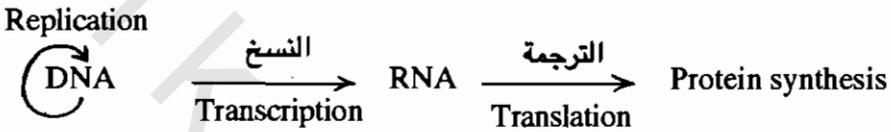


الفصل الثامن

بناء البروتين Protein Synthesis

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



وكان يعتقد فى البداية أن جميع هذه الأنواع الثلاثة تستخدم كقالب template فى عملية الترجمة ، إلا أنه تبين أن واحدا منها فقط وهو ر ن أ المراسل mRNA هو الذى يقوم بالفعل بدور القالب ، فى حين يقوم النوعان الأخران بأنوار أخرى هامة للمساعدة فى توجيهه 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 النيتروجينية الموجودة فى mRNA القالب ، لذلك اتجهت البحوث الى محاولة التعرف على نوعية معينة من ر ن أ تقوم بدور الوسيط أو المهين adaptor بين ر ن أ المراسل mRNA وبين الأحماض الأمينية ليعمل كهمزة الوصل بينهما وقد تم التوصل الى أن جزيئات ر.ن.أ. الناقل tRNA هى التى يمكنها أن تقوم بهذا الدور .

تحتوى الخلية على مجموعة من ر ن أ الناقل وهى عبارة عن جزيئات من الأحماض النووية الريبوزية صغيرة الحجم (بطول حوالى 70 - 90 نيوكليوتيدة) . يسمح بتركيب جزيئ tRNA بوجود موقعين نوعيين مستقلين ويمكن لأحدهما أن يتعرف على ويرتبط بالحامض

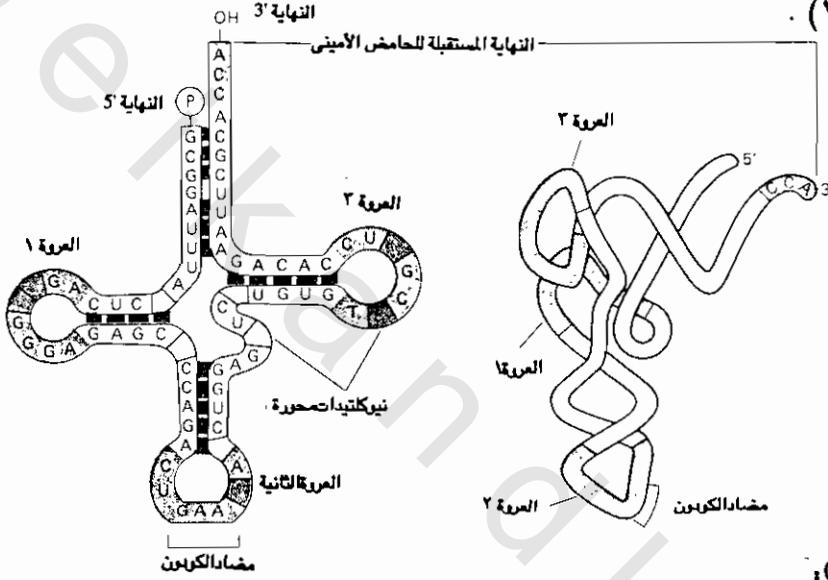
الأمينى بمساعدة انزيم نوعى يسمى tRNA synthetase ؛ فى حين يقوم الموقع الآخر الموجود فى الطرف الآخر من الجزيء والمحتوى على مضاد الكودون بالتعرف على ثلاثية الكودون الموجودة فى تتابع القواعد على جزيء mRNA مما يسمح للأحماض الأمينية بأن تصطف طبقا لهذا التتابع النيوكليدي .

يسمح تركيب جزيء tRNA بأن يرتبط بحامض أمينى واحد من الأحماض العشرين المعروفة . فمثلا 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 تساهميا مع النهاية 3' لجزيء tRNA النوعى المحتوى على مضاد الكودون الصحيح الخاص بهذا الحامض (مضاد الكودون هو التتابع الثلاثى المكمل لتتابع الكودون الثلاثى النوعى لحامض أمينى معين على جزيء mRNA) . يؤدي التزاوج الصحيح بين الكودون ومضاد الكودون بالروابط الهيدروجينية الى امكان وضع الحامض الأمينى فى مكانه فى سلسلة البروتين النامية طبقا للأوامر الموجودة فى تتابع النيوكلييدات فى جزيء mRNA ، مما يسمح بالاستخدام الصحيح للشفرة الوراثية فى ترجمة تتابع النيوكلييدات الى تتابع مقابل من الأحماض الأمينية فى البروتين . يقوم tRNA بنور أساسى كوسيط فى عملية الترجمة حيث ترتبط إحدى نهايتيه بحامض نوعى فى حين تتزاوج النهاية الأخرى مع الكودون الخاص بهذا الحامض على جزيء mRNA أى يمكن القول بأن tRNA يقوم بتحويل تتابع النيوكلييدات الى تتابع من الأحماض الأمينية . من جهة أخرى تؤدي الرابطة التساهمية التى تحدث بين الحامض الأمينى وبين جزيء tRNA الى تنشيط الحامض الأمينى عن طريق تكوين رابطة ذات طاقة عالية عند النهاية الكربوكسيلية لهذا الحامض بحيث يمكنها أن تتفاعل مع المجموعة الأمينية للحامض الأمينى التالى فى تتابع متعدد الببتيد ، حيث تستخدم طاقة التنشيط هذه فى تكوين أصرة ببتيدية . تعد عملية التنشيط هذه ضرورية لبناء البروتين لأن الأحماض الأمينية غير المنشطة لايمكن اضافتها مباشرة الى سلسلة متعدد الببتيد النامية .

تعتمد وظيفة جزيء tRNA على دقة تركيبه الثلاثى الأبعاد Three dimension structure . وقد

أمكن دراسة التركيب الدقيق لعدة جزيئات مختلفة من tRNA وذلك بتقنيات متخصصة ، وقد وجد أن جزيء tRNA يحتوى على مناطق تكون فيها سلسلة متعدد النيوكليوتيدات متزاوجة فى حين توجد مناطق محتوية على قواعد متحورة modified . كما تبين حدوث تفاعلات غير عادية بين القواعد لكى يتمكن الجزيء من الانتشاء أو الانطباق . ظهر فى 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 لكى يكون الجزيء فعالا ويقوم بوظيفته كيميائى ، كما فى الشكل (٨-١) .

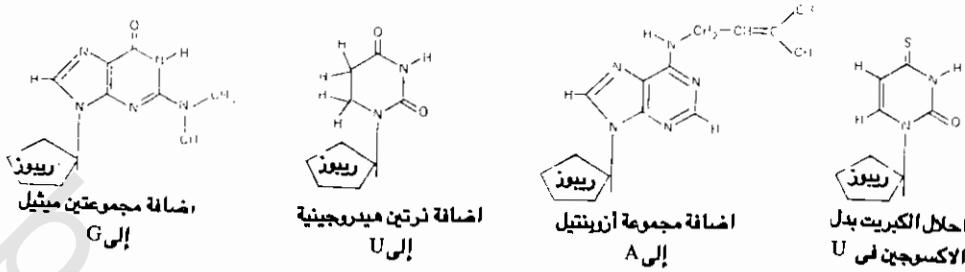


الشكل (٨-١) :

التركيب ثلاثى الأبعاد لجزيء tRNA ويتبين المناطق ذات القواعد المتزاوجة تخطيطيا فى الشكل الأيسر (شكل تركيب ورقة البرسيم) فى حين يتبين التركيب ثلاثى الأبعاد (شكل حرف L) الى اليمين . وأحد النهايات تستقبل الحامض الأمينى ، فى حين تحتوى النهاية الأخرى على النيوكليوتيدات الثلاثة لمضاد الكربون . يرتبط الحامض الأمينى فى النهاية ذات التابع CCA عند النهاية 3' للجزيء .

وقد تبين وجود عدد من النيوكليوتيدات غير العادية فى جزيء tRNA قد تصل نسبتها الى حوالى ١٠٪ من اجمالى النيوكليوتيدات ، والتي تنشأ عن عملية تحويل أو تعديل للنيوكليوتيدات العادية فى عملية التجهيز التى تعقب عملية نسخ tRNA . وقد تبين أن وجود هذه النيوكليوتيدات

غير العادية يساعد على أن يأخذ جزيء tRNA التركيب المطلوب لكي يقوم بوظيفته . ويبين الشكل (٨-٢) تركيب بعض هذه النيوكليوتيدات غير العادية .

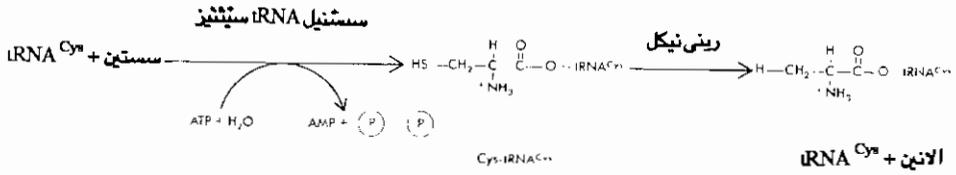


الشكل (٨-٢) :

بعض النيوكليوتيدات غير العادية الموجودة في جزيئات tRNA . وتنتج هذه النيوكليوتيدات عن طريق حدوث تعديلات تساهمية في نيوكليوتيدات عادية بعد اضافتها الى سلسلة رن أ وتمثل هذه النيوكليوتيدات غير العادية حوالي ١٠٪ من اجمالي النيوكليوتيدات في جزيئات tRNA .

دور انزيم Aminoacyl-tRNA synthetase في عملية الترجمة :

وجد أن جزيء tRNA ، وليس الحامض الأميني الذي يحمله ، هو الذي يحدد مكان اضافة هذا الحامض في سلسلة متعدد الببتيد أثناء عملية الترجمة . وقد تاکد ذلك بوضوح بعد تجربة مثيرة تم فيها تحميل tRNA Cys بحامض السستين ، ثم أجريت عملية تحويل لحامض السستين المحمل الى حامض الالانين بعملية يتم فيها نزع مجموعة SH بالريني نيكل Raney Nickel كما في الشكل (٨-٣) وبذلك ينتج جزيء AlaRNA هجين أي «-alanyl- tRNA^{Cys}» وعند استخدام مثل هذا الجزيء في نظام بناء البروتين المعملی وجد أن كل موقع للسستين في سلسلة متعدد الببتيد الناتج قد استبدل بحامض الالانين مما يبين مبدأين أساسيين . أولهما أن الحامض الأميني المحمل ليس له نور في تحديد موقع اضافته في سلسلة متعدد الببتيد ، والثاني والأهم أن جزيء tRNA يقوم بدور المهيب فقط بين الحامض الأميني وبين mRNA وأن التفاعل الحرج يكمن في التطابق الصحيح بين جزيء tRNA النوعی والحامض الأميني المخصص له ، وتتم هذه المطابقة بواسطة انزيم aminoacyl-tRNA synthetase .



الشكل (٨-٣):

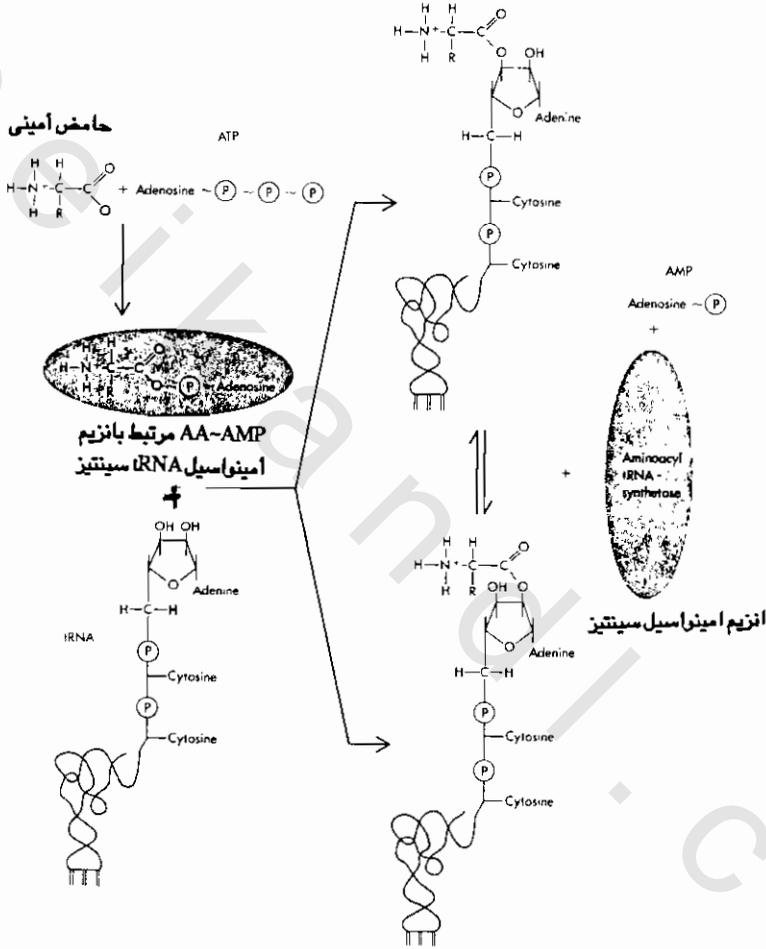
تجربة لاثبات أن جزئ tRNA يقوم فقط بدور المهين . أمكن تحويل السلسلة الجانبية للحامض الأميني السستين الى الانين بعد تحميل الأول على tRNA^{Cys} . تتم اضافة الانين في مكان السستين في جزئ الهيموجلوبين .

تبين وجود انزيم نوعي A-A-tRNA synthetase متخصص لكل حامض أميني (أى يوجد 20 انزيم من هذا النوع) بحيث يكون أحدهما متخصصاً في التزاوج بين الحامض الأميني (X) و tRNA(X) ، وهكذا .

يتم تفاعل التزاوج على خطوتين ويؤدي الى الحصول على جزيئات Aminoacyl-tRNA كما في الشكل (٨-٤) . ويتضح من هذا الشكل أن هذا الانزيم نفسه هو الذى يساعد على تنشيط الحامض الأميني كما سبق الذكر . كما يبين الشكل (٨-٥) كيف تتم ترجمة الشفرة الوراثية من خلال نشاط انزيم A-A-tRNA-synthetase من جهة ومن خلال التزاوج الصحيح بين مضاد الكودون في tRNA والكودون المقابل في جزئ mRNA القالب ، ويتضح من هذا الشكل أن هاتين العمليتين مستقلتان تماما عن بعضهما .

ولكن كيف يتسنى لهذا الانزيم التوفيق بين الحامض الأميني الصحيح وبين جزئ tRNA النوعي الخاص به ، وخاصة في حالة الأحماض الأمينية المتشابهة التركيب . أمكن معرفة كيف يتم هذا التمييز بمتابعة ماتم التوصل اليه بالنسبة لانزيم Isoleucyl-tRNA synthetase حيث أمكن لهذا الانزيم أن يميز بين الأيزوليوسين والثالين ، وهما حامضان أمينيان متشابهان تماما فيما عدا وجود مجموعة ميثيل اضافية في حالة الأيزوليوسين وبالتالي فإن الفرق في طاقة الارتباط binding energy بانزيم Isoleucyl-tRNA synthetase لاتزيد عن ٢ كيلو سعر (3 K cal) وهو مقدار ضئيل من الطاقة يبدو للوهلة الأولى أنه غير كاف لمنع الخطأ في

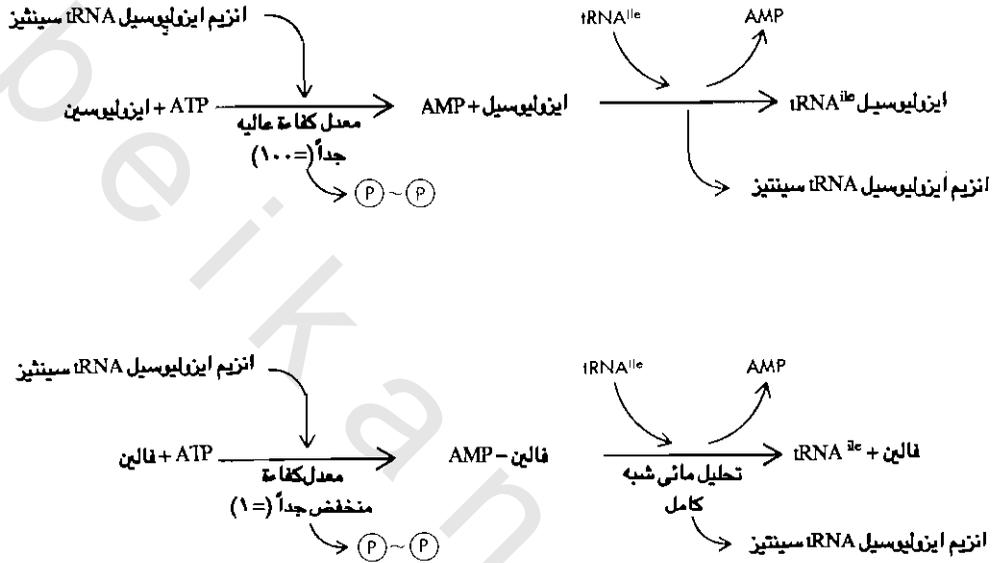
Isoleucyl-tRNA synthetase الاختيار بين هذين الحامضين . فعلى سبيل المثال عندما يوضع tase مع مخلوط متكافئ الكمية من حامض الأيزوليوسين والفالين فإنه قد يحدث التنشيط الخاطئ لجزئ واحد من الفالين (Val - AMP) في نفس الوقت الذي يتم فيه التنشيط الصحيح لـ ١٠٠ جزئ من الأيزوليوسين (Isole - AMP) في هذا المخلوط نفسه .



الشكل (٨-٤) :

تنشيط الحامض الأميني بـ ATP ونقله الى النهاية CCA لجزئ tRNA النوعي . لاحظ أنه بمجرد أن يرتبط الحامض الأميني بالجزئ فإنه يمكن الانتقال بسرعة بين النهاية 3', 2' OH للأدينوسين النهائي في جزئ tRNA .

بين حامضين امينيين متشابهين جدا وهما الفينيل الانين والتيروسين عن طريق تكوين روابط هيدروجينية نوعية مع مجموعة OH للتيروسين كما فى الشكل (٨-٧) . وهناك مجموعات أخرى من الأحماض الأمينية يتم فيها عملية التمييز بدون الحاجة الى مراجعة مثل الاسبارجين وحامض الاسبارتيك ؛ السيتوسين والهستيدين ؛ الليسين والتريوفان .



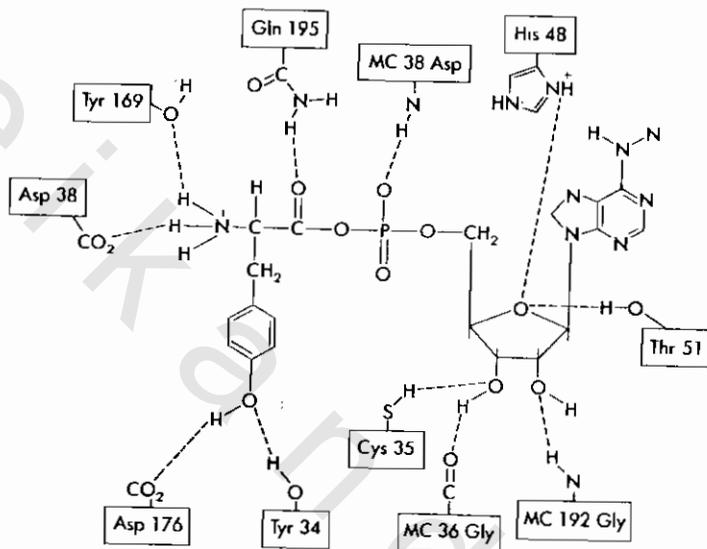
الشكل (٨ - ٦) :

التمييز بين الحامضين المتشابهين ايزوليوسين والفالين عند تكوين ايزوليوسيل tRNA ile .

دور الريبوسومات فى تكوين الروابط الببتيدية :

يعد تكوين الرابطة الببتيدية بمثابة التفاعل الرئيسى فى عملية بناء البروتين حيث ترتبط مجموعة الكربوكسيل (COOH-) فى النهاية النامية لسلسلة متعدد الببتيد بمجموعة الامين (NH₂-) الحرة للحامض الامينى المضاف ، وبالتالي فإن البروتين يتم بناؤه خطوة خطوة من النهاية الطرفية الامينية الى النهاية الطرفية الكربوكسيلية . ويلاحظ أنه على مدى مرحلة بناء البروتين باكملها تظل النهاية الكربوكسيلية لسلسلة متعدد الببتيد النامية

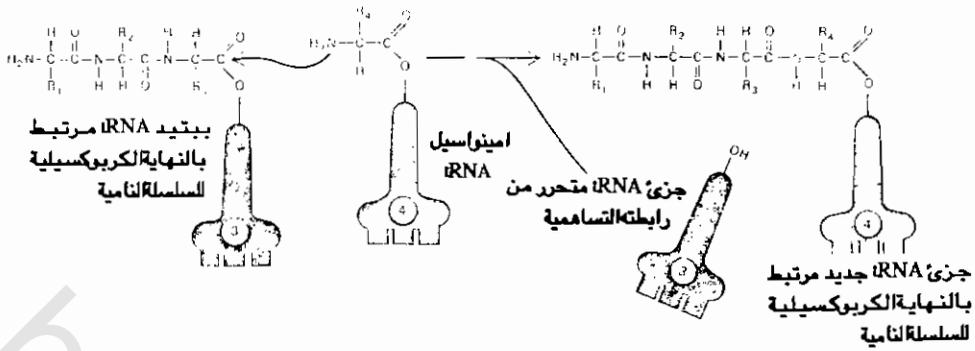
منشطة Activated عن طريق الرابطة التساهمية بينها وبين جزئ tRNA الببتيدى peptidyl . ويتم كسر هذه الرابطة التساهمية الغنية بالطاقة عند اضافة كل حامض أميني . الا أنها تعوض مباشرة عن طريق تكوين رابطة تساهمية جديدة مشابهة تتم عند إضافة أحدث حامض أميني كما في الشكل (٨-٨) . وبهذه الطريقة يحمل كل حامض أميني عند اضافته طاقة التنشيط المطلوبة لاضافة الحامض الأميني التالي له وليست تلك الخاصة باضافته هو نفسه .



الشكل (٨-٧) :

تكوين روابط هيدروجينية بين تيروسيل tRNA سينثيتيز وتيروسيل أنييليت حيث بينت دراسات التركيب الثلاثي وجود أماكن لحدى عشر رابطة هيدروجينية يمكن أن تتكون بين الانزيم و AA-AMP .

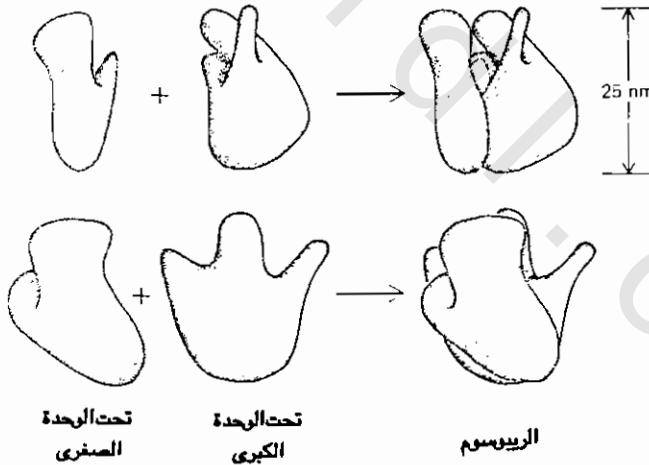
وقد تبين أن عملية تكوين الرابطة الببتيدية تتم على الريبوسومات ، وهى تلك الحبيبات الكروية التى تعد بمثابة السطح الذى يتم عليه عملية البناء البروتينى work bench ، لأنه لايمكن بناء البروتين حرا فى السيتوسول ، نظراً للحاجة الى تنظيم عملية ترجمة كل كودون فى mRNA فى تتابع مضبوط وهى تنسيق تام مع مضاد الكودون الموجود فى tRNA نون أى خلل قد يؤدي الى تغيير فى إطار القراءة . تقوم الريبوسومات بهذا الدور بالتنسيق الهام .



الشكل (٨ - ٨) :

نمو سلسلة متعدد الببتيد خطوة خطوة بإضافة حامض أميني في كل خطوة الى النهاية الكربوكسيلية الغنية في الطاقة الموجودة في الرابطة التساهمية المتكونة من ارتباطها مع جزئ tRNA .

وتتكون الريبوسومات من معقدات كبيرة الحجم نسبيا من ر ن 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 وترتبطان معا لتكوين معقد نو وزن جزئى مرتفع جدا كما في الشكل (٨-٩) .



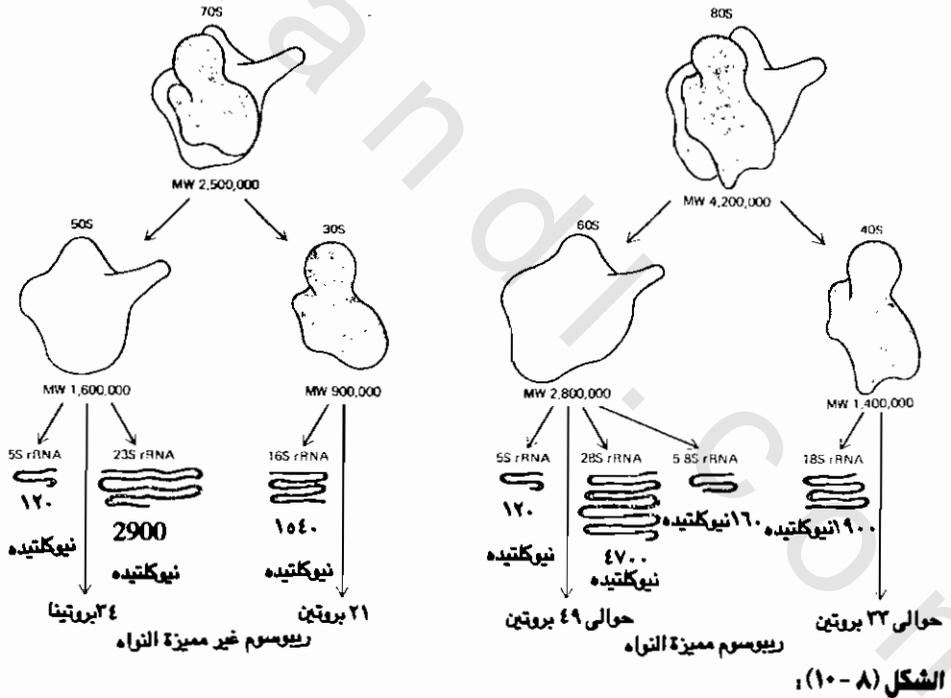
الشكل (٨ - ٩) :

نموذج ثلاثى الأبعاد للريبوسوم البكتيرى 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 الببتيدية بين الأحماض الأمينية في سلسلة متعدد الببتيد .

وجد أن حوالى أكثر من نصف وزن الريبوسومات عبارة عن rRNA وتوجد أدلة متزايدة على أن جزيئات rRNA تلعب دورا رئيسيا في النشاط الحفزى (الأنزيمى) .

يحتوى الريبوسوم على عدد كبير من البروتينات الا أن معظمها لم تعرف له وظيفة محددة بعد مما يرجح أن بروتينات الريبوسوم تقوم أساسا بتنشيط أو تحفيز وظيفة rRNA وأن جزيئات rRNA وليست البروتينات الريبوسومية هي التي تساعد في كثير من التفاعلات الأنزيمية التي تجرى على الريبوسوم . وتجدر الإشارة هنا الى أنه لم تتوفر حتى الآن معلومات تدل على إمكان احتواء rRNA على أى معلومات وراثية أو على قيامه بدور القالب في عملية الترجمة . ويخلص الشكل (٨-١٠) المقارنة بين تركيب الريبوسومات في غير مميزة النواة وفي مميزة النواة .



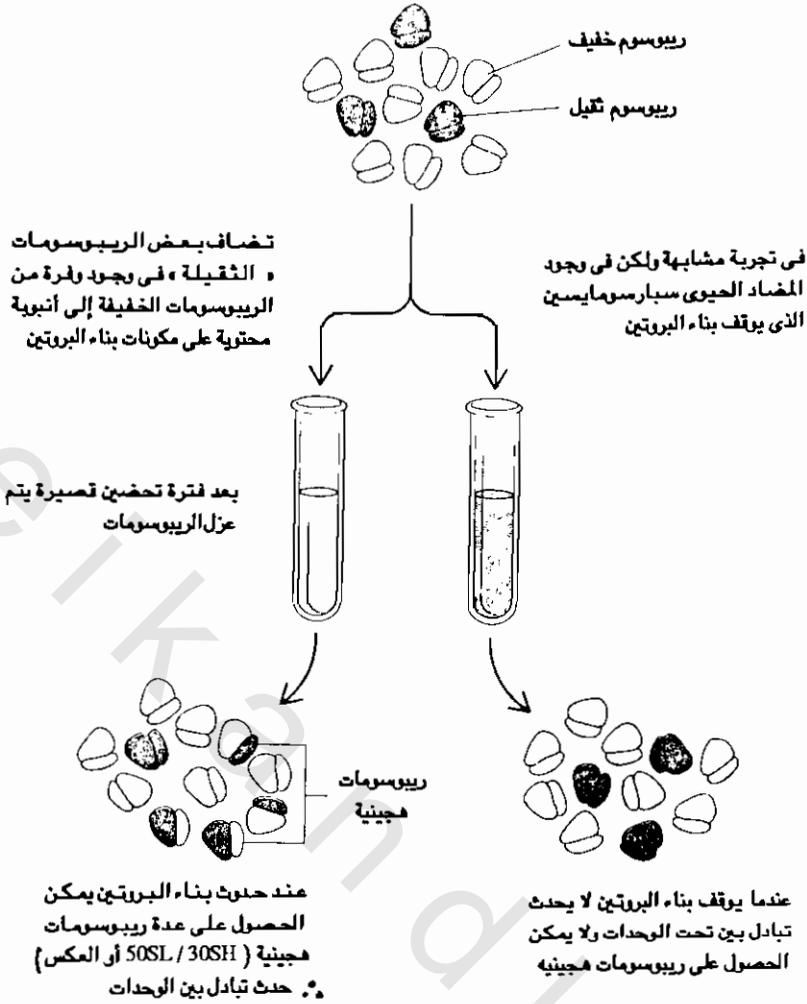
مقارنة بين تركيب ريبوسومات غير مميزة النواة ومميزة النواة .

تبين أن تحت الوحداتين المكونتين للريبوسوم لاتكونان مرتبطتين بصفة دائمة ولكن يتم ارتباطهما فقط عندما يبدأ اشتراك الريبوسوم في عملية بناء البروتين ، ثم ينفصلان مرة أخرى عند الانتهاء من ترجمة أخر شفرة (كودون) على mRNA لتبدأ دورة جديدة وهكذا . وقد استدل على ذلك من تجارب تمت على بكتريا القولون وفي الخميرة ، حيث أظهرت تلك التجارب أن معظم الريبوسومات يتم تفكيكها الى تحت وحداتها وإعادة اتحادها بصفة دورية . إذ أنه عند تنمية الخلايا في نظائر مشعة (ثقيلة) ثم نقلها الى بيئة غير مشعة (خفيفة) بدأت تظهر ريبوسومات هجينية : (Heavy 50 S / L 30 S أو Light 30 S / Heavy 50 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 حوالي دقيقة (وهي الفترة التي يستغرقها بناء سلسلة كاملة من البروتين في البكتريا) وجد أن معظم الريبوسومات الثقيلة قد اختفت في نفس الوقت الذي ظهرت فيه ريبوسومات هجينية (H 50S/L 30S أو L 50S/H 30S) كما في الشكل (٨ - ١١) .

ومما يؤكد أن هذا التبادل بين تحت الوحدات يعتمد كلية على عملية بناء البروتين أنه عند اضافة المضاد الحيوى Sparsomycin الذي يوقف استطالة سلسلة متعدد الببتيد فإنه في نفس الوقت يمنع التبادل بين تحت وحدات الريبوسوم كما هو موضح بالشكل (٨ - ١١) .

تحرك الريبوسومات خطوة خطوة على سلسلة mRNA القالب :

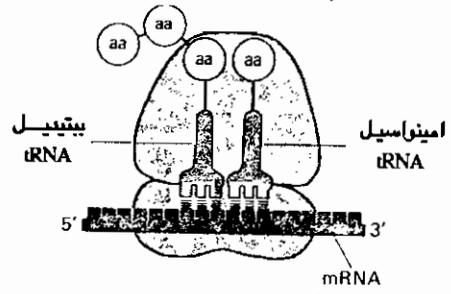
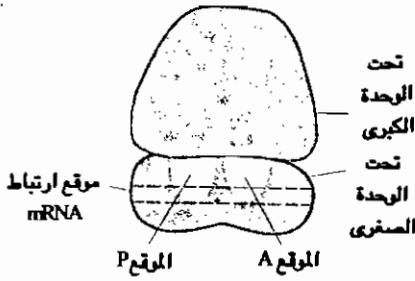
يحتوى الريبوسوم على ثلاث مواقع للارتباط بجزيئات ر ن أ وهي : موقعا خاصا للارتباط بسلسلة mRNA ويوجد في تحت الوحدة الصغيرة 30S وموقعا لارتباط tRNA ويشترك في تكوينهما تحت الوحدات 30S ، 50S معا . وهذان الموقعا الأخيران يسمى أحدهما موقع ارتباط tRNA الببتيدي Peptidyl - tRNA binding site أو الموقع «P-site» وهو الذى يتصل به جزئ tRNA المرتبط بالنهاية النامية لسلسلة متعدد الببتيد . أما الموقع الآخر فيسمى موقع ارتباط امينواسيل Aminoacyl - tRNA binding site أو «A-site» ويرتبط به جزئ tRNA التالى والمحمل بالحامض الأميني المراد اضافته الى السلسلة النامية لتعدد الببتيد .



الشكل (٨ - ١١) :

الاعتماد الاجبارى لتبادل تحت وحدات الريبوسوم على عملية بناء البروتين.

ولكى يكون ارتباط جزئ tRNA بأى من الموقعين قويا ، لابد أن يكون التزاوج صحيحا بين مضاد الكوبون فى هذا الجزئ النوعى من tRNA وبين الكوبون الثلاثى المقابل فى سلسلة mRNA المرتبط بالريبوسوم . كما أن الموقعين A ، P يحتلان مكانين متجاورين بشدة على الريبوسوم لدرجة أن جزئى tRNA المحتلان لهما لا توجد أمامهما فرصة إلا تكوين تزاوج مع الكوبونان المتجاورين مباشرة فى جزئ mRNA كما فى الشكل (٨ - ١٢) .



الشكل (٨ - ١٢) :

مواقع الارتباط الثلاث الرئيسية على الريبوسوم .

الى اليسار : يوجد ريبوسوم غير مرتبط وبين مواقع الارتباط ، ويبدو الريبوسوم على اليمين مرتبطاً .

يتحرك الريبوسوم بمعدل كيون ثلاثي واحد على mRNA فى كل خطوة ، ولو أن هناك مفهوم بديل بأن شريط mRNA هو الذى يمر من خلال الريبوسوم بمعدل ٣ نيوكلييدات فى كل خطوة إلا أن المفهوم الأول هو المرجح حتى الآن .

مراحل عملية بناء البروتين :

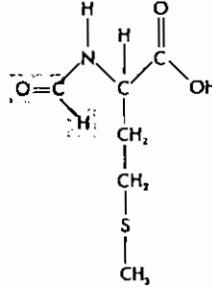
يمكن ، لتسهيل المتابعة فقط ، تقسيم عملية بناء البروتين الى ثلاث مراحل رئيسية وهى :

- ١ - مرحلة البدء Initiation
- ٢ - مرحلة الاستطالة Elongation
- ٣ - مرحلة الانتهاء أو الايقاف Termination .

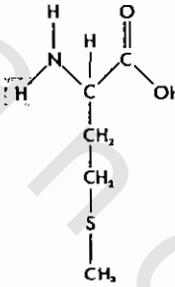
أولاً : مرحلة البدء Initiation :

تبين أن عملية القراءة الصحيحة للشفرات على سلسلة mRNA القالب تتوقف على الموقع الابتدائى الذى يتم فيه إرتباط الريبوسوم بتتابعات القواعد فى mRNA . إذ أنه فى مرحلة البدء لبناء البروتين ، يتم تجميع تحت وحدتى الريبوسوم وارتباطهما فى الموقع المضبوط على mRNA حيث تبدأ القراءة الصحيحة للشفرة ، وبالتالي حيث يبدأ بناء سلسلة متعدد الببتيد .

وقد تبين أنه بالنسبة لمعظم البكتريا يكون الحامض الأميني الأول في السلسلة هو (f) N-formyl methionine وهو عبارة عن حامض الميثونين بعد تعديله بإضافة مجموعة فورمات الى مجموعة الأمين الطرفية (الشكل ٨ - ١٣) .



ن - فورمايل ميثونين



ميثونين

الشكل (٨ - ١٣) :

المقارنة بين ن - فورمايل الميثونين والميثونين .

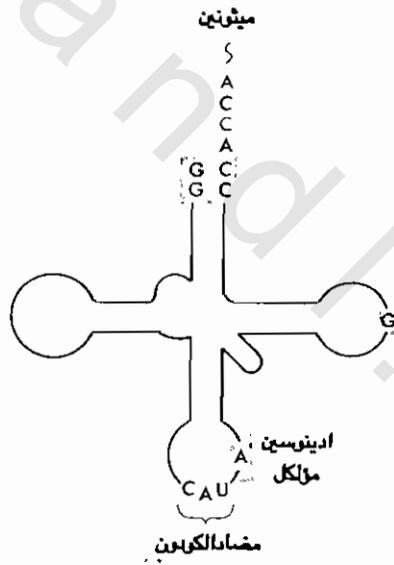
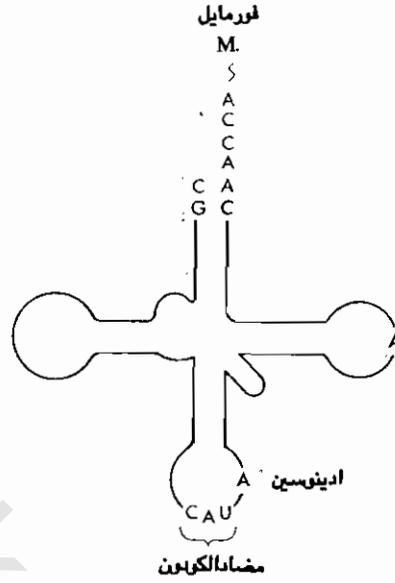
وبذلك يتم شغل مجموعة الأمين الطرفية مما يؤدي الى منع امكان اضافة هذا الحامض المتحور في الأماكن الداخلية بالسلسلة أثناء مرحلة الاستطالة نظرا لأن مجموعة الأمين تكون غير حرة نتيجة لارتباطها بالفورمات . يتم اضافة مجموعة الفورمات انزيميا الى الميثونين بعد أن يرتبط هذا الأخير بجزئ tRNA الخاص به . فقد تبين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

الفورمات في حين يوجد نوع آخر من $tRNA^{Met}_M$ يقوم بحمل الميثيونين الداخلى أثناء مرحلة الاستطالة ولا يحدث عليه تفاعل الفورمات ويسمى $tRNA^{Met}_M$ (للميثيونين الداخلى) . بينت تحليلات تتابع القواعد في كلا النوعين من tRNA أن كلا منهما يحتوى على نفس مضاد الكوبون (CAU) مما أدى الى التساؤل عن كيف يتسنى لنفس الكوبون (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 جزيئى tRNA كما فى الشكل (٨ - ١٤) .

ومن جهة أخرى تبين أن بناء البروتين فى البكتريا يبدأ بتكوين معقد من تحت الوحدة الصغيرة 30S للريبوسوم مع $f\text{Met} - tRNA^{Met}_F$ و mRNA عند الكوبون AUG ثم لاتبث 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 كوبون AUG البدء ، أى عند بداية قراءة الجين ، والكوبون نفسه الذى يشفر للميثيونين الداخلى ؟ أمكن الاجابة على هذا السؤال عندما تم التعرف على أول تتابع بدء عن طريق ربط الريبوسومات مع mRNA نوعى ثم تلى ذلك المعاملة بانزيم ريبونوكلييز لتحليل جميع mRNA ماعدا المنطقة المرتبطة بالريبوسوم حيث تكون محمية من التحليل الانزيمى .

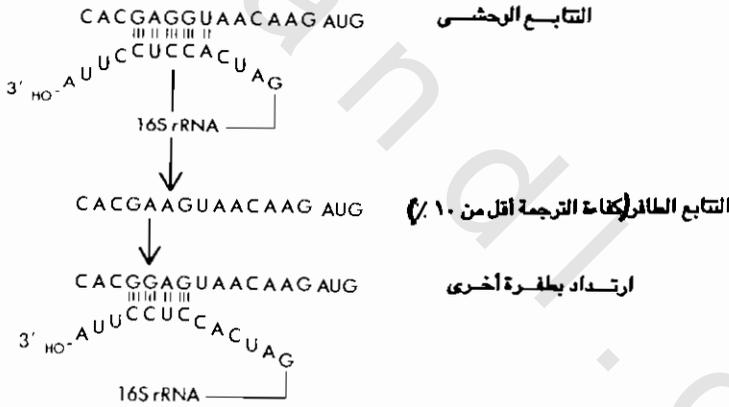
وعند تحليل التتابعات المكونة من ٢٠ نيوكليدية فى هذه المنطقة المحمية وجد أنها تحتوى على AUG's بالقرب من الوسط متبوعة بنيوكليديات تشفر للثلاث أو الأربع أحماض أمينية الأولى فى سلسلة متعدد الببتيد ، وقد وجد أن هذه النيوكليديات يتم التعرف عليها نوعيا بواسطة تحت الوحدة الريبوسومية الصغيرة 30S وأن هذا التتابع يختلف من حين الى آخر ؛ ولكن وجد أن هناك مجموعة مكونة من ٢ الى ٩ نيوكليديات بيورينية تقع فى الجهة 5' من المنطقة المحمية فى mRNA ، وتعتبر هذا التتابع القصير من القواعد هاما جدا لربطه بالريبوسوم . وجد أن معظم مواقع ارتباط الريبوسومات تحتوى على تتابعات مثل : AGGA أو GAGG تقع على بعد حوالى ٨ الى ١٢ نيوكليدية قبل كوبون البدء .



الشكل (٨-١٤):

مواقع الاختلافات بين ن - فورمايل ميثونين tRNA F و ميثونيل tRNA M .

وتتزاوج هذه التتابعات مع تتابعات مكملة لها موجودة في منطقة غنية بالبيريميديئات في النهاية 3' لسلسلة 16S rRNA : (3'-GAUCACCUCCUUA-OH). يؤدي هذا التزاوج إلى وضع كودون البدء AUG في موقع يسمح له بالارتباط بمضاد الكودون الخاص بجزيء Met^{F} tRNA الخاص بالبدء والمرتبط بتحت الوحدة 30S. وبذلك تكون القدرة على تكوين تفاعلين منفصلين لتزاوج القواعد في نفس الوقت : أي mRNA / tRNA (مضاد الكودون / الكودون) وبين mRNA / 16S RNA (مضاد الكودون / الكودون) التي تسمح بالتمييز بين منطقة البدء الحقيقية وبين المواقع الأخرى الداخلية التي قد تحتوي على الكودون AUG الذي يشفر للمثيونين الداخلي. وكما هو متوقع فإن الطفرات التي تؤدي إلى تغيير في المنطقة الغنية في البيورين في موقع ارتباط الريبوسوم تؤدي إلى خفض كفاءة ترجمة mRNA. ويمكن استعادة كفاءة الترجمة باستحداث طفرة أخرى تستعيد التكامل في تزاوج القواعد للنهية 3' في 16S rRNA حتى ولو كان التتابع مختلف عن ذلك الذي في mRNA الأصلي كما في الشكل (8-15).



الشكل (8-15)

تتابع منطقة البدء عند بداية سلسلة mRNA للجين ٢،٠ في الفاج T7. ويؤدي تفاعلها مع النهاية 16S rRNA إلى وضع الريبوسوم في مكان البداية الصحيح على شريط mRNA لبدء الترجمة. وتؤدي طفرة استبدال متماثل من نوع G إلى A إلى وقف هذا التفاعل. ويمكن استعادة هذه الوظيفة لو حدث طفرة استبدال متماثل أخرى (A إلى G) في موقع قريب. يبدو كودون البدء AUG مظللاً في هذا الشكل.

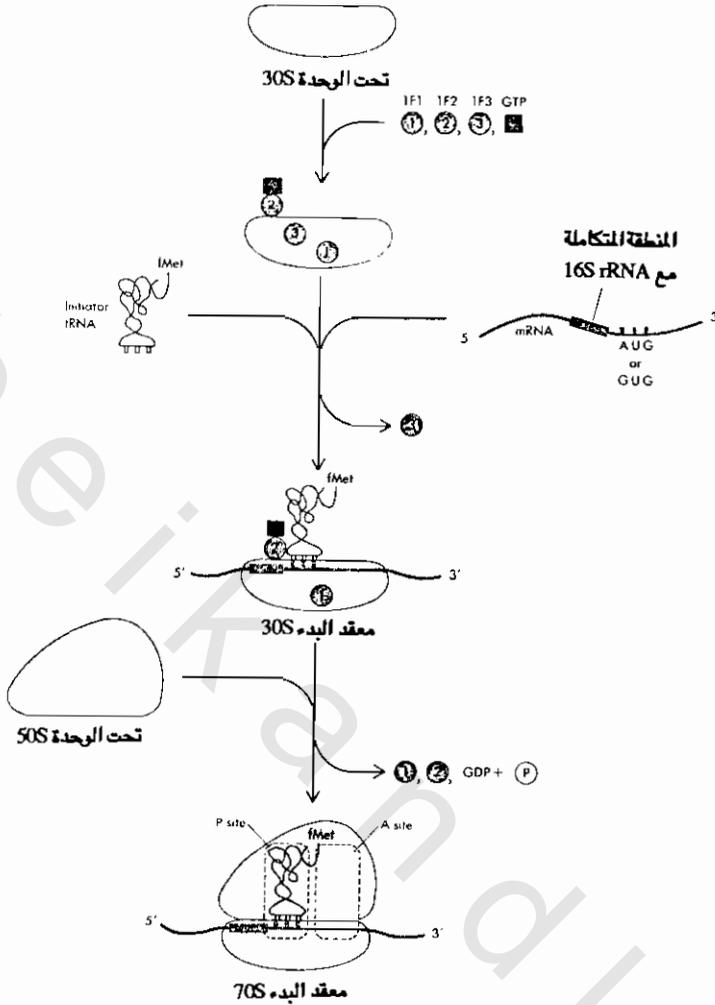
عندما تبدأ استطالة سلسلة متعدد الببتيد لا بد أن يحدث انفكك للتزاوج الحادث بين القواعد بين mRNA ، 16S rRNA وذلك لكي يصبح rRNA حر الحركة على سطح الريبوسوم . تؤدي هذه الحركة الى أن يصبح الريبوسوم على اتصال بمناطق mRNA التي لم يكن من الممكن في السابق أن يرتبط بها لولا أن عملية البناء قد استهلت في المنطقة السابقة . وضمن استمرار حركة الريبوسوم فإنه لا بد أن يتم فك مؤقت لمناطق الحلزونة 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 الى جانب ضرورة وجود F^{Met} N-formyl-Met tRNA ، mRNA وتحت الوحدات الريبوسومية 30S و 50S ، فإنه لا بد لكي تبدأ عملية بناء البروتين أن تتوفر ثلاث بروتينات مختلفة نوعية تكون مرتبطة قليلا بالريبوسومات وتسمى عوامل البدء وهي : IF1 ، IF2 و IF3 كما في الشكل (٨ - ١٦) .

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

ويعتقد الآن أن العامل IF3 يؤدي الى 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 . ويبين الجدول (٨-١) الوزن الجزيئي لعوامل البدء IF وكذلك عوامل الاستطالة (EF) وعوامل الانتهاء أو الانفكك (RF) كما سيأتي بعد . في الخطوة التالية يتم ارتباط F^{Met} Met tRNA و mRNA بمعقد IF-30S-GTP . وفي هذا التفاعل يحدث ارتباط وثيق بين f^{Met} Met tRNA F^{Met} مع المعقد IF2-30S ، وبمجرد تكوين معقد البدء 30S Initiation complex ينطلق العامل IF3 وولى ذلك ارتباط تحت الوحدة 50S بمعقد البدء مما يؤدي الى التحليل المائي لجزيء GTP وانطلاق عاملي البدء الآخرين . ويطلق على المعقد النهائي معقد البدء 70S Initiation complex .70S



الشكل (٨-١٦) :

شكل تخطيطي لعملية بدء بناء البروتين .

اتجاه الترجمة 5' → 3' :

بعد أن يتم الارتباط الصحيح بين منطقة البدء لجزئ mRNA ومعقد البدء والريبوسوم ، يتحرك الريبوسوم في اتجاه ثابت أثناء بناء البروتين حيث أنه ليست لديه حرية الحركة أما في الاتجاه الى اليمين أو الى اليسار ، مما يعكس حقيقة أن جزئ mRNA له اتجاه ثابت ومحدد في القراءة بحيث تقرأ النهاية 5' أولاً وتستمر القراءة متجهة الى نهاية 3' . ومما يدل على

ذلك فإنه في البكتريا وجد أن الريبوسوم يمكنه أن يرتبط بسلسلة غير تامة البناء من mRNA أثناء نسخها على قالب د ن أ وعلى العكس من ذلك اذا كان بناء البروتين يتم في الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ فإن معنى ذلك أن لاتبدأ ترجمة جزيء mRNA في البكتريا الا بعد الانتهاء تماما من عملية نسخه على قالب د ن أ وانزلاقه أولا من على هذا القالب ، وهذا لا يحدث في البكتريا مما يدل على أن الترجمة تتم في الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ وهو نفس اتجاه النسخ .

الجدول (٨-١) :خواص بعض العوامل المشاركة في بناء البروتين في بكتريا القولون .

العوامل	الوزن الجزيئي بالتقريب	القدرة على الارتباط مع GDP (GTP)	الوفرة النسبية بالنسبة لعدد الريبوسومات
عوامل البدء :			
IF1	٩٠٠٠	-	$\frac{1}{7}$
IF2	١٢٠٠٠٠	+	$\frac{1}{7}$
IF3	٢٢٠٠٠	-	$\frac{1}{7}$
عوامل الاستطالة :			
EF-TU	٤٥٠٠٠	+	١٠
EF-TS	٢٠٠٠٠	+	١
EF-G	٨٠٠٠٠	+	١
عوامل الانتهاء :			
RF1	٣٦٠٠٠	-	$\frac{1}{20}$
RF2	٣٨٠٠٠	-	$\frac{1}{20}$
RF3	٤٦٠٠٠	+	$\frac{1}{20}$

ثانيا :مرحلة الاستطالة Elongation :

لم يعرف على وجه التحديد اذا كان $f\text{Met tRNA}^{\text{Met}}$ يرتبط مباشرة من البداية بالموقع P دون أن يمر على الموقع A أولاً أو أنه يتحرك من الموقع A الى الموقع P ولكن من الواضح

أنه لابد أن ينتهي به المطاف في الموقع P ليفسح المجال للحامض المحمل التالي لكي يحتل الموقع A وأن عامل البدء IF2 لابد أن يتحرر بالتحليل المائي لجزئ GTP قبل أن يرتبط - AA tRNA التالي بالريبوسوم . حيث أنه ثبت قطعياً أن جميع جزيئات tRNA - AA ماعدا f Met-tRNA^{Met} لابد أن تدخل إلى الريبوسوم وترتبط به عند الموقع A .

بعد أن يحتل AA - tRNA الجديد الموقع A تتكون رابطة ببتيديية لتكوين ثنائي ببتيدي مرتبط بجزئ tRNA الخاص بالحامض الأميني الثاني (الجديد) ثم يلي ذلك خطوة تسمى الانتقال Translocation حيث يتحرك Peptidyl - tRNA (أى آخر جزئ tRNA المرتبطة به عند النهاية 3' له السلسلة النامية لمتعدد الببتيدي) وكذلك يتحرك الكوبون الثلاثي من mRNA المرتبط بمضاد الكوبون الخاص بأحدث حامض مضاف للسلسلة النامية إلى الموقع P وهكذا تتكرر عملية إضافة الأحماض الأمينية خطوة خطوة بحيث يضاف في كل خطوة حامض أميني جديد إلى أن يتم تكوين السلسلة الكاملة لمتعدد الببتيدي كما في الشكل (٨ - ١٧) .

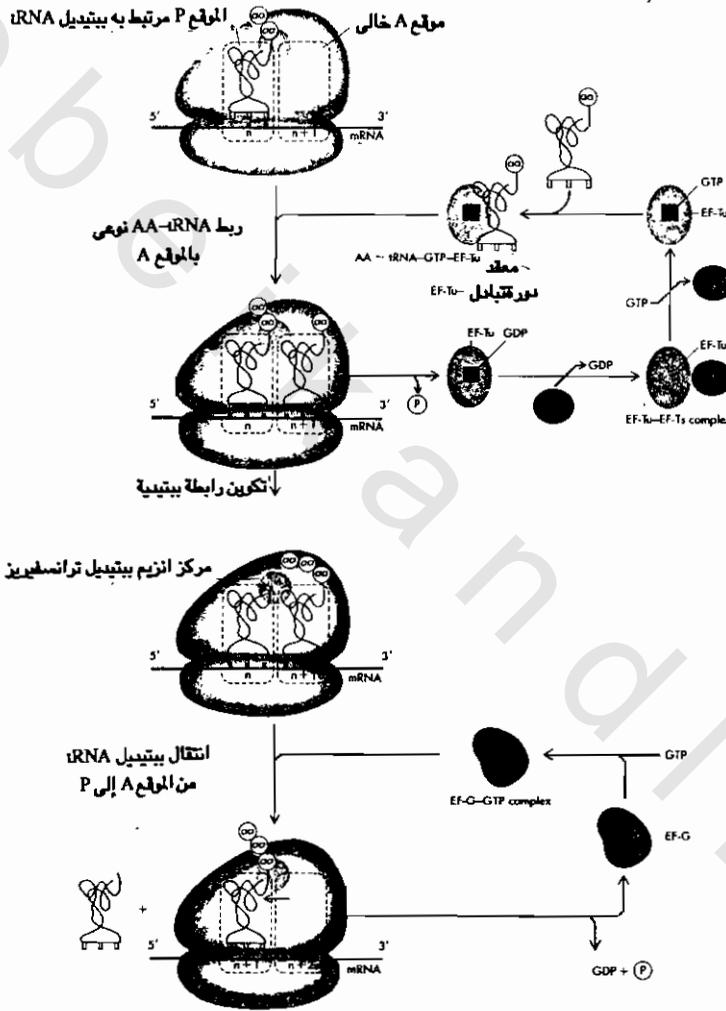
ويمكن تلخيص أهم الخطوات التي تتم في مرحلة الاستطالة فيما يلي :

١ - ترتبط النهاية الكريوكسيلية النامية دائماً بجزئ tRNA . وبعد ارتباط هذا الجزئ الطرفي من tRNA سواء بالموقع P أو A بمثابة القوة الرئيسية التي تربط سلسلة متعدد الببتيدي بالريبوسوم .

٢ - أن تكوين الرابطة الببتيديية يؤدي إلى تحريك نقطة الاتصال للسلسلة النامية من الموقع P إلى الموقع A . وأثناء هذه الخطوة يتم انتقال مجموعة الكريوكسيل الخاصة بالحامض الأميني المحمل على tRNA المحتل للموقع P إلى مجموعة الامين للحامض الأميني المحمل على tRNA المحتل للموقع A حيث يحدث الارتباط بين المجموعتين برابطة ببتيديية كما في الشكل (٨ - ١٨) .

٣ - يتم تحريك (انتقال) جزئ tRNA الطرفي الجديد من الموقع A إلى الموقع P . وفي نفس الوقت يتحرك mRNA القالب المرتبط بتحت الوحدة 30S لكي يتم وضع الكوبون التالي (n+1) في الموقع الذي كان ممثلاً بالكوبون السابق (n) في الموقع P .

٤ - في نفس الوقت الذي تحدث فيه الخطوة الثالثة فإن جزئ tRNA الذي تحرر من الحامض الأميني الخاص به أثناء تكوين الرابطة الببتيديية يبتعد عن الموقع P تاركاً الريبوسوم إلى السيتوسول لكي يتم تحميله مرة أخرى بالحامض الأميني النوعي الخاص به .



سلسلة متعدد الببتيد
النامية مرتبطة بالجمجمة
الطرفية لـ tRNA بالموقع P
على الريبوسوم

ارتباط جزئية نووية من tRNA
بروابط هيدروجينية بالكودون + 1 في
سلسلة mRNA
ويتطلب ذلك وجود عوامل الاستطالة Tu
و GTP

استعادة معد EF-Tu بواسطة Ts

تكوين رابطة بيتيدية بين AA و
AA بواسطة انزيم بيتيديل
ترانسفيريز وهو جزء من نشاط
تحت الوحدة S05

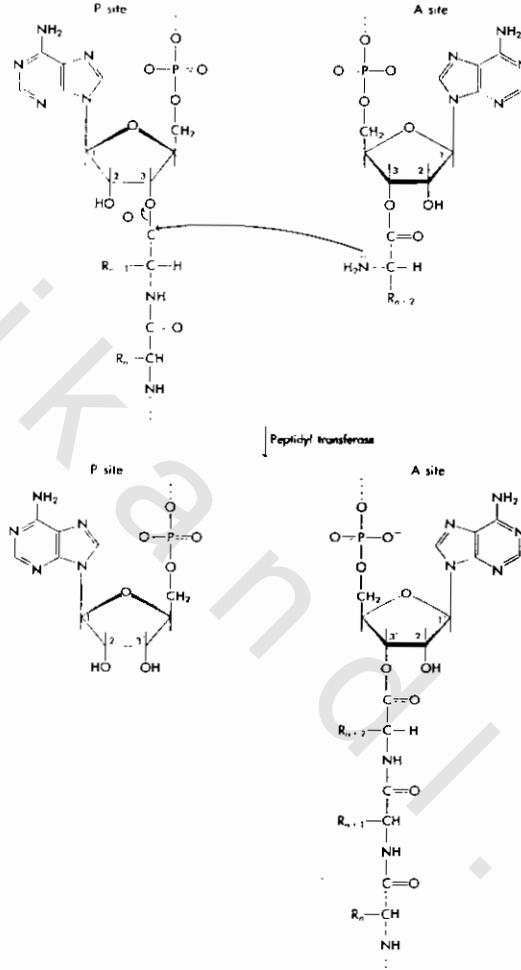
تحرك سلسلة متعدد الببتيد
النامية من الموقع A إلى P
ويتطلب ذلك وجود عامل
الاستطالة EF-G ، GTP

Simultaneous ejection of tRNA
from P site and movement of
mRNA to place (n + 2) codon
in the A site.

الشكل (٨ - ١٧)

رسم تخطيطي لنورة واحدة من تكوين رابطة بيتيدية مبينا دور عوامل الاستطالة المختلفة واشتراك GTP .

٥ - يصبح الموقع A الخالي الآن حراً لكي يستقبل جزيئاً جديداً من tRNA ~ AA والذي تتحدد نوعيته حسب تزاوج القواعد الصحيحة بين مضاد الكودون وبين الكودون المقابل في mRNA .



الشكل (٨ - ١٨) :

تفاعل انزيم ببتيديل ترانسفيريز ويظهر استطالة سلسلة متعدد الببتيد بمعدل حامض أميني واحد . وعند انتهاء نمو السلسلة يحدث مهاجمة (بالتحليل المائي) للرابطة التساهمية بين آخر حامض أميني في السلسلة وبين آخر tRNA نوعي . وبذلك يحدث انفكاك بين الحامض الأميني و tRNA ؛ وبذلك تكون سلسلة متعدد الببتيد قد وصلت الى تمام نموها وتترلق من على الريبوسوم .

مصدر الطاقة اللازمة لعملية الاستطالة :

نظرا لأن المجموعة الكريوكسيلية للحامض الأميني يتم تنشيطها عند ارتباطها تساهميا بجزئ tRNA النوعي ، فقد كان يفترض أنه لا توجد هناك حاجة الى استهلاك طاقة اضافية لتكوين الرابطة الببتيدية . الا أنه تبين أن هذا الافتراض غير صحيح إذ وجد أنه الى جانب الحاجة الى جزئ GTP لتكوين معقد البدء Initiation Complex فإن الأمر يتطلب أيضا تحليل جزئين آخرين من GTP عند اضافة كل حامض أميني الى 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 الى استهلاك طاقة من GTP كما سيأتى بعد علما بأن هذه العوامل لاتشارك مباشرة في تكوين الرابطة الببتيدية .

دور عوامل الاستطالة (EF) Elongation factors في بناء البروتين :

كان يعتقد مبدئيا أن ارتباط جزئ tRNA ~ AA بالريبوسوم عملية لا انزيمية تحدث عندما يصطدم جزئ tRNA ~ AA بالموقع A المرتبط بالكوبون النوعي للحامض الأميني . غير أنه تبين فيما بعد أن هناك مجموعة من البروتينات الصغيرة تسمى عوامل الاستطالة (EF) Elongation factors لابد من اشتراكها في هذه العملية لكي يتم الارتباط بصورة صحيحة (جنول ٨-١٠) . يبدأ 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 في بكتريا القولون بحيث تساوى عدد جزيئاته عدد جزيئات tRNA في الخلية البكتيرية .

يمكن لهذا العامل EF-TU الارتباط مع أى جزئ من AA~tRNA فيما عدا $F \text{ Met} - tRNA^{\text{Met}}$ ولم تتضح الى الآن الطريقة التى يتم فيها تمييز ذلك . وبعد ارتباط AA ~ tRNA بعامل الاستطالة EF-TU فإن المكون AA ~ tRNA ينتقل الى الموقع A على الريبوسوم مع انطلاق معقد حر من EF-TU-GDP والفوسفات كما فى الشكل (٨-١٧) .

يتطلب اعادة استخدام EF-TU لربط جزئ جديد من AA ~ tRNA الى 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 ويحرر العامل EF-TS مرة أخرى ، ثم يقوم المعقد EF-TU-GTP بربط جزيء آخر من tRNA ~ AA بالريبوسوم وهكذا تعاد الدورة ، كما في الشكل (٨-١٧) .

تبين أن تكوين 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 الأخرى في هذا النشاط الانزيمي . وبذلك يمكن تخيل انزيم Peptidyl transferase كمركز نشاط على الريبوسوم يقوم بضبط اصطفاف جزيئين من tRNA ~ AA بالطريقة المضبوطة للسماح بتكوين الرابطة الببتيدية، الشكل (٨-١٨) .

وحيث أن جزيئات tRNA ~ AA تمثل صور منشطة من الأحماض الأمينية فإن هذا التفاعل لابد أن يكون تلقائياً بدون الحاجة الى بذل طاقة اضافية .

تبين وجود عامل استطالة ثالث وهو EF-G وهو ضروري لحركة سلسلة Peptidyl - tRNA من الموقع A الى الموقع P ويطلق على هذا العامل أيضا اسم Translocase . وفي هذه العملية يتكون أولا معقد من EF-G-GTP-ribosome ثم يحدث الانتقال مقرونا بطرد جزيء tRNA الحر من الموقع P (أنظر الشكل ٨-١٧) . ويتطلب تحرير العامل EF-G من هذا المعقد لاعادة استخدامه حدوث التحليل المائي لجزيء 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 ٢٠٠ - ٤٠٠ حامض أميني في حوالى ١٠ - ٢٠ ثانية ، وأنه في أثناء هذه الفترة لاتبقى السلسلة النامية في صورة سلسلة مفردة ولكنها تأخذ بسرعة الشكل الثلاثى الأبعاد الخاص بها ، وذلك عن طريق تكوين عدة روابط ثانوية بحيث قد تصل السلسلة الببتيدية الى الشكل النهائى للبروتين النوعى قبل اضافة الأحماض الأمينية الأخيرة الى النهاية الطرفية للسلسلة .

ثالثاً : مرحلة انتهاء الترجمة (Termination (Release) :

تبين أنه لكي يتم انتهاء عملية بناء سلسلة متعدد الببتيد لابد أن يتوفر شرطين : أولهما أن

يوجد كودون نوعي يعمل كإشارة إيقاف لإستطالة السلسلة ، والشروط الثاني هو توفر بروتينات نوعية تسمى بروتينات الانفكاك أو الانهاء Release factors (RF) التي تقوم بقراءة اشارات انهاء بناء السلسلة .

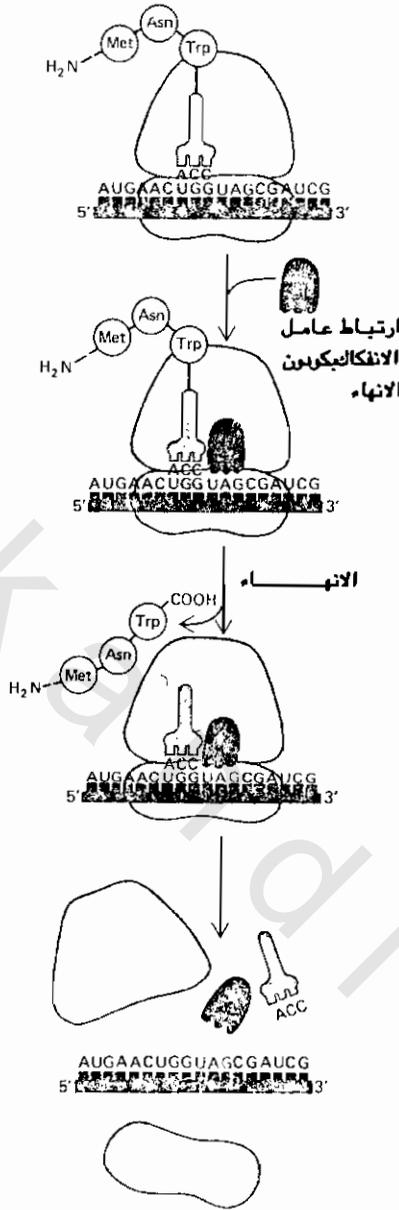
ويرجع ذلك الى حقيقة أنه عندما تصل سلسلة متعدد الببتيد الى تمام استطالتها ، فإن نهايتها الكريوكسيلية تظل مرتبطة بأخر جزئ من tRNA وعلى ذلك فلايد لعملية الانهاء أن تشتمل على ازاحة هذا الجزئ الطرفي من tRNA وتحرير مجموعة الكريوكسيل منه . وعندما يتم ذلك تنفك السلسلة الناشئة التامة النمو بسرعة من على الريبوسوم وذلك نظرا لأن ارتباطها بالريبوسوم كان بواسطة هذا الجزئ الأخير من tRNA . تبين وجود ثلاث كودونات في الشفرة الوراثية متخصصة في اعطاء اشارة الايقاف لعملية بناء البروتين في الخلية وهي UAA , UAG , UGA . إلا أنه تبين أن هذه الكودونات النوعية لايمكن لأي نوع من tRNA التعرف عليها ولكن يتم التعرف عليها فقط بواسطة بروتينات نوعية تسمى عوامل الانفكاك Re-lease factors (RF) .

يحتل أحد عوامل الانفكاك الموقع A على الريبوسوم عندما يتم الوصول الى الكودون الخاص بالانهاء على سلسلة mRNA مما يؤدي الى منع اضافة أي tRNA ~ AA جديد الى هذا الموقع . وقد تبين وجود ثلاث أنواع من عوامل الانفكاك في بكتريا القولون وهي : RF1 , RF2 , RF3 (جدول 8-1) . ويتعرف العامل RF1 على كودوني الايقاف : UAA , UAG في حين يتعرف العامل RF2 على كودوني الايقاف : UAA , UGA .

يؤدي ارتباط عامل الانفكاك بالموقع A على الريبوسوم الى دفع انزيم Peptidyl transferase الى نقل السلسلة الببتيدية التامة النمو الى جزئ ماء بدلا من جزئ AA ~ tRNA (انظر الشكل 8-18) ، فتتزلق السلسلة الكاملة متحررة من الريبوسوم نظرا لعدم وجود ما يربطها به .

هناك عامل انفكاك ثالث RF3 وهو يحتاج الى GTP و GDP لنشاطه ، ويبدو أنه يساعد على تحفيز تفاعل الانفكاك وتحرير سلسلة متعدد الببتيد من الريبوسوم الا أنه لايقوم باحتلال الموقع A مباشرة كما يحدث في العاملين RF1 و RF2 .

يلي ذلك انفكاك mRNA من موقع ارتباطه على الريبوسوم ، وهذا الأخير لايلبث أن يتفكك الى تحت الوحدتين 50S ، 30S اللتان تبحثان عن جزئ mRNA جديد لبدء دورة جديدة من عملية بناء البروتين . ويبين الشكل (8-19) دور عوامل الانفكاك في عملية انهاء بناء سلسلة متعدد الببتيد .



الشكل (٨-١٩):

المرحلة النهائية في عملية بناء البروتين . يؤدي ارتباط عامل الانفكاك (الانهاء) بكونين التوقف الى انتهاء عملية الترجمة . وتحرر سلسلة متعدد الببتيد الكاملة في حين تتفكك تحت وحدتي الريبوسوم.

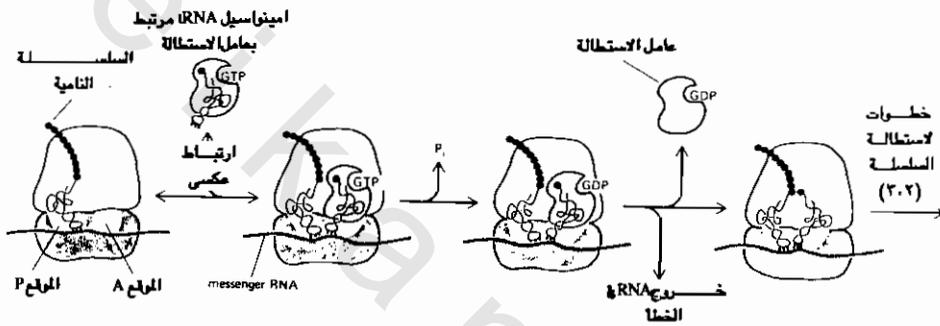
دور GTP فى مراجعة أخطاء الترجمة :

عندما يرتبط tRNA بالحامض الأمينى الخاص به ، فإنه يكون معقد مع عامل الاستطالة EF الذى يرتبط بقوة مع الحامض الأمينى فى جزئ tRNA ~ AA من جهة ويجزئ 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 مؤقتا الحامض الأمينى من أن يضاف إلى سلسلة متعدد الببتيد النامية . إلا أن هذا التعرف المبدئى للكودون لا يلبث أن يدفع عامل الاستطالة الى استهلاك جزئ GTP المرتبط به (بالتطيل المائى الى GDP + فوسفات) مما يؤدى الى انفكك عامل الاستطالة من هذا المعقد على الريبوسوم تاركا جزئ tRNA ~ AA بحيث يصبح فى الامكان أن يستمر بناء البروتين . وكما هو موضح فى الشكل (٨ - ٢٠) 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 عما يحدث بالنسبة للجزئ الصحيح ، بحيث يكون ارتباط الأول ضعيفا بالريبوسوم وبالتالي يكون أكثر تعرضا للانفكك بسهولة أثناء هذه الفترة الوجيزة . وحيث أن التأخير الذى يسببه عامل الاستطالة يؤدى بمعظم جزئيات tRNA غير الصحيحة المرتبطة بالريبوسوم الى الانفكك عنه وتركه بنون أن تستخدم فى بناء البروتين ، فإن هذا العامل يؤدى الى زيادة نسبة الأحماض الأمينية الصحيحة الى غير الصحيحة المضافة الى سلسلة متعدد الببتيد ، ويتم ذلك بالطبع على حساب استهلاك GTP .

البقعة السحرية Magic Spot " PP GPP "

تبين أنه اذا حدث بالصدفة أن احدى جزئيات tRNA غير المحملة بحامض أمينى قد احتلت الموقع A على الريبوسوم فإن ذلك لا يؤدى فقط الى وقف استطالة سلسلة متعدد الببتيد مؤقتا ولكنه يؤدى أيضا الى إبطاء التفاعل على الريبوسوم الذى يستخدم فيه ATP كمعطى لثنائى الفوسفات P ~ P . ويحدث نتيجة لهذا الوضع غير الطبيعى أن يتحول GDP (3'OH - PP5G) الى النيوكلييدة غير العادية 3'OH - PP5G والتي يطلق عليها «البقعة السحرية» Magic Spot . يتم انتاج هذه البقعة السحرية فقط اذا تمكن tRNA غير

المشحون من أن يحتل الموقع A وأن يتزاوج مع الكودون في mRNA . وفي حين أنه أثناء النمو العادي للبكتيريا تتكون كميات ضئيلة جدا من PPGPP نجد أنه تتراكم كميات كبيرة منه أثناء مجاعة الخلية . يعتقد أن هذه الجزيئات غير العادية تقوم بدور الاشارات التي توقف نوعيا بناء سلاسل rRNA و tRNA في الخلية أي أنها تقوم بدور تنظيمي للحيلولة دون إنتاج كميات ريبوسومات أكثر مما تستطيع الخلية استخدامه . يطلق على هذا التثبيط النوعي لبناء rRNA و tRNA تحت ظروف المجاعة ونقص الأحماض الأمينية اسم «الاستجابة الإلزامية» Stringent response .



الشكل (٨-٢٠):

شكل يبين دور GTP في مراجعة أخطاء الترجمة . في مرحلة الارتباط المبدئي يتصل جزئ أمينواسيل tRNA المرتبط بعامل الاستطالة ويتزاوج مبدئياً بالكودون على الموقع A . يدفع هذا التزاوج الى التحليل المائي لجزئ GTP بواسطة عامل الاستطالة مما يسمح لعامل الاستطالة بالانفكاك من جزئ أمينواسيل tRNA الذي يمكنه الآن أن يرتبط بدقة في الموقع A ويشارك في استطالة السلسلة . يسمح فقط لجزئيات tRNA المحتوية على مضاد الكودون الصحيح بأن تبقى متزاوجة بجزئ mRNA لفترة طويلة نسبياً تسمح باضافتها الى سلسلة الببتيد النامية .

وقد تبين وجود طفرة استرخائية Relaxed mutation تؤدي الى الاستمرار في إنتاج rRNA ، tRNA على الرغم من نقص الأحماض الأمينية . وقد وجد أن بعض الخلايا الطافرة هذه ينقصها أنزيم نو وزن جزيئي حوالي ٧٥٠٠٠ دالتون . يسمى بعامل الإلزام Stringent factor وأن هذا العامل هو الذي يرتبط بالريبوسوم ويقوم بتحويل PPG الى PPGPP .

دور بعض المضادات الحيوية في وقف بناء البروتين:

تبين أن بعض المضادات الحيوية يمكن استخدامها للقيام بدور مفيد جداً في تتبع خطوات بناء البروتين، فعلى سبيل المثال :

١ - وجد أن البيورومايسين Puromycin ، مثبت قوى لنمو جميع الخلايا ، وهو يؤدي هذا الدور عن طريق إيقاف نمو واستطالة سلسلة متعدد الببتيد كما في الشكل (٨ - ٢١) . ويرجع ذلك إلى أن هذا المضاد الحيوي يتشابه في تركيبه مع تركيب النهاية 3' لجزئ tRNA ~ AA (مثل التيروسين أو الفينيل الأئين) ، مما يؤدي الى امكان ارتباطه بالموقع A على الريبوسوم بطريقة فعالة جدا بحيث يحتل هذا الموقع بدلا من tRNA ~ AA والا هم من ذلك أن انزيم Peptidyl transferase يقوم باستخدام هذا المضاد الحيوي كبديل بحيث ينقل سلسلة متعدد الببتيد الى المستقبلات الموجودة عليه . ونظرا لأن جزئ البيورومايسين صغيرا جدا بالمقارنة بجزئ tRNA لذلك فإن ارتباطه بالموقع A يكون ضعيفا جدا مما يؤدي الى انفكاك سلسلة متعدد الببتيد النامية والمنتهاية بالبيورومايسين عن الريبوسوم مما يسبب توقف عملية الاستطالة ونتاج سلاسل ببتيدي غير كاملة بأطوال مختلفة . وتجدر الاشارة هنا الى أن حقيقة اضافة البيورومايسين الى النهاية الكربوكسيلية للسلسلة النامية يؤكد أن بناء البروتين يحدث من النهاية N الى النهاية C .

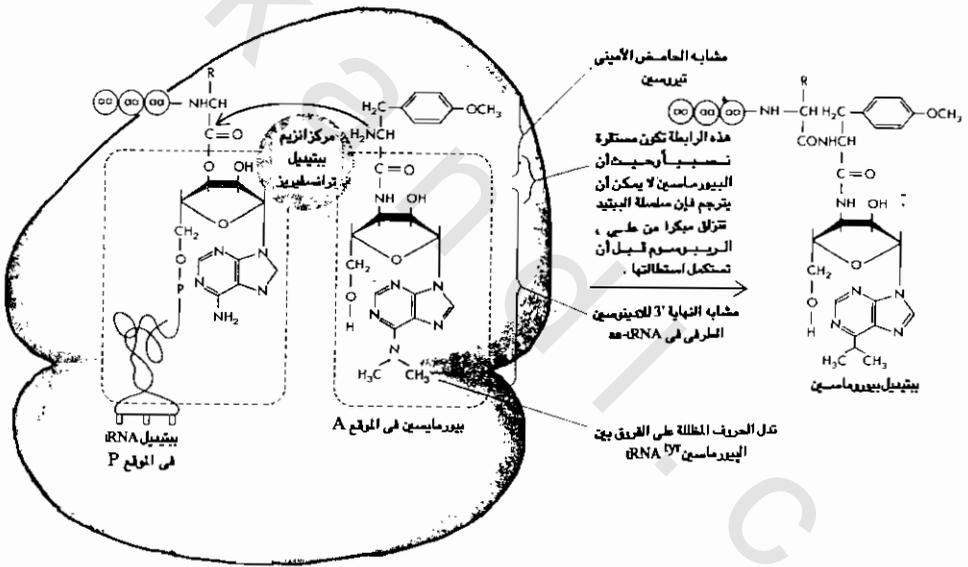
٢ - حامض الفوسيديك Fusidic acid : يتدخل هذا المضاد الحيوي في عملية انطلاق عامل الاستطالة EF-G بعد أن يؤدي دوره في عملية الانتقال حيث يؤدي استمرار ارتباط المعقد EF-G-GDP الى منع ارتباط المعقد التالي tRNA-EF-TU-GTP ~ AA على الموقع A على الريبوسوم والذي لابد أن يسبق أى دورة جديدة للاستطالة مما يوقف نمو سلسلة متعدد الببتيد .

٣ - Chloramphenicol و Sparsomycin يقوم كل من هذين المضادين الحيويين بتثبيط تفاعل انزيم Peptidyl transferase نتيجة لارتباطهما نوعيا بتحت الوحدة 50S .

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

ويلخص جدول (٨-٢) دور بعض المضادات الحيوية في تثبيط عملية بناء البروتين في

الخلية .



الشكل (٨ - ٢١) :

دور المضاد الحيوي بيورومايسين في إنهاء استطالة سلسلة متعدد الببتيد .

الجدول (٨-٢) : دور بعض المضادات الحيوية في تثبيط بناء البروتين.

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