

الفصل التاسع

بناء البروتين Protein Synthesis

تقوم الأنواع الثلاثة من ر ن أ وهي: rRNA, tRNA, mRNA بالدور الرئيسي في عملية الترجمة Translation، أى بناء البروتين، حسب المعادلة المركزية Central Dogma :

Replication التناسخ



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

وقد دلت الدراسات على أنه لا توجد علاقة تجاذب نوعية specific affinity بين المجاميع الجانبية فى كثير من الأحماض الأمينية وبين القواعد النيروجينية الموجودة فى mRNA القالب، لذلك اتجهت البحوث إلى محاولة التعرف على نوعية معينة من ر ن أ تقوم بدور الوسيط أو المهيئ adaptor بين

ر ن أ المرسل mRNA وبين الأحماض الأمينية ليعمل كهزمة الوصل بينهما وقد تم التوصل إلى أن جزيئات ر.ن.أ. الناقل tRNA هي التي يمكنها أن تقوم بهذا الدور.

تحتوى الخلية على مجموعة من ر ن أ الناقل وهي عبارة عن جزيئات من الأحماض النووية الريبوزية صغيرة الحجم (بطول حوالى ٧٠-٩٠ نيوكليوتيدة). يسمح تركيب جزيئ tRNA بوجود موقعين نوعيين مستقلين ويمكن لأحدهما أن يتعرف على ويرتبط بالحامض الأميني بمساعدة أنزيم نوعى يسمى tRNA Synthetase؛ فى حين يقوم الموقع الآخر الموجود فى الطرف الآخر من الجزيئ والمحتوى على مضاد الكودون بالتعرف على ثلاثية الكودون الموجودة فى تتابع القواعد على جزيئ mRNA مما يسمح للأحماض الأمينية بأن تصطف طبقاً لهذا التتابع النيوكليوتيدى.

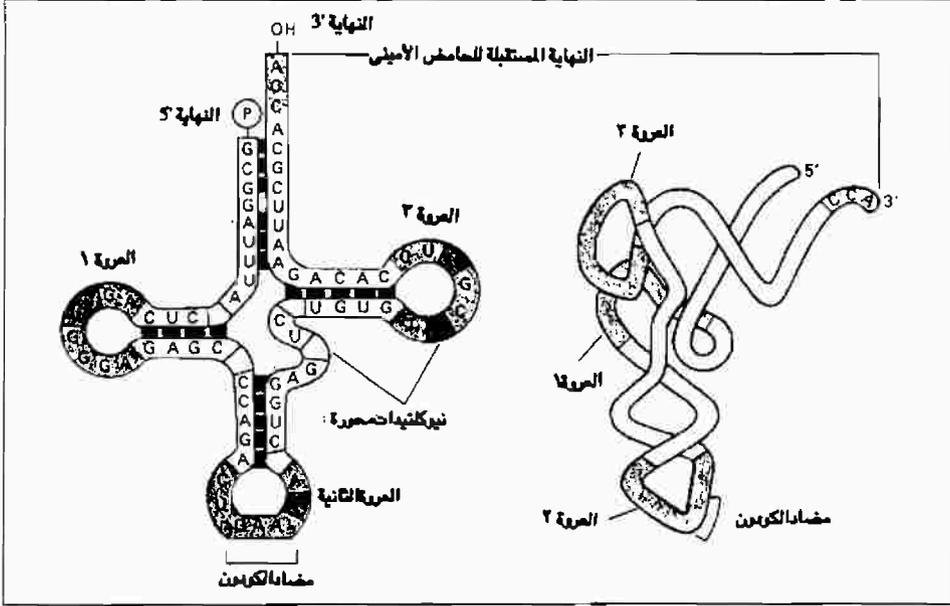
يسمح تركيب جزيئ tRNA بأن يرتبط بحامض أمينى واحد من الأحماض العشرين المعروفة. فمثلاً يطلق على tRNA المتخصص فى حمل أو نقل الجلايسين اسم $tRNA^{Gly}$ وهكذا.. ويوجد لكل حامض أمينى نوع واحد من tRNA التخصصى وقد توجد عدة أنواع من tRNA يستطيع كل منها التفاعل مع نفس الحامض الأمينى.

قبل أن يشارك الحامض الأمينى فى بناء سلسلة متعدد الببتيد، فإن نهايته الكربوكسيلية (COOH-) ترتبط تساهمياً مع النهاية 3' لجزيئ tRNA النوعى المحتوى على مضاد الكودون الصحيح الخاص بهذا الحامض (مضاد الكودون هو التتابع الثلاثى المكمل لتتابع الكودون الثلاثى النوعى لحامض أمينى معين على جزيئ mRNA). يودى التزاوج الصحيح بين الكودون ومضاد الكودون

بواسطة الروابط الهيدروجينية إلى اماكن وضع الحامض الأميني في مكانه في سلسلة البروتين النامية طبقا للأوامر الموجودة في تتابع النيوكليوتيدات في جزيء mRNA، مما يسمح بالاستخدام الصحيح للشفرة الوراثية في ترجمة تتابع النيوكليوتيدات إلى تتابع مقابل من الأحماض الأمينية في البروتين. يقوم tRNA بدور أساسي كوسيط في عملية الترجمة حيث ترتبط إحدى نهايتيه بحامض أميني نوعي في حين تتزاوج النهاية الأخرى مع الكودون الخاص بهذا الحامض على جزيء mRNA أي يمكن القول بأن tRNA يقوم بدور همزة الوصل بين تتابع النيوكليوتيدات وتتابع الأحماض الأمينية. من جهة أخرى تؤدي الرابطة التساهمية التي تحدث بين الحامض الأميني وبين جزيء tRNA إلى تنشيط الحامض الأميني عن طريق تكوين رابطة ذات طاقة عالية عند النهاية الكربوكسيلية لهذا الحامض بحيث يمكنها أن تتفاعل مع المجموعة الأمينية للحامض الأميني التالي في تتابع متعدد الببتيد، حيث تستخدم طاقة التنشيط هذه في تكوين رابطة ببتيدية. تعد عملية التنشيط هذه ضرورية لبناء البروتين لأن الأحماض الأمينية غير المنشطة لا يمكن إضافتها مباشرة إلى سلسلة متعدد الببتيد النامية.

تعتمد وظيفة جزيء tRNA على دقة تركيبه الثلاثي الأبعاد Three Dimension Structure. وقد أمكن دراسة التركيب الدقيق لعدة جزئيات مختلفة من tRNA وذلك بتقنيات متخصصة، وقد وجد أن جزيء tRNA يحتوي على مناطق تكون فيها سلسلة متعدد النيوكليوتيدات متزاوجة في حين توجد مناطق محتوية على قواعد متحورة Modified. كما تبين حدوث تفاعلات غير عادية بين القواعد لكي يتمكن الجزيء من الانثناء أو الانطباق. ظهر في التركيب الدقيق لجزيء tRNA احتواءه على عروات وسيقان متزاوجة القواعد بحيث يأخذ

تركيب الجزيء شكلا يشبه شكل ورقة البرسيم clover leaf shape ويعتقد أنه لابد أن يتم تحويل هذا الشكل بدرجة أكثر تعقيدا حتى تأخذ شكل حرف L لكي يكون الجزيء فعالا ويقوم بوظيفته كمهيئ، كما في الشكل (٩-١).

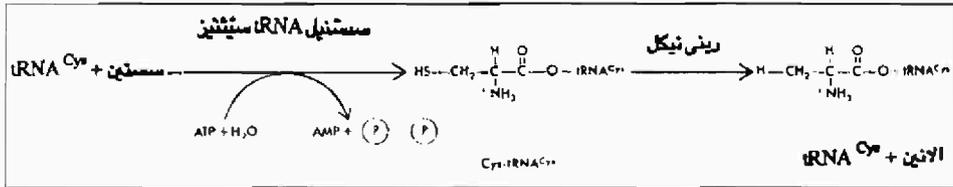


الشكل (٩-١): التركيب ثلاثي الأبعاد لجزيء tRNA ويبين المناطق ذات القواعد المتزاوجة تخطيطيا في الشكل الأيسر (شكل تركيب ورقة البرسيم) في حين يبين التركيب ثلاثي الأبعاد (شكل حرف L) إلى اليمين. تستقبل أحد النهايات الحامض الأميني، في حين تحتوي النهاية الأخرى على النيوكليوتيدات الثلاثة لمضاد الكودون. يرتبط الحامض الأميني في النهاية ذات التتابع CCA عند النهاية 3' للجزيء

وقد تبين وجود عدد من النيوكليوتيدات غير العادية في جزيء tRNA قد تصل نسبتها إلى حوالي ١٠% من إجمالي النيوكليوتيدات، والتي تنشأ عن عملية تحويل أو تعديل للنيوكليوتيدات العادية في عملية التجهيز التي تعقب عملية نسخ tRNA. وقد تبين أن وجود هذه النيوكليوتيدات غير العادية يساعد على أن يأخذ جزيء tRNA التركيب المطلوب لكي يقوم بوظيفته.

دور أنزيم Aminoacyl-tRNA Synthetase في عملية الترجمة:

وجد أن جزئ tRNA، وليس الحامض الأميني الذي يحمله، هو الذى يحدد مكان إضافة 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 إلى حامض الألانين بعملية يتم فيها نزع مجموعة SH بالرينى نيكل Raney Nickel كما فى الشكل (٩-٢) وبذلك ينتج جزئ Ala-tRNA 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 الأميني المحمل ليس له دور فى تحديد موقع إضافته فى سلسلة متعدد الببتيد، والثانى والأهم أن جزئ tRNA يقوم بدور المهيئ فقط بين الحامض الأميني وبين mRNA وأن التفاعل الحرج يكمن فى التطابق الصحيح بين جزئ tRNA النوعى والحامض الأميني المخصص له، وتتم هذه المطابقة بواسطة أنزيم Aminoacyl-tRNA Synthetase.



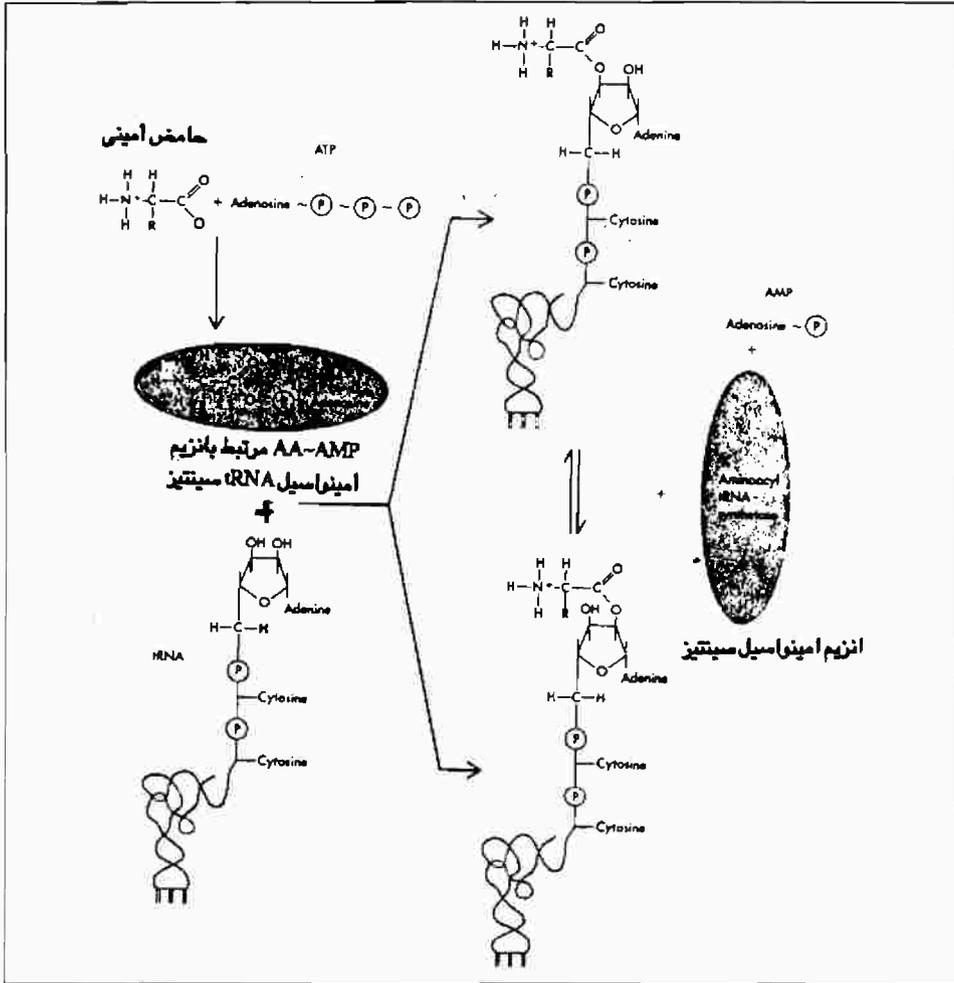
الشكل (٩-٢): تجربة لإثبات أن جزئ tRNA يقوم بدور المهيئ. أمكن تحويل السلسلة الجانبية للحامض الأميني السستين إلى الانين بعد تحميل الأول على tRNA^{cys}. تتم إضافة الانين فى مكان السستين فى جزئ الهيموجلوبين

تبين وجود أنزيم نوعى Aminoacyl tRNA Synthetase متخصص لكل حامض أميني (أى يوجد 20 أنزيم من هذا النوع) بحيث يكون أحدهما متخصصاً فى التزاوج بين الحامض الأميني (X) و tRNA (X)، وهكذا.

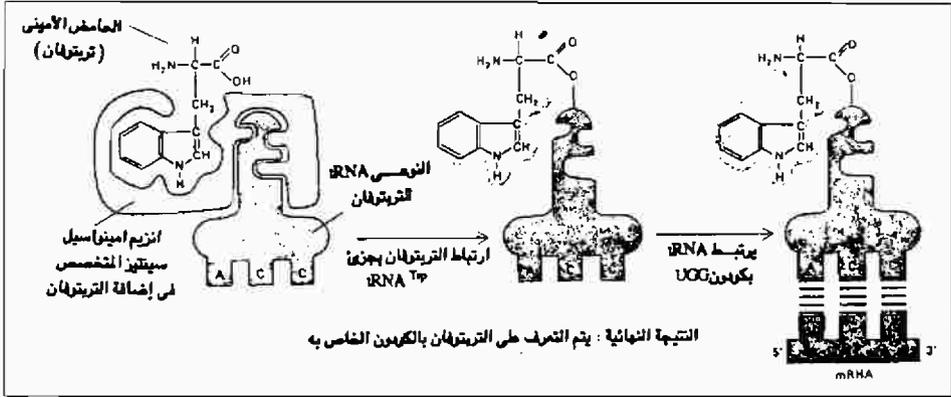
يتم تفاعل التزاوج على خطوتين ويؤدى إلى الحصول على جزئيات Aminoacyl-tRNA كما فى الشكل (٩-٣). ويتضح من هذا الشكل أن هذا الأنزيم نفسه هو الذى يساعد على تنشيط الحامض الأميني كما سبق الذكر. كما يبين الشكل (٩-٤) كيف تتم ترجمة الشفرة الوراثية من خلال نشاط هذا الأنزيم من جهة ومن خلال التزاوج الصحيح بين مضاد الكودون فى tRNA والكودون المقابل فى جزئ mRNA القالب، ويتضح من هذا الشكل أن هاتين العمليتين مستقلتان تماماً عن بعضهما.

ولكن كيف يتسنى لهذا الأنزيم المطابقة Matching بين الحامض الأميني الصحيح وبين جزئ tRNA النوعى الخاص به، وخاصة فى حالة الأحماض الأمينية المتشابهة التركيب. أمكن معرفة كيف يتم هذا التمييز بمتابعة ما تم التوصل إليه بالنسبة لأنزيم Isoleucyl-tRNA حيث أمكن لهذا الأنزيم أن يميز بين الأيزوليوسين والغالين، وهما حامضان أمينيان متشابهان تماماً فيما عدا وجود مجموعة ميثيل إضافية فى حالة الأيزوليوسين وبالتالي فإن الفرق يكمن فى طاقة الارتباط Binding Energy بأنزيم Isoleucyl-tRNA Synthetase والتي لا تزيد عن ٣ كيلو سعر (3 K cal) وهى مقدار ضئيل من الطاقة يبدو للوهلة الأولى أنه غير كاف لمنع الخطأ فى الاختيار بين هذين الحامضين. فعلى سبيل المثال عندما يوضع Isoleucyl-tRNA Synthetase مع مخلوط متكافئ الكمية من حامض الأيزوليوسين والغالين فإنه قد يحدث التنشيط الخاطئ لجزئ

واحد من الفالين (Val-AMP) في نفس الوقت الذي يتم فيه التنشيط الصحيح لـ ١٠٠ جزئ من الأيزوليوسين (Iso - AMP) في هذا المخلوط نفسه.



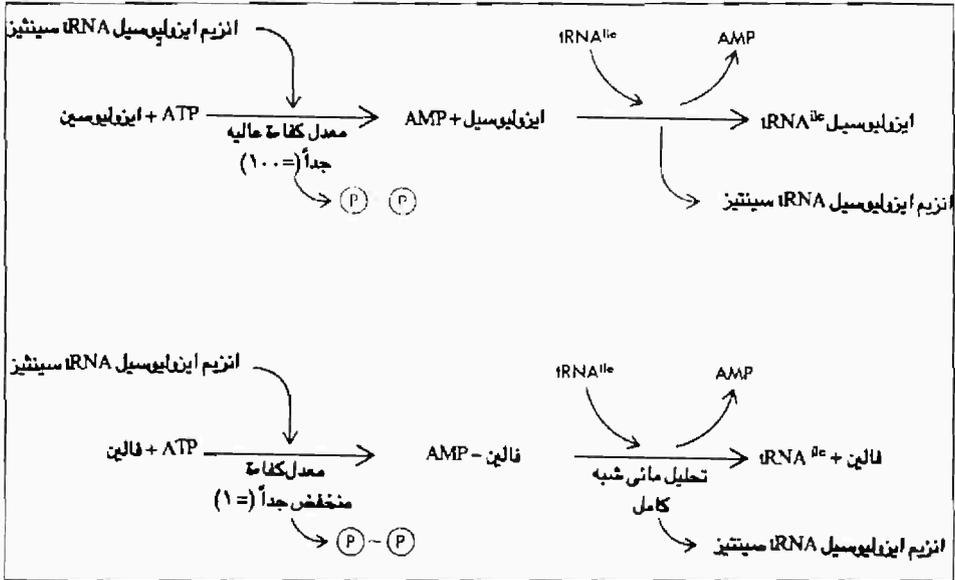
الشكل (٩-٣): تنشيط الحامض الأميني بـ ATP ونقله إلى النهاية CCA لجزئ tRNA النوعي. لاحظ أنه بمجرد أن يرتبط الحامض الأميني بالجزئ فإنه يمكنه الانتقال بسرعة بين النهاية 3', 2' OH للأدينوسين النهائي في جزئ tRNA



الشكل (٩-٤): دور كل من جزئ tRNA وأنزيم امينواسيل tRNA سينتيز في ترجمة الشفرة الوراثية حيث يتم ربط الحمض الأميني بجزئ tRNA النوعى عند النهاية CCA برابطة تساهمية بفعل الأنزيم في حين تتم قراءة ثلاثيات الكودون في mRNA بمضاد الكودون في عروة مضاد الكودون في tRNA حسب قانون تزاوج القواعد

وعند نقل هذه الجزيئات المنشطة من الفالين (Val~AMP) في خطوة تالية إلى جزيئات tRNA-Iso1 فإنه يحدث نسبة عالية من الخطأ غير المسموح به. إلا أن هذا النقل يتم عادة بتكرار منخفض جدا حيث وجد أنه عندما يرتبط tRNA-Iso1 بالمعقد:

Val~ AMP - Iso1~ tRNA Synthetase فإن جميع جزيئات Val ~ AMP تقريبا تتفكك بالتحليل المائي بسرعة إلى مكوناتها من الفالين و AMP (الشكل ٩-٥).



الشكل (٩-٥): التمييز بين الحامضين المتشابهين ايزوليوسين والفالين عند تكون ايزوليوسيل tRNA ile

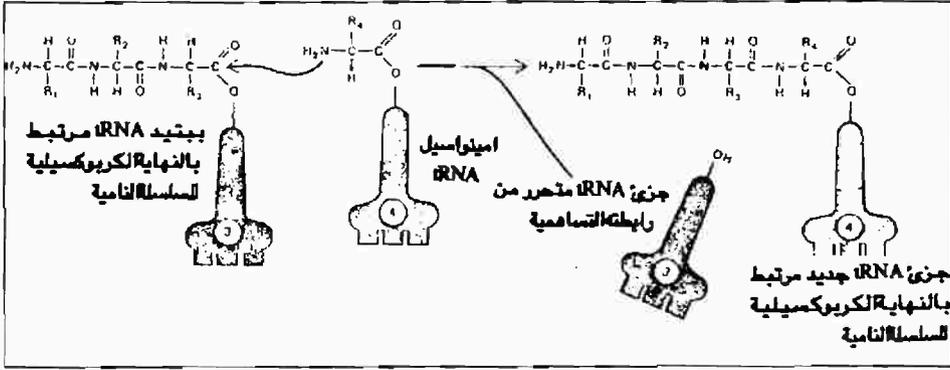
ويتطلب هذا النوع من المراجعة Proofreading الارتباط المستمر بين الحامض الأميني وبين الموقع النشط لأنزيم aa-tRNA Synthetase وذلك من خلال خطوتى التفاعل الأنزيمي الذى يقوم بها هذا الأنزيم، وبذلك يمكن أن يحدث التمييز أو التفريق بين الأيزوليوسين والفالين مرتين وبالتالي تنخفض نسبة الخطأ إلى $10^{-2} = 10^{-1} \times 10^{-1}$.

ويبدو الآن أن عملية المراجعة تحدث فقط فى تلك الأنزيمات التى لا يمكن الحصول فيها على درجة كافية من الدقة فى المطابقة فى خطوة واحدة للاختيار. فمثلا تبين حديثا من دراسة التركيب الدقيق لأنزيم Tyrosyl-tRNA Synthetase أن هذا الأنزيم باستطاعته التمييز بين حامضين أميين متشابهين جدا وهما الفينيل الاتين والتيروسين عن طريق تكوين روابط هيدروجينية نوعية

مع مجموعة OH للتيروسين وهناك مجموعات أخرى من الأحماض الأمينية يتم فيها عملية التمييز بدون الحاجة إلى مراجعة مثل الاسبارجين وحامض الاسبارتيك؛ السيستوسين والهستيدين؛ الليسين والتربتوفان.

دور الريبوسومات في تكوين الروابط الببتيدية:

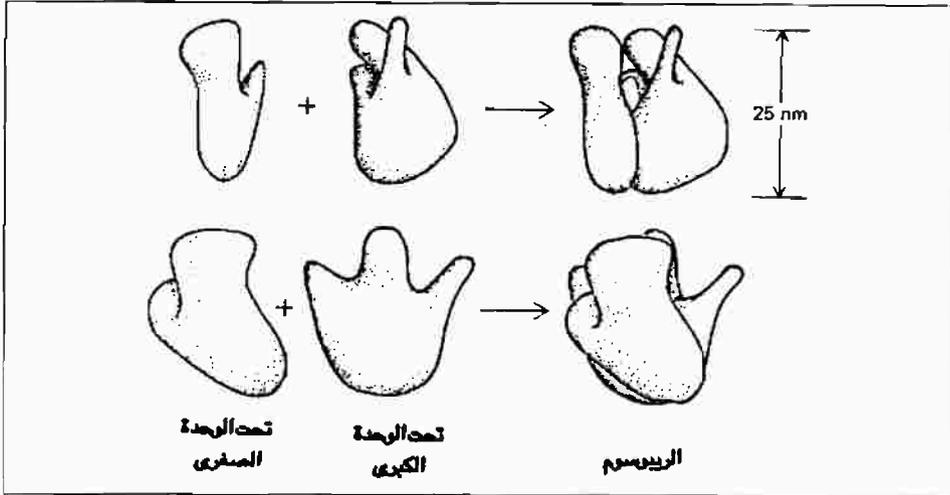
يعد تكوين الرابطة الببتيدية بمثابة التفاعل الرئيسي في عملية بناء البروتين حيث ترتبط مجموعة الكربوكسيل (COOH-) في النهاية النامية لسلسلة متعدد الببتيد بمجموعة الأمين (NH₂-) الحرة للحامض الأميني المضاف، وبالتالي فإن البروتين يتم بناؤه خطوة خطوة من النهاية الطرفية الأمينية إلى النهاية الطرفية الكربوكسيلية. ويلاحظ أنه على مدى مرحلة بناء البروتين بأكملها تظل النهاية الكربوكسيلية لسلسلة متعدد الببتيد النامية منشطة Activated عن طريق الرابطة التساهمية بينها وبين جزئ tRNA الببتيدى Peptidyl~ tRNA ويتم كسر هذه الرابطة التساهمية الغنية بالطاقة عند إضافة كل حامض أميني. إلا أنها تعوض مباشرة عن طريق تكوين رابطة تساهمية جديدة مشابهة تتم عند إضافة أحدث حامض أميني كما في الشكل (٩-٦) وبهذه الطريقة يحمل كل حامض أميني عند إضافته طاقة التنشيط المطلوبة لإضافة الحامض الأميني التالي له وليست تلك الخاصة بإضافته هو نفسه.



الشكل (٩-٦): نمو سلسلة متعدد الببتيد خطوة خطوة بإضافة حامض أميني في كل خطوة إلى النهاية الكاربوكسيلية الغنية في الطاقة الموجودة في الرابطة التساهمية المتكونة من ارتباطها مع جزء tRNA

وقد تبين أن عملية تكوين الرابطة الببتيدية تتم على الريبوسومات، وهي تلك الحبيبات الكروية التي تعد بمثابة السطح Work Bench الذي يتم عليه عملية بناء البروتين، لأنه لا يمكن بناء البروتين حراً في السيتوسول، نظراً للحاجة إلى تنظيم عملية ترجمة كل كودون في mRNA في تتابع مضبوط وفي تنسيق تام مع مضاد الكودون الموجود في tRNA دون أي خلل قد يؤدي إلى تغيير في إطار القراءة وتقوم الريبوسومات بهذا الدور بالتنسيق الهام.

وتتكون الريبوسومات من معقدات كبيرة الحجم نسبياً من رن أ والبروتينات. ويتشابه تنظيم ووظيفة الريبوسومات في غير مميزة النواة وفي مميزة النواة بصفة عامة في احتواء كل منهما على تحت وحدة كبيرة Subunit وأخرى صغيرة ترتبطان معا لتكوين معقد ذو وزن جزيئي مرتفع جداً كما في الشكل (٩-٧).



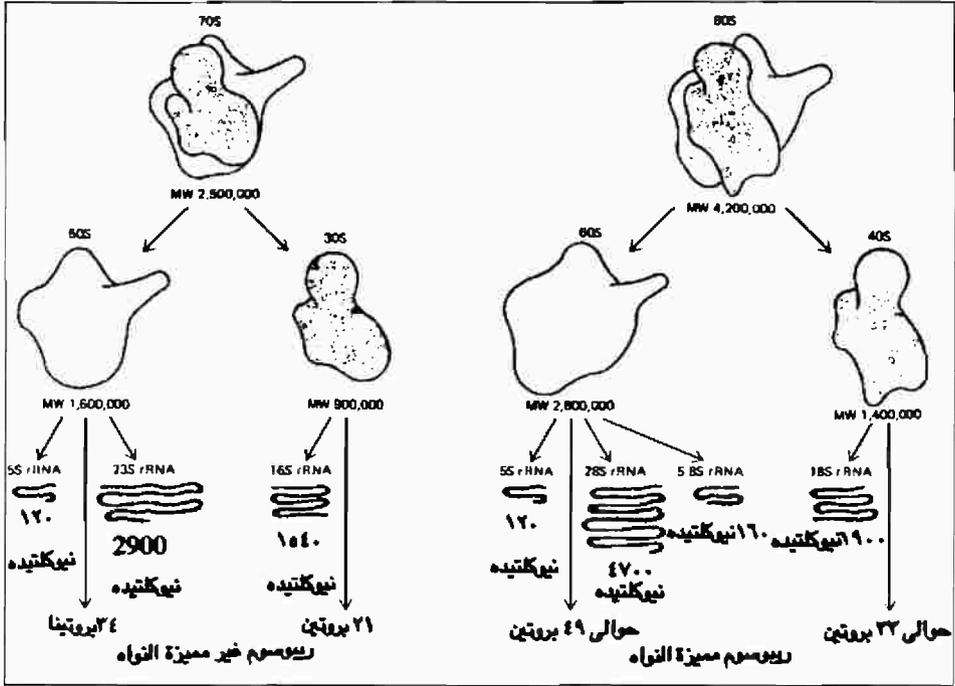
الشكل (٩-٧): نموذج ثلاثي الأبعاد للريبوسوم البكتيري كما يرى من زاويتين مختلفتين

تبين أن تحت الوحدة الصغيرة في الريبوسوم تقوم بالربط بين mRNA و tRNA، في حين تقوم تحت الوحدة الكبيرة بالمساعدة في تكوين الرابطة البيبتيدية بين الأحماض الأمينية في سلسلة متعدد الببتيد.

وجد أن حوالي أكثر من نصف وزن الريبوسومات عبارة عن rRNA وتوجد أدلة متزايدة على أن جزيئات rRNA تلعب دوراً رئيسياً في النشاط الحفزي (الأنزيمي).

يحتوي الريبوسوم على عدد كبير من البروتينات إلا أن معظمها لم تعرف له وظيفة محددة بعد مما يرجح أن بروتينات الريبوسوم تقوم أساساً بتنشيط أو تحفيز وظيفة rRNA وأن جزيئات rRNA وليست البروتينات الريبوسومية هي التي تساعد في كثير من التفاعلات الأنزيمية التي تتم على الريبوسوم. تجدر الإشارة هنا إلى أنه لم تتوفر حتى الآن معلومات تدل على إمكان احتواء rRNA

على أى معلومات وراثية أو على قيامه بدور القالب فى عملية الترجمة. ويخلص الشكل (٨-٩) المقارنة بين تركيب الريبوسومات فى غير مميزة النواة وفى مميزة النواة.



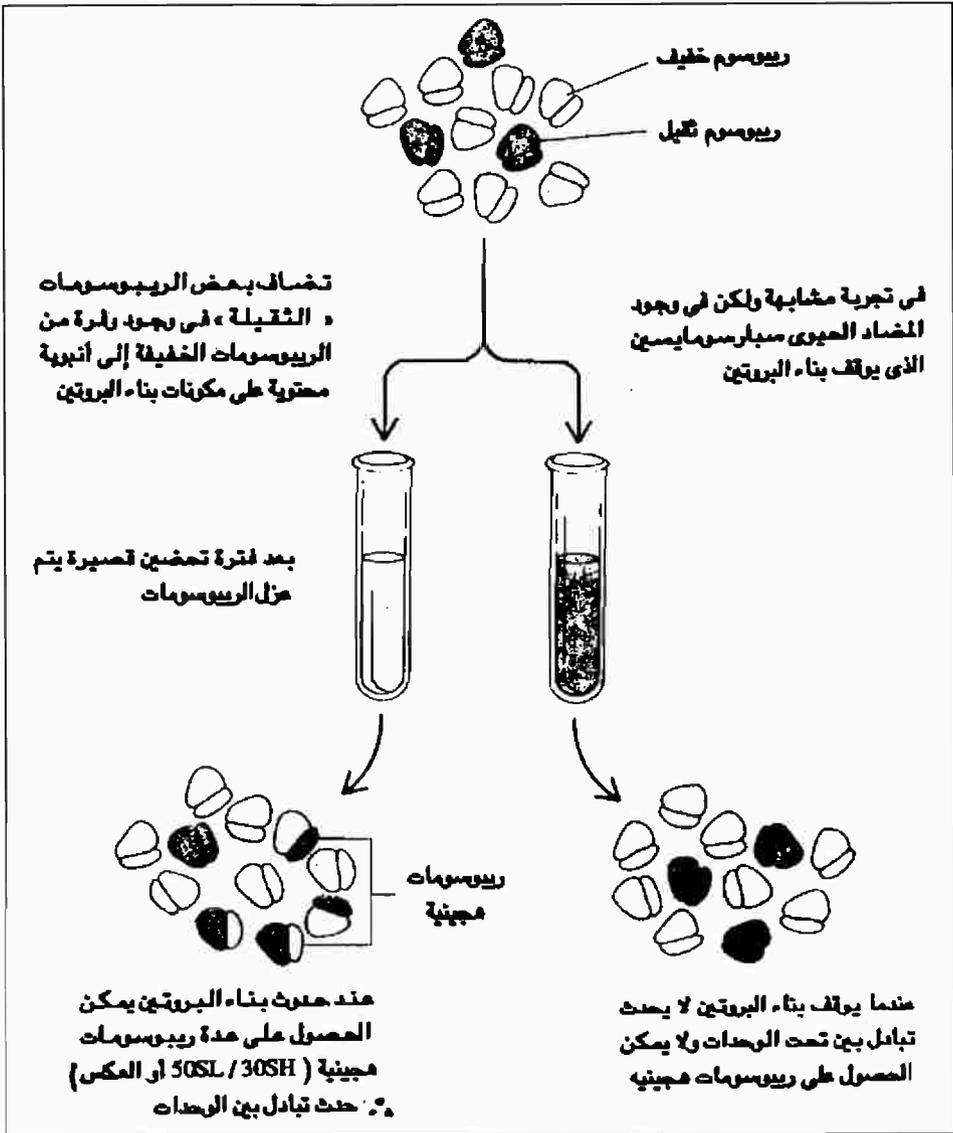
الشكل (٨-٩): مقارنة بين تركيب ريبوسومات غير مميزة النواة ومميزة النواة

تبين أن تحت الوحدتين المكونتين للريبوسوم لا تكونان مرتبطتين بصفة دائمة ولكن يتم ارتباطهما فقط عندما يبدأ اشتراك الريبوسوم فى عملية بناء البروتين، ثم انفصالان 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 إلى تحت وحداتها وإعادة اتحادها بصفة دورية. إذ أنه

عند تنمية الخلايا في نظائر مشعة (ثقيلة) ثم نقلها إلى بيئة غير مشعة (خفيفة) بدأت تظهر ريبوسومات هجينية :

(L 50 S /H30S أو H 50 S/L 30 S) ويدل معدل ظهورها على أن تحت الوحدات يتم تبادلها بمعدل مرة في كل دورة بناء للبروتين. وقد تم التأكد من ذلك بتجربة معملية لبناء البروتين *In Vitro* حيث يمكن متابعة مصدر الريبوسومات الثقيلة (المشعة) في وجود كمية فائضة من الريبوسومات الخفيفة (غير المشعة). ففي خلال حوالى دقيقة (وهى الفترة التى يستغرقها بناء سلسلة كاملة من البروتين فى البكتريا) وجد أن معظم الريبوسومات الثقيلة قد اختفت فى نفس الوقت الذى ظهرت فيه ريبوسومات هجينية (H 50S/L 30S أو L 50S/H 30S) كما فى الشكل (٩-٩).

ومما يؤكد أن هذا التبادل بين تحت الوحدات يعتمد كلية على عملية بناء البروتين، تبين أنه عند إضافة المضاد الحيوى Sparsomycin الذى يوقف استطالة سلسلة متعدد الببتيد، فإنه فى نفس الوقت يمنع التبادل بين تحت وحدات الريبوسوم كما هو موضح بالشكل (٩-٩).

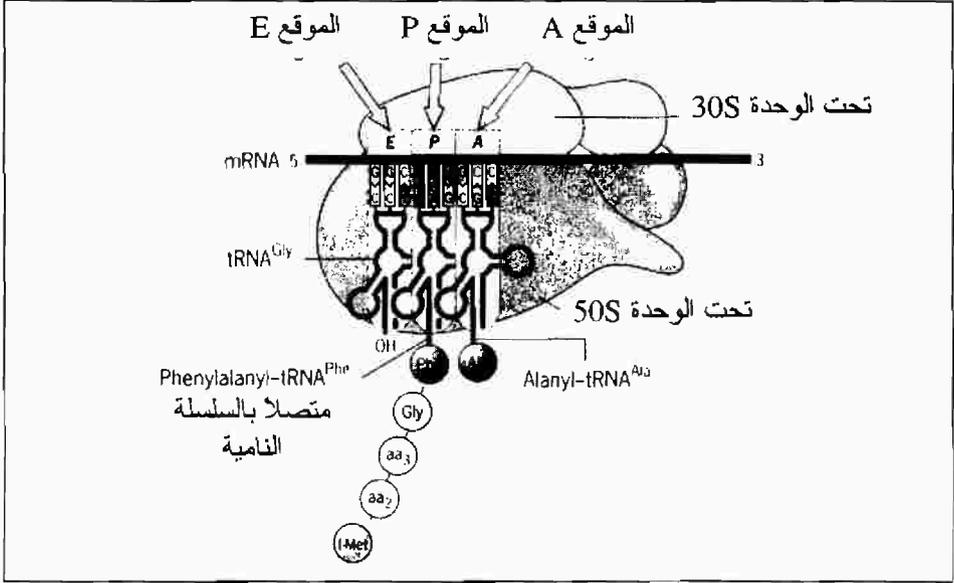


الشكل (٩-٩): الاعتماد الإجباري لتبادل تحت وحدات الريبوسوم على عملية بناء البروتين

تحرك الريبوسومات خطوة خطوة على سلسلة mRNA القالب:

يحتوى الريبوسوم على أربعة مواقع للارتباط بجزئيات ر ن أ وهى :
 موقعا خاصا للارتباط بسلسلة mRNA ويوجد فى تحت الوحدة الصغيرة 30S
 وثلاث مواقع لارتباط tRNA ويشترك فى تكوينها تحت الوحدات 30S، 50S
 معا. وهذه المواقع الثلاثة الأخيرة تسمى أحدهما موقع ارتباط tRNA الببتيدى
 Peptidyl - tRNA Binding Site أو الموقع "P" "P-site" وهو الذى يتصل به
 جزئ tRNA المرتبط بالنهاية النامية لسلسلة متعدد الببتيد. أما الموقع الثانى
 فيسمى موقع ارتباط امينواسيل tRNA. Aminoacyl- tRNA Binding Site أو
 "A site" ويرتبط به جزئ tRNA التالى والمحمل بالحامض الأمينى المراد
 إضافته إلى السلسلة النامية لمتعدد الببتيد. أما الموقع الثالث فيسمى موقع الخروج
 "E Site" "Exit Site" فيصل إليه tRNA بعد تفرغ شحنته من الحامض الأمينى
 الخاص به تمهيدا لإنفكاك هذا الجزئ من tRNA وتركه للريبوسوم ليشارك فى
 دورة جديدة من الارتباط مع جزئ جديد من نفس الحامض الأمينى المتخصص
 فيه (الشكل ٩-١٠).

ولكى يكون ارتباط جزئ tRNA بأى من الموقعين قويا، لا بد أن يكون
 التزاوج صحيحا بين مضاد الكودون فى هذا الجزئ النوعى من tRNA وبين
 الكودون الثلاثى المقابل فى سلسلة mRNA المرتبط بالريبوسوم. كما أن
 الموقعين P,A يحتلان مكانين متجاورين بشدة على الريبوسوم لدرجة أن جزئى
 tRNA المحتلان لهما لا توجد أمامها فرصة إلا تكوين تزاوج مع الكودونين
 المتجاورين مباشرة فى جزئ mRNA كما فى الشكل (٩-١٠).



الشكل (٩-١٠): يحتوى كل معقد من ريبوسوم - م رن أ على ثلاثة مواقع لإرتباط aa-tRNA ويتم شغل الموقع A بمعقد Alanyl tRNA فى حين يتم شغل الموقع P بمعقد Phenylalanyl-tRNA^{Phe} وترتبط سلسلة متعدد الببتيد النامية تساهميا بمعقد Phenylalanyl-tRNA ويتم شغل الموقع E بجزئ tRNA gly قبل تحريره من الريبوسوم

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 نيوكليوتيدات فى كل خطوة إلا أن المفهوم الأول هو المرجح حتى الآن.

مراحل عملية بناء البروتين :

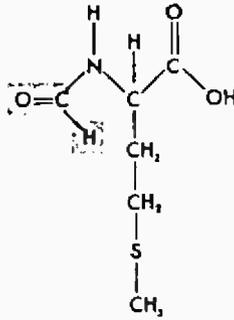
يمكن، لتسهيل المتابعة فقط، تقسيم عملية بناء البروتين إلى ثلاث مراحل رئيسية وهى:

- ١- مرحلة البدء Initiation
- ٢- مرحلة الاستطالة Elongation
- ٣- رحلة الإنهاء أو الإيقاف Termination

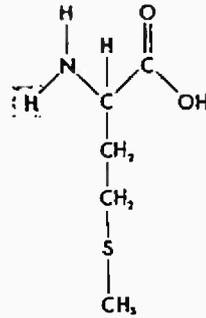
أولاً: مرحلة البدء Initiation:

تبين أن عملية القراءة الصحيحة للشفرات على سلسلة mRNA القالب تتوقف على الموقع الابتدائي الذي يتم فيه ارتباط الريبوسوم بتتابعات القواعد في mRNA. إذ أنه في مرحلة البدء لبناء البروتين، يتم تجميع تحت وحدتي الريبوسوم وارتباطهما في الموقع المضبوط على mRNA حيث تبدأ القراءة الصحيحة للشفرة، وبالتالي حيث يبدأ بناء سلسلة متعدد الببتيد.

وقد تبين أنه بالنسبة لمعظم البكتيريا يكون الحامض الأميني الأول في السلسلة هو Methionine N-Formyl (وهو عبارة عن حامض الميثونين بعد تعديله بإضافة مجموعة فورمات إلى مجموعة الأمين الطرفية) (الشكل ٩-١١).



ن - فورمايل ميثونين



ميثونين

الشكل (٩-١١): المقارنة بين ن. فورمايل الميثونين والميثونين

وبذلك يتم شغل مجموعة الامين الطرفية مما يؤدي إلى منع إمكان إضافة هذا الحامض المتحور في الأماكن الداخلية بالسلسلة أثناء مرحلة الاستطالة نظرا لأن مجموعة الأمين تكون غير حرة نتيجة لارتباطها بالفورمات. تتم إضافة مجموعة الفورمات أنزيميا إلى الميثونين بعد أن يرتبط هذا الأخير بجزئ tRNA الخاص به. فقد تبين أن هناك نوعين من $tRNA^{Met}$. أحدهما متخصص في حمل ميثونين البدء ويسمى $tRNA_i^{Met}$. وهذا الجزئ يسمح بتفاعل الفورمات

فى حين يوجد نوع آخر من $tRNA_m^{Met}$ يقوم بحمل الميثيونين الداخلى أثناء مرحلة الاستطالة ولا يحدث عليه تفاعل القورمات ويسمى $tRNA_m^{Met}$ (للميثيونين الداخلى). بينت تحليلات تتابع القواعد فى كلا النوعين من tRNA أن كلا منهما يحتوى على نفس مضاد الكودون (CAU) مما أدى إلى التساؤل عن كيف يتسنى لنفس الكودون (AUG) أن يشفر لكلا من حامض البدء N-Formyl Methionine وكذلك للميثيونين الداخلى فى السلسلة؟ وقد تبين وجود ثلاثة فروق فى التركيب الدقيق لتتابع القواعد بين جزئى tRNA كما فى الشكل (٩-١٢).

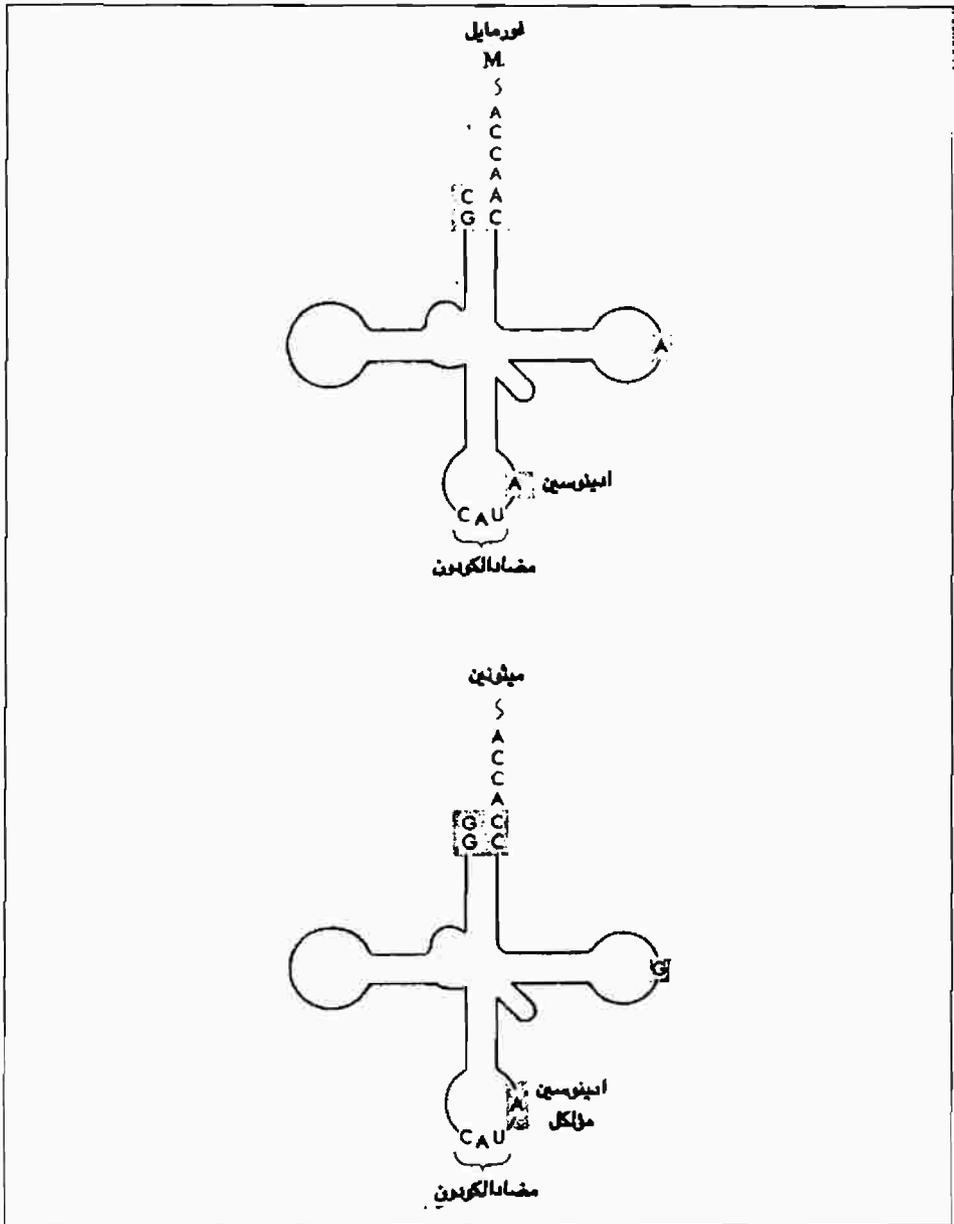
ومن جهة أخرى تبين أن بناء البروتين فى البكتريا يبدأ بتكوين معقد من تحت الوحدة الصغيرة 30S للريبوسوم مع $tRNA_f^{Met}$ - Met و mRNA عند الكودون AUG ثم لاثبت تحت الوحدة الكبيرة 50S أن تتحد لتكوين الريبوسوم 70S الفعال. ويحتوى كل جزئ من mRNA على موقع ارتباط نوعى بالريبوسوم خاص بكل من البروتينات التى تم بناؤها 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 نيوكليدية 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 للميثيونين الداخلى؟ أمكن الاجابة على هذا السؤال عندما تم التعرف على أول تتابع بدء عن طريق ربط الريبوسوم مع mRNA

نوعى ثم تلى ذلك المعاملة بانزيم ريبونيوكلبيز لتحليل جميع mRNA ماعدا المنطقة المرتبطة بالريبوسوم حيث تكون محمية من التحليل الانزيمى.

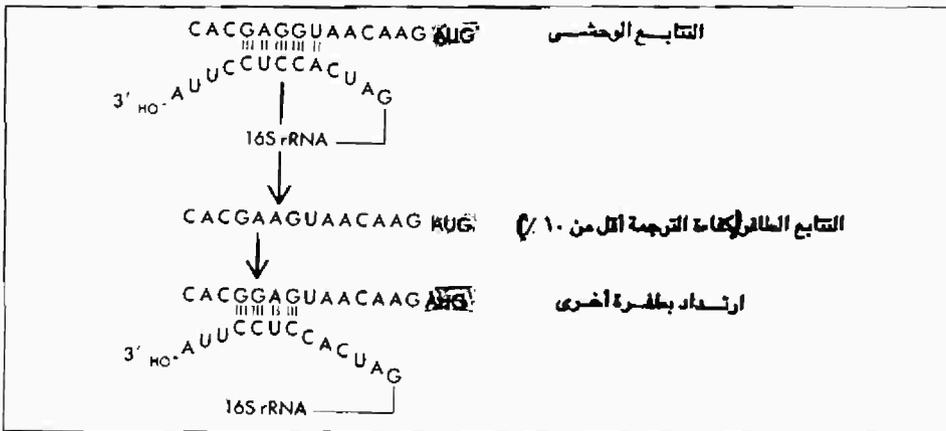
وعند تحليل التتابعات المكونة من ٣٠ نيوكلييدة فى هذه المنطقة المحمية وجد أنها تحتوى على AUG's بالقرب من الوسط متبوعة بنيوكلييدات تشفر للثلاث أو الأربع أحماض الأمينية الأولى فى سلسلة متعدد الببتيد. وقد وجد أن هذه النيوكلييدات يتم التعرف عليها نوعياً بواسطة تحت الوحدة الريبوسومية الصغيرة 30S وأن هذا التتابع يختلف من جين الى آخر. ولكن وجد أن هناك مجموعة مكونة من ٣ إلى ٩ نيوكلييدات بيورينية تقع فى الجهة 5' من المنطقة المحمية فى mRNA ويعتبر هذا التتابع القصير من القواعد هاما جداً لربطه بالريبوسوم. وجد أن معظم مواقع ارتباط الريبوسوم تحتوى على تتابعات مثل: AGGA أو GAGG تقع على بعد حوالى ٨ إلى ١٣ نيوكلييدة قبل كودون البدء.

وتتزاوج هذه التتابعات مع تتابعات مكملة لها موجودة فى منطقة غنية بالبيريميديئات فى النهاية 3' لسلسلة
 16S rRNA : (5' GAUCACCUCCUUA-OH 3').



الشكل (٩-١٢): مواقع الاختلافات بين ن - فورمايل ميثونين $tRNA^{Met}$ وميثونيل $tRNA^{Met}$

يؤدي هذا التزاوج إلى وضع كودون البدء AUG في موقع يسمح له بالارتباط بمضاد الكودون الخاص بجزئ $F \text{ Met tRNA}^{\text{Met}}$ الخاص بالبدء والمرتبط بتحت الوحدة 30S. وبذلك تكون القدرة على تكوين تفاعلين منفصلين لتزاوج القواعد في نفس الوقت: mRNA/tRNA (مضاد الكودون/ الكودون) وبين mRNA/16S rRNA أى بين (mRNA/30SrRNA) هى التى تسمح بالتمييز بين منطقة البدء الحقيقية وبين المواقع الأخرى الداخلية التى قد تحسوى على الكودون AUG الذى يشفر للمثيونين الداخلى. وكما هو متوقع فإن الطفرات التى تؤدى إلى تغيير فى المنطقة الغنية فى البيورين فى موقع ارتباط الريبوسوم تؤدى إلى خفض كفاءة ترجمة mRNA ويمكن استعادة كفاءة الترجمة باستخدام طفرة اخرى تستعيد التكامل فى تزاوج القواعد للنهاية 3' فى 16S rRNA حتى ولو كان التتابع مختلف عن ذلك الذى فى mRNA الأصلي كما فى الشكل (٩-١٣).



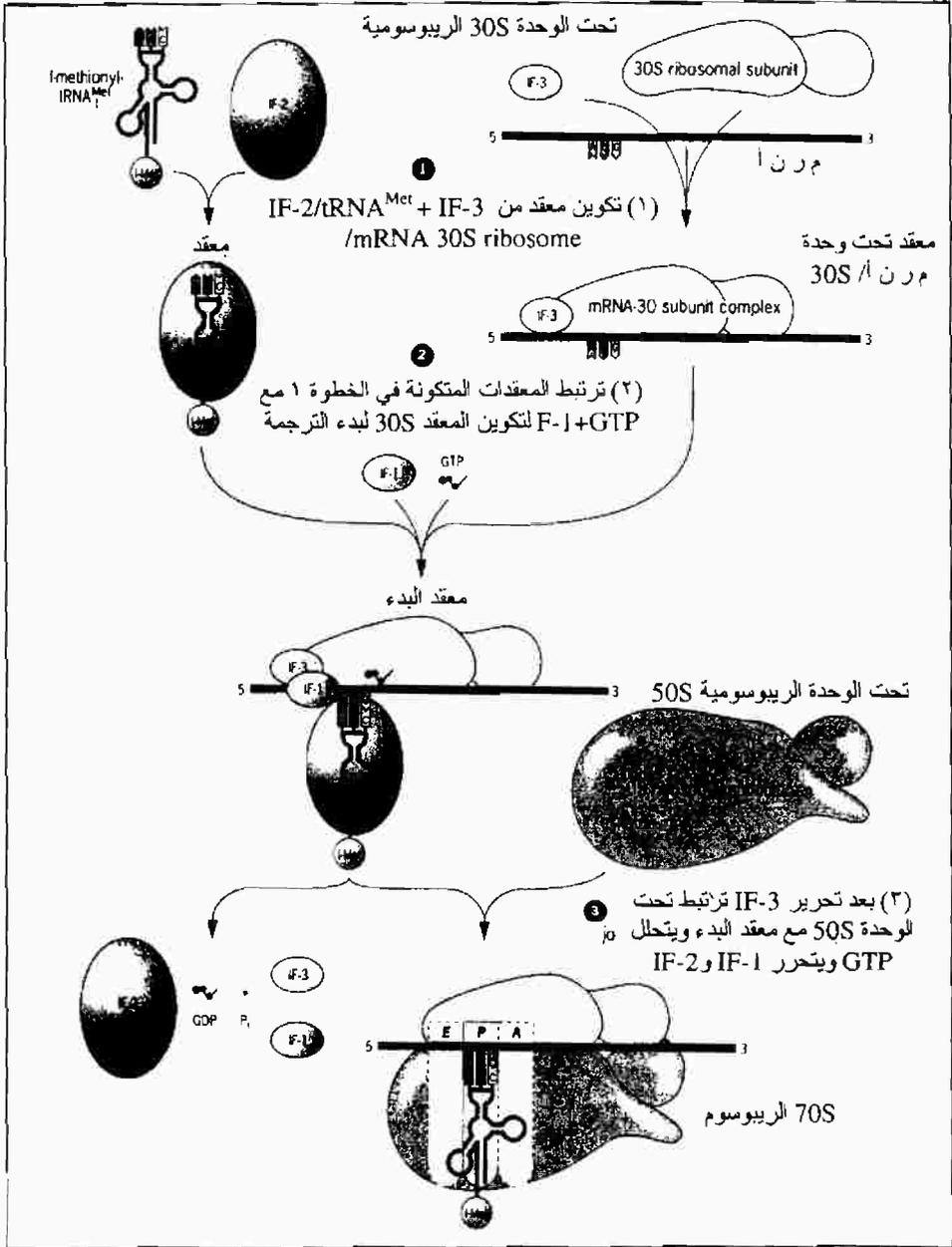
الشكل (٩-١٣): تتابع منطقة البدء عند بداية سلسلة mRNA للجين ٠,٣ فى الفاج T7 ويؤدى تفاعلها مع النهاية 16S rRNA إلى وضع الريبوسوم فى مكان البداية الصحيح على شريط mRNA لبدء الترجمة. وتؤدى طفرة استبدال متماثل من نوع G إلى A الى وقف هذا التفاعل. ويمكن استعادة هذه الوظيفة لو حدث طفرة استبدال متماثلة اخرى (A إلى G) فى موقع قريب. يبدو كودون البدء AUG مظللاً فى هذا الشكل

عندما تبدأ استطالة سلسلة متعدد الببتيد لا بد أن يحدث انفكك للتزاوج الحادث بين القواعد بين mRNA, 16S rRNA، وذلك لكي يصبح mRNA حر الحركة على سطح الريبوسوم. تؤدي هذه الحركة إلى أن يصبح الريبوسوم على اتصال بمناطق mRNA التي لم يكن من الممكن أن يرتبط بها في السابق لولا أن عملية البناء قد استهلكت في المنطقة السابقة. ولضمان استمرار حركة الريبوسوم فإنه لا بد 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 في عملية الترجمة.

عوامل البدء (IF) *Initiation Factors*

تبين أنه إلى جانب ضرورة وجود mRNA, N-formyl-Met tRNA^{Met} وتحت الوحدات الريبوسومية 30S و 50S، فإنه لا بد لكي تبدأ عملية بناء البروتين أن تتوفر ثلاث بروتينات نوعية مختلفة تكون مرتبطة قليلاً بالريبوسوم وتسمى عوامل البدء وهي: IF1, IF2, IF3 كما في الشكل (٩-١٤).

في 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 50S, 30S ولذلك فقد عرف في البداية بعامل تفكك الريبوسوم.



الشكل (٩-١٤): مرحلة بدء الترجمة في بكتريا القولون

ويعتقد الآن أن العامل IF3 يؤدي إلى تغيير دقيق في شكل تحت الوحدة 30S مما يمنع اتحادها بتحت الوحدة 50S ويساعد في نفس الوقت على الارتباط بين تحت الوحدة 30S وبين mRNA. يساعد العامل IF1 على ارتباط كلا من IF2 و IF3. وبين الجدول (٩-١) الوزن الجزيئي لعوامل البدء IF وكذلك عوامل الاستطالة (EF) وعوامل الانتهاء أو الانفكاك (RF) كما سيأتي بعد. في الخطوة التالية يتم ارتباط $F \text{ Met tRNA}_{F}^{\text{Met}}$, mRNA بمعقد IF-30S-GTP. وفي هذا التفاعل يحدث ارتباط وثيق بين $\text{Met tRNA}_{F}^{\text{Met}}$ مع المعقد IF2-GTP، وبمجرد تكوين معقد البدء 30S Initiation Complex ينفصل العامل IF3 ويلى ذلك ارتباط تحت الوحدة 50S بمعقد البدء مما يؤدي إلى التحليل المائي لجزئ GTP وانفصال عاملى البدء الآخرين. ويطلق على المعقد النهائى معقد البدء 70S Initiation Complex.

اتجاه الترجمة 3' → 5'

بعد أن يتم الارتباط الصحيح بين منطقة البدء لجزئ mRNA ومعقد البدء والريبوسوم يتحرك الريبوسوم في اتجاه ثابت اثناء بناء البروتين حيث أنه ليست لدية حرية الحركة إلا في الاتجاه الى اليمين أو الى اليسار، مما يؤكد حقيقة أن جزئ mRNA له اتجاه ثابت ومحدد في القراءة بحيث تقرأ النهاية 5' أولاً وتستمر القراءة متجهة إلى نهاية 3' ومما يدل على ذلك أنه وجد في البكتريا أن الريبوسوم يمكنه أن يرتبط بسلسلة غير تامة البناء من mRNA أثناء نسخها على قالب د.ن.أ. وعلى العكس من ذلك إذا كان بناء البروتين يتم في الاتجاه 5'→3' فإن ذلك يعنى أنه لا تبدأ ترجمة جزئ mRNA فى البكتريا الا بعد الانتهاء تماما من نسخه على قالب د.ن.أ. وانزلاقة أولاً من على هذا القالب وهذا

ما لا يحدث في البكتريا مما يؤكد أن الترجمة تتم في الاتجاه 3' - 5' وهو نفس اتجاه النسخ.

الجدول (٩-١) خواص بعض العوامل المشاركة في بناء البروتين في بكتريا القولون

العوامل	الوزن الجزيئي بالتقريب	القدرة على الارتباط مع (GDP) GTP	الوفرة النسبية لعدد الريبوسومات
عوامل البدء			
IF 1	٩٠٠٠	-	$\frac{1}{7}$
IF 2	١٢٠٠٠	+	$\frac{1}{7}$
IF 3	٢٢٠٠٠	-	$\frac{1}{7}$
عوامل الاستطالة:			
EF-TU	٤٥٠٠٠	+	١٠
EF-TS	٣٠٠٠٠	+	١
EF-G	٨٠٠٠٠	+	١
عوامل الانتهاء:			
RF 1	٣٦٠٠٠	-	$\frac{1}{20}$
RF 2	٣٨٠٠٠	-	١
RF 3	٤٦٠٠٠	+	$\frac{1}{20}$

ثانياً: مرحلة الاستطالة Elongation:

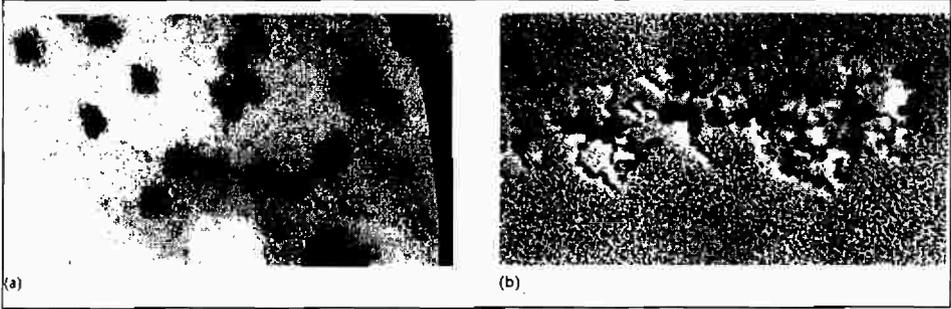
يرتبط $fMet$ $tRNA^{Met}$ مباشرة من البداية بالموقع P دون أن يمر على الموقع A بحيث يكون الموقع A مهيباً لاستقبال الحامض المحمل على tRNA التالي وجد أن عامل البدء IF2 لابد أن يتحرر بالتحليل المائي لجزئ GTP قبل

أن يرتبط aa-tRNA التالي بالريبوسوم. حيث أنه ثبت قطعياً أن جميع جزيئات aa-tRNA ماعدا $f \text{ Met-tRNA}_{F^{\text{Met}}}$ لابد أن تصل إلى الريبوسوم وترتبط به عند الموقع A.

وتتم عملية الاستطالة على ثلاث مراحل كالآتي:

- ١- الارتباط بين امينواسيل - ر.ن.أ الناقل Aminocyl- tRNA بالموقع A على الريبوسوم.
- ٢- انتقال سلسلة متعدد الببتيد النامية من tRNA الموجود في الموقع P إلى tRNA في الموقع A وذلك عن طريق تكوين رابطة ببتيدية جديدة.
- ٣- انتقال الريبوسوم على mRNA لكي يصل إلى الكودون التالي في الموقع A. واثناء هذه الخطوة الاخيرة ينتقل المعقد (المكون من سلسلة متعدد الببتيد النامية + tRNA) من الموقع A إلى الموقع P في حين ينتقل جزئى tRNA بين الموقع P إلى الموقع E ومنه إلى السيتوسول لكي يتم تحميله مرة اخرى بالحامض الامينى النوعى الخاص به.
- ٤- يصبح الموقع A الخالى الآن حراً لكي يستقبل جزئى جديد من aa-tRNA والذي يتحدد نوعيته حسب تزاوج القواعد الصحيحة بين مضاد الكودون وبين الكودون المقابل فى mRNA.
- ٥- فى البكتريا ، واثناء مرحلة الاستطالة وبمجرد انتهاء مرور الجزء الأول من mRNA من خلال الريبوسوم، فإن هذا الجزء يصبح حراً للارتباط من جديد مع تحت وحدة صغرى اخرى للريبوسوم لتكوين معقد بدء ترجمة Initiation Complex جديد. ويمكن لهذه العملية أن تتكرر عدة مرات مع مرور أجزاء جديدة من نفس سلسلة mRNA مما يؤدي إلى

تكوين ما يسمى البوليريبيوسوم Polyribosomes أو بوليسوم Polysomes (الشكل ٩-١٥).



الشكل (٩-١٥): البولي ريبوسومات تحت المجهر الإلكتروني

- أ - بوليريبيوسومات ناتجة من خلايا الأرنب مشاركة في ترجمة م ر ن أ الهيموجلوبين.
- ب - بولير ييوسومات من الخلايا العملاقة لذبابة *Midgefly*.

مصدر الطاقة اللازمة لعملية الاستطالة:

نظراً لأن المجموعة الكربوكسيلية للحامض الأميني يتم تنشيطها عند ارتباطها تساهمياً بجزئ tRNA النوعي، فقد كان يفترض أنه لا توجد هناك حاجة إلى استهلاك طاقة إضافية لتكوين الرابطة الببتيدية. إلا أنه تبين أن هذا الافتراض غير صحيح. إذ وجد أنه إلى جانب الحاجة إلى جزئ GTP لتكوين معقد البدء Initiation Complex فإن الأمر يتطلب أيضاً تحليل جزئين آخرين من GTP عند إضافة كل حامض أميني إلى السلسلة النامية. وقد ثبت ذلك عندما تبين أن هناك عوامل استطالة Elongation factors تساهم في عملية استطالة ونمو سلسلة متعدد الببتيد وأن تلك المساهمة تحتاج إلى استهلاك طاقة من GTP كما سيأتي بعد، علماً بأن هذه العوامل لا تشارك مباشرة في تكوين الرابطة الببتيدية.

نور عوامل الاستطالة *(EF) Elongation Factors* فى بناء البروتين:

كان يعتقد مبدئياً أن ارتباط جزئ aa-tRNA بالريبوسوم عملية لا انزيمية تحدث عندما يصطدم جزئ Aminoacyl-tRNA بالموقع A المرتبط بالكودون النوعى للحامض الأمينى. غير أنه تبين فيما بعد أن هناك مجموعة من البروتينات الصغيرة تسمى عوامل الاستطالة *(EF) Elongation Factors* لابد من اشتراكها فى هذه العملية لكى يتم الارتباط بصورة صحيحة (الجدول ٩-١). ويبدأ ذلك عندما يتفاعل أحد هذه العوامل *(EF-TU)* مع GTP و aa-tRNA لتكوين معقد مكون من: aa-tRNA- EF-TU- GTP. ويوجد العامل EF-TU بوفرة فى بكتريا القولون بحيث تساوى عدد جزيئاته عدد جزيئات tRNA فى الخلية البكتيرية. ولابد من توفر GTP لكى يتم ارتباط Aminoacyl- RNA عند الموقع A.

يمكن لهذا العامل EF-TU الارتباط مع أى جزئ من aa-tRNA فيما عدا $Fmet-tRNA_{F}^{met}$. ولم تتضح بعد الطريقة التى يتم فيها تمييز ذلك. وبعد ارتباط aa-tRNA بعامل الاستطالة EF-TU فإن المكون aa-tRNA ينتقل إلى الموقع A على الريبوسوم مع انفصال معقد حر من EF-TU-GDP والفوسفات. وجدير بالذكر أن هذا المعقد يفقد نشاطه ولا يمكنه الارتباط مرة اخرى مع Aminoacyl tRNA جديد.

ويتطلب اعادة استخدام EF-TU لربط جزئ جديد من aa-tRNA مع الريبوسوم مساهمة عامل استطالة آخر يسمى EF-TS، حيث يقوم هذا العامل بفصل GDP عن EF-TU ويحل محل الأول ليكون معقد مؤقت مع EF-TU. وعندما يجد هذا المعقد الجديد جزئ GTP يتكون معقد من GTP-EF-TU

وينفصل العامل EF-TS مرة أخرى، ثم يقوم المعقد EF-TU-GTP بربط جزيء آخرى من aa-tRNA بالريبوسوم وهكذا تعاد الدورة.

تبين أن تكون الرابطة الببتيدية يتم بمساعدة انزيم Peptidyl Transferase وذلك على تحت الوحدة 50S. وقد وجد أن هناك ستة بروتينات ريبوسومية على الأقل، وكذلك 23S rRNA ضرورية لنشاط هذا الانزيم. كما أن هناك ستة بروتينات أخرى وكذلك 5S rRNA تساهم في هذا النشاط الانزيمي. وبذلك يمكن تخيل انزيم Peptidyl Transferase كمركز نشاط على الريبوسوم يقوم بضبط اصطفاف جزيئين من aa-tRNA بالطريقة المضبوطة للسماح بتكوين الرابطة الببتيدية .

وفي هذه الخطوة تتكون رابطة ببتيدية بين مجموعة الامين في aa-tRNA في الموقع A والنهاية الكربوكسيلية للسلسلة الببتيدية النامية المرتبطة مع tRNA في الموقع P وبالتالي تتصل السلسلة تساهميا مع tRNA في الموقع A.

وحيث أن جزيئات aa-tRNA تمثل صورة منشطة من الأحماض الأمينية فإن هذا التفاعل لا بد أن يكون تلقائيا بدون الحاجة إلى بذل طاقة إضافية.

تبين وجود عامل استطالة ثالث وهو EF-G وهو ضروري لحركة سلسلة Peptidyl-tRNA من الموقع A إلى الموقع P ويطلق على هذا العامل أيضاً اسم Translocase. وفي هذه العملية يتكون أولاً معقد من EF-G-GTP-Ribosome ثم يحدث الانتقال مقرونا بتحريك جزيء tRNA الحر من الموقع P إلى الموقع E ومنه إلى السيئوسول. ونتيجة لهذه الخطوة يصبح الموقع A خالياً ومهيأ لاستقبال

حامض أميني جديد aa-tRNA. ويتطلب تحرير العامل EF-G من هذا المعقد لاعادة استخدامه حدوث التحليل المائي لجزئى 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 300-400 حامض أميني فى حوالى 10-20 ثانية، وأنه فى اثناء هذه الفترة لا تبقى السلسلة النامية فى صورة سلسلة مفردة ولكنها تأخذ بسرعة الشكل الثلاثى الابعاد الخاص بها، وذلك عن طريق تكوين عدة روابط ثانوية بحيث قد تأخذ السلسلة الشكل النهائى للبروتين النوعى قبل اضافة الأحماض الأمينية الأخيرة إلى النهاية الطرفية للسلسلة.

ثالثا: مرحلة انتهاء الترجمة (Termination)(Release):

تبين أنه لكى يتم انتهاء عملية بناء سلسلة متعدد الببتيد لابد أن يتوفر شرطين: أولهما أن يوجد كودون نوعى يعمل كإشارة إيقاف لإستطالة السلسلة، والشرط الثانى هو توفر بروتينات نوعية تسمى بروتينات الأنفكاك أو الأنهاء (RF) Release Factors التى تقوم بقراء اشارات انتهاء بناء السلسلة.

ويرجع ذلك إلى حقيقة أنه عندما تصل سلسلة متعدد الببتيد الى تمام استطالتها، فإن نهايتها الكربوكسيلية تظل مرتبطة بأخر جزئى من tRNA وعلى ذلك فلايد لعملية الانهاء أن تشتمل على ازاحة هذا الجزئى الطرفى من tRNA وتحرير مجموعة الكربوكسيل منه. وعندما يتم ذلك تنفك السلسلة الناشئة التامة النمو بسرعة من على الريبوسوم وذلك نظراً لأن ارتباطها بالريبوسوم كان بواسطة هذا الجزئى الأخير من tRNA. تبين وجود ثلاث كودونات فى الشفرة الوراثية متخصصة فى اعطاء اشارة الايقاف لعملية بناء البروتين فى الخلية

وهي UAA, UAG, UGA. إلا أنه تبين أن هذه الكودونات النوعية لا يمكن لأي نوع من tRNA التعرف عليها ولكن يتم التعرف عليها فقط بواسطة بروتينات نوعية تسمى عوامل الانفكاك (Release Factors (RF).

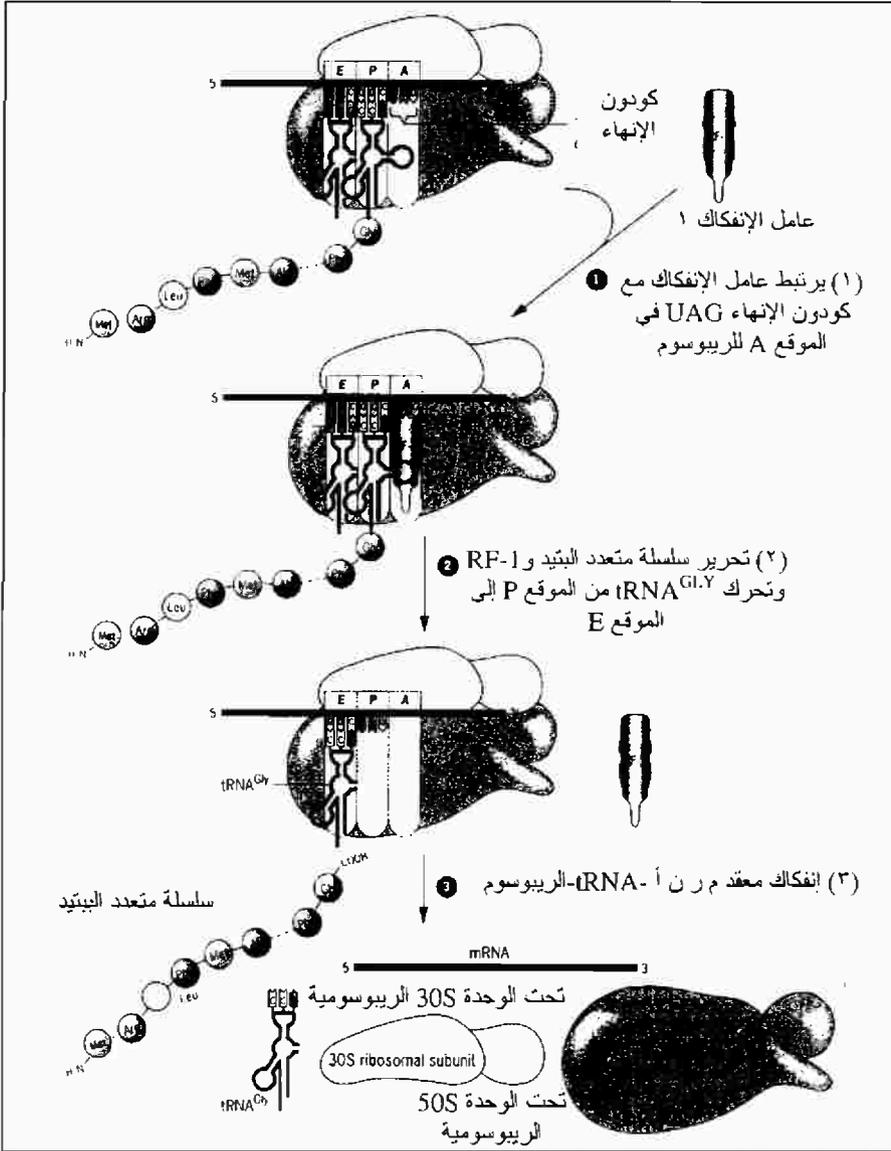
يحتل أحد عوامل الانفكاك الموقع A على الريبوسوم عندما يتم الوصول إلى الكودون الخاص بالانتهاء على سلسلة mRNA مما يؤدي إلى منع إضافة أي aa-tRNA جديد إلى هذا الموقع. وقد تبين وجود ثلاث أنواع من عوامل الانفكاك في بكتريا القولون وهي : RF1, RF2, RF3 (جدول 9-1) ويتعرف العامل RF1 على كودونى الإيقاف : UAA, UAG فى حين يتعرف العامل RF2 على كودونى الإيقاف : UAA, UGA.

يؤدي ارتباط عامل الانفكاك بالموقع A على الريبوسوم إلى دفع انزيم Peptidyl Transferase إلى نقل السلسلة الببتيدية التامة النمو إلى جزئ ماء بدلا من جزئ aa-tRNA فتتزلق السلسلة الكاملة متحررة من الريبوسوم نظراً لعدم وجود ما يربطها به، كما تتحرر من جزئ tRNA فى حين يتحرك جزئ tRNA غير المشحون إلى الموقع E ومنه إلى السيتوسول.

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

يلى ذلك انفكاك mRNA من موقع ارتباطه على الريبوسوم، وهذا الأخير لا يلبث أن يتفكك إلى تحت الوحدات 30S, 50S اللتان تبحثان عن جزئ

mRNA جديد لبدء دورة جديدة من عملية بناء البروتين. وبين الشكل (٩-١٦) دور عوامل الإنفكاك في عملية إنهاء بناء سلسلة متعددة الببتيد.



الشكل (٩-١٦): إنهاء ترجمة سلسلة متعدد الببتيد في بكتريا القولون

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 وجزئ من GTP من جهة أخرى. وجد أن هذا المعقد وليس tRNA فقط هو الذى يتزواج مع الكودون المناسب فى mRNA. إذ أن وجود عامل الاستطالة المرتبط فى هذا المعقد هو الذى يسمح بالتزواج الصحيح بين الكودون ومضاد الكودون، ولكنه فى نفس الوقت يمنع مؤقتاً الحامض الأمينى من أن يضاف إلى سلسلة متعددة الببتيد النامية. إلا أن هذا التعرف المبدئى للكودون لا يلبث أن يدفع عامل الاستطالة إلى استهلاك جزئ GTP المرتبط به (بالتحليل المائى إلى GDP + فوسفات) مما يؤدى إلى انفكك عامل الاستطالة من هذا المعقد على الريبوسوم تاركاً جزئ AA ~ tRNA بحيث يصبح فى الامكان أن يستمر بناء البروتين. وكما هو موضح فى الشكل (٩-١٧) فإن عامل الاستطالة يقوم بعملية تأخير قصيرة بين خطوة التزواج بين الكودون ومضاد الكودون وخطوة استطالة سلسلة متعدد الببتيد مما يعطى فرصة لجزئ tRNA غير الصحيح المرتبط بأن يترك الريبوسوم. إذ أن جزئ tRNA غير الصحيح يعطى عدد أقل من الروابط الهيدروجينية بين الكودون ومضاد الكودون مما يحدث بالنسبة للجزئ الصحيح، بحيث يكون ارتباط الأول ضعيفاً بالريبوسوم وبالتالي يكون أكثر تعرضاً للانفكك بسهولة أثناء هذه الفترة الوجيزة. وحيث أن التأخير الذى يسببه عامل الاستطالة يؤدى بمعظم جزئيات tRNA غير الصحيحة المرتبطة بالريبوسوم إلى الانفكك عنه وتركه بدون أن تستخدم فى بناء البروتين، فإن هذا العامل يؤدى إلى زيادة نسبة الأحماض

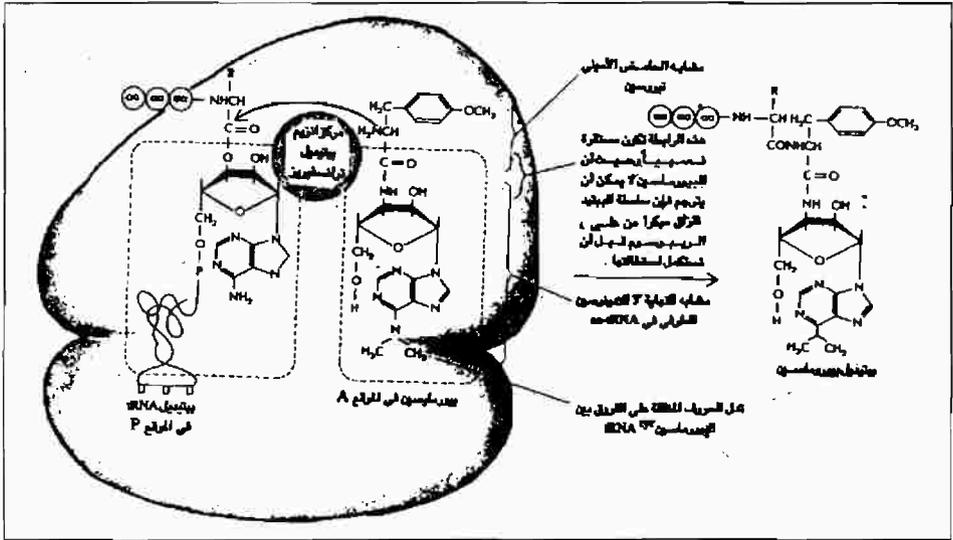
العادي للبكتريا تتكون كميات ضئيلة جداً من PPGPP نجد أنه تتراكم كميات كبيرة منه أثناء مجاعة الخلية. يعتقد أن هذه الجزيئات غير العادية تقوم بدور الاشارات التي توقف نوعياً بناء سلاسل rRNA و tRNA في الخلية أي انها تقوم بدور تنظيمي للحيلولة دون إنتاج كميات ريبوسومات أكثر مما تستطيع الخلية استخدام. يطلق على هذا التثبيط النوعي لبناء rRNA و tRNA تحت ظروف المجاعة ونقص الأحماض الأمينية اسم "الاستجابة المحدودة" Stringent Response.

وقد تبين وجود طفرة استرخائية Relaxed Mutation تؤدي إلى الاستمرار في إنتاج rRNA, tRNA على الرغم من نقص الأحماض الأمينية. وقد وجد أن بعض الخلايا الطافرة هذه ينقصها انزيم ذو وزن جزيئي حوالى 75000 دالتون. يسمى بعامل الإلزام Stringent Factor وأن هذا العامل هو الذى يرتبط بالريبوسوم ويقوم بتحويل PPG إلى PPGPP.

دور بعض المضادات الحيوية في وقف بناء البروتين:

تبين 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 يؤدي هذا الدور عن طريق إيقاف نمو واستطالة سلسلة متعدد الببتيد كما فى الشكل (٩-١٨).



الشكل (٩-١٨): دور المضاد الحيوي بيورومايسين في إنهاء استطالة سلسلة متعدد الببتيد

ويرجع ذلك إلى أن هذا المضاد الحيوي يتشابه في تركيبه مع تركيب النهاية 3' لجزئ tRNA ~ AA (مثل التيروسين أو الفينيل الأنين)، مما يؤدي إلى امكان ارتباطه بالموقع A على الريبوسوم بطريقة فعالة جداً بحيث يحتل هذا الموقع بدلاً من AA ~ tRNA والأهم من ذلك أن انزيم Peptidyl Transferase يقوم باستخدام هذا المضاد الحيوي كبديل بحيث ينقل سلسلة متعدد الببتيد الى المستقبلات الموجودة عليه. ونظراً لأن جزئ البيورومايسين صغيراً جداً بالمقارنة بجزئ tRNA لذلك فإن ارتباطه بالموقع A يكون ضعيف جداً مما يؤدي إلى انفكاك سلسلة متعدد الببتيد النامية والمنتبهة بالبيورومايسين عن الريبوسوم مما يؤدي الى توقف عملية الاستطالة وانتاج سلاسل ببتيدية غير كاملة بأطوال مختلفة. وتجدر الإشارة هنا إلى أن حقيقة اضافة البيورومايسين إلى النهاية

الكربوكسيلية للسلسلة النامية يؤكد أن بناء البروتين يحدث من النهاية N إلى النهاية C.

٢- حامض الفوسيديك Fusidic acid: يتدخل هذا المضاد الحيوي في عملية انطلاق عامل الاستطالة EF-G بعد أن يؤدي دوره في عملية الانتقال، حيث يؤدي استمرار ارتباط المعقد EF-G-GDP إلى منع ارتباط المعقد التالي:

AA-tRNA-EF-TU-GTP على الموقع A على الريبوسوم والذي لا بد أن يسبق أي دورة جديدة للاستطالة، مما يوقف نمو سلسلة متعدد الببتيد.

٣- Chloramphenicol و Sparsomycin يقوم كل من هذين المضادين الحيويين بتنشيط تفاعل انزيم Peptidyl Transferase نتيجة لارتباطهما نوعياً بتحت الوحدة 50S.

٤- Streptomycin يرتبط بتحت الوحدة 30S بحيث يوقف عملية بدء بناء سلسلة متعدد الببتيد.

ويلخص الجدول (٩-٢) دور بعض المضادات الحيوية في تنشيط عملية بناء البروتين في الخلية.

الجدول (٩-٢) دور بعض المضادات الحيوية
في تثبيط بناء البروتين

التأثير النوعي	المثبطات
	أ- تعمل فقط على غير مميزة النواة
يمنع ارتباط AA-tRNA بالموقع A على الريبوسوم	١- تيتراسيكلين Tetracyclin.
يمنع انتقال معقد الابتداء إلى خطوة الاستطالة ويسبب أخطاء في قراءة الشفرة الوراثية.	٢- ستربتومايسين Streptomycin.
يوقف تفاعل انزيم Peptidyl Transferase على الريبوسوم.	٣- كلورامفينيكول Chloromphenicol.
يمنع تفاعل الانتقال Translocation على الريبوسوم	٤- اريثرومايسين Erythromycin.
	ب- تعمل على غير مميزة النواة ومميزة النواة:
يسبب تحرر سلسلة متعدد الببتيد قبل اكتمال نموها عن طريق ارتباطه بنهاية السلسلة النامية.	١- بيورومايسين Puromycin.
	ج- تعمل على مميزة النواة فقط:
يوقف تفاعل الانتقال على الريبوسوم.	١- سيكلوهكساميد Cyclohexamide.
يوقف تفاعل انزيم Peptidyl Transferase على الريبوسوم.	٢- انيسومايسين Anisomycin.

الترجمة في مميزة النواة :

لا تختلف عملية الترجمة في مميزة النواة عما يتم في البكتريا إلا في قليل من الخواص. حيث نجد أنه في مميزة النواة يكون حجم جزيئات الريبوسوم أكبر مما في البكتريا وأن مكوناتها من ر.ن.أ والبروتينات تكون أكثر تعقيدا عما في البكتريا.

من جهة أخرى نجد أن فترة نصف العمر لجزيء mRNA في مميزة النواة تكون عادة اطول بكثير عن مثيلتها في البكتريا وحيث أن معظم mRNA في مميزة النواة يستمر فعلاً لعدة ساعات وليس لدقائق (في البكتريا) قبل أن يحدث له هدم بانزيمات الريبونوكلييز مما يجعله متوافراً لفترة اطول بكثير ليشارك في بناء كميات أكبر من البروتين. وتوجد بعض الفروق في مرحلة بدء الترجمة في مميزة النواة. فقد رأينا كيف يتم تجهيز mRNA بقلنسوة من الجوانين عند النهايه⁵. وقد تبين أن وجود هذه القلنسوة ضروري للترجمة الفعالة حيث وجد أن mRNA الذي يخلو من القلنسوة لا تتم ترجمته بنفس الكفاءة. وبالإضافة إلى ذلك، تحتوي معظم انواع mRNA في مميزة النواة على تتابع تعارف يحيط بكودون البدء AUG مكون من التتابع ACCAUGG ويعرف بتتابع كوزاك Kozak. ويبدو أن هذا التتابع يقوم بنفس الوظيفة في مميزة النواة التي يقوم بها تتابع Shine-Dalgarno في غير مميزة النواة وكلاهما يقوم بتسهيل الارتباط المبدئي بين mRNA مع نحت الوحدة الصغرى للريبوسوم. وهناك فرق آخر وهو أنه في مميزة النواة لا تحتاج عملية بدء الترجمة إلى فورمايل ميثيونين إلا أن الكودون AUG في مميزة النواة يحتاج إلى وجود (tRNA^{met}) وهو المختص ببدء الترجمة بإضافة حامض الميثيونين. وتتشابه العوامل البروتينية (عوامل البدء والاستطالة والانهاء) في ترجمة كلا من البكتريا ومميزة النواة

إلا أن الأخيرة تحتوى على اعداد اكبر من هذه العوامل فى كل خطوة، وبعضها يكون أكثر تعقيداً عما فى البكتريا. ومن المعروف أن عدد كبير من الريبوسومات يكون مرتبطاً بأغشية الشبكة الاندوبلازمية الخشنة فى خلايا مميزة النواة، الا أن هذه الاغشية غير موجودة فى سيتوبلازم البكتريا. ويؤدى هذا الارتباط فى مميزة النواة إلى تسهيل أفراس البروتينات حديثة البناء من الريبوسومات مباشرة إلى القنوات الموجودة فى الشبكة الاندوبلازمية حيث يتم توجيه مسارها الافرازى. فى حين نجد أنه فى غير مميزة النواة يحدث انطلاق السلاسل الببتيدية مباشرة من الريبوسومات الى السيتوبلازم.

وأخيراً فإن هناك فرق كبير فى معدل سرعة استطالة سلسلة متعدد الببتيد، ففى البكتريا نجد أن السلسلة تزيد استطالتها بمعدل ١٥ حامض أمينى فى الثانية الواحدة (عند درجة حرارة ٣٧ م) فى حين يكون هذا المعدل ابطأ بكثير فى مميزة النواة.