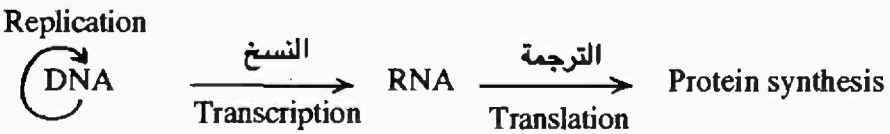
بناء البروتين
Protein Synthesis

تقوم الأنواع الثلاثة من ر ن أ وهى : mRNA , tRNA , rRNA بالدور الرئيسى فى عملية الترجمة Translation ، أى بناء البروتين ، حسب المعادلة المركزية Central dogma :



وكان يعتقد فى البداية أن جميع هذه الأنواع الثلاثة تستخدم كقالب template فى عملية الترجمة ، إلا أنه تبين أن واحدا منها فقط وهو ر ن أ المراسل mRNA هو الذى يقوم بالفعل بدور القالب ، فى حين يقوم النوعان الآخران بأدوار أخرى هامة للمساعدة فى توجيه واتمام عملية الترجمة .

وقد دلت الدراسات على أنه لاتوجد علاقة تجاذب نوعية specific affinity بين المجاميع الجانبية فى كثير من الأحماض الأمينية وبين القواعد النيتروجينية الموجودة فى mRNA القالب ، لذلك اتجهت البحوث الى محاولة التعرف على نوعية معينة من ر ن أ تقوم بدور الوسيط أو المهيئ adaptor بين ر ن أ المراسل mRNA وبين الأحماض الأمينية ليعمل كهمزة الوصل بينهما وقد تم التوصل الى أن جزيئات ر.ن.أ. الناقل tRNA هى التى يمكنها أن تقوم بهذا الدور .

تحتوى الخلية على مجموعة من ر ن أ الناقل وهى عبارة عن جزيئات من الأحماض النووية الريبوزية صغيرة الحجم (بطول حوالى 70 - 90 نيوكلتيدة) . يسمح بتركيب جزئ tRNA بوجود موقعين نوعيين مستقلين ويمكن لأحدهما أن يتعرف على ويرتبط بالحامض

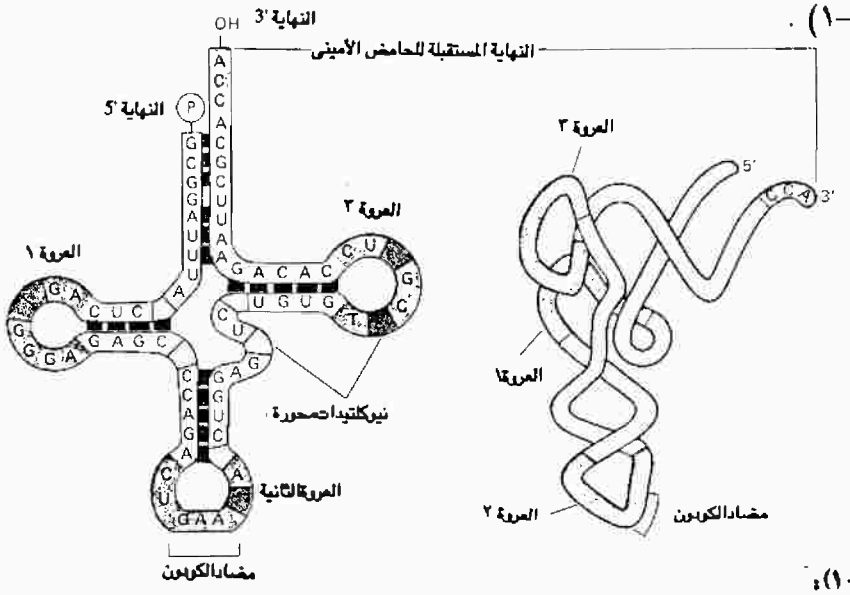
الأمينى بمساعدة انزيم نوعى يسمى tRNA synthetase ؛ فى حين يقوم الموقع الآخر الموجود فى الطرف الآخر من الجزئ والمحتوى على مضاد الكودون بالتعرف على ثلاثية الكودون الموجودة فى تتابع القواعد على جزئ mRNA مما يسمح للأحماض الأمينية بأن تصطف طبقا لهذا التتابع النيوكلتيدى .

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 بالروابط الهيدروجينية الى 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 الى تتابع مقابل من الأحماض الأمينية فى البروتين . يقوم tRNA بدور أساسى كوسيط فى عملية الترجمة حيث ترتبط أحدى نهايتيه بحامض نوعى فى حين تتزاوج النهاية الأخرى مع الكودون الخاص بهذا الحامض على جزئ mRNA أى يمكن القول بأن tRNA يقوم بتحويل تتابع النيوكلتيدات الى تتابع من الأحماض الأمينية . من جهة أخرى تؤدى الرابطة التساهمية التى تحدث بين الحامض الأمينى وبين جزئ tRNA الى تنشيط الحامض الأمينى عن طريق تكوين رابطة ذات طاقة عالية عند النهاية الكربوكسيلية لهذا الحامض بحيث يمكنها أن تتفاعل مع المجموعة الأمينية للحماض الأمينى التالى فى تتابع متعدد الببتيد ، حيث تستخدم طاقة التنشيط هذه فى تكوين آصرة ببتيدية . تعد عملية التنشيط هذه ضرورية لبناء البروتين لأن الأحماض الأمينية غير المنشطة لايمكن اضافتها مباشرة الى سلسلة متعدد الببتيد النامية .

تعتمد وظيفة جزئ tRNA على دقة تركيبه الثلاثى الأبعاد Three dimension structure . وقد

أمكن دراسة التركيب الدقيق لعدة جزيئات 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 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 (٨-١) .

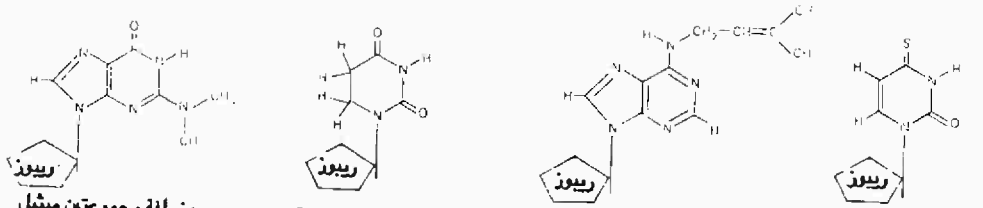


الشكل (٨-١):

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) الى اليمين . وأحد النهايات تستقبل 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 الى حوالى ١٠٪ من اجمالى النيوكلتيدات ، والتى تنشأ عن عملية تحوير أو تعديل للنيوكلتيدات العادية فى عملية التجهيز التى تعقب عملية نسخ tRN . وقد تبين أن وجود هذه النيوكلتيدات

غير العادية يساعد على أن يأخذ جزئ tRNA التركيب المطلوب لكى يقوم بوظيفته . ويبين الشكل (٨-٢) تركيب بعض هذه النيوكلتيدات غير العادية .



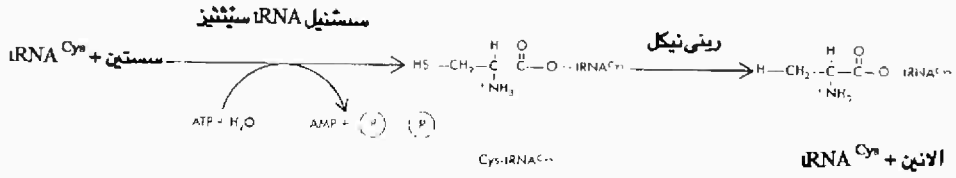
احلال الكبريت بدل الاكسوجين فى U — اضافة مجموعة أزوبنتيل إلى A — اضافة ذرتين هيدروجينية إلى U — اضافة مجموعتين ميثيل إلى G

الشكل (٨ - ٢):

بعض النيوكلتيدات غير العادية الموجودة فى جزيئات tRNA . وتنتج هذه النيوكلتيدات عن طريق حدوث تعديلات تساهمية فى نيوكلتيدات عادية بعد اضافتها الى سلسلة ر ن أ وتمثل هذه النيوكلتيدات غير العادية حوالى ١٠٪ من اجمالى النيوكلتيدات فى جزيئات tRNA .

دور انزيم Aminoacyl-tRNA synthetase فى عملية الترجمة :

وجد أن جزئ tRNA ، وليس الحامض الأمينى الذى يحمله ، هو الذى يحدد مكان اضافة هذا الحامض فى سلسلة متعدد الببتيد أثناء عملية الترجمة . وقد تأكد ذلك بوضوح بعد تجربة مثيرة تم فيها تحميل tRNA Cys بحامض السستين ، ثم أجريت عملية تحويل لحامض السستين المحمل الى حامض الألانين بعملية يتم فيها نزع مجموعة SH بالرينى نيكل Raney Nickel كما فى الشكل (٨-٣) وبذلك ينتج جزئ AlatRNA هجين أى «alanyl-tRNA^{Cys}» وعند استخدام مثل هذا الجزئ فى نظام بناء البروتين المعملى وجد أن كل موقع للسستين فى سلسلة متعدد الببتيد الناتج قد استبدل بحامض الانين alanine مما يبين مبدأين أساسيين . أولهما أن الحامض الأمينى المحمل ليس له دور فى تحديد موقع اضافته فى سلسلة متعدد الببتيد ، والثانى والأهم أن جزئ tRNA يقوم بدور المهيئ فقط بين الحامض الأمينى وبين mRNA وأن التفاعل الحرج يكمن فى التطابق الصحيح بين جزئ tRNA النوعى والحامض الأمينى المخصص له ، وتتم هذه المطابقة بواسطة انزيم aminoacyl-tRNA synthetase .



الشكل (٨ - ٣):

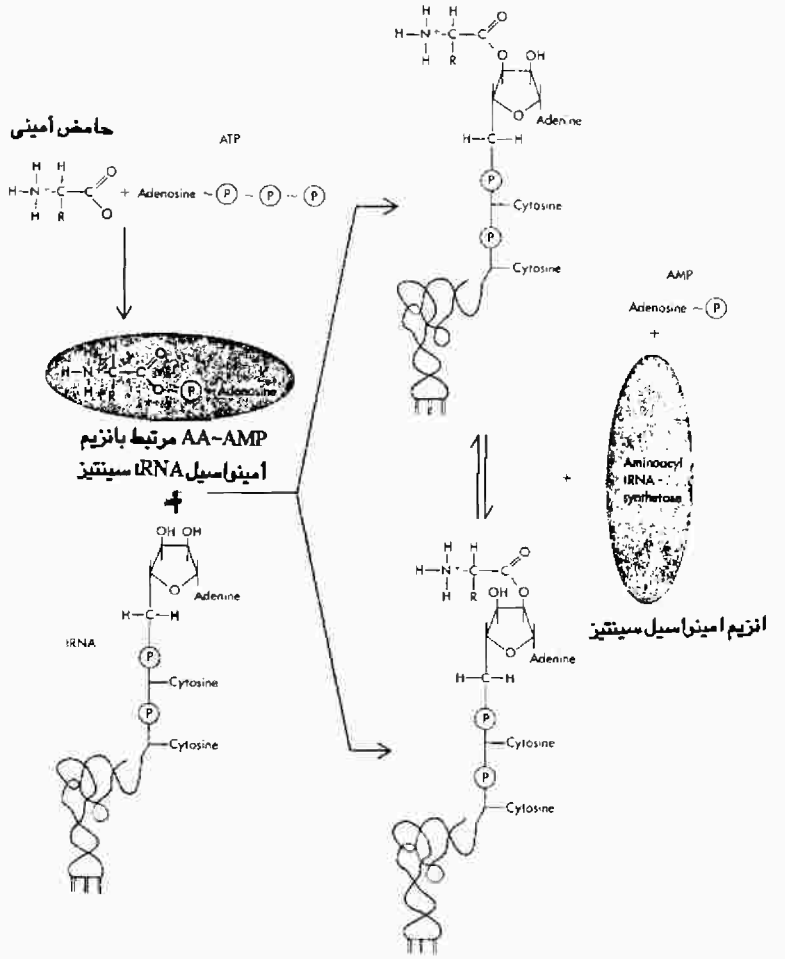
تجربة لاثبات أن جزئ tRNA يقوم فقط بدور المهيئ . أمكن تحويل السلسلة الجانبية للحامض الأمينى السستين الى الانين بعد تحميل الأول على $tRNA^{Cys}$. تتم اضافة الانين فى مكان السستين فى جزئ الهيموجلوبين .

تبين وجود انزيم نوعى A-A-tRNA synthetase متخصص لكل حامض أمينى (أى يوجد 20 انزيم من هذا النوع) بحيث يكون أحدهما متخصصاً فى التزاوج بين الحامض الأمينى (X) و tRNA(X) ، وهكذا .

يتم تفاعل التزاوج على خطوتين ويؤدى الى الحصول على جزيئات Aminoacyl-tRNA كما فى الشكل (٨-٤) . ويتضح من هذا الشكل أن هذا الانزيم نفسه هو الذى يساعد على تنشيط الحامض الأمينى كما سبق الذكر . كما يبين الشكل (٨-٥) كيف تتم ترجمة الشفرة الوراثية من خلال نشاط انزيم A-A-tRNA-synthetase 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 .

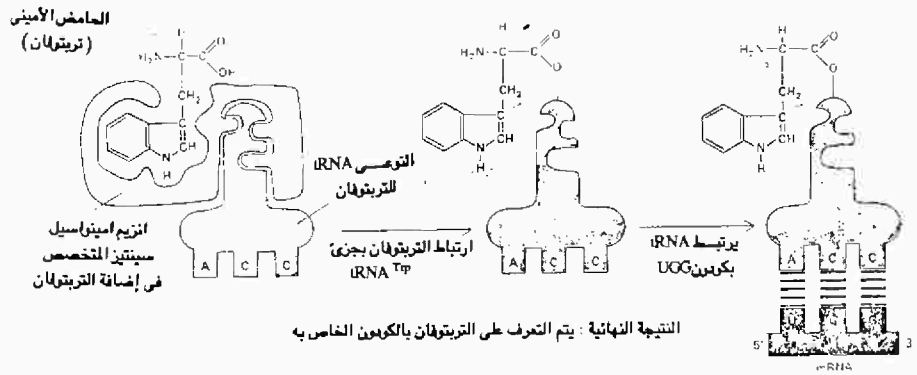
ولكن كيف يتسنى لهذا الانزيم التوفيق بين الحامض الأمينى الصحيح وبين جزئ tRNA النوعى الخاص به ، وخاصة فى حالة الأحماض الأمينية المتشابهة التركيب . أمكن معرفة كيف يتم هذا التمييز بمتابعة ماتم التوصل اليه بالنسبة لانزيم Isoleucyl-tRNA synthetase حيث أمكن لهذا الأنزيم أن يميز بين الأيزوليوسين والڤالين ، وهما حامضان أمينيان متشابهان تماما فيما عدا وجود مجموعة ميثيل اضافية فى حالة الايزوليوسين وبالتالى فإن الفرق فى طاقة الارتباط binding energy بانزيم Isoleucyl-tRNA synthetase لاتزيد عن ٣ كيلو سعر (3 K cal) وهو مقدار ضئيل من الطاقة يبدو للوهلة الأولى أنه غير كاف لمنع الخطأ فى

الاختيار بين هذين الحامضين . فعلى سبيل المثال عندما يوضع Isoleucyl-tRNA synthetase مع مخلوط متكافئ الكمية من حامض الأيزوليوسين والڤالين فإنه قد يحدث التنشيط الخاطئ لجزئ واحد من الڤالين (Val - AMP) فى نفس الوقت الذى يتم فيه التنشيط الصحيح لـ ١٠٠ جزئ من الأيزوليوسين (Isol - AMP) فى هذا المخلوط نفسه .



الشكل (٨ - ٤):

تنشيط الحامض الأمينى بـ ATP ونقله الى النهاية CCA لجزئ tRNA النوعى . لاحظ أنه بمجرد أن يرتبط الحامض الأمينى بالجزئ فإنه يمكن الانتقال بسرعة بين النهاية 3´ , 2´ OH للأدينوسين النهائى فى جزئ tRNA .



الشكل (٨ - ٥) :

دور كل من جزئ tRNA وانزيم امينواسيل tRNA سينثيتيز فى ترجمة الشفرة الوراثية حيث يتم ربط الحامض الأمينى بجزئ tRNA النوعى عند النهاية CCA برابطة تساهمية بفعل الانزيم فى حين تتم قراءة ثلاثيات الكودون فى mRNA بمضاد الكودون فى عروة مضاد الكودون فى tRNA حسب قانون تزاوج القواعد.

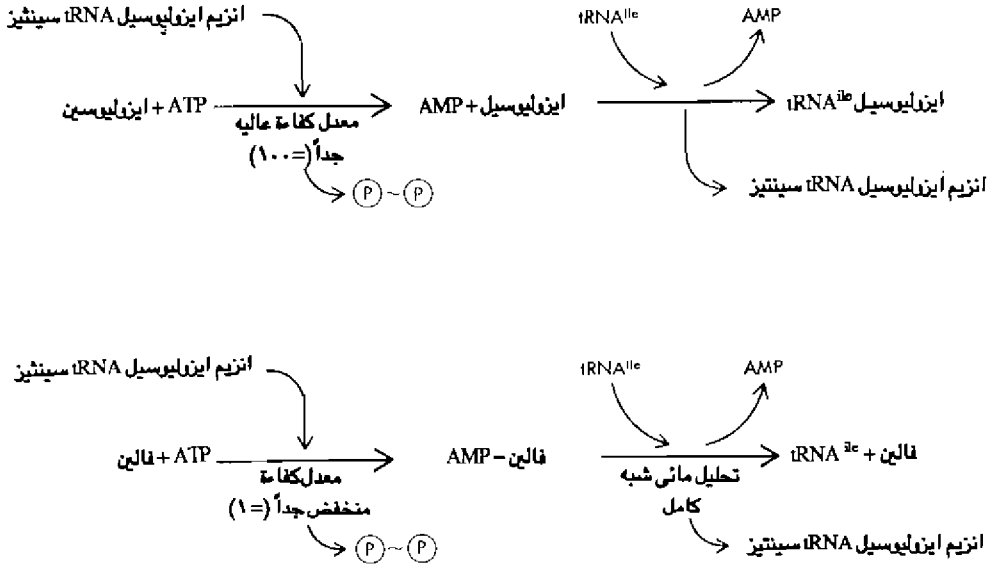
وعند نقل هذه الجزيئات المنشطة من الفالين (Val ~ AMP) فى خطوة تالية الى جزيئات Isol-tRNA فإنه يحدث نسبة عالية من الخطأ غير المسموح به . الا أن هذا النقل يتم عادة بتكرار منخفض جدا حيث وجد أنه عندما يرتبط Isol-tRNA بالمعقد :

Val ~ AMP - Isol ~ tRNA synthetase فإن جميع جزيئات Val ~ AMP تقريبا تتفكك بالتحليل المائى بسرعة الى مكوناتها من الفالين ، AMP (الشكل ٨-٦) .

ويتطلب هذا النوع من المراجعة Proofreading الارتباط المستمر بين الحامض الأمينى وبين الموقع النشط لانزيم AA-tRNA synthetase وذلك من خلال خطوتى التفاعل الانزيمى الذى يقوم بها هذا الانزيم ، وبذلك يمكن أن يحدث التمييز أو التفريق بين الأيزوليوسين والفالين مرتين وبالتالى تنخفض نسبة الخطأ الى $١٠^{-٢} \times ١٠^{-٢} = ١٠^{-٤}$.

ويبدو الآن أن عملية المراجعة تحدث فقط فى تلك الأنزيمات التى لايمكن الحصول فيها على درجة كافية من الدقة فى التوفيق فى خطوة واحدة للاختيار . فمثلا تبين حديثا من دراسة التركيب الدقيق لانزيم tyrosyl-tRNA synthetase ان هذا الانزيم باستطاعته التمييز

بين حامضين امينيين متشابهين جدا وهما الفينيل الانين والتيروسين عن طريق تكوين روابط هيدروجينية نوعية مع مجموعة OH للتيروسين كما فى الشكل (٨-٧) . وهناك مجموعات أخرى من الأحماض الأمينية يتم فيها عملية التمييز بدون الحاجة الى مراجعة مثل الاسبارجين وحامض الاسبارتيك ؛ السيتوسين والهستيدين ؛ الليسين والتربتوفان .



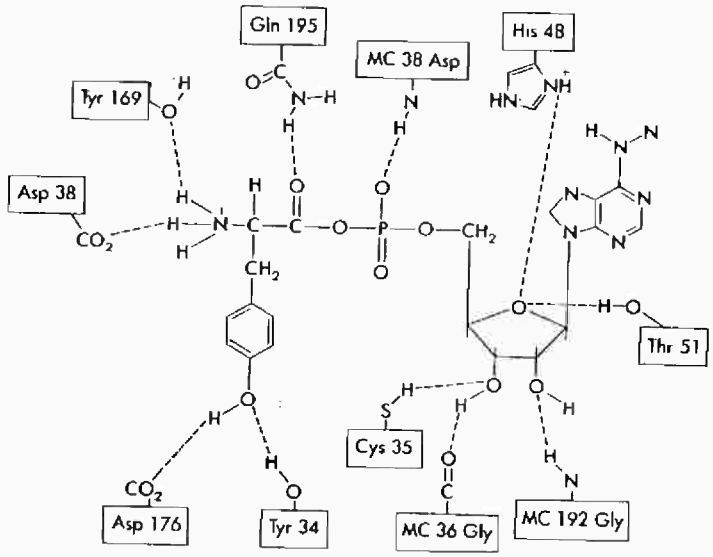
الشكل (٨ - ٦):

التمييز بين الحامضين المتشابهين ايزوليوسين والفالين عند تكوين ايزوليوسيل tRNA ile .

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 الى النهاية الطرفية الكربوكسيلية . ويلاحظ أنه على مدى مرحلة بناء البروتين بأكملها تظل النهاية الكربوكسيلية لسلسلة متعدد الببتيد النامية

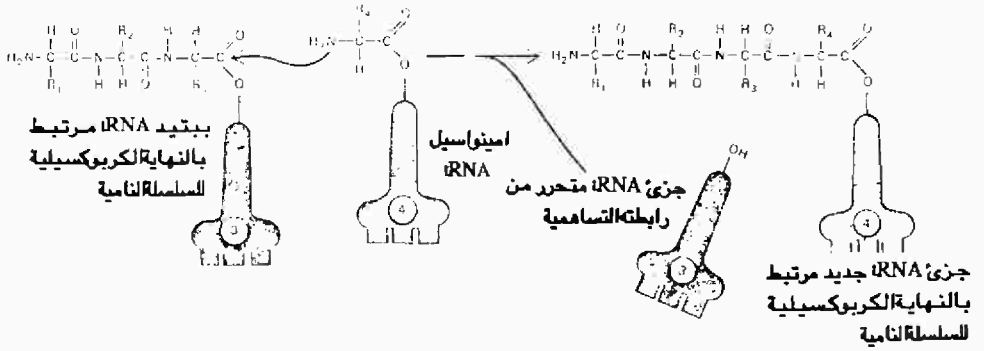
منشطة Activated عن طريق الرابطة التساهمية بينها وبين جزئ tRNA الببتيدى peptidyl tRNA ~ . ويتم كسر هذه الرابطة التساهمية الغنية بالطاقة عند اضافة كل حامض أمينى . الا أنها تعوض مباشرة عن طريق تكوين رابطة تساهمية جديدة مشابهة تتم عند إضافة أحدث حامض أمينى كما فى الشكل (٨-٨) . وبهذه الطريقة يحمل كل حامض أمينى عند اضافته طاقة التنشيط المطلوبة لاضافة الحامض الأمينى التالى له وليست تلك الخاصة باضافته هو نفسه .



الشكل (٨ - ٧):

تكوين روابط هيدروجينية بين تيروسيل tRNA سينثيتيز وتيروسيل أدينيليت حيث بينت دراسات التركيب الثلاثى وجود أماكن لاحدى عشر رابطة هيدروجينية يمكن أن تتكون بين الانزيم و AA~AMP .

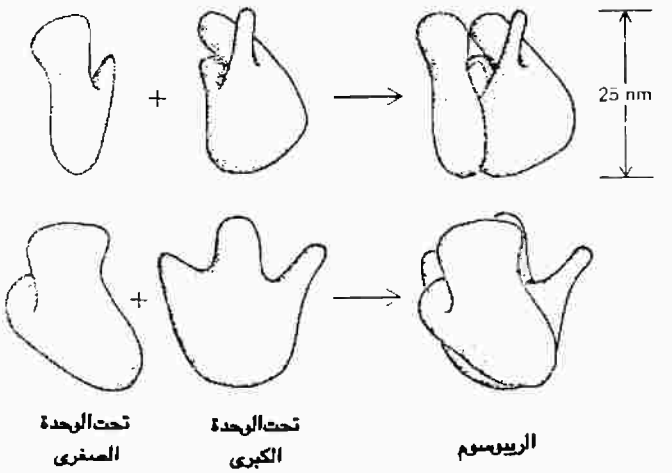
وقد تبين أن عملية تكوين الرابطة الببتيدية تتم على الريبوسومات ، وهى تلك الحبيبات الكروية التى تعد بمثابة السطح الذى يتم عليه عملية البناء البروتينى work bench ، لأنه لايمكن بناء البروتين حرا فى السيتوسول ، نظراً للحاجة الى تنظيم عملية ترجمة كل كودون فى mRNA فى تتابع مضبوط وفى تنسيق تام مع مضاد الكودون الموجود فى tRNA دون أى خلل قد يؤدى الى تغيير فى إطار القراءة . تقوم الريبوسومات بهذا الدور التنسيقى الهام.



الشكل (٨ - ٨):

نمو سلسلة متعدد الببتيد خطوة خطوة باضافة حامض أمينى فى كل خطوة الى النهاية الكربوكسيلية الغنية فى الطاقة الموجودة فى الرابطة التساهمية المتكونة من ارتباطها مع جزئ tRNA .

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 وترتبطان معا لتكوين معقد نو وزن جزيئى مرتفع جدا كما فى الشكل (٨-٩) .



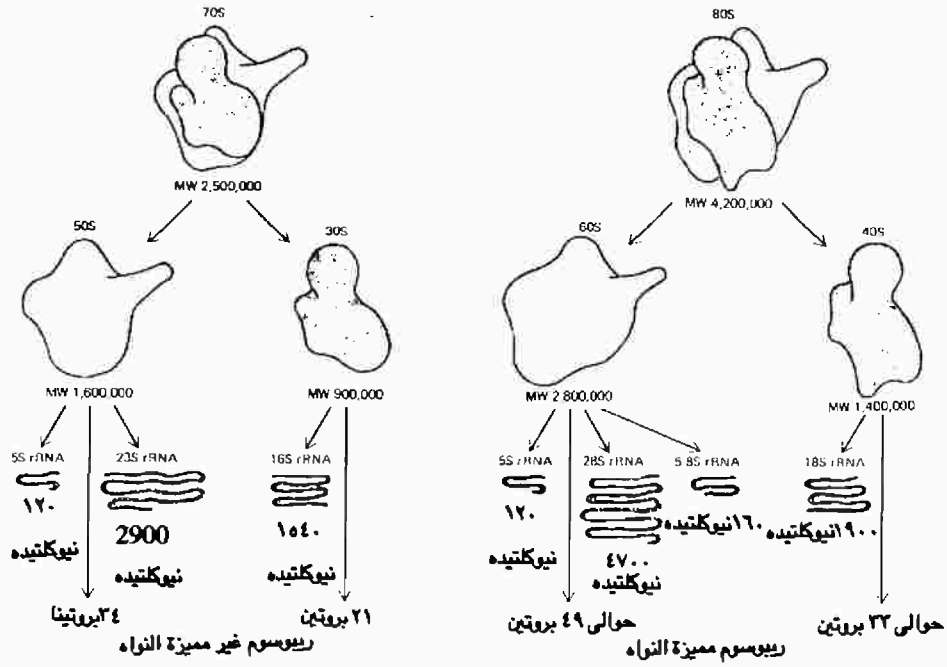
الشكل (٨- ٩):

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 جزيئات rRNA تلعب دورا رئيسيا فى النشاط الحفزى (الأنزيمى) .

يحتوى الريبوسوم على عدد كبير من البروتينات الا أن معظمها لم تعرف له وظيفة محددة بعد مما يرجح أن بروتينات الريبوسوم تقوم أساسا بتنشيط أو تحفيز وظيفة rRNA وأن جزيئات rRNA وليست البروتينات الريبوسومية هى التى تساعد فى كثير من التفاعلات الأنزيمية التى تجرى على الريبوسوم . وتجدر الاشارة هنا الى أنه لم تتوفر حتى الآن معلومات تدل على إمكان احتواء rRNA على أى معلومات وراثية أو على قيامه بدور القالب فى عملية الترجمة . ويلخص الشكل (٨-١٠) المقارنة بين تركيب الريبوسومات فى غير مميزة النواة وفى مميزة النواة .



الشكل (٨ - ١٠):

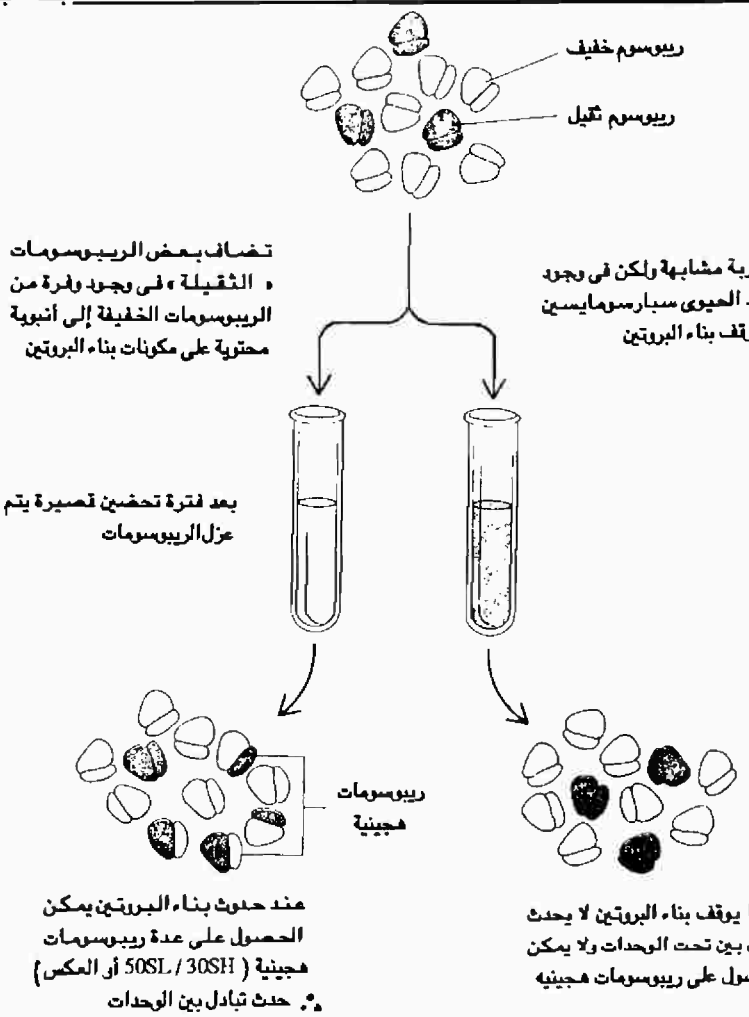
مقارنة بين تركيب ريبوسومات غير مميزة النواة ومميزة النواة .

تبين أن تحت الوحدتين المكونتين للريبوسوم لاتكونان مرتبطتين بصفة دائمة ولكن يتم ارتباطهما فقط عندما يبدأ اشتراك الريبوسوم فى عملية بناء البروتين ، ثم ينفصلان مرة أخرى عند الانتهاء من ترجمة آخر شفرة (كودون) على mRNA لتبدأ دورة جديدة وهكذا . وقد استدل على ذلك من تجارب تمت على بكتريا القولون وفى الخميرة ، حيث أظهرت تلك التجارب أن معظم الريبوسومات يتم تفكيكها الى تحت وحداتها واعادة اتحادها بصفة دورية . اذ أنه عند تنمية الخلايا فى نظائر مشعة (ثقيلة) ثم نقلها الى بيئة غير مشعة (خفيفة) بدأت تظهر ريبوسومات هجينية : (Heavy 50 S / L 30 S أو Light 30 S / Heavy 50 S) 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 الريبوسومات 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 (L 50S/H 30S أو H 50S/L 30S) كما فى الشكل (٨ -١١) .

ومما يؤكد أن هذا التبادل بين تحت الوحدات يعتمد كلية على عملية بناء البروتين أنه عند اضافة المضاد الحيوى Sparsomycin الذى يوقف استطالة سلسلة متعدد الببتيد فإنه فى نفس الوقت يمنع التبادل بين تحت وحدات الريبوسوم كما هو موضح بالشكل (٨ – ١١) .

تحرك الريبوسومات خطوة خطوة على سلسلة mRNA القالب:

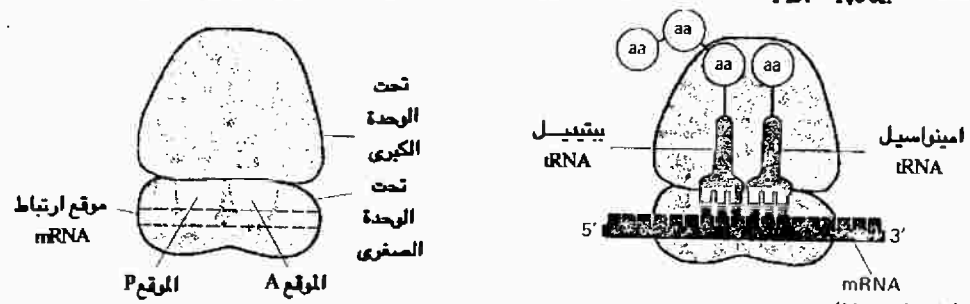
يحتوى الريبوسوم على ثلاث مواقع للارتباط بجزئيات ر ن أ وهى : موقعا خاصا للارتباط بسلسلة mRNA ويوجد فى تحت الوحدة الصغيرة 30S وموقعان لارتباط tRNA ويشترك فى تكوينهما تحت الوحدات 30S ، 50S معا . وهذان الموقعان الأخيران يسمى أحدهما موقع ارتباط tRNA الببتيدى Peptidyl - tRNA binding site أو الموقع «P» «P-site» وهو الذى يتصل به جزئ tRNA المرتبط بالنهاية النامية لسلسلة متعدد الببتيد . أما الموقع الآخر فيسمى موقع ارتباط امينواسيل Aminoacyl - tRNA binding site tRNA أو "A"-site ويرتبط به جزئ tRNA التالى والمحمل بالحامض الأمينى المراد اضافته الى السلسلة النامية لمتعدد الببتيد .



الشكل (٨ - ١١) :

الاعتماد الاجبارى لتبادل تحت وحدات الريبوسوم على عملية بناء البروتين.

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 A ، P يحتلان مكانين متجاورين بشدة على الريبوسوم لدرجة أن جزيئى tRNA المحتلان لهما لاتوجد أمامهما فرصة إلا تكوين تزاوج مع الكودونان المتجاورين مباشرة فى جزئ mRNA كما فى الشكل (٨ – ١٢) .



الشكل (٨ - ١٢):

مواقع الارتباط الثلاث الرئيسية على الريبوسوم .

الى اليسار : يوجد ريبوسوم غير مرتبط وبين مواقع الارتباط ، وبين والريبوسوم على اليمين مرتبطاً .

يتحرك الريبوسوم بمعدل كودون ثلاثى واحد على mRNA فى كل خطوة ، ولو أن هناك مفهوم بديل بأن شريط mRNA هو الذى يمر من خلال 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 الى ثلاث مراحل رئيسية وهى :

١ - مرحلة البدء Initiation

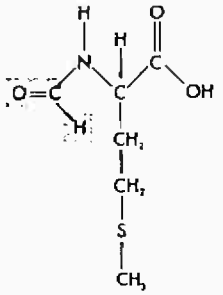
٢ - مرحلة الاستطالة Elongation

٣ - مرحلة الانهاء أو الايقاف Termination .

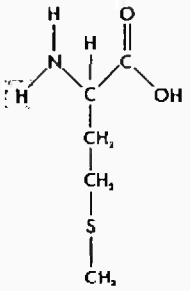
أولا : مرحلة البدء Initiation :

تبين أن عملية القراءة الصحيحة للشفرات على سلسلة mRNA القالب تتوقف على الموقع الابتدائى الذى يتم فيه إرتباط 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 الأميني الأول فى السلسلة هو f) N-formyl methionine (Met وهو عبارة عن حامض الميثونين بعد تعديله باضافة مجموعة فورمات الى مجموعة الأمين الطرفية (الشكل ٨ – ١٣) .



ن – فورمايل ميثونين



ميثونين

الشكل (٨ - ١٣) :

المقارنة بين ن. فورمايل الميثونين والميثونين .

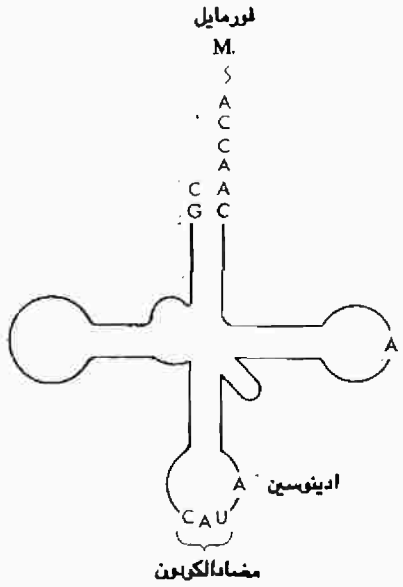
وبذلك يتم شغل مجموعة الامين الطرفية مما يؤدى الى منع امكان اضافة هذا الحامض المتحور فى الأماكن الداخلية بالسلسلة أثناء مرحلة الاستطالة نظرا لأن مجموعة الامين تكون غير حرة نتيجة لارتباطها بالفورمات . يتم اضافة مجموعة الفورمات انزيميا الى الميثونين بعد أن يرتبط هذا الأخير بجزئ tRNA الخاص به . فقد تبين أن هناك نوعين من $tRNA^{Met}$. أحدهما متخصص فى حمل ميثونين البدء ويسمى $tRNA_F^{Met}$. وهذا الجزئ يسمح بتفاعل

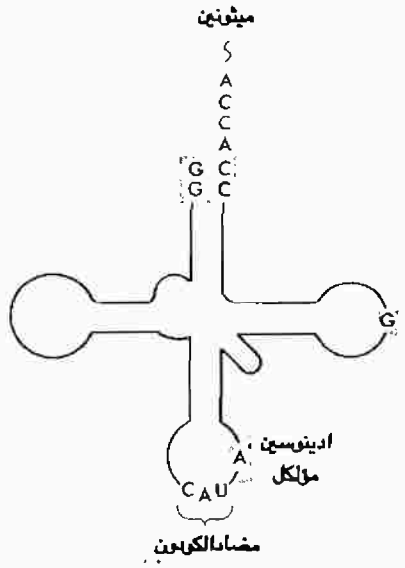
الفورمات فى حين يوجد نوع آخر من $tRNA_M^{Met}$ يقوم بحمل المثيونين الداخلى أثناء مرحلة الاستطالة ولايحدث عليه تفاعل الفورمات ويسمى $TRNA_M^{Met}$ (للمثيونين الداخلى) . بينت تحليلات تتابع القواعد فى كلا النوعين من tRNA أن كلا منهما يحتوى على نفس مضاد الكودون (CAU) مما أدى الى التساؤل عن كيف يتسنى لنفس الكودون (AUG) أن يشفر لكلا من حامض البدء N-formyl methionine وكذلك للمثيونين الداخلى فى السلسلة ؟ وقد تبين وجود ثلاثة فروق فى التركيب الدقيق لتتابع القواعد بين جزيئى tRNA كما فى الشكل (١٤ - ٨) .

ومن جهة أخرى تبين أن بناء البروتين فى البكتريا يبدأ بتكوين معقد من تحت الوحدة الصغيرة 30S للريبوسوم مع f Met - $tRNA_F^{Met}$ و mRNA عند الكودون AUG ثم لاتلبث تحت الوحدة الكبيرة 50S أن تتحد لتكوين الريبوسوم 70S الفعال . ويحتوى كل جزئ من mRNA على موقع ارتباط نوعى بالريبوسوم خاص بكل من البروتينات التى تم بناؤها مستقلة على هذا الريبوسوم .

فعلى سبيل المثال توجد ثلاث مواقع من هذا النوع على RNA لجينوم الفاج R17 الذى يشفر لثلاث بروتينات رئيسية ، ويتخلل كل من هذه المواقع تتابعات نيوكلتيدية تكون وظيفتها وضع mRNA بدقة على المكان المحدد من سطح الريبوسوم قبل بدء عملية بناء البروتين . ولكن كيف يتمكن الريبوسوم من التفريق أو التمييز بين كودون AUG البدء ، أى عند بداية قراءة الجين ، والكودون نفسه الذى يشفر للمثيونين الداخل ؟ أمكن الاجابة على هذا السؤال عندما تم التعرف على أول تتابع بدء عن طريق ربط الريبوسومات مع mRNA نوعى ثم تلى ذلك المعاملة بانزيم ريبونيوكلييز لتحليل جميع mRNA ماعدا المنطقة المرتبطة بالريبوسوم حيث تكون محمية من التحليل الانزيمى .

وعند تحليل التتابعات المكونة من ٣٠ نيوكلتيدة فى هذه المنطقة المحمية وجد أنها تحتوى على AUG's بالقرب من الوسط متبوعة بنيوكلتيدات تشفر للثلاث أو الأربع أحماض أمينية الأولى فى سلسلة متعدد الببتيد ، وقد وجد أن هذه النيوكلتيدات يتم التعرف عليها نوعيا بواسطة تحت الوحدة الريبوسومية الصغيرة 30S وأن هذا التتابع يختلف من حين الى آخر ؛ ولكن وجد أن هناك مجموعة مكونة من ٣ الى ٩ نيوكلتيدات بيورينية تقع فى الجهة 5´ من المنطقة المحمية فى mRNA ، وتعتبر هذا التتابع القصير من القواعد هاما جدا لربطه بالريبوسوم . وجد أن معظم مواقع ارتباط الريبوسومات تحتوى على تتابعات مثل : AGGA أو GAGG تقع على بعد حوالى ٨ الى ١٣ نيوكلتيدة قبل كودون البدء .

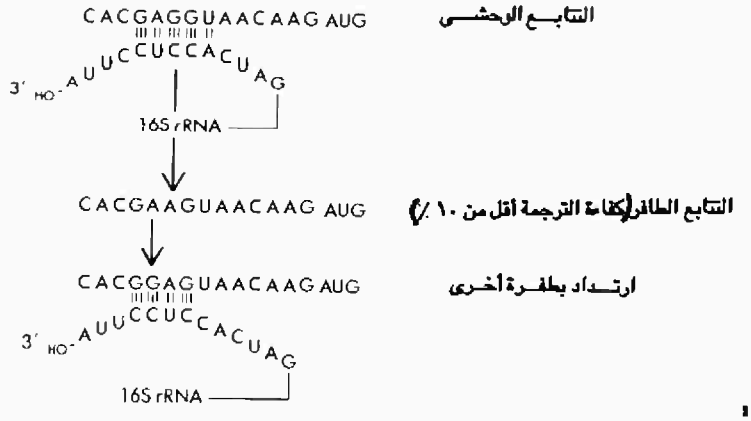




الشكل (٨ - ١٤):

مواقع الاختلافات بين ن - فورمايل ميثونين $tRNA_F^{Met}$ وميثونيل $tRNA_M^{Met}$.

وتتزاوج هذه التتابعات مع تتابعات مكملة لها موجودة فى منطقة غنية بالبيريميدنات فى النهاية 3´ لسلسلة 16S rRNA : (3´ GAUCACCUCCUUA-OH -) . يؤدى هذا التزاوج الى وضع كودون البدء AUG فى موقع يسمح له بالارتباط بمضاد الكودون الخاص بجزئ F^{Met} F Met tRNA الخاص بالبدء والمرتبط بتحت الوحدة 30S . وبذلك تكون القدرة على تكوين تفاعلين منفصلين لتزاوج القواعد فى نفس الوقت : أى mRNA / tRNA (مضاد الكودون / الكودون) وبين mRNA / 16S RNA بين (mRNA / 30S) هى التى تسمح بالتمييز بين منطقة البدء الحقيقية وبين المواقع الأخرى الداخلية التى قد تحتوى على الكودون AUG الذى يشفر للمثيونين الداخلى . وكما هو متوقع فإن الطفرات التى تؤدى الى تغيير فى المنطقة الغنية فى البيورين فى موقع ارتباط الريبوسوم تؤدى الى خفض كفاءة ترجمة mRNA . ويمكن استعادة كفاءة الترجمة باستحداث طفرة أخرى تستعيد التكامل فى تزاوج القواعد للنهاية 3´ فى 16S rRNA حتى ولو كان التتابع مختلف عن ذلك الذى فى mRNA الأصلى كما فى الشكل (٨-١٥) .



الشكل (٨ - ١٥):

تتابع منطقة البدء عند بداية سلسلة mRNA للجين ٠,٣ فى الفاج T7 . ويؤدى تفاعلها مع النهاية 16S rRNA الى وضع الريبوسوم فى مكان البداية الصحيح على شريط mRNA لبدء الترجمة . وتؤدى طفرة استبدال متماثل من نوع G الى A الى وقف هذا التفاعل . ويمكن استعادة هذه الوظيفة لو حدث طفرة استبدال متماثل أخرى (A الى G) فى موقع قريب . يبدو كودون البدء AUG مظللاً فى هذا الشكل .

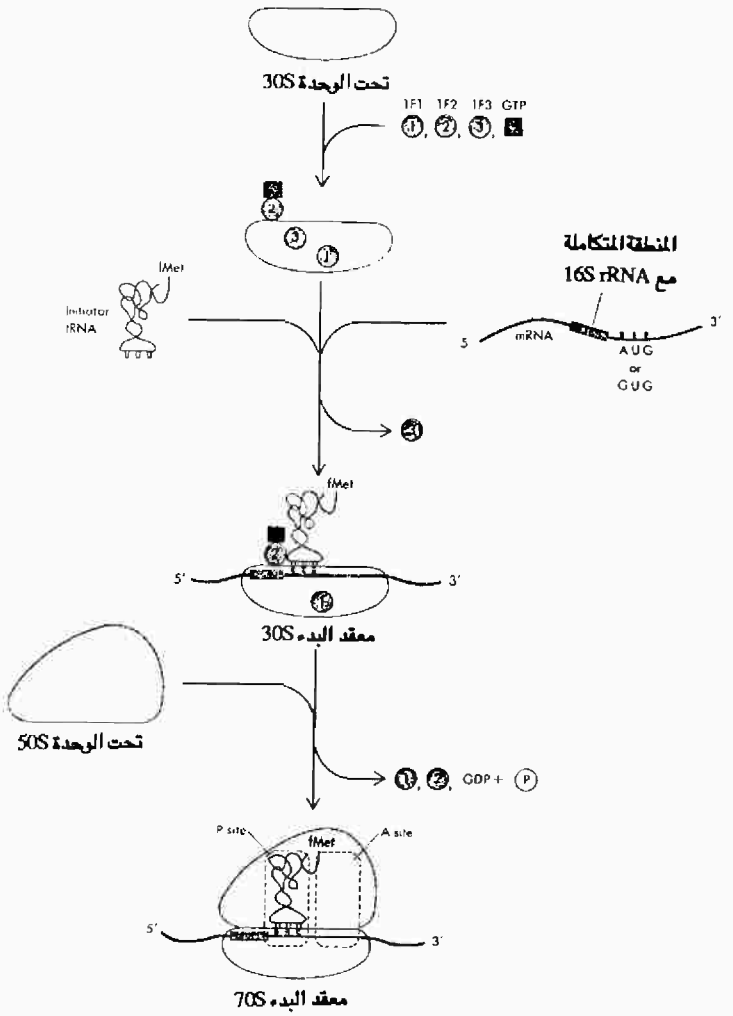
عندما تبدأ استطالة سلسلة متعدد الببتيد لابد أن يحدث انفكاك للتزاوج الحادث بين القواعد بين mRNA ، 16S rRNA وذلك لكى يصبح rRNA حر الحركة على سطح الريبوسوم . تؤدى هذه الحركة الى أن يصبح الريبوسوم على اتصال بمناطق mRNA التى لم يكن من الممكن فى السابق أن يرتبط بها لولا أن عملية البناء قد استهلت فى المنطقة السابقة . ولضمان استمرار حركة الريبوسوم فإنه لابد أن يتم فك مؤقت لمناطق الحلزنة المزدوجة (المكونة لدبوس الشعر hairpin) الموجودة على مناطق mRNA أمام الريبوسوم ، وبذلك تتكون مناطق مفردة السلسلة يمكنها أن تشارك فى عملية الترجمة .

عوامل البدء Initiation Factors (IF) :

تبين أنه الى جانب ضرورة وجود $N\text{-formyl-Met tRNA}_F^{Met}$ ، mRNA وتحت الوحدات الريبوسومية 30S و 50S ، فإنه لابد لكى تبدأ عملية بناء البروتين أن تتوفر ثلاث بروتينات مختلفة نوعية تكون مرتبطة قليلا بالريبوسومات وتسمى عوامل البدء وهى : IF1 ، IF2 و IF3 كما فى الشكل (٨ - ١٦) .

فى الخطوة الأولى يتم ارتباط هذه العوامل الثلاثة بتحت الوحدة 30S ، ويساعد GTP على استقرار ارتباط هذه العوامل . ومن المرجح أنه يرتبط مباشرة بالعامل IF2 . يمنع العامل IF3 الاتحاد بين تحت الوحدتين 30S ، 50S ولذلك فقد عرف فى البداية بعامل تفكك الريبوسوم .

ويعتقد الآن أن العامل IF3 يؤدى الى تغيير دقيق فى شكل تحت الوحدة 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 من IF2 و IF3 . ويبين الجدول (٨-١) الوزن الجزيئى لعوامل البدء IF وكذلك عوامل الاستطالة (EF) وعوامل الانهاء أو الانفكاك (RF) كما سيأتى بعد . فى الخطوة التالية يتم ارتباط $F\ Met\ tRNA_F^{Met}$ و mRNA بمعقد IF-30S-GTP . وفى هذا التفاعل يحدث ارتباط وثيق بين $f\ Met\ tRNA_F^{Met}$ مع المعقد IF2-GTP ، وبمجرد تكوين معقد البدء 30S Initiation complex 30S ينطلق العامل IF3 ويلى ذلك ارتباط تحت الوحدة 50S بمعقد البدء مما يؤدى الى التحليل المائى لجزئ GTP وانطلاق عاملى البدء الآخرين . ويطلق على المعقد النهائى معقد البدء 70S Initiation complex 70S.



الشكل (٨ - ١٦):

شكل تخطيطى لعملية بدء بناء البروتين .

اتجاه الترجمة ´3 ← ´5 :

بعد أن يتم الارتباط الصحيح بين منطقة البدء لجزئ mRNA ومعقد البدء والريبوسوم ، يتحرك الريبوسوم فى اتجاه ثابت أثناء بناء البروتين حيث أنه ليست لديه حرية الحركة أما فى الاتجاه الى اليمين أو الى اليسار ، مما يعكس حقيقة أن جزئ mRNA له اتجاه ثابت ومحدد فى القراءة بحيث تقرأ النهاية ´5 أولا وتستمر القراء متجهة الى لنهاية ´3 . ومما يدل على

ذلك فإنه فى البكتريا وجد أن الريبوسوم يمكنه أن يرتبط بسلسلة غير تامة البناء من mRNA أثناء نسخها على قالب د ن أ وعلى العكس من ذلك اذا كان بناء البروتين يتم فى الاتجاه 5´ → 3´ فإن معنى ذلك أن لاتبدأ ترجمة جزئ mRNA فى البكتريا الا بعد الانتهاء تماما من عملية نسخه على قالب د ن أ وانزلاقه أولا من على هذا القالب ، وهذا لايحدث فى البكتريا مما يدل على أن الترجمة تتم فى الاتجاه 3´ → 5´ وهو نفس اتجاه النسخ .

الجدول (٨-١) :خواص بعض العوامل المشاركة فى بناء البروتين في بكتريا القولون.

العوامل	الوزن الجزيئى بالتقريب	القدرة على الارتباط مع (GDP) GTP	الوفرة النسبية بالنسبة لعدد الريبوسومات
عوامل البدء :			
IF1	٩٠٠٠	-	$\frac{١}{٧}$
IF2	١٢٠٠٠٠	+	$\frac{١}{٧}$
IF3	٢٢٠٠٠	-	$\frac{١}{٧}$
عوامل الاستطالة :			
EF-TU	٤٥٠٠٠	+	١٠
EF-TS	٣٠٠٠٠	+	١
EF-G	٨٠٠٠٠	+	١
عوامل الانهاء :			
RF1	٣٦٠٠٠	-	$\frac{١}{٢٠}$
RF2	٣٨٠٠٠	-	$\frac{١}{٢٠}$
RF3	٤٦٠٠٠	+	$\frac{١}{٢٠}$

ثانيا :مرحلة الاستطالة Elongation :

لم يعرف على وجه التحديد اذا كان f Met $tRNA_F^{Met}$ يرتبط مباشرة من البداية بالموقع P دون أن يمر على الموقع A أولاً أو أنه يتحرك من الموقع A الى الموقع P ولكن من الواضح

أنه لابد أن ينتهى به المطاف فى الموقع P ليفسح المجال للحامض المحمل التالى لكى يحتل الموقع A وأن عامل البدء IF2 لابد أن يتحرر بالتحليل المائى لجزئ GTP قبل أن يرتبط - AA tRNA التالى بالريبوسوم . حيث أنه ثبت قطعيا أن جميع جزيئات AA - tRNA ماعدا $f\ Met\text{-}tRNA_F^{Met}$ لابد أن تدخل الى الريبوسوم وترتبط به عند الموقع A .

بعد أن يحتل AA - tRNA الجديد الموقع A تتكون رابطة ببتيدية لتكوين ثنائى ببتيد مرتبط بجزئ tRNA الخاص بالحامض الأمينى الثانى (الجديد) ثم يلى ذلك خطوة تسمى الانتقال Translocation حيث يتحرك Peptidyl - tRNA (أى آخر جزئ tRNA المرتبطة به عند النهاية 3´ له السلسلة النامية لمتعدد الببتيد) وكذلك يتحرك الكودون الثلاثى من mRNA المرتبط بمضاد الكودون الخاص بأحدث حامض مضاف للسلسلة النامية الى الموقع P وهكذا تتكرر عملية إضافة الأحماض الأمينية خطوة خطوة بحيث يضاف فى كل خطوة حامض أمينى جديد الى أن يتم تكوين السلسلة الكاملة لمتعدد الببتيد كما فى الشكل (٨ – ١٧) .

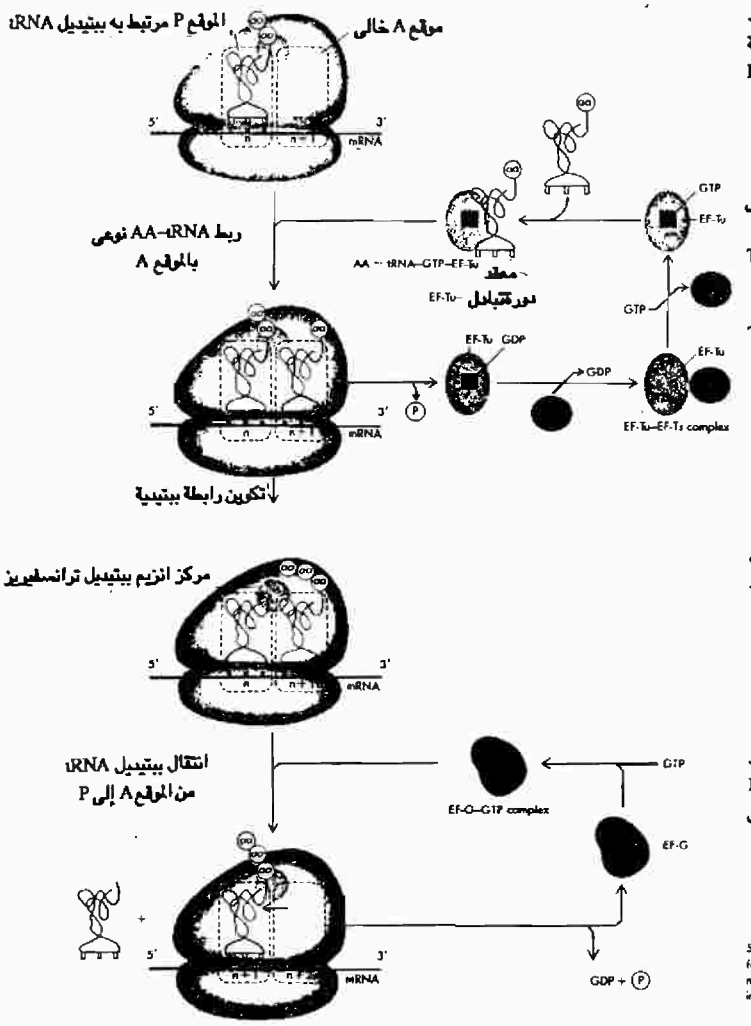
ويمكن تلخيص أهم الخطوات التى تتم فى مرحلة الاستطالة فيما يلى :

١ – ترتبط النهاية الكربوكسيلية النامية دائما بجزئ tRNA . وبعد ارتباط هذا الجزئ الطرفى من tRNA سواء بالموقع P أو A بمثابة القوة الرئيسية التى تربط سلسلة متعدد الببتيد بالريبوسوم .

٢ – أن تكوين الرابطة الببتيدية يؤدى الى تحريك نقطة الاتصال للسلسلة النامية من الموقع P الى الموقع A . وأثناء هذه الخطوة يتم انتقال مجموعة الكربوكسيل الخاصة بالحامض الأمينى المحمل على tRNA المحتل للموقع P الى مجموعة الامين للحامض الأمينى المحمل على tRNA المحتل للموقع A حيث يحدث الارتباط بين المجموعتين برابطة ببتيدية كما فى الشكل (٨ – ١٨) .

٣ – يتم تحريك (انتقال) جزئ tRNA الطرفى الجديد من الموقع A الى الموقع P . وفى نفس الوقت يتحرك mRNA القالب المرتبط بتحت الوحدة 30S لكى يتم وضع الكودون التالى (n+1) فى الموقع الذى كان ممثلاً بالكودون السابق (n) فى الموقع P .

٤ – فى نفس الوقت الذى تحدث فيه الخطوة الثالثة فإن جزئ tRNA الذى تحرر من الحامض الأمينى الخاص به أثناء تكوين الرابطة الببتيدية يبتعد عن الموقع P تاركا الريبوسوم الى السيتوسول لكى يتم تحميله مرة أخرى بالحامض الأمينى النوعى الخاص به .



سلسلة متعدد الببتيد النامية مرتبطة بالمجموعة الطرفية لـ tRNA بالموقع P على الريبوسوم

ارتباط جزيء نوعي من tRNA بروابط هيدروجينية بالكودون ن + ١ في سلسلة mRNA ويتطلب ذلك وجود عوامل الاستطالة Tu و GTP

استعادة معقد Tu-GTP بواسطة Ts

تكوين رابطة ببتيدية بين AA_2 ، AA_3 بواسطة انزيم ببتيديل ترانسفيريز وهو جزء من نشاط تحت الوحدة 50S

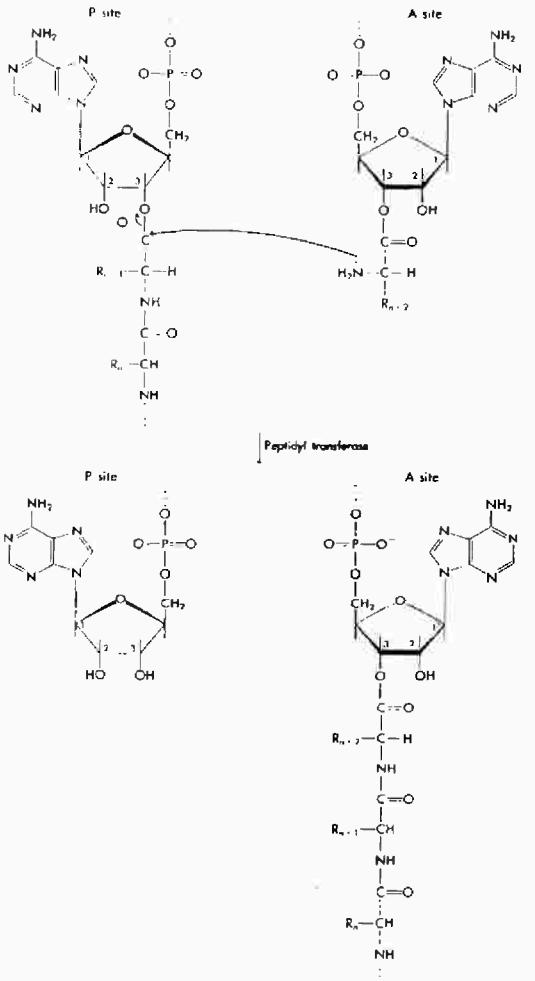
تحرك سلسلة متعدد الببتيد النامية من الموقع A إلى P ويتطلب ذلك وجود عامل الاستطالة G ، GTP

Simultaneous ejection of tRNA from P site and movement of mRNA to place (n + 2) codon in the A site.

الشكل (٨ - ١٧)،

رسم تخطيطي لدورة واحدة من تكوين رابطة ببتيدية مبينا دور عوامل الاستطالة المختلفة واشتراك GTP .

٥ - يصبح الموقع A الخالى الآن حرا لكى يستقبل جزئ جديد من AA ~ tRNA والذى تتحدد نوعيته حسب تزاوج القواعد الصحيحة بين مضاد الكودون وبين الكودون المقابل فى mRNA .



الشكل (٨ - ١٨):

تفاعل انزيم ببتيديل ترانسفيريز ويظهر استطالة سلسلة متعدد الببتيد بمعدل حامض أمينى واحد . وعند انهاء نمو السلسلة يحدث مهاجمة (بالتحليل المائى) للرابطة التساهمية بين آخر حامض أمينى فى السلسلة وبين آخر tRNA نوعى . وبذلك يحدث انفكاك بين الحامض الأمينى و tRNA ؛ وبذلك تكون سلسلة متعدد الببتيد قد وصلت الى تمام نموها وتنزلق من على الريبوسوم .

مصدر الطاقة اللازمة لعملية الاستطالة :

نظرا لأن المجموعة الكربوكسيلية للحامض الأمينى يتم تنشيطها عند ارتباطها تساهميا بجزئ tRNA النوعى ، فقد كان يفترض أنه لاتوجد هناك حاجة الى استهلاك طاقة اضافية لتكوين الرابطة الببتيدية . الا أنه تبين أن هذا الافتراض غير صحيح إذ وجد أنه الى جانب الحاجة الى جزئ GTP لتكوين معقد البدء Initiation Complex فإن الأمر يتطلب أيضا 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 الى استهلاك طاقة من GTP كما سيأتى بعد علما بأن هذه العوامل لاتشارك مباشرة فى تكوين الرابطة الببتيدية .

دور عوامل الاستطالة Elongation factors (EF) فى بناء البروتين :

كان يعتقد مبدئيا أن ارتباط جزئ AA ~ tRNA بالريبوسوم عملية لا انزيمية تحدث عندما يصطدم جزئ AA ~ 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 (جدول ٨-١٠) . يبدأ 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 .

يمكن لهذا العامل EF-TU الارتباط مع أى جزئ من AA~tRNA فيما عدا $F\ Met - tRNA_F^{Met}$ ولم تتضح الى الآن الطريقة التى يتم فيها تمييز ذلك . وبعد ارتباط AA ~ tRNA بعامل الاستطالة EF-TU فإن المكون AA ~ tRNA ينتقل الى الموقع A على الريبوسوم مع انطلاق معقد حر من EF-TU-GDP والفوسفات كما فى الشكل (٨-١٧) .

يتطلب اعادة استخدام EF-TU لربط جزئ جديد من AA ~ tRNA الى 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 ويتحرر العامل EF-TS مرة أخرى ، ثم يقوم المعقد EF-TU-GTP بربط جزئ أخر من AA ~ tRNA بالريبوسوم وهكذا تعاد الدورة ، كما فى الشكل (٨-١٧) .

تبين أن تكوين 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 كما أن هناك ستة بروتينات أخرى وكذلك 5S rRNA تساهم هى الأخرى فى هذا النشاط الانزيمى . وبذلك يمكن تخيل انزيم Peptidyl transfe-rase كمركز نشاط على الريبوسوم يقوم بضبط اصطفاف جزيئين من AA ~ tRNA بالطريقة المضبوطة للسماح بتكوين الرابطة الببتيدية، الشكل (٨-١٨) .

وحيث أن جزئيات AA ~ tRNA تمثل صور منشطة من الأحماض الأمينية فإن هذا التفاعل لابد أن يكون تلقائيا بدون الحاجة الى بذل طاقة اضافية .

تبين وجود عامل استطالة ثالث وهو EF-G وهو ضرورى لحركة سلسلة Peptidyl - tRNA من الموقع A الى الموقع P ويطلق على هذا العامل أيضا اسم Translocase . وفى هذه العملية يتكون أولا معقد من EF-G-GTP-ribosome ثم يحدث الانتقال مقرونا بطرد جزئ tRNA الحر من الموقع P (أنظر الشكل ٨-١٧) . ويتطلب تحرير العامل EF-G من هذا المعقد لاعادة استخدامه حدوث التحليل المائى لجزئ GTP الى GDP وفوسفات حيث تستخدم الطاقة الناتجة لبدء دورة جديدة من الاستطالة على الريبوسوم .

وجد أنه تحت الظروف المثالية لنمو ونشاط بكتريا القولون ، يتم بناء سلسلة متعدد الببتيد بطول حوالى ٣٠٠ - ٤٠٠ حامض أمينى فى حوالى ١٠ - ٢٠ ثانية ، وأنه فى أثناء هذه الفترة لاتبقى السلسلة النامية فى صورة سلسلة مفرودة ولكنها تأخذ بسرعة الشكل الثلاثى الأبعاد الخاص بها ، وذلك عن طريق تكوين عدة روابط ثانوية بحيث قد تصل السلسلة الببتيدية الى الشكل النهائى للبروتين النوعى قبل اضافة الأحماض الأمينية الأخيرة الى النهاية الطرفية للسلسلة .

ثالثا : مرحلة انهاء الترجمة Termination (Release) :

تبين أنه لكى يتم انهاء عملية بناء سلسلة متعدد الببتيد لابد أن يتوفر شرطين : أولهما أن

يوجد كودون نوعى يعمل كإشارة ايقاف لإستطالة السلسلة ، والشرط الثانى هو توفر بروتينات نوعية تسمى بروتينات الانفكاك أو الانهاء Release factors (RF) التى تقوم بقراءة اشارات انهاء بناء السلسلة .

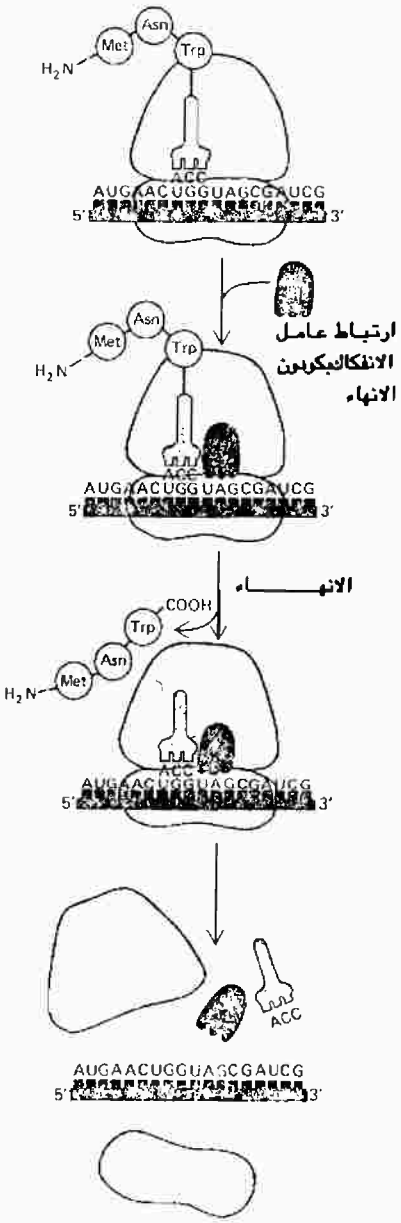
ويرجع ذلك الى حقيقة أنه عندما تصل سلسلة متعدد الببتيد الى تمام استطالتها ، فإن نهايتها الكربوكسيلية تظل مرتبطة بآخر جزئ من tRNA وعلى ذلك فلابد لعملية الانهاء أن تشتمل على ازاحة هذا الجزئ الطرفى من tRNA وتحرير مجموعة الكربوكسيل منه . وعندما يتم ذلك تنفك السلسلة الناشئة التامة النمو بسرعة من على الريبوسوم وذلك نظرا لأن ارتباطها بالريبوسوم كان بواسطة هذا الجزئ الأخير من tRNA . تبين وجود ثلاث كودونات فى الشفرة الوراثية متخصصة فى اعطاء اشارة الايقاف لعملية بناء البروتين فى الخلية 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 الى الكودون الخاص بالانهاء على سلسلة mRNA مما يؤدى الى منع اضافة أى AA ~ tRNA جديد الى هذا الموقع . وقد تبين وجود ثلاث أنواع من عوامل الانفكاك فى بكتريا القولون وهى : RF1 , RF2 , RF3 (جدول ٨-١) . 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 الى دفع انزيم Peptidyl transferase الى نقل السلسلة الببتيدية التامة النمو الى جزئ ماء بدلا من جزئ AA ~ tRNA (انظر الشكل ٨-١٨) ، فتنزلق السلسلة الكاملة متحررة من الريبوسوم نظرا لعدم وجود ما يربطها به .

هناك عامل انفكاك ثالث RF3 وهو يحتاج الى GTP و GDP لنشاطه ، ويبدو أنه يساعد على تحفيز تفاعل الانفكاك وتحرير سلسلة متعدد الببتيد من الريبوسوم الا أنه لايقوم باحتلال الموقع A مباشرة كما يحدث فى العاملين RF1 و RF2 .

يلى ذلك انفكاك mRNA من موقع ارتباطه على الريبوسوم ، وهذا الأخير لايلبث أن يتفكك الى تحت الوحدتين 50S ، 30S اللتان تبحثان عن جزئ mRNA جديد لبدء دورة جديدة من عملية بناء البروتين . ويبين الشكل (٨-١٩) دور عوامل الانفكاك فى عملية انهاء بناء سلسلة متعدد الببتيد .



الشكل (٨-١٩):

المرحلة النهائية فى عملية بناء البروتين . يؤدى ارتباط عامل الانفكاك (الانهاء) بكودون التوقف الى انهاء عملية الترجمة . وتتحرر سلسلة متعدد الببتيد الكاملة فى حين تتفكك تحت وحدتى الريبوسوم.

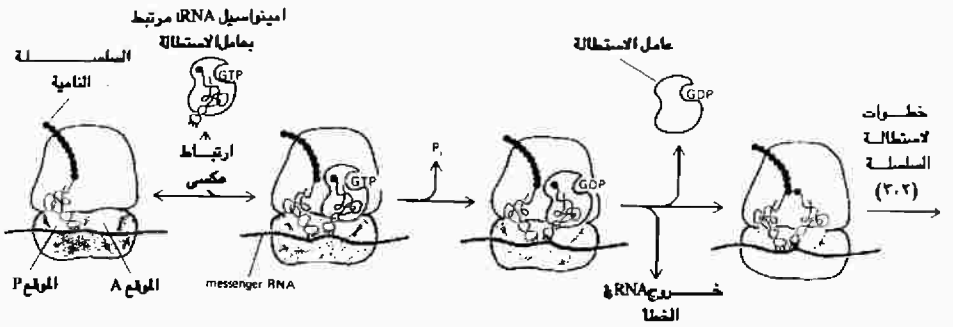
دور GTP فى مراجعة أخطاء الترجمة :

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 متعدد الببتيد النامية . إلا أن هذا التعرف المبدئى للكودون لايلبث أن يدفع عامل الاستطالة الى استهلاك جزئ GTP المرتبط به (بالتحليل المائى الى GDP + فوسفات) مما يؤدى الى انفكاك عامل الاستطالة من هذا المعقد على الريبوسوم تاركا جزئ AA ~ tRNA بحيث يصبح فى الامكان أن يستمر بناء البروتين . وكما هو موضح فى الشكل (٨ - ٢٠) 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 ، اذ أن جزئ tRNA غير الصحيح يعطى عدد أقل من الروابط الهيدروجينية بين الكودون ومضاد الكودون عما يحدث بالنسبة للجزئ الصحيح ، بحيث يكون ارتباط الأول ضعيفا بالريبوسوم وبالتالى يكون أكثر تعرضا للانفكاك بسهولة أثناء هذه الفترة الوجيزة . وحيث أن التأخير الذى يسببه عامل الاستطالة يؤدى بمعظم جزئيات tRNA غير الصحيحة المرتبطة بالريبوسوم الى الانفكاك عنه وتركه بدون أن تستخدم فى بناء البروتين ، فإن هذا العامل يؤدى الى زيادة نسبة الأحماض الأمينية الصحيحة الى غير الصحيحة المضافة الى سلسلة متعدد الببتيد ، ويتم ذلك بالطبع على حساب استهلاك GTP .

البقعة السحرية Magic Spot " PP GPP " :

تبين أنه اذا حدث بالصدفة أن احدى جزئيات tRNA غير المحملة بحامض أمينى قد احتلت الموقع A على الريبوسوم فإن ذلك لايؤدى فقط الى وقف استطالة سلسلة متعدد الببتيد مؤقتا ولكنه يؤدى أيضا الى 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) الى 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 العادى للبكتريا تتكون كميات ضئيلة جدا من PPGPP نجد أنه تتراكم كميات كبيرة منه أثناء مجاعة الخلية . يعتقد أن هذه الجزئيات غير العادية تقوم بدور الاشارات التى توقف نوعيا بناء سلاسل rRNA و tRNA فى الخلية أى أنها تقوم بدور تنظيمى للحيلولة دون إنتاج كميات ريبوسومات أكثر مما تستطيع الخلية استخدامه . يطلق على هذا التثبيط النوعى لبناء rRNA و tRNA تحت ظروف المجاعة ونقص الأحماض الأمينية اسم «الاستجابة الإلزامية» Stringent response .



الشكل (٨-٢٠):

شكل يبين دور GTP فى مراجعة أخطاء الترجمة . فى مرحلة الارتباط المبدئى يتصل جزئ أمينواسيل tRNA المرتبط بعامل الاستطالة ويتزاوج مبدئياً بالكودون على الموقع A . يدفع هذا التزاوج الى 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 نسبيا تسمح باضافتها الى سلسلة الببتيد النامية .

وقد تبين وجود طفرة استرخائية Relaxed mutation تؤدى الى الاستمرار فى انتاج rRNA ، tRNA على الرغم من نقص الأحماض الأمينية . وقد وجد أن بعض الخلايا الطافرة هذه ينقصها أنزيم نو وزن جزيئى حوالى ٧٥٠٠٠ دالتون . يسمى بعامل الإلزام Stringent factor وأن هذا العامل هو الذى يرتبط بالريبوسوم ويقوم بتحويل PPG الى PPGPP.

دور بعض المضادات الحيوية فى وقف بناء البروتين:

تتبين أن بعض المضادات الحيوية يمكن استخدامها للقيام بدور مفيد جداً فى تتبع خطوات بناء البروتين، فعلى سبيل المثال :

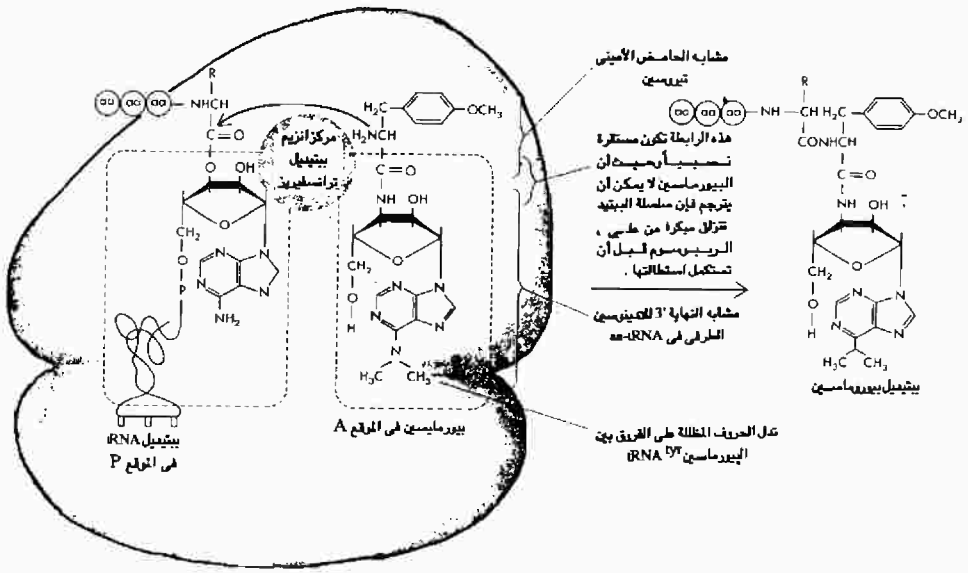
١ – وجد أن البيورومايسين Puromycin ، مثبط قوى لنمو جميع الخلايا ، وهو يؤدى هذا الدور عن طريق ايقاف نمو واستطالة سلسلة متعدد الببتيد كما فى الشكل (٨ – ٢١) . ويرجع ذلك إلى أن هذا المضاد الحيوى يتشابه فى تركيبه مع تركيب النهاية 3´ لجزئ AA ~ tRNA (مثل التيروسين أو الفينيل الأنين) ، مما يؤدى الى امكان ارتباطه بالموقع A على الريبوسوم بطريقة فعالة جدا 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 . ونظرا لأن جزئ البيورومايسين صغيرا جدا بالمقارنة بجزئ tRNA لذلك فإن ارتباطه بالموقع A يكون ضعيفا جدا مما يؤدى الى انفكاك سلسلة متعدد الببتيد النامية والمنتهية بالبيورومايسين عن الريبوسوم مما يسبب توقف عملية الاستطالة وانتاج سلاسل ببتيدية غير كاملة بأطوال مختلفة . وتجدر الاشارة هنا الى أن حقيقة اضافة البيورومايسين الى النهاية الكربوكسيلية للسلسلة النامية يؤكد أن بناء البروتين يحدث من النهاية N الى النهاية C.

٢ – حامض الفيوسيديك Fusidic acid : يتدخل هذا المضاد الحيوى فى عملية انطلاق عامل الاستطالة EF-G بعد أن يؤدى دوره فى عملية الانتقال حيث يؤدى استمرار ارتباط المعقد EF-G-GDP الى منع ارتباط المعقد 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 كل من هذين المضادين الحيويين بتثبيط تفاعل انزيم Peptidyl transferase نتيجة لارتباطهما نوعيا بتحت الوحدة 50S .

4 – Streptomycin يرتبط بتحت الوحدة 30S بحيث يوقف عملية بدء بناء سلسلة متعدد الببتيد .

ويلخص جدول (٨–٢) دور بعض المضادات الحيوية فى تثبيط عملية بناء البروتين فى الخلية .



الشكل (٨ - ٢١) :

دور المضاد الحيوى بيورومايسين فى انهاء استطالة سلسلة متعدد الببتيد .

الجدول (٨-٢) : دور بعض المضادات الحيوية فى 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 الى خطوة الاستطالة ويسبب أخطاء فى قراءة الشفرة الوراثية .
٣ – كلورا مفينيكول Chloromphenicol.	يوقف تفاعل انزيم Peptidyl transferase على الريبوسوم .
٤ – اريثرومايسين Erythromycin .	يمنع تفاعل الانتقال Translocation على الريبوسوم.
ب – تعمل على غيرمميزة 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 .