الفصل التاسع

بنـــاء الـبروتـــين
Protein Synthesis

تقوم الأنواع الثلاثة من ر ن أ وهى: rRNA, tRNA, mRNA بالـدور الرئيسى فى عملية الترجمة Translation، أى بناء البروتين، حسب المعادلـة المركزيةCentral Dogma :

التناسخ Replication

وكان يعتقد فى البداية أن جميع هذه الأنـواع الثلاثـة تـستخدم كقالـب template فى عملية الترجمة، إلا أنه تبين أن واحدا منهـا فقـط وهـو ر ن أ المراسل mRNA هو الذى يقوم بالفعل بدور القالب، فى حـين يقـوم النوعـان الآخران بأدوار أخرى هامة للمساعدة فى توجيه وإتمام عملية الترجمة.

وقد دلت الدراسات على أنه لا توجد علاقـة تجـاذب نوعيـة specific affinity بين المجاميع الجانبية فى كثير من الأحماض الأمينية وبـين القواعـد النيتروجينية الموجودة فى mRNA القالب، لذلك اتجهت البحوث إلـى محاولـة التعرف على نوعية معينة من ر ن أ تقوم بدور الوسيط أو المهيئ adaptor بين

ر ن أ المراسل mRNA وبين الأحماض الأمينية ليعمل كهمزة الوصل بينهما وقد تم التوصل إلى أن جزئيات ر.ن.أ. الناقل tRNA هى التى يمكنها أن تقوم بهذا الدور.

تحتوى الخلية على مجموعة من ر ن أ الناقل وهى عبارة عن جزئيات من الأحماض النووية الريبوزية صغيرة الحجم (بطول حوالى ٧٠-٩٠ نيوكلتيدة). يسمح تركيب جزئ tRNA بوجود موقعين نوعيين مستقلين ويمكن لأحدهما أن يتعرف على ويرتبط بالحامض الأمينى بمساعدة أنزيم نوعى يسمى tRNA Synthetase؛ فى حين يقوم الموقع الآخر الموجود فى الطرف الآخر من الجزئ والمحتوى على مضاد الكودون بالتعرف على ثلاثية الكودون الموجودة فى تتابع القواعد على جزئ mRNA مما يسمح للأحماض الأمينية بأن تصطف طبقا لهذا التتابع النيوكلتيدى.

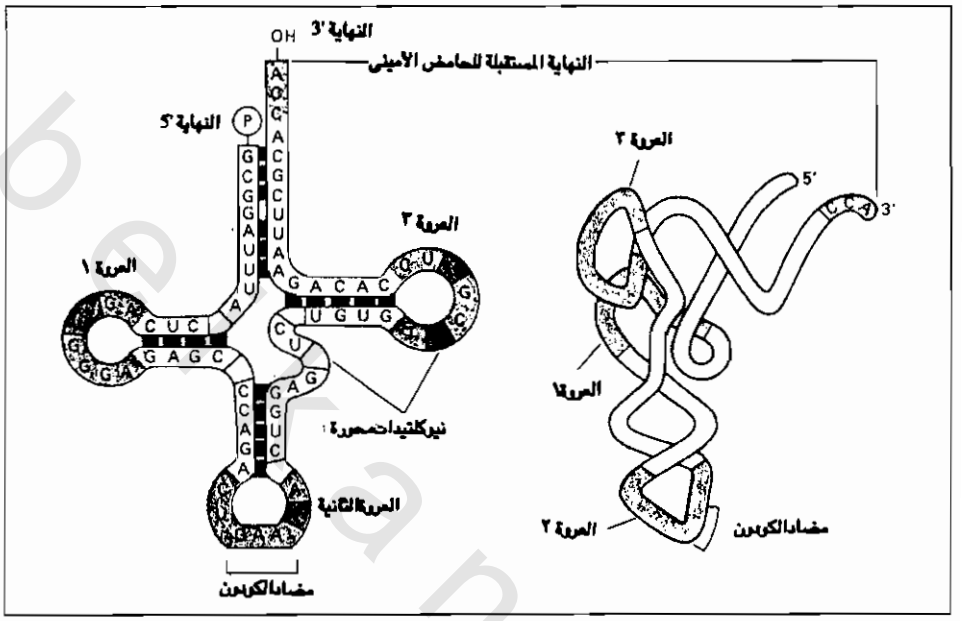
يسمح تركيب جزئ tRNA بأن يرتبط بحامض أمينى واحد من الأحماض العشرين المعروفة. فمثلا يطلق على tRNA المتخصص فى حمل أو نقل الجلايسين اسم $tRNA^{gly}$. وهكذا.. ويوجد لكل حامض أمينى نوع واحد من tRNA التخصصى وقد توجد عدة أنواع من tRNA يستطيع كل منها التفاعل مع نفس الحامض الأمينى.

قبل أن يشارك الحامض الأمينى فى بناء سلسلة متعدد الببتيد، فإن نهايته الكربوكسيلية (-COOH) ترتبط تساهميا مع النهاية '3 لجزئ tRNA النوعى المحتوى على مضاد الكودون الصحيح الخاص بهذا الحامض (مضاد الكودون هو التتابع الثلاثى المكمل لتتابع الكودون الثلاثى النوعى لحامض أمينى معين على جزئ mRNA). يؤدى التزاوج الصحيح بين الكودون ومضاد الكودون

بواسطة الروابط الهيدروجينية إلى امكان وضع الحامض الأمينى فى مكانه فى سلسلة البروتين النامية طبقا للأوامر الموجودة فى تتابع النيوكلتيدات فى جزئ mRNA، مما يسمح بالاستخدام الصحيح للشفرة الوراثية فى ترجمة تتابع النيوكلتيدات إلى تتابع مقابل من الأحماض الأمينية فى البروتين. يقوم tRNA بدور أساسى كوسيط فى عملية الترجمة حيث ترتبط أحدى نهايتيه بحامض أمينى نوعى فى حين تتزاوج النهاية الأخرى مع الكودون الخاص بهذا الحامض على جزئ mRNA أى يمكن القول بأن tRNA يقوم بدور همزة الوصل بين تتابع النيوكلتيدات وتتابع الأحماض الأمينية. من جهة أخرى تؤدى الرابطة التساهمية التى تحدث بين الحامض الأمينى وبين جزئ tRNA إلى تنشيط الحامض الأمينى عن طريق تكوين رابطة ذات طاقة عالية عند النهاية الكربوكسيلية لهذا الحامض بحيث يمكنها أن تتفاعل مع المجموعة الأمينية للحامض الأمينى التالى فى تتابع متعدد الببتيد، حيث تستخدم طاقة التنشيط هذه فى تكوين رابطة ببتيدية. تعد عملية التنشيط هذه ضرورية لبناء البروتين لأن الأحماض الأمينية غير المنشطة لا يمكن إضافتها مباشرة إلى سلسلة متعدد الببتيد النامية.

تعتمد وظيفة جزئ tRNA على دقة تركيبه الثلاثى الأبعاد Three Dimension Structure. وقد أمكن دراسة التركيب الدقيق لعدة جزئيات مختلفة من tRNA وذلك بتقنيات متخصصة، وقد وجد أن جزئ tRNA يحتوى على مناطق تكون فيها سلسلة متعدد النيوكلتيدات متزاوجة فى حين توجد مناطق محتوية على قواعد متحورة Modified. كما تبين حدوث تفاعلات غير عادية بين القواعد لكى يتمكن الجزئ من الانثناء أو الانطباق. ظهر فى التركيب الدقيق لجزئ tRNA احتواءه على عروات وسيقان متزاوجة القواعد بحيث يأخذ

تركيب الجزئ شكلا يشبه شكل ورقة البرسيم clover leaf shape ويعتقد أنه لابد أن يتم تحوير هذا الشكل بدرجة أكثر تعقيدا حتى تأخذ شكل حرف L لكى يكون الجزئ فعالا ويقوم بوظيفته كمهيئ، كما فى الشكل (٩-١).

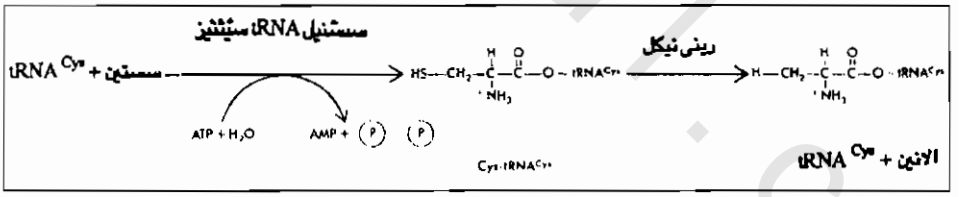


الشكل (٩-١): التركيب ثلاثى الأبعاد لجزئ tRNA ويتبين المناطق ذات القواعد المتزاوجة تخطيطيا فى الشكل الأيسر (شكل تركيب ورقة البرسيم) فى حين يتبين التركيب ثلاثى الأبعاد (شكل حرف L) إلى اليمين. تستقبل أحد النهايات الحامض الأمينى، فى حين تحتوى النهاية الأخرى على النيوكلتيدات الثلاثة لمضاد الكودون. يرتبط الحامض الأمينى فى النهاية ذات التتابع CCA عند النهاية '3 للجزئ

وقد تبين وجود عدد من النيوكلتيدات غير العادية فى جزئ tRNA قد تصل نسبتها إلى حوالى ١٠% من إجمالى النيوكلتيدات، والتى تنشأ عن عملية تحوير أو تعديل للنيوكلتيدات العادية فى عملية التجهيز التى تعقب عملية نسخ tRNA. وقد تبين أن وجود هذه النيوكلتيدات غير العادية يساعد على أن يأخذ جزئ tRNA التركيب المطلوب لكى يقوم بوظيفته.

دور انزيم Aminoacy1-tRNA Synthetase فى عملية الترجمة:

وجد أن جزئ tRNA، وليس الحامض الأمينى الذى يحمله، هو الذى يحدد مكان إضافة هذا الحامض فى سلسلة متعدد الببتيد أثناء عملية الترجمة. وقد تأكد ذلك بوضوح بعد تجربة مثيرة تم فيها تحميل $tRNA^{cys}$ بحامض السستين، ثم أجريت عملية تحويل لحامض السستين المحمل إلى حامض الآلانين بعملية يتم فيها نزع مجموعة SH بالرينى نيكل Raney Nickel كما فى الشكل (٩-٢) وبذلك ينتج جزئ Ala-tRNA هجين أى " Alany1- $tRNA^{cys}$ " وعند استخدام مثل هذا الجزئ فى نظام بناء البروتين المعملى وجد أن كل موقع للسستين فى سلسلة متعدد الببتيد الناتج قد استبدل بحامض الانين Alanine مما يبين مبدأين أساسيين. أولهما أن الحامض الأمينى المحمل ليس له دور فى تحديد موقع إضافته فى سلسلة متعدد الببتيد، والثانى والأهم أن جزئ tRNA يقوم بدور المهيئ فقط بين الحامض الأمينى وبين mRNA وأن التفاعل الحرج يكمن فى التطابق الصحيح بين جزئ tRNA النوعى والحامض الأمينى المخصص له، وتتم هذه المطابقة بواسطة أنزيم Aminoacy1-tRNA Synthetase.



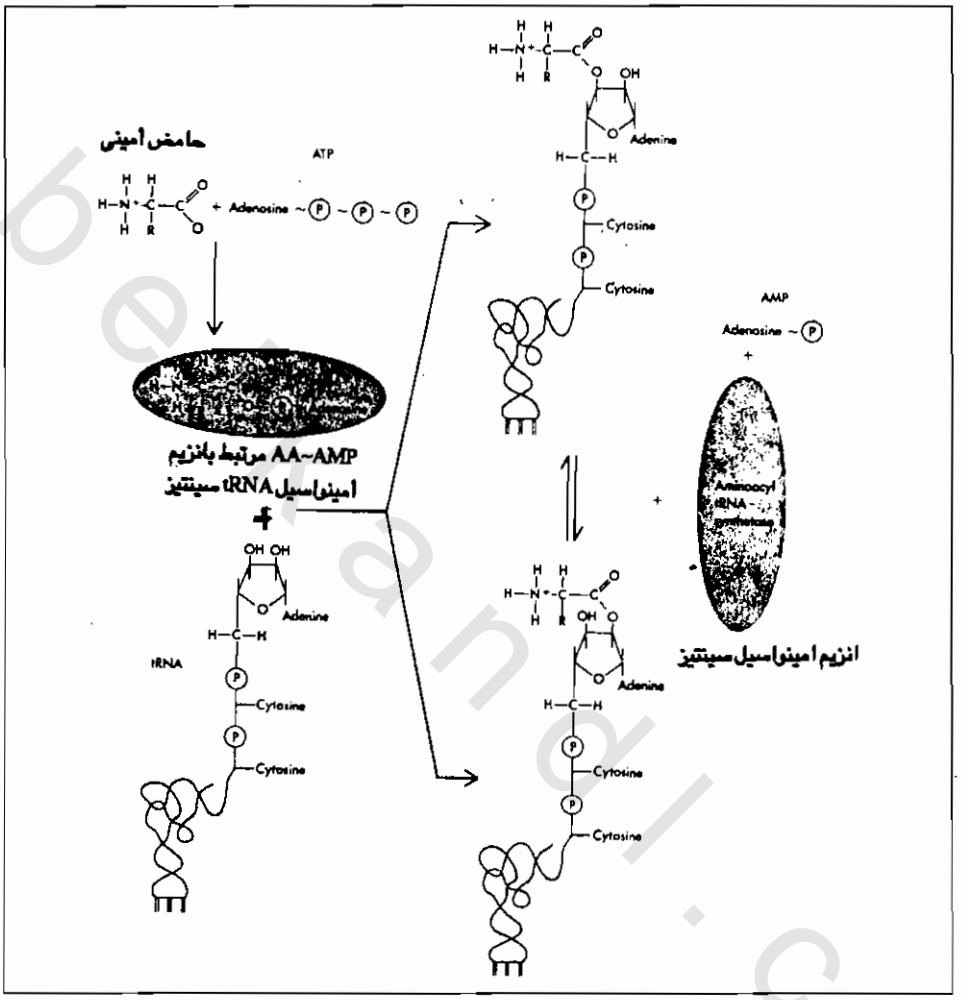
الشكل (٩-٢): تجربة لإثبات أن جزئ tRNA يقوم بدور المهيئ. أمكن تحويل السلسلة الجانبية للحامض الأمينيى السستين إلى الانين بعد تحميل الأول على $tRNA^{cys}$. تتم إضافة الانين فى مكان السستين فى جزئ الهيموجلوبين

تبين وجود أنزيم نوعى Aminoacyl tRNA Synthetase متخصص لكل حامض أمينى (أى يوجد 20 أنزيم من هذا النوع) بحيث يكون أحدهما متخصصاً فى التزاوج بين الحامض الأمينى (X) و tRNA (X)، وهكذا.

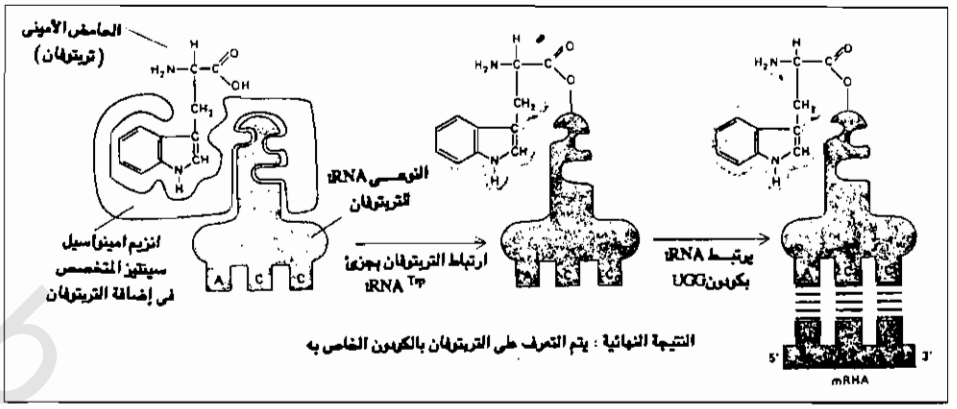
يتم تفاعل التزاوج على خطوتين ويؤدى إلى الحصول على جزئيات Aminoacyl-tRNA كما فى الشكل (٩-٣). ويتضح من هذا الشكل أن هذا الأنزيم نفسه هو الذى يساعد على تنشيط الحامض الأمينى كما سبق الذكر. كما يبين الشكل (٩-٤) كيف تتم ترجمة الشفرة الوراثية من خلال نشاط هذا الأنزيم من جهة ومن خلال التزاوج الصحيح بين مضاد الكودون فى tRNA والكودون المقابل فى جزئ mRNA القالب، ويتضح من هذا الشكل أن هاتين العمليتين مستقلتان تماما عن بعضهما.

ولكن كيف يتسنى لهذا الأنزيم المطابقة Matching بين الحامض الأمينى الصحيح وبين جزئ tRNA النوعى الخاص به، وخاصة فى حالة الأحماض الأمينية المتشابهة التركيب. أمكن معرفة كيف يتم هذا التمييز بمتابعة ما تم التوصل إليه بالنسبة لأنزيم Isoleucyl-tRNA حيث أمكن لهذا الأنزيم أن يميز بين الأيزوليوسين والفالين، وهما حامضان أمينيان متشابهان تماما فيما عدا وجود مجموعة ميثيل إضافية فى حالة الايزوليوسين وبالتالى فإن الفرق يكمن فى طاقة الارتباط Binding Energy بانزيم Isoleucyl-tRNA Synthetase والتي لا تزيد عن ٣ كيلو سعر (3 K cal) وهى مقدار ضئيل من الطاقة يبدو للوهلة الأولى أنه غير كاف لمنع الخطأ فى الاختيار بين هذين الحامضين. فعلى سبيل المثال عندما يوضع Isoleucyl-tRNA Synthetase مع مخلوط متكافئ الكمية من حامض الأيزوليوسين والفالين فإنه قد يحدث التنشيط الخاطئ لجزئ

واحد من الفالين (Val-AMP) فى نفس الوقت الذى يتم فيه التنشيط الصحيح لـ ١٠٠ جزئ من الأيزوليوسين (Iso - AMP) فى هذا المخلوط نفسه.



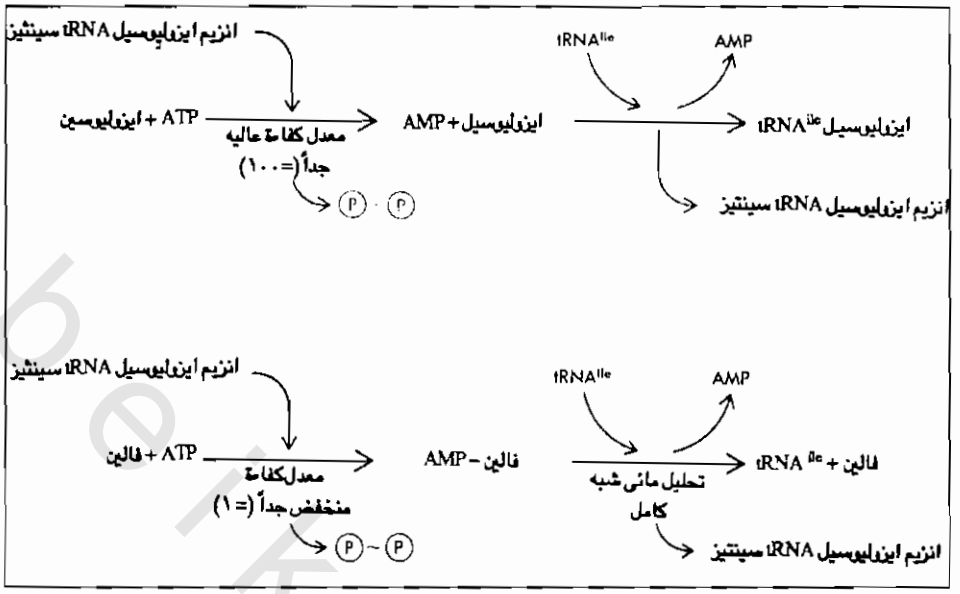
الشكل (٩-٣): تنشيط الحامض الأمينى بـ ATP ونقله إلى النهاية CCA لجزئ tRNA النوعى. لاحظ أنه بمجرد أن يرتبط الحامض الأمينى بالجزئ فإنه يمكنه الانتقال بسرعة بين النهاية '3 ,'OH2 للأدينوسين النهائى فى جزئ tRNA



الشكل (٩-٤): دور كل من جزئ tRNA وأنزيم امينواسيل tRNA سينثيتيز فى ترجمة الشفرة الوراثية حيث يتم ربط الحامض الأمينى بجزئ tRNA النوعى عند النهاية CCA برابطة تساهمية بفعل الأنزيم فى حين تتم قراءة ثلاثيات الكودون فى mRNA بمضاد الكودون فى عروة مضاد الكودون فى tRNA حسب قانون تزاوج القواعد

وعند نقل هذه الجزئيات المنشطة من الفالين (Val~AMP) فى خطوة تالية إلى جزئيات tRNA–Isol فإنه يحدث نسبة عالية من الخطأ غير المسموح به. إلا أن هذا النقل يتم عادة بتكرار منخفض جدا حيث وجد أنه عندما يرتبط Iso1- tRNA بالمعقد:

Val~ AMP - Iso1~ tRNA Synthetase فإن جميع جزيئات Val ~ AMP تقريبا تتفكك بالتحليل المائى بسرعة إلى مكوناتها من الفالين و AMP (الشكل ٩-٥).



الشكل (٩-٥): التمييز بين الحامضين المتشابهين ايزوليوسين والفالين عند تكون ايزوليوسيل tRNA ile

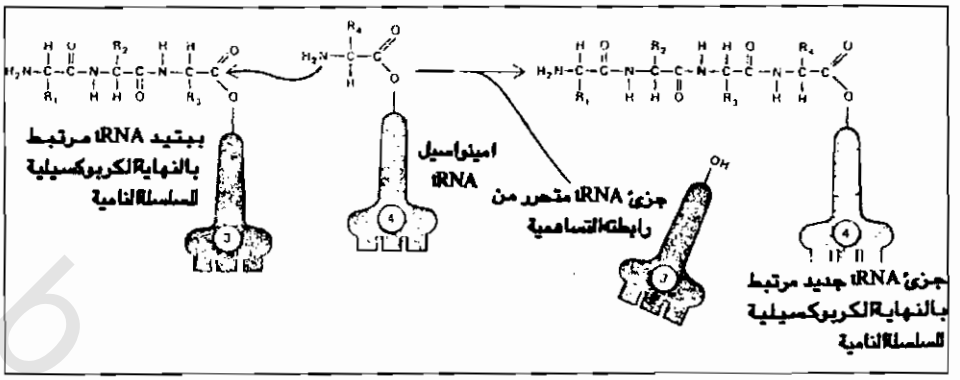
ويتطلب هذا النوع من المراجعة Proofreading الارتباط المستمر بين الحامض الأمينى وبين الموقع النشط لانزيم aa-tRNA Synthetase وذلك من خلال خطوتى التفاعل الأنزيمى الذى يقوم بها هذا الأنزيم، وبذلك يمكن أن يحدث التمييز أو التفريق بين الأيزوليوسين والفالين مرتين وبالتالى تنخفض نسبة الخطأ إلى $١٠^{-٢} \times ١٠^{-٢} = ١٠^{-٤}$.

ويبدو الآن أن عملية المراجعة تحدث فقط فى تلك الأنزيمات التى لا يمكن الحصول فيها على درجة كافية من الدقة فى المطابقة فى خطوة واحدة للاختيار. فمثلا تبين حديثا من دراسة التركيب الدقيق لأنزيم Tyrosyl-tRNA Synthetase أن هذا الأنزيم باستطاعته التمييز بين حامضين أمينيين متشابهين جدا وهما الفينيل الانين والتيروسين عن طريق تكوين روابط هيدروجينية نوعية

مع مجموعة OH للتيروسين وهناك مجموعات أخرى من الأحماض الأمينية يتم فيها عملية التمييز بدون الحاجة إلى مراجعة مثل الاسبارجين وحامض الاسبارتيك؛ السيتوسين والهستيدين؛ الليسين والتربتوفان.

دور الريبوسومات فى تكوين الروابط الببتيدية:

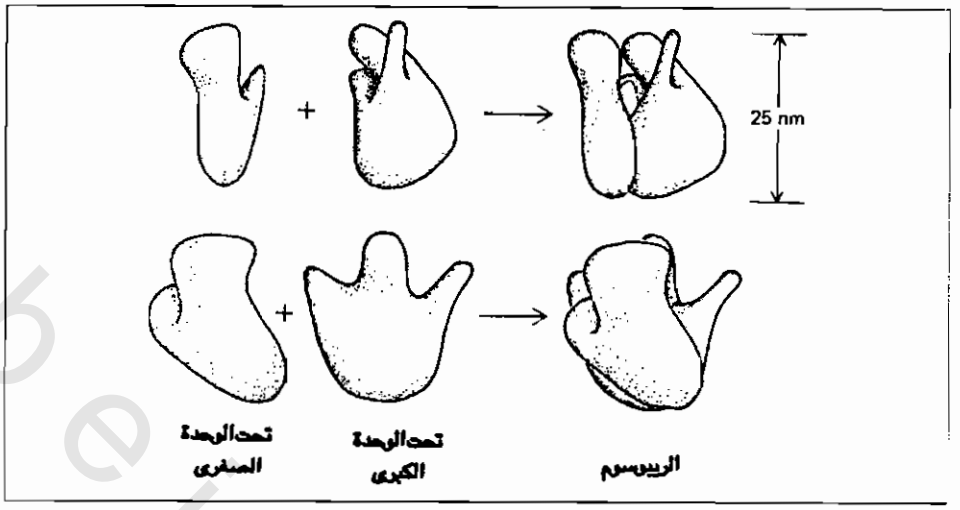
يعد تكوين الرابطة الببتيدية بمثابة التفاعل الرئيسى فى عملية بناء البروتين حيث ترتبط مجموعة الكربوكسيل (COOH-) فى النهاية النامية لسلسلة متعدد الببتيد بمجموعة الأمين (NH_2-) الحرة للحامض الأمينى المضاف، وبالتالى فإن البروتين يتم بناؤه خطوة خطوة من النهاية الطرفية الأمينية إلى النهاية الطرفية الكربوكسيلية. ويلاحظ أنه على مدى مرحلة بناء البروتين بأكملها تظل النهاية الكربوكسيلية لسلسلة متعدد الببتيد النامية منشطة Activated عن طريق الرابطة التساهمية بينها وبين جزئ tRNA الببتيدى Peptidyl~ tRNA ويتم كسر هذه الرابطة التساهمية الغنية بالطاقة عند إضافة كل حامض أمينى. إلا أنها تعوض مباشرة عن طريق تكوين رابطة تساهمية جديدة مشابهة تتم عند إضافة أحدث حامض أمينى كما فى الشكل (٩-٦) وبهذه الطريقة يحمل كل حامض أمينى عند إضافته طاقة التنشيط المطلوبة لإضافة الحامض الأمينى التالى له وليست تلك الخاصة بإضافته هو نفسه.



الشكل (٩-٦): نمو سلسلة متعدد الببتيد خطوة خطوة بإضافة حامض أميني في كل خطوة إلى النهاية الكربوكسيلية الغنية في الطاقة الموجودة في الرابطة التساهمية المتكونة من ارتباطها مع جزئ tRNA

وقد تبين أن عملية تكوين الرابطة الببتيدية تتم على الريبوسومات، وهي تلك الحبيبات الكروية التي تعد بمثابة السطح Work Bench الذي يتم عليه عملية بناء البروتين، لأنه لا يمكن بناء البروتين حرا في السيتوسول، نظراً للحاجة إلى تنظيم عملية ترجمة كل كودون في mRNA في تتابع مضبوط وفي تنسيق تام مع مضاد الكودون الموجود في tRNA دون أي خلل قد يؤدي إلى تغيير في إطار القراءة وتقوم الريبوسومات بهذا الدور التنسيقي الهام.

وتتكون الريبوسومات من معقدات كبيرة الحجم نسبيا من ر ن أ والبروتينات. ويتشابه تنظيم ووظيفة الريبوسومات في غير مميزة النواة وفي مميزة النواة بصفة عامة في احتواء كل منهما على تحت وحدة كبيرة Subunit وأخرى صغيرة ترتبطان معا لتكوين معقد ذو وزن جزئيي مرتفع جدا كما في الشكل (٩-٧).



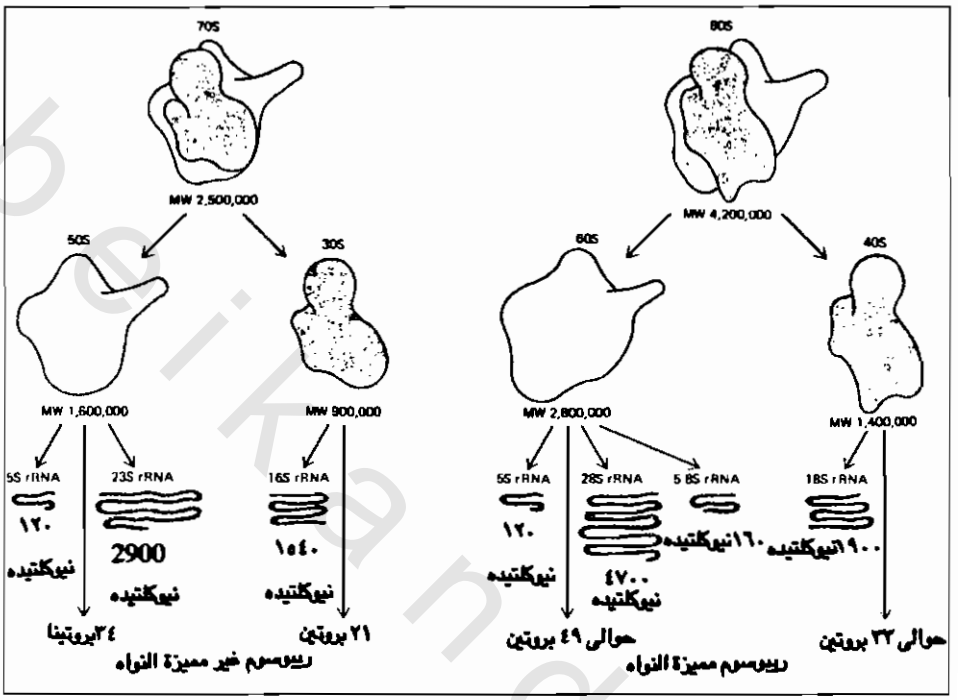
الشكل (٩-٧): نموذج ثلاثى الأبعاد للريبوسوم البكتيرى كما يرى من زاويتين مختلفتين

تبين أن تحت الوحدة الصغيرة فى الريبوسوم تقوم بالربط بين mRNA و tRNA، فى حين تقوم تحت الوحدة الكبيرة بالمساعدة فى تكوين الرابطة الببتيدية بين الأحماض الأمينية فى سلسلة متعدد الببتيد.

وجد أن حوالى أكثر من نصف وزن الريبوسومات عبارة عن rRNA وتوجد أدلة متزايدة على أن جزئيات rRNA تلعب دوراً رئيسيا فى النشاط الحفزى (الأنزيمى).

يحتوى الريبوسوم على عدد كبير من البروتينات إلا أن معظمها لم تعرف له وظيفة محددة بعد مما يرجح أن بروتينات الريبوسوم تقوم أساسا بتنشيط أو تحفيز وظيفة rRNA وأن جزئيات rRNA وليست البروتينات الريبوسومية هى التى تساعد فى كثير من التفاعلات الأنزيمية التى تتم على الريبوسوم. تجدر الإشارة هنا إلى أنه لم تتوفر حتى الآن معلومات تدل على إمكان احتواء rRNA

على أى معلومات وراثية أو على قيامه بدور القالب فى عملية الترجمة. ويلخص الشكل (٩-٨) المقارنة بين تركيب الريبوسومات فى غير مميزة النواة وفى مميزة النواة.



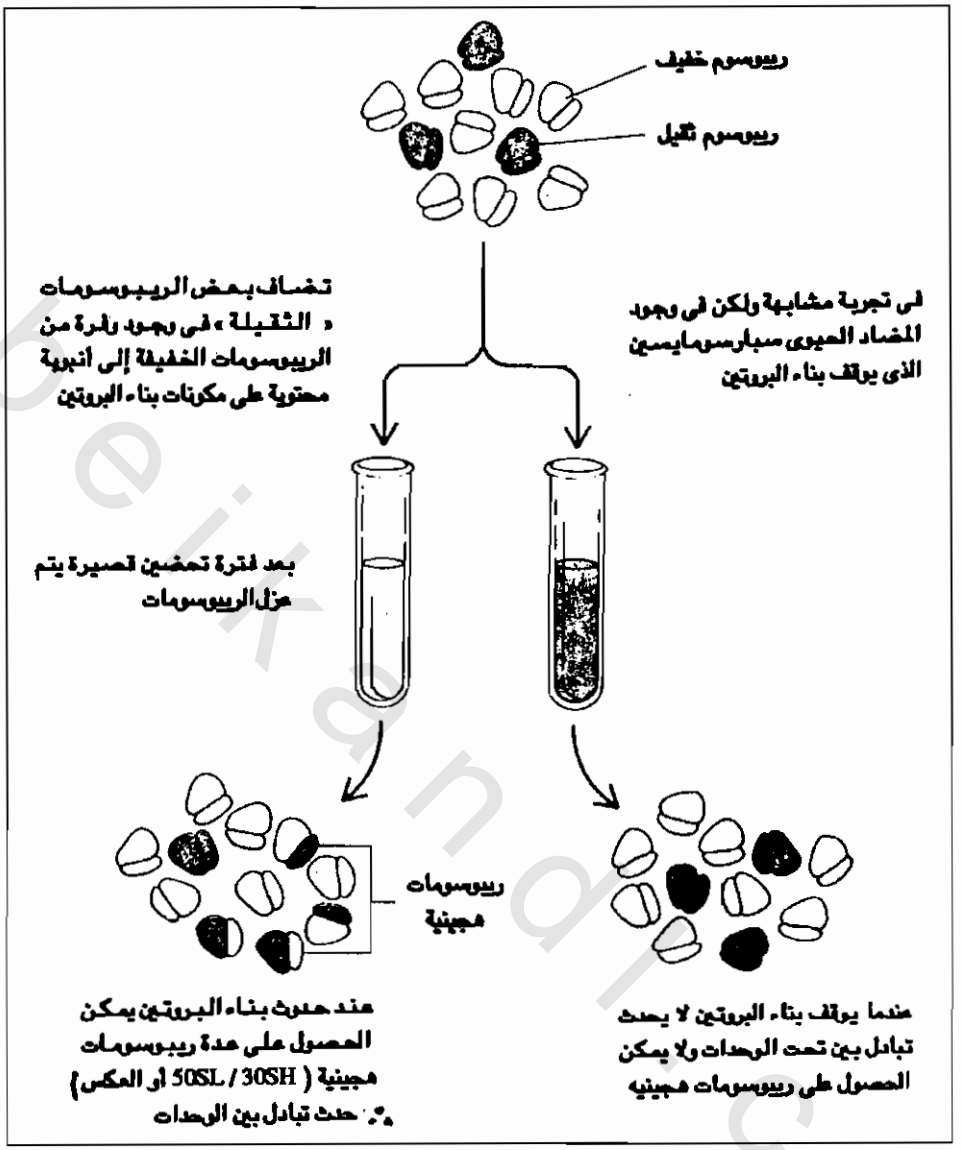
الشكل (٩-٨): مقارنة بين تركيب ريبوسومات غير مميزة النواة ومميزة النواة

تبين أن تحت الوحدتين المكونتين للريبوسوم لا تكونان مرتبطتين بصفة دائمة ولكن يتم ارتباطهما فقط عندما يبدأ اشتراك الريبوسوم فى عملية بناء البروتين، ثم ينفصلان مرة أخرى عند الانتهاء من ترجمة آخر شفرة (كودون) على mRNA لتبدأ دورة جديدة وهكذا. وقد استدل على ذلك من تجارب تمت على بكتريا القولون وفى الخميرة، حيث أظهرت تلك التجارب أن معظم الريبوسومات يتم تفكيكها إلى تحت وحداتها وإعادة اتحادها بصفة دورية. إذ أنه

عند تنمية الخلايا فى نظائر مشعة (ثقيلة) ثم نقلها إلى بيئة غير مشعة (خفيفة) بدأت تظهر ريبوسومات هجينية :

(H 50 S/L 30 S أو L 50 S /H30S) ويدل معدل ظهورها على أن تحت الوحدات يتم تبادلها بمعدل مرة فى كل دورة بناء للبروتين. وقد تم التأكد من ذلك بتجربة معملية لبناء البروتين *In Vitro* حيث يمكن متابعة مصدر الريبوسمات الثقيلة (المشعة) فى وجود كمية فائضة من الريبوسومات الخفيفة (غير المشعة). ففى خلال حوالى دقيقة (وهى الفترة التى يستغرقها بناء سلسلة كاملة من البروتين فى البكتريا) وجد أن معظم الريبوسومات الثقيلة قد اختفت فى نفس الوقت الذى ظهرت فيه ريبوسومات هجينية (H 50S/L 30S أو L 50S/H 30S) كما فى الشكل (٩-٩).

ومما يؤكد أن هذا التبادل بين تحت الوحدات يعتمد كلية على عملية بناء البروتين، تبين أنه عند إضافة المضاد الحيوى Sparsomycin الذى يوقف استطالة سلسلة متعدد الببتيد، فإنه فى نفس الوقت يمنع التبادل بين تحت وحدات الريبوسوم كما هو موضح بالشكل (٩-٩).

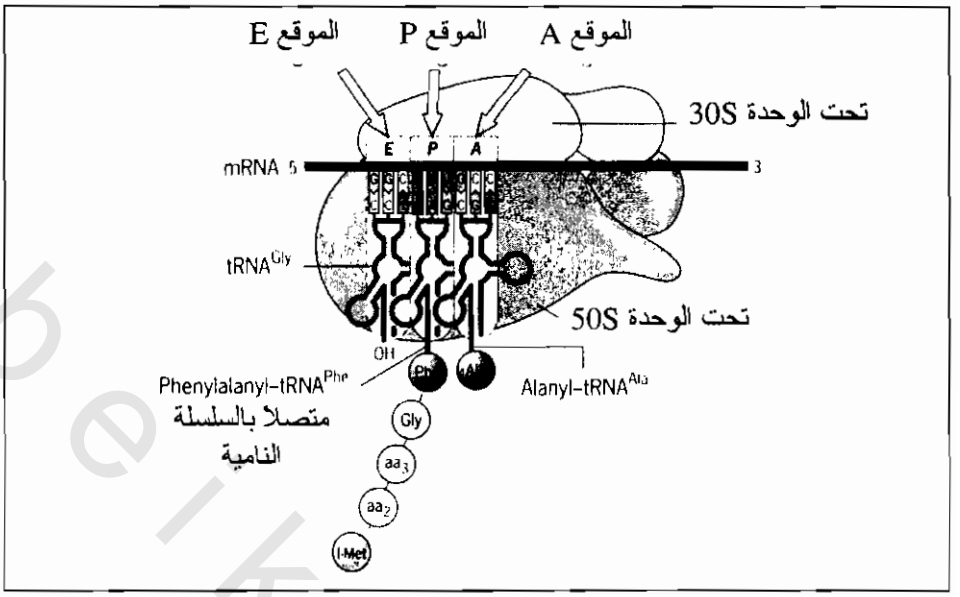


الشكل (٩-٩): الاعتماد الاجبارى لتبادل تحت وحدات الريبوسوم على عملية بناء البروتين

تحرك الريبوسومات خطوة خطوة على سلسلة mRNA القالب:

يحتوى الريبوسوم على أربعة مواقع للارتباط بجزئيات ر ن أ وهى : موقعا خاصا للارتباط بسلسلة mRNA ويوجد فى تحت الوحدة الصغيرة 30S وثلاث مواقع لارتباط tRNA ويشترك فى تكوينها تحت الوحدات 30S، 50S معا. وهذه المواقع الثلاثة الأخيرة تسمى أحدهما موقع ارتباط tRNA الببتيدى Pepitidy1 - tRNA Binding Site أو الموقع "P" "P-site" وهو الذى يتصل به جزئ tRNA المرتبط بالنهاية النامية لسلسلة متعدد الببتيد. أما الموقع الثانى فيسمى موقع ارتباط امينواسيل tRNA. Aminoacyl- tRNA Binding Site أو "A site" ويرتبط به جزئ tRNA التالى والمحمل بالحامض الأمينى المراد إضافته إلى السلسلة النامية لمتعدد الببتيد. أما الموقع الثالث فيسمى موقع الخروج "E Site" "Exit Site" فيصل إليه tRNA بعد تفريغ شحنته من الحامض الأمينى الخاص به تمهيدا لإنفكاك هذا الجزئ من tRNA وتركه للريبوسوم ليشترك فى دورة جديدة من الارتباط مع جزئ جديد من نفس الحامض الأمينى المتخصص فيه (الشكل ٩-١٠).

ولكى يكون ارتباط جزئ tRNA بأى من الموقعين قويا، لابد أن يكون التزاوج صحيحا بين مضاد الكودون فى هذا الجزئ النوعى من tRNA وبين الكودون الثلاثى المقابل فى سلسلة mRNA المرتبط بالريبوسوم. كما أن الموقعين P,A يحتلان مكانين متجاورين بشدة على الريبوسوم لدرجة أن جزيئيى tRNA المحتلان لهما لا توجد أمامها فرصة إلا تكوين تزاوج مع الكودونين المتجاورين مباشرة فى جزئ mRNA كما فى الشكل (٩-١٠).



الشكل (٩-١٠): يحتوى كل معقد من ريبوسوم - م رن أ على ثلاثة مواقع لإرتباط aa-tRNA ويتم شغل الموقع A بمعقد Alanyl tRNA فى حين يتم شغل الموقع P بمعقد Phenylalanyl-tRNA*phe* وترتبط سلسلة متعدد الببتيد النامية تساهميابمعقد Phenylalanyl-tRNA ويتم شغل الموقع E بجزئ tRNA gly قبل تحريره من الريبوسوم

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

مراحل عملية بناء البروتين :

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

١- مرحلة البدء Initiation

٢- مرحلة الاستطالة Elongation

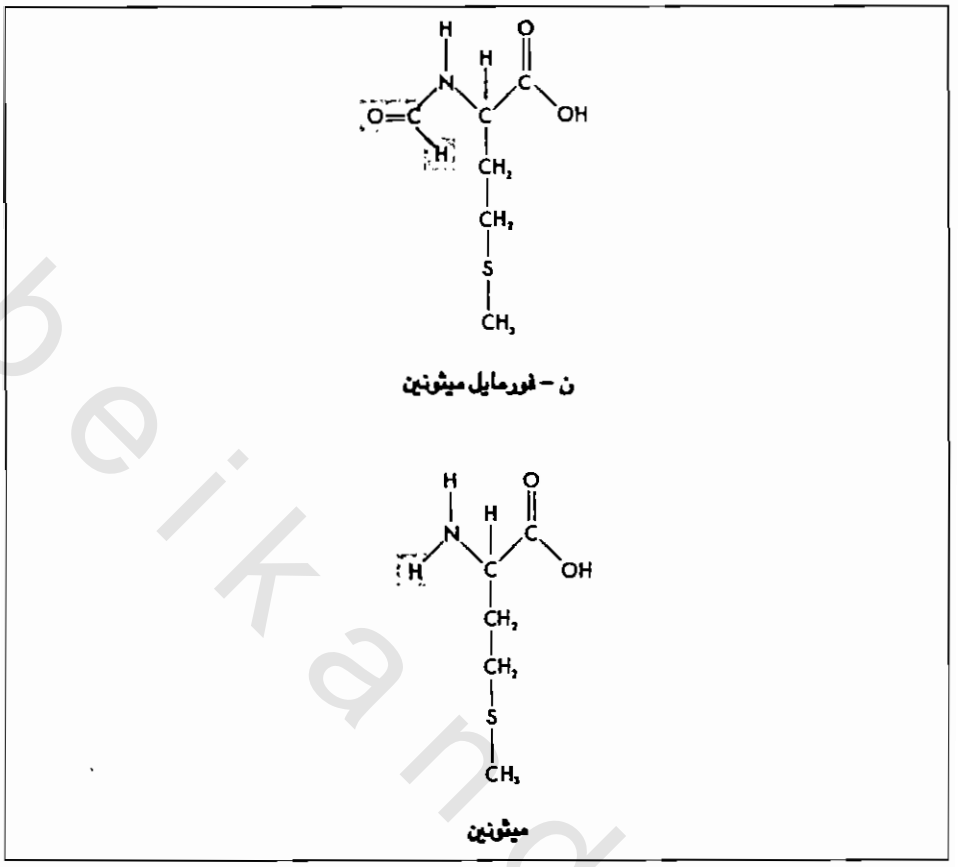
٣- رحلة الإنهاء أو الإيقاف Termination

أولاً: مرحلة البدء Initiation:

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

وقد تبين أنه بالنسبة لمعظم البكتريا يكون الحامض الأمينى الأول فى السلسلة هو Methionine N-Formyl (وهو عبارة عن حامض الميثونين بعد تعديله بإضافة مجموعة فورمات إلى مجموعة الأمين الطرفية) (الشكل ٩-١١).

obeikandl.com



الشكل (٩-١١): المقارنة بين ن. فورمايل الميثونين والميثونين

وبذلك يتم شغل مجموعة الامين الطرفية مما يؤدى إلى منع إمكان إضافة هذا الحامض المتحور فى الأماكن الداخلية بالسلسلة أثناء مرحلة الاستطالة نظرا لأن مجموعة الأمين تكون غير حرة نتيجة لارتباطها بالفورمات. تتم إضافة مجموعة الفورمات أنزيميا إلى المثيونين بعد أن يرتبط هذا الأخير بجزئ tRNA الخاص به. فقد تبين أن هناك نوعين من $tRNA^{Met}$. أحدهما متخصص فى حمل مثيونين البدء ويسمى $tRNA_i^{Met}$. وهذا الجزئ يسمح بتفاعل الفورمات

obeikandi.com

فى حين يوجد نوع آخر من $tRNA_m^{Met}$ يقوم بحمل المثيونين الداخلى أثناء مرحلة الاستطالة ولا يحدث عليه تفاعل القورمات ويسمى $tRNA_m^{Met}$ (للمثيونين الداخلى). بينت تحليلات تتابع القواعد فى كلا النوعين من tRNA أن كلا منهما يحتوى على نفس مضاد الكودون (CAU) مما أدى إلى التساؤل عن كيف يتسنى لنفس الكودون (AUG) أن يشفر لكلا من حامض البدء N-Formyl Methionine وكذلك للمثيونين الداخلى فى السلسلة؟ وقد تبين وجود ثلاثة فروق فى التركيب الدقيق لتتابع القواعد بين جزيئى tRNA كما فى الشكل (٩-١٢).

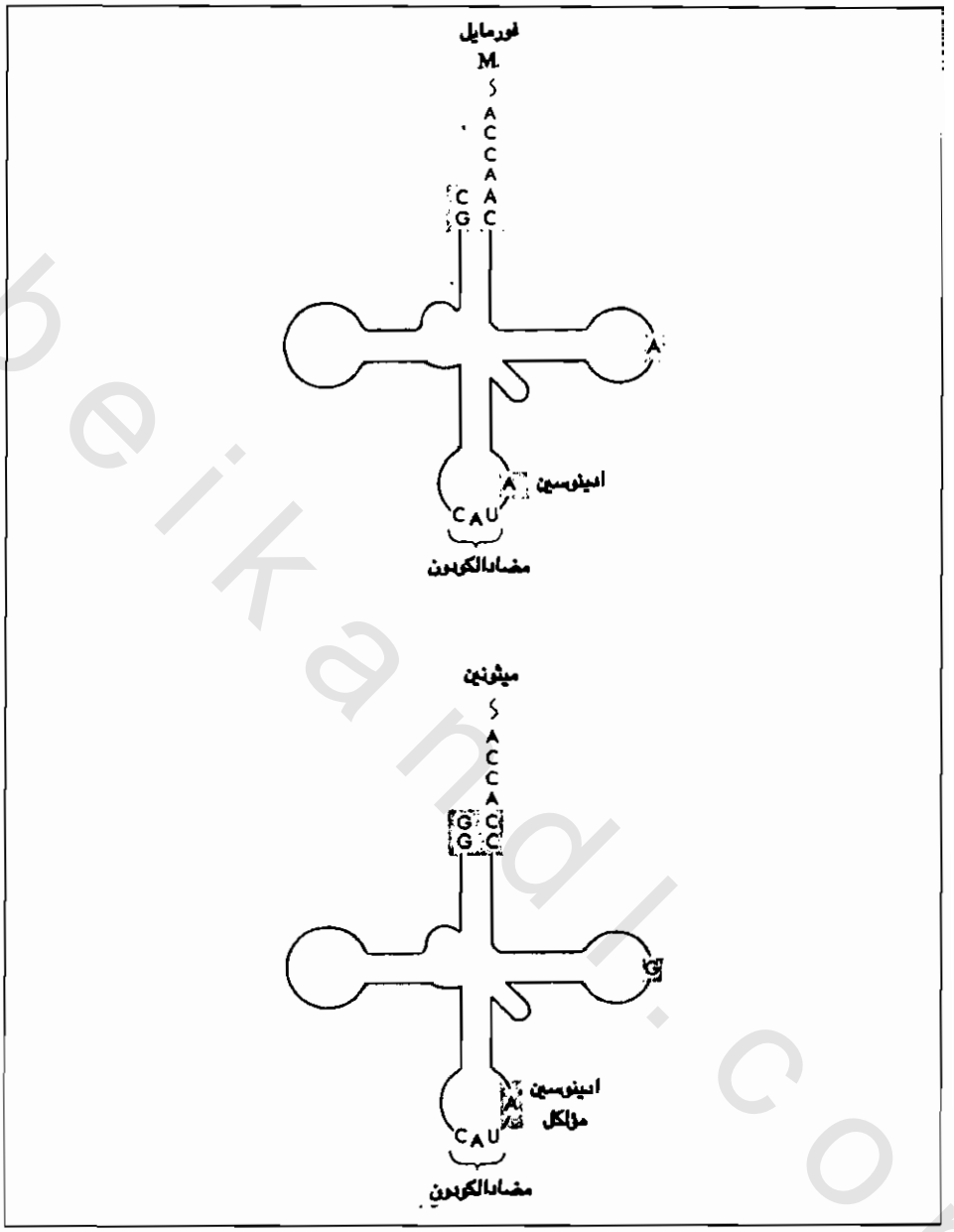
ومن جهة آخرى تبين أن بناء البروتين فى البكتريا يبدأ بتكوين معقد من تحت الوحدة الصغيرة 30S للريبوسوم مع $Met - tRNA_f^{Met}$ و mRNA عند الكودون AUG ثم لاتلبث تحت الوحدة الكبيرة 50S أن تتحد لتكوين الريبوسوم 70S الفعال. ويحتوى كل جزئ من mRNA على موقع ارتباط نوعى بالريبوسوم خاص بكل من البروتينات التى تم بناؤها مستقلة على هذا الريبوسوم.

فعلى سبيل المثال توجد ثلاث مواقع من هذا النوع على RNA لجينوم الفاج R17 الذى يشفر لثلاث بروتينات رئيسية. ويتخلل كل من هذه المواقع تتابعات نيوكلتيدية تكون وظيفتها وضع mRNA بدقة على المكان المحدد من سطح الريبوسوم قبل بدء عملية بناء البروتين. ولكن كيف يتمكن الريبوسوم من التفريق أو التمييز بين كودون AUG البدء، أى عند بداية قراءة الجين، والكودون نفسه الذى يشفر للمثيونين الداخلى؟ أمكن الاجابة على هذا السؤال عندما تم التعرف على أول تتابع بدء عن طريق ربط الريبوسوم مع mRNA

نوعى ثم تلى ذلك المعاملة بانزيم ريبونيوكلييز لتحليل جميع mRNA ماعدا المنطقة المرتبطة بالريبوسوم حيث تكون محمية من التحليل الانزيمى.

وعند تحليل التتابعات المكونة من ٣٠ نيوكلتيدة فى هذه المنطقة المحمية وجد أنها تحتوى على AUG's بالقرب من الوسط متبوعة بنيوكلتيدات تشفر للثلاث أو الأربع أحماض الأمينية الأولى فى سلسلة متعدد الببتيد. وقد وجد أن هذه النيوكلتيدات يتم التعرف عليها نوعياً بواسطة تحت الوحدة الريبوسومية الصغيرة 30S وأن هذا التتابع يختلف من جين الى آخر. ولكن وجد أن هناك مجموعة مكونة من ٣ إلى ٩ نيوكلتيدات بيورينية تقع فى الجهة '5 من المنطقة المحمية فى mRNA ويعتبر هذا التتابع القصير من القواعد هاما جداً لربطه بالريبوسوم. وجد أن معظم مواقع ارتباط الريبوسوم تحتوى على تتابعات مثل: AGGA أو GAGG تقع على بعد حوالى ٨ إلى ١٣ نيوكلتيدة قبل كودون البدء.

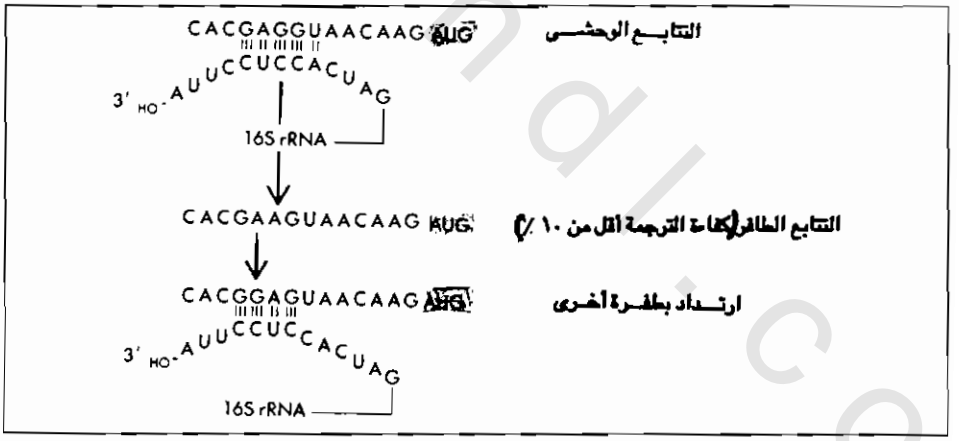
وتتزاوج هذه التتابعات مع تتابعات مكملة لها موجودة فى منطقة غنية بالبيريميدنات فى النهاية '3 لسلسلة
.(5' GAUCACCUCCUUA-OH 3') : 16S rRNA



الشكل (٩-١٢): مواقع الاختلافات بين ن – فورمايل مثيونين $tRNA^{Met}$ وميثونيل $tRNA^{Met}$

obeikandl.com

يؤدى هذا التزاوج إلى وضع كودون البدء AUG فى موقع يسمح له بالارتباط بمضاد الكودون الخاص بجزئ $F\ Met\ tRNA_f^{Met}$ الخاص بالبدء والمرتبط بتحت الوحدة 30S. وبذلك تكون القدرة على تكوين تفاعلين منفصلين لتزاوج القواعد فى نفس الوقت: mRNA/tRNA (مضاد الكودون/ الكودون) وبين mRNA/16S rRNA أى بين (mRNA/30SrRNA) هى التى تسمح بالتمييز بين منطقة البدء الحقيقية وبين المواقع الآخرى الداخلية التى قد تحتوى على الكودون AUG الذى يشفر للمثيونين الداخلى. وكما هو متوقع فإن الطفرات التى تؤدى إلى تغيير فى المنطقة الغنية فى البيورين فى موقع ارتباط الريبوسوم تؤدى إلى خفض كفاءة ترجمة mRNA ويمكن استعادة كفاءة الترجمة باستخدام طفرة اخرى تستعيد التكامل فى تزاوج القواعد للنهاية 3' فى 16S rRNA حتى ولو كان التتابع مختلف عن ذلك الذى فى mRNA الأصلى كما فى الشكل (٩-١٣).



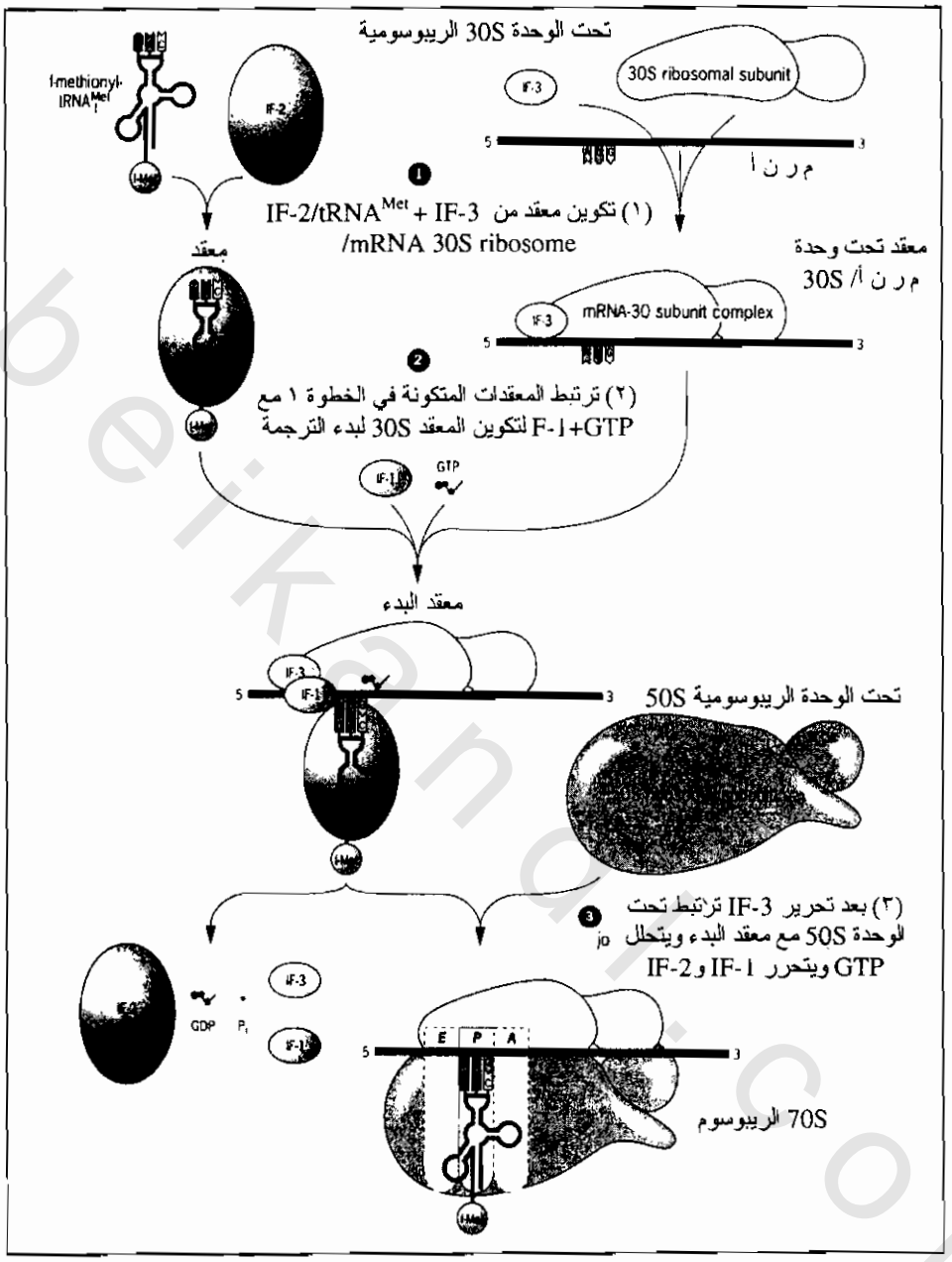
الشكل (٩-١٣): تتابع منطقة البدء عند بداية سلسلة mRNA للجين ٠,٣ فى الفاج T7 ويؤدى تفاعلها مع النهاية 16S rRNA إلى وضع الريبوسوم فى مكان البداية الصحيح على شريط mRNA لبدء الترجمة. وتؤدى طفرة استبدال متماثل من نوع G إلى A الى وقف هذا التفاعل. ويمكن استعادة هذه الوظيفة لو حدث طفرة استبدال متماثلة اخرى (A إلى G) فى موقع قريب. يبدو كودون البدء AUG مظللاً فى هذا الشكل

عندما تبدأ استطالة سلسلة متعدد الببتيد لابد أن يحدث انفكاك للتزاوج الحادث بين القواعد بين 16S rRNA, mRNA وذلك لكى يصبح mRNA حر الحركة على سطح الريبوسوم. تؤدى هذه الحركة إلى أن يصبح الريبوسوم على اتصال بمناطق mRNA التى لم يكن من الممكن أن يرتبط بها فى السابق لولا أن عملية البناء قد استهلت فى المنطقة السابقة. ولضمان استمرار حركة الريبوسوم فإنه لابد أن يتم فك مؤقت لمناطق الحلزنة المزدوجة (المكونة لدبوس الشعر Hairpin) الموجودة على مناطق mRNA أمام الريبوسوم، وبذلك تتكون مناطق مفردة السلسلة يمكنها أن تشارك فى عملية الترجمة.

عوامل البدء (IF) Initiation Factors:

تبين أنه إلى جانب ضرورة وجود mRNA, N-formyl-Met $tRNA_F^{Met}$ وتحت الوحدات الريبوسومية 30S و 50S، فإنه لابد لكى تبدأ عملية بناء البروتين أن تتوفر ثلاث بروتينات نوعية مختلفة تكون مرتبطة قليلاً بالريبوسوم وتسمى عوامل البدء وهى : IF1, IF2, IF3 كما فى الشكل (٩-١٤).

فى الخطوة الأولى يتم ارتباط هذه العوامل الثلاثة بتحت الوحدة 30S، ويساعد GTP على استقرار ارتباط هذه العوامل. ومن المرجح أنه يرتبط مباشرة بالعامل IF2. يمنع العامل IF3 الاتحاد بين تحت الوحدتين 50S, 30S ولذلك فقد عرف فى البداية بعامل تفكك الريبوسوم.



الشكل (٩-١٤): مرحلة بدء الترجمة فى بكتريا القولون

ويعتقد الآن أن العامل IF3 يؤدى إلى تغيير دقيق فى شكل تحت الوحدة 30S مما يمنع اتحادها بتحت الوحدة 50S ويساعد فى نفس الوقت على الارتباط بين تحت الوحدة 30S وبين mRNA. يساعد العامل IF1 على ارتباط كلا من IF2 و IF3. وبين الجدول (٩-١) الوزن الجزيئى لعوامل البدء IF وكذلك عوامل الاستطالة (EF) وعوامل الانهاء أو الانفكاك (RF) كما سيأتى بعد. فى الخطوة التالية يتم ارتباط mRNA , F Met $tRNA_f^{Met}$ بمعقد IF-30S-GTP. وفى هذا التفاعل يحدث ارتباط وثيق بين Met $tRNA_f^{Met}$ مع المعقد IF2-GTP، وبمجرد تكوين معقد البدء 30S Initiation Complex ينفصل العامل IF3 ويلى ذلك ارتباط تحت الوحدة 50S بمعقد البدء مما يؤدى إلى التحليل المائى لجزئ GTP وانفصال عاملى البدء الآخرين. ويطلق على المعقد النهائى معقد البدء 70S Initiation Complex.

اتجاه الترجمة 3' ← 5':

بعد أن يتم الارتباط الصحيح بين منطقة البدء لجزئ mRNA ومعقد البدء والريبوسوم يتحرك الريبوسوم فى اتجاه ثابت اثناء بناء البروتين حيث أنه ليست لدية حرية الحركة إلا فى الاتجاه الى اليمين أو الى اليسار، مما يؤكد حقيقة أن جزئ mRNA له اتجاه ثابت ومحدد فى القراءة بحيث تقرأ النهاية 5' أولاً وتستمر القراءة متجهة إلى نهاية 3' ومما يدل على ذلك أنه وجد في البكتريا أن الريبوسوم يمكنه أن يرتبط بسلسلة غير تامة البناء من mRNA أثناء نسخها على قالب د.ن.أ. وعلى العكس من ذلك إذا كان بناء البروتين يتم فى الاتجاه 5'→3' فإن ذلك يعنى أنه لا تبدأ ترجمة جزئ mRNA فى البكتريا الا بعد الانتهاء تماما من نسخه على قالب د.ن.أ. وانزلاقة أولا من على هذا القالب وهذا

ما لا يحدث فى البكتريا مما يؤكد أن الترجمة تتم فى الاتجاه $3'-5'$ وهو نفس اتجاه النسخ.

الجدول (٩-١) خواص بعض العوامل المشاركة فى بناء البروتين فى بكتريا القولون

العوامل	الوزن الجزيئى بالتقريب	القدرة على الارتباط مع (GDP) GTP	الوفرة النسبية لعدد الريبوسومات
عوامل البدء			
IF 1	٩٠٠٠	–	١
IF 2	١٢٠٠٠	+	$\frac{١}{٧}$
IF 3	٢٢٠٠٠	–	$\frac{١}{٧}$
			$\frac{١}{٧}$
عوامل الاستطالة:			
EF-TU	٤٥٠٠٠	+	١٠
EF-TS	٣٠٠٠٠	+	١
EF-G	٨٠٠٠٠	+	١
عوامل الانهاء:			
RF 1	٣٦٠٠٠	–	$\frac{١}{٢٠}$
RF 2	٣٨٠٠٠	–	١
RF 3	٤٦٠٠٠	+	$\frac{١}{٢٠}$

ثانياً: مرحلة الاستطالة Elongation:

يرتبط $tRNA_F^{Met}$ fMet مباشرة من البداية بالموقع P دون أن يمر على الموقع A بحيث يكون الموقع A مهيئاً لاستقبال الحامض المحمل على tRNA التالى وجد أن عامل البدء IF2 لابد أن يتحرر بالتحليل المائى لجزئ GTP قبل

أن يرتبط aa-tRNA التالى بالريبوسوم. حيث أنه ثبت قطعياً أن جميع جزيئات aa-tRNA ماعدا $f\ Met\text{-}tRNA_F^{Met}$ لابد أن تصل إلى الريبوسوم وترتبط به عند الموقع A.

وتتم عملية الاستطالة على ثلاث مراحل كالاتى:

١- الارتباط بين امينواسيل – ر.ن.أ الناقل Aminocyl- tRNA بالموقع A على الريبوسوم.

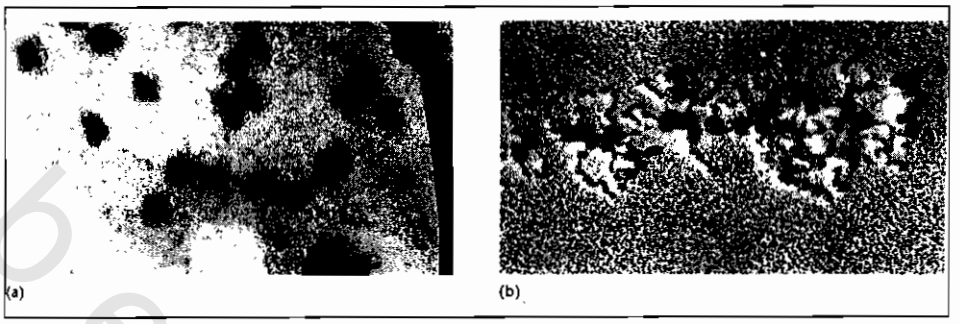
٢- انتقال سلسلة متعدد الببتيد النامية من tRNA الموجود فى الموقع P إلى tRNA فى الموقع A وذلك عن طريق تكوين رابطة ببيتدية جديدة.

٣- انتقال الريبوسوم على mRNA لكى يصل إلى الكودون التالى فى الموقع A. واثناء هذه الخطوة الاخيرة ينتقل المعقد (المكون من سلسلة متعدد الببتيد النامية +tRNA) من الموقع A إلى الموقع P فى حين ينتقل جزئى tRNA بين الموقع P إلى الموقع E ومنه إلى السيتوسول لكى يتم تحميله مرة اخرى بالحامض الامينى النوعى الخاص به.

٤- يصبح الموقع A الخالى الأن حراً لكى يستقبل جزئ جديد من aa~tRNA والذى تتحدد نوعيته حسب تزاوج القواعد الصحيحة بين مضاد الكودون وبين الكودون المقابل فى mRNA.

٥- فى البكتريا ، واثناء مرحلة الاستطالة وبمجرد انتهاء مرور الجزء الأول من mRNA من خلال الريبوسوم، فإن هذا الجزء يصبح حراً للارتباط من جديد مع تحت وحدة صغرى اخرى للريبوسوم لتكوين معقد بدء ترجمة Initiation Compiex جديد. ويمكن لهذه العملية أن تتكرر عدة مرات مع مرور أجزاء جديدة من نفس سلسلة mRNA مما يؤدى إلى

تكوين ما يسمى البوليريبوسوم Polyribosomes أو بوليسوم Polysomes (الشكل ٩-١٥).



الشكل (٩-١٥): البولى ريبوسومات تحت المجهر الإلكترونى

أ - بوليريبوسومات ناتجة من خلايا الأرنب مشاركة فى ترجمة م ر ن أ الهيموجلوبين.

ب- بولير يبوسومات من الخلايا العملاقة لذبابة **Midgefly**.

مصدر الطاقة اللازمة لعملية الاستطالة:

نظراً لأن المجموعة الكربوكسيلية للحامض الأمينى يتم تنشيطها عند ارتباطها تساهمياً بجزئ tRNA النوعى، فقد كان يفترض أنه لا توجد هناك حاجة إلى استهلاك طاقة اضافية لتكوين الرابطة الببتيدية. إلا أنه تبين أن هذا الافتراض غير صحيح. إذ وجد أنه إلى جانب الحاجة إلى جزئ GTP لتكوين معقد البدء Initiation Complex فإن الأمر يتطلب أيضاً تحليل جزيئين آخرين من GTP عند اضافة كل حامض أمينى الى السلسلة النامية. وقد ثبت ذلك عندما تبين أن هناك عوامل استطالة Elongation factors تساهم فى عملية استطالة ونمو سلسلة متعدد الببتيد وأن تلك المساهمة تحتاج إلى استهلاك طاقة من GTP كما سيأتى بعد، علما بأن هذه العوامل لا تشارك مباشرة فى تكوين الرابطة الببتيدية.

دور عوامل الاستطالة Elongation Factors (EF) فى بناء البروتين:

كان يعتقد مبدئياً أن ارتباط جزئ aa~tRNA بالريبوسوم عملية لا انزيمية تحدث عندما يصطدم جزئ Aminoacyl-tRNA بالموقع A المرتبط بالكودون النوعى للحامض الأمينى. غير أنه تبين فيما بعد أن هناك مجموعة من البروتينات الصغيرة تسمى عوامل الاستطالة Elongation Factors (EF) لابد من اشتراكها فى هذه العملية لكى يتم الارتباط بصورة صحيحة (الجدول ٩-١). ويبدأ ذلك عندما يتفاعل أحد هذه العوامل (EF-TU) مع GTP و aa-tRNA لتكوين معقد مكون من: aa ~ tRNA- EF-TU- GTP. ويوجد العامل EF-TU بوفرة فى بكتريا القولون بحيث تساوى عدد جزيئاته عدد جزيئات tRNA فى الخلية البكتيرية. ولابد من توفر GTP لكى يتم ارتباط Aminoacyl- RNA عند الموقع A.

يمكن لهذا العامل EF-TU الارتباط مع أى جزئ من aa~tRNA فيما عدا $Fmet\text{-}tRNA_F^{met}$.ولم تتضح بعد الطريقة التى يتم فيها تمييز ذلك. وبعد ارتباط aa-tRNA بعامل الاستطالة EF-TU فإن المكون aa-tRNA ينتقل إلى الموقع A على الريبوسوم مع انفصال معقد حر من EF-TU-GDP والفوسفات. وجدير بالذكر أن هذا المعقد يفقد نشاطة ولا يمكنه الارتباط مرة اخرى مع Aminoacyl tRNA جديد.

ويتطلب اعادة استخدام EF-TU لربط جزئ جديد من aa~tRNA مع الريبوسوم مساهمة عامل استطالة آخر يسمى EF-TS، حيث يقوم هذا العامل بفصل GDP عن EF-TU ويحل محل الأول ليكون معقد مؤقت مع EF- TU. وعندما يجد هذا المعقد الجديد جزئ GTP يتكون معقد من GTP-EF-TU

وينفصل العامل EF-TS مرة أخرى، ثم يقوم المعقد EF-TU-GTP بربط جزئ آخرى من aa~tRNA بالريبوسوم وهكذا تعاد الدورة.

تبين أن تكون الرابطة الببتيدية يتم بمساعدة انزيم Peptidyl Transferase وذلك على تحت الوحدة 50S. وقد وجد أن هناك ستة بروتينات ريبوسومية على الأقل، وكذلك 23S rRNA ضرورية لنشاط هذا الانزيم. كما أن هناك ستة بروتينات آخرى وكذلك 5S rRNA تساهم هى الآخرى فى هذا النشاط الانزيمى. وبذلك يمكن تخيل انزيم Peptidyl Transferase كمركز نشاط على الريبوسوم يقوم بضبط اصطفاف جزيئين من aa~tRNA بالطريقة المضبوطة للسماح بتكوين الرابطة الببتيدية .

وفى هذه الخطوة تتكون رابطة ببتيدية بين مجموعة الامين فى aa-tRNA فى الموقع A والنهاية الكربوكسيلية للسلسلة الببتيدية النامية المرتبطة مع tRNA فى الموقع P وبالتالى تتصل السلسلة تساهميا مع tRNA فى الموقع A.

وحيث أن جزئيات aa~rRNA تمثل صورة منشطة من الأحماض الأمينية فإن هذا التفاعل لابد أن يكون تلقائيا بدون الحاجة إلى بذل طاقة اضافية.

تبين وجود عامل استطالة ثالث وهو EF-G وهو ضرورى لحركة سلسلة Peptidyl-tRNA من الموقع A إلى الموقع P ويطلق على هذا العامل أيضاً اسم Translocase. وفى هذه العملية يتكون أولاً معقد من EF-G-GTP-Ribosome ثم يحدث الانتقال مقرونا بتحرك جزئ tRNA الحر من الموقعP إلى الموقع E ومنه إلى السيتوسول. ونتيجة لهذه الخطوة يصبح الموقع A خالياً ومهيأ لاستقبال

حامض أميني جديد aa-tRNA. ويتطلب تحرير العامل EF-G من هذا المعقد لاعادة استخدامه حدوث التحليل المائى لجزئ GTP الى GDP وفوسفات حيث تستخدم الطاقة الناتجة لبدء دورة جديدة من الاستطالة على الريبوسوم.

وجد أنه تحت الظروف المثالية لنمو ونشاط بكتريا القولون، يتم بناء سلسلة متعدد الببتيد بطول حوالى ٣٠٠-٤٠٠ حامض أمينى فى حوالى ١٠-٢٠ ثانية، وأنه فى اثناء هذه الفترة لا تبقى السلسلة النامية فى صورة سلسلة مفرودة ولكنها تأخذ بسرعة الشكل الثلاثي الابعاد الخاص بها، وذلك عن طريق تكوين عدة روابط ثانوية بحيث قد تأخذ السلسلة الشكل النهائى للبروتين النوعى قبل اضافة الأحماض الأمينية الأخيرة إلى النهاية الطرفية للسلسلة.

ثالثا: مرحلة انهاء الترجمة (Termination(Release:

تبين أنه لكى يتم انهاء عملية بناء سلسلة متعدد الببتيد لابد أن يتوفر شرطين: أولهما أن يوجد كودون نوعى يعمل كإشارة ايقاف لإستطالة السلسلة، والشرط الثانى هو توفر بروتينات نوعية تسمى بروتينات الأنفكاك أو الأنهاء Release Factors (RF) التى تقوم بقراء اشارات انهاء بناء السلسلة.

ويرجع ذلك إلى حقيقة أنه عندما تصل سلسلة متعدد الببتيد الى تمام استطالتها، فإن نهايتها الكربوكسيلية تظل مرتبطة بأخر جزئ من tRNA وعلى ذلك فلابد لعملية الانهاء أن تشتمل على ازاحة هذا الجزئ الطرفى من tRNA وتحرير مجموعة الكربوكسيل منه. وعندما يتم ذلك تنفك السلسلة الناشئة التامة النمو بسرعة من على الريبوسوم وذلك نظراً لأن ارتباطها بالريبوسوم كان بواسطة هذا الجزئ الأخير من tRNA. تبين وجود ثلاث كودونات فى الشفرة الوراثية متخصصة فى اعطاء اشارة الايقاف لعملية بناء البروتين فى الخلية

وهى UAA, UAG, UGA. إلا أنه تبين أن هذه الكودونات النوعية لايمكن لأى نوع من tRNA التعرف عليها ولكن يتم التعرف عليها فقط بواسطة بروتينات نوعية تسمى عوامل الانفكاك Release Factors (RF).

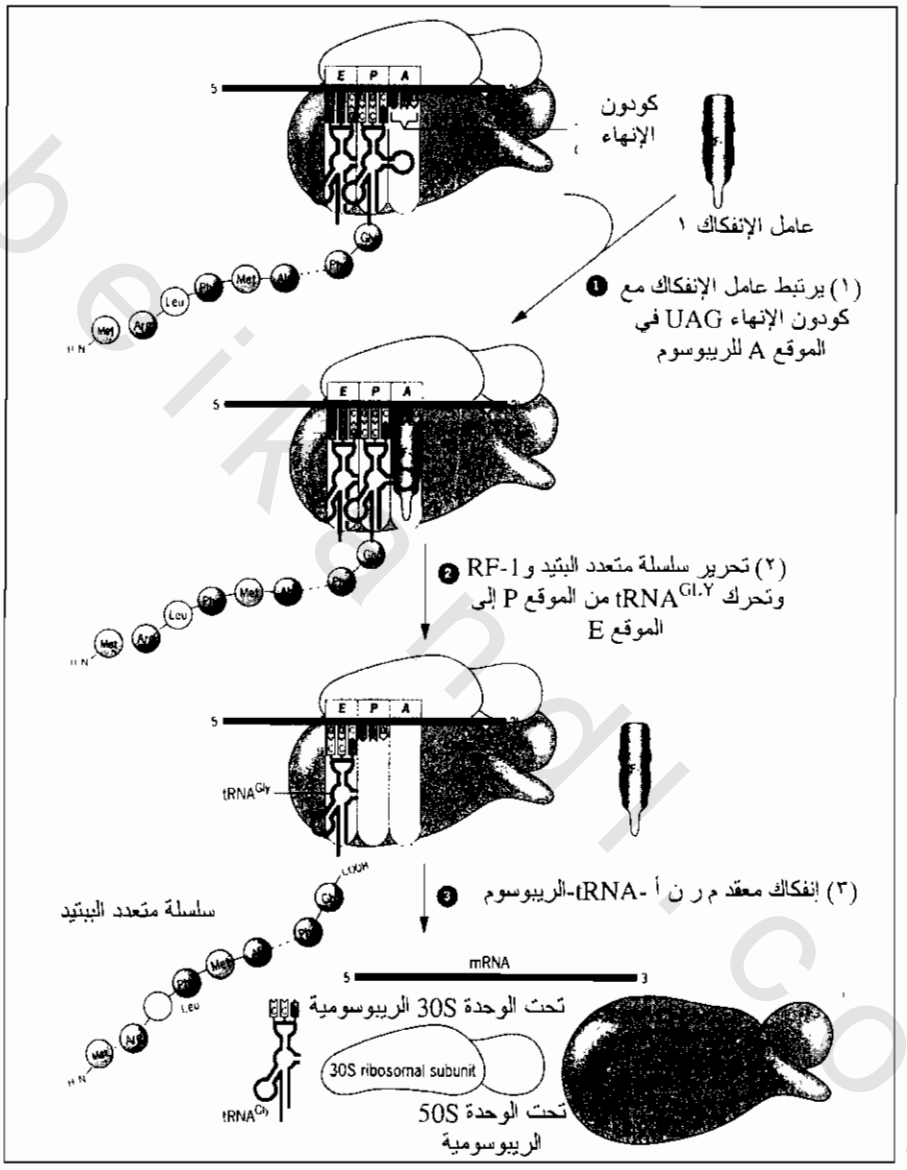
يحتل أحد عوامل الانفكاك الموقع A على الريبوسوم عندما يتم الوصول إلى الكودون الخاص بالانهاء على سلسلة mRNA مما يؤدى ألى منع اضافة أى aa~tRNA جديد الى هذا الموقع. وقد تبين وجود ثلاث أنواع من عوامل الانفكاك فى بكتريا القولون وهى : RF3, RF2, RF1 (جدول ٩-١) ويتعرف العامل RF1 على كودونى الايقاف : UAA, UAG فى حين يتعرف العامل RF2 على كودونى الايقاف : UAA, UGA.

يؤدى ارتباط عامل الانفكاك بالموقع A على الريبوسوم إلى دفع انزيم Peptidy1 Transferase إلى نقل السلسلة الببتيدية التامة النمو إلى جزئ ماء بدلا من جزئ aa~tRNA فتنزلق السلسلة الكاملة متحررة من الريبوسوم نظراً لعدم وجود ما يربطها به، كما تتحرر من جزئ tRNA فى حين يتحرك جزئ tRNA غير المشحون الى الموقع E ومنه إلى السيتوسول.

هناك عامل انفكاك ثالث RF3 وهو يحتاج إلى GTP و GDP لنشاطه، ويبدو أنه يساعد على تحفيز تفاعل الانفكاك وتحرير سلسلة متعدد الببتيد من الريبوسوم. إلا أنه لا يقوم باحتلال الموقع A مباشرة كما يحدث فى العاملين RF2, RF1.

يلى ذلك انفكاك mRNA من موقع ارتباطة على الريبوسوم، وهذا الأخير لا يلبث أن يتفكك الى تحت الوحدتين 30S, 50S اللتان تبحثان عن جزئ

mRNA جديد لبدء دورة جديدة من عملية بناء البروتين. ويبين الشكل (٩-١٦) دور عوامل الانفكاك فى عملية انهاء بناء سلسلة متعددة الببتيد.

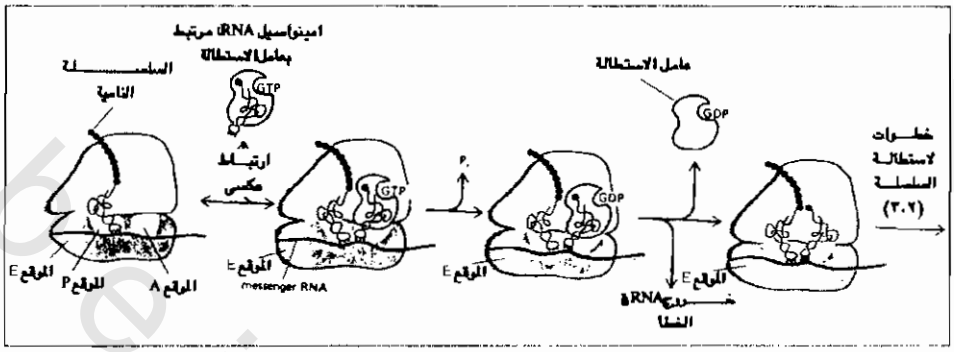


الشكل (٩-١٦): إنهاء ترجمة سلسلة متعدد الببتيد فى بكتريا القولون

دور GTP فى مراجعة أخطاء الترجمة:

عندما يرتبط tRNA بالحامض الأمينى الخاص به، فإنه يكون معقد مع عامل الاستطالة EF الذى يرتبط بقوة مع الحامض الأمينى فى جزئ AA~tRNA من جهة وبجزئ من GTP من جهة أخرى. وجد أن هذا المعقد وليس tRNA فقط هو الذى يتزاوج مع الكودون المناسب فى mRNA. اذ أن وجود عامل الاستطالة المرتبط فى هذا المعقد هو الذى يسمح بالتزاوج الصحيح بين الكودون ومضاد الكودون، ولكنه فى نفس الوقت يمنع مؤقتا الحامض الأمينى من أن يضاف إلى سلسلة متعددة الببتيد النامية. إلا أن هذا التعرف المبدئى للكودون لايلبث أن يدفع عامل الاستطالة الى استهلاك جزئ GTP المرتبط به (بالتحليل المائى إلى GDP + فوسفات) مما يؤدى إلى انفكاك عامل الاستطالة من هذا المعقد على الريبوسوم تاركا جزئ AA ~ tRNA بحيث يصبح فى الامكان أن يستمر بناء البروتين. وكما هو موضح فى الشكل (٩-١٧) فإن عامل الاستطالة يقوم بعملية تأخير قصيرة بين خطوة التزاوج بين الكودون ومضاد الكودون وخطوة استطالة سلسلة متعدد الببتيد مما يعطى فرصة لجزئ tRNA غير الصحيح المرتبط بأن يترك الريبوسوم. إذ أن جزئ tRNA غير الصحيح يعطى عدد أقل من الروابط الهيدروجينية بين الكودون ومضاد الكودون عما يحدث بالنسبة للجزئ الصحيح، بحيث يكون ارتباط الأول ضعيفاً بالريبوسوم وبالتالى يكون أكثر تعرضاً للانفكاك بسهولة أثناء هذه الفترة الوجيزة. وحيث أن التأخير الذى يسببه عامل الاستطالة يؤدى بمعظم جزئيات tRNA غير الصحيحة المرتبطة بالريبوسوم إلى الانفكاك عنه وتركه بدون أن تستخدم فى بناء البروتين، فإن هذا العامل يؤدى إلى زيادة نسبة الأحماض

الامينينة الصحيحة إلى غير الصحيحة المضافة إلى سلسلة متعدد الببتيد، ويتم ذلك بالطبع على حساب استهلاك GTP.



الشكل (٩-١٧): دور GTP فى مراجعة أخطاء الترجمة. فى مرحلة الارتباط المبدئى يتصل جزئ أمينواسيل tRNA المرتبط بعامل الاستطالة ويتزاوج مبدئيا بالكودون على الموقع A. يدفع هذا التزاوج إلى التحليل المائى لجزئ GTP بواسطة عامل الاستطالة مما يسمح لعامل الاستطالة بالانفكاك من جزئ امينواسيل tRNA الذى يمكنه الآن أن يرتبط بدقة فى الموقع A ويشارك فى استطالة السلسلة. يسمح فقط لجزئيات tRNA المحتوية على مضاد الكودون الصحيح بأن تبقى متزاوجة بجزئ mRNA لفترة طويلة نسبيا تسمح باضافتها الى سلسلة الببتيد النامية

البقعة السحرية "PP GPP" Magic Spot:

تبين آنه اذا حدث بالصدفة أن احدى جزئيات tRNA غير المحملة بحامض أمينى قد احتلت الموقع A على الريبوسوم فإن ذلك لايؤدى فقط إلى وقف استطالة سلسلة متعدد الببتيد مؤقتا ولكنه يؤدى ايضا إلى إبطاء التفاعل على الريبوسوم الذى يستخدم فيه ATP كمعطى لثنائى الفوسفات P~P. ويحدث نتيجة لهذا الوضع غير الطبيعى أن يتحول GDP (PP5G-3' OH) إلى النيوكلتيدة غير العادية PP5'-G3'PP والتى يطلق عليها "البقعة السحرية" Magic Spot يتم انتاج هذه البقعة السحرية فقط اذا تمكن tRNA غير المشحون من أن يحتل الموقع A وأن يتزاوج مع الكودون فى mRNA. وفى حين أنه أثناء النمو

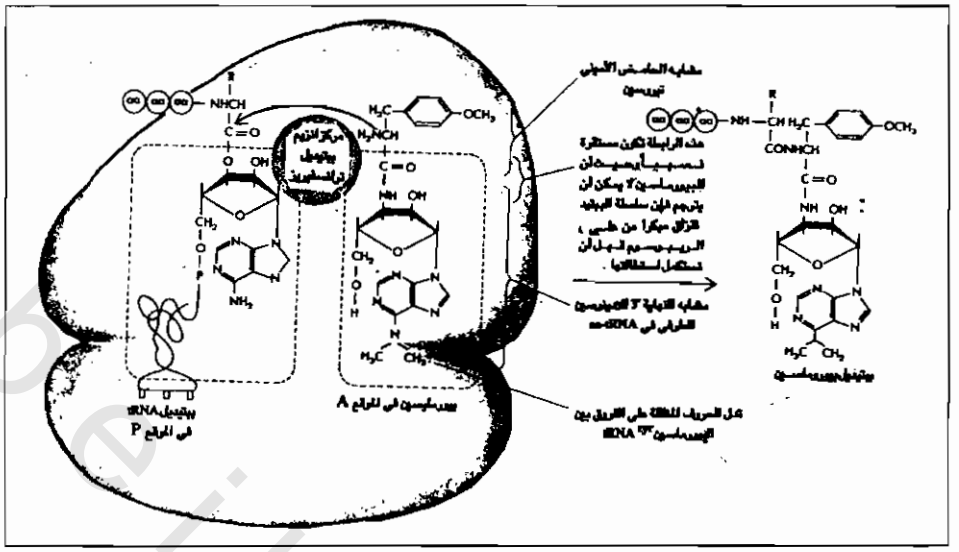
العادى للبكتريا تتكون كميات ضئيلة جداً من PPGPP نجد أنه تتراكم كميات كبيرة منه أثناء مجاعة الخلية. يعتقد أن هذه الجزئيات غير العادية تقوم بدور الاشارات التى توقف نوعيا بناء سلاسل rRNA و tRNA فى الخلية أى انها تقوم بدور تنظيمى للحيلولة دون إنتاج كميات ريبوسومات أكثر مما تستطيع الخلية استخدامة. يطلق على هذا التثبيط النوعى لبناء rRNA و tRNA تحت ظروف المجاعة ونقص الأحماض الأمينية اسم "الاستجابة المحدودة" Stringent Response.

وقد تبين وجود طفرة استرخائية Relaxed Mutation تؤدى إلى الاستمرار فى انتاج tRNA, rRNA على الرغم من نقص الأحماض الأمينية. وقد وجد أن بعض الخلايا الطافرة هذه ينقصها انزيم ذو وزن جزيئى حوالى ٧٥٠٠٠ دالتون. يسمى بعامل الإلزام Stringent Factor وأن هذا العامل هو الذى يرتبط بالريبوسوم ويقوم بتحويل PPG إلى PPGPP.

دور بعض المضادات الحيوية فى وقف بناء البروتين:

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

١- وجد أن البيورومايسين Puromycin، مثبط قوى لنمو جميع الخلايا، وهو يؤدى هذا الدور عن طريق ايقاف نمو واستطالة سلسلة متعدد الببتيد كما فى الشكل (٩-١٨).



الشكل (٩-١٨): دور المضاد الحيوى بيورومايسين فى انهاء استطالة سلسلة متعدد الببتيد

ويرجع ذلك إلى أن هذا المضاد الحيوى يتشابة فى تركيبه مع تركيب النهاية 3' لجزئ AA ~ tRNA (مثل التيروسين أو الفينيل الآنين)، مما يؤدى إلى امكان ارتباطه بالموقع A على الريبوسوم بطريقة فعالة جداً بحيث يحتل هذا الموقع بدلا من AA ~ tRNA والأهم من ذلك أن انزيم Peptidyl Transferase يقوم باستخدام هذا المضاد الحيوى كبديل بحيث ينقل سلسلة متعدد الببتيد الى المستقبلات الموجودة عليه. ونظراً لأن جزئ البيورومايسين صغيرا جدا بالمقارنة بجزئ tRNA لذلك فإن ارتباطه بالموقع A يكون ضعيف جداً مما يؤدى إلى انفكاك سلسلة متعدد الببتيد النامية والمنتهية بالبيورومايسين عن الريبوسوم مما يؤدى الى توقف عملية الاستطالة وانتاج سلاسل ببتيدية غير كاملة بأطوال مختلفة. وتجدر الاشارة هنا إلى أن حقيقة اضافة البيورومايسين إلى النهاية

الكربوكسيلية للسلسلة النامية يؤكد أن بناء البروتين يحدث من النهاية N إلى النهاية C.

٢- حامض الفيوسيديك Fusidic acid: يتدخل هذا المضاد الحيوى فى عملية انطلاق عامل الاستطالة EF-G بعد أن يؤدى دوره فى عملية الانتقال، حيث يؤدى استمرار ارتباط المعقد EF-G-GDP إلى منع ارتباط المعقد التالى:

AA~tRNA-EF-TU-GTP على الموقع A على الريبوسوم والذى لابد أن يسبق أى دورة جديدة للاستطالة، مما يوقف نمو سلسلة متعدد الببتيد.

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

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

ويلخص الجدول (٩-٢) دور بعض المضادات الحيوية فى تثبيط عملية بناء البروتين فى الخلية.

الجدول (٩-٢) دور بعض المضادات الحيوية فى تثبيط بناء البروتين

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

الترجمة فى مميزة النواة :

لا تختلف عملية الترجمة فى مميزة النواة عما يتم فى البكتريا إلا فى قليل من الخواص. حيث نجد أنه فى مميزة النواة يكون حجم جزيئات الريبوسوم أكبر مما فى البكتريا وأن مكوناتها من ر.ن.أ والبروتينات تكون أكثر تعقيدا عما فى البكتريا.

من جهة أخرى نجد أن فترة نصف العمر لجزئ mRNA فى مميزة النواة تكون عادة اطول بكثير عن مثيلتها فى البكتريا وحيث أن معظم mRNA فى مميزة النواة يستمر فعالاً لعدة ساعات وليس لدقائق (فى البكتريا) قبل أن يحدث له هدم بانزيمات الريبونيوكلييز مما يجعله متوافرا لفترة اطول بكثير ليشارك فى بناء كميات أكبر من البروتين. وتوجد بعض الفروق فى مرحلة بدء الترجمة فى مميزة النواة. فقد رأينا كيف يتم تجهيز mRNA بقلنسوة من الجوانين عند النهايه 5'. وقد تبين أن وجود هذه القلنسوة ضرورى للترجمة الفعالة حيث وجد أن mRNA الذى يخلو من القلنسوة لا تتم ترجمته بنفس الكفاءة. وبالاضافة إلى ذلك، تحتوى معظم انواع mRNA فى مميزة النواة على تتابع تعارف يحيط بكودون البدء AUG مكون من التتابع ACCAUGG ويعرف بتتابع كوزاك Kozak. ويبدو أن هذا التتابع يقوم بنفس الوظيفة فى مميزة النواة التى يقوم بها تتابع Shine-Dalgarno فى غير مميزة النواة وكلاهما يقوم بتسهيل الارتباط المبدئى بين mRNA مع نحت الوحدة الصغرى للريبوسوم. وهناك فرق أخر وهو أنه فى مميزة النواة لا تحتاج عملية بدء الترجمة إلى فورمايل ميثيونين إلا أن الكودون AUG فى مميزة النواة يحتاج إلى وجود ($tRNA_{met}$ وهو المختص ببدء الترجمة باضافة حامض الميثيونين. وتتشابة العوامل البروتينية (عوامل البدء والاستطالة والانهاء) فى ترجمة كلا من البكتريا ومميزة النواة

إلا أن الأخيرة تحتوى على اعداد اكبر من هذه العوامل فى كل خطوة، وبعضها يكون أكثر تعقيداً عما فى البكتريا. ومن المعروف أن عدد كبير من الريبوسومات يكون مرتبطاً بأغشية الشبكة الاندوبلازمية الخشنة فى خلايا مميزة النواة، الا أن هذه الاغشية غير موجودة فى سيتوبلازم البكتريا. ويؤدى هذا الارتباط فى مميزة النواة إلى تسهيل أفراز البروتينات حديثة البناء من الريبوسومات مباشرة إلى القنوات الموجودة فى الشبكة الاندوبلازمية حيث يتم توجيه مسارها الافرازى. فى حين نجد أنه فى غير مميزة النوة يحدث انطلاق السلاسل الببتيدية مباشرة من الريبوسومات الى السيتوبلازم.

وأخيراً فإن هناك فرق كبير فى معدل سرعة استطالة سلسلة متعدد الببتيد، ففى البكتريا نجد أن السلسلة تزيد استطالتها بمعدل ١٥ حامض أمينى فى الثانية الواحدة (عند درجة حرارة ٣٧ °م) فى حين يكون هذا المعدل ابطأ بكثير فى مميزة النواة.