

علم الوراثة الطبي MEDICAL GENETICS

الفصل الرابع

تضاعف (تسخن-نسخ) الـ DNA DNA Replication

جامعة دمشق

طلاب العلوم الصحية - السنة الثانية

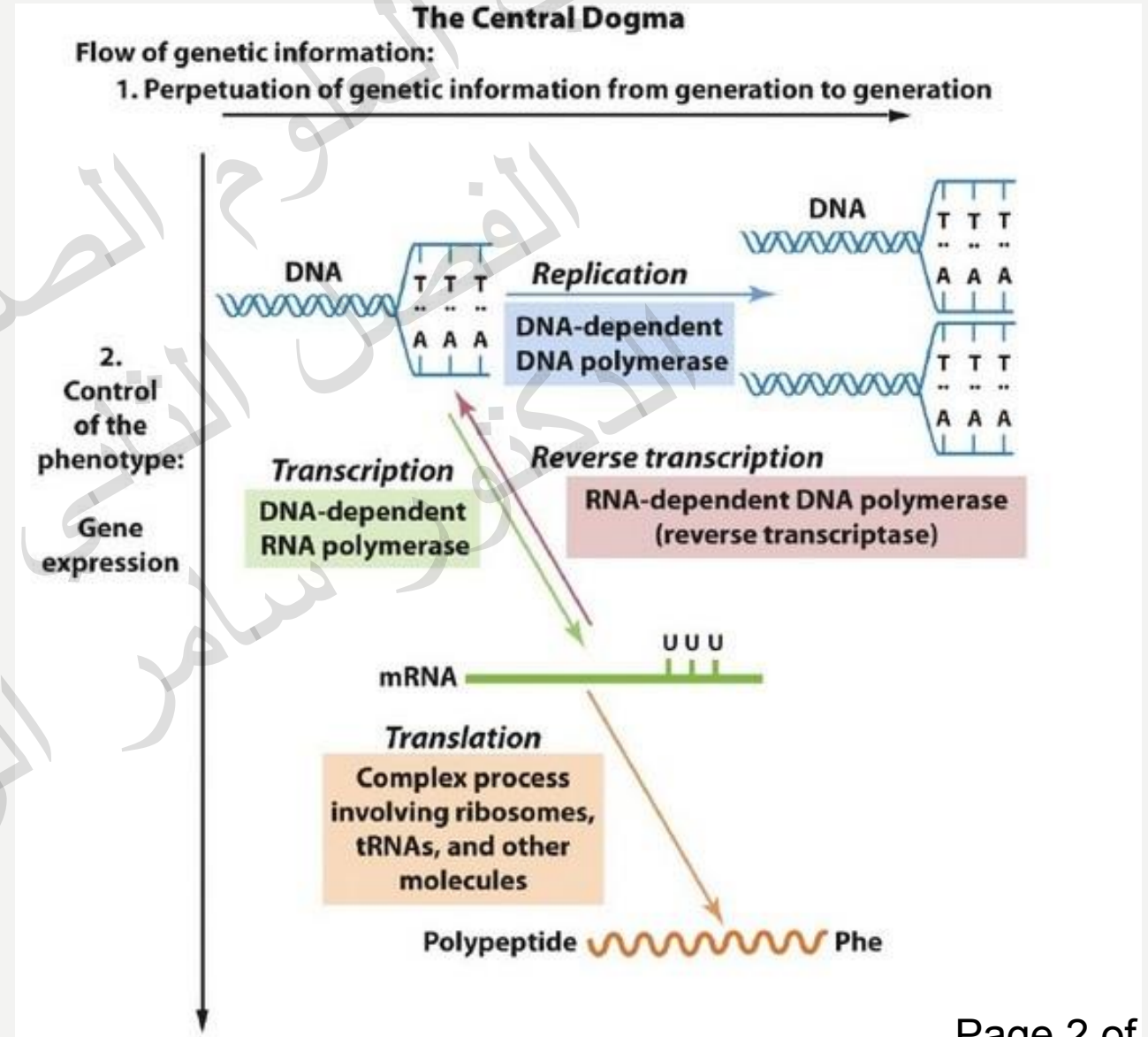
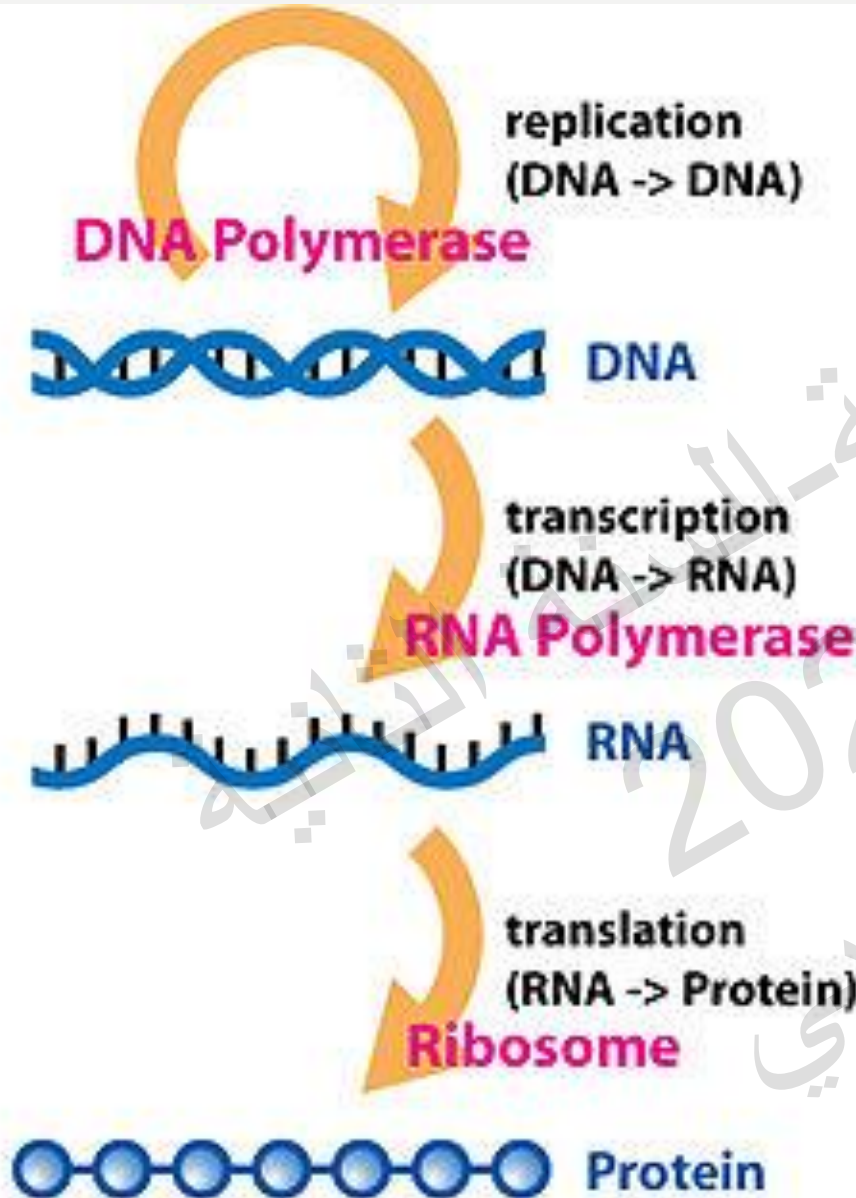
الفصل الثاني 2022

25/04/2022

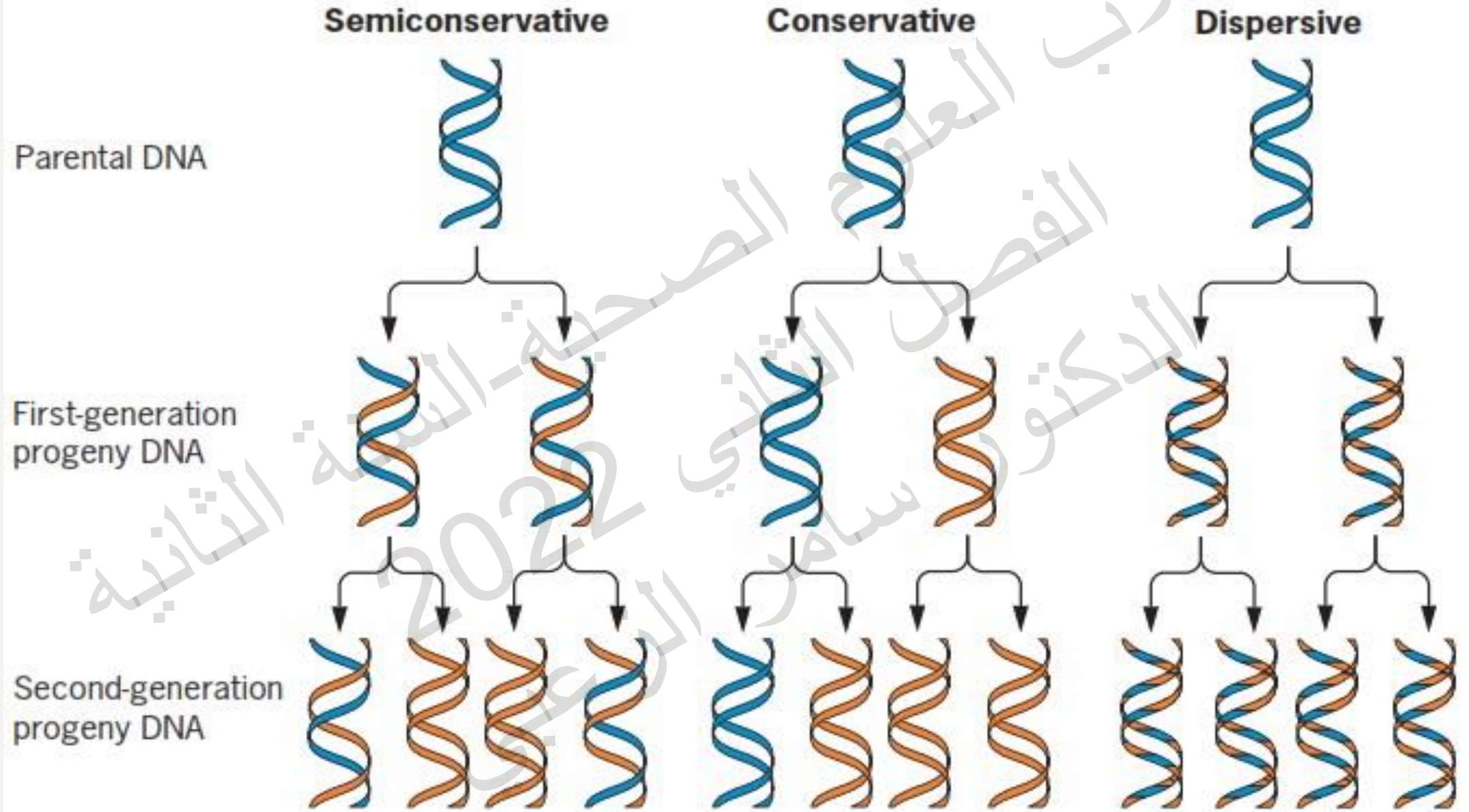
د. سامر الزعبي

أهمية تضاعف الـ DNA

The central dogma

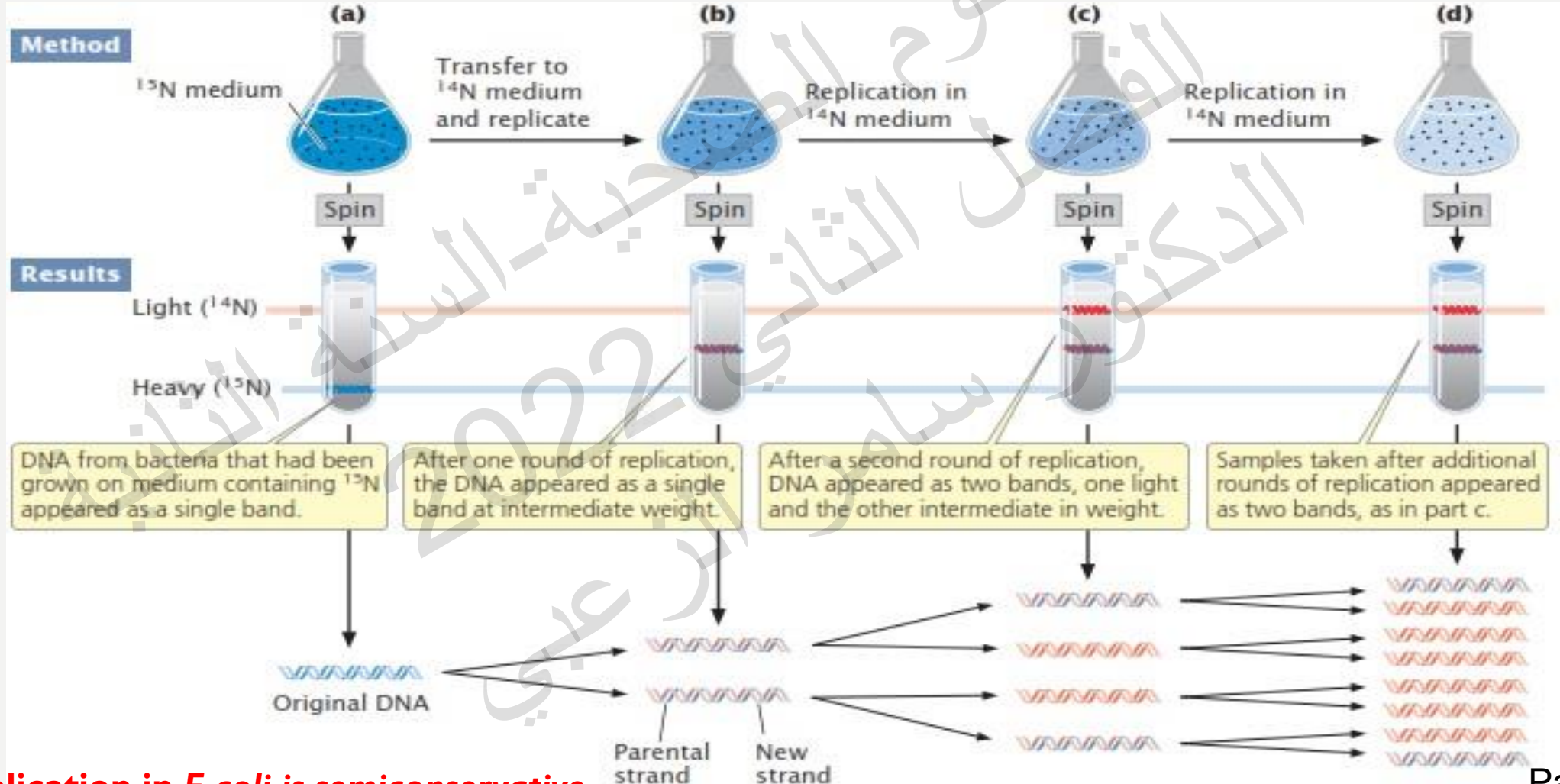


تضاعف الـ DNA



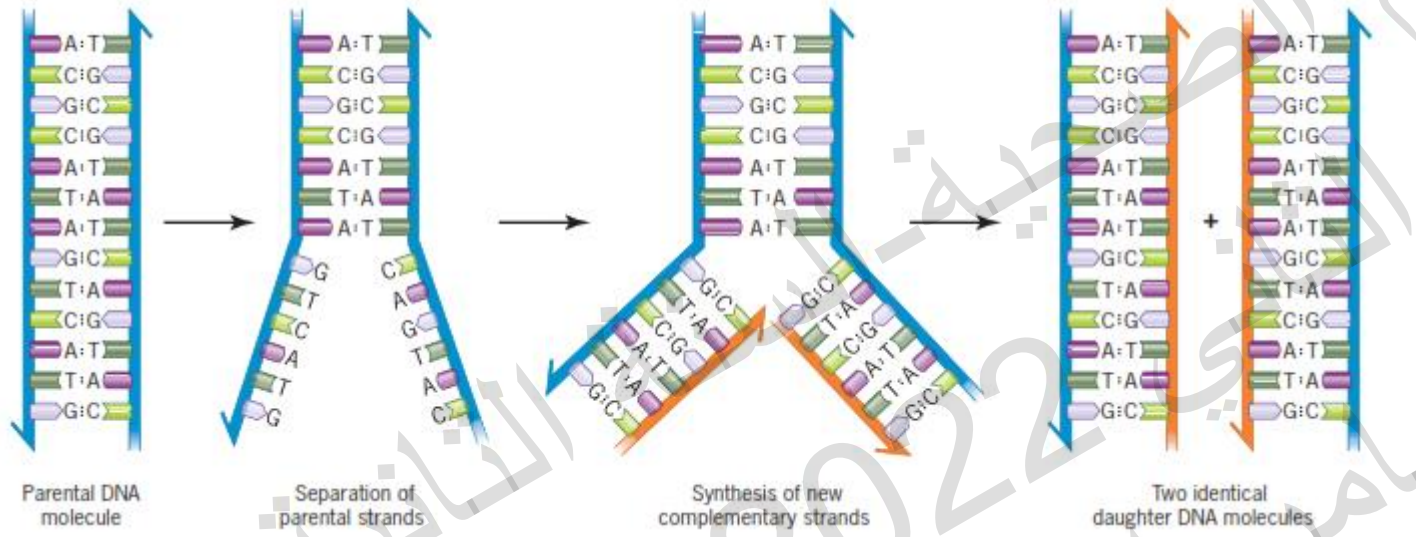
إثبات النظرية الصحيحة

استخدم العالمان Meselson و Stahl 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 للنيتروجين، بعد عدة أجيال تكون البكتيريا قد أدخلت ^{15}N في نوكلويدات الـ DNA. قام العالمان بعد ذلك بأخذ عينة من هذه الجراثيم (أخضعوها لتثقيل متدرج الكثافة)، وزرعوا الجراثيم الباقية في وسط يحوي ^{14}N كمصدر وحيد للنيتروجين، بعد جيل واحد أخذوا عينة أخضعوها لتثقيل متدرج الكثافة.

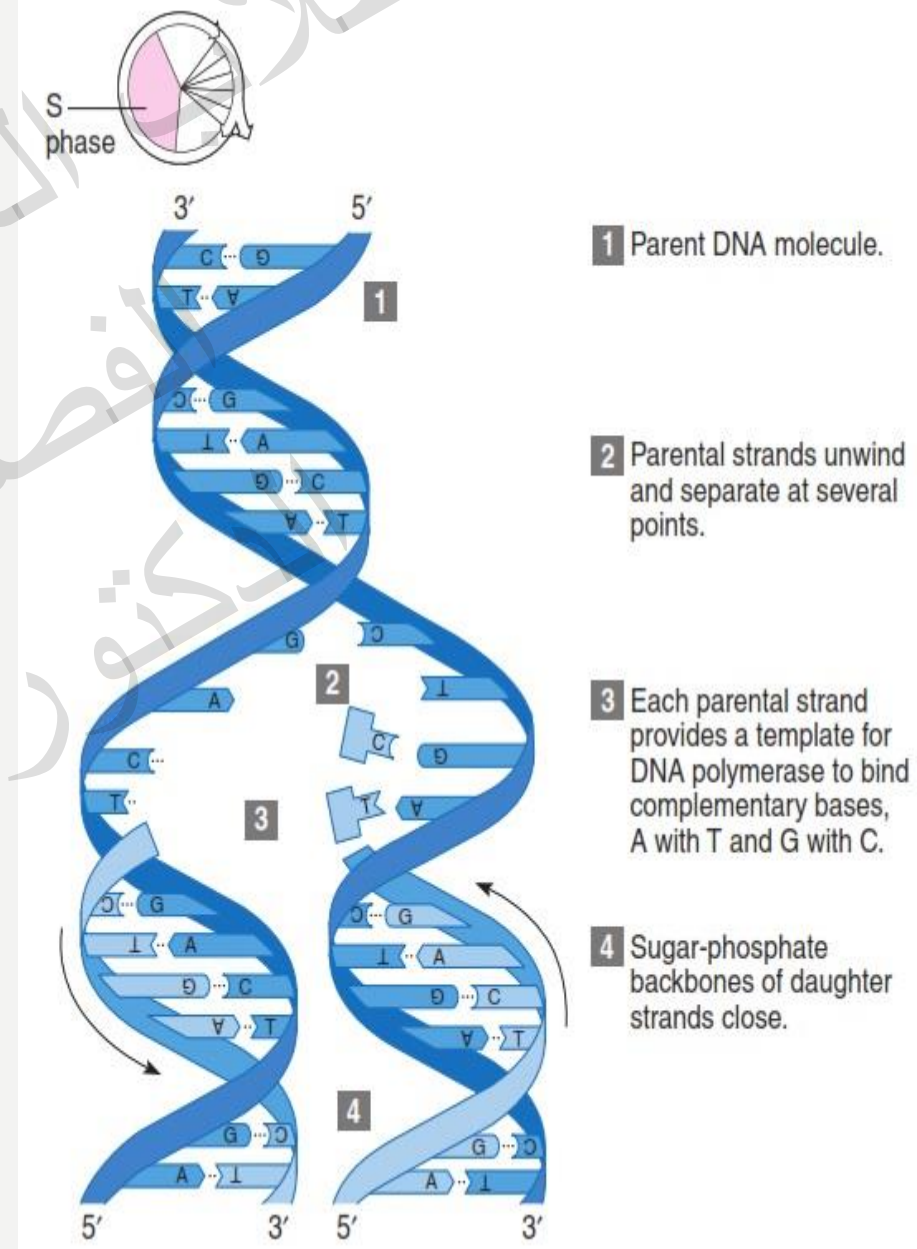


تضاعف الـ DNA

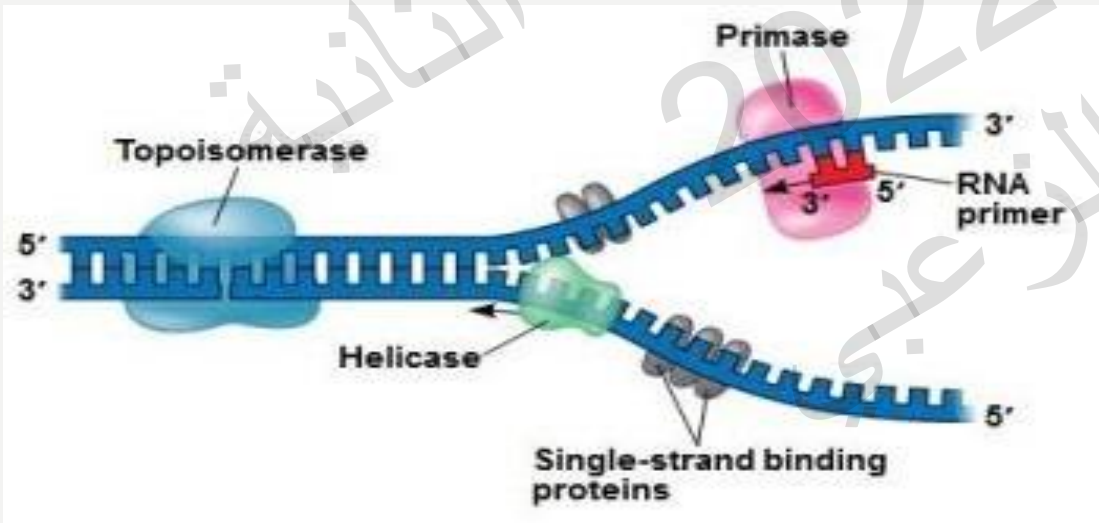
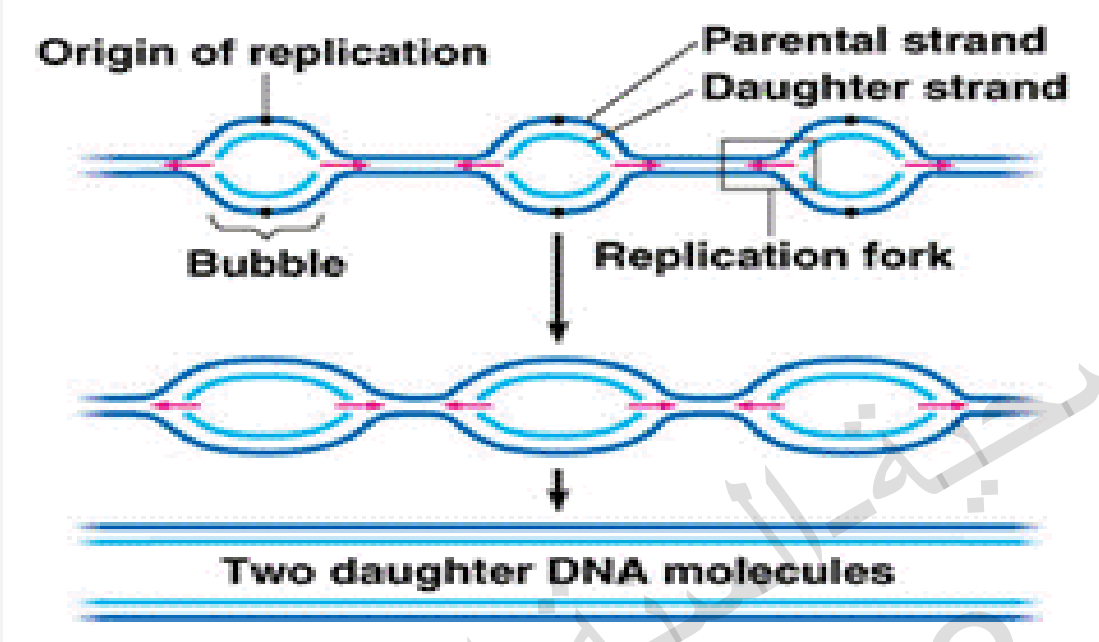
تضاعف الـ DNA نصف محافظ semiconservative، يبدأ في عدة مناطق على طول الصبغي تسمى أصول التضاعف origin of replication ويتقدم باتجاهين متعاكسين من كل نقطة.



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

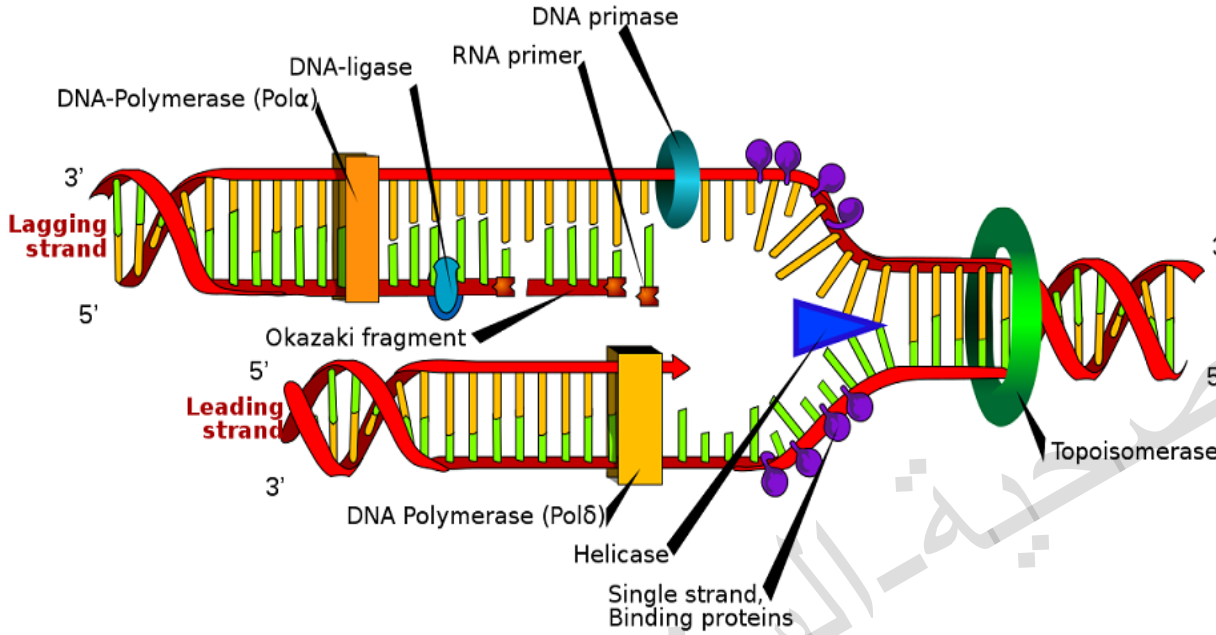


مراحل تضاعف الـ DNA

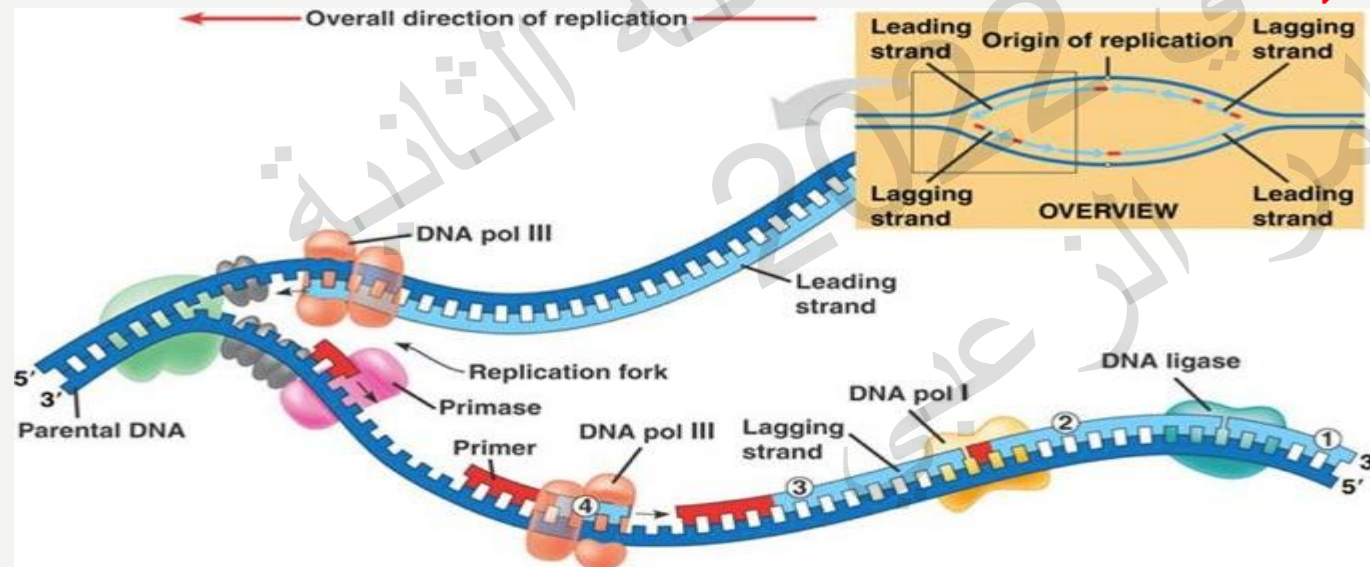


- يحدث تضاعف الـ DNA في طور التركيب S من الدارة الخلوية في كل من الانقسام الفتيلي (الخيطي) و الانقسام المنصف.
- يدخل في عملية التضاعف عدد كبير و متنوع من البروتينات و الإنزيمات وذلك بدء من فك طاقى الـ DNA وانتهاء بتحري الأخطاء الناجمة عن عملية التضاعف و إصلاحها.
- تبدأ عملية التضاعف بإبعاد البروتينات المرتبطة مع الـ DNA في حقيقت النوى أو تعديلها بحيث تسمح للبروتينات والإنزيمات الداخلة في التضاعف بالقيام بوظيفتها.
- تعود البروتينات التي ترتبط مع الـ DNA (الهستونات وغيرها) للارتباط من جديد بالـ DNA حالما تنتهي عملية التضاعف وتشكل جزيء DNA جديد.
- تتم عملية اصطناع جزيئات الهستون 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 طاقى الـ DNA بواسطة إنزيم الهليكاز Helicase في منطقة تدعى بشوكة التضاعف Replication fork.
- هذا يؤدي إلى فك طاقى الـ DNA عن بعضهما وترتبط بكل طاقى بروتينات (البروتينات الرابطة للطاقى المفرد من الـ DNA) لتتبعيهما متباعدين (البروتينات الرابطة للطاقى المفرد من الـ DNA).
- يؤدي فك طاقى 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 طاقى الـ DNA وحل العقدة أو الالتواء المتشكل عن فك الارتباط بين طاقى الـ DNA ثم وصل الطاقين مع بعضهما كما كانا في الأصل.

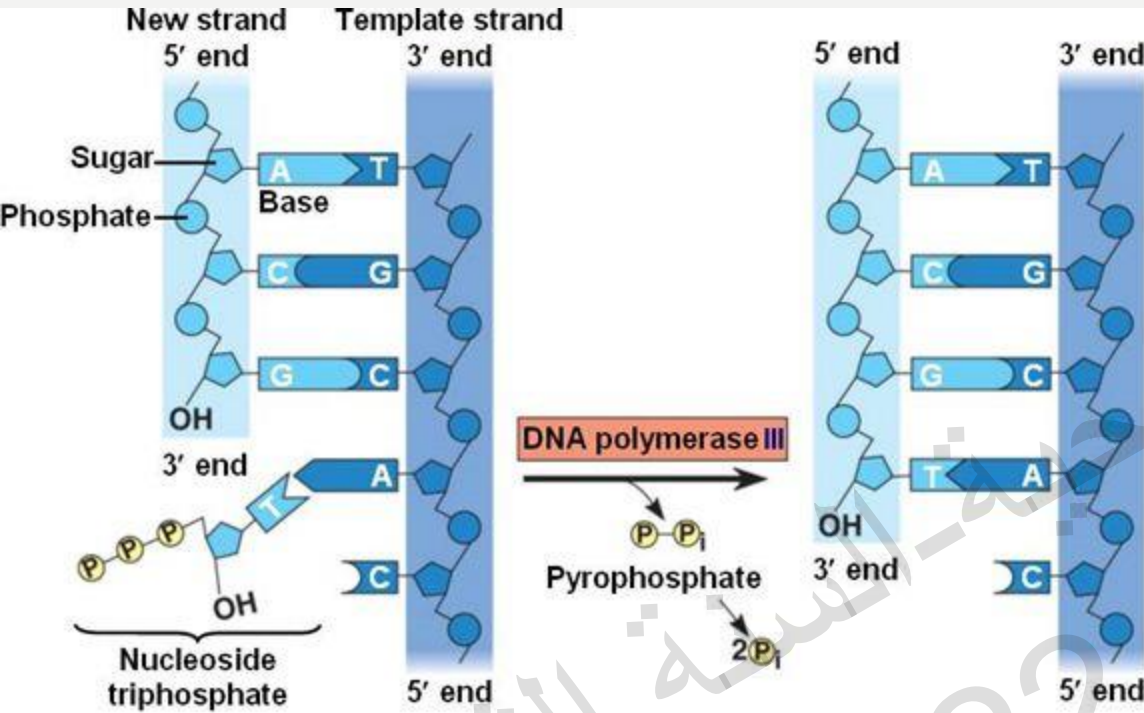
مراحل تضاعف الـ DNA



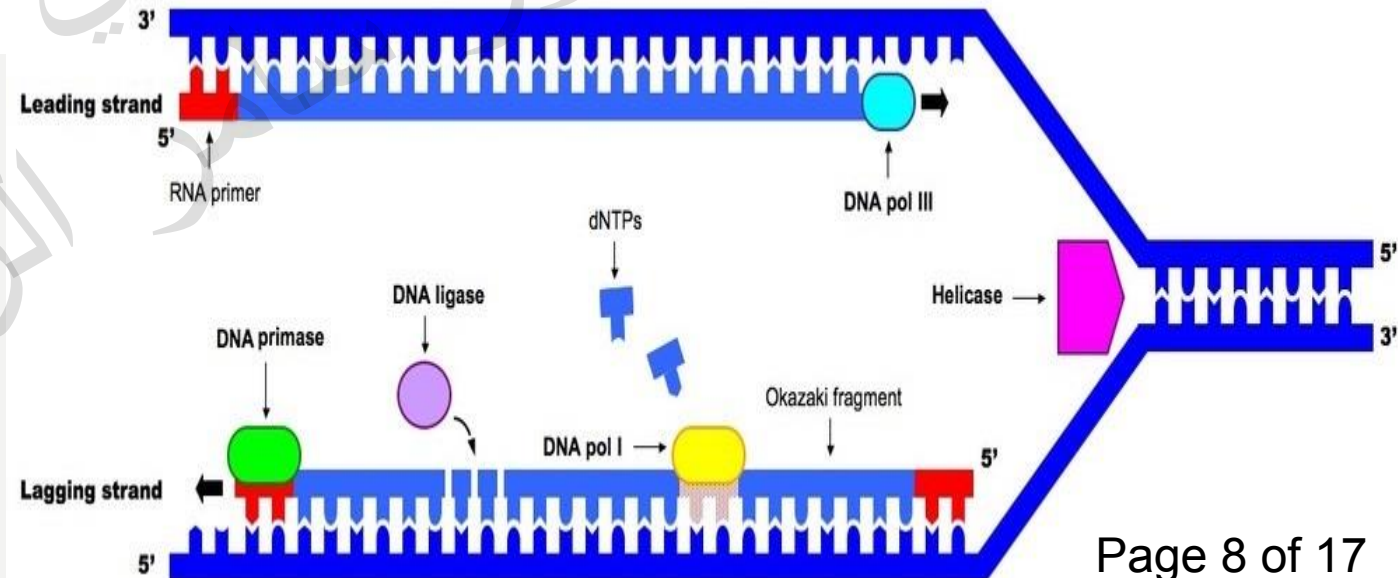
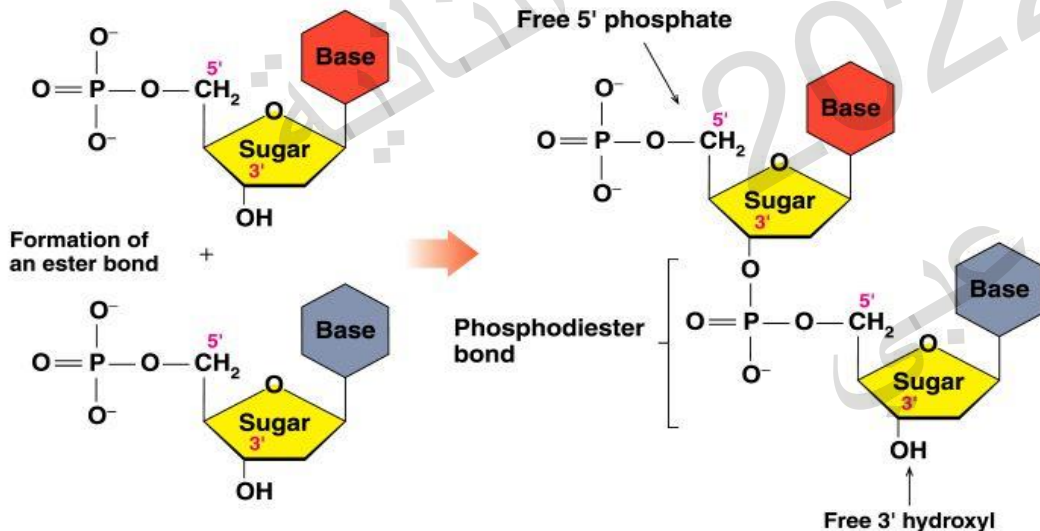
- يقوم إنزيم الـ Primase باصطناع بادئات (مرئسات-مشارع) من الـ RNA ترتبط مع طاق الـ DNA المفرد في أماكن بدء التضاعف.
- يبلغ طول البادئة الواحدة 5-10 نوكلوتيد ويبدأ اصطناع الطاق الجديد من الـ DNA من النهاية 3' للبادئة (اصطناع شريط الـ DNA الجديد دائماً من الاتجاه 5' إلى 3').
- المرئسات عبارة عن عكازات 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 الـ DNA بواسطة إنزيم الـ DNA البوليمراز من النمط الأول DNA polymerase I وذلك **قرب انتهاء تضاعف الـ DNA**.

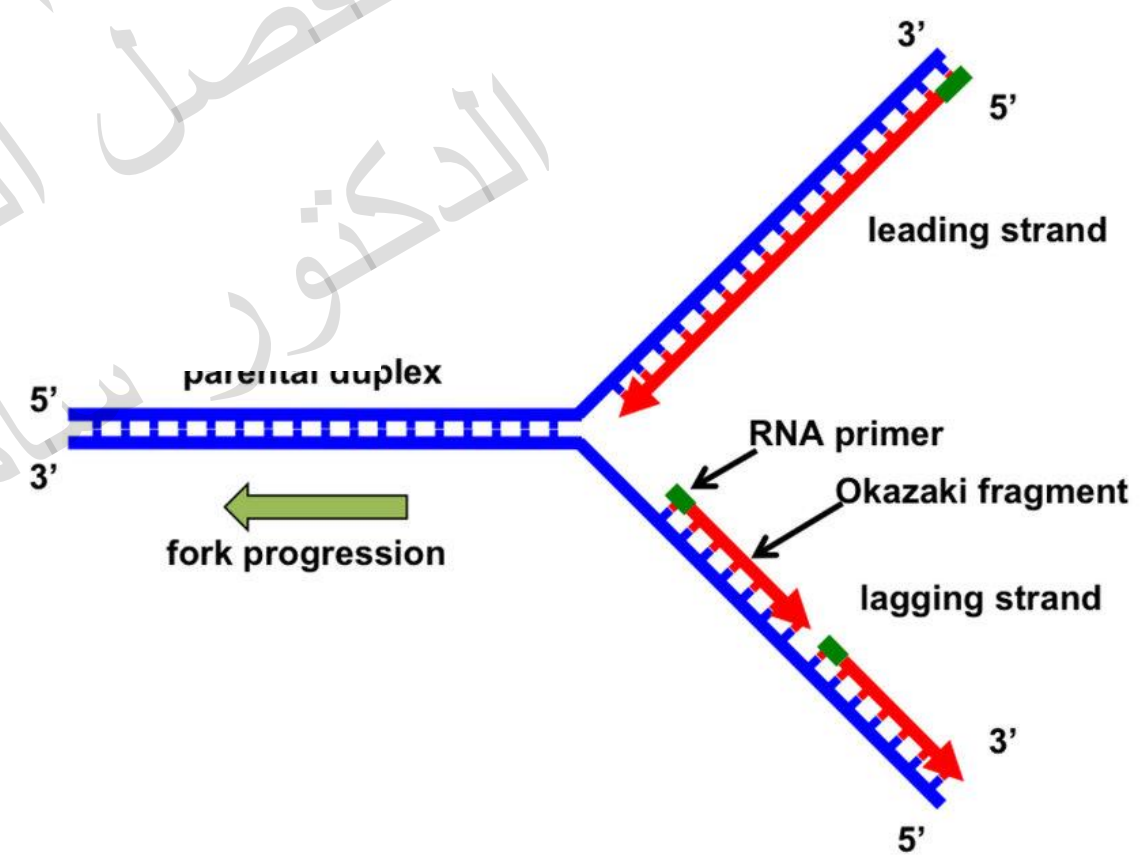
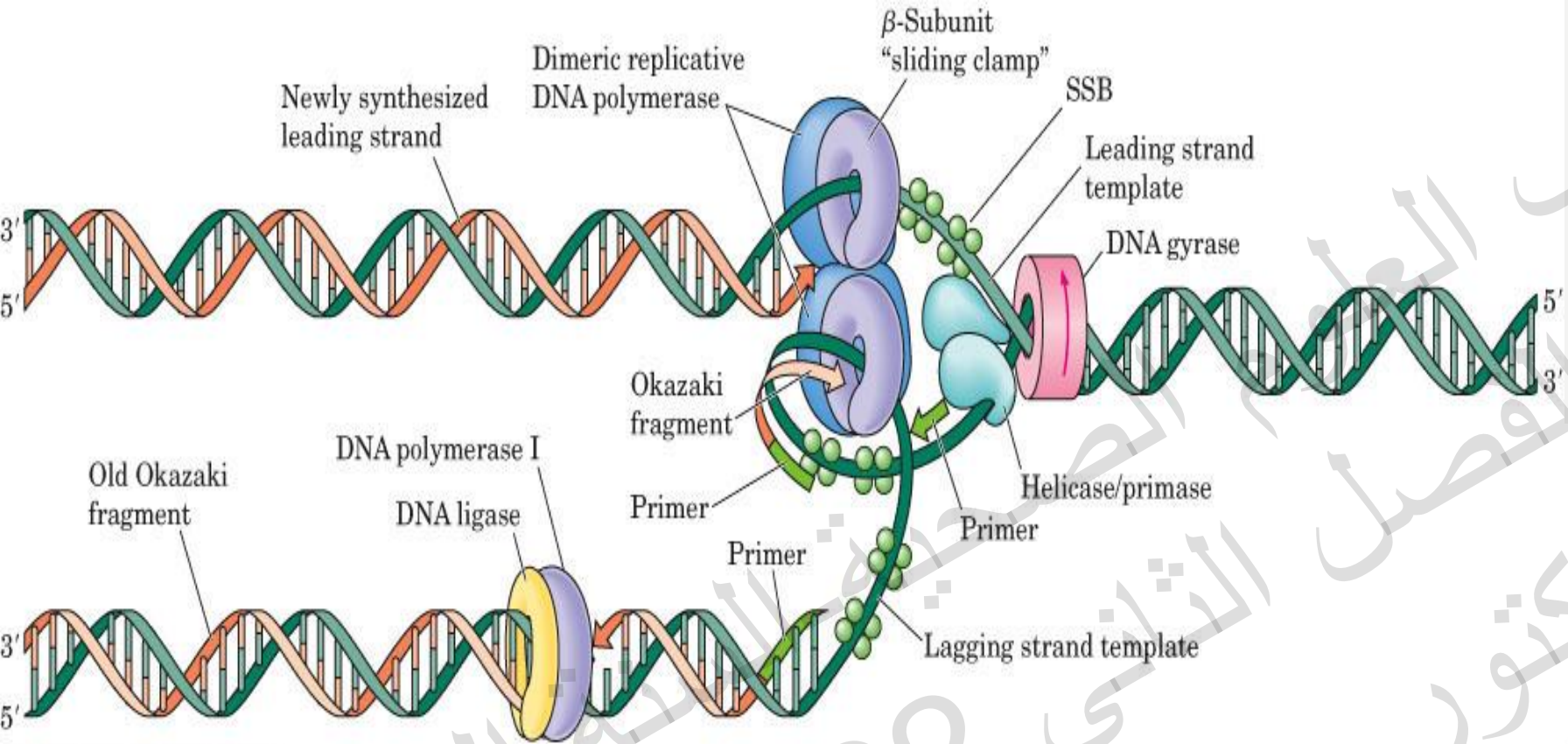


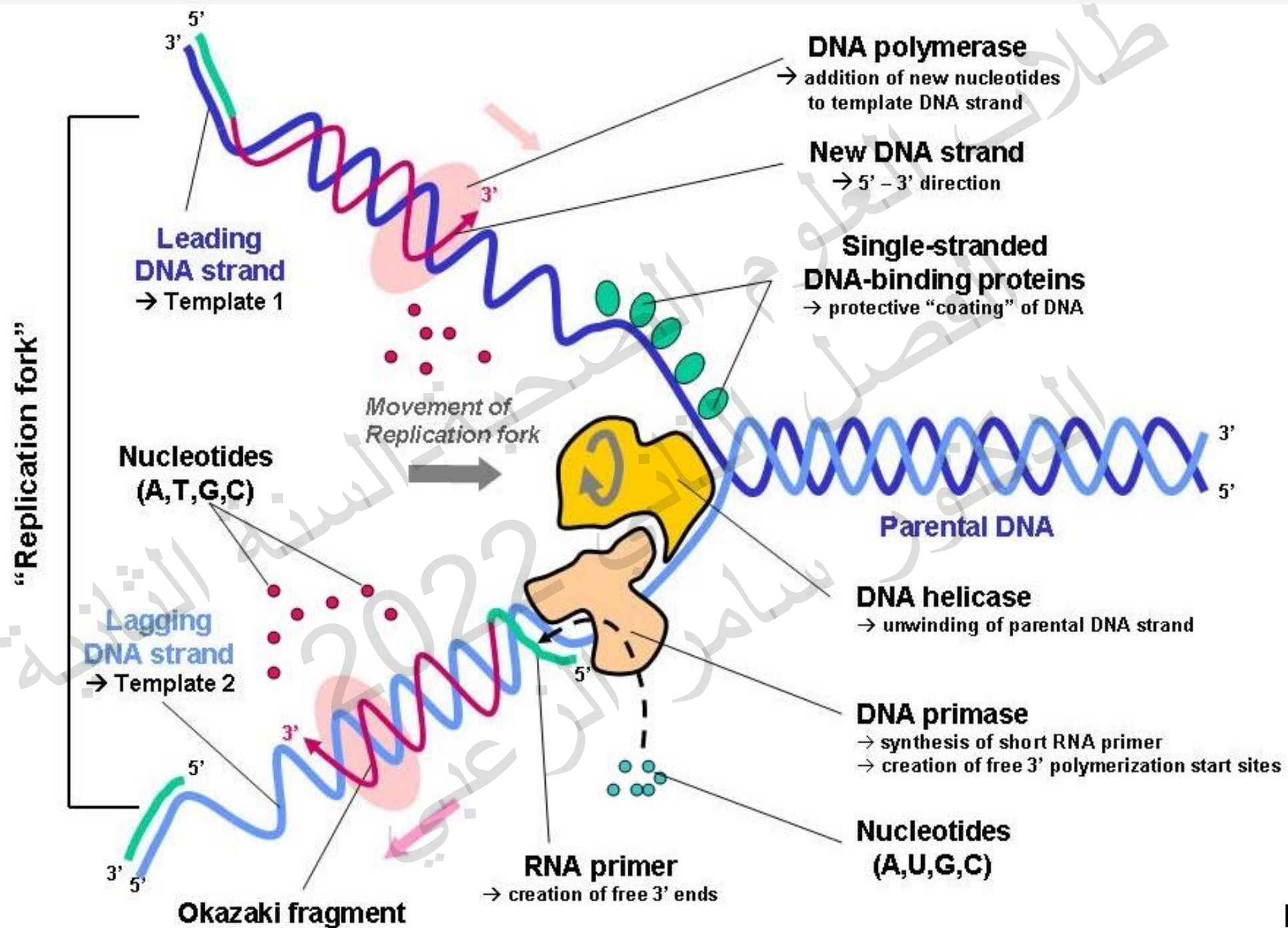
مراحل تضاعف الـ DNA

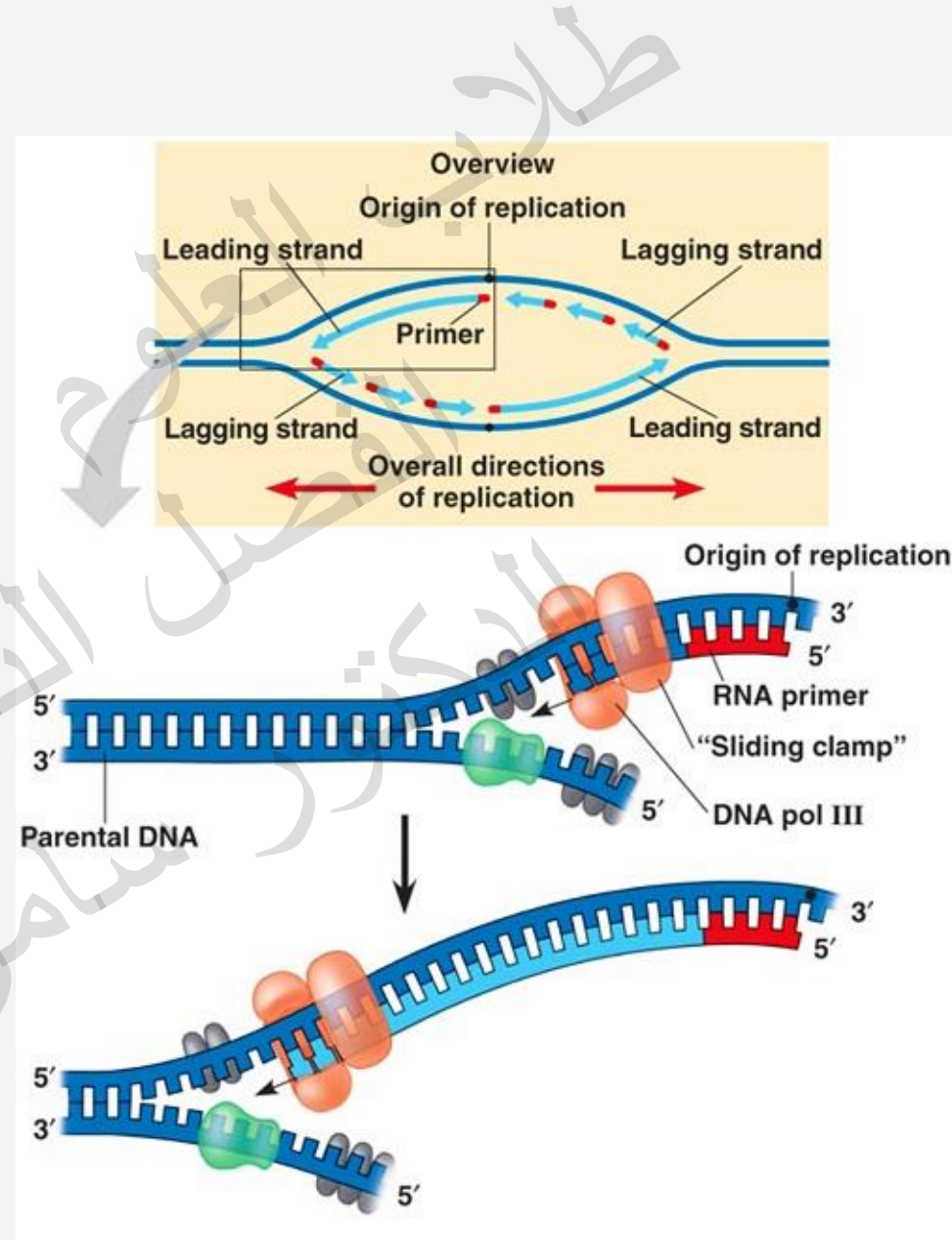
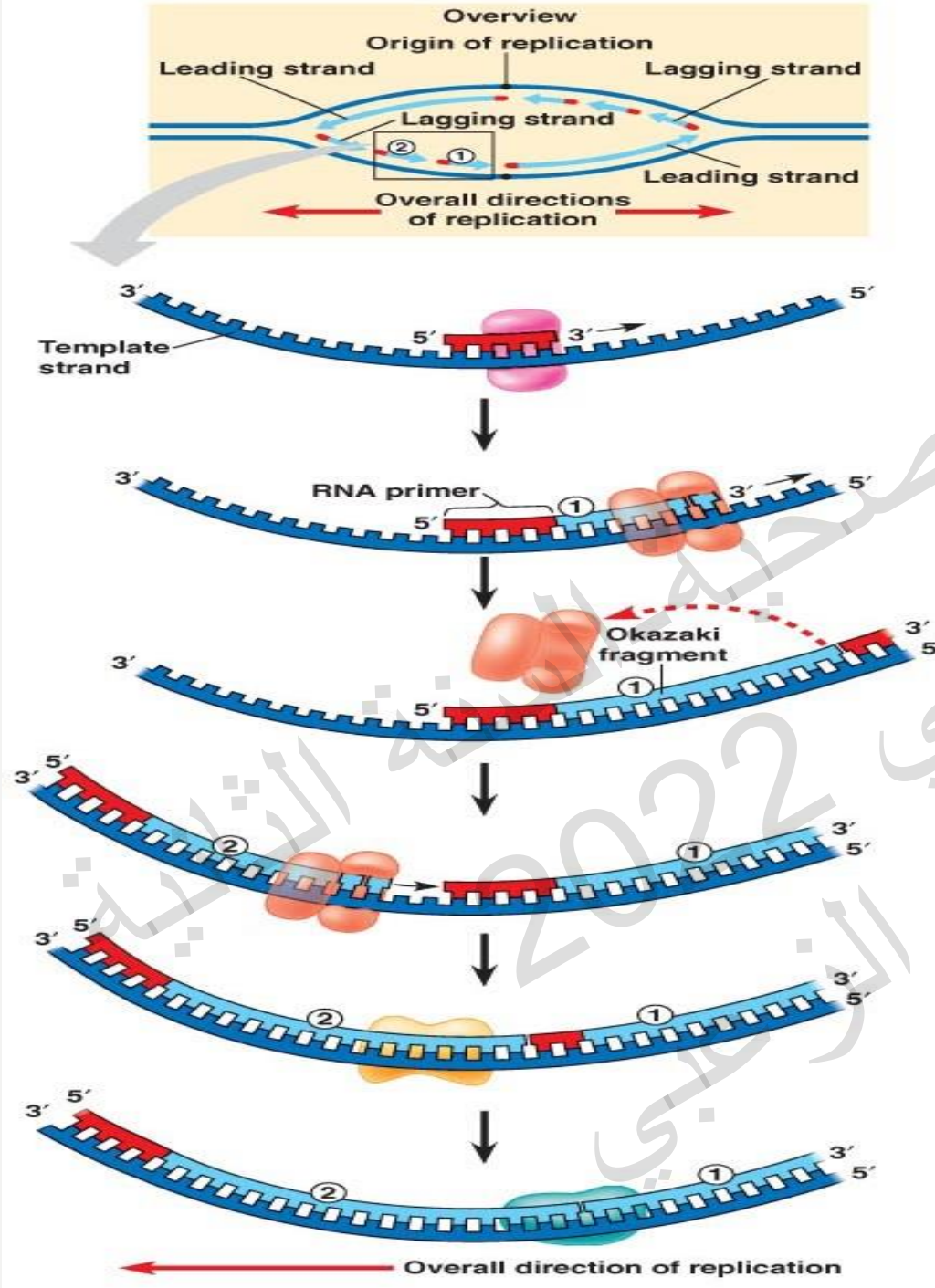


- يرتبط إنزيم الـ DNA بوليميراز من النمط الثالث DNA polymerase III مع بادئات الـ RNA ويقوم بجلب النوكليوتيدات ورصفها بشكل متمم للطاق المرصاف template وربطها مع بعضها البعض.
- ترتبط زمرة الفوسفات للنوكليوتيد القادم مع زمرة الهيدروكسيل 3'-OH الموجودة في النوكليوتيد السابق في طاق الـ DNA النامي مشكلة رابطة 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.







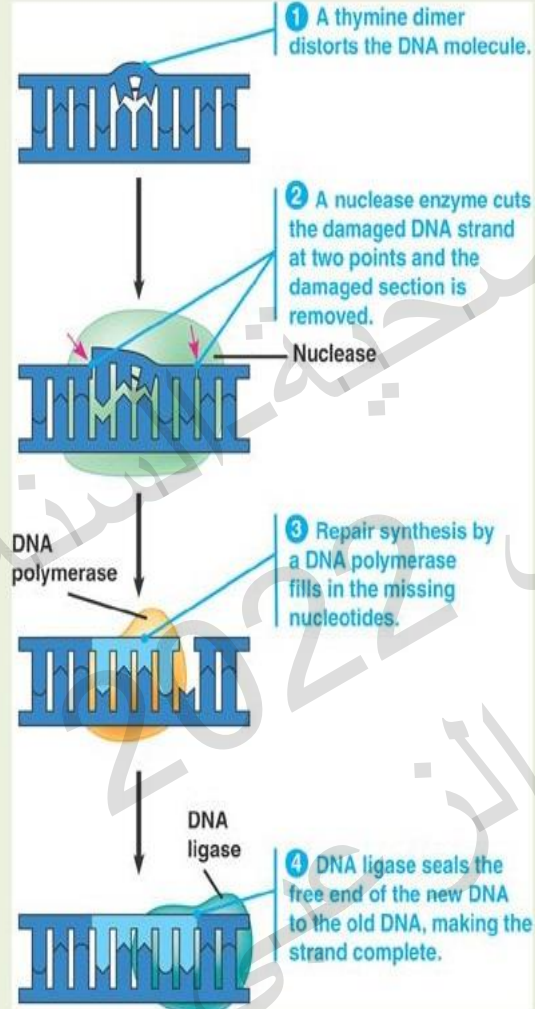


تدقيق و إصلاح أخطاء تضاعف الـ DNA

Repair of DNA

Nucleotide Excision repair

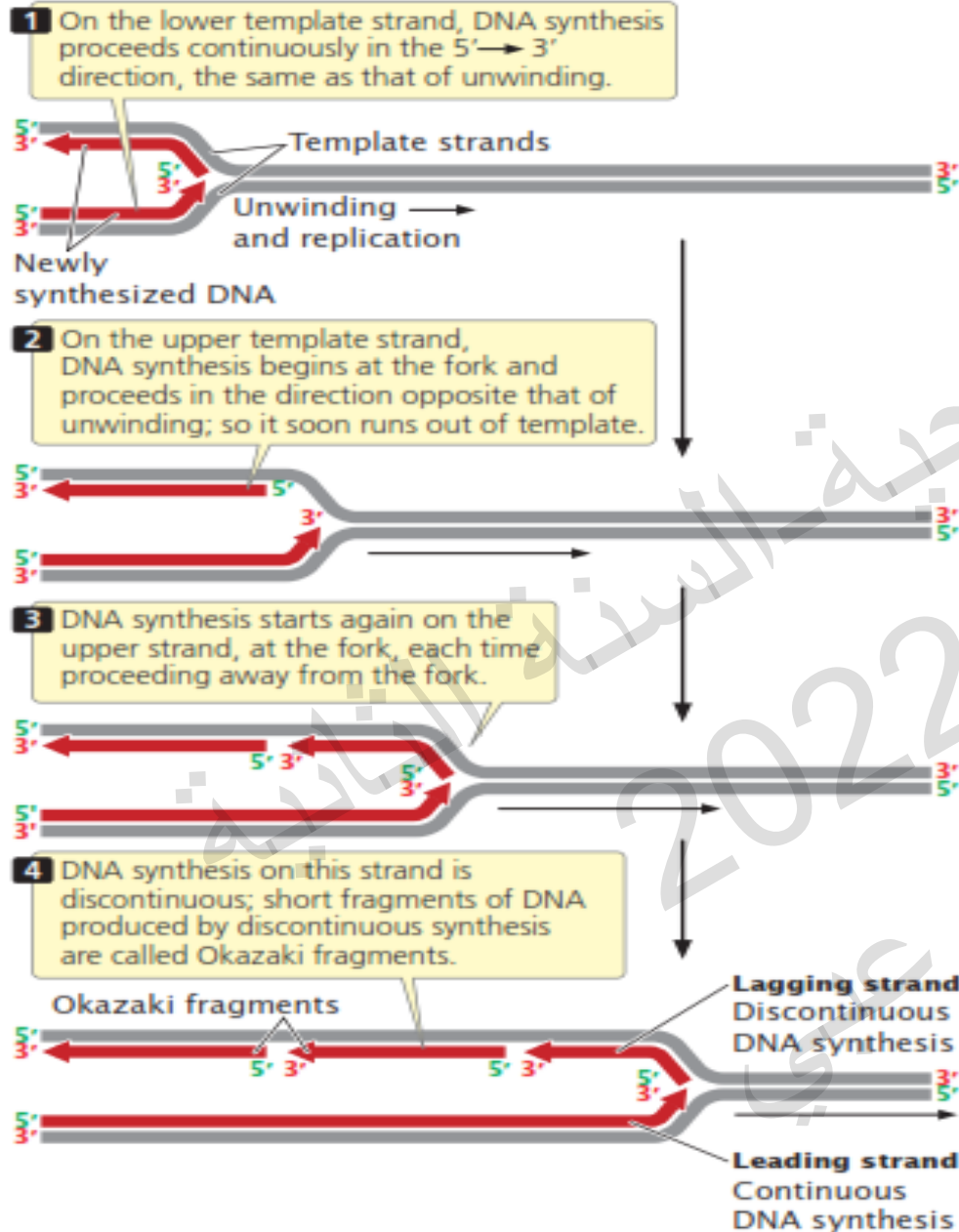
- Enzyme nuclease cuts out damaged segment of DNA
- DNA polymerase replaces missing nucleotides
- DNA ligase joins segments together



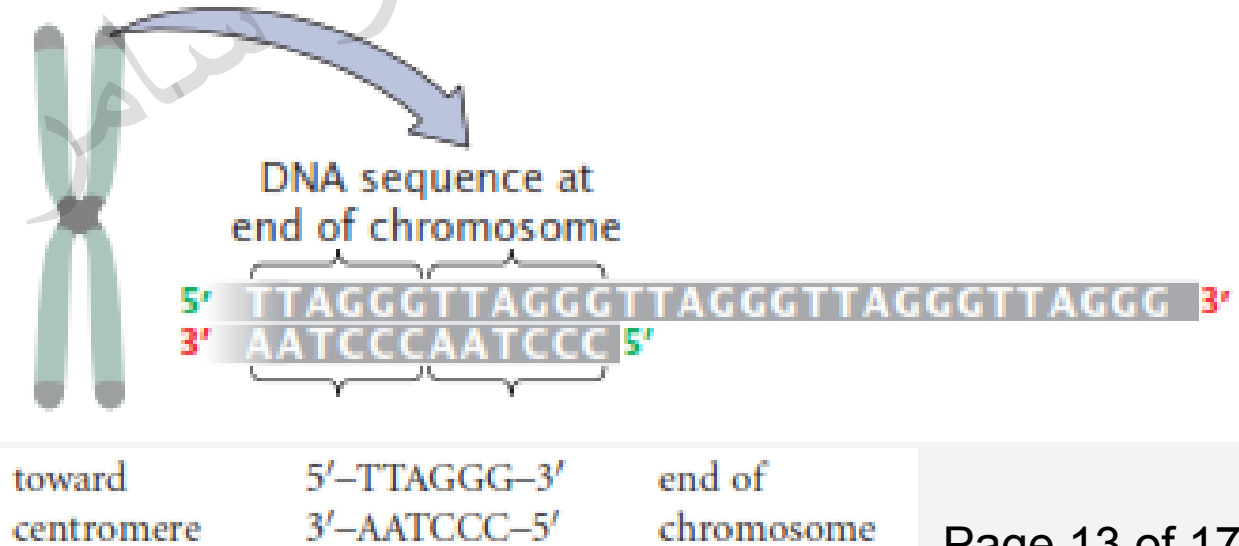
- قد تحصل أخطاء نادرة (1 لكل 10^{15} نوكلوتيد) أثناء عملية تضاعف الـ DNA، وغالباً تسبب تغييراً في زوج واحد من الأسس.
- قد يحدث أحياناً حذف أو تضاعف لشدة من الـ DNA.
- يقوم إنزيم الـ DNA بوليميراز بإصلاح وتدقيق كل نوكلوتيد يتم رصفه مقابل النوكلوتيد الآخر المتمم الموجود على الطاق المرصاف، حيث يقوم إنزيم الـ DNA بوليميراز بإزالة النوكلوتيد المنجبل بشكل خاطيء ووضع النوكلوتيد الصحيح مكانه.
- يشير مصطلح Mismatched nucleotides إلى النوكلوتيدات التي يقابل بعضها بعضاً في طاق الـ DNA بشكل خاطيء كان يتقابل السيتوزين مع الثيمين.
- تستطيع بعض النوكلوتيدات المتقابلة بشكل خاطيء 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 الشدة المتأذية.
 3. يملأ إنزيم بوليميراز الـ DNA بالنوكلوتيدات المناسبة مكان النوكلوتيدات التي تمت إزالتها.
 4. يربط إنزيم الليغاز بين نهايات النوكلوتيدات، أي يشكل روابط فوسفاتية ثنائية الإستر بينها.

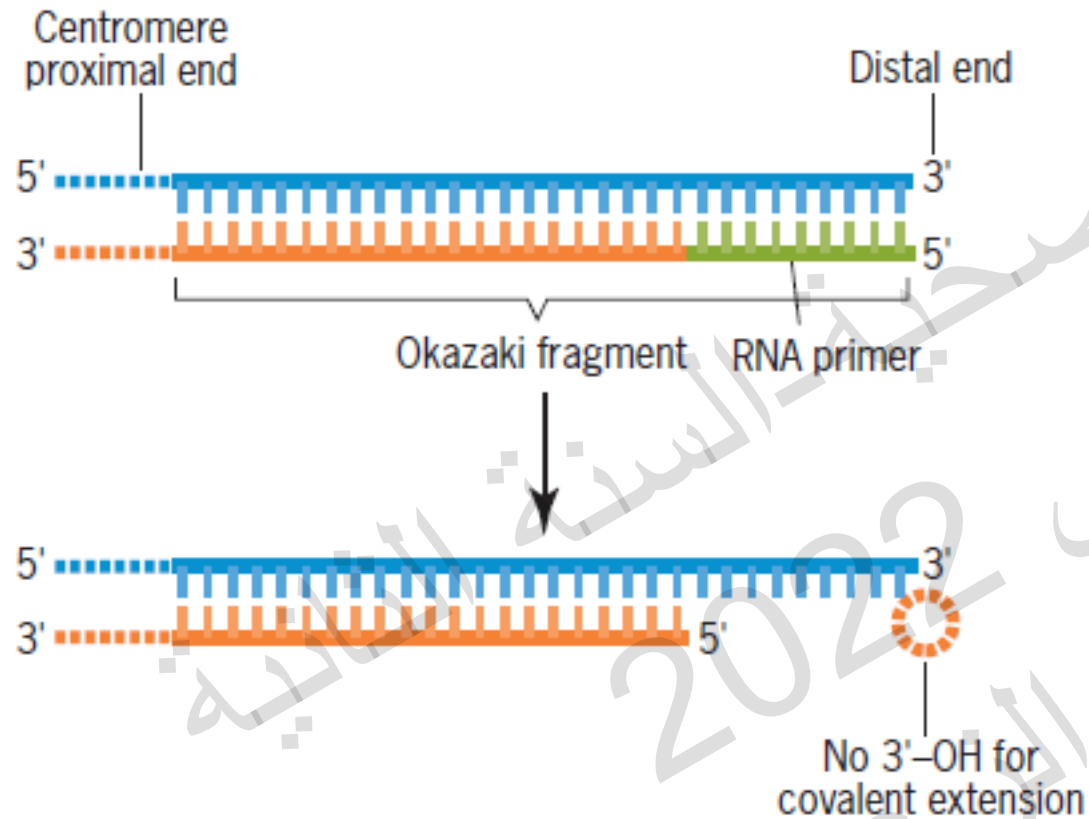
التضاعف عند القسم الطرفي



- 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 قسم طرفي تتكسر وتلتصق مع بعضها.
- يمكن تشبيهها تماماً بقطعة البلاستيك التي تغطي نهايات رباط الحذاء، فعندما يتم إزالة هذه القطعة ينفرد رباط الحذاء و يتشرشر ويصبح غير صالح.
- أيضاً وجود القسميات الطرفية يسهم في تضاعف نهايات الصبغي.
- تتكون القسميات الطرفية من DNA تكراري لوحدات معينة.
- تنتأ أو تبرز النهاية غالباً النهاية الغنية بالguanines على النهاية الغنية بالاستوزين، 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 القسميات الطرفية ليحميها من فعل الإنزيمات التي تصلح كسور الـ DNA.

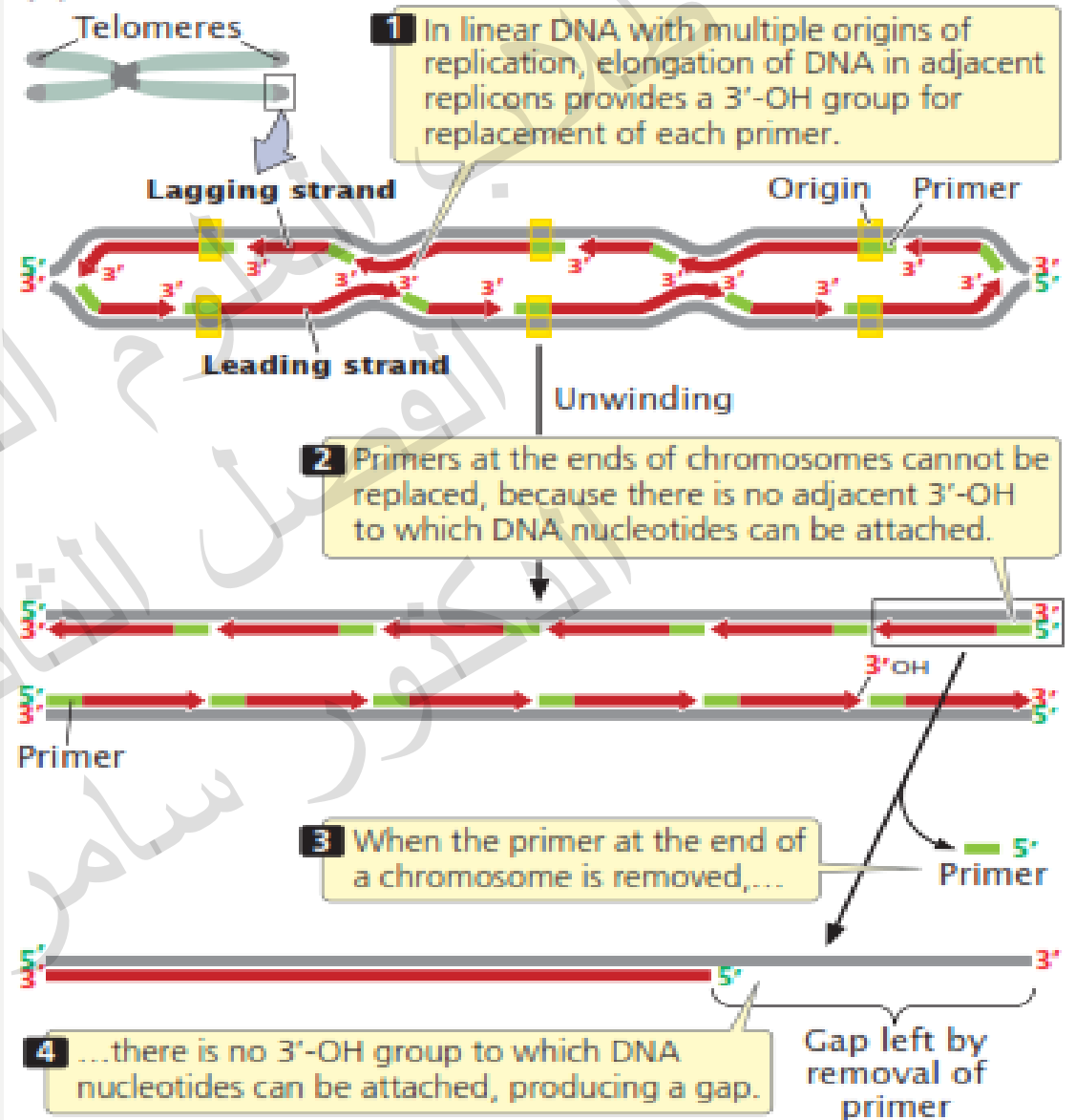


The telomere lagging-strand primer problem.



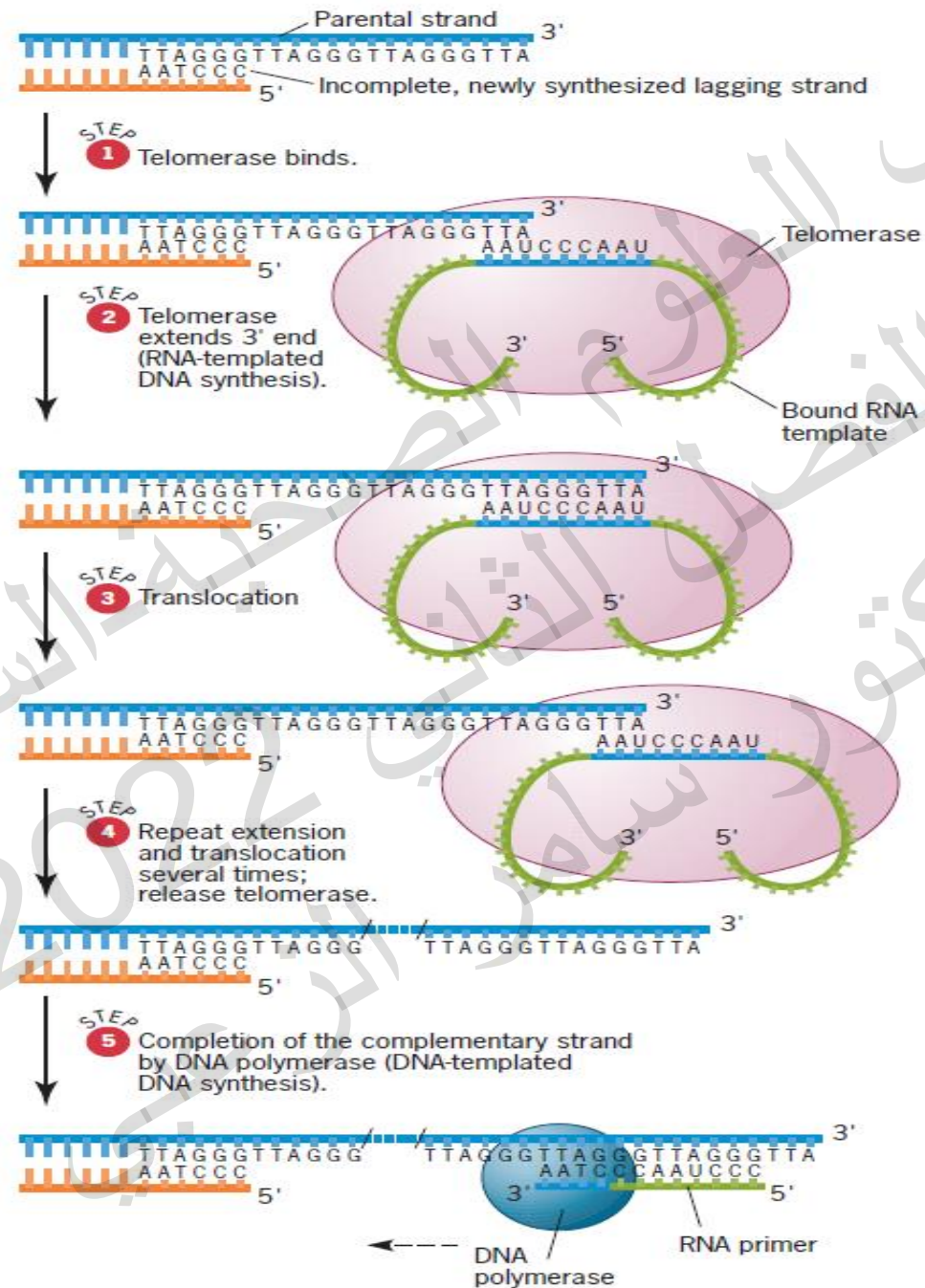
(a)

(b) Linear DNA



Conclusion: In the absence of special mechanisms, DNA replication would leave gaps due to the removal of primers at the ends of chromosome.

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

شكراً لاستماعكم