# الفصل الثالث

# تناسخ د. ن. أ
# DNA Replication

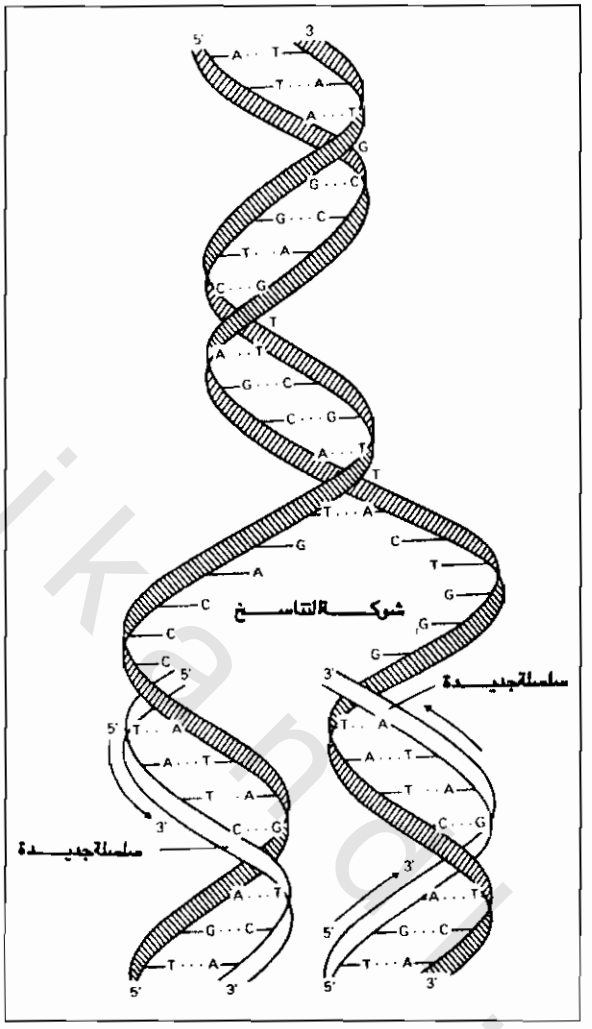
بعد الإعلان عن نموذج واتسون وكريك لتركيب جزئ د. ن. أ، اتجه اهتمام العلماء إلى معرفة كيفية تناسخ جزئ د. ن. أ. وتعد عملية تناسخ جزئ د. ن. أ عملية أساسيه للمادة الوراثية ولابد من اتمامها بدقة متناهية حتى نضمن استمرار انتقال العوامل الوراثية عند انقسام الخلية. ولاشك أن ذلك يعد عملا ضخماً ومعقداً فعلى سبيل المثال لو تخيلنا حدوث هذه العملية فى جينوم الانسان المحتوى على ٣ بليون زوج من القواعد فى ٢٣ زوج من الكروموسومات فإنه لكى يتم تكرار (تناسخ) جزئ بهذا الحجم بدقة فإن ذلك يتطلب ميكانيكية على درجة عالية من الكفاءة والدقة.

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



obeikandi.com

وجد أن المجاميع الجانبية فى أزواج القواعد المتقابلة (بعكس مركبات عضوية أخرى) فى مقدروها تكوين عدد من الروابط الهيدورجينية المتخصصة جدا (النوعية)، وبذلك يتوفر لدينا قالب نموذجى لبناء جزئ جديد عليه حيث يتم التجاذب بين القواعد فى القالب والقواعد المكملة فى السلسلة الجديدة الجارى بناؤها عندما تضاف القواعد واحدة تلو الأخرى طبقا لقاعدة شاراجاف (G≡C,T=A) ويتم ذلك بصورة دقيقة بحيث تنعدم تقريبا فرصة حدوث خطأ ($10^{-8}$) مما يؤدى إلى انتاج جزيئين جديدين عبارة عن صورة طبق الأصل دقيقة للجزئ الأصلى (الشكل ٣-١) وتكون أحدى السلسلتين فى كل جزئ عباره عن سلسلة جديدة والسلسلة الآخرى هى القديمة التى استخدمت كقالب لبناء السلسلة الجديدة.




الشكل (٣-١): شكل تخطيطي يبين ميكانيكية تناسخ جزئ د ن أ حيث يتم التناسخ بفك حلزنة السلسلتين المكونتين للحلزون المزدوج ثم استخدام كل سلسلة كقالب لبناء سلسلة جديدة حسب قانون تزاوج القواعد: (A تقابل T, C تقابل G) ويلاحظ أن التناسخ يتم في الاتجاه 3'→5' فقط

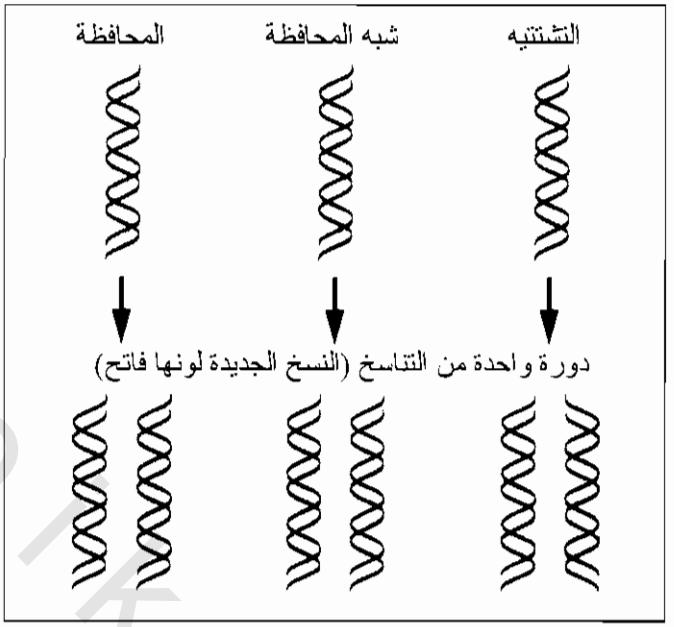


obeikandl.com

## الطريقة شبه المحافظة لتناسخ د. ن. أ:

يقترح نموذج واتسون وكريك أن التناسخ يتم حسب ميكانيكية تعرف بالطريقة شبة المحافظة Semi-conservative بمعنى ان نصف جزئ د. ن. أ الأصلى (سلسلة) يحافظ عليه فى حين يتم بناء سلسلة جديدة عليها.

ألا أنه بالاضافه إلى ذلك فقد اقُترح نموذجين اخرين لتناسخ د. ن. أ ويعتمد كليهما على استخدام د. ن. أ الأبوى كقالب. ويسمى النموذج الأول الطريقة المحافظة Conservative Replication حيث يتم بناء سلسلة جديدة مكملة على كل قالب من السلسلتين القالب تماما كما فى الطريقة شبة المحافظة إلا أنه بعد التضاعف (التكاثر) تنضم السلسلتين الجديدتين معا فى حلزون جديد تماما بينما تتجاذب السلسلتين الابويتين لتكون الحلزون الاصلى أى أن الحلزون الأصلى قد تمت المحافظة عليه أما النموذج الثانى ويطلق عليه الطريقة التشتتية Dispersive Replication حيث تتوزع (تتشتت) السلسلتان الابويتان بين حلزونين جديدين بعد التناسخ وبذلك تكون كل سلسلة مكونة من اجزاء من د. ن. أ الأبوى وأخرى من د. ن. أ الجديد (الشكل ٣-٢) إلا أن كلا من الطريقة المحافظة والتشتتيه لم يتوافر لهما التحقق التجريبى من صحتهما بينما تم ذلك للطريقة شبة المحافظة كما يتضح من تجربه ميسلسون وستاهل.

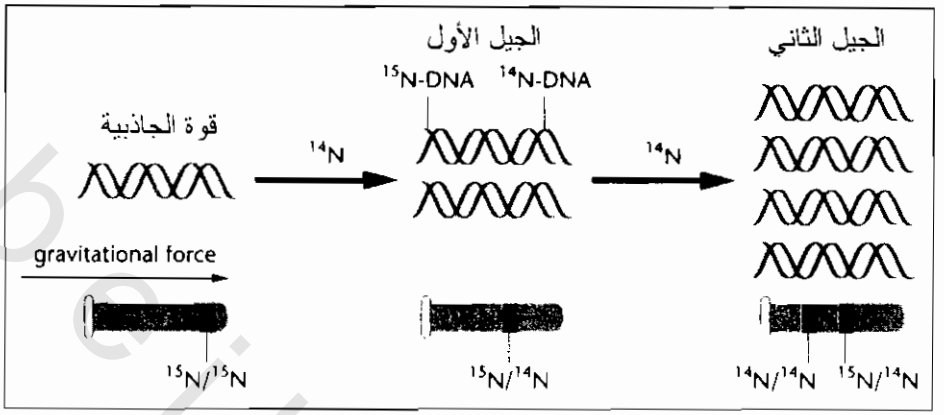



الشكل (٣-٢): نتائج دورة واحدة من تناسخ د ن أ لكل من الطرق الثلاث الممكنة للتناسخ

## تجربة ميسيلسون وستاهل :

قام ميسيلسون وستاهل Meselson and Stahl عام ١٩٥٨ بتجربة على بكتريا القولون واستخدما النتروجين الثقيل (النظير المشع) $N^{15}$ فى تنمية المزرعة البكتيرية لعدة أجيال حتى يتأكدا من أن كل ذرات النتروجين فى جزئ د. ن. أ معلمه بالنتروجين الثقيل .بعد ذلك تم نقل الخلايا البكتيرية إلى مزرعة تحتوى على النتروجين العادى (الخفيف) $N^{14}$ .ثم استخلص د. ن. أ من الخلايا وتم تقدير كثافته بواسطة الطرد المركزى فائق السرعة Ultracentrifugation فى متدرج كثافى Density Gradiant من محلول كلوريد السيزيوم وتبين انه بعد أول دورة (جيل) من الانقسام ظهرت قمة واحدة تمثل جزئ هجين (ثقيل / خفيف) H/L نتيجة لتكوين الجزئ من سلسلة أصلية ثقيلة وسلسلة مكملة خفيفة وفى

الجيل الثانى ظهرت قمتان لجزيئات د. ن. أ واحدة تمثل الهجين والآخرى تمثل الخفيف فقط L/L كما فى الشكل (٣-٣).

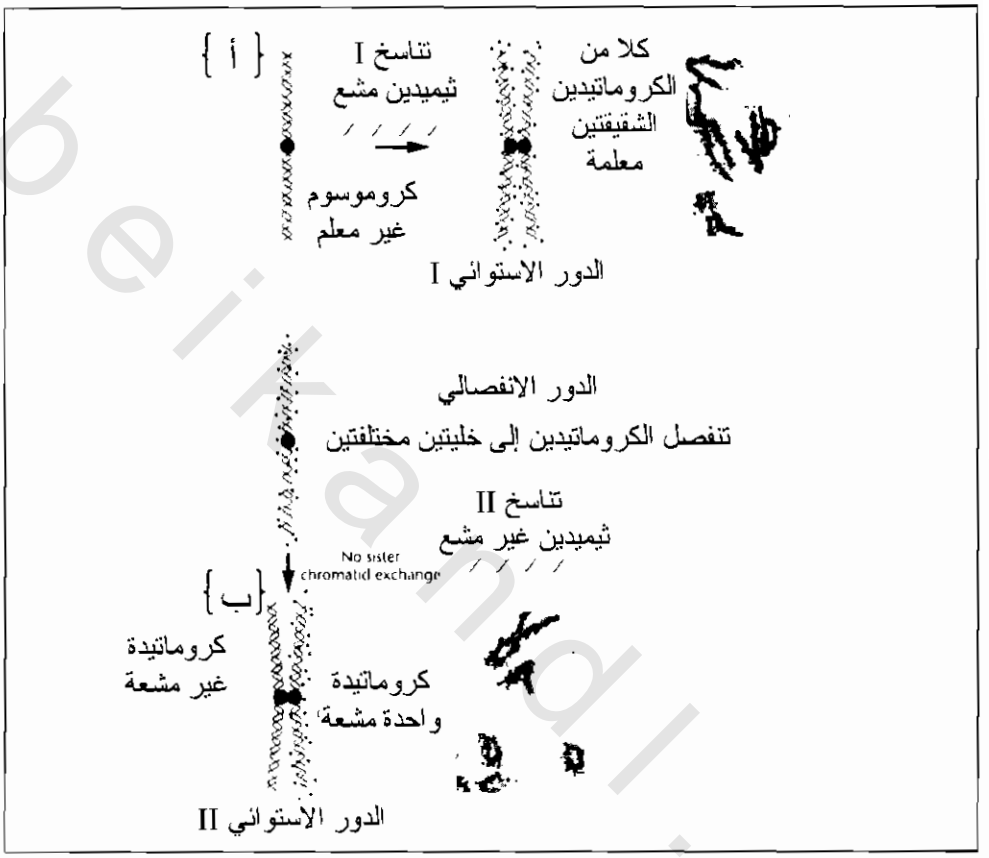



**الشكل (٣-٣): النتائج المتوقعة لجيلين من التناسخ بالطريقة شبه المحافظة في تجربة ميسلسون وستاهل**

يعكس ذلك بوضوح حتمية انفصال السلسلتين الأصليتين ثم استخدام كل سلسلة كقالب لبناء نسخة عليها مما يؤكد صحة نموذج التناسخ بالطريقة شبة المحافظة.

ومن جهة أخرى تمكن تيلور Taylor ومعاونوه عام ١٩٥٧ من إثبات الطريقة شبه المحافظة فى الكائنات مميزة النواه. إذا أنه من المعروف أن كل كروماتيده فى الكروموسوم تمثل جزئ واحد من د. ن. أ. تم تعليم خلايا القمم النامية لجذور نبات الفول بالثيميدين المشع $^{3}$H Thymidine ثم سمح لها بعد ذلك بالنمو فى بيئة غير معلمة، وعند دراسة كروموسومات هذه الخلايا فى الدور الاستوائى بعد جيل (دورة) أو جيلين (دورتين) من الانقسام الخلوى وذلك باستخدام طريقة التصوير بالاشعاع الذاتى Autoradiography تبين أن كلا من

الكروماتيدتين كانتا مشعتان بعد جيل واحد (دورة) فى حين كانت كروماتيده واحدة فقط هى المشعة بعد دورتين من انقسام الخلية كما هو متوقع حسب النظرية شبة المحافظة لتناسخ د. ن. أ (الشكل ٣-٤).




**الشكل (٣-٤): تجربة تايلور وتوضح نموذج الطريقة شبه المحافظة لتناسخ د ن أ في القمة النامية لجذور نبات الفول**

**( أ ) كروموسوم غير معلم خلال دورة الخلية في وجود الثميدين المشع H-thymidine وعند بدء الانقسام الميتوزي تصبح الكروماتيدين الشقيقتين مشعة كما ينضح من صور الإشعاع الذاتي.**

**(ب) وبعد دورة ثانية من التناسخ وفي غياب التميدين المشع فإن كروماتيدة واحدة هي التي ستكون مشعة مما يدل على صحة الطريقة شبه المحافظة للتناسخ.**

## منشأ Origin وشوكات Forks ووحدات التناسخ Units of Replication:

هناك عدة اسئلة تفرض نفسها بخصوص تناسخ د. ن. أ بالطريقة شبه المحافظة:

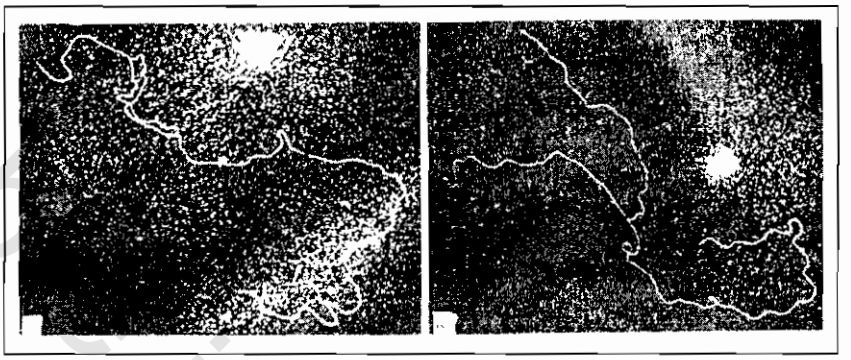
أين يبدأ التناسخ Origin of Replication؟ وهل هناك نقطة واحدة يبدا منها التناسخ أو أن هناك أكثر من منشأ على طول الكروموسوم؟ وهل نقطة المنشأ تكون عشوائية؟

أوانها تقع على منطقة محددة على طول الكروموسوم؟ ومن جهة أخرى ، عندما يبدأ التناسخ فهل يستمر فى اتجاه واحد أو فى اتجاهين معا بعيداً عن المنشأ؟ وبمعنى أخر هل التناسخ وحيد الاتجاه Unidirectional أو ثنائى الاتجاه Bidirectional وللاجابة على هذه التساؤلات تمكن العلماء من أعطاء عدد من الأدلة التجريبية .

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

إلا أنه تبين أن التضاعف يبدأ فى الحقيقة من الداخل ومن نقطة واحدة معينة تسمى نقطة منشأ التناسخ Origin of Replication وقد وجد أنه بالنسبة

لهذا الفيروس تكون هذه النقطه على مسافة حوالى ١٧% من بداية النهاية اليسرى للجزئ كما فى الشكل (٣-٥).



الشكل (٣-٥): تناسخ جزئ د ن أ للفاج T7

(أ) صورة بالمجهر الإلكتروني لجزئ د ن أ لفاج T7 الذي بدء للتو في التناسخ والذي تظهر به فقاعه تناسخ صغيرة تقع على مسافة 17% من النهاية اليسرى للخريطة الوراثية.

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

وبمجرد أن يبدأ بناء جزئ د. ن. أيستمر البناء فى الاتجاهين مما يعطى شكل العين (-O-) التى لا تلبث أن تنمو لتأخذ شكل حرف Y (ومن هنا جاءت تسميتها شوكة التناسخ Replication Fork).

وتظل عملية التناسخ حتى تصل الشوكة إلى نهاية جزئ د ن أ.

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

فقد تبين أنه فى كل هذه المراحل الوسطية للتناسخ تكون هنـــاك اجـــزاء صغيرة فقط غير متحلزنة وحيدة السلسلة.

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

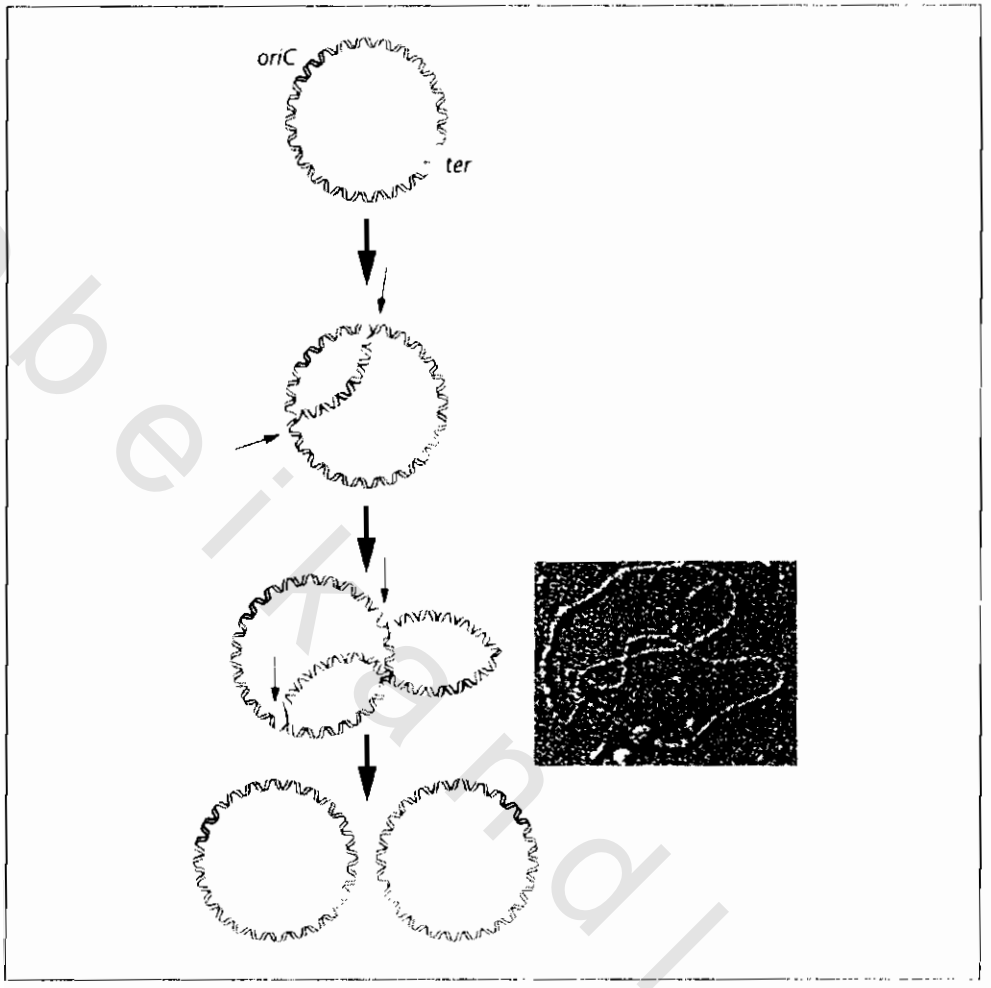
فى حالة جزئ د. ن. أ الحلقى كما فى بكتريا القولون لا يتحتم أن يتحول الجزئ الحلقى إلى جزئ خطى (مستقيم) ولو بصورة مؤقته على العكـــس مـــن ذلك وجد عند دراسة المراحل الوسطية لتضاعف كثير من الجزيئات الحلقية من د. ن.أ أن السلاسل الأبوية تحافظ على الشكل الحلقى طول فترة التناسخ.

وقد اكدت تجارب Cairns (باستخدام Radioisotope, Autoradiography) أن التناسخ يحدث أو يبدأ عند نقطة منشأ واحدة فى بكتريـــا القولـــون وتـــسمى (oriC) وتتكون من ٢٤٥ زوج من القواعد، على الرغم مـــن أن عمليـــة بنـــاء د. ن. أ تحتاج إلى عدد صغير من القواعد.

ظهر فى مثل هذه الجزيئات اثناء تضاعفها شكل (θ ثيتا) عندما تبدأ فـــى تكوين فقاعة التناسخ عند نقطة البداية "المنشأ" كما فى الشكل (٣-٦).



obeikandi.com

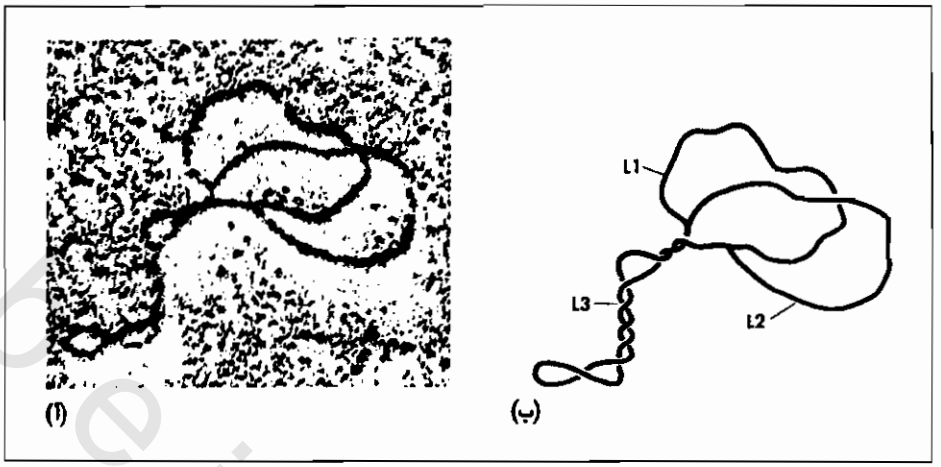



**الشكل (٣-٦): التناسخ ثنائي الاتجاه في بكتريا القولون**
**وصورة المجهر الإلكتروني بالمجهر تبين علمية التناسخ**

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

أمكن اكتشاف مجموعة من الانزيمات يطلق عليها Topoisomerases تقوم بعملية فتح/ غلق Nicking/Closing ( أو كسر/ لحام) لجزئ د. ن. أ بحيث تساعد إما على ازدياد درجة الحلزونة أو استرخاء الحلزون حسب طبيعة المرحلة التى يمر بها الجزئ.

فى الفاج $SV_{40}$ تبين أن كلا من السلسلتين الأبويتين تظلان على حالهما فى معظم فترات دورة التضاعف (الشكل ٣-٧) ويحدث للجزء غير المتضاعف من الشكل ثيتا θ الوسطى تحلزن فائق على فترات منتظمة للحيلوله دون تشوه أو تشابك الحلزون ويتم ذلك بإحدى طريقتين: إما أن يتكون حلزون فائق سلبى وذلك بفعل انزيم Topoisomerase II (Gyrase) كمقدمة لاستطالة السلسلة، أو بتكوين حلزون فائق موجب باستطالة فقاعات التناسخ وذلك فى حالة حدوث كسر فى السلسلة وهو أمر نادر حيث من الممكن فى هذه الحالة توقف استطاله نمو الفقاعة لاستحالة الاستمرار فى تكوين حلزنة فائقة موجبة أشد. وسنتعرض بالتفصيل لدور Topoisomerases فى التناسخ فيما بعد.



الشكل (٣-٧): تناسخ جزئ د ن أ للفاج SV 40

( أ ) صورة بالمجهر الإلكتروني لمرحلة مبكرة من التناسخ.

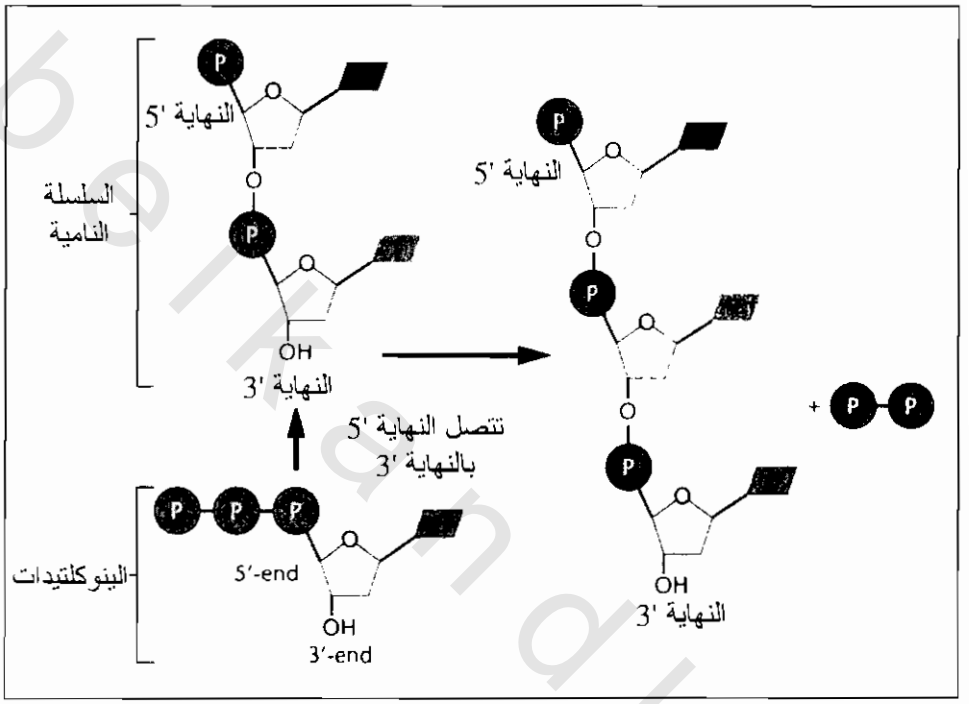
(ب) شكل تخطيطي يبين السلاسل الأبوية المتحلزنة وغير المتناسخة. وتمثل المناطق L1 وL2 الأجزاء التي تم تناسخها بالفعل في حين تشير L3 إلى المنطقة غير المتناسخة التي تأخذ شكل فائق التحلزن. يلاحظ أنه خلال دورة التناسخ يظل جزئ د ن أ متماسك.

## نموذج بناء جزئ د. ن. أ DNA Synthesis model:

سبق التنوية إلى أن السلسلتين المشاركتين فى جزئ د. ن. أ تكونان متضادتين فى الاتجاه Antiparallel ويعنى ذلك أن كلا من السلسلتين البنويتين الجارى بناؤهما على كل من شوكتى التناسخ لابد أن يكونا أيضا فى اتجاهين متضادين، وعلى ذلك فلابد أن يكون الاتجاه العام لنمو السلسلة فى الاتجاه 3'→5' لإحدى السلسلتين بينما المفروض أن يكون النمو للسلسلة المضادة فى الاتجاة 5'→3'.

إلا أن جميع انزيمات بلمرة د. ن. أ DNA Polymerase المعروفة حتى الان والتى تشارك فى اضافة وحدات الينوكلتيدات يمكنها الاضافة ونمو

واستطالة السلسلة فى الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ فقط نظرا لأن التفاعل الكيماوى الذى تساعد فيه هذه الانزيمات يسمح للينوكلتيدة ثلاثية الفوسفات للتفاعل فقط مع مجموعة الهيدروكسيل الحرة فى النهاية $3'OH$ للسلسلة النامية، الشكل (٣-٨).

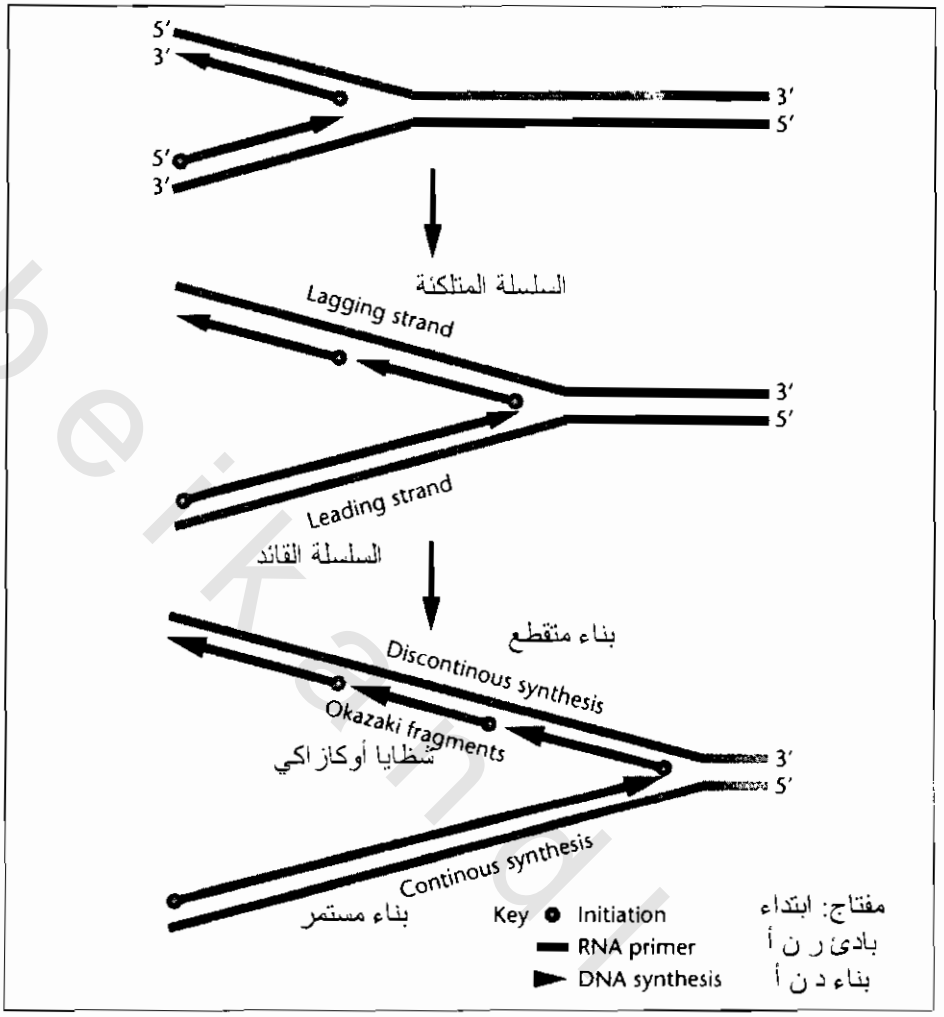



**الشكل (٣-٨):** يتم بناء سلسلة د ن أ في الاتجاه 5' to 3'

لحل هذه المعضلة، تمكن أوكازاكى Okazaki عام ١٩٦٩ من اكتشاف قطع قصيرة متقطعة من د. ن. أ يتم بناؤها فى الاتجاة $5' \leftarrow 3'$ على الخيط القالب المضاد لاتجاه البناء الطبيعى للسلسلة. وقد توصل إلى ذلك بعد تعريضة بكتريا القولون للثيميدين المشع $^3H$ Thymidine لمدة ثوان قليلة حيث ظهرت له قطع د. ن. أ. قصيرة بطول حوالى ١٠٠٠-٢٠٠٠ نيوكلتيده معلمة بالاشعاع،

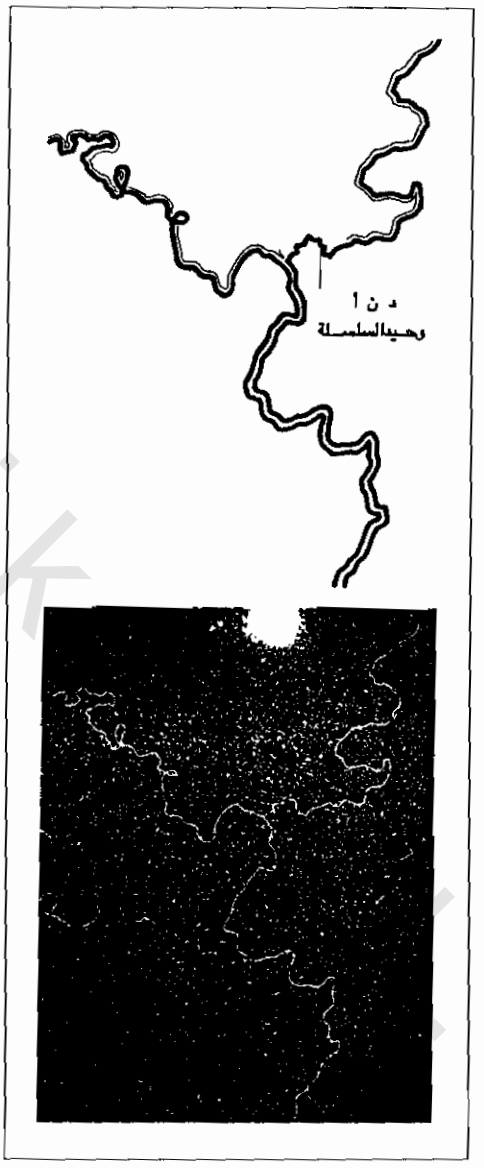
وسميت هذه القطع القصيرة شظايا أوكازاكى Okazaki Fragments نسبة إلى مكتشفها (تكون طول هذه الشظايا فى خلايا الكائنات مميزة النواة بطول ٢٠٠ نيوكلتيده فقط وقد يكون لذلك علاقة بطول شريط د. ن. أ الملتف حول النيوكليوسوم) ثم توصل هذه القطع القصيرة ببعضها بفعل انزيم لحام د. ن. أ DNA Ligase (الشكل ٣-٩).

obeikandl.com




**الشكل (٣-٩): حتمية القطبية المتضادة في بناء د ن أ على طول السلسلتين نظرًا لأن السلسلتين متضادتي الاتجاه وأن إنزيم بلمرة د ن أ III يبني فقط في الاتجاه ('3→'5) فلابد أن يكون البناء على السلسلة المتلكئة متقطع مما يؤدي إلى إنتاج شظايا أوكازاكي بينما يتم البناء بصورة مستمرة وغير متقطعة على سلسلة القائد ويقوم بادئ ر ن أ باستبداء عملية البناء على كل من السلسلتين**

وقد تأكد الآن أن شظايا أوكازكى عبارة عن نواتج أولية لإحدى السلسلتين فقط وهى تلك التى تأخذ الاتجاة $5' \rightarrow 3'$ أما السلسلة ذات الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ فإنها تبنى أو يتم تناسخها على شكل خيط مستمر وغير متقطع من البداية إلى النهاية.وهى لذلك تكون عادة اسرع فى معدل بنائها وتسبق فى ذلك الخيط المتقطع مما أدى إلى تسمية هذا الخيط بالخيط القائد Leading Strand فى حين سمى الخيط المتقطع بالخيط التابع أو البطئ Lagging Strand يؤدى الفرق فى سرعة البناء بين الخيطين إلى ظهور منطقة صغيرة من د. ن. أ الأبوى فى صورة احادية السلسلة عند شوكة التناسخ (الشكل ٣-١٠) ثم تصبح مزدوجة السلسلة عند بدء شظية أوكازاكى فى الظهور والتى يستمر بناؤها حتى تصل إلى نهاية الشظية السابقة لها والتى لا تلبث أن تلتحم بها. يبدأ بناء شظايا أوكازاكى عند نقطة محددة على طول قالب السلسلة البطيئة وتحدد المسافة بين هذه النقط متوسط طول شظايا أوكازاكى المتكونة أثناء تناسخ جزئ معين من د. ن.أ .




الشكل (٣-١٠): يؤدي اختلاف سرعة الحركة بين الخيط القائد والخيط المتلكئ إلى ظهور منطقة صغيرة وحيدة السلسلة في جزئ د ن أ الأبوي عند شوكة التناسخ

## بناء د. ن. أ فى الكائنات الدقيقة:

## DNA Synthesis in Microorganisms:

يمثل التوصل الى أن التناسخ يتم بالطريقة شبة المحافظة وأنه ثنائى الاتجاه ، طراز أو نموذج فقط لتضاعف د. ن. أ والاتحاد بين السلسلتين اللتين تم بناؤهما إلا انه تظل هناك معضلة اكثر تعقيدا تتمثل فى معرفة كيفية حدوث البناء الفعلى لسلسلة طويلة مكملة متعددة الينيوكلتيدات على القالب وسنبدأ باستعراض أنواع أنزيمات بلمره د. ن. أ و دور كل منها فى عملية البناء.

## أنواع انزيمات بلمره د. ن. أ فى بكتريا القولون:

## DNA Polymerases:

اكتشف حتى الآن فى خلايا بكتريا القولون *E.coli* ثلاثة أنواع من انزيمات بلمرة د.ن. أ وقد تم تحديد دور إثنتان منها فى عملية تناسخ د. ن. أ. فبينما كان يظن سابقاً أن انزيم البلمره DNA Polymerase I (DNA Pol I) والذى كان أول انزيم يكتشف فى هذه المجموعة، هو الانزيم الرئيسى المسئول عن بلمره جزئ د. ن. أ إلا أنه أمكن التحقق من أن هناك انزيم آخر وهو (DNA Pol III) والذى اكتشف لاحقا هو الذى يقوم بالدور الأساسى فى بلمرة جزئ د. ن. أ وعلى العكس من ذلك تبين أن انزيم (DNA Pol I) يقوم أساسا بملئ الفراغات أو الفجوات الصغيرة بين شظايا أوكازاكى المتكونة على الخيط المتلكئ. فى حين لم يتحدد بعد دور معين للانزيم الثالث وهو (DNA Pol II) فى عملية البلمرة حيث أن الطفرات التى لا تنتج هذا الأنزيم لا تتأثر بغيابة.

وقد أمكن تحديد دور كل من هذه الانزيمات فى الخلية *in vivo* كالاتى:

١- يفترض أن انزيم د. ن. أ بوليميريز I قد يكون مسئولا عن ازالة بادئ ر. ن. أ القصير وكذلك ملئ الفجوات الناتجة عن تلك الازالة كما أن

نشاطة فى التحليل الطرفى Exonudease يسمح بتصحيح الاخطاء Proofreading أثناء هذه العملية وقد إنتفت أهمية هذا الانزيم فى عملية البلمرة الاساسية عندما اكتشفت طفرة لغياب هذا الانزيم فى بكتريا القولون إلا أن عملية بناء جزئ د. ن. أ لم تتأثر بهذا الغياب.

٢- يبدو ان أنزيم د. ن. أ بوليميرنز II يلعب دورا فى اصلاح الأخطاء الناجمة عن التلف الذى قد يحدث فى جزئ د. ن. أ نتيجة التعرض لعوامل خارجية مثل الاشعة فوق البنفسجية.

٣- يعد انزيم د. ن. أ بوليميرز III هو الانزيم الأساسى المسئول عن عملية البلمرة اللازمة لعملية التناسخ كما أن نشاطه فى التحليل الطرفى $3' \rightarrow 5'$ Exonuclease تمكنه من إصلاح الاخطاء وسوف يتم عرض وظيفة كل من هذه الانزيمات بالتفصيل فيما بعد.

يبين الجدول (٣-١) بعض الخواص الرئيسية لكل من هذه الانزيمات.



openkandl.com

**الجدول( ٣-١) بعض خواص انزيمات البلمره DNA Pol III, II, I في بكتريا القولون**

| الوظيفة | Pol I | Pol II | Pol III |
|---|---|---|---|
| **الوظيفة:** | | | |
| البلمرة 5'→3' | + | + | + |
| التحليل الطرفى 3' →5' exonuclense | + | − | + |
| التحليل الطرفى 5' →3' exonuclense | + | − | + |
| بدء البلمرة | − | − | − |
| الاحتياج لـبادئ من ر. ن. أ لبدء البلمرة | + | + | + |
| **خواص عامة :** | | | |
| الحجم (kdal) | ١٠٩ | ١٢٠ | ١٤٠ |
| عدد الجزيئات فى الخلية | ٤٠٠ | ؟ | ١٥ |
| معدل البلمره * | ٦٠ | ٣٠ | ٩٠٠٠ |
| الجينات التركيبية المعروفة | PolA | Pol B | dnaE, N, Z |
| الطفرات المميتة الشرطية | نعم | لا | نعم |

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

## دور انزيمات بلمرة د. ن. أ فى تصحيح الأخطاء Proofreading:

يتبين من هذا الجدول أن انزيمى Pol I, Pol III تمتلك خواص التحليل أو القطع الطرفى Exonuclease فى الأتجاه 5'→3' بالأضافة إلى وظيفة البلمرة الأساسية.ويعنى ذلك أنه فى مقدور كل من هذه الأنزيمات أن يعيد قطع أو هدم سلسلة متعدد النيوكلتيدات الحديثة التكوين فضلا عن دوره الأصلى فى استطالتها. إلا أن اتجاه البناء يكون أقوى بكثير من اتجاه الهدم. ولكن لماذا توجد

خاصية القدرة على الهدم فى نفس الوقت الذى يفترض فيه أن هذه الأنزيمات تقوم أساسا بدور بنائى؟

تبين أن وجود هذه الخاصية ذو أهمية بالغة فى عملية تصحيح الأخطاء Proofreading أثناء عملية بناء سلاسل جزيئات د. ن. أ الجديدة حيث وجد أن خاصية الهدم الطرفى Exonuclease تنشط بصفة خاصة عند وجود أزواج قواعد غير متكاملة أضيفت فى غير أماكنها الصحيحة أثناء عملية البناء فلو حدث بالصدفة أن قاعدة غير صحيحة أضيفت بالخطأ على النهاية $3'$ للسلسلة النامية فإنه لابد من التخلص منها فى الحال حتى لا تورث هذه الخطأ ويكون احتمال إزالتها عالى قبل أضافة القاعدة التالية ويتم ذلك بفعل الهدم الطرفى لهذه الانزيمات.

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

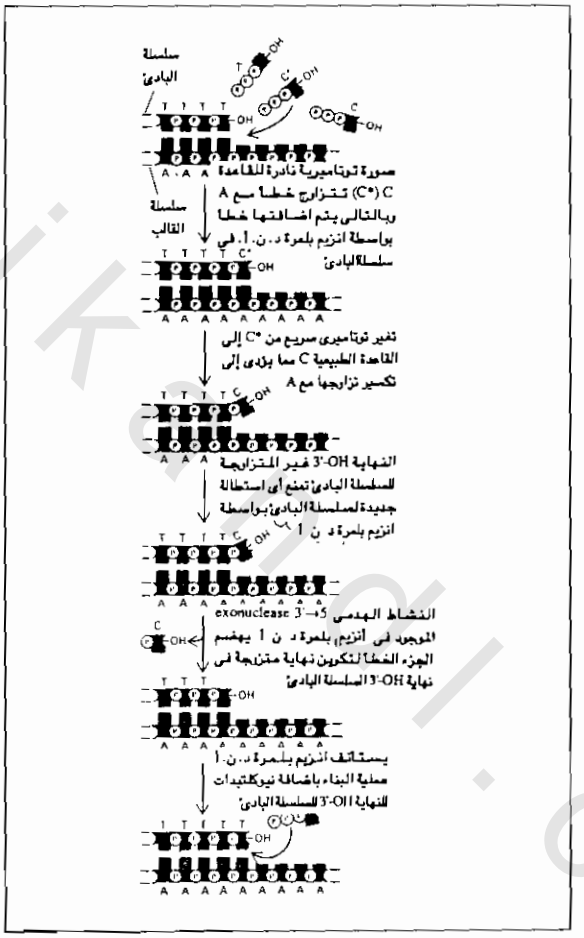
قد يعزى عدم ظهور انزيم بلمرة د. ن. أ فى الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ إلى الاحتياج المستمر إلى عملية التصحيح هذه. إذ لو افترضنا إمكان استطاله السلسلة فى هذا الاتجاه فإن النهاية النامية ستكون دائماً منتهية بمجموعة ثلاثية الفوسفات والتى تكونه روابطها المرتفعة الطاقة ضرورية لإضافة النيوكلتيدة التالية. من جهة أخرى سيؤدى نزع أو إزالة أحدث نيوكلتيده مضافة من مثل هذه السلسلة النامية المنتهية بمجموعة ثلاثية الفوسفات أثناء عملية تصحيح الأخطاء إلى ظهور سلسلة ذات نهاية $5'$ أحادية الفوسفات Monophosphate - $5'$ والتى ستكون بمحتوى طاقتها المحدود غير قادرة على الاستطالة بواسطة إنزيم البلمرة

الأفتراضى هذا مما يؤدى إلى توقف عملية الاستطالة فى السلسلة. وعلى ذلك فإنه يكون من الأسهل تصحيح الخطأ الناتج عن اضافة قاعدة غيرة صحيحة للتو إلى النهاية 3' للسلسلة عن تلك المضافة إلى النهاية 5' ومما يؤكد ذلك أن فرصة ظهور إنزيم بلمرة فى الاتجاه 5'→3' معدومة حتى الان لإفتقاده لخاصية تصحيح الأخطاء فى حين أن التناسخ فى الاتجاه 3'→5' يسمح للإنزيم نفسه فى نفس الوقت بتصحيح الأخطاء بكفاءة عالية.

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

أظهر التركيب الثلاثى الأبعاد لجزئ البلمرة (DNA Pol III) أن هذا الإنزيم يحتوى على نطاقين أو مجالين Domains محدودين، يحتوى النطاق الأكبر على برزخ أو شق عميق ذو شحنه كهربية موجبه ويبلغ نصف قطرة $20A^{o}$ وترتبط سلسلة د. ن. أ فى هذا الشق فى حين قد يحتوى النطاق الأصغر على منطقة للارتباط بالنيوكلتيدة القادمة. يبدو أن تحت النطاق الذى يتميز بالمرونة لدية المقدرة على إغلاق الشق بعد إرتباط سلسلة د.ن. أ. وعندما تكون سلسلة د. ن. أ فى هذا الوضع فإنه يكون باستطاعتها التحرك فقط إما إلى الخلف أو إلى الأمام من خلال الشق. يعتقد أنه فى حالة اضافة نيوكلتيدة خاطئه لهذه السلسلة والتى لا يمكنها أن تتزاوج بطريقة صحيحة مع القاعدة المقابلة فسيؤدى ذلك إلى تشوية وعدم تناسب عند هذه النقطة (القاعدة) مما يحول بين

السلسلة وبين الحركة بسهولة إلى الأمام خلال الشق الضيق مما يدفعها إلى الحركة إلى الخلف بحيث تعود هذه القاعدة الخاطئة إلى موقع نشاط الهدم الطرفى exonuclease $3' \rightarrow 5'$ المصحح للخطأ بحيث يتم إزالة القاعدة الخطأ من موقعها على السلسلة (الشكل ٣-١١).




الشكل (٣-١١): شكل تخطيطي لعملية تصحيح الأخطاء
بعد إضافة القاعدة الخطأ إلى جزئ د ن أ في البكتريا

وتتضح أهمية النشاط الهدمى الطرفى $5' \rightarrow 3'$ لهذا الأنزيم فى تصحيح الأخطاء عندما اكتشفت طفرة فى تحت الوحدة E لهذا الانزيم والمسئولة عن هذا النشاط حيث أدت هذه الطفرة إلى زيادة كبيرة فى الاخطاء وعدم القدرة على تصحيحها.

## أهمية RNA البادئ فى تناسخ جزئ د. ن. أ.:

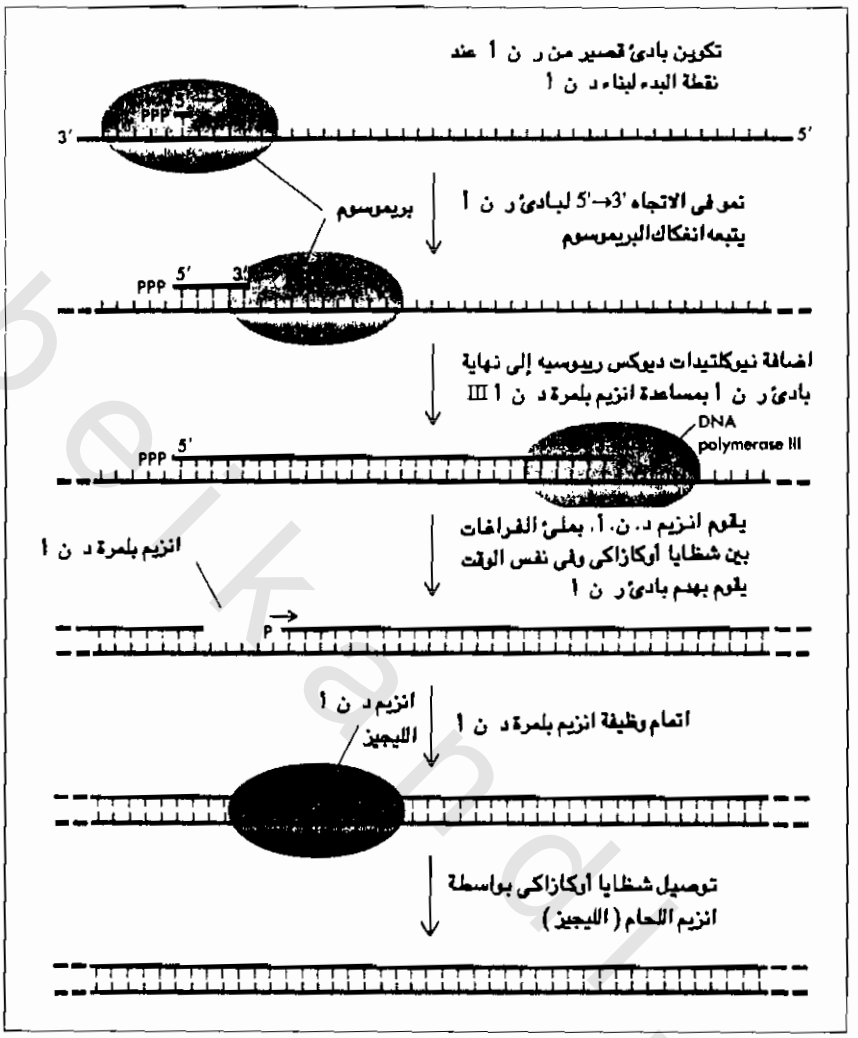
تبين أن إنزيمات بلمرة د. ن. أ DNA Polymerases المعروفة حتى الآن ليس فى مقدورها بدء عملية البلمرة وبناء السلسلة من الصفر *de navo* بل لابد أن تكون مسبوقة ببادئ قصير حتى يمكنها بدء نشاط البلمرة واستطالة سلسلة د. ن. أ. وقد تبين أن عملية بدء بناء أى سلسلة من د. ن. أ يتطلب وجود بادئ قصير جداً من ر. ن. أ RNA (حوالى ١٠ نيوكليتدات فى مميزة النواة واقل من ذلك فى غير مميزة النواة) أى أن نقطة البداية (المنشأ) لبناء د. ن. أ على السلسة القالب لا يتم التعرف عليها بواسطة إنزيمات بلمرة د. ن. أ مخصوصة ولكن بإنزيمات تقوم بنسخ Transcribe د. ن. أ لانتاج سلسلة بادئ قصيرة جداً من ر. ن. أ أمكن التعرف على إنزيم خاص يعرف بالبريميز DNA Primase وهو يختلف تماماً عن إنزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase الخاص بعملية نسخ جزيئات ر. ن. أ على قالب د. ن. أ كما أنه لا يحتاج إلى نهاية $3'$-OH حره لبدء البناء.

تقوم هذه الإنزيمات بالتعرف على تتابعات خاصة على السلسلة القالب (سواء القائد أو التابع) لجزئ د. ن. أ. وجد أن إنزيم البريميز فى خلايا بكتريا القولون عبارة عن سلسلة واحدة من متعدد الببتيد يبلغ حجمه ٦٠ كيلو دالتون وتوجد منها حوالى ٥٠-١٠٠ نسخة فى الخلية الواحدة . ثبت أنه يلزم لبدء

نشاط هذا الإنزيم أن تدخل ضمن معقد مكون من ٦-٧ بروتينات أخرى لتكون معقداً كبيراً يعرف بالبريموسوم Primosome و يتحرك هذا المعقد خطوة خطوة (الخطوة = نيوكلتيدة) فى الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ على القالب الخاص بالخيط المتكلئ ليستبدئ البدايات المتكررة لشظايا أوكازاكى التى يتم بناؤها بصورة متقطعة على هذا القالب التابع. يعتقد أن مكونات البريموسوم المختلفة تقوم بالعمل فيما بينها بصورة تعاونية co-operative لتأمين حركة البريموسوم على جزئ د. ن. أ وكذلك فى ازاحة البروتينات الخاصة بتثبيت السلاسل الفردية من د. ن. أ (والتى يطلق عليها البروتينات المرتبطة بالسلسلة الفردية لجزئ د. ن. أ (SSB) كما سيأتى بعد ) كما تقوم بروتينات البريموسوم بالتعرف على مواقع البدء (المنشأ) الصحيحة وبلمرة وحدات الريبونيوكلتيدات لتكوين بادئ قصير جداً من سلسلة ر. ن. أ أى أن البريموسوم يتحرك على قالب د. ن. أ فى الاتجاه العكسى للاتجاه الذى لابد أن يتحرك عليه عندما يعمل على بناء ر. ن. أ مما قد يفسر لماذا يكون ر. ن. أ البادئ قصير السلسلة جداً لا يتعدى ٣-١٠ نيوكلتيدات.

يوجد لكل كائن تتابع متشابة لجميع بادئات ر. ن. أ مما يؤكد حقيقة أن البريموسوم يقوم ببناء ر. ن. أ. البادئ عند تتابعات معينة (متخصصة) على طول الخيط المتلكئ (التابع) لجزئ د. ن. أ القالب.

بمجرد أن يتم بناء ر. ن. أ البادئ، يبدأ نشاط إنزيم بلمرة د. ن. أ (DNA Pol III) نظرا لأن البادئ قد هيأ له نهاية $3'$ oH حره فى نهاية سلسلته القصيرة ويبدأ فى بناء شظايا أوكازاكى بحيث يتم تناسخ قالب د. ن. أ التابع فى صورة غير مستمرة (متقطعة) (الشكل ٣-١٢).




الشكل (٣-١٢): استخدام بادئ قصير من ر ن أ
لبدء بناء شظايا أوكازاكي على القالب المتلكئ

يتم بعد ذلك إزالة ر. ن. أ البادئ في خطوة لاحقة من خلال نشاط إنزيمDNA Pol I الذي يقوم بملئ الفجوات أو الفراغات بين شظايا د. ن. أ. بحيث يضيف النيوكليتدات الواحدة تلو الآخرى إلى النهاية 3′ التي تقع إلى

الخلف منه وفى نفس الوقت يقوم بتحليل وهدم سلسلة ر. ن. أ البادئ التى تسبقة. تتم عملية هدم ر. ن. أ نتيجة لنشاط موقع مختلف تماماً عن ذلك المسئول عن عملية التصحيح 5'→3' إذ أن ذلك الموقع النشط فى الهدم الطرفى 5'←3' يمكنه إزالة الديوكسى نيوكليتدات بالإضافة إلى الريبونيوكليتدات وعلى ذلك فإن استخدامه لا يكون قاصراً على إزالة بادئ ر. ن. أ ولكنه يقوم أيضاً بتحليل وهدم مناطق د.ن. أ التى يحدث لها تلف نتيجة للتعرض للإشعاع.

يلى ذلك عملية لحام أو لصق شظايا أو كازاكى ببعضها البعض بمساعدة إنزيم اللحام (ليجيز) DNA Ligase الذى يقوم بتوصيل النهاية 3' للشظية الجديدة من د. ن. أ بالنهاية 5' للشظية السابقة لها. وهكذا حتى نحصل فى النهاية على خيط كامل متصل (الشكل٣-١٢) وقد تأكدت وظيفة انزيم الليجيز فى لحام شظايا أوكازاكى عندما لوحظ أنه فى بكتريا طافرة لنقص الأنزيم تراكمت شظايا أوكازاكى بدون لحام.

ولكن لماذا تلجأ الخلية إلى بدء السلسلة ببادئ ر. ن. أ الذى لابد أن يزال فى خطوة لاحقة وتفضل ذلك على بدئها ببادئ من د. ن. أ الذى يفترض أنه لا توجد حاجة إلى إزالته فيما بعد؟ سبق أن ذكرنا أنه لم يوجد حتى الآن إنزيم بلمرة د. ن. أ يمكنه بدء البناء من الصفر *de nove*، بالاضافة إلى ذلك يمكن تفسير تفضيل وجود بادئ ر. ن. أ فى بداية شظايا أو كازاكى على أساس أن الأنزيم الذى يمكنه بدء بناء السلسلة من الصفر *de nove* يفتقر عادة إلى القدرة والكفاءة لإجراء عملية التصحيح الذاتى، وعلى ذلك فإن الإنزيم الذي يستطيع استبداء بناء شظايا أوكازاكى سيكون بالضرورة معرضاً لإنتاج نسخة غير صحيحة نسبياً ($10^{-3}$) مما يؤدى فى النهاية إلى زيادة معدل الطفور بدرجة كبيرة

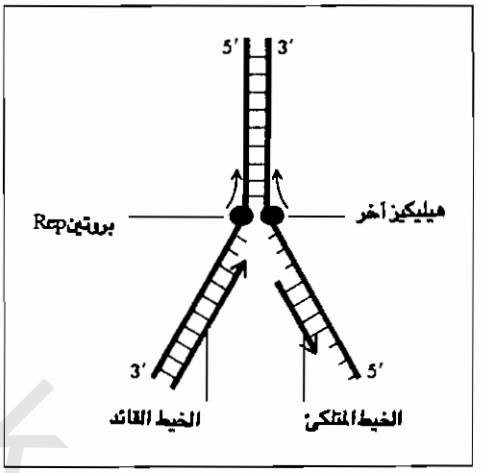
جداً مما يؤثر على حيوية الخلية ونشاطها بشكل سلبى. ولذلك فإنه يبدو أن وجود بادئ من ر. ن. أ بدلاً من د.ن.أ فى بداية السلسلة له ميزة أن هذه التتابعات القصيرة من الريبو نيوكليتدات يمكن اعتبارها بمثابة كشافات يسهل على DNA Pol III أن يتعرف عليها فيما بعد ويقوم بتكسيرها وإزالتها أى أن الإنزيم يميزها على أنها بقع رديئة يجب مسحها وإزالتها.

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

حيث أن سلسلتى الحلزون المزدوج الواقعة أمام شوكة التناسخ لا تنفصلان تلقائياً بالمعدل المناسب تحت الظروف العادية نظراً لأن الحلزون يمكون ثابت جداً والروابط الهيدروجينية تصل بين أزواج القواعد بطريقة منتظمة وتحتاج فى كسرها إلى درجة حرارة عالية نسبياً فى التجارب المعملية (حوالى ٩٦°م)، لذلك فإنه يلزم وجود عوامل مساعدة فى الخلية لفصل السلسلتين حتى يتسنى لإنزيمات بلمرة د. ن. أ. أن تؤدى دورها فى عملية التناسخ على قالب د. ن. أ. وجد أن هناك مجموعة من البروتينات التى تقوم بهذا الغرض يطلق عليها هيليكيزيز Helicases، تقوم هذه البروتينات (بالارتباط مع ATP) بالالتصاق بأجزاء وحيدة السلسلة من د. ن. أ.وتستخدم الطاقة الناتجة من التحليل المائى لجزئ ATP للتحرك الى الأمام وزيادة معدل انفصال سلسلتى د ن أ.

يوجد نوعان من هذه البروتينات أحدهما (هيلكيز II أو I) يرتبط بالقالب الخاص بالخيط البطئ (التابع) ويتحرك فى الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ فى حين يطلق على النوع الآخر اسم Rep protein وهو يرتبط بالقالب الخاص بالخيط القائد ويتحرك

فى الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ (الشكل ٣-١٣) تستمر إنزيمات الهيليكيز فى التقدم أمام شوكة التناسخ لفصل سلسلتى د. ن. أ القالب تمهيداً لعمل إنزيمات البلمرة.

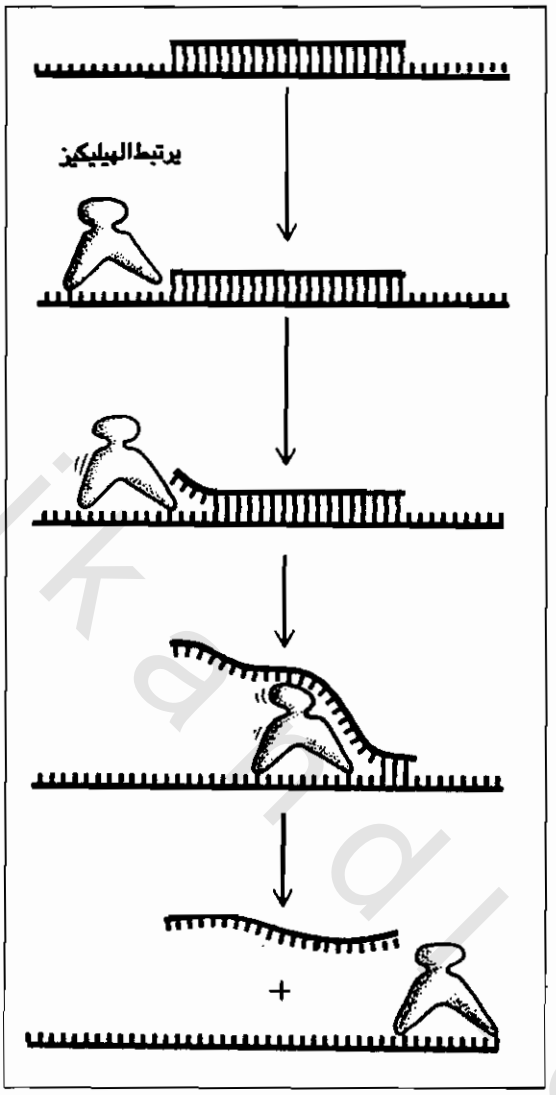



**الشكل (٣-١٣): تقوم إنزيمات الهيليكيزيز Helicases بفك حلزنة د ن أ أمام شوكة التناسخ، يتحرك البروتين (Rep Protein) وهو من أنواع الهيليكيز على أحد السلسلتين في الاتجاه 5'→3' في حين يتحرك إنزيم هيليكيز آخر (هايليكيز I أو II) على السلسلة المكلمة في الاتجاه 3'→5'**

ويبين الشكل (٣-١٤) الطريقة التى تعمل بها إنزيمات الهيليكيزيز.



obeikandl.com




الشكل (٣-١٤): ميكانيكية عمل إنزيمات الهيليكيزيز

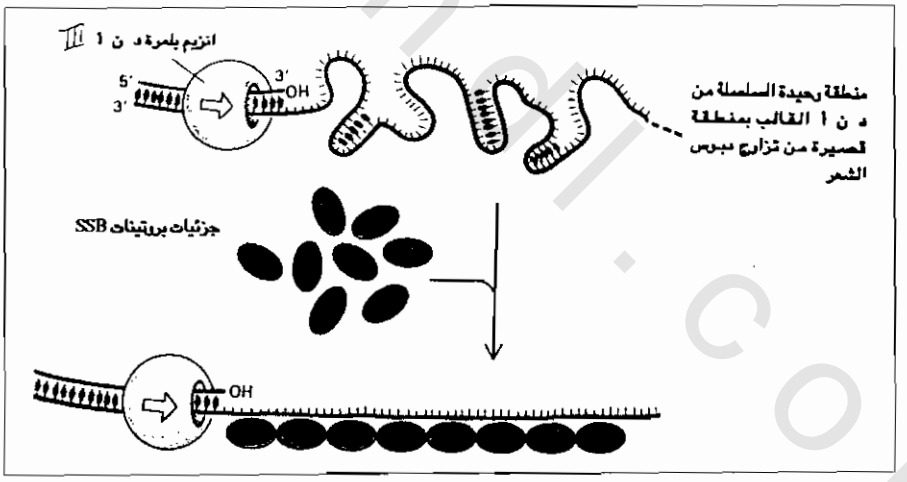
يتم إعادة إتحاد Annealing منطقة قصيرة من د ن أ مع سلسلة طويلة مفردة من د ن أ لتكوين منطقة حلزون مزدوج محدودة تنفك هذه المنطقة المزدوجة عند مرور الهيليكيز على سلسلة د ن أ محررًا الشظية القصيرة من د ن أ ويحتاج هذا التفاعل إلى وجود جميع بروتينات الهيليكيز وATP



obeikandl.com

من جهة أخرى، وجد أن سلسلة القالب عندما تكون فى صورة مفردة فإنها تكون معرضة للأنثناء أو الأنطباق على نفسها بسرعة وبسهولة فى المناطق المفردة لميلها الطبيعى لتكوين مناطق مزدوجة بين أزواج القواعد المتقابلة ولو بطريقة خاطئة مكونة عروات تشبة دبوس الشعر Hairpin مما يعيق عملية التناسخ. توجد مجموعة بروتينات خاصة تقوم بالارتباط بسرعة بالمناطق المفردة من سلسلة القالب لتثبيت هذه المناطق والمحافظة عليها مفرودة وممتدة بدون انحناءات أو انثناءات لحين وصول إنزيم البلمرة إليها.

وجد أن هذه البروتينات المثبته تلتصق بمنطقة من د. ن. أ بدون أن تحجب القواعد النتروجينية حتى تظل الأخيرة معرضة لعملية التناسخ، يطلق على هذه المجموعة من البروتينات اسم بروتينات الارتباط بسلسلة د. ن. أ. المفردة Single Stranded DNA Binding Proteins واختصاراً (SSB) ويبين الشكل (٣-١٥) كيفية عمل هذه البروتينات.




**الشكل (٣-١٥): دور بروتينات SSB أثناء عملية التناسخ حيث يؤدي ارتباط هذه البروتينات بالسلسلة المفردة إلى منع انثنائها قبيل عملية التناسخ مما يسهل مرور إنزيم بلمرة د ن أ على القالب المفرد**

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

## تركيب انزيم البلمرة DNA Pol III:

وجد أن إنزيم بلمرة د. ن. أ من نوع DNA Pol III المسئول عن استطالة سلسلة د.ن.أ أثناء عملية التناسخ يتكون من سبع تحت وحدات من متعدد البيتيد تكون معاً إنزيم كامل Holoenzyme ولابد أن توجد هذه الوحدات جميعاً معاً حتى يمكن للإنزيم أن يقوم بوظائفه على الوجه الأكمل . وجد أن واحده من هذه الوحدات وتسمى ∝ تقوم بنشاط الهدم الطرفى Exonuclease $3' \rightarrow 5'$ بالاضافة إلى وظيفة البلمرة فى حين تقوم الوحدة Є بالهدم الطرفى فى الاتجاة $5' \rightarrow 3'$ ترتبط واحدة أو أكثر من الوحدات الأخرى بجزئ ATP حتى يمكن بدء الاستطالة عند النهاية $3'$ H لبادئ ر. ن. أ.

يبين الجدول(٣-٢) أنواع البروتينات المشاركة فى تناسخ جزئ د.ن.أ فى بكتريا القولون وملخصاً لوظائف كل منها.

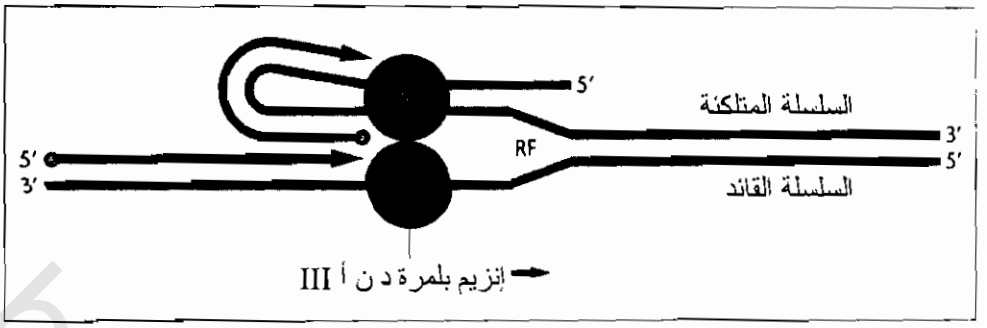
obeikandi.com

## الجدول (٣-٢) أنواع البروتينات المشاركة في تناسخ د. ن. أ في بكتريا القولون E.coli

| اسم البروتين | الكتلة (Kdal) | عدد تحت الوحدات | الوظيفة |
|---|---|---|---|
| SSB | ٧٤ | ٤ | الارتباط بالسلسلة المفردة |
| Protein i | ٦٦ | ٣ | تجميع البريموسوم وتنشيطه |
| Protin n | ٢٨ | ٢ | |
| Protin n' | ٧٦ | ١ | |
| Protin n" | ١٧ | ١ | |
| Dna C | ٢٩ | ١ | |
| Dna B | ٣٠٠ | ٦ | |
| Primase | ٦٠ | ١ | بناء البادئ ر. ن. أ |
| Pol III Holoenzyme | (٧٦٠) | (٢) | البلمرة DNA polymerase |
| ∝ | ١٤٠ | ١ | البلمرة و exonuclease 5'→3' |
| ∈ | ٢٥ | ١ | البلمرة و exonuclease 3'→5' |
| θ | ١٠ | ١ | ٢x استطالة السلسلة د.ن. أ الجديدة |
| β | ٣٧ | ١ | |
| δ | ٥٢ | ١ | |
| δ | ٣٢ | ١ | |
| T | ٨٣ | ١ | |
| Pol I | ١٠٢ | ١ | ملئ الفجوات وإزالة بادئ ر. ن. أ |
| Ligase | ٧٤ | ١ | اللحام بين شظايا أوكازاكى |
| Topoisomerase II (Gyrase) | ٤٠٠ | ٤ | زيادة الحلزنة |
| Gyr A | ٢١٠ | ٢ | |
| Gyr B | ١٩٠ | ٢ | |

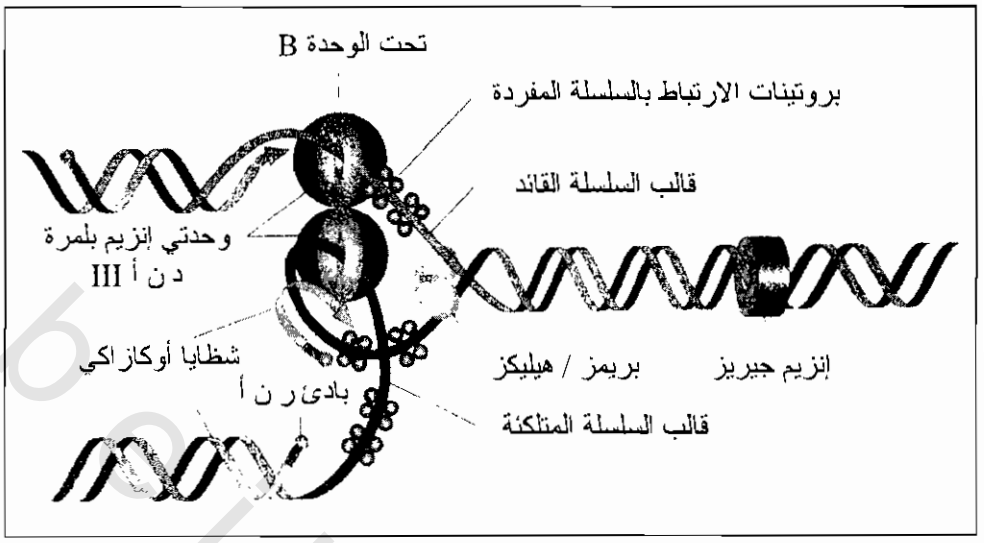
| | | | |
|---|---|---|---|
| Rep Protein | ٦٥ | ١ | فك الحلزون وفصل سلسلتى د.ن.أ |
| Helicase II | ٧٥ | ١ | فك الحلزون وفصل سلسلتى د.ن.أ |
| Dna A | ٤٨ | ٤ | نقطة بداية التناسخ فى د.ن.أ |
| Topoisomerase I | ١٠٠ | | استرخاء الحلزون الفائق السلبى |

تقوم هذه البروتينات بالعمل فى تنسيق تام مع بعضها ويطلق عليها فى مجموعها ماكينة التناسخ Replication Machine مما يؤدى إلى إنتاج جزيئات د. ن. أ صحيحة وخالية من الأخطاء. تبين أن معظم هذه البروتينات تكون مرتبطة ببعضها فى صورة معقدات مكونة من عدة إنزيمات (الكتلة $10^6$ Dalton) وتتحرك بسرعة على خيط د. ن. أ. وقد وجد أن هناك جزيئين من إنزيم DNA Pol III عند شوكة التناسخ بحيث يمكن لهذا الثنائى الإنزيمى أن يقوم بإدارة عملية استطالة كلاً من الخيطين القائد والتابع فى نفس الوقت ويتطلب ذلك أن ينثنى الخيط التابع إلى الخلف (ربما وراء Pol III) حتى يمكنه أن يرتبط بمكونات البلمرة فى نفس اتجاه الخيط القائد. وطبقاً لهذا الافتراض فإن البادئ المتكون بفعل البريموسوم سيكون مغطى بواسطة DNA Pol III عندما يكون قالب الخيط التابع ماراً من البريموسوم وسيكون مغطى بواسطة DNA Pol III عندما يكون قالب الخيط التابع ماراً من خلال معقد الإنزيم Pol III. وعندما تصل السلسلة النامية إلى شظية أوكازاكى السابقة لها فإن الانحناء أو العروه ستسترخى. وفى هذا الوقت سيؤدى بناء الخيط القائد المستمر إلى توفر منطقة مفردة جديدة من قالب الخيط التابع التى يمكنها أن تنحنى إلى الخلف وتشارك فى تكوين شظية أوكازاكى التالية. بهذه الميكانيكية لن يكون الفرق كبيراً بين معدل بناء واستطالة الخيط القائد والخيط التابع (الشكل ٣-١٦).




**الشكل (٣-١٦): يتم التناسخ معًا وفي نفس الوقت على كلا من السلسلة القائد والسلسلة المتلكئة على شوكة تناسخ واحدة. تنحني السلسلة المتلكئة لكي تعكس الاتجاه المادي وليس البيوكيماوي للتناسخ وينشط الإنزيم بوحدتين بحيث تتوزع كل وحدة على إحدى السلسلتين للقيام بعملية البناء**

بالإضافة إلى ذلك سيتم انفصال البريموسوم عن د. ن. أ القالب بنفس السرعة التى تتحرك بها مكونات جزئ DNA Pol III المشاركة فى بلمرة د.ن.أ يطلق علي معقد البروتينات المشاركة فى تناسخ د. ن. أ والتى تشمل جزئين من DNA Pol III والبريموسوم اسم ريبليوسوم Repliosome (وهى عادة تكون فى حجم الريبوسوم) ويوضح الشكل (٣-١٧) الدور الذى تقوم به كل من هذه البروتينات فى عملية تناسخ د. ن. أ.




**الشكل (٣-١٧): ملخص لعملية بناء د ن أ عند شوكة تناسخ واحدة**

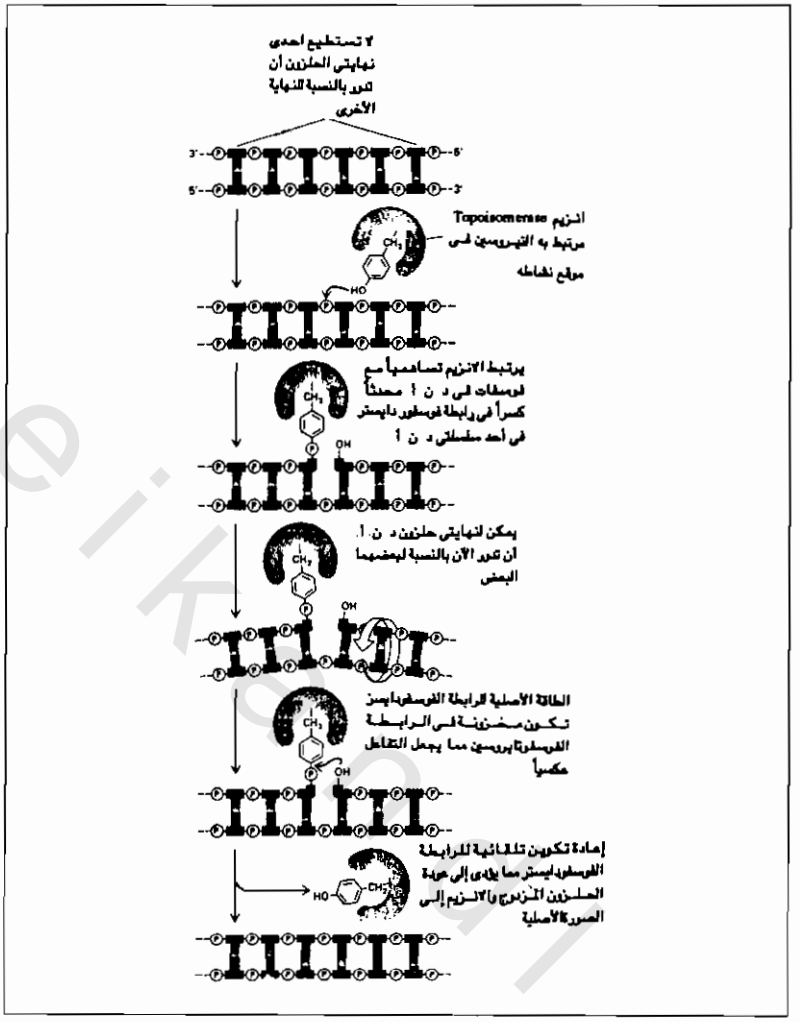
## دور انزيمات Topoisomerase فى تناسخ د. ن. أ:

أن توضيح الحلزون المزدوج لجزئ د. ن. أ "كسلم مسطح" لا يأخذ فى الاعتبار مشكلة الدوران أو الالتفاف Winding الذى يحدث أثناء تناسخ د. ن. أ من المعروف أن كل ١٠ أزواج من القواعد توازى دورة التفاف كاملة حول محور الحلزون المزدوج الأصلى. معنى ذلك أنه لكى تتحرك شوكة التناسخ فإنه يتحتم على جميع أجزاء الكروموسوم التى تسبق الشوكة أن تدور بسرعة (الشكل ٣-١٨) مما يتطلب استهلاك مقدار كبير من الطاقة وعلى الأخص فى حالة الكروموسومات الطويلة نسبياً. ولذلك لجأت الخلية إلى ميكانيكية بديلة إثناء عملية التناسخ عن طريق تكوين محور ارتكاز للدوران "Swivel" فى جزئ د. ن. أ بواسطة بروتينات خاصة يطلق عليها DNA Topoisomerases، يمكن اعتبار هذه المجموعة من البروتينات بمثابة انزيمات تحليل مائى نووى عكسى

"Reversible Nucleases" حيث ترتبط تساهمياً بمجموعات الفوسفات فى الهيكل الأساسى لجزئ د. ن. أ، وبذلك تقوم بتكسير رابطة فوسفواستير ثنائية فى سلسلة د. ن. أ. ومن خواص هذه الرابطة التساهمية التى تكونت بين انزيم Topoisomerase وفوسفات د. ن. أ احتفاظها بالطاقة الناتجة عن كسر الرابطة الفوسفواستير الثنائية وبهذا يكون تفاعل الكسر عكسياً بحيث التئام (لحام) سريع بدون الحاجة إلى مصدر طاقة إضافى. وتجدرالاشارة هنا إلى أن عملية إعادة الالتحام هنا تختلف عما يحدث عن طريق انزيم اللحام DNA Ligase الذى سبقت الاشارة إليه.



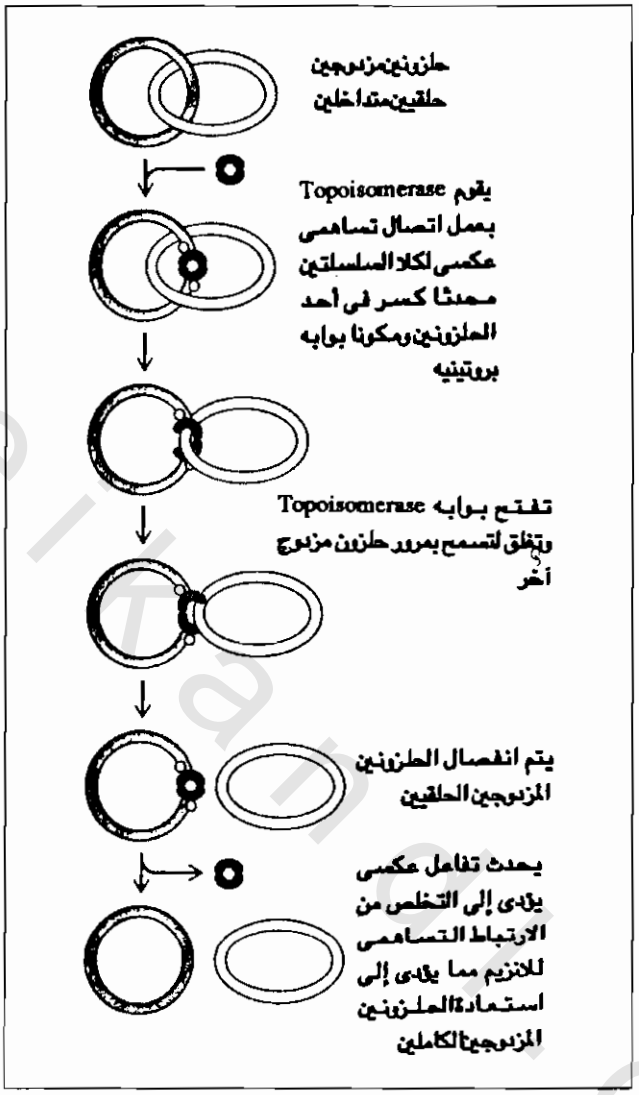
obeikandl.com




**الشكل (٣-١٨): تفاعل أحداث ثغرة عكسية (Nicking) الذي يتم في د ن أ مميزة النواة بمساعدة إنزيم Topoisomerase I**
**حيث تكون هذه الإنزيمات رباطة تساهمية مؤقتة مع جزئ د ن أ**

يوجد نوعين من Topoisomerases الأول يسمى Topoisomerase I ويحدث تأثيرة عن طريق إحداث كسر (أو ثغره صغيرة) "Nick" فى إحدى

سلسلتى الحلزون المزدوج فقط أى أنه يعمل على مستوى السلاسل المفردة. يؤدى القطع أو الكسر الصغير هذا الى السماح لشطري حلزون د. ن. أ الموجودين على جانبى الكسر بالدوران بحرية بالنسبة لبعضها البعض بحيث تستخدم الرابطة الفوسفواستير الثنائية فى السلسلة المقابلة للكسر كنقطة إرتكاز للدوران (الشكل ٣-١٩) وإذا نشأ اى توتر أو شد Tension فى حلزون د. ن. أ فإن اتجاه هذا الدوران سيتحدد بما يضمن تخفيف التوتر أو الشد. ينتج عن ذلك أن تناسخ د. ن. أ يمكن أن يتم بعد حدوث دوران لمنطقة قصيرة فقط من الحلزون وهى المنطة التى تسبق مباشرة شوكة التناسخ. ويحدث نفس الشئ أثناء عملية نسخ Transcription د. ن. أ لتكوين ر. ن. أ.




الشكل (٣-١٩): ميكانيكية عمل إنزيم Topoisomerase II في فصل جزيئين حلقيين من د ن أ أثناء التناسخ ويحتاج هذا الإنزيم إلى ATP لأداء وظيفته يوجد هذا الإنزيم في كل من الخلايا غير مميزة النواة ومميزة النواة

أما النوع الثانى من هذه الانزيمات فيسمى Topoisomerase II ويقوم بدوره عن طريق تكوين رابطة تساهمية مع كل من السلسلتين فى الحلزون المزدوج لجزئ د.ن.أ. في نفس الوقت مما يسبب قطع مؤقت فى السلسلتين. يتم تنشيط هذا الانزيم عن طريق مواقع موجودة على الكروموسومات حيث يتعابر حلزونان مزدوجان فوق بعضهما البعض، وعندما يرتبط Topoisomerase II بنقطة التعابر هذه فإنه :

١- يكسر أحد الحلزون المزدوجين (عكسياً) مما يؤدى إلى إنشاء بوابة فى د. ن. أ.
٢- يمر جزئ د. ن. أ مزدوج أخر من خلال هذا الكسر (البوابة).
٣- يعيد التحام الكسر ثم ينفصل عن د. ن. أ.

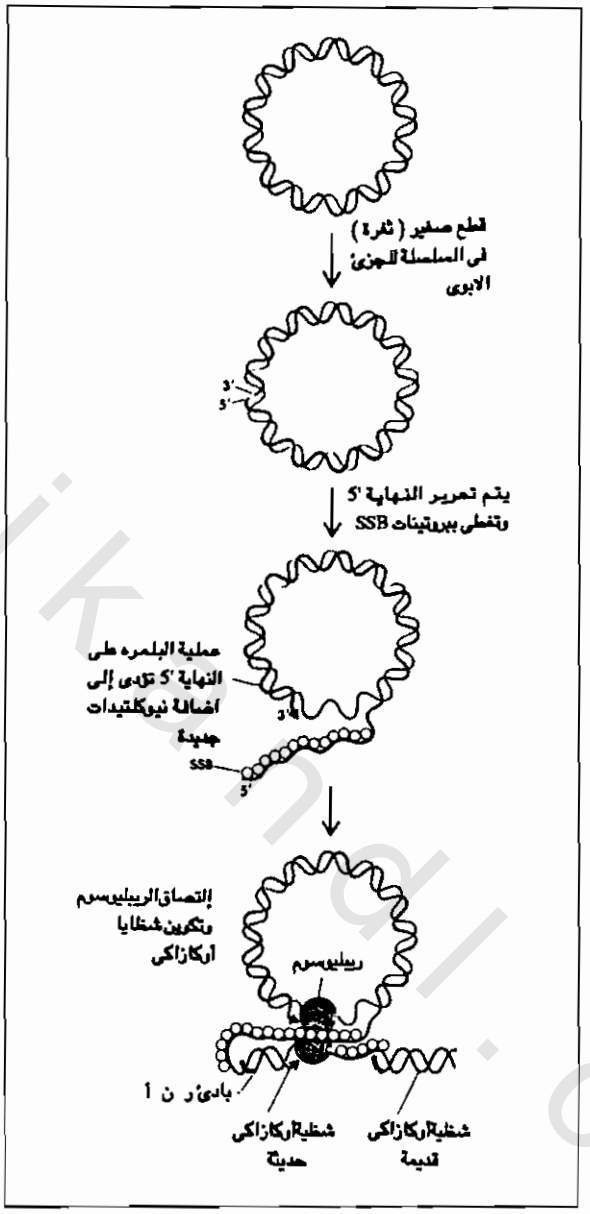
بهذه الكيفية فإن انزيم DNA Topoisomerase II يمكنه بكفاءه أن يقوم بفض الاشتباك بين جزيئين حلقيين من د. ن. أ كما فى الشكل (٣-١٩) يقضى هذا التفاعل نفسه على مشكلة تشابك وتعقد جزئ د. ن. أ "Tangling" التى كان من الممكن أن تحدث أثناء تناسخ د. ن. أ.

## نموذج الدوائر المتدحرجة لتناسخ د. ن. أ الحلقى Rolling Circles:

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

التناسخ (الشكل ٣-٢٠). يتم تغطية هذا الذيل بسرعة ببروتينات SSB لمنع التواءه أو التفافة. ويسمى هذا التركيب التناسخى "الدائرة المتدحرجة" Rolling circle لأن امتداد واسترخاء الذيل 5' وحيد السلسلة ينتج عن دوران الحلزون المزدوج القالب حول محوره. ولا يتسبب هذا الانفكاك فى أى مشاكل توبولوجية Topological حيث أن الدائرة تظل متماسكة بسلسلة واحدة من د. ن. أ مما يعطية حرية الحركة حول الروابط التساهمية الكثيرة الموجودة فى الهيكل الأساسى.

عند استخدام ميكانيكة الدائرة المتدحرجة لتناسخ د. ن. أ المزدوج فإن النهاية 5' ( الذيل) المفردة السلسلة تتحول بسرعة إلى حلزون مزدوج نتيجة لتكوين شظايا أوكازاكى عليها. يحتمل أن القوة المتحركة لاستمرار عملية فك الذيل 5' من الدائرة المتدحرجة ليست ناتجة عن تفاعلات البلمرة التى تحدث على النهاية 3' OH ولكنها ناتجه عن حركة الريبليوسوم المدفوع بمكوناته من الهليكيزيز (الشكل ٣-٢٠).



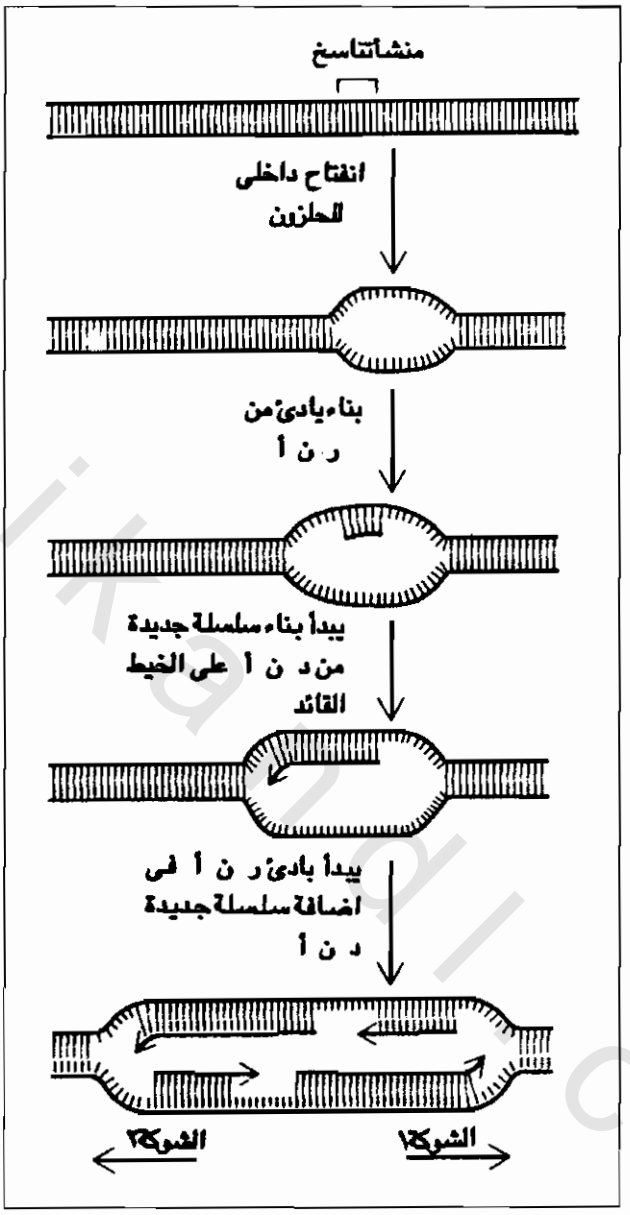

الشكل (٣-٢٠): ميكانيكية الدائرة المتدحرجة لتناسخ جزئ د ن أ الحلقي القوة المؤدية إلى فك حلزنة الذيل '5 تنتج من حركة الريبليوسوم المدفوع بمكوناته من الهيليكيزيز

## بدء شوكات التناسخ عند منشأ التناسخ:

تبدأ شوكات التناسخ فى كل من البكتريا والثدييات عند تركيب معين يعرف بفقاعة التناسخ Replication Bubble وهى منطقة على جزئ د. ن. أ يتم فيها انفصال السلسلتين المستخدمتين كقالب لبناء د. ن. أ (الشكل ٣-٢١) وقد تبين أن هذه الفقاعة تتكون عند تتابع محدد من القواعد على الجزئ يعرف بمنشأ التناسخ Replication Origin والذى يبلغ طوله حوالى ٣٠٠ نيوكلتيده. توجد مناشئ تناسخ مشابهة فى كروموسومات مميزة النواة ولو أنه لم تتحدد تتابعاتها بدقة بعد .

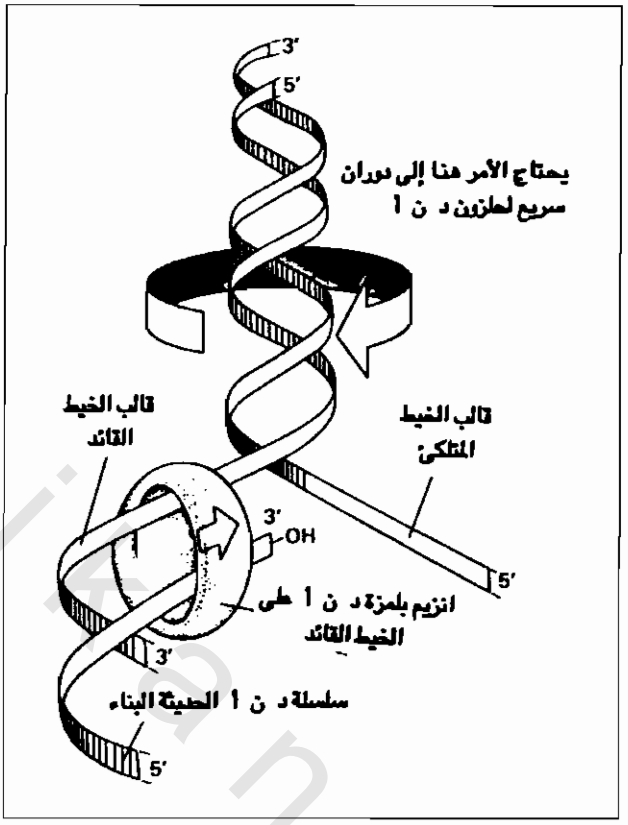


obeikandl.com




الشكل (٣-٢١): رسم تخطيطي للعمليات التي تجرى لبدء تكوين شوكات التناسخ عند منشأ التناسخ

تبين فى التجارب المعملية *In Vitro* أن بدء شوكة التناسخ فى البكتريا والفيرس تبدأ بالطريقة المبينة فى الشكل (٣-٢٢) حيث ترتبط نسخ عديدة من البروتين المستبدئ Initiator Protein بمواقع معينة عند منشأ التناسخ لتكوين معقد بروتينى كبير. يربط هذا المعقد انزيم الهيليكيز فى منطقة مفردة السلسلة من د. ن. أ القالب فى منطقة قريبة من الحلزون. كما يتم ارتباط انزيم بريميز DNA Primase ويتكون البريموسوم الذى يتحرك بعيداً عن المنشأ ويتكون بادئ من ر. ن. أ الذى يبدأ السلسلة الجديدة الأولى من د. ن. أ يؤدى ذلك إلى تجمع سريع لبقية بروتينات التناسخ لتكوين معقدات بروتينية للتناسخ تتحرك بعيداً عن نقطة المنشأ فى الاتجاه المضاد (الشكل ٣-٢٢). تستمر عملية التناسخ ثنائية الاتجاه حتى ينتهى تناسخ كل قالب د. ن. أ الذى يسبق كل شوكة. تتحرك كل شوكة بعيداً عن المنشأ بمعدل حوالى ٥٠٠ نيوكلتيدة فى الثانية الواحدة حتى ينتهى تناسخ جزئ د. ن. أ بأكمله ويستغرق ذلك فى البكتريا حوالى ٣٠-٤٠ دقيقة فقط.




الشكل (٣-٢٢): عملية فك الحلزنة أثناء تناسخ جزئ د ن أ ولكي يتم تحرك شوكة التناسخ في البكتريا بسرعة ٥٠٠ نيوكلتيدة في الثانية فإن الحلزون المزدوج أمام الشوكة لابد أن يدور بسرعة ٥٠ نيوكلتيدة في الثانية