النوكليوتيدات والحمضان النوويان والتأشيب

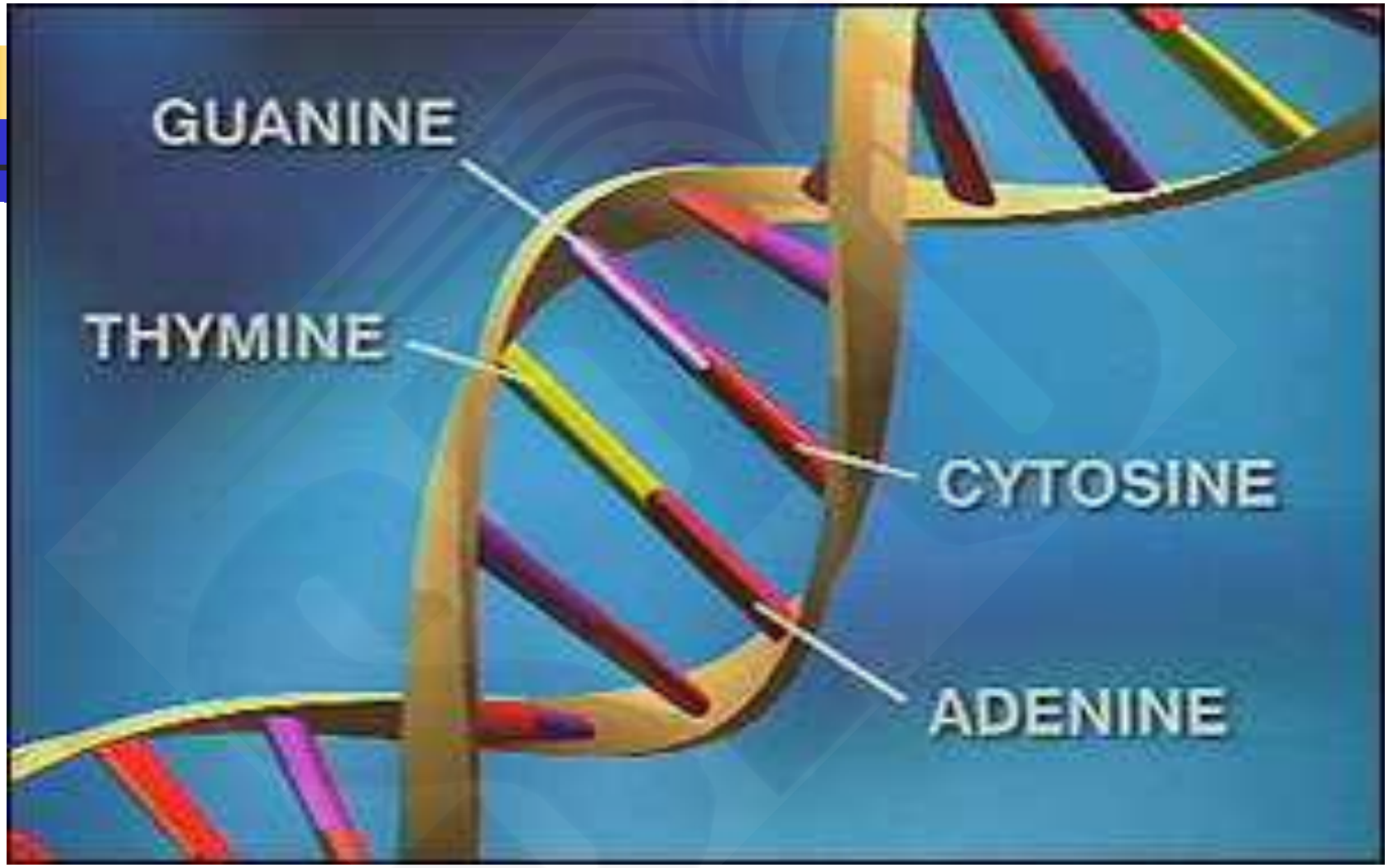
Nucleotides, Nucleic Acids and recombination

الكيمياء الحيوية لطب الاسنان -١

السنة الاولى

د. غياث سمينه

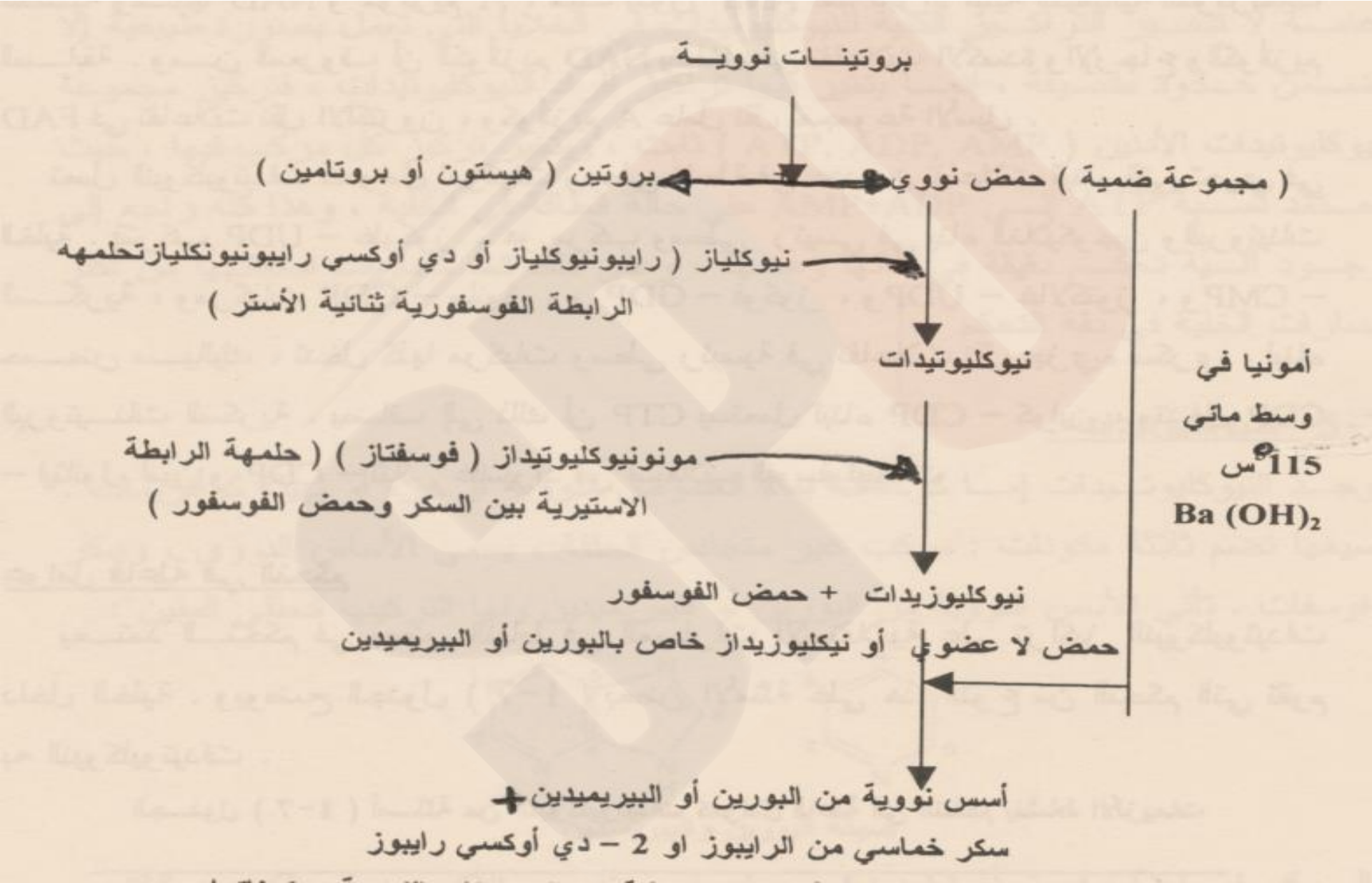
لا تزال الحموض النووية ، منذ أن عزلت من الخلية، منذ ما ينوف على مئة وثلاثون عاماً وحتى الآن ، موضع بحث وتحر.


GUANINE
THYMINE
CYTOSINE
ADENINE

Chemistry of Nucleotids كيمياء النوكليوتيدات

- لاتزال الحموض النووية منذ أن عزلت من الخلية، منذ ما ينوف على مئة وثلاثون عاماً، وحتى الآن موضع بحث وتحر.
- **توجد النوكليوتيدات فى المادة الوراثية :**
- توجد النوكليوتيدات منضمة إلى بروتينات الهيستونات
- **نوكليوتيد+ بروتين هيستون = بروتين نووي ،**
- البروتين النووي يدخل مكونا كبيرا في **الكروماتين** أي في المادة الوراثية

حلمهة البروتينات النووية النقية بالحمض أو بالأنزيمات



وظائف النوكليوتيدات

- **١- دورها في استقلاب الطاقة**
- **ATP** الشكل الرئيسي للطاقة المتاحة في الخلايا .
- **تنشأ :** ١-الفسفرة التأكسدية في الميتوكوندريا .
- ٢- بعض التفاعلات التي تحرر الطاقة .
- **تستعمل :** - لتزويد التفاعلات بالطاقة
- - عامل مفسفر ، تعطي مجموعة فوسفات
- - تقلص العضلات
- - النقل الفاعل
- - صيانة غشاء الخلية
- **٢-وحدات بناء الحموض النووية**
- الحموض النووية اما ديوكسي ريبي **DNA** او ريبي **RNA**

- جميع الحموض النووية مكونة من : وحدات نوكليوزيدية ـ٥ـ ثلاثي فوسفات تجمعها روابط ٣،٥ـفوسفاتية ثنائية الاستر .
- **٣ـ محفزات فيزيولوجية**
- **دور cAMP:** مستقبل ثان لهرموني ابي نيفرين وغلوكاغون في مساري تحلل الغلايكوجين وتكونه.
- **دور cGMP:** يدخل في معظم العمليات والأحداث الاستقلابية
- **٤ـ جزء مكون من بنية كو أنزيمات :**
- **NAD+ ، Co-enzyme A ، FAD يدخل في بنائها AMP**
- **ـ تعمل حوامل لمركبات وسطى نشطة في بناء جزيئات مهمة في الخلية :**

- فمركب **UDP-** مانوز، و**GDP-** فوكوز، و**UDP-** غالاكتوز، و**CMP-** حمض سياليك، تدخل كلها مركبات وسطى رئيسية في تفاعلات نقل جزيء سكري لبناء البروتينات السكرية.
- يضاف إلى ذلك أن **CTP** يستعمل لبناء **CDP-** كولين، وتدخل **CDP-** ايثانول أمين و**CDP-** ثنائي غلسيريد في استقلاب الفوسفوليبيدات.

٥- عوامل فاعلة في التحكم النوكليوتيدات تتحكم بنشاط أنزيمات نقاط استقلابية.

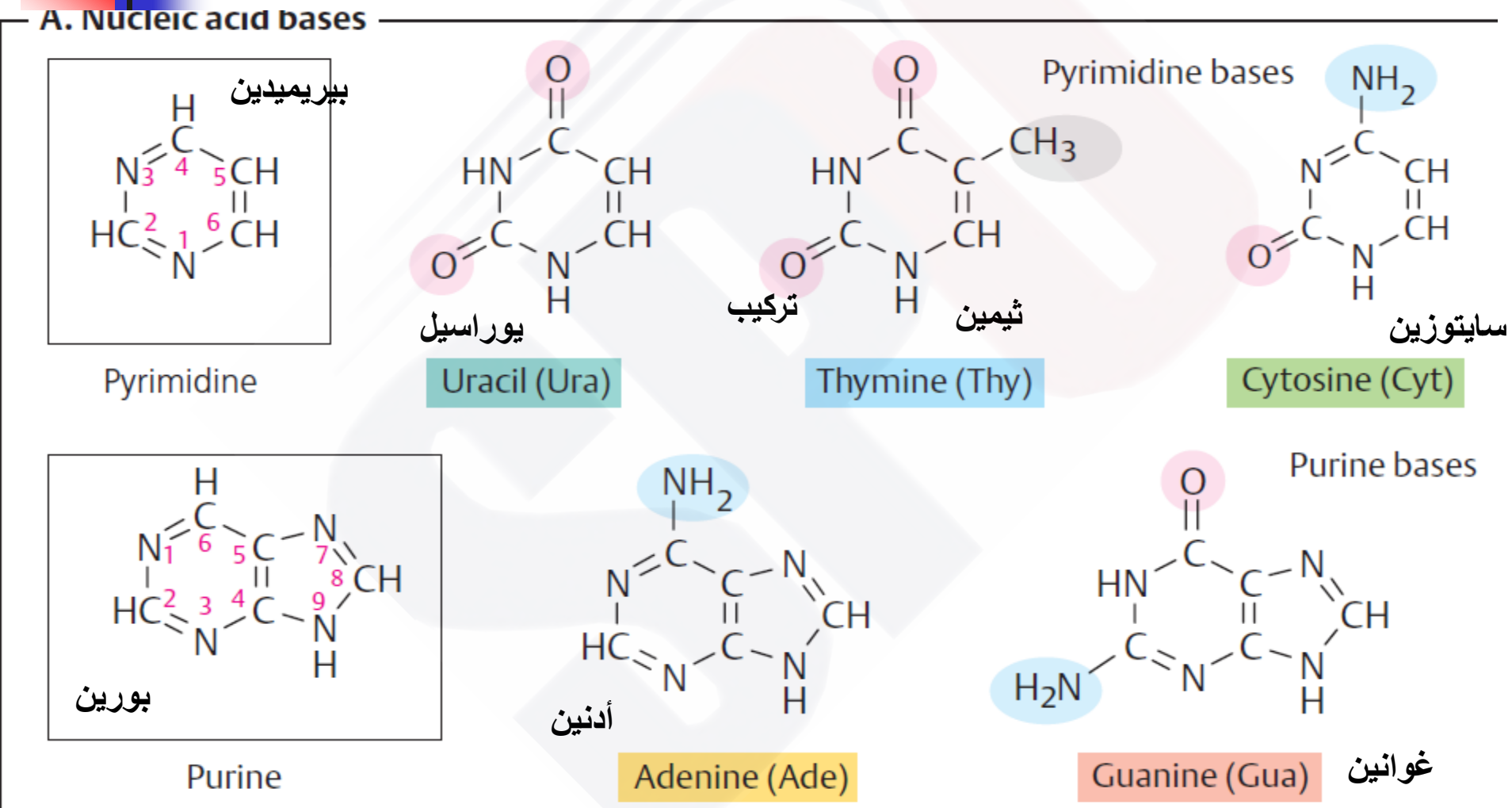
الإنزيم	المنشط	المثبط
فوسفوفركتوكيناز	AMP	ATP
فركتوز داي فوسفتاز	-	AMP
ايزوسترات ديهايدروجيناز	ADP	NADH2
CDP- رودكتاز	ATP	dATP
dCMP- دي أميناز	dCTP	dTTP

وجود النوكليوتيدات في الخلية

- في خلايا الدم الحمراء تتركز نوكليوتيدات الأدنين، و يصعب تحري وجود بقية أنواع النوكليوتيدات .
- في خلايا الكبد والنسج الأخرى يوجد مجال واسع من أحادي وثنائي وثلاثي نوكليوتيدات .
- عامة ، لا تتغير التراكيز الكلية للنوكليوتيدات في الخلايا التي تعمل بصورة طبيعية إلا ضمن حدود ضيقة، إنما يتغير فيها تراكيز أفراد النوكليوتيدات، فتركيز مجموعة نوكليوتيدات الأدنين **(ATP, ADP, AMP)** ثابت، ويتغير تركيز كل مركب فيها،حيث تعتمد نسبة **ATP** إلى **AMP+ADP** على حالة الطاقة في الخلية، وهذا كله راجع إلى وجود آلية تحكم دقيقة في بنائها وهدمها.

تركيب النوكليوتيدات ـ ١

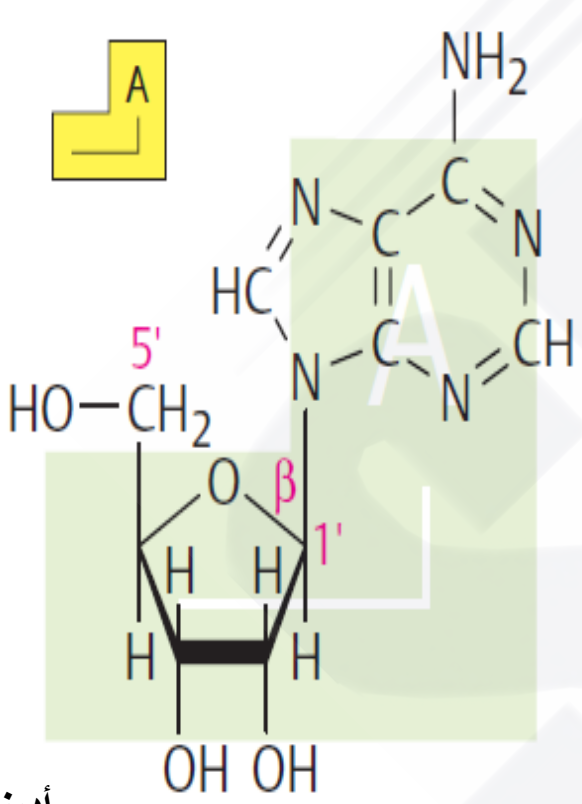
الاسس النووية: بيريميدين (يوراسيل، ثيمين،سايتوزين). بورين (أدنين، غوانين).



تركيب النوكليوتيدات – ٢

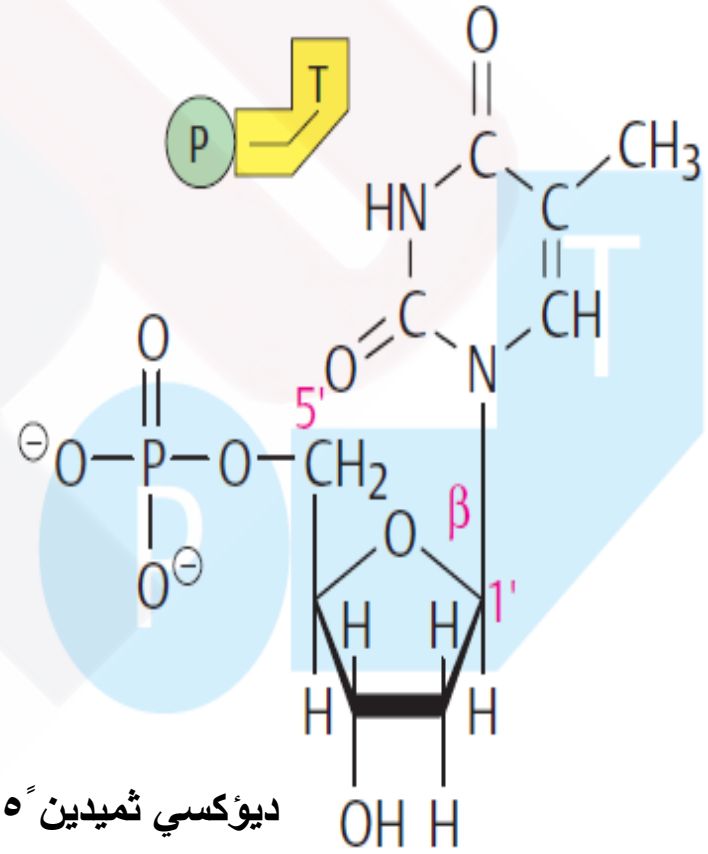
النوكليوزيدات و النوكليوتيدات

B. Nucleosides, nucleotides



أدينوسين

1. Adenosine (Ado)



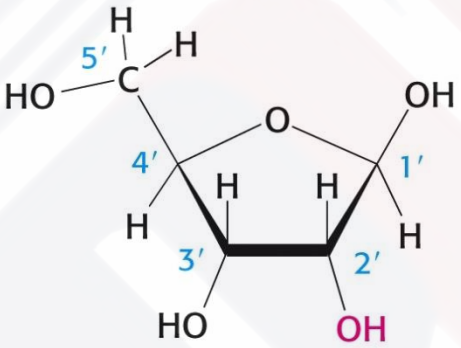
ديوكسي ثميدين ٥ً-احادي فوسفات

2. 2'-Deoxythymidine 5'-monophosphate (dtMP)

تركيب النوكليوتيدات -٣

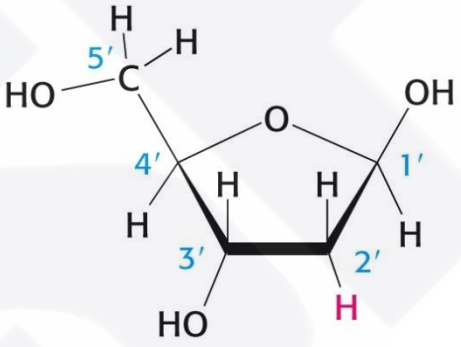
رايبوزفي الرنا. ديوؤكسي رايبوز في الدنا.

RNA



Ribose رايبوز

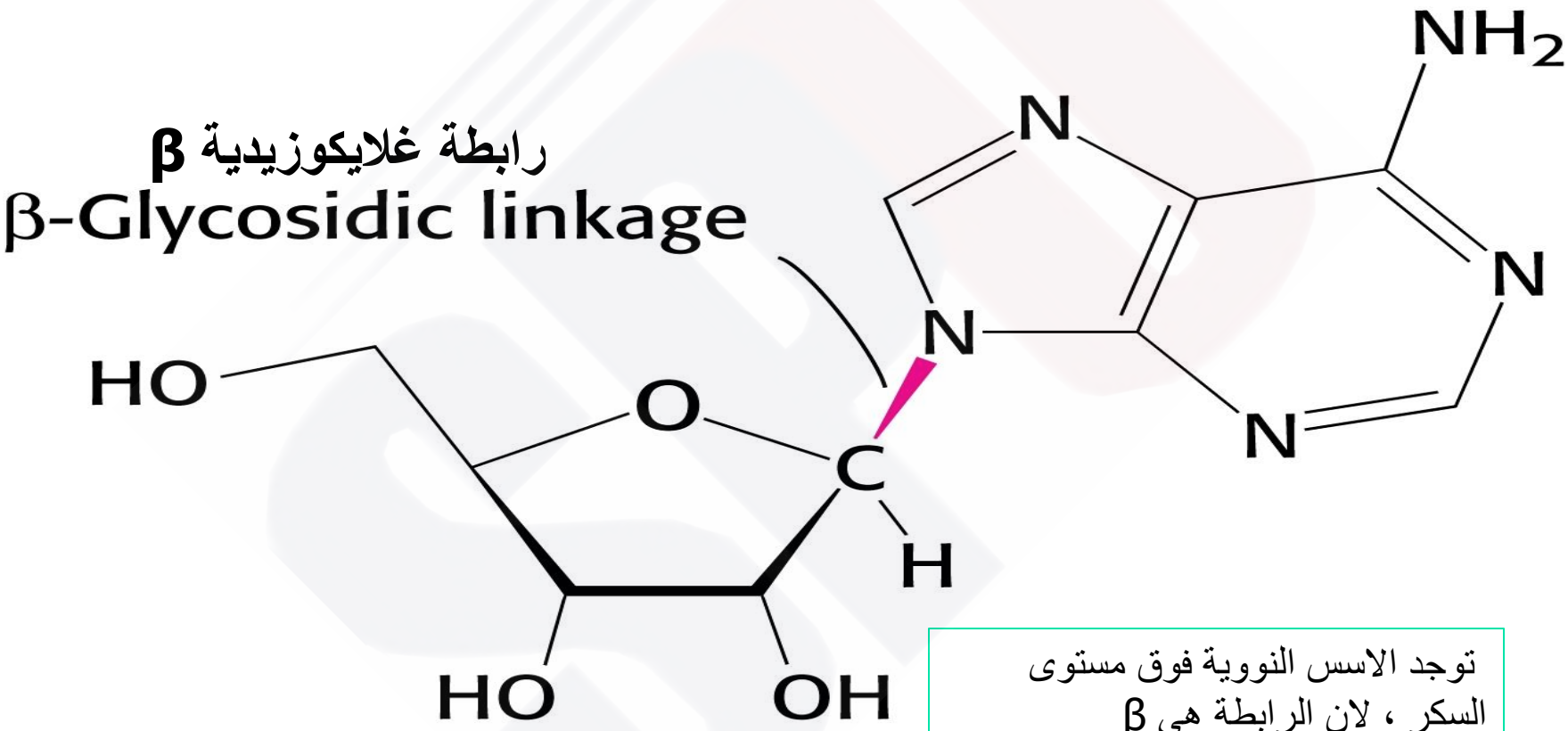
DNA



Deoxyribose ديوؤكسي رايبوز

النوكليوزيدات : ارتباط سكر – بأساس نووي

برابطة غلايكوزيدية β

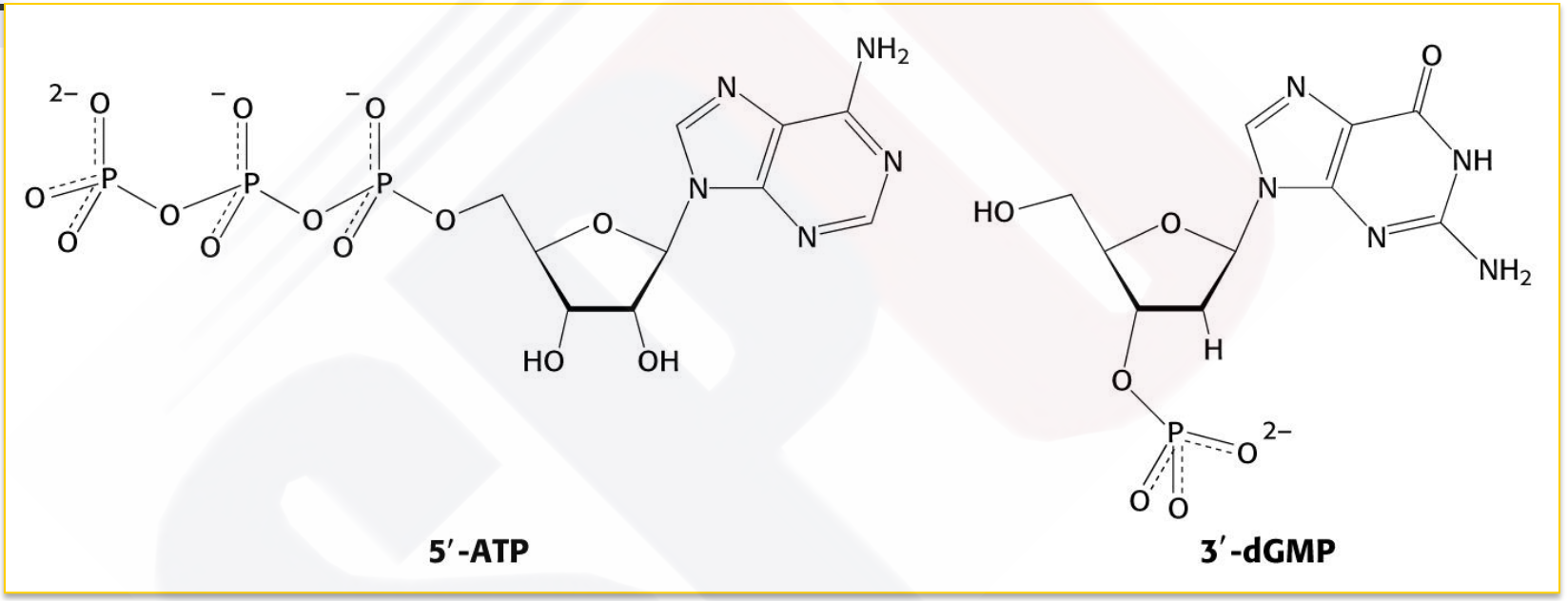


توجد الاسس النووية فوق مستوى السكر ، لان الرابطة هي β

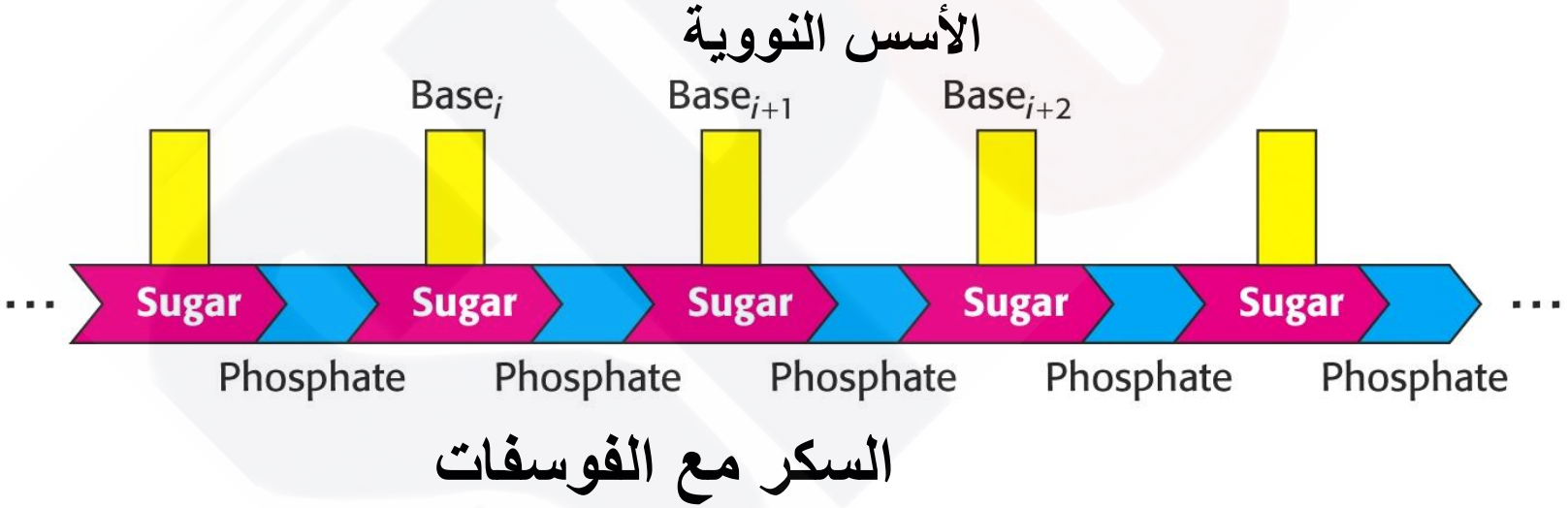
أسماء نوكليوزيدات الرنا : ادينوزين ، غوانوزين ، سايتيدين ، يورودين .

أسماء نوكليوزيدات الدنا : ديؤكسي أدينوزين ، : ديؤكسي غوانوزين ، ديؤكسي سايتيدين، تيميدين.

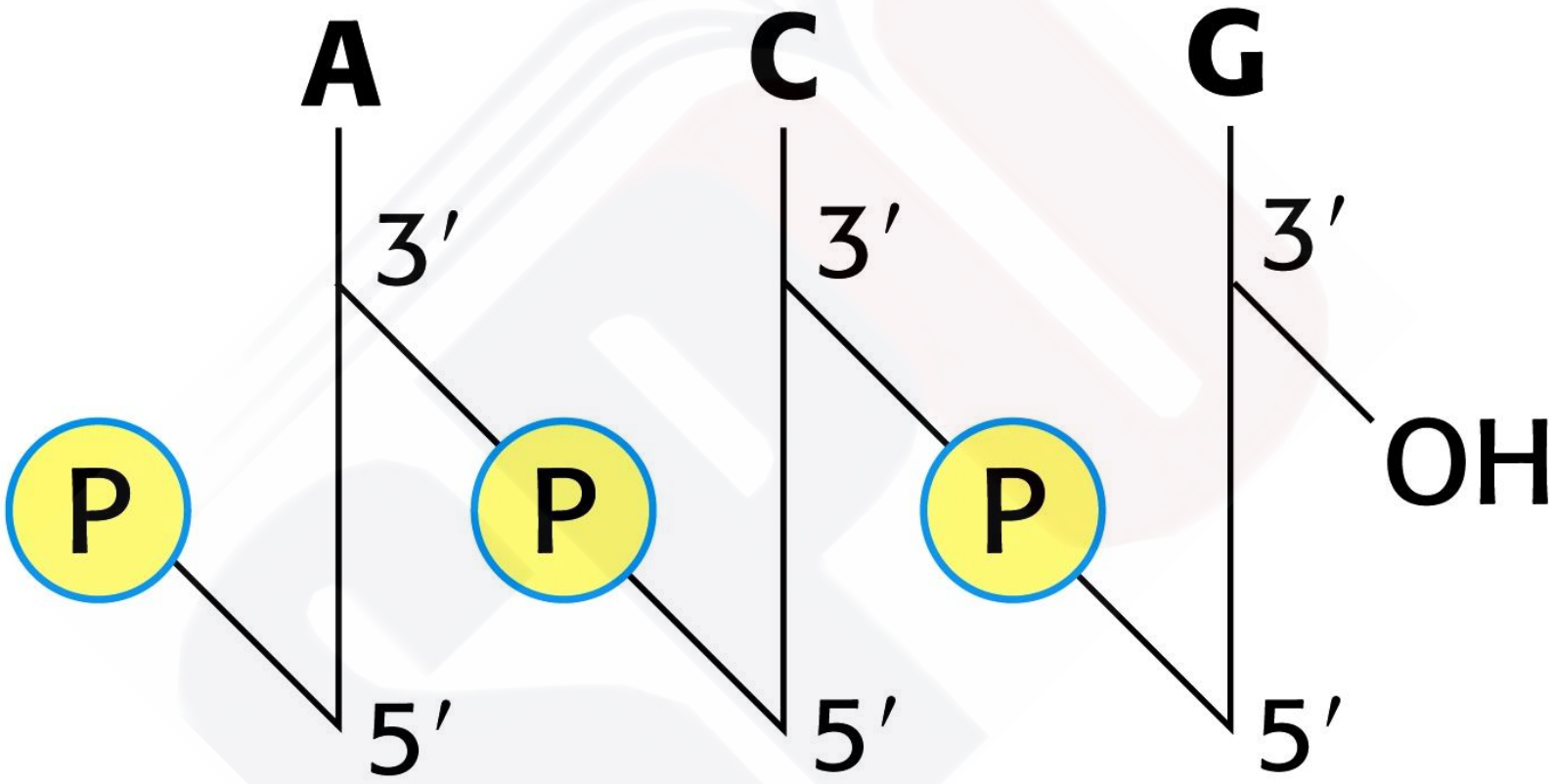
النوكليوتيدات وحدات بناء الحموض النووية



السلسلة الخارجية لحلزون الدنا هي تعاقب السكر مع الفوسفات (العمود الفقري للدنا) ويرتبط بالسكر الأسس النووية الممتدة وبصورة عمودية نحو داخل الحلزون



تمثيل بنية احدى سلسلتيّ الدنا ، لاحظ النهايتان



في النهاية ٥' ، توجد زمرة فوسفات

في النهاية ٣' ،توجد زمرة هيدروكسيل حرة

نموذج واتسون و كريك للدنا حلزون مزدوج

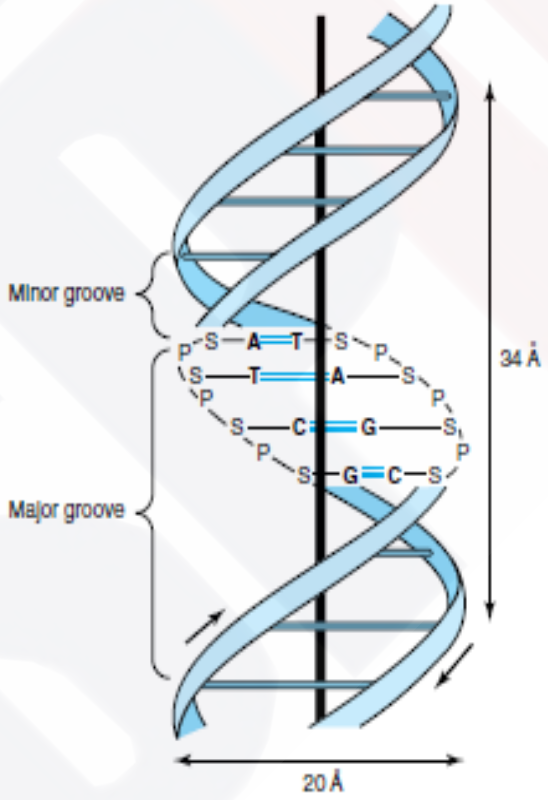
الملامح

سلسلتان من عديد النوكليوتيد حلزونية ، ملتفة حول محور مشترك ، وتجري في اتجاهين متعاكسين

العمود الفقري مكون من الفوسفات والسكر يوجد في الخارج ، و الأسس النووية في الداخل

توجد الأسس النووية عمودية

على محور اللولب



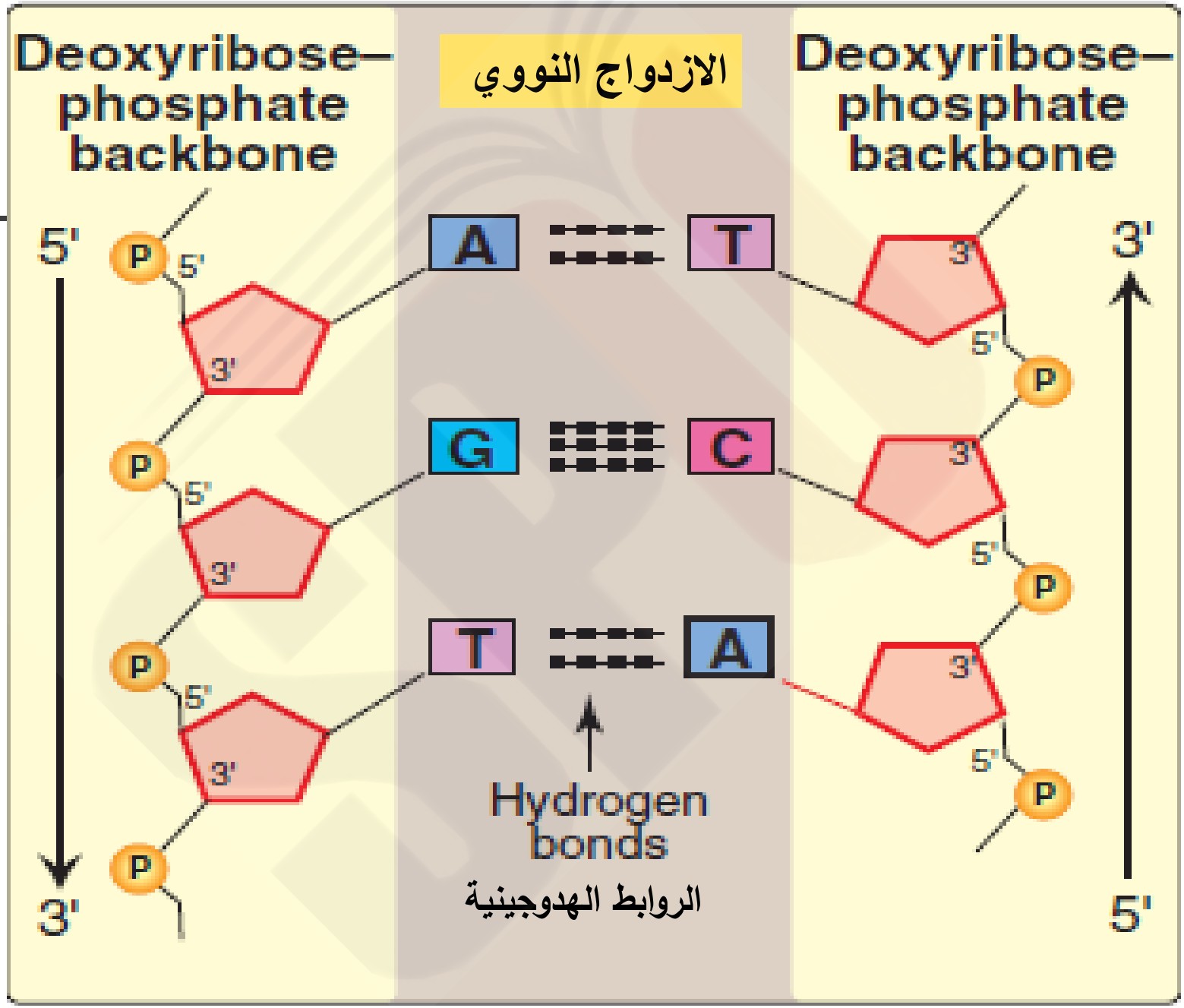
الابعاد تفصل الأسس عن بعضها مسافة ٣,٤ Å

يوجد ١٠ أسس لكل دورة من الحلزون

الدوران : ٣٦ درجة لكل أساس

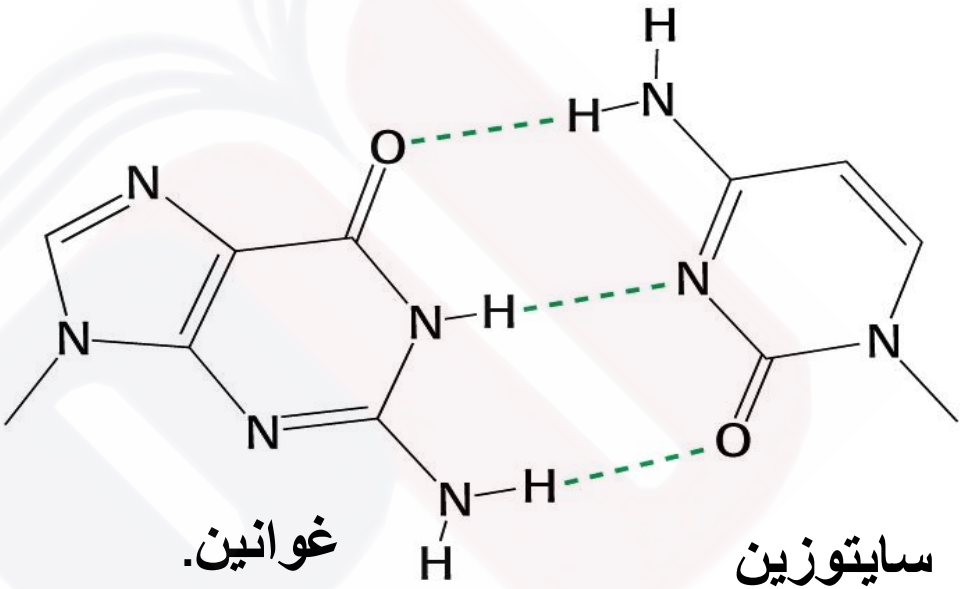
المسافة بين قمتين في الحلزون ٣٤ Å

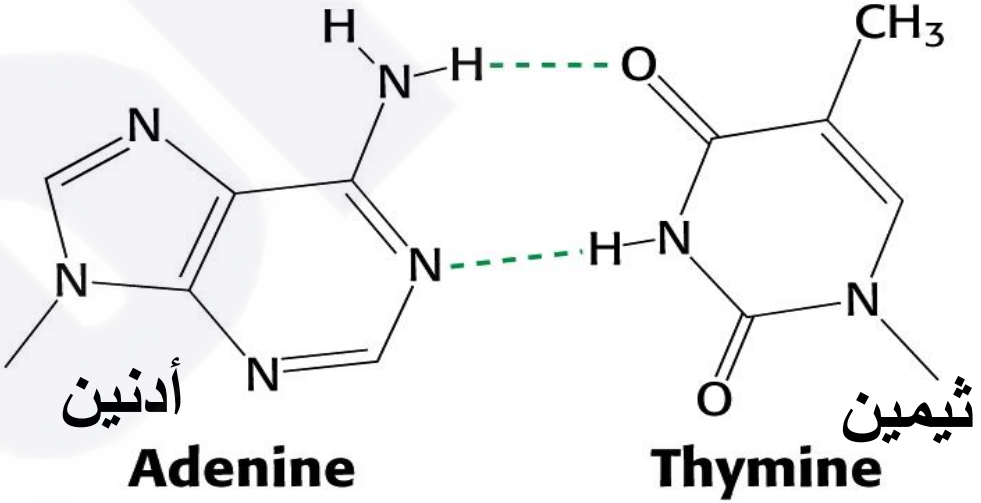
قطر اللولب ٢٠ Å=٢n


Deoxyribose–phosphate backbone
الازدواج النووي
Deoxyribose–phosphate backbone
5'
3'
P
5'
3'
A
T
G
C
T
A
Hydrogen bonds
الروابط الهدوجينية
3'
5'

الازدواج النووي (تفصيل الروابط الهيدروجينية)

يبين الشكل الروابط الهيدروجينية الموجودة بين الأسس النووية في DNA. كما يوضح قواعد الازدواج النووي: الأدنين يزدوج مع ثيمين في DNA ومع يوراسيل في RNA، بينما يزدوج الغوانين مع السايتوزين في DNA،و RNA، وقد تم استنتاج ذلك من مقارنة الأبعاد بين الذرات والمحسوبة من الدراسات التي تمت بأشعة X.





مستويات البناء في الدنا DNA :

يتكون الدنا من سلسلتين (شفعين، طاقين) الشفع الأول هو نوكليوتيدات متعاقبة والشفع الآخر هو سلسلة النوكليوتيدات المتممه للشفع الاول ، وبنية الدنا هي حلزون مزدوج قطره ٢نانومتر ، بعد ذلك يزداد القطر إلى ١٠ نانومتر بانضمام الهيستونات.
يضاف إلى هذا الحلزون المزدوج نوع خاص من البروتينات ، تسمى هيستونات (الحمض الأميني الرئيسي في هذه البروتينات هو الهيستيدين) ، وتأخذ هذه البروتينات شكل اسطواني مقطعها دائري ، حيث يلتف الحلزون المزدوج حول كل اسطوانة ١،٧٥لفة ثم يتركها ويلتصق بإحدى الهيستونات (H1) ثم تأتي اسطوانة أخرى وهكذا.... تسمى اسطوانة الهستونات «مثمن هستوني »

مثمن هيستوني+ ١،٧٥لفه حلزون دنا مزدوج = جسيم نووي nucleosome

وعندما تلتف سلسلة الحلزون المزدوج حول المثمن الهستوني يسمى الناتج ليف كروماتين و قطره ١٠ نانومتر، وهو سلسلة أحادية من الجسيمات النووية ، وعندما تتضاعف الجسيمات النووية إلى جانب بعضها نسميها ليف سيلينود وقطره ٣٠ نانومتر.

الجسيمات النووية كما ترى بالمجهر الالكتروني ويصل بينها شريط دقيق هو الدنا

بنية النوكليوسوم nucleosome
(الجسيم النووي)

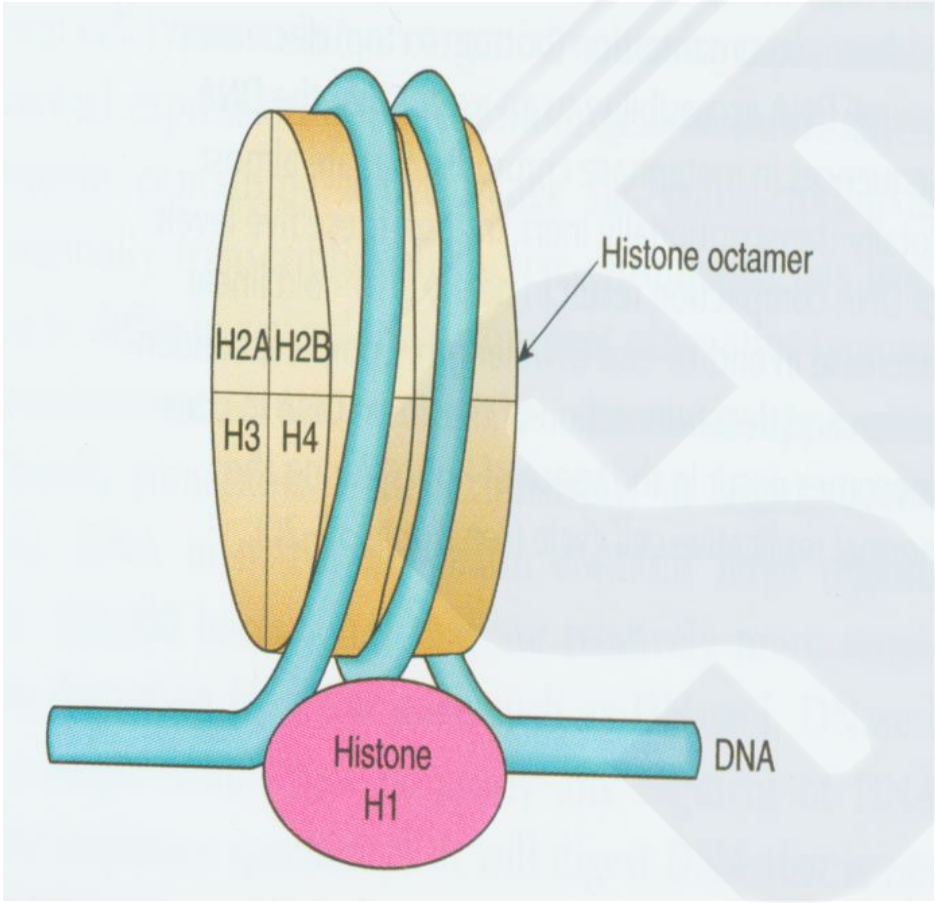
نموذج لبنية نوكليوسيوم (الجسيم النووي) .يغلف الدنا سطح أسطوانة بروتين مكونة من زوج من كل من الهيستونات 2(H_2A، H_2B، H_3، وH_4)والتي تعرف باسم المثمن الهيستوني.

يدور الدنا ١,٧٥ دورة حول الهيستونات وبذلك يغدو ١٤٥ زوج أسس (bp) في تماس مع المثمن الهيستوني، ويشار عادة إلى الهيستون H_1 عندما يكون بتماس مع الدنا بخط متقطع. يمس الدنا الهيستون H_1 بدخوله إلى المثمن الهيستوني وعند خروجه.

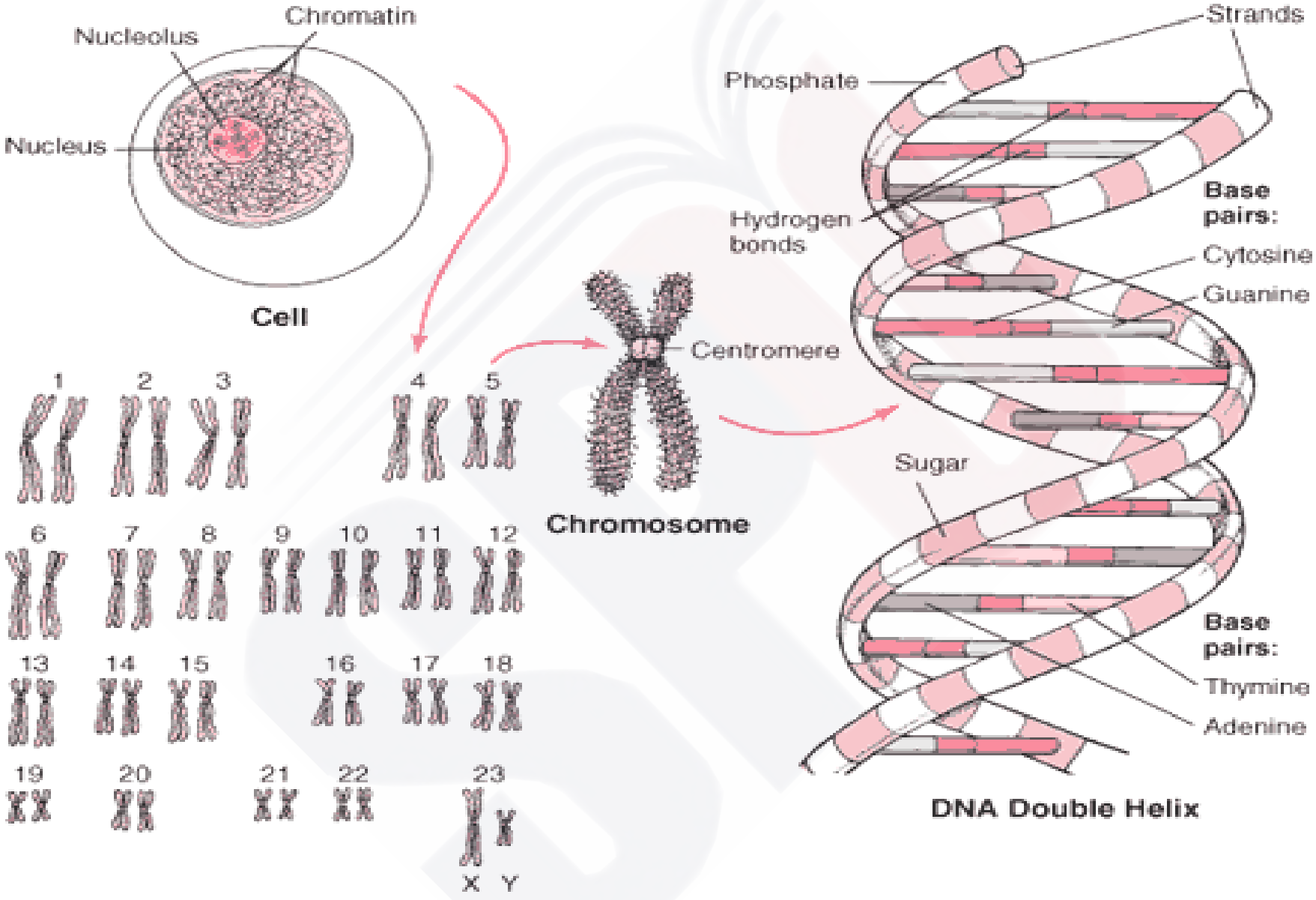
النوكليوسوم (الجسيمات النووية) والهيستونات

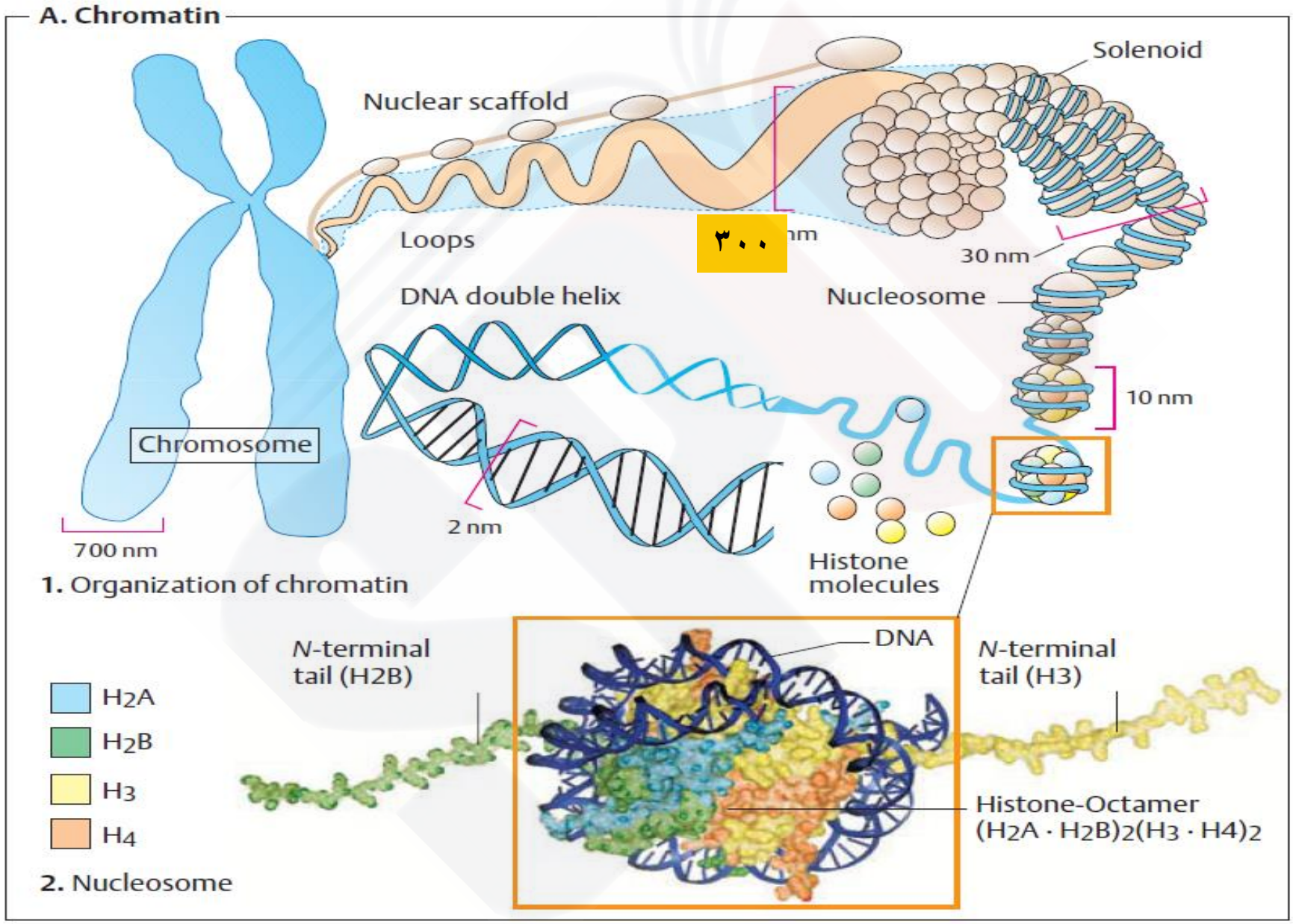
المثمن الهيستوني

(H2A, H2B, H3, H4)2 . Histone Octamers

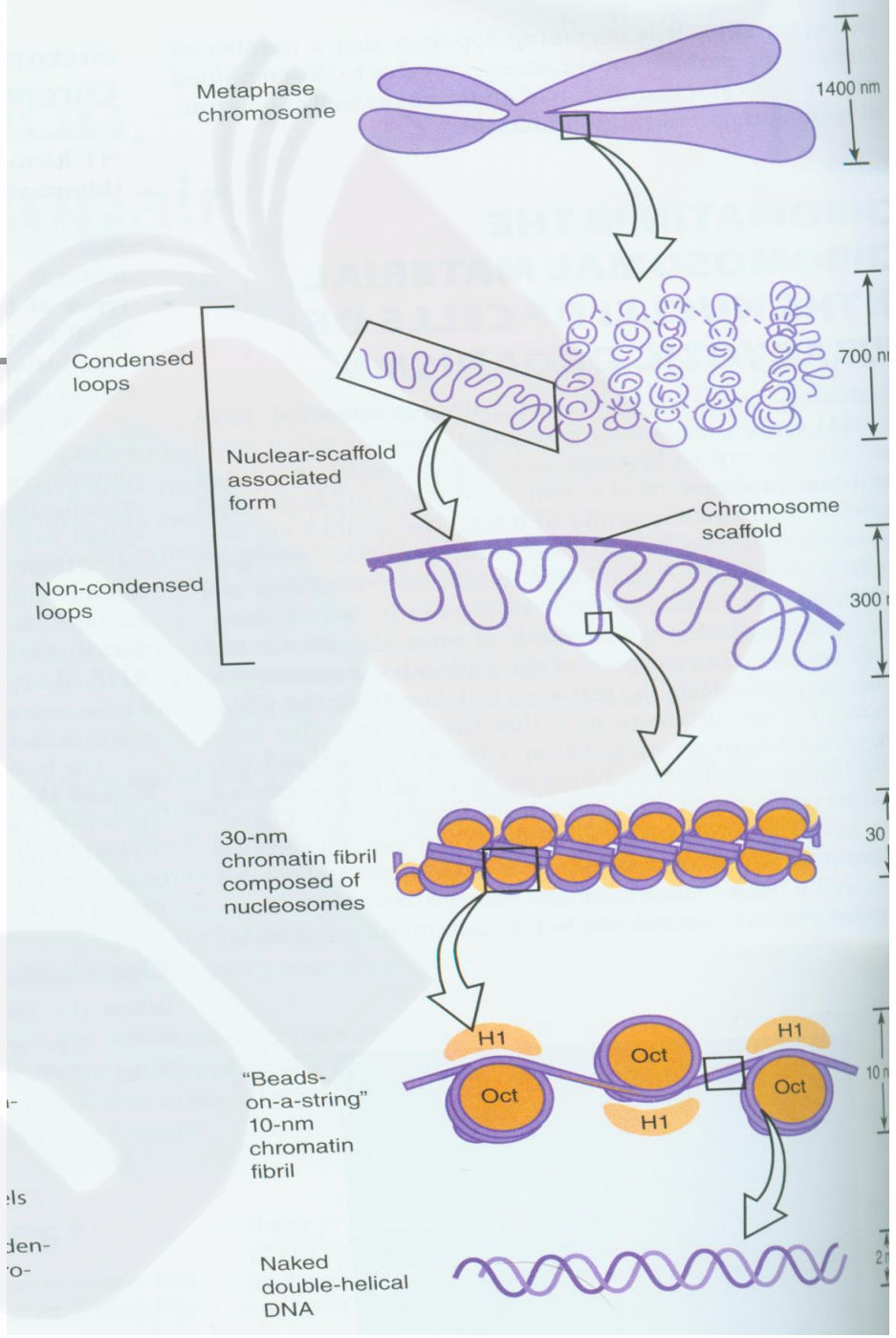


البنية الدقيقة للكروماتين، تتكون من وحدات تعرف بـ نيوكليوسوم، و الوحدة منها مكونة من ١,٧٥ دورة من الدنا الحلزوني الذي يلتف حول نواة مكونة من ثمانية هيستونات.


Nucleolus
Chromatin
Nucleus
Cell
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
X
Y
Pairs of Chromosomes in a Human Cell
Centromere
Chromosome
Strands
Phosphate
Hydrogen bonds
Base pairs:
Cytosine
Guanine
Sugar
Base pairs:
Thymine
Adenine
DNA Double Helix


A. Chromatin
Solenoid
Nuclear scaffold
Loops
۳۰۰
30 nm
DNA double helix
Nucleosome
10 nm
Chromosome
2 nm
700 nm
Histone molecules
1. Organization of chromatin
DNA
N-terminal tail (H2B)
N-terminal tail (H3)
H2A
H2B
H3
H4
Histone-Octamer
(H2A · H2B)2(H3 · H4)2
2. Nucleosome

يبين الشكل تسلسل البنية المفصلة بدءاً من صبغي الطور الاستوائي (metaphase) (في الأعلى) إلى الشريط المزدوج للدنا (في الأسفل).
الدنا الصبغي يتوضب ويتكدس ويتنظم في عدد من السويات.
تتناقص فعالية الدنا في كل مرحلة(من الأسفل إلى الأعلى) من هذه التكدسات ، إلى درجة أن تتابع الدنا في صبغيات الطور التالث (الاستوائي) غير متاح كلياً وخامل وغير قابل للاستنساخ.
يشاهد في الرسم خمسة مستويات من تكدس الدنا تعطي تقريباً تناقصاً بمعدل ١٠٤ مرة في طول الدنا.
يحدث هذا التكدس التام لجزيء الدنا الخطي في الصبغيات ويعكس خلال ساعات اثناء دورة تكاثر الخلية.



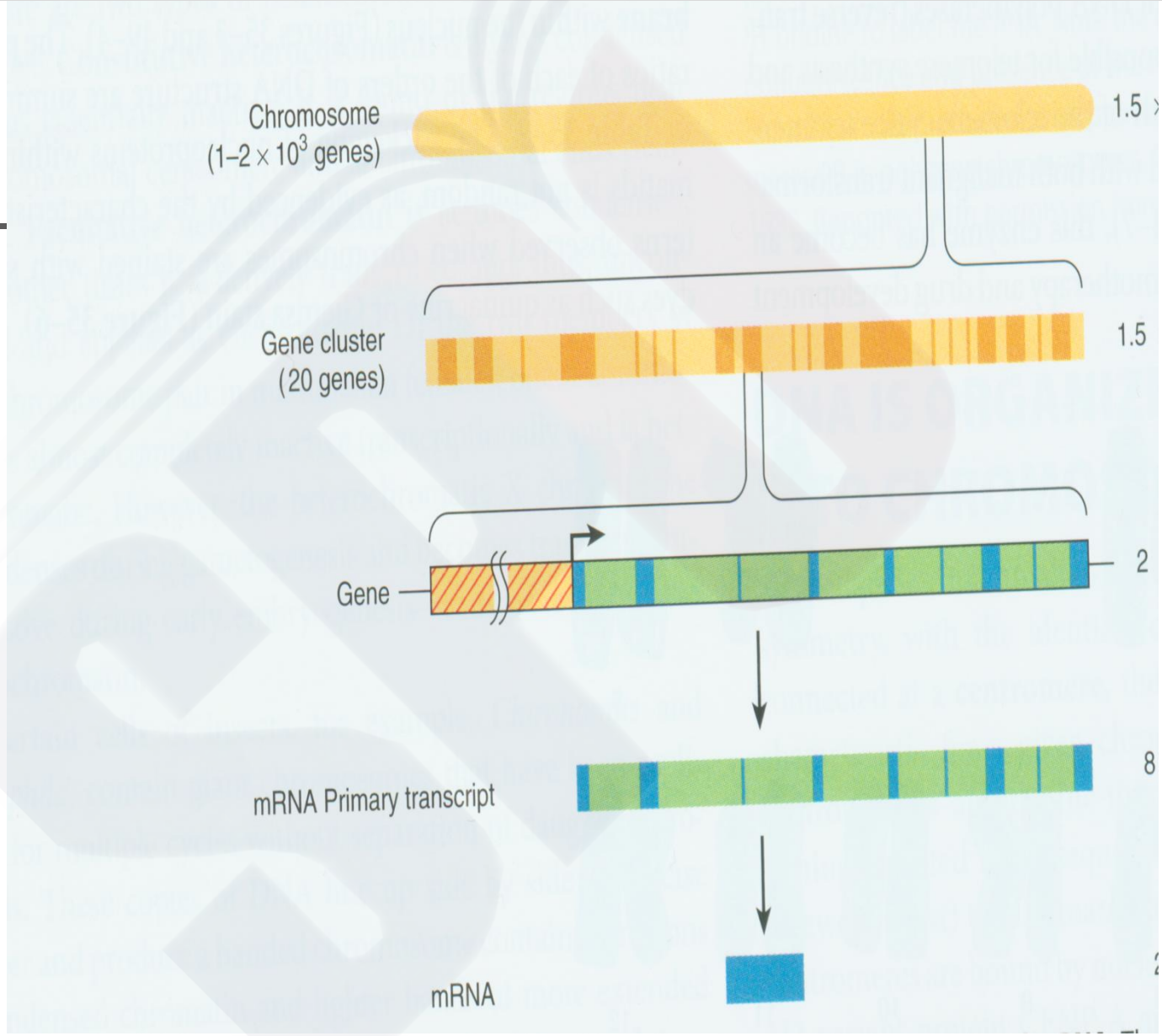
نسب الرص أو التعبئة لكل رتبة من رتب بنية الدنا DNA

نسبة الرص	شكل الكروماتين
١,٠ نحو	دنا مثالي ذو حلزون مضاعف
٧–١٠	ليف ١٠ ن م للجسيمات النووية
٤٠–٦٠	ليف كروماتيني ٢٠–٣٠ ن م للجسيمات النووية الحلزونية الفائقة
٨٠٠٠	الصبغي المكدس في الطور الاستوائي

العلاقة بين الدنا الصبغي والرنا المرسال m RNA

يتكون الدنا البشري الفردي من ٣×١٠^٩ زوج من الأسس موزعة على ٢٣ صبغي. تتجمع الصبغيات في الجينات.
متوسط طول الجين ٢×١٠^٤ زوج أسس، بما في ذلك منطقة التحكم أو التنظيم (المنطقة الغامقة)، الموجودة عادة في النهاية 5ً من الجين.
توجد في أغلب جينات حقيقيات النوى، أكسونات وأنترونات بصورة متناوبة. وفي المثال يوجد تسعة أكسونات (الخطوط القاتمة) وثمانية انترونات (المناطق الفاتحة).
يجري نزع الأنترونات بتفاعلات معالجة، بعدها تربط الأكسونات مع بعضها لإعطاء الرنا المرسال الناضج بعملية تسمى ربط الجدائل او الضفائر splicing

العلاقة بين الدنا الصبغي والرنا المرسال m RNA



بنية الحمضين النوويين:

١- الحموض النووية الدنا DNA والرنا RNAهي جزيئات بوليمرات.

٢- يوجد في الدنا أربعة أسس A، G، C، T ترتبط مع ديوكسي رايبوز برابطة N- غلايكوزية.

٣- ينتظم الدنا DNA في شريطين من خلال تزاوج الأسس A مع T وG مع C، فكل شريط يتمم الآخر، ويشكل الشريطين حلزوناً مضاعفاً يلتف حول محور مركزي.

٤- تترتب أزواج الأسس في دنا الإنسان في متمم فردي لـ ٢٣ صبغياً.

٥- ويحدد التسلسل الدقيق للنوكليوتيدات، التي يبلغ عددها ٣ بليون نوكليوتيد فردية كل فرد.

٦- أحد وظائف الدنا تأمين قالب من أجل التناسخ، للمحافظة علي النمط الوراثي.

٧- الوظيفة الأخرى تأمين قالب من أجل انتساخ جينات الرنا RNA.

٨- يوجد الرنا RNA بعكس DNA بعدة بنيات وحيدة الشريط ومختلفة عن بعضها، ويشترك معظمها في اصطناع البروتين.

٩- التسلسل الخطي لنوكليوتيدات الرنا RNA يضم الأسس A، G، C، وU، والسكر رايبوز.

١٠- توجد أشكال مدروسة رئيسية لكل من الرنا المرسال mRNA والرنا الرايبوزي rRNA والرنا الناقل tRNA.

إن هذا التضاعف لا يبقى مستقيما ً وإنما يلتوي على شكل التفاف شديد عندها نسميه ليف شديد الالتفاف يزداد قطره إلى ٢٠٠ نانومتر وهو الذي يظهر على هيئة الكروموزومات في نهاية انقسام الخلية. قطر الكروموزوم ٧٠٠ نانومتر.

مستويات بناء الرنا RNA :

أنواع RNA :

1. mRNA الرسول : ينقل الشفرة الوراثية من DNA إلى موقع اصطناع البروتينات.

2. rRNA الريبوزومي : يساهم ببناء البروتينات.

3. tRNA الناقل : نقل حمض أميني من سيتوبلاسما الخلية إلى موقع اصطناع البروتينات . اجتماع RNA + بروتينات = الريبوزوم .

إن جزيء tRNA له شكل ورقة الفصة فهو يتألف من ثلاثة فصوص نميز فيه جزأين متقابلين :

1. نميز في الموقع المقابل للرمز الوراثي ثلاثة أسس نووية (A , G , U) `الحموض الامينية (الرمز الوراثي = ٣ أسس نووية).

2. الموقع الذي يتصل به الحمض الأميني (مكان تعليق الحمض الأميني) حيث يتصل الحمض الأميني بالموقع برابطة إسترية حيث تتفاعل COOH الحمض مع OH الموقع، هذا الموقع نسميه الساعد الذي يحمل الحمض الأميني.

هدم النوكليوتيدات :

تعطي الحموض النووية بتفككها نوكليوزيدات – ٥ ـَ- أحادي فوسفات ، ويدخل في هدمها أنزيمات مهمة منها :

1. نوكلياز : أنزيمات تحلمأ الرابطة ثنائية الإستر ٣` – ٥` الفوسفاتية في RNA , DNA ويندرج تحتها ٣٠ أنزيم وأكثر.

اى انها تحلمأ السلاسل الطويلة من الدنا والرنا . وهذه الأنزيمات متخصصة تخصص نوعي وتعمل ضمن مجموعة معينة من الاسس النووية

إذا حضن RNA و DNA مع الأنزيم ECOR1 فإنه يقطع الروابط بين GA .أدى التقدم في تكنولوجيا الأنزيمات إلى نوع جديد من التقانة هي الهندسة الوراثية

هناك مجموعة من الأنزيمات قادرة على التمييز بين تسلسلات معينة من الأسس النووية في نوكليوتيدات جزيء DNA تسمى هذه الأنزيمات النوكلياز الداخلية المقيدة تعمل داخل سلسلة RNA ، DNA

تقوم هذه الأنزيمات بحلمأة الروابط الفوسفورية ثنائية الإستر التي تربط نيوكليوتيدات هيكل الدنا مع بعضها ، عزلت هذه الأنزيمات من الجراثيم وقدمت خدمات جليلة في :
١- رسم خارطة الدنا. ٢- هندسة الوراثة

2. نوكليوتيداز : تحلمأ مجموعة ٥ ـ فوسفات في النوكليوتيدات وتعطي النوكليوزيدات المقابلة .

$H_2O + AMP \leftarrow$ أدينوزسين + Pi (Pi مجموعة فوسفات لا عضوية)

3. نوكليوزيد فوسفوريلاز (فوسفات لا عضوية) ، تفكك الرابطة الجلايكوزيدية.

أدينوسين + Pi ← أدنين + رايبوز-١- فوسفات

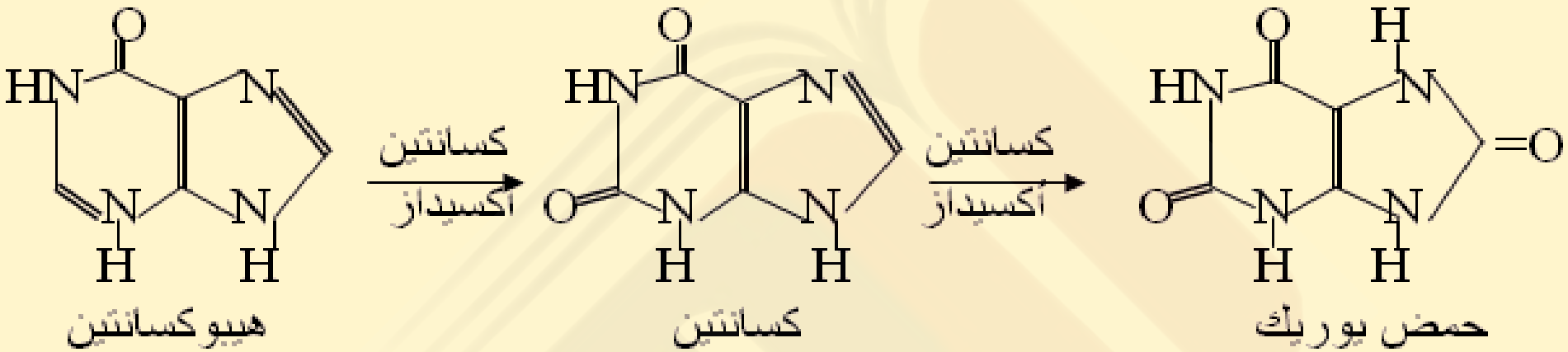
(أساس نووي)

٤- دي أميناز : تزيل مجموعة الأمين من الكربون السادس ، منها أدينوزين دي أميناز التي تزيل مجموعة أمينو من الكربون السادس في النيوكليوزيدات التي تحتويها

أدينوسين + H2O ← NH3 + إيونوسين

IMP + NH3 ← H2O + AMP

٥-فوسفوريلاز : تزيل السكر من النوكليوزيدات عبر اضافة فوسفات الى السكر وتحريره ، وتشكل الاساس النووي



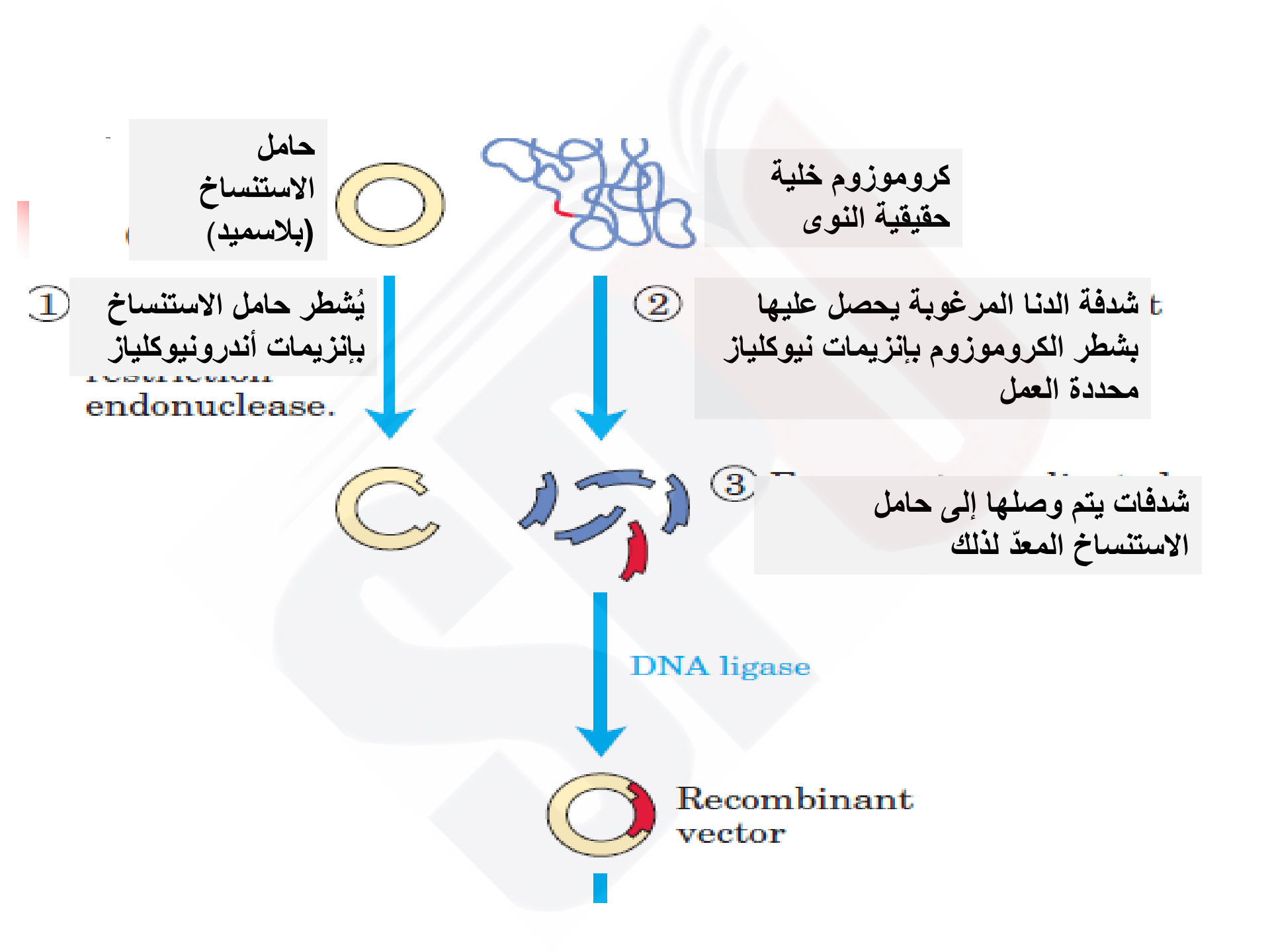
حمض يوريك قليل الذوبان لذلك يترسب في الكلى على شكل حصى.

تأشيب الدنا DNA أو هندسة الوراثة
Recombinant DNA

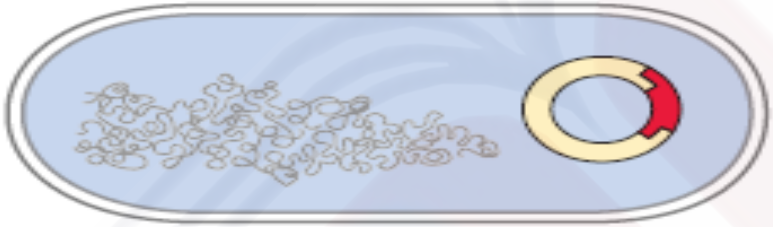
- أدى التقدم في كيمياء DNA والتقدم في الأنزيمات إلى .

التأشيب : نقل صفة وراثية نوعية خاصة نقلا مخبريا من كائن حي إلى كائن حي آخر لا يملك في الأصل الصفة الوراثية التي نقلت إليه وظهور هذه الصفة الوراثية بصورة طبيعية في الكائن المنقول إليه.

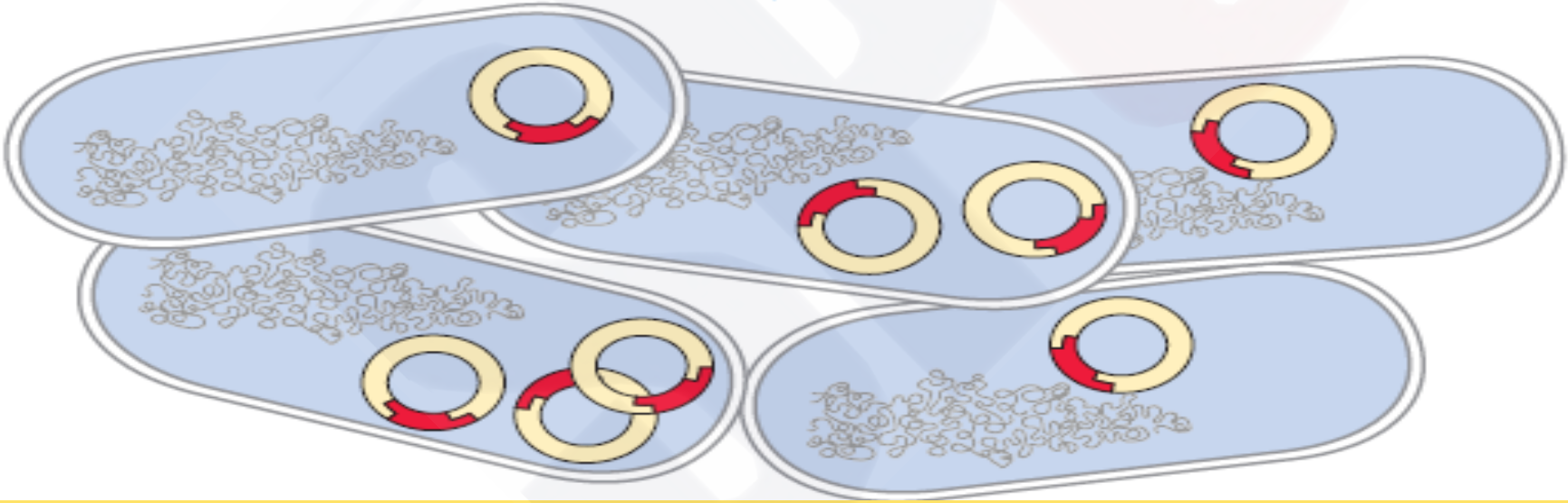
مثال : هرمون الأنسولين الذي تنتجه غدة البنكرياس نقلت هذه الصفة الوراثية إلى أحد أنماط بكتيريا E.coli


حامل الاستنساخ (بلاسميد)
كروموزوم خلية حقيقية النوى
1
يُشطر حامل الاستنساخ بإنزيمات أندرونيوكلياز
endonuclease.
2
شدفة الدنا المرغوبة يحصل عليها بشطر الكروموزوم بإنزيمات نيوكلياز محددة العمل
3
شدفات يتم وصلها إلى حامل الاستنساخ المعدّ لذلك
DNA ligase
Recombinant vector

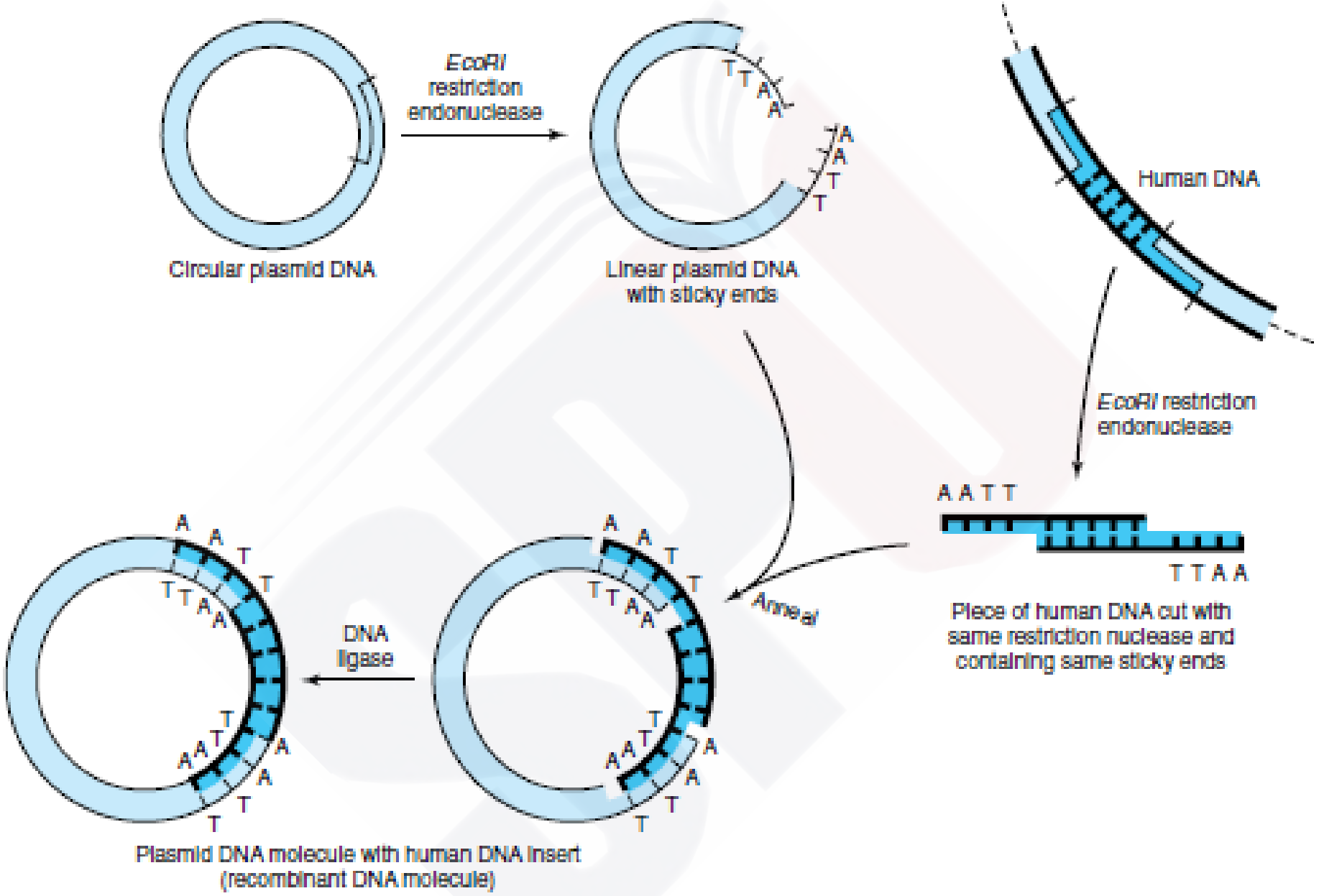
④ يدخل الدنا إلى الخلية المضيفة



⑤ استنساخ (تكاثر) يعطي نسخ متعددة من الدنا المأشوب



دنا هجين يدخل في سيتوبلاسما الخلية (خلية جرثومية جديدة) ثم توضع في شروط تكاثر ويتم اختبار الصفة الوراثية هل بقيت أم لا.


EcoRI restriction endonuclease
Circular plasmid DNA
Linear plasmid DNA with sticky ends
Human DNA
EcoRI restriction endonuclease
A A T T
T T A A
Piece of human DNA cut with same restriction nuclease and containing same sticky ends
Anneal
DNA ligase
Plasmid DNA molecule with human DNA insert (recombinant DNA molecule)

أسس هندسة الوراثة :

1. أنزيمات تحلمأ الروابط الفوسفورية ثنائية الإستر التي تربط نوكليوتيدات هيكل DNA مع بعضها تتم الحلمأة ضمن تتابع معين وقد عزلت هذه الأنزيمات من الجراثيم وتسمى النوكلياز الداخلية المقيدة.

2. Vector حامل : مأخوذ من جرثوم وهو DNA حلقي يسمى بلاسميد ، له صفة المقاومة تجاه المضادات الحيوية.

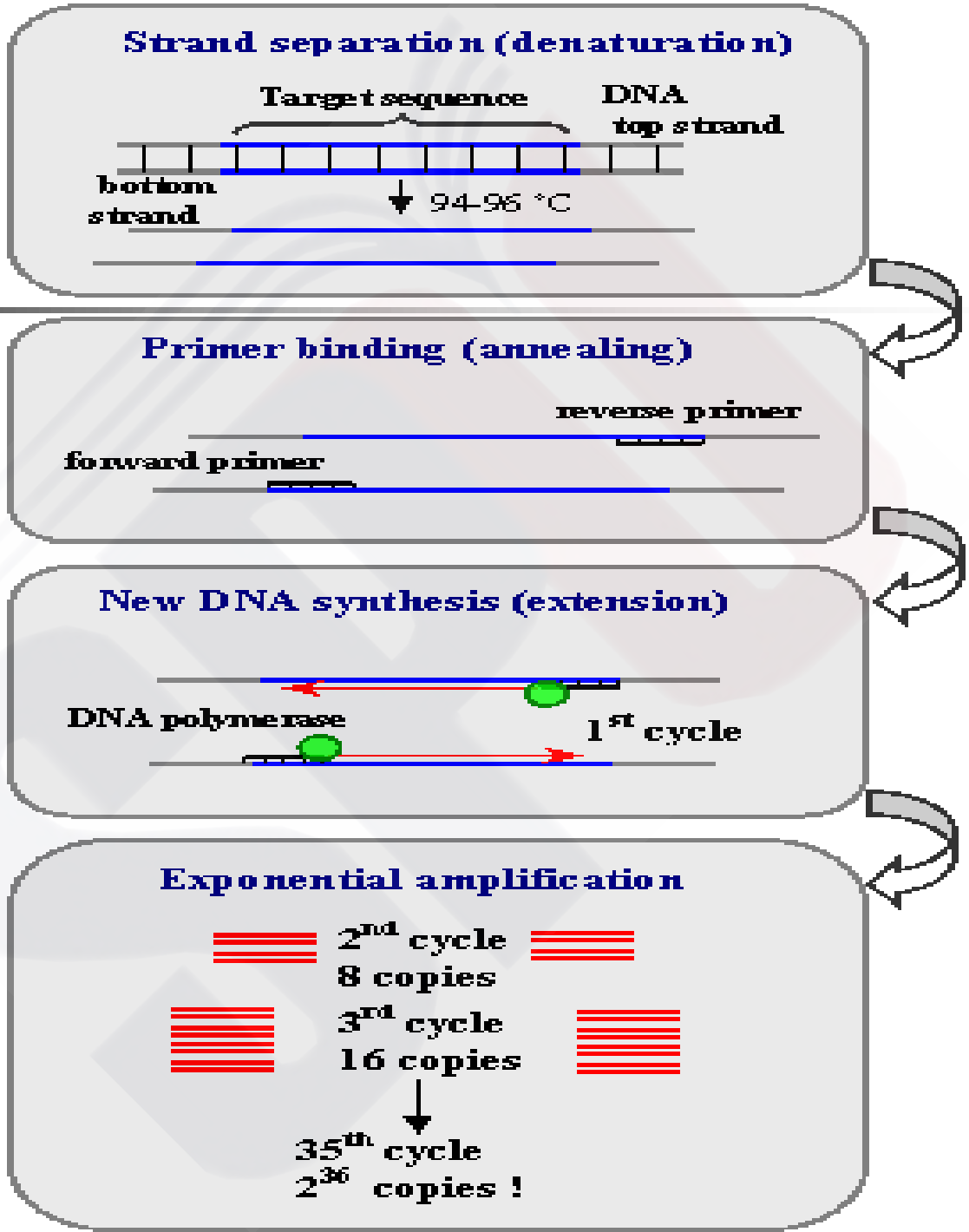
3. تدمج أجزاء خاصة من DNA (هي الصفة الوراثية المرغوبة) في تتابع نوكليوتيدات البلاسمية ويدخل ثانية في الجرثوم.

4. تكاثر الجرثوم الذي يسمى التنسيل او الاستنساخ Cloning .

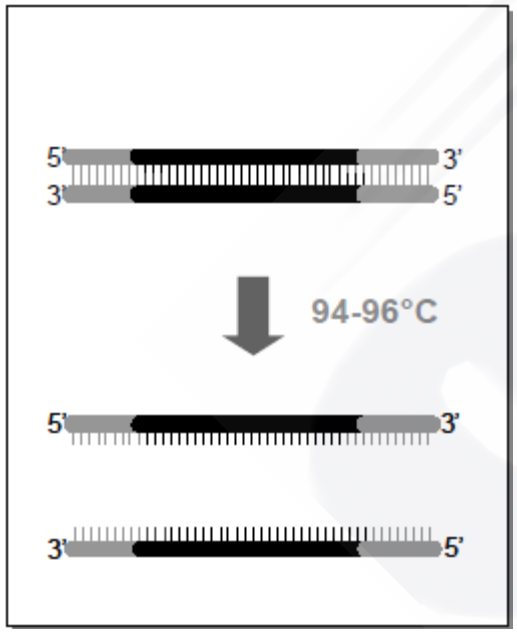
إن تكاثر جزيئات DNA المؤشبة واختيار الأصلح لغرض معين هو الاستنساخ (او التنسيل).

ملخص الدنا والرنا وتدفق المعلومات الوراثية

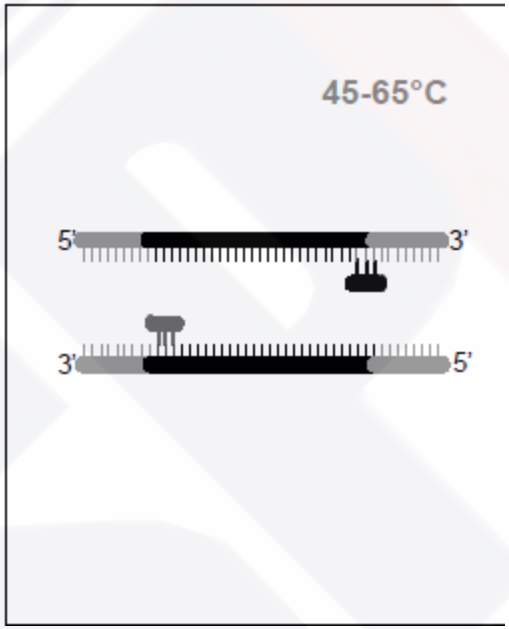
- الدنا والرنا بوليميرين طويلين ، يسميان بالحمضين النوويين.
- تخزن المعلومات الوراثية في تتابع من أربعة أسس على طول سلسلة الدنا ، وتنتقل من جيل الى آخر .
- يتكون الحمضين النوويين من ٤ أسس متصلة الى عمود فقري من السكر – فوسفات .
- سلسلتي الحمض النووي فيهما تتابع أ سس مُتتامة ، ولهما بنية حلزونية مزدوجة .
- يتضاعف الدنا بأنزيمات بوليميراز ، التي تعمل وفق (القالب) االموجود template .
- يسمى انتقال معلومات الدنا **بالتعبير الجيني** ، الذي يظهر بشكل جزيئات بروتينية وظيفية (بروتينات وظيفية بنيوية ، أنزيمات وغيرها)
- يرمز للحموض الأمينية بمجموعات ، كل مكون منها من ثلاثة أسس نووية .
- غالبية جينات حقيقيات النوى هي فسيفساء من انترونات واكسونات


Strand separation (denaturation)
Target sequence
DNA top strand
bottom strand
94-96 °C
Primer binding (annealing)
reverse primer
forward primer
New DNA synthesis (extension)
DNA polymerase
1st cycle
Exponential amplification
2nd cycle
8 copies
3rd cycle
16 copies
35th cycle
236 copies !

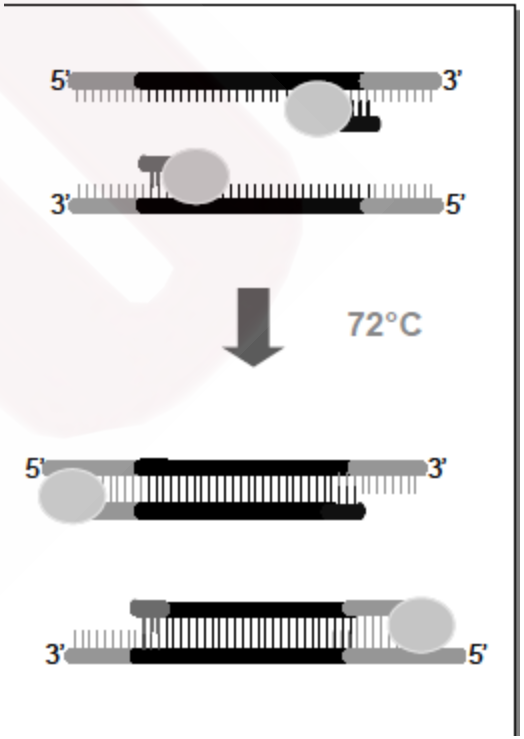
Denaturation

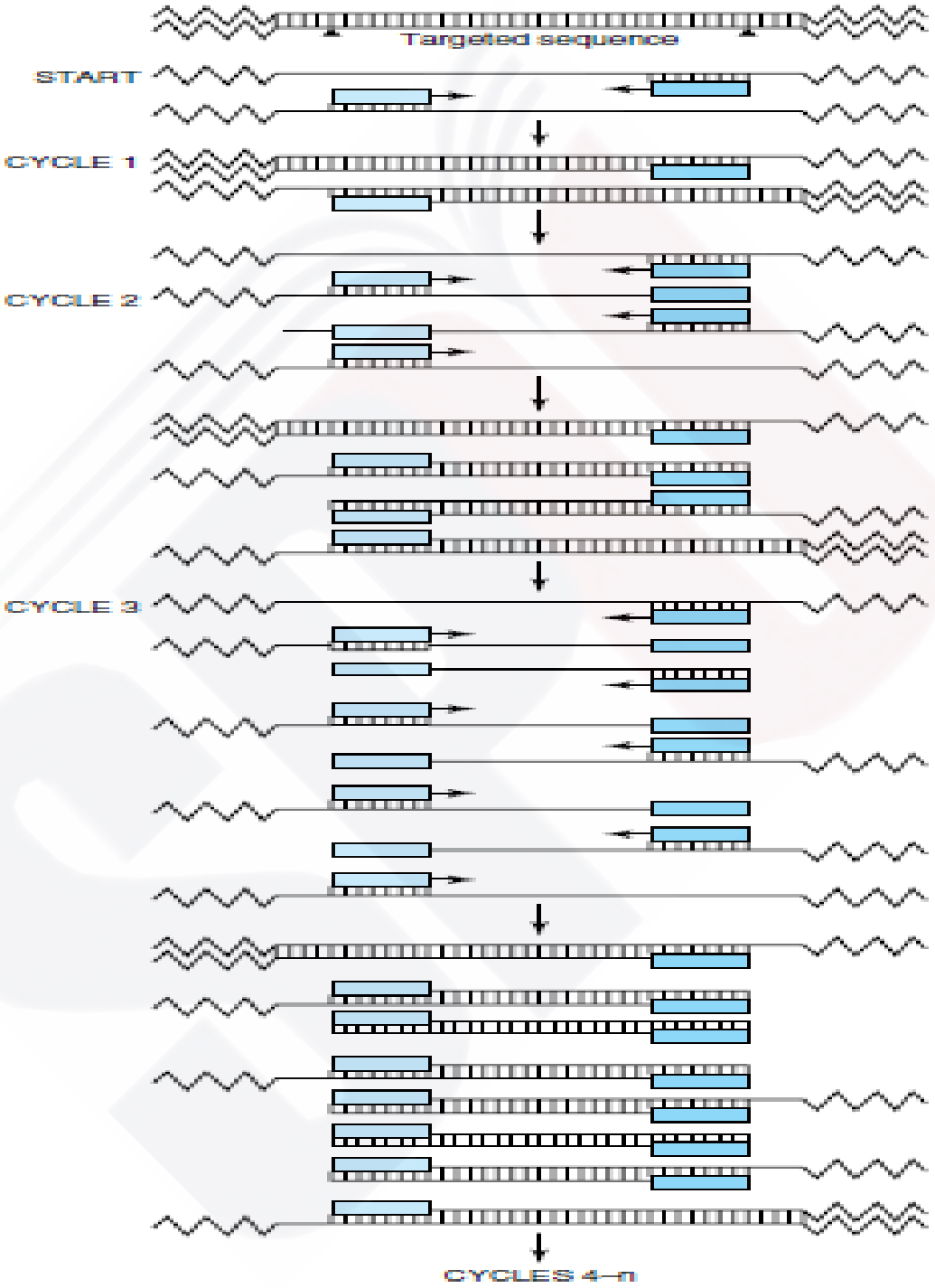


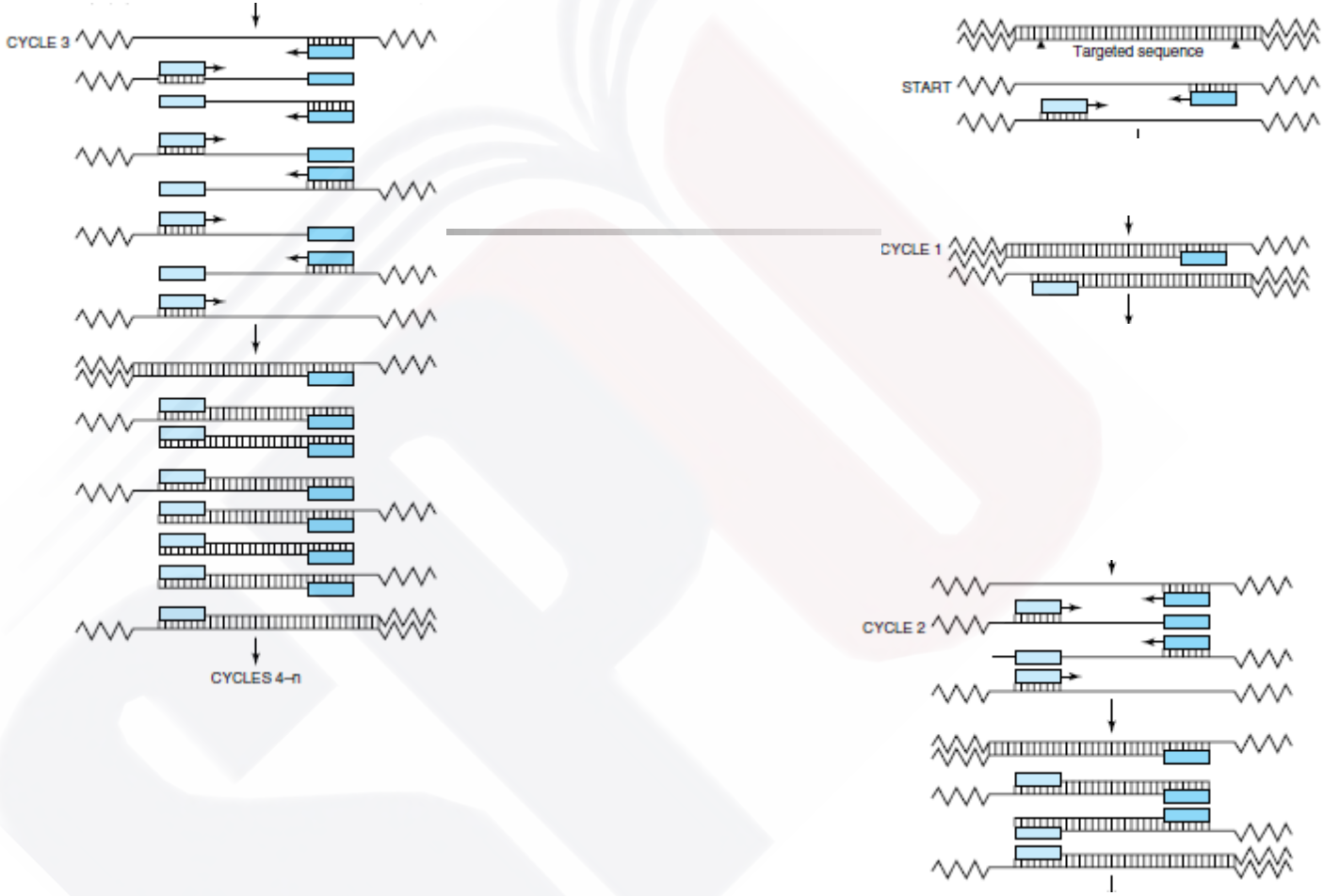
Annealing



Extension




Targeted sequence
START
CYCLE 1
CYCLE 2
CYCLE 3
CYCLES 4–n


Targeted sequence
START
CYCLE 1
CYCLE 2
CYCLE 3
CYCLES 4–n

تطبيقات طريقةPCR

عندما يضخم الدنا يمكن استخدامه في عدد من الطرق المخبرية، فقد استخدم هذه الطريقة بتقنياتها في مشروع الجينوم البشري ، لذلك نقول ان هذا المشروع اعتمد بشدة علي **PCR**.

كما أن **PCR** طريقة مهمة في عدد من الطرق الجديدة التي بدأ تطبيقها في المختبرات البيولوجية والسريرية، منها بصمة الدنا، كشاف البكتيريا أو الفايروسات (وخاصة **AIDS**)، وتشخيص الأمراض الوراثية