علم الوراثة

الفصل الرابع

تضاعف (تنسخ-نسخ) الـ DNA
DNA Replication

طلاب العلوم الصحية - السنة الثانية

الفصل الدراسي الثاني 2021

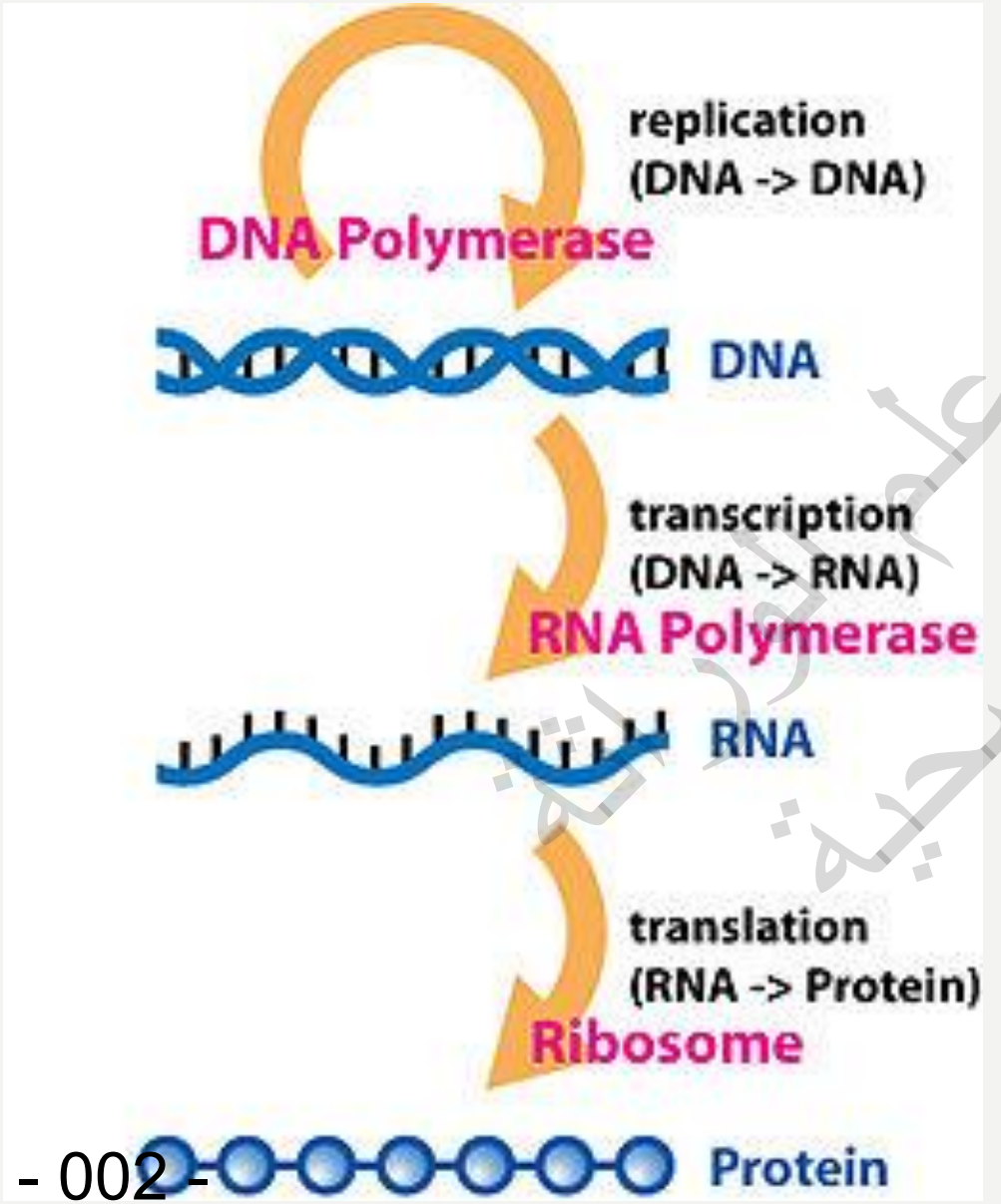
كلية العلوم الصحية

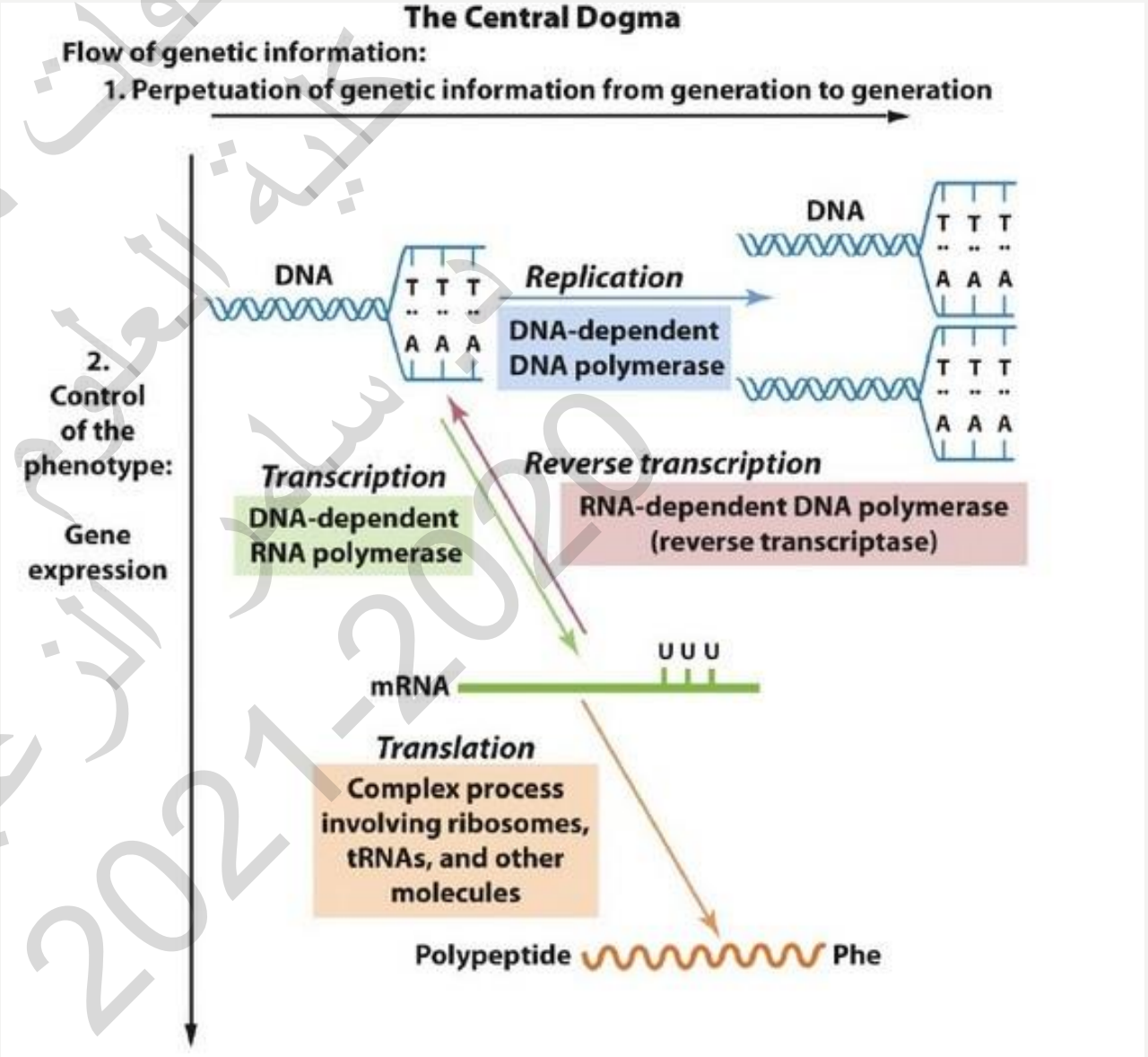
د. سامر الزعبي

10/06/2021

أهمية تضاعف الـ DNA

The central dogma



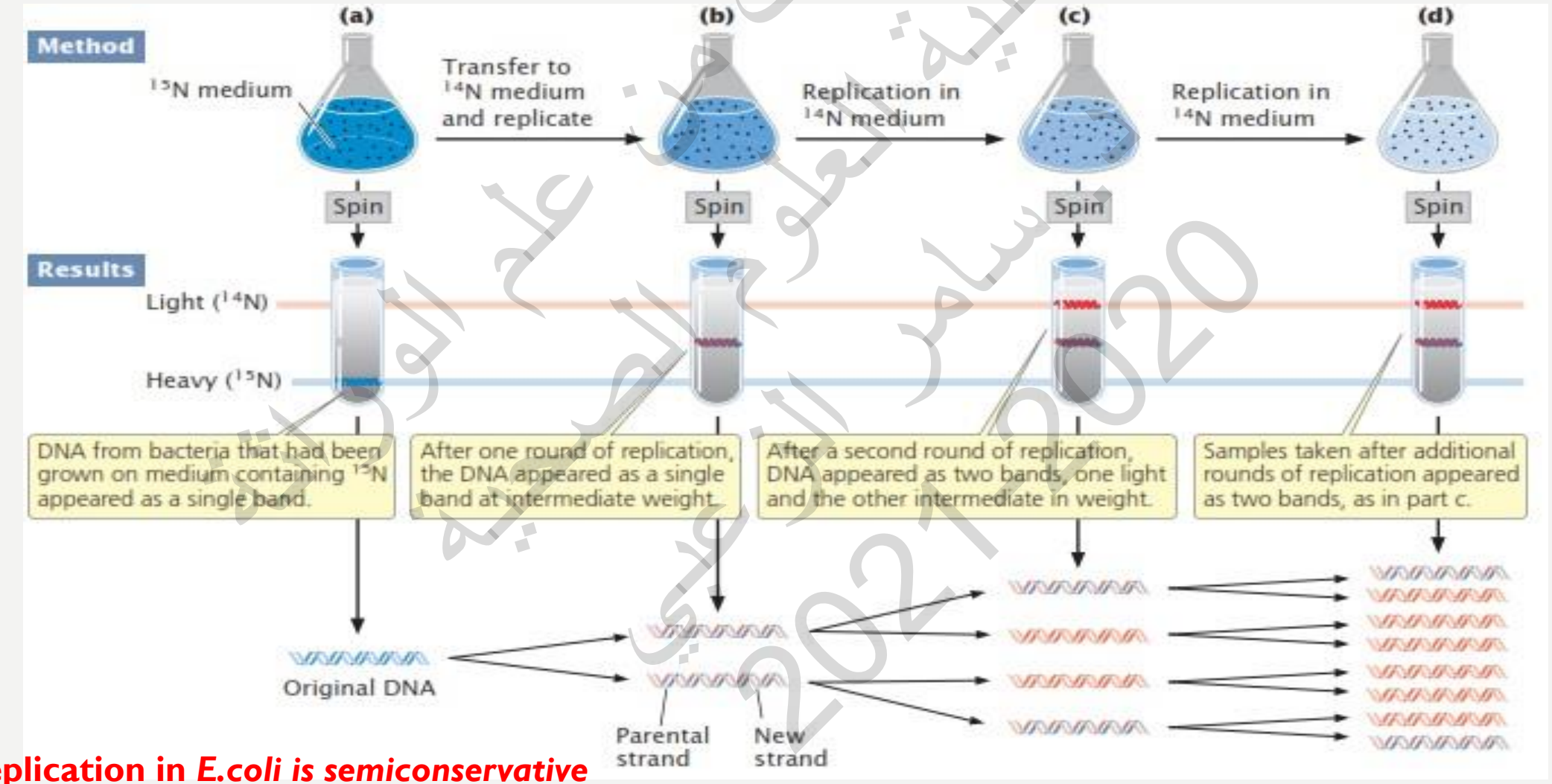


مقتطفات من علم الوراثة
كلية العلوم الصحية
سامر الزعبي
2020-2021

تضاعف الـ DNA

إثبات النظرية الصحيحة

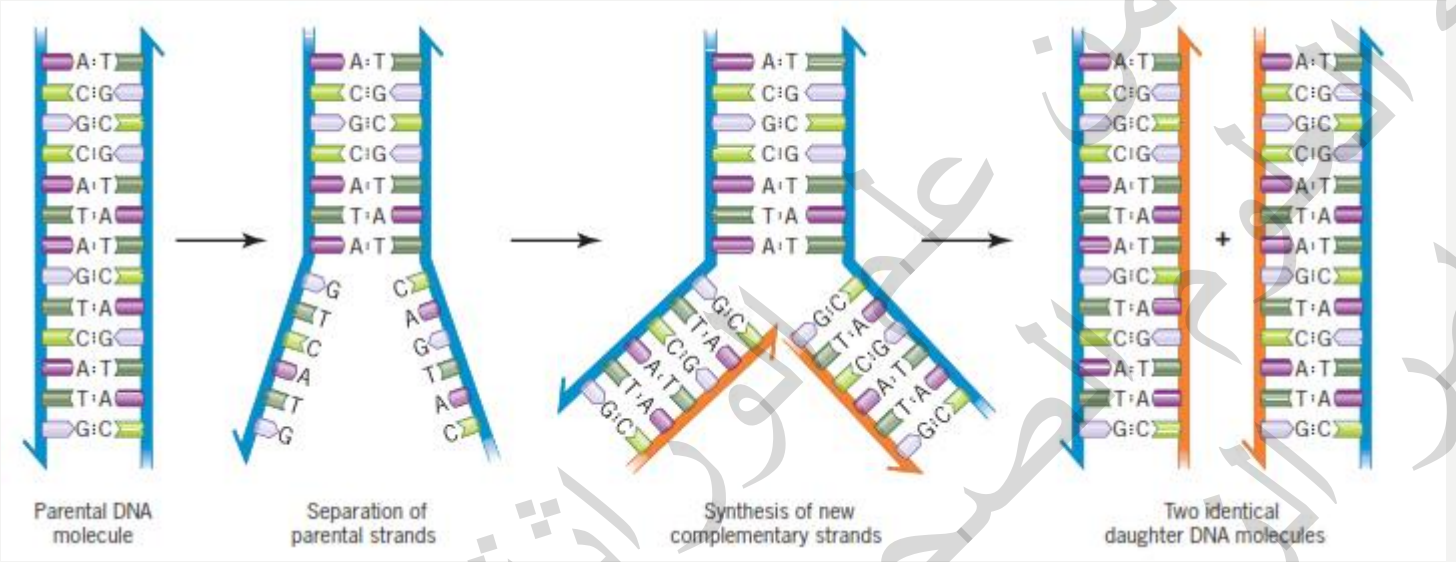
استخدم العالمان Stahl و Meselson نظيران للنيتروجين هما ^{14}N(النظير الشائع) و ^{15}N (النظير **الأثقل** والأندر). حيث زرع الباحثان جراثيم *E. Coli* في وسط يحوي ^{15}N كمصدر وحيد للنتروجين، بعد عدة أجيال تكون البكتيريا قد أدخلت ^{15}N في نوكليوتيدات الـ DNA. قام العالمان بعد ذلك بأخذ عينة من هذه الجراثيم (أخضعوها لتثفيل متدرج الكثافة) ، وزرعوا الجراثيم الباقية في وسط يحوي ^{14}N كمصدر وحيد للنتروجين، بعد جيل واحد أخذوا عينة أخضعوها لتثفيل متدرج الكثافة.



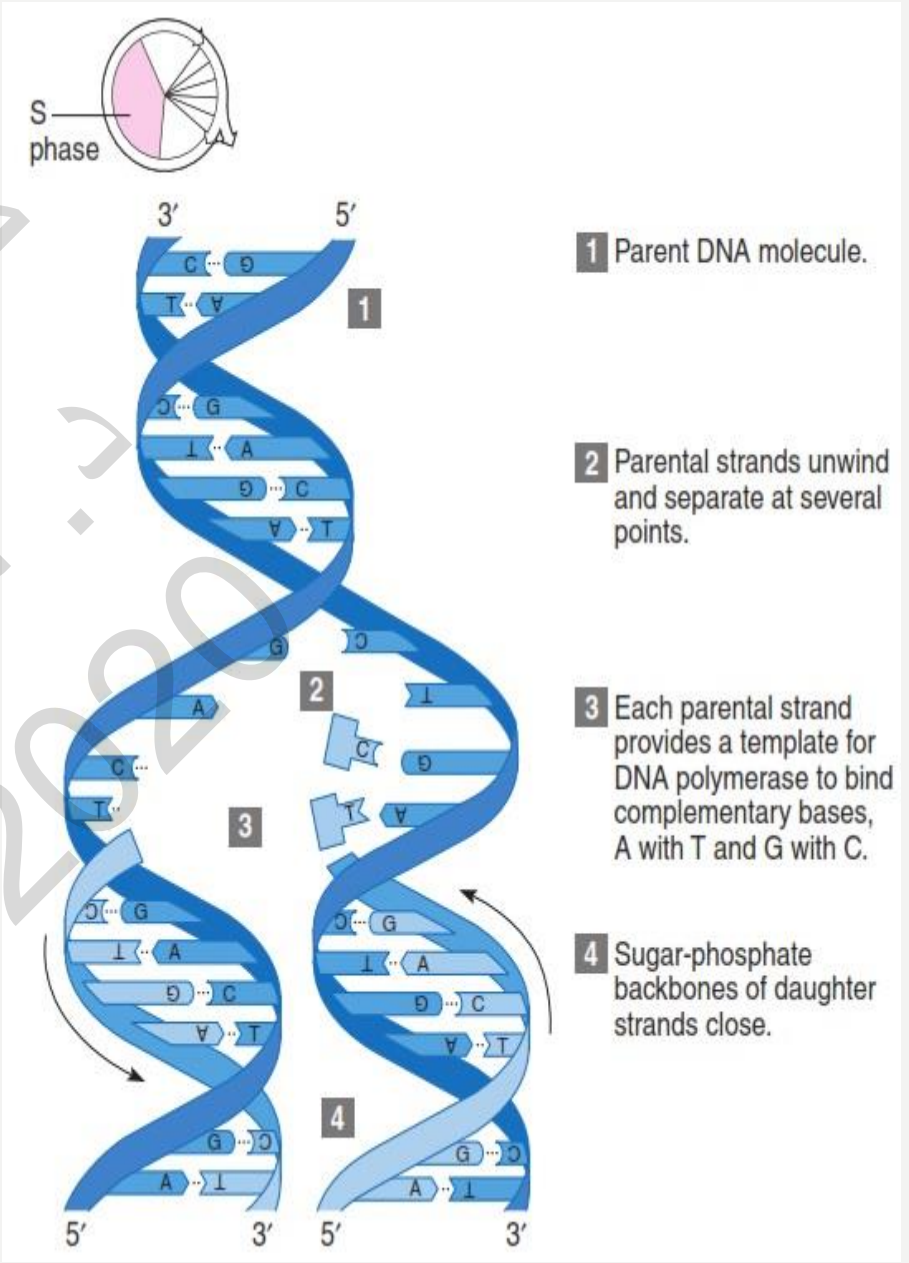
DNA replication in E.coli is semiconservative

تضاعف الـ DNA

تضاعف الـ DNA نصف محافظ semiconservative، يبدأ في عدة مناطق على طول الصبغي تسمى أصول التضاعف origin of replication ويتقدم باتجاهين متعاكسين من كل نقطة.

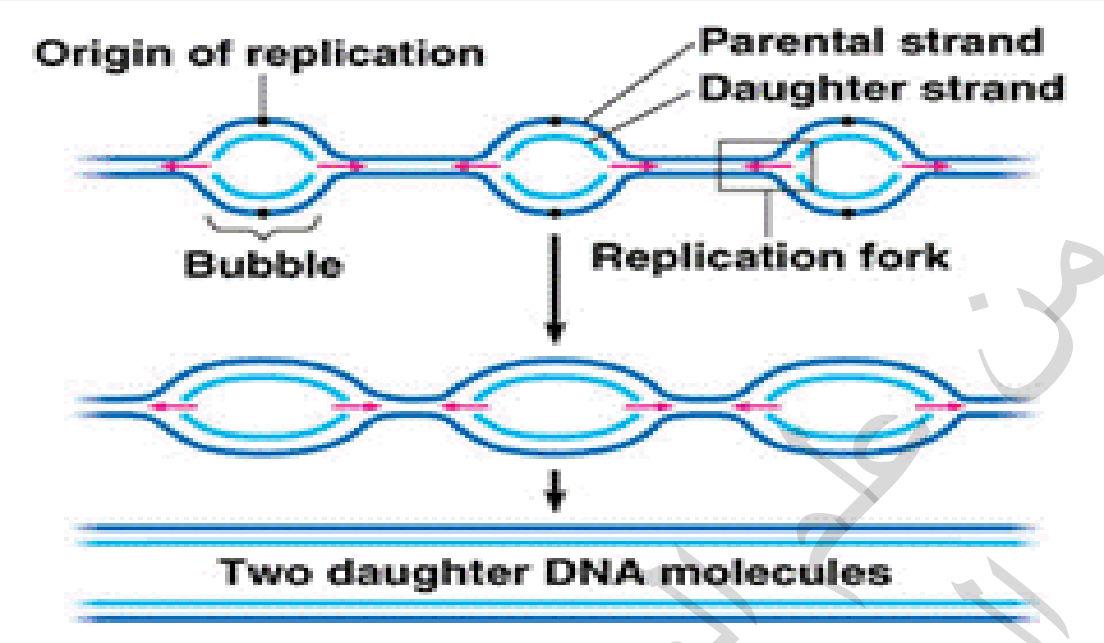


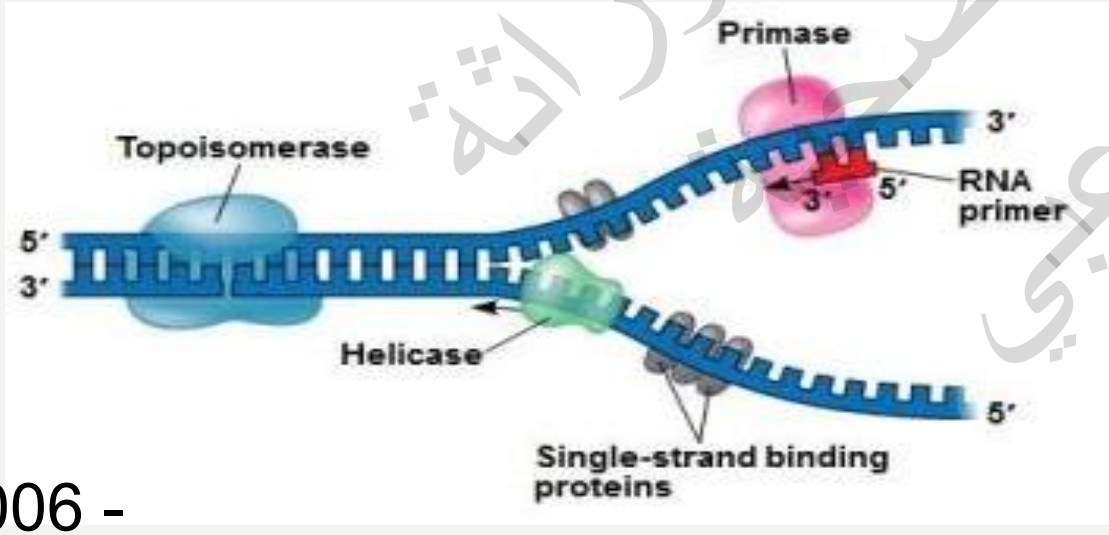
سبب تسمية تضاعف الـ DNA بنصف محافظ semiconservative هو أن كل جزيء DNA جديد يتألف من سلسلة قديمة (أبوية) وسلسلة جديدة مصنعة حديثاً.



2020-2021

مراحل تضاعف الـ DNA





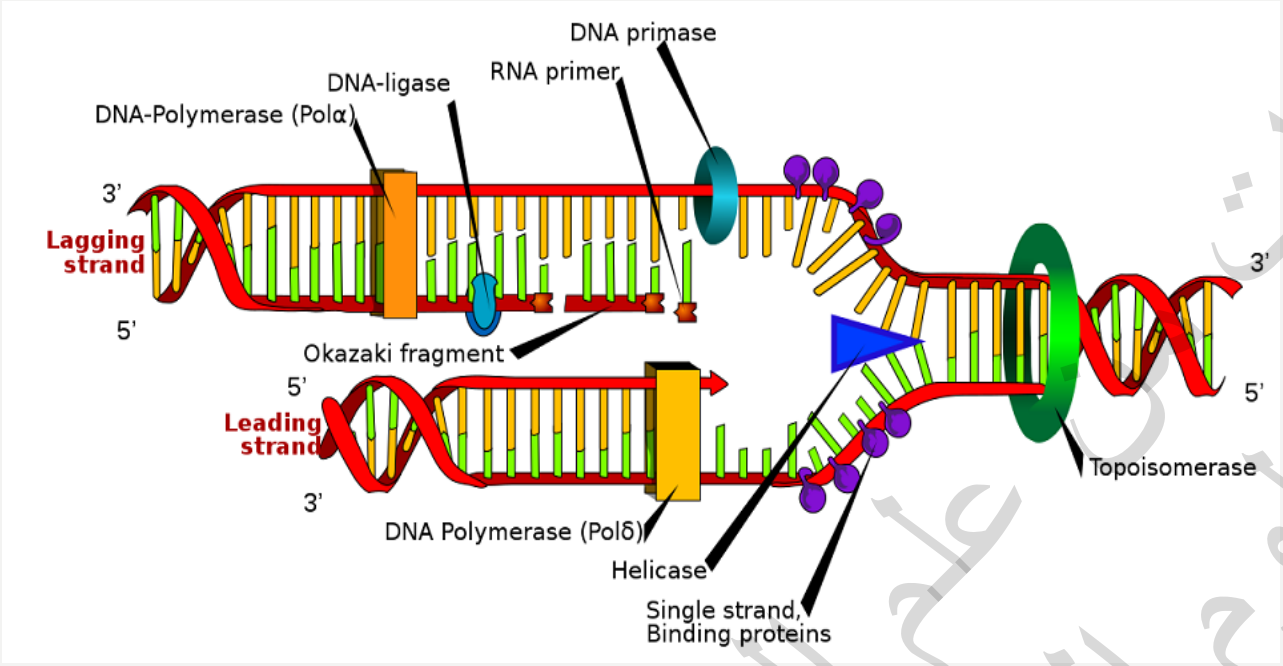
- يحث تضاعف الـ DNA في طور التركيب S من الدارة الخلوية في كل من الانقسام الفتيلي (الخيطي) و الانقسام المنصف.
- يدخل في عملية التضاعف عدد كبير و متنوع من البروتينات و الإنزيمات وذلك بدء من فك طاقي الـ DNA وانتهاء بتحري الأخطاء الناجمة عن عملية الانتساخ و إصلاحها.
- تبدأ عملية التضاعف بإبعاد البروتينات المرتبطة مع الـ DNA في حقيقات النوى أو تعديلها بحيث تسمح للبروتينات والإنزيمات الداخلة في التضاعف بالقيام بوظيفتها.
- تعود البروتينات التي ترتبط مع الـ DNA (الهيستونات وغيرها) للارتباط من جديد بالـ DNA حالما تنتهي عملية التضاعف وتشكل جزيء DNA جديد.
- تتم عملية اصطناع جزيئات الهيستون بالتزامن مع تضاعف الـ DNA في الطور S من الدارة الخلوية (مهمة).

➢ تبدأ عملية التضاعف بتحطيم جزئي للروابط الهيدروجينية مابين الأسس الآزوتية المتقابلة في سلسلتي أو طاقي الـ DNA بوساطة إنزيم الهليكاز Helicase في منطقة تدعى بشوكة التضاعف Replication fork.

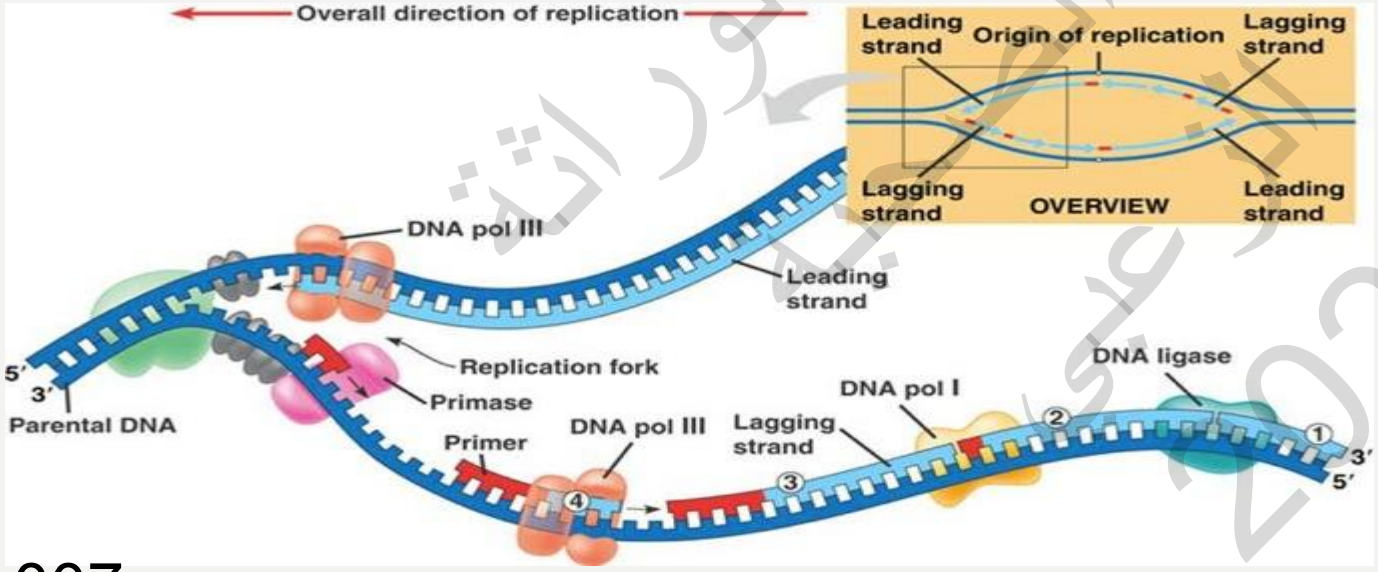
➢ هذا يؤدي إلى فك طاقي الـ DNA عن بعضهما وترتبط بكل طاق بروتينات **Single-strand DNA-binding protein (SSB)** لتبقيهما متباعدين (البروتينات الرابطة للطاق المفرد من الـ DNA).

➢ يؤدي فك طاقي الـ DNA عن بعضهما في منطقة أصول التضاعف إلى زيادة في توتر والتفاف الطاقين، وتشكل عقدة في منطقة قريبة من شوكة التضاعف، لذلك يقوم إنزيم Topoisomerase بقطع طاقي الـ DNA وحل العقدة أو الالتواء المتشكل عن فك الارتباط بين طاقي الـ DNA ثم وصل الطاقين مع بعضهما كما كانا في الأصل.

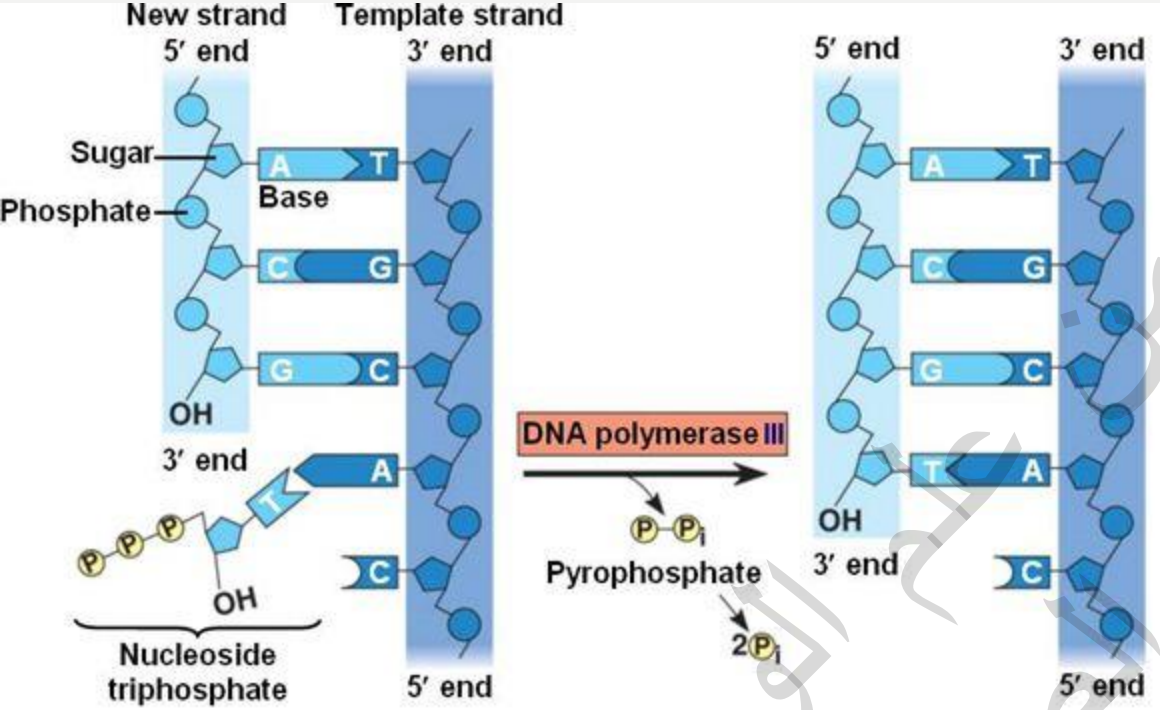
مراحل تضاعف الـ DNA



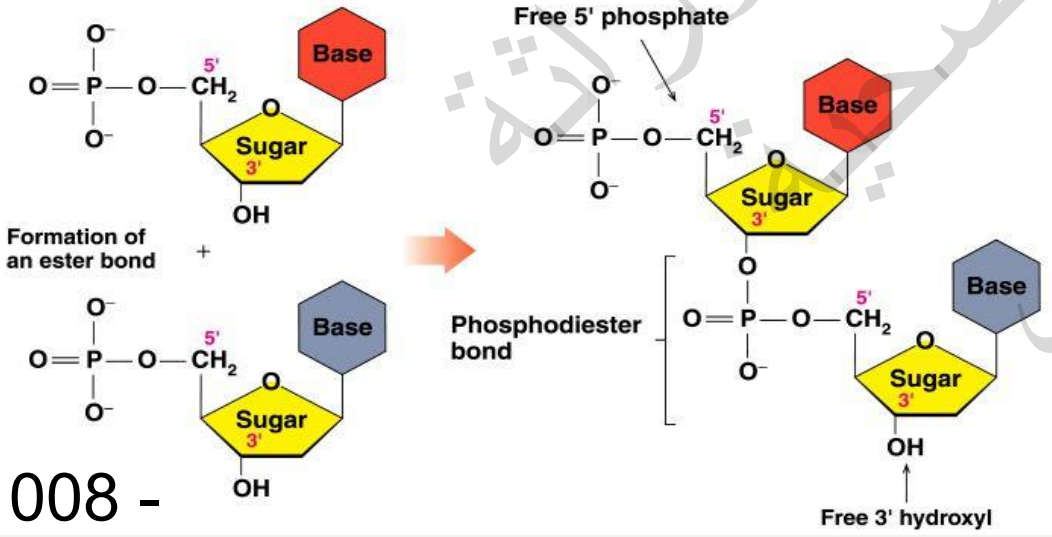
- يقوم إنزيم الـ Primase باصطناع بادئات (مرئسات-مشارع) من الـ RNA ترتبط مع طاق الـ DNA المفرد في أماكن بدء التضاعف.
- يبلغ طول البادئة الواحدة 5-10 نوكليوتيد ويبدأ اصطناع الطاق الجديد من الـ DNA من النهاية `3 للبادئة (اصطناع شريط الـ DNA الجديد دائماً من الاتجاه `5 إلى `3).
- المرئسات عبارة عن عكازات يرتكز عليها الـ DNA بوليميراز لاصطناع شريط الـ DNA الجديد وهي تؤمن نهاية `3 حرة يرتبط إليها النوكليوتيد ثلاثي الفوسفات الذي سيدخل في تركيب الـ DNA.
- السلسلة القائدة لها مرئسة واحدة في مقدمتها، بينما كل قطعة من قطع أوكازاكي في السلسلة المتلكئة لها مرئسة في بداياتها.
- تزال المرئسات وتستبدل بنوكليوتيدات DNA بوساطة إنزيم الـ DNA البوليميراز من النمط الأول DNA polymerase I وذلك قرب انتهاء تضاعف الـ DNA.

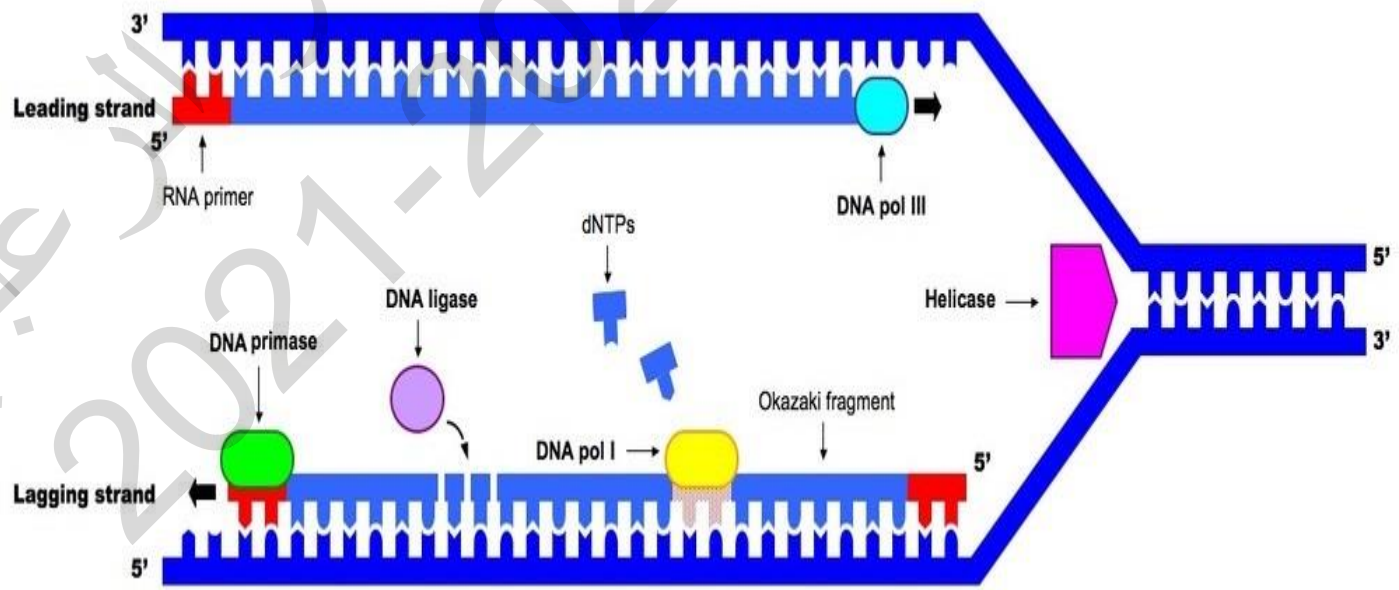


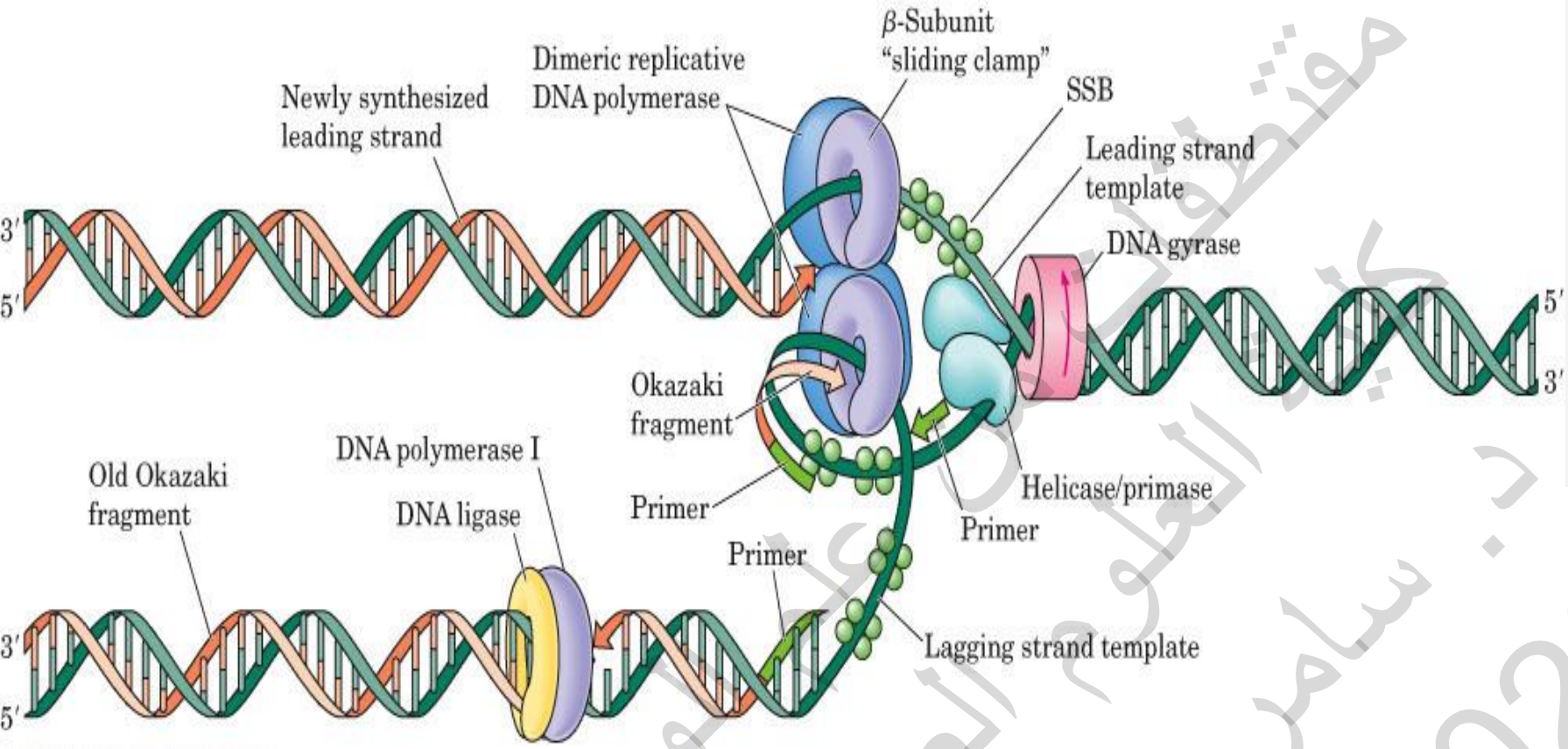
مراحل تضاعف الـ DNA

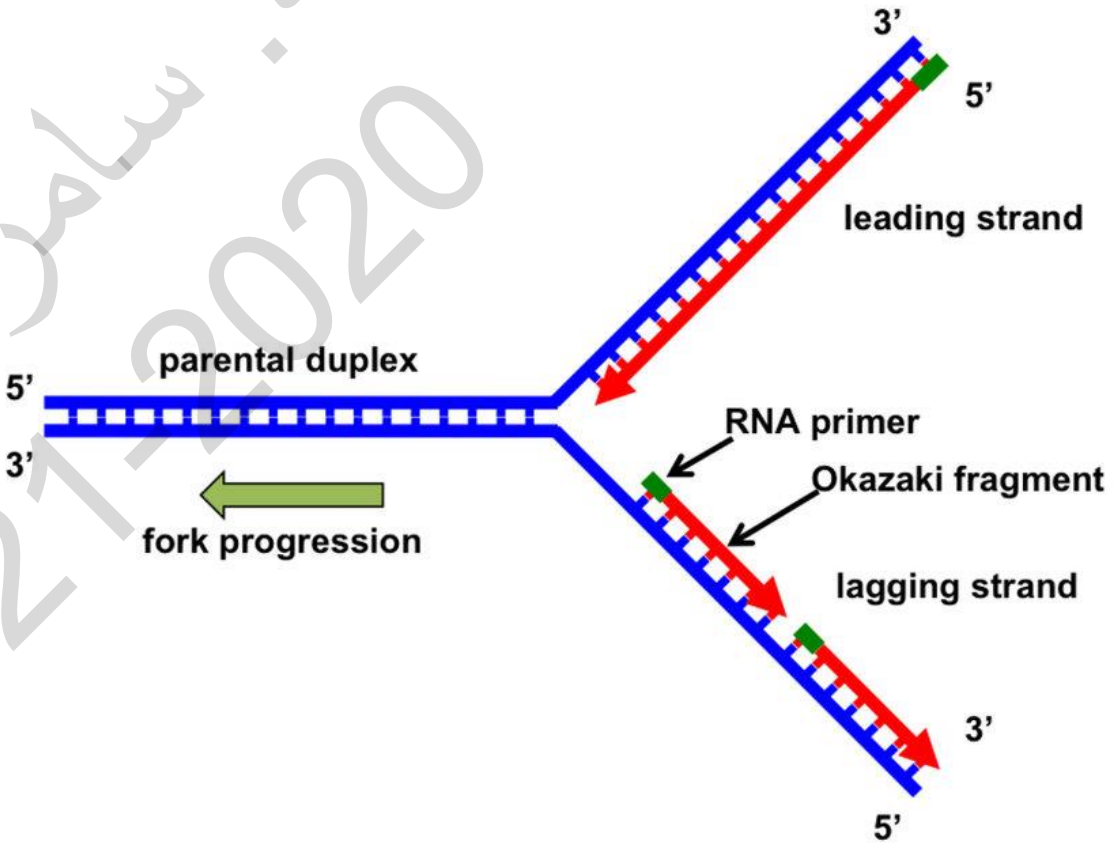


- يرتبط إنزيم الـ DNA بوليميراز من النمط الثالث DNA polymerase III مع بادئات الـ RNA ويقوم بجلب النزكليوتيدات ورصفها بشكل متمم للطاق المرصاف template وربطها مع بعضها البعض.
- ترتبط زمرة الفوسفات للنوكليوتيد القادم مع زمرة الهيدروكسيل 3`-OH الموجودة في النوكليوتيد السابق في طاق الـ DNA النامي مشكلة رابطة فوسفاتية ثنائية الايستر.
- جهة اصطناع طاق الـ DNA الجديد هي `5⟵`3. بما في ذلك قطع أوكازاكي التي يبلغ طولها 1000-2000 نوكليوتيد عند بدائيات النوى، و 100-200 نوكليوتيد عند حقيقات النوى.
- يقوم إنزيم الليغاز بربط شدف أوكازاكي مع بعضها البعض.

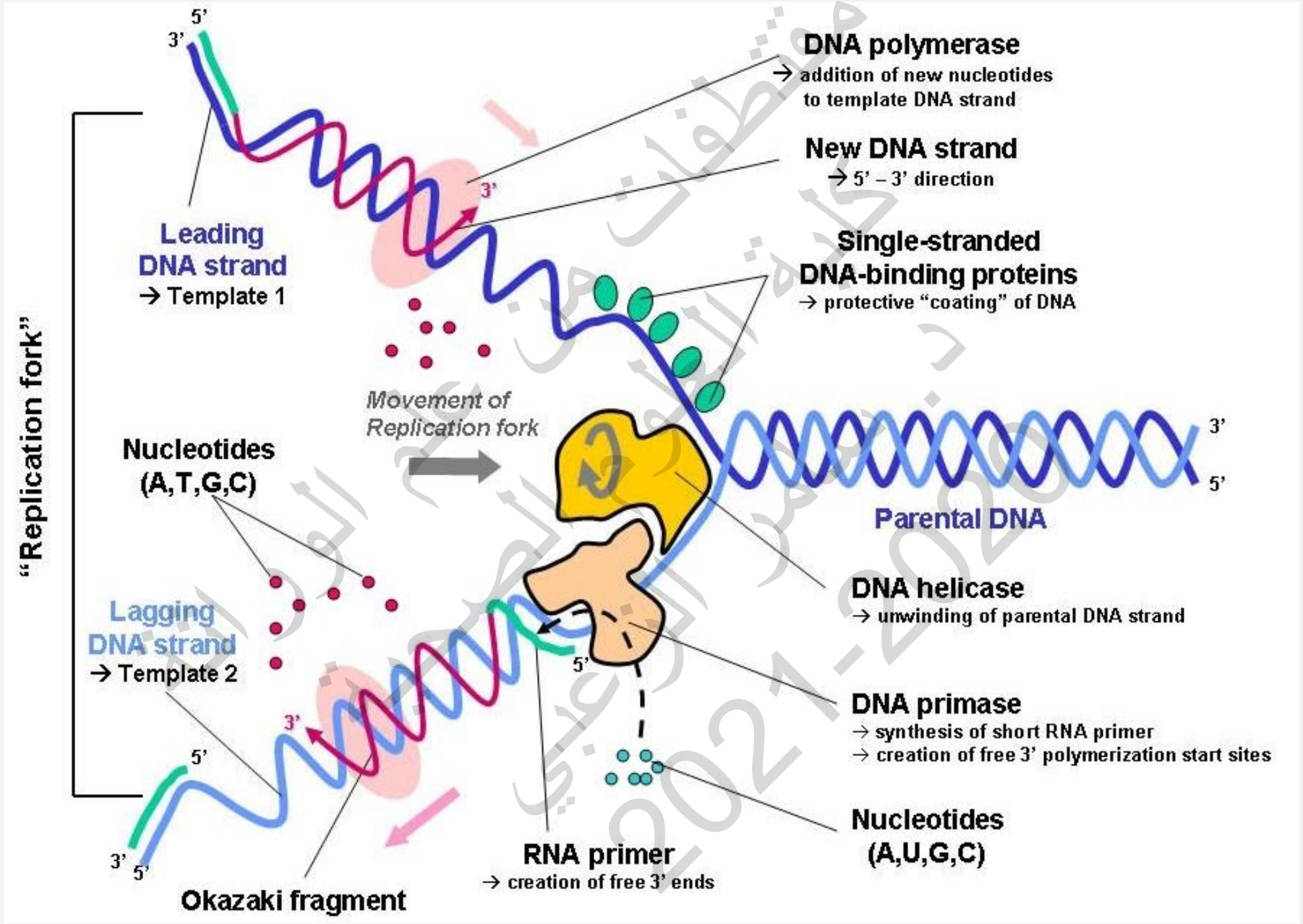




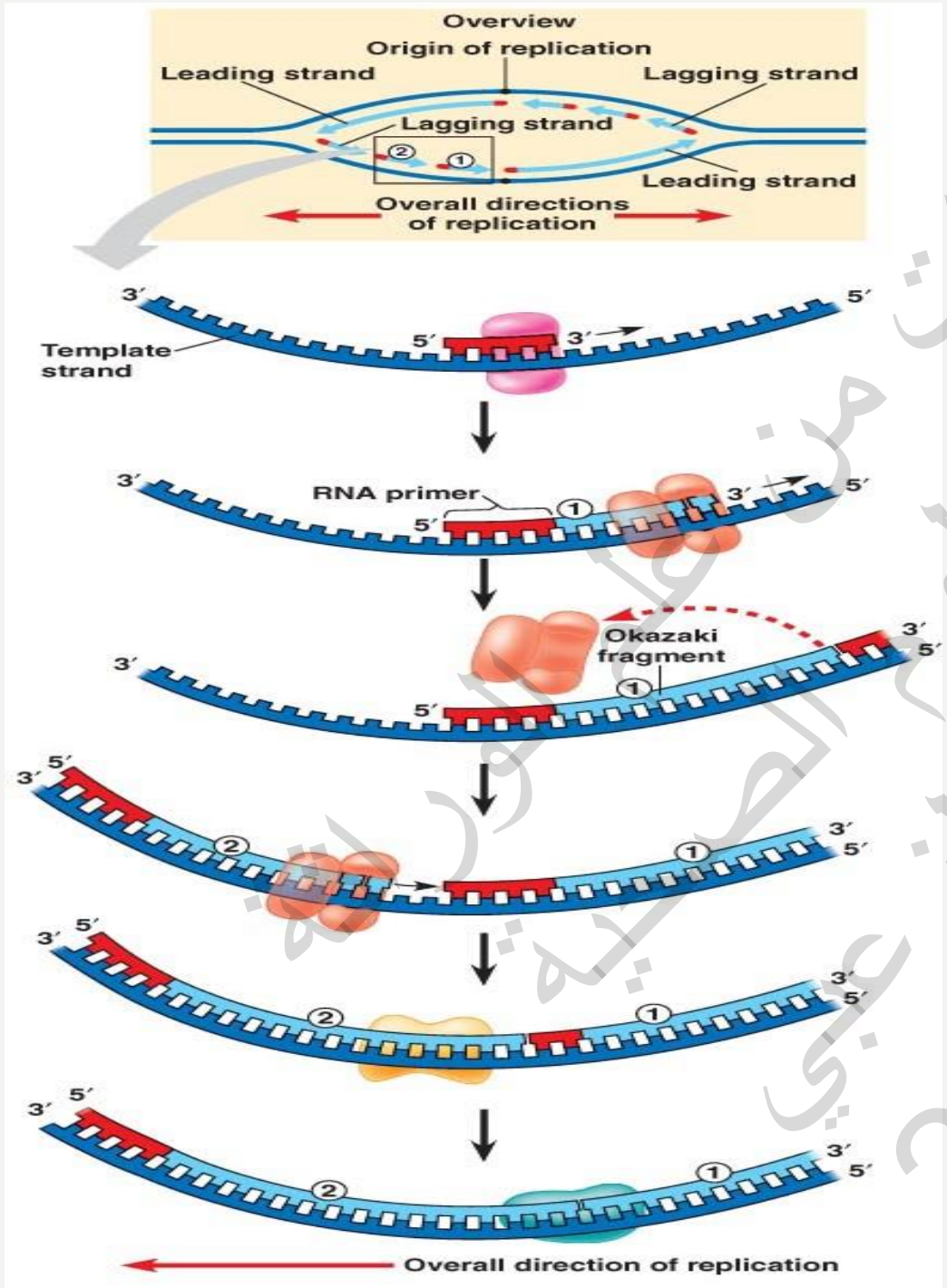


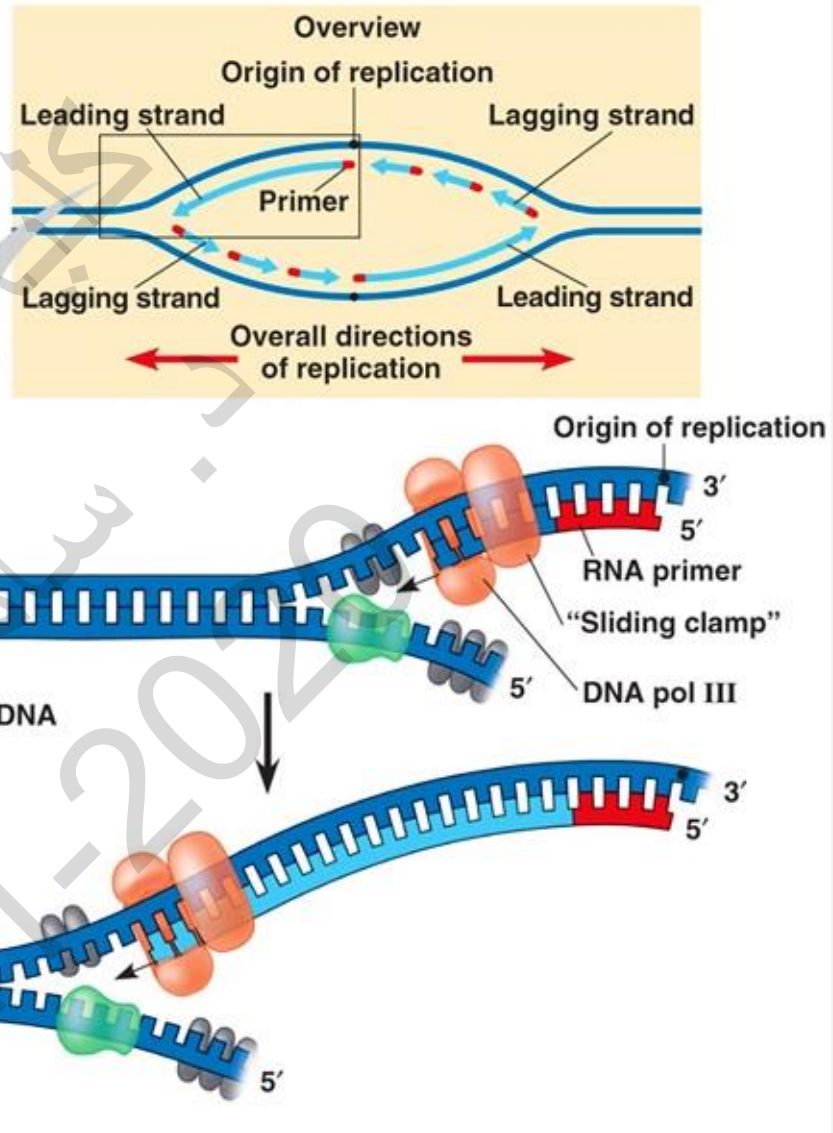


د. سامر الزعبي
2020-2021



5'
3'
DNA polymerase
→ addition of new nucleotides to template DNA strand
New DNA strand
→ 5' – 3' direction
3'
Leading DNA strand
→ Template 1
Single-stranded DNA-binding proteins
→ protective "coating" of DNA
"Replication fork"
Movement of Replication fork
Nucleotides (A,T,G,C)
3'
5'
Parental DNA
DNA helicase
→ unwinding of parental DNA strand
Lagging DNA strand
→ Template 2
5'
DNA primase
→ synthesis of short RNA primer
→ creation of free 3' polymerization start sites
3'
5'
Nucleotides (A,U,G,C)
3'
5'
RNA primer
→ creation of free 3' ends
Okazaki fragment

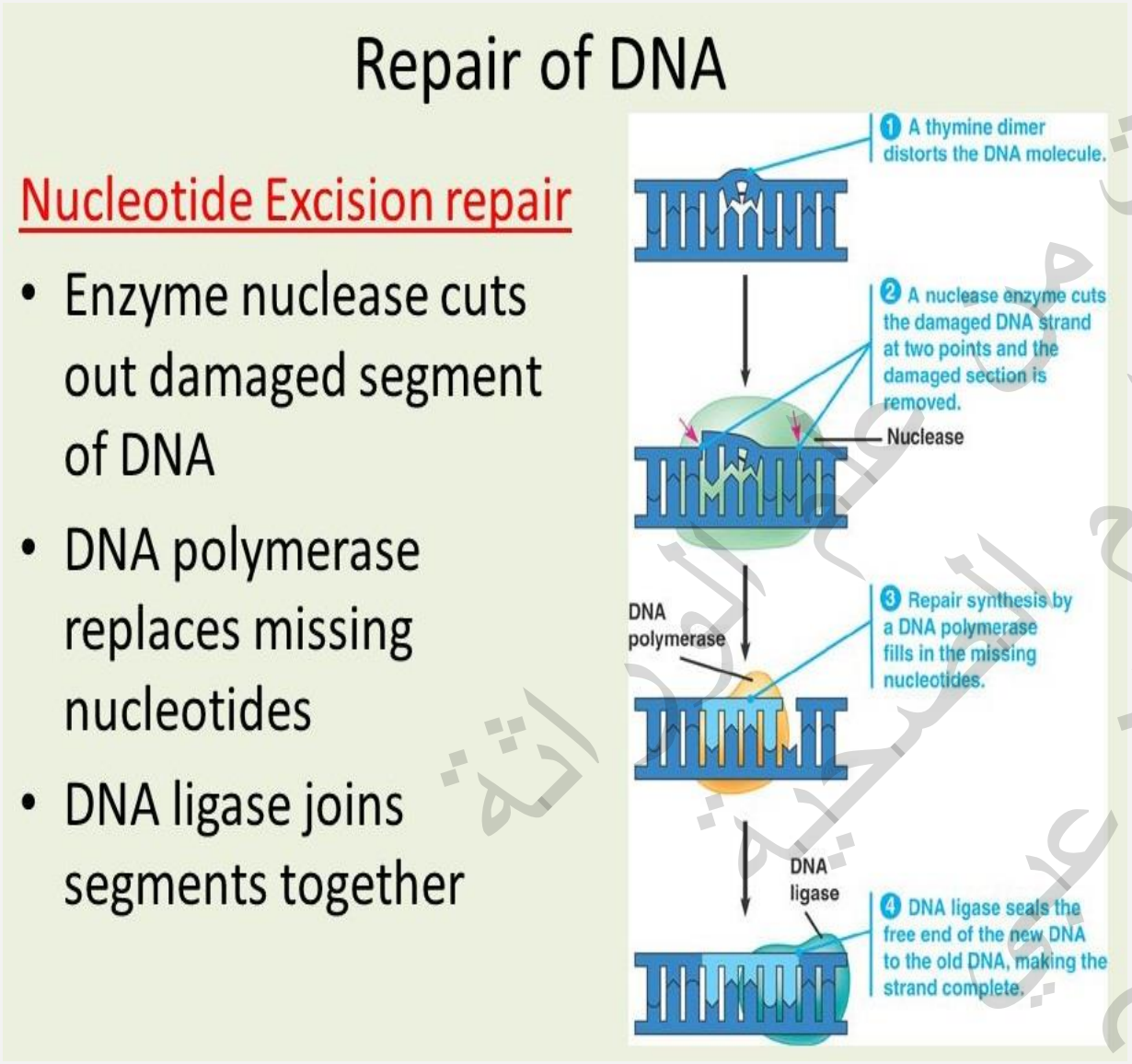




Overview
Origin of replication
Leading strand
Lagging strand
Lagging strand
Leading strand
Overall directions of replication
3′
5′
Template strand
5′
3′
3′
RNA primer
5′
1
3′
5′
3′
Okazaki fragment
1
5′
3′
5′
5′
3′
2
1
3′
5′
3′
5′
2
1
3′
5′
3′
5′
2
1
3′
5′
Overall direction of replication

Overview
Origin of replication
Leading strand
Lagging strand
Primer
Lagging strand
Leading strand
Overall directions of replication
Origin of replication
3′
5′
RNA primer
"Sliding clamp"
DNA pol III
5′
3′
5′
Parental DNA
3′
5′
5′
3′
5′

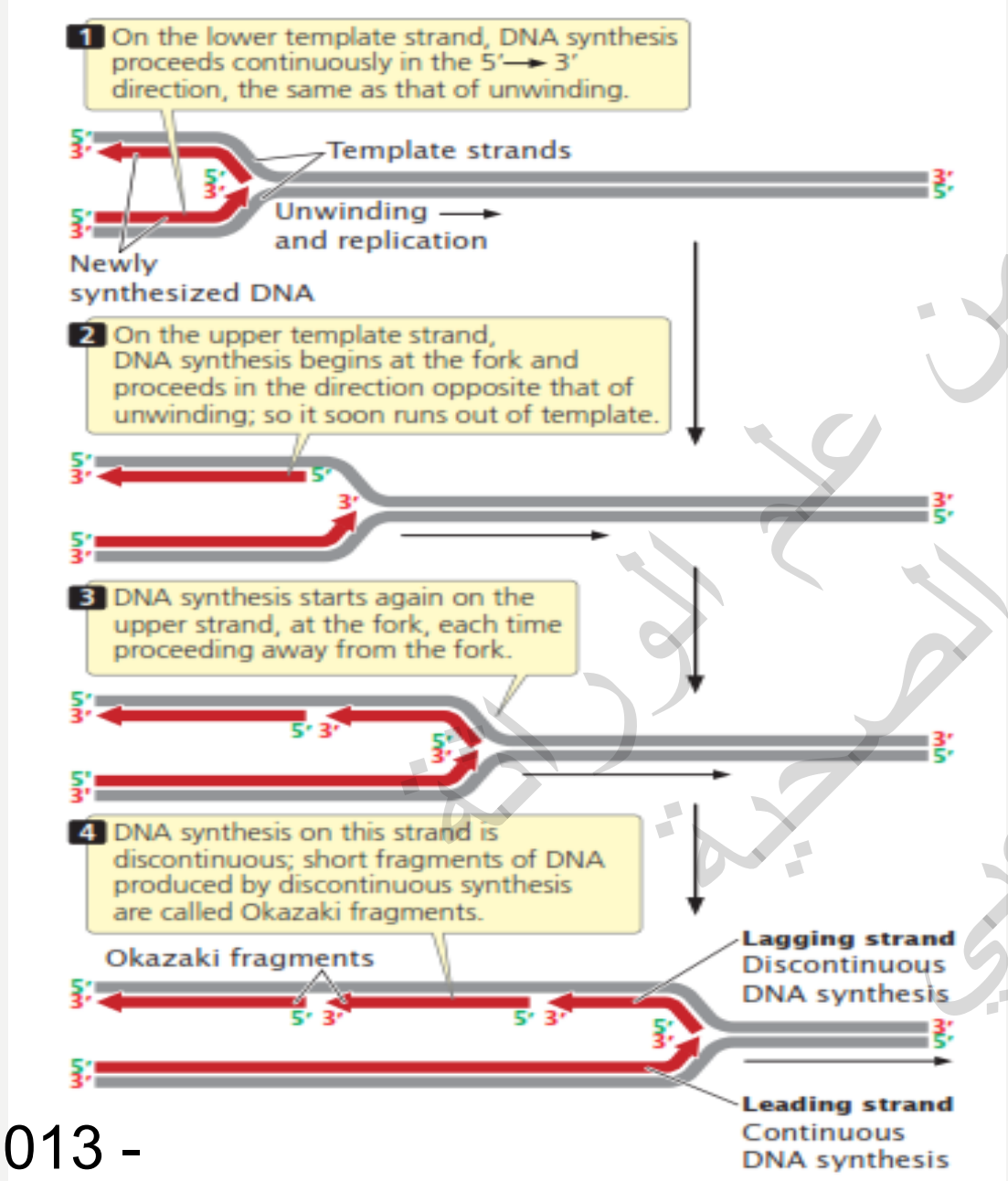
تدقيق و إصلاح أخطاء تضاعف الـ DNA



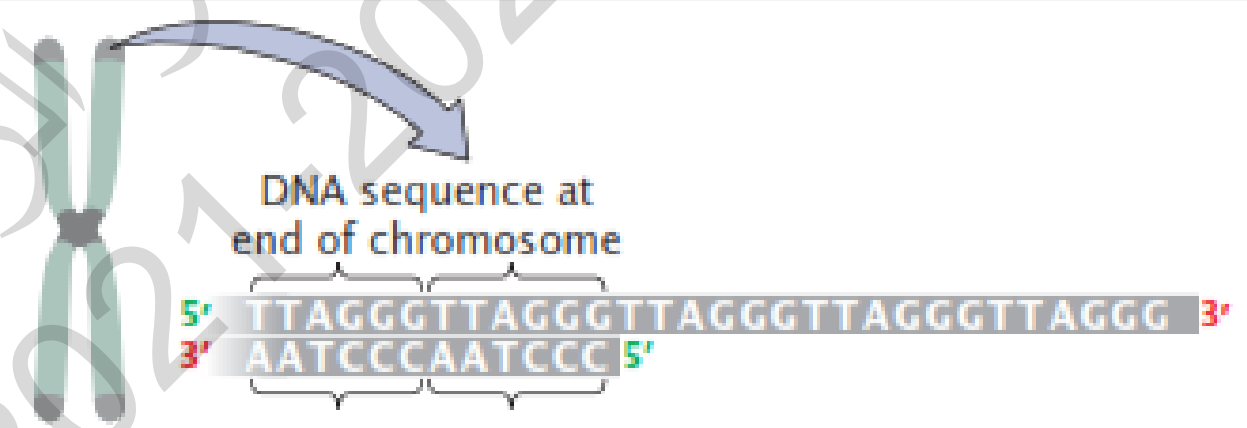
- قد تحصل أخطاء نادرة (1 لكل 10^{15} نوكليوتيد) أثناء عملية تضاعف الـ DNA، وغالباً تسبب تغيراً في زوج واحد من الأسس.
- قد يحدث أحياناً حذف أو تضاعف لشدف من الـ DNA.
- يقوم إنزيم الـ DNA بوليميراز بإصلاح وتدقيق كل نوكليوتيد يتم رصفه مقابل النوكليوتيد الآخر المتمم الموجود على الطاق المرصاف، حيث يقوم إنزيم الـ DNA بوليميراز بإزالة النوكليوتيد المنجبل بشكل خاطىء ووضع النوكليوتيد الصحيح مكانه.
- يشير مصطلح Mismatched nucleotides إلى النوكليوتيدات التي يقابل بعضها بعضاً في طاقي الـ DNA بشكل خاطئ كان يتقابل السيتوزين مع الثيمين.
- تستطيع بعض النوكليوتيدات المتقابلة بشكل خاطئ بعضها مع بعض أن تتفادى إصلاحها من قبل إنزيم الـ DNA بوليميراز، ولكن تقوم بروتينات وإنزيمات تسمى بجهاز إصلاح الـ DNA بمهمة هذا الإصلاح.
- يقوم هذا الجهاز بإصلاح الخلل الناجم عن تضاعف الـ DNA وإصلاح اذيات الـ DNA الناجمة عن عوامل كيميائية أو فيزيائية كي لا تتشكل الطفرة وذلك حسب الخطوات التالية:

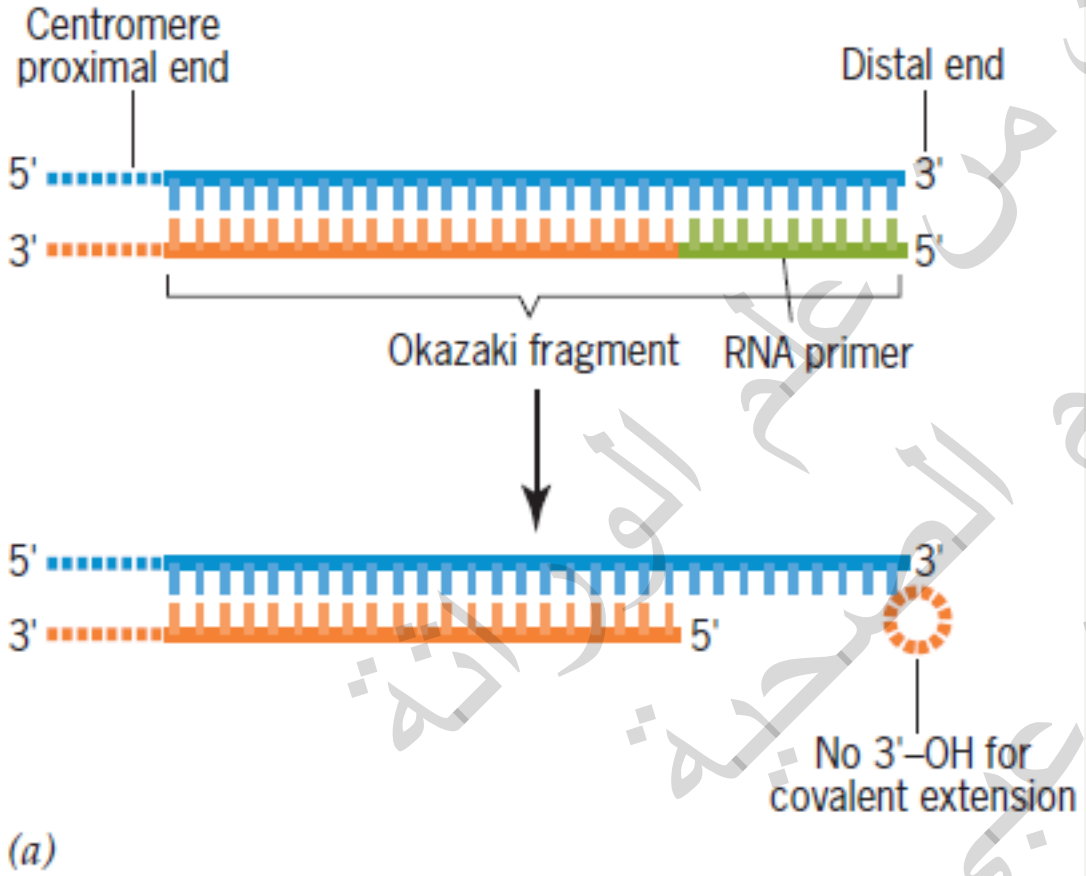
1. اكتشاف الأذية في جزيئة الـ DNA.
2. يقوم إنزيم النوكلياز بقص الـ DNA المتأذي في نقطتين وإزالة الشدفة المتأذية.
3. يملأ إنزيم بوليميراز الـ DNA بالنوكليوتيدات المناسبة مكان النوكليوتيدات التي تمت إزالتها.
4. يربط إنزيم الليغاز بين نهايات النوكليوتيدات، أي يشكل روابط فوسفاتية ثنائية الإستر بينها.

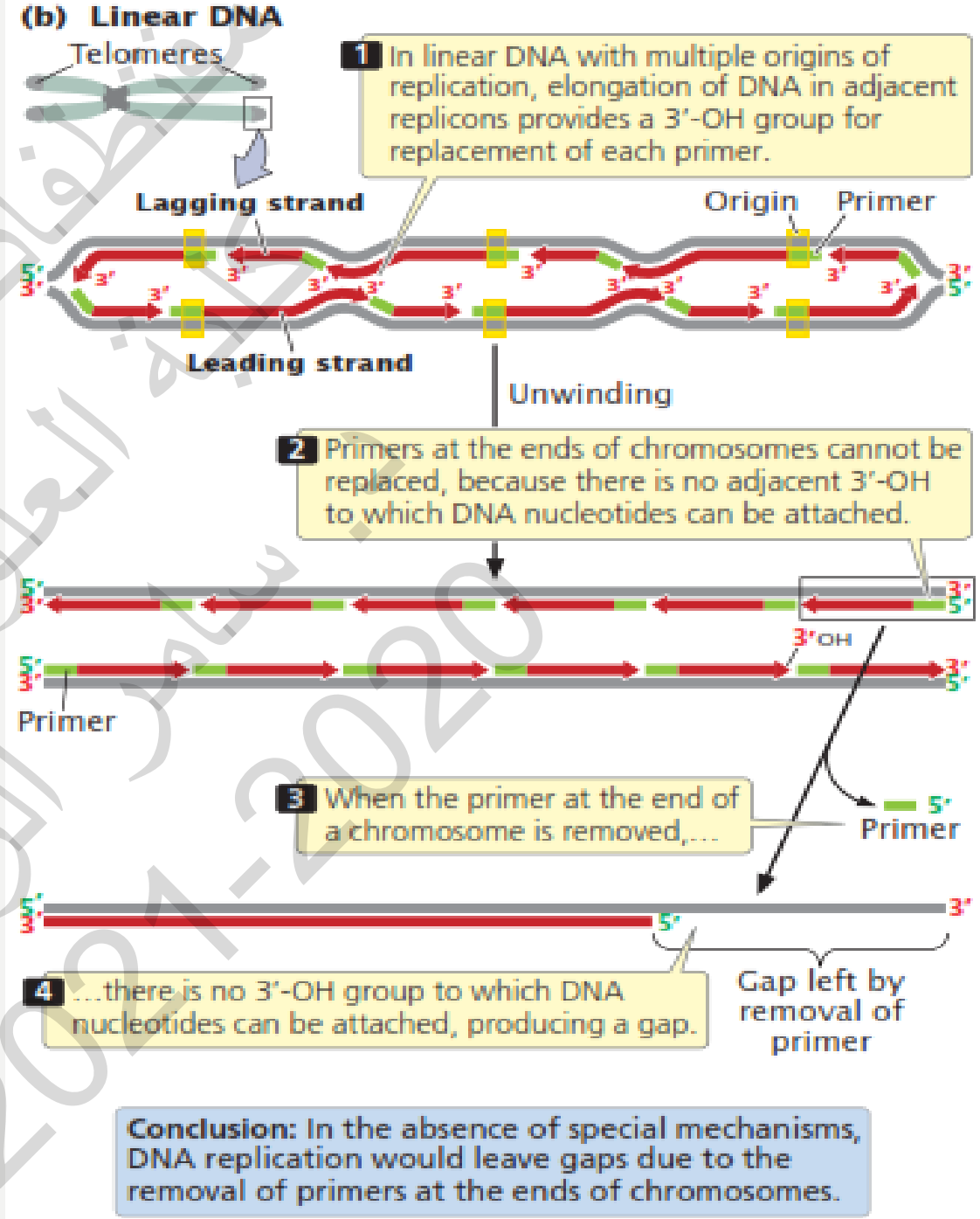
التضاعف عند القسيم الطرفي



- القسميات الانتهائية أو الطرفية Telomeres هي عبارة عن نهايات طبيعية للصبغي وهي لها دور كبير في ثباتية الصبغي والحفاظ على كينونته حيث أن الصبغيات التي ليس قسيم طرفي تتكسر وتلتصق مع بعضها.
- يمكن تشبيها تماماً بقطعة البلاستيك التي تغطي نهايات رباط الحذاء، فعندما يتم إزالة هذه القطعة ينفرد رباط الحذاء و يتشرشر ويصبح غير صالح.
- أيضاً وجود القسيمات الطرفية يسهم في تضاعف نهايات الصبغي.
- تتكون القسيمات الطرفية من DNA تكراري لوحدات معينة.
- تتأ أو تبرز النهاية غالباً النهاية الغنية بالغوانين على النهاية الغنية بالستوزين، وتسمى النهاية `3 الناتئة وطولها بحدود 50−500 نكليوتيد في الثدييات.
- ترتبط بروتينات خاصة بالنهاية `3 الناتئة وتمنعها من التدرك أو التفكك والالتصاق مع النهايات الأخرى.
- من هذه البروتينات Shelterin عند الثدييات الذي يرتبط إلى القسيمات الطرفية ليحميها من فعل الإنزيمات التي تصلح كسور الـ DNA.



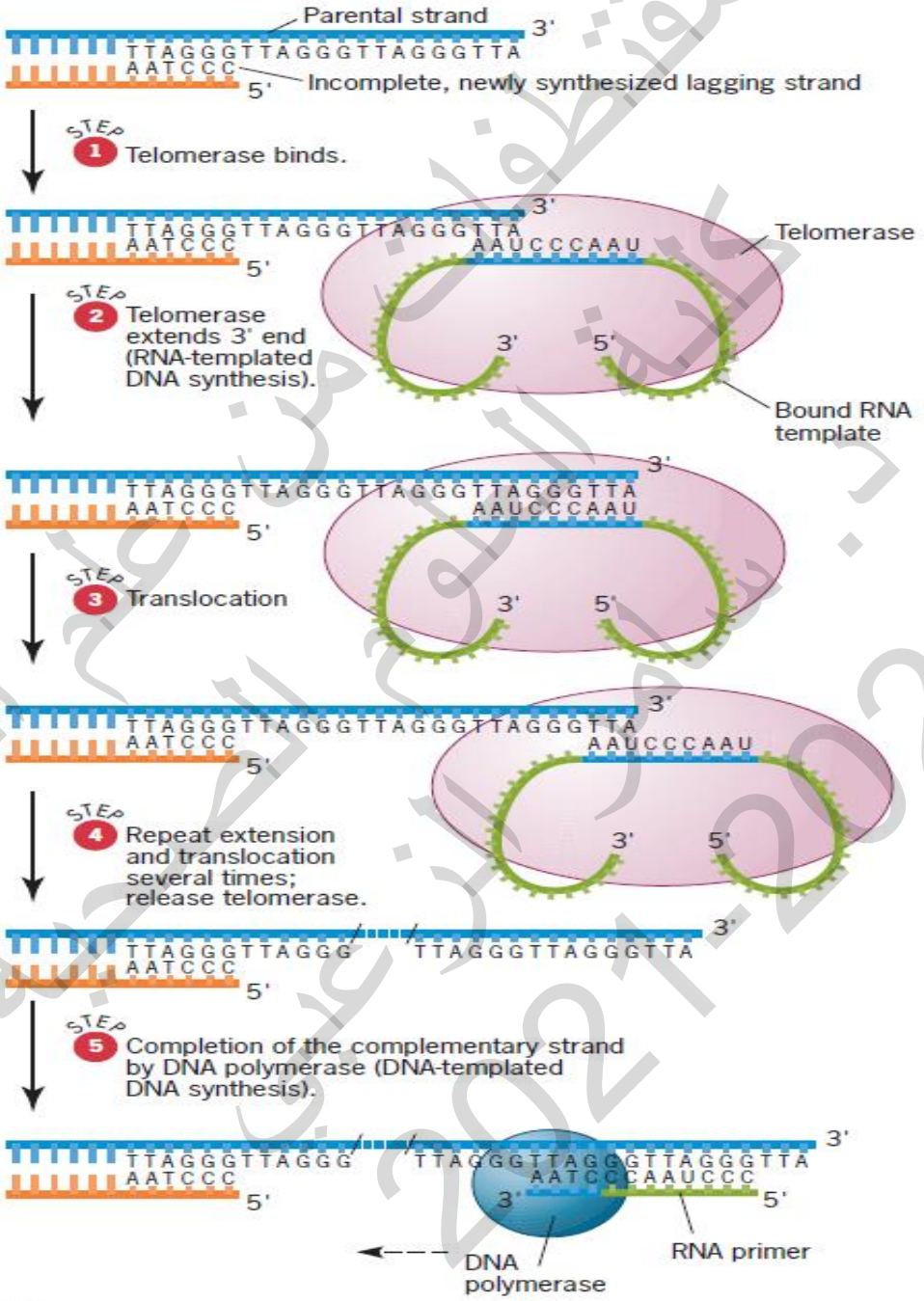




The telomere lagging-strand primer problem.

(a)

Telomerase resolves the terminal primer problem.



(b)

الفرق بين تنسخ الـ DNA في حقيقيات النوى (Eukaryotes) و في بدائيات النوى (Prokaryotes)

تضاعف الـ DNA في حقيقيات النوى	تضاعف الـ DNA في بدائيات النوى
أعقد بسبب احتوائها على كمية DNA أكبر مقارنة مع بدائيات النوى ووجود الهيستونات.	أبسط بسبب قلة كمية الـ DNA وعدم وجود هيستونات.
سرعة اصطناع الـ DNA بوساطة أنزيمات الـ DNA بوليميراز أبطأ بـ25 مرة، ولتفادي هذا التأخير:	أسرع بمعدل 25 مرة.
تحتوي على الكثير من مواقع أصول التضاعف (مواضع منشأ التنسخ) قد تصل في مجين الثدييات إلى 25000 موضع.	تحتوي القليل من مواقع أصول التضاعف (مواضع منشأ التنسخ).
يصل عدد جزيئات الـ DNA بوليميراز في خلايا حقيقيات النوى إلى 10000 جزيئة.	تحتوي كل خلية E. Coli حوالي 15 جزيئة من إنزيم الـ DNA بوليميراز 3.
تستعمل خلايا حقيقات النوى أنواعاً مختلفة من إنزيم الـ DNA بوليميراز (يصل عددها لدى الانسان إلى 14 نوعاً).	عدد انواع الـ DNA بوليميراز أقل.
شدف أوكازاكي أصغر مما هو عند بدائيات النوى.	شدف أوكازاكي أطول بالمقارنة مع مثيلاتها في حقيقيات النوى.

مقتطفات من علم الوراثة
كلية العلوم الصحية
د. سامر الأعرج
2020-2021

شكراً لاستماعكم

مقتطفات من علم الوراثة
كلية العلوم الصحية
د. سرار الزعبي
2021-2020