الفصل الثامن

الشفـرة الوراثيـة
Genetic Code

التوازى بين تتابع القواعد فى جزئ د.ن.أ وتتابع الاحماض الأمينية فى البروتين:
Colinearity Between Base Sequences in DNA and Amino Acid Sequences in Protein:

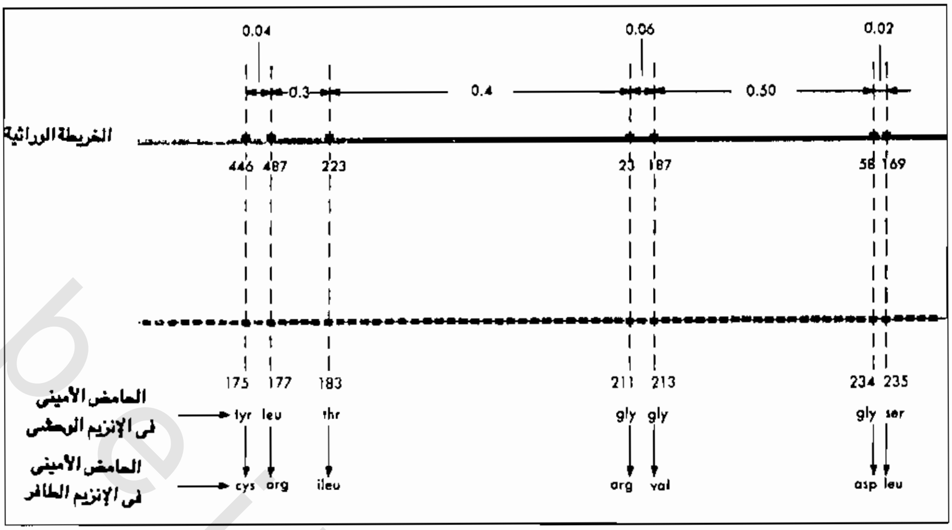
حيث أنه ثبت أن تتابع القواعد فى جزئ د.ن.أ هو الـذى يحـدد تتـابع الأحماض الأمينية فى سلسلة متعـددة الببتيـد الـذى يمثـل النـاتج النهـائى end product لتعبير الجين، ونظراً لأن الكروموسوم يتكون من تتابعات خطيـة للجينات، فإنه من البديهى أن كل منطقة تتابع نيوكلتيدى ستحدد بروتينا نوعيـا بحيث نتوقع وجود تلازم أو تواز تام Colinearity بين تتابع القواعد فـى هـذه المنطقة وتتابع الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج عنها.

وقد أمكن التحقق من وجود هذا التوازى عند دراسة الخريطـة الوراثيـة والجزيئية لتتابع القواعد فى جزئ د.ن.أ وخريطة تتابع الأحماض الامينية فـى البروتين الذى تتحكم فى انتاجه. إذ تمكن يانفسكى Yanofsky عام ١٩٦٤ مـن رسم الخريطة الوراثية للجين الذى يتحكم فى انتاج سلسلة متعدد الببتيد A لانزيم تربتوفان سـينثيتيز Tryptophan Synthetase فـى بكتريـا القولـون *E. Coli*.

كما أمكنه التعرف على مواقع طافرات معينة باستخدم تكرارات الاتحادات الجديدة حيث استخدم تقنية رسم الخريطة الوراثية بالحذف لتحديد المواقع في الطافرات القريبة من بعضها. كانت السلالات الطافرة تحتوى على اقتضابات (حذف) تمتد على مسافات مختلفة على طول الجين A من أحد طرفيه ولكنها كانت تختلف فى المسافة التى تغطيها على طول الجين.

وبدراسة البروتين الطافر الناتج من كل من هذه الطافرات ومقارنة تتابع الأحماض الأمينية به بتلك الناتجة فى بروتين الطراز الوحشى، أمكن التعرف على أماكن الإحلال لمواقع الاحماض الأمينية فى سبع طافرات. وبمقارنة خريطة البروتين بمواقع الطفرات على الخريطة الوراثية لهذا الجين، تبين أن هناك تطابقاً بين مواقع الأحماض الامينية الخاطئة والمستبدلة فى كل بروتين طافر ومواقع حدوث طفرات الحذف، مما يدل على وجود تواز بين تتابع القواعد فى جزئ د.ن.أ (الجين) وبين تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج من هذا الجين كما فى الشكل (٨-١).

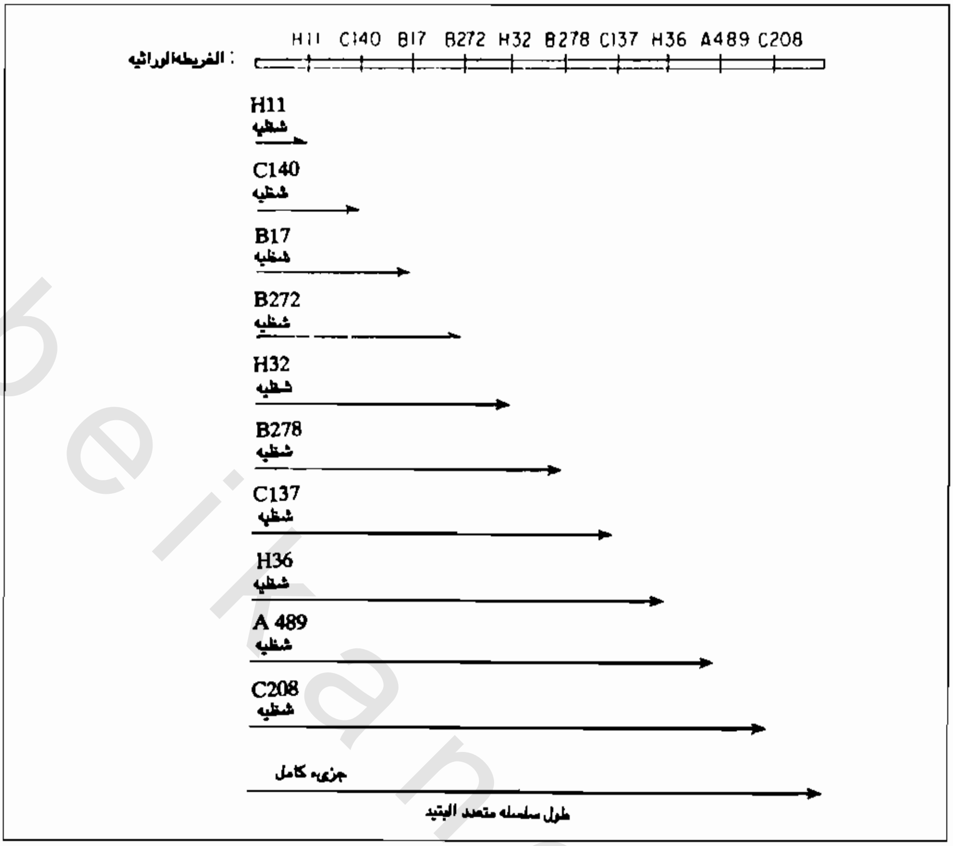
obeikandl.com



الشكل (٨-١): التوازى بين الجين (د.ن.أ) والناتج النهائى له (البروتين). يتبين فى هذا الشكل الخريطة الوراثية لربع الجين المتحكم فى تتابع الأحماض الامينية لبروتين تربتوفان سينثيتز A فى بكتريا القولون. يدل الرقم 04. مثلا على المسافة الوراثية بين الطفرتين A446 و A487. وتدل الأرقام بالنسبة لتتابع الاحماض الأمينية على مواقعها فى سلسلة متعدد الببتيد الجزئية (بطول ٢٦٧ حامض أمينى) وتكون النهاية الأمينية إلى اليسار

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

وقد أمكن باستخدام مطفرات كيماوية معينة استحداث ١٠ طافرات مختلفة فى الجين المتحكم فى بناء بروتين الرأس فى فاج T4 وأمكن رسم خريطة وراثية بطرق تحليل الاتحادات الجديدة. وقد تبين أن طفرات الانهاء المختلفة احدثت توقف لعملية بناء سلسلة البروتين عند نقط مختلفة على طول السلسلة. معروف أن البروتين يبدأ بنائة من النهاية الامينية ($-NH_2$) إلى النهاية الكربوكسيلية (-CooH). وفى كل طفرة تبين وجود النهاية الأمينية لسلسلة متعددة الببتيد الا أن عديدات الببتيدات التالية لهذه البداية اختلفت حسب السلالة الطافرة. إذ تبين أن الطفرات المختلفة يحتوى كل منها على بيتيدات مختلفة فى الأطوال بحيث أنه عند ترتيبها من النهاية N إلى النهاية C للبروتين، وجد أنها تمثل بناء أطوال مختلفة من سلسلة متعدد الببتيد لبروتين الفاج T4. والاهم من ذلك أن طول كل من هذه السلاسل البتيدية الطافرة (والتى تقل بدرجات متفاوته عن الطول الكلى للسلسلة الوحشية للبروتين الفعال) تتناسب مع أماكن حدوث الطفرة على طول الجين المسئول عن انتاج هذا البروتين، بحيث يتلازم توقف استطاله سلسلة متعددة الببتيد مع مكان حدوث طفرة الإنهاء فى الخريطة الوراثية للجين مما يؤكد مرة أخرى مفهوم التوازى بين تتابع القواعد فى د. ن. أ (الجين) وبين تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج. كما فى الشكل (٨-٢).



الشكل (٨-٢): استخدام طفرات الانهاء Termination لأثبات العلاقة المتوازية بين تتابع القواعد فى الجين (د.ن.أ) وبين تتابع الاحماض الأمينية وطول سلسلة متعدد الببتد الناتج حيث يتناسب طول السلسلة الناتجة مع موقع حدوث طفره الانهاء

الشفرة الثلاثية : Triplet code:

حيث أنه توجد أربعة أنواع من القواعد النتروجينية فقط فى جزئ د. ن. أ وهى التى تقوم بتخصيص الأحماض الامينية العشرين فى البروتين، فإنه من الضرورى أن توجد توافيق وتباديل لهذا القواعد الأربعة لكى يتسنى لها أن تفى

بالتشفير لتلك الأحماض الامينية. وفى الحقيقة فإن بناء البروتين يحتاج إلى أكثر من عشرين شفرة عند الأخذ فى الاعتبار اشارات البدء واشـــارات التوقــف أو انهاء بناء سلسلة البروتين.

يسمى تتابع القواعد فى ر.ن.أ المراســل m RNA المــوازى أو المحـــدد لحامض أمينى معين "الكودون" Codon لهذا الحامض الأمينى، وتسمى تتابعــات اشارات البدء كودونات الابتداء Start Codons فى حين تسمى تتابعات اشــارات الانهاء كردونات الايقاف Stop Codons. ويطلق على مجموع هذه الكودونــات اسم الشفرة الوراثية Genetic Code.

وقبل أن يكتشف سر الشفرات الوراثية فقد كان من المفترض أنه اذا كانت جميع الشفرات لابد أن تحتوى على نفس العدد من القواعد فــإن كــل كـــودون (شفرة) لابد أن تحتوى على ثلاثة قواعد على الأقل، ويرجع ذلك إلى الاتى:

- لو افترضنا شفرة القاعدة الواحدة فإن ذلك يعنى أننا سيكون لدينا $٤^١$ = ٤ أى أربع كودونات أحادية الشفرة كما أن كـــودون القاعـــدتين ســـيعطينا $٤^٢$ = ١٦ كودون وهذا العدد لازال قاصرا عن الوفاء بالعدد المطلـــوب من الشفرات حيث لابد أن يزيد عن ٢٠ كودون. وعلى ذلك فإن الكودون ثلاثى القاعدة سيكون أكثر ملائمة لاعطائنـــا العـــدد المطلـــوب وأكثـــر إذ سنحصل على $٤^٣$ = ٦٤ كودون وقد تبين بعد ذلك أن الشفرة الوراثية ثلاثيـــة الأحـــرف بالفعـــل وأن جميـــع الـــشفرات الأربعـــة والـــستون المحتملة تحمل معلومات وراثية بطريقة أو أخرى. وكما سنعلم فيما بعـــد يمكن أن تعين أكثر من شفرة أو كودون واحد للتشفير لـــنفس الحـــامض الأمينى.

الأدلة الوراثية على ثلاثية الشفرة:

Genetic Evidence For Triplet Code:

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

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

إتجاه القراءة →

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

تتابع لأحماض الأمينية : Ser His Phe Asp Lys Leu

mRNA من د.ن.أ الأصلى 5' – AGC CAC UUA GAC AAA CUA–3'

mRNA من د.ن.أ المضاف اليه القاعدة :

5'- AGC <u>A</u>CA CUU AGA CAA ACU A–3'

تتابع الأحماض الأمينية. Ser Thr Leu Arg Gln Thr

وقد تبين بالفعل وجود طفرات للفاج T_4 فى النسل تسمى طافرات تحريك الاطار وهى تنشأ بمعدل ١٠^-٥^ – ١٠^-٦^ .وإذا نميت طافرات تحريك الاطار مرة اخرى فى بيئة محتوية على المطفر بروفلافين فإن بعض الفاج سيظهر بحيث يستعيد الطراز المظهرى الوحشى لتتابع الأحماض الأمينية فى البروتين.

وقد أجريت تجربة لتحديد أى من الأحداث الطفرية ستكون مسئولة عن استعادة الطراز الوحشى. وباستبعاد احتمال حدوث طفرة حذف قاعدة فى نفس موقع طفرة الاضافة للقاعدة السابقة، نظراً لأن هذا الاحتمال ضعيف جداً، فإنه قد تبين أن حدوث طفرة حذف فى موقع قاعدة أخرى قريبة من موقع الاضافة الأول قد يؤدى إلى استعادة اطار القراءة الصحيح وفى بعض الأحيان قد ينتج عنها بروتين فعال بيولوجيا على الرغم من أن تتابعات الأحماض الأمينية بأكملها فى الطراز الوحشى للبروتين الأصلى لن تكون متطابقة مع تلك الناتجة عن الطفرتين (الاضافة والحذف). وقد تبين أن ذلك هو ما يحدث بالفعل عند دراسة مجموعة من الطافرات المستحدثة بالبروفلافين فى الجين rIIB لفاج T_4 الخاص ببكتريا القولون حيث ظهر أن الجمع بين هذه الأحداث الطفرية المتضادة سيعطى نفس التأثير. يحتوى بروتين rIIB لفاج T4 على منطقة يمكن تغيير أو احلال Substitution عدد كبير من الأحماض الامينية بها دون أن تتغير أو تتأثر فاعلية البروتين بشكل ملحوظ إلا أنه حتى فى هذه المنطقة يمكن للبروفلافين استحداث طفرات تؤدى إلى ايقاف نشاط البروتين تماماً.. يحدث عادة عند التهجين بين سلالتين من الفاج كل منها تحمل طفرة مختلفة فى نفس الجين، وذلك عن طريق العدوى المشتركة لبكتريا القولون بهاتين الطفرتين، أن بعض الطرز الوحشية للفاج ستنشأ نتيجة الاتحادات الوراثية بين موقعى الطفرتين. ولكن عندما يتم التهجين بين طفرتى بروفلافين عشوائيتين لـ r II فإنه لا ينتج باستمرار نسل فاج ذو طراز وحشى.

أثبتت نتائج الاتحادات الجديدة أن الطافرات يمكن تصنيفها فى مجموعتين محددتين تسمى إحداهما المجموعة (+) والآخرى (-) وأن التهجين بين طافرتين أحدهما تتبع المجموعة (+) والآخرى تتبع المجموعة (-) (أى من نوعين

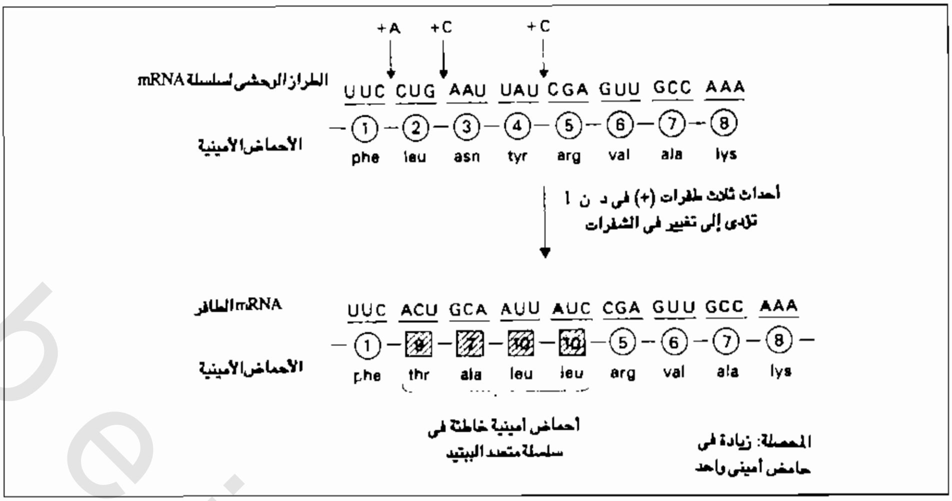
مختلفين) سيؤدى الى الحصول على الطراز المظهرى الوحشى للبروتين الناتج. فى حين لايمكن الحصول على هذه النتيجة لو تم التهجين بين طرازين من نفس المجموعة أى بين (−) و (−) أو بين (+) و (+).

أمكن تفسير هذه النتائج على النحو التالى :

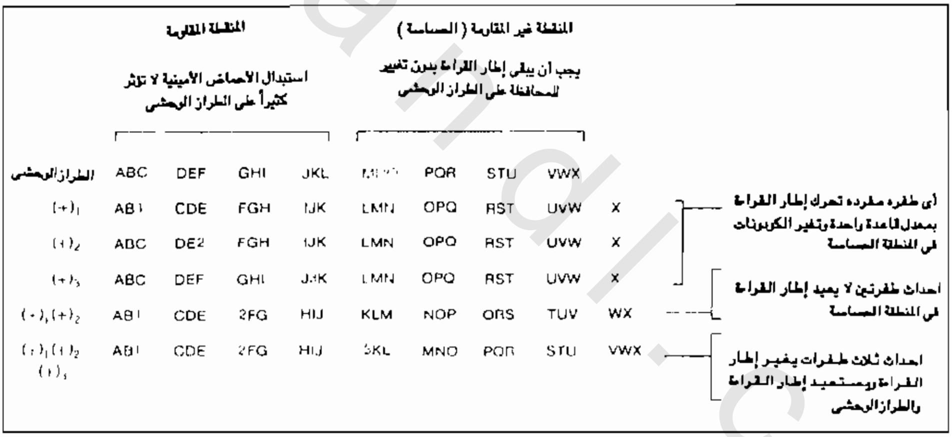
- يمكن اعتبار أن مجموعة الطافرات (+) تكون محتوية على اضافة لقاعدة واحدة فى حين أن المجموعة (−) تعد ذات نقص لقاعدة واحدة وأن الطافرات المزدوجة من النوع (+) (+) أو (−) (−) ستحتوى على قاعدتى اضافة أو نقص فى قاعدتين على الترتيب. وأن كل طفرة مزدوجة متشابهة ستؤدى إلى تحريك اطار القراءة بمعدل قاعدتين ومثل هذا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

انتاج بروتينات فعالة ويقال للبروتين الناتج بأنه شبيه بـالطراز الوحـشى Pseudo-Wild Type Protein.

وبهذا المنطق فإن طفرة رجعية للطفرة (+) لابد أن تكون قد نتجت عـن استحداث طفرة أخرى من المجموعة (–) فى موقع آخر قريـب. وواضـح أن طفرات مزدوجة من نفس المجموعة (+) (+) أو (–) (–) لن تستطيع اسـتعادة الإطار الصحيح للقراءة نظراً لأن الشفرة الوراثية لا يمكـن أن تكـون ثنائيـة الأحرف، إذ أنه لو كانت ثنائية الآحرف لأمكن استعادة إطار القراءة فى مثـل هذه الطفرات المزدوجة المتشابهة. من جهة أخرى، وجد أنه عند اجراء اتحـاد بين ثلاث طفرات من نفس المجموعة أى (+ + +) (– – –) أمكـن اسـتعادة الطراز الوحشى للبروتين فى حين أن الجمع بين طفرات ثلاثيـة مختلطـة (+) (+) (–) أو (–) (–) (+) لن يعطى بروتينا وحشياً. تبين أنه اذا كانـت مواقـع الطفرات الثلاثية المتشابهة قريبة جداً من بعضها على جزئ د.ن.أ فإنها سـتنتج بروتين شبيه بالطراز الوحشى حيث سيكون تتابع الأحماض الأمينية فيه مشابها للطراز الوحشى فيما عدا مواقع حدوث الطفرات الثلاثية كما فى الشكل (٨–٣). يؤكد ذلك أن الشفرة الوراثية ثلاثية الأحرف Triplet، ويبين الشكل (٨–٤) كيف أن توافيق من ثلاثة طفرات متشابهة (+ + +) أو (– – –) فقط هى التى ستنتج طرازاً مظهرياً وحشياً للبروتين.



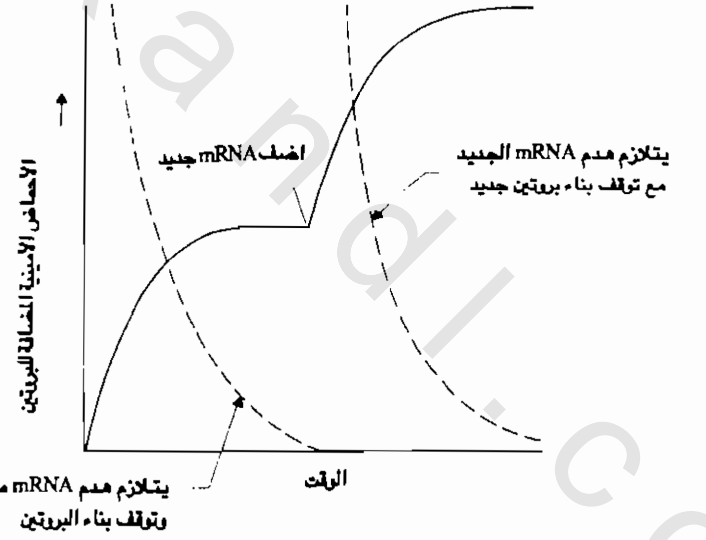
الشكل (٨-٣): شكل تخطيطى يبين كيف يمكن استعادة اطار قراءة mRNA أثناء الترجمة عن طريق احداث ثلاث طفرات اضافة متقاربة (طفرة القاعدة الواحدة) لثلاث نيوكلتيدات فى جزئ د.ن.أ وتكون النتيجة زيادة حامض أمينى واحد فى سلسلة متعدد الببتيد



الشكل (٨-٤): شكل تخطيطى لاثبات أن إحداث ثلاث طفرات اضافة (طفرة القاعدة الواحدة) (١، ٢، ٣ غير المظللة) وليس اثنتان تؤدى إلى استعادة اطار القراءة فى المنطقة الحساسه (مظللة) فى بروتين rII للفاج T4 وذلك اذا كانت الشفرة الوراثية ثلاثية. سيكون هناك حامض أمينى زائد فى المنطقة الحساسه للتراكيب (+)، (+) ، (+) ولكن ذلك لايؤدى إلى طراز طافر

استنباط الشفرة الوراثية: Dicephring of the Genetic Code

اعتمدت التجارب البيوكيماوية للتعرف على الشفرات الوراثية الدالة على الأحماض الأمينية المختلفة على استخدام نظام بناء البروتين في المعمل *In Vitro* في نظام خارج الخلية Cell Free System، حيث وجد نيرنبرج Nirenberg عام ١٩٦١ أنه يمكن استخدام مستخلص من خلايا بكتريا القولون المحتوى على الريبوسومات و ر.ن.أ الناقل tRNA وانزيمات أمينواسيل سينثيتيز Aminoacyl Synthetases و ر. ن. أ المراسل mRNA والأحماض الأمينية في بناء سلاسل متعدد الببتيد في المعمل *In Vitro* إلا أن هذا التفاعل يستمر لفترة قصيرة (دقائق معدودة) ثم يتوقف إلا اذا اضيف اليه mRNA تركيبي جديد كما في الشكل(٨-٥).



الشكل (٨-٥): شكل تخطيطي يبين اعتماد استمرار بناء البروتين معمليا على توفر mRNA. ينخفض معدل بناء البروتين كلما حدث هدم لجزئيات mRNA ثم يرتفع معدل البناء مرة أخرى عند اضافة جزئيات جديدة من mRNA

obeikandl.com

وقد اعتبر ذلك اكتشافا هاما حيث أنه عندما يتم استهلاك mRNA الطبيعى فإنه يمكن استخدام mRNA تركيبى مخلق انزيمياً فى هذا النظام. وجد أن فاعلية مثل هذا النوع من mRNA التركيبى تكون ضعيفة الا اذا تـم تغييـر الوسـط الأيونى واضافة بعض المكونات الآخرى، حيث تبدأ الترجمة فى أماكن عشوائية بدون الحاجة إلى كودون البدء.

وسوف نستعرض فيما يلى شرحاً موجزاً لبعض التقنيـات البيوكيماويـة الرئيسية التى استخدمت فى استنباط الشفرة الوراثية.

أولاً: تقنية المتعدد النيوكلتيدى المتجانس Homopolymers:

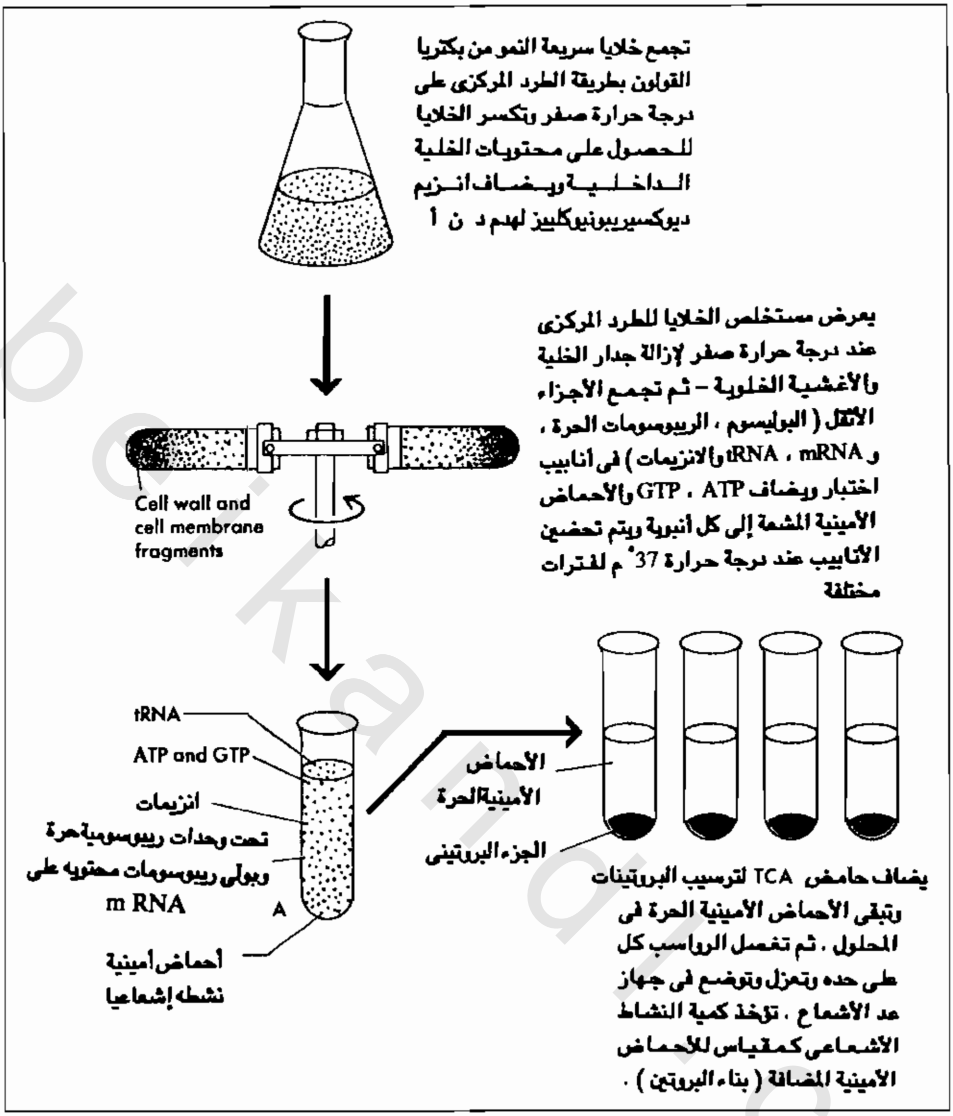
فى التجارب الأولية، استخدم نيرنبرج ومثـاى Nirenberg and Mathaie سلسلة من التفاعلات تحتوى كل منها على ٢٠ حامض أمينى ولكن بشرط وجود حامض أمينى واحد فى كل أنبوبة معلم بالاشعاع وبقية الأحماض التسعة عـشر غير معلمة فى كل تجربة. وتحتوى كل أنبوبة على جميع المكونـات الأخـرى اللازمة لبناء البروتين فى المعمل *In Vitro* فيما عـدا mRNA الطبيعـى. ثـم يضاف لكل مخلوط تفاعل mRNA تركيبى مكون من تتابعات مترادفة من نفس القاعدة: مثلا Poly U: وقد أمكن تخليق هذه النوعيات مـن mRNA الـصناعى باستخدام نشاط انزيم Polynucleotide Phosphorylase الذى يساعد فى التفاعـل التالى:

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

obeikandi.com

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

كما أمكن بتجارب مشابهة معرفة أن AAA يشفر لليسين فى حين يشفر الكودون CCC للبرولين إلا أن GGG لم يمكن تحديد أى من الأحماض الأمينية يشفر له فى ذلك الوقت نظراً لصعوبة ارتباط Poly G بالريبوسومات. والجدول (٨-١) يلخص نتائج هذه التقنية كما يبين الشكل (٨-٦) . بعض التفاصيل الخاصة بعملية بناء البروتين معمليا *In Vitro*.



الشكل (٨–٦): رسم تخطيطى لعملية بناء البروتين معمليا *In Vitro*

obeikandi.com

الجدول (٨–١) قياس معدل ظهور حامض الفينيل ألانين المشع فى متعدد الفنيل ألانين باستخدام م. ر. ن. أ تركيبى متجانس فى نظام بناء البروتين فى المعمل *In Vitro*

م. ر. ن. أ التركيبى	النشاط الاشعاعى فى البروتين الناتج (Count Per Minnte)
لايوجد	٤٤
Poly U	٣٩٨٠٠
Poly A	٥٠
Poly C	٣٨

ثانيا: تقنية البوليميرات المختلطة العشوائية Random Copolymers:

كانت الخطوة التالية هى تخليق بوليميرات من mRNA وتحديد الشفرات الوراثية فى تجارب معملية مشابهة لما سبق الاشارة اليه. واستناداً إلى قانون الاحتمالات، لنفترض أننا قمنا بتخليق بوليمر مختلط عشوائى متعدد النيوكلتيدات باستخدام انزيم Polynucleotide Phosohorylase مع أضافة كلا من GDP , UDP بنسبة ٥: ١ أى :

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

فإن الاحتمال النسبى للحصول على ثلاثى قواعد يحتوى على ثلاث قواعد من نوع U فقط فى هذا المتعدد سيكون ٥ × ٥ × ٥ = ١٢٥ فى حين أن الاحتمال النسبى للحصول على ثلاثى يحتوى على U واحد واثنان من G سيكون: ١×١×٥=٥ فإذا كانت الشفرة U3 UUU = تشفر للفينيل الانين

obeikandl.com

كما سبق القول ، UG2 تشفر للحامض الأمينى المجهول X فإنه يمكن أن نتوقع أن تكرار إضافة حامض الفينل الانين الى سلسلة متعدد الببتيد الناتجة ستكون مكافئة فى القيمة إلى النسب من التكرار الثلاثى U فى متعدد النيوكلتيد فى mRNA التركيبى.

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

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

ويمكن تلخيص النتائج التى حصل عليها Nirenberg and Speyer عام ١٩٦٣ بهذه الطريقة فى الجدول (٨-٢).

obeikandi.com

الجدول (٨-٢) نتائج تقنية البوليميرات المختلطة العشوائية .

الكودون	تكرار الحصول على حامض أميني في السلسلة – الفعلى	تكرار الحصول على حامض أميني في السلسلة – المتوقع	*الثلاثيات المحتملة*	نوع المتعدد النيوكلتيدى المختلط العشوائى **Random Copolymer**
U_3 = phe U_2G=cyst, val UG_2= gly,try pt.	phe : 100 cys:20, val: 20 gly : 4, try, 5	125 (100) 25 (20) 5 (4), (5)	U_3 (5x5x5) U_2G (5x5x1) UG_2 (5x1x1)	Poly – UG بنسبة 1 : 5
A_3 = lys A_2U = Ile, asn AU_2 = leu, tyr pt.	lys: 100 ile: 20, asn: 28 leu: 20, asn: 28	125 (100) 25 (20) 5 (4)	A_3 (5x5x5) A_2U (5x5x1) AU_2(5x1x1)	Poly- AU بنسبة 1 :5
C_3 = pro C_2G = ala, arg CG_2 = gly	pro : 100 ala : 22,arg: 19 gly : 5	125 (100) 25 (20) 5 (4)	C_3 (5x5x5) C_2G (5x5x1) CG_2 (5x1x1)	Poly – CG بنسبة 1 : 5

ثالثا: تقنية الارتباط المباشر لثلاثيات القواعد التركيبية

Direct Triplet Binding:

فى خطوة متقدمة لاستنباط الشفرة الوراثية تـم اجـراء تجـارب علـى الارتباط المباشر النوعى لثلاثيات من القواعد النوعية المحـددة التتـابع علـى الريبوسومات ضمن نظام بناء البروتين فى المعمل *In Vitro* بحيث كان التفاعل بصفة عامة كالتالى:

Ribosome + Aminoacyl – t RNA → No Comlex

أى ريبوسومات + أمينو أسيل – t RNA ← لا يتكون معقد

فى حين يكون ناتج التفاعل :

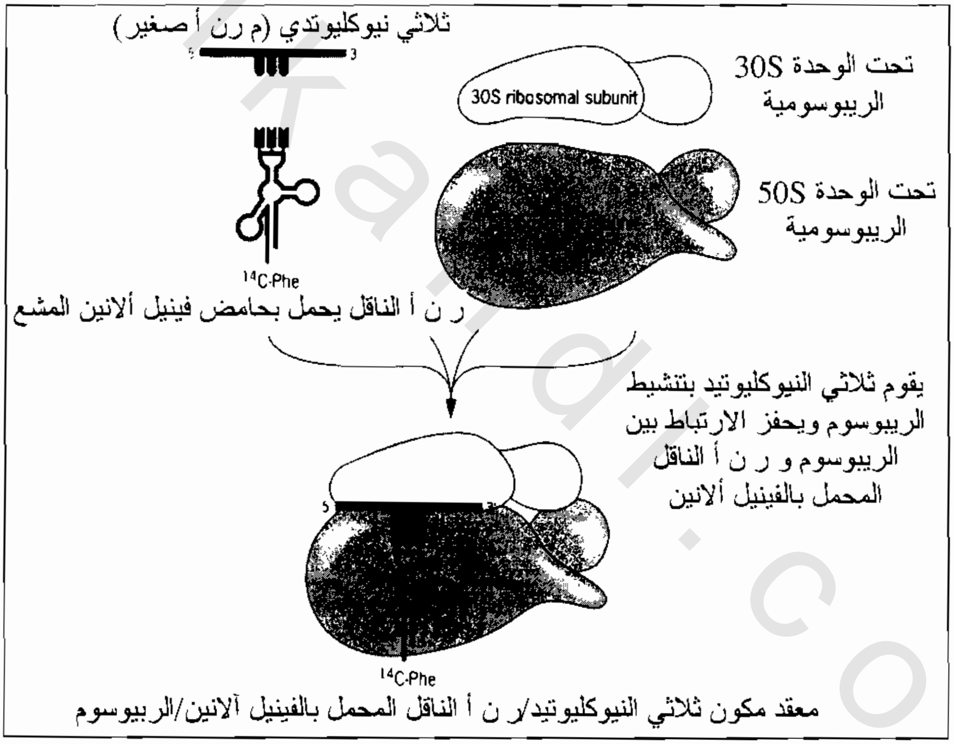
Ribosome + Aminoacyl – tRNA + Trinucleotide Codon → Comlex

ريبوسومات + امينو أسيل – tRNA + كودون ثلاثي ← يتكون معقد

وكانت الفكرة مبنية باختصار علـى أن ر.ن.أ الناقـل tRNA المحمـل بحامض أمينى نوعى X (يسمى أمينواسيل tRNA) لن يرتبط مع الريبوسومات

obeikandi.com

الحرة ولكن الثلاثية النيوكلتيدية (الكودون) النوعيــة ســتعمل كوســيط لــربط امينواسيل tRNA بالريبوسومات. وكانت التقنية بسيطة نــسبياً إذ يــتم حجــز الريبوسومات على مرشحات (فلتر) من نترات السيليولوز بحيث يمكن التمييــز بين جزئيات أمينواسيل tRNA المرتبطة بالريبوسومات عن تلك الحــرة التــى لم ترتبط بها حيث يتم التخلص من هذه الأخيرة بغسيل المرشح بمحلول مناسب حيث يسمح بمرور جزئيات امينواسيل tRNA الحرة وكذلك نيوكلتيدات الأليجو من خلال المرشح في حين لا يسمح بمرور المعقدات المكونة على الريبوســوم من امينواسيل tRNA + الكودونات النوعية الثلاثية (الشكل ٨-٧).



الشكل (٨-٧): تحفيز إرتباط أمينو أسيل -tRNA بالريبوسوم بإستخدام م ر ن أ صناعى (تركيبى) صغير مكون من ثلاث نيوكلتيدات فقط وقد ساعدت هذه التقنية كثيرا فى إكتشاف قاموس الشفرة الوراثية

وعلى ذلك فقد تم اضافة نيوكلتيدات ثنائية أو ثلاثية تركيبية معروفة التتابع مع امينواسيل tRNA ذو نشاط اشعاعى نوعى فى الحامض الأمينى المعلم بالاشعاع. اختبرت كل من هذه النيوكلتيدات الأوليجو مع جميع نوعيات امينواسيل tRNA بحيث يكون فى كل مرة احداها فقط هو المعلم بالأشعاع فى حين تكون التسعة عشر نوعاً الاخرى غير معلمة.

تم تقدير كمية الأشعاع التى تتبقى على المرشح (نتيجة عدم مرور المعقد المكون من امينواسيل tRNA المشع المرتبط بالريبوسوم) لكلا من التفاعلات العشرين والتى يحتوى كل منها على حامض أمينى نوعى مشع.

ويلخص الجدول (٨-٣) بعض النتائج التى حصل عليها ليدر ونيرنبرج عام ١٩٦٤ Leder and Nirenberg.

الجدول (٨-٣) نتائج تقنية الارتباط المباشر لثلاثيات القواعد التركيبية

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

من هذا الجدول يمكن استخلاص النتائج الهامة التالية :

obeikandl.com

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

٢- أن مفهوم الشفرة الثلاثية قد تأكد بصورة قاطعة.

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

رابعاً: تقنية عديدات النيوكلتيدات المعروفة التتابع Polymers of Known Sequence:

كانت الخطوة الأخيرة فى استنباط الشفرة الوراثية هى استخدام سلاسل تركيبية من متعدد النيوكلتيدات ذات تتابع معروف. وقد استخدم هذه التقنية Khorana عام ١٩٦٧ فى التعرف على عدد كبير من الكودونات النوعية المحددة لعدد من الأحماض الأمينية. استخدم كورانا بوليميرات مختلطة مكونة من وحدات متكررة ترادفياً من قاعدتين مختلفتين، مما يؤدى إلى اضافة حامضين من الأحماض الأمينية النوعية (يتم تشعيعها لإمكان متابعتها). وعند استخدام هذه البوليميرات التركيبية فى نظام بناء البروتين فى المعمل *In Vitro* يختبر مدى اضافة أى من الثمانية عشر حامض أمينى الباقية غير المعلمة وذلك عند استخدام حامض أمينى ثالث مشع وسبعة عشر حامض غير مشعة إلى مخلوط التفاعل فى كل مرة مع احداث التباديل والتوافيق الممكنة، عند استخدام هذه الأحماض الامينية فى مخاليط التفاعل. وقد تبين أن سلسلة متعدد الببتيد أحتوت فى كل مرة على حامضين نوعيين مشعين فقط ولم تحدث اى اضافة لحامض مشع ثالث إلى السلسلة الناتجة .

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

فإذا كان تتابع القواعد : UGU GUG UGU GUG UGU

يملى تكوين متعدد الببتيد : cys - val - cys - val - cys

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

وقد إتجهت دراسات تالية بواسطة كورانا ومعاونوه إلى استخدام تتابعات معلومة من ثلاثيات ورباعيات النيوكلتيدات المتكونة بشكل ترادفى بحيث أدى تحليل سلاسل متعدد الببتيد الناتجة إلى التعرف على اضافة أحماض أمينية نوعية بتتابع معين. وقد أمكن التعرف فى النهاية على حوالى نصف عدد الشفرات الأربعة والستون بهذه التقنية . ويمكن تلخيص النتائج فى الجدول (٨-٤).

obeikandl.com

الجدول (٨-٤) نتائج تقنية عديدات النيوكلتيدات المعروفة التتابع

mRNA تركيبى (بوليمير مختلط معروف التتابع)	الكودونات المتعرف عليها	الأحماض الأمينية المضافة فى سلسلة متعدد الببتيد	الشفرات (الكودونات)
poly (C – U)n	*CUC /UCU /CUC*	leucine Serine	5'CUC3' UCU
poly (U.G)n	*UGU /GUG /UGU*	Cysteine Valine	UGU GUG
poly (AC)n	*ACA /CAC /ACA*	Threonine Histidine	ACA CAC
poly (AG)n	*AGA /GAG /AGA*	Arginine Glutamine	AGA GAG

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

5'- AAG - AAGAAG - 3'
lys – lys – lys

أو

5'- GAAGAAGAA - 3'
glu – glu – glu

أو

5'- AGA AGA AGA - 3'
Arg – Arg – Arg

وقد توالى استنباط الكودونات المشفرة من مثل هذه البوليميرات النيوكلتيدية التركيبية الثنائية والثلاثية والرباعية التتابعات. وقد أسفرت جميع

هذه الدراسات عن استنباط كودونات نوعية محددة لأحماض أمينية نوعية وذلك بالنسبة لواحد وستين كودون من الأربعة والستين المحتملة كما فى الجدول رقم (٨-٥).

وتشفر الكودونات الثلاث الباقية لإنهاء أو وقف بناء سلسلة البروتين.

الجدول (٨-٥) الشفرة الوراثية

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

* كودونات الإنهاء أو عديم المعنى

* يستخدم أيضا لتحديد كودون البدء formly-Met – tRNA $_F{}^{Met}$ لذلك فإن كودون الفالين غير محدد "غامض" حيث أنه يشفر لكلا من الفالين والمثيونين.

obeikandl.com

الخواص الرئيسية للشفرة الوراثية:

Major Characteristics of The Code:

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

The Code is Comma Free and Non Overlapping:

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

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

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

obeikandl.com

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

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

٣- وجد يانفسكى Yanofsky أنه عند استبدال أحد الأحماض الأمينية فى السلسلة A من أنزيم Tryptophan Synthetase فى بكتريا القولون بإحدى المطفرات، فقد تبين أن الحامضين الأمينيين الواقعين على جانبى هذا الحامض المستبدل لم يتغيرا بالمرة.

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

فمثلاً التتابع AGU AGU AGU AGU AGU

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

أو (GUA) (GUA) (GUA) (GUA) (GUA)

أو (UAG) (UAG) (UAG) (UAG) (UAG)

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

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

ذات معنى   ذات معنى   ذات معنى   ذات معنى   ذات معنى

AGU AGU AGU AGU AGU

×عديمة المعنى   ×عديمة المعنى   ×عديمة المعنى   ×عديمة المعنى

Yعديمة المعنى   Yعديمة المعنى   Yعديمة المعنى   Yعديمة المعنى

opelkandil.com

فنجد أنه فيما عدا القراءة فى الإطار الأول التى تمثل القراءة الصحيحة نجد أن كل من الاحتمالات الأربعة للكودونات الثلاثية XXX المحتملة فى الإطارات الأخرى للقراءة لن تكون ممثلة أو محددة لأحماض أمينية ولكنها عديمة المعنى حيث أنها لو كانت تشفر لحامض أمينى واحد مترادف فإن التتابع XXXX وكذلك التتابع YYYY سيعطى قراءة ذات معنى فى الإطار الخطأ.

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

لو أن التتابع ذو معنى = AGU AGU

فإن التتابع عديم المعنى = GUA

والتتابع عديم المعنى = UAG

ثانياً : الشفرة ترادفية المعنى Synonyms (أو انحلالية Degenerate):

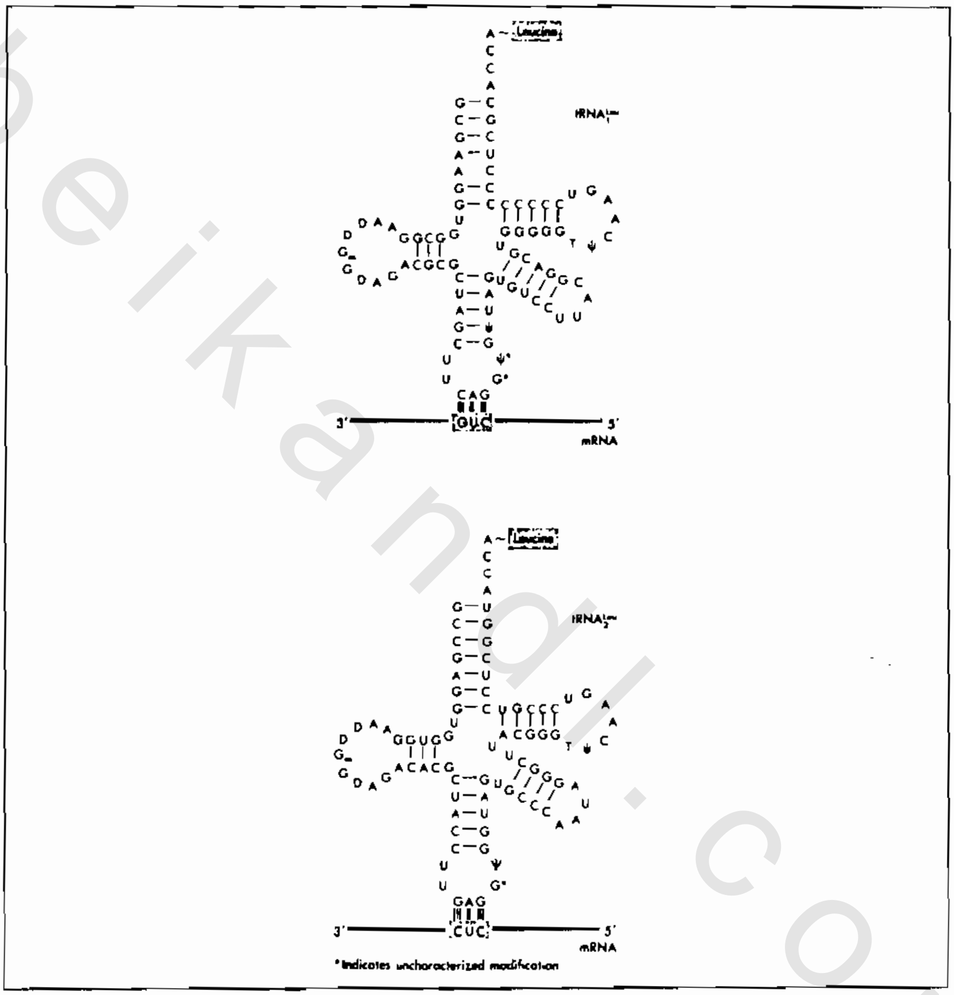
حيث يوجد لدينا ٦١ كودوناً تشفر لعشرين حامض أمينى فى حين تشفر الثلاثة كودونات الباقية لإنهاء أو إيقاف بناء البروتين، وفيما عدا المثيونين والتربتوفان اللذان يوجد لكل منهما كودون واحد، فمن الواضح أن هناك أكثر من كودون واحد يمكن أن يشفر لنفس الحامض الأمينى الواحد. بمعنى أن بعض الكودونات مترادفة المعنى عند القراءة (ويطلق على الشفرة فى هذه الحالة بأنها انحلالية Degenerate) وعلى سبيل المثال نجد أن الليوسين يتم تشفيره بستة كودونات وهى : UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG.

obeikandl.com

ويلاحظ أنه فى معظم الحالات تختلف الكودونات المترادفة عند موقع القاعدة الثالثة فى الكودون فى حين تكون القاعدتين الأولى والثانية ثابتتين بالنسبة لكل حامض أمينى نوعى، مما يوحى بأن هذين الموقعين يعتبران الأكثر أهمية فى تحديد الكودون النوعى لكل حامض (الشكل ٨-٨). وكنتيجة لذلك فإن أى طفرة تحدث فى القاعدة الموجودة فى الموقع الثالث للكودون يمكن غالبا أن لا يكون لها تأثير سلبى على عملية الترجمة إلى بروتين، لأن الحامض الأمينى المحدد ستتم إضافته فى مكانه من السلسلة بالرغم من حدوث هذه الطفرة وتسمى مثل هذه الطفرات بالطفرة الساكتة أو الصامتة Silent Mutation.

وقد أوضحت نتائج دراسات تتابع القواعد فى د ن أ أن جميع الكودونات الأربعة والستون يمكن استخدامها فى الكائن الحى *In Vivo*. وقد يعطى إمكان استخدام جميع هذه الكودونات ميزة وقائية فى التقليل من تأثير الطفرات الضارة التى قد تحدث للكائن الحى. إذ لو افترضنا أن عدد كبير من الكودونات كانت عديمة المعنى فإن معنى ذلك أن الطفرات التى قد تحدث فى العدد القليل الباقى ذو المعنى ستكون أكثر ضراوة وبمعدل حدوث أعلى بكثير بحيث تؤثر بالسلب على فعالية البروتين الناتج. بالإضافة إلى ذلك فإن طبيعة تنظيم الشفرات الوراثية تعمل على التقليل من تأثير الطفرات على عملية الترجمة أثناء عملية بناء البروتين. فمثلاً حتى فى حالة حدوث طفرة فى موقع القاعدة الأولى للكودون فإنه من المحتمل أن تتم ترجمة الكودون المتغير الناتج إلى حامض أمينى مشابه فى خواصه للحامض الأصلى (إن لم يعط نفس الحامض). كما أن الكودونات المحتوية على قاعدة بيريميدينيه فى الموقع الثانى عادة تكون مختصة بالتشفير للأحماض الأمينية الكارهة للماء Hydrophobic فى حين أن الكودونات المحتوية على قاعدة بيورينيه فى الموقع الثانى تكون عادة مختصة بالتشفير

للأحماض الأمينية القطبية Polar (الجدول ٨ – ٥) ونظراً لأن طفرات الاستبدال المتماثل Transition هى الأكثر شيوعا فى طفرات استبدال القاعدة الواحدة، فإن أي تغيير فى الموقع الثانى للكودون سيؤدى غالباً إلى استبدال حـــامض أمينـــى بآخر له خواص مشابهة إلى حد كبير.



الشكل (٨–٨): وجود جزيئيين مختلفين من tRNA للحامض الأميني الليوسين بحيث يتعرف كل منهما على كودون مختلف مما يوضح ترادفية الشفرة

obeikandi.com

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

كما توجد خاصية أخرى مميزة فى الشفرة الوراثية وهى أنه طالما أن الموقعين الأول والثانى يكونان مشغولين بالقاعدة G أو C فإن أى من القواعد الأربعة المحتملة لو احتلت الموقع الثالث ستعطى كودون مختص بالتشفير لنفس الحامض الأمينى. ولو قارنا فى الجدول (٨-٥) على سبيل المثال الكودونات الخاصة بكل من الأحماض الأمينية الألانين، البرولين، الارجينين والجلايسين فسوف تتضح هذه الظاهرة.

ومن جهة أخرى، وفى حالة ما إذا كان الموقعان الأول والثانى للكودون مشغولين بالقاعدة A أو U فإن نوع القاعدة الموجودة فى الموقع الثالث سيكون له تأثير كبير على نوع الحامض الأمينى الذى تترجم له هذه الكودونات. ويفسر ذلك على أساس أن زوج القواعد GC يرتبط بقوة أكثر من الزوج AU. لذلك فإن التزاوج غير الصحيح فى القاعدة الثالثة فى الحالة الأولى يمكن احتماله نظراً لارتباط الموقعين الأول والثانى بروابط قوية (هيدروجينية) بين الزوج GC عما فى حالة AU حيث تكون الروابط ضعيفة نسبياً. ولذلك فإن وجود أى من النيوكلتيدات الأربعة فى الموقع الثالث بصفة عامة قد يكون مرتبطاً بميكانيكية أمان للتقليل من أخطاء قراءة الشفرة الوراثية.

ثالثاً : التأرجح فى مضاد الشفرة Wobble in Anticodon:

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

وقد اقترح Crick مفهوم التأرجح Wobble لتفسير ذلك. ويعنى هذا المفهوم أن القاعدة فى النهاية '5 فى مضاد الكودون ليس ثابتاً (أو مقيداً) فى مكانه مثل القاعدتين الأخرتين مما يسمح بتكوين روابط هيدروجينية مع أى من عدة قواعد واقعة على النهاية '3 فى الكودون المقابل. إلا أنه تبين أن ذلك لا يشمل جميع التباديل الممكنة حيث وجد أن التزاوج فى هذه الحالة يقتصر على القواعد المبينه فى الجدول (٨-٦).

الجدول (٨-٦) التزاوجات الممكنة حسب مفهوم التأرجح

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

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

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

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

obeikandl.com

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

تبين أن ذلك يرجع إلى أن القاعدة فى الموقع الأول فى مضاد الكـــودون Anticodon (على النهاية '5) تكون لها حرية حركة أكثر عن تلك الموجـــودتين فى الموقعين الاخرين، مما يفسر وجود التأرجح فى الموقع الثالث '3 للكـــودون. وعلى العكس من ذلك نجد أن الموقع الثالث فى مضاد الكودون ('3) يكون مقيد الحركة مما قد يفسر انعدام حدوث ظـــاهرة التـــأرجح فـــى الموقـــع الأول ('5) للكودون.

رابعاً : كودون بدء الترجمة (AUG) Initiation Codon
وكودونات إنهاء الترجمة (UAC, UAA, UGA) Termination Codons:

حيث أن بناء البروتين يتم فى الاتجاه من '3 ← '5 كما سيأتى بعد، وحيث أن البناء يتم من النهاية الأمينية NH_2 ؛ فقد تبين أن إشارة البدء لبناء البـــروتين هى الكودون AUG. وقد وجد أن هذا الكودون له وظيفتين متميـــزتين، فعنـــدما يكون AUG فى بداية منطقة التـــشفير Coding Region لجـــزئ mRNA فـــى البكتريا فإنه سيشفر لإضافة N-Formyl Methionine (Fmet) فى حين أن نفس الكودون AUG فى أى مكان آخر بعيد عن منطقة البدء هذه سيشفر للميثـــونين العادى (Met).

وكما سيأتى عند دراسة عملية بناء البروتين فى البكتريا، فإنه يوجد نوعاً مميزاً من tRNA يسمى fmet-tRNA يختلف عن tRNA الخـــاص بـــالميثونين العادى. ولكى يتم ارتباط fmet-tRNA بالريبوسوم فإن الأمـــر يتطلـــب وجـــود

بروتين نوعي يسمى بروتين البدء رقم 2 (Initiation Factor2) (IF2) : في حين يستخدم met tRNA نفس عامل الاستطالة Elongation Factor الذي تستخدمه بقية أنواع tRNA الأخرى. جدير بالذكر أنه في مميزة النواة يوجد نوع واحد من tRNA، جزئ البدء $tRNAi^{met}$ مختص ببدء بناء سلسلة البروتين حيث تبدأ السلسلة هنا بالميثونين وليس Formyl Methionine.

يجب التنويه هنا إلى أن mRNA الطبيعي *In Vivo* يبدأالترجمة دائماً بالكودون AUG في حين أن ذلك ليس شرطاً حتمياً في حالة استخدام mRNA التركيبي في المعمل *In Vitro* كما في حالة التجارب التي استخدمت لاستنباط الشفرات الوراثية والتي سبق شرحها.

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

وتجدر الإشارة إلى أنه قد يوجد أكثر من كودون إنهاء الشفرة جنباً إلى جنب في نهاية منطقة التشفير كضمان إضافي لايقاف عملية بناء البروتين عند نهاية منطقة التشفير Coding Region في جزئ mRNA.

خامساً : اختلاف مقادير tRNA النوعية وتكرار استخدام الكودونات المختلفة في الشفرة:

يحدث أحياناً أن عدة جزيئات من tRNA التي تم بناؤها قد تحتوى على تتابعات نيوكلتيديه مختلفة كثيراً ولكنها في نفس الوقت تحتوى على نفس مضاد الكودون المختص بكودون نوعي لحامض أمينى معين. وغالباً ما تكون إحدى هذه النوعيات المتشابهة موجودة بمقادير كبيرة بالمقارنة بالنوعيات الأخرى الحاملة لنفس مضاد الكودون (قد تصل إلى أكثر من حوالى ١١ ضعف). ففى بكتريا القولون على سبيل المثال يوجد tRNA رئيسى للتيروسين $tRNA^{tyr}$ ونوع آخر من tRNA ثانوى بالنسبة لنفس الحامض وكلاهما يحتوى على نفس مضاد الكودون (3' - AUG-5'). وقد وجد بصفة عامة أن كلا من نوعى tRNA الرئيسى والثانوى يتم نسخهما من جينين مختلفين، وأن الفرق فى تكرار وجودهما يرجع إلى اختلاف فى سرعة أو معدل نسخ كل منهما والتى ترجع إلى الأختلاف فى كفاءة منطقة البروموتور بينهما وكذلك لفروق أخرى فى عملية تجهيز جزئ ر ن أ الناقل tRNA بعد النسخ. لم تتحدد حتى الآن بصفة قاطعة وظيفة ر. ن. أ. الناقل الثانوى tRNA Secondary وقد يكون له دور فى تنظيم عملية الترجمة نظرا لوجوده بكميات ضئيلة نسبيا كما أنه يقوم بدور فى كبت فعل الجين Suppression of Gene Action.

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

obeikandl.com

فعلى سبيل المثال، فى كائن يحتوى على د ن أ غنى فى AT فإنه من المتوقع أن تكون معظم الكودونات محتوية على U أو A فى الموقع الثالث. وفى الحقيقة فقد وجد أن التتابع الكلى لجزئ د ن أ الأحادى فى جينوم البكتريوفاج ∅X174 يحتوى على A 24%، C%22 ,G%23 ,T %31. وقد تبين أن U هى القاعدة المفضلة بالفعل فى الموقع الثالث للكودون. وحتى فى الكائنات التى لايوجد تحيز فى نسب تكوين القواعد، نجد أن استخدام الكودونات ليس متروكا للصدفة. وحيث أننا نعرف الآن تتابع القواعد لكثير من جينات بكتريا القولون فقد أصبح واضحا أن هناك بعض الكودونات التى تستخدم بمعدل عالى جدا فى حين قد لا تستخدم كودونات أخرى لنفس الحامض إلا نادراً.

وجد أنه فى جينات الكائنات الراقية، يكون استخدام الكودونات أيضا غير خاضع للصدفة. إلا أنه تبين وجود اختلاف فى تكرار استخدام بعض الكودونات بين مميزة النواة وغير مميزة النواة. ويطلق على هذه الظاهرة تحيز الكودون Codon Bias. وجد أن تكرار ظهور كودونات نوعية معينة فى بكتريا القولون يرتبط ارتباطا وثيقا بمدى توفر جزئيات tRNA الخاصة بها. ويتضح ذلك بصفة خاصة فى حالة البروتينات التى يتم إنتاجها بكميات كبيرة (مثل RecA Protein والبروتينات الريبوسومية) إذ نجد أن تلك الأنواع من mRNA تحتوى على كودونات يتم قراءتها بواسطة أكثر أنواع tRNA وفرة (يطلق على جزئيات tRNA النوعية التى تحتوى على مضاد لنفس الشفرة اسم مشابهات المستقبلات Isoacceptors)، فى حين لا يحتوى هذا الـ mRNA على كودونات مقابلة لنوعيات tRNA الثانوية.

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

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

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

سادساً : الشفرة الوراثية عامة (تقريباً) The code is nearly universal:

وجد أن Poly-U يؤدى إلى إضافة حامض الفينيل الانين فى التجارب المعملية *in Vitro* فى مستخلصات خلوية مأخوذة من أنواع مختلفة من الكائنات تتراوح بين البكتريا والثدييات. ونفس الشئ تم الحصول عليه عند استخدام Poly C حيث وجد أنه يحفز إدخال البرولين فى تكوين عديد البرولين. وكذلك الحال فى Poly A الذى يختص بالتشفير لليسين فى متعدد الليسين. وقد تم ذلك بصفة عامة بصرف النظر عن نوع المستخلص الخلوى أو مصدره. وقد تأكدت شمولية الشفرة وانطباقها على جميع أنواع الكائنات تقريبا بتجارب حديثة اشتملت على دراسة تتابع القواعد فى د ن أ لجينات محددة تشفر لبروتينات تنتمى إلى أنواع Species مختلفة، وبهذا يبدو أن الشفرة الوراثية قد ظلت ثابتة على مدى أحقاب تطورية طويلة.

من جهة أخرى وجد أن الشفرة الوراثية فى جينوم الميتوكوندريا mtDNA فى الإنسان وغيره من الثدييات قد شذت عن هذه القاعدة فى بعض الخواص ومنها:

- أن الكودون UGA لا يقرأ فى الميتوكوندريا على أنه كودون إنهاء الترجمة ولكنه يشفر لحامض التربتوفان.
- أن المثيونين الداخلى يتم تشفيره بكل من الكودونين AUA, AUG بدلا من الأيزوليوسين فى حين أن المثيونين فى بداية الترجمة يشفر له بالكودونات : AUG, AUA, AUU, AUC.
- أن الكودونين AGG, AGA ليسا كودونان للتشفير للأرجينين ولكنهما بدلا من ذلك يستخدمان كإشارة لإنهاء الترجمة فى الميتوكوندريا. وبذلك يوجد

obeikandi.com

أربع كودونات لوقف الترجمة فى الميتوكوندريا وهى : ,UAA, UAG
.AGA, AGG

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

تأكيد الشفرة الوراثية فى الخلية الحية:

In Vivo Confirmation of The Code:

أمكن التأكيد على صحة الخواص الرئيسية للشفرة الوراثية باستخدام بكتريوتاج MS2 والذى يتكون جينومه من سلسلة مفردة من ر ن أ ويبلغ طوله ٣٥٠٠ ريبونيوكليوتيده تمثل ثلاث جينات فقط وقد تمكن فيرز ومعاونوه Fiers *et al.* من تحليل تتابع هذه الجينات ونواتجها من سلاسل متعدد الببتيدات.

وعند مقارنة تتابع النيوكلتيدات فى الجين مع تتابع الأحماض الامينية فى البروتين الناتج، تبين وجود توازى (تطابق) بين التتابعين بمعنى أنه وطبقا لقاموس الشفرة الوراثية فإننا نجد أن التتابع الخطى للنيوكلتيدات (وبالتالى تتابع ثلاثيات الشفرات) تتفق تماما مع التتابع الخطى للأحماض الأمينية للبروتين وبالإضافة إلى ذلك، فقد وجد أن كودون أول حامض أمينى هو AUG وهو كودون البدء، فى حين كان كودون آخر حامض أمينى فى السلسلة متبوعا بكودونين مترادفين لإنهاء الترجمة وهما UAA, UAG وقد ثبت بعد ذلك بطرق التحليل فى الحى *In Vivo* أن خواص الشفرة الوراثية التى تأكدت فى البكتريا والفيروس تتشابه تماما مع تلك الموجودة فى مميزة النواة.