الفصل السابع

الشفرة الوراثية

Genetic Code

التوازى بين تتابع القواعد فى جزىء د ن أ وتتابع الاحماض الامنية فى البروتين :

Colinearity between base Sequences in DNA and amino acid sequences in protein

حيث أنه ثبت أن تتابع القواعد فى جزئ د ن أس هو الذى يحدد تتابع الأحماض الأمنية فى سلسلة متعدد البيتيد الذى يمثل الناتج النهائى Endproduct لتعبير الجين ، ونظرا لأن الكروموسوم يتكون من تتابعات خطية للجينات فإنه من البديهى أن كل منطقة تتابع نيوكلتيدى ستحدد بروتينا نوعيا بحيث نتوقع وجود تلازم أو توازٍ تام Colinearity بين تتابع القواعد فى هذه المنطقة وتتابع الاحماض الأمينية فى البروتين الناتج عنها .

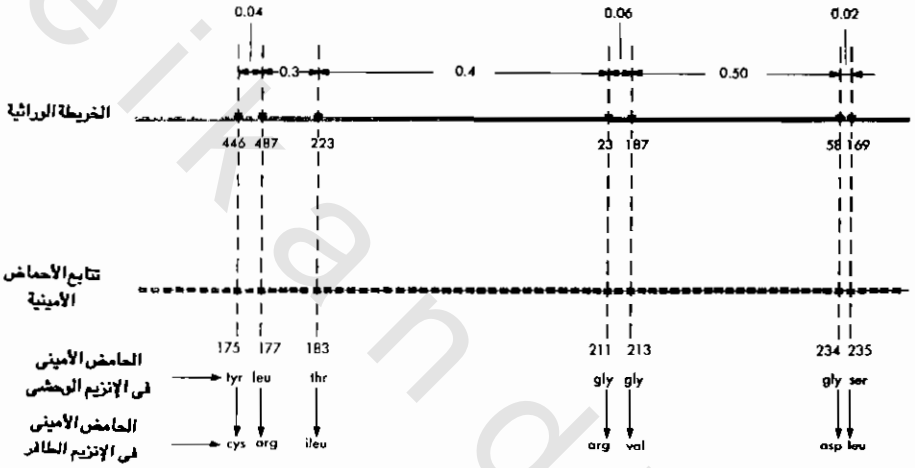
وقد أمكن التحقق من وجود هذا التوازى عند دراسة الخريطة الوراثية والجزيئية لتتابع القواعد فى جزئ د ن أ وخريطة تتابع الاحماض الامينية فى البروتين الذى تتحكم فى انتاجه إذا تمكن يانفسكى Yanofsky عام ١٩٦٤ من رسم الخريطة الوراثية للجين الذى يتحكم فى انتاج سلسله متعدد البيتيد A من انزيم تربتوفان سينثيتيز Tryptophan Synthetase فى بكتريا القولون *E. coli* . كما أمكنه التعرف على مواقع طافرات معينة باستخدام تكرارات الاتحادات الجديده حيث استخدم تقنيه رسم الخريطة الوراثية بالحذف لتحديد المواقع فى الطافرات القريبة من بعضها . كانت السلالات الطافره تحتوى على اقتضابات (حذف) تمتد على مسافات مختلفة على طول الجين A من أحد طرفيه ولكنها كانت تختلف فى المسافة التى تغطيها على طول الجين .

وبدراسة البروتين الطافر الناتج من كل من هذه الطافرات ومقارنة تتابع الاحماض الأمنية به بتلك الناتجة فى بروتين الطراز الوحشى أمكن التعرف على أماكن الإحلال لمواقع الاحماض الأمينية فى سبع طافرات . وبمقارنة خريطة البروتين بمواقع الطفرات على الخريطة الوراثية لهذا الجين ، تبين أن هناك تطابقاً بين مواقع الاحماض الامينية الخاطئة والمستبدلة فى كل بروتين طافر ومواقع حدوث طفرات الحذف مما يدل على وجود توازٍ بين تتابع القواعد فى جزئ د ن أ (الجين) وبين تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج من هذا الجين كما فى الشكل (٧ – ١) .

كما استخدم ساربهاى Sarbhaie تقنيه اخرى تشتمل على طافرات تؤثر على بناء البروتين فى رأس الفاج T4 حيث يوجد نوع من الطفرات تسمى طفره ايقاف بناء البروتين Termination قبل الأوان . وعلى ذلك فإنه إذا كان الجين والبروتين متوازيان فإن حدوث طفره من هذا النوع فى منتصف المسافة على طول الجين أثناء عملية الترجمة لابد أن تتسبب فى أن النصف الأول من البروتين سيتم بناؤه فى حين لا يحدث بناء للنصف الثانى منه ، أى من نقطه طفرة الانهاء وما بعدها وهكذا يمكن بعمل طفرات متتالية تشمل مسافات مختلفة من الجين أن نتتبع مدى الحجم الذى تم انهاء بناؤه من البروتين .

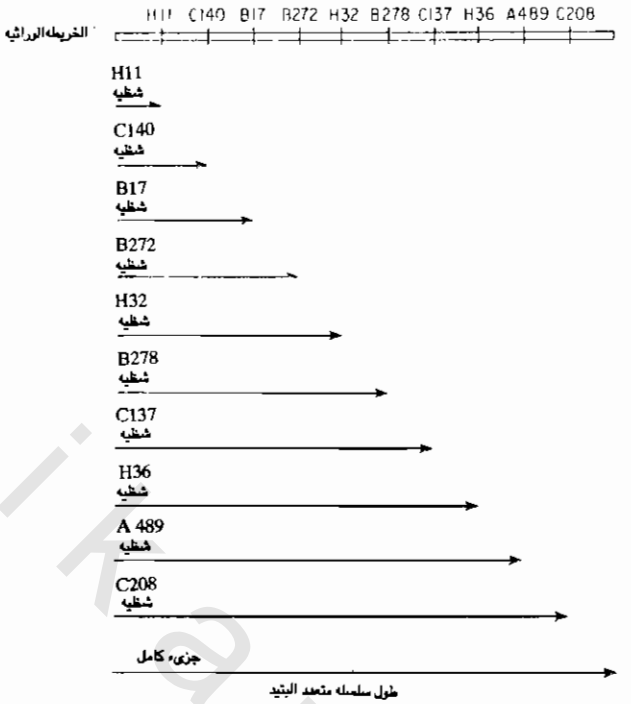
وقد أمكن باستخدام مطفرات كيماوية معينة استحداث ١٠ طافرات مختلفة فى الجين المتحكم فى بناء بروتين الرأس فى فاج T4 وأمكن رسم خريطة وراثية بطرق تحليل الاتحادات الجديدة . وقد تبين أن طفرات الانهاء المختلفة احدثت توقف لعملية بناء سلسله البروتين عند نقط مختلفة على طول السلسلة . معروف ان البروتين يبدأ بنائه من النهاية الامينية ($-NH_2$) إلى النهاية الكربوكسيلية (- CooH) ، وفى كل طفرة تبين وجود النهاية الأمينية كلسلسلة متعددة الببتيد الا ان عديدات الببتيدات التالية لهذه البداية اختلفت حسب السلاله الطافرة . إذ تبين أن الطفرات المختلفة يحتوى كل منها على بيتيدات مختلفة فى الأطوال بحيث أنه عند ترتيبها من النهاية N إلى النهاية C للبروتين ، وجد أنها تمثل بناء اطوال مختلفة من سلسله متعدد الببتيد لبروتين الفاج T4 . والاهم من ذلك أن طول كل من هذه السلاسل الببتيدية الطافرة (والتى تقل بدرجات متفاوتة عن الطول الكلى للسلسلة الوحشية للبروتين الفعال) .

تتناسب مع أماكن حدوث الطفرة على طول الجين المسئول عن انتاج هذا البروتين ، بحيث يتلازم توقف استطاله سلسله متعدد الببتيد مع مكان حدوث طفره الإنهاء فى الخريطة الوراثية للجين مما يؤكد مره أخرى مفهوم التوازى بين تتابع القواعد فى د ن أ (الجين) وبين تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج . كما فى الشكل (٧ -٢) .



الشكل (٧-١):

التوازى بين الجين (د ن أ) والناتج النهائى له (البروتين) . يتبين فى هذا الشكل الخريطة الوراثية لربع الجين المتحكم فى تتابع الأحماض الامينية لبروتين تريتوفان سينثيتز A فى بكتريا القولون . يدل الرقم 04 . مثلا على المسافة الوراثية بين الطفرتين 446 A و 487 A . وتدل الارقام بالنسبة لتتابع الاحماض الأمينية على مواقعها فى سلسلة متعدد الببتيد الجزئية (بطول 267) وتكون النهاية الأمينية إلى اليسار .



الشكل (٧-٢):

استخدام طفرات الانهاء Termination لاثبات العلاقة المتوازية بين تتابع القواعد فى الجين (د ن أ) وبين تتابع الاحماض الأمينية وطول سلسلة متعدد البيتد الناتج حيث يتناسب طول السلسله الناتجة مع موقع حدوث طفره الانهاء

الشفرة الثلاثية : Triplet code :

حيث أنه توجد أربعة أنواع من القواعد النتروجينيه فقط فى جزئ د ن أ وهى التى تقوم بتخصيص الأحماض الامينية العشرين فى البروتين ، فإنه من الضرورى أن توجد توافيق وتباديل لهذه القواعد الأربعة لكى يتسنى لها أن تفى بالتشفير لتلك الأحماض الامينية . وفى الحقيقة فإن بناء البروتين يحتاج إلى أكثر من عشرين شفره عند الأخذ فى الاعتبار اشارات البدء واشارات التوقف أو انهاء بناء سلسلة البروتين .

obeikandl.com

يسمى تتابع القواعد فى ر ن أ المراسل m RNA الموازى أو المحدد لحامض أمينى معين « الكودون » Codon لهذا الحامض الأمينى وتسمى تتابعات اشارات البدء كودونات الابتداء Start codons فى حين تسمى تتابعات اشارات الانهاء كودونات الايقاف stop codons . ويطلق على مجموع هذه الكودونات اسم الشفرة الوراثيه genetic code .

وقبل أن يكتشف سر الشفرات الوراثية فقد كان من المفترض أنه اذا كانت جميع الشفرات لابد أن تحتوى على نفس العدد من القواعد فإن كل كودون (شفرة) لابد أن تحتوى على ثلاثة قواعد على الأقل ، ويرجع ذلك الى الآتى :

لو افترضنا شفرة القاعدة الواحدة فإن ذلك يعنى أننا سيكون لدينا $٤^{١}$ = ٤ أى أربع كودونات أحادية الشفرة كما أن كودون القاعدتين سيعطينا $٤^{٢}$ = ١٦ كودون وهذا العدد لازال قاصرا عن الوفاء بالعدد المطلوب من الشفرات حيث لابد أن يزيد عن ٢٠ كودون . وعلى ذلك فإن الكودون ثلاثى القاعدة سيكون أكثر ملائمة لاعطائنا العدد المطلوب وأكثر اذ سنحصل على $٤^{٣}$ = ٦٤ كودون وقد تبين بعد ذلك أن الشفرة الوراثية ثلاثية الأحرف بالفعل وأن جميع الشفرات الأربعة والستون المحتملة تحمل معلومات وراثية بطريقة أو أخرى . وكما سنعلم فيما بعد يمكن أن تعين أكثر من شفرة أو كودون واحد للتشفير لنفس الحامض الأمينى .

الأدلة الوراثية على ثلاثية الشفرة :

Genetic evidence for a triplet code

فى البكتريوفاج T_4 الخاص ببكتريا القولون تبين أنه اذا تمت تنمية هذا الفاج فى بيئة محتوية على المطفر الكيماوى بروفلاڤين Proflavin الذى يتداخل مع الأسطح المتراصة المفلطحة للقواعد فى جزئ د ن أ فإنه ينتج طفرات حذف أو طفرات اضافة لقاعدة واحدة مما يؤدى الى طفرات تحريك الاطار Frame shift mutation نظرا لأن القواعد تقرأ بالتتابع كما هو موضح فيما يلى :

5' - AGU CAG UCA GUC AGU CAG UCA GUC - 3'

اتجاه القراءة

وعلى ذلك فإن أى من طفرة الاضافة أو الحذف سيؤدى كل منهما الى تحريك أو تغيير اطار القراءة لوحدات الكودونات الخاصة بالأحماض الأمينية الداخلة فى بروتين نوعى معين حيث نجد أن كل حامض أمينى يلى القاعدة المضافة مثلا سيكون مختلف كما يلى :

Ser His Phe Asp Lys Leu

mRNA من د ن أ الأصلى : 5' - AGC CAC UUA GAC AAA CUA - 3'

↓

mRNA من د ن أ المضاف 5' - AGC ACA CUU AGA CAA ACU A - 3'

إليه القاعدة :

Ser Thr Leu Arg Gln Thr

وقد تبين بالفعل وجود طفرات للفاج T_4 فى النسل تسمى طافرات تحريك الاطار وهى تنشأ بمعدل $١٠^{-٥} - ١٠^{-٦}$. واذا نميت طافرات تحريك الاطار مرة أخرى فى بيئة محتوية على المطفر بروفلافين فان بعض الفاج سيظهر بحيث يستعيد الطراز المظهرى الوحشى لتتابع الأحماض الأمينية فى البروتين . وقد أجريت تجربة لتحديد أى من الأحداث الطفرية ستكون مسئولة عن استعادة الطراز الوحشى . وباستبعاد احتمال حدوث طفرة حذف قاعدة فى نفس موقع طفرة الاضافة للقاعدة السابقة ، نظرا لأن هذا الاحتمال ضعيف جدا ، فإنه قد تبين أن حدوث طفرة حذف فى موقع قاعدة أخرى قريبة من موقع الاضافة الأول قد يؤدى الى استعادة اطار القراءة الصحيح وفى بعض الأحيان قد ينتج عنها بروتين فعال بيولوجيا على الرغم من أن تتابعات الأحماض الأمينية بأكملها فى الطراز الوحشى للبروتين الأصلى لن تكون متطابقة مع تلك الناتجة عن الطفرتين (الاضافة والحذف) . وقد تبين أن ذلك هو ما يحدث بالفعل عند دراسة مجموعة من الطافرات المستحدثة بالبروفلافين فى الجين rIIB لفاج T_4 الخاص ببكتريا القولون حيث ظهر أن الجمع بين هذه الأحداث الطفرية المتضادة سيعطى نفس التأثير . يحتوى بروتين rIIB لفاج T4 على منطقة يمكن تغيير أو احلال Substitution

عدد كبير من الأحماض الأمينية بها دون أن تتغير أو تتأثر فعالية البروتين بشكل ملحوظ إلا أنه حتى فى هذه المنطقة يمكن للبروفلافين استحداث طفرات تؤدى الى إيقاف نشاط البروتين تماما . يحدث عادة عند التهجين بين سلالتين من الفاج كل منها تحمل طفرة مختلفة فى نفس الجين ، وذلك عن طريق العدوى المشتركة لبكتريا القولون بهاتين الطفرتين ، أن بعض الطرز الوحشية للفاج ستنشأ عن الاتحادات الوراثية بين موقعى الطفرتين . ولكن عندما يتم التهجين بين طفرتى بروفلافين عشوائيين لـ rII فإنه لاينتج باستمرار نسل فاج نو طراز وحشى .

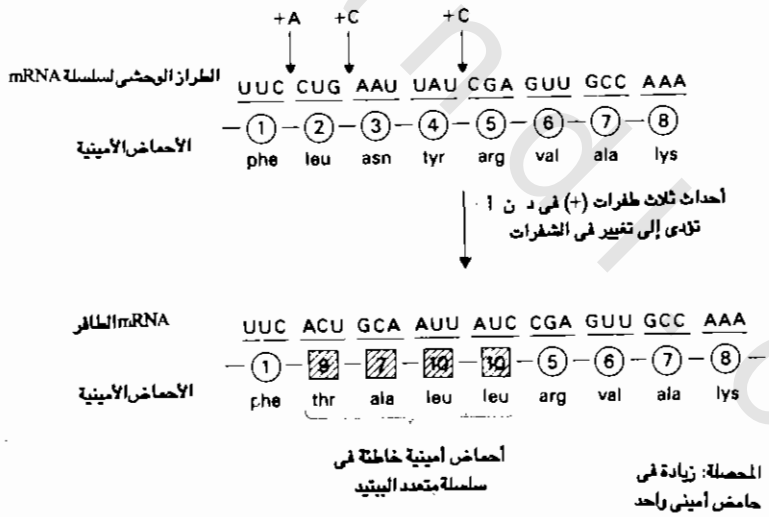
أثبتت نتائج الاتحادات الجديدة أن الطافرات يمكن تصنيفها فى مجموعتين محددتين تسمى إحداهما المجموعة (+) والأخرى (-) وأن التهجين بين طافرتين أحدهما يتبع المجموعة (+) والأخرى تتبع المجموعة (-) (أى من نوعين مختلفين) سيؤدى الى الحصول على الطراز المظهرى الوحشى للبروتين الناتج . فى حين لايمكن الحصول على هذه النتيجة لو تم التهجين بين طرازين من نفس المجموعة أى بين (-) ، (-) أو بين (+) ، (+) .

أمكن تفسير هذه النتائج على النحو التالى :

يمكن اعتبار أن مجموعة الطافرات (+) تكون محتوية على اضافة لقاعدة واحدة فى حين أن المجموعة (-) تعد ذات نقص لقاعدة واحدة وأن الطافرات المزدوجة من النوع (+) (+) أو (-) (-) ستحتوى على قاعدتى اضافة أو تنقص فى قاعدتين على الترتيب . وأن كل طفرة مزدوجة متشابهة ستؤدى الى تحريك اطار القراءة بمعدل قاعدتين ومثل هذا التحريك من شأنه الا يعطى طرازا مظهريا وحشيا للبروتين حيث لن يتكون بروتين فعال . ولكن فى حالة الطفرة المزدوجة غير المتشابهة (+) (-) الناتجة عن الاتحادات الجديدة فإنه على الرغم من أن تحريك اطار القراءة الذى تم فى النقطة التالية لموقع طفرة الاضافة (+) سيؤدى الى قراءة غير صحيحة للاطار وبالتالى سيؤدى الى ادخال أحماض أمينية خاطئة ، إلا أن هذا سرعان ما يتم تصحيحه عند النقطة التالية لطفرة الحذف التالية (-) حيث سيستعاد اطار القراءة الصحيح مرة أخرى فيما يلى هذه النقطة مباشرة . وفيما بين موقعى الاضافة (+) والحذف (-) سيكون تتابع الأحماض الأمينية غير صحيح فى سلسلة متعدد الببتيد ولن يتطابق فى هذه المسافة مع تتابعه فى البروتين الوحشى ولكن طالما أن كلا الطفرتين تقعان فى منطقة لايؤثر تغيير الأحماض الأمينية بها كثيرا فى فعالية البروتين الناتج فإن الجمع بين (+) (-) أو (-) (+) سينتج بروتينا فعالا . بمعنى أنه اذا تم استعادة اطار القراءة قبل الوصول الى

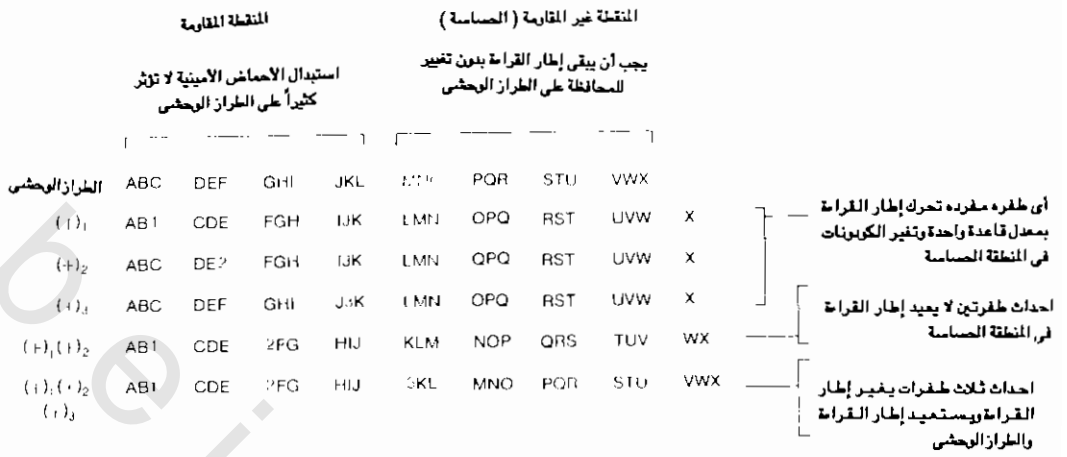
منطقة حرجة لاتتحمل التغيير فى تتابع الأحماض الأمينية فإنه يمكن انتاج بروتينات فعالة ويقال للبروتين الناتج بأنه شبيه بالطراز الوحشى pseudo-wild type protein .

وبهذا المنطق فإن طفرة رجعية للطفرة (+) لابد أن تكون قد نتجت عن استحداث طفرة أخرى من المجموعة (−) فى موقع آخر قريب . وواضح أن طفرات مزدوجة من نفس المجموعة (+) (+) أو (−) (−) لن تستطيع استعادة الإطار الصحيح للقراءة نظرا لأن الشفرة الوراثية لايمكن أن تكون ثنائية الأحرف ، إذ أنه لو كانت ثنائية الأحرف لأمكن استعادة إطار القراءة فى مثل هذه الطفرات المزدوجة المتشابهة . من جهة أخرى ، وجد أنه عند اجراء اتحاد بين ثلاث طفرات من نفس المجموعة أى (+ + +) (− − −) أمكن استعادة الطراز الوحشى للبروتين فى حين أن الجمع بين طفرات ثلاثية مختلطة (+) (+) (−) أو (−) (−) (+) لن يعطى بروتينا وحشيا . تبين أنه اذا كانت مواقع الطفرات الثلاثية المتشابهة قريبة جدا من بعضها على جزئ د.ن.أ. فإنها ستنتج بروتين شبيه بالطراز الوحشى حيث سيكون تتتابع الأحماض الأمينية فيه مشابها للطراز الوحشى فيما عدا مواقع حدوث الطفرات الثلاثية كما فى الشكل (٧-٣) . يؤكد ذلك أن الشفرة الوراثية ثلاثية الأحرف Triplet ، ويبين الشكل (٧-٤) كيف أن توافيق من ثلاثة طفرات متشابهة (+ + +) أو (− − −) فقط هى التى ستنتج طراز مظهريا وحشيا للبروتين .



الشكل (٧ - ٣) ؛

شكل تخطيطى يبين كيف يمكن استعادة اطار قراءة mRNA أثناء الترجمة عن طريق احداث ثلاث طفرات اضافة متقاربة لثلاث نيوكلتيدات فى جزئ د ن أ وتكون النتيجة زيادة حامض أمينى واحد فى سلسلة متعدد الببتيد .

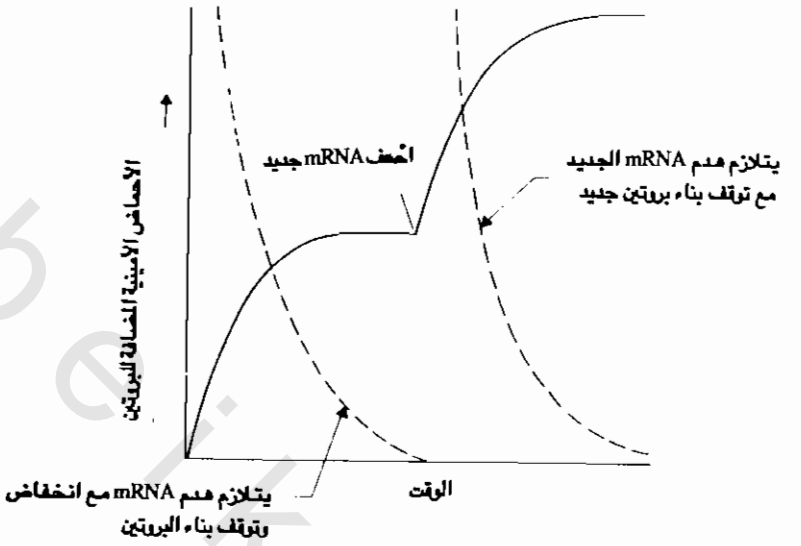


الشكل (٧ - ٤) :

شكل تخطيطى لاثبات أن أحداث ثلاث طفرات اضافة (طفرة القاعدة الواحدة) (١ ، ٢ ، ٣ غير المظللة) وليس اثنتان تؤدى الى استعادة اطار القراءة فى المنطقة غير المقاومة (مظللة) فى بروتين rII للفاج T4 وذلك اذا كانت الشفرة الوراثية ثلاثية . سيكون هناك حامض أمينى زائد فى المنطقة المقاومة للتراكيب (+) ، (+) ، (+) ولكن ذلك لايؤدى الى طراز طافر .

استنباط الشفرة الوراثية Dicephring of the genetic code :

اعتمدت التجارب البيوكيماوية للتعرف على الشفرات الوراثية الدالة على الأحماض الأمينية المختلفة على استخدام نظام بناء البروتين فى المعمل *In vitro* فى نظام خارج الخلية cell free system ؛ حيث وجد نيرنبرج Nirenberg عام ١٩٦١ أنه يمكن استخدام مستخلص من خلايا بكتريا القولون المحتوى على الريبوسومات و ر.ن.أ. الناقل tRNA وانزيمات أمينواسيل سينثيتيز Aminoacyl synthetases و ر ن أ المراسل mRNA والأحماض الأمينية فى بناء سلاسل متعدد الببتيد فى المعمل *In vitro* إلا أن هذا التفاعل يستمر لفترة قصيرة (دقائق معدودة) ثم يتوقف إلا اذا اضيف اليه mRNA تركيبى جديد كما فى الشكل (٧-٥) .



الشكل (٧ - ٥) :

شكل تخطيطى يبين اعتماد استمرار بناء البروتين معمليا على توفر mRNA . ينخفض معدل بناء البروتين كلما حدث هدم لجزئيات mRNA ثم يرتفع معدل البناء مرة أخرى عند اضافة جزئيات جديدة من mRNA .

وقد اعتبر ذلك اكتشافا هاما حيث أنه عندما يتم استهلاك mRNA الطبيعى فإنه يمكن استخدام mRNA تركيبى مخلق انزيميا فى هذا النظام . وجد أن فاعلية مثل هذا النوع من mRNA التركيبى تكون ضعيفة الا اذا تم تغيير الوسط الأيونى واضافة بعض المكونات الأخرى حيث تبدأ الترجمة فى أماكن عشوائية بدون الحاجة الى كودون البدء .

وسوف نستعرض شرحا موجزا لبعض التقنيات الرئيسية التى استخدمت فى استنباط الشفرة الوراثية .

أولا : تقنية المتعدد النيوكلتيدى المتجانس Homopolymers :

فى التجارب الأولية ، استخدم نيرنبرج ومثاى Nirenberg and Mathaie سلسلة من التفاعلات تحتوى كل منها على ٢٠ حامض أمينى ولكن بشرط وجود حامض أمينى واحد فى

كل أنبوبة معلم بالاشعاع وبقية الأحماض التسعة عشر غير معلمة فى كل تجربة . وتحتوى كل أنبوبة على جميع المكونات الأخرى اللازمة لبناء البروتين فى المعمل *In vitro* فيما عدا mRNA الطبيعى . ثم يضاف لكل مخلوط تفاعل mRNA تركيبى مكون من تتابعات مترادفة من نفس القاعدة : مثلا PolyU . وقد أمكن تخليق هذه النوعيات من mRNA الصناعى باستخدام نشاط انزيم Polynucleotide phosphorylase الذى يساعد فى التفاعل التالى :

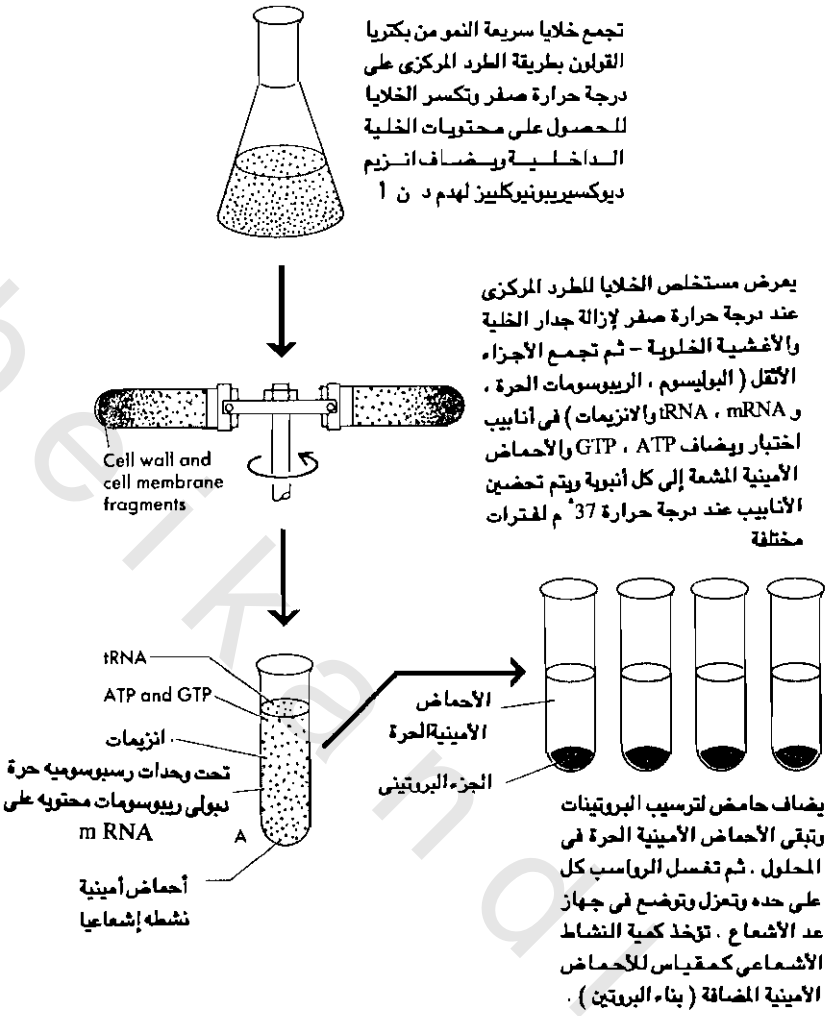
$$\underset{\text{mRNA}}{\text{RNA}} + \text{Pi} \underset{}{\overset{\text{E}}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{Ribonucleoside diphosphate}}{\text{X DP}}$$

وعادة يتم التفاعل من اليسار الى اليمين ولكن فى وجود وفرة من ثنائى الفوسفات فإن التفاعل يجبر على الاتجاه من اليمين الى اليسار أى فى اتجاه تكوين mRNA تركيبى . بعد تحضين مخاليط التفاعل مع mRNA التركيبى الأحادى القاعدة Homopolymer (أى المكون من قاعدة من نوع واحد متكرر ترادفيا فى متعدد النيوكلتيد) ، يتم ترسيب البروتين المتكون فى كل أنبوبة بإضافة ثلاثى كلورات الخليك TCA ، ثم يكشف عن وجود الاشعاع فى البروتين المترسب والتى يستدل بها على نوع الحامض الأمينى المعلم بالاشعاع الذى تم ادخاله فى سلسلة متعدد الببتيد النوعى . وقد وجد أن PolyU يؤدى إلى ادخال حامض الفينيل الانين المشع فقط فى البروتين المترسب وذلك بصورة مترادفة . ونتيجة لذلك فقد أمكن استنتاج أن UUU لابد أن يكون هو الكودون المسئول عن التشفير لحامض الفينيل الانين . ويعد هذا أول كودون تمت معرفته فى الشفرة الوراثية بصفة عامة .

كما أمكن بتجارب مشابهة معرفة أن AAA يشفر لليسين فى حين يشفر الكودون CCC للبرولين إلا أن GGG لم يمكن تحديد أى من الأحماض الأمينية يشفر له فى ذلك الوقت نظراً لصعوبة ارتباط PolyG بالريبوسومات .

والشكل (٧-٦) يبين بعض التفاصيل الخاصة بعملية بناء البروتين معمليا *In Vitro* .

obeikandi.com



الشكل (٧-٦): رسم تخطيطى لعملية بناء البروتين معمليا *In Vitro* .

ثانيا : تقنية البوليميرات المختلطة العشوائية Random Copolymers :

كانت الخطوة التالية هى تخليق بوليميرات من mRNA وتحديد الشفرات الوراثية فى تجارب معملية مشابهة لما سبق الاشارة اليه . واستنادا الى قانون الاحتمالات ، لنفترض اننا قمنا بتخليق بوليمر مختلط عشوائى متعدد النيوكلتيدات باستخدام انزيم Polynucleotide phosphatase مع اضافة كلا من UDP ، GDP بنسبة ٥ : ١ أى :

$$5n\ UDP + n\ GDP \xrightarrow{E} (U\ 5G)\ n + 6\ nPi$$

فإن الاحتمال النسبى للحصول على ثلاثى قواعد يحتوى على ثلاث قواعد من نوع U فقط فى هذا المتعدد سيكون ٥ × ٥ × ٥ = ١٢٥ فى حين أن الاحتمال النسبى للحصول على ثلاثى يحتوى على U واحدة واثنان من G سيكون : ١ × ١ × ٥ = ٥ فإذا كانت الشفرة U3 UUU = تشفر للفينيل الانين كما سبق القول ، UG2 تشفر للحامض الأمينى المجهول X فإنه يمكن أن نتوقع أن تكرار إضافة حامض الفينل الانين الى سلسلة متعدد الببتيد الناتجة ستكون مكافئة فى القيمة إلى النسبة من التكرار لثلاثى U فى متعدد النيوكلتيد فى mRNA التركيبى :

$$\frac{UG_2}{U_3} = \frac{\text{تكرار اضافة الحامض الأمينى X فى متعدد الببتيد}}{\text{تكرار اضافة حامض الفينيل الانين فى متعدد الببتيد}} = \frac{٥}{١٢٥} = ٤\ \%$$

أى أنه لكل مائة جزئ حامض فينيل الانين مضاف للسلسلة سيوجد حوالى أربعة جزيئات من الحامض X فى نفس السلسلة وعندما تم تحليل متعدد الببتيد الناتج وجد أن نسبة حامض الجلايسين glycine فى السلسلة المتكونة كان بالفعل ٤ ٪ فى حين كانت نسبة التربتوفان حوالى ٥ ٪ مما يفترض معه أن الثلاثى UG2 يشفر لهذين الحامضين الأمينين ولكن مع اختلاف تتابع القواعد . وواضح أن هذه التقنية لاتعطى أى معلومات محددة عن تتابع القواعد فى الكودونات لذلك كانت النتائج غامضة .

ويمكن تلخيص النتائج التى حصل عليها Nirenberg and Speyer عام ١٩٦٣ بهذه الطريقة فى الجدول التالى :

نوع المتعدد النيوكليتيدى المختلط العشوائى Random Copolymer	الثلاثيات المحتملة	تكرار الحصول على حامض أمينى فى السلسلة		الكودون
		المتوقع	الفعلى	
Poly - UG بنسبة 1 : 5	U_3 (5 x 5 x 5)	125 (100)	Phe : 100	U_3 = phe
	U_2G (5 x 5 x 1)	25 (20)	Cys:20, Val:20	U_2G = Cyst, vol
	UG_2 (5 x 1 x 1)	5 (4), (5)	gly : 4, try : 5	UG_2 = gly,try
Poly - AU بنسبة 1 : 5	A3 (5 x 5 x 5)	125 (100)	lys : 100	A3 = lys
	A_2U (5 x 5 x 1)	25 (20)	ile : 20, asn : 28	A_2U = Ile, asn
	AU_2 (5 x 1 x 1)	5 (4)	leu : 20, asn : 28	AU_2 = leu, tyr
Poly - CG بنسبة 1 : 5	C_3 (5 x 5 x 5)	125 (100)	pro : 100	C_3 = pro
	C_2G (5 x 5 x 1)	25 (20)	ala : 22, arg : 19	C_2G = ala arg
	CG_2 (5 x 1 x 1)	5 (4)	gly : 5	CG_2 = gly

ثالثا : تقنية الارتباط المباشر لثلاثيات القواعد التركيبية

Direct triplet binding

فى خطوة متقدمة لاستنباط الشفرة الوراثية ثم اجراء تجارب على الارتباط المباشر النوعى لثلاثيات من القواعد النوعية المحددة التتابع على الريبوسومات ضمن نظام بناء البروتين فى المعمل *In Vitro* بحيث كان التفاعل بصفة عامة كالتالى :

Ribosome + aminoacyl - tRNA ---> no comlex

أى ريبوسومات + امينو أسيل – tRNA ⟵ لا يتكون معقد

فى حين يكون ناتج التفاعل :

Ribosome + aminoacyl - tRNA + trinucleotide codon ---> comlex

ريبوسومات + امينو أسيل – tRNA + كودون ثلاثى ⟵ يتكون معقد

وكانت الفكرة مبنية باختصار على أن ر ن أ الناقل tRNA المحمل بحامض أمينى نوعى X (يسمى أمينواسيل tRNA) لن يرتبط مع الريبوسومات الحرة ولكن الثلاثية النيوكلتيديه (الكودون) النوعية ستعمل كوسيط لربط امينواسيل tRNA بالريبوسومات . وكانت التقنية بسيطة نسبياً إذ يتم حجز الريبوسومات على مرشحات (فلتر) من نترات السيليولوز بحيث يمكن التمييز بين جزئيات امينواسيل tRNA المرتبطة بالريبوسومات عن تلك الحرة التى لم ترتبط بها حيث يتم التخلص من هذه الأخيرة بغسيل المرشح بمحلول ملحى مناسب (حيث يسمح بمرور جزئيات امينواسيل tRNA الحرة وكذلك نيوكلتيدات الأليجو من خلال المرشح فى حين لا يسمح بمرور المعقدات المكونة على الريبوسوم من امينواسيل tRNA + الكودونات النوعية الثلاثية) .

وعلى ذلك فقد تم إضافة نيوكلتيدات ثنائية أو ثلاثية تركيبية معروفة التتابع مع امينواسيل tRNA نو نشاط أشعاعى نوعى فى الحامض الأمينى المعلم بالاشعاع . اختبرت كل من هذه النيوكلتيدات الأوليجو مع جميع نوعيات امينواسيل tRNA بحيث يكون فى كل مرة أحداها فقط هو المعلم بالأشعاع فى حين تكون التسعة عشر نوعاً الأخرى غير معلمه .

ثم تقدير كمة الأشعاع الذى يتبقى على المرشح (نتيجة عدم مرور المعقد المكون من امينواسيل tRNA المشع المرتبط بالريبوسوم) لكلا من التفاعلات العشرين والتى يحتوى كل منها على حامض أمينى نوعى مشع .

ويلخص الجدول التالى بعض النتائج التى حصل عليها ليدر ونيرنبرج عام ١٩٦٤ Leder and Nirenberg .

ثنائيات وثلاثيات النيوكلتيدات المضافة	كمية الحامض الأميني المشع (P.mole) المرتبط بالريبوسوم		الكودون
	leu - tRNA leu	Cys tRNA cys	
لاشئ	٠,٧٦	٠,٢٩	--
UGU	,٧٨	١,٤٦	UGU = Cys
UUG	١,٧٤	,٣٢	UUG = leu
GUU	,٩٢	,٣٤	--
UG	٠,٩٢	,٢١	--
GU	٠,٨٦	,٣٤	--

من هذا الجدول يمكن استخلاص النتائج الهامة التالية :

١ – أن ثنائيات القواعد لا تعطى ارتباط على الريبوسومات فى حين أعطت ثلاثيات القواعد ارتباطاً مما يؤكد أن الشفرة لا يمكن أن تكون ثنائية القواعد .

٢ – أن مفهوم الشفرة الثلاثية قد تاكد بصورة قاطعة .

٣ – أن تتابع القواعد فى الشفره الثلاثية من الأهمية بمكان فى تحديد نوع الحامض الأمينى النوعى الذى يشفر له كل كودون ثلاثى .

رابعاً : تقنية عديدات النيوكلتيدات المعروفة التتابع

Polymers of known sequence

كانت الخطوة الأخيرة فى استنباط الشفره الوراثية هى استخدام سلاسل تركيبية من متعدد النيوكلتيدات ذات تتابع معروف ، وقد استخدم هذه التقنية Khorana عام ١٩٦٧ فى التعرف على عدد كبير من الكودونات النوعية المحددة لعدد من الأحماض الأمينية . استخدم كورنا بوليميرات مختلطة مكونة من وحدات متكررة ترادفياً من قاعدتين مختلفتين . مما يؤدى إلى اضافة حامضين من الأحماض الأمينية النوعية (يتم تشعيعها لإمكان متابعتها) . عند

استخدام هذه البوليميرات التركيبية فى نظام بناء البروتين فى المعمل *In vitro* يختبر مدى اضافة أى من الثمانية عشر حامض أمينى الباقية غير المعلمة وذلك عند استخدام حامض أمينى ثالث مشع وسبعة عشر حامض غير مشعة إلى مخلوط التفاعل فى كل مرة مع احداث التباديل والتوافيق الممكنة ، عند استخدام هذه الأحماض الأمينية فى مخاليط التفاعل . وقد تبين أن سلسلة متعدد الببتيد أحتوت فى كل مرة على حامضين نوعين مشعين فقط ولم تحدث أى اضافة لحامض مشع ثالث إلى السلسلة الناتجة .

كانت ميكانيكية اضافة الحامضين الأمينيين متشابهة كما كانت الكمية المضافة من كل منهما متكافئة وكان معدل إضافة أي من الحامضين الأمينيين فى السلسلة تزداد فى وجود الحامض الثانى فى حين ينخفض معدل اضافته فى غيابه ، وكانت أحدى هذه التجارب التى شملت تحفيز اضافة الفالين والسستين بواسطة poly - UG مثالاً لمثل هذه التجارب .

فإذا كان تتابع القواعد : UGU GUG UGU GUG UGU

يملى تكوين متعدد الببتيد : Cys - Val - Cys - Val - Cys

فإن معنى ذلك أن UGU يمثل سستين فى حين يمثل الكودون GUG الفالين .

وقد أدت دراسات تالية بواسطة كورانا ومعاونوه إلى استخدام تتابعات معلومة من ثلاثيات ورباعيات النيوكلتيدات المتكونة بشكل ترادفى بحيث أدى تحليل سلاسل متعدد الببتيد الناتجة إلى التعرف على اضافة أحماض أمينية نوعية بتتابع معين . وقد أمكن التعرف فى النهاية على حوالى نصف عدد الشفرات الأربعة والستون بهذه التقنية . ويمكن تلخيص النتائج فى الجدول التالى :

الشفرات (الكودونات)	الأحماض الأمينية المضافة فى سلسلة متعدد الببتيد	الكودونات المتعرف عليها	mRNA تركيبى (بوليمير مختلط معروف التتابع)
5'CUC3'	leucine	CUC | UCU | CUC	poly (C - U)n
UCU	Serine		
UGU	Cysteine	UGU | GUG | UGU	poly (U.G)n
GUG	Valine		
ACA	Threonine	ACA | CAC | ACA	poly (AC)n
CAC	Histidire		
AGA	Arginine	AGA | GAG | AGA	poly (AG)n
GAG	Glutamine		
5'AUC3'	Poly isoleucine	AUC | AUC | AUC	poly (AUC)n
UCA	Polyserine	USA | UCA | UCA	poly (UCA)n
CAU	Polyhistidine	CAU | CAU | CAU	poly (AU)n
GAA	Poly lysine	GAA | GAA | GAA	poly (GAA)n
AAG	Poly glutamine	AAG | AAG | AAG	
AGA	Poly arginine	AGA | AGA | AGA	

ولتفسير الدور الذى يقوم به متعدد النيوكلتيدات فى هذا المجال ، سنأخذ المتعدد PolyGAA كمثال حيث يتحكم هذا المتعدد فى تكوين أما متعدد الليسين Polysine أو متعدد الجلوتامين Polyglutamine أو متعدد الارجينين polyarginine مما يعنى أن واحداً فقط من أحد الأحماض الأمينية الثلاثة تلك سيدخل فى تكوين متعدد الببتيد اعتماداً على نقطة البدء لثلاثية قواعد عشوائية عند بداية الرسالة كالآتى :

5' - AAG - AAGAAG - 3'

lys - lys - lys

أو

5' - GAAGAAGAA - 3'

glu - glu - glu

أو

5' - AGA AGA AGA - 3'

Arg - Arg - Arg

وقد توالى استنباط الكودونات المشفرة من مثل هذه البوليميرات النيوكلتيديه التركيبية الثنائية والثلاثية والرباعية التتابعات . وقد أسفرت جميع هذه الدراسات عن استنباط كودونات نوعية محددة لأحماض أمينية نوعية وذلك بالنسبة لواحد وستين كودون من الأربعة والستين المحتملة كما فى الجدول رقم (٧ - ١) .

وتشفر الكودونات الثلاث الباقية لإنهاء أو وقف بناء سلسلة البروتين كما هو موضح فى الجدول أعلاه .

جدول (٧ – ١) الشفرة الوراثية

First Position (5′ End)	Second Position: U	Second Position: C	Second Position: A	Second Position: G	Third Position (3′ End)
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA* *Stop* UAG* *Stop*	UGU Cys UGC Cys UGA* *Stop* UGG Trp	U C A G
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	U C A G
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG† Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U C A G
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG† Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	U C A G

*Chain-terminating, or "nonsense," codons
†Also used to specify the initiator formyl-Met-tRNA^{fMet}. The Val triplet GUG is therefore "ambiguous" in that it codes both valine and methionine.

الخواص الرئيسية للشفره الوراثية Major Characteristics of the code

أولاً: الشفرة الوراثية تقرأ بصورة مستمرة بلا فواصل أو تداخل بين الكودونات

The code is comma free and non overlopping

أمكن أثبات عدم التداخل فى قراءة ثلاثيات الكودونات فى الشفره الوراثية بمتابعة تأثير استحداث تغيير فى قاعدة واحدة Single base mutation فى تتابع القواعد فى جزئ د ن أ فإذا حدث تداخل بين الكودونات ، فإن معنى ذلك أن ينتج لدينا تغيير فى أكثر من حامض أمينى واحد فى سلسلة البروتين الناتجة ؛ فى حين لو كانت الشفره غير متداخلة فسيقتصر التغيير على حامض أمينى واحد نتيجة لطفره استبدال القاعدة الواحدة كما هو موضح فى المثال التالى :

عند عدم وجود تداخل	عند وجود تداخل	تتابع القواعد لكودونات الأحماض الأمينية
a b (AGU) (ACG) x d AGC (ACG)	a b c d (AGU) (GUA) (UAC) (ACG) x y z d (AGC) (GCA) (CAC) (ACG)	AGUACG الطبيعى mRNA ↓ AG C ACG الطافر mRNA

حيث نجد أنه إذا كانت الشفرة المتداخلة ، لأدى تغيير فى قاعدة واحدة إلى تغيير مقابل فى ثلاث أحماض أمينية نوعية فى البروتين الناتج فى حين أنه فى حالة الشفرة غير المتداخلة سيقتصر التغيير على استبدال حامض أمينى واحد فى البروتين . وقد دلت نتائج التجارب على أن الفرض الثانى هو الصحيح والأمثلة كثيرة منها :

١ – وجد انجرام Ingram أن الطفرة Hbs المسئولة عن انتاج هيموجلوبين منجلى طافر يؤدى إلى الأنيميا المنجلية تشتمل على تغيير فى حامض أمينى واحد نتيجة لاستبدال قاعدة واحدة بقاعدة أخرى فى الجين ؛ مما أدى إلى إحلال الثالين فى البروتين الطافر محل الجلوتامين فى البروتين الطبيعى .

٢ – استحدث ويتمان Wittman طفرات فى فيرس TMV - RNA وذلك بمعاملة الحامض النووى بالمطفرات ، وعند عزل البروتينات من السلالات الطافرة وهضمها بإنزيم التربسين وتحليلها وجد أنه فى جميع الحالات لم يحدث إلا استبدال لحامض أمينى واحد فقط فى أي من المواقع الطفرية .

٣ – وجد يانُفسكى Yanofsky أنه عند استبدال أحد الأحماض الأمينية فى السلسلة A من أنزيم Trytophen synthetase فى بكتريا القولون بإحدى الطفرات فقد تبين أن الحامضين الأمينيين الواقعين على جانبى هذا الحامض المستبدل لم يتغيرا بالمرة .

فإذا اتفقنا على أن الشفرة غير متداخلة ، فإن ذلك يحتم أن يكون هناك طرق للقراءة الصحيحة أو القراءة الخطأ وإلا لأمكن قراءة التتابع النيوكلتيدى التالى فى ثلاث اطارات للقراءة مختلفة كالآتى :

فمثلاً التتابع AGU AGU AGU AGU AGU

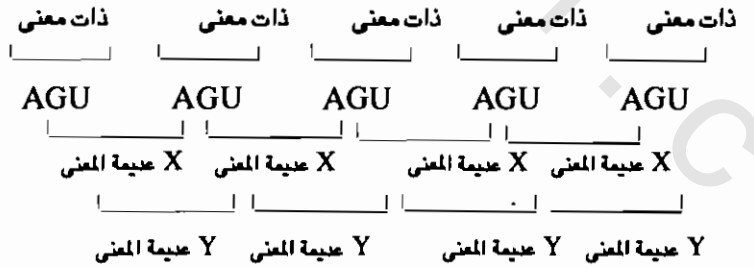
حيث قد يقرأ : (AGU) (AGU) (AGU) (AGU) (AGU)

أو (GUA) (GUA) (GUA) (GUA) (GUA)

أو (UAG) (UAG) (UAG) (UAG) (UAG)

وبالطبع ستتم ترجمة كل من هذه القراءات الثلاث إلى أحماض أمينية نوعية مختلفة اعتماداً على نقطة بدء القراءة .

يمكن التغلب على هذه الصعوبة إما بأن تتم قراءة التتابع النيوكلتيدى من نقطة بدء نوعية محددة وثابتة ، أو أن تكون طبيعة الشفرة الموروثة تسمح بالقراءة الصحيحة فقط بحيث تمنع حدوث الأخطاء . وقد اقترح كريك Crick مفهوم « شفرة بدون فواصل » على أساس أن اطار القراءة الصحيح موروث فى التتابع نفسه ، بحيث أن بعض تتابعات القواعد ستمثل أحماض أمينية فى حين لا يكون للبعض الآخر أى معنى فى هذا المجال . وعلى ذلك فإن بعض الكودونات الأربعة والستين فقط هى التى تستخدم فى التشفير عند الترجمة . وعند كل نقطة فى الشفرة ستكون هناك قراءة واحدة فقط هى الصحيحة فى حين تكون جميع القراءات المحتملة الأخرى عديمة المعنى ولا تشفر لأى حامض أمينى . بمعنى أنه إذا تجاورت الكودونات فى إطار واحد معين ، فإن القراءة ستكون صحيحة وذات معنى sense فى حين أن جميع الإطارات الأخرى المتداخلة للقراءة ستكون غير صحيحة أو عديمة المعنى nonsense وعلى ذلك تكون :



فنجد أنه فيما عدا القراءة فى الإطار الأول التى تمثل القراءة الصحيحة نجد أن كل من الاحتمالات الأربعة للكودونات الثلاثية XXX المحتملة فى الإطارات الأخرى للقراءة لن تكن ممثلة أو محددة لأحماض أمينية ولكنها ستكون عديمة المعنى حيث أنها لو كانت تشفر

لحامض أميني واحد مترادف فإن التتابع XXXX وكذلك التتابع YYYY سيعطى قراءة ذات معنى فى الإطار الخطأ .

وقد تم تجميع الكودونات الستون الأخرى فى عشرين مجموعة تحتوى كل مجموعة على ثلاث كودونات وتشتمل كل مجموعة على توافيق دواره لنفس الثلاث قواعد النتروجينية ووجد أن واحداً فقط من هذه الكودونات الثلاث الموجودة فى كل مجموعة تمثل حامضاً أمينياً فعلى سبيل المثال :

لو أن التتابع نو معنى = AGU AGU

فإن عديم المعنى = GUA

عديم المعنى = UAG

ثانياً : الشفرة ترادفية المعنى Synonyms (أو انحلالية Degenerate)

حيث يوجد لدينا ٦١ كودوناً تشفر لعشرين حامض أميني فى حين تشفر الثلاثة كودونات الباقية لإنهاء أو ايقاف بناء البروتين ، فمن الواضح أن أكثر من كودون واحد يمكن أن يشفر لنفس الحامض الأميني الواحد . بمعنى أن بعض الكودونات مترادفة المعنى عند القراءة (ويطلق على الشفرة فى هذه الحالة بأنها انحلالية Degenerate) وعلى سبيل المثال نجد أن الليوسن يتم تشفيره بستة كودونات وهى : UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG . ويلاحظ أنه فى معظم الحالات ، (الشكل ٧ – ٨) تختلف الكودونات المترادفة عند موقع القاعدة الثالثة فى الكودون فى حين تكون القاعدتين الأولى والثانية ثابتتين بالنسبة لكل حامض أميني نوعى مما يوحى بأن هذين الموقعين يعتبران الأكثر أهمية فى تحديد الكودون النوعى لكل حامض . وكنتيجة لذلك فإن أى طفرة تحدث فى القاعدة الموجودة فى الموقع الثالث للكودون يمكن غالباً ألا يكون لها تأثير سلبى على عملية الترجمة إلى بروتين ، لأن الحامض الأميني المحدد ستتم اضافته فى مكانه من السلسلة بالرغم من حدوث هذه الطفرة وتسمى مثل هذه الطفرات بالطفرة الساكتة أو الصامتة Silent mutation .

وقد أوضحت نتائج دراسات تتابع القواعد فى د ن أ على أن جميع الكودونات الأربعة والستون يمكن استخدامها فى الكائن الحى *In vivo* . وقد يعطى إمكان استخدام جميع هذه

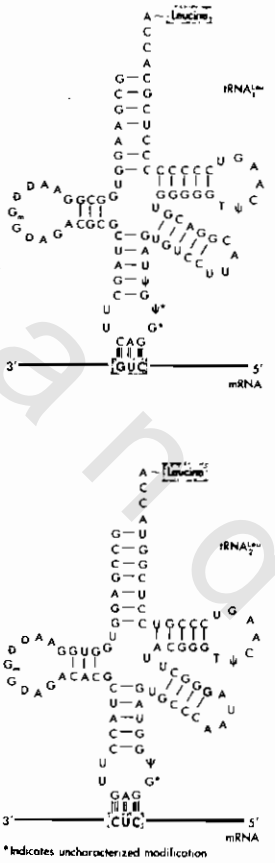
الكودونات ميزة وقائية فى التقليل من تأثير الطفرات الضارة التى قد تحدث للكائن الحى . إذ لو افترضنا أن عدد كبير من الكودونات كانت عديمة المعنى فإن معنى ذلك أن الطفرات التى قد تحدث فى العدد القليل الباقى ذو المعنى ستكون أكثر ضراوة وبمعدل حدوث أعلى بكثير بحيث تؤثر سلبياً على فعالية البروتين الناتج . بالإضافة إلى ذلك فإن طبيعة تنظيم الشفرات الوراثية تعمل على التقليل من تأثير الطفرات على عملية الترجمة أثناء عملية بناء البروتين . فمثلاً حتى فى حالة حدوث طفرة فى موقع القاعدة الأولى للكودون فإنه من المحتمل أن تتم ترجمة الكودون المتغير الناتج إلى حامض أمينى مشابه فى خواصه للحامض الأصلى (إن لم يعط نفس الحامض) . كما أن الكودونات المحتوية على قاعدة بيريميدينيه فى الموقع الثانى عادة تكون مختصة بالتشفير للأحماض الأمينية الكارهة للماء hydrophobic فى حين أن الكودونات المحتوية على قاعدة بيورينيه فى الموقع الثانى تكون عادة مختصة بالتشفير للأحماض الأمينية القطبية polar (الجدول ٧ - ١) ونظراً لأن طفرات الاستبدال المتماثل Transition هى الأكثر شيوعاً فى طفرات استبدال القاعدة الواحدة ، فإن أي تغيير فى الموقع الثانى للكودون سيؤدى غالباً إلى استبدال حامض أمينى بآخر له خواص مشابهة إلى حد كبير .

وكما سبق القول لن تؤثر طفرة الاستبدال المتماثل فى الموقع الثالث على التخصصية الموروثة للكودون بالنسبة للتشفير للحامض الأمينى النوعى بل والأكثر من ذلك فإنه حتى لو حدثت طفرة استبدال غير متماثل Transversion فى هذا الموقع بالذات فإنه لن يكون لها تأثير على الحامض الأمينى المضاف فى حوالى نصف الحالات .

كما توجد خاصية أخرى مميزة فى الشفرة وهى أنه طالما أن الموقعين الأول والثانى يكونان مشغولين بالقاعدة G أو C فإن أى من القواعد الأربعة المحتملة لو احتلت الموقع الثالث ستعطى كودون مختص بالتشفير لنفس الحامض الأمينى . ولو قارنا فى الجدول (٧ - ١) على سبيل المثال الكودونات الخاصة بكل من الأحماض الأمينية الألانين ، البرولين ، الارجينين والجليسن فسوف تتضح هذه الظاهرة .

ومن جهة أخرى وفى حالة ما إذا كان الموقعان الأول والثانى للكودون مشغولين بالقاعدة A أو U فإن نوع القاعدة الموجودة فى الموقع الثالث سيكون له تأثير كبير على نوع الحامض الأمينى الذى تترجم له هذه الكودونات . ويفسر ذلك على أساس أن زوج القواعد GC يرتبط

بقوة أكثر من الزوج AU لذلك فإن التزاوج غير الصحيح فى القاعدة الثالثة فى الحالة الأولى يمكن احتماله نظراً لارتباط الموقعين الأول والثانى بروابط قوية (هيدروجينية) بين الزوج GC عما فى حالة AU حيث تكون الروابط ضعيفة نسبياً . ولذلك فإن وجود أى من النيوكلتيدات الأربعة فى الموقع الثالث بصفة عامة قد يكون مرتبطاً بميكانيكية أمان للتقليل من أخطاء قراءة الشفرة الوراثية .



الشكل (٧-٨):

وجود جزيئين مختلفين من tRNA للحامض الأمينى ليوسين بحيث يتعرف كل منهما على كودون مختلف مما يوضح ترادفيه الشفرة

obeikandl.com

ثالثاً : التأرجح فى مضاد الشفرة Wobble in Anticodon

إذا افترضنا من البداية أنه يوجد فى كل tRNA مضاد للشفرة لكل كودون فإن معنى ذلك أنه لابد أن يكون لدينا على الأقل ٦١ نوع مختلف من tRNA بالإضافة إلى ثلاثة إضافية تختص بإنهاء الترجمة . إلا أن الأدلة أكدت على أن هناك عدد أقل من tRNA عما كان متوقعاً حسب ذلك الافتراض ، وأن كل tRNA نوعى يمكنه أن يميز عدد من الكودونات المختلفة . وقد ساعد على ذلك أكتشاف قاعدة غير عادية فى مضاد الشفرة على tRNA وهى قاعدة الأنوسين Inosine ، وهى تختلف عن القواعد الأربعة المعروفة وهى تنشأ نتيجة لعملية تعديل إنزيمى فى قاعدة الأدينين فى عروه مضاد الشفرة فى جزئ tRNA حيث يتم نزع مجموعة الأمين على ذرة الكربون رقم ٦ فتصبح مجموعة كيتونية على هذه الذرة وينتج الأنوسين .

وقد اقترح Crick مفهوم التأرجح Wobble لتفسير ذلك ويعنى هذا المفهوم أن القاعدة فى النهاية '5 فى مضاد الكودون ليس ثابتاً (أو مُقيداً) فى مكانه مثل القاعدتين الأخرتين مما يسمح بتكوين روابط هيدروجينية مع أى من عدة قواعد واقعة على النهاية '3 فى الكودون المقابل . إلا أنه تبين أن ذلك لا يشمل جميع التباديل الممكنة حيث وجد أن التزاوج فى هذه الحالة يقتصر على القواعد الموجودة فى الجدول (٧ – ٢) .

الجدول (٧ – ٢) التزاوجات الممكنة حسب مفهوم التأرجح

القاعدة فى مضاد الكودون	القاعدة فى الكودون
G	C أو U
C	G
A	U
U	G أو A
I	C أو U أو A

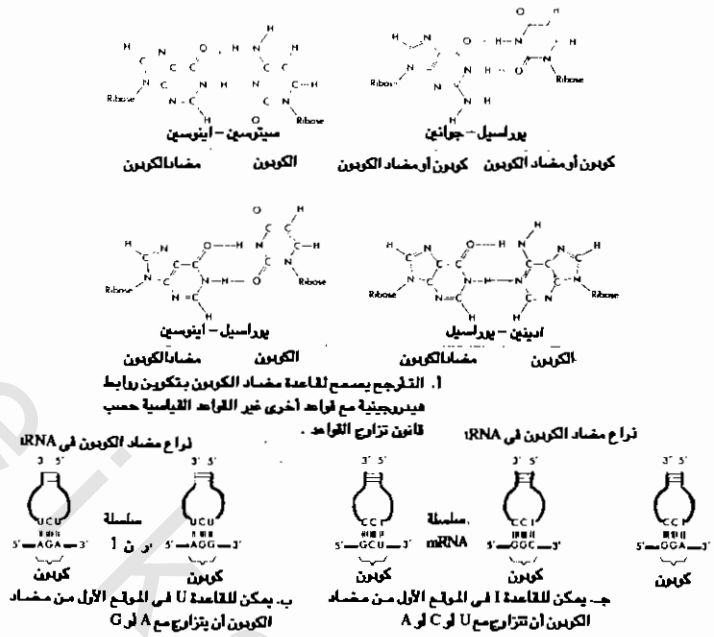
وطبقاً لهذا الجدول فإنه من الممكن للقاعدة U فى الوضع المتأرجح (الأول فى مضاد الكودون) أن تتزاوج مع الأدينين أو الجوانين . كما تستطيع قاعدة الإنوسين I أن تتزاوج مع A أو U أو C كما فى الشكل (٧ – ٩) . تبين أن التزاوجات بين القواعد المسموح بها حسب مفهوم التأرجح هى تلك التى تعطى مساحة ريبوز – ريبوز قريبة من تلك المحددة بتزاوجات AU أو GC . وعلى ذلك فإن التزاوجات التى قد تتم بين قاعدتى بيورين أو بين قاعدتى بيرميدين سيكون من شأنها اعطاء مسافة ريبوز أطول أو أقصر من اللازم مما يؤدى إلى فشل التزاوج .

تبين أن قوانين التأرجح لأى من tRNA لا تسمح بأن تتعرف قاعدة ما على جميع الكودونات الأربعة وكما هو واضح من الجدول أعلاه فإن الإنوسين يمثل أقصى حد يمكن لقاعدة فى مضاد الكودون أن تتعرف على قواعد الموقع الثالث فى الكودون (وهى هنا ٣ قواعد) .

وقد أيدت جميع الدراسات الحديثة مفهوم التأرجح ، فقد تنبأ Crick من البداية بوجود ثلاثة أنواع على الأقل من tRNA للكودونات الستة الخاصة بالسيرين (AGC, AGU, UCG, UCA, UCC, UCU) .

كما أن الحامضين الأمينيين الآخرين (الليوسين والأرجينين والمشفر كل منهما بستة كودونات تمتلك أنواع مختلفة من tRNA لمجموعة الكودونات التى تختلف فى الموقع الأول أو الثانى .

تبين أن ذلك يرجع إلى أن القاعدة فى الموقع الأول فى مضاد الكودون anticodon (على النهاية 5') تكون أكثر حرية فى الحركة عن تلك الموجودتين فى الموقعين الآخرين ، مما يفسر وجود التأرجح فى الموقع الثالث 3' للكودون . وعلى العكس من ذلك نجد أن الموقع الثالث فى مضاد الكودون (3') يكون مقيد الحركة مما قد يفسر أنعدام حدوث ظاهرة التأرجح فى الموقع الأول (5') للكودون .



الشكل (٧ - ٩):

أمثلة للتزاوج المتارجح . يلاحظ أن المسافات بين جزئيات سكر الريبوز وبعضها لجميع الأزواج المتارجحة تكون قريبة جداً من المسافات القياسية بين أزواج القواعد AU أو GC .

رابعاً: كودون بدء الترجمة (AUG) Initiation Codon

وكودونات إنهاء الترجمة (UAC, UAA, UGA) Termination Codons

حيث أن بناء البروتين يتم فى الاتجاه من 3' <-- 5' كما سيأتى بعد ، وحيث أن البناء يتم من النهاية الأمينية NH_2 – ؛ فقد تبين أن إشارة البدء لبناء البروتين هى الكودون AUG . وقد وجد أن هذا الكودون له وظيفتين متميزتين ، فعندما يكون AUG فى بداية منطقة التشفير Coding region لجزئ mRNA فى البكتريا فإنه سيشفر لإضافة (fmet) N-formyl methionine فى حين أن نفس الكودون AUG فى أى مكان آخر بعيد عن منطقة البدء هذه سيشفر للميثونين العادى (Met)

وكما سيأتى عند دراسة عملية بناء البروتين فى البكتريا فإنه يوجد نوعاً مميزاً من tRNA يسمى fMet tRNA يختلف عن tRNA الخاص بالميثونين العادى . ولكى يتم ارتباط fMettRNA بالريبوسوم فإن الأمر يتطلب وجود بروتين نوعى يسمى بروتين البدء رقم 2 (IF2) (initiation factor2) ؛ فى حين يستخدم met tRNA نفس عامل الاستطالة Elon-gation factor الذى تستخدمه بقية أنواع tRNA الأخرى . جدير بالذكر أنه فى مميزة النواة يوجد نوع واحد من tRNA مختص ببدء بناء سلسلة البروتين حيث تبدأ السلسلة هنا بالميثونين وليس formyl methionine .

يجب التنويه هنا إلى أن mRNA الطبيعى *In vivo* يبدأ الترجمة دائماً بالكودون AUG فى حين أن ذلك ليس شرطاً حتمياً فى حالة استخدام mRNA الصناعى فى المعمل *In vitro* كما فى حالة التجارب التى استخدمت لاستنباط الشفرات الوراثية والتى سبق شرحها .

من جهة أخرى ، تؤدى قراءة أى من الكودونات الثلاثة : UAG, UAA, UGA إلى توقف استطالة السلسلة وإنهاء عملية بناء البروتين Termination . إذ أنه عندما يصل الريبوسوم إلى أحد هذه الكودونات الثلاثة فإن سلسلة متعدد الببتيد التامة الاستطالة تنزلق من على الريبوسوم وتنفك عنه . وعلى العكس من جميع الكودونات الأخرى نجد أن كودونات الإنهاء الثلاثة هذه لا يمكن التعرف عليها بأي من tRNA النوعية المعروفة ، فى حين يتم التعرف عليها وقراءتها بواسطة بروتينات نوعية تسمى عوامل الانفكاك أو الانهاء Release factors (RF) كما سيأتى بعد .

وتجدر الإشارة إلى أنه قد يوجد أكثر من كودون أنهاء الشفرة جنباً إلى جنب فى نهاية منطقة التشفير كضمان اضافى لإيقاف عملية بناء البروتين عند نهاية منطقة التشفير Coding region فى جزئ mRNA .

خامساً: اختلاف مقادير tRNA النوعية وتكرار استخدام الكودونات المختلفة فى الشفرة .

يحدث أحياناً أن عدة جزيئات من tRNA التى تم بناؤها قد تحتوى على تتابعات نيوكليتيدية مختلفة كثيراً ولكنها فى نفس الوقت تحتوى على نفس مضاد الكودون المختص بكودون نوعى لحامض أمينى معين . وغالبا ما تكون أحدى هذه النوعيات المتشابهة موجودة بمقادير كبيرة بالمقارنة بالنوعيات الأخرى الحاملة لنفس مضاد الكودون (قد تصل الى أكثر

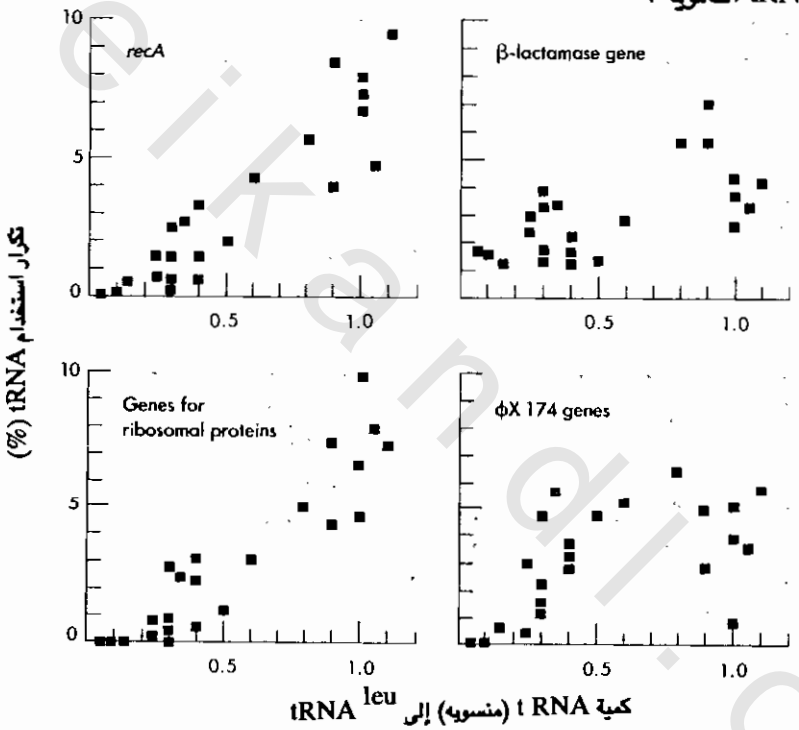
من حوالى ١١ ضعف) . ففى بكتريا القولون على سبيل المثال يوجد tRNA رئيسى للتيروسين tRNA tyr ونوع آخر من tRNA ثانوى بالنسبة لنفس الحامض وكلاهما يحتوى على نفس مضاد الكودون (3´-AUG-5´) . وقد وجد بصفة عامة أن كلا من نوعى tRNA الرئيسى والثانوى يتم نسخهما من جينين مختلفين ، وأن الفرق فى تكرار وجودهما يرجع الى اختلاف فى سرعة أو معدل نسخ كل منهما والتى ترجع الى اختلاف فى كفاءة منطقة البروموتور بينهما وكذلك لفروق أخرى فى عملية تجهيز جزئ ر ن أ الناقل tRNA بعد النسخ . لم تتحدد حتى الآن بصفة قاطعة وظيفة ر ن.أ. الناقل الثانوى Secondary tRNA وقد يكون له دور فى تنظيم عملية الترجمة نظرا لوجوده بكميات ضئيلة نسبيا كما أنه يقوم بدور فى كبت فعل الجين supression of gene action .

من جهة أخرى ، نجد أنه نظرا لحقيقة أن معظم الأحماض الأمينية تتحدد بأكثر من كودون واحد فإن ذلك يدعو للتساؤل عما اذا كانت جميع الكودونات الخاصة بنفس الحامض يتم استخدامها بنفس التكرار ، أم أن هناك أفضلية لبعضها على البعض الآخر فى معدل أو تكرار استخدامها أثناء عملية الترجمة .

فعلى سبيل المثال ، فى كائن يحتوى على د ن أ غنى فى AT فإنه من المتوقع أن تكون معظم الكودونات محتوية على U أو A فى الموقع الثالث . وفى الحقيقة فقد وجد أن التتابع الكلى لجزئ د ن أ الاحادى فى جينوم البكتريوفاج ØX174 يحتوى على A % 24 ، C % 22 ، G % 23 ، T% 31 . وقد تبين أن U هى القاعدة المفضلة بالفعل فى الموقع الثالث للكودون . وحتى فى الكائنات التى لايوجد فيها تحيز فى نسب تكوين القواعد نجد أن استخدام الكودونات ليس متروكا للصدفة . وحيث أننا نعرف الآن تتابع القواعد لكثير من صفات بكتريا القولون فقد أصبح واضحا أن هناك بعض الكودونات التى تستخدم بمعدل عالى جدا فى حين قد لاتستخدم كودونات أخرى لنفس الحامض الا نادرا .

وجد أنه فى جينات الكائنات الراقية ، يكون استخدام الكودونات أيضا غير خاضع للصدفة الا أنه تبين وجود اختلاف فى تكرار استخدام بعض الكودونات بين مميزة النواة وغير مميزه النواة.

وجد أن تكرار ظهور كودونات نوعية معينة فى بكتريا القولون يرتبط ارتباطا وثيقا بمدى توفر جزيئات tRNA الخاصة بها كما فى الشكل (٧ - ١٠) ، ويتضح ذلك بصفة خاصة فى حالة البروتينات التى يتم انتاجها بكميات كبيرة (مثل Rec A protein والبروتينات الريبوسومية) إذ نجد أن تلك الأنواع من mRNA تحتوى على كودونات يتم قراءتها بواسطة أكثر أنواع tRNA وفرة (يطلق على جزيئات tRNA النوعية التى تحتوى على مضاد لنفس الشفرة اسم مشابهات المستقبلات isoacceptors) ، فى حين لايحتوى هذا الـ mRNA على كودونات مقابلة لنوعيات tRNA الثانوية .



الشكل (٧ - ١٠): التلازم بين مقادير tRNA وتكرار استخدام جزيئات tRNA فى تعبير الجينات فى بكتريا القولون . قدرت مقادير كل من ٢٦ نوع مختلف من tRNA بالنسبة لمقدار $tRNA_i^{leu}$ (والذى قدرت لـه القيمة ١) . ثم تم حساب تكرار ظهور الكودونات التى تقوم بفك شفرتهـا فى عدد من الجينات المعروفة التتابـع . ويلاحظ وجود تلازم قوى بين كثرة استخدام tRNA للجينات ذات التعبير المرتفـع (مثل Rec A وجينـات الريبوسومات) وتلازم ضعيف للجينات الأقل تعبيـرا (مثـل β-lactamase , øX 174) .

فى خلايا مميزة النواة نجد أيضا أن الكودونات المقابلة لمشابهات المستقبلات الرئيسية من tRNA تستخدم عادة بأعلى تكرار . ومن أمثلة ذلك ما يحدث بالنسبة لبروتينات الخميرة وخاصة انزيمى ADI ، GDP حيث نجد أن أكثر من ٩٦ ٪ من الأحماض الأمينية بها يتم تشفيرها بواسطة ٢٥ كودون فقط وهى تلك التى يكون tRNA المقابل لها موجودا بوفرة .

وعلى ذلك فيبدو أنه فى الجينات ذات التعبير القوى ، يكون اختيار الكودون محكوما بمدى وفرة tRNA . وقد يكون لذلك علاقة بتنظيم عملية الترجمة لكى تصل الى فعاليتها المثلى . وقد يشير ذلك الى أن الكودونات المقابلة لنوعيات tRNA النادرة قد يكون دورها هو ابطاء عملية الترجمة . وحتى عندما يتأرجح نوع واحد من tRNA ليستطيع قراءة عدة كودونات فإن أحد هذه الكودونات يكون عادة هو المفضل . وقد أدى تحليل تلك الأفضليات الى استنتاج بعض خواص التفاعل بين الكودون ومضاد الكودون ويمكن تلخيص أهمها فى الآتى :

- ان بعض التعديلات أو التحويرات فى القاعدة U فى الموقع ´5 (المتأرجح) لمضاد الكودون يعطى أفضلية للقاعدة A على G فى الموقع الثالث للكودون .
- أن القاعدة إنوسين I فى الموقع ´5 (المتأرجح) لمضاد الكودون تفضل التزاوج مع القاعدة U أو C عن التزاوج مع القاعدة A .
- عندما تكون تزاوجات القاعدتين الأولتين فى الكودون مع مضاد الكودون من نوع AU ، نجد أن الموقع الثالث المفضل يكون مشغولا بالقاعدة C (معطيا تزاوج GC) بدلا من U (الذى يعطى زوج ثالث من نوع AU) ؛ بمعنى آخر يفضل التفاعل القوى فى تزاوج الكودون مع مضاد الكودون .

سادسا: الشفرة الوراثية عامة (شاملة) The code is universal :

وجد أن Poly-U يؤدى الى اضافة حامض الفينيل الانين فى التجارب المعملية *In Vitro* فى مستخلصات خلوية مأخوذة من كائنات مختلفة تتراوح بين البكتريا والثدييات . ونفس الشئ تم الحصول عليه عند استخدام Poly C حيث وجد أنه يحفز ادخال البرولين فى تكوين عديد

البرولين . وكذلك الحال فى Poly A الذى يختص بالتشفير لليسين فى متعدد الليسين . وقد تم ذلك بصفة عامة بصرف النظر عن نوع المستخلص الخلوى أو مصدره . وقد تأكدت شمولية الشفرة وانطباقها على جميع الكائنات تقريبا بتجارب حديثة اشتملت على دراسة تتابع القواعد فى د ن أ لجينات محددة تشفر لبروتينات تنتمى الى أنواع Species مختلفة ، وبهذا يبدو أن الشفرة الوراثية قد ظلت ثابتة على مدى احقاب تطورية طويلة .

من جهة أخرى وجد أن الشفرة الوراثية فى جينوم الميتوكوندريا mtDNA قد شذ عن هذه القاعدة فى بعض الخواص ومنها :

- أن الكودون UGA لايقرأ فى المثيوكوندريا على أنه كودون انهاء الترجمة ولكنه يشفر لحامض التريتوفان .

- أن المثيونين الداخلى يتم تشفيره بكل من الكودونين AUG ، AUA فى حين أن المثيونين فى بداية الترجمة يشفر له بالكودونات : AUG , AUA , AUU , AUC .

- أن الكودونين AGA ، AGG ليسا كودونان للتشفير للأرجينين ولكنهما بدلا من ذلك يستخدمان كأشارة لانهاء الترجمة فى الميتوكوندريا . وبذلك يوجد أربع كودونات لوقف الترجمة فى الميتوكوندريا وهى : UAA , UAG , AGA , AGG .

- أن عدد أنواع tRNA فى الميتوكوندريا يقل بكثير عما فى سيتوبلازم الخلية مميزة النواة حيث لايزيد فى الأولى عن ٢٢ نوع فقط فى حين يصل فى الثانية إلى ٣١ نوع .