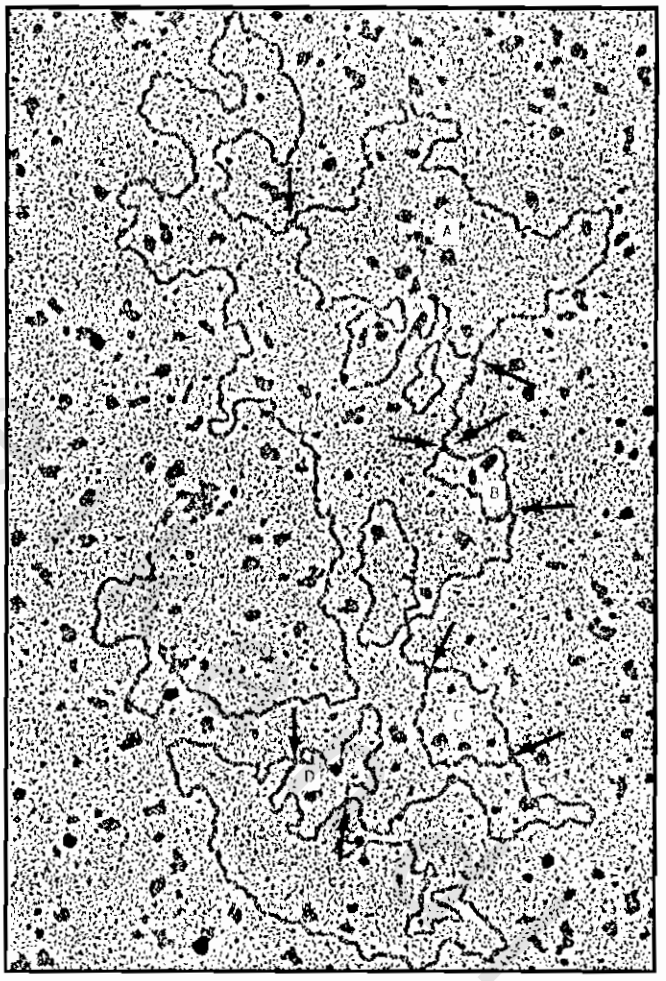
# الفصل الرابع

# تناسخ د. ن. أ الكروموسومات في الخلايا مميزة النواة

## بناء د. ن. أ فى مميزة النواة:

اثبتت البحوث أن عملية تناسخ د. ن. أ فى مميزة النواه تتم بطريقة مشابهة لما يحدث فى البكتريا. ففى كلتا الحالتين يتم فصل (فتح) السلسلتين عن بعضهما عند منشأ التناسخ وتتكون شوكتى تناسخ ويتم بناء د. ن. أ فى اتجاهين متضادين Bidirectional على كل من السلسلة القائد والسلسلة المتلكئة بواسطة انزيم بلمرة د. ن. أ. ويحتاج انزيم بلمرة د. ن. أ فى مميزة النواة نفس المتطلبات الاساسية مثل ما يحدث فى البكتيريا وهى : أربعة نيوكلتيدات وقالب من د. ن. أ وبادئ Primer إلا أنه نظراً لان جينومات مميزة النواة تحتوى كل خلية منها على كمية كبيرة جداً من د. ن. أ مقارنه بالبكتريا (مثال 4.6 Mbp فى البكتريا مقابل 120 Mbp فى الدروسفلا و3200 Mbp فى الانسان) ومن جهة أخرى فإن أطول كروموسوم فى الدروسوفلا يحتوى على 65Mbp مقابل 4.6 Mbp فى البكتريا وفى نفس الوقت نجد أن سرعة تناسخ د. ن. أ فى الدروسوفلا تكون بمعدل حوالى ٢٦٠٠ زوج نيوكتيدى فى الدقيقة عند درجة 25°م وبذلك لو اقتصر البناء فى الدروسوفلا على شوكة تناسخ واحدة فإن معنى ذلك أن يستغرق تناسخ د. ن. أ لهذا الكروموسوم ١٧,٥ يوماً. وبشوكتى تناسخ

تتحركان فى اتجاهين متضادين من منشأ مركزى فإن هذا الكروموسوم سيتم تناسخة فى ٨,٥ يوماً. ولكن لو عرفنا أن كروموسومات جنين الدروسوفلا يتم تناسخها فى ٣ إلى ٤ دقائق فقط وأن انقسام النواة يحدث مرة كل ٩ إلى ١٠ دقائق فى مرحلة الانقسام المبكر Early Cleavage Division ، فإن ذلك يحتم علينا أن نفترض وجود عدد كبير من مناشئ التناسخ على طول كل كروموسوم فى الدروسوفلا وغيرها من مميزة النواه حتى يمكن ان تتم عملية التناسخ بالسرعة المطلوبة أثناء دورة أنقسام الخلية وخاصة أنها تتم أثناء دور البناء S فقط والتى تمثل فترة زمنية محدودة فى دورة الخلية. فى حين أنه فى البكتريا، يحدث تناسخ د. ن. أ بدون توقف أثناء دورة الخلية. وفى الحقيقة فإنه لكى يحدث اتمام تناسخ كروموسوم الدروسوفلا فى ٣,٥ دقيقة فلابد أن يحتوى مثل هذا الكروموسوم على حوالى ٧٠٠٠ شوكة تناسخ موزعة على مسافات متساوية على طول جزئ د. ن. أ وقد اثبتت التجارب ذلك بالفعل حيث أمكن بفحص جزئ د. ن. أ فى الدروسوفلا تحت المجهر الالكترونى، التحقق من وجود عدد كبير من شوكات التناسخ (الشكل ٤-١) والتى تعمل فى وقت واحد. إلا أنه من الواضح ، كما سيأتى بعد ، أن عدد شوكات التناسخ لكل كروموسوم ليس ثابتاً فى كل مراحل النمو والتكوين فى مميزة النواة أذ أن التناسخ يستبدأ فى مواقع كثيرة فى الفترة الجنينية حيث يكون الانقسام الخلوى سريعاً جداً وذلك مقارنة بأعداد أقل في المراحل المتأخرة من التمايز.

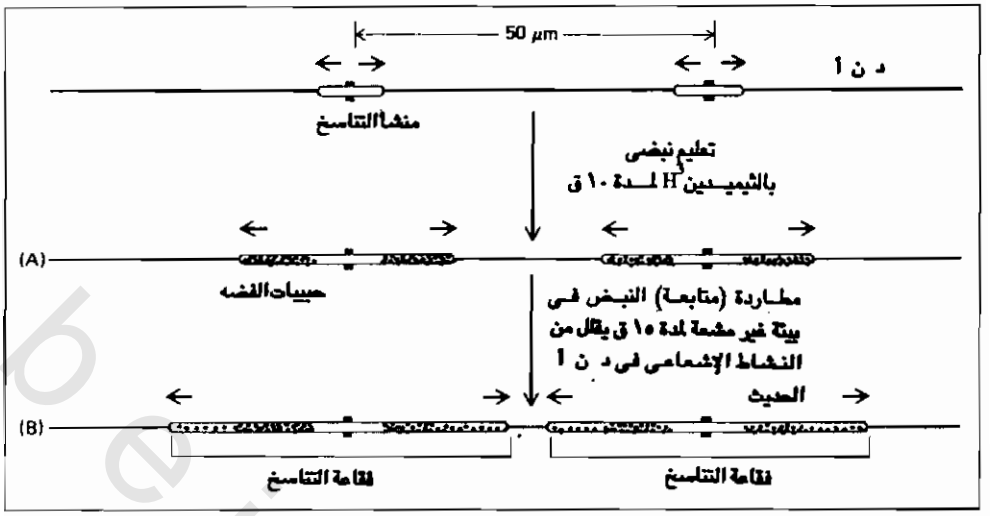



الشكل (٤-١): صورة بالمجهر الإلكتروني لجزئ د ن أ في الدروسفلا يبين مواقع متعددة للتناسخ ويظهر في هذا الشكل أربعة تركيبات للتناسخ بشكل (-O-) (A إلى D) في جزء من جزئ د ن أن وتشير الأسهم إلى مواقع شوكات التناسخ

وقد تحقق ذلك ايضاً بدراسة الطريقة العامة لتناسخ كروموسوم الإنسان حيث تنمى خلايا الإنسان فى مزرعة خلايا وتعلم لفترة قصيرة بالثيميدين المشع $^{3}H$ Thymidine بحيث يكون د. ن. أ المتكون خلال هذه الفترة الوجيزة

ذو إشعاع عال. ثم تكسر الخلايا بلطف ويؤخذ د. ن. أ ويفرد بعناية على سطح شريحة زجاجية مبطنة بمحلول تصوير حتى يمكن تحديد طراز د. ن. أ المشع بطريقة التصوير بالإشعاع الذاتى Autoradiography. اختير الوقت المسموح به للتعليم بالإشعاع بحيث تعطى كل شوكة تناسخ فرصة للحركة بمقدار عدة ميكروميترات على طول سلسلة د. ن. أ القالب. يؤدى ذلك إلى إمكان التعرف على د. ن. أ الذى تم تناسخه حيث يظهر على هيئة خطوط من حبيبات الفضة فى صورة الإشعاع الذاتى تحت المجهر الضوئى. بهذه الطريقة يمكن تقدير كل من سرعة واتجاه حركة شوكة التناسخ (الشكل ٤-٢) والذى يتبين منه أن التناسخ يتم فى اتجاهين متضادين. يدل المعدل الذى يتم به زيادة طول د. ن. أ المتناسخ مع زيادة فترة الإشعاع على أن شوكة التناسخ تتحرك بسرعة ٥٠ نيوكلتيده فى الثانية. ويمثل ذلك حوالى $\frac{١}{١٠}$ من السرعة التى تتحرك بها شوكة التناسخ فى البكتريا. وقد يرجع بطء الحركة فى مميزة النواه إلى الصعوبة التى تواجهها عملية تناسخ د.ن.أ فى الكائنات التى يكون فيها د. ن. أ الكروموسومى منضغط فى صورة كروماتين (نيوكليوسوم). وكما سبق الإشارة فإن متوسط طول كروموسوم الإنسان حوالى ١٥٠ مليون زوج نيوكلتيدى ولكى يتم تناسخ مثل هذا الجزئ الكبير من البداية إلى النهاية بشوكة تناسخ واحدة وبسرعة ٥٠ نيوكلتيده فى الثانية فإن ذلك سيستغرق $١٠^{٦}$ × ١٥٠ × ٠,٠٢ = ٣ × $١٠^{٦}$ ثانية أى حوالى ٨٠٠ ساعة وهو أمر مستبعد بطبيعة الحال.

obeikandl.com

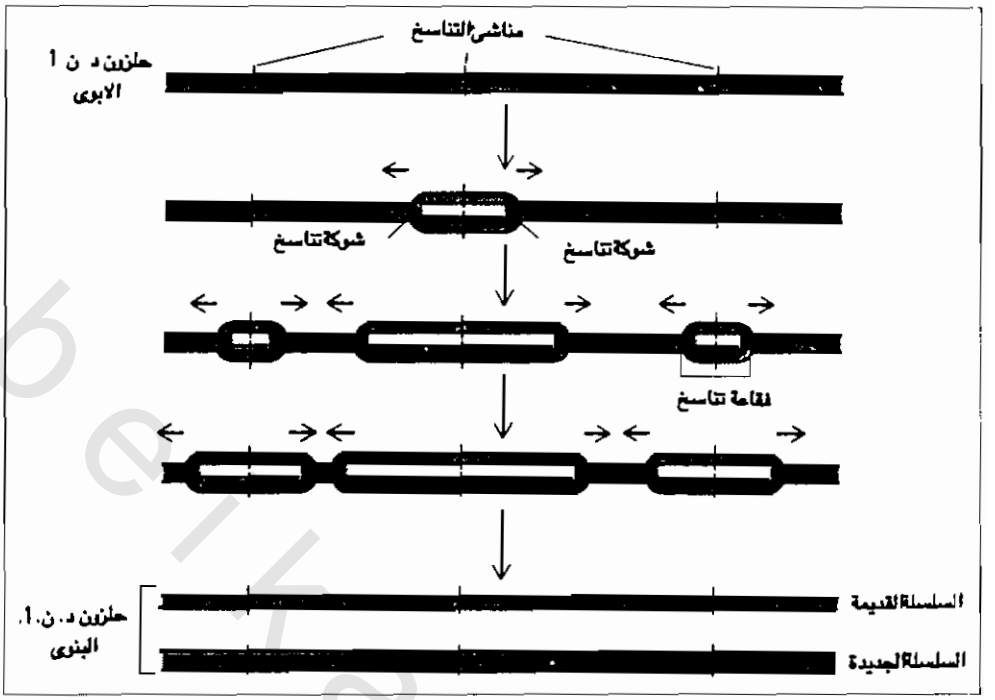



الشكل (٤-٢): إثبات أن حركة شوكة التناسخ تحدث أثناء مرحلة البناء S في مميزة النواة ثم تعليم محدود لـــ د ن أ الحديث البناء في الخلايا البشرية بوميض من التيميدين العالي الإشعاع ($H^3$-Thymidine)

( أ ) تم تحليل الخلايا وأجري فرد لـــ د ن أ على شريحة زجاجية وتمت عملية التصوير بالإشعاع الـــذاتي Autoradiography فظهر خط من حبيبات الفضة على د ن أ المشع.

(ب) نفس التجربة في أ فيما عدا أنه إتيحت فترة زمنية أكبر للتحضير في بيئة غير مشعة مما أدى إلـــى دورات تناسخ متتالية من د ن أ وقد تبين أن أزواج الخطوط الداكنة تحتوي على حبيبات فضة تتدرج بالتناقص في الاتجاهين المتضادين، ويبين ذلك الحركة ثنائية الاتجاه للـــشوكة مـــن منـــشأ تناســـخ مركزي.

وقد أظهرت صور الإشعاع الذاتى (الشكل ٤- ٣) أن هناك عدد كبير من شوكات التناسخ تتحرك فى وقت واحد على كل كروموسوم من مميزة النـــواة. بالإضافة إلى ذلك فإنه توجد عدة شوكات تناسخ توجد بـــالقرب مـــن بعـــضها البعض فى نفس منطقة د. ن. أ فى حين تخلو بعض منـــاطق أخـــرى مـــن أى شوكات تناسخ.




الشكل (٤-٣): طراز تناسخ د ن أ في كروموسوم مميزة النواة حيث تكون مناشئ التناسخ موزعة على مسافات من ٣٠,٠٠٠ إلى ٣٠٠,٠٠٠ زوج نيوكلتيدي في معظم الخلايا ويعتقد أن شوكة التناسخ تتوقف فقط عندما تتقابل مع شوكة تناسخ تتحرك في الاتجاه المضاد أو عندما تصل إلى نهاية الكروموسوم، وبهذه الطريقة فإن كل الكروموسوم يتم تناسخه

وقد أثبتت عدة تجارب لاحقة ما يأتى:

١- أن كل كروموسوم يمكن أن يحتوى على عدة الاف من مناشئ التناسخ.

٢- أن مناشئ التناسخ تميل إلى العمل فى مجاميع تسمى وحدات التناسخ Replication Units وتتكون كل وحدة من حوالى ٢٠ إلى ٨٠ منشأ تناسخ.

٣- يبدأ نشاط وحدات التناسخ خلال مرحلة S فى الميوزى ويستمر حتى يتم تناسخ جزئ د. ن. أ الكروموسومى بأكمله.

٤- داخل وحدة التناسخ الواحدة تكون المناشئ الفردية على مسافات تبلغ حوالى ٣٠,٠٠٠ إلى ٣٠٠,٠٠٠ زوج نيوكلتيدى من بعضها البعض، وقد يوجد منشأ تناسخ واحد لكل عروة أو نطاق كروماتينى.

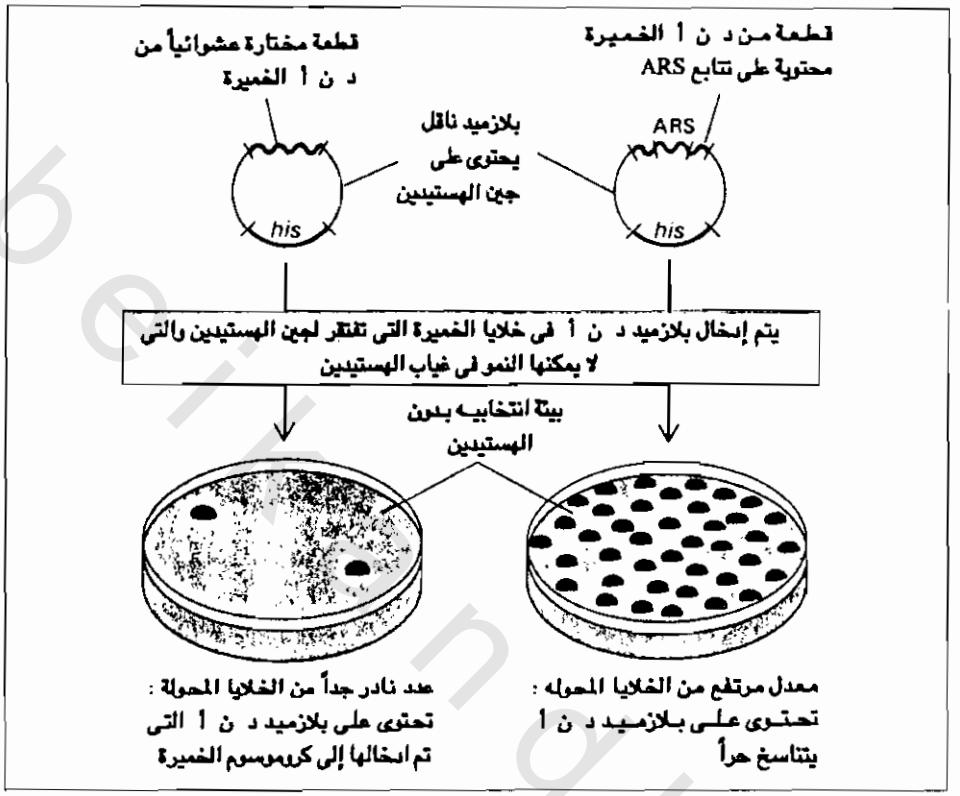
٥- كما هو الحال فى البكتريا، تكون شوكة التناسخ فى أزواج وتتكون فقاعة تناسخ وتتحرك شوكة التناسخ فى اتجاهين متضادين بعيداً عن نقطة المنشأ المشتركة وتظل فى الحركة إلى أن تلتقى (رأساً برأس) مع شوكة تناسخ أخرى آتية من الاتجاه المضاد (أو إلى أن تصل إلى نهاية الكروموسوم). بهذه الطريقة يمكن لعدد كبير من شوكات التناسخ أن تقوم بدورها مستقلة على كل كروموسوم بحيث يكتمل بناء جزيئين كاملين من الحلزون المزدوج البنوى على السلسلتين الأبويتين التى يستخدم كل منهما كقالب (الشكل ٤-٣).

## وجود تتابعات محددة من د. ن. أ تميز مناشئ التناسخ:

سبق الإشارة إلى وجود تتابعات محددة فى مناشئ التناسخ فى البكتريا والفيرس، إلا أنه فى مميزة النواة لم تتحدد بصفة قاطعة بعد تتابعات خاصة بمناشى التناسخ ولو أنه توجد أدلة على أن تناسخ د. ن. أ يبدأ فى مواقع محددة وثابته على الكروموسومات فى خلايا الثدييات.

وقد يفيد فى معرفة تتابعات مناشئ التناسخ النظام الذى تمت دراسته بالتفصيل فى خميرة الخباز حيث أمكن إجبار خلايا الخميرة على أخذ د. ن. أ غريب (عملية تحول Transformation) وقد أمكن استخدام عدد من البلازميدات الكشافة لهذا الغرض. ولا تستطيع البلازميدات البكتيرية عادة أن تتضاعف فى الخميرة ولكن عند إضافة تتابعات معينة من د. ن. أ الخميرة إلى هذه البلازميدات فإنها تصبح قادرة على التضاعف. يطلق على هذه التتابعات اسم

تتابعات التناسخ الذاتى Autonomous Replication Sequences (ARSes) (الشكل ٤-٤).




الشكل (٤-٤): تتابعات التناسخ الذاتي (عناصر ARS) في الخميرة تعمل هذه التتابعات كمناشئ للتناسخ وتمكن البلازميدات التي تحتويها من التناسخ حرة في الخلية المضيفة بدون الحاجة إلى إدخالها إلى كروموسوماتها

يمكن لهذه التتابعات ARSes أن تزيد معدل التناسخ فى المعمل *in vitro* باستخدام مستخلص الخميرة فى حين توجد فى الخلية *in viro* عناصر ARSes أخرى فى الجينوم تتناسخ فى أوقات معينة أثناء دور S فى الخميرة. تبين أن

ARSes المُدخلة Inserted فى البلازميد تتناسخ فى نفس الوقت الذى يـتم فيـه تناسخ مثيلاتها الموجودة فى الكروموسوم.

على الرغم من أن هذه الأدلة غير مباشرة إلا أنها تقترح أن ARSes قد تكون هى المناشئ الحقيقة للتناسخ فى الكروموسومات. ويبـين الـشكل (٤-٥) تتابع جزء قصير طوله ٥٧-٤٩ زوج من القواعد من د. ن. أ الخميـرة التـى وجد أنها كافية لأعطاء البلازميد خاصية التناسخ الذاتى. يوجـد تتـابع قـصير مشترك محفوظ Consensus وهام فى حين أن بقية التتابعات لا تبدى تناظر كبير على الرغم من أهميتها الوظيفية ويكون التناظر قصيراً لدرجة لا يمكـن توقـع حدوث تهجين خلطى بين تتابعات ARSes فى الجينوم.

```
  consensus: ATTTATATTTA
             T     G   T

  aaaagtaaaaTTTaATATTTTggatgaaaaaaacca ttttagacttttcttaact
     *     *   *** **  *****  ** *****    **   *   *   *
gatcattgtatgTTTTATGTTTTgtctggaaaaacatatagtacggata
```

الشكل (٤-٥): التتابعات المتناظرة بين عناصر ARS في نوعين من الخميرة، تدل النجون (*) على مواقع التناظر وتمثل الحروف الكبيرة أفضل تناظر للتابع المحفوظ في ARS الخميرة

وجد أن عدد هذه التتابعات ARSes فى جينوم الخميرة يوجد بتكرار مساو للتكرار المتوقع لمناشئ تناسخ الخميرة (أى حوالى مـرة كـل ٤٠,٠٠٠ زوج نيوكلتيدى).

obeikandi.com

## ضوابط لمنع تكرار بدء التناسخ فى الخلايا مميزة النواة:

يوجد فى كل مجموعة كروموسومية حوالى ٣٠,٠٠٠ منشأ تناسخ يتم تنشيطها بالتتابع على مدى عدة ساعات فى دور S فى دورة الخلية إلا أنه لكى يتم تناسخ د. ن. أ بدقة فلابد للخلية أن تضمن أن كل منشأ تناسخ لا يستخدم الا مرة واحدة فقط فى كل دورة خلية. إن منع تكرار بدء التناسخ فى الدورة الواحدة عملية هامة جداً وأساسية فى تناسخ مميزة النواة وتمثل فرق جوهرى بينها وبين غير مميزة النواه. حيث أنه عند منتصف دور S تكون بعض أجزاء من الكروموسوم لم تبدأ بعد فى التناسخ فى حين تكون أجزاء أخرى قد أتمت تناسخها تماماً. يتطلب ذلك متابعة دقيقة عند منتصف وفى آخر دور S.

إن مناشئ التناسخ التى استخدمت بالفعل قد تم ايضاً تناسخها وهى على درجة كبيرة من التشابة فى تتابعها على الأقل مع مناشئ التناسخ الأخرى التى لم يأت عليها الدور لبدء التناسخ بعد.

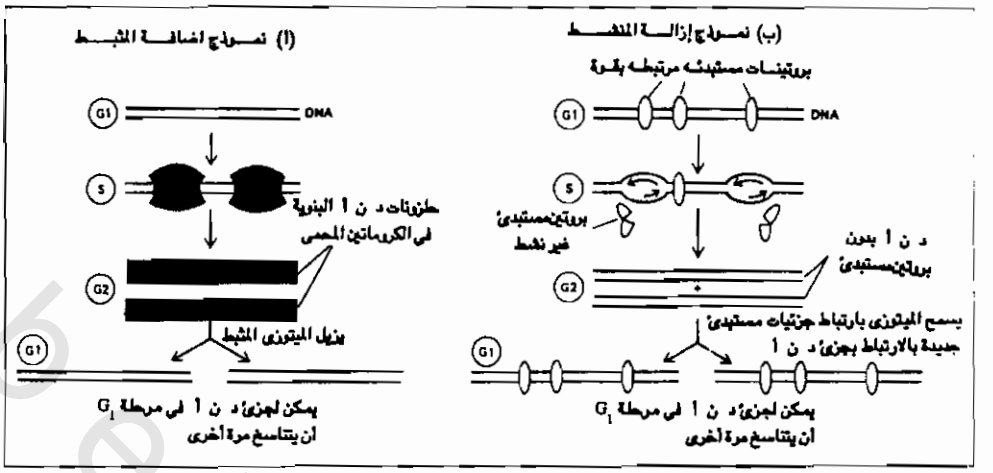
ولكن الخلية لا تحتاج إلى استخدام كل منشأ تناسخ مرة واحدة فى كل دورة خلية فى الدور S فكيف يمكن التمييز بين هذه المناشئ لمنع تكرار استخدامها؟

أمكن باستخدام تقنية الدمج الخلوى Cell Fusion التوصل إلى بعض التفسير.

فعندما تم دمج خلية فى دور S مع خلية فى دور G1 فإن عملية بناء د. ن. أ تستحث فى نواة الخلية G1 مما يشير إلى أن التحول من الدور G1 إلى S تم بواسطة عامل منشط لعملية بناء د. ن. أ وقابل للأنتشار Diffusable من

الخلية S إلى الخلية G1. من جهة أخرى، عندما تم دمج خلية فى دور S مع خلية فى دور G2 (أى خلية اتمت للتو دور S) فقد وجد أن النواة فى الخلية G2 لم تستحث لبناء د.ن.أ. نظرا لأن عملية البناء مستمرة بدون عوائق في النواه في دور S .ولذلك فإن النواه في دور G2 التى أتمت بناء كل د. ن. أ الخاص بها مرة واحدة تبدو كما لو كانت ممنوعة من الدخول فى دورات جديدة من التناسخ فى نفس دورة الخلية وذلك بواسطة عوامل مثبطة غير قابلة للأنتشار Non Diffusible والتى تكون مرتبطة بشدة بجزئ د. ن. أ الخاص بها.وإذا تمت إضافة هذا المثبط داخلياً إثناء دور S فى أعقاب كل شوكة تناسخ فإنه سيحل مشكلة عدم تكرار تناسخ منطقة المنشأ أكثر من مرة فى دورة الخلية الواحدة، وذلك عن طريق إحداث تعديل فى الكروماتين الخاص بـ د. ن. أ الذى تم تناسخه حديثاً وبذلك نضمن أن الجزء من د. ن. أ الذى تم تناسخه مرة لن يتكرر تناسخه مرة أخرى فى نفس دور S كما فى الشكل (٤-٦أ).

يوجد تفسير أخر يعتمد على افتراض وجود بروتين بادئ مرتبط بشدة يحدث له إيقاف لنشاطه inactivation عند مرور شوكة التناسخ (الشكل ٤-٦ ب).




الشكل (٤-٦): ميكانيكيتين بديلتين لتفسير "مانعات إعادة التناسخ" التي تحمي د ن أ المنسوخ حديثًا من تكرار تناسخه في نفس دورة الخلية، وهذه المواقع ضرورية للمحافظة على دقة التناسخ إلا أن الطبيعة الجزيئية لها غير معروفة، تزال عادة الموانع أثناء الانقسام الميتوزي إلا أنه في بعض الأنواع القليلة من الخلايا المتخصصة (مثل خلايا الغدد اللعابية ليرقات حشرة الدروسفلا) فإنه يتم إزالتها بدون الميتوزي مما يؤدي إلى تكوين الكروموسومات البوليتينية العملاقة

(أ) نموذج يعتمد على إضافة مثبط إلى كل الكروماتين المتناسخ حديثًا.

(ب) نموذج يعتمد على الارتباط القوي لبروتين محفز (منشط) الذي يعمل مرة واحدة فقط والذي يمكن إضافته إلى د ن أ أثناء الميتوزي فقط.

وبغض النظر عن طبيعة هذا العامل المثبط لتناسخ د. ن. أ فإنه لابد من إزالته عند أو قبيل بدء فترة الميتوزى حيث أنه بعد أنقسام الخلية لا توجد حماية لـ د. ن. أ البنوى فى النواة فى دور $G_1$.

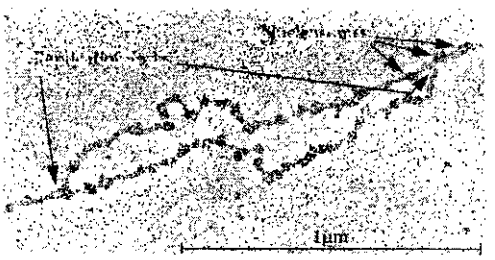
## تضاعف النيوكليوسومات عند شوكات التناسخ:

## Duplication of Nucleosomes at Replication Forks

حيث أن د. ن.أ مميزة النواة في الدور البيني يكون معبأ في نيوكليوسومات (قطر كل منها ١٠ نانو ميتر) ويحتوى كل نيوكليوسوم على

١٦٦ زوج نيوكليتدى ملتف فى دروتين حول ثمانية جزيئات من الهستون. وعند الاخذ فى الاعتبار حجم النيوكليوسومات والحجم الكبير للريبليوسوم Repliosome، فأنه كان من غير المتوقع أن تتحرك شوكة التناسخ من خلال نيوكليوسوم كامل إلى الجانب الاخر له الا أن صور المجهر الالكترونى للكروماتين أثناء تناسخة فى الدروسفلا قد بينت بوضوح إحتفاظ النيوكليوسومات بتركيبها الطبيعى وبنفس المسافات على جانبى شوكات التناسخ (الشكل ٤-٧أ). أى أن النيوكليوسومات تبدو بنفس التركيب والمسافات خلف شوكات التناسخ مباشرة (Post-Replicative DNA) بالضبط كما كانت أمام شوكات التناسخ (Pre-Replicative DNA).

وعلى ذلك فقد تم اقتراح عدة نماذج للتغيرات المرحلية Transient فى تركيب النيوكليوسوم والتى تسمح للريبليوسوم ببناء د. ن. أ عند وصوله الى النيوكليوسوم. حيث يفترض أن النيوكليوسوم. ينقسم بصورة مؤقتة إلى نصفى نيوكليوسوم أثناء مرور الريبليوسوم خلاله ثم يحدث اعادة تجميع لهذين النصفين فى نيوكليوسوم كامل خلف شوكة التناسخ (الشكل ٤-٧ب).




{ أ }

**الشكل (٤-٧): تحرك شوكة التناسخ بعد النيوكليوسوم**

**( أ ) صورة بالمجهر الإلكتروني تبين النيوكليوسومات على جانبي كل شوكة تناسخ في الدروسفلا.**

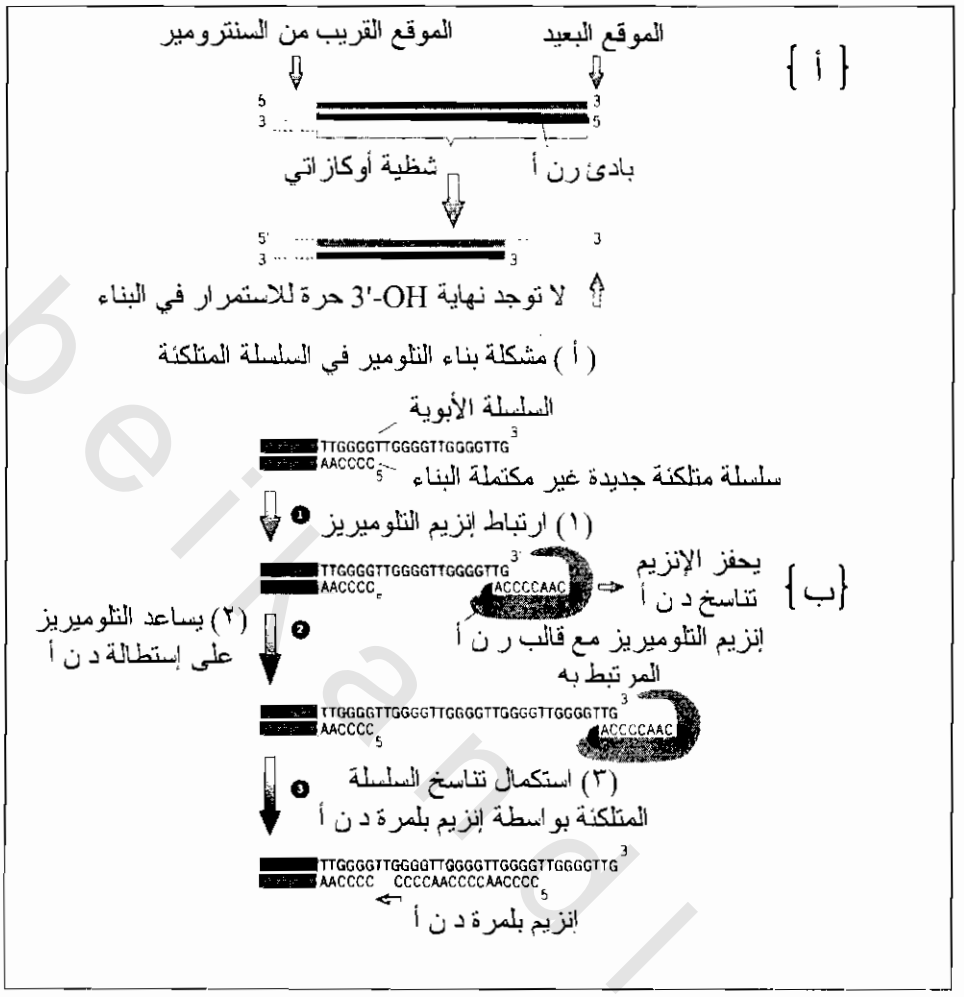
**(ب) نموذج لتحرك شوكة التناسخ بعد النيوكليوسوم.**

وبصرف النظر عن الميكانيكية التى تتحرك بها شوكة التناسخ خلال النيوكليوسومات فإن تناسخ د. ن. أ. وتجميع النيكليوسومات تكون مقترنة coupled بشدة في مميزة النواه حيث يحتاج تضاعف (تناسخ) الكروماتين أثناء دورة الخلية مميزة النواة إلى كمية من الهستونات الجديدة تساوى تقريباً كمية د. ن. أ المتناسخ حديثاً. لهذا السبب نجد أن معظم مميزات النواة يحتوى جينومها على نسخ عديدة لكل من جينات الهستونات. ففى الفقاريات على سبيل المثال يوجد حوالى ٢٠ مجموعة متكررة وتحتوى كل مجموعة على الجينات الخمسة المنتجة للهستونات. وعلى العكس من معظم البروتينات التى يتم بناؤها بصورة مستمرة أثناء الدور البينى، نجد أن الهستونات يتم بناؤها اساساً فى دور S فقط حيث يرتفع خلالها مستوى mRNA للهستونات إلى حوالى ٥٠ ضعف كنتيجة لزيادة معدل النسخ من جهة وانخفاض معدل هدم mRNA. من جهة أخرى ونتيجة للتركيب غير العادى للنهاية 3' (لإنعدام وجود ذيل Poly A كما سيأتى بعد) نجد أن معظم أنواع mRNA الخاصة بالهستونات تكون غير مستقرة بصورة غير عادية وقصيرة العمر بحيث تنهدم خلال دقائق عندما يتوقف بناء د. ن.أ عند نهاية الدور S (أو عند إضافة مثبطات لايقاف بناء د. ن.أ قبل الأوان). وعلى العكس من ذلك، نجد أن جزيئات الهستونات نفسها تكون مستقرة وثابته ويمكن أن تستمر بدون هدم طول عمر الخلية. وقد يكون الارتباط الوثيق بين بناء د. ن.أ وبناء الهستونات راجعاً ولو جزئياً إلى ميكانيكية التغذية الرجعية Feedback التى تتحكم فى مستوى الهستون الحر لضمان أن كمية الهستون الناتجة مناسبة لكمية د. ن.أ المنتجة.

## تناسخ منطقة التلوميز فى الكروموسوم:

من بين الفروق الرئيسية بين تناسخ د. ن.أ في غير مميزة النواه ومميزة النواه طبيعة تركيب الكروموسومات فى كل منها.فعلى العكس من الكروموسوم الحلقى المقفول فى البكتريا نجد أن كروموسومات مميزة النواه تكون خطية. وعند تناسخها فإنها تواجه بمشكلة خاصة عند نهاياتها الطرفية المفتوحة والتى يطلق عليها منطقة التلوميز Telomere. وبينما يستمر البناء بصورة طبيعية الى نهاية الخيط القالب، تنشأ صعوبة على الخيط المتلكئ عندما تتم ازالة ر. ن.أ البادئ(الشكل ٤-٨) وقد تم حل هذه المشكلة بدراسة انزيم خاص بمنطقة التيلوميز ويطلق عليه انزيم تيلوميريز Telomerase حيث وجد انه يحتوى فى تركيبة على تتابع قصير من ر. ن.أ وقد استخدم تيلوميز الطفيل *Tetrahymena thermophilia* الذى يحتوى على تتابعات مترادفه من GGGTTG فى معرفة كيفية اضافة نهايات نيوكلتيدية محددة إلى الكروموسومات بواسطة انزيم التيلوميريز.

يتعرف انزيم التلوميريز على تتابعات التلوميز الغنية فى القاعدة G فى النهاية المفردة السلسلة 3'-overhang مما يؤدى إلى استطالتها فى الاتجاه 5'→3' بمعدل وحدة تكرارات مترادفه فى كل مرة. وكما سبق القول، تبين أن انزيم التلوميريز يعد فريداً فى احتوائه على سلسلة قصيرة من قالب ر. ن.أ ضمن تركيبة. وبعد اضافة عدد من وحدات التكرارات المترادفة اعلاه بواسطة هذا الانزيم، فإن انزيم بلمرة د. ن.أ يقوم ببناء الخيط المكمل. وبدون نشاط انزيم التلوميريز فإن الكروموسومات الخطية Linear ستتوالى فى القصر واذا استمر حذف هذه الاجزاء الطرفية بحيث تصل إلى جين أو جينات ضرورية لحياة الكائن فإن ذلك قد يؤدى إلى موته.




**الشكل (٤-٨): تناسخ منطقة التيلومير في كروموسوم Tetrahymena**

**( أ ) نتيجة لعدم وجود نهاية 3'OH حرة عند نهاية سلسلة البادئ، فإن إنزيم بلمرة د ن أ لا يمكنه استبدال بادئ ر ن أ الذي يبدأ منه بناء د ن أ عند نهاية السلسلة المتلكئة.**

**(ب) يتم تناسخ نهايات هذه الكروموسومات بإنزيم خاص يسمى تيلوميريز الذي يمنع نهايات الكروموسومات من أن تصبح أقصر وأقصر مع كل دورة تناسخ ويتم تحديد تتابع النيوكلتيدات عند نهايات السلسلة المتلكئة بواسطة جزئ قصير من ر ن أ والموجود كمكون أساسي لإنزيم التيلوميريز.**

## تتابع تناسخ مناطق د. ن. أ المختلفة خلال فترة البناء (S):

إن اتمام تناسخ جزئ د. ن.أ فى المنطقة بين منشأ التناسخ والمنشأ الذى يليه يحتاج إلىحوالى ساعة فقط إلا أنه وجد أن دور S يستغرق عادة حوالى ثمانى ساعات فى خلية الثدييات. يشير ذلك إلى أن مناشئ التناسخ لا تنشط فى نفس الوقت وأن د. ن.أ فى كل وحدة تناسخ (المحتوية على مجموعة من ٢٠-٨٠ منشأ كما سبق القول) يجرى تناسخها فى فترة قصيرة فقط من دور البناء (S) والسؤال الأن هو :هل يتم تنشيط وحدات التناسخ المختلفة بطريقة عشوائية أم يوجد نظام معين يتم على أساسه تنشيط التناسخ فى المناطق المختلفة من الجينوم طبقاً لترتيب أو تتابع زمنى معين؟

أمكن الاجابة على هذا السؤال باستخدام مشابه الثيميدين Thymidine\ Analog وهو 5- Bromodeoxyuridine (Brdu) لتعليم مجموعة من الخلايا على فترات قصيرة محددة أثناء دور البناء (S). وفى دور (M) يمكن تمييز تلك المناطق من الكروموسومات الميتوزية التى أخذت Brdu فى بناء د. ن.أ حيث أنها تكون أقل قابلية للصبغ بواسطة صبغات خاصة (الشكل ٤-٩).

الشكل (٤-٩): صورة بالمجهر الضوئي للكروموسومات الميتوزية المصبوغة التي تم فيها تعليم مغاير Differentially د ن أ المتناسخ أثناء فترات محددة في دورة S السابقة

في هذه التجارب تنمو الخلايا في مزرعة وفي وجود البرومو ديوكسي يوريدين (Brdu) ويتم تعليمها لفترة وجيزة بالثيميدين أثناء الفترة المبكرة والمتوسطة والمتأخرة من دورة S، وحيث أن د ن أ المتكون أثناء فترة التعليم بالثيمدين يكون خلزون مزدوج بحيث يكون الثيميدين في سلسلة وBrdu على السلسلة الأخرى، فإنه يصبغ بشدة ويكون داكناً عن بقية د ن أ (الذي يحتوي على Brdu على كلا السلسلتين)، فيظهر كحزمة لامعة (الأسهم) في هذه الصور السالبة، توصل الخطوط المتقطعة المواقع المقارنة على النسخ الثلاثة للكرموسوم المبين

## يتم تناسخ مناطق الهيتروكروماتين متأخراً فى فترة البناء (S):

من المعروف أنه توجد على طول جزئ د. ن.أ فى مميزة النواة منـــاطق أكثر تكثفاً عن المناطق الآخرى كما هو الحال فى مناطق الهيتروكروماتين الذى

يظل فى حالة تكثف شديد Highly Condensed أثناء الدور البينى. فى حين نجد أن الكروماتين النشط يأخذ شكلاً غير متكثف، الذى يبدو أنه مناسباً لنسخ ر. ن.أ عليه. يمكن تفسير الميكانيكية التى تحدد توقيت تناسخ د. ن.أ من خلال ملاحظة أن مناطق الهيتروكروماتين، بما فيها المنطقة المحيطة بالسنترومير والتى تظل متكثفة خلال الدور البينى، يتم تناسخها متأخراً جداً فى دور البناء S. يمكن أن يعزى هذا التناسخ المتأخر إلى تكثيف د. ن. أ بشدة فى الكروماتين.ويدعم هذا الاستنتاج الاختلاف فى توقيت تناسخ كروموسومى X فى إناث الثدييات. إذ على الرغم من أن هذين الكروموسومين يحتويات على نفس تتابع د. ن.أ إلا أننا نجد أن واحداً منها فقط يكون نشطاً فى حين يظل الأخر خاملاً. وجد أن معظم مناطق X فى الكروموسوم الخامل يكون متكثفاً بشدة فى شكل هيتروكروماتين، ويتم تناسخ د. ن. أ الخاص به فى مرحلة متأخرة ويتم تناسخه ببطء على مدى فترة S في حين أن تلك المناطق من الجينوم التى يكون الكروماتين فيها أقل تكثفاً أثناء الدور البينى تكون الأكثر تعرضاً لميكانيكيات التناسخ فى مراحل مبكرة من فترة البناء S.

تظهر صور الإشعاع الذاتى أن شوكات التناسخ تتحرك بسرعات متناسبة خلال فترة البناء S بحيث أن مدى تكثف د. ن.أ لا يؤثر على شوكات التناسخ بعد تكوينها. يبدو أن الترتيب الذى يتم به تنشيط مناشئ التناسخ يعتمد (على الأقل جزئياً) على تركيب الكروماتين فى المنطقة التى يوجد بها هذا المنشأ.

## تناسخ الجينات الأكثر نشاطاً يتم فى مرحلة مبكرة جداً من فترة S:

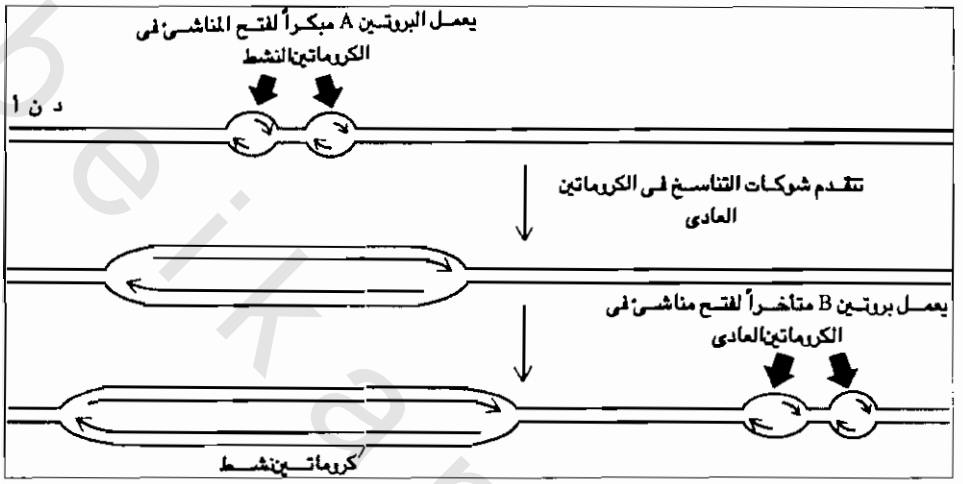
توجد مجموعة من الجينات التى تنشط بصفة عامه فى جميع الخلايا بدون تخصص خلوى ويطلق عليها الجينات غيرالمتخصصة House Keeping Genes

"الشغالة" وهى تختلف عن الجينات الآخرى التى لا تنشط إلا فى خلايا نوعية (Spatial Development) أو فى مرحلة معينة من عمر الكائن ( Temporal Development).

تبين أن هذه المجموعة من الجينات يتم تناسخها فى مرحلة مبكرة من فترة S. فقد أجريت تجارب تبين فيها أن هذه الجينات تتناسخ فى جميع أنواع الخلايا التى أختبرت فى أولى مراحل فترة S، فى حين أن مجموعات الجينات التى تنشط فى بعض أنواع من الخلايا المتخصصة فقط يتم تناسخها مبكراً فى هذه الخلايا المتخصصة فقط فى حين يجرى استنساخها متأخراً فى أنواع الخلايا الأخرى. فعند دراسة نشاط جين أحد جلوبيونات المناعة Immunoglobulins ويبلغ طوله حوالى ٣٠٠,٠٠٠ زوج نيوكلتيدى، وجد أن جميع مناطق الكروماتين لهذا الجين قد أكملت تناسخها قرب بداية فترة البناء S فى الخلايا المتخصصة فى إنتاج الأجسام المناعية (Plasma Cells (APC)) وهى تلك الخلايا التى يكون فيها الجين نشطاً جداً، مما يؤيد وجود عدة مناشئ للتناسخ داخل الجين يتم تنشيطها فى نفس الوقت تقريباً. بينما فى الخلايا غير المتخصصة فى انتاج هذه الجلوبيونات المناعية لم تظهر سوى شوكة تناسخ وحيدة حيث بدأت من أحدى نهايتى هذا الموقع الوراثى بعد حوالى ساعة من بداية فترة البناء S ثم تحركت على شريط د.ن.أ بالسرعة العادية وهى ٣٠٠٠ نيوكلتيدة فى الدقيقة الواحدة.

يبين الشكل (٤-١٠) نموذجاً لتفسير ذلك، حيث يتم استخدام جميع مناشئ التناسخ الموجودة فى الكروماتين النشط فى مرحلة مبكرة جداً من فترة البناء S وعند وصول شوكات التناسخ المتكونة عند هذه المناشئ سيتم وصولها فى

النهاية إلى المناطق الكروموسومية المجاورة المحتوية على كروماتين أكثر تكثفا (هيتروكروماتين). وعلى ذلك فإن أى جين يقع على بعد أقل من مليـــون زوج نيوكلتيدى من منشأ تناسخ فى منطقة الكروماتين النشط سيتم تناسخة فى منتصف فترة S.




الشكل (٤-١٠): نموذج لتفسير لماذا يتم التناسخ للكروماتين النشط مبكرًا في دور S بينما الكروماتين العادي (غير النشط) يتم تناسخه متأخرًا في دور S، يعتقد أن أنواع مختلفة من البروتينات المحفزة ترتبط بمناشئ التناسخ في الكروماتين العادي، وكتفسير بديل قد يتم استخدام مجموعتي المناشئ بواسطة نفس الميكانيكية الجزيئية ولكن في أوقات مختلفة نظرًا لأن التركيب المتكثف (المتحلزن) للكروماتين العادي يؤخر الارتباط الصحيح للبروتينات المشاركة في التناسخ وكتفسير بديل قد يتم استخدام مجموعتي المناشئ بواسطة نفس الميكانيكية الجزيئية ولكن في أوقات مختلفة نظرًا لأن التركيب المتكثف (المتحلزن) للكروماتين العادي يؤخر الارتباط الصحيح للبروتينات المشاركة في التناسخ

لتفسير كيف يتم تناسخ المناطق الكروموسومية غير النشطة والتـــى تقـــع بعيداً عن المناطق النشطة (كما هو الحال فى الكروموسوم X غير النـــشط فـــى الأنثى) فإنه يفترض وجود مجموعة أخرى من مناشئ التناسخ التى تنشط فـــى

منتصف أو فى أواخر دور S بحيث يمكنها بدء شوكات تناسخ فى أى صورة من صور الكروماتين.

تبين أن الجينات غير المتخصصة (الشغالة) Housekeeping Genes تقع فى مناطق الكروماتين الغنية فى حزم G-C فى حين تقع الجينات العادية (التخصصية) والتى تنشط فقط فى خلايا متخصصة فى مناطق الكروماتين الغنية فى حزم A-T.

## تنظيم نشاط مناشئ التناسخ حسب المراحل التكوينية للكائن:

وجد أن دورة الخلية تكون سريعة بصورة غير عادية أثناء طور الانفلاج الأول فى معظم الخلايا البيضية التى ينقسم فيها البلاستومير بدون أى نمو للخلية. وتكون فترة البناء S قصيرة بشكل ملحوظ أثناء هذا الطور التفلجى. من جهة أخرى توجد حالات تكون فترة S فيها طويلة جداً، حيث نجد أنه فى المرحلة السابقة مباشرة للميتوزى تكون فترة S طويلة جداً فى جميع الكائنات التى درست حتى الآن. وعلى سبيل المثال فى سمندل الماء Newt تستغرق فترة S ساعة واحدة فى مرحلة البلاستولا، فى حين تستغرق حوالى ٢٠ ساعة فى الخلايا الجسدية الناضجة وتصل إلى حوالى ٢٠٠ ساعة فى المرحلة التى تسبق الميتوزى فى الخلايا المولدة للحيوانات المنوية Spermatogonia. ترجع الفروق فى طول فترة S إلى تغيرات فى أعداد مناشئ التناسخ النشطة. تحتوى الخلايا الجنينية على أعداد كبيرة من مناشئ التناسخ النشطة، فى حين تقل أعداد هذه المناشئ كثيراً فى كروموسومات مرحلة ما قبل الميوزى.

توجد حالة مماثلة فى الدروسفلا حيث وجد أن فترة S فى النواة الجنينية تستغرق من ٣ إلى ٤ دقائق بينما تستغرق حوالى ٦٠٠ دقيقة فى الخلايا الجسدية للحشرة البالغة. وجد أن الخلية المنفلجة فى هذه الحشرة تحتوى على مناشئ للتناسخ بشكل ملحوظ فى الخلايا الناضجة حيث يصل إلى حوالى ١٢ ميلليميكرون. من الواضح أن نشاط عدد مناشئ التناسخ تخضع للمرحلة التكوينية Developmental Stage التى يمر بها الكائن. وأن كثيرا منها يكون نشطاً فى مرحلة تكوين الجنين فى حين تظل أعداد قليلة منها فقط هى النشطة فى مرحلة نضج الكائن. يدل ذلك على وجود تنظيم معقد يتحكم فى بدء تكوين شوكات التناسخ بطريقة تسمح بتناسخ مناطق د. ن. أ المختلفة فى الجينوم وفقاً لجدول زمنى دقيق.

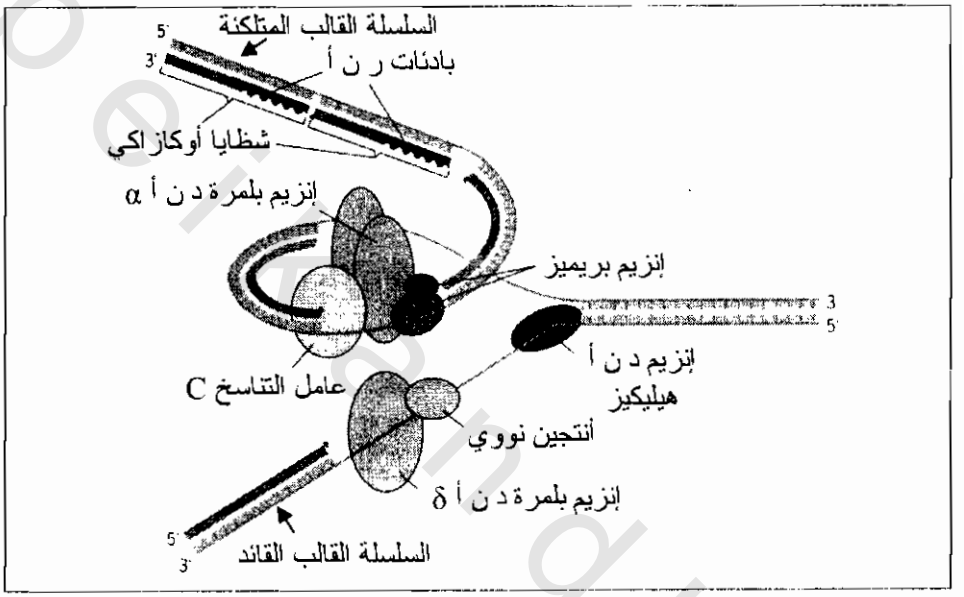
## إنزيمات بلمرة د. ن. أ فى الخلايا المميزة النواة.

تبين وجود أربع صور على الأقل من إنزيم بلمرة د. ن. أ DNA Polymerases وهى ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) وذلك فى جميع نظم الخلايا مميزة النواة.

تحتوى الصورة $\alpha$ على عدد من تحت الوحدات بحيث تتفاعل تحت وحدتين منها لتعطى نشاط أنزيم Primase ما يدل على أن الصورة pol $\alpha$ تحتوى على النشاط الأنزيمى المطلوب للتناسخ المتقطع Discontinueos للخيط المتلكئ.

ومن جهة اخرى ، لا تحتوى الصورة Pol $\delta$ على نشاط البريميز. وتدل النتائج على انها مختصة بتناسخ د. ن. أ للخيط القائد. بالاضافة إلى ذلك، لابد أن تكون المعقدات الانزيمية محتوية على انزيمات هليليكيز لفك حلزونة اللولب

المزدوج أمام شوكة التناسخ. أما الصورة pol β فيبدو أن لها دور فى اصلاح اخطاء التناسخ Proofreeding. فى حين تكون الصورة pol γ مسئولة عن تناسخ د. ن. أ فى الميتوكوندريا. ويبين الشكل (٤-١١) دور انزيمات البلمرة pol α و pol γ فى عملية التناسخ . ويبين الجدول (٤-١) بعض الفروق فى تناسخ د. ن. أ يبين غير مميزة النواة ومميزة النواة.




**الشكل (٤-١١): تحت وحدتين من إنزيم بلمرة و ن أ (α و δ) تقوم بعملية البناء عند شوكة التناسخ في مميزة النواة، يقوم إنزيم بلمرة د ن أ δ بتناسخ السلسلة القائد في حين يقوم الإنزيم α ببناء السلسلة المتلكئة**

**الجدول(٤-١) مقارنة بين تناسخ د. ن. أ فى غير مميزة النواة ومميزة النواه**

| المقارنة | غير مميزة النواة | مميزة النواة |
|---|---|---|
| طول بادئ ر. ن. أ<br>طول شظايا أوكازاكى فى الخيط التابع | حوالى ٥-٨ نيوكلتيدة<br>حوالى ١٠٠٠-٢٠٠٠ نيوكلتيدة | حوالى ٩-١٠ نيوكلتيدة<br>حوالى ٢٠٠ نيوكليتده |
| معدل سرعة تحرك شوك التناسخ | ٥٠٠ نيوكليتدة فى الثانية | ٥٠ نيوكلتيدة فى الثانية |
| عدد مناشئ التناسخ | واحد فقط | عدة الاف وتحت تنظيم تكوينى |
| ميكانيكية منع أعادة بدء التناسخ فى نفس دورة الخلية | لا توجد | توجد |