اسم المحاضرة : تضاعف المادة الوراثية

رقم المحاضرة : الثالثة

المصادر :

1- **Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.**
2- **Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.**
3- **Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.**

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

تضاعف الدنا Replication of DNA

تعد عملية تضاعف الدنا DNA Replication من العمليات المعقدة التي تجري داخل الخلية الحية لانها تتضمن العديد من الخطوات التي تعتمد كل منها على العديد من الانزيمات التي تكون عالية التخصص لاتمام هذه العلمية المهة جدا بالنسبة للخلية وتختلف عملية تضاعف الدنا في الخلايا حقيقة النواة عنها في الخلايا بدائية النواة تبعا لتعقيد المادة الوراثية.

أوضحت الدراسات التي اجريت على بكتريا *E.coli* ، ان تكرار الدنا هي عبارة عن عملية انزيمية معقدة تشترك فيها العديد من الانزيمات والعوامل المساعدة لتضاعف جزئية الدنا الحلقية. وتمر عملية التكرار بثلاث مراحل هي .

١-مرحلة بدأ التكرار Initiation of Replicaion

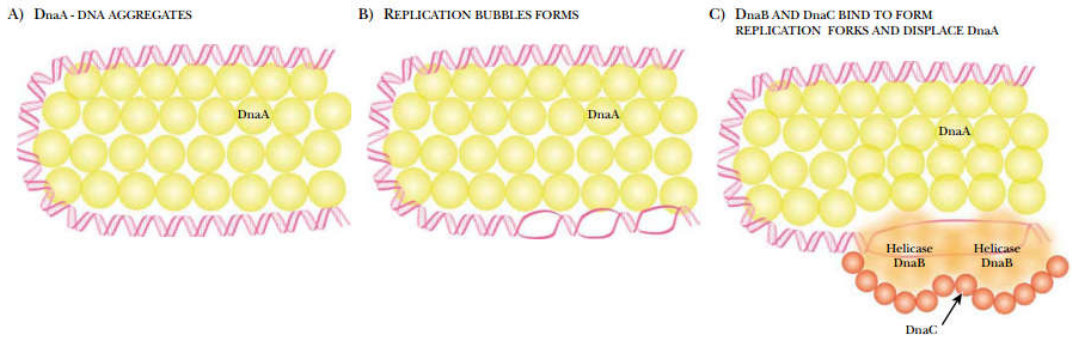
٢- مرحلة الاستطالة و التكرار Replication and Elongation

٣- مرحلة الانتهاء Termination

ان عملية بدأ تضاعف جزيئة الدنا هي ليست بالعملية العشوائية اذ يبدأ تكرار الكروموسوم البكتيري للـ *E.coli* دائما من نقطة ثابتة تدعى بمنشأ التكرار (اصل التضاعف) Origin of Replication (*ori* C) ، حيث ينفك خيطا الحلزون في هذه النقطة و يبتعدان عن بعضهما. تكون منطقة ori C مؤلفة من حوالي ٢٤٥ زوج قاعدي، تكون هذه المنطقة حاوية على منطقتين لتتابعات مكررة قصيرة Short Repeat sequences ، المنطقة الاولى مؤلفة من ٩ نيوكليوتيدات مكررة لخمسة مرات والثانية مؤلفة من ١٣ نيوكليوتيدة مكررة ثلاث مرات.

تكون المنطقة المؤلفة من ٩ نيوكلوتيدات هي موضع ارتباط بروتين يدعى Dna A يكون هذا البروتين مؤلف من ٣٠ وحدة ثانوية ترتبط مع بعضها البعض مكونة شكلا شبيه بالبرميل يرتبط مع المنطقة الاولى والثالثة والخامسة من التتابع المكرر (٩ نيوكليوتيدات). يكون ناتج هذا الارتباط حدوث فتحة في شريط الدنا (melts) في مناطق التكرار الثلاثة المؤلفة من ١٣ نيوكليوتيدة التي تكون غنية بـ A و T نتيجة ابتعاد خيطي الدنا عن بعضهما وتشير الدراسات إلى ان البروتين Dna A لا يملك فعالية انزيمية لاحداث تغيير في تركيب شريط الدنا وتحويله من شريط مزدوج إلى شريط مفرد وان عملية ابتعاد الشريطين عن بعضهما هو نتيجة للضغط الناتج من ارتباط البروتين مع الدنا.

يتم بعد ذلك ارتباط الدنا مع بروتين اخر هو Dna C في منطقة انفتاح الشريط والذي يعمل على تهيئة هذه المنطقة للارتباط ببروتين اخر هو انزيم Helicase والذي يعرف كذلك بـ Dna B



يقوم انزيم Helicase بفك الازدواج القاعدي لخيطي الدنا الابوية وتحويلها الى خيوط منفردة single strand وتبقى خيوط الدنا منفردة ولا تعود الى الازدواج نتيجة ارتباطها ببروتينات تسمى Single Strand Binding proteins التي تعمل على المحافظة على خيوط الدنا بشكل منفرد غير مزدوج .

يتكون نتيجة فعالية انزيم Helicase انفتاح في شريطي الحلزون المزدوج مكونة تركيب يشبه الشوكة يسمى بشوكة التضاعف Replication Fork وتسبق شوكة التضاعف عملية تحويل خيطي الدنا الحلزوني الى خيطين متوازيين نتيجة لفعالية انزيم Gyrase لتسهيل مهمة انزيم Helicase. تنتهي مرحة بدء التكرار بتكوين شوكة التضاعف لتبدأ بعدها مرحلة الاستطالة .

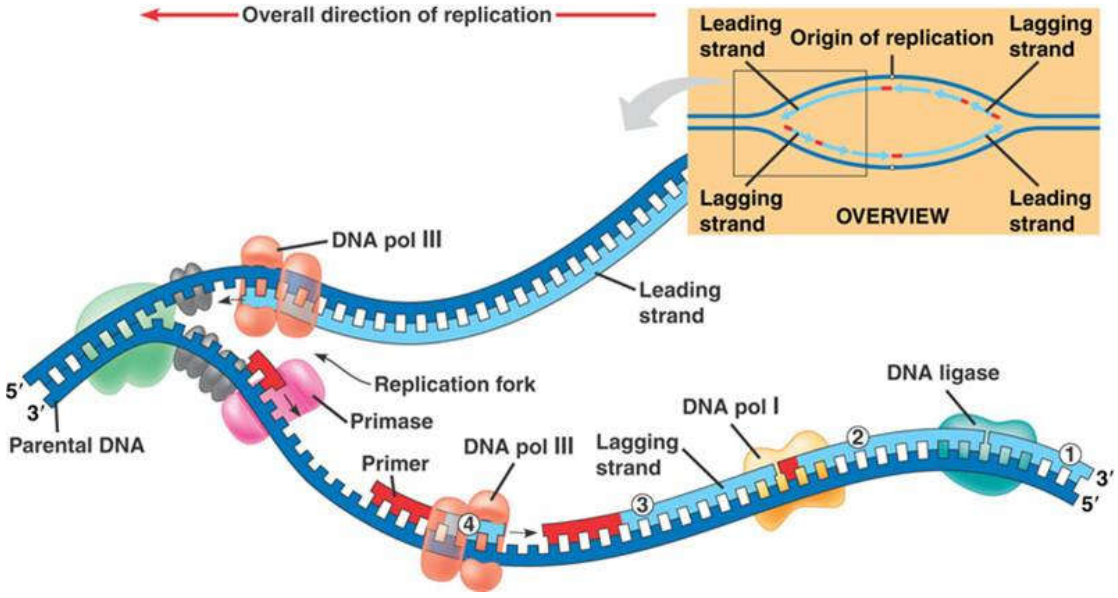
يمتلك الكروموسوم البكتيري منشأ تكرار واحد وتسمى عملية التكرار بالتكرار ثنائي الاتجاه Bidirectional Replication وذلك لحدوثه في اتجاهين مختلفين حيث يتم تخليق ٥٠% من الدنا الجديدة في كل اتجاه. اما في الخلايا حقيقة النواة فيلاحظ وجود اكثر من منشأ للتكرار عى سبيل المثال تملك الخمائر ٣٠٠ منشا للتكرار في حين يحتوي الانسان على ٢٠ الف منشأ للتكرار

مرحلة الاستطالة

يكون انزيم بلمرة الدنا DNA polymerase III هو الانزيم الرئيسي لعملية الاستطالة حيث يقوم ببناء الخيوط البنوية الجديدة اعتمادا على الخيوط الابوية المتباعدة والتي يستخدمها كقالب Tmplate لبناء الخيوط البنوية الجديدة حسب نظرية الازدواج القاعدي. يقوم انزيم DNA polymerase III ببناء خيوط الدنا الجديدة باتجاه 5' 3' فقط ولكن لا يمكن ان يبدأ هذا الانزيم عمله الا اذا توفرت نهاية 3-OH حرة لكي يبدأ هذا الانزيم بعمله في اضافة القواعد النيتروجينية لذا يقوم انزيم يسمى primase وهو من انزيمات RNA Polymerase ، بتخلق خيط قصير من RNA مؤلف من ٥-١٠ نيوكليوتيدات ذي تتابع مكمل لخيط الدنا الابوي تعمل كبوادئ primers لبدء فعالية انزيم بلمرة الدنا ، ترتبط قطعة RNAعن طريق الأواصر الهيدروجينية ببداية الخيط الابوي مكونة بادئا ذي نهاية3-OH حرة تستعمل لإضافة النيوكليوتيدات وتخليق الخيط البنوي الجديد.

تحدث الاستطالة بالاتجاه '5 ← '3 على طول احد الخيطين الابويين مكونة خيط بنوي مستمر يسمى خيط البنوي القائد leading daughter strand . اما في الخيط الابوي الثاني فلا يمكن حدوث الاستطالة بهذه الصورة المستمرة لان الخيط الابوي يكون باتجاه '3 ← '5 ، لذا تتكون قطع دنا صغيرة متعاقبة مكونة ما يسمى بالخيط البنوي المتباطئ lagging daughter strand ، وكلما تباعد الخيطان الأبويان استمرت عملية استطالة الخيط القائد في حين تبدء عملية تخليق بادئ جديد مقابل الخيط السفلي لتكوين قطع دنا صغيرة اخرى . يطلق على القطع الصغيرة على طول الخيط المتباطئ اسم قطع اوكزاكي Okazaki fragment نسبة الى مكتشفها العالم الياباني Reiji Okazaki ويبلغ طول القطعة الواحدة ١٠٠٠ – ٢٠٠٠ نيوكليوتيدة في بدائية النواة في حين يكون طولها اقل من ٢٠٠ نيكليوتيدة في الخلايا حقيقية النواة .

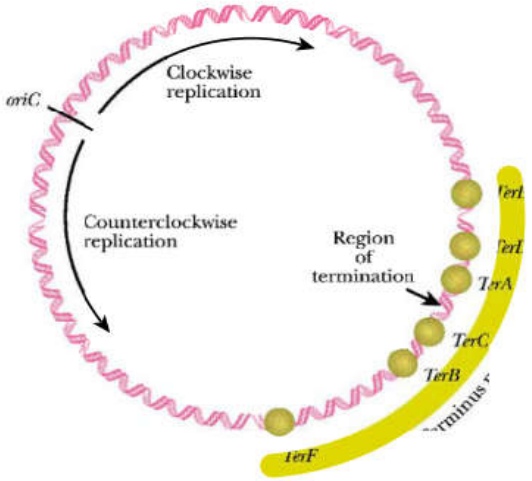
تستمر عملية التكرار لتكوين خيطين جديدين احدهما مستمر ويقابل الخيط الابوي العلوي والاخر عبارة عن قطع دنا صغيرة متتالية ترتبط كل واحدة منها بقطعة البادئ (RNA).بعدها يبدء انزيم اخر هو DNA Polymerase I بإضافة النيوكليوتيدات الى قطع وكزاكي ويقوم ايضاً بإزالة بوادئ ال RNA المرتبطة مع شريط الدنا وملئ الفراغ الناتج من عملية ازالة قطع RNA وذلك لان انزيم DNA polymerase III لا يمتلك فعالية لازالة القواعد النيتروجينية للبوادئ المتكونة من RNA، بعد ذلك يأتي انزيم DNA Ligase ويعمل على ربط قطع الدنا المتكونة ،حيث يقوم هذا الانزيم بربط القواعد النيتروجينية بواسطة الاصرة الفوسفاتية ثنائية الاستر مما يؤدي الى تكوين خيط بنوي مستمر على طول الخيط الابوي السفلي.

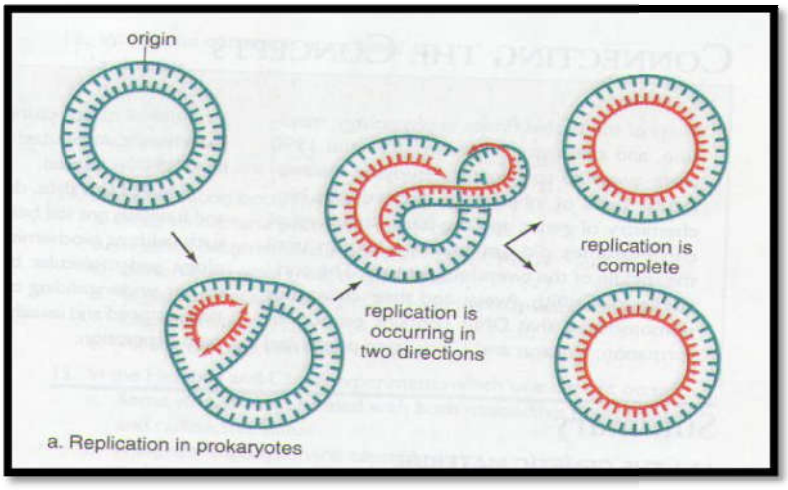


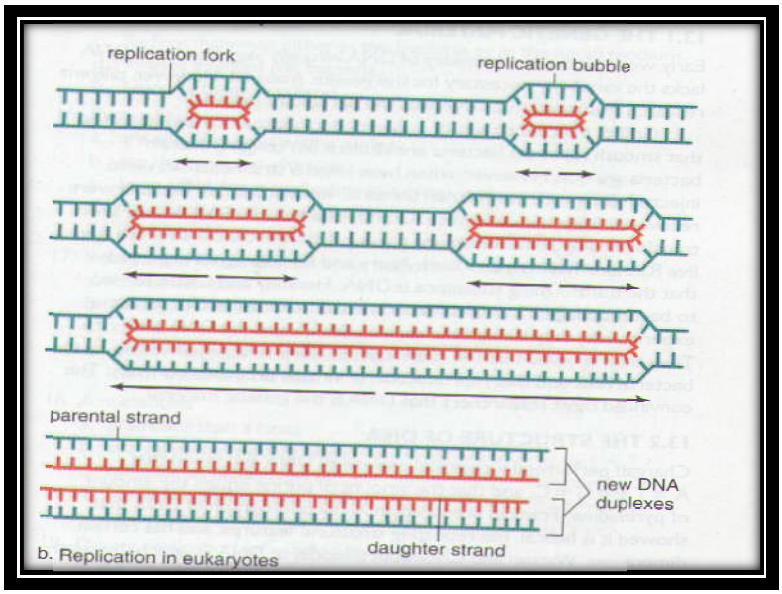
مرحلة الانتهاء

تنهي عملية التضاعف في نقطة محددة تقابل منشأ التكرار تسمى Terminator تصل اليها شوكة التضاعف من كلا الاتجاهين في نفس الوقت لان التضاعف يتم باتجاهين مختلفين.

تتكون منطقة الانتهاء من سبعة تتابعات مكررة محددة تسمى Terminator sequences تكون هذة التتابعات نقاط ارتباط مع بروتين يسمى tus Protein . ثلاثة من هذه التتابعات تكون على يمين نقطة الانتهاء تسمى (Ter A , Ter E , Ter D) وثلاثة على اتجاه اليسار هي (Ter F , Ter B , TerC) . يرتبط البروتين tus مع هذه التتابعات بشكل يسمح بمرور شوكة التضاعف باتجاه واحد فقط ويمنع شوكة التضاعف الاخرى من المرور بالاتجاه المعاكس ويتحدد هذا بطريقة الاتباط جزئية البروتين مع الشريط المزدوج فيسمح لانزيم Helicase بفتح الشريط المزدوج في منطقة الارتباط بالاتجاه المحدد فقط . وعند اكتمال التقاء شوكتي التكرار في نقطة التضاعف النهائية ينفصل الشريطان البنويان بواسطة فعالية انزيم Topoisomerase IV .






replication fork
replication bubble
parental strand
new DNA duplexes
daughter strand
b. Replication in eukaryotes

انزيمات تضاعف الدنا في الخلايا حقيقية النواة

درست عملية تضاعف الدنا في الخلايا حقيقية النواة وظهرت ان هناك انواع عديدة من انزيمات البلمرة التي تشترك في هذه اتمام هذه العملية التي تكون أكثر تعقيدا منها في بدائية النواة. ومن أهم هذه الإنزيمات هي:

١- DNA polymerase α : يقوم هذا الانزيم ببدء عملية تضاعف الدنا في حقيقة النواة حيث يقوم ببناء قطعة من RNA بطول ٥ نيوكليوتيدات (وفي بعض المصادر ١٠ نيوكليوتيدات) ومن ثم يبدأ باستطالة هذه القطعة بإضافة قطعة دنا بطول ٥ إلى ١٠ نيوكليوتيدات وبعدها ينفصل عن الشريط الأبوي لعدم امتلاك هذا الانزيم العوامل التي تجعله أكثر ثباتية على الشريط الابوي فيحل محله انزيم البلمرة الرئيسي ببناء الاشرطة البنوية الجديدة . تسمى القطعة التي يتم إضافتها من قبل انزيم DNA polymerase α بـ iDNA (initiator DNA) . هناك اعتقاد ان انزيم primase الذي يقوم بإضافة قطعة RNA هو متحد مع انزيم بلمرة الدنا الفا .

٢- DNA polymerase δ : هو انزيم البلمرة الرئيسي في الخلايا حقيقة النواة ويقابل الانزيم DNA polymerase III في بدائية النواة ، حيث يكون لهذا الانزيم القدرة على بناء الاشرطة البنوية الحديثة في كلا الاتجاهين وبثباتية عالية على القالب الابوي كما ان له القدرة على القراءة الصحيحة proofreading للاشرطة الابوية ومن ثم الاضافات الصحيحة للنيوكليوتيدات الجديدة .

٣- DNA polymerase γ : هو انزيم البملرة الرئيسي لتضاعف الدنا في المايتوكوندريا

٤- DNA polymerase β : يلعب دورا رئيسا في الحفاظ على استقرار الدنا .

٥- DNA polymerase ε : يلعب دورا رئيسيا في اصلاح الدنا لقدرته على القراءة الصحيحة ومل الفراغات الناتجة من حذف قطع الـ RNA المضافة في بداية التضاعف