المحاضرة السادسة : تضاعف الـ DNA

دورة حياة الخلية Cell cycle:

يقصد بدورة حياة الخلية العمر الزمني لها او المدة الزمنية المحصورة ما بين انقسامين، الانقسام الذي يؤدي الى تجزئتها الى خليتين جديدتين.

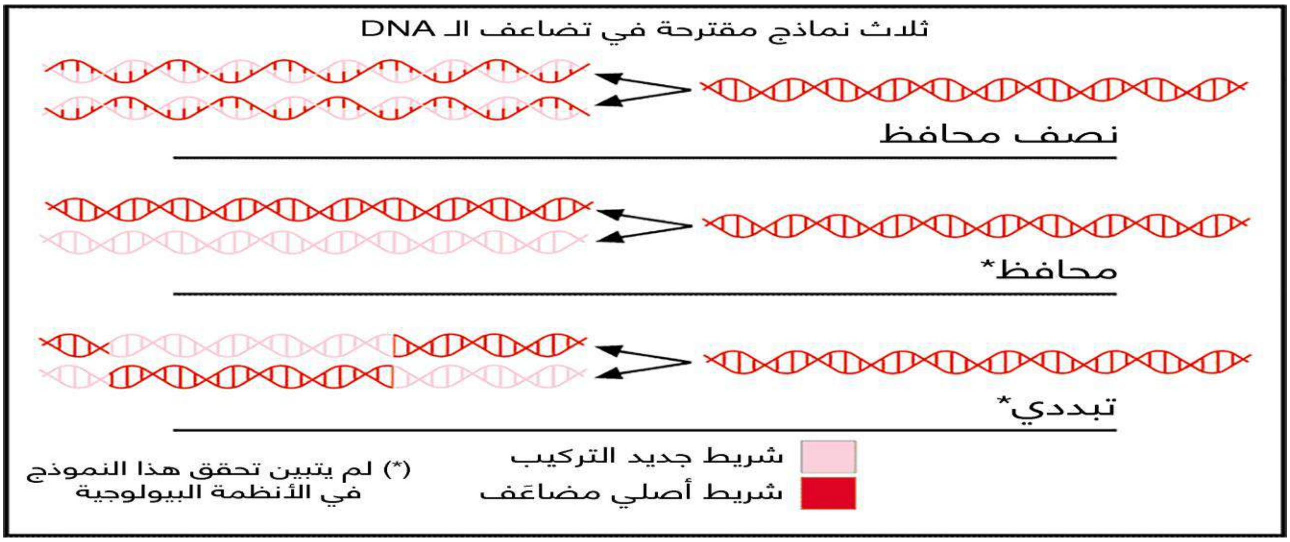
والخلية خلال دورة حياتها تمر بطورين أساسين هما الطور البيني interphase وطور الانقسام الاعتيادي Mitosis phase، يستغرق الطور الاول 90% من زمن الدورة ويتضمن ثلاث مراحل هي :

- مرحلة الشق الأول G1(Gap1) : وفيها تكون الخلية في اقصى نشاطها الايضي اذ تتضاعف مكونات الخلية وعضياتها ومن ثم يزداد حجم الخلية وتبلغ الحجم المحدد لها وراثيا.
- مرحلة التخليق S(Synthesis of DNA) : وفيها تتضاعف المادة الوراثية المتمثلة بالدنا.
- مرحلة الشق الثاني G2(Gap2) : وفيها يستمر نمو الخلية ونشاطها الايضي بطريقة تؤمن تأهب الخلية واستعدادها للانقسام.

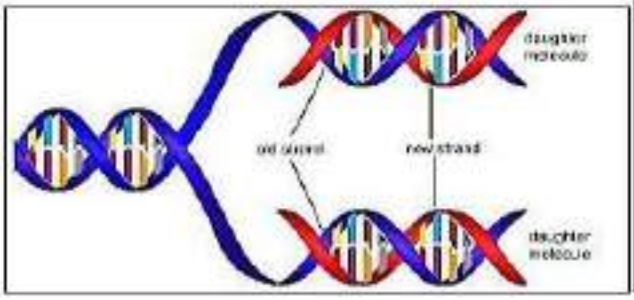
ان انتقال الخلايا من مرحلة او طور الى آخر يقع تحت سيطرة صارمة من اجهزة التنظيم في الخلية نفسها والتي تتحكم بالأحداث والتحولات المختلفة فيها ،وان اي خلل في تنظيم دورة حياة الخلية والاخلال بنقاط السيطرة فيها Check Points يؤدي الى عدم ثبوتها في مسارها الطبيعي وربما انحرف بها للتحول الى خلية سرطانية.وهناك ثمة خلايا تثبت على طور واحد يسمى طور السكون Gap0 وتستمر عليه بعد نشوها وبلوغها مرحلة النضج ولا تغادر هذا الطور طوال حياتها وأفضل مثال عليها الخلايا العصبية.

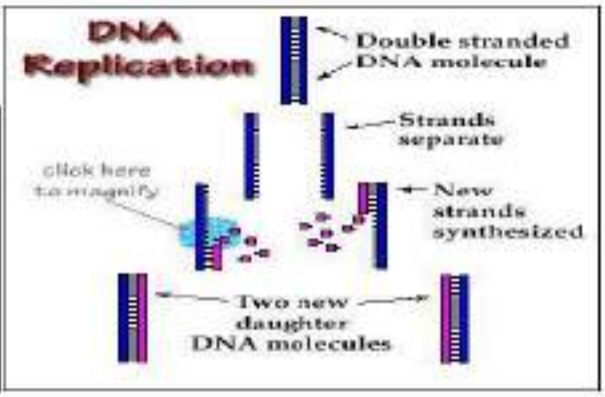
تضاعف الدنا:

تتضاعف الدنا في جميع الكائنات الحية بطريقة تدعى بالتضاعف شبة المحافظ تمييزا لها عن التضاعف المحافظ والتضاعف المشتت ويوضح الشكل التالي الانواع الثلاثة من التضاعف .



1- التضاعف شبه المحافظ Semi conservative Replication :
يقصد به ان ينفصل شريطي الدنا عن بعضهما ويتكون على كل شريط شريط جديد آخر متخذا من الشريط القديم قالبا، وبالنتيجة تتكون جزيئتين من الدنا الحلزوني المزدوج مطابقتين لجزيئة الدنا الاصلي.





2- التضاعف المحافظ Conservative Replication :
ويقصد به ان يتكون دنا حلزوني مزدوج بشريطين جديدين مع بقاء جزيئة الدنا الحلزوني المزدوج الاصلي بشريطيه القديمين دونما تغير او اعادة ترتيب القواعد النيتروجينية.

3- التضاعف المشتت Dispersive Replication :
ويقصد به تكرار الدنا وتضاعفها بعد تشضي شريطي الدنا الاصلي الى قطع صغيرة وانفصال الاشرطة عن بعضها وتكون اشرطة جديدة على هذه القطع وتكون جزيئتين من الدنا تمتلكان اجزاء من القطع القديمة واخرى جديدة.

وقد جاء مقترح حدوث تضاعف الدنا بطريقة شبة محافظة من قبل واطسن وكريك في بحث ثان لهما نشر بعد شهر واحد تقريبا من اكتشافهما لطبيعة الحلزون المزدوج للدنا. ان فكرة التضاعف شبه المحافظ قد ازالت الغموض الذي كان يكتف تضاعف الدنا واعطت تفسيرا منطقيا حول كيفية تضاعف الدنا دون حدوث أخطاء تذكر، وكان لابد من اثبات حدوث عملية التضاعف على النمط الشبه المحافظ في الدنا تجريبيا دعما للمقترح النظري وجاء هذا الاثبات من خلال تجربة قام بها كل من مسيلسون وستال عام 1958 م والتي تعد تجربة رائدة لانها وضعت حدا للنقاشات الدائرة حول كيفية تضاعف الدنا.

ثنائية اتجاه التكرار Bidirectional Replication :

ومن الخواص المهمة التي تتميز بها عملية التضاعف او التكرار الى جانب خاصية شبه المحافظ، هي خاصية ثنائية اتجاه التضاعف ويقصد بها ان بناء اشرطة جديدة على الاشرطة القديمة يكون باتجاهين من نقطة محددة تسمى هذه النقطة بمنشأ التكرار ، تحتوي دنا بدائية النواة على منشأ تكرار واحد كما تحتوي على نقطة انتهاء واحدة ايضا. اما دنا كروموسومات حقيقية النواة فتحتوي على اكثر من منشأ تكراروبعزى ذلك الى كبر حجم جزيئات الدنا في الكروموسومات، ويختلف عدد المناشئ وطول المكررات (طول قطع الدنا التي يحدث فيها التكرار) باختلاف دنا الكائنات الحية.

متطلبات تضاعف الـ DNA :

يتطلب تضاعف الدنا في بدائية النواة وحقيقية النواة الآتي:

1- القالب Template : ويتمثل بكلا شريطي جزيئة الدنا الأصلي، اذ تتخذ تتابعات القواعد النيتروجينية في هذين الشريطين لتحديد تتابعات القواعد النيتروجينية في الاشرطة النامية الجديدة وعلى أساس مبدأ ازدواج القواعد ما بين الأدنين والثايمين من جهة، ومابين الكوانين والسايتوسين من جهة اخرى.

2- المنشأ Origin : ويمثل الموقع الذي تبدأ عنده عملية التضاعف على الدنا الأصلي، وعادة ما يمتلك هذا الموقع تتابعات معينة من القواعد النيتروجينية تساعد على سهولة انفتاح الشريطين وابتعادهما عن بعضهما البعض، وهذا يعني ان التضاعف يبدأ من نقطة محددة معينة على الدنا وليس من اية نقطة او موقع وتعرف هذه النقطة بشوكة التكرار Replication fork .

3- البروتينات Proteins : وتشمل البروتينات التالية:

أ) مجموعة من البروتينات التي يرمز لها DnaA و DnaB و DnaC وظيفتها التعرف على منشأ التكرار وتسهم في فك شريطي جزيئة الدنا عند هذا الموضع.

ب) يشارك البروتين الذي يعرف بـ Rep protein مع بروتينات Single Strand Binding Protein(SSB-P) في ازالة الالتواء والتفاف الحلزون المزدوج لجزيئة الدنا وتحتاج هذه العملية الى ATP مصدرا للطاقة، وتعمل بروتينات SSB-P على الابقاء على شريطي الدنا متباعدين اذ ترتبط بالاشرطة من الخارج وتحول دون عودتها الى وضعها الطبيعي لتكون الاواصر الهيدروجينية مع الشريط المكمل .

4- النيوكليوتيداتNucleotides: نظرا لان عملية التضاعف هي عملية بناء اشرطة جديدة من الدنا ، لذا فانها تحتاج الى النيوكليوتيدات الاربعة التي تدخل في تركيب الدنا، وعلى صورة نيوكليوتيدات رايبوزية منقوصة الاوكسجين ثلاثية الفوسفات،والتي يرمز لها اختصارا dATP و dTTP و dCTP و dGTP اذ يشير d الى السكرdeoxyribose و TP الى triphosphate اما A و T و C و G فيشير الى القواعد النتروجينية، وان الشروع بعملية بناء RNA تحتاج الى نيوكليوتيدات رايبوزية ثلاثية الفوسفات التي تمثل الوحدات الاساسية فيها .

ان جميع هذه الاشكال من النيوكليوتيدات ذات طاقة عالية لانها تحتوي على ثلاث مجاميع من الفوسفات، اذ ان اضافة اي من النيوكليوتيدات الاربعة المذكورة تتحرر عنها فوسفات ثنائي غير عضوي والذي يرمز له بـ PPiبعد تكون آصرة فوسفاتية ثنائية الاستر ما بين نيوكليوتيدين متعاقبين.

5- البادئ Primer :وهي عبارة عن قطعة صغيرة من RNA يختلف طولها من خلية الى اخرى ويتراوح من 2- 10 نيوكليوتيدات رايبوزية مكملة لتتابعات معينة من القالب ، اذ يوفر نهاية من النوع 3-OH حرة تستخدم لاضافة النيوكليوتيدات عند استطالة الشريط النامي الجديد بوساطة انزيمات بلمرة الدنا

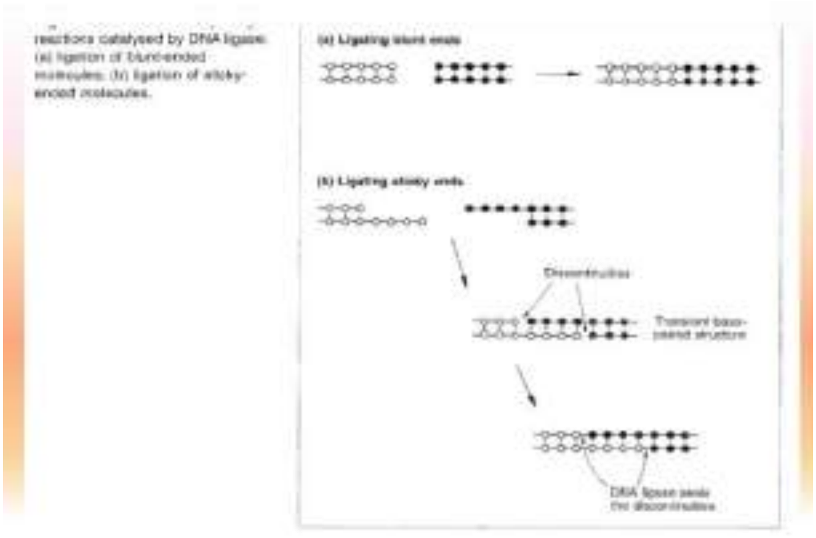
DNA polymerases ، وعليه فان الاشرطة النامية على نحو مستمر في بدائية النواة تحتاج الى بادئ واحد، بينما تحتاج الاشرطة النامية غير المستمرة في حقيقية النواة الى اكثر من بادئ.
تحتوي البوادئ على اليوراسيل بدل الثايمين وعلى سكر الرايبوز بدلا من سكر الرايبوز منقوص الاوكسجين ، مما يعني انه ينبغي ان تزال الاشرطة النامية وان تحل محلها قطع من الدنا ، ويتم ذلك بأنزيمات البلمرة ايضا.

6- الانزيمات Enzymes : ان الشروع بعملية التضاعف يحتاج الى العديد من الانزيمات لتهيئة جزيئة الدنا ومنها:

أ- أنزيم gyrase : يعمل على ازالة الالتفاف الفائق في مواقع الدنا الذي تجري فيه عملية التضاعف، مع ازالة العقد التي تنشأ جراء هذا الالتواء.

ب- أنزيم helicase : يعمل بالتزامن مع بروتينات DnaB و Rep protein وبالتعاون معها ، ويتحدد دوره في فك شريطي جزيئة الدنا وابعادهما عن بعضهما البعض بازالة الاواصر الهيدروجينية الرابطة بين القواعد النتروجينية على الشريطين ، ويحتاج في عمله الى ATP وبواقع جزيئة واحدة لفك كل زوج من القواعد النتروجينية. وبمساعدة البروتينات المذكورة في اعلاه تبدأ اشرطة الدنا بالتباعد عن بعضها مولدة فجوة او ردهة مابين الشريطين تسهل مهمة الانزيمات المسؤولة عن التضاعف في التغلغل والمباشرة بعملها.

ت- أنزيم DNA ligase :وهي من الانزيمات الشائعة في بدائية وحقيقية النواة ، يقوم هذا الانزيم بلحم النهاية 3^- بالنهاية 5^- للنيوكليوتيدات المتجاورة على الشريط من الدنا نفسه ، وهو بذلك يفيد في ربط ما يعرف بقطع اوكازاكي التي سنتحدث عنها لاحقا ، فضلا عن اصلاح اي حالة قطع في الاواصر الفوسفاتية باعادة بناء هذه الاواصر.



مخطط يوضح عمل انزيم Ligase

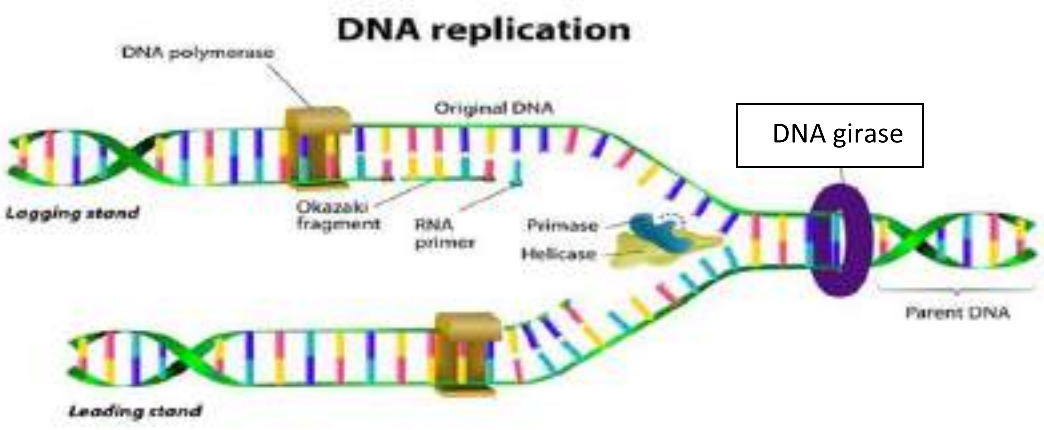
ث- أنزيمات بلمرة الـ DNA :

1) أنزيمات بلمرة الدنا في بدائية النواة: وتوجد ثلاث أنواع من أنزيمات البلمرة وهي DNA Polymerase I و DNA Polymerase II و DNA Polymerase III وجميعها تعمل على بناء الاشرطة الجديدة باضافة النيوكيوتيدات الى بعضها وبصورة متعاقبة متخذة من الاشرطة القديمة قالبا وبناءا على مبدأ الازدواج، تحتاج هذه الانزيمات الى كل من القالب والنيوكليوتيدات الأربعة والبادئ و أيونات ثنائية التكافؤ مثل ايونات المغنيسيوم Mg^{+2} .

- أنزيم DNA polymerase I: ويسمى ايضا Kornberg enzyme ، يعمل باتجاه 5^- الى 3^- على أساس الشريط النامي.
- أنزيم DNA Polymerase III : ويعد الانزيم الرئيس في عملية البلمرة وبناء الدنا ذلك لان عدد النيوكليوتيدات المضافة من قبل جزيئة واحدة من الانزيم خلال دقيقة واحدة في درجة حرارة 37°م أعلى من الانزيمات المماثلة الاخرى .

يعمل الانزيم المحلل للبروتينات والمعروف باسم Subtisilin على تحليل انزيم البلمرة الى قطعتين ، صغيرة بوزن جزيئي 30000 دالتون تمتلك فعالية التحليل باتجاه 5^- الى 3^- (وهي المسؤولة عن ازالة البوادئ) وكبيرة بوزن جزيئي 70000 تمتلك فعالية البلمرة باتجاه 5^- الى 3^- (وهي المسؤولة عن بناء اشرطة دنا جديدة وفعالية تحليل باتجاه 3^- الى 5^-) وهي المسؤولة عن تدقيق القراءة Proof reading .

ان جميع انزيمات البلمرة تمتلك فعالية اضافة النيوكليوتيدات وبالتالي بلمرة سلسلة النيوكليوتيدات باتجاه 5^- الى 3^- ، كما وان لجميعها فعالية ازالة النيوكليوتيدات باتجاه 3^- الى 5^- ، وهذا يعني انها اذا ما اضافت نيوكليوتيدا على نحو غير صحيح اي بما لا يلائم قاعدة ازدواج القواعد النيتروجينية بين الشريط النامي والشريط القالب فانها سرعان ما تقوم بازالته واضافة النيوكليوتيد المطلوب محله، وتسمى هذه الظاهرة اي حذف او ازالة القاعد المضافة بصورة خاطئة في الاشرطة النامية واحلال قواعد صحيحة محاها بالتدقيق Editing او تصحيح القراءة Proof Reading ، ان هذه الخاصية التي تميز انزيمات البلمرة تحمل قدرا كبيرا من الاهمية في بناء جزيئات جديدة من الدنا على درجة عالية من الدقة لكي تكون مماثلة للجزيئات القديمة.



مخطط يوضح عمل كل من البروتينات وانزيمات التضاعف

2) انزيمات بلمرة الدنا في حقيقية النواة:

اما انزيمات بلمرة الدنا في حقيقية النواة فتكون على درجة عالية من التنوع بتنوع حقيقية النواة بدءا من الفطريات وصولا الى الانسان ومنها:

أ- βDNA Polymerase : ويوجد بالدرجة الاساس في نواة الخلية.

ب- ϒDNA Polymerase: ويشكل حوالي من 1-2 % من مجمل الانزيمات المسؤولة عن بلمرة او تضاعف الدنا.

ت- αDNA Plymerase : ويوجد في السايتوبلازم والنواة.

ث- Mitochondrial DNA Polymerase: وهذا الانزيم يقوم بتضاعف الدنا في المايتوكوندريا ، علما ان المايتوكوندريا تحتوي من 2 الى 10 جزيئات من الدنا وهي دائرية حلقية مغلقة، شأنها في ذلك شأن البكتريا وليست على صورة كروموسومات كتلك الموجودة في حقيقية النواة ما يجعل الباحثين يعتقدون ان المايتوكوندريا ماهي الا خلية بدائية النواة داخل حقيقية النواة.

ج- DNA Polymerase Viral Indused: وينتج هذا الانزيم جراء اصابة الخلايا الحيوانية بالفايروسات.