تناسخ د ن أ

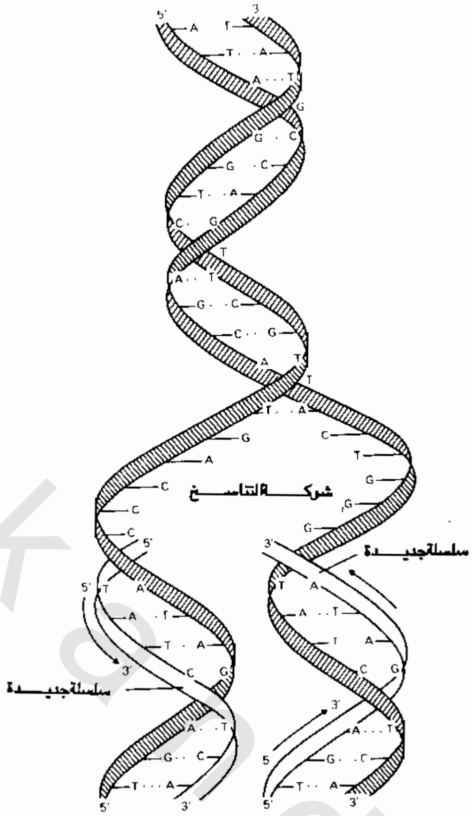
DNA Replication

يمكن اعتبار ميكانيكية تناسخ (تضاعف) جزئى د ن أ نتيجة مباشرة لطبيعة تركيب الحلزون المزدوج . إذ لابد أن تنفصل السلستين المكونتين للحلزون حتى يتسنى استخدام كل منها كقالب لبناء جزئ جديد من د ن أ لكى يحدث هذا الانفصال يجب أن تنفك أولا حلزنة اللولب وذلك بدوران الاجزاء غير المتكررة من الحلزون حول محورها كما أن الروابط الهيدروجينيه التى تربط بين أزواج القواعد المتقابلة فى الجزئ الأصلى تكون سهلة الكسر عادة بدون الحاجة إلى بذل طاقة أو تفاعل انزيمى .

وجد أن المجاميع الجانبية فى أزواج القواعد المتقابله (بعكس مركبات عضويه أخرى) فى مقدورها تكوين عدد من الروابط الهيدرورجينية المتخصصه جدا (النوعية) ، وبذلك يتوفر لدينا قالب نموذجى لبناء جزئ جديد عليه حيث يتم التجاذب بين القواعد فى القالب والقواعد المكملة فى السلسلة الجارى بناؤها عندما تضاف القواعد واحدة تلو الأخرى طبقا لقاعدة شاراجاف (G = C ، T = A) ويتم ذلك بصورة دقيقة بحيث تنعدم تقريبا فرصة حدوث خطأ (10^{-8}) مما يؤدى إلى انتاج جزيئات جديدة عبارة عن صورة طبق الأصل دقيقة للجزئ الأصلى (الشكل ٢ – ١) .

الطريقة شبه المحافظة لتناسخ د ن أ .

يقترح نموذج واتسون وكريك أن التناسخ يتم حسب ميكانيكية تُعرف بالطريقة شبه المحافظة Semi - conservative بمعنى أن نصف جزئ د ن أ الأصلى (سلسلة) يحافظ عليه فى حين يتم بناء سلسلة جديدة عليها . وقد أمكن التحقق من صحة هذه الميكانيكية بعدة أدلة تجريبية .



الشكل (٢ - ١):

شكل تخطيطى يبين ميكانيكية تناسخ جزئ د ن أ يتم التناسخ بفك حلزنه 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 فى الاتجاه '3 ←'5 فقط .

فقد 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 يتأكدا من أن كل ذرات النتروجين فى جزىء د ن أ معلمه بالنتروجين الثقيل . بعد ذلك تم نقل الخلايا البكتيرية إلى مزرعة تحتوى على النتروجين العادى (الخفيف) N^{14} استخلص د ن أ من الخلايا وتم تقدير كثافته بواسطة الطرد المركزى فائق السرعة

obeikandl.com

ultracentrifugation فى متدرج كثافى Density gradiant من محلول كلوريد السيزيوم . تبين أنه بعد أول دوره (جيل) من الانقسام ظهرت قمة واحدة تمثل جزئ هجين ثقيل / خفيف H/L نتيجة لتكوين الجزئ من سلسلة أصلية ثقيله وسلسلة مكمله خفيفه) . فى الجيل الثانى ظهرت قمتين لجزيئيات د ن أ واحدة تمثل الهجين والأخرى تمثل الخفيف فقط L/L كما فى الشكل (٢ – ٢).

يعكس ذلك بوضوح حتميه انفصال السلسلتين الأصليتين ثم استخدام كل سلسلة كقالب لبناء نسخة عليها .

من جهة أخرى تمكن تيلور ومعاونوه Taylor عام ١٩٥٧ من إثبات الطريقة شبه المحافظة فى الكائنات مميزه النواه . إذ أنه من المعروف أن كل كروماتيده فى الكروموسوم تمثل جزئ واحد من د ن أ تم تعليم خلايا القمم النامية لجذور نبات الفول بالثيميدين المشع ^{3}H thymidine ثم سمح لها بعد ذلك بالنمو فى بيئه غير معلمة ؛ عند دراسة كروموسومات هذه الخلايا فى الدور الاستوائى بعد جيل (دورة) أو جيلين (دورتين) من الانقسام الخلوى وذلك باستخدام طريقة التصوير بالاشعاع الذاتى Autoradiography تبين أن كلا من الكروماتيدتين كانتا مشعتان بعد جيل واحد (دورة) فى حين كانت كروماتيده واحده فقط هى المشعة بعد دورتين من انقسام الخلية كما هو متوقع حسب النظرية شبه المحافظة لتناسخ د ن أ الشكل (٢ – ٢).

بدء التناسخ من نقطة محددة تسمى منشأ التناسخ Replication Origin

عند عزل الجزئ الخطى لـ د ن أ على فترات اثناء عملية التناسخ للفيرس T7 وفحصه تحت المجهر الالكترونى كان المتوقع أن تبدأ عملية التضاعف (التناسخ) عند إحدى النهايتين أو عندهما معاً حيث أنه من السهل تخيل أن يبدأ انفصال السلسلتين عند الأطراف وليس فى المناطق الداخلية للحلزون المزدوج .

إلا أنه تبين أن التضاعف يبدأ فى الحقيقة من الداخل ومن نقطة معينة تسمى نقطة منشأ

التناسخ Origin replication وقد وجد أنه بالنسبة لهذا الفيرس تكون على مسافة حوالى17% من بداية النهاية اليسرى للجزيئ كما فى الشكل رقم (٢ – ٣) .

بمجرد أن يبدأ بناء جزئ د ن أ يستمر البناء فى الاتجاهين مما يعطى شكل العين (–o –) التى لا تلبث أن تنمو لتأخذ شكل حرف Y (ومن هنا جاءت تسميتها شوكه التناسخ Replication fork) .

وتظل عملية التناسخ حتى تصل الشوكة إلى نهاية جزىء د ن أ

إن ظهور هذه الاشكال ينفى أن عملية التناسخ تتم على مرحلتين بمعنى أنه يتم الانفصال التام بين السلسلتين الابويتين أولاً قبل أن تبدأ عملية التناسخ فى المرحلة الثانية .

فقد تبين أنه فى كل هذه المراحل الوسطية للتناسخ تكون هناك اجزاء صغيرة فقط غير متحلزنة ووحيدة السلسلة .

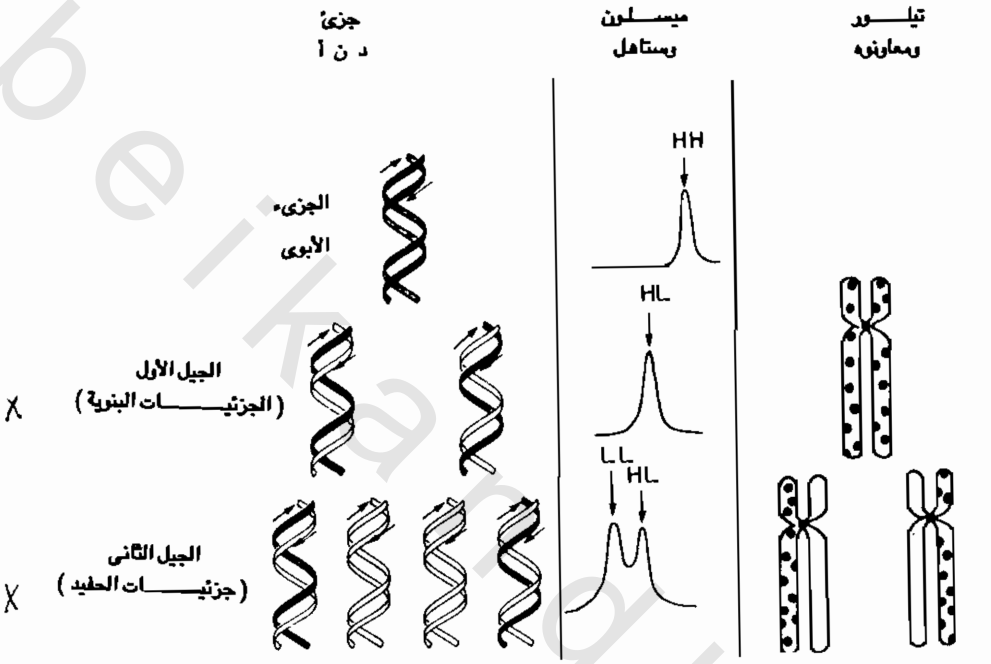
يدل ذلك على أن السلاسل الجديدة يبدأ بناؤها بمجرد أن تبدأ عملية جزئية لفك الحلزنة وانفصال جزئى للسلسلتين .

فى حالة جزئ د ن أ الحلقى كما فى بكتريا القولون لا يتحتم أن يتحول الجزيئ الحلقى إلى جزئ خطى (مستقيم) ولو بصوره مؤقتة . على العكس من ذلك وجد عند دراسة المراحل الوسطية لتضاعف كثير من الجزيئات الحلقية من د ن أ أن السلاسل الأبوية تحافظ على الشكل الحلقى طول فترة التناسخ .

تظهر فى مثل هذه الجزيئات اثناء تضاعفها شكل (θ ثيتا) عندما تبدأ فى تكوين فقاعة التناسخ عند نقطة البداية « المنشأ » كما فى الشكل (٢ – ٤) .

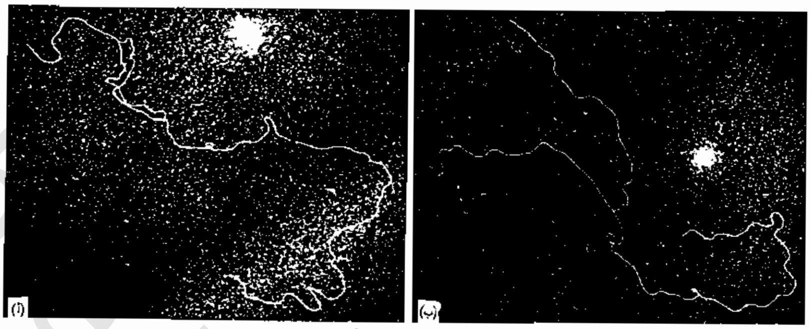
تنمو الفقاعة (الشوكة) فى الاتجاهين المتضادين ولكن كيف يتسنى لجزئ حلقى مقفول من د ن أ أن تنفك حلزنته أثناء التضاعف (التناسخ) .

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 الحلزنة أو استرخاء الحلزون حسب طبيعة المرحلة التى يمر بها الجزئ .



الشكل (٢-٢) :

الطريقة شبه المحافظة لتناسخ د ن أ فى بكتريا القولون وفى كروموسومات مميزة النواه . قام ميسلون وستاهل بتعليم سلسلتى د ن أ الأبوية لبكتريا القولون بالنتروجين الثقيل ^{15}N وتم تحليل النتائج بتقنية الكثافة المتدرجة لمحلول كلوريد السيزيوم . استخدم تيلور ومعاونوه الثيمدين الثقيل ^{3}H - Thymidine والتصوير بالاشعاع الذاتى فى نبات الفول .



الشكل (٢ - ٣):

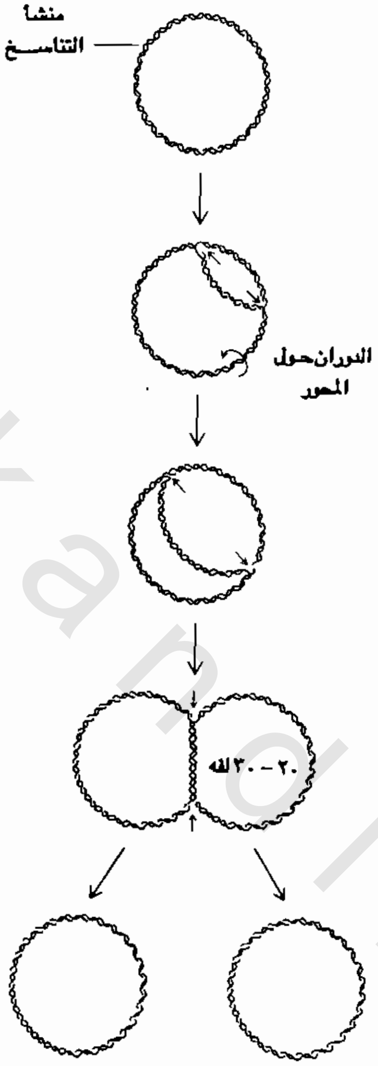
تناسخ جزئ د ن أ للفاج T7 :

(أ) صورة بالمجهر الالكترونى لجزئ د ن أ لفاج T_7 الذى بدء للتو فى التناسخ والذى تظهر به فقاعه تناسخ صغيرة تقع على مسافة 17% من النهاية اليسرى للخريطة الوراثية .

(ب) مرحلة متقدمة من تناسخ الجزئ الذى يظهر فيه شكل حرف Y نتيجة لوصول شوكة التناسخ إلى نهاية الشوط .

تبين أن كلا من السلسلتين الابويتين تظلان على حالهما فى معظم فترات دورة التضاعف الشكل (٢ - ٥) . ويحدث للجزء غير المتضاعف من الشكل ثيتاΘ الوسطى تحلزن فائق على فترات منتظمة للحيلوله دون تشوه أو تشابك الحلزون ويتم ذلك بإحدى طريقتين : إما أن يتكون حلزون فائق سلبى وذلك بفعل انزيم Topoisomerase II (gyrase) كمقدمة لاستطالة السلسلة ، أو بتكوين حلزون فائق موجب باستطالة فقاعات التناسخ وذلك فى حالة حدوث كسر فى السلسلة وهو أمر نادر حيث من الممكن فى هذه الحالة توقف استطالة نمو الفقاعة لاستحالة الاستمرار فى تكوين حلزنة فائقة موجبة أشد . وسنتعرض بالتفصيل لدور Topoisomerases فى التناسخ فيما بعد .

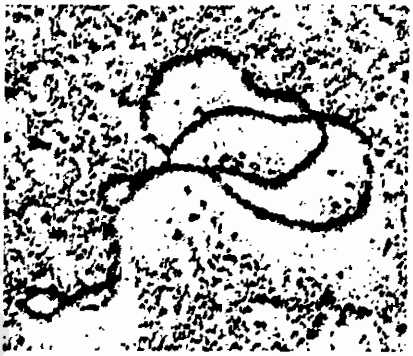
obeikandi.com



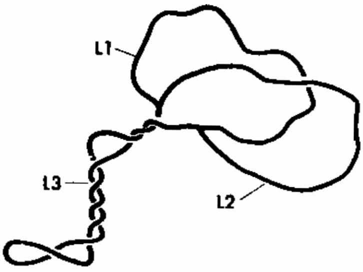
الشكل (٢ - ٤):

شكل مبسط للتناسخ ثنائي الاتجاه لجزئ د ن أ الحلقي .

obeikandl.com



(أ)



(ب)

الشكل (٢-٥) :

تناسخ جزئ د ن أ للقاح SV 40 :

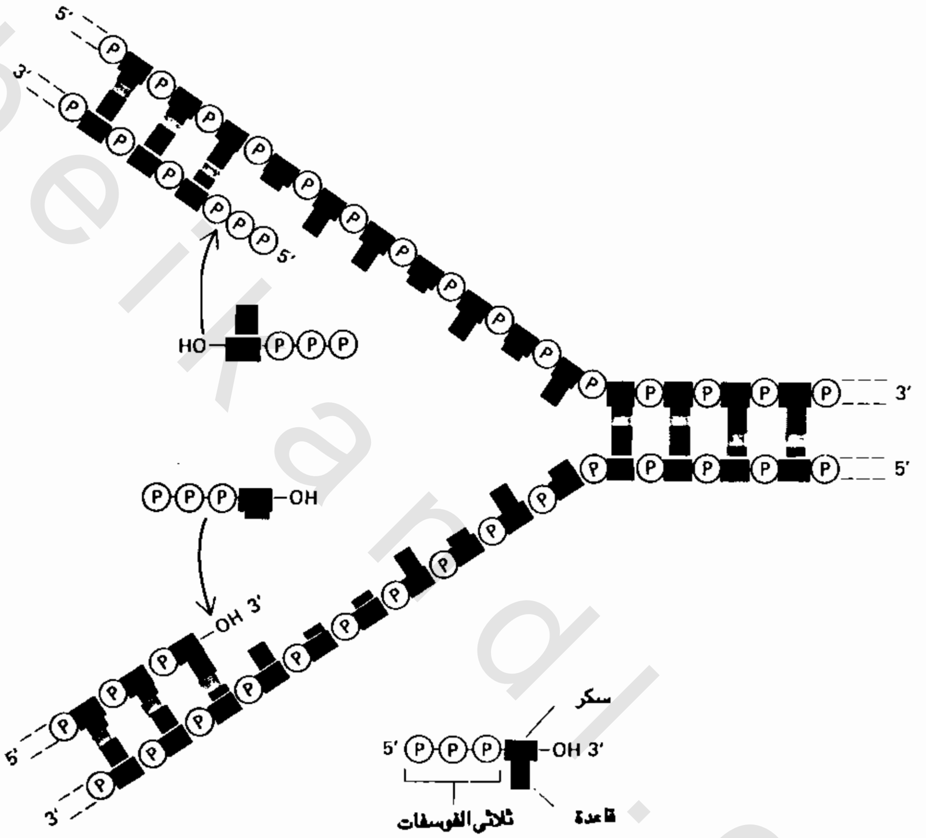
أ - صورة بالمجهر الالكترونى لمرحلة مبكره من التناسخ .

ب - شكل تخطيطى يبين السلاسل الابوية المتحلزنة وغير المتناسخه . وتمثل المناطق L_1 وL_2 الاجزاء التى تم تناسخها بالفعل فى حين تشير L_3 إلى المنطقة غير المتناسخة التى تأخذ شكل فائق التحلزن . يلاحظ أنه خلال دورة التناسخ ظل جزئ د ن أ متماسك .

اتجاه التناسخ يكون '3 ←'5 على كلا السلسلتين :

سبق التنوية إلى ان السلسلتين المشاركتين فى جزئ د ن أ تكونان متضادتين فى الاتجاه Antiparallel ويعنى ذلك ان كلا من السلسلتين البنويتين الجارى بناؤهما على كل من شوكتى التناسخ لابد أن يكونا أيضا فى اتجاهين متضادين ، وعلى ذلك فلابد أن يكون الاتجاه العام لنمو السلسلة فى الاتجاه '3 ←'5 لإحدى السلسلتين بينما المفروض أن يكون النمو للسلسلة المضاده فى الاتجاه '5 ← '3 الشكل (٢ - ٦) .

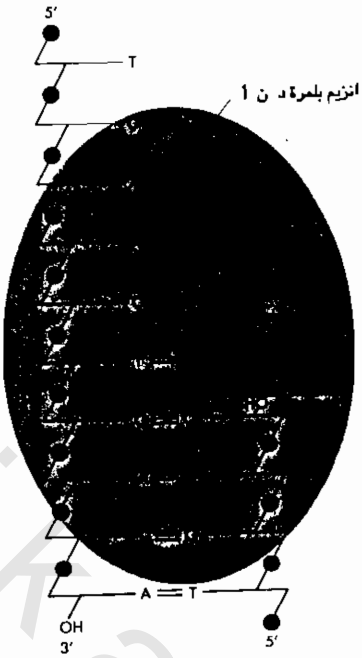
إلا أن جميع انزيمات بلمره د ن أ D N A Polymorase المعروفه حتى الآن والتى تشارك فى اضافه وحدات النيوكلتيدات يمكنها الاضافة ونمو واستطالة السلسلة فى الاتجاه '3→'5 فقط نظرا لأن التفاعل الكيماوى الذى تساعد فيه هذه الانزيمات يسمح للينوكلتيده ثلاثية الفوسفات للتفاعل فقط مع مجموعة الهيدروكسيل فى النهاية $^{3'}OH$ للسلسلة النامية ؛ الشكل (٢ - ٧) .



الشكل (٢-٦):

كل مبسط لميكانيكية تناسخ جزئ د ن أ ولو أن الخلية لا تستخدم هذا النظام لأنه يتطلب أن تنمو كلا السلسلتين الجديدتين نموا مستمرا واحده في الاتجاه 3' → 5' والأخرى في الاتجاه 5' → 3' . وهذا ما لا يحدث كما سيأتى بعد .

obeikandi.com



الشكل (٢ - ٧) :

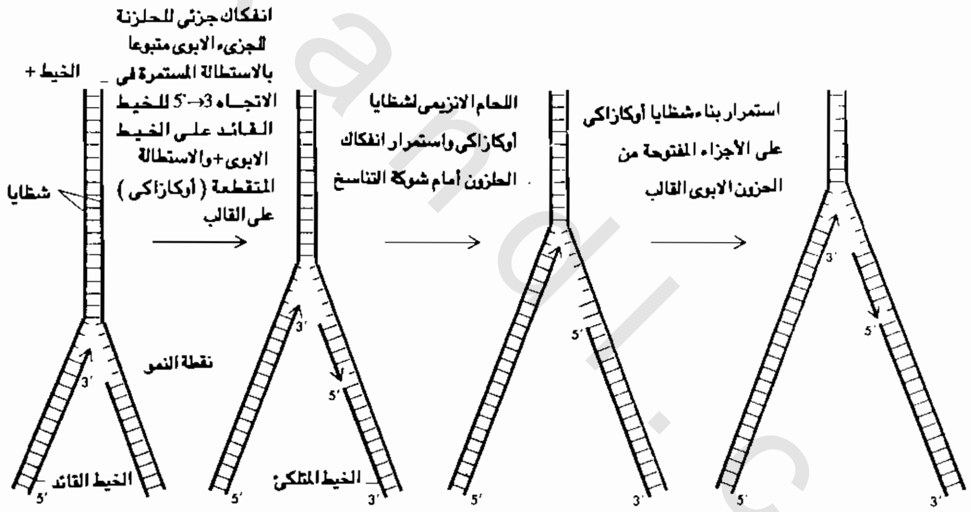
تفاعل ثلاثى فوسفات النيوكليوسيد مع النهاية 3'- oH لسلسلة د ن أ النامية.

لحل هذه المعضلة ، تمكن أوكازاكى Okazaki عام ١٩٦٩ من اكتشاف قطع قصيرة متقطعة من د ن أ يتم بناؤها فى الاتجاه '3 ←'5 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 نيوكلتيده معلمة بالاشعاع ، سميت هذه القطع القصيرة شظايا أوكازاكى Okazaki fragments نسبة إلى مكتشفها (تكون طول هذه الشظايا فى خلايا الكائنات مميزة النواه بطول ٢٠٠ نيوكلتيده فقط وقد يكون لذلك علاقة بطول شريط د ن أ الملتف حول النيوكليوسوم) ثم توصل هذه القطع القصيرة ببعضها بفعل انزيم لحام د ن أ D N A ligase (الشكل ٢ - ٨).

وقد تأكد الآن أن شظايا أوكازكى عبارة عن نواتج أولية لإحدى السلسلتين فقط وهى

obeikandi.com

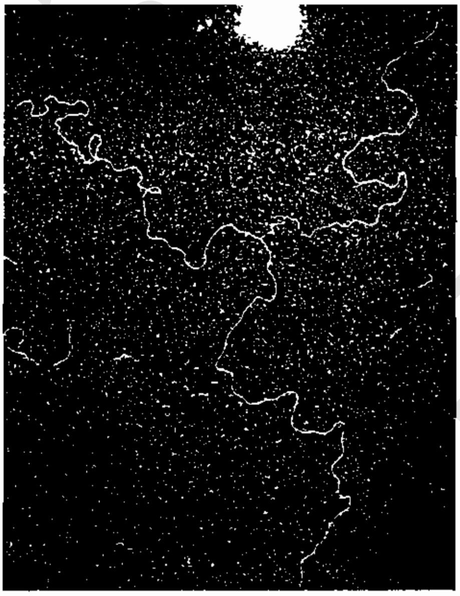
تلك التى تأخذ الاتجاه '5 ←'3 أما السلسلة ذات الاتجاه '3 ←'5 فإنها تبنى أو يتم تناسخها على شكل خيط مستمر وغير متقطع من البداية إلى النهاية . وهى لذلك تكون عادة اسرع فى معدل بنائها وتسبق فى ذلك الخيط المتقطع مما أدى إلى تسمية هذا الخيط بالخيط القائد leading strand فى حين سمى الخيط المتقطع بالخيط التابع أو البطئ lagging strand . يؤدى الفرق فى سرعة البناء بين الخيطين إلى ظهور منطقة صغيره من د ن أ الأبوى فى صورة احادية السلسلة عند شوكة التناسخ الشكل (٢ – ٩) ثم تصبح مزدوجة السلسلة عند بدء شظية أوكازاكى فى الظهور والتى يستمر بناؤها حتى تصل إلى نهاية الشظية السابقة لها والتى لا تلبث أن تلتحم بها . يبدأ بناء شظايا أوكازاكى عند نقط محددة على طول قالب السلسلة البطيئة وتحدد المسافة بين هذه النقط متوسط طول شظايا أوكازاكى المتكونة اثناء تناسخ جزئ معين من د ن أ.



الشكل (٢ - ٨) :

فرضية أن تناسخ الخيط المتلكئ يتضمن اتصال شظايا قصيرة بعد أن يتم تناسخ كل منها فى الاتجاه '3 ←'5 .

obeikandl.com



الشكل (٢-٩):

يؤدى اختلاف سرعة الحركة بين الخيط القائد والخيط المتلكئ إلى ظهور منطقة صغيرة وحيدة السلسلة فى جزئ د ن أ الأبوى عند شوكة التناسخ .

أنواع انزيمات بلمره د ن أ فى بكتريا القولون DNA Polymerase :

اكتشف حتى الآن فى خلايا بكتريا القولون E. Coli ثلاث أنواع من انزيمات بلمرة د ن أ وقد تم تحديد دور إثنان منها فى عملية تناسخ د ن أ بينما كان يظن سابقا أن انزيم البلمره DNA Polymerase I (DNA Pol I) ، والذى كان أول انزيم يكتشف فى هذه المجموعة؛ هو الانزيم الرئيسى المسئول عن بلمره جزئ د ن أ الا أنه أمكن التحقق من أن هناك انزيم آخر وهو (DNA Pol III) والذى اكتشف حديثا هو الذى يقوم بالدور الأساسى فى بلمرة جزئ د ن أ وعلى العكس من ذلك تبين أن انزيم (DNA Pol I) يقوم أساسا بملئ الفراغات أو الفجوات الصغيرة بين شظايا أوكازاكى 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 تتاثر بغيابه .

يبين الجدول رقم ٢ ـ ١بعض الخواص الرئيسيه لكل من هذه الأنزيمات .

الجدول ٢ ـ ١: بعض خواص انزيمات البلمره I ، II ، DNA Pol III فى بكتريا القولون.

الوظيفة	Pol I	Pol II	Pol III
الوظيفة :			
البلمرة 3' ← 5'	+	+	+
التحليل الطرفى 5' ← 3'	+	+	+
التحليل الطرفى 3' ← 5'	+	-	+
بدء البلمره	-	-	-
خواص عامة :			
الحجم (kdal)	١٠٩	١٢٠	١٤٠
عدد الجزيئات فى الخلية	٤٠		١٠ – ٢٠
معدل البلمره*	٦٠	٣٠	٩٠٠٠
الجينات التركيبية المعروفة	PolA	Pol B	dnaE , N , Z
الطفرات المميته الشرطيه	نعم	لا	نعم

* عبارة عن عدد النيوكلتيدات المبلمره عند درجة 37°م فى الدقيقة لكل جزئ من الأنزيم

دور انزيمات بلمرة د ن أ فى تصحيح الأخطاء Proofreading

يتبين من هذا الجدول أن الأنواع الثلاثة من الأنزيمات تمتلك خواص التحليل أو القطع الطرفى Exonuclease فى الأتجاه 5' ←3' بالأضافة إلى وظيفة البلمره الأساسية . يعنى ذلك أن فى مقدور كل من هذه الأنزيمات أن يعيد قطع أو هدم سلسلة متعدد النيوكلتيدات الحديثة التكوين فضلا عن دوره الأصلى فى استطالتها . إلا أن اتجاه البناء يكون أقوى بكثير من اتجاه التكسير أو الهدم . ولكن لماذا توجد خاصيه 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 لابد من التخلص منها فى الحال حتى لا تورث هذا الخطأ ويكون احتمال إزالتها عالى قبل أضافة القاعدة التالية ويتم ذلك بفعل الهدم الطرفى لهذه الانزيمات .

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

قد يعزى عدم ظهور انزيم بلمره د ن أ فى الاتجاه 5' ←3' إلى الاحتياج المستمر إلى عملية التصحيح هذه . اذ لو افترضنا إمكان استطالة السلسلة فى هذا الاتجاه فإن النهاية النامية ستكون دائما منتهية بمجموعة ثلاثية الفوسفات والتى تكون روابطها المرتفعة الطاقة ضرورية لإضافة النيوكلتيده التالية . من جهة أخرى سيؤدى نزع أو إزالة أحدث نيوكلتيده مضافه من مثل هذه السلسلة النامية المنتهية بمجموعة ثلاثية الفوسفات أثناء عملية تصحيح الأخطاء إلى ظهور سلسلة ذات نهاية 5' أحادية الفوسفات 5' - monophosphate والتى

ستكون بمحتوى طاقتها المحدود غير قادرة على الاستطالة بواسطة إنزيم البلمرة الأفتراضى هذا مما يؤدى 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 . يؤكد ذلك أن فرصة ظهور إنزيم بلمرة فى الاتجاه '5 <--'3 معدومة حتى الآن لإفتقاده لخاصية تصحيح الأخطاء فى حين أن التناسخ فى الاتجاه '3 <-- '5 يسمح للإنزيم نفسه فى نفس الوقت بتصحيح الأخطاء بكفاءة عالية . يبين الشكل رقم ٢ – ١٠ ميكانيكية تصحيح الأخطاء أثناء عملية تناسخ جزئ د ن أ.

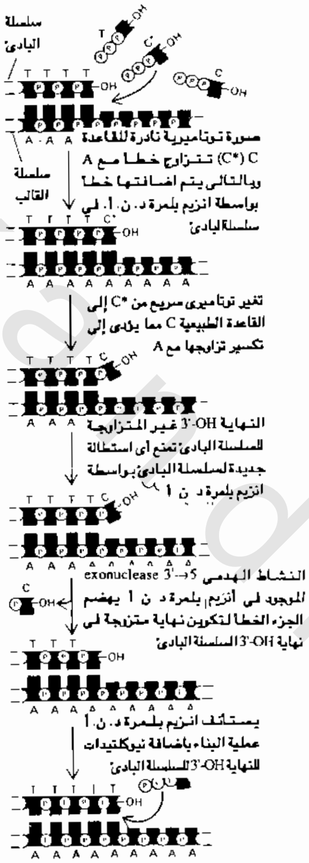
يتميز إنزيم بلمرة د ن أ بأنه بمجرد أن يبدأ عملية الاستطالة للسلسلة النيوكلتيديه فإنه يستمر ملتصقاً بالسلسلة مضيفاً نيوكلتيدات جديدة (واحدة تلو الأخرى) حسب التتابع المكمل للسلسلة القالب إلى أن يتم وصوله إلى إشارة تجعله ينفصل عن السلسلة . ولكن لماذا يظل إنزيم بلمرة د ن أ متصلاً بالقالب إلى نهاية المشوار المحدد له بدون انقطاع ؟

أظهر التركيب الثلاثى الأبعاد لجزئ البلمرة (DNA PolI) أن هذا الانزيم يحتوى على نطاقين أو مجالين Domains محدودين ، يحتوى النطاق الأكبر على برزخ أو شق عميق ذو شحنة كهربية موجبه ويبلغ نصف قطره 20 A° وترتبط سلسلة د ن أ فى هذا الشق (الشكل ٢ – ١١) فى حين قد يحتوى النطاق الأصغر على منطقة للارتباط بالنيوكلتيد . يبدو أن تحت النطاق الذى يتميز بالمرونة لديه المقدرة على إغلاق الشق بعد إرتباط سلسلة د. ن. أ. عندما 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 نيوكلتيده خاطئة لهذه السلسلة والتى لا يمكنها أن تتزاوج بطريقة صحيحة مع القاعدة المقابلة فسيؤدى ذلك إلى تشويه 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 الطرفى '5 <-- '3 exonuclease المصحح الخطأ بحيث يتم إزالة القاعدة الخطأ من موقعها على السلسلة كما هو موضح بالشكل (٢ – ١١) .

RNA البادىء لتناسخ جزئ 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 navo* بل لابد أن تكون مسبوقة ببادئ قصير حتى، يمكنها بدء نشاط البلمرة واستطالة سلسلة د ن أ تبين أن عملية بدء بناء أى سلسلة من

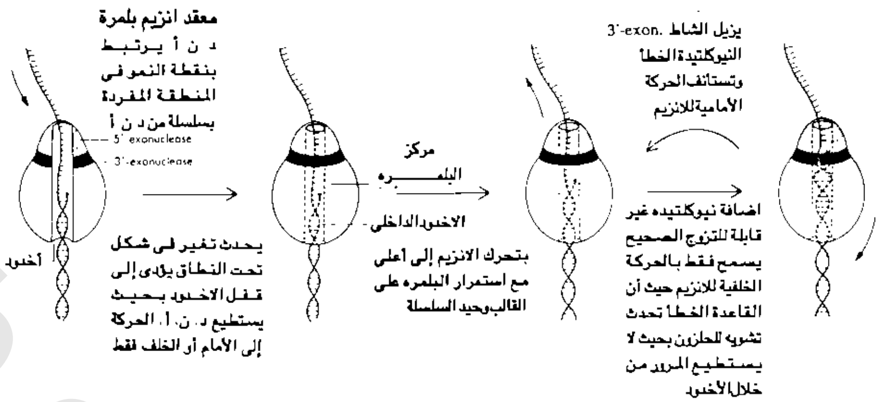
د ن أ يتطلب وجود بادئ قصير جداً من ر ن أ RNA (حوالى ١٠ نيوكليتدات فى مميزة النواة وأقل من ذلك فى غير مميزة النواه) . أى أن نقطة البداية (المنشأ) لبناء د ن أ على السلسلة القالب لا يتم التعرف عليها بواسطة إنزيمات بلمرة د ن أ مخصوصة ولكن بإنزيمات تقوم بنسخ Transcribe د ن أ لانتاج سلسلة بادئ قصيرة جداً من ر ن أ أمكن 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.



الشكل (٢-١٠):

شكل تخطيطى لعملية تصحيح الأخطاء حيث تزال الأخطاء أثناء بناء جزئ د ن أ فى البكتريا . ويعتقد أن ميكانيكية مشابهة تحدث فى مميزة النواة أيضاً .

obeikandi.com



الشكل (٢ - ١١) :

شكل تخطيطى لعملية تصحيح الأخطاء بعد اضافة القاعدة الخطأ إلى جزئ د ن أ.

تقوم هذه الإنزيمات بالتعرف على تتابعات خاصة على السلسلة القالب (الفردية) لجزئ د ن أ وجد أن إنزيم البريميز فى خلايا بكتريا القولون عبارة عن سلسلة واحدة من متعدد الببتيد يبلغ طولها 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 ٦ إلى ٧ بروتينات أخرى لتكون معقداً كبيراً يعرف بالبريموسوم Primosome . يتحرك هذا المعقد خطوة خطوة (الخطوة = نيوكلتيده) فى الاتجاه '3 <-=- '5 على القالب الخاص بالخيط المتلكئ ليستبدئ البدايات المتكررة لشظايا أوكازاكى التى 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 فى ازاحة البروتينات الخاصة بتثبيت السلاسل الفردية من د ن أ (والتى يطلق عليها البروتينات المرتبطة بالسلسلة الفردية لجـزئ د ن أ (SSB) كما سيأتى 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 ٣ – ١٠ نيوكلتيدات .

يوجد لكل كائن تتابع متشابه لجميع بادئات ر ن أ مما يعكس حقيقة أن البريموسوم يقوم

ببناء ر ن أ البادئ عند تتابعات معينة (متخصصة) على طول الخيط المتلكئ (التابع) لجزئ د ن أ القالب .

بمجرد أن يتم بناء ر ن أ البادئ يبدأ نشاط إنزيم بلمرة د ن أ (DNA Pol II) نظراً لأن البادئ قد هيأ له نهاية 3' oH حره فى نهاية سلسلته القصيرة فإنه يبدأ فى بناء شظايا أو كازاكى بحيث يتم تناسخ قالب د ن أ التابع فى صورة غير مستمرة (متقطعة) .

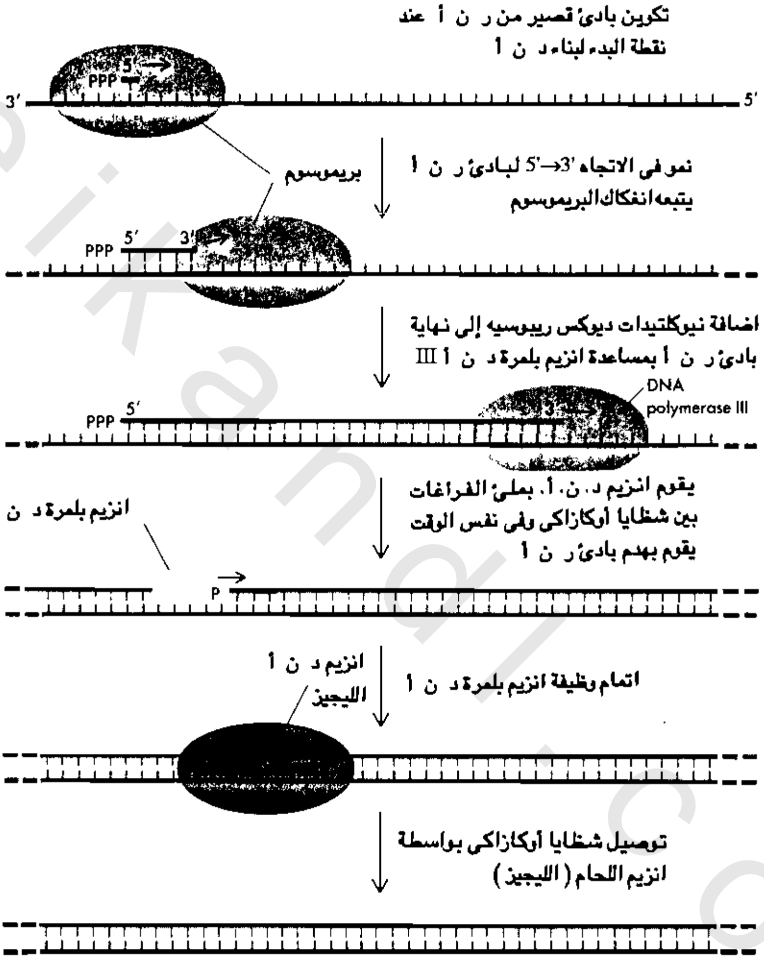
يتم بعد ذلك إزالة ر ن أ البادئ فى خطوة لاحقه من خلال نشاط إنزيم DNA Pol I الذى يقوم بملئ الفجوات أو الفراغات بين شظايا د ن أ بحيث يضيف النيوكليتدات الواحدة تلو الأخرى إلى النهاية 3' التى تقع إلى الخلف منه وفى نفس الوقت يقوم بتحليل وهدم سلسلة ر ن أ البادئ التى تسبقه . تتم عملية هدم ر ن أ نتيجة لنشاط موقع مختلف تماماً عن ذلك المسئول عن عملية التصحيح 5' <-- 3' ، إذ أن ذلك الموقع النشط فى الهدم الطرفى 3' <-- 5' يمكنه إزالة الديوكسى نيوكليتدات بالإضافة إلى الريبونيوكليتدات وعلى ذلك فإن استخدامه لا يكون قاصراً على إزالة بادئ ر ن أ ولكنه يقوم أيضاً بتحليل وهدم مناطق د ن أ التى يحدث لها تلف نتيجة للتعرض للإشعاع .

يلى ذلك عملية لحام أو لصق شظايا أو كازاكى ببعضها البعض بمساعدة إنزيم اللحام (ليجيز) DNA Ligase الذى يقوم بتوصيل النهاية 3' للشظية الجديدة من د ن أ بالنهاية 5' للشظية السابقة لها . وهكذا حتى نحصل فى النهاية على خيط كامل متصل (الشكل ٢ – ١٢) .

ولكن لماذا تلجأ الخلية إلى بدء السلسلة ببادئ ر ن أ الذى لابد أن يزال فى خطوة لاحقه وتفضل ذلك على بدءها ببادئ من د ن أ الذى 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* ، بالاضافة إلى ذلك يمكن تفسير تفضيل وجود بادئ ر ن أ فى بداية شظايا أو كازاكى على أساس أن الانزيم الذى يمكنه بدء بناء السلسلة من الصفر *de novo* يفتقر عادة إلى القدرة والكفاءة لإجراء عملية التصحيح الذاتى ، وعلى ذلك فإن الإنزيم الذى يستطيع استبداء بناء شظايا أوكازاكى سيكون بالضرورة معرضاً لإنتاج نسخة غير صحيحة نسبياً

obeikandl.com

(10^{-5}) . مما يؤدى فى النهاية إلى زيادة معدل الطفرات بدرجة كبيرة جداً مما يؤثر على حيوية الخلية ونشاطها بشكل سلبى . ولذلك فإنه يبدو أن وجود بادئ من ر ن أ بدلاً من د ن أ فى بداية السلسلة له ميزة أن هذه التتابعات القصيرة من الريبو نيوكليتدات يمكن اعتبارها بمثابة كشافات يسهل على DNA Pol I أن يتعرف عليها فيما بعد ويقوم بتكسيرها وإزالتها أى أن الإنزيم يميزها على أنها بقع رديئة يجب مسحها وإزالتها .



الشكل (٢-١٢):

استخدام بادئ من ر ن أ لبدء بناء شظايا أوكازاكى على القالب المتلكئ.

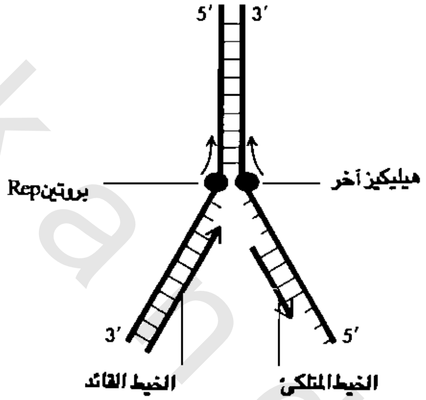
أنواع البروتينات التى تساعد على فك الحلزنة وانفصال سلسلتى د ن أ :

حيث أن سلسلتى الحلزون المزدوج الواقعة أمام شوكة التناسخ لا تنفصلان تلقائياً بالمعدل المناسب تحت الظروف العادية نظراً لأن الحلزون يكون ثابت جداً والروابط الهيدروجينية تصل بين أزواج القواعد بطريقة منتظمة وتحتاج فى كسرها إلى درجة حرارة عالية نسبياً فى التجارب المعملية (حوالى 100° م) ، لذلك فإنه يلزم وجود عوامل مساعدة فى الخلية لفصل السلسلتين حتى يتسنى لإنزيمات بلمرة د ن أ أن تؤدى دورها فى عملية التناسخ على قالب د ن أ وجد أن هناك مجموعة من البروتينات التى 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 المائى لجزئ ATP للتحرك إلى الأمام وزيادة معدل أنفصال سلسلتى د ن أ.

يوجد نوعان من هذه البروتينات أحدها (هيلكيز I ، II) يرتبط بالقالب الخاص بالخيط البطئ (التابع) ويتحرك فى الاتجاه '3 <-- '5 فى حين يطلق على النوع الآخر اسم Rep protein وهو يرتبط بالقالب الخاص بالخيط القائد ويتحرك فى الاتجاه '5 <-- '3. (الشكل٢ – ١٣). تستمر إنزيمات الهيليكيز فى التقدم أمام شوكة التناسخ لفصل سلسلتى د ن أ القالب تمهيداً لعمل إنزيمات البلمرة . ويبين الشكل (٢ – ١٤) تجربة لاختبار الطريقة التى تعمل بها إنزيمات الهيليكيزيز .

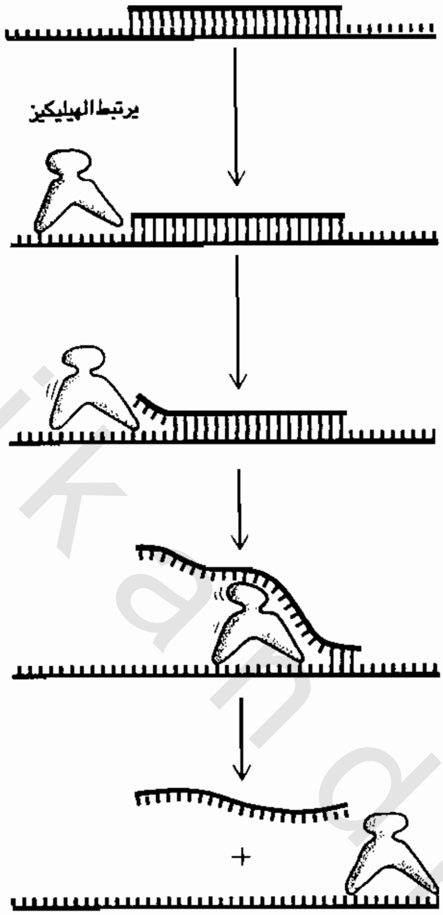
من جهة أخرى وجد أن سلسلة القالب عندما يكون فى صورة مفردة فإنها تكون معرضة للأنثناء أو الانطباق على نفسها بسرعة وبسهولة فى المناطق المفردة لميلها الطبيعى لتكوين مناطق مزدوجة بين أزواج القواعد المتقابلة ولو بطريقة خاطئة مكونة عروات تشبه دبوس الشعر hairpin مما يعيق عملية التناسخ . توجد مجموعة بروتينات خاصة تقوم بالارتباط بسرعة بالمناطق المفردة من سلسلة القالب لتثبيت هذه المناطق والمحافظة عليها مفرودة وممتدة بدون انحناءات أو انثناءات 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 (٢ – ١٥) كيفية عمل هذه البروتينات .



الشكل (٢ - ١٣):

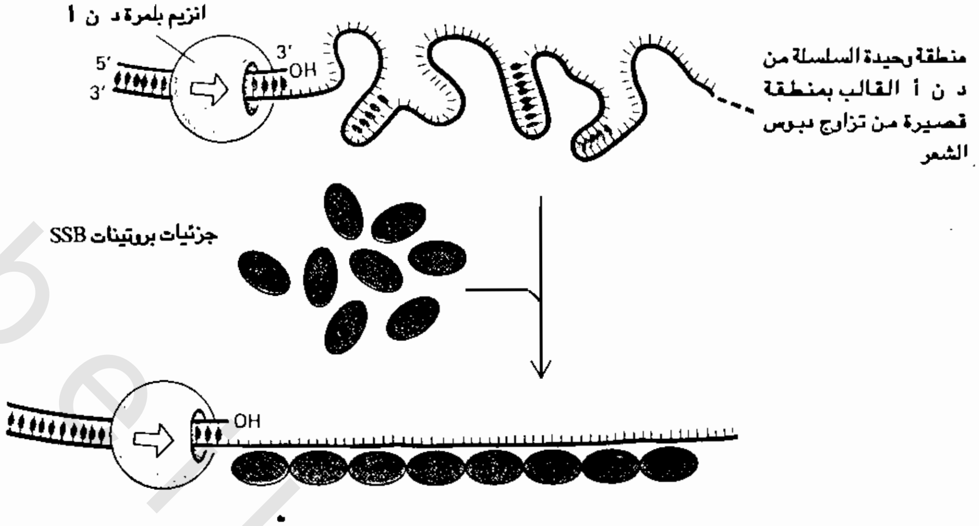
تقوم إنزيمات الهيليكيزيز Helicases بفك حلزنة د ن أ أمام شوكة التناسخ . يتحرك البروتين (Rep protein) وهو من أنواع الهيليكيزعلى أحد السلسلتين فى الاتجاه '5 <-- '3 فى حين يتحرك انزيم هيليكيز آخـر (هيليكيز I أو II) على السلسلة المكملة فى الاتجاه '3 <-- '5 .



الشكل (٢ - ١٤):

تجربة لاختبار ميكانيكية عمل انزيمات الهيليكيزيز . يتم إعادة إتحاد 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 الهيليكيز على سلسلة د ن أ محرراً الشظية القصيرة من د ن أ ويحتاج هذا التفاعل إلى وجود جميع بروتينات الهيليكيز و ATP .

obeikandi.com



يؤدى ارتباط البروتينات إلى فرد منطقة من السلسلة المفرده

الشكل (٢ - ١٥):
تأثير بروتينات SSB على تركيب السلسلة المفردة من جزئ د ن أ أثناء عملية التناسخ بحيث يؤدى ارتباط هذه البروتينات بالسلسلة المفردة إلى منع انثنائها قبيل عملية التناسخ مما يسهل مرور انزيم بلمرة د ن أ على القالب المفرود .

وجد أن هذه البروتبنات لا تحتاج إلى طاقة من ATP ولم يتحدد لها حتى الآن دور إنزيمى معين ، تتكون من أربعة تحت وحدات Subunits طول كل منها ١٧٧ حامض أمينى بحيث ترتبط كل وحدة رباعية Tetramer بمجموعات متجاورة من النيوكليتدات على السلسلة المفردة طولها ٣٢ نيوكلتيده . يؤدى ارتباط وحدة من SSB بمنطقة ما إلى تشجيع أو حفز ارتباط وحدة أخرى من SSB بمنطقة مجاورة على السلسلة ويطلق على هذه العملية الارتباط التعاونى binding C0-operative .

تركيب أنزيم 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 وحدات من متعدد البتيد تكون معاً إنزيم كامل Holoenzyme ولابد أن توجد هذه الوحدات جميعاً معاً حتى يمكن للإنزيم أن يقوم بوظائفه

على الوجه الأكمل . وجد أن واحدة من هذه الوحدات وتسمى ∝ تقوم بنشاط الهدم الطرفى 5' --> 3' exonuclease بالإضافة إلى وظيفة البلمرة فى حين تقوم الوحدة E بالهدم الطرفى فى الاتجاه 5' --> 3' . ترتبط واحدة أو أكثر من الوحدات الأخرى بجزئ ATP حتى يمكن بدء الاستطالة عند النهاية 3' H لبادئ ر ن أ.

يبين الجدول ٢ ـ ٢ أنواع البروتينات المشاركة فى تناسخ جزئ د ن أ فى بكتريا القولون وملخصاً لوظائف كل منها .

الجدول ٢ ـ ٢ أنواع البروتينات المشاركة
فى تناسخ د ن أ فى بكتريا القولون E. coli

اسم البروتين	الكتلة (Kdal)	عدد تحت الوحدات	الوظيفة
SSB	٧٤	٤	الارتباط بالسلسلة المفردة
Protein i	٦٦	٣	تجميع البريموسوم ونشاطه
Protein n	٢٨	٢	
Protein n'	٧٦	١	
Protein n"	١٧	١	
Dna C	٢٩	١	
Dna B	٣٠٠	٦	
Primase	٦٠	١	بناء البادئ ر ن أ.
Pol III Holoenzyne	(٧٦٠)	(٢)	
∝	١٤٠	١	البلمرة exonuclease 5' --> 3'
E	٢٥	١	exonuclease 3' --> 5'
θ	١٠	١	
β	٣٧	١	٢x استطالة السلسلة د ن أ.
γ	٥٢	١	الجديدة
δ	٣٢	١	
T	٨٣	١	
Pol I	١٠٢	١	ملئ الفجوات وإزالة بادئ ر ن أ.

Obeikandi.com

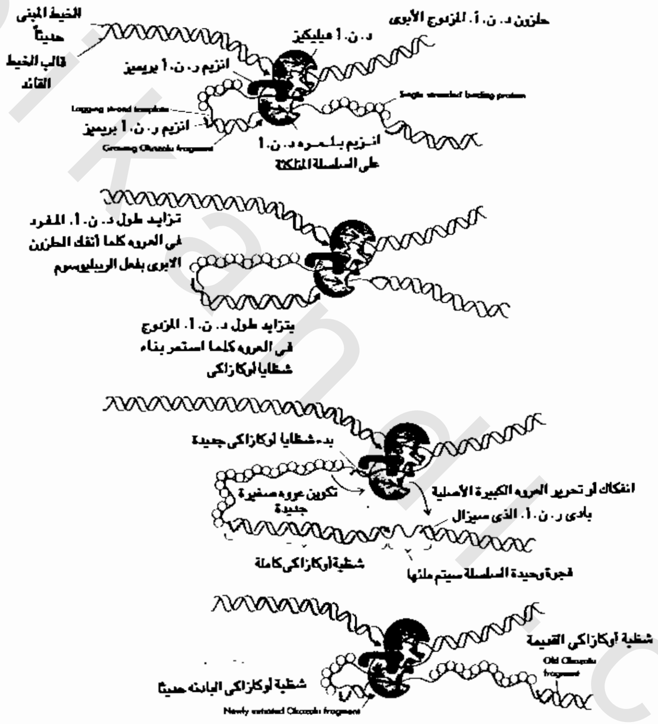
تابع جدول ٢ ـ ٢

اسم البروتين	الكتلة (Kdal)	عدد تحت الوحدات	الوظيفة
Ligase	٧٤	١	اللحام بين شظايا أوكازاكى
Topoisomerase II (Gyrase)	٤٠٠	٤	زيادة الحلزنة
Gyr A	٢١٠	٢	
Gyr B	١٩٠	٢	
Rep Protein	٦٥	١	فك الحلزون وفصل سلسلتى د ن أ
Helicase II	٧٥	١	فك الحلزون وفصل سلسلتى د ن أ
Dna A	٤٨	٤	نقطة بداية التناسخ فى د ن أ
Topoisomerase I	١٠٠		استرخاء الحلزون الفائق السلبى.

تقوم هذه البروتينات بالعمل فى تنسيق تام مع بعضها ويطلق عليها فى مجموعها ماكينة التناسخ Replication machine مما يؤدى 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 . وجد أن هناك جزيئين من إنزيم DNA Pol III عند شوكة التناسخ مما أدى إلى افتراض أن مثل هذا الثنائى الإنزيمى يمكن أن يقوم بإدارة عملية استطالة كلاً من الخيطين القائد والتابع فى نفس الوقت .يتطلب ذلك أن ينثنى الخيط التابع إلى الخلف (ربما وراء Pol III) حتى يمكنه أن يرتبط بمكونات البلمرة فى نفس اتجاه الخيط القائد . طبقاً لهذا الافتراض فإن البادئ المتكون بفعل البريموسوم سيكون مغطى بواسطة DNA Pol III عندما يكون قالب الخيط التابع ماراً من خلال معقد الإنزيم Pol III . عندما تصل السلسلة النامية إلى شظية أوكازاكى 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

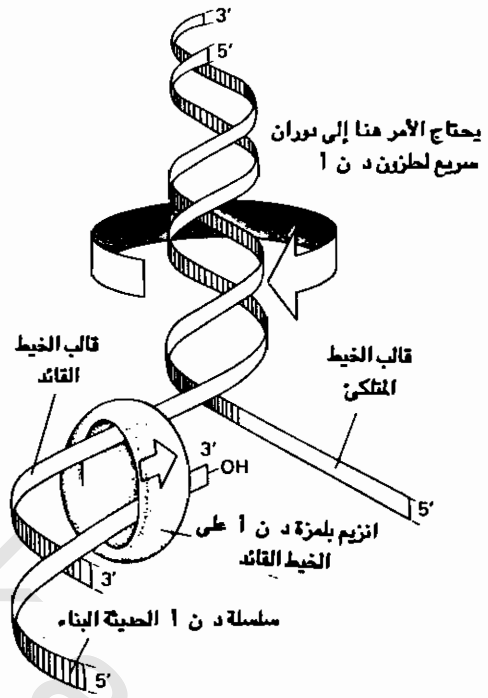
فى تكوين شظية أوكازكى التالية . بهذه الميكانيكية لن يكون الفرق كبيراً بين معدل بناء واستطالة الخيط القائد والخيط التابع .

بالإضافة إلى ذلك سيتم انفصال البريموسوم عن د ن أ القالب بنفس السرعة التى تتحرك بها مكونات جزئ DNA Pol III المشاركة فى بلمرة د ن أ يطلق على معقد البروتينات المشاركة فى تناسخ د ن أ والتى تشمل جزيئين من DNA Pol III والبريموسوم اسم ريبليوسوم Repliosome (وهى عادة تكون فى حجم الريبوسوم) ويوضح الشكل رقم (٢ - ١٦) الدور الذى تقوم به كل من هذه البروتينات فى عملية تناسخ د ن أ



الشكل رقم (٢ - ١٦):

البناء المتزامن لكل من الخيط القائد والمتلكئ عن طريق معقد ثنائى من إنزيم بلمرة د ن أ III (انزيم كامل المرتبط بالبريموسوم والهيليكيزيز (ويطلق على مجموعة المعقد اسم الريبليوسوم) .



الشكل (٢ - ١٧):

عملية فك الحلزنة أثناء تناسخ جزئ د ن أ ولكى يتم تحرك شوكة التناسخ فى البكتريا بسرعة ٥٠٠ نيوكلتيده فى الثانية فإن الحلزون المزدوج أمام الشوكة لابد أن يدور بسرعة ٥٠ نيوكلتيده فى الثانية .

دور انزيمات Topoisomerase فى تناسخ د ن أ

أن رسم الحلزون المزدوج لجزئ د ن أ « كسلم مسطح » لا يأخذ فى الاعتبار مشكله الدوران أو الالتفاف Winding الذى يحدث أثناء تناسخ د ن أ من المعروف أن كل ١٠ أزواج من القواعد توازى دورة التفاف كاملة حول محور الحلزون المزدوج الأصلى . معنى ذلك أنه لكى تتحرك شوكة التناسخ فإنه يتحتم على جميع أجزاء الكروموسوم التى تسبق الشوكة أن تدور بسرعة (الشكل رقم ٢ - ١٧) مما يتطلب استهلاك مقدار كبير من الطاقة وعلى الأخص فى حالة الكروموسومات الطويلة نسبياً . لجأت الخلية إلى ميكانيكية بديلة أثناء عملية التناسخ عن طريق تكوين محور ارتكاز للدوران "Swivel" فى جزئ د ن أ بواسطة

بروتينات خاصة يطلق عليها DNA Topoisomerases . يمكن اعتبار هذه المجموعة من البروتينات بمثابة انزيمات تحليل مائى نووى عكسية "Reversible nucleases" حيث تضيف نفسها تساهمياً لمجموعات 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 يحدث التئام (لحام) سريع بدون الحاجة إلى مصدر طاقة إضافى . يجب الاشارة هنا إلى أن عملية إعادة الالتحام هنا تختلف عما يحدث عن طريق انزيم اللحام DNA Ligase الذى سبقت الاشارة إليه .

يوجد نوعين من Topoisomerases الأول يسمى Topoisomerase I ويحدث تأثيره عن طريق إحداث كسر (أو ثغره صغيرة) "Nick" فى إحدى سلسلتى الحلزون المزدوج فقط أى أنه يعمل على مستوى السلاسل المفردة . يؤدى القطع أو الكسر الصغير هذا إلى السماح لقسمى حلزون د ن أ الموجودين على جانبى الكسر بالدوران بحرية بالنسبة لبعضها البعض بحيث تستخدم الرابطة الفوسفواستير الثنائية فى السلسلة المقابلة للكسر كنقطة إرتكاز للدوران (الشكل رقم ٢ – ١٨) 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 المنطقة التى تسبق مباشرة شوكة التناسخ . يحدث نفس الشئ أثناء عملية نسخ Transcription د ن أ لتكوين ر ن أ.

أما النوع الثانى من هذه الانزيمات فيسمى Topoisomerase II ويقوم بدوره عن طريق تكوين رابطة تساهمية مع كل من السلسلتين فى الحلزون المزدوج لجزئ د ن أ فى نفس الوقت ، أى أنه يعمل على مستوى الخيط المزدوج للجزئ مما يسبب قطع مؤقت فى 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:

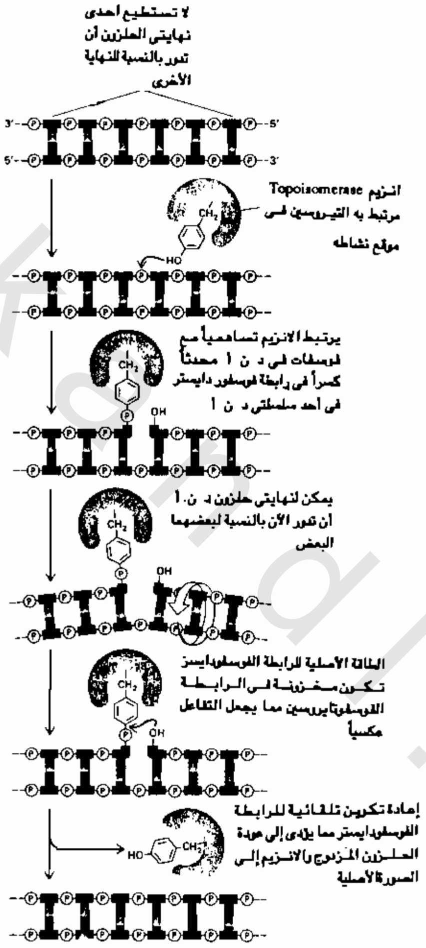
1 – يكسر أحد الحلزونين المزدوجين (عكسياً) مما يؤدى إلى إنشاء بوابة فى د ن أ.

obeikandi.com

2 – يمر جزئ د ن أ مزدوج آخر من خلال هذا الكسر (البوابة) .

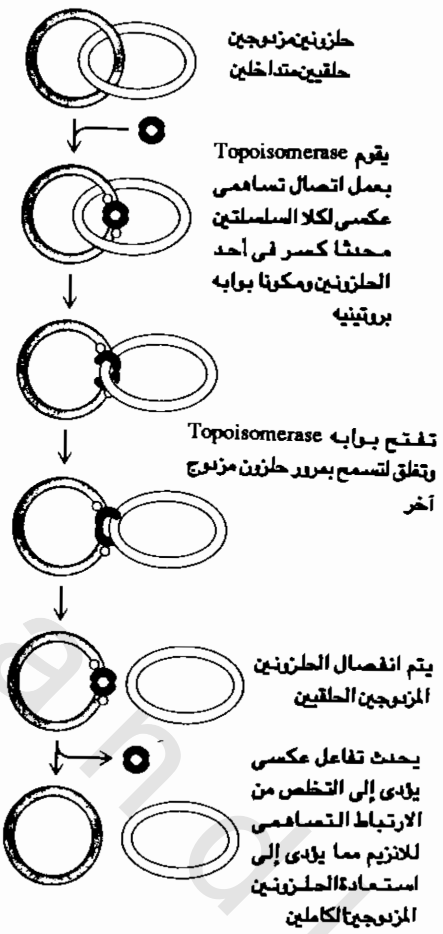
3 – يعيد التحام الكسر ثم ينفصل عن د ن أ.

بهذه الكيفية فإن انزيم DNA Topoisomerase II يمكنه بكفاءه أن يقوم بفض الاشتباك بين جزيئين حلقين من د ن أ كما فى الشكل رقم (٢ – ١٩) . يقضى هذا التفاعل نفسه على مشكلة التشابك وتعقد جزئ د ن أ "Tangling" التى كانت تـحدث أثنـاء تناسـخ د ن أ .



الشكل (٢ - ١٨):

تفاعل احداث ثغرة عكسية (nicking) الذى يتم فى د ن أ مميزه النواه بمساعدة انزيم Topoisomerase I حيث تكون هذه الانزيمات رابطة تساهمية مؤقتة مع جزئ د ن أ.

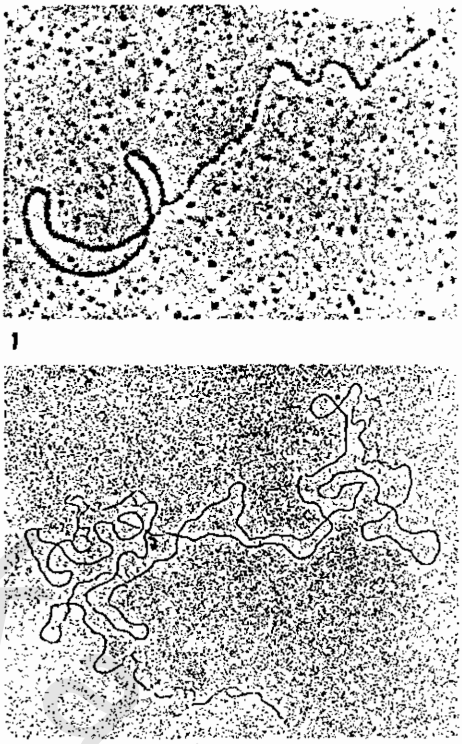


الشكل (٢ - ١٩):

ميكانيكية عمل انزيم Topoisomerase II فى فصل جزيئين حلقيين من د ن أ أثناء التناسخ ويحتاج هذا الانزيم إلى ATP لأداء وظيفته . يوجد هذا الانزيم فى كل من الخلايا غير مميزة النواه ومميزه النواه .

أمكن تأكيد دور انزيم Topoisomerase II فى تجربة على إحدى سلالات الخميرة الطافرة الحساسة للحرارة بحيث يوجد بها أحد صور Topoisomerase II التى يتوقف نشاطها عند درجة حرارة ٣٧°م فعند تسخين خلايا الخميرة هذه إلى هذه الدرجة تظل كروموسوماتها متشابكة فى الميتوزى ولا تقدر على الانفصال .

obeikandi.com



أ

ب

الشكل (٢-٢٠):

صورة بالمجهر الالكترونى للمراحل الوسطية فى الدوائر المتدحرجة : (أ) د ن أ الفيرس Ø x 174 وحيد السلسلة . (ب) تناسخ الجزئ الثنائى السلسلة للفاج P_2 فى (ب) استخدمت ظروف للدنترة الجزئية لكى يتم إظهار التتابعات المتناظرة بين أجزاء الدائرة وذيلها .

نموذج الدوائر المتدحرجة لتناسخ د ن أ الحلقى :

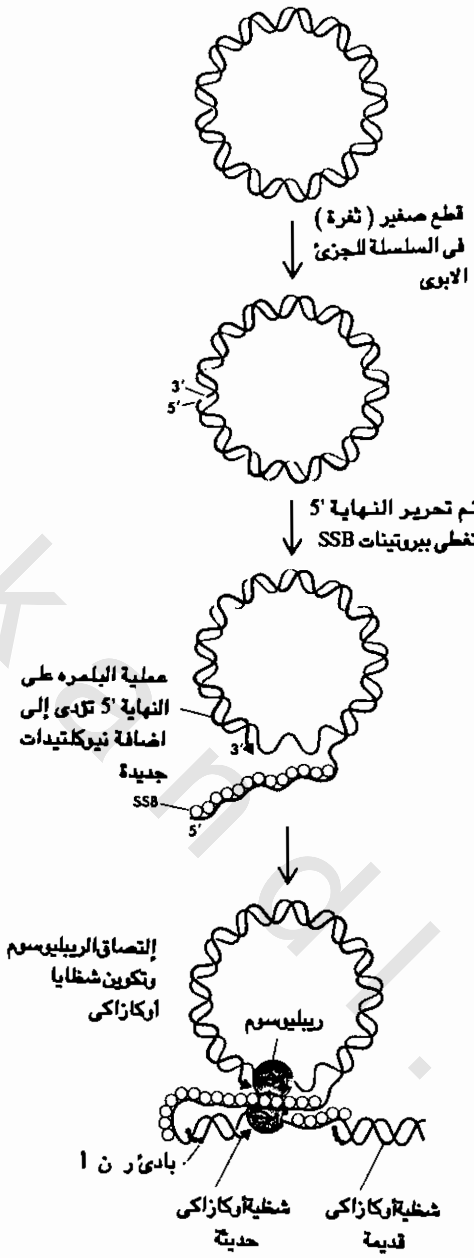
Rolling Circles

توجد طريقة بديلة لتناسخ د ن أ الحلقى فى البكتريا تسمى طريقة الدوائر المتدحرجة . يبدأ بناء د ن أ بإحداث قطع محدد عند منشأ التناسخ فى سلسلة معينة (+) من الحلقة المزدوجة الأبوية . يؤدى ذلك إلى أن تصبح النهاية '5 منفصلة عن الحلقة المزدوجة وسائبه مما يسمح لانزيم DNA Pol III بإضافة نيوكلتيدات إلى النهاية 3'.OH الحرة . مع تقدم شوكة التناسخ فإن النهاية '5 للسلسلة المكسورة ستتدحرج وتنسحب كذيل حر يزداد طولاً مع

obeikandl.com

استمرار التناسخ (الشكل رقم ٢ - ٢٠) . يتم تغطية هذا الذيل بسرعة ببروتينات SSB لمنع التواءه أو التفافة . يسمى هذا التركيب التناسخى « الدائرة المتدحرجة » Rolling circle لأن امتداد واسترخاء الذيل '5 وحيد السلسلة ينتج عن دوران الحلزون المزدوج القالب حول محوره ولا يتسبب هذا الانفكاك فى أى مشاكل توبولوجية Topological حيث أن الدائرة تظل متماسكة بسلسلة واحدة من د ن أ مما يعطيه حرية الحركة حول الروابط التساهمية الكثيرة الموجودة فى الهيكل الأساسى .

عند استخدام ميكانيكية الدائرة المتدحرجة لتناسخ د ن أ المزدوج فإن النهاية '5 (الذيل) المفردة السلسلة تتحول بسرعة إلى حلزون مزدوج نتيجة لتكوين شظايا أوكازاكى عليها . يحتمل أن القوة المحركة لاستمرار عملية فك الذيل '5 من الدائرة المتدحرجة ليست ناتجة عن تفاعلات البلمرة التى تحدث على النهاية 3' OH ولكنها ناتجة عن حركة الريبليوسوم المدفوع بمكوناته من الهليكيزيز (الشكل ٢ - ٢١) .



الشكل (٢ - ٢١):

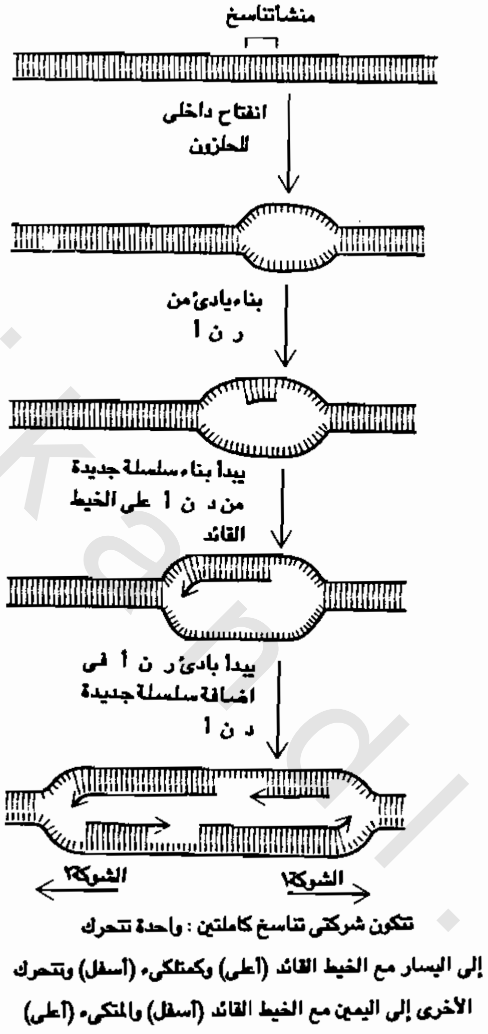
ميكانيكية الدائرة المتدحرجة لتناسخ جزئ د ن أ الحلقى . القوة المؤدية إلى فك حلزنة الذيل 5' تنتج من حركة الريبليوسوم المدفوع بمكوناته من الهيليكيزيز .

بدء شوكات التناسخ عند منشأ التناسخ

تبدأ شوكات التناسخ فى كل من البكتريا والثدييات عند تركيب معين يعرف بفقاعة التناسخ Replication bubble وهى منطقة على جزئ د ن أ يتم فيها انفصال السلسلتين المستخدمتين كقالب لبناء د ن أ (الشكل ٢ - ٢٢) وقد تبين أن هذه الفقاعة تتكون عند تتابع محدد من القواعد على الجزئ يعرف بمنشأ التناسخ Replication origin والذى يبلغ طوله حوالى ٣٠٠ نيوكلتيده . توجد مناشئ تناسخ مشابهة فى كروموسومات مميزة النواة ولو أنه لم تتحدد تتابعاتها بدقة بعد .

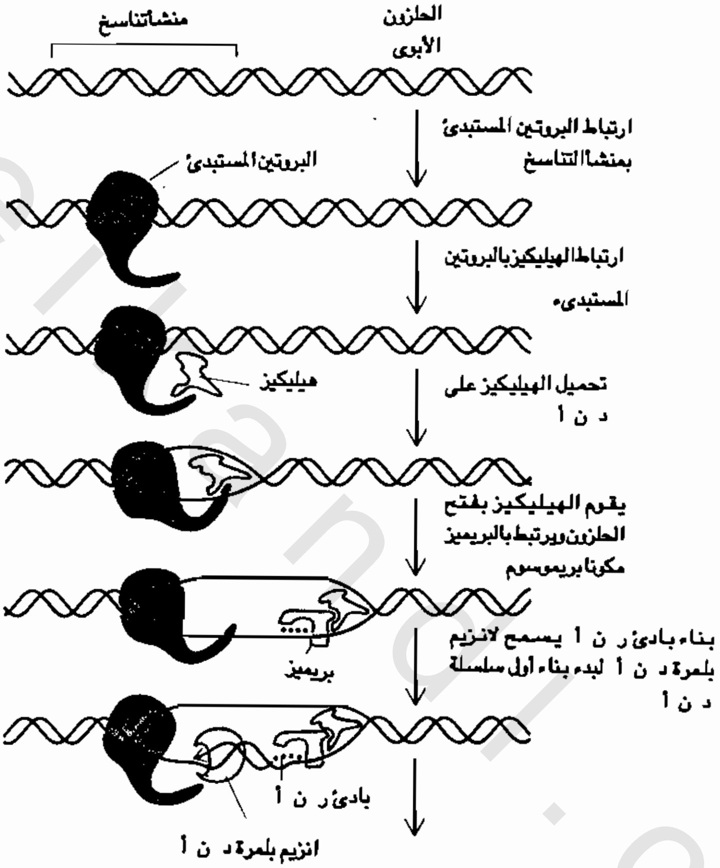
تبين فى التجارب المعملية *In vitro* أن بدء شوكة التناسخ فى البكتريا والفيرس تبدأ بالطريقة المبينة فى الشكل رقم (٢ - ٢٣) . ترتبط نسخ عديدة من البروتين المستبدئ Initiator protein بمواقع معينة عند منشأ التناسخ لتكوين معقد بروتينى كبير . يربط هذا المعقد انزيم الهيليكيز فى منطقة مفردة السلسلة من د ن أ القالب فى منطقة قريبة من الحلزون . كما يتم ارتباط انزيم بريميز DNA Primase ويتكون البريموسوم الذى يتحرك بعيداً عن المنشأ ويكون بادئ من ر ن أ الذى يبدأ السلسلة الجديدة الأولى من د ن أ يؤدى ذلك إلى تجمع سريع لبقية بروتينات التناسخ لتكوين معقدات بروتينية للتناسخ تتحرك بعيداً عن نقطة المنشأ فى الاتجاه المضاد (الشكل ٢ - ٢٢) . تستمر عملية التناسخ ثنائية الاتجاه حتى ينتهى تناسخ كل قالب د ن أ الذى يسبق كل شوكة . تتحرك كل شوكة بعيداً عن المنشأ بمعدل حوالى ٥٠٠ نيوكلتيده فى الثانية الواحدة حتى ينتهى تناسخ جزئ د ن أ بأكمله ويستغرق ذلك فى البكتريا حوالى ٣٠ - ٤٠ دقيقة فقط .

obeikandi.com



الشكل (٢ - ٢٢):

رسم تخطيطى للعمليات التى تجرى لبدء تكوين شوكات التناسخ عند مناشئ التناسخ .



الشكل (٢ - ٢٣):

شكل تخطيطى مبسط للخطوات الأولية المؤدية إلى تكوين شوكات تناسخ فى بكتريا القولون.