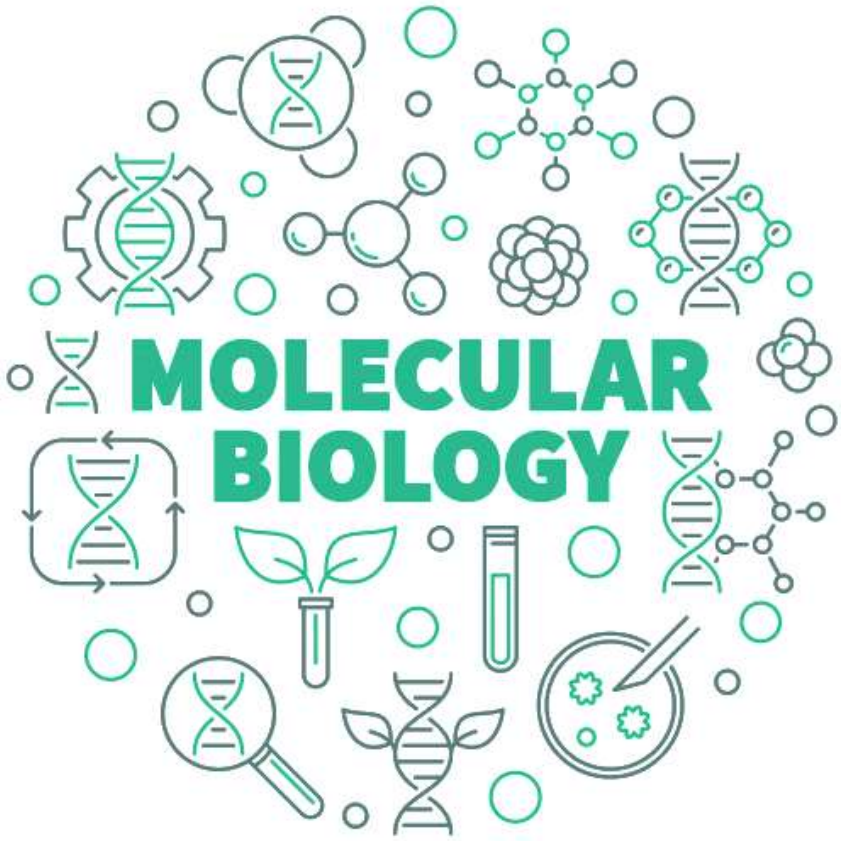
كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

الدراسات الاولية / المرحلة الرابعة

علم الاحياء الجزيئي



ا. م.د مهند وهيب مهدي

مدخل إلى علم البايولوجي الجزيئي

1. **تعريف علم البايولوجي الجزيئي :Molecular Biology**هو مزيج من علوم الحياة والكيمياء الذي يهتم بدراسة تكوين وتركيب ووظيفة الجزيئات الخلوية الكبيرة Macromolecules كالأحماض النووية والبروتينات ودورها في الفعاليات البيولوجية المهمة كالتضاعف الخلوي وتناقل المعلومات الوراثية. ان مصطلح Molecular Biologyصيغ من قبل العالم الامريكي Warren Weaver مدير قسم العلوم الطبيعية في مؤسسة Rockefeller حيث صيغ كفكرة للتفسيرات الفيزيائية والكيمياوية للحياة.

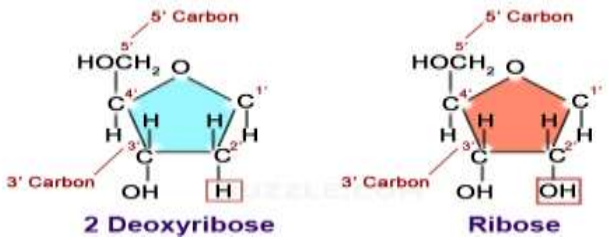
2. **نبذة تاريخية عن علم البايولوجي الجزيئي:**

على الرغم من مكانته البارزة بين العلوم الحيوية الا ان علم البايولوجي الجزيئي هو علم حديث النشأة حيث ان بدايات نشوئه كانت في ثلاثينيات القرن التاسع عشر لكنه دخل حيز التطبيق المؤسساتي وبدأ العمل به في اواسط خمسينيات وبداية ستينيات القرن التاسع عشر. ان نشوء هذا العلم نتج من تقارب وتداخل واندماج علم الوراثة والفيزياء والكيمياء التركيبية وعلى الرغم من قوانين مندل الوراثية الا انه الية تضاعف المادة الوراثية وحدوث الطفرات والتعبير الجيني بقيت غير معروفه.

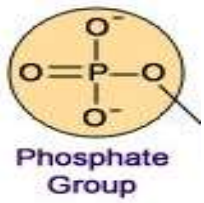
المادة الوراثية Genetic Material

تعرف المادة الوراثية على أنها الجزيئات الحاملة للمعلومات والصفات الوراثية (Genotype)التي تشفر للصفات المظهرية ((Phenotype. بالنسبة للإحياء بدائية النواة prokaryote))تكون المادة الوراثية إما حامض نووي رايبوزي منقوص الأوكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA) او حامض نووي رايبوزي الأوكسجين Ribonucleic acid (RNA)، وفي حقيقية النواة تكون من كلتا المادة أي .DNA&RNA بصوره عامه تتكون هاتين الجريئتين من مجموعه فوسفات + سكر + قاعدة نايتروجينية وفيما يلي شرح مفصل لهاتين الجريئتين:

1-كلاهما يحتوي على سكر الرايبوز (منقوص الأوكسجين في DNA) والرايبوز الاعتيادي (في RNA)



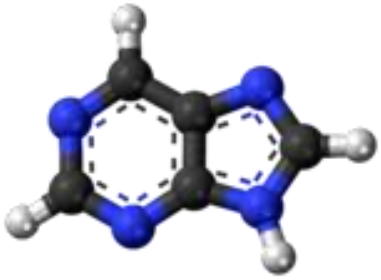
2- كلاهما يحتوي مجموعة الفوسفات والتي تكون بشكل (ثلاثي الفوسفات)

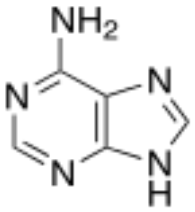


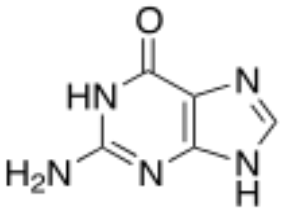
3- كلاهما يحتوي على القاعد النيتروجينية: هنالك مجموعتين من القواعد النيتروجينية وهي:

1- البيورينات Purines وهي مركبات ثنائية الحلقة وتشمل: Adenine and Guanine حيث ان كلتا القاعدتين تكون موجودة في DNA و RNA

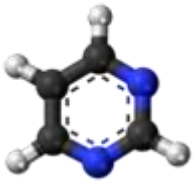
2- البرميدينات Pyrimidine: وهي احادية الحلقة وتشمل ثلاث قواعد هي

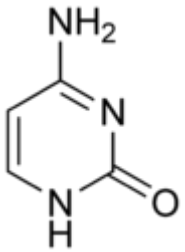


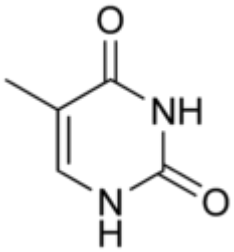


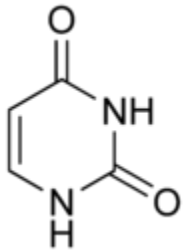


- الثايمين Thymine (موجود فقط في DNA ولاتوجد في RNA)
- اليوراسيل Uracil(موجود فقط في RNA ولاتوجد في DNA)
- السايتوسين Cytosin (موجود في RNA وفي DNA)









Uracil Thymine Cytosine

- ⌘ تسمى الوحدة البنائية للحامض النووي بالنيوكليوتيده Nucleotide
- ⌘ تتكون النيوكليوتيده من (سكر [الرايبوز الاعتيادي اومنقوص الاوكسجين]+ مجموعة فوسفات +قاعده نايتروجينيه)
- ⌘ النيوكليوتيده الحرة تكون ثلاثية الفوسفات
- ⌘ تسمى نيوكليوتيدات ال DNA بمايلي:

Deoxyadenosin triphosphate (dATP)

Deoxythymidine triphosphate (dTTP)

Deoxyguanidine triphosphate (dGTP)

Deoxycytosine triphosphate (dCTP)

- تسمى نيوكليوتيدات ال RNA بمايلي:

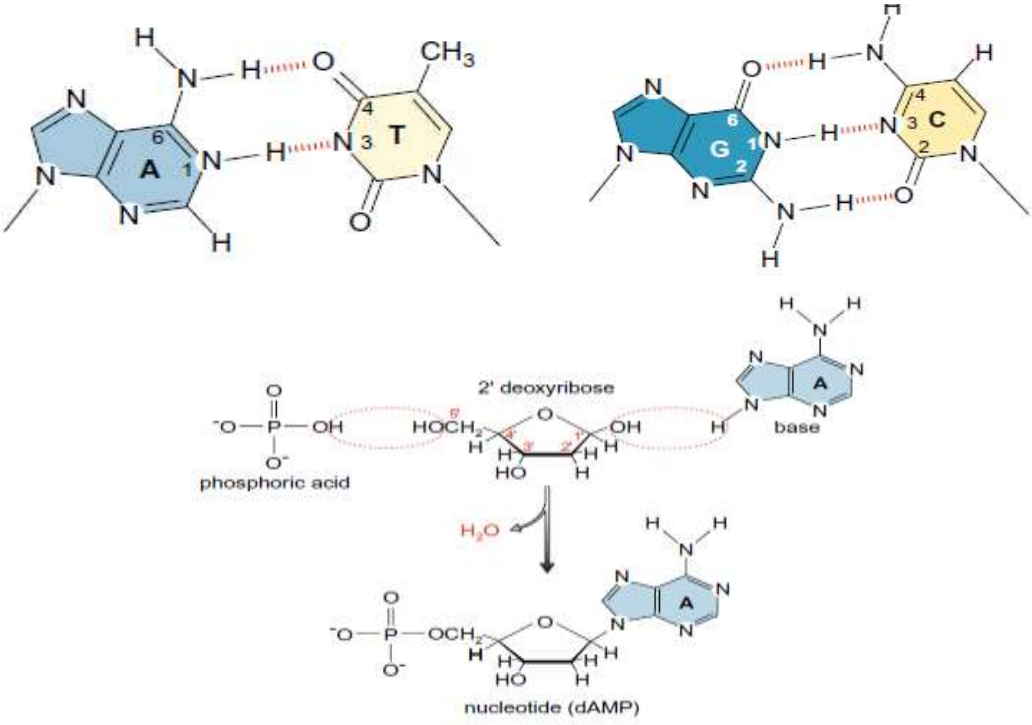
Adenosin triphosphate (ATP)

Guanidine triphosphate (GTP)

Cytosine triphosphate (CTP)

Uracil triphosphate (UTP)

- عندما تسحب مجموعة الفوسفات من النيوكليوتايد تسمى نيوكليوسايد Nucleoside
- النيوكليوتيدة المرتبطة داخل شريط DNA او RNA تكون احادية الفوسفات (المجموعتين الاخرى للنيوكليوتيده الحرة تستهلك عند اضافة النيوكليوتيدة الى الشريط الجديد).
- ترتبط الكوانين بالسايتوسين بثلاث اواصر هيدروجينية. ولذلك يكون الزوج G+C اقوى ارتباطا وأكثر استقرارا وأثقل وزنا.
- ترتبط الادنين بالثايمين او اليوراسيل باصرتين هايدروجينية. ولذلك يكون الزوج A+T او A+U أضعف ارتباطا واقل استقرارا واخف وزنا.

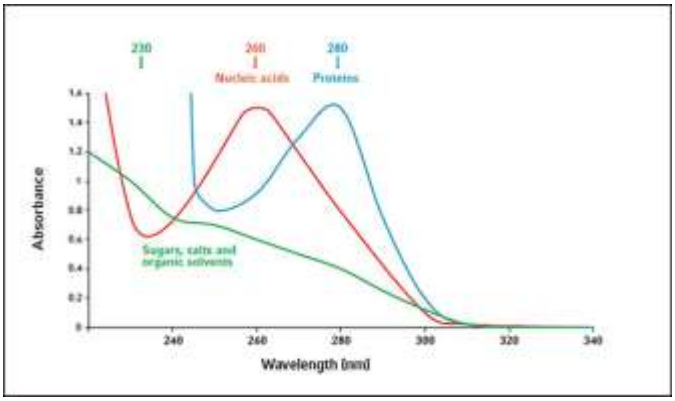


صفات المادة الوراثية الفيزيائية والكيميائية

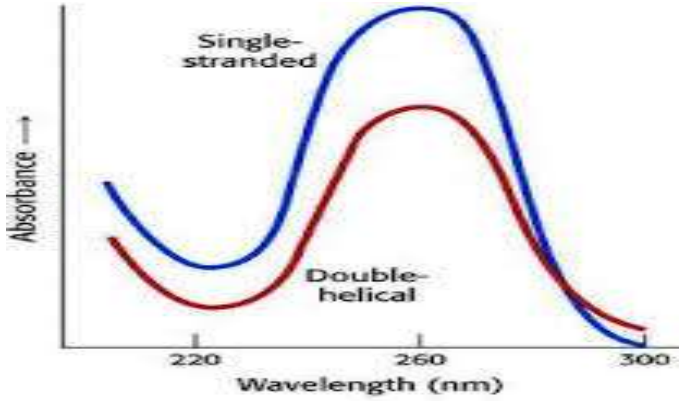
أولا: صفات الدنا DNA الفيزيائية

1 - امتصاص الضوء:

يتصف DNA بامتصاص الضوء في منطقة الأشعة فوق البنفسجية UV وبالأخص عند طول موجي 260 نانوميتر، في حين أن أعلى امتصاص للبروتينات يكون بحدود nm280 شكل رقم (1) وتختلف الأحماض النووية الدنا DNA ذات الأشرطة المفردة عن المزدوجة في قوة امتصاصها للضوء لاحظ شكل رقم (2).



شكل (1) طيف الامتصاص لكل من الحامض النووي والبروتين



شكل (2) طيف الامتصاص لكل من شريط مفرد ومزدرج للدنا DNA

2- كثافة الحامض النووي:

تعتمد كثافة الحامض النووي على تركيزه وشكله البنائي (شريط مفرد، مزدوج دائري، فائق اللف) شكل رقم (3) في محاليله ويمكن توظيف الصفات الشكلية واختلاف الكثافة الفصل الحوامض في محاليل الاملاح ذات الكثافة المعروفة ويمكن استخدام طريقة تعيين كثافة الدنا DNA في مجالات متعددة منها:

أ- ربط الكثافة بمحتواه من القواعد (الكوانين والسايتوسين)

ب - التفريق بين أشكال الدنا DNA ذات الأشرطة المفردة والمزدوجة والدائرية وفائقة اللف.

ج- يمكن اعتماد الطريقة في فصل الأحماض النووية للدنا DNA للعاثيات او البلازميدات عن بكتريا المضيف للاستخدامات الهندسة الوراثية.

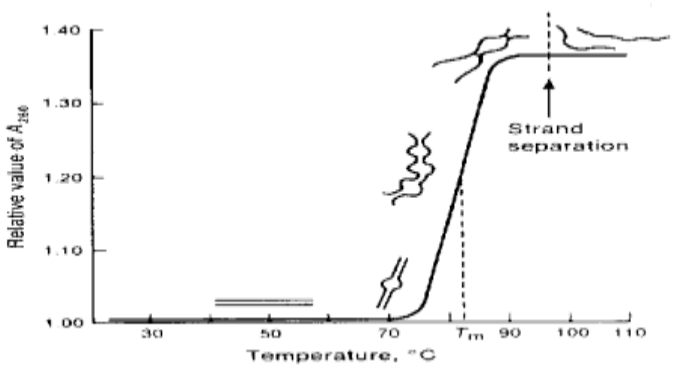
3- مسخ الحامض النووي الدنا DNA

تعاني الاحماض النووية الدنا DNAعملية مسخ Denaturation حيث توصف عملية التحول من الشكل الحلزوني الفعال للحامض النووي الى خيط عادي غير فعال. وتؤثر عملية المسخ في بنيه وصفات الدنا DNA الفيزيائية والكيميائية كالكثافة واللزوجة وطيف الامتصاص والمسخ عملية عكسية

شكل (3) أنواع مختلفة من أشرطة الدنا DNA

4- درجة ذوبان الدنا DNA

عند ارتفاع درجة حرارة المحلول الذي يحتوي الدنا DNA يؤدي هذا الارتفاع الى أنفصال شريطي المزدوج الحلزوني بانفصال الأواصر الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية، ويرافق عملية الانفصال زيادة في الكثافة الضوئية شكل (4). وتسمح درجة الحرارة الى ذوبان (انصهار) Temperature melting والتي يستفاد منها التقدير المحتوى النسبي من G +C للأحماض النووية المختلفة وفق المعادلة التالية G+C=2.4(Tm -69.3) في محلول كلوريد الصوديوم 0.2 مولاري. وعند انخفاض درجة الحرارة تبدأ عملية اعادة الارتباط تدريجيا والتخريب الجزئي يعاود الارتباط بسرعة ويخضع للتفاعل من الدرجة الأولى، في حين التخريب الكلي يستغرق وقتا أطول ويبدأ بشكل سريع يعقبه تفاعل يعتمد على تركيز المواد المتفاعلة والزمن ويرافق أعادة الارتباط هذه قلة في الكثافة الضوئية.



شكل (4) العلاقة بين درجة الحرارة وامتصاص الضوء

5- التهجين في الاحماض النووية

يمكن تكوين المزدوجات الهجينة المتغايرة Hetroduplexes والدنا DNA مع الدنا DNA والتي يتم فيها تهجين شريط DNA من ضرب معين من المخلوقات مع شريط DNA لنفس الضرب من المخلوقات يختلف عن النوع الأول في تغير وراثي معين، يمسخ المزدوج ويهجن مع المتمم لأحد أشرطة الدنا DNA الممسوخ هجين مزدوج للدنا DNA كما يلي: -

1 - يجري تثبيت أحد الأشرطة على حامل معين حدث ولصق على ورقة النايتروسليلوز ويغسل غير الملتصق.

2 - الشريط المراد تهجينة الى الشريط الملصق على ورقة النايتروسليلوز وهذا الشريط موسوم من الناحية للثايمين اذ يضاف المجس المشع ليسمح بالتفاعل مع متممه المثبت على ورقة الترشيح وتقاس كفاءة التهجين من خلال قياس كمية الإشعاع المستقرة على ورقة الترشيح. وتستخدم هذه الطريقة في تعين: طفرات الازالة، الاضافة، تحديد مدى التوافق الوراثي، تحديد عدد الجينات في الحامض النووي.

6- تعقيد الحامض النووي

يقصد بتعقيد الحامض النووي هو مدى احتوائه على تردد متغاير لتوالي القواعد النيتروجينية والمناطق الجينية وغير الجينية، فكلما صعدنا في سلم التطور زاد تعقيد الحامض النووي.

7- خزن الحامض النووي داخل نواة الخلية

يرزم الحامض النووي داخل نواة الخلية مهما كان طوله من خلال الكروموسومات ذات اللف الفائق، كما يلاحظ في الفصل القادم.

8- اللف الفائق للحامض النووي

يحصل لف في الدنا DNA والرنا RNA لكل من خلايا حقيقية النواة وبدائية النواة وكذلك في الفايروسات، ولكن درجة اللف الفائق في الرنا RNA أقل تقيد من الدنا DNA ولهذا اللف الفائق وظائف منها:

أ- خزن الحامض النووي ضمن حجم النواة.

ب - السيطرة على ظروف تضاعف وأستنساخ الحامض النووي داخل الخلية.

ج – الوقاية من تأثير انزيمات التجزئة.

ثانيا: صفات الدناDNA الكيميائية:

في عام 1944 توصل كاركوف Erwin Chargaff أن المجموع الكلي لجزيئات A تساوي دائما المجموع الكلي لجزيئاتT وان كمية C مساوية لكمية G، كما وجد بأن نسبة القواعد النايتروجينية الاربعة كانت واضحة التباين بتباين الكائنات الحية، وتوصل الى ان نسبة الكوانين والسايتوسين تكون متشابهة دائما في الحامض النووي الدنا DNA وان نسبة الأدنين والثايمين تكون متشابهة دائمة وعلية فأن أي يمكن ان يتميز من خلال النسبة (C + G) / (T + A) والتي تتراوح ما بين 26٪ الى 74% ولكنها تعتبر صفة مميزة لكل نوع من الكائنات الحية.

في عام 1953 أقترح واطسون James Watson وكريك Francis Crick ان الحامض النووي يكون بشكل حلزون مزدوج Double helix السلاسل شكل (5) وكل سلسلة عبارة عن متعدد النيوكليوتيدات Polynucleotides وفيما يلي أهم الصفات التركيبية الكيميائية للدنا - :DNA

1- تتألف الجزيئة من سلسلتين من متعدد النيوكليوتيدات.
2- تؤلف كلا السلسلتين زوج من الحلزونات اليمينية اللتين تلتقيان حول نفس المحور.
3- تتألف كل سلسلة من عمود فقري مؤلف من سكريات ديوكس ومجموعة فوسفات.
4- الموقع 1 من جزئية السكر ترتبط بـ N_3 من البيريميدين اوN_9 من البيورين وتمتد كل جزيئة سكر باتجاه مركز الدنا .DNA
5- تحتل القواعد النيروجينية مستويات عمودية على المحور الطولي للدنا DNA وهي بالتالي مصطفة واحدة فوق الأخرى ضمن السلسلة.
6- ترتبط كلا السلسلتين معا بأواصر هيدروجينية تمتد بين قاعدة نيتروجينية في سلسلة وقاعدة نيتروجينية مقابلة لها في السلسلة الثانية، ويكون الارتباط بشكل بحيث تتقابل دائما القاعدة (T)، (A)وترتبطان باصرتين هيدروجتين وتتقابل دائما (G)مع (C)بثلاث أواصر هيدروجينية، يقال عن القواعد المزدوجة بانها متممة (Complementary)
7- تبلغ المسافة بين ذرة الفوسفور للعمود الفقري ومركز محور الدنا (10A°) DNA وبذلك فأن عرض السلسلة المزدوجة للدنا DNA هو (A20 °)
8- أن ذرات النيتروجين المرتبطة بذرة الكربون (4) للسايتوسين وذرة كاربون (6) للادنين تكون بصورة مجموعة الامين (NH_2)دائما بدلا من أن تكون بحالة الايمانيو (NH) بذات الطريقة فان ذرات الأوكسجين المرتبطة بذرة كاربون (6) للكوانين وذرة كاربون (4) للثايمين تكون بحالة كيتو (C =0)دائما وليس في حالة الأينول (COH).

ان هذه التحديدات التركيبية بحالات القواعد النيتروجينية اقترحت ان الادنين (A)هي القاعدة البيورينية الوحيدة القادرة من الناحية التركيبية الارتباط بالثايمين (T) وان الكوانين هي القاعدة البيورينية القادرة على الارتباط بالسايتوسين (C) .لذلك فان التزاوج الممكن بين القواعد في سلسلة الدنا DNA المتقابلتين هو A: T وG:C

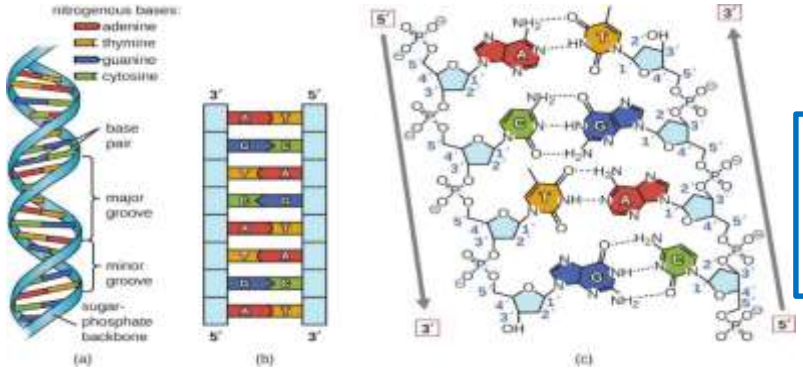
9- تمتد السلسلتان المؤلفتان للحلزون المزدوج باتجاهين متعاكستين، أي أن هاتين السلتين تكونان Antiparallel، بعبارة أخرى أذا اصطفت إحدى السلسلتين بالاتجاه 5' ⟶ 3' فأن السلسلة المقابلة لها يجب أن تصطف بالاتجاه 3' ⟶ 5'.

10- يدور كل زوج من القواعد 36° (درجة) حول محور الحلزون المزدوج بالنسبة والزوج الذي يليه. وبذلك فأن كل 10 أزواج من القواعد تصنع دورة كاملة مقدارها 360° درجة. أن انحناء او تموج السلسلتين حول بعضهما البعض تشكل حلزون مزدوج تلك أخدود ضيق حوالي 12°A أنجستروم عرضا أخدود عريض حوالي22 °A أنجستروم عرضا.

11- يعمل الحلزون المزدوج دورة كاملة كل (10) ازواج من القواعد (أي كل 34°A) أو يعمل الحلزون المزدوج (150) دورة لكل مليون وزن جزيئي.

12- لا يوجد تحديد في تسلسل القواعد لسلسلة ما في جزيئة الدنا DNA من ناحية ثانية فأنه حالما يتحدد تسلسل معين في سلسلة واحدة من التسلسل فأن السلسلة المقابلة لجزيئة الدنا DNA تعين أوتوماتيكية، والمصطلح مكمل (متمم) Complementary يستعمل للتعبير عن العلاقة بين سلسلتين المزدوج الحلزوني، فمثلا (A)هي مكملة ل (T)، (CGA) هي مكملة ل (GCT)وان سلسلة كاملة تكون مكملة للسلسلة المقابلة لها في الحلزون المزدوج. أن التخصص في ازدواج القواعد النيتروجينية تقترح بان كل سلسلة تعمل كقالب Template لبناء السلسلة المكملة لها.

أن هذه الآلية يطلق عليها البناء شبه المحافظ .Semiconservative synthesisوان المظاهر (الصفات)التركيبية أعلاه تمثل النموذج (الموديل) والمعروف بالشكل B(B Form) للدنا DNA في الحقيقة يوجد عدة أشكال تختلف توبولوجيا اتجاه اللف. هناك عوامل كثيرة تساهم في استقرار شكل وصلابة الحلزون المزدوج وهي كذلك مهمة في الحفاظ الدائم على سلامة المعلومات الوراثية من التغيرات الخارجية.

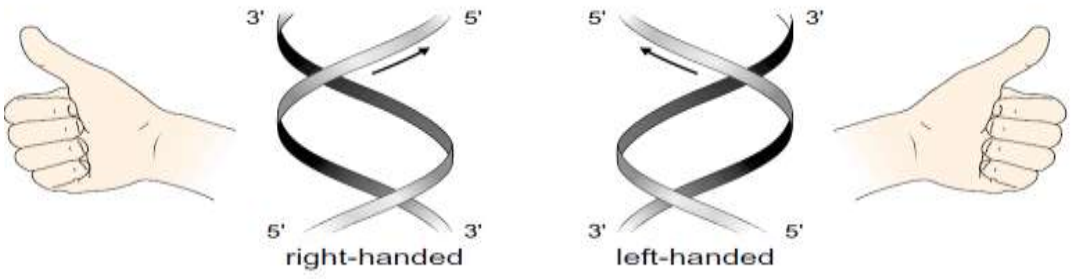


شكل (5) الحلزون المزدوج كما اقترحه واطسن وكريك

الاشكال المختلفة للحامض النووي DNA

1. شكل B (B-form)يمثل نموذج واطسون وكريك يلاحظ هذا الشي ألياف برطوبة عالية جدا 92٪ وفي محاليل ذات قوة أيونية واطئة وهنا الذي يعتقد سيادته في الخلية الحية.
2. شكل A (A-form) يوجد بصورة ألياف عند رطوبة نسبية 75% يتطلب أيونات الصوديوم، البوتاسيوم، أو السيزيوم كأيونات مضادة وبدلا من أن تمتد القاعدة بصورة مسطحة فأنها تميل بالنسبة الى محور الحلزون. كما توجد أزواج قاعدية أكثر في الدورة الواحدة.
3. شكل C (C-form)يحدث عندما تحفظ آلياف الحامض النووي لDNA في رطوبة نسبية مقدارها 66٪ بوجود أيونات الليثيومLithium ions ، وكذلك عند وضعة في تراكيز ملحية عالية يمتلك هذا الشكل عدد أقل من الأزواج القاعدية في الدورة الواحدة من الحامض النووي الدنا .DNA عام 1969 لاحظ كلا من Yank& Sangimaهذا الشكل في الفيروسات وفي عام 1972لاحظ Fasman وجماعته هذا الشكل في كروماتين خلايا حقيقية النواة. تتوفر الاشكال الثلاثة لجميع أنواع الحوامض النووية DNA بغض النظر عن التسلسل. وجدت أشكال آخرى قليلة والتي تظهر على أنها تمثل أختيارات مفتوحة فقط لجزئيات الحامض النووي الدنا DNA التي تمتلك خصوصيات معينة في مكوناتها القاعدية.
4. الشكل D والشكل E (E - form & D - form) (في الحقيقة هما شكلان متماثلان يمتلكان عدد أقل من الأزواج القاعدية لكل دورة (فقط 5 .7-8) ويؤخذ هذين الشكلين فقط في جزئيات الحامض النووي لدنا DNA التي تفتقد للقاعدة الكوانين وعالية من A و.T
5. الشكل Z – form Z يظهر تباينا أكثر ملفتا للنظر مع التراكيب الكلاسيكية. يتميز هذا الشكل بكونة حلزون يساري left - handed helix بينما والاخرى يمينية التحلزن، ويمتلك عدد أكبر من الأزواج الواحدة وبذلك فهو يمتلك تركيب أقل ألتواء، أنه شكل نحيف جدا وقد أقتبس اسمة من مسار التعرج.

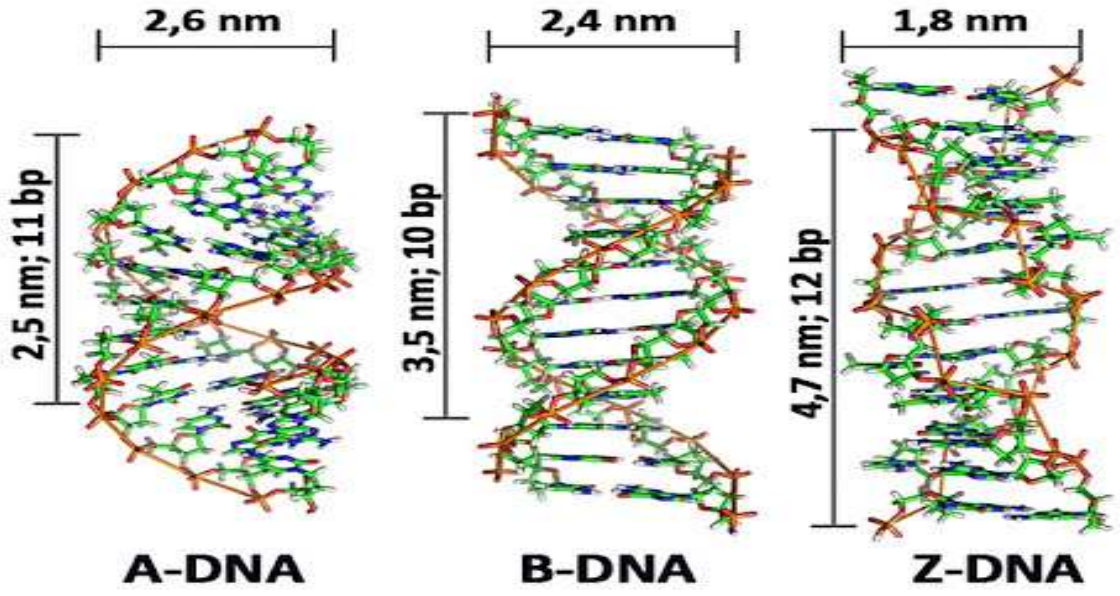
يكون اتجاه اللفه اما لليمين وتسمى right handed كما في جزيئة الدنا نوع A-form DNA و B-form DNA او لليسار وتسمى left handed كما في جزيئة الدنا نوع.Z-form DNA



شكل (6) اتجاه اللف في شريط الدنا

بصوره أساسيه هنالك ثلاثة أشكال للـ DNA يكمن إيجازها بالجدول التالي:

Characteristics	A-form	B-form	Z-form
Helix sense (اتجاه الحلزون)	Right handed	Right handed	Left handed
Rotation degree التواء الحلزون لكل زوج قاعدي	33.6°	35.9°	60/2°
Mean bp/turn معدل ازواج القواعد لكل لفه	10.7	10.0	12
Diameter(القطر)	26A	20	18 A
Medium طبيعة الوسط الذي يتواجد فيه	Found in dehydrated medium	Found in hydrated medium	Found in dehydrated medium
Commonalty العمومية	Less common than B and Z form	More commonly found in cell that A and z form	Rarely found in cell



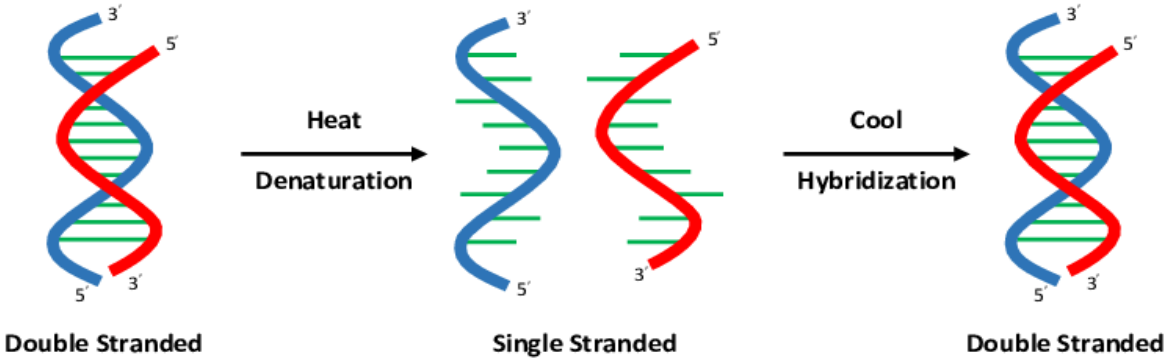
شكل (7) اشكال الدنا

تهجين المادة الوراثية Hybridization Of Genetic Material

مسخ وأعادة طبيعة الدنا DNA Denaturation & Renaturation of DNA

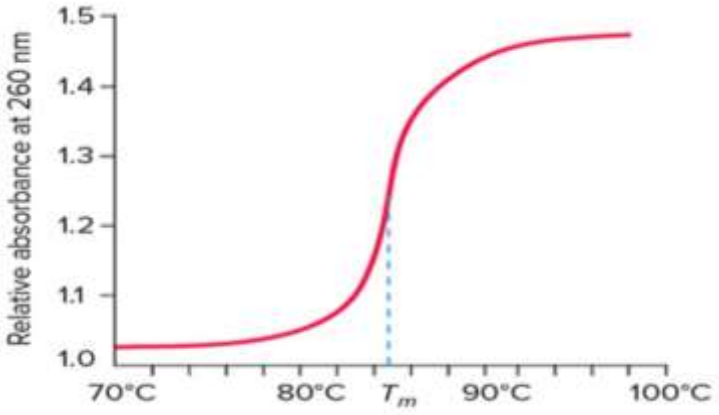
يمكن أن يتلف تركيب الحلزون المزدوج للحامض النووي الدنا DNA المرتبط بروابط هيدروجينية بواسطة الحرارة (او التسخين). وبسبب عدم وجود روابط تساهمية تربط الخيطين الشريكين فأن السلسلتي المتعددتي النيوكليوتيدات الحامض النووي DNA تنفصل بشكل كامل عندما تتكسر جميع الروابط الهدروجينية للحلزون الموجودة بينهما شكل (1)، يطلق على عملية فصل الخيوط بالمسخ Denaturation او التفكك. Melting

يحدث المسخ او (التفكك) عند مدى حراري ضيق وينعكس بصورة تغييرات ملفتة للنظر في الخصائص الفيزيائية للحامض النووي DNA، ويحدث التغيير المهم وعلى نحو خاص في الكثافة البصرية حيث تمتص الحلقات الدائرية المتباينة Heterocyclic rinds للنيوكليوتيدات الضوء بقوة بمدى الشعاع فوق البنفسجي (بحدود اقصى يقترب من 260 مايكروميتر الذي هو الصفة المميزة لكل قاعدة)، ولكن أمتصاص الحامض نفسه هو أقل من 40% مما يظهره خليط من النيوكليوتيدات المؤلفة لنفس الحامض النووي DNA ويوصف هذا المصطلح (Hypochromic effect) أي التأثير ناقص الصبغيات، وينتج من التفاعلات بين الأنظمة الالكترونية للقواعد والتي يمكن ملاحظتها من خلال تكديسها بصورة شعاع متوازي للحلزون المزدوج. أن أي انحراف عن حالة الأزدواج تنعكس مباشرة من خلال انخفاض في هذا التأثير. يعني من خلال الزيادة في الكثافة البصرية باتجاه القيمة المميزة للقواعد الحرة، وعليه فأن عملية مسخ الحامض النووي DNA تتبع Hyperchromicity



شكل (1) تأثير الحرارة على طبيعة الحلزون المزدوج من خلال تكسير الاواصر الهدروجينية بين شريطي الدنا

تسمى النقطة الوسطى للمدى الحراري الذي عندها ينفصل خيطي الحامض النووي DNA بحرارة التفكك Temperature Melting ويرمز لها Tm والشكل (2) يوضح منحنى التفكك Melting curve الذي يتبع بالامتصاص البصري. يأخذ المنحنى دائما نفس الشكل ولكن موقعه على المقياس الحراري (يعني Tm العائد له) يتأثر بكل من المكون القاعدي للحامض النووي DNA والظروف المستعملة للحصول على المسخ.



شكل (2)مسخ الحامض النووي DNA يتبع بزيادة في الكثافة البصرية والتي توصف بالقيمةTm

عندما يوجد الحامض النووي DNA في محلول عند الظروف الفسلجية تقريبا فان قيمة Tmتقع عادة في المدى من 85 - 95م، وتعتمد القيمة على المكون القاعدي. فالطاقة الحرة الأعظم لتكوين ثلاثة روابط هيدروجينية للتزاوج G-C يجعل هذا الزوج أكثر مقاومة للتكسير من التزاوج A -T ذات الرابطتين الهيدروجينيتين. هناك علاقة خطية Linear بين المكون القاعدي وTm، أذ تزداد حوالي 4.0 م لكل نسبة مئوية من محتوى التزوج القاعدي G - C كذلك فأن الحامض النووي DNA المؤلف من G-C40%(مثال لذلك جينومات اللبائن النموذجية) يحصل لها مسخ عند Tm مقدارها حوالي 87 م تحت الظروف الاعتيادية بينما الحامض النووي DNA المؤلف من G- C%60 سيحتاج تفكيك حراري (Tm)عند حوالي 95م تحت نفس الظروف.

يتولد التأثير الكبير على مقدار Tm عن طريق القوة الأيونية للمحلول، فتزدار قيمة Tm بمقدار 16. 6 م لكل عشرة أضعاف زيادة في تركيز الأيونات الموجبة أحادية التكافؤ، والشرط

المستعمل في الغالب هو أنجاز التفاعل في دارئ فوسفاتي Phosphate buffer تركيزه 12.0 مول الذي يزود أيونات الصوديوم Na^+ أحادية التكافؤ بتركيز 18. 0 مول.

يمكن ان تتباين قيمة Tm على نحو عظيم عند أنجاز التفاعل بوجود الكواشف مثل Formamide الذي يفقد الروابط الهيدروجينية استقرارها، وهذا يسمح لقيمة Tm أن تختزل الى ما مقداره 40 م والتي لها أهمية الى ان الحامض النووي DNA لا يعاني من ضرر أخر (مثل كسر الخيوط) من الزيادة في الحرارة.

إحدى الصفات المهمة جدا للحامض النووي DNA الممسخ هو وتحت الظروف المناسبة ان يعكس التفاعل بحيث يعاد تشكيل الخيطين المكملين للحامض النووي DNA المفصولين الى حلزون مزدوج، يطلق على هذه العملية Renaturation(أي أعادة الحالة الطبيعية) وتعتمد على التخصص في التزاوج القاعدي بين الخيطين المكملين Complementary strand، ويأخذ التفاعل مجراة بمرحلتين:

الاولى - تتقابل سلسلتين قصيرتين مكملتين في الخيطين المتفاعلين للحامض النووي DNA مع بعضها البعض (بالصدفة) وتتزاوج لتكوين منطقة حلزونية مزدوجة بعد ذلك.

ثانياً - تمتد منطقة التزاوج القاعدي على طول الجزيئة عن طريق ما يشبه غلق السحاب لتكوين جزيئة مزدوجة بطولها. يتلازم أعادة بناء الحلزون المزدوج بعودة الصفات الأصلية للحامض النووي DNA الى وضعها بعد أن فقدها بس لازم أعادة بناء الحلزون المزدوج بعودة وضعها بعد أن فقدها بسبب تعرضه الى المسخ.

تهجين الحوامض النووية بواسطة التزاوج القاعدية

Nucleic Acids Hybridize by Base Pairing

تشتمل عملية إعادة الحالة الطبيعية Renaturation أو ازالة المسخ تفاعل سلستين مكملتين معا اللتين أنفصلتا بعملية المسخ.

من ناحية ثانية يمكن توسيع هذه التقنية لسماح لأي سلسلتين مكملتين من الحوامض النووية لترتبط معا لتكوين تركيب مزدوج. ويطلق على مثل هذه العملية بالتهاجن Hybridizationعندما يستخدم حوامض نووية من مصادر مختلفة، كما في حالة عندما يكون أحد التحضرين مؤلفا من DNA والأخر من RNA. وتعتمد هذه العملية على نفس الصفة للتزاوج القاعدي المكمل التي تقوم بأعباء تضاعف الحامض النووي DNA قاعدة بعد قاعدة أو أزالة المسخ Renaturation ككل. في الحقيقة تشكل قدرة حامضين نوويين للتهاجن أختباراً دقيقا للتسلسل المكمل.

أن أساس التفاعل هو بتعريض تحضيرين لحوامض نووية مفردة الخيط Single strandedلبعضها البعض وبعد ذلك قياس كمية المادة المزدوجة الخيط Double stranded المتكونة وفي الحقيقة يوجد مسلكين اساسيين لإنجاز التفاعل هما:

1 -تهجين المحلول او السائل.Solution or Liquid Hybridization

2 - تهجين المرشح.Filter Hybridization

يوصف تهجين الترشيح من خلال خلط التحضيرات مفردة الخيط ببعضها في المحلول وعند استعمال كميات أكبر من المادة يمكن أن يتبع التفاعل بتغيير في الكثافة البصرية، وعندما تستعمل كميات أقل من المادة فان أحد المكونات قد يحمل علامة مشعة الذي بدخوله الى شكل مزدوج يتبع مباشرة بتعيين كمية الحامض النووي DNA ثنائي السلسلة الحاوي على العلامة المشعة، ويمكن أن يعمل هذا أما بتحليل جميع الخيوط المفردة التي لم تتفاعل او عن طريق فصل الخيوط المزدوجة من الخيوط المفردة بواسطة طريقة الكروماتوكرافيا Chromatography.

تظهر مشكلة بتهاجن المحلول عندما يراد بحث علاقة التحضرين أحدهما او كلاهما يتألف من DNA مزدوج الخيط. فمثلا إذا مسخت جزيئتان من الحامض النووي DNA المزدوج الى خيط مفرد ويخلط بعدها كلا المحلوليين يمكن أن يظهر نوعان من التفاعل يمكن للخيوط المفردة المكملة الأصلية من أن تستعيد طبيعتها المزدوجة كل خيط مفرد يستطيع أن يتهاجن مع سلسلة مكملة للحامض النووى .DNAوبسبب أن كلا التفاعلين يتنافسان لذلك يصعب تحليل مدى التهاجن.

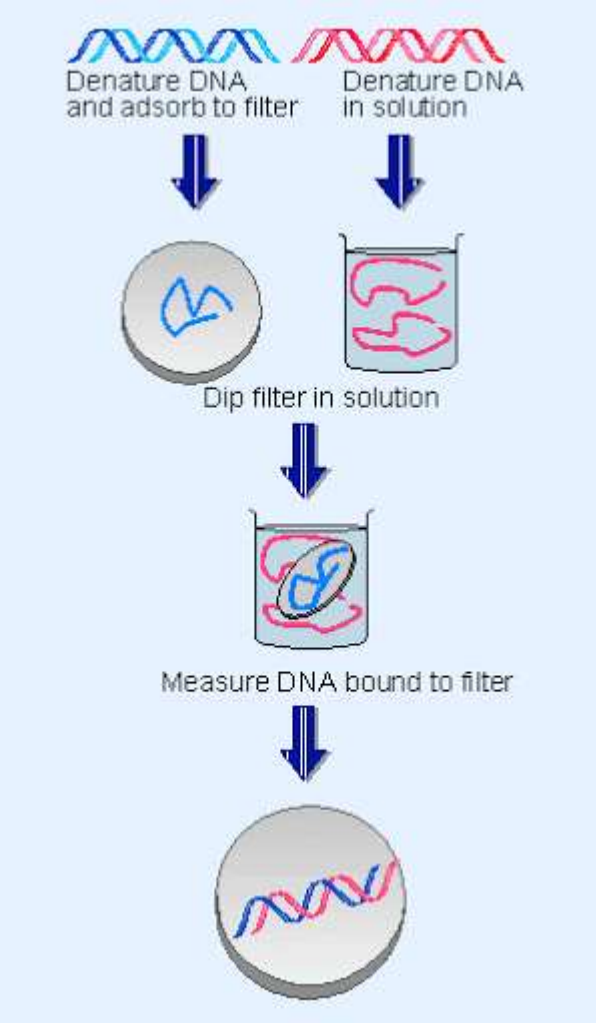
يمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق تجميد أحد تحضيري الحامض النووي DNA بحيث لا يستطيع أن يستعيد طبيعته المزدوجة.

تمتلك مرشحات السليلوز النيتروجينية (Nitrocellulose) صفة مفيدة في انها تجتذب خيوط مفردة من الحامض DNA النووي بينما لا تجتذب (اولا تمتز) الحامض النوويRNA ، وحال أستعمال المرشح لجذب (Adsorb DNA) يمكن منع اي اجتذاب أخر لخيوط مفردة عن طريق معاملات خاصة.

شكل (3) يوضح الطريقة الناتجة التي يتم بها مسخ تحضير الحامض النووي DNA وتجذب الخيوط المفردة الى المرشح، بعد ذلك يضاف التحضير الثاني الحاوي على DNA ممسوخ (او حاوي على RNA)تنجذب الخيوط المفردة للتحضير الثاني فقط اذا كانت قادرة على أن تتزاوج قواعدها مع الخيوط المفردة للحامض النووي DNA التي أجتذبت في التحضير الاول الى المرشح.

أستخدمت هذه التقنية في العديد من التجارب المتعلقة بالدراسات الوراثية على المستوى الجزيئي، وعادة الشكل الذي تأخذه هو ان يضاف الى المرشح تحضير من الحامض النووي RNAالذي يحمل علامة مشعة. بعد ذلك يقاس مقدار (او مدى) التهاجن عن طريق قياس مقدار النشاط الشعاعي المحفوظ في المرشح.

وهذه الطريقة مهمة بسبب (باستثناء الحامض النووي RNA الذي يشكل جينوم بعض الفيروسات) أن جميع أنواع الحوامض النووية RNA تصنع من أستنساخها من الحامض النووي DNA لذلك فان تقنية التهاجن تزودنا بالوسيلة الحيوية - قطعة من الحامض النووي DNA قد استعملت لإنتاج حامض نووي RNA معين



شكل (3) التهاجن بالمرشح filter hybridization يثبت ما اذا كان محلول الحامض النووي DNA الممسوخ (او RNA) يحتوي على سلاسل مكملة لخيوط مجمدة على المرشح .

تعبئة الحامض النووي الدنا Packaging of DNA

من المشاكل العامة هو تعبئة الحامض النووي DNA داخل الملتهمات البكتريا والفايروسات وداخل الخلايا البكتريا وداخل أنوية الخلايا حقيقية النواة، أن طول جزيئة الحامض النووي DNA كجزيئة طويلة تزيد على نحو شاسع أبعاد التجويف الذي يحويها، وعليه يجب ان يكون الحامض النووي DNA (أو RNA في حالة بعض الفيروسات)مضغوطة بقوة كبيرة لكي ينسجم مع الفراغ المتوفر (حجم تجويف الخلية). تعتمد عملية تكثيف الحامض النووي على وجود البروتينات التي ترتبط بها، تكون هذه البروتينات عادة قاعدية وتعمل شحنتها الموجبة على تعادل الشحنات السالبة للحامض النووي.

آن مقدار التناقض بين طول الحامض النووي وحجم حجرته كبير جدا بالنسبة للملتهمات البكتريا Bacteriophages وبالنسبة للفيروسات التي تصيب خلايا حقيقية النواة - سواء كانت طويلة وخيطية او كروية تقريبا متعددة الأوجه (عشرونية الوجه) - فإنها تحتوي كمية كبيرة من الحامض النووي سواء كان DNA أوRNA وسواء كان مفرد الخيط او مزدوج الخيط تملأ بشكل مؤثر الفراغ الداخلي.

بالنسبة الى حجيرات البكتريا او حقيقية النواة يكون التناقض أكبر، فالحامض النووي DNAيحتل مساحة محكمة التي لا تشغل التجويف الكامل للخلية، ويلاحظ هذا بصورة المنطقة الشبيهة بالنواة Nucleoid في البكتريا او بصورة كتلة Chromatin في أنوية خلايا حقيقية النواة في الطور البيني .Interphase

يكون تعليب الكروماتين مرنا، أذ يتغير خلال دورة حياة خلية حقيقية النواة في وقت الانقسام (الاعتيادي أوالأختزالي) تصبح المادة الوراثية معلبة بشدة أكبر ويمكن تمييز هوية الكروموسوم في الانقسام الاعتيادي.

يمكن التعبير عن العلاقة بين طول الدنا DNA الى طول الوحدة الي الترزيم Packing ratio، فمثلا يحتوي أصغر كروموسوم في الأنسان طول 4.6×10^7 زوج قاعدي (حوالي عشر مرات أكبر من حجم جينوم بكتريا القولون (*E coli*) ،ويقابل هذا m

14000 = (4.1 cm)من الدنا DNA المستخلص، ويصل طول nm2 في أشد لحظة تكثيف من الانقسام الاعتيادي، وعليه تكون نسبة الدنا DNA في الكروموسوم بمقدار 7000، وعموما فأن كروموسومات الانقسام الاعتيادي تكون معلبة 5-10 مرات أكبر من كروماتين الطور البيني، والذي بدوره يمتلك نسبة تعليب نموذجية مقدارها 1000-2000.

يعتمد تكثيف الحامض النووي على وجود بروتينات خاصة يرتبط بها، تكون هذه البروتينات قاعدية عادة تعادل شحناتها الموجبة مع الشحنات السالبة للحامض النووي. ان علاقة البروتينات مع الدنا DNA (او الرنا RNA) تعين تركيبة، ويكون المبدأ العام واضحة في تنظيم المادة الوراثية، وتوجد المادة الوراثية ككتلة متماسكة ومن مساحة محددة، ويجب أن تنجز فعالياتها المتنوعة مثل التضاعف والاستنساخ ضمن الحدود.

أولا: تعبئة الحامض النووي الدنا DNA او الرنا RNA في فيروسات

من منظور تعليب التوالية المفردة يوجد اختلاف كبير بين الجينوم الخلوي والفايروس، فالجينوم الخلوي يكون بالضرورة غير محدد الحجم ويمكن أن يتغير عدد وموقع التواليات الفردية عن طريق التضاعف duplication والحذف deletion وأعادة الترتيب rearrangement. وعليه فأن مثل هذا الجينوم يتطلب طريقة عامة لتعبئة الدنا DNA العائد له وغير حساسة للمحتوى الكلي او توزيع التواليات sequences. وعلى العكس فأن هناك محددين تعين متطلبات جينوم الفايروس وهما:

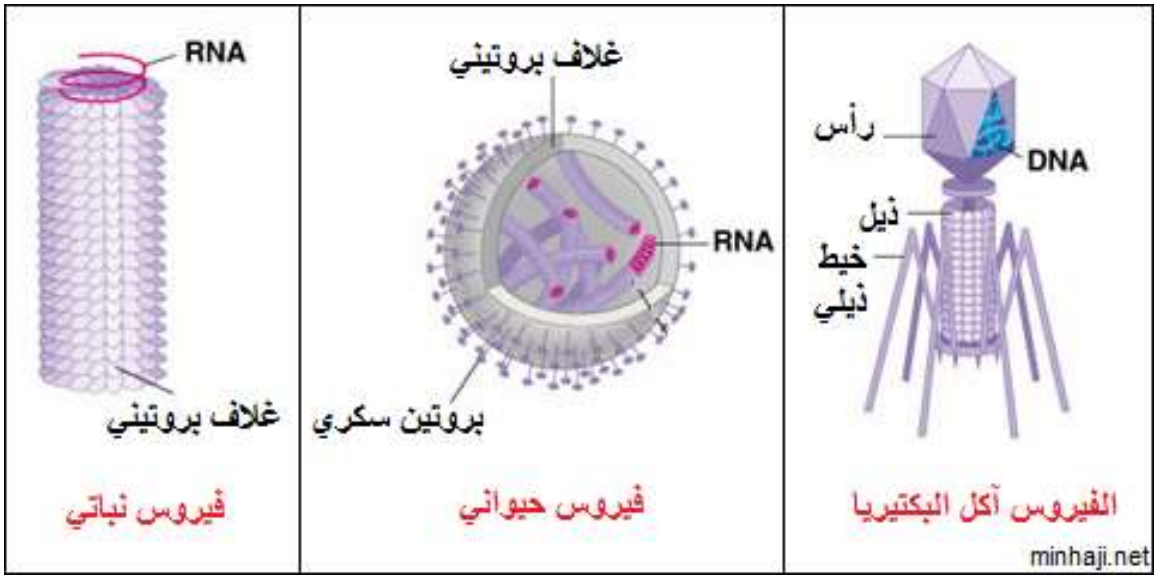
1- أن كمية الحامض النووي المراد تعبئته يعين مسبقا عن طريق حجم الجينوم.

2 - يجب أن ينطبق مع مقاييس الغلاف المكون من البروتين او البروتينات المشفر عنها من قبل جينات الفايروس.

تكون جسيمة الفايروس بسيطة بمظهرها السطحي ويحتل جينوم الحامض النووي ضمن العلبة وهي تركيب متناظر او شبه متناظر ناشئ عن تجميع نوع واحد او عدد قليل من

البروتينات، وقد ترتبط به تراكيب او تنولج داخلها وتتجمع هذه التراكيب من بروتينات مختلفة وضرورية لإصابة الخلية المضيفة.

يكون حجم العلبة capsidالداخلي في النادر أكبر بكثير من حجم ال الذي يتوجب أن تحمله ومجرد حسابات بسيطة تقترح بأن الاختلاف هو أقل من الضعف عادة، وفي الغالب يكون الحجم الداخلي للعلبة بالكاد أكبر من حجم الحامض النووي



شكل (1) الشكل العام للفايروس

عندما تكون العلبة في أشد حالات التحديد بكون العلبة يجب أن تتجمع من البروتينات المشفر عنها من قبل الفايروس يعني أن القشرة الغطاء (shell) الكلية تبني من نوع واحد من الوحدات الثانوية . subunit

ان القواعد الخاصة بتجميع الوحدات الثانوية المتماثلة في تراكيب مغلقة يقيد العلبة لنوع واحد من أصل نوعين فقد تتجمع الوحدات الثانوية البروتينية بشكل مجاميع واحدة فوق الأخرى بشكل متتابع بشكل شعاع حلزوني لتكوين شكل خيطي Filament او شبه عصوي، او قد تكون قشرة كروية كاذبة هذا النوع من التركيب يكون شكلا متعدد السطوح وتناظر عشروني (عشروني الوجه)

أثبت حديثا على أن بعض العلب الفايروسية تتجمع من أكثر من نوع واحد من وحدات الثانوية البروتينية .Protein _ subunitsويجب قبل الحديث عن كيفية تعليب الدنا DNA داخل علبة الفايروس تجدر الإشارة الى ان الفايروسات تحتوي أما على الحامض النووي RNA أوDNA

فالفايروسات الحاوية على RNA توجد بثلاث أشكال

RNA-1 مزدوج الخيط Double stranded RNA الذي يقسم الى عشرة قطع مختلفة منفصلة (غير متصلة ببعضها)

2- RNA مفرد الخيط Single stranded RNA بصورة دائرة مغلقة.

3- RNA مفرد الخيط بشكل مستقيم

من بين الفيروسات الحاوية DNA يوجد اربعة تراكيب أساسية من الحامض النووي الفيروني.

1 - DNA مستقيم ومفرد الخيط كما في Φ M 13

2- DNA حلقي ومفرد الخيط كما في Φx174

3- DNA مزدوج الخيط ومستقيم مثل Herpes virus

4- DNA مزدوج الخيط ومستقيم مزدوج الخيط دائري وملتو الى حلزون شديد مثل Polymatumer virus

توجد المادة الوراثية للفيروسات (سواء كانت DNA او RNA) بحالتين تختلفان في ترزيمها وهي الفيريون الخامل (Inert Virion)والطور الخضري الفعال Active Vegetative يكون الفيريون اساسا بلوري ليس له اي فعاليات أيضية. تصنف الفيروسات عادة اعتمادا على صفات الفيريونات.

يتفاعل الحامض النووي للفيروسات مع نفسه بطرق مختلفة اعتمادا على الفيروس، قد يلتف الخيط المفرد المستقيم من RNA برفق الى حلزون كما في الفيروس الموزائيكي للتبغ (TMVشكل 2) أو قد يتخذ تركيبا معقدة يشبه الزهرة عن طريق تكوين عروات دبوس الشعر(Hairpin loops) من القواعد المتزاوجة مثل الملتهمات البكتيرية QB، f2 او .R17 يكون RNA الفيريون (في أي حالة من الحالات السابقة) مركبا مع البروتينات الكابسوميرية (Capsomeric proteins) وهي مكونات غلافة البروتيني. قد يكون الغطاء Coat او الكابسيد Capsid حلزونيا او متعدد الأضلاع في تصميمة. تكون أغلب فيروسات المحتوية RNA محاطة ايضا بغلاف Envelope يعني أن غشاء الخلية المضيفة المحور بواسطة الفيروس يصبح محيطة حول لب Core الفيريون لتكوين جسيمة فيريون كاملة.

شكل (2) الشكل العام لفايروس موزائيك التبغ

وعن كيفية تعليب الحامض النووي داخل العلبة (RNA أو DNA بالأشكال المشار اليها أعلاه) فأنه يوجد حلين المشكلة كيف تبني العلبة التي تحتوي الحامض النووي: -

أ- يمكن أن تتجمع القشرة البروتينية حول الحامض النووي DNA او RNA عن طريق تفاعلات بين البروتين والحامض النووي خلال عملية التجميع.

ب - او يمكن أن تبنى العلبة من مركبها او (مركباتها) بصورة قشرة فارغة، وبعد ذلك يجب أن يولج (او يدخل) الحامض النووي الى هذا الفراغ ويتكثف حال دخوله.

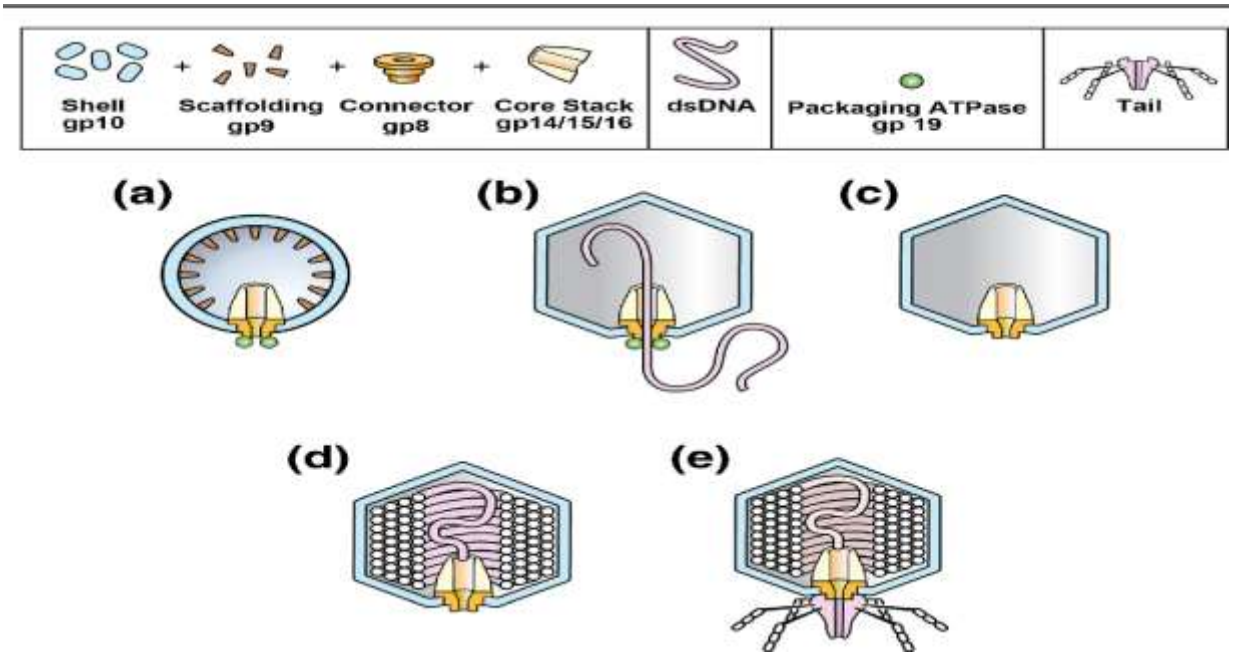
يحدث تجميع العلبة حول الجينوم Genome (وهو محتوى الفيروس او الخلية الحية من الحامض النووي DNA او في بعض أنواع الفيروسات RNA) في حالة الفيروسات والملتهمات الحاوية RNA مفرد الخيط والتي تمتاز بكون مظهرها حلزوني، والمثال المميز لها هو فيروس الموزائيكي للتبغ Tobacco Mosaic Virus وللاختصار يكتب. TMV. يبدأ التجميع عند دبوس شعر مزدوج Duplex hairpin الواقع ضمن سلسلة الحامض النووي RNA من مركز التولد Nucleation center هذا يتواصل بكلا الاتجاهين وعلى طول الحامض النووي RNA لغاية الوصول الى النهايتين. ان وحدة العلبة في TMV هي قرص ثنائي الطبقة، وتحتوي كل طبقة على (17) من الوحدات الثانوية البروتينية المتماثلة. ويشكل القرص تركيب دائريا الذي يتحول الى شكل حلزوني عن طريق التفاعل مع الحامض النووي .RNAيلتوي الحامض النووي RNA على شكل شعاع حلزوني داخل القشرة البروتينية.

ان الطول الكامل لجينوم الحامض النووي RNA هذا يوجد في تركيب محدد عن طريق تفاعله مع القشرة البروتينية. بنفس النوع العام من المسؤولية للتنظيم الداخلي تقدم كذلك بواسطة جينوم الحامض النووي RNA مفرد الخيط للفيروس الموزائيكي للفت الاصفر (Turnip Yellow Mosaic Virus) الذي يمتلك علبة كروية. وهنا مرة ثانية يتحدد موقع الحامض النووي RNA ضمن العلبة مباشرة عن طريق ارتباطه ببروتينات القشرة.

أن الأحداث الجارية في تجميع العلب الكروية للفيروسات الحاوية على DNA قد وصفت بشكل جيد في العاثيات لامبدا (Lambda) و .T4في كلا الحالتين يتم تجميع القشرة ذات الرأس الفارغ عن طريق التفاعل بين مجموعة صغيرة من البروتينات. بعد ذلك يولج

الجينوم المزدوج داخل الرأس، ويرافق هذه العملية (أي عملية الولوج) تغير تركيبي في العلبة.

شكل (3) تجميع العاثي لامبدا Lambdaيبدأ بقشرة رأس صغيرة الحاوية على لب بروتيني Protein core، يحول هذا الى قشرة رأسية فارغة وذات شكل محدد أكثر، بعد ذلك يبدأ ترزيم الحامض النووي الدنا DNA، تتوسع القشرة الرأسية في الحجم على الرغم من أحتفاظها بنفس الشكل، واخيرا يشمع الرأس بكاملة بواسطة الذنب.



شكل (3) تجمع العاثي لامبدا، في البداية دخول نهاية والتي تثبت على غلاف قشرة الداخل.

بالنسبة لكل من العاثيين لامبدا وT4 فالحامض النووي DNA الذي يراد ولوجه (أدخاله) في الرأس الفارغ يأخذ شكل جزيئات تسمى Concatemeric وهذه الجزيئات عبارة عن جينومات متعددة multiple genomes.

تكون نهايتي جينوم العاثي لامبدا معلمه بواسطة تواليات Sequences تسمى Cos (sites cos). يحدث شق او (انقسام) عند يسار Cos site لتوليد نهاية حرة التي تولج في العلبة. يستمر ولوج الحامض النووي DNA لحين مواجهة Cos site آخر يميني الموقع.

عندما تنشق لتوليد النهاية الثانية، النهاية التي ذهبت داخل العلبة في المرحلة الأخيرة من عملية التجميع هي نفسها التي تخرج او عند أصابة خلية مضيفة جديدة.

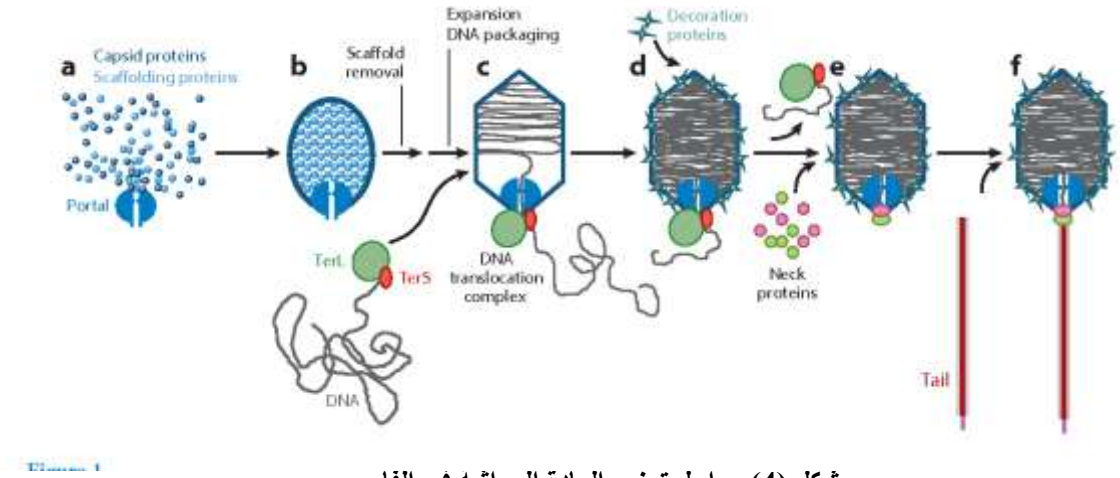
يمكن ترزيم أي DNA واقعه بين أثنين من Cos sites .تتباين المسافة بين Cos sites قليلا فقط عن الطول الاعتيادي للحامض النووي DNA للملتهم لامبدا، ولا يحدث الترزيم إذا كانت هذه المسافة كبيرة جدا أو قصيرة جدا. وهذا يبرهن بوجوب وجود كمية كافية من الحامض النووي DNA لإكمال تفاعل الترزيم أضافة الى انه يظهر وجود فراغ في منطقة الرأس لكمية اضافية قليلة جدا من الحامض النووي DNA حوالي (15%).

بالنسبة للملتهم T4 يبدأ الولوج DNA من نقطة عشوائية في ويستمر الولوج لحين دخول كمية كافية من الجينوم (رأس مملوء)، ويتضمن هذا وجود آليه معينه لقياس كمية الحامض النووي DNA في الحقيقة أن الكمية المولوجة هي أكبر قليلا من طول وحدة جينوم نتيجة وجود وفرة زيادة طرفية Terminal redundancy مطابقة الى الطول الاضافي، فعند الرجوع الى الشكل أعلاه فان الفيريون الأول قد يحتوي DNA يمتد من A الى A والفيريون التالي من B الىB وهكذا يجب أن يكون كل جينوم يمتلك حرف (مختلفة) مكرر عند كلا النهايتين.

بالنسبة لجزيئة الحامض النووي DNA ثنائية الخيط تظهر بصورة قضيب صلب الى حد ما، ومع ذلك يجب أن تلتف الى تركيب مضغوط جدا لتنسجم مع الحيز الموجود في الكابسيد. وما هو معروف عن هذا الانجاز قليل جدا، باستثناء انه توجد بروتينات داخلية Internal proteins في الكابسيد بالإضافة الى الحامض النووي DNA ويحتمل ان هذه البروتينات تجهز بنوع من المنصات (Scaffolding)حيث يتم عليها تكثيف الحامض النووي DNA شكل (4)، وهذه هي نسخة طبق الأمان القشرة في الفيروسات النباتية السابقة الذكر.

تم دراسة العلاقة بين الدنا DNA وقشرة الرأس بشكل مباشر بتعين أي من مناطق الدنا DNA تتقاطع مع بروتينات قشرة الرأس. أن الأجابة المدهشة هي ان جميع مناطق الدنا

DNA تكون الى حد كبير مساوية في حساسيتها للتقاطع. وربما هذا يعني انه عند أدخال الدنا DNAفي الرأس فأنها تتبع قاعدة عامه للتكثيف غير ان شكل التكثيف لا يتم تعينه من خلال تواليات خاصة.



شكل (4) مراحل ترزيم المادة الوراثيه في الفايروس

تكون بعض الفايروسات النباتية متعددة الأجزاء multipartite يتألف جينومها من قطع تعلب كل قطعة في العلبة capsid مختلفة. ومن هذه الفايروسات هو فايروس الفا الفا الموزائيكي alfaalfa mosaic virus، الذي يمتلك اربعة أنواع مختلفة من الرنا RNA مفرد الشريط، يعبئة كل واحد بشكل مستقل داخل غلاف مؤلف من نفس الوحدات البروتينية، وتعتمد الإصابة الناجحة على دخول واحد من كل نوع من الأنواع الأربعة داخل الخلية.

توجد المكونات الأربعة للفايروس بشكل جسيمات مختلفة الأحجام ويعني هذا أن نفس بروتين العلبة يستطيع تعليب كل RNA داخل جسيمته الخاصة به.

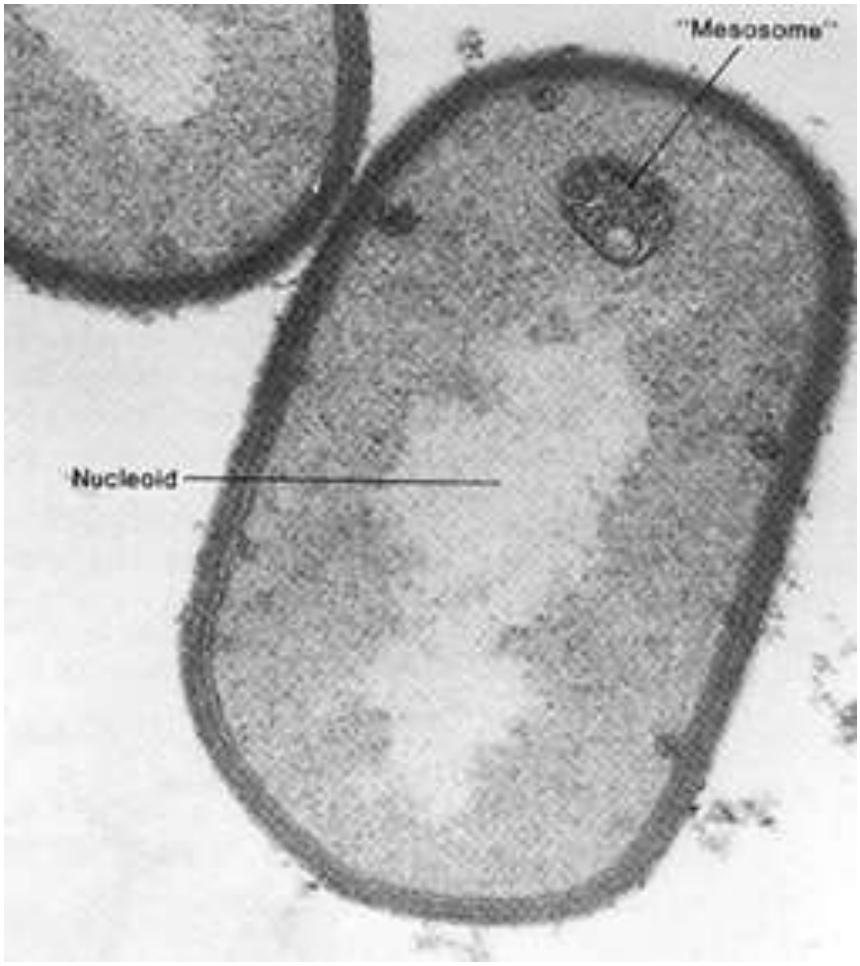
ثانيا: تعبئة الحامض النووي الدنا في خلايا بدائية النواة Prokaryotic Packaging of DNA

عند دراسة مقطع لخلية بكتريا بالمجهر الالكتروني شكل (6) يظهر الحامض النووي DNA بصورة كتلة عديمة الشكل من مادة ليفية قرب مركز الخلية وتحتل تقريبا ثلث مساحة الخلية الكلية (تصل أبعاد الخلية البكتيريا بين 5. 0 الى 0. 6 مايكرون). وخلال الانشطار الثنائي Binary fission وهي طريقة الانقسام الخلوي البسيطة المستخدمة من قبل خلايا بدائية النواة - تنقسم هذه الكتلة من المادة الليفية ويتوجه كل قسم الى الخليتين الشقيقتين. وحيث أن الحامض النووي DNA لا يكون محاطة بغلاف نووي - أي لا يوجد داخل حجرة أو عضية خلوية كما في الخلايا حقيقية النواة لذلك يطلق على الجزء الخلية البكتريا الحاوي على هذا الحامض النووي بمنطقة شبيه بالنواة Nucleoid، وتظهر المادة النووية DNA في صور المجهر الإلكتروني متلازمة مع أمتدادت حويصلية داخلية لغشاء الخلية البكتريا تسمى ميسوسومات Mesosomes. على الرغم من عدم وجود الحامض النووي DNA لخلايا بدائية النواة في حجرة فان له العديد من المظاهر أو الصفات التركيبية المعقدة، فمثلا تحافظ خلية بكتريا القولون *E. coli* على حامضها النووي DNA بشكل كتلة مرزومة بقوة. يبلغ طول الحامض النووي DNA الحلقي لبكتريا القولون عند كسره وجعله بشكل خيط مستقيم حوالي 1 ملم. أضافة الى ذلك تنتج عن عملية ترزيم الحامض النووي DNA في البكتريا مستويات متنوعة من التحلزن من أجل أن يحتل هذا الحامض النووي 10% من حجمه ليصبح طوله حوالي 2 ميكروميتر.

وعلى الرغم من هذا الترزيم القوي فان عمليات الاستنساخ، التضاعف والتوزيع الى الخلايا الشقيقة بعد عملية الانشطار البسيط تأخذ مجراها طبيعيا.

عند ما يتم تحلل خلايا بكتريا القولون *E. coli* cells تتحرر الألياف عروات Loops مرتبطة بغلاف الخلية الممزق، لا يشاهد DNA هذه العروات بصورة (بشكله) الممتد المزدوج حر ولكنة يكون ملتفة بشكل أكثر تماسكا، ربما عن طريق تلازمه مع البروتينات، أذ تم عزل عده بروتينات ارتباط بالدنا DNA (DNA - binding proteins)

من بكتريا القولون مشابهة للبروتينات الكروموسومية في خلايا حقيقية النواة. جدول (1) أهم خصائص هذه البروتينات.



شكل (6) شكل المادة الوراثية متجمعة بمنطقة شبيهه بالنواة في البكتريا

يكون أثنين من البروتينات (HUو H) من المكونات الموجودة بوفرة في الخلية يشابه محتواها من الحوامض الأمينية للهستونات التي ترتبط بالدنا DNA حقيقية النواة، تكون البروتينات صغيرة وقاعدية جدة وترتبط بقوة بالدنا DNA، يحفز البروتين HU لتضاعف الدنا DNA ولا يعرف أي شيء عن وظيفة البروتين .H

جدول (1) أهم خصائص بروتينات الارتباط بالدنا DNA في بكتريا القولون

البروتين	التركيب / دالتون	العدد/ الخلية	مثيلاتها في خلايا حقيقة النواة	الموقع
HU	2 من الوحدات الثانوية 900 دالتون	40000 جزيئات ثنائية	هستون H2B	غير معروف
H	2 من الوحدات الثانوية 28000 دالتون	30000 جزيئات ثنائية	هستون H2A	غير معروف
HLP1	جزيئة أحادية 17000 دالتون	20000 نسخة	غير معروف	firA
P	الوحدة الثانوية 3000 دالتون	غير معروف	البروتامينات	غير معروف

تم تشخيص البروتينP عن طريق وجود الجين المسؤول عنه في أوبرون tRNA ويمتلك هذا البروتين مكونات من الحوامض الأمينية مشابهة للبروتامينات Protamines التي ترتبط بالدنا DNA في نطف معينه، غير أن كميتها ووظائفها غير معروفة.

أما البروتين HLP1 فيتميز بقوة تفاعله مع الجهاز الوراثي، ويشفر عن هذا البروتين عن طريق الجين firA، وحددت طفرات في هذا الجين تعمل على الغاء المقاومة للريفامبسين rifampicin الممنوحة عن طريق بعض الطفرات في الوحدة الثانوية بتا β الأنزيم بلمرة (RNA polymerase)، ولا تظهر خصائص الطفرات ما أذا كان البروتين يتفاعل مع أنزيم بلمرة RNA أو مع الدنا DNA، أن البروتين HLP1 يتميز بكونه صغير وقاعدي ويستطيع الارتباط بالدنا DNA مثل البروتينات الأخرى.

يمكن فصل المنطقة الشبيهة بالنواة Nucleoid مباشرة بشكل معقد سريع الترسيب، يتألف حوالي 80 % DNA بالوزن (المعقدات المشابهة وحقيقية النواة تمتلك حوالي 50 ٪ DNAبالوزن). وفي البكتريا الحاوية على أكثر من نسخة واحدة الجينوم (بسبب حدوث تضاعف للدنا DNA) فأن المعقد يزداد نسبية في الحجم.

يمكن إزالة التفاف المعقد وجعله بحالة أقل تماسكا عن طريق معاملة بمواد تفاعل تؤثر على الرنا RNA او البروتين. وتقترح هذه النتيجة الى أن تركيب هذا المعقد يأخذ

أستقراره عن طريق هذين المكونين، ويبدو أن الدور المحتمل للبروتينات في هذا الأستقرار واضح، أما الدور الذي يمكن أن يمتلكه RNA فوجد أنه غير قابل للتحليل الى حد كبير، جرت محاولات لعزل RNA خاص له علاقة في الوظيفة التركيبية غير أنها فشلت جميعا

في عام 1972 نجح ستونيتكستون Stoningtonوبيتيجون Pettjohn في تحضير (Nucleoids)لبكتريا القولون بشكلها الملتف بشدة. أظهر التحليل الذي اجري على هذه التراكيب الى ان الحامض النووي DNA كان حلزونا مزدوجا وفائق اللف (مفرط اللف)، وان الحامض النووي RNA كان مطلوبا لثبات هذا اللف الفائق (او المفرط)، والشكل (7) يبين تجربتهم والموديل المقترح. يلاحظ من هذا الشكل أن الانزيم RNAase يحرر العروات Loopsغير ان الانزيم DNAaseيحرر اللف الفائق.

يسلك الدنا DNA للجسم المتماسك المعزول في الزجاج in vitro كتركيب مزدوج مغلقclosed duplex structure الذي يحكم عليه عن طريق أستجابته للمادة ethidium bromide.يتداخل هذا المركب بين الازواج القاعدية لتوليد دورات فائقة التحلزن موجبة في جزيئات DNA الحلقية المغلقة closed circular DNA، أي الجزيئات التي يمتلك فيها كلا الشريطين نظام تساهمي وفي الجزيئات الحلقية المفتوحة open circular molecules الحاوية على كسر في شريط واحد او مع الجزيئات الشقيقة يمكن ان يدور الدنا DNA بشكل حر كأستجابة لتداخل المركب ethidium bromide وبالتالي يخفف من الشد.

شكل (7) جينوم البكتريا المؤلف من عدد كبير من عروات من الدنا DNA المزدوج الشريط (بهينة ليف)، وكل عروة مثبتة عند القاعدة لتكوين مقاطعة تركيبية structural domain مستقلة.

في الدنا DNA المغلقة الطبيعية التي تعاني ألتفاف فائق سلبي negatively supercoiled فأن تداخل مادة ethedium bromide يزيل اولاً الألتفاف الفائق السلبي وبعدها يدخل (او يحدث) التفافات فائق موجب positive supercoils وتعتبر كمية مادة ethedium bromide المطلوبة لتحقيق التفاف فائق قيمته صفر هي مقياس للكثافة الأصلية للألتفافات الفائقة السلبية.

تحدث بعض الكسور nicks في المنطقة الشبيهة بالنواة المتماسكة خلال عزلها، كما يمكن أيضا توليد هذه الكسور بمعاملة محدودة بالأنزيم DNase، غير ان ذلك لايوقف قدرة مادة ethidium bromide لأدخال التفافات فائقة موجبة، وتعني هذه المقدرة التي يمتلكها الجينوم للحفاظ على أستجابتة لمادة ethidium bromide بوجه التكسر انه يجب ان يمتلك العديد من المقاطعات domains، ويكون الالتفاف الفائق في كل مقاطعة غير متأثراً بالأحداث الجارية في المقاطعات الأخرى.

تقترح هذه الأستقلالية الى أن تركيب كروموسوم البكتريا قد يمتك تنظيم موضح تخيطيطياً كما في الشكل التالي.

تتألف كل مقاطعة من عروة من الدنا DNA، تكون نهايتها مثبته ببعض الطرق (غير معروفة) لا تسمح الأحداث الدورانية لتنتقل من مقاطعة الى أخرى، به حوالي 100 من مثل هذه المقاطعات في الجينوم، بحيث كل منها تتألف من حوالي (kb40) (13µm) من الدنا DNA مرتبة داخل ليف متماسك بعض الشيء وتركيب هذا الليف لايزال قيد البحث.

أن وجود مقاطعات منفصلة قد تجيز درجات مختلفة من الألتفاف الفائق للأبقاء عليها في مناطق مختلفة من الجينوم.

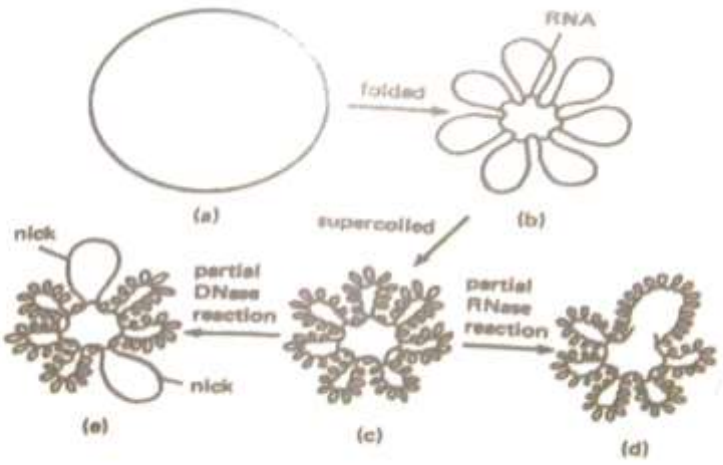
يمكن تنظيم الدنا DNA بالتفاف فائق بطريقتين، فاذا بقي الدنا DNA حراً مساره غير معاق unrestrained ويتولد الالتفاتات الفائقة السلبية حالة من الشد الألتوائي التي يمكن تخفيها بإزالة تحلزن الحلزون المزدوج. وقد تكون الدنا DNA في حالة توازن ديناميكي بين حالات الشد وازالة التحلزن .unwindingومهما يكن فانه يمكن أعاقة الالتفاف الفائق أذا أرتبطت البروتينات بالدنا DNA للامساك به في شكل خاص ثلاثي الأبعاد. وفي هذه الحالة فأن الالتفاتات الفائقة تكون ممثلة بالمسار الذي يتبعه الدنا DNA في تلازمه الثابت مع البروتينات. وتؤثر طاقة التفاعل بين البروتينات والدنا DNA بالالتفاف الفائق على الاستقرار الحلزون المزدوج، الذي يمكن جعله مستقرا بشكل مزدوج او بشكل شريط مفرد بحيث لا ينتقل الشد على طول الجزيئة.

على الرغم من أن الموديل يظهر عدد قليل نسبيا من عروات اللف الفائق (المثبتة بروابط من الحامض النووي RNA) اظهرت صور المجهر الإلكتروني التي حصل عليها وورسيل Worcel وبوركي Burgi عام 1973 تركيبا مفككا لل Nucleoid المعزول متلازم مع قصاصة (فضلة) من غشاء البكتريا، ويمكن أن يكون مصدر هذا الغشاء الميسوسوم .Mesosome بين بيتيجون والعاملين معه الى ان تركيب ال Nucleoid لا يتداخل مع أقتراب الانزيم RNA polymerase من الحامض النووي DNA الاغراض عملية. درس عدد من الباحثين بروتينات قصاصة (فضلة) الغشاء الذي يرتبط بقوة

بالنيوكليويدNucleoid. وهذه البروتينات هي مجاميع ثانوية لتلك الموجودة في جميع غشاء بكتريا القولون، وقد تكون مهمه في ابتداء تضاعف الحامض النووي DNA.

لا تحتوي البكتريا البروتينات القاعدية الخاصة (الهستونات Histones) والموجودة في خلايا حقيقية النواة ومع ذلك تمتلك البكتريا كميات جوهرية من الأمينات المتعددة Polyamines.وهذه البروتينات من المحتمل أنها تعادل الشحنة التي تحملها مجاميع الفوسفات للحامض النووي DNA، ومع بروتينات خاصه عزلت حديثة.

وبذلك تؤدي وظيفة الى حد كبير مشابهه الى وظيفة الهستونات. على الرغم من أن البكتريا تفتقد للهستونات فقد أستطاع كريفت Griffith أن يبين بان الحامض النووي DNA للبكتريا يمتلك مظهرا خرزياً (قطر الخرزة حوالي 100 أنكستروم) مشابهة لتلك التي ستوصف في الحامض النووي DNA لحقيقية النواة. في بدائية النواة يجب أن يكون الحامض النووي DNA قادرا لفرض هذا التركيب بدون تأثير الهستونات. وقد تلعب البروتينات البكتيريا القاعدية دورة مشابها للهستونات لحقيقية النواة في هذا الترزيم.



شكل (5-8) موديل ترتيب الحامض النووي DNA واجزاء الحامض النووي RNA Nucleoid بكتريا القولون في حالتة المكثفة. الخطوات من (a) الى (c) توضح التحولين الشكليين اللذين يكثفان الحامض النووي DNA.
(a) تمثل الكروموسوم الحلقي غيرالملتوي قطر الحلقة: 350 ميكرون.
(b) الكروموسوم الملتوي يحتوي على مقاطعات فائقة اللف (Supercoiled donains) او عروات(Loops) من الحامض النووي DNA محمولة معاً بواسطة روابط من الحامض النووي RNA (RNA linkers). فقط 7 من حوالي 40 مثل هذه المقاطعات موضحة في الشكل (قطر الحلقة الملتوي: 30µm).
(c) كروموسوم ملتوي وفائق اللف، الحامض النووي DNA يلتوي بشكل اكبر الى حلزونات فائقه يسارية Left-handed superhelices (قطر الحلقة فائقة اللف: حوالي 2 µm).
الشكل (c) تأثيرات مهاجمه التركيب (c) بالانزيمDNAase ويبين الشكل(d) تأثيرات مهاجمه التركيب (c) بالانزيم RNAase.

ثالثا: تعبئة الحامض النووي DNA في خلايا حقيقية النواة

Packaging of DNA Eukaryotic

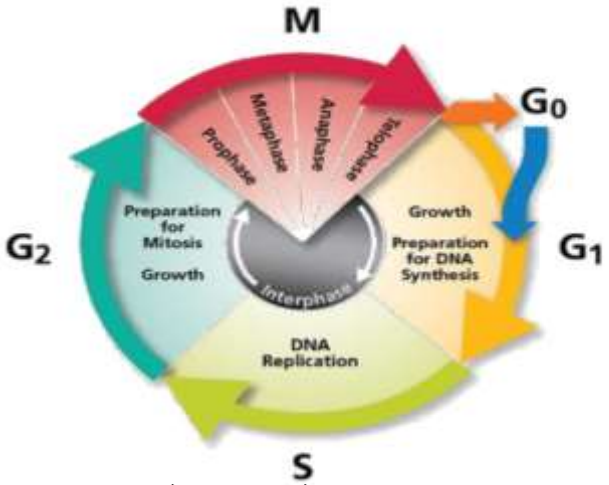
كروموسومات حقيقية النواة خلال الطور البيني

دورة الخلية :-Cycle Cell

تتميز خلايا حقيقية النواة بامتلاكها غلافا يحيط بالمادة الوراثية وهذا الغلاف غير موجود في بدائية النواة. يلاحظ هذا الغلاف فقط في الطور البيني من حياة الخلية من الملائم تقسيم دورة الانقسام الخلوي (دورة حياة الخلية) الى أربعة أطوار شكل(9) هي: -

1. طور الانقسام phase Mitosis او (M phase) ويحصل في هذا الطور انقسام فعلي وهو الطور الأقصر.
2. طور G phase G1أو.(period G1)
3. طور البناء phase Synthesis أو (phase S) في هذا الطور يتضاعف الدنا.DNA
4. طور G2 phase G2 أو (period G2) حيث تدخل الخلية طور الانقسام معيدة الدورة من جديد.

يجب عدم اعتبار الطورين G1 و G2 (Gتعني فاصلة أو (Gap) بأنهما طوري راحة نظرا لكون عمليات الاستنساخ، الترجمة، التفاعل مع البيئة تأخذ مجراها خلال هذين الطورين، أن ترزيم الحامض النووي DNA خلال الأطوار الثلاثة للدور البيني له تطبيقات عميقة في التعبير الجيني وتنظيمه.

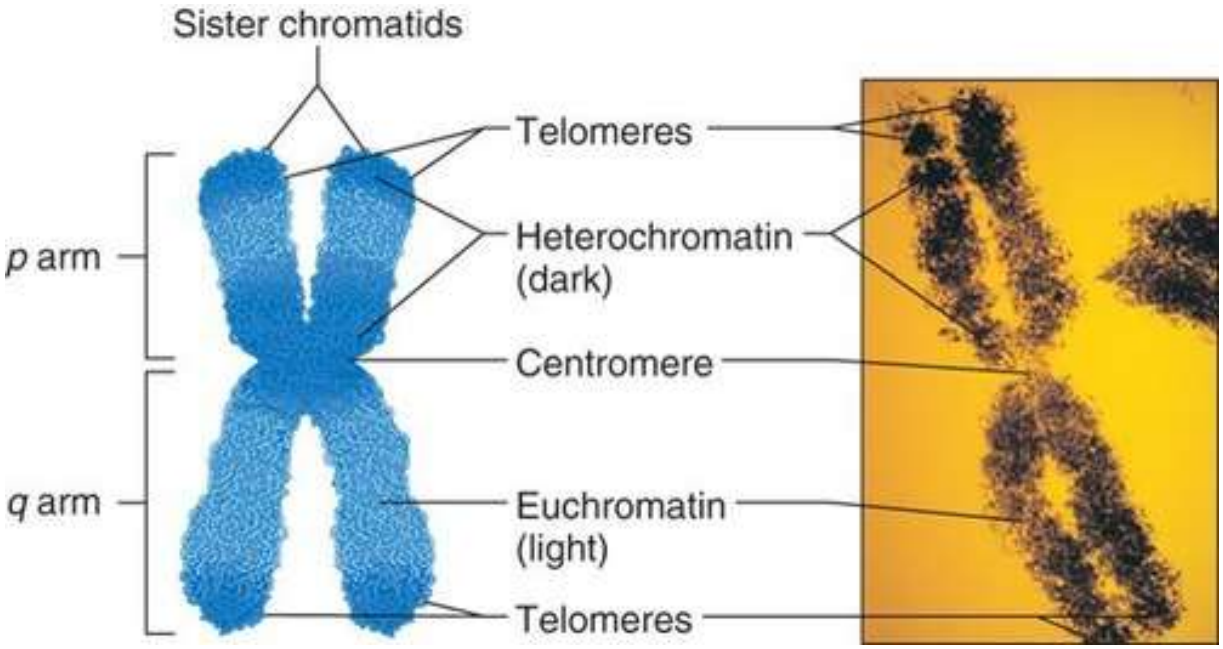


شكل (9) مخطط لدورة حياة الخلية لخلايا حقيقة النواة

التغاير بين كروماتين الطور البيني والكروموسومات الميتوزية –

تتوضح الهوية المفردة للكروموسومات بعد فترة قصيرة جدا من بدء الانقسام الخلوي في هذه المرحلة يلاحظ كل كروموسوم كوحدة منضغطة بنسبة التعبئة تصل الى (1000). يظهر كل كروموسوم في الطور الأستوائي metaphase مؤلف من كروماتيدتين شقيقتين تتكونان بعد عملية تضاعف مسبقة شكل (10).

تبقى كلا الكروماتيدتين الشقيقتين متصلتين ببعضهما في هذا الطور من الأنقسام عن طريق القطعة المركزية .Centromereتتألف كل كروماتيدة من ليف قطره nm30 وتمتلك عقدي مطوي في التركيب الكروموسومي.



شكل (10) الشكل العام لكروموسومات الطور الاستوائي

خلال معظم دورة حياة الخلية لخلايا حقيقية النواة – باستثناء طور الانقسام - فان المادة الوراثية للخلية تشغل مساحة ما من النواة لا يمكن تمييزها بصورة كروموسومات مفردة وانما تكون بصورة مادة كروماتينية منتشرة كما في شكل (11). لا يتغير تركيب كروماتين الطور البيني بشكل ملحوظ بين الانقسامات، فمثلا لا يظهر تمزق خلال فترة تضاعف الكروماتين.

الكروماتين ليفي المظهر على الرغم من أن الشكل الإجمالي لليف (في الحيز الذي يشغله) يصعب تمييزه بالتفصيل ومع ذلك يكون الليف نفسه مشابهة وقد يكون متطابق مع الليف الملاحظ في الكروموسومات الميتوزي.

يمكن تقسيم الكروماتين في الطور البني الى نوعين من الكروماتين، ففي معظم مناطق النواة تكون الألياف الكروماتينية معلبة بكثافة قليلة مقارنة بتعليبها عندما تصبح بشكل كروموسوم، يطلق على هذه المادة الكروماتينية ذات الكثافة الإلكترونية القليلة بالكروماتين الحقيقيEuchromatin ، وربما تكون نسبة التعبئة الأجمالي لها مابين 1000-2000 خلال الطور البيني، مفترضين الى أنها تتكثف أكثر بحوالي 5-10 أضعاف في الأقسام الميتوزي.

تكون بعض مناطق الكروماتين معبئة بكثافة شديدة بالياف تظهر حالة مشابهه الحالة الكروموسوم عند الانقسام الميتوزي، يطلق على هذه المناطق من الكروماتين بالكروماتين المتباين .Heterochromatinوتمر هذه المناطق عبر دورة الخلية بتغيير قليل نسبيا في درجة تكثيفه، وتجدر الاشارة الى أن هذه المناطق الكثيفة من الكروماتين المتباين تتقبل الصبغة بشكل أفضل من المناطق ذات الكثافة القليلة (الكروماتين الحقيقي).

يلاحظ في نفس الليف الكروماتيني مناطق من الكروماتين الحقيقي والمتباين التي تدل ضمنا إلى أن هذه الحالات تمثل درجات متباينة من التكثيف للمادة الوراثية، بنفس الطريقة يوجد الكروماتين الحقيقي من حالات مختلفة من التكثيف خلال الطور البيني وخلال الأنقسام الميتوزي. ويستقى من هذه المظاهر الاستنتاج المهم التالي وهو أن المادة الوراثية تنتظم بأسلوب تسمح بالإبقاء على الحالتين (او الخيارين) جنبا إلى جنب في الكروماتين، وتسمح كذلك بحدوث تغيرات في تعليب الكروماتين الحقيقي بين الطور البيني والانقسام.

توجد علاقة بين الحالة التركيبية للمادة الوراثية وفعاليتها الأستنساخية فالكروموسومات الميتوزية تكون خاملة من الناحية الأستنساخية، أذ توقف الخلية عملية الاستنساخ فعليه خلال عملية الانقسام. يعتبر الكروماتين المتباين خامل من الناحية الأستنساخية

ايضا، ويوجد صنفين من الكروماتين المتباين كما في شكل (11) يحتوي كلاهما نوع متباين من التسلسل النيوكليوتيدي وفي كلا الحالتين يكون فقدان الاستنساخ جليا وهذان الصنفان هما :

1- الكروماتين المتباين التكوينيheterochromatin Constitative

يتألف من مناطق خاملة ورائية أي لا تعبر عن نفسها مطلقة، وتتضمن تواليات الدنا DNA التابع

2- الكروماتين المتباين الأختياريheterochromatin Facultative

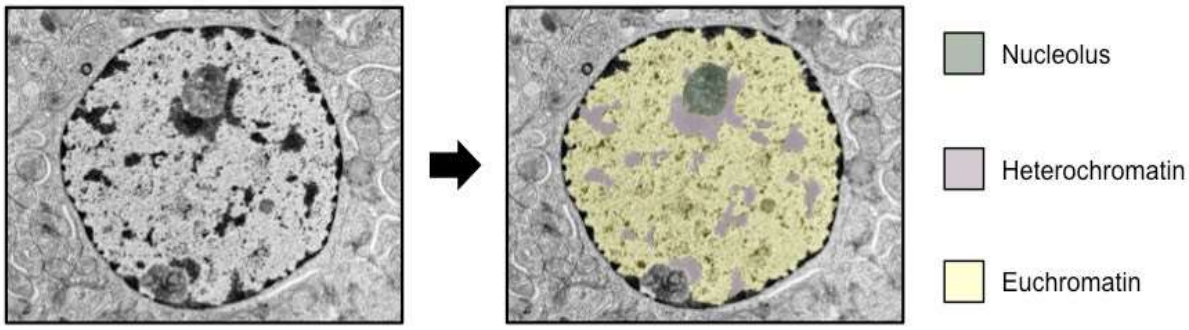
في هذا الصنف يكون أحد كروموسومي الزوج الكروموسومي (أي أحد الكروموسومين المتماثلين) متألف بأكمله من كروماتين متباين، فمثلا الكروموسومات الجنسية (chromosomes- X)في أناث الثدييات حيث يكون أحد الكروموسومين الجنسيين فعالا ويبقى حقيقي للكروماتين والأخر (يتم الانتخاب عشوائية) غير فعال ومتباين الكروماتين بأكمله. وهنا من المحتمل أن نشاهد العلاقة بين الفعالية الأستنساخية والتنظيم التركيبي عندما تستخدم التواليات النيوكليوتيدية المتماثلة للدنا DNA في كلتا الحالتين.

وعليه يكون التكثيف الشديد جدا مع (وربما مسؤول عن) عدم فعالية الكروماتين المتباين، ومع ذلك فأن العكس غير صحيح، فالجينات الفعالة تقع فعلا ضمن الكروماتين الحقيقي ولكن تستنسخ بنسبة قليلة جدا من التواليات في الكروماتين الحقيقي وفي أي وقت لذلك فان موقع الجينات الفعالية في الكروماتين الحقيقي ضروري لكي تعبر عن نفسها ولكنها فير كافية له.

عندما يعزل كروماتين الطور البيني وكروموسومات الانقسام الميتوزي في الزجاج in vitroيظهر كلاهما يمتلكان عروات loops كبيرة من الليف (الكروماتين المتباين التكويني)والتي تكون مقيدة بوضوح عند القاعدة لتكوين مقاطعات مستقلة مشابهه لتلك الموجودة في المنطقة الشبيهة بالنواة للبكتريا، وتسمى هذه العروات في حقيقية النواة النيوكليوسومات Nucleosomes.

كروموسومات مفردة الخيطchromosomes Unineme

يوصف الكروماتين Chromatin (الكروماتين يتألف من DNA وبروتين كما يتلازم معها RNAs)عادة بامتداده في خلايا حقيقية النواة والذي يشكل الكروموسومات شكل (12)، وخلال طور الانقسام (phase M) كل كروموسوم من هذه الكروموسومات يكون ملتفة بقوة كبيرة لذلك تكون الكروموسومات أقصر. وعند الطور Gتسترخي اللفات ويصبح كل كروموسوم مئات المرات أطول مما هو عليه خلال طورM ، ومع ذلك ففي الطور البيني تبقى تراكيب ثانوية ملتفة في الكروماتين. تتألف التراكيب الثانوية الملتفة من مستويين من الالتفاف: خيوط مزدوجة من الحامض النووي DNA والنيوكليوسوماتNucleosomes ، المستوى الأول من الالتفاف هو الحلزون المزدوج، نفسه وسيتم مناقشة تركيب الحلزون المزدوج للحامض النووي DNA قبل مناقشة النيوكليوسومات .

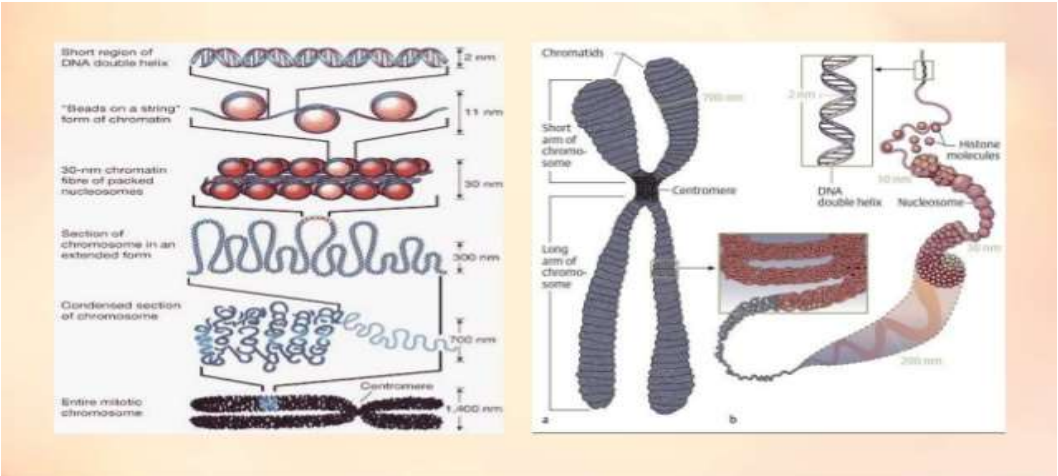


شكل (11) النواة تظهر الكروماتين الحقيقي والمتباين

قد يكون الحامض النووي DNA من كروموسوم معين بصورة عدد من القطع المستقيمة أو الحلقية (متعدد الخيط Multineme)أو بصورة قطعة مفردة واحدة تمتد من احدى نهايتي الكروموسوم الى النهاية الثانية (مفرد الخيط Unineme)إحدى التجارب التي أثبتت بشكل واضح جدا الى أن الكروموسومات مفردة الخيط هي تلك التي أجراها كافينوف Kavenoff ومساعديه في عام 1973. جزيئات الحامض النووي DNA الطويلة تستغرق فترة أطول من الجزئيات القصيرة للاسترخاء بعد ضغط بيئي، أستخدم كافينوف هذا التباين في فترة الاسترخاء لقياس أطوال جزيئات الحامض النووي الدنا DNAفي تحضير لهذا الحامض النووي.

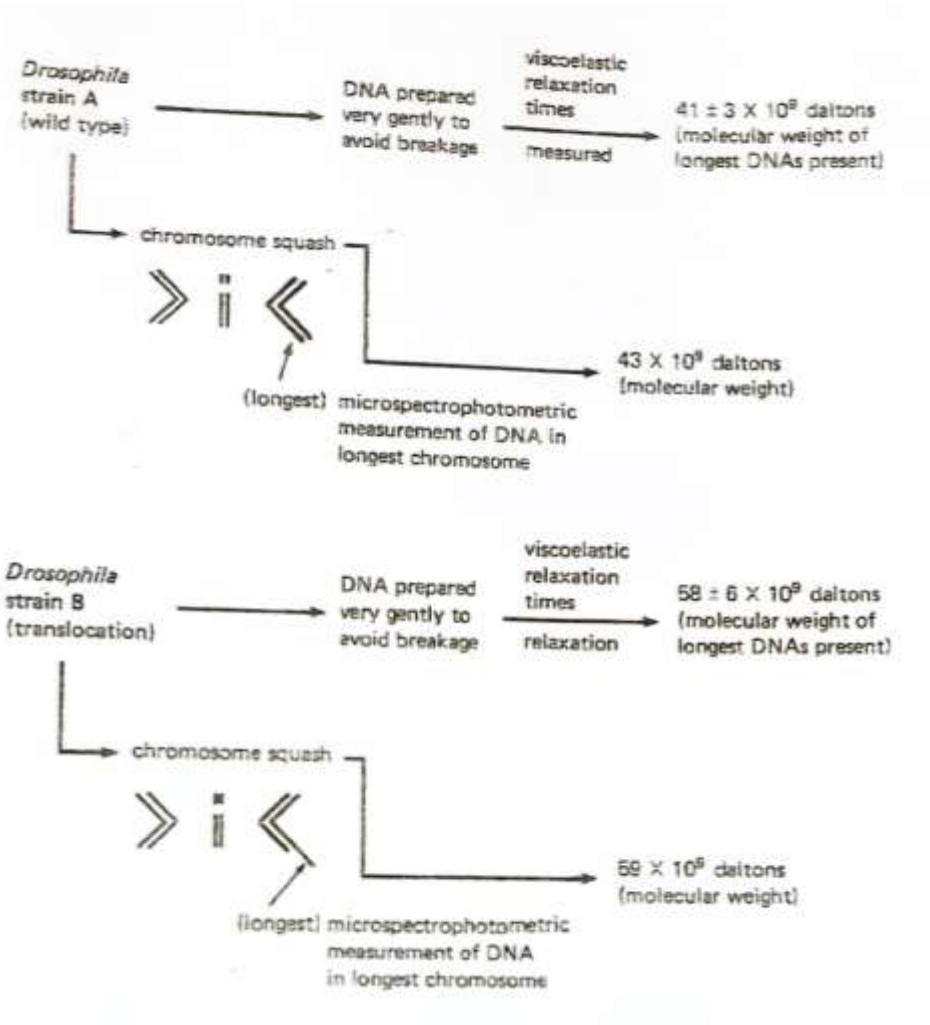
هذا تستغرق فترة أطول من الجزيئات القصيرة للاسترخاء بعد ضغط بيئي استخدم كافينوف هذا التباين في فترة الاسترخاء لقياس أطوال جزيئات الحامض النووي DNA في تحضير لهذا الحامض النووي. حضر الحامض النووي DNA من عدد من السلالات المختلفة وراثيا لحشرة الدروسوفيلا (كل منها تختلف في طول أطول الكروموسومات الأربعة). اختلفت سلالات الدروسوفيلا التي قارنها كافينوف في كمية الحامض النووي DNA في أكبر كروموسوماتها شكل (12). وقد اثبت عن طريق تصبيغ الحامض النووي DNA واستخدام حزمه دقيقه جدا من الطيف الضوئي تسدد من خلال المجهر على أطول الكروموسومات. لقد كان ممكنا من تبيان بان اطول كروموسوم في السلالة A أمتلك DNA بوزن جزيئي $10x41^9$ دالتون في خلاياه بينما أمتلك اطول كروموسوم في السلالة B حامض نووي DNA بوزن جزيئي مقداره $10x59^9$ دالتون. الأطوال كانت نسبية فأطول كروموسوم للسلالة A كان أطول من اطول كروموسوم للسلالة.B

يلاحظ أن أختبار كافينوف لأطوال كروموسوم في دراسته كان ذكيا: اذ أظهرت فترات الاسترخاء الى ان اطول جزيئات DNA الموجودة كانت بكبر كمية الحامض النووي DNA في اطول كروموسوم. لذلك يجب أن يكون أطوال كروموسوم مفرد الخيط(Unineme) ، وحيث ان DNA بهذا الكبر من غير المعقول أن يكون جزءا من كروموسوم آخر (جوهريا أقصر) موجود في الخلية.



شكل (12) الشكل العام للكروموسوم والتركيب الدقيق للدنا DNA والهستونات

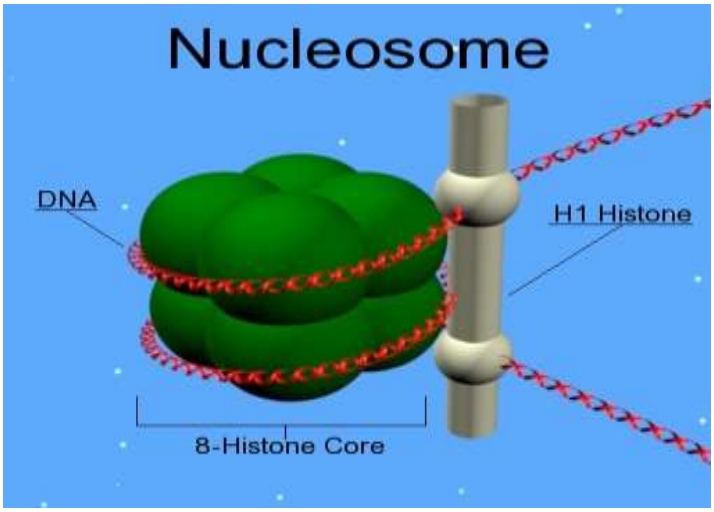
في الحقيقة امتلكت اطول DNA في تحضيرات من السلالة A وزنا جزيئيا مقداره $10x41^{9}$ دالتون بينما اطول DNA من السلالة B امتلك وزنا جزيئيا مقداره $10x58^{9}$ دالتون. من المحتمل أن بعض الكسر قد حصل في اطول كروموسوم خلال تحضير الدنا DNA أوان الاخطاء التجريبية من كلا النوعين من قياسات الدنا DNA منعت من التطابق الصحيح لكلا الرقمين. ومع ذلك فانهما قريبان بما فيه الكفاية لإعطاء دعم شوي لموديل الخيط المفرد



شكل (13) جزء من تجربة تدعم موديل الخيط المفرد لتركيب الكروموسوم

النيوكليوسومات Nucleosomes

الحلزون المزدوج (لجزئية الحامض النووي DNA)يمتد على طول الكروموسوم ويلتف دائريا الى تركيب خرزي يسمى نيوكليوسوم Nucleosome، أن هذا النيوكليوسوم الحقيقية النواة... على الرغم من تشابهه مع تركيب DNA البكتريا يحتوي دائما كجزء من الخرزة مجموعة (طقم) من ثمانية جزيئات من بروتين الهستون Histone شكل (14).



شكل (14) الصيغة التركيبية للنيوكليوسوم

يوجد خمسة أنواع مختلفة من الهستونات التي هي البروتينات النووية القاعدية الحقيقية النواة جدول (2) التي تختلف في الحجم وسلسلة الحوامض الأمينية، وجد في الكروماتين انه عند كل 200 من أزواج قاعدية من الدنا DNA يوجد تسعة جزيئات من الهستونات، جزيئة واحدة من H1 وجزيئتين من كل من الأنواع التالية: H2B ، H4. H2A، H3

جدول (2) أنواع الهستونات واهم خصائصها التركيبية

الهستونات	الحوامض الأمينية القاعدية اللايسين	الارجنين	الحوامض الأمينية الحامضية	نسبة الحوامض القاعدية/ الحامضية	الوزن الجزيئي	عدد النسخ لكل نيوكليوسوم
H1	٪ 29	٪ 1	5 %	5.4	23000	1
H2A	٪ 11	٪ 9	15%	1.4	13960	2
H2B	٪ 16	٪ 6	13%	1.7	13774	2
H3	٪ 10	٪ 13	13%	1.8	15342	2
H4	٪ 11	%14	10%	2.5	11282	2

أجريت دراسات عديدة لأثبات ان الوحدات الثانوية (النيوكليوسومات) هي تراكيب مكررة في الكروماتين. واول مقترح قوي بهذا الخصوص قدم من هيويش Hewish وبوركوين Burgogne الذين درسا حساسية كروماتين الفأر للأنزيم (Ca-Mg-dependentendogenous nucleas) وقد استنتجا انه أذا وجدت وحدات تركيبية ثانوية مكررة (Repeating substructure) عند ذلك فان الدنا DNA قد يمتلك مناطق مكررة بتلازم متين مع البروتينات التي تعطي الوقاية او الحماية من هجوم الانزيم نيوكليس، في تلك الحالة يكون الإنزيم نيوكليس غير متخصص نسبيا قادرة على كسر DNA في مواقع غير محمية، التي توجد كذلك عند فواصل منتظمة. يكسر الدنا DNA الى عشيرة من الأطوال التي هي مضاعفات طول المنطقة المحمية من الدنا DNA ضمن الوحدة المتكررة.

بعد مهاجمة الانزيم نيوكليس للكروماتين (في تجربة هيويش وبوركوين) ففي الدنا DNA من الهستونات وبروتينات آخرى وفصلت (وعزلت) الأطوال المختلفة من الدنا DNA بطريقة الترحيل الكهربائي (Electrophoresis)، حدد موقع ال DNAsوالهلام بعد الهجرة الكهربائية عن طريق التصبيغ بالصبغة المشعةEthidium bromide .

جزيئات الحامض النووي DNA الموجودة كانت بطول 200 bp زوج قاعدي (200)، 400 زوج قاعدي، 600 زوج قاعدي، ومضاعفات أكبر من الطول (200) زوج قاعدي .

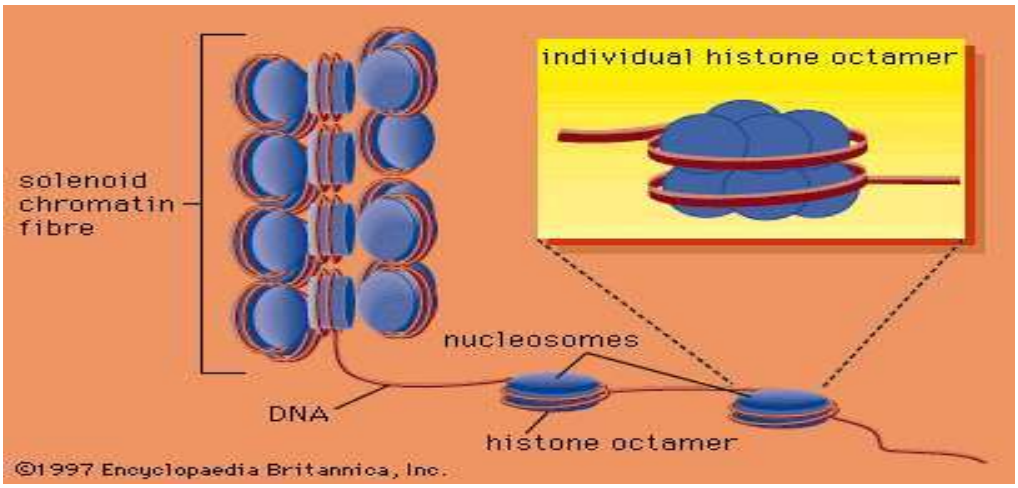
استنتج هيويش وبوركوين الوحدة المكررة بانتظام لتنظيم الكروماتين موجودة وفي هذا الكروماتين لوحظ وجود موقع غير محمي (أي حساس للانزيم نيوكليس) عند كل 200 زوج قاعدي. لايكسر أنزيم النيوكليس الدنا DNA عند كل موقع حساس محتمل، لذلك تتكون أطوال مختلفة، ومع ذلك فان كل طول يكون أحد مضاعفات الرقم 200 زوج قاعدي.

مواقع وحالات بروتينات الهستونات اللاهستونات:

Locations and states of histones and nonhistones

النيوكليوسومات هي أصغر وحدة تعبئة في حقيقية النواة وهي جسيمات متكررة تمتد على طول الكروماتين تكونت عن طريق تلازم جزيئات الحامض النووي DNA والهستون. تمتلك النيوكليوسومات شكلا شبه أسطواني قطره10 نانوميتر وطوله 5. 5 نانوميتر.

وتشكل الهستونات لب النيوكليوسوم يحاط بهذا اللب جزيئة DNA حلزونية لتكون حلزون فائق كما مبين في الشكل (15). يمكن تحرير النيوكليوسومات من الكروماتين عن طريق الهضم الجزيئي له بواسطة أنزيم نيوكليس Nuclease مثل (Micrococcal or endogenous nuclease)، ونتيجة لعملية الهضم تتحرر اولا نيوكليوسومات حاوية على DNA طوله 160-240 زوج قاعدي وبضمنها DNA يمتد بين النيوكليوسومات المتجاورة والذي يصطلح عليه Internucleosomal DNAأو يسمى DNA المباعد DNA Spacer. وباستمرار تعريض الكروماتين الى الانزيم نيوكليس يتكون ناتج وسطى مؤلف من حوالي 160-170 زوج قاعدي والهستونات الليبية وهستون منفصل يسمى H1.واخيرا تنشأ وحده مستقرة تتألف من الهستونات اللبية يحيط بها حلزون من الدنيا DNA طوله حوالي 146 زوج قاعدي.



شكل (15) التركيب الهستوني الثماني الذي يلتف عليه الدناDNA وموقع Hl وألياف الكروماتين تظهر ترزيم الدانا DNA في تركيب النيوكليوسومات والذي يمنحه قطرة بحدود 10 نانوميتر ويتكاثف من خلال ليف حلزون بقطر 30 نانوميتر.

لب النيوكليوسوم الهستوني تركيب مثمن Octomer يتألف من زوج من الانواع الاربعة من الهستونات بواقع جزيئتين من كل نوع وهي:H4، H2B H3، H2A، وتكون البنا DNA حوالي لفتين (او دورتين) كاملتين حول اللب الثماني. ويعتقد ان الهستونات نوع H3 و4H تمثل جسيمات النيوكليوسوم التي تحمل حلقة الدنا DNAالرئيسة بينما تتلازم الهستونات من نوع H2A و H2Bمع سلاسل النيوكليوتيدية للدنا DNA عند أي من نهايتي الحلقة. لقد وجد بان الهستونات H2B H2A غنية بالحامض الاميني القاعدي لايسين (Lysine) وهذا يتفق مع قدرتها على الارتباط بقطع من الدنا. DNA

الهستون H1 غني أيضا باللايسين ويتلازم مع الدنا DNA المباعد ويؤلف كل من الحسيمة اللبية (Core particle) والدنا DNA المباعد و H1 وحدة تسمى نيوكليوسوم مفرد (Mononucleosome)أو تسمى .(Chromatosome)

يختلف تكرار وجود النيوكليوسومات على طول الليف الكروماتيني في الأنسجة المختلفة وعلى الرغم من أن عدد الأزواج القاعدية في الدنا DNA المحيط بلب النيوكليوسوم يبقى نفسه في جميع الخلايا الأ أن طول الدنا DNA المباعد يختلف باختلاف الأنواع وباختلاف الأنسجة ضمن الانواع (في أغلب الكائنات الحية حقيقية النواة يتراوح طول الدنا DNA المباعد بين 20 -80 زوج قاعدي)، قد تكون القطعة المباعدة قصيرة أو مفقودة (كما في الخميرة). او يكون طولها حوالي 80 زوج قاعدي (كما في خلايا حيا من قنفذ البحر) ان اهمية التباين في طول الدنا DNA المباعد لا زالت غير واضحة لحد الآن، فهي أصغر من أن تكون جينات حيث يعتقد ان الجين يتألف عموما من حوالي 1000 زوج نيوكليوتيدي). إضافة الى ذلك يتغير تركيب النيوكليوسومات ولكن لا يعطل (أو لا تمزق) خلال استنساخ الجينات كما بين ذلك بواسطة التجارب على استنساخ جينات الهيموغلوبين.

تحول هذه الجينات الفعالة- بالضبط مثل الكروماتين المعمم-الى أطوال مضاعفات الرقم 200 زوج قاعدي بواسطة أنزيمات النيوكليس مثل (Micrococcal or endogenous nuclease)، وبذلك فان الجينات الفعالة او النشطة في التعبير تبقى مرزومة بالهستونات ومع

ذلك يجب أن يكون هناك جينات بتركيب أكثر انفتاحا ومحميا بشكل اقل والتي في حالة استنساخ، حيث أن انزيم DNase 1 يقطع أنتقائيا مثل هذه الجينات، قد تمتلك الهستونات قدرة أقل في تعادل الشحنة. مساحات الاستنساخ لسبب تحور ملا تحور مثل (Acetylation) لبعض الحوامض الامين (المشحونة بشحنة موجبة) في الهستونات أن آلية السيطرة هذه قد تفت الكروماتين للاستنساخ عن طريق التنافر من قبل شحنات الفوسفات السالبة الموجودة على الدنا DNA.

آلية أخرى التي قد تؤدي الى فتح التركيب - DNA هستون هو بتفاعل واحد من هذين المكونين أو كلاهما (DNA وهستون) مع بعض البروتينات النووية اللاهستونية الخاصة، لذلك فان مثل هذه البروتينات (اللاهستونات) توجه استنساخ جينات معينة. وهذه البروتينات هي جزء من نظام السيطرة الايجابي للاستنساخ. يمكن ان نستنتج نتائج متعددة من هذه الفرضية:

1. ان يمتلك كل نسيج متميز Differentiated مجموعة واضحة ومتمي سن بروتينات اللاهستونية.
2. أن يوجد أي من البروتينات اللاهستونية المنظمة (NHPs) بتلازم مع الكروماتين الفعال ولكن ليس مع الكروماتين غير الفعال. لقد بين كومينكس Comings وجماعته من خلال تحليله DNA غير مشفرة وعالية التكرار وهي جزء من الدناDNA الذي لا يستنسخ أبدا الى أن هذا الدنا DNA يفتقد للبروتينات اللاهستونية تجربه آخري تدعم هذا الموديل انجزت من قبل ألكين Elginوسيلفر Silver ان هذه التجربة معقدة الى حد ما ولكنها تشتمل على عدد من التقنيات المستعملة هذا اليوم عادة في بحوث علم الأحياء الجزيئي، لذلك فأنها تستحق الوصف.

الكروموسوم Chromosome

كلمة مشتقة من اللغة اليونانية القديمة مؤلفة من مقطعين Chromo وتعني اللون وSoma تعني الجسم (الجسيمات الصبغية) هذه الكلمة أطلقت لأول مرة على التراكيب الخيطية الموجودة في النواة من قبل العالم Waldeyer عام 1880 وهي أحدى المكونات الرئيسية في نواة الخلايا وفي عام 1903 Sutton أكد على وجود وحدات التكاثر ضمن الكروموسومات، على حين بين العالمان Boveri&Stung عام 1909 أن العوامل الوراثية او الجينات تُحمل على هذه التراكيب وتقع على امتداد الكروموسومات وبعد بضعة سنوات قدم العالم موركان اثبات بوجودها من خلال تجاربه الوراثية على حشرة ذبابة الفاكهة الدروسوفيلا.

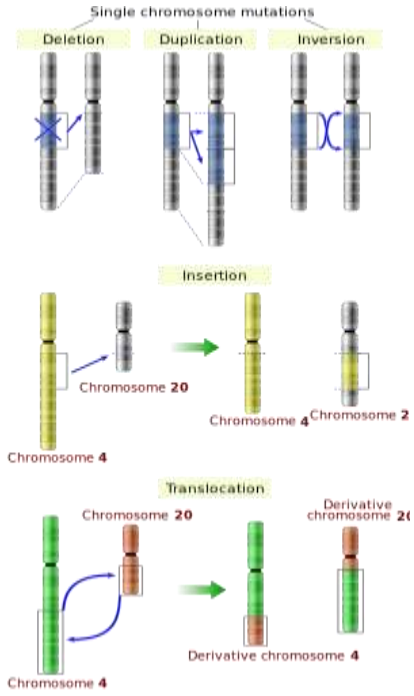
بينما وصف الباحث Beling عام 1931 وجود انتفاخات كروماتينية تظهر على الأمتداد الطولي للكروموسوم التي عددها وحجمها وموقعها ثابتة للنوع الواحد، أعتقد الباحث Macklintosch عام 1931 بأنها تمثل مواقع الجينات او مجموعة من الجينات.

تمكن بينتر Painter 1933 من مشاهدة أنماط حزمية Banding patterns في الكروموسومات العملاقة Giant chromosomes للغدد اللعابية لحشرة الدروسوفيلا والتي ظهرت دراستها باستعمال تقنيات التحزم Banding techniques كمناطق مصبوغة وأخرى غير مصبوغة وبأبعاد مختلفة يطلق عليها اسم الحزم Bands وبين الحزم interpands والتي تظهر على الأمتداد الطولي للكروموسومات. أن الحزم المصبوغة (الداكنة) تمثل مناطق الكروماتين المتباين، تحتوي على تواليات مكررة وهي مناطق غير فعالة وراثيا، في حين ان الحزم غير المصبوغة (المضيئة) تمثل الكروماتين الحقيقي تحتوي على نسخة مفرد من الدنا DNA ذات فعالية ورائية.

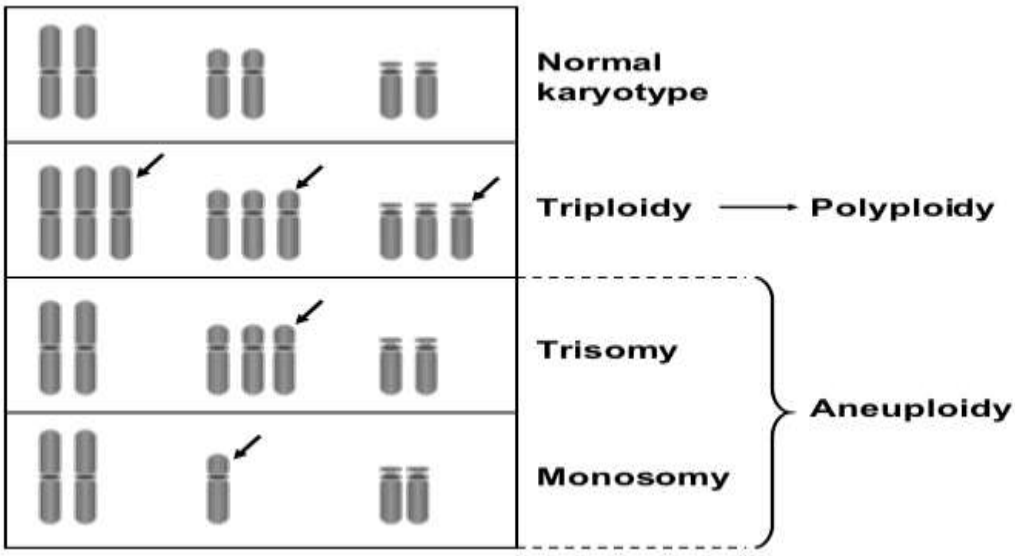
في حين، أستخدمت كلمة Karyotype الهيئة الكروموسومية لأول مرة عام 1936 من قبل دارلكتون Darlington، ثم أستعملت الكلمة بعد ذلك بشكل واسع من قبل Mather عام 1949 وعرفت من قبله كفرع مميز عن علم الخلية بأنها العلم الذي يهتم بدراسة أو وصف النواة من ناحية عدد وحجم وشكل كروموسوماتها التي تظهر في مرحلة الطور الأستوائي Metaphase أثناء انقسام الخلية.

أن الهيئة الكروموسومية Karyotype مركبة من كلمتين لاتينية وهي Karyo وتعني النواة وبإضافة Type فتعني طراز أو نوع أوسمة النواة.

لقد أخذت الهيئة الكروموسومية دورا جيدا ومميزا وعلى نطاق واسع في الأبحاث الوراثية، أذ أعتمدت تقنيات التحزم لتشخيص وتمييز كل زوج كروموسومي في المجموعة الكروموسومية للكائن الحي، وأمكن تتبع مواقع الخلل الوراثي في الكروموسوم من خلال فحص ودراسة مواقع الحزم وعددها في كل كروموسوم ضمن المجموعة الكروموسومية الواحدة بل وحتى أجزاء من الكروموسومات من ناحية التشابه في الحجم والتركيب لجينها وأصبحت أمكانية تمثليها من الحقائق العلمية.



أن تطور الهيئة الكروموسومية أخذ بعدا واسعاً من خلال الحاجة لمعرفة التحورات التركيبية الكروموسومية التي تشمل الداخلية (داخل الكروموسوم) كالانقلاب والإزالة والتضاعف وأنقسام القطعة المركزية والاندماجيات والتغيرات الناتجة بسبب التضاعف الكروموسومي Polyploidy او النقص الكروموسومي Aneuploidy او التغيرات بين الكروموسومات كالانتقال Translocation والتبادل بل وحتى التشوهات والاضطرابات الكروموسومية العددية والتركيبية الناتجة من الطفرات التي تتعرض لها الخلايا (وراثية وبيئية).



الجينوم النووي لخلايا حقيقية النواة دائما منقسم الى سلسلة من الجزيئات الدنا DNA الخيطية Linear (DNA molecules) والتي تتوزع على عدد من الكروموسومات، أضافة الى أن خلايا حقيقية النواة تحتوي على جينوم ثاني Second genome في المايتوكوندريا Mitochondrial genome موجود كجزيئة حلقية من الدنا Circular DNA molecule وفي النبات والكائنات التركيب الضوئي تحتوي على جينوم ثالث ممثل كذلك بجزيئة حلقية من الدنا DNA في البلاستيدات الخضرChloroplast

جينوم خلايا حقيقية النواة متماثل لمختلف الأنواع Species، لكن حجم الجينوم يختلف فهو يتراوح مابين Mb10 في الفطرياتFungi الى أكثر من mb100000 في بعض النباتات الزهرية. كذلك يختلف في عدد الكروموسومات لكل جينوم (من 2 الى مئات)، وكذلك عدد الجينات ضمن الجينوم يتباين ولكن ليس له علاقة بعدد الكروموسومات.

وللمقارنة ما بين جينوم بدائية وحقيقية النواة

1- كثافة الجين Gene density: كثافة الجين في البكتريا القولون تكون عالية جدا، اذ يوجد جين واحد لكل كيلو قاعدة من الدنا DNA وكذلك *Mycoplasma genitaling* له صيغة كروموسومية صغيرة mb 58 .0 تحتوي على 503 جين وكثافة الجين متماثلة لما موجود في البكتريا، وقد وجد نسبة عالية من الدنا DNA تقريبا (90- 85%) تعمل تشفير (تترجم الى بروتينات). وللمقارنة منطقة بطول 50kb الكروموسوم III من جينوم الخميرة تحتوي على أكثر من 20 جين وكمية قليلة من الدنا DNA عالية التكرار، بينما قطعة بنفس الطول من جينوم الإنسان من كروموسوم 16 تحتوي على 6 جينات، وبنفس المسافة لجينوم الذرة *Zea mays* تحتوي على جين محاط بتسلسلات من الدنا DNA عالية التكرار وجينوم النيماتودا يحتوي علىMb97 والدنا DNA ينتظم في 6 كروموسومات تحتوي على 20000 جين (099 .19) التي تشفر الى البروتينات، كثافة الجين أكثر من الخميرة بثلاث مرات و8 مرات أكثر من DNA، ومعدل الكثافة تساوي جين واحد لكل kb5 وحوالي النصف. في جينوم النيماتودا الذي يتضمن فسحات داخلية من الدنا DNA أذ يمتلك أجزاء عالية التكرار مثلATAT من عشر الى مئات المرات.

2 - وجود الأنترونات Introns جينوم البكتريا لا يحتوي على أنترونات، بينما كامل جينوم الخميرة، يحتوي على 239 انترون، في حين يوجد في جين مفرد من جينوم الأنسان أكثر من 100 أنترون.

3-سلسلة التواليات المتكررة (التكرارية او الحافل بالتكرار) Repetitive sequences نبات مثل الذرة Maize التواليات التكرارية ميزة سائدة في الجينوم تحتوي على Mb 2500 من الدنا DNA وتكون حافلة

بالتكرار DNA، بعض التواليات توجد بنسخة واحدة Single copye، في بعض التواليات تظهر بتكرار متوسط Middle repeat. sequences ، وبعضها الأخر بتكرار عالHigh repeat sequences أختلاف التوزيع التكراري للتواليات تختلف من كائن حي الى أخر، وجود الأنترونات وأتساع التسلسلات DNA الحافلة بالتكرار أسباب رئيسية لتباين الواسع الحجم الجينوم في خلايا حقيقية النواة.

المظهر الخارجي

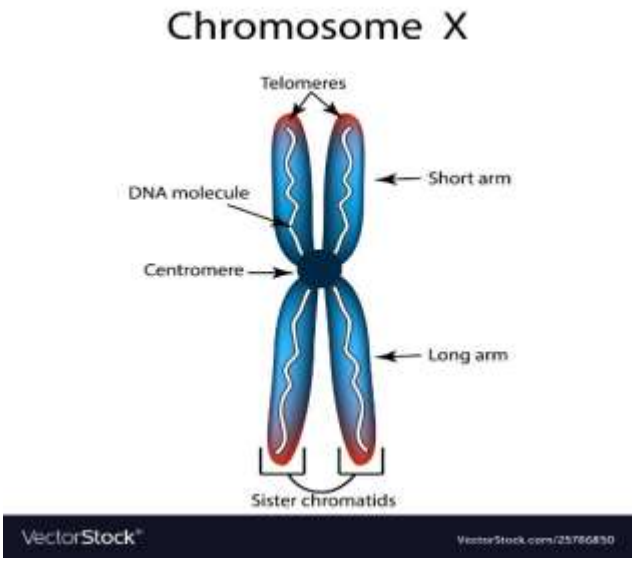
يتغير شكل الكروموسوم في طوله وحجمه خلال دورة حياة الخلية وأن أفضل مرحلة لدراسة الهيئة الكروموسومية هي مرحلة الطور الأستوائي والأنفصالي من الأنقسام الخلوي أذ تظهر بهيئة تراكيب شبه أسطوانية تتلون بشدة بالصبغات القاعدية كصبغة فولكن.

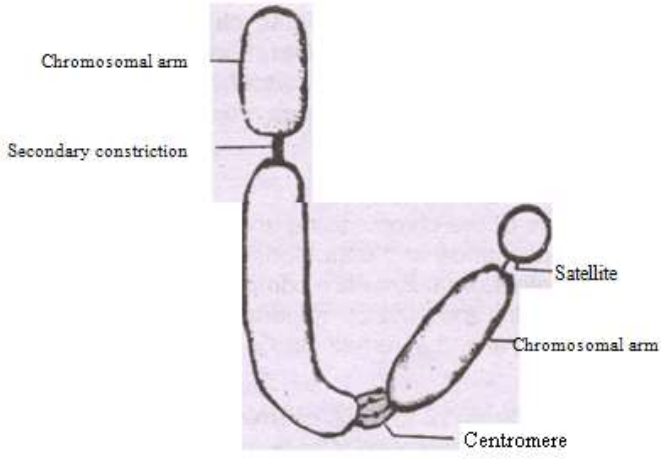
يتكون كل كروموسوم من قطعتين كل قطعة يطلق عليها كروماتيد Chromatid مرتبطان بواسطة تخصرConstriction ويمكن تميز نوعين من التخصرات في الكروموسومات:

1 - التخصر الأبتدائي Primary constriction أو القطعة المركزية Centromere (Kinetochore).

2 - التخصر الثانوي Secondary constriction له علاقة بتنظيم النوية.

تمثل القطعة المركزية منطقة متخصصة لها علاقة بأنقسام الخلية وتعتبر منطقة غير كروماتينية اذ يلاحظ فيها خيطان رفيعان يمثلان الكروموميات، أما في وسطه فقد يكون جسم كروي أوأثنان أو أكثر.





Morphological features of a typical metaphase chromosome

تلعب القطعة المركزية دورا مهما أثناء الأنقسام الخلوي أن تتصل بها ألياف المغزل وتمثل منطقة انثناء الكروموسومات الطور الأستوئي، ويمكن تصنيف الكروموسومات على أساس موقع القطعة المركزية الى أربعة أنواع وهي:

1- **كروموسومات متساوية الأذرع Metacentric**: موقع القطعة المركزة وسطي فيأخذ شكل (V) أثناء الطور الأنفصالي.

2- **كروموسومات غير متساوية الأذرع Submetacentric** : موقع القطعة المركزية قريب من أحد الأطراف فياخذ شكل حرف(ل) لان القطعة المركزية غير وسطية الموقع.

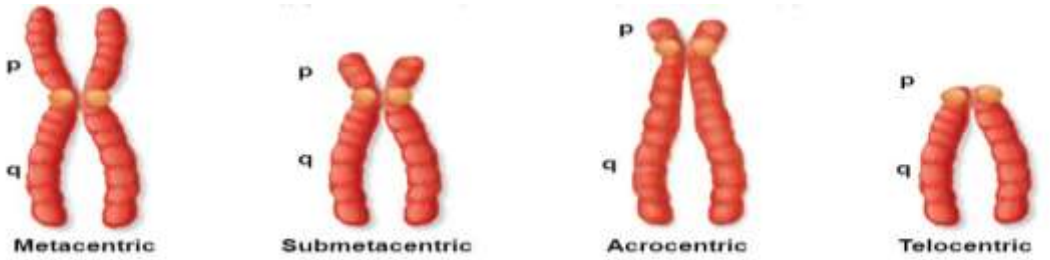
3- **كروموسومات طرفية الموقع Telocentric**: موقع القطعة المركزية طريف

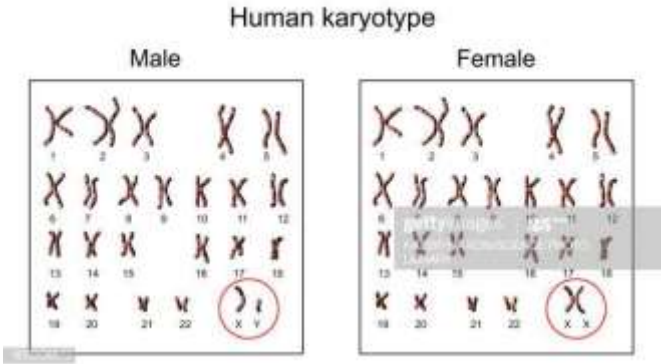
4- **كرموسومات شبه الطرفية Subtelocentric** : يكون موقع القطعة المركزية قريب من الطرف النهائي لأحد الأذرع وقد يحتوي هذا النوع قطعة صغيرة متصلة في القمة تسمي تابع Satellie

يمكن، تميز الكروموسومات ضمن المجموعة الكروموسومية الكاملة الواحدة على أساس موقع، القطعة المركزية من خلال استخراج دليل القطعة المركزية Centromeric index والذي يمثل:

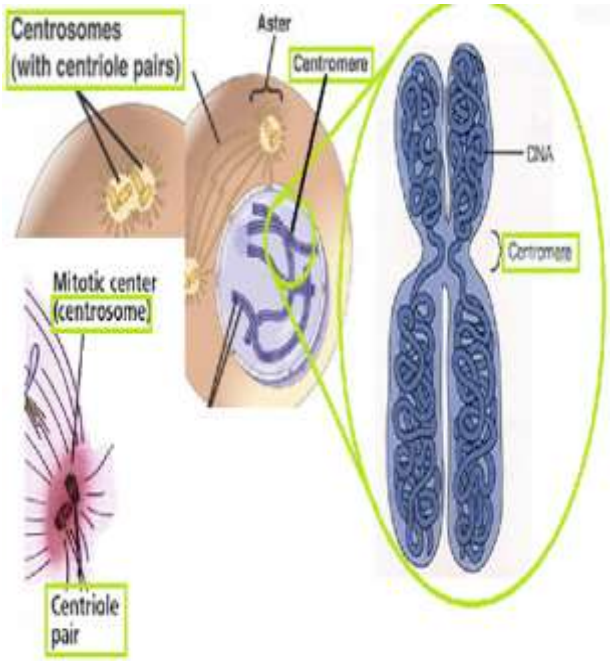
دليل القطعة المركزية (C.I) = طول القطعة المركزية / الطول الكلي للكروموسوم

توجد الكروموسومات في الخلايا الجسمية بهيئة أزواج ثنائية المجموعة الكروموسومية وأحدة تأتي من الأم والأخرى تأتي من الأب، وليس هناك علاقة بين عدد الكروموسومات ودرجة تطور الكائن الحي.





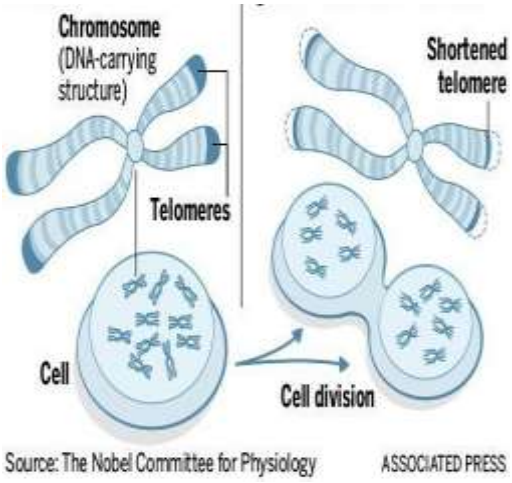
القطعة المركزية Centromere



هي عبارة عن تخصر مميز لكل كروموسوم ترتبط حركة الكروموسوم بها من خلال أتصالها بألياف المغزل Spindle fiber اذ تتصل بها الكرومانيدات الشقيقة لكل كروموسوم. أما الكروموسومات التي تفتقر لها تفقد التوجه الى الأقطاب وتفقد بالنهاية في السايتوبلازم تتكون هذه القطعة من مادة غير كروماتينية Achromatic يلاحظ فيها خيطان رفيعان يمثلان الكروموتيمات وجسم كروي Spherule بمكن أن تكون هذه المنطقة مركز لنشوء بروتين Tubulin التيوبيولين الخاص بالنبيبات الدفيقة ولهذا تعتبر القطعة المركزية أحد العناصر الرئيسية في انقسام وحركة كروموسومات الخلايا. تكون القطعة المركزية متماثلة لجميع الكائنات عالية التكرار فمثلا في كرموسومات الخميرة مؤلفة من bp225 زوج اعدي غنية ب A -T تشكل حوالي 95%).

القطعة الصرفية Telomere

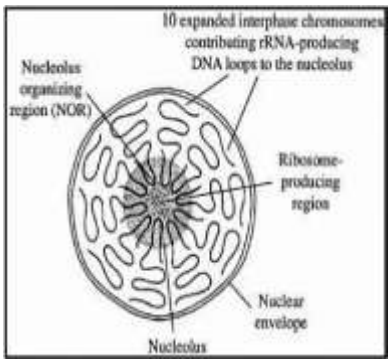
نهايات الكروموسوم تمتلك خاصية فريدة تمنع اندماج او التصاق بقطع كروموسومية أخرى، تقع القطعة الطرفية في نهايات الكروموسومات حقيقية النواة. تلعب دورا مهما اثناء تضاعف الكروموسومات والمحافظة على وحدته التركيبية. تحتوي هذه على تسلسلات من الدنا DNA مماثلة لمعظم الكروموسومات والتي تكون عالية التكرار وهي من بقايا قاعدة الكوانين. في الإنسان وبعض اللبائن تكون بشكل AGGGTT، وفي الأبتدائيات تكون (GGGGTT، وفي الأنسان GGGATT هذه التسلسلات تتضاعف مئات او الاف المرات كليو قاعدة طولا، وفي الفار (25- 50kb) وهذه التسلسلات المتكررة تمنع التصاق النهايات الكروموسومية الطبيعية مع بعضها، أن النهايات الكروموسومية تكون على نوعين.



1- **تواليات الدنا الطرفية Telomeres DNA sequences** تقع في نهايات الكروموسومية تمنع التصاق الكروموسومات مع بعضها.

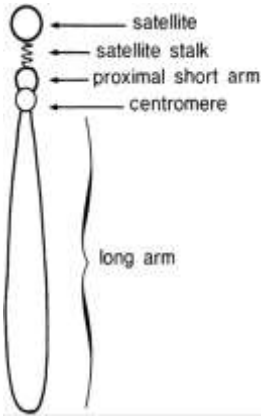
2 - **تواليات مصاحبة للنهايات الطرفية Telomere associated sequences** توجد. ضمن اللمة الطرفية بقائها غير معروف.

منطقة تنظيم النوية Nucleolar Organizing Region(NOR)



تنشأ التخصرات الثانوية في بعض الكروموسومات أثناء الطور الأستوائيMetaphase نتيجة لتكوينها القوية والمعروف ان النوية تصغر وتتضائل بالحجم خلال الطور التمهيدي وتنفصل عن الكروموسوم وتضمحل بالسايتوبلازم ويبقى موقعها على الكروموسوم مميز وتظهر النوية ثانية عند المنطقة ذاتها على الكروموسوم أثناء أعادة تنظيم النواة في الطور النهائيTelophase يوجد في كل مجموعة كروموسومية زوج من الكروموسومات على الأقل مسؤول عن تنظيم وبناء النوية ويمتلك هذا الجزء جينات تسيطر على بناء الحامض النووي rRNA المتواجد بصورة خاصة في النوية.

التابع Satellite



تركيب كروي او مستدير يتصل بالكروموسوم او بعض الكروموسومات بواسطة خيط نحيف من الكروماتين وهوعلامة مميزة في الجزء الطرفي للذراع قد يكون التابع بنفس قطر الكروموسوم او أصغر منه والكروموسوم الذي يمتلك التابع يطلق عليه كروموسوم ذي اتابع Satellited chromosome في الأنسان الكرموسومات التي تكون ارقامها (22 , 21 , 15 , 14 , 13) تمتلك كل منها تابع

يطلق على المحتوى الوراثي او الجينوم في الخلايا حقيقية النواة أسم الكروماتين Chromatin والذي يمثل كل من DNA والبروتينات النووية Nucleoproteins او البروتينات الكروموسومية والذي يظهر بشكل ليف.

تتألف البروتينات النووية من:

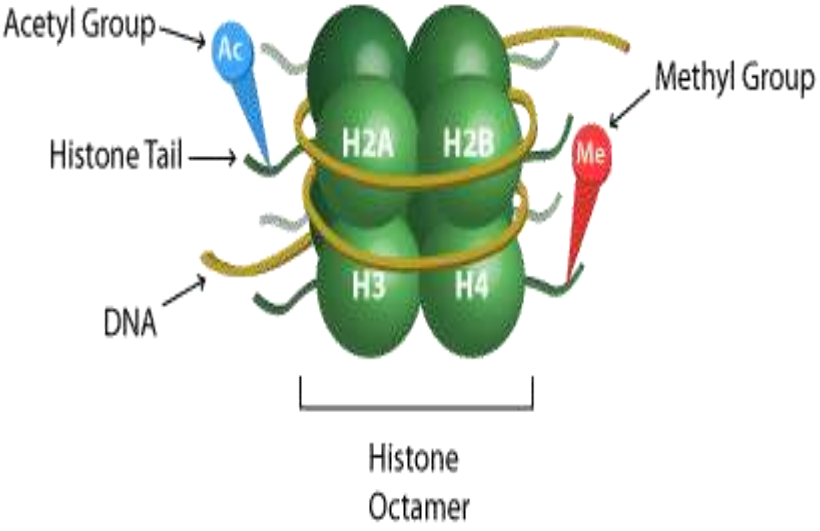
أ- بروتينات قاعدية ذات شحنة موجبة واس هيدروجيني متعادل تعرف بالهستونات Histones وهذه تعتبر من أهم البروتينات الكروموسومية والتي تحتوي على نسبة عالية من الحوامض الأمينية Arginine وLysine والتي ترتبط بسهولة مع الشحنة السالبة المجموعة الفوسفات PO4 لجزيئة .DNAكما تلعب دورا مهما في ترزيم (ضغط) الحامض النووي في أقل من حجم نواة الخلية فمثلا بقدر الطول الكلي لدناDNA في خلية الأنسان تقريبا ب2 م، بينما هذا الدنا DNA بنضغط في النواة ضمن قطر لا يتجاوز مابين 10 - 5 ملي مايكرون. أن هذا التنظيم في بعض جوانبة غير معروف لحد الأن.

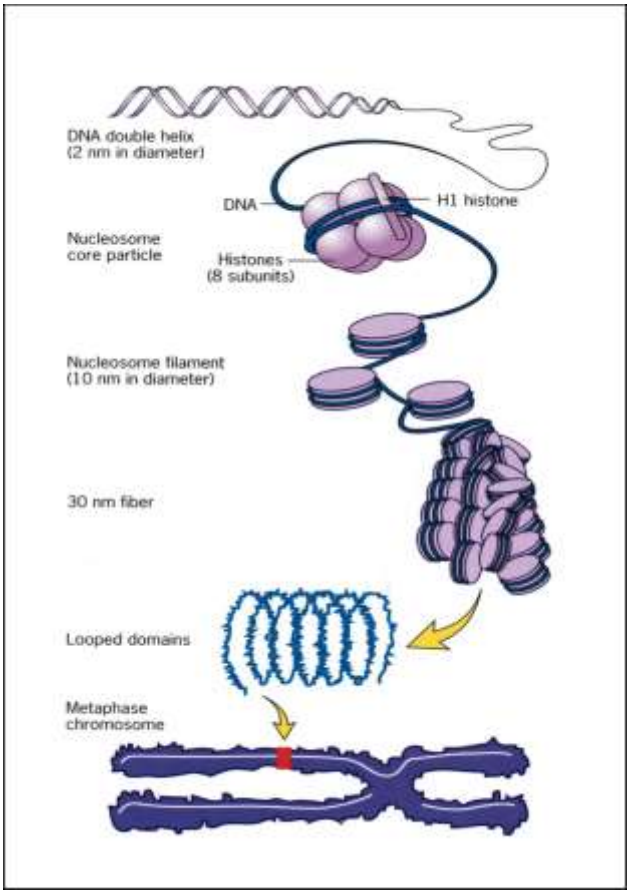
يوجد خمسة أنواع رئيسية من الهستونات في خلايا حقيقية النواة يطلق عليها **H2B, H2A, H3, H4،H1** ، والتي تظهر تشابه في كمياتها لمختلف أنواع خلايا حقيقية النواة .

ب - أضافة الى البروتينات الهستونية يحتوي الكروماتين على كتلة متساوية تقريبا من البروتينات، اللاهستونية Non - histone proteins والتي هي أكثر من مائة نوع مختلف والتي تشمل مجموعة واسعة من الفعالية تلعب دورا مهما في تضاعف الدنا DNA (DNA replication)، والتعبير الجيني .Gene expression

أن الأساس التركيبي لوحدات الكروماتين هي النيوكليوسوم Nucleosome والتي وصفت من دل كورنبرك Roger Kornberg عام 1974. من خلال تجربتين اولهما باستعمال انزيم Micrococcal nuclease الذي يجزىء الدنا DNA أذ وجد انه يمنع أجزاء من الد ا DNA بأطوال 200 زوج قاعدي وأحجام متساوية.

الكروماتين يتكاثف خلال دورة حياة الخلية في مرحلة Interphaseعدم أنقسام الخلية جميع الكروماتين يطلق علية الكروماتين الحقيقي ويتوزع خلال النواة. خلال دورة الخلية يظهر في ألياف حجم nm30 ليعطي عروات كبيرة looped domains تحتوي ما بين 50-100 كليو قاعدة من الدنا DNA تقريبا تشكل حوالي 10%من الكروماتين الحقيقي والتي تحتوي على الجينات الفعالة في عملية الأستنساخ (تكوين mRNA)، أما الكروماتين الأخر يدعى بالكروماتين المتباين والذي يكون عال التكاثف والتجمع والذي يكون غير فعال ويحتوي على تسلسلات عالية التكرار يوجد في مناطق القطع المركزية والقطع الطرفية لنهايات الكروموسومات وقطع ما بين الكروماتين الحقيقي.


Acetyl Group
Ac
Histone Tail
H2A
H2B
Me
Methyl Group
DNA
H3
H4
Histone
Octamer


DNA double helix
(2 nm in diameter)
DNA
H1 histone
Nucleosome
core particle
Histones
(8 subunits)
Nucleosome filament
(10 nm in diameter)
30 nm fiber
Looped domains
Metaphase
chromosome

الجينوم Genome

الجينوم مصطلح جديد في علم الوراثة يجمع بين جزئيين من كلمتين هما Gen الاحرف الثلاثة الأولى من كلمة Geneالتي تعني الجين المورث والجزء الثاني هو الاحرف، الثلاثة الأخيرة من كلمة chromosomeكروموسوم وهي ome.

الجينوم يمثل الطراز الجيني Genotype للكائن الحي بكل ما يحتويه من العوامل الوراثية المتأتية من الأبوين (العوامل السائدة والمتنحية)، ويُمثل الجينوم او المحتوى الوراثي للكائن الحي بنصف العدد الأصلي من الكروموسومات الموجودة في الخلية الجسمية.

أما للإنسان يقصد بالجينوم البشري تلك الخريطة التشريحية توضح توزيع الجينات او حاملات الصفات الوراثية في الأنسان داخل الخلايا البشرية اي توزيع تلك الصفات وعوامل الاستعداد للأمراض المختلفة وغيرها وحتى السلوك اليومي.

لقد قدرت الجينات ما بين 50-100 ألف جين ضمن مشروع الجينوم البشري Human Genome Project والتي تساوي حوالي 3 بليون قاعدة نيتروجينية علما ان هناك 30 الف جين فكت رموزها.

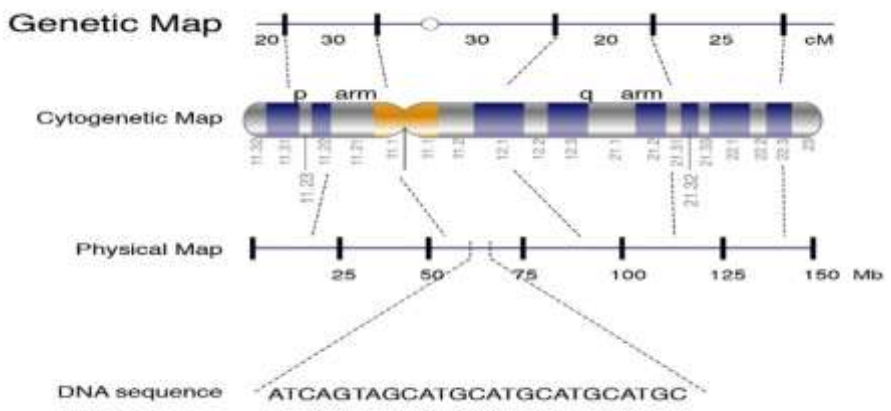
جميع الكائنات الحية لها مادة وراثية منتظمة في تركيب الكروموسومات، والتي لها فائدة كبيرة من ناحية التطور أذ لا فائدة من وجود المادة الوراثية بشكل عدد كبير من الجينات مستقلة ومبعثرة في الخلية، الكروموسومات تمثل الأسلوب الأفضل الذي بواسطته تستطيع الخلية من ضم الجينات ثم توريثها الى الخلايا الجديدة أن انتظام الجينات في الكروموسومات يجعل مشكلة التوريث الدقيق للصفات أكثر سهولة، يكون تنظيم المادة الوراثية لخلايا حقيقية النواة أكثر تعقيدا مما هو عليه في بدائية النواة ولكن الدنا DNA في كلاهما متماثل فهو عبارة عن متعدد النيوكليوتيدات Polynucleotides (النيوكليوتيدة الواحدة مؤلفة من قاعدة نيتروجينية Nitrogenous base+ سكر خماسي الكربون منقوص الأوكسجين Deoxyribose + مجموعة فوسفاتPhosphate).

بدأت عملية تمثيل جينات الخريطة الجينية Genetic map في الكائنات المختبرية في السنوات المبكرة من القرن العشرين وخلالها توسعت لتشمل العديد من الكائنات الحية مثل الدروسوفيلا، الذرة، الفأر، البكتريا، الخمائر.

هذه الدراسات أخذت مسلكين: -

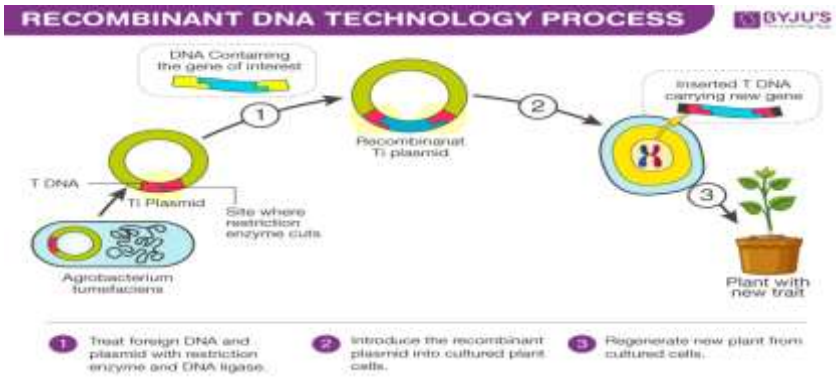
المسلك الأول اهتم الباحثون بالطفرات الذاتية Spontaneous mutations لهذه الكائنات والضروب الطافرة لها والناتجة من خلال المواد الكيميائية والفيزيائية.

اما **المسلك الثاني** تم خلاله وضع الخرائط الوراثية Genetic maps من خلال تحليل الارتباط linkage analysis لبعض الكائنات الحية مثل الدروسوفيلا، هذه التجارب استمرت ما يقارب 70-90 سنة الماضية وكانت تهدف لتمثيل الجينات في الجينوم، لكنها واجهت بعض الصعوبات منها أن الكثير من الطفرات كانت ذات طراز مظهري مميت Lethal phenotype أو غير واضحة.



شكل يوضح الخارطة الجينية

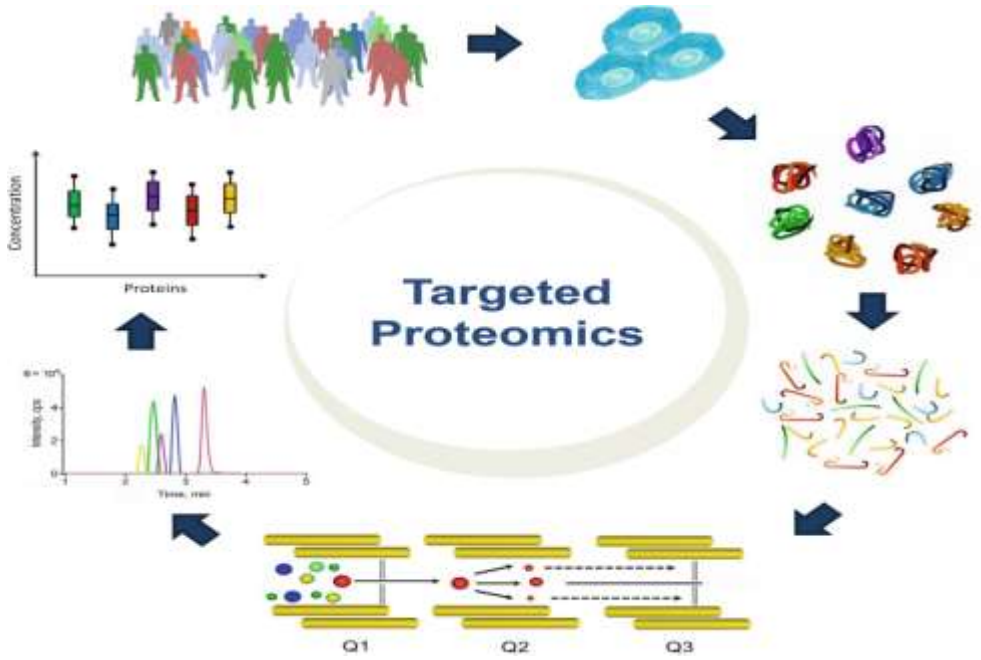
وفي منتصف الثمانيات بدأت الدراسات تعتمد على عمليات التطفير لوضع الخرائط الوراثية من خلال الارتباط وبدأت الاعتماد على تقنيات التشكيلات الدنا Recombinant DNA (Technology) التي اعتبرت **المسلك الثالث** في التحليلات الوراثية، هذه التقنية تعتمد على التجميع الكلوني للجين، كلونة وتجميع قطع من الدنا DNA مع بعضها في مجموعات متداخلة ومن خلالها يتم تقدير او رسم الخرائط الوراثية والفيزيائية لمجموعة كاملة من المحتوى الوراثي.



شكل يوضح Recombinant DNA في الكائنات الحية

الخطوة الأولى تشمل كلونة تتابع معين مع جميع الجينات التي تمثل المحتوى الوراثي من خلال تتابع نيوكليوتيدي Nucleotide sequences، هذه التقنية أوجدت طرائق يطلق عليها Genomics تهدف لوضع معلومات عن التتابع الوراثي لأي كائن حي لكي يتم خزنه وتحليله، فمثلا التتابع الجينومي للإنسان وجد انه يتكون من أكثر من 3 بليون نيوكليوتيدة. من نتائجها مشروع الجينوم البشري Human genome project(HGP) والذي يمثل تهجين تتابع لحوالي (3.2) بليون زوج قاعدي ل Haploid human genome ويشمل تمثيل الجينات في المحتوى الوراثي. في الولايات المتحدة مشروع خريطة وتتابع المحتوى الوراثي في الأنسان بدأ عام 1986-1988 في مركز الصحة العالمية، واتسع ليشمل في عام 1990 فرنسا وبريطانيا واليابان بمشاريع متماثلة. استخدمت في البداية عدد من الكائنات الحية بدائية وحقيقية النواة مثل بكتريا القولون، الخميرة، النيماتودا، حشرة الدروسوفيلا والفأر.

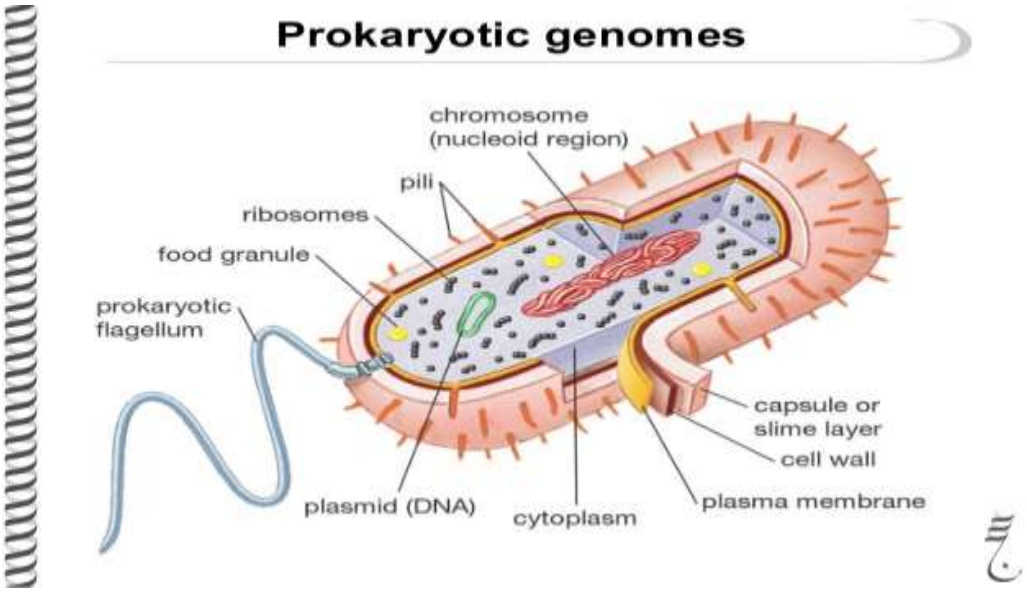
كانت تهدف لمعرفة عدد الجينات وتوزيعها وتحديد عدد الجينات الضرورية للحياة ولربما التطور الجيني العائلي .Gene families في حين يطلق Proteomics على دراسة وتحليل البروتينات التي تنتجها الخلية والجزيئات المرتبطة بها ذات الأدوار الجوهرية بالنسبة للكائن الحي، أي دراسة البروتينات المشفرة من خلال المحتوى الوراثي (يشمل مجموعة من الجينات العابرة من خلال البروتينات) وتشمل نوع البروتين والتحويرات الحاصلة بعد الترجمة، وكذلك تشمل وظيفة البروتينات المشفرة ومواقع وجودها لمختلف التنظيم الخلوي.



شكل يوضح الية Proteomics

الجينوم في خلايا بدائية النواة Genome in prokaryotic cells

المادة الوراثية او الجينوم في خلايا بدائية النواة تنتظم في كروموسوم واحد مفرد رئيسيmain chromosome يحتل منطقة شبيه بالنواة Nucleoid والذي يكون بهيئة جزيئة حلقية مزدوجة Circular DNA molecule من الدنا DNA كما في خلايا البكتريا Bacteria



شكل يوضح جينوم البكتريا

لا يمكن تعين بداية ونهاية لهذه الجزيئة، أضافة الى هذا الكروموسوم يوجد للخلايا البكتريا كروموسوم أو اكثر من الكروموسومات الثانوية الصغيرة minor تدعى بالبلازميد Plasmid الذي يشكل نسبة من 0.5 -2 % من الحجم الكلي لدنا DNA الخلية (يحتوي على 4-35 مايكروميتر من الحلزون ازدوج الدنا DNA بهيئة حلقة صغيرة)، أن المحتوى الوراثي لجزيئة البكتريا القولون: تأخذ صيغة الالتواء اللولبي فائق اللفSuper helical twist بدل المزدوج الدائري Circular duplex DNA لكي يشغل حجم صغيرة ضمن سايتوبلازم الخلية (طول الكروموسوم البكتريا يبلغ 1000 مرة تقريبا من طول الخلية نفسا) وله وزن جزيئي يبلغ $10x2.6^{9}$ دالتون Dalton، يبقى الكروموسوم في حالة التكاثف العالية ويقارب في حجمه حجم النيوكليوتيد داخل الكائن الحي يدعى هذا التركيب بالجينوم الملتف. Folded genome وهذا يعبر عن كروموسوم بكتريا القولون في حالة النشاط.

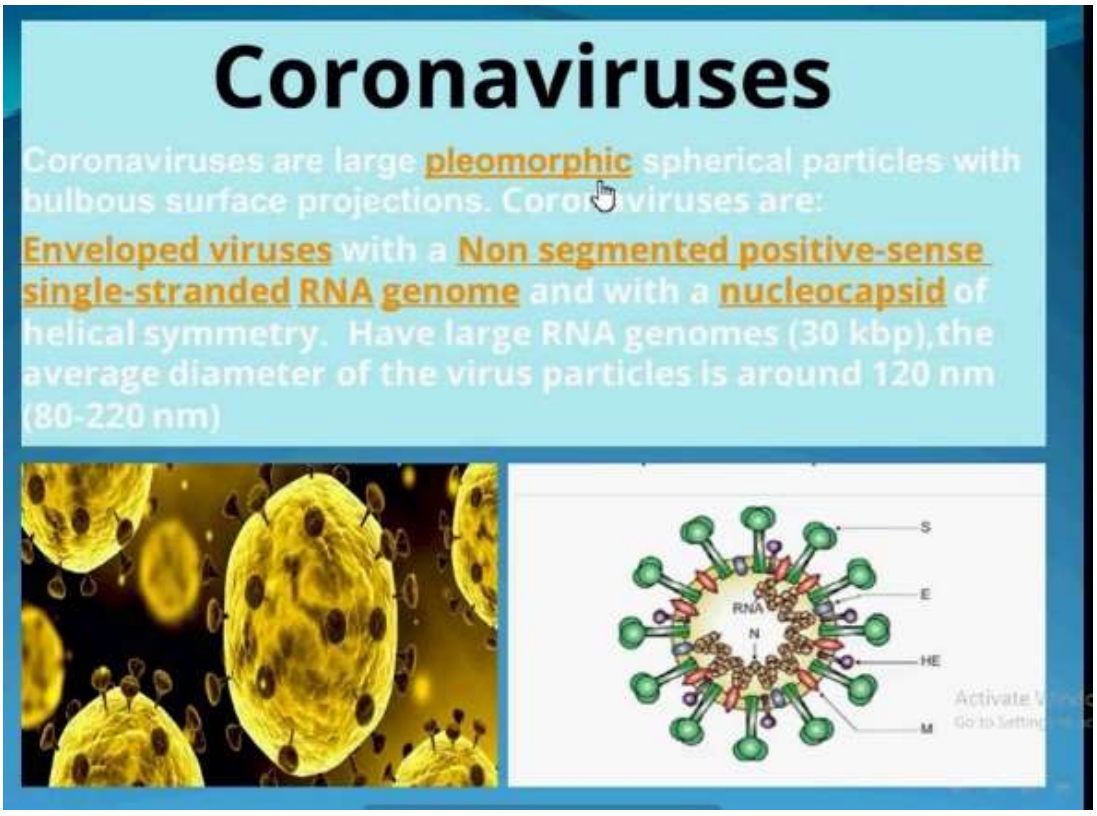
قد يأخذ المحتوى الوراثي بشكل جزيئة خيطية مفردة Linear DNA molecule كما في المايكوبلازمMycoplasma، الذي يمثل أصغر جينوم خلوي مكون من 580kb طولا والذي يعتبر أصغر مجموعة جينية تتطلب توفرها للتضاعف الذاتي العضوي، أن تحتوي على 470 تواليه تشفر لبروتينات والتي تمثل حوالي 80٪ من جينوم الدنا DNA وأغلبها تمثل جينات البروتينات التي تشترك في التضاعف والاستنساخ والترجمة والنقل عبر الغشاء، كما تحتوي على ـ عدد قليل من الجينات الأنزيمات الأيض، وتحتوي خلية المايكوبلازم على حوالي 150 جين غير معروفة الوظيفة.

شكل يمثل جينوم *Mycoplasma genitalium*

جينوم الفيروسات Viruses genome

جينوم الفيروسات يتكون من خيط مفرد او خيط مزدوج من الدنا DNA او الرنا RNA، خيط منفرد من الرنا RNA يمكن أن يكون من نوع الموجب Positive او السالب Negative جينوم الرنا RNA المزدوج عبارة عن جزيئة حلقية مفردة او جزيئة خيطية وكل قطعة عبارة عن جين مفرد.

مثلا فيروس Coronavirus مكون من خيط مفرد من الرنا RNA، الفيروس يقدر جينومه حوالي 30 kbp التي تصيب خلايا الجهاز التنفسي. بينما أكبر جينوم من الفيروسات ظهر في فيروس Poxviridae والتي تتكون من Kbp309.



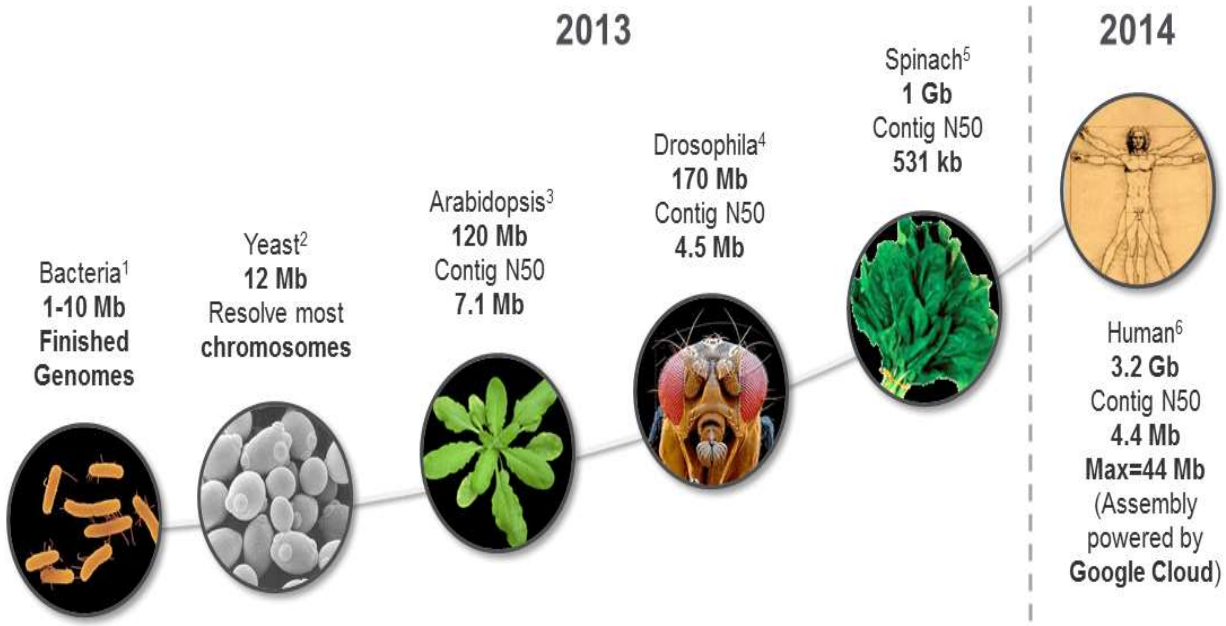
شكل يوضح فيروس Corona

الجينوم في خلايا حقيقية النواة Genome in eukaryotic cells

يكون تنظيم المادة الوراثية هنا أكثر تعقيدا مما هو عليه في بدائية النواة، وتتسم بتنظيم تركيبي محدد المعالم متخذا الصيغة المعروفة بالكروموسومات والتي تكون عبارة عن جزيئة خيطية من الدنا أذ تتوزع المادة الوراثية على مجموعة مميزة لكل كائن حي، اضافة الى الأختلاف في العدد والحجم للكروموسومات ما بين مختلف الأنواع (للكائنات الحية النباتية والحيوانية). في حين سجل أكبر عدد من الكروموسومات في المملكة النباتية بسبب وجود حالات متعدد الكروموسومات Polyploidy (يوجد بالخلايا أكثر من نسخة من العدد الثنائي المعروف) والتي يمكن ملاحظتها في البطاطا والقطن.

أن حجم الجينوم Genome size أو ما يعبر عنه أحيانا بقيمة C (C- Value) والتي يشير الى كمية الدنا DNA في نصف العدد الكامل هذه القيمة تقدر من خلالها كمية او العدد الكلي للأزواج القاعدية. وبشكل عام الكائنات الأكثر تعقيد تحتوي كمية أكبر من الدنا DNA مثال نصف العدد الكامل للإنسان تحتوي ما بين(2-3.12 giga bases) ، بينما النصف العدد الأصلي من الكروموسومات في الخميرة تحتوي على 14 مليون زوج قاعدي. جينوم حشرة الدروسوفيلا يحتوي على$1.65x10^8$ زوج قاعدي، تتوزع على أربعة كروموسومات تحوي 4000 جين، تم تعين موقعها من خلال التشكيلات الوراثية من مجموع 16000 ألف جين في المحتوى الوراثي لحشرة الدروسوفيلا والتي تمثل أبسط جينوم يدرس لسهولة تربية الحشرة في المختبرات ولوجود الكروموسومات العملاقة والموجودة في بعض الأنسجة مثل الغدد اللعابية لليرقات التي يصل طولها عدة مئات والتي تكون واضحة في المجهر الضوئي والتي تظهر بعد التصبيغ بشكل حزم، تم التعرف على أكثر من 500 حزمة واضحة والمشكلة من 20kb من الدنا .DNA

كما تمتلك بعض العضيات في خلايا حقيقة النواة مادة وراثية مثل المايتوكوندريا والبلاستيدات الخضر، جينوم المايتوكوندريا في الانسان تحتوي على 569.16bp، ينتج 13 بروتين وينتج 24 من الحامض النووي RNA، اما جينوم البلاستيدات الخضر يحتوي ما بين (100-200) كيلو قاعدة.



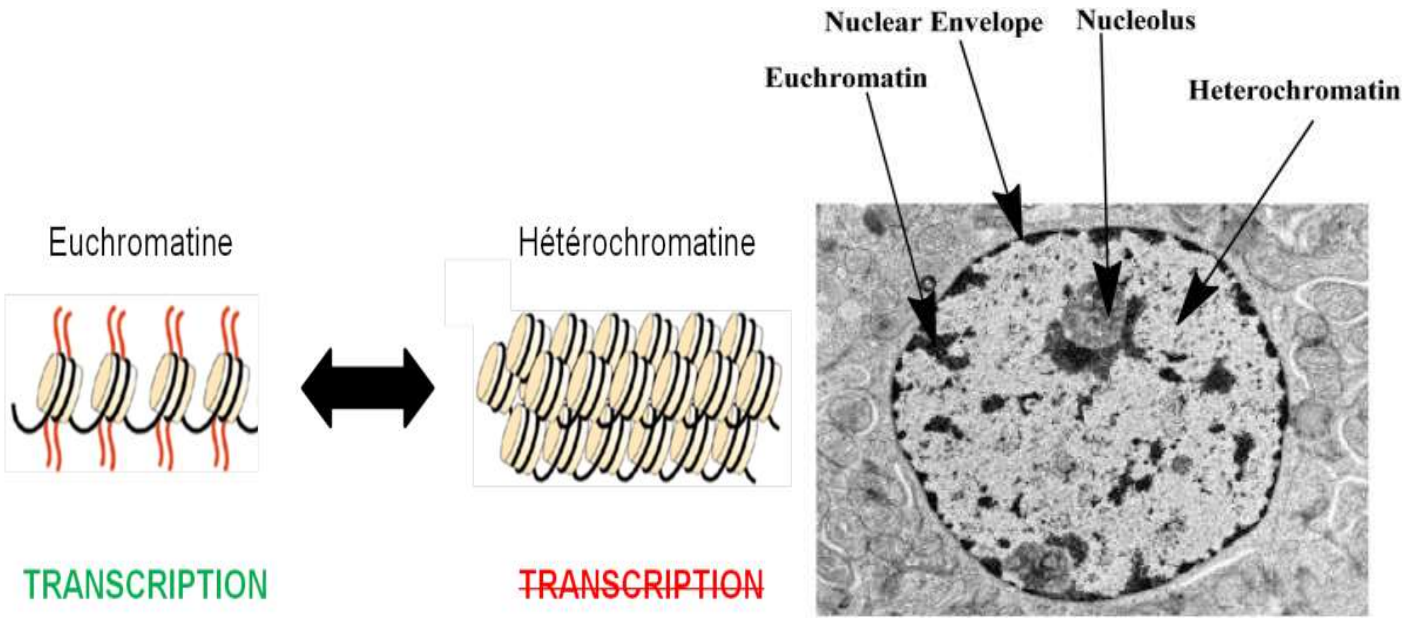
شكل يوضح حجم الجينوم في بعض الكائنات

أنواع الكروماتين

تكون المادة الوراثية النواة الطور البيني Interphase في حالة منتشرة على شكل شبكة من الألياف لا يمكن تميز الكروموسومات بشكل منفرد، يطلق عليها الشبكة الكروماتينية والتي تحتل مساحة واسعة من حجم النواة وقريبة من الغلاف النووي، ولكن في أطوار الأنقسام المختلفة وخاصة في الطور الأستوائي بعد تكاثف وفقدان الماء من قبل الكروموسومات بظهر الكروماتين (المادة الكروموسومية) على نوعين هما:

ا- الكروماتين الحقيقي Euchromatin

يمثل غالبية الكروماتين في الكروموسوم، يتميز ببقائه في حالة غير مكثفة أي مشتتة، يكون بقطر أقل من 300 أنكستروم، فعال وراثياً Active.



2- الكروماتين المتباين Heterochromatin

يكون في حالة تماس مع النوية ويتمركز بمنطقة تنظيم النوية على الكروموسومات التي تكون مسؤولة عن تنظيمها، كذلك يوجد في مناطق القطع المركزية Centromeres والقطع الطرفية Telomeres من الكروموسومات، يكون في حالة مكثفة، قطره أكثر من 300 أنكستروم، غير فعال وراثية Non - active هناك نوعين من هذا الكروماتين:

أ- الكروماتين المتباين التكويني Constitutive heterochromatin

يتميز هذا النوع من الكروماتين بكونه في حالة مكثفة، كما يتميز الدنا DNA الكروماتين المتباين التكويني بكونه غير فعال وراثية على طول الخطر (غير قادر على بناء الحامض النووي RNA) ، أفضل مثال عليه هو مناطق القطع المركزية والقطع الطرفية للكروموسومات وكذلك يتواجد على شكل أشرطة في بقية أجزاء الكروموسوم، لقد أمكن تشخيص بعض الجينات في الكروماتين التكويني والدنا التابع Satellite DNA منها منطقة تنظيم النويةNOR و يتميز هذا الكروماتين التضاعف المتأخر يكون حافل بالتكرار، يمكن اعتبار مواقعة كمراكز للعبور الوراثي Crossing over خلال الانقسام الأختزالي، او تعد كفواصل بين المناطق الفعالة وراثية ضمن الكروماتين الحقيقي لذا يعتقد بأن له علاقة مع تمايز الأنسجة لهذا يختلف في الموقع والكمية من نسيج الى أخر ولهذا يوجد في جميع الكروموسومات بكميات مختلفة.

ب – الكروماتين المتباين الأختياري Facuultative heterochromatin

عبارة عن نوع من الكروماتين غير دائمي، يتواجد بشكل كثيف في ظروف معينه وانه يمثل حالة فسلجية يتعرض لها الكروماتين فقط، وأحسن مثال على ذلك هي كروموسومات الجنس X – chromosomes التي يتألف فيها أحد زوجي الكروموسوم أما معظمة أو برمته من الكروماتين المتباين، عليه نجد بأن أناث الثديات يكون أحد زوجي كروموسوم الجنس فيها فعال وحقيقي الكروماتين، أما الأخر قد يكون غير فعال ومتباين الكروماتين ويمثل الكروماتين الجنسي او ما يسمى بالجسم العصوي (جسم بار) Barr body ويظهر الجسم العصوي بالنسبة للأنسان في اليوم الثاني عشر من بدء النمو الجنيني، أما قبل تلك الفترة فأن كلا كروموسومي الجنس تكون من الكروماتين الحقيقي، يعتقد بأنه يعمل بمثابة اسناد ميكانيكي لأنتاج الجرع التعويضية Dosage compensation

جدول مقارنة بين كروموسوم خلايا حقيقة النواة وبدائية النواة

	خلايا حقيقة النواة	خلايا بدائية النواة
1	يلتف الدنا DNA بشكل Nucleosomes	يكون الدنا بشكل مقاطعات Domains وبهيئة لفات فائقة
2	يحتوي على الكروماتين	لا يحتوي على كروماتين
3	يحتوي على الهستونات	لا يحتوي
4	يحتوي على عدد من نقاط التضاعف	يحتوي على نقطة واحدة لبداية التضاعف
5	الكروموسومات تحتوي على نهايات منتظمة	لا تحتوي على نهايات منتظمة
6	فيه اماكن Introns لا تترجم	لا توجد فيه Introns
7	التضاعف شبه محافظ وباتجاهين وبأكثر من نمط	التضاعف شبه محافظ وباتجاهين وبنمط واحد

الفائدة من دراسة الجينوم

سيتبع مشروع الجينوم البشري فوائد جمة للإنسان يمكن توقع بعضها بينما سنتفاجئ بالبعض الأخر، أما الفوائد المتوقعة للعلاج بالجينات فهائلة ويمكن تلخيصها في. المجالات التالية

تطوير أدوية ومعالجة بالإضافة الى صنع أدوية جديدة يمكن اعتبار مشروع الجينوم البشري كبداية لحقبة جديدة من الطب الشخصي Personalized medicine فالناس يميلون للاستجابة بصورة مختلفة تماما للأدوية التي يصفها لهم الأطباء حتى 50% من الأشخاص الذين يتناولون دواء معيناً سيجدون أنه أما غير مؤثر، أو أنهم سيتعرضون لتأثيرات جانبية غير مرغوب بها. أضافة لخسارة المال والوقت، بل انه يعرض الحياة ذاتها الى للخطر بالإضافة لذلك فنحن جميعا نختلف في قابليتنا للأصابة بالأمراض المختلفة، فبينما ينتهج رجل نمطا صحيا نسبيا للحياة قبل أن يسقط ضحية لنوبة قلبية في منتصف العمر، قد يظل صديقة الذي يدخن عشرين سيكارة يومية ويتناول أفطارا مقليا كل يوم قويا حتى بعد سن الثالثة والتسعين من العمر، لكن لماذا؟ يقع جزء من الأجابة في الجينوم البشري. وقد أتضح أن 9. 99 % من تواليات الدنا DNA متشابهه في جميع البشر، لكن الفرق الذي لا يزيد على1 .0% قد يفسر أختلاف : الأستجابة الفردية للأدوية وقابلية للأصابة بالأمراض..

أهداف مشروع الجينوم البشري:

1 - التعرف على المائة ألف جين في الدنا DNA الأنسان.

2 - تحديد تسلسل الثلاثة بلايين صيغة كيميائية للكروموسومات

3 - تخزين تلك المعلومات على قاعدة بيانات معلومات.

4 - تحويل تلك التقنيات الى القطاع الخاص للأستفادة منها.

5- متابعة الأصدارات التشريعية والتنظيمية والأجتماعية للمشروع.

في مجال الطب الجزيئي Molecular medicine

1- تحسين تشخيص الأمراض.
2- الأكتشاف المبكر للأستعداد للأصابة بالأمراض الوراثية.
3- تصميم الأدوية بحيث تكون أكثر ملاءمة.
4- المعالجة بالجينات وانظمة التحكم للدوية.
5- علم الأدوية الجينيPharmacogenomics تصميم أدوية لأمراض وراثية.

في مجال المايكروبية Microbial genomics

ا- مصادر جديدة لطاقة (الوقود الحيوي).

2 - مراقبة البيئة لاكتشاف الملوثات الخطرة على صحة الأنسان.

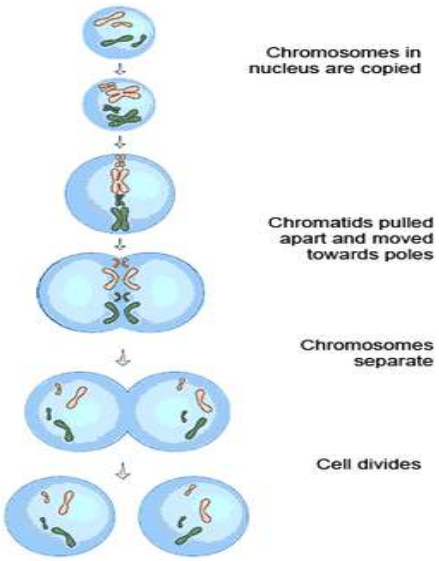
3 - الوقاية من الحرب البيولوجية والكيميائية.

4 - التخلص من النفايات السامة والخطرة بطرق مأمونة وفعالة.

تضاعف وبناء الحامض النووي DNA Replication & Synthesis DNA

سواء امتلكت الخلية كروموسوم مفرد كما في خلايا بدائية النواة Prokaryotic cells مثل البكتريا أو عدد من الكروموسومات كما في خلايا حقيقية النواة Eukaryotic cells يجب أن يتضاعف الجينوم Genome بدقة لمرة واحدة لكل انقسام خليوي والسؤال المطروح كيف يكون التضاعف مرتبطا بدورة الخلية هناك نقطتان يجب عندها مقارنة حالة التضاعف مع ظروف الخلية، يؤدي بدء التضاعف الى نقل الخلية الى انقسام أخر ومع ذلك فأن الخلية لا تبدو انقسامها مالم تكتمل عملية التضاعف. وعليه يعتبر أكمال التضاعف كمنبه للانقسام الخلوي وبعد ذلك ينعزل الجينوم المتضاعف بحيث يذهب كل واحد الى إحدى الخليتين البنوتين عن طريق الانقسام الاعتيادي (غير المباشر Mitosis) في خلايا حقيقية النواة وبواسطة بعض الأليات الأخرى في بدائيات النواة (البكتريا انقساما مباشرة وبسيطاً عن طريق الانشطار الثنائي).

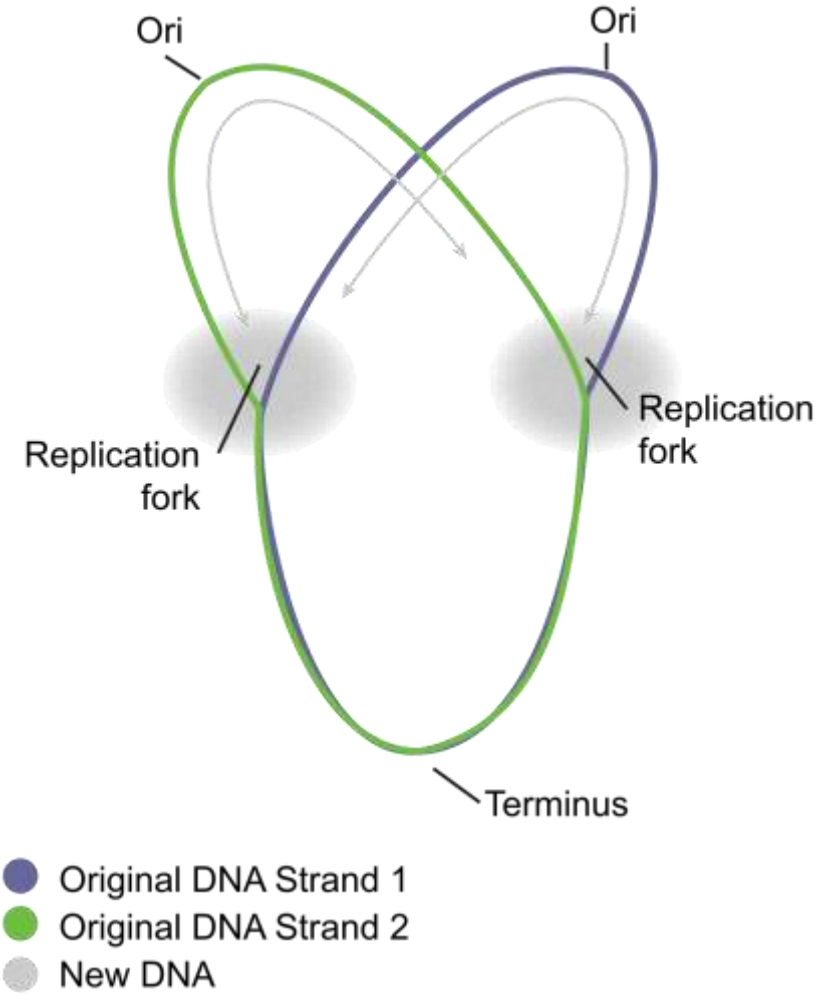
ويجب التذكير بان وحدة الانعزال في الكروموسوم هي الريبليكون، Replicon الذي يمثل الوحدة التي تسيطر بها الخلية على الأفعال الفردية للتضاعف وتثور كل ريبليكون مرة واحدة فقط في دورة الخلية. تعين الريبليكون بامتلاكها وحدات (أو عناصر) السيطرة المطلوبة لعملية التضاعف.



شكل الانقسام المباشر لخلية البكتريا

فهي تمتلك المنشأ Origin أو منشأ التضاعف الذي تبدأ عنده عملية التضاعف، كما تمتلك نهاية Terminus حيث تتوقف عندها التضاعف.

البكتريا مثلا تمتلك منطقة خاصة مفردة دائما يبدأ عندها التضاعف (تعتبر نقطة بداية التضاعف)، هذا الموقع في بكتريا القولون يطلق عليه Ori C مؤلف من تسع أزواج قاعدية 9bp تتضاعف أي سلسلة متصلة بالمنشأ (او بعبارة أدق غير مفصولة عن المنشأ بنهاية (Terminus كجزء من الريبليكون، وبالمعنى الوراثي يعتبر المنشأ Origin بأنه قادر فقط من التأثير على تلك الجزيئة من الدنا DNAالذي هو جزء منها فيزيائية.



شكل كروموسوم البكتريا يظهر نقطة المنشأ Origin اضافة الى شوكتي التضاعف

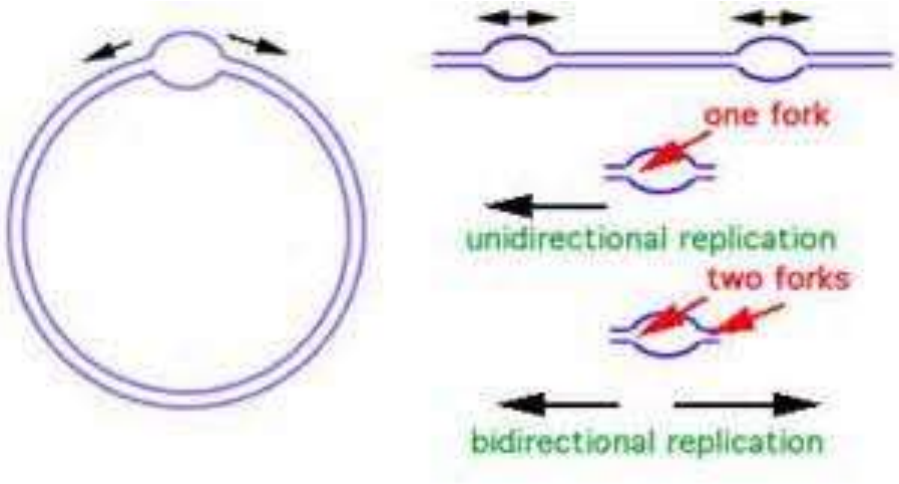
التضاعف في خلايا بدائية النواة

تتضاعف المادة الوراثية في بدائية النواة (تضاعف الدنا DNA في البكتريا) أذ يظهر الكروموسوم في البدايات الأولى قبل التضاعف كتركيب دائري (حلقة مفردة من جزيئة الدنا مزدوجة الخيط Double stranded ترتبط في نقطة واحدة بالغشاء البلازمي للخلية من الداخل)، وحال ابتداء عملية التضاعف فأنها تستمر لحين أكمال تضاعف كامل. تبدأ العملية بتحطيم الأواصر الهيدروجينية بين الأشرطة المتممة أذ يطلق على كل شريط بالقالب Template، ويتم أضافة النيوكليوتيدات المكملة لتكوين شريطين جديدين على طول كل من القالبين الأبويين من نقطة المنشأ، هنا يمكن تقسيم عملية التضاعف الى ثلاث مراحل وهي: -

1- مرحلة الابتداء Initiation

التضاعف يبدأ في موقع خاص من الدنا DNA يدعى المنشأ Origin ويرمز له Ori C. او منشأ التضاعف Origin of replication، هذا الموقع يحتوي على مجموعة من الأنزيمات تقدر بأكثر من (22) أنزيما مختلفة تعمل على تكوين نسخة كاملة مطابقة من جزيئة الدنا DNA.وهذا الموقع مؤلف من تواليات ثابتة في الدنا DNA لحوالي bp9 وهي TTATCCACA، والذي يعتبر موقع أبتداء التضاعف، أذ يرتبط مع ناتج الجين Dna A dna (A).

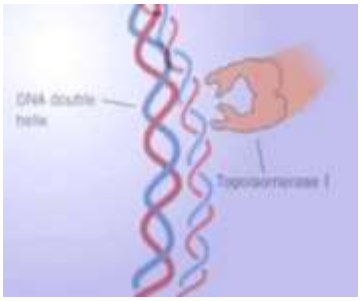
وبمجرد بدأ عملية التكرار تنفصل سلسلتي متعدد النيوكليونيدات لدنا DNA الكروموسوم البكتري، أذ تعمل كل منها كشريط قالبTemplate strand للشريط الجديد. ومن موقع الأبتداء المنشأ (Originتتشكل شوكتي التكرار Replication fork على شكل حرف Y، ثم تتحرك كلا شوكتي التضاعف بعيدا عن المنشأ وبكلا الأتجاهين.



شكل شوكتي التضاعف في كروموسوم البكتريا.

ترتبط الشوكة مع مجموعة من البروتينات المعقدة تمنع الشريطين من الألتصاق مؤلفة من أنزيمات يطلق عليها و.Topoisomerases II تنفتح الأشرطة الأصلية بعد تكسير الأواصر الهيدروجينية بصورة تدريجية ويبدأ تصنيع أشرطة جديدة في وقت حدوث الأنفصال.

أن عملية الأبتداء تحتاج الى نواتج ثلاث جينات على الأقل وهي dna A (Dna A) يقع بالقرب من منشأ التكرار و D - dna C-D وdna B الأخير تشفر أنزيم Helicase الذي يعمل على تفكيك الدنا DNA اعتمادا على مصدر طاقة (ATP - dependent ATP (unwindingويشجع على انفصال الشريطيين الأبويين ويعين شوكة التضاعف Replication Fork التي تتحرك تدريجيا بعيدة عن نقطة المنشا.Origin حيث يثبت الشريطين المفردين الواقعين خلف شوكة التضاعف من خلال مجموعة من البروتينات غير المستقرة المتحلزنة



I و Topoisomerases II انزيمات تعمل على تهأيت اللف الفائق عن طريق ارتباطها بالحلزون ذى الف الفائق الزائل كاسراً أحد شريطين وعاملا على دورانه من خلال الشريط المكسور بعد ذلك يحرر الكسر.

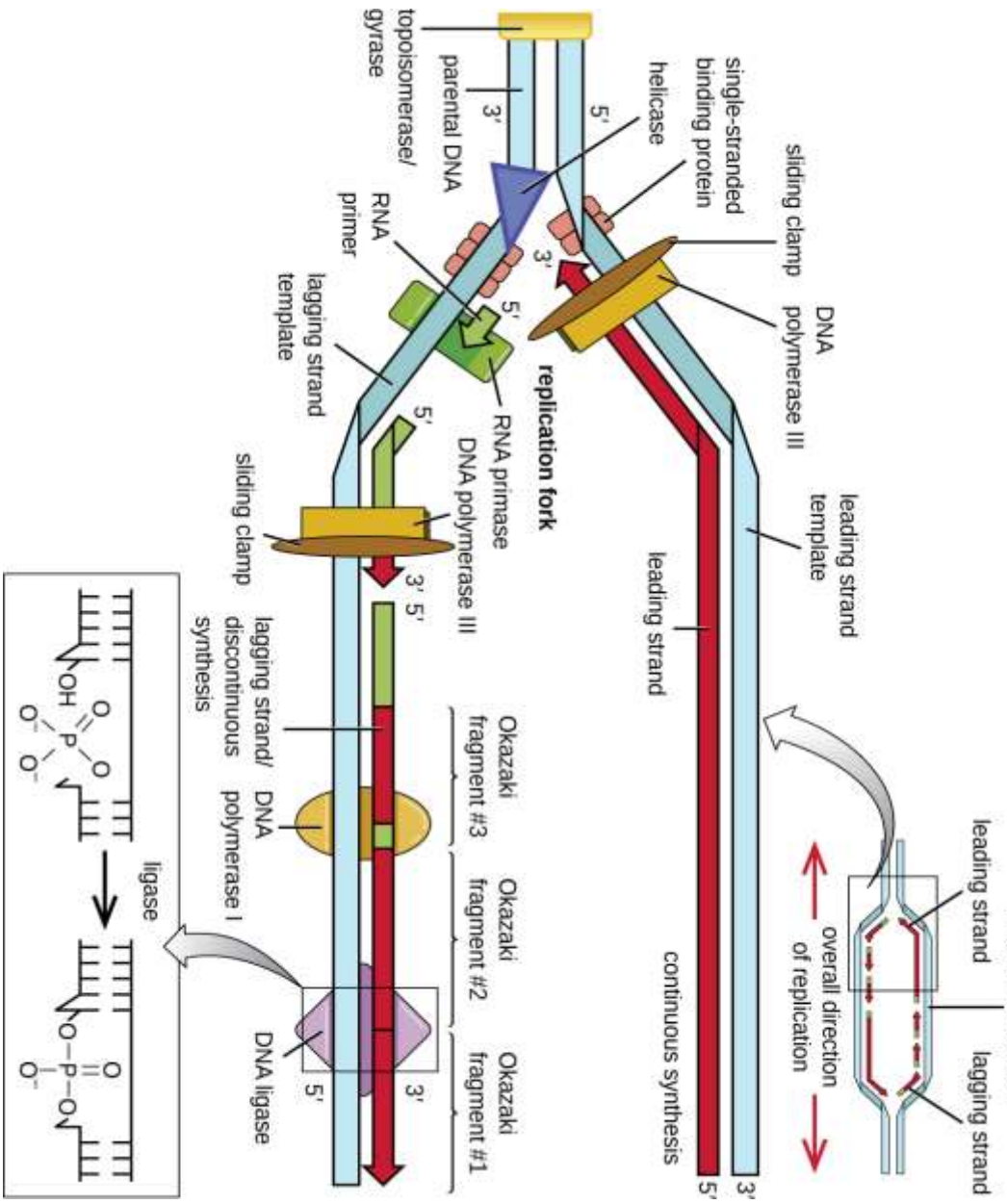
قبل بدء بناء الدنا DNA عند نقطة المنشأ تتكون سلاسل قصيرة من متعدد النيوكليوتيدات من الرنا RNA التي تكون مكملة (متممة) لقالب الدنا DNA يطلق على هذه الامتدادات القصيرة من الرنا RNA بالممهدات Primers وتأخذ موقعها في الاتجاه 5"⟵3"

بعد ذلك تضاعف النيوكليوتيدات الدنا DNA بواقع واحدة في كل مرة الى النهاية الحرة '3 من ممهدات الرنا RNA primers تسمى الأنزيمات الضرورية لبناء الممهدات من الرنا RNA ب Primases يؤدي أضافة نيوكليوتيدات الى الموقع 3" الى أزلة مجموعتي الفوسفات لتكوين نيوكليوسيدات دي اوكسى رايبوزية احادية الفوسفات.

أن نمو الشريط المتباطىء Lagging strand هو من نوع غير المستمر Discontinuous، لذا تتكون ممهدات من الرنا RNA وقطع اوكازاكي Okazaki fragments عديدة طولها حوالي 1000 نيوكليوتيدة.

أن عملية تطويل الشريط القيادي Lagging strand وبناء قطع اوكازاكي تتم بمساعدة أنزيم DNA polymerase II، ومواد تفاعل هذا الأنزيم هي نيوكليوسيدات الدي اوكسي رايبوز ثلاثية الفوسفات (dTTP . dCTP . dGTP . dATP). يعمل أنزيم ناتج من الجين dna G على صنع شريط بادىء قصير Primer اما من DNA اوRNA ويطول هذا البادىء بواسطة أنزيم DNA polymerase III ومن النهاية OH-3 فقط وبذلك يكون النمو باتجاه ' 5 3 أي من 3 الى⟵5.

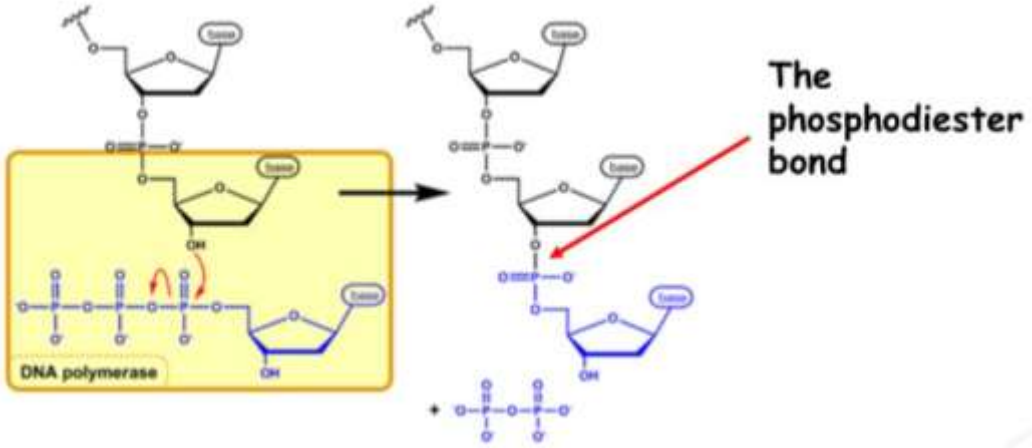
عند اكتمال تكوين قطع اوكازاكي تستأصل الممهدات الرنا RNA وترتبط قطع اوكازاكي وعند اضافة النيوكليوتيدات النهاية لملىء الفراغ يؤدي أنزيم DNA Ligase الى تكوين أصرة فوسفاتية ثنائية الأستر التي تربط النهاية الحرة.



شكل يوضح مخطط لعملية التضاعف في احدى شوكتي التضاعف

2 - مرحلة الاستطالة Elongation

في هذه المرحلة يتم استطالة (تطويل) الشريط القيادي leading strand وبناء قطع اوكازاكى Okazaki fragments خلال انفصال شريطي الحلزون المزدوج تتعرض القواعد النيتروجينية لكل شريط الى المحيط الخارجي وتصبح كمواقع تقابل معها نيوكليوتيدات موجودة بصورة حرة في السايتوبلازم (كما في بدائية النواة او في البلازما النووية (كما في خلايا حقيقية النواة).



شكل يوضح اضافة واحدة من (Nucleoside triphosphates الى النهاية 3-OH وخروج مجموعتي الفوسفات بص مرة مركب Pyrophosphate، أي يكون نمو السلسلة المتعددة النيوكليوتيدات من النهاية 5 باتجاه 3 أي من 5--3.

يطلق على الشريط النامي بـleading strand الشريط القيادي وتحتل النهاية '5 لهذا الشريط القيادي عند موقع نقطة المنشأ والنهاية 3'-OH عند شوكة التضاعف المتحركة Moving replication fork)أي النقطة المتقدمة من انفصال الشريطين الأبوين).

ويطلق على الشريط الأخر من النيوكليوتيدات المتعددة بالشريط المتباطئ Lagging strand، أن النمو يأخذ مجراه ببناء عدد من السلاسل النيوكليوتيدية المتعددة الصغيرة بين شوكة التضاعف ونقطة المنشأ وتكون عملية الإضافة بالاتجاه 5ـــــ3. أن الأشرطة المتباطئة مؤلفة من عدد من النيوكليوتيدات المتعددة (1000-2000) نيوكليوتيدة طولا والتي

يشار اليها الأن بقطع اوكازاكي Okazaki fragments تتكون من ممهد من الرنا RNA لكل قطعة اوكازاكي تحتل موقعاً أسفلها وتسمى الأنزيمات الضرورية لبناء ممهدات من الرنا RNA ب Primases

أن عملية تطويل الشريط القيادي وبناء قطع اوكازاكي تتم بمساعدة الأنزيم DNA polymerase III الذي يعين بواسطة جين dna E هذا الأنزيم يعمل ضمن شوكة التكرار، ويرتبط نشاطه مع عدد من الأنزيمات والعوامل المرافقة للتكرار. كذلك يعمل أنزيم ناتج من الجين dna G على leading strand ذات النمو المستمر او قطعة اوكازاكي للشريط المتباطئ Lagging strand

3- مرحلة الانتهاء Termination

في هذه المرحلة يحصل تفاعل بين القطع المصنعة حديثاً من خلال تجميع وتوصيل بين قطع اوكازاكي، أذ عند أكمال قطع اوكازاكي تستأصل تواليات الممهدات الرنا RNA أنزيمياً. ويتم لحم القطع المنفصلة والتي تترافق مع الشريط السفلى مع بعضها بطريقة أنزيمية.

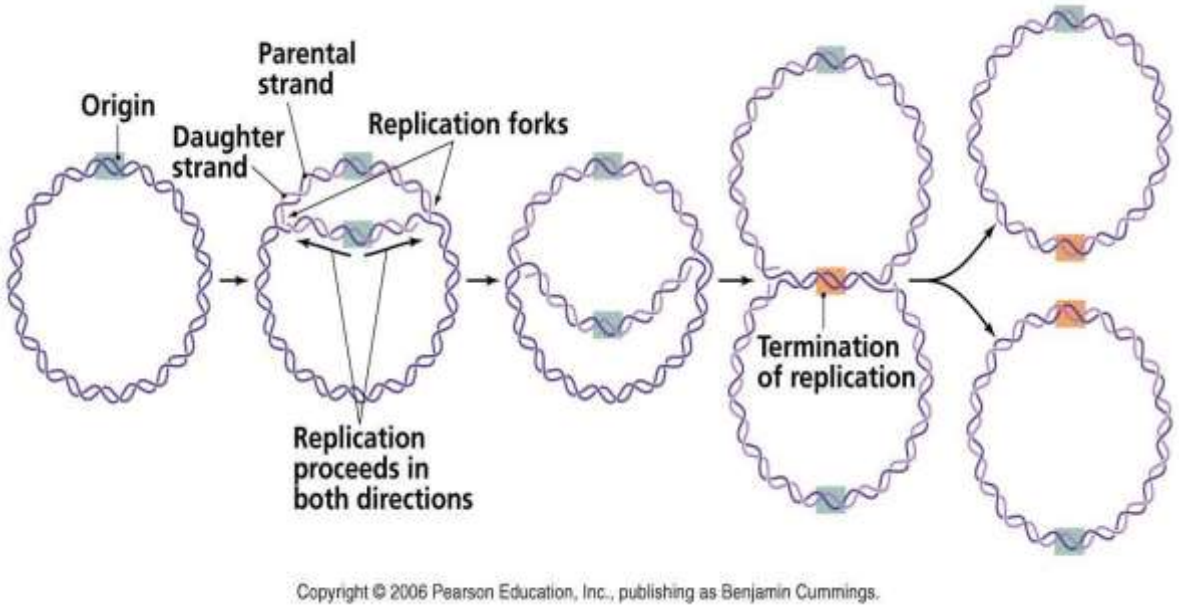
أما الفراغ المتروك من آزاله الممهدات فيملأ بإضافة نيوكليوتيدات وتنجز هذه العملية بفعل أنزيم DNA polymerase I، وعند أضافة النيوكليوتيدة النهاية لمليء الفراغ يؤدي الأنزيم الرابطDNA ligase الى ربط قطع اوكازاكي مع بعضها وتكوين آصرة فوسفاتية ثنائية الأستر التي تربط النهاية الحرة.

في بدائية النواة يكون فيها التضاعف ثنائي الاتجاه Bidirectional تستمر شوكتي التضاعف بالحركة حول الكروموسوم لحين التقائها. في النهاية يتم تشكيل جزيئات الدنا DNA المتماثلة (كروموسومين متماثلين)، خلال هذه العملية جزيئات الدنا DNA قد تتصل بالغشاء السايتوبلازمي Cytoplasmic membrane، أخيرا تستطيل الخلية ثم تفصل جزيئتين الDNA فيزياوياً، ثم تشرع الخلية بانقسام السايتوبلازم مكونة خليتين كل منها تحتوي على

نسخة من المادة الوراثية المتماثلة. في الحقيقة أن تضاعف الدنا DNA عملية معقد أكثر من هذه بسبب طبيعة أنزيمات بلمرة الدنا DNA المشتركة فيها والخاصة لهذا genome المؤلف من 4.639.221 زوج قاعدي البكتريا القولون ان والتي تشفر لحوالي (4288 بروتين).

يجرى تفاعل بين البروتين (او البروتينات) المنظم مع المنشأ لاستمرار عملية التضاعف الى حين اكمالها. وعليه فان التصبيغ الأصلي للريبليكون (في بدائية النواة) درس على انه الجزء المماثل لكل من المنشأ والجين الذي يشفر عن البروتين المنظم، وفي الوقت الحاضر يستعمل الريبليكون لكروموسومات حقيقية النواة لوصف وحدة التضاعف التي تحتوي على المنشأ اما البروتين (والبروتينات المنظمة) فتجهز عن طريق وحدة أخرى.

يؤلف الكروموسوم البكتيريا من ريبليكون مفرد، لذلك تتطابق وحدات التضاعف والانعزال في البكتيريا، فالابتداء عند نقطة مفردة يضمن تضاعف الجينوم بكاملة قد تحتوي الخلايا البكتريا بلازميدات Plasmids بالإضافة الى كروموسومها الرئيسي المفرد. والبلازميد عبارة عن جزيئة حلقية من الحامض النووي الدنا DNA مستقلة وذاتية التضاعف، أي أنها تشكل ريبليكون منفصل. توجد بعض البلازميدات بنسخة واحدة لكل نسخة من الكروموسوم البكتيري ويصطلح على هذا النوع من البلازميد ب -single copyوقد تكون انواع اخرى من البلازميدات الاخرى متعددة النسخ Multi copy وتوجد. بعدد مميز أكبر من واحد لكل كروموسوم بكتريا.



شكل يوضح عملية التضاعف في البكتريا ثنائي الاتجاه Bidirectional، يبدأ من بؤرة أو شوكة التضاعف المركزية ثم يتجه الى الأمام بعيدا عنها، أي يبدأ تسير نقطتا النمو في أتجاهين متعاكسين حول الكروموسوم الدائري الى النهايتين، وكل منها يستنسخ حوالي 50% من الجينوم أذ يلتقي كلاهما في الجهة المقابلة الأخرى من الكروموسوم.

كذلك يشكل كل من DNA للملتهم البكتريا Bacteriophage او للفيروس كريبليكون قادر على أبتداء التضاعف مرات عديدة خلال دورة الإصابة.

ربما أفضل طريقة لدراسة التضاعف في بدائية النواة هو بعكس التعريف: تستطيع اى جزيئة من الحامض النووي DNA الحاوية على منشأ Origin من التضاعف ذاتيا في الخلية، ويعتمد عدد أحداث التضاعف على تفاعل المنشأ مع بروتينات منظمة خاصة.

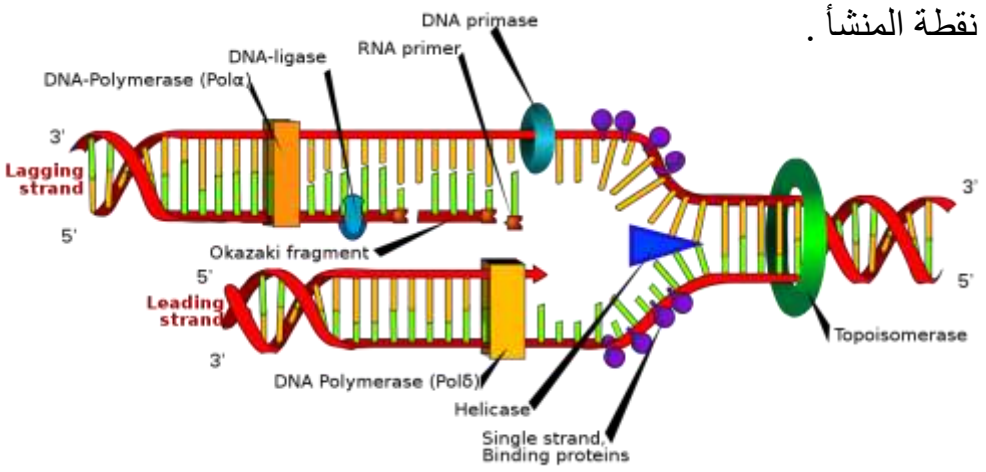
يحتوي كروموسوم خلايا حقيقة النواة عدد كبير من الريبليكونات لذلك تتضمن وحدة الانعزال العديد من وحدات التضاعف، ويضيف هذا بعداً اخر لمشكلة السيطرة فجميع الريبليكونات في هذه الحالة على الكروموسوم يجب ان تنبان خلال دورة خلوية واحدة، ومع ذاك لا تكون جميعها فعالة في وقت واحد، ولكنها تنبه خلال فترة متطاولة بعض الشيء. وعلاوة على ذلك فان كل من هذه الريبليكونات يحب ان ينشط مرة واحدة فقط في دورة الخلية. في ضوء ذلك فان بعض الاشارات تميز الريبليكونات المضاعفة من غير المضاعفة وتبين بان العملية الكلية قد اكتملت. ففي عام 1957 أستطاع حامل جائزة نوبل كورنبرك

Kornberg من بناء الحامض النووي DNA في انبوبة اختبار (in vitro) كما عزل الانزيم DNA polymerase والذي يعرف في الوقت الحاضر بـ DNA polymerase I الذي يشترك في اليه التضاعف ، وفي عام 1958 بين ميسلسون Meselson وستاهل Stahl الى ان تتابع النيوكليوتيدات في كل من شريطي الحامض النووي DNA يبقى كأحد شريطي الحلزون المزدوج الجديد. ويطلق على هذا النوع من التضاعف بـ شبه المحافظ (Semiconservative replication).واستطاع كيرنز Cairns عام 1961 من تصوير تضاعف كروموسوم بكتريا القولون *E.coli* مستعملا طرق مجهرية والتصوير الشعاعي الذاتي.

التضاعف في خلايا حقيقية النواة Replication in Eukaryotic cells

يتألف كروموسوم خلايا حقيقية النواة من الاف الريبليكونات لابتداء عملية التضاعف الدنا DNA تنشط جميع الريبليكونات في نفس الوقت من طور S -phase أن مناطق معينة من الكروموسوم تتضاعف دائما بشكل مبكر في طور (تمثل مناطق الكروماتين الحقيقي من الكروموسوم)، بينما تكون مناطق أخرى من الكروموسوم نشطة في أوقات متأخرة (تمثل مناطق الكروماتين المتباين من الكروموسوم). أن سلسلة الأحداث الجارية خلال التضاعف هي كالاتي: -

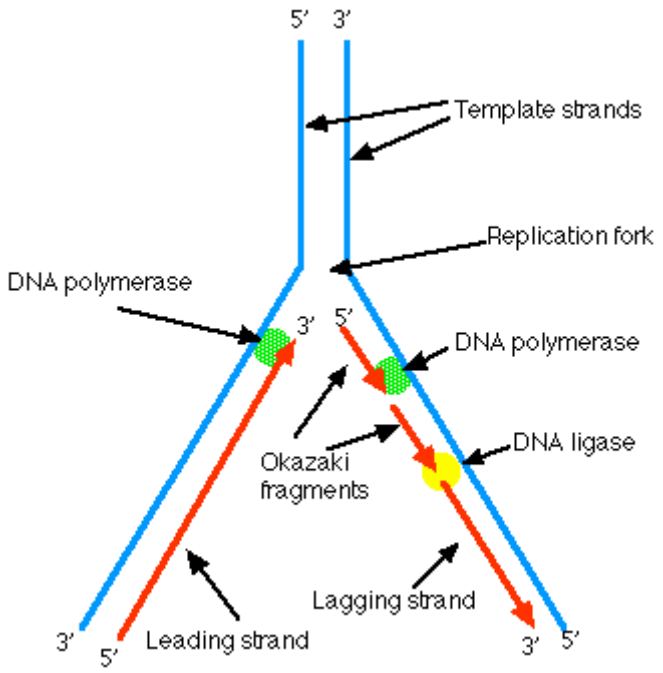
يبدأ انفصال الشريطين الأبويين عند نقطة تسمى المنشأ Origin والتي تحتوي على تسلسل نيوكليوتيدي خاص وتوجه تلازم عدد من البروتينات أنزيم مفكك معتمد على طاقة ATP (ATP - dependent unwinding enzymc يطلق عليه Helicase يشجع على أنفصال الشريطيين الأبويين ويعين شوكة التضاعف Replication fork التي تتحرك تدريجيا بعد عن نقطة المنشأ .



مخطط لعملية التضاعف الدنا DNA لخلايا حقيقية النواة

يثبت الشريطين المفردين الواقعين خلف شوكة التضاعف بمجموعة من البروتينات تسمى Helix - destabilizing proteins تقوم أنزيمات I وII Topoisomnerases بتهيئة اللف الفائق قبل بدء بناء الدنا DNA عند نقطة المنشأ. أذ تتكون سلاسل قصيرة من متعدد

النيوكليوتيدات من الرنا RNA التي تكون متممة لقالب الدنا DNA الأصلي يطلق عليها بالممهدات Primers RNA وتأخذ موضعا في الاتجاه '5 '3 .



شكل يوضح كيفية ارتباط قطع اوكازاكي واتجاه بناء الدنا الجديد

أذن يكون تضاعف الكروموسوم في خلايا حقيقية النواة أكثر تعقيدا من بدائية النواة والتقيد المضاف ناتج جزئية من الطول الكبير للكروموسوم خلايا حقيقية النواة، ومع ذلك يوجد تشابهات أساسية بين تضاعف الدنا DNA لكل منهما ممثل: -

1- يكون التضاعف شبه محافظ.
2- 2 - يستخدم ممهدات من الرنا. RNA
3- رصد التضاعف في كلا الاتجاهين.
4- DNA جديد يتم بناءة على طول الشريط المتباطىء، كسلسلة قطع اوكازاكي.
5- يكون الاتجاه الإجمالي للتضاعف هو'3 -5.

يجب التذكير بأن وحدة الانعزال هي الكروموسوم وأن عملية التضاعف تحصل في - مرحلة S - phase من دورة الخلية Cell cycle أذن يوصف الكروموسومات حقيقية النواة بأنها وحدة التضاعف التي تحتوي على المنشأ Origin وهنا الكروموسوم يحتوي على عدد كبير من الريبليكونات، لذلك تتضمن وحدة الانعزال العديد من وحدات التضاعف. وهنا المشكلة المثيرة كيفه يتم السيطرة فجميع الريبليكونات في هذه الحالة على الكروموسوم يجب أن تنبه خلال فترة متطاولة بعض الشيء وعلاوة على ذلك فان كل من هذه الريبليكونات يجب أن تنشط مرة واحدة فقط لدورة الخلية في S- phase.

لقد مر أكثر من (50) عاما على ما أثبته واطسون Watson وكريك Crick وويلكينس Wilkins عن الطبيعة الحلزونية المزدوجة لجزيئة الحامض النووي DNAواقترحوا كيف ان كل من شريطي (وسلسلتي) الحلزون المزدوج يسلك كقالب Template لتكرار او التضاعف، سلسلة (او شريط) جديدة. منذ ذلك الحين درست الآلية الصحيحة التي بواسطتها يتميز التضاعف للحامض النووي DNA بشكل مكثف في العديد من المختبرات العالمية. أي بقي أحد شريطي الحلزون المزدوج الجديد ويطلق على هذا النوع من التضاعف شبه، المحافظ Semiconservative Replication.

التضاعف كعملية شبه محافظة Replication as a semiconservative process

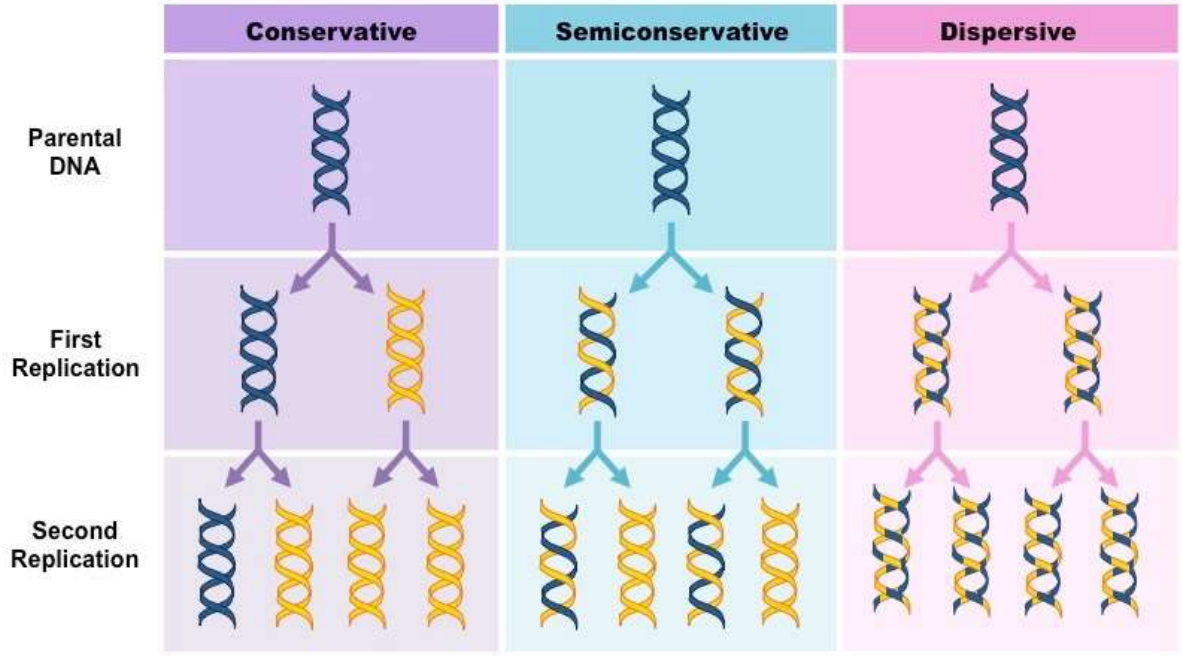
خلال تضاعف الحامض النووي DNA تنفصل السلسلتين (شريطي الدنا) المتعددتي النيوكليوتيدات لجزيئة الدنا DNA الأبوية عن بعضها البعض وتسلك كل سلسلة كقالب Template لبناء سلسلة جديدة، مكملة للسلسلة الأبوية (اوالقالب). خلال انفصال شريطي الحلزون المزدوج تتعرض القواعد النيتروجينية لكل شريط الى المحيط الخارجي وتصبح كمواقع تتقابل معها نيوكليوتيدات موجودة بصورة حرة في السايتوبلازم (كما في بدائية النواة) أو في البلازما النووية (كما في حقيقية النواة). بعد ذلك ترتبط هذه النيوكليوتيدات ببعضها بمساعدة أنزيمات خاصه مكونة في النهاية الشريط المكمل. وبما أن (deoxyadenylic acid) تستطيع ان تكون اواصر هيدروجينية مع مواقع الثايمين في الشريط القالب (وتستطيع dGMP

الارتباط بالسايتوسين فقط، dCMP ترتبط مع الكوانين فقط وdTMP مع الادنين فقط فأن الشريط المبني حديثا سيكون مماثلا للشريط الأصلي المستمر او المكمل) للشريط القالب. وبالنتيجة يتكون حلزونيين مزدوجين جديدين يتألف كل منهما من شريط متعدد النيوكليوتيدات من الحلزون المزدوج الابوي (أي انه الشريط الذي بقي سليما) وشريط متعدد النيوكليوتيدات الجديد. وبما أن كلا الحلزونيين المزدوجين الجديدان قد احتفظا بشريط واحد فقط من الشريطين الأبوية لذلك تسمى العملية بشبه محافظSemiconservative

لقد تم التنبؤ بالتضاعف شبه المحافظ للدنا DNA من خلال موديل واطسون وكريك الأصلي، ولم تثبت صحته لحين الدراسات الكلاسيكية لميسلسون وستاهل، وفي وقت أجراء تجاربهما وجد أسلوبين للتضاعف:

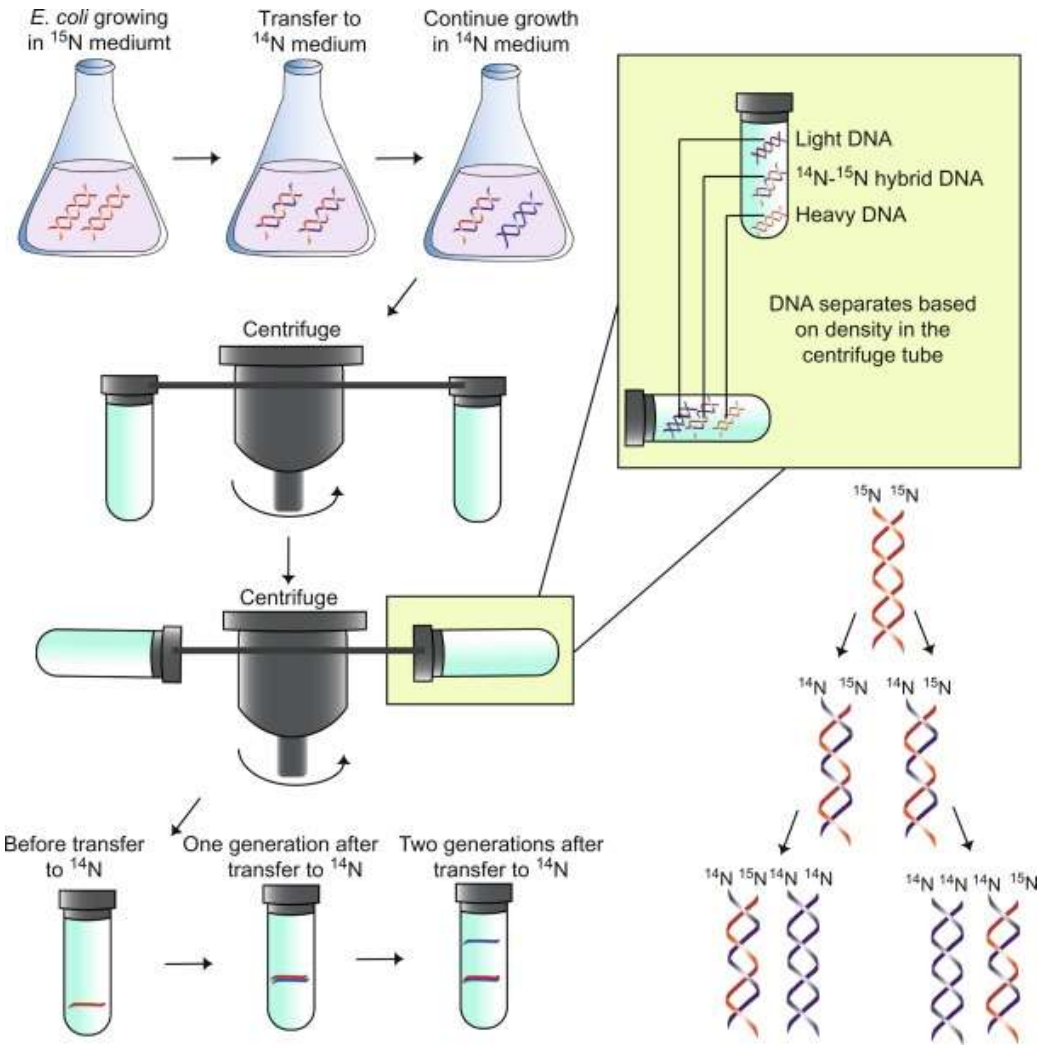
1- التضاعف المحافظ Conservative في هذا النوع من التضاعف يبقي كلا شريطي الحلزون المزدوج الابوي مع بعضهما بعد عملية التضاعف اما الحلزون المزدوج الجديد فيتألف من شريطين حديثي البناء.

2- التضاعف المشتت Dispersive replication في هذا النوع من التضاعف يجزء الحلزون المزدوج الى قطع تتضاعف كل قطعة بصورة مستقلة عن الأخرى ولا يشترط أن يكون التضاعف ، متزامنا في جميع القطع (ومع ذلك فان عملية التضاعف تنجز خلال فترة البناء S - phase من دورة تكاثر الخلية) ، وبعد اكتمال التضاعف يحصل تجميع القطع ويتم أرتباطها لتكوين حلزونين مزدوجين من الدنا .DNA



مخططا يوضح التضاعف شبه المحافظ لجزيئة الدنا . DNA

لقد أثبت ميسلسون وستاهل الطبيعة الشبه محافظة لتضاعف الدنا DNA في سلسله من التقارب الممتازة مستخدمين الدنا DNA المعلم بالنظائر المشعة ومستعملين طريقة طرد مركزي تسمى Isopycnic density gradient centrifugation. فقد زرعا خلايا من بكتيريا القالون *E. coli* في وسط كان فيه النيتروجين من النوع ^{15}N وهو نظير ثقيل للنيتروجين ولكنه ليس نظيرا مشعا Radioisotope بدلا من N الموجود بصورة شائعة وأخف من ^{15}N. بمرور الوقت فأن بيورينات وبيزميدينات الدنا DNA في الخلايا الجديدة أحتوت على ^{15}N (بينما ^{14}N يوجد طبيعيا). وبذلك كانت جزيئات الدنا DNA أكثف. يمكن تمييز ألدنا DNA الحاوي على ذرات نيتروجين ^{15}N من الدنا DNAالحاوي على^{14}N بوضعهما (أي كلا النوعين من الدنا DNA) في جهاز طرد مركزي من نوع Isopycnic centrifugation عند ذلك يترتب كلا النوعين من الدنا DNA بشكل حزم في مواقع مختلفة الكثافة في أنبوبة جهاز الطرد المركزي. كما مبين في الشكل.



شكل يوضح فصل DNA الحاوي N ^{15} من DNA الحاوي على N ^{14} من خلال جهاز الطرد المركزي

وضعت جزيئات الدنا DNA المعزولة من الخلايا في جهاز الطرد المركزي لمدة يومين الى ثلاثة أيام وعند سرع دورانية عالية جدا، وكانت هذه الجزيئات اصلا موضوعة في انابيب خاصة بجهاز الطرد المركزي الحاوية على محلول متمائل من CsCI. وخلال عملية الطرد المركزي تتكون تلقائيا منحنيات كثافة في الأنابيب كنتيجة للتوازن الذي رشح بين بترسيب CsC1 باتجاه قعر الانبوب وانتشار الملح باتجاه قمة الانبوب ويسمى هذا الشكل من عملية الطرد المركزيEquilibrium Isopycnic centrifugation واعتمادا على محتوى الحامض النووي DNA من N ^{15}و ^{14} فأن الدنا DNA بتحزم (بأخذ شكل حزم) في موقع خاص في منحني الكثافة Density gradient وحيث ان الدنا DNA المبني من قبل خلايا نامية في

وسط يحتوي N^{15} فانه يكون اكثر كثافة من الدنا DNA الحاوي على N^{14} لذلك فان الدنا DNA الثقيل (اي الذي يحتوي N^{15}) يتحزم في المواقع السفلي من الأنبوب .

غسلت الخلايا النامية لفترة قصيرة بوجود N^{15} برفعها من هذا الوسط ونقلها الى وسط يحتوي على N^{14} وتركت تستمر في النمو لفترة محددة من الوقت (اى لعدة أجيال) الحامض النووي DNA المعزول من الخلايا نقية بعد جيل من الوقت في وسط حاوي N^{14} أمتلك كثافة وسط بالنسبة للدنا DNA من خلايا نامية فقط في وسط يحتوي على N^{14} (يشار ان هذا الجيل بالجيل الصفر generation 0) او نامية فقط في وسط يحتوي على N^{14} (العينات القياسية controls) ان مثل هذه النتيجة تبلغنا مباشرة بان تضاعف الدنا DNA هو من النوع المحافظ Conservative، وذلك لأنه هذا النوع من التضاعف يعطي حزمتين من الدنا DNA في منحنى الكثافة لخلايا الجيل الأول (F1)، تتألف الحزمة المفردة في الكثافة المتوسطة (يشار اليها بالدنا DNA الهجين) من جزيئات احد شريطيها يحتوي N^{15} ويحتوي الآخر N^{14} . واذا استمر حضن الخلايا في وسط يحتوي N^{14} لجيلين من الوقت (اي الجيل الثاني F2) تتكون حزمتين من الدنا DNA واحدة من نفس الموقع الكثافي لدنا من خلايا تقتصر نموها على وسط حاوي N^{14} (ان العينة القياسية الخفيفة (light control) واخرى بكثافة متوسطة. وتنتج الاجيال التالية أعداد أكبر من جزيئات الدنا DNA التي تتحزم في الموقع الخفيف light (DNA اى حاوي على N^{14}) من منحنى الكثافة. وتتفق هذه النتائج فقط مع موديل التضاعف شبه المحافظ والتضاعف المشتت ينتج حزمة مفردة لكل جيل تلاحظ في مواقع متعاقبة من الكثافة الخفيفة في المنحنى، ان الدراسات التي أجريت على كائنات أخرى بدائية النواة وعلى حقيقية النواة تشير الى ان التضاعف شبه المحافظ للدنا DNA ربما تكون الآلية الاكثر شيوعا.

الجزيئات المشتركة في تضاعف الحامض النووي :DNA

ان التفاصيل المتعلقة بتضاعف الحامض النووي DNA عند شوكة التضاعف Replication fork تكون متشابهة في بدائية وحقيقية النواة. وقد درس كورنبرك Arthur Kornberg وجماعته التفاصيل المتعلقة بالتفاعلات الكيميائية التي بواسطتها تضاف نيوكليوتيدة مفردة الى سلسلة الحامض النووي DNA النامية، والتفاعل الاجمالي يوضح أدناه: -

4 Nucleoside triphosphates → PPi(inorganic phosphate)

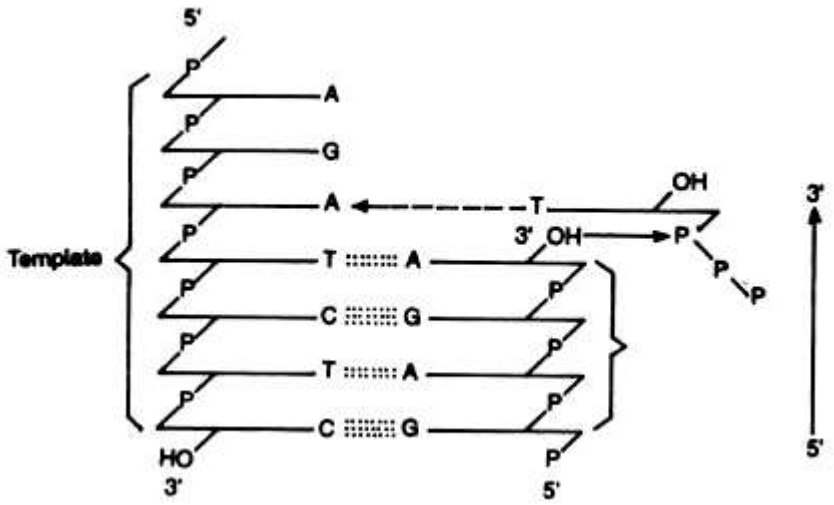
1-dATP (deoxyadenosine triphosphate)

2-dGTP (deoxyguanosine triphosphate)} + new DNA strand

3-dCTP (deoxycytidine triphosphate) complimentary to the

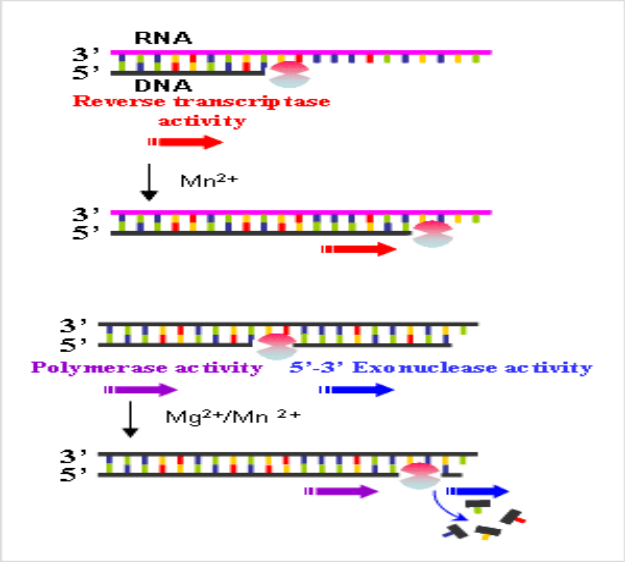
4-dTTP (deoxythymidine triphosphate) templatc strand and Attached to the primer strand

المخطط التالي يوضح العلاقة بين قالب شريط الدنا (Template DNA strand) DNA، شريط DNA الممهد Primer RNA strand، الوحدة الثانوية النيوكليوتيدية التالية Next nucleotide subunit المراد أضافتها، مجموعتي الفوسفات المراد فصلها بصورة مركب Pyrophosphate، والإنزيم DNA polymerase. يتخذ الانزيم DNA polymerase شكل طبله يكسي من الاعلى بالدنا DNA بحيث ان النهاية 3' الحرة النامية للشريط الممهد تكون دائما مجاورة للنيوكليوتيد، التي تمثل موقع الارتباط. ترتبط النيوكليونيدة التالية بالممهد، وينفصل جميع قالب الدنا DNA والممهد نحو الاسفل بحيث تصبح النهاية الجديدة للممهد أسفل الموقع النيوكليوتيدي (يكون نمو السلسلة التعددية النيوكليوتيدات من النهاية 5 باتجاه النهاية 3 اى من 5' 3').



مخطط يوضح المركز الفعال للانزيم DNA polymerasc I لبكتريا القولون *E.coli*. ترتبط سلسله DNA القالب من اليسار وترتبط السلسلة الممهدة الناميه Growing primer من اليمين. ترتبط النيوكليوتيدة بموقع النيوكليوسيدة ثلاثية الفوسفات في يمين المركز ويسهل الأنزيم اتصالها التساهمي بالشريط الممهد بشرط تتقابل النيوكليوتيدة مع النوكليوتيدة في الشريط القالب. وكما مبين في الشكل النيوكليوتيدة المضافة تمتلك T التي تستطيع التزاوج مع A في القالب ، لذلك يتم ارتباط هذه النيوكليوتيدة بالشريط الممهد .

يعتبر الممهد Primer شريط الدنا DNA النامي وينمو عند نهاية '3 ودور شريط القالب هو لمساعدة الأنزيم DNA polymerase لتمييز النيوكليوسيدة ثلاثية الفوسفات Nucleoside triphosphate الصحيحة لترتبط. يجب أن تكون النيوكليوتيدة الداخلة زوج قاعدي خاص (T: A,C: G) مع النيوكليوتيدة المقابلة لها على شريط القالب. فاذا لم تنسجم النيوكليوتيدة المضافة مع ما يقابلها في الشريط القالب ولكنها ارتبطت تأصريا مع الممهد، عند ذلك يقوم الانزيم DNA polymerase I بكسر النيوكليوتيدة الخاطئة. وتعزى استجابة الحذف Editing response للأنزيم DNA polymerase I للفعالية exonuclease-3' (يهاجم فقط النهايات الحرة '3) للانزيم، الذي يعمل فقط على القواعد غير المنسجمة وسكرياتها الملازمة ومجاميع الفوسفات متلازمة مع الجانب، المعاكس للانزيم DNA polymerase I.



شكل يبين موقع الارتباط للمركز الفعال لانزيم كورنبرك DNApolymerase

يوجد كذلك تفاعل الانزيم exoruclease 5' (يهاجم قط التهابات الحرة '5) التي لاتزال وليمته غير اكيدة.

الأسئلة التي طرحت في وقت مبكر والتي هي: كيف يبدا بناء شريط جديد من الدنا DNA والخلية؟ وما هو دور الأنزيم DNA polymeras I في ذلك السؤال طرح لكون هذا الا نزيم لا يستطيع من ادخال نيوكليوتيدات في السلسلة جديدة طالما يوجد شريط قالب ولا يوجد شريط ممهد، السؤال الثاني المطروح هو عدم قدرة الأنزيم DNA polymeras I ان ينجز عملية البناء أو التضاعف في الاتجاة " 5 3. وهل ان الانزيم يؤدى وظيفته بشكل متباين داخل الخلية وخارجها؟ وطرح هذا السؤال لمواجهة الباحثين مشكلة الانزيم DNA polymerase يساهم به تضاعف جزيئة الدنا DNA بالاتجاه 5 - 3. السؤال الثالث لماذا يمكن الاستغناء عن الانزيم DNA polymerase I من عملية التضاعف؟ حيث طرح هذا السؤال لان بعض الطافرات Mutants التي تحتفظ فقط بحوالى (5 الى 1% من الفعالية الاعتيادية للانزيم DNA polymeras I تبقى قادره على النمو الطبيعي، خلال نهاية الستينيات وبداية السبعينات من القرن الماضي حصل على نتائج مهمة التي سلطت الضوء على الأسئلة المطروحة أعلاه حيث تم استخلاص انزيمين آخرين من أنزيمات DNA polymerases من البكتريا وسميت DNA

polymerase II&III في البكتريا الاعتيادية تقريبا 300 الى 400 جريئة من الانزيم DNA polymerase III لكل خلية أيضا.

انزيمات DNA polymerases في بدائيات النواة

1- الانزيم DNA polymerase I

له وزن جزيئي 109000 دالتون ويكون بصورة سلسلة مفردة متعددة الببتيدات. تبدأ هذه السلسلة عند النهاية الطرفية الأمينية بالحامض الأميني ميثايونين Methionine ويحتوي على -

1- Sulphydryl group واحدة.

2- Disulphide group واحدة.

تحتوي خلية بكتريا واحدة من بكتريا القولون على 400 جزيئة من هذا الأنزيم ويكون كل منها كروي وقطرة 5.6 نانوميتر. يمكن أن يأخذ شكل ثنائي الجزيئة Dimeric form الذي يمكن من رؤيته بالمجهر الإلكتروني. عند معاملة الانزيم بأنزيم هاضم للبروتين subtilisin الذي يحصل عليه من البكتريا Bacillus subtilis فأنه يكسر الأنزيم 1 الى قطعتين، قطعة كبيرة وزنها الجزيئي 76000 دالتون التي تحتفظ بفعالية الانزيم Polymerase وفعالية الانزيم5' ← 3' nuclease، وقطعة صغيرة وزنها الجزيئي34000 دالتون التي تحتفظ بفعالية الانزيم 5'3' nuclease بوجود الينا DNA

وعلى ضوء تجارب الارتباط أستنتج كورنبيرك Kornberg الى أن الوظائف المتعددة لهذا الانزيم تشتمل على العمليات التالية: -

1- تحديد سلسلة الدنا DNA بالاتجاه (5' ← 3') بإضافة نيوكليوتيدة مفردة (من نيوكليوسيدة دي اوكسي رايبوزية ثلاثية الفوسفات) بمعدل 1000 نيوكليوتيدة في الدقيقة.

2- التحليل المائي لسلسلة الدنا DNA من النهاية 3'-OH الاتجاه (5' ← 3') الانتاج monophosphates-'5.

3- التحليل المائي لسلسلة الدنا DNA من النهاية 5'-phosphate في الاتجاة 3' ← 5' الانتاج monophosphates -5' بالدرجة الرئيسية.

4- تعريض سلسلة الدنا DNA الى Pyrophosphorolysis من النهاية '3، وهذه هي في الأساس عكس تفاعل البلمرة .Polymerization

5- أستبدال البيروفوسفات اللاعضويInorganic pyrophosphate بمجموعة البيروفوسفات الطرفية Terminal pyrophosphate group للنيوكليوبليدة الدي اوكسي رايبوزية ثلاثية الفوسفات (dNTP).

والتفاعلين الأخيرين (4 و5) هما ببساطة كنتيجة لعكس أما عمل البلمرة ولها أهمية مشكوك فيها داخل الخلية نظرا لحاجتها الى تراكيز عالية من البيروفوسفات اللاعضوية. أما فيما يتعلق بالمركز الفعال للانزيم DNApolymerase1 فأنة يتألف مما لا يقل عن خمسة مواقع رئيسية وتحدد هذه المواقع طبيعة الDNA التي ترتبط بالانزيم. فمثلا ترتبط DNA مفردة السلسلة بسهولة بالموقع (1) بينما لاترتبط، DNA مزدوجة السلسلة ومستقيمة (كما في الملتهم البكتريا T7) وكما لاترتبط جزيئة DNA مزدوج السلسلة وحلقي مثل DNA البلازميد او QX174 replicative form DNA بالانزيم DNA polymerase I لحين أدخال كسر "nick في احد الشريطين بانزيم نيوكلييس Nuclease مناسب لتكوين نهايتين في منطقة الكسر هما -'3OH و-phosphate-'5 ان مثل هذه الكسور تعتبر مواقع فعالة لعملية التضاعف بينما الكسور التي يحدثها الانزيم Micrococcal nuclease (التي تكون نهايتين هما OH-'5 و-phosphate-'3) لا تشكل نقاط تضاعف على الرغم من أنها ترتبط بالانزيم. وتجدر الاشارة الى ان جزيئة واحدة من الأنزيم ترتبط عند كل كسر في كلا الحالتين.

يستطيع بلمرة 16-20 نيوكليوتيدة لكل جزيئة واحدة منه وحوالي 80000 نيوكليوتيدة في الخلية الواحدة.

جدول انزيمات DNA polymerase في بداية النواة

الحالة	DNA polymerase I	DNA polymeraseII	DNA polymeraseIII
الوزن الجزيئي	109000	120000	250000<
الشكل التركيبي	جزيئات مفردة	غير معروف	متباين البلمرة
عدد / الخلية الواحدة	400	غير معروف	10-20
الفعالية الانزيمية elongation '5 ⟶ 3 ' from 3 –OH primer	نعم	نعم	نعم
3' ⟶ 5'exonuclease	نعم	نعم	نعم
'5 ⟶ 3' exonuclease	نعم	كلا	نعم
موقع الطافرات	PolA	PolB	Pol C,dnaN, dnaX, dnaZ, dna Q
الطراز المظهري للطافرات	التأثير في الاصلاح	بدون تأثير	
Lethality	مميت	مميت	مميت

2 - الانزيم DNA polymeraseII

هو أنزيم آخر من انزيمات بدائية النواة نُقي هذا الإنزيم من بكتريا القولون، يمتلك وزنا جزيئية مقداره يتراوح ما بين 90000 الى 120000 دالتون. يقوم ببناء الDNA بالاتجاه **3'** ⟶ **5'**ولكي يصل أقصى فعالية يتطلب:

1- جميع النيوكليوسيدات الاربعة الثلاثية الفوسفات.

2- Mg^{+2}

3- NH^{+4}

4- قالب من الدنا DNA الطبيعية (الأصلية) حاوي على ثغرات مفردة الخيط طولها 50-200 قاعدة. ويتناقص معدل التفاعل بوجود فواصل (ثغرات) أطول. ولكن قد يستعيد التفاعل طبيعته بأضافه البروتين المفكك Unwinding protein لبكتريا القولون.

5- سلسلة ممهدة تمتلك النهاية (3- OH primer) –OH-3'.

يتميز هذا الإنزيم بحساسية ب Sulphydryl reagents ولايتأثر بالمضاد المصلي Antiserum للانزيم DNA polymerase I يثبط هذا الإنزيم بفعل العامل الفعال المضاد لسرطان الدم Antileukaemic agent الذي يرمز له Ara - CTP- ، وهو Ara-Cثلاثي الفوسفات يمتلك الأنزيم كذلك فعالية للانزيم 5' exonuclease ← 3' ولكن ليس له فعالية للانزيم ' **3**exonucl**ease** ← **5'** .

لاتزال وظيفة الانزيم DNA polymerase داخل الخلية غير معروفة والطفرات التي تفتقد الانزيم تظهر طبيعته في جميع الأوجه، ومع ذلك، الطفرات المزدوجة التي تفتقد لكلا الانزيمين 1 و11 تربط قطع اوكازاكي Okazaki fragments أبطأ بكثير من النيوكليوتيدات (2-5 نيوكليوتيدات لكل جزيئة أنزيم وحوالي 500 نيوكليوتيدة لكل خلية بكتريا).

3 - الانزيم DNA polymeraseIII

أنزيم ثالث من أنزيمات بدائية النواة يختلف عن الانزيمين السابقين I وII في كونه مهما (أساسياً) لبناء الحامض النووي DNA فالطفرات التي تفتقد هذا الانزيم لاتستطيع مستخلصها Lysateمن بناء الدنا DNA خارج الخلية وعند اضافة الانزيم IIIمعزول من سلاسلة الطبيعية الى المستخلص السابق تتم عملية تضاعف الدنا .DNA

نقي الانزيم III حوالي (20000) مرة وظهر بانه حساس جدا للملح في محاليل مخففه (ظروف التحليل الطبيعية) ولكن ليس عندما يحلل بواسطة التتميم Complementationأي عند تركيز بروتيني عالي. وعلى الرغم من وجود عدد قليل من جزئياته في الخلية البكتريا (حوالي 10 جزئيات لكل خلية) غير انه يستطيع بلمرة النيوكليوتيدات بمعدل عالي (حوالي 250 - 1000 نيوكليوتيدة لكل جزيئة أنزيم وحوالي 10000 نيوكلوتيدة للخلية الواحدة). أن أفضل قالب للانزيم 111هو DNA ثنائي السلسلة، صغيرة عديدة حاوية على نهاية 3-OH للممهد.

على ضد مجموعة كورنبيرك فان الإنزيم III هو ثنائي الجزيئة مؤلف من وحدتين ثانويتين متماثلتين الوزن الجزيئي لكل منها هو 90000 دالتون. من ناحية ثانية ادعت مجموعة

ريجاردسون Richardsons group الى ان الوحدتين الثانويتين تمتلك اوزانا جزيئية 140000 و40000.

ومثل الانزيمين II و I بمتلك فعالية للانزيم exonuc**lease** **5'** ⟶ **3'** ، ومثل الانزيم I يظهر أيضا فعالية للانزيم exonuc**lease** **3'** ⟶ **5'** لايستطيع الانزيم III استعمال جزيئا DNA، مفردة الخيط طويلة كقالب حتى عندما تزود بممهد Primer

أنزيمات DNA polymerases في حقيقية النواة

بحثت انزيمات DNA polymerases حقيقية النواة بشكل كبير في اللبائن أن أكتشف فيها أول هذه.. الانزيمات عام 1960 (في الغدة الصعترية للعجل. (Calf thymus) تمتلك معظم أنزيمات حقيقية النواة فعالية بناء الـDNA فقط DNA - synthesizing activity بالمقارنة مع أنزيمات بدائية النواة التي تمتلك أيضا فعالية استئصالية.Exonucleolytic activity

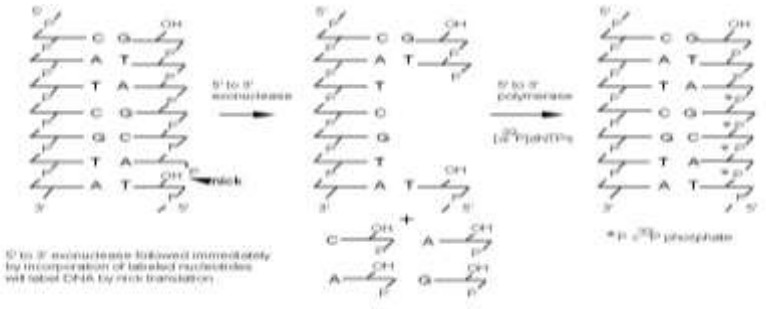
عرفت ثلاثة أصناف من DNA polymerases في حقيقية النواة وكما مبينة في الجدول الذي يلخص أهم خصائصها.

خصائص أنزيمات DNA polymerases في حقيقية النواة

الحالة	DNA polymerase α	DNA polymeraseβ	DNA polymeraseγ
الوزن الجزيئي	110000-220000	45000	60000
الموقع	النواة	النواة	النواة والمايتوكوندريا
الفعالية	%80	%15-10	%15-2
الوحدة الثانوية	مختلف	1	1

تمتلك جميع أنزيماتDNA polymerases في بدائية وحقيقية النواة نفس النوع الأساس من الفعالية البنائية، فكل منها يستطيع من تحديد سلسلة الدنا DNA بإضافة نيوكليوتيدات بمعدل

نيوكليوتيدة واحدة في كل مرة تضاف الى النهاية 3-OHلذلك تبني السلسلة الجديدة في الاتجاه الاعتيادي **5' → 3'**



أن طلائع Precarsor لبناء الدنا DNA مي Nucleoside Triphosphate، التي، تفقد مجموعتي، فوسفات طرفيتين في التفاعل، وان اختيار أي من النيوكليوتيدات الأربعة يضاف يتوقف على طبيعة التزاوج القاعدي مع الشريط القالب .Template strand

تعتمد دقة التضاعف على تخصص التزاوج القاعدي، مع ذلك فعندما ندرس التفاعلات المرتبطة في التزاوج القاعدي فأننا نتوقع حدوث أخطاء بتكرار 10^{-4} الى الى10^{-5} لكل زوج دا عدي مضاف (حصل فيه تضاعف). ويبدو ان المعدل الفعلي في خلايا بكتريا القولون: *E coli* . او في تضاعف الملتهم T 4هو في المدى 10^{-8} الى 10^{-10}(وهذا يتطابق تقره . خطأ واحد لكل 1000 دورة تضاعف بكتريا.

كما عرفنا انزيمات DNA polymerase بدائية النواة فأن جميع هذه الانزيمات (I,II,III) تمتلك فعالية أستئصال بالاتجاة **5' → 3'** وبذلك توصف هذه الإنزيمات بان لها وظيفة تصحيحية Proof reading function . وهذه الوظيفة غير موجودة في أنزيمات DNA polymerase لحقيقية النواة، وهذا يعني أنه لابد من وجود آلية أخرى للسيطرة على معدل الخطأ.

الانزيم. DNA polymerase α هو الوحيد الذي يزداد مستواه خلال طور البناء (S phase)يقاوم هذا الانزيم للنظير 23-dideoxythymidine triphosphate، وهذا النظير لا يثبط أنظمة التضاعف في أنبوبة الاختبار in vitro، ولكنه يثبط الانزيمين β و γ. يثبط المضاد الحيوي الفطري المسمى (فيديكولين Aphidicolin)تضاعف DNA حقيقية النواة في داخل

الكائن الحي، والانزيم الوحيد الذي يثبطه في انبوبة الاختبار هو الانزيم. تحتوي الطافرات المقاومة اللافيديكولين Aphidicolin الانزيم α المقاوم للمضاد الحيوي في انبوبة الاختبار.

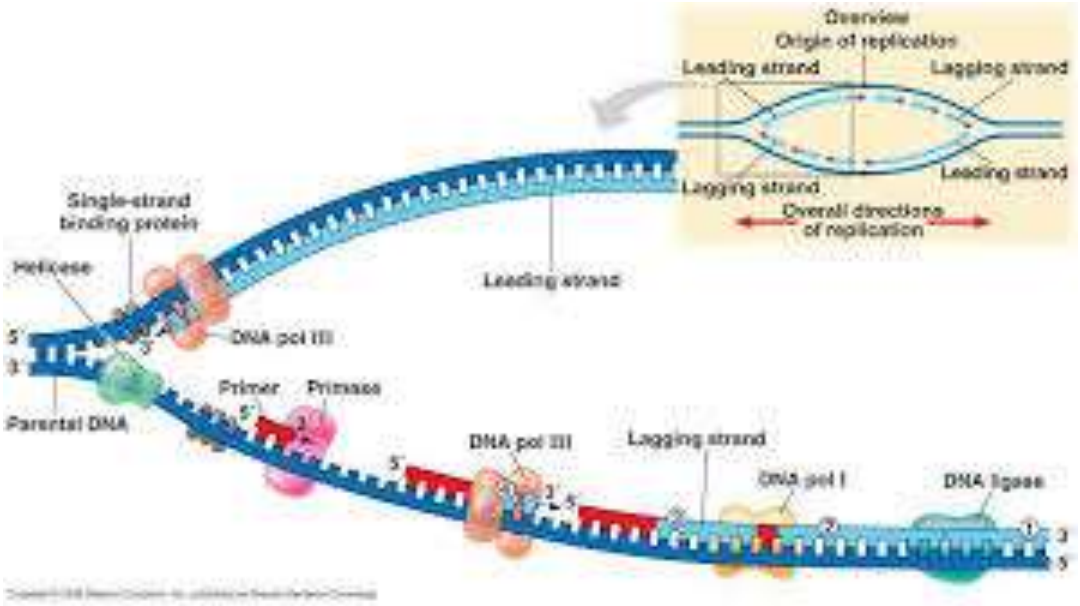
أضافه الى وظيفة الانزيمات DNA polymerases فأنها تشترك أيضا في وظائف الاصلاح Repairحيث يتم تعويض قطع من الDNA المتضررة بقطع جديدة وريما الانزيم يمتلك وظيفة أصلاحية.

أما دور الانزيم γ فيفترض انه ينجز تضاعف DNA المايتوكوندريا، اما دورة (إذا كان موجودا) في النواة فغير معروف.

يتطلب تضاعف الدنا DNA العديد من الفعاليات اضافة الى الانزيمات DNA polymerases أن الصعوبة في تحليل دور الانزيمات DNA polymerases لحقيقية النواة بسبب فقدان أنظمة تحتوي على جميع المحتويات المطلوبة للتضاعف، ومع ذلك حصل تقدم باتجاة الحصول على انظمة مناسبة خارج الخلية in vitro التي تضاعف قوالب محددة. فقد حصل بعض الأنظمة النووية الحاوية على جميع المكونات الضرورية لاستمرار حركة شوكة التضاعف .Replication forkأرتداء البناء عند المناشيء الريبليكونات جديدة لم يحصل عليها لحد الان خارج الكائن الحي..

التضاعف الأحادي والثنائي الاتجاه: Bidirectional Replication Unidirectional and

يبدأ التضاعف عند نقطة من الكروموسوم او الدنا (DNA) حيث عندها يبدأ شريطي الدنا DNA بالانفصال، ويطلق على هذه النقطة بالمنشأ Origin، كما يطلق على كل شريط بالقالب Template يتم أضافة النيوكليوتيدات المكملة لتكوين شريطين جديدين على طول كلا القالبين الأبويين من نقطة المنشأ.



ففي التضاعف الأحادي الاتجاه يتواصل النمو على طول كلا الشريطين الأبويين في اتجاه واحد ابتداءً من نقطة الاصل. وبالنسبة الى أحد القالبين (او الشريطيين) الأبويين يجري بناء شريط مكمل له نتيجة الاضافة المستمرة للنيوكليوتيدات الى النهاية 3-OH للشريط النامي، ويطلق على الشريط النامي مصطلح الشريط القيادي (Leading strand) او يسمى الشريط المستمرContinuous strand

وتحتل النهاية 5 لهذا الشريط القيادي عند موقع المنشأ والنهاية 3-OH عند شوكة التضاعف المتحركة (اي النقطة المتقدمة من انفصال الشريطيين الابويين).

ويطلق على الشريط الاخر من النيوكليوتيدات المتعددة بالشريط المتباطئ، Lagging strand او الشريط غير المستمر Discontinuous strand، وتجري استطالة هذا الشريط باليه محورة نوعا ما. وعلى عكس الشريط القيادي فان الشريط المتباطئ يمتلك الموقع '3 عند نقطة المنشأ والموقع '5 عند شوكة التضاعف. فاذا اضيفت النيوكليوتيدات على نحو متسلسل الى النهاية الشريط المتباطئ عند شوكة التضاعف عند ذلك يكون نمو الشريط بالاتجاه '3 ← '5 وهذا النمو لا يحدث. وبدلا من ذلك فأن النمو يأخذ مجراه ببناء عدد من السلاسل النيوكليوتيدية المتعددة المغيرة بين شوكة التضاعف ونقطة المنشأ. وتكون عملية الاضافة بالاتجاه '5 ← '3، وترتب على هذه السلاسل القصيرة فيما بعد ببعضها وبالنهاية 5 من الشريط المتباطئ وبالنتيجة فان الاتجاه الاجمالي لنمو الشريط المتباطئ هو نفس اتجاه نمو الشريط القيادي. أن شكل النمو غير الاعتيادي الذي يميز بناء الشريط المتباطىء يوضح لماذا يشار اليه أيضا بالشريط غير المستمر.

في التضاعف ثنائي الاتجاه تتكون شوكتين للتضاعف عند نقطة المنشأ وتتحرك كلا الشوكتين بعيدة عن نقطة المنشأ بكلا الاتجاهين أثناء فقدان الحلزون المزدوج لحلزنته، ويتم كذلك بناء الشريطين المكملين في كلا الاتجاهين يوجد خلف كل شوكة تضاعف مجموعة من الأشرطة القيادية والمتباطئة، وكما هو الحال بالنسبة للتضاعف آحادي الاتجاه فان استطالة الشريطين القياديين يكون من النوع المستمر بينما تكون استطالة الشريطين المتباطئين من النوع غير المستمر ويجب التذكير الى ان أضافة النيوكليوتيدات يكون دائما في الاتجاه '3 ← '5 بغض النظر عما إذا كان التضاعف احادي او ثنائي الاتجاه، حيث تضاف النيوكليوتيدات الجديدة الى النهايات OH-3 المتيسرة للشريط المستمر او الشريط غير المستمر.

لقد تم أثبات البناء غير المستمر للأشرطة المتباطئة من قبل. R. Okazaki فقد قام بحضن خلايا بكتريا القولون في وسط يحتوي على الثايميدين المشع. ^{3}H – thymidine لفترة قصيرة من الزمن (لمدة 10 ثانية فقط) ، وبعد ذلك فحص توزيع النظير المشع في الدنا

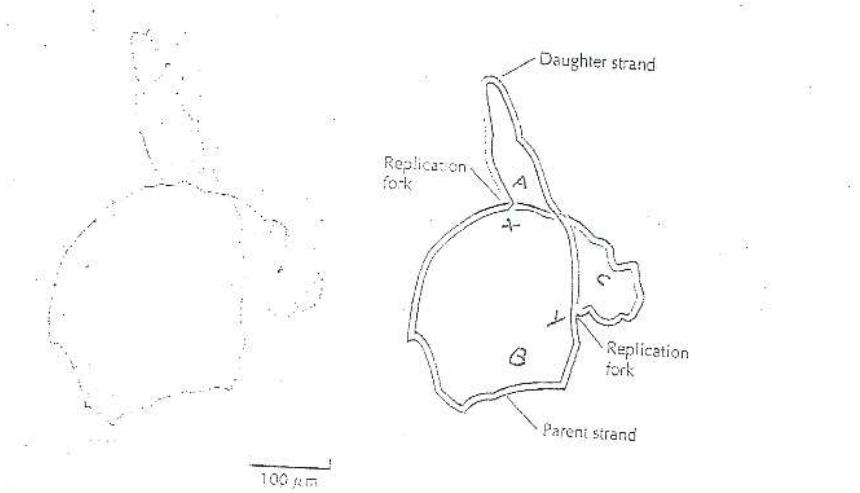
DNA المبني حديثة، لقد وجد النظير المشع في عدد من النيوكليوتيدات المتعددة (1000 - 2000) نيوكليوتيدة طولا والتي يشار اليها الآن بقطع اوكازاكي Okazaki Fragments. عند نقل الخلايا المعرضة للنظير المشع الى وسط غير معلم لفترة متفاوتة من الزمن قبل التحليل فقد أسترد النظير المشع في قطع أطوال من الدنا DNA. ان سبب ذلك هو لارتباط قطع اوكازاكي المتكونة خلال فترة تعريض خلايا البكتريا لفترة صغيرة من الزمن الى النظير المشع وأضيفت هذه القطع المرتبطة الى نهاية الشريط المتباطئ، تكون قطع اوكازاكي في خلايا حقيقية النواة عادة أقصر حوالي (100 - 200) نيوكليوتيدة طولا.

تصوير التضاعف في بكتريا القولون *E. Coli*

أستطاع كيرنز J. Cairns باستعمال التصوير الشعاعي الذاتي من تصوير تضاعف كروموسومات البكتريا فقد وضع كيرنز خلايا بكتريا القولون في وسط يحتوي على الثايمدين المشع لفترات مختلفة من الزمن وبذلك كان الثايمدين المشع يندمج بالدنا حال تضاعف الكروموسوم في الاجيال المتعاقبة للخلايا.

رفعت الخلايا من الوسط الغذائي بعد فترات متباينة من الحضن وحللت بلطف لتحرير الكروموسوم من الخلية (أن قوى القص الناشئة عن التحلل بالفرم تكسر الكروموسوم الى قطع صغيرة). بعد ذلك تنقل الكروموسومات الى شرائح زجاجية وتغطس بمستحلب التصوير الحساس لجسيمات بيتا- β- particles ذات الطاقة الواطئة. بعد تعريص المستحلب الى أشعاعات بيتا تجري عليه عملية الغسل والتحميض ويفحص بالمجهر الضوئي. وحيثما يوجد الثايمدين المعلم فان المستحلب يتعرض ويكون حبيبات مرئية يظهر الكروموسوم غير المستخدم في التضاعف كتركيب دائري في النقاط المعرضة المتعاقبة والقريبة من بعضها. والكروموسوم الذي يضبط في فعل التضاعف يعطي تراكيب يطلق عليها بتراكيب ثيتا Theta structures لامتلاكها مظهر الحرف الاغريقي ثيتا (θ). ان هذه التراكيب هي التي

توضع مواقع شوكات التضاعف في الكروموسوم الحلقي وتضيف دليلا أخر للتضاعف شبه المحافظ.



صورة أشعاعية ذاتية لكروموسوم بكتريا القولون، العروتان A وB قد أكملتا التضاعف بينما العروة C باقية في طريقها للتضاعف

الريبليكون وسلسلة التضاعف Replicon & the Replication Sequence

يبدو أن سلسلة الأحداث الجارية خلال التضاعف هي كالاتي. يبدأ أنفصال الشريطيين الأبويين عند نقطة تسمى المنشأ، التي تحتوي على تسلسل نيوكليوتيدي خاص وتوجه تلازم عدد من البروتينات أنزيم مفكك معتمد على ATP (ATP - dependent unwinoing enzyme) في بعض الأحيان يطلق على هذا الانزيم أسم هيلكيس Helicase) يشجع على انفصال الشريطيين الأبويين ويعين شوكة التضاعف Replication fork التي ستتحرك تدريجيا بعيدا عن نقطة المنشأ ويثبت الشريطيين المفردين الواقعين خلف شوكة التضاعف بمجوعة من البروتينات تسمى Helix -destabilizing proteins ونتيجة لفعل الانزيم المفكك للحلزون يتكون لف فائق موجبPositive supercoil في مزدوج الDNA الى الامام من شوكة التضاعف . ويهدا اللف الفائق بإنزيمات تسمى Topoisomerases عن طريق ارتباطها

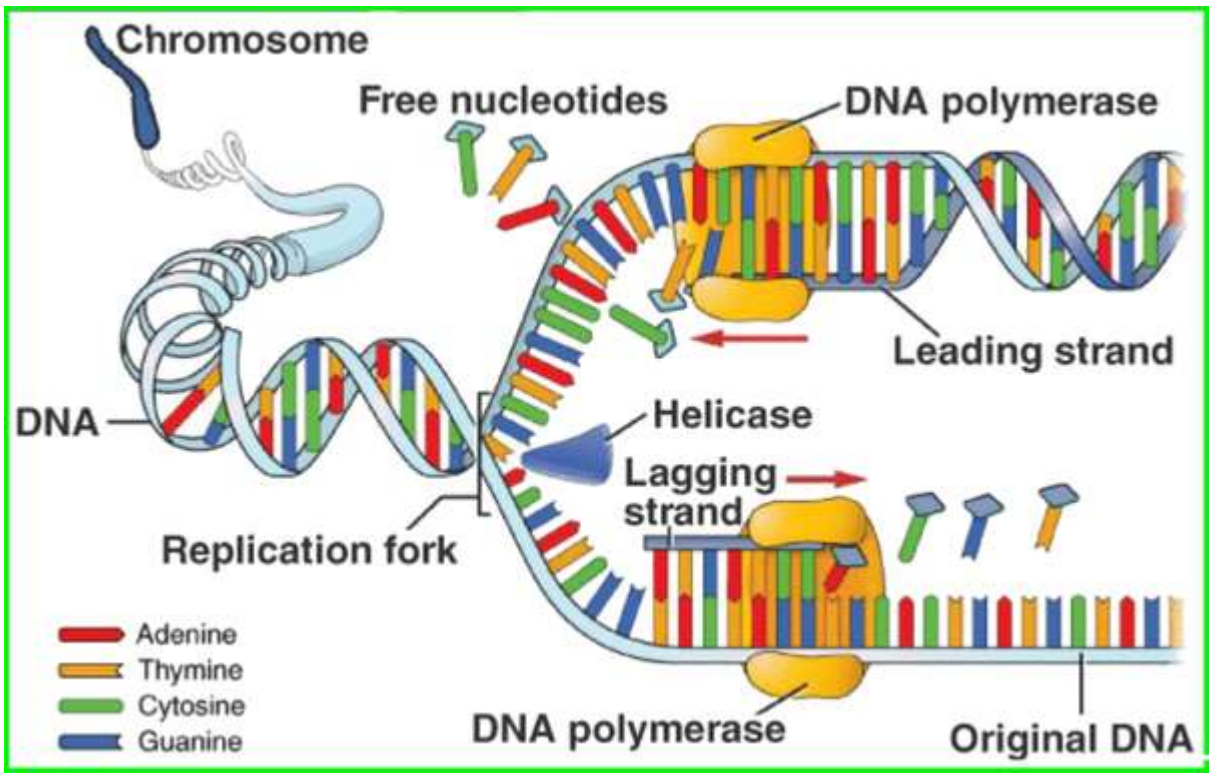
بالحلزون ذات اللف الفائق الزائل كاسرا أحد الشريطيين وعاملا على دورانه من خلال الشريط المكسور بعد ذلك يحرر الكسر.

قبل بدء بناء الدنا DNA عند نقطة المنشأ تتكون سلاسل قصيرة متعددة النيوكليوتيدادت من الرنا RNA التي تكون مكملة (متممة) لقالب الدنا .DNAيطلق على هذه الامتدادات القصيرة من الرنا RNA بالممهدات (Primers) وتأخذ موضعا في الاتجاه 3' ← 5' . بعد ذلك تضاف نيوكليوتيدات الDNA بواقع واحدة وفي كل مرة الى النهاية الحرة 3' من ممهدات الرنا (RNA printers) وحيث أن نمو الشريط المتباطئ هو من نوع غير المستمر Discontinuous، لذلك تتكون ممهدات من الرنا RNA وقطع اوكازاكي Okazaki fragments عديدة. ويلاحظ وجوب تكون ممهد من الرنا RNA لكل قطعة اوكازاكي تحتل موقعة أسفلها شكل وتسمى الانزيمات الضرورية البناء ممهدات من الرنا RNA ب Primases

أن عملية تطويل الشريط القيادي (Leading strand)وبناء قطع اوكازاكي تتم بمساعدة الانزيم DNA polymerase III ومواد تفاعل هذا الانزيم هي النيوكليوسيدات الدي اوكسي رايبوزية ثلاثية الفوسفات (أي dCTP، dGTP ،dATP و..dTTP)

يؤدي أضافه النيوكليوتيدات الى الموقع 3 المتيسر للشريط القيادي ذات النمو المستمر او قطعة اوكازاكي للشريط المتباطىء الى أزالة بمجموعتي فوسفات (Pyrophosphate) لتكوين نيوكليوسيدات دي اوكسي رايوزية أحادية الفوسفات (اي dCMP، dGMP، dAMP، dTMP)وعند أكتمال قطع اوكازاكي تستأصل ممهدات الرنا RNA أنزيميا وتربط قطع أوكازاكي. اما الفراغ المتروك من ازالة الممهدات فيملأ بإضافة نيوكليوتيدات وتنجز هذه العملية بفعل الانزيم DNApolymerase I وعند أضافة النيوكليوتيدة النهائية المليء الفراغ يؤدي الأنزيم DNA ligase I تكوين آصرة فوسفاتية ثنائية الاستر التي تربط النهاية الحرة.

خلال تضاعف الاحادي الاتجاه تدور شوكة التضاعف، بشكل كامل حول الكروموسوم وتنفصل جزيئات الدنا DNA الناتجة. وفي بدائيات النواة التي يكون فيها التضاعف ثنائي الاتجاه تستمر شوكتي التضاعف بالحركة حول الكروموسوم لحين التقائها.



شكل المراحل المختلفة لتضاعف الدنا DNA.

في كروموسومات حقيقية النواة حيث يلاحظ وجود وحدات تضاعفية عديدة او ريبليكونات، فان جميع الريبليكونات ترتبط ببعضها قبل انفصال الكروموسوم. يتألف الريبليكون من تلك القطعة من الكروموسوم المتضمنة نقطة المنشأ ونقطتين ختاميتين Termination points (أي النقاط التي يتم عندها أنهاء التضاعف).

لايزال الكثير لكي يعرف عن الانزيمات المساهمة في تفاعلات التضاعف والعقبة الرئيسية لمثل هذه الدراسات هي صعوبة عزل وتنقية الأنزيمات أما فردية أو بصورة مركبات. ويعز، هذا جزئيا الى حقيقة أن بعض هذه الأنزيمات قد تتلازم مع الأغشية.. ففي خلايا بداية النواة تكون شركات التضاعف مرتبطة بالغشاء البلازمي.

وفي الوقت الحاضر تبين ان هناك عدد من البروتينات المختلفة تكون متورطة مع التضاعف الدنا DNA في خلايا بكتريا القولون والعديد من بروتينات بكتريا القولون تكون متورطة بتفاعلات التي تسبق تكوين ممهدات من الرنا RNA تسمى هذه التفاعلات بـ..Prepriming reactions

تضاعف الكروموسوم في حقيقية النواة

يعتبر تضاعف كروموسوم حقيقية النواة أكثر تعقيدا من بدائية النواة وتضاعف DNA الفيروسات. والتعقيد المضاف ناتج جزئية من الطول الكبير لكروموسوم حقيقية. النواة. ومع ذلك يوجد تشابهات أساسية بين تضاعف الدنا DNA في حقيقية النواة وبدائية النواة والفيروسات فمثلا:

1 - يكون التضاعف شبه محافظ.

2 - يستخدم ممهدات من الرنا .RNA

3- يحصل التضاعف في كلا الاتجاهين.

4 - DNA جديد يتم بناءه على طول الشريط المتباطىء سلسلة من قطع اوكازاكي

5 - يكون الاتجاه الاجمالي للتضاعف هو 3' ⟵ 5'.

التضاعف شبه المحافظ في حقيقية النواة

تم التأكد من التضاعف شبه المحافظ لدنا DNA حقيقية، النواة من خلال سلسلة من التجارب أجريت من قبل J. Taylor H. و P. Woods عام 1957 فقد نميا خلايا قمة جذور الباقلاء لجيل واحد من الوقت في وسط يحتوي على الثايمدين المشع ونقلا بعد ذلك القمم النامية للجذور الى وسط خالي من الثايمدين H^3 حيث تركت لتمر في دورة انقسامية أخرى في هذا الوسط الجديد.

من جهة أخرى أضيف الكولجيسين Colchicine الى الوسط من أجل منع أنفصال الكروماتيدات الشقيقة. بعد ذلك فحصت الخلايا باستخدام المجهر الضوئي والتصوير الشعاعي الذاتي ووجد أن الكروماتيدات الشقيقة لكل كروموسوم أحتوت كميات متساوية من المادة المعلمة (أي أعداد متساوية من الجينات المعروضة لوحظت في كل كروماتيدة). وعندما تركت الخلايا لتضاعف كروموسوماتها ودخلت دورة انقسام مايتوزية ثانية في وسط غير معلَم وجدت المادة المعلَمة في كروماتيدة واحدة فقط من كروماتيدني الكروموسوم - الطور الاستوائي. يكون الكروماتيد الشقيق غير المميز بالتصوير الشعاعي الذاتي، من خلال الطور الاستوائي من الانقسام المايتوزي الثاني مؤلفة من نيوكليوتيدات، غير معلمه بشكل كامل أن هذه النتائج تتوافق مع موديل شبه المحافظ التضاعف الكروموسوم

ريبليكونات كروموسومات حقيقية النواة Replicons of Eukaryotic chromosomes

قد يتألف الكروموسوم المتضاعف لبدائية النواة من ريبليكون واحد، بينما يتألف كروموسوم حقيقي النواة من آلاف الريبليكونات. لأبتدأ عملية تضاعف الدنا DNA في جميع الريبليكوات في نفس الوقت من طور S- phase. وبدلا من ذلك، ومن خلال أنواع معينه من آليات السيطرة تصنع الريبلكونات في فعالية تضاعفية في وقت خاص (او معين)، وباستخدام تقنيات معينه (مثل Pulse labeling technique بالاشتراك مع التصوير الشعاعي الذاتي) أمكن معرفة من أن مناطق معينة من الكروموسوم تتضاعف دائما بشكل مبكر في طوره S

(وتمثل مناطق الكروماتين الحقيقي من الكروموسوم) بينما تكون مناطق أخرى من الكروموسوم نشطة في أوقات متأخرة (وتمثل مناطق الكروماتين المتباين من الكروموسوم).

وكما سبق الاشارة في الفقرات الماضية بوجود ثلاثة أصناف من DNA: polymerases لحقيقية النواة وهم α، β، γ والانزيمات في كل صنف تتميز بوزنها الجزيئي، سلوكها في ال Chromatography وتخصصها في Primer- template-. فالانزيم α (الذي تبين أنه يوجد بأشكال متعددة) يملأ الفراغات المتروكة بين قطع اوكازاكي المتتالية بعد أزالة ممهد الرنا RNA وبعد أدخال آخر نيوكليوتيدة يقوم الانزيم DNA ligase I بربط النهايات الحرة ببعضها. والانزيم به مسؤول بشكل كامل عن تضاعف DNA الموجود في المايتوكوندريا، والانزيم لا يكون مسؤولا عن بناء الدنا DNA عند شركات التضاعف.

تفكيك وأعادة بناء النيوكليوسومات Disassembly & Reassembly of Nucleosomes

يتطلب تضاعف DNA حقيقية النواة تفكيك مسبق للنيوكليوسومات، وبعد حركة شوكة التضاعف بمسافة معينه على طول الكروموسوم، يعاد بناء النيوكليوسوم ففي الذراع المتقدمة Forword arm يكون أخر نيوكليوسوم مبني على بعد 125 نيوكليوتيدة من النهاية 3 للشريط القيادي Leading strand وعلى الذراع المتراجعة يكون أخر نيوكليوسوم مبني على بعد حوالي 250 نيوكليوتيدة من النهاية. 5لاول قطعة اوكازاكي. جزيئات الهستون التي هي جزء من النيوكليوسوم: المقدمة شوكة التضاعف ربما تنقل الى أحد مزدوجي الدنا DNAخلف شوكة التضاعف، بينما مزدوج الدنا DNA الآخر يتشكل مع هستونات مثمنة مبنية حديثة لتكوين نيوكليوسوم كامل جديد. قد تتوزع المثمنات الهستونية الجديدة والقديمة عشوائية بين الذراعين المتقدم والمتراجع.

الحامض النووي DNA الحافل بالتكرار Repetitive DNA

يتألف DNA العائد لكروموسومات بدائية النواة بدرجة أساسية من تسلسلات فريدة Unique sequences.وهذا يعني (باستثناء الجينات التي تشمل شفرات ال (rRNAs تكون تسلسلات الأزواج القاعدية غير مكررة. وعلى العكس فان كروموسومات، كائنات حقيقية النواة تحتوي على DNA حافل بالتكرار Repetitive DNAأي مؤلف من تسلسلات قاعدية مكررة عدة مرات.

لقد وجد أن نسبة التكرار في جينوم حقيقية النواة بشكل حوالي 20-50 ٪ منه يكون ممثلا بالدنا DNA الحافل بالتكرار. وما تبقى من الدنا DNA فيكون مؤلفا من سلاسل فريدة (أي نسخ مفردة). تعين كمية الدنا DNA الممثل بالسلاسل المكررة عن طريق السماح للدنا DNA المجزأة والممسخة لإعادة التئامها عن طريق التزاوج القاعدي المكمل. ويعتمد معدل اعادة الالتئام مباشرة الى كمية الدنا DNA الحافل بالتكرار الموجود. من المعترف به عموما أن السلاسل الفريدة تمثل جينات تركيبية لmRNA والبروتينات. يوجد صنفين واسعين من الدنا DNA الحافل بالتكرار:

1- Moderately Repetitiveمؤلف من 2 الى عدد كبير يصل الى 100000 نسخة من سلسلة معينة.

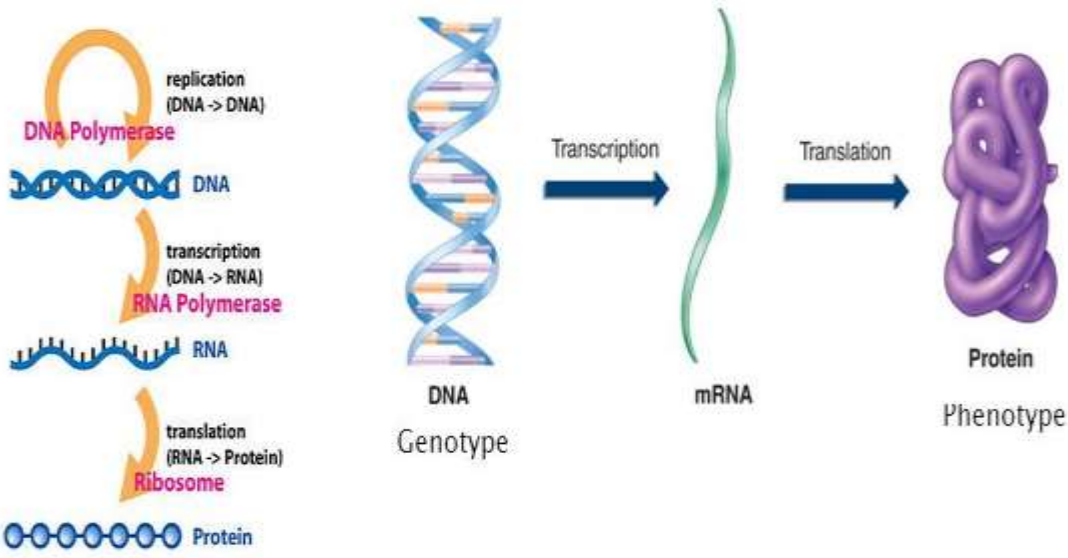
2- Highly Repetitiveمؤلف من أكثر من 100000 نسخة.

النوع الاول من الدنا DNA الحافل بالتكرار يشمل على جينات البروتينات معينة مثل الهستونات والبروتينات الرايبوسومية والعديد من rRNAs أما وظائف النوع الثاني من الدنا DNA الحافل بالتكرار فغير مؤكدة فهي تقع في مواقع الكروماتين المتباين الخامل وظيفيا.

بعض من الدنا Moderately Repetitive DNA قد يهاجر من كروموسوم الى أخر، أن مثل هذه السلاسل البدوية (المهاجرة) Nomadic sequences، قد تكون مشابهه للوحدات الأنتقالية Transposable elements في خلايا بدائية النواة.

استنساخ الحامض النووي الرنا Transcription RNA

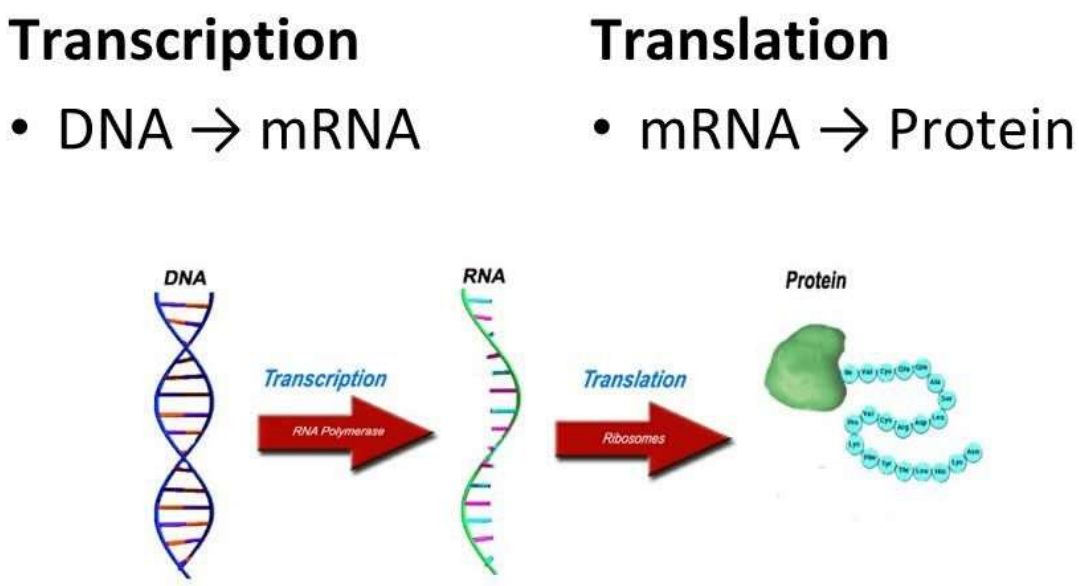
لا يتم تخليق البروتينات بواسطة الدنا DNA مباشرة، وأنما يتم ذلك، بمساعدة الحامض النوري mRNA الذي يقوم بنقل نسخة من المعلومات من الدنا DNA الموجود على الكروموسوم في النواة الى السايتوبلازم لوجود الرايبوسومات والحوامض الأمينية. أن الغرض من عملية الاستنساخ هو تسهيل عملية التعبير الجيني Gene expression والسماح ببقاء الجينات ضمن الكروموسوم لكي يتم الحفاظ على صيغتها التركيبية اثناء التضاعف أو أثناء عمليات الإصلاح والحفاظ على القدرة على توجيه النشاطات الخلوية.



شكل (1) الطراز المظهري ضمن صيغة الكرموسوم

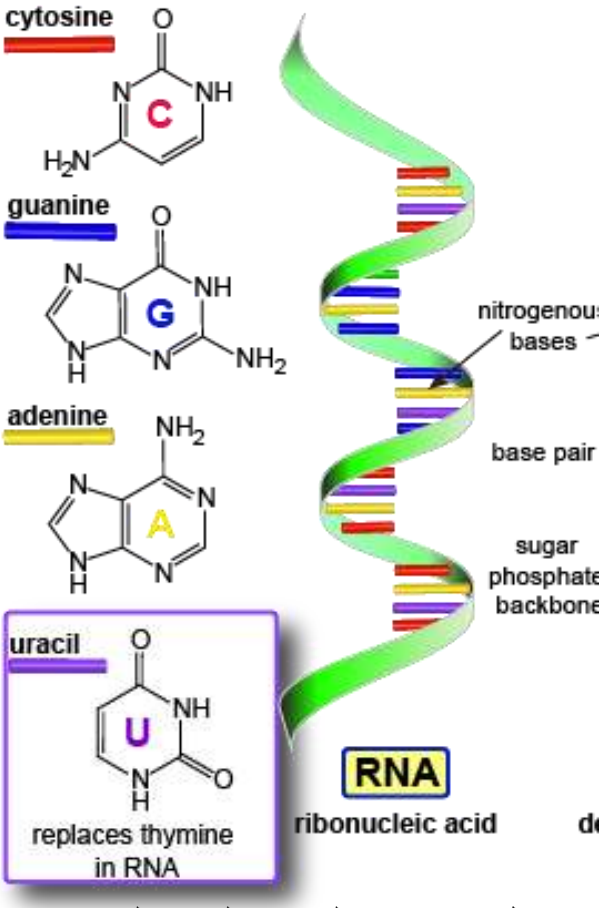
المظاهر المهمة لعملية الاستنساخ في كل من خلايا بدائية وحقيقية النواة

تعتبر جزيئة الدناDNA المكون الوراثي الأساسي للخلايا الحية، اذ تحمل هذه الجزيئة معلومات بصورة شفرات وراثية تنتقل من خلية الى خلية ومن كائن الى كائن آخر، وفي حالات قليلة جدا يحمل الحامض النووي RNA معلومات وراثية كما في بعض الفيروسات ولهذا يعمل الدنا DNA كوسيط في عملية الاستنساخ المعلومات الوراثية التي تعبر في النهاية عن تكوين بروتينات خاصة للخلايا حسب حاجتها الوظيفية مثل (في بدائية النواة كأنزيمات، سموم، عوامل نمو، عوامل التصاق وفي حقيقية النواة الأنتجينات، البروتينات المناعية، الأنزيمات الهرمونات، اللكنينات، المواد الغذائية، عوامل النمو الى غيرها من المواد) الشكل (2) يوضح العلاقة بين DNA وعملية انتاج البروتين وغالبا ان مثل هذه العلاقة في الوقت الحاضر في علم البايولوجي الجزيئي حيث تبين أن التعبير الجيني يشمل عمليتين هما الاستنساخ والترجمة.

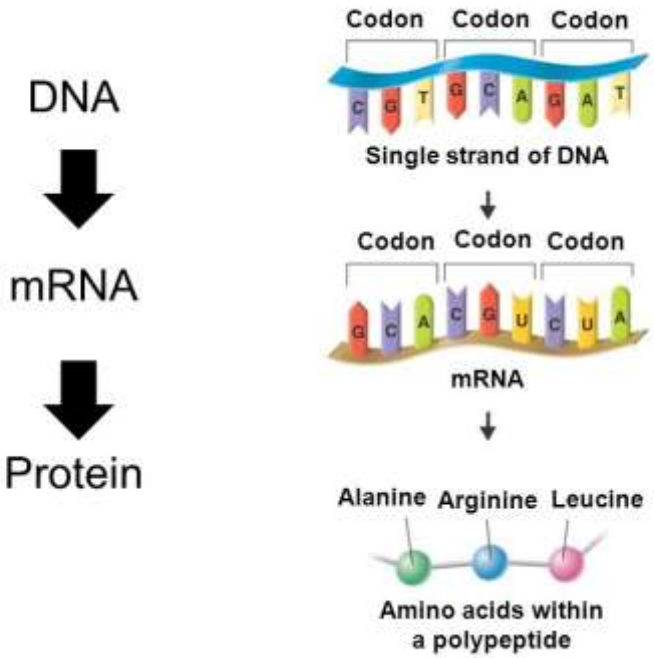


شكل (2) المبدأ المركزي في علم الأحياء الجزيئي

يطلق على عملية البناء الحيوي للحامض النووي لرنا RNA باستخدام قالب من الحامض النووي DNA بعملية الاستنساخ Transcription، وبما أن القاعدة النيتروجينية اليوراسيلUracil تتزاوج مع الادنينAdenine بنفس طريقة تزاوج الثايمينThymine معها فمن المعقول القول بان عملية الأستنساخ تعمل تقريبا بطريقة مشابهه لعملية تضاعف الدنا DNA والاختلاف بين الأستنساخ والتضاعف يكمن في عدد من النواحي ،فالاستنساخ يشمل جزء أو قطعة قصيرة من الدنا DNA الذي يمثل الجين التركيبي Structural gene الشكل (3) الذي يعين تواليات الحوامض الأمينية في سلسلة البروتين (او متعدد الببتيد Polypeptide التي تعطي التركيب الأبتدائي Primary structure لنوع البروتين) شكل (4)، كذلك بعكس التضاعف فأن الاستنساخ يؤدي الى تكوين خيط واحد مفرد أو سلسلة مفردة من الرنا RNA لذلك يجب أن يكون هناك أشارة تبلغ الخلية أي من خيطي الدنا DNA يستعمل كقالب.



شكل (3) تركيب الحامض النووي الرنا RNA



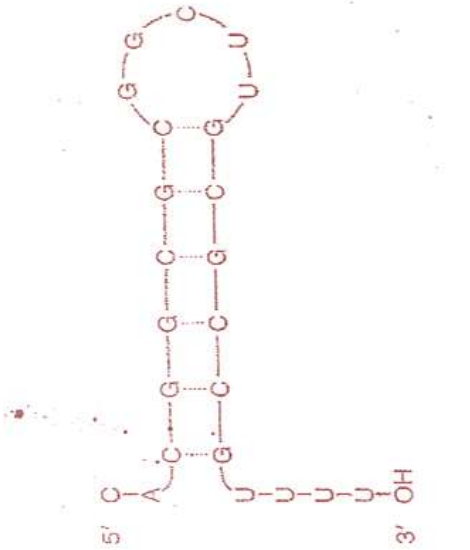
شكل(4) خيط مفرد من الدنا DNA يعمل كقالب لبناء الرنا المراسل mRNA والذي يعين تواليات الحوامض الأمينية في متعدد الببتيد(البروتين).

توجد عناصر السيطرة Controlling elements التي تعمل على تنظيم عملية استنساخ وهي: -

1- تواليات المحفز (المثير) Promoter التي يرتبط بها أنزيم البلمرة RNA polymerase وهي تواليات توجد في الدنا DNA قريبة من الجينات التركيبية شكل(5).
2- تواليات الانتهاء Terminator التي تعطي اشارة انتهاء عملية الأستنساخ والتي تؤدي الى (انحلال RNApolymerase من الدنا DNA القالب Template) شكل (6).
3- يطلق على التواليات الخاصة التي تمثل الجينات التركيبية اثناء الاستنساخ ب الابيرون Operon الخطوات الثلاث موضحة ادناه: -

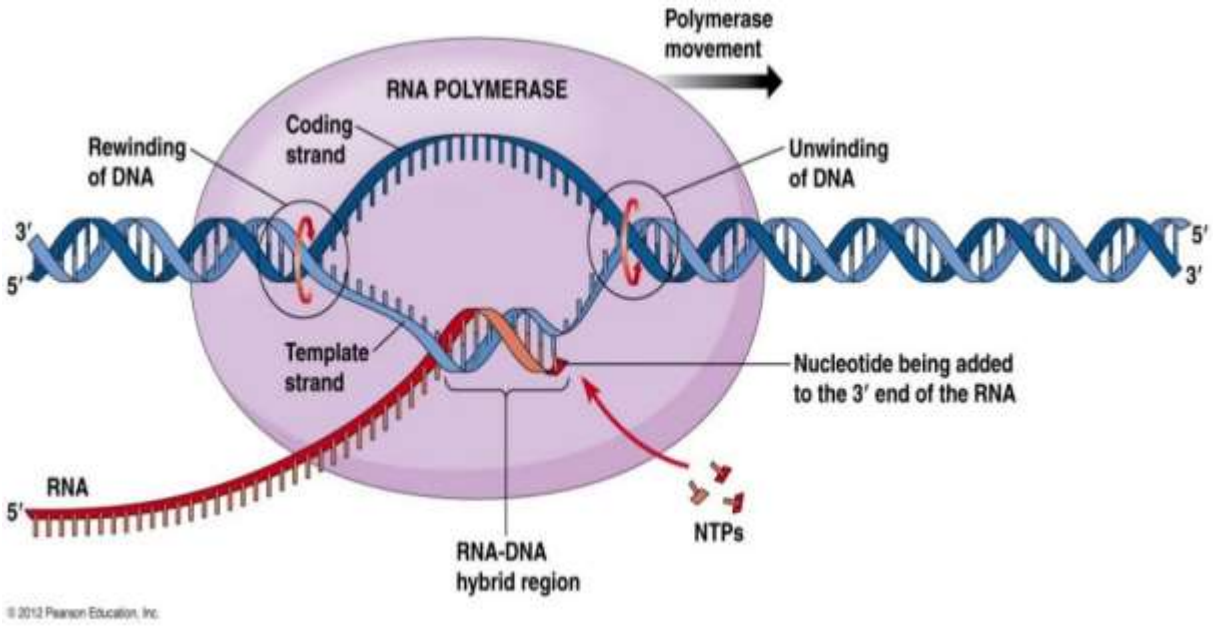
Promoter Operon Terminator

شكل (5) عناصر السيطرة التي تعمل على تنظيم عملية الاستنساخ



شكل (6) توالية الانتهاء من عملية الاستنساخ

وبعكس التضاعف فأن الاستنساخ يؤدي الى تكوين خيط واحد او سلسلة مفردة من الرنا RNA لذلك يجب أن يكون هناك أشارة تبلغ الخلية أي من خيطي الدنا DNA يستعمل كقالب لذا فأن بداية الجين تقع في الطرف '3 من تواليات الشفرة والنهاية للجين تقع في الطرف '5 أي بكون الشريط اتجاه قطبي مضاد للشريط القالب شكل (7).



شكل (7) المراحل المبكرة لعملية الاستنساخ في بدائية النواة

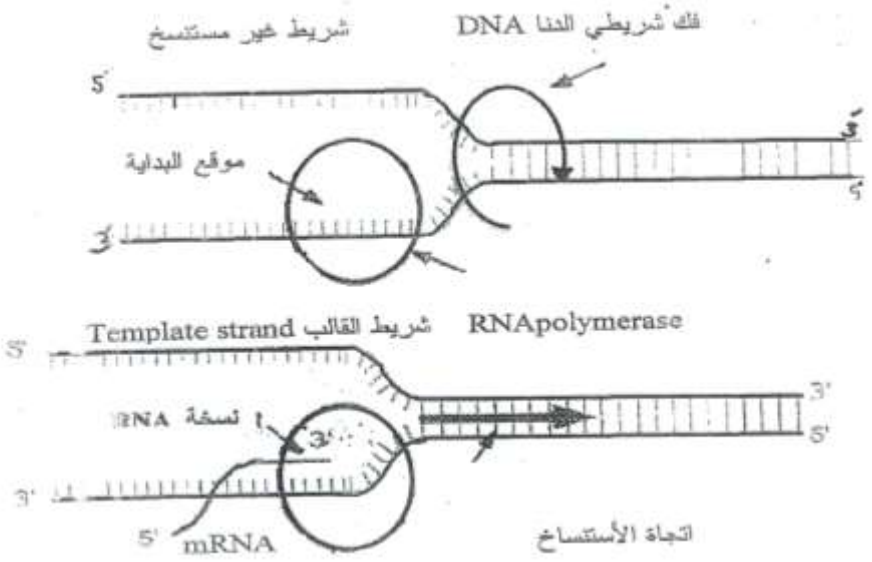
يطلق على التسلسل المنظم من نيوكليوتيدات الدنا DNA الذي يعتبر أشارة لبدء ولأنتخاب القالب خلال عملية الاستنساخ بالموقع المثير Promoter site، تنتهي عملية الأستنساخ عند تسلسلات منظمة خاصة، غالبا ما تكتب هذه التسلسلات كعروات مزدوجة القواعد base-paired loops غير ان أنطوائها (التفافها) الفعلي في الخلية غير معروف.

الاستنساخ في بدائية النواة

المظاهر المهمة لعملية الاستنساخ في كل من بدائيات وحقيقيات النواة هي:

1- ان ناتج عملية الاستنساخ هو تكوين RNA مفرد الشريط.

2- لكي تحدث عملية الاستنساخ يجب ان يتفكك الدنا DNA موقعيا ولكل جين فأن شريط واحد فقط من شريطي الدنا DNA يمكن أن تستخدم كشريط قالب لبناء الرنا RNA والذي يطلق على هذا الشريط بالشريط الحساس Sense strand، يمثل الجينات الفعالة (Active gene) التي يمكن ترجمتها Translation من خلال الرايبوسومات البناء متعدد الببتيد polypeptide شكل (8).



شكل (8) يمثل بداية واتجاه الاستنساخ

3 - أن المواد الأولية لعملية الاستنساخ (RNA precursors) وهي الجزيئات التي تتبلمر بصورة سلسلة من الرنا RNA نيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات UTP، CTP، GTP ، ATP (ribonucleotid triphosphates) ويطلق على مجموعها NTPs تبلمر هذه المواد الأولية وتحفز تفاعلات البلمرة بواسطة انزيم بلمرة الرنا(RNA polymerase) .

4- يتشابه تفاعل بلمرة الرنا RNA وتفاعل بلمرة الدنا DNA حيث تنتخب، النيوكليوسيدات الرايبوزية التالية المراد اضافتها الى السلسلة عن طريق انزيم بلمرة لقدرة على تكوين تزاوج قاعدي مكمل مع القاعدة المكشوفه للدنا DNAعلى الشريط القالب.

5- يتم بناء الرنا RNA بالأتجاة 5 ⟵ 3' فمثلا اذا كان الشريط القالب 3'-TCGGAT-5'- فأن سلسلة الرنا RNA ستكون 5'-AGCCUA-3' . شكل (9).

.DNA5'- A - G - AG - G - TG - C-T-3'

3' -T-C-T-C-C-A-C-G-A-5'

↓

mRNA 5' -A-G-A-G-G-U-G-C-U-3'

↓

tRNAs U-C-UC-C-AC-G-A

↓

Arginine Glycine Alanine

Polypeptide - Arg - Gly – Ala

شكل (9) الجين التركيبي الذي يستنسخ (في كل من بدائية وحقيقية النواة).

6- يبدأ الاستنساخ بأرتباط أنزيم البلمرة RNApolymerase بالموقع المثير وهنا يتم تمييز هذا الموقع من خلال آليتين: -

أ- أن الموقع المثير يمتلك مواصفات يمكن تمييزها بسهولة من قبل الأنزيم RNApolymerase وهي تسلسلات خاصة موجودة في الدنا DNA وفي هذه الحالة لا تحتاج هذه العملية الى عوامل ثانوية مساعدة.

ب - هناك مواقع مثيرة خصائصها غير ملائمة لبدء الاستنساخ (تحتاج الى عوامل بروتينية ثانوية مساعدة) لأبتداء عملية الاستنساخ أذ تستطيع هذه العوامل الثانوية من تمييز التواليات في الدنا DNA حيث تكون متداخلة ومن ثم يرتبط بها الأنزيم.

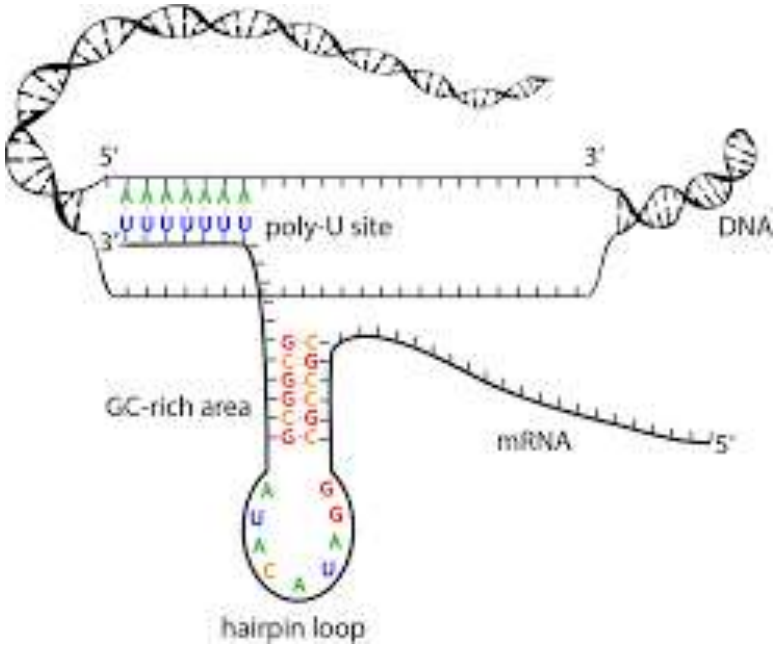
7- أنتهاء الاستنساخ

يوجد نوعين من حالات انتهاء الاستنساخ وهي:

أ-الأنتهاء لا يعتمد على رهوRho - independent termination HO

ب - الأنتهاء يعتمد على رهوRho - dependent termination HO

الحالتين تتطلب وجود قطع او تواليات يطلق عليها Palin drome sequences وهي عبارة عن تواليات مكررة معكوسةinverted repeate sequences ، وفي الحالتين توجد في المستنسخة عروات loops تعيق أنزيم البلمرة RNApolymerase على الحركة طولها حوالي 23 نيوكليوتيدة في الحالة الأولى يتطلب وجود تواليات السن اليوراسيل بحدود (6 تواليات يوراسيل) بعد عروات دبوس الشعر hairpin loops شكل (10)، في الحالة الثانية لا يوجد polyuracil sequences السؤال المهم هنا هل أن عملية الأنتهاء هي جزء من RNA المستنسخ أم جزء من DNA بعد أنتهاء الأستنساخ؟



شكل (10) تواليات تتضمن المنتهي مناطق الييندرومية التي تكون عروات دبوس الشعر متباينة في الطول من 7 الي20 زوج قاعدي، تتبع تراكيب الساق - العروة stem loop بتسلسل من القاعدة يوراسيل في الموقع غير المعتمد على Rho ولا ينبع بهدا التسلسل في الموقع المعتمد على Rho.

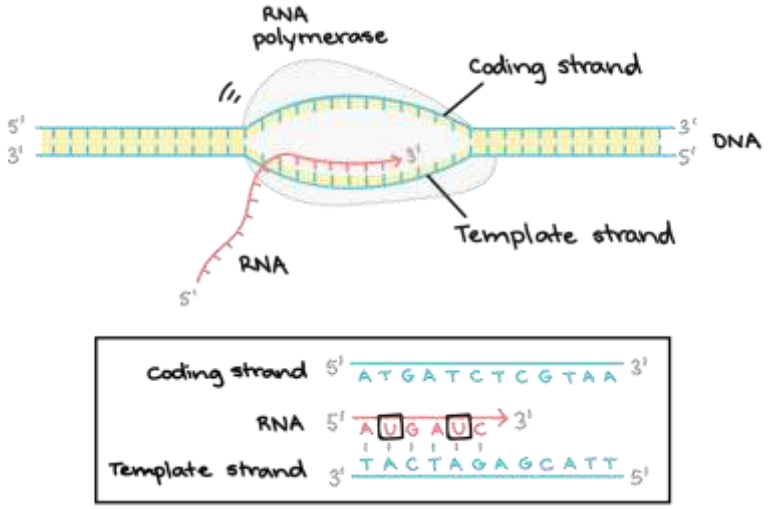
بناء الحامض النووي الرنا mRNA

عبارة عن خيط (سلسلة) مفرد مستقيم من النيوكليوتيدات المتعددة، تؤلف كل ثلاث نيوكليوتيدات متتالية شفرة وراثية (بأستثناء حالات التداخل في الشفرات الوراثية) شكل (11)، والتي يطلق عليها بتواليات التشفيرCoding sequence تلي التوالية الرائدة، تترجم توالية التشفير الى توالية الحوامض الأمينية لجزيئة البروتين.

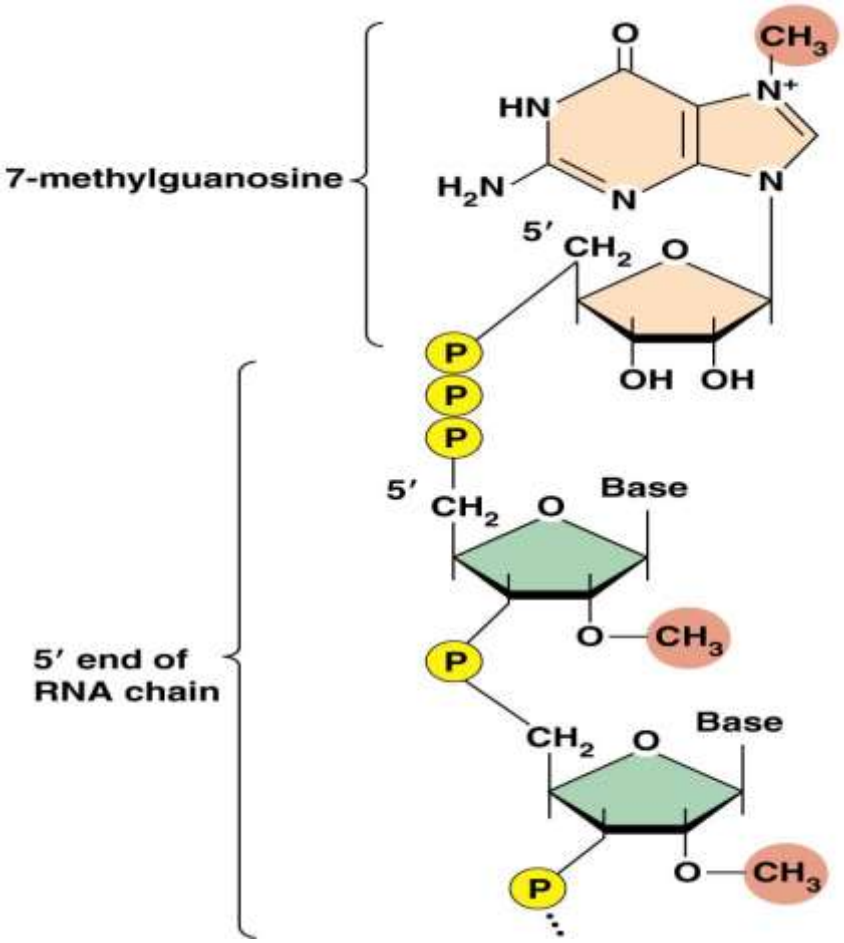
أشارت نتائج البحوث العديدة الى ان الطول الكلي النموذجي لجزئيات، الحامض النووي mRNA المعزول من سايتوسول خلايا حقيقية النواة يبلغ حوالي (1500) . نيوكليوتيدات متتالية مؤلفة من مناطق شفراتها تترجم الى حوامض أمينية ومن مناطق شفراتها لاتترجم. وحيث ان mRNA بهذا الطول يحمل غالبا شفرات وراثية لبروتين مؤلف من حوالي (500) حامض أميني، لذلك فأن mRNA في حقيقية النواة يكون في الغالب آحادي السيسترون Monocistronic أو آحادي الجين Monogenic أي ان mRNA حقيقية النواة يحمل شفرات وراثية لبروتين واحد ، وقد توجد حالات يكون mRNA فيها متعدد السيسترونات . Polycistronic

في بدائية النواة يكون mRNA غالبا متعدد السيسترونات Polycistsonic او متعدد الجين polygenic أي ان mRNA يحمل شفرات وراثية لأكثر من بروتين واحد، وفي هذه الحالة يكون طول mRNA في بدائية النواة أكبر من طولة في حقيقة النواة . فمثلا المسار الحيوي لبناء Tryptophan يتطلب خمسة أنزيمات، وتكون هذه البروتينات موجهه من قبل جينات مجاورة لبعضها البعض في جزيئة الدنا DNA، تستنسخ جميع هذه الجينات الخمسة في mRNA مفرد، وفي هذه الحالة يحمل mRNA أكثر من 7000 نيوكليوتيدات متتالية .

تمتلك جزيئة mRNA نهاية مؤلفة من 3'-OH ونهاية ثانية مؤلفة من 5'-phosphate، وتتشابه جميع أنواع mRNA في هاتين النهايتين. يحصل تحوير في النهاية (5') بعد الاستنساخ مباشرة، أن يحصل عندها عملية Methalation تضاف مجموعة methal السلسلة m7GpppNmNmp او تسمي بـ M7Cppp ويشار اليها بالقلنسوة Cap . يعتقد بان القلنسوة صفة مميزة للاستنساخ في خلايا حقيقة النواة شكل (12).



شكل (11) عملية الاستنساخ تكوين خيط مفرد من mRNA



شكل (12) تركيب القلنسوة للـ mRNAs في خلايا حقيقة النواة

تحتوي النهاية (3') للحامض النووي mRNA على سلسلة متعدد الأدنين Poly - A Polyadenylic acid شائعة في حقيقية النواة ويصل طول هذه النهاية بين (20) الى (250) نيوكليوتيدة، يطلق على هذه النهاية تسمية الذنب Tail

لاتوجد شفرات السلسلة (Poly – A) في الدنا DNA ولكنها تضاف الى mRNA في النواة بعد عملية الاستنساخ. يساهم في عملية اضافة Poly A الى mRNA الأنزيم الذي يميز النهاية الحرة OH-3 لـ mRNA ليضيف حوالي A200، وغير معروف كيف أن طول هذه السلسلة يسيطر عليه، ومع ذلك فان طول هذه السلسلة بضد بر عند انتقال الى السايتوبلازم. وليس هناك ما يشير الى وجود علاقة بين طول Ply A مع قدرة mRNA على ان يترجم او مع ثباته في السايتوبلازم.

وتجدر الاشارة الى ان المنطقتين القلنسوة والذنب لا تترجمان أثناء عملية بناء البروتين الى حوامض أمينية. كما أن هناك مناطق أخرى في :mRNA لا تترجم أيضا وهذه المناطق هي: -

1. القطعة الرائدة Leader segment بالقرب من النهاية (5'). يتباين طولها من mRNA الى أخر، وضمن هذه التوالية توجد المعلومات التي يستعملها الرايبوسوم لبدء بناء البروتين عند الموقع الصحيح، ولا تترجم التوالية الرائدة..
2. القطعة الختامية Trailer segment بالقرب من النهاية (3'). متباينة في طولها من mRNA الى أخر، يلاحظ أن جزيئات mRNA متعددة السيسترون. في بدائيات النواة تمتلك توالية رائدة وختامية وتواليات مباعدةSpacer sequence بين تواليات التشفير.

أن الطبيعة الكيميائية لمنطقة قلنسوة الحامض النووي mRNA تساهم بوضوح في ابتداء الترجمة الصحيحة.

تحتوي خلايا بدائية النواة مثل بكتريا القولون كروموسوم مفرد طوله حوالي 3000000 زوج من القواعد النيتروجينية. آن طول هذا الكروموسوم كاف لحمل شفرات وراثية (باستثناء المناطق التي لا تترجم) لحوالي (3000) بروتين، وهذا العدد من البروتينات يتفق بشكل مناسب مع عدد البروتينات المختلفة المعتقد وجودها في بكتريا القولون.

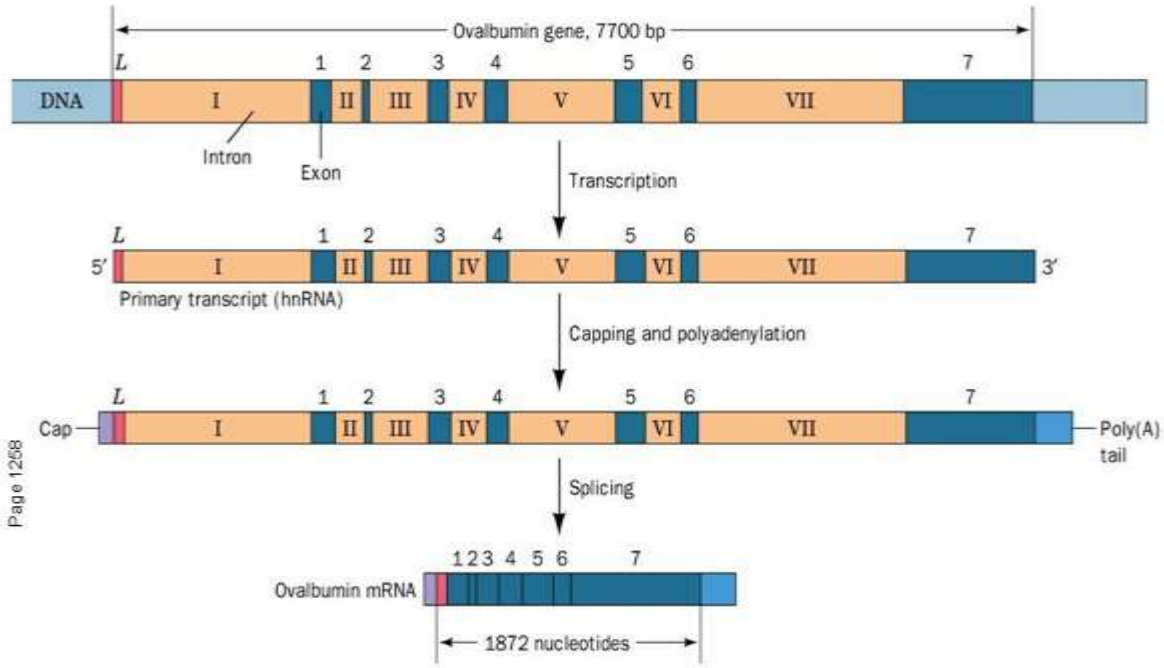
من ناحية ثانية تحتوي خلايا حقيقية النواة كميات كبيرة جدا (بالمقارنة مع بدائية النواة) من الحامض النووي DNAفمثلا يعتقد أن جينوم (الجينوم هو المحتوى الجيني للخلية الحية) الانسان يحتوي على ما يزيد عن 000 000 000 4 زوج من القواعد النيتروجينية موزعة بين (46) كروموسوم الموجودة في كل خلية من خلاياه، أن هذا الطول من الدنا DNA كاف لحمل شفرات وراثية لما يزيد على مليون من السلاسل الببتيدية (البروتينات).

أن هذا العدد أكبر بكثير مما يعتقد وجودة في خلايا الإنسان من احتمل جدا أن العدد الحقيقي من البروتينات المختلفة يتراوح بين 30000 الى 150000. ان التباين الواضح بين كمية الجينات التركيبية للدنا DNA التي يجب أن تكون موجودة في خلايا الانسان والكمية المعبر عنها فعلا يمكن أن يعزى جزئيا الى ما أكتشف حديثة وهو ليس جميع الرنا RNA الناتج من أستنساخ الجين التركيبي يؤدي الى تكوين mRNA المراد ترجمته، اذ يوجد في الجين التركيبي او الدنا DNA تسلسلات نيوكليوتيدية لا تدخل في تركيب mRNA الناضج ولكنها توجد في نوع من RNA يسمى بالرنا RNA المتباين النووي Heterogenous nuclear RNA أحيانا ترتبط مع بعض الدقائق البروتينية مكونة معقدات يطلق عليها دقائق بروتينية رايبوزية نيوكليوتيدية (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles hnRNPs). وهذه التسلسلات النيوكليوتيدية تسمى أنترونات Introns جدول (1) يظهر عدد الأنترونات لبعض الجينات مقارنة بحجم الجين، أما التسلسلات النيوكليوتيدية الموجودة في الجين التركيبي وتبقى في mRNA الناضج والتي تمثل الشفرات الوراثية فتسمى أكسونات .Exones

فمثلا الجين التركيبي المسؤول عن بروتين اوفالبومين Ovalbomin في الدجاج يتألف من ثمانية أكسونات تنفصل الواحدة عن الأخرى بأنترون مفرد شكل (13). وهذا الجين يتألف من 7700 زوج من القواعد النيتروجينية، ان هذا العدد هو اربعة أضعاف أعظم من طول mRNA الناضج والبالغ طوله 1872 نيوكليوتيدة فقط. فاذا أهملنا القلنسوة والذنب Poly-Aعندئذ يكون الجين التركيبي سبعة مرات، أطول من جزء الرسالة التي تترجم الى بروتين.

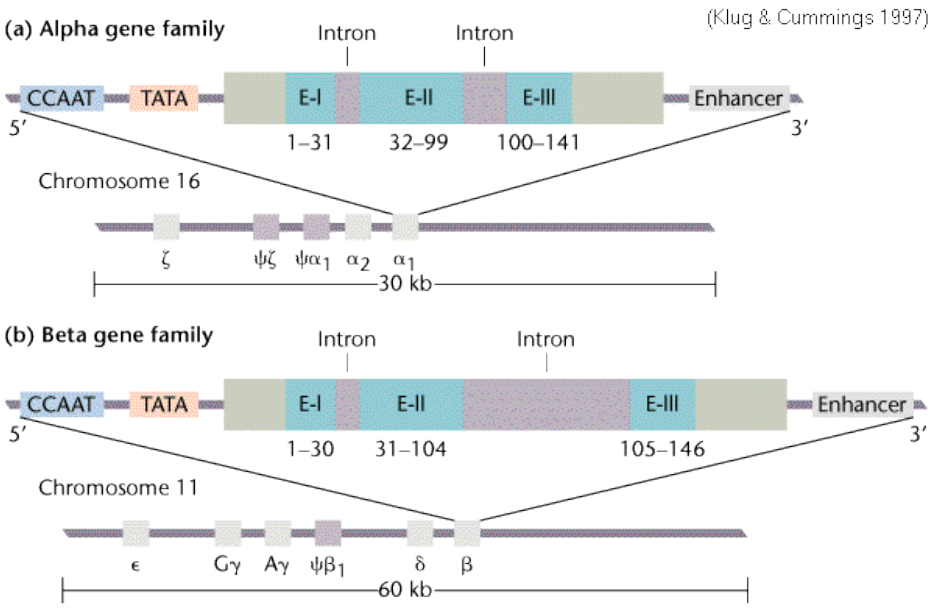
جدول (1) يوضح المقارنة بين حجم الجين في الانسان وحجم mRNA وعدد الانترونات

الجين	حجم الجين (kb)	حجم mRNA(kb)	عدد الانترونات
Insulin	7.1	0.4	2
Collagen(pro-α-2(1)1	0.38	5.0	50
Albumin	0.25	2.1	14
Phenylalanine	0.90	2.4	12
Dystrophin	2000	17.0	50



شكل (13) التواليات الاساسية لإنتاج mRNA الناضج لجين Ovalbomin

مثال أخر جين بيتا كلوبين β -globin في الفأر مؤلف من 146 حامض أميني موزعة على ثلاثة أكسونات مفصولة عن بعضها من خلال أثنين من الانترونات شكل (14) الاكسون الأول Exon 1 يشفر الحوامض الأمينية من (1-30) وExon2 يشفر الحوامض الأمينية من (31-104) والأكسون الثالث يشفر الحوامض الأمينية من (105-146)، وبالإضافة الى أن هذا الجين يحتوي على مناطق لا تترجم في النهايات (3') و(5')



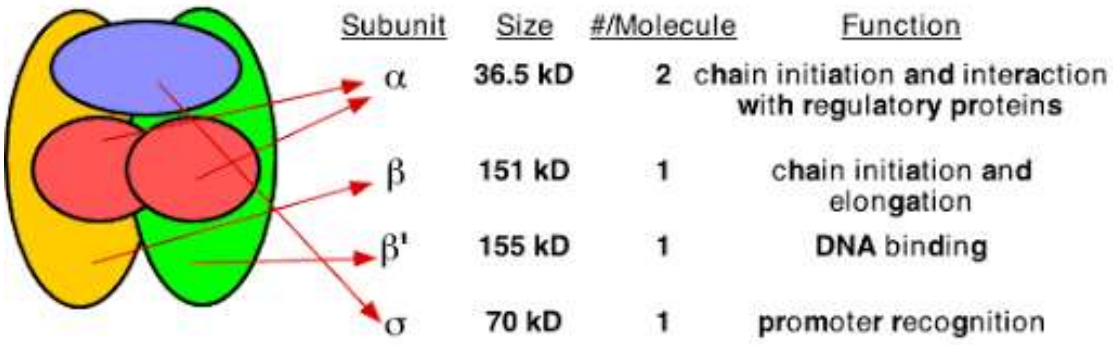
شكل (14) جين بيتا كلوبين β -globin في الفأر

لقد وجد إن بعض جينات الفقريات تحتوي على أكثر من (50) أنترون أنظر جدول (8-1). في حين أن بعض الجينات في حقيقية النواة قد تفقد الأنترونات تماما فمثلا الجينات المسؤولة عن بروتينات الهستونات لا تمتلك قلنسوة ولا تمتاك، أنترونات. ومثال أخر هو الجين المسؤول عن بروتين الأنترفيرون Interferon.

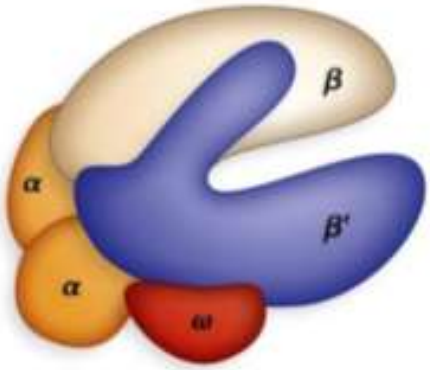
لقد أقترح بعض الباحثين أنه بإزالة (او تحريك) الإكسونات بعيداً فان الانترونات تزيد من تكرار تكوين الاتحادات الجديدة (اي أنها تزيد من تكرار حدوث عملية تكوين التشكيلات الجديدة Recombination وبالتالي فأن هذا يشجع على التطور الكائنات الحية. وفي الحقيقة كلما ارتفع سلم التطور كلما امتلكت الجينات أعداد أكبر من الانترونات.

تركيب الانزيم RNA - polymerase في بدائية النواة

يمتلك كل كائن بدائي النواة أنزيم بلمرة RNApolymerase خاص به، من بين أنزيمات بلمرة RNA لبدائيات النواة درس الأنزيم الموجود في بكتريا القولون ***E. coli*** يمتلك هذا الانزيم معامل ترسيب يتراوح مقداره بين 11S الى 13Sووزنه الجزيئي 500000 دالتون، يتألف هذا الإنزيم من خمسة سلاسل متعددة الببتيدات أومن خمسة وحدات ثانوية مركزية الموقع وثلاث وحدات مساعدة منظمة. حيث توجد سلسلتين الفا α (alpha)، و سلسلة β (Beta)، و سلسلة β'(Beta prime)، وسلسلةϬ. (اوميكا Omega)، وتحتل هذه السلاسل الخمسة مركز الإنزيم، تختلف هذه الوحدات في الموقع الجيني والكتلة شكل (15)، أما السلاسل المساعدة فهي سيكما δ (Sigma) و Ю(Rho رهو) وψ بساى (Psi) شكل (16).



شكل (15) الوحدات الثانوية لأنزيم بلمرة RNA (RNA polymerase) في بكتريا القولون E.coli



شكل (15) مخطط لنموذج أنزيم بلمرة الرنا RNApolymerase في بكتريا القولون (قلب الأنزيم).

تستطيع الوحدات الثانوية المركزية الخمسة (δ و β' وβ و$\alpha 2$) بناء الرنا RNA أذا أحظنت مع القالب الدنا DNA، النيوكليوسيدات الرايبوزية ثلاثية الفوسفات الأربعة. المختلفة وايونات المغنيسيوم Mg^{++} لا تستطيع الوحدات الثانوية الخمسية من تمييز المواقع المثيرة لذلك يستنسخ الرنا RNA بشكل غير مميز السلسلة الببتيدية (الوحدة الثانوية المساعدة) δ هي الجزء الخاص من الانزيم RNA polymerase الذي يستطيع أيجاد المثيرات .Promoters يرتبط معقد من الوحدة الثانوية δ والوحدات الثانوية المركزية بالمثيرات لتبدأ عملية أستنساخ RNA بعد أكمال الاستنساخ تنفصل الوحدة الثانوية δ من الوحدات الثانوية المركزية للانزيم لتنتشر بعيدأ ربما لمساعدة بزيئة اخرى من RNA polymerase لايجاد مثير جديد، أن هذه الوحدة يكون ارتباطها بالأنزيم ضعيف. تلعب هذه الوحدة دورا مهما في بناء الرنا RNA، فأذا لم يرتبط العامل δ بقلب الأنزيم فأن الأخير سيعمل على بدء بناء الرنا RNA عند مواقع عشوائية على طول الدنا DNA وأكثر من هذا فأن كلا شريطي الدنا DNA يستنسخان بدلا من شريط واحد، وهذه الوحدة الثانوية ذات الوزن الجزيئي 95000 دالتون ضرورية لقلب الأنزيم البدء بناء الرنا RNAعند مواقع خاصة على طول الدنا DNA، يطلق على هذه المواقع الخاصة تواليات الممهدة ((Promoter sequences) أو الممهدات (Promoters) مواقع الربط المحفز فأذا لم يرتبط العاملة بقلب الأنزيم فأن الأخير سيعمل على بدء بناء الرنا . RNA عند مواقع عشوائية على طول الدنا DNA واكثر من هذا فأن شريطي الدنا DNA يستنسخان بدلا من شريط واحد .

الوحدة الثانوية في وزنها الجزيئي 165000دالتون، والوحدة الثانوية وزنها الجزيئي 155000 دالتون، في حين الوزن الجزيئي للوحدة الثانوية الواحدة منه هو41000 دالتون الوحدة الثانوية β المعزولة وجد أنها ترتبط بالدنا DNA في الزجاج بينما لا تلاحظ، ط الوحدتين الثانويتين α وβ بالدنا DNA، وعليه أن الوحدة الثانوية β' هي وحدة الارتباط بالدنا .DNA

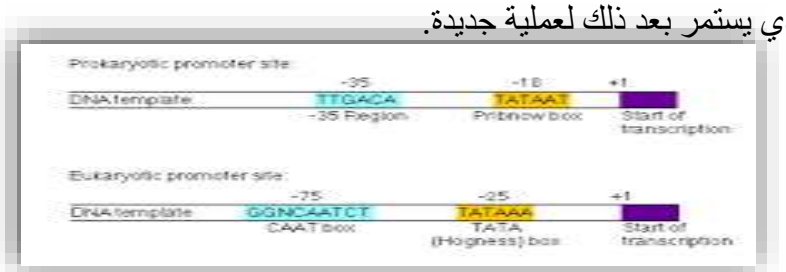
اما الوحدة الثانوية رهو Ю (Rho) هو انهاء الاستنساخ حيث ترتبط هذه الوحدة الثانوية الخماسية (تتكون من خمسة سلاسل ببتيدية متماثلة) بموقع أنهاء استنساخ الرنا RNA لتسمح للانزيم RNA polymerase لتميز موقع ايقاف الاستنساخ.

اما الوحدة الثانوية ψ (بساي Psi) مهمة في تميز المنطقة التي يجب أن تستنسخ بسرعة أكبر من بقية الدنا .DNA

يوجد دليل الى أن قلب انزيم بلمرةRNA يعاني تغييرات شكلية وعلى وجه الخصوص تغيير حساسيته للملح وأنزيمات هدم البروتينات Proteases والمثبطات عندما يكون مرتبطة بالدنا DNA وعندما يكون بناء الرنا RNA محفزاً، وكما لوحظ أن الأنزيم يصبح غير سياسة الى مثبطات بناء الرنا RNA-ريفامبيسين -Rifampicinحالما تكون خطوة ارتداء السلسلة قد اجتازت.

وعندما يتم استنساخ الجين يتحرر أنزيم بلمرة RNA ويحل محل الرنا RNA المبني حديثا الحلزون المزدوج للدنا DNA الذي يعاد تكوينه في هذا الجين المستنسخ ويتوقف الاستنساخ بعد أن يتم تمييز توالية أنهاء الاستنساخ Transcription termination sequence التي تقع بعد الجين من قبل معقد قلب أنزيم بلمرة الرنا RNA وعامل بروتيني يشفر عنه من قبل الجينnus A، وعند انهاء الاستنساخ بشكل صحيح ينفصل عامل الجينnus A من قلب الأنزيم ويمكن أن ي عمل على تفاعل انهاء أخر.

تقع أحداث تمييز وابتداء الاستنساخ المحفزة. بأنزيم بلمرة الرنا RNA بسرعة جدة عادة ضمن 0.2 من الثانية، ومفتاح العملية هو تمييز تواليه الممهد في الدنا DNA عن طريق الأنزيم. تمتلك الممهدات التي تميز عن طريق أنزيم بلمرة الرنا RNA لبكتريا القولون *E. coli* بشكل مشترك (مع أختلافات صغيرة) توالية سباعية النيوكليوتيدات تسمى صندوق بريبناو Pribnow box توجد فوق حوالي خمسة أو ستة قواعد ضد التيار من البداية للأستنساخ أن توالية صندوق بريبنا و على الشريط المقابل للقالب تمتلك الصيغة '3 '-5'TATAAAA او TATA box، مثل هذه التوالية تلاحظ في حقيقية النواة لكن تسمى هنا Goldberg - Hogness box في الحقيقية عند 30 زوج قاعدي عكس التيار ابتداء من نقطة الأبتداء (تلعب هذه التواليات في تنظيم الأستنساخ Regulation of transcription) في حين يطلق على التوالية الثانية بتوالية التمييز Recognition sequence التي تقع عند حوالي 35- زوج قاعدي غدد التيار من بداية نسخة الرنا RNA شكل (16) وربما يرتبط أنزيم بلمرة الرنا RNApolymerase اولا هنا وبعد ذلك ينزلق نحو صندوق بريبنا و لبدء الاستنساخ، بعد بدء بناء الرنا RNA ينفصل عامل δ من قلب الأنزيم الذي يستمر بعد ذلك لعملية جديدة.



شكل (16) تواليات المحفز في بكتريا القولون يمتلك مجموعتين من التواليات تقع بين -10 و : 35 زوج قاعدي لاحظ موقع بداية الأستنساخ.

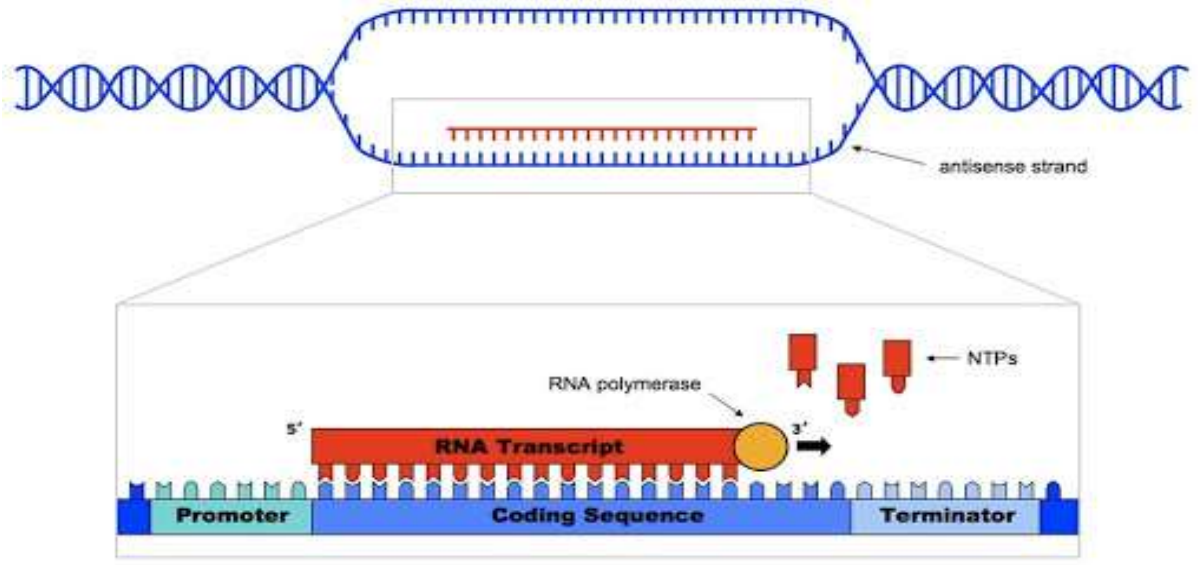
المضاد الحيوي Rifampicin يثبط بدء الاستنساخ بينما يثبط المضاد الحيوي Streptolydigin تطويل سلسلة RNA. ترتبط هذه المضادات الحيوية بالوهلة الثانوية B للخلايا البرية Wildtype cells ولكنها لا ترتبط بالوحدة الثانوية β المعزولة من طافرات مقاومة لهذه الأدوية، وعليه فأن الوحدة الثانوية β قد تتورط في تحفيز تدوين الروابط الفوسفاتية ثنائية الستر، أما دور الوحدة الثانوية α لايزال غير معروف لحد الأن يثبط polymerase لبدائية النواة بالدوائيين Rifampicin (Rifamycin RNA) وStreptolydigin ويرتبطان بالوحدة الثانوية من الانزيم، في هذه الحالة يرتبط الانزيم بالدنا DNA ولكنه لا يستطيع من تطويل RNA.

خطوات بدء وتطويل وانهاء الاستنساخ

يتطلب ثلاثة أنواع من التواليات الأزواج القاعدية لكي يستنسخ الجين وهي: -

1. تواليات DNA تشفر عن التوالي القاعدي لنسخة الرنا RNA (الجين Gene).
2. توالية تعطي أشارة نقطة الأبتداء للاستنساخ (أي توالية الممهد promoter sequence).
3. توالية تعطي اشارة نقطة الأنتهاء للاستنساخ (أي توالية الأنتهاء terminator sequence).

ويمكن توضيح الخطوات الثلاثة كما يلي:



شكل (17) مخطط لنموذج تطويل أنزيم RNApolymerase

من هنا فأن الممهد يقع عكس التيارupstream من الجين وأن المنتهي يقع مع التيار downstream من الجين.

وأن أهم المظاهر لهذه العمليات هي:-

1. يمييز قلب أنزيم بلمرة RNA (RNA polymerase core enzyme) مع عامل سيكما δ توالية المهد ويرتبط بها.
2. ينزلق أنزيم بلمرة RNA باتجاه الجين ويحفز على تفكك موقعي لشريطي الدنا DNA معرضاً شريط القالب template strand لبدء بناء الرنا RNA.
3. يبدأ بناء الرنا RNA وتصنع سلسلة بالأتجاه -'5 الى '3 - وحال اتمام عدة تفاعلات البلمرة (أي حال أضافة عدد قليل من النيوكليوتيدات الى سلسلة RNA النامية) يتحرر عامل سيكما من قلب الأنزيم.
4. تعطي توالية أنهاء الأستنساخ transcription termination sequence أشارة لأنزيم بلمرةRNA ليوقف أستنساخ الدنا DNA تتألف تواليات الانتهاء من جزئيين: -
   a) منطقة تحتوي نسبة عالية من الأزواج القاعدية GC (أي منطقة غنية بـ GC).
   b) سلاسل من قواعد T على شريط الدنا DNA المقابلة لشريط القالب بصورة منطقة غنية بـ AT.

تستنسخ كلا المنطقتين بأنزيم بلمرةRNA ويسبب التزاوج القاعدي بين جزئين من النسخة في هذه المنطقة علاقة متغيرة بين أنزيم بلمرة RNA والدنا DNA، وبالنتيجة فأن أنزيم بلمرة RNA لا يستطيع من أطالة سلسلة الدنا DNA على مدى أكثر وينفصل هذا الأنزيم وكذلك سلسلة الرنا RNA من الدنا DNA، ويشمل تفاعل الأنتهاء على معقد complex بين أنزيم بلمرة RNAوالعامل البروتيني للجين nus A ويتطلب تحرير نسخة RNA من الدنا DNA فعالية بروتين العامل رهو (rho)p factor

الأستنساخ في حقيقية النواة

يحدث الأستنساخ في حقيقيات النواة بطريقة مشابهة جدا في بدائيات النواة، لكن هناك أختلافين فقط بينهما **الأول**: هو أن التواليات التي توجه الأستنساخ تكون مختلفة. **وثانيا**: هو استعمال أكثر من نواع واحد من أنزيمات بلمرة RNA في خلايا حقيقة النواة.

أنواع أنزيمات بلمرة الرنا RNA RNA polymerasesفي حقيقية النواة:

تحتوي حقيقية النواة على الاقل ثلاثة أنواع من هذا الانزيم جدول (3) يظهر أهم خصائص تلك الأنزيمات وهي: -

1 – RNApolymerase I يشكل 50-70% من بناء RNA الخلية يساهم في استنساخ rRNA الرئيسة (8.5 S, 18 S, 28 S) يتركز وجوده في النوية، يحفز بشكل جيد بواسطة Mg^{+2} , Mn^{+2} لا يثبط هذا الانزيم على الاطلاق بالمثبط ألفا - امانيتين.

2- RNApolymerase II يساهم في استنساخ mRNA يتركز في البلازما النووية يحفز بشكل اساس بالايونين Mg^{+2} , Mn^{+2} يشكل تقريبا بين 20%-40 من فعالية الخلية في انتاج RNA. وهو ضروري لبناء معظم أنواع ال RNA وبالذات mRNA يثبط بتراكيز واطئة من الفا - امانيتين.

3- RNA polymerase III يساهم في استنساخ rRNA الصغيرة, 5S RNA و tRNA ويتركز وجوده في البلازما النووية بدلا من النوية. وهو ذي فعالية واطئة حيث يجهز الى 10% من سعة الخلية في بناء RNA.يحفز قليلا بكفاءة أكبر عن طريق Mn^{+2} بدلا من Mg^{+2} يثبط هذا الإنزيم بتراكيز عالية من الفا- امانيتين.

يمكن تميز الأنواع الثلاثة تجريبيا بواسطة: -

1- **تفضيلها الأيوني**
2- **درجة تثبيطها بواسطة amnanitin**
3- **موقعها**

Amnanitinبتركيز قليل يثبط RNA polyII (0.03 mgL) RNA polyIII . يثبط بتركيز أعلى (20) في حين لا يثبط RNA polyI (ولنقل انه يثبط عندما يصل التركيز الى اكثر من 500 ml/mg وهذه المادة المثبطة هي ثنائية الحلقة مثمن الببتيدات تحتوي المايتوكوندريا والبلاستيدات الخضر

أنزيمات بلمرة RNA خاصة بها ، وهي تشبه أنزيمات بلمرة RNA البكتريا في حساسيتها للمثبط ريفامبيسين وعدم حساهميتها للمثبط الفا-امانيتين. جميع هذه الأنواع الثلاثة للإنزيمات هي معقدات يتألم كل منها من عدد من الوحدات الثانوية متعددة الببتيد.

جدول (3) اهم خصائص RNA polymerases الخلايا حقيقية النواة

الشكل	الاستنساخ الخلوي	الموقع	تاثير α- amnanitin
I	rRNA	النوية	غير حساس
II	rRNA, snRNA	بلازما النواة	قوي التثبيط
III	5SrRNA , tRNA	بلازما النواة	تثبيط بالتراكيز العالية

التواليات التي توجه الاستنساخ

اظهر تحليل تواليات الأزواج القاعدية عكس التيار upstream من جينات خلايا حقيقية النواة التي تشفر عن البروتين وجود توالية TATAAAA تقرأ من '5 الى '3 على الشريط غير القالب من الدنا وتسمى هذه التوالية بصندوق TATA box (TATA) او صندوق كولدبيرك - هوكنس (Goldberg - Hogness box) . وتوجد هذه التوالية عند ما يقارب 30 زوج قاعدي عكس التيار من أول زوج قاعدي يستنسخ الى RNA، وأعتبرت على أنها من المحتمل توالية الممهد، وتظهر تواليات أخرى عكس التيار على نحو أبعد من الصندوق TATA على أنها تلعب دورا في تنظيم الأستنساخ وخصوصا في تعيين معدل ابتداء أستنساخ الجين، يوجد كذلك دليل من أن أنواع متعددة مختلفة من تواليات الممهد تستعمل في خلايا حقيقية النواة.

ولحد الآن لازالت المعلومات قليلة عن طبيعة تواليات أنهاء الأستنساخ في خلايا حقيقية النواة بسبب العملية السريعة عند النهايات، '3 من النسخ للجينات التي تشفر عن بروتين، في الخميرة يكون جزء من أشارة أنهاء الأستنساخ هو التوالية TTTTTATA ويوجد دليل الى أن الأشارة الكاملة ليست أكثر من 21 زوج قاعدي، ويظهر أن الأشارة الكاملة تتطلب وجود تواليات أخرى مع التيارdownstream لتكون فعاليتها كاملة.

الحامض النووي الرنا المراسل Messenger RNA

الخصائص العامة

تستنسخ الجينات التي تشفر عن بروتين الى جزيئات mRNA التي تتلازم مع الرايبوسومات حيث يحدث عندها بناء البروتين، وفي بدائيات النواة حيث لا يوجد غلاف نووي فمن الممكن للmRNA أن يتلازم مباشرة مع الرايبوسومات قبل أكتمال أستنساخ سلسلة الرنا المراسل mRNA، أذ يبدأ بناء سلسلة متعدد الببتيد (الترجمة Translation) .

وفي حقيقيات النوى وبسبب وجود غلاف نووي يحيط بالمادة الوراثية يتوجب على الرنا المراسل mRNA أن يهاجر من النواة الى السايتوبلازم لكي يتلازم مع الرايبوسومات البناء البروتين، والأختلافات الأخرى بين الحوامض النووية mRNA لبدائيات وحقيقيات النواة هي: -

1- تكون العديد من جزيئاتmRNA لبدائيات النواة نسخا من عدة جينات متجاورة (يطلق على مثل هذه الجزيئات من الرنا mRNA بمتعددة الجينات polygenic أو تسمى mRNA متعددة السيسترون (polycistronic mRNA) بينما تكون جميع جزيئات mRNA لخلايا حقيقية النواة بصورة نسخ مفردة الجين (تسمى هذه الجزيئات من mRNA بأحادية الجينmonogenic أوتسمى جزيئات mRNA أحادية السيسترون .
2- لا تعالج جزيئات mRNA بدائية النواة أثناء تصنيعها وتمتلك عمرا قصيرا بينما تعالج جزيئات mRNA حقيقية النواة أثناء صنعها وتظهر اختلافا في العمر.
3- يشفر معظم جينوم بدائية النواة عن mRNA، بينما فقط جزء صغير من جينوم خلايا حقيقية النواة يشفر عن mRNA وفي أي وقت فان اقل من 10-20% من مجموع RNA الخلية في خلايا بدائية وحقيقية النواة يظهر ك .mRNA

وعند فحص عشيرة mRNA من خلية بدائية وحقيقية النواة يلاحظ أنها متباينة في الحجم بمدى واسع الى حد ما بقيم S معامل الترسيب، وينتج انها من حقيقة أن عدد الأزواج النيوكليوتيدية في الجين له علاقة بحجم البروتين الذي، يشفر عنه. من جهة أخرى وبسبب أن جزيئة mRNA تحتوي على تواليات متباينة الطول أضافة الى تلك التواليات التي تعين توالي الحوامض الأمينية للبروتين فأن هذه العلاقة الحجمية ليست على نحو مطلق مباشرة. والشكل (18) يظهر التركيب العام لجزيئة mRNA ناضجة.

Leader sequence coding sequence trailer sequence

شكل (18) التركيب العام لجزيئات mRNA ناضجة البدائية وحقيقية النواة

تستنسخ جميع جزيئات mRNA من الجينات التركيبية Structural genes أي الجينات التي تشفر بروتينات.

يوجد عموما في بدائية النواة علاقة خطية colinearity بين الجين الذي يشفر عن بروتين وال mRNA الذي يشفر عنه. أي يوجد توالية مجاورة من الأزواج القاعدية في جين وتترجم هذه التوالية الى توالية مجاورة من نيوكليوتيدات الرنا RNA التي تترجم بعد ذلك لتعطي توالية مجاورة مطابقة من الحوامض الأمينية في البروتين، وسنجد أن ذلك اليس عادة الحالة في mRNA لحقيقية النواة.

تمتلك جزئيات mRNA لبدائية النواة عادة عمر قصير نسبية، وتكون الى حد ما غير مستقرة ونقصد بهذا أن جزيئة mRNA المبنية حديثة قد تؤدي وظيفتها فقط لمدة دقيقتين أو ما يقارب ذلك في أحياء مثل بكتريا القولون ***E.coli*** . بعد هذا الوقت ويشكل تقريبا 10% من دورة الخلية يتحطم الرنا mRNA. وعليه للاستمرار في بناء بروتين معين يجب أن يستنسخ الجين المسؤول عن ذلك البروتين بأستمرار. ويمنع هذا الخلية وسائل سريعة جدا للحافظ على الموارد بسبب أذا لم تكن هناك حاجة للخلية بالبروتين فأن الجين لا يستنسخ وأي mRNA موجود او باق سيتم تحطيمه، ويميز هذا للكائن الحي لان يستجيب بسرعة للتغيير المطلوب عندما تتغير ظروفه الخارجية عن طريق غلق الأستنساخ لبعض الجينات وفتح الأستنساخ لمجموعة مختلفة من الجينات.

بينما تكون معظم جزيئات البدائية النواة قصيرة العمر، فأن بعض أنواع mRNA لهذه الأحياء تمتلك عمرا طويلا نسبيا، وتظهر هذه الأنواع مقاوم للأنزيمات النووية Nucleasesالمسؤولة عن التحلل السريع لجزيئات mRNA قصيرة العمر. فمثلا تم أثبات وجود ما لا يقل عن خمسة أنزيمات نووية رايبيةRibonuclease في بكتريا القولون ***E. coli*** وبعض من هذه الأنزيمات أن لم نقل جميعها قد تكون متورطة في هدم الرنا mRNA.

الأنواع المختلفة من الرنا RNAs

يوجد نوعيين من الرنا RNA وهما tRNAs وrRNAs ولا تختلف عملية بناء كل منها في خلايا بدائية وحقيقية النواة، والأختلاف هو في دورها الأساسي في بناء البروتين الخلايا حقيقية النواة أربعة أنواع منrRNAs وهي (28s, 18s, 5.8s, 5s) أما في بدائية النواة يوجد ثلاث منها هي (23s, 16s, 5s) وكل منها مختلفة عن الأخرى في نسبة وجودها في الخلية وفي الكتلة ووحدة الترسيب وعدد النيوكليوتيدات المؤلفة لها كما في الجدول التالي.

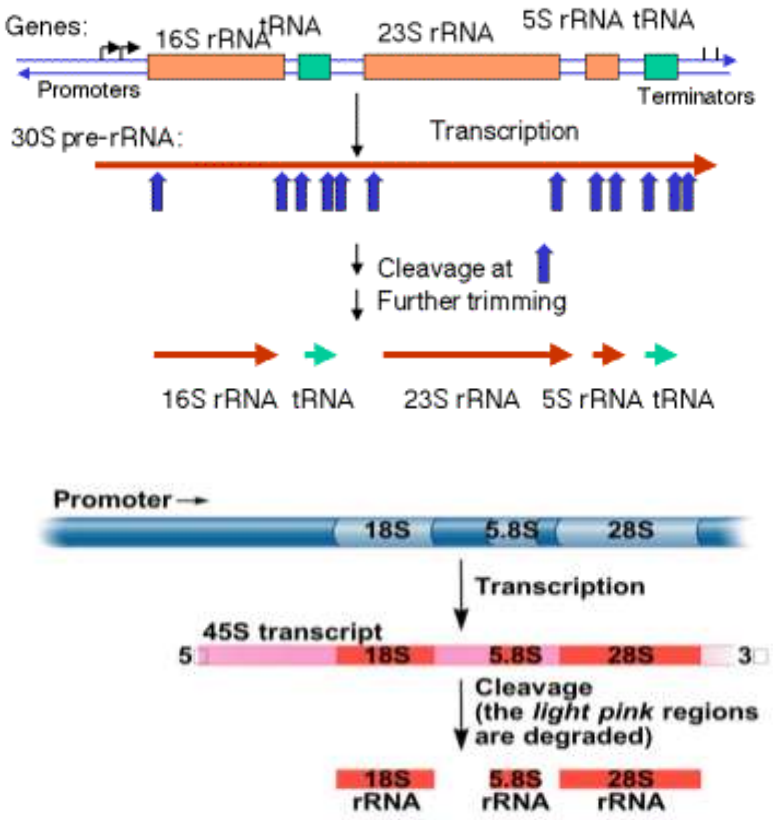
جدول (4) دور انزيمات بلمرة الرنا RNA ploymerases في خلايا حقيقية النواة الأنواع المختلفة RNA

RNA نوع	RNA ploymerases
mRNA	II
tRNA	III
rRNA	
28s, 18s, 5.8s, 5s	I
5s	III
scRNA, snRNA	II & III
Mitochondrial gene	Mitochondrial*
Chloroplast gene	Chloroplast

*أنزيمات ، بلمرة RNA في الميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء مشابهه لأنزيمات البكتريا .

لخلايا حقيقية النواة ثلاث من rRNAs وهي (**5.8s, 18s, 28s**) تشتق بعملية الاستنساخ خلال شريط مفرد من الرنا RNA الأولي (precursr transcript)، أما في بدائية النواة تمتلك ثلاث أنواع من الحامض rRNAs(5s, 16s, 23s) تكون مماثلة كما في خلايا حقيقية النواة (**28s, 18s, 5.8s, 5s**) أيضا تشتق من خلال pre - rRNA مفرد فقط (5srRNA) لخلايا حقيقية النواة يستنسخ من خلال جين منفصل ويكون 5.8srRNA مرتبطة هيدروجينيا مع28srRNA جدول (5).

يتم معالجة الرنا الأولي (الأصل) pre- rRNAs لخلايا بدائية وحقيقية النواة من خلال عده خطوات، أذ يبنى كخيط جزيئي أولي طويل pre-RNAs يحتوي على تواليات مختلفة من rRNA يحصل له تفلج وتقطيع ليعطي التراكيب الثلاث المختلفة من rRNA شكل (19).



شكل (19) تشكيل الانواع المختلفة من rRNAs في خلايا بدائية وحقيقة النواة

جدول (5) اهم خصائص RNA polymerases الخلايا حقيقية النواة

طرز الحامض النووي	الكمية تقريبا	وحدة الترسيب	الكتلة	عدد النيوكليتدات
rRNA	80	23	$1.2X10^{3}$	3700
		16	$0.55X10^{3}$	1542
		5	$3.6X10^{1}$	120
tRNA	15	4	$2.5X10^{1}$	90-75
mRNA	5	مختلف	Heterogeneous	000.10-100

تركيب الرنا الناقل tRNA

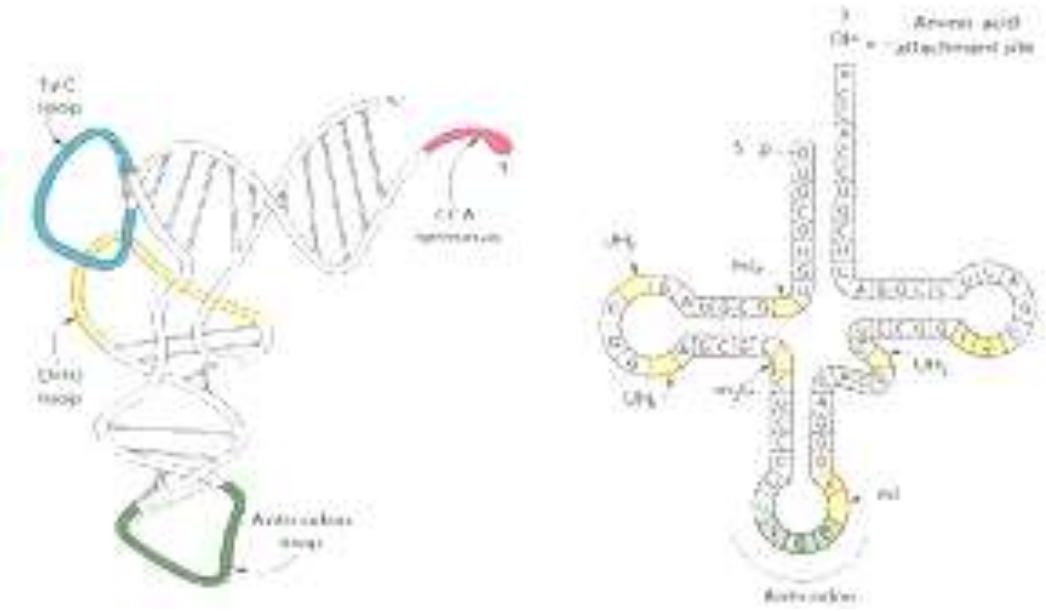
جزيئات tRNAs مثل rRNAs تكون عملية بناءه مماثلة في كل من خلايا بدائية وحقيقية النواة أذ تشتق من الجزيئة الخيطية الطويلة الأولى التي تحتوي على تواليات مختلفة من tRNA، في البكتريا بعض tRNAs يعاني بعض التغيرات اذ يحصل له تحلل من النهاية 5' بفعل أنزيم RNase P.

النهاية 3' ل tRNAs تعاني تغير بأضافة CCA أذ جميع tRNAs تمتلك هذه التوالية في النهايات3'، هذه التوالية تمثل موقع ارتباط الحامض الأميني والتي يتطلبها وظيفيا أثناء عملية بناء البروتين، النهاية CCA تشفر من DNA لبعض الجينات وفي البعض الأخر تضاف أنزيميا، كما يحصل تحوير جزيئات tRNA لبعض القواعد (10 %) من وظيفة هذه التحويرات غير معروف، البعض يعتقد أنها تلعب دورا مهما أثناء بناء البروتين.

بعض pre- tRNA ولربما pre - rRNAs لعدد من الكائنات الحية تحتوي على أنترونات Intons والتي تزال بعمليات القطع قبل النضج، كما يجري أضافة مجاميع مثيلية methyl groups الى القواعد والسكر لبعض النيوكليوتيدات وظيفة وطبيعة هذه التحويرات غير معروف لحد الآن.

لكونه صغير نسبيا فهو أكثر استقرارية في الخلية، ينتج ال tRNA بشكل أو بصورة اولية بعملية الاستنساخ من الدنا DNA بمساعدة أنزيم RNA polymerase، يمتلك نيوكليوتيدات اضافية عند النهاية 3' ، 5' وكذلك داخلياً، تغلق هذه النيوكليوتيدات الاضافية بوساطة انزيمات Endonucleases و Exonucleases وتكون جميع جزيئات tRNA حاوية على سلسلة من C-C-A عند النهاية 3' بعد اضافة المثيل Methylation وقد تضاف هذه السلسلة بوساطة أنزيم Nucleotidyl transferase بعد عملية الاستنساخ تحتوي جزيئات ال tRNA على سلسلة مستقيمة من 75-90 نيوكليوتيدة تعطي شكلها الكلاسيكي الذي يشبه ورقة الجت شكل (20). يوجد ضمن تركيب tRNA خمس مناطق ملتفة وهي:

1. ذراع الحامض الاميني Amino acid arm أو ذراع الاستقبال Acceptor arm عند النهاية 3' التي يضاف الى نهايتها C. CAOH الذي يستقبل الحامض الاميني.
2. ذراع أو عروة DHU أو Dihydrouridine arm or loop.
3. ذراع شفرة المضادة Anticodon arm
4. ذراع أو عروة T بساي T psi C arm or loop C.
5. الذراع الإضافية او المتغايرة Extra or variable arm.



شكل (20) تركيب الحامض النووي الرنا الناقل . tRNA

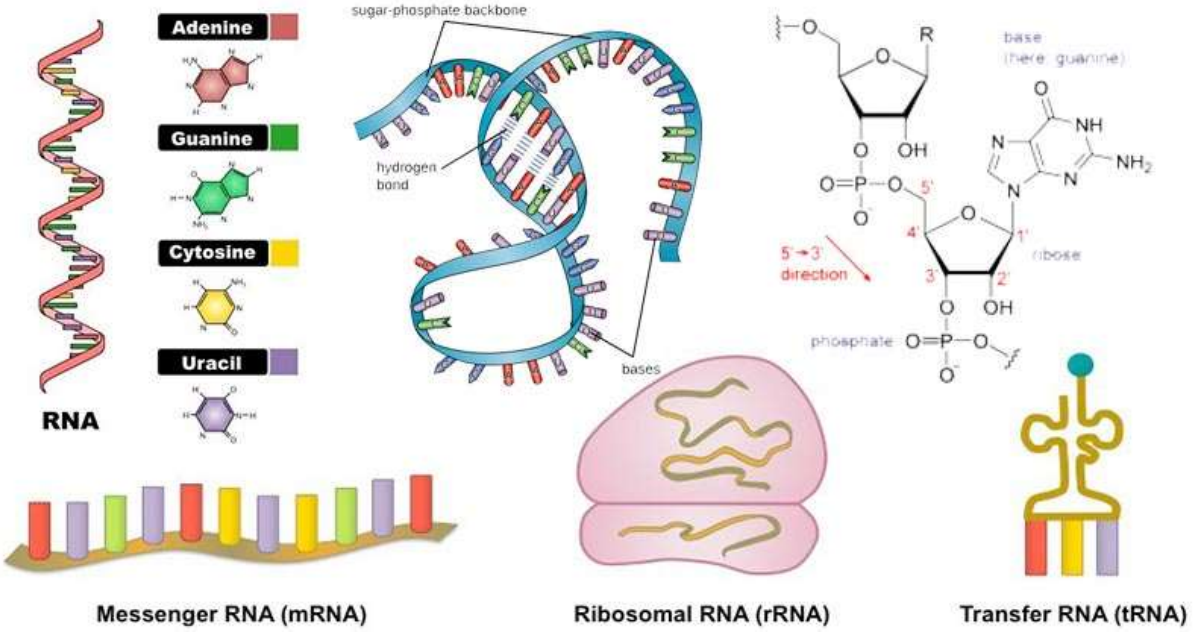
خلال عملية الترجمة Translation الرايبوسومية ترتبط مع mRNA من خلال شفرة الابتداء Start codon وهيAUG والتي يمكن أن شخص من قبل المبتدء لرنا الناقلInitiator tRNA تكون القواعد النتروجينية الثلاثة المكونة للشفرة المضادة Anticodon روابط هيدروجينية مع قواعد الشفرة الوراثية (codon) للرنا mRNA من خلال لتشكيل المتمم للأزواج القاعدية base pairs مع tRNA، وأن الحامض الاميني يرتبط عند النهاية '3 (نيوكليوسيد الادنين) Adenine nucleosideقد تساهم مناطق مختلفة tRNA كمواقع للتميز والارتباط بالانزيمات المتعددة وبروتينات رايبوسومية و mRNA و rRNA تتفاعل مع tRNA أثناء بناء البروتين. جدول (6) يمثل أهم خصائص ال نواع المختلفة من RNA لخلايا حقيقية النواة.

يوجد حوالي 45 جزيئة مختلفة من tRNA (لماذا 45 وليس 64) واحدة لكل شفرة codon وذلك لوجود بعض tRNA تشخص من خلال أكثر من كودون، ولتلافي حالات Wobble تهاوي أو ضعف بعضن جزيئات . tRNA

جدول (6) خصائص الأنواع المختلفة من RNA وخلايا حقيقية النواة

طرز الحامض النووي	الكمية تقريبا	وحدة الترسيب (s)	عدد النيوكليتدات
rRNA	80	28	4718
		18	1874
		5	120
		5.8	160
tRNA	15		90-75
mRNA	5	مختلف	000.10-100

جميع أنواع RNAs تلعب دورا مهما في عملية التعبير الجيني، لكن البعض الأخر مثل (SnRNA small nuclear RNA) يشترك بعملية تكوين mRNAs، اما RNA Telomerase يمثل الدنا التكراري في نهايات الكروموسومية والرنا غير الحساس antisense RNA وshort interfering RNA (siRNA)يمثل الجين المنظم. الدنا يخزن المعلومات الوراثية بينما معظم أنواع الرنا RNA وظيفتها المساهمة في تعبير تلك المعلومات الوراثية المخزونة في الدنا DNA.



شكل (21) الأنواع المختلفة من الرنا RNA

الترجمة Translation

هي عملية ترجمة الشفرات الوراثية المحمولة على الحامض النووي الرايبوزى المرسال (mRNA) إلى سلاسل عديدة الببتيدات Polypeptides. وبكلمات أخرى تتم الترجمة من لغة الأحماض النووية المكونة من 4 حروف (4 نيوكليوتيدات A,G,C,T or U) إلى لغة البروتينات التي تتكون من 20 حرف (20 حامض أميني). وتتم هذه العملية على جسيمات تسمى الريبوسومات Ribosomes.

ومناطق المورث (الجين) التي يتم نسخها إلى الحامض الرايبوزى المرسال (mRNA) ثم يتم ترجمتها تقرأ (تترجم) تتابعاتها النيوكليوتيدية في ثلاثيات حيث تمثل كل ثلاثة نيوكليوتيدات شفرة وراثية (كودون Codon) تترجم إلى حامض أميني معين داخل السلسلة المتعددة الببتيدات.

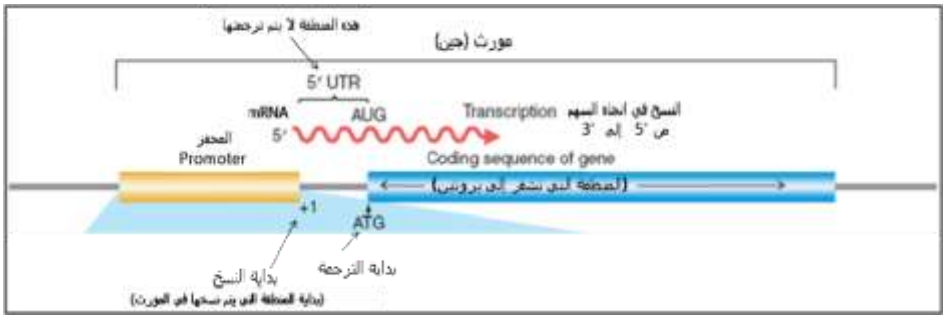
والشفرات (الكودونات) توجه الأحماض الأمينية إلى الاتحاد لتكوين بروتينات من خلال عمليه الترجمة Translation ولأن هناك 4 حروف هي القواعد النيوكليوتيدية فان حصيلة التوليفات المختلفة بين النيوكليوتيدات الأربعة تساوى 4 مرفوعة إلى الأس 3 (4^3) توليفه وهذا العدد أكبر بكثير من المطلوب لتشفير إلى 20 حامض أميني إلا أنه فيما عدا الميثيونين والتربتوفان إن كل الأحماض الأمينية يكون لها أكثر من ثلاثية (شفرة). ولهذا السبب يمكن أحياناً حدوث طفرات (تغيرات) في جين ما بحيث تتغير ثلاثية ما إلى ثلاثية أخرى يكون لها نفس المعنى (same-sense) وبالتالي لا يتغير الحامض الأمينى في البروتين الناتج (تسمى هذه الطفرات بالطفرات الصامتة silent وكذلك توجد ثلاثة شفرات (UAA, UGA, UAG) لا تعنى أي حامض أمينى (non-sense) وتعرف بشفرات توقف الترجمة (STOP) وهذا يعنى أن هناك 16 كودون تعنى 20 حامض أميني مختلف كما هو مبين بالجدول التالي:

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

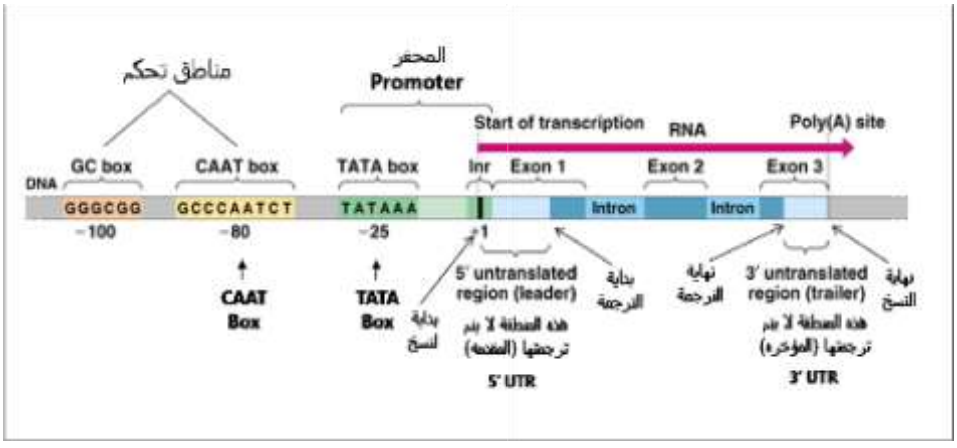
وفى معظم المورثات تكون شفرة AUG هي شفرة بداية الترجمة (START) وتبعد عن الطرف '5 للحامض mRNA بمسافة تعرف باسم المقدمة أو (5' UTR or 5' untranslated region) ويوجد في هذه المسافة معلومات هامة لارتباط الريبوسوم مع الحامض الرايبوزى المرسال mRNA ويتعرف من خلالها على شفرة البداية.

وبالمثل توجد منطقة على الحامض الرايبوزى المرسال (mRNA) في الطرف '3 لا يتم ترجمتها إلى بروتين وتسمى هذه المنطقة بالمؤخرة أو (3' UTR).

وتوجد هذه المناطق (**5' UTR**) و (**3' UTR**) في الحامض الرايبوزى المرسال (**mRNA**) في كلا الكائنات البدائية النواة والحقيقية النواة.

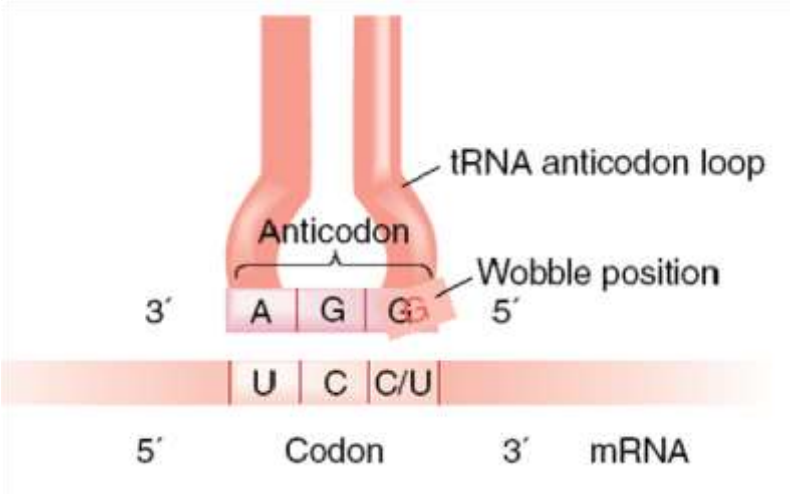


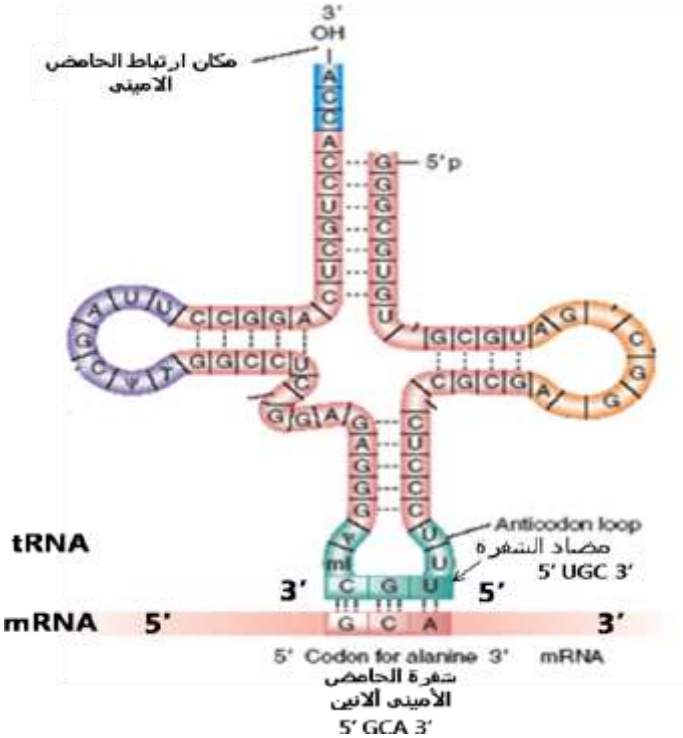
الشكل يوضح وحدة النسخ في الكائنات البدائية النواة. لاحظ وجود مناطق على الحامض الريبوزى المرسال (mRNA) في الطرف '5 والطرف '3 لا يتم ترجمتها إلى بروتين وتسمى على الترتيب (3' UTR و(5' UTR)



الشكل يوضح وحدة النسخ في الكائنات المميزة النواة. لاحظ نقطة البداية ونقطة النهاية لكل من عملية النسخ وعملية الترجمة. تعرف المسافة بين نقطتي البداية باسم (5' UTR) أما المسافة بين نقطتي النهاية فتعرف باسم (3' UTR).

ويقوم الحامض النووي tRNA (الناقل) الذي يحتوي على مضاد الشفرة بحمل الحامض الأمينى الصحيح إلى مكانه في سلسله الببتيدات المتكونة حسب توالى الشفرات على جزيئي الحامض الرايبوزى المرسال mRNA وهذا يمثل المترجم أو المحول (Adaptor) في عملية الترجمة حيث يتعرف على كلا اللغتين (يرتبط بالشفرة من ناحية ويرتبط بالحامض الأمينى المناسب من ناحية أخرى). ويقوم إنزيم Aminoacyl tRNA Syntheses بربط الحامض الأمينى المناسب مع جزئ tRNA الحامل لمضاد الشفرة المناسبة ويلزم لهذا التفاعل تنشيط بجزيئات ATP.

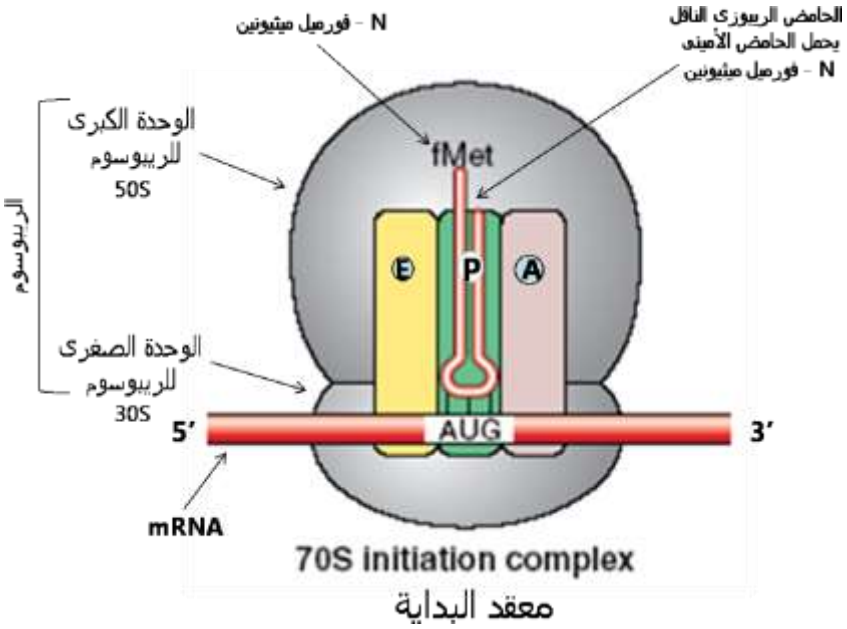




يوضح الشكل السابق التكامل بين الشفرات (كودونات) في الحامض المرسال (mRNA) ومضاد الشفرة (أو الكودون المضاد) في الحامض الناقل (tRNA). لاحظ إن شريطي المرسال والناقل لهما اتجاهين متعاكسين. لاحظ أيضا انه عند تزاوج الموقع الثالث في الكودون (على المرسال) مع الموقع الأول في مضاد الشفرة (على الناقل) يكون هناك فرصة للتزاوج بين الجوانين واليوراسيل مما يسمح لنفس الحامض الناقل بالاعتراف بأكثر من كودون في المرسال (ظاهرة التأرجح أو التطفيف).

ومرحلة بداية الترجمة في الكائنات بدائية النواة تبدأ بتكوين معقد البداية (70S initiation complex) الذي يتألف من:

1. الريبوسوم (الوحدة الصغرى 30S والوحدة الكبرى 50S) بمكوناته من الحامض الرايبوزى الرايبوسومى rRNA.
2. الحامض الرايبوزى المرسال mRNA.
3. الحامض النووي tRNA (الناقل) الذي يحمل الحامض الأمينى N- فورميل ميثيونين ويلزم لتكون هذا المعقد عوامل البداية ومصدر للطاقة. والشكل التالي يوضح معقد البداية في البكتريا:



ويلاحظ أن:

(1) الريبوسوم يحتوي على موقعين مهمين هما الموقع P (مكان الببتيدة المتنامية Peptidyl site) والموقع A (مكان دخول الحامض النووي tRNA المنشط والمحمل بالحامض الأمينى Aminoacyl site). وأظهرت الدراسات الحديثة ان مكان خروج الحامض النووي الناقل (tRNA) يمكن اعتباره موقعا ثالثا في الريبوسوم ويرمز له بالرمز Eنسبة إلى موقع الخروج (Exit).

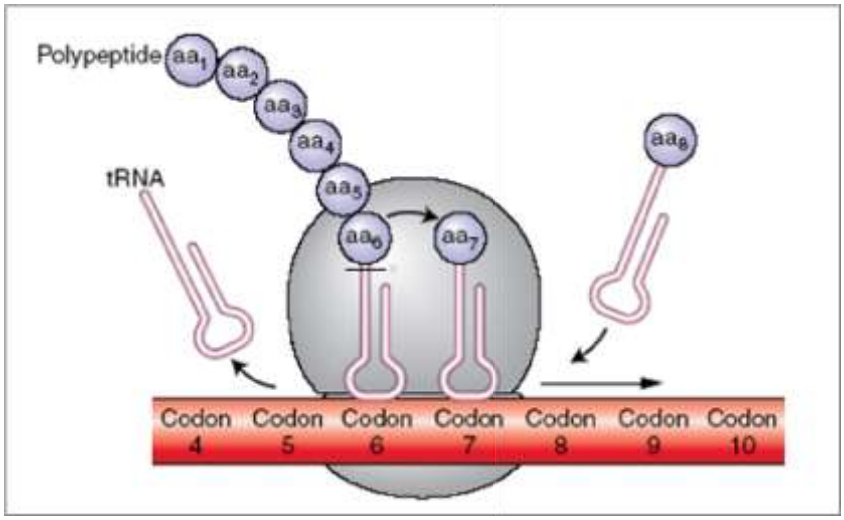
(2) كودون (AUG) البداية في البكتريا تشفر للحامض الأمينى – Nفورميل ميثيونين بينما الكودونات AUG الموجودة في داخل شريط mRNA فهى تشفر للحامض الأمينى الميثيونين.

(3) إن الحامض النووي tRNA(الناقل) الذي يحمل الحامض الأمينى -Nفورميل ميثيونين يرتبط بالموقع P على الريبوسوم مباشرة أما الأحماض النووية tRNA التالية فتدخل أولا من الموقع A في الريبوسوم ثم تنتقل إلى الموقع Pبعد تكون رابطه ببتيدية وبعد تحرك الريبوسوم بمسافة كودون (ثلاثية) واحده.

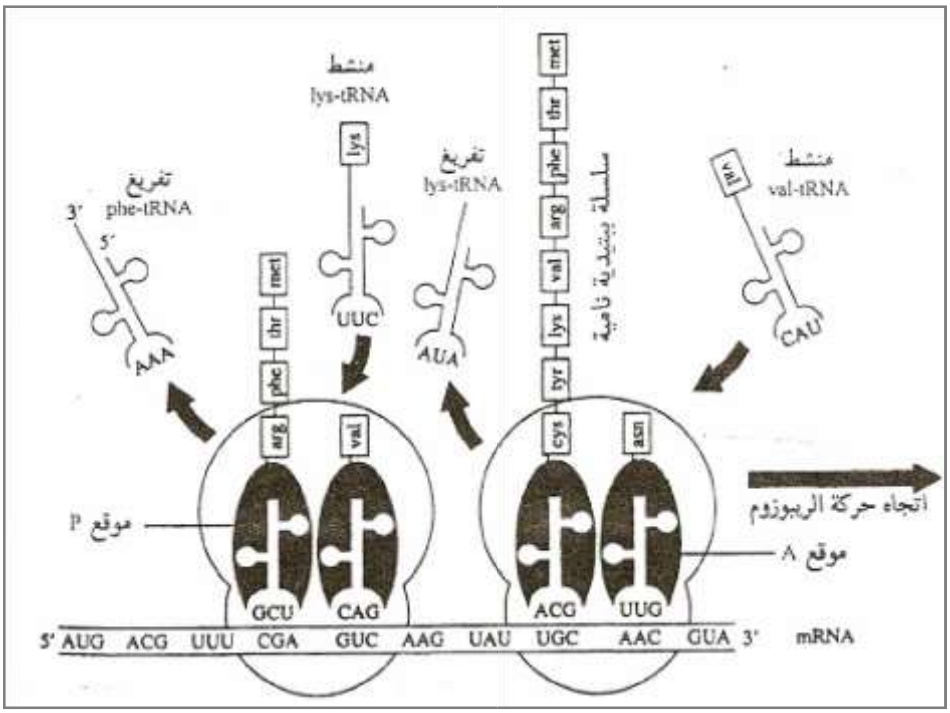
(4) تأتى بعد ذلك مرحلة الاستطالة عندما يدخل الحامض النووي tRNA التالي والمحمل بالحامض الأمينى إلى الموقع A بجوار الحامض النووي tRNA الأول المحمل بالحامض الأمينى ميثيونين ويلاحظ هنا ضرورة التعارف بين الشفرة على المرسال مع مضاد الشفرة على الناقل حتى يتم الارتباط وبالتالي يصبح هناك حامضين أمينو أسيل tRNA في الموقعين Aو Pفي الريبوسوم وتصبح الأحماض الأمينية الأول والثاني جنبا إلى جنب فتتكون بينهما رابطة ببتيدية بفعل الإنزيم Peptidyl transferase وهو مكون رايبوسومى له نشاط إنزيمي وفي نفس الوقت مع تكون الرابطة الببتيدية يحدث كسر للرابطة الإستريه بين الحامض الأمينى الأول (-Nفورميل ميثيونين في البكتريا) وبين الطرف '3 على الناقل الخاص به.

(5) بذلك نجد الحامض الأمينى الأول قد أصبح مرتبطا من طرفه الكربوكسيلى مع الحامض الأمينى الثاني المحمول على الحامض الناقل الخاص به في الموقع A بينما يكون الحامض الناقل في الموقع P خالي من الحامض الأمينى.

(6) يتحرك الريبوسوم مسافة كودون واحدة (ثلاثية واحدة) فيخرج الحامض الناقل الفارغ الموجود في الموقع Pويحل محله الحامض الناقل الموجود في الموقع A بما عليه من أحماض أمينيه ويصبح الموقع A خاليا ويمكنه استقبال حامض أمينو أسيل tRNA جديد وتعرف حركة الريبوسوم لمسافة كودون جديدة بعملية الانتقال Translocationوتستمر عملية الاستطالة خطوه (شفره) خطوه حتى تتواجد شفرة توقف STOP في الموقع. A

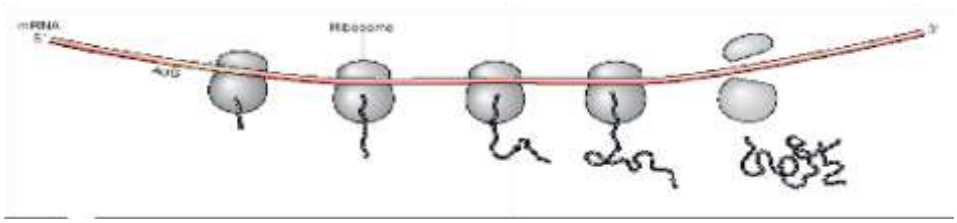


تتكون رابطة ببتيدية بين الطرف الكربوكسيلى للحامض الأمينى السادس والطرف الأمينى للحامض الأمينى السابع مع كسر الرابطة بين الحامض الأميني السادس وبين الطرف '3 على الناقل الخاص به.

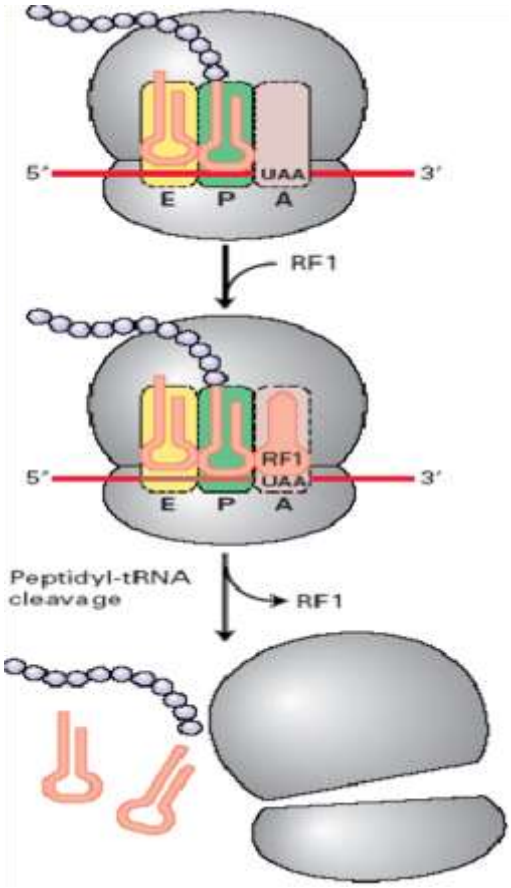


لاحظ ارتباط أكثر من رايبوسوم مع نفس الحامض الرايبوزى mRNA وقارن تتابع عديدات الببتيدات الناتجة.

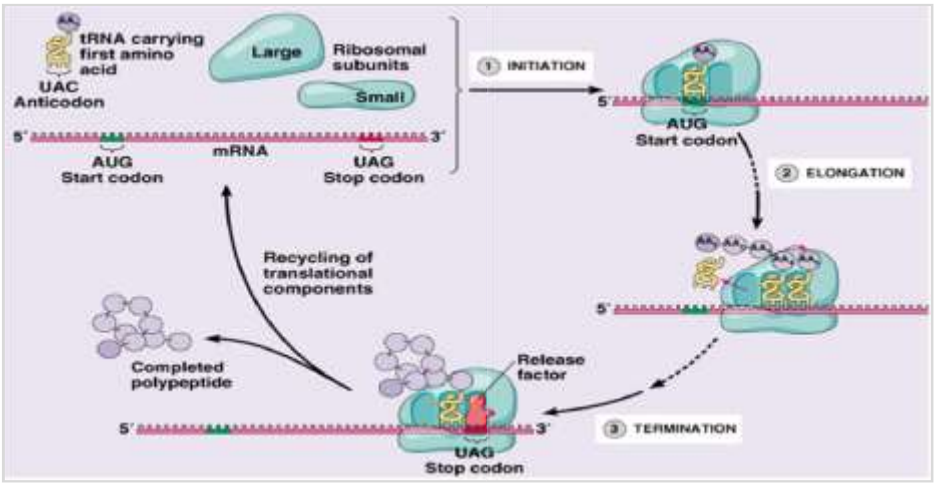
وعادة ما تتم عملية الترجمة بارتباط أكثر من رايبوسوم مع نفس الحامض الرايبوزى mRNA وتتم ترجمته في نفس الوقت بحيث تجد ريبوسومات متقدمة وقد اقتربت من النهاية (STOP) ناحية الطرف '3 للحامض الرايبوزى mRNA ورايبوسومات أخرى مازالت تترجم الشفرات القريبة من الطرف '5 للحامض الريبوزى mRNA ويعرف هذا المعقد باسم عديد الرايبوسومات (Polysomes or Polyribosomes).



عديد الريبوسومات(Polysomes or Polyribosomes)



(7) وعند وجود أحد شفرات التوقف (STOP) في الموقع A تدخل عوامل التحرر أو التفكك Release factors وينفك الرايبوسوم الى الوحدة الصغرى 30s والوحدة الكبرى 50s مع إطلاق الحامض الرايبوزي mRNA والسلسلة عديدة الببتيد الناتجة



ملخص لمراحل الترجمة الثلاثة: البداية (Initiation) والاستطالة (Elongation) والإنهاء (Termination) كما يلاحظ وجود شفرة البداية (AUG) وشفرة النهاية (UAG) في نفس الإطار (Frame).