

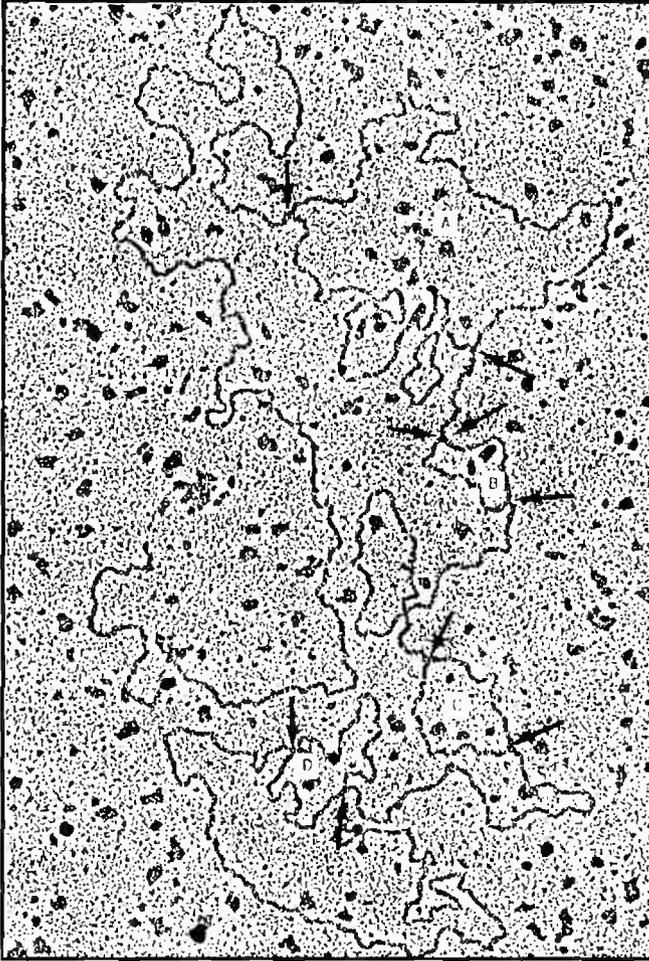
الفصل الرابع

تناسخ د. ن. أ الكروموسومات في الخلايا مميزة النواة

بناء د. ن. أ في مميزة النواة:

اثبتت البحوث أن عملية تناسخ د. ن. أ في مميزة النواة تتم بطريقة مشابهة لما يحدث في البكتيريا. ففي كلتا الحالتين يتم فصل (فتح) السلسلتين عن بعضهما عند منشأ التناسخ وتتكون شوكتي تناسخ ويتم بناء د. ن. أ في اتجاهين متضادين Bidirectional على كل من السلسلة القائد والسلسلة المتلكئة بواسطة انزيم بلمرة د. ن. أ. ويحتاج انزيم بلمرة د. ن. أ في مميزة النواة نفس المتطلبات الاساسية مثل ما يحدث في البكتيريا وهي : أربعة نيوكلييدات وقالب من د. ن. أ وبادئ Primer إلا أنه نظراً لان جينومات مميزة النواة تحتوى كل خلية منها على كمية كبيرة جداً من د. ن. أ مقارنة بالبكتيريا (مثال 4.6 Mbp في البكتيريا مقابل 120 Mbp في الدروسفلا و3200 Mbp في الانسان) ومن جهة أخرى فإن أطول كروموسوم في الدروسوفلا يحتوى على 65Mbp مقابل 4.6 Mbp في البكتيريا وفي نفس الوقت نجد أن سرعة تناسخ د. ن. أ في الدروسوفلا تكون بمعدل حوالى ٢٦٠٠ زوج نيوكليدى في الدقيقة عند درجة 25°م وبذلك لو اقتصر البناء في الدروسوفلا على شوكة تناسخ واحدة فإن معنى ذلك أن يستغرق تناسخ د. ن. أ لهذا الكروموسوم ١٧,٥ يوماً. وبشوكتي تناسخ

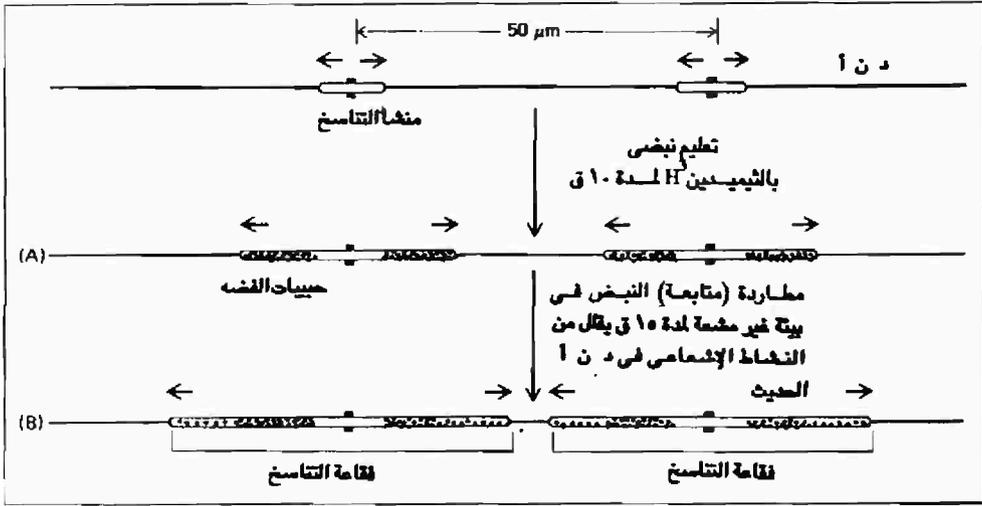
تتحركان في اتجاهين متضادين من منشأ مركزي فإن هذا الكروموسوم سيتم تناسخه في ٨,٥ يوماً. ولكن لو عرفنا أن كروموسومات جنين الدروسوفلا يتم تناسخها في ٣ إلى ٤ دقائق فقط وأن انقسام النواة يحدث مرة كل ٩ إلى ١٠ دقائق في مرحلة الانقسام المبكر Early Cleavage Division ، فإن ذلك يحتم علينا أن نفترض وجود عدد كبير من مناشئ التناسخ على طول كل كروموسوم في الدروسوفلا وغيرها من مميزة النواه حتى يمكن ان تتم عملية التناسخ بالسرعة المطلوبة أثناء دورة انقسام الخلية وخاصة أنها تتم أثناء دور البناء S فقط والتي تمثل فترة زمنية محدودة في دورة الخلية. في حين أنه في البكتريا، يحدث تناسخ د. ن. أ بدون توقف أثناء دورة الخلية. وفي الحقيقة فإنه لكي يحدث اتمام تناسخ كروموسوم الدروسوفلا في ٣,٥ دقيقة فلا بد أن يحتوى مثل هذا الكروموسوم على حوالي ٧٠٠٠ شوكة تناسخ موزعة على مسافات متساوية على طول جزئ د. ن. أ وقد اثبتت التجارب ذلك بالفعل حيث أمكن بفحص جزئ د. ن. أ في الدروسوفلا تحت المجهر الالكتروني، التحقق من وجود عدد كبير من شوكات التناسخ (الشكل ٤-١) والتي تعمل في وقت واحد. إلا أنه من الواضح ، كما سيأتي بعد ، أن عدد شوكات التناسخ لكل كروموسوم ليس ثابتاً في كل مراحل النمو والتكوين في مميزة النواة إذ أن التناسخ يستبدأ في مواقع كثيرة في الفترة الجنينية حيث يكون الانقسام الخلوي سريعاً جداً وذلك مقارنة بأعداد أقل في المراحل المتأخرة من التمايز.



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

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

ذو إشعاع عال. ثم تكسر الخلايا بلطف ويؤخذ د. ن. أ ويفرد بعناية على سطح شريحة زجاجية مبطنة بمحلول تصوير حتى يمكن تحديد طراز د. ن. أ المشع بطريقة التصوير بالإشعاع الذاتى Autoradiography. اختير الوقت المسموح به للتعليم بالإشعاع بحيث تعطى كل شوكة تناسخ فرصة للحركة بمقدار عدة ميكرومترات على طول سلسلة د. ن. أ القلب. 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 ٤-٢) والذى يتبين منه أن التناسخ يتم فى اتجاهين متضادين. يدل المعدل الذى يتم به زيادة طول د. ن. أ المتناسخ مع زيادة فترة الإشعاع على أن شوكة التناسخ تتحرك بسرعة ٥٠ نيوكليتيده فى الثانية. ويمثل ذلك حوالى $\frac{1}{10}$ من السرعة التى تتحرك بها شوكة التناسخ فى البكتريا. وقد يرجع بطء الحركة فى مميزة النواه إلى الصعوبة التى تواجهها عملية تناسخ د. ن. أ فى الكائنات التى يكون فيها د. ن. أ الكروموسومى منضغط فى صورة كروماتين (نيوكليوسوم). وكما سبق الإشارة فإن متوسط طول كروموسوم الإنسان حوالى ١٥٠ مليون زوج نيوكليتيدي ولكى يتم تناسخ مثل هذا الجزئ الكبير من البداية إلى النهاية بشوكة تناسخ واحدة وبسرعة ٥٠ نيوكليتيده فى الثانية فإن ذلك سيستغرق $10 \times 150 \times 0.2 = 3 \times 10^3$ ثانية أى حوالى ٨٠٠ ساعة وهو أمر مستبعد بطبيعة الحال.

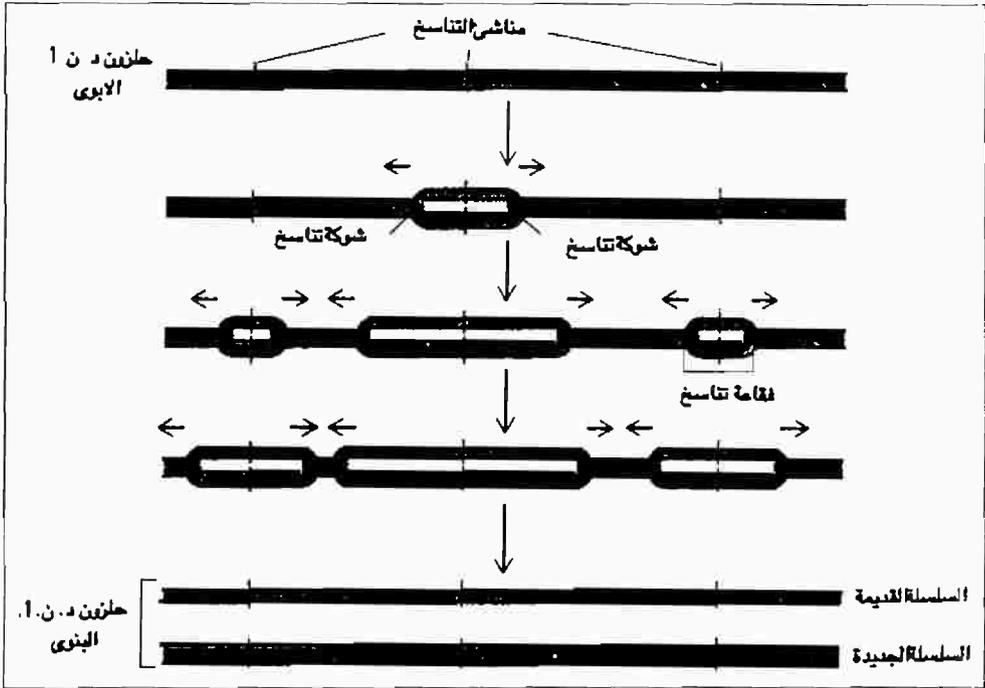


الشكل (٤-٢): إثبات أن حركة شوكة التناسخ تحدث أثناء مرحلة البناء S في مميزة النواة ثم تعليم محدود لـ د ن أ الحديث البناء في الخلايا البشرية بوميض

من الثيميدين العالي الإشعاع (H^3 -Thymidine)

- (أ) تم تحليل الخلايا وأجري فرد لـ د ن أ على شريحة زجاجية وتمت عملية التصوير بالإشعاع الذاتي Autoradiography فظهر خط من حبيبات الفضة على د ن أ المشع.
- (ب) نفس التجربة في أ فيما عدا أنه إتحت فترة زمنية أكبر للتحضير في بيئة غير مشعة مما أدى إلى دورات تناسخ متتالية من د ن أ وقد تبين أن أزواج الخطوط الداكنة تحتوي على حبيبات فضة تتدرج بالتناقص في الاتجاهين المتضادين، ويبين ذلك الحركة ثنائية الاتجاه للشوكة من منشأ تناسخ مركزي.

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



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

وقد أثبتت عدة تجارب لاحقة ما يأتي:

- ١- أن كل كروموسوم يمكن أن يحتوي على عدة الاف من مناشئ التناسخ.
- ٢- أن مناشئ التناسخ تميل إلى العمل في مجاميع تسمى وحدات التناسخ Replication Units وتتكون كل وحدة من حوالي ٢٠ إلى ٨٠ منشأ تناسخ.
- ٣- يبدأ نشاط وحدات التناسخ خلال مرحلة S في الميوزي ويستمر حتى يتم تناسخ جزئ د. ن. أ الكروموسومى بأكمله.

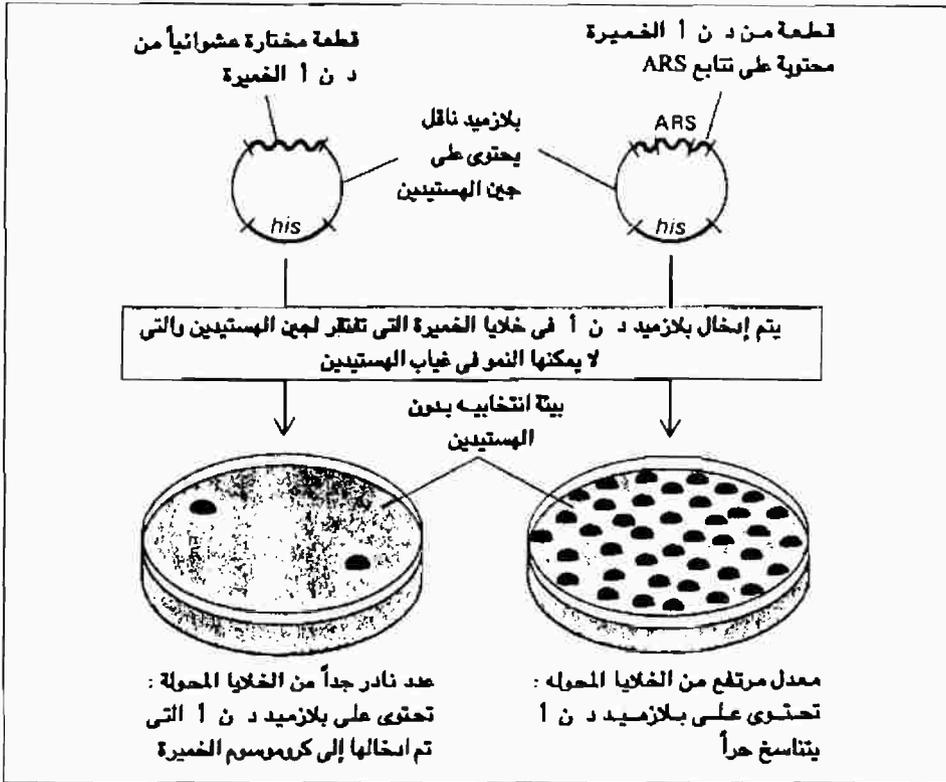
- ٤- داخل وحدة التناسخ الواحدة تكون المناشئ الفردية على مسافات تبليغ حوالى ٣٠,٠٠٠ إلى ٣٠٠,٠٠٠ زوج نيوكليدي من بعضها البعض، وقد يوجد منشأ تناسخ واحد لكل عروة أو نطاق كروماتيني.
- ٥- كما هو الحال فى البكتريا، تكون شوكة التناسخ فى أزواج وتتكون فقاعة تناسخ وتتحرك شوكة التناسخ فى اتجاهين متضادين بعيداً عن نقطة المنشأ المشتركة وتظل فى الحركة إلى أن تلتقى (رأساً برأس) مع شوكة تناسخ أخرى آتية من الاتجاه المضاد (أو إلى أن تصل إلى نهاية الكروموسوم). بهذه الطريقة يمكن لعدد كبير من شوكات التناسخ أن تقوم بدورها مستقلة على كل كروموسوم بحيث يكتمل بناء جزيئين كاملين مسن الحلزون المزدوج البنوى على السلسلتين الأبويتين التى يستخدم كل منهما كقالب (الشكل ٤-٣).

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

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

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

تتابعات التناسخ الذاتي (ARSes) Autonomous Replication Sequences (الشكل ٤-٤).



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

يمكن لهذه التتابعات ARSes أن تزيد معدل التناسخ في 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 المُدخلة Inserted في 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 المناشئ الحقيقية للتناسخ في الكروموسومات. ويبين الشكل (٤-٥) 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 Consensus وهام في حين أن بقية التتابعات لا تبدو تناظر كبير على الرغم من أهميتها الوظيفية ويكون التناظر قصيراً لدرجة لا يمكن توقع حدوث تهجين خلطي بين تتابعات ARsEs في الجينوم.

```

consensus: ATTTATATTTA
             T   G   T

aaaagtaaaaTTTaATATTTTggatgaaaccca t t t t tagact t t t t c t taact
. . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
gatcat t g t a t g T T T T A T G T T T T g t c t g g a a a a c a t a t a g t a c g g a t a
    
```

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

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).

ضوابط لمنع تكرار بدء التناسخ فى الخلايا مميزة النواة:

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

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

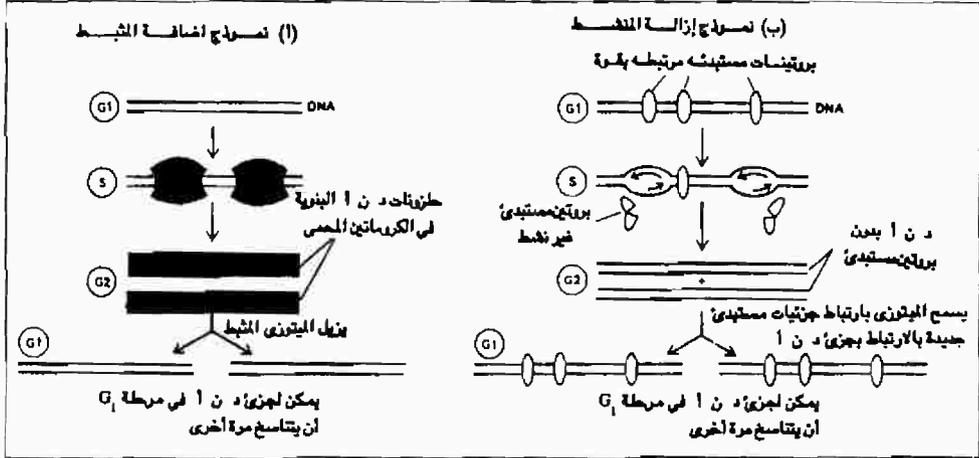
ولكن الخلية لا تحتاج إلى استخدام كل منشأ تناسخ مرة واحدة فى كل دورة خلية فى الدور S فكيف يمكن التمييز بين هذه المناشئ لمنع تكرار استخدامها؟

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

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

الخلية S إلى الخلية G1. من جهة أخرى، عندما تم دمج خلية فسي دور S مع خلية في دور G2 (أى خلية اتمت للتو دور S) فقد وجد أن النواة في الخلية G2 لم تستحث لبناء د.ن.أ. نظراً لأن عملية البناء مستمرة بدون عوائق في النواه في دور S. ولذلك فإن النواه في دور G2 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 Diffusible والتي تكون مرتبطة بشدة بجزئ د.ن. أ الخاص بها. وإذا تمت إضافة هذا المثبط داخلياً أثناء دور S في أعقاب كل شوكة تناسخ فإنه سيحل مشكلة عدم تكرار تناسخ منطقة المنشأ أكثر من مرة في دورة الخلية الواحدة، وذلك عن طريق إحداث تعديل في الكروماتين الخاص بـ د.ن. أ الذى تم تناسخه حديثاً وبذلك نضمن أن الجزء من د.ن. أ الذى تم تناسخه مرة لن يتكرر تناسخه مرة أخرى في نفس دور S كما فى الشكل (٤-١٦).

يوجد تفسير آخر يعتمد على افتراض وجود بروتين بادئ مرتبط بشدة يحدث له إيقاف لنشاطه inactivation عند مرور شوكة التناسخ (الشكل ٤-٦ ب).



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

- (أ) نموذج يعتمد على إضافة ميثط إلى كل الكروماتين المتناسخ حديثاً.
- (ب) نموذج يعتمد على الارتباط القوي لبروتين محفز (منشط) الذي يعمل مرة واحدة فقط والذي يمكن إضافته إلى د ن أ أثناء الميوزي فقط.

وبغض النظر عن طبيعة هذا العامل المثبط لتناسخ د. ن. أ فإنه لا بد من إزالته عند أو قبيل بدء فترة الميوزي حيث أنه بعد أنقسام الخلية لا توجد حماية لـ د. ن. أ البنوي في النواة في دور G₁.

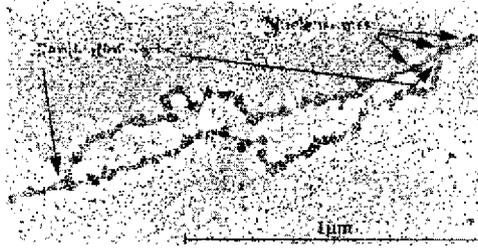
تضاعف النيوكليوسومات عند شوكات التناسخ:

Duplication of Nucleosomes at Replication Forks

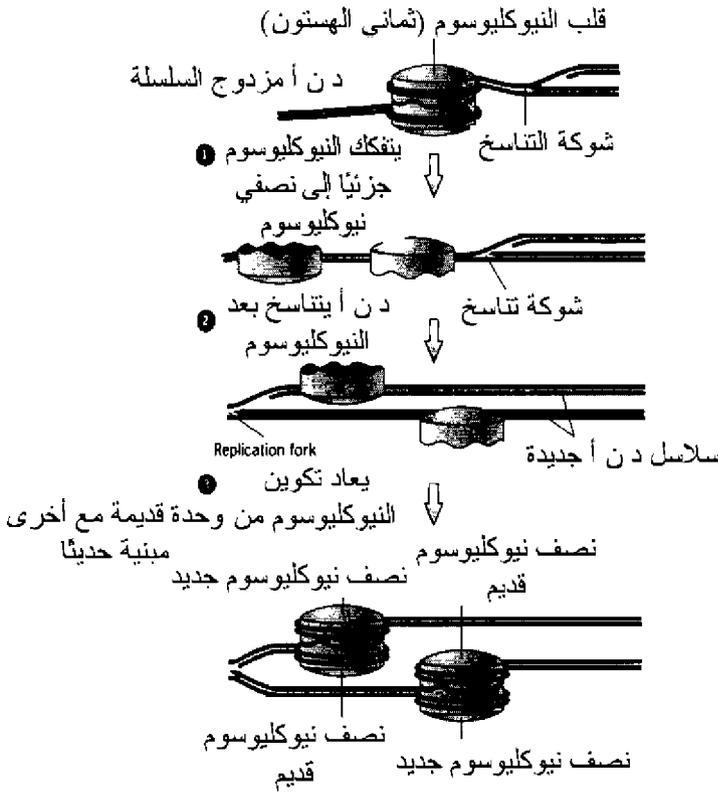
حيث أن د. ن. أ مميزة النواة في الدور البنوي يكون معبأ في نيوكليوسومات (قطر كل منها ١٠ نانو ميتر) ويحتوي كل نيوكليوسوم على

١٦٦ زوج نيوكليتيدي ملتف في دروتين حول ثمانية جزيئات من الهستون. وعند الأخذ في الاعتبار حجم النيوكليوسومات والحجم الكبير للريبليوسوم Repliosome، فإنه كان من غير المتوقع أن تتحرك شوكة التناسخ من خلال نيوكليوسوم كامل إلى الجانب الآخر له إلا أن صور المجهر الإلكتروني للكروماتين أثناء تناسخه في الدروسفلا قد بينت بوضوح إحتفاظ النيوكليوسومات بتركيبها الطبيعي وبنفس المسافات على جانبي شوكات التناسخ (الشكل ٤-٧أ). أى أن النيوكليوسومات تبدو بنفس التركيب والمسافات خلف شوكات التناسخ مباشرة (Post-Replicative DNA) بالضبط كما كانت أمام شوكات التناسخ (Pre-Replicative DNA).

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



{ أ }



{ ب }

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

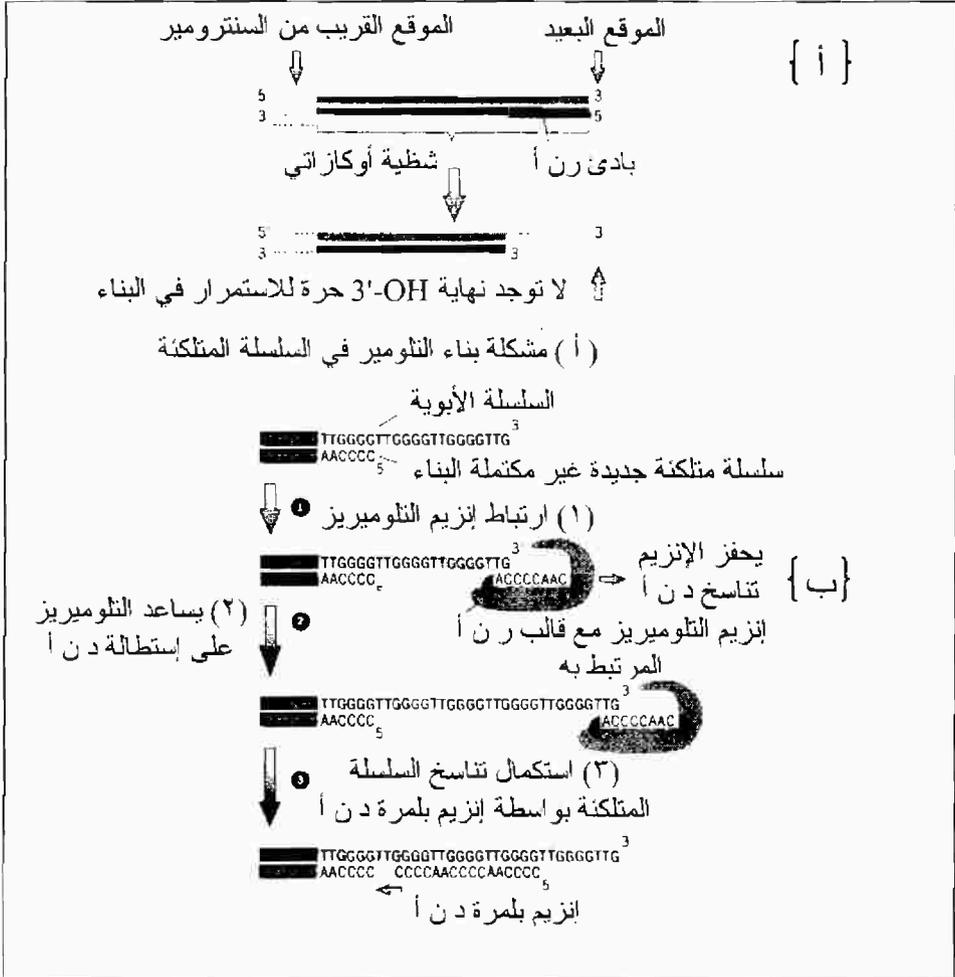
- (أ) صورة بالمجهر الإلكتروني تبين النيوكليوسومات على جانبي كل شوكة تناسخ في الدروسفلا.
 (ب) نموذج لتحرك شوكة التناسخ بعد النيوكليوسوم.

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

تناسخ منطقة التلومير في الكروموسوم:

من بين الفروق الرئيسية بين تناسخ د. ن. أ في غير مميزة النواه ومميزة النواه طبيعة تركيب الكروموسومات في كل منها. فعلى العكس من الكروموسوم الحلقي المقبول في البكتريا نجد أن كروموسومات مميزة النواه تكون خطية. وعند تناسخها فإنها تواجه بمشكلة خاصة عند نهاياتها الطرفية المفتوحة والتي يطلق عليها منطقة التلومير *Telomere*. وبينما يستمر البناء بصورة طبيعية الى نهاية الخيط القالب، تنشأ صعوبة على الخيط المثلثي عندما تتم ازالة ر. ن. أ البادئ (الشكل ٤-٨) وقد تم حل هذه المشكلة بدراسة انزيم خاص بمنطقة التلومير ويطلق عليه انزيم تيلوميريز *Telomerase* حيث وجد انه يحتوى فى تركيبه على تتابع قصير من ر. ن. أ وقد استخدم تيلومير الطفيل *Tetrahymena thermophila* الذى يحتوى على تتابعات مترادفه من GGGTTG فى معرفة كيفية اضافة نهايات نيوكليدية محددة إلى الكروموسومات بواسطة انزيم التيلوميريز.

يتعرف انزيم التلوميريز على تتابعات التلومير الغنية فى القاعدة G فى النهاية المفردة السلسلة 3'-overhang مما يؤدي إلى استئصالها فى الاتجاه 3'→5' بمعدل وحدة تكرارات مترادفه فى كل مرة. وكما سبق القول، تبين أن انزيم التلوميريز يعد فريداً فى احتوائه على سلسلة قصيرة من قالب ر. ن. أ ضمن تركيبه. وبعد اضافة عدد من وحدات التكرارات المترادفة اعلاه بواسطة هذا الانزيم، فإن انزيم بلمرة د. ن. أ يقوم ببناء الخيط المكمل. وبدون نشاط انزيم التلوميريز فإن الكروموسومات الخطية *Linear* ستتوالى فى القصر واذا استمر حذف هذه الاجزاء الطرفية بحيث تصل إلى جين أو جينات ضرورية لحياة الكائن فإن ذلك قد يؤدي إلى موته.



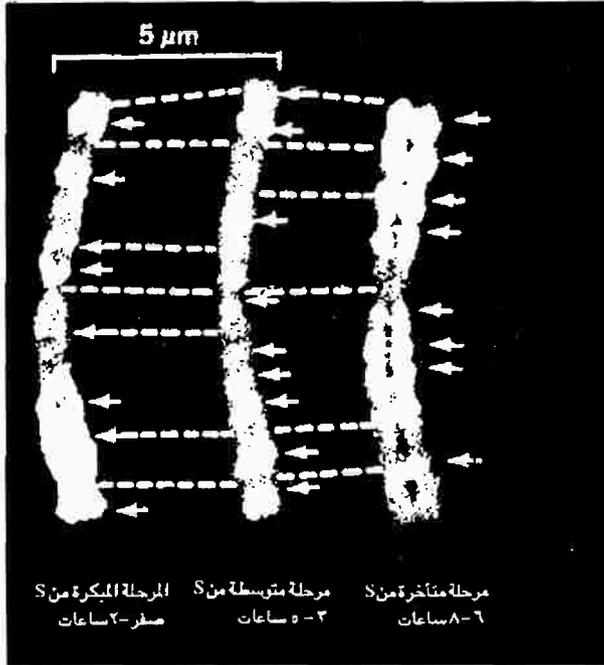
الشكل (4-8): تناسخ منطقة التيلومير في كروموسوم Tetrahymena

- (أ) نتيجة لعدم وجود نهاية 3'OH حرة عند نهاية سلسلة البائد، فإن إنزيم بلمرة دن أ لا يمكنه استبدال باء دن أ الذي يبدأ منه بناء دن أ عند نهاية السلسلة المتكئة.
- (ب) يتم تناسخ نهايات هذه الكروموسومات بإنزيم خاص يسمى تيلوميريز الذي يمنع نهايات الكروموسومات من أن تصبح أقصر وأقصر مع كل دورة تناسخ ويتم تحديد تتابع النيوكليوتيدات عند نهايات السلسلة المتكئة بواسطة جزئ قصير من دن أ والموجود كـمكون أساسي لإنزيم التيلوميريز.

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 ثماني ساعات في خلية الثدييات. يشير ذلك إلى أن منشأ التناسخ لا تنشط في نفس الوقت وأن د. ن. أ في كل وحدة تناسخ (المحتوية على مجموعة من ٢٠-٨٠ منشأ كما سبق القول) يجري 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 الإجابة على هذا السؤال باستخدام مشابه الثيميدين Thymidine Analog 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 ٤-٩).



الشكل (٤-٩): صورة بالمجهر الضوئي للكروموسومات الميتوزية المصبوغة التي تم فيها تعليم مغاير

Differentially د ن أ المتناسخ أثناء فترات محددة في دورة S السابقة

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

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

من المعروف أنه توجد على طول جزئ د. ن. أ في مميزة النواة 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 ر. ن. أ. عليه. يمكن تفسير الميكانيكية التي تحدد توقيت تناسخ د. ن. أ. من خلال ملاحظة أن مناطق الهيتروركروماتين، 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 د. ن. أ. بشدة في الكروماتين. ويدعم هذا الاستنتاج الاختلاف في توقيت تناسخ كروموسومي X في إناث الثدييات. إذ على الرغم من أن هذين الكروموسومين يحتويان على نفس تتابع د. ن. أ. إلا أننا نجد أن واحداً منها فقط يكون نشطاً في حين يظل الآخر خاملاً. وجد أن معظم مناطق X في الكروموسوم الخامل يكون متكثفاً بشدة في شكل هيتروركروماتين، ويتم تناسخ د. ن. أ. الخاص به في مرحلة متأخرة ويتم تناسخه ببطء على مدى فترة S في حين أن تلك المناطق من الجينوم التي يكون الكروماتين فيها 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 د. 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:

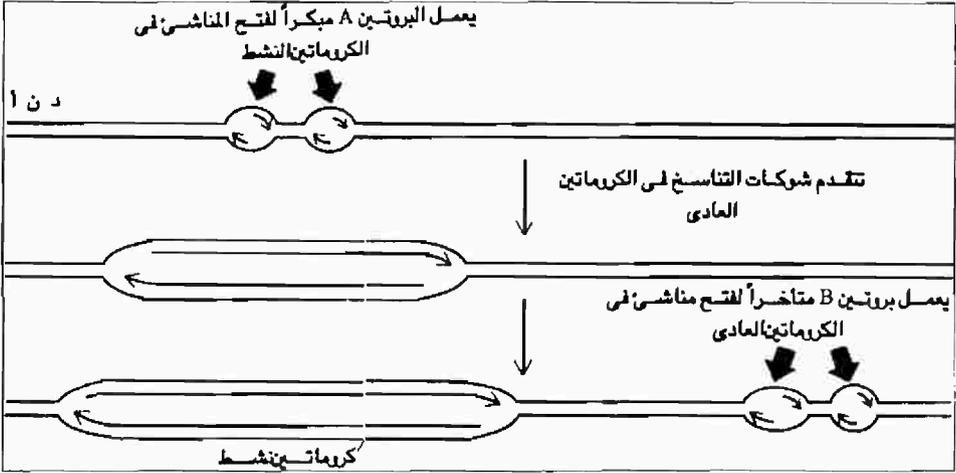
توجد مجموعة من الجينات التي تنشط بصفة عامة في جميع الخلايا بدون تخصص خلوي ويطلق عليها الجينات غير المتخصصة House Keeping Genes

"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 هذه المجموعة من الجينات يتم تناسخها في مرحلة مبكرة من فترة S. فقد أجريت تجارب تبين فيها أن هذه الجينات تتناسخ في جميع أنواع الخلايا التي أختبرت 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 يجرى استنساخها متأخراً في أنواع الخلايا الأخرى. فعند دراسة نشاط جين أحد جلوبونات المناعة Immunoglobulins ويبلغ طوله حوالي 300,000 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 (APC) 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 الجلوبونات 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 دن.أ. بالسرعة العادية وهي 3000 نيوكليدية في الدقيقة الواحدة.

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

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



الشكل (٤-١٠): نموذج لتفسير لماذا يتم التناسخ للكروماتين النشط مبكراً فى دور S بينما الكروماتين العادى (غير النشط) يتم تناسخه متأخراً فى دور S، يعتقد أن أنواع مختلفة من البروتينات المحفزة ترتبط بمناشى التناسخ فى الكروماتين العادى، وكتفسير بديل قد يتم استخدام مجموعتى المناشى بواسطة نفس الميكانيكية الجزيئية ولكن فى أوقات مختلفة نظراً لأن التركيب المتكثف (المتحلزن) للكروماتين العادى يؤخر الارتباط الصحيح للبروتينات المشاركة فى التناسخ وكتفسير بديل قد يتم استخدام مجموعتى المناشى بواسطة نفس الميكانيكية الجزيئية ولكن فى أوقات مختلفة نظراً لأن التركيب المتكثف (المتحلزن) للكروماتين العادى يؤخر الارتباط الصحيح للبروتينات المشاركة فى التناسخ

لتفسير كيف يتم تناسخ المناطق الكروموسومية غير النشطة والتي تقع بعيداً عن المناطق النشطة (كما هو الحال فى الكروموسوم X غير النشط فى الأنثى) فإنه يفترض وجود مجموعة أخرى من مناشى التناسخ التى تنشط فى

منتصف أو في أواخر دور S بحيث يمكنها بدء شوكات تناسخ في أى صورة من صور الكروماتين.

تبين أن الجينات غير المتخصصة (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 مناشئ 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 التفلجى. من جهة أخرى توجد حالات تكون فترة S فيها طويلة جداً، حيث نجد أنه في المرحلة السابقة مباشرة للميتوزى 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 حوالى ٢٠ ساعة في الخلايا الجسدية الناضجة وتصل إلى حوالى ٢٠٠ ساعة في المرحلة التي تسبق الميتوزى في الخلايا المولدة للحيوانات المنوية Spermatogonia. ترجع الفروق في طول فترة S إلى تغيرات في أعداد مناشئ التناسخ النشطة. تحتوى الخلايا الجنينية على أعداد كبيرة من مناشئ التناسخ النشطة، في حين تقل أعداد هذه المناشئ كثيراً في كروموسومات مرحلة ما قبل الميتوزى.

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

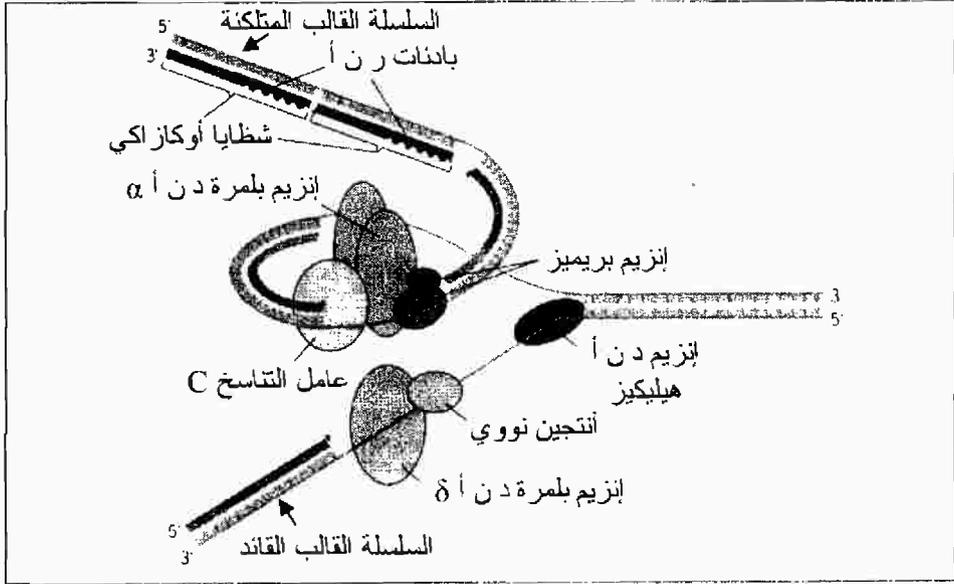
إنزيمات بلمرة د. ن. أ فى الخلايا المميزة النواة.

تبين وجود أربع صور على الأقل من إنزيم بلمرة د. ن. أ DNA Polymerases وهى ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) وذلك فى جميع نظم الخلايا مميزة النواة.

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

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

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



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

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

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