

تناسخ الكروموسومات فى الخلايا مميزة النواة

لاشك أن كروموسومات الإنسان يكون جزئى د ن أ فى كل منها أطول بكثير من كروموسوم بكتريا القولون ففى حين يكون طول جزئى د ن أ فى هذه البكتريا حوالى ١,١ مم (مكون من حوالى ٢,٢ × ٦١٠ زوج من القواعد) نجد أن أطول كروموسوم فى الجينوم البشرى يكون طوله ٧ سم (حوالى ١٥٠ × ٦١٠ نيوكليتيده) . يحتم ذلك أن تتعدد مناشئ التناسخ فى كروموسومات مميزة النواة حتى يمكن أن تتم عملية التناسخ فى الوقت المناسب وبدون أبطاء .

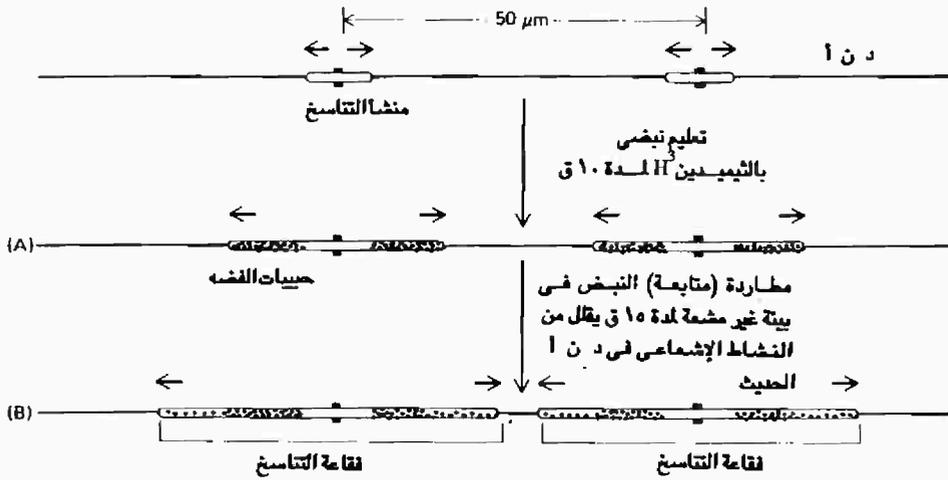
وقد تحقق ذلك بدراسة الطريقة العامة لتناسخ كروموسوم الإنسان حيث تنمى خلايا الإنسان فى مزرعة خلايا وتعلم لفترة قصيرة بالثيميدين المشع ^3H thymidine بحيث يكون د ن أ المتكون خلال هذه الفترة الوجيزة نو إشعاع عال . ثم تكسر الضلايا بلطف ويؤخذ د ن أ ويفرد بعناية على سطح شريحة زجاجية مبطنة بمحلول تصوير حتى يمكن تحديد طراز د ن أ المشع بطريقة التصوير بالإشعاع الذاتى Autoradiography . اختير الوقت المسموح به للتعليم بالإشعاع بحيث تغطى كل شوكة تناسخ فرصة للحركة بمقدار عدة ميكرومترات على طول سلسلة د ن أ القالب . يؤدي 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 ٣ - ١) 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 نيوكليتيده فى الثانية . ويمثل ذلك حوالى $\frac{1}{10}$ السرعة التى تتحرك بها شوكة

التناسخ فى البكتريا . وقد يرجع ببطء الحركة فى مميزة النواة إلى الصعوبة التى تواجهها عملية تناسخ د ن أ فى هذه 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 نيوكليدي ولكن يتم تناسخ مثل هذا الجزيء الكبير من البداية إلى النهاية بشوكة تناسخ واحدة وبسرعة ٥٠ نيوكليده فى الثانية فإن ذلك سيستغرق $١٠ \times ٦٠ \times ١٥٠ = ٠,٢ \times ١٥٠$ ثانية أى حوالى ٨٠٠ ساعة وهو أمر مستبعد بطبيعة الحال .

وقد أظهرت صور الإشعاع الذاتى (الشكل ٢ - ١) أن هناك عدد كبير من شوكات التناسخ تتحرك فى وقت واحد على كل كروموسوم من مميزة النواة . بالإضافة إلى ذلك فإن عدة شوكات تناسخ توجد بالقرب من بعضها البعض فى نفس منطقة د ن أ فى حين تخلو بعض مناطق أخرى من أى شوكات تناسخ .

وقد أثبتت عدة تجارب لاحقة ما يأتى :

- ١ - أن كل كروموسوم ممكن 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 جزيء د ن أ الكروموسومى بأكمله .
- ٤ - داخل وحدة التناسخ الواحدة تكون المناشئ الفردية على مسافات تبلغ حوالى ٢٠,٠٠٠ إلى ٣٠٠,٠٠٠ زوج نيوكليدي من بعضها البعض ، وقد يوجد منشأ تناسخ واحد لكل عروه أو نطاق كروماتينى .



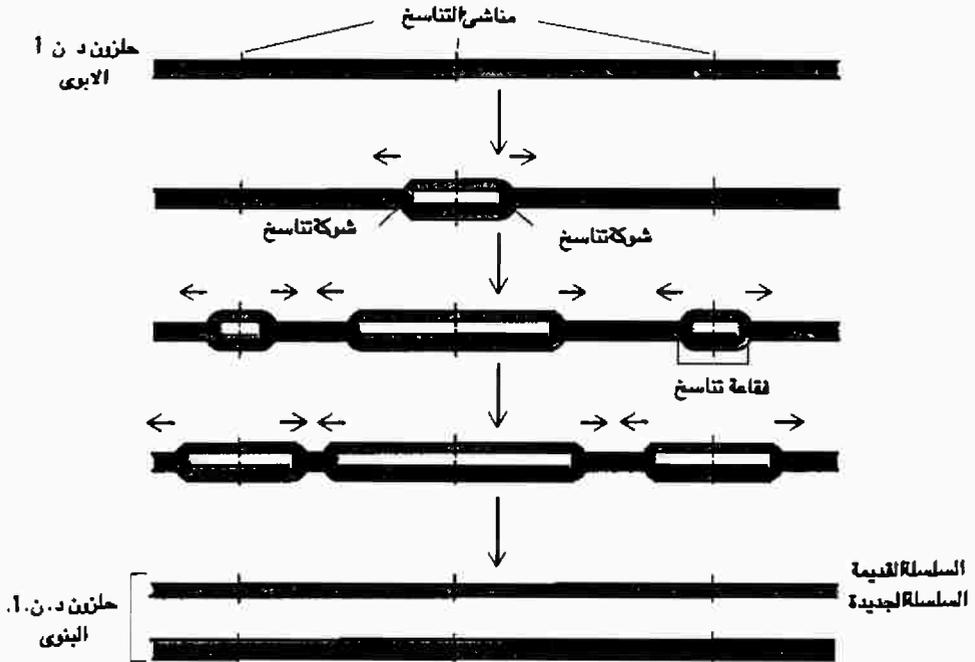
الشكل (٣-١):

التجارب التي تثبت أن حركة شوكة التناسخ تحدث أثناء مرحلة البناء S في مميزة النواة . ثم تعليم قصير لـ د ن أ الحديث البناء في الخلايا البشرية بوميض من الثيميدين العالي الإشعاع (H^3 - thymidine) .

(أ) تم تحليل الخلايا وأجرى 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 اتاحت فترة زمنية أكبر للتخصير في بيئة غير مشعة مما أدى إلى نورات تناسخ متتالية من د ن أ وقد تبين أن أزواج الخطوط الداكنة تحتوي على حبيبات فضة تنترج بالتناقص في الاتجاهين المتضادين . ويبين ذلك الحركة ثنائية الاتجاه للشوكة من منشأ تناسخ مركزي .

٥ - كما هو الحال في البكتريا تكون شوكة التناسخ في أزواج وتتكون فقاعة تناسخ وتتحرك شوكة التناسخ في اتجاهين متضادين بعيداً عن نقطة المنشأ المشتركة وتظل في 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 الطزون المزدوج البنوي على السلسلتين الأبويتين التي يستخدم كل منهما كقالب. (الشكل ٣ - ٢) .

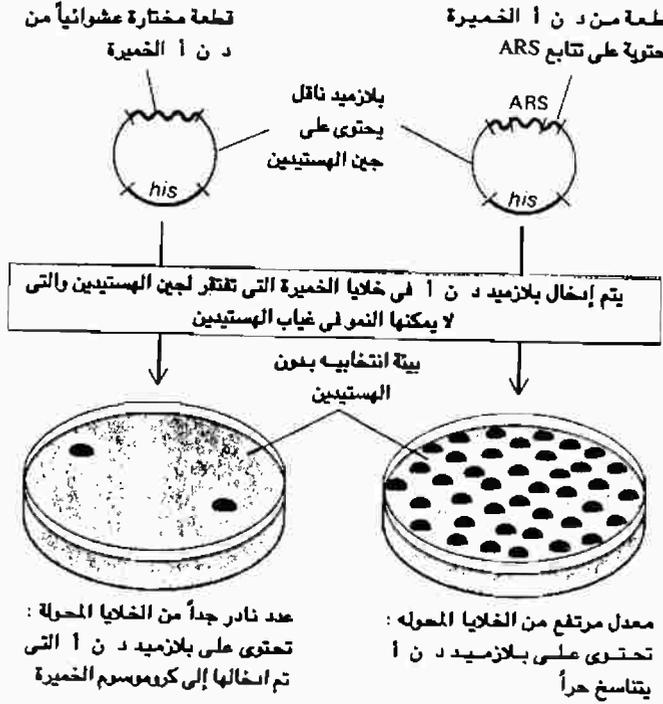


الشكل (٣ - ٢) :

طراز تناسخ د ن أ كروموسوم مميزة النواة حيث تكون منشئ التناسخ موزعة على مسافات من ٣٠,٠٠٠ إلى ٢٠٠,٠٠٠ زوج نيوكليدي في معظم الخلايا . ويعتقد أن شوكات التناسخ تتوقف فقط عندما تتقابل مع شوكات تناسخ تتحرك في الاتجاه المضاد أو عندما تصل إلى نهاية الكروموسوم . وبهذه الطريقة فإن كل الكروموسوم يتم تناسخه .

وجود تتابعات محددة من د ن أ تميز مناشئ التناسخ

سبق الإشارة إلى وجود تتابعات محددة في مناشئ التناسخ في البكتريا والفيروس إلا أنه في مميزة النواة لم تتحدد بصفة قاطعة بعد تتابعات خاصة بمناشئ التناسخ ولو أنه توجد أدلة على أن تناسخ د ن أ يبدأ في مواقع محددة وثابتة على الكروموسومات في خلايا الثدييات.



الشكل (٣-٣) :

تجربة للتعرف على تتابعات التناسخ الثقائي (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.

وقد يفيد في معرفة تتابعات مناشئ التناسخ النظام الذي تمت دراسته بالتفصيل في خميرة الخباز حيث أمكن إجبار خلايا الخميرة على أخذ د ن أ غريب (عملية تحول Trans-formation) وقد أمكن استخدام عدد من البلازميدات الكشافة لهذا الغرض . لا تستطيع

البلازميدات البكتيرية عادة أن تتضاعف في الخميرة ولكن عند إضافة تتابعات معينة من د ن أ الخميرة إلى هذه البلازميدات فإنها أصبحت قادرة على التضاعف . يطلق على هذه التتابعات اسم تتابعات التناسخ الذاتي (ARSes) Autonomous Replication Sequences (الشكل ٣ - ٢) .

يمكن لهذه التتابعات ARSes أن تزيد معدل التناسخ في المعمل *In vitro* باستخدام مستخلص الخميرة في حين توجد في الخلية *In vivo* عناصر ARSes أخرى في الجينوم تتناسخ في أوقات معينة أثناء دور S في الخميرة . تبين أن ARSes المدخلة Inserted البلازميد تتناسخ في نفس الوقت الذي يتم فيه تناسخ مثيلاتها الموجودة في الكروموسوم .

على الرغم من أن هذه الأدلة غير مباشرة إلا أنها تقترح أن ARSes قد تكون هي المناشى الحقيقية للتناسخ في الكروموسومات . وبين الشكل رقم ٢ - ٤ تتابع جزء قصير طوله ٥٧ ، ٤٩ زوج من القواعد من د ن أ الخميرة التي وجد أنها كافية لأعطاء البلازميد خاصية التناسخ الذاتي . يوجد تتابع قصير مشترك محفوظ وهام في حين أن بقية التتابعات لا تبدى تناظر كبير على الرغم من أهميتها الوظيفية ويكون التناظر قصيرا لدرجة لا يمكن توقع حدوث تهجين خلطي بين تتابعات ARSes في الجينوم .

وجد أن عدد هذه التتابعات ARSes في جينوم الخميرة يوجد بتكرار مساو للتكرار المتوقع لمناشئ تناسخ الخميرة (أى حوالى مرة كل ٤٠,٠٠٠ زوج نيوكليدي) .

consensus: ATTTATATTTA
T G T

aaaagtaaaaTTTaATATTTTggatgaaaaaacca ttttagactttttcttaact

.

gatcatgtatgTTTTATGTTTTgtc tggaaaaacat atag lacggata

الشكل (٣-٤):

التتابعات المتناظرة بين عناصر ARS في نوعين من الخميرة . تدل النجوم (*) على مواقع التناظر وتمثل الحروف الكبيرة أفضل تناظر للتتابع المحفوظ في ARS الخميرة .

ضوابط لمنع تكرار بدء التناسخ في الخلايا مميزة النواة

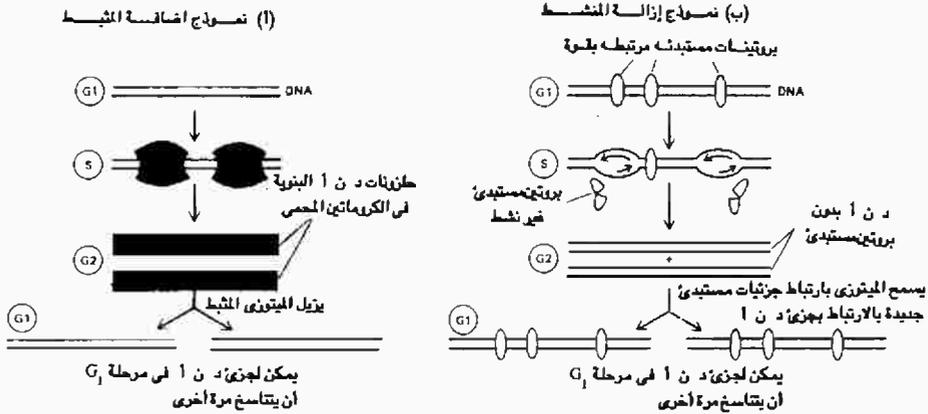
يوجد في كل مجموعة كروموسومية حوالي ٢٠,٠٠٠ منشأً تناسخ يتم تنشيطها بالتتابع على مدى عدة ساعات في نور S في دورة الخلية إلا أنه لكي يتم تناسخ د ن أ بدقة فلا بد للخلية أن تضمن أن كل منشأ تناسخ لا يستخدم إلا مرة واحدة فقط في كل دورة خلية . إن منع تكرار بدء التناسخ في الدورة الواحدة عملية هامة جداً وأساسية في تناسخ مميزة النواة وتمثل فرق جوهري بينها وبين غير مميزة النواه ، حيث أنه عند منتصف نور S تكون بعض أجزاء من الكروموسوم لم تبدأ بعد في التناسخ في حين تكون أجزاء أخرى قد أتمت تناسخها تماماً . يتطلب ذلك متابعة دقيقة عند منتصف وفي آخر نور S .

إن مناشئ التناسخ التي استخدمت بالفعل قد تم أيضاً تناسخها وهي على درجة كبيرة من التشابه في تتابعها على الأقل مع مناشئ التناسخ الأخرى التي لم يأت عليها النور لبدء التناسخ بعد .

ولكن الخلية لا تحتاج إلا إلى استخدام كل منشأ تناسخ مرة واحدة في كل دوره خلية في النور S فكيف يمكن التمييز بين هذه المناشئ لمنع تكرار استخدامها ؟

أمكن باستخدام تقنية الدمج الخلوي Cell fusion التوصل إلى بعض التفسير . فعندما تم دمج خلية في نور S مع خلية في نور G_1 فإن عملية بناء د ن أ تستحث في نواة الخلية G_1 مما يشير إلى أن التحول من النور G_1 إلى S تم بواسطة عامل منشط لعملية بناء د ن أ وقابل للانتشار Diffusable من الخلية S إلى الخلية G_1 . من جهة أخرى ، عندما تم دمج خلية في نور S مع خلية في نور G_2 (أي خلية أتمت للنور S) فقد وجد أن النواة في الخلية G_2 لم تستحث لبناء د ن أ نظراً لأن عملية بناء د ن أ مستمرة بدون عوائق في النواة في نور S فإن النواة في نور G_2 التي أتمت بناء كل د ن أ الخاص بها مرة واحدة تبدو كما لو كانت ممنوعة من الدخول في دورات جديدة من التناسخ في نفس دورة الخلية وذلك بواسطة عوامل مثبطة غير قابلة للانتشار non diffusable والتي تكون مرتبطة بشدة بجزئ د ن أ الخاص بها . إذا تمت إضافة هذا المثبط داخلياً أثناء نور S في أعقاب كل

شبكة التناسخ فإنه سيحل مشكلة عدم تكرار تناسخ المنشأ أكثر من مرة في دورة الخلية الواحدة ، وذلك عن طريق إحداث تعديل في الكروماتين الخاص بـ د ن أ الذي تم تناسخه حديثاً وبذلك نضمن أن الجزء من د ن أ الذي تم تناسخه مرة لن يتكرر تناسخه مرة أخرى في نفس دور S كما في الشكل (٣ - ٥) .



الشكل (٣-٥) :

ميكانيكيتين بديلتين لتفسير « مانعات إعادة التناسخ » التي تحمي د ن أ المنشوخ حديثاً من تكرار تناسخه في نفس دورة الخلية . وهذه المواقع ضرورية للمحافظة على دقة التناسخ إلا أن الطبيعة الجزيئية لها غير معروفة . عادة تزال الموانع أثناء الانقسام الميثوزي إلا أنه في بعض الأنواع القليلة من الخلايا المتخصصة (مثل خلايا الغدد اللعابية ليرقات حشرة الدوسفلا) فإنه يتم إزالتها بدون الميثوزي مما يؤدي إلى تكوين الكروموسومات البوليبيدية العملاقة .

أ - نموذج يعتمد على إضافة مثبط إلى كل الكروماتين المتناسخ حديثاً .

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

يوجد تفسير آخر يعتمد على افتراض وجود بروتين بادئ مرتبط بشدة يحدث له إيقاف لنشاطه inactivation عند مرور شوكة التناسخ (الشكل ٣ - ٥ ب) .

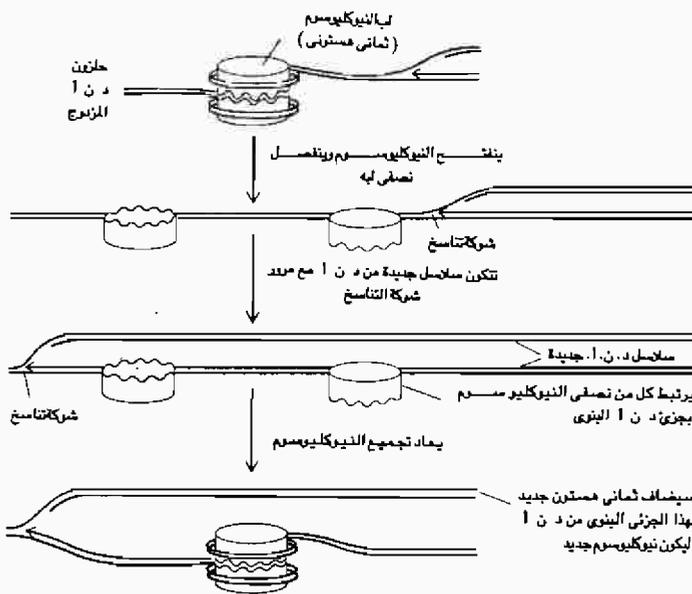
وبغض النظر عن طبيعة هذا العامل المثبط لتناسخ د ن أ فإنه لا بد من إزالته عند أو قبيل بدء فترة الميتوزى حيث أنه بعد أنقسام الخلية لا توجد حماية لـ د ن أ البنوى فى النواة فى دور G_1 .

بناء هستونات جديدة فى الكروماتين أثناء تناسخ د ن أ :

يحتاج تضاعف (تناسخ) الكروماتين أثناء نوره 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 . ففي الفقاريات على سبيل المثال يوجد حوالى ٢٠ مجموعة متكررة وتحتوى كل مجموعة على الجينات الخمسة المنتجة للهستونات . على العكس من معظم البروتينات التى يتم بناؤها بصورة مستمرة أثناء الدور البينى نجد أن الهستونات يتم بناؤها أساساً 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' (كما سيأتى بعد)، نجد أن معظم أنواع mRNA الخاصة بالهستونات تكون غير مستقرة بصورة غير عادية وتهدم خلال دقائق عندما يتوقف بناء د ن أ عند نهاية الدور S (أو عند إضافة مثبطات لإيقاف بناء د ن أ قبل الأوان) . على العكس من ذلك ، نجد أن جزيئات الهستونات نفسها تكون مستقرة وثابتة ويمكن أن تستمر بدون هدم طول عمر الخلية . قد 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 .

بمجرد أن تدخل الهستونات فى تركيب النيوكليوسوم نجد أن جزيئات الهستونات لا تنفصل عن شريط د ن أ المرتبطة به . وعلى ذلك فعندما تتقدم شوكة التناسخ فإنه لا بد أن تمر بطريقة ما من خلال النيوكليوسوم الأبوى الذى يبدو أنه قد صمم بحيث يسمح لكل من عمليتى التناسخ Replication والنسخ Transcription بالاستمرار خلاله . يفترض البعض

أن كل نيوكليوسوم ينقسم بصورة مؤقتة إلى « نصفى نيوكليوسوم » أثناء تناسخ جزيئ د ن أ حتى يمكن السماح لانزيم البلمرة DNA polymerase بنسخ شريط د ن أ غير المحظن الموجود بهذا النيوكليوسوم . يأخذ (يورث) شريط د ن أ المبني حديثاً خلف شوكة التناسخ الهستونات القديمة غير أن هذا الجزيئ الحديث من د ن أ، يحتاج أيضاً إلى كمية مماثلة من الهستونات الجديدة لكي يرتبط بها أيضاً وذلك لكي يكتمل بناء الكروماتين . يتم بناء هذه الهستونات الجديدة عادة فى خلال الدقائق القليلة التى تلى مرور شوكة التناسخ . إلا أن الكروماتين الحديث البناء يحتاج إلى حوالى ساعة لكي يتم نضجه . يبين الشكل رقم (٣ - ٦) نموذجاً مقترحاً لهذه الميكانيكية .



الشكل (٣ - ٦) :

نموذج مقترح يبين كيف يمكن فتح النيوكليوسوم للسماح بتناسخ د ن أ ثم يعاد تجميعه بعد مرور شوكة التناسخ مما يسمح لهستونات لب النيوكليوسوم بالبقاء بصفة دائمة مرتبطة بجزيئ د ن أ على الرغم من أنه فى هذا النموذج يبقى النيوكليوسوم القديم ويورث كما هو لجزيئ د ن أ المنتج على الخيط القائد ، إلا أن الطراز الفعلى لتوارثه لم يتحدد بعد .

كيفية تناسخ منطقة التلومير في الكروموسوم

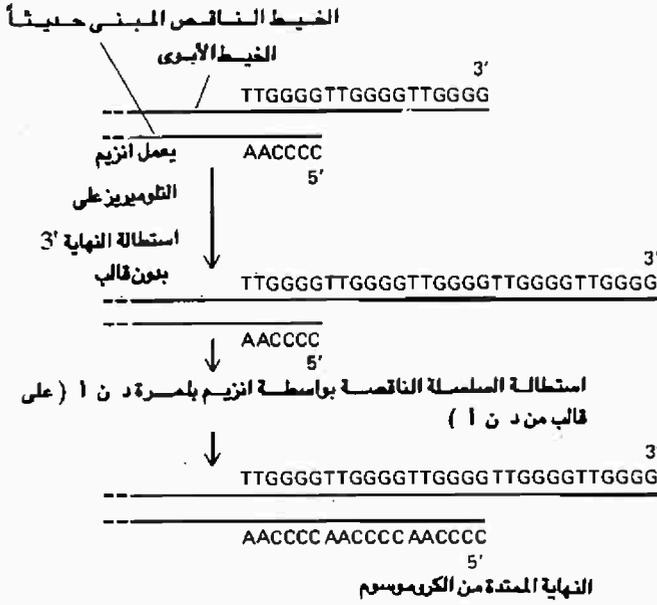
توجد صعوبة في تناسخ أطراف الكروموسومات ذات النهايات المفتوحة (غير الحلقية) وهي الكروموسومات المميزة للكائنات الراقية مما أدى إلى نشأة تتابعات خاصة من د ن أ تسمى التلومير Telomers عند أطراف الكروموسومات . تكون هذه التتابعات متماثلة في كائنات كثيرة مهما كانت درجة ابتعادها في سلم التطور فهي متشابهة في البروتوزوا والفطريات والنباتات والإنسان . تتكون هذه التتابعات من تكرارات مترادفة Tandem لتتابعات قصيرة محتوية على عدد قليل من نيوكلييدات الجوانين المتجاورة كما في الشكل رقم (٣ - ٧) . تبين أن سلسلة د ن أ القصيرة هذه الغنية في G في منطقة التلومير تكون دائماً في النهاية 3' للجزئ . ويبدو أنها تنطبق على نفسها لتكون تركيباً خاصاً لحماية طرف الكروموسوم (ولعل هذا يفسر عدم قابلية منطقة التلومير غير المكسورة للاتحام بمناطق كروموسومية أخرى أو بمنطقة تلومير أخرى) .

يبين الشكل رقم (٣ - ٧) ميكانيكية تناسخ د ن أ عند منطقة التلومير في البروتوزوا كنموذج لما يتم في مميزة النواة .

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

إن اتمام تناسخ جزئ د ن أ في المنطقة بين منشأ التناسخ والمنشأ الذي يليه يحتاج إلى حوالي ساعة فقط إلا أنه وجد أن دور S يستغرق عادة حوالي 8 ساعات في خلية الثدييات . يشير ذلك إلى أن مناشئ التناسخ لا تنشط في نفس الوقت وأن د ن أ في كل وحدة تناسخ (المحتوية على مجموعة من ٢٠ - ٨٠ منشأ كما سبق القول) يجرى تناسخها في فترة قصيرة فقط من دور البناء (S) . والسؤال الآن هو : هل يتم تنشيط وحدات التناسخ المختلفة بطريقة عشوائية أم يوجد نظام معين يتم على أساسه تنشيط التناسخ في المناطق المختلفة من الجينوم طبقاً لترتيب أو تتابع زمني معين ؟

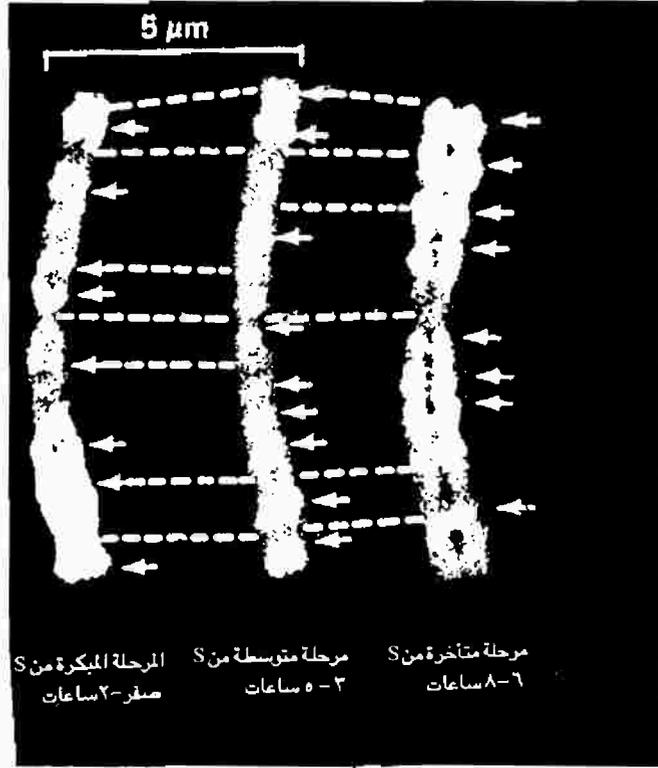
أمكن الرد علي هذا السؤال باستخدام مشابهة الثيميدين Thymidine analoge وهو 5 - Bromodeoxyuridine (BrdU) لتعليم مجموعة من الخلايا على فترات قصيرة محددة أثناء دور البناء (S) . وفي دور (M) يمكن تمييز تلك المناطق من الكروموسومات الميتوزية التي أخذت BrdU في بناء د ن أ حيث أنها تكون أقل قابلية للصبغ بواسطة صبغات خاصة .



الشكل (٣-٧)؛

رسم تخطيطي للتفاعلات التي تحدث لتكوين التومير كما ظهر من التجارب على *Tetrahymena*. يمثل الخط الناقص حديث البناء السلسلة المتناسخة على الجانب المتكئ من شوكة التناسخ. يتعرف إنزيم التوميريز Telomerase الخاص بـ *Tetrahymena* على بعض التراكييب المميزة لتتابعات غنية بالقاعدة G لكي يرتبط بالتومير. وحيث أنه يفترق إلى قالب ويستخدم نيوكلييدات ثلاثية الفوسفات كمادة تفاعل فإن النيوكلييده الموجودة على النهاية 3' لابد أن تدل إنزيم التوميريز ما إذا كان عليه أن يضيف القاعدة G أو T في كل خطوة. يحتوى كل كروموسوم على عدد متغير من تكرارات القواعد الذي قد يصل إلى المئات من أزواج القواعد.

أظهرت هذه التجارب أن المناطق الكروموسومية يتم تناسخها في وحدات كبيرة (كما يستدل على ذلك من عدد مجموعات شوكات التناسخ التي يمكن رؤيتها في صور الإشعاع الذاتي لجزئ د ن أ) وأن المناطق المختلفة في كل كروموسوم يتم تناسخها بالتتابع حسب ترتيب دقيق أثناء فترة البناء (S) كما في الشكل رقم ٣ - ٨.



الشكل (٣-٨):

صورة بالمجهر الضوئي للكروموسومات الميتوزية المصبوغة التي تم فيها تعليم مفاير differentially ا د ن ا المتناسخ أثناء فترات محددة في دوره S السابقة . في هذه التجارب تنمو الخلايا في مزرعة وفي وجود البروموديوكسي يوريدين (BrdU) ويتم تعليمها لفترة وجيزة بالثيميدين أثناء الفترة المبكرة والمتوسطة والمتأخرة من دورة S . وحيث أن د ن ا المتكون أثناء فترة التعليم بالثيميدين يكون حلزون مزدوج بحيث يكون الثيميدين في سلسلة و BrdU على السلسلة الأخرى ؛ فإنه يصبح بشدة ويكون داكناً عن بقية د ن ا (الذي يحتوى على BrdU على كلا السلسلتين) . فيظهر كحزمة لامعة (الأسهم) في هذه الصور السالبة . توصل الخطوط المتقطعة المواقع المقارنة على النسخ الثلاثة للكروموسوم المبين .

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

من المعروف أنه توجد على طول جزيء D ن أ في مميزة النواه مناطق أكثر تكثفاً عن المناطق الأخرى كما هو الحال في مناطق الهيتروكروماتين الذي يظل في حالة تكثف شديد highly condensed أثناء الدور البيئي في حين نجد أن الكروماتين النشط يأخذ شكلاً غير متكثف الذي يبدو أنه مناسباً لنسخ R ن أ عليه . يمكن تفسير الميكانيكية التي تحدد توقيت تناسخ D ن أ من خلال ملاحظة أن مناطق الهيتروكروماتين ، بما فيها المنطقة المحيطة بالسنترومير والتي تظل متكثفة خلال الدور البيئي ، يتم تناسخها متأخراً جداً في دور البناء S . يمكن أن يعزى هذا التناسخ المتأخر إلى تكثيف D ن أ بشده في الكروماتين . يدعم هذا الاستنتاج الاختلاف في توقيت تناسخ كروموسومي X في إناث الثدييات . إذ على الرغم من أن هذين الكروموسومين يحتويان على نفس تتابع D ن أ نجد أن واحداً منها فقط يكون نشطاً في حين يظل الآخر خاملاً . وجد أن معظم مناطق X كروموسوم الخامل يكون متكثفاً بشدة في شكل هيتروكروماتين ويتم تناسخ D ن أ الخاص به في مرحلة متأخرة ويتم تناسخه أثناء المراحل الأولى وعلى طول فترة S . ويبدو من ذلك أن تلك المناطق من الجينوم التي يكون الكروماتين بها أقل تكثفاً أثناء الدور البيئي تكون الأكثر تعرضاً لميكانيكيات التناسخ في مراحل مبكرة من فترة البناء S .

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

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

توجد مجموعة من الجينات التي تنشط بصفة عامة في جميع الخلايا بدون تخصص خلوي ويطلق عليها الجينات اللا نوعية non - specific أو house keeping genes «الشغالة» وهي تختلف عن الجينات الأخرى التي لا تنشط إلا في خلايا نوعية (Spatial development) أو في مرحلة معينة من عمر الكائن (Temporal development) .

تبين أن المجموعة الأولى من الجينات يتم تناسخها في مرحلة مبكرة من فترة S . فقد

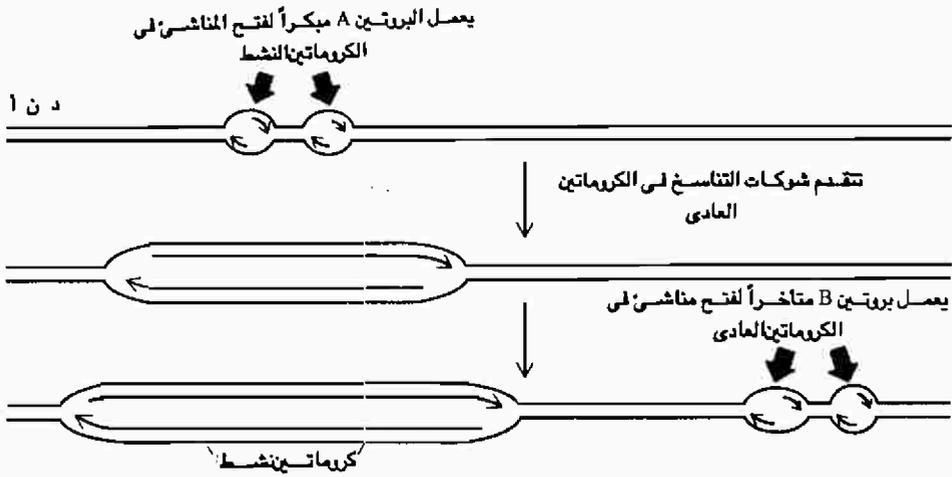
أجريت تجارب تبين فيها أن هذه الجينات تتناسخ في جميع أنواع الخلايا التي أُختبرت في أولى مراحل فترة S في حين أن مجموعات الجينات التي تنشط في بعض أنواع من الخلايا المتخصصة فقط يتم تناسخها مبكراً في هذه الخلايا المتخصصة فقط في حين يجري استنساخها متأخراً في أنواع الخلايا الأخرى . فعند دراسة نشاط جين أحد الجلوبيونات المناعة Immunoglobulins ويبلغ طوله حوالي ٢٠٠,٠٠٠ زوج نيوكليدي . وجد أن جميع مناطق الكروماتين لهذا الجين قد أكملت تناسخها قرب بداية فترة البناء S في الخلايا المتخصصة في إنتاج الأجسام المناعية ((Plasma cells (AFC) وهي تلك الخلايا التي يكون فيها الجين نشطاً جداً مما يؤيد وجود عدة مناشئ للتناسخ داخل الجين يتم تنشيطها في نفس الوقت تقريباً . بينما في الخلايا غير المتخصصة في إنتاج هذه الجلوبيونات المناعية لم تظهر سوى شوكة تناسخ وحيدة حيث بدأت من إحدى نهايتي هذا الموقع الوراثي بعد حوالي ساعة من بداية فترة البناء S ثم تحركت على شريط DNA بالسرعة العادية وهي ٢٠٠٠ نيوكليدي في الدقيقة الواحدة .

يبين الشكل ٢ - ٩ نموذجاً لتفسير ذلك ، حيث يتم استخدام جميع مناشئ التناسخ الموجودة في الكروماتين النشط في مرحلة مبكرة جداً من فترة البناء S . وعند وصول شوكة التناسخ المتكونة عند هذه المناشئ سيتم وصولها في النهاية إلى المناطق الكروموسومية المجاورة المحتوية على كروماتين أكثر تكثفاً (هيتروكروماتين) . وعلى ذلك فإن أي جين يقع على بعد أقل من مليون زوج نيوكليدي من منشأ تناسخ في منطقة الكروماتين النشط سيتم تناسخه في منتصف فترة S .

$$\therefore \text{لماذا؟ الزمن} = \frac{\text{المسافة}}{\text{السرعة}} = \frac{1 \times 10^6}{60 \times 3 \times 10^3} = 5,5 \text{ ساعة}$$

أو، المسافة = السرعة × الزمن = $60 \times 3 \times 10^3 \times 5,5 = 7,2 \times 10^6$ زوج نيوكليدي
حيث أن متوسط طول فترة البناء S في خلية الثدييات يساوي حوالي 8 ساعات

لتفسير كيف يتم تناسخ المناطق الكروموسومية غير النشطة والتي تقع بعيداً عن المناطق النشطة (كما هو الحال في الكروموسوم X غير النشط في الأنثى) فإنه يفترض وجود مجموعة أخرى من مناشئ التناسخ التي تنشط في منتصف أو في أواخر دور S بحيث يمكنها بدء شوكة تناسخ في أي صورة من صور الكروماتين .



الشكل (٣-٩):

نموذج لتفسير لماذا يتم التناسخ للكروماتين النشط مبكراً في دور S بينما الكروماتين العادي (غير النشط) يتم تناسخه متأخراً في دور S . يعتقد أن أنواع مختلفة من البروتينات المبندة ترتبط بمناشى التناسخ في الكروماتين العادي . وكتفسير بديل قد يتم استخدام مجموعتى المناشى بواسطة نفس الميكانيكية الجزيئية ولكن في أوقات مختلفة نظراً لأن التركيب المتكثف (المتحازن) للكروماتين العادي يؤخر الارتباط الصحيح للبروتينات المشاركة في التناسخ .

تبين أن الجينات غير التخصصية (الشغالة) housekeeping genes تقع في مناطق الكروماتين الغنية في حزم G - C في حين تقع الجينات العادية (التخصصية) والتي تنشط فقط في خلايا متخصصة في مناطق الكروماتين الغنية في حزم A - T .

تنظيم نشاط مناشىء التناسخ حسب المراحل التكوينية للكائن :

وجد أن دورة الخلية تكون سريعة بصورة غير عادية أثناء طور الانفلاج الأول في معظم الخلايا البيضية التي ينقسم فيها البلاستومير بدون أى نمو للخلية . وتكون فترة البناء S

قصيرة بشكل ملحوظ أثناء هذا الطور التفلجي . من جهة أخرى توجد حالات تكون فترة S فيها طويلة جداً حيث نجد أنه في المرحلة السابقة مباشرة للميتوزي تكون فترة S طويلة جداً في جميع الكائنات التي درست حتى الآن . وعلى سبيل المثال في سمندل الماء Newt تستغرق فترة S ساعة واحدة في مرحلة البلاستولا في حين تستغرق حوالي ٢٠ ساعة في الخلايا الجسدية الناضجة وتصل إلى حوالي ٢٠٠ ساعة في المرحلة التي تسبق الميتوزي في الخلايا المؤدة للحيوانات المنوية Spermatogonia . ترجع الفروق في طول فترة S إلى تغيرات في أعداد مناشئ التناسخ النشطة . تحتوي الخلايا الجنينية على أعداد كبيرة من مناشئ التناسخ النشطة في حين تقل أعداد هذه المناشئ كثيراً في كروموسومات مرحلة ما قبل الميتوزي .

توجد حالة مماثلة في الدروسفلا حيث وجد أن فترة S في النواة الجنينية تستغرق من ٢ إلى ٤ دقائق بينما تستغرق حوالي 600 دقيقة في الخلايا الجسدية للحشرة البالغة . وجد أن الخلية المتفلجة في هذه الحشرة تحتوي على مناشئ للتناسخ كل ٢ - ٢ ميلليمترون على طول جزئ د ن أ في حين تزيد المسافة بين المناشئ بشكل ملحوظ في الخلايا الناضجة حيث يصل إلى حوالي ١٢ ميلليمترون . من الواضح أن نشاط عدد مناشئ التناسخ تخضع للمرحلة التكوينية Developmental stage التي يمر بها الكائن . وأن كثير منها يكون نشطاً في مرحلة تكوين الجنين في حين تظل أعداد قليلة منها فقط هي النشطة في مرحلة نضج الكائن . يدل ذلك على وجود تنظيم معقد يتحكم في بدء تكوين شوكات التناسخ بطريقة تسمح بتناسخ مناطق د ن أ المختلفة في الجينوم وفقاً لجدول زمني دقيق .

أنواع إنزيمات بلمرة د ن أ في الخلايا المميزة النواة

تبين وجود ثلاث صور من إنزيم بلمرة د ن أ . DNA polymerases وهي : α , B,

(وذلك في جميع نظم الخلايا مميزة النواة كما في الجدول ٢ - ١ .

الجدول ٣ - ١ صور إنزيم بلمرة د ن أ فى مميزة النواة

الصورة :			
٤	β	α	
الميتوكوندريا تتاسخ mt DNA	النواة إصلاح الأخطاء	النواة تتاسخ د ن أ النواة	الموقع : الوظيفة : الكتلة (Kdal)
٢٠٠ - ١٥٠	٥٠ - ٢٠	٢٢٠ - ١٢٠	

تقوم الصورة α والمسئولة عن تتاسخ معظم د ن أ النووى بنفس الدور الذى يقوم به DNA Pol III فى البكتريا . ويتكون الإنزيم α من عدد من وحدات من عديدات الببتيدات بحيث تقوم أطول وحدة فيها (حوالى ١٥٠ كيلودالتون) بنشاط البلمرة . لم يكتشف حتى الآن صورة إنزيمية فى مميزة النواة موازية وظيفياً لإنزيم DNA PolII فى البكتريا على الرغم من اكتشاف صورة جديدة δ فى الخلايا الثيموسية قد تعطى نفس الوظيفة تقريباً .

لم تتحدد حتى الآن وظيفة الصورة β على الرغم من أنها قد تشترك فى عملية إصلاح الأخطاء proofreading أما الصورة فقد تم تحديد وظيفتها حيث أنها متخصصة فى تتاسخ mt DNA ويكون وجودها قاصراً على الميتوكوندريا (وربما فى الكلوروبلاست فى النبات) .

يبين الجدول رقم ٢ - ٣ بعض الفروق في تناسخ د ن أ من غير مميزة النواة ومميزة النواة
جدول ٢- ٣ مقارنة بين تناسخ د ن أ في غير مميزه النواه ومميزه النواه

مميزة النواة	غير مميزة النواة	المقارنة
حوالي ٩ - ١٠ نيوكليده حوالي ٢٠٠ نيوكليده ٥٠ نيوكليده في الثانية عدة آلاف وتحت تنظيم تكويني توجد	حوالي ٥ - ٨ نيوكليده حوالي ١٠٠٠ - ٢٠٠٠ نيوكليده ٥٠٠ نيوكليده في الثانية واحد فقط لا توجد	طول بادئ ر ن أ طول شظايا أوكازاكي في الخيط التابع معدل سرعة تحرك شوكة التناسخ عدد مناشئ التناسخ ميكانيكية منع إعادة بدء التناسخ في نفس بوره الخلية