

تنظيم التعبير الجيني في غير مميزة النواة

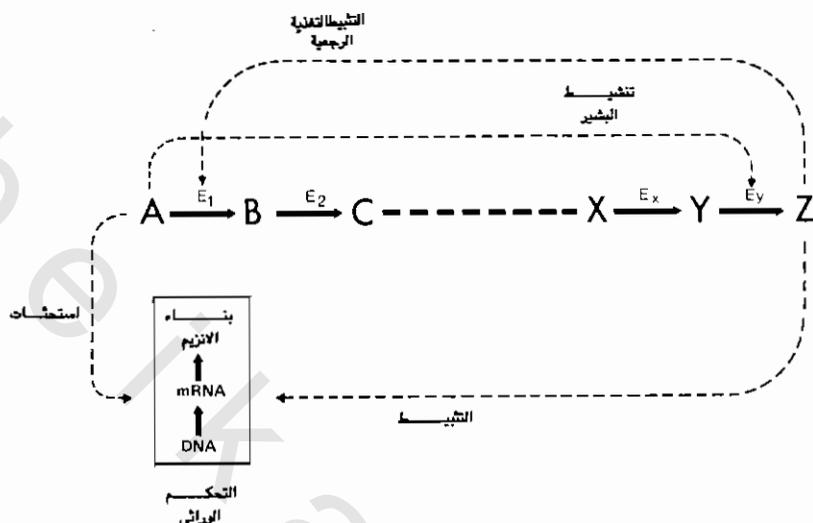
يوجد في الخلية تباين كبير في إعداد الجزيئات المختلفة للبروتينات النوعية ، لذلك كان لابد من وجود نظم لتأمين البناء الاختياري لتلك البروتينات التي تحتاجها الخلية بكميات كبيرة . كما أن الخلية البكتيرية بطبيعتها محافظة ، بمعنى أنها نادراً ما تستهلك طاقة في بناء أو هدم مواد تزيد عن احتياجاتها . لذلك نجد أن الخلية قد استنبطت نظم للتحكم في مستويات إنتاج الاف المركبات الكيماوية بداخلها . ويتم تنظيم النشاط الانزيمي عن طريق ميكانيكيتين رئيسيتين وهما :

التحكم الوراثي والتحكم في النشاط الحفزي كما هو موضح في الشكل (٩ - ١) .

يتضمن التحكم الوراثي تنظيم انتاج الكمية الكلية لجزيئات إنزيم معين وسوف نتعرض لذلك فيما بعد عند دراسة نظام الأوبرون ؛ حيث تكون محصلة هذا النظام أن الإنزيم لا يتم انتاجه إلا عند الحاجة إليه فقط . أما التحكم في النشاط الحفزي Catalysis ، فيتضمن تغيير في نشاط الإنزيم بدون تغيير في الكمية الكلية للإنزيم المنتج أى أن التغيير يكون نوعياً وليس كميأ . ويتم ذلك بصفة خاصة في الإنزيمات التنظيمية الألوستيرية Allosteric enzymes بفعل جزيئات الوستيرية منشطة أو مثبطة .

توجد ميكانيكيتين رئيسيتين لهذا النوع من التحكم وهما :

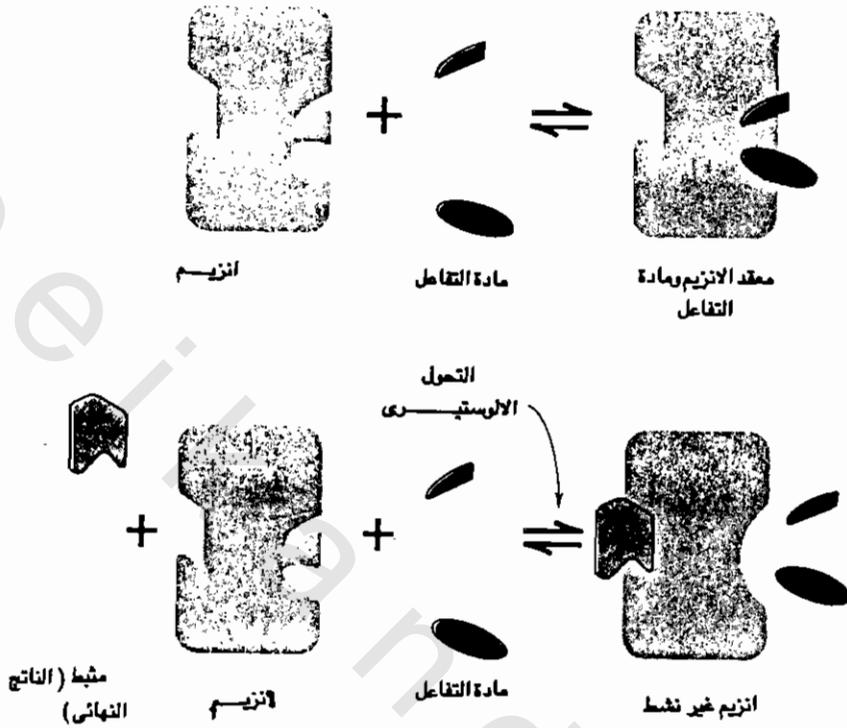
التثبيط بالتغذية الرجعية (FBI) Feed back inhibition ، والتثبيط بمادة التفاعل الأولية Substrate كما هو موضح بالشكل أعلاه .



الشكل (٩-١):

شكل تخطيطي يبين نظم التحكم في النشاط الإنزيمي عن طريق التثبيط بالتغذية الرجعية ونظام التحكم الوراثي (الأوبرون)

في حالة التغذية الرجعية يعمل المنتج النهائي endproduct في السلسلة الايضية كمثبط الوستيري للإنزيم الأول في السلسلة ؛ ويترتب على ذلك أنه عندما يتم بناء كمية كافية من هذا المنتج النهائي ، فإن السلسلة الايضية باكملها يتم إيقافها وبذلك تتجنب الخلية استمرار إنتاج وتراكم مركبات أكثر من احتياجاتها . ويبين الشكل (٩ - ٢) كيف أن ارتباط المنتج النهائي يؤدي إلى تثبيط نشاط الإنزيم بهذه الميكانيكية والتي تتضمن عملية تحول الوستيري Allosteric transformation ويتم ذلك في موقع على الإنزيم غير الموقع النوعي للارتباط بمادة التفاعل . وعادة يكون الارتباط ضعيف بحيث يسهل فك الارتباط عندما تتغير الظروف حتى يمكن للإنزيم أن يستعيد نشاطه إذا احتاجت الخلية إليه أى ، أن التفاعل هنا يكون عكسياً .



الشكل (٩-٢) :

رسم تخطيطي لتفاعل التحول الالوستيري .

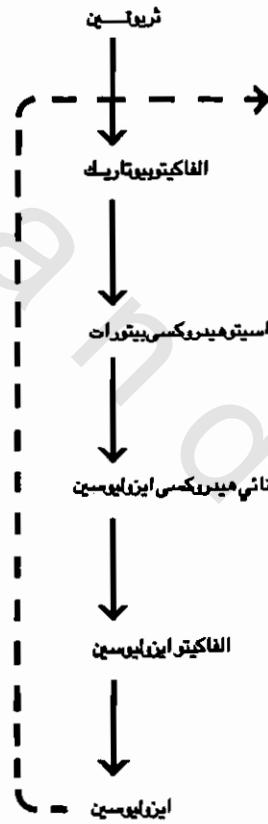
أما في حالة التنشيط بمادة التفاعل الأولية ، فإن أول مادة تفاعل في سلسلة المسار الأيضي تعمل كمنشط الالوستيري للإنزيم الأخير في السلسلة .

يعد النظام الوراثي طريقة بطيئة نسبياً للتحكم في النشاط الإنزيمي ؛ في حين يعد نظام التنشيط بالتغذية الرجعية نظام سريع جداً لضمان أن مستويات النشاط الإنزيمي كافية وفي حدود احتياجات الخلية فقط .

أنواع التثبيط بالتغذية الرجعية

يمكن تقسيم التثبيط بالتغذية الرجعية إلى الأنواع التالية :

- ١ - فى حالة سلاسل الأيض المستقيمة (غير المتفرعة) وحيث يفصل عادة بين مادة التفاعل الأول وبين المنتج النهائي عدد من الخطوات الإنزيمية ، فإن المنتج النهائي عند وصوله إلى مستوى معين من التركيز يقوم بالارتباط بالإنزيم المساعد فى الخطوة الأولى مسبباً إيقاف نشاطه وبالتالي يؤدي إلى توقف أى بناء جديد فى السلسلة الأيضية . والمثال على ذلك ما يحدث فى السلسلة الأيضية للحامض الأمينى الايزوليوسين كما فى الشكل (٩ - ٣).



الشكل (٩-٣) :

مثال لنظام التغذية الرجعية فى السلاسل الأيضية البسيطة (غير المتفرعة) فى بناء الايزوليوسين من الثريونين . تبين الخطوط المنقطعة أن الايزوليوسين (الناجى النهائي) يقوم بتثبيط الانزيم الذى يساعد فى تفاعل الخطوة الأولى (ثريونين ← الفا - كيتوبوتاريك) .

٢ - في حالة السلاسل الأيضية المتفرعة branched pathways حيث تبدأ سلسلة الأيض بمادة تفاعل مشتركة ثم لا تلتب السلسلة أن تنتشعب بحيث تنتهي بعدد من النواتج النهائية المختلفة . ومعنى ذلك أنه إذا طبقت نفس القاعدة المعمول بها في حالة السلاسل غير المتفرعة ، فإنه بمجرد وصول أى من المنتجات النهائية إلى مستوى معين من التركيز سيتم ارتباط هذا المنتج بإنزيم الخطوة الأولى في السلسلة ، مما يعنى وقف السلسلة بأكملها وما يترتب على ذلك من توقف إنتاج النواتج النهائية الأخرى ، على الرغم من أنها قد لا تكون قد وصلت إلى المستوى المطلوب والذي يفى باحتياجات الخلية .

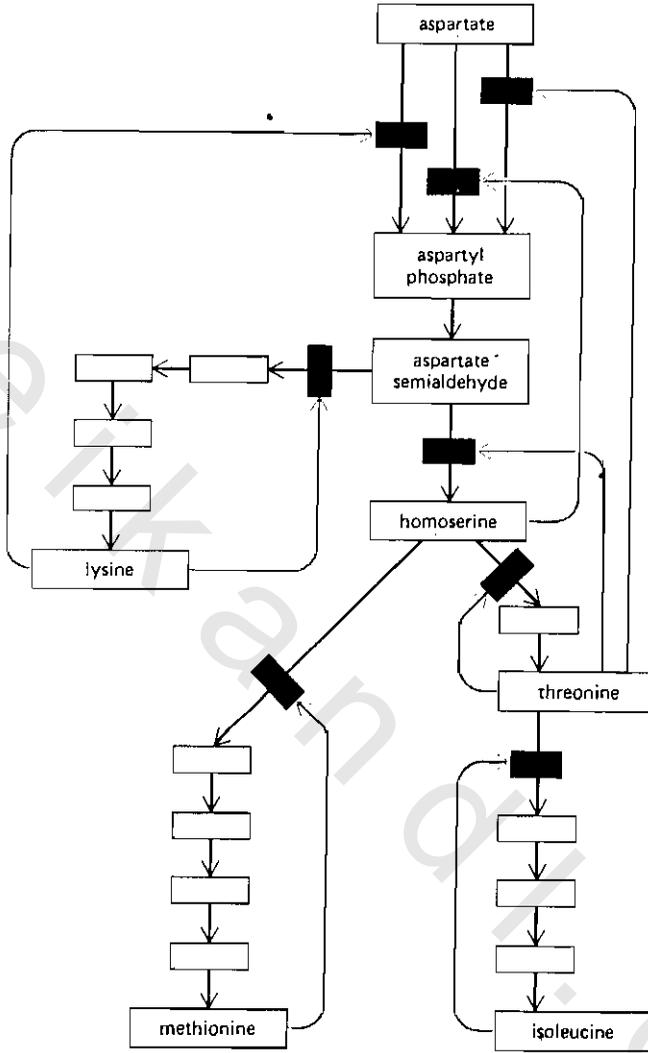
لذلك اقترحت أربعة أنواع من التثبيط بالتغذية الرجعية لتفسير ما يحدث في حالة السلاسل المتشعبة وهى :

أ - تعدد الصور الإنزيمية (مشابهات الإنزيم) Isozymes

حيث يكون للإنزيم المشارك في أول خطوة في السلسلة الأيضية عدة صور (مشابهات إنزيمية) ، بحيث يختص كل واحد من المنتجات النهائية المختلفة بالارتباط نوعياً بأحد هذه الصور مما يؤدي إلى إيقاف جزئى للسلسلة المتفرعة ؛ بحيث يتم إيقاف الخطوات الوسطية المؤدية إلى هذا المنتج النهائى وحده فى حين يستمر الإنتاج فى الأفرع الأخرى للسلسلة إلى أن تصل بنورها إلى المستوى المطلوب للخلية ، فيحدث الارتباط بين صورة أخرى للإنزيم مع المنتج النهائى التالى وهكذا . والمثال على ذلك ما يحدث فى سلسلة الأيض المتفرعة الخاصة بإنتاج الأحماض الأمينية الثلاثة : الليسين والايذوليوسين والميثونين حيث تبدأ كلها من مادة تفاعل أولية مشتركة وهى حامض الأسبارتيك كما فى الشكل (٩ - ٤) .

ب - التثبيط المتناسق concerted feedback inhibition

حيث لا يحدث إيقاف للسلسلة المتفرعة إلا عندما يتم الوصول إلى مستويات كافية من جميع النواتج النهائية معاً ؛ بمعنى أن وجود أحد المنتجات النهائية بكمية زائدة لا يكفى لإيقاف السلسلة الأيضية .



الشكل (٩-٤):

مثال لنظام التثبيط بالتغذية الرجعية في سلاسل الأيض المتفرعة حيث يتم تثبيط بناء الأحماض الأمينية
الليسين والمثيونين والثريونين والايذوليوسين في البكتريا بنظام تعدد الصور الإنزيمية (مشابهات الإنزيمات)

ج - النشاط التجمعي أو التراكمي additive or commulative FBI

حيث يؤدي كل من النواتج النهائية التثبيط جزئى فقط ؛ ولكن عندما تتوفر كميات زائدة من منتجين نهائيين أو أكثر فإن درجة التثبيط المشترك لهما ستكون مساوية لمجموع التثبيط الذى يحدثه كل منهم على حده . ويتضح ذلك فى السلسلة المتفرعة الخاصة بانتاج التريبتوفان والهستيدين و ATP ، GTP ، والجلوسامين وتبدأ جميعاً بحامض الجلوتاميك كما فى الشكل (٩ - ٥) ، حيث يحدث إغلاق للخطوة الأولى فى السلسلة وهى glutamic --> glut. N بنظام تجمعي حسب عدد النواتج النهائية التى تصل إلى مستوى تركيز معين فى البيئة .

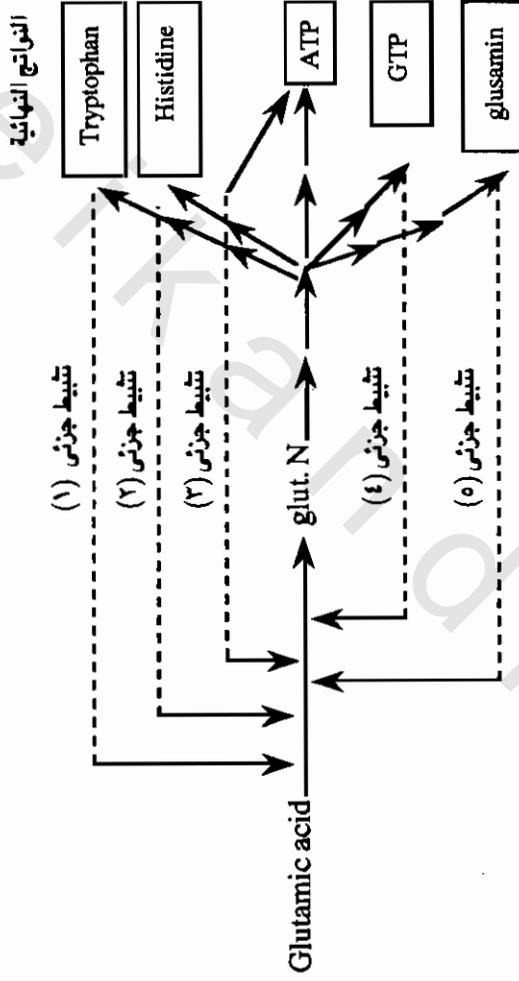
د - التثبيط التعاونى co-operative FBI

حيث يكون التثبيط المشترك لاثنين أو أكثر من النواتج النهائية أقوى من التأثير التجمعي لهما أى أن وجود اثنين أو أكثر من النواتج النهائية بكمية فائضة سيعطى درجة من التثبيط الرجعى أعلى من مجموع التثبيط الناتج عن فعل كل منهما على حدة .

ثانياً : التحكم الوراثى Genetic Control

يتم تنظيم التعبير الجيني فى البكتريا أساساً على مستوى عملية بناء ر ن أ المراسل mRNA أى على مستوى النسخ Transcription . ويتم ذلك عادة بالسماح ببدء أو منع بدء عملية النسخ بواسطة إنزيم بلمرة ر ن أ وحيث أن البكتريا تعتمد فى الحصول على غذائها من المواد المتوفرة فى الوسط المحيط بها مباشرة فإنها تستجيب بسرعة للتغيرات التى تحدث فى هذا الوسط حسب وفرة هذه المواد الغذائية .

تبين أنه إذا أتاحت لبكتريا القولون الفرصة للاختيار بين سكرى الجلوكوز واللاكتوز كمصدر للكربون ، فإن البكتريا تفضل استهلاك جميع الجلوكوز الموجود فى البيئة أولاً قبل أن تبدأ فى استخدام اللاكتوز كمصدر للطاقة اللازمة لها . وقد لوحظ أن التحول إلى استخدام اللاكتوز كان مقروناً بفترة توقف فى نمو البكتريا تم خلالها بناء إنزيم بيتا جلاكتوسيديز - β galactosidase الذى يقوم بالمساعدة فى عملية التحليل المائى لسكر اللاكتوز إلى جلوكوز وجلاكتوز . أمكن عزل وتمييز بعض الطافرات البكتيرية التى تتميز بوجود بعض النقص النوعى فى تنظيم هذا التحكم ، مما أدى فى النهاية إلى التوصل إلى البروتين المثبط لللاكتوز Lactose repressor protein .



الشكل (٩-٥) :

مثال للنظام التجمعي أو التراكمي للتنشيط بالتغذية الرجعية في سلاسل الايمن المتفرعة

وقد أدت الدراسات البيوكيماوية والوراثية التي أجريت على مثبط سكر اللاكتوز ومثبط فاج لامبدا وعدد آخر من البروتينات المنظمة للنشاط الأيضي في البكتريا إلى استنتاج نموذج عام للتنظيم على مستوى النسخ في الخلية غير مميزة النواة .

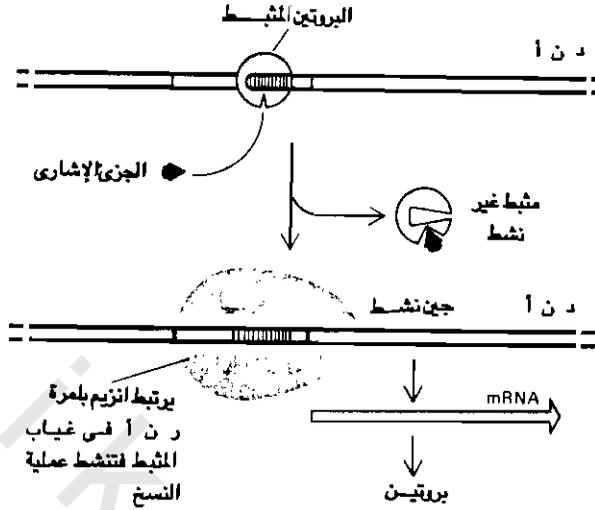
تبين أن ارتباط هذه البروتينات نوعياً بتتابعات معينة في جزئ د ن أ يؤدي إلى تثبيط أو حث بدء بناء ر ن أ لذلك الجين ، وذلك من خلال الارتباط بالمنطقة التالية مباشرة لمنطقة البروموتور حيث موقع ارتباط إنزيم ر ن أ لبدء عملية النسخ .

لوحظ أن التغيرات التي تحدث في عملية الارتباط النوعي لتلك البروتينات التنظيمية على جزئ د ن أ تؤدي إلى فتح أو قفل التعبير الجيني .

معروف أن كروموسوم بكتريا القولون يتكون من جزئ حلقى واحد من د ن أ بطول حوالي $4,7 \times 10^6$ زوج نيوكليدي . ويمثل هذا الطول ما يكفي للتشفير لحوالي 4000 بروتين نوعي . وعلى الرغم من أن نسبة فقط من هذه البروتينات هي التي يتم بناؤها في فترة ما ، إلا أن البكتريا بمقنورها تنظيم تعبير عدة جينات طبقاً لمستويات التركيز داخل الخلية لبعض مواد التفاعل النوعية والتي تختلف حسب مصادر الغذاء المتاحة في بيئة الخلية البكتيرية .

وقد أمكن التحقق من وجود بروتين مثبط للاكتوز يقوم بالارتباط بوحدة نسخية تسمى Lac operon : بحيث يؤدي هذا الارتباط النوعي إلى توقف إنتاج إنزيم بيتا جلاكتوسيداز β - galactosidase في غياب اللاكتوز . وقد تبين أن هذا المثبط يقوم بإيقاف عملية النسخ لهذا الأوبرون عن طريق ارتباطه بتتابع نوعي في جزئ د ن أ يتكون من حوالي 21 زوج نيوكليدي يطلق عليه « المشغل » Operator والذي يتداخل في تتابعه مع تتابع منطقة البروموتور السابقة له مباشرة . عندما يتم ارتباط البروتين المثبط بمنطقة المشغل فإنه يمنع إنزيم بلمرة ر ن أ من بدء عملية نسخ ر ن أ عند منطقة البروموتور ، مما يؤدي إلى إيقاف عملية النسخ للمنطقة المجاورة من جزئ د ن أ وبذلك يلعب دور ضبط أو تنظيم إنتاج إنزيم بيتا جلاكتوسيداز حسب احتياج الخلية . تبين أنه في وجود كمية من سكر اللاكتوز يتكون جزئ من السكر يسمى اللولاكتوز Allolactose في الخلية حيث يرتبط هذا السكر نوعياً بالبروتين مما يؤدي إلى انفكاكه عن منطقة المشغل وبذلك يمكن استئناف عملية النسخ في عملية تسمى « إبطال التثبيط » derepression ويترتب على ذلك أن تتمكن الخلية من إنتاج

ليس فقط إنزيم β - galactosidase ولكن جميع الإنزيمات اللازمة لهدم اللاكتوز ولكن ذلك يحدث فقط عندما يتوفر اللاكتوز (مادة التفاعل) في البيئة كما في الشكل (٩ - ٦) .



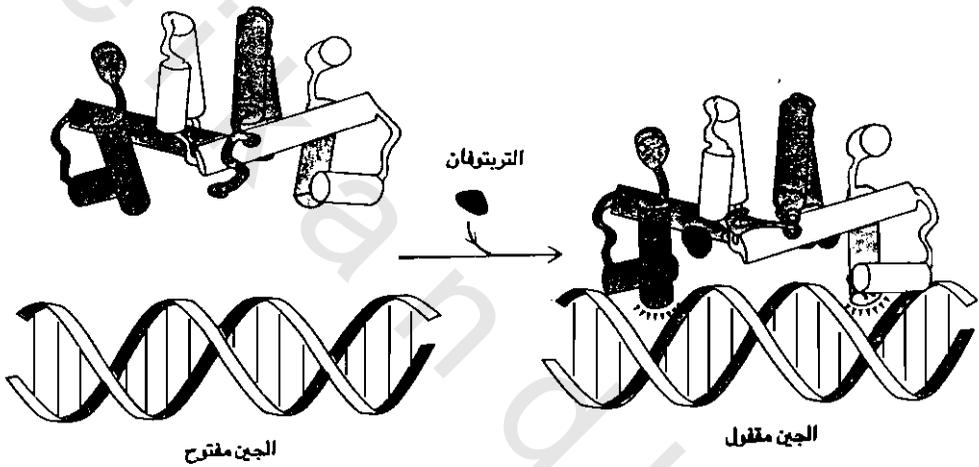
الشكل (٩ - ٦) :

إبطال تثبيط derepression الجين في البكتريا حيث يقوم جزئى اشارى صغير بالارتباط بالبروتين المثبط بحيث يغير من شكله فيترك جزئى د ن أ مما يسمح بتعبير الجينات المجاورة ونسخها .

ويلاحظ أن اللاكتوز (اللولاكتوز) يعمل هنا كجزئى إشارى Signal molecule نوعى بحيث يؤدي وجوده إلى تنشيط الوحدة النسخية بأكملها عن طريق خفض أو تقليل قدره المثبط على الارتباط بمنطقة المشغل .

ولكن من جهة أخرى تبين وجود نظم أخرى يقوم فيها الجزئى الاشارى بعملية عكسية تماماً لما يحدث في أوبرون اللاكتوز ؛ أى أنه يستخدم في وقف نشاط الوحدة النسخية عن طريق زيادة النشاط التثبيطى للمثبط وبالتالي رفع قدرته على الارتباط بمنطقة المشغل . وقد تبين أن ذلك يحدث في عملية التحكم في التعبير الجينى لخمسة جينات متجاورة تعمل في تنسيق فيما بينها للتشغيل لإنتاج الانزيمات اللازمة لإنتاج الحامض الأمينى تربتوفان في بكتريا

القولون . ويطلق على هذه الوحدة النسخية اسم أوبرون التريتوفان Trp. Operon . وجد أن البروتين المثبط للتريتوفان يتحكم في إنتاج الجزيء الكبير المتعدد السسترون Polycistronic من mRNA الذى يشفر للخمس بروتينات معاً . إلا أن هذا البروتين التنظيمى يكون عادة فى صورته الأولية غير فعال ويسمى aporepressor ويحتاج لكى يتحول إلى الصورة الفعالة إلى الارتباط نوعياً بجزيء من التريتوفان (المنتج النهائى) حتى يجعله مثبط نشط - Active repressor يمكنه الارتباط بمنطقة المشغل وإيقاف النسخ لوحدة الاوبرون كما فى الشكل (٩ - ٧) .



الشكل (٩-٧) ،

يؤدى ارتباط التريتوفان بالمثبط إلى تغيير فى شكل المثبط مما يسمح له بالارتباط بقوة بالتتابع النوعى فى جزيء DNA مما يوقف النسخ للجينات المسئولة عن التشفير للانزيمات الخاصة بإنتاج التريتوفان فى أوبرون التريتوفان . يبين الشكل ثلاثى الأبعاد كيف أن ارتباط التريتوفان يؤدى إلى زيادة المسافة بين حلزونى التعارف (الأسطوانات المظلمة) فى الثانى مما يسمح بتكوين تفاعلات لروابط هيدروجينية متعائلة التى تظهر هنا كاشعة .

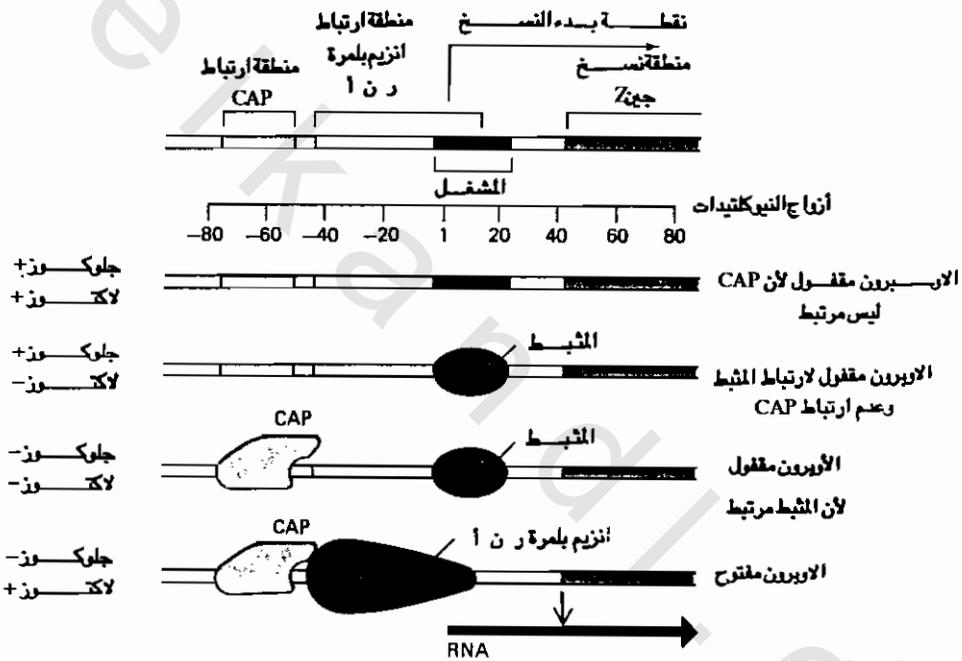
دور البروتينات المنشطة في بدء عملية النسخ للاوبرون

إلى جانب نظام التحكم السلبي المشار إليه سابقاً ، حيث يرتبط البروتين المثبط بالقرب من منطقة البروموتور ويتدخل في نشاط إنزيم بلمرة ر ن أ ، يوجد نوع آخر من التحكم يسمى التنظيم الموجب positive regulation ، حيث يؤدي وجود بروتين نوعي يسمى البروتين المنشط activator protein إلى تسهيل عمل إنزيم بلمرة ر ن أ وقد تبين أن هذا النوع من التنظيم الموجب يكون ضرورياً لبعض الوحدات النسخية في بكتريا القولون ، وخاصة تلك التي تحتوي على بروموتور ضعيف نسبياً بحيث لا تستطيع في حد ذاتها الارتباط بكفاءة بإنزيم بلمرة ر ن أ ويتم تنشيط مثل هذه الوحدات النسخية عن طريق ارتباط البروتين المنشط بمنطقة نوعية مجاورة على جزيء د ن أ ، بحيث يتمكن هذا البروتين من أن يتلامس مع إنزيم بلمرة ر ن أ بطريقة تؤدي إلى زيادة قدرة الأخيرة على بدء النسخ .

يحدث أحياناً أن يتشابه الدور الذي يقوم به البروتين المنشط مع ذلك الذي يقوم به البروتين المثبط ، بل أنه في بعض النظم الوراثية في البكتريا قد يقوم نفس البروتين التنظيمي بدور المثبط والمنشط معاً عندما ترتبط جزيئاته بعدة مواقع في الجينوم بحيث يقوم بتنشيط النسخ في بعض المناطق في حين يلعب دوراً منشطاً للنسخ في مناطق أخرى . تتم عملية التنشيط عندما يرتبط البروتين المنشط بجزيئات إشارة signal molecules بحيث تؤدي إلى زيادة أو خفض قدرته التنشيطية ، وبالتالي تؤدي إلى فتح أو قفل نشاط الوحدة النسخية على الترتيب . ترجع تسمية هذا النوع من التحكم الجيني بالتنظيم الموجب إلى حقيقة أن عملية النسخ تحدث بكفاءة أعلى في وجود البروتينات التنظيمية عما في حالة غيابها كما في الشكل (٩ - ٨ ب) .

في حالة اوبرون اللاكتوز Lacoperon نجد أن هناك نوعاً خاصاً من البروتين المنشط يسمى Catabolite activator protein ويطلق عليه اختصاراً (CAP) ، بحيث يتيح هذا البروتين للبكتريا أن تستخدم مصدر بديل للكربون فقط عندما لا يتوفر الجلوكوز في البيئة ، والذي يعد بالطبع مصدراً مثالياً للكربون . في حالة اوبرون اللاكتوز يحدث تنسيق بين عمل

البروتين المثبط للاكتوز والبروتين المنشط CAP لكي يتم انتاج التعبير الجيني المناسب . وكما سبق القول فإن وجود اللاكتوز يؤدي إلى انفكاك البروتين المثبط عن د ن أ إلا أنه تبين أن ذلك ليس كافياً في حد ذاته لتنشيط عملية النسخ لاوبرون اللاكتوز ، نظراً لأن منطقة البروموتور ضعيفة مما يؤدي إلى انخفاض درجة ارتباط انزيم بلمرة ر ن أ بها . لذلك تحتاج عملية النسخ بواسطة هذا البروموتور إلى تقوية درجة ارتباط انزيم بلمرة ر ن أ بالبروموتور ويتم ذلك عن طريق ارتباط البروتين المنشط CAP في منطقة تسبق مباشرة منطقة البروموتور كما هو موضح في الشكل (٩ - ٩) . تنطبق نفس الميكانيكية على بروموتور المالتوز والجلالكتوز وغيرهما من الإنزيمات الخاصة بتمثيل السكريات .



الشكل (٩ - ٩):

تأثير تركيز الجلوكوز واللاكتوز على تنظيم بدء النشاط النسخي في أوبرون اللاكتوز من خلال مفعولهما على البروتين المثبط والجين المنشط CAP . تؤدي اضافة اللاكتوز إلى زيادة تركيز اللولاكتوز الذي يزيل المثبط من على د ن أ وعند اضافة الجلوكوز ينخفض تركيز CAMP الضروري لنشاط CAP فيتترك الأخير د ن أ مما يؤدي إلى قفل الأوبرون . يعتقد أن بروتين CAP يلامس إنزيم بلمرة ر ن أ لمساعدته على بدء النسخ .

يتم تنظيم عملية ارتباط البروتين المنشط CAP بجزئ د ن أ بواسطة الجلوكوز وذلك

لضمان استخدام مصادر بديلة للكربون فقط في غياب الجلوكوز . ويحدث ذلك عندما يؤدي عدم توفر الجلوكوز في البيئة إلى استحداث زيادة في مستوى الخلية من جزيئات AMP الحلقى cAMP والذي يعمل كجزيء اشارى للخلية البكتيرية وكذلك في الخلية مميزة النواة كما سيأتى بعد .

يرتبط cAMP بالبروتين CAP محدثاً تغييراً في الشكل التركيبى لهذا البروتين مما يمكنه من الارتباط بكفاءة بالتتابع النوعى الموجود على جزيء د ن أ مما يؤدي بالتالى إلى تنشيط نسخ الجينات المجاورة . ولكن عندما يكون الجلوكوز متوفراً في البيئة ، ينخفض مستوى تركيز cAMP بحيث يتفكك عن البروتين CAP فيتحول الأخير إلى الصورة غير النشطة التى لا يمكنها أن ترتبط بجزيء د ن أ مما يؤدي إلى تحول الخلية بسرعة إلى استخدام الجلوكوز فقط ، ويتوقف النسخ حتى في وجود كمية كبيرة من اللاكوز في البيئة كما في الشكل (٩ - ٩) .

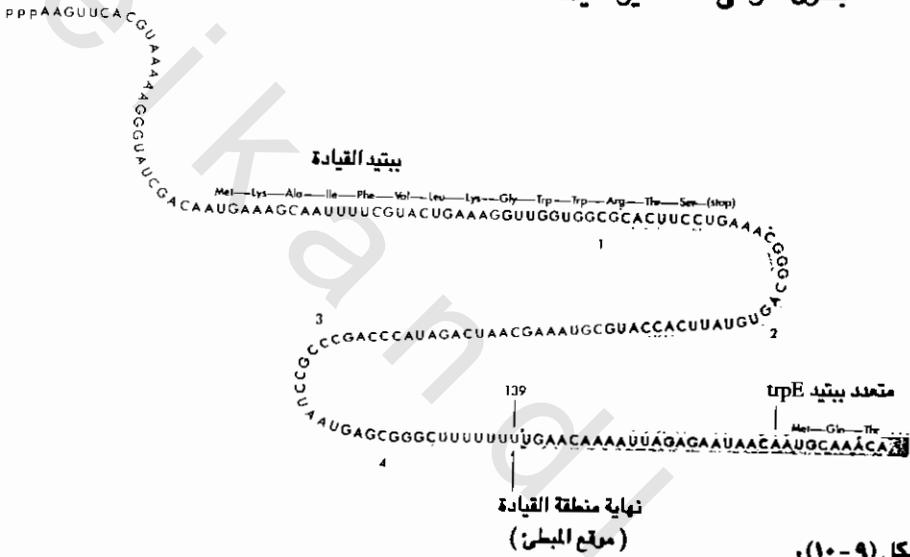
دور منطقة التباطؤ attenuation في تنظيم نسخ أوبرون التريتوفان

في البداية كان المفهوم الشائع أن بناء الإنزيمات الخمسة في أوبرون التريتوفان يتم تنظيم نسخها بصفة رئيسية عن طريق البروتين المثبط ؛ وكما سبق القول فإن الملاحظ هنا أن نسخ الجينات الخمس المتجاورة المكونة لأوبرون التريتوفان يحدث فقط عندما تكون كمية التريتوفان محدودة جداً في بيئة الخلية البكتيرية .

وعلى ذلك فإن التريتوفان يعمل في هذه الحالة ليس كمستحث للنسخ ، ولكنه على العكس من ذلك تماماً ، يعمل كترين مثبط co-repressor ، بحيث يكون دوره عبارة عن تنشيط المثبط النوعى الخاص به وحتى يمكنه أن يرتبط بتتابع المشغل لأوبرون التريتوفان . ولذلك فإنه عندما يكون تركيز التريتوفان منخفض ، نجد أن منطقة المشغل تكون حرة مما يسمح لعملية النسخ لجزيء mRNA بأن تبدأ من منطقة البروموتور المجاورة .

إلا أنه تبين حديثاً أنه بالإضافة إلى هذا التنظيم المبدئى ، توجد ميكانيكية تحكم اضافية تعمل على تنظيم هذا الأوبرون . إذ وجد أن مجرد بدء بناء جزيء ر ن أ المراسل mRNA لا يعنى بالضرورة أن عملية البناء هذه ستستمر تلقائياً إلى أن نحصل على جزيء كامل من mRNA بل تبين أن معظم جزيئات mRNA لجينات أوبرون التريتوفان تتوقف عن النمو بعد البداية مباشرة ، وقبل أن يبدأ حتى نسخ أول جين في هذا الأوبرون ولا تستأنف النسخ إلا إذا حدث تأكيد ثان وبطريقة أخرى مستقلة بأن التريتوفان غير متوفر بالفعل .

وقد تاکد ذلك بتحليل تتابعات النهاية 5' في جزئ mRNA لهذا الأوبرون حيث ظهر أن هناك ١٦١ نيوكليتيده في RNA تكون ضمن منطقة البروموتور قبل الوصول إلى أول كودون في جين TrpE (وهو الجين الأول في هذا الأوبرون) كما في الشكل (٩ - ١٠) . حيث وجد بالقرب من نهاية هذا التابع وقبل بدء جين trp E كودون لانتهاء النسخ Terminator والذي يأخذ شكل عروة دبوس الشعر المميز في رن أ (ويتكون من التتابعات في المناطق 3 ، 4 في الشكل أعلاه ويليه تتابعاً مكوناً من U8 . وعند هذه المنطقة والتي تسمى منطقة الأبطاء at-tenuator نجد أن بناء رن أ يتوقف عادة (والمفروض أن يتوقف بصفة دائمة ونهائية عند الوصول إلى هذه المنطقة) معطياً سلسلة قصيرة من رن أ فيما يعرف بمنطقة القيادة Leader بطول حوالي ١٣٩ نيوكليتيده .



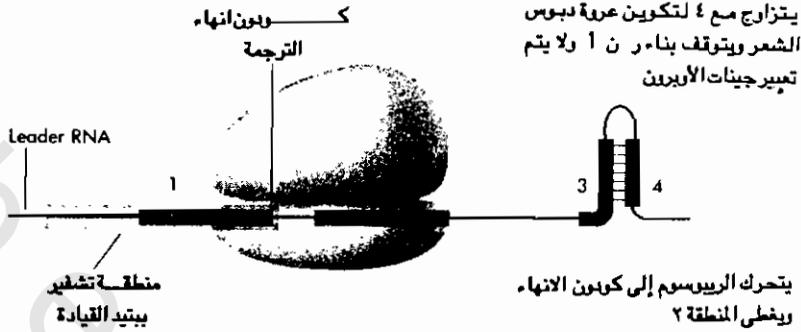
الشكل (٩ - ١٠) :

تتابع النيوكليتيديات في منطقة القيادة Leader لجزئ رن أ في أوبرون التريبتوفان

ولكن كيف يتسنى لإنزيم بلمرة رن أ تخطى عقبة منطقة المبطئ لاستكمال عملية البناء وخاصة عندما يكون تركيز التريبتوفان منخفضاً؟ تكمن الإجابة على ذلك السؤال عند دراسة ثلاث خواص لتتابعات منطقة القيادة Leader :

١ - وجود شكل عروة دبوس شعر ثانية بالاضافة إلى عروة دبوس الشعر الخاصة بانتهاء النسخ ويمكن أن تتكون هذه العروة الإضافية من تزاوج المنطقة ١ ، ٢ في منطقة القيادة Leader كما في الشكل (٩ - ١١) .

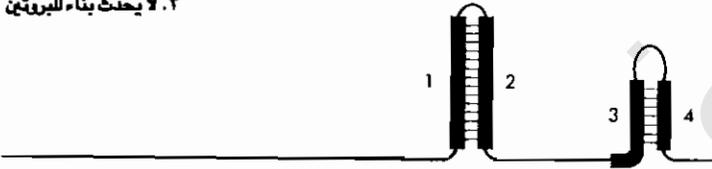
١. ترتبوفان عالي التركيز



٢. ترتبوفان منخفض التركيز



٣. لا يحدث بناء للبروتين



إذا لم يبدأ الريبوسوم في ترجمة كودون البدء تتكون عروة دبوس الشعر (٢.١) بحيث تمنع تكوين لعروة (٢.٢) مما يسمح بتكوين عروة الانهاء (٤.٢) فلا يحدث تعبير لجينات الأوبرون

الشكل (٩-١١) :

دور منطقة المبطى في تنظيم نشاط أوبرون الترتبوفان حسب مستوى تركيز الترتبوفان .

٢ - أن تتابع القواعد في المنطقة ٢ يكون متكاملًا مع المنطقة ٣ مما يعطى فرصة لتزاوج هاتين المنطقتين أيضاً لتكوين عروة دبوس شعر أخرى مما يحول نون تكوين عروة دبوس الشعر الخاصة بالإنهاء (٣ ، ٤) .

٣ - تختص منطقة Leader من ر ن أ بالتشفير لسلسلة قصيرة من الببتيدات القائدة مكونة من حوالي ١٤ حامض أميني مسبقة بموقع ارتباط قوى بالريبوسوم . وجد أن تتابع منطقة القيادة يحتوى على كودونين متتاليين للتربتوفان . وقد تبين أن هذه خاصية مميزة لهذه المنطقة ، فقد وجد في أوبرونات أخرى مثل أوبرون الليوسين أن هذه المنطقة النوعية تحتوى على أربعة كودونات مترادفة تشفر لليوسين في حين يحتوى أوبرون الهستيدين على ٦ كودونات متتالية للهستيدين في تلك المنطقة .

تبين أن وظيفة هذه الكودونات هي منع الريبوسوم من محاولة الاشتراك في ترجمة منطقة القيادة Leader . ويعنى ذلك أنه عندما يكون تركيز التربتوفان منخفضاً جداً في الخلية يكون مقدار $Trp-tRNA^{trp}$ منخفضاً جداً مما يحتم على الريبوسوم أن يتوقف عندما يصل إلى كودون التربتوفان في منطقة القيادة ويظل mRNA حول كودون التربتوفان مرتبطاً بالريبوسوم وبالتالي لا يمكنه الدخول في تكوين عروه دبوس الشعر للإنهاء (٣ ، ٤) وبيين الشكل (٩ - ١١) النتائج المترتبة على ذلك . حيث يكون الريبوسوم مقيداً بكودون التربتوفان في مكان يسمح بأن تظل المنطقة ٢ حرة للارتباط بالمنطقة ٣ ويؤدي هذا بدوره إلى عدم إمكان تكوين عروه دبوس الشعر الخاصة بالإنهاء (٣ ، ٤) مما يسمح لإنزيم بلمرة ر ن أ بعبور منطقة المبطى إلى الأوبرون ويتم نسخ جينات هذا الأوبرون . ولكن إذا حدث من جهة أخرى أن توفرت كميات كبيرة من التربتوفان في البيئة ، وبالتالي ارتفع مقدار جزيئات $trp - tRNA^{trp}$ مما يسمح للريبوسوم بالتحرك خلال كودون التربتوفان ، فإن الريبوسوم سيشغل منطقة التتابع ٢ مما يسمح بتكوين عروة دبوس الشعر الخاص بإنهاء النسخ (٣ ، ٤) وبالتالي يتوقف النسخ عند نهاية منطقة القيادة في جزيء mRNA . هناك احتمال آخر وهو أن الترجمة قد تتوقف قبل كودون التربتوفان (وذلك نظراً لندرة أحد الأحماض الأمينية الأخرى) أو قد تفشل في البدء بالمرة مما يؤدي إلى أن يصبح التتابع ١ حراً لكي يتزاوج مع التتابع ٢ وبالتالي تتكون عروة دبوس شعر الإنهاء التي تؤدي إلى إيقاف عملية تعبير الجينات في هذا الأوبرون . يعتقد أن أهمية منطقة القيادة في جزيء mRNA ترجع فقط إلى أنها تضع الريبوسوم في

المكان المناسب أثناء عملية الترجمة لهذه المنطقة نفسها . ومما يؤكد هذا الدور الفريد انها لا تلبث أن تتحلل إنزيمياً بعد أدائه .

من الممكن أن يكون وجود كلاً من ميكانيكى التحكم بالتثبيط والأبطاء يؤديان إلى السماح فقط بحدوث النشاط النسخى حسب المستوى الذى يتوفر فيه التريتوفان فى الخلية بحيث يحتاج الأمر إلى خطوتين للاستجابة حسب تصاعد درجة الاحتياج إلى التريتوفان . إذ تحدث الاستجابة المبدئية المتمثلة فى توقف ارتباط البروتين المثبط بمنطقة المشغل . وعندما تدعو الحاجة إلى إنتاج المزيد من التريتوفان فإن الخطوة الثانية تؤدي إلى الاسترخاء فى نظام الأبطاء . وقد تبين أن بعض نظم الأوبرون الأخرى مثل أوبرون الهستيدين His operon وأوبرون الليوسين Leu - operon تعتمدان أساساً على نظام الأبطاء ولا يحتوى أى منهما على نظام البروتين المثبط .

تعريف الأوبرون : وجد فى عدد كبير من النظم البكتيرية أن مجموعة من الجينات التى تشفر لعدد من البروتينات النوعية التى ترتبط ببعضها بعلاقات وظيفية محددة ، من الممكن أن يتحكم فى تعبيرها جميعاً مشغل واحد Operator . وعادة تكون هذه المجموعة من الجينات مرتبطة بشدة على الكروموسوم البكتيرى . ويطلق على المنطقة من المادة الوراثية التى تحتوى على عدد من الجينات التى تربطها علاقة وظيفية متناسقة والتى تتكون من المشغل وعدد من الجينات التركيبية اسم الأوبرون . وحسب التعريف فإن الأوبرون عبارة عن وحدة نسخ وراثية ذات تعبير متناسق .

العناصر الرئيسية للأوبرون :

- ١ - يتكون الأوبرون من مجموعة من الجينات المتجاورة التى تربطها علاقات وظيفية ويطلق عليها الجينات التركيبية (S) .
- ٢ - يتم تنظيم تعبير هذه الجينات التركيبية فى الأوبرون عن طريق تتابع نيوكليدي قصير نسبياً يسمى المشغل (O) ويوجد عادة قبل أول جين تركيبى من ناحية النهاية 5' .
- ٣ - يوجد جين منظم مستقل (i) يقوم بالتحكم فى إنتاج البروتين المثبط الذى ينتج عن تفاعله مع المشغل إحداث تثبيط متناسق ومنتظم لجميع الجينات التركيبية معاً وفى نفس الوقت .

بمعنى أنه يحدث توقف متواز وكفى في تعبير جميع الجينات التركيبية الخاصة بهذا الأوبرون بحيث تظل نسبة التعبير الجيني ثابتة بين هذه الجينات .

٤ - يحدث إعادة تنشيط (أو إيقاف للتثبيط) Derepression لجميع الجينات التركيبية معاً وفي نفس الوقت وينفس المعدل (فيما يسمى بإعادة التنشيط المتناسق co-ordinate derepression) ويتم ذلك إما باستخدام جزئٍ مستحث Inducer أو نتيجة لحدوث طفرة تأسيسية Constitutive mutation في المشغل (O^c) .

٥ - تؤدي طفرة الاقترضاب أو الحذف deletion التي تشمل منطقة المشغل فقط (O) إلى وقف متناسق للنشاط النسخي لجميع الجينات التركيبية في الأوبرون .

٦ - يبدأ النسخ عند منطقة البروموتور التي تسبق منطقة المشغل والتي تقع إلى اليسار منها ، حيث يرتبط إنزيم بلمرة RNA بهذه المنطقة لبدء النسخ .

٧ - يتم نسخ الأوبرون كوحدة نسخية كبيرة مكونة من جزئٍ RNA متعدد السيسترونات Polycistronic mRNA بحيث يشتمل على جميع مناطق الجينات التركيبية معاً بدلاً من أن يتم النسخ على مستوي كل جين تركيبى على حدة إلا أنه عند الترجمة تتم ترجمة كل جين تركيبى مستقلاً إلى بروتين محدد .

تركيب أوبرون اللاكتوز Lac operon

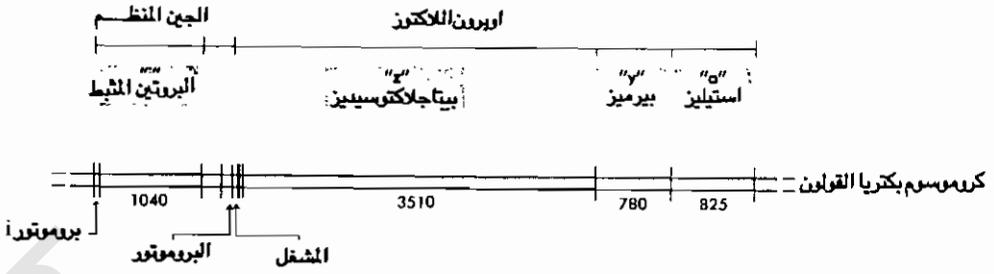
تتكون الوحدة النسخية لأوبرون اللاكتوز من ثلاث جينات تركيبية وهي على الترتيب من اليسار إلى اليمين :

الجين z : ويتحكم في إنتاج إنزيم بيتا جلاكتوسيداز β - galactosidase .

والجين y : ويقوم بإنتاج إنزيم Lac permease عند الترجمة .

والجين a : وينتج إنزيم Transacetylase عند الترجمة .

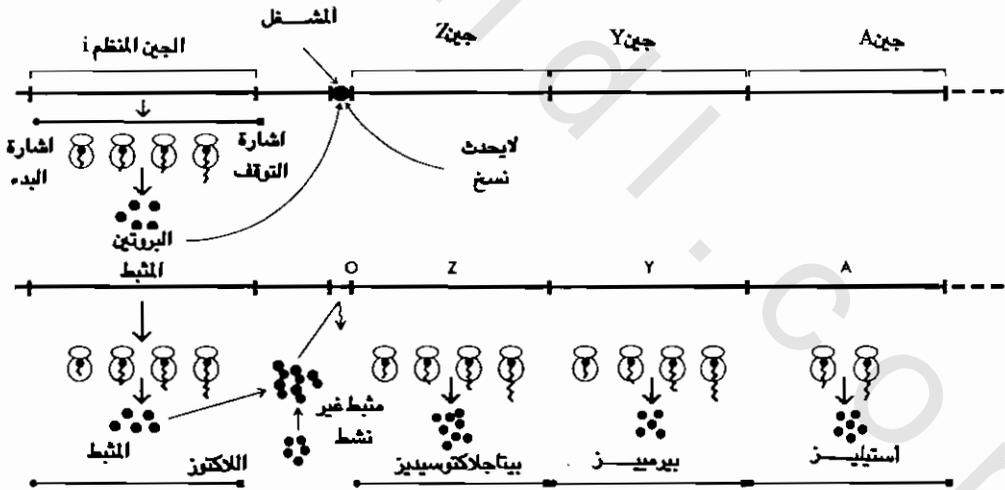
ويتم نسخ جينات هذه الإنزيمات الثلاثة معاً في وحدة نسخية واحدة يطلق عليها أوبرون اللاكتوز . ويوجد الجين المنظم (i) الذي ينتج البروتين التنظيمي المثبط repressor protein إلى اليسار من مجموعة الجينات التركيبية ، يليه منطقة البروموتور (P) التي يرتبط بها إنزيم بلمرة RNA ثم منطقة المشغل (O) الذي يرتبط به البروتين المثبط كما في الشكل (٩ - ١٢) .



الشكل (٩-١٢) :

مكونات أوبرون اللاكتوز والجين المنظم لنشاطه .

كما يبين الشكل (٩ - ١٣) الطريقة التي يتم بها التفاعل بين البروتين المثبط والجزئ المستحث Inducer والمشغل للتحكم في مستوى بناء بروتينات (إنزيمات) أوبرون اللاكتوز في بكتريا القولون . وتجدر الاشارة إلى النظام الاضافي الخاص بالبروتين المنشط CAP كما سبق الذكر . من ذلك يتبين أن أوبرون اللاكتوز يتبع نظام الأوبرون المستحث Inducible operon system .



الشكل (٩-١٣)

يؤدي التفاعل بين البروتين المثبط والجزئ المستحث والمشغل إلى تنظيم بناء انزيمات أوبرون اللاكتوز .

اثبات نظام التحكم فى ابرون اللاكتوز Lac operon بدراسة الطافرات :

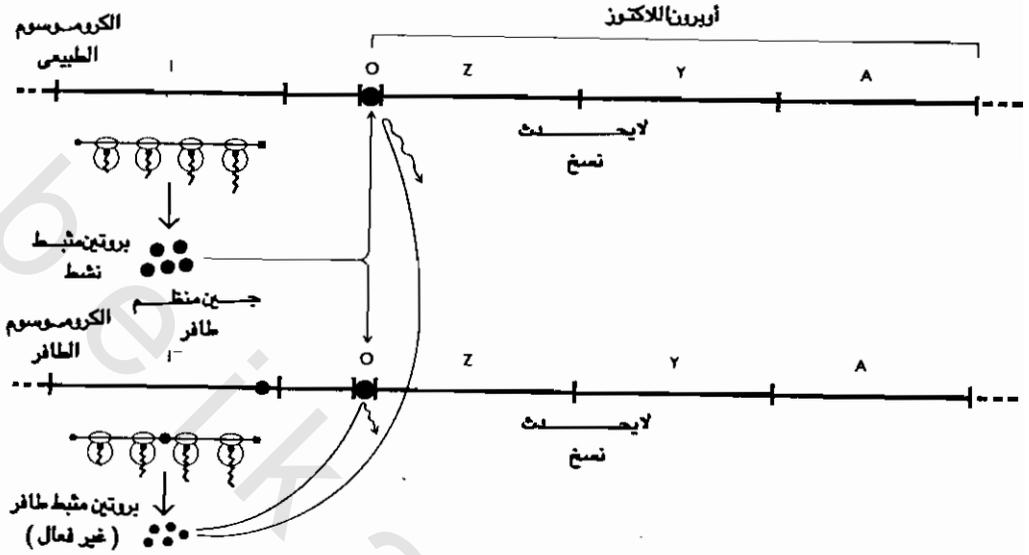
١ - طفرات فى الجين المنظم (i) Regulatory gene

تؤثر الطفرات التى تحدث فى الجين الخاص بإنتاج البروتين المثبط (i) على القدرة على التحكم فى تعبير أوبرون اللاكتوز ، وقد ساعدت هذه الطفرات بشكل كبير فى استنباط نموذج الأوبرون .

٢ - أمكن التعرف على عدة أنواع من الطفرات التى تحدث فى الجين i : ومنها الطفرة (-i) حيث يصبح الجين غير قادر على إنتاج بروتين مثبط فعال . ويتم ذلك إما بطفرة تغيير القاعدة الواحدة أو طفرة حذف deletion فى هذا الجين . وتؤدى طفرة الحذف فى الجين i إلى غياب البروتين المثبط بالكامل فى حين تؤدى الطفرات الأخرى إلى إنتاج بروتين مثبط غير فعال بحيث لا يتمكن من الارتباط بقرين المثبط الخاص به وبالتالي لا يمكنه أن يأخذ الشكل النشط فى التثبيط . ويؤدى حدوث الطفرة -i إلى إنتاج جميع إنزيمات الأوبرون بصرف النظر عن الاحتياج إليها من عدمه ويقال لهذه الطفرات بأنها طافرات تأسيسية constitutive mutations . ويبين الشكل (٩ - ١٤) كيف أمكن استخدام خلايا بكتيرية ثنائية جزئياً Partial diploid بالنسبة للكروموسوم البكتيرى وبتركيب (-i / i) لبيان أن وجود أليل واحد من الجين i يكون سائداً على الأليل الطافر -i . حيث وجد أنه فى هذه الحالة لن تتكون أى كمية من جزيئات إنزيم بيتا جلاكتوسيداز galactosidase - β فى هذه الخلايا فى غياب اللاكتوز فى البيئة ، حيث أن وجود نسخة واحدة من الأليل i سيؤدى إلى إنتاج كمية كافية من البروتين المثبط للقيام بتثبيط كلا الموقعين للمشغل فى الكروموسومين .

٢ - طفرات فى الجين المشغل (O) Operator .

أمكن عزل سلسلة من الطافرات التأسيسية constitutive mutations فى هذا الجين بحيث تفقد القدرة على التحكم فى إنتاج الإنزيم الذى يستمر إنتاجه بصرف النظر عن وجود المستحث Inducer من عدمه .

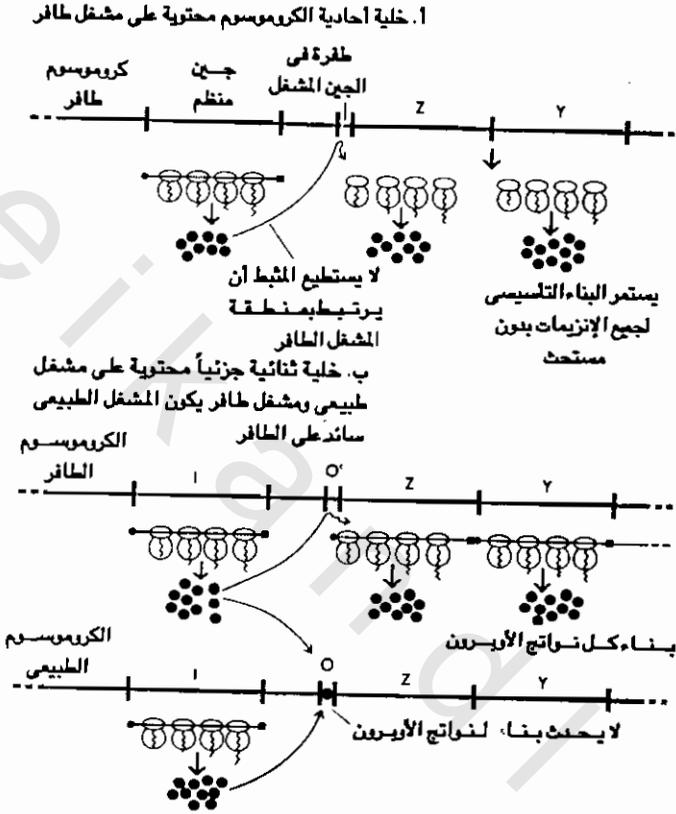


الشكل (٩-١٤) :

استخدام تركيب ثنائي جزئي في كروموسوم البكتريا لإثبات أن وجود مثبط واحد فعال يكون سائد على وجود مثبط غير نشط . لا تنتج أى كميات من إنزيمات الأوبرون في هذه الحالة

وعند تحديد موقع تلك الطفرات تبين أن عدداً منها كان متجمعاً بالقرب من الجين Z في منطقة المشغل . وقد أطلق على هذه الطفرات التأسيسية - operator constitutive μ^c (O^c) . وقد وجد أنها قد فقدت القدرة على الارتباط بالبروتين المثبط ، بحيث لا يمكن وقف عملية النسخ في الوقت المناسب . وقد تم التأكد من ذلك بمقارنة ما يحدث في الخلايا أحادية الكروموسوم haploid والثنائية الجزئية Partial diploid والخلطة بالنسبة لهذا الموقع أى بتركيب (O / O^c) كما في الشكل (٩ - ١٥) . حيث تبين أنه في الخلايا الأحادية كانت الطفرة التأسيسية O^c فعالة بحيث منعت ارتباط المثبط بالمشغل مما أدى إلى استمرار إنتاج إنزيمات الأوبرون في غياب المستحث (اللاكتوز) أما في حالة الخلايا الثنائية جزئياً بتركيب O/O^c فقد وجد أن الأليل O^c كان سائداً على O بحيث

تغلقت الطفرة O^c على الأليل الوحشى O وجعلت فى إمكان الخلية الثنائية الجزئية أن تستمر فى إنتاج الإنزيمات الثلاثة للأوبرون بالرغم من غياب المستحث [(قارن ما يحدث بالنسبة للتركيب O^c/O بما يحدث بالنسبة للتركيب (i^-/i^-)].



الشكل (٩-١٥) :

تنظيم النسخ فى أوبرون اللاكتوز بالمشغل الطبيعي والطاقر

٢- طفرات فى الجينات التركيبية Structural genes

أمكن عزل طفرات عديدة المعنى لكل من الجينات التركيبية الثلاثة لأوبرون اللاكتوز وقد تبين أن تتابع مواقع هذه الجينات على الكروموسوم البكتيرى هو $a - y - z$. بينت الطفرات عديدة المعنى فى الموقع Z أن تأثيرها لن يقتصر على وقف الانزيم المسئولة عنه فقط وهو

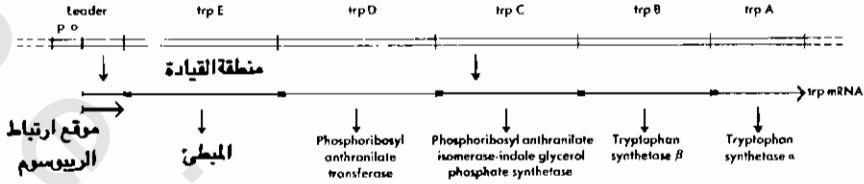
بيتا جلاكتوسيديز β - galactosidase ، ولكن تأثيرها سيمتد ليشمل تعبير الجينان التاليان a , y بحيث يتوقف إنتاج انزيمي Transacetylase, Permease على الترتيب . في حين لو حدثت الطفرة في الموقع y فقط فإن التأثير المانع سيشمل الجين التالي له في الخريطة الكروموسومية وهو الجين a في حين لن تؤثر هذه الطفرة على الجين السابق له في الترتيب أي الجين z فيستمر في إنتاج انزيم بيتا جلاكتوسيديز β - galactosidase في نفس الوقت الذي يتوقف فيه إنتاج انزيمي transacetylase, Permease . وإذا حدثت الطفرة في الجين التركيبي a فسيفتصر تأثيرها على تعبير هذا الجين فقط فلا ينتج إنزيم Transacetylase ويستمر الجينان الاخران في إنتاج الإنزيمات الخاصة بها بدون تغيير . يطلق على هذا النوع من الطفرات اسم الطفرات القطبية Polar mutation حيث أنها ذات اتجاه محدد في التأثير مما يفترض معه وجود تدرج في التأثير القطبي في اتجاه النسخ $3' \rightarrow 5'$ وليس العكس . ويعتقد أنه كلما اقتربت الطفرة القطبية من تتابع المشغل Operator كلما زاد التأثير القطبي لهذه الطفرة بحيث يقل أو يندمج إنتاج الجينات التالية مباشرة لها ؛ في حين يقل التأثير كلما كان موقع الطفرة القطبية بعيداً عن المشغل . وقد تم تفسير ذلك على أساس أن الجينات الثلاثة يتم نسخها في صورة جزيء mRNA واحد كبير متعدد البسترونات Polycistronic في الاتجاه القطبي $3' \rightarrow 5'$ حسب تتابع الجينات $a - y - z$ ، بحيث يكون من الصعب على انزيم بلمرة ر ن أ الاستمرار في النسخ في المنطقة التالية للطفرة القطبية مما يؤدي إلى توقف النسخ .

ثانياً : أوبرون التربتوفان Tryptophan Operon

يعد أوبرون التربتوفان في بكتريا القولون من النوع القابل للكبت أو التثبيط - Repressible system حيث يتم التثبيط عن طريق الناتج النهائي end product لسلسلة الايض التي يتحكم فيها هذا الاوبرون وهو الحامض الأميني التربتوفان الذي يعمل هنا ككبرين مثبط - corepressor بحيث يرتبط بالبروتين المثبط الأولى غير الفعال aporepressor ويحوه إلى الصورة الفعالة فينشط في التثبيط مما يجعله قادراً على الارتباط بمنطقة المشغل وقفل الأوبرون .

تحتاج الخلية إلى التربتوفان لبناء البروتين ، وعندما يكون التربتوفان متوفر في البيئة فإن

ويبين الشكل (٩ - ١٦) الملامح الرئيسية لنظام الأوبرون القابل للتثبيط Repressible في حين يبين الشكل (٩ - ١٧) مكونات أوبرون التريتوفان . وتجدر الإشارة هنا إلى المستوى الثاني من التنظيم في هذا الأوبرون والخاص بمنطقة المبطي attenuator والذي سبقت مناقشته في هذا الفصل .



الشكل (٩-١٧):

مكونات أوبرون التريتوفان في بكتريا القولون مبيناً العلاقة بين منطقة القيادة والجينات التركيبية المشفرة لإنزيمات الأوبرون .