1

الفصل الأول

تركيب الأحماض النووية وتعبئتها

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

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

مقدمة

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

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

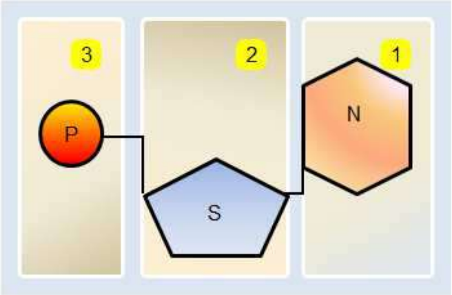
تختلف كمية الـ DNA للخلية الواحدة بشكل واسع بين الكائنات المختلفة. ففي خلايا اللبائن، يكون محتوى الـ DNA في تلك الخلايا أكثر بالآلاف المرات (حوالي بـ 8000 مرة) من محتوى الـ DNA في خلايا البكتريا. أما العاثيات البكتيرية، كما في T-phage والذي يخمج بكتريا القولون، فانه يحتوي على عشر أو على 1 إلى 12 من كمية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

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

كيميائية الأحماض النووية

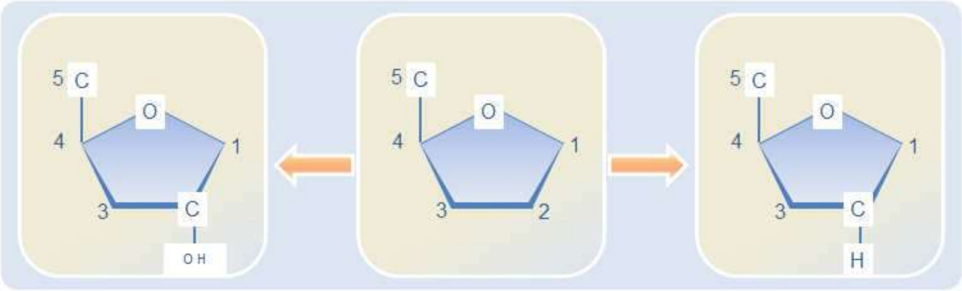
عندما نعرف ان الـ DNA والـ RNA هما المادة الوراثية يجب علينا ان نتقدم نحو التحري عن التركيب الكيميائي لهذه الجزيئات، لأن تركيبها يخبرنا بمقدار كبير حول كيف تعمل هذه الجزيئات.تتكون الأحماض النووية nucleic acids من ارتباط النيوكليوتيدات nucleotides بطريقة متكررة إلى بوليمرات تشبه في شكلها السلسلة. تتكون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

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



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

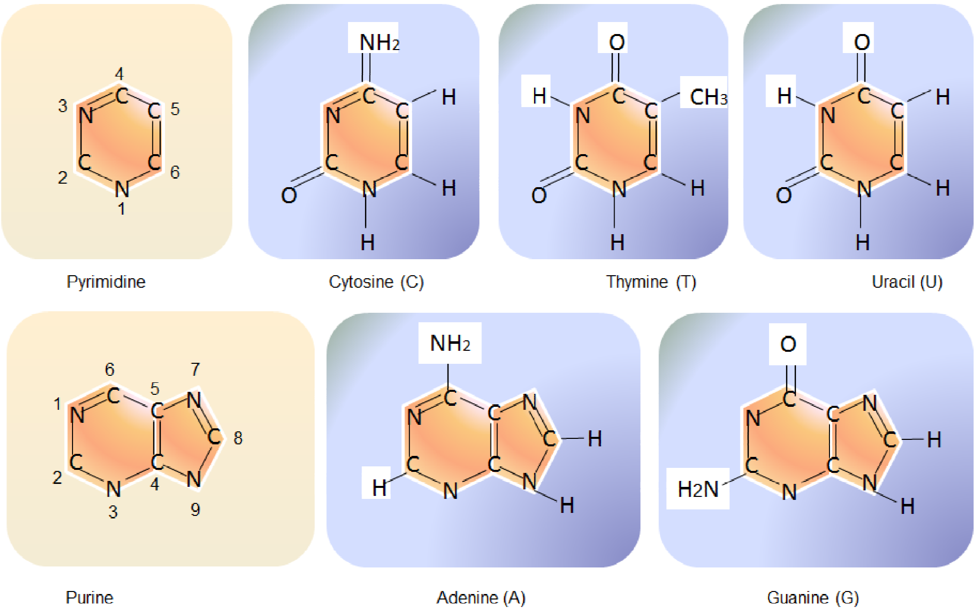
لاحظ إن الـ ATP أي مركب adenosine triphosphate ، والذي هو عملة الطاقة للخلية، هو عبارة عن نيوكليوسايد ثلاثي الفوسفات nucleoside triphosphate. يختلف السكر فقط في وجود الرايبوز ribose في الـ RNA ، لهذا سمي ribonucleic acidالرايبوز منقوص الأوكسجين ولهذا سمي deoxyribonucleic acid، حيث يغيب الأوكسجين في جزيئة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



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

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

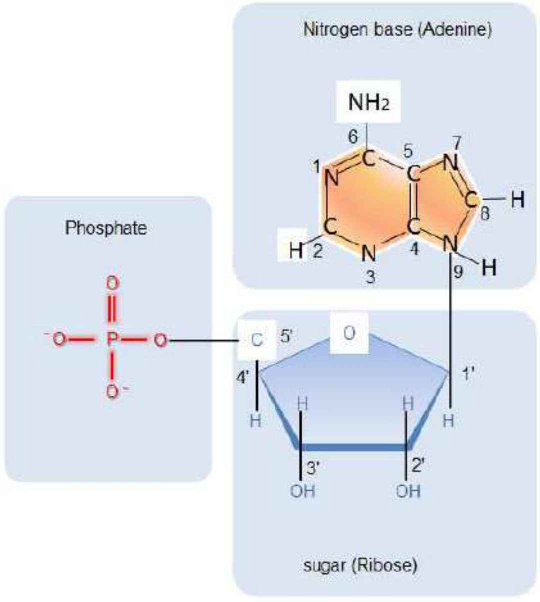
تتكون النيوكليوتيدة بالخلية بربط القاعدة النتروجينية (من ذرة النتروجين رقم 9 بالبيورين، أو من ذرة النتروجين رقم 1 بالبيريميدين) بذرة الكاربون رقم 1´ في جزيئة السكر sugar بآصرة كلايكوسيدية glycosidic bond، وبربط الفوسفات بنفس جزيئة السكر (شكل 4.1) بآصرة أستر ester bond عند ذرة الكاربون رقم 5´. هذا ومن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



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

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

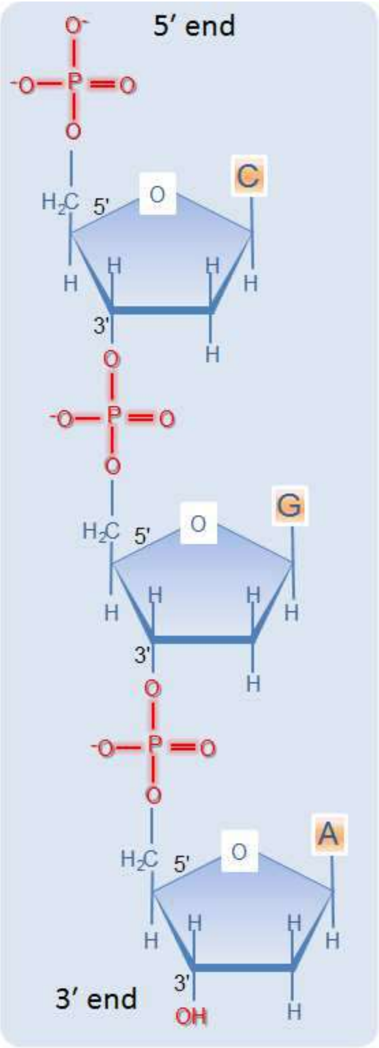
المجاورة، وتسمى هذه الآصرة بآصرة الفوسفات ثنائية الأستر phosphodiester bonding (شكل 5.1).



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

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

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

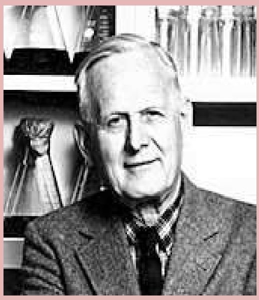


الأغشية بواسطة هذا التأين. وبالنتيجة، كل هذه الظروف قد انطبقت على حامض الفوسفوريك وليس غير حامض الفوسفوريك!

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

الـ DNA هو المادة الوراثية

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



Maclyn McCarty

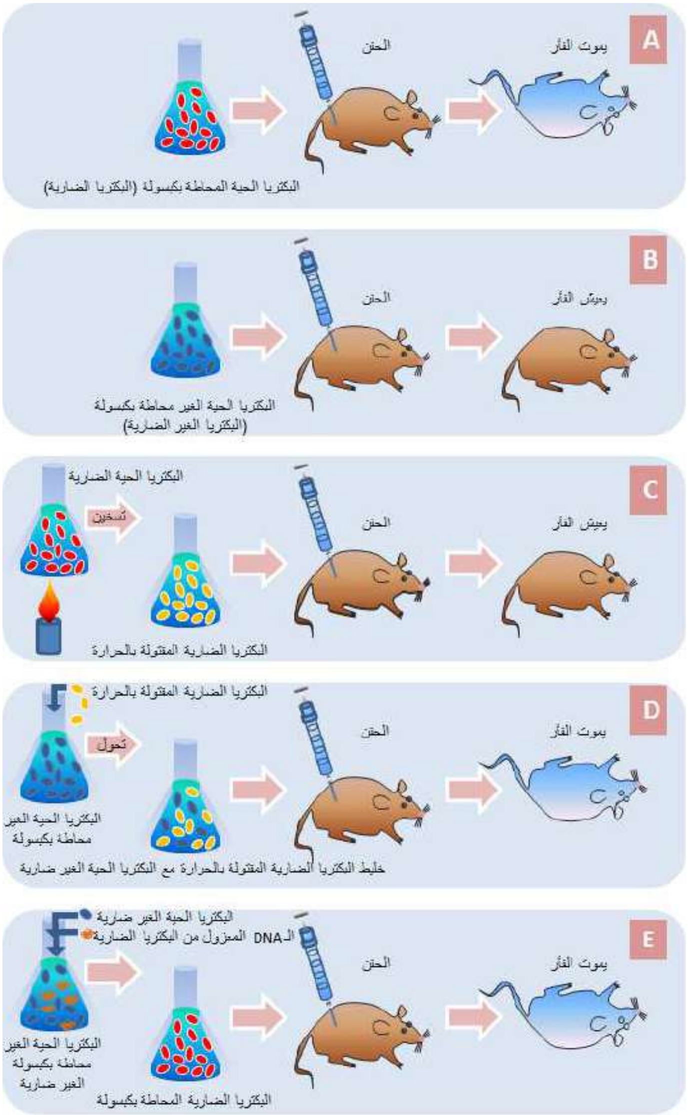
Oswald Avery

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

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

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

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

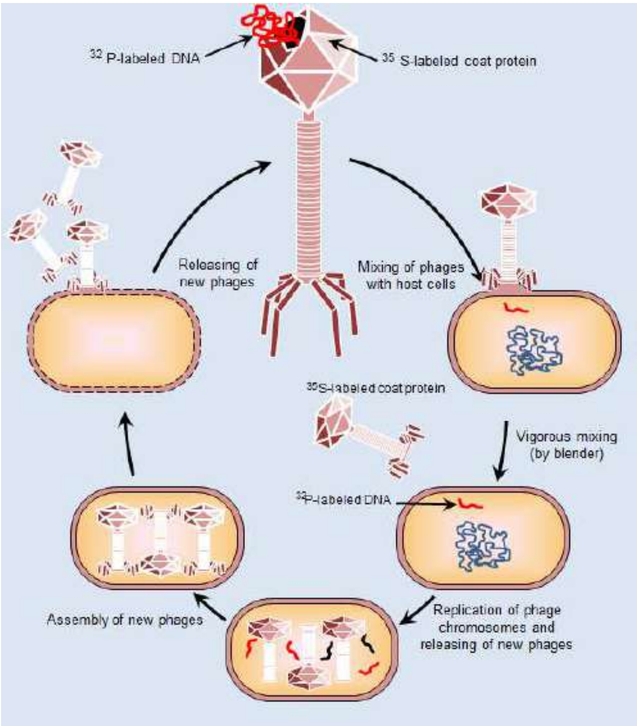


شكل (6.1): تجربة Avery-MacLeod-McCarty. (a) عند حقن السلالة المحاطة بكبسولة بالفئران، تموت الفئران نتيجة هذا الحقن، أي توصف هذه السلالة بالقاتلة (b) بينما تكون السلالة الغير محاطة بكبسولة (c) كما هو عليه الحال في السلالة المحاطة بكبسولة والمقتولة بالحرارة غير مؤذية. (d) بين بحث مسبق أجري من قبل Frederick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

Alfred Hershey

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

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



شــكل (7.1):مخطــط لتجربــة Hershey و Chase، وفيهــا تــم اثبات بأن المكون DNA للعاثي T2 هو الذي يحمل المعلومات الوراثية بينمــا يعمــل الغــلاف البروتينــي (protein coat) كقشــرة واقيــة فحسب (تصميم المؤلف).

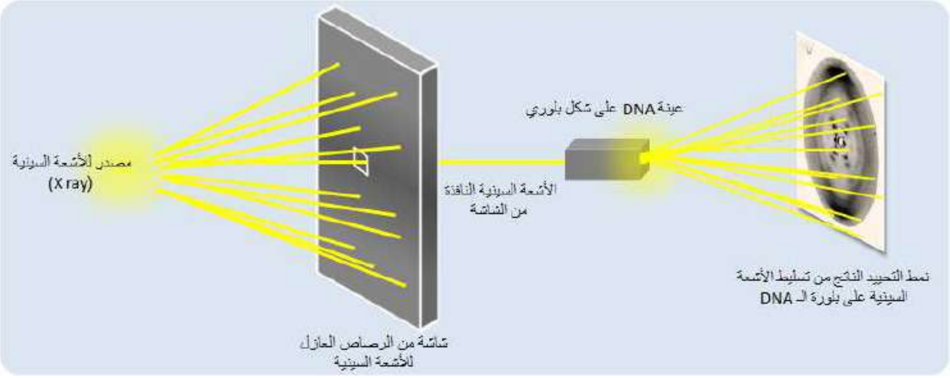
عندما قامت العاثيات المعلمة بنظير الكبريت المشع بخمج البكتريا، فان معظم الأغلفة البروتينية المفصولة والمعلمة اشعاعياً بقيت في الخلايا. علاوة على ذلك، عندما تحررت العاثيات الجديدة من الخلايا، فلم تحتوي معظمها على فعالية اشعاعية. أشارت هذه النتيجة الى الحقيقة التي تقول بأنه على الرغم من أن المكون البروتيني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

اكتشاف الـ DNA

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

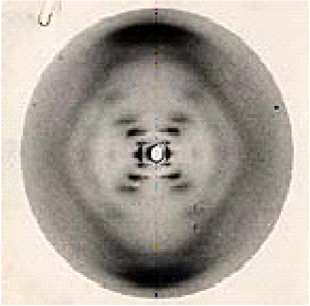
تقنية الـ DNA X-ray crystallography

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



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

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



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

Maurice Wilkins

Rosalind Franklin

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

نسب جاركاف Chargaff's ratios

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

Erwin Chargaff

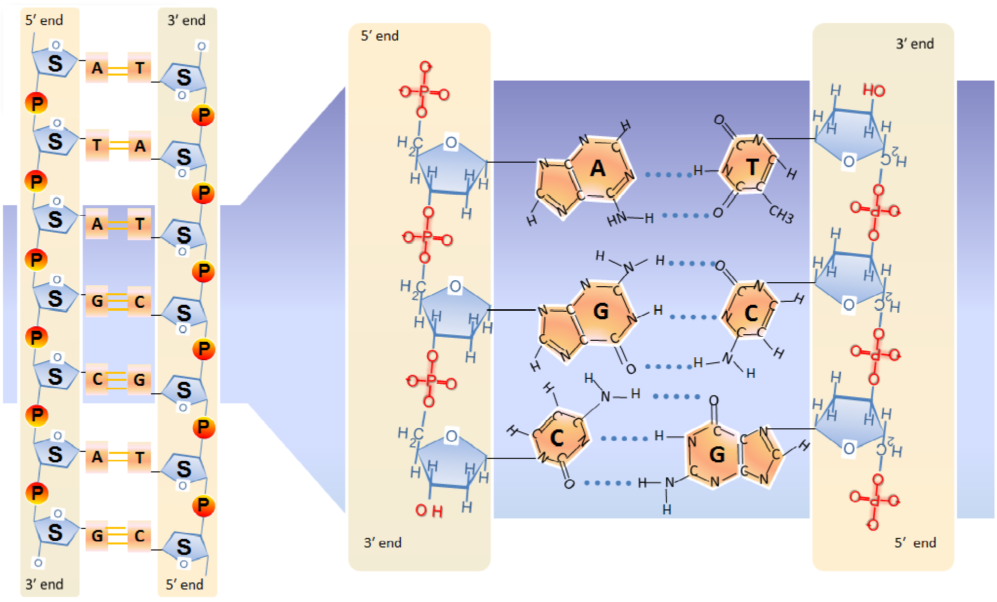
فرضية tetranucleotide hypothesis

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

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

موديل واطسن وكريك Watson-Crick model

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

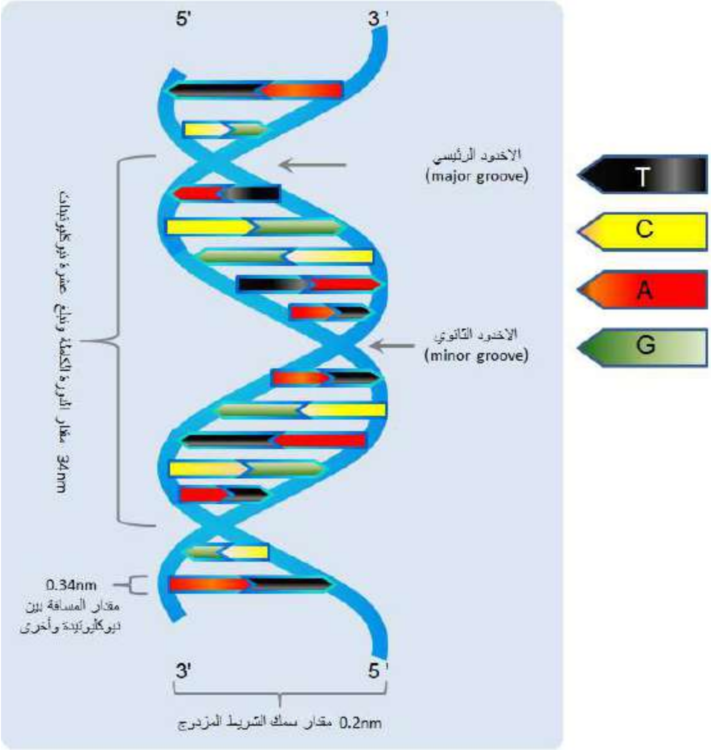


شكل (10.1): حلزون الـ DNA المزدوج: التركيب الكيميائي لـ DNA حيث تتجه في القواعد النتروجينية إلى الداخل بينما تتجه فيه السكر والفوسفات إلى الخارج مؤلفاً للعمود الفقري للجزيئة. في يسار الشكل يبرز الهيكل الخارجي (السكر – فوسفات) الى الخارج بينما ترتبط القواعد النتروجينية مع بعضها البعض بواسطة الأواصر الهيدروجينية.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

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

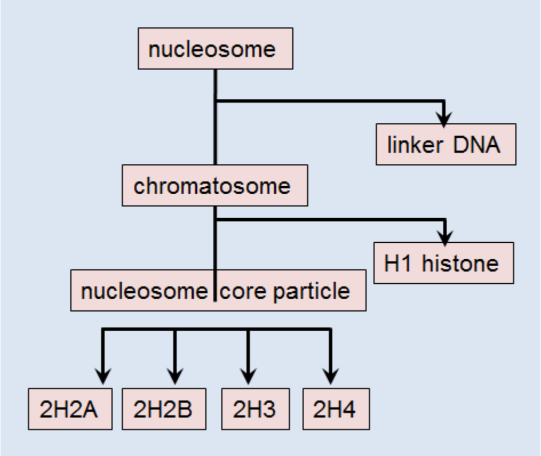
وبعد تجارب أخرى مع هذه الموديلات، وجد Watson و Crick بأن الازدواج الهيدروجيني hydrogen bonding ضروري لتكوين أدراج السلم الحلزوني والذي من الممكن أن يحدث بسهولة بين أزواج قاعدية معينة (تلك الأزواج التي وجدها Chargaff بتكرارات متساوية). تتسم الأواصر الهيدروجينية بأنها أواصر ضعيفة جدا، وتتكون بين ذرتين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

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



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

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

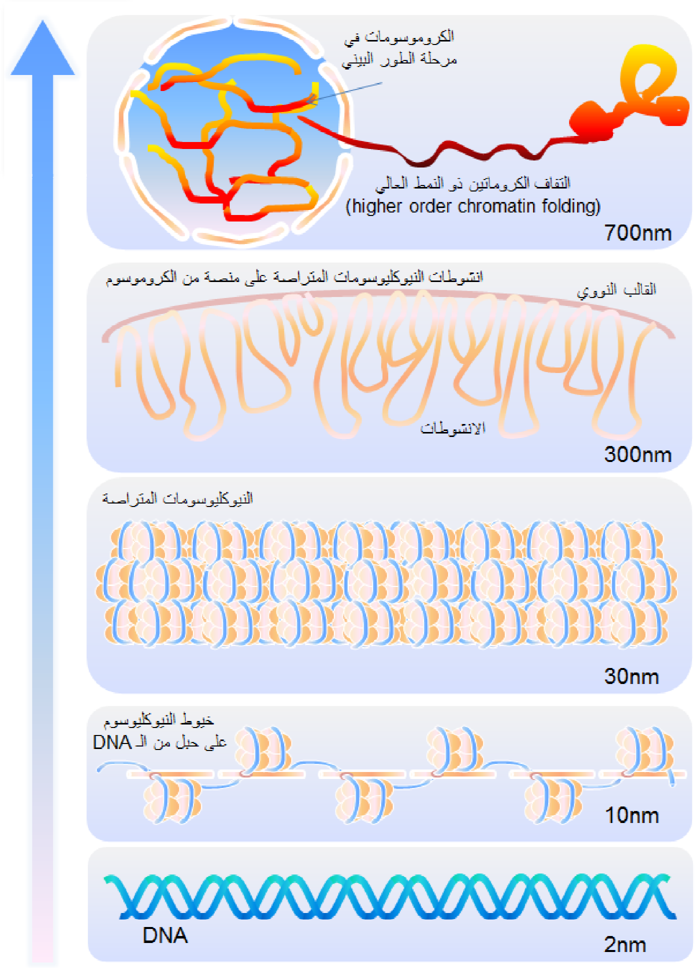


شكل (20.1): مخطط يوضح فيه تشريح النيوكليوسوم (تصميم المؤلف)

تكثف الكروموسومات

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

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



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

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

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

ملحق الفصل الأول

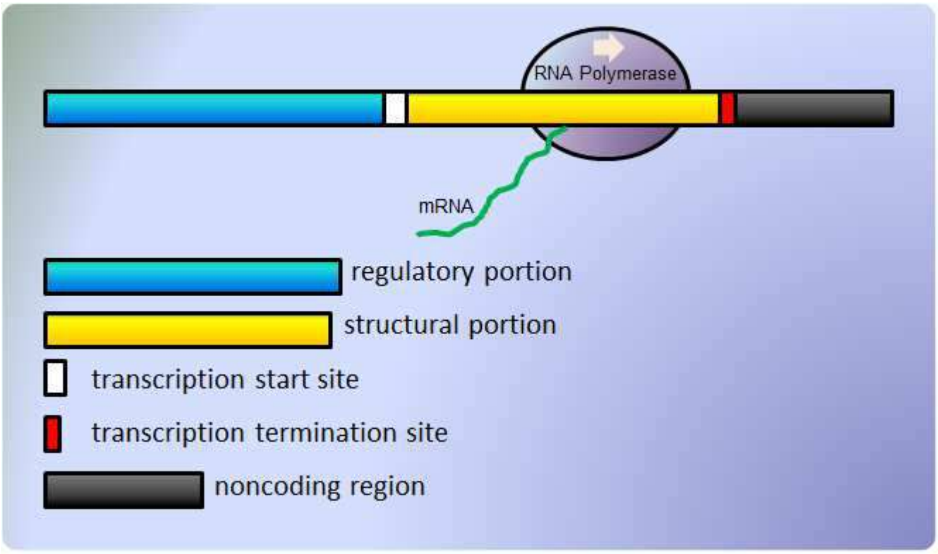
التطبيقات المختلفة لتراكيب الدنا الغير الاعتيادية

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

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

تشريح الجين

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



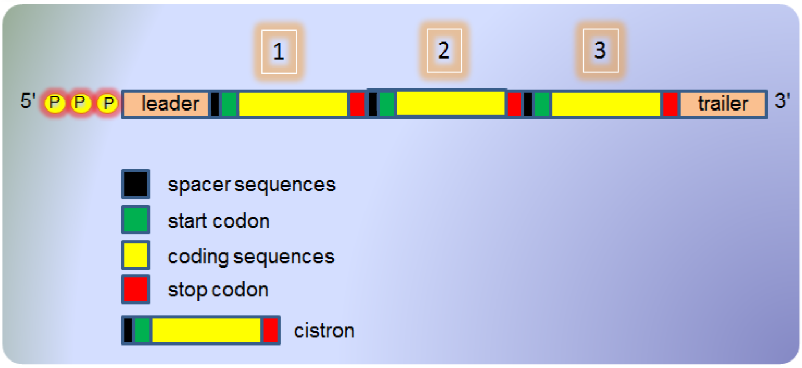
شكل (2.2): تشريح الجين. لاحظ بان الجين يتكون من قسمين القسم التنظيمي والذي لا يعبر جينياً عن نفسه والقسم التركيبي الذي يعبر جيناً عن نفسه (من تصميم المؤلف).

جينات بدائية النواة

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

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

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



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

جينات حقيقية النواة

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

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

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

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

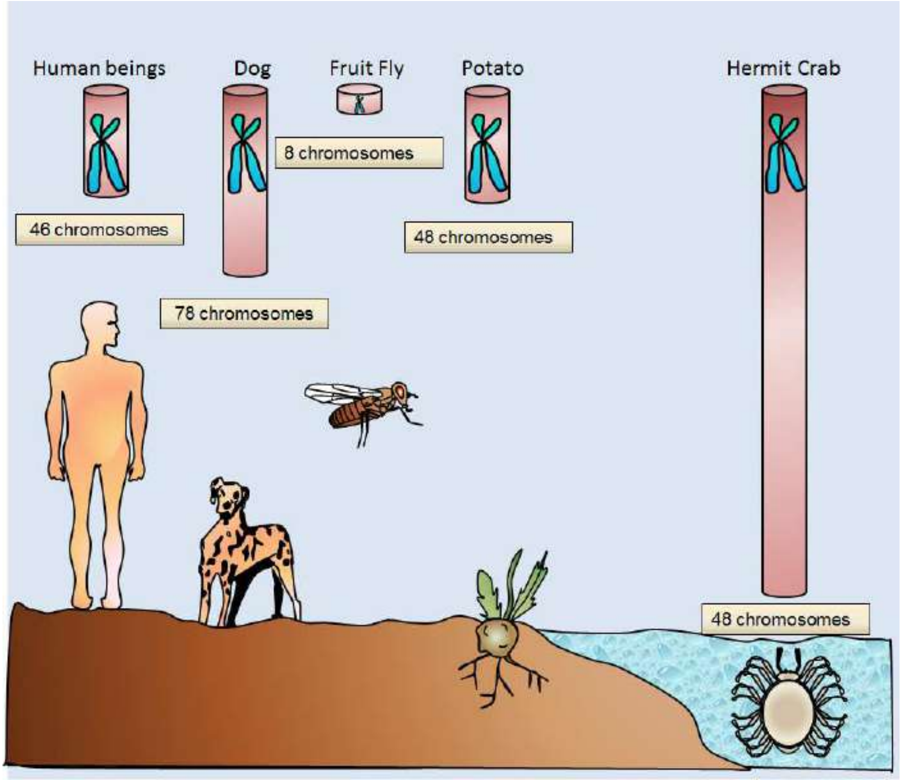
تسلسلات الدنا الغير مشفرة non-coding DNA sequences

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

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

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

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



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

التسلسلات الغير مشفرة

أولاً:

التسلسلات الغير مشفرة داخل الجين أو ذات العلاقة بالجين:

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

أ. الانترونات (Introns)

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

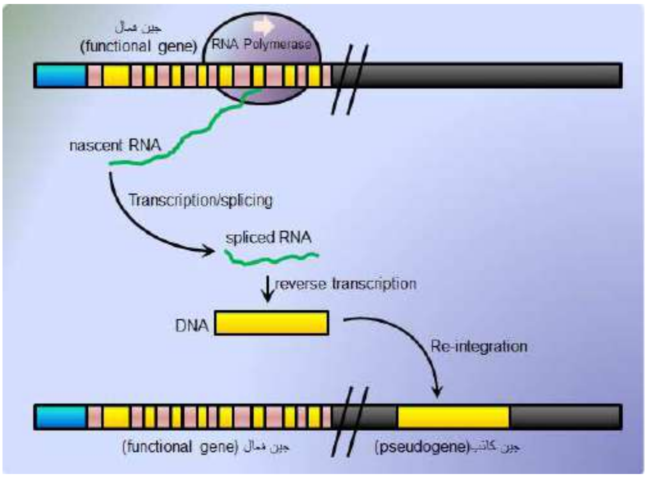
Richard Roberts   Philip Sharp

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

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

ب. الجينات الكاذبة (Pseudogenes)

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



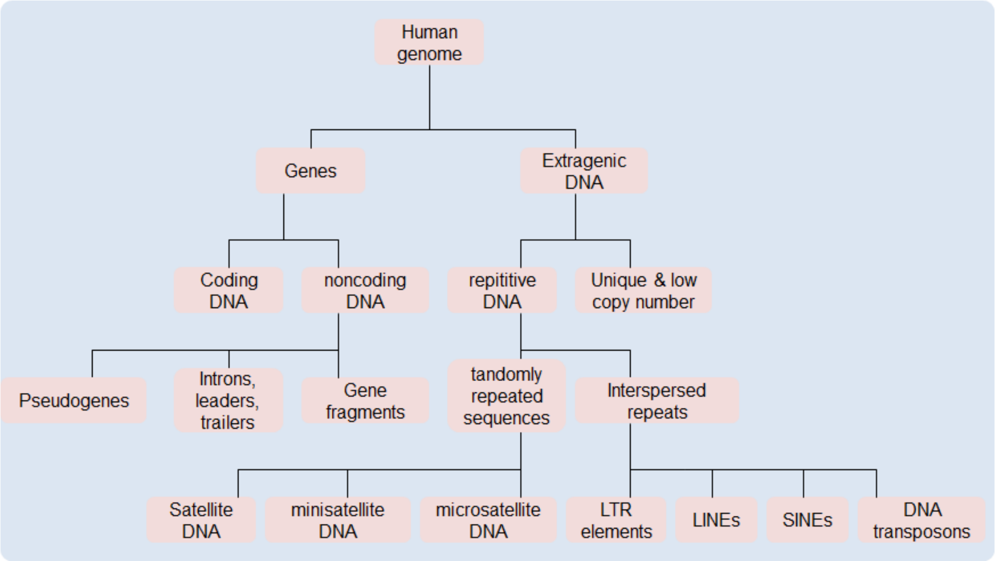
شكل (5.2): الجينات الكاذبة المعالجة والناشئة من انحشار جزيئات الـ mRNA المستنسخة بشكل معاكس. عندما يوجد إنزيم reverse transcriptase في الخلية، يقوم بنسخ جزيئات الـ mRNA إلى جزيئة DNA مزدوجة الشريط في حالات نادرة، يمكن لهذه الجزيئات أن تنحشر في الجينوم مولدة للجينات الكاذبة. وبسبب إزالة الانترونات بسرعة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

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

أ. التسلسلات المتكررة ترادفياً Tandemly repeated sequences

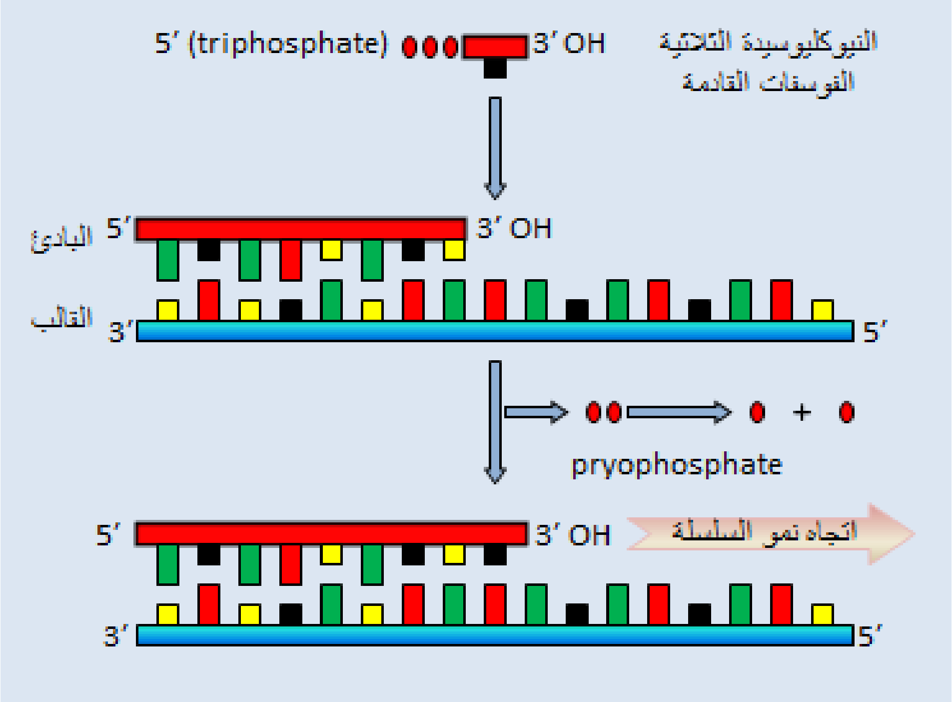
يحتوي جينوم الكائنات الراقيةعلى كمية من الـ DNA أكبر بكثير من الكمية الضرورية منه لتكوين الجينات حيث أن معظم هذا الـ DNA لايشفر عن أي وظيفة جينية، أي يعتبر كعناصر غير وراثية (noncoding elements).وكمثال على ذلك الجينوم البشري والذي هو جينوم عملاق يتألف من 3 بليون زوج قاعدي ($3x10^9$bp) لكل مجموعة مفردة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

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



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

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



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

احتياجات إنزيم DNA polymerase

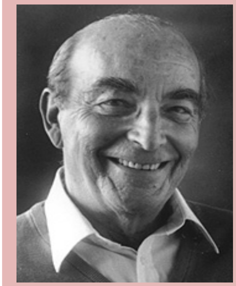
يحتاج إنزيم DNA polymerase في حالته النقية إلى:

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

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

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

قصة الإنزيمين DNA polymerase III و DNA polymerase I



Arthur Kornberg

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

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

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

كيفية عمل إنزيم DNA polymerase I في بكتريا القولون

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

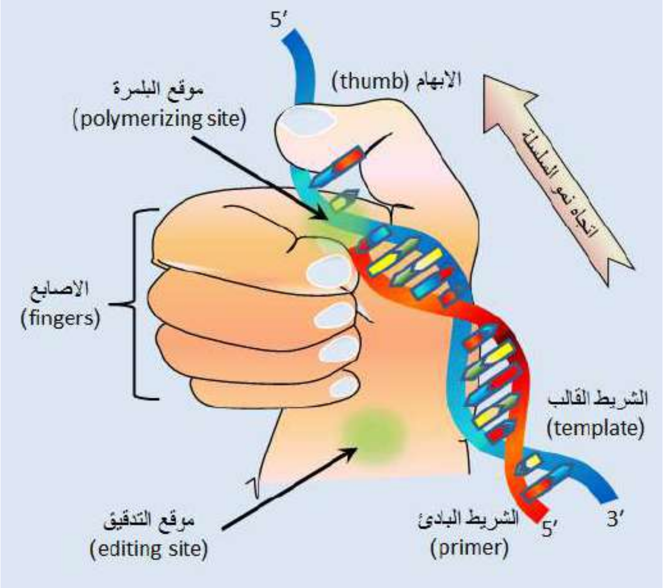
تتعاون تلك الفعاليات الثلاث مع بعضها البعض حيث توفر لانزيم DNA polymerase I خاصية فريدة، وهي تجمع ثلاث فعاليات في وحدة ثانوية واحدة، وهذا بدوره يعطي قابلية لهذا الانزيم لكي يشارك في فعاليات عديدة داخل وخارج جسم الكائن الحي بالاضافة الى عملية التضاعف كما في عملية اصلاح خلل الـ DNA (أنظر الفصل السابع)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

كيفية عمل إنزيم التضاعف الرئيس في بكتريا القولون

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

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

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



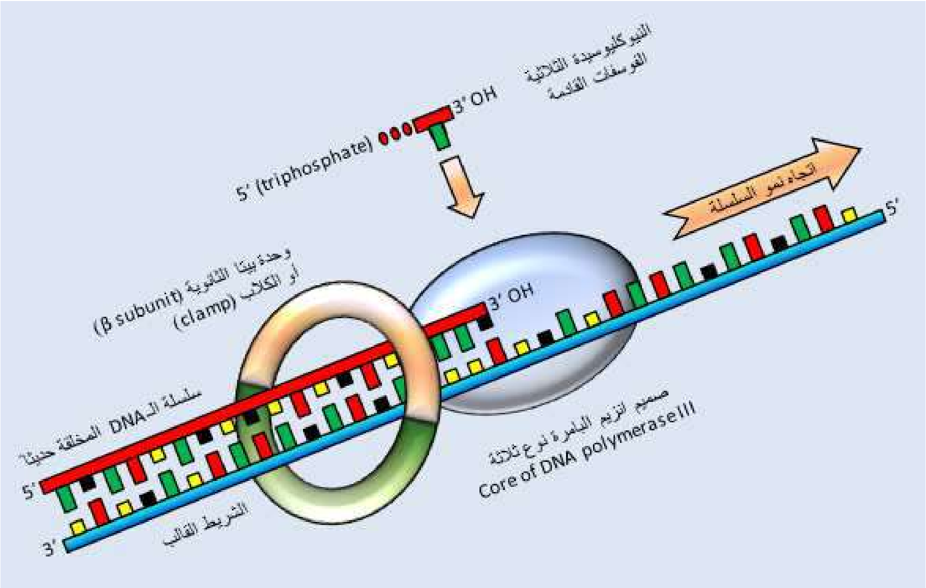
شكل (7.3): تركيب إنزيم البوليمريز الصميمي core DNA polymerase في بكتريا القولون حسب معطيات تقنية X-rays crystallography. وببساطة، يشبه إنزيم DNA polymerase اليد اليمنى نصف المفتوحة، حيث يلاحظ إن كل من راحة اليد palm، والأصابع fingers، والإبهام thumb يقبض على الـ DNA، بالاضافة الى ذلك، يبرز موقعين منفصلين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

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

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

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

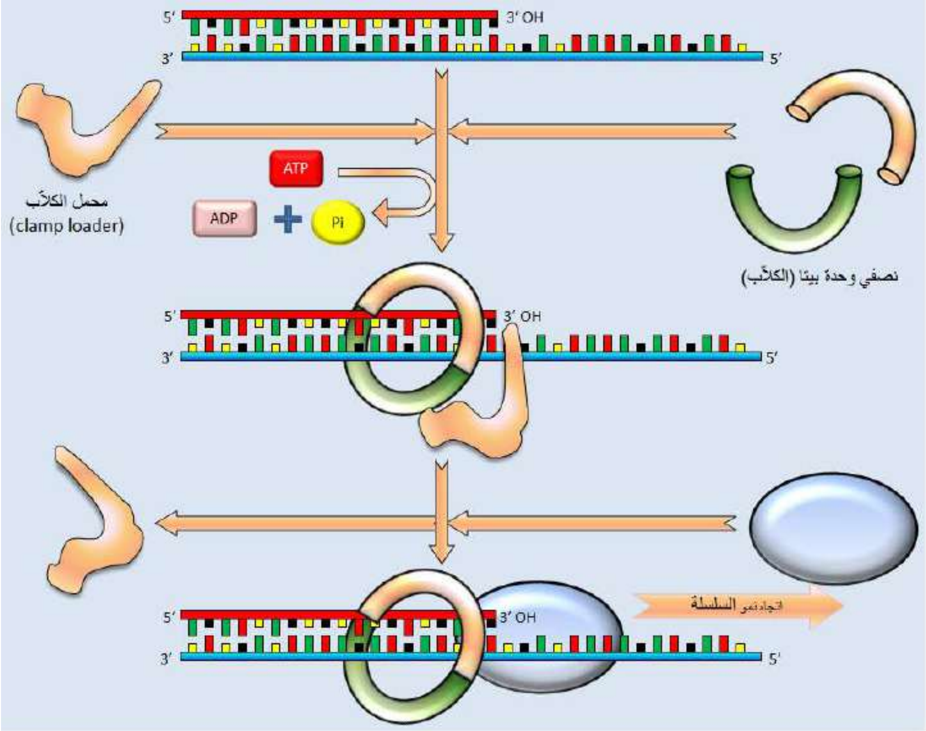
إلى أخرى. يرجع سبب وجود هذه الخواص المتناقضة إلى شكل وحدة β الثانوية التي تشبه الكعكة المحيطة بالـ DNA، أو التي تشبه الحلقة التي تنزلق على الحبل (شكل 8.3).



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

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

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



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

مشاكل تواجه إنزيم DNA polymerase في عملية التضاعف

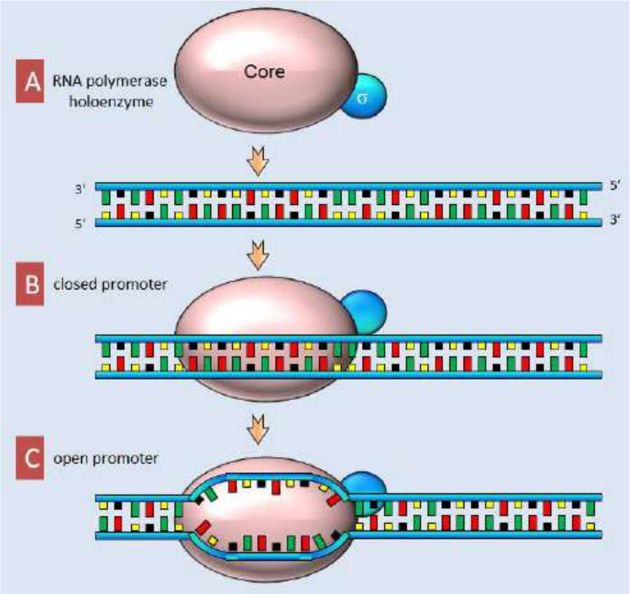
لعله من الطرق الناجعة للتوغل في تفاصيل عملية التضاعف هو أن نشبه الإنزيم المضاعف الرئيسي DNA polymerase III بمهندس معماري، والذي يطلب منه مضاعفة الحمض النووي، ومن ثم ينظر هذا المهندس إلى شريط الـ DNA ونرى ماذا يطلب منا لفعل ذلك. وبالطبع لا تعتبر عملية تضاعف الـ DNA بالعملية السهلة، لذا تبرز

وصف عملية الاستنساخ

لتسهيل دراسة عملية الاستنساخ تم تقسيمها إلى ثلاثة مراحل وكالآتي:

مرحلة البدء initiation stage

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

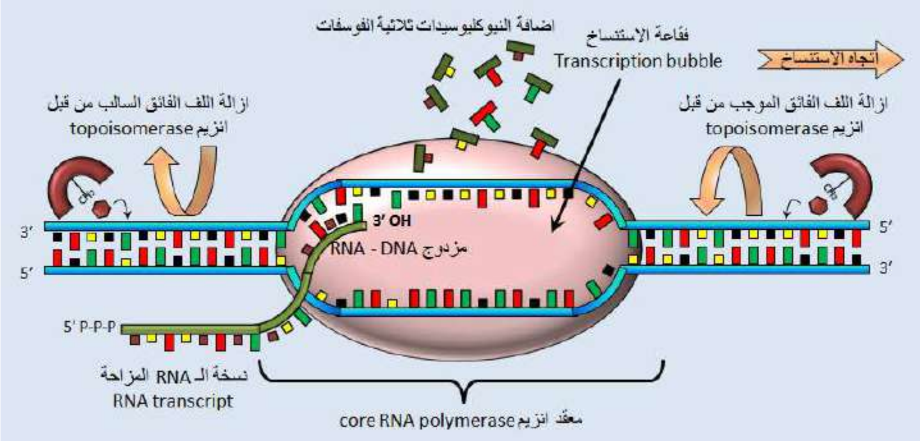


شكل (5.4)a و b و c: ارتباط إنزيم RNA polymerase زائدا عامل "سكما" بالـ DNA. تتكسر الأواصر الهيدروجينية التي تربط شريطي الـ DNA ويتكون معقد البرومتر استعداداً لتخليق الـ RNA (تصميم المؤلف) .

مرحلة الاستطالة elongation stage

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

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

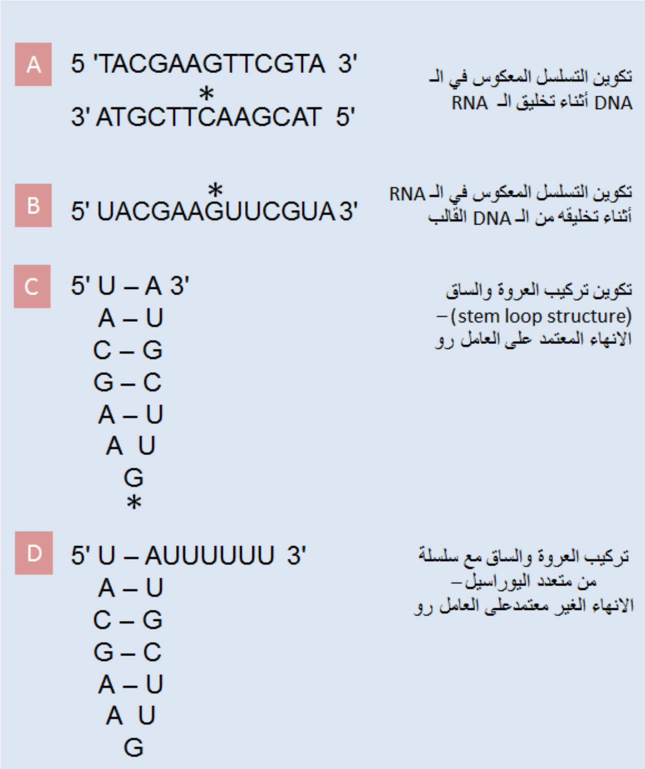


شكل (6.4) : ملخص لمرحلة الاستطالة elongation في عملية الاستنساخ، (تذكر بأن إنزيم RNA polymerase المشار إليه في الشكل هو الإنزيم الصميمي core enzyme وليس الإنزيم الكامل holoenzyme بسبب ازالة وحدة سكما حال بدء مرحلة الاستطالة) (تصميم المؤلف).

مرحلة الانتهاء termination stage

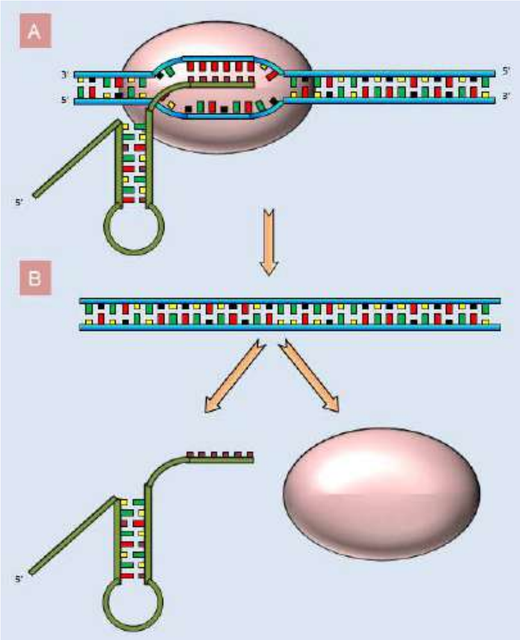
إن آخر مرحلة في تخليق الـ RNA هي مرحلة إنهاء نمو السلسلة. ينتهي تخليق الـ RNA وذلك بواسطة طريقتين مختلفتين واللذين سيرد ذكرهما في أدناه. إن مايعرف بتسلسلات الـ DNA المنهية أو بمنهيات الاستنساخ transcription terminators أما أن تكون معتمدة على العامل رو rho-dependent (ρ dependent) أو غير معتمدة على العامل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

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



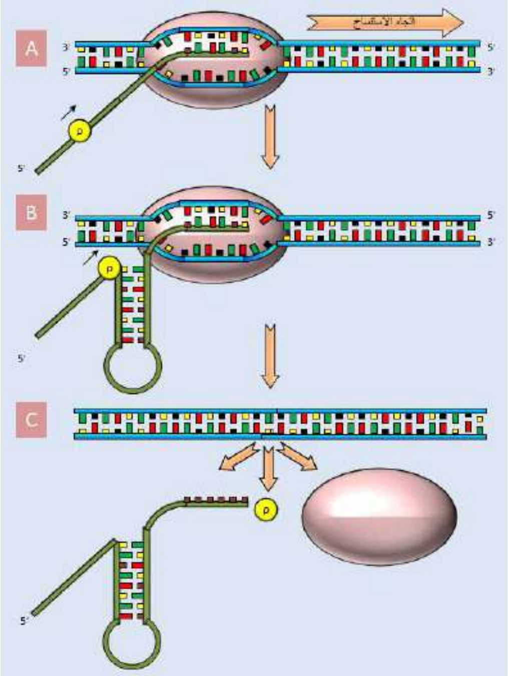
شكل (7.4): دورالتسلسلات المعكوسة في انهاء عملية تخليق الـ RNA (تصميم المؤلف).

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



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

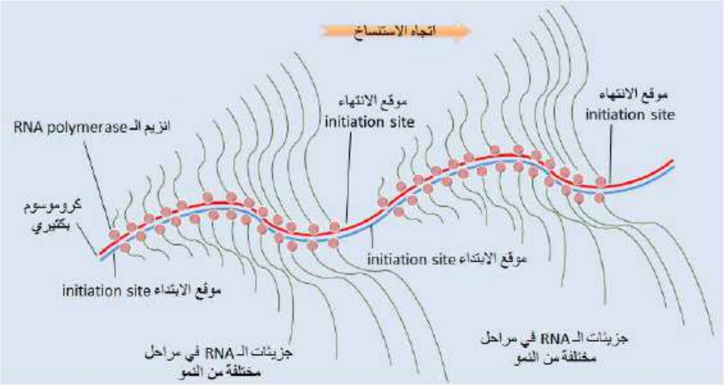
أما عملية الإنهاء المعتمدة على العامل "رو" (شكل 9.4) والتي هي أقل شيوعاً وأعقد من الانهاء الغير معتمد على العامل "رو"، فإنها تستخدم كذلك تكوين تركيب دبوس الشعر، ولكن انفكاك هجين RNA – DNA يحتاج إلى تعاون البروتين "رو" ، كما لا تتبع تكرارات متعدد اليوراسيل تركيب دبوس الشعر كما في الطريقة السابقة. يبدو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



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

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

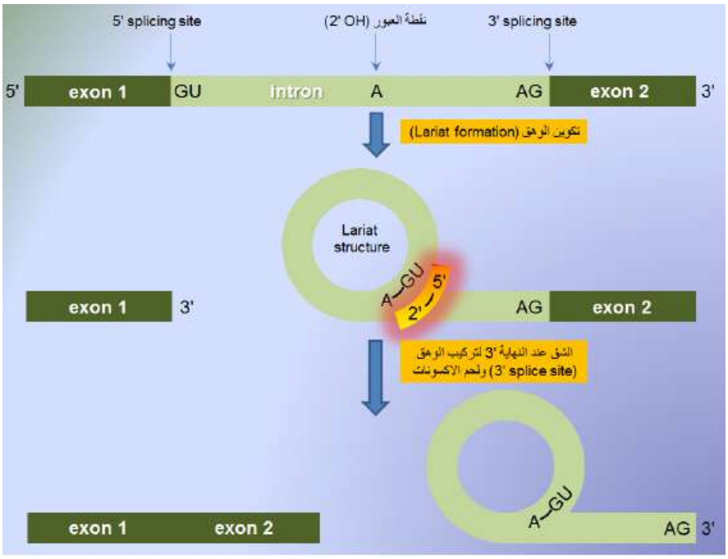
ان أكثر من جزيئة RNA polymerase ربما تستنسخ نفس الشريط المشفر للجين بصورة متزامنة، ولكن العملية ذات أطوار زمنية وفراغات مكانية، بحيث في أية لحظة كل RNA polymerase يستنسخ جزء مختلف من تسلسل الـ DNA.فكلما يترك إنزيم RNA polymerase بروموتر يرتبط به إنزيم RNA polymerase آخر. إن هذا يعطي شكلا يشبه النصل (10.4).



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

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

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



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

أنواع الـ RNA:

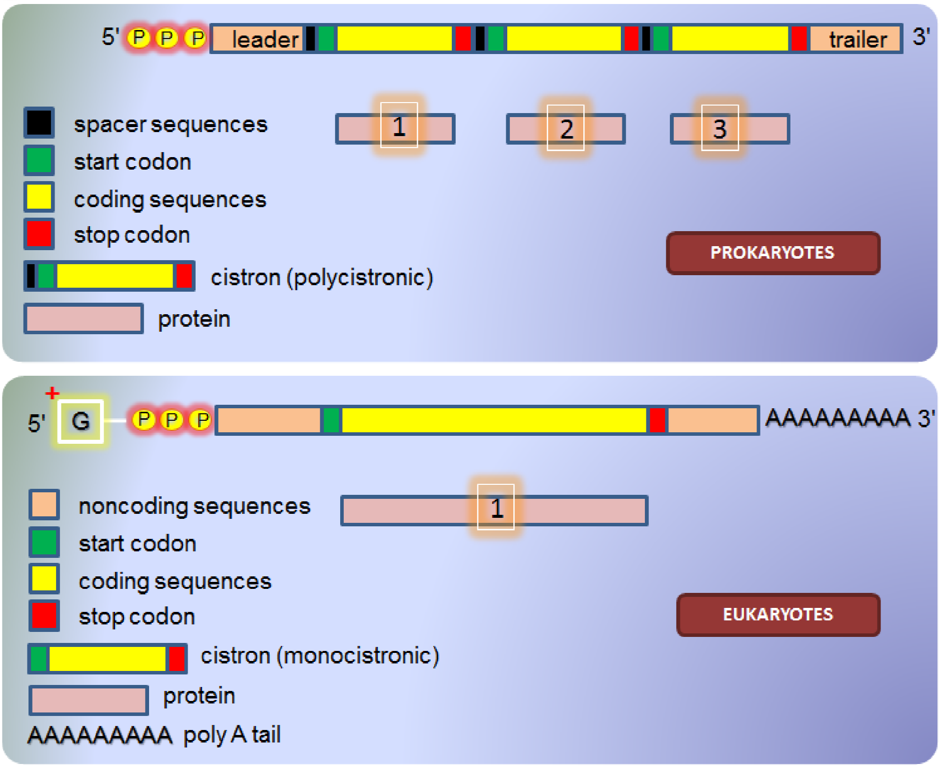
إن هنالك ثلاث أنواع رئيسية من الـ RNA الخلوي تدخل في تخليق البروتين وهي: mRNA و tRNA و rRNA . بالإضافة إلى ان هنالك أنواع RNA أخرى تعمل كبواديء primers لتخليق الـ DNA، والتي يتم تخليقها من قبل إنزيم RNA primase (راجع الفصل الثالث)، وأنواع أخرى أهمها هو snRNA.

الرنا المراسل Messenger RNA (mRNA)

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

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

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



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

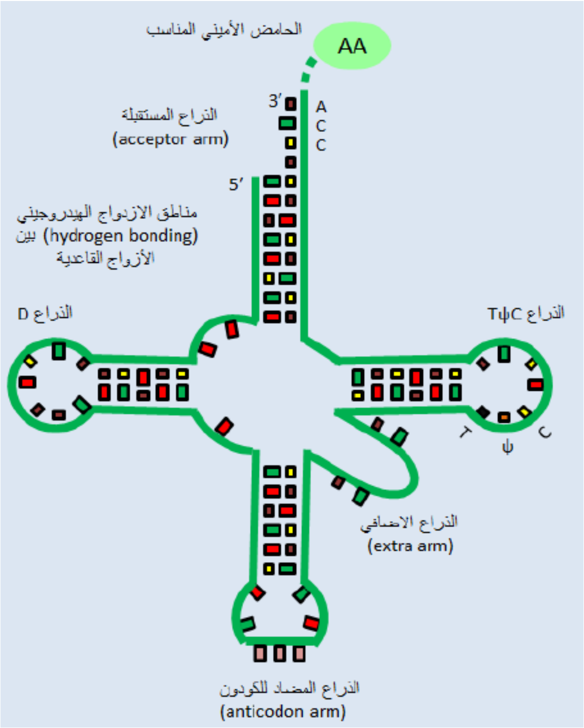
الرنا الرسول (tRNA) transfer RNA

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

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

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

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



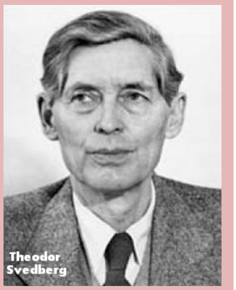
شكل (16.4): تركيب الحامض النووي المراسل tRNA (تصميم المؤلف)

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

الرنا الرايبوسومي Ribosomal RNA (rRNA)

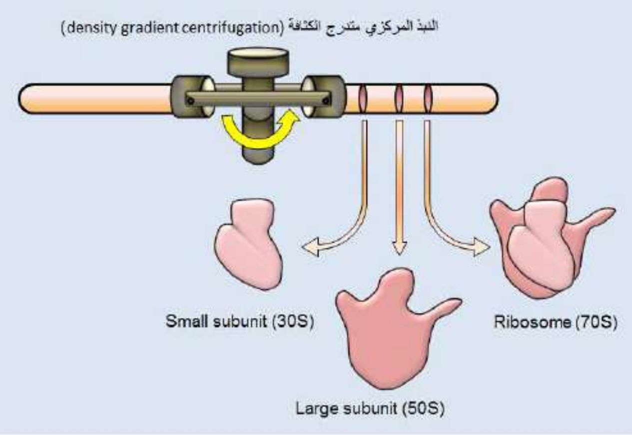
تعد جزيئات الـ rRNA هي المكون التركيبي والوظيفي للرايبوسومات، والرايبوسومات أجسام كبيرة من معقدات rRNA وبروتينات والتي تشكل الماكنة التي تأوي معظم التفاعلات المرتبطة بتخليق البروتين.

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



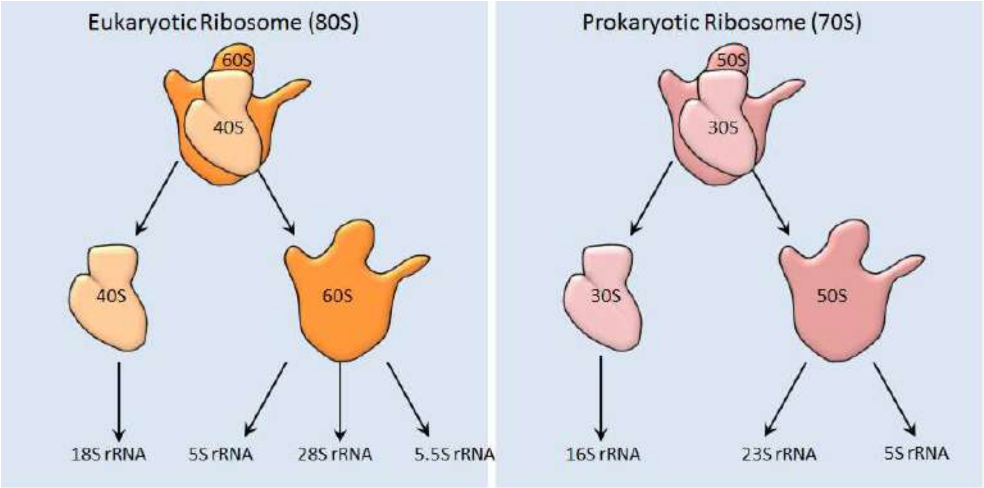
Theodor Svedberg

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



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

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



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

الرنا الصغير الثابت Small stable RNA (ssRNA)

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

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

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

ملحق الفصل الرابع

الرايبوزايم (The Ribozyme)

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

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

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