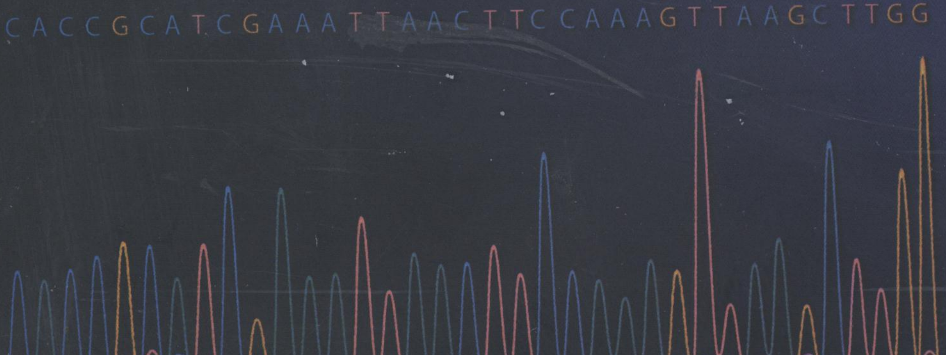
دكتور / فتحى محمد عبد التواب

البيولوجيا الجزيئية للجينوم



مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المكتبة الأكاديمية
شركة مساهمة مصرية
ISO 9002

البيولوجيا الجزيئية للجينوم

أستاذ دكتور

فتحي محمد عبدالتواب

الناشر

المكتبة الأكاديمية

شركة مساهمة مصرية

٢٠٠٧

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين عويد الهلالي

https://scholar.google.com/citations?user=t1aAacgAAAAJ&hl=en

salamalhelali@yahoo.com

https://www.facebook.com/salam.alhelali

https://www.facebook.com/groups/
/Biothesis

https://www.researchgate.net/profile/
/Salam_Ewaid

07807137614

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

﴿ هَلْ أَتَىٰ عَلَى ٱلْإِنسَـٰنِ حِينٌ مِّنَ ٱلدَّهْرِ لَمْ يَكُن
شَيْـًٔا مَّذْكُورًا ۝١ إِنَّا خَلَقْنَا ٱلْإِنسَـٰنَ مِن نُّطْفَةٍ
أَمْشَاجٍ نَّبْتَلِيهِ فَجَعَلْنَـٰهُ سَمِيعًۢا بَصِيرًا ۝٢ ﴾

صدق الله العظيم

سورة الإنسان (آيات ١،٢)

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

إهـــــــداء

إلـــى

زوجتى العزيزة الأستاذة الدكتورة/ مي فؤاد محمود

لمؤازرتها المستمرة لي أثناء معاناتي في وضع هذا الكتاب

إبنى وإبنتى الأعزاء عمـرو ، ونورتان

لثقتهما فى دور الآداب والعلوم في تقدم الأمة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مقدمة

شهدت بداية القرن العشرين محاولات جادة من جانب علماء الوراثة لتحديد هوية بعض الجينات ورسم الخرائط الوراثية لبعض الكائنات وخاصة حشرة الدروسفلا ونبات الذرة الشامية والفأر والبكتريا والخميرة. وقد إستنبط علماء الوراثة مجموعة من الطرق لرسم الخرائط الوراثية والتى إعتمدت على تناول الدراسة بمسارين رئيسين:

إذ إعتمد المسار الأول على تحليلات الطفرات التلقائية أو تلك الطفرات المستحدثة بالمطفرات الكيماوية أو الفيزيائية.

فى حين إعتمد المسار الثانى على إستخدام الطفرات المتحصل عليها لرسم الخرائط الوراثية بتحليلات الإرتباط والعبور، وفى بعض الكائنات مثل الدروسفلا أمكن إستنباط الخريطة المادية Physical لتحديد مواقع الجينات على الكروموسومات. و قد كانت هذه الطرق التى تمت منذ أكثر من ثمانين عاما تعد فعالة فى وقتها وتم إستخدامها على نطاق واسع فى الدراسات الوراثية المبكرة إلا أنه يعيب تلك الطرق ضرورة توفر طفرة واحدة على الأقل لكل جين فى الجينيوم وأنه من الصعب الحصول على هذه الطفرات بالإضافة إلى أن الطفرات غالبا ما تكون مميتة مما يجعل من الصعب إن لم يكن من المستحيل رسم خريطة لجين طافر. لذلك إستبدل الوراثيون فى منتصف الثمانيات من القرن الماضى هذه الطرق الكلاسيكية المعتمدة على الطفور بإستخدام تقنيات د ن أ المعاد صياغته Recombinant DNA لإجراء التحليلات الوراثية. وفى هذه الطريقة يتم تجزئة جينوم الكائن إلى شظايا أو قطع محددة من التتابعات

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

التى يتم تحميلها فى بلازميدات لعمل كلونات يطلق عليها فى مجموعها المكتبة الجينومية.

ويتم بعد ذلك ترتيب الكلونات فى مجموعات متداخلة Overlapping والتى يتم تجميعها فى الخرائط الوراثية Genetic Maps والخرائط المادية Physical Maps المشتملة على الجينوم بأكمله. وتتمثل الخطوة النهائية فى تحليل تتابعات الكلونات والتعرف على جميع الجينات التى يحتويها هذا الجينوم من خلال تتابعات النيوكلتيدات وبذلك أصبح فى إستطاعتنا لأول مرة عزل جين معين من مجموع الجينات التى يحتويها جينوم ما والتى قد تصل إلى عشرات الألأف من الجينات وكلونته وإجراء الدراساث عليه بمفرده ومعرفة تركيبه ووظيفته وتفاعله مع البيئة المحيطة أو مع غيره من الجينات الآخرى ويطلق على مجموع هذه الطرق مصطلح الجينوما Genomics.

وقد أدى إختراع جهاز PCR إلى إحداث طفرة هائلة غير مسبوقة فى مجال التحليلات الجينومية.

ومن جهة أخرى نتج عن الكم الهائل من البيانات فى المكتبات الجينومية وخاصة تلك التى تختص بالكائنات الراقية مثل الإنسان بما يحتويه من ٣٠-٤٠ ألف جين إلى ضرورة اللجوء إلى إستخدام الحاسبات الإلكترونية وإستنباط طرق جديدة لتحليل هذه البيانات و المساعدة فى رسم الخرائط الجينومية وقد نشأ عن ذلك فرع جديد من العلوم يطلق عليه المعاوماتية الحيوية Bioinformatics وهو عبارة عن تزاوج بين البيولوجيا والحاسبات والتى فتحت مجالا واسعا لتحليل تركيب وظائف الجينومات المعقدة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويتم عادة تقسيم التحليلات الجينومية إلى عدة أقسام حيث تعرف الجينوميا Genomics بأنها تشتمل على دراسة تركيب ووظيفة الجينوم ويطلق مصطلح الجينوميا الوظيفية Functional Genomics على دراسة وتحديد وظيفة ناتج الجين ويشمل ذلك تعبير الجين والعلاقة بين تتابع وتركيب ناتج الجين مع غيره من نواتج جينات أخرى فى نفس الكائن أو فى غيره من الكائنات الأخرى والتفاعلات الجزيئية لنواتج الجين وتعرف الجينوميا التركيبية Structural Genomics على أنها الدراسات المختصة بتحديد الوحدات التركيبية والتركيب الكامل للبروتين وعلاقة تلك التحليلات التركيبية بالوظيفة.

ومن جهة أخرى نشأت تحليلات الجينوميا المقارنة Comarative Genomes والتى تُعنىَ باستخدام التشابه فى التتابعات النيوكلتيدية والترتيب المقارن للجينات فى مختلف الكائنات لتحديد وظيفة الجين وعلاقاته التطورية.

ويطلق على دراسة المحتوى الكلى للخلية من جزيئات ر ن أ والذى يعكس طرز التعبير الجينى مصطلح Transcriptome فى حين يطلق مصطلح Proteome على المحتوى الكلى للخلية من البروتينات والذى يعكس إمكاناتها البيوكيماوية.

وقد أدت تطبيقات الكلونة الجينات أو تكنولوجيا الجين إلى فتح أفاق واسعة فى مجالات متعددة مثل إنتاج الأدوية المعدلة وراثيا والأكثر فاعلية وفى إنتاج نباتات وحيوانات معدلة وراثيا ومكتسبة لصفات هامة مثل تحمل الظروف البيئية القاسية مثل الجفاف أو الملوحة أو الحرارة المرتفعة ....إلخ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

كما توصلت دراسات وبحوث تكنولوجيا الجين إلى إستنباط طرق حديثة لعلاج بعض الأمراض الوراثية فيما يسمى العلاج بالجينات وكذلك إنتاج أدوية حديثة مهندسة وراثيا وأكثر فاعلية فى علاج الكثير من الأمراض.

إلا أن التقدم الهائل فى هذه المجالات صاحبه بعض التخوف من إمكان حدوث بعض الأخطار على الإنسان والبيئة نتيجة للتوسع فى إستخدام الكائنات المعدلة وراثيا (GMO) فى الغذاء أو الدواء وقد أدى ذلك إلى إنشاء لجان قومية للأمان الحيوى للتأكد من مدى سلامة الغذاء أو الدواء وعدم وجود أى خطورة من إستخدامه.

كما نشأت بعض المخاوف المتعلقة بأخلاقيات إستخدام تقنيات العلاج بالجينات وتم وضع معايير تحدد الشروط الواجب إتخاذها عند إجراء هذه التقنيات مع التأكيد على تحريم إستخدامها فى الخلايا التناسلية (الجرثومية) للإنسان أو فى إدخال جينات لصفات معينة بهدف رفع قدرات أو إمكانات الفرد عن المستوى العام للمجتمع الذى يعيش فيه.

إن كل يوم يأتى بجديد فى مجال الجينوميا مما يجعل الباحثون فى سباق مستمر مع الزمن لملاحقة التطورات المستمرة فى هذا المجال الحيوى والذى يتعلق مباشرة بالإنسان و بيئته.

ويضم الكتاب فى فصوله الأولى شرحا تفصيليا لتركيب و وظائف المادة الوراثية والتعبير الجينى وذلك للتمهيد للفصول الخاصة بالتحليلات الجينومية وتطبيقات تكنولوجيا الجين.

آمل أن يساهم هذا الكتاب فى إثراء المكتبات العربية بالموضوعات المتعلقة بالبيولوجيا الجزيئية وهندسة الجينات لما لهذه الموضوعات الحيوية من

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

أهمية كبيرة للباحثين والدارسين فى كليات العلوم والزراعة والطب والصيدلة وغيرها من المعاهد والمراكز البحثية فى مصر والبلاد العربية.

ولا يفوتنى أن أتقدم بالشكر والتقدير إلى **المكتبة الأكاديمية** ممثلة فى صاحبها ومديرها **الأستاذ/ أحمد أمين** ، كما أتقدم بشكر خاص **للمهندس/ حمدى قنديل** مدير الإنتاج بالمكتبة الأكاديمية على ما بذله من جهد متواصل فى متابعة مراحل طبع هذا الكتاب.

والله **سبحانه و تعالى** ولى التوفيق ...؛

المؤلف

فتحي محمد عبدالتواب

القاهرة في / /٢٠٠٦

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المحتويات

الموضوع	الصفحة

الفصل الأول: علم الوراثة من منظور تاريخي ٣١

التحول الوراثي ٣٣

الإستنقال الوراثي ٣٥

ثبات كمية د ن أ في الكروموسومات ٣٦

التأثير المطفر للأشعة فوق البنفسجية ٣٧

تركيب جزئ د ن أ ٣٩

أهم الإنجازات في مجال البيولوجيا الجزيئية ٤٠

الفصل الثاني: تركيب جزئ د ن أ
DNA Structure ٤٣

المعادلة المركزية Central Dogma ٤٤

قاعدة Charagaff لتزاوج القواعد النيتروجينية ٤٧

نموذج الحلزون المزدوج لجزئ د ن أ ٤٨

بعض خواص جزئ د ن أ ٥٣

ثبات التناظر Stability of Tautameric Forms ٥٣

الدنترة وإعادة الإتحاد Denaturation and Annealing ٥٦

الصور المختلفة لجزئ د ن أ ٦٠

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الموضوع	الصفحة

ارتباط جزئ د ن أ البكتيري ببروتينات شبه هستونية ٦٣

الفصل الثالث: تناسخ د ن أ
DNA Replication ٦٥

الطريقة شبه المحافظة لتناسخ د ن أ (تجربة ميسيلسون وستاهل) ... ٦٨
منشأ التناسخ وشوكات التناسخ ووحدات التناسخ ٧٢
نموذج بناء جزئ د ن أ ٧٧
بناء د ن أ في الكائنات الدقيقة ٨٣
أنواع إنزيمات بلمرة د ن أ في بكتريا القولون ٨٣
دور إنزيمات د ن أ في تصحيح الأخطاء Proofreading ٨٥
أهمية RNA البادئ لتناسخ جزئ د ن أ ٨٩
أنواع البروتينات التي تساعد على فك الحلزنة وانفصال سلسلتي
د ن أ ٩٣
تركيب إنزيم البلمرة DNA pol III ودور إنزيمات Topoisomerases
في تناسخ د ن أ ٩٧
نموذج الدوائر المتدحرجة لتناسخ د ن أ الحلقي Rolling Circles ... ١٠٦
بدء شوكات التناسخ عند منشأ التناسخ ١٠٩

الفصل الرابع: تناسخ الكروموسومات
في الخلايا مميزة النواة ١١٣
DNA Replication in Eucaryotes

بناء د ن أ في مميزة النواة ١١٣

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الموضوع	الصفحة

وجود تتابعات محددة من د ن أ تميز مناشئ التناسخ ١١٩
ضوابط لمنع تكرار بدء التناسخ في الخلايا مميزة النواة ١٢٢
تضاعف النيوكليوسومات عند شوكات التناسخ ١٢٤
تناسخ منطقة التلومير في الكروموسوم ١٢٨
تتابع تناسخ مناطق د ن أ المختلفة خلال فترة البناء (S) ١٣٠
يتم تناسخ مناطق الهيتروكروماتين متأخرًا في فترة البناء (S) ١٣١
تناسخ الجينات الأكثر نشاطًا يتم في مرحلة مبكرة جدًا من فترة S .. ١٣٢
تنظيم نشاط مناشئ التناسخ حسب المراحل التكوينية للكائن ١٣٥
إنزيمات بلمرة د ن أ في الخلايا المميزة النواة ١٣٦

الفصل الخامس: الأساس الجزيئي للطفور وطرق إصلاح أخطاء التناسخ ١٣٩

طبيعة الطفرات ١٤٠
طفرات تغير القاعدة الواحدة Single Base Mutation ١٤١
معدل الخطأ عند إضافة النيوكلتيدات أثناء عملية التناسخ ١٤٤
طرق التحكم في مستويات الطفور ١٤٤
الجينات المطفرة Mutators ١٤٥
نتائج أخطاء الانزلاق Slippage Errors أثناء التناسخ ١٤٦
الطفرات الناتجة عن تغيرات كبيرة نسبيًا في تتابعات القواعد ١٤٧
أهمية دراسة المطفرات الكيماوية ١٤٨
ميكانيكيات إصلاح الأخطاء في د ن أ ١٥٢

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الموضوع	الصفحة

إصلاح طفرات التعرض للأشعة فوق البنفسجية ١٥٥

إصلاح طفرات إضافة الأكليل ١٥٦

الإصلاح بالاستئصال ١٥٩

دور إنزيمات الجليكوسيليز في الإصلاح ١٦٢

استئصال قاعدة واحدة ١٦٢

استئصال النيوكلتيدة ١٦٥

تصحيح أخطاء عدم المطابقة Mismatch Repair ١٦٨

تصحيح أخطاء ما بعد التناسخ ١٧٠

الإصلاح بالاتحاديات الجديدة ١٧٠

دور بروتينات الإنقاذ .S.O.S في إصلاح د ن أ (الإصلاح القابل للخطأ Error Prone Repair).. ١٧٣

المطفرات الطبيعية وطرق التعرف عليها ١٧٥

الفصل السادس: بناء ر ن أ في غير ممزة النواة
RNA Synthesis in Procaryotes ١٧٩

تركيب جزئ ر ن أ ١٧٩

البناء الأنزيمي لجزئ ر ن أ على قالب د ن أ ١٨٠

تركيب إنزيم بلمرة ر ن أ RNA Polymerase ١٨٣

اختيار سلسلة واحدة من د ن أ للعمل كقالب لبناء ر ن أ ١٨٧

اتجاه البناء في جزئ ر ن أ ١٨٩

دور منطقة تتابع المستبدئ Promoter في بناء ر ن أ ١٩١

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الصفحة	الموضوع

تأثير ارتباط إنزيم البلمرة مع تتابع المستبدئ Promoter في فك حلزنة د ن أ وبدء عملية النسخ ١٩٦

الكفاءة النسبية لتتابعات المستبدئ Promoters ١٩٨

دور البروتينات المنظمة Regulators في التأثير على بدء النسخ ١٩٩

نيوكلتيدات بدء بناء سلسلة ر ن أ ٢٠٠

فك الحلزنة وإعادتها أثناء تقدم إنزيم بلمرة ر ن أ ٢٠٠

دور إشارات الإنهاء أو التوقف في انتهاء النسخ ٢٠١

الفصل السابع: بناء ر ن أ في مميزة النواة ٢٠٥

RNA Synthesis in Eucaryotes

أنواع إنزيمات بلمرة ر ن أ في مميزة النواة ٢٠٥

دور عوامل النسخ Transcription Factors (TF) في الارتباط بالمستبدئ Promoter ٢٠٧

اختلاف النشاط النسخي لإنزيم RNA pol II حسب تتابعات د ن أ القالب ٢١٢

تعديل أو تجهيز النسخ الأولية لسلاسل mRNA ٢١٤

حذف تتابعات كبيرة متخللة من hnRNA أثناء تجهيز mRNA في النواة ٢١٩

تراكب ر ن أ المراسل RNA Splicing ٢٢١

دور البروتينات النووية الصغيرة snRNA في عملية التراكب Splicing ٢٢٤

يتم حذف الإنترونات في شكل عروات Lariats ٢٢٥

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الموضوع	الصفحة

حذف عدة إنترونات من كل جزئ من hnRNA ٢٣٠

بناء ر ن أ الريبوسومي على مجموعــات مترادفــة مــن الجينــات المتماثلة ٢٣٣

الفصل الثامن: الشفرة الوراثية ٢٣٧
Genetic Code

التوازي بين تتابع القواعد في جزئ د ن أ وتتابع الأحماض الأمنيــة في البروتين Colinearity Between Base Sequences in DNA and Amino Acid Sequences in Protein ٢٣٧

الشفرة ثلاثية Triplet Code ٢٤١

الأدلة الوراثية على ثلاثية الشفرة Genetic Evidence for a Triplet Code ٢٤٣

استنباط الشفرة الوراثية Dicephring of the Genetic Code ٢٤٨

تقنية المتعدد النيوكلتيدي المتجانس Homopolymers ٢٤٩

تقنية البوليميرات المختلقة العشوائية Random Copolymers ٢٥٢

تقنية الارتباط المباشر لثلاثيات القواعــد التركيبيــة Direct Triplet Binding ٢٥٤

تقنية عديدات النيوكلتيدات المعروفة التتــابع Polymers of Known Sequence ٢٥٧

الخواص الرئيسية للشفرة الوراثية ٢٦١

الشفرة الوراثية تقرأ بصورة مستمرة بلا فواصــل أو تــداخل بــين الكودونات ٢٦١

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الموضوع	الصفحة

الشفرة ترادفية المعني Synonyme (أو انحلالية Degenerate) ٢٦٤
التأرجح في مضاد الشفرة ٢٦٨
كودون بدء الترجمة وكودونات إنهاء الترجمة ٢٧٠
اختلاف مقادير tRNA النوعية وتكرار استخدام الكودونات المختلفة في الشفرة ٢٧٢
تحيز الشفرة Codon Bias ٢٧٣
الشفرة الوراثية عامة Universal (تقريبًا) ٢٧٥
تأكيد الشفرة الوراثية في الخلية الحية ٢٧٦

الفصل التاسع: بناء البروتين
Protein Synthesis ٢٧٧

دور إنزيم Aminoacyl-tRNA Synthetase في عملية الترجمة ٢٨١
دور الريبوسومات في تكوين الروابط الببتيدية ٢٨٦
تحرك الريبوسومات خطوة خطوة على سلسلة mRNA القالب ٢٩٢
مراحل عملية بناء البروتين ٢٩٣
مرحلة البدء Initiation Stage ٢٩٤
عوامل البدء ٣٠٠
اتجاه الترجمة (5'→3') ٣٠٢
مرحلة الاستطالة Elongation Stage ٣٠٣
مصدر الطاقة اللازمة لعملية الاستطالة ٣٠٥
دور عوامل الاستطالة Elongation Factors (EF) في بناء البروتين ٣٠٦

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الموضوع	الصفحة

مرحلة إنهاء الترجمة Termination (Relese) ٣٠٨
دور GTP في مراجعة أخطاء الترجمة ٣١١
البقعة السحرية "pp Gpp" Magic Spot ٣١٢
دور بعض المضادات الحيوية في وقف بناء البروتين ٣١٣
الترجمة في مميزة النواة ٣١٧

الفصل العاشر: تنظيم التعبير الجيني في غير مميزة النواة ٣١٩

Regulation of Gene Expression in Procaryotes

أنواع التثبيط بالتغذية الرجعية Types of Feedback Inhibition ٣٢٢
تعدد الصور الإنزيمية (مشابهات الإنزيم) Isozymes ٣٢٤
التثبيط المتناسق Concerted Feedback Inhibition ٣٢٦
النشاط التجمعي أو التراكمي Additive or Commulative FBI ٣٢٦
التثبيط التعاوني Co-operative FBI ٣٢٧
التحكم الوراثي Genetic Control ٣٢٧
دور البروتينات المنشطة في بدء عملية النسخ للأوبرون Operon .. ٣٣٢
تعريف الأوبرون ٣٣٦
العناصر الرئيسية للأوبرون ٣٣٦
تركيب أوبرون اللاكتوز Lac Operon ٣٣٧
الأدلة الوراثية لإثبات نموذج الأوبرون ٣٤٠
أوبرون التربتوفان Typtophan Operon ٣٤٤
دور منطقة التباطؤ Attenuation في تنظيم نسخ أوبرون التربتوفان ٣٤٧

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الموضوع الصفحة

الفصل الحادي عشر: تنظيم التعبير الجيني في مميزة النواة ٣٥٣

Regulation of Gene Expression in Eucaryotes

التنظيم المكاني Gene-in-Site ٣٥٧

التنظيم الزماني Gene-in-Time ٣٥٨

عوامل النسخ Transcription Factors ٣٦٠

البروموتور والمحفز Promoter and Enhancer ٣٦٤

البروموتور ٣٦٤

المحفز ٣٦٦

تنظيم النشاط النسخي بعوامل بيئية ٣٦٨

الحرارة وجينات الصدمة الحرارية ٣٦٨

الضوء : جينات ريبيلوز كاربوكسيليز في النبات (RBC) ٣٧٠

تنظيم النسخ بواسطة عوامل بيولوجية ٣٧٢

الهرمونات الأستيرودية ٣٧٢

الهرمونات البيتيدية ٣٧٤

تنظيم التعبير الجيني بعد النسخ Post-transcription Regulation ... ٣٧٦

بدائل التراكب Alternative Splicing of RNA ٣٧٧

جين التربونين Troponin ٣٧٨

جين كالسيتونين البشري Calcitonin ٣٧٩

جين Sxl المرتبط بالجنس ٣٨١

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الموضوع	الصفحة

معدل ثبات م ر ن أ Stability of mRNA ٣٨٣
انتقال م رن أ mRNA Transport ٣٨٥
مراجعة م رن أ mRNA Editing ٣٨٨
تنظيم الترجمة في غير مميزة النواة ٣٩٠
تنظيم الترجمة في مميزة النواة ٣٩٤

الفصل الثاني عشر: تكنولوجيا د ن أ المعاد صياغته ٤٠٣
Recombinant DNA Technology

أنزيمات القطع المحددة Restriction Endonucleases ٤٠٤
الكلونة Cloning ٤١٠
أنواع ناقلات الكلونة Cloning Vectors ٤١٣
البلازميد ٤١٣
الفاج ٤١٣
الكوزميد ٤١٤
YAC ٤١٤
BAC ٤١٤
المكتبة الجينومية ٤١٦
مكتبة cDNA ٤٢٠
تكوين مكتبة cDNA من جزيئات منتخبة من م ر ن أ ٤٢٥
طرق الحصول على الكلون المرغوب من مكتبة الجينات ٤٢٨
تحديد وعزل كلون نوعي من مكتبة الجينات ٤٣٢

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الموضوع	الصفحة

تصميم الواسمات Design of Probes ٤٣٧

استنباط الواسمات بالإستعانة بمكتبة cDNA ٤٣٨

استنباط الواسمات بمعلومية تتابعات الأحماض الأمينية للبروتين ٤٣٩

استنباط الواسمات لجين ضمن مجموعات جينات متقاربة Multigene Family ٤٤٣

تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل PCR ٤٤٤

الشروط الواجب توافرها في تجارب PCR ٤٤٩

طرق تحليل نواتج PCR ٤٤٩

التفريد الكهربي ٤٥٠

كلونة نواتج PCR ٤٥١

دراسة موقع وتركيب الجين في جزئ د ن أ ٤٥٥

تحديد موقع الجين Gene Location ٤٥٥

فصل الكروموسومات في مميزة النواة البدائية ٤٥٩

تحديد موقع الجين على كروموسومات مميزة النواة بطريقة التهجين في الموضع *In Situ* Hybridization ٤٦٢

تحليل التتابعات النيوكلتيدية في جزئ د ن أ DNA Sequencing ٤٦٤

طريقة إنهاء بناء السلسلة Chain Termination ٤٦٤

طريقة الهدم الكيماوي Chemical Degradation ٤٦٨

تحليل تتابعات نواتج PCR ٤٧٠

تكوين تتابعات طويلة من د ن أ ٤٧٦

بعض الإنجازات الهامة في تحليل تتابعات د ن أ ٤٧٨

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الموضوع	الصفحة

الفصل الثالث عشر: التحليلات الجينومية ٤٨١
Genomic Analysis

طرق تكوين التتابعات المتجاورة Assembly of Contigs ٤٨٣
طريقة Shotgun ٤٨٤
طريقة Clone Contig ٤٨٦
المشي على الكروموسوم Chromosome Walking ٤٨٦
القفز على الكروموسوم Chromosome Jumping ٤٨٧
استخدام الخرائط الوراثية والفيزيائية للمساعدة في بناء تتابعات الجينوم ٤٩٢
دراسة ما بعد الجينوميا Post-Genomics ٤٩٤
تحديد موقع الجين في تتابعات الجينوم ٤٩٥
البحث عن إطار قراءة مفتوح ORF ٤٩٦
تحديد ORF الصحيحة ٤٩٨
تحديد وظيفة جين غير معروف ٥٠٠
تحليلات الحذف Deletion Analysis ٥٠٠
Reporter Gene ٥٠١
تحديد نواتج ترجمة جين مكلون HART, HRT ٥٠٤
تحليل البروتينات باستخدام الطفرات معمليًا Site Directed Mutagenesis ٥٠٩
هندسة البروتين Protein Engineering ٥١١
دراسة التفاعلات بين البروتينات ٥١٢
استعراض الفاج Phage Display ٥١٣

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الموضوع	الصفحة

نظام الهجينان في الخميرة Yeast Two-hybrid System ٥١٤
تقنيـــــات إســــكات التعبيـــــر الجينــــي Gene Silencing
Gene Knockout, Gene Knockdown ٥١٧
دراسة المحتوى النسخي والمحتوى البروتيني للجينوم Trancriptome
and Proteome ٥٢١
بعض المفاهيم الجديدة الناتجة عن التحليلات الجينومية ٥٢٩

الفصل الرابع: تطبيقات تكنولوجيا الجين ٥٣٧
Applications of Gene Technology

إنتاج بروتينات معدلة وراثيًا ٥٣٧
الأنسولين المعدل وراثيًا ٥٣٩
إنتاج هرمون النمو البشري في خلايا بكتريا القولون ٥٤٤
إنتاج عامل التجلط VIII ٥٤٧
إنتاج بروتينات بشرية معدلة أخرى ٥٥٠
إنتاج فاكسينات بتكنولوجيا الجين ٥٥١
استنباط فاكسينات حية معدلة وراثيًا ٥٥٤
إنتاج بروتينات معدلة وراثيًا في الحيوانـــات الحيـــة Recombinant
Protein From Live Animals ٥٥٦
إنتاج بروتينات معدلة وراثيًا فـــي النبـــات Recombinant Protein
From Plants ٥٥٧
تحديد الجينات المسئولة عن الأمراض البـــشرية Identification of
Genes Responisble for Human Diseases ٥٥٨

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الموضوع	الصفحة

العلاج بالجينات Gene Therapy ٥٦٣
العلاج الجيني للسرطان ٥٦٦
تشخيص وحصر العيوب الوراثية Diagnosis and Screening of Genetic Disorders ٥٦٧
استخدام البصمة الوراثية في القضايا الشرعية Forensic Applications ٥٦٩
استخدام تكنولوجيا الجين في الزراعة Gene Cloning in Agriculture ٥٧٠
إضافة الجين ٥٧١
إنتاج نباتات مقاومة للحشرات ٥٧١
الطرح الجيني ٥٧٦
استخدام ر ن أ مضاد المعنى لتنظيم التعبير الجيني Antisense RNA. ٥٧٦
استخدام asRNA لإنتاج ثمار طماطم طويلة العمر ٥٨٠
الأمان الحيوي والكائنات المعدلة وراثيًا Biosafety and GMO ٥٨٣
المخاطر المحتملة على البيئة ٥٨٥
الحيوانات المعدلة وراثيًا Transgenic Animals ٥٨٦
تكنولوجيا الجين والأخلاقيات Gene Technology and Ethics ٥٨٩
الاختبارات الوراثية والأخلاقيات Gene Testing and Ethics ٥٨٩
القضايا الأخلاقية والعلاج بالجينات Ethical Issues in Gene Therapy ٥٩١
التأثير السلبي لتكنولوجيا الجين على الدول النامية ٥٩٣

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الموضوع	الصفحة

الفصل الخامس عشر: مقدمة في المعلوماتية الحيوية ٥٩٥
Bionformatics

قواعد البيانات Data Bases ٥٩٦
تحديد إطارات القراءة المفتوحة ORF ٥٩٩
استخدام التناظر لتعريف الجينات Using Homology to Find Genes ٦٠٠
أسس البحث عن التشابه Principles of Similarity Searching ٦٠٣
استخدام برنامج BLAST لتحديد التشابه في تتابعات البروتين ٦٠٥
تفسير نتائج BLAST ٦٠٦
العرض البياني Graphic Display ٦٠٧
قائمة إصابة الهدف The Hit List ٦٠٩
المحاذاة The Alignments ٦١٢
تحليل ر ن أ غير الشفري وتتابعات د ن أ غير الجينية Analysis of
Non-coding RNA and Extragenic DNA ٦١٥
تحديد وظيفة جين جديد Identifying The Function of a New Gene. ٦١٥
اختيار أنسب برنامج BLAS للدراسات المختلفة لتحديد درجة تـشابه
التتابعات ٦١٦

الفصل السادس عشر: الجينوميا المقارنة ٦١٩
Comparative Genomics

استخدام الجينوميا المقارنة في النبات ٦٢٢
استخدام الجينوميا المقارنة في دراسة الأمراض الوراثية البشرية ... ٦٢٥

مراجع مختارة Selected References ٦٣١

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفصل الأول

علم الوراثة من منظور تاريخى

يعتقد أن علم الوراثة قد نشأ حول فكرة وجود عناصر غير مرئية محتوية على المعلومات الوراثية، والتى سميت فيما بعد بأسم الجينات، وأن هذه العناصر تنتقل إلى كل من الخليتين البنويتين عند انقسام الخلية.

إلا أنه قبل ان يتم الانقسام فلابد أن يكون بمقدور الخلية الأم تكوين نسخة من جيناتها حتى تعطى مجموعة كاملة من هذه الجينات إلى كل خليـــة بنويـــة. إذ أن الجينات فى الحيوان المنوى أو البويضة تنقل الصفات الوراثية من جيـــل إلى الجيل التالى. وعند إعلان قوانين مندل للوراثة ثم تصحيح الفكـــرة الـــسائدة عن العوامل الوراثية من نظرية الدمج Blending Theory إلى نظرية العوامـــل المستقلة المتميزة Particulate Theory والتى تظل فيه الجينات محتفظة بكينونتها واستقلالها من جيل إلى جيل. وقد أدى ذلك إلى الاعتقاد بـــأن هـــذه العوامـــل الوراثية المسئولة عن الصفات البيولوجية المختلفة لابد أن تكون مركبة من نظم من الذرات التى لابد أن تخضع لقوانين الكيمياء والفيزياء أو بمعنى آخر لابد أن هذه الجينات تتكون من جزيئات معينة موجودة فى الخلية الحية.

فى البداية لم يمكن تحديد او حتى تخيل طبيعة هذه الجزيئات التى يمكنها أن تُختزن فى الخلية ويكون بمقدورها إدارة الأنشطة المختلفة للكائن اثناء نمـــوه

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وتمايزه وفى نفس الوقت يكون باستطاعتها أن تتضاعف (تتكرر) بطريقة دقيقة وصحيحة وبصفة مستمرة تقريباً Unlimited.

عقب إعلان نظرية الكروموسومات للوراثة Chromosome Theory of Inheritance فى بداية القرن العشرين أصبح من الواضح أن الكروموسومات هى الحاملة للمعلومات الوراثية ولكن تبين فى تلك المرحلة المبكرة أن الكروموسومات مكونه من مركبات عديدة تشمل البروتينات والأحماض النووية وخاصة الحامض النووى الديوكسى ريبوزى د ن أ DNA

وقد تركز البحث في البداية على التعرف على أنواع من البروتينات النوعية نظراً لأن البروتينات تحتوى بين جزيئاتها على قدر واسع من الأختلافات الكيماوية والبيولوجية مما يؤهلها للقيام بمهمة المادة الوراثية فى حين أعتبرت الأحماض النووية غير صالحة لهذه المهمة نظرا لافتقارها إلى التباين الكيماوى الواسع بين جزيئاتها. وأنه بالتالى من المستبعد وجود وظيفة وراثية لجزئ د.ن.أ وأن كل مهمته أن يعمل كإطار لتدعيم البنية الاساسية للكروموسومات.

ظلت المحاولات مركزة فى هذا الاتجاه إلى أن وصلت إلى طريق مسدود حيث ثبت أنه لا يوجد أى نوع من بروتينات الخلية يمكن أن تتوفر فيه شروط المادة الوراثية وهى:

١- القدرة على اختزان جميع المعلومات الوراثية المطلوبة لإدارة وتنظيم الإنشطة الايضية فى الخلية.
٢- القدرة على التضاعف بانتظام وبدقة بحيث يمكن انتقال المعلومات وتوريثها للخلايا البنوية بطريقة مضبوطه.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٣- القدرة على التعبير لهذه المعلومات الوراثية فى صورها المختلفة.
٤- القدرة على الطفور بنسب منخفضة جدا بحيث تحدث تغيرات وراثية يمكن توريثها إلى النسل.

من هنا تحول الانتباه، بعد فيض من البحوث والدراسات إلى د.ن.أ، على اعتباره هو بالفعل المادة الوراثية فى معظم الخلايا الحيه (عدا قليل من الفيروسات يكون ر.ن.أ . هو المادة الوراثية بها).

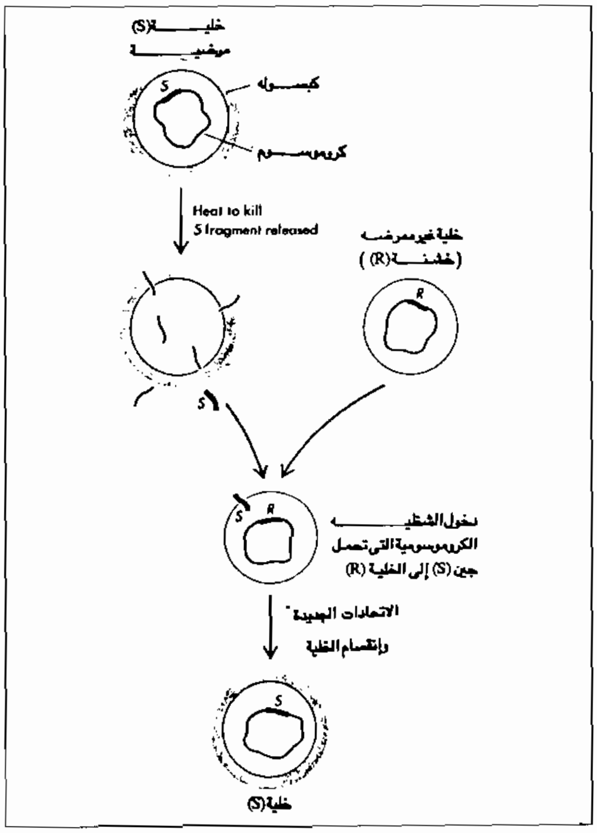
يمكن تلخيص الأدلة على أن د.ن.أ هو المادة الوراثية فى الآتى:

١- التحول الوراثى Genetic Transformation:

تمكن أفرى Avery ومعاونوه عام ١٩٤٤ من التوصل إلى أن المادة الوراثية تكمن فى د.ن.أ. بالخلية وليس فى بروتيناتها وذلك بعد قيامهم بتجربة رائدة للتحول الوراثى بين سلالتين من البكتريا المسببة للالتهاب الرئوى فى الأنسان من نوع Pneumococcus، حيث كانت السلالة الأولى وتسمى S-type لها القدرة على تكوين حافظة أو كبسولة من عديدات التسكر Polysaccharides حولها مما يقيها من أجهزة الدفاع فى الحيوان المصاب ويمكنها من أحداث الأصابة بالمرض وقد أعطيت الاسم S (Smooth) لان مستعمراتها النامية على البيئة الصلبة تعطى مظهراً أملس. أما السلالة الآخرى المستخدمة فهى السلالة R-type وهى طافرة تفتقر إلى الأنزيم المسئول عن بناء سكريات الكبسولة مما يجعل مظهر المستعمرة على البيئة الصلبة خشنا Rough وهذه السلالة تكون غير مرضية لعدم قدرتها على مقاومة الجهاز المناعى بالجسم نظراً لعدم وجود الكبسولة الواقية حولها.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

عندما أضاف Avey مستخلصاً نقياً من د.ن.أ للسلالة S بعد التخلص من البروتينات و ر.ن.أ . إنزيمياً، إلى مزرعة من السلالة R أمكن الحصول على بعض الخلايا من نوع S ومن جهة أخرى، فقدت السلالة S القدرة على تحويل السلالة R تماما عندما تم تكسير د.ن.أ. بالمعاملة بإنزيم DNase أى أن جزئ د.ن.أ. هو المسئول عن عملية التحول الوراثى وكان هذا أول دليل عملى على أن د.ن.أ. هو مادة الوراثة (الشكل ١-١).



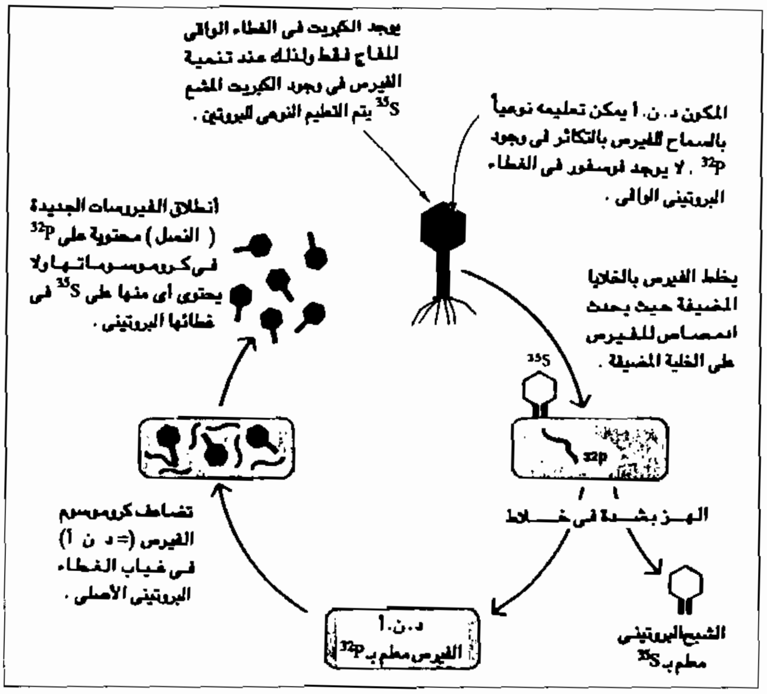
الشكل (١-١): تجربة التحول الوراثى لاثبات أن د.ن.أ هو المادة الوراثية حيث أضيفت صفة الكبسولة الملساء (S) إلى خلية من سلالة غير مكبسلة (خشنة R) فتحولت الأخيرة إلى خلايا ملساء (S)

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢- الاستنقال الوراثى (النقل الفاجى) **Genetic Transduction:**

حيث قام هيرشى Hershey وتشيز Chase عام ١٩٥٢ بعدوى بكتريا القولون *E.coli* بالفاج T_2 بعد تعليم بروتينات الغطاء المحيط بالفاج بالكبريت المشع ^{35}S فى حين تم تعليم جزئ د.ن.أ. الداخلى بالفوسفور المشع ^{32}P ومن المعروف أن الفاج يقوم بحقن محتوياته الداخلية فقط (د.ن.أ) إلى داخل الخلية البكتيرية فى حين يبقى الغطاء المغلف له معلقا خارج الخلية المحقونة ويمكن التخلص منه بالرج بحرص فى خلاط. تبين أن معظم الفوسفور المشع (وبالتالى د.ن.أ الفاج) قد دخل إلى الخلية البكتيرية فى حين لم تظهر آثار للكبريت المشع إلا النادر جداً والتى وجدت معلقة بالجدار الخارجى للخلية البكتيرية (الشكل ١-٢) وقد وجد أن جميع النسل الناتج من الفاج بعد تكاثرة داخل الخلية البكتيرية والذى خرج بعد تحلل الخلية البكتيرية Lysis وانفجارها يحتوى على ^{32}P فوسفور مشع مصدره بالطبع د.ن.أ الفاج الأصلى ولا يحتوى أى نسل من الفاج على أى أثر من ^{35}S مما يدل على أن بروتين الفاج لم يكن له أى دور فى انتقال المادة الوراثية إلى النسل فى حين أن د.ن.أ هو المادة الوراثية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١-٢): إثبات أن د.ن.أ. للفاج T_2 هو الذى يحمل المعلومات الوراثية وأن الغطاء البروتينى يستخدم فقط كغطاء واقى ولا يحمل أى معلومات وراثية

٣- ثبات كمية د.ن.أ فى الكروموسومات:

بينت الدراسات السيتولوجية والسيتوكيماوية فى الكائنات مميزة النـواة أن د.ن.أ يوجد فى النواه فقط (فيما عدا د.ن.أ الميتوكوندريا والكلوروبلاست) فـى حين أن البروتينات توجد فى النواة والسيتوبلازم والغشاء البلازمى. بالاضـافة إلى ذلك فقد ثبت أن كمية د.ن.أ فى الخليـة الثنائيـة العـدد الكروموسـومى Diploid Cell يكون ثابتاً دائماً للكائن الواحد ويساوى ضعف الكمية الموجـودة فى الخلية الجاميطية الاحادية Haploid (الجدول ١-١).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فى حين لا توجد هذه العلاقة الثابتة فى كمية البروتينات من نوعية الخلايا اعلاه.

بالاضافة على ذلك فإن د.ن.أ وبعكس البروتينات وغيرها من الجزيئات الاخرى فى الخلية يكون ثابتاً أيضياً Metabolically Stable بمعنى أنه لا تجرى له عملية بناء ثم هدم بسرعة ولكن بمجرد أن يتم بناؤه فى الخلية فإن د.ن.أ يظل فيها محتفظاً بخواصة طالما أن الخلية تنمو نمواً طبيعاً.

الجدول (١-١)

محتوى الخلية الاحادية (n) والثنائية (2n) لبعض الأنواع (Picogrm)

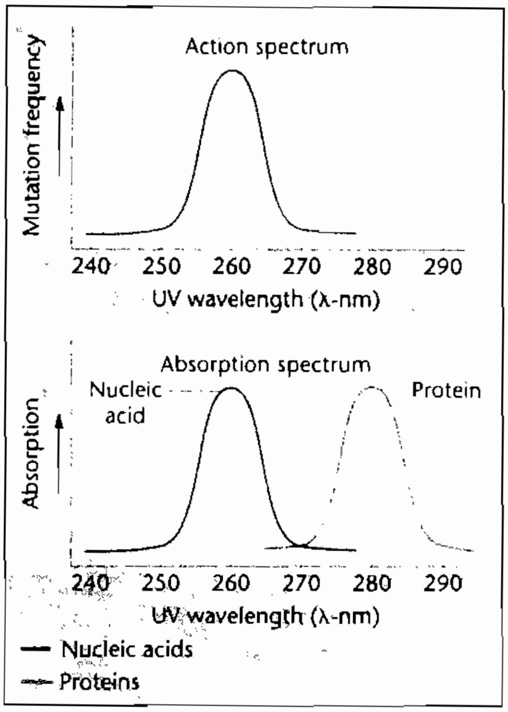
الكائن	n	2n
الانسان	٣,٢٥	٧,٣٠
الدجاجة	١,٢٦	٢,٤٩
السمك	٢,٦٧	٥,٧٩
الكابوريا	١,٦٥	٣,٤٩

التأثير المطفر للاشعة فوق البنفسجية:

تبين أن الاشعة فوق البنفسجية تعطى أعلى معدل للطفور عند طول موجة 260nm. ومعروف أن جزيئات د.ن.أ ، ر.ن.أ يمتصان هذه الاشعة بقوة عند 260nm ومن جهة اخرى وجد أن البروتين يمتص معظم هذه الاشعة عند 280nm إلا أنه لم تحدث أيه تأثيرات طفرية عند هذه الموجة الاخيرة.

ويعطى هذا الدليل غير المباشر برهانا على أن الاحماض النووية وليست البروتينات هى بالفعل المادة الوراثية (الشكل ١-٣).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١-٣): مقارنة المجال الضوئي الذي يحدد طوله موجة UV الأكثر فاعلية لإحداث الطفور ومجال الامتصاص الذي يبين أطوال الموجات التي يمتص عندها كل من د ن أ والبروتين الأشعة فوق البنفسجية UV

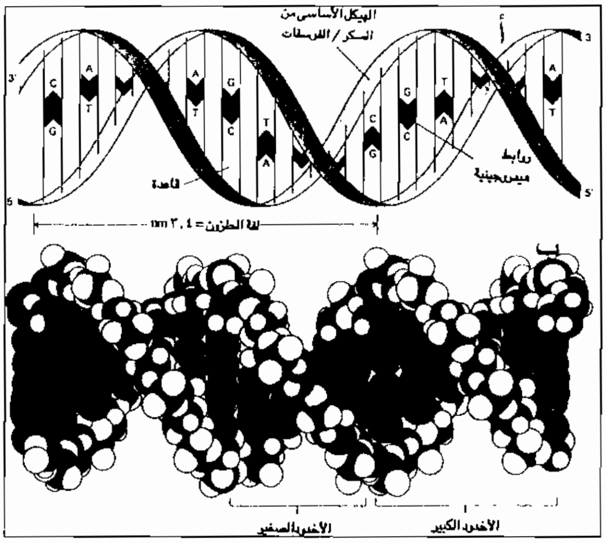
ومن أمثلة الادلة المباشرة : ما قدمته تقنية د.ن.أ المعاد صياغته Recombinant DNA التي أدت الى انتاج نباتات وحيوانات محولة وراثيا Transgenic Plants and Animals حيث يتم نقل جين معين (مثل جين الأنسولين البشرى) إلى بكتريا القولون *E.coli* فقد وجد أن هذه البكتريا قد اكتسبت هذا الجين وتم بالفعل انتاج الانسولين البشرى فى خلايا البكتريا المحولة وراثياً. وقد أمكن أيضا الحصول على دليل مباشر آخر عندما تم حقن Microingection جين β-Globin البشرى فى البويضة المخصبة للفأر حيث وجد

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ان هذا الجين موجود بالفعل فى أنسجة الفأر الناضج جنسيًا والمحـــول وراثيـــا وانتج β-Globin البشرى وامكن متابعة توريثه فى نسل هذا الفأر. ويـــدل ذلـــك وغيره من نتائج التحول الوراثى فى مميزة النواة دلالة قاطعة على أن د.ن.أ هو المادة الوراثية حيث أنه اجتاز شرط القدرة على التعبيـــر Expression وســـوف نعرف فى الفصول التالية كيف يتم تخزين وتناسخ وطفور وتعبيـــر د.ن.أ فـــى مميزة النواه.

تركيب جزئ د ن أ:

شهد عام ١٩٥٣ الميلاد الحقيقى لعلم البيولوجيا الجزيئية بالمعنى الحديث حين اعلن واتسون وكريك Watson & Crick نموذج الحلزون المزدوج لتفـــسير تركيب جزئ د.ن.أ (الشكل ١-٤).



الشكل (١-٤): نموذج الحلزون المزدوج لجزئ د.ن.أ تتزاوج (تلتف) سلسلتان متكاملتان فى تتابعات النيوكليتيدات ومتضادتان فى الإتجاه على شكل حلزون مزدوج يمينى الدوره (الشكل ١-٤-أ يمثل رسما تخطيطا للنموذج والشكل ١-٤-ب يمثل نموذجاً فراغياً)

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وذلك بعد اجرائهما لدراسات مستفيضة وكذلك تفسيرهما الصحيح للنتائج التى اظهرتها صور انحراف الأشعة السينية X-ray Difraction التـــى أجراهـــا ويلكنز Wilkins، وفرانكلين Franklin لجزئ د.ن.أ وكذلك بالاستفادة من النتائج التى اعلنها شاراجاف Charagaff عام ١٩٥٠عن محتوى د.ن.أ مـــن القواعـــد النتروجينيه فيما يعرف بقاعدة شاراجاف.

وقد قوبل هذا النموذج فى البداية بحملة من عدم التصديق إلا أن البحوث والدراسات المستفيضة فى هذا المجال اثبتت أن هذا النموذج هو الوحيـــد حتـــى الآن الذى يمكن على أساسه تفسير خواص المادة الوراثية وبذلك فتح الباب على مصراعيه لتطور علم البيولوجيا الجزيئية.

والجدول التالى يبين بعض الاحداث الهامة في مجال تطور علم البيولوجيا الجزيئية.

الجدول (١-٢): أهم الإنجازات فى مجال البيولوجيا الجزيئية

١٨٦٩	Miescher عزل مادة د. ن. أ لأول مرة واسماها نيوكلين Nuclein.
١٩٤٤	أثبت Avery ومعاونوه أن د. ن. أ هو المادة الوراثية بتجارب التحـــول الوراثى فى بكتريا القولون.
١٩٤٩	Charagaff أثبت العلاقة بين كمية القواعد النتروجينيه فى جزئ د. ن. أ (C= G, A = T).
١٩٥٢	Hershey أثبت أن د. ن. أ هو المادة الوراثية فى تجـــارب الاســـتنقال الوراثى (انتقال بالفاج).
١٩٥٣	Watson & Crickإعلان نموذج الحلـــزون المـــزدوج لتركيـــب جـــزئ د. ن.أ.
١٩٥٥	Kornberg إكتشاف أنزيم بلمره جزئ د. ن. أ DNA Polymerase.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

١٩٦١	Marmur & Doty إكتشاف خاصية إعادة الاتحاد Renaturation في جزئ د. ن. أ المدنتر Denatured مما فتح المجال لعملية التهجين بين جزيئات الاحماض النووية،
١٩٦٢	Arber أعطى أول دليل على وجود أنزيمات القطع المحددة DNA Restriction Endonucleases مما أدى بعد ذلك إلى تنقيتها واستخدامها في دراسة تتابع د. ن. أ بواسطة Nathan & Smith.
١٩٦٦	Nirenberg, Ochoa & Khorana فك الشفرة الوراثية Genetic Code.
١٩٦٧	Gellert أكتشاف انزيم اللحام DNA ligase الذى يستخدم في وصل شظايا د. ن. أ ببعضه.
١٩٧٠	Temin, Mizutani & Baltimore اكتشاف انزيم النسخ العكسى Reverse Transcriptase الذى أدى فيما بعد إلى الحصول على جينات تركيبية Synthetic Genes (cDNA).
١٩٧٣-١٩٧٢	تطور تقنيات كلونه د. ن. أ في معامل Berg, Cohen, Boyer.
١٩٧٧-١٩٧٥	Maxam & Gilbert, Sanger & Coulson استنباط طرق سريعة لدراسة تتابع القواعد في جزئ د. ن. أ.
١٩٨٢-١٩٨١	أنتج Spardiling دروسفلا محولة وراثياً كما انتج Palmmiter فئران محولة وراثيا.
١٩٨٢	إنشاء Gene Bank في المعهد القومى للصحة NIH بالولايات المتحدة الأمريكية.
١٩٨٣	Cech & Altman أثبتا أن ر. ن. أ يمتلك خواص انزيميه.
١٩٨٥	اخترع mallis ومعاونوه جهاز PCR
١٩٨٧	استنبط Capecchi طرق لنقل واستبدال جينات مستهدفة في الخلايا الجنينية الجذعية للفأر.
١٩٨٨	اختيار Watson كمنسق عام لمشروع الجينوم البشرى.
١٩٨٩	اللجنة الاستشارية للمعهد القومى للصحة NIH لبحوث د. ن. أ المعاد صياغته توافق لأول مرة على تجربة نقل جين بشرى.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

١٩٨٩	استطاع Tsui ، Collins ومعاونوهما أن يكلونوا (Clone) "جين التليف الحويصلى"وهو الجين الذى يؤدى إليه الطافر إلى موت طفل من كل ٢٠٠٠ طفل فى الولايات المتحدة "مرض الطفولة المميت".
١٩٨٩	تمكن Fields and Song من استنباط نظام Yeast Two Hybrid System لدراسة التفاعل بين البروتينات.
١٩٨٩	استنبط Olson ومساعدوه Sequence Tagged Sites (STS).
١٩٩٠	استنبط Lipman ومساعدوه برنامج BLAST للتعرف على درجة التماثل بين تتابعات د. ن. أ والبروتين.
١٩٩٠	قام Simon وزملاؤه بدراسة كيفية استخدام BAC's لكلونة اجزاء كبيرة من تتابعات د. ن. أ البشرية.
١٩٩١	قدم Hood and Hunkapillar تقنية جديدة أوتوماتيكيه لتحليل تتابعات د. ن. أ.
١٩٩٥	نجح Venter وزملاؤه فى تحليل تتابعات أول جينوم بالكامل وهو جينوم *Haemophiltus in fluenzae*.
١٩٩٦	أعلن Goffeau ومجموعة من العلماء على المستوى الدولى اتمام تحليل تتابعات أول كائن فى مميزة النواة وهو خميرة الخباز *Saccharomyces Cerevisiae*.
١٩٩٧-١٩٩٦	اكتشف Lockhart وزملاؤه وكذلك Brown and DeRisi تقنية Microarrays.
١٩٩٨	نجح Sulston and Waterston فى تحليل التتابعات الكاملة لكائن متعدد الخلايا وهو النيماتودا.
٢٠٠١	أعلن فريق العلماء والباحثين استكمال تحليل تتابعات الجينيوم البشرى.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الفصل الثانى

تركيب جزئ د. ن. أ
DNA Structure

قبل أن نتطرق إلى تركيب جزئ د. ن. أ (الحلزون المزدوج) يجدر بنا أولاً أن نتعرف على المكونات الكيماوية للأحماض النووية بنوعيها د. ن. أ، ر. ن. أ نظراً للأدوار الرئيسية التى تقوم بها فى حفظ المادة الوراثية ونقلها من جيل إلى جيل.

تعد الأحماض النووية من الجزئيات الكبيرة الحجم نسبيا وذات أهمية بيولوجية قصوى. تحتوى معظم الكائنات الحية على كميات متفاوته من الأحماض النووية بنوعيها د. ن. أ و ر. ن. أ فى حين توجد بعض الفيروسات لا يوجد بها إلا د. ن. أ والبعض الاخر لا يحتوى إلا على ر. ن. أ فقط.

يعتبر د. ن. أ المصدر الرئيسى للمعلومات الوراثية وكما سيأتى بعد فإن لهذا الجزئ القدرة على التكاثر Replication (التكرر الذاتى Self-replication) يتم نسخ Transcription المعلومات الموجودة فى جزئ د. ن. أ إلى نسخ Copies من ر. ن. أ الذى يحتوى تتابع نيوكليوتيداته على الشفرات "الثلاثية الأحرف" الخاصة بتتابع الأحماض الأمينية عندما يتم بناء البروتينات فى عملية تعرف بالترجمة Translation لهذه الشفرات. يطلق على تتابع أو تدفق

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

هذه الأحداث البيولوجية الهامة اسم المبدأ المركزى أو المعادلة المركزية Central Dogma ويمكن تلخيصها كالاتى:

Replication

DNA —Transcription→ RNA —Translation→ Protein

حيث يشير السهم الدائرى حول د. ن. أ إلى قدرته على التضاعف الذاتى فى حين يتم نسخ جزئ ر. ن. أ على قالب من د. ن. أ وتتم عملية بناء البروتين تحت إدارة تتابع القواعد (الشفرات) فى جزئ ر. ن. أ التى يقال لها أنها تترجم إلى تتابع مقابل من الأحماض الأمينية التى يتم ربطها على الريبوسوم بروابط ببتيديه.

يوجد د.ن.أ فى الكائنات مميزة النواة داخل النواة فى حين يتكون ر. ن. أ فى النواة ثم يمر منها الى السيتوبلازم حيث يتم بناء البروتين على الريبوسومات.

يتكون جزئ الحامض النووى من سكر خماسى (ريبوز فى حالة ر.ن.أ، ديوكسى ريبوز فى حالة د. ن. أ) وحامض فوسفوريك وقواعد نيتروجينيه من نوع البيورين (أدينين A ، جوانين G) وهى ثنائية الحلقة أو البيرميدين (أحادية الحلقة) : (سيتوسين C وثايمين T أو يوراسيل فى حالة ر. ن. أ U).

يؤدى التحليل المائى الكامل لجزئ د. ن. أ إلى :

د. ن. أ ← سكر خماسى + قواعد نتروجينية + حامض فوسفوريك.

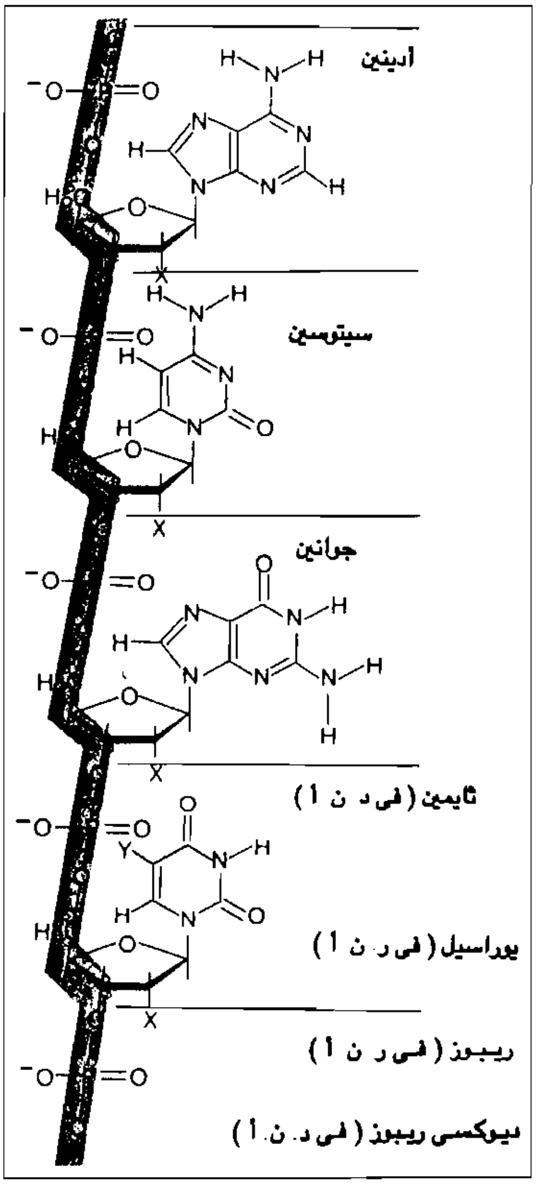
(ديوكسى ريبوز) $\begin{bmatrix} A,G \\ T,C \end{bmatrix}$

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يتكون جزئ الحامض النووى من متعدد خطى مــن الوحــدات البنائيــة الاساسية التى يطلق على كل منها نيوكليوتيدة Nucleotide ترتبط مــع بعــضها بروابط فوسفو استيرية ثنائية Phophodiester Bond (الشكل ٢-١) تصل هــذه الرابطة ذرة كربون رقم 5' فى السكر الخماسى للنيوكلتيدة بذرة الكربون رقم 3' فى السكر الخماسى للنيوكلتيدة التالية لها. وعلى ذلك فــإن الهيكــل الاساســى للحامض النووى د. ن. أ يتكون من تعاقب الــسكر الخماســى مــع حــامض الفوسفوريك فى حين تتصل قواعد النيتروجينيه بهذا السكر الخماســى برابطــة جليكوسيدية كما فى الشكل(٢-١).

يتضح من هذا الشكل أن حامض الفوسفوريك فى جزئ د. ن. أ يــستخدم مجموعتين حامضيتين فقط فــى تكــوين الرابطــة الأســتيرية الثنائيــة بينمــا تبقى المجموعة الحامــضية الثالثــة حــرة ممــا يكــسب الحــامض النــووى الخواص الحامضية وبذلك يتمكن جزئ د. ن. أ من تكوين روابط ايونيــة مــع البروتينات القاعدية (الهستونات). كما أن وجود هذه المجموعة الحامضية الحرة تتسبب فى أن الحامض النووى يكون قابلا للصبغ بسهولة بالصبغات القاعديــة Basophilic.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٢-١): جزء من سلسلة حامض نووي مفردة يبين النيوكلتيدات ومكوناتها وكذلك الهيكل الأساسي المكون من وحدات مترادفة من السكر والفوسفات

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يلخص الجدول ٢-١ بعض الفروق الرئيسية فى التركيب الكيماوى بين د. ن. أ و ر. ن. أ.

الجدول ٢-١ بعض الفروق الرئيسية فى التركيب الكيماوى بين د. ن. أ و ر. ن. أ.

	د ن أ	ر ن أ
الموقع	فى النواة أساسا	فى السيتوبلازم أساسا وفى النوية
السكر الخماسى	ديوكسى ريبوز	ريبوز
القواعد البيرميدنية	سيتوسين (C)	سيتوسين (C)
	ثيمين (T)	يوراسيل (U)
القواعد البيورينية	أدينين (A)	أدينين (A)
	جوانين (G)	جوانين (G)
التفاعل الكيماوى	فولجين	صبغات Basophilic مع المعاملة بإنزيم ريبونيكليز Ribonuclease
الأنزيم المحلل مائيا	DNase	RNase
دوره فىالخلية	المادة الوراثية	بناء البروتين
الوزن الجزيئى	مرتفع جداً	منخفض نسبياً

قاعدة Charagaff لتزاوج القواعد النتروجينية:

قام شاراجاف عام ١٩٤٩-١٩٥٣ بتحليل محتوى جزئ د.ن.أ من القواعد النتروجينية فى عدد كبير من الكائنات الحية المختلفة (الجدول ٢-٢) وقد وجد أن القواعد الأربعة لا توجد بكميات متساوية كما أن نسبها تختلف من نوع من الكائنات إلى النوع الآخر مما أدى إلى الاعتقاد بأن تتابع القواعد النتروجينية فى جزئ د.ن.أ أكثر أهمية من كمياتها أو مقدارها فى تحديد خصائصها الوراثية. كما أثبتت نتائج شاراجاف أيضا أن نسب القواعد النتروجينيه الأربعة ليست

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

عشوائية على الاطلاق حيث تبين أن كمية الأدنين (A) فى جميع الكائنات تساوى كمية الثايمن (T) فى حين تساوت كمية السيتوسين (C) مع كمية الجوانين (G) وقد ساعدت هذه القاعدة البيولوجية الهامة فى فهم التركيب الثلاثى الأبعاد لجزئ د.ن.أ فى الحلزون المزدوج كما سيأتى بعد .

الجدول ٢-٢ البيانات التى أدت إلى استنباط قاعدة شاراجاف

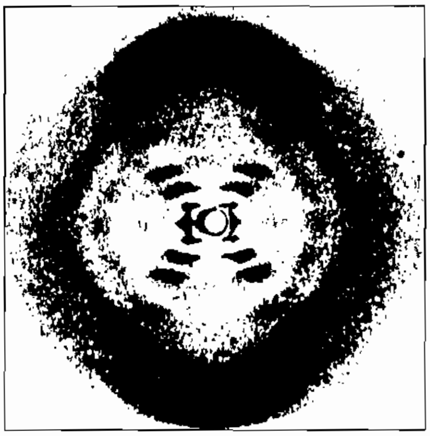
مصدر د.ن.أ	نسب القواعد				
	A/G	T/C	A/T	G/C	Purine / Pyrimidine
الثور	١,٢٩	١,٤٣	١,٠٤	١,٠٠	١,١٠
الأنسان	١,٥٦	١,٧٥	١,٠٠	١,٠٠	١,٠
الدجاجة	١,٤٥	١,٢٩	١,٠٦	٠,٩١	٠,٩٩
سمك السالمون	١,٤٣	١,٤٣	١,٠٢	١,٠٢	١,٠٢
نبات القمح	١,٢٢	١,١٨	١,٠٠	٠,٩٧	٠,٩٩
قطر الخميرة	١,٦٧	١,٩٢	١,٠٣	١,٢٠	١,٠٠
فيروس الانفلونزا	١,٧٤	١,٥٤	١,٠٧	٠,٩١	١,٠٠
بكتريا القولون (K2)	١,٠٥	٠,٩٥	١,٠٩	٠,٩٩	١,٠٠
البكتريا السبحية لدرن الدجاج	٠,٤٠	٠,٤٠	١,٠٩	١,٠٨	١,١٠

نموذج الحلزون المزدوج لجزئ د.ن.أ DNA double helix:

اهتم العلماء بتحليل صور انحراف آشعة X لجزيئات د.ن.أ والتى قام بها Wilkins R. and Franklin فى الفترة من ١٩٥٠-١٩٥٢ (الشكل ٢-٢) وقد أظهرت هذه الصور طرزا معينة منتظمة أدت بالعلماء إلى التكهن بأن جزئ د.ن.أ ليس فقط حلزونى التركيب بل أهم من ذلك أنه يتكون من أكثر من سلسلة واحدة من متعدد النيوكلتيدات، قد تكون أثنتين أو ربما ثلاثة سلاسل. فى نفس الوقت أمكن تحديد الروابط الفوسفودايستر التى تربط بانتظام بين النيوكلتيدات

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فى سلسلة د.ن.أ كما كان لقاعدة شاراجاف أهمية كبيرة فى التوصل إلى معرفة العلاقة بين القواعد النتروجينية فى جزئ د.ن.أ ذو التركيب الحلزونى المزدوج. أدى ذلك وغيره من الأبحاث إلى اعلان واتسون Watson وكريك Crick عام ١٩٥٣ عن نموذج الحلزون المزدوج لتفسير تركيب جزئ د.ن.أ بحيث توفرت فى هذا النموذج الخواص والشروط المطلوبة للمادة الوراثية.



الشكل (٢-٢): صورة انحراف الأشعة السينية بجزئ د ن أ يدل الطراز المتقاطع في الوسط على أن الجزئ يأخذ شكل اللولب أو الحلزون بينما تدل المناطق الكثيفة في قمة وقاعدة الصورة على أن القواعد البيورينية والبيريميدينية بسمك $34\ A^{\circ}$ وتتراص بانتظام متجاورة ومتعامدة على محور الحلزون

يتكون جزئ د.ن.أ حسب هذا النموذج من سلسلتين متكاملتين من متعددات النيوكلتيدات ملتفة أو متحلزنة كل حول الآخرى بانتظام فى شكل لولب مزدوج يمينى الاتجاة (الشكل ٢-٣-أ) ويكون طول الدورة الكاملة للحلزون $34A^{\circ}$ وبذلك تكون كل دورة للحلزون مكونه من ١٠ قواعد لكل سلسلة. ومن جهة أخرى، فإن قطر الحلزون المزدوج هو$20A^{\circ}$. تتكون كل سلسلة فى هذا الحلزون من عديد من النيوكلتيدات المرتبطة بروابط فوسفواستيرية ثنائية بين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

السكر والفوسفات كما سبق القول فى حين ترتبط القواعد النتروجينية بالسكر برابطة جليكوسيدية وتكون متعامدة على المحور الأساسى للجزئ وموجودة إلى الداخل بحيث تتقابل القواعد النتروجينية من أحدى السلسلتين مع القواعد المكملة لها فى السلسلة المقابلة حسب قاعدة شارجاف (C ≡ G، A = T)، وجد أن أزواج القواعد النتروجينية تكون مفلطحة واسطحها كارهة للماء مما يجعلها تتلاصق بقوى يطلق عليها قوى التراص stacking forces ويبعد كل زوج من القواعد عن الذى يلية بمسافة $3.4A^o$.

ترتبط القواعد المتقابلة بين السلسلتين بروابط هيدروجينية بحيث ترتبط G مع C بثلاث روابط هيدروجينية فى حين ترتبط A مع T برابطتين فقط (الشكل ٢-٣-ج).

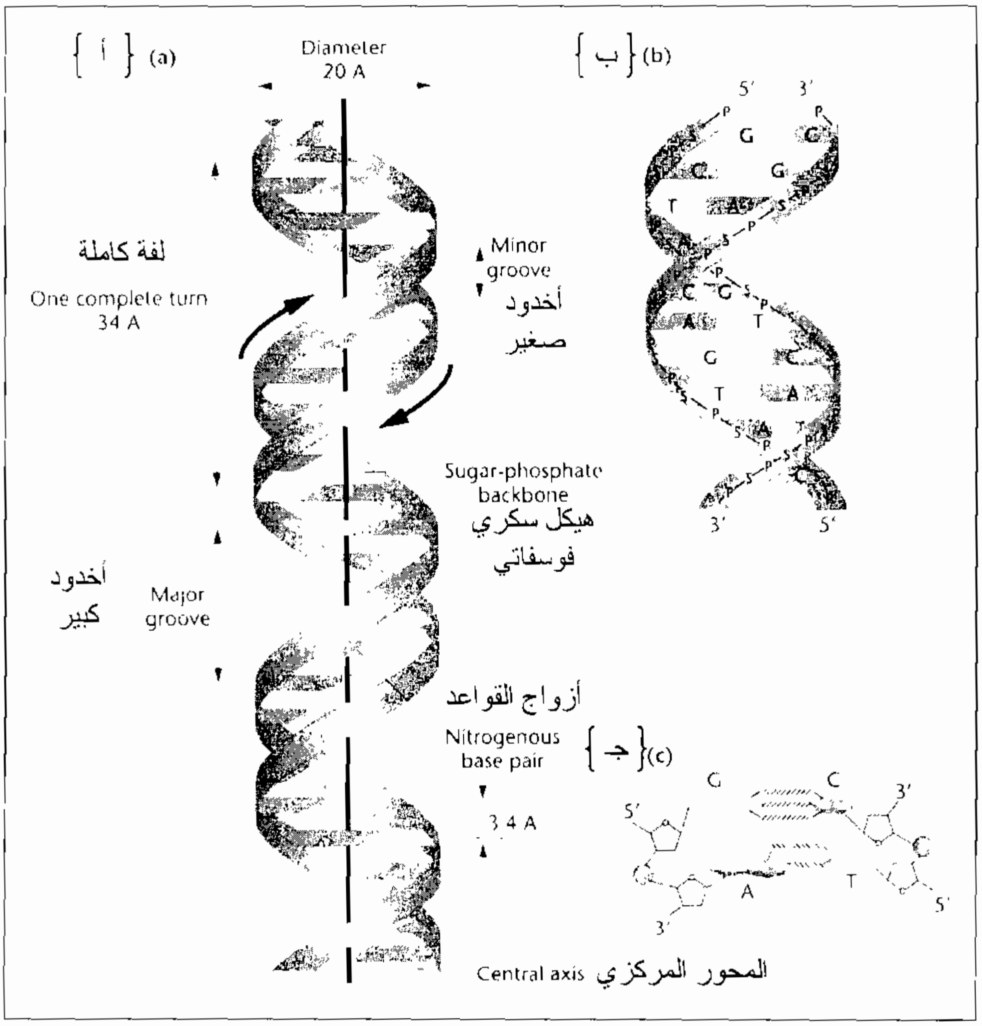
وجد أن هذه التزاوجات بين القواعد هى الوحيدة الممكنة نظرا لأن تقابل قاعدتين من نوع البيورين (ثنائية الحلقة وكبيرة الحجم نسبيا) سيحتل فراغا كبيرا بحيث لا يسمح بتكوين حلزون منتظم ومن جهة أخرى سيؤدى تقابل قاعدتين من نوع البيرميدين معا إلى شغل فراغ صغير نسبياً مما يؤدى إلى خلخلة غير مرغوبة فى الحلزون.

يؤدى التقيد بقاعدة تزاوج القواعد هذه Base Pairing Rule إلى وجود علاقة تكامل صارمة بين تتابع القواعد بين السلسلتين فى الحلزون المزدوج. فمثلا إذا كان لدينا التتابع:

5'- A T G C A G T C – 3' على أحد السلسلتين

فنجد : 3'- T A C G T C A G – 5' على السلسلة المقابلة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٢-٣)

(أ) نموذج الحلزون المزدوج كما اقترحه واتسون وكريك - تمثل الأشرطة الملتفة الهيكل الأساسي المكون من السكر - والفوسفات وتمثل أزواج القواعد النتروجينية بأشرطة أفقية ويمثل الخط الرأسي المحور المركزي للحلزون.

(ب) شكل تفصيلي يبين القواعد وهيكل السكر - الفوسفات والروابط الهيدروجينية للحلزون.

(ج) توضيح للطبيعة المتضادة الاتجاه للحلزون والتراص الأفقي للقواعد.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وكما سنرى فيما بعد فإن خاصية تكامل القواعد النيتروجينية هامة جدا في عملية تناسخ ال د. ن. أ. وفي التعبير الجيني.

وطبقاً لنموذج الحلزون المزدوج فإن حتمية تضاد الاتجاه تأتى من حقيقة عدم إمكان تغيير زوايا الروابط النتروجينية بين مكونات النيوكليوتيدات.

ويترتب على حتمية التزاوج بين (T, A) ، (C, G) أنه لابـد أن تكـون الروابط الفوسفواستيري الثنائية للسلسلتين موجهـة فـي اتجـاهين متـضادين Antiparallel أي أن اتجاه \ C- 5 إلى \C-3 يسرى فى اتجاهين متضادين وعلى ذلك فإن الحلزون المزدوج اذا إنقلب بواقع 180° فإنه سيبدو ظاهريـا مطـابق للحلزون الأصلى .

تبين أن الروابط الجليوسيدية التى تربط القواعد بالسكر لا تكون مواجهـة لبعضها البعض بالضبط مما يؤدى إلى أن الهيكل الأساسى (سـكر- فوسـفات) لسلسلتى الحلزون المزدوج لا يكونان على مسافات متساوية من محور الحلزون وبذلك يكون الأخدودان المتكونان على طول المحور الأساسى غير متـساويان فى الحجم (العمق)، فيتكون اخدود عميق يسمى الأخـدود الكبيـر أو الرئيـسى Major Groove بالتناوب مع أخدود أقـل عمقـاً يـسمى الأخـدود الـصغير Minor Groove .

تكون أرضية الأخدود الكبير مملوءة بذرات النتروجين والاكسوجين التى تخص أزواج القواعد التى تعلوه والتى تمتد الى الداخل من الهيكـل الأساسـى الخاص بها. وعلى العكس من ذلك نجد أن أرضية الاخـدود الـصغير تكـون

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مملوءة بذرات النتروجين والاكسوجين للقواعد والتى تمتد إلى الخارج فى اتجاه الهيكل الأساسى.

وقد تبين أن امكانات حدوث روابط هيدروجينية فى الأخدود الكبير تؤدى إلى امكان زيادة الإعتماد عليه فى التعرف على تتابع القواعد فى جــزئ د.ن.أ عما فى الأخدود الصغير.

وقد أدت هذه الحقيقة إلى التكهن بأن بعض البروتينات المتخصصة (مثل البروتين المثبط Repressor أو المستحث Inducer) التى تتفاعل وتــرتبط مــع تتابعات معينة على جزئ د.ن.أ عن طريق تكوين روابــط هيدروجينيـــة مـــع مجاميع معينة توجد على الأغلب فى الأخدود الكبير.

بعض خواص جزئ د.ن.أ.:

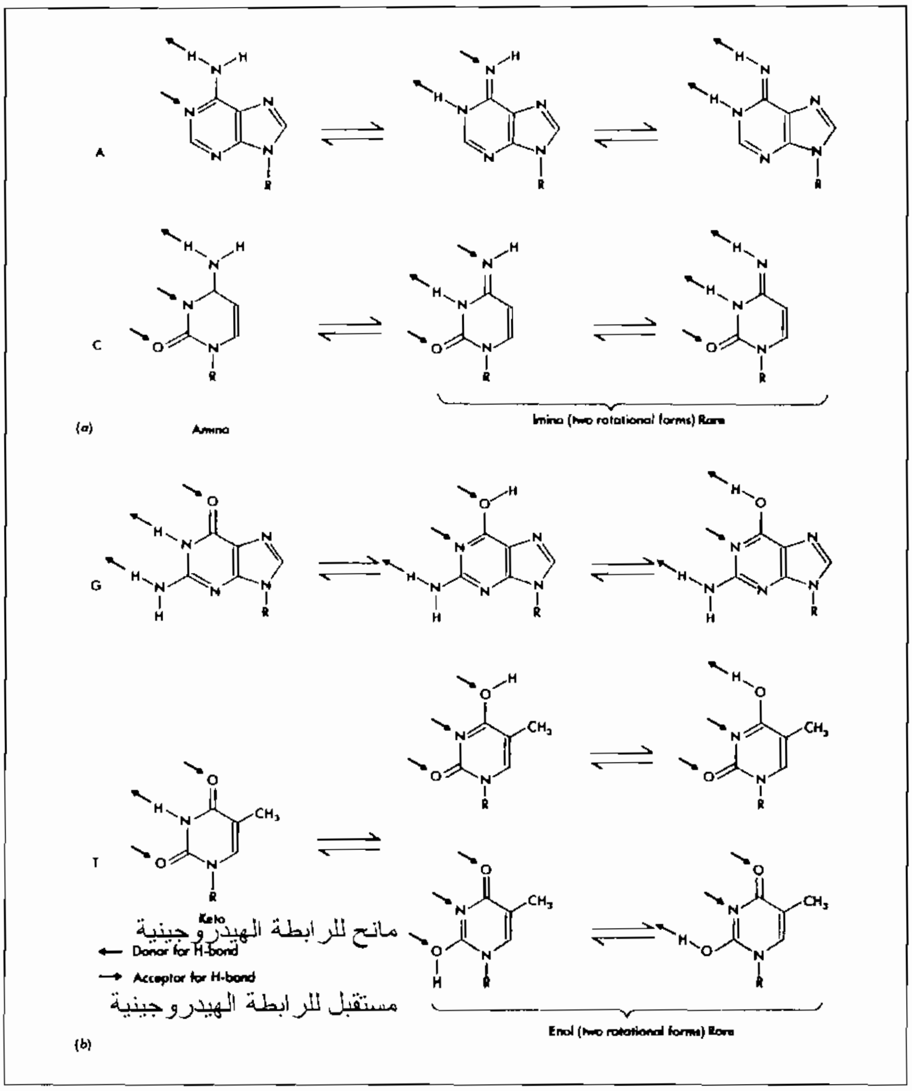
ثبات التناظر Stability of Tautameric Form:

تبين أن ذرات الهيدروجين المرتبطة بالاكسجين أو النيتروجين فى القواعد البيورينية أو البيرميدينية تفضل صورا ارتباطية معينة كما تميل إلى البقاء فـــى اماكن معينة ولا تنتقل بين ذرات الأكسوجين أو النتروجين فـــى تلــك القواعــد إلا فى حالات نادرة ويقال فى هذه الحالة أن تلك الــذرات ثابتــة أو مـــستقرة التناظر Tautamerically Stable حيــث يكــون الوضــع الطبيعــى أن يكــون النتروجين فى الصورة الأمينية Amino Form (NH_2) بينما الوضع النادر تكون فى الصورة الإيمينية Imino From (NH) كما فى الشكل (٢-٤)، كمـــا أن ذرة الأكسوجين المرتبطة بذرة C6 فى الجوانين والثايمين تكون عادة فى الـــصورة الكيتونية Keto From (C=O) ونادرا ما تأخذ الـشكل الاينـــولى Enol (COH). ويعد هذا الثبات أو الاستقرار مهما جدا حتى يمكن لجــزئ د . ن . أ أن يقـــوم

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بوظائفه البيولوجية بصورة منتظمة. فلو كانت ذرات الهيدروجين حرة الحركـــة وليست ثابتة فى مواقعها هذه لأصبح من الشائع أن تتمكن قاعدة الإدينـــين (A) من التزاوج مع قاعدة السيتوسين (C) فى حين قد تتزاوج قاعدة الجـــوانين (G) مع الثايمين (T). وسوف يؤدى ذلك على اختلال فى تتابع القواعد بين السلسلتين بحيث تفقد صفة التكامل الأساسية، وبالتالى يفقد جزئ د . ن . أ أهم خاصية من خصائصة وهى القدرة على التناسخ الذاتى Self Replication بـــدون أخطـــاء. إذ أنه لو سمح للصور النادرة أن تزداد فسيؤدى ذلك إلى زيادة كبيـــرة وغيـــر مرغوبة فى الأخطاء (الطفرات) ما يؤثر سلباً على نمو وانقسام الخلية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٢-٤): صور التناظر التوتاميرية في القواعد النيتروجينية

(أ) القواعد A و C تكون عادة في الصورة الأمينية (Amino) ولكنهاد نادرًا ما تأخذ الصورة الإيمينية (Imino).

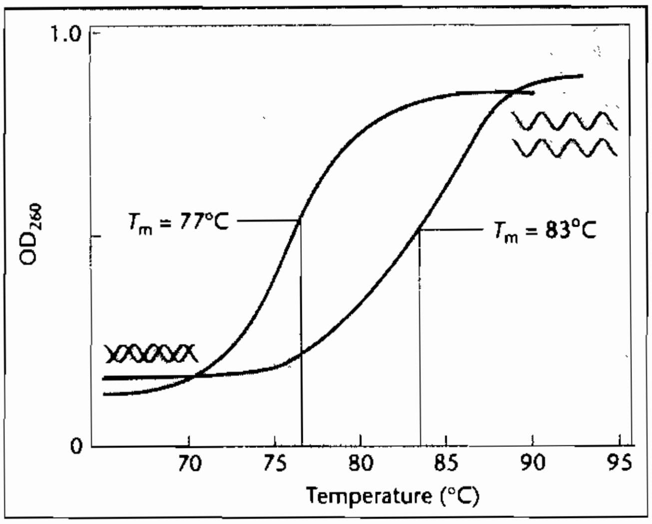
(ب) القواعد T و G تكون عادة في الصورة الكيتونية (Keto) ولكنها نادرًا ما تأخذ الصورة الأينولية (Inol).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الدنترة واعادة الاتحاد Denaturation And Annealing:

من الخصائص الهامة لجزئ د . ن . أ قدرة السلسلتين الداخلتين في تركيبة على الإنفصال والابتعاد عن بعضهما تحت ظروف معينة فيما يعرف بعملية الدنترة Denaturation وذلك عند تعريض الحلزون المزدوج لدرجة حرارة أعلى من درجة الحرارة الفسيولوجية (أى حوالى٩٥°م) ويحدث ذلك نتيجة لكسر الروابط الهيدروجينية، وهى روابط ضعيفة وسهلة الكسر بطبيعتها، والتى تربط أزواج القواعد فى السلسلتين. ونتيجة لارتباط C, G بثلاث روابط هيدروجينية فإن يلزم فى حالة الجزيئات الغنية فى نسبة القواعد G, C درجة حرارة أعلى من تلك التى ترتفع فيها نسبة AT حيث أن الأخيرة تكون مرتبطة برابطتين فقط أى أن درجة حرارة الدنترة (ويطلق عليها نقطة الإنصهار Tm) أو حرارة الانصهار وعندها يكون ٥٠% من السلسلتين قد انفكت وتعتمد على نسبة (G+C / A+T) بحيث ترتفع بزيادة هذه النسبة واذا تم التبريد البطئ لجزئ د . ن . أ المدنتر فإن السلسلتين المتكاملتين سيعاد اتحادهما حيث تسمى هذه العملية Anealing أو Renaturation وتتجاذب أزواج القواعد وترتبط بروابط هيدروجينية حسب قاعدة شاراجاف وبذلك يستعيد الجزئ التركيب الحلزوني الأصلى. ويمكن متابعة هذه التحولات فى المعمل بقياس درجة امتصاص الاشعة فوق البنفسجية UV (أو الكثافة الضوئية OD) عند 260um بإستخدام سبكتروفوتوميتر حيث تنخفض لزوجة د . ن . أ اثناء الدنترة ويرتفع امتصاص UV. ويبين الشكل (٢-٥) عملية الانصهارفي نوعين مختلفين من د. ن. أ من حيث محتواهما من نسبة GC.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

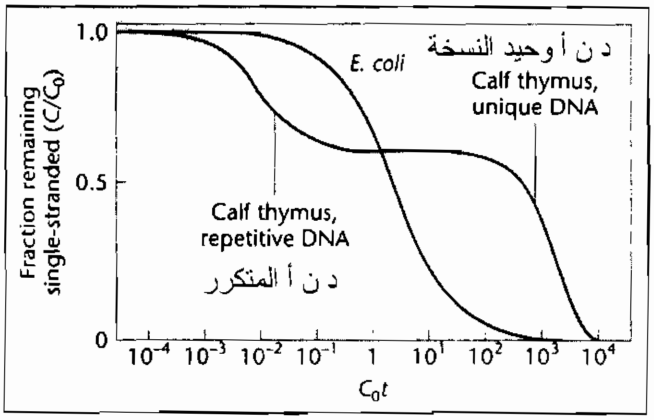


الشكل (٢-٥): العلاقة بين زيادة درجة امتصاص أشعة UV وارتفاع درجة الحرارة في جزيئين من د ن أ يختلفان في محتواهما من G≡C الجزئ الذي تكون درجة حرارة الانصهار فيه (Tm) ٨٣°م يحتوي على مقدار أعلى من G≡C عن الجزئ بدرجة انصهار (Tm) ٧٧°م

تعد خاصية الدنترة و إعادة الإتحاد ذات فائدة كبيرة فى البيولوجيا الجزيئية حيث أنها تعد الأساس لواحدة من أهم التقنيات فى الوراثة الجزيئية وهى تقنية التهجين الجزيئى Molecular Hybridization ويبين الشكل (٢- ٦) كيفية استخدام هذه الخاصية لتقدير حجم الجينوم (عدد النيوكلتيدات) لكائن ما، إذ وجد أنه عندما تتم عملية إعادة الاتحاد تحت ظروف قياسية فإن الجينوم الأكبر حجماً سيأخذ وقتا أطول لإعادة الاتحاد عن الجينوم الصغير الحجم. ويرجع ذلك إلى أن تتابعات القواعد تأخذ وقتا أطول للتوصل إلى التتابع المكمل الصحيح (فكلما زاد حجم الجينوم كلما زادت فرص التصادم بين التتابعات غير الصحيحة - غير المكملة - بين الجزيئات) وقد أدت دراسات إعادة الإتحاد إلى اكتشاف التتابعات المتكررة فى جزئ د . ن . أ فى الكائنات مميزة النواة.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

فعندما تكون تتابعات معينة فى الجزئ عالية التكرار Highly Repetitive فـإن إعادة الاتحاد بينها سيكون أسرع بكثير عما فى التتابعات الممثلة بنسخ وحيـدة (الشكل ٢-٦).



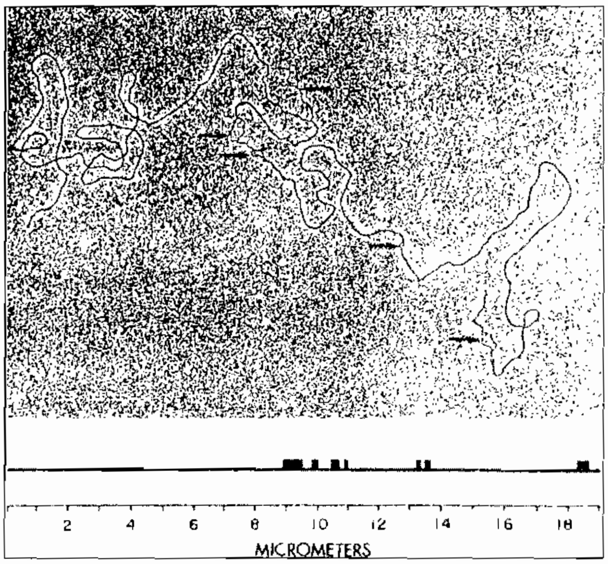
الشكل (٢-٦): منحنى Cot لجزئ د ن أ في الغدة الثيموسية للعجل حيث يحدث للجزء المتكرر من د ن أ العجل إعادة الاتحاد بسرعة عن جزئ د ن أ من بكتيريا القولون في حين يحدث العكس في حالة الجزء غير المتكرر من جزئ د ن أ في العجل

كما يمكن استخدام تقنية التهجين الجزيئى (على اعتبـار وجـود درجـة معقوله من تكامل القواعد بين جزيئـات د . ن . أ وتحـت ظـروف حراريـة مناسبة) بحيث يمكن اعادة الاتحاد (التهجين) بين جزيئين من الحامض النـووى من مصادر مختلفة وقد يؤدى هذا إلى امكانية التهجين بـين نـوعين Species مختلفين من د . ن . أ. ويعد ذلك ذو أهمية خاصـة فـى دراسـة العلاقـات التطورية بين الانواع على المستوى الجزيئى أو حتـى بـين جـزئ د . ن . أ وجزئ ر . ن . أ.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وعلى سبيل المثال فإنه جزئ ر . ن . أ من السهل تهجينه بمنطقة من د . ن . أ الذى تم نسخة عليها أصلا أو مع د . ن . أ من نوع Species آخر بشرط أن يكون التتابع النيوكليتدى متكامل بدرجة معقولة.

يمكن أيضا الاستفادة من عملية الدنترة لجزئ د . ن . أ فى عمل خريطة مادية لجزئ د . ن . أ فيما يعرف بعملية رسم خرائط الدنترة الجزئية Partial Denaturation Mapping. تعتمد هذه التقنية على حقيقة أن المنطقة الغنية فى أزواج القواعد AT تنفصل كما سبق القول بمعدل أسرع وأسهل عن GC. ويمكن التعرف على هذه المناطق تحت المجهر الألكترونى على شكل عروات loops أو فقاعات bubbles . يمكن قياس المسافات بين العروات ونهاية جزئ د . ن . أ كما فى الشكل (٢-٧).



الشكل (٢-٧): صورة بالمجهر الإلكتروني لجزئ د ن أ الفاج لامبدا تشير الأسهم إلى أماكن حدوث الدنترة (التفكك) وتبين الخريطة الخطية (إلى أسفل) التفكك الجزئي حيث تدل المستطيلات على مواقع التفكك وطولها النسبي

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الصور المختلفة لجزئ د . ن . أ:

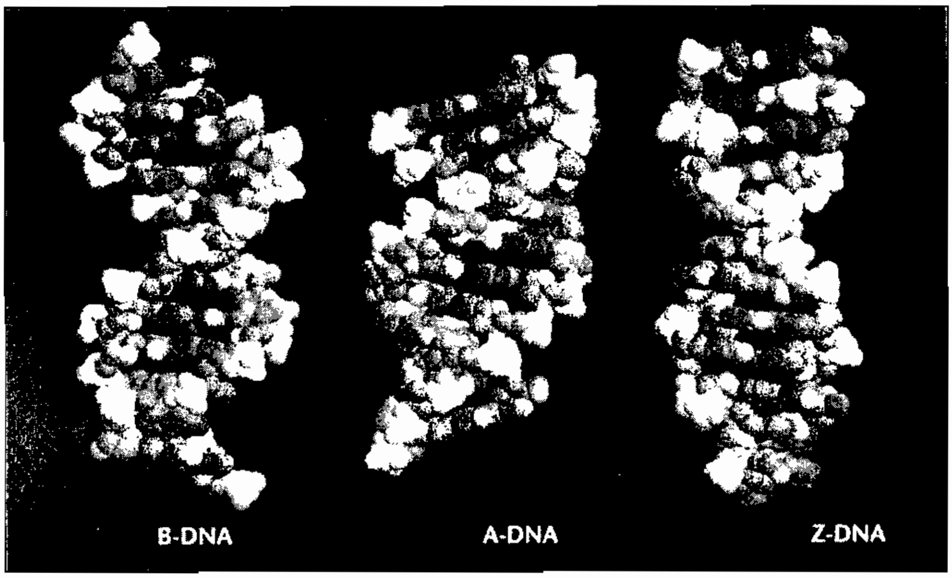
ظل الاعتقاد السائد حتى وقت قريب أن جزئ د . ن . أ لايوجد إلا فـــى صورة Configuration واحدة كما قدمها واتسون وكريك وبمعدل دوران ثابـــت (36A°) للحلزنة بين القواعد المتجاورة (أى عشرة أزواج من النيوكلتيدات لكـــل لفة حلزونية واحدة). إلا ان الدراسات الحديثة اثبتت أن درجـــة الـــدوران فـــى الحقيقة هى 34.6° وبالتالى يكون عدد القواعد فى كل لفة ١٠,٤ قاعدة.

ومن جهة أخرى، كان الاعتقاد السائد أن الشكل الهندسى للحلزون موحـــد ومنتظم. إلا أن التجارب اللاحقة أثبتت أن د . ن . أ متعدد الصور حسب تتابع القواعد فى الجزئ. يعد ذلك هاما جداً حيث يؤثر على تفاعله مع البروتينـــات. وقد وجد أن هناك ثلاث صور مختلفة لجزئ د . ن . أ أكثرها شيوعاً وثباتاً هى الصورة الأصلية التى قدمها واتسون وكريك والتى تعرف بالصورة B (الـــشكل ٢-٨) وهو حلزون منتظم يمينى الدورة. وإلى جانب ذلك توجد صورة أخـــرى نادرة يطلق عليها الصوة (A) يحتوى فيها الجزئ علـــى بعـــض منـــاطق ذات تتابعات معينة وهو يمينى الدورة أيضاً إلا أن أزواج القواعد تكون منحـــدرة أو مائلة بشدة كما تكون منزاحة نحو الخارج بالنسبة لمحور الحلزون ممـــا يـــؤدى إلى تكوين حلزون أقصر وأوسع عما فى الصورة B (الشكل ٢- ٨) يتكون هذا النوع عادة تحت ظروف الملوحة أو ظروف نقص الماء كما أنه الأكثر شيوعاً عند تزاوج ر. ن . أ RNA مع د . ن . أ DNA كما هو الحادث فى الإجـــزاء البادئة Primer فى شظايا أوكازاكى كما سيأتى بعـــد. ويرجـــع ذلـــك إلـــى أن مجموعة الهيدروكسيل فى سكر الريبوز فى جزئ ر . ن . أ لا تسمح بتكـــوين حلزون هجين بين RNA/ DNA من النوع B.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويعد هذا هو السبب أيضاً فى أن حلــزون ر . ن . أ/ ر . ن . أ RNA (فى دبوس الشعر Hairpin) الذى يتكون احيانا من النوع A.

يوجد نوع ثالث من ر . ن . أ النادر ذو حلزون يسارى الــدورة يــسمى الصورة (Z) (الشكل ٢-٨) وهو متعرج وغير منتظم ومن هنا جاءت تسميته Z ويتميز بوجود تتابعات خاصة ويتكون تحت ظروف خاصة.



الشكل (٢-٨): الصور الثلاثة للحلزون المزدوج لجزئ د ن أ ويلاحظ أن كلا منها يحتوي على نفس العدد من أزواج النيوكلتيدا (٢٢ نيوكلتيدة) ويتكون كل منها من سلسلتين متضادتي الاتجاه ومرتبطة معًا بروابط هيدروجينية بين القواعد المتكاملة

الصورة (B) الأكثر شيوعًا (يميني الدورة).

الصورة (A) نادرة وتحدث تحت ظروف الإجهاد البيني مثل الجفاف والملوحة (يميني الدورة).

الصورة (Z) نادرة جدًا والحلزون غير منتظم (يساوي الدورة) ويتكون عندما يكون تتــابع القواعــد ذو طابع خاص غير عادي (عالي جدًا في نسبة GC).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

قد يكون لكل من هذه الصور النادرة دور فى التعرف علــى البروتينــات التى ترتبط بــ د . ن . أ (مثل المستحث Inducer أو المثبط Repressor) كمــا سيأتى بعد.

يمكن تلخيص بعض الفروق الأساسية بين الصور الثلاثة لجزئ د . ن . أ كما فى الجدول (٢-٣).

الجدول ٢-٣: مقارنة بين بعض الخواص التركيبية لصور د . ن . أ

المقارنة	الصورة		
	A	B	Z
معدل حدوثة	نادر	شائع	نادر جدا
الشكل العام	قصير وواسع	أطول وأرفع	مستطيل ورفيع
الإرتفاع بين أزواج القواعد	2.3A°	3.32A°	3.8A°
اتجاه الحلزون	يمينى	يمينى	يسارى
عدد القواعد لكل دورة حلزون	١١	١٠,٤	12
متوسط الدوران لكل زوج من القواعد	33.6°	34.6°	-60°
درجة ميل القواعد بالنسبة للمحور	+ 19.0°	-1.2°	-9°
موقع محور الحلزون	الأخدود الكبير	خلال أزواج القواعد	الأخدود الكبير
نسب الأخدود الكبير	ضيق جدا وعميق جدا	واسع ومتوسط العمق	مفلطح على سطح الحلزون أو غير موجود
نسب الإخدود الصغير	واسع جدا وضحل	ضيق ومتوسط العمق	ضيق جدا وعميق جدا

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

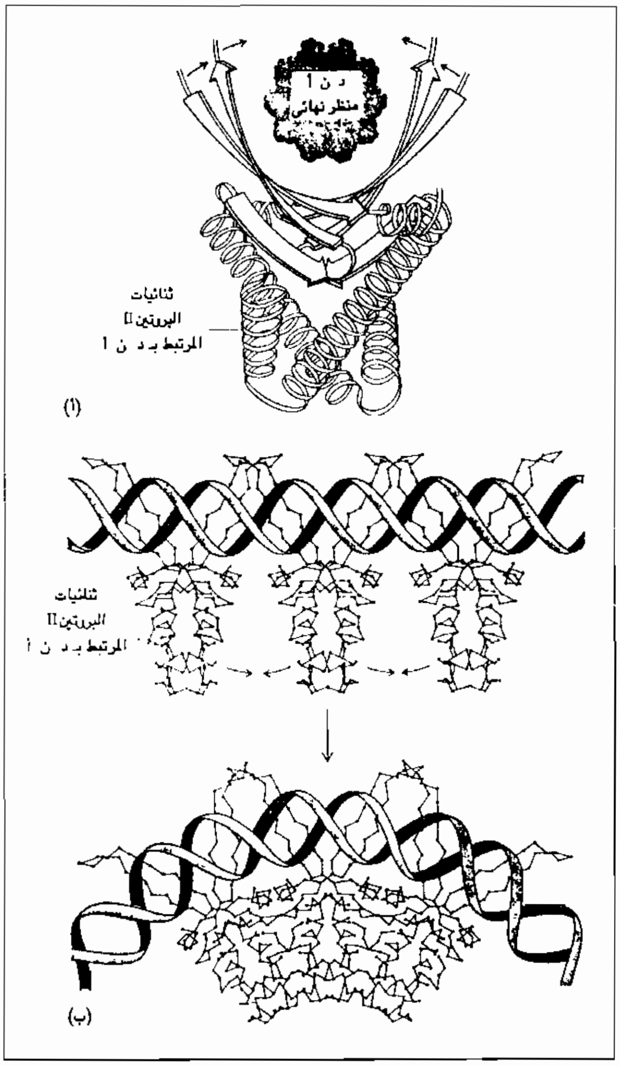
ارتباط جزئ د. ن. أ البكتيرى ببروتينات شبه هستونية:

ظل الاعتقاد السائد لعدة أحقاب أن جزئ د. ن. أ البكتيرى يكون عاريا ولا ترتبط به أية بروتينات شبه هستونية بحيث لا يوجد له تركيب منضغط شبيه بكروماتين كروموسومات مميزة النواة.

ولكن تبين حديثاً باستخدام تقنيات أكثر تقدماً أن بعض المناطق من كروموسوم بكتريا القولون تنتظم فى تراكيب تشبه حبات الخرز والتى أمكن استخلاص كميات صغيرة من البروتينات القاعدية منها تشبه الهستونات. وقد يكون لذلك الارتباط علاقة بوجود مناطق منضغطة بانتظام على طول الكروموسوم البكتيرى حتى يمكنه أداء وظائفه. أمكن بلورة إحدى هذه البروتينات ويطلق عليها البروتين II المرتبط بـ د. ن. أ DNA-Binding Protein II وتبين أنه مكون من سلاسل ببتيدية حجمها ٩٥٠٠ دالتون ترتبط ببعضها فى ثنائيات Dimers ويمتد منها أذرع غنيه فى الأرجينين لها القدرة على التفاعل مع الفوسفات فى الهيكل الأساسى لجزئ د. ن. أ. ومن المرجح أن هذه الثنائيات البروتينية المتجاورة مع د. ن. أ فى غير مميزة النواة تقوم بتكوين تنظيم حلزونى معين مع د. ن. أ. المرتبط من الخارج كما فى الشكل (٢-٩).

ومن الجدير بالاهتمام أن متوسط درجة التحلزن الفائق (أى عدد لفات التحلزن الفائق لكل ١٠ أزواج من القواعد) يبلغ حوالى ٠,٠٥ لجميع الحلزونات الطبيعية لجزئ د. ن. أ سواء فى البكتريا أو فى الخلايا مميزة النواة مما يوحى بأن التركيب الكروماتينى قد يكون متشابة فى غير مميزة النواة ومميزة النواة على السواء.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٢-٩): البروتينات شبه الهستونية المرتبطة بجزئ د ن أ
في بكتريا القولون

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفصل الثالث

تناسخ د. ن. أ
DNA Replication

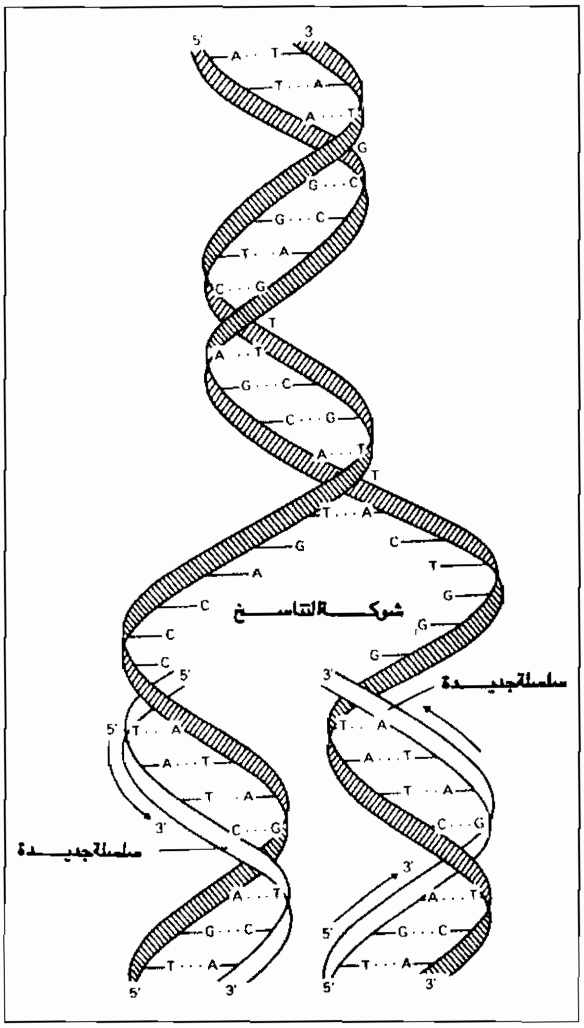
بعد الإعلان عن نموذج واتسون وكريك لتركيب جـــزئ د. ن. أ، اتجـــه اهتمام العلماء إلى معرفة كيفية تناسخ جزئ د. ن. أ. وتعد عملية تناسخ جـــزئ د. ن. أ عملية أساسيه للمادة الوراثية ولابد من اتمامها بدقة متناهية حتى نضمن استمرار انتقال العوامل الوراثية عند انقسام الخلية. ولاشك أن ذلك يعـــد عمـــلا ضخماً ومعقداً فعلى سبيل المثال لو تخيلنا حدوث هذه العملية فى جينوم الانسان المحتوى على ٣ بليون زوج من القواعد فى ٢٣ زوج من الكروموسومات فإنه لكى يتم تكرار (تناسخ) جزئ بهذا الحجم بدقة فإن ذلك يتطلب ميكانيكية علـــى درجة عالية من الكفاءة والدقة.

يمكن اعتبار ميكانيكية تناسخ (تضاعف) جزئ د. ن. أ نتيجـــة مباشـــرة لطبيعة تركيب الحلزون المزدوج. إذ لابد أن تنفـــصل السلـــسلتين المكـــونتين للحلزون حتى يتسنى استخدام كل منها كقالب لبناء جـــزئ جديـــد مـــن د. ن. أ ولكى يحدث هذا الانفصال يجب أن تنفك أولا حلزنة اللولـــب وذلـــك بـــدوران الاجزاء غير المتكررة من الحلزون حول محورها كما أن الروابط الهيدروجينية التى تربط بين أزواج القواعد المتقابلة فى الجزئ الأصلى تكون ســـهلة الكـــسر عادة بدون الحاجة إلى بذل طاقة أو تفاعل أنزيمى.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وجد أن المجاميع الجانبية فى أزواج القواعد المتقابلة (بعكس مركبات عضوية أخرى) فى مقدروها تكوين عدد من الروابط الهيدورجينية المتخصصة جدا (النوعية)، وبذلك يتوفر لدينا قالب نموذجى لبناء جزئ جديد عليه حيث يتم التجاذب بين القواعد فى القالب والقواعد المكملة فى السلسلة الجديدة الجارى بناؤها عندما تضاف القواعد واحدة تلو الأخرى طبقا لقاعدة شاراجاف (G≡C,T=A) ويتم ذلك بصورة دقيقة بحيث تنعدم تقريبا فرصة حدوث خطأ (10^{-8}) مما يؤدى إلى انتاج جزيئين جديدين عبارة عن صورة طبق الأصل دقيقة للجزئ الأصلى (الشكل ٣-١) وتكون أحدى السلسلتين فى كل جزئ عباره عن سلسلة جديدة والسلسلة الآخرى هى القديمة التى استخدمت كقالب لبناء السلسلة الجديدة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٣-١): شكل تخطيطي يبين ميكانيكية تناسخ جزئ د ن أ حيث يتم التناسخ بفك حلزنة السلسلتين المكونتين للحلزون المزدوج ثم استخدام كل سلسلة كقالب لبناء سلسلة جديدة حسب قانون تزاوج القواعد: (A تقابل C, T تقابل G) ويلاحظ أن التناسخ يتم في الاتجاه '3→'5 فقط

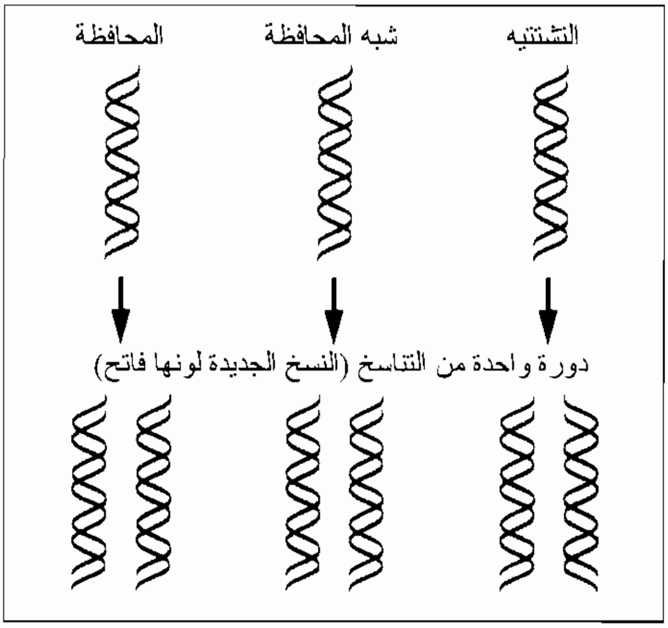
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الطريقة شبه المحافظة لتناسخ د. ن. أ:

يقترح نموذج واتسون وكريك أن التناسخ يتم حسب ميكانيكية تعرف بالطريقة شبة المحافظة Semi-conservative بمعنى ان نصف جزئ د. ن. أ الأصلى (سلسلة) يحافظ عليه فى حين يتم بناء سلسلة جديدة عليها.

ألا أنه بالاضافه إلى ذلك فقد اقتُرح نموذجين اخرين لتناسخ د. ن. أ ويعتمد كليهما على استخدام د. ن. أ الأبوى كقالب. ويسمى النموذج الأول الطريقة المحافظة Conservative Replication حيث يتم بناء سلسلة جديدة مكملة على كل قالب من السلسلتين القالب تماما كما فى الطريقة شبة المحافظة إلا أنه بعد التضاعف (التكاثر) تنضم السلسلتين الجديدتين معا فى حلزون جديد تماما بينما تتجاذب السلسلتين الابويتين لتكون الحلزون الاصلى أى أن الحلزون الأصلى قد تمت المحافظة عليه أما النموذج الثانى ويطلق عليه الطريقة التشتتية Dispersive Replication حيث تتوزع (تتشتت) السلسلتان الابويتان بين حلزونين جديدين بعد التناسخ وبذلك تكون كل سلسلة مكونة من اجزاء من د. ن. أ الأبوى وأخرى من د. ن. أ الجديد (الشكل ٣-٢) إلا أن كلا من الطريقة المحافظة والتشتتيه لم يتوافر لهما التحقق التجريبى من صحتهما بينما تم ذلك للطريقة شبة المحافظة كما يتضح من تجربه ميسلسون وستاهل.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



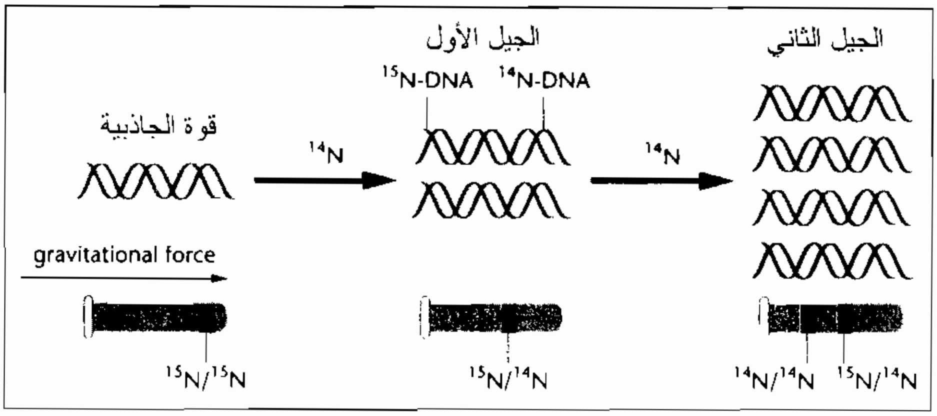
الشكل (٣-٢): نتائج دورة واحدة من تناسخ د ن أ لكل من الطرق الثلاث الممكنة للتناسخ

تجربة ميسيلسون وستاهل :

قام ميسيلسون وستاهل Meseleson and Stahl عام ١٩٥٨ بتجربة على بكتريا القولون واستخدما النتروجين الثقيل (النظير المشع) N^{15} في تنمية المزرعة البكتيرية لعدة أجيال حتى يتأكدا من أن كل ذرات النتروجين في جزئ د. ن. أ معلمه بالنتروجين الثقيل .بعد ذلك تم نقل الخلايا البكتيرية إلى مزرعة تحتوى على النتروجين العادى (الخفيف) N^{14}. ثم استخلص د. ن. أ من الخلايا وتم تقدير كثافته بواسطة الطرد المركزى فائق السرعة Ultracentrifugation في متدرج كثافى Density Gradiant من محلول كلوريد السيزيوم وتبين انه بعد أول دورة (جيل) من الانقسام ظهرت قمة واحدة تمثل جزئ هجين (ثقيل / خفيف) H/L نتيجة لتكوين الجزئ من سلسلة أصلية ثقيلة وسلسلة مكملة خفيفة وفي

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجيل الثانى ظهرت قمتان لجزيئات د. ن. أ واحدة تمثل الهجين والآخرى تمثل الخفيف فقط L/L كما فى الشكل (٣-٣).



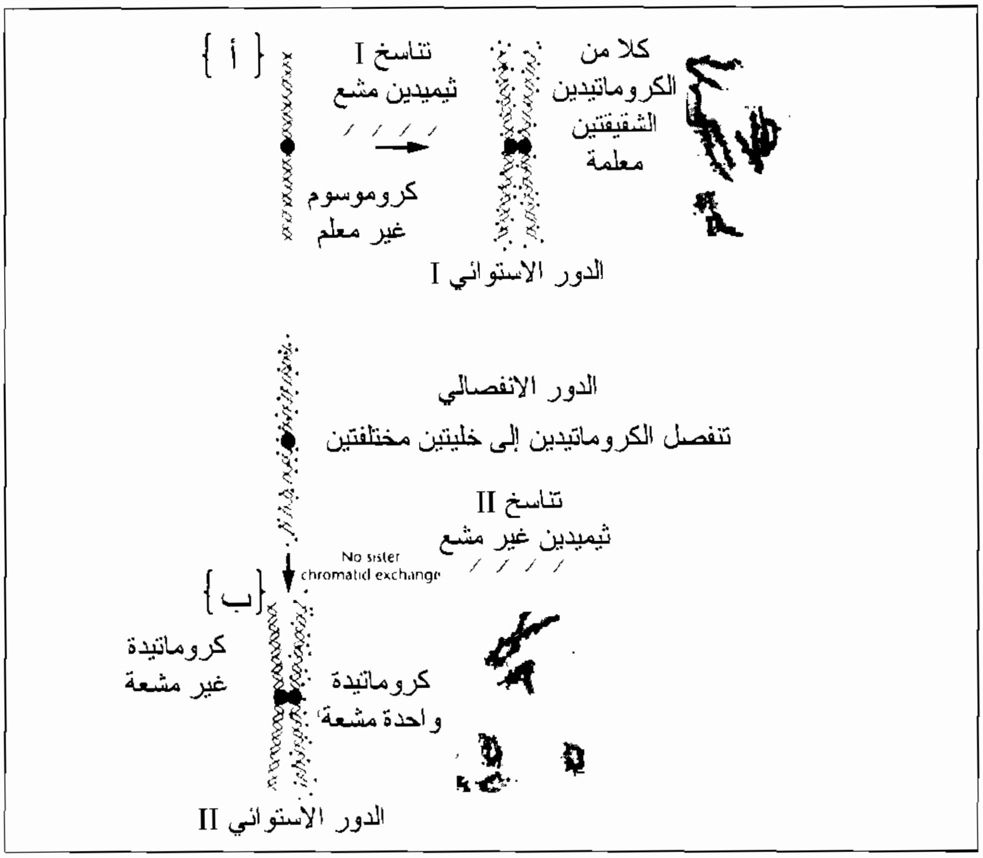
الشكل (٣-٣): النتائج المتوقعة لجيلين من التناسخ بالطريقة شبه المحافظة في تجربة ميسلسون وستاهل

يعكس ذلك بوضوح حتمية انفصال السلسلتين الأصليتين ثم استخدام كل سلسلة كقالب لبناء نسخة عليها مما يؤكد صحة نموذج التناسخ بالطريقة شبة المحافظة.

ومن جهة أخرى تمكن تيلور Taylor ومعاونوه عام ١٩٥٧ من إثبات الطريقة شبه المحافظة فى الكائنات مميزة النواه. إذا أنه من المعروف أن كل كروماتيده فى الكروموسوم تمثل جزئ واحد من د. ن. أ. تم تعليم خلايا القمم النامية لجذور نبات الفول بالثيميدين المشع ^{3}H Thymidine ثم سمح لها بعد ذلك بالنمو فى بيئة غير معلمة، وعند دراسة كروموسومات هذه الخلايا فى الدور الاستوائى بعد جيل (دورة) أو جيلين (دورتين) من الانقسام الخلوى وذلك باستخدام طريقة التصوير بالاشعاع الذاتى Autoradiography تبين أن كلا من

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الكروماتيدتين كانتا مشعتان بعد جيل واحد (دورة) فى حين كانــت كروماتيـــده واحدة فقط هى المشعة بعد دورتين من انقسام الخلية كما هــو متوقــع حــسب النظرية شبة المحافظة لتناسخ د. ن. أ (الشكل ٣-٤).



الشكل (٣-٤): تجربة تايلور وتوضح نموذج الطريقة شبه المحافظة لتناسخ د ن أ في القمة النامية لجذور نبات الفول

(أ) كروموسوم غير معلم خلال دورة الخلية في وجود الثميديين المــشع H-thymidine وعنــد بــدء الانقسام الميتوزي تصبح الكروماتيدين الشقيقتين مشعة كما يتضح من صور الإشعاع الذاتي.

(ب) وبعد دورة ثانية من التناسخ وفي غياب التميدين المشع فإن كروماتيدة واحدة هي التي ستكون مشعة مما يدل على صحة الطريقة شبه المحافظة للتناسخ.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

منشأ Origin وشوكات Forks ووحدات التناسخ Units of Replication:

هناك عدة اسئلة تفرض نفسها بخصوص تناسخ د. ن. أ بالطريقة شبه المحافظة:

أين يبدأ التناسخ Origin of Replication؟ وهل هناك نقطة واحدة يبدا منها التناسخ أو أن هناك أكثر من منشأ على طول الكروموسوم؟ وهل نقطة المنشأ تكون عشوائية؟

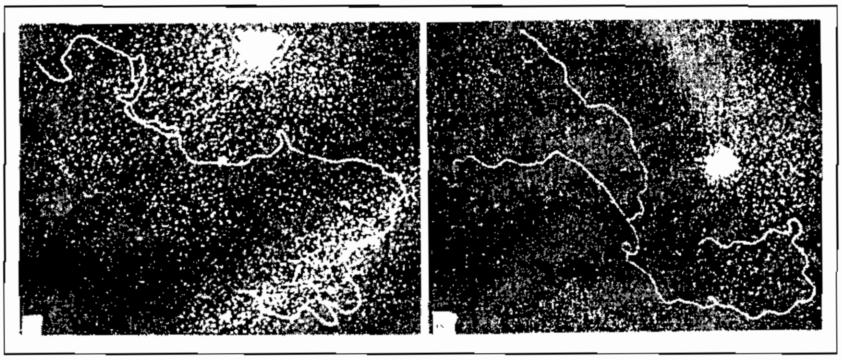
أوانها تقع على منطقة محددة على طول الكروموسوم؟ ومن جهة أخرى ، عندما يبدأ التناسخ فهل يستمر فى اتجاه واحد أو فى اتجاهين معا بعيداً عن المنشأ؟ وبمعنى أخر هل التناسخ وحيد الاتجاه Unidirectional أو ثنائى الاتجاه Bidirectional وللاجابة على هذه التساؤلات تمكن العلماء من أعطاء عدد من الأدلة التجريبية .

فقد تم عزل الجزئ الخطى لـ د. ن. أ على فترات اثناء عملية التناسخ للفيرس T7 وفحصه تحت المجهر الالكترونى وكان من المتوقع أن تبدأ عملية التضاعف (التناسخ) عند إحدى النهايتين أو عندهما معاً حيث أنه من السهل تخيل أن يبدأ انفصال السلسلتين عند الأطراف وليس فى المناطق الداخلية للحلزون المزدوج.

إلا أنه تبين أن التضاعف يبدأ فى الحقيقة من الداخل ومن نقطة واحدة معينة تسمى نقطة منشأ التناسخ Origin of Replication وقد وجد أنه بالنسبة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

لهذا الفيروس تكون هذه النقطه على مسافة حوالى ١٧% مــن بدايــة النهايــة اليسرى للجزئ كما فى الشكل (٣-٥).



الشكل (٣-٥): تناسخ جزئ د ن أ للفاج T7

(أ) صورة بالمجهر الإلكتروني لجزئ د ن أ لفاج T7 الذي بدء للتو في التناسخ والذي تظهر به فقاعــه تناسخ صغيرة تقع على مسافة 17% من النهاية اليسرى للخريطة الوراثية.

(ب) مرحلة متقدمة من تناسخ الجزئ الذي يظهر فيه شكل حرف Y نتيجة لوصول شوكة التناســخ إلــى نهاية الشوط.

وبمجرد أن يبدأ بناء جزئ د. ن. أيستمر البناء فى الاتجاهين مما يعطــى شكل العين (-O-) التى لا تلبث أن تنمو لتأخذ شكل حرف Y (ومن هنا جــاءت تسميتها شوكة التناسخ Replication Fork).

وتظل عملية التناسخ حتى تصل الشوكة إلى نهاية جزئ د ن أ.

كما إن ظهور هذه الاشكال ينفى أن عملية التناسخ تتم علــى مــرحلتين بمعنى أنه يتم الانفصال التام بين السلسلتين الأبويتين أولاً قبل أن تبــدأ عمليــة التناسخ فى المرحلة الثانية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فقد تبين أنه فى كل هذه المراحل الوسطية للتناسخ تكون هناك اجزاء صغيرة فقط غير متحلزنة وحيدة السلسلة.

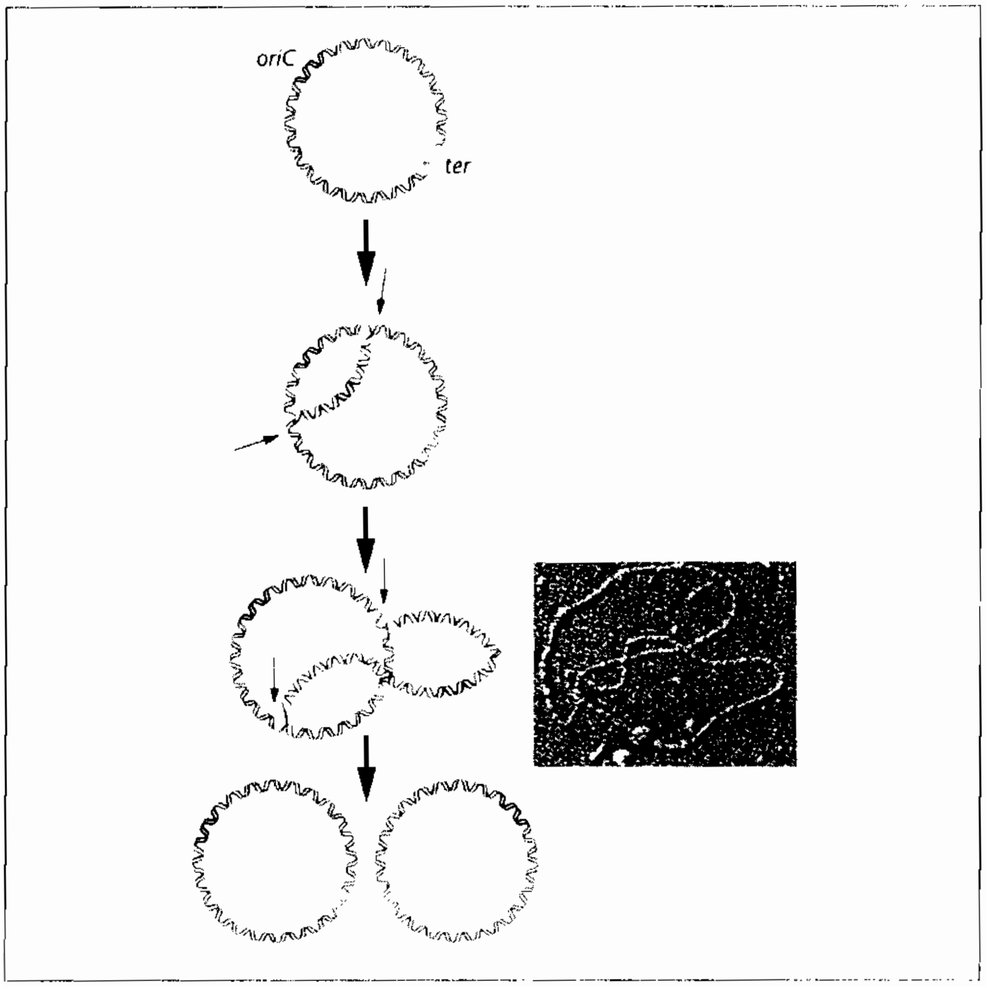
يدل ذلك على أن السلاسل الجديدة يبدأ بناؤها بمجرد أن تبدأ عملية جزئية لفك الحلزنة وانفصال جزئى للسلسلتين.

فى حالة جزئ د. ن. أ الحلقى كما فى بكتريا القولون لا يتحتم أن يتحول الجزئ الحلقى إلى جزئ خطى (مستقيم) ولو بصورة مؤقته على العكس من ذلك وجد عند دراسة المراحل الوسطية لتضاعف كثير من الجزيئات الحلقية من د. ن.أ أن السلاسل الأبوية تحافظ على الشكل الحلقى طول فترة التناسخ.

وقد اكدت تجارب Cairns (باستخدام Autoradiography ,Radioisotope) أن التناسخ يحدث أو يبدأ عند نقطة منشأ واحدة فى بكتريا القولون وتسمى (oriC) وتتكون من ٢٤٥ زوج من القواعد، على الرغم من أن عملية بناء د. ن. أ تحتاج إلى عدد صغير من القواعد.

ظهر فى مثل هذه الجزيئات اثناء تضاعفها شكل (θ ثيتا) عندما تبدأ فى تكوين فقاعة التناسخ عند نقطة البداية "المنشأ" كما فى الشكل (٣-٦).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٣-٦): التناسخ ثنائي الاتجاه في بكتريا القولون
وصورة المجهز الإلكتروني بالمجهر تبين علمية التناسخ

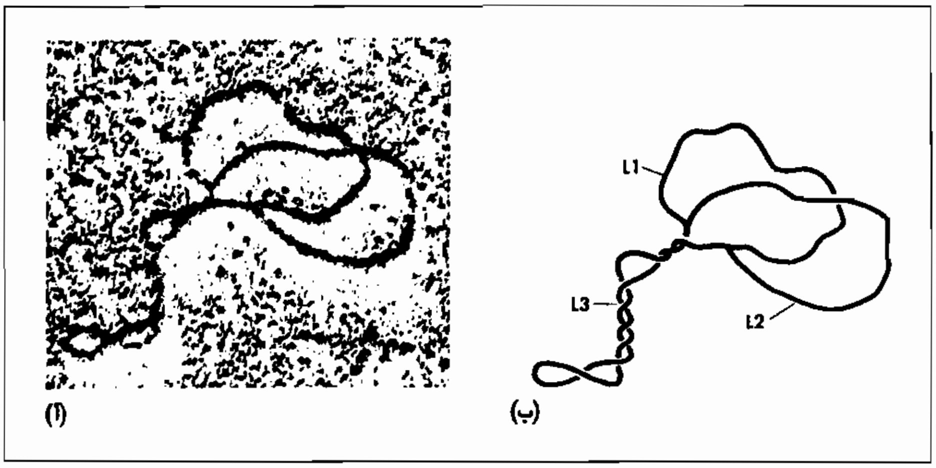
تنمو الفقاعة (الشوكة) فى الاتجاهين المتضادين ولكن كيف يتسنى لجزئ حلقى مقفول من د. ن. أ أن تنفك حلزنته أثناء التضاعف (التناسخ).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

أمكن اكتشاف مجموعة من الانزيمات يطلق عليها Topoisomerases تقوم بعملية فتح/ غلق Nicking/Closing (أو كسر/ لحام) لجـــزئ د. ن. أ بحيـــث تساعد إما على ازدياد درجة الحلزونة أو استرخاء الحلـــزون حـــسب طبيعـــة المرحلة التى يمر بها الجزئ.

فى الفاج SV_{40} تبين أن كلا من السلسلتين الأبويتين تظلان على حالهمـــا فى معظم فترات دورة التضاعف (الشكل ٣-٧) ويحدث للجزء غير المتضاعف من الشكل ثيتا θ الوسطى تحلزن فائق على فترات منتظمة للحيلوله دون تـــشوه أو تشابك الحلزون ويتم ذلك بإحدى طريقتين: إما أن يتكون حلزون فائق ســـلبى وذلك بفعل انزيم Topoisomerase II (Gyrase) كمقدمة لاستطالة السلـــسلة، أو بتكوين حلزون فائق موجب باستطالة فقاعات التناسخ وذلك فى حالـــة حـــدوث كسر فى السلسلة وهو أمر نادر حيث من الممكن فى هذه الحالة توقف اســـتطاله نمو الفقاعة لاستحالة الاستمرار فى تكوين حلزنة فائقة موجبة أشد. وسنتعرض بالتفصيل لدور Topoisomerases فى التناسخ فيما بعد.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (٣-٧): تناسخ جزئ د ن أ للفاج SV 40

(أ) صورة بالمجهر الإلكتروني لمرحلة مبكرة من التناسخ.

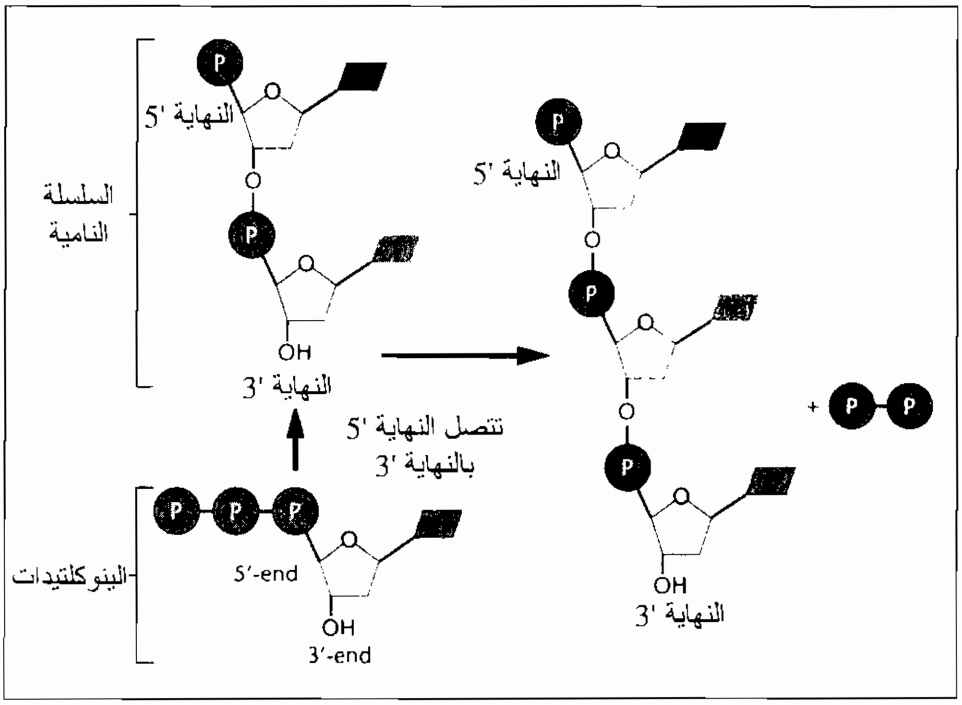
(ب) شكل تخطيطي يبين السلاسل الأبوية المتحلزنة وغير المتناسخة. وتمثل المناطق L1 وL2 الأجـزاء التي تم تناسخها بالفعل في حين تشير L3 إلى المنطقة غير المتناسخة التي تأخذ شكل فائق التحلزن. يلاحظ أنه خلال دورة التناسخ يظل جزئ د ن أ متماسك.

نموذج بناء جزئ د. ن. أ DNA Synthesis model:

سبق التنوية إلى أن السلسلتين المشاركتين فـي جـزئ د. ن. أ تكونـان متضادتين في الاتجاه Antiparallel ويعنى ذلك أن كلا من السلسلتين البنـويتين الجارى بناؤهما على كل من شوكتى التناسخ لابد أن يكونا أيضا فى اتجـاهين متضادين، وعلى ذلك فلابد أن يكون الاتجاه العام لنمو السلـسلة فـى الاتجـاه 5'→3' لإحدى السلسلتين بينما المفروض أن يكون النمو للسلسلة المضادة فـى الاتجاة 5'→3'.

إلا أن جميع انزيمات بلمرة د. ن. أ DNA Polymerase المعروفة حتـى الان والتى تشارك فى اضافة وحدات النيوكلتيـدات يمكنهـا الاضـافة ونمـو

واستطالة السلسلة فى الاتجاه '3←'5 فقط نظرا لأن التفاعل الكيماوى الذى تساعد فيه هذه الانزيمات يسمح للينوكلتيدة ثلاثية الفوسفات للتفاعل فقط مع مجموعة الهيدروكسيل الحرة فى النهاية 3'OH للسلسلة النامية، الشكل (٣-٨).

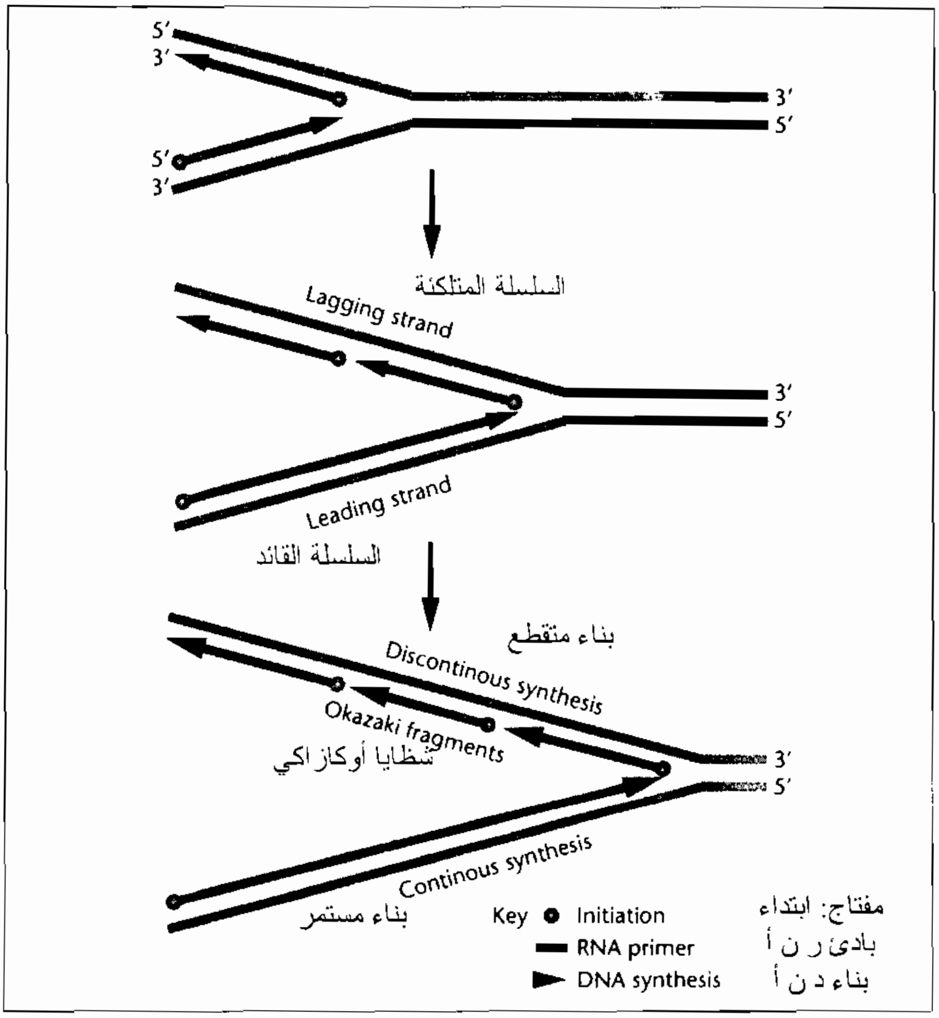


الشكل (٣-٨): يتم بناء سلسلة د ن أ في الاتجاه 5' to 3'

لحل هذه المعضلة، تمكن أوكازاكى Okazaki عام ١٩٦٩ من اكتشاف قطع قصيرة متقطعة من د. ن. أ يتم بناؤها فى الاتجاة '3←'5 على الخيط القالب المضاد لاتجاه البناء الطبيعى للسلسلة. وقد توصل إلى ذلك بعد تعريضة بكتريا القولون للثيميدين المشع ^{3}H Thymidine لمدة ثوان قليلة حيث ظهرت له قطع د. ن. أ. قصيرة بطول حوالى ١٠٠٠-٢٠٠٠ نيوكلتيده معلمة بالاشعاع،

وسميت هذه القطع القصيرة شظايا أوكازاكى Okazaki Fragments نسبة إلى مكتشفها (تكون طول هذه الشظايا فى خلايا الكائنات مميزة النواة بطول ٢٠٠ نيوكلتيده فقط وقد يكون لذلك علاقة بطول شريط د. ن. أ الملتف حول النيوكليوسوم) ثم توصل هذه القطع القصيرة ببعضها بفعل انزيم لحام د. ن. أ DNA Ligase (الشكل ٣-٩).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

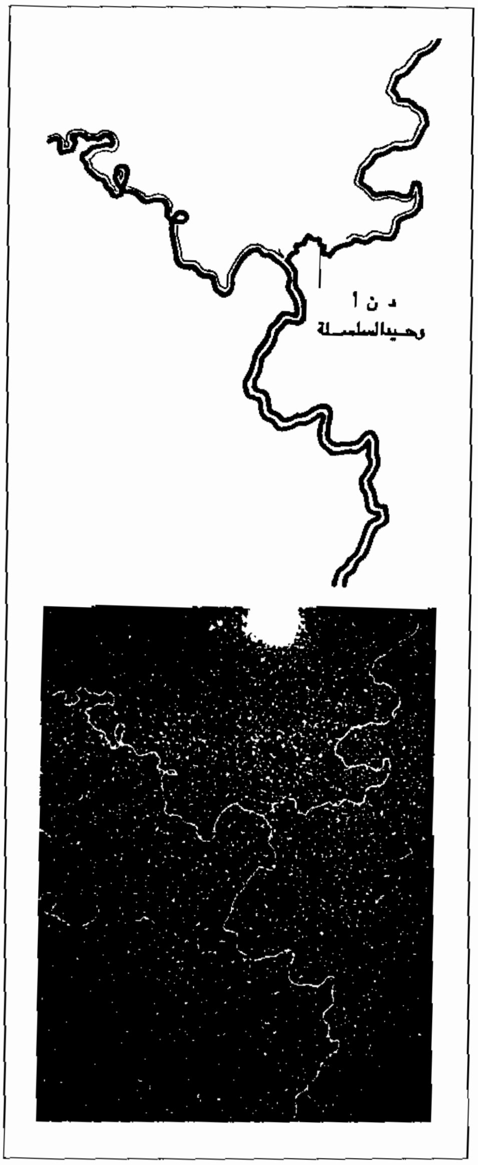


الشكل (٣-٩): حتمية القطبية المتضادة في بناء د ن أ على طول السلسلتين نظرًا لأن السلسلتين متضادتي الاتجاه وأن إنزيم بلمرة د ن أ III يبني فقط في الاتجاه (3'←5') فلابد أن يكون البناء على السلسلة المتلكئة متقطع مما يؤدي إلى إنتاج شظايا أوكازاكي بينما يتم البناء بصورة مستمرة وغير متقطعة على سلسلة القائد ويقوم بادئ ر ن أ باستبداء عملية البناء على كل من السلسلتين

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وقد تأكد الآن أن شظايا أوكازكى عبارة عن نواتج أولية لإحدى السلسلتين فقط وهى تلك التى تأخذ الاتجاه $5' \leftarrow 3'$ أما السلسلة ذات الاتجـاه $3' \rightarrow 5'$ فإنهـا تبنى أو يتم تناسخها على شكل خيط مستمر وغير متقطـع مـن البدايـة إلـى النهاية.وهى لذلك تكون عادة اسرع فى معدل بنائها وتسبق فـى ذلـك الخـيط المتقطع مما أدى إلى تسمية هذا الخيط بالخيط القائد Leading Strand فى حـين سمى الخيط المتقطع بالخيط التابع أو البطئ Lagging Strand يؤدى الفرق فـى سرعة البناء بين الخيطين إلى ظهور منطقة صغيرة من د. ن. أ الأبـوى فـى صورة احادية السلسلة عند شوكة التناسخ (الشكل ٣-١٠) ثم تـصبح مزدوجـة السلسلة عند بدء شظية أوكازاكى فى الظهور والتى يستمر بناؤها حتى تـصل إلى نهاية الشظية السابقة لها والتى لا تلبث أن تلتحم بهـا. يبـدأ بنـاء شـظايا أوكازاكى عند نقطة محددة على طول قالب السلسلة البطيئة وتحدد المسافة بـين هذه النقط متوسط طول شظايا أوكازاكى المتكونة أثناء تناسخ جزئ معين مـن د. ن.أ .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٣-١٠): يؤدي اختلاف سرعة الحركة بين الخيط القائد والخيط المتلكئ إلى ظهور منطقة صغيرة وحيدة السلسلة في جزئ د ن أ الأبوي عند شوكة التناسخ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بناء د. ن. أ فى الكائنات الدقيقة:

DNA Synthesis in Microorganisms:

يمثل التوصل الى أن التناسخ يتم بالطريقة شبة المحافظة وأنه ثنائى الاتجاه ، طراز أو نموذج فقط لتضاعف د. ن. أ والاتحاد بين السلسلتين اللتين تم بناؤهما إلا انه تظل هناك معضلة اكثر تعقيدا تتمثل فى معرفة كيفية حدوث البناء الفعلى لسلسلة طويلة مكملة متعددة الينيوكلتيدات على القالب وسنبدأ باستعراض أنواع أنزيمات بلمره د. ن. أ و دور كل منها فى عملية البناء.

أنواع انزيمات بلمره د. ن. أ فى بكتريا القولون:

DNA Polymerases:

اكتشف حتى الآن فى خلايا بكتريا القولون *E.coli* ثلاثة أنواع من انزيمات بلمرة د.ن. أ وقد تم تحديد دور إثنتان منها فى عملية تناسخ د. ن. أ. فبينما كان يظن سابقاً أن انزيم البلمره DNA Polymerase I (DNA Pol I) والذى كان أول انزيم يكتشف فى هذه المجموعة، هو الانزيم الرئيسى المسئول عن بلمره جزئ د. ن. أ إلا أنه أمكن التحقق من أن هناك انزيم آخر وهو (DNA Pol III) والذى اكتشف لاحقا هو الذى يقوم بالدور الأساسى فى بلمرة جزئ د. ن. أ وعلى العكس من ذلك تبين أن انزيم (DNA Pol I) يقوم أساسا بملئ الفراغات أو الفجوات الصغيرة بين شظايا أوكازاكى المتكونة على الخيط المتلكئ. فى حين لم يتحدد بعد دور معين للانزيم الثالث وهو (DNA Pol II) فى عملية البلمرة حيث أن الطفرات التى لا تنتج هذا الأنزيم لا تتأثر بغيابة.

وقد أمكن تحديد دور كل من هذه الانزيمات فى الخلية *in vivo* كالاتى:

١- يفترض أن انزيم د. ن. أ بوليميريز I قد يكون مسئولا عن ازالة بادئ ر. ن. أ القصير وكذلك ملئ الفجوات الناتجة عن تلك الازالة كما أن

نشاطة فى التحليل الطرفـى Exonudease يـسمح بتـصحيح الاخطـاء Proofreading أثناء هذه العملية وقد إنتفت أهمية هذا الانزيم فى عمليـة البلمرة الاساسية عندما اكتشفت طفرة لغياب هذا الانـزيم فـى بكتريـا القولون إلا أن عملية بناء جزئ د. ن. أ لم تتأثر بهذا الغياب.

٢- يبدو ان أنزيم د. ن. أ بوليميرنز II يلعب دورا فـى اصـلاح الأخطـاء الناجمة عن التلف الذى قد يحدث فى جـزئ د. ن. أ نتيجـة التعـرض لعوامل خارجية مثل الاشعة فوق البنفسجية.

٣- يعد انزيم د. ن. أ بوليميرز III هو الانزيم الأساسى المسئول عن عمليـة البلمرة اللازمة لعملية التناسخ كما أن نشاطه فى التحليل الطرفى $5' \rightarrow 3'$ Exonuclease تمكنه من إصلاح الاخطاء وسوف يتم عرض وظيفة كـل من هذه الانزيمات بالتفصيل فيما بعد.

يبين الجدول (٣-١) بعض الخواص الرئيسية لكل من هذه الانزيمات.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجدول(٣-١) بعض خواص انزيمات البلمره DNA Pol III, II, I
في بكتريا القولون

الوظيفة	Pol I	Pol II	Pol III
الوظيفة:			
البلمرة 3'→5'	+	+	+
التحليل الطرفى 3' →5' exonuclense	+	−	+
التحليل الطرفى 5' →3' exonuclense	+	−	+
بدء البلمرة	−	−	−
الاحتياج لـبادئ من ر. ن. أ لبدء البلمرة	+	+	+
خواص عامة :			
الحجم (kdal)	١٠٩	١٢٠	١٤٠
عدد الجزيئات فى الخلية	٤٠٠	؟	١٥
معدل البلمره *	٦٠	٣٠	٩٠٠٠
الجينات التركيبية المعروفة	PolA	Pol B	dnaE, N, Z
الطفرات المميتة الشرطية	نعم	لا	نعم

* عبارة عن عدد النيوكلتيدات المبلمرة عند درجة 37°م فى الدقيقة لكل جزئ من الأنزيم.

دور انزيمات بلمرة د. ن. أ فى تصحيح الأخطاء Proofreading:

يتبين من هذا الجدول أن انزيمى Pol III, Pol I تمتلك خواص التحليل أو القطع الطرفى Exonuclease فى الأتجاه '5→'3 بالأضافة إلى وظيفة البلمرة الأساسية.ويعنى ذلك أنه فى مقدور كل من هذه الأنزيمات أن يعيد قطع أو هدم سلسلة متعدد النيوكلتيدات الحديثة التكوين فضلا عن دوره الأصلى فى استطالتها. إلا أن اتجاه البناء يكون أقوى بكثير من اتجاه الهدم. ولكن لماذا توجد

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

خاصية القدرة على الهدم فى نفس الوقت الذى يفترض فيه أن هذه الأنزيمات تقوم أساسا بدور بنائى؟

تبين أن وجود هذه الخاصية ذو أهمية بالغة فى عملية تصحيح الأخطاء Proofreading أثناء عملية بناء سلاسل جزيئات د. ن. أ الجديدة حيث وجد أن خاصية الهدم الطرفى Exonuclease تنشط بصفة خاصة عند وجود أزواج قواعد غير متكاملة أضيفت فى غير أماكنها الصحيحة أثناء عملية البناء فلو حدث بالصدفة أن قاعدة غير صحيحة أضيفت بالخطأ على النهاية 3' للسلسلة النامية فإنه لابد من التخلص منها فى الحال حتى لا تورث هذه الخطأ ويكون احتمال إزالتها عالى قبل أضافة القاعدة التالية ويتم ذلك بفعل الهدم الطرفى لهذه الانزيمات.

أى أن هذا النشاط الهدمى يعطى الفرصة لتصحيح الأخطاء مبكرا مما يؤدى إلى أنتاج سلاسل د. ن. أ دقيقة جدا واكثر انضباطا بكثير عما لو اعتمدنا فقط على خاصية التزاوج بين أزواج القواعد المكملة فقط.

قد يعزى عدم ظهور انزيم بلمرة د. ن. أ فى الاتجاه 5'←3' إلى الاحتياج المستمر إلى عملية التصحيح هذه. إذ لو افترضنا إمكان استطاله السلسلة فى هذا الاتجاه فإن النهاية النامية ستكون دائماً منتهية بمجموعة ثلاثية الفوسفات والتى تكونه روابطها المرتفعة الطاقة ضرورية لإضافة النيوكلتيدة التالية. من جهة أخرى سيؤدى نزع أو إزالة أحدث نيوكلتيده مضافة من مثل هذه السلسلة النامية المنتهية بمجموعة ثلاثية الفوسفات أثناء عملية تصحيح الأخطاء إلى ظهور سلسلة ذات نهاية 5' أحادية الفوسفات 5' - Monophosphate والتى ستكون بمحتوى طاقتها المحدود غير قادرة على الاستطالة بواسطة إنزيم البلمرة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الأفتراضى هذا مما يؤدى إلى توقف عملية الاستطالة فى السلسلة. وعلى ذلك فإنه يكون من الأسهل تصحيح الخطأ الناتج عن اضافة قاعدة غيرة صحيحة للتو إلى النهاية '3 للسلسلة عن تلك المضافة إلى النهاية '5 ومما يؤكد ذلك أن فرصة ظهور إنزيم بلمرة فى الاتجاه '5→'3 معدومة حتى الان لإفتقاده لخاصية تصحيح الأخطاء فى حين أن التناسخ فى الاتجاه '3→'5 يسمح للإنزيم نفسه فى نفس الوقت بتصحيح الأخطاء بكفاءة عالية.

يتميز إنزيم بلمرة د. ن. أ III بأنه بمجرد أن يبدأ عملية الاستطالة للسلسلة النيوكلتيدية فإنه يستمر ملتصقاً بالسلسلة مضيفاً نيوكلتيدات جديدة (واحده تلو الآخرى) حسب التتابع المكمل للسلسلة القالب إلى أن يتم وصوله إلى إشارة تجعله ينفصل عن السلسلة. ولكن لماذا يظل إنزيم بلمرة د. ن. أ متصلاً بالقالب إلى نهاية المشوار المحدد له بدون انقطاع؟

أظهر التركيب الثلاثى الأبعاد لجزئ البلمرة (DNA Pol III) أن هذا الإنزيم يحتوى على نطاقين أو مجالين Domains محدودين، يحتوى النطاق الأكبر على برزخ أو شق عميق ذو شحنه كهربية موجبه ويبلغ نصف قطرة 20A° وترتبط سلسلة د. ن. أ فى هذا الشق فى حين قد يحتوى النطاق الأصغر على منطقة للارتباط بالنيوكلتيدة القادمة. يبدو أن تحت النطاق الذى يتميز بالمرونة لدية المقدرة على إغلاق الشق بعد إرتباط سلسلة د.ن. أ. وعندما تكون سلسلة د. ن. أ فى هذا الوضع فإنه يكون باستطاعتها التحرك فقط إما إلى الخلف أو إلى الأمام من خلال الشق. يعتقد أنه فى حالة اضافة نيوكلتيدة خاطئه لهذه السلسلة والتى لا يمكنها أن تتزاوج بطريقة صحيحة مع القاعدة المقابلة فسيؤدى ذلك إلى تشوية وعدم تناسب عند هذه النقطة (القاعدة) مما يحول بين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

السلسلة وبين الحركة بسهولة إلى الأمام خلال الشق الضيق مما يـدفعها إلـى الحركة إلى الخلف بحيث تعود هذه القاعدة الخاطئة إلى موقـع نـشاط الهـدم الطرفى 3\→5\ exonuclease المصحح للخطأ بحيث يتم إزالة القاعدة الخطأ من موقعها على السلسلة (الشكل ٣-١١).

الشكل (٣-١١): شكل تخطيطي لعملية تصحيح الأخطاء
بعد إضافة القاعدة الخطأ إلى جزئ د ن أ في البكتريا

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وتتضح أهمية النشاط الهدمى الطرفى 5'←3' لهذا الأنزيم فى تصحيح الأخطاء عندما اكتشفت طفرة فى تحت الوحدة E لهذا الانزيم والمسئولة عن هذا النشاط حيث أدت هذه الطفرة إلى زيادة كبيرة فى الاخطاء وعدم القدرة على تصحيحها.

أهمية RNA البادئ فى تناسخ جزئ د. ن. أ.:

تبين أن إنزيمات بلمرة د. ن. أ DNA Polymerases المعروفة حتى الآن ليس فى مقدورها بدء عملية البلمرة وبناء السلسلة من الصفر *de navo* بل لابد أن تكون مسبوقة ببادئ قصير حتى يمكنها بدء نشاط البلمرة واستطالة سلسلة د. ن. أ. وقد تبين أن عملية بدء بناء أى سلسلة من د. ن. أ يتطلب وجود بادئ قصير جداً من ر. ن. أ RNA (حوالى ١٠ نيوكليتدات فى مميزة النواة واقل من ذلك فى غير مميزة النواة) أى أن نقطة البداية (المنشأ) لبناء د. ن. أ على السلسة القالب لا يتم التعرف عليها بواسطة إنزيمات بلمرة د. ن. أ مخصوصة ولكن بإنزيمات تقوم بنسخ Transcribe د. ن. أ لانتاج سلسلة بادئ قصيرة جداً من ر. ن. أ أمكن التعرف على إنزيم خاص يعرف بالبريميز DNA Primase وهو يختلف تماماً عن إنزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase الخاص بعملية نسخ جزيئات ر. ن. أ على قالب د. ن. أ كما أنه لا يحتاج إلى نهاية 3'-oH حره لبدء البناء.

تقوم هذه الإنزيمات بالتعرف على تتابعات خاصة على السلسلة القالب (سواء القائد أو التابع) لجزئ د. ن. أ. وجد أن إنزيم البريميز فى خلايا بكتريا القولون عبارة عن سلسلة واحدة من متعدد الببتيد يبلغ حجمه ٦٠ كيلو دالتون وتوجد منها حوالى ٥٠-١٠٠ نسخة فى الخلية الواحدة . ثبت أنه يلزم لبدء

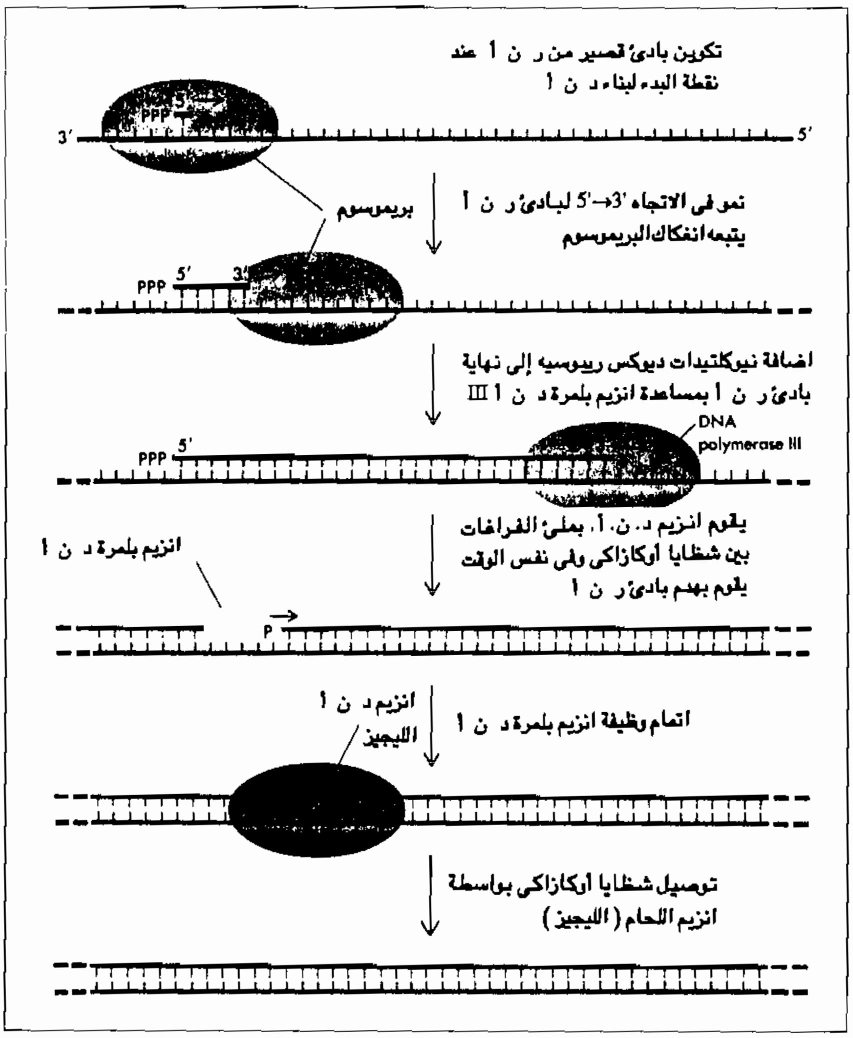
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

نشاط هذا الإنزيم أن تدخل ضمن معقد مكون من ٦-٧ بروتينات أخرى لتكون معقداً كبيراً يعرف بالبريموسوم Primosome و يتحرك هذا المعقد خطوة خطوة (الخطوة = نيوكلتيدة) فى الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ على القالب الخاص بالخيط المتلكئ نيستبدئ البدايات المتكررة لشظايا أوكازاكى التى يتم بناؤها بصورة متقطعة على هذا القالب التابع. يعتقد أن مكونات البريموسوم المختلفة تقوم بالعمل فيما بينها بصورة تعاونية co-operative لتأمين حركة البريموسوم على جزئ د. ن. أ وكذلك فى ازاحة البروتينات الخاصة بتثبيت السلاسل الفردية من د. ن. أ (والتى يطلق عليها البروتينات المرتبطة بالسلسلة الفردية لجزئ د. ن. أ (SSB) كما سيأتى بعد) كما تقوم بروتينات البريموسوم بالتعرف على مواقع البدء (المنشأ) الصحيحة وبلمرة وحدات الريبونيوكلتيدات لتكوين بادئ قصير جداً من سلسلة ر. ن. أ أى أن البريموسوم يتحرك على قالب د. ن. أ فى الاتجاه العكسى للاتجاه الذى لابد أن يتحرك عليه عندما يعمل على بناء ر. ن. أ مما قد يفسر لماذا يكون ر. ن. أ البادئ قصير السلسلة جداً لا يتعدى ٣-١٠ نيوكلتيدات.

يوجد لكل كائن تتابع متشابة لجميع بادئات ر. ن. أ مما يؤكد حقيقة أن البريموسوم يقوم ببناء ر. ن. أ. البادئ عند تتابعات معينة (متخصصة) على طول الخيط المتلكئ (التابع) لجزئ د. ن. أ القالب.

بمجرد أن يتم بناء ر. ن. أ البادئ، يبدأ نشاط إنزيم بلمرة د. ن. أ (DNA Pol III) نظرا لأن البادئ قد هيأ له نهاية $3'$ oH حره فى نهاية سلسلته القصيرة ويبدأ فى بناء شظايا أوكازاكى بحيث يتم تناسخ قالب د. ن. أ التابع فى صورة غير مستمرة (متقطعة) (الشكل ٣-١٢).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (٣-١٢): استخدام بادئ قصير من ر ن أ
لبدء بناء شظايا أوكازاكي على القالب المتلكئ

يتم بعد ذلك إزالة ر. ن. أ البادئ في خطوة لاحقة من خلال نشاط إنزيمDNA Pol I الذي يقوم بملئ الفجوات أو الفراغات بين شظايا د. ن. أ. بحيث يضيف النيوكليتدات الواحدة تلو الآخرى إلى النهاية '3 التي تقع إلى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الخلف منه وفى نفس الوقت يقوم بتحليل وهدم سلسلة ر. ن. أ البادئ التى تسبقة. تتم عملية هدم ر. ن. أ نتيجة لنشاط موقع مختلف تماماً عن ذلك المسئول عن عملية التصحيح 3'→5' إذ أن ذلك الموقع النشط فى الهدم الطرفى 5'→3' يمكنه إزالة الديوكسى نيوكليتدات بالإضافة إلى الريبونيوكليتدات وعلى ذلك فإن استخدامه لا يكون قاصراً على إزالة بادئ ر. ن. أ ولكنه يقوم أيضاً بتحليل وهدم مناطق د.ن. أ التى يحدث لها تلف نتيجة للتعرض للإشعاع.

يلى ذلك عملية لحام أو لصق شظايا أو كازاكى ببعضها البعض بمساعدة إنزيم اللحام (ليجيز) DNA Ligase الذى يقوم بتوصيل النهاية 3' للشظية الجديدة من د. ن. أ بالنهاية 5' للشظية السابقة لها. وهكذا حتى نحصل فى النهاية على خيط كامل متصل (الشكل٣-١٢) وقد تأكدت وظيفة انزيم الليجيز فى لحام شظايا أوكازاكى عندما لوحظ أنه فى بكتريا طافرة لنقص الأنزيم تراكمت شظايا أوكازاكى بدون لحام.

ولكن لماذا تلجأ الخلية إلى بدء السلسلة ببادئ ر. ن. أ الذى لابد أن يزال فى خطوة لاحقة وتفضل ذلك على بدئها ببادئ من د. ن. أ الذى يفترض أنه لا توجد حاجة إلى إزالته فيما بعد؟ سبق أن ذكرنا أنه لم يوجد حتى الآن إنزيم بلمرة د. ن. أ يمكنه بدء البناء من الصفر *de nove*، بالاضافة إلى ذلك يمكن تفسير تفضيل وجود بادئ ر. ن. أ فى بداية شظايا أو كازاكى على أساس أن الأنزيم الذى يمكنه بدء بناء السلسلة من الصفر *de nove* يفتقر عادة إلى القدرة والكفاءة لإجراء عملية التصحيح الذاتى، وعلى ذلك فإن الإنزيم الذي يستطيع استبداء بناء شظايا أوكازاكى سيكون بالضرورة معرضاً لإنتاج نسخة غير صحيحة نسبياً (10^{-5}) مما يؤدى فى النهاية إلى زيادة معدل الطفور بدرجة كبيرة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

جداً مما يؤثر على حيوية الخلية ونشاطها بشكل سلبى. ولذلك فإنه يبدو أن وجود بادئ من ر. ن. أ بدلاً من د.ن.أ فى بداية السلسلة له ميزة أن هذه التتابعات القصيرة من الريبو نيوكليتدات يمكن اعتبارها بمثابة كشافات يسهل على DNA Pol III أن يتعرف عليها فيما بعد ويقوم بتكسيرها وإزالتها أى أن الإنزيم يميزها على أنها بقع رديئة يجب مسحها وإزالتها.

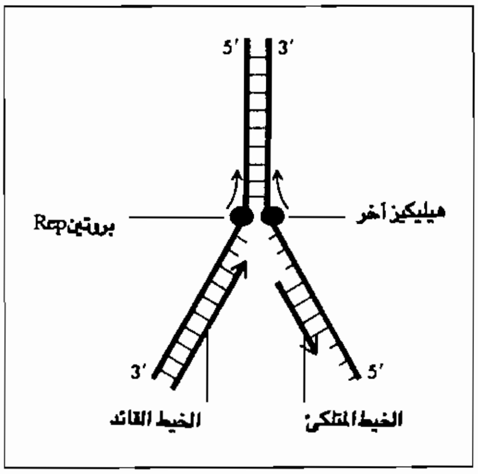
أنواع البروتينات التى تساعد على فك الحلزنة وانفصال سلسلتى د. ن. أ:

حيث أن سلسلتى الحلزون المزدوج الواقعة أمام شوكة التناسخ لا تنفصلان تلقائياً بالمعدل المناسب تحت الظروف العادية نظراً لأن الحلزون يمكون ثابت جداً والروابط الهيدروجينية تصل بين أزواج القواعد بطريقة منتظمة وتحتاج فى كسرها إلى درجة حرارة عالية نسبياً فى التجارب المعملية (حوالى ٩٦°م)، لذلك فإنه يلزم وجود عوامل مساعدة فى الخلية لفصل السلسلتين حتى يتسنى لإنزيمات بلمرة د. ن. أ. أن تؤدى دورها فى عملية التناسخ على قالب د. ن. أ. وجد أن هناك مجموعة من البروتينات التى تقوم بهذا الغرض يطلق عليها هيليكيزيز Helicases، تقوم هذه البروتينات (بالارتباط مع ATP) بالالتصاق بأجزاء وحيدة السلسلة من د. ن. أ.وتستخدم الطاقة الناتجة من التحليل المائى لجزئ ATP للتحرك الى الأمام وزيادة معدل انفصال سلسلتى د ن أ.

يوجد نوعان من هذه البروتينات أحدهما (هيلكيز II أو I) يرتبط بالقالب الخاص بالخيط البطئ (التابع) ويتحرك فى الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ فى حين يطلق على النوع الآخر اسم Rep protein وهو يرتبط بالقالب الخاص بالخيط القائد ويتحرك

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

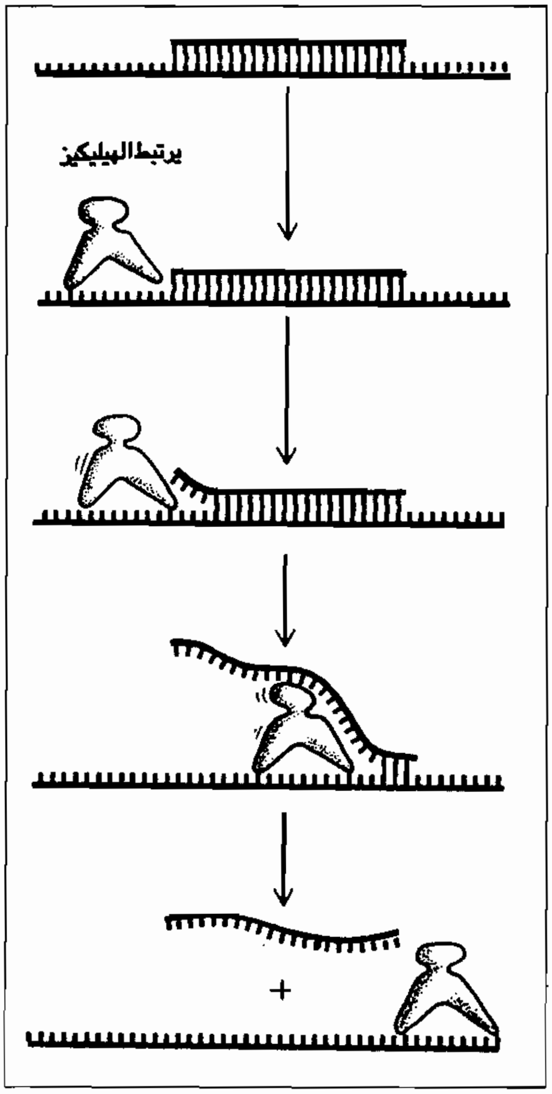
فى الاتجاه '5←'3 (الشكل ٣-١٣) تستمر إنزيمات الهيليكيز فى التقـدم أمـام شوكة التناسخ لفصل سلسلتى د. ن. أ القالب تمهيداً لعمل إنزيمات البلمرة.



الشكل (٣-١٣): تقوم إنزيمات الهيليكيز Helicases بفك حلزنة د ن أ أمام شوكة التناسخ، يتحرك البروتين (Rep Protein) وهو من أنواع الهيليكيز على أحد السلسلتين في الاتجاه '5←'3 في حين يتحرك إنزيم هيليكيز آخر (هليليكيز I أو II) على السلسلة المكلمة في الاتجاه '3←'5

ويبـين الشكل (٣-١٤) الطريقـة التـى تعمـل بهـا إنزيمـات الهيليكيزيز.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

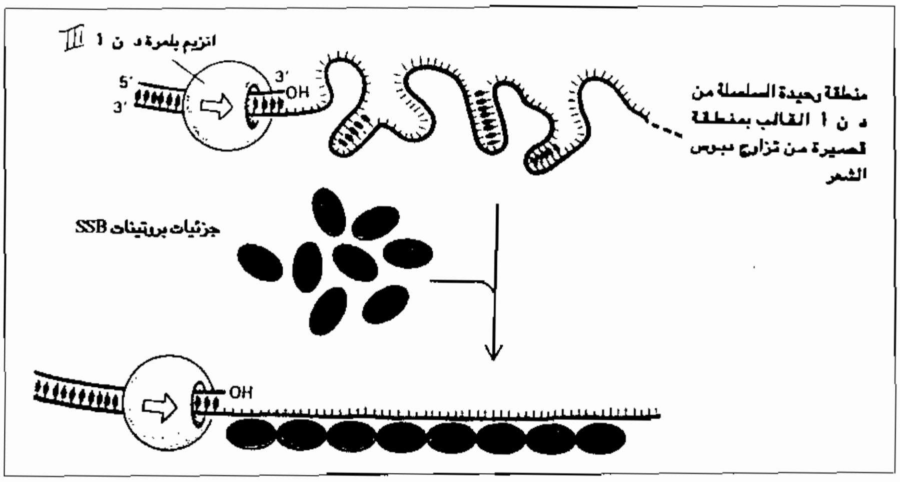


الشكل (٣-١٤): ميكانيكية عمل إنزيمات الهيليكيزيز
يتم إعادة إتحاد Annealing منطقة قصيرة من د ن أ مع سلسلة طويلة مفردة من د ن أ
لتكوين منطقة حلزون مزدوج محدودة تنفك هذه المنطقة المزدوجة عند مرور الهيليكيز على سلسلة د ن أ
محررًا الشظية القصيرة من د ن أ ويحتاج هذا التفاعل إلى وجود جميع بروتينات الهيليكيز وATP

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

من جهة أخرى، وجد أن سلسلة القالب عندما تكون فى صورة مفردة فإنها تكون معرضة للأنثناء أو الأنطباق على نفسها بسرعة وبسهولة فـــى المنـــاطق المفردة لميلها الطبيعى لتكوين مناطق مزدوجة بين أزواج القواعد المتقابلة ولـــو بطريقة خاطئة مكونة عروات تشبة دبوس الشعر Hairpin مما يعيـــق عمليـــة التناسخ. توجد مجموعة بروتينات خاصة تقوم بالارتبـــاط بـــسرعة بالمنـــاطق المفردة من سلسلة القالب لتثبيت هذه المناطق والمحافظة عليها مفرودة وممتـــدة بدون انحناءات أو انثناءات لحين وصول إنزيم البلمرة إليها.

وجد أن هذه البروتينات المثبته تلتصق بمنطقـــة مـــن د. ن. أ بـــدون أن تحجب القواعد النتروجينية حتى تظل الأخيرة معرضة لعملية التناســـخ، يطلـــق على هذه المجموعة من البروتينات اسم بروتينات الارتبـــاط بسلـــسلة د. ن. أ. المفردة Single Stranded DNA Binding Proteins واختـــصاراً (SSB) ويبـــين الشكل (٣-١٥) كيفية عمل هذه البروتينات.



الشكل (٣-١٥): دور بروتينات SSB أثناء عملية التناسخ حيث يؤدي ارتباط هذه البروتينات بالسلسلة المفردة إلى منع انثنائها قبيل عملية التناسخ مما يسهل مرور إنزيم بلمرة د ن أ على القالب المفرد

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وجد أن هذه البروتينات لا تحتاج إلى طاقة من ATP ولم يتحدد لها حتى الآن دور إنزيمى معين و تتكون من أربعة تحت وحدات Subunits طول كل منها ١٧٧ حامض أمينى بحيث ترتبط كل وحدة رباعية Tetramer بمجموعات متجاورة من النيوكليتدات على السلسلة المفردة طولها ٣٢ نيوكلتيدة. يؤدى ارتباط وحدة من SSB بمنطقة ما إلى تشجيع أو حفز ارتباط وحدة أخرى من SSB بمنطقة مجاورة على السلسلة ويطلق على هذه العملية الارتباط التعاونى Cooperative Binding.

تركيب انزيم البلمرة DNA Pol III:

وجد أن إنزيم بلمرة د. ن. أ من نوع DNA Pol III المسئول عن استطالة سلسلة د.ن.أ أثناء عملية التناسخ يتكون من سبع تحت وحدات من متعدد الببتيد تكون معاً إنزيم كامل Holoenzyme ولابد أن توجد هذه الوحدات جميعاً معاً حتى يمكن للإنزيم أن يقوم بوظائفه على الوجه الأكمل . وجد أن واحده من هذه الوحدات وتسمى ∝ تقوم بنشاط الهدم الطرفى Exonuclease 3'→5' بالاضافة إلى وظيفة البلمرة فى حين تقوم الوحدة Є بالهدم الطرفى فى الاتجاة 3'→5' ترتبط واحدة أو أكثر من الوحدات الأخرى بجزئ ATP حتى يمكن بدء الاستطالة عند النهاية 3' H لبادئ ر. ن. أ.

يبين الجدول(٣-٢) أنواع البروتينات المشاركة فى تناسخ جزئ د.ن.أ فى بكتريا القولون وملخصاً لوظائف كل منها.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الجدول (٣-٢) أنواع البروتينات المشاركة
فى تناسخ د. ن. أ فى بكتريا القولون E.coli

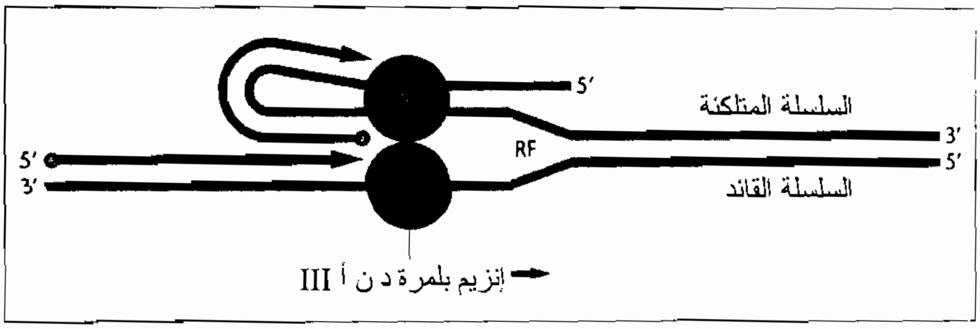
الوظيفة	عدد تحت الوحدات	الكتلة (Kdal)	اسم البروتين
الارتباط بالسلسلة المفردة	٤	٧٤	SSB
تجميع البريموسوم وتنشيطه	٣	٦٦	Protein i
	٢	٢٨	Protin n
	١	٧٦	Protin n'
	١	١٧	Protin n"
	١	٢٩	Dna C
	٦	٣٠٠	Dna B
بناء البادئ ر. ن. أ	١	٦٠	Primase
البلمرة DNA polymerase	(٢)	(٧٦٠)	Pol III Holoenzyme
البلمرة و exonuclease 5'→3'	١	١٤٠	∝
البلمرة و exonuclease 3'→5'	١	٢٥	∈
	١	١٠	θ
	١	٣٧	β
٢x استطالة السلسلة د.ن. أ الجديدة	١	٥٢	δ
	١	٣٢	δ
	١	٨٣	T
ملئ الفجوات وإزالة بادئ ر. ن. أ	١	١٠٢	Pol I
اللحام بين شظايا أوكازاكى	١	٧٤	Ligase
زيادة الحلزنة	٤	٤٠٠	Topoisomerase II (Gyrase)
	٢	٢١٠	Gyr A
	٢	١٩٠	Gyr B

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Rep Protein	٦٥	١	فك الحلزون وفصل سلسلتى د.ن.أ
Helicase II	٧٥	١	فك الحلزون وفصل سلسلتى د.ن.أ
Dna A	٤٨	٤	نقطة بداية التناسخ فى د.ن.أ
Topoisomerase I	١٠٠		استرخاء الحلزون الفائق السلبى

تقوم هذه البروتينات بالعمل فى تنسيق تام مع بعضها ويطلق عليها فى مجموعها ماكينة التناسخ Replication Machine مما يؤدى إلى إنتاج جزيئات د. ن. أ صحيحة وخالية من الأخطاء. تبين أن معظم هذه البروتينات تكون مرتبطة ببعضها فى صورة معقدات مكونة من عدة إنزيمات (الكتلة 10^6 Dalton) وتتحرك بسرعة على خيط د. ن. أ. وقد وجد أن هناك جزيئين من إنزيم DNA Pol III عند شوكة التناسخ بحيث يمكن لهذا الثنائى الإنزيمى أن يقوم بإدارة عملية استطالة كلاً من الخيطين القائد والتابع فى نفس الوقت ويتطلب ذلك أن ينثنى الخيط التابع إلى الخلف (ربما وراء Pol III) حتى يمكنه أن يرتبط بمكونات البلمرة فى نفس اتجاه الخيط القائد. وطبقاً لهذا الافتراض فإن البادئ المتكون بفعل البريموسوم سيكون مغطى بواسطة DNA Pol III عندما يكون قالب الخيط التابع ماراً من البريموسوم وسيكون مغطى بواسطة DNA Pol III عندما يكون قالب الخيط التابع ماراً من خلال معقد الإنزيم Pol III. وعندما تصل السلسلة النامية إلى شظية أوكازاكى السابقة لها فإن الانحناء أو العروه ستسترخى. وفى هذا الوقت سيؤدى بناء الخيط القائد المستمر إلى توفر منطقة مفردة جديدة من قالب الخيط التابع التى يمكنها أن تنحنى إلى الخلف وتشارك فى تكوين شظية أوكازاكى التالية. بهذه الميكانيكية لن يكون الفرق كبيراً بين معدل بناء واستطالة الخيط القائد والخيط التابع (الشكل ٣-١٦).

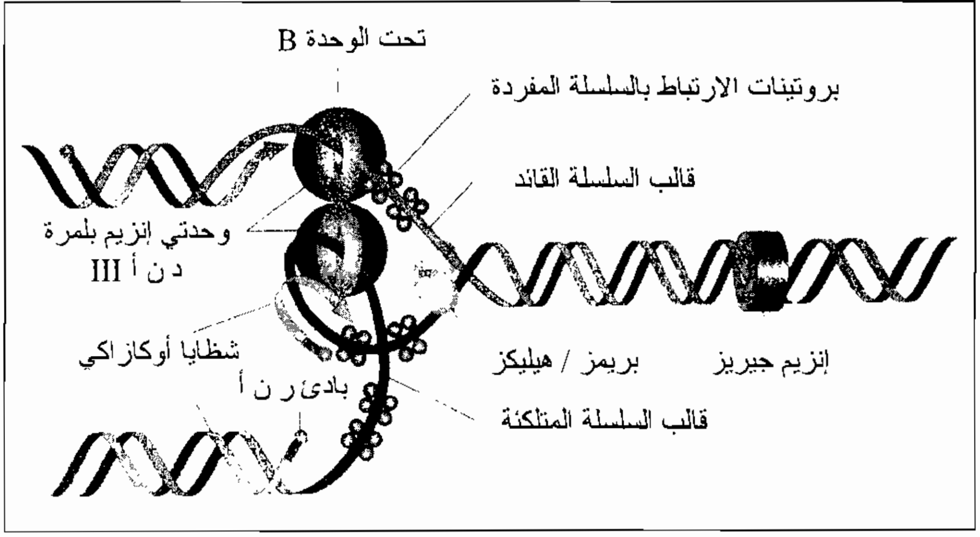
salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (٣-١٦): يتم التناسخ معًا وفي نفس الوقت على كلا من السلسلة القائد والسلسلة المتلكئة على شوكة تناسخ واحدة. تنحني السلسلة المتلكئة لكي تعكس الاتجاه المادي وليس البيوكيماوي للتناسخ وينشط الإنزيم بوحدتين بحيث تتوزع كل وحدة على إحدى السلسلتين للقيام بعملية البناء

بالإضافة إلى ذلك سيتم انفصال البريموسوم عن د. ن. أ القالب بنفس السرعة التى تتحرك بها مكونات جزئ DNA Pol III المشاركة فى بلمرة د.ن.أ يطلق علي معقد البروتينات المشاركة فى تناسخ د. ن. أ والتى تشمل جزئين من DNA Pol III والبريموسوم اسم ريبليوسوم Repliosome (وهى عادة تكون فى حجم الريبوسوم) ويوضح الشكل (٣-١٧) الدور الذى تقوم به كل من هذه البروتينات فى عملية تناسخ د. ن. أ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٣-١٧): ملخص لعملية بناء د ن أ عند شوكة تناسخ واحدة

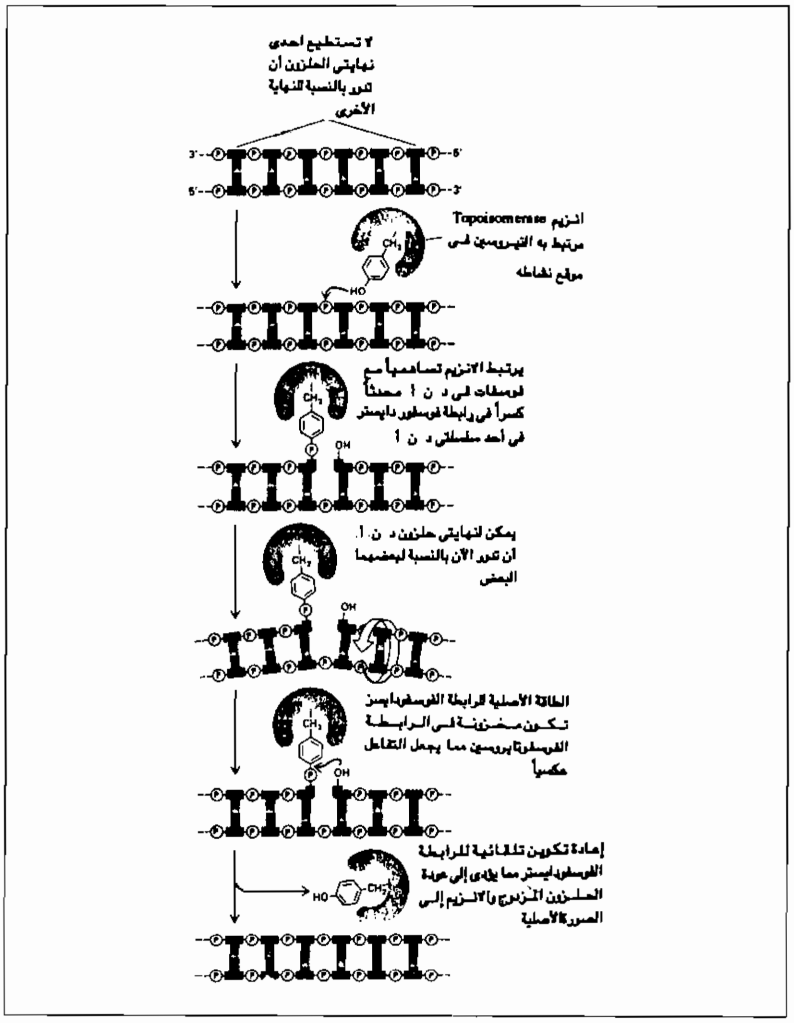
دور انزيمات Topoisomerase فى تناسخ د. ن. أ:

أن توضيح الحلزون المزدوج لجزئ د. ن. أ "كسلم مسطح" لا يأخذ فى الاعتبار مشكلة الدوران أو الالتفاف Winding الذى يحدث أثناء تناسخ د. ن. أ من المعروف أن كل ١٠ أزواج من القواعد توازى دورة التفاف كاملة حول محور الحلزون المزدوج الأصلى. معنى ذلك أنه لكى تتحرك شوكة التناسخ فإنه يتحتم على جميع أجزاء الكروموسوم التى تسبق الشوكة أن تدور بسرعة (الشكل ٣-١٨) مما يتطلب استهلاك مقدار كبير من الطاقة وعلى الأخص فى حالة الكروموسومات الطويلة نسبياً. ولذلك لجأت الخلية إلى ميكانيكية بديلة إثناء عملية التناسخ عن طريق تكوين محور ارتكاز للدوران "Swivel" فى جزئ د. ن. أ بواسطة بروتينات خاصة يطلق عليها DNA Topoisomerases، يمكن اعتبار هذه المجموعة من البروتينات بمثابة انزيمات تحليل مائى نووى عكسى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

"Reversible Nucleases" حيث ترتبط تساهمياً بمجموعـات الفوسـفات فـي الهيكل الأساسى لجزئ د. ن. أ، وبذلك تقوم بتكسير رابطة فوسفواستير ثنائيـة فى سلسلة د. ن. أ. ومن خواص هذه الرابطة التساهمية التى تكونت بين انـزيم Topoisomerase وفوسفات د. ن. أ احتفاظها بالطاقة الناتجة عن كسر الرابطـة الفوسفواستير الثنائية وبهذا يكون تفاعل الكسر عكسياً بحيث التئام (لحام) سريع بدون الحاجة إلى مصدر طاقة إضافى. وتجدر الاشارة هنا إلى أن عملية إعـادة الالتحام هنا تختلف عما يحدث عن طريق انـزيم اللحـام DNA Ligase الـذى سبقت الاشارة إليه.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



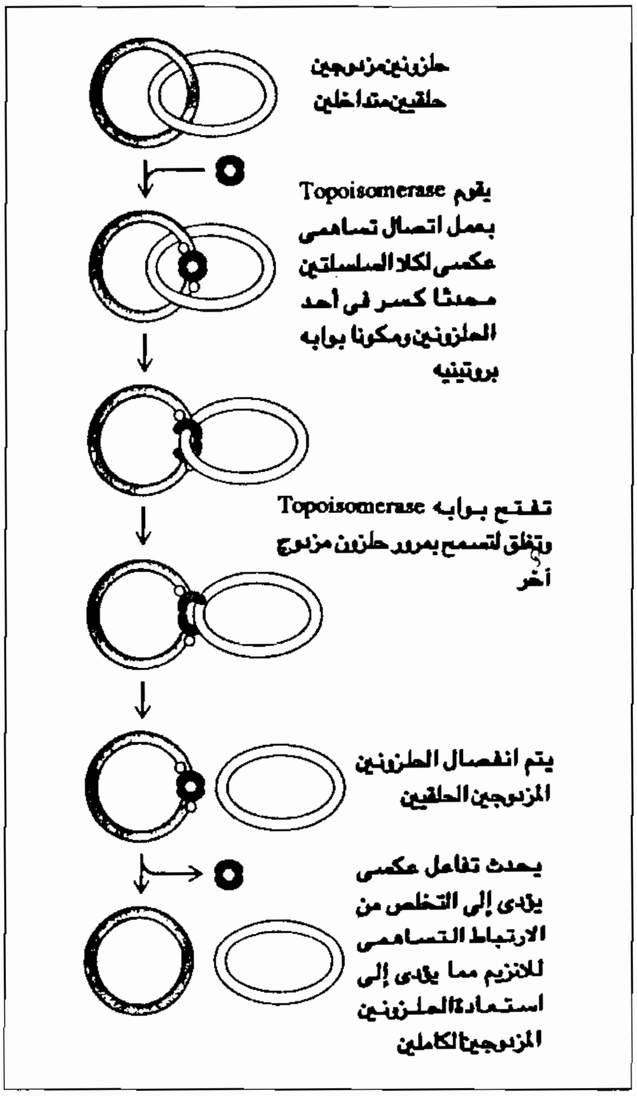
الشكل (٣-١٨): تفاعل أحداث ثغرة عكسية (Nicking) الذي يتم في د ن أ مميزة النواة بمساعدة إنزيم Topoisomerase I
حيث تكون هذه الإنزيمات رباطة تساهمية مؤقتة مع جزئ د ن أ

يوجد نوعين من Topoisomerases الأول يسمى Topoisomerase I ويحدث تأثيرة عن طريق إحداث كسر (أو ثغره صغيرة) "Nick" في إحدى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

سلسلتى الحلزون المزدوج فقط أى أنه يعمل على مستوى الـــسلاسل المفـــردة. يؤدى القطع أو الكسر الصغير هذا الـــى الـــسماح لـــشطري حلـــزون د. ن. أ الموجودين على جانبى الكسر بالدوران بحرية بالنسبة لبعضها الـــبعض بحيـــث تستخدم الرابطة الفوسفواستير الثنائية فى السلسلة المقابلة للكسر كنقطة إرتكـــاز للدوران (الشكل ٣-١٩) وإذا نشأ اى توتر أو شد Tension فى حلزون د. ن. أ فإن اتجاه هذا الدوران سيتحدد بما يضمن تخفيف التوتر أو الشد. ينتج عن ذلك أن تناسخ د. ن. أ يمكن أن يتم بعد حدوث دوران لمنطقة قـــصيرة فقـــط مـــن الحلزون وهى المنطة التى تسبق مباشرة شوكة التناسخ. ويحدث نفس الشئ أثناء عملية نسخ Transcription د. ن. أ لتكوين ر. ن. أ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٣-١٩): ميكانيكية عمل إنزيم Topoisomerase II في فصل جزيئين حلقيين من د ن أ أثناء التناسخ ويحتاج هذا الإنزيم إلى ATP لأداء وظيفته يوجد هذا الإنزيم في كل من الخلايا غير مميزة النواة ومميزة النواة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

أما النوع الثانى من هذه الانزيمات فيسمى Topoisomerase II ويقوم بدوره عن طريق تكوين رابطة تساهمية مع كل من السلسلتين فى الحلزون المزدوج لجزئ د.ن.أ. في نفس الوقت مما يسبب قطع مؤقت فى السلسلتين. يتم تنشيط هذا الانزيم عن طريق مواقع موجودة على الكروموسومات حيث يتعابر حلزونان مزدوجان فوق بعضهما البعض، وعندما يرتبط Topoisomerase II بنقطة التعابر هذه فإنه :

١- يكسر أحد الحلزون المزدوجين (عكسياً) مما يؤدى إلى إنشاء بوابة فى د. ن. أ.
٢- يمر جزئ د. ن. أ مزدوج أخر من خلال هذا الكسر (البوابة).
٣- يعيد التحام الكسر ثم ينفصل عن د. ن. أ.

بهذه الكيفية فإن انزيم DNA Topoisomerase II يمكنه بكفاءه أن يقوم بفض الاشتباك بين جزيئين حلقيين من د. ن. أ كما فى الشكل (٣-١٩) يقضى هذا التفاعل نفسه على مشكلة تشابك وتعقد جزئ د. ن. أ "Tangling" التى كان من الممكن أن تحدث أثناء تناسخ د. ن. أ.

نموذج الدوائر المتدحرجة لتناسخ د. ن. أ الحلقى Rolling Circles:

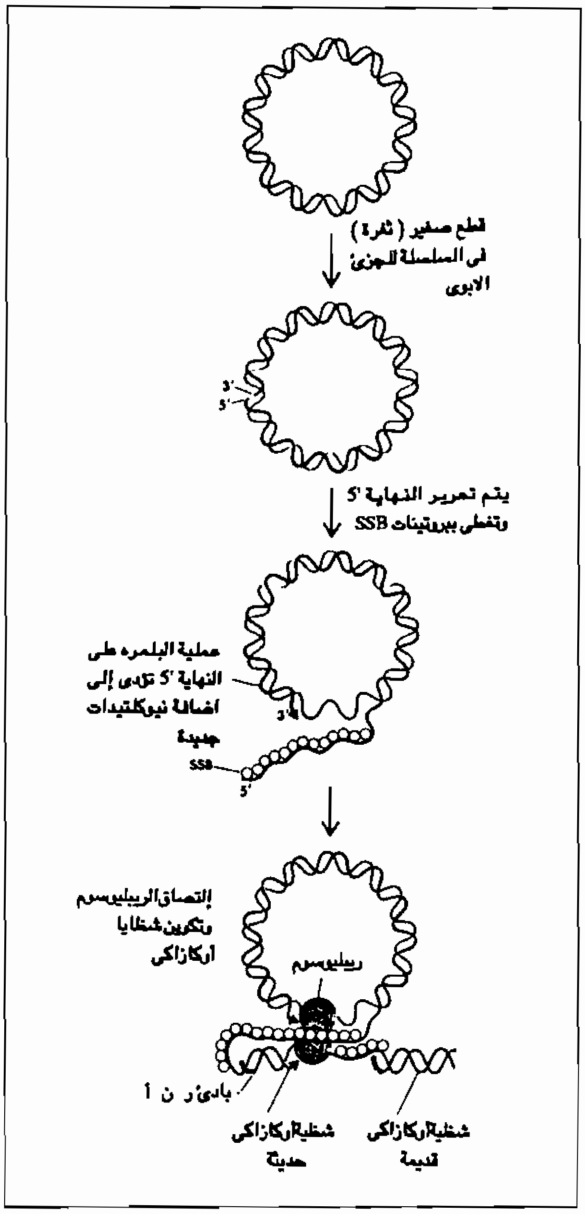
توجد طريقة بديلة لتناسخ د. ن. أ الحلقى فى البكتريا تسمى طريقة الدوائر المتدحرجة حيث يبدأ بناء د. ن. أ بإحداث قطع محدد عند منشأ التناسخ فى سلسلة معينة (+) من الحلقة المزدوجة الأبوية. يؤدى ذلك إلى أن تصبح النهاية $5'$ منفصلة عن الحلقة المزودوجة وسائبة مما يسمح لانزيم DNA Pol III بإضافة نيوكلتيدات إلى النهاية $3'$ OH الحرة. ومع تقدم شوكة التناسخ فإن النهاية $5'$ للسلسلة المكسورة ستتدحرج وتنسحب كذيل حر يزداد طولاً مع استمرار

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

التناسخ (الشكل ٣-٢٠). يتم تغطية هذا الذيل بسرعة ببروتينات SSB لمنع التواءه أو التفافة. ويسمى هذا التركيب التناسخى "الدائرة المتدحرجة" Rolling circle لأن امتداد واسترخاء الذيل 5' وحيد السلسلة ينتج عن دوران الحلزون المزدوج القالب حول محوره. ولا يتسبب هذا الانفكاك فى أى مشاكل توبولوجية Topological حيث أن الدائرة تظل متماسكة بسلسلة واحدة من د. ن. أ مما يعطية حرية الحركة حول الروابط التساهمية الكثيرة الموجودة فى الهيكل الأساسى.

عند استخدام ميكانيكة الدائرة المتدحرجة لتناسخ د. ن. أ المزدوج فإن النهاية 5' (الذيل) المفردة السلسلة تتحول بسرعة إلى حلزون مزدوج نتيجة لتكوين شظايا أوكازاكى عليها. يحتمل أن القوة المتحركة لاستمرار عملية فك الذيل 5' من الدائرة المتدحرجة ليست ناتجة عن تفاعلات البلمرة التى تحدث على النهاية OH 3' ولكنها ناتجه عن حركة الريبليوسوم المدفوع بمكوناته من الهليكيزيز (الشكل ٣-٢٠).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



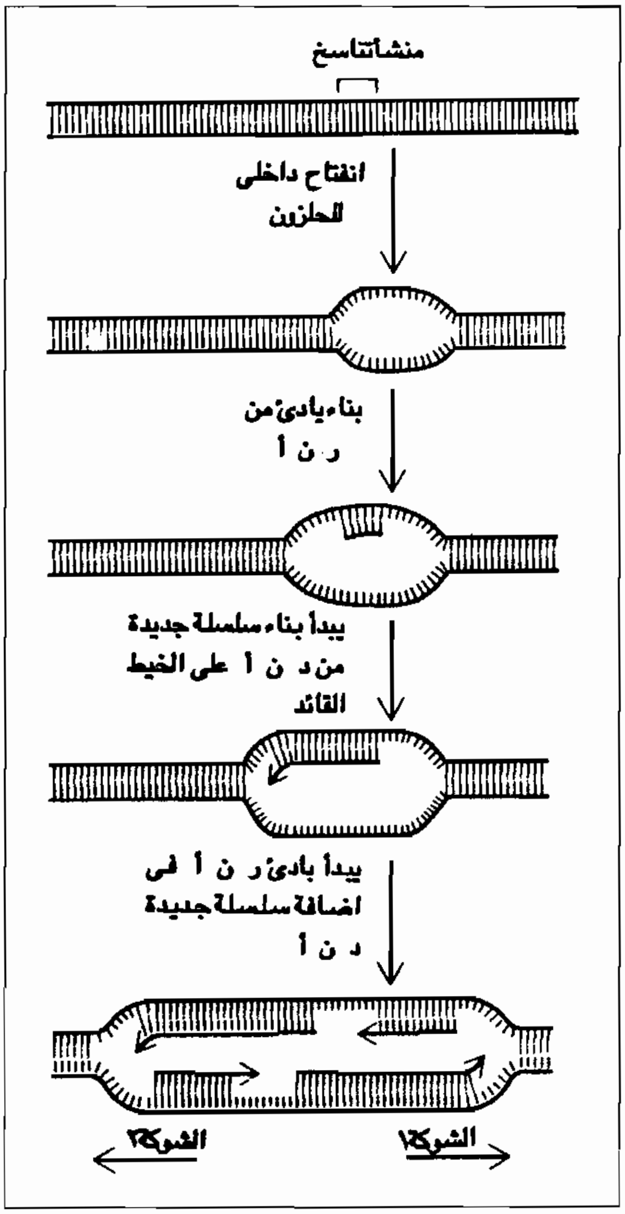
الشكل (٣-٢٠): ميكانيكية الدائرة المتدحرجة لتناسخ جزئ د ن أ الحلقي القوة المؤدية إلى فك حلزنة الذيل '5 تنتج من حركة الريبليوسوم المدفوع بمكوناته من الهيليكيزيز

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بدء شوكات التناسخ عند منشأ التناسخ:

تبدأ شوكات التناسخ فى كل من البكتريا والثدييات عنـد تركيـب معـين يعرف بفقاعة التناسخ Replication Bubble وهى منطقة على جزئ د. ن. أ يتم فيها انفصال السلسلتين المستخدمتين كقالب لبناء د. ن. أ (الشكل ٣-٢١) وقـد تبين أن هذه الفقاعة تتكون عند تتابع محدد من القواعد على الجزئ يعرف بمنشأ التناسخ Replication Origin والذى يبلغ طوله حوالى ٣٠٠ نيوكلتيـده. توجـد مناشئ تناسخ مشابهة فى كروموسومات مميزة النواة ولو أنه لم تتحدد تتابعاتهـا بدقة بعد .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

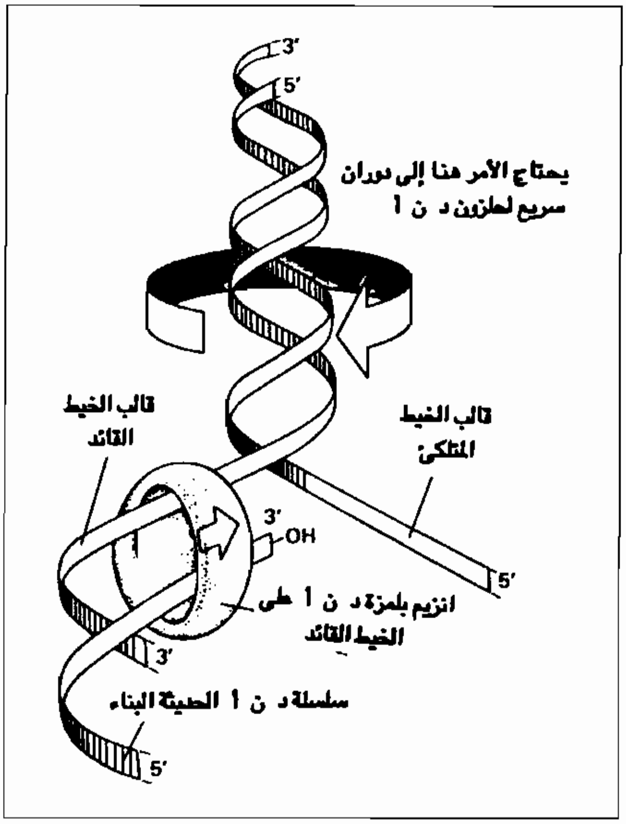


الشكل (٣-٢١): رسم تخطيطي للعمليات التي تجرى لبدء تكوين شوكات التناسخ عند منشأ التناسخ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تبين فى التجارب المعملية *In Vitro* أن بدء شوكة التناسخ فـــى البكتريـــا والفيرس تبدأ بالطريقة المبينة فى الشكل (٣-٢٢) حيث ترتبط نسخ عديدة مـــن البروتين المستبدئ Initiator Protein بمواقع معينة عند منشأ التناســـخ لتكـــوين معقد بروتينى كبير. يربط هذا المعقد انزيم الهيليكيز فى منطقة مفردة السلـــسلة من د. ن. أ القالب فى منطقة قريبة من الحلزون. كما يتم ارتباط انزيم بريميـــز DNA Primase ويتكون البريموسوم الذى يتحرك بعيداً عن المنشأ ويتكون بادئ من ر. ن. أ الذى يبدأ السلسلة الجديدة الأولى من د. ن. أ يؤدى ذلك إلى تجمع سريع لبقية بروتينات التناسخ لتكوين معقدات بروتينية للتناسخ تتحرك بعيداً عن نقطة المنشأ فى الاتجاه المضاد (الشكل ٣-٢٢). تستمر عملية التناســـخ ثنائيـــة الاتجاه حتى ينتهى تناسخ كل قالب د. ن. أ الذى يسبق كل شوكة. تتحرك كـــل شوكة بعيداً عن المنشأ بمعدل حوالى ٥٠٠ نيوكلتيدة فى الثانية الواحـــدة حتـــى ينتهى تناسخ جزئ د. ن. أ بأكمله ويستغرق ذلك فى البكتريا حـــوالى ٣٠-٤٠ دقيقة فقط.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٣-٢٢): عملية فك الحلزنة أثناء تناسخ جزئ د ن أ ولكي يتم تحرك شوكة التناسخ في البكتريا بسرعة ٥٠٠ نيوكلتيدة في الثانية فإن الحلزون المزدوج أمام الشوكة لابد أن يدور بسرعة ٥٠ نيوكلتيدة في الثانية

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفصل الرابع

تناسخ د. ن. أ الكروموسومات
فى الخلايا مميزة النواة

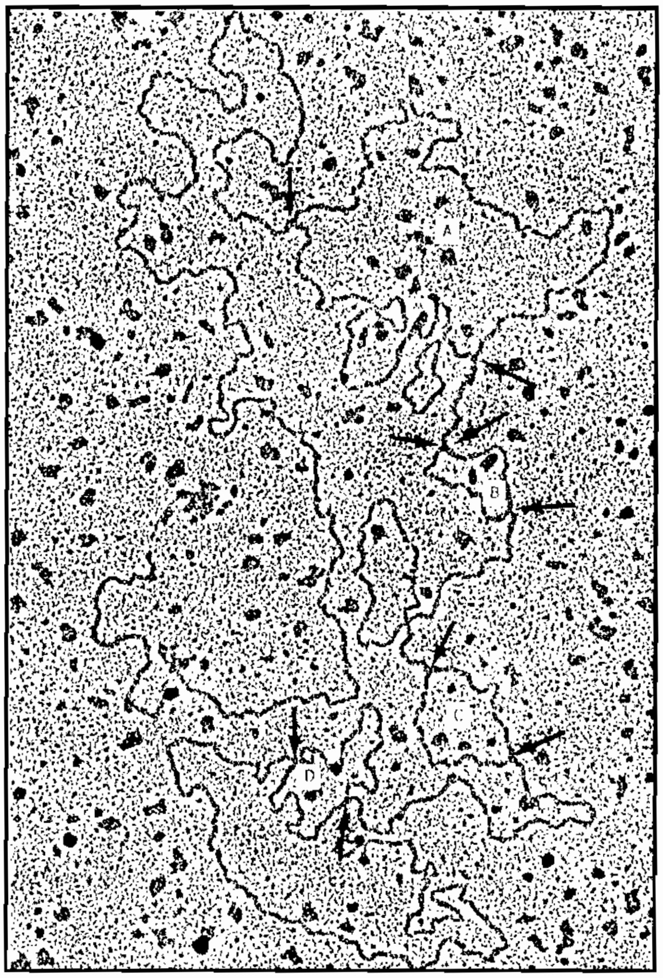
بناء د. ن. أ فى مميزة النواة:

اثبتت البحوث أن عملية تناسخ د. ن. أ فى مميزة النـــواه تـــتم بطريقـــة مشابهة لما يحدث فى البكتريا. ففى كلتا الحالتين يتم فصل (فتح) السلسلتين عن بعضهما عند منشأ التناسخ وتتكون شوكتى تناسخ ويتم بناء د. ن. أ فى اتجاهين متضادين Bidirectional على كل من السلسلة القائد والسلسلة المتلكئة بواســطة انزيم بلمرة د. ن. أ. ويحتاج انزيم بلمرة د. ن. أ فـــى مميـــزة النـــواة نفـــس المتطلبات الاساسية مثل ما يحدث فى البكتيريا وهى : أربعة نيوكلتيدات وقالب من د. ن. أ وبادئ Primer إلا أنه نظراً لان جينومات مميزة النواة تحتوى كـــل خلية منها على كمية كبيرة جداً من د. ن. أ مقارنه بالبكتريا (مثال 4.6 Mbp فى البكتريا مقابل 120 Mbp فى الدروسفلا و3200 Mbp فى الانسان) ومـــن جهـــة أخرى فإن أطول كروموسوم فى الدروسوفلا يحتـــوى علـــى 65Mbp مقابـــل 4.6 Mbp فى البكتريا وفى نفس الوقت نجـــد أن ســـرعة تناســـخ د. ن. أ فـــى الدروسوفلا تكون بمعدل حوالى ٢٦٠٠ زوج نيوكتيدى فى الدقيقة عند درجـــة 25°م وبذلك لو اقتصر البناء فى الدروسوفلا على شوكة تناسخ واحدة فإن معنى ذلك أن يستغرق تناسخ د. ن. أ لهذا الكروموسوم ١٧,٥ يوماً. وبشوكتى تناسخ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تتحركان فى اتجاهين متضادين من منشأ مركزى فإن هذا الكروموســوم ســيتم تناسخة فى ٨,٥ يوماً. ولكن لو عرفنا أن كروموسومات جنين الدروسوفلا يــتم تناسخها فى ٣ إلى ٤ دقائق فقط وأن انقسام النواة يحدث مرة كل ٩ إلــى ١٠ دقائق فى مرحلة الانقسام المبكر Early Cleavage Division ، فإن ذلك يحــتم علينا أن نفترض وجود عدد كبير من مناشئ التناسخ على طول كل كروموسوم فى الدروسوفلا وغيرها من مميزة النواه حتى يمكن ان تــتم عمليــة التناســخ بالسرعة المطلوبة أثناء دورة أنقسام الخلية وخاصة أنها تتم أثناء دور البنــاء S فقط والتى تمثل فترة زمنية محدودة فى دورة الخلية. فى حين أنه فى البكتريــا، يحدث تناسخ د. ن. أ بدون توقف أثناء دورة الخلية. وفى الحقيقــة فإنــه لكــى يحدث اتمام تناسخ كروموسوم الدروسوفلا فى ٣,٥ دقيقة فلابد أن يحتوى مثــل هذا الكروموسوم على حوالى ٧٠٠٠ شوكة تناسخ موزعة على مسافات متساوية على طول جزئ د. ن. أ وقد اثبتت التجارب ذلك بالفعل حيث أمكــن بفحــص جزئ د. ن. أ فى الدروسوفلا تحت المجهر الالكترونى، التحقق من وجود عدد كبير من شوكات التناسخ (الشكل ٤-١) والتى تعمل فى وقت واحد. إلا أنه من الواضح ، كما سيأتى بعد ، أن عدد شوكات التناسخ لكل كروموسوم ليس ثابتــاً فى كل مراحل النمو والتكوين فى مميزة النواة أذ أن التناسخ يستبدأ فى مواقــع كثيرة فى الفترة الجنينية حيث يكون الانقسام الخلوى سريعاً جداً وذلك مقارنــة بأعداد أقل في المراحل المتأخرة من التمايز.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



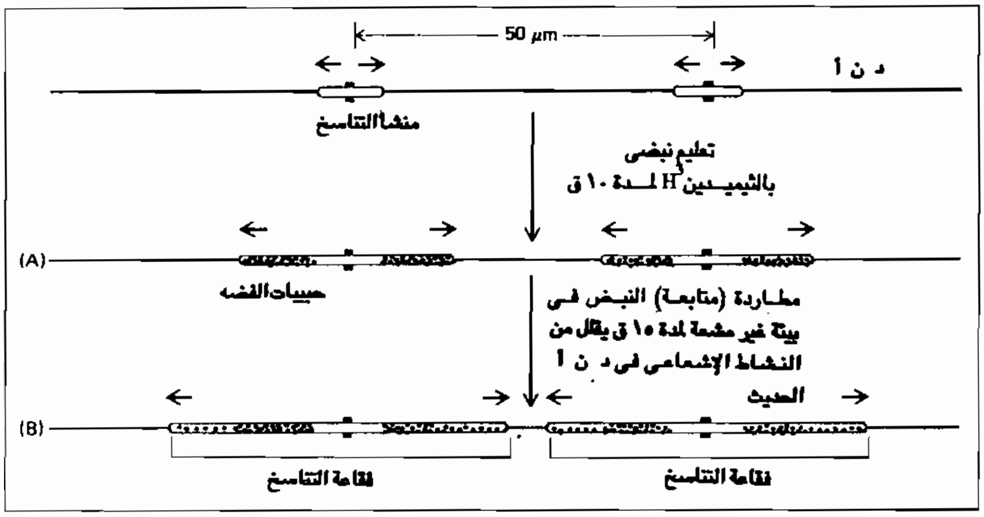
الشكل (٤-١): صورة بالمجهر الإلكتروني لجزئ د ن أ في الدروسفلا يبين مواقع متعددة للتناسخ ويظهر في هذا الشكل أربعة تركيبات للتناسخ بشكل (-O-) (A إلى D) في جزء من جزئ د ن أن وتشير الأسهم إلى مواقع شوكات التناسخ

وقد تحقق ذلك ايضاً بدراسة الطريقة العامة لتناسخ كروموسوم الإنسان حيث تنمى خلايا الإنسان فى مزرعة خلايا وتعلم لفترة قصيرة بالثيميدين المشع ^{3}H Thymidine بحيث يكون د. ن. أ المتكون خلال هذه الفترة الوجيزة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ذو إشعاع عال. ثم تكسر الخلايا بلطف ويؤخذ د. ن. أ ويفرد بعناية على سطح شريحة زجاجية مبطنة بمحلول تصوير حتى يمكن تحديد طراز د. ن. أ المشع بطريقة التصوير بالإشعاع الذاتى Autoradiography. اختير الوقت المسموح به للتعليم بالإشعاع بحيث تعطى كل شوكة تناسخ فرصة للحركة بمقدار عدة ميكروميترات على طول سلسلة د. ن. أ القالب. يؤدى ذلك إلى إمكان التعرف على د. ن. أ الذى تم تناسخه حيث يظهر على هيئة خطوط من حبيبات الفضة فى صورة الإشعاع الذاتى تحت المجهر الضوئى. بهذه الطريقة يمكن تقدير كل من سرعة واتجاه حركة شوكة التناسخ (الشكل ٤-٢) والذى يتبين منه أن التناسخ يتم فى اتجاهين متضادين. يدل المعدل الذى يتم به زيادة طول د. ن. أ المتناسخ مع زيادة فترة الإشعاع على أن شوكة التناسخ تتحرك بسرعة ٥٠ نيوكلتيده فى الثانية. ويمثل ذلك حوالى $\frac{١}{١٠}$ من السرعة التى تتحرك بها شوكة التناسخ فى البكتريا. وقد يرجع بطء الحركة فى مميزة النواه إلى الصعوبة التى تواجهها عملية تناسخ د.ن.أ فى الكائنات التى يكون فيها د. ن. أ الكروموسومى منضغط فى صورة كروماتين (نيوكليوسوم). وكما سبق الإشارة فإن متوسط طول كروموسوم الإنسان حوالى ١٥٠ مليون زوج نيوكلتيدى ولكى يتم تناسخ مثل هذا الجزئ الكبير من البداية إلى النهاية بشوكة تناسخ واحدة وبسرعة ٥٠ نيوكلتيده فى الثانية فإن ذلك سيستغرق $١٠^{٦} \times ١٥٠ \times ٠,٠٢ =$ ٣×١٠^{٦} ثانية أى حوالى ٨٠٠ ساعة وهو أمر مستبعد بطبيعة الحال.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



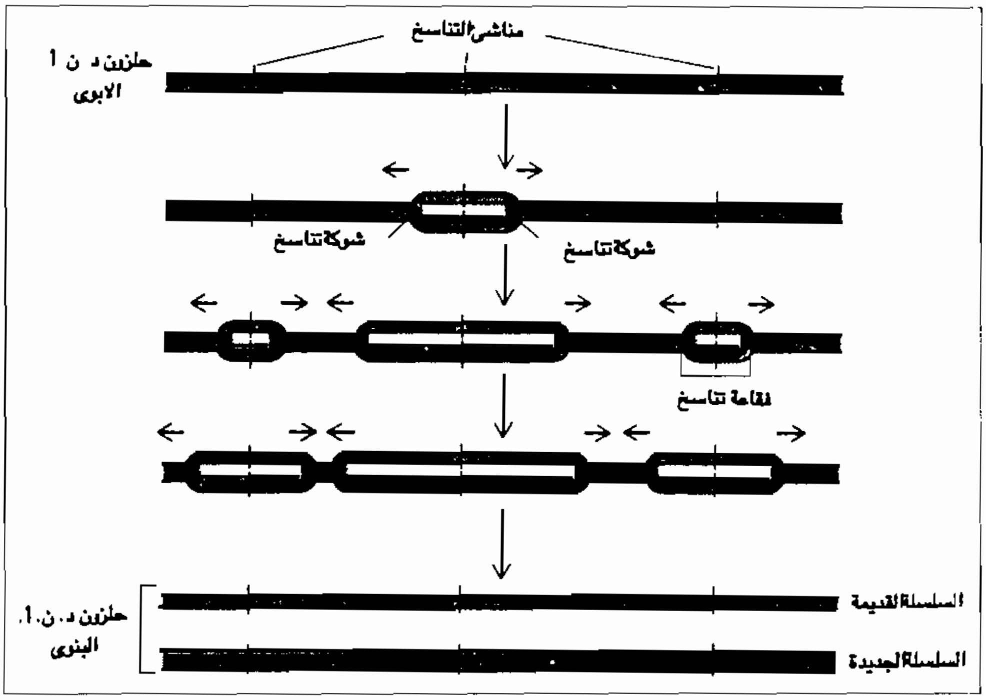
الشكل (٤-٢): إثبات أن حركة شوكة التناسخ تحدث أثناء مرحلة البناء S في مميزة النواة ثم تعليم محدود لـ د ن أ الحديث البناء في الخلايا البشرية بوميض من التيميدين العالي الإشعاع (H^3-Thymidine)

(أ) تم تحليل الخلايا وأجري فرد لـ د ن أ على شريحة زجاجية وتمت عملية التصوير بالإشعاع الذاتي Autoradiography فظهر خط من حبيبات الفضة على د ن أ المشع.

(ب) نفس التجربة في أ فيما عدا أنه إتيحت فترة زمنية أكبر للتحضير في بيئة غير مشعة مما أدى إلى دورات تناسخ متتالية من د ن أ وقد تبين أن أزواج الخطوط الداكنة تحتوي على حبيبات فضة تتدرج بالتناقص في الاتجاهين المتضادين، ويبين ذلك الحركة ثنائية الاتجاه للشوكة من منشأ تناسخ مركزي.

وقد أظهرت صور الإشعاع الذاتي (الشكل ٤- ٣) أن هناك عدد كبير من شوكات التناسخ تتحرك في وقت واحد على كل كروموسوم من مميزة النواة. بالإضافة إلى ذلك فإنه توجد عدة شوكات تناسخ توجد بالقرب من بعضها البعض في نفس منطقة د. ن. أ في حين تخلو بعض مناطق أخرى من أي شوكات تناسخ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٤-٣): طراز تناسخ د ن أ في كروموسوم مميزة النواة حيث تكون مناشئ التناسخ موزعة على مسافات من ٣٠,٠٠٠ إلى ٣٠٠,٠٠٠ زوج نيوكلتيدي في معظم الخلايا ويعتقد أن شوكة التناسخ تتوقف فقط عندما تتقابل مع شوكة تناسخ تتحرك في الاتجاه المضاد أو عندما تصل إلى نهاية الكروموسوم، وبهذه الطريقة فإن كل الكروموسوم يتم تناسخه

وقد أثبتت عدة تجارب لاحقة ما يأتي:

١- أن كل كروموسوم يمكن أن يحتوى على عدة الاف من مناشئ التناسخ.

٢- أن مناشئ التناسخ تميل إلى العمل فى مجاميع تسمى وحدات التناسخ Replication Units وتتكون كل وحدة من حوالى ٢٠ إلى ٨٠ منشأ تناسخ.

٣- يبدأ نشاط وحدات التناسخ خلال مرحلة S فى الميوزى ويستمر حتى يتم تناسخ جزئ د. ن. أ الكروموسومى بأكمله.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٤- داخل وحدة التناسخ الواحدة تكون المناشئ الفردية على مسافات تبلغ حوالى ٣٠,٠٠٠ إلى ٣٠٠,٠٠٠ زوج نيوكلتيدى من بعضها البعض، وقد يوجد منشأ تناسخ واحد لكل عروة أو نطاق كروماتينى.

٥- كما هو الحال فى البكتريا، تكون شوكة التناسخ فى أزواج وتتكون فقاعة تناسخ وتتحرك شوكة التناسخ فى اتجاهين متضادين بعيداً عن نقطة المنشأ المشتركة وتظل فى الحركة إلى أن تلتقى (رأساً برأس) مع شوكة تناسخ أخرى آتية من الاتجاه المضاد (أو إلى أن تصل إلى نهاية الكروموسوم). بهذه الطريقة يمكن لعدد كبير من شوكات التناسخ أن تقوم بدورها مستقلة على كل كروموسوم بحيث يكتمل بناء جزيئين كاملين من الحلزون المزدوج البنوى على السلسلتين الأبويتين التى يستخدم كل منهما كقالب (الشكل ٤-٣).

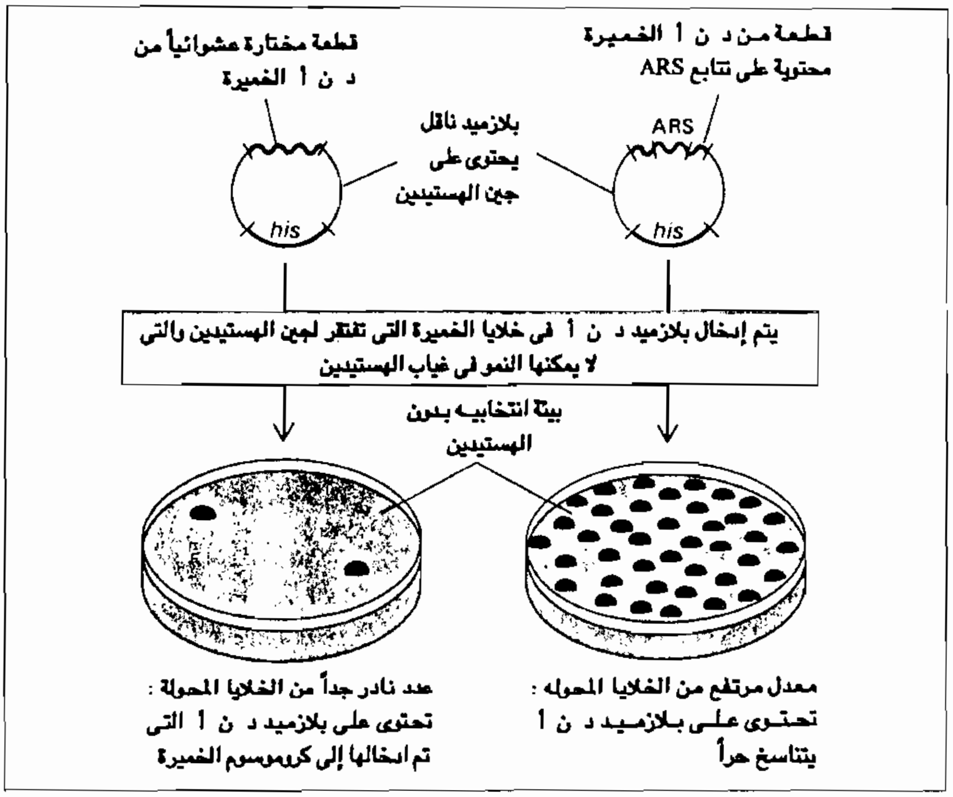
وجود تتابعات محددة من د. ن. أ تميز مناشئ التناسخ:

سبق الإشارة إلى وجود تتابعات محددة فى مناشئ التناسخ فى البكتريا والفيرس، إلا أنه فى مميزة النواة لم تتحدد بصفة قاطعة بعد تتابعات خاصة بمناشى التناسخ ولو أنه توجد أدلة على أن تناسخ د. ن. أ يبدأ فى مواقع محددة وثابته على الكروموسومات فى خلايا الثدييات.

وقد يفيد فى معرفة تتابعات مناشئ التناسخ النظام الذى تمت دراسته بالتفصيل فى خميرة الخباز حيث أمكن إجبار خلايا الخميرة على أخذ د. ن. أ غريب (عملية تحول Transformation) وقد أمكن استخدام عدد من البلازميدات الكشافة لهذا الغرض. ولا تستطيع البلازميدات البكتيرية عادة أن تتضاعف فى الخميرة ولكن عند إضافة تتابعات معينة من د. ن. أ الخميرة إلى هذه البلازميدات فإنها تصبح قادرة على التضاعف. يطلق على هذه التتابعات اسم

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

تتابعـــات التناســـخ الـــذاتي Autonomous Replication Sequences (ARSes) (الشكل ٤-٤).



الشكل (٤-٤): تتابعات التناسخ الذاتي (عناصر ARS) في الخميرة تعمل هذه التتابعات كمناشئ للتناسخ وتمكن البلازميدات التي تحتويها من التناسخ حرة في الخلية المضيفة بدون الحاجة إلى إدخالها إلى كروموسوماتها

يمكن لهذه التتابعات ARSes أن تزيد معدل التناسخ في المعمـــل *in vitro* باستخدام مستخلص الخميرة في حين توجد في الخلية *in viro* عناصـــر ARSes أخرى في الجينوم تتناسخ في أوقات معينة أثناء دور S في الخميـــرة. تبـــين أن

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ARSes المُدخلة Inserted فى البلازميد تتناسخ فى نفس الوقت الذى يــتم فيــه تناسخ مثيلاتها الموجودة فى الكروموسوم.

على الرغم من أن هذه الأدلة غير مباشرة إلا أنها تقترح أن ARSes قد تكون هى المناشئ الحقيقة للتناسخ فى الكروموسومات. ويبــين الــشكل (٤-٥) تتابع جزء قصير طوله ٥٧-٤٩ زوج من القواعد من د. ن. أ الخميــرة التــى وجد أنها كافية لأعطاء البلازميد خاصية التناسخ الذاتى. يوجــد تتــابع قــصير مشترك محفوظ Consensus وهام فى حين أن بقية التتابعات لا تبدى تناظر كبير على الرغم من أهميتها الوظيفية ويكون التناظر قصيراً لدرجة لا يمكــن توقــع حدوث تهجين خلطى بين تتابعات ARSes فى الجينوم.

```
  consensus:  ATTTATATTTA
              T    G   T

  aaaagtaaaaTTTaATATTTTggatgaaaaaaaccattttagacttttcttaact
    *      *   * * *  * *  * * * * *   * *  * * * * *    * *   *   *   *
gatcattgtatgTTTTATGTTTTgtctggaaaaacatatagtacggata
```

الشكل (٤-٥): التتابعات المتناظرة بين عناصر ARS في نوعين من الخميرة، تدل النجون (*) على مواقع التناظر وتمثل الحروف الكبيرة أفضل تناظر للتابع المحفوظ فى ARS الخميرة

وجد أن عدد هذه التتابعات ARSes فى جينوم الخميرة يوجد بتكرار مساو للتكرار المتوقع لمناشئ تناسخ الخميرة (أى حوالى مــرة كــل ٤٠,٠٠٠ زوج نيوكلتيدى).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ضوابط لمنع تكرار بدء التناسخ فى الخلايا مميزة النواة:

يوجد فى كل مجموعة كروموسومية حوالى ٣٠,٠٠٠ منشأ تناسخ يتم تنشيطها بالتتابع على مدى عدة ساعات فى دور S فى دورة الخلية إلا أنه لكى يتم تناسخ د. ن. أ بدقة فلابد للخلية أن تضمن أن كل منشأ تناسخ لا يستخدم الا مرة واحدة فقط فى كل دورة خلية. إن منع تكرار بدء التناسخ فى الدورة الواحدة عملية هامة جداً وأساسية فى تناسخ مميزة النواة وتمثل فرق جوهرى بينها وبين غير مميزة النواه. حيث أنه عند منتصف دور S تكون بعض أجزاء من الكروموسوم لم تبدأ بعد فى التناسخ فى حين تكون أجزاء أخرى قد أتمت تناسخها تماماً. يتطلب ذلك متابعة دقيقة عند منتصف وفى آخر دور S.

إن مناشئ التناسخ التى استخدمت بالفعل قد تم ايضاً تناسخها وهى على درجة كبيرة من التشابة فى تتابعها على الأقل مع مناشئ التناسخ الأخرى التى لم يأت عليها الدور لبدء التناسخ بعد.

ولكن الخلية لا تحتاج إلى استخدام كل منشأ تناسخ مرة واحدة فى كل دورة خلية فى الدور S فكيف يمكن التمييز بين هذه المناشئ لمنع تكرار استخدامها؟

أمكن باستخدام تقنية الدمج الخلوى Cell Fusion التوصل إلى بعض التفسير.

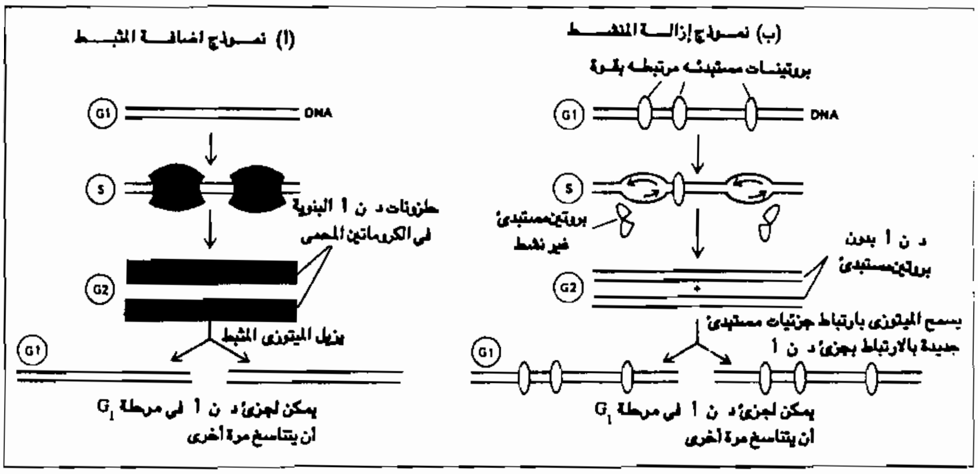
فعندما تم دمج خلية فى دور S مع خلية فى دور G1 فإن عملية بناء د. ن. أ تستحث فى نواة الخلية G1 مما يشير إلى أن التحول من الدور G1 إلى S تم بواسطة عامل منشط لعملية بناء د. ن. أ وقابل للأنتشار Diffusable من

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الخلية S إلى الخلية G1. من جهة أخرى، عندما تم دمج خلية فـــى دور S مـــع خلية فى دور G2 (أى خلية اتمت للتو دور S) فقد وجد أن النواة فى الخلية G2 لم تستحث لبناء د.ن.أ. نظرا لأن عملية البناء مستمرة بدون عوائق في النـــواه في دور S .ولذلك فإن النواه في دور G2 التى أتمت بناء كل د. ن. أ الخاص بها مرة واحدة تبدو كما لو كانت ممنوعة من الدخول فى دورات جديـــدة مـــن التناسخ فى نفس دورة الخلية وذلك بواسطة عوامل مثبطة غير قابلة للأنتـــشار Non Diffusible والتى تكون مرتبطة بشدة بجزئ د. ن. أ الخاص بها.وإذا تمت إضافة هذا المثبط داخلياً إثناء دور S فى أعقاب كل شوكة تناسخ فإنـــه ســـيحل مشكلة عدم تكرار تناسخ منطقة المنشأ أكثر من مرة فى دورة الخلية الواحـــدة، وذلك عن طريق إحداث تعديل فى الكروماتين الخاص بـــ د. ن. أ الـــذى تـــم تناسخه حديثاً وبذلك نضمن أن الجزء من د. ن. أ الذى تم تناســـخه مـــرة لـــن يتكرر تناسخه مرة أخرى فى نفس دور S كما فى الشكل (٤-٦أ).

يوجد تفسير أخر يعتمد على افتراض وجود بروتين بادئ مـــرتبط بـــشدة يحدث له إيقاف لنشاطه inactivation عند مرور شوكة التناسخ (الـــشكل ٤-٦ ب).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٤-٦): ميكانيكيتين بديلتين لتفسير "مانعات إعادة التناسخ" التي تحمي د ن أ المنسوخ حديثًا من تكرار تناسخه في نفس دورة الخلية، وهذه المواقع ضرورية للمحافظة على دقة التناسخ إلا أن الطبيعة الجزيئية لها غير معروفة، تزال عادة الموانع أثناء الانقسام الميتوزي إلا أنه في بعض الأنواع القليلة من الخلايا المتخصصة (مثل خلايا الغدد اللعابية ليرقات حشرة الدروسفلا) فإنه يتم إزالتها بدون الميتوزي مما يؤدي إلى تكوين الكروموسومات البوليتينية العملاقة

(أ) نموذج يعتمد على إضافة مثبط إلى كل الكروماتين المتناسخ حديثًا.

(ب) نموذج يعتمد على الارتباط القوي لبروتين محفز (منشط) الذي يعمل مرة واحدة فقط والذي يمكن إضافته إلى د ن أ أثناء الميتوزي فقط.

وبغض النظر عن طبيعة هذا العامل المثبط لتناسخ د. ن. أ فإنه لابد من إزالته عند أو قبيل بدء فترة الميتوزى حيث أنه بعد أنقسام الخلية لا توجد حماية لـ د. ن. أ البنوى فى النواة فى دور G_1.

تضاعف النيوكليوسومات عند شوكات التناسخ:

Duplication of Nucleosomes at Replication Forks

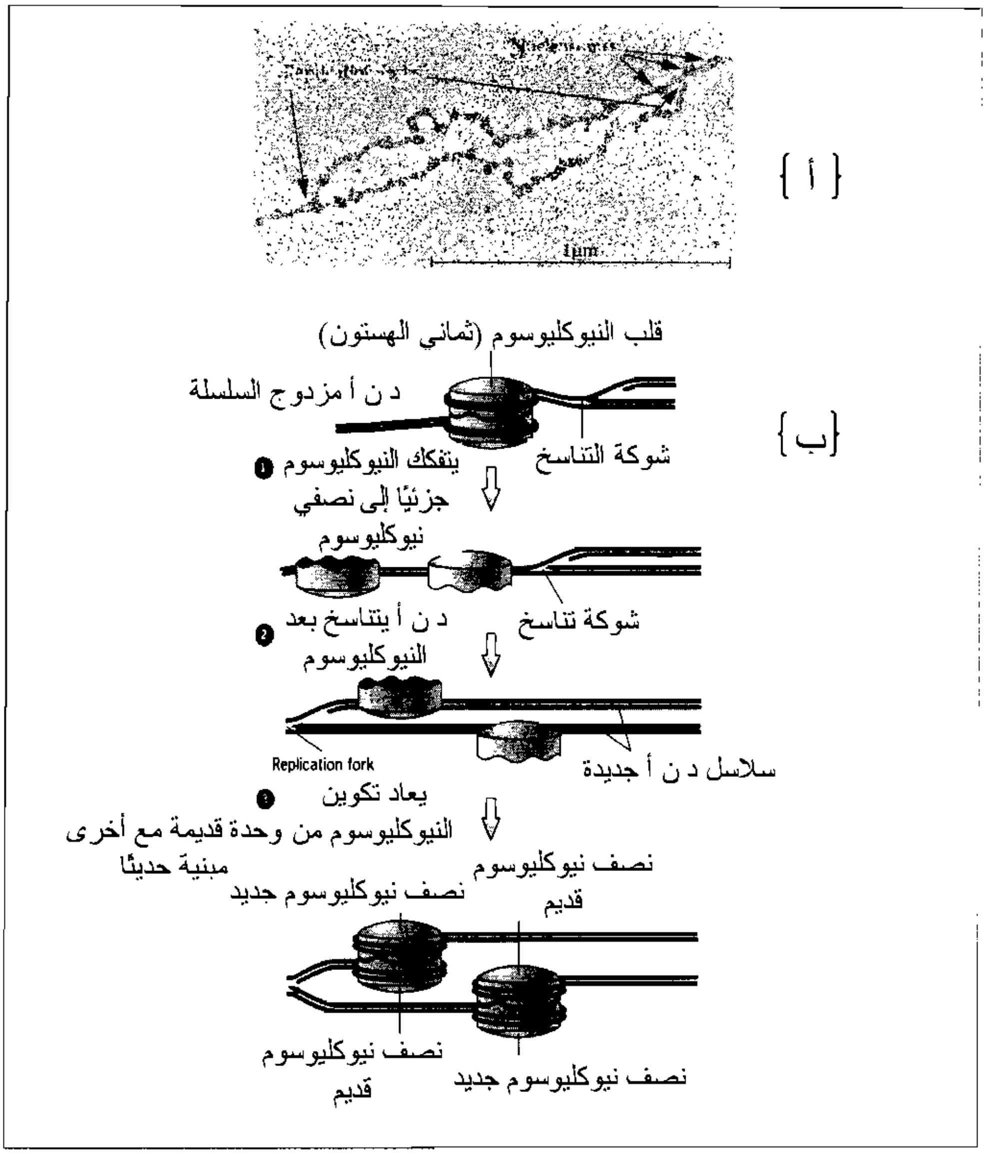
حيث أن د. ن.أ مميزة النواة فى الدور البينى يكون معبأ فى نيوكليوسومات (قطر كل منها ١٠ نانو ميتر) ويحتوى كل نيوكليوسوم على

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

١٦٦ زوج نيوكليتدى ملتف فى دروتين حول ثمانية جزيئات من الهستون. وعند الاخذ فى الاعتبار حجم النيوكليوسومات والحجم الكبير للريبليوسوم Repliosome، فأنه كان من غير المتوقع أن تتحرك شوكة التناسخ من خلال نيوكليوسوم كامل إلى الجانب الاخر له الا أن صور المجهر الالكترونى للكروماتين أثناء تناسخة فى الدروسفلا قد بينت بوضوح إحتفاظ النيوكليوسومات بتركيبها الطبيعى وبنفس المسافات على جانبى شوكات التناسخ (الشكل ٤-٧أ). أى أن النيوكليوسومات تبدو بنفس التركيب والمسافات خلف شوكات التناسخ مباشرة (Post-Replicative DNA) بالضبط كما كانت أمام شوكات التناسخ (Pre-Replicative DNA).

وعلى ذلك فقد تم اقتراح عدة نماذج للتغيرات المرحلية Transient فى تركيب النيوكليوسوم والتى تسمح للريبليوسوم ببناء د. ن. أ عند وصوله الى النيوكليوسوم. حيث يفترض أن النيوكليوسوم. ينقسم بصورة مؤقتة إلى نصفى نيوكليوسوم أثناء مرور الريبليوسوم خلاله ثم يحدث اعادة تجميع لهذين النصفين فى نيوكليوسوم كامل خلف شوكة التناسخ (الشكل ٤-٧ب).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٤-٧): تحرك شوكة التناسخ بعد النيوكليوسوم

(أ) صورة بالمجهر الإلكتروني تبين النيوكليوسومات على جانبي كل شوكة تناسخ في الدروسفلا.

(ب) نموذج لتحرك شوكة التناسخ بعد النيوكليوسوم.

وبصرف النظر عن الميكانيكية التى تتحرك بها شوكة التناسخ خلال النيوكليوسومات فإن تناسخ د. ن. أ. وتجميع النيكليوسومات تكون مقترنة coupled بشدة في مميزة النواه حيث يحتاج تضاعف (تناسخ) الكروماتين أثناء دورة الخلية مميزة النواة إلى كمية من الهستونات الجديدة تساوى تقريباً كمية د. ن. أ المتناسخ حديثاً. لهذا السبب نجد أن معظم مميزات النواة يحتوى جينومها على نسخ عديدة لكل من جينات الهستونات. ففى الفقاريات على سبيل المثال يوجد حوالى ٢٠ مجموعة متكررة وتحتوى كل مجموعة على الجينات الخمسة المنتجة للهستونات. وعلى العكس من معظم البروتينات التى يتم بناؤها بصورة مستمرة أثناء الدور البينى، نجد أن الهستونات يتم بناؤها اساساً فى دور S فقط حيث يرتفع خلالها مستوى mRNA للهستونات إلى حوالى ٥٠ ضعف كنتيجة لزيادة معدل النسخ من جهة وانخفاض معدل هدم mRNA. من جهة أخرى ونتيجة للتركيب غير العادى للنهاية '3 (لإنعدام وجود ذيل Poly A كما سيأتى بعد) نجد أن معظم أنواع mRNA الخاصة بالهستونات تكون غير مستقرة بصورة غير عادية وقصيرة العمر بحيث تنهدم خلال دقائق عندما يتوقف بناء د. ن.أ عند نهاية الدور S (أو عند إضافة مثبطات لايقاف بناء د. ن.أ قبل الأوان). وعلى العكس من ذلك، نجد أن جزيئات الهستونات نفسها تكون مستقرة وثابته ويمكن أن تستمر بدون هدم طول عمر الخلية. وقد يكون الارتباط الوثيق بين بناء د. ن.أ وبناء الهستونات راجعاً ولو جزئياً إلى ميكانيكية التغذية الرجعية Feedback التى تتحكم فى مستوى الهستون الحر لضمان أن كمية الهستون الناتجة مناسبة لكمية د. ن.أ المنتجة.

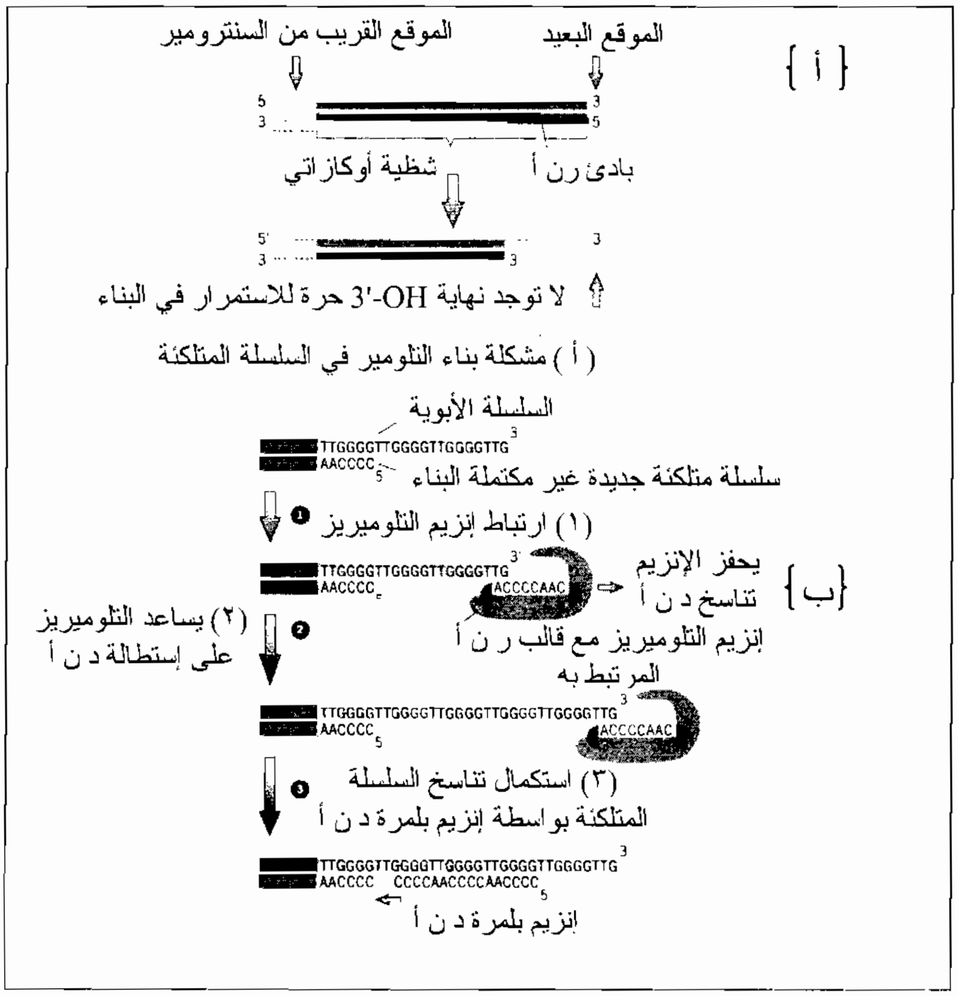
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تناسخ منطقة التلومير فى الكروموسوم:

من بين الفروق الرئيسية بين تناسخ د. ن.أ في غير مميزة النواه ومميزة النواه طبيعة تركيب الكروموسومات فى كل منها.فعلى العكس من الكروموسوم الحلقى المقفول فى البكتريا نجد أن كروموسومات مميزة النواه تكـون خطيـة. وعند تناسخها فإنها تواجه بمشكلة خاصة عند نهاياتها الطرفية المفتوحة والتـى يطلق عليها منطقة التلومير Telomere. وبينما يستمر البناء بصورة طبيعية الى نهاية الخيط القالب، تنشأ صعوبة على الخيط المتلكئ عندما تـتم ازالـة ر. ن.أ البادئ(الشكل ٤-٨) وقد تم حل هذه المشكلة بدراسة انـزيم خـاص بمنطقـة التيلومير ويطلق عليه انزيم تيلوميريز Telomerase حيث وجد انه يحتوى فـى تركيبة على تتابع قصير من ر. ن.أ وقد استخدم تيلومير الطفيل *Tetrahymena thermophilia* الذى يحتوى على تتابعات مترادفه من GGGTTG فـى معرفـة كيفية اضافة نهايات نيوكلتيدية محددة إلـى الكروموسـومات بواسـطة انـزيم التيلوميريز.

يتعرف انزيم التلوميريز على تتابعات التلومير الغنية فى القاعدة G فـى النهاية المفردة السلسلة 3'-overhang مما يؤدى إلى استطالتها فى الاتجاه 3'→5' بمعدل وحدة تكرارات مترادفه فى كل مرة. وكما سبق القول، تبـين أن انـزيم التلوميريز يعد فريداً فى احتوائه على سلسلة قصيرة من قالـب ر. ن.أ ضـمن تركيبة. وبعد اضافة عدد من وحدات التكرارات المترادفة اعلاه بواسـطة هـذا الانزيم، فإن انزيم بلمرة د. ن.أ يقوم ببناء الخيط المكمل. وبدون نـشاط انـزيم التلوميريز فإن الكروموسومات الخطية Linear ستتوالى فى القصر واذا اسـتمر حذف هذه الاجزاء الطرفية بحيث تصل إلى جين أو جينات ضـرورية لحيـاة الكائن فإن ذلك قد يؤدى إلى موته.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٤-٨): تناسخ منطقة التيلومير في كروموسوم Tetrahymena

(أ) نتيجة لعدم وجود نهاية 3'OH حرة عند نهاية سلسلة البادئ، فإن إنزيم بلمرة د ن أ لا يمكنه استبدال بادئ ر ن أ الذي يبدأ منه بناء د ن أ عند نهاية السلسلة المتلكئة.

(ب) يتم تناسخ نهايات هذه الكروموسومات بإنزيم خاص يسمى تيلوميريز الذي يمنع نهايات الكروموسومات من أن تصبح أقصر وأقصر مع كل دورة تناسخ ويتم تحديد تتابع النيوكلتيدات عند نهايات السلسلة المتلكئة بواسطة جزئ قصير من ر ن أ والموجود كمكون أساسي لإنزيم التيلوميريز.

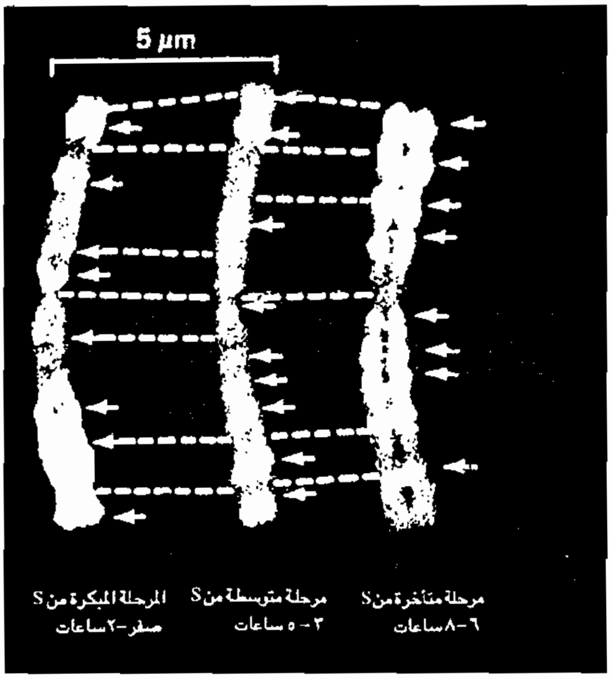
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تتابع تناسخ مناطق د. ن. أ المختلفة خلال فترة البناء (S):

إن اتمام تناسخ جزئ د. ن.أ فى المنطقة بين منشأ التناسخ والمنشأ الــذى يليه يحتاج إلىحوالى ساعة فقط إلا أنه وجد أن دور S يستغرق عــادة حــوالى ثمانى ساعات فى خلية الثدييات. يشير ذلك إلى أن مناشئ التناسخ لا تنشط فــى نفس الوقت وأن د. ن.أ فى كل وحدة تناسخ (المحتوية علــى مجموعــة مــن ٢٠-٨٠ منشأ كما سبق القول) يجرى تناسخها فى فترة قصيرة فقــط مــن دور البناء (S) والسؤال الأن هو :هل يتم تنشيط وحدات التناسخ المختلفــة بطريقــة عشوائية أم يوجد نظام معين يتم على أساسه تنشيط التناسخ فى المناطق المختلفة من الجينوم طبقاً لترتيب أو تتابع زمنى معين؟

أمكن الاجابة على هذا السؤال باستخدام مــشابه الثيميــدين Thymidine\ Analog وهو Bromodeoxyuridine -5 (Brdu) لتعليم مجموعة من الخلايا على فترات قصيرة محددة أثناء دور البناء (S). وفى دور (M) يمكن تمييــز تلــك المناطق من الكروموسومات الميتوزية التى أخذت Brdu فى بناء د. ن.أ حيــث أنها تكون أقل قابلية للصبغ بواسطة صبغات خاصة (الشكل ٤-٩).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٤-٩): صورة بالمجهر الضوئي للكروموسومات الميتوزية المصبوغة التي تم فيها تعليم مغاير Differentially د ن أ المتناسخ أثناء فترات محددة في دورة S السابقة

في هذه التجارب تنمو الخلايا في مزرعة وفي وجود البرومو ديوكسي يوريدين (Brdu) ويتم تعليمها لفترة وجيزة بالثيميدين أثناء الفترة المبكرة والمتوسطة والمتأخرة من دورة S، وحيث أن د ن أ المتكون أثناء فترة التعليم بالثيمدين يكون حلزون مزدوج بحيث يكون الثيميدين في سلسلة وBrdu على السلسلة الأخرى، فإنه يصبغ بشدة ويكون داكنًا عن بقية د ن أ (الذي يحتوي على Brdu على كلا السلسلتين)، فيظهر كحزمة لامعة (الأسهم) في هذه الصور السالبة، توصل الخطوط المتقطعة المواقع المقارنة على النسخ الثلاثة للكرموسوم المبين

يتم تناسخ مناطق الهيتروكروماتين متأخراً فى فترة البناء (S):

من المعروف أنه توجد على طول جزئ د. ن.أ فى مميزة النواة منـــاطق أكثر تكثفاً عن المناطق الآخرى كما هو الحال فى مناطق الهيتروكروماتين الذى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يظل فى حالة تكثف شديد Highly Condensed أثناء الدور البينى. فى حين نجد أن الكروماتين النشط يأخذ شكلاً غير متكثف، الذى يبدو أنه مناسباً لنسخ ر. ن.أ عليه. يمكن تفسير الميكانيكية التى تحدد توقيت تناسخ د. ن.أ من خلال ملاحظة أن مناطق الهيتروكروماتين، بما فيها المنطقة المحيطة بالسنترومير والتى تظل متكثفة خلال الدور البينى، يتم تناسخها متأخراً جداً فى دور البناء S. يمكن أن يعزى هذا التناسخ المتأخر إلى تكثيف د. ن. أ بشدة فى الكروماتين.ويدعم هذا الاستنتاج الاختلاف فى توقيت تناسخ كروموسومى X فى إناث الثدييات. إذ على الرغم من أن هذين الكروموسومين يحتويات على نفس تتابع د. ن.أ إلا أننا نجد أن واحداً منها فقط يكون نشطاً فى حين يظل الأخر خاملاً. وجد أن معظم مناطق X فى الكروموسوم الخامل يكون متكثفاً بشدة فى شكل هيتروكروماتين، ويتم تناسخ د. ن. أ الخاص به فى مرحلة متأخرة ويتم تناسخه ببطء على مدى فترة S في حين أن تلك المناطق من الجينوم التى يكون الكروماتين فيها أقل تكثفاً أثناء الدور البينى تكون الأكثر تعرضاً لميكانيكيات التناسخ فى مراحل مبكرة من فترة البناء S.

تظهر صور الإشعاع الذاتى أن شوكات التناسخ تتحرك بسرعات متناسبة خلال فترة البناء S بحيث أن مدى تكثف د. ن.أ لا يؤثر على شوكات التناسخ بعد تكوينها. يبدو أن الترتيب الذى يتم به تنشيط مناشئ التناسخ يعتمد (على الأقل جزئياً) على تركيب الكروماتين فى المنطقة التى يوجد بها هذا المنشأ.

تناسخ الجينات الأكثر نشاطاً يتم فى مرحلة مبكرة جداً من فترة S:

توجد مجموعة من الجينات التى تنشط بصفة عامه فى جميع الخلايا بدون تخصص خلوى ويطلق عليها الجينات غيرالمتخصصة House Keeping Genes

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

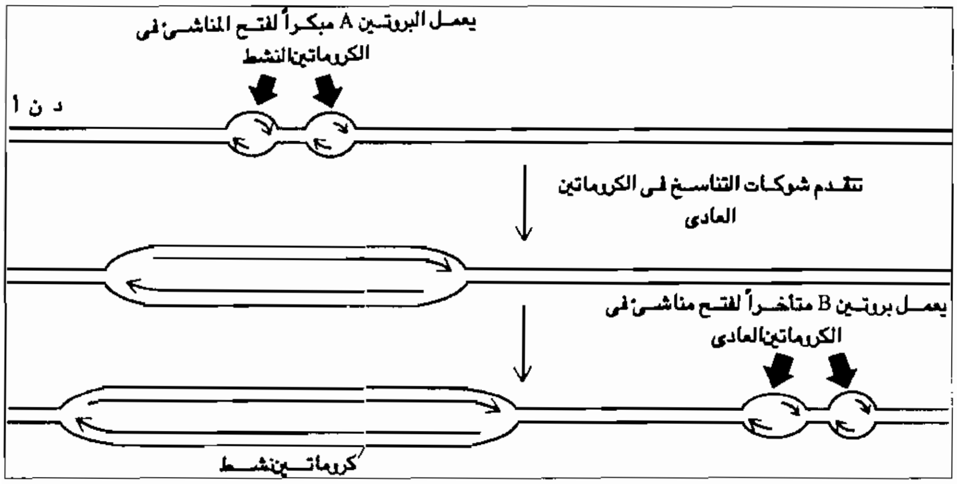
"الشغالة" وهى تختلف عن الجينات الآخرى التى لا تنشط إلا فى خلايا نوعية (Spatial Development) أو فى مرحلة معينة من عمر الكائن (Temporal Development).

تبين أن هذه المجموعة من الجينات يتم تناسخها فى مرحلة مبكرة من فترة S. فقد أجريت تجارب تبين فيها أن هذه الجينات تتناسخ فى جميع أنواع الخلايا التى أختبرت فى أولى مراحل فترة S، فى حين أن مجموعات الجينات التى تنشط فى بعض أنواع من الخلايا المتخصصة فقط يتم تناسخها مبكراً فى هذه الخلايا المتخصصة فقط فى حين يجرى استنساخها متأخراً فى أنواع الخلايا الأخرى. فعند دراسة نشاط جين أحد جلوبيونات المناعة Immunoglobulins ويبلغ طوله حوالى ٣٠٠,٠٠٠ زوج نيوكلتيدى، وجد أن جميع مناطق الكروماتين لهذا الجين قد أكملت تناسخها قرب بداية فترة البناء S فى الخلايا المتخصصة فى إنتاج الأجسام المناعية (Plasma Cells (APC)) وهى تلك الخلايا التى يكون فيها الجين نشطاً جداً، مما يؤيد وجود عدة مناشئ للتناسخ داخل الجين يتم تنشيطها فى نفس الوقت تقريباً. بينما فى الخلايا غير المتخصصة فى انتاج هذه الجلوبيونات المناعية لم تظهر سوى شوكة تناسخ وحيدة حيث بدأت من أحدى نهايتى هذا الموقع الوراثى بعد حوالى ساعة من بداية فترة البناء S ثم تحركت على شريط د.ن.أ بالسرعة العادية وهى ٣٠٠٠ نيوكلتيدة فى الدقيقة الواحدة.

يبين الشكل (٤-١٠) نموذجاً لتفسير ذلك، حيث يتم استخدام جميع مناشئ التناسخ الموجودة فى الكروماتين النشط فى مرحلة مبكرة جداً من فترة البناء S وعند وصول شوكات التناسخ المتكونة عند هذه المناشئ سيتم وصولها فى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

النهاية إلى المناطق الكروموسومية المجاورة المحتوية على كروماتين أكثر تكثفا (هيتروكروماتين). وعلى ذلك فإن أى جين يقع على بعد أقل من مليـــون زوج نيوكلتيدى من منشأ تناسخ فى منطقة الكروماتين النشط سيتم تناسخة فى منتصف فترة S.



الشكل (٤-١٠): نموذج لتفسير لماذا يتم التناسخ للكروماتين النشط مبكرًا في دور S بينما الكروماتين العادي (غير النشط) يتم تناسخه متأخرًا في دور S، يعتقد أن أنواع مختلفة من البروتينات المحفزة ترتبط بمناشئ التناسخ في الكروماتين العادي، وكتفسير بديل قد يتم استخدام مجموعتي المناشئ بواسطة نفس الميكانيكية الجزيئية ولكن في أوقات مختلفة نظرًا لأن التركيب المتكثف (المتحلزن) للكروماتين العادي يؤخر الارتباط الصحيح للبروتينات المشاركة في التناسخ وكتفسير بديل قد يتم استخدام مجموعتي المناشئ بواسطة نفس الميكانيكية الجزيئية ولكن في أوقات مختلفة نظرًا لأن التركيب المتكثف (المتحلزن) للكروماتين العادي يؤخر الارتباط الصحيح للبروتينات المشاركة في التناسخ

لتفسير كيف يتم تناسخ المناطق الكروموسومية غير النشطة والتـــى تقـــع بعيداً عن المناطق النشطة (كما هو الحال فى الكروموسوم X غير النـــشط فـــى الأنثى) فإنه يفترض وجود مجموعة أخرى من مناشئ التناسخ التى تنشط فـــى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

منتصف أو فى أواخر دور S بحيث يمكنها بدء شوكات تناسخ فى أى صـــورة من صور الكروماتين.

تبين أن الجينات غير المتخصصة (الشغالة) Housekeeping Genes تقـــع فى مناطق الكروماتين الغينة فى حزم G-C فى حـــين تقـــع الجينـــات العاديـــة (التخصصية) والتى تنشط فقط فى خلايا متخصصة فـــى منـــاطق الكرومـــاتين الغنية فى حزم A-T.

تنظيم نشاط مناشئ التناسخ حسب المراحل التكوينية للكائن:

وجد أن دورة الخلية تكون سريعة بصورة غير عادية أثناء طور الانفلاج الأول فى معظم الخلايا البيضية التى ينقسم فيها البلاســـتومير بـــدون أى نمـــو للخلية. وتكون فترة البناء S قصيرة بشكل ملحوظ أثناء هذا الطور التفلجى. من جهة أخرى توجد حالات تكون فترة S فيها طويلة جداً، حيث نجـــد أنـــه فـــى المرحلة السابقة مباشرة للميتوزى تكون فترة S طويلة جداً فى جميع الكائنـــات التى درست حتى الآن. وعلى سبيل المثال فى سمندل الماء Newt تستغرق فترة S ساعة واحدة فى مرحلة البلاستولا، فى حين تستغرق حوالى ٢٠ ساعة فـــى الخلايا الجسدية الناضجة وتصل إلى حوالى ٢٠٠ ساعة فى المرحلة التى تسبق الميتوزى فى الخلايا المولدة للحيوانات المنوية Spermatogonia. ترجع الفروق فى طول فترة S إلى تغيرات فى أعداد مناشئ التناسخ النشطة. تحتوى الخلايـــا الجنينية على أعداد كبيرة من مناشئ التناسخ النشطة، فى حين تقل أعداد هـــذه المناشئ كثيراً فى كروموسومات مرحلة ما قبل الميوزى.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

توجد حالة مماثلة فى الدروسفلا حيث وجد أن فترة S فى النواة الجنينية تستغرق من ٣ إلى ٤ دقائق بينما تستغرق حوالى ٦٠٠ دقيقة فى الخلايا الجسدية للحشرة البالغة. وجد أن الخلية المنفلجة فى هذه الحشرة تحتوى على مناشئ للتناسخ بشكل ملحوظ فى الخلايا الناضجة حيث يصل إلى حوالى ١٢ ميلليميكرون. من الواضح أن نشاط عدد مناشئ التناسخ تخضع للمرحلة التكوينية Developmental Stage التى يمر بها الكائن. وأن كثيرا منها يكون نشطاً فى مرحلة تكوين الجنين فى حين تظل أعداد قليلة منها فقط هى النشطة فى مرحلة نضج الكائن. يدل ذلك على وجود تنظيم معقد يتحكم فى بدء تكوين شوكات التناسخ بطريقة تسمح بتناسخ مناطق د. ن. أ المختلفة فى الجينوم وفقاً لجدول زمنى دقيق.

إنزيمات بلمرة د. ن. أ فى الخلايا المميزة النواة.

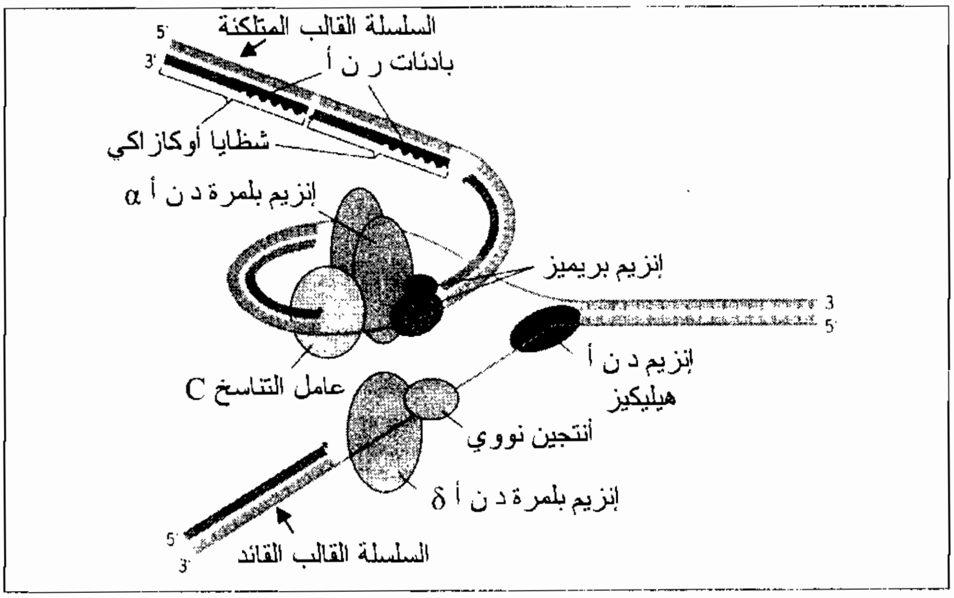
تبين وجود أربع صور على الأقل من إنزيم بلمرة د. ن. أ DNA Polymerases وهى (α, ß, γ, δ) وذلك فى جميع نظم الخلايا مميزة النواة.

تحتوى الصورة α على عدد من تحت الوحدات بحيث تتفاعل تحت وحدتين منها لتعطى نشاط أنزيم Primase ما يدل على أن الصورة pol α تحتوى على النشاط الأنزيمى المطلوب للتناسخ المتقطع Discontinueos للخيط المتلكئ.

ومن جهة اخرى ، لا تحتوى الصورة Pol δ على نشاط البريميز. وتدل النتائج على انها مختصة بتناسخ د. ن. أ للخيط القائد. بالاضافة إلى ذلك، لابد أن تكون المعقدات الانزيمية محتوية على انزيمات هليليكيز لفك حلزونة اللولب

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المزدوج أمام شوكة التناسخ. أما الصورة pol ß فيبدو أن لها دور فى اصلاح اخطاء التناسخ Proofreeding. فى حين تكون الصورة pol γ مسئولة عن تناسخ د. ن. أ فى الميتوكوندريا. ويبين الشكل (٤-١١) دور انزيمات البلمرة pol α و pol γ فى عملية التناسخ . ويبين الجدول (٤-١) بعض الفروق فى تناسخ د. ن. أ يبين غير مميزة النواة ومميزة النواة.



الشكل (٤-١١): تحت وحدتين من إنزيم بلمرة و ن أ (α وδ) تقوم بعملية البناء عند شوكة التناسخ في مميزة النواة، يقوم إنزيم بلمرة د ن أ δ بتناسخ السلسلة القائد في حين يقوم الإنزيم α ببناء السلسلة المتلكئة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الجدول(٤-١) مقارنة بين تناسخ د. ن. أ فى غير مميزة النواة ومميزة النواه

المقارنة	غير مميزة النواة	مميزة النواة
طول بادئ ر. ن. أ طول شظايا أوكازاكى فى الخيط التابع	حوالى ٥-٨ نيوكلتيدة حوالى ١٠٠٠-٢٠٠٠ نيوكلتيدة	حوالى ٩-١٠ نيوكلتيدة حوالى ٢٠٠ نيوكليتده
معدل سرعة تحرك شوك التناسخ	٥٠٠ نيوكليتدة فى الثانية	٥٠ نيوكلتيدة فى الثانية
عدد مناشئ التناسخ	واحد فقط	عدة الاف وتحت تنظيم تكوينى
ميكانيكية منع أعادة بدء التناسخ فى نفس دورة الخلية	لا توجد	توجد

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الفصل الخامس

الأساس الجزيئ للطفور
وطرق إصلاح أخطاء التناسخ

حيث أن أمكانات نمو وتمايز أى كائن تتحدد بما يحتويـــة جينومـــة مـــن الجينات، لذلك فإنه يتحتم أن يحدث تغير (طفور) فى المـــادة الوراثيـــة د. ن. أ لملائمة تطور الكائنات مع البيئة المحيطة بها. إلا أنه من المعروف أن التغيرات التطورية عادة ما تكون نادرة الحدوث. لهـــذا يتميـــز جـــزئ د. ن. أ بالثبـــات والاستقرار أثناء تخزينة وتناسخة فى الخلية على مدى الأجيال. حيث أن ذلـــك من شأنه المحافظة على بقاء الكائنات ونموها. أن المحتوى الجينى للخلية يترجم عادة إلى آلاف من البروتينات المختلفة والتى قد يؤدى أى تغير فى أى منها إلى أثار ضارة بالخلية والكائن نفسه. وعلى ذلك فإن على الخلية أن تقابل تحد مـــن شقين.

الأول: لابد أن تكون النظم الأنزيمية الخاصة بتناسخ د. ن. أ فيها دقيقة جداً.

الثانى: أن يكون بمقدور الخلية استنباط نظم دقيقة لاصلاح الأخطاء العارضـــة التى قد تحدث فى جزئ د. ن. أ أثناء حفظة أو تناسخة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أن جزئ د. ن. أ عبارة عن مركب عضوى معقد ذو قدرة محدودة على الثبات حيث أنه لايعانى فقط من الاتلاف التلقائى المتمثل فى فقدان بعض القواعد النتروجينية بل أنه معرض ايضا للهجمات الموجهة اليه من الكيماويات الطبيعية (وغير الطبيعية) والاشعاع الذى قد يحطم هيكلة الأساسى أو يحدث تغيرا كيماوياً فى قواعده. معروف أن الطفرات تنشأ بصفة عامة عندما يؤدى التلف الحادث إلى تغيير فى الخواص الشفرية للقواعد. ونظراً لأن قدرة الكائن على احتمال أو مقاومة المعدل الطبيعى للتلف فى المادة الوراثية محدودة. فلابد أن تتواجد فى الخلية ميكانيكيات انزيمية تخصصية لاصلاح الأماكن التالفة فى جزئ د. ن. أ.. وتخصص البكتريا وغيرها من الكائنات نسبة لابأس بها من جينومها لانتاج وتنظيم عمل النظم الانزيمية الاصلاحية بها.

طبيعة الطفرات:

تتضمن الطفرات التلقائية معظم التغيرات التى قد تحدث فى تتابعات القواعد فى جزئ د. ن. أ إذ نجد أن بعض الطفرات قد يكون لها تأثير طفيف على الناتج النهائى للجين مثل طفرات الحساسية للحرارة Temperature-Sensitive التى تنتج عادة من تغير قاعدة بأخرى.

إلا أن كثير من الطفرات التلقائية قد تقضى على وظيفة الجين تماماً. مثل هذه الطفرات المدمرة والتى يطلق عليها "الطفرات اللاغية" Null Mutations لا تقتصر فقط على تبديل قواعد أو اضافة أو حذف قاعدة ما ولكنها تشمل اضافات أو اقتضابات كبيرة الحجم نسبياً، كما قد تتضمن اعادة ترتيب بعض اجزاء الكروموسوم.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

طفرات تغير القاعدة الواحدة Single Base Mutation:

يعد هذا النوع من الطفرات من أبسط أنواع الطفرات. وترجع اهميتها إلى أن حدوث تغير فى قاعدة واحدة بما ينتج عنه من تغير فى أحد البروتينات يؤثر على دقة تناسخ جزئ د. ن. أ. كما أن هناك العديد من الطفرات الهامة تعطـى تأثيرها عن طريق احداث تغييرا فى قاعدة واحدة، هذا بالاضافة إلى أن طفرات تغير القاعدة الواحدة تعتبر حرجة وضرورية بالنسبة للتطور لانها تقوم بتغييـر الجينات تدريجياً وبطرق غير حادة وطفيفة بحيث تنتج في النهاية تباين وراثـى مفيد للكائن.

يمكن متابعة أنواع طفرات القاعدة الواحدة التلقائية عن طريـق دراسـة طفرات ايقـاف الترجمـة Translation Stop Codon. ففـى الجـين المـنظم لانتاج اللاكتوز والذى يدخل ضمن مكونات أوبرون اللاكتوز فى بكتريا القولون Lactose Operon (I) والمسئول عن انتاج البروتين المثـبط لنـشاط أوبـرون اللاكتوز (وسوف نتناول ذلك بالتفصيل فيما بعد) امكن اثبات أن هذه الطفـرات ناتجة عن تغيرات فى قواعد مفردة فى بعض الشفرات الثلاثيـة التـى كانـت متطابقة فى الأصل مع شفرة إيقاف النسخ (Nonsense) وذلك فى اثنتـان مـن ثلاث مواضع للقواعد. كما أمكن اثبات أن المثبط الفعال ينتج مرة أخـرى مـن الجين الطافر فى الخلية المحتوية على جين كابت Suppressor (وهو ذلك الجين الذى يسمح بترجمة شفرة الايقاف على أنها شفرة لأحـد الأحمـاض الأمينيـة (Missense) وبذلك تستمر عملية النـسخ وبالتـالى الترجمـة إلـى البـروتين المعين).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

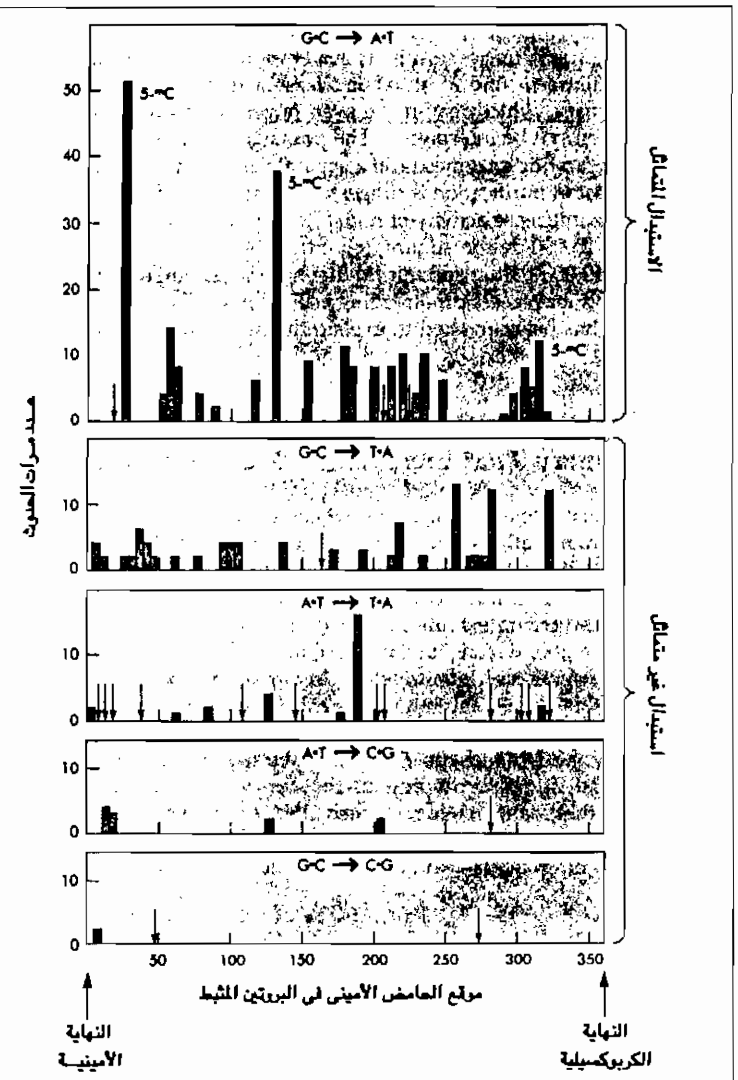
أظهرت هذه التجارب والتحليلات أن بالامكان الحصول على جميع أنواع التغيرات فى القواعد فى تتابع جزئ د. ن. أ فمثلا طفرة الاستبدال المتماثل Transition تنتج عندما تحل قاعدة بيورينية محل اخرى من نفس المجموعة (G↔A) أو تحل قاعدة بيريميدينية محل أخرى بيريميدينية (G↔T) ونحصل على طفرة الاستبدال المغاير Transversion عندما تستبدل قاعدة بيورينية بقاعدة بيريميدينية أو العكس كما فى الشكل (٥-١).

تبين أن هناك اختلاف فى معدل الطفور بين المواقع المختلفة التى يمكن أن يحدث بها طفور حيث ظهر أن هناك "مواقع ساخنة" (Hot Spots) يحدث بها الطفور بمعدل أعلى بكثير عما فى باقى المواقع الآخرى.

تكون تغيرات القواعد المفردة عادة من النوع العكسى Reversible ويكون معدل الطفرة الرجعية Back Mutation إلى القاعدة الاصلية الطبيعية مماثلا فى المقدار لمعدل التغير الى القاعدة الطافرة. تمثل هذه الحقيقة فرقا جوهرياً للتمييز بين تغير القاعدة المفردة والتغيرات الأكثر شدة مثل الاقتضابات الكبيرة Deletions التى لا يمكن أن تسترجع بالطفور العكسى. وهناك حالة وسطية تتم فى حالة اضافة Insertion or Addition أو حذف Deletion لقاعدة واحدة إذ قد يحدث هنا طفور عكسى ولكن بمعدل أقل بكثير عما فى حالة تغير القاعدة المفردة (طفرات الاسبتدال).

تمثل معظم حالات طفرات الاستبدال هذه حالات فشل نادرة فى عملية تناسخ د. ن. أ وذلك عندما يحدث اضافة النيوكلتيدة غير الصحيحة إلى السلسلة النامية على الرغم من أنها لا تتزاوج طبيعياً مع القاعدة المقابلة على القالب.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (٥-١): توزيع أنواع الطفرات التلقائية التى تؤدى إلى احداث كودون التوقف فى جين المنظم المنتج للبروتين المثبط لأوبرون اللاكتوز. ويتبين هنا الأنواع الأربعة لطفرات الاستبدال غير المتماثل Transversion وواحدة من النوعين المحتملين لطفرة الاستبدال المتماثل Transition والتجارب الأخرى تبين أن الاستبدال الاخر المتماثل (AT↔GC) يمكن أن يحدث ايضا تلقائياً. تدل الأسهم الرأسية على مواقع الطفرات المحتملة. السيتوسين المميثل (5 me-C) تعتبر مواقع ساخنة للطفور.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

معدل الخطأ عند اضافة النيوكلتيدات أثناء عملية التناسخ:

حيث أن نظام Lac يكشف حالات طفور القاعدة الواحدة فى أى مـــن ٨٠ موقع محدد فإنه يصبح من اليسير حساب معدل ظهور كل طفرة عنـــد تناســـخ د.ن.أ وبالتالى المعدل الذى يخطئ فيه نظام التناسخ فى كل موقـــع. وجـــد أن متوسط معدل الخطأ هذا لجميع المواقع الثمانين يكون حوالى $١٠^{-٩}$ لكـــل دورة تناسخ. ولكن لو أخذنا فى الاعتبار أن البقع الساخنة تعطى طفرات بمعدل يزيد ٢٥ ضعف عن المعدل المتوسط فى حين توجد مواقع أخـــرى تعطـــى معـــدل للطفور أقل بحوالى ٢٥ ضعف عن المتوسط. كما ظهر من حـــساب طفـــرات الاستبدال فى مواقع معينة فإن معدل الخطأ بصفة عامة يتراوح بين $١٠^{-٧}$ إلـــى $١٠^{-١١}$ لكل دورة تناسخ. وعلى الرغم من وجود نظام لتصحيح أخطاء التناسخ Proofreading في البكتريا إلا أن وجود هذا النظام في الخلايـــا مميـــزة النواه لم يتحقق بعد.

طرق التحكم فى مستويات الطفور:

قد يبدو للوهلة الأولى أن تكرار الأخطاء يعكس مباشـــرة مـــدى الدقـــة الموروثة فى تزاوج القواعد AT, GC إلا أنه عندما يتعين على انـــزيم بلمـــرة د. ن. أ أن يقوم باضافة $١٠^{٩}$ نيوكلتيدة مثلا فإنه من المتوقع أن يحـــدث خطـــأ نادر فى تزاوج قاعدة أو عدد قليل من القواعد أثناء التناســـخ. بالاضـــافة إلـــى ما يمكن أن يحدثه التغير فى صور التناظر بين القواعد من حدوث تزاوجـــات خاطئة يصل معدلها أحيانا إلى $١٠^{-٤}$ وهو أعلى بكثير من التكرار الفعلى للطفرة التلقائية. أمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق نشاط انزيم بلمـــرة د. ن. أ فى تصحيح الأخطاء Proofreading أو المراجعة والتى سبق الاشارة اليها حيث

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يؤدى نشاط الهدم الطرفى (3'→5') Exonuclease الموجـود ضـمن وظـائف انزيمات البلمرة الى ازالة القواعد المضافة بالخطأ إلى النهاية الناميـة للسلـسلة الجديدة أولا بأول .

أثبتت دراسات على جزيئات انزيمات البلمرة الطافرة أن معدل الطفور قد يكون محكوما بالعلاقة بين معدل نشاط الهدم الطرفى الخلفى (3'→5') ومعـدل نشاط البناء (5'→3') بمعنى أنه اذا انخفضت كفاءة النـشاط الهـدمى الطرفـى (3'→5') ارتفع معدل الطفور بدرجة كبيرة وغير عادية. من جهـة أخـرى، أذا ارتفعت كفاءة نشاط الهدم الطرفى (3'→5') فسيودى ذلك إلى انخفاض حاد فـى معدل الطفور. وعلى الرغم مـن وجـود نظـام تـصحيح أخطـاء التناسـخ Proofreading فى البكتريا وغير مميزة النواة ألا أن وجود هذا النظام فى مميزة النواة لم يتحقق بعد.

الجينات المطفرة Mutators:

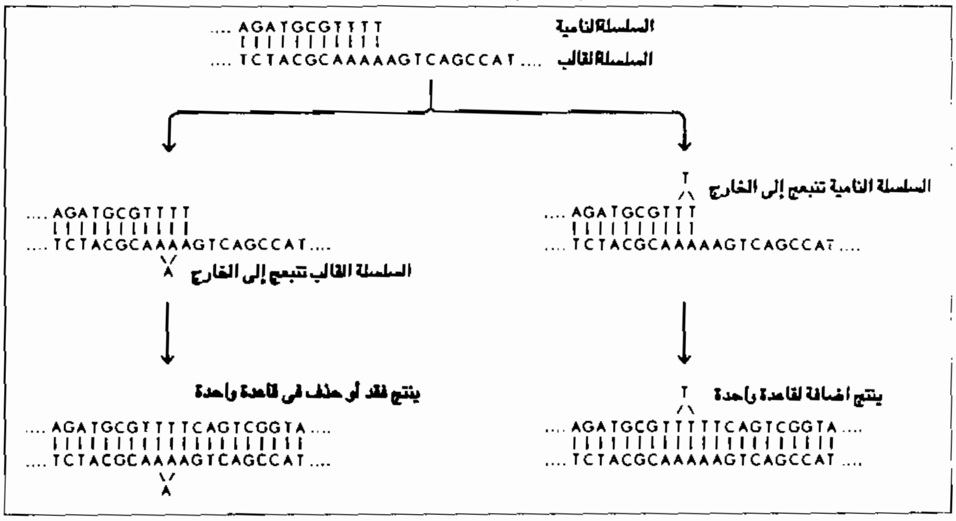
توجد فى البكتريا بعض الطفرات التى تكون وظيفتها زيادة معدل الطفـور فـى جينات أخرى ويطلق عليها Mutators. وعموماً فإن هذه الجينات المطفرة تحدث زيادة فى معدل الطفور فى جميع الجينات التى تمت دراستها وبالتالى فلابد أنها تؤثر على البروتينات التى تدخل ضمن ماكينة التناسخ. مـن أفـضل الجينـات المطفرة المعروفة فى بكتريا القولون الجين Mut D الذى يـؤدى نـشاطه إلـى حدوث تغيير فى الوحدة E فى انزيم بلمرة د. ن. أ DNA Pol III مما يؤدى إلى انخفاض معدل الهدم الطرفى (3'→5') وتقل كفاءة الانزيم فـى التعـرف عليـه وازالة القاعدة غير الصحيحة التى تضاف إلى النهاية النامية لسلسلة د. ن. أ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

كما أن الجينات المطفرة Mut H و Mut L و Mut S تتدخل فى تركيب ونشاط نوعيات البروتينات التى تعمل فى اصلاح اخطاء التزاوج بين القواعد. وهى العملية التى يقوم أثناءها انزيم بلمرة د. ن. أ بعملية مسح scanning لجزئ د. ن. أ الحديث البناء لاكتشاف القواعد المضافة بالخطأ وتصحيحها.

نتائج أخطاء الإنزلاق Slippage Errors أثناء التناسخ:

إن أخطاء التناسخ بواسطة انزيم بلمرة د. ن. أ لا تكون عادة مقصورة على تغيرات فى زوج واحد من القواعد اذ يحتمل أن يتم حذف أو اضافة واحدة أو عدد قليل من ازواج القواعد كنتيجة لحدوث إزاحة للقواعد "الانبعاج للخارج" (Looping Out) سواء فى السلسلة القالب (معطية اقتضاب أو حذف) أو فى السلسلة الجديدة النامية (معطية إضافة). تحدث هذه الأخطاء بصفة خاصة عند وجود تتابعات لقواعد مترادفة فى جزئ د. ن. أ ويمكن لهذا الجزء المنبعج (المنزلق) أن يستقر بالتزاوج الطبيعى بين القواعد فى المنطقة التى تلى القاعدة غير المتزاوجة كما فى الشكل (٥-٢).



الشكل (٥-٢): تحدث إضافات أو حذف بسبب الأزاحة (الخطأ) عند النهاية النامية للتناسخ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

عندما يجيئ الدور على جزئ د. ن. أ المحتوى على هذا الخطأ لكى يعمل كقالب، فإن الاقتضاب أو الاضافة سيتم نسخها بدقة مما يؤدى فى النهايــة إلـــى تثبيت الطفرة. تؤدى الطفرة الناتجة عن إضافة أو اقتضاب زوج واحد أو عــدد قليل من أزواج القواعد الى تغير اطار القراءة داخل بعض التتابعــات الــشفرة للبروتين مسببة إخلال كامل فى عملية بناء ذلك البروتين. وتسمى هذه الطفــرة طفرة تحرك الإطار Frame Shift Mutation وينتج عنها بروتين غير فعال.

الطفرات الناتجة عن تغيرات كبيرة نسبياً فى تتابعات القواعد:

توجد كثير من الطفرات التى يرتفع فيها عدد القواعــد المتغيــرة بحيــث تشمل إعادة ترتيب كبيرة فى تتابعات هذه القواعد. وتوجد هذه التغيــرات فــى الطفرات المسئولة عن تدمير وظيفة ونشاط الجين. يمكن اقتطاع أجزاء كبيــرة من د. ن. أ والتى قد تصل إلى آلاف النيوكلتيدات من خلال عملية غير طبيعية لنشاط انزيمات الاتحادات الجديدة اثناء عملية العبور أو نتيجة لحدوث أخطــاء فى عملية تناسخ سلسلة د. ن. أ القالب.

من جهة أخرى يمكن لبعض أجزاء جزئ د. ن. أ أن تنقلب Inverted من خلال عملية تكوين الاتحادات الجديدة داخل جزئ د. ن. أ أو قد يحدث تبــادل بين أجزاء من الكروموسومات غير المتناظرة فى مميزة النواة بحيــث يترتــب على ذلك أن الجينات القريبة من مكان التبادل لايتسنى تنظيمها بدقة.

وحيث أن الكروموسومات تتميز بالثبات فــى تركيبهــا فــإن التغيــرات الكروموسومية التلقائية لابد أن تمثل حوادث نادرة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أهمية دراسة المطفرات الكيماوية:

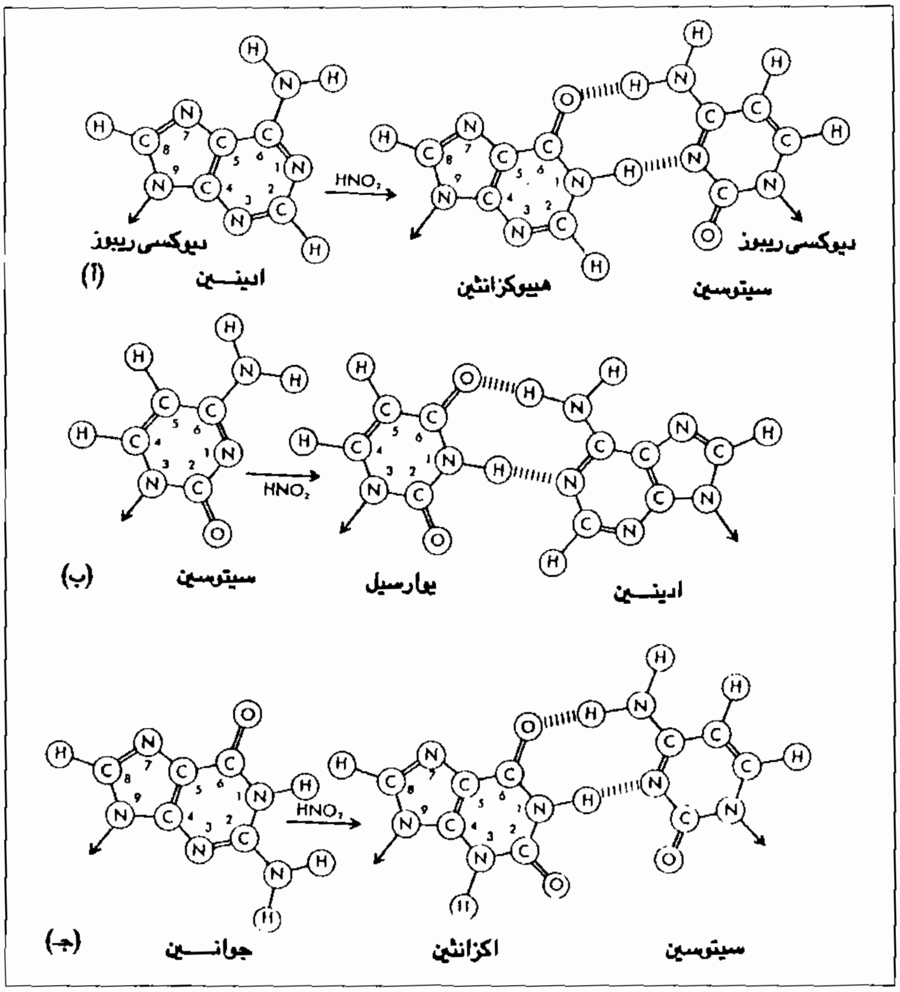
لاشك أن المطفرات الكيماوية تؤدى إلى زيادة هائلة فى معدل حدوث الطفرات، مما يعنى أنها تتدخل بطريقة مباشرة فى مسارات تناسخ د. ن. أ بالخلية. لذلك يفيد استخداث طافرات بمطفرات معينة فى دراسة أهمية كل من بروتينات ماكينة التناسخ فى عملية بناء د. ن. أ كما أن المطفرات الطبيعية تؤثر على جميع الكائنات بما فيها الانسان.

تمتلك البكتريا والفيروس نظم وراثية خاصة يمكن استخدامها بكفاءة فى دراسة ميكانيكية عمل عدد كبير من المطفرات كما أنها تقدم طرق مباشرة وسهلة لاختبار مدى قدرة أى مادة كيماوية على إحداث الطفور(مطفر كيماوى) بحيث يمكن تجنب استخدامه واستبعاده أو اتخاذ الاحتياطات عند استخدامة.

تعمل المطفرات أما بطريقة مباشرة على جزئ د. ن. أ لتغيير خواص القالب أو عن طريق تخريب عملية التناسخ بحيث تؤدى إلى اضافة القاعدة الخطأ.

تتفاعل الكيماويات النشطة مع د. ن. أ DNA-reactive Chemicals مثل حامض النيتروز (HNO_2) أو ناقلات الألكيل أو المؤلكلة Alkylating Agents مثل ميثيل نيتروزو جوانيدين Methyl Nitrosoguanidine مباشرة مع د. ن. أ بحيث تؤثر على القواعد فتغيرها إلى تراكيب كيماوية جديدة. وهذه التراكيب الجديدة (القواعد الجديدة) تتزاوج غالباً بطرق مختلفة عن القواعد الأصلية المشتقة منها. أى أن المطفر قد أدى فى النهاية إلى تغيير فى التتابع الشفرى لجزئ د. ن. أ (الشكل ٥-٣).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٥-٣): عملية أزالة مجموعة الأمين بالأكسدة فى قواعد جزئ د. ن. أ بواسطة حامض النيتروز وتأثيرها على تزاوج القواعد:

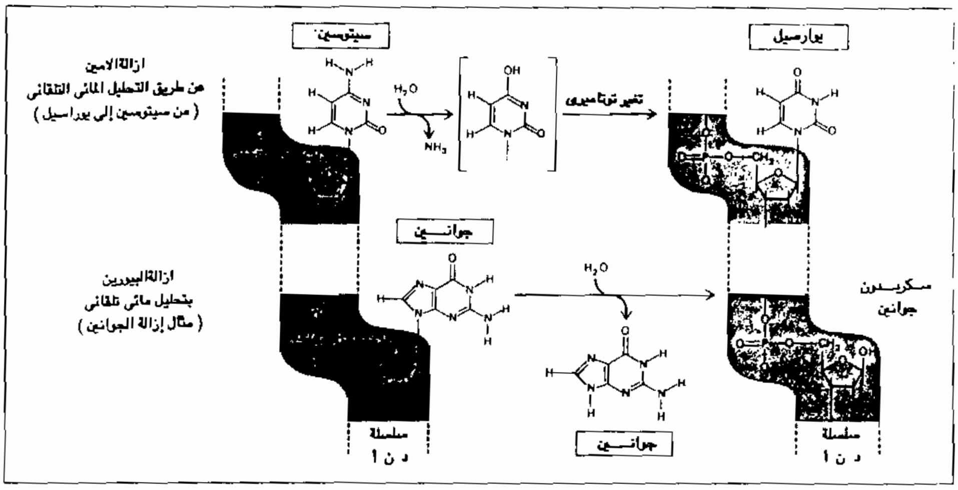
أ - يتحول الأدينين الى الهيبوكزانثين الذى يتزاوج مع السيتوسين بدلا من الثايمين.

ب- يتحول السيتوسين الى اليوراسيل الذى يرتبط بالادينين بدلا من الجوانين.

ج - يتحول الجوانين الى الكزانثين الذى يستمر فى الارتباط بالسيتوسين ولكن بـرابطتين هيـدروجينيتين فقط. لا يحتوى الثايمين (واليوراسيل) لجزئ د. ن. أ على مجموعة أمينو لذلك لايحدث بهما تغير.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ألا أن بعض القواعد المشتقة لا يمكنها أن تتزاوج بالمرة. ويؤدى التلــف أحيانا إلى ازالة القاعدة نهائياً من الهيكل الأساسى لجــزئ د. ن. أ كمــا فــى الشكل (٥-٤) وفى هذه الحالة تنشأ الطفرة عندما تحاول ماكينة التناسخ اصلاح الضرر الذى تعرض له جزئ د. ن. أ بطرق خاصة بحيث تــؤدى ميكانيكيــة الاصلاح نفسها إلى احداث طفرات أخرى فيما يعرف بالإصلاح القابل للخطــأ Error Prone Repair كما سيأتى بعد .

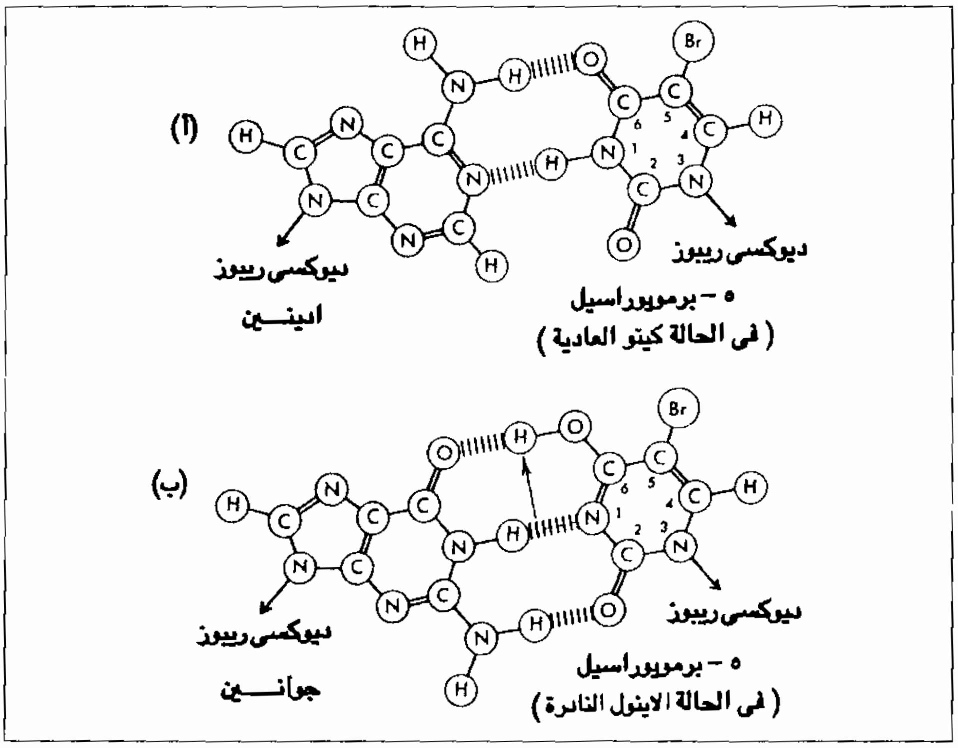


الشكل (٥-٤): تفاعلان كيماويان يحدثان تلقائياً بكثرة ويؤديان إلى احداث تلف خطير فى تركيب جزئ د. ن. أ فى الخلية، وهما تفاعل أزالة مجموعة الأمين أو ازالة البيورين، ويمثل كل تفاعل بمثال نوعى

توجد مجموعة أخــرى مــن المطفــرات تــسمى مــشابهات القواعــد Base Analogs والتى يؤدى تشابهها مع القواعد الطبيعية الى اضافتها بالخطــأ كما لو كانت نيوكلتيدات ثلاثية الفوسفات فى سلــسلة د. ن. أ أثنــاء التناســخ الطبيعى. إلا أن تركيبها الشاذ يؤدى إلى تزاوج بــين القواعــد بطريقــة غيــر صحيحة وغير دقيقة مما يؤدى إلى حدوث أخطاء متكررة أثناء عملية التناسخ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ومن أمثلة اشباه القواعد ذات التأثير القوى فى أحــداث الطفــرات مـــادة 5- Bromouracil وهى مشابهة للقاعدة النيتروجينية الثايمين، يعتقــد أن قــدرتها الطفرية ترجع إلى أن ذرة الهيدروجين فى الموقع رقم ١ بها ليست ثابتة بدرجة كافية مثل ذرة الهيدروجين المقابلة فى الثايمين بحيث يحدث أحيانا لهذه الذرة أن ترتبط بذرة الأكسوجين المتصلة بذرة الكربون رقم ٦ (الشكل ٥-٥) مما يؤدى إلى تزاوج البرومويوراسيل مع الجوانين.



الشكل (٥-٥): نتائج تزاوج ٥- برومويوراسيل مع القواعد النيتروجينية

أ - فى الحالة الكيتو العادية وفى وجود ذرة هيدروجين فى الموقع (N) يرتبط البرومويوراسيل بالأدينين.

ب- فى الحالة الاينول النادرة فإن التحرك التوتاميرى لذرة الهيدروجين هذه يحدد التزاوج النـوعى مـع الجوانين.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

توجد مجموعة ثالثة من المطفرات الكياوية تشمل مطفرات تحريك الاطار Frame Shift Mutagens مثل البروفلافين Proflavin الذى يحدث إقتـضاب أو حذف أو اضافة لقاعدة واحدة أو أحيانا لعدد قليل من القواعد. تتميز مطفـرات تحريك الاطار بأن جزيئاتها مفلطحة ومتعددة الحلقات Polycyclic مما يمكنهـا من الارتباط بالأسطح المفلطحة للقواعد بطريقة مماثلة لقـوى التـراص بـين القواعد فى الحلزون المزدوج. قد تعمل هذه المطفـرات أيـضا عـن طريـق الارتباط بالقواعد المنبعجة إلى الخارج Looping-Out إما فى سلـسلة د. ن. أ القالب أو السلسلة الجديدة أثناء عملية بناء الجزئ مما يؤدى إلى تثبيت العروات المنبعجة بحيث تتزايد فرصة حدوث طفرات فى المنطقة المزاحة.

ميكانيكيات اصلاح الأخطاء فى د. ن. أ:

يمكن للطفرة أن تستمر وتبقى عندما يكون التغير الوراثى الـذى أحدثتـه ليس ضارا أو فى حالات نادرة عندما يكون مفيدا ولكن غالبية الطفرات تكـون ضارة ومدمرة ولا تقوى الخلية على احتمالها ولذلك لابد من توفر ميكانيكيـات انزيمية متخصصة لاصلاح ما افسدته التغيرات الطارئة.

سبق الاشارة إلى أن بعض القواعد قد تزال منها مجموعات معينة ومثال ذلك ما يحدث لقاعدة السيتوسين عندما تحدث ازالة تلقائيـة لمجموعـة الأمـين بها Deamination (الشكل ٥-٤) بحيث تتحول إلى يوراسيل الذى يتزاوج فـى د. ن. أ مثل الثايمين مما يؤدى إلى تحول زوج القواعد GC لكـى يـصبح AT عند تناسخ د. ن. أ وإذا لم يحدث تصحيح سريع لهذه التغيـرات فـإن قاعـدة سيتوسين من كل ١٠٠٠ قاعدة فى الجينوم البـشرى يمكـن أن تتحـول إلـى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يوراسيل فى فترة حياة الانسان مما يعنى أرتفاع معدل الطفور إلـــى مـــستويات لاتحتمل.

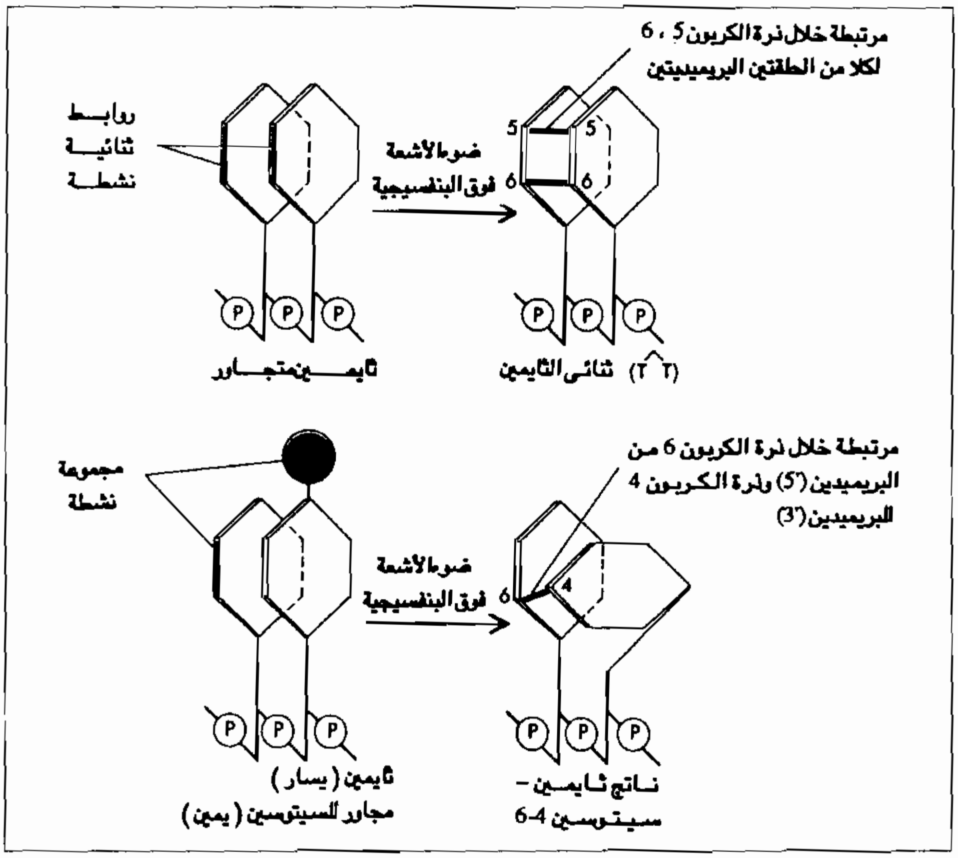
كما أن هناك نوع آخر من التغيرات أشد خطورة مثل ذلك الذى يؤدى الى كسر فى الهيكل الأساسى للجزئ (Sugar/Phosphate) أو الذى يحـــدث تغيـــرا كبيرا جداً فى أحد القواعد لدرجة أنها تفقد أى شبه أو صلة بأى قاعدة نتروجينية تماماً.

من الطبيعى أن مثل هذه التغيرات الشديدة تحول دون الحـــصول علـــى التعبير الصحيح للجين، بالاضافة إلى انها تمنع استمرار عملية تناســـخ د. ن. أ حيث أن انزيم بلمرة د. ن. أ يتوقف عن البناء عندما يصل إلى تزاوج قواعـــد خاطئ. وفضلا عن ذلك فإن انكسار الهيكل الأساسى يجعل السلسلة غير صالحة للعمل كقالب.

من التغيرات النموذجية التى تمنع تزاوج القواعد تكون ثنائى بيريميـــدينى Pyrimidine Dimer. وجد أن الأشعة فوق البنفسجية (200nm) تمـــتص بـــشدة بالقواعد ويترانب على ذلك تفاعل كيماوى ضوئى Photochemical يؤدى إلـــى الاتحاد بين قاعدتي بيريميدين متجاورتين فى تراكيب غير قابله للتـــزاوج مثـــل ثنائى الثايمين كما فى الشكل (٥-٦). يمكن لجزيئات د. ن. أ فى خلايا الجلـــد المعرضة لأشعة الشمس العادية على ســـبيل المثـــال أن تكتـــسب الآلاف مـــن هذه الثنائيات فى اليوم الواحد. وإذا لم يتم التخلص منها بانزيمـــات الاصـــلاح المناسبة فى الخلية ينشأ مـــرض جلـــدى يـــسمى الجفـــاف الجلـــدى الملـــون Xyroderma Pigmentosa الناتج عن خلل وراثى فى الانزيمات المسئولة عـــن فك الثنائيات وغيرها من الأخطاء التى تحدث بفعل الأشـــعة فـــوق البنفـــسجية.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ويؤدى المكون فوق البنفسجى من آشعة الشمس الى حدوث نسبة عالية من موت وضمور خلايا الجلد ويتسبب فى نمو خلايا سرطانية عديدة فى الأفراد المصابين (الشكل٥-٧).



الشكل (٥-٦): تكوين ثنائيات البريميدين الناتجة عن التفاعل الضوئى عند التعرض للأشعة فوق البنفسجية

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الشكل (٥-٧): التأثيرات المظهرية للمرض الوراثى Xeroderma Pigmentosum
الأفراد الحاملة لهذا المرض تظهر بها أورام جلدية بعد التعرض لضوء الشمس. الأفراد الأصيلة للطفرات الجسمية المتنحية المسئولة عن هذا المرض تكون أقل فعالية فى إصلاح الاخطاء فى DNA الناتجة عن التعرض لضوء الأشعة فوق البنفسجية

إصلاح طفرات التعرض للاشعة فوق البنفسجية:

Photoreactivation Repair:

على الرغم من أن معظم التلف فى جزئ د. ن. أ يكون خطيراً وغير قابل للاصلاح إلا أنه يوجد نوعين شائعين من هذه الأضرار أو الأخطاء التى

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

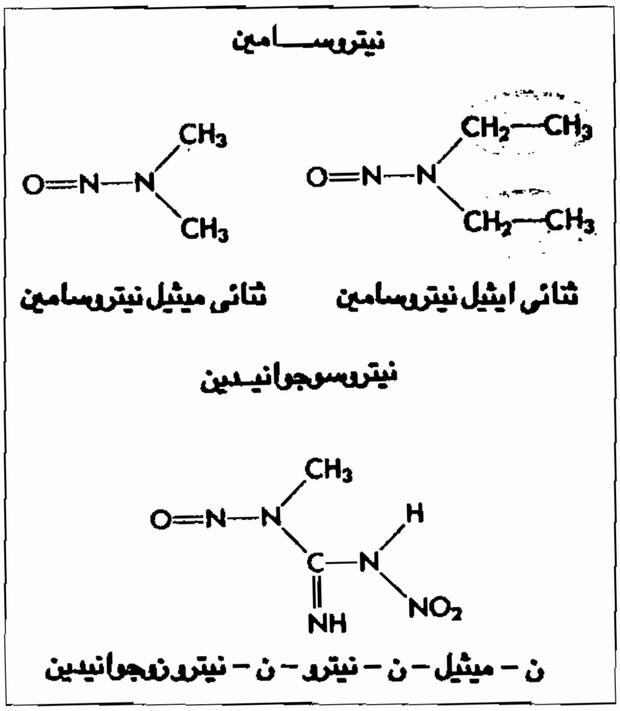
يمكن اصلاحها مباشرة بواسطة انزيمات متخصصة تقوم بعملية عكسية تمحو بها أثر التغير المتلف.

وُجد أن ثنائيات البريميدين تكون هدفا لانزيم متخصص الذى يرتبط بهذه الثنائيات ويساعد على حدوث تفاعل ضوئى كيماوى أخر مستخدما فى هذه الحالة الضوء العادى مما يؤدى إلى فك ارتباط الثنائيات وتحويلها إلى قواعد بيرميدينية مفردة عادية. وتسمى هذه العملية التفاعل التنشيطى الضوئى Photoreactivation وقد اطلق على هذا الانزيم فى البداية Photolyse ألا أن الدراسات الحديثة أثبتت أن عملية الاصلاح هذه تعتمد على نشاط أنزيمى متخصص يطلق عليه Photoreactivation Enzymue (PRE).

اصلاح طفرات أضافة الالكيل Alkylation Repair:

قد يحدث التلف أو الضرر فى جزئ د. ن. أ نتيجة لعملية انتقال الالكيل Alkylation حيث تنتقل مجموعة ميثيل أو إيثيل إلى مواقع نشطة فى القواعد أو الى الفوسفات فى الهيكل الاساسى للجزئ. وتشمل الكيماويات المؤلكة نيتروزامين Nitrosamine والمطفر الكيماوى الفعال ميثيل نيتروزوجوانيدين Methtyl- 1- Nitrosoguanidine (الشكل ٥-٨).

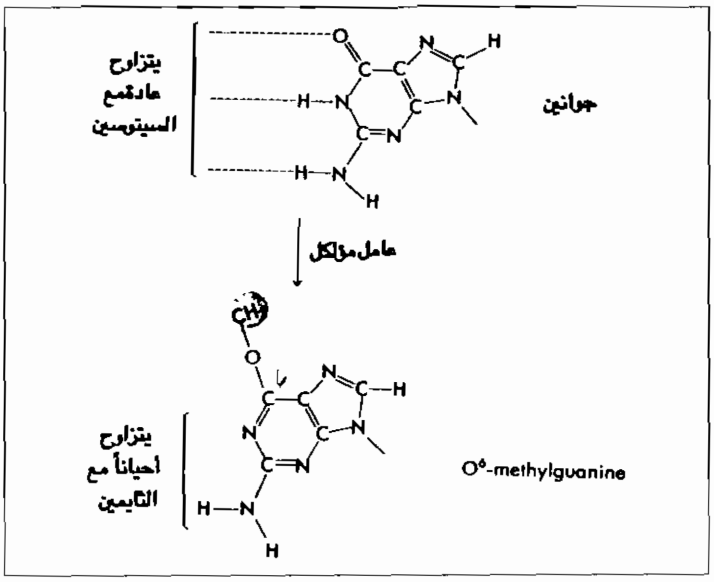
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٥-٨): بعض المطفرات المؤلكلة تظهر مجموعات الألكيل النشطة مظللة

من أكثر القواعد حساسية لعملية نقل الألكيل قاعدة الجوانين التى تتعرض لنقل مجموعة ميثيل Methylation فى ذرة الأوكسوجين المرتبطة بذرة الكربون رقم ٦ وينتج المركب O^6-Methylguanine الذى يخطئ كثيراً فى التزاوج بحيث يتزاوج مع الثايمين مما يؤدى إلى تغير الزوج GC إلى AT عند تناسخ د. ن. أ كما فى الشكل (٥-٩). يلاحظ أنه رغم أن النتيجـة واحـدة إلا أن الاختـلال الحادث هنا ينتج عن عملية Methylation فى حين أن نفس النتيجة تحدث عندما يتم ازالة مجموعة الأمين Deamination من قاعـدة الـسيتوسين (كمـا سـبق الاشارة).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (٥-٩): تفاعل الجوانين بعامل مؤلكل لتكوين O6-Methylguanine

تتم أزالة هـذا الخطـأ أو الـضرر بفعـل انـزيم O6-Methlguanine Methyltransferase الذى يتحكم فى انتاجه الجين (ada). يتعرف هـذا الانـزيم على O6-Methylguanine فى الحلزون ويقوم بإزالة مجموعة الميثيل عن طريق نقلها إلى أحد الأحماض الامينية (Cysteine) الموجودة ضمن تركيب بروتينـات الانزيم نفسه .ومن المحتمل أن هذا الانزيم ينشط أيضا فى أزالة مجاميع الميثيل من الهيكل الفوسفاتى لجزئ د. ن. أ. و تجدر الاشارة هنا إلى أن جزئ الانزيم الذى يشترك فى مثل هذا التفاعل لا يستعيد نشاطه فى ازالة الميثيل مرة أخرى نظراً لبقاء مجموعة الميثيل فى تركيبه نفسه بعد انتهاء التفاعل مما يعنـى أنـه يلزم استهلاك جزئ انزيم جديد كل مرة لإزالة مجموعة ميثيل واحدة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

عند تعريض بكتريا القولون النامية لتركيز منخفض وغير ضار من النيتروزوجواندين فإنها تصبح بعد المعاملة أكثر مقاومة للتأثير المطفر والسام لهذه المادة. يطلق على هذه المقاومة المستحدثة الاستجابة التكيفية Adaptive Response وهى تنتج من ارتفاع مقداره الف ضعف فى محتوى الخلية من انزيم O^6-Methylguanine Methyltransferase يصاحبه استحثاث فى إنزيم Glycosylase الذى يزيل القواعد المؤلكلة من الهيكل الأساسى لجزئ د. ن.أ. ويتم وقف استبداء كلا من الانزيمين بطفرات فى الجين ada مما يشير إلى أن نواتج هذا الجين عبارة عن انزيم الترانسفيريز ومنظم موجب للجين نفسه ولانزيم الجليكوسيلز.

الإصلاح بالاستئصال Excision Repair:

أن تركيب جزئ د. ن. أ من سلسلتين متكاملتين هو الذى يسمح بإصلاح معظم الأخطاء فى د. ن.أ بغض النظر عن طبيعة التغير الكيماوى المصاحب للتلف. إذ أن فقد بعض المعلومات الوراثية من أحد السلسلتين يمكن تعويضه بنسخ هذه المعلومات نفسها من السلسلة المكملة لتجديد المنطقة التى حدث بها التلف. ينطبق هذا بصفة خاصة إذا اقتصر التلف على قاعدة واحدة فى أحدى السلسلتين المتكاملتين.

توجد مسارات متعددة للاصلاح بالاستئصال Excision Repair أو الحذف التى يتم فيها ازالة قاعدة تالفة أو قطعة خاطئة من الهيكل الأساسى. تؤدى جميع هذه المسارات إلى نفس النواتج الوسطية حيث يحدث كسر أو فجوة فى سلسلة أحادية من د. ن.أ فى موقع الضرر مما يهيئ نهاية OH 3 حرة تمكن انزيم بلمرة د. ن.أ DNA Polymerase I من بدء البناء لتتابع جديد يحل محل الجزء

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

التالف معتمداً فى ذلك على التتابع المقابل فى السلسلة المكملة التى لم يلحقها أى ضرر.

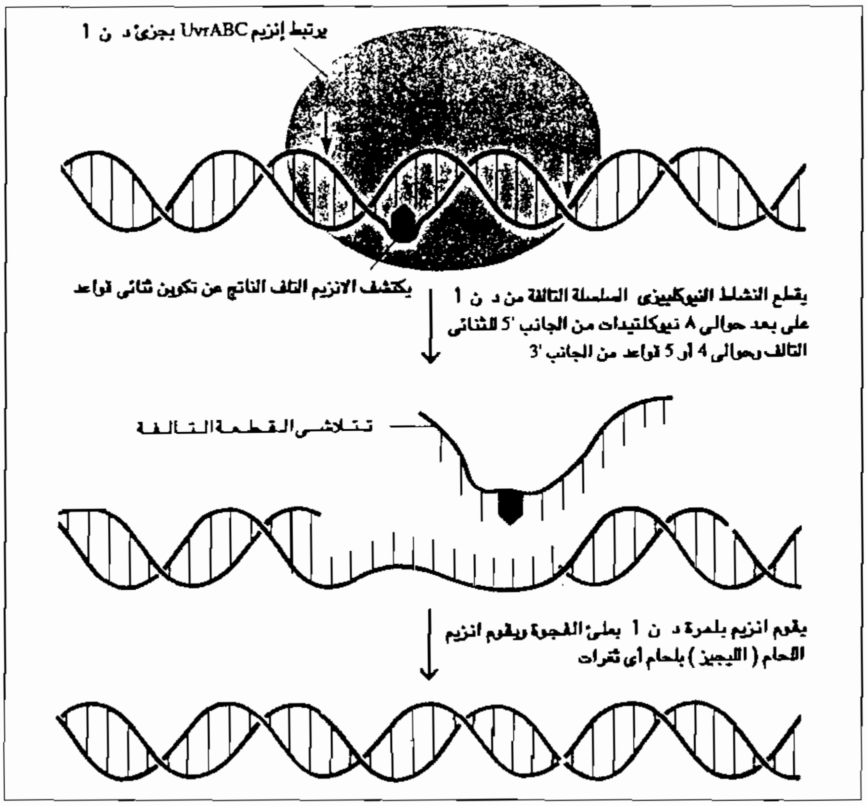
تبين أن الخلايا الطافرة للجين المسئول عن انتاج إنزيم البلمرة DNA poi تكون كفاءتها فى الإصلاح بالاستئصال منخفضة جداً مما يؤكد أن هذا الإنـزيم هو الذى يقوم بالدور الأساسى فى هذا النوع من الإصلاح حيـث أنـه يكـون بالكثرة والسرعة اللازمة لملئ الفراغات او الفجـوات الـصغيرة بكفـاءة فـى المناطق التالفة المنتشرة على الجزئ والتى يستدعى الأمر إصلاحها بسرعة. فى حين نجد أن إنزيم البلمرة DNA Pol III ولو أن به نشاط 5'→3' Exonuclease إلا أنه نظراً لكبر حجمة وتعقيده ولضرورة أن يظل مرتبطاً بـشوكة التناسـخ النامية لفترة طويلة ووجوده بعدد قليل نسبياً من النسخ فى الخلية فإنـه لا يقـوم عادة بهذا الدور.

والإنزيم الآخر الهام فى هذه العملية هو إنزيم الليجيـز (اللحـام) DNA Ligase الذى يقوم بلحام الأجزاء ببعضها بعد أن ينتهى إنزيم البلمرة من عمله.

فى حالة الأخطاء الناتجة عن التعرض للأشعة فوق البنفسجية وجد أنـه، إلى جانب الطفرات التى تحدث فى الجين الخاص بـأنزيم Photoreactivation Enzyme والتى تؤدى إلى تعطيل عملية الإصلاح فـى بكتريـا القولـون، أن الطفرات الحساسة للأشعة فوق البنفسجية (وبالتالى تفشل فى إصلاح هذا التلف) تحدث فى ثلاث مواقع وراثية uvrA, uvrB, uvr C وبعكس التنـشيط الـضوئى السابق الاشارة إليه. نجد أن نظام الإصلاح الذى تشفر له هذه الجينـات لـيس مختصاً بإصلاح التلف الناتج من الأشعة فوق البنفسجية فقط ولكنه يتعرف على أى تلف شديد ينتج عنه تشوية فى الحلزون المزدوج للجزئ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تشفر هذه الجينات الثلاث لتحت وحدات Subunits منفصلة لإنزيم واحد وهو إنزيم uvrABC Endonuclease الذى يقوم بإزالة الجزء التالف من د.ن.أعن طريق قطع السلسلة المحتوية على هذا التلف، ويحدث ذلك بأن يقوم الإنزيم بعمل قطع على جانبى الجزء التالف مما يؤدى إلى إزالة ١٢ قاعدة أوليجونيوكلتيدية محتوية على الجزء التالف ويتم ملئ الفجوة الناتجة بإنزيم البلمرة DNA PolI بإضافة نيوكلتيدات مكملة لتلك الموجودة على السلسله السليمة ثم تلحم بانزيم اللحام (الليجيز) كما فى الشكل (٥-١٠).



الشكل (٥-١٠): نظام الإصلاح بالاستئصال للثنائيات وبعض أنواع التلف الكبيرة وذلك بواسطة انزيمات uvr ABC

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

اتضح حديثاً أن انزيم uvr ABC Endonuclease لا يتعرف على الجــزء التالف مباشرة ولكنه يتعرف عليه من خلال الشكل غير الطبيعى لجزئ د. ن. أ ولكن كيف يتم ذلك؟

تبين أن الكسرين اللذين يحدثهما الانزيم يحدثان على نفس الجانــب مــن الحلزون بحيث يبعدان عن بعضهما بمسافة تزيد قليلاً عن دورة كاملة للحلزون فى حين أن التلف يكون أقرب إلى الجهة الآخرى من الحلزون. من الممكن أنه لكى تقترب المواقع النشطة للانزيم بالحلزون فإنه يقوم باحاطة الحلــزون لكــى يلمس الجانب الاخر مما يؤدى إلى أن تكون المسافة ١٢ قاعدة.

دور انزيمات الجليكوسيليز DNA Glycosylases فى الاصلاح:

(أ) استئصال قاعدة واحدة: Base Excision Repair

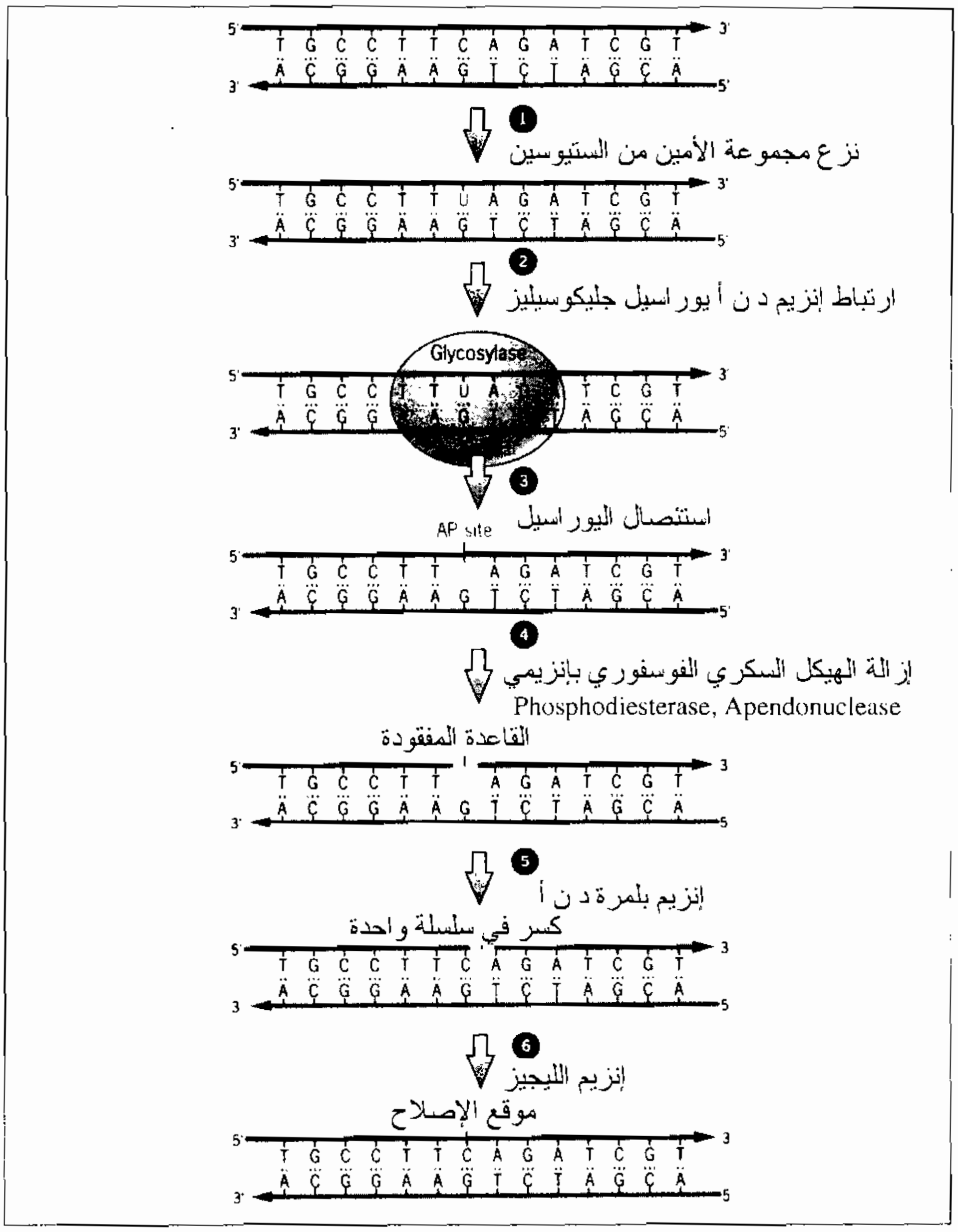
توجد طريقة أخرى لإزالة القواعد التالفة حيث تقــوم انزيمــات د. ن. أ الجليكوسليز بالتعرف على قاعدة واحدة غير صحيحة وإزالتهــا مــن الهيكــل الأساسى لجزئ د. ن.أ تاركة ثغرة أو ثقب Hole يطلق عليه موقــع AP وهــو اختصار لــ Apurine (أى يفتقر إلى A أو G) أو Apyrimidine (يفتقر إلى C أو T) ثم يتم التعرف على الثقب بواسطة انزيم APendonuclease الذى يكــسر الرابطة الفوسفواستيرية الثنائية فى الهيكل الأساسى تاركاً نهاية 3OH يبدأ منهــا انزيم البلمرة DNA PolI فى البناء لتعويض النيوكلتيدات المفقودة بالإضافه إلى بعض النيوكلتيدات المجاورة.

توجد عدة أنواع مختلفة من إنزيمات د. ن.أ الجليكوسيليز يختص كل منها فى إزالة نوع معين من القواعد غير الطبيعية أو التالفة وعلى الأخص القواعــد المميثلة Methylated Bases كمــا يقــوم إنــزيم Uracil -DNA Glycosylase

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بتصحيح الخطأ الناشئ عن عدم الثبات الطبيعى للسيتوسين حيث أنـــه يحـــدث أحياناً عملية نزع تلقائى لمجموعة الأمين من السيتوسين بمعدل مـــنخفض جـــداً ليعطى يوراسيل. يتعرف الجليكوسيليز على اليوراسيل ويزيله مما يتيح الفرصة لإحلال السيتوسين بإنزيم البلمرة كما فى الشكل (٥-١١).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

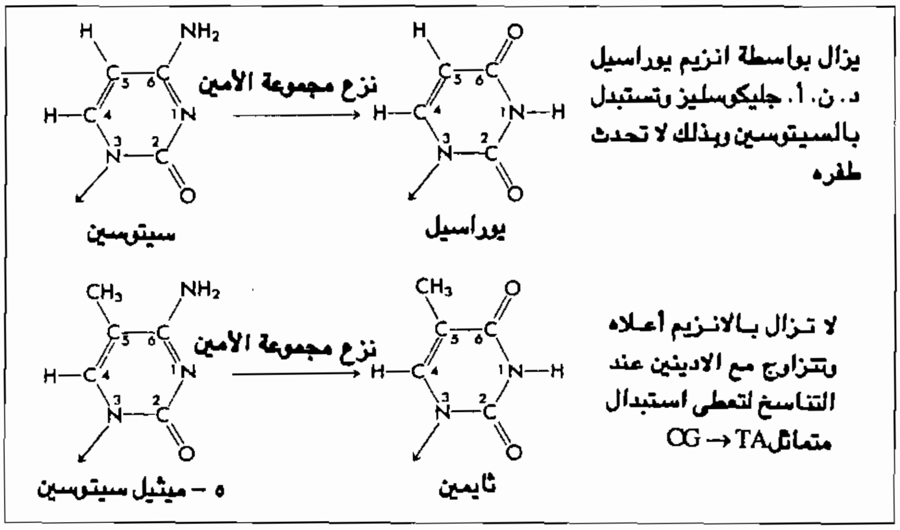


الشكل (٥-١١): إصلاح جزئ د ن ا بمسار إستئصال القاعدة الواحدة . يمكن بدء الإصلاح بإستخدام أى من إنزيمات DNAglycosylase المختلفة فى المثال المبين يبدأ uracil DNA glycosylase عملية الإصلاح

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

(ب) استئصال نيوكلتيدة Nucleotide Excision Repair:

أن النظام الإصلاحى السابق يخفق أو يضعف بشكل ملحوظ إذا كان السيتوسين مميثل على ذرة الكربون رقم ٥ كما يحدث مثلا فى التتابعات المحمية من تأثير انزيمات القطع المحددة (Restriction Endonucleases) (كما سيأتى بعد) يتزاوج السيتوسين المميثل على ذرة كربون 5- Methyl Cytosine طبيعياً أثناء تناسخ د.ن.أ ولا يمكن إزالته بانزيم DNA Glycosylase ولكن عملية إزالة مجموعة الأمين من السيتوسين ينتج عنها ثايمين وليس يوراسيل وحيث أن الثايمين قاعدة طبيعية من قواعد د. ن. أ فإنه لا يمكن إزالتها بانزيم Uracil DNA Glycosylase أو أى انزيم أخر ولكنها تبقى وتتزاوج مع الادينين فى الجيل التالى للخلية مما يؤدى إلى حدوث الطفرة واستمرارها وعلى ذلك فإن 5- Methylcytosine يعتبر بقعة ساخنة للطفرة التلقائية(الشكل ٥-١٢).

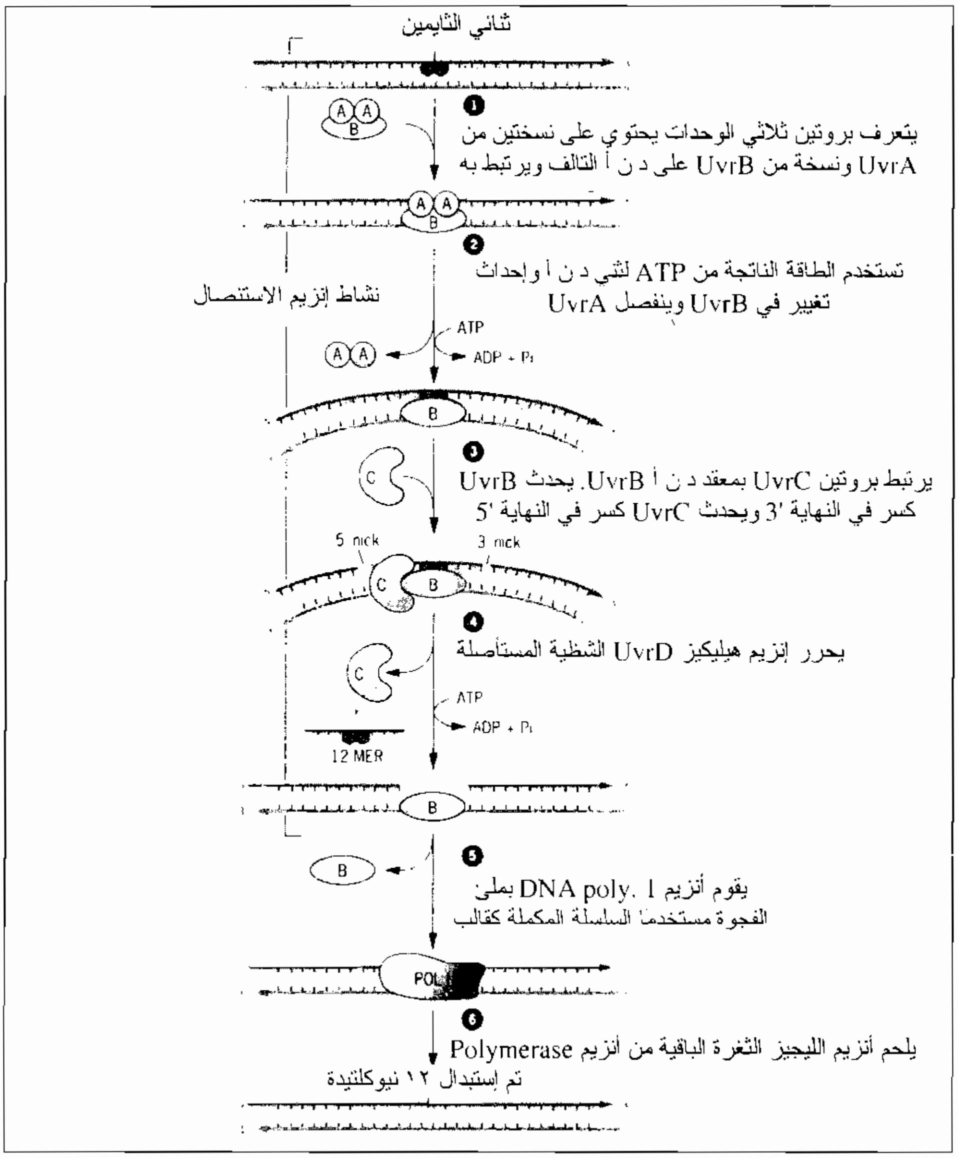


الشكل (٥-١٢): الأساس الجزيئى للبقعة الساخنة للقاعدة ٥- مثيل سيتوسين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مما يستدعى اللجوء الى ميكانيكية أكثر شدة بحيث تؤدى الى استئصال ليس القاعدة المعيبه فقط بل استئصال الهيكل الفوسفوسكرى معها بأكمله. وفى هذا النظام يقوم انزيم فريد فى نشاط الهدم الطرفى الاستئصالى يسمى Excinuclease بأحداث قطع على جانبى النيوكلتيدة المحتويه على القاعدة المعيبة ويتطلب لنشاطة نواتج ثلاث جينات uvrA uvrB ,uvrC بالاضافة إلى نشاط DNA Helicase II (uvrD) يبلغ طول د. ن.أ المستقطع على جانبى القاعدة المراد اصلاحها حوالى ١٢ نيوكليوتيدة ويقوم أنزيم Pol I ببناء الفجوة يلية انزيم ليجيز الذى يقوم بعمل اللحام كما فى الشكل (٥-١٣).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٥-١٣): إصلاح د ن أ بمسار إستئصال النيوكلتيدة الواحدة فى بكتريا القولون . يتطلب نشاط إنزيم Excision nuclease وجود نواتج ثلاث جينات UvrA وUvrB و UvrC يحدث إستئصال النيوكلتيدة فى الإنسان بمسار مشابه فيما عدا أن بروتينات أخرى عديدة تشارك فى العملية كما أنه يتم إستئصال أوليجوبنوكليوتيد طولها ٢٩ نيوكليتيدة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

تصحيح أخطاء عدم المطابقة Mismatch repair:

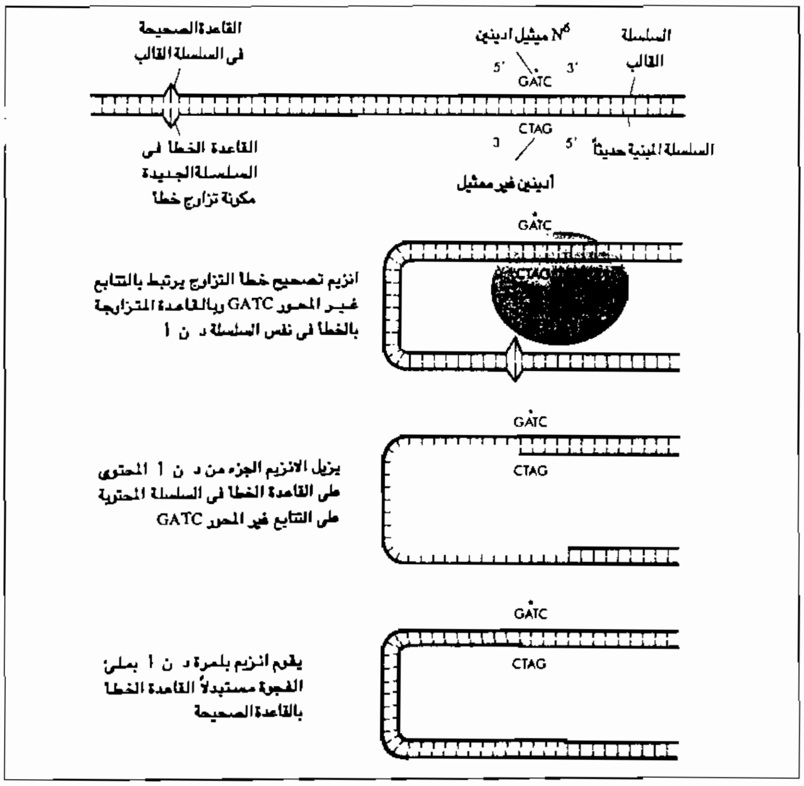
أن بعض حالات أخطاء التزاوج بين القواعد قد لا يتم اكتشافها بميكانيكية المراجعة Proofreading التى تقوم بها انزيمات البلمرة Polymerase III DNA إذا أن هناك حد أقصى لما يمكن أن تقوم به هذه الانزيمات فى مجال التصحيح حيث يقدر معدل الخطا الطبيعى لها بحوالى ١×١٠$^{-٨}$ أى زوج قواعد خطأ لا يكتشف لكل ١٠$^{-٨}$ زوج متناسخ. لذلك اكتشف فى بكتريا القولون أنزيم أخر على جانب كبير من الدقة يقوم باكتشاف الأخطاء المتسربة من عملية المراجعة ويقوم بتصحيح أخطاء ما بعد التناسخ Post-Replication Repair ويسمى انزيم تصحيح عدم المطابقة Mismatch Correction Enzyme والذى ينتج بواسطة الجينات mut S, mut L, mut H .يقوم هذا الإنزيم بعملية مسح Scanning واعادة مراجعة لجزئ د. ن. أ حديث التناسخ ليتعرف على أزواج القواعد غير الصحيحة، ويقوم بإزالة منطقة أحادية السلسلة تحتوى على النيوكلتيدة الخطأ مما يعطى الفرصة لإنزيم البلمرة لإدخال (أو اضافة) القاعدة الصحيحة وملئ الفجوة الناتجة. ولكن برزت مشكلة هامة وهى التعرف على أى من القاعدتين فى الزوج النيوكليتيدى هى الخطأ حيث أن كلاهما مكونان طبيعيان لجزئ د. ن. أ وإذا أزيلت أحدى القاعدتين من هذا الزوج عشوائياً فإن معدل إحتمال أن تزال القاعدة الصحيحة بدلاً من الخطأ يصل إلى ٥٠% وباتالى تكون الطفرة قد استقرت بدلاً من تصحيحها وإزالتها. وللتغلب على هذه المشكلة تبين وجود اشارة خاصة محكومة بتوقيت محدد تقوم بتوجيه عملية إزالة التزاوج الخطأ لتعمل على السلسلة حديثة البناء فقط بحيث يزيل الانزيم الجزء من د. ن. أ المحتوى على القاعدة غير الصحيحة وقد يزيل معها عشرات النيوكلتيدات الصحيحة وذلك من السلسلة المحتوية على التتابع النوعى GATC المجاور لهذه

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

القاعدة المطلوب إزالتها كما فى الشكل (٥-١٤) وعامل الوقت له أهمية بالغة فى توجيه نشاط انزيم التصحيح للسلسلة المطلوبة حيث أن الأنزيم لا يستطيع التعرف على التتابع الكشاف إذا كان الادينين فى هذا التتابع القصير قد تمت ميثلته إلى N^6 Methyladenine بانزيم الميثلة Adenine Methylase المشفر بالجين dam، قبل وصول انزيم التصحيح إليه وبالتالى لا يمكن إزالة القاعدة غير الصحيحة. والمدهش هنا أن معظم تتابعات GATC فى الخلية يحدث بها تحوير من هذا النوع (أى ميثلة الأدينين) بعد تناسخها ولكن بعد فترة قصيرة جداً من التأخير قد لا تزيد عن ثوان أو دقائق قليلة إلا أن هذه الفترة الزمنية الوجيزة تكون كافية لكى يرتبط انزيم التصحيح بهذا التتابع ولذلك فإن الإنزيم لابد أن يتجه إلى سلسلة د. ن. أ الجديده و التى تم بناؤها للتو والتى لم يتحور فيها التتابع الكشاف بعد باضافة مجموعة الميثيل إلى الأدينين بدلا من التوجه إلى السلسلة القالب التى يكون فيها المميثلة قد تمت منذ فترة.

يتعرف انزيم التصحيح هنا ليس فقط على القاعدة الخطأ ولكنه يتعرف ايضاً على بعض الاضافات أو الاقتضابات وبالتالى فإنه يقلل من فرص حدوث طفرات تحرك الإطار بالإضافة إلى طفرات الاستبدال.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٥-١٤): نموذج يبين كيف يقوم نظام إصلاح أخطاء عدم التطابق Mismatch فى بكتريا القولون باستبدال قاعدة خاطئة ومتزاوجة بالخطأ فى الحلزون المزدوج لجزئ د. ن. أ.

تصحيح أخطاء ما بعد التناسخ Post Replication Repair:

الاصلاح باتحادات جديدة Recombinntional Repair:

عرفنا أن الإصلاح الاستئصالى Excision Repair يستخدم السلسلة المكملة كقالب لإحلال جزء جديد بدلاً من الجزء التالف من د. ن. أ. ولكن يحدث أحياناً أن هذا القالب نفسه لا يكون متوفراً كما يحدث مثلاً عندما تتقابل شوكة التناسخ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع منطقة مشوهة أو تالفة (مثل ثنائى البيريميدين) بحيث تنقطع العلاقة بين السلسلتين فى منطقة التشوه قبل أن يتمكن الإصلاح الاستئصالى من الوصول إليها. بالاضافة إلى ذلك إذا كانت كلتا القاعدتين فى الزوج النيوكلتيدى قد تغيرتا كأن ترتبطان تصالبيا Crosslinked بمادة كيماوية مثل العقار المسرطن Mitomycin، فإن أى منهما لا تسطيع أن تستخدم كقالب للأخرى.

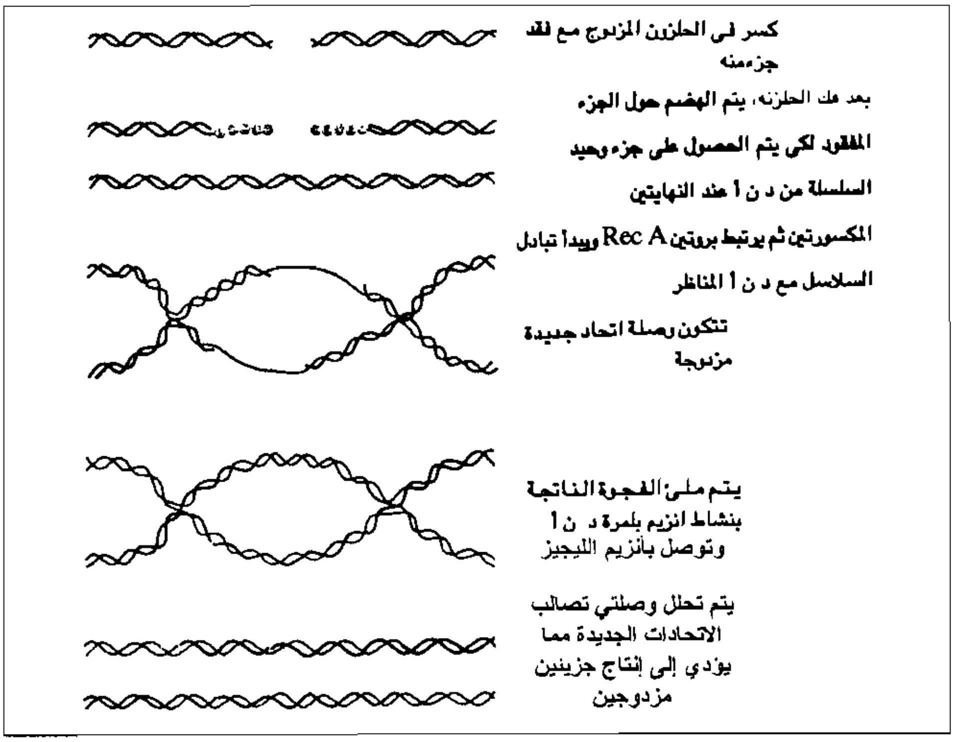
ومن جهة أخرى فإن الحلزون المزدوج حين يحدث به كسر مستعرض يشمل السلسلتين ويصاحبه فقد لجزء من الحلزون المزدوج نهائياً مما يؤدى الى صعوبة إصلاح المنطقة التالفة مباشرة بالدقة المطلوبة.

فى جميع هذه الحالات نجد أن جميع المعلومات (التتابعات النيوكلتيدية) الاصلية والمكملة قد فقدت فى مكان التلف ولا يمكن استرجاعها إلا عن طريق البحث عن جزء آخر مناظر فى جزئ د. ن. أ منفصل فى الخلية نفسها ولكنه متطابق مع الجزء التالف. يسمى ذلك بالاصلاح التالى لعملية الاتحادات الجديدة Recombinational Repair، حيث يتوفر دائماً مصدر مناسب لاحتياطى د. ن. أ فى الخلية. فمثلا عندما تترك منطقة تالفة فى قطعة مفردة من د. ن. أ عند مرور شوكة التناسخ فإن د. ن. أ البنوى الآخر سيحمل نفس التتابع. وإذا حدث تلف لكلا السلسلتين فى منطقة غير متناسخة، فإن البكتريا النشطة فى النمو يكون لديها عادة نسخة إضافية أو أكثر من كروموسوماتها يمكن استخدامها فى هذه الحالة. وبديهى أن خلايا مميزة النواة ثنائية المجموعة الكروموسومية سيتوفر لديها نسخ اضافية من د. ن. أ لاستخدامه فى عملية مماثلة للاصلاح.

وجد أن العنصر الأساسى فى عملية التصحيح بالاتحادات الجديدة عبارة عن انزيم يقوم بإعادة الاتحاد Annealing بين تتابعات كل من جانبى المنطقة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

التالفة وتلك المكملة لها فى جزئ د. ن. أ السليم وبذلك يحدث التطابق الحــرج الذى يتعرف على الجزء الذى يحمل المعلومات الناقصة. وجد أن هذا النــشاط الانزيمى يتم فى بكتريا القولون عن طريق RecA protein كما فى الشكل رقم (٥-١٥).



الشكل (٥-١٥): نموذج لإصلاح كسر فى الحلزون المزدوج لجزئ د. ن. أ
بواسطة نشاط بروتين Rec A

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

دور بروتينات الانقاذ .S.O.S فى إصلاح د. ن. أ (الاصـــلاح القابـــل للخطأ Eror- prone Repair):

من المعروف أن الخلية يمكنها غالباً تنظيم تعبير الجينات حسب الحاجـــة لمنتجات هذه الجينات. لذلك فليس مستغرباً أن نجد الكثير من إنزيمات الإصلاح لجزئ د. ن. أ يتم تنشيطها عند الطلب والمتمثل فى حدوث تلف د. ن. أ. وعلى سبيل المثال تنشط إنزيمات ميثيل ترانسفيريز DNA Methyltransferase عنـــد وجود د. ن. أ مؤلكل Alkylated بطريقة غير عادية. ولكن أهم وأكبر مجموعة يتم استبدائها أو "استنفارها" تتكون من مجموعة من الجينات يطلق عليها جينات الانقاذ S.O.S والتى يتم استبدائها عند حدوث تدمير شديد فـــى جـــزئ د. ن. أ يؤدى إلى ايقاف بناء د. ن. أ تماماً. من أمثلة أنواع التلف الذى يحفـــز جينـــات الانقاذ ذلك التلف الناتج عن تكوين ثنائى البريميدين الذى يحـــول دون حـــدوث تزاوج بين القواعد تماماً، بحيث عندما تصل إليه شوكة التناسخ فإنهـــا تتوقـــف وتتركه ثم تبدأ من جديد بعد مسافة من هذا التشوه الحادث مما يؤدى إلى تكوين فجوة فى د. ن. أ والتى لا يلبث أن يرتبط بها RecA Protein. وفضلاً عن بدء التبادل بين سلاسل د. ن. أ عن طريق الاصـــلاح بالاتحـــادات الجديـــدة فـــإن الارتباط الحادث بين RecA Protein وبين سلسلة مفردة من د. ن. أ يؤدى إلـــى حفز RecA Protein لكى يقوم بوظيفة انزيميـــة مختلفـــة تمامـــاً عـــن وظيفـــة الاتحادات الجديدة وهى: هدم (بالتحليل المائى) للمثبط الخاص بجينـــات الانقـــاذ S.O.S (والمعروف باسم مثبط Lex A) وبهذه الطريقـــة يقـــوم RecA Protein بتحفيز عملية اصلاح د. ن. أ بكل من طريقة الاتحادات الجديدة بالاضافة الـــى استبداء نشاط حوالى ١٥ جين من جينات الانقاذ S.O.S نتيجة لتخليصه لها مـــن

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

البروتين المثبط. والجدول(٥-١) يبين عدد من جينات الانقاذ وملخص لدور كل منها فى الاصلاح.

الجدول (٥-١) جينات الانقاذ S.O.S ودورها فى اصلاح د. ن. أ

اسم الجين	دورة فى اصلاح د. ن. أ
أولاً:	**جينات معروفة الوظيفة**
uvr A urv B urv C	تشفر لانزيم الاستئصال Excision Endonuclease
umu D umu C	يشفران للبروتين المطلوب لاصلاح د. ن. أ الناتج من عملية الاصلاح القابل للخطأ Error-Prone Repair ولمعظم مسببات الطفور.
sul A	يشفر للبروتين المثبط لانقسام الخلية (ربما لتعطى فرصة زمنية لاصلاح د. ن. أ)
ثانيًا:	**جينات داخلة فى بناء د. ن. أ ولكن دورها المحدد فى الاصلاح غير معروف.**
SSb	ينتج البروتينات المرتبطة بالسلسلة المفردة SSB
uvr D	ينتج انزيم هيليكيز II الذى يقوم بفصل السلسلتين أمام شوكة التناسخ
him A	يشفر لأحد البروتينات الداخلة فى الاتحادات الجديدة المحددة الموقع
Rec N	يدخل فى اصلاح د. ن. أ بالاتحادات الجديدة
ثالثًا:	**جينات غير معلومة الوظيفة**
din A din B din D din F	

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وعلى الرغم من أنه معروف الآن كيف أن مشابهات القواعد وبعض القواعد المُحَورة (المُعدلة) تسبب طفرات من خلال التزاوج غير الصحيح، إلا أنه لم يتضح بعد كيف تنشأ الطفرات عندما تكون القواعد مشوهه وتالفة جداً لدرجة أنها تفقد القدرة على التزاوج تماماً. ولكن هذه الحالة هى أهم العمليات على الأطلاق لأن معظم المطفرات الطبيعية والتالى معظم المسرطنات Carcenogens تعمل على أن تظل الخلايا فى إنتاج سلاسل د. ن. أ بالرغم من غياب القالب بما يحتوية من معلومات وراثية لازمة للتناسخ فى مواقع التلف.

وفى محاولة شبه يائسة من الخلية لاصلاح هذه الاخطاء الكبيرة التى نتجت عن تلف كبير فى سلسلتى د. ن. أ الابوية وعدم وجود قالب سليم للتناسخ فإنها تلجأ إلى تنشيط ما يسمى SOS Repair System أى الاصلاح بإنقاذ ما يمكن انقاذه للهروب من التأثيرات المميته الناتجة من هذا التلف. وفى هذا المسار الانقاذى يؤدى نشاط بروتينات الانقاذ إلى دفع انزيم Pol III إلى الاستمرار فى التناسخ خلال الجزء التالف من القالب بدون توقف عند منطقة التلف وتكون النتيجة تلافى وجود فجوة فى د. ن. أ البنوى الناتج إلا أن ذلك يكون على حساب صحة عملية التناسخ نفسها. حيث تحتوى نواتج التناسخ هذه على اخطاء جسيمة تؤدى إلى زيادة كبيرة فى معدل الطفور ولذلك سمى هذا النوع من الاصلاح- الاصلاح المصحوب (القابل) بالخطأ Error Prone Repair.

المطفرات الطبيعية وطرق التعرف عليها:

من المهم التعرف على المطفرات وتفادى تعرض الإنسان لها لسببين وهما:

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

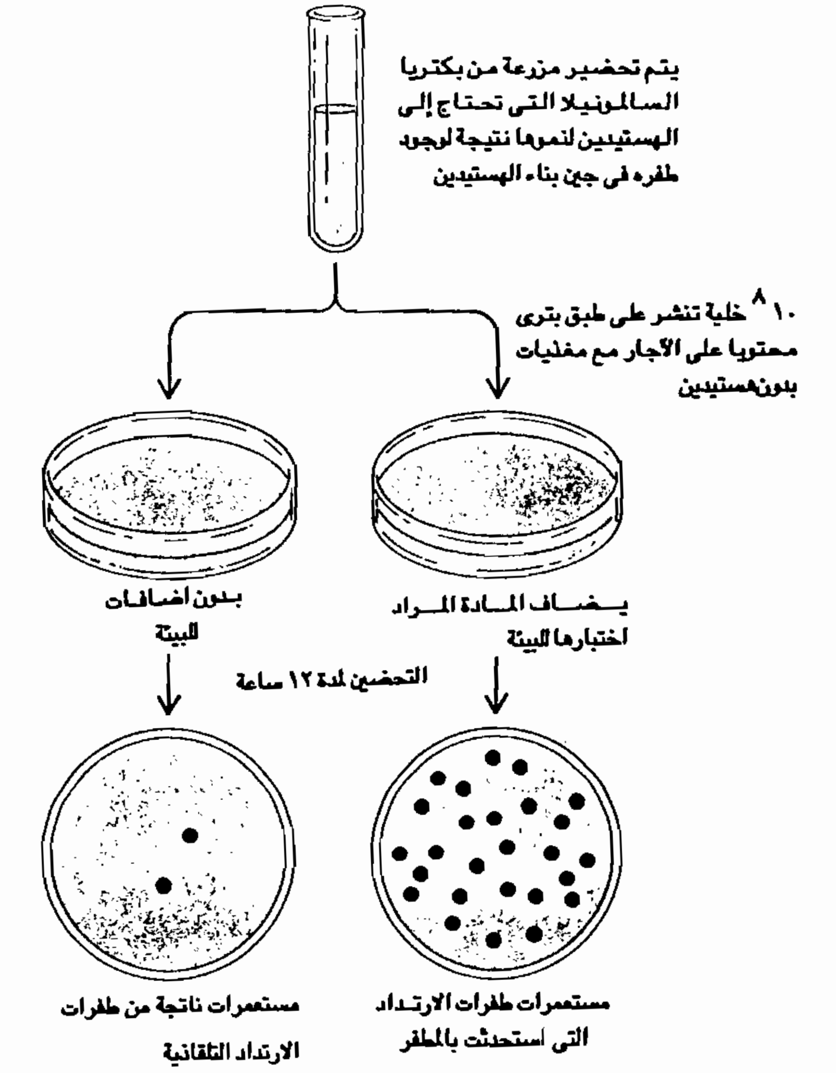
١- أن التغيرات الوراثية العشوائية تكون عادة ضارة للأجيال المقبلة. ولكن حتى الطفرات الجسدية Somatic Mutations أى تلك التى تحدث فى الخلايا اللاجنسية قد تهدد حياة الكائن نفسه. إذ من المعروف أن السرطان ينتج غالباً من طفرات جسدية تؤدى إلى نمو غير منتظم للخلايا.

٢- قد يكون هناك ارتباط بين بعض الأمراض المرتبطة بالشيخوخة مثل تصلب الشرايين Atherosclerosis وبين تراكم د. ن. أ تالف لم يمكن اصلاحه. بل هناك فرضية بأن عملية الشيخوخة بكاملها قد تنتج عن تلف غير عكسى فى د. ن. أ فى الخلايا الجسدية.

ثبت أن معظم المطفرات تكون فى نفس الوقت مسرطنات. وقد تم التوصل إلى طريقة سهلة لتحديد ما إذا كانت مادة ما مسرطنة أم لا وذلك عن طريق استخدام سلالات بكتيرية معينة فى اختبار القدرة الطفرية لهذه المادة، فقد استنبط Ames دكتور إيميز اختبار سمي بأسمه Ames test (الشكل ٥-١٦) وقد استفاد إيميز من عدة خواص مميزة لسلالة من بكتيريا السالمونيلا Salmonella بحيث يسهل قياس معدل الطفور الرجعى Reversion إلى المظهر الوحشى للبكتريا فى طفرة عوز للهستدين. كما أن هذه السلاله تحتوى على بلازميد باستطاعته التعبير بكفاءة عن صور مظهرية مغايرة يحكمها جينين umu C، umu D والتى تكون ضرورية فى حالة ما إذا كان التلف من النوع المطفر. إلا أنه تبين أن معظم المركبات المسرطنة وخاصة النواتج الطبيعية لا تظهر نشاطاً مسرطناً إذا تمت اضافتها مباشرة إلى البكتريا النامية ولكن لابد أن يحدث لها تنشيط أولاً عن طريق التحضين Incubation مع مستخلص من كبد الثدييات. وهى عملية مشابهة لما يحدث فى الطبيعة عندما يتم تمثيل المواد الغريبة فى الكبد.وأثناء عملية التنشيط هذه يتم تحويل المواد المسرطنة إلى

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

مشتقات محبه للماء تتفاعل بسهولة مع القواعد فى جزئ د. ن. أ. ولكن هل جميع المواد المطفرة الهامة لابد أن تكون بالتالى مسرطنة؟



الشكل (٥-١٦): اختبار إيمز لتقدير المقدرة الطفرية (المسرطنة) لمادة مطفرة على أساس قدرتها على إحداث الطفور الرجعى إلى الطراز الوحشى فى سلالة من بكتريا السالمونيلا المعدلة وراثيا

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تبين من الدراسات على الأمراض الوبائية بأن تدخين السجائر من أهم المواد المسرطنة التى تواجه الإنسان وقد تبين من اختبار إيمز أن التدخين مطفر قوى.

كما أن الخطر الكامن لبعض المطفرات من الكيماويات الصناعية مثل Ethylene Dichloride معروف تماماً. وهناك الكثير من ملوثات البيئة قد تكون مسرطنة. ولكن تبين حديثاً أن معظم مصادر المطفرات والمسرطنات تأتى من الإغذية وحتى فى الغذاء العادى مثل الخضروات الشائعة.

إذ أن النبات يقوم بإنتاج مواد سامة للدفاع عن نفسه ضد المفترسات مثل الحشرات ثم يقوم الكبد بتمثيلها بحيث تكون النواتج مطفرات فعالة.كما تبين أن معظم المطفرات تكون مؤكسدات Oxidants مثل شق الأكسوجين Oxygen Radicals الذى يتفاعل مع قواعد د. ن. أ وهناك مصدر غذائى آخر يمكن أن يؤدى إلى الطفور بل وإلى السرطان وهى الدهون التى يتم تمثيلها إلى مؤكسدات نشطة فى الكبد إلا أن الأمل يكمن فى تفادى هذه المخاطر المحتملة عن طريق بعض مضادات التأكسد الطبيعية Antioxidants مثل الجلوتاثيون Glutathione.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفصل السادس

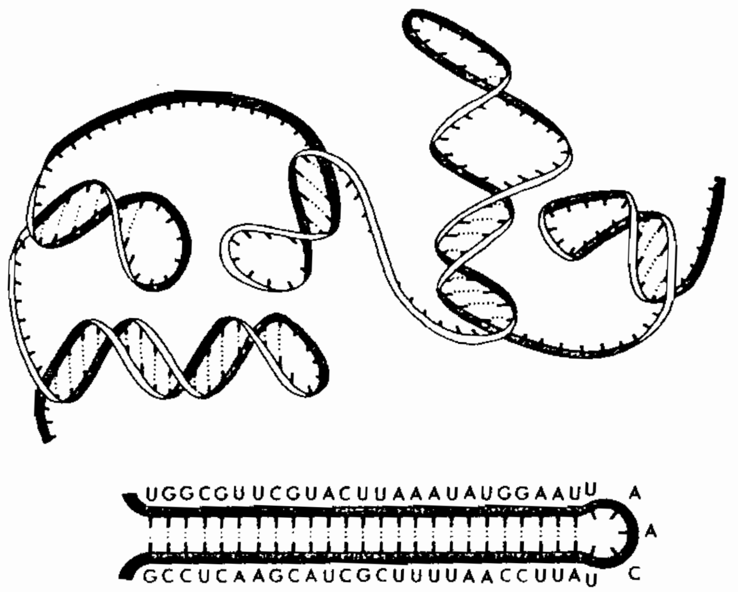
بنـاء ر. ن. أ فى غير مميزة النواة
RNA Synthesis in Prokaryotes

تركيب جزئ ر. ن. أ:

يتكون جزئ ر. ن. أ عادة من سلسلة مفردة بعكس د. ن. أ وهو ينـسخ على قالب د. ن. أ وتعد سلاسل ر. ن. أ قصيرة جداً بالمقارنة بجـزئ د. ن. أ حيث تمثل كل سلسلة من ر. ن. أ عادة تتابعات خاصة بجين واحد أو بمجموعة من الجينات التى تربطها علاقة وظيفية مشتركة فيما يسمى بالأوبرون Operon كما سيأتى بعد. على الرغم من أن جزئ ر. ن. أ يكون أحادى السلسلة إلا أنـه قد يتشكل فى تركيبات مختلفة أكثر تعقيداً. توجد فـى معظـم أنـواع ر. ن. أ مناطق قصيرة تأخذ شكل قريب من الحلزون المزدوج والتى تتكون نتيجة لتكون ما يسمى بتركيب دبوس الشعر Hairpin بين تتابعات متكاملة بحيث تتزاوج عند التوائها وتكون منطقة مزدوجة السلسلة كما فى الشكل (٦-١).

بالإضافة إلى أزواج القواعد الثابتة AU ,GC فإنه قـد يتكـون تـزاوج ضعيف من نوع GU والتى تساهم أيضاً فى التركيب الثانوى (الثـانى) لجـزئ ر. ن. أ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



مثال حقيقي لعروة ر ن أ من ر ن أ
الفيرس R17

الشكل (٦-١): إنثناء سلسلة ر. ن. أ مبيناً مناطق عديدة مزدوجة الحلزون مرتبطة ببعضها بروابط هيدروجينية

من المعروف أنه توجد ثلاث أنواع رئيسية من ر. ن. أ وهـي ر. ن. أ انمراسل mRNA، ر. ن. أ الريبوسومى rRNA ر. ن. أ الناقل tRNA ويقـوم كل منها بدور محدد فى عملية الترجمة وبناء البروتين كما سيأتى بعد.

فى حالة tRNA مثلاً نجد أن طبيعة تكوينه ووظيفتـه تحـتم أن تنثنـى السلسلة لتكوين عدد من العروات (فيما يعرف بشكل ورقة البرسيم Clover Leaf Shape كما سيأتى بعد) ولذلك يوجد عدد كبير من التتابعات المتكاملة الداخليـة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

حتى يمكنها أن تتزاوج عند تقابلها فى هذه العروات حتى يتسنى للجزئ أن يأخذ هذا الشكل المميز فى التركيب الثالثى Tertiary.

تحتوى كل خلية غير مميزة النواة على عدد كبير ومختلف من جزيئات ر.ن. أ والتى تتراوح فى الطول بين ٧٠ نيوكلتيدة إلى عشرات الالاف من النيوكلتيدات. وهى فى الغالب من نوع السلاسل الطولية المفردة ولكن يوجد القليل منها الذى يأخذ شكلاً حلقياً.

البناء الأنزيمى لجزئ ر. ن. أ على قالب د. ن. أ:

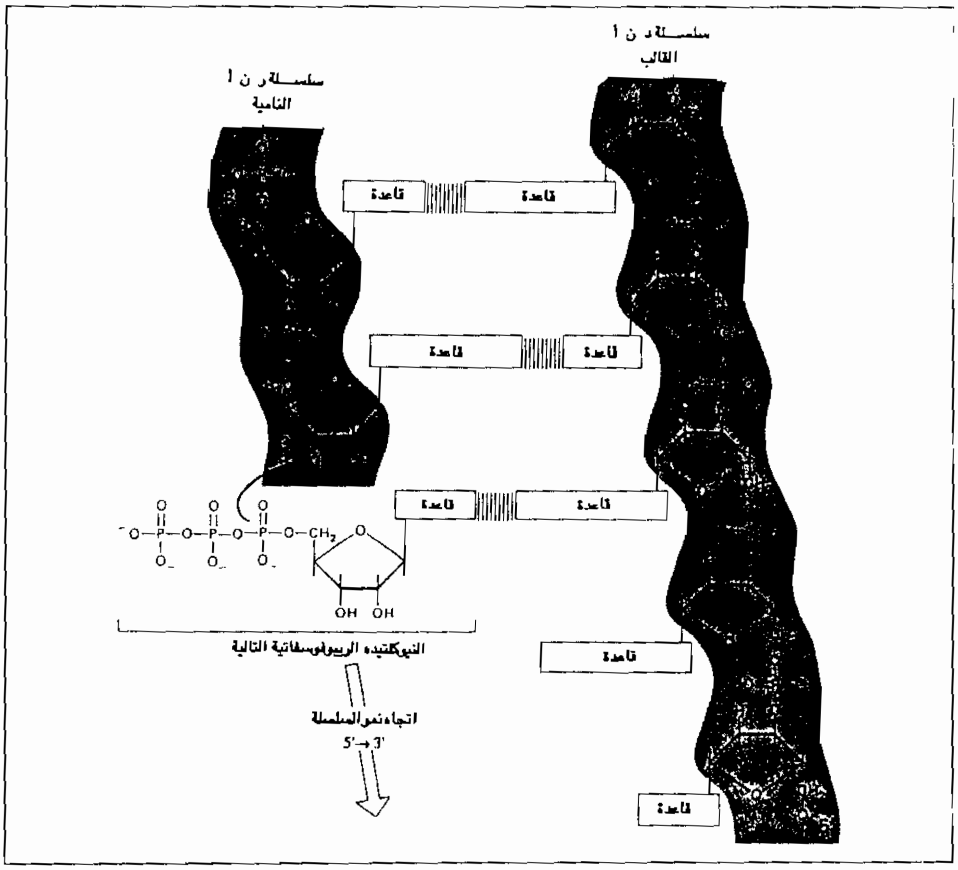
تدعو حقيقة أن ر. ن. أ مثله مثل د. ن. أ يتكون من سلسلة طويلة غير متفرعة مكونة من تتابعات مختلفة لأربعة نيوكلتيدات (U, A, C, G) إلى افتراض أن المعلومات الوراثية المخزونة فى سلاسل د. ن. أ يتم انتقالها إلى تتابع مكمل من نيوكلتيدات ر. ن. أ.

وطبقاً لهذه الفرضية فإنه لابد أن يحدث انفصال بين سلسلتى د. ن. أ فى مرحلة معينة من دورة الخلية لتعمل السلاسل المفردة كقالب يتم عليها بناء ر.ن. أ تكاملياً مع تتابع القواعد الموجودة على القالب بحيث يتقابل A مع U ,G مع C. ولابد من وجود ضوابط لمعرفة إذا كانت سلسلة د. ن. أ المنفصلة ستستعمل كقالب لانتاج سلسلة مكملة من د. ن. أ أو فى بناء سلسلة من ر. ن. أ.

أمكن التحقق من وجود تلك الضوابط عندما تم اكتشاف الانزيم المسئول عن التخليق الحيوى لجزئ ر. ن. أ والذى سمى فى البداية انزيم النسخ Transcriptase ثم أصبح اسمه انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polmerase والذى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يوجد فى جميع خلايا غير مميزة النواة. فمثلاً وجد أن خلية بكتريا القولون الواحدة تحتوى على حوالى ٣٠٠٠ جزئ من هذا الانزيم. يقوم ذا الانزيم بربط الوحدات البنائية لسلاسل ر. ن. أ وهى الريبونيوكلتيدات Ribonucleotides ببعضها وذلك بتكوين روابط 5’ ,3’ فوسفودايستر التى تعمل على ثبات الهيكل الأساسى لجزئ ر. ن. أ كما فى الشكل (٦-٢).



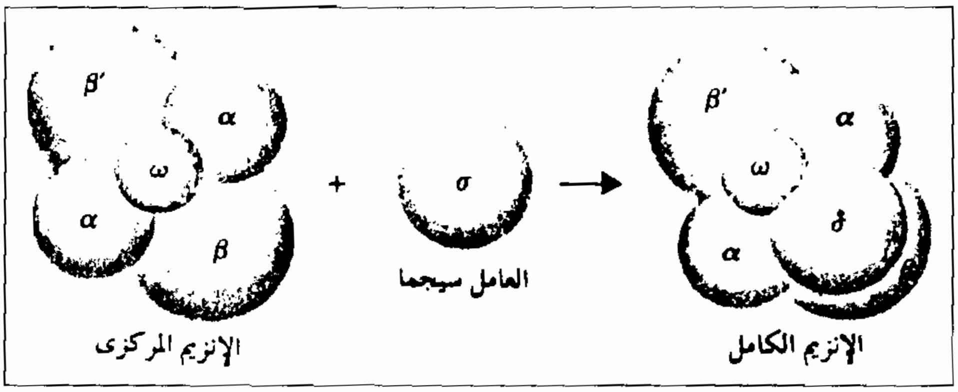
الشكل (٦-٢): دور انزيم ر. ن. أ فى بكتريا القولون فى اضافة النيوكلتيدات الريبوسومية لاستطالة سلسلة ر. ن. أ على أساس قانون تزاوج القواعد مع مكملاتها فى د. ن. أ القالب ويكون البناء فى الاتجاه 3’ → 5’

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

إلا ان ذلك لا يمكن أن يحدث إلا فى وجود قالب من د. ن. أ مما يدل على أن د. ن. أ لابد أن يقوم بترتيب النيوكلتيدات التى تدخل فى تتابع ر. ن. أ بمعلومية تتابع القواعد فى السلسلة د. ن. أ القالب وذلك حتى يستطيع انزيم ر.ن.أ العمل بكفاءة فى عملية البناء.

تركيب انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase:

يتكون انزيم بلمرة ر. ن. أ من عدد من تحت الوحدات وتتكون الصورة النشطة للانزيم والمسماه بالإنزيم الكامل Holoenzyme من خمس سلاسل من متعددات الببتيد المختلفة وهى (∝, β', β, σ, ω) وترتبط مع بعضها بروابط ثانوية غير تساهمية. وتمثل كل وحدة مرة واحدة فى الجزئ الكامل فيما عدا الوحدة ∝ التى تمثل بوحدتين ويكون الوزن الجزيئى للأنزيم الكامل حوالى ٥٠٠,٠٠٠ دالتون (الشكل ٦-٣) ويلخص الجدول (٦-١) الوحدات الداخلة فى تركيب الانزيم فى بكتريا القولون ووظيفة كل منها فى عملية النسخ.



الشكل (٦-٣): رسم توضيحى للتركيب المعقد لانزيم بلمرة ر. ن. أ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجدول (٦-١) تحت وحدات subunits لانزيم بلمرة ر. ن. أ في بكتريا القولون وعوامل النسخ ووظيفة كل منها

تحت الوحدة	اسم الجين	الموقع على الخريطة (دقائق)*	الوزن الجزيئى (Dalton)	عدد تحت الوحدات فى الانزيم	الوظيفة
β' (بيتا)	rpo C	٨٩,٥	١٥٥,٠٠٠	١	الارتباط مع د. ن. أ؟
β (بيتا)	rpo B	٨٩,٥	١٥١,٠٠٠	١	موقع التفاعل لبلمرة ر. ن. أ
σ (سيجما)	rpo D	٦٦,٥	٧٠,٠٠٠	١	التعرف على تتابع promoter وبدء البلمرة
∝ (الفا)	rpo A	٧٢	٣٦,٥٠٠	٢	؟
ω (أوميجا)	--	—	١١,٠٠٠	١	؟
عوامل النسخ					
P (Rho)	rho	84.5	٤٦,٠	٦	انهاء أو وقف البلمرة
nus A	nus A	٦٥	٦٩,٠٠٠	١	الاستطالة والانهاء.

* يشير إلى الموقع على الخريطة المعروفة عن التركيب الحلقى لجزئ د. ن. أ. في بكتريا القولون والذى يمثل بستين دقيقة.

لايوجد ارتباط قوى بين تحت الوحدة سيجما (σ) مع بقية مكونات الإنزيم. لذلك يمكن فصل معقد إنزيمى مكون من ($\beta', B, \propto_2, w$) بدون الوحدة σ ويطلق على هذا المعقد الإنزيم المركزى core enzyme حيث تبـين أن باسـتطاعة أن

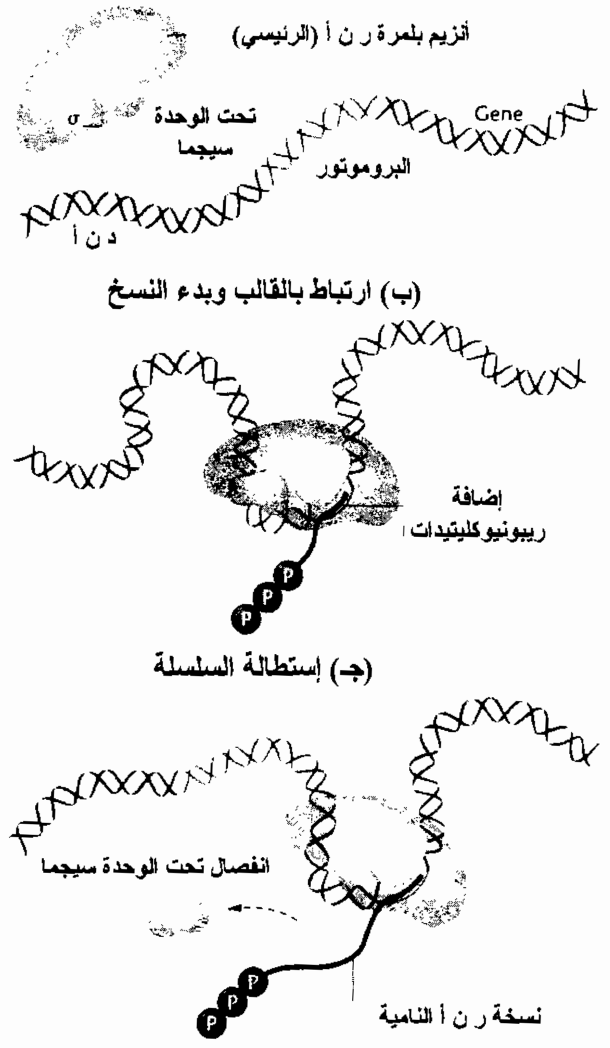
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يقوم بتكوين الروابط الفوسفودايستر اثناء بناء سلسلة ر. ن. أ بنفس الكفاءة التى يقوم بها الإنزيم الكامل أى فى وجود أو غياب الوحدة سيجما σ ويعتقـد بـأن مركز النشاط الإنزيمى يقع فى الوحدة β للإنزيم المركزى.

إلا أن تحت الوحدة σ تلعب دوراً رئيسياً وهاماً فى التعرف علـى نقطـة بدءبناء السلسلة على قالب د. ن. أ والمعروفة بأسم منطقـة تتـابع المـستبدئ Promoter كما سيأتى بعد. ويبين الشكل (٦-٤) رسماً تخطيطياً لعمليـة بنـاء ر. ن. أ بواسطة إنزيم بلمرة ر. ن. أ.

ويظهر من الشكل المراحل الثلاثـة للنـسخ وهـى البـدء والاسـتطالة والانهاء.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٦-٤): المراحل المبكرة للنسخ في غير مميزة النواة

أ - مكونات العملية.

ب- إرتباط القالب عند الموقع (-١٠) وتشمل تحت الوحدة سيجما لإنزيم بلمرة ر ن أ وبدء بناء ر ن أ.

ج - إستطالة السلسلة بعد إنفصال تحت الوحدة سيجما من معقد النسخ ويتحرك الإنزيم على طول قالب د ن أ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

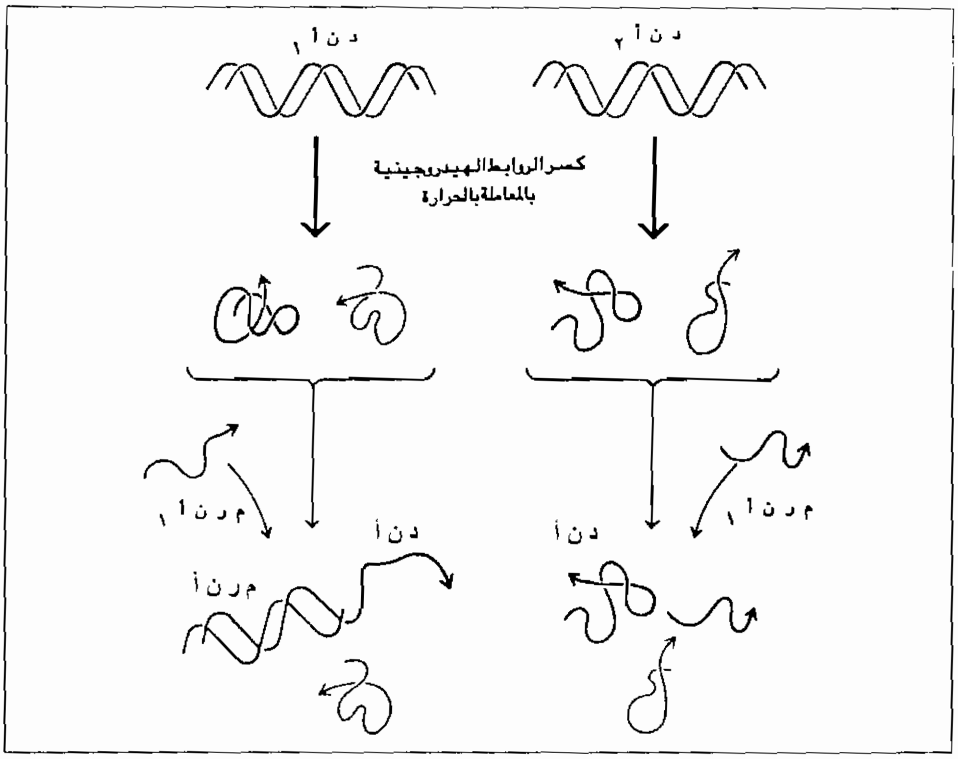
اختيار سلسلة واحدة من د. ن. أ للعمل كقالب لبناء ر. ن. أ.:

فى حين يحتوى جزئ د. ن. أ عادة على عدد كبير جداً من الجينات فإن كل جزئ من ر. ن. أ يمثل عادة تتابعات ريبونيوكلتيدية مكملة محدودة تمثـل جين واحد محدد. وعلى ذلك فإنه إذا افترضنا أن كل من سلسلتى د. ن. أ يمكن أن تستخدمان كقالب لبناء سلسلة معينة من ر. ن. أ، فإن معنى ذلـك أن كـل جين سينتج منه نسختين من ر. ن. أ بتتابعات مكملة. وحيـث أن كـل الأدلـة الوراثية تُجمع على أن كل جين يتحكم فى جزئ واحد مـن البـروتين (متعـدد الببتيد) فإن ذلك سيضعنا أمام أحد احتمالين: إما أن واحدة فقـط مـن سلاسـل ر. ن. أ هى التى سيتم بنائها أو إذا كان لابد من بناء السلسلتين فإن إحداهما فقط ستكون نشطة وفعالة. ولكن تبين أن الاحتمال الأول هو الصحيح ففـى الخليـة الحية *in vivo* لا يوجد إلا نوع واحد من سلسلة ر. ن. أ التى تمثل جين معـين. كما أمكن البرهنة على ذلك بدراسة ر.ن.أ المتكون فى الخلية البكتيرية بواسطة فيرس SP8 الذى يتكاثر فى الخلية البكتيرية *Bacillus Subtilis*. يتميز الحلزون المزدوج لهذا الفيرس باحتواء كل سلسلة على قواعد مختلفة ومميزة بحيث يمكن التعرف على كل منهما بطرق جزيئية خاصة كما يمكن فصل السلسلتين بسهولة وبذلك يمكن معرفة ما إذا كان ر.ن. أ المتكون يحتوى على تتابعات من القواعد مكملة لسلسلة واحدة فقط أم لكلا السلسلتين.

استخدمت فى ذلـك تقنيـة تهجـين ر.ن. أ مـع د. ن. أ RNA/ DNA Hybridization حيث تخلط جزئيات ر. ن. أ مع السلاسل المفردة مـن د. ن. أ الناتجة عن عملية الدنترة للحلزون المـزدوج Denaturation بالتـسخين. عنـد إجراء عملية إعادة الاتحاد Renaturation بالتبريد البطئ لهذا الجزئ المدنتر فى وجود سلاسل ر. ن. أ التى سبق بناؤها على قالب د. ن. أ الفيروس نفسه فـإن

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بعضاً من ر. ن. أ سينجذب إلى مناطق د.ن. أ المكملة فى احدى السلسلتين فقط ويكون حلزون مزدوج كما فى الشكل (٦-٥).

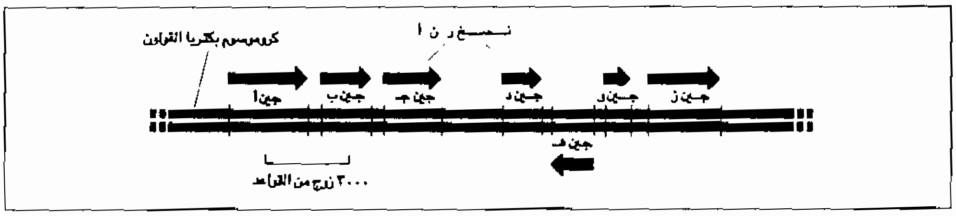


الشكل (٦-٥): استخدام الهجين د. ن. أ / ر. ن. أ لبيان التكامل فى تتابع القواعد من جزئ ر. ن. أ. وأحد سلسلتى د. ن. أ القالب. يبين الجانب الأيسر من الشكل التخطيطى تكوين جزئ هجينى بين جزئ ر. ن. أ وأحد السلسلتين للقالب. ويبين الجانب الايمن لماذا يمسح تكوين هجين د. ن. أ/ ر. ن. أ بالكشف عن التكامل فى التتابع. إذا تم خلط نفس جزئ ر. ن. أ مع د. ن. أ غريب فانه لن يتكون جزئ هجين

تبين أن ر. ن. أ المبنى حيوياً فى الخلية سيتجه إلى تكوين هجين مع إحدى السلسلتين من د. ن. أ للفيروس SP8 فقط، مما يعنى أنه بالنسبة لجين ما يتم التخليق الحيوى لتتابعات ر. ن. أ على إحدى السلسلتين من د. ن. أ فقط. أى

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

أن النسخ لا يتم إلا على سلسلة قالب واحد بالنسبة لجين معين. وبصفة عامة فإن إحدى السلسلتين من د. ن. أ فى الكائنات غير مميزة النـواة تـستخدم كقالـب لمجموعة من الجينات فى حين قد تستخدم السلسلة الآخرى كقالب لنـسخ عـدد آخر من الجينات كما فى الشكل (٦-٦).



الشكل (٦-٦): منطقة قصيرة من كروموسوم بكتيرى تبين عملية نسخ عدة جزيئات من ر.ن.أ على قالب د. ن. أ المحتوى على عدة جينات متجاورة

ويتم ذلك الاختيار بتوجيه من منطقة تتابع المستبدئ Promoter الموجـودة على سلسلة د. ن. أ التى تؤدى إلى ارتباط إنزيم بلمرة ر. ن. أ بالسلسلة القالب الصحيحة لجين معين كما سيأتى بعد.

إتجاه البناء فى جزئ ر. ن. أ:

إن اتجاه البناء فى جزئ ر. ن. أ يتحدد (كما فى د. ن. أ) باتجاه ارتبـاط السكر الريبوزى بالفوسفات فى الهيكل الأساسى للجزئ فإذا انتهت السلسلة بذرة كربون رقم 5’ فيطلق عليها النهاية 5’ فى حين يطلق على النهاية المحتوية على الذرة رقم 3’ النهاية 3’.

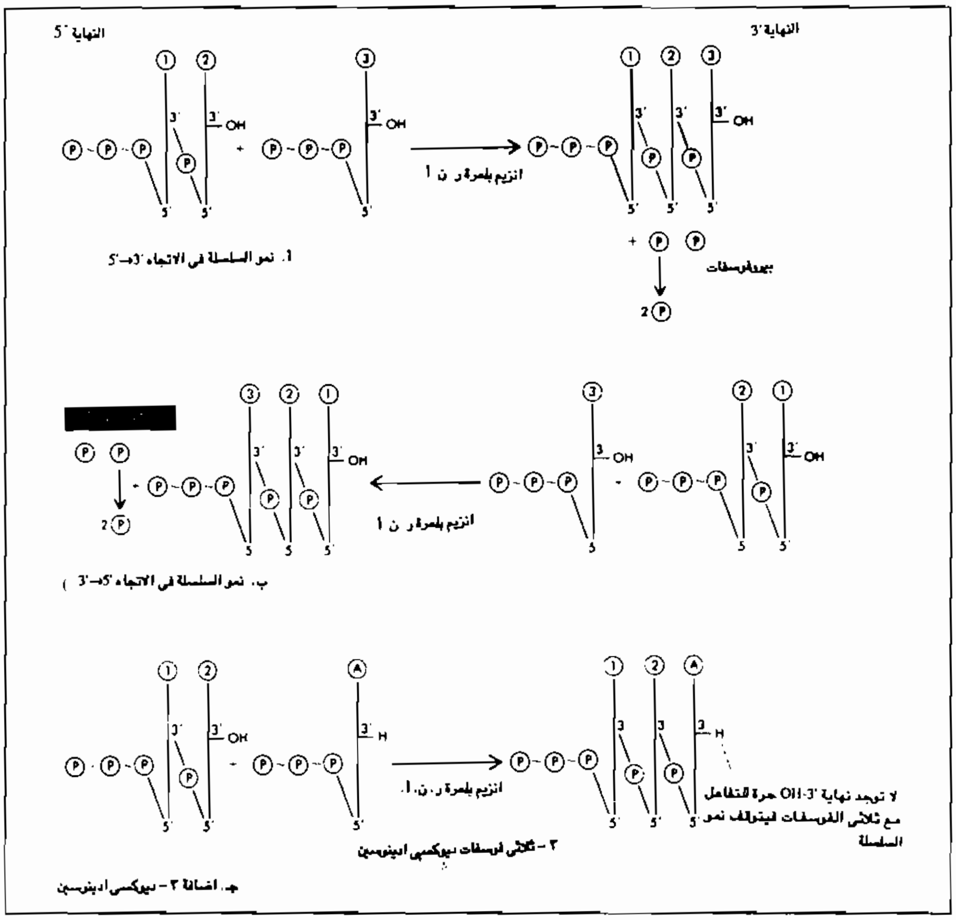
هناك احتمالان فقط لاتجاه البناء فى ر. ن. أ. أما فى الاتجـاه 3’→5’ أو 5’→3’ فإذا كان النمو فى الاتجاه 3’ → 5’ فإنه من المتوقع أن تكون النيوكلتيدة الأولى فى السلسلة محتوية على مجموعة ثلاثية من الفوسفات P - P - P ولكـن

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

إذا كانت السلسلة ستنمو فى الاتجاة 5’→3’ فإنه من المتوقع أن تكون النيوكلتيدة التى تنتهى بها السلسلة هى المحتوية على مجموعة فوسفات ثلاثية P - P - P.

تبين أن الاحتمال الأول هو الصحيح حيث وجد أنه فى السلاسل الحديثة البناء تكون أحدث نيوكلتيدة مضافة للنهاية النامية عند النهاية 3’ فى حين تكون مجاميع الفوسفات الثلاثية P - P - P مرتبطة بالنيوكلتيدة التى ابتدأ بها بناء السلسلة.كما أمكن البرهنة على الاتجاة البنائى 3’→5’ باستخدام المثبط الأيضى 3’- Deoxyadenosine وهو مشابة لقاعدة الأدينيين ولكن مع عدم وجود ذرة الأوكسوجين على ذرة الكربون 3’ والتى تشارك فى تكوين أحد الروابط الهيدروجينية بين القواعد. عند اضافة هذا المثبط إلى الخلايا البكتيرية فإنه يتم أولاً فسفرته إلى 3’deoxyadenosine phosphate P - P - P ثم يتم ارتباطه بعد ذلك بالنهاية 3’ النامية من السلسلة وحيث أنه لا يحتوى على مجموعة 3’- OH فإنه لا يمكنه استقبال نيوكلتيدات جديدة فتقف سلسلة ر. ن. أ عن النمو والاستطالة مما يؤكد أن البناء لابد أن يتم فى الاتجاه 3’→5’ فقط كما فى الشكل (٦-٧).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٦-٧): رسم تخطيطي لأثبات أن اتجاه النسخ هو 3' → 5' باستخدام ٣- ثلاثي فوسفات ديوكسي أدينوسين

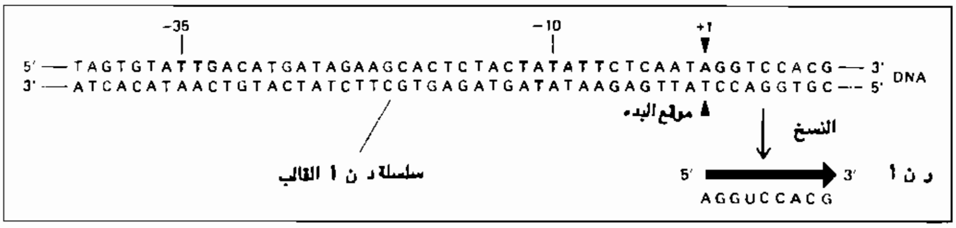
دور منطقة تتابع المستبدئ Promoter في بناء ر. ن. أ:

في حين انه لا يوجد أىدور بنائي للوحدة سيجما (σ) في إنــزيم ر. ن. أ الكامل إلا أن لها وظيفة هامة جداً حيث تقوم بالتعرف على أشارات البدء علــى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

طول جزئ د. ن. أ القالب. وقد أظهرت نتائج التجارب المعملية *In Vitro* أنـــه فى غياب الوحدة σ قد يتم بناء سلسلة ر. ن. أ ولكن ببدايات غير صحيحة ممـــا يجعل السلسلة الناتجة غير صالحة لعمليـــة بنـــاء البـــروتين المطلـــوب حيـــث يتم ارتباط الإنزيم المركزى Core Enzyme بأماكن عشوائية على طول قالـــب د. ن. أ مما يعطى ر.ن. أ بتتابعات غير صحيحة وبالتالى نحصل على منـــتج غير فعال. ولكن وجود الوحدة سيجما σ مع بقية الوحدات فى الإنـــزيم يـــؤدى الى التعرف على الموقع الصحيح لبداية النسخ ممـــا يـــدل علـــى أن الإنـــزيم الكامل Holoenzyme لديه المقدرة على الارتباط نوعياً مع تتـــابع البـــدء علـــى جزئ د. ن. أ والذى يعرف بمنطقة تتابع المـــستبدئ Promoter. تتكـــون هـــذه المنطقة فى بكتريا القولون من حوالى ٥٠-٦٠ نيوكلتيده ويرتبط بها انزيم بلمرة ر. ن. أ فى منطقة تمتد حوالى ٤٠ قاعدة قبل بدء النسخ Upstream إلى حوالى ٢٠ قاعدة بعد بدء النسخ Downstream. تبـــين أن هنـــاك تتابعـــات نوعيـــة محفوظة فى منطقة تتابع الابتداء هذا ويطلق عليها التتابع الكـــشاف المحفـــوظ Consensus Sequence، لابد أن يتعرف عليها إنزيم بلمرة ر.ن.أ وهى تتكـــون من تتابعين طول كل منهما ٦ نيوكلتيدات وتقعان قبل موقع بدء النـــسخ بحيـــث يفصل بينهما حوالى ١٧ نيوكلتيدة من التتابعات غير المحددة من د.ن.أ كما فى الشكل (٦-٨).

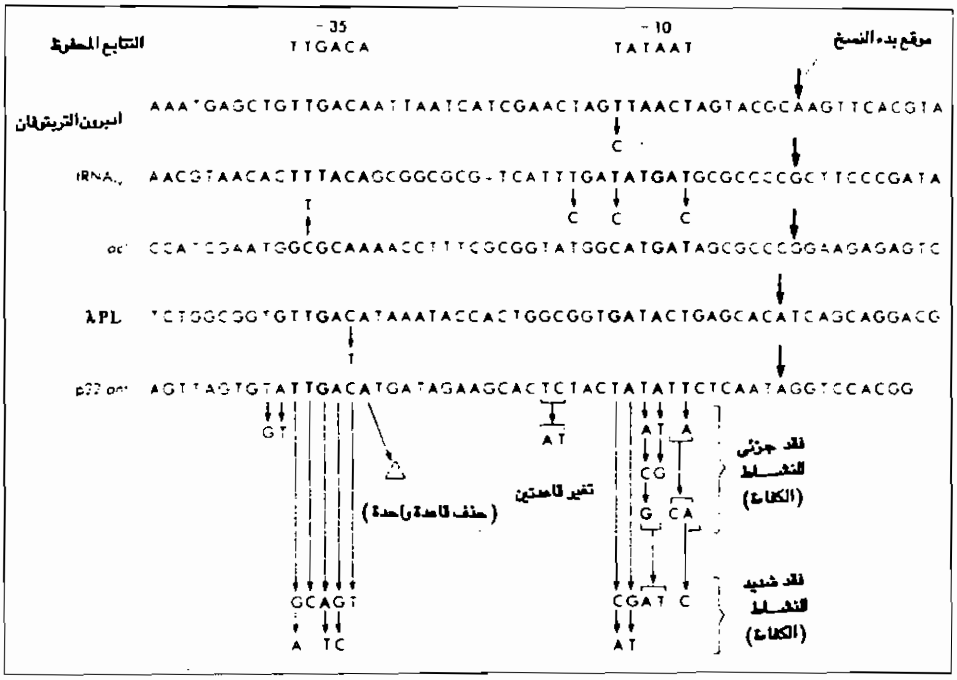
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٦-٨): منطقة تتابع البروموتور على سلسلة د. ن. أ القالب التى يتعرف عليها إنزيم بلمرة ر. ن. أ لبدء النسخ لسلسلة ر. ن. أ. تتكون منطقة البروموتور من تتابعين قصيرين على بعد حوالى -٣٥ إلى -١٠ نيوكلتيده من نقطة بدء نسخ سلسلة ر. ن. أ. وتحدد هذه التتابعات موقع ارتباط انزيم بلمرة ر. ن. أ، وتكون هذه التتابعات مع موقع البدء منطقة البروموتور. ويؤدى حدوث طفرات فى أى من هذه التتابعين المحفوظين إلى توقف نشاط البروموتور فى حين لا يتأثر هذا النشاط إذا حدثت التغيرات فى أى تتابعات أخرى

يبدأ التتابع السداسى الأول عند موقع النيوكلتيده رقم -٣٥ قبل بدء النسخ وتتكون غالباً من التتابع (TTGACA) فى حين يقع التتابع السداسى الثانى عند النيوكلتيده رقم -١٠ قبل بدء النسخ وتتكون من التتابع (TATATT). وجد أنه لابد أن يرتبط إنزيم البلمرة ر. ن. أ بهذين الموقعين قبل أن تبدأ عملية النسخ الفعلية عند نيوكتيده البدء فى الموقع رقم +١ على سلسلة د. ن. أ القالب. وقد تبين أن أى تغيير (طفور) فى أى من هذين التتابعين السداسيين يؤدى إلى توقف نشاط البروموتور وبالتالى توقف بدء النسخ بإنزيم بلمرة ر. ن. أ فى حين لا تتأثر عملية النسخ كثيراً إذا حدث تغير فى التتابعات الآخرى فى منطقة الابتداء Promoter كما فى الشكل (٦-٩).

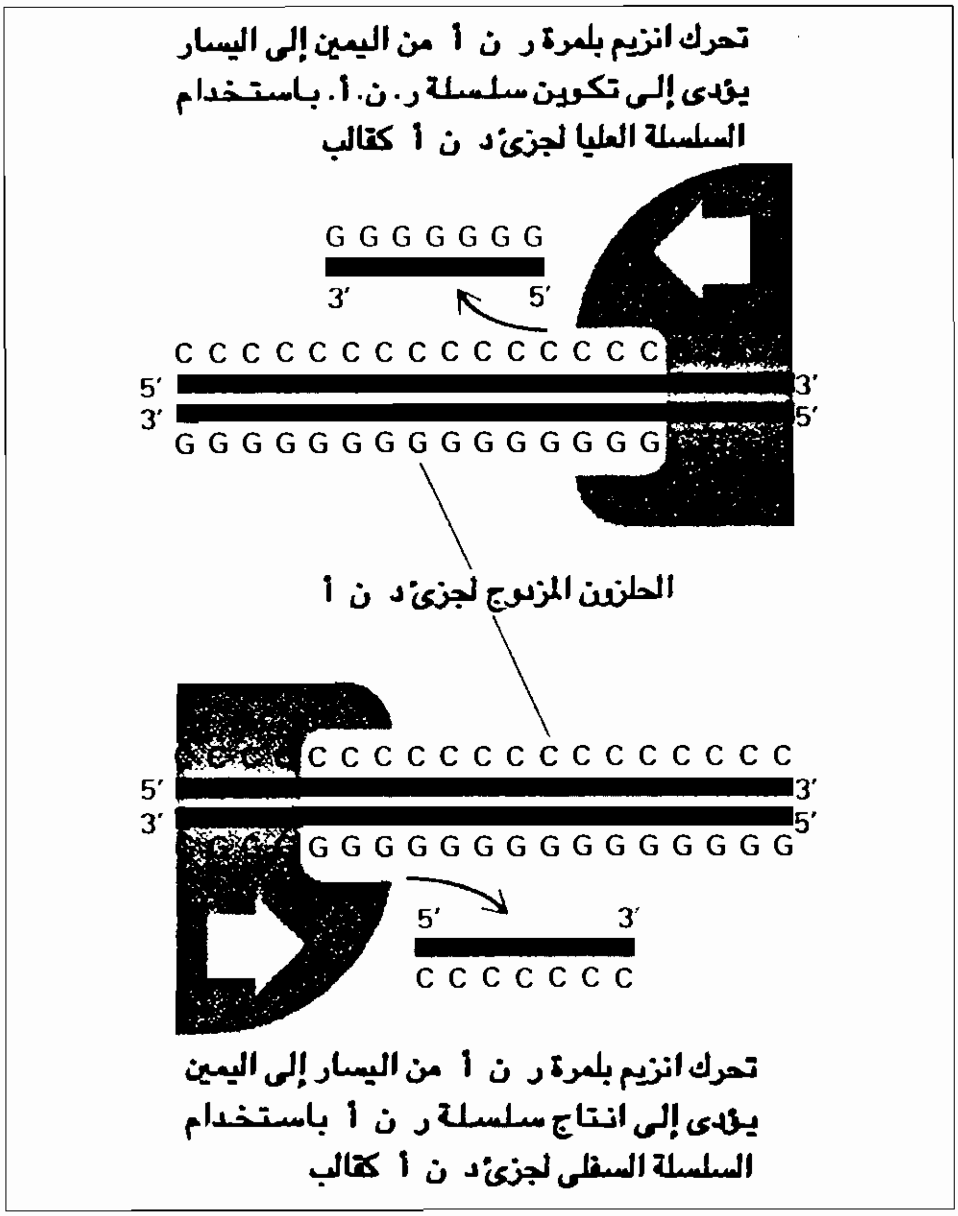
salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (٦-٩): مواقع الطفرات التى تؤدى إلى خفض أو توقف نشاط البروموتور فى عملية بدء النسخ (الأسهم إلى أسفل) أو زيادة النشاط (الأسهم إلى أعلى) فى خمس بروموتورز مختلفة. كما يظهر تتابع القواعد فى سلاسل ر.ن. أ.

وكما سبق القول، يتم اختيار السلسلة القالب بتوجيه من تتابع المستبدئ Promoter حيث تؤدى حقيقة أن البناء يتم فى الاتجاه '3→'5 إلى أنه يلزم على إنزيم بلمرة ر. ن. أ أن يتجه إلى السلسلة التى يكون فيها تتابع المستبدئ الحرج Consensus Sequence فى الاتجاه الصحيح (Forward and Upstream) مما يسمح بارتباط قوى بينه وبين الانزيم كما فى الشكل (٦-١٠).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٦-١٠): أهمية اتجاه تتابع القواعد فى البروموتور فى اختيار سلسلة د. ن. أ القالب الصحيح لنسخ سلسلة ر. ن. أ بواسطة إنزيم بلمرة ر. ن. أ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

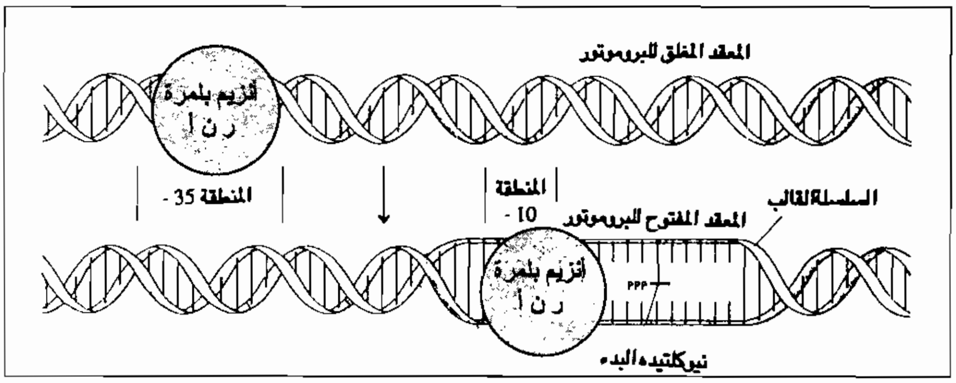
تأثير ارتباط إنزيم البلمرة مع تتابع المستبدئ Promoter فـــى فـــك حلزنـة د.ن. أ وبدء عملية النسخ:

تبين فى بكتيريا القولون أن إنزيم بلمرة ر. ن. أ يـــرتبط بمنطقـــة تتـــابع المستبدئ Promoter فى خطوتين محددتين: حيث يبحث أولاً عن منطقة الابتداء ويرتبط بها ارتباطاً مبدئياً ضعيفاً فى المعقد المقفـــول (Closed) أى قبـــل فـــك الحلزون المزدوج لجزئ د. ن. أ ويحدث هذا التعرف المبدئى غالباً فى المنطقة (-٣٥) حيث تبين أن الطفرات التى تمنع الارتباط مع تتابع المستبدئ هى تلـــك التى تؤدى إلى تغيير القواعد فى هذه المنطقة. والخطوة الثانية تتم عند تحـــول المعقد المقفول إلى معقد مفتوح، ويتم فيه ارتباط إنزيم بلمرة ر. ن. أ بقوة بتتابع المستبدئ Promoter. فى هذه المرحلة من التحول يتم فك حلزنـــة حـــوالى ١٧ زوج من القواعد وتتكون ما يسمى فقاعة التناسخ Transcription Buble بدءاً من منطقة (-١٠) مما يجعل السلسلة المفردة للقالب معرضة ومكشوفة لفعل إنـــزيم بلمرة ر. ن. أ لاستخدامها كقالب لتوجيه تتابع نسخ القواعد فى سلـــسلة ر. ن. أ النامية.

تبين أن المنطقة (-١٠) تكـــون عـــادة غنيـــة فـــى ازواج القواعـــد AT ومعروف أنها تكون أسهل فى الأنفكاك بالدنترة عن الأزواج GC. وقد تبين أن الطفرات التى تمنع تكوين المعقد المفتوح تقع فى نفس هذه المنطقة إذ تحدث هذه الطفرات تغير فى تتابع المنطقة (-١٠) ولكنها تحافظ على محتواها مـــن أزواج القواعد AT مما يشير إلى أن هذه المنطقة تأخذ شكلاً مميـــزاً ونوعيـــاً بحيـــث يتعرف عليها إنزيم البلمرة بالأضافة إلى كونها سهلة الأنـــصهار. يـــؤدى فـــك الحلزنة الجزئي فى حلزون د. ن. أ عند تكوين المعقد المفتوح إلى أمتداد منطقة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

د. ن. أ التى تلامس إنزيم بلمرة ر. ن. أ بحيث تشمل النيوكلتيدات التـــى تلـــى منطقة (-١٠) التى كانت سابقاً على الجانب الآخر من حلزون د. ن. أ بالنـسبة لجهة الارتباط كما فى الشكل (٦-١١).



الشكل (٦-١١): ارتباط إنزيم بلمرة ر. ن. أ بالمعقد المقفول والمفتوح للبروموتور
يبين الشكل منطقة تلامس الإنزيم بالبروموتور عند بداية الارتباط (المعقد المقفول) وبعد انفصال سلسلتى د. ن. أ للسماح ببدء نمو سلسلة ر. ن. أ (المعقد المفتوح) تبدو مواقع التلامس داكنة اللون

يلى ذلك تحرك إنزيم بلمرة ر. ن. أ خطوة خطوة علـــى قالـــب د. ن. أ (الخطوة = اضافة ريبونيوكلتيدة واحدة) مع استمرار الانفكاك الجزئى للحلزون أمام الإنزيم حتى يمكن أن تـستمر عمليـــة النـــسخ. وبـــذلك تنمـــو السلـــسلة بمعدل نيوكلتيدة فى كل خطوة فى الاتجاة 3'→5'. وبمجرد بدء استطالة سلسلة ر. ن. أ تنفصل الوحدة سيجما σ من المعقد الإنزيمى وتصبح حـــرة للارتبـــاط بإنزيم مركزى آخر Corenzyme. وقد يفسر ذلك على أساس إما أنها قـــد أدت دورها فى التعرف على منطقة تتابع المستبدئ Promoter عند نقطة بدء النـــسخ وبذلك لم يعد لها دور تقوم به أو أن استمرار وجودها فـــى المعقـــد الانزيمـــى الكامل قد يؤدى إلى استمرار الارتباط القوى بين الانزيم الكامـــل وبـــين ألـــ Promoter مما يحول دون سهولة حركة الإنزيم على القالب لبدء رحلة البلمـــرة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

فى حين يكون هذا الارتباط ضعيف فى غياب الوحدة σ مما يتيح للانزيم حرية الحركه فى اتجاه استطالة سلسلة ر. ن.أ.

وعلى العكس من ذلك، وجد أن الارتباط بين الإنزيم الكامل Holoenzyme وبين مناطق د. ن. أ غير المحتوية على تتابع المستبدئ Promoter يكون ضعيفاً جداً مما يسمح بتحرك الإنزيم على القالب بسرعة بحثاً عن منطقة المستبدئ. أى أن دور الوحدة سيجما فى هذه الحالة هو تثبيط الارتباط غير النوعى بين د.ن.أ القالب وبين الأنزيم.

ظهر حديثاً أنه إلى جانب الوحدة سيجما الرئيسية (70 σ) المسئولة عن التعرف على مناطق المستبدئ Promoter الرئيسية فى جينوم بكتريا القولون توجد وحدات نوعية أخرى من الوحدة سيجما مثل (σ 28, σ 32, σ 38, σ 54) تكون متخصصة فى التعرف على نوعيات خاصة من تتابع المستبدئ غير العادية والتى تمثل نقطة بدء النسخ لأنواع غير عادية من ر.ن.أ مسئولة عن انتاج بروتينات متخصصة تحتاجها الخلية تحت الظروف غير العادية مثل ظروف الإجهاد البيئى.

الكفاءة النسبية لتتابعات المستبدئ Promoters:

تبين وجود فروق كبيرة فى فعالية ونشاط المستبدئ بحيث قد يعمل بعضها بكفاءة أكبر عن البعض الآخر، بحيث تسمح بحدوث دورات أكثر وأسرع لبدء بناء ر.ن.أ. وقد تبين أن معدل حدوث كلا من خطوتى الارتباط الأولى وتكوين المعقد المفتوح تختلف بين تتابعات المستبدئ المختلفة Promoter ما بين مرة واحدة كل عشرة دقائق أو أكثر إلى بدء الارتباط مرة كل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ثانية أو ثانيتين فقط. تعد هذه احدى وسائل التحكم فى معدل التعبير الجينى Regulation of Gene Expression.

دور البروتينات المنظمة Regulators فى التأثير على بدء النسخ:

إن معدل النسخ لجين ما ليس من الضرورى أن يكون ثابتاً ولكنه يمكن أن يتغير حسب احتياجات الخلية تحت الظروف المختلفة من النمو. يقال لمثل هذا الجين بأنه منظم regulated.يتم تنظيم النسخ فى بكتريا القولون عن طريق بعض البروتينات النوعية التى يؤدى ارتباطها بجزئ د.ن.أ بالقرب من أو داخل المستبدئ promoter إلى زيادة أو انخفاض فى معدل البناء لإنزيم بلمرة ر.ن.أ. وتشمل هذه البروتينات المنظمة المثبطات repressors والتى تقوم بإيقاف أو منع الارتباط بين إنزيم بلمرة ر.ن.أ مع تتابع المستبدئ وبالتالى توقف عملية النسخ. كما تشمل المنشطات Activators التى ترتبط بإنزيم بلمرة ر.ن.أ وتحفز نشاطه. وجد أن المستبدئ Promter الذى يحتاج إلى منشطات لكى يعمل بكفاءة أكبريكون فيه التتابع المحفوظ consensus sequence فى النقطة (-٣٥) غير متطابق أو غير متشابه مع التتابع النموذجى مما يعنى أن المنشط يعمل كبديل لتعويض النقص الوظيفى لهذا الجزء من موقع الأرتباط.

يمكن أن يعمل بروتين ما كمثبط المستبدئ معين فى حين قد يقوم هذا البروتين نفسه بدور المنشط لمستبدئ آخر والعكس صحيح، ويتوقف ذلك على الموقع الدقيق لنقطة ارتباطة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

نيوكلتيدات بدء بناء سلسلة ر.ن.أ:

إن بدء النسخ الحقيقى يحدث عادة عند حافة المنطقة التى يرتبط فيها إنزيم بلمرة ر.ن.أ بقالب د.ن.أ ذو السلسلة المفردة وعلى بعد حوالى ١٣ إلى ١٣ قاعدة من بداية منطقة (-١٠) وبذلك يبدو أن مركز النشاط لهذا الإنزيم يقع فى النهاية البعيدة له فى اتجاه بناء ر.ن.أ. وقد وجد أن أول نيوكلتيده يتم اضافتها فى سلسلة ر.ن.أ حديثة البناء تكون عادة إما ثلاثى فوسفات الأدينين أو ثلاثى فوسفات الجوانين. وفى بعض الأحيان قد تبدأ بثلاثى فوسفات السيتوسين (PPPC). وفى أحيان نادرة قد تكون قاعدة البدء ثلاثى فوسفات اليوراسيل (PPPU). ولكن قد يحدث إزالة لهذه القاعدة الأولى فى المراحل التالية من نضج السلسلة وذلك بفعل إنزيمات التحليل المائى للأحماض النووية Nucleases فى الخلية.

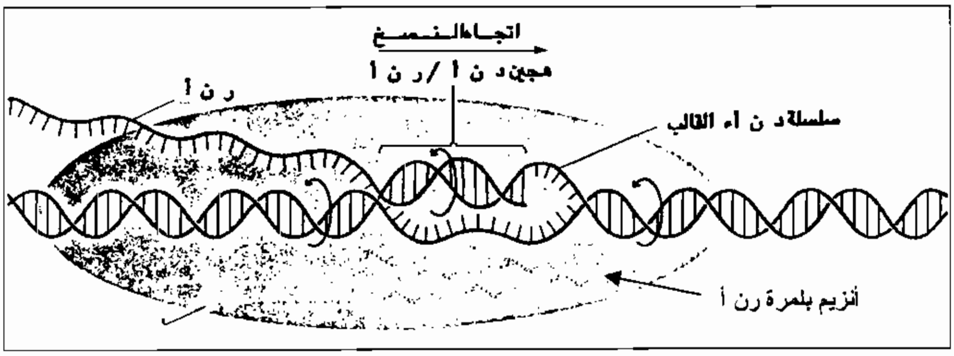
فك الحلزنة وإعادتها أثناء تقدم إنزيم بلمرة ر.ن.أ.:

يقوم إنزيم بلمرة ر.ن.أ بفك حلزنة د.ن.أ باستمرار اثناء تقدمة فى عملية النسخ على القالب لبناء سلسلة ر. ن. أ واستطالتها وذلك لكى تصبح نيوكلتيدات القالب معرضة للنسخ. تبدأ نقطة النمو والاستطالة لسلسلة ر.ن.أ بمنطقة مكونة من هجين ر. ن. أ / د. ن. أ بطول حوالى ١٢ قاعدة والتى تنفك عندما تترك سلسلة ر. ن. أ السلسلة القالب وتعود سلسلتى حلزون د. ن. أ إلى التحلزن مرة أخرى حول بعضهما البعض فى حلزون مزدوج كما فى الشكل (٦-١٢).

إلا أن المنطقة من د.ن.أ التى تكون غير متحلزنة بمرور إنزيم البلمرة عليها تكون أطول قليلاً من طول منطقة هجين ر. ن. أ/ د. ن. أ إذ تكون بطول

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

حوالى ١٧ قاعدة وهى تساوى المسافة التى تنفك عند بداية بدء تكـوين المعقـد المفتوح عند منطقة المستبدئ Promoter.



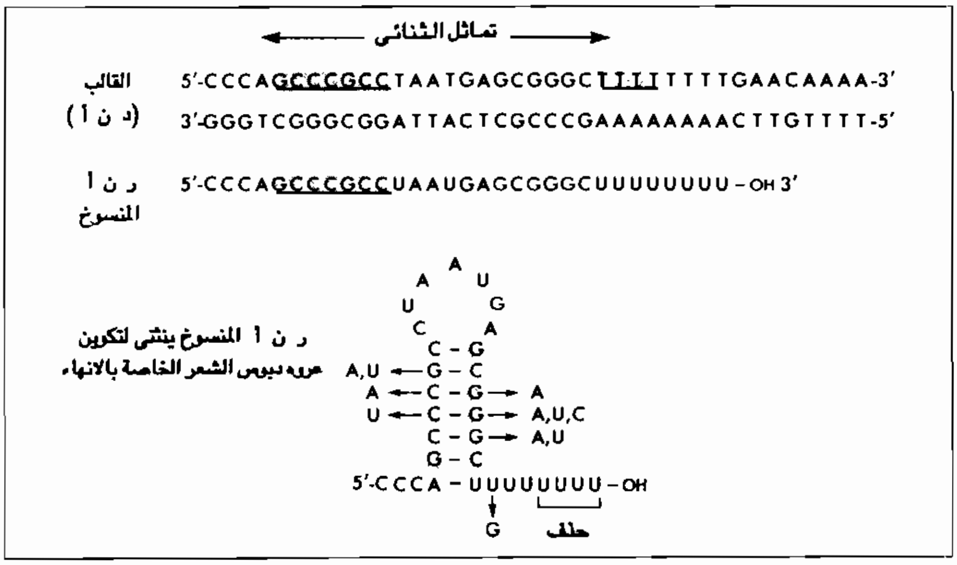
الشكل (٦-١٢): نموذج لمعقد الاستطالة المكون من إنزيم بلمرة ر.ن.أ ود.ن.أ القالب وسلسلة ر.ن.أ النامية. يدل اتجاه الاسهم على الدوران الذى يجب أن يحدث فى جزئ د.ن.أ لتنفك الحلزنة كلما تعرضت السلسلة القالب للإنزيم ولتكوين هجين مؤقت من د.ن.أ و ر.ن.أ ولكى تتحلزن سلاسل د.ن.أ مرة أخرى عندما تنحرر سلسلة ر.ن.أ.

دور اشارات الإنهاء أو التوقف فى إنهاء النسخ:

توجد إشارات فى جزئ د.ن.أ البكتيرى تسمى الموقفات أو مواقع الإنهاء Terminators والتى تكون وظيفتها وقف بناء ر.ن.أ عند نقطة محددة على قالب د.ن.أ. فعند موقع الانهاء يتوقف إنزيم بلمرة ر.ن.أ عـن إضـافة نيوكلتيـدات جديدة إلى سلسلة ر.ن.أ وتنفك السلسلة عنه ويترك الإنزيم د.ن.أ القالب لكى يبدأ دوره جديدة من النسخ. وفى بعض مواقع الانهاء تحتاج عمليـة الايقـاف إلـى بروتين إضافى يسمى عامل ρ (رو Rho) فى حين قد يقوم الإنـزيم المركـزى نفسه Core Enzyme بهذا الدور بدون الحاجة إلى عوامل إضافية.

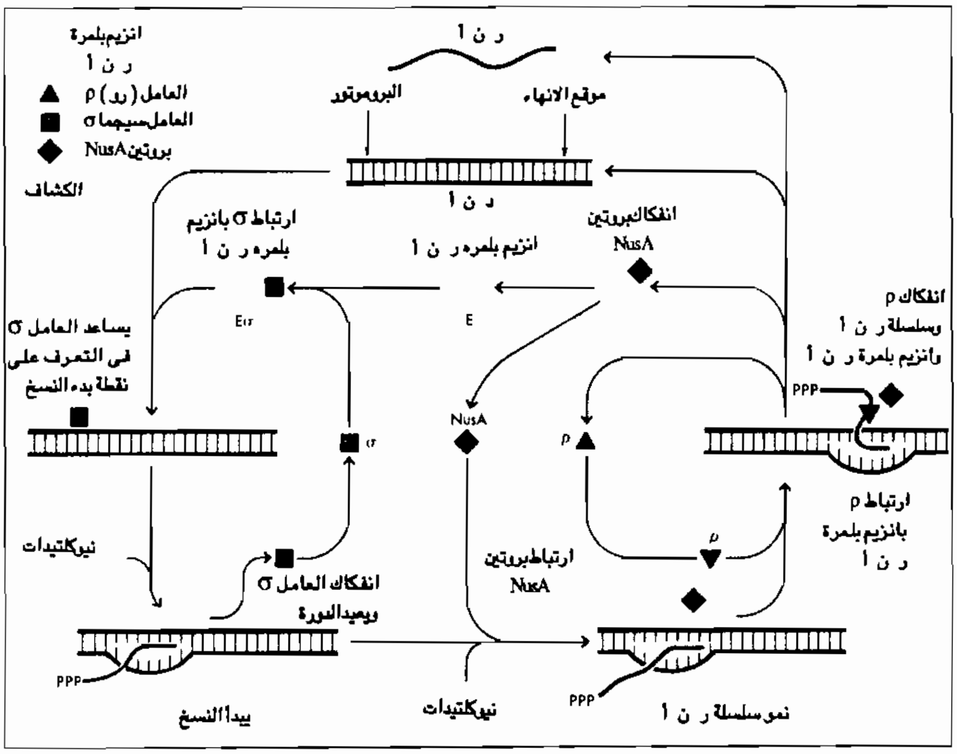
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

توجد تتابعات معينة فى منطقة الايقاف فى سلسلة د.ن.أ القالب تتكون من تتابع ثنائى متماثل Dyad Symmetry فى د. ن. أ على مسافة ١٥ إلى ٢٠ نيوكلتيده قبل نهاية منطقة نسخ ر.ن.أ يلية تتابع من ٦ قواعد أدينين A فى سلسلة د. ن. أ القالب والتى يتم نسخها إلى ست قواعد من اليوراسيل U عند نهاية سلسلة ر. ن. أ كما فى الشكل (٦-١٣) يتوقف إنزيم بلمرة ر. ن. أ عن ضافة أى نيوكلتيدات جديدة عندما يتم نسخ منطقة الايقاف هذه حيث يتكون بسرعة حلزون بتركيب دبوس الشعر Hairpin فى هذه المنطقة مما يؤدى إلى توقف النسخ وانزلاق إنزيم بلمرة ر.ن.أ عن السلسلة القالب لجزئ د.ن.أ كما يحدث إنفكاك لسلسلة ر. ن. أ المبنية حديثاً، وتصبح حرة ويبين الشكل (٦-١٤) دور كل من إنزيم بلمرة ر. ن. أ وعامل سيجما σ وعامل ρ رو Rho فى بناء ر. ن. أ.



الشكل (٦-١٣): تتابع منطقة انهاء النسخ المستقلة عن العامل ρ وتركيب سلسلة ر.ن.أ التى توقف نموها. الطفرات التي تحتها خط تؤدى إلى منع جزئى أو كلى لعملية الايقاف

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٦-١٤): دور إنزيم بلمرة ر.ن.أ والعامل سيجما σ والعامل ρ (رو) والبروتين NusA في عملية بناء سلسلة ر.ن.أ.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفصل السابع

بناء ر. ن. أ. فى مميزة النواة
RNA Synthesis in Eucaryotes

أن عملية بناء ر.ن.أ Transcription فى مميزة النواة عملية على درجة عالية من الانتقائية Selective. ففى معظم الثدييات على سبيل المثال لا يتم نسخ أكثر من حوالى ١% من مجموع التتابعات التى توجد فى د.ن.أ الخلية الى تتابعات فعالة من ر.ن.أ أى فى صورة ر.ن.أ المراسل الناضج Mature mRNA. وتحدث عملية الانتقاء على مستويين:

الأول: حدوث نسخ جزئى فقط لتتابعات معينة من د. ن. أ لانتاج ر.ن.أ النووى غير المتجانس hnRNA.

الثانى : بقاء نسبة صغيرة فقط من هذه التتابعات المنسوخة نتيجة لإجراء عمليات تجهيز وتعديل وحذف Splicing لتتابعات كثيرة من ر. ن. أ النووى قبل خروج ر. ن. أ النهائى إلى السيتوبلازم.

أنواع انزيمات بلمرة ر. ن. أ فى مميزة النواة:

على العكس مما وجد فى غير مميزة النواه حيث يعمل انزيم بلمرة ر. ن. أ واحد لانتاج الأنواع المختلفة من ر. ن. أ تبين أنه فى مميزة النواة توجد ثلاثة أنواع مختلفة من انزيمات بلمرة ر. ن. أ وهى:

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

١- انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase I ويختص ببناء السلاسل الطويلة الخاصة بجزئيات ر.ن.أ الريبوسومى rRNA.

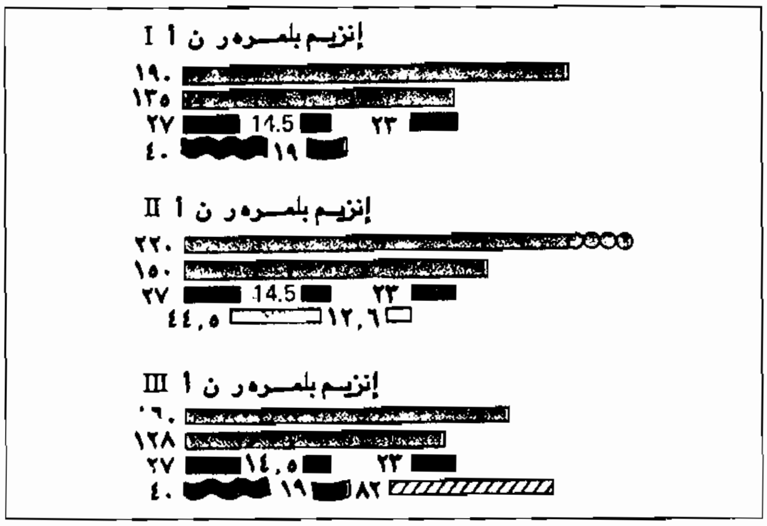
٢- انزيم بلمـــرة ر. ن. أ RNA Polymerase II ويخـــتص بنـــسخ سلاســـل جزئيات ر. ن. أ المراسل mRNA.

٣- انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase III ويقوم ببناء عدد من سلاســـل ر. ن. أ القصيرة مثل ر.ن.أ الناقل و ر.ن.أ الريبوسومى قصير السلسلة (5\ SrRNA).

يتكون كل انزيم من هذه الانواع الثلاثة من عدد من تحت الوحدات. وقـــد تتشابة الانزيمات الثلاثة فى بعض مكوناتها من تحت الوحدات إلا أنها تحتـــوى على تحت وحدات فريدة تميز كل نوع من هذه الانزيمات كما فى الشكل (٧-١) وعلى العكس من انزيم بلمرة ر.ن.أ فى البكتريا الذى يمكنه مباشـــرة الارتبـــاط بمنطقة تتابع المستبدئ Promoter، نجد أن انزيمات بلمرة ر.ن.أ فـــى مميـــزة النواة لا يمكنها أن ترتبط بتتابع المسبتدئ إلا فى وجـــود بعـــض البروتينـــات النوعية الموجودة بالفعل على جزئ د.ن.أ نفسه.

تحتوى خلية الثدييات عادة على حوالى ٤٠٠٠٠ جزئ من انزيم البلمـــرة RNA Polymerase II وعلى نفس العـــدد تقريبـــاً مـــن انـــزيم البلمـــرة RNA Polymerase I وحوالى ٢٠٠٠٠ جزئ من انزيم البلمرة RNA Polymerase III علماً بأن التركيز الفعلى لانزيمات البلمرة يختلف حسب معدل نمو الخلية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٧-١): رسم تخطيطى يبين الاختلافات فى تركيب تحت الوحدات البروتينية المكونة لإنزيمات بلمرة ر.ن.أ فى مميزة النواه (الخميرة). تظهر تحت الوحدات المتشابهة بنفس المظهر. يظهر الوزن الجزيئى لتحت الوحدات بالكيلو دالتون. وتأخذ تحت الوحدات الثلاثة المتماثلة فى الوزن الجزيئي في الإنزيمات الثلاثة اللون الأسود الداكن

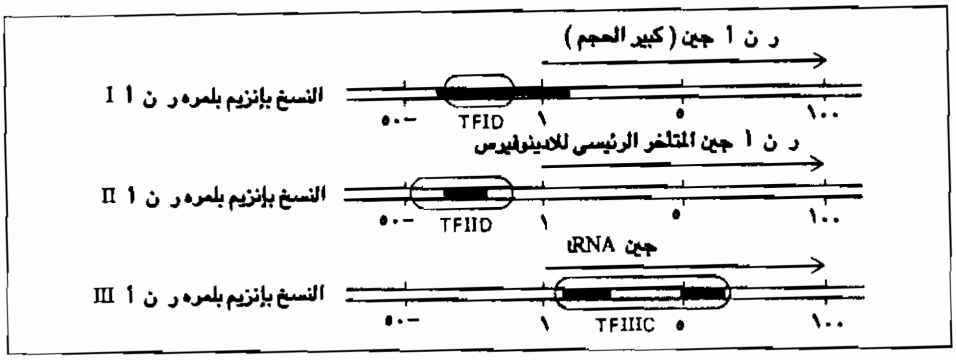
دور عوامل النسخ Transcription Factors فى الارتباط بالمستبدئ :Promoter

لا يمكن لانزيمات بلمرة ر.ن.أ التعرف مباشرة على منطقة المستبدئ فى مميزة النواة، ولكن لابد أولاً من حدوث ارتباط لبروتينات نوعية مع تتابعات معينة فى د. ن. أ القالب لتنشيط المستبدئ وتحفيزة على الدخول فى عملية النسخ. يطلق على هذه البروتينات النوعية اسم عوامل النسخ Transcription Factors (TF) وهى ضرورية لبدء بناء ر. ن. أ، وهى تختلف عن عوامل بدء النسخ فى غير مميزة النواة (عامل سيجما) فى أنها ترتبط بجزئ د. ن. أ مستقلة

عن انزيم بلمرة ر. ن. أ. تتعرف كل من الانزيمات الثلاثة على مستبدئ Promoter ذو نوعية مختلفة ويحتاج كل منها فى الغالب إلى عوامل نسخ (TF) مختلفة عن الآخر ويرمز اليها بـ TFI, TFII, TFIII ، على الترتيب. ويكون الرمز متبوعاً بحرف يدل على اسبقية اكتشافة. فمثلا TFIIIA كان أول عامل نسخ اكتشف للعمل مع انزيم RNA Polymerase III.

دلت الدراسات المعملية *In Vitro* على أن عوامل النسخ TF عبارة عن معقدات نسخ ثابتة نسبياً وتقوم بجذب جزئيات انزيمات بلمرة ر. ن. أ انتقائياً لمنطقة تتابع الابتداء النوعية والخاصة بكل منها. ويرتبط كل من عوامل النسخ المختلفة بالمنطقة الخاصة به في المستبدئ Promoter على سلسلة د. ن. أ القالب.ويكون كلا من انزيم البلمرة ر. ن. أ I، وانزيم بلمرة ر.ن.أ II معقدات مع كل من عوامل النسخ النوعية الذى يرتبط به قبل موقع بدء النسخ (Upstream) مباشرة. إلا أن عوامل النسخ الرئيسية لانزيم بلمرة ر.ن.أ RNA Pol. III ترتبط فى نقطة لاحقة Downstream بعد موقع بدء النسخ مباشرة مما يعنى أن انزيم RNA Pol. III لابد أن يقوم بنسخ منطقة ارتباط عامل النسخ بدون أن يزيح أو يزيل عامل النسخ من على قالب د. ن. أ كما فى الشكل (٧-٢) يبدو أن هذا العامل (TFIII C) يؤدى إلى إنثناء د. ن. أ حول نفسه لتكوين حبيبة كبيرة من البروتين النووى.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

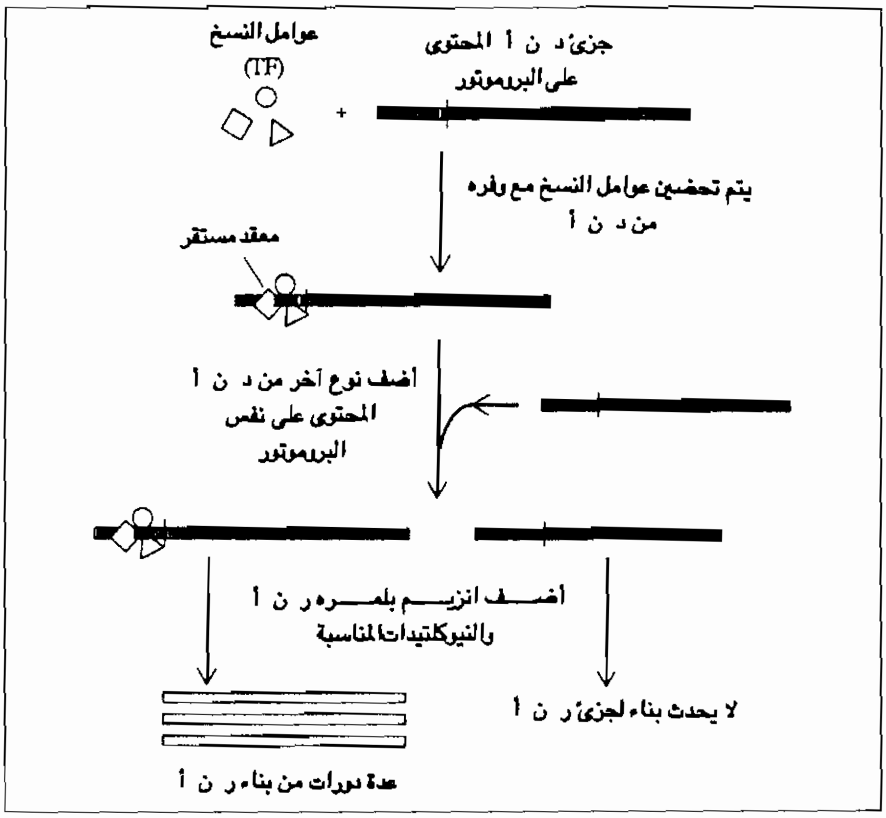


الشكل (٧-٢): تكوين معقدات مستقرة لعوامل النسخ (TF) على الجين (فى د.ن.أ) تدل المستطيلات السوداء على مواقع التتابعات الضرورية لنشاط البروموتور. والمنطقة المظللة تدل على الجزء من الجين المرتبط بعوامل النسخ. تدل الارقام على المواقع على جزئ د.ن.أ (مقدرة بعدد ازواج النيوكلتيدات) بالنسبة لموقع بدء النسخ (+١).

وقد تبين أنه لابد من تكوين معقد مستقر وثابت نسبياً بين عامل نسخ معين وبين منطقة المستبدئ Promoter حتى يمكن ضمان انتظام عملية النسخ بصفة مستمرة. وقد امكن التحقق من ذلك بتجربة معملية تم فيها مقارنة تأثير تحضين د.ن.أ مع عامل النسخ المناسب، فى حين اضيف العامل نفسه إلى نفس د. ن. أ فى التجربة المقارنة ولكن بدون اعطاء فترة التحضين المناسبه.

تبين أنه فى الحالة الأولى كانت فترة التحضين كافية لتكوين معقد ثابت ومستقر من د. ن. أ وعامل النسخ، وبذلك نشطت عملية النسخ عدة مرات لهذا الجزئ من د. ن. أ فى حين لم يتسنى ذلك لنفس الجزئ من د.ن.أ نتيجة لعدم اتاحة الفرصة لتكوين المعقد المذكور كما فى الشكل (٧-٣).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

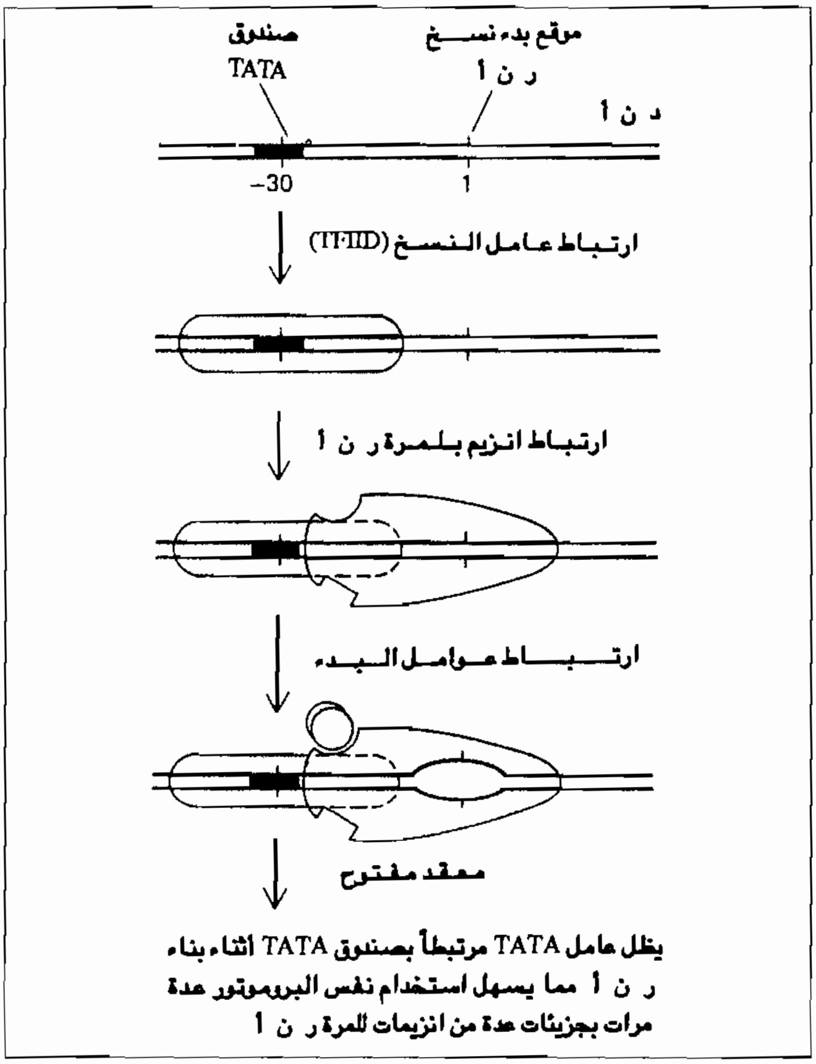


الشكل (٧-٣): تجربة معملية لإثبات ضرورة تكوين معقد نسخي مستقر فى منطقة البروموتور فى مميزة النواه حتى يمكن بدء عملية النسخ

يوجد عامل نسخ هام جداً لعدد كبير من تتابعـــات المـــستبدئ Promoter لانزيم RNA Pol II وهو TFIID والذى يتكون من معقد بروتينى كبير الحجـــم ويطلق عليه عادة عامل TATA لانه يرتبط نوعيـــا بتتـــابع نـــوعى محفـــوظ Consensus Sequence غنى فى A-T يسمى صـــندوق [TATA Box] يتمركـــز عند حوالى (-٢٥) قاعدة قبل موقع بدء النسخ (+١) ويؤدى نشاط عامل النسخ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

TATA إلى تحفيز النشاط النسخى لانزيم RNA Pol. II كما هو مبين فى الشكل (٧-٤).

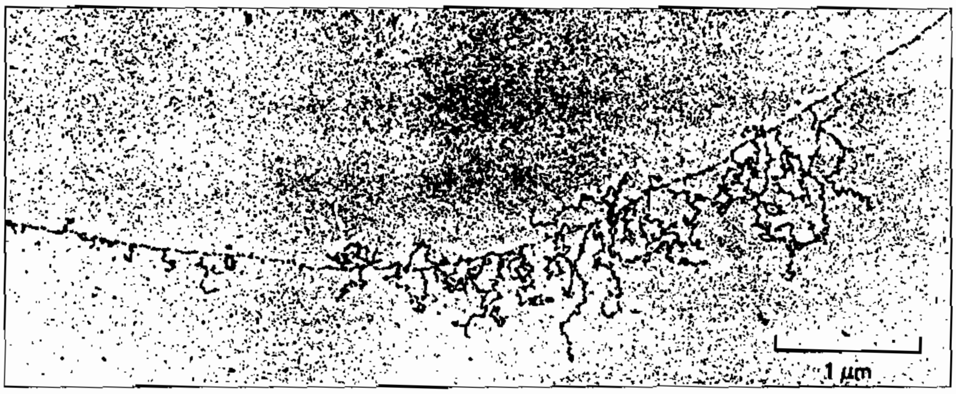


الشكل (٧-٤): ميكانيكية التعرف على منطقة البروموتور بواسطة إنزيم بلمرة ر.ن.أ II فى مميزة النواه. لابد من ارتباط عامل النسخ (TFIID) بصندوق TATA لتكوين معقد نسخى مستقر قبل أن يتمكن الانزيم من التعرف على البروموتور

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

اختلاف النشاط النسخى لأنزيم RNA Pol. II حسب تتابعـات د.ن.أ القالب:

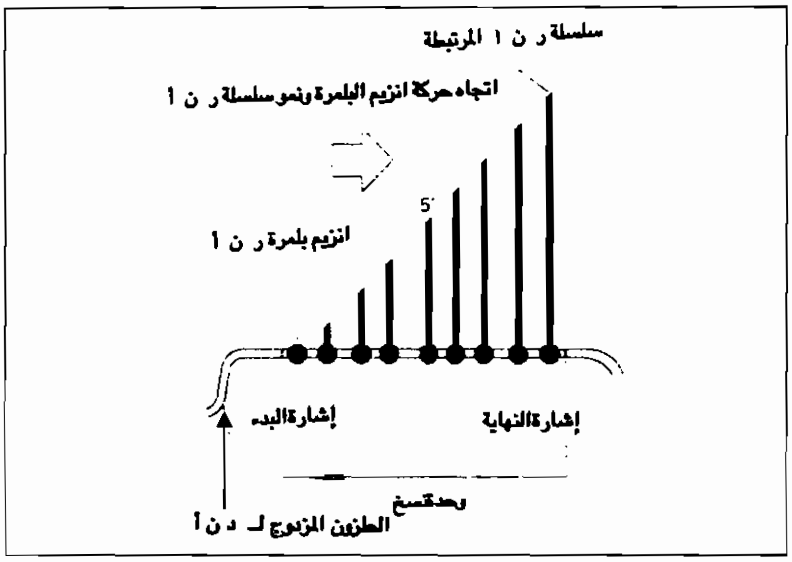
وجد أن انزيم RNA Pol. II المشترك فى عملية النسخ يبدو تحت المجهر الالكترونى كحبيبات كروية تجر وراءها ذيلا من سلسلة تمثل ر.ن.أ وجـد أن هذه الحبيبات تبدو عادة كوحدات متباعدة نسبياً. ويشير ذلـك إلـى أن معظـم الجينات التى يتم نسخها إلى جزئيات ر.ن.أ أوليـة (Precursors) تكـون ذات تكرار منخفض وقد يفسر ذلك على أساس اتاحة الفرصة لوحدة من انزيم البلمرة لاتمام عملية النسخ لجين معين قبل أن تبدأ وحدة انزيمية أخـرى فـى عمليـة النسخ . ولكن يحدث احيانا أن عدداً كبير نسبياً من جزيئات انزيم بلمرة ر. ن. أ II (مرتبطاً بها سلاسل ر.ن.أ النامية) تكون متجمعة مع بعضها. تظهـر هـذه التجمعات بصفة خاصة فى التتابعات التى تمثل عدد محدود من الجينات التى يتم نسخها بتكرار أكبر كما فى الشكل (٧-٥).



الشكل (٧-٥): منطقة من الكروماتين تحتوى على جين يتم نسخه بمعدل عالى جداً بحيث تظهر عدة جزيئات من انزيم بلمرة ر.ن.أ II ملتصقة بنواتج نسخها من سلاسل ر.ن.أ فى نفس الوقت، ويكون اتجاه النسخ من اليسار إلى اليمين

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

يتزايد طول سلاسل ر. ن. أ المرتبطة بالانزيم فى مثل هــذه التجمعــات فى اتجاه النسخ مما يعطيها طرازاً مميزا بحيث يحدد هذا الطراز مواقــع بــدء وإنهاء أو توقف انزيم بلمره ر. ن. أ II بالنــسبة لكــل وحــدة نــسخ نوعيــة Transcription Unit كما فى الشكل (٧-٦).



الشكل (٧-٦): وحدة نسخ نموذجية. مبيناً اتجاه النسخ ومواقع البدء والتوقف فى الوحدة

يمكن تلخيص النتائج الهامة التى توصلت إليها الدراســات البيوكيماويــة الموازية للنتائج المتحصل عليها من المجهر الالكترونى فى النقاط التالية:

١- أن جزئيات انزيمات بلمرة ر.ن.أ فى مميزة النواه (كما فى غير مميــزة النواة) تبدأ وتنهى النسخ عند مواقع نوعية محددة على الكروموسوم.

٢- أن متوسط طول سلسلة ر. ن. أ الناتجة من أنزيم البلمرة RNA Pol II فى وحدة النسخ يبلغ حوالى ٨٠٠٠ نيوكلتيدة وقد يزيد إلى أكثر من ٢٠٠٠٠ نيوكلتيدة. أن هذا الطول الكبير نسبيا، والذى يزيد كثيــراً عــن الطــول

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

المتوسط لسلسلة mRNA الناضج الذى يدخل فعلاً فى عملية الترجمة إلى بروتين والذى يبلغ حوالى ١٢٠٠ نيوكليتده (يشفر لبروتين بطول ٤٠٠ حامض امينى). قد يعكس التركيب المعقد للجين فى مميزة النواة وخاصة وجود عدد من الانترونات Introns فى النسخ الأولية للجين والتى يتم استئصالها فى المرحلة اللاحقة لتجهيز mRNA النهائى أو الناضج Mature mRNA كما سيأتى بعد.

٣- على الرغم من أن معدل استطالة سلسلة ر.ن.أ يبلغ فى المتوسط حوالى ٣٠ نيوكلتيده فى الثانية على مستوى جميع أنواع ر.ن.أ فإن مواقع بدء النسخ المختلفة لجزئيات انزيم بلمره ر.ن.أ II تختلف كثيراً فى درجة كفاءتها بحيث يتم نسخ بعض الجينات بمعدل اسرع عن الآخرى.

تعديل أو تجهيز النسخ الأولية لسلاسل mRNA: RNA Processing

تعرف النواتج الأولية لعملية النسخ بواسطة انزيم RNA Pol. II باسم جزئيات ر.ن.أ غير المتجانس النووى (hnRNA) وترجع هذه التسمية إلى أن هذه الجزيئات تكون غير متجانسة فى احجامها الأولية بمجرد انتاجها فى النواه.

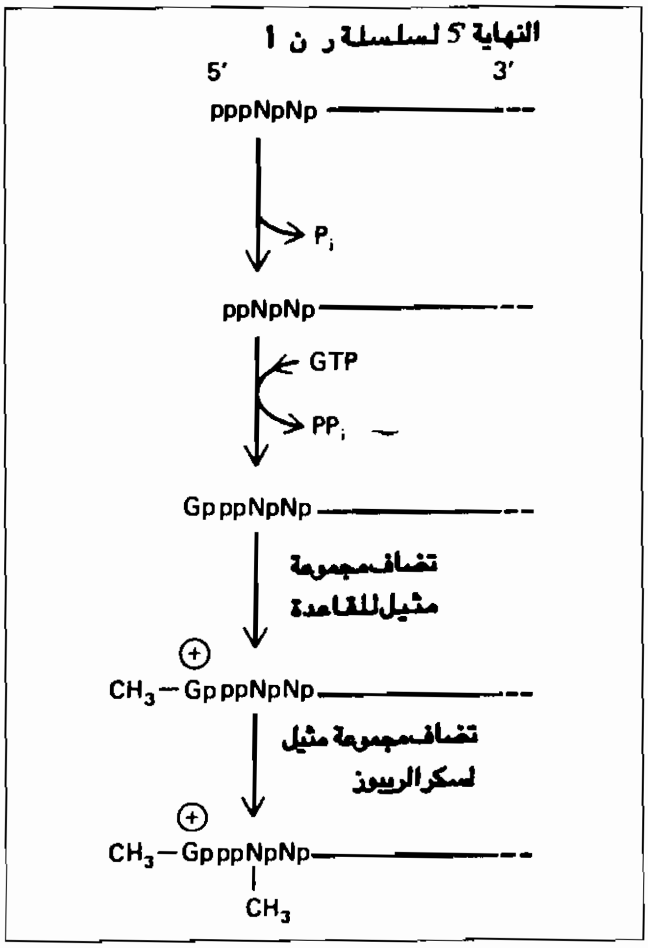
يكون مصير قليل من هذه النسخ الأولية أن تترك النواه فى صورة جزئيات ر. ن. أ المراسل mRNA إلا أن ذلك لا يحدث قبل أن تتم بها عملية تحوير تساهمية عند كل من النهاية 5’ والنهاية 3’ أثناء عملية النسخ وهذه التعديلات هامة جداً وضرورية لحسن اداء سلاسل mRNA لوظيفتها فى الترجمة فى السيتوبلازم كما سيأتى بعد.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يتم أولاً التعديل أو التحوير فى النهاية '5 لسلسلة ر. ن. أ (وهى النهايـــة المتكونة اولاً أثناء عملية النسخ) وذلك بإضافة ما يسمى بقلنسوة Cap الجـــوانين المميثلة Methylated – G Nucleotide. وتحدث التغطية بالقلنسوة مباشرة عقـــب بناء الثلاثين نيوكلتيدة الأولى فى سلسلة ر. ن. أ النامية. وتشتمل على تكثيـــف مجموعة الفوسفات الثلاثية لجزئ GTP مع مجموعة ثنائية للفوسفات متبقية على النهاية '5 للسلسلة النامية كما فى الشكل (٧-٧) وتقوم هذه القلنسوة بدور رئيسى فى عملية استبداء بناء البروتين كما يبدو أنها تقوم بحماية النسخة الناميـــة مـــن ر.ن.أ من عمليات التحلل والهدم.

ولا تتحدد النهاية '3 لمعظم سلاسل ر. ن. أ المراســـل mRNA بمنطقـــة انتهاء النسخ أو توقفة (حيث أن النسخ يستمر ويتجاوز هذه النهاية النوعية فـــى الناتج الأولى hnRNA).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٧-٧): تفاعلات تكوين الغطاء (القلنسوة) عند النهاية 5' لسلسلة ر.ن.أ الجارى بناؤها بواسطة انزيم بلمرة ر. ن. أ II

ولكنها تتميز بتحوير أو تعديل من نوع آخر بحيث يحدث كسر نوعى للسلسلة النامية عند موقع محدد، ثم يضاف إلى النهاية 3' المكسوره ذيل من عديد الادينين polyAtail بواسطة انزيم بلمرة مستقل بحيث يصل طول هذا الذيل إلى حوالى ١٠٠-٢٠٠ أو أكثر من قواعد الادينين. يتم التعرف على نقطة

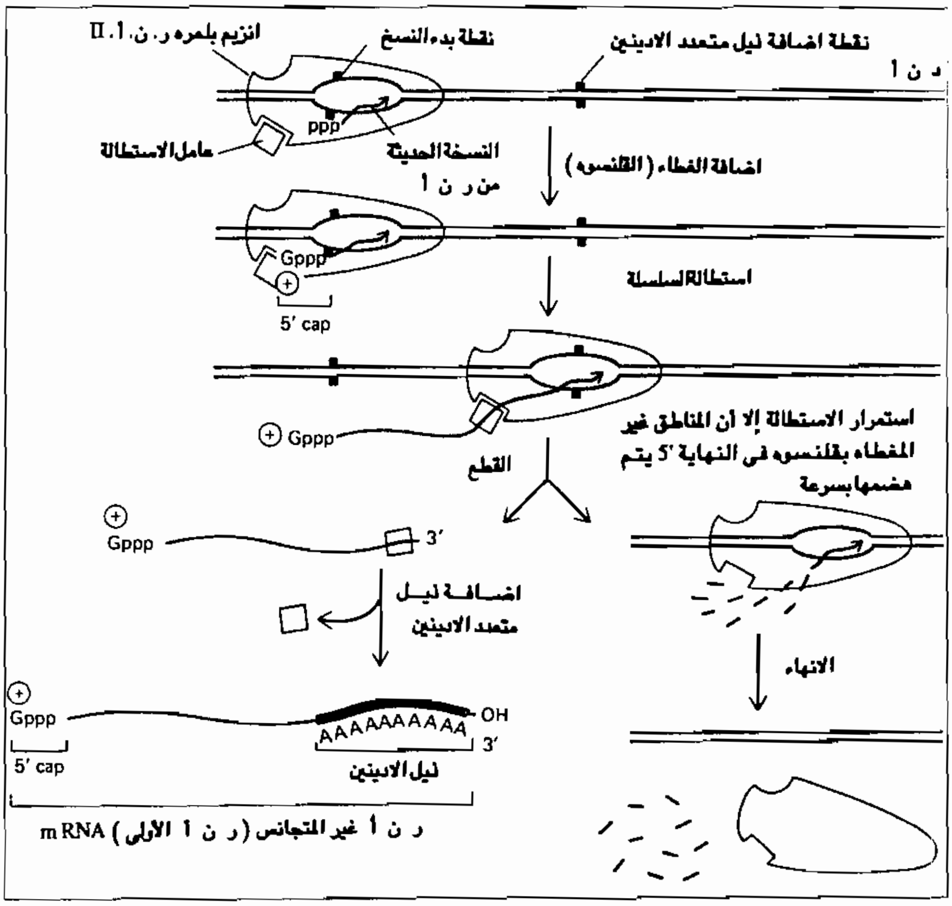
salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الاشارة المميزة لمكان الكسر أو القطـع بظهـور التتـابع النـوعى القـصير: AAUAAA فى سلسلة ر. ن. أ والتى تقع على بعد ١٠-٣٠ نيوكلتيده قبل موقع القطع واضافة الذيل. بعد احداث الكسر أو القطع مباشر يقـوم انـزيم Poly A Polymerase باضافة ذيل متعدد الأدينين إلى النهاية 3 فى سلسلة ر.ن.أ لاتمـام النسخة المبدئية أو الأولية من ر.ن.أ كما فى الشكل (٧-٨).

لم تتحدد حتى الآن وظيفة ذيل polyA على وجه الدقة، ولكنه قد يكون له دور فى تسهيل خروج ر.ن.أ المراسل mRNA الناضج من النواه، كما يعتقد أنه يلعب دوراً فى ثبات أو استقرار جزيئات mRNA بحيث يؤخر عملية هدمها في السيتوبلازم حتى يمكنها أن تشارك فى عدد محدد مـن دورات الترجمـة قبـل هدمها. وقد تبين بالفعل أنه فى غياب ذيل polyA فإن نسخ mRNA يتم هـدمها بسرعة كبيرة.

على الرغم من أن نواتج نسخ انزيم بلمرة ر. ن. أ II تمثـل أكثـر مـن نصف ر. ن. أ الاجمالى المنتج فى الخلية، إلا إن معظم هذه النسخ تكون غيـر ثابته وقصيرة العمر، بحيث أن ما يتبقى منها بالفعل فـى وقـت مـا بالخليـة لا يمثل إلا نسبة ضئيلة جداً من إجمالى ر. ن. أ كما فى الجدول (٧-١).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٧-٨): بناء جزئ ر.ن.أ غير المتجانس النووى hnRNA بواسطة انزيم بلمره ر.ن.أ II واضافة ذيل من متعدد الادينين polyA إلى سلسلة ر.ن.أ مما يؤدى إلى كسر السلسلة ليتسنى إضافة هذا الذيل

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الجدول (٧-١) بعض المقادير النسبية من أنواع ر.ن.أ
في خلية نموذجية للثدييات

نوع ر.ن.أ	الكمية المنتجة الأولية (كنسبة من إجمالى ر.ن.أ)	*الكمية المتبقية بالفعل (كنسبة من إجمالى ر.ن.أ)
	%	%
rRNA (فى النواة)	٣٩	٤
rRNA (فى السيتوبلازم)	-	٧١
hnRNA (فى النواة)	٥٨*	٧
mRNA الناضج (فى السيتوبلازم)	-	٣
tRNA	٣	١٥

* يلاحظ أنه على الرغم من أن معظم ر.ن.أ الأولى المنسوخ يكون فى صورة hnRNA إلا أن معظمة يتم هدمه وبذلك فإن النسبة المتبقية فى صورة mRNA الناضج تكون ضئيلة جداً ولا تتعدى ٣% ر.ن.أ فى الخلية.

تبين أن كلا من عمليتى اضافة القلنسوة G على النهاية 5' وإضافة الذيل polyA إلى النهاية 3' تحتاجان إلى نشاط انزيم RNA pol II بالاضافة إلى أحد عوامل الاستطالة Elongation Factor الذى يكون مرتبط بالانزيم اثناء عملية النسخ.

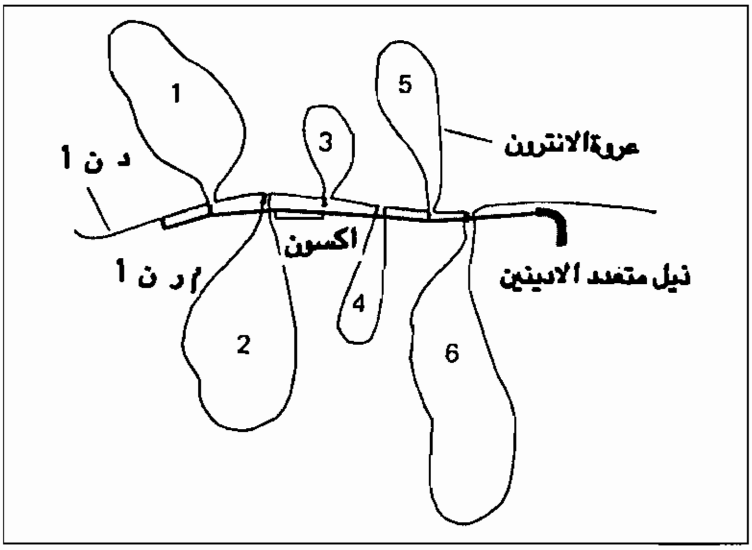
حذف تتابعات كبيرة متخللة من hnRNA أثناء تجهيز mRNA فى النواة:

ثبت أن النسخة الأولية الناتجة فى النواه من hnRNA تكون غير ثابتة إذ تبين أن طول جزئيات hnRNA الحديثة البناء ينخفض بسرعة بحيث يصل إلى طول جزئيات mRNA السيتوبلازمى بعد حوالى ٣٠ دقيقة فقط من انتاجها (من حوالى ٦٠٠٠ نيوكلتيده فى سلسلة hnRNA ينخفض العدد إلى حوالى ١٥٠٠

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

نيوكلتيده فى سلسلة mRNA). وبعد هذه الفترة القصيرة تبدأ جزيئـــات mRNA فى الخروج من النواه بحيث لا يصل إلى ستيوبلازم الخلية إلا حوالى ٥% فقط من إجمالى hnRNA الأصلى الذى انتج فى النواه فى حين يـــتم هـــدم معظـــم ما تبقى منه إلى شظايا قصيرة فى النواه على مدى حوالى ساعة. تبين أن هـــذه التتابعات الطويلة التى يتم هدمها لا تقع بالمره على أى من طرفى السلـــسلة 5' أو 3' ولكنها تكون متخللة للسلسلة فى مناطق وسطية. وقد تحقق ذلك عند مقارنة تتابعات النيوكليتيدات فى سلسلة mRNA معين بالتتابعات المقابلة فـــى د. ن. أ المستخدم كقالب للنـــسخ بإســـتخدام تقنيـــة التهجـــين بـــين ر. ن. أ / د. ن. أ والتحليلات الجزيئية للمقارنة بين تتابعات د.ن.أ الاصـــلية وتتابعـــات mRNA النهائى حيث ظهر وجود تتابعات متخلله فى د. ن. أ غير موجودة فى mRNA المنسوخ عليها وذلك فى حالات متعددة مثل جين β-globin و Ovalbumin فـــى الفقاريات. أى أن الجين فى مميزة النواة لا يتكون من تتابعات شفرية مـــستمرة بل تتخلله تتابعات غير شفرية طويلة، بعكس جينات غير مميـــزة النـــواه التـــى تتكون من تتابع شفرى مستمر. ويطلق على التتابعات التـــى توجـــد فـــى د.ن.أ مميزة النواة ولكنها تحذف من mRNA اسم الانترونات Introns فى حين تسمى التتابعات الشفرية الموجودة فى mRNA تتابعات الاكسونات Exons كمـــا فـــى الشكل (٧-٩).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٧-٩): اثبات وجود انترونات فى جينات مميزة النواة بتجربة التهجين بين د.ن.أ و ر.ن.أ حيث يتم هنا انتاج بيتا جلوبين mRNA ويتم عزله وتنقيته من الخلايا المتخصصة فى انتاجه. ثم تجرى تجربة تهجين من mRNA ومنطقة د.ن.أ المحتوية على هذا الجين. تبدو المناطق من جزئ د.ن.أ التى لا يحدث بها تهجين مع ر.ن.أ كعروات ممتدة إلى الخارج وهى تمثل الانترونات فى هذا الجين

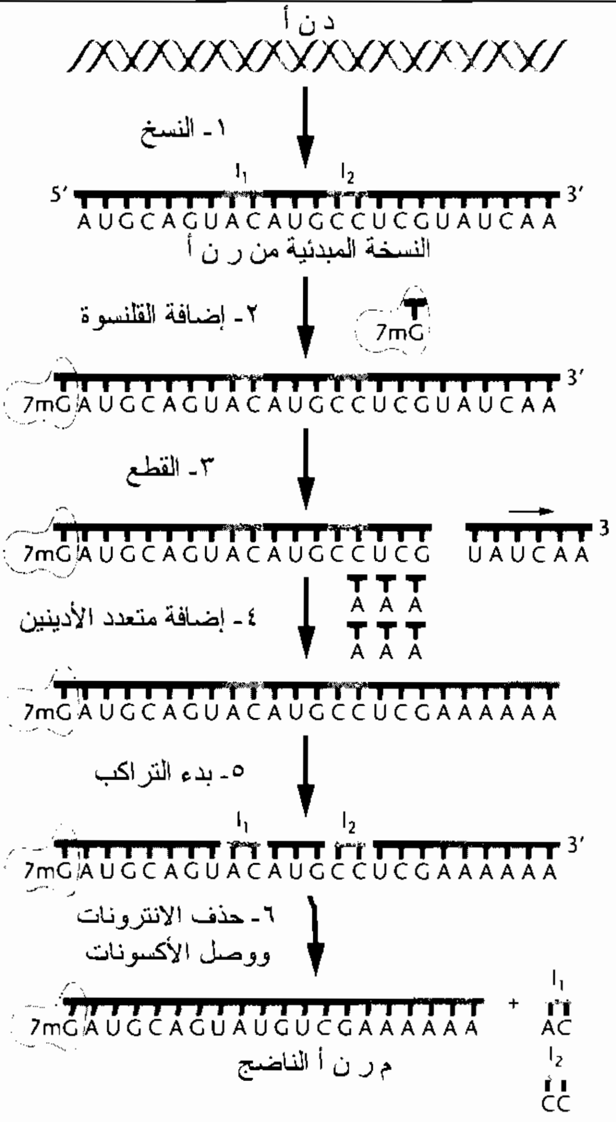
تراكب ر. ن. أ المراسل RNA splicing:

يتم حذف أو استبعاد تتابعات الانترونات المتخللة لجزئ hnRNA أثناء عملية تجهيز mRNA، ثم توصل تتابعات الاكسونات ببعضها بعملية تشبه القص/ واللصق ر. ن. أ RNA Splicing حيث تتبعج الإنترونات للخارج فى صورة عروات Lariats قبل إستبعادها. من المعروف أن النسخة الأولية من hnRNA مطابقة فى الطول والتتابع لمنطقة القالب من د.ن.أ المنسوخة عليه، بحيث تحتوى هذه النسخه على جميع الأكسونات والإنترونات، فى حين نجد أن تلك الأخيرة تحذف أو تستبعد أثناء تجهيز mRNA. تحدث هذه العملية فى نواه

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الخلية قبل أن يخرج mRNA إلى السيتوبلازم، بحيث يحتوى فقط على تتابعات الإكسونات التى تشفر لسلسلة متعدد ببتيد نوعى عند الترجمة على الريبوسومات. تمثل تتابعات الإنترونات فى hnRNA نسبة كبيرة جداً من الطول الكلى للجزئ، ويختلف طول وعدد هذه الإنترونات من جين إلى آخر. ويفسر ذلك كيف يتبقى من الطول الكلى للنسخة الأصلية من hnRNA (حوالى ٥٠٠٠٠ نيوكلتيده) تتابع قصير فقط من mRNA يتراوح بين ٥٠٠، ٣٠٠٠ نيوكلتيدة فقط. ويبين الشكل (٧-١٠) مراحل عملية تجهيز ر. ن. أ بعد نسخه Postranscriptial Processing.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (٧-١٠): عملية تجهيز جزئ ر ن أ بعد النسخ فى مميزة النواة Post transcription. يتم تعديل جزئ ر ن أ النووى غير المتجانس (hnRNA) و تحويله إلى mRNA الذى يحتوى على القلنسوة 5'G cap وذيل متعدد الأدينين على النهاية '3، ثم تتم إزالة الإنترونات

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

دور البروتينات النووية الصغيرة snRNP في عملية التراكب Splicing:

يتم تكثيف سلسلة ر. ن. أ المنسوخة حديثاً بسرعة إلى مجموعات متجاورة من الحبيبات المحتوية على بروتينات وتتكون كل حبيبة من حوالى ٥٠٠ نيوكلتيده من ر. ن. أ ملتفة حول معقد بروتينى يقوم بتكثيف وتجهيز كل نسخة نامية من ر. ن. أ وهذا المعقد يشبه إلى حد ما تركيب النيوكليوسومات فى الكروماتين.

يمكن فصل وتنقية حبيبات hnRNP's الناتجة (وتسمى حبيبات الريبونيوكليوبروتين النووية غير المتجانسة) بعد معاملة النواة بإنزيم الريبونيوكلييز RNase بطريقة تسمح فقط بهدم شريط ر.ن.أ الرابط بين الحبيبات. تترسب هذه الحبيبات عند 30S ويبلغ قطر كل منها ضعف قطر النيوكليوسوم (أى حوالى 20nm). يتكون بروتين اللب أو البروتين المركزى فى كل حبيبة من حوالى ثمانية أنواع مختلفة من البروتينات يتراوح مجموع وزنها الجزيئى بين ٣٤٠٠٠ إلى ١٢٠٠٠٠ دالتون. وتعد هذه البروتينات أكثر البروتينات وفرة فى النواه بعد الهستونات. تحتوى كل من هذه البروتينات الثمانية على نسخه أو أكثر من تتابع مشترك قصير ونوعى من الاحماض الأمينية.

تبين وجود بعض الحبيبات الثابتة (المستقرة) والتى تكون أقل شيوعاً فى النواه عن الحبيبات السابقة. وتوحى مواقعها على سلاسل ر.ن.أ بأنها تقوم بدور هام فى عملية التراكب Splicing. تتكون هذه الحبيبات بسرعة جداً عند نقاط الالتقاء بين تتابعات الانترونات والاكسونات. وكلما استطالت سلسلة ر. ن. أ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يحدث التحام بين هـذه الحبيبـات فـى أزواج لتكـوين معقـد كبيـر يـسمى Spliceosome الذى يقوم بعملية التراكب Splicing (القطع والربط) فى سلاسـل ر. ن. أ.

أظهرت نتائج التجارب البيوكيماوية أن النواه تحتوى علـى عـدد مـن المعقدات المتكونة من بروتينات مقترنة مع ر. ن. أ قصير السلـسلة (لا يزيـد طول السلسلة عن ٢٥٠ نيوكلتيده). وقد اطلـق علـى هـذه المعقـدات اسـم معقدات البروتينات الريبونووية الصغيرة Small Nuclear Ribonucleoproteins (sn RNP's) ويرمز اليها كالاتى:

U1, U2, U3,....... U12 RNA'S وهى تشبة فى تركيبها الريبوسـومات مـن حيث حدوث اقتران فى كل منها بين ر. ن. أ والبروتينات إلا أنها أصغر بكثير فى الحجم عن الريبوسومات حيث يصل وزنها الجزيئى إلى حـوالى ٢٥٠٠٠٠ دالتون مقابل ٤,٥ مليون دالتون للريبوسوم.

تبين أن كل من هذه الأنواع من sn RNP's تقوم بـالتعرف علـى تتـابع نوعى فى سلسلة hnRNA من خلال التزاوج التكاملى بين القواعد RNA/ RNA وتشارك بعض هذه المعقدات الصغيرة فى عملية التراكـب Splicing كمـا أن بعضها يقوم بدور فى تفاعلات الكسر Cleavage التى تؤدى إلى تكوين نهايـات 3' لبعض سلاسل ر.ن.أ حديثة التكوين.

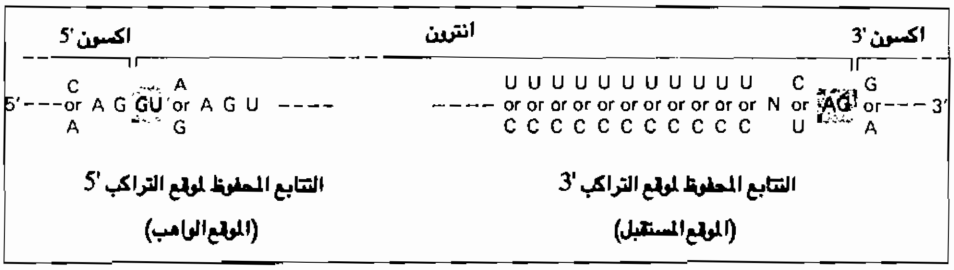
يتم حذف الانترونات فى شكل عروات Lariat:

تختلف الانترونات فى الطول ما بين ٨٠ نيوكلتيده إلى ١٠٠٠٠ نيوكلتيده أو أكثر وتختلف عن الاكسونات فى أن تتابعات القواعد فيها ليس لهـا دور أو أهمية محددة حتى الآن لذلك يعتقد بأن الانترونات قد تراكمت بهـا الطفـراف

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بمعدل سريع أثناء التطور. كما أنه من الممكن تغيير معظم تتابعات الانترونات بدون أن يصاحبه أى تغيير يذكر فى وظيفة الجين. وقد أدى ذلك على افتراض أن الانترونات ليس لها وظيفة بالمرة وأنها تمثل غالباً "مخلفات وراثية" Genetic Junk وهو ما سوف نتعرض له فيما بعد. وقد وجد أن أهم التتابعات الثابتة أو المحفوظة في الانترون هى تلك التتابعات المطلوبة لاستبعاد أو استئصال الانترون حيث تبين وجود تتابع نوعى محفوظ Consensus Sequence عند كل من نهايتى منطقة الأنترون. وأن هذا التتابع المحفوظ يتشابه تقريباً فى جميع الانترونات المعروفة حتى الآن. وجد أن تغيير (بالطفرة) فى هذا التتابع المحفوظ يقلل من فاعلية عملية التراكب Splicing ويؤثر سلبيًا على حذف الانترونات من النسخة الأولية لجزئ ر.ن.أ hnRNA.

توجد هذه التتابعات الطرفية عند موقعين نوعيين من مواقع التراكب Splice Site وهما مواقع التراكب 5' Splice Site ويسمى الموقع المعطى أو الواهب Donner Site وموقع التراكب 3' Splice Site ويطلق عليه الموقع المستقبل Acceptor Site كما هو موضح بالشكل (٧-١١).



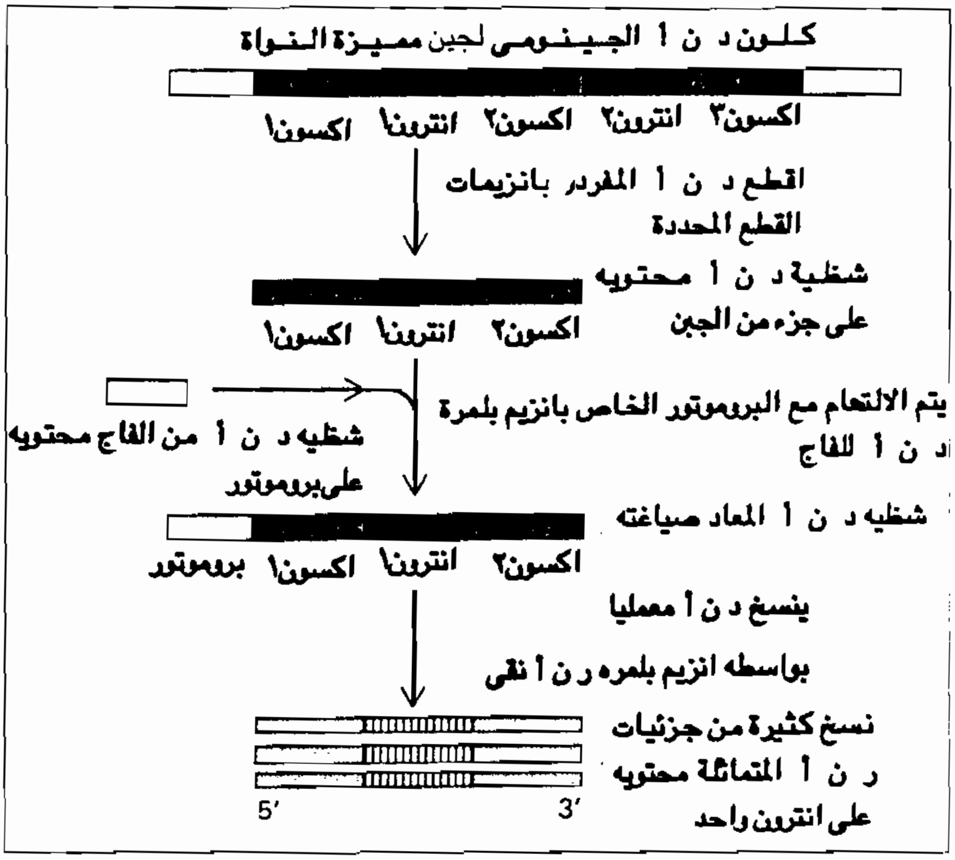
الشكل (٧-١١): التتابعات النيوكلتيدية المحفوظة Consensus Squences لمواقع الربط 5' ,3' المستخدمة فى تجهيز سلسلة ر.ن.أ ويلاحظ أن الثنائى النيوكلتيدى المظلل على الجانبين يكون عادة ثابتاً ولا يتغير

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

لابد أن تتم تفاعلات التراكب (الحذف وإعادة الالتحام) Splicing لسلسلة ر.ن.أ بدقة متناهية حيث أن أى خطأ حتى ولو لم يتجاوز نيوكلتيدة واحدة سيؤدى إلى تغيير فى إطار القراءة فى جزئ ر.ن.أ المراسل النهائى الناتج وقد يؤدى إلى طفرات عديمة المعنى.

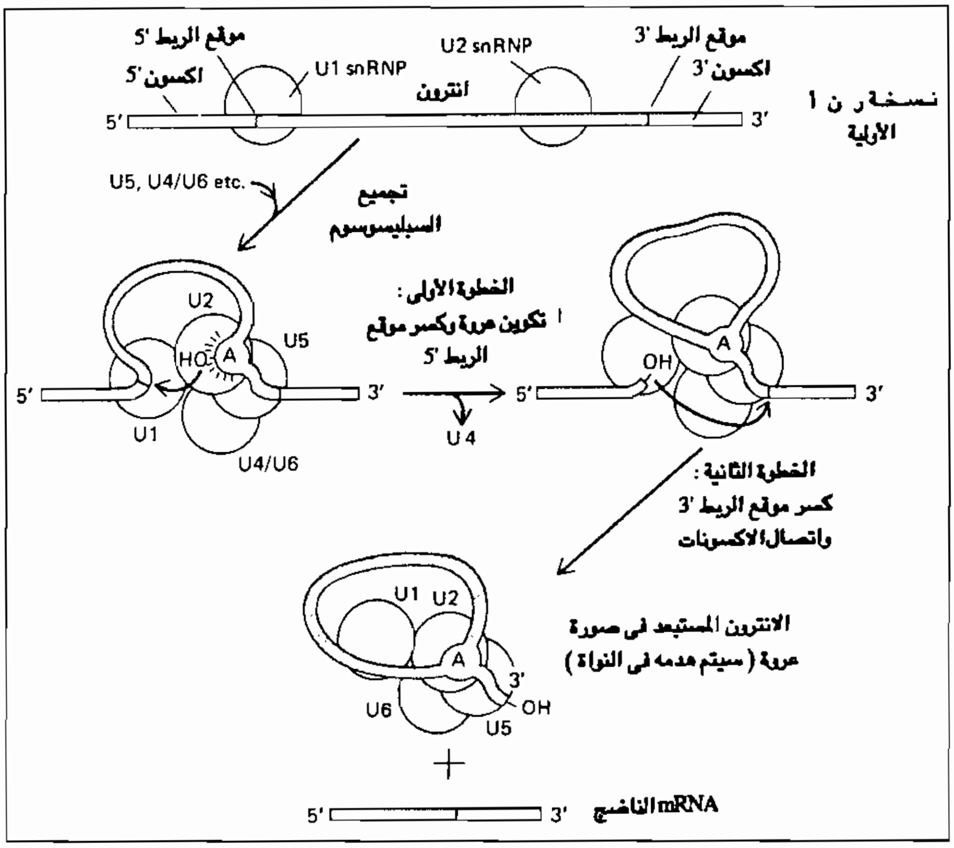
أمكن دراسة عملية استبعاد أو حذف تتابعات الإنترونات بتجربة معملية *In Vitro* حيث تم الحصول على أحد الأنواع التركيبية من سلاسل ر.ن.أ الأولية المحتوية على انترون واحد عن طريق تحضين تتابع محدد من د.ن.أ مع أنزيم بلمرة ر.ن.أ النشط كما فى الشكل (٧-١٢) وعند إضافة هذه الجزيئات الناتجة من ر.ن.أ الأولى إلى مستخلص خلوى، تبين أنه يتم فيها عملية التراكب splicing فى تفاعل انزيمى من خطوتين وفى وجود ATP وبعض الأنواع المختارة من البروتينات النووية الصغيرة وخاصة : sn RNP's U1, U2, U5, U4/U6 وبعض بروتينات نوعية اخرى. وبعد اتاحة فترة تحضين طويلة نسبياً، تتجمع هذه المعقدات أولاً فى معقد كبير يسمى سبليسوسوم Spliceosome. وقد أدى إمكان التعرف على انواع ر.ن.أ التى تظهر كنواتج وسطية أثناء التفاعل بالاضافة إلى تحديد أنواع snRNP's المطلوبة لانتاجها إلى اكتشاف ان الانترون يستأصل فى صورة عروة Lariat كما يتبين فى مسار التراكب Splicing فى الشكل (٧-١٣).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (٧-١٢): شكل تخطيطى للطريقة المستخدمة لانتاج كميات وفيرة من ر.ن.أ النقى لدراسة عملية تراكب ر.ن.أ معملياً. تعتمد الطريقة على القدرة على انتاج كمية كبيرة من تتابعات د.ن.أ المرغوب بطرق الهندسة الوراثية بالإضافة إلى توفر انزيمات بلمرة ر.ن.أ من الفاج T7 أو SP6 التى تقوم بنسخ د.ن.أ معمليا بكفاءة عالية. وبربط شظايا د.ن.أ مميزة النواة ببروموتور الفاج، فإن انزيم بلمرة ر.ن.أ يمكن استخدامه لإنتاج كميات كبيرة من ر.ن.أ معملياً مشفرة لشظايا د.ن.أ ويمكن إضافة الغطاء ٥ الموجود فى hnRNA إلى هذه الجزيئات من ر.ن.أ بالطرق البيوكيماوية

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (٧-١٣): دور السبليسوسوم (المكون من تجمع البروتينات الصغيرة U4/U6, U5, U2 U1 وغيره من المكونات) فى تراكب ر.ن.أ الأولى. بعد تجميع السبليسوسوم يتم التفاعل فى خطوتين:

١- تقوم نيوكلتيده ادينوسية خاصة (A) موجودة بالقرب من موقع الربط 3' بمهاجمة موقع الاستبعاد 5' مما يؤدى إلى كسره. ثم ترتبط النهاية المكسورة تساهمياً بهذه القاعدة A مكونة نيوكلتيده متفرعة.

٢- يتم اضافة النهاية المعرضة 3'OH للإكسون الأول إلى بداية الإكسون الثانى مع إحداث كسر فى جزئ ر.ن.أ عند موقع الربط 3\ مما يؤدى إلى اتصال الإكسونين ببعضها واستبعاد الانترون فى صورة عروة. تحدث هذه العمليات فى النواه وتؤدى إلى انتاج mRNA ناضج من النسخة الأولية لجزئ ر.ن.أ hnRNA.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

أمكن تحديد بعض الوظائف النوعية التخصصية لبعض أنــواع sn RNP's فمثلاً: U1 snRNP يرتبط بموقع التراكب 5' Splice Site وذلك بمساعدة تتــابع نيوكلتيدى فى U1 RNA المقترن فى هذا المعقد، حيث وجـد أن هنــاك تتـابع نيوكلتيدى فى هذا المعقد الصغير يكون مكملاً للتتــابع النيوكليتــدى المحفــوظ المكون من ٩ نوكلتيدات فى هذا الموقع من الانترون وحيث أنه قـد تبـين أن RNA يمتلك خاصية العمل كانزيم (Ribozyme) فإنه من المحتمل أن يكون ر . ن. أ نفسه أو المكونات البروتينية للسبليسوسوم هى المسئولة عن كسر وتكـوين الروابط التساهمية التى تتطلبها عملية التراكب splicing.

حذف عدة إنترونات من كل جزئ من hnRNA:

حيث أن السبليسوسوم يتعرف أساساً على التتابع المحفوظ عند حدود كـل انترون، لذلك فإن موقع التراكب 5' (الموقع المعطى) عند طـرف أى إنتـرون معين يمكن أن يوصل بموقع التراكب 3' (الموقع المستقبل) لأى إنتـرون آخـر أثناء عملية القطع والربط Splicing. وعلى ذلك فعندما أجريت تجربـة لـضم النصفين 5' ,3' لانترونين مختلفين أمكن لانزيمات التراكب أن تتعرف على تتابع الانترون الهجين وتقوم بحذفها. وعلى ضوء هذه النتيجة أمكن معرفة أن جينات الفقاريات بصفة عامة تحتوى على عدد من الإنترونات قد تصل إلى ٥٠ إنترون كما فى الجدول(٧-٢).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجدول (٧-٢) حجم بعض الجينات البشرية وعدد الانترونات بها

اسم الجين	* حجم الجين (Kbp)	حجم hmRNA (Kbp)	*** عدد الإنترونات
بيتا جلوبين β-globin	١,٥	٠,٦	٢
انسولين Insulin	١,٧	٠,٤	٢
بروتين كينيز (P.K.C)C	١١	١,٤	٧
البيومين Albumin	٢٥	٢,١	١٤
كتاليز Catalase	٣٤	١,٦	١٢
كولاجين Collagen	٣٨	٥	٥٠
مستقبل LDL	٤٥	٥,٥	١٧
عامل التخثر VIII	١٨٦	٩	٢٥
ثيروجلوبيولين Thyroglobulin	٣٠٠	٨,٧	٣٦
** Dystrophin	>٢٠٠٠	١٧	>٥٠

* يمثل حجم الجين هنا التتابعات المنسوخة لكل جين بالاضافة إلى التتابعات المنظمة المجاورة الخاصة بكل جين.

** يؤدى حدوث طفرة فى هذا الجين إلى مرض ضمور العضلات Duchene M.D.

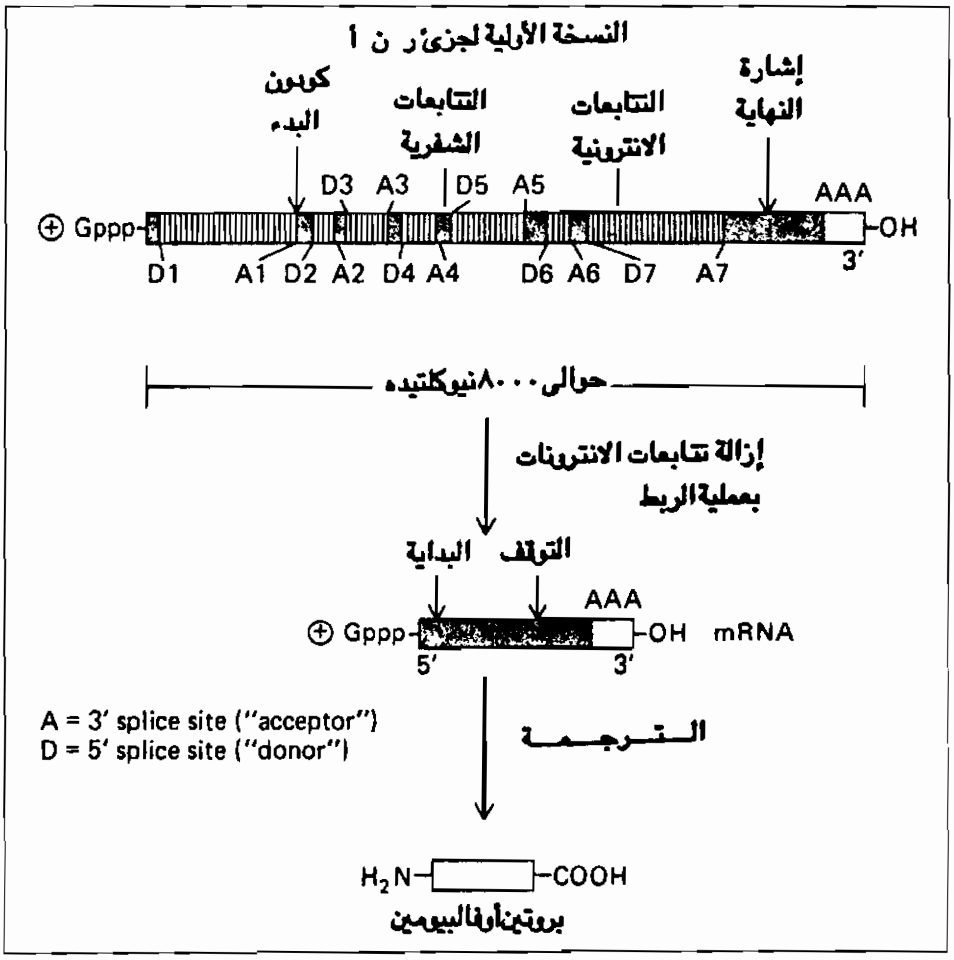
*** تعتبر جينات الهستونات والانتروفيرون من الأمثلة النادرة فى جينات مميزة النواة التى تخلو من الإنترونات.

وجد أنه إذا حدث خطأ فى التزاوج بين مواقع التراكب 5', 3' أثناء عملية تراكب ر. ن. أ Splicing. فإن ذلك سيؤدى حتما إلى غياب بعض التتابعات الشفرية الهامة من mRNA الناتج مما يؤدى إلى عدم إنتاج بروتين فعال عند الترجمة ولكن يحدث بطريقة ما أن هذا الخطأ يمكن تلافيه كالأتى:

تبين أن ماكينة تراكب ر.ن.أ تضمن عادة أن كل موقع التراكب 5' يتزاوج فقط مع أقرب موقع تراكب 3' التالى له مباشرة فى اتجاه مسار تتابع بناء ر.ن.أ (أى من 5' إلى 3') كما فى الشكل (٧-١٤) ولم تعرف حتى الان بطريقة محددة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الطريقة التى يتم بها هذا التزاوج المتتالى بين مواقع التراكب على الرغم من أن تجمع معقد السبليسوسوم فى اثناء عملية نسخ سلسلة ر.ن.أ النامية يفترض أن له دور رئيسى فى ضمان التزاوج الصحيح بين مواقع التراكب المناسبة.



الشكل (٧-١٤): النسخة الأولية لسلسلة ر.ن.أ لجين أوفالبيومين Ovalbumin فى الدجاج مبينا الإزالة المنتظمة لسبعة إنترونات للحصول على mRNA الناضج الفعال. يرمز إلى موقع الربط '5 بالحرف D وإلى موقع الربط '3 بالحرف A فى هذا الشكل

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

كما توجد بعض الأدلة على أن الدقة الكامنة فى الشكل الثلاثى الأبعاد فى سلسلة ر.ن.أ والذى تتخذه تتابعات الأنترونات والإكسونات قد تلعب دوراً رئيسياً فى هذا الإنضباط.

بناء ر. ن. أ الريبوسومى على مجموعة مترادفة من الجينات المتماثلة:

وجد أنه جينوم مميزة النواة يحتوى على نسخ متكررة ترادفيا من جينات rRNA موزعة فى مجموعات على الكروموسومات المختلفة عند مناطق تنظيم النويات Nucleolus Organizer Region (NOR)، بحيث يكون كل جين (بطول يختلف من حوالى ٨٠٠٠ إلى ١٣٠٠٠ نيوكليتد حسب الكائن) منفصل عن الجين المجاور بتتابعات غير منسوخة تعرف بخيط د.ن.أ الرابط spacer الذى يختلف بدوره كثيراً فى الطول وفى تتابع القواعد. ونتيجة للنظام التكرارى المترادف ووجود عدد كبير نسبياً من النسخ لكل من جينات rRNA، ونظرا لأن معدل النسخ فيها يكون سريعاً فإن ذلك يؤدى إلى إنتاج عدد كبير من نسخ ر. ن. أ الريبوسومى للوفاء باحتياجات الخلية العالية من جزئيات ر. ن. أ الريبوسومى التى تحتاجها لتكوين الريبوسومات اللازمة فى عملية بناء البروتين كما سيأتى بعد.

يتم نسخ جينات rRNA بواسطة إنزيم بلمرة ر.ن.أ (RNA pol I) وينتج كل جين نفس النسخ الأولية من rRNA. يصل طول هذه النسخ الأولية فى الإنسان والتى تعرف بـ 45S RNA إلى حوالى ١٣٠٠٠ نيوكليتده، وقبل أن تترك النواه فى صورة حبيبات ريبوسومية بعد إقترانها بنوعيات معينة من البروتينات فى النوبة والتى يسمى البروتينات الريبوسومية

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Ribosomal Proteins. تم تكسير كل وحدة من هذا المنتج الأولـــى 45S rRNA إلى ثلاث أنواع من rRNA بمعدل نسخة واحدة من كل نوع وهى:

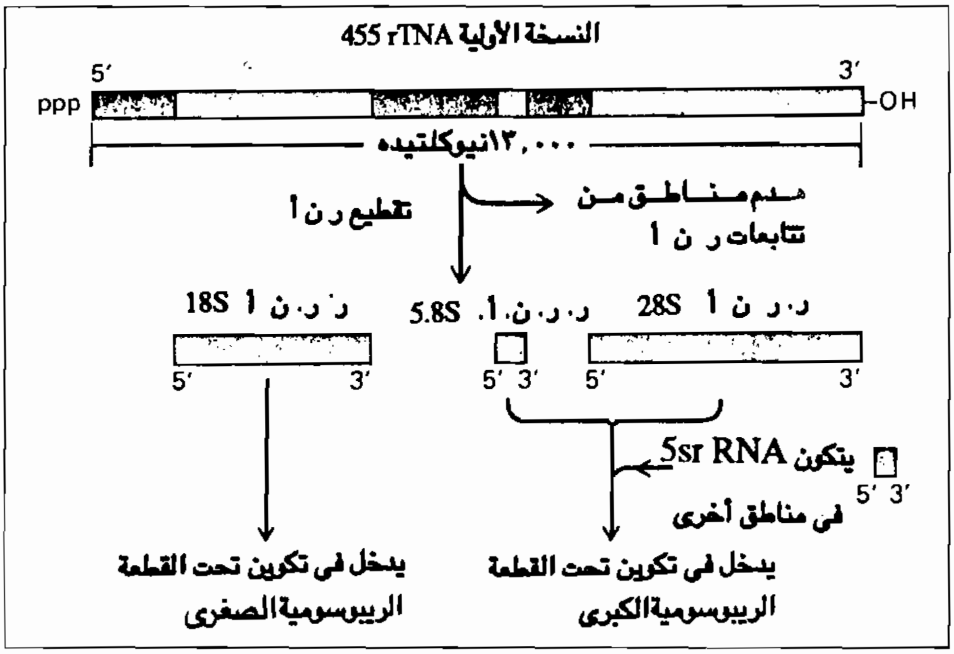
28 Sr RNA (وطوله حوالى ٥٠٠٠ نيوكتيدة).

18 Sr RNA (وطوله حوالى ٢٠٠٠ نيوكلتيده).

5.8 Sr RNA (وطوله حوالى ١٦٠ نيوكلتيده).

وتوجد ضوابط لكى ينتج من كل نسخة أولية من 45S RNA نسخة واحدة من كل من هذه الأنواع الثلاثة، بحيث يتم هدم وتحليل ما يتبقى من فائض مـــن التتابعات فى الوحدة الأولية والذى يقدر بحوالى ٦٠٠٠ نيوكليتده فى النواه كمـــا فى الشكل (٧-١٥). يوجد نوع رابع من r RNA وهو 5S r RNA وهو ينـــسخ مستقلا عن الأنواع الثلاثة السابقة وهو يوجد فى نسخ متكررة فى أماكن متفرقة بعيدة تماماً عن منطقة 45S RNA الرئيسية،. ويكون هذا النـــوع مـــن r RNA قصير جداً بطول حوالى ١٢٠ نيوكلتيده فقط، وهو ينسخ بواسطة انـــزيم RNA pol III الذى يقوم ايضاً بنسخ الجينات الخاصة بانتاج tRNA والـــذى لا يزيـــد طول سلسلة كل منها عن حوالى ٧٥-١٠٠ نيوكلتيده فقط والذى تتم فى قواعده النتروجينية تعديلات غير عادية فى عملية ما بعـــد النـــسخ Post-Transciption لكى يأخذ التركيب الثالثى والفعال فى الترجمة والذى يأخذ شكلاً مميزا يعـــرف بشكل ورقة البرسيم clover- Ieaf كما سيأتى بعد.

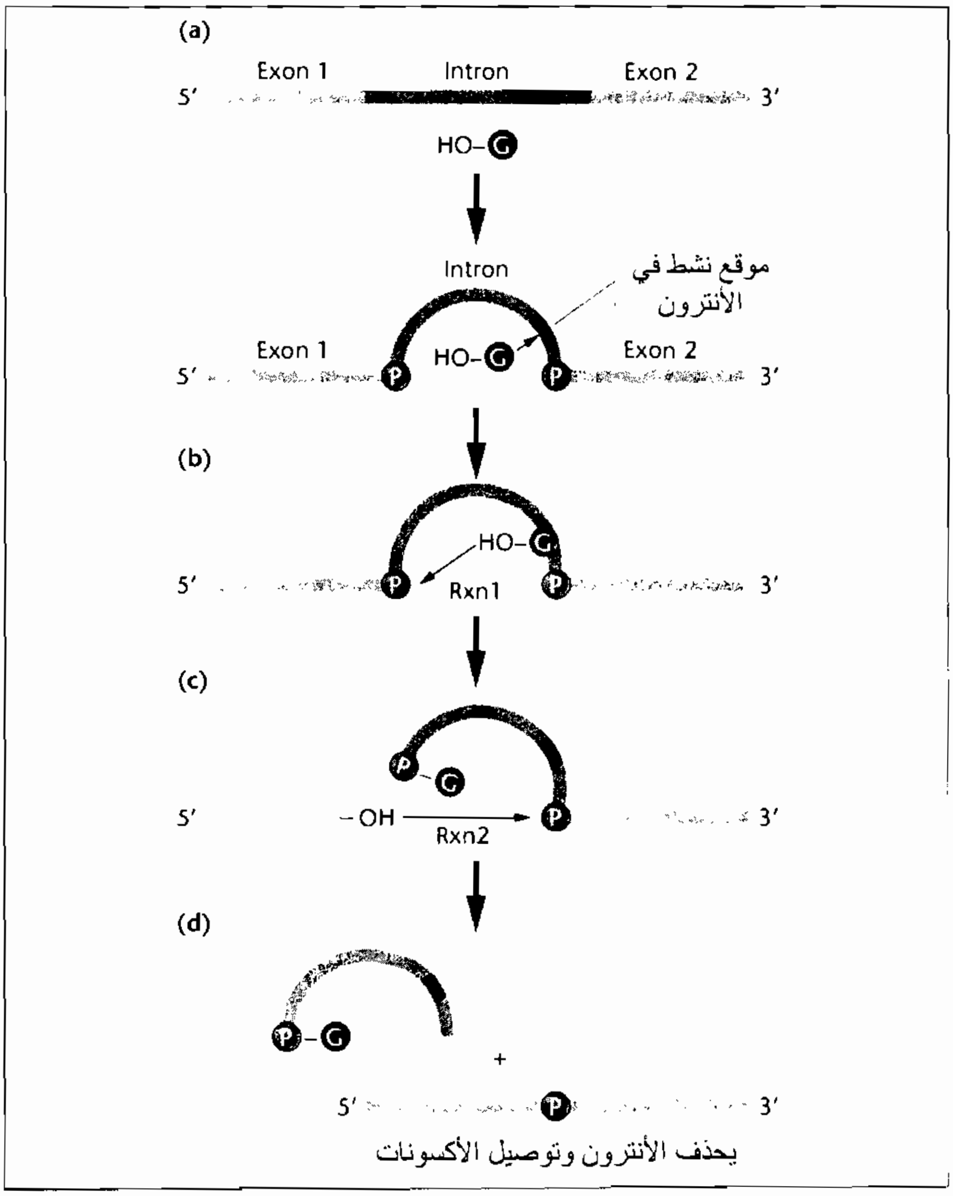
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٧-١٥): طريقة تجهيز جزئ ر.ن.أ الريبوسومى الأولى 45S r RNA لإنتاج الأنواع الثلاثة المختلفة من ر.ن.أ الريبوسومى. ويتم التخلص من حوالى نصف طول الجزئ الأولى فى هذه التفاعلات

وتجدر الاشارة إلى أن عملية استبعاد أو حذف الانترونات من جزئيات rRNA الأوليه (وكذلك mRNA في الميتوكندريا و tRNA الميتوكندريا) يتم بعملية استئصال ذاتى حيث تحتوى الانترونات نفسها على النشاط الانزيمي اللازم لإزالتها ويسمى RNA الذى يحتوى على نشاط تحليل ذاتي Autocatalytic بالريبوزيم Ripozyme ويبين الشكل (٧-١٦) عملية الاستئصال الذاتى للانترون.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٧-١٦): ميكانيكية التراكب Splicing حيث يتم إزالة المجموعة (١) من الإنترونات من النسخة. الأولية لإنتاج rRNA و يتم ذلك بعملية إستنصال ذاتية يشترك فيها تفاعلان للأسترة العابرة Transestrification

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الفصل الثامن

الشفـرة الوراثيـة
Genetic Code

التوازى بين تتابع القواعد فى جزئ د.ن.أ وتتابع الاحماض الأمينية فى البروتين:

Colinearity Between Base Sequences in DNA and Amino Acid Sequences in Protein:

حيث أنه ثبت أن تتابع القواعد فى جزئ د.ن.أ هو الـذى يحـدد تتـابع الأحماض الأمينية فى سلسلة متعـددة الببتيـد الـذى يمثـل النـاتج النهـائى end product لتعبير الجين، ونظراً لأن الكروموسوم يتكون من تتابعات خطيـة للجينات، فإنه من البديهى أن كل منطقة تتابع نيوكلتيدى ستحدد بروتينا نوعيـا بحيث نتوقع وجود تلازم أو تواز تام Colinearity بين تتابع القواعد فـى هـذه المنطقة وتتابع الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج عنها.

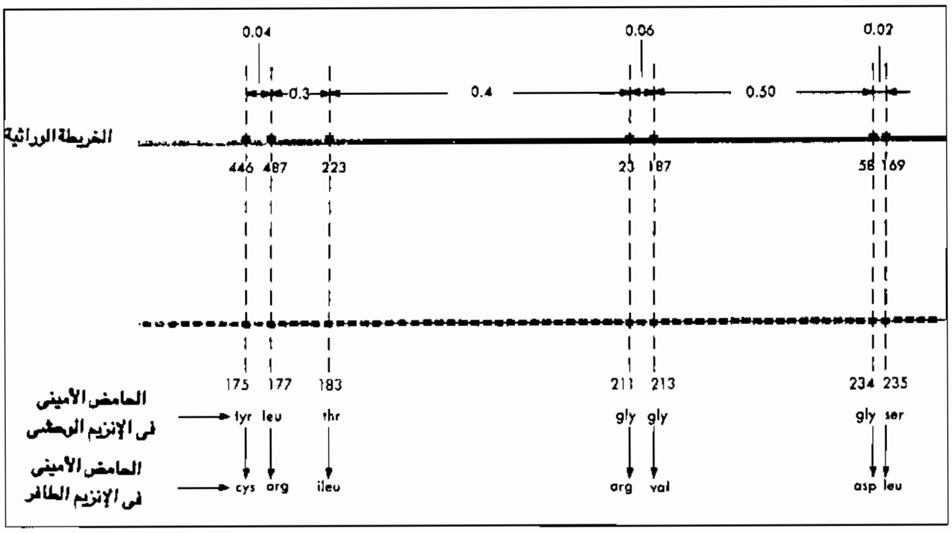
وقد أمكن التحقق من وجود هذا التوازى عند دراسة الخريطـة الوراثيـة والجزيئية لتتابع القواعد فى جزئ د.ن.أ وخريطة تتابع الأحماض الامينية فـى البروتين الذى تتحكم فى انتاجه. إذ تمكن يانفسكى Yanofsky عام ١٩٦٤ مـن رسم الخريطة الوراثية للجين الذى يتحكم فى انتاج سلسلة متعدد الببتيد A لانزيم تربتوفان سـينثيتيز Tryptophan Synthetase فـى بكتريـا القولـون *E. Coli*.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

كما أمكنه التعرف على مواقع طافرات معينة باستخدم تكرارات الاتحادات الجديدة حيث استخدم تقنية رسم الخريطة الوراثية بالحذف لتحديد المواقع فى الطافرات القريبة من بعضها. كانت السلالات الطافرة تحتوى على اقتضابات (حذف) تمتد على مسافات مختلفة على طول الجين A من أحد طرفيه ولكنها كانت تختلف فى المسافة التى تغطيها على طول الجين.

وبدراسة البروتين الطافر الناتج من كل من هذه الطافرات ومقارنة تتابع الأحماض الأمينية به بتلك الناتجة فى بروتين الطراز الوحشى، أمكن التعرف على أماكن الإحلال لمواقع الاحماض الأمينية فى سبع طافرات. وبمقارنة خريطة البروتين بمواقع الطفرات على الخريطة الوراثية لهذا الجين، تبين أن هناك تطابقاً بين مواقع الأحماض الامينية الخاطئة والمستبدلة فى كل بروتين طافر ومواقع حدوث طفرات الحذف، مما يدل على وجود تواز بين تتابع القواعد فى جزئ د.ن.أ (الجين) وبين تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج من هذا الجين كما فى الشكل (٨-١).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



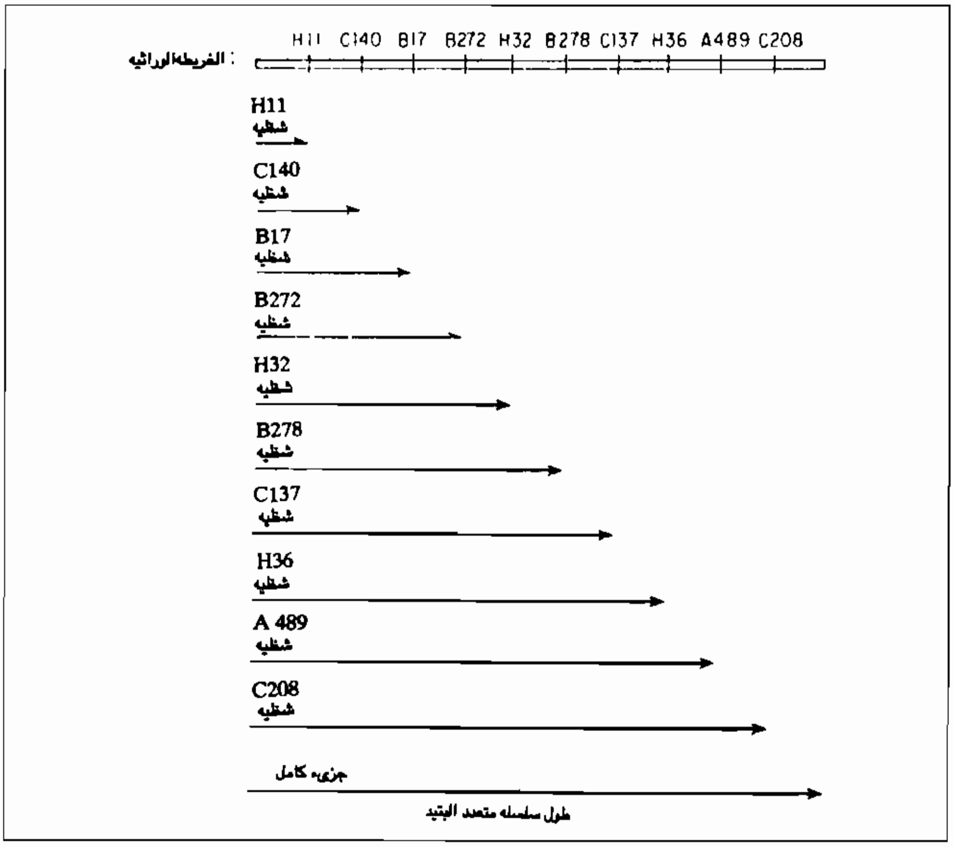
الشكل (٨-١): التوازى بين الجين (د.ن.أ) والناتج النهائى له (البروتين). يتبين فى هذا الشكل الخريطة الوراثية لربع الجين المتحكم فى تتابع الأحماض الامينية لبروتين تربتوفان سينثيتز A فى بكتريا القولون. يدل الرقم 04. مثلا على المسافة الوراثية بين الطفرتين A446 و A487. وتدل الأرقام بالنسبة لتتابع الاحماض الأمينية على مواقعها فى سلسلة متعدد الببتيد الجزئية (بطول ٢٦٧ حامض أميني) وتكون النهاية الأمينية إلى اليسار

كما استخدم ساربهاى Sarbhaie تقنية اخرى تشتمل على طافرات تـؤثر على بناء البروتين فى رأس الفاج T4 حيث يوجد نوع من الطفرات تسمى طفره ايقاف بناء البروتين Termination قبل الأوان. وعلى ذلك فإنه إذا كان الجـين والبروتين متوازيان فإن حدوث طفره من هذا النوع فى منتصف المسافة علـى طول الجين أثناء عملية الترجمة لابد أن تتسبب فـى أن النـصف الأول مـن البروتين سيتم بناؤه فى حين لا يحدث بناء للنصف الثانى منه، أى مـن نقطـة طفرة الأنهاء وما بعدها. وهكذا يمكن بعمل طفرات متتاليـة تـشمل مـسافات مختلفة من الجين أن نتتبع مدى الطول الذى تم أنهاء بناؤه من البروتين.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وقد أمكن باستخدام مطفرات كيماوية معينة استحداث ١٠ طافرات مختلفة فى الجين المتحكم فى بناء بروتين الرأس فى فاج T4 وأمكن رسم خريطة وراثية بطرق تحليل الاتحادات الجديدة. وقد تبين أن طفرات الانهاء المختلفة احدثت توقف لعملية بناء سلسلة البروتين عند نقط مختلفة على طول السلسلة. معروف أن البروتين يبدأ بنائة من النهاية الامينية ($-NH_2$) إلى النهاية الكربوكسيلية (-CooH). وفى كل طفرة تبين وجود النهاية الأمينية لسلسلة متعددة الببتيد الا أن عديدات الببتيدات التالية لهذه البداية اختلفت حسب السلالة الطافرة. إذ تبين أن الطفرات المختلفة يحتوى كل منها على بيتيدات مختلفة فى الأطوال بحيث أنه عند ترتيبها من النهاية N إلى النهاية C للبروتين، وجد أنها تمثل بناء أطوال مختلفة من سلسلة متعدد الببتيد لبروتين الفاج T4. والاهم من ذلك أن طول كل من هذه السلاسل البتيدية الطافرة (والتى تقل بدرجات متفاوته عن الطول الكلى للسلسلة الوحشية للبروتين الفعال) تتناسب مع أماكن حدوث الطفرة على طول الجين المسئول عن انتاج هذا البروتين، بحيث يتلازم توقف استطاله سلسلة متعددة الببتيد مع مكان حدوث طفرة الإنهاء فى الخريطة الوراثية للجين مما يؤكد مرة أخرى مفهوم التوازى بين تتابع القواعد فى د. ن. أ (الجين) وبين تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج. كما فى الشكل (٨-٢).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٨-٢): استخدام طفرات الانهاء Termination لاثبات العلاقة المتوازية بين تتابع القواعد فى الجين (د.ن.أ) وبين تتابع الاحماض الأمينية وطول سلسلة متعدد الببتد الناتج حيث يتناسب طول السلسلة الناتجة مع موقع حدوث طفره الانهاء

الشفرة الثلاثية : Triplet code:

حيث أنه توجد أربعة أنواع من القواعد النتروجينية فقط فى جزئ د. ن. أ وهى التى تقوم بتخصيص الأحماض الامينية العشرين فى البروتين، فإنه من الضرورى أن توجد توافيق وتباديل لهذا القواعد الأربعة لكى يتسنى لها أن تفى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بالتشفير لتلك الأحماض الامينية. وفى الحقيقة فإن بناء البروتين يحتاج إلى أكثر من عشرين شفرة عند الأخذ فى الاعتبار اشارات البدء واشارات التوقف أو انهاء بناء سلسلة البروتين.

يسمى تتابع القواعد فى ر.ن.أ المراسل m RNA الموازى أو المحدد لحامض أمينى معين "الكودون" Codon لهذا الحامض الأمينى، وتسمى تتابعات اشارات البدء كودونات الابتداء Start Codons فى حين تسمى تتابعات اشارات الانهاء كردونات الايقاف Stop Codons. ويطلق على مجموع هذه الكودونات اسم الشفرة الوراثية Genetic Code.

وقبل أن يكتشف سر الشفرات الوراثية فقد كان من المفترض أنه اذا كانت جميع الشفرات لابد أن تحتوى على نفس العدد من القواعد فإن كل كودون (شفرة) لابد أن تحتوى على ثلاثة قواعد على الأقل، ويرجع ذلك إلى الاتى:

- لو افترضنا شفرة القاعدة الواحدة فإن ذلك يعنى أننا سيكون لدينا $٤^{١}$ = ٤ أى أربع كودونات أحادية الشفرة كما أن كودون القاعدتين سيعطينا $٤^{٢}$ = ١٦ كودون وهذا العدد لازال قاصرا عن الوفاء بالعدد المطلوب من الشفرات حيث لابد أن يزيد عن ٢٠ كودون. وعلى ذلك فإن الكودون ثلاثى القاعدة سيكون أكثر ملائمة لاعطائنا العدد المطلوب وأكثر إذ سنحصل على $٤^{٣}$ = ٦٤ كودون وقد تبين بعد ذلك أن الشفرة الوراثية ثلاثية الأحرف بالفعل وأن جميع الشفرات الأربعة والستون المحتملة تحمل معلومات وراثية بطريقة أو أخرى. وكما سنعلم فيما بعد يمكن أن تعين أكثر من شفرة أو كودون واحد للتشفير لنفس الحامض الأمينى.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الأدلة الوراثية على ثلاثية الشفرة:

Genetic Evidence For Triplet Code:

فى البكتريوفاج T_4 الخاص ببكتريا القولون تبين أنه اذا تمت تنميـــة هــذا الفاج فى بيئة محتوية على المطفر الكيماوى بروفلافين proflavin الذى يتداخل مع الأسطح المتراصة المفلطحة للقواعد فى جزئ د.ن.أ فإنه ينتج طفرات حذف أو طفرات اضافة لقاعدة واحدة مما يؤدى إلى طفرات تحريك الاطـــار frame shift mutation نظراً لأن القواعد تقرأ بالتتابع كما هو موضح فيما يلى:

5' – AGU CAG UCA GUC AGU CAG UCA GUC-3'

إتجاه القراءة →

وعلى ذلك فإن أى من طفرة الاضافة أو الحذف سيؤدى كل منهما إلـــى تحريك أو تغيير اطار القراءة لوحدات الكودونات الخاصة بالإحماض الأمينيـــة الداخلة فى بروتين نوعى معين حيث نجد أن كل حامض أمينى يلـــى القاعـــدة المضافة مثلا سيكون مختلف كما يلى:

تتابع لأحماض الأمينية : Ser His Phe Asp Lys Leu

mRNA من د.ن.أ الأصلى 5' – AGC CAC UUA GAC AAA CUA–3'

mRNA من د.ن.أ المضاف اليه القاعدة :

5'- AGC ACA CUU AGA CAA ACU A–3'

Ser Thr Leu Arg Gln Thr تتابع الأحماض الأمينية.

وقد تبين بالفعل وجود طفرات للفاج T_4 فى النسل تسمى طافرات تحريك الاطار وهى تنشأ بمعدل $١٠^{-٥}$ – $١٠^{-٦}$. وإذا نميت طافرات تحريـــك الاطـــار مرة اخرى فى بيئة محتوية على المطفر بروفلافين فإن بعض الفـــاج ســـيظهر بحيث يستعيد الطراز المظهرى الوحشى لتتابع الأحماض الأمينية فى البروتين.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وقد أجريت تجربة لتحديد أى من الأحداث الطفرية ستكون مسئولة عن استعادة الطراز الوحشى. وباستبعاد احتمال حدوث طفرة حذف قاعدة فى نفس موقع طفرة الاضافة للقاعدة السابقة، نظراً لأن هذا الاحتمال ضعيف جداً، فإنه قد تبين أن حدوث طفرة حذف فى موقع قاعدة أخرى قريبة من موقع الاضافة الأول قد يؤدى إلى استعادة اطار القراءة الصحيح وفى بعض الأحيان قد ينتج عنها بروتين فعال بيولوجيا على الرغم من أن تتابعات الأحماض الأمينية بأكملها فى الطراز الوحشى للبروتين الأصلى لن تكون متطابقة مع تلك الناتجة عن الطفرتين (الاضافة والحذف). وقد تبين أن ذلك هو ما يحدث بالفعل عند دراسة مجموعة من الطافرات المستحدثة بالبروفلافين فى الجين rIIB لفاج T_4 الخاص ببكتريا القولون حيث ظهر أن الجمع بين هذه الأحداث الطفرية المتضادة سيعطى نفس التأثير. يحتوى بروتين rIIB لفاج T4 على منطقة يمكن تغيير أو احلال Substitution عدد كبير من الأحماض الامينية بها دون أن تتغير أو تتأثر فاعلية البروتين بشكل ملحوظ إلا أنه حتى فى هذه المنطقة يمكن للبروفلافين استحداث طفرات تؤدى إلى ايقاف نشاط البروتين تماماً.. يحدث عادة عند التهجين بين سلالتين من الفاج كل منها تحمل طفرة مختلفة فى نفس الجين، وذلك عن طريق العدوى المشتركة لبكتريا القولون بهاتين الطفرتين، أن بعض الطرز الوحشية للفاج ستنشأ نتيجة الاتحادات الوراثية بين موقعى الطفرتين. ولكن عندما يتم التهجين بين طفرتى بروفلافين عشوائيتين لـ r II فإنه لا ينتج باستمرار نسل فاج ذو طراز وحشى.

أثبتت نتائج الاتحادات الجديدة أن الطافرات يمكن تصنيفها فى مجموعتين محددتين تسمى إحداهما المجموعة (+) والآخرى (−) وأن التهجين بين طافرتين أحدهما تتبع المجموعة (+) والآخرى تتبع المجموعة (−) (أى من نوعين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مختلفين) سيؤدى الى الحصول على الطراز المظهرى الوحشى للبروتين الناتج. فى حين لايمكن الحصول على هذه النتيجة لو تم التهجين بين طرازين من نفس المجموعة أى بين (–) و (–) أو بين (+) و (+).

أمكن تفسير هذه النتائج على النحو التالى :

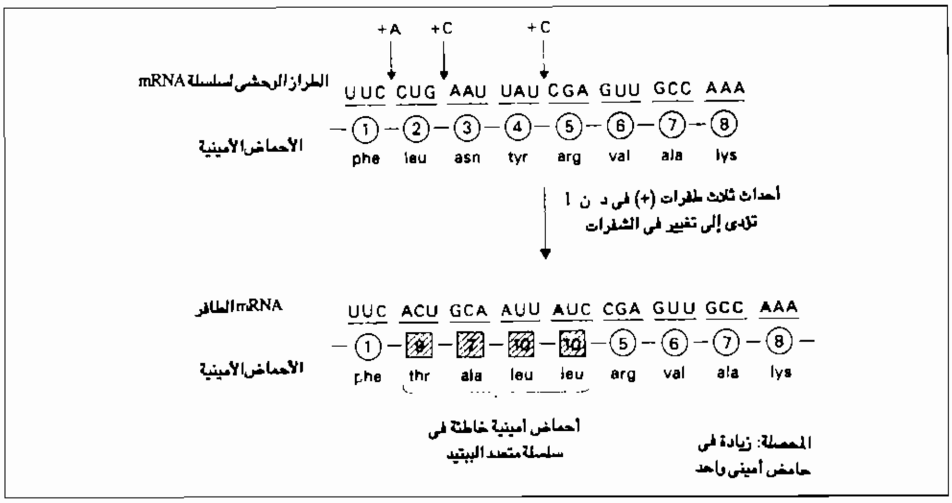
- يمكن اعتبار أن مجموعة الطافرات (+) تكون محتوية على اضافة لقاعدة واحدة فى حين أن المجموعة (–) تعد ذات نقص لقاعدة واحدة وأن الطافرات المزدوجة من النوع (+) (+) أو (–) (–) ستحتوى على قاعدتى اضافة أو نقص فى قاعدتين على الترتيب. وأن كل طفرة مزدوجة متشابهة ستؤدى إلى تحريك اطار القراءة بمعدل قاعدتين ومثل هذا التحريك من شأنه الا يعطى طرازا مظهرياً وحشياً للبروتين حيث لن يتكون بروتين فعال. ولكن فى حالة الطفرة المزدوجة غير المتشابهة (+) (–) الناتجة عن الاتحادات الجديدة فإنه على الرغم من أن تحريك اطار القراءة الذى تم فى النقطة التالية لموقع طفرة الاضافة (+) سيؤدى إلى قراءة غير صحيحة للاطار وبالتالى سيؤدى إلى ادخال أحماض أمينية خاطئة، إلا أن هذا سرعان ما يتم تصحيحه عند النقطة التالية لطفرة الحذف التالية (–) حيث سيستعاد اطار القراءة الصحيح مرة أخرى فيما يلى هذه النقطة مباشرة. وفيما بين موقعى الاضافة (+) والحذف (–) سيكون تتابع الأحماض الأمينية غير صحيح فى سلسلة متعدد الببتيد ولن يتطابق فى هذه المسافة مع تتابعه فى البروتين الوحشى، ولكن إذا كانت كلا الطفرتين تقعان فى منطقة لايؤثر تغيير الأحماض الأمينية بها كثيرا فى فعالية البروتين الناتج فإن الجمع بين (+) (–) أو (–) (+) سينتج بروتينا فعالا، بمعنى أنه اذا تم استعادة اطار القراءة قبل الوصول إلى منطقة حرجة لا تتحمل التغيير فى تتابع الأحماض الأمينية فإنه يمكن

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

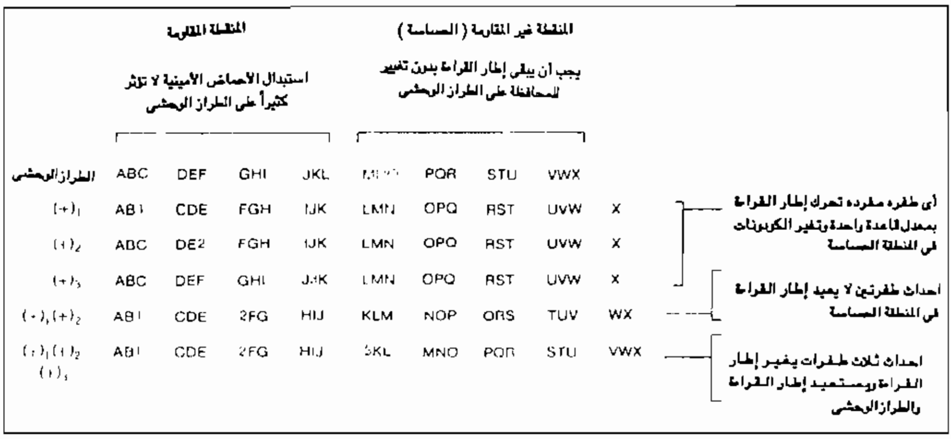
انتاج بروتينات فعالة ويقال للبروتين الناتج بأنه شبيه بـالطراز الوحـشى Pseudo-Wild Type Protein.

وبهذا المنطق فإن طفرة رجعية للطفرة (+) لابد أن تكون قد نتجت عـن استحداث طفرة أخرى من المجموعة (-) فى موقع آخر قريـب. وواضـح أن طفرات مزدوجة من نفس المجموعة (+) (+) أو (-) (-) لن تستطيع اسـتعادة الإطار الصحيح للقراءة نظراً لأن الشفرة الوراثية لا يمكـن أن تكـون ثنائيـة الأحرف، إذ أنه لو كانت ثنائية الآحرف لأمكن استعادة إطار القراءة فى مثـل هذه الطفرات المزدوجة المتشابهة. من جهة أخرى، وجد أنه عند اجراء اتحـاد بين ثلاث طفرات من نفس المجموعة أى (+ + +) (- - -) أمكـن اسـتعادة الطراز الوحشى للبروتين فى حين أن الجمع بين طفرات ثلاثيـة مختلطـة (+) (+) (-) أو (-) (-) (+) لن يعطى بروتينا وحشياً. تبين أنه اذا كانـت مواقـع الطفرات الثلاثية المتشابهة قريبة جداً من بعضها على جزئ د.ن.أ فإنها سـتنتج بروتين شبيه بالطراز الوحشى حيث سيكون تتابع الأحماض الأمينية فيه مشابها للطراز الوحشى فيما عدا مواقع حدوث الطفرات الثلاثية كما فى الشكل (٨-٣). يؤكد ذلك أن الشفرة الوراثية ثلاثية الأحرف Triplet، ويبين الشكل (٨-٤) كيف أن توافيق من ثلاثة طفرات متشابهة (+ + +) أو (- - -) فقط هى التى ستنتج طرازاً مظهرياً وحشياً للبروتين.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٨-٣): شكل تخطيطى يبين كيف يمكن استعادة اطار قراءة mRNA أثناء الترجمة عن طريق احداث ثلاث طفرات اضافة متقاربة (طفرة القاعدة الواحدة) لثلاث نيوكلتيدات فى جزئ د.ن.أ وتكون النتيجة زيادة حامض أمينى واحد فى سلسلة متعدد الببتيد

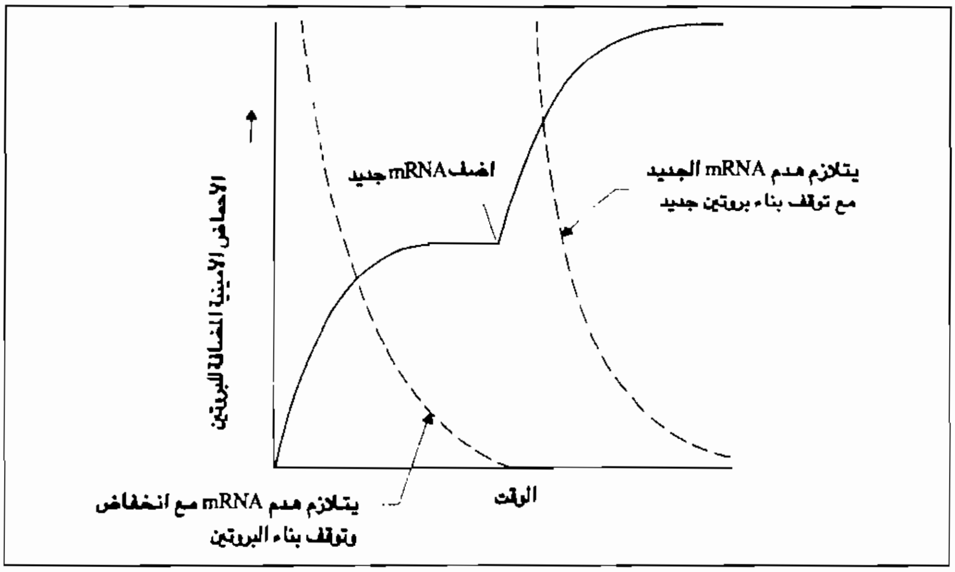


الشكل (٨-٤): شكل تخطيطى لاثبات أن إحداث ثلاث طفرات اضافة (طفرة القاعدة الواحدة) (١، ٢، ٣ غير المظللة) وليس اثنتان تؤدى إلى استعادة اطار القراءة فى المنطقة الحساسه (مظللة) فى بروتين rII للفاج T4 وذلك اذا كانت الشفرة الوراثية ثلاثية. سيكون هناك حامض أمينى زائد فى المنطقة الحساسه للتراكيب (+)، (+) ، (+) ولكن ذلك لايؤدى إلى طراز طافر

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

استنباط الشفرة الوراثية: Dicephring of the Genetic Code

اعتمدت التجارب البيوكيماوية للتعرف على الشفرات الوراثية الدالة على الأحماض الأمينية المختلفة على استخدام نظام بناء البروتين في المعمل *In Vitro* في نظام خارج الخلية Cell Free System، حيث وجد نيرنبرج Nirenberg عام ١٩٦١ أنه يمكن استخدام مستخلص من خلايا بكتريا القولون المحتوى على الريبوسومات و ر.ن.أ الناقل tRNA وانزيمات أمينواسيل سينثيتيز Aminoacyl Synthetases و ر. ن. أ المراسل mRNA والأحماض الأمينية في بناء سلاسل متعدد الببتيد في المعمل *In Vitro* إلا أن هذا التفاعل يستمر لفترة قصيرة (دقائق معدودة) ثم يتوقف إلا اذا اضيف اليه mRNA تركيبي جديد كما في الشكل(٨-٥).



الشكل (٨-٥): شكل تخطيطي يبين اعتماد استمرار بناء البروتين معمليا على توفر mRNA. ينخفض معدل بناء البروتين كلما حدث هدم لجزئيات mRNA ثم يرتفع معدل البناء مرة أخرى عند اضافة جزئيات جديدة من mRNA

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وقد اعتبر ذلك اكتشافا هاما حيث أنه عندما يتم استهلاك mRNA الطبيعى فإنه يمكن استخدام mRNA تركيبى مخلق انزيمياً فى هذا النظام. وجد أن فاعلية مثل هذا النوع من mRNA التركيبى تكون ضعيفة الا اذا تـــم تغييـــر الوســـط الأيونى واضافة بعض المكونات الآخرى، حيث تبدأ الترجمة فى أماكن عشوائية بدون الحاجة إلى كودون البدء.

وسوف نستعرض فيما يلى شرحاً موجزاً لبعض التقنيـــات البيوكيماويـــة الرئيسية التى استخدمت فى استنباط الشفرة الوراثية.

أولاً: تقنية المتعدد النيوكلتيدى المتجانس Homopolymers:

فى التجارب الأولية، استخدم نيرنبرج ومثـــاى Nirenberg and Mathaie سلسلة من التفاعلات تحتوى كل منها على ٢٠ حامض أمينى ولكن بشرط وجود حامض أمينى واحد فى كل أنبوبة معلم بالاشعاع وبقية الأحماض التسعة عـــشر غير معلمة فى كل تجربة. وتحتوى كل أنبوبة على جميع المكونـــات الأخـــرى اللازمة لبناء البروتين فى المعمل *In Vitro* فيما عـــدا mRNA الطبيعـــى. ثـــم يضاف لكل مخلوط تفاعل mRNA تركيبى مكون من تتابعات مترادفة من نفس القاعدة: مثلا Poly U: وقد أمكن تخليق هذه النوعيات مـــن mRNA الـــصناعى باستخدام نشاط انزيم Polynucleotide Phosphorylase الذى يساعد فى التفاعـــل التالى:

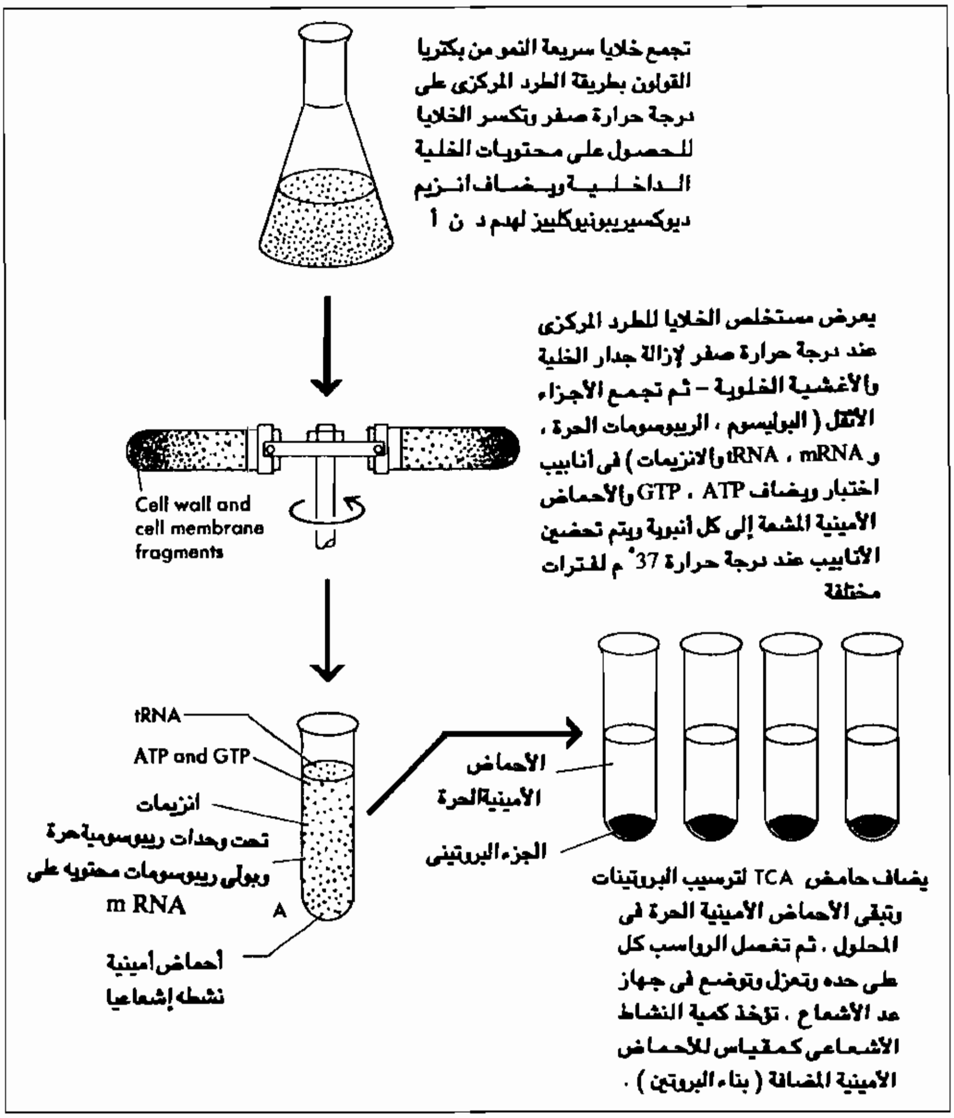
RNA + Pi mRNA	$\underset{\longleftarrow}{\overset{E}{\longrightarrow}}$	X DP Ribonucleoside diphosphate

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وعادة يتم التفاعل من اليسار إلى اليمين ولكن فى وجود وفرة من ثنائى الفوسفات فأن التفاعل يجبر على الاتجاه من اليمين إلى اليسار أى فى اتجاه تكوين mRNA تركيبى. بعد تحضين مخاليط التفاعل مع mRNA التركيبى الأحادى القاعدة Homoploymer (أى المكون من قاعدة من نوع واحد متكرر ترادفيا فى متعدد النيوكلتيد)، يتم ترسيب البروتين المتكون فى كل أنبوبة بإضافة ثلاثى كلورات الخليك TCA، ثم يكشف عن وجود الاشعاع فى البروتين المترسب والتى يستدل بها على نوع الحامض الأمينى المعلم بالاشعاع الذى تم ادخاله فى سلسلة متعدد الببتيد النوعى. وقد وجد أن Poly U يؤدى إلى إدخال حامض الفينيل الانين المشع فقط فى البروتين المترسب وذلك بصورة مترادفة ونتيجة لذلك فقد أمكن استنتاج أن UUU لابد أن يكون هو الكودون المسئول عن التشفير لحامض الفينيل الانين. ويعد هذا أول كودون تمت معرفته فى الشفرة الوراثية بصفة عامة.

كما أمكن بتجارب مشابهة معرفة أن AAA يشفر لليسين فى حين يشفر الكودون CCC للبرولين إلا أن GGG لم يمكن تحديد أى من الأحماض الأمينية يشفر له فى ذلك الوقت نظراً لصعوبة ارتباط Poly G بالريبوسومات. والجدول (٨-١) يلخص نتائج هذه التقنية كما يبين الشكل (٨-٦) . بعض التفاصيل الخاصة بعملية بناء البروتين معمليا *In Vitro*.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٨-٦): رسم تخطيطى لعملية بناء البروتين معمليا *In Vitro*

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجدول (٨-١) قياس معدل ظهور حامض الفينيل ألانين المشع فى متعدد الفنيل ألانين باستخدام م. ر. ن. أ تركيبى متجانس فى نظام بناء البروتين فى المعمل *In Vitro*

م. ر. ن. أ التركيبى	النشاط الاشعاعى فى البروتين الناتج (Count Per Minnte)
لايوجد	٤٤
Poly U	٣٩٨٠٠
Poly A	٥٠
Poly C	٣٨

ثانيا: تقنية البوليميرات المختلطة العشوائية Random Copolymers:

كانت الخطوة التالية هى تخليق بوليميرات من mRNA وتحديد الشفرات الوراثية فى تجارب معملية مشابهة لما سبق الاشارة اليه. واستناداً إلى قانون الاحتمالات، لنفترض أننا قمنا بتخليق بوليمر مختلط عشوائى متعدد النيوكلتيدات باستخدام انزيم Polynucleotide Phosohorylase مع أضافة كلا من GDP , UDP بنسبة ٥: ١ أى :

$$5n\ UDP + n\ GDP \xrightarrow{E} (U\ 5G)\ n + 6\ nPi$$

فإن الاحتمال النسبى للحصول على ثلاثى قواعد يحتوى على ثلاث قواعد من نوع U فقط فى هذا المتعدد سيكون ٥ × ٥ × ٥ = ١٢٥ فى حين أن الاحتمال النسبى للحصول على ثلاثى يحتوى على U واحد واثنان من G سيكون: ١×١×٥=٥ فإذا كانت الشفرة U3 UUU = تشفر للفينيل الانين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

كما سبق القول ، UG2 تشفر للحامض الأمينى المجهول X فإنه يمكن أن نتوقع أن تكرار إضافة حامض الفينل الانين الى سلسلة متعدد الببتيد الناتجة ستكون مكافئة فى القيمة إلى النسب من التكرار الثلاثى U فى متعدد النيوكلتيد فى mRNA التركيبى.

$$\frac{UG_2}{U_3} = \frac{\text{تكرار اضافة الحامض الأمينى(X) فى متعدد الببتيد}}{\text{تكرار اضافة حامض الفينيل الانين فى متعدد الببتيد}} = \frac{٥}{١٢٥} = ٤\%$$

أى أنه لكل مائة جزئ حامض فينيل الانين مضاف للسلسلة سيوجد حوالى أربعة جزيئات من الحامض X فى نفس السلسلة. وعندما تم تحليل متعدد الببتيد الناتج وجد أن نسبة حامض الجلايسين Glycine فى السلسلة المتكونة كان بالفعل ٤% فى حين كانت نسبة التربتوفان حوالى ٥% مما يفترض معه أن الثلاثى UG2 يشفر لهذين الحامضين الأمينين ولكن مع اختلاف تتابع القواعد. وواضح أن هذه التقنية لا تعطى أى معلومات محددة عن تتابع القواعد فى الكودونات لذلك كانت النتائج غامضة.

ويمكن تلخيص النتائج التى حصل عليها Nirenberg and Speyer عام ١٩٦٣ بهذه الطريقة فى الجدول (٨-٢).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجدول (٨-٢) نتائج تقنية البوليميرات المختلطة العشوائية .

نوع المتعدد النيوكلتيدى المختلط العشوائى **Random Copolymer**	*الثلاثيات المحتملة*	تكرار الحصول على حامض أمينى فى السلسلة		الكودون
		المتوقع	الفعلى	
Poly – UG بنسبة 5 : 1	U_3 (5x5x5) U_2G (5x5x1) UG_2 (5x1x1)	125 (100) 25 (20) 5 (4), (5)	phe : 100 cys:20, val: 20 gly : 4, try, 5	U_3 = phe U_2G=cyst, val UG_2= gly,try pt.
Poly- AU بنسبة 5: 1	A_3 (5x5x5) A_2U (5x5x1) AU_2(5x1x1)	125 (100) 25 (20) 5 (4)	lys: 100 ile: 20, asn: 28 leu: 20, asn: 28	A_3 = lys A_2U = Ile, asn AU_2 = leu, tyr pt.
Poly – CG بنسبة 5 : 1	C_3 (5x5x5) C_2G (5x5x1) CG_2 (5x1x1)	125 (100) 25 (20) 5 (4)	pro : 100 ala : 22,arg: 19 gly : 5	C_3 = pro C_2G = ala, arg CG_2 = gly

ثالثا: تقنية الارتباط المباشر لثلاثيات القواعد التركيبية

Direct Triplet Binding:

فى خطوة متقدمة لاستنباط الشفرة الوراثية تم اجراء تجارب على الارتباط المباشر النوعى لثلاثيات من القواعد النوعية المحددة التتابع على الريبوسومات ضمن نظام بناء البروتين فى المعمل *In Vitro* بحيث كان التفاعل بصفة عامة كالتالى:

Ribosome + Aminoacyl – t RNA → No Comlex

أى ريبوسومات + أمينو أسيل – t RNA ← لا يتكون معقد

فى حين يكون ناتج التفاعل :

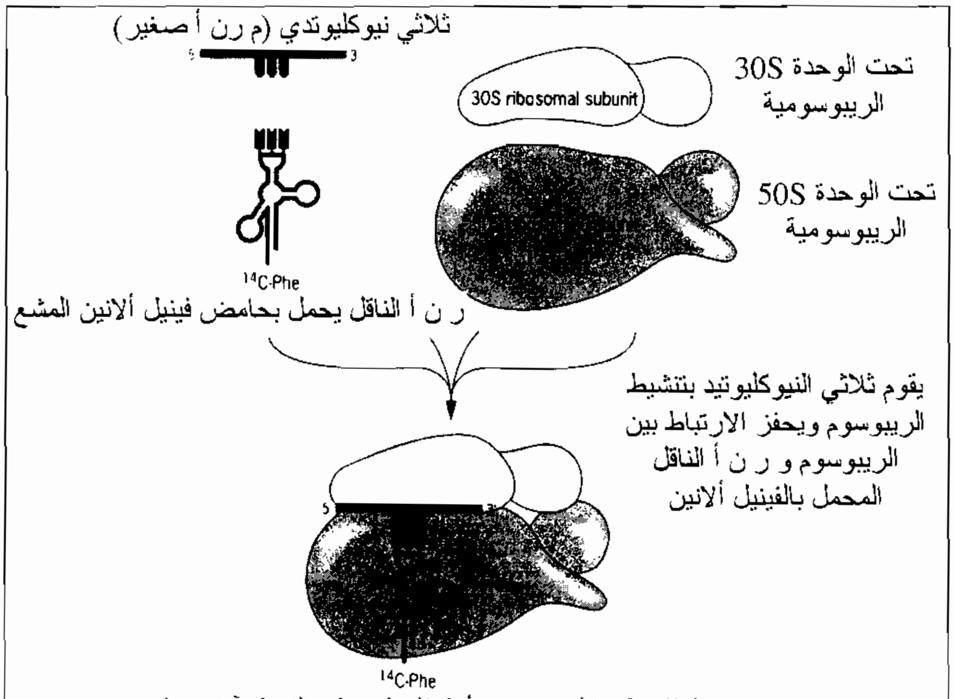
Ribosome + Aminoacyl – tRNA + Trinucleotide Codon → Comlex

ريبوسومات + امينو أسيل – tRNA + كودون ثلاثى ← يتكون معقد

وكانت الفكرة مبنية باختصار على أن ر.ن.أ الناقل tRNA المحمل بحامض أمينى نوعى X (يسمى أمينواسيل tRNA) لن يرتبط مع الريبوسومات

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الحرة ولكن الثلاثية النيوكلتيدية (الكودون) النوعية ستعمل كوسيط لربط امينواسيل tRNA بالريبوسومات. وكانت التقنية بسيطة نسبياً إذ يتم حجز الريبوسومات على مرشحات (فلتر) من نترات السيليولوز بحيث يمكن التمييز بين جزئيات أمينواسيل tRNA المرتبطة بالريبوسومات عن تلك الحرة التى لم ترتبط بها حيث يتم التخلص من هذه الأخيرة بغسيل المرشح بمحلول مناسب حيث يسمح بمرور جزئيات امينواسيل tRNA الحرة وكذلك نيوكلتيدات الأليجو من خلال المرشح فى حين لا يسمح بمرور المعقدات المكونة على الريبوسوم من امينواسيل tRNA + الكودونات النوعية الثلاثية (الشكل ٨-٧).



الشكل (٨-٧): تحفيز إرتباط أمينو أسيل -tRNA بالريبوسوم بإستخدام م ر ن أ صناعى (تركيبى) صغير مكون من ثلاث نيوكلتيدات فقط وقد ساعدت هذه التقنية كثيرا فى إكتشاف قاموس الشفرة الوراثية

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وعلى ذلك فقد تم اضافة نيوكلتيدات ثنائية أو ثلاثيـــة تركيبيـــة معروفـــة التتابع مع امينواسيل tRNA ذو نشاط اشعاعى نوعى فـــى الحـــامض الأمينـــى المعلم بالاشعاع. اختبرت كل من هذه النيوكلتيدات الأوليجو مع جميع نوعيـــات امينواسيل tRNA بحيث يكون فى كل مرة احداها فقط هو المعلم بالأشعاع فـــى حين تكون التسعة عشر نوعاً الاخرى غير معلمة.

تم تقدير كمية الأشعاع التى تتبقى على المرشح (نتيجة عدم مرور المعقد المكون من امينواسيل tRNA المشع المرتبط بالريبوسوم) لكلا مـــن التفـــاعلات العشرين والتى يحتوى كل منها على حامض أمينى نوعى مشع.

ويلخص الجدول (٨-٣) بعض النتائج التى حصل عليها ليدر ونيرنبـــرج عام ١٩٦٤ Leder and Nirenberg.

الجدول (٨-٣) نتائج تقنية الارتباط المباشر لثلاثيات القواعد التركيبية

ثنائيات وثلاثيات النيوكلتيدات المضافة	كمية الحامض الأمينى المشع (P.mole) المرتبط بالريبوسوم		الكودون
	leu – tRNA leu	Cys tRNA cys	
لاشئ	٠,٧٦	٠,٢٩	--
UGU	٠,٧٨	١,٤٦	UGU = Cys
UUG	١,٧٤	٠,٣٢	UUG = leu
GUU	٠,٩٢	٠,٣٤	--
UG	٠,٩٢	٠,٢١	--
GU	٠,٨٦	٠,٣٤	--

من هذا الجدول يمكن استخلاص النتائج الهامة التالية :

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

١- أن ثنائيات القواعد لا تعطى ارتباط على الريبوسومات فى حين اعطت ثلاثيات القواعد ارتباطاً مما يؤكد أن الشفرة لا يمكن أن تكون ثنائية القواعد.

٢- أن مفهوم الشفرة الثلاثية قد تأكد بصورة قاطعة.

٣- أن تتابع القواعد فى الشفرة الثلاثية من الأهمية بمكان فى تحديد نوع الحامض الأمينى النوعى الذى يشفر له كل كودون ثلاثى.

رابعاً: تقنية عديدات النيوكلتيدات المعروفة التتابع Polymers of Known Sequence:

كانت الخطوة الأخيرة فى استنباط الشفرة الوراثية هى استخدام سلاسل تركيبية من متعدد النيوكلتيدات ذات تتابع معروف. وقد استخدم هذه التقنية Khorana عام ١٩٦٧ فى التعرف على عدد كبير من الكودونات النوعية المحددة لعدد من الأحماض الأمينية. استخدم كورانا بوليميرات مختلطة مكونة من وحدات متكررة ترادفياً من قاعدتين مختلفتين، مما يؤدى إلى اضافة حامضين من الأحماض الأمينية النوعية (يتم تشعيعها لإمكان متابعتها). وعند استخدام هذه البوليميرات التركيبية فى نظام بناء البروتين فى المعمل *In Vitro* يختبر مدى اضافة أى من الثمانية عشر حامض أمينى الباقية غير المعلمة وذلك عند استخدام حامض أمينى ثالث مشع وسبعة عشر حامض غير مشعة إلى مخلوط التفاعل فى كل مرة مع احداث التباديل والتوافيق الممكنة، عند استخدام هذه الأحماض الامينية فى مخاليط التفاعل. وقد تبين أن سلسلة متعدد الببتيد أحتوت فى كل مرة على حامضين نوعيين مشعين فقط ولم تحدث اى اضافة لحامض مشع ثالث إلى السلسلة الناتجة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

كانت ميكانيكية اضافة الحامضين الأمينيين متشابهة كما كانت الكمية المضافة من كل منهما متكافئة وكان معدل إضافة أى من الحامضين الأمينيين فى السلسلة تزداد فى وجود الحامض الثانى فى حين ينخفض معدل اضافته فى غيابه. وكانت أحدى هذه التجارب التى شملت تحفيز اضافة الفالين والسستين بواسطة UG–poly مثالاً لمثل هذه التجارب.

فإذا كان تتابع القواعد : UGU GUG UGU GUG UGU

يملى تكوين متعدد الببتيد : cys - val - cys - val - cys

فإن معنى ذلك أن الكودون UGU يمثل السستين فى حين يمثل الكودون GUG الفالين.

وقد إتجهت دراسات تالية بواسطة كورانا ومعاونوه إلى استخدام تتابعات معلومة من ثلاثيات ورباعيات النيوكلتيدات المتكونة بشكل ترادفى بحيث أدى تحليل سلاسل متعدد الببتيد الناتجة إلى التعرف على اضافة أحماض أمينية نوعية بتتابع معين. وقد أمكن التعرف فى النهاية على حوالى نصف عدد الشفرات الأربعة والستون بهذه التقنية . ويمكن تلخيص النتائج فى الجدول (٨-٤).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الجدول (٨-٤) نتائج تقنية عديدات النيوكلتيدات المعروفة التتابع

mRNA تركيبى (بوليمير مختلط معروف التتابع)	الكودونات المتعرف عليها	الأحماض الأمينية المضافة فى سلسلة متعدد الببتيد	الشفرات (الكودونات)
poly (C – U)n	*CUC /UCU /CUC*	leucine Serine	5’CUC3’ UCU
poly (U.G)n	*UGU /GUG /UGU*	Cysteine Valine	UGU GUG
poly (AC)n	*ACA /CAC /ACA*	Threonine Histidine	ACA CAC
poly (AG)n	*AGA /GAG /AGA*	Arginine Glutamine	AGA GAG

ولتفسير الدور الذى يقوم به متعدد النيوكلتيدات فى هذا المجال، سنأخذ المتعدد PolyGAA كمثال؛ حيث يتحكم هذا المتعدد فى تكوين أما متعدد الليسين Polylysine أو متعدد الجلوتامين Polyglutamine أو متعدد الأرجينين Polyarginine مما يعنى أن واحداً فقط من أحد الأحماض الأمينية الثلاثة تلك سيدخل فى تكوين متعدد الببتيد اعتماداً على نقطة البدء لثلاثية قواعد عشوائية عند بداية الرسالة كالآتى:

5’- AAG - AAGAAG - 3’
lys – lys – lys

أو

5’- GAAGAAGAA - 3’
glu – glu – glu

أو

5’- AGA AGA AGA - 3’
Arg – Arg – Arg

وقد توالى استنباط الكودونات المشفرة من مثل هذه البوليميرات النيوكلتيدية التركيبية الثنائية والثلاثية والرباعية التتابعات. وقد أسفرت جميع

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

هذه الدراسات عن استنباط كودونات نوعية محددة لأحماض أمينية نوعية وذلك بالنسبة لواحد وستين كودون من الأربعة والستين المحتملة كما فى الجدول رقـم (٨-٥).

وتشفر الكودونات الثلاث الباقية لإنهاء أو وقف بناء سلسلة البروتين.

الجدول (٨-٥) الشفرة الوراثية

First position (5' End)		*U*	C	A	G		Third Position (3'End)
	U	UUU] Phe UUC UUA] Leu UUG	UCU UCC] Ser UCA UCG	UAU] Tyr UAC UAA* Stop UAG* Stop	UGU] Cys UGC UGA* Stop UGG Trp	U C A G	
	C	CUU CUC] Leu CUA CUG	CCU CCC] Pro CCA CCG	CAU] His CAC CAA] Gln CAG	CGU CGC] Arg CGA CGG	U C A G	
	A	AUU AUC] Ile AUA AUG+ Met	ACU AAC] Thr ACA ACG	AAU] Asn AAC AAA] Lys AAG	AGU] Ser AGC AGA] Arg AGG	U C A G	
	G	GUU GUC] Val GUA GUG+	GCU GCC] Ala GCA GCG	GAU] Asp GAC GAA] Glu GAG	GGU GGC] Gly GGA GGG	U C A G	

* كودونات الإنهاء أو عديم المعنى

* يستخدم أيضا لتحديد كودون البدء $tRNA_F{}^{Met}$ – formly-Met لذلك فإن كودون الفالين غير محـدد "غـامض" حيث أنه يشفر لكلا من الفالين والمثيونين.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الخواص الرئيسية للشفرة الوراثية:

Major Characteristics of The Code:

أولاً : الشفرة الوراثية تقرأ بصورة مستمرة بلا فواصل أو تداخل بين الكودونات:

The Code is Comma Free and Non Overlapping:

أمكن إثبات عدم التداخل فى قراءة ثلاثيات الكودونات فى الشفرة الوراثية بمتابعة تأثير استحداث طفرات القاعدة الواحدة single base mutation فى تتابع القواعد فى جزئ د ن أ. فإذا حدث تداخل بين الكودونات، فإن معنى ذلك أن ينتج لدينا تغيير فى أكثر من حامض أمينى واحد فى سلسلة البروتين الناتجة؛ فى حين لو كانت الشفرة غير متداخلة فسيقتصر التغيير على حامض أمينى واحد نتيجة لطفرة استبدال القاعدة الواحدة كما هو موضح فى المثال التالى:

تتابع القواعد لكودونات الأحماض الأمينية	عند وجود تداخل	عند عدم وجود تداخل
mRNA الطبيعى AGUACG ↓ mRNA الطافر AG [C] ACG	a b c d (AGU) (GUA) (UAC) (ACG) x y z d (AGC) (GCA) (CAC) (ACG)	a b (AGU) (ACG) x b AGC (ACG)

حيث نجد أنه إذا كانت الشفرة متداخلة، سيؤدي الاستبدال فى قاعدة واحدة إلى تغيير مقابل فى ثلاث أحماض أمينية نوعية فى البروتين الناتج فى حين أنه فى حالة الشفرة غير المتداخلة سيقتصر التغيير على استبدال حامض أمينى واحد فى البروتين. وقد دلت نتائج التجارب على أن الفرض الثانى هو الصحيح والأمثلة كثيرة منها:

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

١- وجد انجرام Ingram أن الطفرة Hbs المسئولة عن انتاج هيموجلوبين منجلى طافر يؤدى إلى الأنيميا المنجلية تشتمل على تغيير فى حامض أمينى واحد نتيجة لاستبدال قاعدة واحدة بقاعدة أخرى فى الجين؛ مما أدى إلى إحلال الفالين فى البروتين الطافر محل الجلوتامين فى البروتين الطبيعى.

٢- استحدث ويتمان Wittman طفرات فى فيروس TMV- RNA وذلك بمعاملة الحامض النووى بالمطفرات، وعند عزل البروتينات من السلالات الطافرة وهضمها بإنزيم التربسين وتحليلها، وجد أنه فى جميع الحالات لم يحدث إلا استبدال لحامض أمينى واحد فقط فى أى من المواقع الطفرية.

٣- وجد يانفسكى Yanofsky أنه عند استبدال أحد الأحماض الأمينية فى السلسلة A من أنزيم Tryptophan Synthetase فى بكتريا القولون بإحدى المطفرات، فقد تبين أن الحامضين الأمينيين الواقعين على جانبى هذا الحامض المستبدل لم يتغيرا بالمرة.

فإذا اتفقنا على أن الشفرة غير متداخلة، فإن ذلك يحتم أن يكون هناك طرق للقراءة الصحيحة أو القراءة الخطأ وإلا لأمكن قراءة التتابع النيوكلتيدى التالي فى ثلاث إطارات للقراءة مختلفة كالآتى:

فمثلاً التتابع AGU AGU AGU AGU AGU

حيث قد يقرأ : (AGU) (AGU) (AGU) (AGU) (AGU)

أو (GUA) (GUA) (GUA) (GUA) (GUA)

أو (UAG) (UAG) (UAG) (UAG) (UAG)

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وبالطبع ستتم ترجمة كل من هذه القراءات الثلاث إلى أحماض أمينية نوعية مختلفة اعتماداً على نقطة بدء القراءة.

يمكن التغلب على هذه الصعوبة إما بأن تتم قراءة التتابع النيوكلتيدى من نقطة بدء نوعية محددة وثابتة، أو أن تكون طبيعة الشفرة الموروثة تسمح بالقراءة الصحيحة فقط بحيث تمنع حدوث الأخطاء. وقد اقترح كريك Crick مفهوم "شفرة بدون فواصل" على أساس أن إطار القراءة الصحيح موروث فى التتابع نفسه، بحيث أن بعض تتابعات القواعد ستمثل أحماض أمينية فى حين لا يكون للبعض الآخر أى معنى فى هذا المجال. على ذلك فإن بعض الكودونات الأربعة والستين فقط هى التى تستخدم فى التشفير عند الترجمة. وعند كل نقطة فى الشفرة ستكون هناك قراءة واحدة فقط هى الصحيحة فى حين تكون جميع القراءات المحتملة الأخرى عديمة المعنى ولا تشفر لأى حامض أمينى. بمعنى أنه إذا تجاورت الكودونات فى إطار واحد معين، فإن القراءة ستكون صحيحة وذات معنى Sense فى حين أن جميع الإطارات الأخرى المتداخلة للقراءة ستكون غير صحيحة أو عديمة المعنى Nonsense وعلى ذلك تكون :

ذات معنى ذات معنى ذات معنى ذات معنى ذات معنى
AGU AGU AGU AGU AGU

×عديمة المعنى ×عديمة المعنى ×عديمة المعنى ×عديمة المعنى

Yعديمة المعنى Yعديمة المعنى Yعديمة المعنى Yعديمة المعنى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فنجد أنه فيما عدا القراءة فى الإطار الأول التى تمثل القراءة الصحيحة نجد أن كل من الاحتمالات الأربعة للكودونات الثلاثية XXX المحتملة فى الإطارات الأخرى للقراءة لن تكون ممثلة أو محددة لأحماض أمينية ولكنها عديمة المعنى حيث أنها لو كانت تشفر لحامض أمينى واحد مترادف فإن التتابع XXXX وكذلك التتابع YYYY سيعطى قراءة ذات معنى فى الإطار الخطأ.

وقد تم تجميع الكودونات الستون الأخرى فى عشرين مجموعة تحتوى كل مجموعة على ثلاث كودونات. وتشتمل كل مجموعة على توافيق دواره لنفس الثلاث قواعد النتروجينية ووجد أن واحداً فقط من هذه الكودونات الثلاث الموجودة فى كل مجموعة تمثل حامضاً أمينياً فعلى سبيل المثال:

لو أن التتابع ذو معنى = AGU AGU

فإن التتابع عديم المعنى = GUA

والتتابع عديم المعنى = UAG

ثانياً : الشفرة ترادفية المعنى Synonyms (أو انحلالية Degenerate):

حيث يوجد لدينا ٦١ كودوناً تشفر لعشرين حامض أمينى فى حين تشفر الثلاثة كودونات الباقية لإنهاء أو إيقاف بناء البروتين، وفيما عدا المثيونين والتربتوفان اللذان يوجد لكل منهما كودون واحد، فمن الواضح أن هناك أكثر من كودون واحد يمكن أن يشفر لنفس الحامض الأمينى الواحد. بمعنى أن بعض الكودونات مترادفة المعنى عند القراءة (ويطلق على الشفرة فى هذه الحالة بأنها انحلالية Degenerate) وعلى سبيل المثال نجد أن الليوسين يتم تشفيره بستة كودونات وهى : UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG.

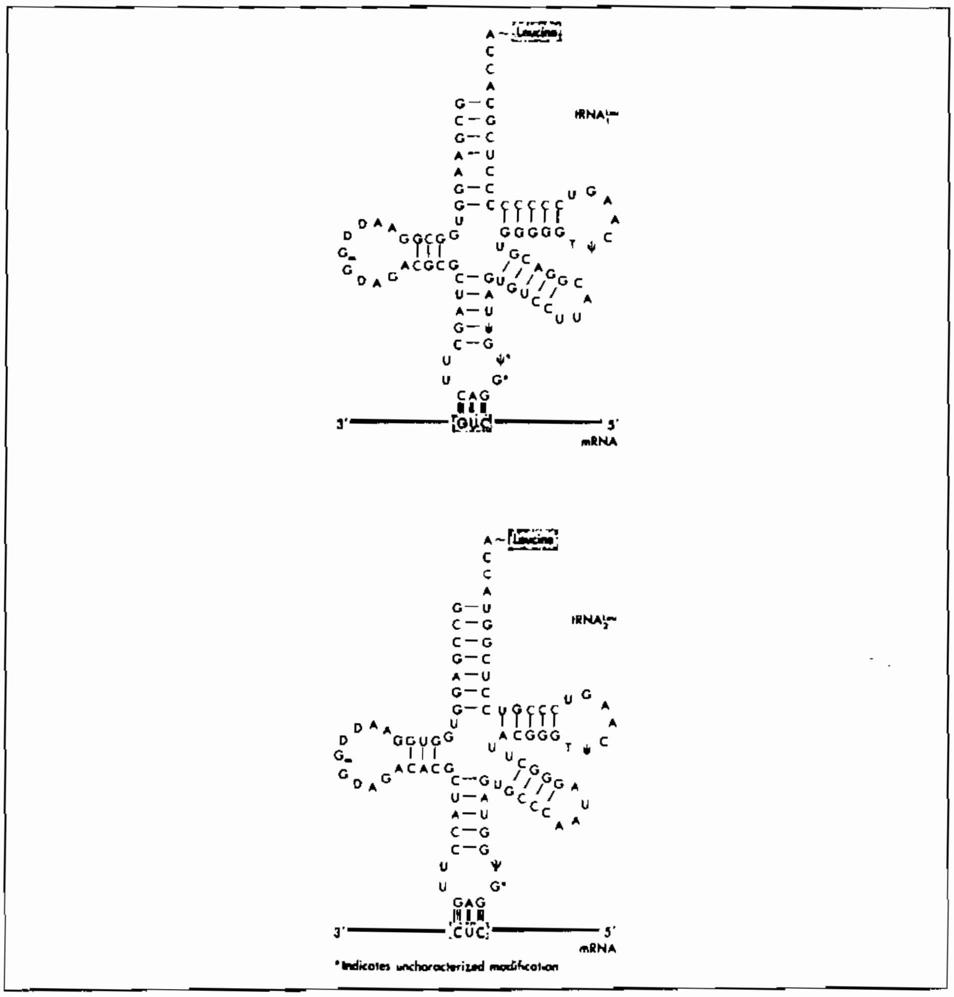
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويلاحظ أنه فى معظم الحالات تختلف الكودونات المترادفة عند موقع القاعدة الثالثة فى الكودون فى حين تكون القاعدتين الأولى والثانية ثابتتين بالنسبة لكل حامض أمينى نوعى، مما يوحى بأن هذين الموقعين يعتبران الأكثر أهمية فى تحديد الكودون النوعى لكل حامض (الشكل ٨-٨). وكنتيجة لذلك فإن أى طفرة تحدث فى القاعدة الموجودة فى الموقع الثالث للكودون يمكن غالبا أن لا يكون لها تأثير سلبى على عملية الترجمة إلى بروتين، لأن الحامض الأمينى المحدد ستتم إضافته فى مكانه من السلسلة بالرغم من حدوث هذه الطفرة وتسمى مثل هذه الطفرات بالطفرة الساكتة أو الصامتة Silent Mutation.

وقد أوضحت نتائج دراسات تتابع القواعد فى د ن أ أن جميع الكودونات الأربعة والستون يمكن استخدامها فى الكائن الحى *In Vivo*. وقد يعطى إمكان استخدام جميع هذه الكودونات ميزة وقائية فى التقليل من تأثير الطفرات الضارة التى قد تحدث للكائن الحى. إذ لو افترضنا أن عدد كبير من الكودونات كانت عديمة المعنى فإن معنى ذلك أن الطفرات التى قد تحدث فى العدد القليل الباقى ذو المعنى ستكون أكثر ضراوة وبمعدل حدوث أعلى بكثير بحيث تؤثر بالسلب على فعالية البروتين الناتج. بالإضافة إلى ذلك فإن طبيعة تنظيم الشفرات الوراثية تعمل على التقليل من تأثير الطفرات على عملية الترجمة أثناء عملية بناء البروتين. فمثلاً حتى فى حالة حدوث طفرة فى موقع القاعدة الأولى للكودون فإنه من المحتمل أن تتم ترجمة الكودون المتغير الناتج إلى حامض أمينى مشابه فى خواصه للحامض الأصلى (إن لم يعط نفس الحامض). كما أن الكودونات المحتوية على قاعدة بيريميدينيه فى الموقع الثانى عادة تكون مختصة بالتشفير للأحماض الأمينية الكارهة للماء Hydrophobic فى حين أن الكودونات المحتوية على قاعدة بيورينيه فى الموقع الثانى تكون عادة مختصة بالتشفير

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

للأحماض الأمينية القطبية Polar (الجدول ٨ – ٥) ونظراً لأن طفرات الاستبدال المتماثل Transition هي الأكثر شيوعا في طفرات استبدال القاعدة الواحدة، فإن أي تغيير في الموقع الثاني للكودون سيؤدي غالباً إلى استبدال حامض أميني بآخر له خواص مشابهة إلى حد كبير.



الشكل (٨–٨): وجود جزيئين مختلفين من tRNA للحامض الأميني الليوسين بحيث يتعرف كل منهما على كودون مختلف مما يوضح ترادفية الشفرة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وكما سبق القول لن تؤثر طفرة الاستبدال المتماثل فى الموقع الثالث على التخصصية الموروثة للكودون بالنسبة للتشفير للحامض الأمينى النـوعى بـل والأكثر من ذلك فإنه حتى لو حدثت طفرة استبدال غير متماثـل Transversion فى هذا الموقع بالذات فإنه لن يكون لها تأثير على الحامض الأمينى المـضاف فى حوالى نصف الحالات.

كما توجد خاصية أخرى مميزة فى الشفرة الوراثية وهى أنـه طالمـا أن الموقعين الأول والثانى يكونان مشغولين بالقاعدة G أو C فإن أى مـن القواعـد الأربعة المحتملة لو احتلت الموقع الثالث ستعطى كودون مختص بالتشفير لنفس الحامض الأمينى. ولو قارنا فى الجدول (٨-٥) على سبيل المثـال الكودونـات الخاصة بكل من الأحماض الأمينية الألانين، البرولين، الارجينين والجلايـسين فسوف تتضح هذه الظاهرة.

ومن جهة أخرى، وفى حالة ما إذا كان الموقعان الأول والثانى للكـودون مشغولين بالقاعدة A أو U فإن نوع القاعدة الموجودة فى الموقع الثالث سـيكون له تأثير كبير على نوع الحامض الأمينى الذى تترجم له هذه الكودونات. ويفسر ذلك على أساس أن زوج القواعد GC يرتبط بقوة أكثر من الـزوج AU. لـذلك فإن التزاوج غير الصحيح فى القاعدة الثالثة فى الحالة الأولى يمكـن احتمالـه نظراً لارتباط الموقعين الأول والثانى بروابط قوية (هيدروجينية) بـين الـزوج GC عما فى حالة AU حيث تكون الروابط ضعيفة نسبياً. ولذلك فإن وجـود أى من النيوكلتيدات الأربعة فى الموقع الثالث بصفة عامـة قـد يكـون مرتبطـاً بميكانيكية أمان للتقليل من أخطاء قراءة الشفرة الوراثية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ثالثاً : التأرجح فى مضاد الشفرة Wobble in Anticodon:

إذا افترضنا من البداية أنه يوجد فى كل جزئ tRNA مضاد للشفرة لكل كودون فإن معنى ذلك أنه لابد أن يكون لدينا على الأقل ٦١ نوع مختلف من tRNA بالإضافة إلى ثلاثة إضافية تختص بإنهاء الترجمة. إلا أن الأدلة أكدت على أن هناك عدد أقل من tRNA عما كان متوقعاً حسب ذلك الافتراض، وأن كلtRNA نوعى يمكنه أن يميز عدد من الكودنات المختلفة. وقد ساعد على ذلك اكتشاف قاعدة غير عادية فى مضاد الشفرة على tRNA وهى قاعدة الأنوسين Inosine، وهى تختلف عن القواعد الأربعة المعروفة، وتنشأ نتيجة لعملية تعديل إنزيمى فى قاعدة الأدينين فى عروة مضاد الشفرة فى جزئ tRNA حيث يتم نزع مجموعة الأمين على ذرة الكربون رقم ٦ فتصبح مجموعة كيتونية على هذه الذرة وينتج الأنوسين.

وقد اقترح Crick مفهوم التأرجح Wobble لتفسير ذلك. ويعنى هذا المفهوم أن القاعدة فى النهاية '5 فى مضاد الكودون ليس ثابتاً (أو مقيداً) فى مكانه مثل القاعدتين الأخرتين مما يسمح بتكوين روابط هيدروجينية مع أى من عدة قواعد واقعة على النهاية '3 فى الكودون المقابل. إلا أنه تبين أن ذلك لا يشمل جميع التباديل الممكنة حيث وجد أن التزاوج فى هذه الحالة يقتصر على القواعد المبينه فى الجدول (٨-٦).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجدول (٨-٦) التزاوجات الممكنة حسب مفهوم التأرجح

القاعدة الأولى فى مضاد الكودون	القاعدة الثالثة فى الكودون
G	U أو C
C	G
A	U
U	A أو G
I	A أو U أو C

وطبقا لهذا الجدول فإنه من الممكن للقاعدة U فى الوضع المتأرجح (الأول فى مضاد الكودون) أن تتزاوج مع الأدينين أو الجوانين. كما تستطيع قاعدة الإنوسين I أن تتزاوج مع A أو U أو C. تبين أن التزاوجات بين القواعد المسموح بها حسب مفهوم التأرجح هى تلك التى تعطى مساحة ريبوز - ريبوز قريبة من تلك المحددة بتزاوجات AU أو GC. وعلى ذلك فإن التزاوجات التى قد تتم بين قاعدتى بيورين أو بين قاعدتى بيرميدين سيكون من شأنها إعطاء مسافة ريبوز أطول أو أقصر من اللازم مما يؤدى إلى فشل التزاوج.

تبين أن قوانين التأرجح لأى من tRNA لا تسمح بأن تتعرف قاعدة ما على جميع الكودونات الأربعة. وكما هو واضح من الجدول أعلاه فإن الإنوسين يمثل أقصى حد يمكن لقاعدة فى مضاد الكودون أن تتعرف على قواعد الموقع الثالث فى الكودون (وهى هنا ٣ قواعد).

وقد أيدت جميع الدراسات الحديثة مفهوم التأرجح، فقد تنبأ Crick من البداية بوجود ثلاثة أنواع على الأقل من tRNA للكودونات الستة الخاصة بالسيرين (AGC, AGU, UCG, UCA, UCC, UCU).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

كما أن الحامضين الأمينيين الأخرين (الليوسين والأرجينين) والمشفر كل منهما بستة كودونات تمتلك أنواع مختلفة من tRNA لمجموعة الكودونات التـــى تختلف فى الموقع الأول أو الثانى.

تبين أن ذلك يرجع إلى أن القاعدة فى الموقع الأول فى مضاد الكـــودون Anticodon (على النهاية '5) تكون لها حرية حركة أكثر عن تلك الموجـــودتين فى الموقعين الاخرين، مما يفسر وجود التأرجح فى الموقع الثالث '3 للكـــودون. وعلى العكس من ذلك نجد أن الموقع الثالث فى مضاد الكودون ('3) يكون مقيد الحركة مما قد يفسر انعدام حدوث ظـــاهرة التـــأرجح فـــى الموقـــع الأول ('5) للكودون.

رابعاً : كودون بدء الترجمة (AUG) Initiation Codon

وكودونات إنهاء الترجمة (UAC, UAA, UGA) Termination Codons:

حيث أن بناء البروتين يتم فى الاتجاه من '3 ← '5 كما سيأتى بعد، وحيث أن البناء يتم من النهاية الأمينية NH_2 ؛ فقد تبين أن إشارة البدء لبناء البـــروتين هى الكودون AUG. وقد وجد أن هذا الكودون له وظيفتين متميـــزتين، فعنـــدما يكون AUG فى بداية منطقة التـــشفير Coding Region لجـــزئ mRNA فـــى البكتريا فإنه سيشفر لإضافة N-Formyl Methionine (Fmet) فى حين أن نفس الكودون AUG فى أى مكان آخر بعيد عن منطقة البدء هذه سيشفر للميثـــونين العادى (Met).

وكما سيأتى عند دراسة عملية بناء البروتين فى البكتريا، فإنه يوجد نوعاً مميزاً من tRNA يسمى fmet-tRNA يختلف عن tRNA الخـــاص بـــالميثونين العادى. ولكى يتم ارتباط fmet-tRNA بالريبوسوم فإن الأمـــر يتطلـــب وجـــود

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بروتين نوعي يسمى بروتين البدء رقم 2 (IF2) (Initiation Factor2) : في حين يستخدم met tRNA نفس عامل الاستطالة Elongation Factor الذي تستخدمه بقية أنواع tRNA الأخرى. جدير بالذكر أنه في مميزة النواة يوجد نوع واحد من tRNA، جزئ البدء $tRNAi^{met}$ مختص ببدء بناء سلسلة البروتين حيث تبدأ السلسلة هنا بالميثونين وليس Formyl Methionine.

يجب التنويه هنا إلى أن mRNA الطبيعي *In Vivo* يبدأالترجمة دائماً بالكودون AUG في حين أن ذلك ليس شرطاً حتمياً في حالة استخدام mRNA التركيبي في المعمل *In Vitro* كما في حالة التجارب التي استخدمت لاستنباط الشفرات الوراثية والتي سبق شرحها.

من جهة أخرى، تؤدي قراءة أي من الكودونات الثلاثة : ,UAG, UAA UGA إلى توقف استطالة السلسلة وإنهاء عملية بناء البروتين Termination. إذ أنه عندما يصل الريبوسوم إلى أحد هذه الكودونات الثلاثة فإن سلسلة متعدد البيتيد التامة الاستطالة تنزلق من علىالريبوسوم وتنفك عنه. وعلى العكس من جميع الكودونات الأخرى نجد أن كودونات الإنهاء الثلاثة هذه لا يمكن التعرف عليها بأي من tRNA النوعية المعروفة، في حين يتم التعرف عليها وقراءتها بواسطة بروتينات نوعية تسمى عوامل الانفكاك أو الإنهاء Release Factors (RF) كما سيأتي بعد.

وتجدر الإشارة إلى أنه قد يوجد أكثر من كودون إنهاء الشفرة جنباً إلى جنب في نهاية منطقة التشفير كضمان إضافي لايقاف عملية بناء البروتين عند نهاية منطقة التشفير Coding Region في جزئ mRNA.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

خامساً : اختلاف مقادير tRNA النوعية وتكرار استخدام الكودونات المختلفة في الشفرة:

يحدث أحياناً أن عدة جزيئات من tRNA التي تم بناؤها قد تحتوى على تتابعات نيوكلتيديه مختلفة كثيراً ولكنها في نفس الوقت تحتوى على نفس مضاد الكودون المختص بكودون نوعي لحامض أمينى معين. وغالباً ما تكون إحدى هذه النوعيات المتشابهة موجودة بمقادير كبيرة بالمقارنة بالنوعيات الأخرى الحاملة لنفس مضاد الكودون (قد تصل إلى أكثر من حوالى ١١ ضعف). ففى بكتريا القولون على سبيل المثال يوجد tRNA رئيسى للتيروسين $tRNA^{tyr}$ ونوع آخر من tRNA ثانوى بالنسبة لنفس الحامض وكلاهما يحتوى على نفس مضاد الكودون (3' - AUG-5'). وقد وجد بصفة عامة أن كلا من نوعى tRNA الرئيسى والثانوى يتم نسخهما من جينين مختلفين، وأن الفرق فى تكرار وجودهما يرجع إلى اختلاف فى سرعة أو معدل نسخ كل منهما والتى ترجع إلى الأختلاف فى كفاءة منطقة البروموتور بينهما وكذلك لفروق أخرى فى عملية تجهيز جزئ ر ن أ الناقل tRNA بعد النسخ. لم تتحدد حتى الآن بصفة قاطعة وظيفة ر. ن. أ. الناقل الثانوى Secondary tRNA وقد يكون له دور فى تنظيم عملية الترجمة نظرا لوجوده بكميات ضئيلة نسبيا كما أنه يقوم بدور فى كبت فعل الجين Suppression of Gene Action.

من جهة أخرى، نجد أنه نظرا لحقيقة أن معظم الأحماض الأمينية تتحدد بأكثر من كودون واحد فإن ذلك يدعو للتساؤل عما إذا كانت جميع الكودونات الخاصة بنفس الحامض يتم استخدامها بنفس التكرار، أم أن هناك أفضلية لبعضها على البعض الآخر فى معدل أو تكرار استخدامها أثناء عملية الترجمة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فعلى سبيل المثال، فى كائن يحتوى على د ن أ غنى فى AT فإنه من المتوقع أن تكون معظم الكودونات محتوية على U أو A فى الموقع الثالث. وفى الحقيقة فقد وجد أن التتابع الكلى لجزئ د ن أ الأحادى فى جينوم البكتريوفاج ∅X174 يحتوى على 24% A، 22%C, 23%G, 31% T. وقد تبين أن U هى القاعدة المفضلة بالفعل فى الموقع الثالث للكودون. وحتى فى الكائنات التى لايوجد تحيز فى نسب تكوين القواعد، نجد أن استخدام الكودونات ليس متروكا للصدفة. وحيث أننا نعرف الآن تتابع القواعد لكثير من جينات بكتريا القولون فقد أصبح واضحا أن هناك بعض الكودونات التى تستخدم بمعدل عالى جدا فى حين قد لا تستخدم كودونات أخرى لنفس الحامض إلا نادراً.

وجد أنه فى جينات الكائنات الراقية، يكون استخدام الكودونات أيضا غير خاضع للصدفة. إلا أنه تبين وجود اختلاف فى تكرار استخدام بعض الكودونات بين مميزة النواة وغير مميزة النواة. ويطلق على هذه الظاهرة تحيز الكودون Codon Bias. وجد أن تكرار ظهور كودونات نوعية معينة فى بكتريا القولون يرتبط ارتباطا وثيقا بمدى توفر جزئيات tRNA الخاصة بها. ويتضح ذلك بصفة خاصة فى حالة البروتينات التى يتم إنتاجها بكميات كبيرة (مثل RecA Protein والبروتينات الريبوسومية) إذ نجد أن تلك الأنواع من mRNA تحتوى على كودونات يتم قراءتها بواسطة أكثر أنواع tRNA وفرة (يطلق على جزئيات tRNA النوعية التى تحتوى على مضاد لنفس الشفرة اسم مشابهات المستقبلات Isoacceptors)، فى حين لا يحتوى هذا الـ mRNA على كودونات مقابلة لنوعيات tRNA الثانوية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فى خلايا مميزة النواة نجد أيضا أن الكودونات المقابلة لمشابهات المستقبلات الرئيسية من tRNA تستخدم عادة بأعلى تكرار. ومن أمثلة ذلك ما يحدث بالنسبة لبروتينات الخميرة وخاصة أنزيمى GDP, ADI حيث نجد أن أكثر من ٩٦% من الأحماض الأمينية بها يتم تشفيرها بواسطة ٢٥ كودون فقط وهى تلك التى يكون tRNA المقابل لها موجودا بوفرة.

وعلى ذلك فيبدو أنه فى الجينات ذات التعبير القوى يكون اختيار الكودون محكوما بمدى وفرة tRNA وقد يكون لذلك علاقة بتنظيم عملية الترجمة لكى تصل إلى فعاليتها المثلى. وقد يشير ذلك إلى أن الكودونات المقابلة لنوعيات tRNA النادرة قد يكون دورها هو إبطاء عملية الترجمة. وحتى عندما يتأرجح نوع واحد من tRNA ليستطيع قراءة عدة كودونات، فإن أحد هذه الكودونات يكون عادة هو المفضل. وقد أدى تحليل تلك الأفضليات الى استنتاج بعض خواص التفاعل بين الكودون ومضاد الكودون ويمكن تلخيص أهمها فى الآتى:

- أن بعض التعديلات أو التحويرات فى القاعدة U فى الموقع '5 (المتأرجح) لمضاد الكودون يعطى أفضلية للقاعدة A على G فى الموقع الثالث للكودون.
- أن القاعدة إنوسين I فى الموقع '5 (المتأرجح) لمضاد الكودون تفضل التزاوج مع القاعدة U أو C عن التزاوج مع القاعدة A.
- عندما تكون تزاوجات القاعدتين الأولتين فى الكودون مع مضاد الكودون من نوع AU، نجد أن الموقع الثالث المفضل يكون مشغولا بالقاعدة C (معطيا تزاوج GC) بدلا من U (الذى يعطى زوج ثالث من نوع AU)؛ بمعنى آخر يفضل التفاعل القوى فى تزاوج الكودون مع مضاد الكودون.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

سادساً : الشفرة الوراثية عامة (تقريباً) The code is nearly universal:

وجد أن Poly-U يؤدى إلى إضافة حامض الفينيل الانين فى التجارب المعملية *in Vitro* فى مستخلصات خلوية مأخوذة من أنواع مختلفة من الكائنات تتراوح بين البكتريا والثدييات. ونفس الشئ تم الحصول عليه عند استخدام Poly C حيث وجد أنه يحفز إدخال البرولين فى تكوين عديد البرولين. وكذلك الحال فى Poly A الذى يختص بالتشفير لليسين فى متعدد الليسين. وقد تم ذلك بصفة عامة بصرف النظر عن نوع المستخلص الخلوى أو مصدره. وقد تأكدت شمولية الشفرة وانطباقها على جميع أنواع الكائنات تقريبا بتجارب حديثة اشتملت على دراسة تتابع القواعد فى د ن أ لجينات محددة تشفر لبروتينات تنتمى إلى أنواع Species مختلفة، وبهذا يبدو أن الشفرة الوراثية قد ظلت ثابتة على مدى أحقاب تطورية طويلة.

من جهة أخرى وجد أن الشفرة الوراثية فى جينوم الميتوكوندريا mtDNA فى الإنسان وغيره من الثدييات قد شذت عن هذه القاعدة فى بعض الخواص ومنها:

- أن الكودون UGA لا يقرأ فى الميتوكوندريا على أنه كودون إنهاء الترجمة ولكنه يشفر لحامض التربتوفان.
- أن المثيونين الداخلى يتم تشفيره بكل من الكودونين AUA, AUG بدلا من الأيزوليوسين فى حين أن المثيونين فى بداية الترجمة يشفر له بالكودونات : AUG, AUA, AUU, AUC.
- أن الكودونين AGG, AGA ليسا كودونان للتشفير للأرجينين ولكنهما بدلا من ذلك يستخدمان كإشارة لإنهاء الترجمة فى الميتوكوندريا. وبذلك يوجد

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أربع كودونات لوقف الترجمة فى الميتوكوندريا وهى : UAA, UAG, AGA, AGG.

- أن عدد أنواع tRNA فى الميتوكوندريا يقل بكثير عما فى سيتوبلازم الخلية مميزة النواة حيث لا يزيد فى الأولى عن ٢٢ نوع فقط فى حين يصل فى الثانية إلى ٣١ نوع.

تأكيد الشفرة الوراثية فى الخلية الحية:

In Vivo Confirmation of The Code:

أمكن التأكيد على صحة الخواص الرئيسية للشفرة الوراثية باستخدام بكتريوتاج MS2 والذى يتكون جينومه من سلسلة مفردة من ر ن أ ويبلغ طوله ٣٥٠٠ ريبونيوكليوتيده تمثل ثلاث جينات فقط وقد تمكن فيرز ومعاونوه Fiers *et al.* من تحليل تتابع هذه الجينات ونواتجها من سلاسل متعدد الببتيدات.

وعند مقارنة تتابع النيوكلتيدات فى الجين مع تتابع الأحماض الامينية فى البروتين الناتج، تبين وجود توازى (تطابق) بين التتابعين بمعنى أنه وطبقا لقاموس الشفرة الوراثية فإننا نجد أن التتابع الخطى للنيوكلتيدات (وبالتالى تتابع ثلاثيات الشفرات) تتفق تماما مع التتابع الخطى للأحماض الأمينية للبروتين وبالإضافة إلى ذلك، فقد وجد أن كودون أول حامض أمينى هو AUG وهو كودون البدء، فى حين كان كودون آخر حامض أمينى فى السلسلة متبوعا بكودونين مترادفين لإنهاء الترجمة وهما UAA, UAG وقد ثبت بعد ذلك بطرق التحليل فى الحى *In Vivo* أن خواص الشفرة الوراثية التى تأكدت فى البكتريا والفيروس تتشابه تماما مع تلك الموجودة فى مميزة النواة.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الفصل التاسع

بنـــاء الـبروتـــين

Protein Synthesis

تقوم الأنواع الثلاثة من ر ن أ وهى: rRNA, tRNA, mRNA بالـدور الرئيسى فى عملية الترجمة Translation، أى بناء البروتين، حسب المعادلـة المركزيةCentral Dogma :

وكان يعتقد فى البداية أن جميع هذه الأنــواع الثلاثــة تـستخدم كقالــب template فى عملية الترجمة، إلا أنه تبين أن واحدا منهـا فقــط وهـو ر ن أ المراسل mRNA هو الذى يقوم بالفعل بدور القالب، فى حـين يقـوم النوعـان الآخران بأدوار أخرى هامة للمساعدة فى توجيه وإتمام عملية الترجمة.

وقد دلت الدراسات على أنه لا توجد علاقـة تجـاذب نوعيـة specific affinity بين المجاميع الجانبية فى كثير من الأحماض الأمينية وبـين القواعـد النيتروجينية الموجودة فى mRNA القالب، لذلك اتجهت البحوث إلـى محاولـة التعرف على نوعية معينة من ر ن أ تقوم بدور الوسيط أو المهيئ adaptor بين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ر ن أ المراسل mRNA وبين الأحماض الأمينية ليعمل كهمزة الوصل بينهما وقد تم التوصل إلى أن جزئيات ر.ن.أ. الناقل tRNA هى التى يمكنها أن تقوم بهذا الدور.

تحتوى الخلية على مجموعة من ر ن أ الناقل وهى عبارة عن جزئيات من الأحماض النووية الريبوزية صغيرة الحجم (بطول حوالى ٧٠-٩٠ نيوكلتيدة). يسمح تركيب جزئ tRNA بوجود موقعين نوعيين مستقلين ويمكن لأحدهما أن يتعرف على ويرتبط بالحامض الأمينى بمساعدة أنزيم نوعى يسمى tRNA Synthetase؛ فى حين يقوم الموقع الآخر الموجود فى الطرف الآخر من الجزئ والمحتوى على مضاد الكودون بالتعرف على ثلاثية الكودون الموجودة فى تتابع القواعد على جزئ mRNA مما يسمح للأحماض الأمينية بأن تصطف طبقا لهذا التتابع النيوكلتيدى.

يسمح تركيب جزئ tRNA بأن يرتبط بحامض أمينى واحد من الأحماض العشرين المعروفة. فمثلا يطلق على tRNA المتخصص فى حمل أو نقل الجلايسين اسم $tRNA^{gly}$. وهكذا.. ويوجد لكل حامض أمينى نوع واحد من tRNA التخصصى وقد توجد عدة أنواع من tRNA يستطيع كل منها التفاعل مع نفس الحامض الأمينى.

قبل أن يشارك الحامض الأمينى فى بناء سلسلة متعدد الببتيد، فإن نهايته الكربوكسيلية (COOH-) ترتبط تساهميا مع النهاية '3 لجزئ tRNA النوعى المحتوى على مضاد الكودون الصحيح الخاص بهذا الحامض (مضاد الكودون هو التتابع الثلاثى المكمل لتتابع الكودون الثلاثى النوعى لحامض أمينى معين على جزئ mRNA). يؤدى التزاوج الصحيح بين الكودون ومضاد الكودون

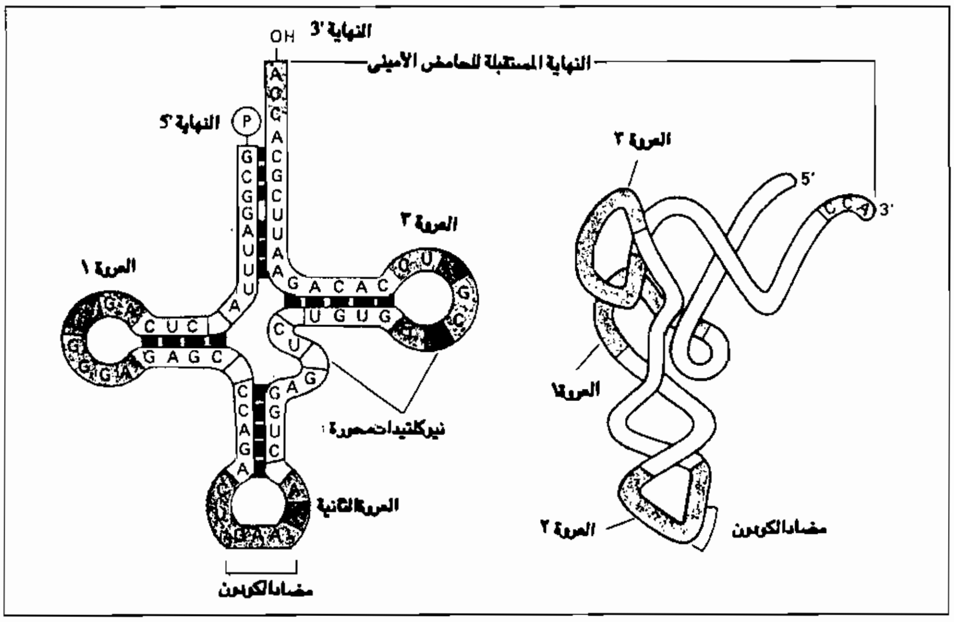
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بواسطة الروابط الهيدروجينية إلى امكان وضع الحامض الأمينى فى مكانه فى سلسلة البروتين النامية طبقا للأوامر الموجودة فى تتابع النيوكلتيدات فى جزئ mRNA، مما يسمح بالاستخدام الصحيح للشفرة الوراثية فى ترجمة تتابع النيوكلتيدات إلى تتابع مقابل من الأحماض الأمينية فى البروتين. يقوم tRNA بدور أساسى كوسيط فى عملية الترجمة حيث ترتبط أحدى نهايتيه بحامض أمينى نوعى فى حين تتزاوج النهاية الأخرى مع الكودون الخاص بهذا الحامض على جزئ mRNA أى يمكن القول بأن tRNA يقوم بدور همزة الوصل بين تتابع النيوكلتيدات وتتابع الأحماض الأمينية. من جهة أخرى تؤدى الرابطة التساهمية التى تحدث بين الحامض الأمينى وبين جزئ tRNA إلى تنشيط الحامض الأمينى عن طريق تكوين رابطة ذات طاقة عالية عند النهاية الكربوكسيلية لهذا الحامض بحيث يمكنها أن تتفاعل مع المجموعة الأمينية للحامض الأمينى التالى فى تتابع متعدد الببتيد، حيث تستخدم طاقة التنشيط هذه فى تكوين رابطة ببتيدية. تعد عملية التنشيط هذه ضرورية لبناء البروتين لأن الأحماض الأمينية غير المنشطة لا يمكن إضافتها مباشرة إلى سلسلة متعدد الببتيد النامية.

تعتمد وظيفة جزئ tRNA على دقة تركيبه الثلاثى الأبعاد Three Dimension Structure. وقد أمكن دراسة التركيب الدقيق لعدة جزئيات مختلفة من tRNA وذلك بتقنيات متخصصة، وقد وجد أن جزئ tRNA يحتوى على مناطق تكون فيها سلسلة متعدد النيوكلتيدات متزاوجة فى حين توجد مناطق محتوية على قواعد متحورة Modified. كما تبين حدوث تفاعلات غير عادية بين القواعد لكى يتمكن الجزئ من الانثناء أو الانطباق. ظهر فى التركيب الدقيق لجزئ tRNA احتواءه على عروات وسيقان متزاوجة القواعد بحيث يأخذ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تركيب الجزئ شكلا يشبه شكل ورقة البرسيم clover leaf shape ويعتقد أنه لابد أن يتم تحوير هذا الشكل بدرجة أكثر تعقيدا حتى تأخذ شكل حرف L لكى يكون الجزئ فعالا ويقوم بوظيفته كمهيئ، كما فى الشكل (٩-١).



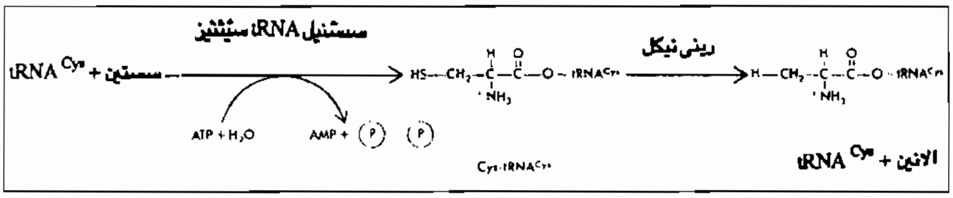
الشكل (٩-١): التركيب ثلاثى الأبعاد لجزئ tRNA ويتبين المناطق ذات القواعد المتزاوجة تخطيطيا فى الشكل الأيسر (شكل تركيب ورقة البرسيم) فى حين يتبين التركيب ثلاثى الأبعاد (شكل حرف L) إلى اليمين. تستقبل أحد النهايات الحامض الأمينى، فى حين تحتوى النهاية الأخرى على النيوكلتيدات الثلاثة لمضاد الكودون. يرتبط الحامض الأمينى فى النهاية ذات التتابع CCA عند النهاية '3 للجزئ

وقد تبين وجود عدد من النيوكلتيدات غير العادية فى جزئ tRNA قد تصل نسبتها إلى حوالى ١٠% من إجمالى النيوكلتيدات، والتى تنشأ عن عملية تحوير أو تعديل للنيوكلتيدات العادية فى عملية التجهيز التى تعقب عملية نسخ tRNA. وقد تبين أن وجود هذه النيوكلتيدات غير العادية يساعد على أن يأخذ جزئ tRNA التركيب المطلوب لكى يقوم بوظيفته.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

دور انزيم Aminoacy1-tRNA Synthetase فى عملية الترجمة:

وجد أن جزئ tRNA، وليس الحامض الأمينى الذى يحمله، هـو الـذى يحدد مكان إضافة هذا الحامض فى سلسلة متعدد الببتيد أثناء عمليـة الترجمـة. وقد تأكد ذلك بوضوح بعد تجربة مثيرة تم فيهـا تحميـل $tRNA^{cys}$ بحـامض السستين، ثم أجريت عملية تحويل لحامض السستين المحمل إلى حامض الآلانين بعملية يتم فيها نزع مجموعة SH بالرينى نيكل Raney Nickel كما فى الـشكل (٩-٢) وبذلك ينتج جزئ Ala-tRNA هجين أى " $Alany1- tRNA^{cys}$ " وعنـد استخدام مثل هذا الجزئ فى نظام بناء البروتين المعملى وجـد أن كـل موقـع للسستين فى سلسلة متعدد الببتيد الناتج قد اسـتبدل بحـامض الانـين Alanine مما يبين مبدأين أساسيين. أولهما أن الحامض الأمينى المحمل ليس له دور فـى تحديد موقع إضافته فى سلسلة متعدد الببتيد، والثانى والأهـم أن جـزئ tRNA يقوم بدور المهيئ فقط بين الحامض الأمينى وبين mRNA وأن التفاعل الحـرج يكمن فى التطابق الصحيح بين جـزئ tRNA النـوعى والحـامض الأمينـى المخصص له، وتـتم هـذه المطابقـة بواسـطة أنـزيم Aminoacy1-tRNA Synthetase.



الشكل (٩-٢): تجربة لإثبات أن جزئ tRNA يقوم بدور المهيئ. أمكن تحويل السلسلة الجانبية للحامض الأمينى السستين إلى الانين بعد تحميل الأول على $tRNA^{cys}$. تتم إضافة الانين فى مكان السستين فى جزئ الهيموجلوبين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

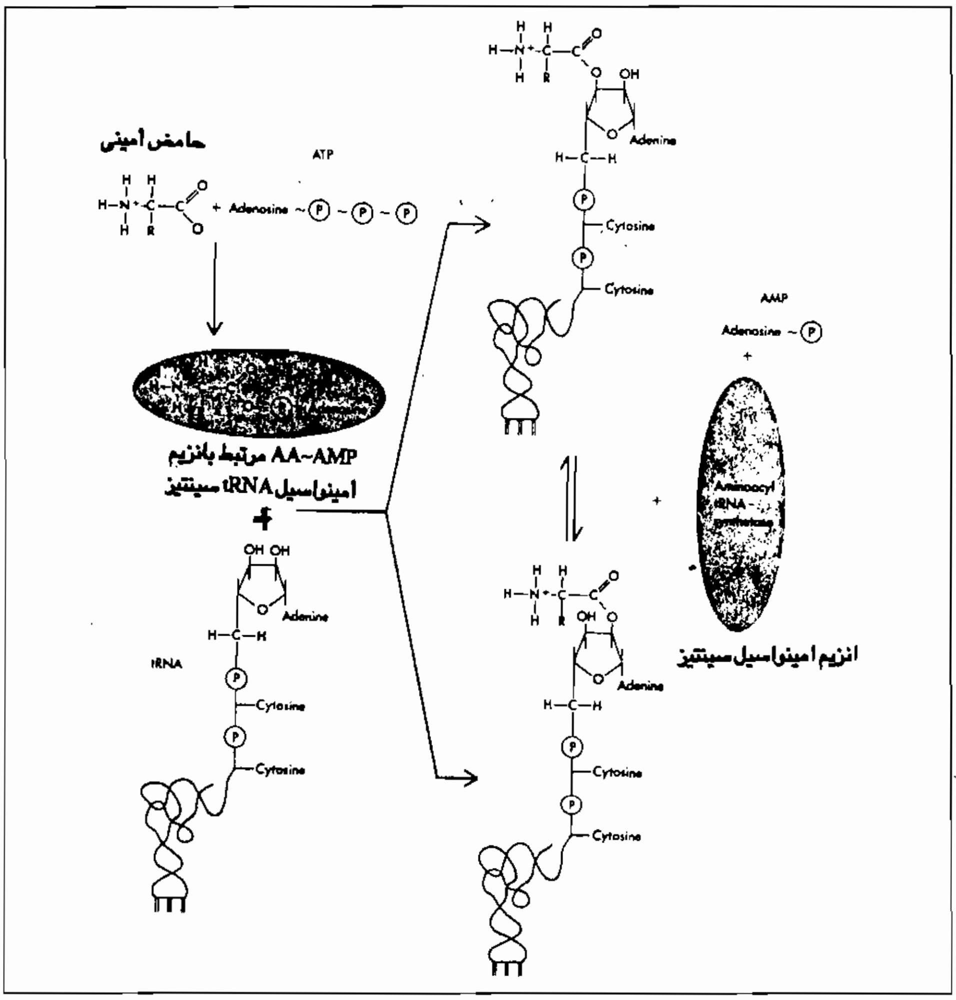
تبين وجود أنزيم نوعى Aminoacyl tRNA Synthetase متخصص لكل حامض أمينى (أى يوجد 20 أنزيم من هذا النوع) بحيث يكون أحدهما متخصصاً فى التزاوج بين الحامض الأمينى (X) و tRNA (X)، وهكذا.

يتم تفاعل التزاوج على خطوتين ويؤدى إلى الحصول على جزئيات Aminoacyl-tRNA كما فى الشكل (٩-٣). ويتضح من هذا الشكل أن هذا الأنزيم نفسه هو الذى يساعد على تنشيط الحامض الأمينى كما سبق الذكر. كما يبين الشكل (٩-٤) كيف تتم ترجمة الشفرة الوراثية من خلال نشاط هذا الأنزيم من جهة ومن خلال التزاوج الصحيح بين مضاد الكودون فى tRNA والكودون المقابل فى جزئ mRNA القالب، ويتضح من هذا الشكل أن هاتين العمليتين مستقلتان تماما عن بعضهما.

ولكن كيف يتسنى لهذا الأنزيم المطابقة Matching بين الحامض الأمينى الصحيح وبين جزئ tRNA النوعى الخاص به، وخاصة فى حالة الأحماض الأمينية المتشابهة التركيب. أمكن معرفة كيف يتم هذا التمييز بمتابعة ما تم التوصل إليه بالنسبة لأنزيم Isoleucy1-tRNA حيث أمكن لهذا الأنزيم أن يميز بين الأيزوليوسين والفالين، وهما حامضان أمينيان متشابهان تماما فيما عدا وجود مجموعة ميثيل إضافية فى حالة الايزوليوسين وبالتالى فإن الفرق يكمن فى طاقة الارتباط Binding Energy بأنزيم Isoleucy1-tRNA Synthetase والتي لا تزيد عن ٣ كيلو سعر (3 K cal) وهى مقدار ضئيل من الطاقة يبدو للوهلة الأولى أنه غير كاف لمنع الخطأ فى الاختيار بين هذين الحامضين. فعلى سبيل المثال عندما يوضع Isoleucy1-tRNA Synthetase مع مخلوط متكافئ الكمية من حامض الأيزوليوسين والفالين فإنه قد يحدث التنشيط الخاطئ لجزئ

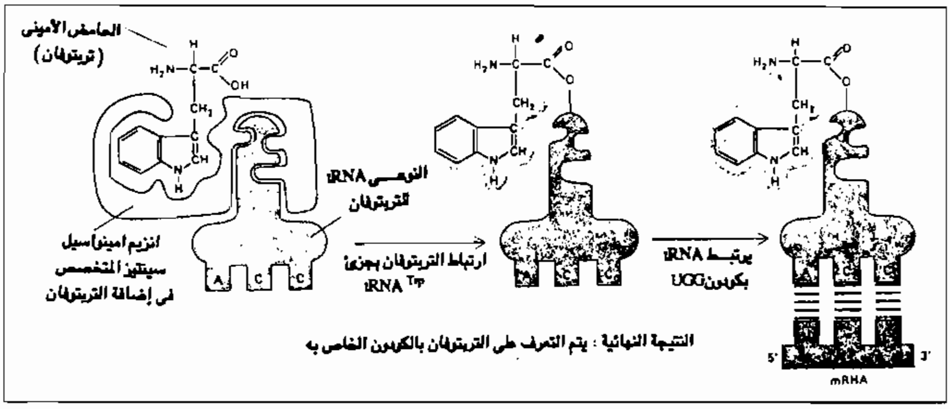
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

واحد من الفالين (Val-AMP) فى نفس الوقت الذى يتم فيه التنشيط الصحيح لـ ١٠٠ جزئ من الأيزوليوسين (Iso - AMP) فى هذا المخلوط نفسه.



الشكل (٩-٣): تنشيط الحامض الأمينى بـ ATP ونقله إلى النهاية CCA لجزئ tRNA النوعى. لاحظ أنه بمجرد أن يرتبط الحامض الأمينى بالجزئ فإنه يمكنه الانتقال بسرعة بين النهاية OH2', 3' للأدينوسين النهائى فى جزئ tRNA

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

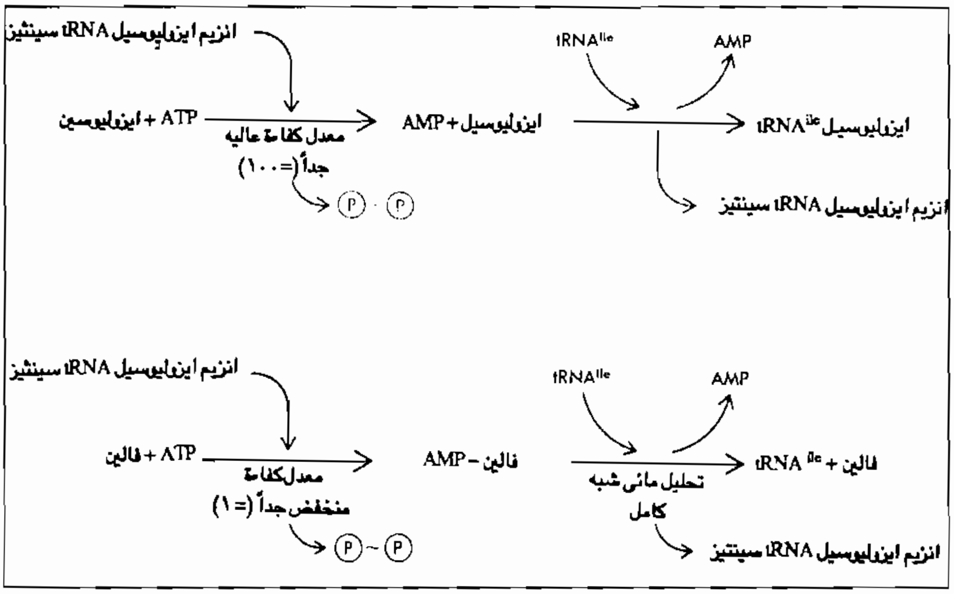


الشكل (٩-٤): دور كل من جزئ tRNA وأنزيم امينواسيل tRNA سينثيتيز فى ترجمة الشفرة الوراثية حيث يتم ربط الحامض الأمينى بجزئ tRNA النوعى عند النهاية CCA برابطة تساهمية بفعل الأنزيم فى حين تتم قراءة ثلاثيات الكودون فى mRNA بمضاد الكودون فى عروة مضاد الكودون فى tRNA حسب قانون تزاوج القواعد

وعند نقل هذه الجزئيات المنشطة من الفالين (Val~AMP) فى خطوة تالية إلى جزئيات tRNA–Isol فإنه يحدث نسبة عالية من الخطأ غير المسموح به. إلا أن هذا النقل يتم عادة بتكرار منخفض جدا حيث وجد أنـــه عنـــدما يـــرتبط Isol- tRNA بالمعقد:

Val~ AMP - Isol~ tRNA Synthetase فإن جميع جزيئات Val ~ AMP تقريبا تتفكك بالتحليل المائى بسرعة إلى مكوناتها من الفالين و AMP (الشكل ٩-٥).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (٩-٥): التمييز بين الحامضين المتشابهين ايزوليوسين والفالين عند تكون ايزوليوسيل tRNA ile

ويتطلب هذا النوع من المراجعة Proofreading الارتباط المستمر بين الحامض الأمينى وبين الموقع النشط لانزيم aa-tRNA Synthetase وذلك من خلال خطوتى التفاعل الأنزيمى الذى يقوم بها هذا الأنزيم، وبذلك يمكن أن يحدث التمييز أو التفريق بين الأيزوليوسين والفالين مرتين وبالتالى تنخفض نسبة الخطأ إلى $١٠^{-٢} \times ١٠^{-٢} = ١٠^{-٤}$.

ويبدو الآن أن عملية المراجعة تحدث فقط فى تلك الأنزيمات التى لا يمكن الحصول فيها على درجة كافية من الدقة فى المطابقة فى خطوة واحدة للاختيار. فمثلا تبين حديثا من دراسة التركيب الدقيق لأنزيم Tyrosyl-tRNA Synthetase أن هذا الأنزيم باستطاعته التمييز بين حامضين أمينيين متشابهين جدا وهما الفينيل الانين والتيروسين عن طريق تكوين روابط هيدروجينية نوعية

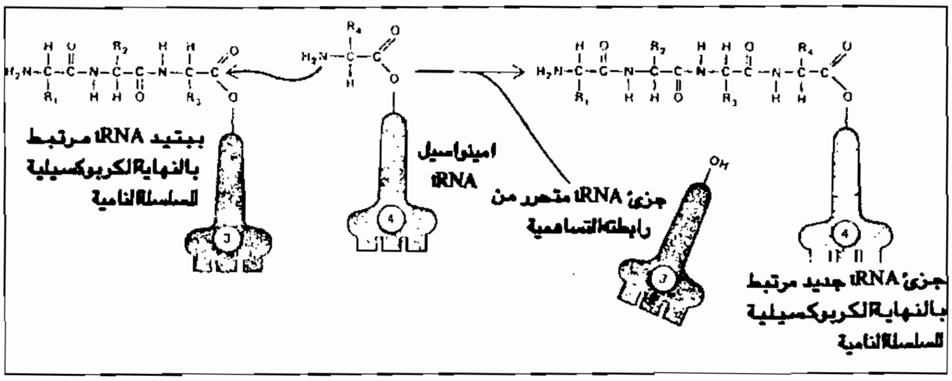
salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

مع مجموعة OH للتيروسين وهناك مجموعات أخرى من الأحماض الأمينية يتم فيها عملية التمييز بدون الحاجة إلى مراجعة مثل الاسبارجين وحامض الاسبارتيك؛ السيتوسين والهستيدين؛ الليسين والتربتوفان.

دور الريبوسومات فى تكوين الروابط الببتيدية:

يعد تكوين الرابطة الببتيدية بمثابة التفاعل الرئيسى فى عملية بناء البروتين حيث ترتبط مجموعة الكربوكسيل (COOH-) فى النهاية النامية لسلسلة متعدد الببتيد بمجموعة الأمين (NH2-) الحرة للحامض الأمينى المضاف، وبالتالى فإن البروتين يتم بناؤه خطوة خطوة من النهاية الطرفية الأمينية إلى النهاية الطرفية الكربوكسيلية. ويلاحظ أنه على مدى مرحلة بناء البروتين بأكملها تظل النهاية الكربوكسيلية لسلسلة متعدد الببتيد النامية منشطة Activated عن طريق الرابطة التساهمية بينها وبين جزئ tRNA الببتيدى Peptidy1~ tRNA ويتم كسر هذه الرابطة التساهمية الغنية بالطاقة عند إضافة كل حامض أمينى. إلا أنها تعوض مباشرة عن طريق تكوين رابطة تساهمية جديدة مشابهة تتم عند إضافة أحدث حامض أمينى كما فى الشكل (٩-٦) وبهذه الطريقة يحمل كل حامض أمينى عند إضافته طاقة التنشيط المطلوبة لإضافة الحامض الأمينى التالى له وليست تلك الخاصة بإضافته هو نفسه.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

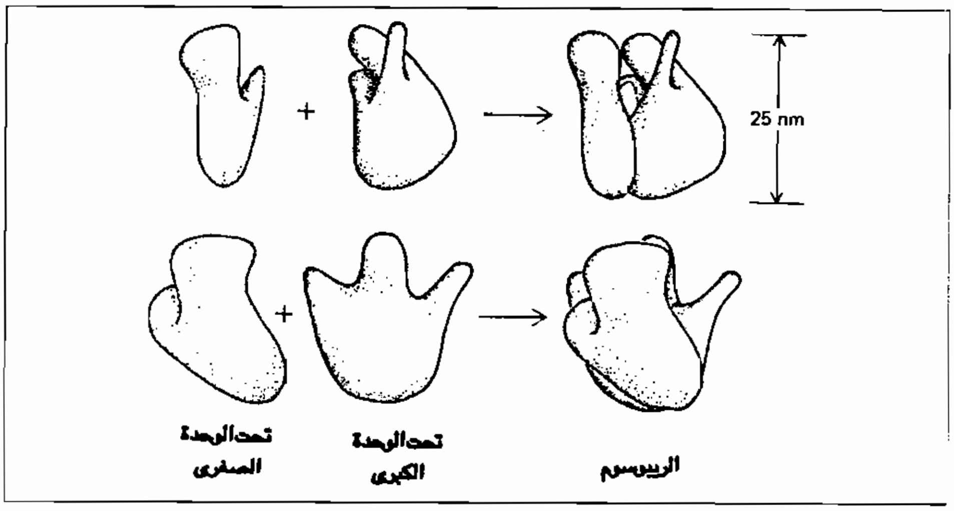


الشكل (٩-٦): نمو سلسلة متعدد الببتيد خطوة خطوة بإضافة حامض أمينى فى كل خطوة إلى النهاية الكربوكسيلية الغنية فى الطاقة الموجودة فى الرابطة التساهمية المتكونة من ارتباطها مع جزئ tRNA

وقد تبين أن عملية تكوين الرابطة الببتيدية تتم على الريبوسومات، وهى تلك الحبيبات الكروية التى تعد بمثابة السطح Work Bench الذى يتم عليه عملية بناء البروتين، لأنه لا يمكن بناء البروتين حرا فى السيتوسول، نظراً للحاجة إلى تنظيم عملية ترجمة كل كودون فى mRNA فى تتابع مضبوط وفى تنسيق تام مع مضاد الكودون الموجود فى tRNA دون أى خلل قد يؤدى إلى تغيير فى إطار القراءة وتقوم الريبوسومات بهذا الدور التنسيقى الهام.

وتتكون الريبوسومات من معقدات كبيرة الحجم نسبيا من ر ن أ والبروتينات. ويتشابه تنظيم ووظيفة الريبوسومات فى غير مميزة النواة وفى مميزة النواة بصفة عامة فى احتواء كل منهما على تحت وحدة كبيرة Subunit وأخرى صغيرة ترتبطان معا لتكوين معقد ذو وزن جزيئى مرتفع جدا كما فى الشكل (٩-٧).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٩-٧): نموذج ثلاثى الأبعاد للريبوسوم البكتيرى كما يرى من زاويتين مختلفتين

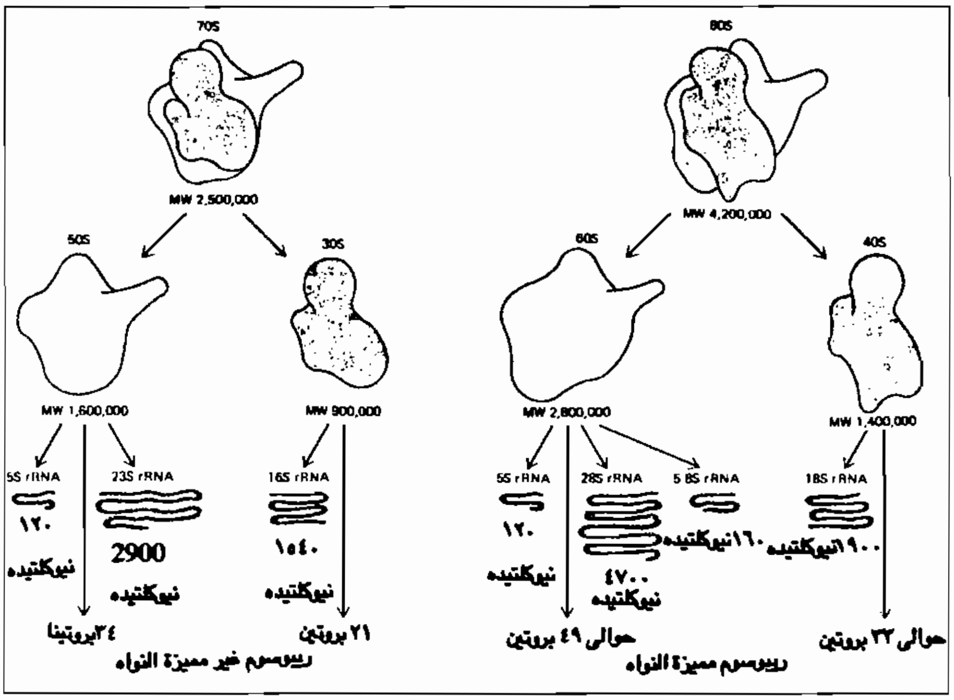
تبين أن تحت الوحدة الصغيرة فى الريبوسوم تقوم بالربط بين mRNA و tRNA، فى حين تقوم تحت الوحدة الكبيرة بالمساعدة فى تكوين الرابطة الببتيدية بين الأحماض الأمينية فى سلسلة متعدد الببتيد.

وجد أن حوالى أكثر من نصف وزن الريبوسومات عبارة عن rRNA وتوجد أدلة متزايدة على أن جزئيات rRNA تلعب دوراً رئيسيا فى النشاط الحفزى (الأنزيمى).

يحتوى الريبوسوم على عدد كبير من البروتينات إلا أن معظمها لم تعرف له وظيفة محددة بعد مما يرجح أن بروتيئات الريبوسوم تقوم أساسا بتنشيط أو تحفيز وظيفة rRNA وأن جزئيات rRNA وليست البروتينات الريبوسومية هى التى تساعد فى كثير من التفاعلات الأنزيمية التى تتم على الريبوسوم. تجدر الإشارة هنا إلى أنه لم تتوفر حتى الآن معلومات تدل على إمكان احتواء rRNA

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

على أى معلومات وراثية أو على قيامه بدور القالــب فــى عمليــة الترجمــة. ويلخص الشكل (٩-٨) المقارنة بين تركيب الريبوسومات فى غير مميزة النواة وفى مميزة النواة.



الشكل (٩-٨): مقارنة بين تركيب ريبوسومات غير مميزة النواة ومميزة النواة

تبين أن تحت الوحدتين المكونتين للريبوسوم لا تكونان مرتبطتين بــصفة دائمة ولكن يتم ارتباطهما فقط عندما يبدأ اشتراك الريبوسوم فى عمليــة بنــاء البروتين، ثم ينفصلان مرة أخرى عند الانتهاء من ترجمة آخر شفرة (كــودون) على mRNA لتبدأ دورة جديدة وهكذا. وقد استدل على ذلك من تجارب تمــت على بكتريا القولون وفى الخميرة، حيث أظهــرت تلــك التجــارب أن معظــم الريبوسومات يتم تفكيكها إلى تحت وحداتها وإعادة اتحادها بصفة دورية. إذ أنه

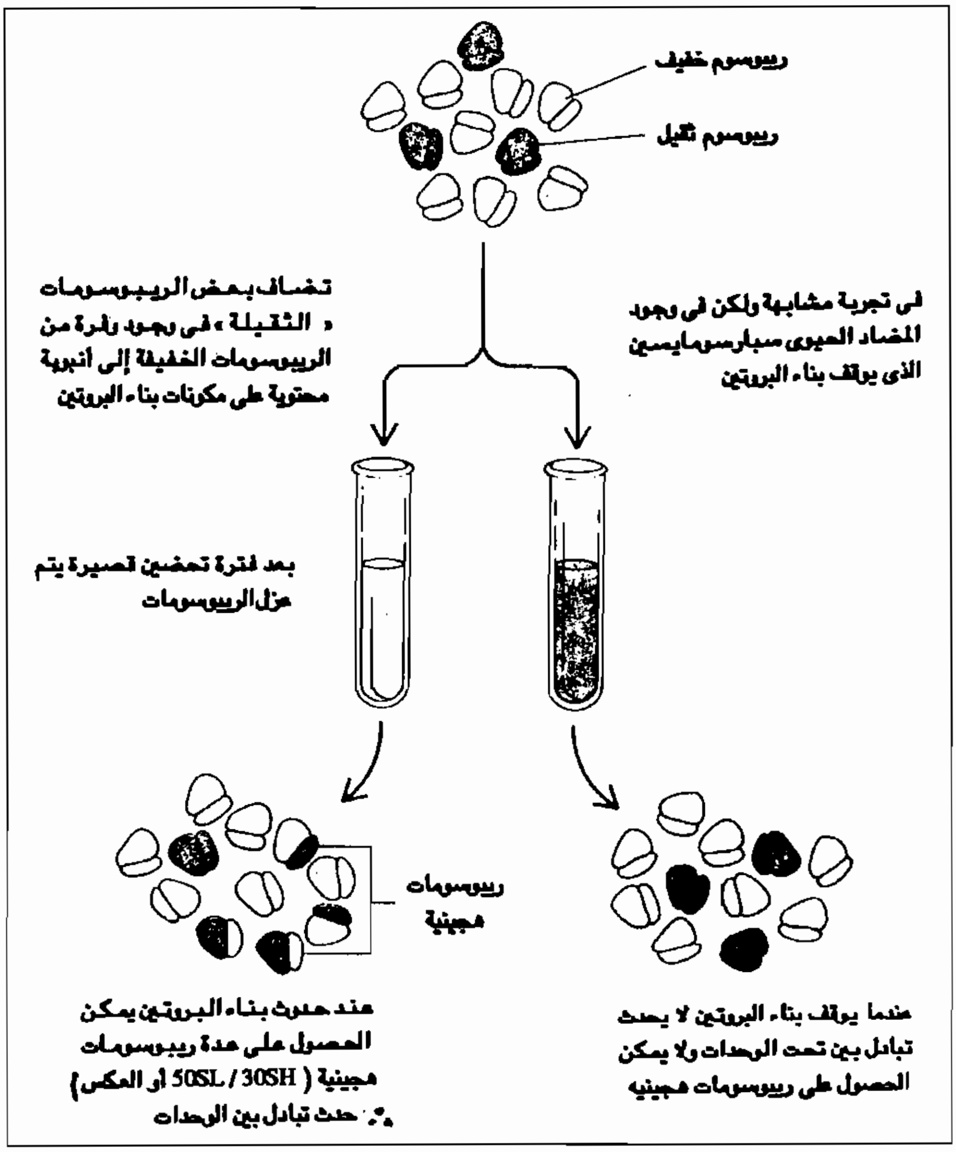
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

عند تنمية الخلايا فى نظائر مشعة (ثقيلة) ثم نقلها إلى بيئة غير مشعة (خفيفة) بدأت تظهر ريبوسومات هجينية :

(H 50 S/L 30 S أو L 50 S /H30S) ويدل معدل ظهورها على أن تحت الوحدات يتم تبادلها بمعدل مرة فى كل دورة بناء للبروتين. وقد تم التأكد من ذلك بتجربة معملية لبناء البروتين *In Vitro* حيث يمكن متابعة مصدر الريبوسمات الثقيلة (المشعة) فى وجود كمية فائضة من الريبوسومات الخفيفة (غير المشعة). ففى خلال حوالى دقيقة (وهى الفترة التى يستغرقها بناء سلسلة كاملة من البروتين فى البكتريا) وجد أن معظم الريبوسومات الثقيلة قد اختفت فى نفس الوقت الذى ظهرت فيه ريبوسومات هجينية (H 50S/L 30S أو L 50S/H 30S) كما فى الشكل (٩-٩).

ومما يؤكد أن هذا التبادل بين تحت الوحدات يعتمد كلية على عملية بناء البروتين، تبين أنه عند إضافة المضاد الحيوى Sparsomycin الذى يوقف استطالة سلسلة متعدد الببتيد، فإنه فى نفس الوقت يمنع التبادل بين تحت وحدات الريبوسوم كما هو موضح بالشكل (٩-٩).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٩-٩): الاعتماد الاجبارى لتبادل تحت وحدات الريبوسوم على عملية بناء البروتين

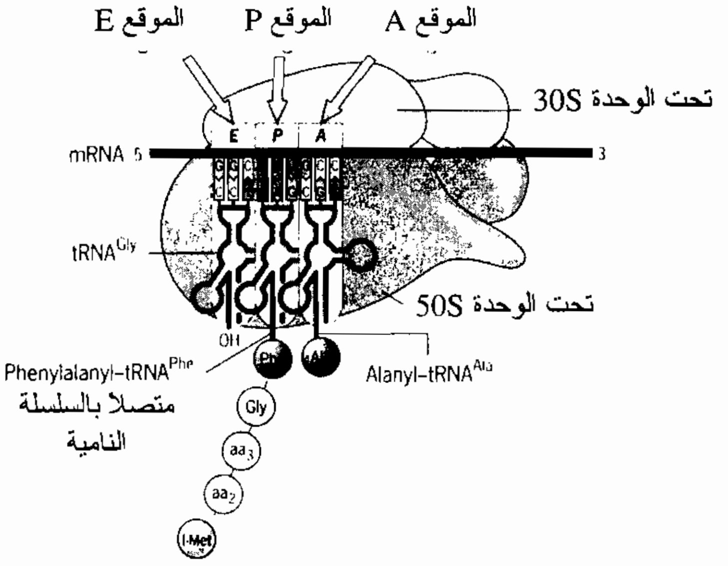
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تحرك الريبوسومات خطوة خطوة على سلسلة mRNA القالب:

يحتوى الريبوسوم على أربعة مواقع للارتباط بجزئيات ر ن أ وهى : موقعا خاصا للارتباط بسلسلة mRNA ويوجد فى تحت الوحدة الصغيرة 30S وثلاث مواقع لارتباط tRNA ويشترك فى تكوينها تحت الوحدات 30S، 50S معا. وهذه المواقع الثلاثة الأخيرة تسمى أحدهما موقع ارتباط tRNA الببتيدى Pepitidy1 - tRNA Binding Site أو الموقع "P" "P-site" وهو الذى يتصل به جزئ tRNA المرتبط بالنهاية النامية لسلسلة متعدد الببتيد. أما الموقع الثانى فيسمى موقع ارتباط امينواسيل tRNA. Aminoacyl- tRNA Binding Site أو "A site" ويرتبط به جزئ tRNA التالى والمحمل بالحامض الأمينى المراد إضافته إلى السلسلة النامية لمتعدد الببتيد. أما الموقع الثالث فيسمى موقع الخروج "E Site" "Exit Site" فيصل إليه tRNA بعد تفريغ شحنته من الحامض الأمينى الخاص به تمهيدا لإنفكاك هذا الجزئ من tRNA وتركه للريبوسوم ليشترك فى دورة جديدة من الارتباط مع جزئ جديد من نفس الحامض الأمينى المتخصص فيه (الشكل ٩-١٠).

ولكى يكون ارتباط جزئ tRNA بأى من الموقعين قويا، لابد أن يكون التزاوج صحيحا بين مضاد الكودون فى هذا الجزئ النوعى من tRNA وبين الكودون الثلاثى المقابل فى سلسلة mRNA المرتبط بالريبوسوم. كما أن الموقعين P,A يحتلان مكانين متجاورين بشدة على الريبوسوم لدرجة أن جزيئى tRNA المحتلان لهما لا توجد أمامها فرصة إلا تكوين تزاوج مع الكودونين المتجاورين مباشرة فى جزئ mRNA كما فى الشكل (٩-١٠).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (٩-١٠): يحتوى كل معقد من ريبوسوم - م رن أ على ثلاثة مواقع لإرتباط aa-tRNA ويتم شغل الموقع A بمعقد Alanyl tRNA فى حين يتم شغل الموقع P بمعقد Phenylalanyl-tRNA*phe* وترتبط سلسلة متعدد الببتيد النامية تساهميابمعقد Phenylalanyl-tRNA ويتم شغل الموقع E بجزئ tRNA gly قبل تحريره من الريبوسوم

يتحرك الريبوسوم بمعدل كودون ثلاثى واحد علـــى mRNA فـــى كـــل خطوة، ولو أن هناك مفهوم بديل بأن شريط mRNA هو الذى يمر مـــن خـــلال الريبوسوم بمعدل ٣ نيوكلتيدات فى كل خطوة إلا أن المفهوم الأول هو المرجح حتى الآن.

مراحل عملية بناء البروتين :

يمكن، لتسهيل المتابعة فقط، تقسيم عملية بناء البروتين إلى ثلاث مراحل رئيسية وهى:

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

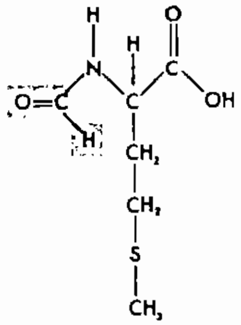
١- مرحلة البدء Initiation
٢- مرحلة الاستطالة Elongation
٣- رحلة الإنهاء أو الإيقاف Termination

أولاً: مرحلة البدء Initiation:

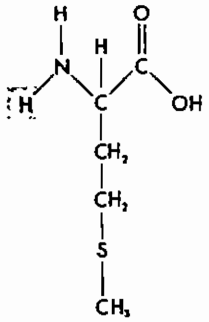
تبين أن عملية القراءة الصحيحة للشفرات على سلسلة mRNA القالب تتوقف على الموقع الإبتدائى الذى يتم فيه ارتباط الريبوسوم بتتابعات القواعد فى mRNA. إذ أنه فى مرحلة البدء لبناء البروتين، يتم تجميع تحت وحدتى الريبوسوم وارتباطهما فى الموقع المضبوط على mRNA حيث تبدأ القراءة الصحيحة للشفرة، وبالتالى حيث يبدأ بناء سلسلة متعدد الببتيد.

وقد تبين أنه بالنسبة لمعظم البكتريا يكون الحامض الأمينى الأول فى السلسلة هو Methionine N-Formyl (وهو عبارة عن حامض الميثونين بعد تعديله بإضافة مجموعة فورمات إلى مجموعة الأمين الطرفية) (الشكل ٩-١١).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



ن – فورمايل ميثونين



ميثونين

الشكل (٩-١١): المقارنة بين ن. فورمايل الميثونين والميثونين

وبذلك يتم شغل مجموعة الامين الطرفية مما يؤدى إلى منع إمكان إضافة هذا الحامض المتحور فى الأماكن الداخلية بالسلسلة أثناء مرحلة الاستطالة نظرا لأن مجموعة الأمين تكون غير حرة نتيجة لارتباطها بالفورمات. تـتم إضـافة مجموعة الفورمات أنزيميا إلى المثيونين بعد أن يرتبط هـذا الأخيـر بجـزئ tRNA الخاص به. فقد تبين أن هناك نوعين من $tRNA^{Met}$. أحدهما متخـصص فى حمل مثيونين البدء ويسمى $tRNA_i^{Met}$. وهذا الجزئ يسمح بتفاعل الفورمات

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فى حين يوجد نوع آخر من $tRNA_m^{Met}$ يقوم بحمل المثيـونين الـداخلى أثنـاء مرحلة الاستطالة ولا يحدث عليه تفاعل القورمات ويسمى $tRNA_m^{Met}$ (للمثيونين الداخلى). بينت تحليلات تتابع القواعد فى كلا النوعين من tRNA أن كلا منهما يحتوى على نفس مضاد الكودون (CAU) مما أدى إلى التساؤل عن كيف يتسنى لنفس الكودون (AUG) أن يشفر لكلا من حامض البدء N-Formyl Methionine وكذلك للمثيونين الداخلى فى السلسلة؟ وقد تبين وجود ثلاثة فروق فى التركيـب الدقيق لتتابع القواعد بين جزيئى tRNA كما فى الشكـل (٩-١٢).

ومن جهة أخرى تبين أن بناء البروتين فى البكتريا يبدأ بتكوين معقد مـن تحت الوحدة الصغيرة 30S للريبوسوم مـع $Met-tRNA_f^{Met}$ و mRNA عنـد الكودون AUG ثم لاتلبث تحت الوحدة الكبيرة 50S أن تتحد لتكوين الريبوسـوم 70S الفعال. ويحتوى كل جزئ مـن mRNA علـى موقـع ارتبـاط نـوعى بالريبوسوم خاص بكل من البروتينات التى تـم بناؤهـا مـستقلة علـى هـذا الريبوسوم.

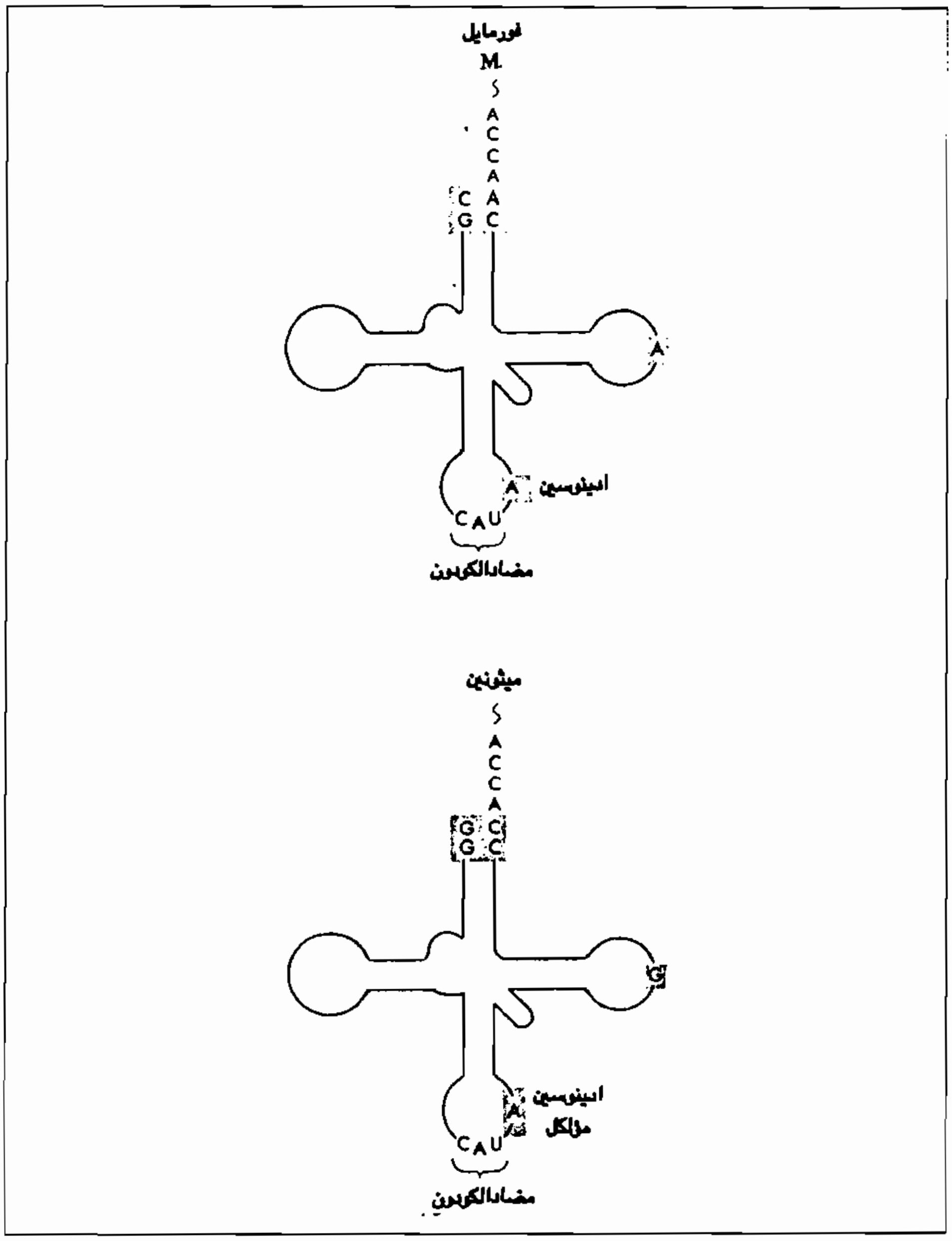
فعلى سبيل المثال توجد ثلاث مواقع من هذا النوع علـى RNA لجينـوم الفاج R17 الذى يشفر لثلاث بروتينات رئيسية. ويتخلل كل من هـذه المواقـع تتابعات نيوكلتيدية تكون وظيفتها وضع mRNA بدقة على المكان المحدد مـن سطح الريبوسوم قبل بدء عملية بناء البروتين. ولكن كيف يتمكن الريبوسوم من التفريق أو التمييز بين كودون AUG البدء، أى عنـد بدايـة قـراءة الجـين، والكودون نفسه الذى يشفر للمثيونين الداخلى؟ أمكن الاجابة على هـذا الـسؤال عندما تم التعرف على أول تتابع بدء عن طريق ربط الريبوسـوم مـع mRNA

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

نوعى ثم تلى ذلك المعاملة بانزيم ريبونيوكلييز لتحليل جميـــع mRNA ماعـــدا المنطقة المرتبطة بالريبوسوم حيث تكون محمية من التحليل الانزيمى.

وعند تحليل التتابعات المكونة من ٣٠ نيوكلتيدة فى هذه المنطقة المحميـــة وجد أنها تحتوى على AUG's بالقرب من الوسط متبوعة بنيوكلتيـــدات تـــشفر للثلاث أو الأربع أحماض الأمينية الأولى فى سلسلة متعدد الببتيد. وقد وجـــد أن هذه النيوكلتيدات يتم التعرف عليها نوعياً بواسطة تحت الوحـــدة الريبوســـومية الصغيرة 30S وأن هذا التتابع يختلف من جين الى آخر. ولكن وجـــد أن هنـــاك مجموعة مكونة من ٣ إلى ٩ نيوكلتيدات بيورينية تقع فى الجهة '5 من المنطقـــة المحمية فى mRNA ويعتبر هذا التتابع القصير من القواعد هاما جـــداً لربطـــه بالريبوسوم. وجد أن معظم مواقع ارتباط الريبوسوم تحتوى على تتابعات مثـــل: AGGA أو GAGG تقع على بعد حوالى ٨ إلى ١٣ نيوكلتيـــدة قبـــل كـــودون البدء.

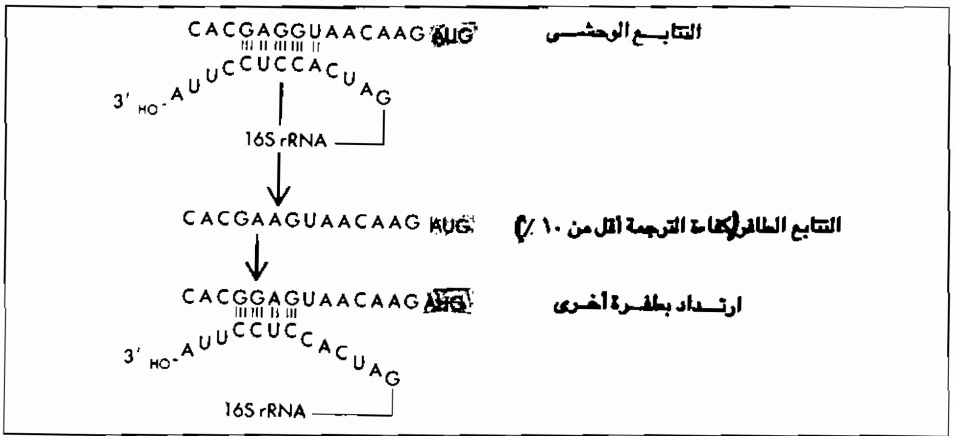
وتتزاوج هذه التتابعات مع تتابعات مكملة لها موجودة فى منطقـــة غنيـــة بالبيريميدنات فى النهاية '3 لسلسلة
16S rRNA : (5' GAUCACCUCCUUA-OH 3').



الشكل (٩-١٢): مواقع الاختلافات بين ن - فورمايل مثيونين $tRNA^{Met}$
وميثونيل $tRNA^{Met}$

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يؤدى هذا التزاوج إلى وضع كودون البدء AUG فى موقع يسمح له بالارتباط بمضاد الكودون الخاص بجزئ F Met $tRNA_f^{Met}$ الخاص بالبدء والمرتبط بتحت الوحدة 30S. وبذلك تكون القدرة على تكوين تفاعلين منفصلين لتزاوج القواعد فى نفس الوقت: mRNA/tRNA (مضاد الكودون/ الكودون) وبين mRNA/16S rRNA أى بين (mRNA/30SrRNA) هى التى تسمح بالتمييز بين منطقة البدء الحقيقية وبين المواقع الآخرى الداخلية التى قد تحتوى على الكودون AUG الذى يشفر للمثيونين الداخلى. وكما هو متوقع فإن الطفرات التى تؤدى إلى تغيير فى المنطقة الغنية فى البيورين فى موقع ارتباط الريبوسوم تؤدى إلى خفض كفاءة ترجمة mRNA ويمكن استعادة كفاءة الترجمة باستخدام طفرة اخرى تستعيد التكامل فى تزاوج القواعد للنهاية '3 فى 16S rRNA حتى ولو كان التتابع مختلف عن ذلك الذى فى mRNA الأصلى كما فى الشكل (٩-١٣).



الشكل (٩-١٣): تتابع منطقة البدء عند بداية سلسلة mRNA للجين ٠,٣ فى الفاج T7 ويؤدى تفاعلها مع النهاية 16S rRNA إلى وضع الريبوسوم فى مكان البداية الصحيح على شريط mRNA لبدء الترجمة. وتؤدى طفرة استبدال متماثل من نوع G إلى A الى وقف هذا التفاعل. ويمكن استعادة هذه الوظيفة لو حدث طفرة استبدال متماثلة اخرى (A إلى G) فى موقع قريب. يبدو كودون البدء AUG مظللاً فى هذا الشكل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

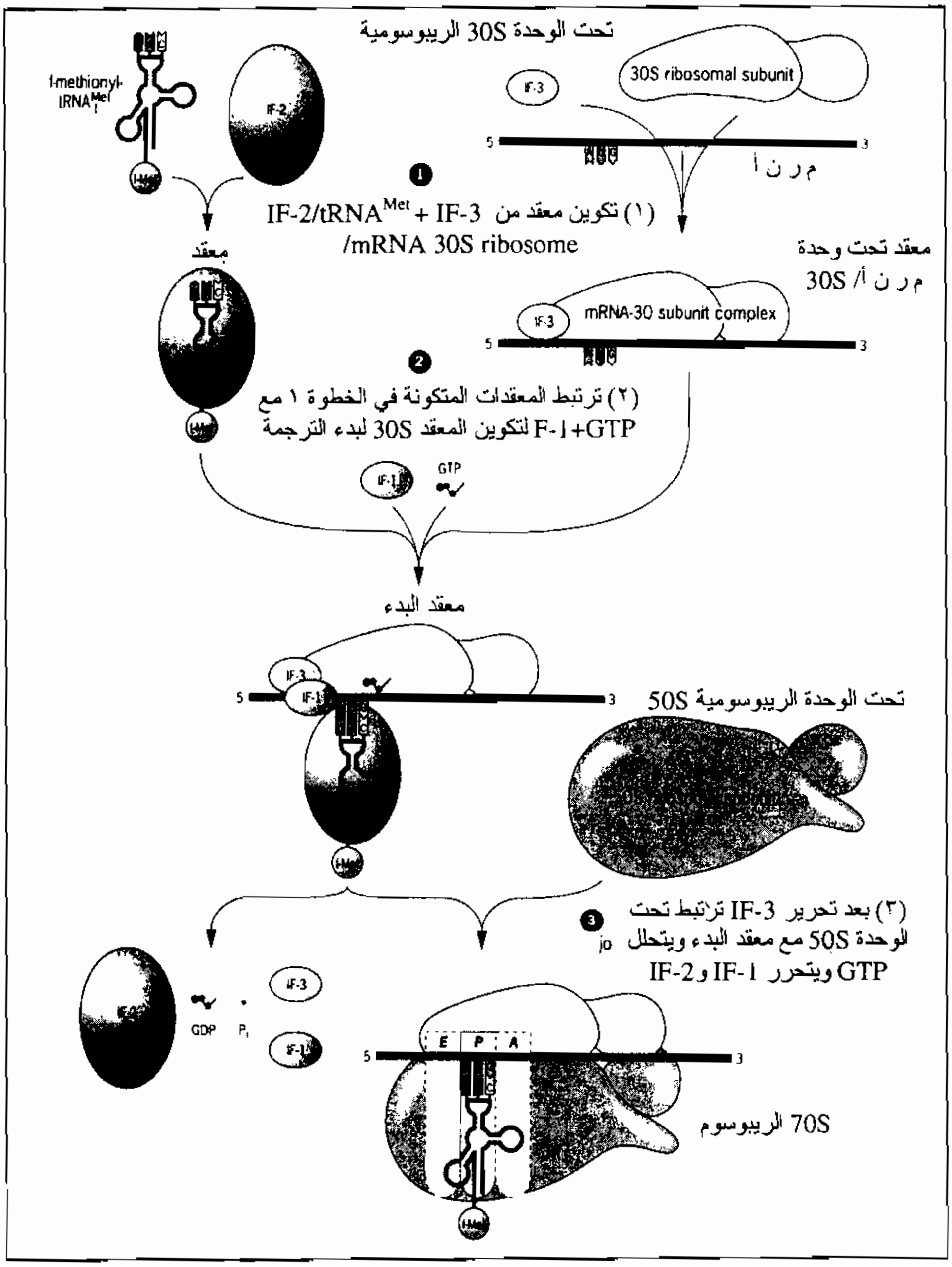
عندما تبدأ استطالة سلسلة متعدد الببتيد لابد أن يحدث انفكـــاك للتـــزاوج الحادث بين القواعد بين 16S rRNA, mRNA وذلك لكى يـــصبح mRNA حـــر الحركة على سطح الريبوسوم. تؤدى هذه الحركة إلى أن يصبح الريبوسوم على اتصال بمناطق mRNA التى لم يكن من الممكن أن يرتبط بها فى السابق لـــولا أن عملية البناء قد استهلت فى المنطقة الـــسابقة. ولـــضمان اســـتمرار حركـــة الريبوسوم فإنه لابد أن يتم فك مؤقت لمناطق الحلزنة المزدوجة (المكونة لدبوس الشعر Hairpin) الموجودة على مناطق mRNA أمام الريبوسوم، وبذلك تتكـــون مناطق مفردة السلسلة يمكنها أن تشارك فى عملية الترجمة.

عوامل البدء (IF) Initiation Factors:

تبين أنه إلى جانب ضرورة وجـــود mRNA, N-formyl-Met $tRNA_F^{Met}$ وتحت الوحدات الريبوسومية 30S و 50S، فإنه لابد لكـــى تبـــدأ عمليـــة بنـــاء البروتين أن تتوفر ثلاث بروتينات نوعية مختلفة تكون مرتبطة قليلاً بالريبوسوم وتسمى عوامل البدء وهى : IF1, IF2, IF3 كما فى الشكل (٩-١٤).

فى الخطوة الأولى يتم ارتباط هذه العوامل الثلاثة بتحـــت الوحـــدة 30S، ويساعد GTP على استقرار ارتباط هذه العوامل. ومن المـــرجح أنـــه يـــرتبط مباشرة بالعامل IF2. يمنع العامل IF3 الاتحاد بين تحـــت الوحـــدتين 50S, 30S ولذلك فقد عرف فى البداية بعامل تفكك الريبوسوم.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (٩-١٤): مرحلة بدء الترجمة فى بكتريا القولون

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ويعتقد الآن أن العامل IF3 يؤدى إلى تغيير دقيق فى شكل تحت الوحـــدة 30S مما يمنع اتحادها بتحت الوحدة 50S ويساعد فى نفس الوقت على الارتباط بين تحت الوحدة 30S وبين mRNA. يساعد العامل IF1 على ارتباط كلا مـــن IF2 و IF3. وبين الجدول (٩-١) الوزن الجزيئى لعوامـــل البـــدء IF وكـــذلك عوامل الاستطالة (EF) وعوامل الانهاء أو الانفكاك (RF) كما سيأتى بعد. فـــى الخطوة التالية يتم ارتباط $F Met\ tRNA_f^{Met}$, mRNA بمعقد IF-30S-GTP. وفى هذا التفاعل يحدث ارتباط وثيق بـــين $Met\ tRNA_f^{Met}$ مـــع المعقـــد IF2-GTP، وبمجرد تكوين معقد البدء 30S Initiation Complex ينفصل العامل IF3 ويلـــى ذلك ارتباط تحت الوحدة 50S بمعقد البدء مما يؤدى إلى التحليل المائى لجـــزئ GTP وانفصال عاملى البدء الآخرين. ويطلق على المعقد النهائى معقـــد البـــدء 70S Initiation Complex.

اتجاه الترجمة $5' \rightarrow 3'$:

بعد أن يتم الارتباط الصحيح بين منطقة البدء لجزئ mRNA ومعقد البدء والريبوسوم يتحرك الريبوسوم فى اتجاه ثابت اثناء بناء البروتين حيث أنه ليست لدية حرية الحركة إلا فى الاتجاه الى اليمين أو الى اليسار، مما يؤكد حقيقـــة أن جزئ mRNA له اتجاه ثابت ومحدد فى القراءة بحيـــث تقـــرأ النهايـــة '5 أولاً وتستمر القراءة متجهة إلى نهاية '3 ومما يدل على ذلك أنه وجد في البكتريا أن الريبوسوم يمكنه أن يرتبط بسلسلة غير تامة البناء من mRNA أثناء نسخها على قالب د.ن.أ. وعلى العكس من ذلك إذا كان بناء البروتين يتم فى الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ فإن ذلك يعنى أنه لا تبدأ ترجمة جزئ mRNA فى البكتريـــاالا بعـــد الانتهـــاء تماما من نسخه على قالب د.ن.أ. وانزلاقة أولا من على هـــذا القالـــب وهـــذا

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ما لا يحدث فى البكتريا مما يؤكد أن الترجمة تتم فى الاتجاه $3' - 5'$ وهو نفس اتجاه النسخ.

الجدول (٩-١) خواص بعض العوامل المشاركة فى بناء البروتين فى بكتريا القولون

العوامل		الوزن الجزيئى بالتقريب	القدرة على الارتباط مع (GDP) GTP	الوفرة النسبية لعدد الريبوسومات
عوامل البدء				
	IF 1	٩٠٠٠	−	$\frac{١}{٧}$
	IF 2	١٢٠٠٠	+	$\frac{١}{٧}$
	IF 3	٢٢٠٠٠	−	$\frac{١}{٧}$
عوامل الاستطالة:				
	EF-TU	٤٥٠٠٠	+	١٠
	EF-TS	٣٠٠٠٠	+	١
	EF-G	٨٠٠٠٠	+	١
عوامل الانهاء:				
	RF 1	٣٦٠٠٠	−	$\frac{١}{٢٠}$
	RF 2	٣٨٠٠٠	−	١
	RF 3	٤٦٠٠٠	+	$\frac{١}{٢٠}$

ثانياً: مرحلة الاستطالة Elongation:

يرتبط $tRNA_F^{Met}$ fMet مباشرة من البداية بالموقع P دون أن يمر على الموقع A بحيث يكون الموقع A مهيئاً لاستقبال الحامض المحمل على tRNA التالى وجد أن عامل البدء IF2 لابد أن يتحرر بالتحليل المائى لجزئ GTP قبل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أن يرتبط aa-tRNA التالى بالريبوسوم. حيث أنه ثبت قطعياً أن جميع جزيئات aa-tRNA ماعدا f Met-$tRNA_F^{Met}$ لابد أن تصل إلى الريبوسوم وترتبط به عند الموقع A.

وتتم عملية الاستطالة على ثلاث مراحل كالاتى:

١- الارتباط بين امينواسيل – ر.ن.أ الناقل Aminocyl- tRNA بالموقع A على الريبوسوم.

٢- انتقال سلسلة متعدد الببنيد النامية من tRNA الموجود فى الموقع P إلى tRNA فى الموقع A وذلك عن طريق تكوين رابطة ببيتدية جديدة.

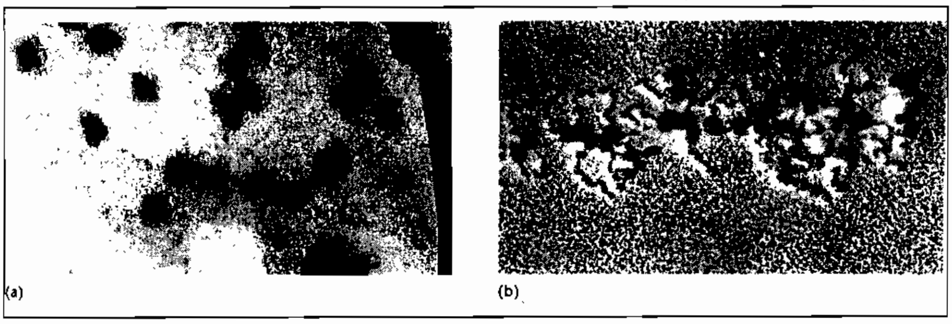
٣- انتقال الريبوسوم على mRNA لكى يصل إلى الكودون التالى فى الموقع A. واثناء هذه الخطوة الاخيرة ينتقل المعقد (المكون من سلسلة متعدد الببتيد النامية +tRNA) من الموقع A إلى الموقع P فى حين ينتقل جزئى tRNA بين الموقع P إلى الموقع E ومنه إلى السيتوسول لكى يتم تحميله مرة اخرى بالحامض الامينى النوعى الخاص به.

٤- يصبح الموقع A الخالى الأن حراً لكى يستقبل جزئ جديد من aa~tRNA والذى تتحدد نوعيته حسب تزاوج القواعد الصحيحة بين مضاد الكودون وبين الكودون المقابل فى mRNA.

٥- فى البكتريا ، واثناء مرحلة الاستطالة وبمجرد انتهاء مرور الجزء الأول من mRNA من خلال الريبوسوم، فإن هذا الجزء يصبح حراً للارتباط من جديد مع تحت وحدة صغرى اخرى للريبوسوم لتكوين معقد بدء ترجمة Initiation Compiex جديد. ويمكن لهذه العملية أن تتكرر عدة مرات مع مرور أجزاء جديدة من نفس سلسلة mRNA مما يؤدى إلى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تكوين ما يسمى البوليريبوسوم Polyribosomes أو بوليسوم Polysomes (الشكل ٩-١٥).



الشكل (٩-١٥): البولى ريبوسومات تحت المجهر الإلكترونى

أ - بوليريبوسومات ناتجة من خلايا الأرنب مشاركة فى ترجمة م ر ن أ الهيموجلوبين.

ب- بولير يبوسومات من الخلايا العملاقة لذبابة **Midgefly**.

مصدر الطاقة اللازمة لعملية الاستطالة:

نظراً لأن المجموعة الكربوكسيلية للحامض الأمينى يتم تنشيطها عند ارتباطها تساهمياً بجزئ tRNA النوعى، فقد كان يفترض أنه لا توجد هناك حاجة إلى استهلاك طاقة اضافية لتكوين الرابطة الببتيدية. إلا أنه تبين أن هذا الافتراض غير صحيح. إذ وجد أنه إلى جانب الحاجة إلى جزئ GTP لتكوين معقد البدء Initiation Complex فإن الأمر يتطلب أيضاً تحليل جزيئين آخرين من GTP عند اضافة كل حامض أمينى الى السلسلة النامية. وقد ثبت ذلك عندما تبين أن هناك عوامل استطالة Elongation factors تساهم فى عملية استطالة ونمو سلسلة متعدد الببتيد وأن تلك المساهمة تحتاج إلى استهلاك طاقة من GTP كما سيأتى بعد، علما بأن هذه العوامل لا تشارك مباشرة فى تكوين الرابطة الببتيدية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

دور عوامل الاستطالة Elongation Factors (EF) فى بناء البروتين:

كان يعتقد مبدئياً أن ارتباط جزئ aa~tRNA بالريبوسوم عملية لا انزيمية تحدث عندما يصطدم جزئ Aminoacyl-tRNA بالموقع A المرتبط بالكودون النوعى للحامض الأمينى. غير أنه تبين فيما بعد أن هناك مجموعة من البروتينات الصغيرة تسمى عوامل الاستطالة Elongation Factors (EF) لابد من اشتراكها فى هذه العملية لكى يتم الارتباط بصورة صحيحة (الجدول ٩-١). ويبدأ ذلك عندما يتفاعل أحد هذه العوامل (EF-TU) مع GTP و aa-tRNA لتكوين معقد مكون من: aa ~ tRNA- EF-TU- GTP. ويوجد العامل EF-TU بوفرة فى بكتريا القولون بحيث تساوى عدد جزيئاته عدد جزيئات tRNA فى الخلية البكتيرية. ولابد من توفر GTP لكى يتم ارتباط Aminoacyl- RNA عند الموقع A.

يمكن لهذا العامل EF-TU الارتباط مع أى جزئ من aa~tRNA فيما عدا $Fmet\text{-}tRNA_F^{met}$. ولم تتضح بعد الطريقة التى يتم فيها تمييز ذلك. وبعد ارتباط aa-tRNA بعامل الاستطالة EF-TU فإن المكون aa-tRNA ينتقل إلى الموقع A على الريبوسوم مع انفصال معقد حر من EF-TU-GDP والفوسفات. وجدير بالذكر أن هذا المعقد يفقد نشاطة ولا يمكنه الارتباط مرة اخرى مع Aminoacyl tRNA جديد.

ويتطلب اعادة استخدام EF-TU لربط جزئ جديد من aa~tRNA مع الريبوسوم مساهمة عامل استطالة آخر يسمى EF-TS، حيث يقوم هذا العامل بفصل GDP عن EF-TU ويحل محل الأول ليكون معقد مؤقت مع EF- TU. وعندما يجد هذا المعقد الجديد جزئ GTP يتكون معقد من GTP-EF-TU

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وينفصل العامل EF-TS مرة أخرى، ثم يقوم المعقد EF-TU-GTP بربط جـــزئ آخرى من aa~tRNA بالريبوسوم وهكذا تعاد الدورة.

تبين أن تكون الرابطة الببتيدية يتم بمساعدة انزيم Peptidyl Transferase وذلك على تحت الوحدة 50S. وقد وجد أن هناك ستة بروتينات ريبوسومية على الأقل، وكذلك 23S rRNA ضرورية لنشاط هذا الانزيم. كمـــا أن هنـــاك ســـتة بروتينات آخرى وكذلك 5S rRNA تساهم هى الآخرى فى هذا النشاط الانزيمى. وبذلك يمكن تخيل انزيم Peptidyl Transferase كمركز نشاط على الريبوســـوم يقوم بضبط اصطفاف جزيئين من aa~tRNA بالطريقـــة المـــضبوطة للـــسماح بتكوين الرابطة الببتيدية .

وفى هذه الخطوة تتكون رابطة ببتيدية بين مجموعة الامين فى aa-tRNA فى الموقع A والنهاية الكربوكسيلية للسلسلة الببتيدية النامية المرتبطة مع tRNA فى الموقع P وبالتالى تتصل السلسلة تساهميا مع tRNA فى الموقع A.

وحيث أن جزئيات aa~rRNA تمثل صـــورة منـــشطة مـــن الأحمـــاض الأمينية فإن هذا التفاعل لابد أن يكون تلقائيا بدون الحاجـــة إلـــى بـــذل طاقـــة اضافية.

تبين وجود عامل استطالة ثالث وهو EF-G وهو ضرورى لحركة سلسلة Peptidyl-tRNA من الموقع A إلى الموقع P ويطلق على هذا العامل أيضاً اسم Translocase. وفى هذه العملية يتكون أولاً معقد من EF-G-GTP-Ribosome ثم يحدث الانتقال مقرونا بتحرك جزئ tRNA الحر من الموقعP إلـــى الموقـــع E ومنه إلى السيتوسول. ونتيجة لهذه الخطوة يصبح الموقع A خالياً ومهيأ لاستقبال

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

حامض أمينى جديد aa-tRNA. ويتطلب تحرير العامل EF-G من هـذا المعقـد لاعادة استخدامه حدوث التحليل المائى لجزئ GTP الى GDP وفوسفات حيـث تستخدم الطاقة الناتجة لبدء دورة جديدة من الاستطالة على الريبوسوم.

وجد أنه تحت الظروف المثالية لنمو ونشاط بكتريا القولـون، يـتم بنـاء سلسلة متعدد الببتيد بطول حوالى ٣٠٠-٤٠٠ حامض أمينى فى حوالى ١٠-٢٠ ثانية، وأنه فى اثناء هذه الفترة لا تبقى السلسلة النامية فى صورة سلسلة مفرودة ولكنها تأخذ بسرعة الشكل الثلاثي الابعاد الخاص بها، وذلك عن طريق تكـوين عدة روابط ثانوية بحيث قد تأخذ السلسلة الشكل النهائى للبروتين النوعى قبـل اضافة الأحماض الأمينية الأخيرة إلى النهاية الطرفية للسلسلة.

ثالثا: مرحلة انهاء الترجمة Termination(Release):

تبين أنه لكى يتم انهاء عملية بناء سلسلة متعدد الببتيـد لابـد أن يتـوفر شرطين: أولهما أن يوجد كودون نوعى يعمل كإشارة ايقاف لإستطالة السلـسلة، والشرط الثانى هو توفر بروتينات نوعية تسمى بروتينات الأنفكاك أو الأنهـاء Release Factors (RF) التى تقوم بقراء اشارات انهاء بناء السلسلة.

ويرجع ذلك إلى حقيقة أنه عندما تصل سلسلة متعدد الببتيـد الـى تمـام استطالتها، فإن نهايتها الكربوكسيلية تظل مرتبطة بأخر جزئ من tRNA وعلى ذلك فلابد لعملية الانهاء أن تشتمل على ازاحة هذا الجزئ الطرفى مـن tRNA وتحرير مجموعة الكربوكسيل منه. وعندما يتم ذلك تنفك السلسلة الناشئة التامـة النمو بسرعة من على الريبوسوم وذلك نظراً لأن ارتباطها بالريبوسـوم كـان بواسطة هذا الجزئ الأخير من tRNA. تبين وجود ثلاث كودونات فى الـشفرة الوراثية متخصصة فى اعطاء اشارة الايقاف لعملية بناء البروتين فـى الخليـة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وهى UAA, UAG, UGA. إلا أنه تبين أن هذه الكودونات النوعية لايمكن لأى نوع من tRNA التعرف عليها ولكن يتم التعرف عليها فقط بواسطة بروتينات نوعية تسمى عوامل الانفكاك Release Factors (RF).

يحتل أحد عوامل الانفكاك الموقع A على الريبوسوم عندما يتم الوصول إلى الكودون الخاص بالانهاء على سلسلة mRNA مما يؤدى ألى منع اضافة أى aa~tRNA جديد الى هذا الموقع. وقد تبين وجود ثلاث أنواع من عوامل الانفكاك فى بكتريا القولون وهى : RF3, RF2, RF1 (جدول ٩-١) ويتعرف العامل RF1 على كودونى الايقاف : UAA, UAG فى حين يتعرف العامل RF2 على كودونى الايقاف : UAA, UGA.

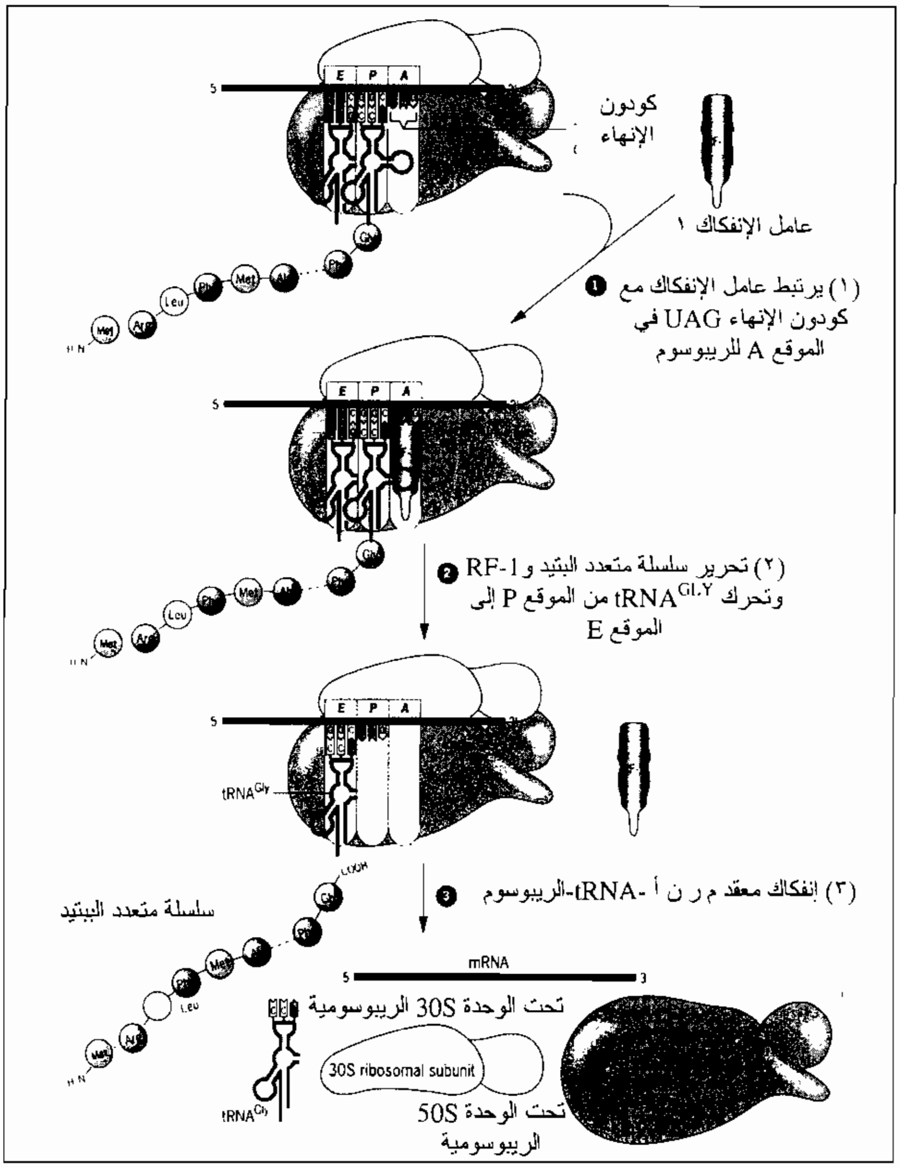
يؤدى ارتباط عامل الانفكاك بالموقع A على الريبوسوم إلى دفع انزيم Peptidyl Transferase إلى نقل السلسلة الببتيدية التامة النمو إلى جزئ ماء بدلا من جزئ aa~tRNA فتنزلق السلسلة الكاملة متحررة من الريبوسوم نظراً لعدم وجود ما يربطها به، كما تتحرر من جزئ tRNA فى حين يتحرك جزئ tRNA غير المشحون الى الموقع E ومنه إلى السيتوسول.

هناك عامل انفكاك ثالث RF3 وهو يحتاج إلى GTP و GDP لنشاطه، ويبدو أنه يساعد على تحفيز تفاعل الانفكاك وتحرير سلسلة متعدد الببتيد من الريبوسوم. إلا أنه لا يقوم باحتلال الموقع A مباشرة كما يحدث فى العاملين RF2, RF1.

يلى ذلك انفكاك mRNA من موقع ارتباطة على الريبوسوم، وهذا الأخير لا يلبث أن يتفكك الى تحت الوحدتين 30S, 50S اللتان تبحثان عن جزئ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

mRNA جديد لبدء دورة جديدة من عملية بناء البروتين. ويبين الشكل (٩-١٦) دور عوامل الانفكاك فى عملية انهاء بناء سلسلة متعددة الببتيد.



الشكل (٩-١٦): إنهاء ترجمة سلسلة متعدد الببتيد فى بكتريا القولون

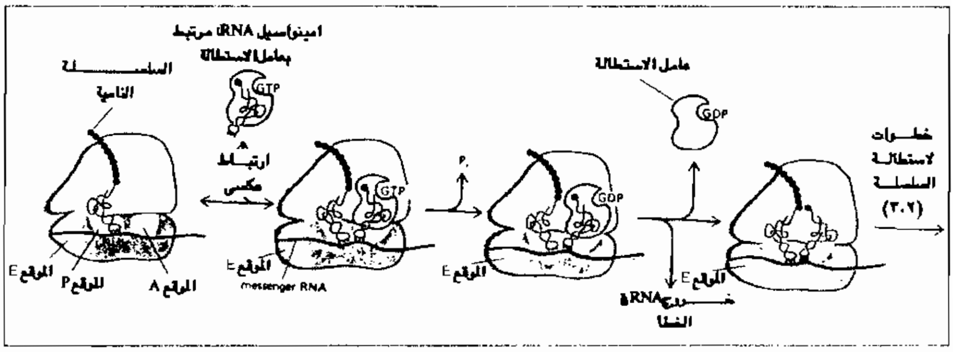
salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

دور GTP فى مراجعة أخطاء الترجمة:

عندما يرتبط tRNA بالحامض الأمينى الخاص به، فإنه يكون معقد مع عامل الاستطالة EF الذى يرتبط بقوة مع الحامض الأمينى فى جزئ AA~tRNA من جهة وبجزئ من GTP من جهة أخرى. وجد أن هذا المعقد وليس tRNA فقط هو الذى يتزاوج مع الكودون المناسب فى mRNA. اذ أن وجود عامل الاستطالة المرتبط فى هذا المعقد هو الذى يسمح بالتزاوج الصحيح بين الكودون ومضاد الكودون، ولكنه فى نفس الوقت يمنع مؤقتا الحامض الأمينى من أن يضاف إلى سلسلة متعددة الببتيد النامية. إلا أن هذا التعرف المبدئى للكودون لايلبث أن يدفع عامل الاستطالة الى استهلاك جزئ GTP المرتبط به (بالتحليل المائى إلى GDP + فوسفات) مما يؤدى إلى انفكاك عامل الاستطالة من هذا المعقد على الريبوسوم تاركا جزئ tRNA ~ AA بحيث يصبح فى الامكان أن يستمر بناء البروتين. وكما هو موضح فى الشكل (٩-١٧) فإن عامل الاستطالة يقوم بعملية تأخير قصيرة بين خطوة التزاوج بين الكودون ومضاد الكودون وخطوة استطالة سلسلة متعدد الببتيد مما يعطى فرصة لجزئ tRNA غير الصحيح المرتبط بأن يترك الريبوسوم. إذ أن جزئ tRNA غير الصحيح يعطى عدد أقل من الروابط الهيدروجينية بين الكودون ومضاد الكودون عما يحدث بالنسبة للجزئ الصحيح، بحيث يكون ارتباط الأول ضعيفاً بالريبوسوم وبالتالى يكون أكثر تعرضاً للانفكاك بسهولة أثناء هذه الفترة الوجيزة. وحيث أن التأخير الذى يسببه عامل الاستطالة يؤدى بمعظم جزئيات tRNA غير الصحيحة المرتبطة بالريبوسوم إلى الانفكاك عنه وتركه بدون أن تستخدم فى بناء البروتين، فإن هذا العامل يؤدى إلى زيادة نسبة الأحماض

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الامينية الصحيحة إلى غير الصحيحة المضافة إلى سلسلة متعدد الببتيد، ويتم ذلك بالطبع على حساب استهلاك GTP.



الشكل (٩-١٧): دور GTP فى مراجعة أخطاء الترجمة. فى مرحلة الارتباط المبدئى يتصل جزئ أمينواسيل tRNA المرتبط بعامل الاستطالة ويتزاوج مبدئيا بالكودون على الموقع A. يدفع هذا التزاوج إلى التحليل المائى لجزئ GTP بواسطة عامل الاستطالة مما يسمح لعامل الاستطالة بالانفكاك من جزئ امينواسيل tRNA الذى يمكنه الآن أن يرتبط بدقة فى الموقع A ويشارك فى استطالة السلسلة. يسمح فقط لجزئيات tRNA المحتوية على مضاد الكودون الصحيح بأن تبقى متزاوجة بجزئ mRNA لفترة طويلة نسبياً تسمح باضافتها الى سلسلة الببتيد النامية

البقعة السحرية "PP GPP" Magic Spot:

تبين أنه اذا حدث بالصدفة أن احدى جزئيات tRNA غير المحملة بحامض أمينى قد احتلت الموقع A على الريبوسوم فإن ذلك لايؤدى فقط إلى وقف استطالة سلسلة متعدد الببتيد مؤقتا ولكنه يؤدى ايضا إلى إبطاء التفاعل على الريبوسوم الذى يستخدم فيه ATP كمعطى لثنائى الفوسفات P~P. ويحدث نتيجة لهذا الوضع غير الطبيعى أن يتحول GDP (PP5G-3' OH) إلى النيوكلتيدة غير العادية PP5'-G3'PP والتى يطلق عليها "البقعة السحرية" Magic Spot يتم انتاج هذه البقعة السحرية فقط اذا تمكن tRNA غير المشحون من أن يحتل الموقع A وأن يتزاوج مع الكودون فى mRNA. وفى حين أنه أثناء النمو

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

العادى للبكتريا تتكون كميات ضئيلة جداً من PPGPP نجد أنه تتـراكم كميـات كبيرة منه أثناء مجاعة الخلية. يعتقد أن هذه الجزئيات غير العادية تقوم بـدور الاشارات التى توقف نوعيا بناء سلاسل rRNA و tRNA فى الخليـة أى انهـا تقوم بدور تنظيمى للحيلولة دون إنتاج كميات ريبوسومات أكثر ممـا تـستطيع الخلية استخدامة. يطلق علـى هـذا التثبـيط النـوعى لبنـاء rRNA و tRNA تحت ظروف المجاعة ونقص الأحماض الأمينية اسـم "الاسـتجابة المحـدودة" Stringent Response.

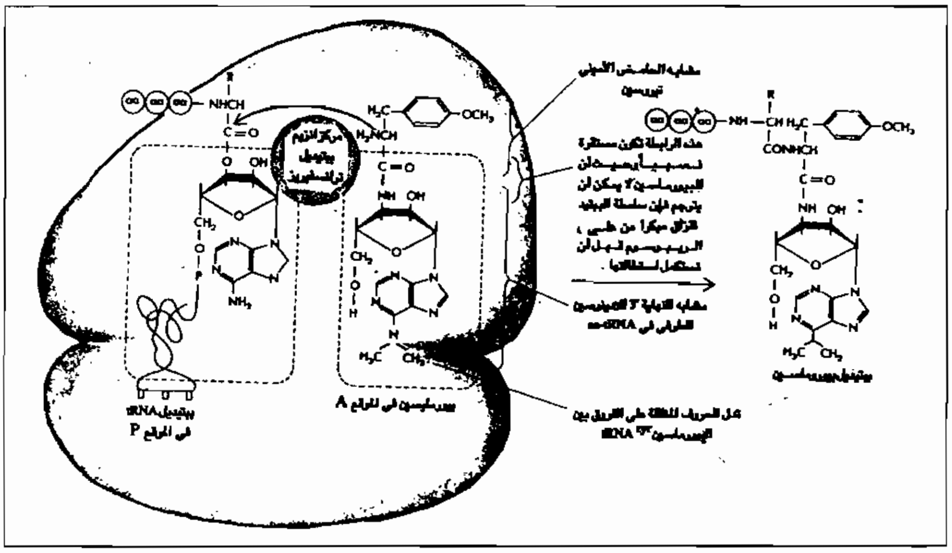
وقد تبين وجود طفرة استرخائية Relaxed Mutation تؤدى إلى الاستمرار فى انتاج tRNA, rRNA على الرغم من نقص الأحماض الأمينية. وقد وجـد أن بعض الخلايا الطافرة هذه ينقصها انـزيم ذو وزن جزيئـى حـوالى ٧٥٠٠٠ دالتون. يسمى بعامل الإلزام Stringent Factor وأن هذا العامل هو الذى يرتبط بالريبوسوم ويقوم بتحويل PPG إلى PPGPP.

دور بعض المضادات الحيوية فى وقف بناء البروتين:

تبين أن بعض المضادات الحيوية يمكن استخدامها للقيام بدور مفيد جـداً فى تتبع خطوات بناء البروتين فعلى سبيل المثال:

١- وجد أن البيورومايسين Puromycin، مثبط قوى لنمو جميع الخلايا، وهو يؤدى هذا الدور عن طريق ايقاف نمو واستطالة سلسلة متعدد الببتيد كما فى الشكل (٩-١٨).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (٩-١٨): دور المضاد الحيوى بيورومايسين فى انهاء استطالة سلسلة متعدد الببتيد

ويرجع ذلك إلى أن هذا المضاد الحيوى يتشابة فى تركيبه مع تركيب النهاية '3 لجزئ AA ~ tRNA (مثل التيروسين أو الفينيل الآنين)، مما يؤدى إلى امكان ارتباطه بالموقع A على الريبوسوم بطريقة فعالة جداً بحيث يحتل هذا الموقع بدلا من AA ~ tRNA والأهم من ذلك أن انزيم Peptidyl Transferase يقوم باستخدام هذا المضاد الحيوى كبديل بحيث ينقل سلسلة متعدد الببتيد الى المستقبلات الموجودة عليه. ونظراً لأن جزئ البيورومايسين صغيرا جدا بالمقارنة بجزئ tRNA لذلك فإن ارتباطه بالموقع A يكون ضعيف جداً مما يؤدى إلى انفكاك سلسلة متعدد الببتيد النامية والمنتهية بالبيورومايسين عن الريبوسوم مما يؤدى الى توقف عملية الاستطالة وانتاج سلاسل ببتيدية غير كاملة بأطوال مختلفة. وتجدر الاشارة هنا إلى أن حقيقة اضافة البيورومايسين إلى النهاية

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الكربوكسيلية للسلسلة النامية يؤكد أن بناء البروتين يحدث من النهايـــة N إلى النهاية C.

٢- حامض الفيوسيديك Fusidic acid: يتدخل هذا المضاد الحيوى فى عمليـــة انطلاق عامل الاستطالة EF-G بعد أن يؤدى دوره فى عمليـــة الانتقـــال، حيث يؤدى استمرار ارتباط المعقد EF-G-GDP إلى منع ارتباط المعقـــد التالى:

AA~tRNA-EF-TU-GTP على الموقع A على الريبوسوم والذى لابد أن يسبق أى دورة جديدة للاستطالة، مما يوقف نمو سلسلة متعدد الببتيد.

٣- Chloramphenicol و Sparsomycin يقوم كـــل مـــن هـــذين المـــضادين الحيويين بتثبيط تفاعل انزيم Peptidyl Transferase نتيجـــة لارتباطهمـــا نوعياً بتحت الوحدة 50S.

٤- Streptomycin يرتبط بتحت الوحدة 30S بحيث يوقف عملية بـــدء بنـــاء سلسلة متعدد الببتيد.

ويلخص الجدول (٩-٢) دور بعض المضادات الحيوية فى تثبيط عمليـــة بناء البروتين فى الخلية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجدول (٩-٢) دور بعض المضادات الحيوية

في تثبيط بناء البروتين

المثبطات	التأثير النوعى
أ- تعمل فقط على غير مميزة النواة	
١- تيتراسيكلين Tetracyclin.	يمنع ارتباط AA~tRNA بالموقع A على الريبوسوم
٢- ستربتومايسين Streptomycin.	يمنع انتقال معقد الابتداء إلى خطوة الاستطالة ويسبب أخطاء فى قراءة الشفرة الوراثية.
٣- كلورامفينيكول Chloromphenicol.	يوقف تفاعل انزيم Peptidyl Transferase على الريبوسوم.
٤- اريثرومايسين Erythromycin.	يمنع تفاعل الانتقال Translocation على الريبوسوم
ب- تعمل على غير مميزة النواة ومميزة النواة:	
١- بيورومايسين Puromycin.	يسبب تحرر سلسلة متعدد الببتيد قبل اكتمال نموها عن طريق ارتباطه بنهاية السلسلة النامية.
جـ- تعمل على مميزة النواة فقط:	
١- سيكلوهكساميد Cyclohexamide.	يوقف تفاعل الانتقال على الريبوسوم.
٢- انيسومايسين Anisomycin.	يوقف تفاعل انزيم Peptidyl Transferase على الريبوسوم.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الترجمة فى مميزة النواة :

لا تختلف عملية الترجمة فى مميزة النواة عما يتم فى البكتريا إلا فى قليل من الخواص. حيث نجد أنه فى مميزة النواة يكون حجم جزيئات الريبوسوم أكبر مما فى البكتريا وأن مكوناتها من ر.ن.أ والبروتينات تكون أكثر تعقيدا عما فى البكتريا.

من جهة أخرى نجد أن فترة نصف العمر لجزئ mRNA فى مميزة النواة تكون عادة اطول بكثير عن مثيلتها فى البكتريا وحيث أن معظم mRNA فى مميزة النواة يستمر فعالاً لعدة ساعات وليس لدقائق (فى البكتريا) قبل أن يحدث له هدم بانزيمات الريبونيوكلييز مما يجعله متوافرا لفترة اطول بكثير ليشارك فى بناء كميات أكبر من البروتين. وتوجد بعض الفروق فى مرحلة بدء الترجمة فى مميزة النواة. فقد رأينا كيف يتم تجهيز mRNA بقلنسوة من الجوانين عند النهايه 5'. وقد تبين أن وجود هذه القلنسوة ضرورى للترجمة الفعالة حيث وجد أن mRNA الذى يخلو من القلنسوة لا تتم ترجمته بنفس الكفاءة. وبالاضافة إلى ذلك، تحتوى معظم انواع mRNA فى مميزة النواة على تتابع تعارف يحيط بكودون البدء AUG مكون من التتابع ACCAUGG ويعرف بتتابع كوزاك Kozak. ويبدو أن هذا التتابع يقوم بنفس الوظيفة فى مميزة النواة التى يقوم بها تتابع Shine-Dalgarno فى غير مميزة النواة وكلاهما يقوم بتسهيل الارتباط المبدئى بين mRNA مع نحت الوحدة الصغرى للريبوسوم. وهناك فرق أخر وهو أنه فى مميزة النواة لا تحتاج عملية بدء الترجمة إلى فورمايل ميثيونين إلا أن الكودون AUG فى مميزة النواة يحتاج إلى وجود ($tRNA_{met}$ وهو المختص ببدء الترجمة باضافة حامض الميثيونين. وتتشابة العوامل البروتينية (عوامل البدء والاستطالة والانهاء) فى ترجمة كلا من البكتريا ومميزة النواة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

إلا أن الأخيرة تحتوى على اعداد اكبر من هذه العوامل فى كل خطوة، وبعضها يكون أكثر تعقيداً عما فى البكتريا. ومن المعروف أن عدد كبير من الريبوسومات يكون مرتبطاً بأغشية الشبكة الاندوبلازمية الخشنة فى خلايا مميزة النواة، الا أن هذه الاغشية غير موجودة فى سيتوبلازم البكتريا. ويؤدى هذا الارتباط فى مميزة النواة إلى تسهيل أفراز البروتينات حديثة البناء من الريبوسومات مباشرة إلى القنوات الموجودة فى الشبكة الاندوبلازمية حيث يتم توجيه مسارها الافرازى. فى حين نجد أنه فى غير مميزة النوة يحدث انطلاق السلاسل الببتيدية مباشرة من الريبوسومات الى السيتوبلازم.

وأخيراً فإن هناك فرق كبير فى معدل سرعة استطالة سلسلة متعدد الببتيد، ففى البكتريا نجد أن السلسلة تزيد استطالتها بمعدل ١٥ حامض أمينى فى الثانية الواحدة (عند درجة حرارة ٣٧ °م) فى حين يكون هذا المعدل ابطأ بكثير فى مميزة النواة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفصل العاشر

تنظيم التعبير الجينـي
في غير مميزة النواه

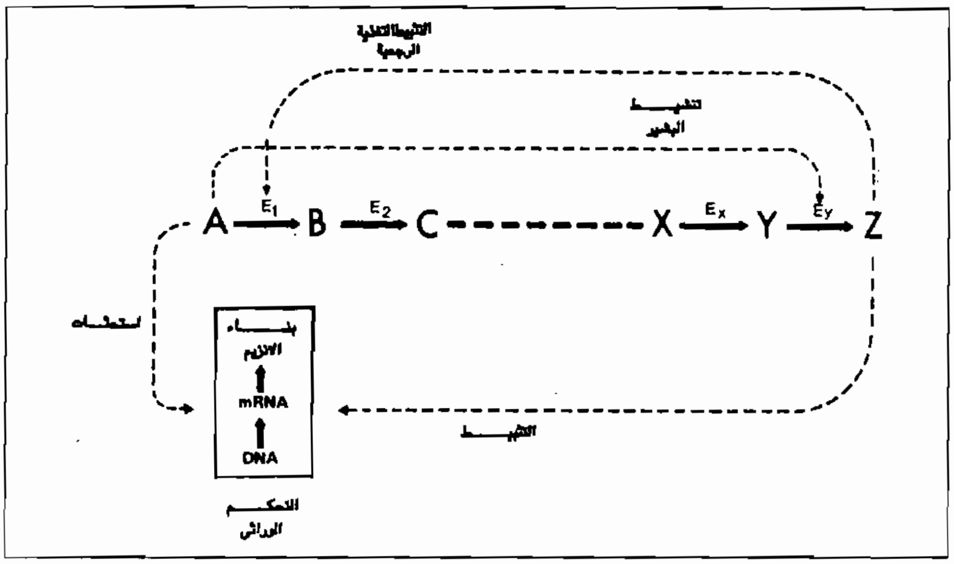
تتميز الخلية الحية بوجود تباين كبير فـي أعـداد الجزيئـات المختلفـة للبروتينات النوعية ، لذلك كان لا بد من وحود نظم لتأمين البناء الإختيارى لتلك البروتينات التي تحتاجها الخلية بكميات كبيرة.

كما أن الخلية البكتيرية بطبيعتها محافظة ، بمعنى أنها نادرا ما تـستهلك طاقة في بناء أو هدم مواد تزيد عن احتياجاتها. لذلك نجد ان الخلية قد استنبطت نظم للتحكم في مستويات انتاج الاف المركبات الكيماوية بداخلها. ويـتم تنظـيم النشاط الانزيمى عن طريق ميكانيكيتين رئيسيتين وهما: التحكم الوراثي والتحكم في النشاط الحفزي كما هو موضح في الشكل (١٠-١).

يتضمن التحكم الوراثي تنظيم انتاج الكمية الكلية لحزيئات إنـزيم معـين وسوف نتعرض لذلك فيما بعد عند دراسة نظام الأوبـرون ، حيـث تكـون محصلة هذا النظام أن الإنزيم لا يتم انتاجة الا عند الحاجة اليه فقط. اما التحكم في النشاط الحفزي Catalysis ، فيتضمن تغيير في نشاط الإنزيم بدون تغيير في الكمية الكلية للإنزيم المنتج أي أن التغيير يكون نوعيا وليس كميا. ويـتم ذلـك

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بصفة خاصة في الانزيمات التنظيمية الألوستيرية Allosteric Enzymes بفعل جزيئات ألوستيرية منشطة أو مثبطة.

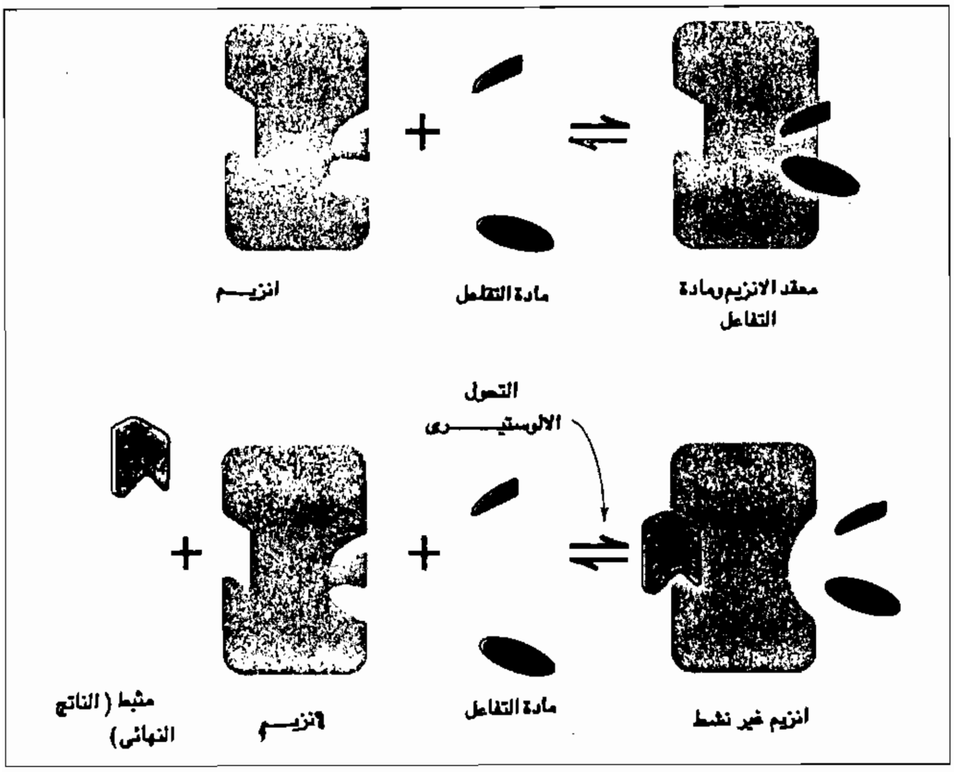


الشكل (١٠-١): شكل تخطيطي يبين نظم التحكم فى النشاط الإنزيمى عن طريق التثبيط بالتغذية الرجعية ونظام التحكم الوراثي (الأوبرون)

توجد ميكانيكيتين رئيسيتين لهذا النوع من التحكم وهما : التثبيط بالتغذية الرجعية Feed Back Inhibition (FBI) ، والتنشيط بمادة التفاعل الأولية Substrate كما هو موضح بالشكل (١٠-١).

فى حالة التغذية الرجعية يعمل المنتج النهائي End Product فى السلسلة الايضية كمثبط الوستيرى للإنزيم الاول في السلسلة ، ويترتب على ذلك انه عندما يتم بناء كمية كافية من هذا المنتج النهائى، فإن السلسلة الايضية باكملها يتم إيقافها وبذلك تتجنب الخلية استمرار إنتاج وتراكم مركبات أكثر من احتياجاتها . ويبين الشكل (١٠-٢) كيف أن ارتباط المنتج النهائي يؤدى إلى

تثبيط نشاط الإنزيم بهذه الميكانيكية والتي تتضمن عملية تحول الوستيرى Allosteric Transformation.



الشكل (١٠-٢): شكل تخطيطي لتفاعل التحول الألوستيرى

ويتم ذلك في موقع على الإنزيم غير الموقع النوعى للارتباط بمادة التفاعل. وعادة يكون الارتباط ضعيف بحيث يسهل فك الارتباط عندما تتغير الظروف حتى يمكن للإنزيم أن يستعيد نشاطه إذا احتاجت الخلية إليه، أى أن التفاعل هنا يكون عكسيا. أما فى حالة التنشيط بمادة التفاعل الاولية ، فإن أول مادة تفاعل فى سلسلة المسار الايضي تعمل كمنشط الوستيرى للإنزيم الأخير فى السلسلة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

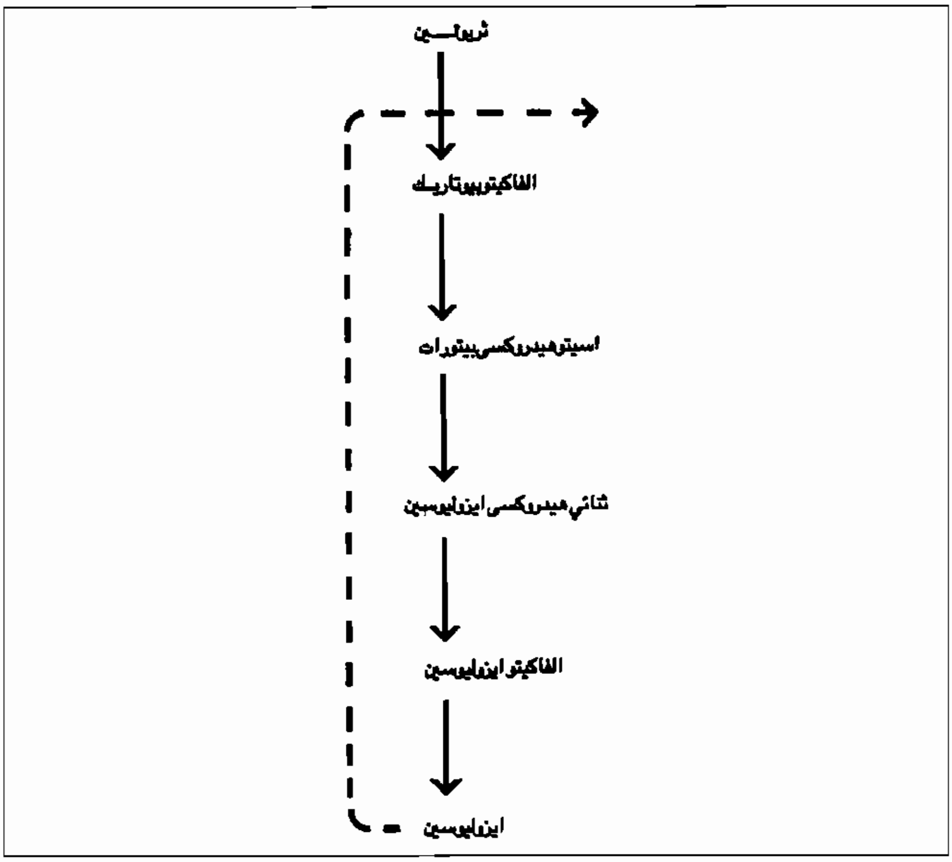
من جهة اخرى، يعد النظام الوراثى طريقة بطيئة نسبيا للتحكم فى النشاط الإنزيمى ، فى حين يعد نظام الثبيط بالتغذية الرجعية نظام سريع جدا لضمان أن مستويات النشاط الإنزيمى كافية وفى حدود احتياجات الخلية فقط.

أنواع التثبيط بالتغذية الرجعية Types of Feedback Inhibition:

يمكن تقسيم الثبيط بالتغذية الرجعية إلى الانواع التالية:

١- فى حالة سلاسل الايض المستقيمة (غير المتفرعة) وحيث يفصل عادة بين مادة التفاعل الأول وبين المنتج النهائي عدد من الخطوات الإنزيمية ، فإن المنتج النهائى عند وصوله الى مستوى معين من التركيزيقوم بالارتباط بالإنزيم المساعد في الخطوة الاولى مسببا إيقاف نشاطه وبالتالى يودى إلى توقف اى نشاط جديد في السلسلة الإيضية. والمثال على ذلك ما يحدث فى السلسلة الأيضية للحامض الامينى الايزوليوسين كما في الشكل (١٠-٣).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١٠-٣): مثال لنظام التغذية الرجعية في السلاسل الايضية البسيطة (غير المتفرعة) في بناء الأيزوليوسين من الثيريونين. تبين الخطوط المتقطعة أن الايزوليوسين (الناتج النهائي) يقوم بتثبيط الانزيم الذي يساعد في تفاعل الخطوة الأولى (ثريونين- > الفا-كيتوبيوتاريك)

٢- فى حالة السلاسل الايضية المتفرعة Branched Pathway حيث تبدا سلسلة الايض بمادة تفاعل مشتركة ثم لا تلبث السلسلة ان تتشعب بحيث تنتهى بعدد من النواتج النهائية المختلفة. ومعنى ذلك أنه إذا طبقت نفس القاعدة المعمول بها في حالة السلاسل غير المتفرعة ، فإنه بمجرد

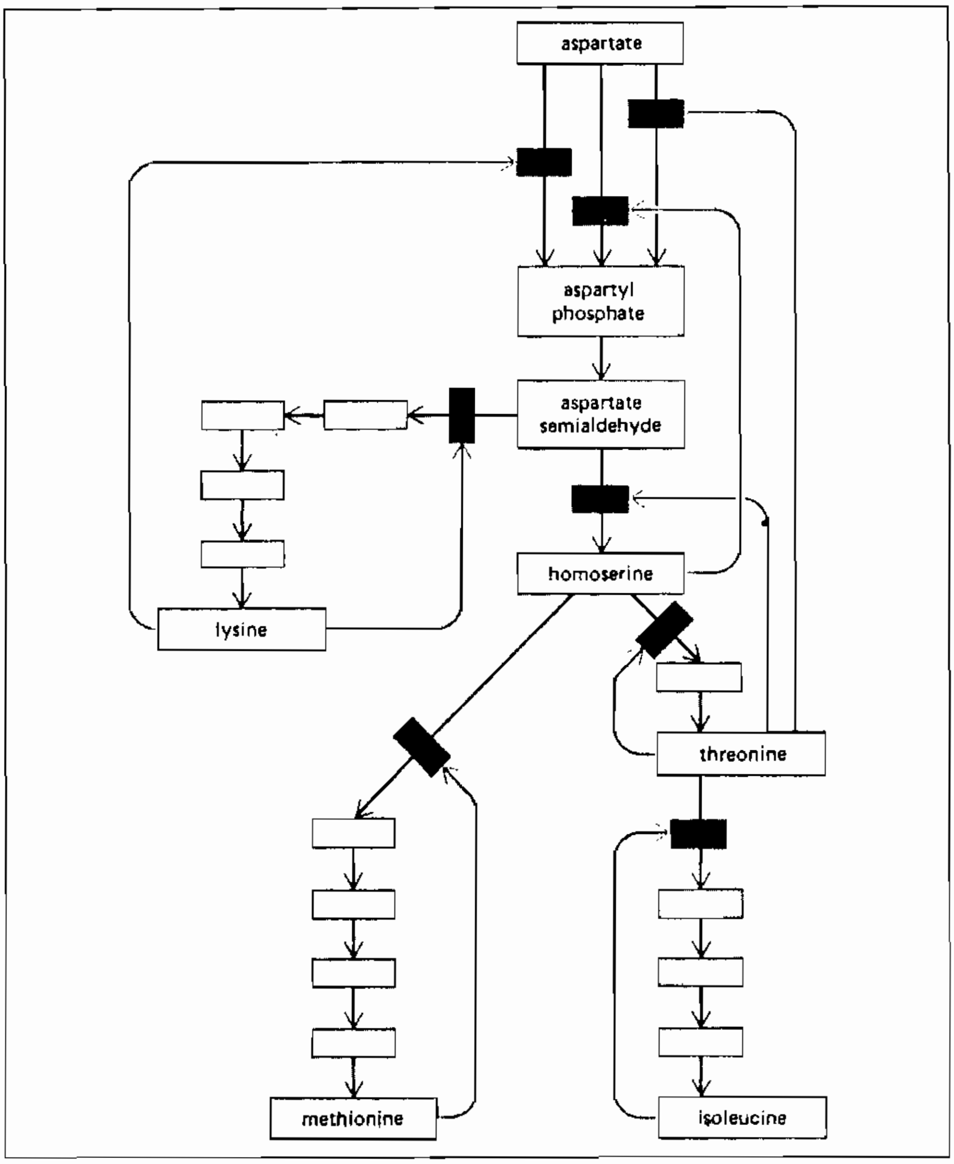
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وصول اى من المنتجات النهائية إلى مستوى معين مــن التركيــز ســيتم ارتباط هذا المنتج بإنزيم الخطوة الأولى في السلسلة ، مما يعنــى وقــف السلسلة بأكملها وما يترتب على ذلك من توقف إنتــاج النــواتج النهائيــة الاخرى ، على الرغم من أنها قد لا تكون قــد وصــلت إلــى المــستوى المطلوب والذى يفى باحتياجات الخلية ما قد يؤدي ذلك من نتائج ســلبية. لذلك اقترحت أربعة انواع من التثبيط بالتغذية الرجعية لتفسير ما يحــدث فى حالة السلاسل المتشعبة وهى:

أ- تعدد الصور الانزيمية (مشابهات الانزيم) Isozymes:

حيث يكون للإنزيم المشارك في أول خطوة من السلسلة الأيــضية عدة صور (مشابهات انزيمية) ، بحيث يختص كل واحد مــن المنتجــات النهائية المختلفة بالارتباط نوعيا بأحد هذه الصور مما يؤدى إلى إيقــاف جزئى للسلسلة المتفرعة، بحيث يتم ايقاف الخطوات الوسطية المؤدية إلى هذا المنتج النهائى وحده فى حين يستمر الانتاج فى الأفرع الأخرى مــن السلسله إلى أن تصل بدورها إلى المستوى المطلوب للخليــة ، فيحــدث الارتباط بين صورة أخرى للإنزيم مع المنتج النهــائى التــالى وهكــذا . والمثال على ذلك ما يحدث فى سلسلة الايض المتفرعة الخاصــة بإنتــاج الأحماض الامينية الثلاثة: الليسين والأيزوليوسين والمثيونين حيث تبــدا كلها من مادة تفاعل اولية مشتركة وهى حامض الاســبارتيك كمــا فــى الشكل (١٠-٤).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٠-٤): مثال لنظام التثبيط بالتغذية الرجعية في سلاسل الايض المتفرعة حيث يتم تثبيط بناء الاحماض الأمينية الليسين والمثيونين والثريونين والايزوليوسين في البكتريا بنظام تعدد الصور الانزيمية(مشابهات الانزيمات)

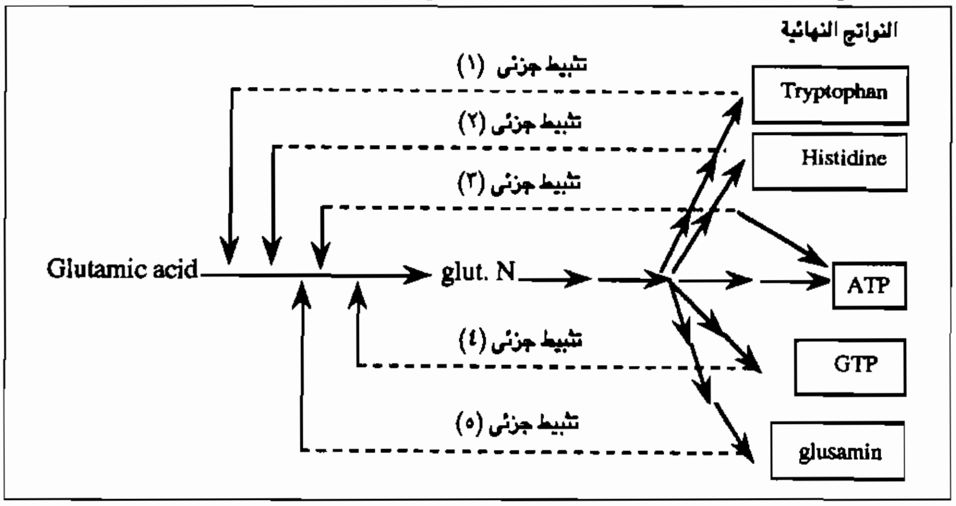
salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ب- التثبيط المتناسق Concerted Feedback Inhibition:

حيث لا يحدث ايقاف للسلسلة المتفرعة إلا عندما يتم الوصول إلى مستويات كافية من جميع النواتج النهائية معا: بمعنى ان وجود احد المنتجات النهائية بكمية زائدة لا يكفى لايقاف السلسلة الايضية بأكملها.

ج- التثبيط التجميعي أو التراكمي Additive or Cumulative FBI:

حيث يؤدى كل من النواتج النهائية الى احداث تثبيط جزئي فقط ، ولكن عندما تتوفر كميات زائدة من منتجين نهائيين أو أكثر فإن درجة التثبيط المشترك لهما ستكون مساوية لمجموع التثبيط الذى يحدثة كل منهم على حده. ويتضح ذلك في السلسلة المتفرعة الخاصة بإنتاج التربتوفان والهستيدين و ATP, GTP والجلوسامين وتبدأجميعا بحامض الجلوتاميك كما في الشكل (١٠-٥) ، حيث يحدث اغلاق للخطوة الأولى في السلسلة وهى Glutamic --> Glut. N بنظام تجميعي حسب عدد النواتج النهائية التي تصل الى مستوى تركيز معين في البيئة.



الشكل (١٠-٥): مثال للنظام التراكمى للتثبيط بالتغذية الرجعية فى سلاسل الأيض المتفرعة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

د- التثبيط التعاوني Co-operative FBI:

حيث يكون التثبيط المشترك لاثنين أو أكثر من النـواتج النهائيـة أقوى من التأثير التجميعى لهما أى أن وجود اثنين أو أكثر مـن النـواتج النهائية بكمية فائضة سيعطى درجة من التثبيط الرجعى أعلى من مجموع التثبيط الناتج عن فعل كل منهما على حدة.

التنظيم الوراثى Genetic Control:

يتم تنظيم التعبير الجينى فى البكتريا أساساعلى مستوى عملية بناء ر ن أ المراسل mRNA أى على مستوى النـسخ Transcription. ويـتم ذلـك عـادة بالسماح ببدء أو منع بدء عملية النسخ بواسطة انزيم بلمـرة ر ن أ. وحيـث أن البكتريا تعتمد فى الحصول على غذائها من المواد المتوفرة في الوسط المحـيط بها مباشرة فإنها تستجيب بسرعة للتغيرات التى تحدث فى هذا الوسـط حـسب وفرة هذه المواد الغذائية .

تبين أنه اذا أتيحت لبكتريا القولون الفرصة للأختيار بين سكرى الجلوكوز واللاكتوزكمصدر للكربون فإن البكتريا تفضل استهلاك الجلوكوز الموجود فى البيئة أولا قبل أن تبدأ فى استخدام اللاكتوز كمصدر للطاقة اللازمة لهـا. وقـد لوحظ أن التحول الى استخدام اللاكتوز كان مقرونا بفترة توقف فى نمو البكتريا تم خلالها بناء انزيم بيتا جلاكتوسيديز ß-Galactosidase الذى يقوم بالمساعدة في عملية التحليل المائى لسكر اللاكتوز الى جلوكوز وجلاكتوز. أمكن عزل وتمييز بعض الطافرات البكتيرية التى تتميز بوجود بعض النقص النوعى فـى تنظـيم هذا التحكم مما أدى فى النهاية الى التوصل الى البـروتين المثـبط للاكتـوز Lactose Repressor Protein وقد أدت الدراسات البيوكيماوية والوراثيـة التـى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

اجريت على مثبط سكر اللاكتوز ومثبط فاج لامبدا وعدد آخر من البروتينات المنظمة للنشاط الأيضى فى البكتيريا إلى استنتاج نموذج عام للتنظيم على مستوى النسخ فى الخلية غير مميزة النواة .

تبين أن ارتباط هذه البروتينات المثبطة نوعياً بتتابعات معينة فى جزئ د ن أ يؤدى إلى تثبيط أو حث بدء بناه ر ن أ لذلك الجين ، وذلك من خلال الارتباط بالمنطقة التالية مباشرة لمنطقة البروموتور حيث موقع ارتباط إنزيم بلمرة ر ن أ لبده عملية النسخ.

لوحظ أن التغيرات التى تحدث فى عملية الارتباط النوعي لتلك البروتينات التنظيمية على جزئ د ن أ تؤدى إلى فتح أوقفل التعبير الجينى.

معروف أن كروموسوم بكتريا القولون يتكون من جزئ حلقى واحد من د ن أ بطول حوالى ٤,٣×١٠^٦ زوج نيوكلتيدى . ويمثل هذا الطول ما يكفي للتشفير لحوالى ٤٠٠٠ بروتين نوعى. وعلى الرغم من أن نسبه فقط من هذه البروتينات هى التى يتم بنائها فى فترة ما ، إلا أن البكتريا بمقدروها تنظيم تعبير عدة جينات طبقاً لمستويات التركيز داخل الخلية لبعض مواد التفاعل النوعية والتى تختلف حسب مصادر الغذاء المتاحة فى بيئة الخلية البكتيرية.

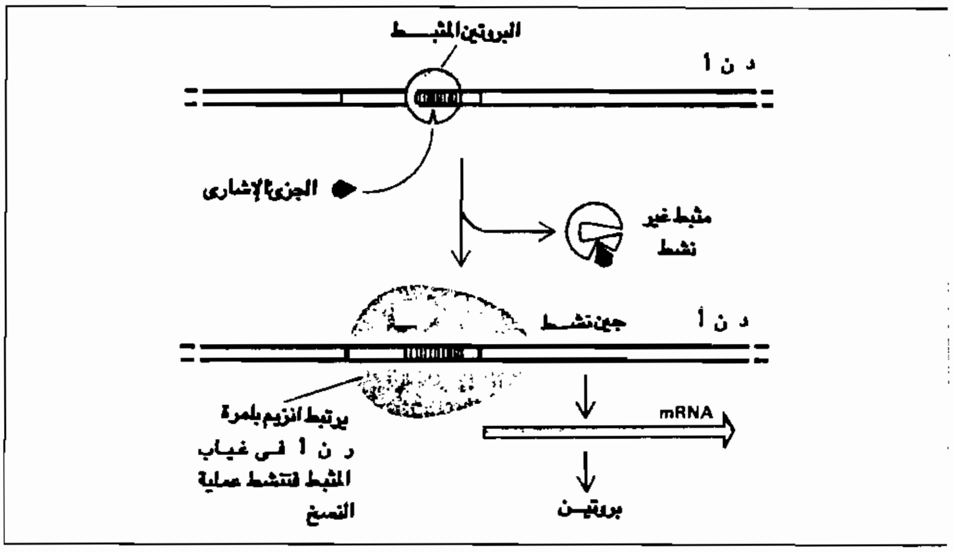
وقد أمكن التحقق من وجود بروتين مثبط للاكتوزوالذي يقوم بالارتباط بوحدة نسخية تسمى أوبرون اللاكتوز Lac Operon، بحيث يؤدى هذا الارتباط النوعى إلى توقف انتاج إنزيم بيتا جلاكتوسيديز ß-Galactosidase فى غياب اللاكتوز. وقد تبين أن هذا المثبط يقوم بإيقاف Repression عملية النسخ لهذا الأوبرون عن طريق ارتباطه بتتابع نوعى قصير فى جزئ د ن أ يتكون من

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

حوالى ٢١ زوج نيوكلتيدى يطلق عليه «المشغل» Operator والــذى يتــداخل فى تتابعه مع تتابع منطقة البروموتور السابقة له مباشرة. عندما يــتم ارتبـــاط البروتين المثبط بمنطقة المشغل فإنه يمنع انزيم بلمرة ر ن أ من بده عملية نسخ ر ن أ عند منطقة البروموتور ، مما يؤدى إلى ايقاف عمليــة النــسخ للمنطقــة المجاورة من جزئ د ن أ وبذلك يلعب دور ضـــبط أو تنظـــيم إنتـــاج إنـــزيم بيتاجلاكتوسيديز حسب احتياج الخلية. تبين أنه فى وجـــود كميـــة مـــن ســـكر اللاكتوز يتكون جزيء من السكر يـــسمى Allolactose وهـــو أحـــد الـــصور الأيزوميرية لسكر اللاكتوز في الخلية حيث يرتبط هذا السكر نوعيا بـــالبروتين المثبط مما يؤدي إلى انفكاكة وإزاحته عن منطقة المشغل وبذلك يمكن اســـتئناف عملية النسخ فى عملية تسمى «إبطال التثبيط» Derepression ويترتب على ذلك أن تتمكن الخلية من إنتاج ليس فقــط إنـــزيم ß-galactosidase ولكـــن جميـــع الإنزيمات اللازمة لهدم اللاكتوز ولكن ذلك يحدث فقط عندما يتـــوفر اللاكتـــوز (مادة التفاعل) فى البيئة كما في الشكل (١٠-٦).

ويلاحظ أن اللاكتوز (اللولاكتوز) يعمل هنـــا كجـــزئ إشـــارى Signal Molecule نوعي بحيث يؤدى وجوده إلي تنشيط الوحدة النسخية بأكملهـــا عـــن طريق خفض أوتقليل قدره المثبط على الارتباط بمنطقة المشغل.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

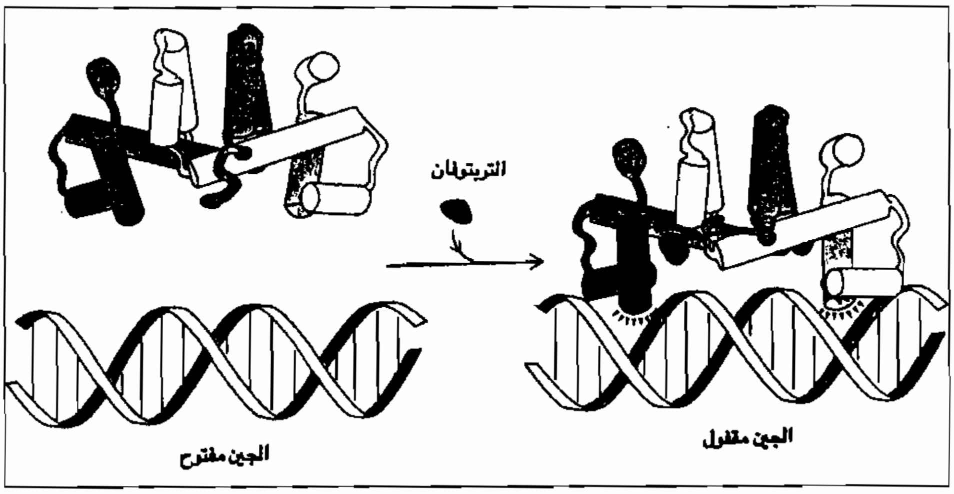


الشكل (١٠-٦): إبطال تثبيط Derepression الجين في البكتريا حيث يقوم جزئ اشارى صغير بالارتباط بالبروتين المثبط بحيث يغيرمن شكله فيترك جزيء د ن أ مما يسمح بتعبير الجينات المجاورة ونسخها

ولكن من جهة أخرى تبين وجود نظم أخرى يقوم فيها الجزئ الاشارى بعملية عكسية تماما لما يحدث فى أوبرون اللاكتوز ، أى أنه يستخدم في وقف نشاط الوحدة النسخية عن طريق زيادة النشاط التثبيطى للمثبط وبالتالي رفع قدرته على الارتباط بمنطقة المشغل . وقد تبين أن ذلك يحدث فى عملية التحكم فى التعبير الجينى لخمس جينات متجاورة تعمل فى تنسيق فيما بينها للتشفير لإنتاج الانزيمات اللازمة لإنتاج الحامض الأميني تربتوفان في بكتريا القولون. ويطلق على هذه الوحدة النسخية اسم أوبرون التربتوفان Trp. Operon. وجد أن البروتين المثبط للتربتوفان يتحكم في إنتاج الجزئ الكبير المتعدد السسترون Polycistronic من mRNA الذى يشفر للخمس بروتينات معا. إلا أن هذا البروتين التنظيمي يكون عادة في صورته الاولية غير فعال ويسمى Aporepressor ويحتاج لكى يتحول إلى الصورة الفعالة إلى الارتباط نوعيا

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بجزئ من التربتوفان (المنتج النهائى) حتى يجعله مثبط نشط Active Repressor يمكنه الارتباط بمنطقة المشغل وايقاف النسخ لوحدة الاوبرون كما في الشكل (١٠-٧).

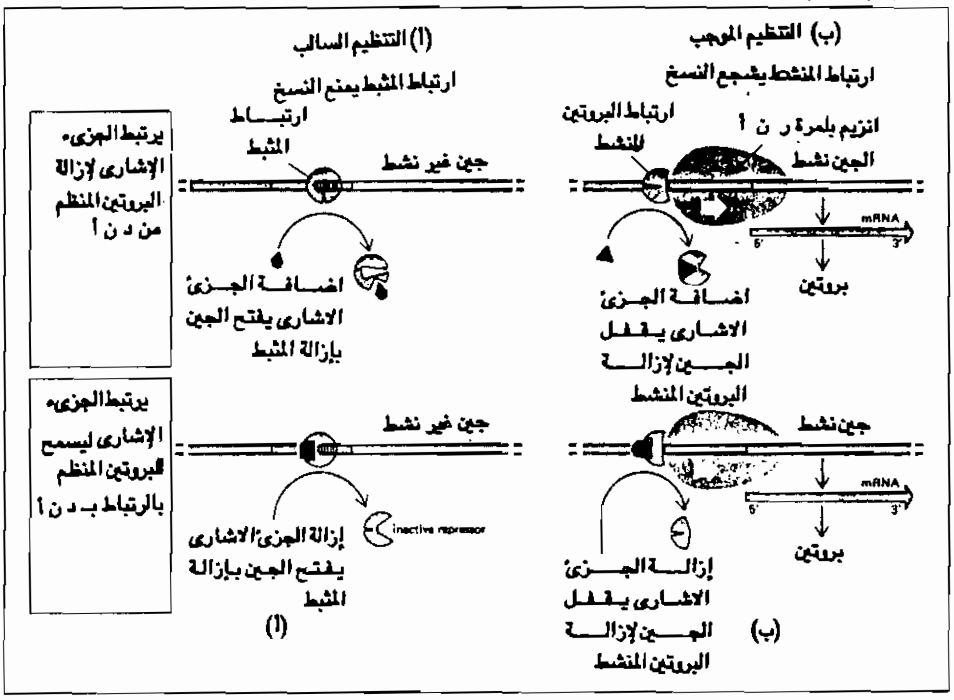


الشكل (١٠-٧): يؤدى ارتباط التربتوفان بالمثبط إلى تغير في شكل المثبط مما يسمح له بالارتباط بقوة بالتتابع النوعي في جزئ د ن ا مما يوقف النسخ للجينات المسئولة عن التشفير للانزيمات الخاصة بانتاج التربتوفان في اوبرون التربتوفان. يبين الشكل ثلاثى الابعاد كيف أن ارتباط التربتوفان يؤدى إلى زيادة المسافة بين حلزونى التعارف (الأسطوانات المظللة) في الثنائي مما يسمح بتكوين تفاعلات لروابط هيدوجينية متماثلة التى تظهر هنا كأشعة

أى أنه بالنسبة لأوبرون اللاكتوز تؤدى الزيادة فى تركيز اللاكتوز (الجزئ الاشارى) إلى انفكاك البروتين المثبط من على التتابع النوعى لجزئ د ن أ الخاص بأوبرون اللاكتوز وبالتالى تنشيط النسخ فى حين أن زيادة تركيز التربتوفان(كجزئ اشارى) تؤدى إلى زيادة كفاءة المثبط للإرتباط بمنطقة المشغل مما يؤدى إلى تثبيط النسخ. ونظراً لأنه فى كلتا الحالتين يؤدى ارتباط البروتين المنظم بمنطقة المشغل إلى كبت النسخ ، فيطلق على هذا النوع من

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

التحكم اسم التنظيم السلبي Negative Regulation كما في الـشكل (١٠-٨أ) أي أنة في التنظيم السلبي يحدث التعبير الجيني الا اذا تم إيقافه بواسـطة جـزيء منظم (مثبط).



الشكل (١٠-٨): ملخص لميكانيكيات التحكم الوراثي السلبى (أ) والتحكم الموجب (ب) في غير مميزة النواة. يلاحظ ان اضافة جزئ اشارى صغير مستحث يمكنة أن ينشط الجين إما بإزالة المثبط من على د ن أ (الجزء العلوى إلى اليسار) أو بربط بروتين منشط للجين (الجزء السفلى إلى اليمين). وبنفس الطريقة يؤدى اضافة جزئ اشارى مثبط إلى ايقاف النشاط النسخي للجين إما بإزالة البروتين المنشط من على د ن ا (الجزد الأيمن العلوى) اويربط البروتين المثبط بجزئ د ن أ (الجزء الأيسر السفلي)

دورالبروتينات المنشطة في بدء عملية النسخ للأوبرون:

إلى جانب نظام التحكم السلبى المشار إليه سابقاً ، حيث يرتبط البـروتين المثبط بالقرب من منطقة البروموتور ويتدخل في نشاط انـزيم بلمـرة ر ن أ،

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يوجد نوع آخر من التحكم يسمى التنظيم الموجب Positive Regulation حيث لا يحدث النسخ الا في وجود جزيء منظم (منشط)حيث يؤدى وجود بروتين نوعى يسمى البروتين المنشط Activator Protein إلى تسهيل عمل إنزيم بلمرة ر ن أ وقد تبين أن هذا النوع من التنظيم الموجب يكون ضروريأ لبعض الوحدات النسخية فى بكتريا القولون، وخاصة تلك التى تحتوى على برموتور ضعيف نسبيأ بحيث لا يستطيع فى حد ذاته الارتباط بكفاءة بإنزيم بلمرة ر ن أ ويتم تنشيط مثل هذه الوحدات النسخية عن طريق ارتباط البروتين المنشط بمنطقة نوعية مجاورة على جزئ د ن أ ، بحيث يتمكن هذا البروتين من أن يتلامس مع إنزيم بلمرة ر ن أ بطريقة تؤدى إلى زيادة قدرة الأخير على بدء النسخ.

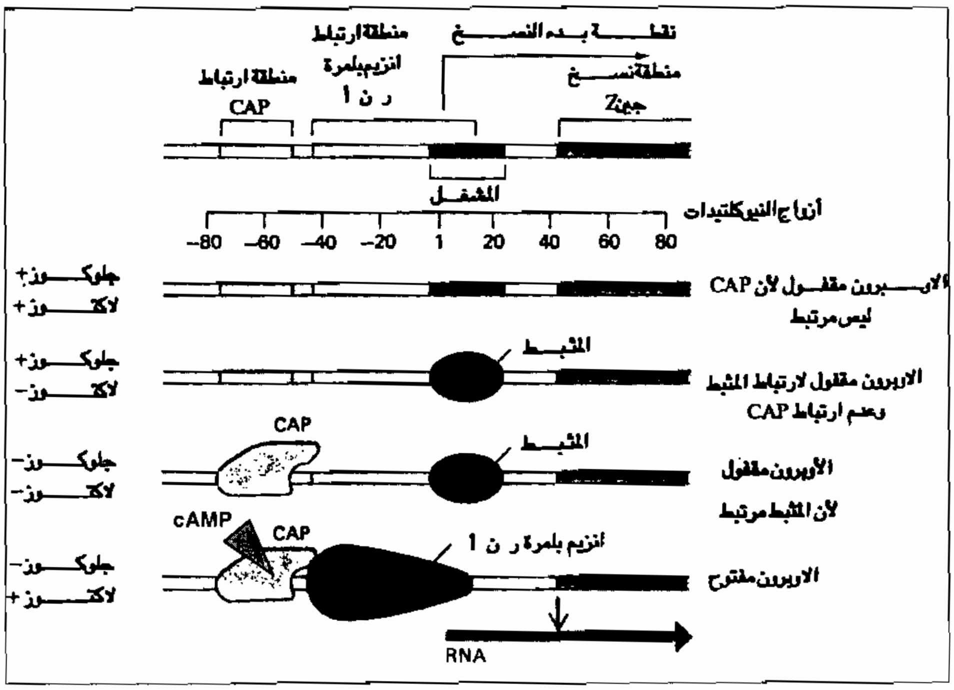
يحدث أحياناً أن يتشابه الدور الذى يقوم به البروتين المنشط مع ذلك الذى يقوم به البروتين المثبط ، بل أنه فى بعض النظم الوراثية فى البكتريا قد يقوم نفس البروتين التنظيمى بدور المثبط والمنشط معا عندما ترتبط جزيئاته بعدة مواقع فى الجينوم بحيث يقوم بتثبيط النسخ فى بعض المناطق فى حين يلعب دوراً منشطا للنسخ فى مناطق أخرى. تتم عملية التنشيط عندما يرتبط البروتين المنشط بجزيئات اشارة Signal Molecules بحيث تؤدى إلى زيادة أو خفض قدرته التنشيطية ، وبالتالى تؤدى إلي فتح أو قفل نشاط الوحدة النسخية على الترتيب ترجع تسمية هذا النوع من التحكم الجيني بالتنظيم الموجب إلى حقيقة أن عملية النسخ تحدث بكفاءة أعلى في وجود البروتينات التنظيمية عما في حالة غيابها كما في الشكل (١٠-٨ ب). فى حالة اوبرون اللاكتوز Lac Operon نجد أن هناك نوعاً خاصا من البروتين المنشط يسمى Catabolite Activator Protein ويطلق علية اختصاراً (CAP)، بحيث يتيح هذا البروتين للبكتريا أن

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تستخدم مصدر بديل للكربون فقط عندما لا يتوفر الجلوكوز في البيئة ، والــذى يعد بالطبع مصدرا مثالياً للكربون. فى حالة أوبرون اللاكتوز يحدث تنسيق بين عمل البروتين المثبط للاكتوز والبروتين المنشط CAP لكى يتم انتــاج التعبيــر الجينى المناسب. وكما سبق القول فان وجود اللاكتوز يؤدى الى انفكاك البروتين المثبط عن د ن أ ، الا آنه تبين آن ذلك ليس كافياً فى حد ذاته لتنشيط عمليــة النسخ لاوبرون اللاكتوز ، نظراً لأن منطقة البروموتور ضعيفة مما يؤدى إلــى انخفاض درجة ارتباط انزيم بلمرة ر ن أ بها. لذلك تحتاج عملية النسخ بواسطة هذا البروموتور الي تقوية درجة ارتباط إنزيم بلمرة ر ن أ بالبروموتور ويــتم ذلك عن طريق ارتباط البروتين المنشط (CAP) فى منطقة تسبق مباشرة منطقة البروموتور كما هو موضح فى الشكل (١٠-٩). تنطبق نفس الميكانيكية علــى بروموتور المالتوز والجلاكتوز وغيرهما مــن الإنزيمــات الخاصــة بتمثيــل السكريات.

يتم تنظيم عملية ارتباط البروتين المنــشط CAP بجــزئ د.ن.أ. حــسب تركيز الجلوكوز في البيئة وذلك لضمان استخدام مصادر بديلة للكربون فقط فى غياب الجلوكوز. ويحدث ذلك عندما يؤدى عدم توفر الجلوكوز فى البيئة الــى استحداث زيادة فى مستوى الخلية من جزيئات AMP الحلقــي cAMP والــذى يعمل كجزىء اشارى للخلية البكتيرية وكذلك فى الخلية مميزة النواة كما سيأتى بعد.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٠-٩): تأثير تركيز الجلوكوزواللاكتوز على تنظيم بدء النشاط النسخي في اوبرون اللاكتوز من خلال مفعولهما على البروتين المثبط والجين المنشط CAP. تؤدى اضافة اللاكتوز إلى زيادة تركيز اللولاكتوز الذى يزيل المثبط من على د ن أ وعند اضافة الجلوكوز ينخفض تركيز cAMP الضرورى لنشاطCAP فيترك الأخير د.ن.أ. مما يؤدي الى قفل الاوبرون. يعتقد أن بروتين CAP يلامس انزيم بلمرة ر.ن.أ. لمساعدتة على بدء النسخ

يرتبط cAMP بالبروتين CAP محدثأ تغييرأ فى الشكل التركيبي لهذا البروتين مما يمكنه من الارتباط بكفاءة بالتتابع النوعى الموجود على جزىء د ن أ مما يؤدى بالتالى الى تنشيط نسخ الجينات المجاورة. ولكن عندما يكون الجلوكوز متوفرأ فى البيئة ، ينخفض مستوى تركيز cAMP بحيث يتفكك عن البروتين CAP فيتحول الأخير الى الصورة غيرالنشطة التى لا يمكنها آن ترتبط بجزئ د ن أ مما يؤدى الى تحول الخلية بسرعة الى استخدام الجلوكوز فقط ، ويتوقف النسخ حتى فى وجود كمية كبيرة من اللاكتوز في البيئة كما في الشكل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

(١٠-٩) وقد تبين أن انتاج جزئ cAMP يعتمد على نشاط إنزيم Adenyl Cyclase وأن وجود الجلوكوز يثبط نشاط هذا الانزيم.

تعريف الأوبرون:

وجد فى عدد كبير من النظم البكتيرية ان مجموعة من الجينات التى تشفر لعدد من البروتينات النوعية التى ترتبط ببعضها بعلاقات وظيفية محددة ، من الممكن أن يتحكم فى تعبيرها جميعا مشغل واحد Operator ، وعادة تكون هذه المجموعة من الجينات مرتبطة بشدة على الكروموسوم البكتيرى. ويطلق على المنطقة من المادة الوراثية التى تحتوى على عدد من الجينات التى تربطها علاقة وظيفية متناسقة والتى تتكون من المشغل وعدد من الجينات التركيبية اسم الأوبرون. وحسب التعريف فإن الأوبرون عبارة عن وحدة نسخ وراثية ذات تعبير متناسق.

العناصر الرئيسية للأوبرون:

يتكون الأوبرون من مجموعة من الجينات المتجاورة التى تربطها علاقات وظيفية ويطلق عليها الجينات التركيبية (S) Structural Genes.

١- يتم تنظيم تعبير هذه الجينات التركيبية فى الأوبرون عن طريق تتابع نيوكلتيدى قصير نسبيا يسمى المشغل Operator (O) ويوجد عادة قبل أول جين تركيبى من ناحية النهاية '5.

٢- يوجد جين منظم Regulator مستقل (i) يقوم بالتحكم فى إنتاج البروتين المثبط Repressor الذى ينتج عن تفاعلة مع المشغل إحداث تثبيط متناسق ومنتظم لجميع الجينات التركيبية معا وفى نفس الوقت بمعنى أنه يحدث

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

توقف متواز وكمى فى تعبير جميع الجينات التركيبية الخاصة بهذا الأوبرون بحيث تظل نسبة التعبير الجينى ثابته بين هذه الجينات.

٣- يحدث إعادة تنشيط (أو إيقاف للتثبيط) Derepression لجميع الجينات التركيبية معا وفى نفس الوقت وبنفس المعدل (فيما يسمى بإعادة التنشيط المتناسق Co-ordinate Derepression) ويتم ذلك إما باستخدام جزئ مستحث Inducer أو نتيجة لحدوث طفره تأسيسية Constitutive Mutation فى المشغل (Oc).

٤- تؤدى طفرة الاقتضاب او الحذف Deletion التى تشمل منطقة المشغل فقط (O) الى وقف متناسق للنشاط النسخى لجميع الجينات التركيبية فى الاوبرون.

٥- يبدأ النسخ عند منطقة البروموتور التى تسبق منطقة المشغل والتى تقع الى اليسار منها ، حيث يرتبط إنزيم بلمرة ر ن أ بهذه المنطقة لبدء النسخ.

٦- يتم نسخ الإوبرون كوحدة نسخية كبيرة مكونة من جزئ RNA متعدد السيسترونات Polycistronic mRNA بحيث يشتمل على جميع مناطق الجينات التركيبية معا بدلا من ان يتم النسخ على مستوى كل جين تركيبى على حدة إلا أنه عند الترجمة تتم ترجمة كل جين تركيبى مستقلا الى بروتين محدد.

تركيب اوبرون اللاكتوز Lac Operon:

تتكون الوحدة النسخية لأوبرون اللاكتوز من ثلاث جينات تركيبية وهى على الترتيب من اليسار الى اليمين:

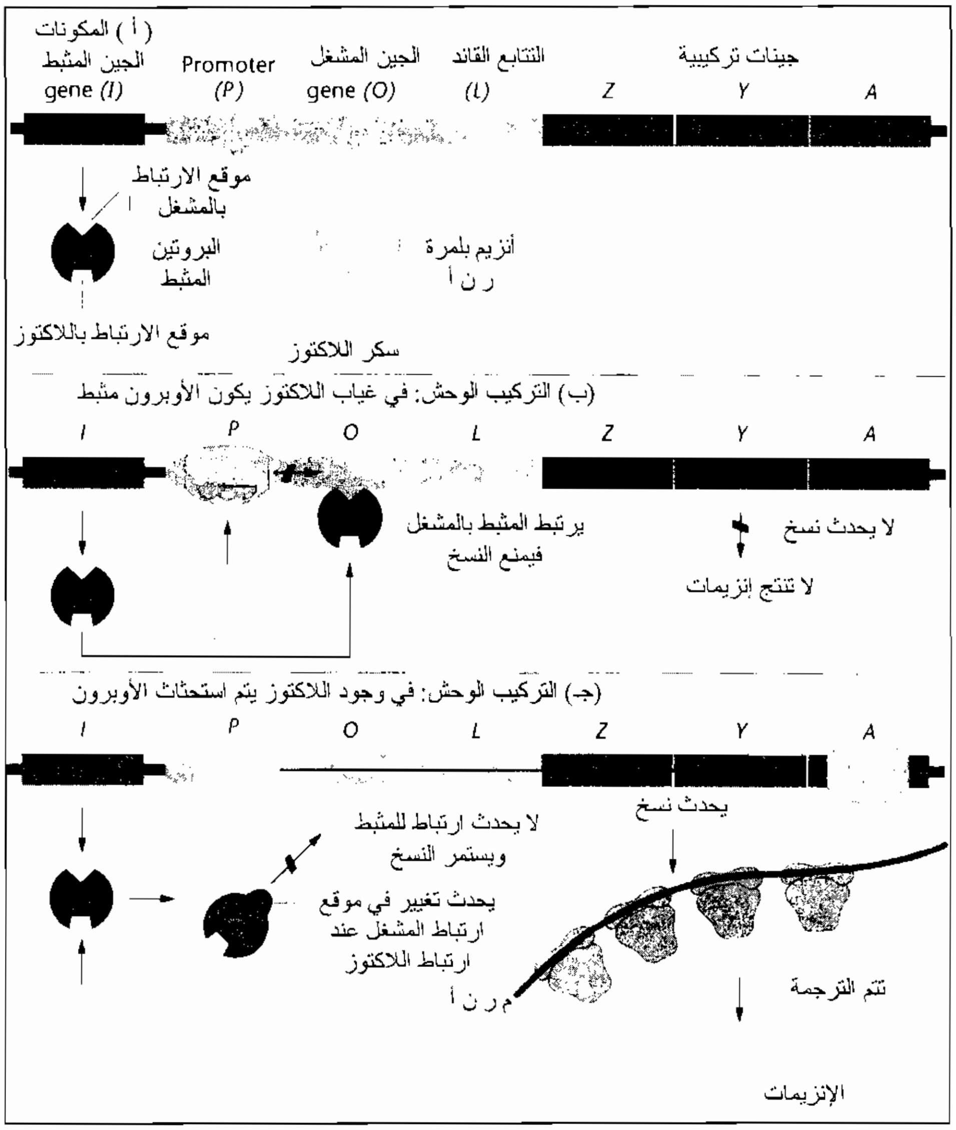
الجين z : ويتحكم فى انتاج انزيم بيتا جلاكتوسيديز ß-Galactosidase.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

والجين y : ويقوم بانتاج انزيم Lac Permease عند الترجمة.
والجين a : وينتج انزيم Transacetylase عند الترجمة.

ويتم نسخ جينات هذه الانزيمات الثلاثة معا فى وحدة نسخية واحدة يطلق عليها أوبرون اللاكتوز. ويوجد الجين المنظم (i) الذى ينتج البروتين التنظيمى المثبط Repressor Protein الى اليسار من مجموعة الجينات التركيبية ، يليه منطقة البروموتور (P) التى ترتبط بها انزيم بلمرة ر ن أ ثم منطقة المشغل (O) الذى يرتبط به البروتين المثبط كما فى الشكل (١٠-١٠).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٠-١٠): مكونات أوبرون اللاكتوز Lac Operon وتأثير وجود أو غياب سكر اللاكتوز على إستحثاثه Induction

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الأدلة الوراثية لإثبات نموذج الاوبرون:

Genetic Proof of The Operon Model:

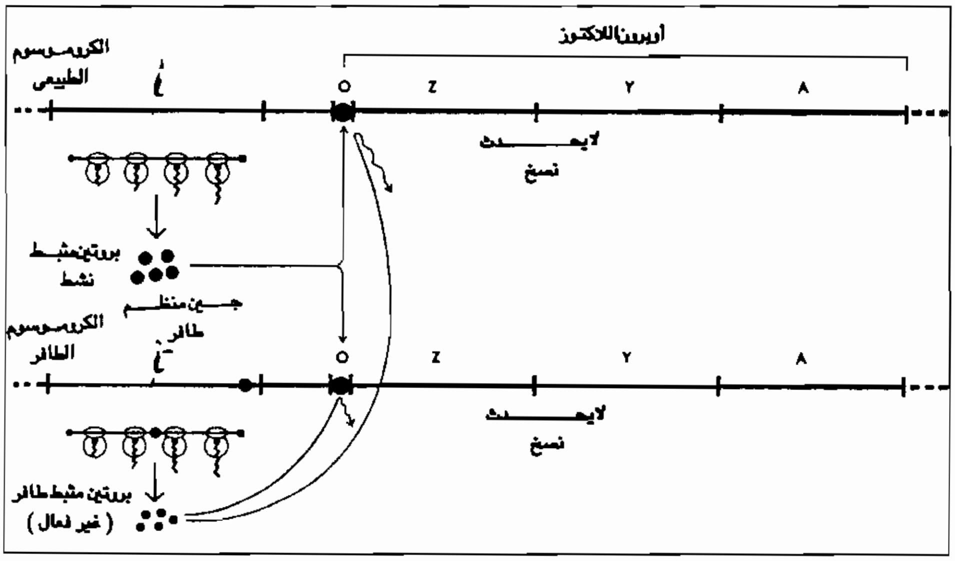
١- طفرات فى الجين المنظم (i) Regulatory Gene:

تؤثر الطفرات التى تحدث فى الجين الخاص بإنتاج البروتين المثـبط (i) على القدرة على التحكم فى تعبير أوبرون اللاكتوز ، وقد ساعدت هذه الطفرات بشكل كبير فى استنباط نموذج الاوبرون.

أمكن التعرف على عدة انواع من الطفرات التى تحدث فـى الجـين i : ومنها الطفرة (i^-) حيث يصبح الجين غير قادر على انتاج بروتين مثبط فعـال. ويتم ذلك إما بطفرة تغيير القاعدة الواحدة أو طفرة حذف Deletion فـى هـذا الجين. وتؤدى طفرة الحذف فى الجين i الى غياب البروتين المثبط بالكامل فـى حين تؤدى الطفرات الاخرى الى انتاج بروتين مثبط غير فعال بحيث لا يتمكن من الارتباط بقرين المثبط الخاص به وبالتالى لا يمكنه ان يأخذ الشكل النشط فى التثبيط .أى لا يمكنة الارتباط بالتتابع النيوكلتيدى الخاص بـه علـى المـشغل. ويؤدى حدوث الطفرة -i الى انتاج جميع انزيمات الاوبرون بصرف النظر عن الاحتياج اليها من عدمه ويقـال لهـذه الطفـرات بانهـا طـافرات تأسيـسية Constitutive Mutations. ويبين الشكل (١٠-١١) كيف امكن استخدام خلايـا بكتيريه ثنائية جزيئا Partial Diploid بالنسبة للكروموسوم البكتيرى وبتركيـب (i/i-) لبيان ان وجود أليل واحد من الجين i يكون سائدا على الأليل الطـافر -i حيث وجد انه فى هذه الحالة لن تتكون اى كميـة مـن جزيئـات انـزيم بيتـا جلاكتوسيديز ß-Galactosidase فى هذه الخلايا فى غياب اللاكتوز فى البيئة ، حيث ان وجود نسخة واحده من الأليل الوحشى i سيؤدى الى انتاج كمية كافيـة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

من البروتين المثبط للقيام بتثبيط كلا الموقعين للمشغل في الكروموسومين ويطلق على الجين i الذى ينتج بروتين مثبط قابل للانتشار Diffusable بانه ذو تأثير عابر Trans-Acting. من جهة اخرى توجد طفرة اخرى يطلق عليها i^s حيث تؤدى الى تثبيط فائق للاوبرون Super Repression نتيجة لأن الطفرة أدت الى تغيير دائم في منطقة ارتباط البروتين المثبط بسكر اللاكتوز (Inducer) بحيث يظل المثبط الطافر مرتبط بقوة بالمشغل حتى في وجود فائض من اللاكتوز.



الشكل (١٠-١١): استخدام تركيب ثنائى جزئى فى كروموسوم البكتريا لاثبات ان وجود مثبط واحد فعال يكون سائد على وجود مثبط غير نشط. لا تنتج أى كميات من انزيمات الاوبرون فى هذه الحالة

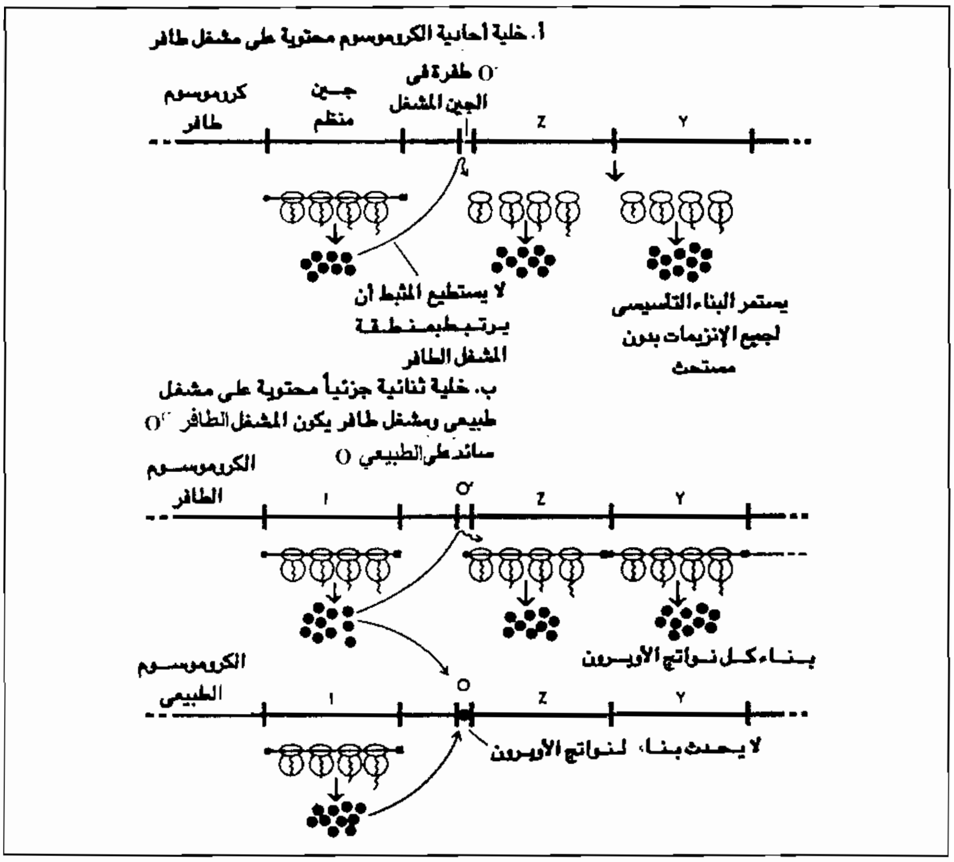
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢- طفرات فى الجين المشغل Operon(O):

أمكن عزل سلسله من الطافرات التأسيسية Constitutive Mutations فـــى هذا الجين بحيث تفقد القدرة على التحكم فى انتاج الانزيم الذى يـستمر انتاجـة بصرف النظر عن وجود المستحث Inducer من عدمه.

وعند تحديد موقع تلك الطفرات تبين ان عددا منها كان متجمعا بـــالقرب من الجين Z فى منطقة المشغل . وقد اطلق على هـــذه الطـــافرات التأسيـسية Operator Constitutive Mutations (O^c). وقد وجد انها قد فقدت القدرة علـــى الارتباط بالبروتين المثبط ، بحيث لا يمكن وقف عمليـــة النـــسخ فـــى الوقـــت المناسب . وقد تم التأكد من ذلك بمقارنـــة مـــا يحـــدث فـــى الخلايـــا أحاديـــة الكروموسوم Haploid والثنائية الجزئية Partial Diploid والخليطه بالنسبة لهذا الموقع اى بتركيب (O/O^c) كما فى الشكل (١٠-١٢) حيث تبين انه فى الخلايا الأحادية كانت الطفرة التأسيسية O^c فعاله بحيث منعت ارتباط المثبط بالمـــشغل مما أدى الى استمرار إنتاج إنزيمات الأوبرون فى غياب المستحث (اللاكتـــوز) أما فى حالة الخلايا الثنائية جزئيا بتركيب (O/O^c) فقد وجد أن الأليل O^c كـــان سائدا على O بحيث تغلبت الطفرة O^c على الأليل الوحشى O وجعلت فى امكان الخلية الثنائية الجزئية ان تستمر فى انتاج الانزيمات الثلاثة للأوبرون بـــالرغم من غياب المستحث (قارن ما يحدث بالنسبة للتركيب O^c/O بما يحدث بالنـــسبة للتركيب (-i/i)).ويدل ذلك على ان منطقة المشغل من النوع Cis-Acting وليس بمقدورها انتاج أى منتج ينتشر Diffusible.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٠-١٢): تنظيم النسخ فى أوبرون اللاكتوز بالمشغل الطبيعى والطافر لمنطقة المشغل (Oc/O)

٣- طفرات فى الجينات التركيبية Structural Genes:

أمكن عزل طفرات عديمة المعنى لكل من الجينات التركيبية الثلاثة لأوبرون اللاكتوز وقد تبين ان تتابع مواقع هذه الجينات على الكروموسوم البكتيرى من اليسار إلى اليمين هو z-y,a. بينت الطفرات عديمة المعنى فى الموقع z أن تأثيرها لن يقتصر على وقف انتاج الانزيم المسئول عنه فقط وهو

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

بيتا جلاكتوسيديز ß-Galactosidase ولكن تاثيرها سيمتد ليشمل تعبير الجينـــان التاليان a,y بحيث يتوقف انتـــاج انزيمـــى Transacetylase, Permease علـــى الترتيب فى حين لو حدثت الطفرة فى الموقع y فقط فان التأثير المانع سيـــشمل الجين التالى له فى الخريطة الكروموسومية وهو الجين a فى حين لن تؤثر هذه الطفرة على الجين السابق له فى الترتيب أى الجين z فيستمر فى انتاج انزيم بيتا جلاكتوسيديز ß-Galactosidase فى نفس الوقت الذى يتوقف فيه انتاج انزيمـــى Transacetylase, Permease. واذا حدثت الطفـــرة فـــى الجـــين التركيبـــى a فسيقتصر تأثيرها على تعبير هذا الحين فقط فلا ينـــتج انـــزيم Transacetylase ويستمر الجينان الاخران فى انتاج الانزيمات الخاصة بها بدون تغيير. ويطلـــق على هذا النوع من الطفرات اسم الطفرات القطبية Polar Mutation حيث انهـــا ذات اتجاه محدد فى التأثير مما يفترض معه وجود تدرج فى التاثير القطبى فى اتجاه النسخ '3<---'5 وليس العكس. ويعتقد انه كلما اقتربت الطفرة القطبية مـــن تتابع المشغل Operator كلما زاد التأثير القطبي لهذه الطفرة بحيث يقل أو ينعدم تعبير الجينات التالية مباشرة لها ، في حين يقل التأثير كلما كان موقع الطفـــرة القطبية بعيدا عن المشغل. وقد تم تفسير ذلك على أساس أن الجينات الثلاثة يتم نسخها في صورة جزئ mRNA واحد كبير متعدد السيسترونات Polycistronic في الاتجاه القطبي '3 <-- '5 حسب تتابع الجينات z -y-a ، بحيث يكون مـــن الصعب على انزيم البلمرة ر ن أ الاستمرار في النسخ في المنطقة التالية للطفرة القطبية مما يؤدى الى توقف النسخ.

أوبرون التربتوفان Tryptophan Operon:

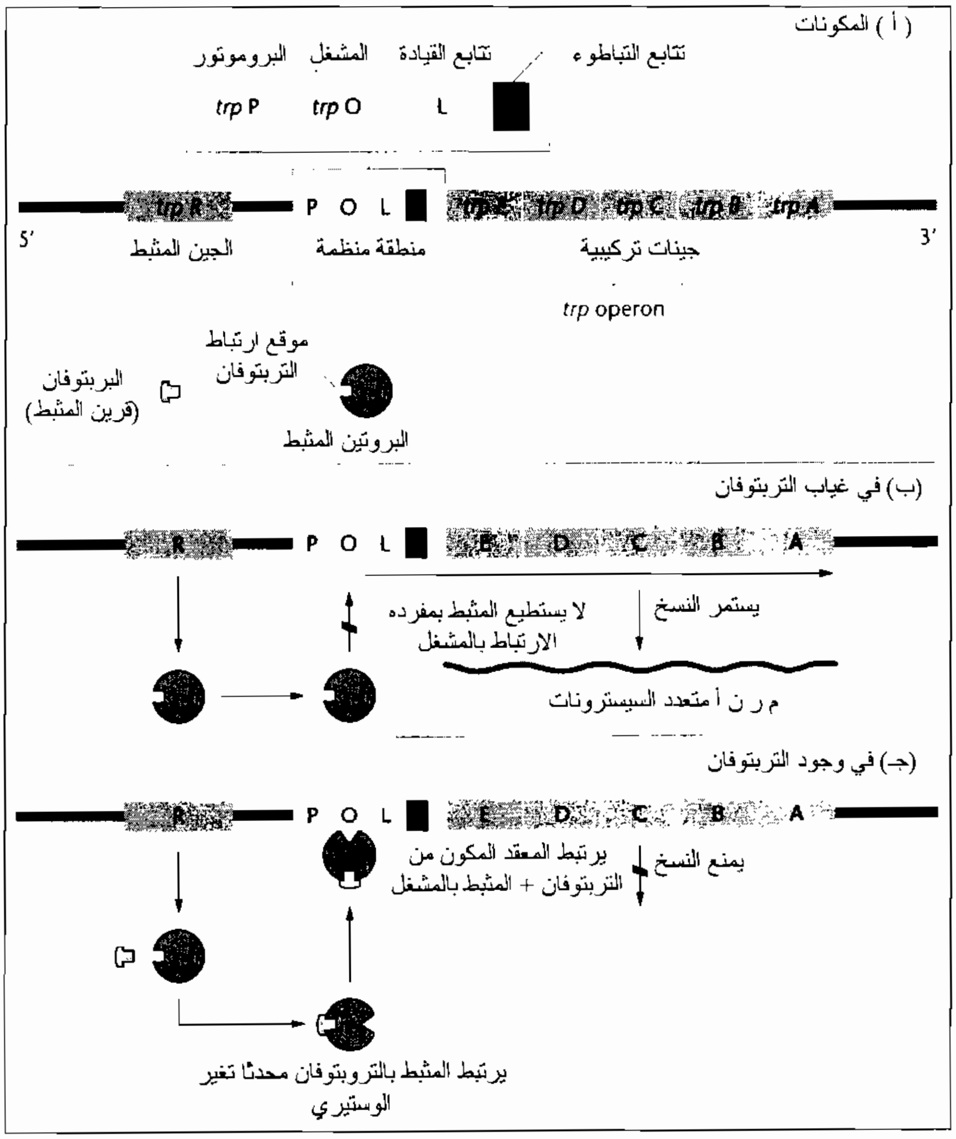
يتكون أوبرون التربتوفان من خمس جينات تركيبيـــة متجـــاورة. ويعـــد أوبرون التربتوفان في بكتريا القولون من النـــوع القابـــل للكبـــت أو التثبـــيط

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Repressible System حيث يتم التثبيط عن طريق الناتج النهـائى End Product لسلسلة الأيض التي يتحكم فيها هذا الأوبرون وهو الحامض الأميني التربتوفـان الذى يعمل هنا كقرين مثبط Co-repressor بحيث يرتبط بالبروتين المثبط الأولي غير الفعال Aporepressor ويحوله الى الصوره الفعالة فينـشط فـي التثبـيط مما يجعله قادرا على الارتباط بمنطقة المشغل وقفل الأوبرون.

تحتاج الخلية الى التربتوفان لبناء البروتين ، وعندما يكـون التربتوفـان متوفر فى البيئة فإن جميع الإنزيمات الخمسة التي تساعد فـي سلـسلة البنـاء الخاصة بالتربتوفان تكون غير متوفرة نتيجة لتثبيط نسخ جميع الجينات التركيبية الخاصة بها . ويعتبر هذا الأمر طبيعيا نظرا لأن جميع الأوبرونات التى تتحكم في انتاج مركب أو جزئ نهائى لا بد ان تكون قابلة للتثبيط عندما يزيـد انتـاج هذا المنتج النهائى عن حدود احتياج الخلية . في حين أن الاوبرونات المـسئولة عن انحلال أو هدم مادة التفاعل (مثل سكر اللاكتوز) لا بد أن تكون من النـوع القابل للإستبداء Inducible عند توفر مادة التفاعل حتى يتسنى تحليل أو هـدم هذه المادة بالإنزيمات التي تنتج عن نشاط الأوبرون.ويبين الـشكل (١٠-١٣) مكونات اوبرون التربتوفان.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١٠-١٣)

أ - **مكونات أوبرون التربتوفان Trp Operon والعناصر المنظمة.**

ب- **إستحثاثه.**

ت- **تثبيط نشاطه.**

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

دور منطقة التبــاطوء Attenuation فــي تنظــيم نــسخ أوبــرن التربتوفان:

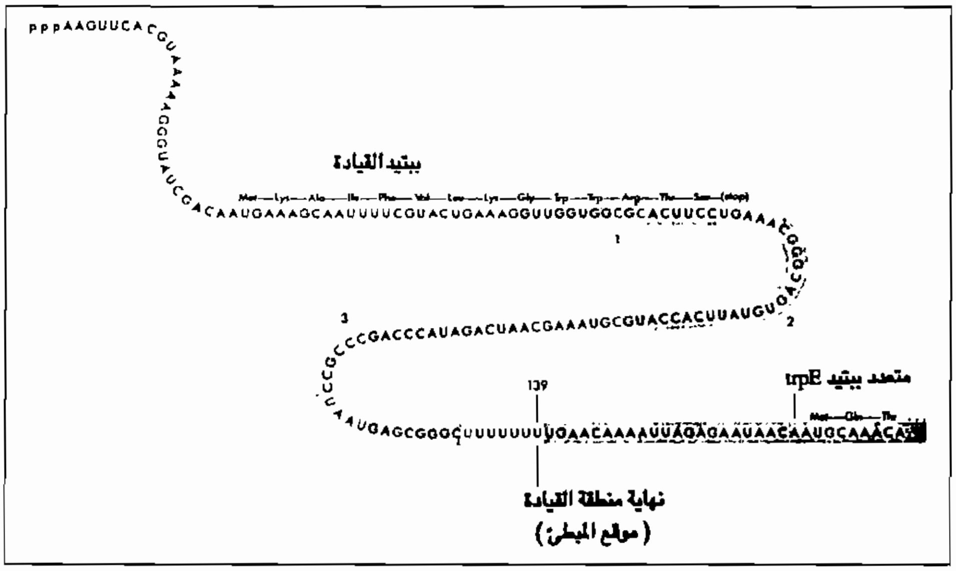
فى البداية كان المفهوم الشائع ان بناء الانزيمات الخمسة فــى أوبــرون التربتوفان يتم تنظيم نسخها بصفة رئيسية عن طريق البروتين المثــبط : وكمــا سبق القول فان الملاحظ هنا أن نسخ الجينــات الخمــس المتجــاورة المكونــة لأوبرون التربتوفان يحدث فقط عندما تكون كمية التربتوفان محدودة جــدا فــى بيئة الخلية البكتيرية.

وعلى ذلك فإن التربتوفان يعمل فى هذه الحالة لــيس كمــستحث للنــسخ ولكنه على العكس من ذلك تماماً ، يعمل كقرين مثــبط Co-repressor بحيــث يكون دوره عبارة عن تنشيط المثبط النوعى الخاص به حتى يمكنه أن يــرتبط بتتابع المشغل لأوبرون التربتوفان. ولذلك فإنه عندما يكون تركيــز التربتوفــان منخفض، نجد أن منطقة المشغل تكون حرة مما يسمح لعمليــة النــسخ لجــزئ mRNA بأن تبدأ من منطقة البروموتور المجاورة.

إلا أنه تبين حديثاً أنه بالاضافة إلى هذا التنظيم المبدئى توجد ميكانيكيــة تحكم اضافية تعمل على تنظيم هذا الأوبرون. إذ وجد أن مجرد بدء بناء جــزئ ر ن أ المراسل mRNA لا يعنى بالضرورة أن عملية البناء هذه ستستمر تلقائياً إلى أن نحصل على جزئ كامل منmRNA بل تبين أن معظم جزيئات mRNA لجينات أوبرون التربتوفان تتوقف عن النمو بعد البداية مباشرة ، وقبل أن يبــدأ حتى نسخ أول جين فى هذا الأوبرون ولا تستأنف النسخ إلا إذا حدث تاكيد ثان وبطريقة أخرى مستقلة بأن التربتوفان غير متوفر في البيئة بالفعل.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وقد تأكد ذلك بتحليل تتابعات النهاية 5' في جزئ mRNA لهذا الأوبرون حيث ظهر أن هناك ١٦١نيوكلتيده فى RNA وتسمى منطقة القيادة Leader Sequence تكون ضمن منطقة البروموتور قبل الوصول إلى أول كودون فى جينTrpE(وهو الجين الأول فى هذا الأوبرون) كما فى الشكل (١٠-١٤). حيث وجد بالقرب من نهاية هذا التتابع وقبل بدء جين trpE تتابع لانهاء النسخ Terminator والذى يأخذ شكل عروه دبوس الشعر المميز فى ر ن أ (ويتكون من التتابعات فى المناطق ٣ ، ٤ في الشكل) ويليه تتابعا مكونا من U8. وعند هذه المنطقة والتى تسمى منطقة الأبطاء Attenuator نجد أن بناء ر ن أ يتوقف عادة (والمفروض أن يتوقف بصفة دائمة ونهائية عند الوصول إلى هذه المنطقة) معطياً سلسلة قصيرة من ر ن أ فيما يعرف بمنطقة القيادة Leaderبطول حوالي ١٣٩نيوكلتيد.



الشكل (١٠-١٤): تتابع النيوكلتيدات في منطقة القيادة Leader لجزئ ر ن أ في أوبرون التربتوفان

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

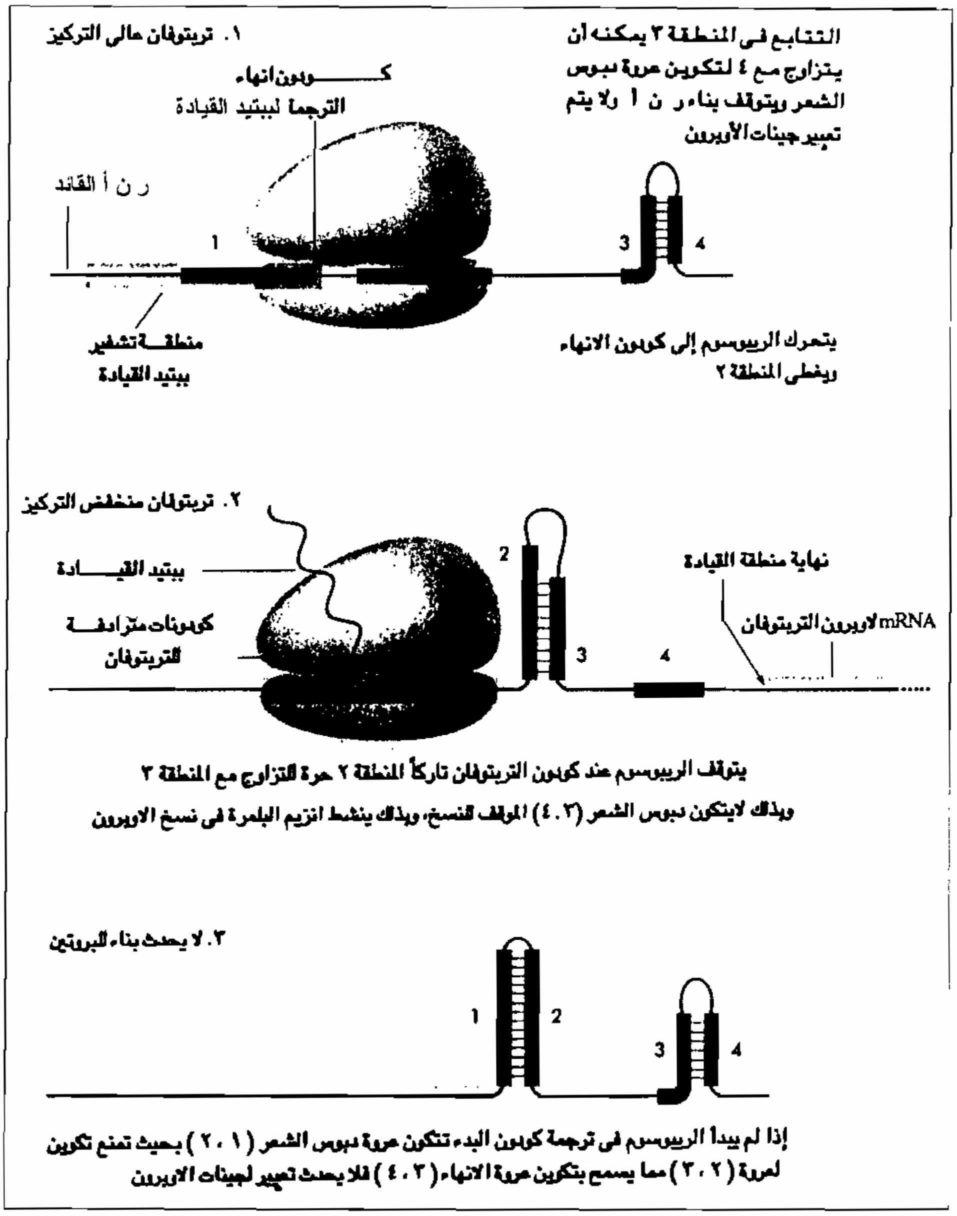
ولكن كيف يتسنى لإنزيم بلمرة ر ن أ تخطى عقبة منطقة المبطئ لاستكمال عملية البناء وخاصة عندما يكون تركيز التربتوفان منخفضاً. تكمن الإجابة على هذا السؤال عند دراسة ثلاث خواص لتتابعات منطقة القيادة :

١- وجود شكل عروة دبوس شعر ثانية بالاضافة إلى عروة دبوس الشعر الخاصة بانهاء النسخ ويمكن أن تتكون هذه العروة الإضافية من تزاوج المنطقة ٢،١في منطقة القيادة Leader كما فى الشكل (١٠-١٥).

٢- أن تتابع القواعد فى المنطقة ٢ يكون متكاملاً مع المنطقة ٣ مما يعطى فرصة لتزاوج هاتين المنطقتين أيضا لتكوين عروة دبوس شعر أخرى مما يحول دون تكوين عروة دبوس الشعر الخاصة بالانهاء (٣/٤).

٣- تختص منطقة Leader من ر ن أ بالتشفير لسلسلة قصيرة من الببتيدات القائدة مكونة من حوالى ١٤ حامض أمينى مسبوقة بموقع ارتباط قوى بالريبوسوم. وجد ان تتابع منطقة القيادة يحتوى على كودونين متتاليين للتربتوفان. وقد تبين أن هذه خاصية مميزة لهذه المنطقة فقد وجد فى أوبرونات أخرى مثل أوبرون الليوسين أن هذه المنطقة النوعية تحتوى على أربعة كودونات مترادفة تشفر لليوسين فى حين يحتوى أوبرون الهستدين على ستة كودونات متتالية للهستيدين فى كل المنطقة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٠-١٥): دور منطقة المبطىء Attenautor فى تنظيم نشاط أوبرون التريبتوفان حسب مستوى تركيز التريبتوفان

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

تبين أن وظيفة هذه الكودونات هى منع الريبوسوم من محاولة الاشتراك فى ترجمة منطقة القيادة Leader. ومعنى ذلك أنه عندما يكون تركيز التربتوفان منخفضاً جداً فى الخلية يكون مقدار trp-tRNA ^{trp} منخفضاً جداً مما يحتم على الريبوسوم أن يتوقف عندما يصل إلى كودون التربتوفان فى منطقة القيادة ويظل mRNA حول كودون التربتوفان مرتبطا بالريبوسوم وبالتالى لا يمكنه الدخول فى تكوين عروه دبوس الشعر للإنهاء (٣/٤) ويبين الشكل (١٠-١٥) النتائج المترتبة على ذلك. حيث يكون الريبوسوم مقيداً بكودون التربتوفان فى مكان يسمح بأن تظل المنطقة ٢ حرة للإرتباط بالمنطقة ٣ أويؤدى هذا بدوره إلي عدم إمكان تكوين عروه دبوس الشعر الخاصة بالانهاء (٣/٤) مما يسمح لإنزيم بلمرة ر ن أ بعبور منطقة المبطئ إلى الأوبرون ويتم نسغ جينات هذا الأوبرون. ولكن إذا حدث من جهة أخرى أن توفرت كميات كبيرة من التربتوفان فى البيئة ، وبالتالى ارتفع مقدار جزيئات trp-tRNA ^{trp} مما يسمح للريبوسوم بالتحرك خلال كودون التربتوفان ، فإن الريبوسوم سيشغل منطقة التتابع ٢ مما يسمح بتكون عروة دبوس الشعر الخاص بإنهاء النسخ (٣/٤) وبالتالى يتوقف النسخ عند نهاية منطقة القيادة فى جزئ mRNA. هناك احتمال آخر وهو أن الترجمة قدتتوقف قبل كودون التربتوفان (وذلك نظراً لندرة أحد الأحماض الأمينية الأخرى) أو قد تفشل فى البدء بالمرة مما يؤدى الى أن يصبح التتابع ١ حراً لكى يتزاوج مع التتابع ٢ وبالتالى تتكون عروة دبوس شعر الإنهاء (٣/٤) التى تؤدى إلى إيقاف عملية تعبير الجينات فى هذا الاوبرون.

يعتقد أن أهمية منطقة القيادة فى جزئ mRNA ترجع فقط إلى أنها تضع الريبوسوم فى المكان المناسب أثناء عملية الترجمة لهذه المنطقة نفسها. ومما يؤكد هذا الدور الفريد ان ببتيد القياده يتم تحليله انزيميا بعد ذلك مباشرة.

من الممكن ام يكون وجود كلا من ميكانيكتى التحكم بـــالتثبيط والابطـــاء يؤديان الى السماح فقط بحدوث النشاط النسخى حسب المستوى الذى يتوفر فيــه التربتوفان فى الخليه بحيث يحتاج الأمر الى خطوتين للاستجابة حسب تــصاعد درجة الاحتياج الى التربتوفان. إذ تحدث الاستجابة المبدئية المتمثله فى توقــف ارتباط البروتين المثبط بمنطقة المشغل. وعندما تدعو الحاجة الى انتاج المزيــد من التربتوفان فان الخطوة الثانية تؤدى الى الاسترخاء فى نظام الابطاء. وقــد تبين ان بعض نظم الأوبرون الأخرى مثل أوبـــرون الهـــستيدين His Operon وأوبرون الليوسين Leu-operon تعتمدان اساسا على نظام الأبطاء ولا يحتـــوى أى منهما على نظام البروتين المثبط.

وعلى ذلك فان تنظيم إنتاج التربتوفان يتم على ثلاث مستويات وهى:

١- Repressor/Operator.

٢- Attenuation.

٣- Feedback Inhibition.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفصل الحادي عشر

تنظيم التعبير الجينـي في مميزة النواه

عندما اكتشف جاكوب ومونود Jacob and Monod نظام الأوبرون لتنظيم التعبير الجيني في بكتريا القولون عام ١٩٦٠ اتجهت الأنظـار الـى محاولـة إكتشاف نظام مقابل لتنظيم التعبير الجيني في مميزة النواه. وعلى الرغم من أن بعض سمات تنظيم التعبيرالجيني في أوبرون اللاكتوز يمكن أن تكون موجـودة في مميزة النواة الا انه من الواضح أن خلايا مميزة النواة قد كونت نظام أكثـر تعقيدا لتنظيم التعبير الجيني.

ومعروف أنه في مميزة النواه متعددة الخلايا يمثل تنظيم التعبير المتغـاير Differential Regulation لب التمايزالخلوي والوظيفي. إن السؤال الاساسى هو كيف يتمكن الكائن من تفعيل التعبير الجيني لمجموعة معينة من الجينـات فـي نوع معين من الخلايا في حين يعطي الأمر لمجموعة أخرى من الجينات لكـي تنشط في التعبير الجيني في نوع اخر من الخلايا .ففي حين نجد أن مجموعـة من الجينات تنشط في أنسجة أو خلايا معينة فمثلا نجد أن هناك مجموعة مـن الجينات التي تنشط في التعبير في الخلايا العصبية الا انها تكون مثبطة (ساكتة) في خلايا البنكرياس التي ينشط بها مجموعة مختلفة تماما من الجينـات ونفـس

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

لشئ يحدث في خلايا الدم وهكذا. يطلق على التخصص بين الخلايا المختلفة لتنظيم المكانى Spatial Regulation أو "جين في المكان" .gene–in–site. ومن جهة أخري نجد أن هناك مجموعة من الجينات يتم تنظيمها حسب مراحل نمو وتمايز الكائن من مرحلة الخلية الزيجوتية الى مرحلة النضج ويطلق على هذا لنوع من التنظيم اسم التنظيم الزماني Temporal أو "gene- in- time".

ومن ناحية أخرى تبين أن هناك جينات يتم تنظيم تعبيرها بسبعض لاشارات البيولوجية مثل الهرمونات أونتيجة لمحفزات بيئية مثل الحرارة والضوء وسوف نتعرض ذلك بالتفصيل فيما بعد.

وهناك عوامل كثيرة تساعد على فهم الطبيعة المعقدة لتنظيم التعبير لجيني في مميزة النواه عنها في غير مميزة النواه:
تحتوي خلايا مميزة النواة على مقادير أكبر بكثير من المعلومات الوراثية عن تلك الموجودة في مميزة النواة كما أن د ن أ يكون مرتبط بالهستونات وغيرها من البروتينات في صورة معقدات لتكوين الكروماتين، ويعتبر تركيب لكروماتين ، سواء المفتوح (غير المتحلزن) و الذى يكون معرضا للنسخ أو في لصورة المقفولة (متحلزن) و الذي يكون غير قابل للنسخ، من العوامل الهامة فى تنظيم تعبير الجين.

حيث أنه في مميزة النواه تكون عملية النسخ منفصلة في المكان و الزمان عن الترجمة بحيث يحدث النسخ فى النواة فى حين تتم الترجمة في مرحلة لاحقة في السيتوبلازم و بذلك فإنه يتحتم على م.ر.ن.أ. أن ينتقل من النواة الى السيتوبلازم لكي يستخدم كقالب لبناء البروتين.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

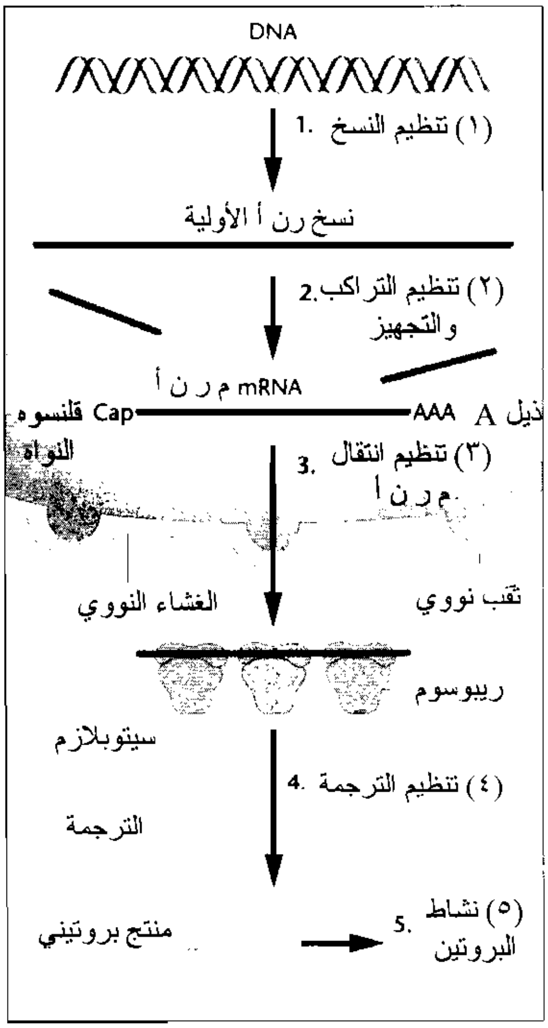
يـــتم تجهيزنـــسخ ر ن أ وتقليـــل حجمهـــا (طولهـــا) قبـــل نقلهـــا الـــى السيتوبلازم.

يتميز م.ر.ن.أ. فى مميزة النواه بأنه أطول بكثير فى فترة منتصف العمر ($t_{1/2}$) عن نظيرة فى غير مميزة النواه. بحيث اذا حدث قفل لعملية النـسخ فـى غير مميزة النواه فإن م.ر.ن.أ يتحلل فى دقائق قليلة وتتوقف الترجمـــة بينمـــا لا يحدث ذلك عادة فى مميزة النواه.

تتميز معظم الكائنات مميزة النواة الراقية بنوعيات خلايا متمايزة. والتـــى تستخدم مجموعات مختلفة من الجينات المتداخلة Overlapping لتكوين بروتينات مختلفة بالرغم من أن كل خلية تحتوى على المجموعة الكاملة من الجينات.

وكنتيجة لهذة العوامل، فإن التعبير الجينى فى مميزة النواة يمكن أن يـــتم التحكم فيه وتنظيمة بطرق عديدة وفي مراحل مختلفة (الـــشكل ١١-١) والتـــى تشمل التنظيم أثناء: (١) النسخ (مثل مل يحدث فى غير مميـــزة النـــواه)، (٢) تجهيز وتراكب Splicing لنسخة م.ر.ن.أ. الأولية والذى يشار الية بتنظيم ما بعد النسخ Post Transcriptional لكى يصبح فى الصورة الفعالة ،(٣) انتقال م ر ن أ من النواة الى السيتوبلازم ، (٤) الترجمة (أى اختيار أى مـــن م ر ن أ ســـتتم ترجمته) ، (٥) تعديل البروتين المترجم لكى يـــصبح فـــى الـــصورة الفعالـــة وظيفيا.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١١-١): المستويات المحتملة للتنظيم أثناء مراحل التعبير الجينى

وقبل ان نتطرق الى دور كل من هذه العوامل فى تنظيم التعبير الجينـــى يجدر بنا أن نشرح ببعض التفصيل مفهوم كل مـــن التنظـــيم المكـــانى Spatial

والزمانى Temporal لتعبير الجين نظرا للدور الهام لذى يلعبه كل منهما فى تمايز ونمو خلايا الكائنات ميزة النواة.

أولاً: التنظيم المكانى Spatial Regulation (Gene-in-Site):

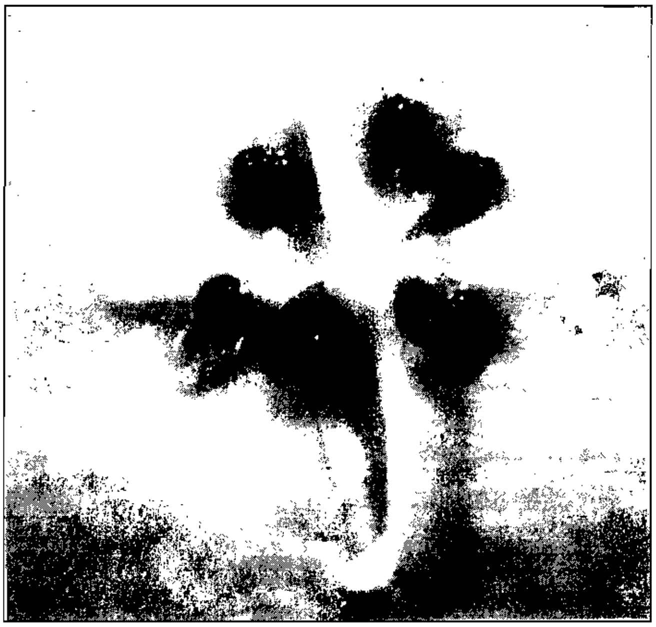
تعطى جينات التيوبيولين Tubulin فى نبات الأرابيدوبسيس Arabidopsis مثالا واضحا للتنظيم المكانى حيث تمثل بروتينات التيوبيولين الوحدات البنائية للأنابيب الدقيقة (الخيوط) Microtubules في الخلية. ويوجد نوعلن رئيسيان من هذه البروتينات α ، β وتدخل هذه البروتينات فى تكوين الشعيرات Cilia والأسواط Flagella كما أنها توجد فى كثير من الأماكن داخل الخلايا فى السيتوبلازم وحول الغلاف النووى وفى أماكن متخصصة تسمى مراكز تنظيم الميكروتيوبيوليز (MOC) وتلعب هذة البروتينات دورا هاما فى حركة الخلايا حيث تقوم الأسواط والأهداب بالانقباض والانبساط لمساعدة الخلية على التحرك من مكان الى اخر. وفي داخل الخلايا تكون هذة الخيوط مسئولة عن حركة الكروموسومات أثناء الانقسام الميتوزي.

ويشفر لكل من α و β تيوبيولين مجموعاات محددة من الجينات تختص كل مجموعة بأحد هذين النوعين. فمثلا في نبات Arabidopsis يوجد ستة جينات α و ٩ جينات βتيوبيولين وعند عزل بعض هذة الجينات ومتابعة تعبيرها وجد ان كل جين يتم تعبيره بطراز مكاني Spatial نوعي.

فقد وجد مثلا أن الجين TUA1 والذي يشفر لنوع مختلف من α تيوبيولين يتم تعبيرة تفضيليا في حبوب اللقاح (الشكل ١١-٢) كما يحدث بعض التعبير أيضا في المتك ولكن لا يحدث أي تعبير بالمرة في الأوراق أوالسيقان أو الجذور. وعلى العكس من ذلك ، وجد أن TUB1 يتم تعبيرة فقط في أجزاء من

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجذور التي تلي مباشرة القمة النامية للجذر. ومن جهة أخري وجـد ان جـين TUB8 يتم تعبيره في الحزم الوعائية للنبات فقط. وتدل هدة الإختلافـات فـي التعبير الجيني على تنظيم مكاني نوعي في التعبير الجيني في الأنسجة المختلفة حسب احتياج النبات.



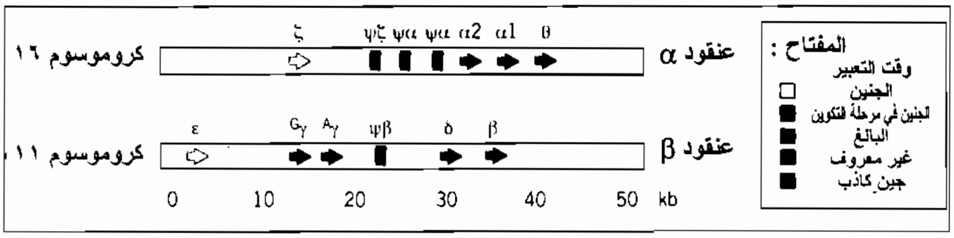
الشكل (١١-٢): أزهار نبات الارابيدوبس تم صبغها لتحديد مكان تعبير جين Gus المرتبط ببروموتور خاص بجين TUA1 الفاتيوبيولين حيث إقتصر التعبير على المتك فقط مما يؤكد مفهوم gene -in-site

ثانيًا: التنظيم الزماني (gene-in -time) Temporal Regulation:

تعتبر مجموعة جينات الهيموجلوبين أفضل مثال للتنظيم الزماني للتعبيـر الجيني. ويتكون بروتين الجلوبين من أربعة سلاسل ببتيدية، اثنتان منهـا مـن نوع سلاسل α واثنتان منها من النوع β. وفي الجينوم البشري يوجد مجموعـة من الجينات المتعددة لكل من β و α جلوبين موزعة على النحو التالي:

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

توجد جينات α جلوبين على الكروموسوم رقم ١٦ ومكونة من ٢٨ كيلو قاعدة في حين تقع جينات β جلوبين على الكروموسوم رقم١١ ومكونة من ٤٥ كيلو قاعدة (الشكل ١١-٣) ووجد أن الجينات المكونة لكل عنقود Cluster عبارة عن تكرارات لجين جلوبين أصلي Ancestral بحيث تكون عائلة صغيرة من الجينات المتعددة Multigene Family. وعلى مدار مراحل التطور انفصلت وتنوعت هذه المجموعة من الجينات عن بعضها نتيجة لحدوث طفرات عشوائية في كل منها بحيث أصبح كل منها حاليا يشفر لسلسلة مختلفة قليلا. وفي بعض من هذة الجينات المتكررة ، أدى حدوث طفرات تحريك الاطار Frame Shift أوطفرات إنهاء الترجمة Chain Termination الى انعدام قدرتها على تكوين سلاسل ببتيدية. ويطلق على مثل هذة المجموعة الأخيرة من الجينات "الجينات الكاذبة Pseudogenes" ويرمز لها فى الشكل أعلاه بالرمز(ψ).



الشكل (١١-٣): تأكيد مفهوم تنظيم التعبير الجينى المرتبط بمراحل التمايز gene-in-time فى جينات β جلوبين البشرية.

ومن الخصائص الهامة لكل من مجموعتي جينات α و β أن تعبيرها يتم على مراحل زمنية مختلفة حسب تكوين ونمو الفرد بحيث يقتصر تنشيط التعبير الجيني لمجموعة الجينات في أحد الجوانب (الأيسر) على مرحلة الجنين Embryo في حين يتم تعبير الجينات التي تقع في المنطقة الوسطى للترتيب في مرحلة نموالجنين Fetus أما الجينات الواقعة على الجانب الآخر (الأيمن) فإن

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تعبيرها يبدأ فقط بعد الميلاد Post-Natal. ويبدو أن هذا التنشيط المتتابع للجينات من جانب الى أخر في المجموعة مرتبط بالحاجة الى انتاج أنواع مختلفة قليلاً من الهيموجلوبين أثناء أطوار النمو والتمايز حيث يحتاج الجنين Embryo والجنين النامى Fetus والطفل الوليد الى متطلبات اكسوجينية مختلفة حسب اختلاف النمو فى الاجهزة الدورية لكل منها وحسب اختلاف البيئة التي يتكون وينمو فيها كل منها. ويبدوأن اختلاف التوقيتات الزمنية لتنظيم بدء تنشيط تعبير جينات الجلوبين عبارة عن موائمة وتكيف مع الظروف المتغيرة التي تحدث في هذة المراحل المختلفة.

عوامل النسخ: Transcription Factors (T.F):

على العكس من البكتريا والتي يحتاج فيها البروموتور (المستبديء) الى أعداد قليلة نسبيا من البروتينات لتنظيم النسخ (سواء بروتينات مثبطة Repressors أومنشطة Activators) نجد أنه في مميزة النواه تكون هناك حاجة ماسة الى اشتراك عدد أكبر من البروتينات التنظيمية التي تؤدي دورا متناسقا في تنظيم عملية النسخ. كما أن عملية التنظيم هذه تكون أكثر تعقيدا نظرا لأن الجينات تكون موجودة داخل النواة . ولكي تشارك هذه الجينات في عملية النسخ فلا بد أن يتم ارسال اشارات بيئية (مثل الضوء او الحرارة) أو بيولوجية (الهرمونات) من خارج الخلية لتمر من الغشاء البلازمي الى السيتوبلازم ومنه الى الغلاف النووي ثم الى النواه لتصل في النهاية الى الكروموسومات أي أن خلايا مميزة النواة تحتاج الى نظم اشارية Signals داخلية للتحكم في نسخ د ن أ. كما أن هناك مشكلة اخرى وهي أن معظم مميزة النواة متعددة الخلايا مما يحتم على الإشارات البيئية أن تمر من خلال طبقات من الخلايا حتى يكون

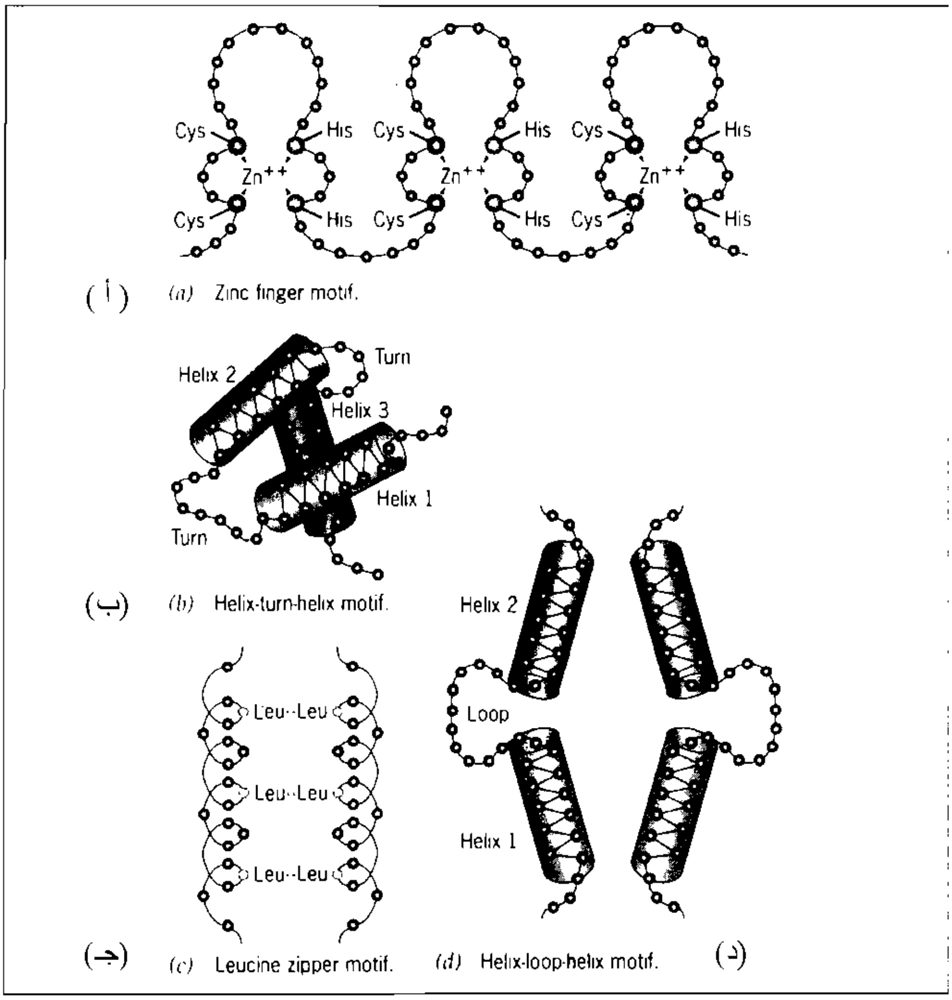
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

لها تأثير على عملية نسخ الجينات في نسيج معين . وعلى ذلك فإنة لابـد مـن وجود نظم اتصالات بين الخلايا وبعضها ليتم تنظيم التعبير الجيني.

وكما يحدث قي غير مميزة النواة، فإن تنظيم النسخ فـي مميـزة النـواة يشتمل على تفاعل بين بروتينات نوعية وبين د ن أ، وترتبط بروتينات تنظيمية موجبة أوسالبة مع تتابعات نوعيـة مـن د ن أ (فـي البرومـوتـور Promotor والمحفز Enhancer والمسكت Silencer) كما سيأتي ذكرها فيما بعد، مما يؤدى الى تثبيط أو تحفيز النسخ. ويطلق علـى هـذه المجموعـة مـن البروتينـات المتخصصة اسم عوامل النـسخ Transcription Factors (TF) وتتميـز هـذه البروتينات باحتوائها على نطاقين كيماويين هامين على الأقـل وهمـا نطـاق الارتباط مع د ن أ ونطاق تنشيط النسخ وقد تحتل هذة النطاقات اجزاء مختلفـه من جزئ البروتين أو قد تكون متداخلة المواقع. ويبدو أن هناك تفاعلا فيزيائيـا يحدث بين عوامل النسخ. فقد يتلامس أحد عوامل النسخ المرتبط بالمحفز أو مع تلك المرتبطة بالبروموتور ومن خلال هذه الاتصالات والتفاعل بينها فإن نطاق تنشيط النسخ فى TF يؤدي إلى إحداث حدوث تغيرات فى الأشـكال التركيبيـة للبروتينات المتجمعة ممهدة الطريق لإنـزيم بلمـرة ر ن أ RNA Polymerase لبدء النسخ. وتحتوى كثير مـن عوامـل النـسخ علـى خـصائص تركيبيـة مميزه والتى تنتج من الارتباط بـين الاحمـاض الأمينيـة Structural Motifs المكونة لسلاسل متعددة الببتيد. وأحد هـذه التركيبـات هـو أصـابع الزنـك Zink Fingers وهو عبارة عن عروة مكونة من سلسلة ببتيـد قـصيرة والتـى تتكون عندما يرتبط حامضين من السستين فى جزء وحامضين من الهستيدين فى جزء قريب مع أيون من الزنك ، مما يؤدى الى بروز جزء ببتيدى بين زوجـى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الأحماض الامينية مما يعطى شكل الأصبع (الشكل ١١-٤-أ) وقد تبـين مـن تحليلات الطفرات أن هذه الأصابع تلعب دورا هاما فى الارتباط مع د ن أ.



الشكل (١١-٤): طرز التركيبات المختلفة فى الأنواع المختلفة من عوامل النسخ

أ - طراز إصبع الزنك فى عامل النسخ SP1 فى الثدييات.

ب- حلزون ــ لفة ــ حلزون. جـ- سوستة الليبوسين.

د - حلزون ــ عروة ــ حلزون.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويوجد تركيب آخر فى كثير من عوامل النسخ ويطلق عليه (حلـزون – لفه – حلزون) helix-turn-helix ، والمكون من ثلاث حلزونات قـصيرة مـن الأحماض الأمينية مفصولة عن بعضها بلفات (الشكل ١١-٤-ب). وقد بينـت التحليلات الوراثيــة والبيوكيماويــة أن القطعــة الحلزونيــة الأقــرب للنهايــة الكربوكسيلية تكون مسئولة عن الارتباط بجزئ د ن أ بينما تـدخل الحلزونـات الاخرى فى تكوين ثنائيات بروتينية.

كما يوجد تركيب ثالث يسمى "سوسته الليوسين" Leucine Zipper ويتكون من سلسلة من الاحماض الامينية بحيث يكون كل حامض سابع فى السلسلة هـو الليوسين (الشكل ١١-٤-ج) ويسمح هذه التركيب بتكوين ثنائيــات Dimmers من خلال التفاعل بين جزيئات الليوسين فى كل من مناطق الـسوسته. وتكـون تتابعات السوسته فى العادة مجاوره لمجموعة من الاحماض الامينيــة الموجبــة الشحنة. وعندما تتفاعل سوستتان ، فإن هذه المناطق المشحونة تبرز للخارج فى اتجاهين متضادتين مكونه سطحاً يمكنه الارتباط بجزئ د.ن.أ سالب الشحنة.

والتركيب الرابع الموجود فى بعض عوامل النـسخ يـسمى (حلـزون – عروة – حلزون helix- loop- helix) ويتكون من منطقتـين حلـزونيتين مـن الأحماض الامينية يفصلها عروة غير حلزونيــة (الـشكل ١١-٤-د) وتـسمح مناطقه الحلزونية بتكوين الثنائيات بين سلسلتى متعدد الببتيد وقد يتواجـد هـذا التركيب بالقرب من سلسلة من الاحماض الامينية موجبة الشحنة وعندما تتكون الثنائيات Dimmers فإن هذه الاحماض الامينية يمكنها الارتبـاط بجـزئ د.ن.أ سالب الشحنة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

البروموتور والمحفز Promoter and Enhancer:

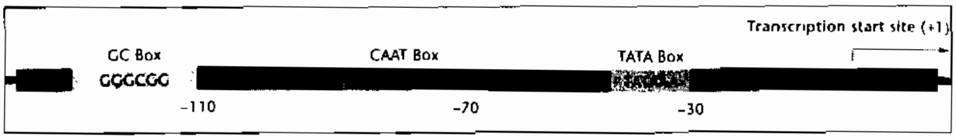
وهما عبارة عن مناطق تتابعات من د.ن.أ Cis-Acting وليس لها منتج إلا اننا نعرف أن بدء النسخ يتم على البروموتور الخاص بجين معين والذى يتم التعرف عليه بإنزيم بلمرة ر.ن.أ RNA Polymerase II. إلا أنه لكى يتم البدء بدقة لعملية النسخ من منطقة البروموتور فإن الامر يحتاج إلى عدد من البروتينات (عوامل النسخ) كما سبق القول. ويوجد نوعان من عوامل النسخ. فتلك التى ترتبط بتتابعات البروموتور تسمى عوامل النسخ الاساسية Basal Transcription Factors فى حين تلك التى ترتبط بالمحفز يطلق عليها عوامل النسخ الخاصة Special Transcription Factors. وبينما نجد أن نشاط البروموتور يؤدى إلى البدء الصحيح لعملية النسخ Initiation of Transcription نجد أن نشاط المحفز يؤدى إلى زيادة معدلات النسخ Maximization of Rate of Transcription.

البروموتور Promotor:

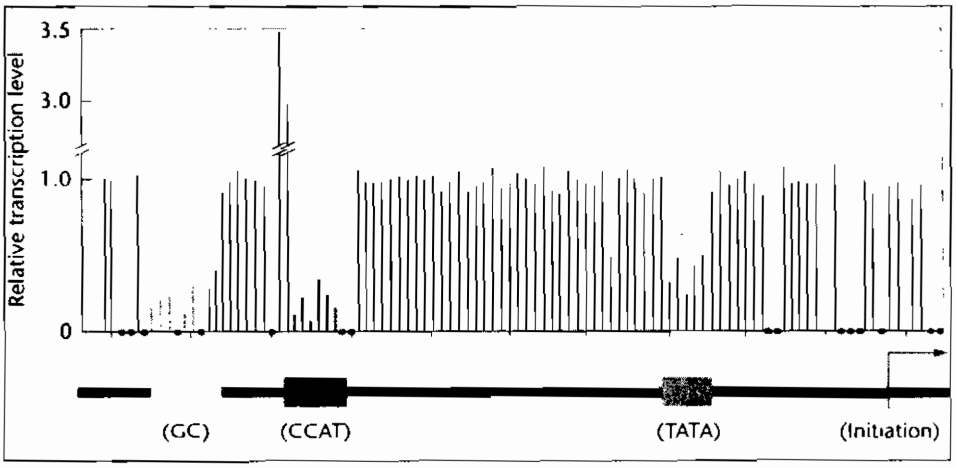
يوجد البروموتور فى منطقة قريبة ومجاورة قبل الجين Upstream الذى يقوم بتنظيم نسخة. ويتكون البروموتور من تتابعات د.ن.أ تقع عادة على بعد حوالى ١٠٠ زوج من القواعد قبل الجين 5'-Upstream (الشكل ١١-٥) وتحتوى المنطقة الرئيسية للبروموتور على تتابع يسمى صندوق TATA تقع على بعد ٢٥-٣٠ زوج من القواعد قبل نقطة بدء النسخ ويرمز لها (-25 to -30) وتتكون من ٨ أزواج من القواعد المحفوظة Consensus مكونة من أزواج من A=T فقط. وتكون محاطة غالباً من الجانبين بمناطق غنية فى G≡C.وقد تأكدت أهمية صندوق TATA بتحليلات الطفرات (الشكل ١١-٦) حيث تبين أن

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

حدوث طفرات داخل تتابع هذا الصندوق يؤدى إلى خفض شديد فى معدل النسخ بينما لا يتأثر النسخ فى المناطق الاخرى المجاورة بالرغم من حدوث طفـرات بها.



الشكل (١١-٥): يشتمل البروموتور عند النهاية '5 لجينات مميزة النواة على تتابعات متخصصة فى عملية النسخ: صندوق TATA (‎-30) وصندوق CAAT(‎-70) وصندوق GC (‎-110)



الشكل (١١-٦): ملخص لتاثير طفرات القاعدة الواحدة فى منطقة البروموتور على معدل النسخ فى جين β جلوبين ، يمثل كل خط رأسى مستوى النسخ الناتج بعد طفرة فى نيوكلتيدة واحدة (منسوبة للطراز الوحشى) فى تجارب منفصلة . تمثل النقط مواقع النيوكلتيدات التى لم يحدث بها طفرات ويلاحظ أن مناطق الصناديق GC وCCAT وTATA هى أكثر المناطق التى تؤثر فيها الطفرات على مستوى النسخ

ويرجع هذا الانخفاض فى معدل النسخ نتيجة لفقد القدرة على الارتبـــاط بعوامل النسخ (TF) المسئولة عن تحفيز النسخ. وعلى مسافة أبعد على يــسار

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

هذا الصندوق يوجد تتابعين أخرين مهمين لعملية بدء النسخ. ويسمى احدهما صندوق CAAT وتتابعة المحفوظ هو CCAAT ويمثل بالمنطقة (٧٠- إلى ٨٠-) وتؤدى الطفرات فى هذا الصندوق ايضا إلى خفض كبير فى معدل النسخ أما الصندوق الاخر والذى يقع على بعد -١١٠ قاعدة فيسمى صندوق GC. وتتابعة المحفوظ هو GGGCGG وقد تأكدت أهميته ايضا بتحليل الطفرات التى يؤدى حدوثها داخلة إلى خفض شديد فى معدل النسخ كما فى الشكل أعلاه.

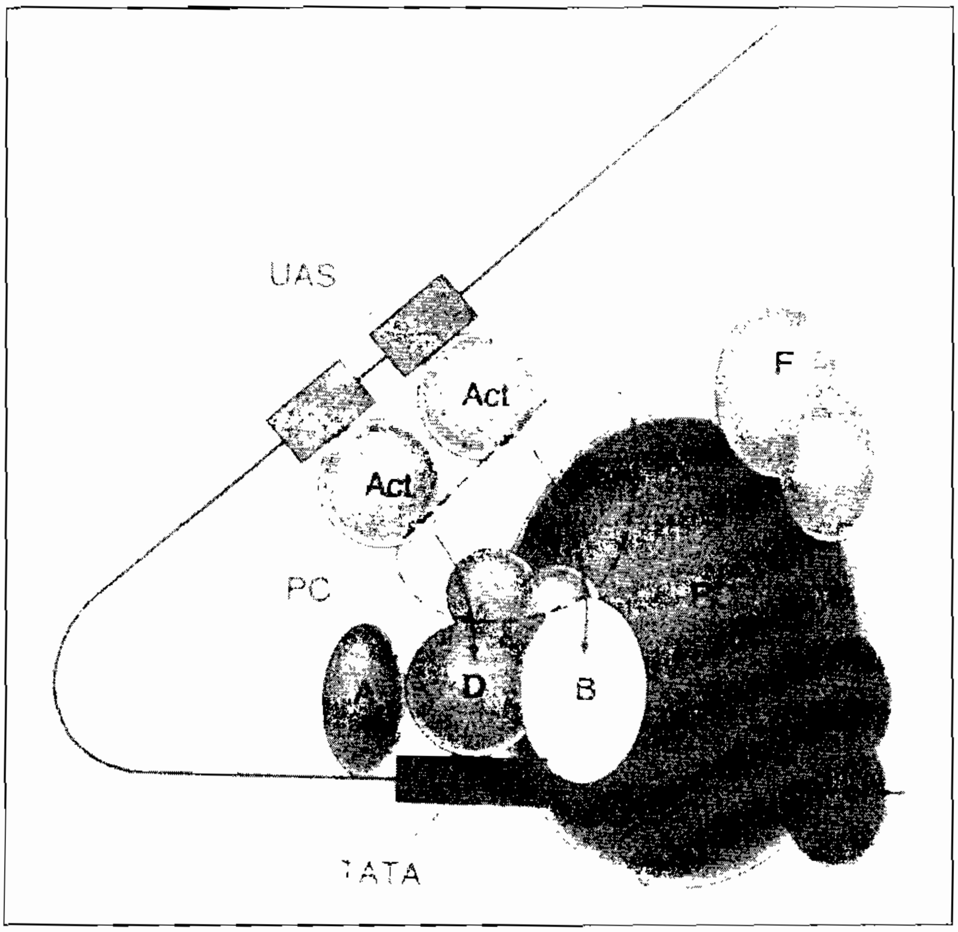
المحفز Enhancer:

بالاضافة إلى منطقة البروموتور نجد أن النسخ فى معظم الخلايا مميزة النواة يتأثر بمنطقة اضافية من تتابعات د.ن.أ تسمى المحفز، والذى يؤدى نشاطة إلى زيادة كبيرة فى معدل النسخ.

وهناك بعض الامثلة على الاختلاف فى موقع المحفز، ففى جينات السلسلة المناعية الثقيلة يقع المحفز داخل الجين نفسه فى انترون يقع بين اكسونين. ومن جهة اخرى، وجد أن المحفزات الخاصة بجينات β-Globin فى الانسان تقع بعد نقطة بدء النسخ Downstream. ولكن كيف يتسنى للمحفز أن يلعب دور فى عملية النسخ فى حين أنه قد يقع على بعد الاف القواعد من البروموتور ومن نقطة بدء النسخ. تبين أن ذلك يتم عندما ترتبط مجموعة عوامل النسخ الخاصة مع تتابعات المحفز حيث يؤدى ذلك إلى تغيير فى شكل الكروماتين Configuration بحيث يحدث ثنى لجزئ د.ن.أ ويتكون قوس Loop بحيث تصبح منطقة البروموتور والمحفز فى موقعين متواجهين مما يسهل معه التفاعل بين عوامل النسخ الموجودة عليهما لتنشيط عملية النسخ كما فى الشكل(١١-٧) الذى يبين التفاعل المتناسق بين عوامل النسخ وارتباطها بكل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

من البروموتور والمحفز لتكوين معقد بدء النسخ Preinitiation Complex (PIC) لكي يبدأ انزيم بلمرة ر.ن.أ فى عملية النسخ.والجدول التالى يعطى مقارنة بـين البروموتور والمحفز.



الشكل (١١-٧): (PIC) حيث يسمح إنحناء جزئ د ن أ بتفاعل البروتينات المنشطة (Act) الموجودة على المحفز مع عوامل النسخ الموجودة على البروموتور مما يؤدى إلى إرتفاع معدل النسخ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجدول (١): مقارنة بين البروموتور والمحفز

البروموتور	المحفز
١- يقع فى منطقة قريبة مجاورة لنقطة بدء النسخ	قد يقع على بعد آلاف ازواج القواعد من نقطة بدء النسخ.
٢- يعمل فقط فى الاتجاه الامامى Forward direction	يمكن أن يعمل فى الاتجاه الامامى Forward أو الاتجاه المنقلب Inverted
٣- يقع فى منطقة قبل نقطة بدء النسخ فقط upstream	قد يقع فى منطقة قبل upstream أو بعد downstream من نقطة بدء النسخ.
٤- مسئول عن بدء عملية النسخ Initiation of transcription	مسئول عن زيادة معدل النسخ maximization of rate of transcription
٥- ترتبط به مجموعة عوامل النسخ الاساسية basal TF	ترتبط به مجموعة عوامل النسخ الخاصة Special TF

تنظيم النشاط النسخى بعوامل بيئية:

Regulation of Transcription by Environmental Factors (Signals):

أولاً : الحرارة وجينات الصدمة الحرارية:

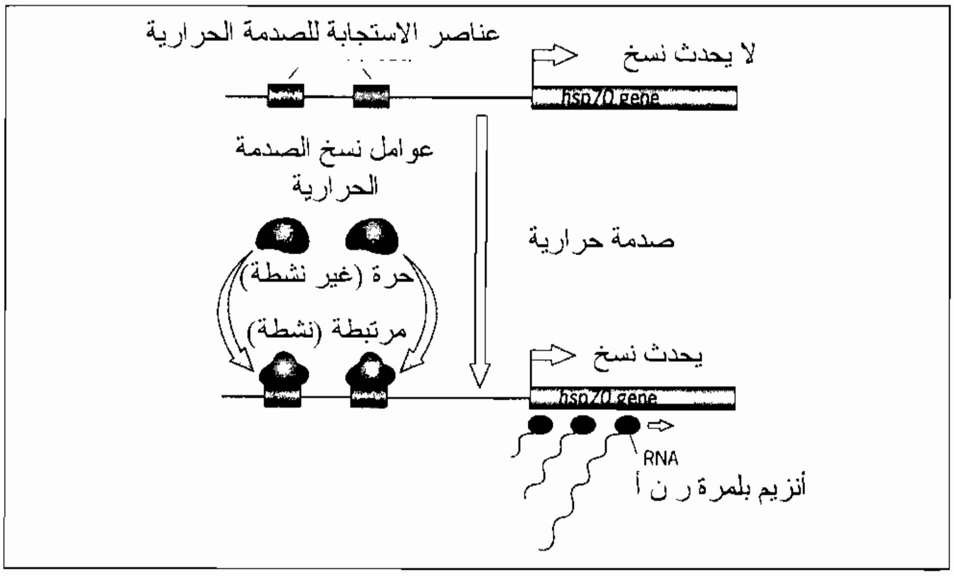
Temperature: The Heat Shock Genes:

وجد أنه عندما يتعرض الكائن لاجهاد حرارى فإنه يستجيب ببناء مجموعة من البروتينات التى تساعد على استقرار وثبات البيئة الداخلية للخلية. ويطلق على هذه البروتينات بروتينات الصدمة الحرارية Heat-Shock Proteins. وتوجد هذة البروتينات فى كل من الكائنات غير مميزة النواة ومميزة النواة وتعد من أكثر البروتينات المحفوظة شيوعاً. وبمقارنة تتابعات الاحماض الامينية لهذه البروتينات فى كائنات متباعدة فى الأحقاب التطورية، وجد أن نسبة التطابق

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

بينها مازالت كبيرة فمثلاً وجد أن درجة التشابة بين بروتينات الصدمة الحرارية فى بكتريا القولون وحشرة الدروسفلا حوالى ٤٠-٥٠% .

ويتم تنظيم التعبير لبروتينات الصدمة الحرارية (HSP) على مستوى النسخ. بمعنى أن الإجهاد الحرارى يستحث نوعياً نسخ الجينات المشفرة لهذه البروتينات (الشكل ١١-٨) ففى الدروسفلا مثلا يوجد أحد هذه البروتينات ويسمى HSP 70 (أشارة إلى أن وزنه الجزيئى 70KD) يتم تشفيره بمجموعة من الجينات على احد الكروموسومات الجسدية (الأوتوسومات) وقد تبين أنه عندما ترتفع درجة الحرارة عن ٣٣ْم، كما يحدث فى أيام الصيف الحارة، فإن كل من هذه الجينات يتم نسخة إلى م.ر.ن.أ والتى يتم ترجمتها بالتالى إلى سلاسل ببتيدية HSP70.



الشكل (١١-٨): إستحثات النسخ فى جين Hsp70 فى حشرة الدروسفلا نتيجة للصدمة الحرارية. يقع HSE'5 بين ٤٠ و٩٠ زوج من القواعد قبل موقع بدء النسخ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويتم استحثاث نسخ هذا الجين بواسطة عامل النسخ للصدمة الحرارية Heat Shock Transcription Factor (Hstf) الموجود فى نواة حشرة الدروسفلا، وعندما تتعرض الحشرة للاجهاد الحرارى فإن عامل النسخ HSTF يتغير كيماوياً بعملية فسفرة Phosphorylation مما يؤدى إلى تنشيطة بحيث يرتبط نوعياً بتتابعات نيوكلتيدية سابقة Upstream لجين HSP70 وينتج عن ذلك أن يصبح الجين معرضاً أكثر للنسخ بواسطة أنزيم بلمرة ر.ن.أ RNA Pol II . ويلى ذلك عملية ترجمة لبروتينات الصدمة. ويطلق على التتابعات التى يرتبط بها HSTF اسم عناصر الاستجابة للصدمة احرارية Heat-Shock Response Elements (HSRE) ويعتقد انها تشمل منطقة المحفز Enhancer

ثانيًا: الضوء: جينات إنزيم ريبيولوز كاربوكسيليز فى النبات:

Light: The Ribulose 1.5-Bis Phosphate Carboxylase Genes In Plants (RBC):

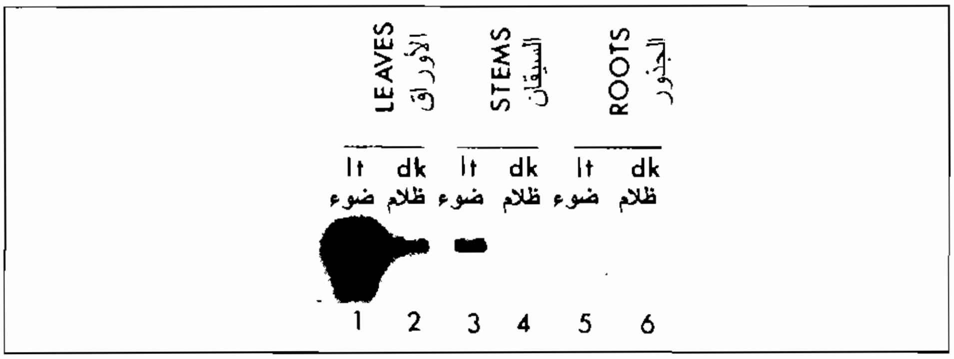
يعد انزيم (RBC) من أكثر البروتينات شيوعا على سطح الارض. ويلعب هذا الانزيم دوراً هاماً فى عملية البناء الضوئى فى النباتات الخضراء ويؤدى نشاط هذا الانزيم إلى تثبيت ثانى اكسيد الكربون بإدخالة إلى جزيئات الجلوكوز والتى يتم بعد ذلك تمثيلها لكى تمد الخلايا بالطاقة. وتعتمد هذه العملية على قدرة النبات على امتصاص الطاقة الضوئية.

وفى غياب الضوء تتوقف العملية تماماً وتنتفى الحاجة إلى إنزيم RBC، مما يؤكد أن انتاج هذا الانزيم يتم استحثاثة نوعياًعندما يتعرض النبات للضوء.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

يتكون انزيم RBC من معقد مكون من وحدة كبيرة وأخرى صغيرة ويقع الجين المشفر للوحدة الكبرى فى الكلوروبلاست بينما يقع جين الوحدة الصغيرة فى النواة.

وقد تم تحليل تعبير جين الوحدة الصغرى (rbcS) فى عدد مـن الانـواع النباتية وقد بينت هذه التحليلات أن جين (rbcS) يتم نسخة بقوة عند تعـريض النبات للضوء (الشكل ١١-٩).



الشكل (١١-٩): إستحثاث النسخ فى الجين الخاص بتحت الوحدة الصغرى لإنزيم ريبيولوز ٥،١ ثنائى الفوسفات كربوكسيليز (RBC) عند التعرض للضوء

ويعتقد أن الضوء يتم امتصاصه بواسطة بروتين فى السيتوبلازم يـسمى الفيتوكروم Phytochrome الذى يكون مرتبطاً بجزئ ممتص للـضوء يـسمى الكروموفور Chromophore. ويؤدى امتصاص الضوء بهذا الكروموفور إلـى تغيير تركيبى فى سلسلة ببتيد الفيتوكروم مما ينتج عنه تغيـرات نوعيـة فـى بروتينات اخرى ذات صلة بهذه العملية. ويبدو أن بعض من هـذه البروتينـات ترتبط بمناطق قبلية Upsteam تسبق جين rbcS وتقوم بتنشيط النـسخ، وتكـون هذه الاستجابة سريعة وقوية مما ينتج عنها انتاج كميات كبيرة من نـسخ ر.ن.أ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

rbcS بعد التعرض للضوء، مما يؤدى إلى توفر اعداد كبيرة مـن نـسخ ر.ن.أ اللازمة لإنتاج بروتينات الوحدة الصغيرة من RBC.

وتوجد عملية اخرى يتم من خلالها انتاج الوحدة الكبرى وعلى ذلك فـإن التعرض للضوء يؤدى إلى استحثاث induction انتاج أحد الانزيمات الرئيـسية لعملية البناء الضوئى.

تنظيم النسخ بواسطة عوامل بيولوجية:

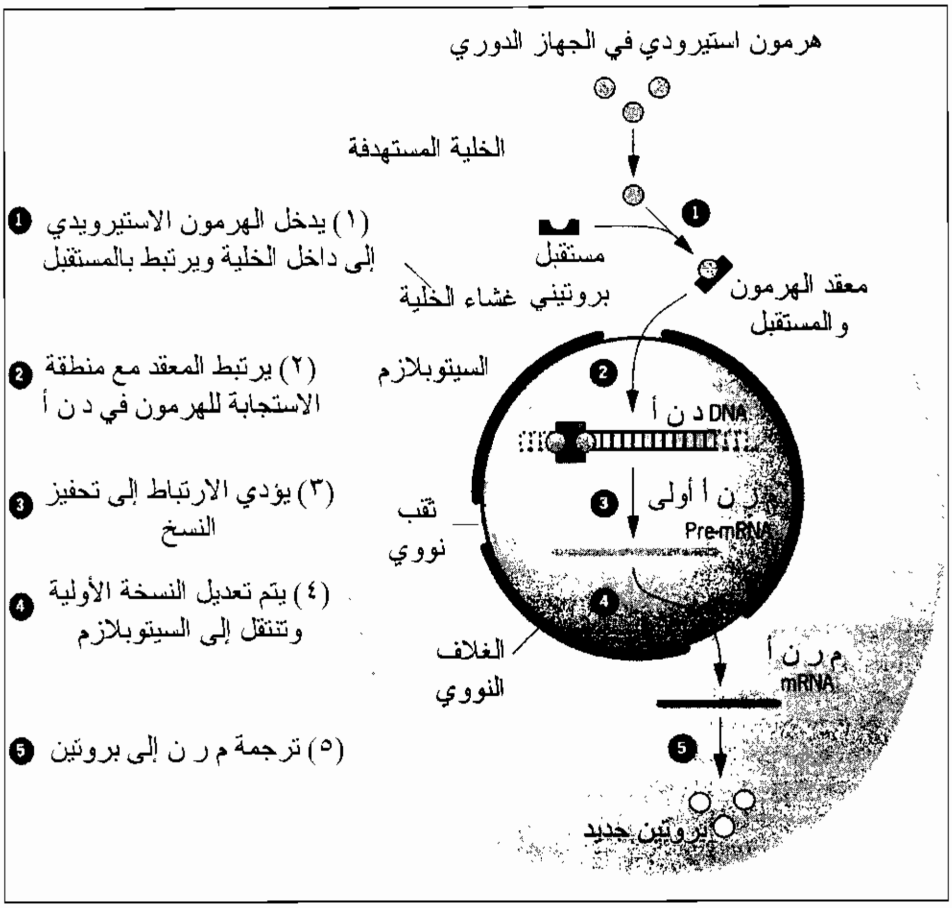
Regulation of Transcription by Biological Singals:

١- الهرمونات الاستيرودية Steroid Hormones:

توجد فى الثدييات مجموعتان رئيسيتان من الهرمونات وهى الهرمونـات الاستيرودية Steroid Hormones والهرمونـات الببتيديـة Peptide Hormones وتتميز الهرمونات الاستيرودية بأنها جزيئات صـغيرة الحجـم وتـذوب فـى الليبيدات وهى مشتقة من الكوليسترول ونظرا لصغر حجمها وطبيعتها الليبيديـة فإنها تمر بسهولة من خلال الغشاء البلازمى للخلية. ومـن امثلـة الهرمونـات الاستيرودية : الاستروجين والبروجسيترون التى تقوم بأدوار هامة فى الدورات التكاثرية (التناسلية) الانثوية Female Reproductive Cycles ويقابلها فى الذكور هرمون التيستسترون Testosterone. كما يتبـع هـذه المجموعـة هرمونـات جلوكوكورتيكويد Glucocorticoid التى تدخل فى تنظيم مستويات الـسكر فـى الدم. وعند دخول أحد هذه الهرمونات فى الخلية فإنها تـرتبط مـع بروتينـات سيتوبلازمية نوعية تسمى مستقبلات الهرمونات Hormone Receptors. ويوجد لكل نوع من هذه الهرمونات مستقبلات متخصصة نوعية. ويـرتبط الهرمـون بالمستقبلات الخاصة به مكونا معقد يمر من خلال الغلاف النووى إلـى النـواه

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

حيث يقوم بدوره كعامل نسخ لتنظيم تعبير جينات معينة (الشكل ١١-١٠). ومن ذلك يتبين أن هذا النوع من الهرمونات يقوم بدور مباشر فى تنظيم النسخ.



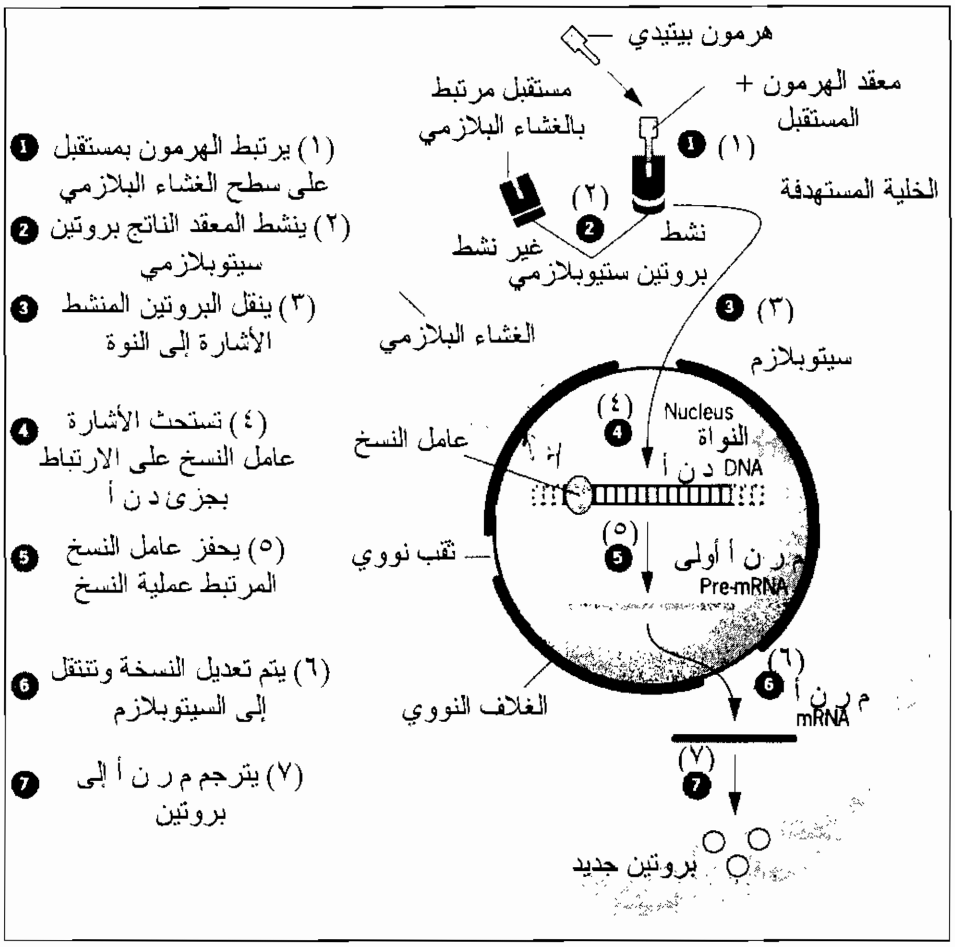
الشكل (١١-١٠): تنظيم التعبير الجينى بالهرمونات الاستيرودية. يرتبط الهرمون مع مستقبلات خاصة داخل الخلية المستهدفة (فى السيتوبلازم) ويمر المعقد الناتج إلى النواة حيث يبدأ نسخ جين معين

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

٢- الهرمونات الببتيدية **Peptide Hormones:**

تتكون هذه الهرمونات من سلاسل خطية Linear Chains من الاحماض الامينية ويتم تشفيرها بعدد من الجينات النووية. ومن امثلة هذه الهرمونات هرمون الانسولين Insulin الذى ينظم مستويات السكر فى الدم، وهرمون Somatotropin الذى يعد هرمون نمو وهرمون البرولاكتين Prolactin الذى يساعد على افراز اللبن فى اناث الثدييات. ونظراً لأن هذه المجموعة من الهرمونات تكون عادة كبيرة الحجم وذات طبيعة غير دهنية مما يجعلها غير متوافقة مع الطبيعة الدهنية لتركيب الغشاء البلازمى، لذلك فإنها لا يمكنها المرور مباشرة من الغشاء البلازمى وحيث أنه يتعذر مرورها مادياً Physically من غشاء الخلية فإنها لابد أن ترسل اشاراتها إلى داخل الخلية بواسطة مستقبلات بروتينية موجودة على سطح الغشاء البلازمى Membrane-Bound Receptor Proteins (الشكل ١١-١١) وعندما يتفاعل هرمون ببتيدى مع مستقبلاته الخارجية فإن ذلك يؤدى إلى احداث تغيرات تركيبية فى هذة المستقبلات بحيث يؤدى فى النهاية إلى احداث تغييرات فى بروتينات اخرى داخل الخلية أي أن هذا النوع من الهرمونات يقوم بدور غير مباشر في تنظيم النسخ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١١-١١): تنظيم التعبير الجينى بالهرمونات الببتيدية يرتبط الهرمون (إشارة خارجية) بمستقبل على سطح الغشاء البلازمى للخلية المستهدفة

أ - **يؤدى المعقد المتكون إلى تنشيط بروتين فى السيتوبلازم الذى يؤدى إلى سلسلة من التغيرات داخل الخلية .**

ب- **تنقل هذه التغيرات الإشارات إلى النواة حيث يقوم عامل النسخ بتحفيز نسخ جين معين ثم يلى ذلك ترجمته إلى بروتين جديد.**

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

إذ نتيجة لحدوث سلسلة من هذه التغيرات، يتم ارسال الاشارة الهرمونية من خلال السيتوبلازم فى الخلية ومنه إلى النواه حيث تعطى التأثير الخاص المؤدى إلى تنظيم تعبير جينات معينة. وتسمى هذه العملية استنقال الاشارة Signal Transduction ويتم ذلك بواسطة تتابعات نوعية فى جزئ د.ن.أ وتسمى (HREs) Hormone Response Elemets, ويعتقد أنها تقع فى منطقة المحفز. وترتبط بهذه المنطقة عوامل النسخ لكى تبدأ عملية النسخ بواسطة انزيم بلمرة ر.ن.أ. وبالنسبة للهرمونات الببتيدية فإن المستقبلات تظل مرتبطة بالغشاء البلازمى حتى بعد تكوينها لمعقد مع الهرمون. اى أن الاشارة الهرمونية يتم نقلها إلى النواه بواسطة بروتينات أخرى (عوامل النسخ).

تنظيم التعبير الجينى بعد النسخ:

Post-Transcriptional Regulation of Gene Expression:

كما سبقت الاشارة إلى حدوث تنظيم التعبير الجينى فى نقاط كثيرة على طول المسار من د.ن.أ إلى البروتين. وعلى الرغم من أن تنظيم النسخ يعد من أوضح العمليات وأكثرها استخداماً فى تنظيم التعبير الجينى فى مميزة النواة ، إلا أن تنظيم ما بعد النسخ Post-Transcription يحدث ايضا فى كثير من الكائنات. ويتم تعديل نسخ ر.ن.أ غير المتجانس النووى (hnRNA) وتجهيزها قبل أن تخرج إلى السيتوبلازم فى صورة م.ر.ن.أ. الناضج لكى تتم الترجمة على الريبوسومات. وتشتمل عملية التجهيز لجزئ hnRNA على حذف الانترونات ويتم تراكب Spllicing (لصق) الاكسونات (مناطق التشفير) جنباً إلى جنب وتضاف للنهاية 5' فلنسوة G ويتم بناء ذيل متعدد الأدينين للنهاية 3' ثم تخرج جزيئات mRNA م.ر.ن.أ إلى السيتوبلازم. وهناك عدد من نظم التنظيم فى م.ر.ن.أ وستدرس هنا أهم أربعة منها وهى:

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

١- بدائل التراكب Alternative Splicing of mRNA.

٢- ثبات م.ر.ن.أ Stability of mRNA.

٣- انتقال mRNA Transport mRNA.

٤- مراجعة mRNA Editing mRNA.

أولاً: بدائل التراكب Arternative Splicing of mRNA:

تؤدى عملية التغيير النوعى فى تراكب م.ر.ن.أ (أى حذف الانترونات ولصق الاكسونات) إلى انتاج نسخ كثيرة ومختلفة من نفس نسخة ر.ن.أ الأولية بحيث يختص كل منها فى انتاج بروتين نوعى مختلف. ويتم ذلك بصفة خاصة عندما يحتوى الجين على عدد كبير من الانترونات متخللة الاكسونات حيث أنه قد يتم حذف الانترونات بشكل منفصل لكل انترون على حدة أو تحذف كمجموعة مع بعضها وذلك حسب الكيفية التى تتفاعل بها ماكينة التراكب مع سلسلة ر.ن.أ. وإذا حدث أن انترونين يتم حذفهما معاً، فإن الاكسون الموجود بينهما قد يتم حذفة ايضا. وبذلك يكون لدى ماكينة التراكب فرصة لتعديل التتابعات الشفرية لجزئ ر.ن.أ بحذف بعض الاكسونات. وتعد ظاهرة اختلاف بدائل تراكب نسخ ر.ن.أ هامة للاقتصاد فى استخدام المعلومات الوراثية إذ انه بدلا من اللجوء إلى التكرار الجينى gene duplication، فإن هذه العملية تعطى الفرصة لكى نحصل من نفس الجين على اعداد كبيرة من النسخ المختلفة حسب مواقع التراكب وبالتالى اعداد من البروتينات النوعية المختلفة.

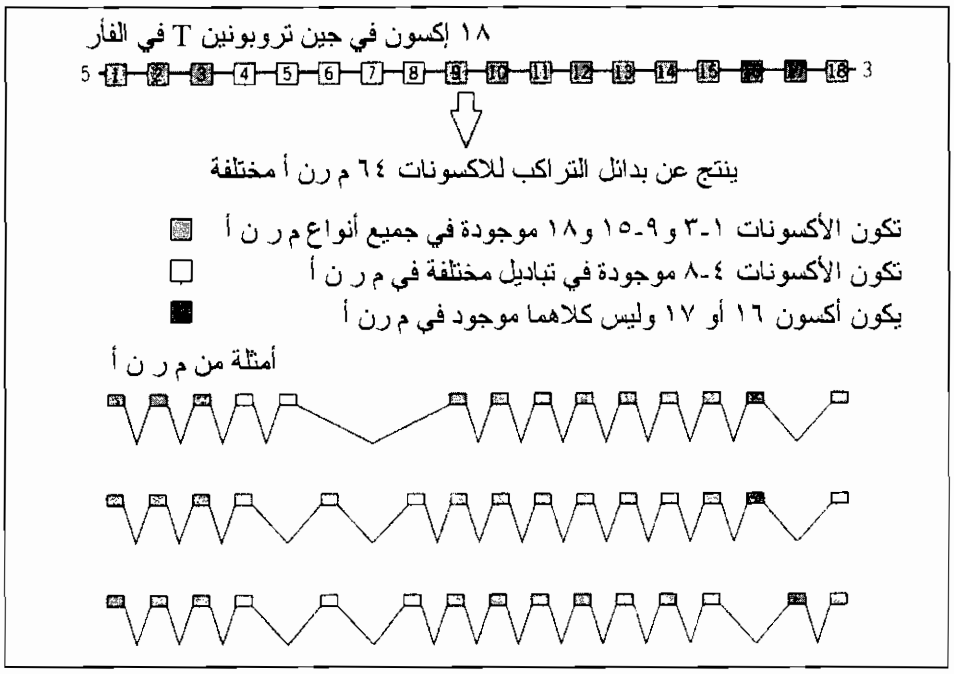
وفيما يلى بعض الامثلة لبدائل التراكب:

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أ- *جين التروبونين Troponin-T gene:*

يعتبر ما يحدث من تعدد التراكيب اثناء تعبير الجين الخـاص ببـروتين Troponin T ، وهو بروتين يوجد فى العضلات الهيكلية للفقاريات ، مثالا جيداً لتعدد وتداخل عملية التراكـب Alternative Splicing. ويتـراوح حجـم هـذا البروتين بين ١٥٠ إلى ٢٥٠ حامض امينى. يبلغ طول جين Troponin T فـى الفأر أكثر من ١٦ كيلو قاعدة ويحتوى على ١٨ اكسون مختلف (الـشكل ١١-١٢) ، ويتم تراكب نسخ ر.ن.أ لهذا الجين بطرق مختلفة لانتاج اعداد كبيرة من م.ر.ن.أ النوعية المختلفة وعند ترجمتها فإنها تعطى انواع كثيرة من متعـددات ببتيدية T النوعية. وقد وجد أن جميع هذه الببتيدات المتعدده تشترك فى وجـود الاحماض الامينية للاكسونات ١ إلـى ٣ و ٩ إلـى ١٥ واكـسون ١٨. إلا أن المناطق المشفرة بالاكسونات من ٤ إلى ٨ قد تكون نواتجها أمـا موجـودة أو غائبة حسب طراز التراكب وفى أى تباديل، بالاضافة إلى حدوث اختلاف آخر ناتج عن وجود أو غياب المناطق المشفرة باكسون ١٦ و ١٧ بحيث أنه إذا وجد اكسون ١٦ غاب ١٧ والعكس صحيح ويتوقع عند حدوث جميع هـذه التباديـل الحصول على ٦٤ نوع مختلف من م.ر.ن.أ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١١-١٢): بدائل التراكب لنسخة رن أ الناتجة من جين التربونين T فى الفأر.
يبين الشكل ثلاث حالات فقط من بين ٦٤ م ر ن أ محتملة

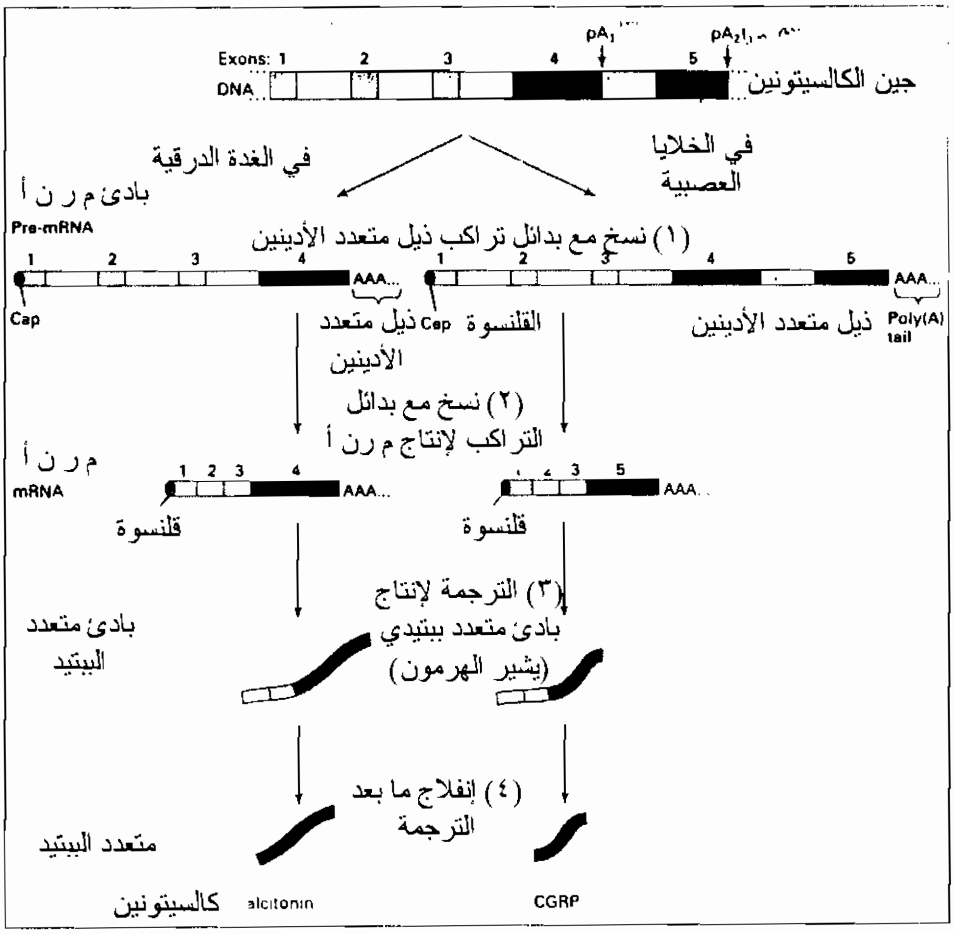
ويبدو أن هذه الصور المختلفة من بروتين التروبونين T تقـوم بوظـائف متباينة قليلا فى العضلات مما ينعكس على الاختلافات التى تحدث فـى نـشاط الخلية العضلية.

ب- جين كالسيتونين البشرى:

Human Calcitonin Gene(Alternative Splicing and Alternative Poly A:

وتمثل عملية التراكب فى هذا الجين دور كل من تداخل التراكب وتغيـر مكان اضافة ذيل متعدد الأدينين إلى النهاية '3 فى انتاج بروتينات نوعيـة ذات وظائف مختلفة فى انسجة مختلفة (الشكل ١١-١٣).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١١-١٣): تؤدى عملية بدائل تراكب ذيل الأدينين و إكسونات هرمون الكالسيتونين البشرى (CALC) إلى نواتج نوعية فى الأنسجة حيث ينتج CALC فى الغدة الدرقية فى حين ينتج CGRP فى بعض الخلايا العصبية المتخصصة

إذ ينتج عن التراكب بروتين كالسيتونين (CALC) فى الغدة الدرقية، بينما يحدث تراكب من نوع اخر فى بعض الخلايا العصبية Neurons يؤدى إلى انتاج بروتين اخر متخصص يسمى Calcitonin-Gene Related Peptide (CGRP) ويرجع ذلك إلى أن الجين الأصلى يحتوى على خمسة اكسونات ويحدث

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

التراكب على مرحلتين، ففى المرحلة الأولى يتراكب موقع اضافة ذيل متعدد الادينين Poly A حيث يحدث فى الغدة الدرقية اضافة هذا الذيل عند نهاية الاكسون رقم ٤ مع حذف الاكسون رقم ٥ فى حين تحدث هذه الاضافة فى الخلايا العصبية عند نهاية الاكسون الخامس بدون حذف. وفى المرحلة الثانية من التراكب يحدث فى حالة الغدد الدرقية اضافة القلنسوة G عند النهاية 5' بدون أى تعديلات آخرى بحيث يكون م.ر.ن.أ الناتج محتوى على الاكسونات من ١ إلى ٤.

أما فى حالة الخلايا العصبية فيؤدى التراكب المغاير فيها إلى حذف الاكسون رقم ٤ بحيث يصبح م.ر.ن.أ الناضج مكون من الاكسونات ١ ، ٢ ، ٣ ، ٥ ويؤدى ذلك بالطبع إلى اختلاف تركيب ووظائف البروتين الناتج فى كل من هذين النسيجين.

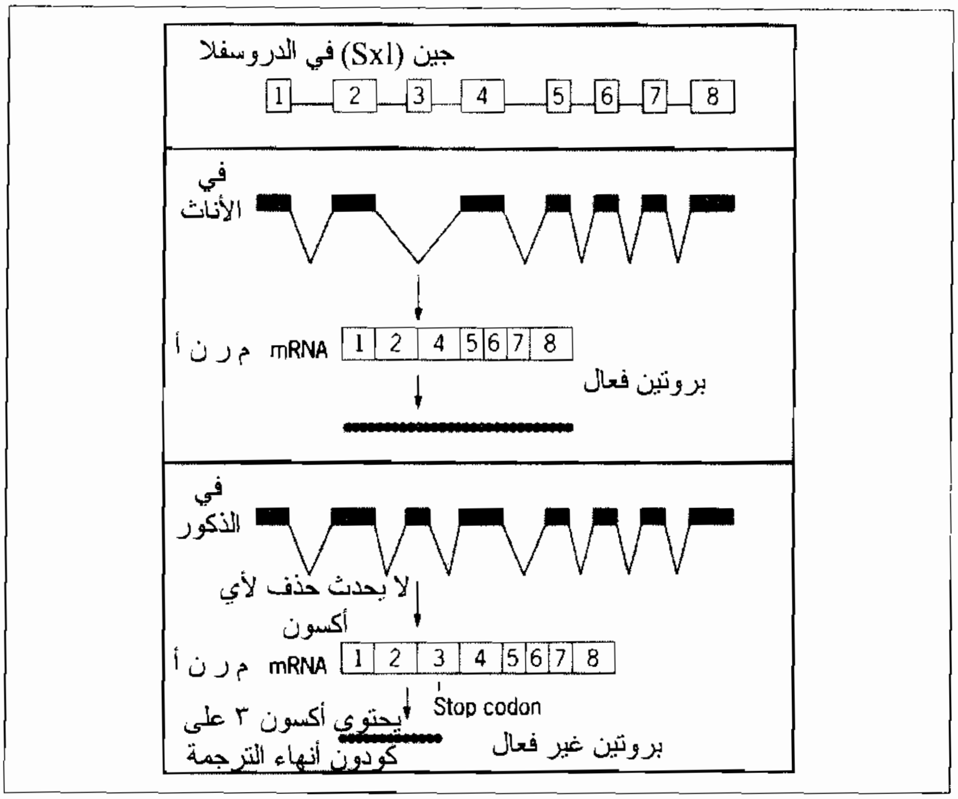
ج- جين (Sxl) المرتبط بالجنس:

X- Linked Sex – Lethal gene (Sxl):

وهو جين موجود على كروموسوم X فى حشرة الدروسفلا ومسئول عن تعيين الجنس فيها ويشتمل على ثمانى اكسونات. ويعد هذا الجين المنظم الرئيسى لعملية تعيين الجنس فى هذه الحشرة Master Regulator. ففى كروموسومات الانثى يتم تراكب نسخ هذا الجين بحيث يتم حذف الاكسون رقم ٣ مما يؤدى إلى انتاج م.ر.ن.أ يشفر لبروتين منظم، بينما فى كروموسومات الذكر فإن نسخ هذا الجين يتم تراكبها بطريقة مختلفة Alternatively Spliced بحيث تشتمل على الاكسون رقم ٣ المحتوى على كودون انهاء الترجمة. وينتج عن ذلك أنه عندما يترجم م.ر.ن.أ فى الذكور فإنه يعطى ببتيد قصير يفتقر إلى نشاط تنظيمى (الشكل ١١-١٤). وفى حالة الجنين XX، حيث يوجد بروتين Sxl

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بالكامل، يتم تعبير مجموعة معينة من الجينات والتى تؤدى إلى تمايز هذه الأجنة إلى اناث. وعلى العكس من ذلك، نجد أنه فى حالة الجنين XY حيث يغيب الطول الكامل لبروتين Sxl يتم تعبير مجموعة أخرى من الجينات التى تسبب تمايز هذا الجنين ليكون ذكراً.



الشكل (١١-١٤): تبادل التراكب لنسخ ر ن أ الناتجة من جين (Sxl) فى الدروسفلا

وبالطبع تخضع عملية التراكب هذه فى النهاية إلى النسبه بين الاوتوسومات وعدد كروموسومات X. وعلى ذلك فإن تباين التراكب فى Sxl RNA مسئول عن التمايز الجنسى فى الدروسفلا.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ثانيًا: معدل ثبات م.ر.ن.أ Stability of mRNA:

حيث أن م.ر.ن.أ يعمل كقالب لبناء البروتين فى السيتوبلازم كما سبق القول، فإن ترجمة هذه النسخ من م.ر.ن.أ يمكن ان تتم بواسطة العديد من الريبوسومات اثناء تحركها على طول م.ر.ن.أ فى نظام متتابع. وتستمر عملية الترجمة هذه إلى أن يحدث هدم لجزئ م.ر.ن.أ . وعلى ذلك فإن هدم م.ر.ن.أ يعتبر نقطة تنظيم للتحكم فى النظام العام التعبير الجينى.

ويستطيع م.ر.ن.أ طويل العمر Long-Lived أن يدخل فى دورات كثيرة من بناء البروتين فى حين لايحدث ذلك فى حالة م.ر.ن.أ قصير العمر Short-Lived وفى حالة م.ر.ن.أ الذى يتم هدمة بسرعة فإنه لابد من تعويض ذلك بعملية نسخ اضافية حتى لايتوف بناء البروتين الذى يشفر له. وقد يكون توقف انتاج هذه البروتين جزء من برنامج نمو وتمايز الكائن. أذ عندما يؤدى البروتين وظيفته فإنه قد تنتفى الحاجة إليه بعد ذلك حتى أن استمرار بناء هذا البروتين قد يكون ضاراً بالخلية وفى هذه الحالات قد يمثل الهدم السريع لـ م.ر.ن.أ. ميكانيكيه لمنع استمرار بناء بروتين غير مرغوب فيه بعد مرحلة معينة من التمايز.

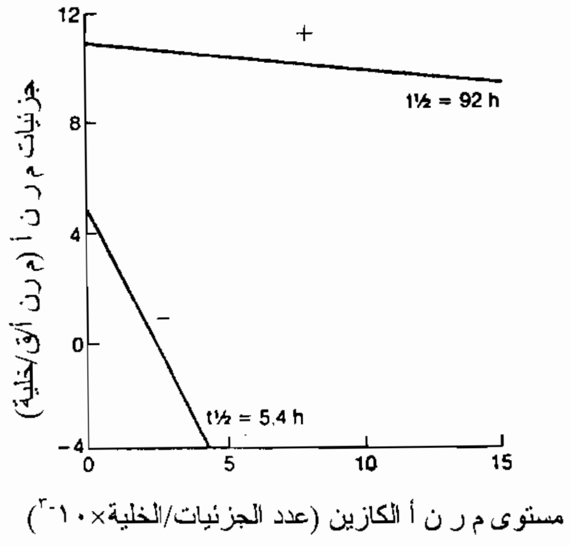
وقد تبين أن فترة نصف العمر (t ½) الخاصة بجزئ م.ن.ر.أ تتأثر بعوامل كثيرة. فمثلاً وجد أن طول ذيل متعدد الأدينين Poly A يلعب دوراً مهما فى ثبات م.ر.ن.أ إذ كلما زاد طول هذا الذيل كلما طالت فترة نصف العمر لهذا الجزئ والعكس صحيح. ومن المعروف أن م.ر.ن.أ الهستون لا يحتوى على ذيل متعدد الادينين وقد وجد انه قصير العمر جداً.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ومن جهة أخرى، تبين ان وجود تتابعات معينة فى المنطقة UTR '3 (أى المنطقة '3 غير المترجمة) يؤثر بشدة على ثبات م.ر.ن.أ. فقد ثبت أن عددا من أنواع م.ر.ن.أ قصيرة العمر تتميز بوجود التتابع AUUUA بتكرار مترادف فى لمنطقة UTR '3 وعند نقل هذه التتابعات إلى منطقة UTR '3 لجــزئ م.ر.ن.أ خر أكثر ثباتاً فقد تحول إلى جزئ أقل ثباتاً وأقصر عمرا.

بالاضافة إلى ذلك اظهرت بعض الدراسات أن ثبات م.ر.ن.أ يتأثر ببعض الهرمونات فقد وجد أن هرمون الاستيروجين يزيد ثبات ويطيل عمــر mRNA لجين فيتولوجنين Vitellogenin فى أبوذنيبه *Xenopus leavis*

كما وجد أن هرمون البرولاكتين Prolactin يطيل فترة نصف العمر لنسخ م.ر.ن.أ لجين الكازين Casein gene (الشكل ١١-١٥).



الشكل (١١-١٥): إختلاف ثبات م ر ن أ (فترة نصف العمر) لبروتين الكازين فى وجود (+) أو غياب (−) هرمون البرولاكتين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

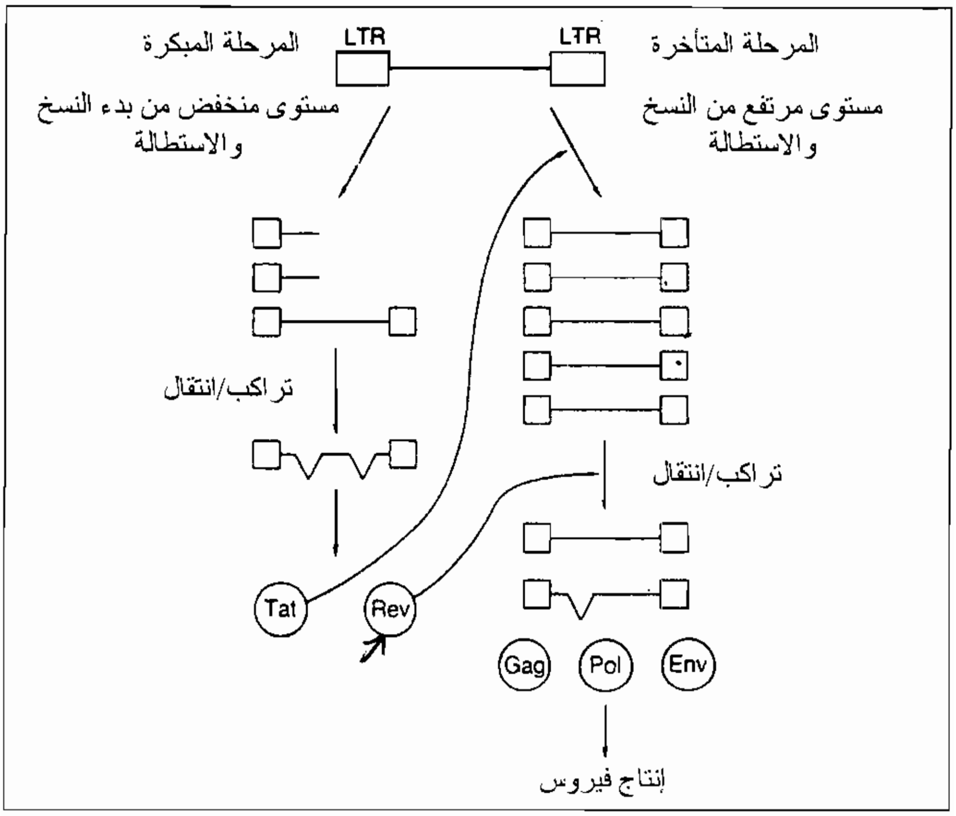
ثالثًا: انتقال mRNA Transport mRNA:

تبين انه مقدار ما يخرج من نواة خلية الثدييات من جزيئات hnRNA فى صورة mRNA يمثل ٥% فقط من مجموع الجزيئات التى تم بنائها داخل النواه. حيث أنه اثناء عملية التجهيز والتعديل والتراكب، يتم التخلص من اعداد كبيـــرة من جزيئات ر.ن.أ غير المرغوب فيها بالهدم بواسطة معقد بروتينى كبير يسمى Exosome الذي يتكون من عدد من تحت الوحدات ذات نشاط انزيمـــى للهـــدم الطرفى لجزيئات ر.ن.أ RNA Exonucleases. وكما سبق القول فإن عمليـــة خروج ر.ن.أ من النواة يتم تأخيرها حتى تنتهى عمليـــة التجهيـــز Processing. وعلى ذلك، فإن أى ميكانيكية تؤدى إلى منع استكمال عملية التراكـــب Splicing فى جزئ معين من ر.ن.أ يمكن أن توقف عملية خروج ر.ن.أ من النواة.

وتعد عملية تنظيم خروج RNA لفيروس HIV النموذج المفـــضل لهـــذه الظاهرة والمسماه Regulated Nuclear Transport of mRNA (الشكل ١١-١٦) حيث تتم عملية بناء mRNA على مرحلتين، ففى المرحلـــة الميكـــره للعـــدوى بالفيروس يتم بناء عدد محدود جداً من نسخ ر.ن.أ الكاملة الاســـتطالة واعـــداد قليلة من النسخ الناقصة الاستطالة وبإطوال متفاوته. ويحدث للنسخ الكاملة عملية تراكب Splicing وانتقالmRNA Transport تام التجهيز (بعد حذف انتـــرون ١ و٢) إلى السيتوبلازم حيث تتم ترجمته إلى بروتينين أحدهما يسمى Tat والآخر يسمى Rev. وفى المرحلة المتأخرة للعدوى يساعد بروتين Tat علـــى تنـــشيط عملية بدء النسخ والاستطالة الكاملة لعدد كبير من جزيئات ر.ن.أ وبعدها يساعد بروتين Rev على تراكب وانتقال جزيئات ر.ن.أ إلى السيتوبلازم بحيث تكـــون أما كاملة الاستطالة (محتوية على انترون ١ و٢) او محذوف منها الانترون رقم ١ فقط. وفى السيتوبلازم يتم ترجمة ثلاثة بروتينات هامة لانتاج وحدات جديـــدة

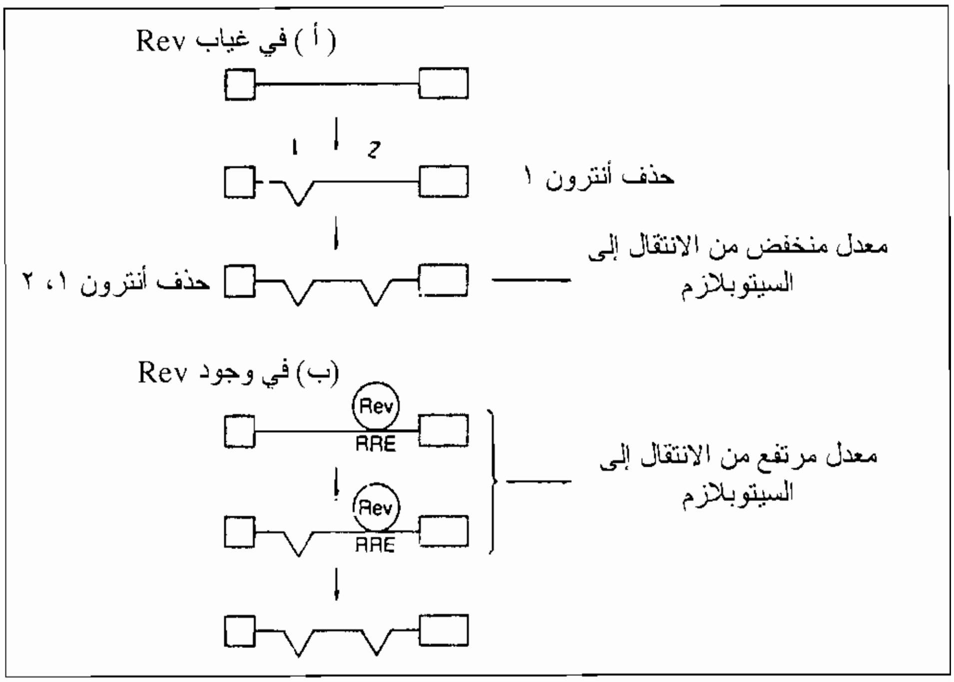
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

من الفيروس وهى Gag, Pol, Env ويبين الشكل (١١-١٧) الدور الذى يقوم به البروتين Rev فى تسهيل عملية انتقال ر.ن.أ من النواة إلى السيتوبلازم.



الشكل (١١-١٦): تنظيم تعبير جين HIV و إنتقاله. فى المرحلة المبكرة من العدوى يحدث مستوى منخفض من إستحثاث النسخ و إستطالة منتجا عدد صغير من م ر ن أ الفيروس التام التراكب الذى يشفرلبروتينىTat وRev و عند إنتاج هذين البروتينين ، يحفزTat على إستحثات و إستطالة النسخ مما يؤدى إلى زيادة فى إنتاج م ر ن أ الفيروسى. يقوم بروتين Rev بعد عملية النسخ بتحفيز عملية التراكب والإنتقال لجزيئات م ر ن أ غير المتراكبة أو المحذوف منها الانترون رقم (١) فقط والتى يتم ترجمتها إلى ثلاث بروتينات تركيبية فيروسية وهى Gag, pol,Env

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١١-١٧): يؤدى إرتباط Rev بمنطقة الإستجابة (RRE) فى ر ن أ لجينHIV إلى تحفيز إنتقال ر ن أ غير المعدل أو المتراكب (يحذف انترون١ فقط) ولا يحدث إنتقال لجزيئات م ر ن أ التى حذفت منها الانترونين١و٢معا نظرا لغياب موقع الإرتباط ببروتينRevوالموجود على الانترون (٢)

فقد تبين وجود تتابع قصير متخلل للانترون رقم ٢ ويسمى عنصر الاستجابة لريف Rev Responsive Element (RRE) وفى حالة غياب بروتين Rev وحدوث Splicing للانترون ١ فقط أو للانترون ١ و٢ معا فإن ذلك سيؤدى إلى انخفاض شديد فى معدل انتقال ر.ن.أ إلى السيتوبلازم. ومن جهة اخرى ، فى حالة وجود بروتين Rev وفى وجود نسخ ر.ن.أ كامل بدون تراكب أو بتراكب جزئى يشمل حذف انترون ١ فقط فإن ذلك يعطى فرصة اكبر لارتباط Rev بمنطقة RRE الموجودة فى الانترون رقم ٢ مما يساعد على حدوث معدل عالى جداً من انتقال ر.ن.أ الى السيتوبلازم.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويعد بروتين Rev أول بروتين تنظيمي لعملية انتقال ر.ن.أ إلى السيتوبلازم. وقد أفترضت ميكانيكيتان لتفسير عمل بروتين Rev ويعتمد التفسير الاول على امكان حدوث تفاعل هذا البروتين مباشرة مع نظام خلوى لنقل ر.ن.أ ويرتبط مع مستقبل نووى يسمى Exportin مما يؤدى إلى تسهيل انتقال ر.ن.أ إلى خارج النواة. ويفترض الاقتراح الثانى أن Rev يقوم بدور غير مباشر بحيث يؤدى الى إزاحة مؤقته لبروتينات تراكب ر.ن.أ والتى قد تمنع ر.ن.أ من الانتقال قبل أن يتم تراكبه Splicing

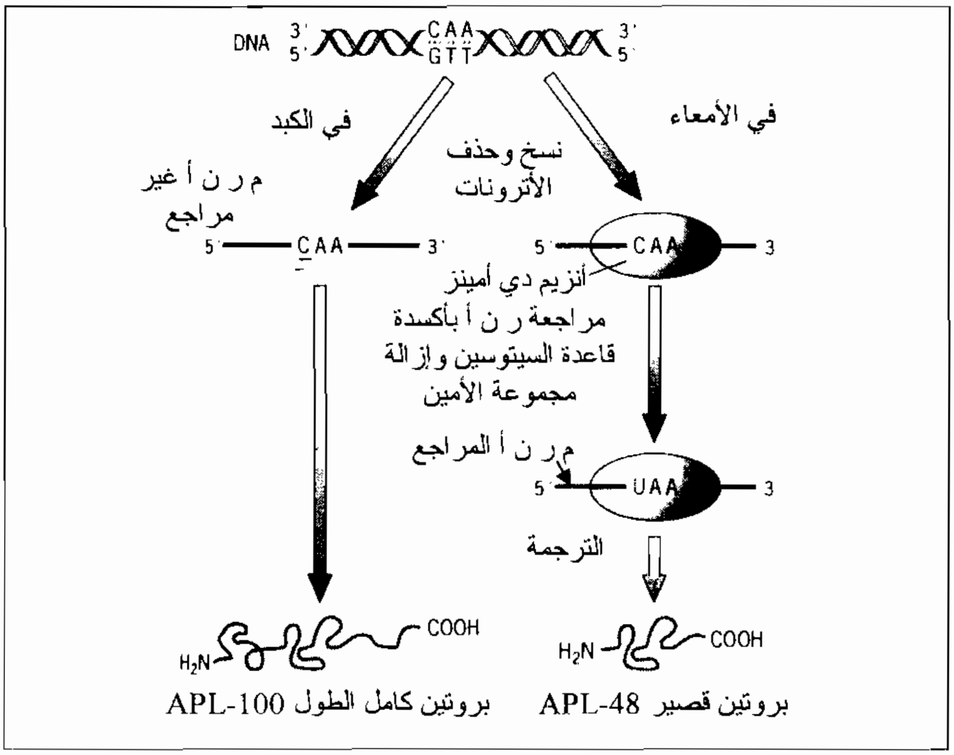
رابعًا: مراجعة م.ر.ن.أ mRNA Editing:

سبق الاشارة إلى القاعدة أو المبدأ الاساسى Central Dogma فى تدفق المعلومات الوراثية التى تبدأ من د.ن.أ الذى يتم نسخ تتابعات جين معين منه كصورة مكملة طبق الاصل من تتابعات المنطقة التى يمثلها هذا الجين فى صورة جزئ م.ر.ن.أ بلا زيادة أو نقصان والذى يعمل بدورة كقالب لترجمة الشفرات الثلاثية التى يحتويها إلى احماض امينية فى سلاسل ببتيدية مقابلة حسب قاموس الشفرة الوراثية.

إلا أنه من المدهش حقاً حدوث إستثناءات لهذه القاعدة العامة. إذ يحدث احيانا أن م.ر.ن.أ نفسه لابد ان تتم فيه عملية مراجعة Editing بإضافة (أو حذف) بعض القواعد حتى يمكن ترجمته إلى بروتين نوعى فعال ليفى باحيتاجات نسيج نوعى معين، بينما تصلح النسخة الأصليه غير المراجعة للترجمة إلى بروتين فعال آخر فى نسيج آخر أى يكون لدينا نسختين مختلفتين من م.ر.ن.أ.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

والمثال على ذلك مـا وجـد فـى نـسخ م. ر. ن. أ الخاصـة بجـين Apolipoprotein B فى الثدييات والذى يلعب البروتين الناتج منه دوراً مهماً فى انتقال جزيئات الليبيدات، وتبين أن هذا البروتين له صورتين متقـاربتين جـداً (الشكل ١١-١٨).



الشكل (١١-١٨): عملية المراجعة Editing لجزىء م ر ن أ أبوليبوبروتين Apolipoprotein-B فى أمعاء الثدييات

إذ وجد أن احد الصورتين من هذا البروتين ويسمى الجزئ الكبير (APB-100) ذو وزن جزيئى مرتفع (512KD) يتم بناؤه فى الكبد، فى حين أن الصورة الاخرى ويسمى البروتين الاصغر (APB- 48) يتم بناؤه فى الامعاء.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وقد تبين أن تتابع البنوكلتيدات فى هذا الجين كان بالطبع متطابقاً فى كـــل من الكبد والامعاء، بل والأكثر من ذلك كانت نسختى م.ر.ن.أ متــساويتين فـــى الحجم (14.5 Kb) إلا أنه بينما كان هذا التتابع طبيعى فـــى APB-100 بحيـــث كانت الشفرة الثلاثية عند الموقع ٦٦٦٦ هى CAA وتشفر للجلوتامين وتـــستمر بعدها ترجمة هذا الجزئ الكبير إلى نهايته بدون توقف لنحصل علـــى بـــروتين APB-100 فى الكبد بحيث يكون طول السلسلة ٤٥٦٣ حـــامض امينـــى. إلا أن ذلك لم يحدث بالضبط فى الامعاء ولكن حدث استبدال للقاعـــدة C فـــى نـــسخة م.ر.ن.أ بالقاعدة U فى هذا الموقع (6666) بحيث اصـــبحت الـــشفرة الثلاثيـــة UAA وهى تمثل كما نعرف شفرة ايقاف الترجمة عنـــد هـــذه النقطـــة وعـــدم استمرارها فينتج البروتين الصغير فى الامعاء APB-48 المكـــون مـــن ٢١٥٣ حامض أمينى. وقد تبين ان هذا الاستبدال من C إلى U قد تم بواســـطة نـــشاط انزيم RNA- Binding Deaminase.

تنظيم الترجمة Translational Control:

أولاً: فى غير مميزة النواة:

حيث أننا نعرف الآن أن نظام الأوبرون فى *E.coli* يحتوى على عدد من الجينات التركيبية (٣ فى حالة lac أوبرون و ٥ فى حالة Trp أوبرون) وبالتالى يتم نسخ هذه الجينات معا فى م.ر.ن.أ متعـــدد الســـسترونات Polycistronic ، إلا أن الترجمة تتم منفصلة لكل جين على حدة. كما نعرف أنه نظراً لعدم وجود نواه فى البكتريا فإنه يمكن أن تحدث عمليات النسخ والترجمة وهدم م.ر.ن.أ فى نفس الوقت تقريباً ولذلك فإننا يمكن أن نتوقع أن يتم انتاج البروتينات بمقـــادير مختلفة من نفس نسخ mRNA وذلك عن طريق ميكانيكيات مختلفة منها:

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

١- اختلاف فعالية بدء الترجمة:
Unequal Efficiencies of Translational Initiation:
وهى ظاهرة معروف حدوثها عند كودونات AUG للجينات المختلفة.

٢- تغييرات فى سرعة (فعالية) حركة الريبوسوم:
Altered Efficiencies of Ribosome Movement:
ويحدث ذلك عندما تتكون عروة دبوس الشعر أو غيرها من التراكيب على جزئ mRNA مما يؤدى إلى اعاقة تحرك الريبوسوم على طول هذا الجزئ.

٣- اختلاف معدل الهدم فى مناطق م.ر.ن.أ:
Differential Rates of Degradation:
حيث تكون بعض مناطق م.ر.ن.أ أكثر عرضة للهدم السريع عن غيرها من المناطق.

يوجد فى م.ر.ن.أ البكتيرى تتابع محفوظ من ستة نيوكلتيدات يسمى Shine-Dalgarno Sequence ويقع دائماً على بعد عدد قليل من كودون بدء الترجمة AUG. ويتزاوج هذا التتابع مع القواعد المقابلة فى 16S RNA فى الوحدة الصغرى للريبوسوم بغرض وضع الكودون AUG فى المكان الصحيح على الريبوسوم.

ويعطى هذا التفاعل مساهمة كبيرة لفاعلية عملية بدء الترجمة حيث تمد الخلية البكتيرية بطريقة بسيطة للتحكم فى بناء البروتين عن طريق ما يعرف بميكانيكية التحكم السلبى فى الترجمة. وتنطوى هذه الميكانيكية على حجب Blocking تتابعات Shine-Delgarno إما بتغطيتها بالارتباط ببروتين أو بمشاركتها فى التزاوج مع قواعد مقابلة فى احدى مناطق م.ر.ن.أ. ويحتوى عدد كبير من م.ر.ن.أ البكتيرى على بروتينات نوعية مثبطة للترجمة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

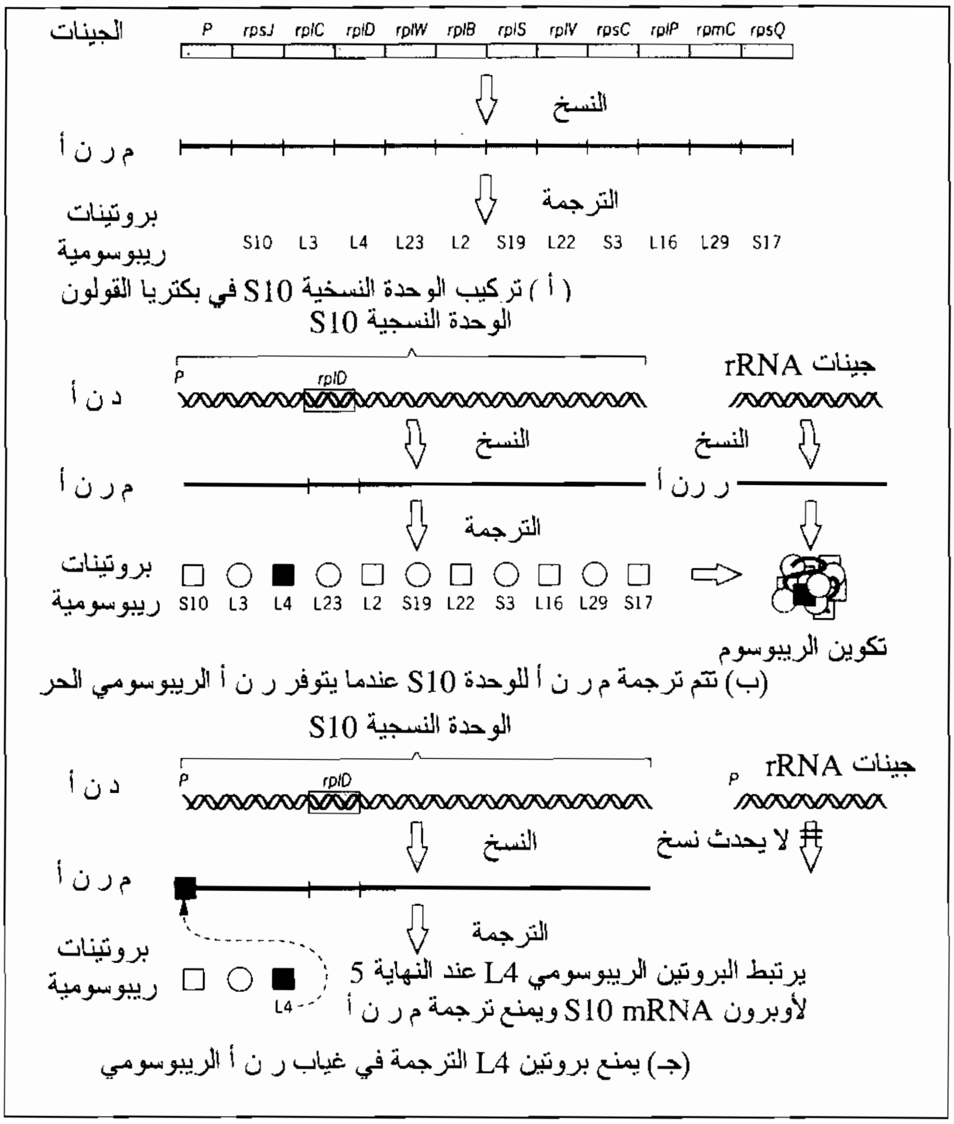
Translational Repressor Proteins والتى يمكنها الارتباط فى منطقة مجـــاورة لتتابع Shine-Dalgarno مما يؤدى إلى تثبيط ترجمة هذا الجـــزء مـــن م.ر.ن.أ فقط.

وعلى سبيل المثال فإن بعض البروتينات الريبوسومية يمكنها تثبيط ترجمة م.ر.ن.أ الخاص بها نفسها عن طريق الارتباط بالمنطقة 5'UTR. ويطلق علـــى هذه الميكانيكيـــة اســـم التنظـــيم الـــذاتى الـــسلبى Negative Self-Regulation أو Negative Autogenous Regulation (الشكل ١١-١٩).

وفى هذه الميكانيكية تقوم مجموعة البروتينات الريبوسومية للجـــين S10 (الخاص بالوحدة الصغرى) بهذا النوع من التنظيم السلبى. تحتوى وحدة النـــسخ S10 على ١٠ جينات ذات تنظيم متناسق وكلها تشفر لبروتينـــات ريبوســـومية (الشكل ١١-١٩-أ) وفى حالة وحدة النسخ S10، وجد أن أحد الجينات فى هـــذه الوحدة يقوم بتثبيط ترجمة جميع نسخ جينات الوحـــدة النـــسخية. أى أن الجـــين المشفر للبروتين المثبط يكون هونفسه أحد الجينات التى يتم تنظيمها (بـــالتثبيط) وبذلك يكون الجين المثبط قد تم تنظيمة ذاتياً وسلبياً. فى الوحدة النـــسخية S10 يكون الجين المنظم هو rPID الذى يشفر للبروتين L4.وعندما يوجد rRNA حراً فى الخلية فإن بروتين L4 يرتبط بـــ rRNA هذا (الشكل١١-١٩-ب).

ويتجمع فى تركيب الريبوسوم. اما فى حالة غياب rRNA فإن بروتين L4 يرتبط بالنهاية 5' للوحدة النسخية S10 ويثبط ترجمتها (الشكل ١١-١٩-جـــ) ويؤدى هذا الى منع بناء بروتينات ريبوسومية عندما لايوجد لها احتيـــاج فـــى الخلية.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١١-١٩)

أ - تركيب جين S10 فى بكتريا القولون (ب) و(ج) تنظيم النسخ لهذا الجين تكون ترجمة م ر ن أ تحت تحكم بروتين L4 الذى يرتبط بتتابع نيوكلتيدى بالقرب من النهاية '5 لنسخة S10.

ب- تفاعل البروتينات الريبوسومية مع rRNA لتكوين الريبوسوم.

ت- فى غياب rRNA يرتبط بروتين L4 قرب النهاية '5 لنسخة S10 و يمنع عملية الترجمة.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

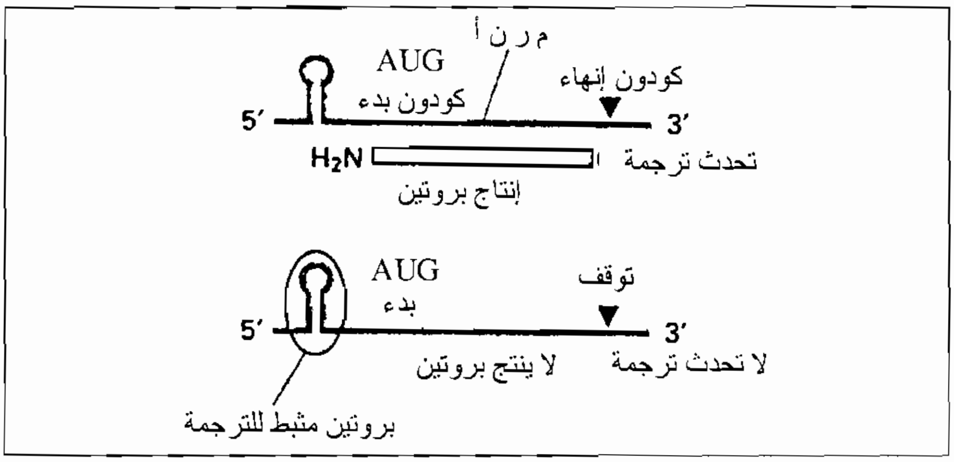
ثانيًا: تنظيم الترجمة فى مميزة النواة:

سبقت الاشارة إلى أن م.ر.ن.أ فى مميزة النواة لايحتوى على تتابع Shine-Dalgarno ، وبدلا من ذلك يتقرر اختيار كودون بدء الترجمة AUG اعتمادا على قربة لمنطقة القلنسوة G-cap عند النهاية 5' لجزئ م.ر.ن.أ وهو الموقع الذى ترتبط عنده الوحدة الصغرى للريبوسوم مع mRNA لبدء الترجمة. وقد وجد أن مميزة النواة تستخدم ايضاً مثبطات للترجمة.

ويرتبط بعض من هذه المثبطات بالنهاية 5' لجزئ م.ر.ن.أ وبالتالى تتوقف عملية بدء الترجمة. فى حين يتعرف البعض الاخر من هذه المثبطات على تتابعات نيوكلتيدية عند المنطقة 3'UTR لانواع معينة من م.ر.ن.أ وتعمل على خفض معدل بدء الترجمة عن طريق التداخل Interference مع عملية الاتصال بين قلنسوة 5' G-cap ومنطقة 3'Poly A والتي لابد من حدوثها بطريقة صحيحة لضمان فعالية الترجمة. ومن الامثلة التى تمت دراستها للتدليل على حدوث التحكم السلبى فى الترجمة فى مميزة النواة تنظيم ترجمة م.ر.ن.أ الفيريتين Feritin حيث وجد أن هذه الميكانيكية تؤدى إلى السماح بزيادة سريعة فى بناء بروتين الفيريتين الذى يقوم بتخزين الحديد وبذلك ترتفع مستويات أيونات الحديد الذائبة فى سيتوبلازم الخلية.ويقوم الحديد هنا بدور تنظيمى اعتماداً على وجود تتابع من حوالى ٣٠ نيوكليوتيده فى منطقة القيادة 5' فى جزئ م.ر.ن.أ للفيرتين. وينطبق هذا التتابع المستجيب للحديد Iron-Respone Sequence فى تركيب يعطى شكل ساق وعروة والذى يرتبط به بروتين مثبط للترجمة يسمى Aconitase والذى يمنع ترجمة أى تتابعات م.ر.ن.أ لاحقة Downstream (الشكل ١١-٢٠). ويعتبر الاكونيتيز بروتين مرتبط بالحديد Iron-Binding Protein ويؤدى تعرض الخلية لوفرة من الحديد إلى انفكاكة (أى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الاكونتينز) من جزئ mRNA للفيريتين بحيث يؤدى إلى إزاحة مثبط الترجمة مما يؤدى الى زيادة انتاج الفيريتين إلى أكثر من مائة ضعف.

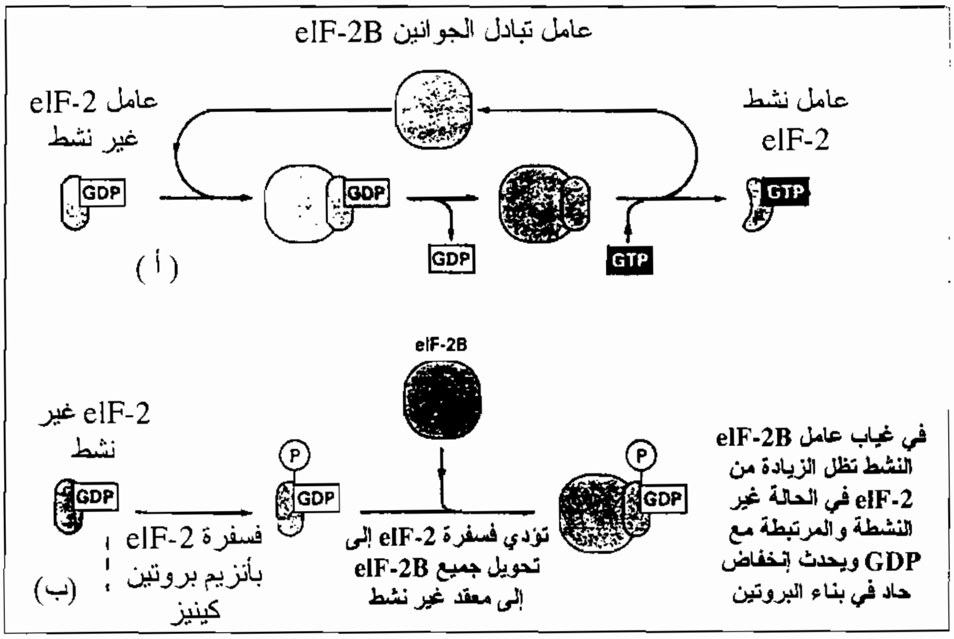


الشكل (١١-٢٠): التحكم السلبى فى عملية النسخ فى مميزة النواة ويتم ذلك بواسطة إرتباط بروتين نوعى مع تتابع مقابل فى م ر ن أ بحيث يعمل كمثبط للترجمة .يؤدى هذا الإرتباط إلى خفض مستوى الترجمة لجزئ م ر ن أ

من جهة اخرى وجد ان خلايا مميزة النواة تستخدم ميكانيكية الفسفرة لعامل بدء الترجمة elf-2 لتقليل معدل بناء البروتين استجابة لبعض العوامل البيئية مثل عدم توفر عوامل النمو أو نقص بعض المغذيات Nutrients أو عند الاصابة بالفيرس أو عند الارتفاع المفاجئ فى الحرارة. وتتم الفسفرة بنشاط انزيمات معينة للبروتين كينيزيز التى تنشط استجابة للظروف اعلاه. وقد سبق شرح دور عامل بدء الترجمة elf-2 فى عملية ترجمة البروتين فى فصل سابق. وقد وجد انه نظراً لان العامل elf-2 يرتبط بشدة بجزئ GDP فإن هناك عامل آخر يسمى elf-2B تبرز الحاجة إليه ليؤدى إلى تحرير GDP حتى يمكن ارتباط جزئ جديد من GTP بالعامل elf-2 حتى يمكن اعادة استخدام هذا الأخير

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

(الشكل ١١-٢١-أ) ويحدث تثبيط لاعادة استخدام العامل elf-2 عند فسفرته وذلك لأن elf-2 المفسفر يرتبط بشدة بالعامل elf-2B وبصورة غير عادية مسبباً وقف نشاط العامل elf-2B.



الشكل (١١-٢١): دورة elf-2

أ - إعادة تدوير elf-2 بواسطة عامل تبادل الجوانين (elf-2B).

ب- تؤدى فسفرة elf-2 إلى التحكم فى معدلات بناء البروتين عن طريق منع نشاط elf-2B.

وحيث أنه يوجد مقادير من elf-2 أكثر من elf-2B فى الخلية فإن elf-2 المفسفر يمكنه الارتباط بشدة elf-2B ومنعة من اعادة الاستخدام مما يؤدى إلى بطء شديد فى بناء البروتين (الشكل ١١-٢١-ب).

وتعد عملية تنظيم مشتوى elf-2 النشط هامة بصفة خاصة فى خلايا الثدييات، حيث تمثل جزءاً من الميكانيكية التى تسمح لهذه الخلايا بالدخول فى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مرحلة من الراحه وعدم الانقسام Nonproliferating (تسمى Go) – بحيث ينخفض معدل بناء البروتين فيها إلى خمس ($\frac{١}{٥}$) معدله فى الخلايا النشطة فى الانقسام.

كما يمكن أن يتم تنظيم الترجمة إذا لجأت الخلية مميزة النواة إلى استخدام كودون بدء AUG بديل يقع فى منطقة لاحقة Downstream من نقطة بدء الترجمة الصحيحة. إذ أن الترجمة الطبيعية عادة تبدأ من كودون AUG الذى يقع Downstream من النهاية '5 مباشرة لجزئ م.ر.ن.أ حيث أنه أول كودون يصادف الوحدة الصغرى للريبوسوم.

إلا أن التتابعات النيوكلتيدية المحيطة مباشرة بهذا الكودون تؤثر على كفاءة عملية بدء الترجمة. فإذا كان موقع التعرف مع الريبوسوم ضعيف، فإن الريبوسوم سيتخطى أول كودون AUG ويتجه إلى الارتباط بالكودون الثانى أو الثالث AUG وتعد هذه الظاهرة التى تعرف "بالمسح المتسرب Leaky Scanning" استراتيجية تستخدم كثيراً لانتاج بروتين أو اكثر متقاربين فى التركيب من نفس جزئ mRNA ويختلفان فقط فى النهاية الامينية لكل منهما. فهى تسمح مثلا لبعض الجينات بإنتاج نفس البروتين بحيث يحتوى على تتابعات اشارية مرتبطة بالنهاية الامينية له أو العكس مما يتيح امكانية توجيه هذه البروتينات إلى مواقع مختلفة فى الخلية.

وفى بعض الحالات، يمكن للخلية تنظيم الوفرة النسبية من صور البروتين Isofoms الناتجة من "المسح المتسرب"، فمثلاً فى بعض أنواع الخلايا، تؤدى الزيادة النوعية فى وفرة عامل بدء الترجمة elf- 4f إلى تفضيل استخدام كودون AUG الاقرب للنهاية '5 فى جزئ م.ر.ن.أ .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يوجد نوع اخر من التنظيم يستخدم واحد أو اكثر من اطـــارات القـــراءة المفتوحة القصيرة (ORF) التىتقع بين النهاية '5 لجزئ م.ر.ن.أ وبـــين بدايـــة الجين. وعادة ما تكون الاحماض الامينية المشفرة لهـذه الاطـــارات Upstram (UORFs') غير مهمة وانما تستخدم هذه (UORF s') لأداء وظيفة تنظيمية فقط، حيث أن هذه الاطارات القصيرة تعمل على خفض كبير فـــى ترجمـــة الجـــين اللاحق Dawnstream وذلك عندما تنجح فى تقييد حركة معقد ريبوســوم بـــدء الترجمة بحيث يتجة الريبوسوم الى ترجمة UORF وينفك عن م.ر.ن.أ قبـــل أن يصل إلى تتابعات تشفير البروتين.

وقد وجد أن خميرة الخباز تحتوى على أربعة UORF s' قصيرة والتـــى تستخدمها الخميرة لمواجهة المجاعة أو النقص فى بعض المغذيات النوعية وذلك عن طريق ايقاف بناء كل انواع البروتينات فيما عدا تلك المطلوبة لبنـــاء تلـــك المغذيات الناقصة فى البيئة. ففى الخميرة يوجد م.ر.ن.أ يشفر لبروتين يـــسمى GCN4 وهو جين يشفر لبروتين تنظيمى ضرورى لتنشيط عدد من الجينات التى تشفر لبروتينات هامة لبناء احماض امينية. وتكون منـــاطق UORF's الاربعـــة مسئولة عن احداث زيادة انتقائية Selective فى ترجمة GCN4 استجابة لفسفرة العامل elf-2 مدفوعا بالنقص الحاد فى الاحماض الامينية. ويتم ذك بميكانيكيـــة تتلخص فى أن تحت وحدات الريبوسوم تتحرك علـــى طـــول م.ر.ن.أ حيـــث تصادف كل من UORF's إلا انها تقوم بترجمة تحت مجموعة واحدة منها فقط. فمثلاً إذا تمت ترجمة UORF رقم ٤، كما هو الحال فى الخلايا غيـــر المجهـــدة غذائياً Unstarved ، فإن الريبوسوم يتفكك عند نهاية هذه UORF وتكون عملية ترجمة GCN4 ضعيفة أو معدومة. ويؤدى الانخفاض فى نشاط elf-2 إلى زيادة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فرصة تحرك الريبوسوم الماسح ليصل إلى UORF الرابـــع قبـــل أن يكتـــسب القدرةعلى بدء الترجمة.

ومثل هذا الريبوسوم يمكنه بدء الترجمة بكفاءة لجـــزئ م.ر.ن.أ GCN4 مما يؤدى إلى انتاج بروتينات تحفز بناء الاحمـــاض الامينيـــة التـــى تحتاجهـــا الخلية.

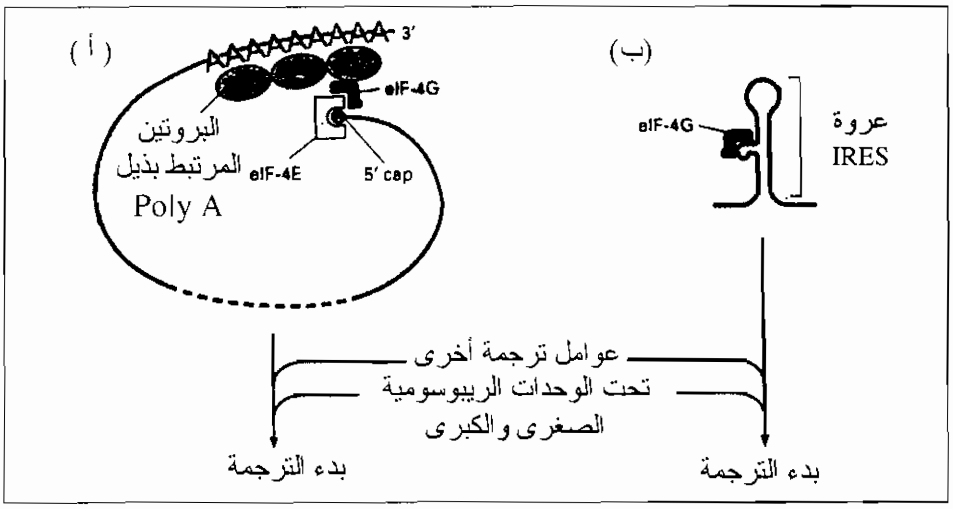
وتوجد ميكانيكية اخرى تؤدى إلى تنظيم الترجمـــة وذلـــك مـــن خـــلال طريقة اخرى تمكن للخلية من بدء الترجمة عند مواقع بعيـــده عـــن النهايـــة 5' لجزئ م.ر.ن.أ وفى هذه الحالة تبدأ الترجمـــة مباشـــرة عنـــد مواقـــع معينـــة من تتابعـــات ر.ن.أ يـــسمى كـــل منهـــا موقـــع دخـــول داخلـــى للريبوســـوم Internal Ribosome Entry site (IRES) وقد توجد IRES فى أماكن مختلفة فـــى م. ر. ن.أ.

وفى بعض الحالات غيرالعادية يمكن لتتابع تـــشفير بـــروتينين معينـــين هجينين ان تكون موجوده ترادفيا على نفس م.ر.ن.أ بحيث تتم ترجمة التتـــابع الأول بالطريقة العادية لميكانيكية المسح الريبوسومى فى حين تتم ترجمة التتابع الثانى بواسطة IRES. وتكون IRES بطول مئات النيوكلتيـــدات وتنثنـــى فـــى تركيبات نوعية يمكنها الارتباط بنفس البروتينات المستخدمة لبدء عملية الترجمة التى تعتمد على وجود القلنسوة G-Cap (الشكل ١١-٢٢). وفى الحقيقة فإن كل مجموعة من IRES تحتاج إلى مجموعة معينة من عوامل البدء إلا أن كل هـــذه IRES تستغنى عن الحاجة إلى قلنسوة G-5' Cap أو عوامل بدء الترجمة التـــى تتعرف عليها (elf-4E). وقد اكتشفت IRES'S لأول مرة فى بعض فيروســـات اصابة الثدييات بحيث تعطى طريقة مبتكرة للفيرس لكى يسخر ماكينة ترجمـــة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

العائل لحسابه. فعند الاصابة، تنتج هذه الفيروسات انزيم بروتييز (موجود فـى جينوم الفيروس) الذى يؤدى نشاطه إلى انفلاج عامل الترجمـة elf-4G للخليـة المصابة مما يجعله غير قادر على الارتباط بالعامل elf-4E (معقـد الارتبـاط بالقلنسوه G-Cap 5') ويؤدى ذلك إلى وقف معظم عمليات الترجمة فـى خليـة العائل وتحول عملية الترجمة بكفاءة الى تتابعات IRES الموجودة فى كثير مـن م.ر.ن.أ الفيروسى ويصبح العامل elf-4G الناقص أحد مكونات بـدء الترجمـة عند هذه المواقع الداخلية. وقد يحفز ترجمة بعـض م.ر.ن.أ المحتـوى علـى IRES. وتحدث هذه الميكانيكية ايضا فى م.ر.ن.أ الخلوى، فعندما تدخل الخليـة مميزة النواة مرحلة M فى دورة الخلية، ينخفض معدل الترجمة إلـى حـوالى ٢٥% عن معدلها فى المرحلـة البينيـة Intrerphase للخليـة. ويحـدث هـذا الانخفاض الحاد نتيجة عملية نزع الفـسفرة Dephosphorylation مـن معقـد الارتباط بالفلنسوة elf-4E والذى يعتمد على دوره الخلية بحيث تنخفض قدرتـه على الارتباط بالقلنسوة 5'-Cap. إلا أن جزيئات م.ر.ن.أ المحتوية علـى IRES تكون منيعة ضد هذا التأثير ويزداد المعدل النسبى لترجمتها عندما تدخل الخلية فى دور M.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١١-٢٢): ميكانيات استحثاث الترجمة

أ - تتطلب الميكانية المعتمدة على تكوين القلنسوة وجود مجموعة من عوامل البدء التي يساعد على تجميعها على م ر ن أ وجود القلنسوة '5 و ذيل متعدد الادنين.

ب- تحتاج الميكانيكية المعتمدة على IRES فقط إلى تحت مجموعة من عوامل بدء الترجمة العادية و التي تتجمع مباشرة على عروة IRES.

ومن الأمثلة المثيرة للفضول ما تم التوصل اليه مؤخرا عن ميكانيكية اضافة مزيد من ذيل متعدد الادينين PolyA-Tail في السيتوبلازم وأثر ذلك على تنظيم الترجمة. إذ من المعروف أن عملية الاضافة المبدئية لذيل Poly A التي النهاية '3 في جزئ م.ر.ن.أ تحدث في النواة بطريقة أوتوماتيكية في معظم أن لم يكن جميع نسخ م.ر.ن.أ في خلايا مميزة النواة. ومعروف أن ثبات mRNA يعتمد على طول هذا الذيل بحيث انه مع كل دورة ترجمة يحدث هدم جزئي لبعض نيوكلتيدات هذا الذيل ويقصر تدريجياً في الطول في السيتوبلازم بحيث ينتهي الأمر الى هدم mRNA بالكامل. إلا أنه في بعض الحالات يحدث العكس في السيتوبلازم بمعنى أن ذيل poly A يزداد طولاً باضافة وحدات جديدة من

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

نيوكلتيدات الأدينين اليه. وتعد هذه الميكانيكية نموذج إضافى من تنظيم الترجمة. ففى امهات البويضات الناضجة Oocytes وجد أن عملية هدم mRNA الطبيعيـــة التى تحدث فى بقية الخلايا لاتحدث فى هذه الخلايا العملاقة وذلك حتى تــتمكن هذه الخلايا من بناء مخزون ضخم من م.ر.ن.أ للتحضير لعمليـــة الاخـــصاب. وفى هذه الخلايا يكون معظم م.ر.ن.أ المخزون فى الـــسيتوبلازم طـــول ذيـــل PolyA فيها لايزيد عن ١٠-٣٠ نيوكلتيدة فقط عند النهاية 3' ولا يحـــدث لهـــا ترجمة فى هذه الصورة. وفى مراحل معينة اثنـــاء نـــضج الاووســـيت وبعـــد الاخصاب مباشرة Post- Fertilization وعندما تكون الخلية الزيجوتية الأولى فى حاجة إلى البروتينات التى تشفر لها هذه النسخ مـــن م.ر.ن.أ، تحـــدث اضـــافة لمتعدد A لمجموعات مختاره من م.ر.ن.أ فى السيتوبلازم مما يحفز بقوة بـــدء ترجمتها.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفصل الثاني عشر

تكنولوجيا د. ن. أ المعاد صياغته
Recombinant DNA Technology

شهد النصف الثانى من خمسينيات القرن العشرين مولد الوراثة الجزيئية Molecular Genetics مع إعلان نموذج الحلزون المزدوج DNA Double Helix الذى أعلنه واتسون وكريك Watson and Crick عام ١٩٥٣ لتفسير تركيب جزئ د. ن. أ على اعتبار أنه مادة الوراثة، حيث تكمن العوامل الوراثية المسئولة عن الصفات المختلفة للكائن فى تتابع القواعد النيتروجينية الموجودة على شريط د. ن. أ فى النواة. أعقب ذلك تطورات متلاحقة فى الستينات للتعرف على الأساس الجزيئ لعملية تضاعف وتناسخ جزئ د. ن. أ والتركيب الدقيق للجين والنظم الوراثية والبيوكيماوية المسيطرة على معدل التعبير الجينى مثل نظم الأوبرون Operon System. واستمرت مراكز البحوث منذ السبعينات وحتى الآن فى نشر نتائج البحوث فى هذا المجال بحيث أصبح كل يوم يأتى بجديد.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تكنولوجيا الجين المعاد صياغته:

Recombinant DNA Technology :

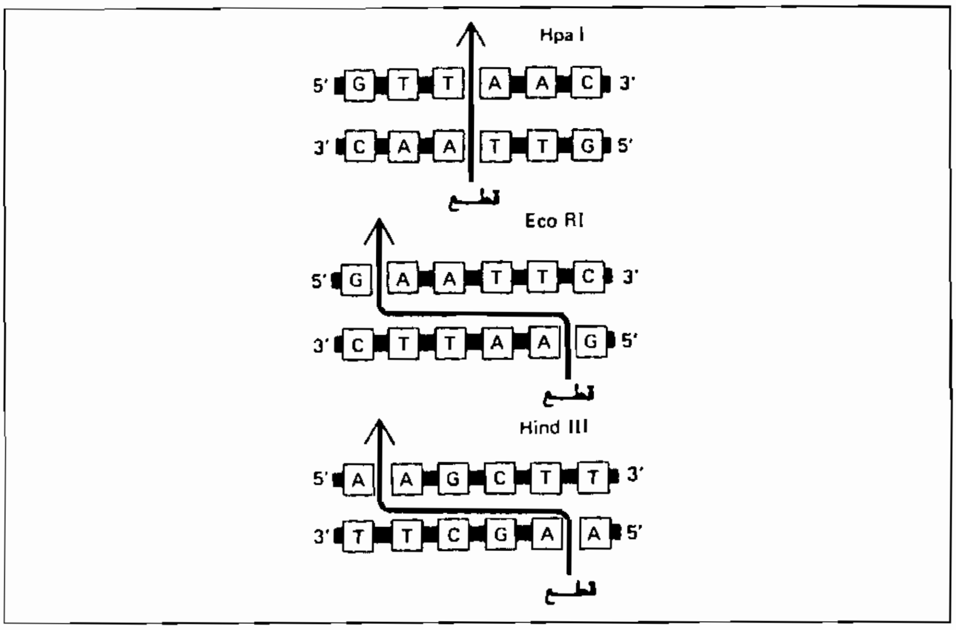
شهد منتصف السبعينات ميلاد Recombinant DNA Technology أو تقنية الجين Gene Technology. وفيما يلى شرح مختصر لبعض العناصر الرئيسية المستخدمة فى هذة التقنية.

انزيمات القطع المحددة Restriction Endonucleases:

توجد بعض انزيمات القطع الداخلى Endonucleases وهى تلك الانزيمات التى تقوم بقطع جزئ د. ن. أ عند تتابعات محددة من أزواج القواعد الداخلية يطلق عليها تتابعات التعرف Recognation Sequnces والتى يوجد بداخلها موقع معين يعرف بموقع القطع Cleavage Site.

وتعتبر إنزيمات القطع الداخلى الأداة الرئيسية فى بحوث د. ن. أ المعاد صياغته Recombinant DNA . وقد جاءت تسمية هذه الانزيمات فى الأصل بالانزيمات المحددة Restriction Enzymes نتيجة لأن وجودها فى خلية بكتيرية معينة يحد أو يمنع نمو البكتريوفاج بها. تقوم انزيمات القطع الداخلى بقطع د. ن. أ الى قطع صغيرة عند تتابع نوعى متخصص محدد. وعلى العكس من معظم التفاعلات الانزيمية أو الكيماوية أو الفيزيائية التى تحدث قطعاً عشوائياً فى جزئ د. ن. أ فإن هذه الإنزيمات المحددة والتى يبلغ عددها حوالى ٢٠٠ انزيم تتعرف على تتابعات نوعية قصيرة مكونة من ٤-٦ أزواج من القواعد وتُحدث كسر نوعى فيها كما فى الشكل (١٢-١).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-١): تتابعات النيوكلتيدات فى د ن أ التى يتم التعرف على كل منها بواسطة ثلاثة إنزيمات قطع محددة شائعة الإستخدام و يتكون التتابع عادة من ستة أزواج من القواعد

ويوجد إلى جانب هذه الانزيمات فى الخلية البكتيرية مجموعة مصاحبة من انزيمات الميثلة DNAmethylases التى تقوم باضافة مجموعات ميثيل إلى جزئ د. ن. أ البكتيرى حتى تحمية من أن يستخدم كمادة تفاعل فتقوم انزيمات القطع المحددة لنفس البكتريا بتكسيرة وهضمة ذاتياً. وعلى ذلك فإن انزيمات ميثلة د. ن. أ النوعية الموقع تكون ملازمة دائماً لانزيمات القطع المحددة في البكتريا. تسمى انزيمات القطع حسب نوع البكتريا التى تستخلص منها هذه الانزيمات كما فى الجدول (١٢-١).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الجدول (١٢-١): بعض الانزيمات محددة القطع الداخلى والتتابعات النوعية التى تتعرف عليها وموقع القطع لكل منها (↓).

المصدر البكتيرى	التتابع المميز	الانزيم
Bacillus amyloliquef aciens H.	G ↓ GATCC CCTAG ↑ G	Bam HI
Bacillus globigi	A ↓ GATCT TCTAG ↑ A	Bg l II
E. coli RY13	G ↓ AATTC CTTAA ↑ G	Eco RI
E. coli R245	↓ CCTGG GGACC ↑	Eco RII
Haemophillus influenzae Rd	A ↓ AGCTT TTCGA ↑ A	Hind III
Heamophillus haemolyticus	GCG ↓ C C ↑ GCG	Hha I
Haemophilus parainfluenza	GTT ↓ AAC CAA ↑ TTG	Hpa I
Microcoleus strain	CC ↓ TNAGG GGANT ↑ CC	Mst II
Providencia stuartil 164	CTGCA ↓ G G ↑ ACGTC	Past I
Thermus aquaticus YT1	T ↓ CGA AGC ↑ T	Taq I

* N= أى نوع من النيوكليتدات الأربعة.

فمثلاً انزيم Eco RI يستخلص من بكتريا القولون *E. coli* وهكذا. تكون أول ثلاث حروف من اسم الانزيم مشتقة من أول حرف فى الجنس البكتيرى الذى يستخلص منه (E) والحرفين الأولين فى النوع البكتيرى (co)، وقد يتبع ذلك اسم السلالة النوعية التى استخدمت فى الاستخلاص (R) ورقم لاتينى (I) يحدد أسبقية اكتشاف الانزيم. يتعرف كل انزيم على تتابع نوعى من أزواج القواعد فى جزئ د. ن. أ مكونا من ٤-٧ من أزواج القواعد. ويحدث كسراً محدداً به [وتبين الأسهم فى الجدول (١٢-١) مكان القطع بين القواعد لكل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

انزيم] وقد ينتج عن القطع نهايات مزدوجة السلسلة blunt ends كما فى حالة انزيم (Hpa I) أو نهايات وحيدة السلسلة sticky ends (لزجه) كما فى حالة انزيم Bam HI كما فى الشكل التالى :

```
- G ↓ GATCC     Bam H1            - G    GATCC-
- CCTAG ↑ G    ---------->    - CCTAG +      G-
```

نهاية لزجة

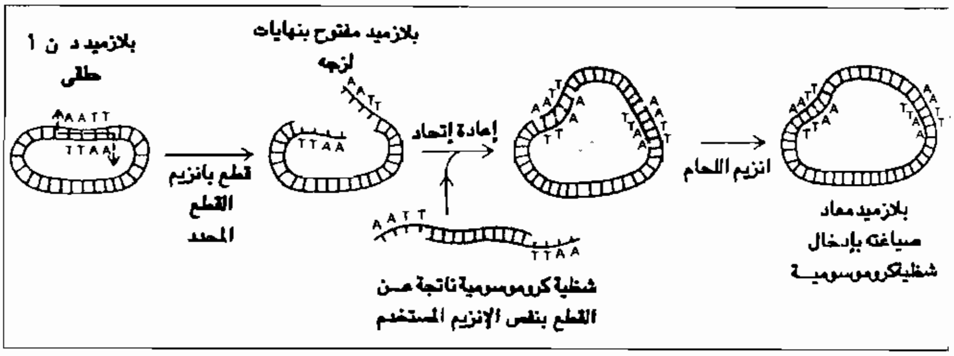
```
- GTT ↓ AAC      HpaI         - GTT  +  AAC-
- CAA ↑ TTG    ---------->    - CAA      TTG-
```

نهاية مزدوجة .

ويرجع ذلك إلى الميكانيكية التى يستخدمها الانزيم. وتعد النهايات اللزجة ذات فائدة عملية كبيرة فى تكوين جزئ د. ن. أ هجينى معاد صياغته (الشكل ١٢-٢) يمكن فى حالة عدم الحصول على نهايات فردية لزجة Sticky Ends، استخدام انزيم Terminal Transferase للحصول على ذيل فردى فى نهاية القطع المحددة وفى وجود عدد معين من نيوكلتيدات dATP لانتاج ذيل من عديد الادينين Poly A Tail (طوله حوالى ١٠٠ نيوكلتيدة) على النهاية (3') على د.ن.أ البلازميد بينما يمكن اضافته إلى ذيل من عديد الثايمين Poly T بنفس الطول على نهاية د. ن. أ المرغوب اضافته إلى البلازميد. ويتم بعد ذلك التقاء القطع عند الذيول المتكاملة بخاصية تزاوج القواعد Base Pairing ويتكون بينها روابط هيدروجينية وتستكمل عملية الالتحام بمساعدة انزيمات Polymerase I و Ligase كما سبق الذكر (أنظر الشكل ١٢-٢). وإذا افترضنا أن النيوكلتيدات تكون موزعة بتتابع عشوائى فى جزئ ما من د. ن. أ فإنه من الممكن حساب معدل تكرار القطع الذى يحدثه انزيم معين فى طول معين من د.ن. أ. إذ أنه لكل موقع فى جزئ د. ن. أ يكون هناك ٤ احتمالات: (T, G, C, A) وعلى ذلك فإن انزيم القطع الذى يتعرف على ٤ أزواج من القواعد سيحدث قطع (فى

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

المتوسط) مرة كل ٢٥٦ زوج من القواعد (٤[٤]) فى حين أن الانزيم الذى يتعرف على ٦ أزواج من القواعد سيقوم بالقطع كل ٤٠٩٦ زوج نيوكلتيدى (٤[٦]).



الشكل (١٢-٢): تمكن النهايات اللزجة الناتجة من بعض أنواع إنزيمات القطع المحددة من إلتحام قطع من د ن أ ببعضها حسب قانون تزاوج القواعد المكملة. شظايا د ن أ المتصلة بهذه الكيفية يمكنها تكوين روابط تساهمية قوية بمساعدة إنزيم الليجيز ويبدو فى الشكل بلازميد معاد صياغته بإضافة د ن أ كروموسومى إليه

ونتيجة لذلك فإن قطعة ما من د. ن. أ ستحتوى على مواقع خطية مختلفة ومميزة للأنزيمات المختلفة وبالتالى يمكن رسم خرائط القطع المحدد Restriction Maps. وعند هضم د. ن. أ بأنزيم قطع معين فإن نهايات جميع القطع الناتجة ستكون محتوية على نفس التتابع النيوكلتيدى ويمكن عزل القطع الناتجة باستخدام تقنية التفريد الكهربى باستخدام جيل الاجاروز Agarose كما سيأتى بعد. وتعد هذه الخطوة اساسية فى الكلونة Cloning كما تعتبر أحد الاستخدامات الرئيسية لهذه الانزيمات. ويمكن بالاستخدام الصحيح لهذه الانزيمات واختيار الانزيم المناسب الحصول على شظايا قصيرة نسبياً من د. ن. أ تحتوى على جين معين ويمكن فصل هذه الشظية عن بقية الشظايا غير المرغوبة بطريقة التفريد الكهربى.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بالاضافة إلى هذه المجموعة من انزيمات القطع المحدد توجد عدة انزيمات تقوم بأدوار رئيسية فى مجال الهندسة الوراثية، ويلخص الجدول (٢-١٢) دور هذه الانزيمات فى بحوث د. ن. أ المعاد صياغته Recombinant DNA.

الجدول (٢-١٢) بعض الانزيمات الهامة في بحوث د ن أ المعاد صياغته

الانزيم	التفاعل	الدور الأساسى
١- أنزيم الفوسفاتيز القاعدى Alkaline phophatase	نزع مجموعة الفوسفات من النهاية 5' من ر. ن. أ أو د.ن.أ	التخلص من مجاميع 5'-P04 قبل التعليم بالكينيز لمنع الالتحام الذاتى self- ligation
٢- BAL 31 nuclease	تحليل كل من النهايتين 5', 3' فى جزئ د. ن. أ	تقصير مضطرد فى جزئ د.ن. أ
٣- أنزيم لحام د. ن. أ DNA ligase	يساعد فى الربط بين جزيئات د. ن. أ	توصيل جزيئات د. ن. أ ببعضها
٤- DNA Pol I	بناء د.ن.أ مزدوج السلسلة من د.ن.أ أحادى السلسلة	بناء د.ن.أ المزدوج السلسلة وعمل ثغرة للترجمة nick-translation
٥- DNase I	تحت الظروف المناسبة ينتج قطع وحيدة السلسلة فى د.ن.أ	ثغرة الترجمة - وعمل خريطة لمواقع التتابعات فائقة الحساسية.
٦- Exonuclease III	نزع نيوكلتيدات من النهاية 3' لجزئ د.ن.أ	دراسة تتابعات قواعد د.ن.أ وعمل خريطة التفاعل بين د.ن.أ والبروتين
٧- λ Exonuclease	نزع نيوكلتيدات من النهاية 5' لجزئ د. ن. أ	دراسة تتابعات قواعد د.ن.أ DNA sequencing

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٨- Polynucleotide kinase	نقل الفوسفات الطرفية (موقع γ) من ATP الى مجموعات 5'-OH فى د.ن.أ أو ر.ن.أ	تعليـــــم DNA أو RNA بالفوسفور المشع P^{32} .
٩- انزيم النسخ العكسى Reverse Transcriptase	بناء DNA على قالب RNA	بناء cNDA من mRNA وفى دراسة خريطة النهاية 5' من RNA
١٠- S I nuclease	هدم د.ن.أ وحيد السلسلة	ازالة عروة دبوس الشعر Hairpin فى عملية بناء cDNA وفى دراسة خريطة mRNA (من كلا النهايتين 5', 3')
١١- Terminal Transferase	اضافة نيوكلتيدات إلى النهاية 3' من جزئ د.ن.أ بدون الحاجة إلى قالب د.ن.أ	اضافة ذيل متعدد متجانس Homopolymer(أى مكون من قاعدة واحدة متكررة مثل Poly A) لتكوين نهايات لزجة.

الكلونة Cloning:

يمكن تعريف الكلون بأنه عدد كبير من الجزيئات أو الخلايا المتطابقة التى تنشأ من أصل واحد. يمكن عن طريق الكلونة انتاج أعداد كبيرة من جزيئات د.ن.أ المتماثلة التى يمكن تعريفها وتمييزها أو استخدامها فى أغراض اخرى. تعتمد هذه التقنية على حقيقة أن جزيئات د.ن.أ الهجينية "الكيميرى" يمكن ادخالها فى ناقلات الكلونة Cloning Vectors التى تكون عادة أما بلازميد بكتيرى أو فاج أو كوزميد Cosmid والذى يستمر بعد ذلك فى التناسخ فى خلية مضيفة Host Cell ولكن تحت تأثير نظم التحكم الخاصة بهم. وبهذه الطريقة يمكن

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الحصول على أعداد هائلة من نسخ الجين.وتتلخص الخطوات الاساسية لكلونة الجين Gene Cloniag (الشكل ١٢-٣) فى الاتى:

١- ادخال قطعة أو شظية من د.ن.أ محتوية على الجين المطلوب كلونته فى ناقل الكلونة Cloning Vector لا نتاج د.ن.أ معاد صياغة (كيميرى) Recanbinat DNA.

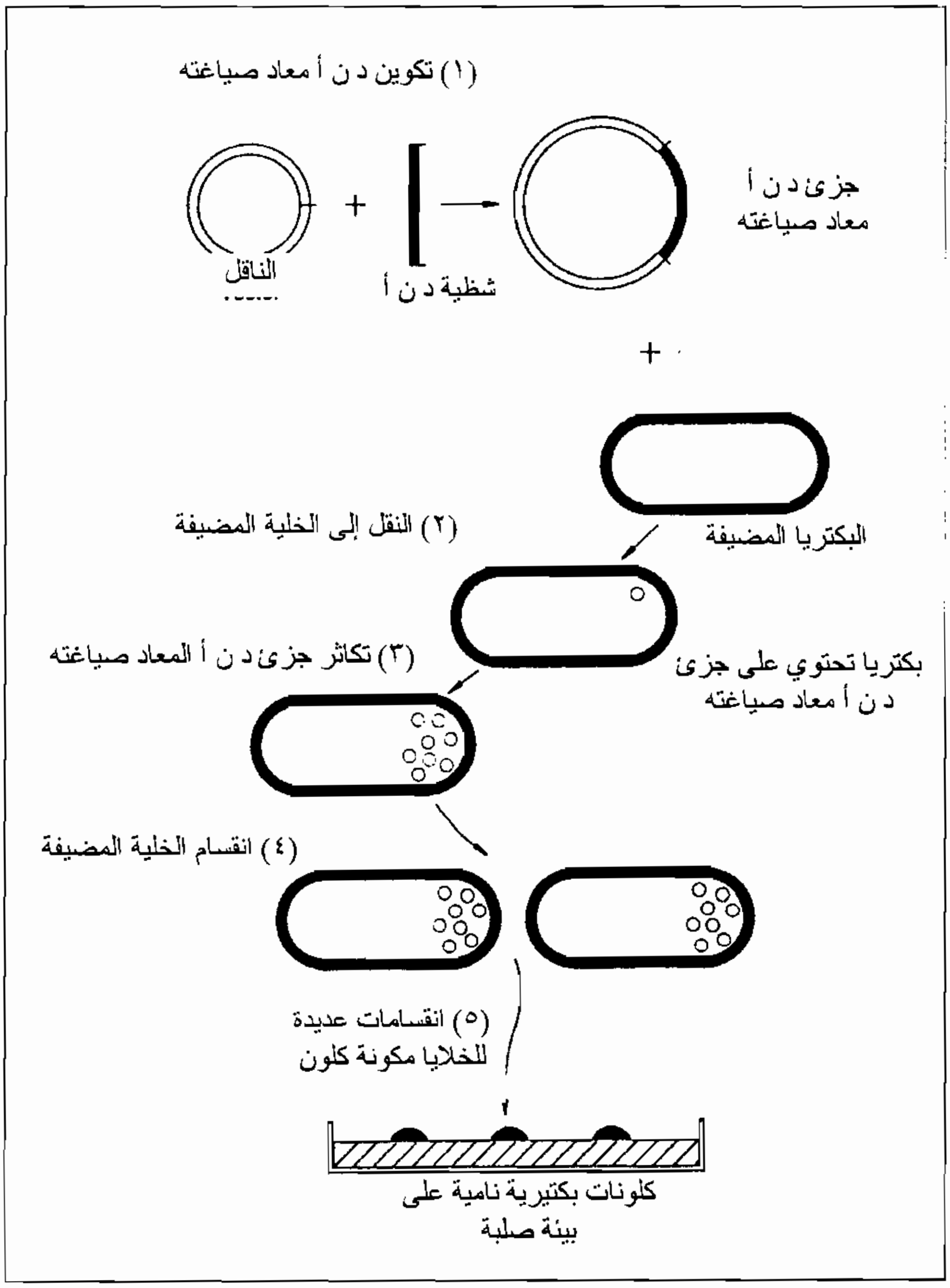
٢- يلعب الناقل دور وسيلة الانتقال لادخال الجين الى الخلية المضيفة والتى تكون عادة بكتريا على الرغم من أنه يمكن استخدام خلايا حيه أخرى لاستضافة الجين.

٣- يتكاثر الناقل داخل الخلية المضيفة منتجا اعداد كبيرة جداً من النسخ المتطابقة بما فى ذلك نسخ من الجين المكلون.

٤- عندما تنقسم الخلية المضيفة فإن نسخ من جزيئات د.ن.أ المعاد صياغته Recombinant DNA تمر إلى خلايا النسل حيث يحدث بها تضاعف جديد للناقل.

٥- يعد عدد كبير من انقسامات الخلية المضيفة نحصل على كلون Clone (مستعمره) من الخلايا المضيفة المتطابقة وتحتوى كل خلية فى هذا الكلون على نسخة أو أكثر من د.ن.أ المعاد صياغته. ويقال للجين المحمول فى الجزئ المعاد صياغته انه قد تكلون Cloned.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٣): الخطوات الأساسية فى عملية كلونة الجين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أنواع ناقلات الكلونة Cloning Vectors:

البلازميدات:

تكون البلازميدات البكتيرية عادة مكونة من جزئ صغير حلقى مـــزدوج من د.ن.أ والذى تكون وظيفته الطبيعية هى إكساب الخليـــة المـــضيفة لـــصفة المناعة ضد بعض المضادات الحيوية. وللبلازميدات عدة خواص تجعلها مفيـــدة جدا كناقلات الكلونة. إذ انها توجد كنسخة وحيدة أو عدة نـــسخ فـــى البكتريـــا، وتتناسخ مستقلة عن د. ن. أ البكتيرى كما أن تتابع القواعد فـــى جـــزئ د.ن.أ البلازميد معروف بالكامل مما يتيح معرفة المكان الدقيق لنشاط القطع للانـــزيم والذى يتم فيه إدخال د.ن.أ المراد اضافته. ويكون البلازميد أصغر بكثير مـــن كروموسوم الخلية المضيفة مما يجعل من السهل عزله منها.

الـــفـــاج:

يتكون د. ن. أ الفاج من جزئ خطى من د. ن. أ الذى يمكن فيه ادخـــال القطع المرغوبة من د. ن. أ الجديد (الاجنبى) فى عدة مواقع للقطـــع الانزيمـــى المحدد. ويتم تجميع د. ن. أ الهجينى (الكيميرى) بعد أن يـــستكمل الفـــاج دورة التحلل للبكتريا Lytic Cycle وينتج وحدات فاج ناضجة معدية، والميزة الرئيسية للناقلات من نوع الفاج هى أنه بينما يمكن للبلازميد استقبال أو ادخـــال شـــظية د. ن. أ بطول حوالى ١-١٠ كيلو قاعدة، فإن الفاج يمكنـــة اســـتيعاب شـــظايا د ن أ. بطول يتراوح بين ١٠-٢٠ كيلو قاعدة ويرجع ذلك إلى أن مـــا يمكـــن لحجم رأس الفاج أن تستوعبة يكون محدوداً.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الكوزميد Cosmid:

وهى مجموعة من الناقلات يمكنها أن تستقبل شظايا أطول مـن د. ن. أ وهى تجمع بين أفضل مميزات البلازميد والفاج معاً.

والكوزميد عبارة عن بلازميد يحتوى على تتابع د.ن.أ تسمى مواقع (Cos Cos (Sites المطلوبة لتعبئة د.ن.أ لامبدأ فى حبيبة الفاج. وتنمو هذه الناقلات فى صورة بلازميد فى البكتريا، ولكن حيث أن معظم د.ن.أ اللامبدا يـتم اسـتبعاده فإنه يمكن إدخال قطع أكبر من د.ن.أ الكيميرى فى رأس الحبيبـة الفيروسـية. ويمكن للكوزميد أن يستوعب قطع د.ن.أ بطول من ٣٥ إلى ٥٠ كيلو قاعدة.

وقد أستنبطت مؤخرا ناقلات كلونة Cloning vectors لديها القدرة علـى استيعاب شظايا د.ن.أ ذات احجام أكبر . ومن أهم هذه الناقلات:

الكروموسوم البكتيري الصناعي:

Bacterial Artificial Chromosomes BAC's:

المشتق من بلازميد F. ويمكن لهذا الناقـل أخـذ شـظية د.ن.أ بطـول ٣٠٠-٦٠٠ك قاعدة مما يؤدى إلى خفض عدد كلونات مكتبة الجينوم البـشرى إلى ٣٠٠٠٠ كلون فقط. كما استنبطت نافلات تجمع بين مزايا بكتريوفـاج P1 وBAC's ويطلق عليها P1-Derived Artificial Chromosomes PAC's وتـصل سعة هذا الناقل الى ٣٠٠ك قاعدة. ومن جهة أخرى امكن تكوين ناقل ذو سـعة كبيرة تـصل مـن ٦٠٠-١٢٠٠ك قاعـدة ويطلـق عليـه Yeast Artifical Chromosome YAC's وهو مشتق من بلازميد بكتريا القولـون PBR322 مـع إضافة عدد من جينات الخميرة اليه. ويبين الجدول (١٢-٣) مقارنة بين سـعة هذه الناقلات.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

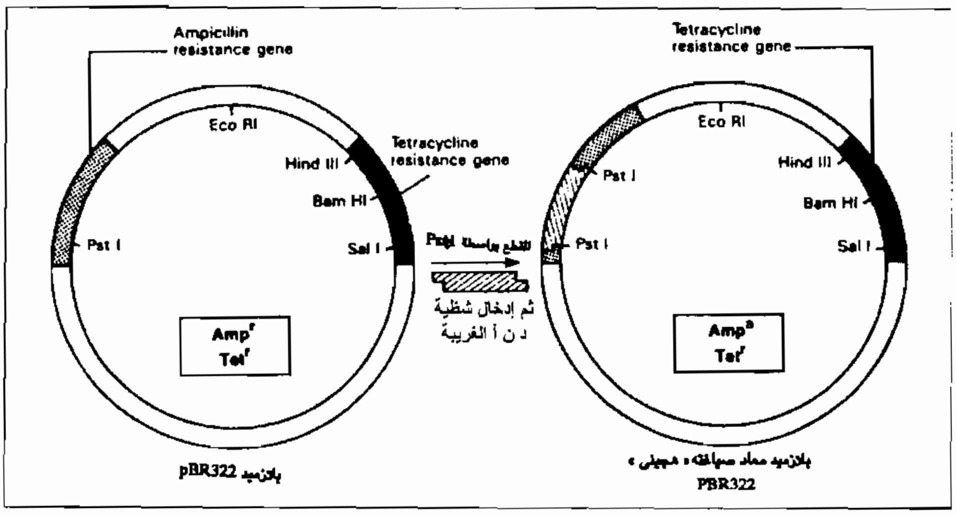
الجدول (١٢-٣) بعض الناقلات الشائعة الاستخدام فى الكلونة

الناقل vector	حجم د.ن.أ الذى يمكن ادخاله (kb)
Plasmid pBR 322	٠,١- ١٠
Lambda Phage 4 A	١٠ - ٢٠
Cosmids	٣٥ - ٥٠
BAC's	٣٠٠-٦٠٠
YAC's	٦٠٠-١٢٠٠
PAC's	٣٠٠

يمكن أثناء عملية أدخال د.ن.أ إلى منطقة فعالة للناقل Vector أن يحدث تداخل مع عمل أو نشاط هذه المنطقة. ولذلك يجب الحذر من الاخلال بأحد الوظائف الضرورية للناقل. إلا أن هذا المفهوم يمكن استغلاله ايضا للتوصل إلى تقنية انتخابية. إذ يحتوى البلازميد pBR322 مثلا على جين المناعة ضد المضاد الحيوى (tet^R) Tetracyclin، وكذلك الجين الخاص بالمناعة ضد Ampicillin (amp^R) ويستخدم عادة موقع واحد للانزيم Pst1 داخل جين المقاومة للامبسلين (amp^R) كموقع إدخال لقطعة من د.ن.أ الغريب. وبالاضافة إلى أن هذا الموقع يحتوى على نهاية لزجة، فإن د.ن.أ المضاف فى هذا الموقع سيحدث خللا فى جين المقاومة للأمبسلين مما يؤدى إلى أن تكون الخلية البكتيرية الحاملة لهذا البلازميد حساسة للامبسلين كما فى الشكل (١٢-٤) وبالتالى يمكن التمييز بين البلازميد الأصلى والبلازميد الهجينى بفقد الأخير لصفة المقاومة للأمبسلين مع احتفاظة بالمقاومة للتراسيكلين. ويمكن التأكد من حدوث الادخال عن طريق معرفة الفرق فى الحجم بين البلازميد الأصلى والبلازميد الهجينى بطريقة التفريد الكهربى، حيث يكون البلازميد الأخير أكبر حجما عن الناقل الأصلى.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وسنتعرض فيما بعد للطرق المختلفة لاختيار الكلون المحتوى على الجين محل الدراسة.



الشكل (١٢-٤): يتم التعرف على البلازميد المعاد صياغته بإدخال شظية د ن أ المرغوبة بإستخدام إنزيم PSt1 مما يحدث خللا فى الجين المسئول عن المقاومة للأمبسيلين مما يفقده القدرة على المقاومة لهذا المضاد الحيوى عند تنمية البكتريا فى بيئة محتوية على الأمبسلين

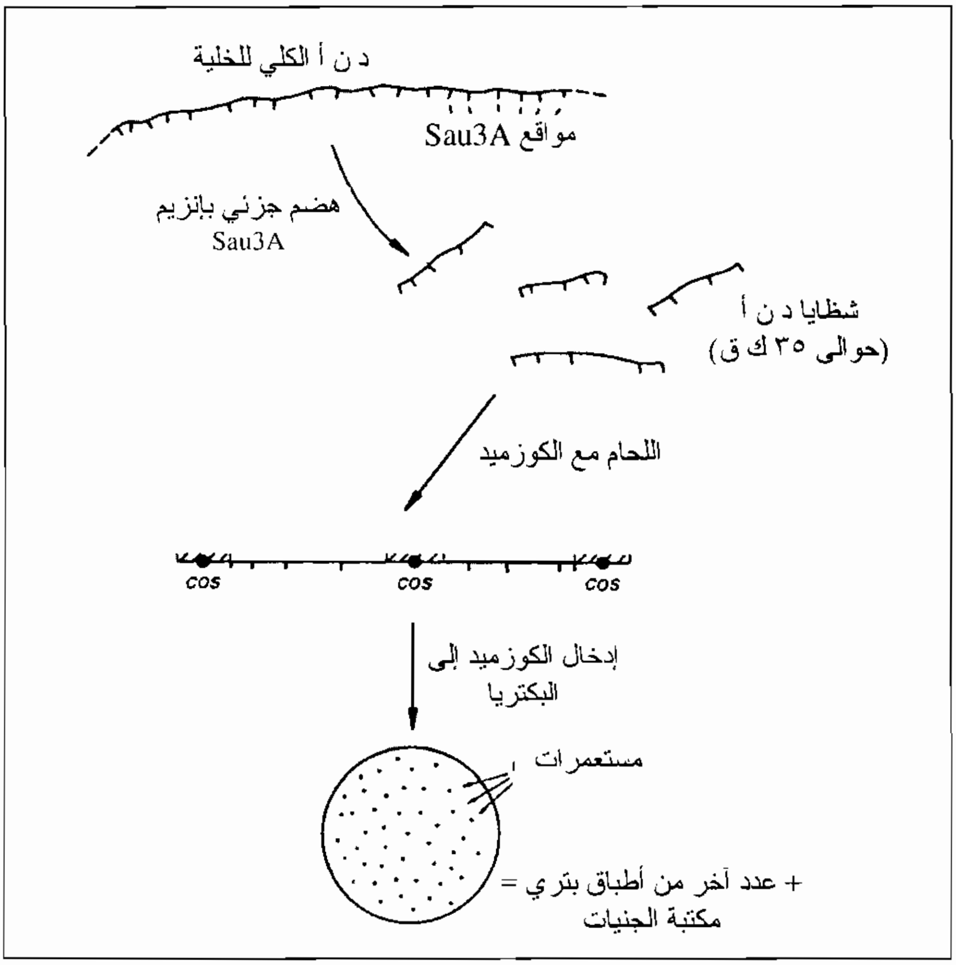
مكتبة د.ن.أ (بنك الجينات) Gene library:

أ- المكتبة الجينومية:

يمكن باستخدام انزيمات القطع المحددة والأنواع المختلفة لناقلات الكلونة تعبئة الجينوم الكامل لكائن ما فى ناقلات. يطلق على المجموعة المكونة من هذه الكلونات المعاد صياغتها اسم المكتبة الجينومية. يمكن تكوين مكتبة جينوم من جميع قطع د.ن.أ المأخوذة من خط خلايا أو نسيج معين بحيث تكون هناك فرصة لاحتواءها على جميع الجينات الخاصة بهذا الكائن المأخوذة منه.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يتم انتاج مكتبة الجينوم بعزل وتنقية محتوى الخلية مـــن د.ن.أ بـــإجراء عملية هضم جزئى لـــ د.ن.أ بإنزيم قطع يتميز بارتفاع معدل نـــشاطة القطعـــى مثل SauIIIA. والغرض من ذلك هو الحصول على شظايا د.ن.أ طويلة نـــسبيا مما يضمن أن معظم الجينات ستكون سليمة ولم يحدث لآى منهـــا أى تجزئـــة نتيجة القطع (الشكل ١٢-٥).



الشكل (١٢-٥): تكوين مكتبة جينات فى ناقل الكوزميد

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ويمكن استخدام الفاج كناقل فى مثل هذه المكتبات أو الكوزميد أو YAC أوBAC لأنها تسمح بإدخال شظايا د.ن.أ كبيرة نسبياً (جدول ١٢-٣) وحيث أن الهدف هو الحصول على مكتبة كاملة فإن عدد الشظايا المطلوب يكون متناسباً عكسياً مع حجم الشظية وطردياً مع حجم الجينوم كما فى الجدول (١٢-٤).

الجدول (١٢-٤) عدد الكلونات Clones اللازمة لتكوين المكتبة الجينومية لمجموعة من الكائنات

النوع Species	حجم الجينوم (bp)	عدد الكلونات اللازمة		
		شظايا١٧ك قاعدة (١)	شظايا٣٥ك قاعدة (٢)	شظايا٣٠٠ك قاعدة (٣)
بكتريا القولون	٤,٦ × $١٠^{٦}$	٨٢٠	٤١٠	٤١
خميرة الخباز	١,٨ × $١٠^{٧}$	٣٢٢٥	١٥٠٠	١٥٠
حشرة الدروسفلا	١,٢ × $١٠^{٨}$	٢١٥٠٠	١٠٠٠٠	١٠٠٠
الانسان	٣,٢ × $١٠^{٩}$	٥٦٤٠٠٠	٢٧٤٠٠٠	٣٠٠٠٠
الضفدع	٢,٣ × $١٠^{١٠}$	٤٠٥٣٠٠٠	١٩٦٩٠٠٠	١٩٦٩٠٠
الأرز	٥,٧ × $١٠^{٨}$	١٠٠٠٠٠	٤٩٠٠٠	٤٩٠٠

*محسوبة على أساس احتمال (P)=٩٥% أن أى جين معين سيكون موجود فى المكتبة. (١)باستخدام λ فاج كناقل للكلونه. (٢)باستخدام الكوزميد كناقل للكلونه. (٣)باستخدام BAC's كناقل للكلونه.

تمثل الأعداد المذكورة فى الجدول عدد شظايا د.ن.أ (كلونات مستقلة) اللازمة للوصول إلى احتمال ٩٥% لإمكان الحصول على تتابع معين من د.ن.أ فى مكتبة د.ن.أ المعاد صياغته بمتوسط طول الشظية المدخلة ٢×$١٠^{٤}$ نيوكلتيدة. يرجع الاختلاف فى العدد إلى اختلاف عدد الجينات التى يحملها كل كائن ممثل فى الجدول وتحسب عدد الكلونات اللازمة من المعادلة:

$$N = \frac{Ln(1-P)}{Ln(1-f)}$$

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

حيث P تمثل الاحتمال المطلوب و f تمثل الجزء من الجينوم الكامل فـــى الكلون الواحد؛ وعلى سبيل المثال فى حالة مكتبة جينوم الإنسان المذكورة فـــى الجدول أعلاه، وعلى اعتبار أن هناك ٣×١٠^٩ نيوكلتيدة فى الجينـــوم الاحـــادى فتكون :

$$N = \frac{Ln(1-0.99)}{Ln\left\langle 1-\left(\frac{2\times10^{4}}{3\times10^{9}}\right)\right\rangle}$$

وميزة تكوين مكتبة مكونة من شظايا د.ن.أ طويلة نسبياً تبـــدو واضـــحة اذا قورنت بنتائج المعادلة أعلاه فيما إذا كان حجم شظايا د.ن.أ بحجم أقـــل أى ٥×١٠^٣ بدلا من ٢×١٠^٤.

وعلى ذلك فإن مكتبة الجينـــوم البـــشرى المحتـــوى علـــى ١٠^٦ شـــظية د.ن.أ معاد صياغتها بطول كبير نسبياً (٢×١٠^٤) ستصل فرصة الحصول عليها كاملة الى ٩٩% وبالتالى فإن احتمال الحصول على جين وحيد النسخة ســـيكون مرتفعاً.

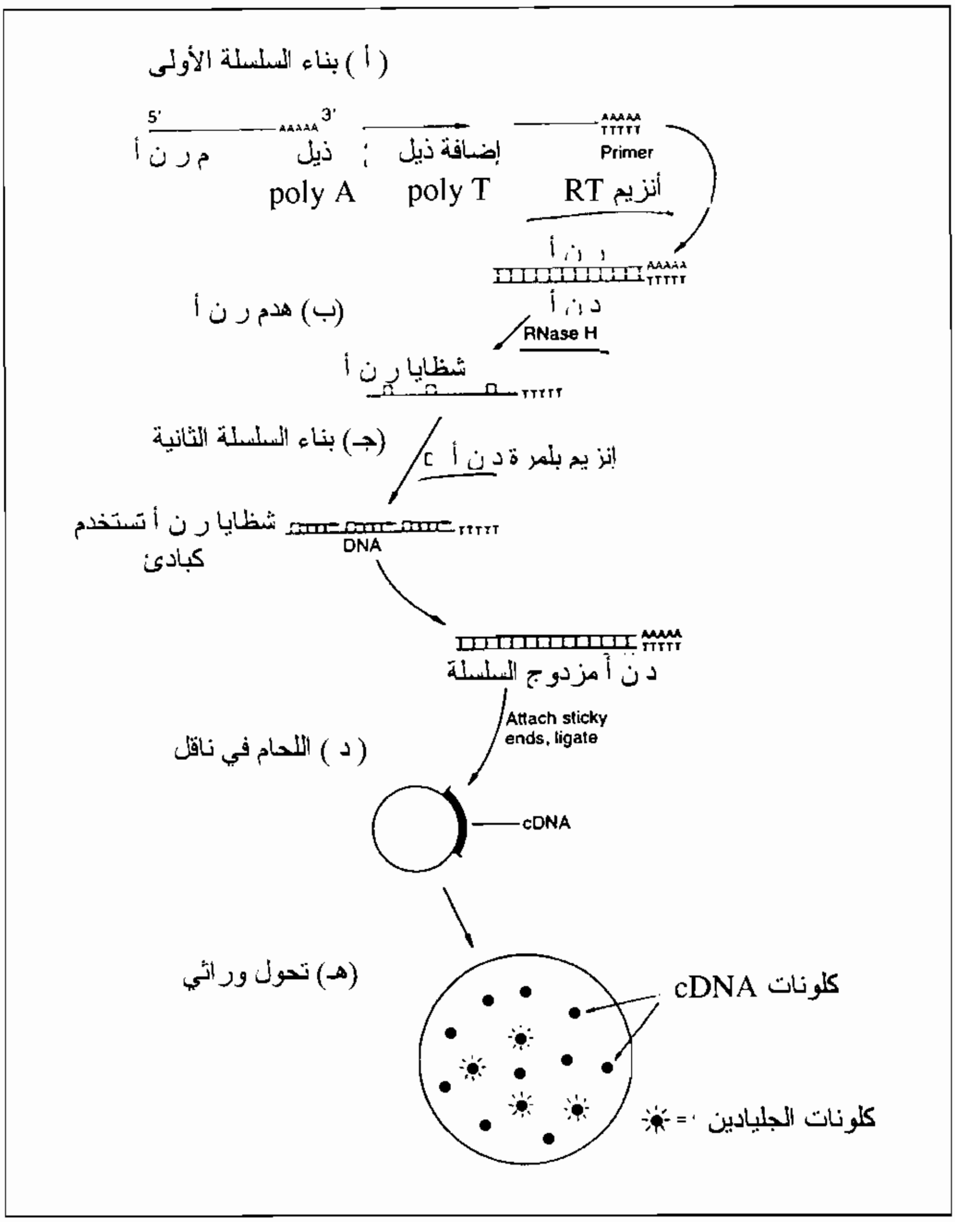
يطلق على هذه الطريقة اسم طريقة Shotgun أى أننا فـــى قطـــع جميـــع الجينوم بحثا عن الجينات المرغوبة كمن يصوب بالبندقية علـــى هـــدف غيـــر معلوم. كما أن هذه التقنية تستغرق وقتا طويلاً وعملاً متـــصلا والنتيجـــة قـــد لا تكون مضمونة اذ قد نحصل على شظايا لا شفرية كثيرة ضمن الأعداد الهائلة من الشظايا الموجودة فى مكتبة الجينوم.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ب- مكتبة cDNA:

وتعتمد على تقنية متخصصة تعتمد على كلونة د.ن.أ المنسوخ cDNA. حيث يقتصر الاختيار على تلك التتابعات من د.ن.أ التى يمكن نسخها إلى ر.ن.أ والتى يفترض أنها تمثل جينات معينة. ويحدث ذلك عن طريق استخلاص mRNA من الخلايا المتخصصة فى انتاج بروتين معين بكميات كبيرة حيث تزداد نسبة mRNA النوعى الذى يشفر لهذا البروتين (راجع gene-in site و gene-in time فى الفصل الحادى عشر). ثم يتم انتاج نسخ من د.ن.أ المنسوخ Complementary DNA (cDNA) على قالب من ر.ن.أ المراسل mRNA باستخدام انزيم النسخ العكسى Reverse Transcriptase. ويتم تحويل جزيئات د.ن.أ الوحيدة السلسلة الناتجة الى جزيئات مزدوجة بفعل انزيم بلمرة د.ن.أ، DNA Poly I. ثم يتم بعد ذلك ادخال هذه الجزيئات إلى البلازميد ثم تجرى عملية الكلونة كما فى الشكل (١٢-٦).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

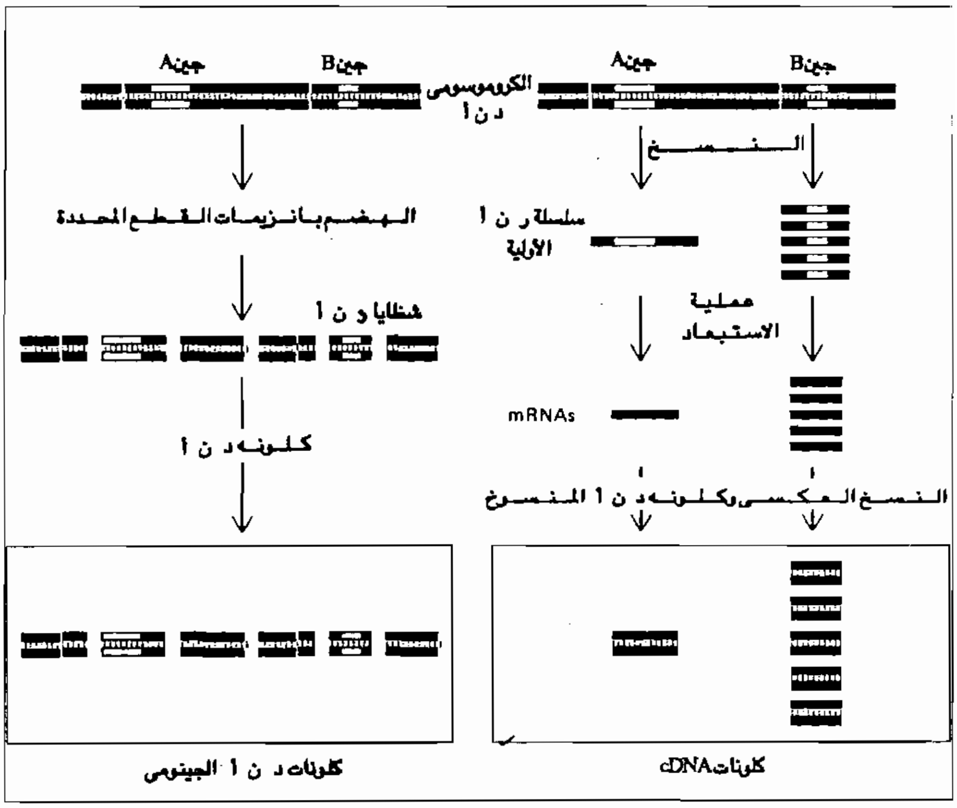


الشكل (١٢-٦): إحدى الطرق الممكنة لكلونة cDNA

Poly A = ادينوسين متعدد ، أولجو d.T = متعدد الثايميدين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يسمى كل كلون متحصل عليه بهذه الطريقة كلون د.ن.أ المنسوخ cDNA، في حين تسمى المجموعة الكاملة للكلونات المشتقة من تحضير أحد أنواع mRNA مكتبة د.ن.أ المنسوخ cDNA Library. وهناك فرق هام بين كلونات د.ن.أ الجينوم وكلونات د.ن.أ المنسوخ كما هو موضح في الشكل (١٢-٧).



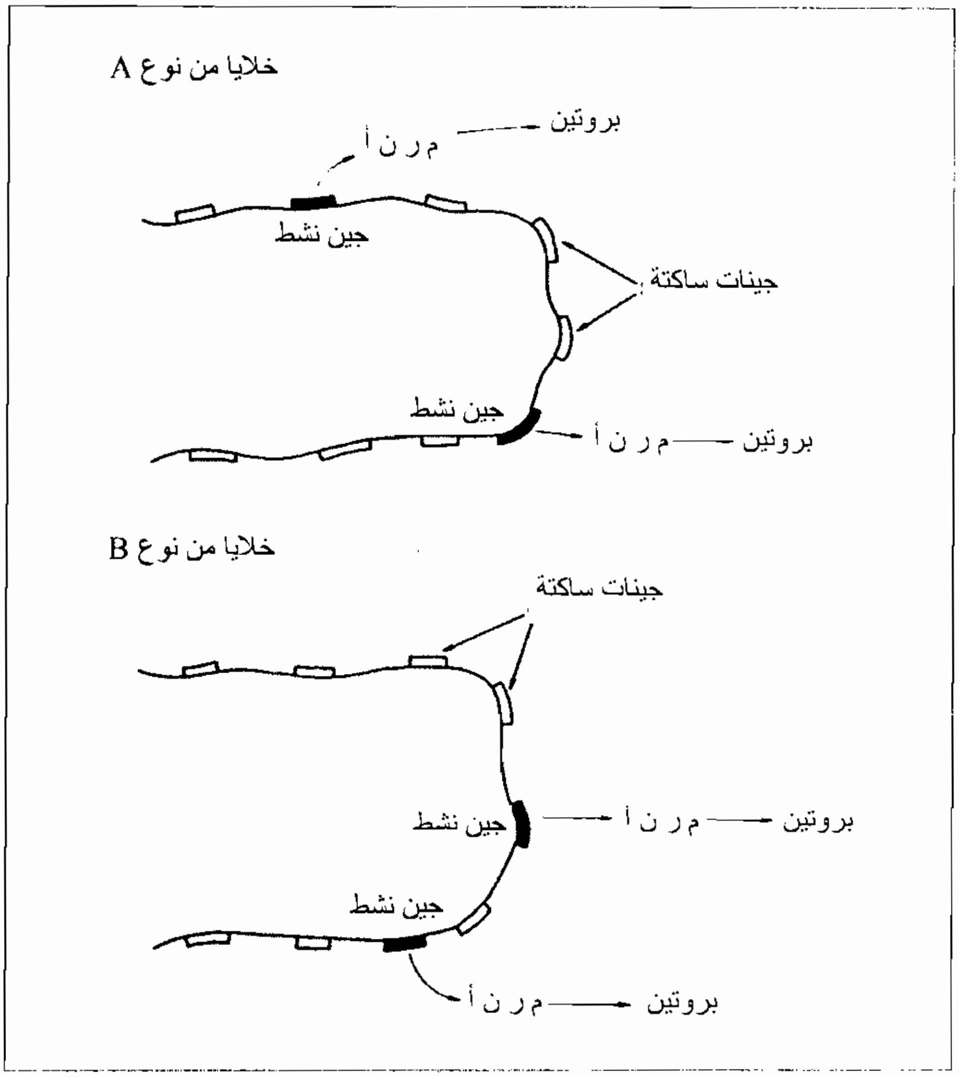
الشكل (١٢-٧): شكل تخطيطي للفروق بين كلونات د ن أ المنسوخ cDNA وكلونات د ن أ الجينومى. يتم نسخ الجين A بتكرار منخفض فى حين يتم نسخ الجين B بتكرار مرتفع

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

إذ نجد أن كلونات الجينوم تمثل عينة عشوائية من جميع تتابعــات د.ن.أ فى كائن ما، وفيما عدا حالات استثنائية نادرة، ستكون متشابهة بصرف النظــر عن طراز الخلية المستخدم فى استخلاصها، بعكس الحال فــى كلونــات د.ن.أ المنسوخ cDNA إذ انها ستحتوى فقط على تلك المناطق من الجينوم التــى تــم نسخها الى mRNA وحيث أن خلايا الأنسجة المختلفة تكون عــادة متخصــصة لانتاج أنواع معينة من جزيئات mRNA النوعى فــإن مكتبــة د.ن.أ المنــسوخ ستختلف بالطبع حسب أنواع ووظائف الخلايا المــستخدمة لتحــضير المكتبــة (الشكل ١٢-٨).

توجد عدة مميزات لاســتخدام مكتبــة د.ن.أ المنــسوخ cDNA لكلونــة الجينات. أولاً: أن كثير من البروتينات يتم انتاجها بكميات كبيرة جداً بواســطة الخلايا المتخصصة، مما يعنى أن mRNA الذى تنتجة هذه الخلايا للترجمة لهذه البروتينات سيكون وفيرا لدرجة أن مكتبة cDNA المحضرة من الخلايا ستكون غنية جداً فى جزيئات د.ن.أ المنسوخ cDNA الذى يشفر للبروتينــات النوعيــة كما فى الشكل (١٢-٧). أن وفرة cDNA المرغوب فيه فى المكتبة يقلل بشكل كبير مشكلة التعرف على الكلون المرغوب فى المكتبة. فعلى سبيل المثال نجــد أن الهيموجلوبين ينتج بكميات كبيرة فى خلايا الدم الحمراء ولهذا الــسبب فــإن جينات الجلوبين كانت من بين أول الجينات التى تمت كلونتها.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٨): إختلاف تعبير الجينات بإختلاف نوعيات الخلايا

والميزة الثانية لكلونات cDNA أنها تحتوى على التتابعات الشفرية فقط Exons بدون الانترونات، وعلى ذلك فإذا كان الهدف من الكلونة هو التوصل

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الى تتابع الاحماض الأمينية للبروتين من تتابع القواعد فـــى د.ن.أ المـــوازى أو لانتاج البروتين بكميات كبيرة عن طريق دفع الجين المكلون إلى التعبيـــر فـــى خلية البكتريا أو الخميرة، فإنه من الأفضل أن نبدأ باستخدام cDNA لأن البكتريا أو الخميرة ليس باستطاعتها اجراء عملية استبعاد الانترونات مما يسبب مـــشكلة عند استخدام الكلون الجينومى.

تعتبر مكتبات الجينوم ومكتبـــات د. ن. أ المنـــسوخ (cDNA) مـــصادر هامة للاستخدام فى البحـــوث ويتـــوفر العديـــد منهـــا حاليـــاً مـــن مـــصادر تجارية.

تكوين مكتبة د. ن .أ المنسوخ من جزيئات منتخبة من mRNA:

عندما يتم تحضير cDNA من خلايا يكون فيها تعبير الجـــين المرغـــوب عالياً جداً فإن غالبية كلونات cDNA يتوقع أن تحتـــوى علـــى تتـــابع الجـــين المرغوب هذا، مما يعطى فرصة للحصول عليه بإقل جهد ممكن وبدرجة عالية من الكفاءة. أما فى حالة الجينات الأقل درجة فى معدل النسخ فتوجد عدة طرق يمكن استخدامها للأكثار من جزيئات mRNA النوعى قبل تكوين مكتبة cDNA فعلى سبيل المثال إذا توفر جسم مضاد للبروتين المستهدف فإنه يمكن استخدامه للترسيب الموجه لتلك البوليريبوسومات المحتوية على سلاســـل متعـــدد الببتيـــد المرغوبة.

وحيث أن تلك البوليسومات ستحتوى أيضاً على mRNA الذى يشفر لذلك البروتين فإنه يمكن أكثار جزيئات mRNA المرغوبة إلـــى أكثـــر مـــن الـــف ضعف.

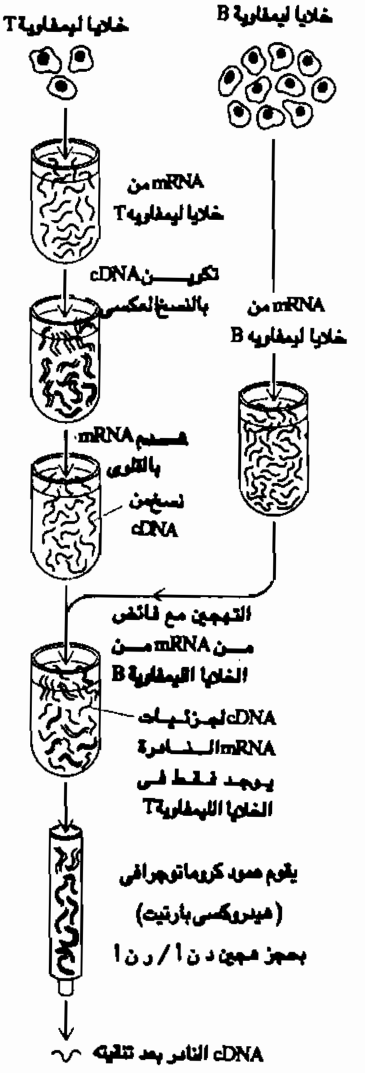
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وهناك طريقة بديلة أعلى كفاءة لإكثار أى تتابع نيوكلتيدى معين قبل انتاج كلونات cDNA ويسمى التهجين الطرحى Subtractive Hybridization, يمكن استخدام هذه الطريقة إذا توفر نوعان متقاربان بشدة من طرز الخلايا من نفس الكائن ولكن أحد الطرازين فقط ينتج البروتين المرغوب. وقد استخدمت هذه الطريقة لأول مرة لمعرفة بروتينات مستقبلات سطح الخلية الموجودة على الخلايا T الليمفاوية (ليمفوسايت) T-Lymphocytes وليست تلك الموجودة على B-Lymphocytes ويمكن استخدامها ايضاً فى الخلية التى يتم فيها تعبير اليل إلى بروتين.

فى حين لا يحدث أى تعبير للأليل الطافر فى نفس الخلية، وتكون أول خطوة هى بناء cDNA باستخدام mRNA من طراز الخلية الذى ينتج البروتين المرغوب. ثم يتم تهجين هذه الجزيئات من cDNA مع كمية وفيرة من جزيئات mRNA المستخلصة من الطراز الخلوى الآخر.

يتم التعرف على تلك التتابعات من cDNA النادرة التى تفشل فى العثور على جزيئات مكملة من mRNA للتزاوج معها والتى تمثل فى الغالب تتابعات mRNA الموجودة فقط فى الطراز الأول من الخلايا. يتم فصل هذه التتابعات غير المتزاوجة وتنقيتها بطرق بيوكيماوية معينة والتى تتضمن فصل الأحماض النووية وحيدة السلسلة عن مزدوجة السلسلة كما فى الشكل (١٢-٩).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٩): إستخدام طريقة التهجين الطرحي لتنقية الكلونات النادرة من cDNA التى يوجد لها mRNA فى الخلايا الليمفاوية من النوع T و لكن ليس من النوع B

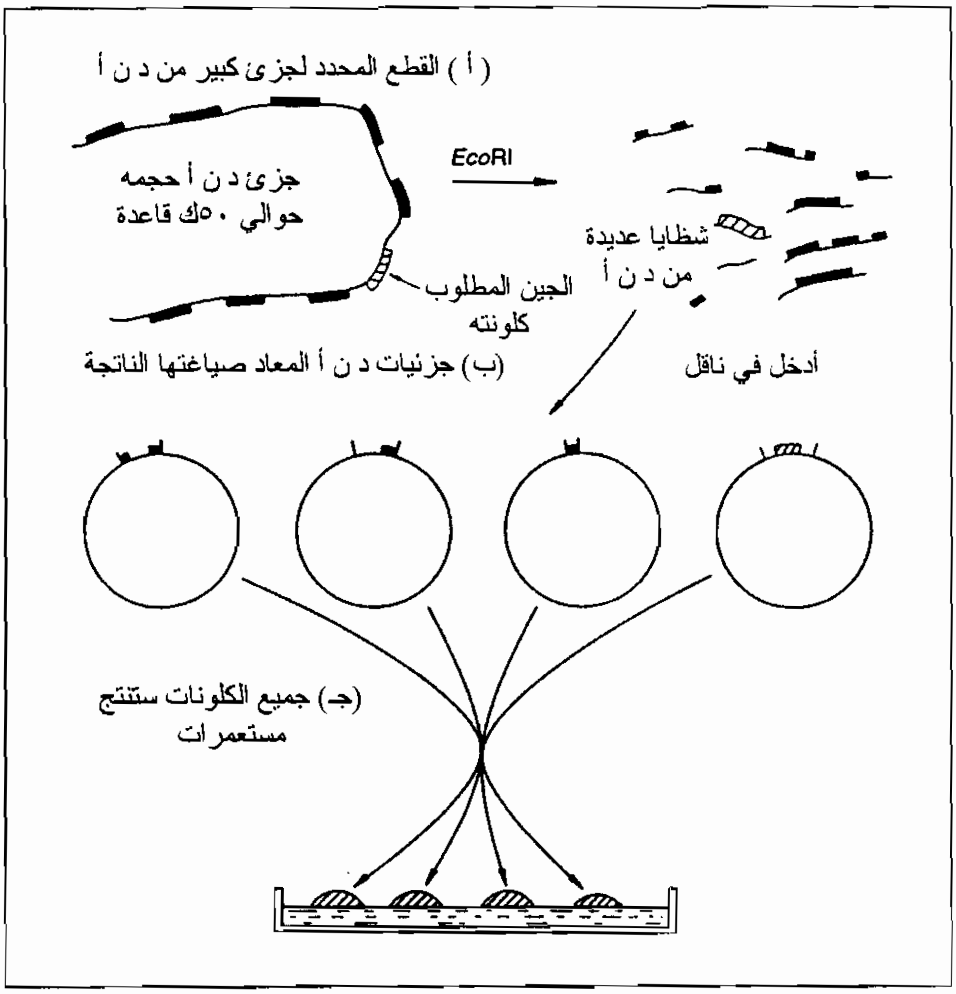
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

للتعرف على الكلون المحتوى على الجين المرغوب يتم نقل Blotting أطباق المزرعة المحتوية على المستعمرات البكتيرية النامية على قطعة من ورق الترشيح التى تلتصق بها بعض المستعمرات البكتيرية. يتم معاملة المستعمرات الملتصقة والتى تعرف بالنسخ المطابقة Replicas.

طرق الحصول على كلون مرغوب من مكتبة الجينات:

أن أهم مشكلة فى عملية كلونة الجين تتركز فى التعرف على المجموعات النادرة من الكلونات التى تحتوى على شظية د.ن.أ المحتوى على الجين المرغوب (الشكل ١٢-١٠) وتكون هذه المشكلة أشد صعوبة بصفة خاصة فى مكتبة الجينوم حيث قد يقتضى الأمر ضرورة التعرف على خلية واحدة بكتيرية من بين مليون خلية بحيث تكون محتوية على جين بشرى معين.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

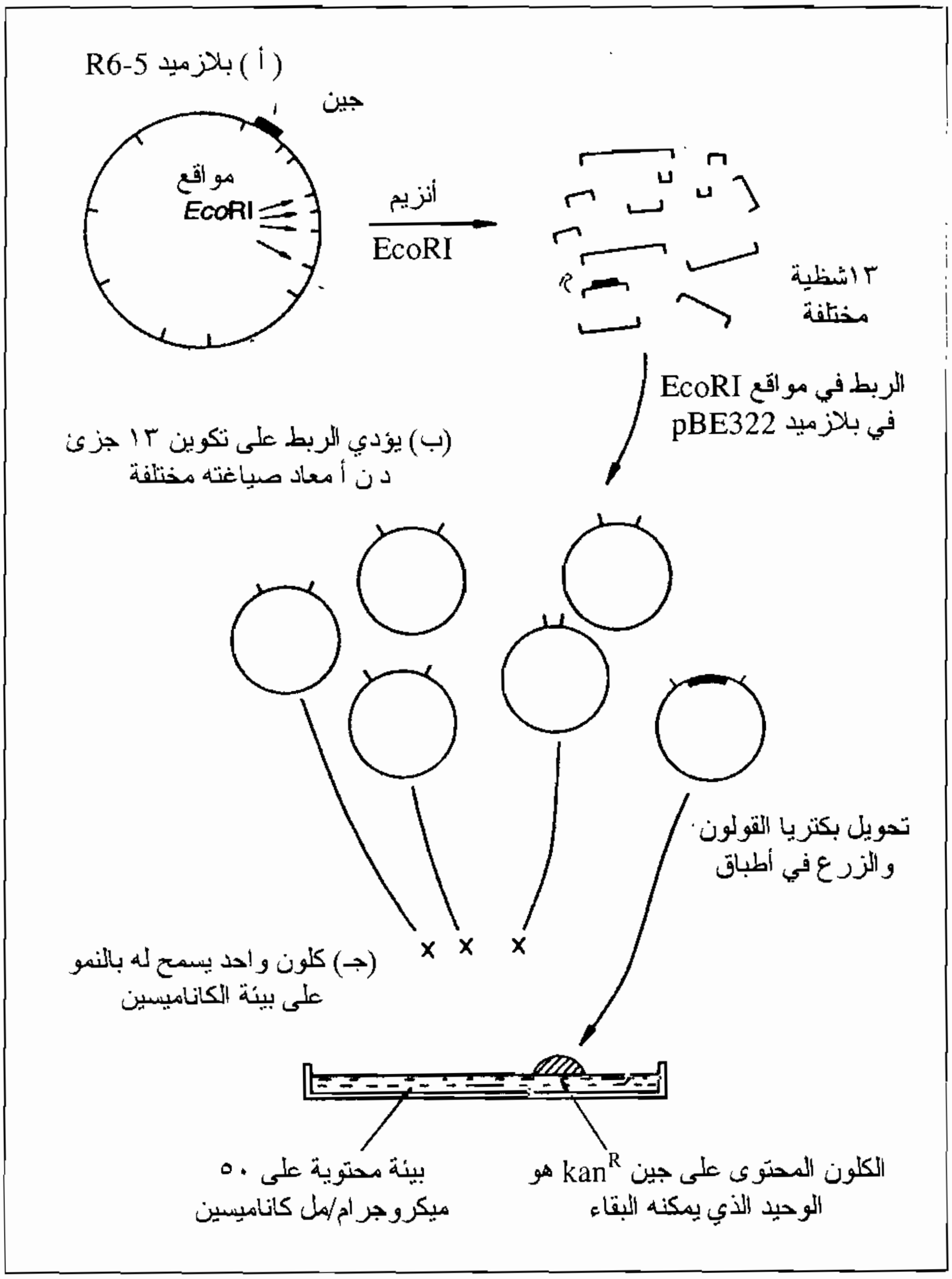


الشكل (١٢-١٠): مشكلة الإنتخاب

وتوجد طريقتين اساسيتين للحصول على الكلون المرغوب:

١- الانتخاب المباشر للجين المرغوب direct selection بمعنى أنه يتم تصميم التجربة بحيث تكون الكلونات المتحصل عليها هى فقط المحتوية على الجين المطلوب كما فى الشكل (١٢-١١).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-١١): الإنتخاب المباشر لكلونة جين المقاومة للكانامبسين (KanR) فى بلازميد R6-5

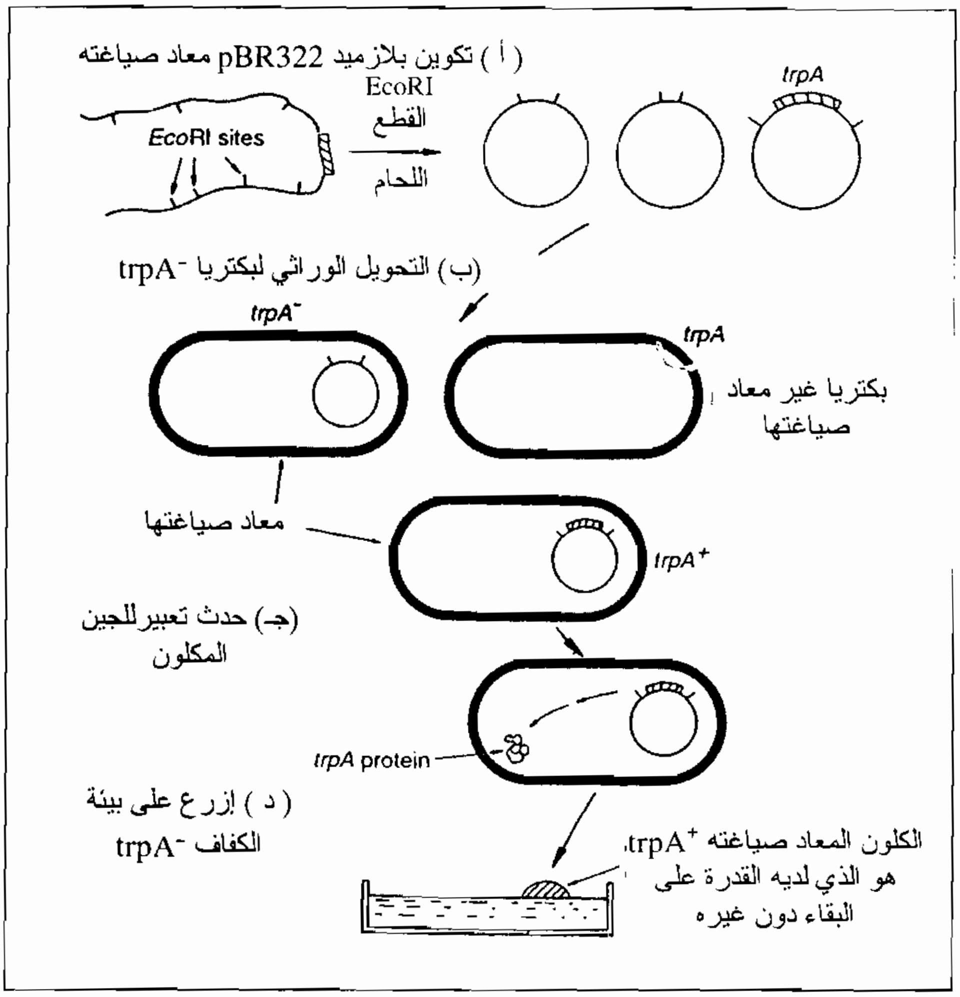
salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

حيث يتم الانتخاب للكلون المحتوى على جين المقاومة للكاناميسين فقط وذلك بتنميته على بيئة أجار تحتوى على هذا المضاد الحيوى. إلا أن هذا الطريقة تقتصر على الانتخاب لجينات المقاومة للمضادات الحيوية.

٢- استخدام طريقة معدلة فيما يسمى بطريقة Marker-Rescue للانتخاب لأحد الجينات المسئولة عن كثير من انزيمات البناء الحيوى Biosynthetic Enzymes. مثل تحديد الكلون المحتوى على جين trpA (الشكل ١٢-١٢) إلا أن هناك بعض المحددات لهذه الطريقة حيث تتطلب وجود سلالة بكتيرية طافرة للجين المطلوب الكشف عنه ($TrpA^-$) بألاضافة إلى ضرورة توافر بيئة الكفاف التى يمكن للطراز الوحشى لهذا الجين فقط أن ينمو عليها.

إلا أن هاتين الطريقتين تصلحان فقط للتعرف على كلونات الجينومات الصغيرة لغير مميزة النواة مثل بكتريا القولون ولكنها تكون قاصرة عن أداء هذا الدور فى حالة الكائنات الراقية مميزة النواة والتى يكون جينومها موزعاً فى عشرات الالاف من الكلونات.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-١٢): الإنتخاب المباشر لجين trp^A المكلون فى بكتريا القولون الطافرة للزيتوفان (trp^{A-})

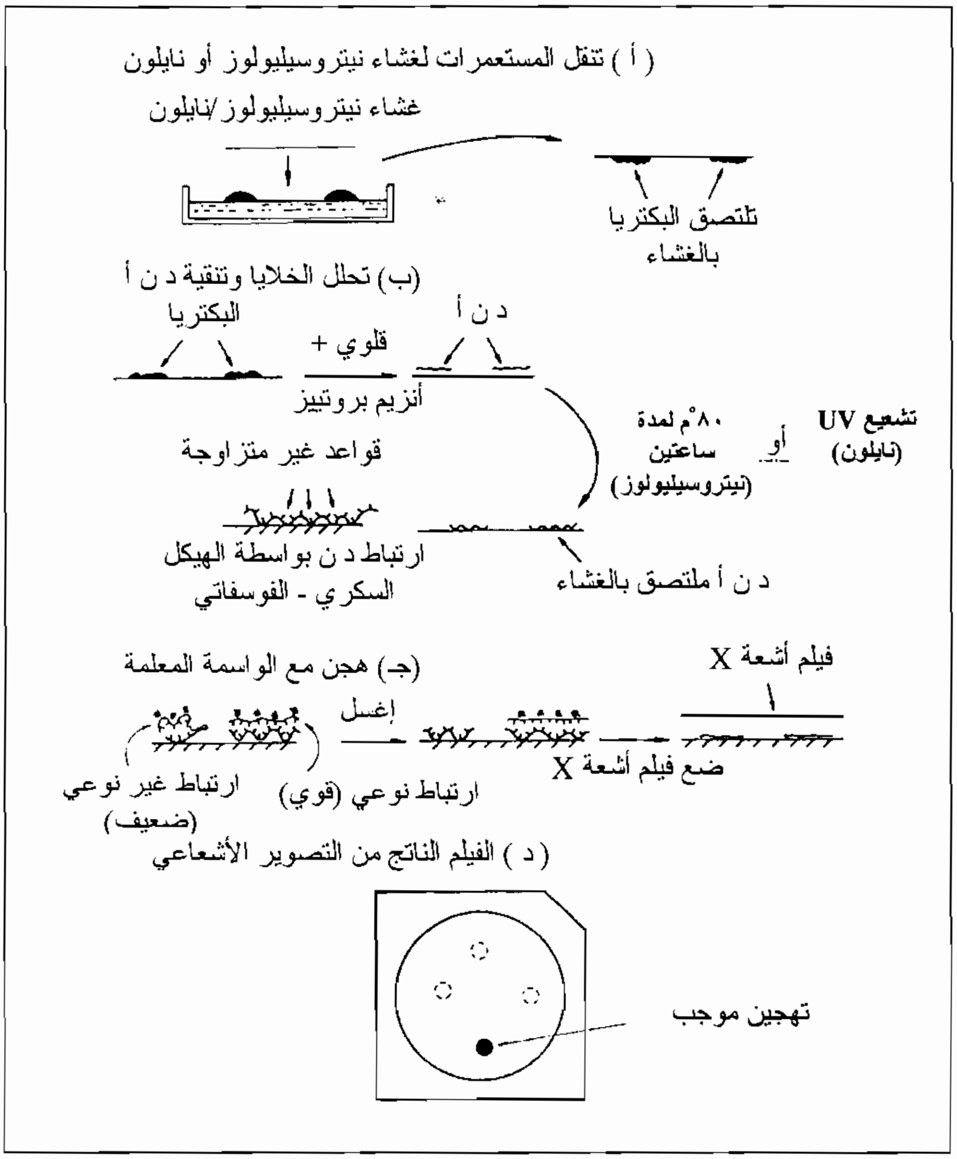
تحديد وعزل كلون من مكتبة الجينات:

Identification of a Colne From a Gene Library :

تستخدم تقنية التهجين بالواسمات (المشعة) Hybridization Probing بحيث يمكن بهذه التقنية التعرف على الكلونات الهجينية فى المستعمرات البكتيرية

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

لمكتبة الجينات مباشرة بطريقة Probing *In Situ* أى التنقيب فى الموقع كما فـــى الشكل(١٢-١٣).



الشكل (١٢-١٣): تهجين المستعمرات بالواسمة المعلمة بالإشعاع

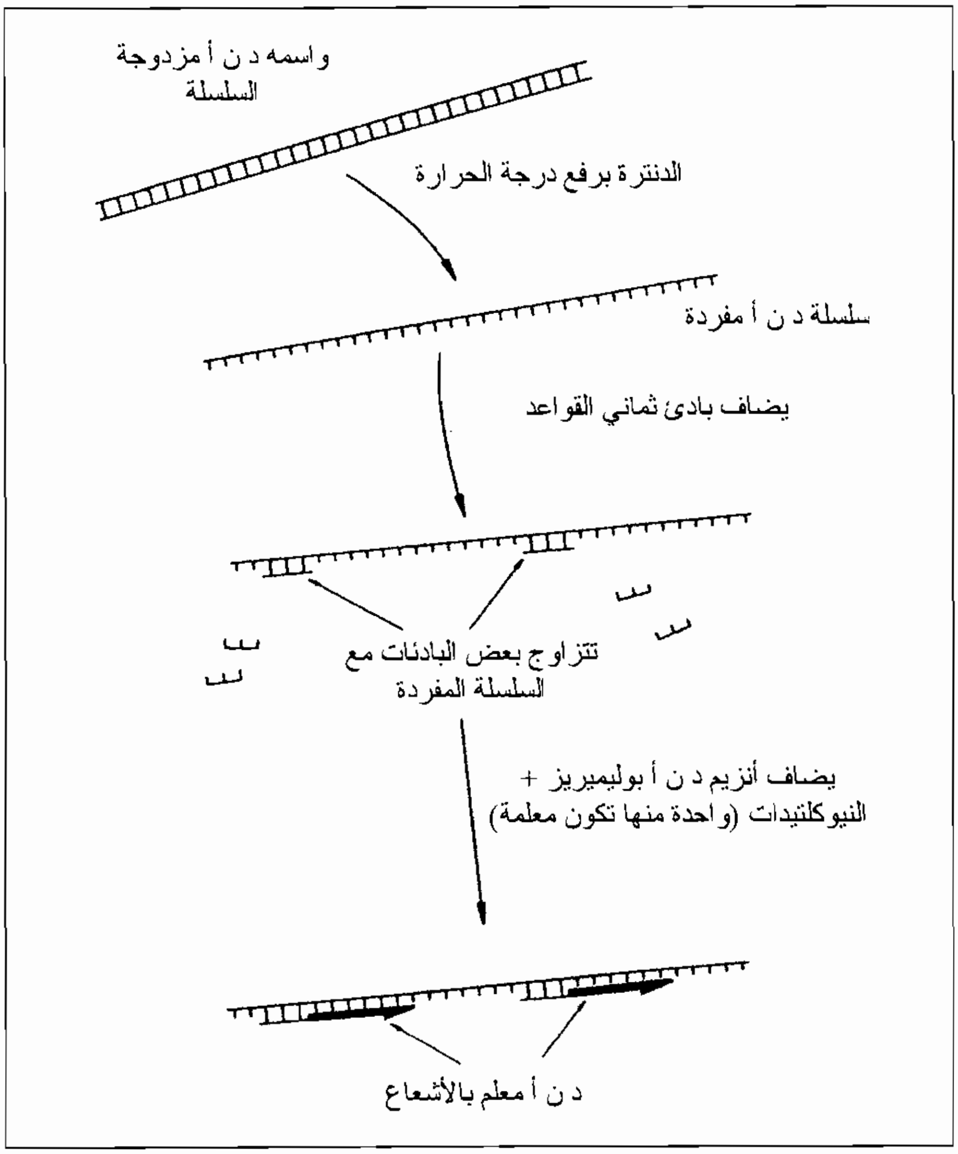
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويتم ذلك بأن تنقل أولاً المستعمرات البكتيرية إلى غشاء من النتروسيليلوز أو النايلون ثم يعامل الغشاء بانزيم Protease ومحلـول قلـوى للـتخلص مـن المكونات غير النووية وتؤدى هذه المعاملات ايضا إلـى دنتـرة د.ن.أ وكسر الروابط الهيدروجينية بين سلسلتى د.ن.أ ويبقى د.ن.أ وحيد السلسلة فقط علـى الغشاء والذى تتم معاملته حراريا، فى حالة غشاء النيتروسيليلوز على درجـة ٨٠ ْم لمدة ساعتين أو بالتعريض للاشعة فوق البنفسجية UV فى حالـة غـشاء النايلون. والغرض من ذلك تثبيت د.ن.أ على الغشاء ، بحيـث يكـون د. ن. أ ملتصقا بالغشاء عن طريق الهيكل السكرى الفوسفاتى فى حين تكـون القواعـد حرة لكى تتزاوج مع الواسمات المشعة وهذه الاخيرة تتم دنترتها وتضاف إلـى الغشاء فى محلول كيماوى يساعد على التهجين بين قواعد الواسـمه والقواعـد المكملة فقط فى د.ن.أ المثبت. وبعد فترة يغسل الغشاء للتخلص من الواسـمات غير المرتبطة ويتم تحديد مكان الواسمه المرتبطه بالتصوير بالاشـعاع الـذاتى Autoradiography.

الواسمات Probes:

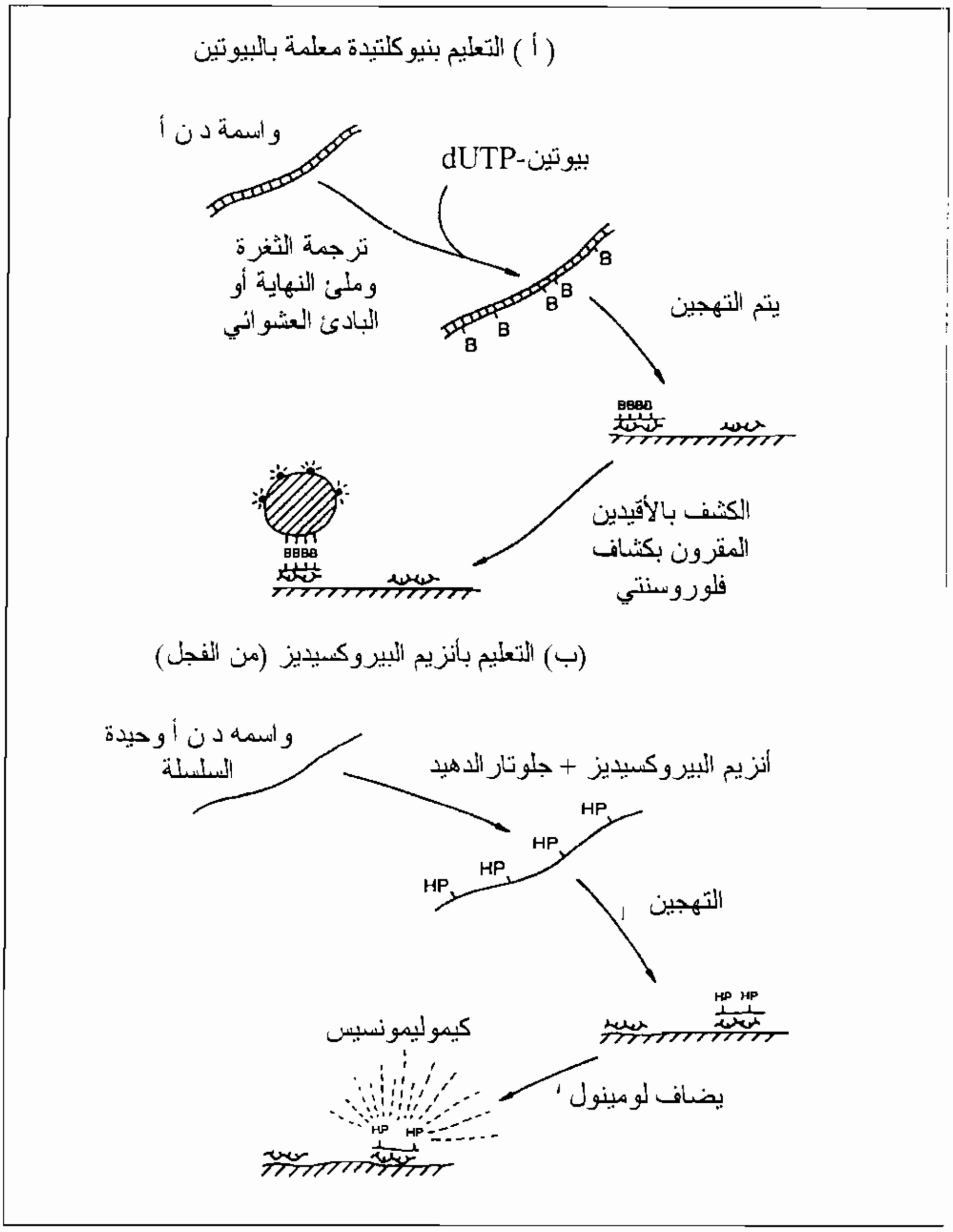
هى عبارة عن جزيئات أوليجو د.ن.أ مكونه مـن عـدد محـدود مـن النيوكلتيدات (١٨-٢٠ نيوكلتيدة) ذات تتابعات نوعية Specific مكملـة لتتـابع محفوظ فى جين معين بحيث يتم التجاذب بينهما فقط. ويتم تعليم Labeling هذه الواسمات أما بالاشعاع بإضافة الفوسفور المشع ^{32}P (الـشكل ١٢-١٤) إلا أن الباحثين اتجهوا مؤخرا إلى استخدام طرق تعليم Labelling لا تستخدم المـواد المشعة تلافيا للأخطار التى قد تنجم من استعمالها ومشاكل التخلص من النفايات المشعة لذلك استخدمت لهذا الغرض طريقتين كما فى الشكل (١٢-١٥).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-١٤): تعليم د ن أ بالإشعاع بطريقة البادئ Priming ثمانى القاعدة العشوائى. يكون مخلوط البادئ العشوائى معقد بحيث يحتوى على بعض الجزيئات التى يمكنها أن تتزاوج مع الواسمة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١٢-١٥): طريقتان لتعليم الواسمات بدون إشعاع

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وتعتمد الطريقة الأولى على استخدام نيوكلتيدات ثلاثى فوسفات ديوكسى يوريدين (dUTP) والتى يتم ارتباطها بالتفاعل مع البيوتين Biotin وهو جزئ يتفاعل بقوة مع بروتين الافيدين Avidin. وبعد التهجين فى الموضع يمكن تحديد مواقع الواسمة المرتبطة بإضافة الافيدين المتفاعل مع كاشف فلورسنت.

أما الطريقه الثانية فتعتمد على تكوين معقد من الواسمة وأنزيم البيروكسيديز Horseradish Peroxidase ثم يتم الكشف عن موقع تهجين الواسمة مع الجين عن طريق قابلية الانزيم لتحليل مادة لومينول Luminal بحيث تنطلق اشعاعات Chemiluminescence.

ويمكن تسجيل الاشارات المنبعثة على فيلم تصوير عادى بطريقة مشابهة للتصوير بالاشعاع الذاتى Autoradiography.

تصميم الواسمات Design of Probes :

وكما سبق القول فإن تتابع الواسمة لابد أن يكون مكملاً للتتابع المحفوظ لجزء من الجين المكلون حتى يمكن أن يحدث Hybridiration Probing. ولكن يحدث أحيانا كثيرة أن الجين نفسه غير معروف أو غير متوفر وخاصة إذا كان الهدف من التجربة هو ايجاد كلون له.

ويعتمد استنباط الواسمات على حسب المعلومات المتوفرة عن الجين المرغوب وهناك ثلاث احتمالات :

١- عندما يعطى الجين تعبيراً قوياً فى نوع معين من الخلايا فيتم تكوين مكتبة cDNA.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

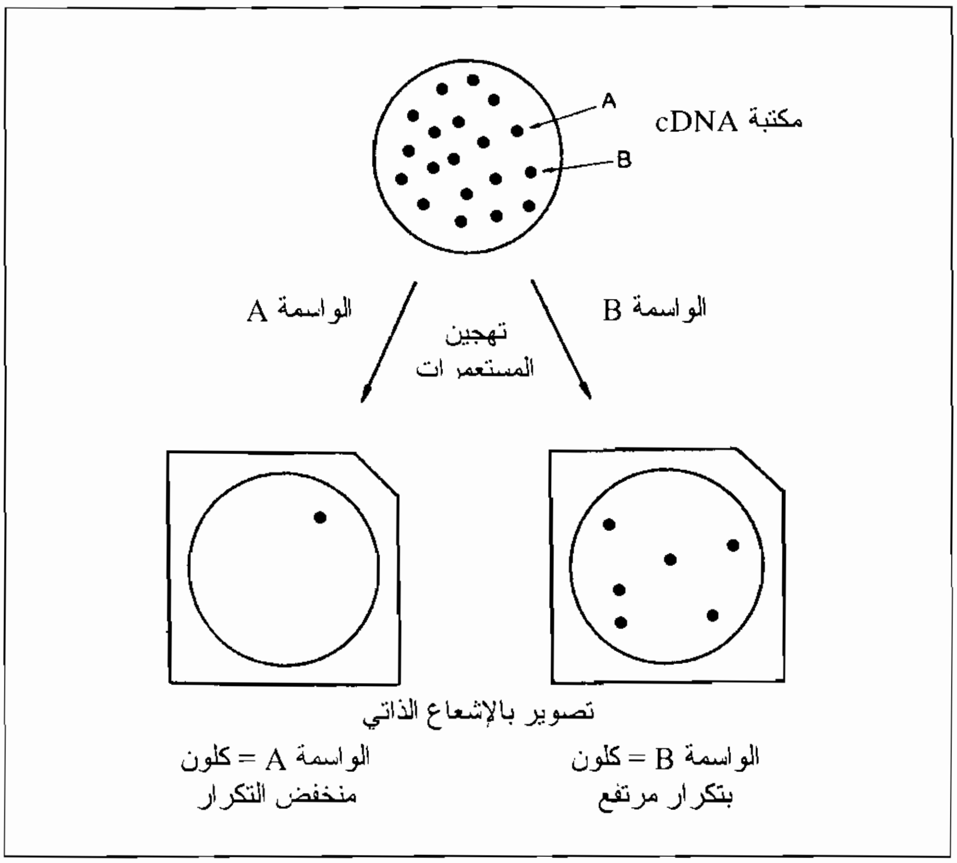
٢- عندما يكون تتابع الاحماض الامينية فى سلسلة متعدد الببتيد التى يشفر لها الجين معروفاً كلياً أو جزئياً.

٣- عندما يكون الجين ضمن مجموعة جينات متقاربة الوظيفة Multigene Family.

أولاً: استنباط الواسمات بالاستعانة بمكتبة cDNA:

تعتمد هذه الطريقة على مبدأ الوفرة ضد الندرة . Abundancy VS Scarecity فعند تكوين مكتبة cDNA من حبوب القمح مثلا فإنه نظراً لان البروتين الرئيسى الموجود اثناء نمو الجنين فى حبه القمح سيكون من نوع بروتين الجليادين gliadin فإننا نتوقع الحصول على نسبة عالية من نسخ ر.ن.أ الجليادين. ويتم التعرف على كلونات جين الجليادين باستخدام جميع كلونات cDNA من المكتبة كل على حدة كواسمة لجميع أفراد الكلونات الأخرى فى المكتبة (الشكل ١٢-١٦). يتم اختيار كلون بطريقة عشوائية ويتم تنقية د.ن.أ المعاد صياغته فى هذا الكلون (Insert) ويعلم Labelled ويستخدم كواسمة لبقية الكلونات فى المكتبة ويكرر ذلك باستخدام كلونات اخرى كواسمات إلى أن نحصل على الكلون الذى يتهجن مع نسبة كبيرة من كلونات المكتبة. ويعد هذا الكلون الوفير من Abundant cDNA Clone بمثابة Clone محتمل للجليادين ويجرى تحليلة بالتفصيل (عن طريق تحليلات تتابعات د.ن.أ وعزل نواتج الترجمة) حتى يمكن التأكد من هويته.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-١٦): البحث بالتهجين فى مكتبة جينات (cDNA) للتعرف على كلون متوفر فى المكتبة بتكرار عال

ثانيًا: استنباط الواسمات عندما تكون تتابعات الاحماض الامينية للبروتين الذى يشفر له الجين معروفة كلياً أو جزئياً:

وفى هذه الحالة يمكن استخدام قاموس الـــشفرة الوراثيـــة Genetic Code للتنبوء بالتتابع النيوكلتيدى للجين المقابل. ويعد هذا التنبوء تقريبى نظراً لانـــه، فيما عدا الميثيونين والتربتوفان اللذين يمثل كل منهما بكودون واحد فقط ، نجـــد

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أن جميع الاحماض الامينية الاخرى يشفر لكـل منهـا إثنـين أو أكثـر مـن الكودونات، فمثلا حامض الالانين يشفر له بأربعة كودونات وهى GCA, GCT, GCG, GCC، بحيث تكون نيوكلتيدين GC مشتركة فى الكودونات الاربعة.

وكمثال لتوضيح كيفية اجراء هذه التنبؤات، سنأخذ بروتين الـسيتوكروم Cytochrome C الذى يلعب دوراً هاماً فى السلسلة التنفسية Respiratory Chain لجميع الكائنات الهوائية التـنفس Aerobic، ويبـين الـشكل (١٢-١٧) تتـابع الاحماض الامينية لبروتين السيتوكروم فى الخميرة. ويحتوى هذا التتابع علـى منطقة تبدأ من الحامض الامينى رقم ٥٩ التى تتكون من Trp- Asp- Glu- Asn- Asn- Met وبمعلومية قاموس الشفرة الوراثية نجد أن هذه الببتيديـة الـسداسية يشفر لها بالاتى:

$TGG – GAC^{T}C – GAC^{A}C - GAAC^{T}C – ATG$

GLY-SER-ALA-LYS-LYS-GLY-ALA-THR-LEU-PHE-LYS-THR-ARG-CYS-GLU- (15)
LEU-CYS-HIS-THR-VAL-GLU-LYS-GLY-GLY-PRO-HIS-LYS-VAL-GLY-PRO- (30)
ASN-LEU-HIS-GLY-ILE-PHE-GLY-ARG-HIS-SER-GLY-GLN-ALA-GLN-GLY- (45)
TYR-SER-TYR-THR-ASP-ALA-ASN-ILE-LYS-LYS-ASN-VAL-LEU-TRP-ASP- (60)
GLU-ASN-ASN-MET-SER-GLU-TYR-LEU-THR-ASN-PRO-LYS-LYS-TYR-ILE- (75)
PRO-GLY-THR-LYS-MET-ALA-PHE-GLY-GLY-LEU-LYS-LYS-GLU-LYS-ASP- (90)
ARG-ASN-ASP-LEU-ILE-THR-TYR-LEU-LYS-LYS-ALA-CYS-GLU (103)

الشكل (١٢-١٧): تتابع الأحماض الأمينية لبروتين سيتوكروم C فى الخميرة وتمثل الببتيدة السداسية (التي تحتها خط) كيف يمكن التنبؤ بالتتابع النيوكلتيدى من تتابع الأحماض الأمينية المقابلة

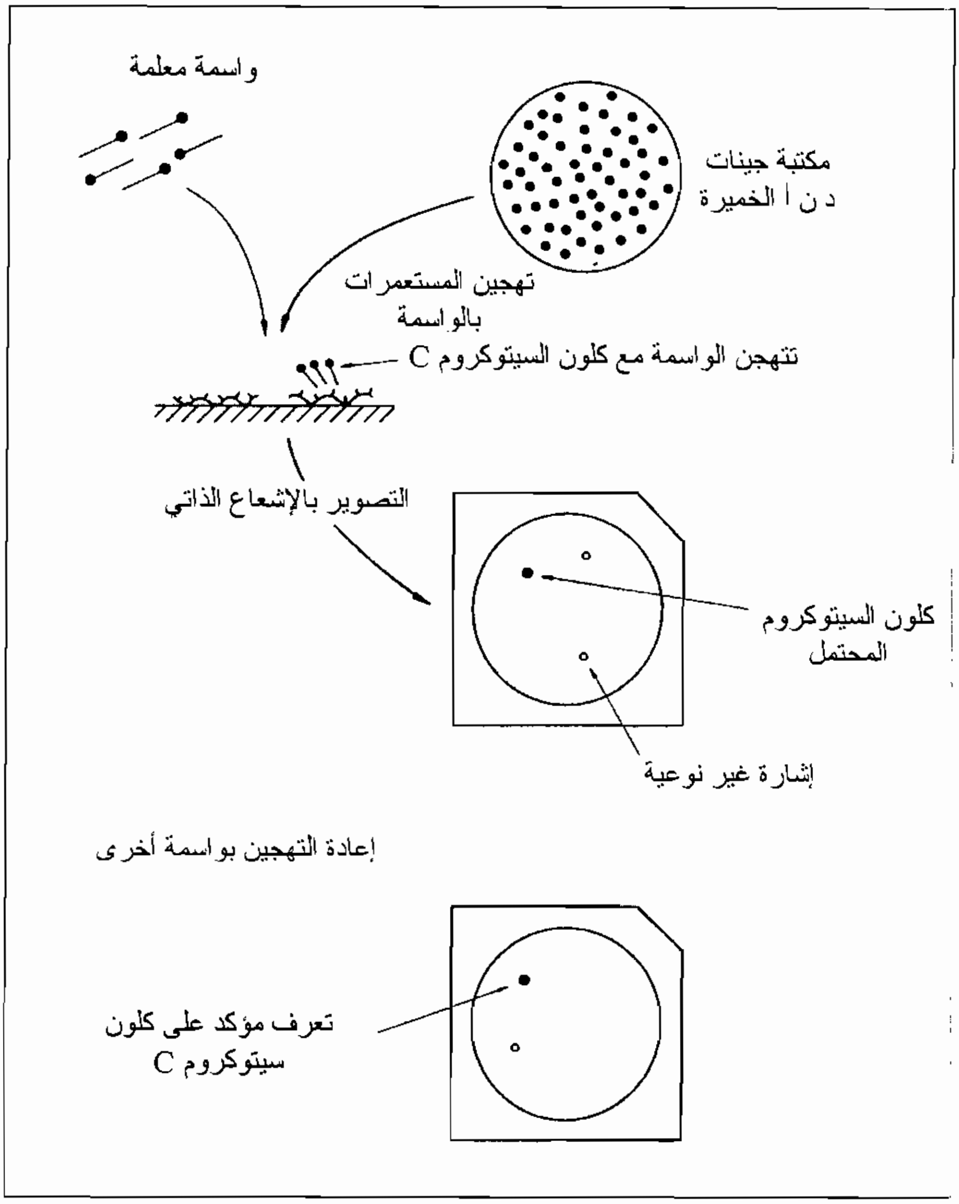
وبالرغم من أن هذا التتابع يمثل ١٦ تتابعا محتملا ، فـإن ١٤ مـن ١٨ نيوكلتيدة يمكن التنبوء بها بالتأكيد، وبذلك يمكن بناء واسـمة أوليجونيوكلتيديـة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

باستخدام هذه التنبؤات وقد يكون فى امكان هذه الواسمة التعرف على الجين المشفر لبروتين السيتوكروم.

وفى هذه الحالة يتم بناء عدد ١٦ أوليجونيوكلتيد واسمه مختلفه و المشفره لتتابع الاحماض الامينية اعلاه. ويمكن استخدامها لاستكشاف مكتبة cDNA الخميرة وسوف تتعرف واحده من هذه الواسمات على التتابع الصحيح لهذه المنطقة من Cytocluome C . وستدلنا اشارة التهجين فى الموضع على الكلونات التى تحتوى على هذا الجين (الشكل ١٢-١٨).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١٢-١٨): إستخدام أوليجو نيوكليوتيد تركيبى معلم النهاية للتعرف على كلون السيتوكروم فى الخميرة

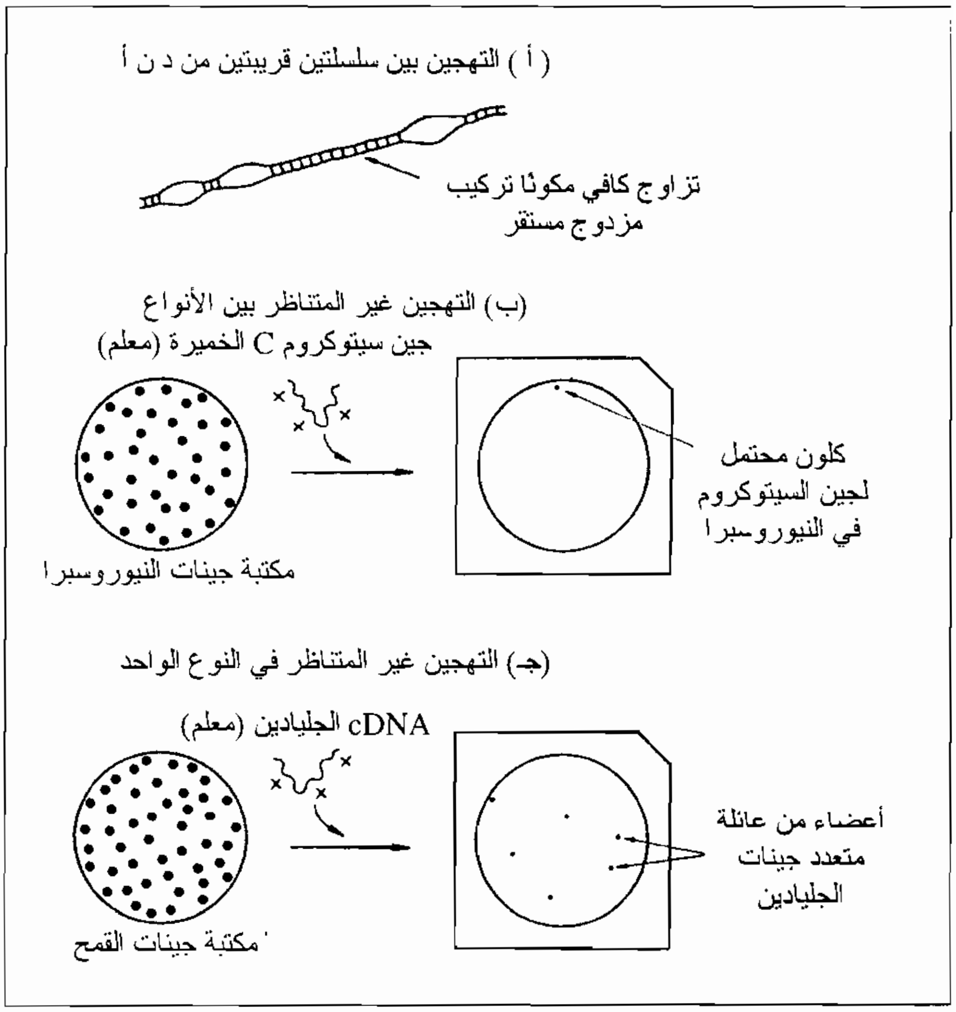
ثالثاً: استنباط الواسمات عندما ينتمي الجين لمجموعة جينات متقاربة Multigene Family:

يمكن التعرف على تتابعات متشابهة بنسبة عالية عند مقارنة جينين يشفران لنفس البروتين ولكنهما ينتميان لكائنات مختلفة مما يعنى المحافظة على تركيب الجين اثناء عملية التطور. وغالبا ما يتشابة بدرجة عالية جينان من كائنات قريبة بحيث أن واسمه مفردة السلسلة من احد هذين الجينين يمكنها تكوين هجين مستقر وثابت مع الجين الآخر وعلى الرغم من أن الجزيئين ليسا متكاملين تماما، إلا أنه يحدث تزاوج للقواعد بينهما بدرجة كافية لتكوين تركيب هجينى مستقر (الشكل ١٢-١٩).

ويستخدم التنقيب غير المتجانس Heterologous Probing فى التهجين بين تتابعات متقاربة للتعرف على الكلونات المرغوبة. فمثلا يمكن استخدام واسمه Cytochrme C والسابق الاشارة اليها، فى التنقيب عن هذا الجين فى كائن اخر (يتبع جنس آخر) مثل النيوروسيرا *Neurospora Crassa* بحيث نحصل على تزاوج قواعد يكون كافيا لاعطاء اشارة للاستدلال على Clone السيتوكروم C فى مكتبة النيوروسبرا (الشكل ١٢-١٩-ب).

ومن جهة أخرى، يمكن استخدام التنقيب غير المتجانس للتعرف على جينات فى نفس الكائن كالقمح مثلا ولكن فى اصناف مختلفة كما يحدث فى حالة واسمة جين الجليادين السابق الاشارة اليها (الشكل ١٢-١٩-ج).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١٢-١٩): التهجين غير المتناظر Heterologous Probing

تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل:

Polymerase Chain Reaction (PCR):

يعد توصل Mullis عام ١٩٨٥ الى مفهوم الكلونة فى الانبوب *In Vitro* Cloning وتقديمة لتقنية PCR من أهم وأعظم الاكتشافات التى حدثت فى الثلث

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الاخير من القرن العشرين ، حيث احدثت طفرة هائلة فى مجال التقنيات الحديثة المستخدمة فى البيولوجيا الجزيئية مما ساعد الباحثون علـــى تطـــوير ابحـــاثهم بطريقة غير مسبوقة نظراً لما لهذه التقنية، والتى تتميز بالسهولة والدقـــة، مـــن تطبيقات متعدده فى المجالات البيولوجية المختلفة.

ويؤدى PCR إلى اكثار منتخب Selective Amplification لمنطقة مختاره من جزئ د.ن.أ. ويمكن اختبار أى منطقة من أى جزئ د.ن.أ للأكثار بـــشرط معرفة التتابعات النيوكلتيدية عند حدى هذه المنطقة، حيث يؤدى ذلك إلى امكان تكوين زوج من البادئ Pair of Primers مكون من عدد محدود من النيوكلتيدات لا يقل عن ١٠ ولا يزيد عن ٣٠ نيوكلتيده بحيث تكون تتابعات النيوكلتيدات فى احد بادئى الزوجين مكملة لتلك الموجودة على احـــد حـــدى المنطقـــة المـــراد مضاعفتها (اكثارها) فى حين يكون البادئ الاخر مكمل للحد الاخر المحيط بهذه المنطقة وبذلك عند اجراء تجربة PCR يتم التهجين بين البادئ وهـــذه الحـــدود يحدث تضاعف Amplificution للمنطقة بينهما بطريقة دقيقة وسريعة بمـــساعدة انزيم بلمرة د.ن.أ متخـــصص لا يتـــأثر بـــدرجات الحـــرارة العاليـــة وهـــو Taq Polymerase I.

ولبدء تجربة PCR يوضع فى الانبوبة د.ن.أ القالب مـــضاف اليـــه زوج البادئ المتخصص ومخلوط من النيوكلتيدات الأربعة A,T, C,G ومحلول كلوريد المغنسيوم بتركيز معين (٣-٧ ميكروجرام / لتر) وانزيم Taq Polymerase ويتم تحضينة فى جهاز PCR، ويختار البرنامج المناسب والذى يبـــدأ برفـــع درجـــة الحرارة إلى ٩٤ ^{o}م لدنترة د.ن.أ وفصل سلسلتى د.ن.أ القالب، يليهـــا خفـــض

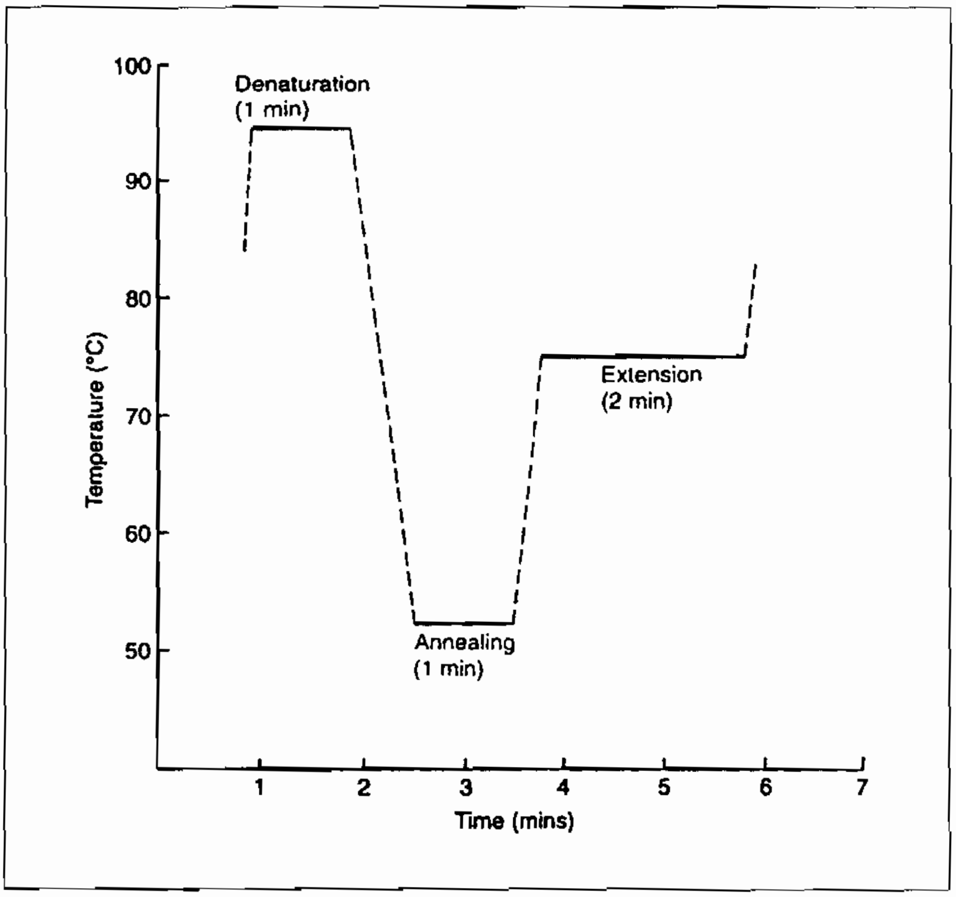
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تدريجى للحرارة الى ٥٠-٦٠ °م درجة ليتم التهجين والتزاوج بـين تتابعـات البادئ مع حدود المنطقة المراد تضاعفها.

ثم يتم رفع درجة الحرارة إلى ٧٢°م للمساعدة فى بدء نشاط انـزيم Taq لبناء سلسلة جديدة على المنطقة المرغوبة. ويبـين الـشكل (١٢-٢٠) منحنـى التدرج الحرارى فى PCR. وهكذا تستمر هذه العملية ٢٥-٣٦ دورة مما يؤدى إلى بناء عدة ملايين نسخة من قطعة د.ن.أ. وبعد الانتهاء من التجربة يتم تحليل نواتج التضاعف Amplificantion بالتفريد الكهربى على جيل الأجاروز والصبغ بمادة ايثديم بروميد Ehtidium Bromide (الشكل ١٢-٢١).

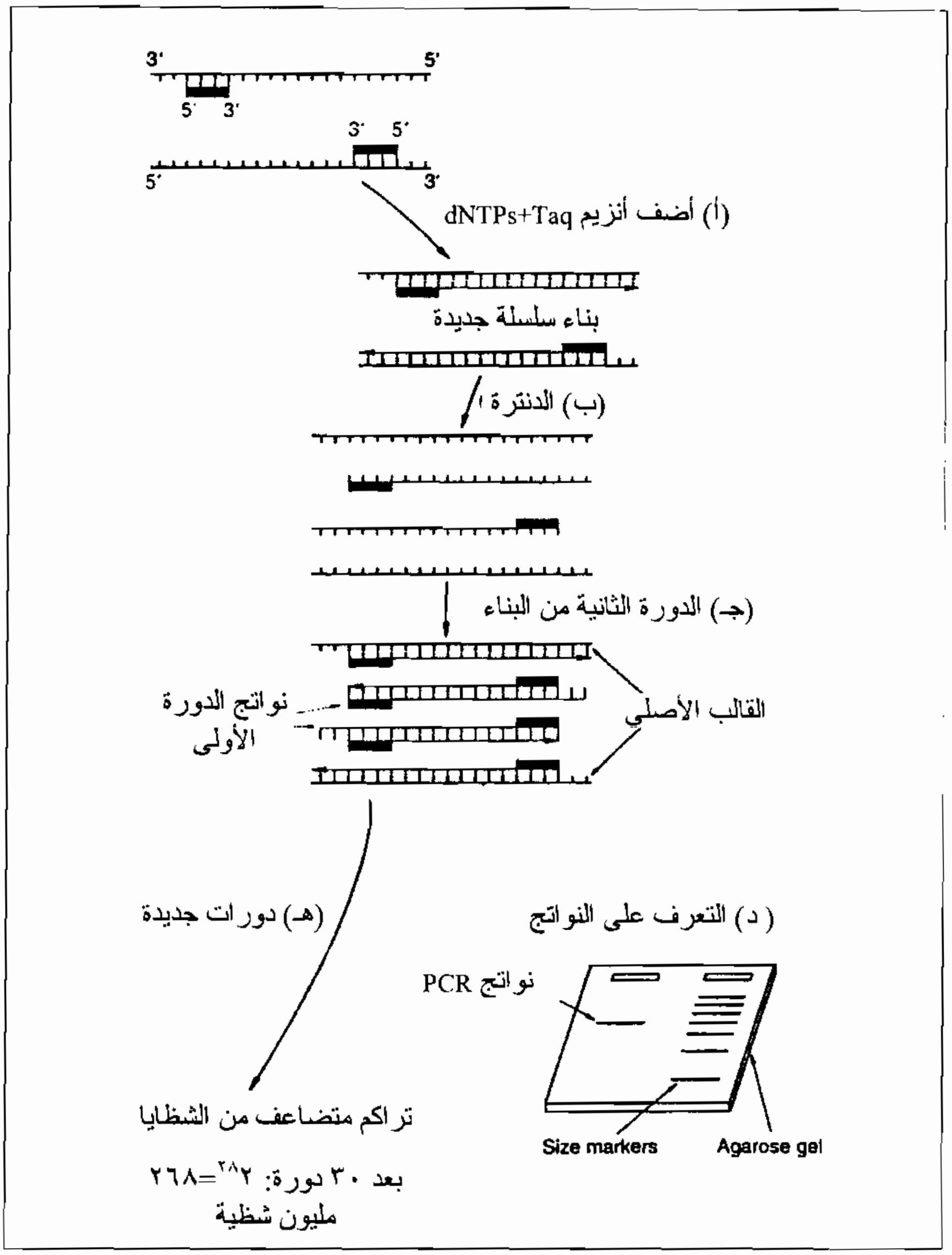
كما يمكن لنواتج التضاعف أن تكلون فى بلازميد ناقـل ويـتم فحـصها بالتقنيات القياسية مثل تحليل تتابعات د.ن.أ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٢٠): منحنى البرنامج الحرارى فى PCR

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٢١): تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الشروط الواجب توافرها فى تجارب PCR:

لكى يتم الحصول على نواتج تضاعف PCR دقيقة وصحيحة للمنطقة المراد اكثارها، لابد من مراعاة ما يأتى :

١- أن يكون تصميم البادئ دقيقا وصحيحاً بحيث يتجه فقط إلى المناطق المستهدفه فى القالب لضمان الحصول على نواتج التضاعف المطلوبة فقط.

٢- أن يكون طول البادئ مناسباً بحيث لا يقل عن ١٠ نيوكلتيدات ولا يزيد عن ٣٠ نيوكلتيده حتى لا نحصل على نواتج تضاعف غير مرغوبة فى حالة البادئ القصير جداً أو خفض شديد فى نواتج التضاعف فى حالة البادئ الطويل جداً .

٣- مراعاة التطبيق الدقيق لمنحنى درجات الحرارة حسب البرنامج المختار فى PCR إذ لو ارتفعت حرارة التهجين Annealing عن الحرارة المثلى فلن يحدث تهجين بين البادئ والقالب وبالتالى لا نحصل على ايه نواتج تضاعف ، والعكس صحيح إذا انخفضت كثيراً درجة الحرارة عن الدرجة المطلوبة فسينتج عن ذلك تهجين خاطئ فى مواقع غير صحيحة للبادئ على القالب Mismatched hybrid ونحصل على نواتج PCR غير صحيحة.

طرق تحليل نواتج:

Analysis of PCR Amplification Products PCR:

١- التفريد الكهربى.

٢- الكلونة.

٣- تحليل التتابعات النيوكلتيدية.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

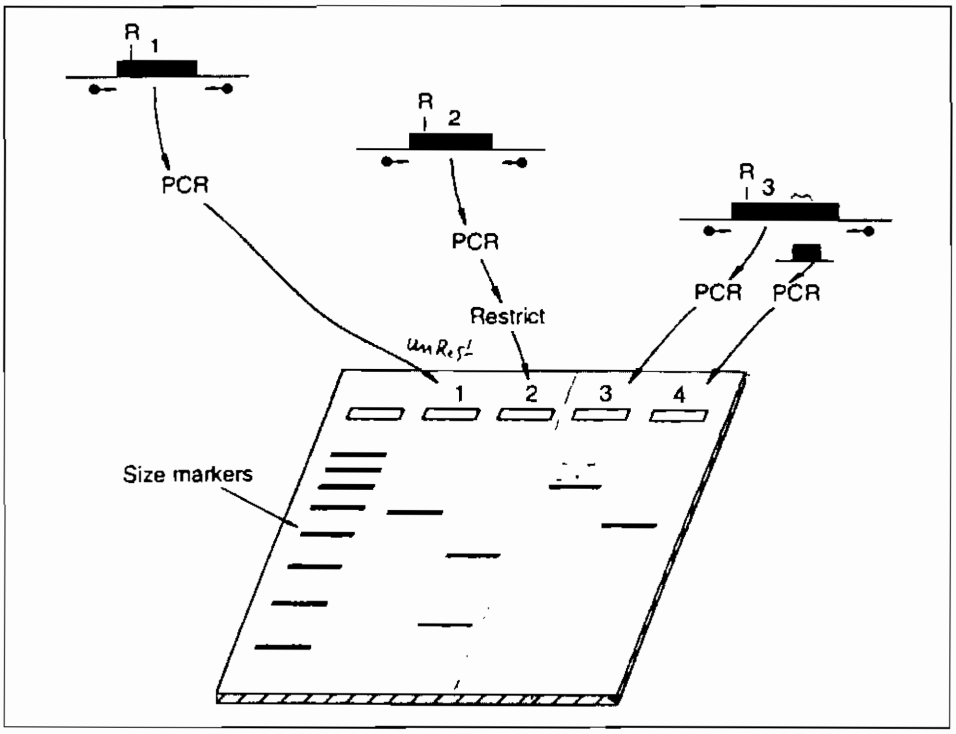
أولاً: التفريد الكهربى لنواتج PCR:

كما سبق الاشارة فإن نواتج التضاعف يتم اختبار أولى لها بأخذ جزء من ناتج التفاعل وتفريده على جيل اجاروز بالتفريد الكهربى. ويدل ظهور حزمة واحدة تمثل الناتج المتضاعف على نجاح التجربة. أما إذا ظهرت اكثر من حزمة أو لم تظهر حزمة بالمرة فإن ذلك يدل على حدوث اخطاء فى التجربة ولابد من اعادتها.

بالاضافة إلى ذلك فإن هناك حالات يستخدم فيها التفريد الكهربى لجيل الاجاروز للحصول على معلومات أكثر عن نواتج PCR منها:

أ - يمكن التحقق من وجود مواقع قطع محددة Restriction Sites من عدمة فى المنطقة المتضاعفة بمعاملة ناتج PCR بإنزيم قطع محدد Restriction Endonuclease قبل جريان العينة بالتفريد الكهربى (الشكل ١٢-٢٢) ويطلق على هذه التقنية PCR-Based RFLP (PBR) وتعد من البدائل السهلة والسريعة لتقنية RFLP حيث تحتاج إلى كمية صغيرة من د.ن.أ ولا تحتاج إلى استخدام النقل Southern Blotting.
وتستخدم هذه الطريقة فى استنباط الخرائط الجينومية وفى دراسة الامراض الوراثية كما سيأتى بعد .
الأساس لعملية DNA Profiling وهى من التقنيات المحورية فى علم الطب الشرعى (العدلى) كما سيأتى بعد.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٢٢): يعطى التفريد الكهربى لنواتج PCR معلومات عن جزئ د ن أ القالب

- المضمار ١ و٢ يبين على التوالى ناتج PCR غير محدد القطع بالإنزيم الذى يقطع عند الموقع R.
- يبين المضمار ٣ النتيجة عندما يكون د ن أ القالب محتويا على إضافة Insertion فى المنطقة المتكاثرة Amplified.
- يبين المضمار ٤ النتيجة عندما يكون د ن أ القالب قد فقد جزء فى المنطقة المتكاثرة.

ب- الكشف عن وجود طفرات اضافة Insertion أو حذف Deletion فى جزئ د.ن.أ فيها يطلق عليه "طفرة الطول" Length Mutation والتى تكون

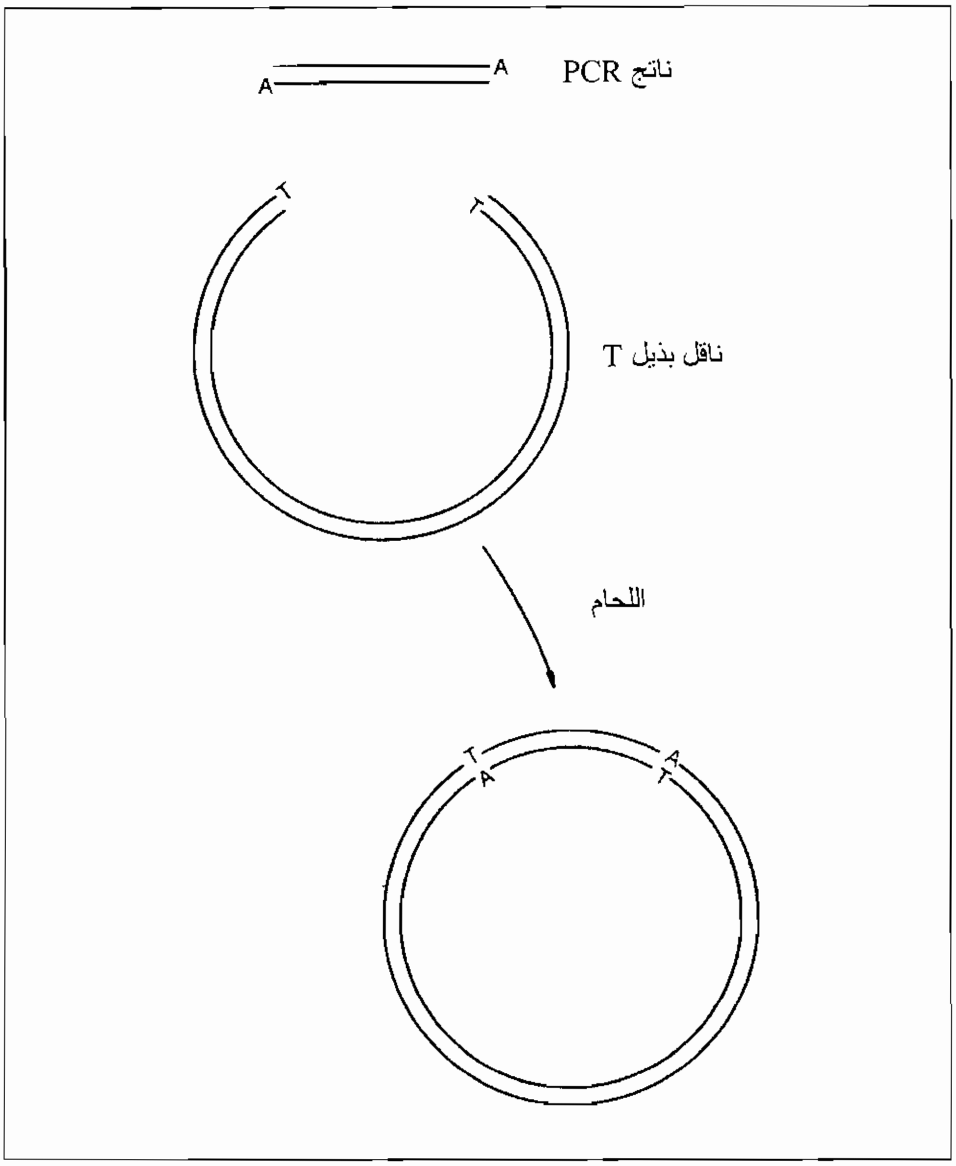
ثانياً: كلونة نواتج PCR:

يمكن من الناحية النظرية كلونة نواتج PCR فى بلازميدات لتكوين مكتبة جينات إلا أنه من الناحية العملية توجد بعض الصعوبات منها أن نواتج البلمـرة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

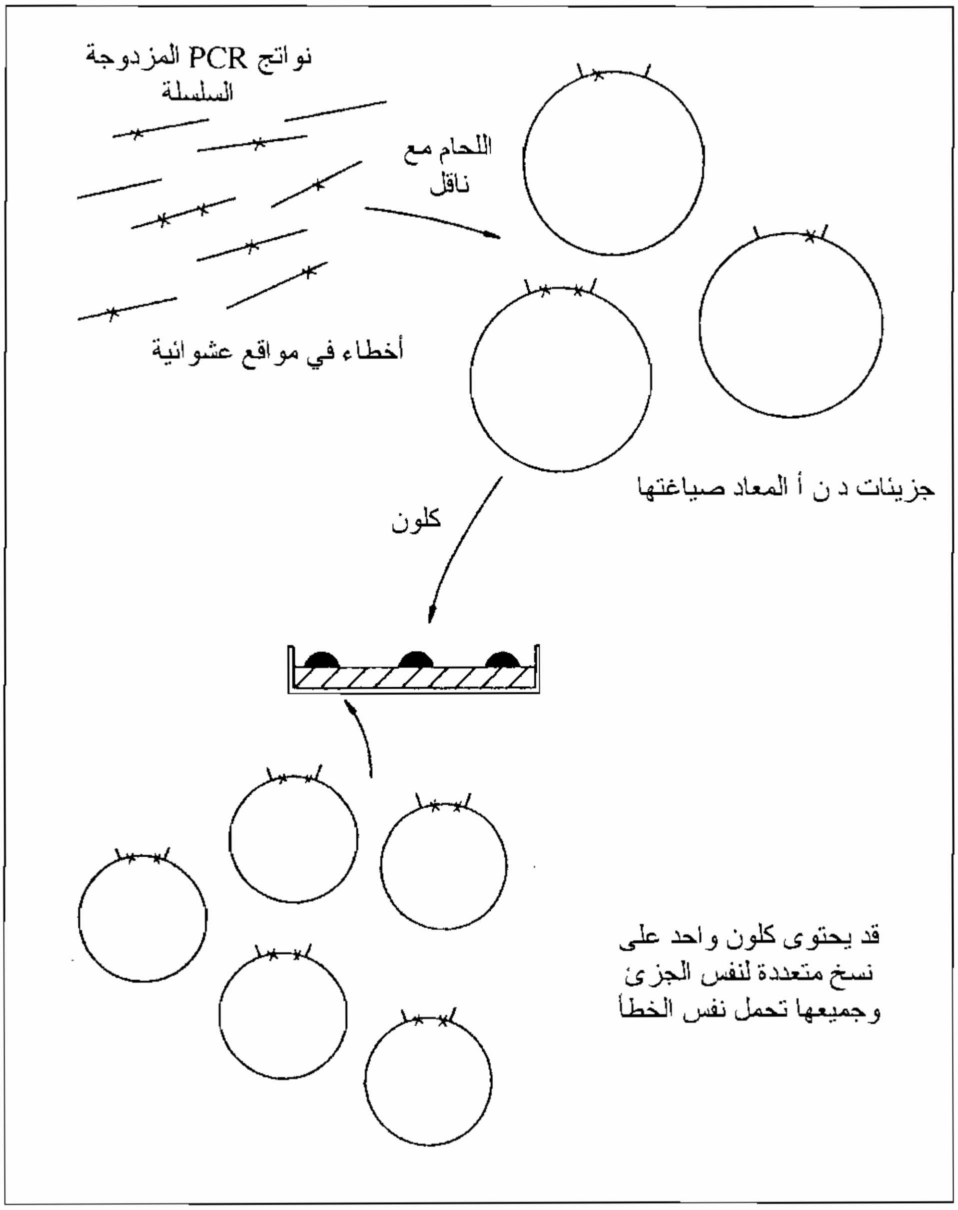
بانزيم Taq1 تكون نهايتها مرتبطة بنيوكلتيدة اضافية من الادينوسـين مكونـة Overhang مما يعيق عملية الكلونة. ويمكن التغلب على هذه الصعوبة بإستخدام ناقل Vector خاص يحتوى على ذيل من نيوكلتيدية T واحدة كما فـى الـشكل (١٢-٢٣) ومن جهة أخرى تبين أن Taq Polymerase يعمل اخطاء أثناء بنـاء د.ن.أ ، إذ أحيانا ما يضع نيوكلتيدة خطأ فى السلسلة النامية مما يؤدى إلى تراكم الاخطاء بمعدل خطأ واحد لكل ٩٠٠٠ نيوكلتيدة يتم بناؤها مما يقتضى الحـذر عند كلونة هذه النواتج (الشكل ١٢-٢٤) وقد تم انتاج Taq Polymerase محتويا على خاصية تصحيح الاخطاء Proofreeding بحيث يمكن تلافـى مثـل هـذه الاخطاء.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١٢-٢٣): إستخدام ناقل خاص يحتوى على ذيل T لكلونة ناتج PCR

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٢٤): يؤدى التكرار العالى لحدوث أخطاء و الناتج من إنزيم Taq إلى بعض الصعوبات عند كلونة نواتج PCR

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

دراسة موقع وتركيب الجين فى جزئ د.ن.أ:

أولاً: تحديد موقع الجين Gene Location:

توجد تقنيات متعدده لتحديد موقع جين معين فـــى جـــزئ د.ن.أ وتتحـــدد طبيعة الطريقة المستخدمة حسب حجم جزئ د.ن.أ بحيث تختلف الطريقة فـــى حالة الجزيئات الصغيرة مثل تلك الخاصة بالبلازميدات وكروموسومات الفـــاج عن تلك المستخدمة لتحديد موقع الجين على جزئ د.ن.أ كبير الحجم كمـــا فـــى كروموسومات مميزة النواة.

أ - تحديد موقع الجين فى جزئ صغير الحجم:

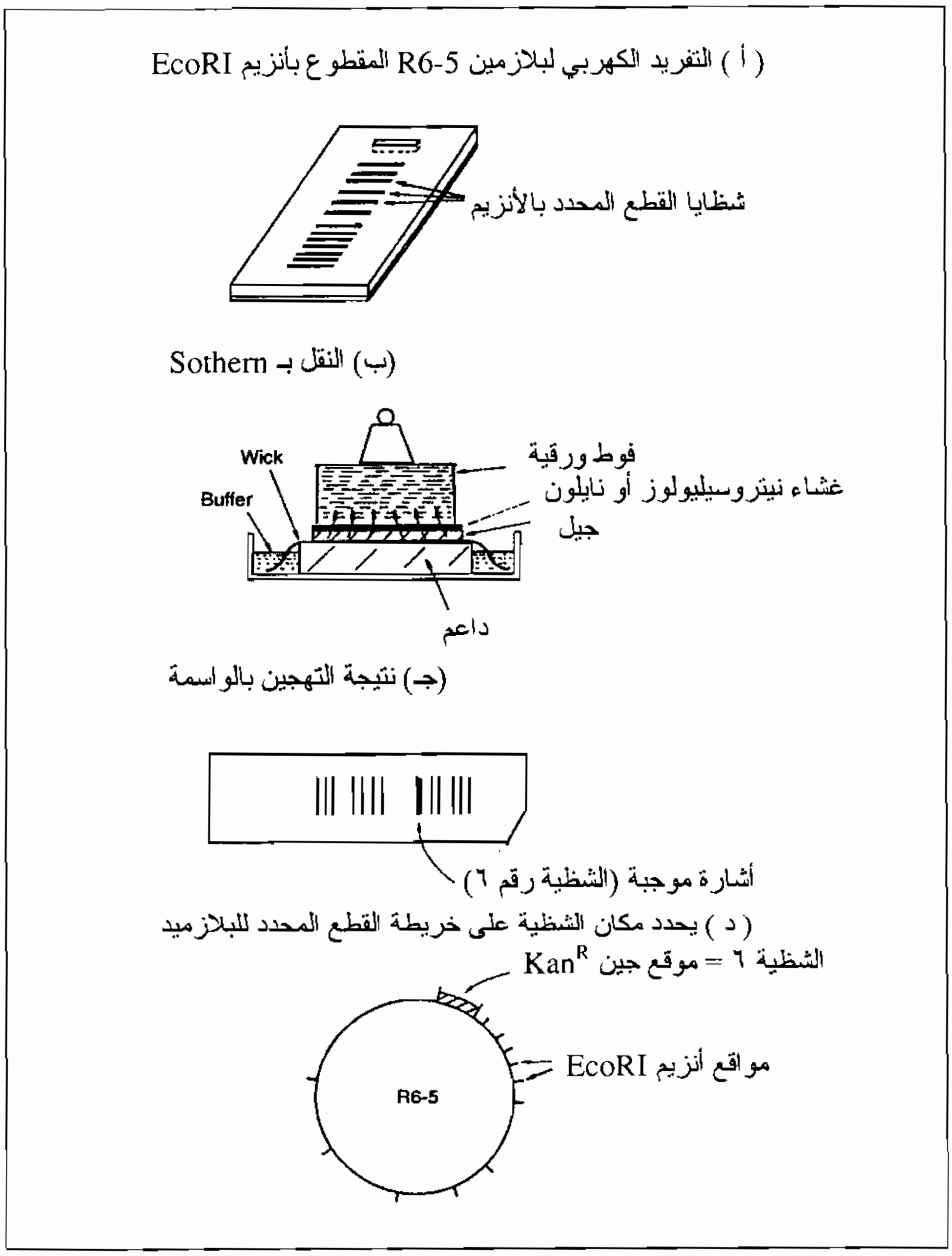
فى حالة جزيئات د.ن.أ صغيرة الحجم مثل البلازميد البكتيرى PBR 322 أمكن بالانتخاب المباشر التوصل الى أن الجين المشفر للمقاومة للمضاد الحيوى كانامايسين Kanamycin موجود ضمن كلونات القطعة R6-5 الناتجة عن القطع بإنزيم القطع المحدد EcoR1 والتى أنتجت ١٣ شظية. ولكى نعـــرف بالتحديـــد على أى من هذه الشظايا يقع جين الـــ Kan^R حتى يمكن أن نضعه على خريطة القطع المحددة للشظية (R6-5)، ولكى يتم ذلك لابد أولاً أن يتم تفريـــد كهربـــى على جيل الاجاروز لنواتج القطع المحدد للمنطقة R6-5 الـــشكل ١٢-٢٥ ب). ويلى ذلك عملية نقل بطريقة Southern Blotting (الشكل ١٢-٢٥-ب) متبوعة بعملية التنقيب بالتهجين hybridization Probing (الشكل ١٢-٢٥-جـــ) حيـــث تعطى صورة Autoradiography الاشارة الموجبة الدالة على ترتيـــب الـــشظية المحتوية على جين Kan^R بالنسبة للشظايا الآخرى.

وأخيراً وباستخدام خريطة القطع المحدده للقطعة R6-5 يمكن وضع هـــذه الشظية فى موقعها على تلك الخريطة (الشكل ١٢-٢٥-د).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

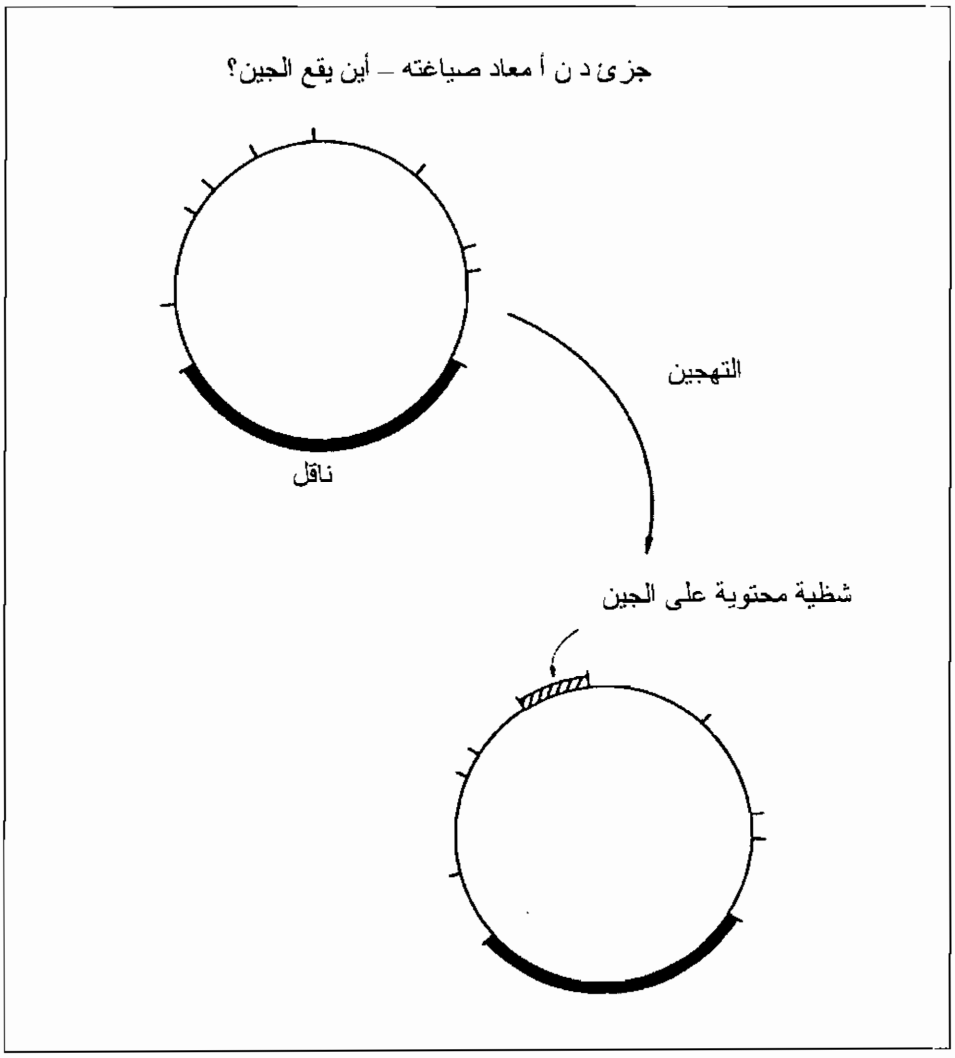
ومن جهة أخرى، يمكن استخدام تقنية النقل Southern لتحديد مكان جـــين معين مكلون ضمن جزئ كبير الحجـــم نـــسبيا مـــن د.ن.أ المعـــاد صـــياغته Reconbinant DNA كما فى الـــشكل (١٢-٢٦) إلا أن اســـتخدام Resriction Maping و Southern يكون قاصراً عن تحديد موقع الجين إذا زاد حجم جـــزئ د.ن.أ عن ٢٥٠ك قاعدة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٢٥): النقل بطريقة Southern

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١٢-٢٦): يمكن إستخدام التهجين بطريقة Southern لتحديد موقع جين مكلون من جزئ د ن أ (كبير الحجم نسبيا) المعاد صياغته

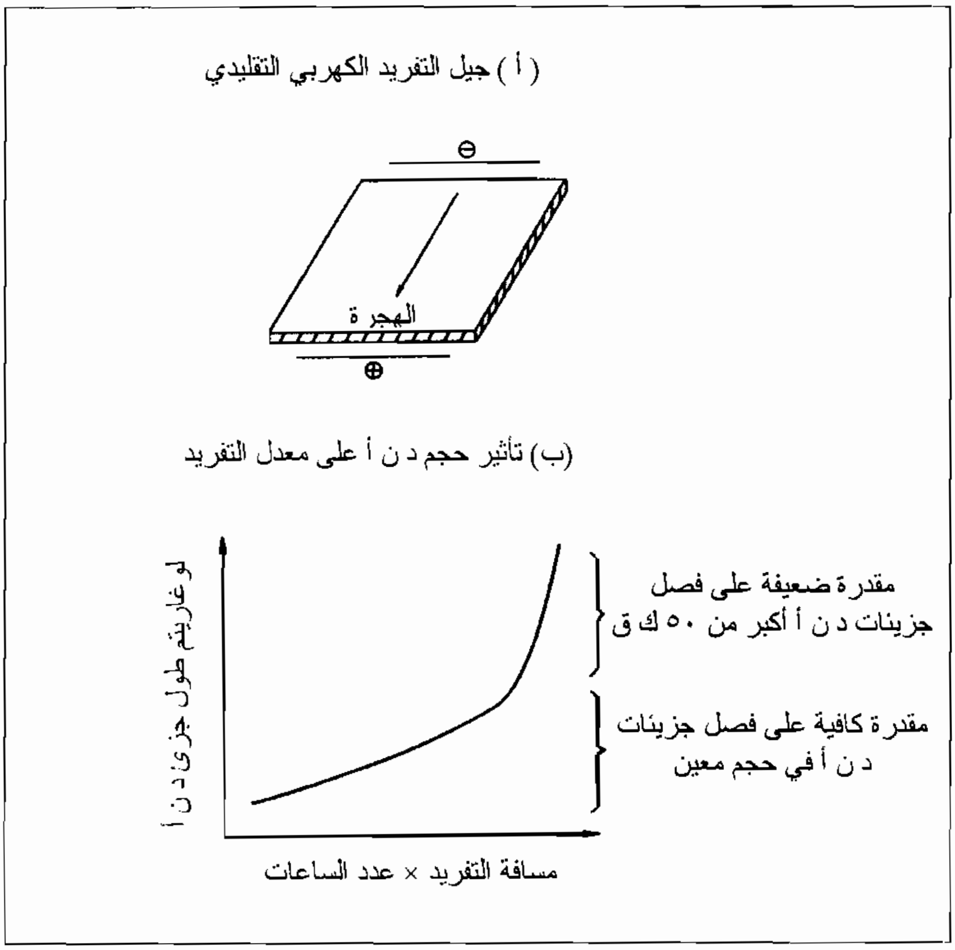
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ب- فصل الكروموسومات فى مميزة النواة الصغيرة (البدائية):

Separting Chromosomes of Lower Eukaryote By Gel Electrophoresis:

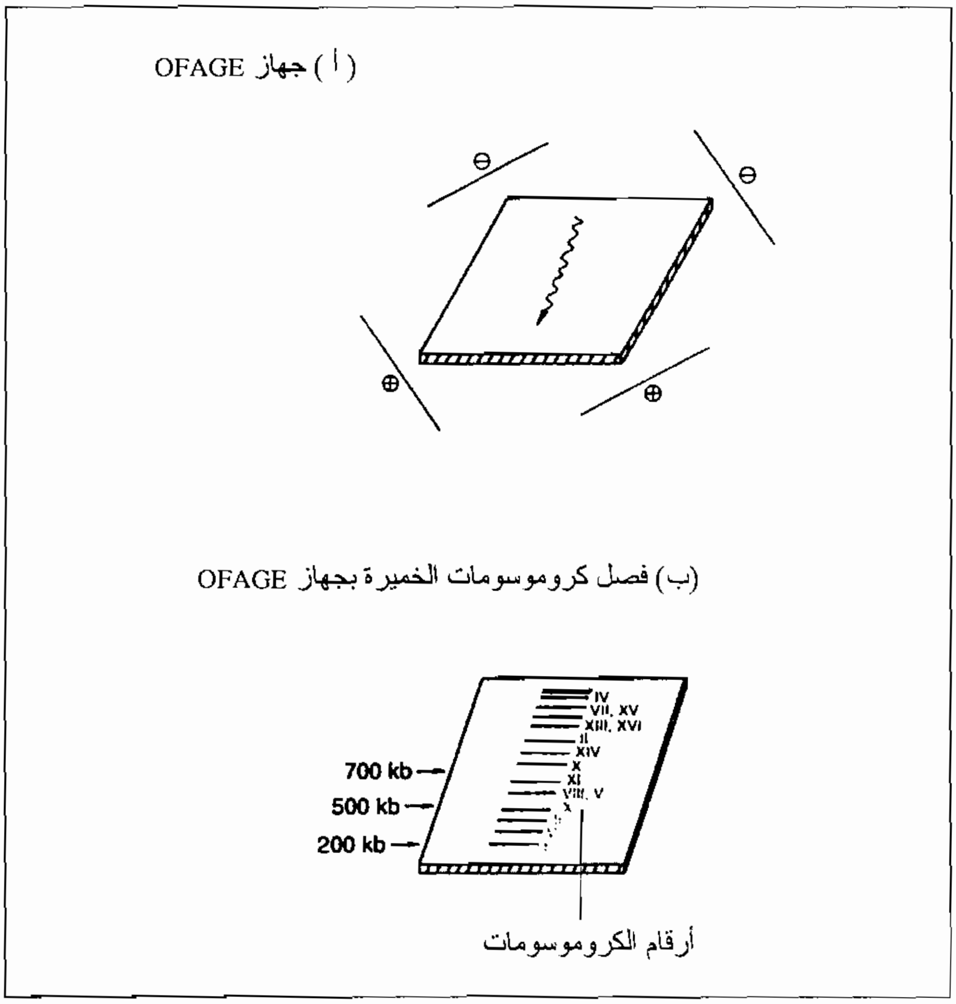
ثبت أن طرق التفريد الكهربى العادية على جيل الاجاروز لا يمكنها فصل الحزم الخاصة بشظايا د.ن.أ إذا زاد حجمها عن ٥٠ك قاعدة كما فى الشكل (١٢-٢٧) ولذلك لا يمكن الاعتماد عليها فى فصل الجزيئات (أو الكروموسومات) الكبيرة الحجم نسبياً. وقد امكن التغلب على هذه الصعوبة باستخدام ما يسمى Pulsed Field Electrophoresis (PFE) وهو من عدة أنواع وأشهرها(Orthogonal Field Alternative Gel Electrophoresis (OFAGE وفيه يحدث للمجال الكهربى تغيير فى المسار بين زوجين من الاقطاب Electrodes ويقع كل زوج من هذه الاقطاب بزاوية 45° بالنسبة للمحور الطولي للجيل (الشكل ١٢-٢٨). وينتج عن ذلك مجال نبضى Pulsed Field مما يجبر جزيئات د.ن.أ على تغير اتجاهها باستمرار تبعاً للنبضات. وعندما يحدث تبادل للمجالين بطريقة منتظمة، فإن محصلة الحركة لجزيئات د.ن.أ فى الجيل ستستمر من احدى النهايتين إلى النهاية الاخرى فى خط مستقيم تقريباً إلا أنه مع كل تغيير يحدث فى اتجاه المجال فإن على كل جزئ د.ن.أ أن يعيد استقامة حركته Realign بزاوية ٩٠° قبل أن يستمر فى الهجرة. ويعد ذلك اهم نقطة فى هذا النظام حيث يكون باستطاعة الجزيئات الصغيرة نسبياً (القصيرة) أن تعمل Realingnment أسرع من الجزيئات الأطول مما يسمح للجزيئات القصيرة بالحركة والتقدم بسرعة أكبر إلى نهاية الجيل. وقد أمكن بهذه التقنية الوصول إلى زيادة هائلة فى قدرة الجيل على فصل جزيئات قد يصل طولها إلى عدة الاف ك قاعدة. ويبين الشكل (١٢-٢٨-ب) فصل كروموسومات الخميرة بهذه التقنية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٢٧): محددات جيل التفريد الكهربى التقليدى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢- ٢٨): التفريد الكهربى بجهاز أورثوجونال التبادلى (OFAGE)

ويمكن الاستفادة من هذه التقنية ايضا فى عزل وتنقيــة د.ن.أ مــن كــل كروموسوم على حدة وتكوين مكتبات جينية كروموسومية وبالطبع تكون هــذه المكتبات اصغر بكثير فى عدد الكلونات الخاصة بها عما فى المكتبة الجينوميــة مما يجعل من السهل التعامل معها. بالاضافة إلى ذلك، فإنه يمكن نقل Southern

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

لحزيئات د.ن.أ على غشاء نيتروسيليوز أو نايلون واجــراء تعريــف للجينــات المكلونة بطرق التحليل القياسية.

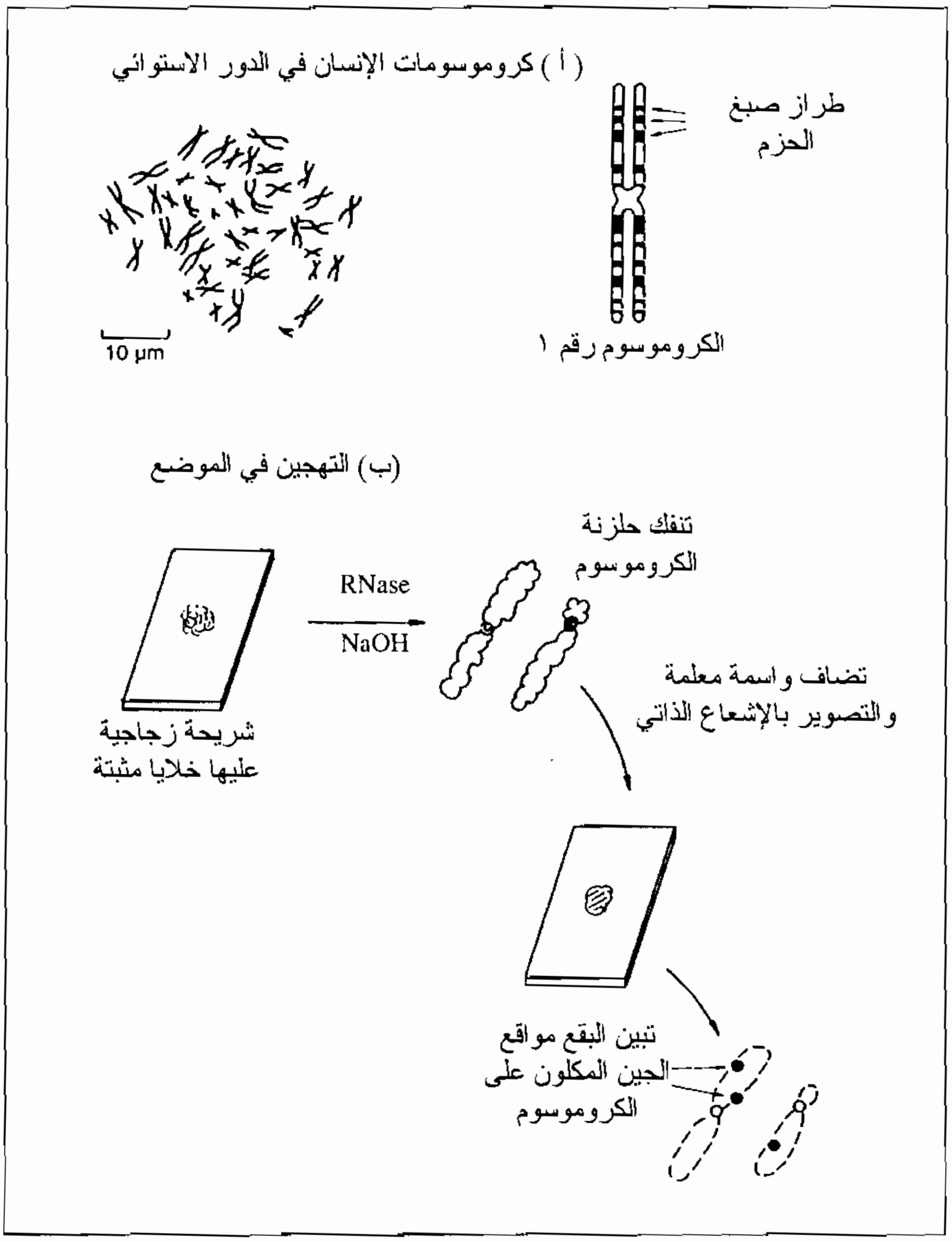
ج- تحديد موقع الجين على كروموسومات مميزة النواة بطريقة التهجين فــى الموضع *In Situ Hybridization*:

فى حالة كروموسومات مميزة النواة الراقية حيث يزيد طــول جزيئــات د. ن. أ فيهاعن ٥٠ الف كيلو قاعدة كما فى الثدييات والنباتات الراقية، نجد أن PFE لا يمكنه فصل مثل تلك الكروموسومات الكبيرة الحجم. لذلك يمكن تحديــد موقع الجين فى هذه الحالة بتقنية التهجين فى الموضع *In Situ* Hybridization.

حيث يمكن بها تحديد على أى كروموسوم يقع الجين بالاضافة إلى موقــع الجين على الكروموسوم نفسه.

وتتلخص الطريقة فى تفريد كروموسومات الدور الاســتوائى الميتــوزى على شريحة ميكروسكوبية ومعاملتها بانزيم الريبونيوكليز ومحلول هيدروكــسيد الصوديوم لهــدم ر.ن.أ ودنتــرة جزيئــات د.ن.أ ويــضاف الــى التحــضير الكروموسومى واسمة مشعة للجين المطلوب تحديد موقعة حيث يحدث تهجــين بين الواسمة والجين على الكروموسوم والذى يــتم الكــشف عنــه بالتــصوير بالاشعاع الذاتى Autoradiography (الشكل ١٢-٢٩).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٢٩): التهجين في الموضع In Situ Hybridization

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ويمكن الاستعاضة عن الواسمة المشعة باستخدام كاشف فلورسنتى مرتبط بلواسمة بحيث يمكن التعرف على التهجين مباشرة باستخدام ميكروسكوب فلورسنتى Fluorescet Microscope وإذا استخدمت فلورسنت بالوان مختلفة Fluorochromes فإنه يمكن التعرف على أكثر من جين واحد فى نفس الوقت حيث سيعطى كل نوع من الفلورسنت اشارات لونية مميزة ويطلق على هذه التقنية Fluorescent *In Situ* Hybridration (FISH).

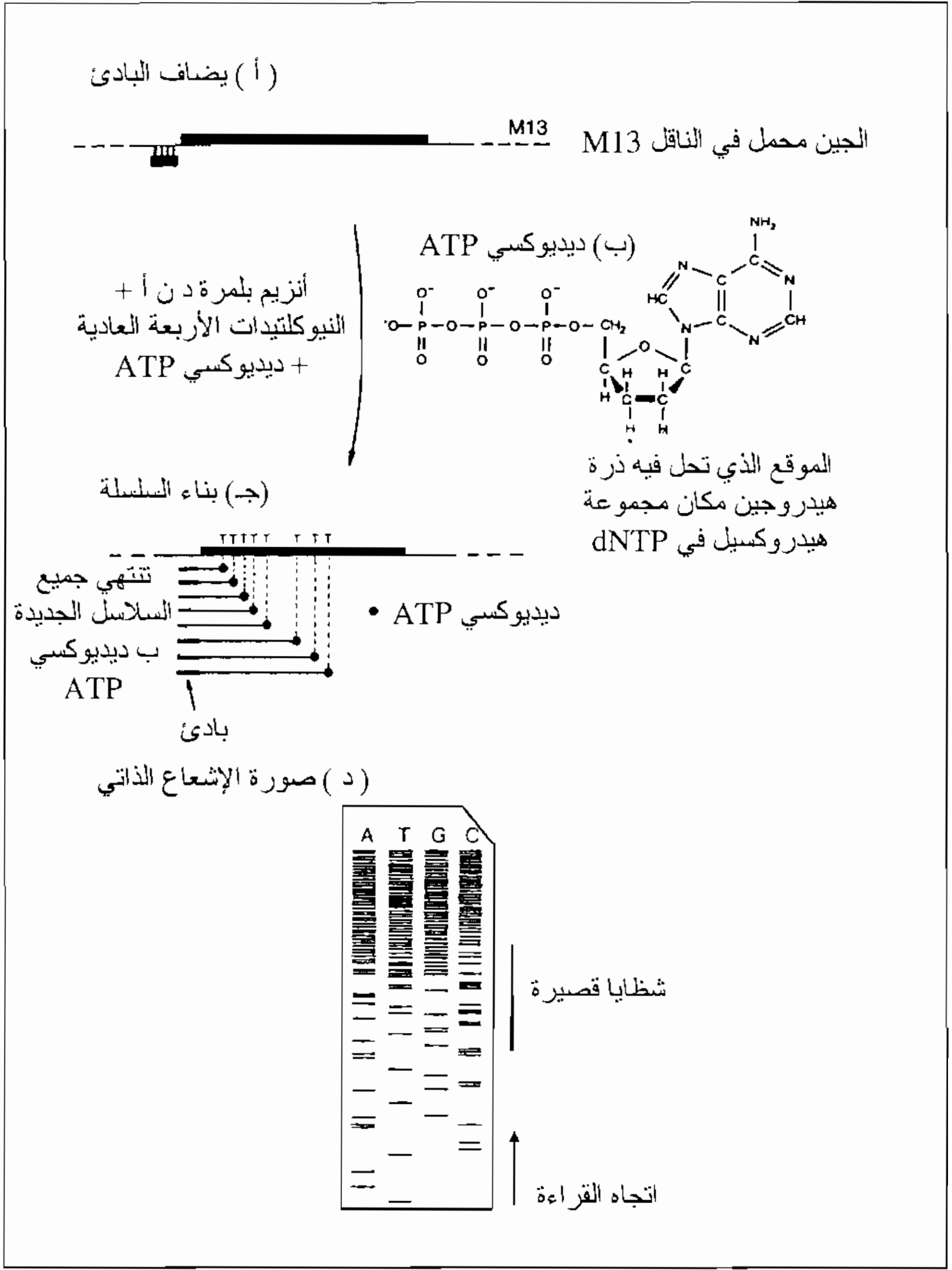
تحليل التتابعات النيوكلتيدية فى جزئ د.ن.أ DNA sequencing:

تعد طرق تحليل تتابعات الاحماض النووية من أهم التقنيات المستخدمة فى مجال البيولوجيا الجزيئية والتى يمكن بها التحديد الدقيق لترتيب النيوكلتيدات فى تتابعات مستمرة فى قطعة من د.ن.أ. وعلى الرغم من أن طرق تحليل التتابعات بدأت منذ بداية الستينات من القرن الماضى إلا أن أوخر السبعينات شهدت ظهور تقنيات سريعة وفعالة لتحليل تتابعات د.ن.أ.

أ - طريقة أنهاء بناء السلسلة Chain Termination Method:

وقد استنبطها Sanger and Coulson وتتطلب الطريقة استخدام سلسلة د.ن.أ مفردة للبناء عليها ولذلك تتم كلونة مثل هذه السلسلة فى ناقل M13 وحيد السلسلة بحيث يتم بناء سلسلة د.ن.أ المكملة عليها بانزيم DNA Pol 1 أو أنزيم Sequenase. ويحتاج الامر إلى وجود بادئ Primer لكى يستطيع الانزيم بدء البناء (الشكل١٢-٣٠) ويتكون مخلوط التفاعل من العناصر الاساسية المعروفة لبناء د.ن.أ بحيث يتوفر فيها النيوكلتيدات الاربعة العادية dNTP's A,C,G,T مع مراعاة أن تكون إحدى هذه النيوكلتيدات معلمه بالاشعاع مع توزيع هذا المخلوط فى أربعة انابيب وتعطى الحروف : T,G,C,A.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



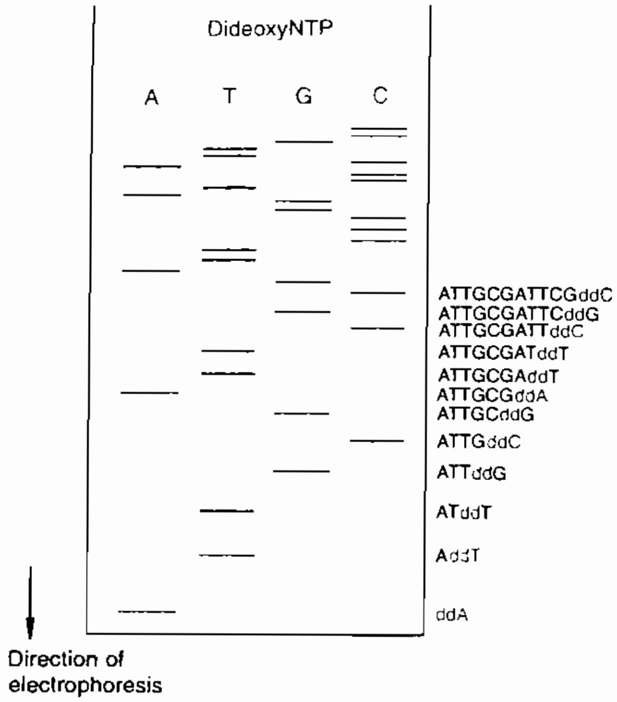
الشكل (١٢-٣٠): طريقة سانجروكولسون لتحليل تتابعات د ن أ بإنهاء سلسلة د ن أ

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وبالاضافة إلى مخلوط النيوكلتيدات الاربعة في كل انبوبة يضاف نيوكلتيدة واحدة معدله منزوع منها مجموعة 3\OH وتسمى Dideoxy Nucleotide والتي تتوقف عندها عملية استطالة سلسلة د.ن.أ الجديدة نظراً لعدم وجود مجموعة 3'OH حرة بها والتي تحتاجها عملية البناء لاضافة النيوكلتيدة التالية. أي أن انهاء السلسلة يحدث اينما يتم الاضافة الانزيمية لهذه النيوكلتيدة المعدلة. وإذا احتوى المخلوط في الانبوبة A على Dideoxy ATP فإن الانهاء سيحدث عندما تتقابل مع النيوكلتيده T على طول تتابعات السلسلة القالب، وتكون النتيجة هي الحصول على مجموعة من السلاسل الجديدة المختلفة الأطوال ولكنها تشترك في أن كل منها ينتهي بالنيوكلتيدة المعدلة Dideoxy A. نفس الشئ سيحدث في الانبوبة C ولكن باضافة Dideoxy C والانبوبة G بأضافة Dideoxy G والانبوبة T بأضافة Dideoxy T.

يلي ذلك التفريد الكهربي لمحتويات الانابيب الاربعه من مجموعة سلاسل د.ن.أ Oligo جنباً إلى جنب. ويمكن باستخدام التصوير بالاشعاع الذاتي، التعرف على التتابعات حيث تتم قرائتها من اسفل الجيل إلى أعلى كالاتي (الشكل ١٢-٣١).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٣١): كيفية قراءة صورة الإشعاع الذاتى للجيل الناتج من طريقة إنهاء السلسلة.
يحتوى كل مضمار على الشظايا الناتجة عن بناء السلسلة فى وجود واحدة من الأربعة ديوكسى ريبونيوكلتيد.
تتم قراءة التتابع بتحديد المضمار الذى تتكون فيه كل شظية مبتدأ من أسفل بأصغر شظية فى الحجم وصاعدا بالتدريج فى صورة الجيل

تحدد أولاً أخف حزمة بين نواتج مخاليط الأنابيب الأربعة والتى تمثل اصغر شظيه من د.ن.أ التى تم انهاء السلسلة عندها وليكن ذلك عند A بمعنى أنه فى المسار A تكون أول نيوكلتيدة فى التتابع هى A . ثم نبحث عن ثانى اسرع شظيه فى التحرك والتى يزيد طولها بمعدل نيوكلتيدة واحدة فقط عن سابقتها فنجد أنها فى المسار T وبذلك تكون النيوكلتيدة الثانية فى التتابع هى T

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

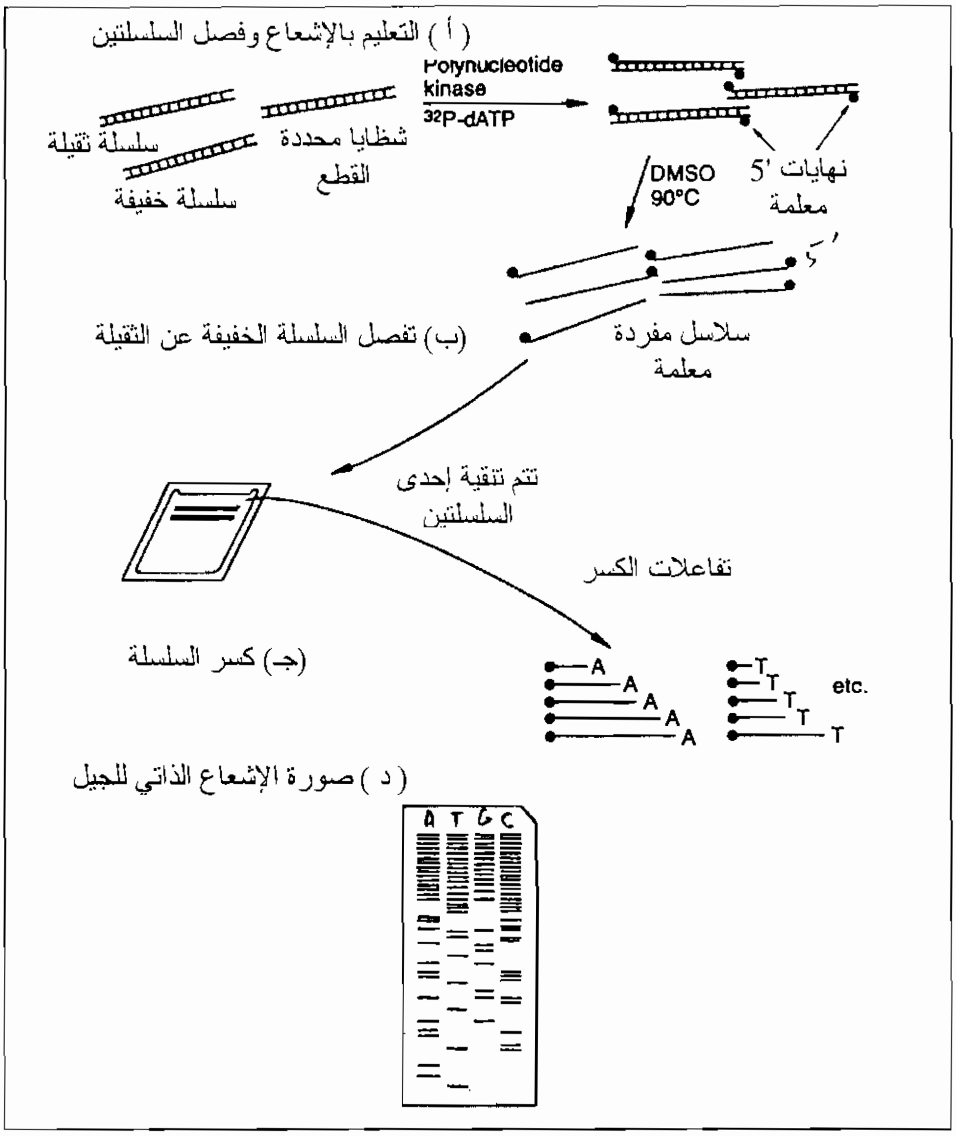
ويكون التتابع عند هذه النقطة هو AT. وتستمر عملية القراءة من اسفل الى أعلى حتى نصل إلى نقطة تكون فيها السلاسل متداخلة ويصعب قراءتها وعموماً فإن هذه الطريقة تنتج قراءة تتابعات لحوالى ٤٠٠ نيوكلتيدة من صوره اشعاع ذاتى واحده Autoradiograph

ب- طريقة الهدم الكيماوى Chemical degradation of DNA:

استنبط هذه الطريقة Maxam and Gilbert وتحتاج هذه الطريقة إلى استخدام قطع د.ن.أ مزدوجة السلسلة وبذلك لا تحتاج الى الكلونة فى الناقل M13 ولا إلى بادئ نظرا لأن الأساس فى هذه الطريقة ليس البناء ولكن هدم جزئ د.ن.أ ثنائى السلسلة الموجود بالفعل باستخدام محاليل كيماوية موجهة ليتسنى قطعه عند نيوكلتيدة نوعية معينة. ويتم اولاً التعليم Labeling بالفوسفور المشع ^{32}P عند النهاية $5'$ لقطعة د.ن.أ مزدوجه السلسلة المراد تحليل تتابعها، ثم يضاف Dimethylsulphoxide (DMSO) ويتم التسخين على درجة ٩٠ °م ويؤدى ذلك إلى تفكيك الحلزون المزدوج ودنترة جزئ د.ن.أ. يلى ذلك فصل السلسلتين بالتفريد الكهربى على اساس أن احدى السلسلتين تكون اثقل قليلا من الاخرى على اعتبار احتوائها على نسبة أعلى من البيورينات. ويتم فصل وتنقية احدى السلسلتين ثم يتم تقسيمها إلى أربع عينات وتعامل كل عينة بإحدى محاليل كاشفات القطع. وفى الحقيقة فإن أول مجموعة من الكاشفات تحدث تعديل فى تركيب النيوكلتيدة المتخصصة لها بحيث تجعلها معرضة للقطع عند هذه النيوكلتيدة عند اضافة مادة البيبريدين Piperidine. وتتم عملية التعديل Modification وتفاعل القطع Cleavage Reaction تحت ظروف قياسية تؤدى إلى احداث قطع واحد فى السلسلة. وتحتفظ بعض الشظايا المقطوعة بالفوسفور المشع ^{32}P $5'$. وبعد التفريد الكهربى ، يمكن التعرف على تتابعات النيوكلتيدات

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بالتصوير الذاتى الاشعاعى Autoradiograply وتتم قراءة التتابع من اسفل إلـــى اعلى كما سبق الشرح فى طريقة انهاء البناء (الشكل ١٢-٣٢).



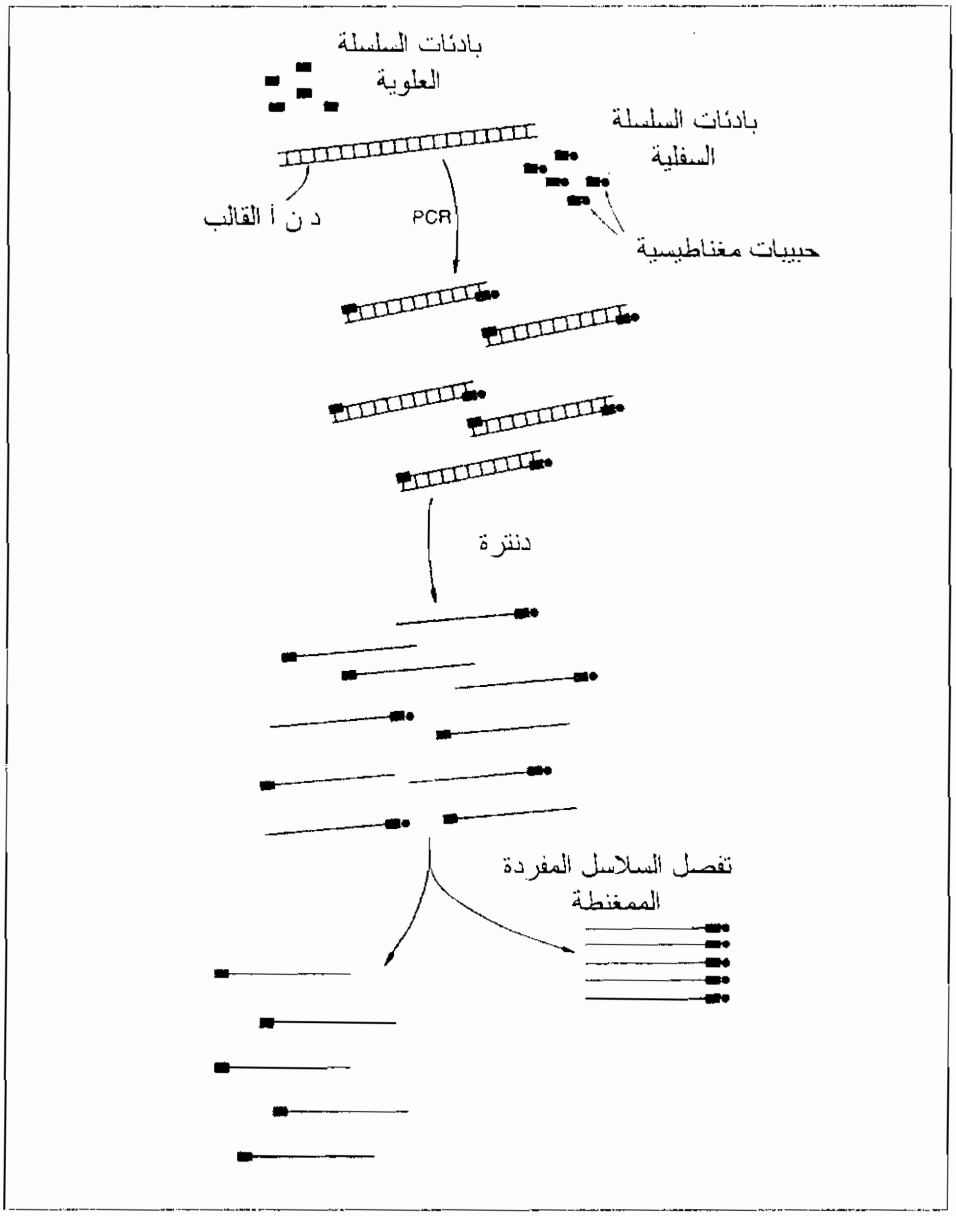
الشكل (١٢-٣٢): طريقة ماكسام وجلبرت لتحليل تتابعات د ن أ بالهدم الكيماوى

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

تحليل تتابعات نواتج Sequencing PCR Products PCR:

يحتاج الامر فى اغلب الأحيان إلى تحديد تتابعات الشظايا الناتجة من PCR ويمكن نظرياً اجراء ذلك عن طريق كلونة هذه الشظايا مع استخدام تقنية انهاء السلسلة السابق الاشارة اليها. إلا أنه نظراً للمشاكل الخاصة بكلونة هذه الشظايا فإنه من الأفضل أن يتم تحليل تتابعاتها مباشرة Direct بدون كلونة باستخدام تقنية أنهاء السلسلة Chain Termination وحيث أن هذه التقنية تتطلب استخدام سلسلة مفردة من د.ن.أ، فإنه يمكن عمل تعديل فى البادئ المستخدم بحيث يكون احد الزوجين مرتبط بقطعة من المغناطيس والاخر عادى. ثم يتم الاكثار فى جهاز PCR وبذلك يمكن فصل السلسلتين بعد نهاية برنامج PCR كما فى الشكل (١٢-٣٣)ويتم بعد ذلك اجراء تحليل التتابعات بطريقة انهاء السلسلة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

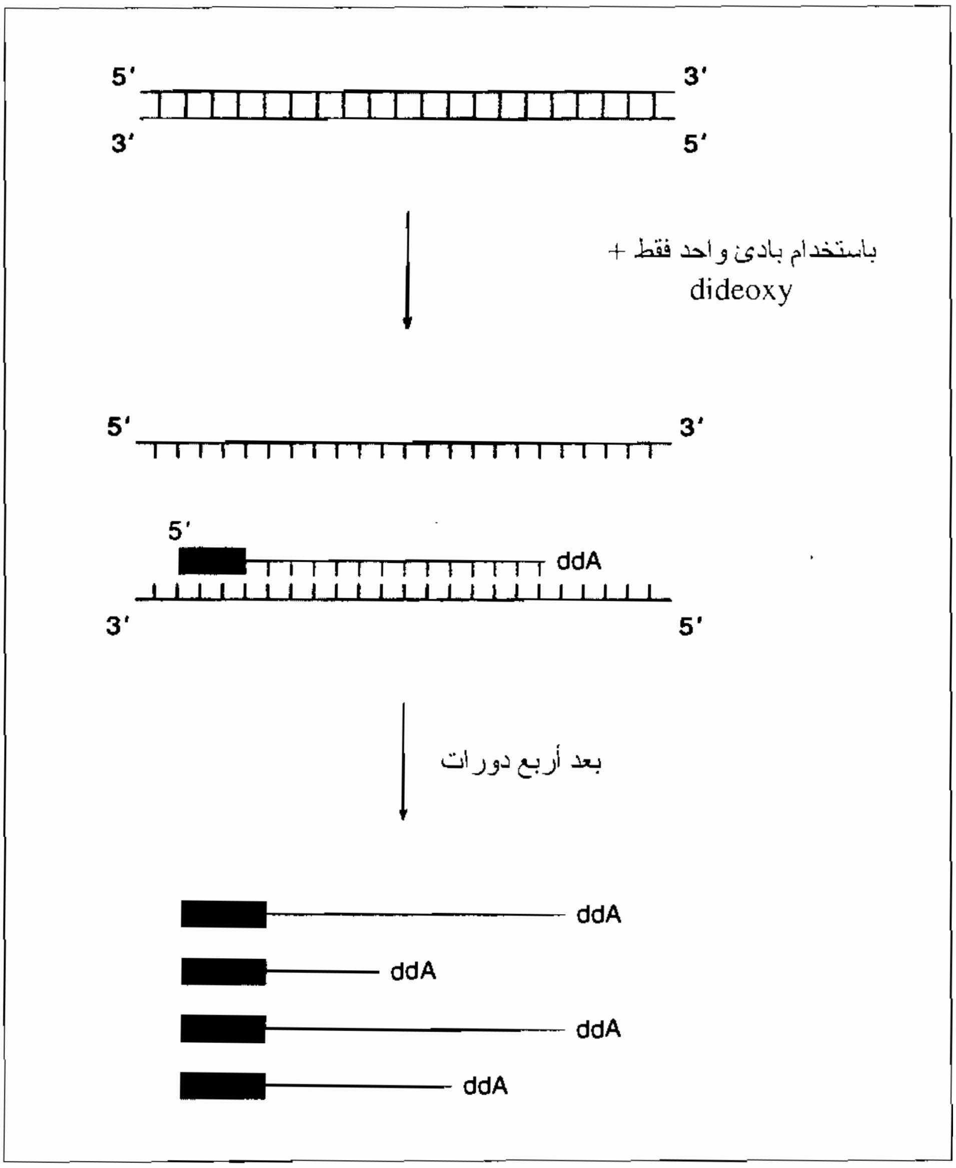


الشكل (١٢-٣٣): طريقة للحصول على عينة نقية من سلسلة مفردة من د ن أ من ناتج PCR مزدوج السلسلة. يتم تعليم احد البادئين بحبيبات ممغنطة وبعد إنتهاء دوراتPCR تتم دنترة نواتج PCR مزدوجة السلسلة و تفصل السلاسل الممغنطة من تلك غير الممغنطة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وتوجد تقنية بسيطة وسهلة لتحليل تتابعات نـواتج PCR ويطلـق عليهـا Thermal Cycle Sequencing وتتضمن الجمع بين PCR وتحليل تتابعات النواتج فى تفاعل واحد. وفى هذه التقنية يستخدم مخلوط للتفاعل مشابة لمخلـوط PCR مع اختلافين هامين أولهما استخدام بادئ واحـد Single Primer فقـط (ولـيس زوج) ومعنى ذلك أن عملية الاكثار المميزة لتقنية PCR لا يمكـن أن تحـدث ولكن كل ما يحدث هو أن سلسلة واحدة من د.ن.أ القالب هى التى سيتم أكثارها الى نسخ عديدة. ولابد من استمرار هذا الاكثار نظراً لأن التفاعل يكون متسلسل حرارياً Thermally Cycled تمامـاً مثـل مـا يحـدث فـى PCR، والفـرق أو الاختلاف الثانى هو أن هذا التفاعل المعدل يجرى اربع مرات على التوازى وفى كل مرة مع نيوكلتيدة معدلة Dideoxy مختلفة (G, C, T, A) ممـا يـؤدى إلى انهاء بناء الشظايا الجديدة عنـد كـل مـن هـذه النيوكلتيـدات المعدلـة (الشكل ١٢-٣٤). يلى ذلك التفريد الكهربى للنواتج كما فى حالة تقنيـة انهـاء السلسلة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

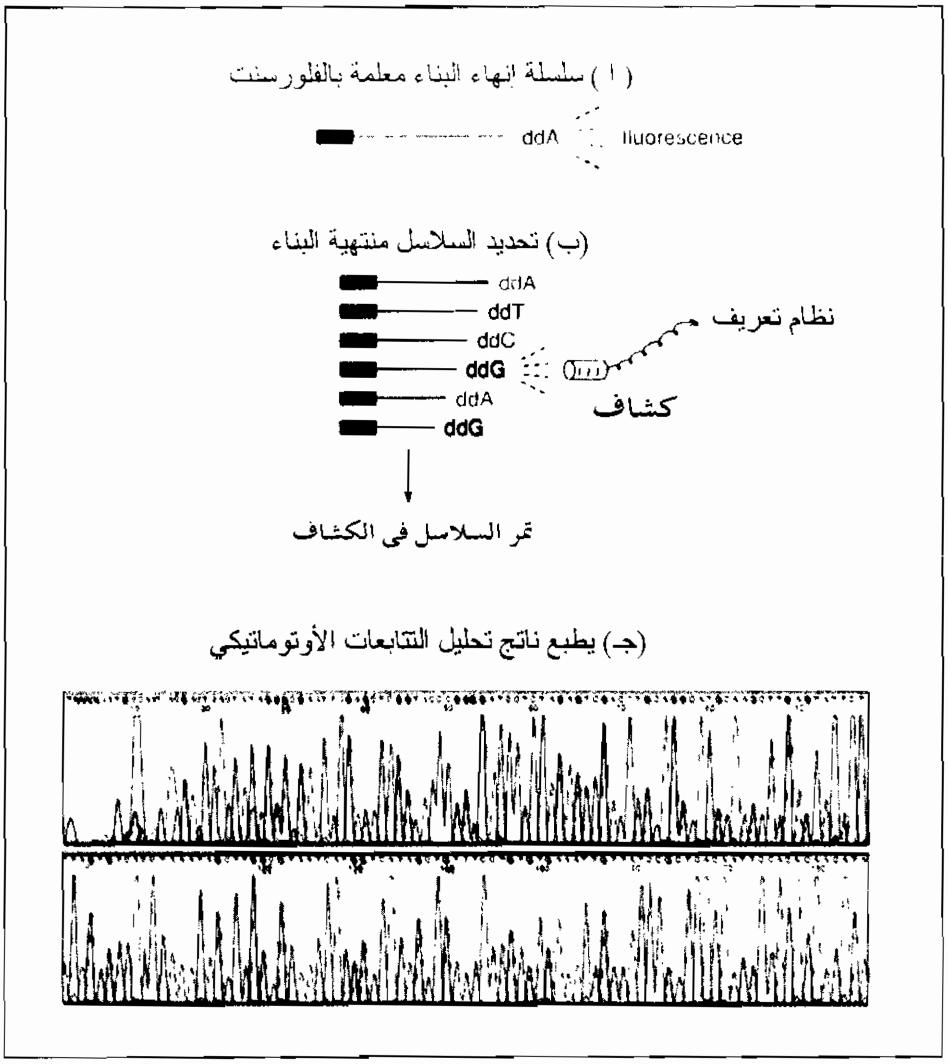


الشكل (١٢-٣٤): الأساس فى تحليل تتابعات د ن أ بطريقة Thermal Cycle Sequencing. يتم تحضير PCR مع إضافة بادئ واحد فقط (وليس زوج من البادئات) واحد داى ديوكس نيوكلتيدة Dideoxy NTP حيث يحدث بناء لأحد سلاسل القالب إلى العديد من سلاسل إنهاء البناء (بطريقة سانجر ــ كولسون)

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وقد تم تطوير عملية تحليل التتابعات بجعلها Automated وبدلا من استخدام التعليم بالاشعاع استعيض عنه بالتعليم الفلورسنتى والذى يتم بربط فلورسنت بلون مختلف Different Fluorochrome مميز لكل قاعدة Dideoxy (مثلا أحمر مع A وأزرق مع T وأصفر مع G وأخضر مع C) وتتم متابعة اشارات الفلورسنت بنوع خاص من Imaging System يتضمن استخدام كمبيوتر لقراءة تتابعات د.ن.أ بدلا من الاعتماد على نظر الباحث. ويتم وضع نواتج التفاعل فى انبوبة شعرية واحدة لنظام التفريد الكهربى وامرارها على كشاف فورسنتى Fluorescent Detector الذى يحدد نوع الاشارة الفلورسنت المنبعثة من كل حزمة ويغذى النتائج للكمبيوتر الذى يقوم بتحويل المعلومات إلى تتابعات د.ن.أ المقابلة. ويمكن طبع التتابعات لفحصها أو تخزن فى الكمبيوتر للقيام بتحليلات أكثر (الشكل ١٢-٣٥).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٣٥): **تحليل تتابعات د ن أ أوتوماتيكيا:**

أ - يتم تعليم كل من Dideoxy NTP بكشاف فلورسنتي.

ب- يتم تعليم كل من Dideoxy NTP بكشاف فلورسنتي مختلف اللون بحيث يمكن تمييزالسلاسل المنتهية البناء أثناء مرورها على الكشاف Detector.

ج- مثال لتتابعات د ن أ مطبوعة من الكمبيوتر.

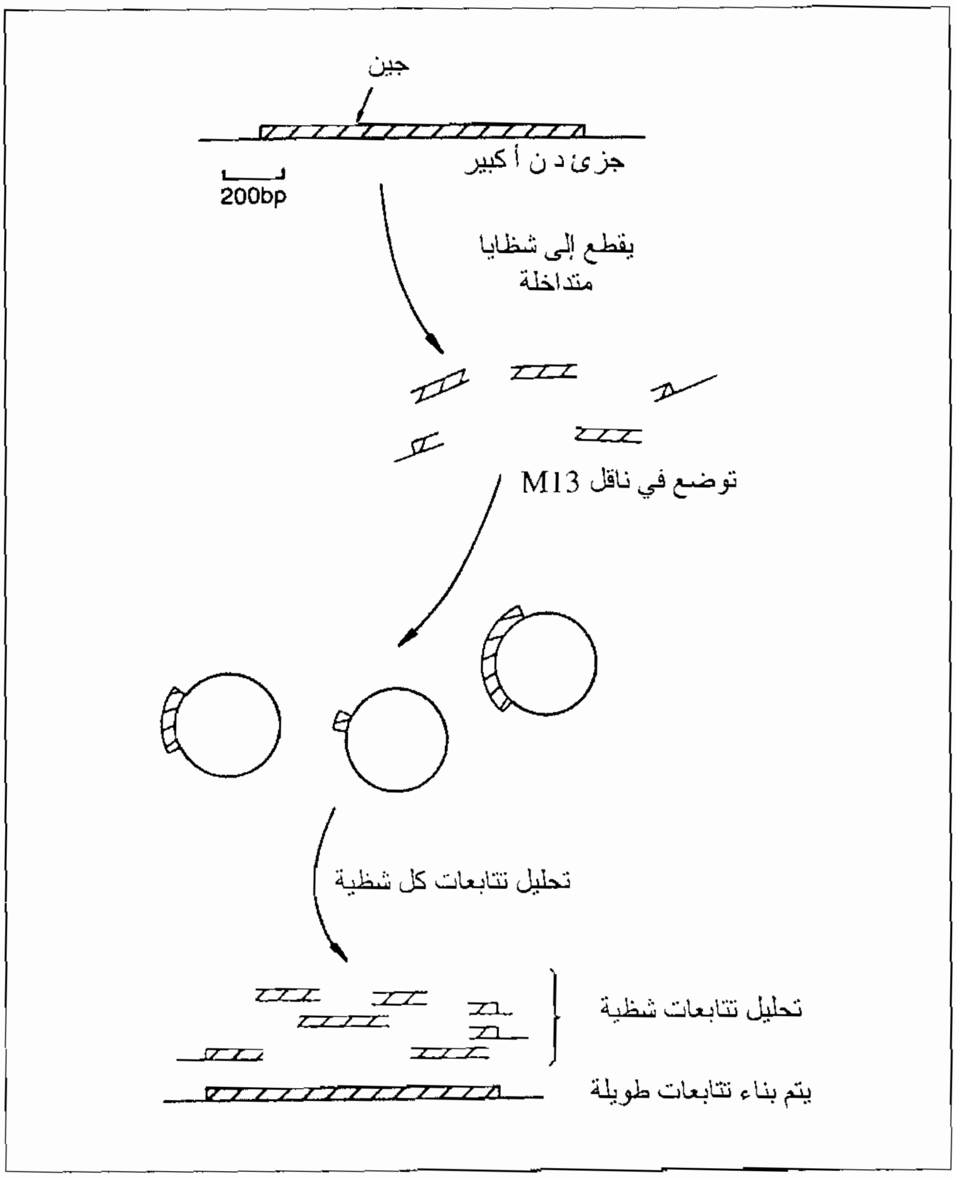
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويمكن لجهاز تحليل التتابعات الأوتومـــاتيكى Automated Sequencer أن يقرأ حتى ٩٦ تتابع مختلف فى ساعتين وبذلك يعطى بيانات أكثر وبسرعة أكبر عما هو ممكن بالتحليل اليدوى، حيث يعطى الشوط الواحد للتحليل تتـــابع ٧٥٠ نيوكلتيدة مقابل ٤٠٠ نيوكلتيدة فقط بالتحليل اليدوى ويمكن بالتحليل الاتوماتيكى واستخدام Robotic Systems وبنظام مشابة للمصنع حيث يوجـــد ٩٦ مـــسار أو خط تحليل تتابع اوتوماتيكى تعمل معا بالتوازى الحصول علـــى تتابعـــات ٥٠ مليون نيوكلتيدة على مدى يومين من التشغيل المتواصل للنظام مما يعـــد قفـــزة هائلة فى مجال تحليل التتابعات.

تكوين تتابعات طويلة من د.ن.أ.:

ويتم ذلك من خلال اجراء تجارب تحليل تتابعات د.ن.أ لعدد كبيـــر مـــن الشظايا المكلونة أو لنواتج PCR بحيث تكون جميعها مشتقة مـــن جـــزئ د.ن.أ واحد أكبر الشكل (١٢-٣٦) ولابد أن تكون هذه الشظايا متداخلة Overlapping حتى تكون التتابعات نفسها متداخلة. ويمكن التعرف علـــى مواقـــع التـــداخلات إما بالعين المجردة أو باستخدام الكمبيوتر. ويتم تكوين التتابع الرئيسى Master Sequence أو Contig بالتدريج. وتوجد عدة طرق لانتاج الـــشظايا المتداخلـــة. إذ يمكن قبل الكلونة تقطيع جزئ د.ن.أ بأربع أو خمسة انزيمات قطع محـــددة. وهناك طريقه اخرى لتكسير جزئ د.ن.أ وهى تسليط ذبذبات قوية Sonication مما يؤدى إلى تقطيع جزئ د.ن.أ بطريقة عشوائية أكثر مما يؤدى الـــى زيـــادة احتمالات الحصول على شظايا متداخلة يمكن وضعها فـــى التتـــابع الرئيـــسى Contiguous Master Sequence.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٢-٣٦): بناء تتابعات د ن أ طويلة من مجموعة تتابعات متداخلة قصيرة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وقد تحققت نجاحات هامة فى مجال تحليل التتابعات النيوكلتيدة فى عـــدد من الجينومات وكان أول كائن تم تحليل تتابعاته هو بكتريوفاج 174 ϕX وتـــلاه تحليل فيروس 40 SV والبلازميد 322 PBR. وبعد ذلك توالت تحليلات تتابعات جينومات أكبر مثل جينوم الميتوكوندريا البشرية وبكتريوفاج λ وقد تم مـــؤخراً تحليل التتابعات الكاملة لجينومات الخميـــرة والدروســـفلا والنيمـــاتودا ونبـــات الارابيدوبس ونبات الارز وتوجت بالانتهاء من تحليل التتابعات الكاملة للجينـــوم البشرى.

ويبين الشكل (١٢-٣٧) التقدم الهائل الذى حدث فـــى كفـــاءة تحلـــيلات تتابعات الجينوم المختلفة وبعض الانجازات التى تمت فى هذا المجال.

درجة الكفاءة القاعدة / الفرد / السنه	**انجازات هامة فى تحليل تتابعات** د.ن.أ	
	١٨٦٨	اكتشف Miescher د.ن.أ
	١٩٤٤	اثبت Avery أن د.ن.أ هو مادة الوراثة.
	١٩٥٣	اعلن Watcon & Crick الحلزون المزدوج لـــ د.ن.أ
١	١٩٦٥	تحليل تتابعات ala tRNA للخميرة بواسطة Holley

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

١٥	١٩٧٠	تحليل تتابعات بكتريوفاج λ بواسطة wu
١٥٠		
١٥٠٠	١٩٧٧	استنبط Sanger طريقة انهاء السلسلة لتحليل التتابعات واستنبط Glibert طريقة الهدم الكيماوى لتحليل التتابعات
١٥٠٠٠	١٩٨٠	استنبط Messing ناقل الكلونة M13
٢٥٠٠٠	١٩٨٦	استنبط Hood نظام تحليل تتابعات اوتوماتيكى جزئى
١٠٠٠٠٠		
١,٠٠٠,٠٠٠	١٩٩٥	اعلن Venter تحليل تتابعات أول جينوم بكتيرى واستخدم فيها اجهزة اوتوماتيكية بالفلورسنت تدار بالانسان الاتى robot وقدم مفهوم تحليل التتابعات بجهاز PCR
الكفاءة / قاعدة/ الماكينة/السنه	١٩٩٦	المجموعة الدولية للعلماء اعلنت تحليل التتابعات الخاصة بجينوم الخميرة
١٥٠,٠٠٠,٠٠٠	١٩٩٨	شركة Perkin- Elmer اخترعت جهاز تحليل تتابعات يحتوى على ٩٦ انبوبة شعرية يتم تشغيلة اوتوماتيكياً بالكامل
	١٩٩٨	تحليل التتابع الكامل لجينوم دودة النماتودا

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

٢٠٠٠	تحليل التتابع الكامل لمناطق اليوكروماتين فى جينوم الدروسفلا وكذلك تحليل التتابع الكامل لجينوم نبات الارادبيدوبس
٢٠٠١	نشر العلماء القائمون على HGP وشركة Celera أول مسودة للتتابعات الجينوم البشرى.
٢٠٠٢	نشر أول مسودة لتتابعات جينوم الازر

الشكل (١٢-٣٧): بعض الانجازات الهامة فى تحليل تتابعات د. ن. أ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفصل الثالث عشر

التحليلات الجينومية

Genomic Analysis

منذ أكثر من سبعين عاماً دأب الوراثيون على استخدام مصطلح الجينـــوم Genome للدلالة على نسخة كاملة من المعلومات الوراثية أو مجموعة كامله من الكروموسومات (الاحادية) للكائن. وعلى العكس من ذلــك نجــد أن مــصطلح جينوميا Genomics من المصطلحات الحديثة جداً. وقد كان Thomas Roderick أول من اطلق هذا المصطلح عام ١٩٨٦ للإشارة إلى أحد المجـــالات الوراثيـــة التى تهتم برسم الخرائط Mapping وتحليل التتابعات وتحليل وظائف الجينومات بالكامل. وقد اتخذ هذا المصطلح ايضا لتــسمية مجلــة علميــة جديــدة باســم Genomics مختصة بنشر الابحاث الخاصة بهذا المجال الحديث.

ونتيجة للتقدم الهائل فى هذا المجال والذى أدى إلى التوصل الــى رســم خرائط مفصلة وتتابعات للجينومات المختلفة، فقد تم تقسيم مجال الجينوميا إلى: جينوميا تركيبية Structural Genomics وتختص بدراســة تركيــب الجينـــوم، وجينوميا وظيفة Functional Genomics وتختص بدراسة وظائف جينات الجينوم والتى تشمل التحليلات النسخية Tranciptome أى المجموعة الكاملة مــن ر.ن.أ المنسوخة من الجينوم، والتحليلات البروتينية Proteome أى المجموعة الكاملـــة من البروتينات المشفرة من الجينوم.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وقد تفرعت الجينوميا الوظيفية الى مجال جديد وهو Proteomics والذى يختص بتقدير تركيب ووظائف جميع البروتينات فى الكائن الحى.

وبينما نجد أن الجينوميا التركيبية متقدمة بشكل جيد نتيجة لتوفر التتابعات النيوكلتيدية الكاملة لعدد كبير من الكائنات ، فإن الجينوميا الوظيفية تبدو على اعتاب مرحلة نمو هائلة. وقد ساعد على ذلك استنباط تقنيات حديثة مثل Gene Chips, Microarray مما ساعد العلماء على متابعة وتحليل تعبير جينومات كاملة (أى جميع الجينات فى كائن ما) فى المراحل المختلفة من النمو والتمايز أو استجابة للتغيرات البيئية التى يتعرض لها الكائن مثل الاجهادات الحرارية أو نقص بعض المغذيات. والأمل كبير ان تقدم هذه التقنيات معلومات هامة عن وظائف الجينات وكيفية تفاعلها مع بعضها وكذلك تفاعلها مع البيئة المحيطة بها.

ولدراسة الجينوم يجب اجراء ثلاثة تحليلات هامة وهى:

١- الجينوميا Genomics وتتمثل فى الحصول على بيانات تحليل تتابعات د.ن.أ فى صورة اعداد هائلة من التتابعات الفردية بطول ٥٠٠-٨٠٠ قاعدة والتى يجب تجميعها فى تتابعات جينومية متجاورة Contiguous ولذلك لابد من وجود استراتيجية يتم على اساسها التجميع الصحيح لهذه التتابعات بدون أخطاء أو فجوات.

٢- ما بعد الجينوميا Post-Genomics أو الجينوميا الوظيفية Functional Genomics ويتم فيها تحليل التتابعات لتحديد مواقع الجينات ، والتتابعات التنظيمية Control Sequence وغيرها من العوامل الهامة. ويتبع ذلك سلسلة من التجارب لتحديد وظائف أى جينات جديدة غير معلومة الوظائف Candidate Genes أو Orphans.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٣- المعلوماتيه الحيوية Bioinformatics وتتضمن استخدام الكمبيوتر للمساعدة فى دراسات ما بعد الجينوميا وتشمل تجميع التتابعات المتجاورة Contigs بالكمبيوتر (باستخدام برامج متخصصة) ودراسة التتابعات للكشف عن وجود الجينات والتبنؤ بوظائف بعض الجينات الجديدة وتخزين الكميات الهائلة من البيانات والمعلومات التى يتم الحصول عليها خلال مراحل تنفيذ المشروعات الجينومية. ويطلق على المعلوماتية الحيوية Molecular Biology *in Silico* فى اشارة الى اهمية الكمبيوتر فى هذا الشأن.

طرق تكوين التتابعات المتجاورة Assenbly of Contigs:

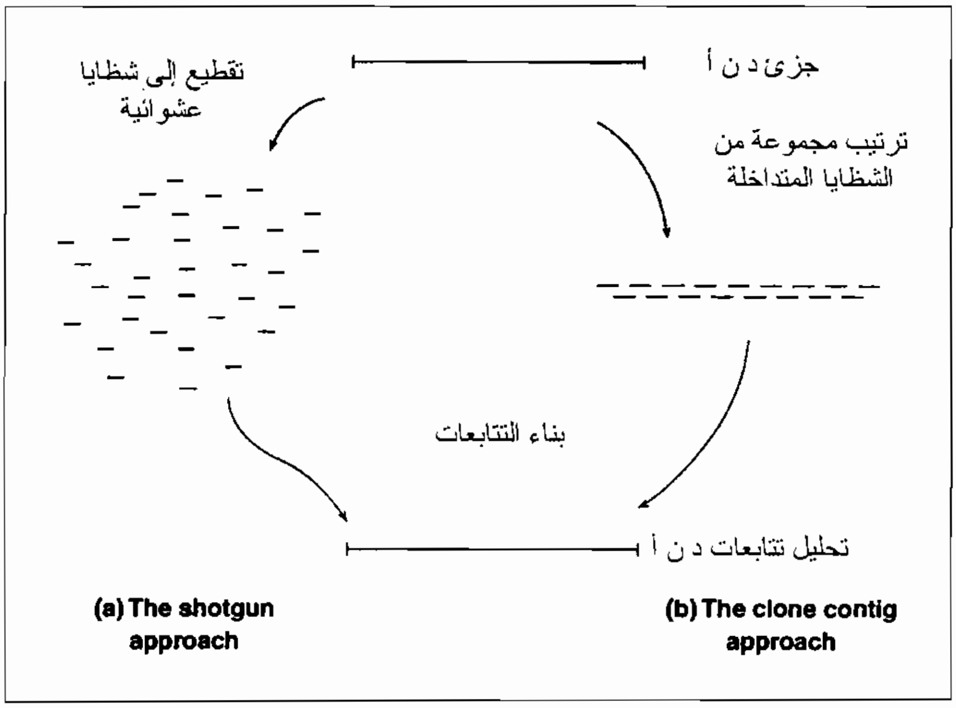
لقد اصبح الحصول على بيانات تتابعات د.ن.أ عملية روتينية فى المشاريع الجينومية وخاصة بعد استخدام الطرق الاوتوماتيكية فى هذا المجال كما سبق القول. ولكن المشكلة الأولى والحقيقية تتمثل فى الحاجة إلى تجميع أو اصطفاف assemble الالاف وحتى الملايين من شظايا التتابعات بطول ٧٥٠ قاعدة، فى شكل تتابع جينومى متجاور (متراص). ويتم استخدام استراتيجيتين لهذا الغرض (الشكل١٣-١):

١- طريقة Shotgun Approach والتى يتم فيها تقطيع أو كسر الجينوم عشوائياً إلى شظايا قصيرة ويتم فحص التتابعات الناتجة للتعرف على التداخلات بينها Overlaps وتستخدم هذه التداخلات فى المساعدة على بناء التتابعات المتجاورة للجينوم.

٢- طريقة الكلونات المتجاورة Clone Contig Approach وتتضمن خطوة مبدئية يتم فيها تحديد الكلونات المتداخلة Overlapping ثم يلى ذلك تحليل تتابعات قطع د.ن.أ المكلونة وتوضع هذه القطع فى اماكنها الصحيحة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

على خريطة الـــ Contig توطئة للبناء التـــدريجى للتتابعـــات المتداخلـــة للجينوم.



الشكل (١٣-١)

(أ) طريقة Shotgun و(ب) Clone Contig لترتيب التتابعات الجينومية

أولاً: طريقة Shotgun لبناء تتابعات الجينوم:

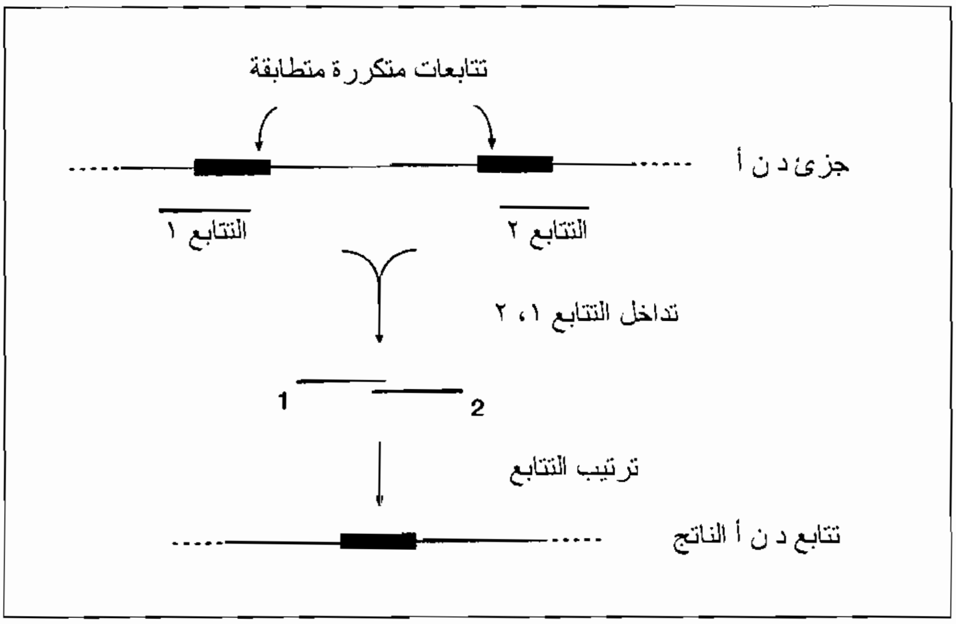
The Shotgun Approach To Genome Sequencing:

أن أهم عامل فى نجاح هذه الطريقة هو التعرف على التداخلات الصحيحة بين جميع تتابعات الشظايا التى تم انتاجها بهذه الطريقة (Sonication). ويجـــب أن تكون عملية تحديد هذه التداخلات دقيقة تماماً حتى يمكـــن الحـــصول علـــى التتابعات الصحيحة للجينوم إذ أن أى خطأ فى تعريف زوج من تتابعات الشظايا

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

المتداخلة يؤدى إلى حدوث سلسلة من الاخطاء مما يجعل العملية غير مجدية ولا يعتد بنتائجها. وتزداد احتمالات الوقوع فى اخطاء فى الجينومات الكبيرة الحجم. لذلك يفضل استخدام هذه الطريقة فى تحليل تتابعات الجينومات البكتيرية الصغيرة.

وتنشأ المشاكل عند استخدام هذه الطريقة فى الجينومات الكبيرة الحجم نتيجة لاحتوائها على تتابعات متكررة من د.ن.أ Repetitive DNA Sequences كما فى مميزة النواة. أذ انه عند تجميع التتابعات المتجاورة فإن تلك التتابعات التى تقع جزئياً أو كلياً داخل وحدة متكررة من د.ن.أ يمكن بالخطأ اعتبارها متداخلة مع التتابع المتكرر المتماثل فى وحدة متكررة أخرى (الشكل ١٣-٢).



الشكل (١٣-٢): مشكلة وجود تتابعات متكررة عند تحليل تتابعات د ن أ بطريقة Shotgun. قد ينتج عن ذلك غياب قطعة من جزئ د ن أ من تتابع د ن أ الكلى

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وقد يؤدى ذلك إلى وضع اجزاء من تتابعات الجينوم فى غير اماكنها الصحيحة أو فقدها تماماً. وقد امكن التغلب على هذه المشكلة بالاستعانة بالخرائط الوراثية والفيزيائية لتوجيه تجميع (رص) التتابعات المتحصل عليها بهذه الطريقة كما سيأتى بعد.

ثانيًا: طريقة Clone Contig Approuch:

ولا تعانى هذه الطريقة من مشاكل وجود التتابعات المتكررة في جزئ د.ن.أ فى الجينومات الكبيرة، إلا أنها تتطلب بذل عمل أكثر لذلك تأخذ وقتا طويلاً وتكلفة أكثر، ويتطلب تكوين سلاسل كلونات د.ن.أ المتداخلة هذا الوقت والجهد الاضافى وبمجرد الانتهاء من هذه العملية تجرى عملية تحليل تتابعات كل قطعة بطريقة Shotgun ويتم بناء تتابعات الجينوم خطوة خطوة كما فى الشكل اعلاه.

ويجب أن تكون الشظايا طويلة بقدر الامكان لتقليل العدد الكلى من الكلونات المطلوبة لتغطية الجينوم بأكمله. ولذلك يحتاج الأمر إلى استخدام ناقلات كلونة ذات سعة كبيرة مثل BAC's.

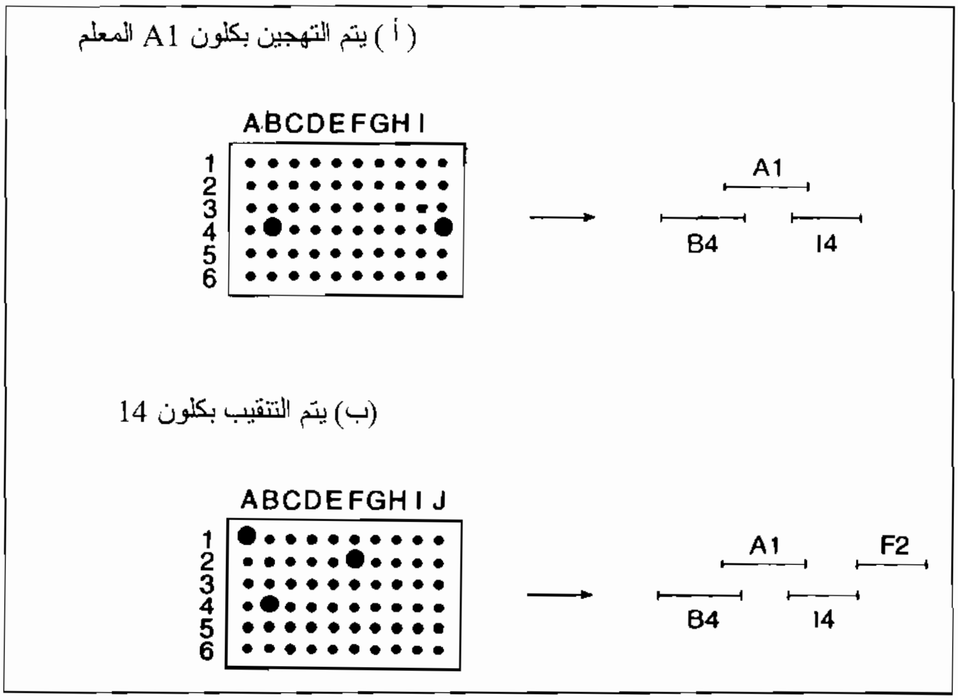
وتوجد طريقتين لبناء Clone Contig وهما:

١ - طريقة المشى على الكروموسوم Chromosome Walking:

وتبدأ هذه العملية باختيار كلون عشوائياً من المكتبة ويتم تعليمة Labelled ويستخدم كواسمة تهجينية مقابل جميع الكلونات الاخرى فى المكتبة (الشكل ١٣-٣-أ). وتكون الكلونات التى تعطى اشارة تهجين مع الكلون الواسم هى التى تتداخل معه. ويلى ذلك استخدام احد هذه الكلونات المتداخلة كواسمة (ويتم تعليمها) وتبدأ دورة جديدة من التنقيب عن التداخلات، وهكذا حتى يتم الكشف

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

عن جميع التداخلات الممكنة بين الكلونات فى المكتبة (الشكل١٣-٣-ب) وبذلك يتم بناء Clone Contig خطوة خطوة. إلا أن هذه الطريقة تعتبر مجهده وشـاقة ويستعان بها فقط فى الكروموسومات القصيرة التى تحتوى على عدد قليل نسبياً من الكلونات أو عندما يكون الغرض منها ملئ الفجوات الصغيرة بين إلى Contigs والتى تم بناؤها بطرق اخرى سريعة.



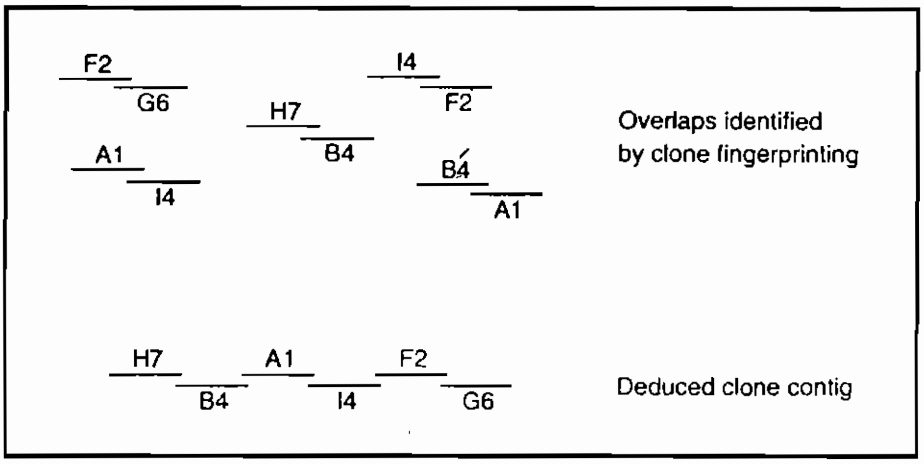
الشكل (١٣-٣): المشى على الكرموسوم Chromosome Walking

٢- طريقة القفز على الكروموسوم *Chromosome Jumping*:

وهى طريقة اسرع بكثير من المشى على الكروموسوم حيث يتطلب المشى أن يتم ذلك خطوة خطوة ببطء من نقطة بداية محدده Fixed وخاصة عندما تكون المسافات كبيرة بين الكشافات الجزيئية الاقرب للجين المرغوب.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

بينما فى طريقة القفز على الكروموسوم لا يحتاج الامر أن يبدأ بنـــاءه Conting من نقطة بداية محدده ولكن يكون الغرض هو التعرف على ازواج من الكلونات المتداخلة Pairs of Overlapping Clones وعندما نحصل على عدد كـــافي مـــن أزواج الكلونات المتداخلة، فإن بناء الـــ Conting سيكون سهلا وتعرف هـــذه الطريقة ببصمة الكلون Clone Fingerprinting (الشكل ١٣-٤).

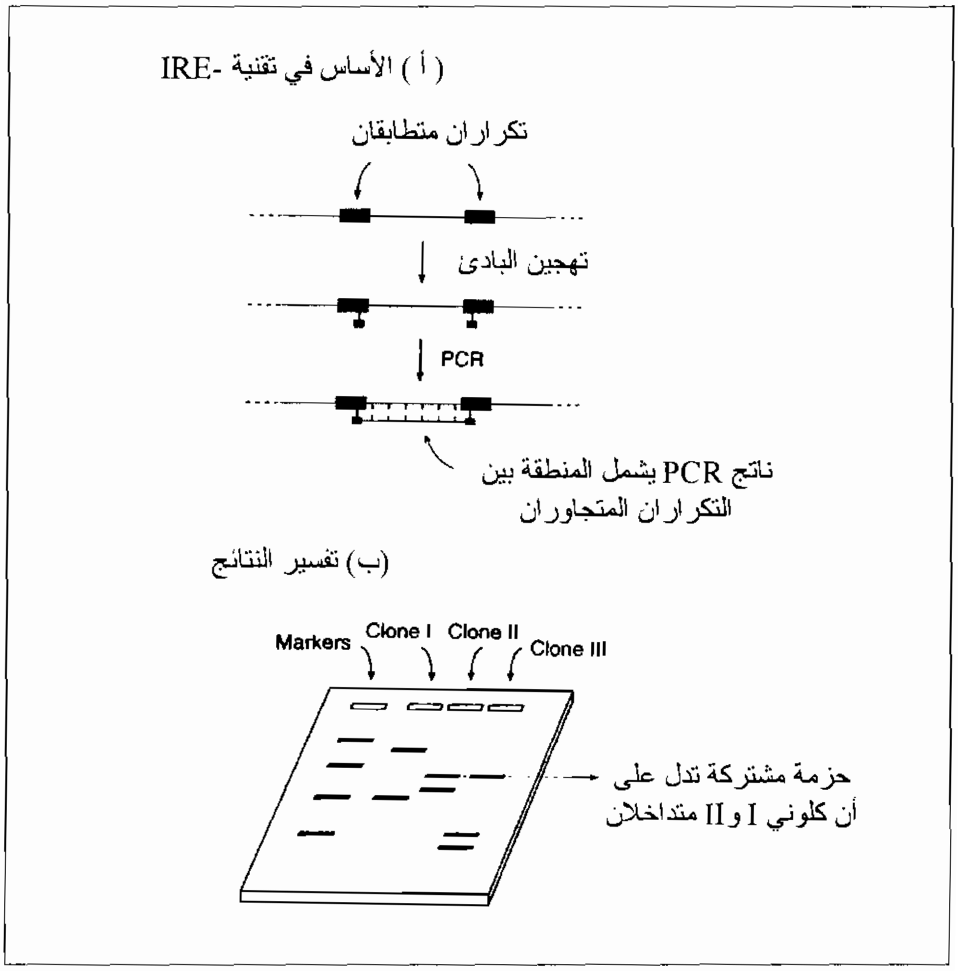


الشكل (١٣-٤): تكوين Clone Contig بتقنية بصمة الكلون Clone Fingerpriuting

ومن الطرق المستخدمة طريقة Repetitive DNA PCR والمعروفة ايـــضا بأسم Interspersed Repeat Element PCR (IRE-PCR) ويستخدم هذا النوع من PCR بادئات يتم تصميمها بحيـــث تتـــزاوج مـــع تتابعـــات د.ن.أ المتكـــررة Repetitive مما يدفعها إلى توجيه الاكثار Amplification لجـــزئ د.ن.أ فـــى المنطقة المحصورة بين منطقتـــين متكـــررتين متجـــاورتين (الـــشكل ١٣-٥). وتنتشر التتابعات المتكررة النوعية بطـــرز خاصـــة بطريقـــة عـــشوائية فـــى جينوم مميزة النواة وعلى مسافات مختلفة فيما بينها مما يؤدى إلـــى الحـــصول

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

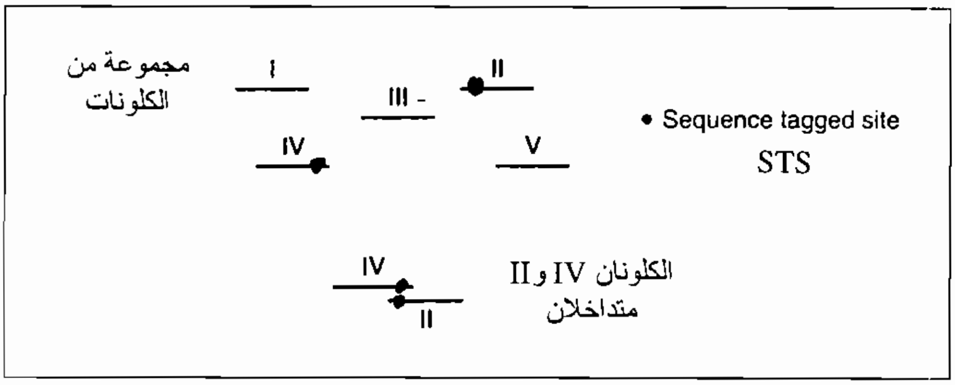
على اطوال (احجام) مختلفة من نواتج PCR عند استخدام هذه البادئات لعمل بصمات لكلونات د.ن.أ فى مميزة النواة. وإذا حصلنا على زوج من الكلونات يعطى نفس الحجم من نواتج PCR فلا بد انهما يحتويان على تكرارات على ابعاد متساوية نتيجة لان شظايا د.ن.أ المكلونة فى هذه الحالة تكون متداخلة.



الشكل (١٣-٥): تقنية PCR للتتابعات المتداخلة(IRE - PCR)

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

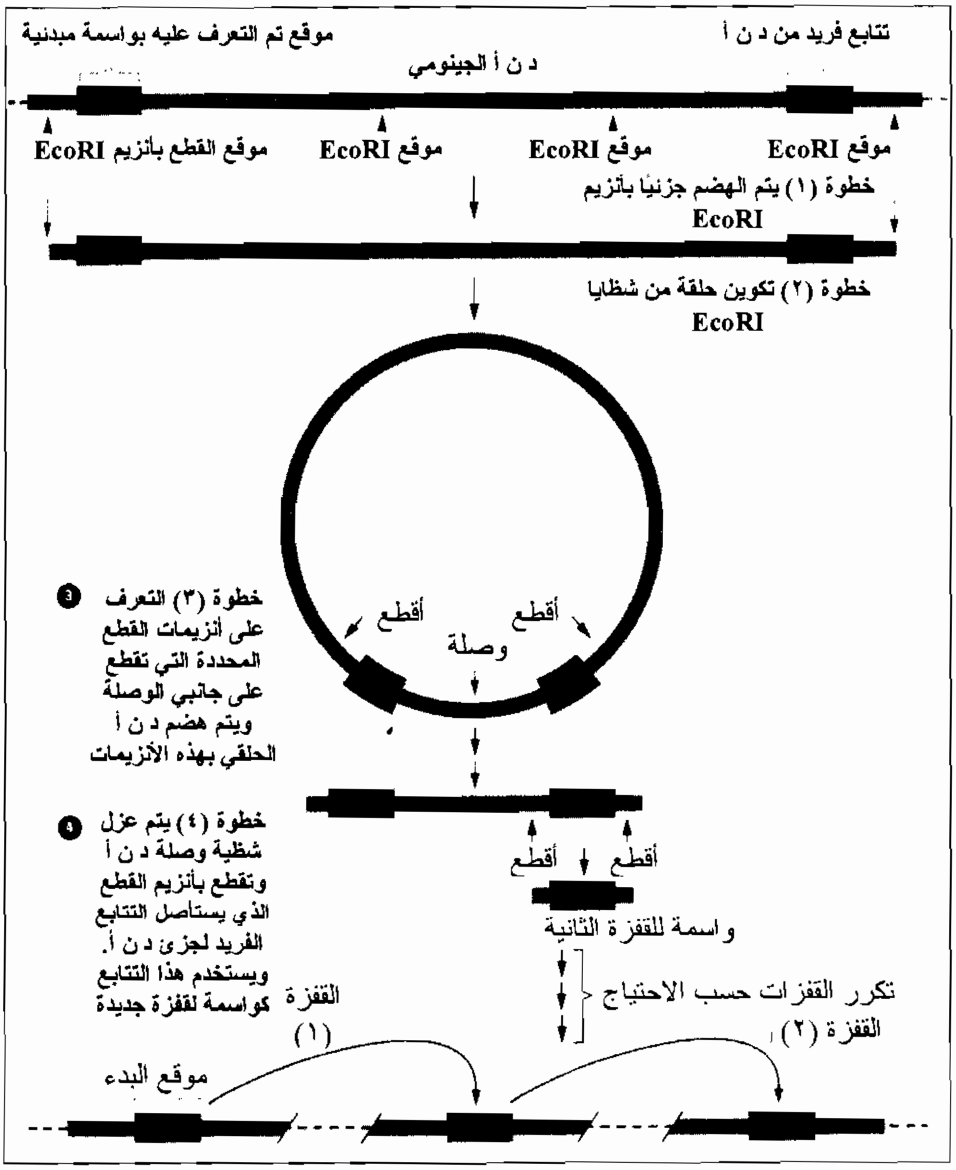
وتوجد طريقة آخرى لبناء Contig وتعتمد على (STS) Sequence Tagged Sites وهى عبارة عن تتابع جزئى للجين وتتميز بأنها تقع فى مكان فريد فى الجينوم، وتستخدم مع جهاز PCR كبادئات لعمل البصمة للكلونات كما فى الشكل (١٣-٦).



الشكل (١٣-٦): تقنية محتوى STS لرسم الخريطة

وفى حالة القفز على الكروموسوم قد تتسع القفزة الواحدة بحيث نعطى مسافة ١٠٠ كيلو قاعدة أو أكثر كما فى الشكل(١٣-٧). وتتميز طريقة القفز على الكروموسوم بإمكان القفز فوق تتابعات د ن أ المتكررة والتى تعيق عملية المشى.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٣-٧): القفز على الكروموسوم Chromosome Jumping كطريقة مختصرة وسريعة عن المشى على الكروموسومات الطويلة. ويمكن إستخدام هذه الطريقة للقفز فوق التتابعات المتكررة من د ن أ التى توقف عملية المشى على الكروموسوم

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

استخدام الخرائط الوراثية والمادية للمساعدة فى بناء تتابعات الجينوم

Using Maps to Aid Sequence Assembly

تستخدم الخرائط الوراثية والسيتولوجية والمادية للتحقق من صحة وضع Clone Conting فى مكانة الصحيح فى التتابعات الجينومية.

وقد تبين أن الخرائط المبنية على اساس STS ذات أهمية خاصة إذ انها يتم تحديدها بكل من التخريط الوراثى والمادي معا مما يعنى انه يمكن استخدامها لتثبيت Anchor Clone Contig على خريطة الجينوم مما يساعد على تحديد مكان الـ Contig على الكروموسوم.

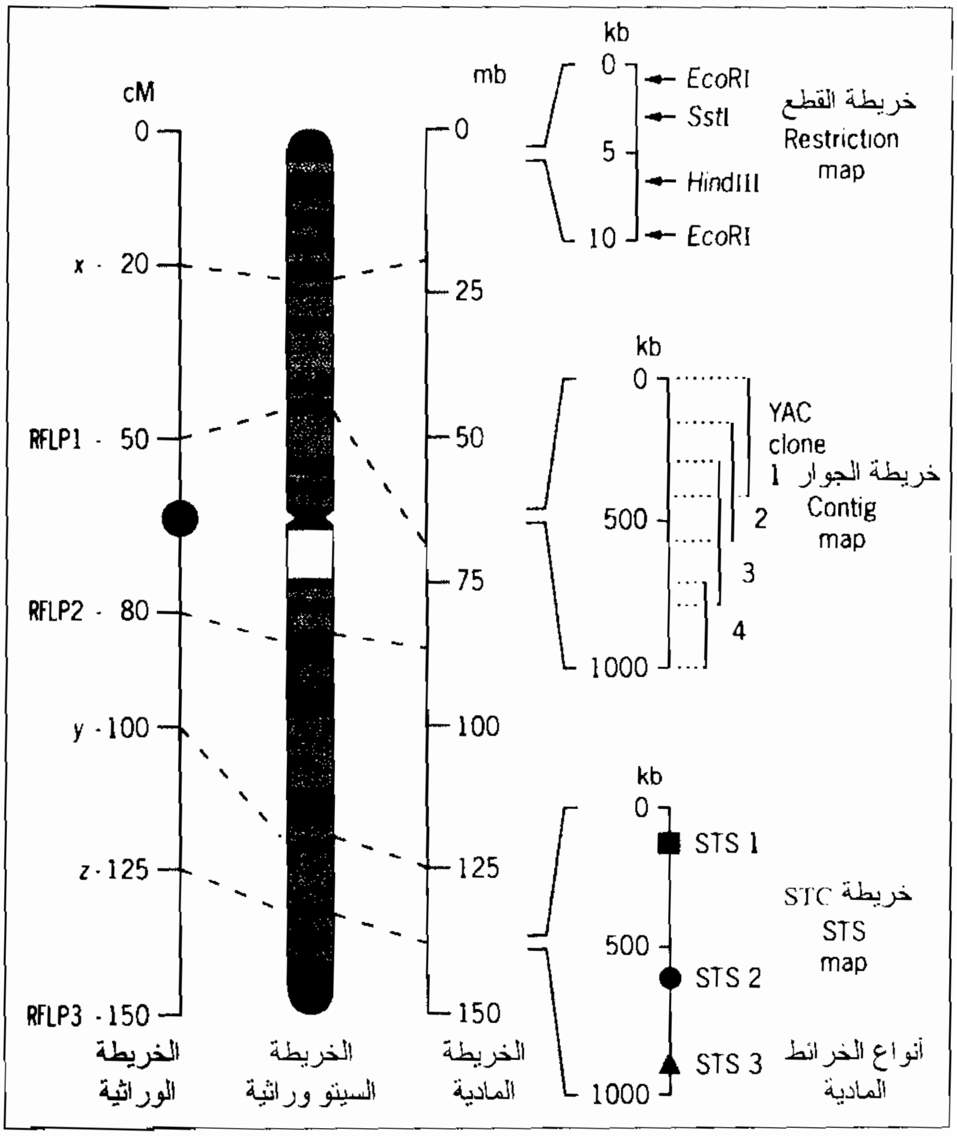
ويمكن الحصول على الخرائط الوراثية Genetic Map بتحديد المسافات الوراثية من نسب العبور الوراثى فى النسل الناتج من التهجين بين آباء متفارقة فى صفة ما، او فى حالة الانسان عن طريق تحليل شجرة النسب Pedigree Analysis أو بإستنباط كشافات جزيئية DNA Markers مثل RFLP أو SSR أو SNP.

أما الخرائط المادية Physical Map فيتم استنباطها من خلال تحديد مكان تتابع معين مثل (EST) على جزئ د.ن.أ الكروموسومى بطريقة FISH السابق شرحها.

وعندما يتم رسم الخريطة المادية لكروموسوم ما فإنه يجب ربطها بالخرائط الوراثية والسيتووراثية Cytogenetic. ويتم تحديد التلازم بين الخرائط

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الوراثية والمادية بتعيين موضع الكلونات على الخريطة المادية لجينـــات ســبق معرفة موقعها على الخريطة الوراثية (الشكل ١٣-٨).



الشكل (١٣-٨): التلازم بين الخرائط الوراثية والسيتووراثية والمادية للكروموسوم

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ويطلق على الجينات المشتركة فى مواقعها بين الخرائط الوراثية والخرائط المادية اسم جينات "وتدية" Anchor لأنها تثبت أو تربط الخريطة المادية بالخريطة الوراثية والعكس صحيح. وكما سبقت الاشارة اعلاه فإن خرائط STS تكون اكثر الخرائط المادية والوراثية التى يمكن أن توفى بهذا الغرض.

وترجع أهمية اللجوء إلى هذه الخرائط للمساعدة فى بناء تتابعات د.ن.أ للجينوم وخاصة فى الجينومات الكبيرة الحجم مثل تلك الموجودة فى الكائنات مميزة النواة لأنها تستخدم كدليل Guide لمراجعة عملية تجميع التتابعات والتأكد من أن هذه العملية قد تمت بطريقة صحيحة من خلال تجميع الاعداد الكبيرة من التتابعات القصيرة الناتجة من جهاز تحليل التتابعات الاوتوماتيكى (بطول حوالى ٧٠٠ نيوكلتيدة لكل تتابع قصير). وإذا حدث أن كشاف ما Marker تم استنباطة بالخرائط الوراثية أو المادية وظهر فى التتابع الجينومى فى موقع غير متوقع فإن ذلك يعنى أنه قد حدث خطأ فى تجميع التتابعات بحيث يجب أن يعاد النظر فى مثل هذه الحالة لتصحيح هذا الخطأ.

دراسة ما بعد الجينوميا Post-Genomics:

إن استكمال عملية تحليل تتابعات الجينوم ما هى إلا بداية، إذ انه يتعين تحديد مواقع الجينات والتعرف على وظيفة كل جين وهى عملية ليست سهلة وذلك حتى فى حالة الجينومات التى تمت دراستها باستفاضة بطرق التحليلات الوراثية وتقنيات كلونة الجينات.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فعلى سبيل المثال، فقد أظهر تحليل تتابعات فطر الخميرة *S.cervisiae* والتى تعد من افضل الكائنات التى تمت دراستها، أن هذا الجينوم يحتوى على حوالى ٦٠٠٠ جين منها ٣٦٠٠ جين فقط هى التى تم تحديد وظائف لكل منهاإما على اساس دراسات سابقة تمت على الخميرة او لوجود جينات فى الخميرة متطابقة فى تتابعاتها مع كائنات آخرى. ومعنى ذلك أن هناك ٢٤٠٠ جين لم يتحدد لها وظيفة حتى الان ويطلق على مثل هذه الجينات Orphans "يتامى".

وهنا يأتى الدور الهام للمعلوماتية الحيوية Bioinformatics والتى يطلق عليها احيانا Molecnler Biology *In Silico* بحيث تساعد فى تعيين وظائف ممكنة لكثير من هذه الجينات.

تحديد موقع الجين فى تتابعات الجينوم:

يمكن بسهولة معرفة موقع الجين إذا كانت تتابعات الاحماض الامينية للبروتين الناتج من هذا الجين معروفة مما يسمح بالتنبؤ بالتتابعات النيوكلتيدية لهذا الجين أو إذا كان قد سبق تحليل تتابعات cDNA أو EST لهذا الجين.

إلا أنه فى كثير من الأحيان لا توجد معلومات مسبقة عن كثير من الجينات بحيث يمكن منها التعرف على التتابع الصحيح لهذه الجينات، وفى هذه الحالات فإن تحديد موقع الجين يكون صعباً حتى لو توفرت الخريطة التى يقع عليها. إن معظم الخرائط تتميز بدقة محدودة ويمكنها فقط التكهن بالموقع التقريبى للجين تاركه مئات من كيلو قاعدة أو أكثر للبحث عنها، وكثير من الجينات لا تظهر على الخرائط نظراً لأن وجودها ذاته غير متوقع، فكيف يمكن تحديد مثل هذه الجينات فى تتابعات الجينوم؟

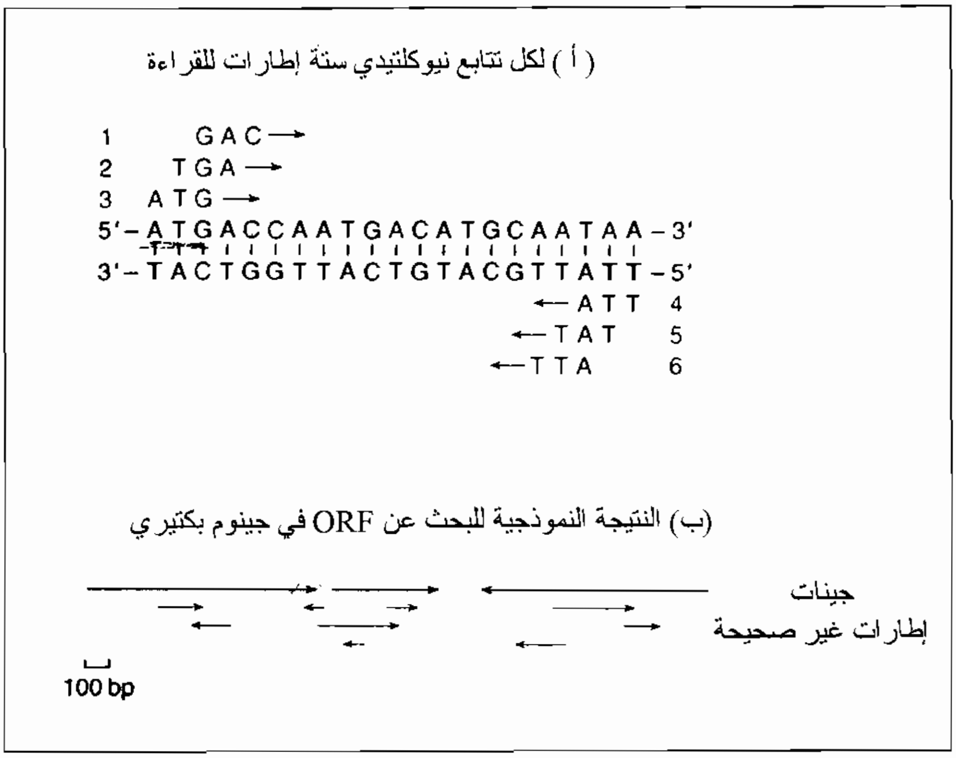
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

البحث عن اطار قراءة مفتوح:

Searching For Open Reading Frame (ORF):

أن تتابع د.ن.أ للجين عبارة عـن ORF أى مكـون مـن سلـسلة مـن الكودونات الثلاثية تبدأ بكودون البدء (ATG) وينتهى بكودون الانهاء (TAA أو TAG أو TGA). يتم البحث عن ORF فى التتابعات الجينومية عادة بـالكمبيوتر، ويعتبر ذلك أول خطوة فى تحديد موقع الجين. ومن المهم أن يتم بحـث جميـع الاطارات الستة المحتملة لأن الجين يمكن ان يتجه فى أى من الاتجاهين علـى طول جزئ د.ن.أ ثنائى السلسلة (الشكل ١٣-٩-أ) وفى حالة الجينوم البكتيـرى فإن النتيجة ستكون التعرف على ORF طويل نسبيا الذى يتكـون غالبـاً مـن الجينات، مع وجود بعض ORF's القصيرة الموجودة جزئيـاً أو كليـاً داخـل الجينات ولكنها تقع فى ORF مختلفـة (الـشكل ١٣-٩-ب) وهـذه التتابعـات القصيرة تمثل بالتأكيد تباديل نيوكلتيدية تكونت بالصدفة ولكنها لا تمثل جينـات حقيقية.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١٣-٩): البحث عن إطارات قراءة مفتوحة (ORF)

(أ) يوجد ستة ORF لكل تتابع من دن أ وقد يحتوى أى منها على جين.

(ب) نتيجة البحث عن ORF فى جينوم البكتريا.

تبين الأسهم إتجاه الجينات و التتابعات ORF غير الصحيحة.

تعد عملية تحديد موقع الجين فى مميزة النـــواة أصـــعب بكثيـــر، إذ أن جينومات مميزة النواة تحتوى على قدر كبير جداً من د.ن.أ المتكرر Repetitive وكذلك على أعداد كبيرة من الانترونات متخللة للجينات. ويؤدى ذلك إلى أنـــه عند فحص التتابعات سنجد الكثير من ORF's القصيرة التى لا يمكن اهمالها فقد امكن فى جينوم الخميرة مثلا التعرف على اكثر من ٤٠٠ ORF's قصيرة والتى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

اعتبرت تمثل جينات حقيقية ومن المحتمل أن تمثل بعض هذه ORF القصيرة جينات إلا أن الغالبية منها ليست جينات حقيقية.

التمييز بين الجينات الحقيقة وORF العشوائية:

تحتوى بعض الجينومات وخاصة الجينوم البشرى وغيره من الفقاريات على بعض الادلة التي تساعد على التعرف على ORF الخاص بجين فعلى وتمييزه عن ذلك الذى يمثل ORF عشوائى ويتم استبعاده ومن هذه الأدلة ما يلى:

١- CpG Islands: حيث وجد فى الجينوم البشرى أن حوالى ٥٠-٦٠% من الجينات تحتوى على منطقة غنية فى تتابعات G.C ويطلق عليها جزر CpG Island وغالباً ما تمثل نقطة بداية الجين.

٢- تحيز الكودون Codon bias: يمكن استخدام ظاهرة تحيز الكودون كوسيلة مفيدة للتعرف على الجين. إذ أن المعروف أن جميع الاحماض الامينية ماعدا الميثيونين والتريتوفان يشفر لها بكودونين أو أكثر، فعلى سبيل المثال نجد أن الحامض الامينى الانين Alanine يتم تشفيره بأربعة كودونات: GCA, GCC, GCG, GCT وفى معظم الجينومات لايتم استخدام جميع الكودونات الأربعة بنفس المعدل، ففى الانسان مثلا، تبين وجود تحيز نحو استخدام الكودون GCC بمعدل يزيد أربعة اضعاف عن GCG، وعلى ذلك إذا حصلنا على ORF يحتوى على تكرار عالى High Frequency من الكودونات النادرة فإن الاحتمال الاقوى هو انه لايمثل جين بشرى فيتم استبعاده.

٣- البحث عن درجة التطابق Homology Search: فى خطوة تالية للتعرف المبدئى على جين ما يتم البحث عن مدى التطابق بين تتابعات هذا الجين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المبدئى (ORF) مقارنة مع جميع التتابعات الجينية المتوفرة فى قاعدة بيانات د.ن.أ العالمية باستخدام برامج كمبيوتر متخصصة وتشمل المقارنة ليس فقط الجينات المعروفة للكائن تحت الدراسة ولكن جينات اخرى من جميع الانواع الاخرى.

ويقصد بذلك انه إذا تشابة جينان من كائنين مختلفين فى تتابعات النيوكلتيدات فقد يتشابهان ايضا فى الوظيفة مما يعكس تاريخهما التطورى المشترك.

ولإجراء اختبار التطابق يتم عادة ترجمة تتابعات النيوكلتيدات للجين المبدئى إلى ما يقابلها من الاحماض الامينية باستخدام قاموس الشفرة الوراثية حيث أن ذلك يؤدى إلى زيادة كفاءة البحث عن التطابق نظراً لاننا نتعامل هنا مع ٢٠ حامض امينى فى حين انه فى حالة التتابعات النيوكلتيدية سيكون التعامل مع ٤ قواعد فقط أى أن فرصة حدوث خطأ فى تتابع حامضين أمينين ستكون (١/٢٠) أى ٥% فى حين يرتفع هذا الاحتمال الخاطئ ليصل إلى (١/٤) أى ٢٥% فى حالة استخدام التتابعات النيوكلتيدية.

وتتم هذه التحليلات من خلال شبكة الانترنت بالاتصال بموقع لاحدى الشبكات الدولية الخاصة بقواعد بيانات د.ن.أ واستخدام برنامج بحث متخصص مثل BLAST (Basic Local Alingnment Search Tool) وأذا اعطت النتيجة تتابعات لإكثر من ٢٠٠ حامض أمينى فى الطول ونسبة تشابة Identity ٣٠% أو أكثر مع تتابع ما فى قاعدة المعلومات (بمعنى أن ٣٠ من كل ١٠٠ موقع يوجد بها نفس الحامض الامينى فى كلا التتابعين) ، فإن التتابعين غالبا ما يكونا متطابقين وبالتالى يكون ORF تحت الدراسة قد تم التحقق من أنه جين حقيقى.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ولزيادة التحقق يمكن اجراء اختبارات النسخ والترجمة المعملية *In Vitro* للتأكد من أن الجين سيتم نسخة إلى RNA وبروتين على التوالى.

تحديد وظيفة جين غير معروف:

Determining The Function of an Unknown Gene

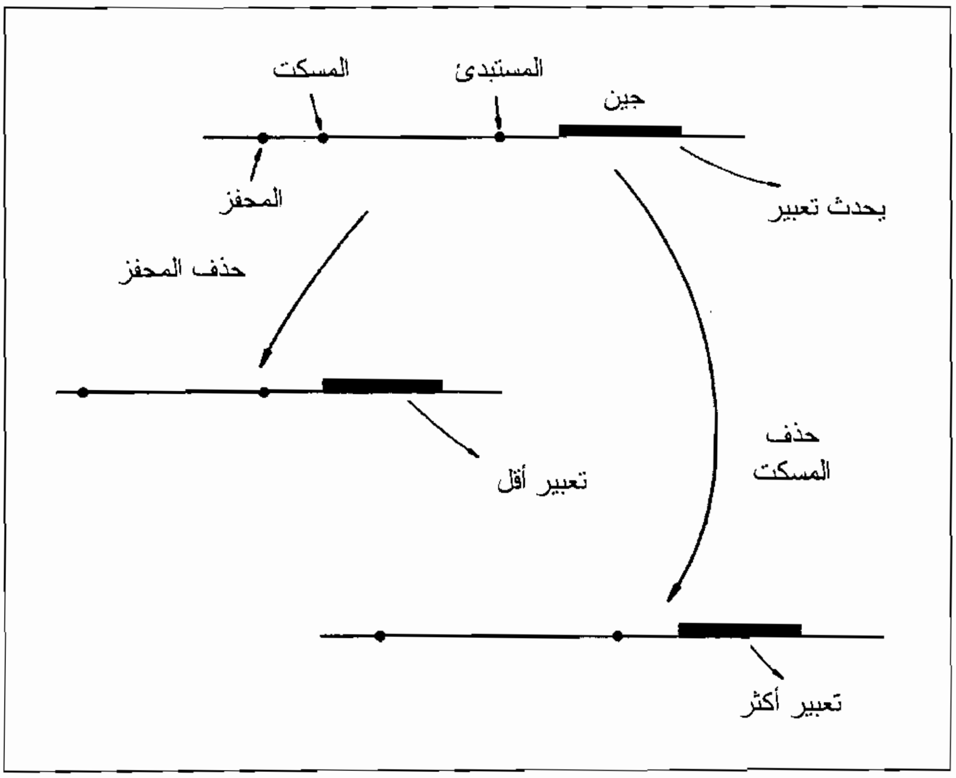
هناك احتمالات كبيرة فى أن يتم من خلال المعلوماتية الحيوية Bioinfomatics و Homolgy Search التوصل إلى تحديد وظيفة للجين غير المعروف وظيفته (orphan) خاصة عندما تتوفر معلومات عن العلاقة بين تركيب البروتين ووظيفته. وعموماً يوجد حتى الان طرق عديدة لدراسة وظيفة الجين.

تحديد التتابعات التنظيمية للجين بتحليلات الحذف:

Idintifying Control Sequences by Deletion Analysis:

يمكن بتحليلات الحذف التعرف على كل من مواقع ووظائف التتابعات النيوكلتيدة التى تتحكم فى تعبير الجين. وتعتمد هذه التقنية على افتراض أن حذف التتابع التنظيمى المتحكم في تعبير الجين سيؤدى إلى تغيير فى الطريقة التى يحدث بها تنظيم تعبير جين مكلون يتحكم فيه هذا التتابع التنظيمى (الشكل ١٣-١٠). فمثلا إذا تم حذف تتابع مثبط للتعبير فى جين ما، فإن ذلك سيؤدى إلى ارتفاع معدل تعبير هذا الجين. ومن جهة اخرى يمكن التعرف على التتابعات التنظيمية النوعية والمتخصصة فى تغيير التعبير الجينى فى نسيج معين Tissue-Specific حيث أن حذفها سيؤدى إلى أن الجين المستهدف سيتم تعبيره فى انسجة اخرى غير النسيج المتخصص النوعى.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

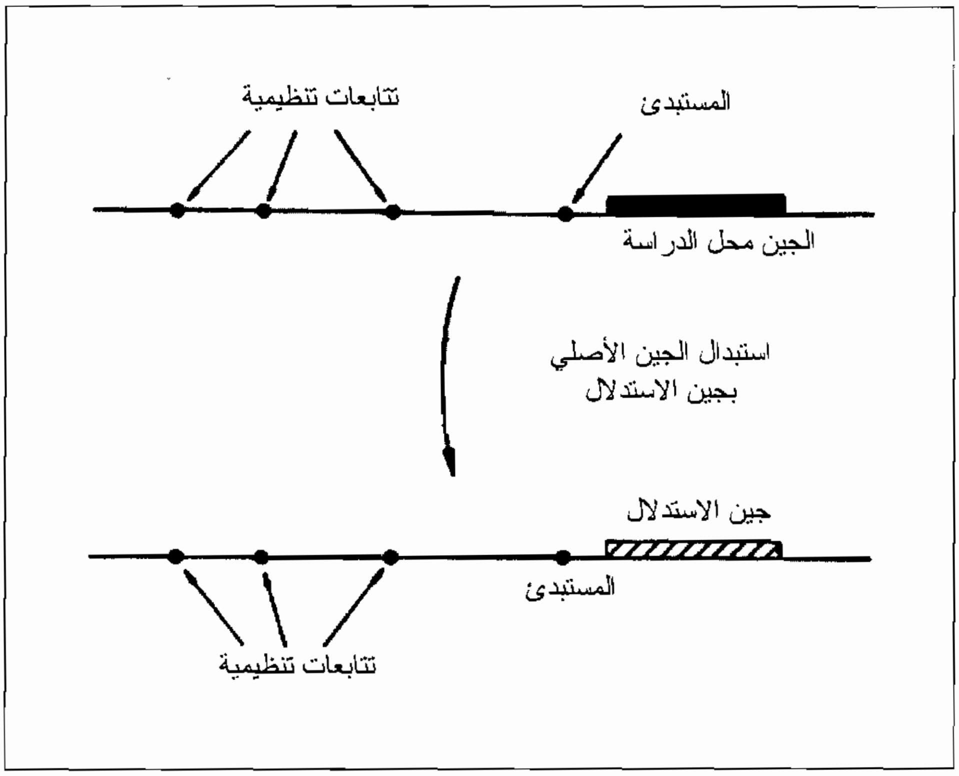


الشكل (١٣-١٠): الأساس فى تحليلات الحذف

وتستخدم تقنية جين الإستدلال Reporter Gene فى تحديد التتابعات التنظيمية التى يتم حذفها ومتابعة تأثير غيابها على تعبير الجين المكلون. والغرض من استخدام Reporter gene هو سهولة متابعة التغير الحادث فى طراز التعبير للجين المكلون وتمييزة عن الطراز الطبيعى للتعبير للنسخة الاصلية للجين قبل الحذف. وجين الإستدلال Reporter Gene عبارة عن جين اختبارى يرتبط بالمنطقة القبلية Upstream Region للجين المكلون (الشكل ١٣-١١) بحيث يحل محل الجين نفسه. وعند ادخاله إلى الكائن المضيف فإن طراز تعبير الجين التقريرى سيقلد بالضبط تعبير الجين الاصلى نظرا

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

لأن الجين التقريرى يكون تحت تأثير نفس التتابعات التنظيمية مثل الجين الاصلى.



الشكل (١٣-١١): جين الإستدلال Reporter gene

ويجب اختيار الجين التقريرى بعناية بحيث يستوفى بعض الشروط الاساسية التالية:

١- أن يشفر هذا الجين لطراز مظهرى مختلف ولا يوجد مثيل له فى الكائن المضيف.

٢- أن يتم التعرف بسهولة على الطراز المظهرى الجديد فى الكائن المضيف.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٣- يفضل أن يكون فى الامكان تقدير هذا الطراز المظهرى كميا.

وقد أمكن تحديد عدد من الجينات التقريرية لدراسة التنظيم الجينى الجدول (١).

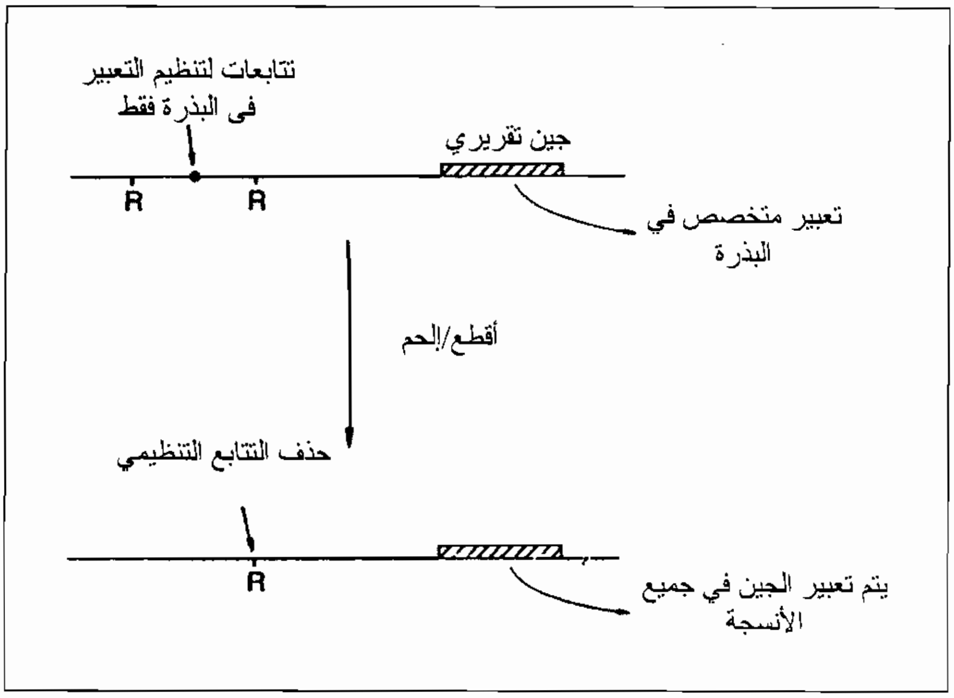
الجدول (١) بعض نماذج للجينات التقريرية المستخدمة فى دراسة التنظيم الجينى فى الكائنات الراقية

الجين	نواتج الجين	التحليل assay
LacZ	ß- galactosidase	اختبار كيماوى هستولوجى
Neo	Neomycin phosphotranseferase	مقاومة المضاد الحيوى كاناميسين
cat	Chloramphenicol acetyltransferase	مقاومة المضاد الحيوى كلورامفينيكول
Lux	Lucifenase	انبعاث ضوئى حيوى Bioluminoscence
urid A	ß- glucouronidase (GUS)	اختبار كيماوى هستولوجى

اجراء اختبار الحذف:

بعد اختيار الجين التقريرى وانتاج التركيب المعاد صياغته، يمكن اجراء الحذف فى المنطقة القبلية Upstream لهذا التركيب باحدى طرق الحذف كما فى الشكل (١٣-١٢).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١٣-١٢): تحليلات الحذف: يتم ربط جين الإستدلال Reporter Gene (التقريري) بالمنطقة السابقة Upstream لجين متخصص يشفر لأحد بروتينات البذرة فى النبات. أدت إزالة الشظية المحصورة بين موقعى R إلى حذف التتابع التنظيمى الذى يحدد تعبير الجين فى البذرة بحيث يحدث تعبير لجين الإستدلال فى أنسجة النبات المختلفة

يلى ذلك دراسة تأثير الحذف بعد إدخال التركيب فى الكائن المضيف وتقدير طراز ومعدل تعبير الجين التقريرى فإذا حدثت زيادة فى التعبير فإن ذلك يعنى أنه قد حدثت إزالة لتتابع مثبط أو مسكت Silencing، فى حين أن حدوث انخفاض فى معدل التعبير يعنى حذف منطقة منشط أو محفز. أما إذ نتج عن الحذف تغيير فى التخصص النسيجى Tissue Specificity فإنه يشير إلى أن المنطقة المستهدفة بالحذف تمثل تتابعاً تنظيمياً متخصص فى الاستجابة فى نسيج نوعى Tissue- Responsive.

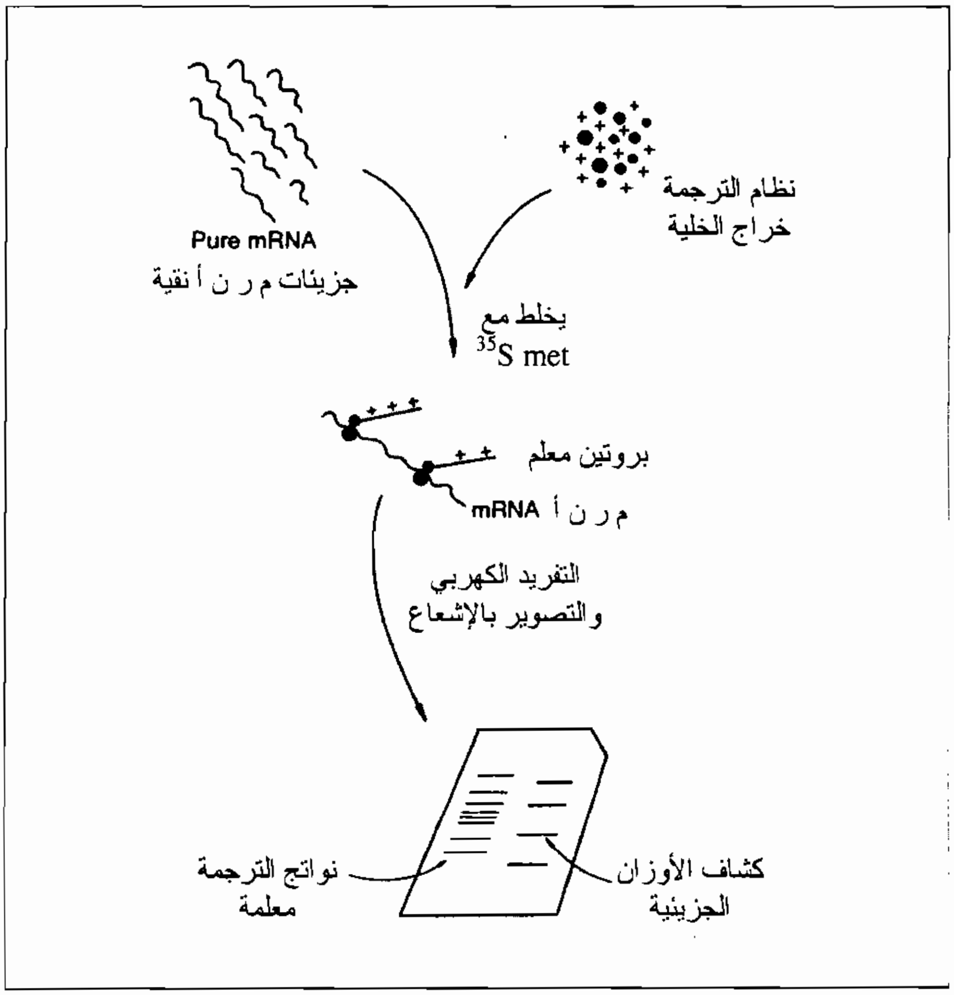
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تحديد نواتج ترجمة جين مكلون:
Identifying The Translation Product of a Cloned Gene:

توجد تقنيتين رئيسيتين للتعرف على نواتج ترجمة الجين المكلون وهما hybrid-release translation (HRT) أى ترجمة ر.ن.أ المحرر من الهجين و hybrid-arrest translation (HART) أى ترجمة ر.ن.أ المرتبط بالهجين وكلا التقنيتين تعتمدان على قدرة من م. ر.ن.أ النقى على إدارة بناء البروتين فى نظام ترجمة بدون خلية Cell-Free System أى فى انبوبة الاختبار *In Vitro* وفى وجود تحضير يحتوى على جميع العناصر والمكونات اللازمة لإجراء هذة الترجمة مثل tRNA والريبوسمات وغيرها من المكونات . ويمكن الحصول على المكونات اللازمة للترجمة المعملية هذه من حبوب القمح أثناء انباتها أو من خلايا الأرنب Reticulocytes والتى تكون نشطة بدرجة عالية فى عملية بناء البروتين .وتتم عملية الترجمه خارج الخلية عند اضافة عينة من م. ر.ن.ا. الى نظام الترجمة خارج الخلية هذا مع مخلوط من ٢٠ حامض أمينى بحيث يكون حامض الميثيونين معلم بالكبريت المشع (^{35}S).

وتتم ترجمة جزيئات م. ر. ن. أ إلى مخلوط من البروتينات المشعة (الشكل ١٣-١٣) والتى يمكن فصلها بالتفريد الكهربى وفحصها بالتصوير الاشعاعى الذاتى. وتكون كل حزمة ممثلة لبروتين معين مشفر بواسطة احد جزيئات م. ر.ن.أ الموجوده فى العينة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

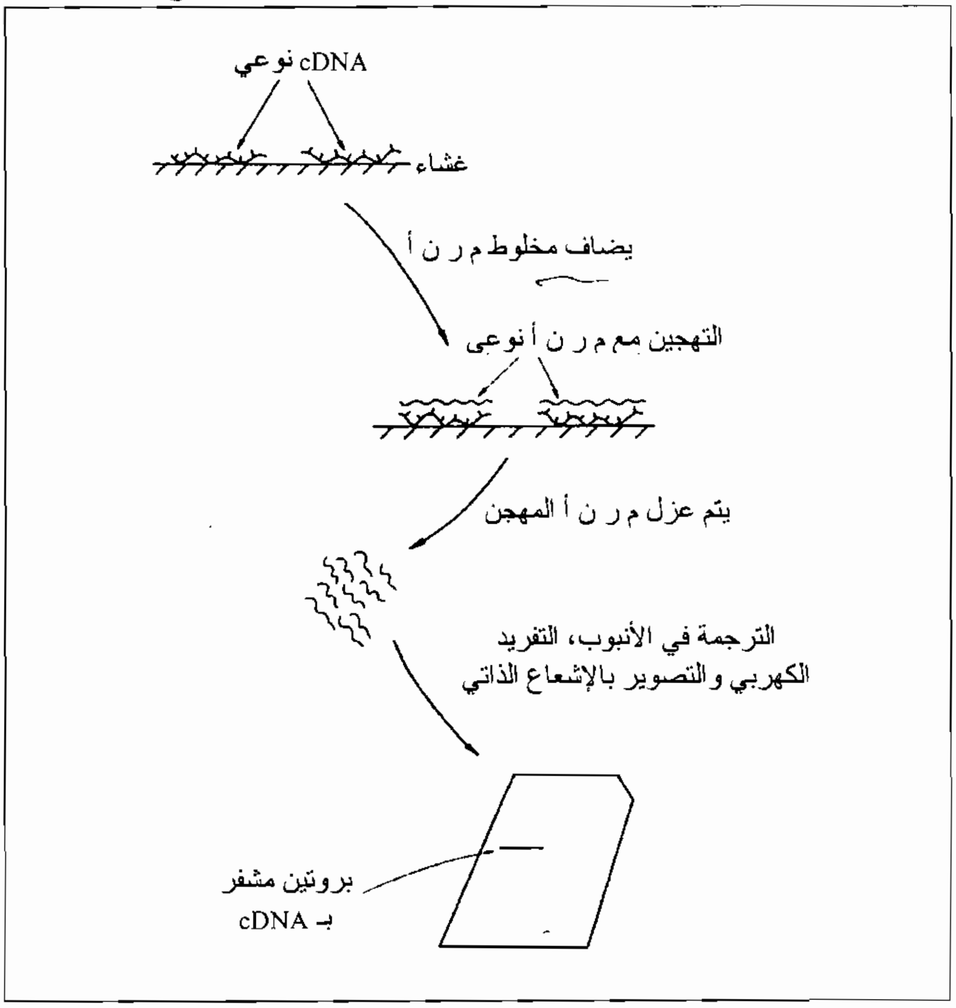


الشكل (١٣-١٣): الترجمة خارج الخلية (فى الأنبوب *In Vitro*)

ويستخدم فى كلا التقنيتين كلون cDNA محضر مباشرة من عينة م.ر.ن.أ تحت الدراسة ويستخدم كواسمة قابضة Catching Probe. وفى تقنية HRT تـتم دنترة cDNA ويثبت على غشاء نيترو سيليولوز أونايلون ويحضن مـع عينـه م.ر.ن.أ المراد اختبارها (الشكل ١٣-١٤). وفى هذه الاثناء يحدث التهجين بين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

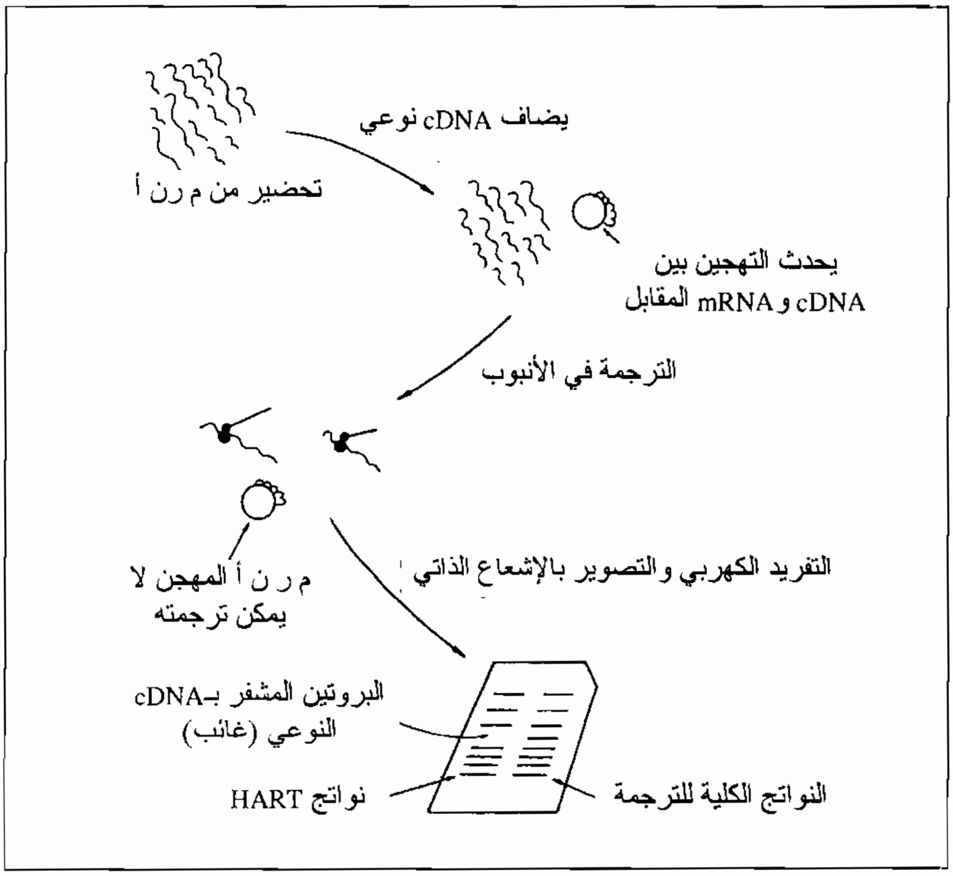
م.ر.ن.أ مع مقابلة من cDNA ويبقى ملتصقا بالغشاء. وبعد إزالة الجزيئات الحره يتم استعادة م.ر.ن.أ المهجن وتتم ترجمته فى نظام خارج الخلية وينتج عن هذه الترجمة عينة وحيدة نقية من البروتين فى صورة الاشعاع الذاتى.



الشكل (١٣-١٤): الترجمة بتقنية تحرير الهجين Hybrid Release (HRT)

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أما فى تقنية (HART) فيكمن الفرق فـــى أن cDNA المـــدنتر يـــضاف مباشرة إلى عينة م.ر.ن.أ (الشكل ١٣-١٥) ويحدث التهجين هنا ايـــضا بـــين cDNA ومقابلة من م.ر.ن.أ إلا انه فى هذه الحالة لا تتم إزالـــة م.ر.ن.أ غيـــر المرتبط (الحر).



الشكل (١٣-١٥): الترجمة بتقنية تقييد الهجين Hybrid arrest (HART)

وبدلاً من ذلك تتم ترجمة العينة بأكملها فى نظام خـــارج الخليـــة وهنـــا لا يستطيع م.ر.ن.أ المرتبط بالتهجين أن يدير عملية الترجمة مما يـــؤدى إلـــى

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ترجمة جميع أنواع م ر ن أ فى العينة إلى بروتينات ماعدا البـــروتين المـــشفر بالجين المكلون. أى يتم تحديد بروتين الجين المكلون بأنه ذلك البـــروتين الـــذى تغيب حزمته من صورة الاشعاع الذاتى.

تحليل البروتينات باستخدام الطفرات فى الأنبوب (معمليا):

Analysis of Proteins by *In Vitro* Mutagenesis

على الرغم من أن كلا من HART, HRT يمكنها التعرف علـــى نـــواتج الترجمة للجين المكلون، إلا أنها تكون قاصرة عن اعطاء معلومات عن البروتين نفسه. ومن الامور الهامة معرفة العلاقة بين تركيب البروتين ووظيفتة. ويمكـــن دراسة هذه العلاقة باستحداث طفرات فى الجين المشفر لهذا البروتين ثم متابعـــة تأثير تغيير تتابعات الاحماض الامينية على خواص ونشاط النـــاتج البروتينـــى. وتوجد تقنيات مختلفة لاستحداث الطفرات إلا أن طريقة الطفرة الموجهة للموقع Site-Directed Mutagenesis هى التقنية المفضلة للحصول على طفرة فـــى أى موقع محدد على الجين لاحداث طفرة القاعدة الواحدة Point Mutation.

وفى هذه الطريقة تتم كلونة الجين المستهدف فى صورة سلسلة مفردة فى ناقل الكلونة M13.

وتكون الخطوة الأولى هى عزل وتنقيـــة سلـــسلة د.ن.أ مفـــرده للجـــين والتعرف على تتابعات المنطقة المطلوب استحداث طفرة فيها.

ثم يتم بنـــاء سلـــسلة قـــصيرة مـــن أوليجونيوكلتيـــد مكملـــة لتتابعـــات للمنطقة المستهدفة إلا انها تحتوى على النيوكلتيدة المغايرة المرغوبـــة (الـــشكل ١٣-١٦-أ).

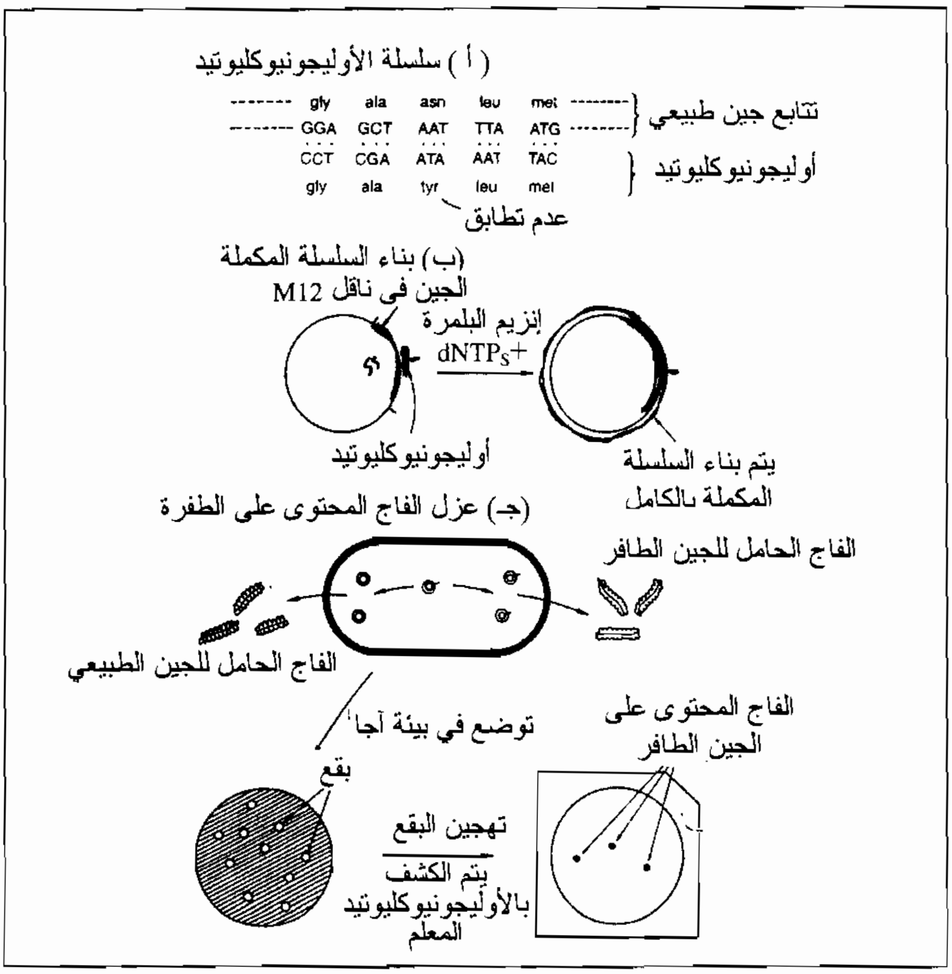
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وبالرغم من وجود درجة من عدم التطابق، فإن شظية الأوليجو ستتهجن مع د.ن.أ. وحيد السلسلة وتعمل كبادئ Primer لبناء سلسلة مكملة باستخدام شظية كلينو من انزيم DNA Pol 1 (الشكل ١٣-١٦-ب). ويستمر هذا التفاعل البنائى إلى أن يتم بناء سلسلة جديدة كاملة ويصبح الجزئ المعاد صياغته ثنائى السلسلة تماماً.

يجرى بعد ذلك إدخال لجزئ د.ن.أ الناتج فى خلايا بكتريا القولون حيث يؤدى تناسخة إلى انتاج نسخ عديدة من جزئ د.ن.أ المعاد صياغته. وطبقاً لطريقة شبة المحافظة لتناسخ د.ن.أ فإن نصف عدد جزيئات د.ن.أ الثنائية السلسلة الناتجة تكون غير طافرة فى كلا من السلسلتين بينما النصف الاخر سيكون طافرا وبذلك يكون نصف نسل الفاج يحمل نسخا من الجزيئات غير الطافرة والنصف الاخر يحمل جزيئات طافرة. وتزرع الفاج الناتج من خلايا بكتريا القولون على بيئة اجار صلبة لانتاج بقع plaques ويكون نصف عدد البقع Plaques محتوية على جزئ د.ن.أ المعاد صياغته الاصلى بينما النصف الاخر يكون محتويا على النسخ الطافرة. ويتم التعرف على البقع المحتوية على الجزئ الطافر باستخدام واسمة معلمة من الاوليجو الذى سبق استخدامه اعلاه (الشكل ١٣-١٦-جـ).

ومن خصائص الخلايا المحتوية على M13 انها لا يحدث لها تحلل Lyse وإنما تستمر فى الانقسام، وبذلك يمكن للجين الطافر أن يتم تعبيره فى خلايا بكتريا القولون المضيفة للحصول على بروتين معاد صياغته. ويمكن تنقية هذا البروتين من الخلايا ودراسة خواصة. ويمكن بهذه التقنية معرفة تأثير استحداث طفرة القاعدة الواحدة على معدل نشاط البروتين.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٣- ١٦): تقنية الطفرة الموجهة للموقع (Site -Directed)

هندسة البروتين Protein Engineering:

لقد قدمت تقنية الطفرة الموجهة الموقع Site-Directed Mutagenesis امكانات هائلة سواء فى مجال البحوث الاساسية أو فى البحوث التطبيقية. فمثلا يمكن الآن دراسة كيف يؤثر تركيب البروتين على فعل الانزيم

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Enzyme Action. وفى الماضى كان هذا ممكنا من خلال تحليلات بيوكيماوية مطولة وشاقة للتوصل إلى معلومات عن تحديد الاحماض الامينية التى تلعب دوراً فى تحديد الارتباط بمادة التفاعل والوظائف الحفزية فى جزئ الانزيم. والآن ومن خلال تقنية الطفور الموجه يمكن تحديد دور كل حامض أمينى على حده فى نشاط الانزيم.وذلك عن طريق استبداله بحامض أمينى آخر ودراسة تأثير ذلك على نشاط الانزيم. وقد أدى ذلك إلى إحداث تقدم هائل فى طريقة فهم الحفز البيولوجى Biological Catalysis وادى إلى نشأة مجال جديد يسمى هندسة البروتين Protein Engineering والتى تستخدم فيه تقنيات الطفور الموجه لاستنباط انزيمات جديده لاغراض بيوتكنولوجية. فعلى سبيل المثال ، إدى تبديل تتابعات الاحماض الامينية عند النيوكلتيدة رقم ٢٢٢ فى الجين المشفر لانزيم Subtilisin (الموجود فى المنظفات الصناعية لغسيل الملابس) إلى إحلال حامض الالانين محل حامض الميثونين بعد أن تبين أن الاخير يتأكسد عند استخدام الماء الساخن كما يتأثر باستخدام المبيضات مثل Chlorax وقد أدى هذا الاحلال الى انتاج انزيم Subtilisin مهندس وراثياً ويتحمل الحرارة العالية ولايتأثر كثيراً بالكلوراكس.

دراسة تفاعلات البروتينات:

Studying Protein-Protein interactions:

وجد فى الخلايا الحية أن قليل جداً من البروتينات يمكن ان تقوم بوظائفها فى عزله تامة عن بقية البروتينات، ولكن معظمها يعمل معا فى المسارات البيوكيماوية وفى المعقدات البروتينية الكبيرة. ويمكن معرفة وظيفة بروتين ما لم تسبق دراسته وذلك عن طريق تحديد أى بروتينات أخرى يعمل معها فى الخلية. وتستخدم تقنيتين هامتين للوصول إلى ذلك وهما:

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

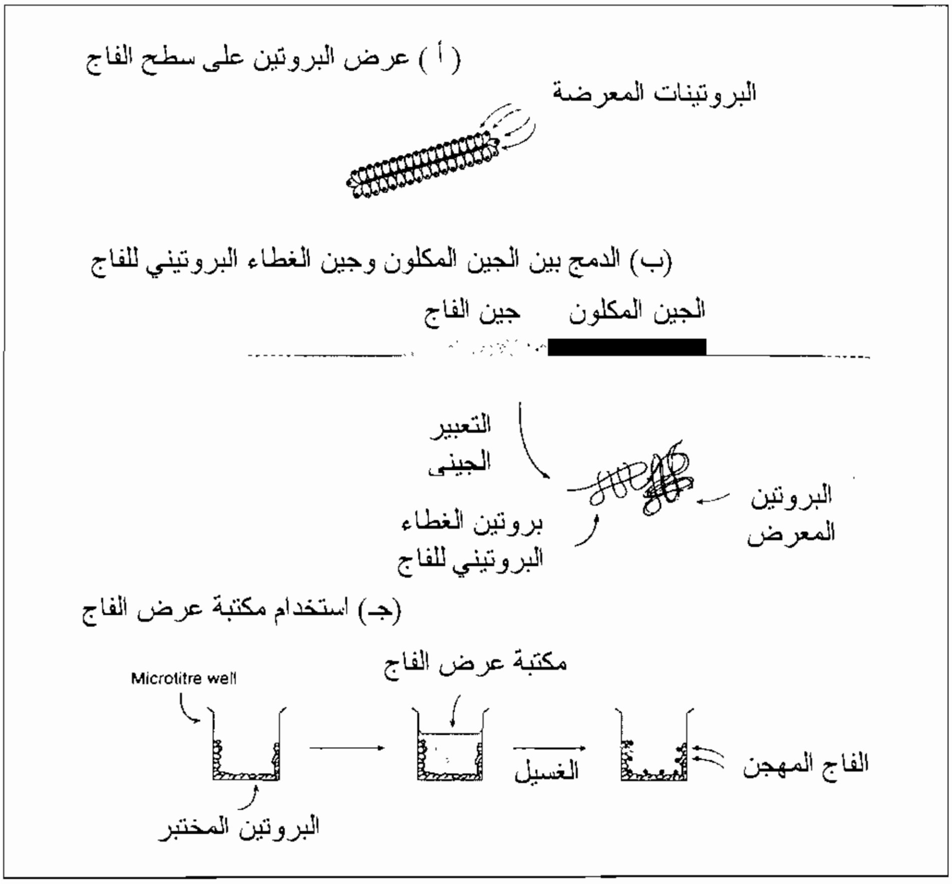
- استعراض الفاج Phage Display.
- ونظام الهجينين فى الخميرة Yeast-Two Hybrid System.

أولاً: استعراض الفاج Phage Display:

وقد سميت هذه التقنية بهذا الاسم لأن البروتين يتم عرضه علـى سـطح البكتريوفاج M13 (الشكل ١٣-١٧-أ) ويحدث ذلك بكلونة الجين المشفر لهـذا البروتين فى الناقل M13 بحيث يحدث اندماج بين الجين المكلون مع جين الفاج الخاص ببروتين الغطاء Coat Protein (الشكل ١٣-١٧-ب) وبعد ادخال الجين المكلون فى خلايا بكتريا القولون يقوم الجين المندمج Fused Gene بإدارة عملية بناء بروتين هجينى مكون جزئيا من بروتين الغطاء وجزيئـاً مـن البـروتين المكلون ويبرز البروتين الهجينى من غطاء الفاج بحيث يصبح البروتين المكلون معرضا على سطح الفاج مما يعطى الفرصة لدراسته.

وتجرى هذه التقنية عادة مع مكتبة عرض الفاج Phage Display Library مكونة من عدد كبير من الفاج المعاد صياغته وكل منه يعرض بروتين مختلف. ويمكن تحضير مكتبات كبيرة مكونة من كلونات من مخلوط مـن cDNA مـن نسيج معين أو حتى بكلونة شظايا د.ن.أ الجينومية. وتتكون المكتبة مـن فـاج عارضا مدى واسع من البروتينات المختلفة والتى تستخدم للتعرف علـى تلـك البروتينات التى تتفاعل مع البروتين المختبر. ويتم تثبيت البروتين فى Wells of a Microtitre Tray أو على حبيبات يمكن استخدامها فى عمود كرومـاتوجراف يتم خلطها بمكتبة عرض الفاج (الشكل ١٣-١٧-ج) ويمثل الفاج الـذى يظـل ملتصقا بالميكروتيتر تراى بعد سلسلة من الغسيل هـو الفـاج الـذى يعـرض البروتين الذى يتفاعل مع البروتين المختبر المثبت فى جوانب الوعاء Tray.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٣-١٧): عرض الفاج Phage Display

أ – **عرض البروتينات على سطح فاج خيطى معاد صياغته.**

ب– **الاندماج الجينى المستخدم فى عرض البروتين.**

ج– **طريقة الكشف عن التفاعل بين البروتين المختبر و مكتبة عرض الفاج.**

ثانياً: نظام الهجينين فى الخميرة Yeast-Two Hybrid System:

تعتمد هذه التقنية على اكتشاف أن التعبير الجينى فى فطر الخميرة يعتمد على التفاعل بين ازواج من عوامل النسخ (الشكل ١٣-١٨-أ) وفى هذا النظام يتم تبديل زوج من عوامل النسخ مسئوله عن تعبير جين معين فى الخميرة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويحل محله بروتينات مندمجة Fusion Proteins وبحيث يكون كل بروتين مكون جزيئاً من أحد عاملى النسخ وجزيئاً من البروتين المختبر وتقـــاس قـــدره زوج البروتينات المندمجة هذه على إدارة تعبير الجين المستهدف فى الخميرة.

ولاجراء هذا الاختبار، لابد من اجراء تجربتى كلونة فى الخميرة وتشتمل التجربة الأولى على الجين المشفر للبروتين المراد اختباره ويتم دمج هذا الجين مع الجين الخاص بإحد زوجى عوامل النسخ ويلحـــق هـــذا التركيـــب بكلـــون الخميرة.

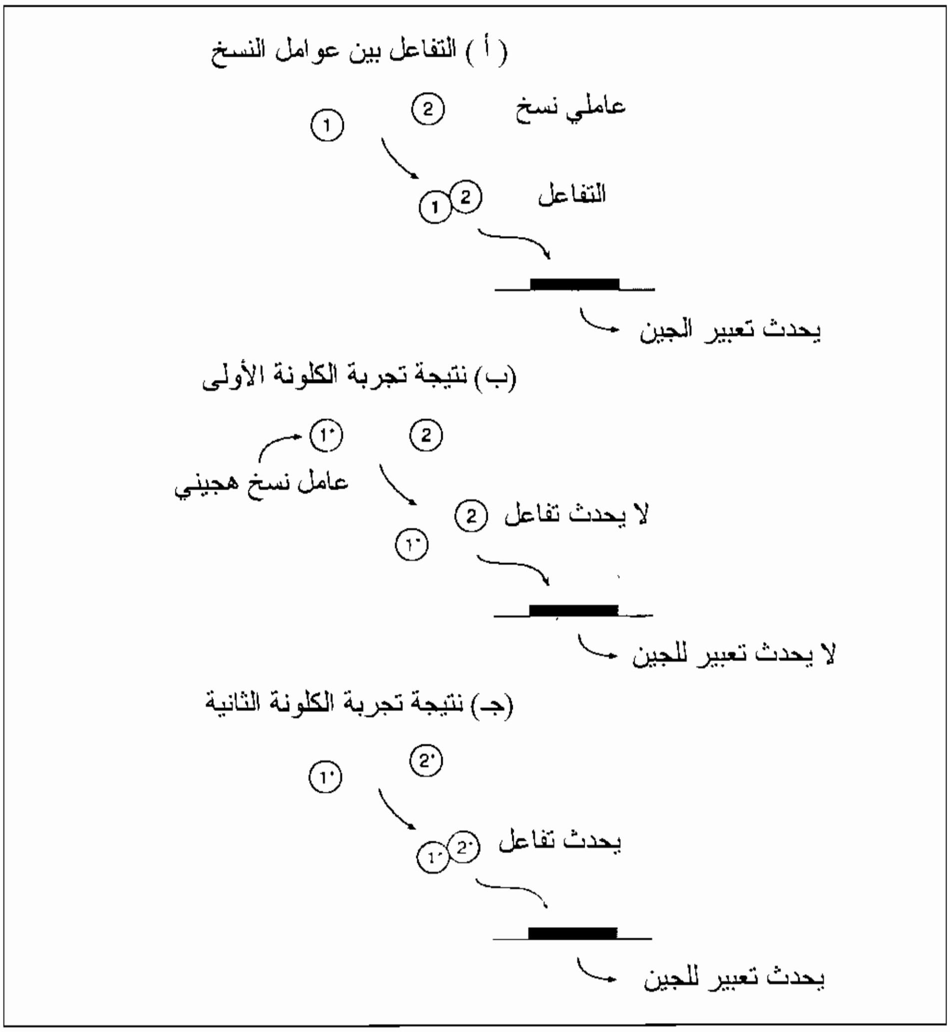
ولا تستطيع الخميرة المعاد صياغتها هنا أن يـــتم فيهـــا تعبيـــر الجـــين المستهدف نظراً لأن عامل النسخ المعدل هنا لايمكنه التفاعل مع قرينه (الشكل ١٣-١٨-ب)

وفى تجربة الكلونة الثانية يتم تكوين نسخة هجينية لعامل النـــسخ الآخـــر (القرين) ويكلون فى الخميرة.

ويدل استعادة تعبير الجين المستهدف على أن عـــاملى النـــسخ الهجينـــين يمكنها التفاعل مع بعضها البعض.

ويجب أن يتم الإتصال بين الجين المستهدف وعاملى النسخ بطريقة معينة بحيث أن هذا التفاعل يتم بين مكونات البروتينات المختبره فى الهجن البروتينيه وليس بين قطع بروتينات عوامل النسخ (الشكل ١٣-١٨-جـ). وبعد ذلك يـــتم تعريف ازواج البروتينات المتفاعلة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٣-١٨): نظام الهجينان فى الخميرة Yeast-Two Hybrid System

أ - زوج من عوامل النسخ التى يجب أن تتداخل حتى يمكن حدوث التعبير الجينى.

ب- إستبدال عامل النسخ (١) ببروتين هجينى *١ يؤدى إلى منع التعبير الجينى لأن *١ لا يمكنه التفاعل مع العامل (٢).

ج- إستبدال العامل (٢) بالبروتين الهجينى *٢ ممايؤدى إلى إستعادة التعبير الجينى إذا تمكن الجزء الهجينى من *١ و*٢ من التفاعل.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

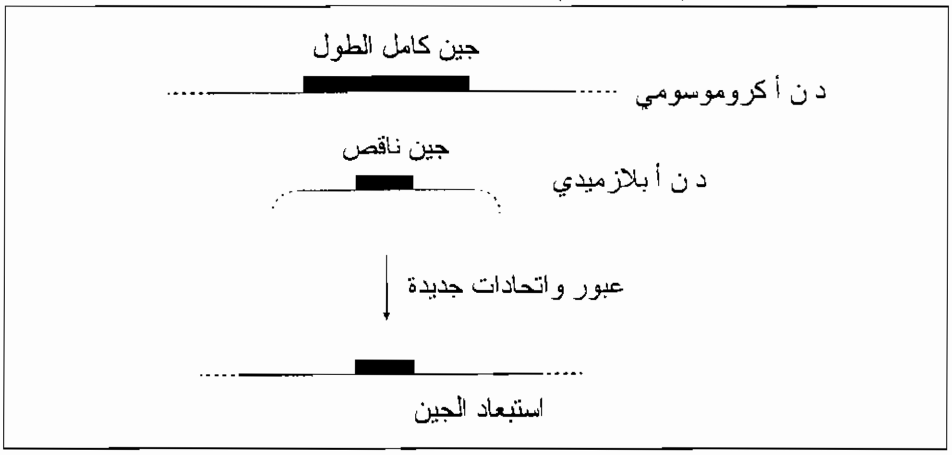
ويمكن أن تشتمل تجربة الكلونة الثانية على مكتبة من الجينـــات المعدلـــه تمثل بروتينات مختلفة بحث يمكن اختبار أحد البروتينات مقابل بروتينات أخرى كثيرة فى هذا النظام.

ثالثا : تقنيات اسكات التعبير الجيني Gene Silencing:

١ - *Gene Knockout*:

ويتم فى هذه التقنية استخدام نسخة منقوصة Deleted للجـــين "للـــتخلص Knockout من النسخة الفعاله الموجودة فى كروموسوم الكائن وبذلك يتم الحكم على وظيفة هذا الجين نتيجة لغياب هذه الوظيفة بعد هذه الازالة للنسخة الفعالـــة له.

اذ يحدث نتيجة للاتحادات الجديـــدة Recombination بـــين الجـــين المنقـــوص والنسخة الكاملة الكروموسومية أن يحل الأول محل الثـــانى (الـــشكل ١٣-١٩) ويتم بعد ذلك تقييم تاثير هذا التخريب علـــى الطـــراز المظهـــرى Phenotype للكائن لمعرفة الوظيفة(الغائبة هنا).



الشكل (١٣-١٩): حذف الجين (Knockout) بإتحادات جديدة بين نسخة كروموسومية للجين ونسخ ناقصة (Deleted) فى بلازميد الكلونة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويستخدم Knockout الفأر للاستدلال على ما يقابلها فى الجينات البشرية حيث يحتوى الفأر على نسخة ناقصة للجين وقد ساعدت هذه التقنية على تحديد وظائف لعدد من الجينات إلا أن هناك بعض المشاكل التى قد تنشأ فى هذا الشأن فمثلا بعض عمليات الاستبعاد Knockout قد لا يكون لها تأثير واضح على الطراز المظهرى للكائن ويكون ذلك إما نتيجة لأن هذا الجين يمكن الاستغناء عنه بمعنى أنه حتى بعد أيقاف نشاطه يمكن لجينات آخرى تعويض غيابه، أو أن التغير المظهرى ضعيف وغير محسوس لدرجة أنه لايمكن التعرف عليه.

٢ - *إيقاف تعبير نسخ m RNA بتقنية siRNA and Gene Knockdown:*

وهى من أحدث التقنيات لدراسة وظيفة الجين Gene Function وتعتمد هذه التقنية على إدخال سلسلة تركيبية Synthetic مزدوجة قصيرة من ر.ن.أ يتراوح طولها بين ٢١-٢٣ نيوكليوتيد بحيث يكون تتابع النيوكلتيدات فيها مكملاً لنسخة mRNA المراد إيقاف تعبيرها ولذلك يطلق على هذه التقنية Post Transcriptional Gene Silencing (PTGS) أى تثبيط تعبير الجين بعد النسخ حيث تستخدم إحدى سلسلتى siRNA فى توجيه RISC إلى mRNA المستهدف بحيث يتم تدميره بإنزيمات ريبونيوكليز. ويتكون RISC من معقد ريبونيوكليزى كبير يطلق عليه RNA Induced Silencing Complex ويتحد مع هذه المعقد جزئ siRNA. ويحتوى RISC على نشاط إنزيم RNase III وإنزيم Helicase الذى يقوم بفصل سلسلتى siRNA. وقد أدى إستنباط هذه التقنية إلى سهولة دراسة وظيفة الجين Gene Function بطريقة سريعة ودقيقة وغير مكلفة. وتتميز هذه التقنية بإمكان الكشف عن وظيفة أى جين الذى يتم تعبيره سواء فى طراز نوعى من الخلايا أو فى مسار أيضى نوعى. فقد أمكن مثلا بهذه التقنية

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

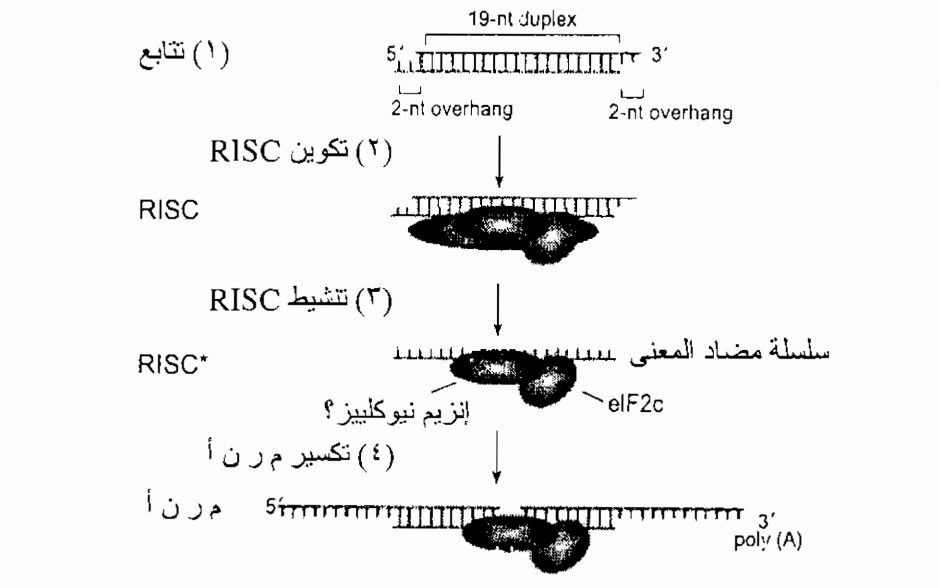
تحديد وظائف معظم الجينات فى جينوم C.Elegance وعددها ١٩ ألـــف جـــين. ويبين الشكل (١٣-٢٠) ميكانيكية هذه التقنية ويتطلب نجاح هذه التقنية مراعـــاة المتطلبات التالية:

١- دقة إختيار تتابع siRNA المكملة لنسخة mRNA المستهدفة.

٢- بناء siRNA أو تكوين بلازميدات معاد صياغتها تحتوى على تتابع د.ن.أ المشفر لجزئ siRNA.

٣- إختيار الطريقة المثلى لإنتقال Transfection جزئ siRNA أو البلازميـــد المشفر له فى الخلايا المستهدفة.

٤- متابعة Monitering فعالية إسكات تعبير الجين Gene Silencing.



الشكل (١٣-٢٠): إزالة تعبير الجين (Knockdown) بتقنية SiRNA

١- إدخال جزئ siRNA. ٢- تكوين المعقد RISC.

٣- إنفصال سلسلتى siRNA بإنزيم هيليكيز و تنشيط RISC.

٤- تقوم إحدى سلسلتى siRNA بتوجيه RISC إلى م ر ن أ المستهدف لتدميره.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أولاً: إختيار التتابع الصحيح لجزئ siRNA:

تبين أن هناك شروط يجب استيفاءها لإختيار جزئ siRNA أهمها:

١- إختيار التتابع المكمل لجزئ mRNA بحيث يكون على بعد Downstream من ٥٠-١٠٠ نيوكلتيدة من كودون بدء الترجمة.

٢- يجب أن لا يشمل هذا التتابع المناطق غير الشفرية سواء على النهاية 5'UTR او 3'UTR.

٤- أن يكون محتوى جزئ siRNAمن GC يتراوح بين ٣٠-٧٠%.

٥- الطول الأمثل لجزئ siRNA هو ٢١ نيوكلتيدة بحيث تكون أحدى السلسلتين فيه محتوى على تتابع AA(N)19TT بحيث تمثل N أى نيوكلتيدة حسب التتابع المكمل فى mRNA المراد إبطال تعبيره فى حين تكون نيوكلتيدين على الجانبين من نوع Uridines مفردتين ومكونة Overhang كما يجب أن تحتوى النهايتين على مجموعة 5'phosphate ، 3'oH.

ثانيًا: إختيار أنسب ناقل تعبير Expression Vector:

وجد أن أفضل ناقل للتعبير يستخدم فيه الوحدات التنظيمية لإنزيم بلمرة ر.ن.أ. RNA pol III والتى تسمح بتعبير siRNA فى جميع الانسجة. ويستخدم ناقل التعبير PDECAP بنجاح فى كثير من الكائنات مميزة النواة.

ثالثًا: إختيار الطريقة المثلى لنقل جزئ siRNA إلى الخلايا المستهدفة (العدوى) Transfection:

توجد وسائل عديدة لإحداث عملية النقل Transfection بنجاح منها إستخدام الحبيبات الليبوسومية Liposomes لتغليف جزئ siRNA أو البلازميد

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الخاص به أو بإجراء عملية Electroporation "الإختراق الكهربى" أو بإستخدام قاذفة الجينات Biolistic Gun فى حالة الخلايا النباتية.

رابعًا: متابعة تأثير siRNA على إبطال تعبير mRNA:

يتم التحقق من نجاح siRNA فى تثبيط (Knockout) تعبير جين معين بإستخدام تقنية النقل الغربى Western Blot و Immunofluorescence بإستخدام الإجسام المضادة النوعية Specific Antibody للبروتين المستهدف كما يمكن متابعة ذلك من غياب الطراز المظهرى phenotype للصفة وكذلك من تحليلات النقل الشمالى Northern Blot حيث تغيب حزمة م.ر.ن.أ المستهدفة.

دراسة المحتوى النسخى والمحتوى البروتينى للجينوم:

Transcriptome and Proteome:

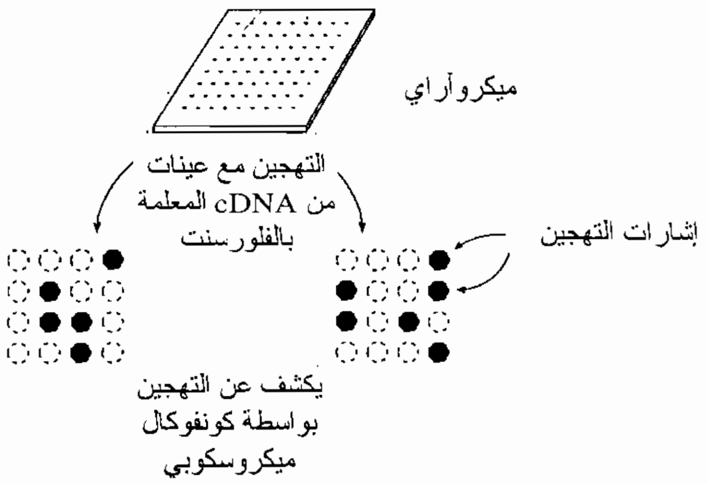
كما سبق القول يمكن تعريف المحتوى النسخى Transcriptome بأنه محتوى الخلية من جزئيات ر.ن.أ والذى يعكس الطراز العام للتعبير الجينى فى هذه الخلية.

فى حين يعرف المحتوى البروتينى Proteome بأنه محتوى الخلية من البروتينات والذى يعبر عن قدراتها البيوكيماوية.

وقد نشأت تقنية دراسة المحتوى البروتينى Transcriptome بداية كجزء من المشروع البحثى لدراسة ما بعد الجينوميا فى فطر الخميرة. وفى هذه التقنية يتم اجراء نوع متطور Sophisticated من تحليلات التهجين وفى هذه الدراسة وضعت عينات من الكلونات الفردية لكل من الجينات الخاصة بالخميرة وعددها ٦٠٠٠ جين مكلون على شريحة زجاجية فى مصفوفات رأسية وأفقية ٨٠×٨٠

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويسمى هذا التحضير Microarray. ولتحديد أى من هذه الجينات يكون نشطاً فى خلايا الخميرة نامية تحت ظروف إجهاد معينة (جفاف أو حرارة أو نقص مغذيات الخ)، يستخلص م.ر.ن.أ من هذه الخلايا المعرضة لهذا الاجهاد ويحول هذا م. ر.ن.أ إلى cDNA الذى يعلم بالفلورسنت ويهجن مع عينات الجينات المكلونة فى الـ Microarray (الشكل ١٣-٢١) ويتم تحديد أين حدث التهجين حسب اشارات الفلورسنت التى يتم التعرف عليها باستخدام Confocal Microscope. والكلونات التى تعطى اشارات تدل على أن هذه الجينات بالذات هى التى كانت نشطة تحت ظروف الاجهاد محل الدراسة ويمكن تكرار التجربة مع cDNA اخر مستخلص تحت ظروف اجهاد اخرى.



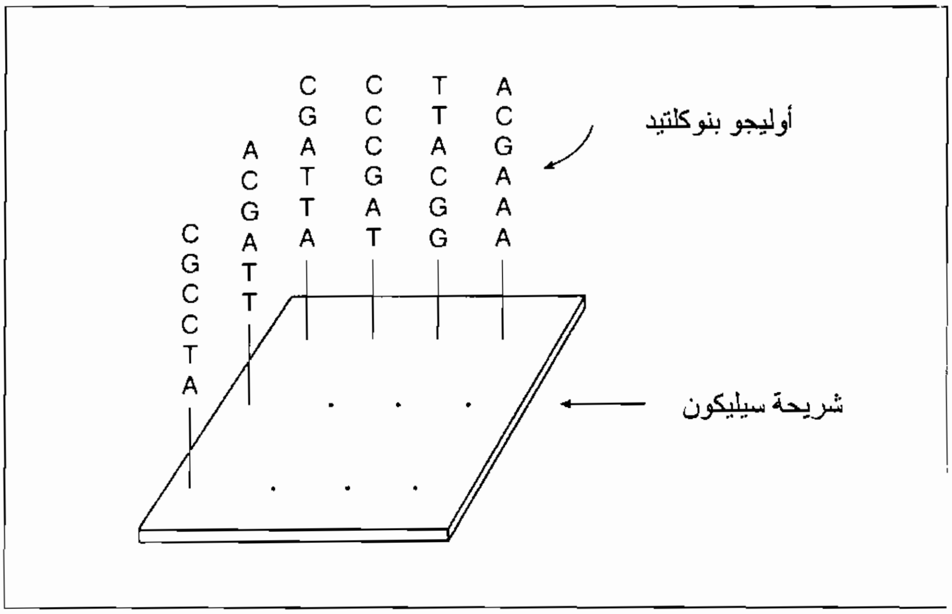
الشكل (١٣-٢١): تحليلات الميكرو أراى Microarray. فى هذا المثال حدث تهجين بين الميكروأراى مع تحضيرين مختلفين من cDNA بحيث يكون كل منهما معلم بكشاف فلورسنتى مختلف اللون .ويتم تحديد الكلونات التى تتهجن مع cDNA بالفحص المجهرى Confocal Microscopy

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تستخدم Microarray حالياً للتعرف على التغيرات التي تحدث في المحتوى النسخي لعدد كبير من الكائنات وفي بعض الحالات تستخدم نفس الاستراتيجية المستخدمة في الخميرة، إلا أن ذلك يكون ممكنا فقط في حالة الكائنات المحتوية على عدد قليل نسبياً من الجينات. يمكن استخدام Microarray لمسح جميع الجينات البشرية بحيث يمكن القيام بها على ١٠ شرائح ١٨×١٨ ملمتر إلا أن تحضير كلونات لكل من ٣٠-٤٠ الف جين سيكون عملا شاقاً. ومن حسن الحظ أن ذلك قد لايكون ضرورياً. فمثلاً لدراسة التغيرات في المحتوى النسخي الذي يحدث كنتيجة للسرطان، يمكن تحضير Microarray باستخدام مكتبة cDNA من نسيج طبيعي. وعند التهجين مع cDNA معلم مستخلص من النسيج السرطاني يمكن معرفة اي من الجينات حدث لها زيادة في النشاط Up-Regulation وأي منها حدث لها انخفاض في النشاط Down- Regulation استجابة للاصابة بالسرطان.

وإلى جانب الـ Microarray تم استحداث تقنية ذات امكانيات واسعة اكبر بكثير يطلق عليها DNA Chips وهي عبارة عن رقائق من السليكون تحمل اعداد كبيرة جداً من نيوكلتيدات الاوليجو (بطول ٢٠-٣٠ نيوكلتيدة) والتي يتم بناؤها مباشرة على سطح الرقائق والتي يمكن تحضيرها بكثافة تصل إلى مليون أوليجو لكل سنتيمتر مربع وهي كثافة أعلى بكثير مما في Microaarray العادية (الشكل ١٣-٢٢) ويتم تحديد مواقع التهجين بين الـ Oligonucleotide والواسمات (cDNA المعلم) الكترونياً. وحيث أنه يتم تحضير أوليجونيوكلتيدات على الرقائق *de novo* باستخدام طريقة أوتوماتيكية خاصة (Robot) فإنه يمكن عمل Chips لكل جين بشري أو أي كائن أخر بسهولة نسبية.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١٣-٢٢): شريحة د ن أ DNA Chip يمكن للشريحة الحقيقية حمل عدد أكثر بكثير من الأوليجونيوكلتيد عن المبين و يبلغ طول كل أوليجو حوالى ٢٠-٣٠ نيوكلتيدة

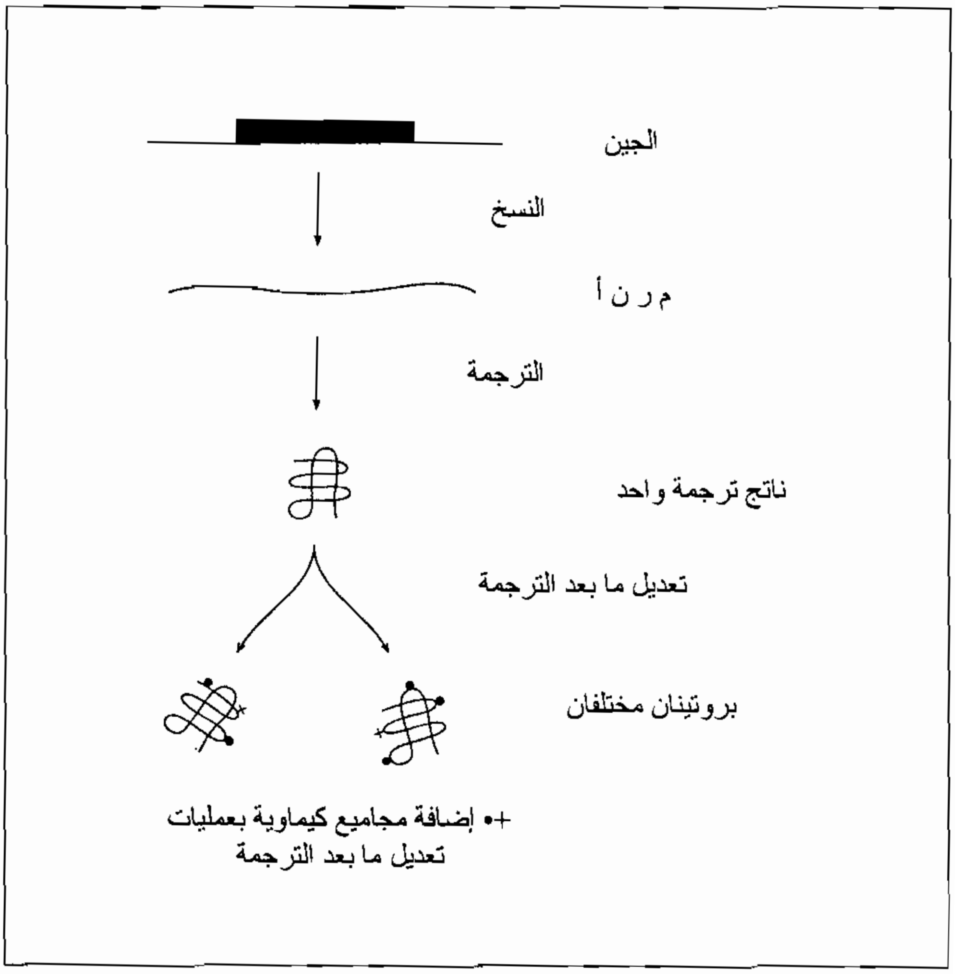
دراسة المحتوى البروتينى للخلية Proteome:

تؤدى دراسة المحتوى البروتينى للخلية إلى امدادنا بمعلومات اضافية عن وظائف الجينات و التى لا يمكن الحصول عليها من دراسة الـ Transoriptome فقط ، نظراً لان جزئ م.ر.ن.أ واحد يمكنه أن يعطى أكثر من نوع واحد من البروتين المتغاير نتيجة لتعديلات لاحقة للترجمة Post-Translational Processing (الشكل ١٣-٢٣).

ففى مميزة النواة نجد أن معظم البروتينات الناتجة من ترجمة م.ر.ن.أ معين قد يحدث لها عمليات تعديل لاحقة بإضافة مجموعات كيماوية مثل عمليات

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفسفرة Phosphorylation أو اضافة سكريات Glycosylation أو كبرته Sulphanation .. الخ. وذلك لكي تنشط هذه البروتينات وتتخصص في أداء وظيفة معينة.



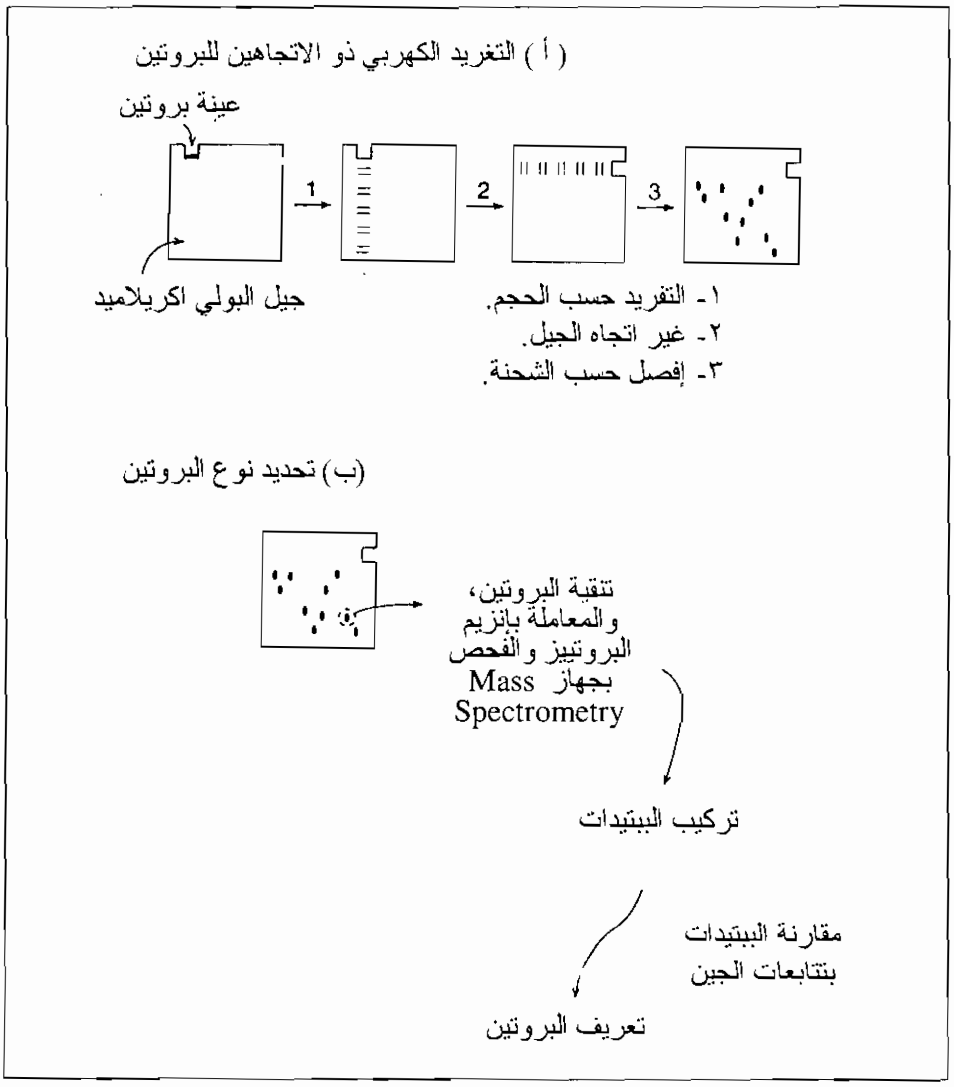
الشكل (١٣-٢٣): يمكن للجين الواحد أن يشفر لبروتينين مختلفين بوظائف مختلفة، إذا حدث تعديل للنسخة الأولية للبروتين بطريقتين مختلفتين من عمليات التجهيز بعد الترجمة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ولدراسة البروتيوم يتم أولاً فصل المحتوى البروتينى الكامل للخلية أو النسيج وذلك باستخدام تقنية التفريد الكهربى ذو الاتجاهين Two-Dimensional Electrophoresis وفى هذه التقنية يوضع البروتين فى مجرى Well فى احد جانبى جيل الاكرلاميد للتفريد الكهربى. يتم تفريدها فى هذا الاتجاه حسب اوزانها الجزيئية، ثم يدار الجيل بعد ذلك بزاوية ٩٠° ويجرى تفريد كهربى ثان وفى هذه الحالة يتم فصل حزم البروتينات حسب الشحنات الموجودة عليها. وتكون النتيجة هى الحصول على طراز تفريد كهربى ذو اتجاهين باحجام وأشكال وكثافات مختلفة، وتمثل كل بقعة بروتين مختلفة أو مجموعة متقاربة من البروتينات (الشكل١٣-٢٤-أ)، وتقدر الاختلافات بين البقع البروتينية عند مقارنة جيلين مختلفين.

ولتعريف البروتين الناتج فى بقعة معينة، يتم تنقية عينه منها من الجيل وتعامل بإنزيم Protease (Restriction Endoprotease) الذى يقطع سلسلة متعدد الببتيد عند تتابع معين للاحماض الأمينية (يشبه إلى حد كبير ما يحدث مع انزيمات القطع المحدده التى تقطع جزئ د.ن.أ عند تتابع معين) ويتم تحليل الببتييدات الناتجة عن التقطيع متبقية Mass Spectrometry (الشكل١٣-٢٤-ب) الذى يحدد تركيب الاحماض الامينية فى كل ببتيدة. وتكون هذه المعلومات كافية عادة لإمكان التعرف على الجين المشفر لهذا البروتين بالرجوع إلى تتابعات النيوكلتيدات فى الجينوم وباستخدام قاموس الشفرة الوراثية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٣-٢٤): تحليلات البروتيوم Proteome analysis

أ - جيل الأكريلاميد للتفريد الكهربائى للبروتين فى الإتجاهين Two-Dimensional.

ب- تحديد البروتين الموجود فى بقعة وحيدة بالمعاملة بإنزيم البروتييز يليه إستخدام تقنية Mass Spectrometry للببتيدات الناتجة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وتسمى هذه الطريقة Peptide Mass Fingerprinting (PMF). وللتــدليل على أهمية الطريقة فى التعرف على وظيفة الجين قام بعض العلمــاء بتطبيقهــا على بكتريا *Mycoplasma Genitalium* والذى يعتبر أصــغر جينــوم بكتيــرى (٠,٥٨ mb) فى محاولة للتعرف على الحد الادنى من التفاعلات البيوكيماويــة والأيضية التى يتطلبها النظام الحيوى. وباستخدام التفريد الكهربى ذو الاتجاهين 2D.Elecphophoresis أمكن التعرف على ٤٢٧ بقعة بروتينية على الجيل فــى طور Exponential Phase. وقد تم تحليل ٢٠١ بروتين منها والتعــرف عليهــا بطريقة (PMF) ومقارنتها ببروتينات معروفة. وقد تم التعرف من هذه التحليلات على ١٥٨ بروتين معروف (٣٣% من المحتوى البروتينى) فى حين ظــل ١٧ بروتين غير معروف. واشتملت البقع الباقية على شظايا مشتقه مــن بروتينــات أكبر أو صور مختلفة من نفس البروتين (مشابهات البروتين) ونــواتج معدلــه لاحقة للترجمة. وقد تضمنت البروتينات التى تم تحديــدها: انزيمــات خاصــة بالتفاعلات الايضية للطاقة وتناسخ د.ن.أ ونسخه وترجمته وكــذلك الانزيمــات الخاصة بنقل المواد خلال الغشاء البلازمى. وعندما تحولت الخلية البكتيرية إلى الطول Stationary Phase حدث انخفاض بنسبة ٤٢% فى المواد البروتينية التى تم بناؤها.

كما ظهرت بروتينات جديدة، فى حين حدثت تغيرات فى نسب بروتينات اخرى كثيرة. ويبدو أن هذه التغيرات نتجت عن نقص فــى بعــض المغــذيات وارتفاع الحموضة فى بيئة النمو والتأقلم مع بعض التغيرات البيئية. وقد ساعدت هذه النتائج على تحديد الحد الأدنى من التعبير الجينى الــذى يكــون ضــرورياً للمعيشة المستقلة للكائن والتغيرات التى تحدث فى التغيير الجينى التى تــصاحب التحول من طور Exponential إلى طور Postexponential. كما أظهرت النتائج

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

انه من غير المحتمل وجود ظروف يمكن أن يتم فيها تعبير جميـــع المحتـــوى البروتينى للخلية دفعة واحدة. حيث وجد أن ٣٣% فقط من هذا المحتـــوى تـــم تعبيره تحت الظروف المثلى لأقصى نمو.

ومن المحتمل أن ٦٧% الباقية عبارة عن بروتينات يمكن أن يتم تعبيرها تحت ظروف بيئية مختلفة.

وعموماً فإن تحليلات المحتوى البروتينى تقدم معلومات واسعة المدى عن التعبير الجينى والتى لايمكن الحصول عليها من التحليلات الجينومية فقط.

بعض المفاهيم الجديدة الناتجة عن التحليلات الجينومية:

Some New Concepts of Post-Genomics

أولاً: جينومات البكتريا الحقيقية Genomes of Eubacteria:

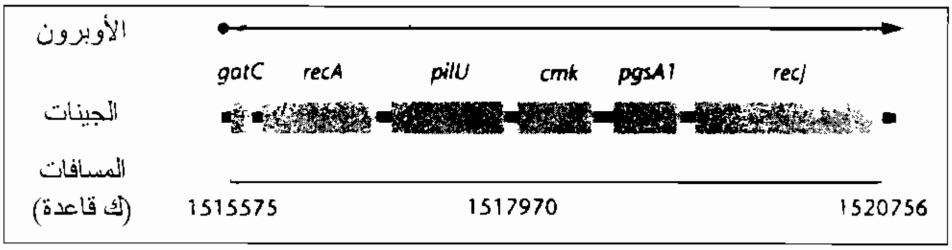
وجد فى بكتريا القولون ثلاث جينات متداخلة Overlapping Genes بـــين وحدات النسخ (الأوبرونات) وهى حالة نادرة إذ أن ذلك شائع فقط فى جينومات الفيروس.

وجد فى بكتريا القولون أن حوالى ٢٧% من وحدات النسخ تكـــون فـــى صورة أوبرونات (حوالى ٦٠٠ أوبرون).

وجد فى بكتريا *Aguifex aeolicus* أن معظم الجينات تكون فـــى صـــورة وحدات نسخ متعددة السسترونات Polycistronic والتى درجنا علـــى تـــسميتها بالاوبرون، إلا أن التعبير السائد بأن الاوبرون يحتوى علـــى جينـــات تركيبـــة مرتبطة بعلاقات وظيفية متقاربة وتتحكم فى مسار بيوكيماوى واحد لا ينطبـــق على هذا الكائن. فقد وجد أن احد الأوبرونات يحتوى على سته جينات تركيبيـــة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

لايربط بينها أى علاقة وظيفية إذ نجد أن جينين مختصين بإعادة اتحـــاد د.ن.أ DNA Recombination وجين واحد لبناء الليبيدات، وآخـــر لبنـــاء الاحمـــاض النووية وواحد لبناء البروتين وجين لحركة الخلية Motility كمـــا فـــى الـــشكل (١٣-٢٥).



الشكل (١٣-٢٥): أوبرون فى جينيوم بكتريا Aquifex Aeolicus. يحتوى هذا الابرون على جينات: لبناء البروتين (gatC) والإتحادات الجديدة فى جزئ د ن أ (recA) و(recJ) ولحركة البروتين(pilU) وللبناء الحيوى للنيوكلتيدات (pgsA1). ويختلف هذا التنظيم عن الفكرة التقليدية بأن الجينات فى الاوبرون تشفر لبروتينات تتحكم فى مسار بيوكيماوى مشترك

من المعروف أن معظم جينومات غيـــر مميـــزة النـــواة تحتـــوى علـــى كروموسوم واحد حلقى إلا أنه اكتشفت حالات يكون فيها الكروموسوم البكتيرى خطى Linear كما فى بكتيريا *Borrelia Burgdorferi* بالاضـــافة إلـــى بعـــض الانواع من Streptomyces.

لا شك أن الاهم أن الاكتشافات الخاصة بالبلازميدات تجعلنا نعيد النظـــر فى تعريف الجينوم البكتيرى بأنه يتكون من جزئ حلقى واحد من د.ن.أ.

إذ أنه من الشائع أن معظم البلازميدات تحمل جينـــات غيـــر ضـــرورية ويمكن نقلها من خلية إلى اخرى، كما أن نفس البلازميد يكون موجود غالباً فى بكتريا تنتمى إلى أنواع مختلفة مما أدى إلى الاعتقاد بأن جينـــات البلازميـــدات

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

لايجب اعتبارها ضمن الجينوم البكتيرى إلا أنه تبين أن بكتريا *B. Bursdorferi* تحتوى على حوالى ١٧ بلازميد والتى تحتوى على ٤٣٠ جين على الاقل ويبدو أن بعضها ضرورى حيث تشمل الجينات الخاصة ببناء البيورينات وبروتينات الغشاء البلازمى.

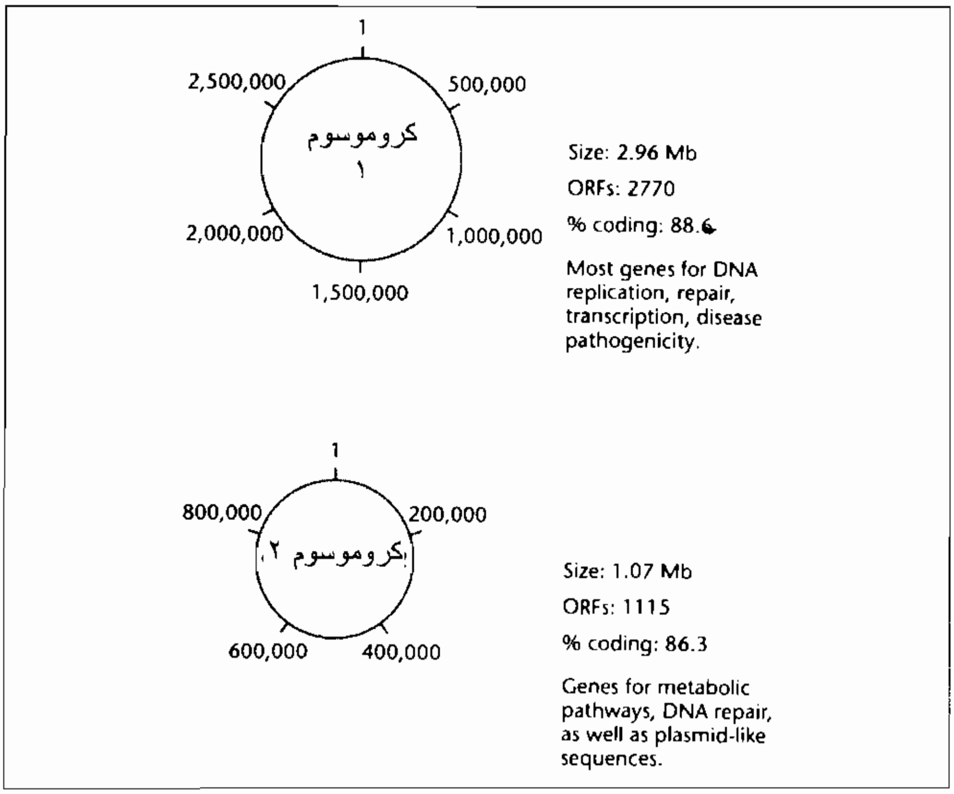
وقد تبين مؤخراً من تحليل تتابعات جينوم *Vibrio cholerae* المسبب لمرض الكوليرا، وجود كروموسومين حلقيين فى نفس الخلية البكتيرية (الشكل ١٣-٢٦) وتبين أن الكروموسوم رقم ١(2.96 Mb) يحتوى على ٢٧٧٠ إطار قراءة مفتوح (ORF) وان الكروموسوم رقم ٢ (1.07 Mb) يحتوى على ١١١٥ إطار (ORF) وبعضها يشفر لجينات ضرورية مثل البروتينات الريبوسومية ويبدو أن الكروموسوم ٢ مشتق من بلازميد اكتسبه نوع ابوى قديم Ancestral Species حيث تبين وجود كروموسومين فى أنواع اخرى من Vibrio.

إن إكتشاف وجود جينومات غير مميزة النواة ذات كروموسومات متعددة Multichromosomal بحيث يكون احد الكروموسومات مشتق من بلازميد يؤدى إلى عدة تساؤلات هامة:

فمثلاً متى يمكن اعتبار البلازميد كروموسوم، وما هى ميكانيكيات التنظيم التى تتحكم فى التغيير الجينى والمسارات الأيضية فى مثل هذه النظم البكتيرية متعددة الكروموسومات؟

إن الإجابة على هذه الاسئلة قد تؤدى إلى إعادة النظر فى كثير من المفاهيم الخاصة بجينومات غير مميزة النواة وقد تفتح المجال لمعرفة تطور الكروموسومات المتعددة فى جينومات مميزة النواة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٣-٢٦): يتكون جينوم بكتريا الكوليرا من كرموسومين ويحتوى الكروموسوم الأكبر (١) على معظم الجينات المسؤلة عن الوظائف الضرورية للخلية ولإحداث العدوى. بينمـــا تكـــون معظـــم الجينات فى الكروموسوم (٢) لم يعرف لها وظيفة.

وقد يدل التحيز فى المحتوى الجينى ووجود تتابعات مشابهة للبلازميد علـــى الكروموســـوم ٢علـــى أن هـــذا الكروموسوم كان فى الأصل بلازميد ضخم تم إحتوائه بواسطة نوع Vibrio قديم

ثانيًا: جينومات Archaea:

وهى أحدى ثلاث أقسام رئيسية فى الكائنات الحية (وكانت تسمى ســـابقا Archaebacteria) والقسمان الآخران هما Eubacteria (البكتريا الحقيقية والتـــى

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

لايوجد لها نواة محاطة بغـــلاف نـــووى مثـــل *Haemophilus* و *Mycoplasma*) والقسم الاخر هو Eukaria (وتحتوى على نواة محاطة بغلاف نووى حقيقى).

وكلا من Eubacteria و Archaebacteria تتبعـــان غيـــر مميـــزة النـــواة Prokaryotes أى انها لا تمتلك نواه وقـــد اعتبـــرت Archraebacteria حـــديثاً كمملكة منفصلة اعتمـــادا علـــى تحليـــل تتابعـــات د.ن.أ المـــشفر لـــــ ر.ن.أ الريبوسومى (rDNA) كما تم تأكيد ذلك مؤخراً بتحليـــل تتابعـــات البروتينـــات وتحليلات المسارات الايضية.

ومن جهة اخرى وجد أن جينات Archaea تتشابة كثيراً مع جينات مميزة النواة. فمثلاً وجد أن الجينات المشفرة لبناء ر.ن.أ، وبناء البروتين وبنـــاء د.ن.أ تتشابة بدرجة كبيرة مع تلك الموجودة فى مميزة النواة .. والمدهش هو أن هذه البكتريا وجد بها بروتينات الهستونات الكروموسومية. وهناك بعض الأدلة على أن د.ن.أ الكروموسومى ينتظم فى كروماتين. كما أنه على الـــرغم مـــن عـــدم وجود انترونات فى الجينات المشفرة للبروتين إلا أنه وجـــدت انترونـــات فـــى جينات tRNA مشابهة لتلك الموجوده فى مميزة النواة.

تبين أنه بكتريا *Methunococcus jannasckii* والتى تعيش فـــى أعمـــاق البحار وتحت درجة الحرارة العالية والتى تصل إلى ٩٤ْ م ويتكون جينومها من ثلاثة كروموسومات: كروموسوم حلقى (1.66 Mb) وكروموســـومين حلقيـــين صغيرين مكونين من 58.4Kb و 16.5 Kb.وقد وجد أن ٥٨% من جينات هـــذا الكائن لاتتشابه مع أى جينات معروفة. وتقوم معظم الجينات بوظائف معينة مثل انتاج الطاقة وانقسام الخلية والمسارات الايضية العامـــة بحيـــث تتـــشابه مـــع

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ما يحدث فى *Eubacteria* كما أنها تشبه *Eubacteria* فى التنظيم العام وتحتوى لى أوبرونات ولا تحتوى على إنترونات.

ثالثًا: جينومات مميزة النواة Eucaryotic Genames:

يقسم عادة الجينوم النووى لمميزة النواة إلى سلسلة من جزيئات د.ن.أ الخطية بحيث يكون كل كروموسوم محتوى على جزئ واحد من د.ن.أ بالاضافة إلى ذلك يوجد جينوم أخر صغير فى مميزة النواة وهو جينوم الميتوكوندريا فى صورة جزئ حلقى من د.ن.أ، وفى النبات يوجد جينوم ثالث فى صورة د.ن.أ. حلقى وهو جينوم الكلوروبلاست. وسنقتصر هنا على تلخيص لبعض خصائص الجينوم النووى فى مميزة النواة. وكما سبق الذكر فإنه توجد اختلافات كبيرة فى احجام جينومات مميزة النواه المختلفة.

وبالمقارنة بغير مميزة النواة نجد أن مميزة النواة تتميز بكثافة جينية منخفضة Low Gene Density (الشكل١٣-٢٧). وعموما فكلما زاد حجم الجينوم كلما قلت به الكثافة الجينية فلو قارنا بين منطقة من فطر الخميرة (Lower Eukaryote) على الكروموسوم III ومنطقة من الجينوم البشرى على الكروموسوم 7 نجد الاختلافات التالية:

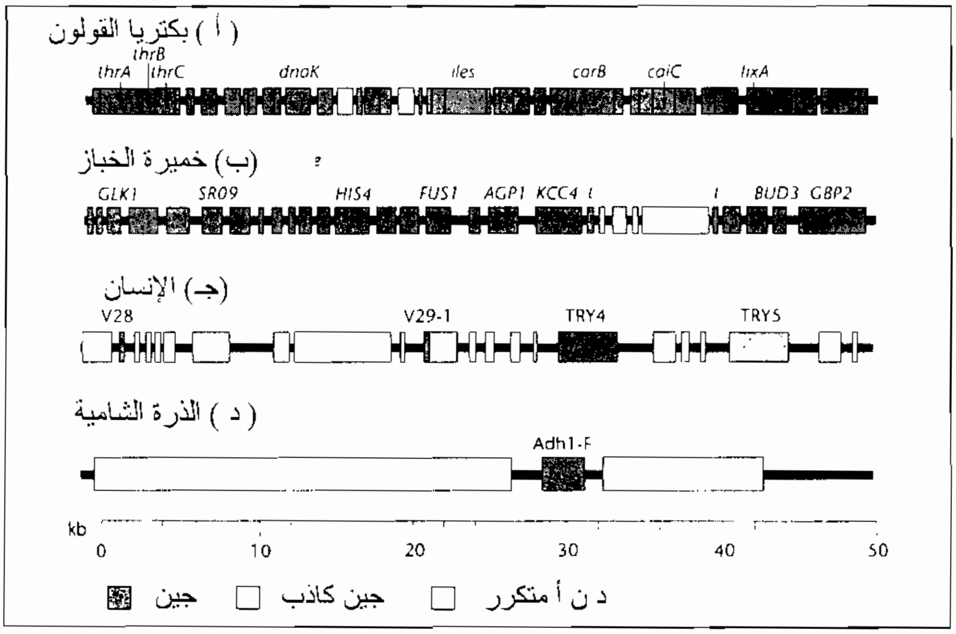
١- **الكثافة الجينية**: تحتوى منطقة الخميرة بطول ٥٠ك قاعدة على أكثر من ٢٠ جين بينما تحتوى منطقة الجينوم البشرى بنفس الطول على ٦ جينات فقط.

٢- **الإنترونات**: لاتحتوى الخميرة على أى انترونات ولكن كل جين بشرى يحتوى على انترونات عديدة وفى الحقيقة فإن جينوم الخميرة بأكملة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يحتوى على ٢٣٩ انترون فى حين أن بعض الجينات البشرية يحتوى كل منها على أكثر من ١٠٠ انترون.

٣- **التتابعات المتكررة Repetitive Sequences**: يعتبر وجــود الانترونـــات والتتابعات المتكررة من الاسباب الرئيسية للتبـــاين الكبيـــر فـــى احجـــام الجينومات فى مميزة النواة. ففى بعض النباتات مثل الذرة الشامية ، وجد أن التتابعات المتكررة هى السمة الغالبة للجينوم حيث أن حجـــم جينـــوم الذرة الشامية هو 2500. Mb إلا أن ٨٠% منها مكون من د.ن.أ متكـــرر مما يؤدى إلى انخفاض حاد فى الكثافة الجينيه فى هذا الجينوم.



الشكل (١٣-٢٧): مقارنة الكثافة الجينية (Gene Density) بين أربعة كائنات

أ - منطقة طولها ٥٠ كيلو قاعدة فى بداية جينيوم بكتريا القولون.

ب- منطقة من كروموسوم الخميرة رقم III.

جـ- منطقة طولها ٥٠ كيلو قاعدة من مكروموسوم ٧ البشري تشفر للمستقبلات السطحية للخلية.

د - منطقة من جينوم الذرة الشامية تحيط بجين Adh 1-F

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وبعكس ما هو شائع من أن مناطق الهيتيروكروماتين لا تحتــوى علــى أى جينات، تبين وجود ٥٠ جين فى منطقــة الهيتيروكرومــاتين فــى حــشرة الدروسفلا.

أثبتت نتائج مشروع الجينوم البشرى أن عدد الجينات البشرية يتراوح من ٣٠-٤٠ الف جين وهو يقل كثيرا عن العدد الذى كان مقدراً فى الـسابق بــين ٨٠-١٠٠ الف جين.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الفصل الرابع عشر

تطبيقـــات تكنولـوجيـــا الجـــين
Applications of Gene Technology

لقد أدت تكنولوجيا د ن أ المعاد صـــياغته Recombinant DNA وكلونـــة الجين Gene Cloning إلى إنطلاق عصر جديد سمى بحـــق عـــصر الهندســـة الوراثية وتكنولوجيا الجين.

فقد توالى استخدام هذة التقنيات فى إنتاج الادوية والفاكسينات والكيماويات الصناعية و الأغذية المعدلة وراثيا.

كما تقوم تكنولوجيا الجين بدور كبير فى مجال تشخيص وعلاج الأمراض الوراثية البشرية وتقليل تلوث البيئة وتحسين الانتاج النبـــاتى والحيـــوانى كمـــا ونوعا.

إنتاج بروتينات معدلة وراثيا:
Production of Recombinant Proteins:

سبق الاشارة إلى أهمية تكنولوجيا الجين فى انتاج بروتينات معدلة وراثيا ذات قيمة إقتصادية كبيرة مما ادى إلى نشأة مجال جديد مـــن االبيوتكنولـــوجى أطلق عليه هندسة البروتينات Protein Engineering.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الا انه قبل ان نتطرق إلى إستعراض بعض الامثلة من البروتينات التـــى تم إنتاجها بتكنولوجيا الجين فإنه من المفيد ان نفرق بين نوعين مـــن النـــاقلات وهما: ناقلات الكلونة Cloning Vectors وهذة سبق شرحها بالتفصيل ، وناقلات التعبير Expression Vectors والتى يجب أن تحتوى علـــى بعـــض التتابعـــات التى تمكنها من إجراء عمليتى نسخ وترجمة الجـــين المكلـــون إلـــى البـــروتين المرغوب.

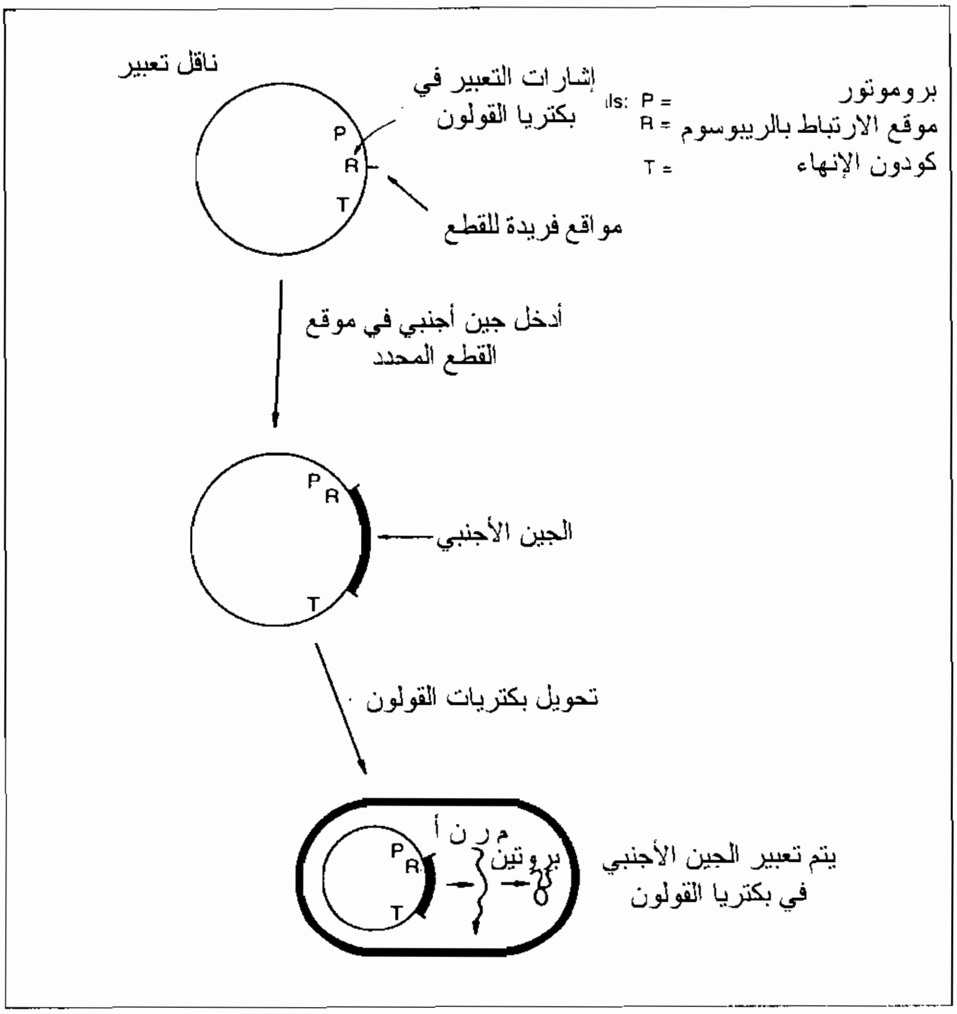
وتشمل هذة التتابعات :

(١) تتابع المستبدئ Promoter والذى يكون تتابعه قبلـــى للجـــين المطلـــوب upstream.

(٢) تتابع الانهاء Terminator والذى يحدد النقطة التى تنتهى عنـــدها عمليـــة نسخ الجين.

(٣) تتابع الارتباط بالريبوسوم Ribosome Binding Site وهو عبارة عن تتابع نيوكليوتيدى قصير يتعرف عليه الريبوســـوم كنقطـــة ارتبـــاط بجـــزئ م ر ن أ. ويقع كودون البدء (AUG) دائما على بعد نيوكلتيدات قليلة بعـــد هذا الموقع Downstream (الشكل ١٤-١).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٤-١): إستخدام ناقل تعبير للحصول على تعبير جين أجنبى فى خلية بكتريا القولون

أولاً: الانسولين المعدل وراثيا Recombinant Insulin:

ينتج الانسولين الطبيعى من مجموعة خلايا β فى جزر لانجيرهانز فى البنكرياس البشرى وهو يتحكم فى مستوى الجلوكوز فى الدم. ويؤدى نقص

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الانسولين إلى الاصابة بمرض السكرى Diabetes Mellitus والذى قد تؤدى تعقيداته إلى الموت إذالم يتم علاجه.

ومن حسن الحظ أنه توجد بعض أنواع مرض السكرى التى يمكن تقليل مضاعفاتهابالعلاج المستمر بالحقن بالانسولين لتعويض النقص فى انتاجه فى خلايا الفرد المصاب.

وقد كان مصدر الانسولين فى الماضى هو عن طريق إستخلاصه من بنكرياس الخنازير والابقار. وعلى الرغم من أن هذا الانسولين الحيوانى أعطى نتائج مقبولة ، إلا أنه قد تنشأ بعض المشاكل الصحية من إستعماله لعلاج مرض البول السكرى فى الانسان. إذ أنه نتيجة للاختلاف البسيط بين البروتينات الحيوانية و البشرية قد يؤدى إلى ظهور بعض الاعراض الجانبية مثل الحساسية Allergy.

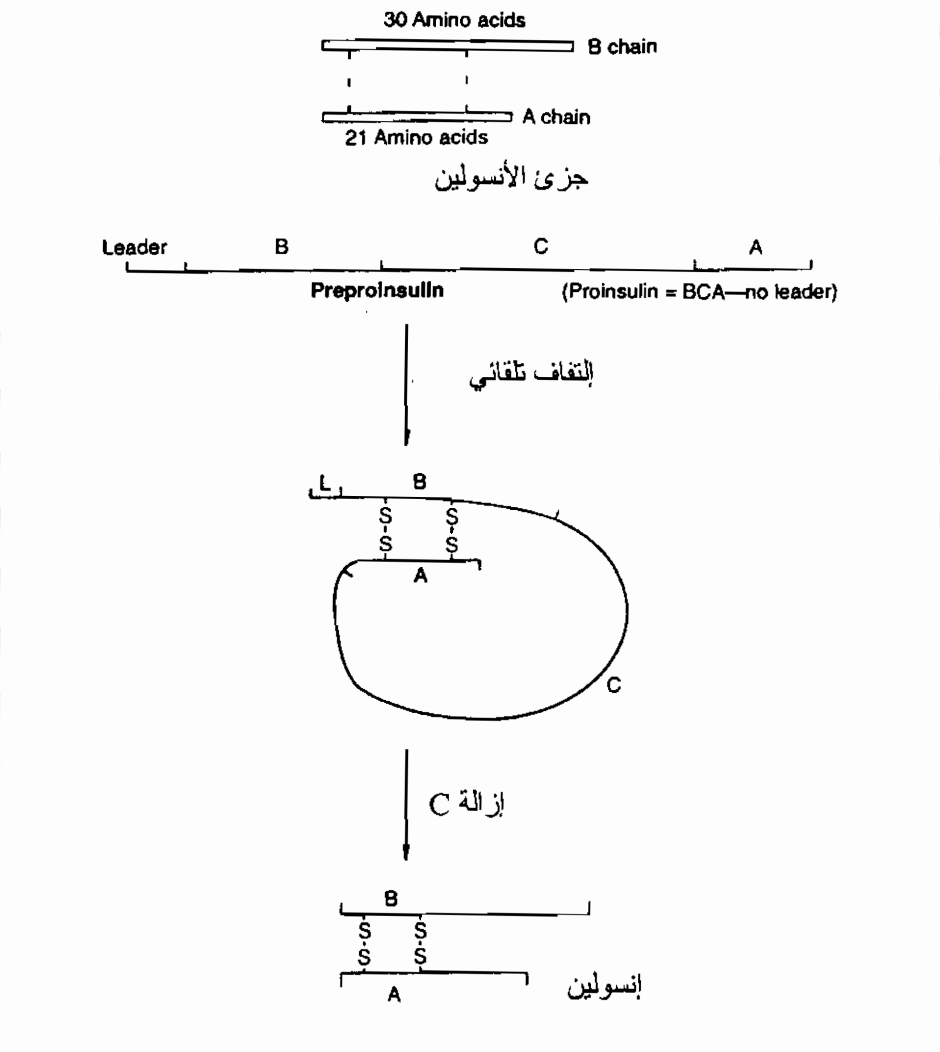
والمشكلة الثانية تكمن فى صعوبة تنقية الانسولين الحيوانى وإمكان وجود ملوثات خطرة يصعب التخلص منها.

ويعتبر بروتين الانسولين مثالى لانتاجه بتقنية د ن أ المعاد صياغته فى خلايا بكتيريا القولون. إذ أن الانسولين البشرى لايحدث له أى تعديل Modifications بعد الترجمة (اى لا يضاف إليه اى مجموعات إضافية مثل سلاسل الأوليجو السكريه .....الخ).

كما أن جزئ الانسولين صغير الحجم ويشتمل على سلسلتين ببتيدتين الاولى مكونة من ٢١ حامض أمينى (السلسلة A) والاخرى مكونة من ٣٠ حامض أمينى (السلسلةB) (الشكل١٤-٢) و يتم بناء هاتين السلسلتين كبادئ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أنسولين يسمى Preproinsulin والذى يحتوى على سلــسلتى A و B مــرتبطتين بسلسلة ثالثة (C) و يسبقهم تتابع قائد Leader Sequence.



الشكل (١٤-٢): تركيب جزئ الإنسولين وملخص لبنائه بعملية التجهيز من جزئ الإنسولين القبلى البعدى Preproinsulin

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

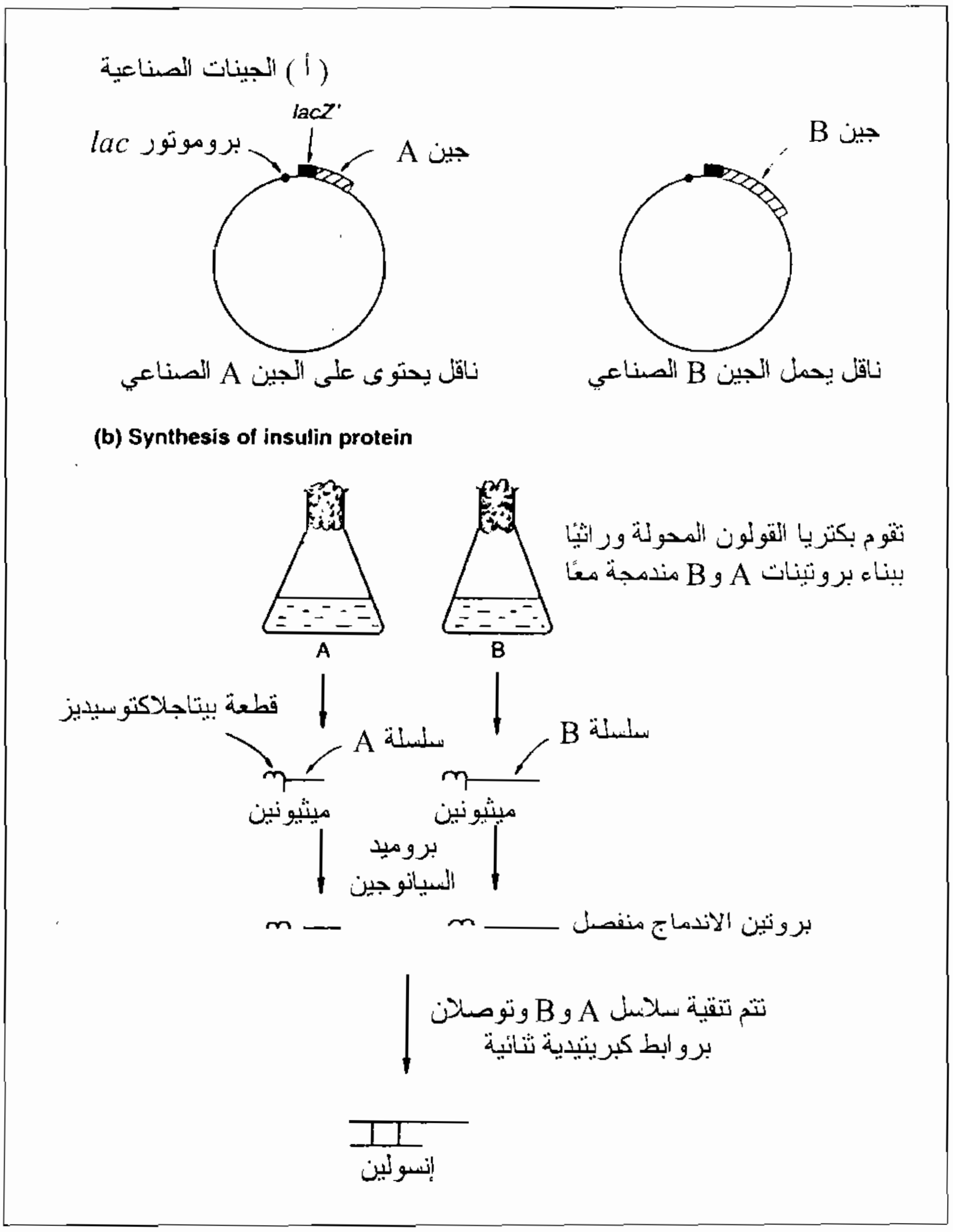
وتتم إزالة التتابع القائد وحذف السلسلة C بعد النسخ ، وتبقى سلسلتى A و B مرتبطتين ببعضها برابطتين كبريتيدين Disulfide Bonds.

وقد أمكن بناء جين انسولين صناعى وترجمته إلى بروتين الانسولين الفعال. حيث أمكن تكوين بلازميدين معاد صياغتهما أحدهما يحتوى على الجين الصناعى الخاص بالسلسلة A والاخر يحتوى على جين السلسلة B. وفى كل حالة تم وصل الجين الصناعى بجين Lacz فى ناقل تعبير Expression Vector من نوع PBR 322 (الشكل ١٤-٣) مما يجعل كل جين صناعى تحت تحكم بروموتور Lac القوى. ويتم ترجمة كل منهما كبروتين مندمج Fused Protein يتكون من الاحماض الامينية الاولى من إنزيم β.Galactosidase متبوعة بسلسلة A أو B (الشكل ١٤-٣ ب).

وقد صمم كل جين بحيث يكون الحامض الاميني الميثيونين يفصل بين β-Galac وسلسلة الانسولين مما يمكن معه إزالة جزء β-Galc و فصلها عن سلسلة الانسولين وذلك بالمعاملة بمادة Cyanogen Bromide (CBr) ويتم الارتباط بين سلسلة A و B برابطتين كبريتدتين تتم فى المعمل. وقد أمكن تطوير عملية إنتاج الا نسولين ببناء Synthesis جين Proinsulin بحيث يشمل سلسلة A و B معا وبالكامل.

ويتميز بادىء الهرمون الناتج Prohormone بأنه يلتف ذاتيا Spontaneous Folding ليأخذ التركيب الصحيح بالروابط الكبريتيديه. ويمكن التخلص من سلسلة C بسهولة بتحليلها إنزيميا.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٤-٣): بناء الإنسولين المعاد صياغته بإستخدام جينات صناعية لكل من سلسلتى A وB

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ثانيًا: إنتاج هرمون النمو البشرى فى خلايا بكتيريا القولون:

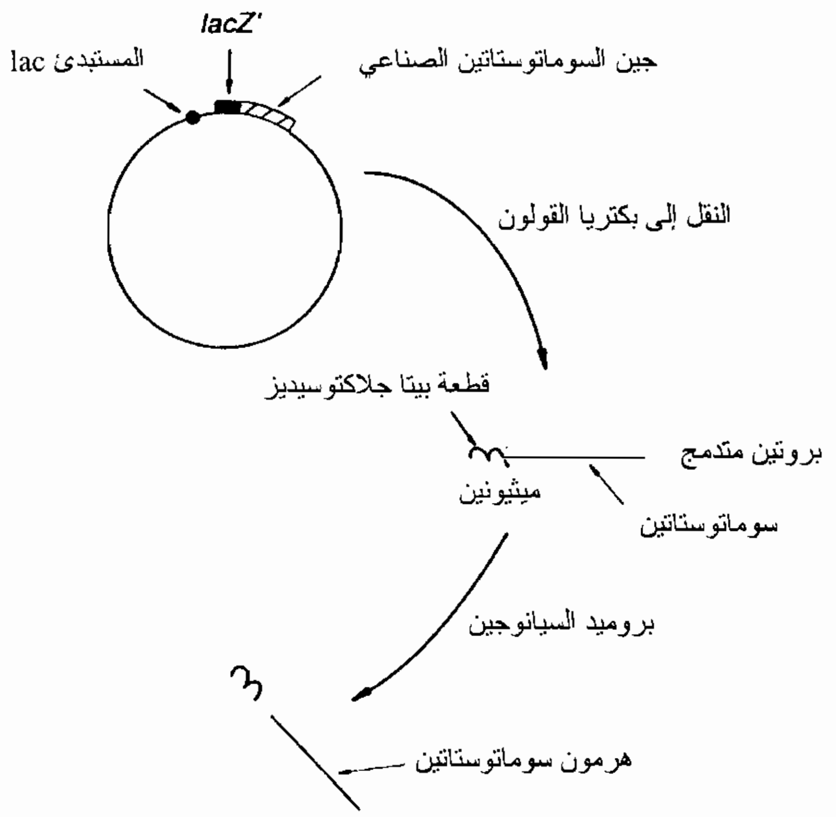
Synthesis of Growth Hormones in E.coli:

فى نفس الوقت تقريبا الذى إنتج فيه هرمون الأنسولين فى بكتيريا القولون ، كانت مجموعة أخرى من العلماء تعمل فى مشروع لانتاج هرمونى النمو البشرى سوماتوستاتين Somatostatin وسوماتوتروفين Somatotrophin.

ويعمل هذان الهرمونان بصورة مشتركة للتحكم فى عمليات النمو فى جسم الانسان ويؤدى نقصها إلى إختلال فى نمو العظام Acromegaly والتقزم. وقد كان هرمون سوماتوستاتين أول بروتين بشرى يتم تكوينه فى بكتيريا القولون (إلا أن هرمون الانسولين كان أول هرمون بشرى يصرح به على نطاق تجارى بعد موافقة هيئة الغذاء والدواء الامريكية (FDA) US Food and Drug Administration ونظرا لانه يتكون من سلسلة قصيرة من ١٤ حامض أمينى فقط. فقد كان من السهل بناء جين صناعى لهذا الهرمون. واستخدمت فى إنتاج هذا الهرمون نفس الاستراتيجية التى سبق وضعها فى إنتاج الانسولين المعاد صياغته بحيث أدخل الجين الصناعى فى ناقل التعبير LacZ (الشكل ١٤-٤) وبناء بروتين مندمج Fusion Protein والقطع بمادة بروميد السيانوجين (CBr).

ومن جهة أخرى ونظرا لان هرمون السوماتوتروفين مكون من سلسلة طويلة نسبيا (١٩١ حامض أمينى) مكافئة تقريبا لحوالى ٦٠٠ زوج من القواعد النتروجينية ، فقد كان لابد من إستخدام إستراتيجية مختلفة نظرا لانه كان من الصعب فى ذلك الوقت (أواخر السبعنيات) بناء هذا الجين صناعيا بالكامل.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

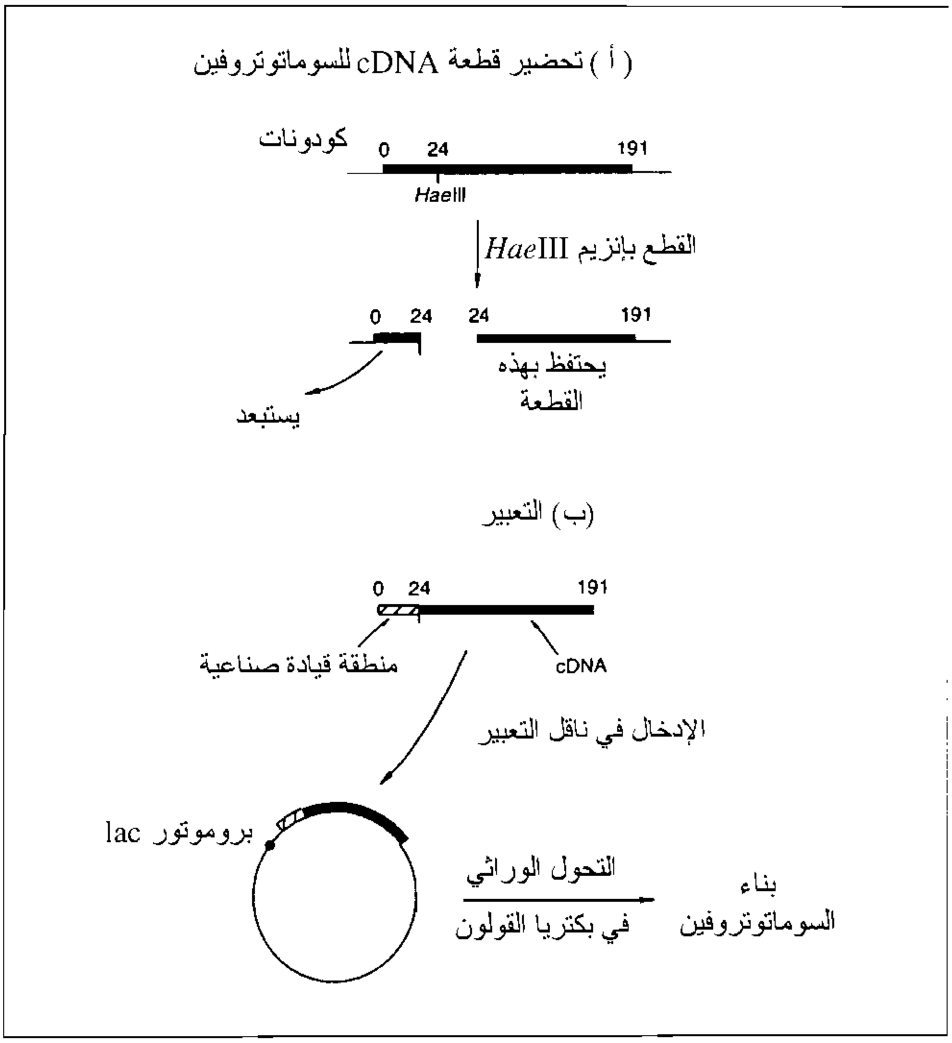


الشكل (١٤-٤): إنتاج هرمون السوماتوستاتين المعاد صياغته

ولذلك تم الاعتماد على cDNA من م ر ن أ المستخلص من الغدة النخامية التى تنتج هذا الهرمون فى جسم الا نسان. و تم قطع cDNA الناتج بانزيم القطع المحدد Hae III إلى قطعتين (الشكل١٤-٥) وكانت القطعة الاطول تحتوى على الكودونات من ٢٤ إلى ١٩١ وإستخدمت هذة القطعة لتكون البلازميد المعدل فى حين إستبدلت القطعة الصغرى بجزئ د ن أ صناعى الذى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

إشتمل على نقطة بداية جين السوماتوتروفين ، و إحتوى على الاشارات الصحيحة اللازمة لعملية الترجمة فى بكتيريا القولون (الشكل١٤-٥) وتم لحام هذا الجين المعدل فى ناقل تعبير يحمل البرموتور Lac.



الشكل (١٤-٥): إنتاج هرمون السوماتوتروفين المعاد صياغته

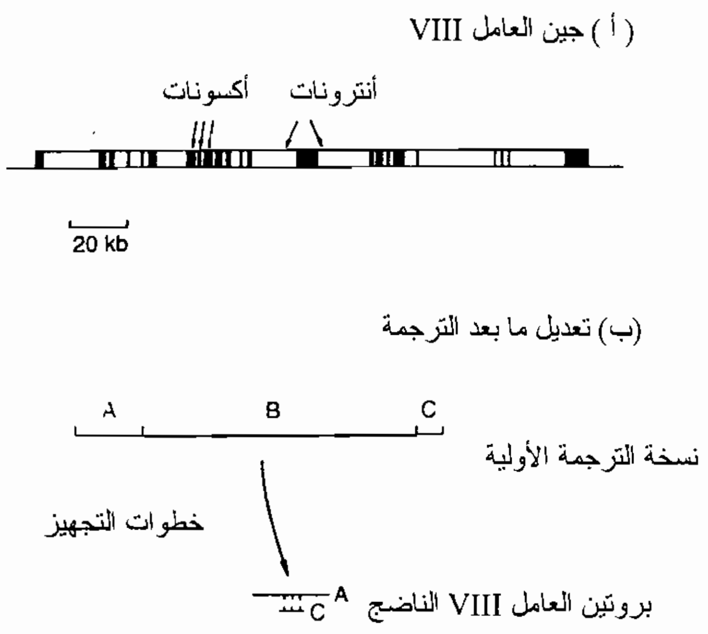
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ثالثًا: إنتاج عامل التجلط Recombinant Factor VIII:

يلعب عامل التجلط Factor VIII دورا رئيسيا فى عمليـــة تجلـط الـــدم. ويؤدى عدم قدرة الجسم على بناء هذا العامل (نتيجة لغياب النسخة السائدة مـــن هذا الجين الموجود على كروموسوم الجنس X) إلى صعوبة وقف نزف الدم عند التعرض لجرح قطعى نتيجة عدم قدرة الجسم على تكوين جلطة لوقف النزيـــف وخاصه فى الأفراد المصابين بمرض النازف Haemophilia (هيموفيليا). ويتميز هذا الجين بأنه يتكون من ١٨٦ك قاعدة و يحتوى على ٢٦إكسون و٢٥إنتـــرون كما أن م ر ن أ يشفر لسلسلة طويلـــة مكونـــة مـــن ٢٣٥١ حـــامض أمينـــى (الشكل١٤-٦) كما أن بروتين العامل VIII يتم تعديله بصورة معقدة بعد الترجمة Post-Translational Processing بحيث يعطـــى فـــى النهايـــة بـــروتين ثنـــائى الجزئ Dimeric مكونا من تحت وحدة كبيـــرة مـــشتقة مـــن المنطقـــة القبليـــة Upstream لمتعددة الببتيد الاولية وتحت وحدة صغيرة مـــن المنطقـــة اللاحقـــة Downstream (الشكل ب) ثنائى الجزئ Dimeric. وتحتوى تحت الوحدتين على ١٧ رابطة كبريتيدية Disulphide Bonds وعدد مـــن الـــسلاسل الجليكوســـيدية القصيرة Glycosylated.

ومن الواضح أن مثل هذا البروتين المعقد الكبير الحجم لايمكـــن للجهـــاز الوراثى لبكتيريا القولون أن يقوم بإنتاجه لافتقاره إلـــى كثيـــر مـــن العناصـــر المسئولة عن إنتاج مثل هذا البروتين لذلك كان لابد من إستخدام مزارع خلايـــا ثديية للقيام بهذة العملية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٤-٦): عامل التجلط VIII وناتج ترجمته (البروتين)

وقبل أن نتطرق إلى عملية بناء هذا البروتين المعدل وراثيا فى الخلايا الثديية تجدر الإشارة إلى الاسباب التى إقتضت ضرورة إنتاج هذا البروتين بطرق تكنولوجيا الجين إذ أنه حتى وقت قريب كانت الطريقة الوحيدة لعلاج الهيموفيليا هى الحقن ببروتين عامل التجلط VIII النقى والمستخلص من الدماء البشرية لافراد متبرعين و تعد عملية تنقية هذا البروتين عملية معقدة والعلاج مكلف جدا.

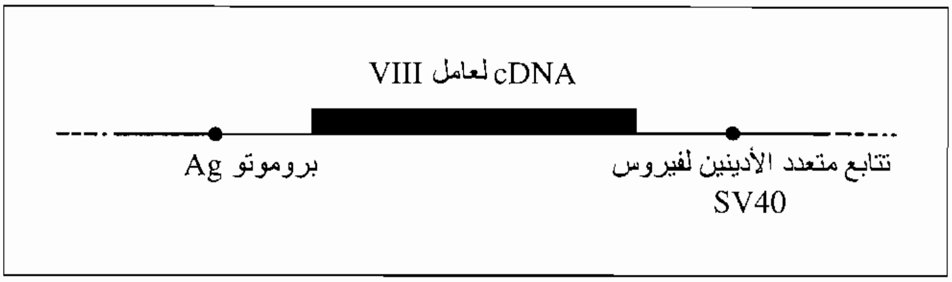
والأخطر من ذلك أنه بالرغم من دقة عمليات التنقية فإنها كانت قاصرة عن التخلص من الفيروسات المرضية التى قد تكون موجودة فى دم المتبرع . إذ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تبين أن فيروسات إلتهاب الكبد الوبائى Hepatitis و فيروس HIV المسئول عن الايدز (AIDS) يمكن أن تمر مع البروتين المستخلص وبالتالى حدثت بالفعل إصابات بهذة الامراض الخطيرة للافراد المعالجين بالحقن ببروتين عامل التجلط المستخلص بهذة الطريقة. لهذا فإن عامل التجلط المعدل والمنتج بتكنولوجيا الجين يكون خالى من هذة الملوثات الخطيرة مما يعد إنجازا مهما فى مجال البيوتكنولوجى.

وفى المحاولات الاولى لإنتاج هذا البروتين المعدل وراثيا باستخدام خلايا الثدييات ، تمت كلونة جزئ cDNA بأكمله فى مزرعة من خلايا الهامستر Hamster Cells إلا أن الكميات المنتجة من البروتين كانت ضئيلة جدا وغير مشجعة وقد يرجع ذلك إلى أن العمليات ما بعد الترجمة Post-Translational ، على الرغم من إنها تحدث بطريقة صحيحة فى خلايا الهامستر ، إلا أنها لاتقدر على تحويل كل النتائج الاولية إلى الصورة النشطة مما يؤدى إلى انخفاض حاد فى كمية الناتج النهائى. وللتغلب على هذة المشكلة ، إستخدمت قطعتين منفصلتين من cDNA تشفر إحداهما لتحت الوحدة الكبيرة من سلسلة متعددة الببتيد والثانية تشفر لتحت الوحدة الصغيرة وتم إلتحام Ligation كل من قطعتى cDNA فى ناقل تعبيرى Expression Vector بحيث تكون تحت تأثير بروموتورقوى وتسبق Upstream إشارة من متعدد الادينين Poly A من فيروس SV 40 (الشكل ١٤-٧) وتم إدخال البلازميد إلى مزرعة من خلايا الهامستر حيث أنتجت كميات توازى ١٠ أضعاف الكمية المنتجة من الخلايا التى إحتوت على cDNA الكامل الطول كما أن بروتين عامل التجلط الناتج كان فعالا ولا يختلف فى ذلك عن البروتين فى صورته الاصلية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٤-٧): إشارات التعبير المستخدمة فى إنتاج العامل VIII المعاد صياغته. يتكون البروموتور من هجين صناعى من تتابعات جين بيتا اكتين للدجاج وبيتا جلوبين للأرنب وتستخدم إشارة متعدد الأدينين Poly A الخاصة بفيروس SV40 (وهى مهمة للتجهيز الصحيح لجزئ م ر ن أ قبل الترجمة إلى بروتين)

إنتاج بروتينات بشرية معدلة أخرى:

Synthesis of Other Recombinant Human Proteins:

توالت عمليات إنتاج بروتينات معدلة بتكنولوجيا الجين ويبين الجدول(١٤-١) بعض الامثلة لهذة البروتينات.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجدول (١٤-١) ، بعض البروتينات البشرية التى أنتجت من جينات مكلونة فى البكتيريا أو فى خلايا مميزة النواة أو بواسطة Molecular Pharming

البروتين	الغرض من إستخدامه فى العلاج
الانسولين	مرض البول السكرى
السوماتوستاتين	إختلا ل النمو
السوماتوتروفين	إختلا ل النمو
عامل التجلط VIII	هيموفيليا
عامل التجلط IX	مرض Christmas
الفا انترفيرون	اللوكيميا وأنواع أخرى من السرطان
بيتا انترفيرون	السرطان والايدز
جاما انترفيرون	السرطان و الروماتويد
انترليوكين	السرطان و إختلا ل المناعة
عامل نمو Epidermal	القرحة ulcer
منشط البلازمونيجين النسيجى (tpA) Tissue Plasmonigen Activator	الذبحة الصدرية heart attack
سوبر أوكسيد ديسمبوتيز (SOD)	التخلص من التلف الناتج من الشوارد المؤكسدة فى عملية زرع الكلية.
البيومين السيرم	يستخدم كإضافات للبلازما Plasma Supplement
ريلاكسين Relaxin	يستخدم فى المساعدة على الولادة To aid Child birth
إنزيم ديوكسى ريبونيوكلييز	لعلاج مرض التليف الحويصلى Cystic Fibrosis

إنتاج فاكسينات بتكنولوجيا الجين Recombinant Vaccines:

تتلخص عملية التحصين Vaccination ضد مرض معين فى حقن الدم بتحضير من الانتجن Antigen الذى يؤدى إلى تحفيز الجهاز المناعى للجسم لبناء

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أجسام مضادة Antibodies لحماية الجسم من الاصابة. وقد جرت العادة حتى وقت قريب على إستخدام صورة غير نشطة أ و ميتة من الميكروب المعدى فى تحضير الفاكسين(الطعوم).

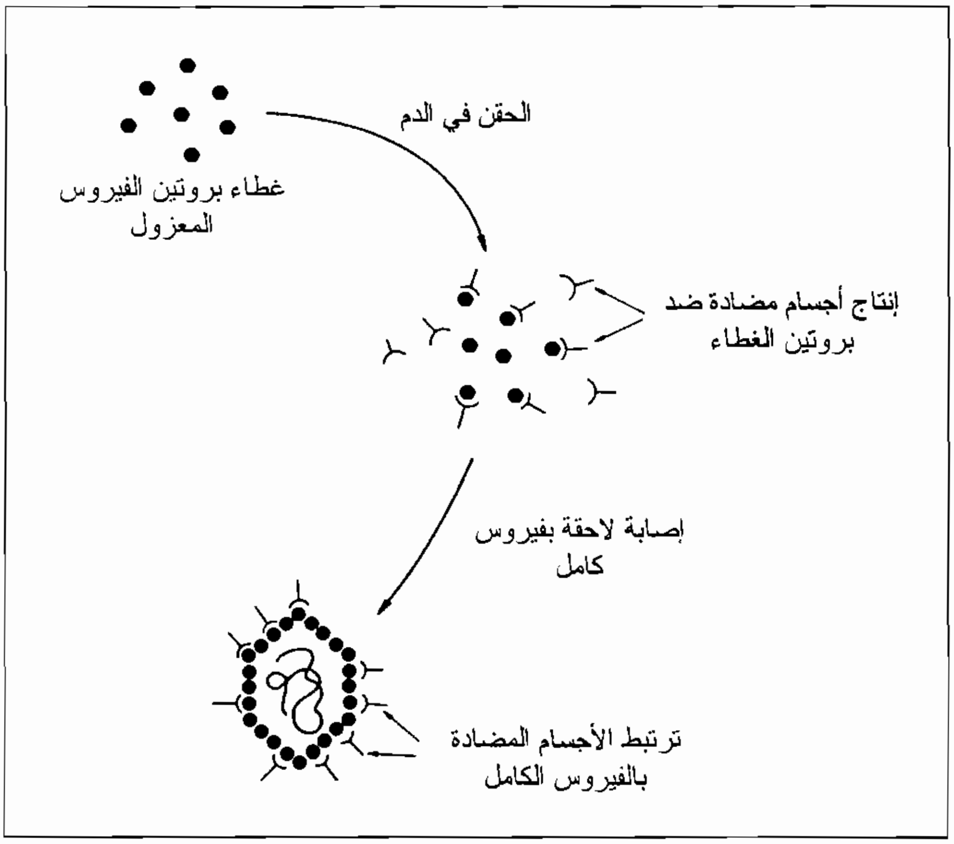
فمثلا الطعوم ضد الفيروس كانت تتكون من وحدات فيروس تم إيقاف نشاطها Attenuated بمعاملات حرارية أو عمليات مماثلة إلا أنه نشأت مشكلتين من إستخدام هذة الطعوم :

١- لابد من أن تكون عملية إيقاف النشاط فعالة بنسبة ١٠٠% وإلا فإن وجود حبيبة فيروس واحدة حية فى الطعم المستخدم ستؤدى إلى الاصابة. وقد كانت هذه مشكله فى طعوم الحمى القلاعية فى الابقار.

٢- لابد من الحصول على كميات كبيرة من حبيبات الفيروس لانتاج الطعم وهذه يتم الحصول عليها عادة من مزارع الانسجة. إلا أن بعض الفيروسا ت وخاصة فيروس إلتهاب الكبد B لاتنمو فى مزارع الانسجة.

وللتغلب على هذة المشاكل إستخدمت تقنية كلونة الجين وخاصة بعد إكتشاف أن تحفيز الجهاز المناعى فى ا لجسم لانتاج أجسام مضادة يعتمد أساسا على انتجينات موجودة فى بروتينات غطاء الفيروس Coat Proteins (الشكل ١٤-٨).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٤-٨): الفكرة الأساسية لتفسير إستخدام تحضير من الغطاء البروتينى للفيروس لإستخدامه كطعم Vaccine

ولذلك يتم تحديد الجين المشفر لهذا البروتين ويكلون فى ناقل تعبير مناسب لانتاج بروتينات معدلة وراثيا تستخدم كطعوم. و تمتاز تلك الطعوم بعدم وجود الفيروس الحى كما يمكن إنتاجها بكميات كبيرة.

وقد أمكن الحصول بهذة التقنية على طعم ضد إلتهاب الكبد B و ذلك بكلونته فى ناقل للتعبير 2µm وإدخاله إلى خلايا فطر الخميرة. وقد أمكن

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الحصول على كميات كبيرة نسبيا من هذا البروتين المعدل وأثبت فعاليته عند حقن القردة به. وقد تمت الموافقة على إستخدام هذا الفاكسين كطعم في الانسان.

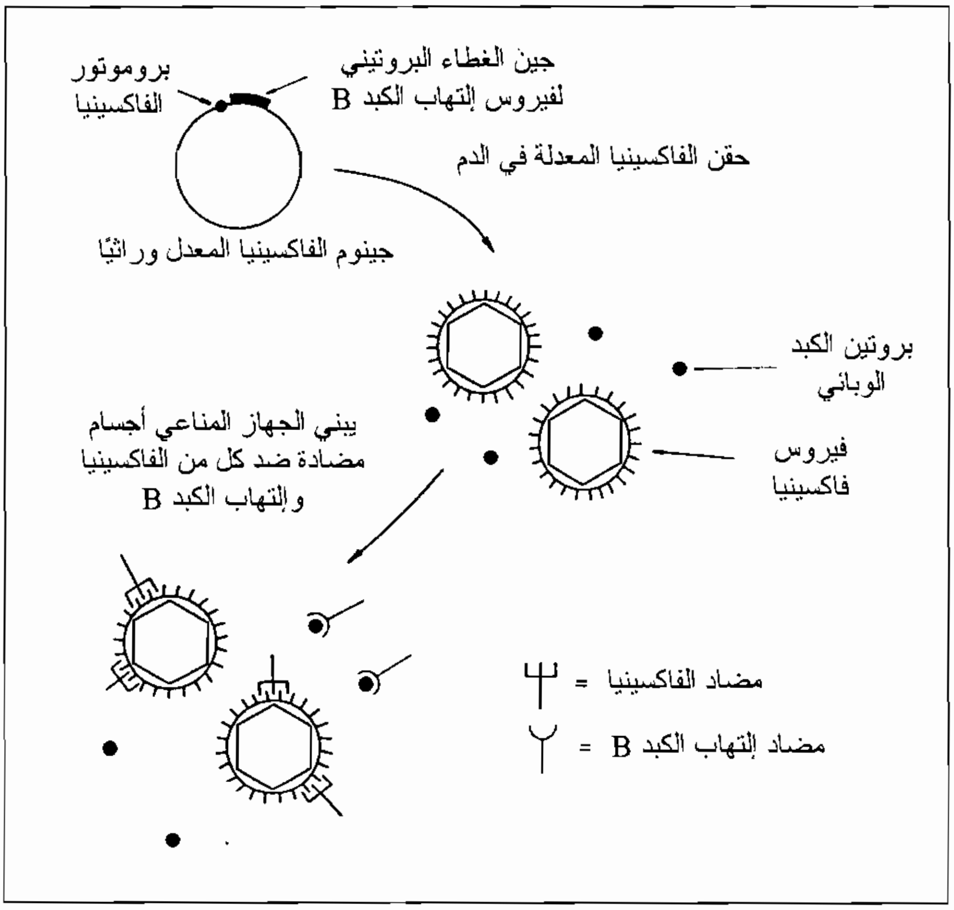
إستنباط فاكسينات حية معدلة وراثيا:

Live Recombinant Vaccines:

يرجع إستخدام فيروس فاكسينيا Vaccinia كطعم ضد فيروس مرض الجدرى Smallpox إلى عام ١٧٩٦ حين إكتشف Edward Jenner لاول مرة أن هذا الفيروس ، غير الضار بالانسان ، يمكنه تحفيز الجهاز المناعى ضد فيروس مرض الجدرى الخطير. وقدإشتق إسم فاكسين من كلمة فاكسينيا. وقد أدى إستخدام هذة التقنية إلى التخلص تماما من مرض الجدرى على المستوى العالمى فى عام ١٩٨٠. وقد تطور إستخدام فيروس الفاكسينيا مؤخرا بحيث يمكن إستعماله كطعم حى ضد أمراض أخرى. فإذا تم الحاق جين بروتينات الغطاء لفيروس إلتهاب الكبد الوبائى B فى جينوم الفاكسينيا تحت تحكم بروموتور الفاكسينيا مما يؤدي إلى تعبيرالجين (الشكل ١٤-٩). وبعد الحقن فى الدم سيؤدى تكاثر الفيروس المعدل وراثيا إلى إنتاج حبيبات فاكسينيا جديدة بالإضافه إلى إنتاج كميات كبيره من انتجن إلتهاب الكبد B. وسيؤدى ذلك إلى إكتساب المناعة ضد الجدرى وإلتهاب الكبد الوبائى B معا. وتوجد إمكانات كثيرة لهذة التقنية، إذ يمكن إستخدام جينوم الفاكسينيا الحية لكلونة عدد من الجينات المسئولة عن إكتساب المناعة ضد عدد من الامراض بحيث أظهرت نتائج هذة التجارب فعالية كبيرة فى الحيوانات المعملية. وعلى سبيل المثال، فإن مثل هذة التجارب أثبتت إحتمال الحصول على طعوم واسعة المدى Broad Spectrum عندما تبين أن فيروس فاكسينيا المعدل وراثيا و الذى يتم فيه

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تعبيرعدد من الجينات لبروتينات انتجينات مختلفة مثل فيروس الانفلونزا وإلتهاب الكبد B.



الشكل (١٤-٩): الفكرة الأساسية لتفسيرإمكان إستخدام فيروس الفاكسينيا المعاد صياغته

والهيربس Simplex Herpes قد أعطى مناعة ضد كل من هذه الامراض مجتمعه فيالقرود. إلا أن هناك تخوف من أن إطلاق مثل هذة الفاكسينيا المعدلة وراثيًا فى البيئة من خلال برنامج تطعيم ، خشية أى مخاطر على سلامة البيئة.

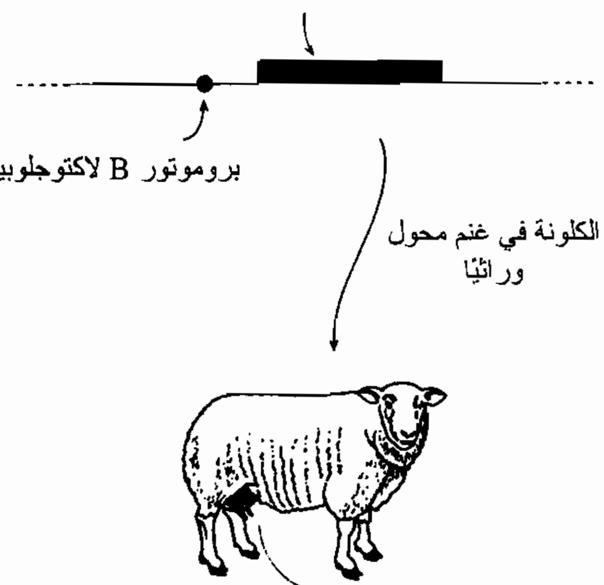
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

إنتاج بروتينات معدلة وراثيا فى الحيوانات الحية:

Recombinant Protein From Live Animals:

أمكن مؤخرا إستخدام الحيوانات الحية مثل الابقار والخنازير والاغنام كمفاعلات بيولوجية Bioreactors لانتاج بروتينات مهندسة وراثيا. وفى هذه التقنية يتم كلونة جين البروتين المرغوب تحت تحكم البروموتور الخاص بجين B-Lactoglobulin ويتم إدخال ناقل التعبير هذا إلى الحيوان المحول وراثيا Transgenic Animal والذى يتم إنتاجه بالحقن المجهرى Microinjection للخلية البيضية المخصبه ويؤدى وجود الجين المرغوب تحت تحكم هذا البروموتور إلى أن يصبح إنتاج البروتين المرغوب قاصرا على أنسجة الضرع فقط بحيث يفرز هذا البروتين مع اللبن (الشكل ١٤-١٠). ويمكن إستخلاص وتنقية البروتين المرغوب من اللبن بسهولة نسبية. وقد أمكن بهذة التقنية إنتاج بروتين عامل التجلط VIII فيما يسمى Molecular Pharming حيث تم الحاق cDNA الخاص بهذا الجين بأكمله تحت تحكم البرموتور اعلاه فى الخنزير. وقد أدى ذلك إلى بناء هذا البروتين فى خلايا الضرع وإفرازه فى اللبن. وقد تبين أن البروتين الناتج له نفس خواص ونفس فاعلية البروتين الطبيعى لعامل التجلط VIII.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١٤-١٠): إنتاج بروتين معاد صياغته فى لبن الأغنام المحولة وراثيا

إنتاج بروتينات معدلة وراثيا فى النبات:

Recombinant Proteins From Plants:

كما يحدث فى الحيوان فإنه يمكن إستخدام النبات كمفاعل بيولوجى لانتاج بروتينات مرغوبة خاصة وأنه ثبت أن معظم البروتينات الحيوانية التى يتم إنتاجها فى خلايا النبات يحدث لها نفس التعديلات لما بعد الترجمة Post-Translational Modifications. ويمكن زراعة النباتات بكثافه عاليه فى الحقل مما يعطى محصولا جيدا من البروتين المعدل وإمكان التخزين لبعض

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الاجزاء النباتية المحتوية على هذا البروتين مثل الدرنات أو فى الفاكهـة التـى تكون عادة غنية فى البروتين. و بصرف النظر عن الطريقة التى يمكن أن يـتم فيها إنتاج البروتين المعدل فى النبات ، فإن النبات يوفر تقنية رخيصة و غيـر معقدة للانتاج الكبير Mass Production من البروتينات المعدلة وراثيا. وقد تـم إنتاج بروتينات مختلفة على نطاق تجريبى مثل بعـض المنتجـات الـصيدلانية كالانترليكون والاجسام المضادة كما تجرى بعض التجارب لانتاج فاكسينات فى النبات (مثل الفاكسين ضد الملاريا) مما يعدخطوه كبيره لإستنباط برنامج تطعيم رخيص وفعال.

وقد إستخدم نبات الدخان Tobacco بالفعل لانتاج أجسام مضادة. وتتلخص الطريقة فى إدخال كلون للجين الخاص بالسلسلة الخفيفة فى أحد النباتات ، فـى حين ادخل كلون الجين الخاص بالسلسلة الثقيلة فى نبات آخر. وأمكـن بالفعـل الحصول على كميات لابأس بها من السلسلتين كل فى النبات المعدل وراثيا. ثم تم التهجين بين النباتين وعند حصاد نباتات الجيل الاول الناتجة وجدت كميـات معقولة من الاجسام المضادة كاملة حيث حدثت داخل نباتات الجيل الاول عملية تعديل كاملة بحيث أصبح تركيب الاجسام المضادة مشابه للبـروتين الاصـلى وبنفس الفاعلية.

تحديد الجينات المسئولة عن الامراض البشرية:

Identification of Genes Responsible for Human Diseases:

لاشك أن الامراض الوراثية كانت وستظل موجودة فى العشائر البـشرية إلا أنها إكتسبت أهمية أكبر فى السنين الاخيرة وذلـك لان بـرامج التطعـيم وإستخدام المضادات الحيوية وتحسين النواحى المعيشية و الصحية قد أدت إلـى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

إنخفاض فى معدلات الاصابة بالامراض المعدية مثل الجدرى والسل والكوليرا والتى كانت السبب الرئيسى فى الوفاة فى أوائل القرن العشرين.

ونتيجة لذلك أصبحت نسب أعلى من أفراد العشيرة تموت من أمراض ذات مكون وراثى وخاصة الامراض التى تظهر أعراضها فى عمر متأخر من حياة الفرد نتيجة لارتفاع متوسط الاعمار.

وترجع أهمية التعرف على الجينات المسئولة عن الامراض الوراثية إلى ما يأتى:

١- قد يعطى تحديد أو تعريف الجين مؤشرا عن الاساس البيوكيماوى للمرض مما يساعد على تصميم إستراتيجيه العلاج.

٢- إن تحديد الطفرة الموجودة فى جين معيب Defective يمكن أن يستخدم لاستنباط برنامج للمسح Scanning والمتابعة حتى يمكن التعرف على وجود الجين فى الافراد الحاملة Cariers أو تلك التى لم يظهر بها المرض بعد. و يمكن تقديم إستشارة طبية وراثية Genetic Counselling لحاملى الطفرة لتوعيتهم بفرص توريث المرض لاطفالهم.

كما أن التعرف المبكر على الطفرة فى الافراد التى لم يظهر فيها المرض بعد تسمح بإتخاذ إحتياطيات لتقليل مخاطر تقدم المرض فى الجسم.

٣- يعتبر تعريف أو تشخيص الجين أحد المتطلبات المبدئية Prerequisite للعلاج بالجينات كما سيأتى بعد.

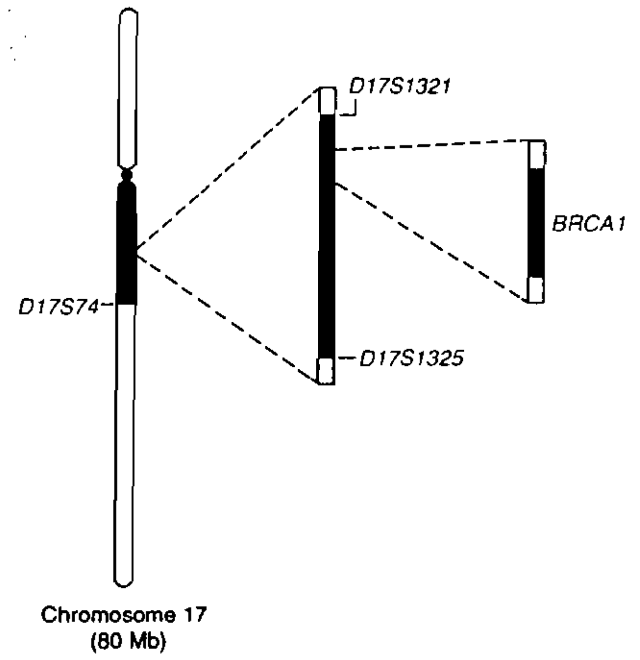
ولكى يتم تحديد الجين المسئول عن مرض ما فإنه يمكن بالنسبة للعشائر البشرية اللجوء إلى تحليلات شجرة النسب Pedigree Analysis والتى يتم فيها

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

دراسة توريث الجين المرغوب فى عائلات تتميز بمعدلات إصابة عالية بالمرض المطلوب دراسته. ويفضل الحصول على عينات د ن أ مأخوذة من ثلاثة أجيال على الأقل من كل عائلة وكلما زاد عدد أفرد العائلة كلما كان ذلك أفضل. وتتم دراسة الارتباط بين ظهور أو غياب المرض وبين وجود أو عدم وجود كشافات د ن أ DNA Markers فى تحليل شجرة النسب. و يمكن توضيح ذلك بإستعراض الخطوات التى اتخذت للتعرف على أحد الجينات المسئولة عن سرطان الثدى. و قد بدأت التجارب المبشرة فى عام ١٩٩٠عندما تبين أنه فى عائلات تتميز بارتفاع نسبة الاصابة بسرطان الثدى وجود عدد من الاناث المصابة ظهر فى تحليلات عينات د ن أ الخاصة بهن ظهور الكشاف RFLP (D17S74) والذى كان قد سبق تحديد موقعه على الذراع الطويل للكروموسوم رقم ١٧ (الشكل١٤-١١). مما يشير إلى أن الجين المراد تحديد موقعه (BRCA1) لابد أن يقع فى مكان ما على الذراع الطويل للكروموسوم ١٧. وكانت تلك بداية مبشرة إلا أنها لم تكن كافية لتحديد الموقع الدقيق لهذا الجين إذ تبين أن اكثر من ١٠٠٠ جين آخر تقع فى تلك المنطقة نفسها والتى تمتد حوالى ٢٠ مليون قاعدة على كروموسوم ١٧. وقد إستدعى ذلك القيام بتجارب إرتباط آخرى لتحديد موقع الجين BRCA1 بدقة اكثر، وقد تم ذلك بدراسة المنطقة التى تحتوى على BRCA1 والبحث عن وجود كشافات (STS) فيها والتى تفيد فى التحديد الدقيق لرسم خريطة هذا الجين. وقد أدى إستخدام هذه الكشافات إلى خفض المسافة التى يقع فيها الجين من ٢٠مليون قاعدة إلى ٦٠٠الف قاعدة فقط وتسمى عملية تحديد مكان الجين بهذة الطريقة الكلونة الموضعية Positional Cloning (الشكل ١٤-١١) ولكى يتم تحديدالجين بدقة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

اكثر كان لابد من التعرف على جين BRCA1 من بين ٦٠ جين الموجودة فـــي المنطقة المكونة من ٦٠٠الف قاعدة.



الشكل (١٤-١١) : الخريطة الوراثية الفيزيائية لجين سرطان الثدي. تم وضع الجين مبدئيا في قطعة طولها ميجا قاعدة على الكرموسوم رقم ١٧ وأدت تجارب الرسم الإضافي للخريطة إلى تضيق هذه المسافة إلى منطقة طولها ٦٠٠كيلو قاعدة محاطة بموقعين سبق تعريفها على الخريطة وهما D17S1321 وD17S1325 وتم في النهاية تحديد جين BRCA1 على الكرموسوم ١٧ وذلك بعد دراسة تحليلات تتابعات التعبير

ويمكن إستخدام واحدة أو أكثر مـــن التقنيـــات التاليـــة للوصـــول إلـــى هذا الهدف:

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

١- إستخدام cDNA (RT-PCR) المتحصل عليه من إستخلاص mRNA من أنسجة مختلفة وإجراء تجارب Hybridization Probing. فقد تبين مثلا أن جين BRCA1 يمكن أن يتهجن مع د ن أ من نسيج الثدى و أيضا مع RNA من المبيض و قد وجد إرتباط بين الاصابة بسرطان المبيض وسرطان الثدى.

٢- تحليلات Southern باستخدام د ن أ مستخلص من أنواع مختلفة Species (وتسمى Zooblots) على اعتبار أن أى جين هام فى الانسان ممكن أن يكون له مثيل متطابق معه نسبيا فى الثدييات الآخرى بحيث يمكن التعرف عليه بالكشف بالتهجين Hybridization Probing باستخدام الواسمات المناسبة.

٣- يمكن مقارنة تحليلات التتابعات النيوكلتيديه فى افراد سليمه وافراد مصابة لمعرفة إذا كان الجين فى الافراد المصابة يحتوى على طفرات قد توضح سبب حدوث المرض فيهم.

٤- للتحقق من هوية للجين المحتمل Candidate Gene ، قد يتم إجراء تجارب إسكات تعبير الجين Gene Silincing (امابحذفه) Gene Knockout فى الفئران أو القضاء عليه Gene Knockdown (siRNA) كما سبق، ومتابعة ظهور أعراض مرضية على الفأر مشابهة لما يحدث للمرضى البشريين للحكم على إذا ما كان هذا الجين هو بالفعل الجين المطلوب.

و قد أدى إستخدام هذة التحليلات على المنطقة المحتوية على جين سرطان الثدى إلى تحديد جين بطول ١٠٠ك قاعدة مكون من ٢٢إكسون و يشفر لبروتين بطول ١٨٦٣ حامض أميني والذى يعد جين محتمل قوى للجين BRCA1. وقد وجدت نسخ من هذا الجين بالفعل فى أنسجة الثدى والمبيض

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ووجدت متشابهات له فى الفئران والجرذان والارانب والاغنام والخنازير (Zooblots).

وقد تبين وجود عدد من الطفرات (مثل طفرات تحريك الاطار Frame Shift وطفرات عديمة المعنى None Sense) فى العائلات الحساسة للاصابة مما يؤدى إلى إنتاج بروتينات غير فعالة مما يسبب الاصابة بالسرطان. وقد أجمعت هذة النتائج على أن هذا الجين BRCA1 هو المسؤل عن سرطان الثدى.

العلاج بالجينات Gene Therapy:

تهدف عملية العلاج بالجينات إلى محاولة التوصل إلى الشفاء من مرض وراثى بإعطاء المريض نسخة سليمة من الجين المعيب. وقد إتسعت طرق العلاج بالجينات لتشمل محاولات لعلاج أى مرض عن طريق إدخال جين مكلون للمريض و توجد طريقتين أساسيتين للعلاج بالجينات:

<u>الأولى</u> : علاج الخلايا الجرثومية (التناسلية) Germline Therapy.

والثانية: علاج الخلايا الجسدية Somatic Cell Therapy.

وفى العلاج الجرثومى Germline يتم إدخال نسخة من الجين السليم فى الخلية البيضية المخصبة بعملية الحقن المجهرى Microinjection ثم إعادة زرعها Reimplanted فى رحم الام. و إذا نجحت العملية فإن الجين سيتم تعبيره فى جميع الخلايا الناتجة عن إنقسام هذه الخلية الاولى والتى يتكون فيها فى النهاية جسم الفرد. ويعيب هذه الطريقة أنها تنطوى على جانب لا اخلاقى Immoral حيث لم تؤخذ موافقة Consent الفرد الناتج بهذة الطريقة على هذا الاجراء كما أنه قد يتسع إستخدام هذه الطريقة ليشمل جينات اخرى غير علاج

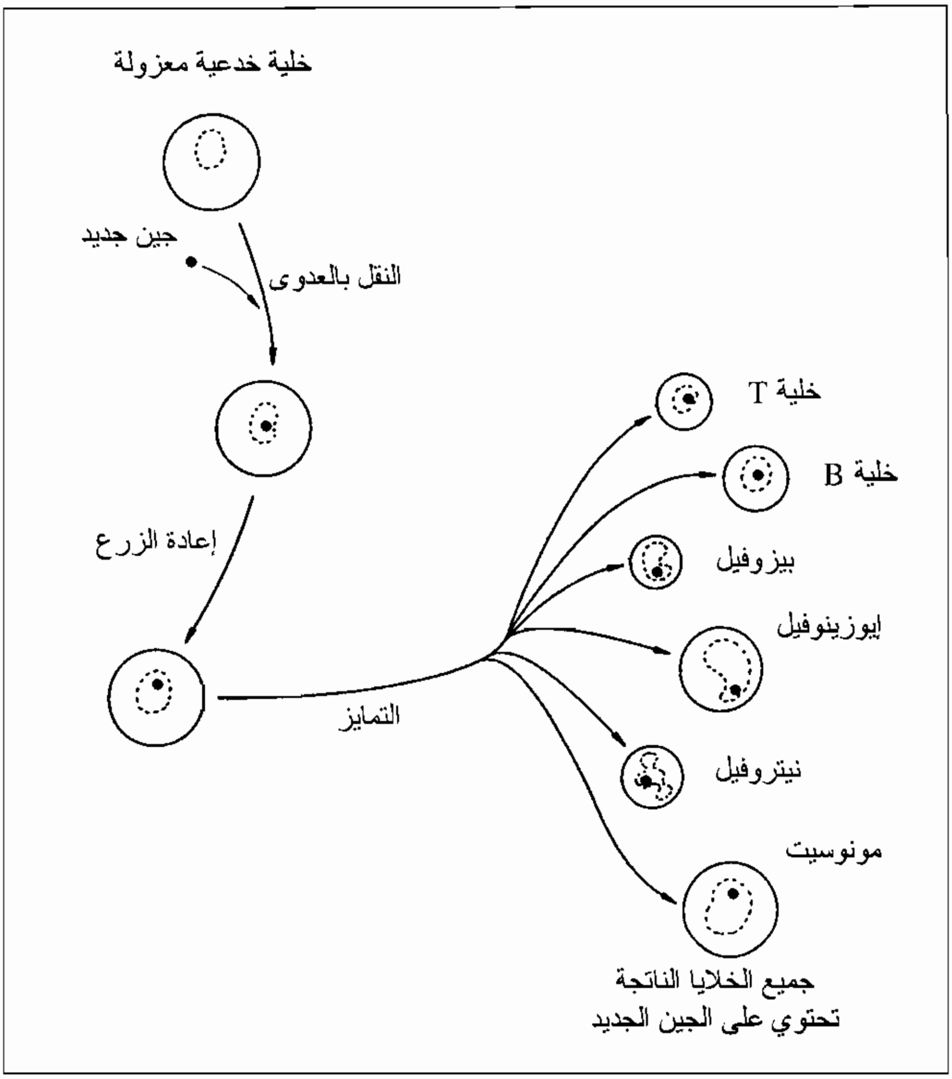
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الأمراض الوراثية مثل محاولة تجميع جينات سوبرمان فى شـــخص واحـــد أو تجميع صفات معينة مثل الذكاء الحاد أو التفوق الرياضى فى عـــشيرة بـــشرية معينة مما يعد نوعا من التفرقة العنصرية غير المرغوبة. لذلك فقد تـــم تحـــريم إستخدام هذة التقنية فى قانون حماية الجينيوم البشرى الذى أقرته الامم المتحـــدة فى أوائل التسعينات من القرن الماضى.

من جهة أخرى ينطوى العلاج بالجينات للخلايا الجسدية علـــى إســـتخدام الخلايا الجسدية ، حيث يتم أخذ عينة من النسيج الجسدى للفرد ويتم إدخال الجين المرغوب إلى هذه الخلايا معمليا ثم يعاد زرعها فى الجسم. وقد أعطـــت هـــذه الطريقة أمالا كبيرة خاصة فى علاج أمراض الدم الوراثيـــة مثـــل الهيموفيليـــا والثاليثميا. إذ يتم إدخال الجين فى الخلايا الجذعية Stem Cells من نخاع العظام والتى يؤدى إنقسامها إلى إنتاج جميع أنواع خلايا الدم المتخصصة.

وتتلخص الطريقة فى تحضير مستخلص من خلايا نخاع العظام يحتـــوى على عده بلايين من الخلايا و التى يتم إدخال الجين المكلون فيها بناقل تعبير من نوع ريتروفيروس Retrovirus-Based Vector ثم يعاد زرعها فى نخاع العظام. ويؤدى التكاثر والتمايز Differentiation فى هذة الخلايا إلـــى اكتـــساب جميـــع خلايا الدم الناضجه لهذا الجين المرغوب (الـــشكل١٤-١٢) كمـــا تبـــشر هـــذه الطريقة فى علاج أمراض الرئة مثل التليف الحويصلى Cystic Fibrosis بإدخال الجين المكلون فـــى ادينـــوفيروس Adenovirus أو فـــى حبيبـــات الليبوســـوم Liposomes بحيث تستخدم "بخاخة" Inhaler لتوصيلها إلى الخلايا الطلائية فى الرئة، إلا أن التعبير الجيينى يكون قصير الامد ولا يزيد تـــأثيره عـــن أســـابيع قليلة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٤-١٢): يؤدى تمايز الخلايا الجذعية Stem Cells المحولة وراثيا إلى تعبير الجين الجديد فى جميع أنواع خلايا الدم الناضجة

ومن جهة أخرى أمكن إستخدام العلاج بالجينات فى عام ١٩٩٠ فى علاج فتاة كانت تعانى من مرض نقص المناعة الشديد Severe Combined

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Immunodificieny Syndrome (SCID) وينتج عن الاصابة بهـذا المـرض أن تتوقف وظائف الجهاز المناعى ويموت المصاب عند تعرضه لاى عدوى ولـو بسيطة لانعدام قدرته على المقاومة. و قد تبين أن أحد الطفرات الرئيسية التـى تسبب SCID تحدث فى الجين المشفر لانزيم أدينوسين دى أمينيـز Adenosine Deaminase (ADA). وكانت أول خطوة فى العلاج الجينى لهذة الحالـة هـى فصل خلايا الدم البيضاء من نوع Tمن المريض و التى تقوم بدور رئيسى فـى الجهاز المناعى. و تخلط هذا الخلايا مع ريتووفيروس معدل وراثيـا ويحمـل النسخة الصحيحة من جين ADA. و ينقل الفيروس هذة النـسخة الفعالـة إلـى جينوم الخلايا و تتم تنمية خلايا T المعدلة وراثيا فى المعمل للتأكد من أن الجين المنقول يتم تعبيره. ثم يتم حقن المريض بحوالى بليون خلية Tالمعدلة. و بعدهذا العلاج إستمر مستوى بروتين ADA الطبيعى فى الطفلة فى حـوالى ٢٥-٣٠% من خلايا T وهى تعيش الأن حياة طبيعية.

العلاج الجينى للسرطان:

تنشأ معظم الاورام السرطانية نتيجة لحدوث طفرات تؤدى إما إلى تنشيط لبعض الجينات المسرطنة الاولية Protooncogenes مما يـؤدى إلـى تكـوين الأورام أو وقف نشاط Inactivation لأحد الجينات المثبطة للـسرطان Tumer Suppressor Genes والتى يؤدى نشاطها الطبيعى عادة إلى كبت تكوين الأورام السرطانية. ويمكن اللجوء إلى تقنية إدخـال Antisense RNA مـضاد المعنـى بحيث يكون مكملا لتتابعات الجين المسرطن فيوقف نـشاطه المـسرطن (وقـد إستحدثت مؤخرا تقنية أكثر فاعلية فى وقف نشاط الجين المستهدف وهى تقنيـة siRNA كما سبق شرحه) وفى حالة حدوث طفرة تؤدى إلى إيقاف نشاط الجين المثبط للسرطان فإن العلاج الجينى فى هذة الحالة ينطوى على إدخـال نـسخة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

صحيحة ونشطة من هذا الجين. إلا أن العقبة الرئيسية فى هذة الحالات تكمن فى صعوبة التوصل إلى الطريقة التى تضمن وصول الجين المكلون إلـــى الخلايـــا السرطانية والقضاء عليها دون غيرها من الخلايا الطبيعية. ومن الطرق الفعالة لعلاج أنواع كثيرة من السرطان إدخال جين يدمر الخلايا الـــسرطانية إنتقائيـــا Selectively.

وتوجد كثير من الجينات التى تشفر لبروتينات سامة ولاشـــك أن إدخـــال إحداهما بنجاح إلى الخلايا السرطانية سيؤدى إلى موتها وشفاء المريض. ولابد من التأكد من أن الجين المكلون الذى يشفر لهذا البروتين السام سيتجه فقط إلـــى الخلايا السرطانية بحيث لايقتل الخلايا السليمة مما يتطلب إستنباط نظـــم دقيقـــة لتوصيل هذة الجينات أو التوصل إلى وسيلة للتحقق من أن هـــذا الجـــين ســـيتم تعبيره فى الخلايا السرطانية فقط. ويمكن أن يتم ذلـــك بوضـــعه تحـــت تحكـــم برموتور متخصص ينشط فقط فى هذا النوع من الخلايا Tissue-Specific ومن الطرق المقترحة الأخرى إستخدام العلاج الجينى عن طريق رفع قدرة الجهـــاز المناعى فى قتل الخلايا السرطانية وربما يتم ذلك بكلونـــة جـــين يـــسبب بنـــاء انتجينات قوية على سطح الخلايا السرطانية مما يسمح بزيـــادة فاعليـــة خلايـــا الجهاز المناعى فى التعرف عليها وقتلها.

تشخيص ومسح العيوب الوراثية:

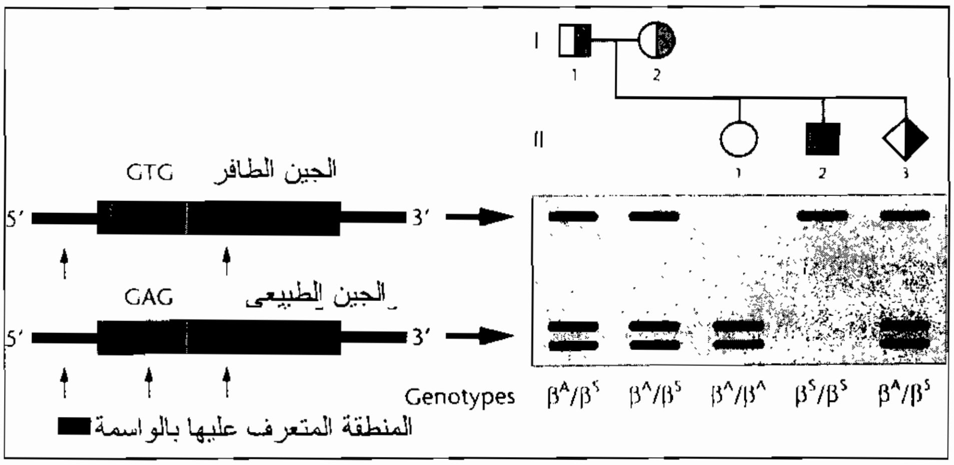
Diagnosis and Screening Of Genetic Disorders:

يتم تشخيص معظم الأمراض الوراثية قبل الولادة Prenatally. ومن أكثر الطرق إستخداما طريقتى البذل للسائل الأمنيوتى Amniocentesis أو أخذ عينـــة قسطرة Villus Sampling (CVS). فى الطريقة الأولـــى يـــتم ســـحب الـــسائل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الأمينوتى بسرنجة ويتم تحليل الخلايا للكشف عن حدوث خلل كروموســومى أو طفرة الجين الواحد. وفى طريقة (CVS) يتم إدخال أنبوب الأسطره أو البذل فى الرحم و تؤخذ عينة صغيرة من نسيج مــشيمه الجنــين. و تجــرى إختبــارات سيتووراثية Cytogenetic وبيوكيماوية ود ن أ المعاد صياغته على عينة النسيج. وقد أثبتت تحليلات د ن أ المعاد صياغته حساسية كبيرة ودرجة عالية من الدقة فى إكتشاف العيوب الوراثية. وقد أمكن تشخيص مرض الأنيميا المنجلية قبــل الولادة بهذه الطرق، ومعروف أن هذا المرض ينتج عن طفرة متنحية تؤدى إلى إستبدال حامض أمينى واحد فى بروتين ß-Globin نتيجة طفرة إستبدال لقاعــدة واحدة والتى تؤدى إلى غياب موقع القطع الانزيمــى القطــع المحــدد Mst II و Cvn1 مما يؤدى إلى تغير فى طراز RFLP لشظايا القطع المحددة. وتــستخدم الإختلافات فى طــراز RFLP لتــشخيص مــرض الانيميــا المنجليــة قبــل الولادة ولتحديد الطرز الوراثية للأباء والأفراد الآخــرين فــى العائلــة اللــذين قد يكونوا بتركيب وراثى خليط (حاملين للطفرة Carriers) لهذه الحالة (الــشكل ١٤-١٣).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الشكل (١٤-١٣): تشخيص مرض الأنيميا المنجلية بطريقة Southern تمثل الأسهم القصيرة مواقع القطع المحددة فى جين الجلوبين الطافر (βs). أدت طفرة فى نيوكلتيدة واحدة إلى غياب موقع القطع لأحد الإنزيمات ، مما يؤدى إلى إنتاج شظية واحدة طويلة فى الجيل. ينتج الجين الطبيعى (βA) شظيتين قصيرتين مع إنزيم MstII. وفى شجرة النسب يوجد بالعائلة إبنة واحدة غير مصابة أصيلة (βAβA) (II-1) وإبن مصاب (II-2) وجنين غير مصاب (II-3) يمكن قراءة الطرز الوراثية من الجيل مباشرة كما هو مبين أسفل الشكل

إستخدام البصمة الوراثية فى الأمور الشرعية (القضائية):

Forensic Applications of DNA Fingerprints

أصبح إستخدام البصمة الوراثية الوراثية من الأمور الهامة التى يلجأ إليها القضاء لاتخاذها كدليل لبراءة أو إدانة المتهمون أمام ألمحاكم كما أنها تستخدم فى مجالات آخرى كثيرة مثل قضايا الهجرة والنزاع علـى الأبـوة وغيرهـا. وتستخدم فى هذة الطريقة تقنية التهجين بالواسمات مـن نـوع Microsatellites نظرا لدقتها. ويبين الشكل (١٤-١٤) بصمة د ن أ لقضية تم اخذ عينات دم من فردين أحدهما المتهم وعمل مطابقة بين طرز بصمات د ن أ مع تلك الناتجة من بقع دم وجدت فى مكان الجريمة.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الشكل (١٤-١٤): البصمة الوراثية الجزيئية DNA Fingerprinting فى قضية شرعية (قضائية). تتطابق بصمة د ن أ للمتهم (المشتبه به) رقم (٢) (S2) مع تلك الناتجة من عينة الدم المأخوذة من موقع الجريمة (E)

إستخدام تكنولوجيا الجين فى الزراعة:

Gene Cloning and DNA Analysis in Agriculture

إستخدم تكنولوجيا الجين فى النبات:

لاشك أن الطرق التقليدية لتربية النبات على مدى القرنين الماضيين قد أدت إلى إستنباط أصناف نباتية عالية المحصول وتتميز بصفات جودة عالية ومقاومة للأمراض والحشرات. إلا أن معظم برامج التربية التقليدية تعتمد بشكل كبير على عنصر الصدفة فى الحصول على إتحادات جديدة فى النسل أو الهجن الناتجة من التلقيح بين الأباء. كما أن إستنباط صنف جديد يستغرق عادة وقتا طويلا قد يصل إلى اكثر من عشر سنوات. وفضلا عن ذلك فإن مربى النبات عادة ما يشكو من وجود تلازم عكسى بين صفات جودة المحصول فى نبات ما وبين كمية هذا المحصول.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ولذلك تقدم تكنولوجيا الجين إسلوبا متطورا فى تربية النبات حيث يمكن من خلالها إحداث تغيرات موجهة و محددة فى الطرز الوراثية للنبات بدلا من الإعتماد على الصدفة. كما أنها تتميز بإختصار كبير فى الوقت والمجهود يصل إلى نصف الوقت الذى تتطلبه طرق التربية التقليدية.

وتستخدم إستراتيجتين رئيستين لتكنولوجيا الجين فى النبات:

١- إضافة الجين Gene Addition حيث تستخدم كلونة الجين لتغيير بعض الصفات النباتيه بإدخال جين أو جينات جديدة مسؤله عن تحسين هذه الصفات.

٢- طرح (حذف) الجين Gene Subtraction: ويؤدى إستخدام تكنولوجيا الجين فيها إلى إيقاف نشاط جين أو أكثر داخل النبات.

أولا: إضافه الجين:

إنتاج نباتات مقاومة للحشرات:

أدت المخاوف الناجمة عن التوسع فى إستخدام المبيدات الكيماوية إلى إتجاه العلماء إلى تبنى إستراتيجية إستنباط أصناف من نباتات المحاصيل الحقلية كالذرة والقطن وغيرها ذات مقاومة ذاتية للحشرات بإدخال جين يشفر لبروتين سام بحيث تؤدى تغذية الحشرة عليه إلى هلاكها دون أن يؤثر ذلك على النبات نفسه. ومن أهم الجينات التى إستخدمت فى هذا المجال جين δ Endotoxin الموجود فى جينوم بكتيريا *Bacillus thuringiensis* والذى يطلق عليه Bt جين.

وقد وجد أن البروتين الذى يشفر له هذا الجين تصل درجة سميته إلى ٨٠ ألف ضعف سمية المبيدات الكيماوية كما أنه يتميز بأنه إنتقائى Selective بمعنى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وجود سلالات بكتيرية مختلفة يتخصص كل منها فى بروتينات فعالة ضد يرقات مجموعات معينة من الحشرا ت (الجدول ١٤-٢).

الجدول (١٤- ٢) التخصص النوعى للبروتينات المنتجة من سلالات بكتيريا Bt فى مقاومة لبعض أنواع الحشرات المختلفة:

السلالة	الحشرات المتأثرة
Cry I	يرقات حرشفية الأجنحة Lepidoptera
Cry II	يرقات حرشفية وثنائية الأجنحة Lepidoptera and Diptera
Cry III	يرقات حرشفية الأجنحة Lepidoptera
Cry VI	ثنائيه الأجنحة Diptera
Cry V	دودة النيماتودا Nematode
Cry VI	دودة النيماتودا Nematode

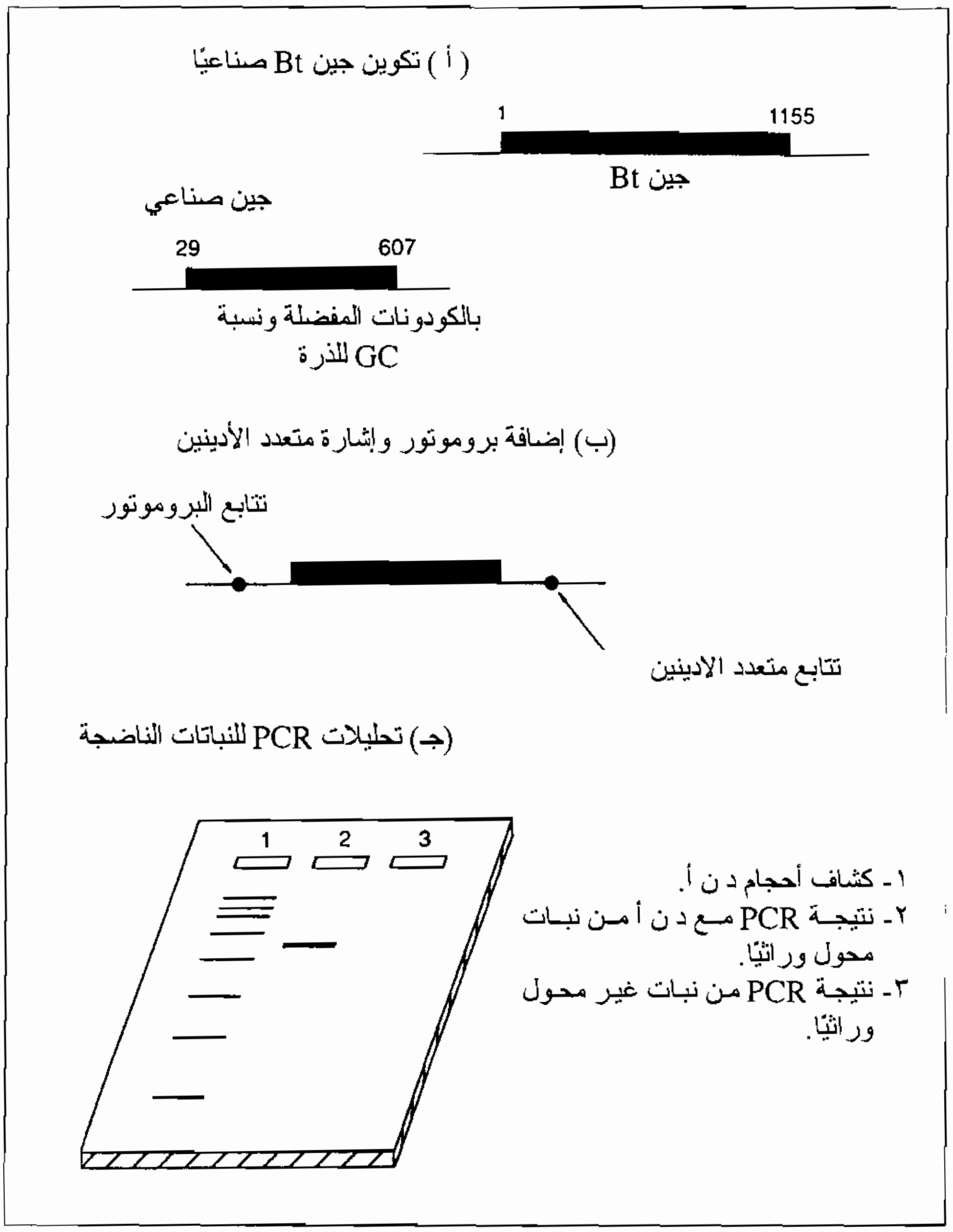
وقد أجريت محاولات ناجحة لإنتاج سموم Bt بكميات إقتصادية لإستخدامها عن طريق الرش كمبيدات حيوية Bioinsecticides فى محاولة لإستخدامها كمبيدات صديقة للبيئة (المثال المبيد AGRIN) إلا أنه نظرا لأنها تتحلل بسرعة Biodegradable مما يعنى ضرورة تكرار رشها على فترات متقاربة مما يزيد فى تكلفه المكافحة. لذلك إتجهت الدراسات إلى إستخدام تكنولوجيا الجين وهندسة البروتينات لتعديل تركيب البروتين السام لجعله أكثر ثباتا كما إهتمت الدراسات بنقل الجين إلى النبات بحيث يقوم النبات نفسه ببناء هذا البرتين السام. إستخدمت تقنية تكنولوجيا الجين فى نبات الذرة الشامية لمقاومة حشرة ثاقبات الذرة الأوربية European Corn Borer وقد إستخدمت السلالة Cry 1A(b) المنتجة للبروتين السام والتى تحتوى على ١١٥٥ حامض

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

امينى والتى تقع منطقة النشاط السمى فيها فى القطعة الواقعة بين الأحماض الأمينية رقم ٢٩ الى ٧٠٦.

وقد تم تعديل تركيب الجين ليكون أكثر فاعلية حيث تم بناء سلسلة من النيوكليتدات صناعيا تشمل الكودونات من ٢٩ إلى ٦٠٧ حيث تبين أنها كافية لإعطاء التعبير الكامل للسمية. كما روعى إستبدال الكودونات الموجودة فى الجين الأصلى بتلك المفضل إستخدامها فى نبات الذرة (Codon Bias) وتمت زيادة نسبة GC إلى٦٥ % بدلا من 38 % وأختير المستبدئ Prmoter القوى CaMV لقيادة التعبير الجينى. ويتم إدخال الجين المكلون فى أجنة نبات الذرة بقاذفة الجينات Microprojectile. وتمت تنمية هذة الأجنة إلى النبات الكامل وأجرى التحقق من حدوث التحول الوراثى بنجاح بتحليلات PCR (الشكل ١٤-١٥) وتأكد نجاح إنتاج البروتين السام بتحليلات النقل الغربى western blotting كما نجحت تجارب إختبار التأكد من أن نبات الذرة المحول وراثيا يستطيع بالفعل مقاومة ثاقبات الذرة: وقد أمكن إنتاج نباتات محاصيل أخرى محولة وراثيا بإدخال هذا الجين لمقاومة الحشرات ذاتيا ومنها القطن والأرز والبطاطس والطماطم وغيرها. كما لم يقتصر الأمر على إستخدام جين Bt لهذا الغرض بل إستخدمت بروتينات سامة أخرى من مصادر نباتية مثل مثبطات إنزيم البروتينيز Proteinase Inhibitors.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي



الشكل (١٤-١٥): الخطوات الرئيسية فى الطريقة المستخدمة للحصول على نباتات ذرة شامية مهندسة وراثيا يحدث فيها تعبير جين صناعى للبروتين السام δ-(βt).

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وقد أتسعت دائرة إستخدام تكنولوجيا الجين لإكساب نباتات المحاصيل المختلفة صفات جديدة لتحسين الجودة أو المحصول كما فى الجدول (١٤-٣).

الجدول (١٥-٢) بعض الأمثلة لإستخدام كلونة الجينات لإضافة جينات فى النبات

الجين	المصدر	الصفات الجديدة
إندوتوكسين δ	*B.thuringiensis*	المقاومة للحشرات
مثبطات البروتينيز	نباتcowpea	المقاومة للحشرات
كيتنيز	الأرز	مقاومة الفطريات
جلوكاينيز	البرسيم الحجازى	مقاومة الفطريات
البروتين المثبط للريبوسوم	الشعير	مقاومة الفطريات
أورنوثين كربوميثيل ترانسفيريز	*Pseudomonas Syringae*	مقاومة البكتيريا
إنزيم بلمره رن أ و هيليكيز	فيروس إلتفاف ورقه البطاطس	مقاومة الفيروس
ر ن أ التابع Satellite RNA	فيروسات متنوعة	مقاومة الفيروس
بروتين غطاء الفيروس	فيروسات متنوعة	مقاومة الفيروس
'5'-2 Oligoadenylate Synthetase	الفأر	مقاومة الفيروس
Acetolactate Synthase	نبات الدخان(التبغ)	مقاومة الحشائش
Phosphinothericin Acetyl transferase	أنواع بكتيريا ستربتوميسيس Streptomysis	مقاومة الحشائش
DNA adenine methylase	بكتيريا القولون	العقم الذكرى فى النبات
البروتين الغنى فى حامض الميثونين	الفول البرازيلىBrazil nuts	زيادة محتوى الكبريت
Aminocyclopropane Carpoxylic Acid Deaminase	أنواع مختلفة	تعديل نضج الثمار
Taumatin	*Thaumatococcus danelli*	زيادة الحلاوة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Acyl Carrier Protein Thioesterase	*Umbellularia californica*	تعديل محتوى النبات من الزيوت و الدهون
Delta-12desaturase	فول الصويا	تعديل محتوى النبات من الزيوت و الدهون
HVA-1	الشعير	تحمل الإجهاد البيئى
Cpy /SacB	الخميره	الجفاف فى القمح
MtLD	بكتيريا	تحمل الجفاف
HAL-1	الخميرة	تحمل الجفاف والملوحة (فىالطماطم و القمح)
d a p A	بكتيريا	زيادة محتوى حامض الليسين فى فول الصويا

ثانيًا: الطرح الجينى Gene Subtraction:

إن المقصود هنا ليس حذف الجين أو إزالته ولكن إيقاف نشاطه فى خلايا النبات الحـى. ويعـد إسـتخدام تقنيـة م ر ن أ مـضاد المعنـى Antisense Technology من أكثر التقنيات نجاحا والتى أدت إلى إنتاج نباتات محولة وراثيا تستخدم حاليا على نطاق تجارى.

إستخدام ر ن أ مضاد المعنى لتنظيم التعبير الجينى:
Antisense RNA and Regulation of Gene Expression:

تعتمد هذة الطريقة على بناء جزيئات من ر ن أ متكاملة فى التتابع مـع ر ن أ المراسل mRNA الناتج من نسخ جين معين . ويطلق على هذا الأخيـر اسم ر ن أ ذو المعنى Sense RNA نظرا لأنه يحمل الكودونات التى تتم قراءتها أثناء عملية الترجمة لإنتاج بروتين فعال يحتوى على تتابع نوعى من الأحماض الأمينية . ومن جهة أخرى يطلق على النـسخة المكملـة مـن ر ن أ (مـضاد

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المعنى) Anti Sense نظرًا لأن تتابع النيوكلتيدات بها يكون معكــوس بالنــسبة للتتابع الموجود على النسخة الأصلية مما يترتب عليــه عــدم إمكــان قــراءة كودونات شفرية صحيحة وذات معنى بل تقرأ على أنها كودونات انهاء الترجمة فى أى اطار قراءة من الاطارات الثلاثة لها.

يؤدى وجود ر ن أ مضاد المعنى مع ر ن أ المراسل الطبيعــى لــنفس الجين فى سيتوسول الخلية إلى حدوث تجاذب نوعى بينهما بحيث ينــتج جــزئ مزدوج هجين من "م ر ن أ". وبديهى أنه لايمكن ترجمــة مثــل هــذا الجــزئ المزدوج مما يعنى عدم الحصول على النــاتج النهــائى لتعبيــر هــذا الجــين (البروتين) وبالتالى يكون بمقدورنا تحديد وظيفة هذا الجين.

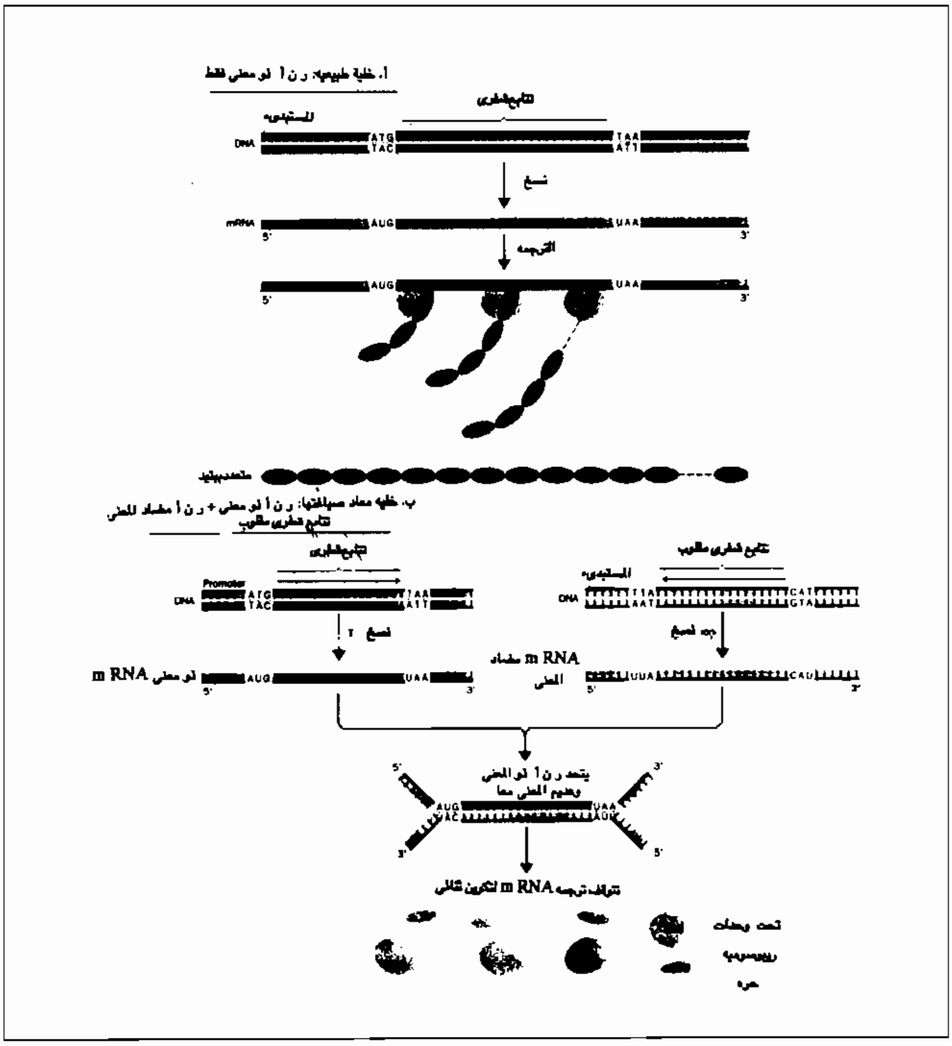
وتتلخص طريقة إنتاج ر ن أ مضاد المعنى لجين ما فى الخلية فى الآتى:

١- كلونة الجين المطلوب دراسته.
٢- فصل التتابع الشفرى للجين عن منطقة البروموتور الخاص به بإســتخدام انزيمات القطع المحددة المناسبة.
٣- إعادة إتحاد التتابع الشفرى للجين مع نفس البروموتور و٠لكن فى إتجــاه معكوس التتابع.
٤- إعادة إدخال هذا التتابع المعكوس المتحد بالبروموتور ؛ أى الجين المضاد المعنى ، إلى الخلية المضيفة بإحدى طرق التحول الوراثى.

ويبين الشكل (١٤-١٦) خطوات هذة العملية ونتائجها وتكون المحــصلة النهائية لهذة العملية هى أن الجين المعكوس التتابع سيتم نسخة إلى نــسخ مــن ر ن أ مضاد المعنى و هذه بدورها عند اصطدامها بالنــسخ الطبيعيــة ل ر ن أ

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

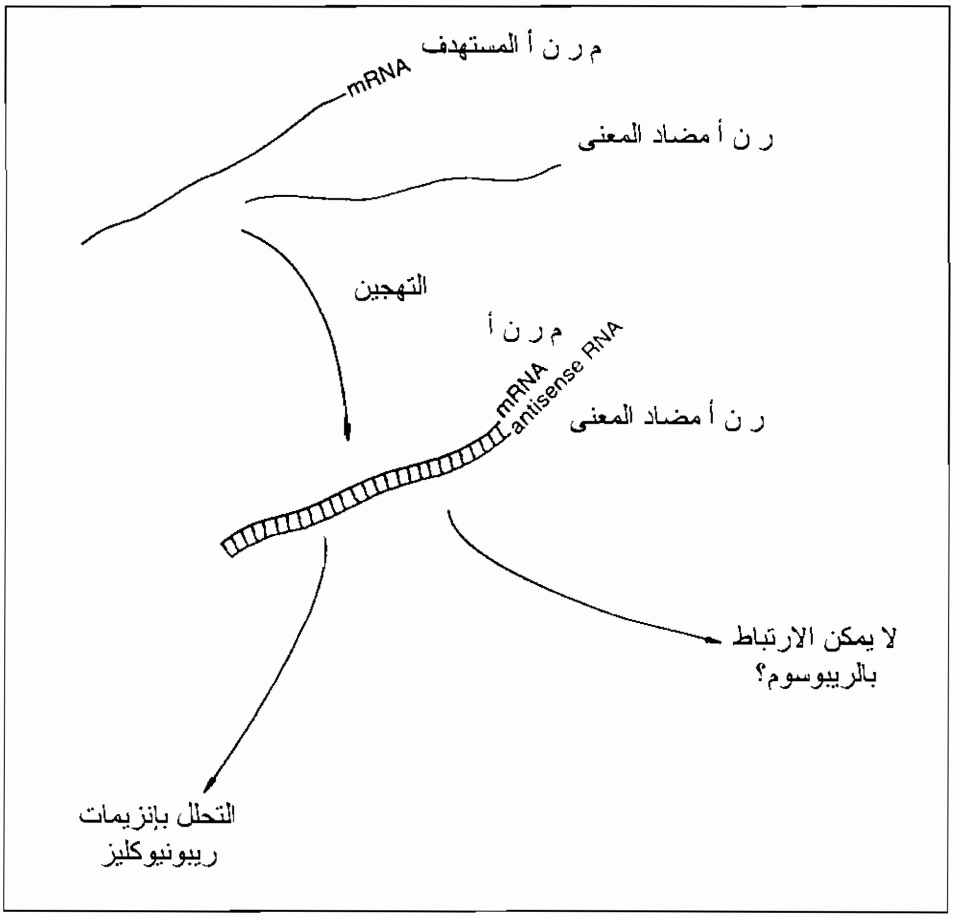
المراسل لنفس الجين (ذوالمعنى) تتزاوج معها مكونة جــزئ ر ن أ مــزدوج لا يمكن ترجمته مما يؤدى إلى توقف إنتاج البروتين الذى يشفر له هذا الجين.



الشكل (١٤-١٦): رسم تخطيطى لإستخدام تقنية ر ن أ مضاد المعنى لإيقاف التعبير الجينى: (إلى أعلى): خلية طبيعية يتم بها إنتاج سلسلة متعدد الببتيد بعمليتى النسخ والترجمة. (إلى أسفل): خلية محتوية على جين مضاد المعنى مع الجين الطبيعى مما يؤدى إلى تكوين جزىء مزدوج من م ر ن أ لا يمكن ترجمته وبذلك لاينتج بروتين لهذا الجين

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ويتلخص تفسير ميكانيكية ر ن أ مضاد المعنى فى وقف أو منع ترجمة mRNA إما إلى أن ر ن أ مزدوج السلسلة الناتج يحدث له تحلل سريع Rapid Degradation بواسطة إنزيمات ريبونيوكليزيز أو أن ر ن أ مضاد المعنى asRNA يمنع الريبوسومات من الارتباط مع م ر ن أ الفعال (الطبيعى) كما فى (الشكل ١٤-١٧).



الشكل (١٤-١٧): الميكانيكيات المقترحة لتثبيط تعبير الجين بواسطة ر ن أ مضاد المعنى Antisense RNA

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وقد تم إستخدام ر ن أ مضاد المعنى فى إيقاف تعبير عـــدد كبيـــر مـــن الجينات فى كل من غير مميزة النواة ومميزة النواة. وبالإضافة إلى إســـتخدامه فى إيقاف تعبير الجينات معروفة الوظيفة فإنه يمكن إستخدامه أيضا فى التعرف على وظيفة الجينات المجهولة الوظيفة.

إذ يمكن إستخدام ر ن أ مضاد المعنى فى إنتاج طفرات وظيفيـــة بحيـــث يعطى الشكل المظهرىالطافر للكائن الذى حدثت به هذه العملية معلومات هامـــة عن وظيفة الجين فى الخلية المتأثرة. ولكى نضمن الحصول على إيقـــاف تـــام للتعبير الجينى فإنه إما أن يستخدم بروموتور قوى جدا لدفع عملية نسخ التتـــابع الشفرى المعكوس أو أن يتم إدخال عدد كبير من نسخ ر ن أ مضاد المعنى إلى الخلية المضيفة. وقد تم مؤخرا تطوير هذه التقنيه بحيث أقتصر طـــول شـــظية asRNA على عدد محدود من التتابع النيوكلتيدى المكمل لمنطقة محفوظـــة فـــى ر ن أ الطبيعى لا تزيد عن ٢٥-٣٠ نيوكلتيدة إلاأنها تؤدى إلى نفس النتيجة.

إستخدام asRNA لإنتاج ثمار طماطم طويلة العمر:

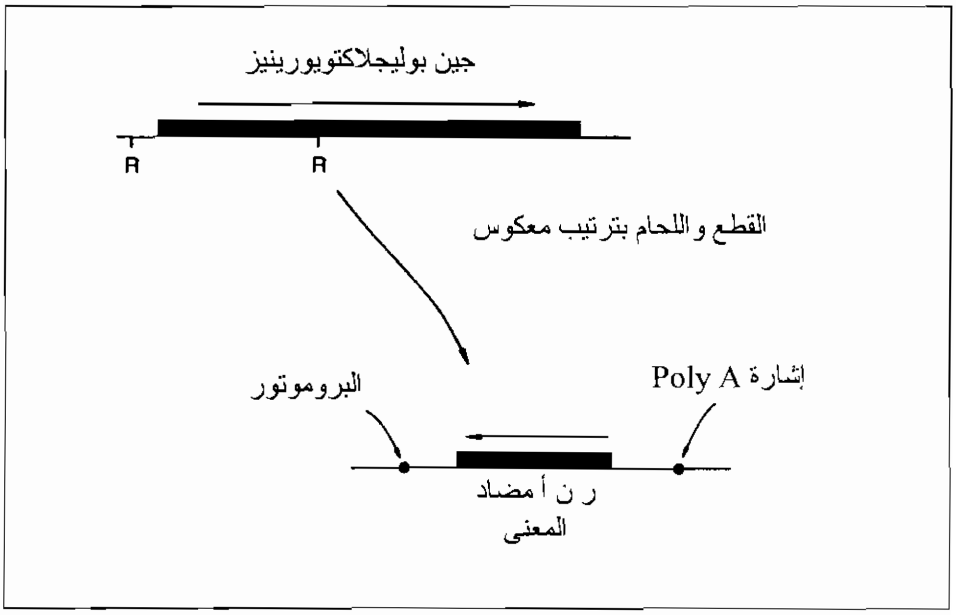
asRNA and The Engineering of Fruit Ripening in Tomato:

من المعروف أن ثمار الطماطم بعد النضج تكون قصيرة العمـــر وقابلـــة للتلف والعطب بعد ايام قليلة من قطفها وقد تبين أن أحد أسباب ذلك يرجع إلـــى نشاط إنزيم Polygalacturonase الذى يقوم بتحليل حامض Polygalactouronic من جدر خلايا الثمرة مما يؤدى إلى خفض صلابتها بالتدريج وينتهـــى الأمـــر بتلف أو عطب ثمار الطماطم وعدم صلاحيتها للاستخدام الآدمى.

ومن هنا نشأت فكرة وقف تعبير الجين المسؤل عن هذا الإنزيم بتقنيـــة asRNA مما يؤدى إلى إطالة عمرالثمار قبل فسادها.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ويبين الشكل (١٤-١٨) تكــوين جـــين Antisense Polygalactourinase حيث تم الحصول على شظية قطع محددة بطول ٧٣٠ قاعدة من النهاية '5 للجين الطبيعى للجلاكتويورينيز والذى يمثل حوالى نصف التتابع الشفرى الكامل.

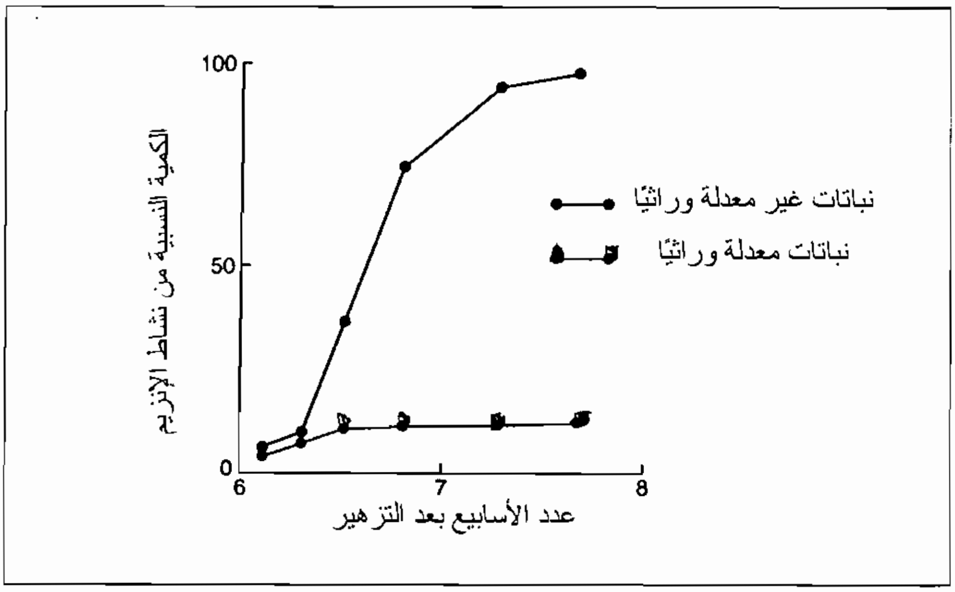


الشكل (١٤-١٨): تكوين ر ن أ مضاد المعنى للجين المشفر لإنزيم بوليجلا كتويورينيز Polygalactourinase فى الطماطم (R = موقع قطع محدد)

وتم عكس إتجاه هذة الشظية ووضعها مع برموتور CaMV عند بداية تتابع الشظية كما تم إضافة ذيل Poly A فى النهاية '3 لهذة الشظية و تمــت عمليــة التحول الوراثى بواسطة ناقل الكلونة pBIN19T١. وقد تم بالفعل بطرق الوراثة الجزيئية التحقق من دخول الجين وإنتاج نسخ asRNA. تم تقدير مستوى إنــزيم Polygalacturinase فى ثمار النبات المحولة ومقارنته بتلك الموجودة فى ثمــار النباتات غير المحولة (الطبيعية) حيث تبين أن مستوى بناءالإنزيم كان منخفضا

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

جدا فى النباتات المحولة وراثيا (الشكل١٤-١٩) والأهم مــن ذلــك أن ثمــار الطماطم المحولة وراثيا أمكن تخزينها لمدد طويلة قبل فسادها مما يدل على أن asRNA لم يوقف تماما تعبير جين Polyglacturinase إلا أنه أحدث خفض مؤثر فى التعبير الجينى مما أدى إلى تأخير فساد الثمار لفترة أطول.



الشكل (١٤-١٩): إختلاف نشاط إنزيم بوليجلا كتويورينيز بين ثمار الطماطم العادية وتلك التى يتم فيها تعبير م ر ن أ مضاد المعنى لنفس الجين

وكان أول صنف تجارى يتم تسويقه تجاريا بهذة التقنيــة هــو الــصنف Flavor Savor.

ويبين الجدول (١٤-٤) بعض الأمثلة لإستخدام asRNA فى تعديل بعض الصفات فى النبات.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الجدول (١٤-٤) بعض الأمثلة لإستخدام asRNA فى النبات

الجين المستهدف	الصفة المعدلة
polygalacturinase	تأخير فساد الثمار فى الطماطم
Aminocyclopropane carboxylic acid synthase	تعديل نضج الثمار فى الطماطم
Polyphenol oxidase	منع تشوه اللون discoloration فى الثمار والخضروات
Starch synthase	خفض محتوى النشا فى الخضروات
Delta-12 desaturase	زيادة نسبة حامض الأوليبيك فى فول الصويا
Chalcone synthase	تعديل ألوان الأزهار فى نباتات الزينه

الأمان الحيوى والكائنات المعدلة وراثيا Biosafety and GMO:

لاشك أن الكائنات المعدلة وراثيا سواء كانت نبات أو حيوان أو كائنات دقيقة قد ساهمت بشكل كبير فى تقديم كثير من الحلول غيرالتقليدية لمشاكل كثيرة سواء بالنسبة للامن الغذائى أو إنتاج مستحضرات دوائية أكثر فاعلية أو الحصول على لقاحات رخيصة وآمنة لعدد من الأمراض المعدية أو فى مقاومة الأفات الزراعية وغيرها. إلا أن البعض يرى أن إستخدام مثل هذه الكائنات المعدلة وراثيا ينطوى على بعض المخاطر. فمثلا فى حالة الطماطم المعدلة وراثيا Flavar Savor يستخدم ناقل تعبير محتوى على نسخة من المضاد الحيوى كاناميسين Kan^R كجين كشاف Marker Gene لمتابعة نجاح عملية التحول الوراثى Transformation وهذا المضاد الحيوى ذو مصدر بكتيرى ويشفر لإنزيم نيومايسين فوسفوترانسفيرير Neomycin Phosphotransferase ويوجد هذا الجين والإنزيم الناتج فى جميع خلايا النبات المعدل وراثيا. و قد برزت المخاوف من أن هذا الإنزيم قد يكون ضارا للانسان وعلى الرغم من أن هذه

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المخاوف لم يعد لها ما يبررها بعد أن ثبت عدم صحتها بتجارب عديدة على نماذج حيوانية إلا أنه مازالت هناك قضيتين متعلقتين بالأمان الحيوى بالنسبة للأغذية المعدلة وراثيا وهما:

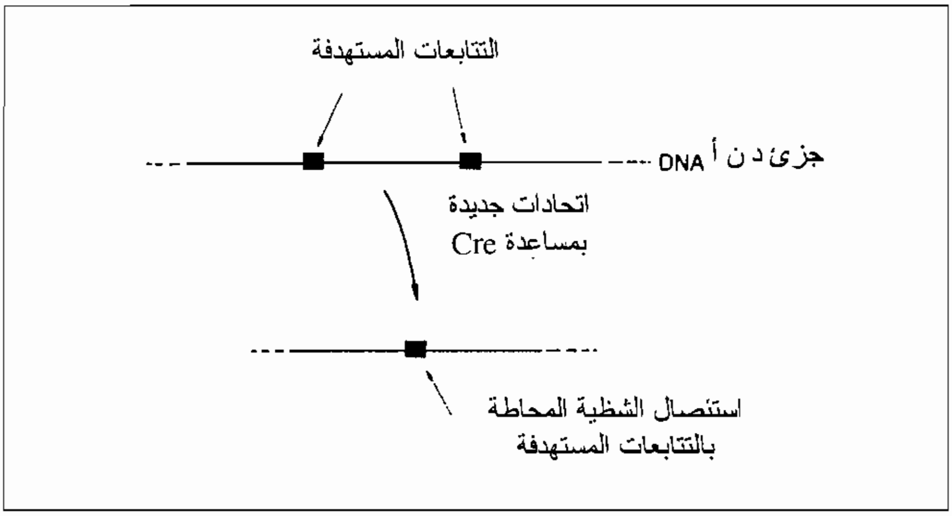
١- هل من الممكن لجين KanR الموجود فى هذة الأغذية أن ينتقل إلى البكتيريا الموجودة فى الجهاز الهضمى للانسان ويحولها إلى بكتيريا مقاومة للكاناميسين وغيره من المضادات الحيوية؟

٢- هل يمكن لجين KanR أن ينتقل إلى كائنات أخرى فى البيئة مما يؤدى إلى الإخلال بالنظام البيئىEcosystem؟

وحتى الآن مازال النقاش محتدما بين مؤيد ومعارض ، إلا أنه لو أخذنا فى الإعتبار أن عمليات الهضم ستؤدى إلى تحطيم و هدم كامل لجميع جينات Kan^R فى الغذاء المعدل وراثيا قبل أن تصل إلى الفلورا البكتيرية فى القناة الهضمية وأنه حتى لو لم يحدث هدم للجين فإن فرصة إنتقاله لبكتيريا ضئيلة جدا. إلا أن مستوى الخطورة لا يمكن أن يصل إلى الصفر بمعنى أنه لا يوجد معدل لإنعدام الخطوره تماما There is no zero risk factor وبالمثل وعلى الرغم من أن نتائج التجارب أفترضت أن زراعة النباتات المعدلة وراثيا سيكون لها تأثير ضئيل جدا على البيئة نظرا لأن جينات Kan^R شائعة بالفعل فى النظم البيئية الطبيعية إلا أن إمكان حدوث بعض الإختلالات المستقبلية غير المنظورة لايمكن إنكارها. وقد أدت هذة المخاوف من إستخدام Kan^R وغيره من المضادات الحيوية إلى استنباط طرق للتخلص من هذه الجينات م د ن أ النبات بعد التحقق من نجاح عملية التحول الوراثى.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويستخدم فى إحدى التقنيات إنزيم مصدره بكتريوفاج p1 ويسمى Cre والذى يؤدى نشاطه إلى إستئصال شظية د ن أ المحاطه من طرفيها بتتابع تابع التعرف Recognition Sequence مكون من ٣٤ قاعدة (الشكل ١٤-٢٠) وفى هذة الحالة يتم إدخال نوعين من ناقلات التعبير إلى خلايا النبات بحيث يكون الأول محتويا على الجين المرغوب و معه الجين الكشاف Kan^R محاطا بتتابع التعرف Cre بينما يحتوى الناقل Vector الثانى على جين Cre. وبعد التحول الوراثى، سيؤدى تعبير جين Cre إلى إستئصال جين Kan^R من د ن أ النبات المحول.



الشكل (١٤-٢٠): إستئصال د ن أ بواسطة إنزيم Cre ريكومبينيز Recombinase

المخاطر المحتملة على البيئة:

هناك أيضا مخاوف من تأثير إستخدام GMO على البيئة وقد برزت هذه المخاوف بصفة خاصة عند إنتاج نباتات معدلة وراثيا ومقاومة للفيروس إذ أنه فى مثل هذه الحالة تستخدم الجينات المشفرة للغطاء البروتينى للفيروس

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الممرض. ولا يؤدى تعبير هذه الجينات إلى ظهور أعراض مرضية ولكنه يعطى النبات بعض الحماية من الإصابة بالفيروس الحى.

وهناك مخاوف من أن النبات الذى يبنى بروتين غطاء فيروسى ممرض ربما يهاجم نوع اخر من الفيروس والذى قد يؤدى تكاثره إلى إنتاج نسل هجينى يحتوى على جنيوم الفيروس المعدى معبأ فى الغطاء البروتينى الذى يبنيه النبات. وقد يكون النسل الهجينى محتويا على صفات خطرة وغير متوقعة. فمثلا من الممكن لبروتين الغطاء الجديد أن يوسع مدى العوائل Host Range للفيروس الثانى مما يمكنه من إصابة نباتات جديدة كانت مقاومة أصلا للمرض الناتج.

كما أن هناك مخاوف حول ما إذا كان الجين المكلون فى النبات المحول يمكنه الهروب "Escape" والإنتقال إلى نباتات برية وإذا حدث ذلك فما هى حجم المخاطر المحتملة على النظام البيئى من جراء ذلك.

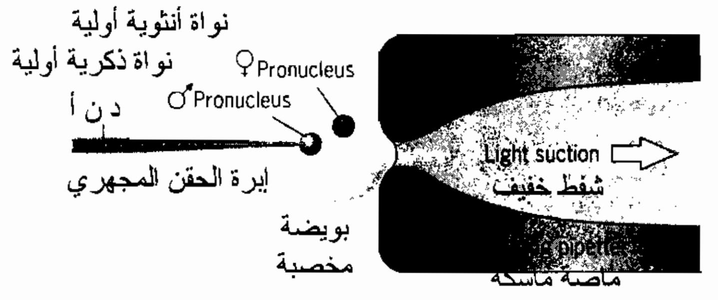
وهناك الكثيرمن البحوث التى تجرى حاليا لإعطاء إجابات كافية لمثل هذه الأسئلة وغيرها سواء بالنسبة لحماية البيئه تحت إشراف وكاله حماية البيئة Environanental Protection Agency (EPA) أو بالنسبة للأغذية المعدلة وراثيا تحت إشراف هيئة الغذاء و الدواء Food and Drug Administration (FDA).

الحيوانات المعدلة وراثيا Transgenic Animals:

تستخدم تقنية الحقن المجهرى Microinjection كطريقة أساسية فى نقل الجينات المرغوبة إلى نواة الخلية البيضية الاولية للزيجوت (الشكل ١٤-٢١). وقد أجريت تجارب كثيرة على التحول الوراثى فى الفأر بإعتباره حيوان معملى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

متميز حيث يستخدم كأداة لدراسة التعبير الجينى فى الثدييات و لإختبار مختلف ناقلات الكلونة و التعبير والطرق المحتملة لإستخدامها فى الإنسان.



الشكل (١٤-٢١): إنتاج حيوانات محولة وراثيا بالحقن المجهرى لجزئ د ن أ فى بويضات مخصبة

وقد تمت دراسة المئات من الجينات البشرية والتى تم نقلها إلى الفأر حيث تبين فى معظم الحالات أن الجينات المنقولة Transgenes أظهرت طرز طبيعية للتوريث مما يدل على أنه قد تم إيلاجها فى جينوم العائل.

ومن التجارب الرائدة فى هذا الشأن دراسة تأثير كلونة جين هرمون النمو البشرى على زيادة نمو الفأر المحول وراثيا (الشكل١٤-٢٢) وقد شجعت هــذة النتائج مربى الحيوان على محاولة إدخال هرمون النمو إلى حيوانات المزرعــة بغرض زيادة إنتاج اللحم فيها.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الشكل (١٤-٢٢): أر محول وراثيا (إلى اليسار) يحمل الجين الكيميرى لهرمون النمو البشرى حيث يبلغ حجمه ضعف حجم فأر المقارنة غيرالمحول وراثيا (إلى اليمين)

وقد تم إنتاج خنازير معدلة وراثيا بجين هرمون النمو على أمل أن زيادة مستوى هرمون النمو قد يؤدى إلى تحسين صفات اللحم وزيادة معـــدل النمـــو. كما تمت نفس المحاولات فى الأسماك والدواجن لنفس الغرض. وقـــد أظهـــرت نتائج الخنازير المعدلة وراثيا أنه لم تطرأ زيادة فى معدل النمو عند التغذية على العليقة القياسية ، إلا أنها إرتفعت عند التغذية على عليقة غنية فـــى البـــروتين. إلا أن الخنازير الناتجة تميزت بتحسن صفات اللحم ، نظرا لأن هرمون النمـــو يفضل بناء البروتينات بدلا من الدهون. ومن جهة أخرى ظهرت أثـــار جانبيـــة غير مرغوبة فى هذه الحيوانات نتيجة لزيادة هرمون النمـــو إذ كانـــت الإنـــاث

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

عقيمة كما أن الخنازير المعدلة من الجنسين تميزت بضعف العضلات وعدم القدرة على الحركة لثقل وزنها و تعرضها للأمراض.

وعلى الرغم من أن العلماء ما زالوا يحاولون التغلب على المشاكل الناجمة عن زيادة هرمون النمو فى الحيوانات المزرعية إلا أنه لم يثبت حتى الآن أن مثل هذه الطريقة قد تكون غير فعالة فى زيادة إنتاج اللحم. وتجرى حاليا اختبارات على حيوانات معدلة وراثيا لمقاومة الأمراض الفيروسية ومن هذه الأمراض مرض الدواجن Avian Leukosis Virus (ALV) والذى يسبب خسائر كبيرة فى مزارع الدواجن.

وكما سبق القول فقد إستخدمت الحيوانات المعدلة وراثيا كالأغنام والأبقار لإنتاج بعض البروتينات المرغوبة وإفرازها فى اللبن.

تكنولوجيا الجين والأخلاقيات Gene Technology and Ethics:

أدى التقدم الهائل الذى نتج عن إستخدام تكنولوجيا الجين سواء فى مجال المسح الوراثى والإستشاره الوراثية أو الإختبارات الخاصة بالكشف عن العيوب الوراثية وكذلك إمكان إستخدام تكنولوجيا الجين فى العلاج بالجينات إلى ظهور بعض القضايا الهامة المتعلقة بالأخلاقيات Ethics ووضع خطوط فاصلة بين ما هو جائز أخلاقيا وما هو مرفوض تماما.

الإختبارات الوراثية والأخلاقيات Genetic Testing and Ethics:

تشتمل الإختبارات الوراثية على نوعين من الإختبارات: التشخيص ما قبل الولادة Prenatal Diagnosis والمسح Screening للأفراد الحاملة الخليطة لطفرة متنحية Genetic Carriers. كما يمكن للأختبارات الوراثية التنبؤ بإحتمال ظهور

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مرض وراثى Risk of Disease وبالتالى تحديد الأفراد التى تبدو طبيعية حاليـــا ولكن الإحتمال عالى فى أن يصاب بمرض وراثى فى المستقبل. ونظرا للتقــدم التكنولـــوجى المـــستمر خاصـــة فـــى مجـــال تقنيـــة DNA Microarray فإنه يمكن إختبار ٥٠-١٠٠ مرض فى وقت واحد والتى تشمل أمراضا كثيـــرة التى قد لا تعرف إلا بعد مرور سنوات كثيرة. وسوف يؤثر هذا التقدم بدرجـــة كبيرة على صحتنا وطرز التكاثر والرعاية الطبية. ومـــن جهـــة أخـــرى فـــإن إستخدام هذة التقنيات ستؤدى إلى ظهور قضايا قانونية وإجتماعية وأخلاقية مـــن الصعب حلها.

فمثلا ما الذى يجب أن يعرفه الفرد قبل أن يقرر الموافقة علـــى إجـــراء إختبار أو فحص وراثى؟ وكيف يمكننا حماية سرية المعلومات الناتجة عن هـــذه الإختبارات؟ وكيـــف يمكننـــا تعريـــف و منـــع التفرقـــة الوراثيـــة Genetic Discrimination؟

وبالنسبة للتفرقة الوراثية، فهل يحق إتخاذ نتائج الإختبار الـــوراثى ضـــد الأفراد التى تبين أن إحتمال الخطورة المستقبلية لظهور مرض ما فيها مرتفـــع سواء فى مجال الوظائف أو التامين على الحياة؟

ومن المعروف أن الأنيميا المنجلية فى الأفراد الحاملة الخليطة تؤدى إلى مقاومة الملاريا فى هؤلاء الأفراد وقد يكون ذلك صحيحا فى بعض الأمـــراض الوراثية الآخرى.

فكيف نحمى مثل هذة المزايا للطفرات فى الوقت الذى نحاول فيه التخلص من الجوانب المدمرة لها؟

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

لذلك يجب أن تتم مدوالات و مناقشات واسعة يشارك فيها الجمهور العادى مع العلماء المتخصصين للوصول إلى صيغة أخلاقية مقبولة من الجميع.

وقد إنبثقت لجنة من لجان مشروع الجينوم البشرى مهتمة بهذا الشأن وتسمى لجنة Ethical, Legal and Social Implications (ELSI) مهمتها تحديدالقضايا المتعلقة بالإختبارات الوراثية.

وتختص هذة اللجنة بإصدار التوصيات لتقديمها إلى صانعى القرار ورجال القانون حفاظا على مزايا الإختبارات الوراثية مع التقليل أو إستبعاد المخاطر المحتملة وفضلا عن ذلك فقد تشكلت مجموعات آخرى مكونة من العلماء والمتخصصين فى مجال الرعاية الصحية والقانونيين والمهتمين بأخلاقيات المهنة والمستهلكين لمناقشة هذة القضايا وتكوين رأى عام حولها.

القضايا الأخلاقية و العلاج بالجينات:

Ehical Issues in Gene Therapy:

لاشك أن العلاج بالجينات ينطوى على قضايا أخلاقية كثيرة ويعد مصدرا لمناقشات حامية ولذلك فإن العلاج بالجينات قد أقتصر حاليا على إستخدام الخلايا الجسدية Somatic Cells كهدف للنقل الجينى. وتوجد ضوابط أخلاقية صارمة لإستخدام العلاج الجينى بحيث يسبق العلاج سلسلة من التجارب والمراجعات على مستويات متعددة ويتم إخبار المريض وتوعيته مسبقا بما يمكن أن ينتج عن العلاج سواء سلبا أو إيجابا.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وقد وضعت ضوابط جديدة لضمان حماية أكثر للمريض. ويتم التنسيق مع الوكالات الحكومية المنظمة لتجارب العلاج بالجينات. ويطلق على نقل الجينات إلى الخلايا الجسدية إسم علاج الخلايـا الجـسدية بالجينـات Somatic Gene Therapy. وفى هذا النوع من العلاج تكون النتائج المترتبة عليه قاصرة علـى الشخص المعالج فقط وبموافقة صريحة منه بعد إبلاغـه بأبعـاد هـذا العـلاج وتوعيته بكافة الإحتمالات الناتجة عن هذا العلاج.

وهناك نوعين آخرين من العلاج بالجينات لم تتم الموافقة عليهمـا نظـرًا لأنها تنطوى على قضايا أخلاقية هامة.

ويسمى النوع الأول علاج الخلايا الجرثوميـة (التناسـلية) Germ-Line Therapy حيث تكون الخلايا التناسلية (الحيوانات المنوية أو البويضة) هدفا للنقل الجينى وفى هذة الحالة فإن د ن أ المصحح للخطأ الوراثى سيصل إلـى جميـع خلايا الفرد (النسل) الناتج من الجاميطات المعدلة وراثيا بما فى ذلـك الخلايـا الجرثومية. ومعنى ذلك أن أفراد آخرين فى الأجيال القادمة يمكن أن تتأثر بهذا العلاج بدون سابق موافقتهم فهل يعد هذا عملا أخلاقيا؟ هل نملك الحق لإتخـاذ هذا القرار للأجيال المقبلة؟ و لذلك فقد تم تحريم مثل هذة البحوث.

ويطلق على النـوع الثـانى العـلاج الجينـى التحفيـزى (التحـسينى) Enhancement Gene Therapy وهو ينطوى على مشاكل وقضايا أخلاقية أخطر من سابقيه. وفى هذا النوع يمكن رفع إمكانات الفرد بالنـسبة لـصفات معينـة مرغوبة ويعارض هذا الإتجاه قطاعات كبيرة من المجتمع. فمثلا لـو أن هـذه الجينات أمكن تحديدها وكلونتها فهل يمكن إستخدامها لزيادة طول الفرد أو زيادة القدرات الرياضية أو زيادة القدرات العقلية (الذكاء)؟ لذلك فقد تـم وقـف أى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بحوث فى هذا الشأن إلى أن يتم مناقشة القضايا الأخلاقية المرتبطة بنتائجها المحتملة.

التاثيرالسلبى لتكنولوجيا الجين على الدول النامية:

إن التأثيرالمحتمل لتطبيقات تكنولوجيا الجين على الدول النامية محل جدل واسع النطاق.

وتوجد ثلاث مخاوف رئيسية محتملة من هذا التطبيقات:

١- قلة التمويل للمشاريع البحثية عالية التكلفة والخاصة بتكنولوجيا الجين بالنسبة للمناطق الإستوائية الهامة فى الدول النامية والتى ليس لها قيمة تسويقية تذكرفى الدول المتقدمة. ويعتبر محصول نبات الكسافا أحد هذة الأمثلة حيث يعتبر ثالث أهم محصول يزرع فى المناطق الإستوائية ، ويعد الغذاء الرئيسى لأكثر من ٥٠٠ مليون نسمة وخاصة فى المناطق الريفية الفقيرة فى إفريقيا الإستوائية ، إلا أنه يعد من المحاصيل "اليتيمة" نظرا لأن نصيب المشاريع البحثية التى تجرى عليه من التمويل الدولى ضئيلة جدا.

٢- هناك مخاوف من أن بعض المنتجات التى تنتج فى الدول النامية ستخضع لمشاريع تطبيقات تكنولوجيا الجين فى الدول المتقدمة بحيث تستطيع الدول المتقدمة إنتاجها مما يؤدى إلى حرمان الدول النامية ذات الإقتصاد الضعيف من مصدر أساسى للدخل الناتج عن تصدير هذه المنتجات ومثال ذلك إنتاج حامض اللوريك Lauric Acid فى نبات الكانولا المعدل وراثيا والذى يزرع فى أمريكا الشمالية. بينما كان هذا الحامض يستورد أساسا

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

من دول جنوب شرق اسيا حيث يستخرج من بذور النخيل وزيت جــوز الهند.

٣- مشكلة حقوق الملكيــة الفكريــة Intellectual Property Rights وتمثــل خطورة كبيرة على الدول النامية خاصة وأن الشركات العملاقة المنتجــة للتقاوىالمعدلة وراثيا تقوم بتسجيل كثير من هذة المحاصيل مما يؤدى إلى ما يشبه الإحتكارفى تسويق هذه المحاصيل لحــساب هــذه الــشركات ، مما يؤثر سلبيا على المزارع فى الدول النامية نتيجة إرتفاع أسعار مثــل هذه التقاوى بحيث تزيد تكلفة المنتجات الزراعية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفصل الخامس عشر

مقدمة فى المعلوماتية الحيوية
Bioinformatics

يمكن تعريف المعلوماتية الحيوية بأنها الفرع الحسابى Computational للبيولوجيا الجزيئية. وقبل عصر المعلوماتية الحيوية كانت هناك طريقتين فقط لإجراء التجارب البيولوجية إما داخل الكائن الحى (*والتى سميت In Vivo أى فى الحى*) أو فى بيئة صناعية (*التى سميت In Vitro أى فى الأنبوب*) وقياسا على ذلك فإنه يمكنا القول بأن المعلوماتية الحيوية هى فى الحقيقة *In Silico BIOLOGY* أى البيولوجيا فى السليكون كناية عن أن مكونات الحاسب الآلى ناتجة من رقائق السليكون.

على مدى الحقبتين الأخيرتين، حدثت تطورات هائلة فى كفاءة أجهزة الكمبيوتر سواء الكمبيوتر الشخصى أو الكمبيوتر العملاق Super Computer نتيجة إستنباط برامج متقدمة ساعدت الباحثين فى مجال البيولوجيا على الحصول على تفسيرات وإجابات عن أسئلة لم يكن بمقدورهم التوصل إليها ناهيك عن السرعة الفائقة فى تحليل النتائج وإستنباط التفسيرات الصحيحة لها.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وفى تعريف آخر للمعلوماتية الحيوية بأنها تطبيق تقنية المعلوماتية لإدارة Management وتنظيم البيانات البيولوجية ، وتعد من المجالات العلمية الحديثة ذات التطور السريع.

قواعد البيانات Data Bases:

فى السنوات العشرين الماضية أصبح شائعا تخزين البيانات البيولوجية فى قواعد البيانات العامة Public Databases مما أدى إلى نمو هائل فى كمية المعلومات المخزونة فى هذه القواعد كما زادت أعداد هذه القواعد نفسها لكى تسع الكم الهائل من هذه البيانات التى تتدفق بمعدلات كبيرة جدا كل يوم تقريبا إن لم يكن كل ساعة على مدار الساعة. ونتيجة لذلك فقد أصبح لزاما على الباحثين أينما كانوا لكى يسترجعوا مايهمهم من قواعد البيانات هذه الإستعانة بالكمبيوتر وشبكة المعلومات الدولية (world wide web (www.

وفى ضوء ذلك يمكن إضافة تعريف آخر للمعلوماتية الحيوية بأنها التقنية التى تختص بإستخدام الكمبيوتر فى جمع وتنظيم وتحليل وإستخدام وعرض البيانات البيولوجية والمشاركة فى الإستفادة من هذه البيانات مع المجتمع العلمى وذلك من خلال شبكات المعلومات والكمبيوتر الشخصى لكل باحث حيث يمكن فتح نافذه لانهائية على العالم بمجرد الضغط بأطراف الأصابع على Keyboard وهو جالس أمام الكمبيوتر الشخصى المتصل بتلك الشبكات.

وتعد قواعد البيانات بمثابة القلب للمعلوماتية الحيوية، وتوجد أنواع كثيرة ومختلفة من هذه القواعد حسب طبيعة المعلومات المخزونة (مثل تتابعات القواعد، والتراكيب وشرائح الجيل.....الخ) أو حسب طريقة التخزين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

(دوسيهات Flat-Files أو جداول ...الخ) وتزداد أعداد قواعد البيانات بطريقة سريعة جدا ، ففى خلال عام ٢٠٠٠ تم إستحداث ٥٥ قاعدة معلومات جديدة بحيث أصبح العدد الكلى للقواعد فى نهاية السنة ٢٨١ قاعدة وهذه القواعد متاحة للجميع.

وتعد قاعدة بيانات Gene Bank فى الولايات المتحدة الأمريكية من المصادر الأساسية لتتابعات د ن أ والبروتينات ، كذلك توجد قاعدة بيانات يابانية Data Bank of Japan (DDBj) ، كما يشرف معمل البيولوجيا الجزيئية الأوربية على قاعدة بيانات مختصة بتتابعات النيوكلتيدات (EMBL). ويمكن تخزين أى تتابعات جديدة فى أى من هذه القواعد الثلاثة حيث توجد بينها مشاركة أوتوماتيكية يومية فى هذه البيانات. وإذا كان الغرض من البحث عن جين فى تتابعات د ن أ مميزة النواة فإنه من الأفضل أستخدام dbEST وهى قاعدة بيانات مكونة من EST's.

تحليل التتابعات:

بعد تحديد تتابعات قطعة طويلة من د ن أ، فإن أول مهمة هى التعرف على الجينات التى قد توجد فى هذه القطعة وفى حالة غير مميزة النواة تكون الكثافة الجينية Gene Density عادة مرتفعة نظرا لأن معظم الجينات المشفرة لبروتينات لاتوجد بها انترونات مما يسهل كثيرا فى عملية تحليل التتابعات ومعرفة الجينات الموجودة فى قطعة د ن أ تحت الدراسة. ولكن الأمر يختلف إذا كانت تتابعات د ن أ خاصة بمميزة النواة الراقية حيث نجد أنه من الصعب التعرف على الجين نظرا لأنه قد يكون مكونا من عدد من الإكسونات يتخللها عدد مماثل أو يزيد من الإنترونات. فمثلا فى الجينوم البشرى يكون متوسط

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

طول الإكسون ١٥٠ زوج من القواعد ومتوسط طول الإنترون عدة كيلو قاعدة وقد يصل طول الجين إلى مئات من كيلو قاعدة.

كما أن م ر ن أ لبعض الجينات قد يحدث له تعـديلات بطـرق متعـددة مما يؤدى إلى تكوين متراكبات مختلفة من نفس الجزئ بحيث يتم بناء سلاسـل ببتيدية مختلفة من جين واحد.

وهناك مشكلة إضافية للعثور على الجين وهى نسبة الإشارة Signal إلـى الضوضاء Noise أو التشويش، ففى جينوم البكتريا تشكل الجينات نسبة ٨٠-٨٥ % من د ن أ الكلى ، وفى الخميرة تنخفض هذه النسبة إلى ٧٠% وفى حـشرة الدروسفلا ودودة النتيماتودا تكون النسبة ٢٥% فى حين تصل هذه النسبة إلـى أدنى مستوى لها فى الجنيوم البشرى لتكون ٣ إلى ٥٪ فقط من د ن أ الكلى.

لذلك نجد أن تحديد موقع بداية ونهاية جين ما وطراز التراكب Splicing فى إكسونات من بين جميع التتابعات غير الشفرية يكون فى منتهـى الـصعوبة وبمجرد التعرف على الجين يتم تحويل التتابعات النيوكلتيدية إلى تتابعات مـن الأحماض الأمينية المقابلة. ويكون السؤال الآن هو ما هى الوظيفة المحتملة لهذا البروتين؟

وبإجراء مسح لجميع المعلومات المتاحة فى قواعد المعلومات المختلفة فقد يكون من الممكن تحديد بروتينات آخرى بتتابعات مشابهة مما قد يـساعد فـى تحديد وظيفته ، ويمكن أيضا إستخدام مقارنات التتابعات لتعريف بعض العناصر Motifs فى البروتين مثل عناصر الإرتباط بجزئ ATP أو بجزئ دن أ وقد يفيد ذلك فى إعطاء معلومات عن وظيفة الجين.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تحديد إطارات القراءة المفتوحة (ORF):

بعد الحصول على التتابعات النيوكلتيدية لشظية طويلة نسبيا من د ن أ فإن أول مهمة هى تحديد إطار القراءة الصحيح وحيث أن هناك ثلاث إطارات قراءة محتملة على كل سلسلة من جزئ د ن أ فإن ذلك يتطلب إجراء ترجمة لستة إطارات Six Translation Frames وينتج عن ذلك ست تتابعات بروتين محتملة (الشكل ١٥-١) ويفترض فى إطار القراءة الصحيحة أن يكون الأطول وأن يكون مستمر وغير متقطع نتيجة لوجود أى من كودونات الإنهاء (TGA,TAA,TAG) وكلما زاد طول ORF كلما زاد إحتمال أن تمثل جين لأن ORF الطويلة لا تحدث عادة بالصدفة. إن تحديد نهاية مثل هذه ORF يكون أسهل من تحديد بدايتها. إن النهاية الأمينية N_Terminal للبروتين تكون عادة مكونة من حامض الميثونين لذلك فإن وجود كودون ATG يمكن أن يدل على النهاية ′5 للجين إلا أن الميثونين ليس هو الحامض الأول دائما فى تتابع البروتين ويمكن أن يتواجد فى أماكن آخرى فى السلسلة ويتطلب ذلك إستخدام تقنيات أخرى لتحديد بداية ORF مثل تفضيل إستخدام كودونات معينة Codon Bias لكل كائن (الجدول ١٥-١) ووجود تتابع CpG (CpG Islands). إلا أنه يجب الحرص عند مسح تتابعات النيوكلتيدات لتحديد ORF لأن حدوث أى خطأ قد يعطى سلسلة من الأخطاء فى التتابع النهائى خاصة إذا أدى هذا الخطأ إلى إضافة أو حذف غير صحيح لكودون إنهاء ، كما أن الخطأ قد يحدث نتيجة إضافة أو حذف قاعدة واحدة غير صحيحة مما يجعل التحديد الصحيح للـ ORF أكثر صعوبة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

```
Query Sequence:
              10         20         30         40         50
  0  TCCATTGAGC CTTATACCAG TAACATCTAC ACTCGAAGAT CTTGTCAGGG
 50  GAATTTCAGA TTGTGAATCC TCACTTACTG AAAGATCTTA CTGAGCGGGG
100  CTTGTGGAAT GAAGAGATGA AAAATCAGAT TATTGCATGC AATGGCTCCA
150  TTCAGTTTTC CTTTTTCAGA GCATACCAGA AATTCCTGAT GACCTGAAGC
200  AACTCTATAA GACCGTGTGG GAAATCTCTC AGAAGACTGT TCTCAAGATG

Six-Frame Amino Acid Translation:

Forward 0
              10         20         30         40         50
  0  SIEPYTSNIY TRRSCQGNFR L!ILTY!KIL LSGACGMKR! KIRLLHAMAP
 50  FSFPFSEHTR NS!!PEATL! DRVGNLSEDC SQD

Forward 1
              10         20         30         40         50
  0  PLSLIPVTST LEDLVRGISD CESSLTERSY !AGLVE!RDE KSDYCMQWLH
 50  SVFLFQSIPE IPDDLKQLYK TVWEISQKTV LKM

Forward 2
              10         20         30         40         50
  0  H!ALYQ!HLH SKILSGEFQI VNPHLLKDLT ERGLWNEEMK NQIIACNGSI
 50  QFSFFRAYQK FLMT!SNSIR PCGKSLRRLF SR

Reverse 0
              10         20         30         40         50
  0  HLENSLLRDF PHGLIELLQV IRNFWYALKK EN!MEPLHAI I!FFISSFHK
 50  PRSVRSFSK! GFTI!NSPDK IFECRCYWYK AQW

Reverse 1
              10         20         30         40         50
  0  ILRTVF!EIS HTVL!SCFRS SGISGML!KR KTEWSHCMQ! SDFSSLHSTS
 50  PAQ!DLSVSE DSQSEIPLTR SSSVDVTGIR LNG

Reverse 2
              10         20         30         40         50
  0  S!EQSSERFP TRSYRVASGH QEFLVCSEKG KLNGAIACNN LIFHLFIPQA
 50  PLSKIFQ!VR IHNLKFP!QD LRV!MLLV!G SM
```

الشكل (١٥-١): يوجد لكل جين ستة إطارات مفتوحة للقراءة ORF

إستخدام التناظر لتعريف الجينات:

Using Homology to Find Genes:

يمكن تسهيل عملية تحديد هوية الجينات الموجودة فى تتابعات طويلة إذا بحثنا عن تتابعات مماثلة (متناظرة) معروف نواتج نسخها (مثل cDNA أو EST

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أو حتى لجين فى نوع آخر) وقد أدى النمو السريع فى بيانات EST إلى تغيــر جذرى فى معدل تحديد الجينات إذ يمكن مسح Screen التتابعات الجينية بسرعة لوجود مواقع EST لتعريف الجينات المحتملة. وتشتق كلونات EST من تتابعات النهاية ′3 غير المترجمة ′3 UTR والتى يتم الحصول عليها بإستخدام بادئ مــن متعدد T إذا كان م ر ن أ محتويا على ذيل متعدد الأدينــين Poly A. وتتميــز تتابعات ′3 UTR بخاصيتين حيث يندر وجود أنترونات بها كما أنهــا تحتــوي عادة على تتابعات محفوظة أقل مما فى المناطق الــشفرية وتــؤدى الخاصــية الأولى إلى الحصول على نواتج PCR قصيرة بحيث يمكن إكثارها فــى حــين تؤدى الظاهرة الثانية إلى سهولة التمييز بين أفراد العائلات الجينيــة المتــشابهة جدا فى مناطقها الشفرية. إلا أن تتابعات EST كثيرا ما تمتد فى إتجاه النهاية ′5 لتصل إلى التتابعات الشفرية و بذلك تتداخل Overlap مــع إكــسونات محتملــة إلا أنه لا يمكن توقع أن تقوم بتحديد و تعريف جميع الإكسونات الشفرية لهــذا الجين. ويجب التنويه إلى أنه لا يمكن إفتراض أن جميع EST's تعتبر دلائــل موثوق بها لجين أو لجزئ م ر ن أ ناضج ففى بعض الحالات قد تكون مــشتقة من تتابعات أنترونات غير معدلــة Unprocessed بادئــة مــن مــسار Poly A جينومى أو من جينات كاذبة معدلة. ويعــد برنــامج (BLAST) Basic Local Alignment Search Tool من أكثر البرامج إستخداما لإجراء مسح لمدى التشابه بين التتابع النيوكلتيدى محل الدراسة Query Sequence مع تلك الموجودة فــى قواعد بيانات التتابعات. ويبحث البرنامج BLASTN عن درجــة التــشابه مــع قواعد تتابعات النيوكلتيدات فى حين يقوم برنامج BLASTX بترجمــة التتــابع النيوكلتيدى محل الدراسة (Query) فى الإطارات الستة المحتملة والبحث عــن

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

درجة التشابه مع قواعد بيانات البروتين، ويستخدم برنامج BLASTp الخـــاص بتتابع البروتين للبحث عن درجة التشابه مع قواعد بيانات البروتينات.

الجدول (١٥-١) النسب المئوية لاستخدام الكودونات الستة للحامض الأميني سيرين في الكائنات المختلفة (تحيز الكودون Codon bias)

الكودون	بكتريا القولون	الدروسفلا	الإنسان	الذرة	الخميرة
AGT	٣	١	١٠	٣	٥
AGC	٢٠	٢٣	٣٤	٣٠	٤
TCG	٤	١٧	٩	٢٢	١
TCA	٢	٢	٥	٤	٦
TCT	٣٤	٩	١٣	٤	٥٢
TCC	٣٧	٤٨	٢٨	٣٧	٣٣

وقبل البدء فى البحث عن التشابه فإنه من المهم التخلص مـــن التتابعـــات المتكررة Repetitive ومن أى تتابعات خاصة بناقل الكلونة التـــى قـــد تكـــون موجودة ضمن الشظية وذلك بإستخدام بـــرامج متخصـــصة مثـــل Vec Screen وRepeat Masker التى تقوم بهذه المهمة بالإضافة إلى التعـــرف علـــى الجـــين ويستخدم برامج BLASTP, BLASTN كثيرا فى دراســـة الجينوميـــا المقارنـــة Comparative Genomics.

ومن أهم خواص مطابقة التتابعات قياس ما إذا كانت نتائج المقارنة تمثل دليلا فعليا للتناظر أى ما هو إحتمال أن يكون التطـــابق النـــاتج يمكـــن توقعـــه بمحض الصدفة؟

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أسس البحث عن التشابه Principles of Similarity Searching:

لا يعطى تتابع د ن أ أو البروتين فى حد ذاته معلومات كافية لتحديد هوية جين ما ولكن لابد من تحليل تلك التتابعات بطرق مقارنة مقابل التتابعات المتاحة فى قواعد البيانات حتى يمكن إستنباط فرضيات تتعلق بدرجات التشابه (القرابة) والوظيفة الممكنة. ويتم ذلك بإستخدام أحد البرامج المشار إليها لمقارنة التتابع محل الدراسة (Query) مع جميع التتابعات الآخرى فى قواعد البيانات وتتم هذه المقارنات فى أزواج Pairwise وتأخذ كل مقارنة درجة Score تعكس درجة التشابة بين التتابع محل الدراسة (Query) والتتابعات التى يجرى مقارنتها به وكلما زادت الدرجة كلما دل ذلك على زيادة درجة التشابه.

ويمكن أن تتم دراسة التشابه Alignment إما بطريقة شاملة Global أو محلية Local. وتتضمن الطريقة الشاملة تحديد درجة التشابه على مستوى تتابعات جزئ د ن أ بأكمله مع ما يقابله من تتابعات فى قواعد البيانات. أما الطريقة المحلية فتعنى بتجزئة التتابعات إلى مناطق صغيرة ودراسة أقصى درجات التشابه لكل منطقة محلية. ويتم التمييز بين التطابقات الحقيقية وتلك الناتجة عن الصدفة بإستخدام تقديرات إحصائية لتحديد إذا كان التطابق راجع للصدفة. وتستخدم معظم برامج مقارنة التتابعات مثل BLAST الطريقة المحلية لتحديد تطابق التتابعات وتبدأ العملية بتقطيع (كسر) التتابع محل الدراسة Query (المجهول) وكذلك تتابعات قواعد البيانات إلى شظايا (كلمات) والبدء فى البحث عن الكلمات المتطابقة Word Matches.

ويكون البحث المبدئى لكلمة بطول W والتى تعطى درجة لا تقل عن T عند مقارنتها بالتتابع محل الدراسة (Query) بإستخدام ماتركس معين من التقييم.

ويستمر تحديد التطابق بين الكلمات ممتدا فى أى من الإتجاهين فى محاولة لتكوين درجة تطابق لا تقل عن خمسة درجات كحد أدنى. وتحدد قيم T سرعة وحساسية البحث ويتم التعبير عن كل زوج من التطابقات بدرجة Score ويتم ترتيب الدرجات المختلفة فى رتب Ranks. ويستخدم ماتركس الدرجات لحساب درجة التطابق بين كل قاعدة وقاعدة أو بين كل حامض أمينى وحامض أمينى ويستخدم ماتركس الوحدة فى حالة د ن أ بحيث تعطى قيمة (+١) إذا كان متطابقا و القيمة صفر إذا لم يكن هناك تطابق. أما فى حالة مقارنة تتابعات الأحماض الأمينية فيستخدم ماتركس الإستبدال والمبنى على حساب قدرة الأحماض الأمينية النسبية على الطفور Relative Mutability.

ويتم تقييم كل حامض أمينى مستبدل بدرجة تتناسب مع مدى إمكانية أن يكون قريبا فى الوظيفة للحامض الأمينى المقابل فى التتابع البروتينى محل الدراسة Query ولا يمثل إلا تغييرا محدودا بحيث لا يؤثر على تركيب ووظائف البروتين ويطلق على مثل هذه الحالة Conservative Change. ومن جهة آخرى إذا أدى الإستبدال بين حامض أمينى صغير مثل الفالين بحامض آخر كبير محتويا على سلسلة جانبية قطبية مثل حامض الأسبارتيك فإن ذلك سيؤدى إلى تأثير كبير على تركيب و وظيفة البروتين مما يعرف Non-Conservative Substitution ولذلك يجب مقارنة تتابعات الأحماض الأمينية ليس على أساس النسبة المئوية للتطابق Identity فقط ولكن أيضا على أساس النسبة المئوية للتشابه Similarity. ويحسب التشابه على أساس القدرة النسبية للأحماض الأمينية على الطفور كما سبق القول وعموما فإن التغيرات المحافظة Conservative Changes تكون أكثر شيوعا على مدار التطور وتكون الدرجة النهائية للتطابق عبارة عن مجموع درجات كل موقع. وتسمى المواقع التى تقابل

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الحرف (الممثل لرمز الحامض الأمينى) بفراغ Null بالفجوات Gaps وتكون درجة الفجوة سالبة وحيث أن حدث طفرى واحد قد يؤدى إلى إضافة أو حذف حامض أمينى أو أكثر فإن مجرد وجود الفجوة يكون عادة أكثر أهمية عن طول هذه الفجوة. تحسب المعنوية لكل تطابق كدرجة إحتمال (p) أو درجة توقع (E) Expectation وهما مجرد طريقتان لتمثيل معنوية التطابق لأن $P=1^{-e}$ وكلما زادت قيمة P لتقترب من (١) كلما زادت معنوية التطابق فى جين كلما إنخفضت قيمة E كلما دل على زيادة المعنوية. ويبين المثال التالى بعض التفاصيل الخاصة بهذه العملية.

إستخدام برنامج BLAST لتحديد تشابه تتابعات البروتين:

لإيجاد تتابعات البروتينات فى قواعد البيانات التى تتشابه مع تتابع البروتين محل الدراسة فإن BLAST يعتبر أفضل برنامج للتنقيب عن البيانات Data Mining ، ويوجد نوعان من هذا البرنامج يمكنهما التعامل مع تتابعات البروتينات وهما:

١- Blastp للمقارنة بين تتابعات بروتين ما مع قواعد البيانات للبروتينات.

٢- tblastn للمقارنة بين تتابعات البروتين مع قواعد البيانات للتتابعات النيوكلتيدية.

ويعتمد إختيار أى من النوعين على الغرض من الدراسة ، فإذا كان المطلوب معرفة وظيفة البروتين محل الدراسة فيفضل إستخدام Blastp لمقارنة هذا البروتين مع البروتينات الآخرى الموجودة فى قواعد البيانات ، أما إذا كان الهدف هو إكتشاف جينات جديدة تشفر لبروتينات بسيطة فيستخدم tplastn لمقارنة المدروس مع تتابعات د ن أ فى قواعد البيانات والتى يتم ترجمتها إلى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بروتينات فى ستة إطارت مفتوحة للقراءة ORF. ويقوم برنامج Tplastn بهذه الترجمة أوتوماتيكا بدون تدخل من الباحث وكل ما على الباحث التأكد منه هو أن تكون تتابعات د ن أ محل الدراسة Query فى الإتجاه '3→'5 أو إذا كانت بروتين أن تكون التتابعات من النهاية الأمينية إلى النهاية الكربوكسيلية.

تفسير نتائج BLAST:

Understanding BLAST Output:

بعد الإنتهاء الدقيق من تنفيذ خطوات إدخال بيانات التتابع المطلوب (المثال هنا بروتين النيوكليولين Nucleolin) إلى الكمبيوتر الشخصى المزود بالبرامج المناسبة والمتصل بشبكة المعلومات ، سنحصل على ثلاث مخرجات (أقسام) تمثل النتائج الرئيسية التى يمكن من خلالها الحكم على درجة التشابه بين البروتين محل الدراسة مع أى من البروتينات الموجودة فى قواعد البيانات.

ويتم ظهور هذه الأقسام بالتتابع كما يلى:

١- عرض بيانى Graphic Display: بين مناطق التشابه بين التتابع محل الدراسة مع التتابعات الأخرى.

٢- قائمة إصابة الهدف Hit List: وتعطى أسماء التتابعات المشابهة للتتابع تحت الدراسة مرتبة حسب درجات التشابه.

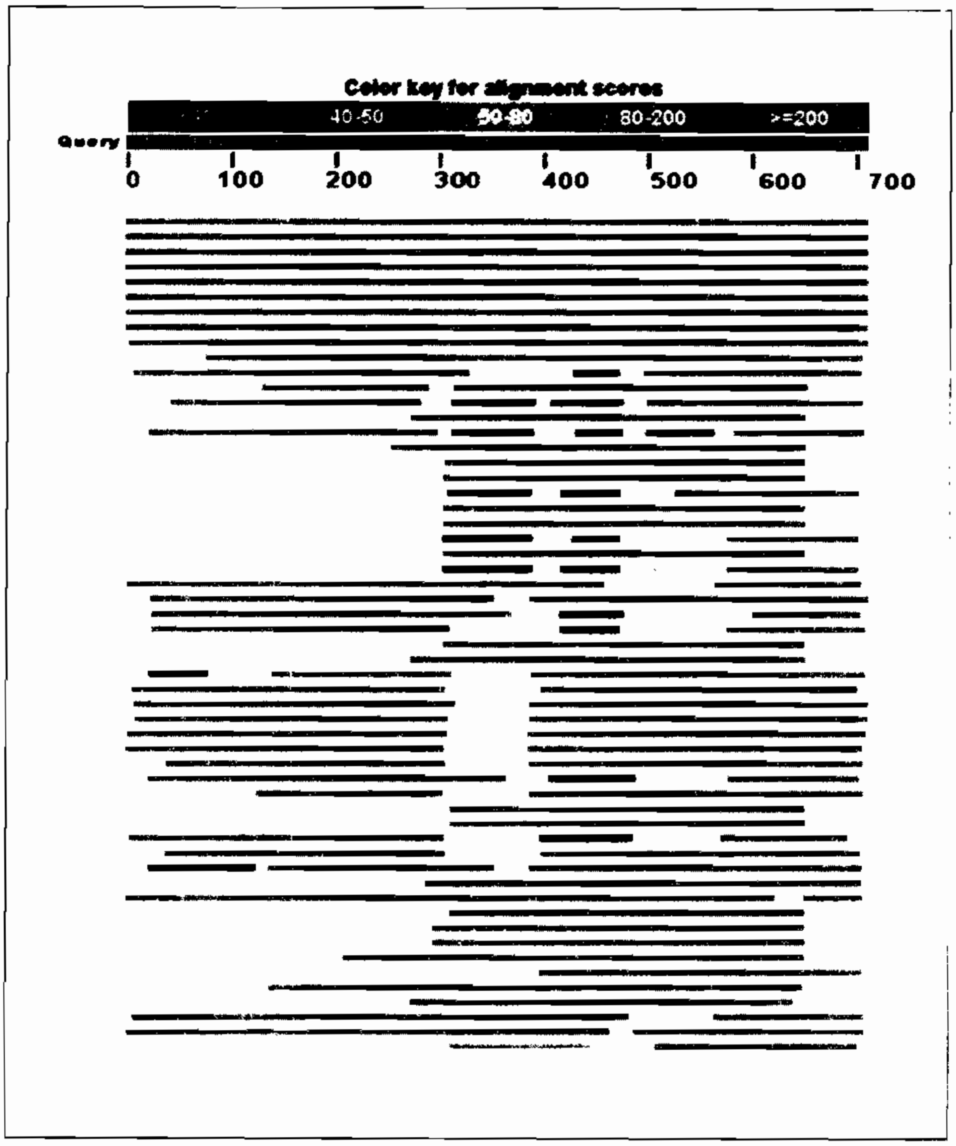
٣- المحاذاة Alignment (التطابق): وتبين جميع درجات التوازى بين التتابع تحت الدراسة وتلك المشابهة لها (النجاحات).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أولاً: العرض البيانى The Graphic Display:

يساعد العرض البيانى (الشكل ١٥-٢) على فهم نتائج البحث. ويشتمل العرض البيانى على التتابع المدروس الذى يكون فى القمة (أعلى خط أفقى) ويمثل كل خط Bar جزء من تتابع آخر مشابه للتتابع محل الدراسة وتحديد المنطقة التى يحدث بها هذا التشابه. ويوجد كود للألوان للدلالة على درجة التشابه حيث تدل الخطوط الحمراء على أعلى درجات التشابه ، فى حين تدل الخطوط الوردية Pink على درجة تشابه أقل جودة ، وتشير الخطوط الخضراء على إنخفاض حاد فى درجة التشابه ، أما الخطوط الزرقاء أو السوداء فتعنى إنعدام التشابه تقريبا.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



شكل (١٥-٢): عرض بيانى Graphic Display لنتائج بحث المطابقة ببرنامج BLAST بين مناطق التشابه بين التتابع محل الدراسة مع تتابعات قواعد البيانات المقارنة (اللون الأحمر والوردى يمثلان أعلى درجة تشابه فى حين أن اللون الأزرق والأسود يمثلان اقل تشابه أو إنعدام التشابه)

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وعموما يمكن إعتبار الخطوط الحمراء والوردية Pink والخضراء دلالات جيدة للتشابه. أما الخطوط السوداء فتدل على إنعدام التشابه مع التتابع المدروس ويقال أنها فى "المنطقة الرمادية" "Twilight Zone" أى تلك التى تكون نسبة التشابه فيها أقل من ٢٥% كما سيأتى بعد (يمثل ٢٥% بالنسبة لتتابعات الأحماض الأمنية فى البروتين و ٧٠% لتتابعات النيوكلتيدى فى د ن أ الحد الأدنى للتناظر Homology).

ثانيًا: قائمة إصابة الهدف (النجاحات) The Hit List:

تعطى هذه القائمة مؤشرات مباشرة للحكم على ما إذا كان التتابع تحت الدراسة يشبه أى من التتابعات الموجودة بالفعل فى قواعد البيانات ومدى الثقة فى مصداقية وجودة هذا التشابه (الشكل ١٥-٣) ويحتوى كل خط على أربعة مكونات هامة:

١- الرقم الكودى للتتابع والإسم The Sequence Accession Number and Name:

مما يعطى الفرصة للوصول إلى قاعدة البيانات المحتوية على هذا التتابع للحصول على المزيد من المعلومات عن هذا التتابع.

٢- التوصيف Description:

يعطى وصف كل تتابع فكرة سريعة عما إذا كان هذا التتابع ذا قيمة مقارنة بالتتابع محل الدراسة.

٣- نقط النجاح The Bit Score:

وهى مقياس للمعنوية الإحصائية للتشابه. وكلما زادت قيمتها (مقدارها) دل ذلك على درجة تشابه عالية. وإذا إنخفضت الدرجة عن ٥٠ نقطة فإن معنى ذلك أنه ليس هناك تشابه يذكر.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٤- قيمة The E–Value E (قيمة التوقع Expectation Value):
وتعطى تقديرا لعدد المرات المتوقعة للحصول على نفس التشابه بمحض الصدفة. وكلما إنخفضت قيمة E كلما دل ذلك على درجة تشابه عالية بين التتابعات مما يعطى ثقة أكبر بأن هذا التتابع مناظر بالفعل للتتابع تحت الدراسة ، إذ أن قيمة E قريبة جدا من الصفر تعنى أن هذه التتابعات متطابقة ، وعموما فإن أى تشابهات بقيمة E أعلى من (10^{-4}) لا تؤخذ فى الإعتبار حيث أنها تقع فى المنطقة الرمادية Twilight Zone وتدل على إنعدام التشابه تقريبا بين التتابعات.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Sequences producing significant alignments:

Sequence	Description	Score (bits)	E Value
gi|128843|sp|P09405|NUCL_MOUSE	Nucleolin (Protein C23)	676	0.0
gi|128844|sp|P13383|NUCL_RAT	Nucleolin (Protein C23)	627	e-179
gi|128842|sp|P08199|NUCL_MESAU	Nucleolin (Protein C23)	598	e-171
gi|128841|sp|P19338|NUCL_HUMAN	Nucleolin (Protein C23)	509	e-144
gi|128840|sp|P15771|NUCL_CHICK	Nucleolin (Protein C23)	326	1e-88
gi|464252|sp|P20397|NUCL_XENLA	Nucleolin (Protein C23)	308	2e-83
gi|12229875|sp|Q13310|PAB4_HUMAN	Polyadenylate-binding prot...	101	6e-21
gi|3183544|sp|P11940|PAB1_HUMAN	Polyadenylate-binding prote...	96	2e-19
gi|417441|sp|P04147|PABP_YEAST	Polyadenylate-binding protei...	96	3e-19
gi|129535|sp|P29341|PAB1_MOUSE	Polyadenylate-binding protei...	96	3e-19
gi|12229876|sp|Q15097|PAB2_HUMAN	Polyadenylate-binding prot...	93	1e-18
gi|1171978|sp|P42731|PAB2_ARATH	Polyadenylate-binding prote...	92	3e-18
gi|1352709|sp|P20965|PABP_XENLA	Polyadenylate-binding prote...	89	2e-17
gi|3123239|sp|P31209|PABP_SCHPO	Polyadenylate-binding prote...	87	1e-16
gi|128576|sp|P27476|NSR1_YEAST	Nuclear localization sequenc...	81	6e-15
gi|1171979|sp|Q05196|PAB5_ARATH	Polyadenylate-binding prote...	79	4e-14
gi|585638|sp|P21187|PABP_DROME	Polyadenylate-binding protei...	78	7e-14
gi|12229883|sp|Q9ZQA8|PABX_ARATH	Probable polyadenylate-bin...	74	8e-13
gi|133249|sp|P19684|ROC5_NICSY	33 kDa ribonucleoprotein, ch...	74	1e-12
gi|12643628|sp|O64380|PAB3_ARATH	Polyadenylate-binding prot...	74	1e-12
gi|417556|sp|P32588|PUB1_YEAST	Nuclear and cytoplasmic poly...	73	1e-12
gi|133247|sp|P28644|ROC1_SPIOL	28 kDa ribonucleoprotein, ch...	66	3e-10
gi|13124200|sp|Q12926|ELV2_HUMAN	ELAV-like protein 2 (Hu-an...	64	8e-10
gi|123734|sp|P26378|ELV4_HUMAN	ELAV-like protein 4 (Paraneo...	64	8e-10
gi|13124206|sp|Q60899|ELV2_MOUSE	ELAV-like protein 2 (Hu-an...	64	8e-10
gi|2500580|sp|O61701|ELV4_MOUSE	ELAV-like protein 4 (Parane...	64	9e-10

الشكل (١٥-٣): قائمة إصابة الهدف Hit List وتعطى أسماء التتابعات المشابهة للتتابع محل الدراسة Query مرتبة حسب درجات التشابه

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ثالثًا: المحاذاه The Alignments (التطابق):

يعتبر عرض نتيجة المحاذاة بمثابة حجر الزاوية فى بحث BLAST لأنها تعطى تفاصيل دقيقة عن حقيقة التشابة وأهميته (الشكل ١٥-٤) ويمكن منه استنباط الخواص التالية:

١- نسبة التطابق The Percent Identity:

وهى تعطى بديل قوى لقيمة E وتجدر الإشارة مرة أخرى إلى أن نسبة تطابق أعلى من ٢٥% تعتبر نسبة مشجعة. وتعطى الإشارات الموجبة مقياسا لأجزاء التتابعات المتطابقة أو المتشابهة بشكل كبير وممثلة بالعلامة (+) فى الشكل أعلاه ، وتدل أماكن الفجوات على أماكن التتابعات التى تخلو من التشابه.

٢- الطول Length:

وتمثل طول منطقة التشابه والتى تدل على مدى إستمرار التشابه بدون إنقطاع بين التتابع محل الدراسة والتتابع المقارن وتمثل نتيجة تشابه كل منطقة بثلاث سطور:

السطر العلوى: يمثل تتابع الشظية محل الدراسة Query.

السطر السفلي: يمثل التتابع المقارن المشتق من قواعد البيانات The Hit or The Subject.

السطر الأوسط بين التتابعين: : ويحتوى على علامة + تمثل الأحماض الأمينية المتشابهة وحرف يمثل الأحماض المتطابقة أو فراغ يمثل عدم وجود تشابه و يدل وجود مناطق xxxxx فى التتابع محل الدراسة Query على وجود عدد كبير من الأحماض الأمينية المترادفة (من نفس النوع) والتى يقوم BLAST بحجبها أتوماتيكيا Automatically Masked ويطلق عليها المناطق المنخفضة التعقيد Low-Complexity Segments

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وقد يؤدى إظهارها إلى حدوث مشاكل فى البحث عن التشابه وإعطاؤهـــا علامات × تجعل BLAST بتجاهل المناطق المقابلة ويحدث هذا فى التتابع محل الدراسة فقط.

وتدل الإعداد Numbers على جانبى القطعة المدروسة من التتابعات على عدد الأحماض الأمينية الذي يشمله كل تتابع فى التتابع المدروس والتتابع المقابل فى قاعدة المعلومات.

ويجب أن لا يحتوي آى تتابع على عدد كبير من الفجوات وأن يتكون من عدد قليل من القطع ذات تشابه مرتفع بدلا من وجود نقط متطابقة متفرقـــة هنـــا وهناك ويكون لذلك أهمية خاصة إذا كان التشابه يقع فى المنطقة الرمادية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

```
>gi|464252|sp|P20397|NUCL_XENLA   Nucleolin (Protein C23)
          Length = 651

 Score =  308 bits (789), Expect = 2e-83
 Identities = 203/381 (53%), Positives = 267/381 (69%), Gaps = 22/381 (5%)

Query: 280 KRKKEMTXXXXXXXXXXXXXVEGSEPTTPFNLFIGNLNPNKSVNELKFAISELFAKNDLAV 339
           KRKKEM              +    +    ++FIGNLN  K   +ELK A+ E F+K +L +
Sbjct: 209 KRKKEM----PKTIPEAKKTKTDTASEGLSIFIGNLNSTKEFDELKDALREFFSKKNLTI 264

Query: 340 VDVRTGTNRKFGYVDFESAEDLEKALELTGLKVFGNEIKLEKP------KGRDSKKVRAA 393
            D+R G ++KFGYVDF S E++EKAL+LTG K+ G E+K+EK        K  ++KK R +
Sbjct: 265 QDIRIGNSKKFGYVDFSSEEEVEKALKLTGKKILGTEVKIEKAMAFDKNKTAENKKERDS 324

Query: 394 RTLLAKNLSFNITEDELKEVFEDAMEIRL-VSQDGKSKGIAYIEFKSEADAEKNLEEKQG 452
           RTL  KN+ ++ T +EL+E+FE+A +IR+   +DG +KGIAY+EF +E +A K LEEKQG
Sbjct: 325 RTLFVKNIPYSTTVEELQEIFENAKDIRIPTGKDGSNKGIAYVEFSNEDEANKALEEKQG 384

Query: 453 AEIDGRSVSLYYTGEKGQRQERTGKTSTWSGESKTLVLSNLSYSATKETLEEVFEKATFI 512
           AEI+GRS+ + +TGEK Q    +G     G+SK LV++NLSYSAT+++L EVFEKAT I
Sbjct: 385 AEIEGRSIFVDFTGEKSQ---NSGNKKGPEGDSKVLVVNNLSYSATEDSLREVFEKATSI 441

Query: 513 KVPQNPHGKPKGYAFIEFASFEDAKEALNSCNKMEIEGRTIRLELQ-------GSNSRSQ 565
           ++PQN  G+ KG+AFIEF+S EDAK+A++SCN  EIEGR+IRLE         G   S
Sbjct: 442 RIPQN-QGRAKGFAFIEFSSAEDAKDAMDSCNNTEIEGRSIRLEFSQGGGPQGGGRGGSA 500

Query: 566 PSKTLFVKGLSEDTTEETLKESFEGSVRARIVTDRETGSSKGFGFVDFNSXXXXXXXXXX 625
```

الشكل (١٥-٤): أزواج التتابعات المتشابهة Pair Wise Alignments الناتجة من BLAST

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تحليل ر ن أ غير الشفرى وتتابعات د ن أ غير الجينية:

Analysis of Non-Coding RNA and Extragenic DNA:

يتكون الجينيوم فى مميزة النواة متعددة الخلايا من تتابعات أكثر بكثير من تلك الخاصة بالتشفير للجينيات فعلى سبيل المثال ، يمكن بتحليل ر ن أ غير الشفرى ومناطق تنظيم التعبير الحصول على معلومات هامة. ومن السهل الحصول على rRNA (ر ن أ الريبوسومى) وهو من أكبر أنواع ر ن أ غير الشفرية. ويمكن التعرف عليه بتحليل تشابه التتابعات . كما يمكن التعرف على tRNA بإستخدام برنامج tRNAscan-SE والذى يمكنه البحث عن تراكيب مميزة مثل قدرة tRNA على تكوين عروات دبوس الشعر Hairpins. وتعد المناطق المختصة بتنظيم تعبير الجينات بصفة خاصة هامة فى تتابعات الجينيوم وقد تم حتى الآن التعرف على عدد محدود من مواقع الإرتباط بعوامل النسخ وذلك بالطرق التقليدية. ويعد وجود مثل هذه المواقع فى التتابع محل الدراسة Query مؤشرا لمنطقة التنظيم هذه و لكن هذه التتابعات تتميز بالقصر النسبى ويمكن أن توجد بمحض الصدفة. ويمكن الحصول على أدلة أفضل لإثبات وجود هذه المناطق عن طريق عمل دراسة مقارنة للتتابعات المحفوظة التى تسبق نفس الجين Upstream فى جينومين متقاربين مثل الفأر والإنسان.

تحديد وظيفة جين جديد:

Identifying the Function of a New Gene:

إن أبسط طريقة للتعرف على وظيفة جين جديد تتم من خلال البحث عن نظائر Homologoues فى قواعد بيانات البروتينات وإذا أعطى البروتين الجديد المشفر بإطار قراءة ORF غير مميز درجة تشابه معنوية مع بروتين آخر معروف الوظيفة، فإن ذلك يثبت أن ORF محل الدراسة هو فى الحقيقة جين

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

جديد وغالبا مايتم تحديد وظيفته ويتم ذلك من خلال أحد برامج BLAST مثل BLASTP أو PSI-BLAST أو SWISS-PROT. ويلخص الجدول (١٥-٢) كيفية الإختيار الصحيح لأحد برامج BLAST حسب متطلبات الدراسة.

الجدول (١٥-٢) إختيار برنامج BLAST المناسب للدراسات المختلفة لتشابه التتابعات

نوع الدراسة	البرنامج المناسب
البحث عن وجود جينات فى الجينوم **Finding Genes in a Genome**	يتم قطع تتابعات الجينوم إلى تتابعات متداخلة صغيرة (٢-٥ ك قاعدة) ويستخدم برنامج Blastx لتقدير درجة التشابه مقابل NR (قواعد بيانات البروتين غير المتكررة Non-Redundant) و يعطى ذلك نتائج أفضل إذا لم يكن الجينوم محتويا على أنترونات (مثل البكتريا).
التنبؤ بوظيفة بروتين **Predicting a Protein Function**	يستخدم SWISS-PROT وعند الحصول على نسبة تشابه جيدة (أعلى من ٢٥% تطابق) على مستوى الطول الكلى للبروتين فإن ذلك يعطى تأكيد على أن البروتين محل الدراسة يقوم بوظيفة مشابهة للبروتين المقارن المشتق من SWISS-PROT.
التنبؤ بالتركيب الثالثى 3-D للبروتين **Predicting a Protein 3-D Structure**	يستخدم Blastp مقابل PDB (قاعدة بيانات تركيب البروتين) وعند الحصول على درجة تشابه مناسبة (أعلى من ٢٥% تطابق) فإن معنى ذلك أن البروتين محل الدراسة تركيبه الثالثى مشابه للبروتين المقارن فى قاعدة البيانات.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

العثور على أفراد فى عائلة من البروتينات Finding Protein Family Members	يستخدم Blastp أو PSI-BLAST ويقارن ببرنامج NR وبعد الحصول على جميع أفراد العائلة يمكن عمل بحث على قواعد البيانات للتشابه بين التتابعات المتعددة Multiple Sequence Analysis ورسم الشجرة التطورية Phylogenetic Tree.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفصل السادس عشر

مقدمـــة فـي الجيـنـوميـــا المقارنـــة

Introduction to Comparative Genomic

تعتبر الجينوما المقارنة مجال حديث فى الأبحاث البيولوجية يهتم بمقارنة درجة التشابه (والقرابة) بين التتابعات الجينومية للأنواع المختلفة بدأً من الإنسان الفأر والشمبانزى مع الخميرة والينماتودا وحشرة الدروسفلا. وبمقارنة تتابعـات الجينوم البشرى مع جينومات الكائنات الأخرى يمكن للباحثين تحديـد منـاطق التشابه والإختلاف. وتساعد هذه الدراسات الباحثين على التوصل إلـى مفـاهيم أفضل عن تركيب ووظائف جينات الأنسان مما يساهم فى إستنباط إسـتراتيجات جديدة للتعامل مع الأمراض البشرية. كما تقدم الجينوميـا المقارنـة أداة فعالـة لدراسة التغيرات التطورية التى تحدث بين الكائنات المختلفة وتساعد فى تحديـد هوية الجينات المحفوظة Conserved (المشتركة) بين الأنواع المختلفة بالإضافة إلى تحديد الجينات النوعية الفريدة والمميزة لكل نوع. ومـن فوائـد الجينوميـا المقارنة ، وبمساعدة المعلوماتية الحيوية يمكن التوصل إلـى التحديـد الـدقيق للمكونات الجينومية المحفوظة بين عدة كائنات على مـدى ملايـين الـسنين ، كما يمكن للباحثين تحديد الإشارات Signals التى تتحكم فـى وظيفـة الجـين وبالتالى يمكن إستنباط طرق جديدة لعلاج الأمراض البشرية و تحـسين صـحة الإنسان.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وبالإضافة إلى ذلك يمكن للجينوميا المقارنة أن تعود أيضا بـالنفع علـى عالم الحيوان بحيث يمكن تحديد الفروق الدقيقة بين الأنواع الحيوانية كما أنها قد تؤدى إلى إعادة النظر فى مفاهيمنـا عـن بعـض فـروع شـجرة التطـور Evolutionary Tree فضلا عن التوصل إلى إستراتيجات جديدة للمحافظة علـى الأنواع النادرة والمعرضة للانقراض.

سبق الإشارة إلى أن التشابه بين الجينات المتنـاظرة و الموجـودة فـى كائنات مختلفة قد قدمت طريقة لتحديد وظيفة لجين غير معروف ويعـد ذلـك مثالا لما يمكن بمعلومية جينوم كائن ما المساعدة فى فهم ودراسة جينوم كـائن آخر.

تعتمد الجينوما المقارنة على أن جينومات الكائنات ذات القرابة تكون عادة متشابهة وقد جاء هذا الإفتراض عند دراسة الجينات المتنـاظرة وحيـث أن أى كائنين مشتركان فى أصل واحد حديث نسبيا سيكون بهما جينومان يحتوى كـل منهما على إختلافات خاصة بكل نوع Species-Specific فى إطار بناء مشترك مصدره الجينوم الأصلى.

وكلما كان الكائنان شديدى القرابة على المستوى التطـورى كلمـا زادت درجة التشابه بين جينوميهما وفى هذه الحالة يمكن أن تظهر الجينومـات قـدر كامل أو جزئى من الحفاظ على نفس ترتيب التتابع الجينى Synteny. وفى هـذه الحالة يمكن إستخدام المعلومات الخاصة بالخريطة الجينومية لكائن مـا لتحديـد مواقع الجينات فى جينوم آخر.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

لاشك أن تحديد خرائط الجينومات الصغيرة الحجم يكون أسهل بكثير عن تلك الخاصة بالجينومات الكبيرة الحجم ، و يعنى ذلك أنه إذا وجد جينومان متشابهان Syntenic وكان إحداهما أصغر بدرجة كبيرة عن الآخر فإن دراسة خرائط الجينوم الأصغر سيكون أقل تعقيدا وأسهل فى التناول مما يعطى دفعة قوية لإكتشاف خصائص الجينوم الأكبر بمعلومية ما يتوافر من معلومات مشتقة من الجينوم الأصغر. ومن أمثلة ذلك الدراسة التى تمت بين جينوم Puffer Fish مقارنة بالجينوم البشرى إذ إن حجم جينوم هذا الكائن حوالى 400Mb أى لا يتعدى 1/7 من حجم الجينوم البشرى إلا أنه يحتوى تقريبا على نفس العدد من الجينات الخاصة بالجينوم البشرى. وقد أوضحت الخرائط الوراثية التى تمت على Puffer Fish وجود بعض التشابه مع تتابع وترتيب الجينات البشرية على الأقل فى المسافات القصيرة نسبيا.

ويدل ذلك على أنه من الممكن إلى حد ما إستخدام خريطة Puffer Fish لإيجاد جينات بشرية مناظرة لتلك المعروفة التتابع فى Puffer Fish والعكس صحيح:

وقد يؤدى ذلك إلى تحديد مواقع جينات بشرية لم يسبق رسم خرائطها والأهم من ذلك المساعدة فى تحديد مواقع تتابعات هامة مثل البروموتور وغيره من إشارات تنظيم التعبيرالجينى الموجودة أمام Upstrean الجينات البشرية وذلك لأن هذه التتابعات التنظيمية من المحتمل أن تكون متشابهة فى الجينومين ويمكن التعرف عليها نظرا لأنها تكون عادة محاطة بتتابعات د ن أ غير شفرية Non-Coding والتى تباعدت بدرجة كبيرة بفعل سلسلة من الطفرات العشوائية التى تحدث على مدى تطور الجينومين.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

إستخدام الجينوميا المقارنة فى النبات:

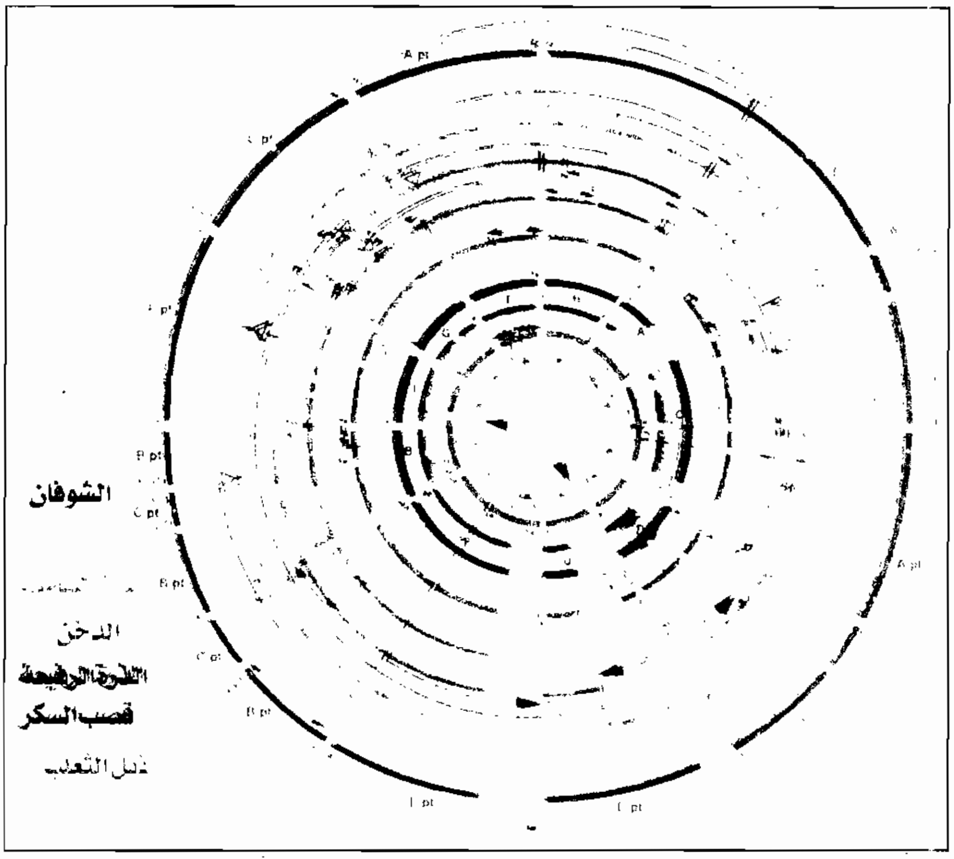
من المزايا المؤكدة للجينوميا المقارنة إستخدامها فى رسم الخرائط الوراثية للجينومات النباتية. ويمثل القمح نموذجا جيدا لذلك حيث يعتبر القمح أهم محصول غذائى للإنسان، حيث يعطى حوالى ٢٠% من السعرات الحرارية اللازمة للإنسان، لذلك إزداد الإهتمام بطرق التحسين الوراثى بهدف زيادة إنتاج محصول الحبوب من هذا النبات. إلا أن هذا الهدف يصطدم بحقيقة أن حجم جينوم القمح كبير جداً أى حوالى 17000 Mb وهو أكبر من حجم الجينوم البشرى بأكثر من خمسة أضعاف ولذلك فإن وجود نموذج لجينوم آخر صغير الحجم يكون فيه ترتيب الجينات متشابه مع القمح سيكون مفيداً فى رسم خريطة الجينات المرغوبة التى قد تكون لها موقع مكافئْ (مقابل) فى جينوم القمح. ويتبع القمح وغيره من محاصيل الحبوب مثل الأرز العائلة النجيلية والتى يتبعها عدد كبير من الأنواع وحيث إن حجم جينوم الأرز حوالى 400 Mb وهو أصغر بكثير من حجم جينوم القمح كما أوضحت نتائج المقارنة بين هذين الجينومين وجود درجة كبيرة من التشابه وقد أدى ذلك إلى إمكان عزل الجينات المرغوبة من جينوم القمح عن طريق البدء بتحديد مواقع الجينات المقابلة (المكافئة) فى جينوم الأرز الصغير الحجم. لقد تبين أن محتوى وترتيب الجينات يكون متشابه داخل العائلات التقسيمية على الرغم من وجود إختلافات كبيرة بين الأنواع فى أحجام الجينومات و فى أعداد الكروموسومات.

وقد أظهرت دراسة مواقع كشافات Markers خرائط القطع المحددة فى عدد من أنواع محاصيل الحبوب إمكان تحديد مناطق كروموسومية يكون ترتيب هذه الكشافات فيها متطابق ومحفوظ بدرجة كبيرة.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ومن الممكن حاليا وصف جينومات جميع الأنواع النباتية النجيليـــة عــن طريق علاقتها بجينوم مرجعى Reference Genome وهو جينوم الأرز الأصغر حجما. يطلق على مناطق جينوم الأرز التى تحتــوى علـــى مجموعـــات مـــن الكشافات المتوازية Colinear بين الأنواع النجيلية الآخرى الكتـــل الإرتباطيـــة Linkage Blocks (الشكل١٦-١). وعلى الرغم من مرور حـــوالى ٦٠ مليـــون سنة من التباعد التطورى بين هذه الأنواع إلا أن أقل من ٣٠ كتلـــة إرتباطيـــة موجودة فى الأرز تكون كافية لتمثيل جميـــع الجينومـــات علـــى الـــرغم مـــن الإختلافات الكبيرة فى أحجام تلك الجينومات. وترجع معظم هذه الإختلافات إلى حدوث تغيرات تركيبية فى الجينومات تشمل الإنتقالات والإنقلابات والتكـــرارات الكروموسومية ودرجات التضاعف الكروموسومية المختلفة. أى أن الإختلافات بين هذه الأنواع يكون فـــى صـــور أو أشـــكال الجينـــات Versions of Genes (الأليلات) التى تحملها وليس فى الطرز الأصلية لهذه الجينات.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



شكل (١٦-١): خريطة مجمعة لإثنى عشر جينوم للنجيليات. تمثل كل دائرة الهيئة الكروموسومية لأحد جينومات النجيليات ، تمت محاذاه الدوائرمقارنة بجينوم الأرز بحيث تمر الأقطار على صور مختلفة لنفس الجينات فى الأنواع المختلفة ، وتدل الأسهم على الإنقلابات والإنتقالات بالنسبة لجينوم الأرز والتى تكون ضرورية لوصف الكروموسومات الحالية. تتحدد مواقع التيلوميرات (▲) والسنتروميرات (■) فى حالة معرفة أماكنها. تدل المناطق المظللة على مناطق الكروموسومات التى لا تتوفرعنها بيانات مقارنة. L = الذراع الطويل ، S = الذراع القصير ، T = قمة الكروموسوم ، β = قاعدة الكروموسوم ، Pt = جزء

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويمكن بذلك بمعلومية جينوم الأرز الصغير الحجم رسم خرائط لجينومات كبيرة معقدة مثل القمح والذرة الشامية وقصب السكر وغيرها من أنواع النجيليات.

إستخدام الجينوميا المقارنة فى دراسة الأمراض الوراثية البشرية:

لقد قدمت الجينوميا المقارنة نتائج هامة فى مجال التعرف على جينات الأمراض البشرية فقد تبين مثلا بمقارنة جينوم حشرة الدروسفلا بالجينوم البشرى أن حوالى ٦٠% من الجينات تكون محفوظة (متشابهة) بين هذه الحشرة والإنسان. وبمعنى أخر ، يبدو أن الكائنين يشتركان فى مجموعة كبيرة من الجينات كما إتضح أن ثلثى الجينات البشرية التى لها علاقة قوية بالسرطان لها جينات مقابلة فى جينوم حشرة الدروسفلا.

والأكثر من ذلك أنه عندما تم إدخال جين بشرى ذو علاقة بالأعراض المبكرة لمرض باركنسون Parkinson إلى جينوم الدروسفلا أظهرت الحشرة أعراضا مرضية مشابهة لتلك التى تظهر على الإنسان المصاب بهذا المرض مما يشير إلى إمكانية إستخدام هذه الحشرة الصغيرة لإختبارات خاصة بعلاج هذا المرض فى الإنسان.

إن أحد الأهداف الرئيسية لدراسة تحليلات التتابعات النيوكلتيدية فى جينوم الإنسان تتمثل فى إمكان تحديد التتابعات للجينات المسئولة عن الأمراض البشرية مما قد يؤدى إلى معرفة الأساس البيوكيماوى للأمراض الوراثية والتوصل إلى طريقة لمنع الإصابة بالمرض أو كيفية العلاج.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وتلعب الجينوميا المقارنة دورا هاما فى دراسة الأمراض الوراثية نظـراً لأن إكتشاف جين مناظر فى كائن آخر ذو جينوم صغير (مثـل: الدروسـفلا أو الخميرة أو النماتودا أو حتى الفأر) يمثل مرجعاً هاما لفهم الوظيفة البيوكيماويـة للجين البشرى. حيث تعتبر مثل هذه الجينومـات الـصغيرة نموذجـاً Model Genome للإستدلال منه عن تركيب ووظائف الجينات. فى الجينومات الكبيـرة الأكثر تعقيداً. وتعطى الدروسفلا آمالا عريضة فى هذا الشأن خاصة وأن الطرز المظهرية لمعظم جينات هذه الحشرة قد تم التعرف عليهـا بدقـة ممـا يعطـى الفرصة لإستخدام البيانات المتاحة بالفعل للإستدلال عن طبيعة فعـل الجينـات (المسؤلة عن أمراض وراثية) بمعلومية نظائرها فى جينوم الدروسفلا. وقد تبين أن حوالى ٦٠% من إجمالى ٢٩٨ جين مسئول عن الأمراض البشرية قد وجـد لكل منها جين مكافئْ (مناظر) فى الدروسفلا وأن حوالى ٧٠٠٠ (٥٠%) مـن جميع بروتينات الحشرة تتشابه مع بروتينات معروفة فى الثدييات ومـن أمثلـة الجينات الموجودة فى جينوم هذه الحشرة ولها مقابل فى الجينوم البشرى الجـين الكابت للسرطان P^{53} والذى يؤدى طفوره إلى أن تتحول الخلايا الطبيعيـة إلـى خلايا سرطانية وقد تم تحديد جين P^{53} فى الدروسفلا ووجد أنه ، وكما يحـدث فى الخلايا البشرية ، عند إطفار هذا الجين تحولت خلايا الدروسفلا إلى خلايـا سرطانية. وقد شجعت هذه النتائج الباحثين على إسـتخدام هـذه الحـشرة ذات الجينوم البسيط نسبيا لدراسة الأساس الجزيئى للسرطان فى الإنسان.

ومن جهة أخرى ، ثبت أن حوالى ٣٠% من البروتينات (حوالى ٦٠٠٠) فى ديدان النيماتودا المتناهية الصغر تتشابه مع تلك الموجـودة فـى الثـدييات وتستخدم هذه الديدان حاليا فى البحوث الخاصة بإستنباط أدوية جديدة مهندسـة وراثيا وإختبار فعاليتها.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

من المعروف أن جميع الأدوية الجديدة لابد أن يتم إختبارها أولاً على الثدييات غير الإنسان ، وأن الفأر هو الكائن الثديي المفضل في مثل هذه الإختيارات.

ويعتبر جينوم الفأر الأقرب للجينوم البشرى كما وجد أن ٩٠% من بروتينات الفأر التى تم تعريفها مؤخراً تبدى تشابها مع بروتينات بشرية معروفة.

إلا أن أهم الإنجازات فى مجال إستخدام الجينوميا المقارنة فى التعرف على الجينات المسببة للأمراض فى الإنسان قد حدثت عند مقارنة جينوم خميرة الخباز بالجينوم البشرى.

فقد تبين أن جينات عدد من الأمراض الوراثية لها جينات مناظرة Homologs فى جينوم الخميرة (الجدول ١٦-١) و تشمل هذه الجينات تلك المسببة للسرطان ولمرض التليف الحويصلى Cystic Fibrosis والمتلازمات العصبية Neurological Syndromes وقد وجد فى حالات كثيرة أن الجين المناظر فى الخميرة له وظيفة معروفة تساعد فى التعرف على النشاط البيوكيماوى للجين البشرى المقابل. وفى بعض الحالات أمكن إثبات درجة التشابه الفسيولوجى بين نشاط الجين فى الإنسان و الخميرة. وعلى سبيل المثال ، تبين أن جين الخميرة SGS1 مناظر لجين بشرى مسبب لتناذرى بلوم Bloom`s ويرنر Werner`s واللذان يتميزان بإختلالات فى نمو الفرد. وقد تميزت خلايا الخميرة المحتوية على جين SGS1 الطافر بقصر العمر عن خلايا الخميرة الطبيعية وتظهر سريعا علامات بدء الشيخوخة المبكرة مثل العقم وقد تبين أن هذا الجين يشفر فى الخميرة لواحد من زوج من جينات الهليكيز

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

DNA Helicases الهامة فى نسخ جينات ر رن أ r RNA و لتناسخ د ن أ. وقـد أدى الربط بين جين SGS1 والجينات الخاصة بتناذرى بلوم وويرنز بإسـتخدام الجينوميا المقارنة إلى إمكان التوصل إلى الأساس البيوكيماوى لبعض الأمراض البشرية.

الجدول (١٦-١): أمثلة لبعض جينات الأمراض البشرية التى وجد لها جينات مناظرة فى خميرة الخباز

جينات الأمراض البشرية	الجين المناظر فى الخميرة	الوظيفة فى الخميرة
أميلوتروفيك لاتيرال سكليريروسيز (O_2) Amylotrophic Lateral Sclerosis	SOD 1	بروتين مضاد لسوبر أوكسيد
أتاكسيا تيلا نجيتاسيا Ataxia Telangiectasia	TEL 1	يشفر لإنزيم بروتين كينيز
سرطان القولون Colon Cancer	MSH2,MLH1	إصلاح د ن أ
التليف الحويصلى Cystic Fibrosis	YC F1	المقاومة للمعادن
ميوتينيك ديستروفى (ضمور العضلات) Myotonic Dystrophy	YPK 1	يشفر لإنزيم بروتين كينيز
نيوروفيبروماتوزيز (بطراز ١) Type 1 Neurofibromatosis	I RA 2	يشفر لبروتين تنظيمى
تناذرويرنر Werner`s Syndrome	SGS 1	توزيع بروتين النوية
مرض ويلسون Wilson`s disease	CCC 2	إنتقال النحاس

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

نبذة عن المؤلف

الأستاذ الدكتور/ فتحى محمد عبد التواب

- حصل على بكالوريس فى العلوم الزراعية عام ١٩٥٩ من كلية الزراعة جامعة القاهرة.
- حصل على الماجستير فى الوراثة السيتولوجية عام ١٩٦٦ من جامعة ميرلاند بالولايات المتحدة الأمريكية.
- حصل على دكتوراه فلسفة فى الوراثة البيوكيماوية عام ١٩٦٨ من جامعة ميرلاند بالولايات المتحدة الأمريكية.
- تدرج فى وظائف هيئة التدريس بالجامعة إلى أن أصبح رئيسا لقسم الوراثة بكلية الزراعة جامعة عين شمس.
- شارك فى العديد من النشاطات والمؤتمرات المحلية والدولية فى الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية.
- شارك فى تأسيس مختبرات الوراثة الجزيئية فى مصر وفى بعض الجامعات العربية.
- أمين عام الجمعية المصرية للعلوم الوراثية.
- عضو اللجنة القومية للوراثة بأكاديمية البحث العلمى والتكنولوجيا.
- عضو اللجنة الإشرافية للحملة القومية للأصول الوراثية بمركز البحوث الزراعية.
- عضو اللجنة الدائمة لترقية الباحثين بمعهد الهندسة الوراثية الزراعية بمركز البحوث الزراعية.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

- عضو اللجنة الدائمة لترقية الباحثين بمعهد بحوث القطن بمركز البحوث الزراعية.
- عضو هيئة تحرير المجلة العربية للتكنولوجيا الحيوية.
- عضو اللجنة العلمية الدائمة للوراثة بالمجلس الأعلى للجامعات المصرية.
- عضو فى الجمعية الأمريكية للوراثة.
- نائب رئيس تحرير المجلة المصرية للعلوم الوراثية.
- له أكثر من ثمانين بحثا منشورا فى المجلات العلمية العالمية والمحلية فى مجال الوراثة البيوكيماوية والجزيئية.
- أمين عام الجمعية المصرية لخريجى الجامعات الأمريكية.
- الباحث الرئيسى فى عدد من المشاريع البحثية القومية فى مجال الوراثة الجزيئية «الهندسة الوراثية».
- شارك فى ترجمة ثلاث كتب فى الوراثة الحديثة ومعجم المصطلحات الوراثية.
- قام بترجمة ثلاث كتب فى الثقافة العلمية.
- قام بتأليف كتاب بيولوجيا ووراثة الخلية عام ١٩٩١.
- قام بتأليف كتاب البيولوجيا الجزيئية (مدخل الهندسة الوراثية) عام ١٩٩٣.
- قام بوضع أول أطلس وراثى بيوكيماوى فى مصر عن طريق إستنباط بصمات وراثية بيوكيماوية لمعظم المحاصيل الرئيسية فى مصر (١٩٩٢).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مراجع مختارة
Selected References

Agrawal, N. et al. (2003). RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications, Microb Molec. Biol. Rev. 67:657-685.

Alberts, B.,Johnson, A., Lewis J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell, 4th edition. Garland Science.

Ames, B. (1983). "Dietary Carcinogenes and Anticarcinogenes". Science 221:1256-1264.

Attwood, T. K. and Pary-Smith, D. J. (1999). Introduction to Bioinformatics. Addison Wiley Longman, Harlow.

Baker, B. S. (1989). Sex in flies: the splice of life. Nature 340:521-524.

Baltimore, D. (2001). Our genome unveiled. Nature 409:814-816.

Bassett, D. E.; M.S. Boguski and P. Hieter (1996). Yeast genes and human disease. Nature, 379, 589-590.

Black, D. L. (2000). Protein diversity from alternative splicing : A challenge for bioinformatics and Post-genomic biology. Cell 103:367-370.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. Nature 350:569-572.

Bodnar, A. G. et al. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells Science 279:349-352.

Brown, T. A. (2001). Gene cloning and DNA analysis. 4th edition. Blackwell Science Ltd.

Brown, T. A. (2002). Genomes-2. BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford , UK.

Brown, T. A. (2006). Gene Cloning and DNA Analysis, an Introduction. 5th edition. Blackwell Publishing.

Campbell, J. (1988). Eucaryotic DNA replication: Yeast bears its ARSs. Trends Biochem. Sci. 13: 212-217.

Campbell, J. L. (1986). Eucaryotic DNA Replication. Ann. Rev. Biochem. 55:733-71.

Carter. P. (1986). Site-directed mutagenesis. Biochem.J.237:1-7.

Clark, B. (1980). Elongation step of protein synthesis. Trends Biochem. Sci. 5:207-210.

Claverie, J-M. and C. Notredame (2003). Bioinformatics for Dummies. Wiley Publishing Inc.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Craigen, W. J.; R. G. Cook, W. P. Tate and C.T. Caskey (1985). "Bacterial Peptide Chain Release Factors: Conserved Primary Structure and Possible Frameshift Regulation of Release Factor 2". Proc. Nat. Acad.Sci. 82: 3616-3620.

Crick, F. H. C. (1966). The genetic code III. Sci. Amer. 215:550-562.

Cullen, B. R. and Malim, H. (1991). The HIV-1 Rev protein: prototype of a novel class of eukaryotic transcriptional regulators. Trends in Biochem. Sci. 16:341-348.

Darnel, J. E. Jr. (1983). "The Processing of RNA". Sci. Amer. 249:89-99.

Dear, P. H. (1997). Genome Mapping: A Practical Approach Oxford Univ. Press, N. Y.

DeRisi, J. L., Iyer, V. R. & Brown, P.O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science, 278:680-86.

Devos, K. and M. D. Gale (2000). Genome Relationsships: The grass model in Current research. The plant cell 12:637-646.

Dynan, W. S. (1988). Modularity in Promoters and enhancers. Cell 58:1-4.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240:889-895.

Fields, S. & Sternglanz, R. (1994). The two hybrid system:an assay for protein-protein interactions. Trends in Genetics, 10, 286-92.

Fischer, R. & Emans, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. Transgenic Research, 9, 279-99.

Flavell, R. B., Dart. E., Fuchs. R. L. & Fraley, R. T. (1992). Selectable marker genes: safe for plants? Biotechnology, 10, 141-4.

Friedberg E. C, Walker G. C. and Siede W. (1995). DNA Repair and Mutagenesis. Washington, D. C. ASM Press.

Friedman, D. I; Imperiale, M. J. and S. L. Adhya (1987). 3' end formation in the control of gene expression. Ann. Rev. Genet. 21:453-488.

Gale, M. D. and K. M. Devos (1998). Plant Comparative genetics after 10 year. Science 282:656-58.

Giddings, G., Allison, G., Brooks, D. & Carter, A. (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. Nature Biotechnology, 18. 1151-5.

Goddlin, O. J. M. and Pen, J. (1995). Plants as bioreactors. Trends in Bioteeh. 13:379-387.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Goeddel, D. V., Kleid, D. G. Bolivar, F. et al. (1979). Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 76.106-10.

Goodman, N. (2002). Bioligical data becomes computer literate: new advances in Bioinformatics. Current Opinion in Biotechnology 13:68-71.

van Hal, N. L. W., Vorst, O., van Houwelingen, A. M. M. L. et al.(2000). The application of DNA microarrays in gene expression analysis. Journal of Biotechnology. 78:271-80.

Hamedeh, H. and Afshuri, C. (2000). Gene chips and functional genomics. Am Scientist 88:508-515.

Hannig, G. & Makrides, S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli. Trends in Biotechnology, 16, 54-60.

Hartwell L., Hood L. Goldberg ML. and et al. (2002). genes from genes to genomes. Boston, McGrow Hill.

Heiskanen, M., Peltonen. L. & Palotie. A. (1996). Visual mapping by high resolution FISH. Trends in Genetics. 12:379-82.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Hodges, P. and Scott J. (1992). Apolipoprotein β mRNA editing: A new tier for the control of gene expression: Trends in Biotech. Sci. 17:77-81.

Hunt, S. P. and Livesey R. (Editors) (2000). Functional Genomics: A Practical Approach. Oxford University Press.

Ioannou. P. A., Amemiya. C. T. Garnes. J. et al. (1994). Pl-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. Nature Genetics. 6:84-9.

Jiricny, J. (1998). Eukaryotic mismatch repair: An update. Mutation Research. 409:107-121.

Kim V. N. (2003). RNA interference in functional genomics and medicine. J. Korean Med.Sci. 18:309-318.

Klug, W. S. and Cummings M. R. (2002). Essentials of Genetics 4th edition. Printice Hall, New Jersey.

Kornberg A: and Baker T. A. (1992). DNA Replication.2nd edition. New York, WH. Freeman.

Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryates, eucaryotes, and organelles. Microb. Rev. 47:1-45.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Krawczak, M. & Schmidtke, J. (1998). DNA Fingerprinting, 2nd edn. BIOS Scientific Publishers. Oxford.

Krug, R. M. (1993). The regulation of mRNA transport from nuclens to cytoplasm. Current Opinion in Cell Biology. 5: 944-949.

Latchman, D. (1996). Gene Regulation: A eukaryotic Perspective 2nd edition. Chapman and Hill.

Lee S. K., R. E. Johnson; S. L. Yu; L. Prakash and S. Prakash (1999). Requirement of yeast SGSl and SRS2 genes for replication and transcription, Science, 286:2339-2342.

Lemoine, N. & Cooper, D. (1998). Gene Therapy. BIOS Scientific Publishers. Oxford.

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

Li. L. (2000). Progress in proteomics. Progress in Biochemistry and Biophysics. 27:227-31.

Liu, M. A. (1998). Vaccine developments. Nature Medicine, 4:515-19.

Lodish H., Berk A., Zipursky SL et al (2000). Molecular Cell Biology 4th edition. New York, WH Freeman.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Lu, A. L; S. Clarkand P.Modrich (1983). "Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro". Proc. Nat.Acad.Sci.80: 4639-4643.

Mazur, B. (1995). Commercializing The Products of Plant Biotechnology Trends. in Biotech. 13:319-323.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck Eidens. D. et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCAI. Science, 266:66-71.

Modrich, P. (1987). DNA mismatch correction.Ann. Rev. Bioch. 56:435-466.

Mol, J. N. M., R. van Blokland, P. DE Lange, M.Stam, AND J. M. Kooter. (1994). Post-translational inhibition of gene expression: sense and antisense genes. In Homologous Recombintion and gene Silencing in Plants, pp.309-334, J. Paszkowski, ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.

Monaco. A. P. & Larin, Z. (1994). YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. Trends in Biotechnology, 12:280-86.

Mountain, A. (2000). Gene therapy: The first decade. Trends Biotech. 18: 119-128.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Mullis, K. B. (1990). The unusual origins of the polymerase chain reaction. Scientific American, 262 (4), 56-65.

Ogawa,T and T.Okazaki (1980). Discontinuous DNA replication. Ann. Rev Biochem. 49:421-457.

Peltz, S. W. and Jacobson (1992). mRNA stability in trans-it. Current Opinion in Cell Biology 4:979-983.

Primrose, S. B. and R. M. Twyman (2003). Principies of Genome Analysis and Genomics 3rd Edition .Blackwell Publishing.

Rich, A., and Kim, S. H. (1978). The three dimensional Structure of transfer RNA. Sci Amer. 238:52-62.

Roth, J. R. (1974). "Frameshift Mutations". Ann. Rev. Genet. 8:319-346.

Rumsay, G. (1998). DNA chips: state of the art Nature Biotechnology. 16:40-4.

Russev, G. and R. Hancock (1982). Assembly of new histones into nucleosomes and their distribution in replicating chromation. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 79:3143-3147.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). MoLecular Cloning, A Laboratory Manual,2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Sanger, F., Nicklen. S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 74:5463-7.

Schwartz, D. C. and C. R. Cantor (1984). "Separation of Yeast Chromosome–Sized DNA's by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis". Cell 37:67-75.

Sharp, P. A. (1987). Splicing of messenger RNA precursors. Science 235:766-771.

Sharp, P. A. (1994). Nobel Lecture: Split genes and RNA Splicing Cell 77:805-815.

Singer, M. and P, Berg (1991). Genes and Geomes. University Science Books, Mill Valley , California.

Smith, C. J. S., Watson, C. F., Ray, J. et al. (1988). Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. Nature, 334:724-6.

Smith, T. F. (1998). Functional genomics-bioinformatics is ready for the challenge. Trends in Genetics, 14:291-3.

Snustad, D. P. and M. J. Simmons (2003). Principles of Genetics 3rd edition John Wiley and Sons, Inc.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Spirin, A. S. (1986). Ribosome structure and Protein synthesis, Menlo Park, Ca: Benjamin-Cummings.

Tepfer, M. (1993). Viral genes and transgenic plants: what are the potential environmental risks? Biotechnology, 11:1125-32.

Toenniessen, G. H. (1995). Plant biotechnology and developing countries . Trends in Biotech. 13:404-409.

Venter J. C. et al. (2001). The sequence of the human genome. Science 291:1304-1351.

Venter, C. et al. (1998). Shotgun Sequencing of the human genome. Science 280:1540-1542.

Watson J. D.; Hopkins, N.H; Roberts, J. W. Steitz, J.A.and A. M. Weiner (2005). Molecular Biology of the Gene, 5th ed., Menlo Park, Ca: Benjamin-Cummings.

Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller. (1992). Recombinant DNA, 2nd ed. Scientific American Books, New York.

Weintraub, H. M. (1990). Antisense RNA and DNA. Sci. Amer. 262(1): 40-46.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Williams, J. G. K. et al. (1990). DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acide Res. 18:6531-35.

Yamamoto, K. and T. Sasaki (1997). Large scale EST sequencing in rice. Plant Mol. Biol. 35:135-144.

Yanisch-Perron. C., Vieira, J. & Messing. J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103-19.

Yanofsky, C. (1981). Attenuation in the control of expression of bacterial operons. Nature 289:751-758.

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي