن طور G1 و S و G2.
intron	منطقة غير مشفرة منالجين الحقيقي النواة والتي تستنسخ الى جزيئة RNA ولكنه يتم قصها بواسطة الـ RNA splicing خلال انتاج الـ mRNA أو أي RNA آخر.
inversion	نوع من الطفرات والتي تنعكس فيها قطعة من الكروموسوم.
kinetochore	تركيب معقد متكون من البروتينات الموجودة في الكروموسوم الانقسامي والذي يرتبط به النبيبات الدقيقة والتي تلعب دوراً نشطاً في حركة الكروموسومات الى الأقطاب. يكون الـ kinetochore جزءً من الكروموسوم يعرف بالسنترومير.
label	مجموعة كيميائية، وهي أما أن تكون ذرة ذات نشاط اشعاعي أ، صبغة متفلورة تضاف الى جزيئة لكي تتتبعها من خلال تفاعل كيمو حيوي أو لكي تحدد موقعها. وتعني "كفعل" اضافة مجموعة أوذرةالى خلية أو جزيئة.
lagging strand	واحد من أشرطة الـ DNA المخلقة حديثاً للـ DNA الموجود في شوكة التضاعف. يصنع الشريط المتلكئ (lagging strand) بشكل غير مستمر عن طريق تكوين قطع أوكازاكي وارتباطها ببعضها بشكل تساهمي.
lambda bacteriophage	فايروس يخمج بكتريا القولون. يستخدم بشكل واسع كناقل كلونة.
leading strand	أحد أشرطة الـ DNA المخلقة حديثاً للـ DNAالموجود في شوكة التضاعف. يصنع الشريط القائد (leading strand) بواسطة التخليق المستمر بالاتجاه من النهاية 5′ الى النهاية 3′.
lethal mutation	طفرة تسبب موت الخلية أو الكائن الحي الذي يحتويها.
ligase	انزيم يربط (يلحم) جزيئتين ببعضهما بنمط يعتمد على الطاقة. وعلى سبيل المثال، ربط نهاية جزيئة DNA بنهاية أخرى من خلال أواصر الفوسفات ثنائية الأستر.
liposome	حويصلة اصطناعية ثنائية الأغشية من الدهون الفوسفاتية (phospholipids) متكونة من المزيج المائي لجزيئات الدهون الفوسفاتية.
lysis	تمزيق الغشاء البلازمي للخلية، مؤدياً الى تحرر السايتوبلازم وموت الخلية.
lysogeny	حالة بكتيرية والتي تحمل فيها الخلايا البكتيرية الـ DNA الفايروسي الغير نشط بشكل منحشر في الجينوم التابع لها. ويمكن للفايروس أن يتنشط بعد هذا لكي يضاعف الخلية المنحلة.
M phase	مرحلة من دورة الخلية حقيقية النواة ينقسم خلالها النواة والسايتوبلازم.
macromolecule	جزيئة كما في البروتين أو الحمض النووي أو متعدد السكر ذو حجم جزيئي أكبر من عدة آلالاف قليلة من وحدة الدالتون.
meiosis	نوع متخصص من الانقسام الخلوي تنتج فيه الخلايا البيضية والنطفية. يتألف من انقسامين نوويين متعاقبين بدورة واحدة من تضاعف الـ DNA، وهذا ينتج خلايا بنوية من خلية ثنائية المجموعة الكروموسومية أبتداءً.
membrane	دهن ثنائي الأغشية مع بروتينات مرتبطة به والتي تحيط بكل الخلايا، وفي الخلايا الحقيقية النواة، وبالعديد من العضيات أيضاً.
messenger RNA (mRNA)	جزيئة mRNA تضطلع بتخصيص تسلسل الحامض الأميني في البروتين. نتجت هذه الجزيئة من انشقاق الـ RNA (RNA spicing) في الكائنات حقيقية النواة من جزيئة RNA أكبر صنعت بواسطة انزيم RNA polymerase كنسخة مكملة للـ DNA. ويتم ترجمتها الى بروتين في عملية محفزة من قبل الرايبوسومات.
metabolism	مجموع العمليات الكيمياوية الحادثة في الخلايا الحية.
microinjection	حقن الجزيئات في الخلية باستخدام ماصة دقيقة خاصة.
mismatch repair	عملية اصلاح الـ DNA التي تصحح النيوكليوتيدات المنحشرة بشكل مغلوط خلال تضاعف الـ DNA. يتم ازالة الامتداد القصير للـ DNA المخلق حديثاً والذي يتضمن نيوكليوتيدة مغلوطة واستبداله بالتسلسل الصحيح نسبة الى الشريط القالب.
mitochondrion (mitochondria)	عضية مرتبط بالغشاء، وهي بحجم البيكتريا، وتقوم بعملية الفسفرة التأكسدية وتنتج معظم الـ ATP

	في الخلايا حقيقية النواة.
mitosis	انقسام النواة في الخلية حقيقية النواة، متضمنة لتكثف الـ DNA الى كروموسومات مرئية، وانفصال الكروموسومات المتضاعفة لتكوين مجموعتين متماثلتين. (تعني في الاغريقية *mitos* خيط، وهذا يسير الى المظهر الذي يشبه الخيط في الكروموسومات المتكثفة).
mitotic chromosome	كروموسومات متكثفة بشكل كبير بحيث يحمل كل كروموسومين جديدين مع بعضهما البعض بالسنترومير ككروماتيدات شقيقة.
mitotic spindle	صف من النبيبات الدقيقة والجزيئات المرتبطة بها والتي تتكون بين الأقطاب المتقابلة للخلية الحقيقية النواة خلال الانقسام الخيطي وتعمل على تحريك الكروموسومات المزدوجة كل على حدة.
mutation	تغيير موروث في التسلسل النيوكليوتيدي للكروموسوم.
negative control	نوع من التنظيم الجيني والذي يوقف فيه شكل الارتباط النشط للبروتين التنظيمي بالـ DNA من عمل الجين.
Northern blotting	تقنية يتم فيها تقييد قطع الـ RNA المفصولة بواسطة الترحيل الكهربائي على ورقي. ثم يتم الكشف عن الـ RNA بواسطة التهجين بمجس موسوم من الأحماض النووية.
nuclear envelope	غشاء مزدوج يحيط بالنواة، ويتألف من غشاء خارجي وداخلي وهو مثقب بالثقوب النووية.
nucleic acid (DNA or RNA)	جزيئة عملاقة (macromolecule) متألفة من سلسلة من النيوكليوتيدات المرتبطة ببعضها البعض بواسطة آصرة فوسفات ثنائية الأستر.
nucleoside	جزيئة متألفة من قاعدة الـ purine أو الـ pyrimidine المرتبطة تساهمياً بالسكر الرايبوزي أو السكر الرايبوزي منقوص الأوكسجين.
nucleosome	تركيب يشبه الخرزة في الكروماتين حقيقي النواة. يتألف من DNA بطول قصير ملتف حول لب من البروتينات الهستونية، وهو وحدة التركيب الأساسية للكروماتين.
nucleotide	نيوكليوسيدة مع مجموعة فوسفات أوأكثرمرتبطة برابطة استر مع الجزء السكر فيها. يعد الـ DNA والـ RNA هي متعددات من النيوكليوتيدات.
nucleus	عضية مرتبط بالغشاء في الخلية حقيقية النواة، تحتوي على DNA ينتظم الى كروموسومات.
Okazaki fragments	قطع قصيرة من الـ DNA تنتج في شريط الـ lagging خلال تضاعف الـ DNA. ترتبط هذه القطع بواسطة انزيم DNA ligase لتكون شريط DNA مستمر.
oncogene	جين محور يمكن أن يعمل ناتجه في المساعدة على تسرطن الخلية. نموذجياً، يعد الجين المسرطن (oncogene) شكل طافر من الجين الطبيعي (proto-oncogene) الداخل في تنظيم نمو أو انقسام الخلية.
oocyte	البيضة في طور النمو. وهي عادة ما تكون كبيرة وغير متحركة.
operator	منطقة صغيرة من الـ DNA في الكروموسوم البكتيري تسيطر على استنساخ الجين المجاور.
operon	في الكروموسوم البكتيري، مجموعة من الجينات التي تقع تحت سيطرة operator واحد.
PCR (polymerase chain reaction)	تقنية لتضخيم مناطق متخصصة من الـ DNA بواسطة استخدام بوادئ ذات تسلسلات متخصصة وعدة دورات من تخليق الـ DNA، تتبع كل دورة بحرارة ماسخة للـ DNA لفصل الأشرطة المكملة عن بعضها البعض.
peptide bond	آصرة كيميائية بين مجموعة الكاربونيل لحامض أميني معين ومجموعة الأمين لحامض أميني ثاني. تربط الآصرة الببتيدية الأحماض الأمينية مع بعضها البعض في جزيئة البروتين.
plasma membrane	الغشاء الذي يحيط الخلية الحية.
plasmid	جزيئة DNA دائرية صغيرة والتي تتضاعف بشكل مستقل عن الجينوم. تستخدم البلازميدات المحورة بشكل واسع كنواقل لكلونة الـ DNA.
point mutation	تغير في نيوكليوتيدة مفردة في الـ DNA، وخصوصاً في منطقة الـ DNA المشفرة للبروتين.
polypeptide	بوليمرخطي يتألف من أحماض أمينية متعددة. تعد البروتينات عبارة عن متعددات ببتيدية كبيرة، كما يمكن استخدام المصطلحين (البروتينات ومتعددات الببتيد) بشكل قابل للتبادل.
polyribosome (polysome)	جزيئة mRNA يرتبط بها عدد من الرايبوسومات الداخلة في عملية تخليق البروتين.
posttranslational modification	التغيير المحفز انزيمياً الحاصل في البروتين بعد عملية تخليقه. كما في اضافة مجاميع الأسيل (acetylation) والشق (cleavage) واضافة السكريات (glycosylation) والفسفرة (phosphorylation).
primary structure	تسلسل من الوحدات المفردة في البوليمر الخطي، كما في تسلسل الأحماض الأمينية في البروتين.
primosome	معقد نتج من ارتباط انزيم DNA primase مع انزيم DNA helicase والمتكون في شريط الـ lagging خلال تضاعف الـ DNA، ويقوم بزيادة كفاءة التضاعف.
prion	شكل معدي غير طبيعي من بروتين طبيعي والذي تضاعف في العائل وذلك باجبار البروتينات الطبيعية لنفس النوع على تبني التركيب الغير طبيعي.
prion disease	التهابات دماغية قابلة للنقل كما في مرض Kreutzfeld Jacob في البشر، والـ scrapie في النعاج والـ bovine spongiform encephalopathy (BSE) في الأبقار، والتي يبدوا أنها قد تكونت نتيجة انتقال الأشكال الغير طبيعية من بروتينات الـ prion.
probe	قطعة محددة من الـ RNA أو الـ DNA موسومة اشعاعياً أو كيميائياً، وتستخدم في تحديد تسلسلات نيوكليوتيدية متخصصة بواسطة التهجين معها.

promoter	تسلسل نيوكليوتيدي في الـ DNA يرتبط بها انزيم RNA polymerase لكي يبدأ الاستنساخ.
protein	المكون الرئيسي ذو الجزيئات العملاقة للخلايا. يرتبط البوليمر الخطي للأحماض الأمينية ببعضها البعض بواسطة أواصر ببتيدية بتسلسل متخصص.
protein glycosylation	اضافة سلاسل جانبية من متعدد السكريات بعد عملية الترجمة الى البروتين.
protein phosphorylation	اضافة تساهمية لمجموعة فوسفات للسلسلة الجانبية للبروتين والمحفزة من قبل الانزيم protein kinase.
proto-oncogene	جين طبيعي، يدخل عادة في تنظيم دورة الخلية ويمكن أن يتحول الى جين مسرطن حاث للسرطان بواسطة طفرة.
pseudogene	جين يحتوي على عدة طفرات متراكمة جعلته غير فعال وغير وظيفي.
quaternary structure	العلاقة ثلاثية الأبعاد لسلاسل ببتيدية مختلفة للبروتين متعدد الوحدات الثانوية (multisubunit protein) أو لمعقد البروتين.
radioactive isotope	شكل من الذرة ذو نواة غير مستقرة يصدر اشعاعاً عند اضمحلاله.
RecA protein	نموذج لصنف من البروتينات الارتباطية بالـ DNA والذي يحفز ايثاق (synapsis) أشرطة الـ DNA خلال اعادة الارتباط الوراثي.
recombinant DNA	أي جزيئة DNA متكونة من ربط قطع الـ DNA من مصادر مختلفة، ويستخدم بشكل واسع في كلونة الجينات وفي التحوير الوراثي للكائنات الحية وفي علم الأحياءالجزيئي عموماً.
recombination	العملية التي بواسطتها تتكسر جزيئات الـ DNA ويعاد ارتباطها في اتحادات جديدة. ويمكن أن تحدث في الخلية الحية على سبيل المثال خلال التعابر في الانقسام الاختزالي أو خارج جسم الكائن الحي باستخدام DNAمنقى وانزيمات تعمل على كسر ولحم أشرطة الـ DNA.
replication fork	منطقة تشبه الحرف Y منجزئة الـ DNA المتضاعفة والتي تتكون فيها الأشرطة البنوية وتنفصل.
replication origin	موقع في جزيئة الـ DNA يبدأ عنده ازدواج الـ DNA.
restriction enzyme	أحد أنواعالانزيمات الهاضمة الكثيرة والتي يمكن لها أن تشق جزيئة الـ DNA في أي موقع يحتوي على تسلسل قصير محدد من النيوكليوتيدات، وتستخدم بشكل واسع في تجارب الهندسة الوراثية.
retrotransposon	نوع من أنواع العناصر القابلة للقفز والتي تتحرك بواسطة استنساخها أولاً الى نسخة من الـ RNA ثم يعاد تحويلها الى DNA بواسطة انزيم reverse transcriptase وتنحشر في مكان آخر في الكروموسومات.
retrovirus	فايروس يحتوي على الـ RNA ويتضاعف في الخلية بواسطة صنع وسيط DNA مزدوج الشريط.
reverse transcriptase	انزيم اكتشف لأول مرة في الـ retroviruses ويقوم بصنع نسخة DNA مزدوجة الشريط من جزيئة RNA قالب مفردة الشريط.
ribonuclease (RNase)	انزيم يقطع جزيئة الـ RNA بواسطة التحليل المائي لآصرة أو أكثر من أواصر الفوسفات ثنائية الأستر.
ribosome	جزيئة مؤلفة من جزيئات rRNAs وبروتينات رايبوسومية ترتبط مع الـ mRNA وتحفز تخليق البروتين.
ribozyme	جزيئة RNA ذات فعالية حفزية.
RNA (ribonucleic acid)	بوليمر متكون من أحاديات نيوكليوتيدية مرتبطة تساهمياً.
RNA polymerase	انزيم يحفز تخليق جزيئة RNA بالاعتماد على قالب DNA من مولدات نيوكليوسيدية ثلاثية الفوسفات.
RNA primer	امتداد قصير من الـ RNA تم تخليقه على شريط DNA قالب. وهو ضروري من قبل انزيمات الـ DNA polymerases لبدء تخليقها للـ DNA.
RNA splicing	عملية يحدث فيها قص تسلسلات الانترون من جزيئات الـ RNA المستنسخة في النواة خلال تكوين الـ mRNA أوأنواع أخرى من الـ RNA.
rough endoplasmic reticulum (rough ER)	الشبكة الاندوبلازمية ذات الرايبوسومات الموجودة على سطحها، وتدخل في تخليق البروتينات الارتباطية بالغشاء والبروتينات الافرازية.
S phase	أحد مراحل دورة الخلية الحقيقية النواة يتم فيها تخليق الـ DNA.
satellite DNA	مناطق من الـ DNA عالي التكرار من الكروموسوم حقيقي النواة، وعادة ما يتم تمييزها بمكونها النيوكليوتيدي الغير طبيعي. ولايتم استنساخ هذا النوع من الـ DNA وليس له وظيفة معروفة.
SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	نوع من أنواع الترحيل الكهربائي والذي يتم فيه ترحيل مزيج البروتينات المرغوب فصلها في هلام يحتوي على المنظف SDS والذي يحتج انطواء البروتينات ويحررها من الارتباط بجزيئات أخرى.
secondary structure	نمط من الطي الموقعي المنظم لجزيئة البوليمر. كما في الحلزونات وصفائح بيتا في البروتينات.
sex chromosome	كروموسوم ربما يكون موجود أو غير موجود، أو موجود بعدد متنوع من النسخ وفقاً لجنس الفرد، كما في كروموسومي X و Y في اللبائن.
site-directed mutagenesis	تقنية يمكن بواسطتها عمل طفرة في موقع محدد من الـ DNA.

site-specific recombination	نوع من اعادة الارتباط لايحتاج الى تماثل كبير بين تسلسلي الـ DNA اللذان ينجزان العملية. ويمكن أن يحدث بين جزيئتي DNA مختلفتين أو ضمن جزيئة DNA مفردة.
small nuclear RNA (snRNA)	جزيئات DNA صغيرة تصنع معقدات مع البروتينات لتكون دقائق من RNA وبروتين (ribonucleoprotein particles) والتي تدخل في عملية الـ RNA splicing.
smooth endoplasmic reticulum (smooth ER)	منطقة من الشبكة الاندوبلازمية لاترتبط معها الرايبوسومات، وتدخل في تخليق الدهون.
Southern blotting	تقنية يمكن بواسطتها تقييد قطع الـ DNA المفصولة في الترحيل الكهربائي على حزمة ورقية. ويمكن الكشف عن قطع خاصة بمجس موسوم. (سميت على اسم مبتكرها E. M. Southern).
sperm (spermatozoon,spermatozoa)	كميت ذكري نضج في الحيوانات، وهو متحرك وصغير مقارنة بالبيضة.
spliceosome	تجمع كبير لجزيئات الـ RNA والبروتين والذي ينجز عملية الـ splicing لـ mRNA في حقيقية النواة.
structural gene	منطقة من الـ DNA تشفر لبروتين أو لجزيئة RNA والتي تكوّن جزءاً من تركيب أو لها وظيفة انزيمية، وتتميز عن مناطق الـ DNA التي تنظم التعبير الجيني.
substrate	جزيئة يعمل عليها الانزيم.
subunit	مكون من معقد ذو مكونات متعددة (multicomponent complex)، كما في بروتين واحد من مجموع معقد بروتيني أو سلسلة متعدد ببتيد من بروتين متعدد السلاسل (multichain protein).
supercoiled DNA	منطقة من الـ DNA يلتف فيها الحلزون المزدوج على نفسه أكثر.
TATA box	تسلسل متعارف عليه في منطقة البروموتر للعديد من الجينات حقيقية النواة والذي يرتبط بعامل الاستنساخ العام، ومن هنا فانه يخصص موقع بدء الاستنساخ.
telomerase	انزيم يطيل تسلسلات التيلومير في الـ DNA.
telomere	نهاية الكروموسوم، المرتبطة مع تسلسل DNA مميز والذي يتضاعف بشكل خاص، ويقوم بصد رغبة الكروموسوم بأن يتقصر مع كل جولة من جولات التضاعف (في الاغريقية تعني *telo* نهاية).
temperature-sensitive (ts) mutant	الكائن الحي الذي يحمل بروتين محور وراثياً (أو جزيئة RNA) والذي يعمل عادة في درجة حرارية معينة ولكنه غير طبيعي في درجة حرارية (عادة أعلى) أخرى.
template	شريط مفرد من الـ DNA أو الـ RNA والذي تعمل نيوكليوتيداته كدليل لتخليق الشريط المكمل.
terminator	اشارة في الـ DNA البكتيري توقف الاستنساخ.
tertiary structure	شكل معقد ثلاثي الأبعاد من سلسلة بوليمر مطوية، وخاصة ماتكون جزيئة بروتين أو RNA.
topoisomerase (DNA topoisomerase)	انزيم يقوم بعمل قطوعات عكسية في جزيئة الـ DNA ذات الحلزون المزدوج لأجل ازالة العقد أو لفتح التفاف الانحناءات الزائدة.
transcript	الـ RNA الناتج من استنساخ الـ DNA.
transcription (DNA transcription)	نسخ شريط واحد من الـ DNA الى تسلسل RNA مكمل بواسطة الانزيم RNA polymerase.
transcription attenuation	تثبيط التعبير الجيني في البكتريا بواسطة انهاءالاستنساخ قبل أوانه.
transcription factor	مصطلح يستخدم لأي بروتين ضروري في بدء أو في تنظيم الاستنساخ في الكائنات حقيقية النواة، ويتضمن كلا البروتينات المنظمة للجين بالاضافة الى عوامل الاستنساخ العامة.
transfection	ادخال جزيئة الـ DNA الغريبة في الخلية حقيقية النواة، وعادة مايتبع هذا الادخال تعبير جين واحد أو عدة جينات في الـ DNA الداخل حديثاً.
transfer RNA (tRNA)	مجموعة من جزيئات الـ RNA التي تستخدم في تخليق البروتين كوسائط (adaptor) بين الـ mRNA والأحماض الأمينية. يرتبط كلنوع من جزيئات الـ RNA تساهمياً بحامض أميني معين.
Transgenic animal	وهو الكائن الذي حصل على معلومة وراثية جديدة عن طريق اكتسابه لـ DNA الغريب
translation (RNA translation)	عملية يقوم بواسطتها التسلسل الموجود في جزيئة الـ mRNA بتوجيه اندماج الأحماض الأمينية في البروتين، وتحدث في الرايبوسوم.
translocation	نوع من الطفرات والتي ينكسر فيها جزء من الكروموسوم ويرتبط في جزء آخر.
transposition	حركة تسلسل من الـ DNA من موقع الى موقع آخر ضمن الجينوم.
tumor suppressor gene	يبدو أن هذا الجين يمنع تكوين السرطان. كما ان فقدان وظيفته تؤدي الى زيادة الاستعداد في الاصابة بالسرطان.
ubiquitin	بروتين صغير متفق عليه بشكل كبير في الكائنات حقيقية النواة ويبدو بأنه يرتبط تساهمياً بالأحماض الأمينية lysines لبروتينات أخرى. ان ارتباط سلسلة قصيرة من الـ ubiquitins بمثل تلك الأحماض الأمينية يعمل على وضع اشارة على البروتين لكي يتم تحطيمه داخل الخلية بواسطة الـ proteosome.
virus	جسيمة متألفة من حمض نووي (DNA أو RNA) معبئ ضمن بروتين وقادر على التضاعف ضمن خلية العائل وينتشر من خلية الى أخرى. تسبب العديد من الفايروسات أمراضاً مختلفة.
Western blotting	تقنية يتم فيها تقييد البروتينات المفصولة على هلام متعدد الأكريلامايد في حزمة ورقية وتحليلها عادة

	بواسطة جسم مضاد موسوم.
X-inactivation	تثبيط نسخة واحدة من الكروموسوم X في الخلايا الجسمية في اناث اللبائن.
zygote	خلية ثنائية المجموعة الكروموسومية تكونت بدمج الكميت الذكري مع الأنثوي.