تنسخ (تضاعف) ال (DNA) Replication of DNA

.....

تتضح العلاقة بين البنية والوظيفة في الحلزون المزدوج لل DNA، إذ تتكون بنية الـ DNA من سلسلتين من النكليوتيدات المتكاملة والمرتبطة بروابط هيدروجينية نوعية. تلعب كل سلسلة دور القالب Template أثناء عملية التضاعف، وتكون السلاسل المتكاملة لل DNA ذات قطبية منعكسة. تبدأ عملية التضاعف بحدوث قطع في جزيئة ال DNA وتحطيم للجسور الهيدروجينية وإزالة التحلزن ويتم تركيب السلسلة المتممة تدريجياً من الطرف الأول للسلسلة إلى الطرف الآخر كطريقة الفتح والإغلاق. يعني ذلك أن تركيب سلاسل ال DNA بالمعنى الفيزيائي يحصل باتجاه واحد فقط، يتم تضاعف الDNA :

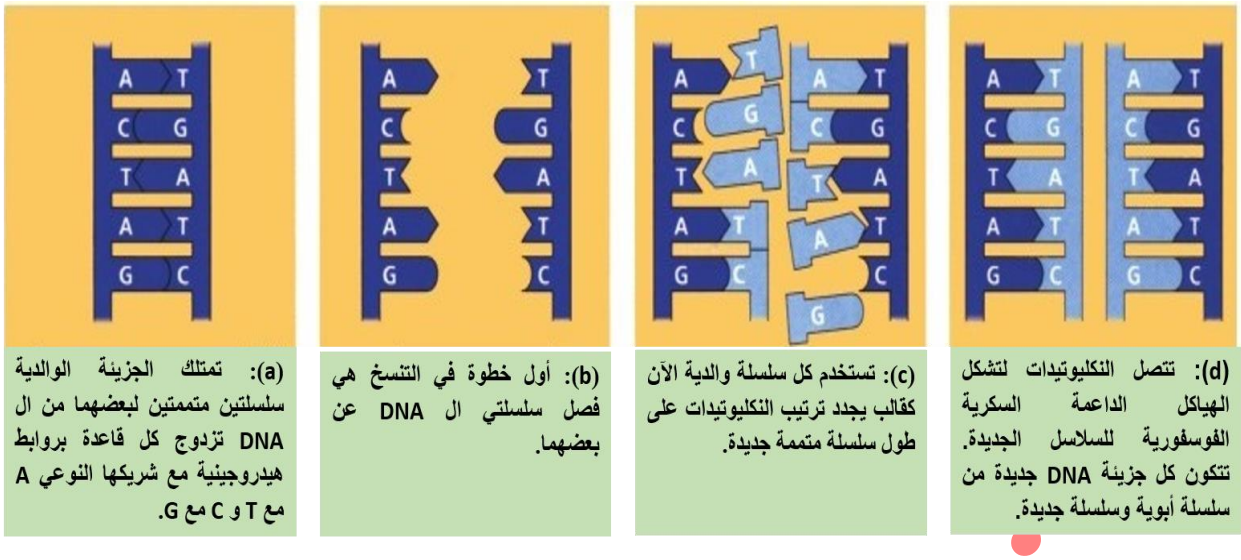
- في الفيروسات داخل جسم الخلية المضيفة.
- في بدائية النواة داخل المنطقة النووية.
- في حقيقيات النوى فيتم داخل النواة.

يتضاعف الدنا بهدف نقل المعلومات الوراثية من الآباء إلى الأبناء، لذلك يجب أن تكون العملية كاملة ودقيقة للمحافظة على الثبات الوراثي. وتتم هذه العملية في الطور S (مرحلة بناء ال DNA) من الدورة الخلوية.

أولاً: المبدأ الأساسي في عملية تنسخ (تضاعف) ال DNA: ازدواج الأسس إلى السلسلة القالب

يوضح الشكل (1:4) فكرة Watson وCrick الأساسية. إن السلسلتين متكاملتان، إذ تمتلك كل منهما المعلومات اللازمة لبناء السلسلة الأخرى. عندما تنسخ الخلية جزيء ال DNA، تعمل كل سلسلة كقالب لترتيب النكليوتيدات في سلسلة جديدة متممة (مكمِّلة).

وبينما تصطف النكليوتيدات على السلسلة القالب حسب قاعدة ازدواج الأسس تتشكل روابط هيدروجينية فيما بينها وتتكون سلسلة جديدة. ففي بداية عملية التضاعف يكون لدينا جزيئة واحدة من ال DNA ثنائي السلسلة، ويصبح لدينا اثنتان في نهايتها، كل منهما هي عبارة عن نسخة طبق الأصل عن جزيئة ال DNA الوالدي.



الشكل (1:4): نموذج تنسخ ال DNA المفهوم الأساسي. في هذا النموذج تم تقويم قطعة صغيرة من ال DNA إلى بنية تشبه السلم، تمثل سكتا السلم الهيكل الداعمة الفوسفورية السكرية لسلسلتي ال DNA وتمثل الدرجات أزواج الأسس الآزوتية. تم تمثيل الأنواع الأربعة للأسس بأشكال مبسطة. يمثل الأزرق الداكن سلاسل ال DNA الموجودة في الجزيئة الوالدية. ويمثل الأزرق الفاتح النكليوتيدات الحرة وال DNA المصطنع حديثاً.

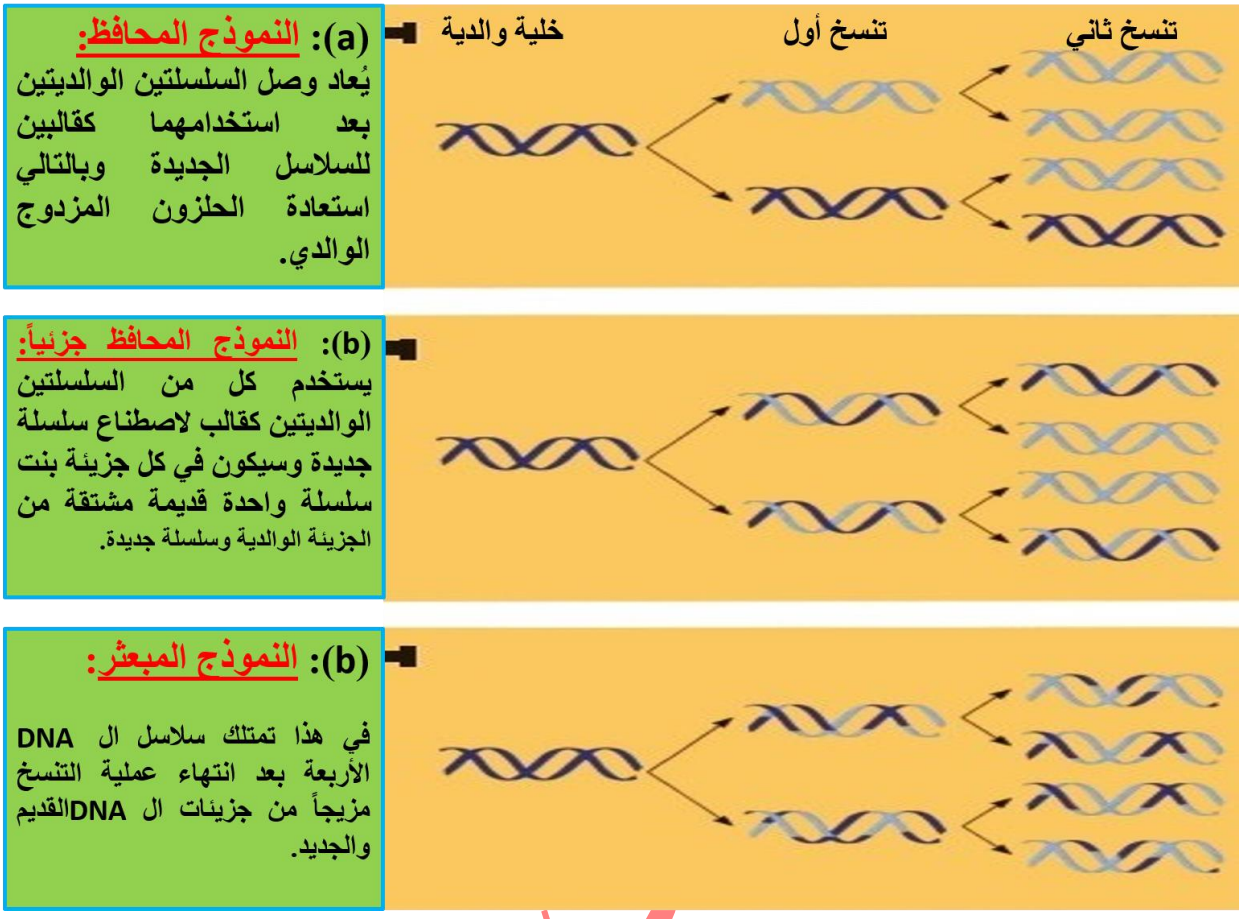
تنبأ نموذج واتسون وكريك بأنه عندما يتنسخ الحلزون المزدوج فإنه سيوجد في الجزيئتين البنتين سلسلة واحدة قديمة مشتقة من الجزيئة الوالدية وسلسلة جديدة. وقد أُطلِق على هذا النموذج بالنموذج المحافظ جزئياً semiconservative حيث يمكن التمييز بين ثلاثة احتمالات لنموذج التنسخ (الشكل 2:4) وهي:

1- النموذج المحافظ جزئياً Semiconservative للتنسخ، إذ يوجد في الجزيئتين البنتين سلسلة واحدة قديمة مشتقة من الجزيئة الوالدية وسلسلة جديدة.

2- النموذج المحافظ Conservative للتنسخ والذي يُعاد فيه تشكيل الجزيئة الوالدية بعد المعالجة (أي يحافظ عليها).

3- النموذج المبعثر Dispersive وفيه تمتلك سلاسل ال DNA الأربعة بعد انتهاء عملية التنسخ مزيجاً من جزيئات الDNA القديم والجديد.

حسان حسن



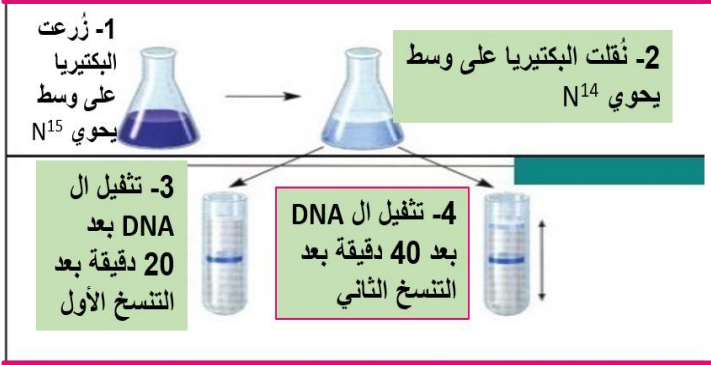
الشكل (2:4): ثلاثة نماذج بديلة لتنسخ ال DNA. ترمز القطع الصغيرة للحلزون المزدوج هنا إلى ال DNA في الخلية. ابتداءً من الخلية الوالدية، فمنا بتتبع ال DNA لجيلين من الخلايا أي جولتين من تنسخ ال DNA. يأخذ ال DNA المصطنع حديثاً اللون الأزرق الفاتح.

وعلى الرغم من أن استنباط آلية التنسّخ المحافظ والمبعثر ليس سهلاً، لكن هذه النماذج ظلت احتمالات قائمة حتى نهاية الخمسينيات من القرن الماضي عندما ابتكر Mathew Meselson و Franklin Stahl تجربة اختبرت الفرضيات الثلاث. ودعمت نتائج هذه التجربة نموذج التنسخ المحافظ جزئياً لل DNA كما توقع Watson و Crick (الشكل 3:4).

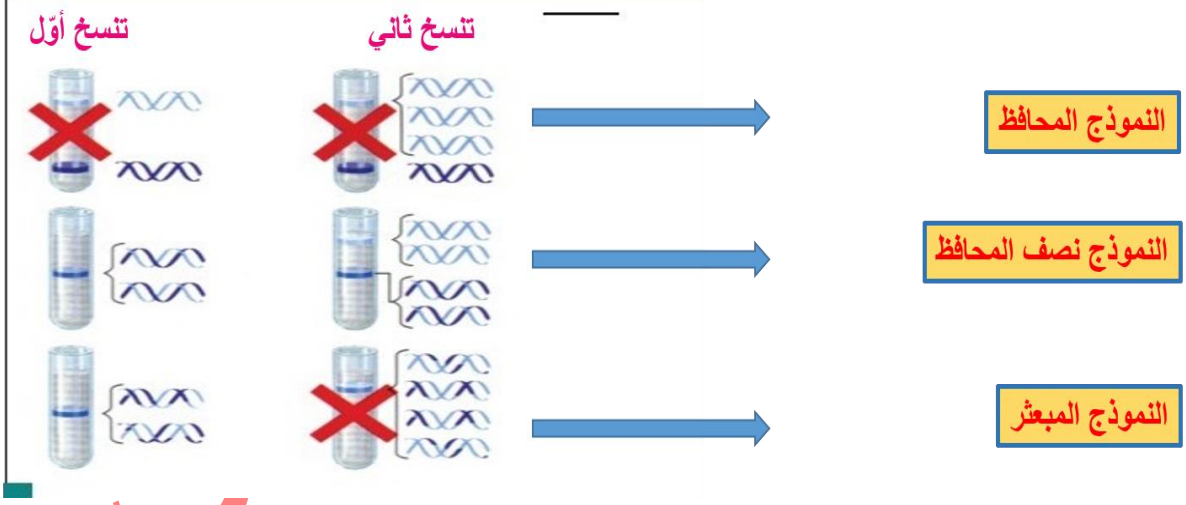
إن المبدأ الأساسي لتنسخ ال DNA بسيط بشكل أنيق وهو يتضمن عمليات كيميائية بيولوجية معقدة.

هل يتبع تنسخ ال DNA النموذج المحافظ أو المحافظ جزئياً أو المبعثر. استنبت Franklin Stahl وMathew Meselson بكتيريا ال E. coli لعدة أجيال في وسط يحتوي نكليوتيدات موسومة بالنظير المشع الثقيل N^{15}. ضمت البكتيريا النتروجين المشع إلى ال DNAالخاص بها، ثم نقل العالمان البكتيريا إلى وسط يحوي النظير المشع الأخف N^{14} فقط. وبالتالي سيكون أي DNA جديد تصطنعه البكتيريا أخف وزناً من ال DNA الوالدي المصطنع في الوسط N^{15}. واستطاع العالمان تمييز ال DNA ذو الكثافات المختلفة عبر تثقيل ال DNA المستخلص من البكتيريا.

تمثل الشرائط في أنبوبي التثقيل نتائج تثقيل عينتي DNA من الحوجلة في الخطوة 2 وأُخذت إحدى العينات بعد 20 دقيقة والأخرى بعد 40 دقيقة.



استنتج العالمان أن عملية تنسخ ال DNA تتبع النموذج المحافظ جزئياً بعد مقارنة نتائجهما مع النتائج المتوقعة في كل النماذج الثلاثة في الشكل (16:10). أنتجت عملية التنسخ الأولى في الوسط N^{14} شريطاً من ال DNAهجين (N^{14}-N^{15}) استبعدت هذه النتيجة النموذج المحافظ. أنتجت عملية التنسخ الثانية كلاً من ال DNA الخفيف والهجين وبذلك تم استبعاد النموذج المبعثر ودعمت النموذج المحافظ جزئياً.



الشكل (3:4): هل يتبع تنسخ ال DNA النموذج المحافظ أو المحافظ جزئياً أو المبعثر.

ثانياً: تنسخ ال DNA:

تحتوي بكتيريا الإيشيرشيا القولونية على صبغي واحد مكون من حوالي 4.6 مليون زوج نكليوتيدي. وتستطيع هذه البكتيريا أن تنسخ كل هذا ال DNA وتنقسم لتكون خليتين بنتين متماثلتين وراثياً في أقل من ساعة. بينما تحتوي كل خلية من خلايا جسمنا على 46 صبغي في نواتها، وفي كل صبغي توجد جزيئة

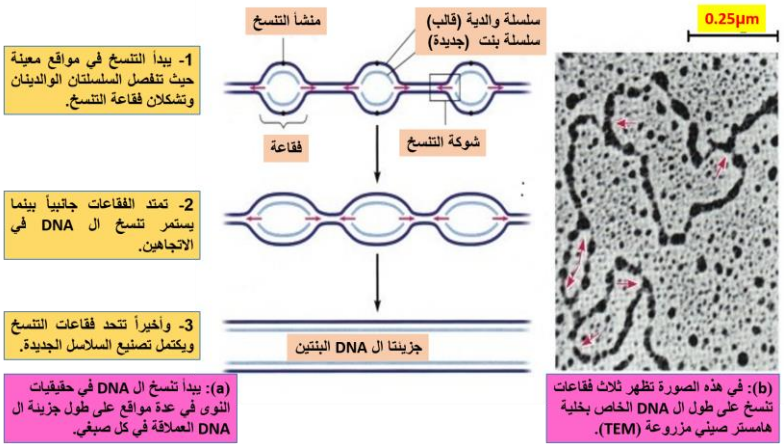
حلزون مزدوج طويلة واحدة، وبمجموعها تشكل حوالي 6 مليارات زوج نكليوتيدي، أو أكثر بألف مرة مما يوجد في الخلية البكتيرية. ومع ذلك تحتاج الخلية بضع ساعات فقط لتنسخ كل هذا ال DNA، ويتم تحقيق هذا التنسخ لتلك الكمية الهائلة من المعلومات الوراثية بنسبة خطأ ضئيلة جداً (بنسبة 1 إلى 10 بليون نكليوتيد) ويتميز نسخ ال DNA بسرعته ودقته.

ويشارك أكثر من 12 إنزيم وبروتينات أخرى في تنسخ ال DNA، وهناك معلومات أكثر عن تنسّخ ال DNA في البكتيريا من الخلايا حقيقية النواة. كما أن هناك تشابه في عملية التنسخ بين الخلايا بدائية النواة والخلايا حقيقية النواة.

أ- بدء التضاعف: منشأ التنسّخ:

يبدأ تنسخ ال DNA من مواقع محددة تدعى **منشأ التنسّخ**. يمتلك الصبغي البكتيري (وهو دائري) منشأً واحداً وهو امتداد من ال DNA ذو تتالي نوعي من النكليوتيدات. تتعرف البروتينات التي تستهل عملية تنسخ ال DNA على هذا التتالي وترتبط بال DNA فاصلةً سلسلتي ال DNA عن بعضهما وتبني ما يُدعى **بفقاعة التنسخ** (Replication Bubble). بعدها يستمر تنسخ ال DNA بالاتجاهين حتى يتم نسخ كل الجزيئة.

يمكن للصبغي في الخلية حقيقية النواة على خلاف الصبغي البكتيري أن يحتوي على عدة مئات أو ربما الآلاف من تتاليات منشأ التنسخ. يتشكل عدد من فقاعات التنسخ ثم تندمج، وبالتالي مسرعة نسخ جزيئة DNA طويلة جداً (الشكل 4:4). وكما في البكتيريا تتقدم عملية التنسخ في حقيقيات النوى في الاتجاهين من كل منشأ. توجد في كل نهاية من فقاعة التنسخ ما يُدعى شوكة التنسخ (التضاعف) Replication Fork وهي منطقة لها شكل حرف Y تتطاول منها سلاسل ال DNA الجديدة.



الشكل (4:4): منشأ التنسخ في حقيقيات النوى. تشير الأسهم الحمراء إلى حركة شوكة التنسخ وبالتالي إلى الحركة الكلية لتنسخ ال DNA في كل فقاعة.

ب- تطويل سلسلة DNA جديدة:

يُحفَّز تطويل DNA جديد عند شوكة التنسخ بواسطة إنزيمات تدعى إنزيمات تكثيف ال DNA (DNA Polymerse). وبينما تصطف نكليوتيدات مفردة مع نكليوتيدات متممة لها على طول سلسلة ال DNA القالب، يقوم إنزيم تكثيف ال DNA بإضافة نكليوتيد تلو الآخر إلى النهاية النامية من سلسلة ال DNA الجديدة.

إن معدل التطويل (الاستطالة) هو 500 نكليوتيد في الثانية عند البكتيريا و50 نكليوتيد في الثانية عند الخلية البشرية.

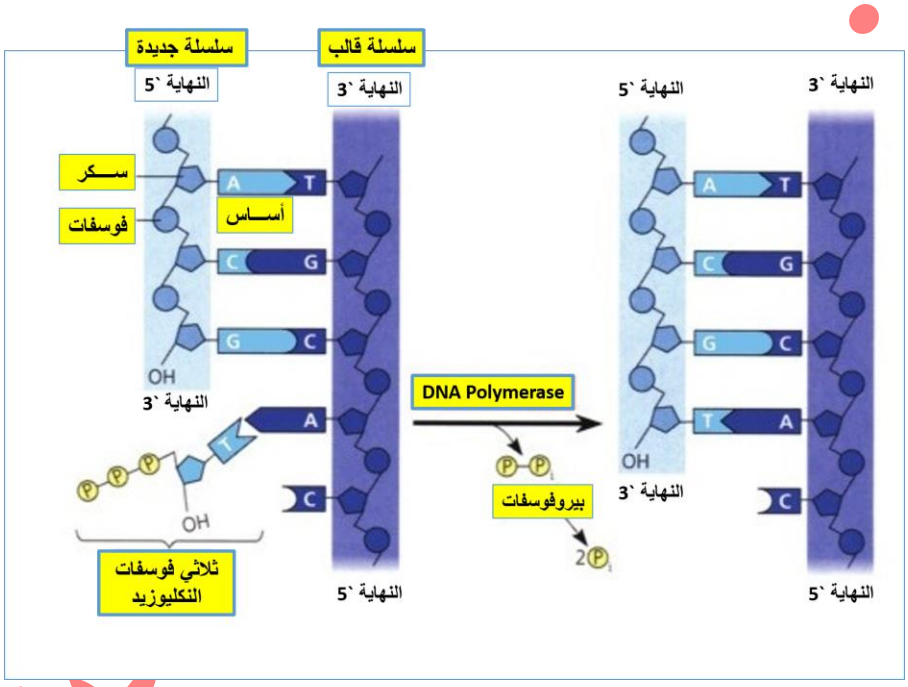
يشترك نوعان من إنزيمات تكثيف ال DNA في عملية التنسخ في بكتيريا E. coli هما: DNA Polymerase I و DNA Polymerase II، أما في الخلية البشرية فالوضع أكثر تعقيداً حيث تم اكتشاف أكثر من أحد عشر نوعاً مختلفاً من إنزيمات تكثيف ال DNA حتى الآن، لكن المبادئ الأساسية هي نفسها.

إن كل نكليوتيد يُضاف إلى سلسلة DNA آخذة في النمو هو في الواقع نكليوزيد ثلاثي الفوسفات، وهو نكليوزيد (سكر + أساس آزوتي) مع ثلاث مجموعات فوسفات (أي أنها جزيئة ATP).

د. حسان حسن

الاختلاف الوحيد بين جزيئة ال ATP المستخدم في استقلاب الطاقة والنكليوزيد ثلاثي الفوسفات الذي يزود ال DNA بالأدنين هو الجزء السكري، وهو ريبوز منقوص الأوكسجين في وحدة بناء ال DNA ولكنه الريبوز في ال ATP.

وهذه المواحيد ثلاثية الفوسفات المستخدمة في بناء ال DNA هي جزيئات منشَّطة كيميائياً بشكل جزئي بسبب احتواء ذيولها ثلاثية الفوسفات على طبقة غير مستقرة من شحنة سلبية. كلما انضم موحود إلى النهاية النامية لسلسلة ال DNA يخسر زمرتي فوسفات على شكل جزيء بيروفوسفات. ومن ثم فإن حلمهة البيروفوسفات إلى جزيئتين من الفوسفات اللاعضوية هو تفاعل مطلق للطاقة يقود تفاعل البلمرة Polymerization Reaction (الشكل 5:4).



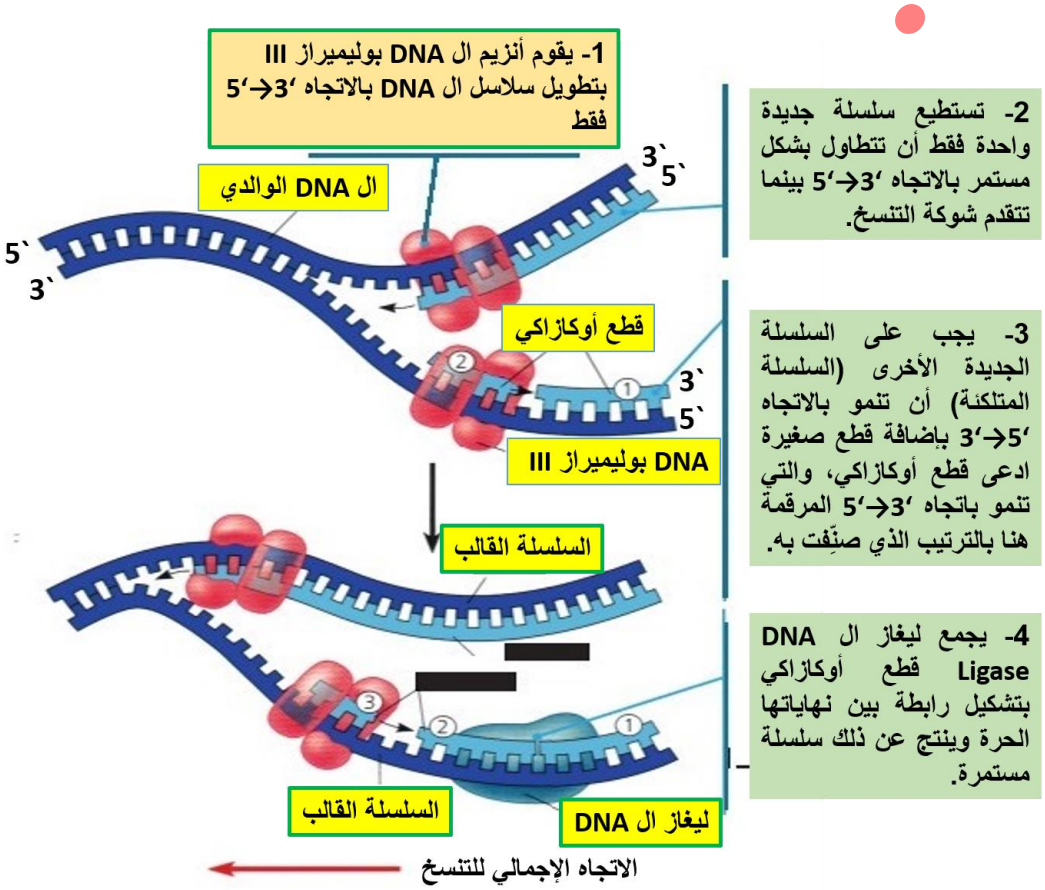
الشكل (5:4): انضمام نكليوتيد إلى سلسلة ال DNA. يحفز إنزيم تكثيف ال DNA إضافة النكليوزيد ثلاثي الفوسفات إلى النهاية `3 من سلسلة ال DNA المتنامية.

ت- التطويل عكسي التوازي Antiparallel Elongation

إن نهايتي سلسلة ال DNA مختلفتين، كذلك فإن سلسلتي ال DNA في الحلزون المزدوج متعاكستي التوازي، أي أنهما متوضعتان في اتجاهين معاكسين لبعضهما (الشكل 5:4). وبالتاي ستكون السلسلتان الجديدتان المتشكلتان خلال تنسخ ال DNA متعاكستي التوازي أيضاً بالنسبة لسلسلتي القالب.

كيف تؤثر البنية عكسية التوازي على عملية التنسخ؟

يضيف إنزيم تكثيف ال DNA النكليوتيدات إلى النهاية الحرة (`3) فقط لسلسلة ال DNA الآخذة بالنمو وليس للنهاية (`5) (الشكل 5:4). وبالتالي فإن سلسلة ال DNA الجديدة يمكنها أن تستطيل بالاتجاه `3→`5 فقط (الشكل 6:4). وهكذا يستطيع إنزيم تكثيف ال DNA بوليميراز (III) (DNA Pol III) أن يصطنع سلسلة متممة على طول سلسلة قالب واحدة عبر تطويل ال DNA الجديد في الاتجاه `3→`5. يقوم إنزيم تكثيف ال DNA (DNA Pol III) ببساطة بحضن شوكة التنسخ على السلسلة القالب وبينما تتقدم الشوكة يقوم بإضافة نكليوتيدات إلى السلسلة المتممة. إن سلسلة ال DNA المصنوعة بهذه الطريقة تُدعى بالسلسلة القائد Leading strand.



الشكل (6:4): تصنيع السلسلة القائد والسلسلة المتلكئة خلال تنسخ ال DNA. يرتبط ال polemerase III DNA بشكل وثيق مع بروتين يحيط بالحلزون المزدوج المصطنع حديثاً كالكعكة. لاحظ أن قطع أوكازاكي أطول بكثير مما يبدو في الشكل. لقد مثلنا في هذا الشكل خمسة أسس لكل قطعة للتبسيط.

ولتطويل سلسلة ال DNA الجديد الآخر في الاتجاه `3→`5 الإجباري، يجب أن يعمل إنزيم تكثيف ال DNA (DNA Pol III) على طول السلسلة القالب الأخرى بعكس اتجاه شوكة التنسخ (التضاعف). تُدعى سلسلة ال DNA المصنعة بهذه الطريقة بالسلسلة المتلكئة lagging strand، وبعكس السلسلة القائد الذي يتم اصطناعها بشكل مستمر، يتم تصنيع السلسلة المتلكئة على شكل سلسلة من القطع. عندما تُفتح فقاعة التنسخ إلى الحد المطلوب، يقوم DNA Pol III بالالتصاق بالسلسلة المتلكئة ويتحرك بعيداً عن شوكة التنسخ، مصطنعاً قطعة صغيرة من ال DNA.

وبينما تنمو الفقاعة، يمكن تصنيع قطعة أخرى وهكذا، تُدعى هذه القطع من السلسلة المتلكئة بقطع أوكازاكي Okazaki fragments، نسبة إلى العالم الياباني الذي اكتشفها. يتراوح طول هذه القطع بين 1000 إلى 2000 نكليوتيد في ال E. coli و100 إلى 200 نكليوتيد في الخلايا حقيقية النواة. ويقوم إنزيم آخر يدعى DNA Ligase بجمع الهياكل السكرية الفوسفورية الداعمة لقطع أوكازاكي مشكلاً سلسلة جديدة مفردة.

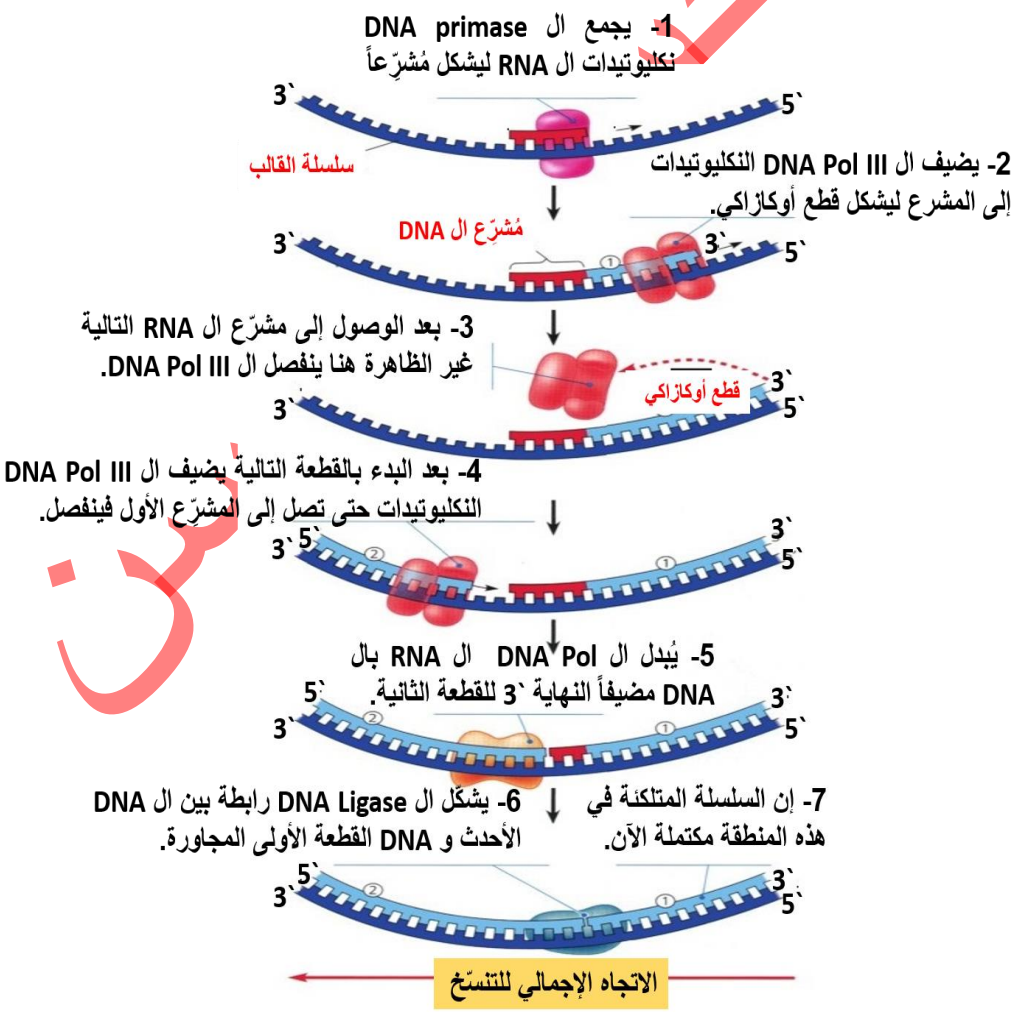
ث- الشروع باصطناع ال DNA (priming DNA Synthesis)

- لا يمكن لإنزيمات تكثيف ال DNA أن تُطلق (تقدح) اصطناع عديدات النكليوتيد (سلسلة DNA جديدة). بل يمكنها فقط إضافة النكليوتيدات إلى النهاية `3 من سلسلة أولية قصيرة موجودة مسبقاً تزدوج قواعدها مع السلسلة القالب (الشكل 5:4).
- إن سلسلة النكليوتيدات الأولية قصيرة وتُدعى المُشرّع (البادئ) primer. يتألف المُشرِّع إما من ال DNA أو ال RNA، وفي بدء التّنسّخ الخلوي يكوّن المُشرّع امتداداً قصيراً من ال RNA مع مجموعة هيدروكسيل حرة على النهاية `3، ويمكن لإنزيم يدعى البريماز Primase أن يبدأ بسلسلة RNA من لا شيء.
- يقوم إنزيم ال Primase بجمع نكليوتيدات ال RNA معاً بشكل متتابع، صانعاً مُشرِّعاً متمماً للسلسلة القالب في الموقع الذي سيحدث فيه بدء سلسلة ال DNA الجديد (طول المشرع عادة من 5 إلى 10 نكليوتيدات).
- ومن ثم يضيف إنزيم تكثيف ال DNA بوليميراز (III) نكليوتيد DNA إلى النهاية `3 لمشرّع ال RNA ثم يستمر بإضافة نكليوتيدات ال DNA لسلسلة ال DNA الآخذة بالنمو حسب قاعدة تزاوج الأسس.

- يحتاج ال DNA Pol III مُشرِّعاً واحداً للبدء باصطناع السلسلة القائد، أما في اصطناع السلسلة المتلكئة، تحتاج كل قطعة أوكازاكي إلى مُشرّع مستقل (الشكل 7:4).

- يقوم إنزيم ال DNA pol I باستبدال نكليوتيدات ال RNA الخاصة بالمُشرّع بنكليوتيدات ال DNA، وإضافتها الواحدة تلو الأخرى إلى النهاية `3 بقطعة أوكازاكي المجاورة (القطعة /2/ من الشكل 7:4) لكن إنزيم DNA pol I لا تستطيع ضم النكليوتيد الأخير لقطعة ال DNA المستبدلة هذه إلى نكليوتيد ال DNA الأولى لقطعة أوكازاكي والتي تم استبدال مُشرّعها للتو (القطعة /1/ في الشكل 7:4).

- لذلك يقوم إنزيم ال DNA ligase بهذه المهمة، حيث يضم الهياكل السكرية الفوسفورية الداعمة لكل قطع أوكازاكي لتشكيل سلسلة مستمرة من ال DNA.



الشكل (7:4): تصنيع السلسلة المتلكئة.

بروتينات أخرى تساعد في تنسخ ال DNA

تعرفنا على ثلاثة أنواع من البروتينات التي تُوظف في اصطناع ال DNA وهي:

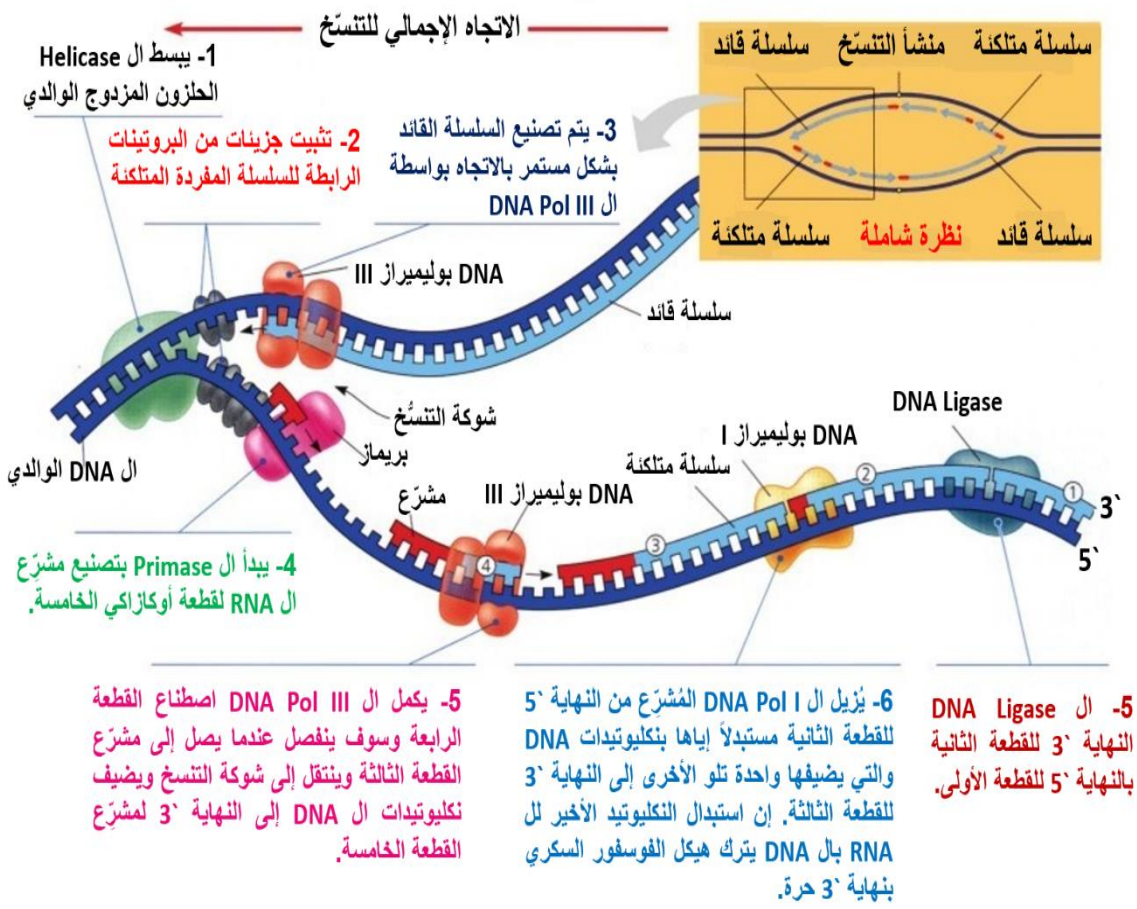
1- إنزيمات تكثيف ال DNA (DNA Pol III,II,I).
2- إنزيم ال DNA ligase.
3- الإنزيم المُشرّع DNA Primase.

لكن هناك أنواع أخرى تشارك في تنسخ ال DNA ومنها:

- إنزيم الهيليكاز Helicase وهو ضروري لفك الشريط الحلزوني المزدوج.
- إنزيم التوبوإيزوميراز Topoisomeraseوهو ضروري لتخفيف الإجهاد أمام شوكة التضاعف.
- البروتينات الرابطة مفردة السلسلة كالهيليكاز Helicase الذي يعمل على تقويم الحلزون المزدوج عند شوكة التضاعف (التنسخ)، فاصلاً بين السلسلتين الأصليتين ومهيئاً كل منهما لتعمل كسلسلة قالب.

تسبب عملية فك الالتواء هذه التواءً أشد وإجهاداً أمام شوكة التنسخ، ويساعد التوبوإيزوميراز Topoisomerase في تخفيف هذا الإجهاد. وبعد أن يقوم إنزيم ال Helicase بفصل السلسلتين الوالديتين ترتبط جزيئات البروتينات الرابطة وحيدة السلسلة مع السلسلتين المفردتين لجعلهما مستقرتين ريثما يقومان بدورهما كقالبين لاصطناع سلاسل متممة جديدة. يلخص الشكل (8:4) والجدول (16:1) عملية تنسخ ال DNA.

د. حسان حسن



الشكل (8:4): خلاصة تنسخ ال DNA البكتيري. يظهر الشكل التفصيلي شوكة تنسخ (تضاعف) واحدة، لكن كما هو موضح في الشكل الشامل يحدث التنسخ بشكل متزامن بواسطة شوكتين، واحدة في كل نهاية لفقاعة التنسخ، لاحظ في الشكل الشامل أن قدح سلسلة القائد يتم بمُشرّع RNA (أحمر) كما كل شدفة أوكازاكي في السلسلة المتلكئة، وبمشاهدة كل سلسلة بنت بشكلها الكلي في النظرة الشاملة يمكننا أن ندرك أن نصفها يصنع كسلسلة قائد بشكل مستمر، بينما النصف الآخر على الطرف الآخر من الأصل يصنع بشكل قطع كسلسلة متلكئة.

الجدول (1:4): بروتينات تنسخ ال DNA البكتيري ووظائفها

البروتين	الوظيفة في السلسلة القائد والسلسة المتلكئة	
Helicase	إزالة التواء الحلزون المزدوج عند شوكة التنسخ	
بروتين رابط مفرد الطاق	يرتبط بالسلسلة المفردة لل DNA ويجعله مستقراً حتى يمكن استخدامه كقالب	
Topoisomerase	يصحح الالتواء المفرط بعد شوكة التنسخ بكسر وتدوير وإعادة جميع سلاسل ال DNA	
	وظيفة في السلسلة القائد	**وظيفة في السلسلة المتلكئة**
Primase	يُصنّع مشرّع RNA واحد في النهاية `5 للسلسلة القائد	يُصنّع مشرِّع RNA في النهاية `5 لكل قطع أوكازاكي
DNA pol III	يُصنّع السلسلة القائد بشكل مستمر، مضيفاً النكليوتيدات للمُشرّع	يقوم بتطويل كل قطع أوكازاكي بإضافة النكليوتيدات إلى مُشرّعها
DNA pol I	يزيل المُشرّع من النهاية `5 للسلسلة القائد، ويستبدلها ب DNA مضيفاً إلى النهاية إلى النهاية `3 المجاورة	يزيل المُشرّع من النهاية `5 لكل قطعة، ويستبدلها ب DNA مضيفاً إلى النهاية `3 للقطعة المجاورة
DNA ligase	يضم النهاية `3 لل DNA التي استبدل المُشرّع بها إلى السلسلة القائد	يضم قطع أوكازاكي

ثالثاً: آلة تنسخ ال DNA كمعقد ثابت

إنه لمن لمناسب تمثيل جزيئات ال DNA كقاطرة تتحرك على طول ال DNA (سكة القطار). لكن هذا النموذج غير دقيق في نقطتين مهمتين:

1- تشكل مختلف البروتينات التي تساهم في تنسخ ال DNA معقداً كبيراً واحداً /آلة تنسخ ال DNA/. وتسهل تآثرات بروتينية-بروتينية عديدة عمل هذه الآلة، فمثلاً يعمل إنزيم ال Helicase بشكل أسرع عندما يكون على تماس مع إنزيم ال Primase.

د. حسان حسن

2- إن آلة تنسخ ال DNA هي غالباً ثابتة خلال عملية التنسخ. في الخلايا حقيقية النواة، تتجمع عدة نسخ من الآلة على شكل مصانع ترسو في المادة النووية مشكلة هيكلاً من الألياف يمتد إلى داخل النواة.

تدعم الدراسات الحديثة نموذجاً تقوم فيه جزيئة ال DNA بوليميراز بدور البكرة التي تلف حبل ال DNA الوالدي، وينبثق منها جزيئات DNA بنات جديدة وتقترح براهين أخرى أن السلسلة المتلكئة تتشكل على شكل عرى من المعقد وبالتالي عندما يكمل إنزيم تكثيف ال DNA اصطناع قطعة أوكازاكي وينفصل، لا يتوجب عليه السفر بعيداً ليصل إلى مشرع القطعة التالية قرب شوكة التنسخ. إن عرى السلسلة المتلكئة هذه تشرع اصطناع قطع أوكازاكي أكثر في وقت أقل.

رابعاً: تصحيح التجارب الطباعية Proofreading وإصلاح ال DNA

لا يمكننا إرجاع دقة تنسخ ال DNA إلى النوعية في ازدواج الأسس فقط، فعلى الرغم من الأخطاء في جزيئة ال DNA المكتملة تقارب نسبة الواحد في ال 10 بليون نكليوتيد، فإن أخطاء الإزدواج الأولية بين النكليوتيدات الحديثة وتلك في السلسلة القالب هي أكثر من ذلك ب 100.000 مرة بما معدله خطأ واحد لكل 100.000 زوج من الأسس.

في الواقع، خلال عملية تنسخ ال DNA يقوم إنزيم تكثيف ال DNA بتصحيح التجربة الطباعية لكل نكليوتيد مع نكليوتيده الموافق في الوقت الذي يتم فيه إضافته إلى السلسلة المتنامية. وعندما يجد نكليوتيداً مزدوجاً بشكل غير صحيح يقوم إنزيم تكثيف ال DNA بحذف النكليوتيد ويستمر بالاصطناع. (تشبه هذه العملية تصحيح الخطأ الطباعي باستخدام زر الحذف ومن ثم إدخال الحرف الصحيح) يُدعى تصحيح ال DNA بهذه الطريقة الإصلاح بعكس الضرر ويكون التصليح هنا مباشر بحيث يعيد العمل الإنزيمي البنية المتغيرة إلى الشكل الطبيعي.

ولكن قد تتجنب النكليوتيدات، غير المتوافقة (المرتبطة بشكل خاطئ)، أحياناً عملية التصحيح من قبل إنزيم تكثيف ال DNA أو قد تنشأ بعد أن يكتمل اصطناع ال DNA عبر حدوث أذيّة لأساس نكليوتيدي موجود مسبقاً. فمثلاً تستخدم الخلايا إنزيمات خاصة في عملية تثبيت النكليوتيدات المغلوطة الازدواج. لقد ركّز

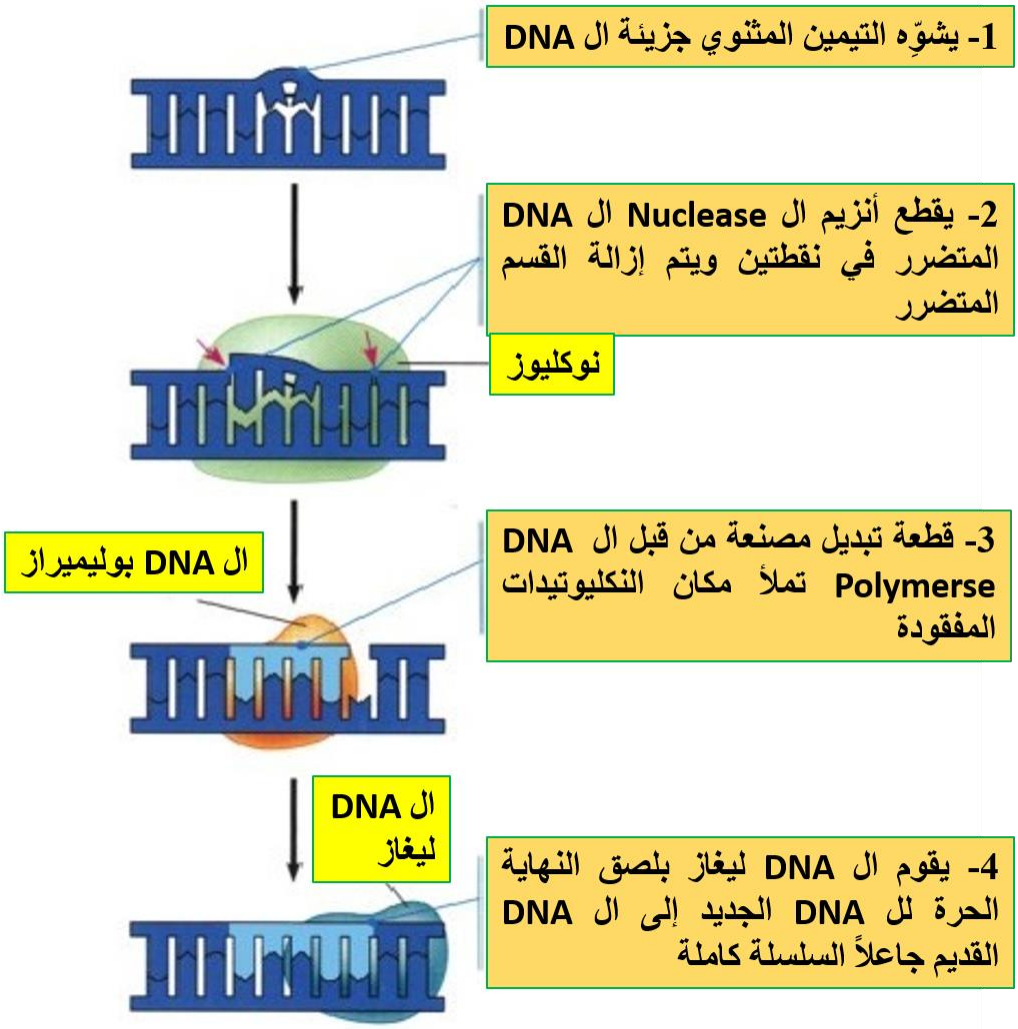
الباحثون على أهمية تلك الإنزيمات عندما وجدوا أن عيباً وراثياً في واحدٍ منها يتوافق مع شكل من سرطان الكولون، ويبدو أن هذا العيب الوراثي يسمح للأخطاء المسببة للسرطان بالتراكم في ال DNA بمعدل أسرع من الطبيعي.

إن المحافظة على المعلومات الوراثية المرمّزة في ال DNA يحتاج إلى إصلاح متكرر للأضرار المختلفة التي يتعرض لها ال DNA الموجود. تتعرض جزيئات ال DNA بشكل دائم للعوامل الكيميائية والفيزيائية الضارة. تستطيع العوامل الكيميائية التفاعلية (في البيئة والتي تحدث في الخلايا بشكل طبيعي)، والانبعاثات الإشعاعية والأشعة السينية والأشعة فوق البنفسجية أن تغير النكليوتيدات بطريقة تؤثر على المعلومات الوراثية بشكل ضار.

وبالإضافة لذلك تتعرض قواعد ال DNA إلى تغيرات كيميائية عضوية في الظروف الخلوية الطبيعية. ولحسن الحظ يتم تصحيح التغيرات في ال DNA قبل أن تصبح طفرات ذاتية الاستمرار. تراقب كل خلية وتصحح مادتها الوراثية بشكل دائم. ولأن إصلاح ال DNA المتضرر ضروري جداً لبقاء الكائن الحي، فليس مستغرباً وجود عدد من إنزيمات إصلاح ال DNA المختلفة. يُعرف منها حتى الآن، حوالي 100 في بكتيريا ال E. coli ، و130 عند البشر.

تستفيد معظم آليات إصلاح ال DNA من البنية مزدوجة الأسس لل DNA. عادة يتم قطع السلسلة التي تحتوي الأذية بواسطة إنزيم قاطع لل DNA وهو إنزيم النكلياز DNA cutting enzyme –nulease ويتم ملء الثغرة بنكليوتيدات تزدوج بشكل صحيح مع النكليوتيدات في السلسلة السليمة.

إن الإنزيمات التي تساهم في عملية ملء الثغرة هي إنزيمات تكثيف ال DNA (DNA- Polymerase) و إنزيم الليكاز (Ligase). يُدعى تصحيح ال DNA بهذه الطريقة الإصلاح باستئصال النكليوتيد Nucleotide excision repair (الشكل 4: 9).



الشكل (9:4): الإصلاح باستئصال النكليوتيد لل DNA المتضرر. يقوم فريق من إنزيمات باكتشاف وإصلاح ال DNA المتضرر. يظهر هذا الشكل DNA يحتوي تيمين مثنوي، وهو نوع من الضرر يحدث غالباً بسبب الأشعة فوق البنفسجية. يقطع إنزيم nuclease المنطقة المتضررة من ال DNA و يقوم إنزيم DNA POLYMERASE في البكتيريا باستبداله بقطعة DNA طبيعية. ويكمل إنزيم ال ligase العملية بإغلاق الشرخ المتبقي في هيكل السكر –الفوسفور الداعم.

إن إحدى وظائف إنزيمات الإصلاح ال DNA في خلايا جلدنا هي إصلاح الضرر الوراثي الناتج عن الأشعة فوق البنفسجية في ضوء الشمس. أحد أنماط الضرر الظاهر في الشكل (9:4) هو الارتباط التكافؤي لقواعد التيمين المتجاورة على سلسلة ال DNA. إن مثنويات التيمين تجعل ال DNA يلتوي وتتدخل في

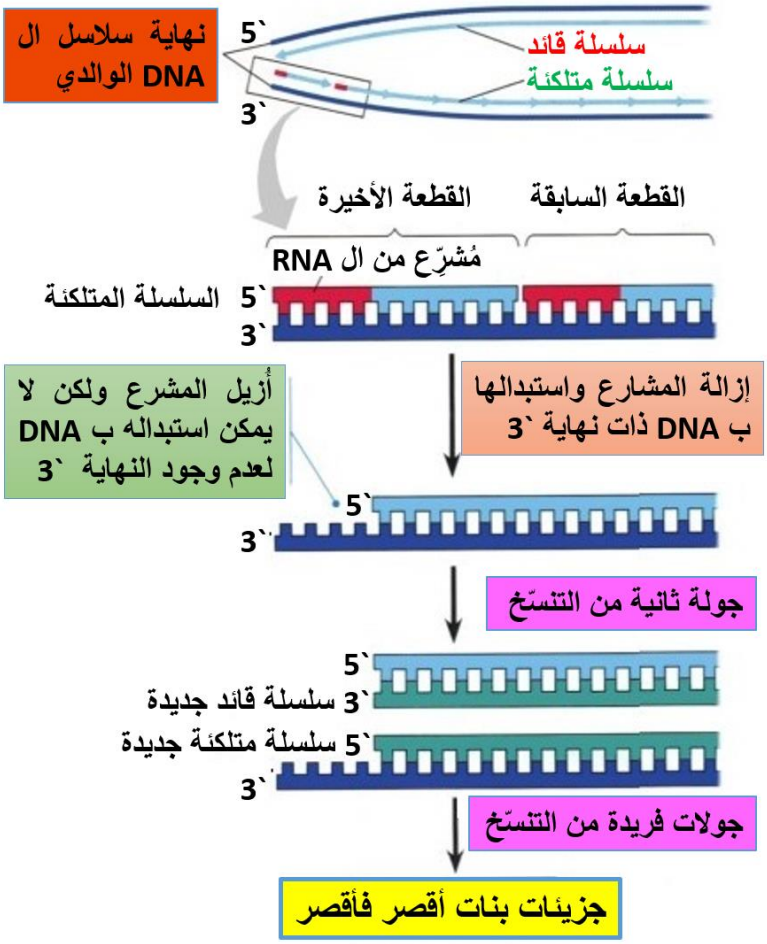
عملية تنسخه. تتضح أهمية إصلاح هذا النوع من الضرر من خلال مرض جفاف الجلد المصطبغ والذي ينجم في معظم الحالات عن عيب وراثي في أحد إنزيمات الإصلاح باستئصال النكليوتيد. يكون المصابون بهذا الاضطراب ذوي تحسس مفرط لضوء الشمس، وتبقى الطفرات التي تحدث في خلايا جلدهم بسبب الأشعة فوق البنفسجية دون تصحيح وتسبب سرطان الجلد.

خامساً: تنسخ نهايات جزيئات ال DNA:

على الرغم من الدور الرئيسي الذي تلعبه إنزيمات ال DNA بوليميراز في عملية تنسخ وإصلاح ال DNA، تبين لاحقاً أنه هناك جزءاً صغيراً من ال DNA الخلوي لا تستطيع هذه الإنزيمات القيام بعملية التنسّخ والإصلاح فيه. إن حقيقة أن ال DNA بوليميراز قادر على إضافة النكليوتيدات إلى النهاية `3 فقط من عديد نكليوتيد موجود مسبقاً يشكل مشكلة في DNA الخلايا حقيقية النواة.

حيث لا توجد طريقة تستطيع فيها آلة التنسّخ لإكمال النهاية `5 لسلسلة ال DNA الجديد وحتى إن أمكن بدء قطعة أوكازاكي بمُشرِّع RNA مرتبط بنهاية السلسلة القالب، فحالما يتم نزع المُشرِّع، لا يمكن استبداله بال DNA، لعدم وجود نهاية `3 يستطيع إنزيم ال DNA بوليميراز إضافة نكليوتيدات لها (الشكل 10:4). وبالتالي تنتج إعادة جولات التنسّخ جزيئات DNA أقصر فأقصر.

د. حسان حسن

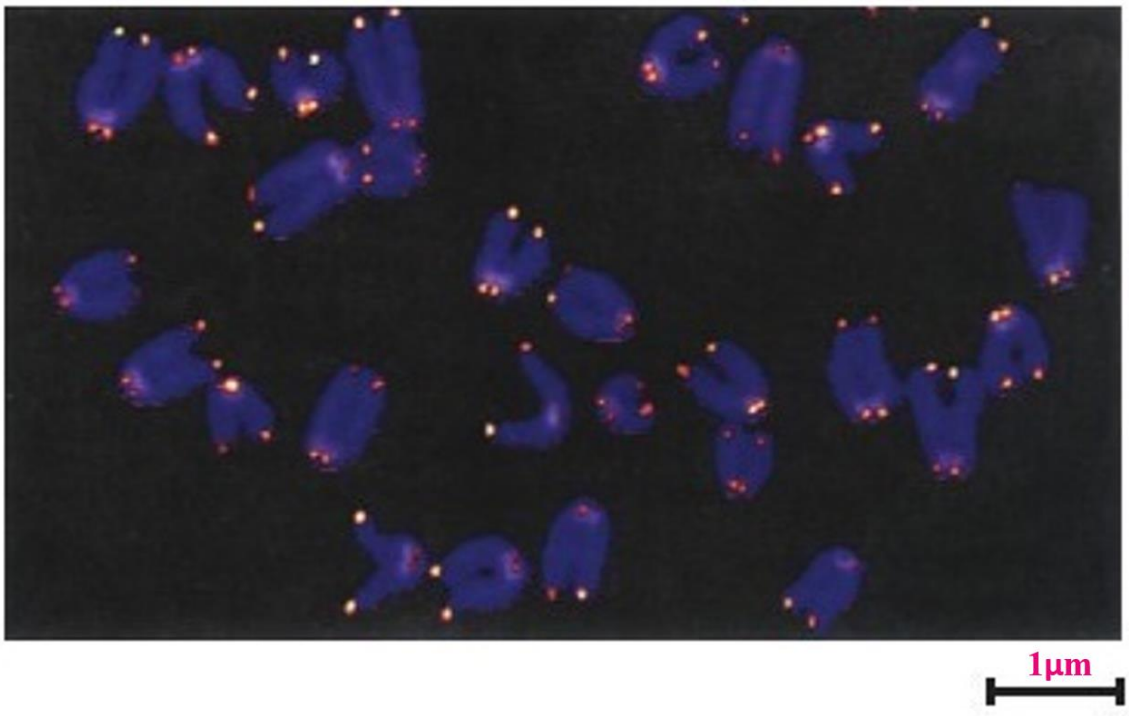


الشكل (10:4): تقاصر نهايات جزيء ال DNA الخطي: تتبع هنا نهاية أحد سلسلتي جزيء ال DNA خلال جولتين من التنسّخ بعد الجولة الأولى. نلاحظ أن السلسلة المتلكئة الجديدة أقصر من السلسلة القالب، بعد جولة ثانية، أصبح كل من السلسلة القائد والسلسلة المتلكئة أقصر من ال DNA الأبوي الأصلي وهكذا تصبح النهايات الأخرى لجزيئات ال DNA هذه أكثر قصراً.

لا تواجه بدائيات النوى هذه المشكلة لأنها تمتلك DNA حلقي دون نهايات لكن ماذا عن الخلايا حقيقية النواة؟

تمتلك جزيئات ال DNA الصبغي في الخلايا حقيقية النواة تتالياً نكليوتيدياً يدعى القسيم الطرفي telomeres في نهاياتها (الشكل 11:4). لا تحتوي القسيمات الطرفية على مورثات، بل يتألف ال DNA

من تكرارات متعددة لتتالية نكليوتيدية قصيرة. وعلى سبيل المثال، فإن الوحدة المتكررة في القسيم الطرفي البشري هي تتالية من 6 نكليوتيدات TTAGGG. يختلف عدد التكرارات في القسيم الطرفي من 100 إلى 1000.



الشكل (11:4): القسيمات الطرفية. تمتلك الخلايا حقيقية النواة تتالياً متكرراً غير مُشفّر يُدعى القسيم في نهايات ال DNA الخاص بها. وهي مُعلَّمة في صبغيات الفئران هذه بصباغ برتقالي ساطع (LM).

يقوم القسيم الطرفي بمجموعة من الوظائف هي:

- يحمي القسيم الطرفي جينات الكائن الحي من التآكل عبر جولات تنسخ ال DNA المتتابعة.
- يمنع DNA القسيم الطرفي وبروتينات معينة تترافق معه بطريقة ما النهايات المتعثرة staggered من الجزيئات البنات من تفعيل منظومات الخلية لمراقبة أذية ال DNA. (إن نهاية جزيئة ال DNA التي تشاهد على أنها شرخ في الجزيئ المزدوج يمكنها في حال تركها مفعلة قدح إشارات مسالك التحويل الطاقي مؤدية إلى توقف الدورة الخلوية وموت الخلية).
- لا تمنع القسيمات الطرفية تقصير جزيئة ال DNA بسبب الجولات المتعاقبة من التنسخ، لكنها تؤجل تآكل الجينات قرب نهايات جزيئة ال DNA.

- وكما يظهر في الشكل (10:4) تقصر القسيمات الطرفية مع كل جولة من التنسخ. وبالتالي، يميل القسيم الطرفي لأن يكون أقصر في الخلايا الجسمية المنقسمة في الأشخاص الأكبر عمراً، وفي الخلايا المستنبتة التي انقسمت عدة مرات. وقد اقترح أنه هناك علاقة بين تقاصر قسيمات الطرفين وعملية الشيخوخة في أنسجة معينة وشيخوخة الكائن الحي ككل.

لكن ماذا عن الخلايا التي يبقى جينومها دون تغير من كائن حي إلى نسله عبر أجيال متعددة؟

- إن كانت صبغيات الخلايا الجنسية Germ Cells (والتي ستعطي الأعراس gamete) تقصر مع كل دورة خلوية، فستفقد جينات أساسية في الأعراس التي تنتجها. ولحسن الحظ، لا يحدث ذلك لأن هناك:
- إنزيم يدعى التيلوميراز telomerase يحفز تطويل القسيم الطرفي في الخلايا الجنسية في حقيقية النواة، وبالتالي يعيدها إلى طولها الأصلي ويعوض عن التقاصر الناتج عن تنسخ ال DNA.
- إن عملية التطويل ممكنة بسبب وجود جزيئة قصيرة من ال RNA في القسيم الطرفي تعمل كقالب لقطع قسيمات طرفية جديدة.
- لا تكون التيلوميراز مفعلة في معظم الخلايا الجسمية، لكن فعاليتها في الخلايا الجنسية تنتج قسيمات طرفية بالطول الأعظمي في اللاقحة (البيضة الملقحة).
- يمكن لتقاصر القسيمات الطرفية النظامي أن يحمي الكائن الحي من السرطان بتحديد عدد الانقسامات التي يمكن للخلية الجسدية أن تمر بها.
- تملك خلايا الأورام الكبيرة قسيمات طرفية قصيرة بشكل غير معتاد، وهذا متوقع في خلية انقسمت مرات كثيرة. وإن التقاصر أكثر من ذلك سيؤدي افتراضياً إلى التخريب الذاتي للسرطان. ومما يثير الاهتمام ما وجده العلماء من فعالية للتيلوميراز في الخلايا الجسمية السرطانية، مما يقترح أن قدرته على تثبيت طول القسيم المركزي قد يسمح لهذه الخلايا السرطانية بالاستمرار.
- يظهر عدد من الخلايا السرطانية قدرة غير محدودة على الانقسام الخلوي، كما في ذراري الخلايا الخالدة المستنبتة.
- إذا كان التيلوميراز حقاً عاملاً مهماً في سرطانات متعددة، فمن الممكن أن تشكل هدفاً مفيداً في تشخيص السرطان وعلاجه الكيميائي.

باختصار فإن عملية تضاعف ال DNA في بدائيات النوى Replication of Prokaryotic DNA تتم وفق الخطوات:

1. **بدء التضاعف:** وتشمل بدء فتح الحلزون المزدوج لتكوين شريطين كل منهما يعمل كقالب Template - والذي يعرف بأنه الشريط الأصلي الذي يتضاعف منه الشريط الجديد للدنا - ويتم ذلك بوساطة أنزيم Endonuclease والذي يقوم بقطع السلسلة في مناطق خاصة (السكر-فوسفات) تسمى مناطق بدء التضاعف Replication Origins ، ثم يتم تكسير الروابط الهيدروجينية وتتشكل شوكة التضاعف والتي تأخذ شكل حرف Y نتيجة تشكل فقاعات التضاعف(الشكل 12:4).
2. **فتح قالب الدنا:** ينفتح الشريط في نقطة بداية التضاعف على طوله بمساعدة ثلاثة أنواع من البروتينات:
   أ- بروتينات مرتبطة مع شريط الدنا المفرد (SSB) التي تساعد على عملية الفتح وثبات القالب لعملية البناء.
   ب- بروتينات فتح الدنا DNA-helicase والضرورية لفتح الشريط الحلزوني المزدوج.
   ج- أنزيم DNA-gyrase الذي يحفز تكون اللف الفائق السالب في الدنا.
3. **البادئ Priming:** وهو قطعة صغيرة من الرنا البادئ (5-10 نيكليوتيدة) والتي تتخلق من عمل أنزيم يسمى Primase الذي يعمل على تكوين مجموعة هيدروكسيل حرة على النهاية 3′ في ال RNA، التي تضاف عليها نيكليوتيدات ال DNA. ومن ثم يتم إزالة ال RNA البادئ كلياً أنزيمياً والذي يترك فجوة يستوجب ملؤها.
4. **أنزيمات البلمرة (التضاعف)** DNA Polymerase: يوجد منه ثلاثة أنواع: I و II و III، يعمل كلٍ منها على تحفيز تضاعف ال DNA بتوجيه النيكليوتيدات توجيهاً مباشراً نحو ال DNA القالب ويتم التضاعف‘3→‘5.
   الأنزيم المبلمر I يرتبط مع الشريط المفرد للدنا وهو المسؤول عن ملئ الفجوات في البادئ، كما أنه يتفقد سلاسل النكليوتيدات وتستئصل الخاطئة منها بالاتجاه ‘3→‘5. الأنزيم المبلمر II سلسلة متعددة الببتيد وله نفس وظيفة الأنزيم المبلمر I. الأنزيم المبلمر III وهو سلسلتيين ببتيديتين ولا يستخدم في الشريط المفرد للدنا وغير ثابت ويعمل على غلق الفجوات على الشريط المزدوج للدنا ويعمل بالاتجاه ‘3→‘5.
5. **قطع أوكازاكي** Okazaki fragments: لاحظ العالم أوكازاكي ومساعديه أن الأشرطة الوليدة في البكتريا المعوية تضاف بشكل قطع مكونة من 1000-2000 نيكليوتيدة وبشكل غير متصل مع بعضها البعض على كلا الاتجاهين في منطقة التضاعف والتي أطلق عليها قطع أوكازاكي. حيث يمكن أن ترتبط مع بعضها البعض لإنتاج شريط متصل بواسطة أنزيم DNA-ligase.

أقسام الصبغي الداخلة في عملية التضاعف والانقسام:

كل جزيئة دنا والتي تشكل صبغي خطي يجب أن تحتوي على أجزاء معينة ضرورية لعملية التضاعف وهي:

- **الجسيم المركزي:** يربط الصبغي المتضاعف إلى خيوط المغزل في الطور الانقسامي ويوجه نسخه إلى كل خلية بنت بسبب مرونته العالية، لاحتوائه على كثافة عالية من الكروماتين المغاير.
- **الأجسام النهائية:** تشكل غطاء لأطراف الصبغي وتتكون من سلسلة متوالية لنكليوتيدات متشابهة تؤمن عملية التضاعف حتى نهاية الصبغي.

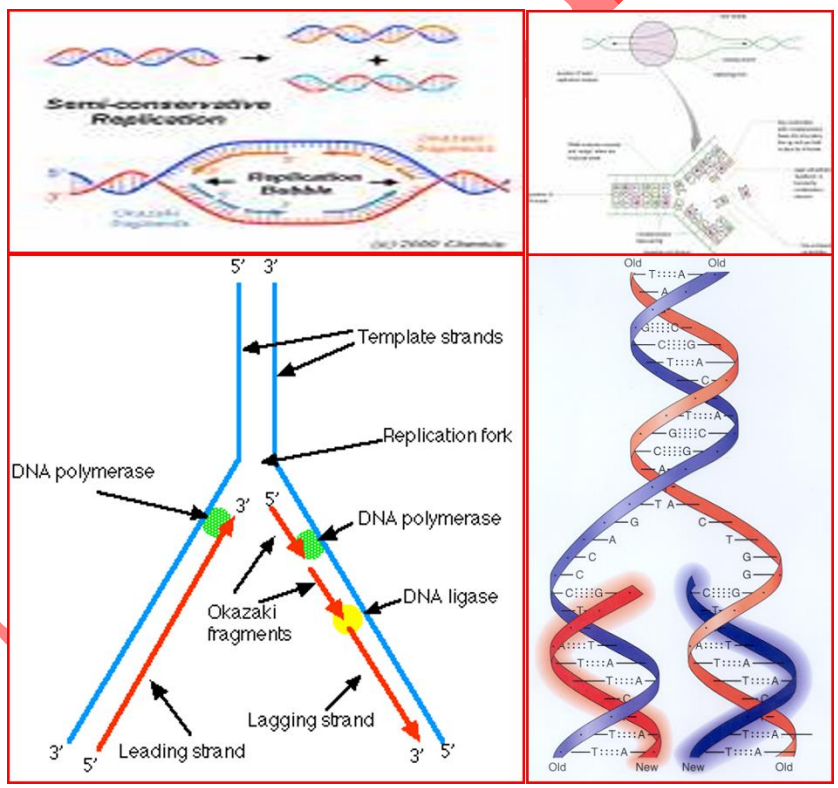
- **مناطق بدء التضاعف:** تتصف بأنها تحوي على تسلسلات قصيرة من النيكليوتيدات تجذب البروتينات البادئة، وتكون منطقة واحدة على الصبغي عند البكتريا بينما متعددة على الصبغي (حوالي 10000) عند حقيقيات النوى لذلك يبدأ التضاعف في عدة أماكن بنفس الوقت. إن الزوج الأكثر تواجداً في مناطق بدء التضاعف للدنا هو A-T لأن فصل روابطه الهيدروجينية أسهل وأسرع من الزوج C-G كون الأول يرتبط فقط برابطتين هيدروجينيتين والثاني بثلاث.

آلية تضاعف الدنا DNA Replication Mechanisims:

1. شوكة التضاعف Replication Fork:

ينفصل شريطي الدنا في مناطق بدء التضاعف وتتشكل شوكة التضاعف التي تأخذ شكل حرف Y وتعتبر الموقع الفعال للتضاعف، حيث تنفتح هذه الشوكة في اتجاهيين متعاكسين على سلسلة الدنا حتى التضاعف الكامل. تمثل أذرع الشوكة الشرائط الأصلية (القالب) لحلزون الدنا وفي الداخل تتوضع الشرائط المتممة (الشكل 12:4).

2. آلية التضاعف: بواسطة أنزيم DNA Polymerase ترتبط النيكليوتيدات الحرة القادمة من الوسط بشكل نيكليوتيد ثلاثي الفوسفات إلى القالب في شوكة التضاعف واحدة تلوى الأخرى.



الشكل (12:4): شوكة التضاعف التي تأخذ شكل حرف Y وتعتبر الموقع الفعال للتضاعف، حيث تنفتح هذه الشوكة في اتجاهيين متعاكسين على سلسلة الدنا حتى التضاعف الكامل. تمثل أذرع الشوكة الشرائط الأصلية (القالب) لحلزون الدنا وفي الداخل تتوضع الشرائط المتممة.