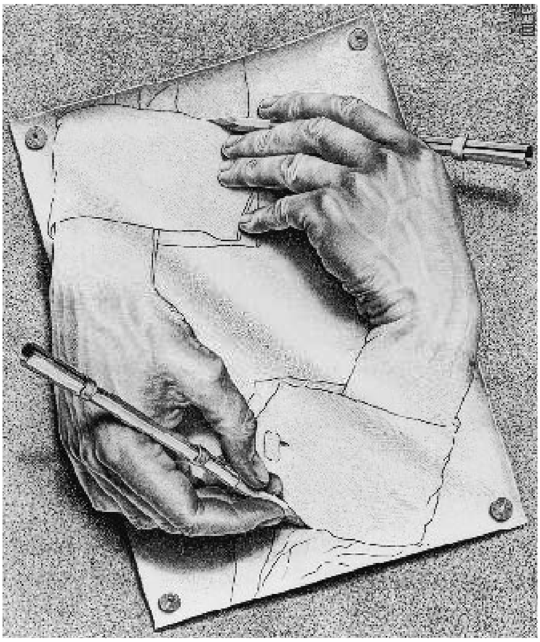
3

الفصل الثالث

تضاعف الـ DNA



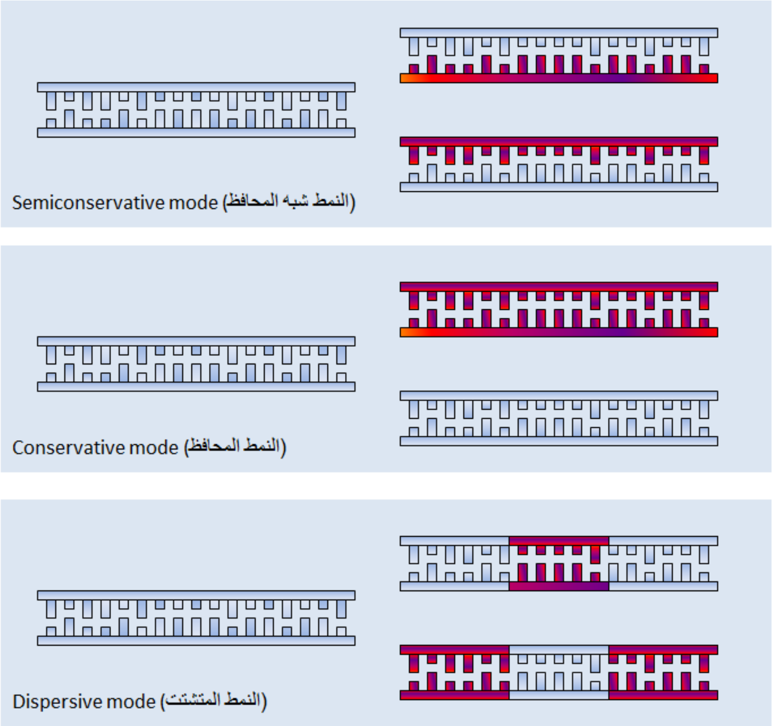
لوحة تناظرية توحي عملية التضاعف: هاتين اليدين تكملان بعضهما البعض وكذلك هي الحال بالنسبة لجزيئة الـ DNA الحاوية على شريطين يكملان بعضهما البعض، ليكونا فقاعة التضاعف ليمتد عليهما شريطي القالب ويرسمان طريقهما الى الأمام كما في هذه اللوحة (Lewis, 2009).

مقدمة

على كل الكائنات أن تضاعف الـ DNA التابع لها بدقة لا متناهية قبل كل انقسام خلوي. في هذا الفصل سوف ندرس كيف تنجز "آلية التضاعف" هذه المهمة بتلك الدقة، وذلك عند تضاعف الـ DNA بمعدل سرعة يقدر بأكثر من 1000 نيوكليوتيدة بالثانية الواحدة.تعد عملية فتح التفاف unwinding حلزون الـ DNA المزدوج خطوة أساسية في عملية التضاعف replication والاستنساخ transcription. وعندما يتضاعف حلزون الـ DNA المزدوج، فان كل سلسلة تعمل كقالب template لتخليق السلسل المكملة complementary chain. اقترحت هنا آلية الازدواج القاعدي base-pairing بأن شريطي الـ DNA الجديدين يستنسخان من الشريطين القديمين. ولو أن هذه الآلية توفر نسخا دقيقا للمعلومات الوراثية، ولكنها أثارت تساؤلا حول: هل إن التضاعف محافظ أو شبه محافظ؟

في الآلية الأولى ، الآلية المحافظة (conservative mode)، فان الشريطين الأبويين يكونا حلزوناً مزدوجاً جديداً بينما يبقى الحلزون المزدوج القديم سليما، بينما في الآلية الثانية، الآلية شبه المحافظة (semiconservative mode)، يزدوج كل شريط قديم مع الشريط الجديد المستنسخ منه، وسميت بهذا الاسم وذلك بسبب المحافظة على شريط واحد فقط في الـ DNA الأبوي في كل حلزون مزدوج ناتج، أي نصف الحلزون من أحد الشريطين القديمين، ونصفه من أحد الشريطين الجديدين الناتجين.

أما في الآلية الثالثة، الآلية المتشتتة (dispersive mode)، يتحطم كلا شريطي النيوكليوتيدات (يتشتت disperse) إلى قطع، والتي تعمل كقوالب لتخليق قطع جديدة من الـ DNA، ثم وبطريقة ما يعاد تكوينها من جديد إلى جزيئتي DNA كاملتين. وفي هذه الآلية، تتشتت كل جزيئة DNA مع قطع الـ DNA القديمة والجديدة، وفي هذه الحالة، لا يحافظ على أي من القطع الأصيلة (شكل1.3).



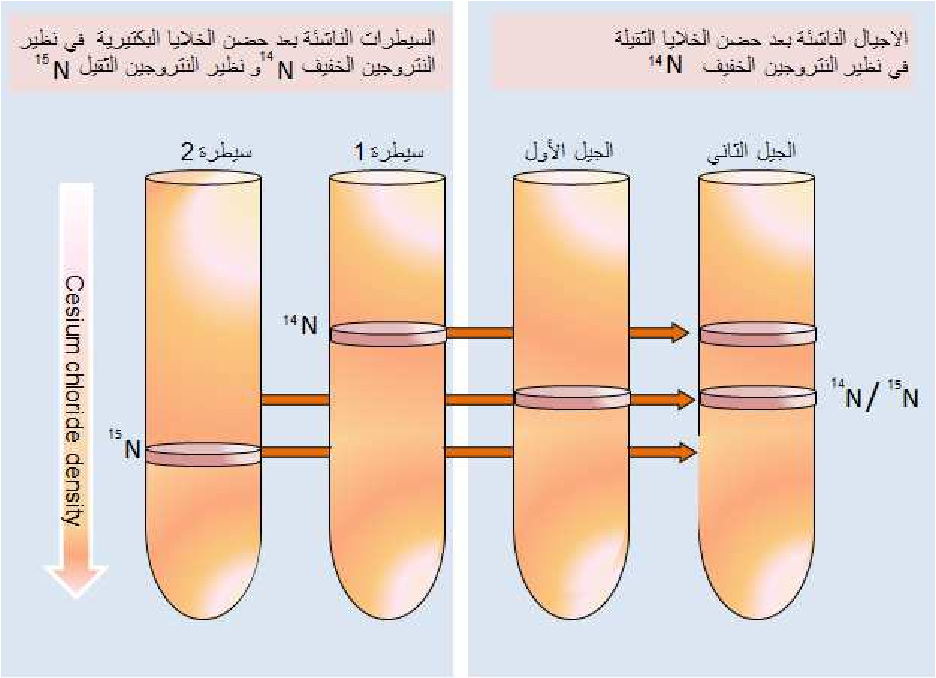
شكل (1.3): مخطط يوضح الفرضيات الثلاثة لتضاعف الـ DNA ، والتي تشمل الآلية الشبه محافظة، والآلية المحافظة، والآلية المتشتتة.يشير اللون الأزرق الى الأشرطة الأبوية بينما يشير اللون الأحمر الى الأشرطة البنوية (تصميم المؤلف).

على الرغم من عدم احتياج التضاعف شبه المحافظ إلى آلية تكهنية لتضاعف جزيئة الـ DNA، ولكنه يحتاج إلى مقدار كبير من البراعة لابتكار تجربة تثبت ذلك للمرة الأولى. وكان هذا الابتكار من نصيب كل من Meselson و Stahl في عام 1958 حيث تصوروا طريقة لإثبات الآلية شبه المحافظة في تضاعف المادة الوراثية (الجينوم) لبكتريا القولون.

M. Meselson

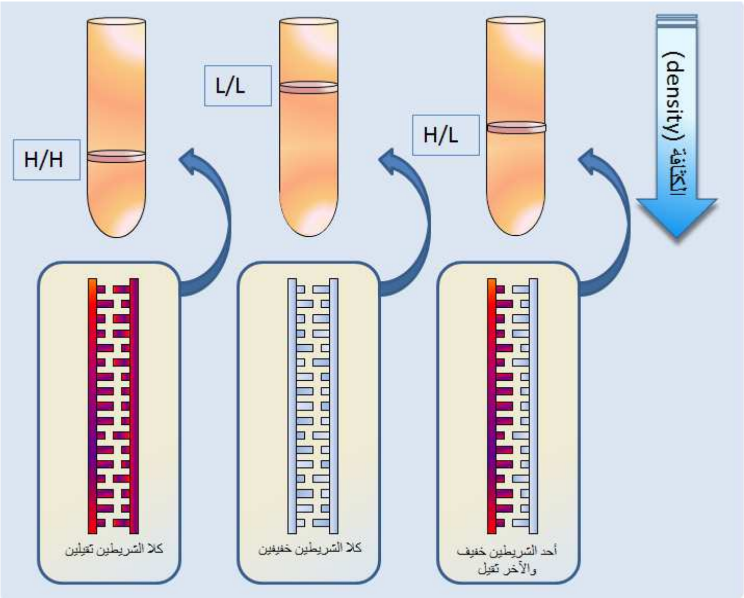
F. Stahl

إعتمد عمل طريقتهم إلى استخدام النظائر المشعة isotopes التي سوف تنتج في DNA ذو كثافات محورة بعد التضاعف. ولهذا السبب قاموا بتنمية خلايا بكتريا القولون لعدة أجيال على وسط يتكون من أيونات الأمونيوم (NH_4) كمصدر للنتروجين الذي يحتاجه الـ DNA (بالإضافة إلى البروتين) في تخليقه والذي يكون فيه كل النتروجين من نوع النظير المشع الثقيل ^{15}N (إن النتروجين الطبيعي هو ^{14}N). وبعد تنمية بكتريا القولون لعدة أجيال في هذا الوسط، وجدوا بان DNA خلايا القولون أثقل من الـ DNA الطبيعي، بسبب وجود ذرات ^{15}N فيه، حيث اندمج النظير ^{15}N في قواعد الـ DNA خلال التضاعف. وكنتيجة، فان الـ DNA في الخلايا الناتجة progeny cells ذات كثافة أكبر من الكثافة الطبيعية. وبعد ذلك، قاموا بنقل البكتريا المتشبعة بالوسط ^{15}N لكي تنموا في وسط محتوي على النتروجين ^{14}N الطبيعي، وسمحوا للخلايا بأن تتضاعف جيل واحد فقط في البداية. وبعد ذلك قاموا بعزل الـ DNA من الخلايا وحلّلوه بواسطة تقنية تسمح بمعرفة كثافة الـ DNA تدعى بتقنية النبذ المركزي المعتمد على تدرج الكثافة density gradient centrifugation والمنجزة باستخدام محلول كلوريد السيزيوم cesium chloride (CsCl). حيث يوضع المحلول في جهاز النبذ المركزي فائق السرعة ultra-centrifuge والذي يدور بسرعات عالية لساعات طويلة. وفي النهاية يحدث هنالك توازن بين قوة النبذ المركزي والانتشار diffusion، إن مثل هذا التدرج في الكثافة يحصل في أنبوب تتضح به زيادة تركيز كلوريد السيزيوم(CsCl) من قمة الأنبوب إلى قعره. وإذا ما أضيف الـ DNA أو أية مادة أخرى فإنها تتركز وتكون حزمة في الأنبوب عند نقطة عندما تكون كثافتها نفس كثافة كلوريد السيزيوم. وإذا كان هنالك عدة أنواع من الـ DNA بكثافات مختلفة، فإنها ستكون حزما مختلفة. وفي هذه التجربة، حيث ينتج ^{15}N DNA النقي حزمة مفردة من الـ DNA، ونفس الشيء بالنسبة لـ ^{14}N DNA . يكمن الفرق الوحيد في كون أن الـ DNA الأكثر كثافة ينتج في حزمة واقعة إلى أسفل أنبوب النبذ المركزي. وهكذا فان موقع الـ DNA في الأنبوب جعل من المعقول أن نتعقب أو نراقب كثافة الـ DNA، ومن الممكن الكشف عن الحزم وذلك بملاحظة الأنابيب تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي 260 نانوميتر، والذي به تدمص الأحماض النووية بقوة).وعلى أية حال، فعند تحليل DNA الجيل الجديد وجد بأنه يحتل موقعا وسطا بالضبط بين الحزمة الخفيفة (حزمة الجيل الجديد) والحزمة الثقيلة (حزمة الجيل السابق). إن هذا بنفسه، ليس بمفاجئة، لأن هذا يخبرنا بأنه ليس أكثر من أن نصف ذرات النتروجين في الـ DNA الجديد هي ^{14}N والنصف الآخر هي ^{15}N، حيث إن الحزمة الوحيدة المرئية في الـ DNA المعزول هي تلك المطابقة للهجين ^{14}N ^{15}N-DNA (شكل 2.3)، وذلك لأن التضاعف شبه محافظ semiconservative. وإذا كان التضاعف محافظا conservative ، فسوف يظهر لدينا حزمتين في الجيل الأول من التضاعف والتي تمثلان حزمة ^{15}N DNA الأصلية وحزمة ^{14}N DNA الجديدة.



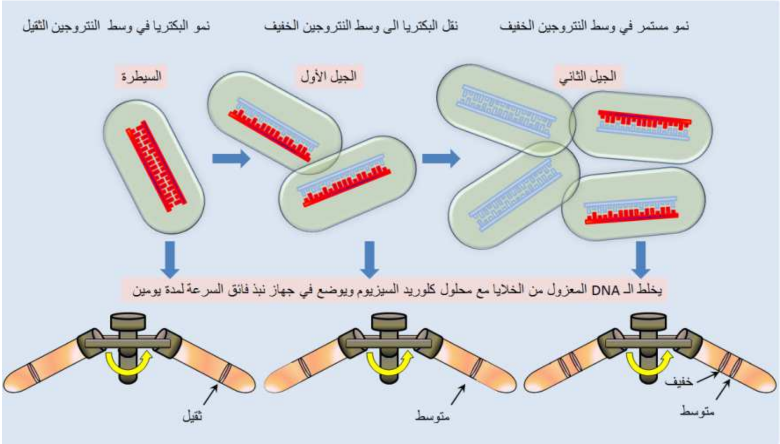
شكل (2.3): مخطط يوضح مواقع حزم الـ DNA الناتجة عن الاختلاف في كثافة النتروجين في الجيلين الأول والثاني ومقارنتهما مع سيطرة النتروجين الثقيل وسيطرة النتروجين الخفيف (تصميم المؤلف).

ليس هذا فحسب، وإنما وخلال الأجيال المتعاقبة، إذا كانت طريقة التضاعف محافظة، فان الـ DNA الأصيل سوف يستمر بالظهور ممثلا بالحزمة ^{15}N. وهذا بالطبع لم يحدث. وإذا كانت طريقة التضاعف متفرقة dispersive، فان النتيجة ستكون ظهور نمط ذو حزم متعددة، وذلك اعتمادا على درجة التفرق. إن النتائج المبينة في الشكل (3.3) هي متوافقة تماما مع آلية التضاعف شبه المحافظ وفقط الآلية شبه المحافظة، لأن النتائج في الأجيال المتعاقبة قد اتفقت مع هذا الطرح.وهكذا، فان نتيجة تحليل الـ DNA للجيل الثاني النامي في وسط الواسم الخفيف ^{14}N بيّن كميات متساوية من كثافة الـ DNA الهجين وكثافة الـ DNA الخفيف، أما الجيل الثالث والأجيال الأخرى فبين زيادة في نسبة ^{14}N على نسبة 15N، وتتمثل هذه النسبة بزيادة سمك حزمة ^{14}N.



شكل (3.3): مخطط يوضح طبيعة أشرطة الـ DNA الممثلة لمواقع الحزم المختلفة في أنبوب الطرد المركزي (تصميم المؤلف)

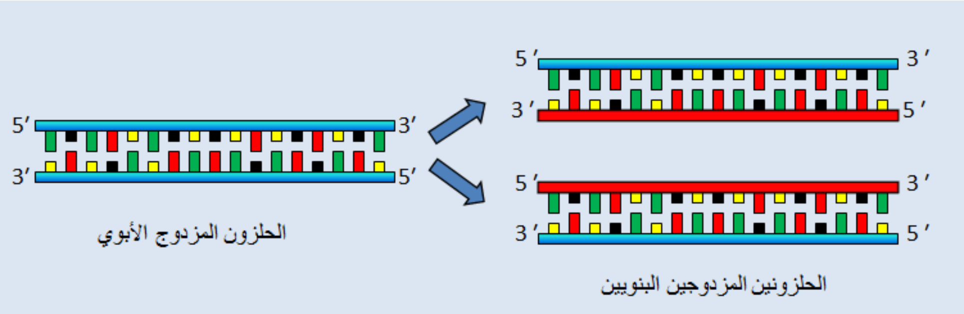
وبعد اجراء تلك التجارب عرف وبشكل واضح بأن الـ DNA في الكائنات بدائية وحقيقية النواة يتضاعف بشكل شبه محافظ. ومن الجدير بالذكر إن بعض المؤرخين والفلاسفة في مجال الوراثة قد اعتبروا هذه التجربة (شكل 4.3)من أكثر التجارب العلمية المنجزة روعة.



شكل (4.3): مخطط شامل لتجربة Meselson و Stahl عام 1958 والتي يوضح فيها الخطوات العملية للتجربة التي من خلالها تم معرفة الفرضية الصحيحة لتضاعف الـ DNA (تصميم المؤلف).

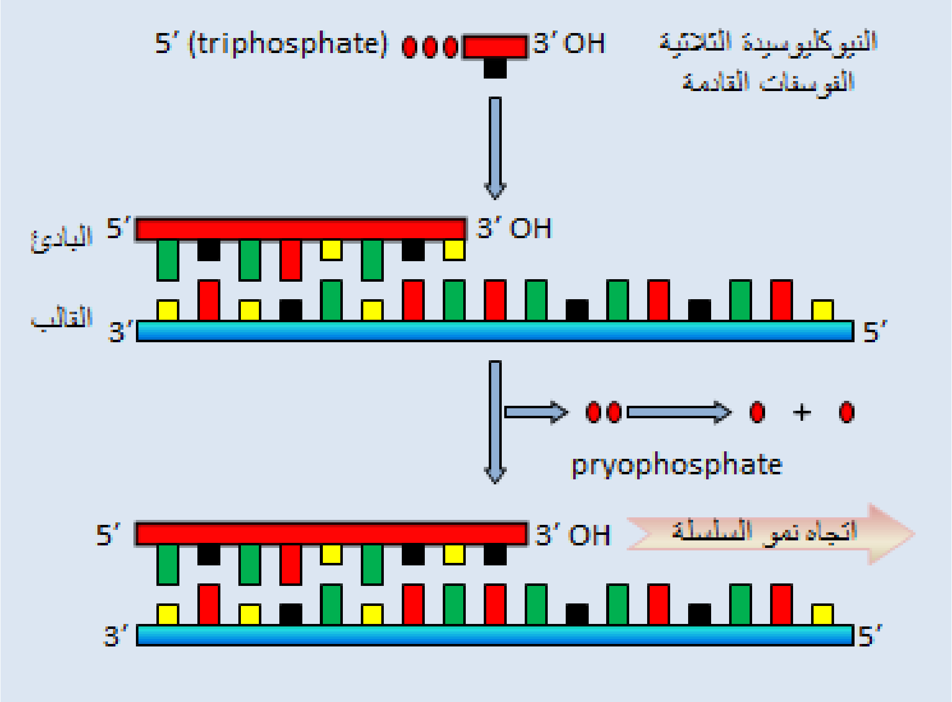
الازدواج القاعدي وتضاعف الـ DNA

كما تم الإشارة إليه سابقا، يعد قالب الـ DNA أساس ومبدأ عملية التضاعف فضلا عن عملية الاستنساخ، حيث ان كل شريط مكمل للشريط المقابل له (A with T, and G with C)، حيث تستلزم عملية المتممية complementarity بين أشرطة الـ DNA ان تميز كل نيوكليوتيدة في شريط القالب template النيوكليوتيدة الحرة المكملة لها لترتبط بها بأواصر هيدروجينية (شكل 5.3).



شكل (5.3): حلزون الـ DNA المزدوج الذي يعمل كقالب لتضاعفه. بما ان النيوكليوتيدة A سوف تزدوج وبنجاح مع النيوكليوتيدة T، و G فقط مع C، فان كل شريط DNA من الممكن ان يعمل كقالب لكي يحدد تسلسل النيوكليوتيدات في شريطه المكمل وذلك بواسطة الازدواج القاعدي. وبهذه الطريقة، جزيئة الـ DNA ذات الحلزون المزدوجة يمكن أن تستنسخ بدقة. يدل اللون الأزرق على الأشرطة الأبوية بينما يدل اللون الأحمر على الأشرطة البنوية (تصميم المؤلف).

وهكذا تستمر عملية البلمرة polymerization بالاتجاه ´5 إلى ´3 وبتحفيز من قبل إنزيم DNA polymerase، والذي اكتشف سنة 1957. ان النيوكليوتيدات الحرة التي تعمل كمادة أساس substrate لهذا الإنزيم وجد بأنها تكون على هيئة deoxyribonucleoside triphosphates ، ان سبب وجودها بهيئة ثلاثية الفوسفات هو لإعطائها الطاقة اللازمة للوصول إلى النيوكليوتيدات المكملة والواقعة في الشريط القالب. وتكون كل النيوكليوتيدات المندمجة في سلسلة الـ DNA أو الـ RNA بشكل أحادي الفوسفات، يستثنى من ذلك النيوكليوتيدة الطرفية في النهاية ′5 حيث تكون بشكل ثلاثي الفوسفات، وهنا تحتوي بالإضافة إلى مجموعة الفوسفات α على مجموعتي الفوسفات β و γ (شكل 6.3).



شكل (6.3): عملية تخليق الـ DNA المحفزة من قبل إنزيم DNA polymerase: كما مبين، يحفز إنزيم DNA polymerase عملية إضافة النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات التدريجية للنهاية من نوع 3′ OH المتكشفة لشريط البادىء، والذي يزدوج بالشريط القالب الثاني. ولهذا يتبلمر شريط الـ DNA المصنع بالاتجاه من 5´ إلى 3´ كما هو مبين في الشكل السابق. ولأن كل نيوكليوتيدة ثلاثية الفوسفات deoxyribonucleoside triphosphate قادمة يجب أن تزدوج مع الشريط القالب لكي يتم تمييزها من قبل إنزيم الـ DNA polymerase، فان هذا الشريط هو الذي يحدد أي من النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات (A, C, G, or T) هي التي تضاف. يقاد التفاعل من قبل تحرير ذرتي فوسفات pyrophosphate من قبل كل نيوكليوتيدة ثلاثية الفوسفات أثناء اندماجها في سلسلة الـ DNA الحديثة التكوين (تصميم المؤلف).

احتياجات إنزيم DNA polymerase

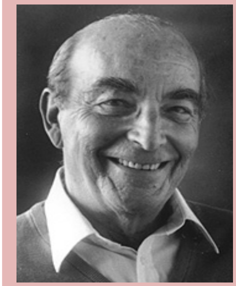
يحتاج إنزيم DNA polymerase في حالته النقية إلى:

1- دنا قالب DNA template
2- أربعة نيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات deoxynucleoside triphosphate
3- أيونات المغنسيوم لتخليق الـ DNA
4- بادىء يوفر مجموعة هيدروكسيل (3′ OH end) متكشفة، وذلك لعدم قدرة إنزيم DNA polymerase على بدء التضاعف بنفسه. وعند وجود نهاية الهيدروكسيل

المتكشفة فقط هنا يتسنى للإنزيم التقدم بالتفاعل بالاتجاه من 5´ إلى 3´ بالاستناد على شريط القالب.

يحفز الإنزيم إضافة نيوكليوتيدات أحادية mononucleotides للنهاية الهيدروكسيلية ′3لسلسلة الـ DNA النامية. وفي نفس الوقت، ينكسر الربط بين ذرتي الفوسفات α و β ، محررة مجموعة البايروفوسفات (PPi) pyrophosphate الغير عضوية. ان تكوين الآصرة ثنائية الفوسفات ربما يحدث كهجوم محب للنواة nucleophilic attack ، بواسطة مجموعة ′3 OH، على ذرة الفوسفات α للنيوكليوسيدة ثلاثية الفوسفات الداخلة في السلسلة. يسبب هذا الهجوم إزاحة مجموعة الـ pyrophosphate وتكوين رابطة داخل نيوكليوتيدية intra-nucleotide linkage.

قصة الإنزيمين DNA polymerase III و DNA polymerase I



Arthur Kornberg

في عام 1957، عزل آرثر كورنبيرغ Arthur Kornberg هو وزملائه من خلايا بكتريا القولون إنزيماً قادرا على تخليق الـ DNA على شريط القالب المتعدد النيوكليوتيدات polynucleotide template. أطلق على هذا الإنزيم اسم DNA polymerase لقدرته على بلمرة شريط DNA جديد مستخدما الشريط القالب، كذلك أطلق عليه اسم Kornberg enzyme نسبة إلى مكتشفه.

وبالطبع، اعتقد آنذاك بأن هذا الإنزيم هو الإنزيم المسؤول عن تضاعف الـ DNA في الخلايا البكتيرية. ولكن، ولسوء الحظ ، عندما درست تلك الإنزيمات بتعمق أكثر توصل الباحثون إلى نتائج غير متفقة مع تلك التي توصل إليها Kornberg، ان أكثر هذه التجارب شهرة هي تلك التي جرت عام 1969 في خلايا بكتريا القولون، حيث حذف فيها الجين الذي يشفر عن الإنزيم الذي اكتشفه Kornberg والذي يعرف الآن باسم DNA polymerase I، ولكن على الرغم من حذف هذا الجين إلا ان خلايا بكتريا القولون ما زالت قادرة على مضاعفة الـ DNA التابع لها. وفي النهاية توصل الباحثون إلى الآتي: ولو أن إنزيم DNA polymerase يدخل في عملية التضاعف، ولكنه ليس الإنزيم المضاعف الرئيسي. أما الإنزيم الذي يعتقد بأن له دور أساسي في عملية التضاعف هو إنزيم DNA polymerase III . ان تعقيد الدور الذي يلعبه في الخلية منعكسة في تعقيد تركيبه الذي يتكون من عشر وحدات ثانوية subunits (أنظر أدناه).

إذن يوجد إنزيم DNA polymerase في خلايا بكتريا القولون بثلاثة أنواع، DNA polymerase III وهو إنزيم التضاعف الرئيسي، و DNA polymerase II، . يعمل إنزيم DNA polymerase II في آليات الإصلاح المستحثة والتي تعرف بـ SOS response (أنظر الفصل السابع)، حيث يسهّل هذا الإنزيم عملية تخليق الـ DNA في أشرطة القالب المتضررة. و DNA polymerase I، والذي يتألف من وحدة ثانوية subunit واحدة، والذي يدخل في عملية تضاعف الـ DNA من خلال إزالة بوادىء الـ RNA في النهاية 5′ لكل قطعة أوكازاكي واستبدالها بالـ DNA، فضلاً عن دوره الرئيسي في عملية إزالة الضرر الحادث بالـ DNA والذي يعرف بإصلاح الـ DNA(DNA repair). ستتركز مناقشتنا على إنزيم DNA polymerase III، والذي يحفّز استطالة سلسلة الـ DNA في شوكة تضاعف بكتريا القولون.

كيفية عمل إنزيم DNA polymerase I في بكتريا القولون

يتكون هذا الانزيم من وحدة ثانوية واحدة (one subunit)، ويمكن شق تلك الوحدة المفردة وذلك بمعاملة هذا الانزيم من قبل معاملة هاضمة للبروتين (proteolytic treatment. يدعى ناتج الشق الأكبر بقطعة كلينو (Klenow fragment) والتي يمكن أن تستخدم في التفاعلات التخليقية خارج جسم الكائن الحي. تحتوي قطعة Klenow على فعاليتين، هما الفعالية المبلمرة (polymerizing activity) ذات الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ وفعالية تصحيح الخطأ (proofreading activity) ذات الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ وهي فعالية مزيلة للنيوكليوتيدات الخاطئة. أما الشق الثاني لهذا الانزيم فيحتوي على الفعالية المزيلة للنيوكليوتيدات (exonuclease activity) ذات الاتجاه $5' \rightarrow 3'$، حيث يوجد فصل في الموقع مابين اضافة النيوكليوتيدة وازالتها.

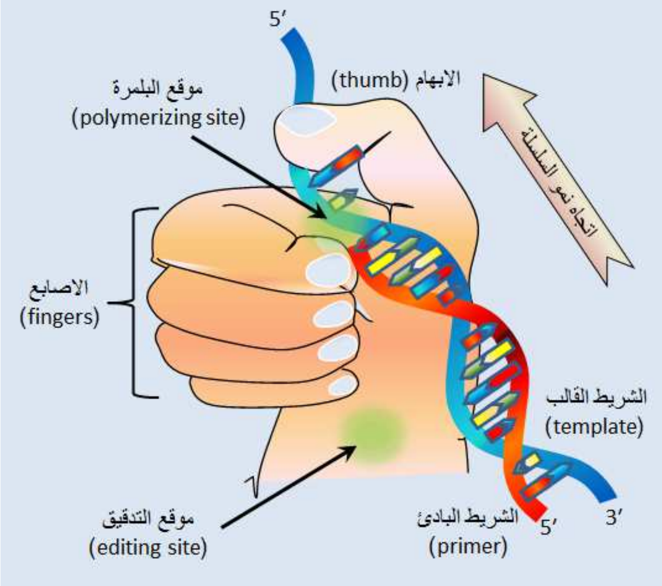
تتعاون تلك الفعاليات الثلاث مع بعضها البعض حيث توفر لانزيم DNA polymerase I خاصية فريدة، وهي تجمع ثلاث فعاليات في وحدة ثانوية واحدة، وهذا بدوره يعطي قابلية لهذا الانزيم لكي يشارك في فعاليات عديدة داخل وخارج جسم الكائن الحي بالاضافة الى عملية التضاعف كما في عملية اصلاح خلل الـ DNA (أنظر الفصل السابع) وعملية اعادة الارتباط (أنظر الفصل الثامن)، كما أن قدرة هذا الانزيم على امتداد ثلمة (nick) صغيرة في الـ DNA نتيجة لتعاون فعالياته المتنوعة أعطت دوراً كبيراً لهذا الانزيم لكي يشارك العديد من تجارب الهندسة الوراثية (أنظر الفصل الحادي عشر). من هذا نستنتج بأن Arthur Kornberg لم يتصور جزافاً بأن هذا الانزيم هو انزيم التضاعف الرئيس في الخلية، ولكنه لم يدرك حينها بأن هنالك انزيماً اعقد من ذلك، وهو DNA polymerase III.

كيفية عمل إنزيم التضاعف الرئيس في بكتريا القولون

سنركز الاهتمام على إنزيم DNA polymerase III بوصفه إنزيم التضاعف الرئيسي في الخلية. إن هذا الإنزيم هو بروتين في غاية التعقيد ذو وزن جزيئي عالي (600 KDa) ، ويتألف من عشرة وحدات ثانوية 10 different subunits . إن ما يعرف بإنزيم البوليمريز الصميمي core polymerase يتألف من ثلاث وحدات ثانوية. تحتوي وحدة ألفا الثانوية α subunit (التي تمثل أصابع اليد fingers) على الموقع الفعال لإضافة النيوكليوتيدات بسبب امتلاكها الفعالية المبلمرة من 5′ إلى 3′، ووحدة ابسلون الثانوية ε subunit (التي تمثل راحة اليد palm) والتي تضطلع بإزالة النيوكليوتيدات المغلوطة mismatched nucleotides (المضافة بشكل خاطيء) بواسطة آلية معينة تعرف بآلية إصلاح الخطأ proofreading mechanism السابقة الذكر. تقوم هذه الوحدة الثانوية بهذا الدور بسبب امتلاكها الفعالية الإنزيمية المزيلة للنيوكليوتيدات والتي تعرف بـ exonuclease activity ذات الاتجاه المعاكس لعملية البلمرة والذي هو من 3′ إلى 5′.أما الوحدة الثانوية الثالثة والتي تعرف بثيتا θ subunit (والتي تمثل الإبهام thumb) فهي على أية حال غير معروفة الوظيفة (شكل 7.3).

يتقدم إنزيم DNA polymerase III –كما نوقش سابقاً – بالاتجاه من 5′ إلى 3′ وذلك بسبب امتلاكه لوحدة α ذات الفعالية المبلمرة من 5′ إلى 3′. ولايمكن له من أن يتقدم بالاتجاه المعاكس بسبب عدم امتلاكه لوحدة ثانوية أخرى ذات فعالية بلمرة من 3′ إلى 5′. ولكن، يحدث في بعض الأحيان أن تندمج نيوكليوتيدة مغلوطة في سلسلة الـ DNA النامية، وفي هذه الحالة، يتوقف إنزيم DNA polymerase III عن العمل، ثم ينقل النهاية 3′ للسلسلة النامية من وحدة α المبلمرة (أصابع اليد)، إلى وحدة ε الهاضمة ذات الاتجاه المعاكس. وهكذا تزال النيوكليوتيدة المغلوطة بالاتجاه من 3′ إلى 5′. وحالما تنتهي عملية إزالة النيوكليوتيدة المغلوطة بآلية تصحيح الخطأ المعاكسة لاتجاه عملية البلمرة، ترجع النهاية 3′ لسلسلة الـ DNA النامية إلى موقع البلمرة في وحدة α، وتستأنف عملية البلمرة بالاتجاه من 5′ إلى 3′ (شكل 7.3).

أما الدور الرئيسي للوحدات الثانوية المتبقية (6 وحدات ثانوية) هو تحويل إنزيم البوليمريز الصميمي من إنزيم تفريقي distributive (غير تقدمي)، أي الإنزيم الذي يسقط من الشريط القالب بعد تخليقه من عشر الى خمسين نيوكليوتيدة، إلى إنزيم تقدمي processive والذي يمكن له تخليق امتدادات طويلة من الـ DNA تصل إلى أكثر من 500 ألف نيوكليوتيدة بدون أن يسقط من الشريط القالب. إن الفعالية الأخيرة تكون ضرورية للتخليق الكفء لكلا شريطي الـ leading مع شريط الـ lagging.



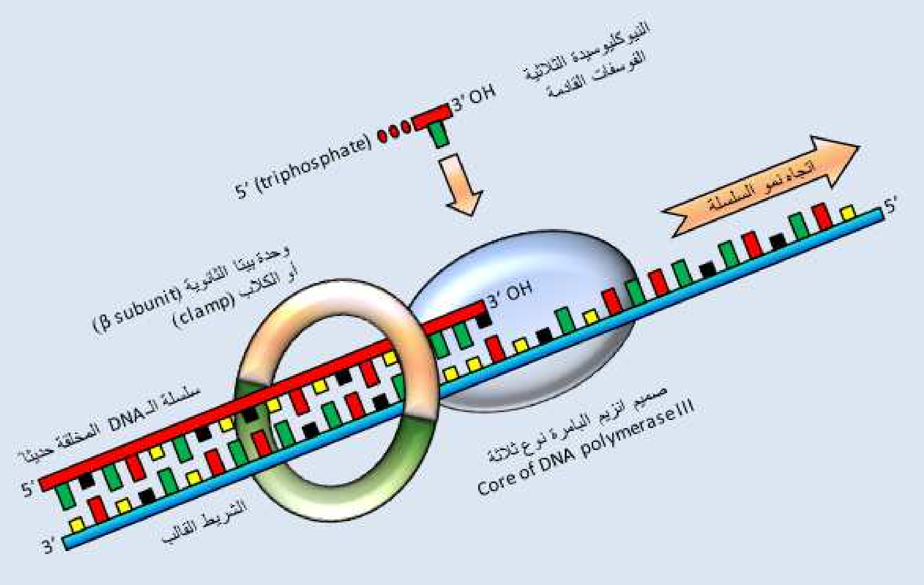
شكل (7.3): تركيب إنزيم البوليمريز الصميمي core DNA polymerase في بكتريا القولون حسب معطيات تقنية X-rays crystallography. وببساطة، يشبه إنزيم DNA polymerase اليد اليمنى نصف المفتوحة، حيث يلاحظ إن كل من راحة اليد palm، والأصابع fingers، والإبهام thumb يقبض على الـ DNA، بالاضافة الى ذلك، يبرز موقعين منفصلين مكانياً عن بعضهما وهما موقع البلمرة وموقع التدقيق في الانزيم (تصميم المؤلف).

إن أساس الطبيعة التقدمية لإنزيم DNA polymerase III هو قابلية وحدة بيتا الثانوية β subunit على تكوين شكل يشبه الكعكة أو الحلقة حول الحلزون المزدوج وذلك لربط وحمل الإنزيم الصميمي (شكل 8.3). وهنا تبرز أحد الاجابات الرئيسية عن التساؤل عن سبب تدخل انزيم معقد كأنزيم DNA polymerase III في عملية التضاعف على الرغم من امتلاك انزيم DNA polymerase I لنفس الفعالية المبلمرة التي يمتلكها الانزيم III، بسبب عدم قدرة الانزيم I على اطالة سلسلة الـ DNA لمسافات طويلة كما هو عليه الحال في الانزيم III، وهذا هو أحد الأسباب الرئيسية في تعقيد الانزيم III مقارنة بالانزيم I، حيث احتاج الانزيم III الى عدة وحدات ثانوية لتقوم بهذا الدور.

تعد جزيئات DNA polymerase core لوحدها قادرة على تخليق امتداد قصير فقط من النيوكليوتيدات قبل تتهاوى عن الشريط القالب. ولكن هذا لن يحصل للإنزيم بسبب وجود تركيب يعرف بالكلاّب clamp والذي يحافظ على إنزيم الـ polymerase مرتبطا بقوة على شريط الـ DNA وذلك من خلال ارتباط هذا الكلاب بالـ DNA من جهة وبالإنزيم الصميمي من جهة أخرى.

إن وجود الكلاّب المنزلق sliding clamp جعل لإنزيم DNA polymerase خاصيتين متناقضتين، (شكل 8.3)، فعلى الرغم من اتصاله المحكم بالـ DNA وعلى امتدادات طويلة، إلا انه رخو بشكل كاف لكي يتحرك بشكل انزلاقي متسلسل من نيوكليوتيدة

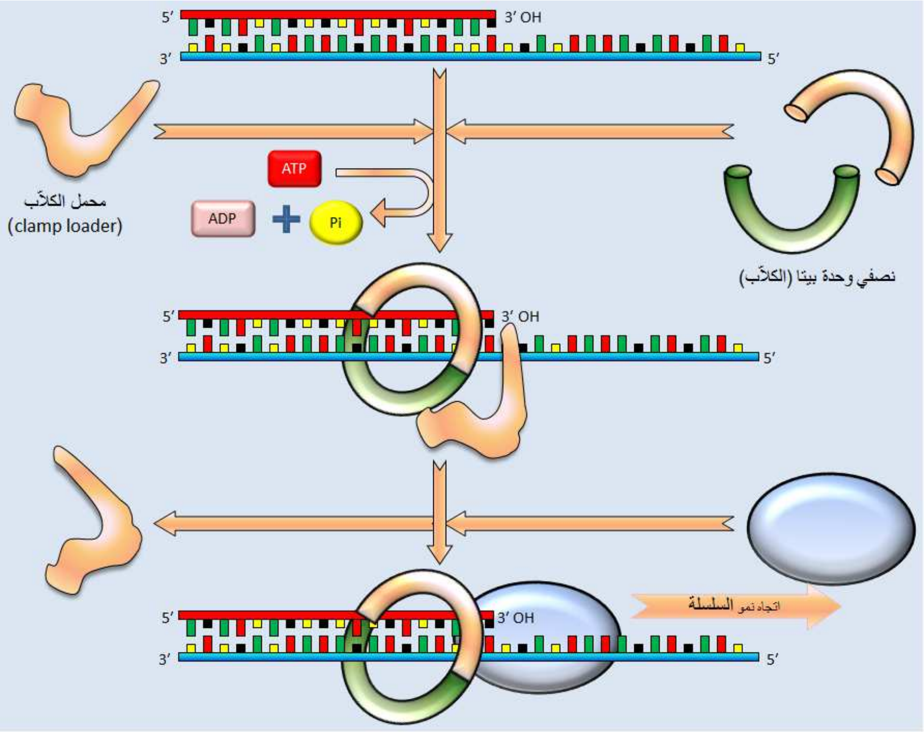
إلى أخرى. يرجع سبب وجود هذه الخواص المتناقضة إلى شكل وحدة β الثانوية التي تشبه الكعكة المحيطة بالـ DNA، أو التي تشبه الحلقة التي تنزلق على الحبل (شكل 8.3).



شكل (8.3): وحدة بيتا الثانوية المزدوجة β-subunit dimer تقيد إنزيم E. coli DNA polymerase III الصميمي بالـ DNA، وبهذه الطريقة، تزيد من صفة التقدمية processivity لهذا الإنزيم لأكثر من ألف مرة (تصميم المؤلف).

كيف يمكن لهذا الكلاّب منع إنزيم الـ polymerase من الانفصال وبنفس الوقت بدون عرقلة حركة إنزيم الـ polymerase السريعة على طول جزيئة الـ DNA؟ توصلت الدراسات الجارية على هذا الكلاب إلى انه يكوّن حلقة كبيرة حول حلزون الـ DNA المزدوج. ولوحظ إن جانب واحد من الحلقة يرتبط بالجزء الخلفي من إنزيم DNA polymerase، بينما تنزلق الحلقة كاملة وبشكل حر على طول الـ DNA كلما تحرك الإنزيم. لا يتصل الكلاب من تلقاء نفسه بإنزيم الـ DNA polymerase ، إذ لا بد من وجود محمّل الكلاّب clamp loader أو ما يعرف بمعقد كاما γ complex، والذي يشبه حمالة البنطلون ويتألف من خمسة وحدات ثانوية، والذي وبمساعدة التحلل المائي للـ ATP يقوم بربط الكلاّب بإنزيم الـ DNA polymerase (شكل 9.3). وبهذه الطريقة، تزداد صفة تقدمية الإنزيم .

يتوسط معقد كاما γ complex وظيفتين مهمتين: (1) تحميل load كلاّب وحدة بيتا الثانوية β-subunit clamp بالإنزيم الصميمي عند بداية تخليق شريط الـ DNA، في تفاعل يحتاج إلى طاقة الـ ATP. (2) تفريغ تحميل unload كلاّب وحدة بيتا الثانوية بعد اكتمال تخليق شريط الـ DNA (شكل 9.3).



شكل (9.3) : مخطط يوضح كيفية تراكب الكلاّب لكي تبقي من إنزيم الـ DNA polymerase متحركا على الـ DNA وذلك في التفاعل المبسّط المبين في أعلاه. إن محمّل الكلاب clamp loader ينفصل حال تراكب الكلاب على إنزيم الـ polymerase (تصميم المؤلف).

مشاكل تواجه إنزيم DNA polymerase في عملية التضاعف

لعله من الطرق الناجعة للتوغل في تفاصيل عملية التضاعف هو أن نشبه الإنزيم المضاعف الرئيسي DNA polymerase III بمهندس معماري، والذي يطلب منه مضاعفة الحمض النووي، ومن ثم ينظر هذا المهندس إلى شريط الـ DNA ونرى ماذا يطلب منا لفعل ذلك. وبالطبع لا تعتبر عملية تضاعف الـ DNA بالعملية السهلة، لذا تبرز

أمام هذا المهندس الفذ عدة مشاكل أساسية إذا تغلب عليها يمكن له الشروع في تلك العملية،ولعله يمكن إبرازها بخمس مشاكل أساسية:

المشكلة الأولى: ويمكن تسميتها بمشكلة فتح الالتفاف (unwinding problem) وفيها لا يقدر إنزيم DNA polymerase على صهر حلزون الـ DNA المزدوج (هذا يعني: كسر الأواصر الهيدروجينية) لكي يفصل الشريطين المراد نسخهما.

المشكلة الثانية: وهي مشكلة البدء (initiation problem) وتتمثل بعدم قدرة إنزيمات الـ DNA polymerases عموماً على تخليق سلسلة الـ DNA أو الـ RNA آنياً (*de novo* synthesis) وذلك لحاجتها إلى شريط DNA أو RNA موجود مسبقاً يعرف بالبادئ (primer).

المشكلة الثالثة: وتسمى بمشكلة الاتجاهية (directionality problem) وتتمثل بعدم مقدرة كل إنزيمات DNA polymerase على تحفيز إضافة النيوكليوتيدات بكلا الاتجاهين، أي من 5′ إلى 3′، ومن 3′ إلى 5′. وبماإن شريطي حلزون الـ DNA المزدوج هما متعاكسان (من 5′ إلى 3′، ومن 3′ إلى 5′) بالاتجاه الكيميائي، وبما أن كل إنزيمات DNA polymerases تحفز إضافة النيوكليوتيدات عند النهاية 3′ الهيدروكسيلية لسلسلة الـ DNA النامية وليس عند النهاية 5′، وبالتالي يمكن لأشرطة الـ DNA أن تنمو في الاتجاه من 5′ إلى 3′ فقط وعدم قدرتها على النمو بالاتجاه المعاكس.

المشكلة الرابعة: وتتعلق بطبوغرافية الـ DNA لذا سأسميها هنا بالمشكلة الطبولوجية (topological problem). وتتمثل هذه المشكلة بحدوث حالة اللف الفائق (supercoiling) عند تقدم فقاعة التضاعف replication fork إلى الإمام. ويمكن فهم هذه المشكلة عند تشبيه الـ DNA بحبل ذ جديلتين، مثبت بمسمار من أحد طرفيه بالحائط والطرف الآخر يمسكه شخص ما ليفتل جديلتيه ليتقدم باتجاه الحائط. وهنا تبرز المشكلة، حيث يصل هذا الشخص إلى مرحلة يتعذر فيه تقدمه نحو الحائط أكثر من ذلك وذلك بسبب "اللف الفائق" أمام نقطة الفتل (أمام شوكة التضاعف). وهذا يعيق التقدم ويوقف العملية كنتيجة نهائية.

المشكلة الخامسة: وتدعى بمشكلة نهاية التضاعف (end replication problem) وهي تختص بالكائنات حقيقية النواة عموماً لاحتوائها على كروموسومات خطية بدلاً من تلك الدائرية الموجودة في بدائية النواة كالبكتريا مثلاً.

وفي هذا الفصل، سوف نصف حلول الخلايا للمشاكل السابقة الذكر والناتجة من تركيب الـ DNA وخواص إنزيمات الـ DNA polymerases، كمشكلة فتح الالتفاف unwinding problem، ومشكلة تخليق البادئ priming problem، ومشاكل الاتجاه directionality problems والمشاكل الطبولوجية topological problems ومشكلة نهاية التضاعف end replication problem.

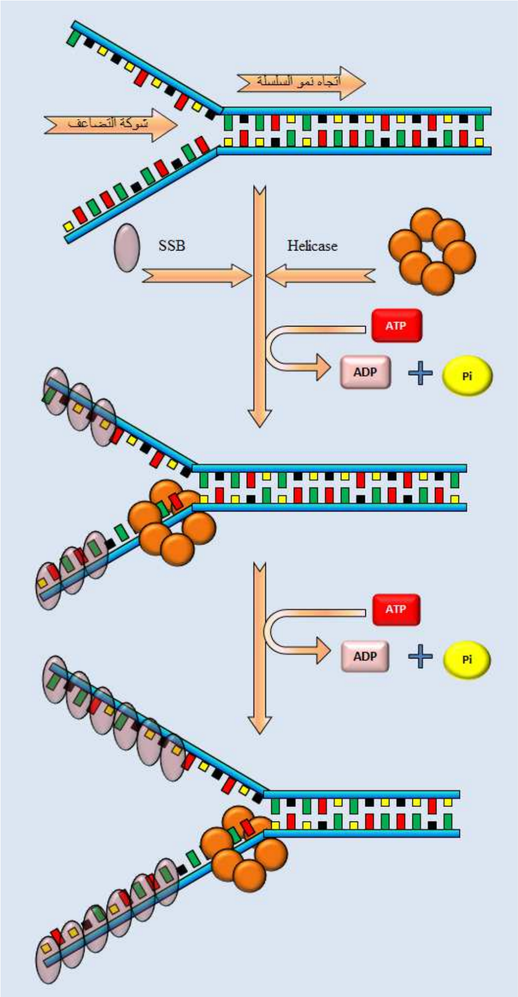
حل مشكلة فتح الالتفاف unwinding problem

لكي تتقدم عملية تخليق الـ DNA، فان حلزون الـ DNA المزدوج يجب أن يتم فتحه قبل شوكة التضاعف لكي تتمكن الـ deoxyribonucleoside triphosphates من أن تكون أزواجاً قاعدية مع الشريط القالب. وعلى أية حال، يعتبر حلزون الـ DNA المزدوج ثابت جدا في الظروف الطبيعية، حيث تنغلق الأزواج القاعدية على بعضها البعض بقوة كبيرة بحيث يجب أن تصل درجة حرارة الماء إلى الغليان لفصلها عن بعضها البعض في أنبوب التفاعل test tube (راجع الفصل الأول - مسخ الـ DNA). ولهذا السبب، فان إنزيم DNA polymerase III يمكن له أن ينسخ حلزون الـ DNA المزدوج فقط عندما يكشف الشريط القالب عند فصله عن شريطه المكمل. لذا لابد من وجود بروتينات تضاعفية أخرى لتساعد على فتح الحلزون المزدوج لتوفر شريط DNA قالب مفرد الشريط single stranded DNA template لكي يستنسخ من قبل إنزيم DNA polymerase III. وهنالك نوعان من البروتينات تساهم في هذه العملية – DNA helicase والبروتينات المرتبطة بالـ DNA ذو الشريط المفرد single stranded DNA binding proteins .

1 - إنزيمات الـ DNA helicases: إن إنزيم الـ helicase هو مركب ذو ستة وحدات ثانوية متماثلة hexamere of identical subunits وله القدرة على أن يلتف حول كلا شريطي الـ DNA المفردين في تفاعل يحتاج إلى ATP. ويشكل إنزيم الـ helicase صنفاً من الإنزيمات التي تتحرك على طول حلزون الـ DNA المزدوج مستغلة طاقة التحلل المائي للـ ATP لتفصل الشريطين (شكل 10.3).

يرتبط إنزيم الـ helicase بمنطقة مفردة الشريط من الـ DNA ، ثم يتحرك على طول ذلك الشريط صاهراً الأواصر الهيدروجينية hydrogen bonds التي تربطه بشريطه المكمل. حيث تستخدم إنزيمات DNA helicases آلية التحلل المائي للـ ATP والذي يمكنها من تغيير شكلها بصورة تسمح لها بأداء وظيفتها المتمثلة بفتح شريطي الـ DNA، وبواسطة هذه الآلية يدفع هذا الإنزيم نفسه إلى الأمام بسرعة على طول شريط الـ DNA المفرد الشريط. وعندما يلاقي هذا الإنزيم منطقة الحلزون المزدوجة، فانه يستمر بالحركة على طول الشريط ، فاصلاً شريطي الحلزون عن بعضهما البعض بمعدل 1000 نيوكليوتيدة بالثانية الواحدة (وهذه هي نفس سرعة عملية التضاعف في بكتريا القولون).

إن إنزيم الـ helicase، كما هو الحال بالعديد من البروتينات التي تعمل على الـ DNA، فانه يوصف بالتقدمي processive (أنظر) معنى صفة التقدمية في إنزيم DNA polymerase III). ولكونه يكون كلاباً clamp حول شريط الـ DNA المفرد، فان إنزيم الـ helicase "لا يسقط" إلى أن يصل إلى نهاية ذلك الشريط، أو إلى أن يفرغ تحميله unloaded من الـ DNA من قبل بروتين آخر.



شكل (10.3): آلية عمل إنزيم DNA helicase وبروتينات SSB (تصميم المؤلف).

2 - البروتينات المرتبطة بالـ DNA المفرد الشريط single stranded DNA binding proteins (SSB): والتي تدعى أيضا بالبروتينات المزيلة لثباتية الحلزون المزدوج، وترتبط بقوة وبشكل تعاوني cooperatively (أي إن ارتباط إحداها يمهد لارتباط الأخرى) بأشرطة الـ DNA المفردة المكشوفة بدون تغطية القواعد النتروجينية، ولهذا السبب تبقى القواعد جاهزة لتعمل عمل القوالب templates. هذه البروتينات (SSB) غير قادرة على فتح حلزون الـ DNA المزدوج الطويل بشكل مباشر (شكل 10.3)، ولكنها تساعد إنزيمات الـ helicases بتثبيت الحالة الغير ملتفة unwinding وذلك بواسطة منع

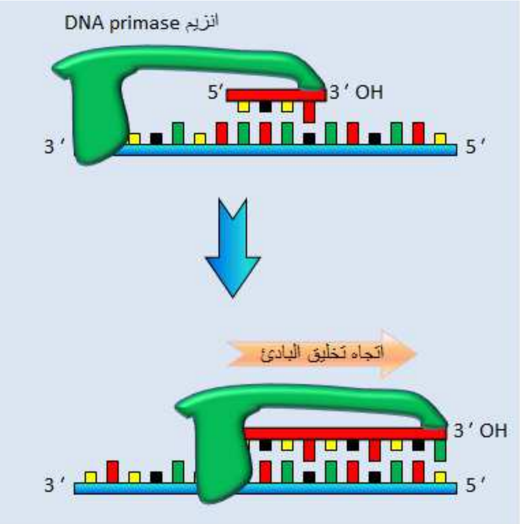
حدوث عملية إعادة الالتفاف rewinding ، وبذلك فأنها تقدم الشريط القالب لإنزيم الـ DNA polymerase.

بالإضافة إلى ذلك، فان ارتباطها التعاوني يغطي ويقوي مناطق الـ DNA مفردة الشريط على شريط الـ lagging القالب، وبهذه الطريقة فإنها تمنع من تكوين جزيئات DNA صغيرة تشبه الدبوس hairpin structures والتي تعيق تخليق الـ DNA المحفز من قبل إنزيم DNA polymerase. إن ارتباط بروتينات الـ SSB بشريط الـ DNA المفرد يعمل على حمايته من هجوم الإنزيمات الهاضمة الداخلية endogenous nucleases.

حل مشكلة البدء Initiation problem:

كما تم الإشارة إليه قبل قليل، لا يمكن لإنزيم DNA polymerase من أن يطيل أشرطة الـ DNA إلا بوجود بواديء مجهزة له مسبقاً من قبل إنزيمات أخرى. إن البواديء المستخدمة خلال عملية تضاعف الـ DNA في بدائية وحقيقية النواة هي جزيئات RNA صغيرة والذي يحفز تخليقها من خلال إنزيم الـ primase والذي هو نوع من أنواع إنزيمات RNA polymerase. لا يؤدي إنزيم RNA primase دوره وحيداً اعتماداً على نفسه فقط، وإنما بارتباطه بإنزيم الـ helicase المرتبط في ذلك الحين في منطقة الـ DNA المراد تضاعفها. يستخدم مصطلح الـ primosome الآن بشكل عام للدلالة على المعقد المتكون بين إنزيمي الـ primase والـ helicase. يقوم إنزيم الـ RNA primase بعد ارتباطه بتخليق بواديء RNA قصيرة مكملة لكلا شريطي حلزون الـ DNA المزدوج، وحالما ينهي الإنزيم عمله، فانه ينفك عن الشريط القالب المفرد الشريط.

لماذا يفضل أن يخلّق هنا RNA من قبل إنزيم DNA primase (الانزيم الذي يخلق بوادئ RNA صغيرة على شريط الـ lagging والذي لا يمتلك فعالية تصحيح الخطأ) ثم يمحى بدلا من أن يخلّق DNA مباشرة؟ وذلك لأن إنزيم DNA polymerase الذي له قابلية على تصليح الخطأ في تخليق الـ DNA ذاتياً لا يستطيع أن يبدأ تخليق السلسلة تلقائياً (*de novo*) لأنه يحتاج إلى نهاية هيدروكسيلية من نوع 3′ ، وتوفر هذه النهاية من قبل باديء الـ RNA الذي يخلقه إنزيم DNA primase (شكل 11.3)، والذي له القابلية – حاله في ذلك حال انزيم الـ RNA polymerase– على تخليق السلسلة تلقائياً (أنظر الفصل الرابع). وعلى أية حال، لابد من الاشارة الى أن الانزيمين يشاركان معاً في تخليق بوادئ الـ RNA في البكتريا، فبينما يقوم انزيم DNA primase باضافة البوادئ على شريط الـ lagging، يقوم انزيم RNA polymerase باضافة تلك البوادئ على شريط الـ leading.



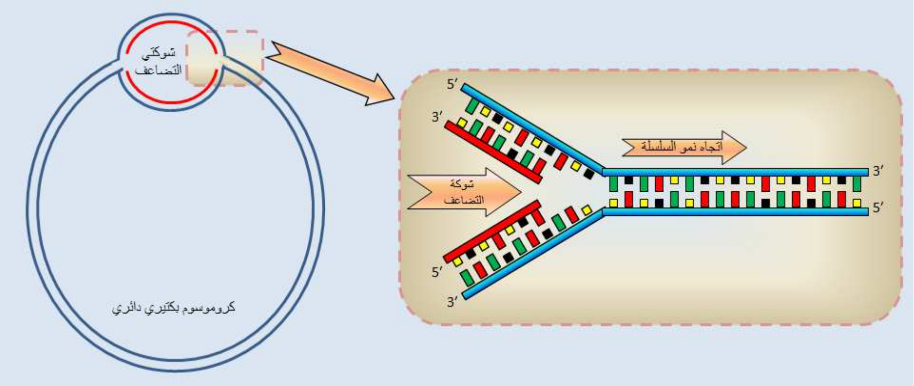
شكل (11.3): تخليق بادئ الـ RNA. مخطط توضيحي يبين التفاعل المحفز من قبل انزيم DNA primase. يقف انزيم الـ primase بعد تخليقه لمتعدد نيوكليوتيدي صغير ليوفر نهاية 3′ OH متكشفة لكي يقوم انزيم DNA polymerase باطالتها بعد ذلك (تصميم المؤلف).

حل مشكلة الاتجاهية directionality problem

قبل أن ندخل هنا إلى حل هذه المشكلة لا بد لنا من فهم تفاصيلها أولاً ليتسنى لنا التفكير في كيفية حلها بعد ذلك. وتفهم التفاصيل خلال تضاعف الـ DNA داخل الخلية بواسطة إنزيم DNA polymerase، حيث يعمل كل شريط DNA قديم (أبوي) كقالب لتكوين شريط جديد كامل. ولأن كل من الخليتين البنويتين daughter cells ترث حلزون DNA جديد محتو على شريطين أحدهما قديم والآخر جديد، لذا يدعى تضاعف حلزون الـ DNA المزدوج بأنه شبه محافظ semi-conservative. كيف ينجز هذا العمل البطولي الفذ؟ يكمن جوهر العمل يكمن في الشريط القالب template strand والذي هو الشريط الذي يستنسخ ليكون شريطاً جديداً. تحفظ المعلومات في الشريط القالب على الرغم من أن النسخة الأولى ذات تسلسل مكمل complementary، وليست ذات تسلسل مماثل، حيث تنتج نسخة النسخة التسلسل القالب الأصلي من جديد. وعندما ينتهي النسخ، فان كل من الحلزونين المزدوجين الناتجين يتألفان من واحد من الأشرطة الأصلية زائداً نسخته، منفصلين عن بعضهما البعض.

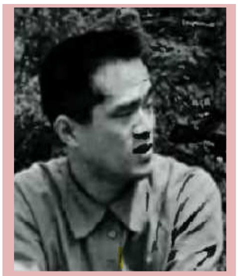
توصلت التحليلات الجارية في بداية الستينات بأن هنالك مناطق تضاعفية صغيرة تتحرك بصورة دؤوبة على طول حلزون الـ DNA المزدوج الأبوي. ولأن شكلها يشبه الحرف Y لذا سمّيت هذه المنطقة الفعالة بشوكة التضاعف replication fork (شكل12.3). وهي منطقة متخصصة بشكل عالي من الـ DNA، والتي يقوم عندها إنزيم DNA polymerase بإضافة النيوكليوتيدات. تبدأ تلك الشوكات التضاعفية بالتكون عند

نقطة بداية التضاعف *OriC*، ثم تستمر بالنمو وتكبير بالشكل كلما استمرت بالنمو. لا يقتصر وجود تلك التراكيب على الجينوم الكروموسومي وانما توجد في أي جزيئة تمتلك تسلسلات أصول التضاعف (لذا تدعى كل جزيئة حاوية على تلك التسلسلات بالكيانات التضاعفية أو الـ replicons).



شكل (12.3): اثنان من شوكتا التضاعف يتحركان باتجاهين متعاكسين في كروموسوم دائري (تصميم المؤلف).

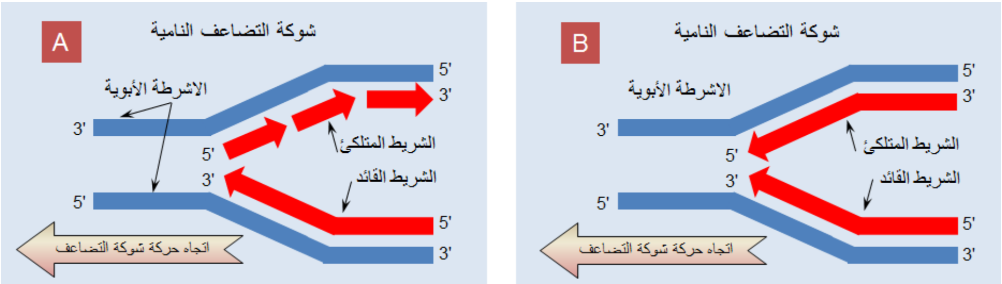
مبدئياً، إن أبسط ميكانيكية لتضاعف الـ DNA هي النمو المستمر لكلا الشريطين الجديدين، نيوكليوتيدة بعد نيوكليوتيدة، حيث تتحرك شوكة التضاعف من إحدى نهايتي الـ DNA إلى النهاية الأخرى، ولكن بسبب طبيعة شريطي الـ DNA ذات الاتجاه المتعاكس antiparallel orientation فان هذه الآلية ستحتاج إلى شريط بنوي واحد لكي يتبلمر بالاتجاه من 5´ إلى 3´ والآخر يتبلمر بالاتجاه المعاكس. مثل هكذا شوكة تضاعف ستحتاج إلى نوعين مختلفين من إنزيمات الـ DNA polymerase . أحدهما يتبلمر بالاتجاه من ´5إلى 3´ ، أما الآخر، فانه يتحرك بالاتجاه المعاكس (من 3´ إلى 5´ شكل A.13.3). ولكن هكذا نوع من البلمرة لا يحصل في عملية التضاعف، حيث لا يوجد إنزيم DNA polymerase يمتلك الفعالية المبلمرة ذات الاتجاه من 3´ إلى 5´. إذن، كيف يتم إنجاز نمو سلسلة DNA بالاتجاه من 3´ إلى 5´؟



Reiji Okazaki

تم إجابة هذا السؤال من خلال سلسلة من التجارب التي أجراها Reiji Okazaki في نهاية الستينات، حيث لاحظ وجود قطع صغيرة بطول 1000-2000 نيوكليوتيدة، تعرف هذه القطع الآن بقطع أوكازاكي Okazaki fragments، والتي يبلغ طولها في الكائنات حقيقية النواة (كما في البشر) 100-200 نيوكليوتيدة. تبين بأن قطع أوكازاكي تتبلمر عموماً في الاتجاه من 3´ إلى 5´ كما أنها ترتبط مع بعضها البعض بعد تخليقها لتكوين سلسلة طويلة من الـ DNA.

يعرف شريط الـ DNA البنوي الذي يخلّق بشكل مستمر continuously من باديء RNA مفرد بـالشريط الأمامي leading strand، ويكون اتجاه تخليقه من ´5 إلى ´3، وذلك هو نفس اتجاه حركة شوكة التضاعف. إن تخليق هذا الشريط يسبق قليلا تخليق الشريط البنوي الآخر والذي يخلّق بصورة غير مستمرة discontinuously ، والذي يعرف بالشريط الخلفي lagging strand والذي يكون تخليقه أكثر تعقيداً. وبالنسبة للـ lagging strand، فان اتجاه بلمرة النيوكليوتيدات هو معاكس بطريقة ما لاتجاه حركة شوكة التضاعف. يتأخر تخليق الـ DNA في شريط الـ lagging لأنه يجب أن ينتظر شريط الـ leading لكي يكشف الشريط القالب لكي يتسنى لقطع أوكازاكي أن تتخلق عليه. إن طبيعة تخليق شريط الـ lagging الغير مستمرة هي الآلية الوحيدة المعقولة والمتناسبة مع الفعالية المبلمرة polymerizing activity لإنزيمات DNA polymerase ذات الاتجاه من ´5 إلى ´3. وهي آلية تعتبر معقدة مقارنة بشريط الـ leading (شكل B.13.3).

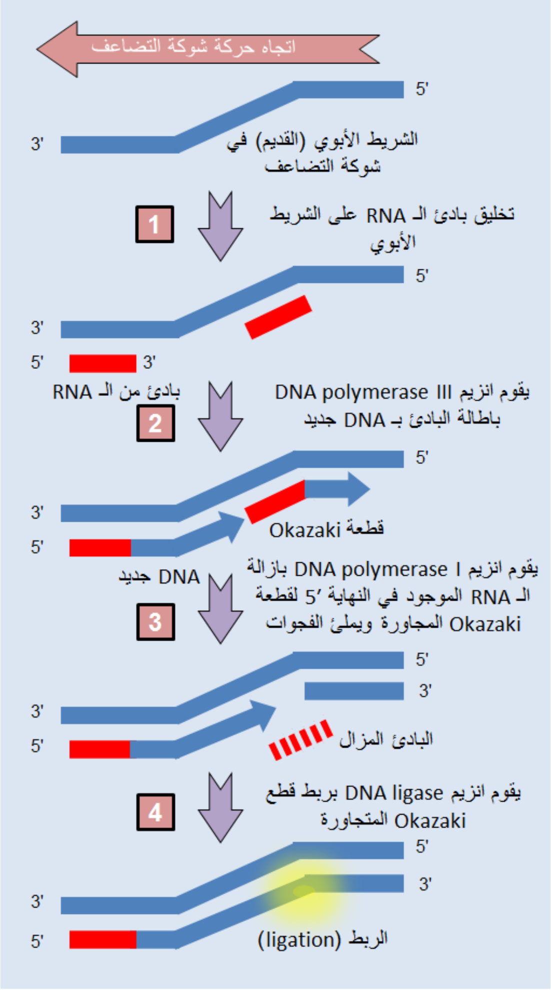


شكل (3 . 13): (A) الموديل الصحيح لتضاعف الـ DNA، والذي يتضمن التخليق غير المستمر لقطع أوكازاكي في شريط الـ lagging. (B) موديل غير صحيح لتضاعف الـ DNA. ولو أن هذا الموديل يبدو بأنه أبسط موديل معقول لتضاعف الـ DNA، ولكن الآلية المبينة بشكل مخطط هنا هي ليست تلك التي تستخدمها الخلايا في تضاعفها. وفي هذا المخطط ، فان كلا الشريطين البنويين سوف ينموان بشكل مستمر. إن هذا يحتاج إلى نمو سلسلة الـ DNA البنوية في كلا الاتجاهين من ´3 إلى ´5 ، ومن ´5 إلى ´3 . ولكن في الحقيقة لا يوجد إنزيم يمتلك الفعالية المبلمرة من ´3 إلى ´5 ليحفز التفاعل بهذا الاتجاه. (تصميم المؤلف).

إذن أصبح لدينا – بعد اكتشاف قطع أوكازاكي - من الواضح كيف هي الآلية التي تحل هذه المشكلة. فبالنسبة لشريط الـ leading، فان باديء واحد ضروري فقط عند بداية عملية التضاعف، فحالما تتكون شوكة التضاعف replication fork ، يقوم إنزيم DNA polymerase III وبشكل مستمر بإضافة نيوكليوتيدات جديدة إلى نهاية سلسلة الـ DNA النامية. أما على جانب شريط الـ lagging من شوكة التضاعف، فان كل مرة ينهي بها إنزيم DNA polymerase قطع أوكازاكي القصيرة (والتي تستغرق بضع ثواني)، فانه يجب أن يبدأ بتخليق قطعة جديدة كليا في موقع أبعد على طول الشريط القالب (شكل 14.3). هذا وتستخدم آلية خاصة لإنتاج بواديء ضرورية لهذا الغرض.

ففي الخطوة الأولى: يقوم إنزيم RNA primase والذي يستخدم ribonucleoside triphosphates) بدلا من deoxyribonucleoside triphosphates) بتخليق بواديء RNA صغيرة short RNA primers على شريط الـ lagging) شكل 14.3).

في الخطوة الثانية: فبسبب احتواء بواديء الـ RNA على نهاية هيدروكسيلية متكشفة من نوع OH 3´end ، لذا فمن الممكن إطالتها بواسطة إنزيم DNA polymerase III في بكتريا القولون ليبدأ الأخير إضافة deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs) إلى النهاية ′3 للبواديء. وهكذا ينمو كل شريط lagging باتجاه معاكس للاتجاه الذي تتحرك به شوكة التضاعف. تدعى القطع الصغيرة النامية، والمحتوية على الـ RNA المرتبط تساهمياً بالـ DNA بقطع أوكازاكي، نسبة إلى مكتشفها العالم الياباني Okazaki .Reiji وفي البكتريا والعاثيات البكتيرية يبلغ طولها 1000 إلى 2000 نيوكليوتيدة، كما إن دورة تخليق قطعة أوكازاكي تستغرق ثانيتين لتكتمل. وفي الخلايا حقيقية النواة، تكون قطع أوكازاكي أصغر بكثير (من 100 إلى 200 نيوكليوتيدة). ينتهي تخليق كل قطعة أوكازاكي ينتهي عندما يصل إنزيم الـ DNA polymerase III إلى النهاية ´5 لقطعة أوكازاكي السابقة.



شكل (14.3) : كيفية تخليق قطع أوكازاكي في الشريط الـ laggingوالمتألفة من أربع خطوات: وهي خطوة (1) تخليق البادئ (2) اطالة البادئ و (3) ازالة الـ RNA وملئ الفجوات و (4) لحم قطع Okazaki المتولدة ببعضها البعض (تصميم المؤلف).

في الخطوة الثالثة: ، يعمل نظام خاص وسريع لإصلاح الـ DNA وذلك لإنتاج سلسلة مستمرة من قطع الـ DNA على شريط الـ lagging من خلال إزالة بواديء الـ

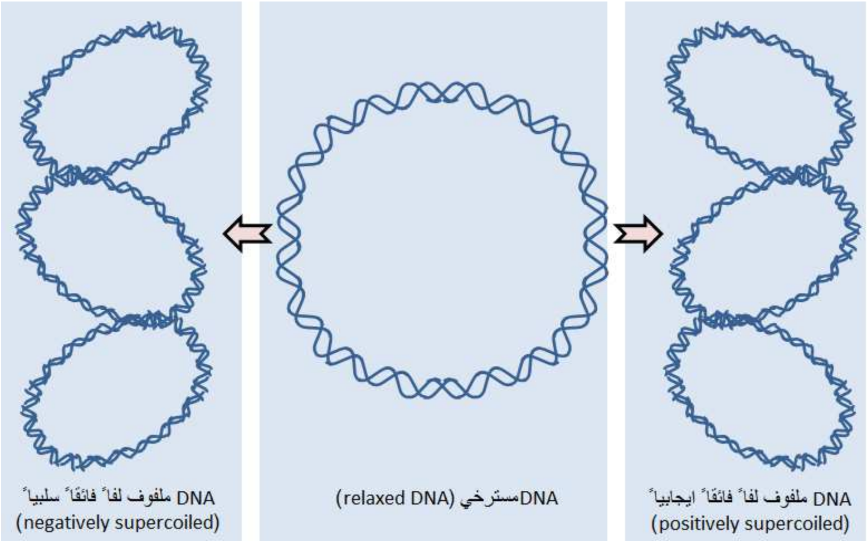
RNA واستبدالها بتسلسلات الـ DNA. يتم ذلك في بكتريا القولون بواسطة إنزيم DNA polymerase I.

في الخطوة الرابعة: يربط إنزيم يدعى DNA ligase النهاية ´3 لقطعة الـ DNA بالنهاية ´5 للقطعة السابقة لإكمال العملية (شكل 14.3).

حل المشكلة الطبولوجية topological problem

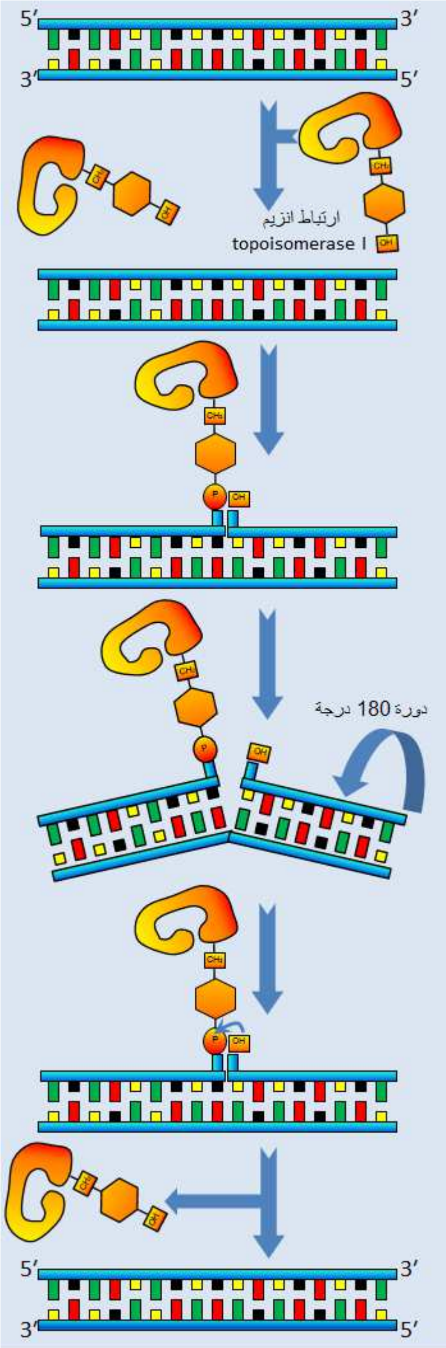
بما أن جزيئة الـ DNA تتكون من شريطين يلتفان حول بعضهما البعض، تواجه بعض العمليات الخاصة كما في تضاعف الـ DNA وإنهاءه بالإضافة إلى عملية الاستنساخ مشكلات طوبولوجية. تسبب إنزيمات معينة في الخلية حصول حالة اللف المبالغ فيه overcoiling (اللف الفائق الموجب positive supercoiling) أو حالة اللف الأقل من اللازم undercoiling (اللف الفائق السالب negative supercoiling).

يحدث اللف الفائق الموجب (شكل 15.3) عندما يلتف الحلزون المزدوج الدائري حول نفسه بنفس اتجاه التفاف الحلزون المزدوج (يميني الاتجاه right-handed)، بينما يحدث اللف الفائق السالب عندما يلتف الحلزون المزدوج حول نفسه باتجاه معاكس لاتجاه التفاف الحلزون المزدوج (يساري الاتجاه left-handed).



شكل (15.3): اللفات الفائقة السالبة والموجبة لجزيئة DNA دائرية. يمكن أن تعمل إنزيمات الـ topoisomerases على الـ DNA المرتخي (في المركز) وتعطيه لفات فائقة سالبة (إلى اليسار) أو لفات فائقة موجبة (إلى اليمين) (تصميم المؤلف).

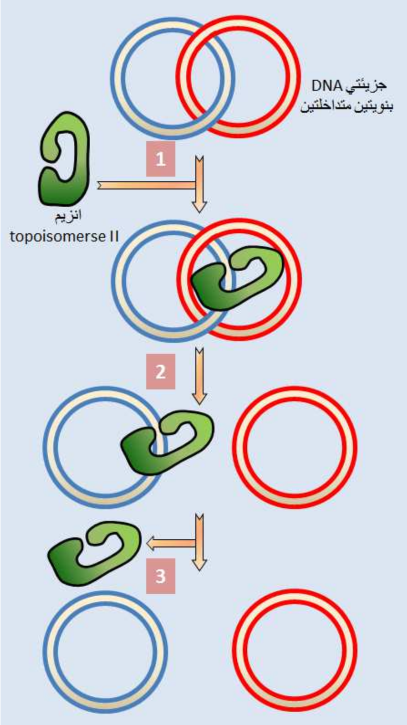
يزيد اللف الفائق السالب من عدد لفات حلزون مزدوج واحد حول الآخر (يدعى هذا بعدد الربط linking number أو L)، بينما يقللها اللف الفائق الموجب. تحتوي كل الأشكال الثلاثة الملاحظة في الشكل 14.3 على نفس التسلسل، ولكنها تختلف في عدد الربط. ووفقاً لذلك، تدعى هذه بالآيزوميرات الطوبولوجية (topological isomers) أو بالـ topoisomeres. تدعى الإنزيمات التي تخلّق أو تقلل من هذه الحالات بالـ topoisomerases. تؤثر إنزيمات الـ topoisomerases على اللف الفائق بإحدى الطريقتين، فأما أن يقوم النوع رقم واحد من إنزيم topoisomerase والمعروف بـ I type topoisomerase بكسر إحدى شريطي الحلزون المزدوج، وبينما هو في حالته الارتباطية بالنهايات المكسورة، يعبّر الشريط الآخر خلال الكسر، ثم يلحم الكسر (شكل 16.3).



شكل (16.3): دور لإنزيم topoisomerase Iفي اختزال لف الـ DNAالفائق وذلك بكسر شريط من الحلزون المزدوج وعبور الشريط الآخر من خلاله. لايمكن لكل نهاية من الحلزون المزدوج بمفردها القيام بالدوران حول نفسها من دون التدخل الانزيمي الموضح في الخطوات من 1الى 5. في الخطوة 1 يميز انزيم topoisomerase type I المحمل بالحامض الأميني التايروسين في موقعه الفعال (active site) مجموعة الفوسفات في الحلزون المزدوج أولاً. ثم يقوم (في الخطوة 2) بالارتباط تساهمياً بتلك المجموعة. وبهذه الطريقة يكسر رابطة الفوسفات ثنائية الأستر في شريط واحد فقط. وهنا (الخطوة 3) يمكن لنهايتي الحلزون المزدوج أن تدوركل منهما بالنسبة للأخرى محررة الضغط المتراكم نتيجة للف الفائق. وبما أن طاقة آصرة الفوسفات ثنائية الأستر قد تم حفظها من قبل الانزيم عن طريق ربط الفوسفات بالحامض الأميني التايروسين، لذا يمكن للتفاعل هنا أن ينعكس بهجوم مجموعة الهيدروكسيل على مجموعة الفوسفات لتسحبها الى موقعها الأصلي ثانية (الخطوة 4). وأخيراً (الخطوة 5)، تتكون مجموعة الفوسفات ثنائية الأستر من جديد لتعيد نفس الانزيم دون تغيير ونفس الحلزون المزدوج مع اختزال اللف الفائق لدرجة واحدة (تصميم المؤلف).

تقوم إنزيمات الـ topoisomerase النوع الثاني والمعروفة بالـ topoisomerase type II (كما في إنزيم DNA gyrase في بكتريا القولون) بطريقة العمل نفسها، ولكنها بدلاً من كسر شريط واحد من الحلزون المزدوج فأنها تكسر كليهما وتعبّر الحلزون المزدوج الآخر خلال الفجوة المؤقتة. وكلما تقدم تضاعف الـ DNA يتكون لفاً فائقاً موجباً قبل تركيب المضاعف. يتم التخلص من هكذا لف فائق بواسطة إنزيمات topoisomerases والتي هنا يأتي دورها والتي أما أن تخلق لفاً فائقاً سالباً قبل المضاعف لكي يحضر للتضاعف أو لكي يخفف من وطأة اللف الفائق الموجب بعد تخليقه.

بالإضافة إلى أهمية إنزيمات topoisomerases في عملية التضاعف السابقة الذكر، فإنها تعد ذات أهمية بصورة عامة في أوجه أخرى، وتتضح هذه الأهمية من خلال التجارب الجارية على الجينات التي تشفر لهذه الإنزيمات. تبين أن تطفير هذه الجينات يؤدي إلى إن البكتريا التي تتعرض إلى هكذا تطفير تنمو بشكل فقير جداً. تقوم إنزيمات الـ topoisomerases بإزالة الـDNA المشربكtangled DNA كما في عملية تكثف الكروموسوم chromosome condensation (راجع الفصل الثاني). كما تؤدي إنزيم الـ topoisomerase II دوراً مهماً في المرحلة النهائية لتضاعف الجزيئات الدائرية، فعندما يكتمل تضاعف جزيئة الـ DNA الدائرية تتكون حلقتين متداخلتين مع بعضهما البعض، وهنا تعمل إنزيمات DNA topoisomerase على فصل تلك الجزيئتين المتداخلتين عن بعضهما البعض (شكل 17.3). يعمل هذا الانزيم بطريقة مشابهة لانزيم topoisomerase I ولكنه يسبب كسراً مؤقتاً في كل من شريطي الحلزون المزدوج، وبهذه الطريقة يرتبط الانزيم topoisomerase II بأحد الدائرتين المتولدتين من التضاعف ذات الشريط المزدوج ويسبب كسر مؤقت ذو شريط مزدوج والذي يعمل "كبوابة" يمكن من خلالها أن تعبر دائرة الـ DNA (شكل 17.3). ثم يقوم انزيم topoisomerase II بإعادة لحم الأشرطة المكسورة.



شكل (17.3): دور انزيم topoisomerase II في انهاء تضاعف جزيئات الـ DNA الدائرية. في الخطوة (1) يرتبط انزيم topoisomerase II بالارتباط بجزيئتي الـ DNA الدائريتين المتداخلتين المنقسمتين للتو، في الخطوة رقم (2) يقوم نفس الانزيم بالتسبب بكسر في كلا شريطي الـ DNA لجزيئة دائرية واحدة ليسمح بعبور الجزيئة الأخرى خلال الكسر، وفي الخطوة رقم (3) يعيد الانزيم لحم الشريطين المكسورين لنفس الجزيئة الدائرية المكسورة من قبله (تصميم المؤلف).

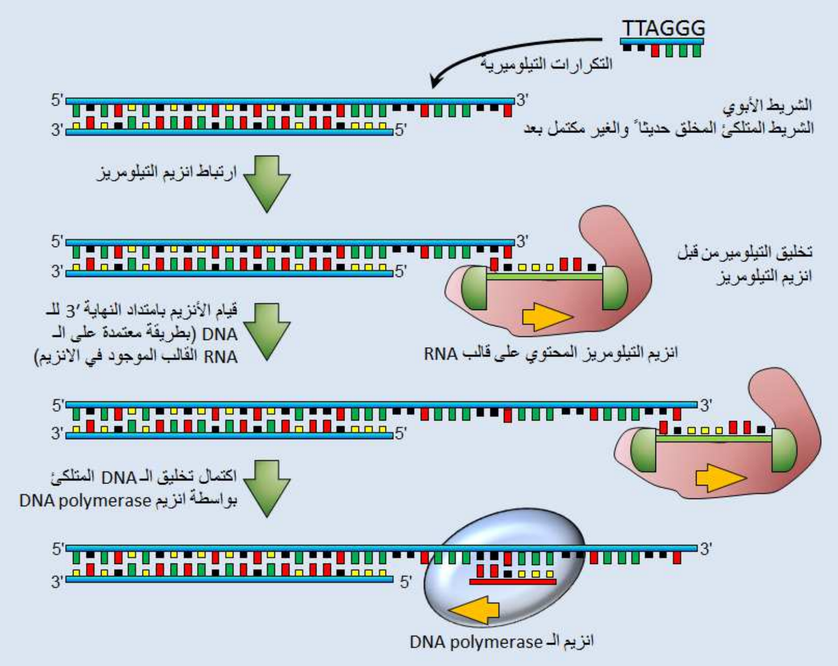
حل مشكلة نهاية التضاعف end replication problem

تواجه جزيئات الـ DNA الدائرية والخطية مواقف مختلفة عند نهاية عملية تخليق الـ DNA. ففي حالة الجزيئات الدائرية فإنها تمتلك مواقع DNAتسمى مواقع الانتهاء(*ter*) regions of termination في كروموسوم بكتريا القولون، وتبعد 180 درجة عن منشأ التضاعف origin of *Escherichia coli* chromosome (*Ori*C) بالكروموسوم الدائري. وهنالك ستة تسلسلات أخرى، تتركز على كلا جانبي نقطة اللقاء وتعمل هذه التسلسلات كمنهيات terminators عندما ترتبط ببروتين الانتهاء termination protein وتأمر هذه المواقع المضاعف replisome بأن يقف ويكف عن القيام بعمله.

في حالة الجزيئات الدائرية ، فأن شوكتا التضاعف تترك منشأ التضاعف وتنتقل إلى الاتجاهات المتقابلة بعيداً عن بعضها البعض وحتماً تتقابلان في منتصف الطريق حول الدائرة. وإذا كانت أحدى الشوكتان متأخرة بالنسبة للأخرى فأنها سوف تقف عندما تصل موقع الانتهاء التابع لها وتنتظر وصول شريكتها .إن بروتين الانتهاء يقوم بتثبيط إنزيم الـhelicase المستخدم خلال عملية تخليق الـ DNA ولهذا يتعثر تقدم الشوكتان. وعندما تلتقي الشوكتان فهذا يعني انتهاء عملية التضاعف. أما في حالة الجزيئات الخطية، ففي الكائنات حقيقية النواة كما في البشر والحيوانات ، والنباتات، والخمائر، والفطريات فكلها تمتلك كروموسومات خطية، لا تستطيع عملية التضاعف بمفردها أن تضاعف نهايات الكرموسومات الخطية بشكل كامل. وهناك طريقة خاصة تتعلق بسلوك التيلومير telomere استخدمت لضمان عدم فقدان المعلومات من نهايات الكرموسومات الخطية.

توصف عملية تضاعف الـ DNA بأنها شبه أو نصف غير مستمرة semi- discontinuous وهذا يوضح اختلاف آلية تضاعف الـ DNA الحاصلة في الشريط القائد leading strand عن تلك الحاصلة في الشريط المتلكئ lagging strand . إن الشريط القائد يتضاعف بشكل مستمر. ولكي يتضاعف الشريط المتلكئ فإن عملية بلمرة الـ DNA polymerization تبدأ من عدة بوادئ من نوع الـ RNA والتي تستطيل لتخلق قطع اوكازاكي وأخيرا تتكسر هذه البوادئ وتستبدل بتسلسلات من الـ DNA. أن إزالة أي بادئ من نوع RNA في الشريط القائد يؤدي إلى ترك فجوة والتي تملئ عادة بامتداد قطعة اوكازاكي التالية، وفي اللبائن هنالك مشكلة في تضاعف النهايات القاصية extreme ends للكروموسومات الخطية، ففي بداية السبعينات من القرن الماضي اكتشف Watson عام 1972 بأن خواص عملية تضاعف الـ DNA تمنع الخلية من نسخ نهايات الـ DNA الخطي بشكل كامل ، والتي تدعى بالتيلوميرات. وبسبب طبيعة تخليق شريط الـ lagging، فإن أنزيم بوليمريز الـ DNA لا يستطيع أن يضاعف النهاية ′3للشريط الـ DNA الخطي ذو الحلزون المزدوج بشكل كامل. عندما استنتج Watson هذه المشكلة في عام 1972 ، أوضح بأنه عندما يصل إنزيم بوليمريز الـ DNA إلى نهاية جزيئة الـ DNA الخطية فسوف

تكون هنالك مشكلة في إكمال التضاعف (شكل 18.3). عند غياب التيلومير، فأن تضاعف الـ DNA الشبه غير مستمر سوف يسبب في أنتاج جزيئة خطية والتي تصبح أقصر وأقصر مع كل تضاعف. لقد بين Watson هذا التقصّر بشكل غير مباشر إذ لاحظ حجب جزء من التيلومير عن فعالية إنزيم بوليمريز الـ DNA وبتلك الوسيلة يتم اعتراض القمم عن التضاعف مع كل انقسام خلوي متعاقب ، وبمعنى آخر ينقص طول التيلوميرات مع كل دورة تضاعف، ولسنوات عديدة لوحظ بأن الفقدان المتدرج للتيلوميرات ربما يعمل كآلية محفزة أساسية لبدء الشيخوخة. ولكن تنشيط إنزيم التيلومريز (وهو عبارة عن معقد من البروتينات والـ RNA، حيث يعمل المكون RNA الدور الأساسي في تحفيز إضافة التسلسلات التيلوميرية في كل دورة تضاعف بينما يقتصر دور البروتينات الأخرى على مساعدة الـ RNA في هذه العملية) في الخلايا السرطانية غالباً يعمل على تعويض ذلك الخلل بإضافة تسلسلات متلاحقة متكررة ترادفيا (TTAGGG) بعد كل عملية تضاعفية وبالتالي تحافظ الخلايا السرطانية على ديمومتها (شكل18.3).



شكل (18.3): تضاعف التيلومير. يلخص الشكل التفاعلات الداخلة في تكوين التسلسلات الغنية بالكوانين المتكررة G- rich sequences والتي تكون نهايات الكروموسومات (التيلوميرات) لعدة كائنات حقيقية النواة. ان الشريط الغير كامل المصنع حديثاً هو الشريط المصنع في الجانب المتخلف lagging side لشوكة التضاعف. وكما هو موضح في أعلاه، يتألف إنزيم التيلومريز من معقد RNA-protein والذي يحمل الـ RNA القالب لتخليق تسلسل الـ DNA التيلوميري الغني بالكوانين والتي هي TTAGGG في البشر. ولقد افترض في هذا التصميم أن شريط الـ lagging يتم إكماله بواسطة إنزيم α DNA polymerase والذي يحمل فعالية الـ primase في إحدى وحداته الثانوية (تصميم المؤلف)

إن هنالك عدة تجارب مهدت لاكتشاف إنزيم الـ telomerase بدأت مع ملاحظة إن فقدان التسلسلات الجينومية في كـل دورة تضاعف مـــن الممكن إن تعوض عـــن طريق إضافة تسلسلات طرفية، وعلاوة على ذلك تمتلك الكائنات الحية القابلية على نقل تسلسلات طرفية مختصة بالنوع إلى الـ DNA.

Elizabeth Blackburn

لقد اكتشف كل من Elizabeth Blackburn و Carol Greider في سنة 1985 بأن هنالك فعالية في مستخلصات الطفيلي *Tetrahymena* وتقوم هذه الفعالية بإضافة التكرارات التيلوميرية لبوادئ الـ DNA التيلوميرية قليلة النيوكليوتيدات المفردة الشريط، ووجدوا أيضا بأن هذه العملية تثبط بمعاملة المستلخص بالإنزيم المحطم للرنا، ولهذا تسمى هذه الفعالية المعتمدة على الـ DNA بأنزيم terminal transferase أو بالتيلومريز ، حيث تحدث العملية بوساطة نسخ تسلسل الشريط القالب والذي هو جزء من المكون رنا بهذا الإنزيم. وفيما بعد وجد بأن هذا الإنزيم يتكون من المكون رنا، والفعالية الإنزيمية لهذا الإنزيم تحتاج إلى كل من المكون رنا والمكونات البروتينية. درس هذا الإنزيم بشكل مفصل باستخدام الكائن الهدبي *T. thermophila* لأن خلية مفردة لهذا الكائن الحي تمتلك أكثر من 40,000 تيلومير. وعموماً، يمكن تلخيص آلية تفاعل إنزيم التيلومريز الرئيسية بالآتي: تمييز البادئ ، إضافة النيوكليوتيدات ، والانتقال من مكان إلى آخر(شكل18.3) وبهذه الطريقة يقوم هذا الإنزيم بمد النتوء المنتهي بالنهاية 3′ الغني بالكوانين والموجود بنهايات التيلوميرات.

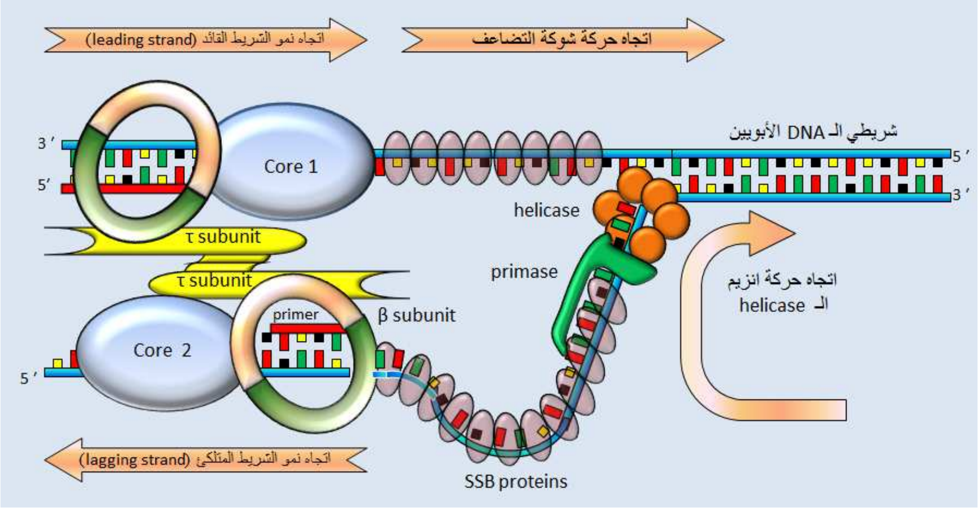
خلاصة خطوات التضاعف:

يبدأ تضاعف الـ DNA عند تسلسل من النيوكليوتيدات يدعى بأصل التضاعف origin of replication. يقوم إنزيم helicase بفتح التفاف unwind حلزون الـ DNA المزدوج، وترتبط بروتينات SSB بمناطق الـ DNA مفردة الشريط وتعمل على الحفاظ على حالتها الغير ملتفّة.

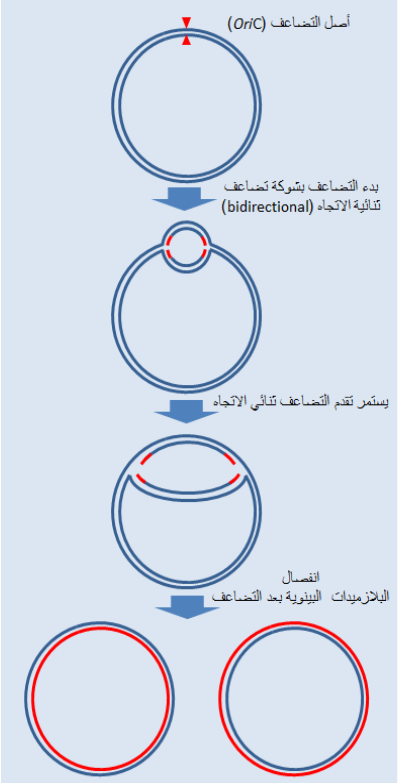
يعد إنزيم DNA polymerase III إنزيم التضاعف الرئيسي في بكتريا القولون. يمكن لهذا الإنزيم أن يضيف النيوكليوتيدة للنهاية 3′ للسلسلة الموجودة مسبقاً من النيوكليوتيدات، ولكن لا يمكن له من أن يبتدأ تخليق السلسلة آنياً *de novo* synthesis. ولهذا السبب، يقوم إنزيم RNA primase، وهو أحد أنواع إنزيم RNA polymerase، بتخليق باديء الـ RNA، وهو تسلسل يتألف من حوالي 10 أزواج قاعدية مكملة للـ DNA الأبوي.وبعد تخليق الباديء، يقوم إنزيم DNA polymerase III بإضافة النيوكليوسيدات منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات dNTP ليخلق سلسلة جديدة من الـ DNA. وبما أن

شريطي الـ DNA متضادي الاتجاه antiparallel، لذا يجب أن تتم عملية إطالتهما بواسطة آليتين مختلفتين، حيث يقوم شريط الـ leading بالاستطالة باتجاه شوكة التضاعف، وذلك بإضافة النيوكليوتيدات بشكل مستمر للنهاية ′3 النامية. وبالتناقض، فان شريط الـ lagging، والذي يستطيل بعيداً عن (عكس) شوكة التضاعف، يتم تخليقه بصورة غير مستمرة عن طريق سلسلة من القطع والتي تدعى بقطع أوكازاكي Okazaki fragments.عندما يصل إنزيم DNA polymerase III إلى باديء الـ RNA في شريط الـ lagging، فانه يستبدل بإنزيم DNA polymerase I، والذي يزيل الـ RNA ويستبدله بالـ DNA. يرتبط بعد ذلك إنزيم DNA ligase ويلحم الشقوق المتبقية. يفتح التفاف الـ DNA بعد ذلك أكثر، وتضاف بواديء جديدة في شريط الـ lagging، بينما يقفز إنزيم DNA polymerase III إلى الأمام ليبدأ تخليق قطعة أوكازاكي أخرى.وللسهولة، يتكون إنزيم DNA polymerase III من جزيئتين منفصلتين، إحداهما تعمل على شريط الـ leading، والأخر تعمل على شريط الـ lagging، وهما يعملان معاً بشكل متزامن، ويرجع الفضل في ذلك إلى وحدة "تاو" الثانوية τ-subunit. تعمل هذه الوحدة على ازدواج جزيئتي الـ DNA polymerase الصميميتين ببعضهما البعض عند شوكة التضاعف وهي التي يرجع اليها الفضل في جعل تخليق كل من شريط الـ leading مع الـ lagging يحصل بشكل متزامن. وهكذا، فان بروتينات التضاعف ترتبط ببعضها البعض في وحدة كبيرة مفردة، وتتحرك بسرعة على طول الـ DNA معطية الإمكانية للـ DNA لكي يتخلق في كلا اتجاهي شوكة التضاعف في نمط منسق وكفوء.

إن عملية تضاعف الـ DNA هي عملية تتضمن خليط من البروتينات نوقش كل منها على حدة، ولكن في الحقيقة، إن معظم البروتينات تحمل مع بعضها البعض بمعقد إنزيمي متعدد كبير large multi-enzyme complex والذي يعرف بالـ replisome، والذي يتحرك بسرعة على طول الـ DNA. هذا المعقد يمكن تخيله كماكنة خياطة صغيرة متألفة من أجزاء بروتينية وتستمد الطاقة من عملية التحلل المائي hydrolysis للـ nucleoside triphosphate. ولو أن معقد التضاعف قد تمت دراسته بشكل مكثف في بكتريا القولون والعديد من الفايروسات، ولكن هذا التركيب يشابه في عمله كثيرا التركيب الموجود في الكائنات حقيقية النواة. إن وظائف وحدات هذا التركيب ملخصة بالشكل 19.3.



شكل (19.3) : مخطط يبين علاقة بروتينات التضاعف المختلفة مع بعضها البعض عند شوكة التضاعف (تصميم المؤلف)



تراكيب تضاعفية أخرى

إن موديل تضاعف بكتريا القولون المناقش سلفاً هنا هو تركيب ثيتا theta structure. ويحدث هذا الموديل النموذجي في جزيئات الـ DNA الخطية والدائرية على حد سواء. ويحدث في الجزيئات الكبيرة كالجينوم البكتيري وفي بعض البلازميدات (شكل 20.3).

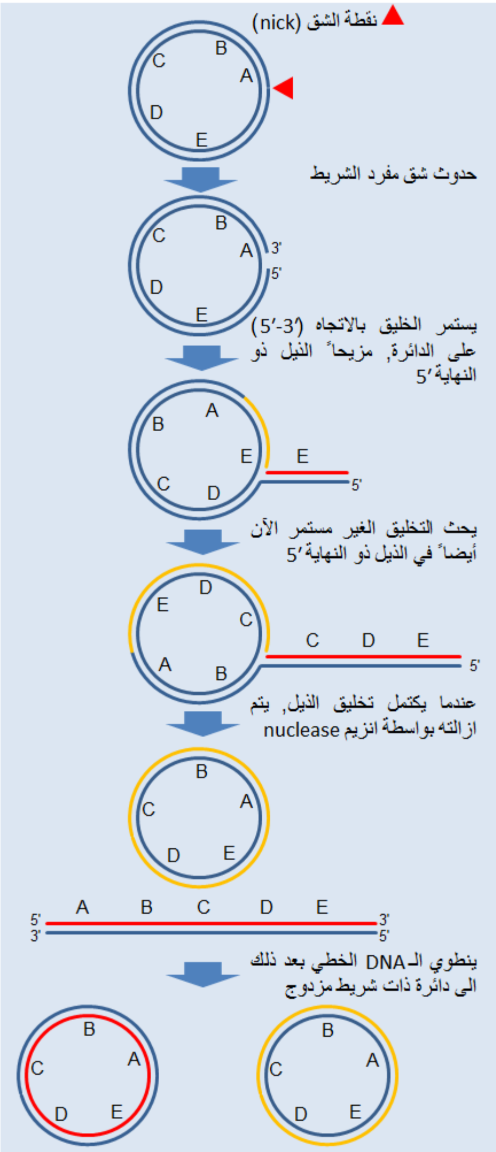
ويتقدم التضاعف هنا من منشأ واحد باتجاه واحد unidirectional أو باتجاهين bidirectional إلى أن يتم نسخ البلازميد كاملاً.

شكل (20.3): تضاعف البلازميدات بشكل مستقل عن الكروموسوم البكتيري: يبدأ التضاعف عند منشأ التضاعف (*oriC*) ويستمر حول الدائرة. وفي هذا المخطط، يحدث التضاعف في كلا الاتجاهين، وفي بعض البلازميدات يحدث التضاعف في اتجاه واحد فقط (تصميم المؤلف).

يوجد هنالك موديلين آخرين للتضاعف في الكروموسومات الدائرية، ويتمثلان بأسلوبين آخرين للتضاعف في الكروموسومات الدائرية وهما: الدائرة المتدحرجة (rolling circle) وعروة الإزاحة (D-loop).

موديل الدائرة المتحرجة Rolling Circle Model

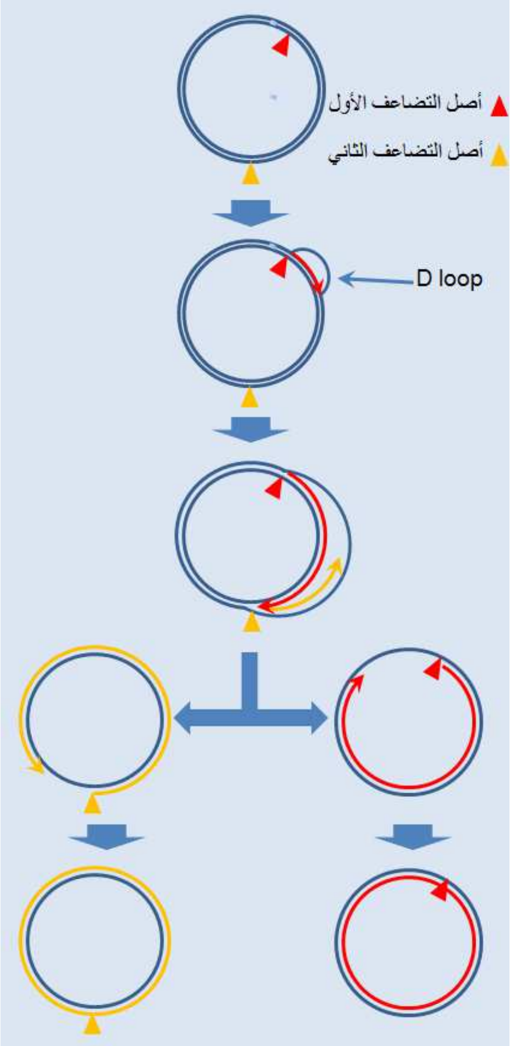
يحدث هكذا نوع من التضاعف في الـ DNA الفايروسي، حيث تستخدم العديد من العاثيات هذه الطريقة بحيث تملئ رؤوسها بالـ DNA الخطي المتضاعف من الجزيئة الأبوية الدائرية. كذلك يحدث أيضاً في بكتريا القولون خلال عملية الجماع كما في بلازميد الخصوبة F plasmid أو في كروموسوم بكتريا القولون ذو تردد إعادة الارتباط العالي Hfr chromosome (أنظر الفصل التاسع). ووفقاً لموديل الدائرة المتدحرجة للتضاعف، يتم عمل الشق (كسر في إحدى أصرتي الفوسفات ثنائية الأستر) في أحد شريطي جزيئة الـ DNA الدائرية، ويمتلك هذا الشق طبعاً نهايتين احدهما هي نهاية هيدروكسيلية من نوع 3′، ونهاية فوسفات من نوع 5′ (شكل 21.3).



شكل (21.3): موديل الدائرة المتحرجة للتضاعف. تعد الحروف من A إلى E معلمات كروموسومية لتبين اتجاه الحركة (تصميم المؤلف).

وتحت تأثير بروتينات الـ helicase والـ SSBs تتولد شوكة التضاعف. وهنا يكون تخليق الشريط البادئ (primer) غير ضروري بسبب توفر النهاية الهيدروكسيلية من نوع

3′، وبالتالي يستمر تخليق الشريط القائد (leading strand) وذلك باطالة تلك النهاية الهيدروكسيلية المتكشفة. وفي نفس الوقت، يتم ازالة القالب الأبوي لتخليق الشريط المتخلف (lagging strand). ان نوع الانزيم المبلمر المستخدم في هذه العملية هو DNA polymerase III. هذا ويتضاعف الشريط الأبوي المزاح بطريقة اعتيادية من قبل البادئ. ينتج هكذا موديل تضاعفي عن دائرة بامتداد خطي، وهذا يشبه الحرف الاغريقي سكما (σ) ومن هنا جاء الأسم تضاعف سكما sigma replication أو تضاعف الدائرة المتدحرجة rolling circle replication.



موديل عروة الإزاحة (D-Loop Model)

يحتوي الكلوروبلاست والمايتوكوندريا (في الخلايا حقيقية النواة) على جزيئات DNA دائرية والتي تتضاعف بآلية مختلفة قليلاً. يحتل أصل التضاعف في هذه الجزيئات نقطة مختلفة لكل من شريطي القالب الأبويين. يبدأ التضاعف عند أحد الشريطين، مزيحاً الشريط الآخر في نفس الوقت الذي يكون فيه عروة الإزاحة (displacement loop) أو D-structure (شكل 22.3).

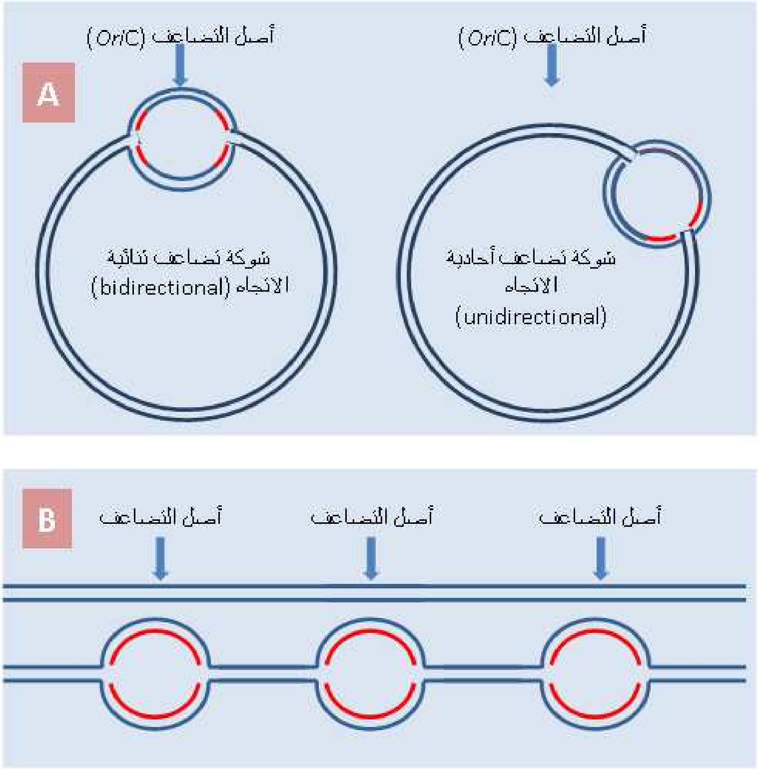
يستمر التضاعف إلى أن تصل العملية إلى منشأ التضاعف في الشريط الآخر. ثم يبدأ التضاعف على الشريط الآخر وباتجاه معاكس. ولكن يمكن حدوث الموديل الأول (تركيب ثيتا) في DNA المايتوكوندريا تحت ظروف نمو معينة.

شكل (22.3): موديل عروة الحرف D في تضاعف المايتوكوندريا والكلوروبلاست. تتكون عروات الإزاحة من تضاعف المايتوكوندريا والكلوروبلاست عند مناطق مختلفة في شريطي الحلزون المزدوج (تصميم المؤلف).

ملحق الفصل الثالث

التضاعف في الكائنات حقيقية النواة

على الرغم من تشابه الخواص العامة لتضاعف الـ DNA في الخلايا حقيقية النواة مع تلك التي في بدائية النواة، إلا إن هنالك بعض الفروق المهمة. إن كروموسومات الكائنات حقيقية النواة كبيرة جداً، وفي بعض الحالات تكون أكبر بالالآف المرات من نظيراتها في بدائية النواة. ولكي تتضاعف هذه الكتل الضخمة الخطية من الـ DNA بوقت معقول، يجب عليها أن تحتوي على عدّة مناطق لبداية عملية التضاعف والتي تعرف بأصول التضاعف origins of replication (*Ori*C). وهي عادة ما يزيد عددها عن 100 أصل للتضاعف. بينما لا يوجد في جينوم genome بكتريا القولون الدائري سوى أصل تضاعفي واحد (شكل23.3).



شكل (23.3): أصول وشوكات التضاعف. في الفرعAشوكات التضاعف في الـ DNA الدائري الصغير في بدائية النواة. في الفرعB جزء من الـ DNA الخطي الطويل جداً في حقيقية النواة (تصميم المؤلف).