

## الفصل الثالث

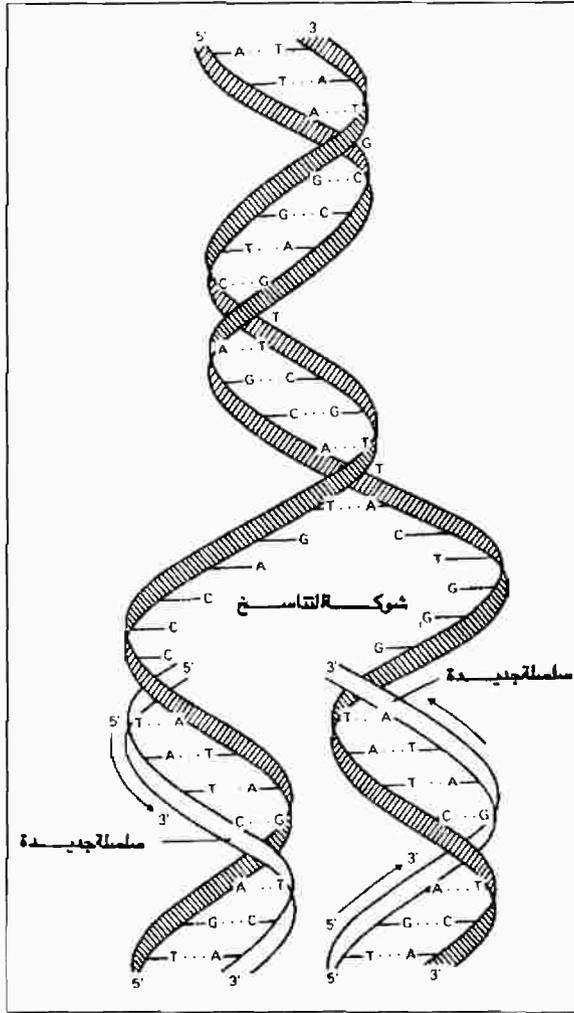
### تناسخ د. ن. أ

### DNA Replication

بعد الإعلان عن نموذج واتسون وكريك لتركيب جزئ د. ن. أ، اتجه اهتمام العلماء إلى معرفة كيفية تناسخ جزئ د. ن. أ. وتعد عملية تناسخ جزئ د. ن. أ عملية أساسية للمادة الوراثية ولا بد من اتمامها بدقة متناهية حتى نضمن استمرار انتقال العوامل الوراثية عند انقسام الخلية. ولاشك أن ذلك يعد عملاً 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 على درجة عالية من الكفاءة والدقة.

يمكن اعتبار ميكانيكية تناسخ (تضاعف) جزئ د. ن. أ نتيجة مباشرة لطبيعة تركيب الحلزون المزدوج. إذ لا بد أن تتفصل السلسلتين المكونتين للحلزون حتى يتسنى استخدام كل منها كقالب لبناء جزئ جديد من د. ن. أ. ولكى يحدث هذا الانفصال يجب أن تنفك أو لا حلزنة اللولب وذلك بدوران الاجزاء غير المتكررة من الحلزون حول محورها كما أن الروابط الهيدروجينية التى تربط بين أزواج القواعد المتقابلة فى الجزئ الأصيل تكون سهلة الكسر عادة بدون الحاجة إلى بذل طاقة أو تفاعل أنزيمى.

وجد أن المجاميع الجانبية في أزواج القواعد المتقابلة (بعكس مركبات عضوية أخرى) في مقدورها تكوين عدد من الروابط الهيدروجينية المتخصصة جدا (النوعية)، وبذلك يتوفر لدينا قالب نموذجي لبناء جزئ جديد عليه حيث يتم التجاذب بين القواعد في القالب والقواعد المكملة في السلسلة الجديدة الجارية بناؤها عندما تضاف القواعد واحدة تلو الأخرى طبقا لقاعدة شاراجاف ( $G \equiv C, T = A$ ) ويتم ذلك بصورة دقيقة بحيث تتعدم تقريبا فرصة حدوث خطأ ( $10^{-8}$ ) مما يؤدي إلى إنتاج جزيئين جديدين عبارة عن صورة طبق الأصل دقيقة للجزئ الأصلي (الشكل ٣-١) وتكون إحدى السلسلتين في كل جزئ عبارة عن سلسلة جديدة والسلسلة الأخرى هي القديمة التي استخدمت كقالب لبناء السلسلة الجديدة.

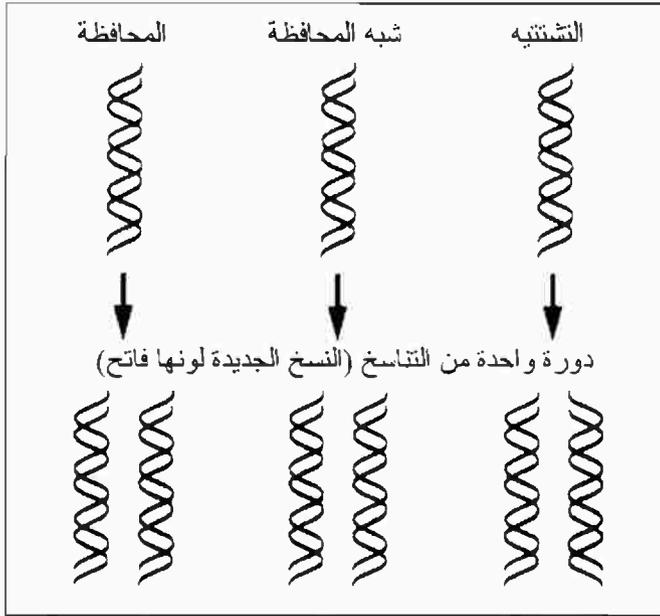


الشكل (٣-١): شكل تخطيطي يبين ميكانيكية تناسخ جزئى د ن أ حيث يتم التناسخ بفك حلزونة السلسلتين المكونتين للحلزون المزدوج ثم استخدام كل سلسلة كقالب لبناء سلسلة جديدة حسب قانون تزاوج القواعد: (A تقابل T, C تقابل G) ويلاحظ أن التناسخ يتم في الاتجاه 3'→5' فقط

## الطريقة شبه المحافظة لتناسخ د. ن. أ:

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

ألا أنه بالإضافة إلى ذلك فقد اقترح نموذجين آخرين لتناسخ د. ن. أ ويعتمد كليهما على استخدام د. ن. أ الأبوي كقالب. ويسمى النموذج الأول الطريقة المحافظة Conservative Replication حيث يتم بناء سلسلة جديدة مكملة على كل قالب من السلسلتين القالب تماما كما في الطريقة شبه المحافظة إلا أنه بعد التضاعف (التكاثر) تتضم السلسلتين الجديدتين معا في حلزون جديد تماما بينما تتجاذب السلسلتين الابويتين لتكون الحلزون الاصلى أى أن الحلزون الاصلى 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 والتشتتية لم يتوافر لهما التحقق التجريبي من صحتها بينما تم ذلك للطريقة شبه المحافظة كما يتضح من تجريبه ميسلسون وستاهل.

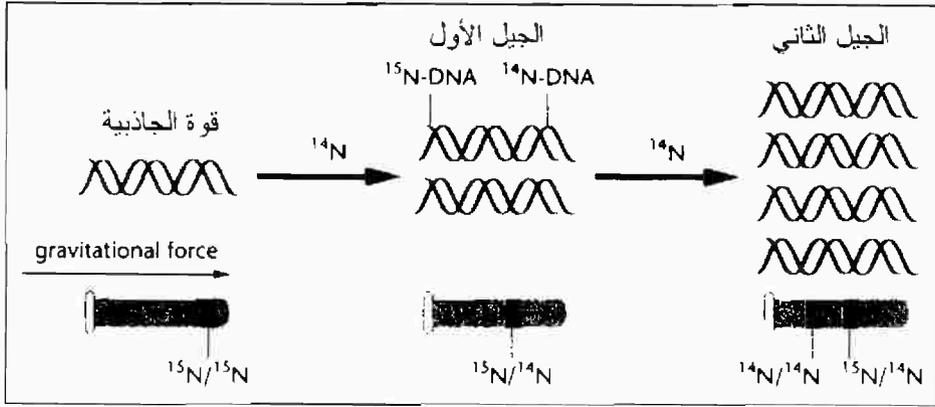


الشكل (٢-٣): نتائج دورة واحدة من تناسخ د ن أ لكل من الطرق الثلاث الممكنة للتناسخ

### تجربة ميسيلسون وستاهل :

قام ميسيلسون وستاهل Meseleson and Stahl عام ١٩٥٨ بتجربة على بكتريا القولون واستخدما النتروجين الثقيل (النظير المشع)  $N^{15}$  فى تنمية المزرعة البكتيرية لعدة أجيال حتى يتأكدوا من أن كل ذرات النتروجين فى 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 فى متدرج كثافى Density Gradient 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 وفى

الجيل الثاني ظهرت قمتان لجزيئات د. ن. أ واحدة تمثل الهجين والأخرى تمثل الخفيف فقط L/L كما في الشكل (3-3).

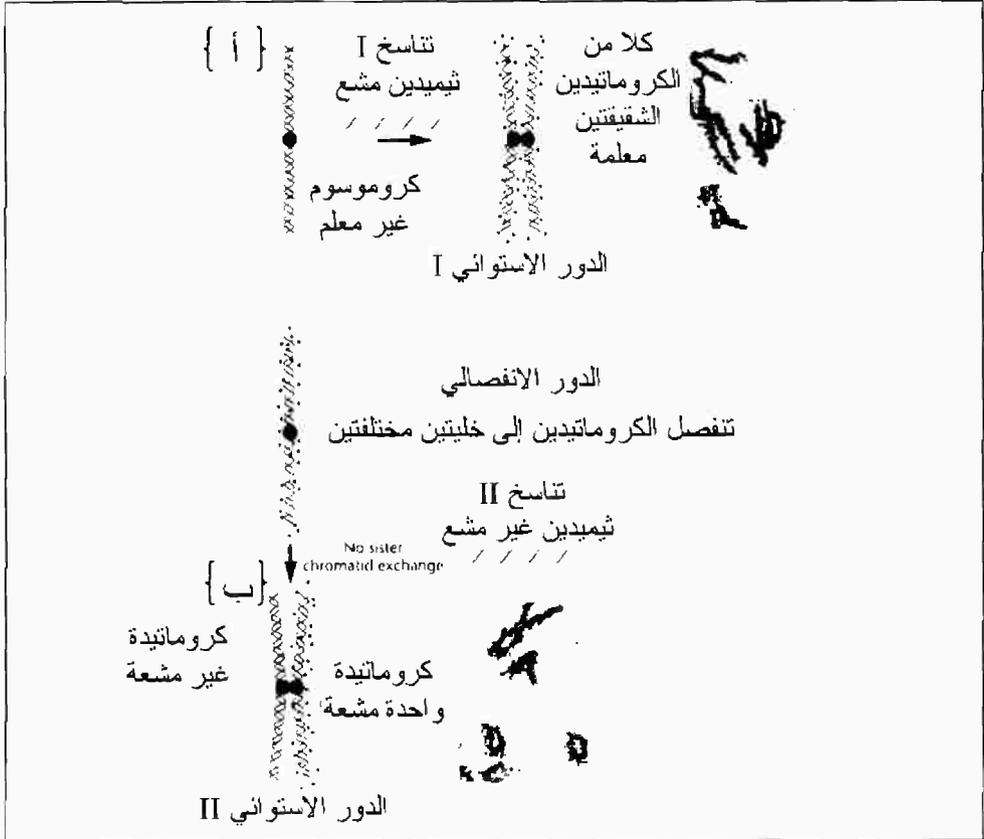


الشكل (3-3): النتائج المتوقعة لجيلين من التتاسخ بالطريقة شبه المحافظة في تجربة ميسلسون وستاهل

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

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

الكروماتيدتين كانتا مشعتان بعد جيل واحد (دورة) في حين كانت كروماتيده واحدة فقط هي المشعة بعد دورتين من انقسام الخلية كما هو متوقع حسب النظرية شبه 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 الثيميدين المشع H-thymidine وعند بدء الانقسام الميوزي تصبح الكروماتيدين الشقيقتين مشعة كما ينضح من صور الإشعاع الذاتي.
- (ب) وبعد دورة ثانية من التناسخ وفي غياب الثيميدين المشع فإن كروماتيدة واحدة هي التي ستكون مشعة مما يدل على صحة الطريقة شبه المحافظة للتناسخ.

## منشأ Origin وشوكات Forks ووحدات التناسخ Units of Replication:

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

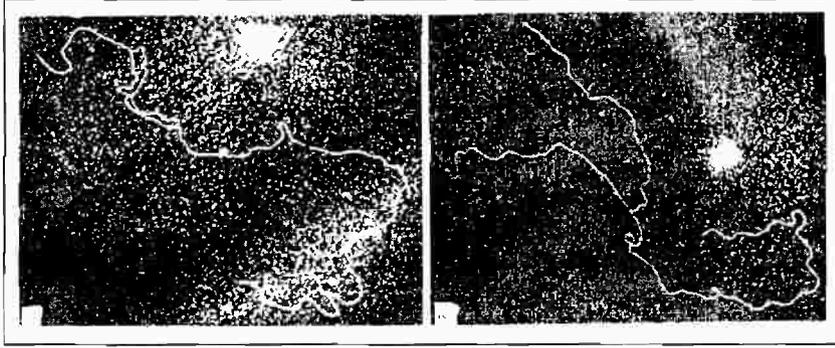
أين يبدأ التناسخ Origin of Replication؟ وهل هناك نقطة واحدة يبدأ منها التناسخ أو أن هناك أكثر من منشأ على طول الكروموسوم؟ وهل نقطة المنشأ تكون عشوائية؟

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

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

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

لهذا الفيروس تكون هذه النقطة على مسافة حوالي ١٧% من بداية النهاية اليسرى للجزء كما في 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 فقاعه 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 التناسخ إلى نهاية الشوط.

وبمجرد أن يبدأ بناء جزئ د. ن. أ يستمر البناء في الاتجاهين مما يعطى شكل العين (-O-) التي لا تلبث أن تنمو لتأخذ شكل حرف Y (ومن هنا جاءت تسميتها شوكة التناسخ Replication Fork).

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

كما إن ظهور هذه الاشكال ينفي أن عملية التناسخ تتم على مرحلتين بمعنى أنه يتم الانفصال التام بين السلسلتين الأبويتين أولاً قبل أن تبدأ عملية التناسخ في المرحلة الثانية.

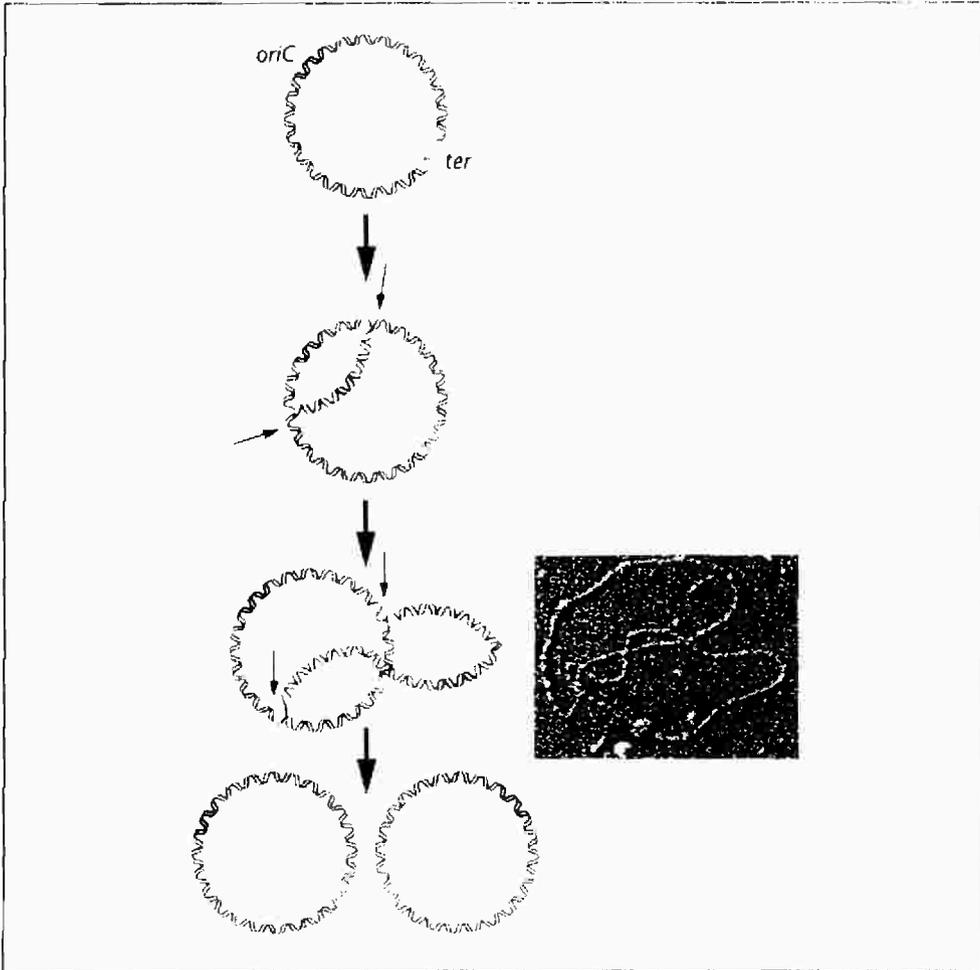
فقد تبين أنه في كل هذه المراحل الوسيطة للتناسخ تكون هناك أجزاء صغيرة فقط غير متحلزنة وحيدة السلسلة.

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

في حالة جزئ د. ن. أ الحلقي كما في بكتريا القولون لا يتحتم أن يتحول الجزئ الحلقي إلى جزئ خطي (مستقيم) ولو بصورة مؤقتة على العكس من ذلك وجد عند دراسة المراحل الوسيطة لتضاعف كثير من الجزيئات الحلقية من د. ن. أ أن السلاسل الأبوية تحافظ على الشكل الحلقي طول فترة التناسخ.

وقد اكدت تجارب Cairns (باستخدام Radioisotope, Autoradiography) أن التناسخ يحدث أو يبدأ عند نقطة منشأ واحدة في 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 في مثل هذه الجزيئات اثناء تضاعفها شكل ( $\theta$  ثيتا) عندما تبدأ في تكوين فقاعة التناسخ عند نقطة البداية "المنشأ" كما في الشكل (٣-٦).

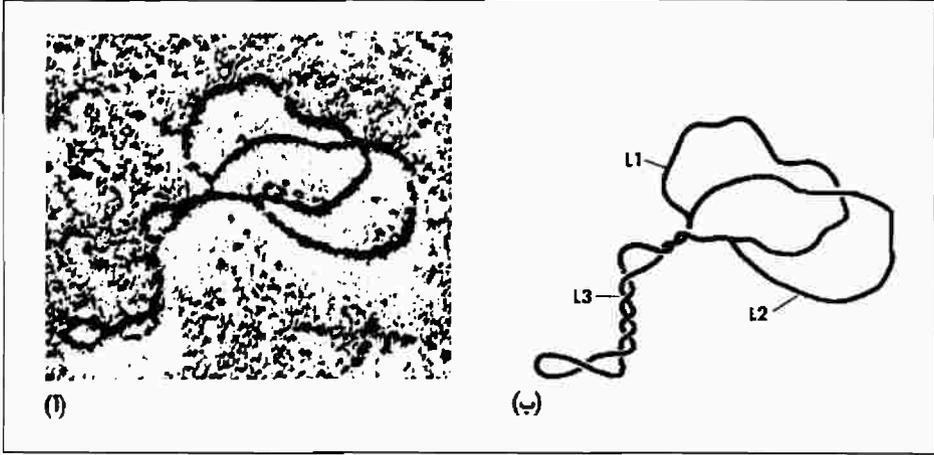


الشكل (٦-٣): التناسخ ثنائي الاتجاه في بكتريا القولون  
 وصورة المجهر الإلكتروني بالمجهر تبين عملية التناسخ

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

أمكن اكتشاف مجموعة من الانزيمات يطلق عليها Topoisomerases تقوم بعملية فتح/ غلق Nicking/Closing ( أو كسر/ لحام) لجزئ د. ن. أ بحيث تساعد إما على ازدياد درجة الحلزونية أو استرخاء الحلزون حسب طبيعة المرحلة التي يمر بها الجزئ.

في الفاج SV<sub>40</sub> تبين أن كلا من السلسلتين الأبويتين تظلان على حالهما في معظم فترات دورة التضاعف (الشكل ٣-٧) ويحدث للجزء غير المتضاعف من الشكل ثيما  $\theta$  الوسطى تحلزن فائق على فترات منتظمة للحيلولة دون تشوه أو تشابك الحلزون ويتم ذلك بإحدى طريقتين: إما أن يتكون حلزون فائق سلبي وذلك بفعل انزيم Topoisomerase II (Gyrase) كمقدمة لاستطالة السلسلة، أو بتكوين حلزون فائق موجب باستطالة فقاعات التناسخ وذلك في حالة حدوث كسر في السلسلة وهو أمر نادر حيث من الممكن في هذه الحالة توقف استطاله نمو الفقاعة لاستحالة الاستمرار في تكوين حلزونة فائقة موجبة أشد. وسنتعرض بالتفصيل لدور Topoisomerases في التناسخ فيما بعد.



الشكل (3-7): تناسخ جزئ د ن أ للفاج SV 40

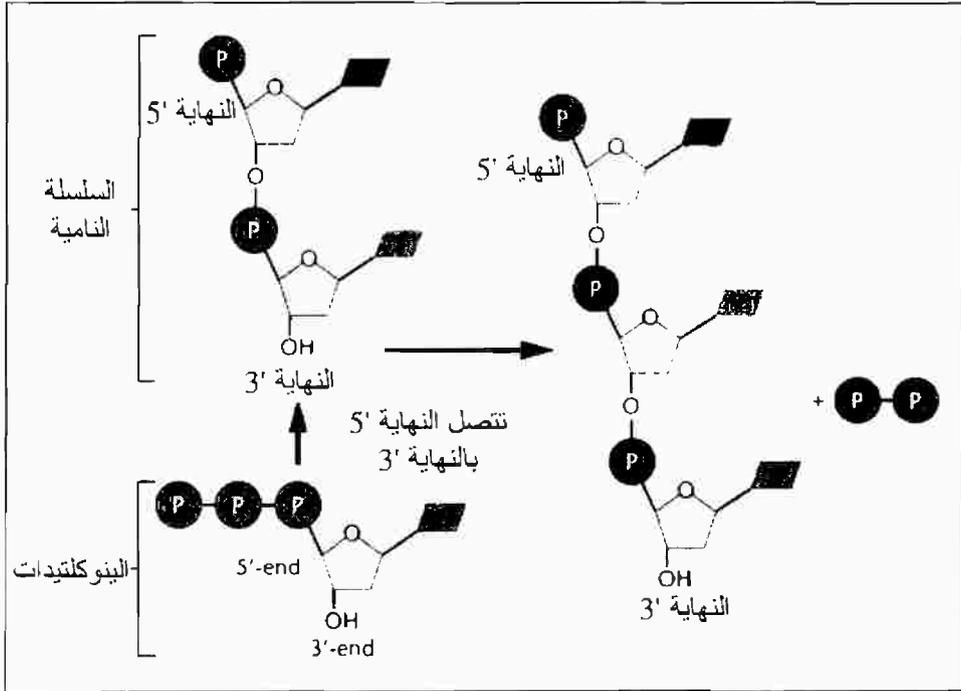
- (أ) صورة بالمجهر الإلكتروني لمرحلة مبكرة من التناسخ.  
 (ب) شكل تخطيطي يبين السلاسل الأبوية المتحلزنة وغير المتناسخة. وتمثل المناطق L1 و L2 الأجزاء التي تم تناسخها بالفعل في حين تشير L3 إلى المنطقة غير المتناسخة التي تأخذ شكل فائق التحلزن. يلاحظ أنه خلال دورة التناسخ يظل جزئ د ن أ متماسك.

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

سبق التنوية إلى أن السلسلتين المشاركتين في جزئ د. ن. أ تكونان متضادتين في الاتجاه Antiparallel ويعني ذلك أن كلا من السلسلتين البنويتين الجارى بناؤهما على كل من شوكتى التناسخ لا بد أن يكونا أيضا في اتجاهين متضادين، وعلى ذلك فلا بد أن يكون الاتجاه العام لنمو السلسلة في الاتجاه  $5' \rightarrow 3'$  لإحدى السلسلتين بينما المفروض أن يكون النمو للسلسلة المضادة في الاتجاه  $3' \rightarrow 5'$ .

إلا أن جميع انزيمات بلمرة د. ن. أ DNA Polymerase المعروفة حتى الآن والتي تشارك في اضافة وحدات النيوكلييدات يمكنها الاضافة ونمو

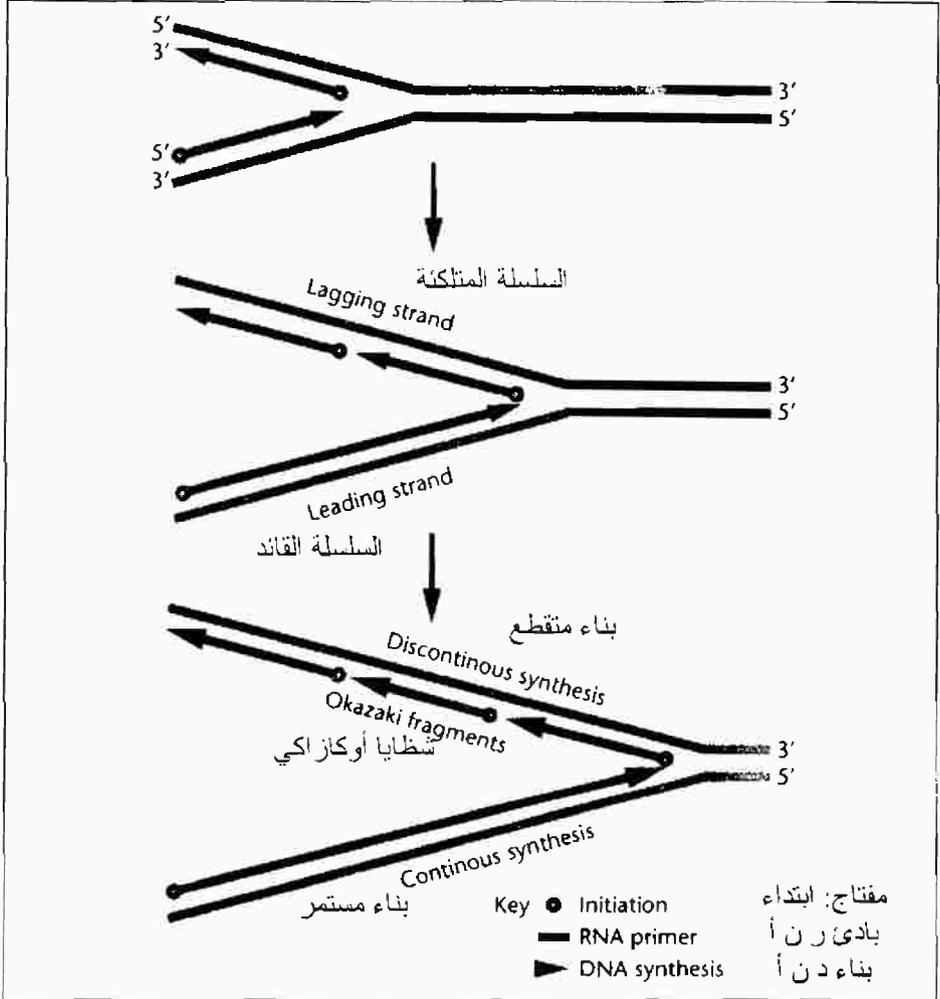
واستطالة السلسلة في الاتجاه  $5' \rightarrow 3'$  فقط نظرا لأن التفاعل الكيماوى الذى تساعد فيه هذه الأنزيمات يسمح للنيوكلييدة ثلاثية الفوسفات للتفاعل فقط مع مجموعة الهيدروكسيل الحرة فى النهاية  $3'OH$  للسلسلة النامية، الشكل (٣-٨).



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

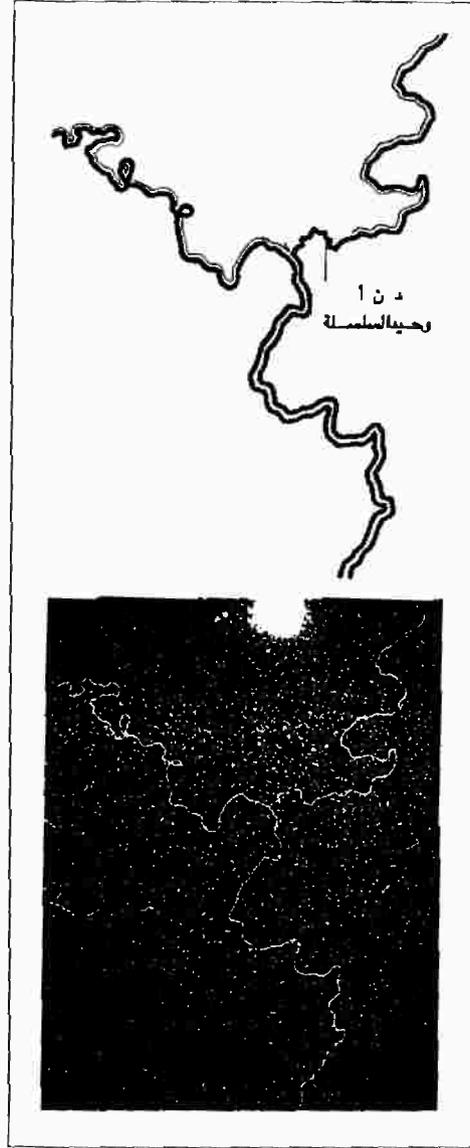
لحل هذه المعضلة، تمكن أوكازاكي Okazaki عام ١٩٦٩ من اكتشاف قطع قصيرة متقطعة من د. ن. أ يتم بناؤها فى الاتجاه  $5' \rightarrow 3'$  على الخيط القالب المضاد لاتجاه البناء الطبيعى للسلسلة. وقد توصل إلى ذلك بعد تعريضه بكتريا القولون للثيميدين المشع  $^3H$  Thymidine لمدة ثوان قليلة حيث ظهرت له قطع د. ن. أ. قصيرة بطول حوالى ١٠٠٠-٢٠٠٠ نيوكلييدة معلمة بالأشعاع،

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



الشكل (٣-٩): حتمية القطبية المتضادة في بناء د ن أ على طول السلسلتين نظراً لأن السلسلتين متضادتي الاتجاه وأن إنزيم بلمرة د ن أ III يبني فقط في الاتجاه (5'→3') فلا بد أن يكون البناء على السلسلة المتكئة 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

وقد تأكد الآن أن شظايا أوكازاكي عبارة عن نواتج أولية لإحدى السلسلتين فقط وهي تلك التي تأخذ الاتجاه  $5' \rightarrow 3'$  أما السلسلة ذات الاتجاه  $3' \rightarrow 5'$  فإنها تبنى أو يتم تناسخها على شكل خيط مستمر وغير متقطع من البداية إلى النهاية. وهي لذلك تكون عادة أسرع في معدل بنائها وتسبق في ذلك الخيط المتقطع مما أدى إلى تسمية هذا الخيط بالخيط القائد *Leading Strand* في حين سمي الخيط المتقطع بالخيط التابع أو البطيء *Lagging Strand* يؤدي الفرق في سرعة البناء بين الخيطين إلى ظهور منطقة صغيرة من د. ن. أ. الأبو في صورة احادية السلسلة عند شوكة التناسخ (الشكل ٣-١٠) ثم تصبح مزدوجة السلسلة عند بدء شظية أوكازاكي في الظهور والتي يستمر بناؤها حتى تصل إلى نهاية الشظية السابقة لها والتي لا تلبث أن تلتحم بها. يبدأ بناء شظايا أوكازاكي عند نقطة محددة على طول قالب السلسلة البطيئة وتحدد المسافة بين هذه النقاط متوسط طول شظايا أوكازاكي المتكونة أثناء تناسخ جزئ معين من د. ن. أ.



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 التماسخ

## بناء د. ن. أ في الكائنات الدقيقة:

### DNA Synthesis in Microorganisms:

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

## أنواع انزيمات بلمره د. ن. أ في بكتريا القولون:

### DNA Polymerases:

اكتشف حتى الآن في خلايا بكتريا القولون *E.coli* ثلاثة أنواع من انزيمات بلمرة د.ن. أ وقد تم تحديد دور إثنان منها في عملية تناسخ د. ن. أ. فبينما كان يظن سابقاً أن انزيم البلمره DNA Polymerase I (DNA Pol I) والذي كان أول انزيم يكتشف في هذه المجموعة، هو الانزيم الرئيسي المسئول عن بلمره جزئ د. ن. أ إلا أنه أمكن التحقق من أن هناك انزيم آخر وهو (DNA Pol III) والذي اكتشف لاحقاً هو الذى يقوم بالدور الأساسى فى بلمرة جزئ د. ن. أ وعلى العكس من ذلك تبين أن انزيم (DNA Pol I) يقوم أساساً بملئ الفراغات أو الفجوات الصغيرة بين شظايا أوكازاكي 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 مسئولاً عن ازالة ببادئ ر. ن. أ القصير وكذلك ملئ الفجوات الناتجة عن تلك الازالة كما أن

نشاطة فى التحليل الطرفى Exonudease يسمح بتصحيح الاخطاء Proofreading أثناء هذه العملية وقد إنتفت أهمية هذا الانزيم فى عملية البلمرة الاساسية عندما اكتشفت طفرة لغياب هذا الانزيم فى بكتريا القولون إلا أن عملية بناء جزئ د. ن. أ لم تتأثر بهذا الغياب.

٢- يبدو ان أنزيم د. ن. أ بوليميرنز II يلعب دورا فى اصلاح الأخطاء الناجمة عن التلف الذى قد يحدث فى جزئ د. ن. أ نتيجة التعرض لعوامل خارجية مثل الاشعة فوق البنفسجية.

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

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

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

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

\* عبارة عن عدد النيوكليوتيدات المبلمرة عند درجة 37°م فى الدقيقة لكل جزئى 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 الاتجاه 3'→5' بالإضافة إلى وظيفة البلمرة الأساسية ويعنى ذلك أنه فى مقدور كل من هذه الأنزيمات أن يعيد قطع أو هدم سلسلة متعدد النيوكليوتيدات الحديثة التكوين فضلا عن دوره الأسمى فى استطالتها. إلا أن اتجاه البناء يكون أقوى بكثير من اتجاه الهدم. ولكن لماذا توجد

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 لا بد من التخلص منها فى الحال حتى لا تورث هذه الخطأ ويكون احتمال إزالتها عالى قبل إضافة القاعدة التالية ويتم ذلك بفعل الهدم الطرفى لهذه الانزيمات.

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

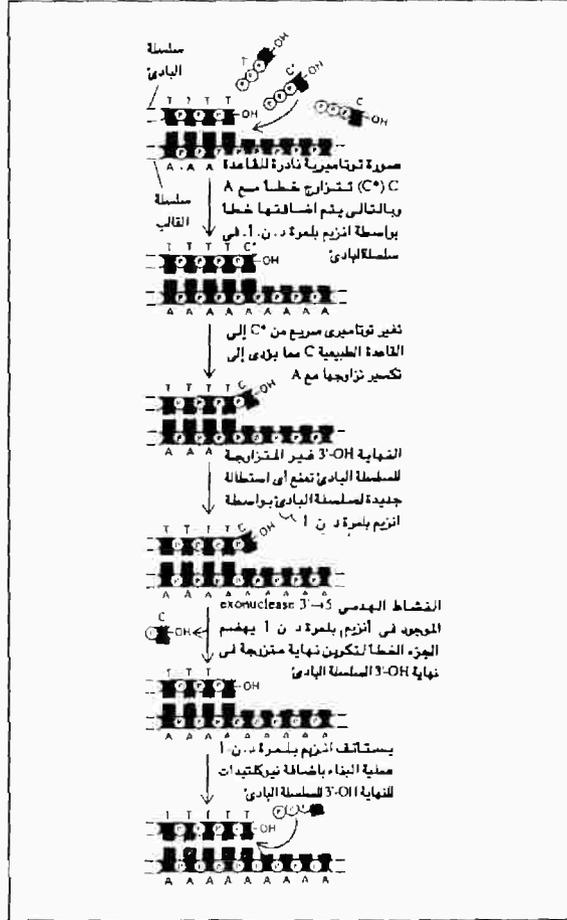
قد يعزى عدم ظهور انزيم بلمرة د. ن. أ فى الاتجاه 5' → 3' إلى الاحتياج المستمر إلى عملية التصحيح هذه. إذ لو افترضنا إمكان استطاله السلسلة فى هذا الاتجاه فإن النهاية النامية ستكون دائما منتهية بمجموعة ثلاثية الفوسفات والتى تكونه روابطها المرتفعة الطاقة ضرورية لإضافة النيوكلييدة التالية. من جهة أخرى سيؤدى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

الأفتراضى هذا مما يؤدي إلى توقف عملية الاستطالة فى السلسلة. وعلى ذلك فإنه يكون من الأسهل تصحيح الخطأ الناتج عن اضافة قاعدة غير صحيحة للتو إلى النهاية 3' للسلسلة عن تلك المضافة إلى النهاية 5' ومما يؤكد ذلك أن فرصة ظهور إنزيم بلمرة فى الاتجاه 3'→5' 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 النيوكليوتيدية فإنه يستمر ملتصقاً بالسلسلة مضيفاً نيوكليوتيدات جديدة (واحد تلو الأخرى) حسب التتابع المكمل للسلسلة القالب إلى أن يتم وصوله إلى إشارة تجعله ينفصل عن السلسلة. ولكن لماذا يظل إنزيم بلمرة د. ن. أ متصلًا 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 شحنة كهربية موجبه ويبلغ نصف قطرة  $20\text{\AA}$  وترتبط سلسلة د. ن. أ فى هذا الشق فى حين قد يحتوى النطاق الأصغر على منطقة للارتباط بالنيوكليوتيدة 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 نيوكليوتيدة خاطئه لهذه السلسلة والتي لا يمكنها أن تتزواج بطريقة صحيحة مع القاعدة المقابلة فسيؤدى ذلك إلى تشوية وعدم تناسب عند هذه النقطة (القاعدة) مما يحول بين

السلسلة وبين الحركة بسهولة إلى الأمام خلال الشق الضيق مما يدفعها إلى الحركة إلى الخلف بحيث تعود هذه القاعدة الخاطئة إلى موقع نشاط الهدم الطرفي  $3' \rightarrow 5'$  exonuclease بحيث يتم إزالة القاعدة الخاطئة من موقعها على السلسلة (الشكل ٣-١١).



الشكل (٣-١١): شكل تخطيطي لعملية تصحيح الأخطاء

بعد إضافة القاعدة الخاطئة إلى جزئ د ن أ في البكتريا

وتتضح أهمية النشاط الهدمي الطرفي  $5' \rightarrow 3'$  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 الأخطاء وعدم القدرة على تصحيحها.

### أهمية RNA البادئ فى تناسخ جزئى د. ن. أ.:

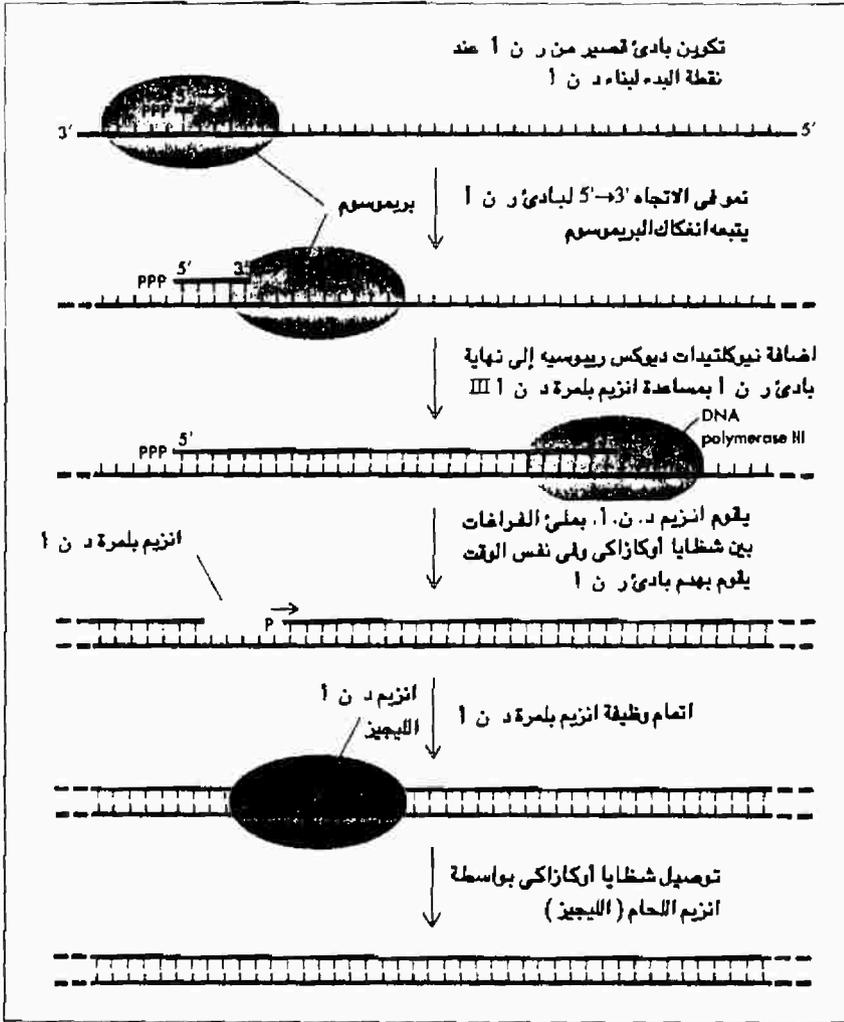
تبين أن إنزيمات بلمرة د. ن. أ. DNA Polymerases المعروفة حتى الآن ليس فى مقدورها بدء عملية البلمرة وبناء السلسلة من الصفر *de novo* بل لابد أن تكون مسبقة ببادئ قصير حتى يمكنها بدء نشاط البلمرة واستطالة سلسلة د. ن. أ. وقد تبين أن عملية بدء بناء أى سلسلة من د. ن. أ. يتطلب وجود ببادئ قصير جداً من ر. ن. أ. RNA (حوالى ١٠ نيوكليوتيدات فى مميزة النواة وقل من ذلك فى غير مميزة النواة) أى أن نقطة البداية (المنشأ) لبناء د. ن. أ. على السلسلة القالب لا يتم التعرف عليها بواسطة إنزيمات بلمرة د. ن. أ. مخصوصة ولكن بإنزيمات تقوم بنسخ Transcribe د. ن. أ. لإنتاج سلسلة ببادئ قصيرة جداً من ر. ن. أ. يمكن 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) لجزئى 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

نشاط هذا الإنزيم أن تدخل ضمن معقد مكون من 6-7 بروتينات أخرى لتكون معقداً كبيراً يعرف بالبريموسوم Primosome و يتحرك هذا المعقد خطوة خطوة (الخطوة = نيوكلييدة) في الاتجاه 3'→5' على القالب الخاص بالخيط المتكلى ليستبدئ البدايات المتكررة لشظايا أوكازاكي التي 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 في ازاحة البروتينات الخاصة بتثبيت السلاسل الفردية من د. ن. أ (والتي يطلق عليها البروتينات المرتبطة بالسلسلة الفردية لجزئ د. ن. أ (SSB) كما سيأتي 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 3-10 نيوكلييدات.

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

بمجرد أن يتم بناء ر. ن. أ البادئ، يبدأ نشاط إنزيم بلمرة د. ن. أ (DNA Pol III) نظراً لأن البادئ قد هيا له نهاية 3' OH حرة فى نهاية سلسلته القصيرة ويبدأ فى بناء شظايا أوكازاكي بحيث يتم تناسخ قالب د. ن. أ التابع فى صورة غير مستمرة (متقطعة) (الشكل 3-12).



الشكل (٣-١٢): استخدام بادئ قصير من ر ن أ

بدء بناء شظايا أوكازاكي على القالب المتكلى

يتم بعد ذلك إزالة ر. ن. أ البادئ فى خطوة لاحقة من خلال نشاط إنزيم DNA Pol I الذى يقوم بملئ الفجوات أو الفراغات بين شظايا د. ن. أ. بحيث يضيف النيوكليدات الواحدة تلو الأخرى إلى النهاية 3' التى تقع إلى

الخلف منه وفي نفس الوقت يقوم بتحليل وهدم سلسلة ر. ن. أ البادئ التي تسبقه. تتم عملية هدم ر. ن. أ نتيجة لنشاط موقع مختلف تماماً عن ذلك المسئول عن عملية التصحيح '5'→'3' إذ أن ذلك الموقع النشط في الهدم الطرفي '3'→'5' يمكنه إزالة الديوكسي نيوكليوتيدات بالإضافة إلى الريبونوكليوتيدات وعلى ذلك فإن استخدامه لا يكون قاصراً على إزالة بادئ ر. ن. أ ولكنه يقوم أيضاً بتحليل وهدم مناطق د.ن. أ التي يحدث لها تلف نتيجة للتعرض للإشعاع.

يلى ذلك عملية لحام أو لصق شظايا أو كازاكي ببعضها البعض بمساعدة إنزيم اللحام (ليجيز) DNA Ligase الذي يقوم بتوصيل النهاية '3' للشظية الجديدة من د. ن. أ بالنهاية '5' للشظية السابقة لها. وهكذا حتى نحصل في النهاية على خيط كامل متصل (الشكل 3-12) وقد تأكدت وظيفة إنزيم الليجيز في لحام شظايا أوكازاكي عندما لوحظ أنه في بكتريا طافرة لنقص الأنزيم تراكتت شظايا أوكازاكي بدون لحام.

ولكن لماذا تلجأ الخلية إلى بدء السلسلة ببائئ ر. ن. أ الذي لا بد أن يزال في خطوة لاحقة وتفضل ذلك على بدئها ببائئ من د. ن. أ الذي 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 novo*، بالإضافة إلى ذلك يمكن تفسير تفضيل وجود بادئ ر. ن. أ في بداية شظايا أو كازاكي على أساس أن الأنزيم الذي يمكنه بدء بناء السلسلة من الصفر *de novo* يفترق عادة إلى القدرة والكفاءة لإجراء عملية التصحيح الذاتي، وعلى ذلك فإن الإنزيم الذي يستطيع استبداء بناء شظايا أوكازاكي سيكون بالضرورة معرضاً لإنتاج نسخة غير صحيحة نسبياً ( $10^{-3}$ ) مما يؤدي في النهاية إلى زيادة معدل الطفرات بدرجة كبيرة

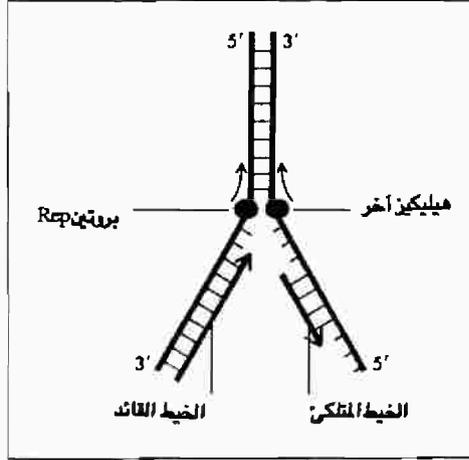
جداً مما يؤثر على حيوية الخلية ونشاطها بشكل سلبي. ولذلك فإنه يبدو أن وجود بادئ من ر. ن. أ بدلاً من د.ن.أ في بداية السلسلة له ميزة أن هذه التتابعات القصيرة من الريبو نيوكليوتيدات يمكن اعتبارها بمثابة كشافات يسهل على DNA Pol III أن يتعرف عليها فيما بعد ويقوم بتكسيروها وإزالتها أي أن الإنزيم يميزها على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

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

حيث أن سلسلتى الحلزون المزدوج الواقعة أمام شوكة التناسخ لا تفصلان تلقائياً بالمعدل المناسب تحت الظروف العادية نظراً لأن الحلزون يكون ثابت جداً والروابط الهيدروجينية تصل بين أزواج القواعد بطريقة منتظمة وتحتاج في كسرها إلى درجة حرارة عالية نسبياً في التجارب المعملية (حوالي 96°م)، لذلك فإنه يلزم وجود عوامل مساعدة في الخلية لفصل السلسلتين حتى يتسنى لإنزيمات بلمرة د. ن. أ. أن تؤدي دورها في عملية التناسخ على قالب د. ن. أ. وجد أن هناك مجموعة من البروتينات التي 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 المائي لجزئ ATP للتحرك الى الأمام وزيادة معدل انفصال سلسلتى د ن أ.

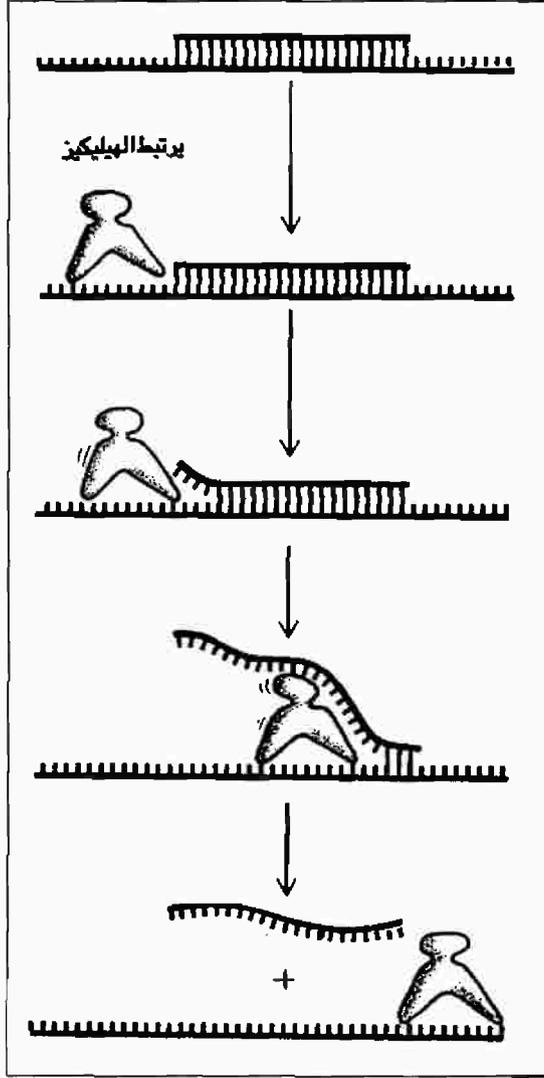
يوجد نوعان من هذه البروتينات أحدهما (هيليكيز II أو I) يرتبط بالقالب الخاص بالخيط البطئ (التابع) ويتحرك في الاتجاه 3'→5' في حين يطلق على النوع الآخر اسم Rep protein وهو يرتبط بالقالب الخاص بالخيط القائد ويتحرك

في الاتجاه  $3' \rightarrow 5'$  (الشكل ٣-١٣) تستمر إنزيمات الهليكيز في التقدم أمام شوكة التناسخ لفصل سلسلتى د. ن. أ القالب تمهيداً لعمل إنزيمات البلمرة.



الشكل (٣-١٣): تقوم إنزيمات الهليكيزيز Helicases بفك حلزونة د ن أ أمام شوكة التناسخ، يتحرك البروتين (Rep Protein) وهو من أنواع الهليكيز على أحد السلسلتين في الاتجاه  $3' \rightarrow 5'$  في حين يتحرك إنزيم هليكيز آخر (هليكيز I أو II) على السلسلة المكلمة في الاتجاه  $5' \rightarrow 3'$

ويبين الشكل (٣-١٤) الطريقة التى تعمل بها إنزيمات الهليكيزيز.

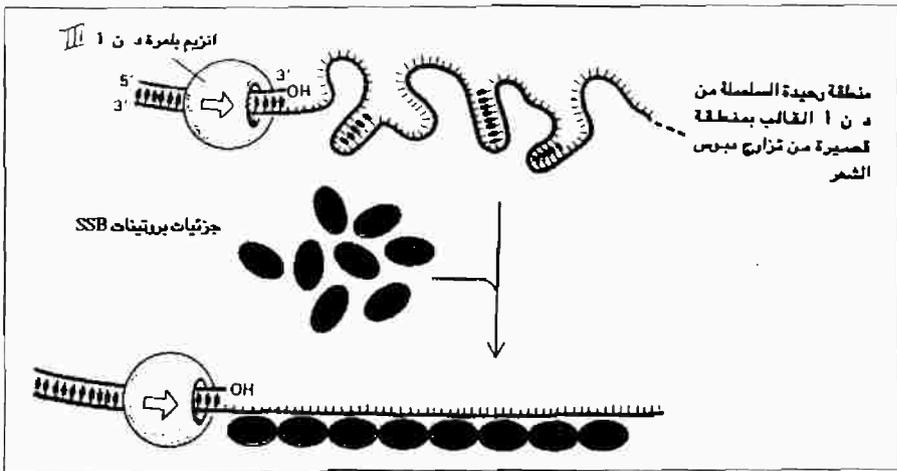


الشكل (٣-١٤): ميكانيكية عمل إنزيمات الهليكيز

يتم إعادة اتحاد 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 الهليكيز على سلسلة د ن أ محرراً الشظية القصيرة من د ن أ ويحتاج هذا التفاعل إلى وجود جميع بروتينات الهليكيز و ATP

من جهة أخرى، وجد أن سلسلة القالب عندما تكون في صورة مفردة فإنها تكون معرضة للأنتشاء أو الأنطباق على نفسها بسرعة وبسهولة في المناطق المفردة لميلها الطبيعي لتكوين مناطق مزدوجة بين أزواج القواعد المتقابلة ولو بطريقة خاطئة مكونة عروات تشبه دبوس الشعر Hairpin مما يعيق عملية التناسخ. توجد مجموعة بروتينات خاصة تقوم بالارتباط بسرعة بالمناطق المفردة من سلسلة القالب لتثبيت هذه المناطق والمحافظة عليها مفردة وممتدة بدون انحناءات أو انتشاءات لحين وصول إنزيم البلمرة إليها.

وجد أن هذه البروتينات المثبتة تلتصق بمنطقة من د. ن. أ بدون أن تحجب القواعد النتروجينية حتى تظل الأخيرة معرضة لعملية التناسخ، يطلق على هذه المجموعة من البروتينات اسم بروتينات الارتباط بسلسلة د. ن. أ. المفردة Single Stranded DNA Binding Proteins واختصاراً (SSB) ويبين 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 انتشاءها قبيل عملية التناسخ مما يسهل مرور إنزيم بلمرة د ن أ على القالب المفرد

وجد أن هذه البروتينات لا تحتاج إلى طاقة من ATP ولم يتحدد لها حتى الآن دور إنزيمي معين و تتكون من أربعة تحت وحدات Subunits طول كل منها ١٧٧ حامض أميني بحيث ترتبط كل وحدة رباعية Tetramer بمجموعات متجاورة من النيوكليوتيدات على السلسلة المفردة طولها ٣٢ نيوكليوتيدة. يؤدي ارتباط وحدة من SSB بمنطقة ما إلى تشجيع أو حفز ارتباط وحدة أخرى من SSB بمنطقة مجاورة على السلسلة ويطلق على هذه العملية الارتباط التعاوني 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 ولا بد أن توجد هذه الوحدات جميعاً معاً حتى يمكن للإنزيم أن يقوم بوظائفه على الوجه الأكمل . وجد أن واحده من هذه الوحدات وتسمى  $\infty$  تقوم بنشاط الهدم الطرفي Exonuclease  $5' \rightarrow 3'$  بالإضافة إلى وظيفة البلمرة في حين تقوم الوحدة  $\epsilon$  بالهدم الطرفي في الاتجاه  $3' \rightarrow 5'$  ترتبط واحدة أو أكثر من الوحدات الأخرى بجزئ ATP حتى يمكن بدء الاستطالة عند النهاية  $3' H$  لبداي ر. ن. أ.

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

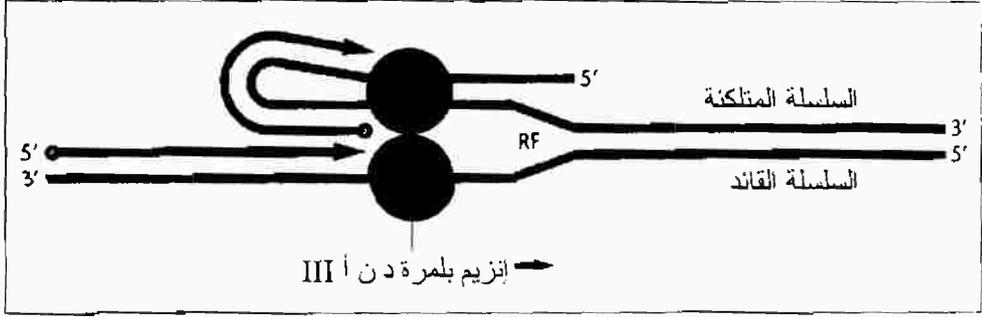
الجدول (٢-٣) أنواع البروتينات المشاركة

في تناسخ د. ن. أ في بكتريا القولون E.coli

الوظيفة	عدد تحت الوحدات	الكتلة (Kdal)	اسم البروتين	
الارتباط بالسلسلة المفردة	٤	٧٤	SSB	
تجميع الريموسوم وتنشيطه	٣	٦٦	Protein i	
	٢	٢٨	Protein n	
	١	٧٦	Protein n'	
	١	١٧	Protein 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	ε	
٢x استطالة السلسلة د.ن. أ الجديدة	}	١	١٠	θ
		١	٣٧	β
		١	٥٢	δ
		١	٣٢	δ
		١	٨٣	T
ملئ الفجوات وإزالة بادئ ر. ن. أ	١	١٠٢	Pol I	
اللحام بين شظايا أوكازاكي	١	٧٤	Ligase	
زيادة الحلزنة	٤	٤٠٠	Topoisomerase II (Gyrase)	
	٢	٢١٠	Gyr A	
	٢	١٩٠	Gyr B	

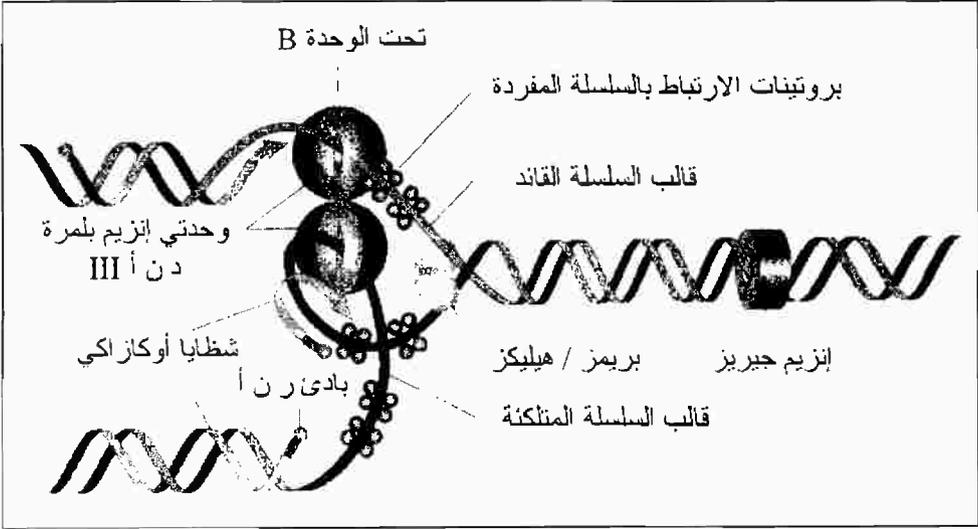
فك الحلزون وفصل سلسلتى د.ن.أ.	١	٦٥	Rep Protein
فك الحلزون وفصل سلسلتى د.ن.أ.	١	٧٥	Helicase II
نقطة بداية التناسخ فى د.ن.أ.	٤	٤٨	Dna A
استرخاء الحلزون الفائق السلبى		١٠٠	Topoisomerase I

تقوم هذه البروتينات بالعمل فى تنسيق تام مع بعضها ويطلق عليها فى مجموعها ماكينة التناسخ Replication Machine مما يؤدي 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 ينتهى 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 أوكازاكي 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 أوكازاكي التالية. بهذه الميكانيكية لن يكون الفرق كبيراً بين معدل بناء واستطالة الخيط القائد والخيط التابع (الشكل ٣-١٦).



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

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

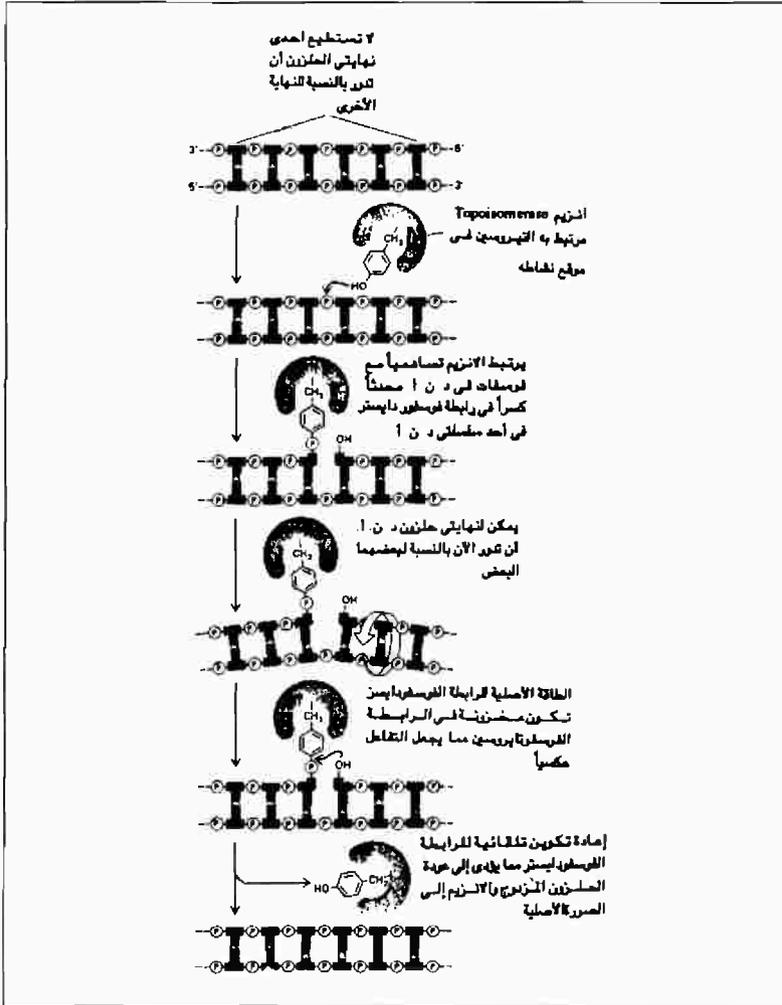


الشكل (٣-١٧): ملخص لعملية بناء دن أ عند شوكة تناسخ واحدة

### دور انزيمات Topoisomerase في تناسخ د. ن. أ:

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

“Reversible Nucleases” حيث ترتبط تساهمياً بمجموعات الفوسفات فى الهيكل الأساسى لجزئ د. ن. أ، وبذلك تقوم بتكسير رابطة فوسفواستير ثنائية فى سلسلة د. ن. أ. ومن خواص هذه الرابطة التساهمية التى تكونت بين انزيم Topoisomerase وفوسفات د. ن. أ احتفاظها بالطاقة الناتجة عن كسر الرابطة الفوسفواستير الثنائية وبهذا يكون تفاعل الكسر عكسياً بحيث التئام (لحام) سريع بدون الحاجة إلى مصدر طاقة إضافى. وتجدر الإشارة هنا إلى أن عملية إعادة الالتحام هنا تختلف عما يحدث عن طريق انزيم اللحام DNA Ligase الذى سبقت الإشارة إليه.



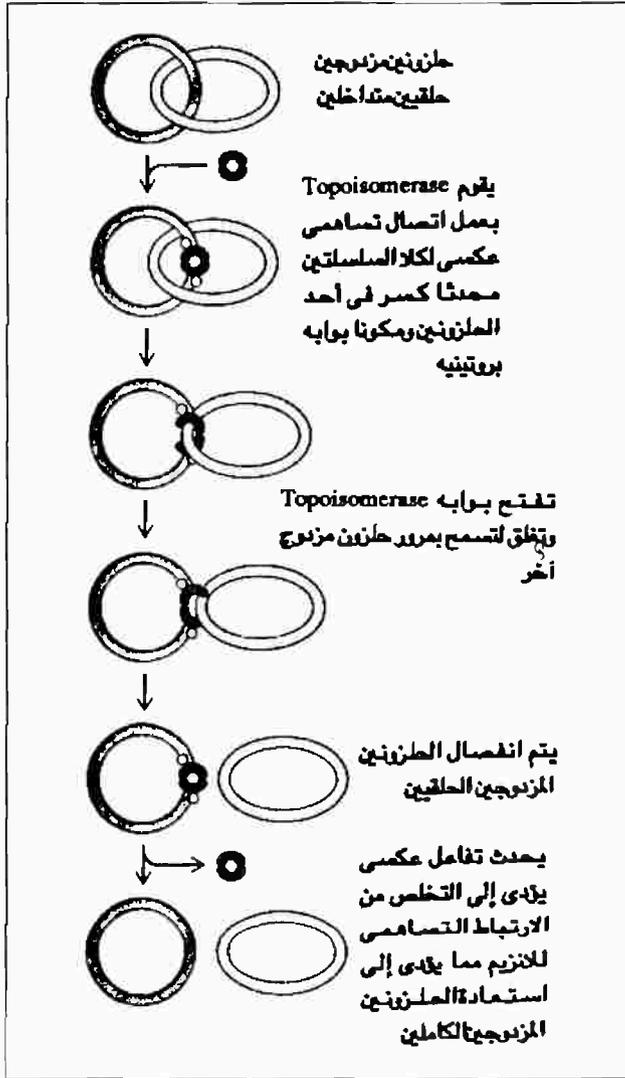
الشكل (٣-١٨): تفاعل أحداث ثغرة عكسية (Nicking) الذي يتم في د ن أ مميزة النواة

بمساعدة إنزيم Topoisomerase I

حيث تكون هذه الإنزيمات رباطة تساهمية مؤقتة مع جزيء د ن أ

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

سلسلتى الحلزون المزدوج فقط أى أنه يعمل على مستوى السلاسل المفردة. يؤدي القطع أو الكسر الصغير هذا الى السماح لشطري حلزون د. ن. أ الموجودين على جانبي الكسر بالدوران بحرية بالنسبة لبعضها البعض بحيث تستخدم الرابطة الفوسفواسثير الثنائية فى السلسلة المقابلة للكسر كنقطة ارتكاز للدوران (الشكل ٣-١٩) وإذا نشأ أى 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 قصيرة فقط من الحلزون وهى المنطة التى تسبق مباشرة شوكة التناسخ. ويحدث نفس الشئ أثناء عملية نسخ Transcription د. ن. أ لتكوين ر. ن. أ.



الشكل (3-19): 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

أما النوع الثاني من هذه الانزيمات فيسمى Topoisomerase II ويقوم بدوره عن طريق تكوين رابطة تساهمية مع كل من السلسلتين في الحلزون المزدوج لجزئ د.ن.أ. في نفس الوقت مما يسبب قطع مؤقت في 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 يؤدي إلى إنشاء بوابة في د.ن.أ.
- ٢- يمر جزئ د.ن.أ. مزدوج آخر من خلال هذا الكسر (البوابة).
- ٣- يعيد التحام الكسر ثم ينفصل عن د.ن.أ.

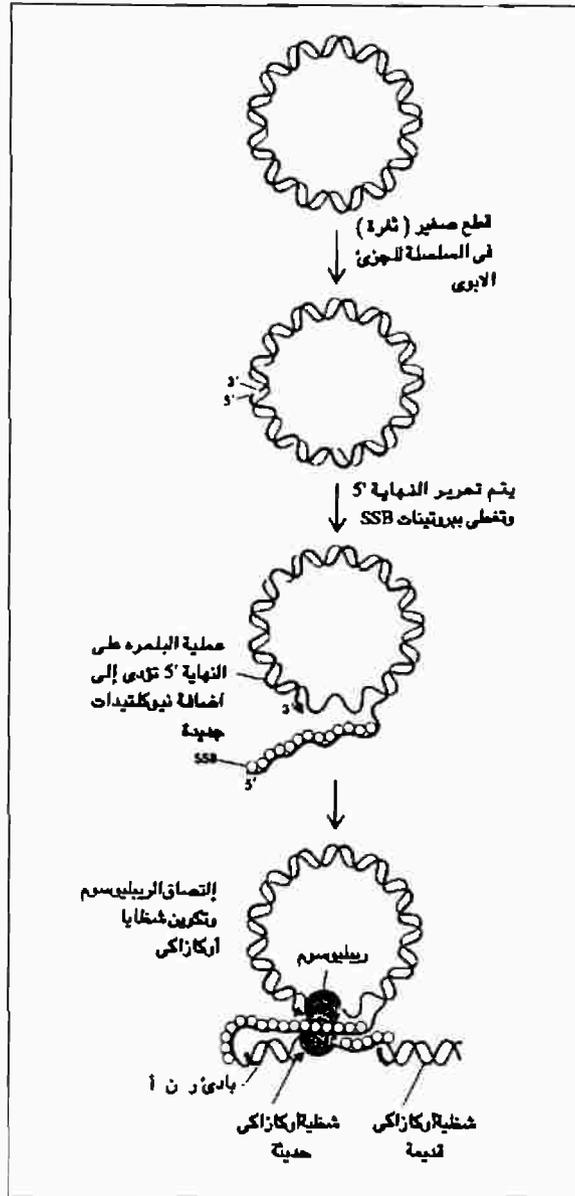
بهذه الكيفية فإن انزيم DNA Topoisomerase II يمكنه بكفاءة أن يقوم بفض الاشتباك بين جزيئين حلقيين من د.ن.أ. كما في الشكل (٣-١٩) يقضى هذا التفاعل نفسه على مشكلة تشابك وتتعقد جزئ د.ن.أ. "Tangling" التي كان من الممكن أن تحدث أثناء تناسخ د.ن.أ.

### نموذج الدوائر المتدرجة لتناسخ د.ن.أ. الحلقي Rolling Circles:

توجد طريقة بديلة لتناسخ د.ن.أ. الحلقي في البكتريا تسمى طريقة الدوائر المتدرجة حيث يبدأ بناء د.ن.أ. بإحداث قطع محدد عند منشأ التناسخ في سلسلة معينة (+) من الحلقة المزدوجة الأبوية. يؤدي ذلك إلى أن تصبح النهاية 5' منفصلة عن الحلقة المزدوجة وسائبة مما يسمح لانزيم DNA Pol III بإضافة نيوكليوتيدات إلى النهاية 3' OH الحرة. ومع تقدم شوكة التناسخ فإن النهاية 5' للسلسلة المكسورة ستتدرج وتسحب كذيل حر بزيادة طولاً مع استمرار

التناسخ (الشكل ٣-٢٠). يتم تغطية هذا الذيل بسرعة ببروتينات SSB لمنع التواءه أو التفافه. ويسمى هذا التركيب التناسخي "الدائرة المتدحرجة" Rolling circle لأن امتداد واسترخاء الذيل 5' وحيد السلسلة ينتج عن دوران الحلزون المزدوج القالب حول محوره. ولا يتسبب هذا الانفكاك في 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.

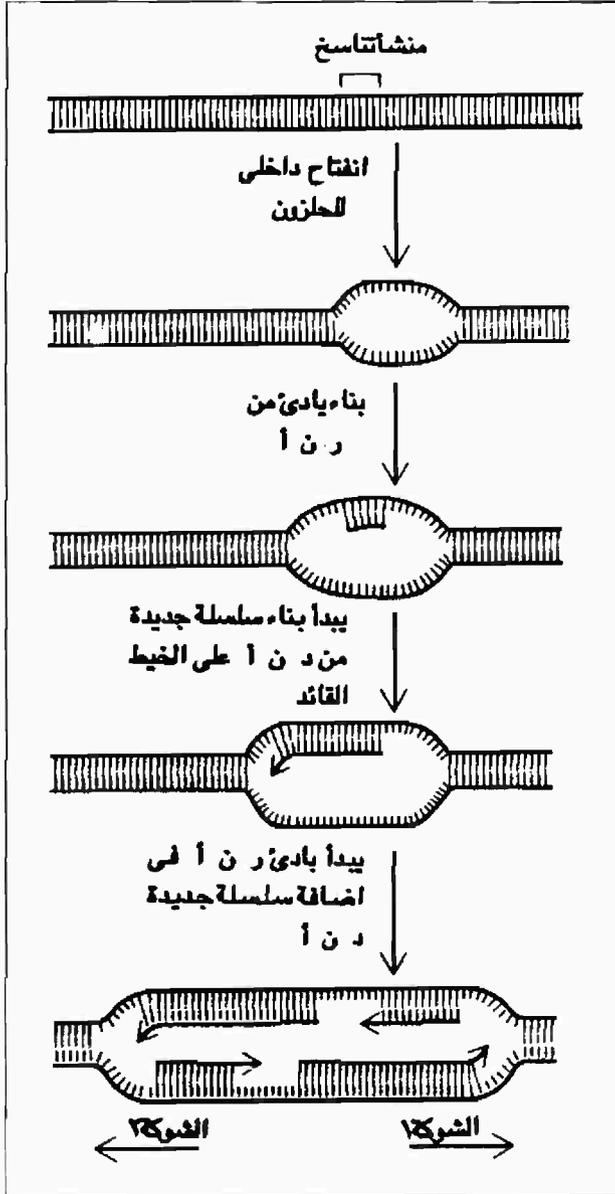
عند استخدام ميكانيكة الدائرة المتدحرجة لتناسخ د. ن. أ المزدوج فإن النهاية 5' (الذيل) المفردة السلسلة تتحول بسرعة إلى حلزون مزدوج نتيجة لتكوين شظايا أوكازاكي عليها. يحتمل أن القوة المتحركة لاستمرار عملية فك الذيل 5' من الدائرة المتدحرجة ليست ناتجة عن تفاعلات البلمرة التى تحدث على النهاية OH 3' ولكنها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



الشكل (٣-٢٠): ميكانيكية الدائرة المتدرجة لتناسخ جزيء ن أ الحلقي القوة المؤدية إلى فك حلزونة الذيل 5' تنتج من حركة الريبوسوم المدفوع بمكوناته من الهيليكيز

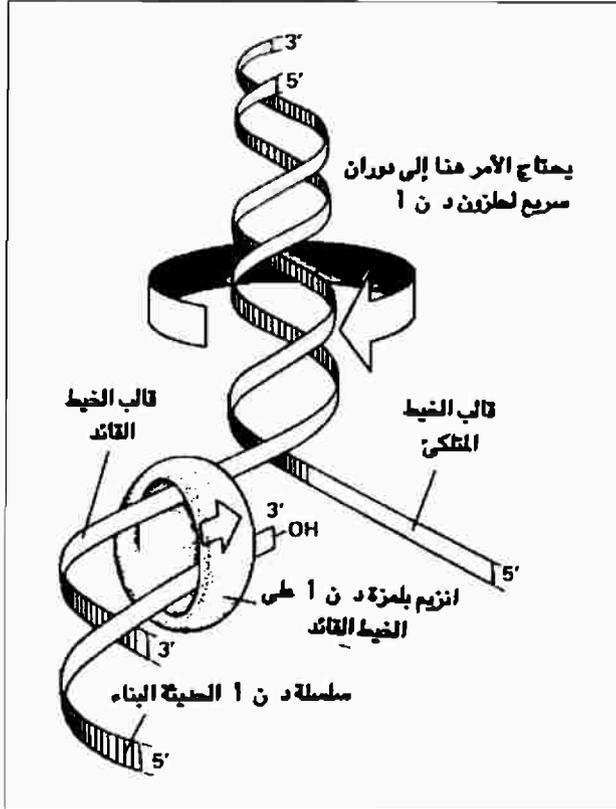
## بدء شوكات التناسخ عند منشأ التناسخ:

تبدأ شوكات التناسخ في كل من البكتريا والثدييات عند تركيب معين يعرف بفقاعة التناسخ Replication Bubble وهي منطقة على جزئ د. ن. أ يتم فيها انفصال السلسلتين المستخدمتين كقالب لبناء د. ن. أ (الشكل ٣-٢١) وقد تبين أن هذه الفقاعة تتكون عند تتابع محدد من القواعد على الجزئ يعرف بمنشأ التناسخ Replication Origin والذي يبلغ طوله حوالي ٣٠٠ نيوكلييده. توجد مناشئ تناسخ مشابهة في كروموسومات مميزة النواة ولو أنه لم تتحدد تتابعاتها بدقة بعد .



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

تبين في التجارب المعملية *In Vitro* أن بدء شوكة التناسخ في البكتريا والفيروس تبدأ بالطريقة المبينة في الشكل (٣-٢٢) حيث ترتبط نسخ عديدة من البروتين المستبدئ Initiator Protein بمواقع معينة عند منشأ التناسخ لتكوين معقد بروتيني كبير. يربط هذا المعقد انزيم الهليكيز في منطقة مفردة السلسلة من د. ن. أ القالب في منطقة قريبة من الحلزون. كما يتم ارتباط انزيم بريميز DNA Primase ويتكون البريموسوم الذي يتحرك بعيداً عن المنشأ ويتكون بادئ من ر. ن. أ الذي يبدأ السلسلة الجديدة الأولى من د. ن. أ يؤدي ذلك إلى تجمع سريع لبقية بروتينات التناسخ لتكوين معقدات بروتينية للتناسخ تتحرك بعيداً عن نقطة المنشأ في الاتجاه المضاد (الشكل ٣-٢٢). تستمر عملية التناسخ ثنائية الاتجاه حتى ينتهي تناسخ كل قالب د. ن. أ الذي يسبق كل شوكة. تتحرك كل شوكة بعيداً عن المنشأ بمعدل حوالي ٥٠٠ نيوكلييدة في الثانية الواحدة حتى ينتهي تناسخ جزئ د. ن. أ بأكمله ويستغرق ذلك في البكتريا حوالي ٣٠-٤٠ دقيقة فقط.



الشكل (٣-٢٢): عملية فك الحلزنة أثناء تناسخ جزئ D ن 1 ولكي يتم تحرك شوكة التناسخ في البكتريا بسرعة ٥٠٠ نيوكلييدة في الثانية فإن الحلزون المزدوج أمام الشوكة لابد أن يدور بسرعة ٥٠ نيوكلييدة في الثانية