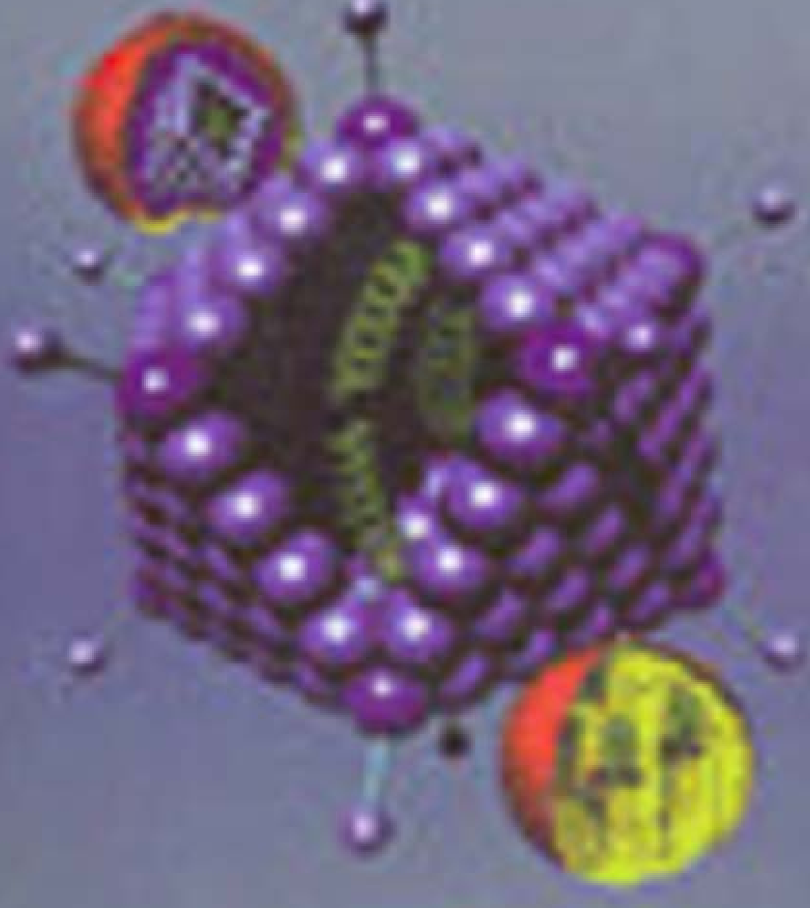
د. عبد الحسين الفيصل

الوراثة الجزيئية



د. عبد الحسين الفيصل

الوراثة الجزيئيّة

الأهلية

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿هذا خَلقُ اللهِ فأَرُوني مَاذَا خَلقَ الّذينَ
من دُونهِ بل الظالمُونَ في ضَلَلٍ مُّبينٍ﴾

صدق الله العظيم

سورة لقمان (١١)

بِسْمِ اللهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مقدمـة الكتاب

تعـتـبـر الـفـتـرة الزمنية مـا بين اكـتـشـاف قـوانين الوراثة المندلية وأعـوام الخمسينات فترة مخاض وتكوين لإرساء علم الوراثة التقليدية. إلا أن اتساع المعرفة وتطور طرق البحث العلمي وابتكار الأدوات والأجهزة المتطورة أدى إلى خلق ثورة حقيقية في مجال علم الوراثة. بحيث أن هذا العلم شهد اتساعاً لم يشهده أي علم آخر حيث أن علم الوراثة اليوم هو سلسلة طويلة ومعقدة من الفروع تبتدئ بالوراثة التقليدية لتصل يومنا هذا إلى الهندسة الوراثية والوراثة الجزيئية ولا نعرف ما يكمنه المستقبل من تطور جديد، إلا أنني على يقين بالغ بأن هذا العلم سيلعب دوراً مهماً في حياة الإنسانية في الحقبة القادمة من التأريخ الإنساني وخصوصاً بعد أن أدخل هذا العلم كسلاح لتدمير الإنسانية شأنه شأن الأسلحة الفتاكة بدل أن يستخدم استخداماً سليماً لإرساء حضارة الإنسان والحفاظ عليه.

كان لا بد لنا نحن العرب وقد سطعت شمس علومنا على جميع أرجاء المعمورة لمئات السنين قبل انطفائها أن نوقد شعلة النور هذه من جديد لنعيد للأمة العربية مكانتها وهيبتها وأن نأخذ مكاننا قوياً تحت الشمس وبجدارة علومنا وتأريخنا المشرف.

إنه ليحدوني الأمل بأن أجد هذا الجهد المتواضع يأخذ مكانه الصحيح في طريقنا الطويل نحو الضياء والنور أملاً به أن أبدد بعض الظلام وأن أقدم من خلاله شمعة يستنير بنورها طلاب المعرفة من أمتنا المجيدة وخصوصاً بأن مكتبتنا العربية والجامعية تفتقد إلى كتاب يتحدث عن علم حديث جداً في

مجال الوراثة ألا وهو الوراثة الجزيئية. لقد دفعتني الرغبة في أن أكون السباق في وضع مثل هذا الكتاب وخصوصاً بأنه يمثل اختصاصي الدقيق المشاركة المخلصة والأمينة في مسيرة النور العربية وقد توخيت فيه البساطة في السرد والتفصيل في المعلومات للإبقاء على الأهداف العلمية للكتاب كما ضمنته أحدث ما وقع تحت يدي من معلومات حول الوراثة الجزيئية بالإضافة للرسوم التوضيحية.

لقد وضع هذا الكتاب ليتناسب مع طلبة علوم الحياة في كلية العلوم والتربية بالإضافة لطلبة كليات الطب والزراعة لصلته الوثيقة ببعض تخصصاتها.

نشرت الطبعة الأولى من هذا الكتاب من قبل جامعة التحدي ـ سرت ـ ليبيا ومع حرص الجامعة الكبير ألا أن الكتاب جاء مترافقاً مع العديد من الاخطاء الطباعية وخصوصاً في الاشكال لعدم التزام الناشر في أعادة مسودة الكتاب للتدقيق قبل الطباعة النهائية لأسباب غير معروفة. لذلك فأن دار الأهلية للنشر والتوزيع ـ عمان ـ الأردن أخذت المسؤولية في نشر الطبعة الثانية بعد تنقيحها. وقد وجدتها فرصة ثمينة لأجل تطوير بعض فصول الكتاب وهكذا تم تطوير الفصل الأول ليصبح أكثر أتساعاً وتفصيلاً والفصل الثامن والحادي عشر حيث أضيف إليهما المزيد من المعلومات كما أضيف فصلاً جديداً عن السرطان ووراثته الجزيئية تم فيه تفصيل الأحداث الوراثية الدقيقة لدخول الخلايا الطبيعية إلى مرحلة السرطان.

وفي الختام ... أقدم أخلص الشكر والتقدير للدار الأهلية للنشر والتوزيع على تبنيها نشر الطبعة الثانية من هذا الكتاب والله الموفق.

د. عبد الحسين مويت الفيصل

محتويات الكتاب

مقدمة الكتاب : الصفحة

الفصل الأول : الأساس النظري والخلوي للتوريث 9

- قوانين مندل والاساس النظري للتوريث 11
- الاساس الوراثي للصفات 17
- التجاذب والتنافر 27
- الارتباط التام 30
- المجموعات المرتبطة 32
- العبور 35
- الأساس الخلوي للتوريث 37
- الانقسام غير المباشر 38
- الانقسام الاختزالي 43
- الانقسام الاختزالي في الأعضاء الجنسية الحيوانية 46
- الانقسام الاختزالي في النباتات 49
- السيادة غير التامة 52

الفصل الثاني : الطبيعة الوراثية للحامض النووي منقوص الأكسجين 53

- هل أن الحامض النووي منقوص الأكسجين هو المادة الوراثية ؟ 55
- تجارب المكورات المسبحية لذات الرئة 56
- تجارب المكورات الثنائية لذات الرئة 58
- تجارب هيرشي وشاس على العاثي 60
- تجارب كونرات وسانجر على راشح التبغ الموزائيكي 63
- مميزات المادة الوراثية 65
- موقع الحامض النووي منقوص الأكسجين في الخلية 69
- تركيب صبغي الأحياء بدائية النواة 70
- تركيب صبغي الأحياء حقيقية النوى 72
- تنظيم الحامض النووي في صبغيات الأحياء حقيقية النوى .. 76
- المجينات والصبغيات 79

الفصل الثالث : **التوليف الكيميائي للحامض النووي** 81
- التركيب الكيميائي للحامض النووي منقوص الأكسجين ... 84
- ثبات التركيب الكيميائي للحامض النووي منقوص الأكسجين 89
- النموذج الثلاثي الأبعاد للحامض النووي المنقوص الأكسجين (نموذج الحلزون المزدوج) 91
- التركيز المولاري للقواعد النيتروجينية في الحامض النووي 96
- الحامض النووي الريبوزي 98
الفصل الرابع : **تضاعف الحامض النووي منقوص الأكسجين** 101
- الشكل العام لتضاعف الحامض النووي منقوص الأكسجين 104
- التضاعف شبه المحافظ في الأحياء 107
- التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي في البكتريا 107
- التضاعف شبه المحافظ في الرواشح والعاثيات 111
- التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي في حقيقيات النوى 116
- التظهير بالإشعاع الذاتي لعملية تضاعف الحامض النووي 118
- آلية تضاعف الحامض النووي 121
- التضاعف من موقع أصل واحد 121
- التضاعف من مواقع أصل متعددة 124
- الأنزيمات المرافقة لعملية تضاعف الحامض النووي 126
الفصل الخامس : **بناء الحامض النووي** 131
- بناء أشرطة الحامض النووي المنقوص الأكسجين 134
- بناء الحامض النووي في القطع الصغيرة (قطع أوكازاكي) .. 139
- تأسيس أشرطة الحامض النووي باستخدام بادئات حامض نووي ريبوزي 141
الفصل السادس : **تعبير المورثات** 147
- البروتينات والأحماض الأمينية 150
- الاستنساخ 152
- أنزيمات بلمرة الحامض النووي الريبوزي 152
- استنساخ الحامض النووي الريبوزي المرسال 154

- أهمية منطقتي المحفز والمنهي في عملية الاستنساخ 158
- ملخص عملية استنساخ الحامض النووي المرسال 161
- عملية ما بعد استنساخ الحامض النووي المرسال 161
- عمليات القطع والإضافة في الحامض النووي المرسال الأولي 164
- استنساخ الحامض النووي الناقل 166
- استنساخ الحامض النووي الريبوزي الريبوسومي 169
- الترجمة وبناء البروتين 171
- الشفرة الوراثيـة 178
- نظرية الأرجوحـة 183
- ملخـص 186

الفصل السابع : **تنظيم تعبير المورثات** 191
- آلية الحث والكبت 194
- أوبرون اللاكتور القابل للحث 198
- دور بروتين تنشيط الهدم وأحادي فوسفات الأدينوسين الحلقي في التحكم الموجب في أوبرون لاك 200
- أوبرون التربتوفان 202
- أوبرون الأرابينوز 203
- التخصص الوظيفي والاختلاف المظهري في خلايا النوع الواحد 204
- السيطرة الهرمونية في عملية الاستنساخ 208
- التحكم الوراثي في الخلايا السرطانية 210
- ملخـص 214

الفصل الثامن : **الآلية الجزيئة للارتباط والعبور** 219
- مقدمة 221
- الألية الجزئية للعبور 225

الفصل التاسع : **الطفرات الوراثية وإصلاح الحامض النووي** 235
- الطفرات التلقائية والمستحدثة 238
- الطفرات الوراثية في الخلايا الجسمية والجنسية 240
- التغييرات المظهرية المرافقة للطفرات الوراثية 242

- أخطاء الأيض الموروثة 244
- مرض البول الأسود 244
- مرض البول الكيتوني الوراثي 245
- مرض الخلايا المنجلية الوراثي 245
- تجارب العالمان بيدل وتاتوم على عفن الخبز (نيوروسبورا) ....
- الطفرات المستحثة 248
- الطفرات المستحثة بواسطة عوامل حيوية 249
- الطفرات المستحثة بواسطة عوامل فيزيائية 252
- الإصابة المفردة 252
- الطفرات المستحثة كيميائياً 253
- فحص إيمز للمواد الكيمياوية المسرطنة 260
- الآلية الجزيئية لحدوث الطفرات الوراثية 262
- الآلية الجزيئية لحدوث الطفرات الوراثية التلقائية 262
- الآلية الجزيئية للطفرات الوراثية المستحثة 264
- إصلاح أضرار الحامض النووي 265
- آليات إصلاح أضرار الحامض النووي 267
- تفاعل التنشيط الضوئي 267
- الاستئصال 268
- إزالة المجاميع الكيميائية 270
- إصلاح الحامض النووي للاتحادات الجديدة 272

الفصل العاشر : الحامض النووي البلازميدي والمايتوكونديري والبلاستيدي ... 275
- بلازميدات الخصوبة 279
- العناصر الانتقالية وعناصر الإدخال 286
- الحامض النووي الما يتوكونديري 288
- الحامض النووي البلاستيدي 292

الفصل الحادي عشر : الهندسة الوراثية 295
- مقدمة 297
- المبادىء العامة في الهندسة الوراثية 300
- أنزيمات الهندسة الوراثية 301

- أنزيمات هدم الأحماض النووية 302
- الأنزيمات المقيدة أو القاطعة 303
- أنزيمات بلمرة الحامض النووي 307
- أنزيمات اللحام 308
- تحوير النهايات العمياء 310
- الروابط 310
- التوصيلات 311
- التذييل بالبوليمر المتجانس 314
- أنزيمات تحوير الحامض النووي 316
- أنزيمات إزالة الانطباق 317
- إستخلاص الحامض النووي DNA و RNA 318
- نواقل الهندسة الوراثية 323
- البلازميدات 325
- العاثيات 332
- الكوزميدات 340
- نواقل التعبير 340
- تقطيع الأحماض النووية بالأنزيمات 341
- أستخلاص القطع المناسبة 342
- بنك المورثات 342
- حساب حجم بنك المورثات 344
- تشخيص الكلونات الحاوية على مورث معين 345
- الطريقة المناعية 346
- طريقة التهجين النووي 347
- تطبيقات الهندسة الوراثية 348

الفصل الثاني عشر : **الوراثة الجزيئية للسرطان** 351
- مقدمة 353
- نظريات نشوء السرطان 354
- العوامل التي تساعد على الإصابة بالسرطان 357
- المورثات السرطانية الابتدائية والفايروسية 357

- وظائف المورثات السرطانية الخلوية والفايروسية 360
- المورثات السرطانية المشفرة لبروتينات الكاينيز المفسفرة 360
- المورثات المشفرة لعوامل النمو 362
- المورثات المشفرة لمستقبلات عوامل النمو 363
- المورثات المشفرة لبروتينات تآصر GTP 366
- المورثات المشفرة لبروتينات نووية 367
- آليات تنشيط المورثات السرطانية الخلوية 371
- تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بالفايروسات 371
- تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بالطفرات الوراثية 373
- تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بالانتقال الكروموسومي 376
- تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بتضخمها وزيادة تعبيرها ... 379
- تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بالتآزر الجيني 380
- فقدان أو عطب المورثات الكابتة للسرطان 381
- الموت المبرمج للخلايا والسرطان 382
- دور العوامل الكيمياوية والفيزياوية والبايولوجية في نشوء السرطان 384
- آلية انتشار النقائل السرطانية 386
المراجع : 391
الأجنبية : 392

الفصل الأول
الأساس النظري والخلوي للتوريث

المحتويات

- قوانين مندل والأساس النظري للتوريث
- الأساس الوراثي للصفات
- التجاذب والتنافر
- الارتباط التام
- المجموعات المرتبطة
- العبور
- الأساس الخلوي للتوريث
- الانقسام غير المباشر
- الانقسام الاختزالي
- الانقسام الاختزالي في الأعضاء الجنسية الحيوانية
- الانقسام الاختزالي في النباتات
- السيادة غير التامة

مقدمة :

يعتبر علم الوراثة الجزيئية الآلية الدقيقة للصور المتنوعة في الوراثة. لذا فأنه يستند في حقيقته إلى كل علوم الوراثة ويرتبط معها بوشائح عميقة. فهو ينسل عميقاً في أغوار طبيعة التوارث والمورثات ويتابع آلية عملها وانتقالها إلى الأجيال الجديدة ويرصد كل شاردة أو واردة لها علاقة في ذلك. لذا فأن الحديث عن الوراثة الجزيئية يبقى مقطوعاً بدون الحديث عن الأساس النظري والخلوي للتوريث.

لهذا فأن خير ما نستهل به في هذا الكتاب هو الحديث عن الأساس النظري الذي أرساه مندل والأساس الخلوي عبر دور الصبغيات والمورثات في ذلك.

قوانين مندل والأساس النظري للتوريث :

بدأ علم الوراثة الحديث عام **1955** عندما أعيد اكتشاف أبحاث العالم جريجور مندل وبعد حوالي خمسة وثلاثون سنة من نشرها. عبر مندل خلال أبحاثه تلك عن أن الصفات تمر عبر وحدات معينة موجودة في الخلايا وتنتقل هذه الوحدات من جيل إلى آخر. لم يعتمد مندل في توضيح حقائق التوريث

على تتابعات داخلية عبر دراسة الخلايا كما هو عليه اليوم بل أعتمد صيغة أحصائية دقيقة لصفات مرئية لأزواج من الصفات النقية الواضحة لنبات البازلاء **Pissum stivum** التي تعقبها جيلاً بعد جيل ودونها في سجلات مرتبة ترتيباً دقيقاً إلى درجة أنها أستخدمت مرة أخرى لإعادة التأكد من نتائجه والنتائج اللاحقة التي حصل عليها علماء آخرين. توصل مندل عبر تجاربه الطويلة التي نشر نتائجها في خمس وخمسون صفحة إلى أن النبات لا يظهر الأصفة واحدة من زوج الصفات المستخدمة ولا تلبث الصفة المتنحية أن تظهر في الجيل الثاني بنسبة معينة ثابتة. كما وجد بأن الصفات تتوزع توزيعاً حراً وأن الصفة المتنحية لا بد وأن تظهر عبر جيل أو أكثر.

لم يكن مندل يعرف ما يدور حوله من أبحاث علمية تدور حول فكرة الوراثة. فقد نشر العالم الألماني أوغست فايسمان كتاباً في العالم **1892** سماه « بالبلازما الجرثومية » ضمنه آراءه الوراثية والتي شملت آراءه حول أشتراك الأب والأم في وراثة أبناءهما وأن التكاثر الجنسي يؤدي إلى أتحادات من العوامل الوراثية.

كما شملت أراءه أن الصفات موجودة على هيئة عوامل محمولة على الكروموسومات التي شاهدها في نوى الخلايا. وأن هناك الآلاف من هذه العوامل. إلا أنه لم يستوعب أنها جميعاً تقع على الكروموسومات لظنه أن الكروموسومات أصغر من أن تحتملها جميعاً. أن معظم هذه الآراء غير مسندة ببراهين إلا أنها جاءت مطابقة لم توصل إليه مندل في تجاربه على نبات

البازلاء. وقد أستخدم هذا الكتاب الذي ترجم إلى عدة لغات كسند علمي ومصدر رئيسي لنظرية العالم الأمريكي آ.ب ويلسون التي أطلق عليها « نظرية وراثة الكروموسومات » التي ظهرت في العالم 1896.

أختلفت طريقة البحث العلمي التي أتخذها العامل مندل لدراسة التوارث فبدلاً من الإهتمام بعدد كبير من الصفات مرة واحدة كما فعل سابقوه ركز جل أهتمامه في دراسة صفات منفرده ليتابعها جيلاً أثر جيل حاسباً عدد الطرز المظهرية من كل فئة في كل جيل ومدوناً أياها في سجلات دقيقة الترتيب.

أختار مندل نبات البازلاء دون أن يذكر سبب أختياره ذلك. لكن صفات هذا النبات التي قد لا يكون مندل قد أنتبه إليها ساهمت بصورة كبيرة في نجاحه. فالنظام الزهري له مؤلف بما يضمن التلقيح الذاتي وتوفير ظروف سهلة لعمل تلقيح خلطي مسيطر عليه. كما أن الهجائن الناتجة من التهجين الخلطي خصيبة وأن هناك أصنافاً عديدة من هذا النبات ذات صفات مظهرية مميزة مثل طول الساق والبذور وطبيعة البذور وموضع الأزهار وغيرها.

الأساس الوراثي للصفات:

أجرى مندل تجاربه على نباتات تختلف في زوج واحد من الصفات مثل الأختلاف في طول الساق أو لون الأزهار وغيرها وتابع توارث هذه الصفات لعدة أجيال ودون المعلومات والنتائج الخاصة بكل تلقيح.

فمثلاً عند تلقيح نبات بازلاء ذو بذور ملساء الشكل مع آخر ذو بذور مجعدة ونقي كانت أفراد الجيل الأول جميعها نباتات ذات بذور ملساء وأطلق مندل على صفة ملساء البذور بالصفة السائدة **Dominant** وعلى الصفة مجعدة البذور بالصفة المتنحية **Recessive**. ترك مندل أفراد الجيل الأول **(F1)** ملساء البذور تتلقح ذاتياً وحصل نتيجة ذلك على الجيل الثاني (**F2**) ووجد

بأن هذا الجيل (F2) يتألف من صفتين مظهريتين هما نباتات بذور ملساء وأخرى نباتات ببذور مجعدة (الصفة التي تنحت في الجيل الأول) .

نبات ذو بذور مجعدة × نبات ذو بذور ملساء P

↓

نباتات ذات بذور ملساء F1

F1×F1

↓

نباتات ذات بذور مجعدة : نباتات ذات بذور ملساء F2

النسبة المئوية 3 : 1

وجد مندل أنه في حالة ترك أفراد الجيل الثاني مجعدة البذور بالتلقيح بينها فأنها تعطي نسلا جميعه ذو بذور مجعدة بينما أعطى أفراد الجيل الثاني ملساء البذور نتائج مختلفة فبعضها أعطى نباتات ذات بذور ملساء كاملة والأخرى أعطت نباتات ذات بذور ملساء وأخرى مجعدة بنسب 3 : 1.

ومن نتائج تجاربه هذه وجد ما يلي :

– أن أحد الصفتين اللتين أستخدمتا في الدراسة أختفت في أفراد الجيل الأول الناتجة من تلقيح الأباء (P) .

-ظهور الصفة المتنحية التي أختفت في الجيل الأول في أفراد الجيل الثاني وكانت نسبة النباتات ذات البذور الملساء (السائدة) إلى النباتات ذات البذور المجعدة (المتنحية) لتساوي 3 : 1 .

أستنتج من هذه النتائج أن الصفات هي ليست مزجاً بين صفات الأم والأب كما كان يعتقد لعدم حصوله على نباتات جيل أول وسط في صفاتها

بين الأبوين. كما أستنتج أيضاً بأن الصفات تنعزل مرة ثانية في الجيل الثاني بنسبة 3 : 1.

قام مندل بعد ذلك بإعادة تجاربه على نبات البازلاء مستخدماً صفات مظهرية أخرى كطول الساق ولون الزهرة وموضعها ولون البذور وتوصل في جميع تجاربه هذه إلى نفس النتائج التي حصل عليها من تجربته على صفة طبيعة البذور.

فسر مندل ملاحظاته السابقة كما يلي:

يتحكم في إظهار الصفات عدد من العوامل الوراثية (وحدات Units) ويحدد كل صفة عاملان مستقلان يأتي أحدهما من أحد الأبوين والأخر من الأب الثاني ويكون عاملا كل صفة متماثلين أو غير متماثلين إحداهما سائد على الآخر. وعندما يتواجدان في فرد بصورة غير متماثلة يحجب المتنحي منهما عن الظهور بواسطة العامل الآخر السائد.

فمثلاً فسر أختفاء صفة مجعد البذور في الجيل الأول F1 الناتج عن تلقيح الأبـــاء (P) بأن نباتات الجيل الأول الملساء البذور تحتوي على عاملي الصفة إحداهما جاء من الخلية الجنسية الذكرية والآخر من الخلية الجنسية الأنثوية وأن صفة أملس البذور تسود سيادة تامة على صفة مجعد البذور مسببة اختفاء أثرها. وأن ظهور صفة مجعدة البذور في نباتات الجيل الثاني F2 يعود إلى أن هذه الصفة وجميع الصفات المتنحية الأخرى لا تظهر إلا حين يجتمع عاملي الصفة المتنحية بشكل نقي في النبات وهو ما يؤكد أنعزال الصفات في الجيل الثاني. وأطلق تبعاً لذلك مصطلحات سائد نقي وسائد هجين ومتنحي نقي.

أستخدم مندل الحروف الإنجليزية للدلالة على العوامل حيث إستخدام الحرف الإنجليزي الكبير للدلالة على العامل السائد والحرف الإنجليزي الصغير

للدلالة على العامل المتنحي.

جيل الأباء (P) نبات أملس البذور X نبات مجـعـد

النمط المظهري Phenotype

DD **dd**

النمط الوراثي Genotype

↓

الجيل الأول (F1) نبات ملساء البذور

Dd « سائد هجين »

F1×F1

↓

الجيل الثاني (F2) نباتات ملساء البذور: نباتات مجعدة البذور

DD + **2Dd** : **dd**

سائد نقي سائد هجين متنحي

استخدم مندل نوعان من التهجينات لتمييز النباتات السائدة النقية والسائدة الهجينة لأجل التأكد من النتائج التي حصل عليها وهذه التهجينات هي التهجين الأختباري Test Cross بين أحد أفراد الجيل الثاني والأب المتنحي والتهجين الرجعي Back Cross بين أحد أفراد الجيل الأول وأي من الأبوين.

1- تهجين اختباري

(F1) نبات أملس البذور X نبات مجعد البذور(P).

Dd ↓ **dd**

نبات أملس البذور : نبات مجعد البذور

Dd %50 : **dd %50**

2- تهجين رجعي

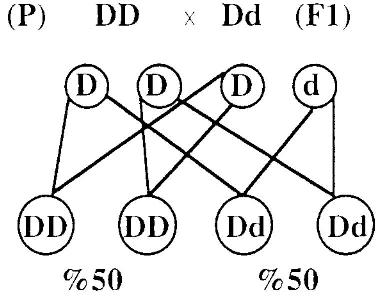
(f1) نبات أملس البذور X نبات أملس البذور (P)

Dd ↓ DD

نباتات ملساء البذور 100%

50% Dd + DD 50%

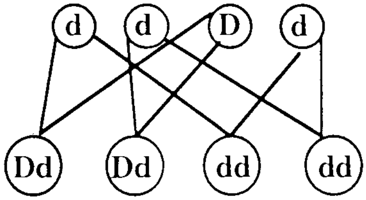
أستنتج مندل من هذه التجارب بأنه في حالة التضريب بين أفراد الجيل الأول F1 مع الأب السائد فإن النسل الناتج يكون جميعه أملس البذور بنوعين من التركيبات الوراثية (DD , Dd) وذلك تبعاً لما أفترضه في بداية تجاربه. وأن النسبة متساوية لكل من التركيبين الوراثيين وكما يلي:



نباتات التهجين الرجعي / ذات صفة سائدة

كما أستنتج بأن التضريب بين نباتات الجيل الأول مع الأب المتنحي والذي يؤدي إلى الحصول على 50% لكل من الصفتين يؤكد حصول أنعزالهما. كما يؤكد بأن أفراد الجيل الأول السائدة هي في الواقع سائدة هجينة Dd وليست نقية وكما يلي:

(P) dd × Dd (F1)

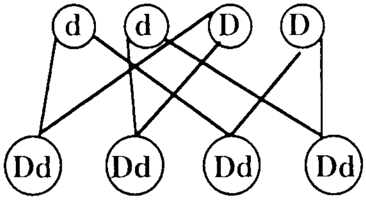


%50 %50

مجعدة البذور ملساء البذور

نباتات التهجين الاختباري / في حالة أن الفرد من **F1** سائد هجين **Dd** .

(P) dd × DD (F1)



%100 ملساء البذور

التهجين الاختباري / في حالة أن الفرد (**F1**) سائد نقي .

إن جميع التجارب التي أجراها العالم مندل تؤكد صحة فرضيته التي تقول بأن العوامل المسؤولة عن الصفات موجودة على هيئة مفردة في كل من الخلايا الجنسية الذكرية والأنثوية وتلتقي هذه بعد الأخصاب لتصبح مزدوجة ويعتمد تعبيرها على سيادة العامل أو تنحيه وأطلق على هذه العوامل بالاليلات التي تؤلف بعد أزدواجها ما يعرف بالمورثات **Genes** .

ونتيجة لذلك فإن هناك أفراد ذوو اليلات مختلفة وأخرى ذات اليلات متماثلة **DD** أو **dd** . سميت ملاحظات مندل هذه فيما بعد بقانون مندل .

الأول أو قانون الأنعزال (Law of Segregation جدول (2 - 1) .

(جدول 2 - 1) :

النتائج الحقيقية التي حصل عليها مندل في تجاربه على الصفات السبعة لنبات البازلاء.

الصفات	السائدة		المتنحية		المجموع
	العدد	%	العدد	%	
طول الساق	787	73,69	277	26,04	1064
لون الأزهار	705	75,89	224	24,11	929
موضع الأزهار	651	75,87	207	24,13	858
شكل البذور	5474	74,74	1850	25,26	7324
لون الفلقة	6022	73,06	2001	24,94	8023
شكل القرنات	882	74,68	299	25,32	1181
لون القرنات	428	73,79	152	26,21	580

على الرغم من النتائج الباهرة التي حصل عليها مندل من خلال تجاربه السابقة والتي خرج منها بفرضية مع إثباتاتها إلا أن طموحه العلمي في توفير حقائق أكثر لأسناد فرضياته دفعة إلى اللجوء إلى التضريب بين نباتات ذات صفتين مختلفتين لمعرفة فيما إذا كانت هذه الصفات تتصرف بصورة مستقلة أو غير مستقلة وهو ما أطلق عليه بالهجين الثنائي (Dihybrid Crosses).

كان أحد التضريبات التي أجراها مندل هو التضريب بين نباتي بازلاء الأول ذو بذور مستديرة صفراء اللون والآخر ذو بذور مجعده خضراء وكانت

نتائج الجيل الأول توضح بأن البذور هي صفراء اللون مستديرة مما يبين أن اللون الأصفر والبذور المستديرة هي الصفات السائدة. وعندما أجرى التضريبات لنباتات الجيل الأول (F1 X F1) حصل على النتائج التالية:

الأباء (P) نبات ذو بذور صفراء مستديرة X نبات ذو نبات خضراء مجعدة

mmrr ↓ MMRR

الجيل الأول (F1) نباتات صفراء البذور مستديرة

Mm Rr

F1×F1

↓

	عدد النباتات	النسبة المئوية
نباتات ذات بذور صفراء مستديرة	315	9
نباتات ذات بذور صفراء مجعدة	101	3
نباتات ذات بذور خضراء مجعدة	32	1
نباتات ذات بذور خضراء مستديرة	108	3

أستنتج مندل من هذه النتائج بأن النسب التي ظهرت في الجيل الثاني تساوي 9 : 3 : 3 : 1 وأن 9/16 من المجموع الكلي للنباتات ذات صفات سائدة (بذور صفراء، ومستديرة) مقارنة مع 1/16 من المجموع الكلي للنباتات تظهر فيها الصفات متنحية. وهو ما يدل على الإنعزال الحر للصفتين دون أن يتأثر أحدهما بالآخر بدليل أن نتائج 1 : 3 : 3 : 9 هي في الواقع حاصل ضرب النسبة 1 : 3 × 1 : 3 التي تمثل نسبة كل من الصفات المتنحية والسائدة أستناداً إلى قانون مندل الأول. ولأجل الزيادة في توضيح كيفية حصول مثل هذا التوزيع الحر فأنه لا بد من العودة إلى أنواع الخلايا الجنسية التي تنتجها نباتات الآباء ونباتات الجيل الثاني وإعتماداً على أن عملية الأخصاب تخضع كلياً للصدفة.

أن أفـراد نبـاتـات الأباء (نبـات ذو بذور صـفـراء مـسـتـديرة ونبـات بذور خـضـراء مجـعـدة (تنتج نوعـان من الخـلايا الجنسـيـة وهي MR و mr) وعـنـد الأخـصـاب فأن الخلية المخصبة ستحمل زوجين من العوامل وهي Mm Rr وهـي تمثل نباتات الجيل الثاني ذات البذور المستديرة الصفراء.

أما أفراد هذا الجيل فأنهـا تنتج أربعة أنواع من الخلايا الجنسية وهي MR، Mr، mR، mr وعند الأخصاب فإن هناك 16 احتمالاً وهي :

9 MMRR , MMRr , MmRR , MmRr

وهي تمثل النباتات ذات البذور المستديرة الصفراء.

3 MMrr , Mmrr

وتمثل النباتات ذات البذور المستدير الخضراء.

3 mmRR , mmRr

تمثل النباتات ذات البذور الصفراء المجعدة.

1 mmrr

وتمثل النباتات ذات البذور الخضراء المجعدة.

واستناداً إلى قانون مندل الأول فإننا نستطيع تجميع النتائج السابقة كالتالي :

نباتات ذات بذور مستديرة 315 + 108 = 423 = 76,08٪

نباتات ذات بذور مجعدة 101 + 32 + 133 = 23,92 ٪

1:3

نباتات ذات بذور صفراء 315 + 101 = 416 = 74,82٪

نباتات ذات بذور خضراء 108 + 32 = 140 = 25,18٪

1:3

على اعتبار أن النتائج تمثل تضريباً أحادي لزوج واحد من الصفات في كل مرة .

ويظهر من التحليل السابق بأن 3/4 النباتات هي نباتات ذات بذور مستديرة و 3/4 نباتات ذات بذور صفراء و 1/4 نباتات ذات بذور خضراء و 1/4 ذات بذور مجعدة وعند ضرب هذه النسب أعتماداً على الصفات المظهرية لنباتات الجيل الثاني فأنه يمكن الحصول على النتائج التالية :

النباتات ذات البذور الصفراء المستديرة 3/4 × 3/4 = 9/16

النباتات ذات البذور الصفراء المجعدة 3/4 × 1/4 - 3/16

النباتات ذات البذور الخضراء المجعدة 1/4 × 1/4 = 1/16

النباتات ذات البذور الخضراء المستديرة 1/4 × 3/4 = 3/16

وأعاد مندل تجاربه في التضريبات الزوجية لعدد من الصفات الأخرى وتوصل إلى نفس النتائج .

كان من حظ مندل أن جميع الصفات التي قام بدراستها وتحليلها هي صفات تتبع السيادة التامة أو التنحي التام دون أن يكون هناك وسطاً بينهما أذ لولا ذلك لكان نصيبه مثلما كان نصيب غيره من العلماء مثل كولر ينتر وجارتنر .

أعاد مندل مرة أخرى التهجين الأختباري بين أفراد الجيل الأول والأب المتنحي للتأكد من التركيب الوراثي لافراد الجيل الأول وتنبأ بحصوله على نسبة ثابتة 1/4 لكل من الفئات المظهرية الأربعة التي حصل عليها من الجيل الثاني وهو ما حصل عليه فعلاً . ويستمر سريان قاعدة الإنعزال الحر عند التضريب بين نباتين بثلاثة صفات أو أكثر إلا أن التحليل الوراثي سيكون أكثر تعقيداً فالتضريب بوجود ثلاثة صفات سوف يؤدي إلى الحصول على نباتات

جيل أول مؤلفة من فئة مظهرية واحدة ذات تهجين ثلاثي وتبعاً للتوزيع الحر فأنه سوف تتكون ثمانية أنواع من الخلايا الجنسية، أما في الجيل الثاني فإن عدد الإتحادات الممكن حصولها هو 64 إتحاداً ويصبح الأمر أكثر تعقيداً عند استخدام التضريب بين نباتات تختلف في أكثر من ثلاثة صفات مستقلة.

لقد قادت ملاحظته الثانية إلى وضع قانونه الثاني المسمى بقانون الانعزال الحر Law of Independent assortment.

التجاذب والتنافر : Coupling and Repulsion

افترض مندل أن الإتحادات بين الأمشاج المذكرة والمؤنثة تتم بصورة عشوائية في جميع احتمالات الإخصاب الممكنة بينهما. إلا أنه أثناء تجارب العالمين بيتسون وبانيت (1906) على نبات بازلاء الزينة **Latnyrus odoratus** وجدا حالة لا ينطبق عليها قانون الإنعزال الحر. ففي تجارب التلقيح بين نباتين أصيلين أحدهما ذو أزهار قرمزية وحبوب لقاح طويلة وآخر ذو أزهار حمراء وحبوب لقاح مستديرة حصلا على النتائج التالية في الجيل الثاني :

التكرار	أحمد مستدير	أحمر طويل	قرمزي مستدير	قرمزي طويل	المجموع
الحقيقي	1338	393	390	4831	6952
المتوقع	434,5	1303,5	1303,5	3910,5	6952

لقد كانت هذه النتائج لا تتطابق مع ما هو متوقع استناداً إلى قانون مندل الثاني (9: 3: 3: 1) حيث كانت نسبة الفئات المظهرية قرمزية طويل وأحمر مستدير أعلى مما هو متوقع. فيما كانت نسبة الفئات المظهرية قرمزية مستديرة وأحمر طويل أقل مما هو متوقع.

وقد فسرا ذلك إلى وجود تجاذب بين الاليلين السائدين (قرمزي وطويل) وبين الاليلين المتنحيين (أحمر ومستدير) مما أدى إلى بقاءهما معاً في أمشاج

الجيل الأول بحيث أدت إلى ظهور نسبة غير متوقعة في الجيل الثاني وقد أطلقا على هذه الحالة بالتجاذب **Coupling** . إلا أنهما وجدا بأن التجاذب الذي ظهر في التجارب الأولى لم يظهر في تجاربهم عندما أجريا تلقيحاً بين نبات قرمزي الأزهار وحبوب لقاح مستديرة مع آخر ذو أزهار حمراء وحبوب لقاح طويلة حيث كانت نتائج الجيل الثاني كالآتي :

التكرار	أحمد مستدير	أحمر طويل	قرمزي مستدير	قرمزي طويل	المجموع
الحقيقي	1	97	95	226	419
المتوقع	26,5	78,5	78,5	235,5	419

وقد أدى الشذوذ في هذه النتائج إلى إفتراض أن الأنيلات السائدة والمتنحية لا تميل إلى الدخول في مشيجة واحدة وهو ما أطلق عليه بالتنافر **(Repulsion)** . وقد ظهر من نتائج تجارب العالم توماس مورجان وطلبته – على حشرة ذبابة الفاكهة – التي نشرها عام **1911** بأن التجاذب والتنافر ما هما إلا حالتين لظاهرة واحدة أطلق عليها بالارتباط **(linkage)** يتم من خلالها ظهور الإتحادات الأبوية بنسبة أعلى من المتوقع. فيما تنشأ الاتحادات الجديدة للمورثات المرتبطة بعملية تدعى بالعبور **(Crossing Over)** التي يتم من خلالها تبادل أجزاء من الصبغيات المتناظرة. ويعتبر كلاً من التوزيع الحر والعبور من أهم طرق إنتاج الاتحادات الجديدة من المورثات.

قام مورجان وبريجز بتلقيح ذباب الفاكهة أصلية للون الجسم الأسود والجناح المختزل – صفات ناتجة عن طفرات متنحية – مع أخرى برية ذات لون رمادي وجناح طويل ولقحت إناث الجيل الأول مع ذكر أسود اللون مختزل الجناح وقد توصلا إلى النتائج التالية :

الآباء رمادي طويل X أسود مختزل

الجيل الأول F1 رمادي طويل

التكرار	أسود مختزل	أسود طويل	رمادي مختزل	رمادي طويل	المجموع
الحقيقي	652	161	130	822	1765
المتوقع	441.25	441,25	441,25	441,25	1765

وقد تبين لهما بأن فئات الإتحادات الأبوية (رمادي طويل وأسود مختزل) كانت بنسبة أكبر من المتوقع بينما كانت الإتحادات الجديدة (رمادي مختزل وأسود طويل) أقل من المتوقع. وفسرا ذلك إلى أن توزيع الصفات الأربعة لأمشاج الاناث الخليطة لم تكن متساوية في التوزيع كما هو متوقع استناداً إلى التوزيع الحر لمندل. ويظهر بأن الاليلين السائدين (رمادي اللون وطويل الجناح) يقعان على صبغي، فيما يقع الاليلين المتنحيين (أسود اللون وجناح مختزل) على الصبغي النظير في الفرد الخليط وأطلق على ذلك بالخليط التجاذبي **(Coupling Heterozygote)**. وعندما أعادا تجربتهما مرة ثانية مستخدمين أباء رمادية اللون مختزلة الجناح مع سوداء اللون طويلة الجناح توصلا إلى نفس الاستنتاج السابق حيث كانت الاتحادات الأبوية أكبر من النسبة المتوقعة لهما فيما كانت الإتحادات الجديدة أقل من النسبة المتوقعة لها. وهو ما دل على أن المورثات المسؤولة عن صفة اللون وطبيعة الجناح مرتبطة. ويظهر الفرد الخليط هنا في أن آليل سائد وآخر متنحي تقع في كل صبغي وهو ما يطلق عليه بالخليط التنافري **(Repulsion Hetero Zygote)**.

الآباء رمادي مختزل X أسود طويل

F1 رمادي طويل

إناث الجيل الأول X ذكر أسود مختزل الجناح

التكرار	أسود مختزل	أسود طويل	رمادي مختزل	رمادي طويل	المجموع
الحقيقي	241	1418	1294	283	3236
المتوقع	809	809	809	809	3236

ويظهر من كلا التجربتين بأن صفتي اللون وطبيعة الجناح غير مرتبطتين ارتباطاً تاماً حيث كانت النسبة المئوية للاتحادات الجديدة في التجربة الأولى مقارنة بالمجموع الكلي تساوي:

$$\% \ 16.5 = \frac{100 \times 291}{1767}$$

وفي التجربة الثانية:

$$\% \ 16.2 = \frac{100 \times 524}{3236}$$

وقد أثبتت هذه النتائج وغيرها بأن النسبة المئوية للاتحادات الجديدة بين مورثات مرتبطة ثابتة إلا أنها تختلف بين الأزواج المرتبطة ووجد بأن هذه النسبة تقع بين صفر و50٪.

الارتباط التام Complete Linkage

في التجارب السابقة لوحظ بأن نسبة الفئات الأبوية والاتحادات الجديدة تختلف عن النسبة المتوقعة مما دل على وجود الارتباط غير التام. ولكن عندما أجرى تلقيح بين أبوين أصيلين من حشرات ذبابة الفاكهة أحدهما قرمزي العين ومختزل الجناح (طفرة) وآخر أحمر العين طويل الجناح (بري) كانت أفراد الجيل الأول الهجينة حمراء العيون طويلة الجناح وعندما لقحت إناث

الجيل الأول مع ذكر قرمزي العين مختزل الجناح كانت نتائج الاتحادات الجديدة تختلف عن النسبة المتوقعة مما يدل على وجود ارتباط غير تام :

الآباء : حمراء العيون طويلة الأجنحة X قرمزي العيون مختزل الجناح

↓

الجيل الأول :♀♂ حمراء العيون طويلة الجناح (هجينة) .

♀ حمراء العيون طويلة الجناح X ♂ قرمزي العيون مختزل الجناح

المجموع	حمراء طويلة الجناح	حمراء مختزلة	قرمزي طويل	قرمزي مختزل
2839	1339	151	154	1195

النسبة المئوية للاتحادات الجديد = $\frac{100 \times 300}{2839} = 10.7$ %

ولكن عندما أجرى تلقيح الذكور الهجينة (حمراء العين طويلة الجناح) لأنثى قرمزية العين مختزلة الجناح لوحظ بأن أفراد الجيل الناتجة تمثل الاتحادات الأبوية بنسب متساوية تقريباً فيما اختفت الاتحادات الجديدة مما يعتبر دليلاً على وجود الارتباط التام وعدم حصول العبور في الذكر الهجين.

(F1خلطي) ♂ أحمر العيون طويل الجناح X ♀ قرمزية العيون مختزلة الجناح

↓

519 :أحمر العيون طويل الجناح

552 :قرمزي العيون مختزل الجناح

1701 المجموع

النسبة المئوية للاتحادات الجديدة = $\frac{100 \times 0}{1071} = 0$ %

ولم يكن الشذوذ في قوانين مندل الذي لاحظه بيتسون وبانيت ومورجان هو الشذوذ الوحيد بل أكتشف العديد من الصفات المظهرية التي يتم توارثها بطريقة خاصة وشاذة عما هو متوقع لها استناداً إلى قوانين مندل. مثل تلك السيادة غير التامة في ريش الدجاج والسيادة الوسطية في ألوان زهرة نبات حنك السبع والسيادة الموزائيكية في لون ريش الدجاج الأندلسي وغير ذلك. وقد ساهمت جميع هذه الملاحظات في تعديل الآراء المندلية.

المجموعات المرتبطة Linkage Groups

تعرف المجموعة المرتبطة بأنها مجموعة المورثات المرتبطة الواقعة على نفس الصبغي. يمكن من خلال هذه المجموعات معرفة ما إذا كانت المورثات أو المجموعات منها تخضع للتوزيع الحر أم للارتباط مع بعضها. وعلى ذلك فإن مورثات أي كائن حي تكون ممثلة بمجموعات مرتبطة ويتساوى عدد هذه المجموعات مع عدد الصبغيات – العدد الأحادي – لكل نوع. فمثلاً إن لذبابة الفاكهة أربعة مجموعات قسمت تبعاً لتوافق الخصائص إلى المجموعة الأولى المرتبطة بالجنس وثلاثة مجموعات موجودة على الصبغيات ويتفق ذلك مع ما لهذه الحشرة. كذلك وجود سبعة مجاميع مرتبطة في نبات البازلاء وهو يقابل وجود سبعة صبغيات. ولا يزال لم يكتشف العديد من هذه المجاميع في عدد كبير من الأحياء. تعتبر المجموعات المرتبطة واحدة من أهم طرق تحديد الخرائط الموقعية للمورثات على الصبغيات حيث أن معرفة موقع مورث معين واحد لمجموعة مرتبطة يعطي توقعاً لموقع المورثات الأخرى لنفس المجموعة. وقد برهنت دراسات المجاميع المرتبطة على أن المورثات مرتبة بطريقة طولية على الصبغيات حيث إن دراسات هذه المجاميع أكدت بأن العلاقة بين مورثات مرتبطة تكون مشابهة تماماً للعلاقة الهندسية بين نقاط تقع على خط مستقيم. وعلى ذلك فإنه لو افترضنا أن مجموعة مرتبطة مكونة من المورثات أ، ب، جـ وحيث أن المورث أ مرتبط مع ب فلا بد أن المورث ب مرتبط مع

المورث جـ وعليه فإن المسافة بين أو جـ هي إما حاصل جمع المسافة بين أو ب والمسافة بين ب و جـ عندما يكون المورث ب يشغل منطقة وسطية بين أ و جـ أو ما تبقى من طرح المسافتين إذا كان المورث جـ هو الذي يشغل المنطقة الوسطية. فلو أن قيمة العبور بين أ و ب هي 5٪ وبين ب و جـ هي 11٪ وبين أو جـ هي 15٪ فيكون ترتيب هذه المورثات طولياً حسب موقعها على الصبغي كالتالي: جـ ب أ والمسافة النسبية بينهما هي 5، 11، 15 على الترتيب. وبناءً على ذلك فإنه من أجل دراسة تحديد مواقع ثلاث مورثات مرتبطة لا بد من إجراء ثلاثة تجارب مختلفة تشمل كل منها موقعين من المواقع الثلاثة. إلا أنه يمكن تحديد هذه العلاقة من خلال دراسة المورثات الثلاثة سويةً. فمثلاً عند إجراء التلقيح بين أفراد من ذبابة الفاكهة شوكية العين أصيلة (echinus-ec-) بأخرى درعية (Scute-sc-) وعديمة العرق الطولي (Crossveinless-cv-) أصيلة للصفتين (هذه الصفات هي طفرات متنحية مرتبطة بالجنس) فإن الأفراد الإناث في الجيل الأول تحمل الخليط الثلاثي (Sc + /cv +/ ec +) وعند تلقيح أنثى من الجيل الأول مع ذكر متنحي ثلاثي الصفات شوكية العين درعي عديم العرق الطولي أعطت النتائج التالية:

ذكر Sc ec cv X أنثى Sc/ + cv/ + ec/ +

	الفئة المظهرية	العدد	التكرار	النسبة المئوية	الاتحادات
1	شوكي	810	1638	82,7	اتحادين أبوين
2	درعي عديم العرق	828			
3	درعي شوكي	62	150	7,6	اتحادات جديدة للموقعين ec و sc نتيجة عبور مفرد في المنطقة الأولى.
4	عديم العرق	88			
5	درعي	89	192	9,7	اتحادات جديدة للموقعين cv و ec نتيجة عبور مفرد في المنطقة الثانية.
6	شوكي عديم العرق	103			
7	بري	0	0	0	
8	درعي شوكي عديم العرق	0			
	المجموع	1980	1980	100	

تؤكد هذه النتائج أن هناك عبور مفرد في المنطقة الأولى (sc-ec) مؤدياً إلى ظهور فئات درعي شوكي وعديم العرق (3 و 4) وهي اتحادات جديدة تمثل 7,6٪ من مجموع الفئات المظهرية في التجربة. أما العبور المفرد الثاني فهو الذي يحدث في المنطقة (ec-cv) الذي يؤدي إلى ظهور الاتحادات الجديدة درعي وشوكي عديم (5 و 6) التي تبلغ نسبتها 9,7٪.

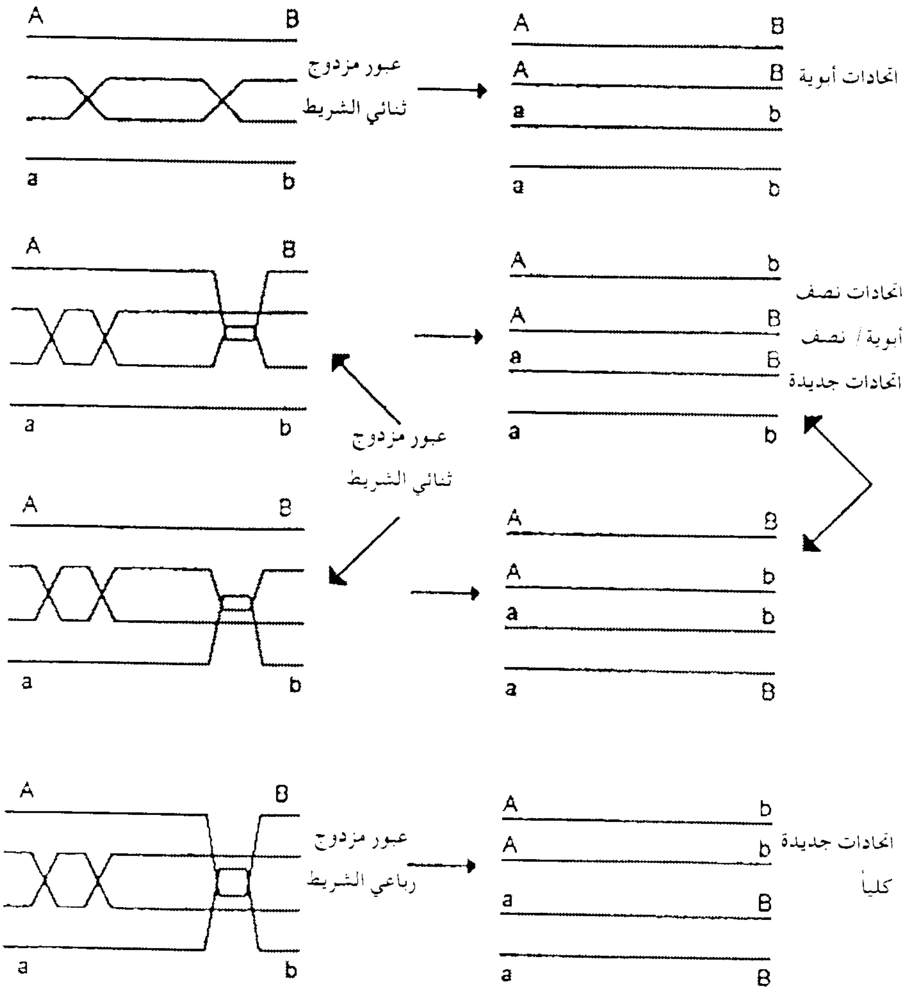
وعلى ذلك فإن هذه الاتحادات الجديدة التي تمثل 17,3٪ من مجموع الفئات المظهربة تمثل اتحادات للموقعين (sc, cv) وأن أختفاء وجود الطراز البري ومتنحي أصيل ثلاثي (7 و 8) يدل على عدم حصول عبور مزدوج في المنطقتين الأولى والثانية في نفس الوقت. وحيث أن النسبة 17,3٪ هي حاصل جميع النسبة 7,6٪ و 9,7٪ للموقعين الأول والثاني فإن المسافة بين sc-cv تساوي مجموع المسافتين sc-ec, ec-cv مما يدل على أن هذه المورثات تنتظم بترتيب طولي أما أن يكون sc-ec-cv أو cv ec sc. ويمكن استخدام مثل هذه المواقع

المعروفة بعد ذلك لتحديد مورثات أخرى مرتبطة معها .

العبــور Crossing over

فسر مورجان حصول الاتحادات الجديدة للمورثات المرتبطة إلى ظاهرة العبور في الدور الضام (Pachytene) من الطور التمهيدي في الإنقسام الاختزالي الأول بعد أن تكون أزواج الصبغيات القرينة قد تقابلت والتصقت في الدور الازدواجي (Zygotene) أذ يحدث التبادل بين الصبغيات القرينة ويتكون التصالب (chiasma) حيث يحدث التبادل الوراثي أولاً ثم تظهر في صورة تصالب عند نهايات الوحدات الثنائية . ترتبط الصبغيات المتناظرة بمعقد يدعى معقد الالتصاق (Synaptinema Complex) الذي يربط الكروماتيدات ببعضها على أمتداد طولها وبالتالي يسهل التبادل الكروماتيدي والعبور الوراثي . يتراوح عدد التصالبات بين تصالب واحد وعدة تصالبات حسب طول الصبغيات . تحدث الكسور والتبادلات عند نقطة متناظرة على الكروماتيدتين غير الشقيقتين (Nonsister Chromatids). وقد يحدث بين الكروماتيدات الشقيقة (Sister Chromatids) ولكنها لا تكون ذات مغزى وراثي وذلك لأن الكروماتيدات الشقيقة تكون متطابقة وغالباً ما يحدث العديد من العبور في كل مرة تزدوج فيها . ولقد توصلت العديد من الدراسات السايتولوجية إلى أدلة مباشرة للعبور من خلال استخدامها الأزواج الصبغية غير متماثلة في الطول (بسبب احتوائها على كسور صبغية (Chromosomal translocation) . كان من نتيجتها تتبع العبور بكل سهولة في هذه الصبغيات . كما وجد بأن العبور يمكن أن يحدث كعبور مزدوج ثنائي الشريط و ثلاثي الشريط أو رباعي الشريط (شكل 1-1) .

وقد لوحظ بأن العبور يحدث في جميع الكائنات الحية (ذكور وإناث) . إلا أنه وجدت بعض الحالات التي لا يحدث فيها عبور في أحد الجنسين (ذكور أو إناث) . (راجع المثال الموجود في الارتباط التام) .



شكل (١-١) : طرز الاتحادات الناتجة من ثلاث أنواع من العبور المزدوج.

الأساس الخلوي للتوريث :

تعتبر الخلية هي الوحدة التركيبية والوظيفية في الكائن الحي . تتألف الخلية من غشاء أو غلاف يحيط بمادتها الحية المؤلفة من السايتوبلازم الذي يزخر بالعديد من العضيات السايتوبلازمية . تمثل النواة جسماً صغيراً يقع في منتصف الخلية غالباً وتحاط بغشاء يدعى بالغشاء النووي ويرتبط مع السايتوبلازم بواسطة ثقوب . تحتوي النواة على عصارة نووية تتوارى داخلها الصبغيات أو الكروموسومات . لا يمكن رؤية الكروموسومات في النواة عند فحصها بالمجهر الضوئي عند وجود الخلية في طور الراحة ولكن يمكن مشاهدتها كأجسام طولية ذات مناطق مركزية **Centromers** عند دخول الخلية مراحل الإنقسام الخلوي . يختلف عدد الكروموسومات في النواة من نوع إلى آخر ولكنه يكون زوجياً **Diploid** في الخلايا الجسمية وفردياً **Haploid** في الخلايا الجنسية .

تمثل الإنقسامات الخلوية الأساس المادي للتوريث حيث يتم خلالها أنقسام الكروموسومات وتوزيعها على الخلايا الشقيقة بالتساوي وبالتالي تحقيق الاتصال الوراثي .

لم يكن مندل يعرف شيئاً عن الكروموسومات والمورثات والإنقسامات الخلوية وأنشطار الكروموسومات في الإنقسامات الأختزالية . إلا أن جميع ملاحظاته وتفسيره لنتائج تجاربه جاءت مطابقة تماماً لما قد كشف عنه بعد موته . أذ أوضحت الدراسات الخلوية أن هناك جسوراً وراثية كبيرة بين الخلايا تتم أثناء الإنقسامات الخلوية . كما أوضحت هذه الدراسات بأن ما أطلق عليه مندل بالعوامل ما هو في حقيقة الأمر سوى المورثات التي تترتب بصورة طولية على أجسام طويلة تدعى بالكروموسومات وأن لهذه الأخيرة الدور الرئيسي في عملية إنتقال العوامل أو المورثات من جيل إلى آخر . كما وجد بأن عدد الكروموسومات في خلايا النوع الواحد ثابت ولكنه يختلف من نوع

إلى آخر. تجتمع الكروموسومات في الخلايا حقيقية النوى في منتصف الخلايا عادة وتحاط بغشاء مشابه في تركيبه لغشاء السايتوبلازم مكونة جسماً يكاد يكون كروياً كثيف القوام يدعى بالنواة.

أما في الخلايا البدائية مثل البكتريا فإن هناك كروموسوماً واحداً يأخذ حيزاً كثيفاً في الخلية دون أن يحاط بغشاء ويلتف حول نفسه كثيراً. كما بينت الدراسات السايتولوجية بأن كروموسومات الخلايا حقيقية النوى زوجية في الخلايا الجسمية وفردية في الخلايا الجنسية.

درست الإنقسامات الخلوية بشكل مسهب وكبير بعد توفر الأدوات اللازمة لمثل هذه الدراسات خصوصاً التطورات المتلاحقة في المجهر وأتباع الطرق الكيميائية في كشف وتصبيغ الكروموسومات ومتابعتها أثناء الإنقسام.

الانقسام غير المباشر (الميتوزي) Mitosis Division:

يحدث هذا النوع من الانقسام في الخلايات الجسمية ويؤدي إلى تكوين خليتين من كل خلية منقسمة تحتوي كل منها على نفس عدد كروموسومات الخلية المنقسمة الأولية (شكل 1 – 2).

قبل انقسام الخلية تبدأ مرحلة التحضير للانقسام من خلال تهيئة المواد اللازمة للعملية ومن ضمن ذلك تضاعف المادة الوراثية. وتبدو الخلية في هذه المرحلة ساكنة وتحتوي على جميع العضيات الداخلية كما هي في جميع الخلايا وتسمى هذه المرحلة بالدور البيني بعدها تبدأ الخلية بالدخول في مرحلة متميزة هي :

المرحلة التمهيدية أو الدور التمهيدي : Prophase

تتميز الخلايا التي تدخل هذه المرحلة بمجموعة من المميزات منها :

1. ظهور الكروموسومات في النواة وتبدو في هذه المرحلة بأنها رفيعة

خيطية ملتفة على بعضها لا تلبث أن تصبح أكثر غلظة وسماكة.

2ـ أختفاء النويـة.

3ـ بداية تحلل غشاء النواة وظهور الكروموسومات مؤلفة من كروماتيدات مزدوجة مرتبطة مع بعضها عن طريق السنترومير.

4ـ ظهور الاقطاب وخيوط المغزل.

المرحلة الاستوائية أو الدور الاستوائي Metaphase :

أهم مميزات الخلايا التي في هذا الدور :

1ـ أنتظام الكروموسومات في وسط الخلية بشكل طولي وعمودي على أستواء الخلية.

2ـ وجود الكروموسومات على هيئة أزواج.

المرحلة الانفصالية أو الدور الانفصالي Anaphase :

مميزاتـه :

1ـ تحرك الكروموسومات بأتجاه المغزل على هيئة مجموعتين.

2ـ ارتباط الكروموسومات من مواقع السنترومير بخيوط المغزل التي لا تلبث في هذه المرحلة بالتقلص مؤدية إلى إنفصال أزواج الكروموسومات.

3ـ ينتهي هذا الدور بوصول مجموعتي الكروموسومات إلى أقطاب الخلية.

المرحلة النهائية أو الدور النهائي Teleophase :

مميزاتـه :

1ـ وجود مجموعتان من الكروموسومات في أقطاب الخلية محاطتان بغشاء مؤذنة بظهور النواة مرة أخرى.

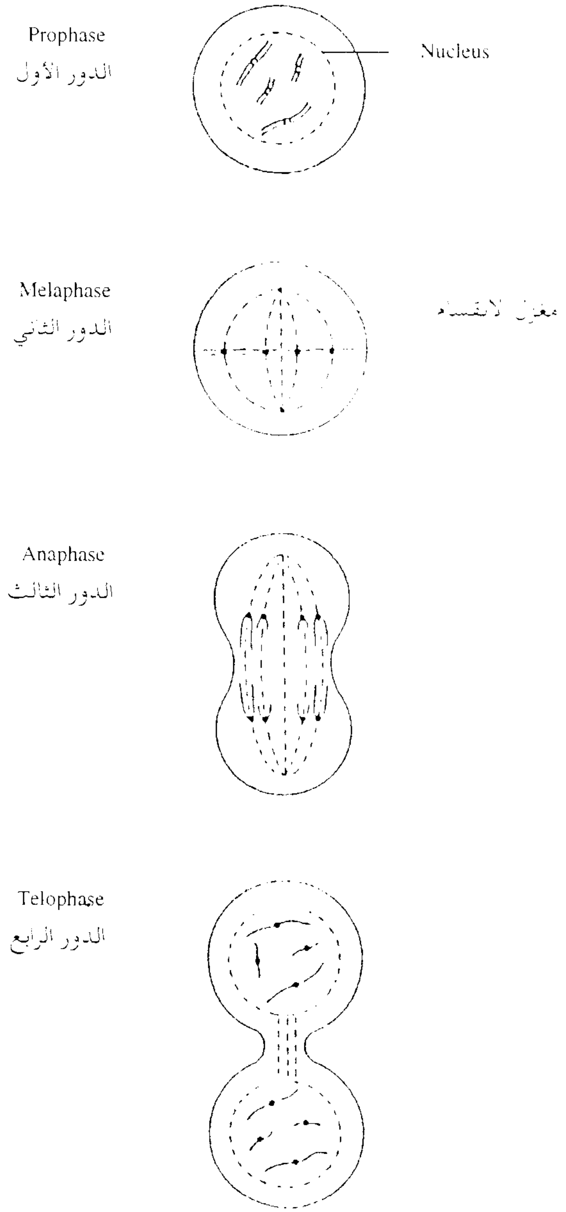
2ـ بناء الغشاء أو الجدار بين النواتين لفصل محتويات الخلية الأم.

3- بداية أختفاء الكروموسومات حيث تظهر عندئذ على هيئة خيطية رفيعة تلتف على بعضها البعض.

4- ظهور النوية في مرحلة متأخرة منه.

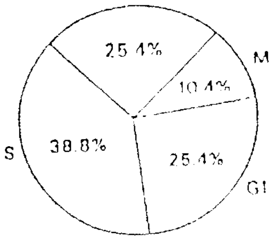
تعتبر عملية الانقسام غير المباشر جزءاً من الدورة الخلوية التي تمر بها الخلايا ويستغرق أنقسام الخلايا بين 1-3 ساعات بينما تحتاج هذه الخلايا إلى أكثر من أربعة ساعات لتحضير نفسها للدخول فيه (شكل 1-3).

ويلاحظ بأن ما يحصل في هذا الانقسام لا يحقق التصور الذي تم وضعه من خلال تجارب ونتائج مندل حيث أحتفظت كل خلية من الخلايا الناتجة عن هذا الانقسام بنفس عدد الكروموسومات الذي كان موجوداً في الخلية الأم بينما دلت النتائج السابقة على ضرورة إنفصال عوامل الصفات قبل حصول الأخصاب وهذا ما يوفر الدليل المادي العلمي لوجود نوع أخر من الانقسامات الخلوية ألا وهو الانقسام الاختزالي الذي لا يمكن مشاهدته إلا في الخلايا الجنسية.



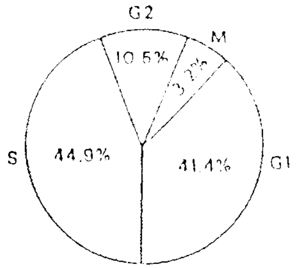
شكل 1 - 2 : مراحل الانقسام غير المباشر **Mitosis** في الخلايا .

دورة الانقسام
في خلية الباقلاء



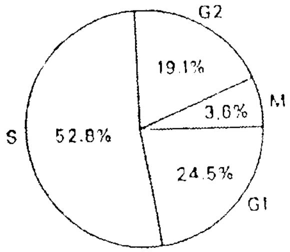
Broad bean
root cells

دورة الانقسام في
خلية عضلية / فأر



Mouse fiboblasts
22.0

دورة الانقسام في
خلية عضلية / هامستر



Chinese ham-
ster fibroblasts
11.0 h

شكل 1 - 3: دورة الخلية في ثلاثة أنواع من الخلايا ويلاحظ أختلاف فترة مراحل الدورة في كل خلية.

الإنقسام الاختزالي Meiosis Division :

يحصل الانقسام الاختزالي في الخلايا الجنسية أو المولد للخلايا الجنسية ويؤدي إلى تكوين أربعة خلايا جديدة بنصف العدد الأصلي من الكروموسومات. يتم أختزال أعداد الكروموسومات إلى النصف من خلال أنقسامين متوالين للنواة يتخللها أنقسام مفرد للكروموسومات وبذلك تتكون أربعة خلايا كل منها بنصف العدد الأصلي من الكروموسومات (شكل 1 - 4).

الانقسام الاختزالي الأول Meiosis :

يتم في هذا الانقسام انفصال الكروموسومات القرينة بعد حصول العبور وتبادل المواد الوراثية فيما بينها.

مراحل الانقسام:

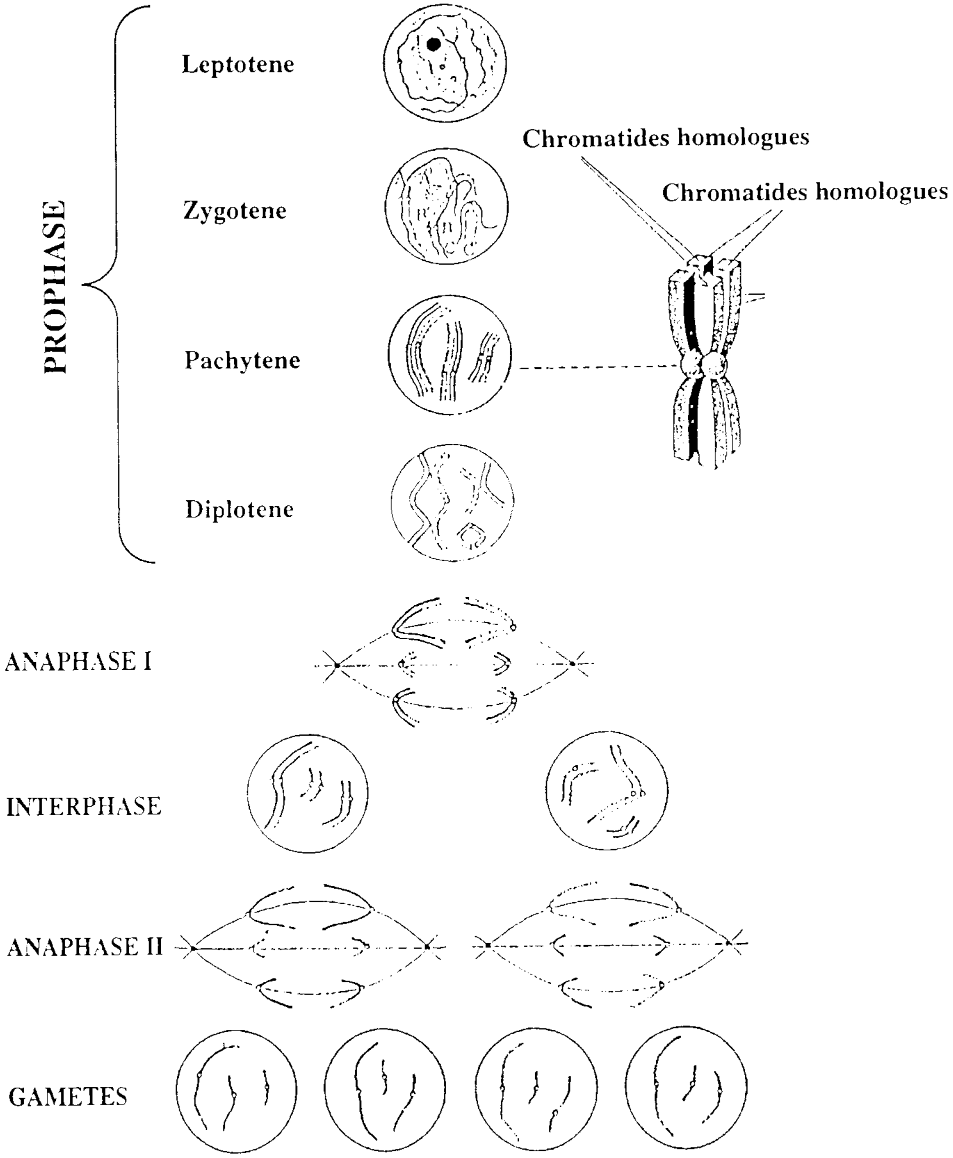
الدور التمهيدي الأول **ProphaseI** : يعتبر هذا الطور أطول مراحل الانقسام الاختزالي وتحصل فيه العديد من المظاهر الانقسامية المتنوعة ولذلك فقد تم تقسيمه إلى مراحل ثانوية هي :

الطورالقلادي **Leptotene**: وتظهر فيه الكروموسومات طويلة رفيعة ذات مناطق منتفخة بحيث تشبه الكروموسومات في هذا الطور المسبحة و تقصر في نهاية الطور.

الطور الثنائي **Zygotene** : تزدوج الكروموسومات بسبب تغلظها وظهور الكروماتيدات بشكل واضح.

الطور الضام **Pachyten**: تنجذب الكروموسومات القرينة إلى بعضها وتظهر هذه وكأنها تراكيب رباعية بسبب تميز كروما يتداتها كما تبدأ الكروماتيدات في التراكيب الرباعية بالاقتراب ومساس بعضها.

الطور الازدواجي **Diplotene**: يحصل في هذا الطور العبور وظهور مناطق



شكل **1 - 4** : مراحل الانقسام الاختزالي **Meiosis**
في الخلايا الجنسية.

تصالب الكروماتيدات العابرة .

الطور التشتتي Diakinesis: ينتهي في هذا الطور حدوث العبور وتنفصل الكروموسومات المتصالبة وتتغلظ وتقصر وتظهر ألياف المغزل ويختفي الغشاء النووي . ويعتبر هذا الطور الجزء النهائي للمرحلة التمهيدية لتبدء بعدها مرحلة الدور الاستوائي .

الدور الاستوائي الأول MetaphaseI: تصطف في هذا الطورالكروموسومات في منتصف أستواء الخلية حيث يرتبط كل كروموسوم بخيط من خيوط المغزل .

الدور الانفصالي الأول AnaphaseI: تنفصل في هذا الطور الكروموسومات القرينة أو المتناظرة بحيث تذهب كل مجموعة إلى أحد أقطاب الخلية .

الدور النهائي الأول Telophase I : تحاط مجاميع الكروموسومات في هذا الطور بغشاء وتبدأ الكروموسومات بالتغلظ والاستطالة وقد تنفصل الخلايا في بعض الكائنات إلا أنه وبشكل عام فأن الخلايا الناتجة من هذا الانقسام تدخل بعد فترة وجيزة جداً الانقسام الاختزالي الثاني دون المرور في مرحلة راحة أو انتظار .

الانقسام الاختزالي الثاني Meiosis II:

يؤدي هذا الانقسام إلى أنشطار كروماتيدات كروموسومات الخلايا الناتجة من الانقسام الاختزالي الأول لإنتاج أربعة خلايا بنصف العدد الأصلي من الكروموسومات . يمر هذا الانقسام بعدة مراحل هي :

الدور التمهيدي الثاني Prophase II:

تصبح الكروموسومات هذا الطور قصيرة وسميكه ويستمر هذا الطور لفترة قصيرة جداً .

الدور الاستوائي الثاني Metaphase II:

وتظهر كروماتيدات كل كروموسوم مرتبطة مع ألياف المغزل من منطقة أرتباطها مع بعضها وتصطف الكروموسومات في منتصف الخلية استعداداً لأنشطار كروماتيدات الكروموسومات.

الدور الانفصالي الثاني Anaphase II:

تبتعد في هذا الطور الكروماتيدات الشقيقة لكل كروموسوم بأتجاه أحد أقطاب الخلية بسبب تقلص ألياف المغزل المرتبطة معها.

الدور النهائي الثاني II.:

تبدأ الكروموسومات (الكروماتيدات) بالألتفاف على بعضها وتبدأ بالتحول إلى الشكل الخيطي ويبدأ غشاء النوى بالظهور محيطاً كل مجموعة كروموسومية ولا تلبث الخلايا أن تنفصل في نهاية هذا الطور مؤدية إلى الحصول على أربعة خلايا من كل خلية شاركت في الانقسام الأختزالي.

الانقسام الاختزالي في الأعضاء الجنسية الحيوانية:.

يجري هذا الانقسام في الغدد الجنسية للحيوانات أثناء عملية إنتاج الحيوانات المنوية أو البويضات. أما في النباتات فيجري أثناء عملية انتاج الأبواغ.

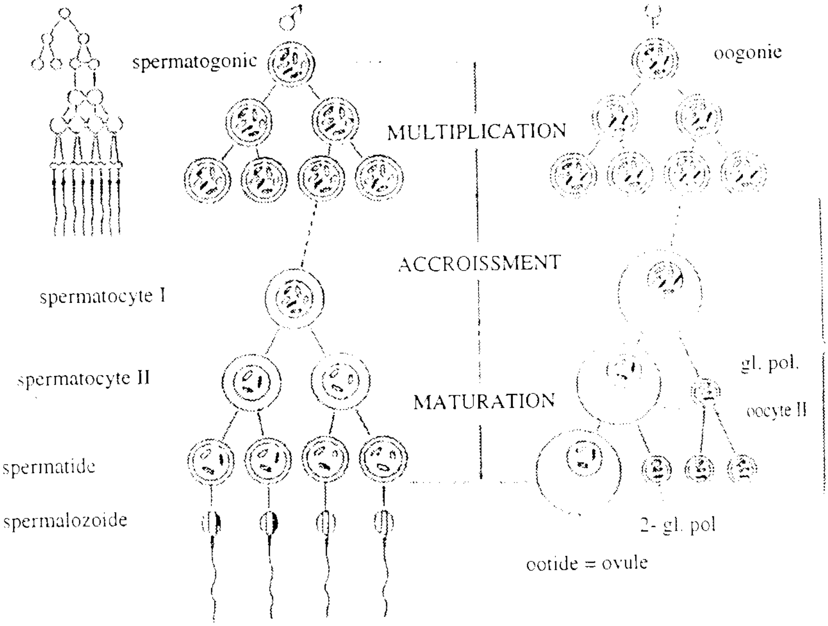
الانقسام الاختزالي لانتاج الحيوانات المنوية Spermatogenesis:

كما سبق الحديث فأن هذا الإنقسام يحصل في الغدد الجنسية للحيوانات

وبالضبط في الانيبوبات المنوية. يتألف النسيج الذي يدخل الانقسام الاختزالي من 2 - 5 طبقات. الخلايا الخارجية منها تدعى بالخلايا السبرمية الأمية والتي تكون ذات عدد كامل من الكروموسومات وتنقسم أنقساماً غير مباشر لإنتاج خلايا منوية أولية. تنقسم كل خلية منوية أولية أنقساماً اختزالياً أولياً لإنتاج خليتين كل منهما بنصف العدد الأصلي من الكروموسومات تسمى هذه الخلايا بالخلايا المنوية الثانوية. تدخل هذه الخلايا الانقسام الأختزالي الثاني لإنتاج أربعة خلايا بنصف العدد الأصلي من الكروموسومات. تدعى هذه الخلايا بطلائع المني ولا تلبث أن تمر بمرحلة تحوير تنتهي بعدها كخلايا منوية جنسية (شكل 1 - 5).

الانقسام الأختزالي لإنتاج البويضات Oogenesis :

يحصل هذا الانقسام في الخلايا البيضية الأمية في المبيض التي تتميز بكونها ذات عدد كامل من الكروموسومات وتنقسم أنقساماً غير مباشر لإنتاج خلايا بيضية أولية. تدخل هذه الخلايا الأنقسام الأختزالي الأول حيث تنفصل الكروموسومات القرينة لإنتاج خليتين بنصف العدد الأصلي من الكروموسومات. أحدى هاتين الخليتين تكون كبيرة الحجم لأستقطابها كمية كبيرة من السايتوبلازم تدعى هذه بالخلية البيضية الثانوية فيما تسمى الخلية الصغيرة الحجم بالجسم القطبي الأول والذي يظهر كجسم داكن داخل الخلية البيضية الثانوية. تنقسم الخلايا البيضية الثانوية والأجسام القطبية الأولية أنقساماً أختزالياً ثانياً حيث تنتج من كل خلية بيضية ثانوية خلية تدعى أم البيض وجسم قطبي ثانوي بينما يؤدي الانقسام الأختزالي الثاني لكل جسم



شكل ١ـ 5 : عمليتي تكوين الحيوانات المنوية والبويضات في الأنسجة الجنسية .

قطبي أولي إلى إنتاج جسمين قطبيين ثانويين. وهكذا فأن كل خلية بيضية أولية تؤدي بعد الانقسام الاختزالي إلى إنتاج خلية أم البيض وثلاثة أجسام قطبية ثانوية (شكل 1-6) وتتم جميعها بأحتواءها على نصف العدد الأصلي من الكروموسومات.

الانقسام الأختزالي في النباتات :

تعتبر عملية تكوين الخلايا الجنسية (الجاميتات) في النبات أكثر تعقيداً مما هو لدى الحيوانات. فمثلاً تتألف الطحالب الخضراء وكذلك خلاياها الجنسية من نصف العدد الأصلي من الكروموسومات بسبب أن الانقسام الأختزالي يحصل في الانقسام الخلوي الأول والثاني للبيضة المخصبة. ويحصل العكس في بعض الطحالب البنية حيث يتألف جسمها من خلايا تحتوي على العدد الكامل من الكروموسومات بسبب أن الإنقسام الأختزالي يحصل قبل تكوين الخلايا الجنسية مباشرة وهو ما يشبه ما يحصل لدى الحيوانات. وهناك أنواع من الطحالب تعمل على تكوين خلايا لاجنسية (أبواغ) من البيضة المخصبة وتؤدي إلى تكوين نباتات ذات أبواغ لاجنسية. أما في النباتات الراقية فأننا نجد بأنها تتميز بما يسمى بتبادل الأجيال حيث يتبادل الطور البوغي اللاجنسي والذي ينشأ من الإنقسام الأختزالي والذي ينمو لتكوين النبات الذي يعمل بدوره على تكوين الخلايا الجنسية الأحادية المجموعة الكروموسومية والتي تمثل الطور الجنسي (الجاميتي) (حبوب اللقاح والبويضات) وهذه بعد الأخصاب تعمل على تكوين الطور البوغي (النبات) مرة أخرى. وهكذا نجد أن هناك طور بوغي بين كل طورين جاميتيين أو جنسيين.

تحتوي حبة اللقاح (الجامتية الذكرية) الناضجة على ثلاثة أنوية واحدة غير جنسية ونواتان ذكريتان وعند أختراق حبة اللقاح عبر الأجزاء التناسلية الأنثوية (عبر القلم) فأن أحدى النواتين الذكريتين تتحد مع نواة الخلية

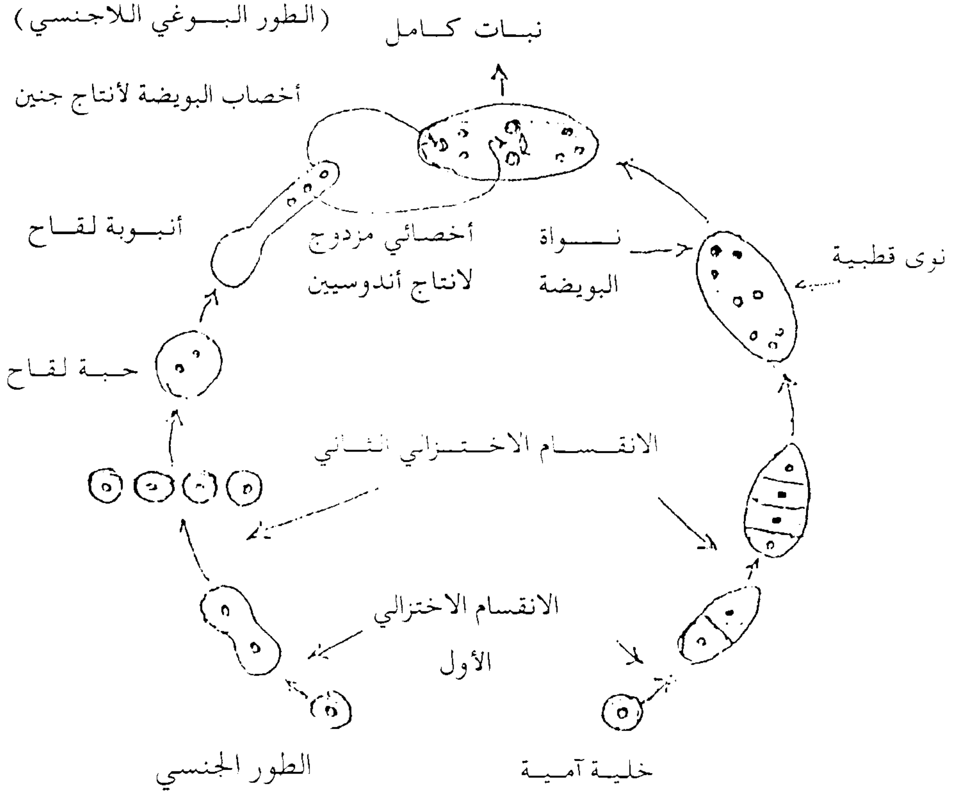
البيضية (في المبيض) لتكوين جنين البذرة وتتحد النواة الذكرية الثانية مع نواة الاندوسبيرم لإنشاء نسيج الاندوسبيرم الضروري لنمو الجنين (نواتين قطبيتين في الاندوسبيرم) وتسمى عملية الاتحاد الأخيرة بالإخصاب المزدوج.

يعتبر نبات الذرة من أفضل الأمثلة التي تم دراسة الانقسام الاختزالي فيها. يحمل نبات الذرة نوعين من الأزهار هما الأزهار الذكرية والأزهار الأنثوية (نبات وحيد المسكن). تنقسم الخلايا داخل الأسدية أختزالياً لإنتاج أربعة حبوب لقاح مفردة المجموعة الكروموسومية من كل خلية تدخل هذا الانقسام.

وتنقسم نواة كل حبة لقاح أنقساماً غير مباشر لإنتاج نواة لاجنسية (خضريه) ونواة مذكرة تناسلية لا تلبث هذه أن تنقسم إلى نواتين تناسليتين.

أما في المبيض فتتحول خلية واحدة من خلايا المبيض إلى خلية أم البيض التي تدخل الانقسام الأختزالي لإنتاج أربعة خلايا تضمحل ثلاثة منها لتبقى خلية واحدة تدخل ثلاثة انقسامات مباشرة لإنتاج ثمانية نوى أحادية المجموعة الكروموسومية هما خلية البيضة وخليتان مساعدتان ونواتان قطبية وثلاثة خلايا سمتيه.

وعند حصول الإخصاب تخترق الأنوية الثلاثة لحبة اللقاح قلم المبيض حيث تلتحم أحدى الأنوية التناسلية الذكرية مع البيضة لإنتاج البيضة المخصبة الثنائية المجموعة الكروموسومية بينما تخصب النواة التناسلية الثانية نواتي الاندوسبيرم القطبية لتكوين نسيج الأندوسبيرم (شكل 1-6).



شكل 6.1 : الانقسامات الاختزالية في النباتات الراقية وعملية الاخصاب لتكوين الجنين (الطور البوغي) والاندوسبيرم .

السيادة غير التامة : Incomplete Dominance

إن جميع النتائج التي حصل عليها مندل في كافة تجاربه بينت بأن بعض الصفات تسود سيادة تامة على غيرها من الصفات ولم يشذ عن ذلك شيء. وعندما أعيدت تجارب مندل على صفات أخرى لنباتات وحيوانات وجد بأن هناك أختلافاً في سيادة الصفات بحيث لا يمكن تفسيرها أستناداً إلى نتائج مندل، ذلك أن أفراد الجيل الأول تحمل صفات وسطية بين الأبوين بينما تظهر ثلاث فئات مظهرية في الجيل الثاني على الأغلب. ولم تقتصر الملاحظات الجديدة على هذا النوع الشاذ بل تعدته إلى مشاهدات أخرى تخرج عن التفسير المندلي. سميت الصفات التي تشذ عن السيادة التامة التي وضعها مندل بالسيادة غير التامة **Incomplete Dominance**. لقد دلت الدراسات السايتولوجية التي أجريت فيما بعد أن السيادة التامة تحصل عندما يقع مورثاً الصفة في نفس الموقع على الكروموسومات المتماثلة مما يؤدي إلى وجود تراكيب وراثية أقل من الأنماط المظهرية (هناك نمطان مظهريان أحداهما سائد والآخر متنحي بينما التراكيب الوراثية ثلاثة تراكيب هي سائد نقي وسائد هجين ومتنحي) بينما تتساوى التراكيب الوراثية مع الأنماط المظهرية في السيادة غير تامة بسبب أحتلال مورثات الصفة لمواقع مختلفة على الكروموسومات المتماثلة.

الفصل الثاني

الطبيعة الوراثية للحامض النووي منقوص الأكسجين (DNA)

المحتويات

- هل أن الحامض النووي منقوص الأكسجين هو المادة الوراثية ؟
- تجارب المكورات المسبحية لذات الرئة
- تجارب المكورات الثنائية لذات الرئة.
- تجارب هيرشي وشاس على العاثي
- تجارب كونرات وساجر على راشح التبغ الموزائكي
- ميزات المادة الوراثية
- موقع الحامض النووي منقوص الأكسجين في الخلية
- تركيب صبغي الأحياء بدائية النواة
- تركيب صبغي الأحياء حقيقة النوى
- تنظيم الحامض النووي في صبغيات الأحياء حقيقة النوى
- الجين والصبغيات

لم يحض الحامض النووي منقوص الأكسجين بالإهتمام اللازم كمادة وراثية لعقود طويلة أمتدت منذ التعرف على موقعه في الخلية في العقد السابع من القرن الثامن عشر. وطغى الاهتمام بالبروتينات لما تتميز به من صفات جعلت الكثير يعتقد بأنها المادة الوراثية المسؤولة عن انتقال الصفات والمعلومات الوراثية، وساهم في ذلك الكم الكبير من البحوث العلمية حول تركيب وصفات البروتينات. ولم يكن من السهولة الحديث عن الحامض النووي كمادة وراثية لغياب العديد من المعلومات والأدلة التي يمكن من خلالها إثبات أنه المادة الوراثية.

إلا أن المعلومات اللاحقة التي تراكمت حول الحامض النووي أثارت الشكوك حول دور البروتينات كمادة وراثية؛ وساهمت بحوث العلماء جرفس عام 1928 وأفيري وجماعته 1944 وغيرهم في إبراز دور الحامض النووي منقوص الأكسجين كمادة وراثية. وأزاحت التجارب والبحوث اللاحقة اللثام على حقيقة الحامض النووي ودوره بما لا يقبل الشك وسقطت بذلك دعاوى دور البروتينات كمادة وراثية. ويعتبر ظهور نموذج الحلزون المزدوج وما رافقته من حقائق تتويج حقيقي للحامض النووي إذ أصبح المادة الوراثية حقيقة لا يختلف عليها أثنان.

ـ هل أن الحامض النووي منقوص الأكسجين هو المادة الوراثية؟

تم التعرف على التركيب الكيميائي للحامض النووي منقوص الأكسجين قبل أكثر من مائة عام بعد فترة قصيرة من اكتشافه في عصارة نوى خلايا الكريات البيضاء عام 1871 من قبل العالم فريدريك **Friedrch Miescher** والذي أطلق عليه آنذاك تسمية النيوكلين **Nuclein**. لقد جذبت تلك العصارة الانتباه لما تمتلكه من محتوى عالي من الفوسفور وطبيعتها الحامضية إلا أنها لم تجذب الأنتباه إلى دورها الوراثي حيث كان معظم الانتباه مركز في بداية هذا القرن على البروتينات.

إلا أنه في الفترة من عام 1928 حتى عام 1952 نُشر العديد من الأبحاث العلمية التي سلطت الضوء على الطبيعة الوراثية لهذا الحامض وليس على البروتينات كما كان معتقداً آنذاك.

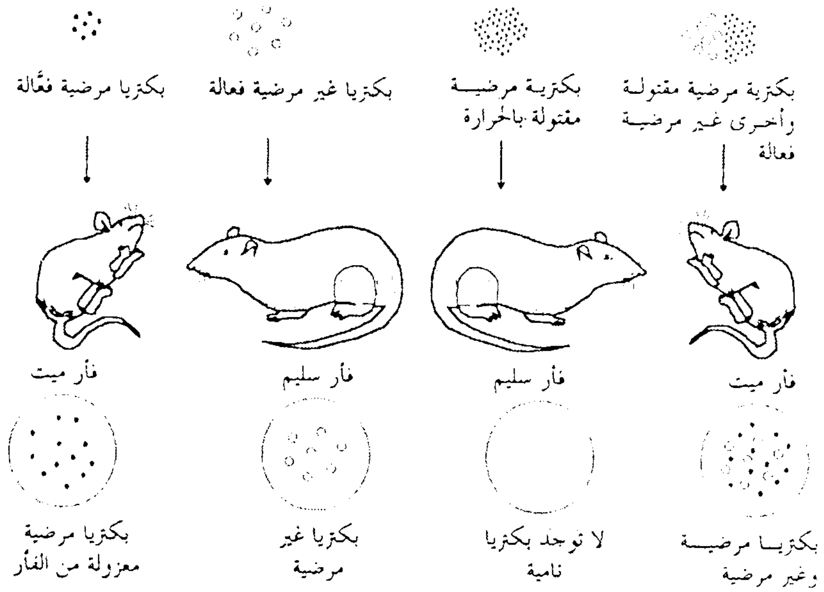
تجارب المكورات المسبحية لذات الرئة Streptococcus Pneumonia

من المعروف بأن هذا النوع من المكورات المسبحية له قابلية إصابة الأجهزة التنفسية للبائن بذات الرئة. تأتي قابلية هذه المكورات على الإصابة المرضية من الكبسولة المتعددة السكر Polysaccharides Capsule والتي تحيط بها. تمنع هذه الكبسولة النظام المناعي للحيوانات من التأثير على المكورات. يدعى هذا الطراز من المكورات بالطراز (Type S). كما أن هناك طراز آخر من هذه المكورات تفتقد إلى الكبسولة نتيجة لفقدانها الأنزيم الضروري لتصنيع هذه الكبسولة (طفرة وراثية) وبالتالي فإنها غير قادرة على إصابة الحيوانات بذات الرئة. يدعى هذا الطراز بالطراز (Type R). تتميز مستعمراته النامية بخشونة مظهرها الخارجي (Rough) بينما تتميز مستعمرات الطراز S بكونها ناعمة المظهر (Smooth). كما يطلق على الطراز المرضي من هذه المكورات بالطراز المرضي (Virulent) على الطراز الثاني بغير المرضي (avirulent).

في عام 1928 وجد العالم جرفثس (Fredrick Griffiths) بأن حقن المكورات الحية من طراز (R) أو المكورات الميتة بالحرارة للطراز (S) في جسم الفئران ليس له تأثير على الإصابة بالأمراض التنفسية. إلا أن حقنها بخليط من المكورات الحية للطراز R ومكورات ميتة من الطراز S أدى إلى ظهور الأمراض التنفسية المقترنة بالإصابة بالطراز S.

إن الفحص الذي تم إجراءه على البكتيريا المعزولة من دماء حيوانات التجارب أثبت وجود المكورات ذات الكبسولة والتي تميز الطراز S شكل (2-1).

أثبتت هذه التجربة بأن تحول المكورات من الطراز R إلى الطراز S ليس ناتجاً عن طفرة وراثية (التي تحدث بمعدل خلية لكل 10^7 خلايا) بسبب أحتواء جميع المكورات المعزولة على كبسولة وليس على أعداد قليلة جداً كما هو الحال في الطفرات الوراثية. بينت هذه النتائج بأن المكورات الميتة من الطراز S عملت بطريقة ما على اكساب مكورات الطراز R الحية القابلية على مقاومة الجهاز المناعي للفئران والتكاثر وإحداث الإصابة بذات الرئة، وهذا معناه بأن مكورات الطراز R امتلكت تغييراً وراثياً مكنها من المقاومة وكان هذا التغيير الوراثي قد جاء من المواد الوراثية للطراز S.



شكل (1-2): تجربة فردريك جرفش التي أثبت من خلالها الطبيعة الوراثية للحامض النووي، أثبتت التجربة قدرة البكتيريا المرضية المقتولة على تحويل البكتيريا غير المرضية إلى بكتيريا مرضية.

تجارب المكورات الثنائية لذات الرئة Diplococcus Pneumonia :

في عـامي 1914 و 1952 نشر بحثان سلطت نتائجهما الضوء على الحامض النووي منقوص الأكسجين (DNA) كمادة مسؤولة عن توارث الصفات.

أجرى البحث الأول من قبل العلماء أفيري، ماكلويد وماكرثي عام 1944 (Avery, Macleod & McCarty, 1944).

لقد دلت نتائج هذا البحث بأن الحامض النووي منقوص الأكسجين المنقى من السلالة S من هذه المكورات (التي لها قابلية أيضاً على إصابة الجهاز التنفس للبائن بمرض ذات الرئة) قادر على تحويل السلالة R غير المرضية إلى السلالة S لها القابلية على الإصابة بذات الرئة.

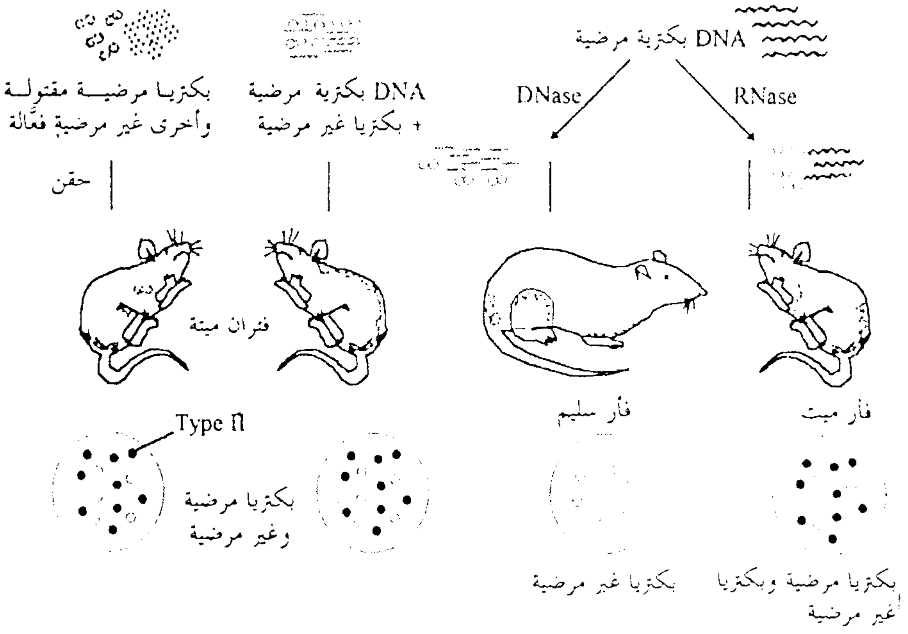
لقد تكررت القدرة على التحويل عندما أضيف الحامض النووي منقوص الأكسجين المستخلص من السلالة الجديدة إلى سلالة R ثالثة غير مرضية حيث أدى إلى تحويلها إلى سلالة S المرضية الشكل (2-2).

ولأجل إثبات مسؤولية الحامض النووي منقوص الأكسجين دون الحامض النووي الريبوزي في نقل الصفات الوراثية الجديدة قام هؤلاء العلماء بمعاملة الحامض النووي منقوص الأكسجين المستخلص من مكورات الطراز S مرة بالأنزيم المحطم للحامض النووي الريبوزي (Ribonuclease-RNase) لأجل التخلص من الحامض النووي الريبوزي الذي يمكن وجوده مع الحامض النووي منقوص الأكسجين (من الصعب آنذاك فصل الحامض النووي منقوص الأكسجين بصورة نقية تماماً كما هو الحال عليه الآن، وغالباً ما يكون ملوثاً بالحامض النووي الريبوزي) ومرة ثانية بالأنزيم المحطم للحامض النووي منقوص الأكسجين (Deoxyribonuclease-DNase) الذي يؤدي إلى تحطيم الحامض النووي منقوص الأكسجين. عند إعادة التجارب السابقة مع نماذج الحامض النووي منقوص الأكسجين المعاملة بالأنزيمات وجد بأن عملية تحويل السلالة R إلى

السلالة S لم تحدث عند معاملة السلالة R مع الحامض النووي المعامل بالأنزيم المحطم للحامض النووي منقوص الأكسجين.

بينما تحولت هذه السلالة إلى السلالة S عند معاملتها بنموذج الحامض النووي المعامل بالأنزيم المحطم الحامض النووي الريبوزي.

أكدت نتائج هذه التجارب مسؤولية الحامض النووي منقوص الأكسجين على ظهور الصفات الوراثية الجديدة وتحول مكورات السلالة R إلى السلالة S.

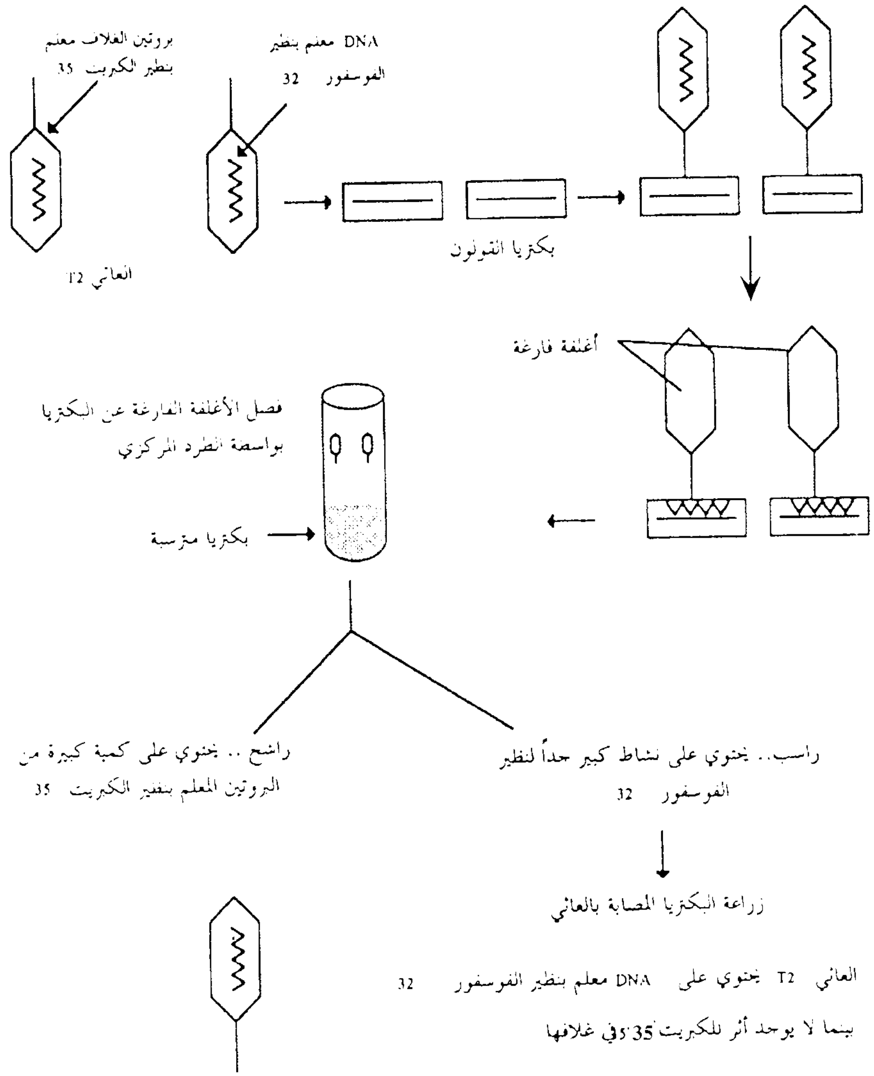


شكل (2 - 2) : تجربة أفيري وجماعته التي أثبتت أن الحامض النووي منقوص الأكسجين هو المسؤول عن ظهور الصفات الجديدة وتحول البكتيريا إلى سلالة مرضية.

تجارب هيرشي وشاس على العاثي T2

أما البحث الثاني والذي نشر عام 1952 من قبل هيرشي وشاس (Hershey & Chase,1952) فقد تضمن استخدام النظائر المشعة التي ظهرت في نهاية الأربعينات لدراسة الحامض النووي منقوص الأكسجين وإثبات كونه المادة الوراثية . قام الباحثان بإستخلاص عاثيات (T2 Phage) مُعلّمة إما بنظير الكبريت 35 (S^{35}) الذي يرتبط فقط مع البروتين لوجود الكبريت في تركيبه الكيميائي) أو بنظير الفسفور 32 (P^{32}) الذي يرتبط فقط مع الحامض النووي لوجود الفسفور في تركيبه الكيميائي) . لقد تم عزل هذه العاثيات المعلمة بالنظائر المشعة عن طريق تنمية بكتريات القولون (E.coli) المصابة بالعاثي T2 ولعدة أجيال على أوساط زرعية تحتوي إما على نظير الكبريت 35 فقط أو على نظير الفوسفور 32 فقط . لقد أستخلص البروتين المُعلّم والحامض النووي منقوص الأكسجين المُعلّم من هذه العاثيات واستخدمت هذه بعدها بثلاث تجارب تحول (Transformation) مع بكتريا القولون . في التجربة الأولى تم إصابة البكتريا بخلاصة من البروتين المعلم بنظير الكبريت 35 والحامض النووي منقوص الأكسجين المعلم بنظير الفوسفور 32 والثانية بخلاصة من الحامض النووي منقوص الأكسجين المعلم بنظير الفوسفور 32 فقط والثالثة بخلاصة من البروتين المعلم بنظير الكبريت 35 فقط . ثم بعدها تم إزالة المواد الزائدة العالقة بجدران البكتريا عن طريق الخلط مع وسط زرعي سائل دون الإضرار في خلايا البكتريا ثم ترسيب البكتريا بواسطة جهاز الطرد المركزي (Centrifuge) . فحص الراشح الحاوي على بقايا البروتين والحامض النووي منقوص الأكسجين التي لم تدخل البكتريا والراسب الذي يمثل البكتريا المصابة في التجارب الثلاثة ووجد بأن الراشح يحتوي على نسبة عالية من بروتين العاثي T2 ويكاد يكون الحامض النووي منقوص الأكسجين معدوماً بينما احتوت البكتريا (الراسب) على كمية كبيرة من الحامض النووي منقوص الأكسجين ونسبة ضئيلة جداً

من البروتين شكل (3.2). كما وجدوا بأن الأجيال الجديدة من العاثيات T2 الناتجة من التجارب تحتوي فقط على حامض نووي منقوص الأكسجين معلم ولا أثر لأي نشاط إشعاعي لنظير الكبريت 35. لقد أثبتت هذه التجارب بشكل لا يقبل الشك بأن الحامض النووي منقوص الأكسجين هو المادة الوراثية المسؤولة عن نقل الصفات.



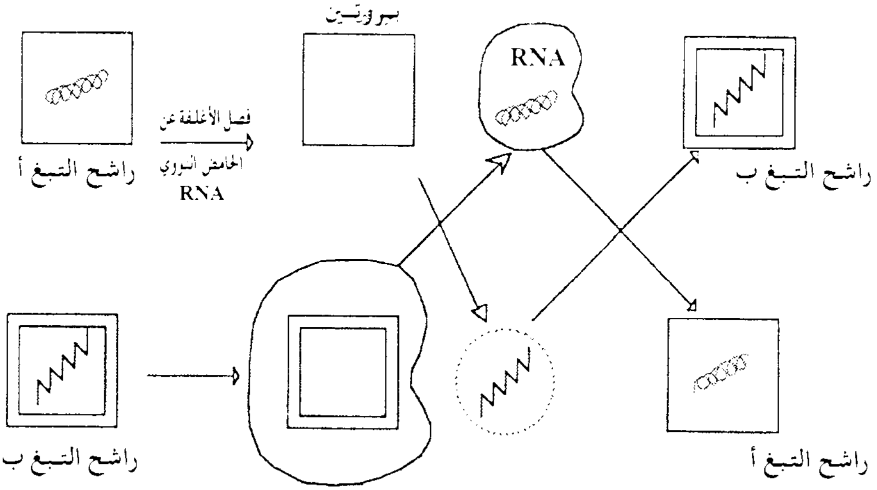
شكل (2 - 3) : مخطط لتجربة هيرشي وشاس لإثبات أن الحامض النووي هو المادة الوراثية. تم في هذه التجربة تعليم بروتين أغلفة العاثي **T2** والـ **DNA** بنظير الكبريت **35** والفوسفور **32** على التوالي وبعد إصابة البكتريا بهذه العاثي لوحظ إنتقال الحامض النووي **DNA** إلى البكتريا دون الأغلفة وتم تكوين جيل جديد من العاثيات مُعلّم بنظير الفوسفور **32**.

ـ تجارب كونرات وسانجر على راشح التبغ الموزائكي

في السنوات القليلة التي تلت إجراء التجارب السابقة وجد بأن هناك بعض الاستثناءات كما هو الحال في معظم الرواشح الحاوية على الحامض النووي الريبوزي فقط، وحيث أن الحامض النووي منقوص الأكسجين غير موجود في هذه الرواشح فإن نتائج التجارب المجراة على هذه الرواشح أعطت نتائج مشابهة مما دفع الباحثين إلى دراسة العلاقة بين الحامض النووي الريبوزي والحامض النووي منقوص الأكسجين وكيفية حصول التحول عن طريق الحامض النووي الريبوزي للراشح.

استخدم كونرات وسانجر (**Conrrat & Singer,1957**) في تجاربهما ضروباً عديدة من راشح موزائيك التبغ **TMV (Tobacco Mosaic Virus)** الذي يتألف من بروتين وحامض نووي ريبوزي . تم فصل بروتينات هذه الضروب عن الحامض النووي الريبوزي العائد لها وتم دمج بروتين من ضرب مع حامض نووي ريبوزي من ضرب آخر لتخليق ضروب جديدة ذات بروتين مختلف شكل (2 - 4) . وعند إصابة أوراق التبغ بتلك الضروب الجديدة أنتجت إصابة ونسل وراثي مماثل للضروب الأبوية التي أخذ منها الحامض النووي الريبوزي. لقد أكدت هذه التجارب بأن المادة الوراثية في هذه الرواشح هي الحامض النووي الريبوزي وليس البروتين. أثبتت الأبحاث الحديثة حول هذه الرواشح ورواشح أخرى بأن الحامض النووي الريبوزي يتحول إلى حامض نووي منقوص الأكسجين بعد دخوله خلايا المضيف ليكمل دورته داخل المضيف لتكوين ذرية جديدة حاوية على الحامض النووي الريبوزي. لقد أثبتت نتائج هذه التجارب وتجارب أخرى عديدة أجريت فيما بعد بأن ما كان يعتقده العلماء في بداية هذا القرن من أن البروتينات هي العوامل الوراثية بسبب امتلاكها ما يعرف بالتباين الكيميائي (**Chemical diversity**) والذي لم يكن معروفاً في الحامض النووي المنقوص الأكسجين والضروري للمادة الوراثية كان خطأ

كبيراً وخصوصاً بعد ما نشر العالمان وأطسون وكريك عام **1953** نموذجاً محتملاً للتركيب الكيميائي الجزئي للحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين الذي فتح الآفاق الحقيقية لدراسة الوراثة الجزيئية وعلوم الحياة الجزيئي.



شكل (**2 - 4**) : تجارب كونرت وسانجر لإثبات دور المادة الوراثية حيث قاما بفصل بروتينات أغلفة عدد من سلالات راشح التبغ **TMV** عن الحامض النووي ثم دمج بروتين سلالة مع **RNA** سلالة أخرى حيث أن السلالات الناتجة كانت تشبه السلالات التي تم أخذ الحامض النووي منها.

مميزات المادة الوراثية

هناك ثلاثة مميزات لإعتبار الحامض النووي منقوص الأكسجين هو المادة الوراثية وهي مميزات توفرت بشكل فريد فيه دون غيره من البوليمرات، وهذه المميزات هي :

1- أن المادة الوراثية يجب أن تحمل جميع المعلومات الضرورية لإدارة تنظيم محدد ودقيق.

تتمكن المورثات من التعبير عن نفسها (Expression) من خلال تصنيعها للبروتينات الخاصة بكل منها. إن هذه البروتينات هي أيضاً بوليمرات مكونة من عدة مئات من النسخ المكررة لعشرين وحدة جزيئة مختلفة تدعى الأحماض الأمينية. تتضمن تتابعات هذه الأحماض الأمينية جميع الصفات الكيميائية والفيزيائية للبروتينات. ولا بد للمادة الوراثية من تنظيم بداية ونهاية عملية تصنيع هذه البروتينات.

إن التتابع الكامل لكل حامض أميني من الأحماض الأمينية المكونة للبروتين المنتج يحتاج إلى شفرة (Code) من مونوميرات مختلفة مثبتة في المادة الوراثية. ولو أن المادة الوراثية مكونة من وحدة مكررة مفردة مثل الادينيين المتعدد (Polyadenine) أو أي وحدة مكررة مفردة مثل التتابع AGCTAGCT AGCT فإنها لا تتضمن المعلومات الكاملة بل معلومات قليلة جداً بسبب محدودية التتابع المكررة ولكن بما أن القواعد الأربعة المكونة للحامض النووي يمكن ترتيبها بأي تتابع وبما أن التتابع يمكن أن يختلف من جزء من الجزيئة إلى أخر ومن كائن إلى آخر فإنه يمكن أن يتضمن على تتابعات فريدة عديدة يمكن أن يكون أي منها هو مورث مفرد. وبذلك فإن عملية إنتاج البروتينات يمكن أن تتم وتدار من خلال سلسلة طويلة من الحامض النووي. والسؤال الذي يخطر بالبال من خلال هذا التوضيح هو أنه كيف تتمكن سلسلة

مكونة من قواعد أربعة من إنتاج عدة مئات من تتابعات الأحماض الأمينية ومن خلال استخدام 20 حامض أميني لأنتاج سلسلة من متعدد الببتيدات؟

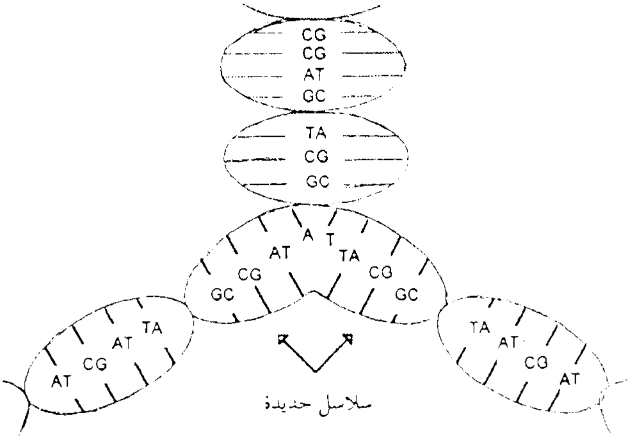
يتم ذلك من خلال عملية بسيطة وذلك بقراءة تتابعات قواعد الأوامر (Orders) على الحامض النووي (يتم ذلك بقراءة كل ثلاثة قواعد سوية) ومن ثم ترجمتها إلى تتابعات أحماض أمينية حيث تمثل قراءة كل ثلاث قواعد تتابع لحامض أميني معين وتدعى تتابعات قواعد الأوامر (أي كل ثلاثة قواعد) بالشفره الوراثية (Genetic Code).

2. يجب عل المادة الوراثية أن تتضاعف بشكل دقيق جداً لذا فإن جميع المعلومات التي تحتويها سوف تنتقل بالضبط إلى الخلايا الجديدة (Daughter Cells). إن التضاعف المضبوط لجزئية الحامض النووي يكمن في تكامل (Complementary) أزواج القواعد النيتروجينية AT والـــ GC في أشـــرطة النيوكليوتيد. وعن طريق فصل أشرطة الحامض النووي عن بعضها يمكن أن يخدم كل شريط كقالب لصناعة شريط جديد مما ينتج في النهاية زوجان من الأشرطة المخلزنة المشابهة تماماً شكل (2 - 5).

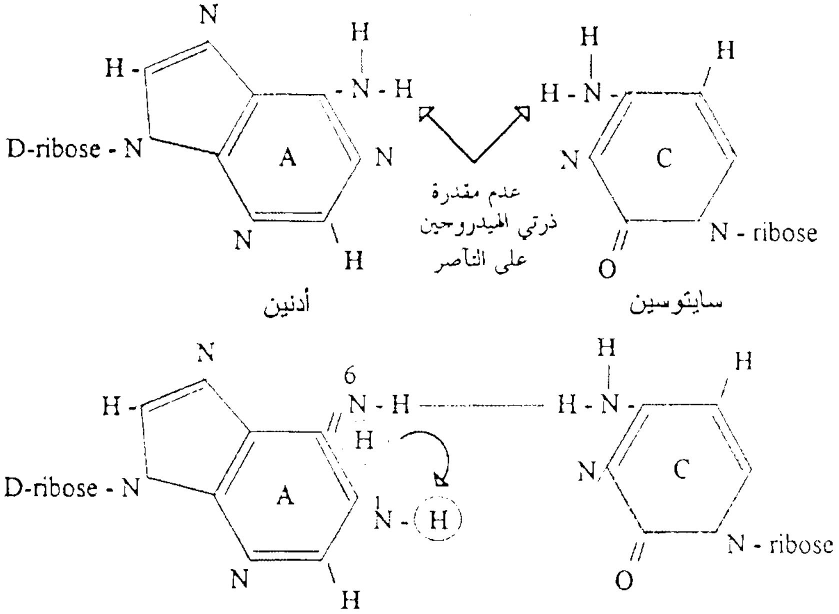
3. إن المادة الوراثية يجب أن تكون قادرة على ظهور طفرات وراثية آنية والتي تنتقل وراثياً إلى الأجيال القادمة.

إن الخصوصية في أزدواج Pairing قواعد البيورينات والبيرميدنيات في تركيب الحامض النووي يحتاج إلى موقع ثابت لذرات الهيدروجين في القواعد. ولكن يمكن أن تحصل حركة انتقالية لهذه الذرات أحياناً. فمثلاً الادنين والسايتوسين لا يمكن أن يتقابلا لتكوين زوج قاعدي ولكن زحف ذرة الهيدروجين من الموقع 6-amino في الادنين إلى الموقع N-1 سوف يسمح للهيدروجين بأن يرتبط بين تلك القواعد شكل (2 - 6). فإذا ما حدث مثل هذا الازدواج النادر خلال عملية تضاعف الحامض النووي فإن أحد أشرطة

الحامض سوف يحمل سايتوسين بدلاً من الثايمين في تلك النقطة ويؤدي ذلك إلى تغيير قاعدة نيتروجينية واحدة في شفرة وراثية معينة بحيث تتغير المعلومات التي تحملها هذه الشفرة (راجع الفصول القادمة) . مثل هذه المقدرة على تغيير موقع الهيدروجين في القواعد تدعى بالانحراف التاتوميري (Tatomeric Shift) وتكون في العادة نادرة وتترافق مع ثبوتية المعلومات الوراثية .



شكل (2-5) تضاعف الحامض النووي **DNA** طبقاً لنموذج الحلزون المزدوج .



شكل (2 - 6) : ازدواج القواعد النيتروجينية استناداً للموقع الثابت لذرات الهيدروجين فيها ويلاحظ ازدواج السايتوسين مع الادنين بعد زحف ذرة الهيدروجين من الموقع **6-amino** إلى الموقع **1-Nitrogen** مما يولد الطفرة الوراثية .

موقع الحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين في الخلية

كان يعتقد منذ سنين طويلة بأن المورثات هي الأجزاء المسؤولة عن نقل الصفات الوراثية والتي كان يعتقد بأنها تقع على الصبغيات. وكان هناك افتراض بوجود علاقة بين المورثات والبروتينات والذي له أهمية كبيرة في تطور علم الوراثة. إلا أن هذا الإفتراض لم يتحقق لعدم معرفة التركيب الجزيئي للمورث آنذاك. ولسنوات عديدة كان هناك أمل بعد تطوير المجهر الضوئي في رؤية المورثات مرتبة الواحدة جنب الآخر على الصبغيات. إلاأنه وفي عام **1940** حيث ظهر المجهر الالكتروني الذي له قابلية تكبير تفوق كثيراً المجهر العادي، خاب ظن العلماء في رؤية الصفوف متراصة من المورثات كما تخيلوها على الصبغيات حيث لم يظهر المجهر الالكتروني أي تكرار متشابه على المستوى الجزيئي للصبغي. وعلى الرغم من أن الحامض النووي منقوص الأكسجين اكتشف منذ عام **1871** إلا أنه لم يجلب الانتباه إليه كونه المادة الوراثية المفترضة باسمها المورثات كما لم يكن موقعه معروفاً حتى عام **1924** حيث نشرت طريقة صباغة الحامض النووي منقوص الأكسجين والتي أطلق عليها طريقة فولجين للصبغ (**Feulgen Staining Procedure**). تعتمد هذه الطريقة على نوع من الأصباغ الكيميائيةالتي لها قابلية على التفاعل مع السكريات الموجودة في الحامض النووي منقوص الأكسجين مكونة مركبات حمراء اللون وقد ظهرت المركبات الحمراء لهذه الصبغة فوق الصبغيات مما أثبت أن الحامض النووي منقوص الأكسجين يقع على الصبغيات وهو الذي سلط الضوء الحقيقي حول دور هذا الحامض كمادة وراثية. أثبتت الدراسات التي تلت تحديد موقع الحامض النووي منقوص الأكسجين على الصبغيات بأن هناك كمية منه تقع خارج نوى الخلايا على الأخص في الخلية البكترية، حيث يظهر فيها على هيئة حلقة تدعى البلازميدات، وكذلك كميات منه تقع في المايتوكوندريا يدعى بالحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين

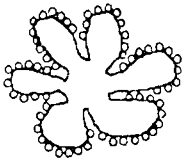
المايتـو كـونـديري (mt DNA) أو في البـلاسـتـيـدات ويـدعى الحامض النووي منقوص الأكسجين البلاستيدي (Plastid DNA).

تركيب صبغي الأحياء بدائية النواة :

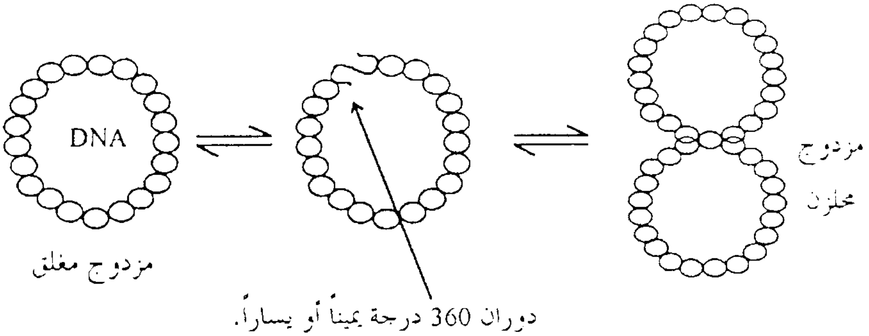
تعتبر بكتريا القولون من أكثر الأحياء بدائية النواة التي تم دراستها في هذا المجال. يتألف الصبغي البكتيري الذي يدعى أيضاً بالنيوكليود (Nucleoid) أو الصبغي الملتف (Folded Chromosome) من حامض نووي ريبوزي منقوص الأكسجين مكثف على هيئة حلقة يبلغ محيطها حوالي 1100 ميكرون.

تقع هذه الحلقة في منطقة خلوية تدعى بالمنطقة النووي (Nuclear region). يترتب الحامض النووي في صبغي البكتريا على شكل طيات تمتد إلى الخارج وتمتد من هذه الطيات طيات ثانوية أخرى. وهذا ما يمكن الحامض النووي البكتيري من أن يكون شديد الانطباق بحيث يتمكن من أشغال حيز صغير جداً من قطر الخلية البالغ 1 - 2 ميكرون. ويدعى مثل هذا الحامض الشديد الانطباق بالحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين فائق الحلزنة (Supercoiled DNA) شكل (2 - 7).

هناك نوعين من الحلزنة الأولى وهي الحلزنة الفائقة أو تدعى بالحلزنة الموجبة، والثانية قليلة الحلزنة وتدعى بالحلزنة السالبة. ويمكن ملاحظة حصول الحلزنة الموجبة والسالبة عند كسر أحد خيوط المزدوج الحلزن حيث أنه فيما إذا تحرر الخيط المكسور وأخذ بالدوران بعكس إتجاه الحلزنة فإنه سيكون ذو التفاف سالب وإذا حصل العكس فإنه سيكون ذو التفاف موجب. ويمكن لحلقة الحامض النووي منقوص الأكسجين المغلقة بأن تتجه لتصبح حلقة ذات حلزنة فائقة. ويلعب أنزيم الجايريز (Gyrase) دوراً مهماً في عملية الحلزنة الفائقة فيما يكون لأنزيم تكسير الحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين (DNase) دوراً معاكساً شكل (2 - 8).

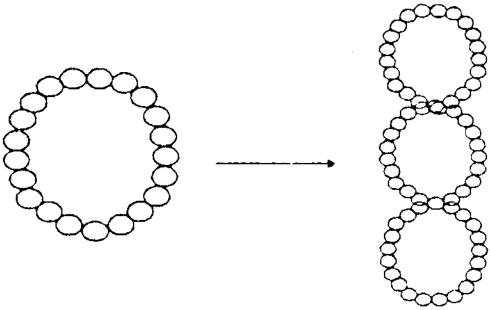


شكل (2 - 7) تركيب صبغي بكتريا القولون ويلاحظ الطيات السبع الرئيسية والطيات الثانوية (50 - 40 طية) .



شكل (2 - 8) ميكانيكية دوران خيط مفرد من حلقة حامض نووي ونماذج لحلقة حامض نووي ومحلزن .

يعتقد بأن لأنزيم تحطيم الحامض النووي (DNase) أهمية كبيرة في عملية تضاعف الحامض النووي حيث أنه لا بد من فك الحلزنة أولاً ويعمل الأنزيم الثاني الجايريز على تحقيق الحلزنة مرة أخرى بعد اكتمال التضاعف شكل (2 - 9) .



شكل (2 - 9) : عمل أنزيم الجايريز في حصول الحلزنة الفائقة ويعتمد حصول الحلزنة الفائقة السالبة على حصول كسر في مزدوج الحامض النووي المحلزن ومن ثم التحامه بعد مروره باتجاه اليمين.

تركيب صبغي الأحياء حقيقية النوى

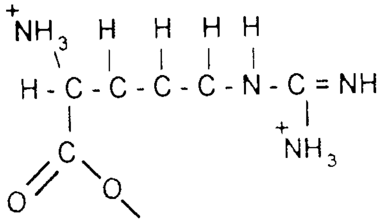
يتألف مجين (Genome) الكائنات حقيقية النوى من عدد مختلف من المورثات يزيد عددها على المليون مورث. تحتوي الأحياء حقيقية النوى على مجموعة ثنائية من المورثات حيث تتوزع كل مجموعة أحادية كاملة على عدد ثابت من الصبغيات. تمتلك الأمشاج الذكرية إحدى هاتين المجموعتين بينما توجد المجموعة الثانية في الأمشاج الأنثوية. كما أن جزيئة الحامض النووي منقوص الأكسجين الخاصة بالأحياء حقيقية النوى لا تحتوي فقط على المورثات التركيبية بل إن هناك العديد من الترددات غير المشفرة التي تتوزع بين المورثات التركيبية كالمتداخلات (Entrons) أو الترددات الأخرى التي لا يعرف أهميتها والتي تمثل نسبة كبيرة من الحامض النووي منقوص الأكسجين للأحياء حقيقية النوى. يتراوح طول جزيئة الحامض النووي منقوص الأكسجين التي تمثل مجين الإنسان (نصف العدد من الصبغيات) حوالي متراً واحداً يتوزع بين 23 صبغي. يحتوي كل صبغي على حوالي 15 - 85 مليمتر من الحامض النووي اعتماداً على طوله وحجمه، حيث يتراوح معدل قطر الصبغي في الطور الانقسامي حوالي 0.4 ميكرون وطوله 9 ميكرون فيما تكاد تختفي

الصبغيات في النواة ولا يمكن تمييزها في الطور الساكن غير انقسامي. أوضح التحليل الكيميائي للصبغيات بأن الصبغي يتكون من كروماتين يتألف أساسا من الحامض النووي منقوص الأكسجين بالإضافة لنوعين البروتينات هما البروتينات الهستونية وهي بروتينات قاعدية ذات شحنة موجبة في الوسط المتعادل (PH 7.0) وبروتينات غير هستونية حامضية ذات شحنة سالبة في الوسط المتعادل. تتمثل البروتينات الهستونية بنسبة مكافئة للحامض النووي الموجود. لقد تم عزل نحو خمسة أنواع من هذه البروتينات التي سميت: H4, H3, H2a, H2b,H1 وهي ثابتة في جميع الأحياء عدا بعض الحيوانات المنوية. تترتب الهستونات بطريقة خاصة مع حمض نووي مكونة معقد تركيبي يمثل الوحدة الأساسية المكونة للكروماتين.

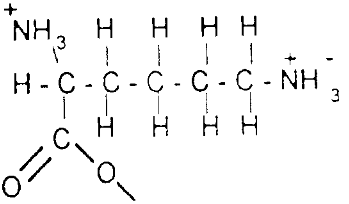
يدعى هذا المعقد التركيبي بالنيوكليوسوم (Nucleosoe). البروتين الهستوني H1 يختلف بين الأحياء ويعتقد بأن لهذا الاختلاف دور مهم في تعبير المورثات. يعزى ذلك إلى أحتواء هذه البروتينات على نسبة عالية (20-30 %) من حامض الارجنين واللايسين وهما من الأحماض القاعدية ذات الشحنة الموجبة التي ترجع إلى وجود مجموعة الأمين ($-NH_3^+$) في نهايتها ويسمح لهذه البروتينات الهستونية بالاتحاد مع جزيئة الحامض النووي السالبة الشحنة بسبب وجود مجموعة الفوسفات سالبة الشحنة شكل (2 - 10).

يتركب النيوكليوسوم من سلسلة من الأجسام البيضاوية التي يبلغ قطر كل منها حوالي 110 الكستروم وبإرتفاع 60 انكستروم. تتألف الجسيمة البيضاوية أو النيوكليوسوم من لب مؤلف من ثمانية جزئيات من البروتينات الهستونية H4,H3,H2a,H2b تحاط بلفتين من شريط الحامض النووي بطول 160-146 زوج قاعدي ويعمل جزىء تاسع من البروتينات الهستونية وهو البروتين H1 على تثبيت اللفتين من الخارج. ويعتقد بأن ترتيب الهستونات الداخلية والخارجية في تركيب النيوكليوسوم له دور أساسي في حماية جزيئة

حامض الأرجنين



حامض اللايسين



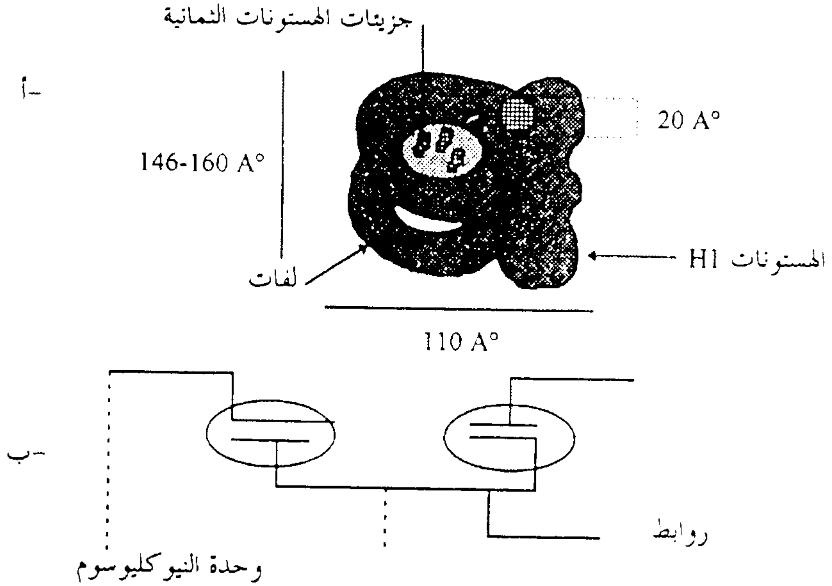
شكل (2 - 10) الأيونات الموجبة في حامضي الأرجنين واللايسين الداخلة في تركيب البروتينات الهستونية والتي ترجع إليها الطبيعة القاعدية والشحنة الموجبة.

الحامض النووي من التحطم بواسطة الانزيمات المحطمة (Nucleases) ودور في عملية تعبير المروثات شكل (2 - 11) .

ترتبط تلك الجسيمات البيضاوية مع بعضها بواسطة أشرطة حامض نووي ذات أطوال مختلفة تتراوح بين 8 - 114 زوج قاعدي .

تتألف الوحدة الكاملة للنيوكليوسوم من تسع جزيئات هستونية و 200 زوج قاعدي (تمثل لفات النيوكليوسوم واللفة الرابطة) . بينما يبلغ قطر المزدوج الذي يمثل اللفة حوالي 20 انكستروم .

إن هذا التصور للوحدةالبنائية للنيوكليوسوم قد جاء من التحليل الكهربائي باستخدام طرق الترحيل الكهربائي (Electrophpresis) للهلام . حيث يتم في هذه الطريقة فصل الحامض النووي من البروتينات ويتم بعدها تحطيم الحامض النووي بواسطة الأنزيمات المحطمة ويتم ترحيل القطع عبر الهلام باستخدام تيار كهربائي عالي حيث تتسارع القطع ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة بالهجرة سريعاً باتجاه القطب الموجب فيما تتوالى القطع الأثقل



شكل (2 - 11) : أ- تركيب النيوكليوسوم ويلاحظ التفاف جزيئة الحامض النووي حول لب مكون من ثمانية جزيئات هستونية وجزيء تاسع خارجي لتثبيت لفات الحامض.
ب - أسلوب أرتباط وحدات النيوكليوسوم المكونة للكروماتين.

بالهجرة بنفس الاتجاه ولكن بسرعة مختلفة اعتماداً على أوزانها الجزيئية. وكذلك الحال بالنسبة لفصل أجزاء البروتين.

لقد أدى الاستخدام المثالي والبديع لتلك التقنيات إلى ثورة حقيقية ساهمت في إبراز الكثير من المعلومات التي ساعدت في الإجابة على العديد من الأسئلة المحيرة حول ترتيب المادة الوراثية وطبيعتها. وعلى الرغم من المعلومات الكبيرة حول تركيب وترتيب المادة الوراثية فإنه لازال هناك العديد من الجوانب التي لا تزال الأسئلة تتردد عنها وخصوصاً فيما يخص أهمية ترتيب الحامض النووي بالطريقة التي شرحناها ودور كل جزء مكون لهذا الترتيب وخصوصاً البروتينات والتماثل في هذا الترتيب لدى الكائنات الحية

المختلفة.

تنظيم الحامض النووي في صبغيات الأحياء حقيقية النوى

اعتمدت دراسة تنظيم الحامض النووي في الصبغيات أساساً على طرق التلوين. تعتبر طريقة فولجين من الطرق الرائدة في هذا المجال وتعتمد على نوع من الأصباغ الكيميائية ذات القابلية على التآصر مع سكريات الحامض النووي.

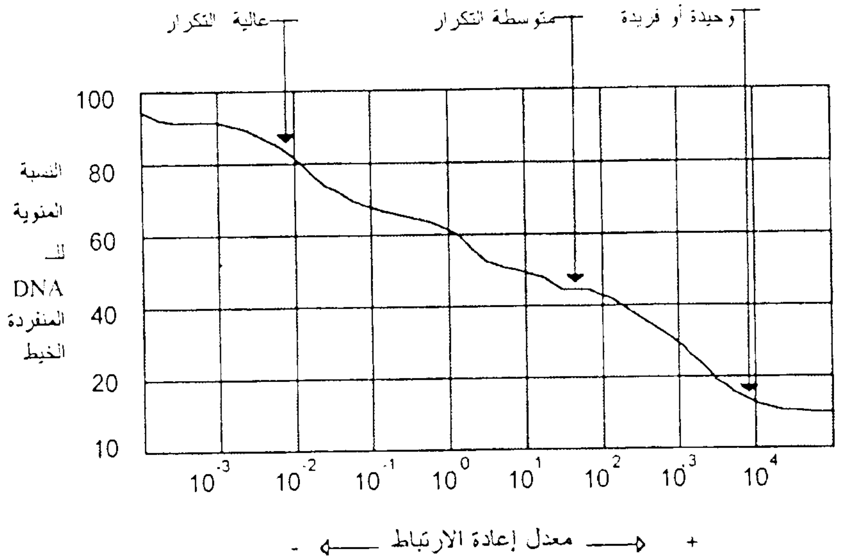
ويتوفر لدينا اليوم أنواع مختلفة من طرق تلوين الصبغيات ومن أشهر هذه الطرق ما يسمى بتحزم G (G-banding)، وتحزم C (C-banding) وغيرها. إن فحص الصبغيات الملونة بتلك الطرق تحت المجهر الضوئي يوضح بأن هناك مناطق مختلفة الاصطباغ حيث تظهر مناطق شديدة الاصطباغ ومناطق باهتة الاصطباغ معطية الصبغي هيئة ذات حزم أو أقلام. تدعى المناطق الفاقعة الاصطباغ بالكروماتين المتباين (Heterochromatin). ويأتي اصطباغها الشديد من الحلزنة الفائقة والشديدة في هذه المناطق بينما تدعى المناطق الباهتة اللون بالكروماتين الحقيقي (Euchromatin) حيث تكون الحلزنة فيها أقل شدة.

أظهر التحليل الوراثي بأن معظم المورثات التركيبية القادرة على التعبير عن نفسها تقع في المناطق الفاتحة الاصباغ (الكروماتين الحقيقي) بينما تقع التتابعات غير المشفرة أو غير النشطة وراثياً في منطقة الكروماتين المتباين. كما أن طرق الطرد المركزي الفائق (Ultracentrifuge) المختلفة ساهمت أيضاً في فصل تتابعات الحامض النووي اعتماداً على أوزانها الجزيئية. كما أن طرقاً مثل تهجين الحامض النووي منقوص الأكسجين (DNA-DNA) أو تهجين النووي منقوص الأكسجين مع الحامض النووي الريبوزي (DNA-RNA) [التي تعتمد على استخدام النظائر المشعة في تعليم أحد الأشرطة المستخدمة ومن ثم استخدامه في عملية إعادة الارتباط (Reassosiation) باستخدام درجة حرارة

عالية وتبريد مفاجىء] أو طرق تحليل الكيمياء الحيوية (التي تعتمد على تحديد نسبة القواعد النيتروجينية في أزواج النيوكليوتيدات في تتابعات الحامض النووي منقوص الأكسجين) قد قدمت معلومات ممتازة عن وجود أشكالاً مختلفة من التتابعات في مناطق الكروماتين الحقيقي . لقد وجد بأن هناك العديد من التتابعات المتكررة (Repetitive DNA) وهي تمثل (20-50%) من مكونات مجينات الأحياء حقيقية النوى . وبالإضافة للتتابعات المتكررة فإن التحليل باستخدام التدرج الكثافي للحامض النووي وباستخدام الطرد المركزي الفائق يعطي حزمة ضيقة أو عدة حزم من الحامض النووي بالإضافة لحزمة رئيسية . تدعى مثل هذه الحزمة الضيقة بالـ DNA التابع Satellite DNA . كما أظهرت تجارب إعادة الارتباط بأن هناك أحجام مختلفة من التتابعات المتكررة حيث يوجد تتابعات DNA متكررة متوسطة وأخرى عالية التكرار بالإضافة لوجود تتابعات مفردة (Single sequences) وهي تمثل في الأحياء حقيقية النوى المورثات التركيبية . لقد وجد من هذه الدراسات بأن مجين الأحياء حقيقية النوى مكون من (40-80%) من التتابعات المفردة ذات النسخة الواحدة فيما يتراوح أعداد نسخ التتابعات متوسط التكرار بين 2- 100,000 وتزيد نسخ التتابعات عالية التكرار عن 100,000 نسخة شكل(2 - 12) .

لقد أظهرت نتائج الدراسات باستخدام الطرق السابق ذكرها بأن نسبة كبيرة من المجين مكونة أصلاً من التتابعات متوسطة التكرار تترتب بشكل متبادل مع التتابعات المفردة التي تمثل المورثات التركيبية . ويأتي إحاطة هذه التتابعات بالمورثات ليلقي الضوء على إحتمال أهميتها في عملية تنظيم عمل المورثات . وبالإضافة للأهمية التنظيمية التي يعتقد أن تقوم بها التتابعات متوسط التكرار فلقد وجد بأن هناك أنواعاً معينة من هذه التتابعات لها القدرة على الانتقال من موضعها إلى مواضع أخرى وتدعى مثل هذه التتابعات المتحركة بالعناصر المتنقلة (Transposable elements) أو تتابعات نومادك

(Nomadic sequences). إن الوظيفة الحقيقية لهذه العناصر المتنقلة غير معروفة إلا أنه أثبت بأنها مسؤولة عن حدوث العديد من الطفرات الوراثية في الحيوانات والنباتات كما يعتقد بأن لها دوراً في عملية تعبير المورثات ووظائف أخرى سيتم ذكرها عند التحدث عن البلازميدات. كما لم يتم التثبت من الدور الحقيقي للتتابعات العالية التكرار إلا أنه يعتقد بأن لها أهمية ما في عملية التطور الحياتي في الكائنات. وقد تم تعيين مناطق وجود هذه التتابعات على الصبغيات باستخدام طرق تلوين الصبغيات وكذلك طرق تعيين مواقع التتابعات باستخدام النظائر المشعة حيث وجد بأن معظم هذه التتابعات تقع في منطقة الكروماتين المتباين فيما تقع تتابعات المورثات التركيبية في منطقة الكروماتين الحقيقي.



شكل (2 - 12) : أنواع تتابعات معزولة من DNA الإنسان بواسطة طريقة إعادة الارتباط DNA - DAN أو DNA - RNA.

الجينات والصبغيات

الصبغيات كما تم شرحها هي عبارة عن حامض نووي منقوص الأكسجين وبروتينات مختلفة تتحد مع بعضهابشكل منظم كما هو الحال في صبغيات الأحياء حقيقية النوى. بينما يترتب صبغي الأحياء بدائية النوى كالبكتريا بطريقة خاصة عما هو عليه في الأحياء حقيقية النوى.

يلتوي الحامض النووي منقوص الأكسجين بشكل يختلف تماماً عن شكل الحلزنة السابق ذكره حيث يدعى التفاف جزيئة الحامض النووي في الصبغي بالحالة المكثفة (Condensed State) الناتج من إرتباطه مع البروتين. فيما يختلف الوضع بالنسبة للرواشح حيث لا يوجد صبغيات بل إن المادة الوراثية تكون ممثلة بجزيئة صغيرة من الحامض النووي الريبوزي أو المنقوص الأكسجين.

يمثل المجين بالنسبة للكائنات حقيقية النوى مجموعة زوجية كاملة من الصبغيات (diploid). يختلف حجم المجين من مجموعة لأخرى فمثلاً يعتبر مجين الرواشح أصغر أنواع المجينات فيما تحتوي الأسماك على أكبرها. فمثلاً يمتلك العاثي البكتيري MS2 مجين مكون من شريط من الحامض النووي الريبوزي مؤلف من أربعة مورثات فقط ويتراوح طوله حوالي 3569 زوج قاعدي (bp). فيما يتكون مجين راشح السيميان (Simian 40(sv40) من حلقة DNA مزدوجة حاوية على خمسة موثات ويتراوح طوله حوالي 5224 زوج قاعدي. وقد تحتوي بعض الرواشح والعاثيات الأكثر تطوراً على مجينات مؤلفة من أكثر من 250 مورث وهو أكثر من 50 مرة عن تلك التي سبق ذكرها. أما في البكتريا فالحال أكثر تعقيداً، فمثلاً في بكتريا القولون فإن صبغيها يتألف من أكثر من 1500 مورث بطول حوالي 4×10^6 زوج قاعدي.

أما في الأحياء حقيقية النوى والتي يكون المجين فيها معبأ في عدد من الصبغيات فإن أصغر مجين فيها ممثل في الدودة (Caenorhabditis elegans) وهو

أكثر بحوالي 20 مرة مما هو في مجين بكتريا القولون. فيما يكون مجين الإنسان وذبابة الفاكهة أكثر بحوالي 700-400 مرة مما هو في بكتريا القولون وعلى التوالي. إن حجم المجين كما هو واضح من الأمثلة السابقة يؤكد زيادة الحجم بتطور الأحياء فالأحياء الأكثر تطوراً هي الأكبر في مجينها ولا يستثنى من هذه القاعدة سوى بعض البرومائيات والأسماك حيث أن بعضها يمتلك مجين أكبر مما هو لدى الإنسان وبعض اللبائن. فعلى سبيل المثال فإن مجين الإنسان مؤلف من أكثر من مليون مورث فيما يتألف مجين ذبابة الفاكهة من أكثر من 600,000 مورث جدول (2 - 1).

جدول (2 - 1) : حجم مجينات لبعض الأحياء

الكائن	المجين
الإنسان	$3x10^9$
ذبابة الفاكهة	$12x10^7$
بكتريات القولون	$4x10^6$
العاثي T4	$2x10^5$
العاثي لامبدا	$48x10^3$
العاثي ØX174	5387
الراشح SV 40	5224

الفصل الثالث

التوليف الكيميائى للحامض النووي

Nucleic acid structure

المحتويات

- التركيب الكيميائي للحامض النووي منقوص الأكسجين.
- ثبات التركيب الكيميائي للحامض النووي منقوص الأكسجين.
- النموذج الثلاثي الأبعاد للحامض النووي المنقوص الأكسجين (نموذج الحلزون المزدوج)
- التركيز المولاري للقواعد النيتروجينية في الحامض النووي
- الحامض النووي الرايبوزي

مقدمة :

تم التعرف على التركيب الكيميائي للحامض النووي منذ نهاية العقد الثالث ومطلع العقد الرابع من هذا القرن. عرف الحامض النووي بأنه مؤلف من سلسلة عديدة البوليمرات وأنه يتألف من نيوكليوتيدات تتألف من سكر خماسي مرتبطة مع مجاميع فوسفات وقواعد نيتروجينية.

كما وجد بأن هناك أربعة قواعد نيتروجينية مختلفة في هذه النيوكليوتيدات. لقدأتاحت تقنية الترحيل الورقي (Chromatography) التي استخدمت عام 1940 والتي استخدمت في تحليل بوليمرات البروتينات فرصة لتحليل الحامض النووي. أثبت من خلالها العالم تشارجاف عام 1949 حقائق أخرى غير معروفة عن الحامض النووي. أهمها في أن النيوكليوتيدات لا تختلف فقط في القواعد النيتروجينية بل إن نسبة هذه القواعد مختلفة أيضاً. وإن النسبة تختلف من حامض نووي لنوع معين في الأحياء إلى أخر.

كما أنه في عام 1950 استخدم المجهر الالكتروني لدراسة الحامض النووي ووجد بأنه جزيئة غير اعتيادية مؤلفة من وحدات تمتد إلى الآلاف من الانكسترومات ويبلغ سمكها 20 انكستروم. اتاحت هذه الدراسة الفرصة أمام الباحثين في الخوض عميقاً في كنه الحامض النووي. وأظهرت صور أشعة إكس أخذت لبلورة حامض نووي بين عام 1950 - 1952 من قبل فرانكلين وجو سلنك روزيلند بأن الحامض النووي عبارة عن حلزون مزدوج أو ثلاثي الأشرطة. وفي عام 1952 أكتشف علماء الكيمياء العضوية في جامعة كامبرج

بأن النيوكليوتيدات المؤلفة للحامض النووي ترتبط مع بعضها بواسطة روابط فوسفات ثنائية الاستر مشكلة العمود الفقري. توجت هذه المعلومات جميعاً بنظرية نموذج الحلزون المزدوج التي وضعها واطس وكريك عام 1953 والتي أثبتت بأن الحامض النووي هو عبارة عن شريطين يتحلزنان مع بعضهما وتترتب النيوكليوتيدات في هذا النموذج بطريقة خاصة تسمح بتوفير الخصائص المهمة اللازمة بإعتباره المادة الوراثية.

التركيب الكيميائي للحامض النووي منقوص الأكسجين

الحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين هو عبارة عن جزيئات مكونة من وحدات متكررة (Polymers) تدعى بالنيو كليوتيدات. تتألف هذه من سكر خماسي الكاربون و مجموعة فوسفور وأربعة قواعد نيتروجينية. أثنان من هذه القواعد هما من البايرميدينات (Pyrimidines) التي تحتوي على حلقة بنزين واحدة وهما الثايمين (Thymine) والسايتوسين (Cytosine). أما القاعدتان النيتروجينيتان الأخريان فهما من البيورينات (Purines) التي تحتوي على حلقتي بنزين وهما الادنين (Adenin) والجوانين (Guanine) شكل (3 - 1). كما أن هناك أشكال محورة من هذه القواعد وبكمية قليلة في بعض الأحياء. عندما ترتبط القاعدة النيتروجينية مع السكر منقوص الأكسجين (Deoxribose). فإنها تكون مركباً يدعى نيوكليوسايد (Nucloside) وعند ارتباط سكر النيوكليوسايد مع مجموعة الفوسفور يتكون ما يدعى بالنيوكليوتايد (nucleotide) شكل (3 - 2).

ونظراً لوجود أربعة قواعد نيتروجينية فإن الحامض النووي يحتوي على أربعة أنواع من النيوكليوتيدات وهي الـ

* (deoxyadenylic acid) الذي ينتج من ارتباط الادينين.
* (deoxyguanylic acid) الذي ينتج من ارتباط الجوانين.

※ (thymidylic acid)الذي ينتج من ارتباط الثايمين.

※ (deoxy cytidylic acid) الذي ينتج من ارتباط السايتوسين.

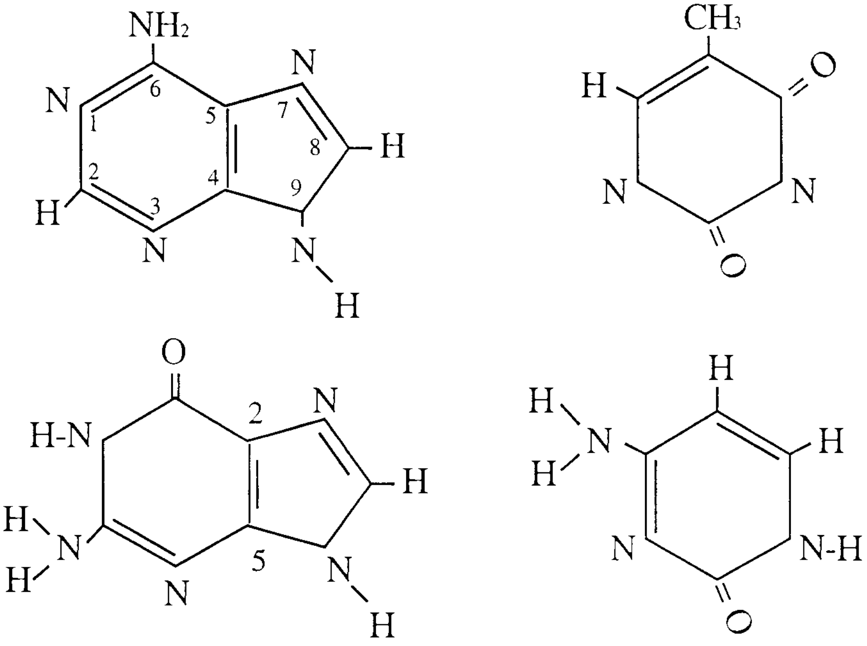
إن الاختلاف الوحيد بين هذه النيوكليوتيدات هو في ارتباط القاعدة النيتروجينية مع السكر. كما يطلق على هذه النيوكليوتيدات التسميات التالية :

※ deoxyadenosine 5-Monophosphate) ((d-AMP)

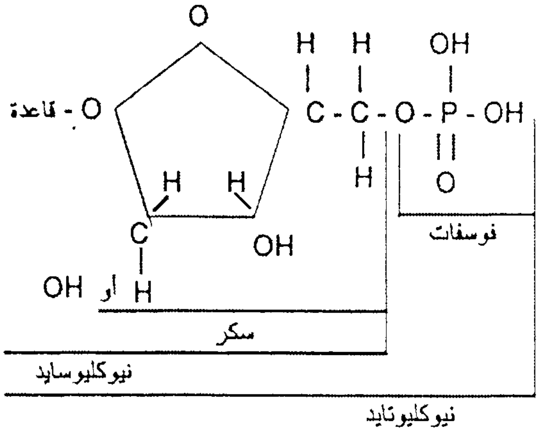
※ deoxyguansine 5-Monophosphate) ((d-GMP)

※ deoxythymine 5-Monophosphate) ((d-TMP)

※ deoxycytosine 5-Monophosphate) ((d-CMP)

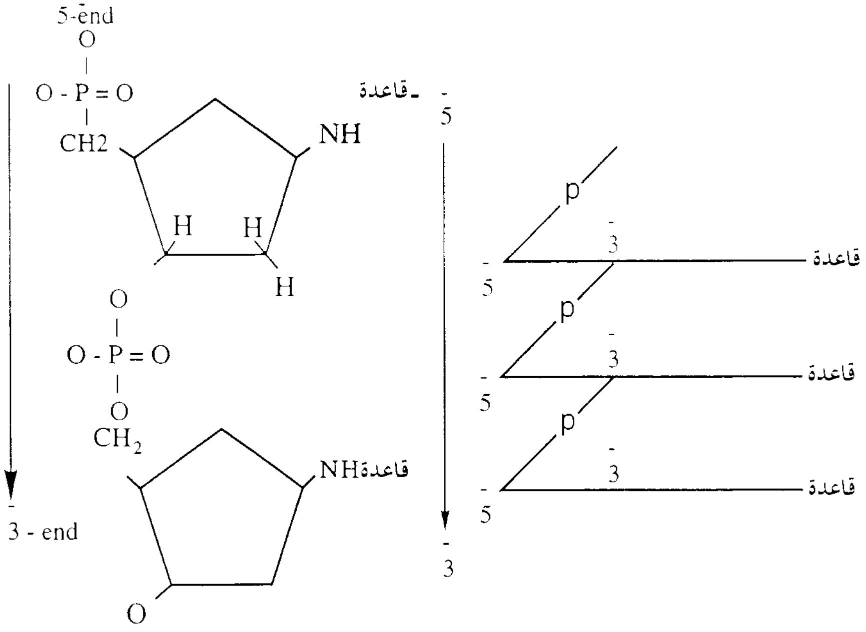


شكل (3 - 1) : القواعد النيتروجينية في الحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين.



شكل (3 - 2) : تركيب النيوكليوتيد.

ترتبط هذه النيوكليوتيدات في الحامض النووي لتكوين شريط متعدد النيوكليوتيدات حيث أن المجموعة الفوسفورية المرتبطة مع ذرة الكربون الخامسة لسكر النيوكليوتيد ترتبط مع ذرة الكربون الثالثة للسكر في النيوكليوتيد الآخر شكل (3 - 3) .

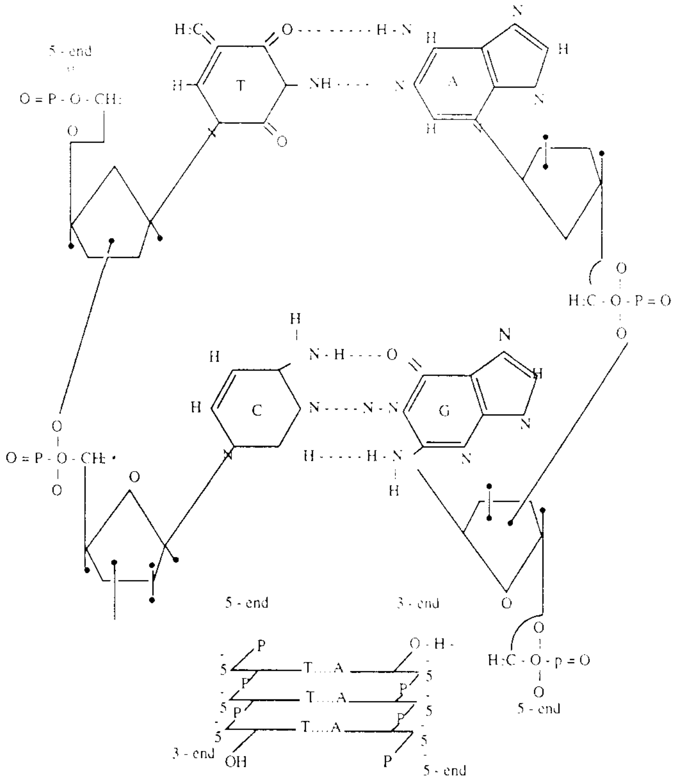


شكل (3 - 3) : ارتباط النيوكليوتيدات في سلسلة متعددة النيوكليوتيدات حيث أن المجموعة الفسفورية لذرة الكربون الخامسة لسكر نيوكليوتيد ترتبط مع ذرة الكربون الثالثة لسكر نيوكليوتيد آخر .

تدعى تلك الروابط بين الفسفور والسكر بروابط الفسفور ثنائي الإستر (phosphodiester bonds) . إن اتجاهات ارتباط ذرة الكربون الخامسة للسكر في النيوكليوتيد مع ذرة الكربون الثالثة لنيوكليوتيد آخر تستمر على طول الشريط - 5 - 3 - 5 مما يولد قطبية (Polarity) معينة تعتبر مهمة جداً في التضاعف والوظيفة الوراثية . ويلاحظ من اتجاهات الارتباط بأن المجموعة النهائية لكل شريط متعدد النيوكليوتيد هي مجموعة 5 - فوسفوريل [(5-P)-Phosphoryl)] حيث ترتبط ذرة الكربون الخامسة لنيوكليوتيد مع

مجموعة الفوسفور لتكوين هذه النهاية فيما تقع مجموعة 3-هيدروكسيل (3-OH) (hydroxyl) 3 في النهاية الثالثة.

تترتب نهايات شريطي الحامض النووي باتجاهات متعاكسة حيث يبدأ الشريط الأول بالنهاية الخامسة لينتهي بالنهاية الثالثة بينما يبدأ الشريط الثاني بنهايته المجاورة لبداية الشريط الأول بالنهاية الثالثة لينتهي بالنهاية الخامسة وهو ما يطلق عليه التوازي المتضاد (Antiparallel) شكل (3 - 4). وهذا يدل على أن القواعد النيتروجينية في الشريط الأول بإتجاه معاكس لإتجاه القواعد في الشريط الثاني.



شكل(3 - 4): الاتجاهات المتعاكسة لأشرطة الحامض النووي حيث تمثل أواصر الفوسفور ثنائي الإستر العمود الفقري للأشرطة بينما تمثل مجموعة P – 5 المجموعة النهائية لكل شريط.

ثبات التركيب الكيميائي للحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين

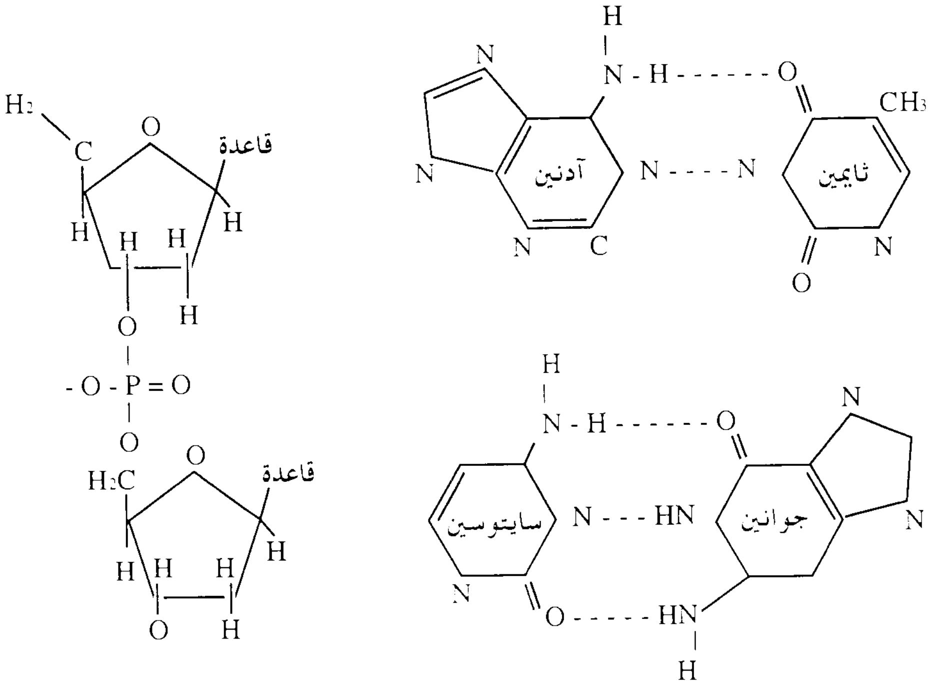
جزيئة الحامض النووي (DNA) تكون ثابتة تماماً في الوسط الخلوي ويعود ذلك إلى ثلاثة أنواع من الروابط الكيميائية الموجودة في تركيب البوليمرات. هذه الروابط الثلاثة هي:

1- الروابط المكافئة (Covalent bonds): وهي التي ترتبط بالذرات الداخلة في تركيب وحدات النيوكليوتيد مع آخر من خلال الجسور الفوسفورية (3- Phosphodiester bridge). تبدأ هذه الروابط من ذرة الكربون الثالثة من سكر خماسي للنيوكليوتيد المجاور تكون هذه الروابط القوية العمود الفقري لكل شريط وتعمل على تقوية الأشرطة متعددة النيوكليوتيدات لمقاومة الأضرار المحتملة وخصوصاً الكسور شكل (3 - 5أ).

2- الروابط الهيدروجينية الضعيفة (Hydrogen bonds) وتترتب هذه الروابط بطريقة لا تنكسر فيها الرابطة إلا إذا ما حصل عدة كسورات في نفس الوقت وهو ما يحتاج إلى طاقة عالية من الحرارة تصل إلى 100°م وهو ما لم يتوفر في الخلية ولكنه متوفر في العمل المختبر. ويساعد ذلك في فصل أشرطة الحامض النووي عن بعضها لتكوين أشرطة مفردة أو أحادية (single strand DNA) حيث تدعى عملية فصل الأشرطة عن بعضها باستخدام الحرارة العالية بالمسخ (denaturation) أو (Melting) شكل (3 - 5).

إن فصل أشرطة الحامض النووي وفر الإمكانية على تشخيص الاختلاف في تركيب القواعد النيتروجينية بين أنواع مختلفة من الأحماض النووية وبين أشكال جزيئية أخرى مختلفة من المورثات. بالإضافة إلى الروابط الهيدروجينية بين أشرطة الحامض النووي فإن الروابط الهيدروجينية موجودة أيضاً بين سلاسل السكر – فوسفور وجزئيات الماء المحيط بها.

3- الروابط غير المحبة للماء (Hydrophobic interactions) بين السطوح الملساء



شكل (3 - 5) : أ. الروابط المكافئة والهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية التي تحافظ على استقرارية الحامض النووي.

ب . رابطة الفوسفور ثنائي استر.

للقواعد النيتروجينية والتي تلتصق عمودياً على طول الشريط حيث تعمل على زيادة ثبوتية الشكل الجزيئي للحامض النووي كما ترتبط هذه مع الماء المحيط بالشريط بواسطة روابط هيدروجينية لزيادة ثبوتية الشريط ولمنع الماء من الدخول كمنافس مع القواعد النيتروجينية لتكوين روابط هيدروجينية مع بعضها البعض دون الماء.

إن جميع هذه الروابط تتداخل مع بعضها لتعمل على إعطاء ثبوتية الحامض النووي والمحافظة على صفاته الجزيئية والوظيفية تحت الظروف الفسلجية في الخلية. بالإضافة لهذه الروابط فإن هناك العديد من الأيونات

الموجبة مثل أيون الصوديوم (+Na) وأيون البوتاسيوم (+K) وأيون الكالسوم (++Ca) الموجودة في السائل المحيط تعادل الشحنة السالبة لمجموعة الفوسفات حيث بدون هذه الأيونات فإن التيار الكهربائي التابع يؤدي إلى إنحراف سلسلة السكر – فوسفور وبالتالي عدم استقرارها.

النموذج الثلاثي الأبعاد للحامض المنقوص الأكسجين أو الحلزون المزدوج

لم تكن نظرية النموذج الثلاثي الأبعاد التي وضعها واطسن وكريك عام 1953 هي أول محاولة لبناء نموذج للحامض النووي. بل سبقته محاولة واحدة ترجع إلى عام 1951 حيث وضعت نظرية لبناء نموذج حامض نووي على هيئة حلزون الفا من قبل العلماء كوثران وكريك وفاند. كانت الغاية من هذه النظرية هو توفير طريقة سهلة لاختبار احتمالية حصول خطأ في ارتباط القواعد النيتروجينية.

لقد أستفاد كريك كثيراً في محاولته مع زملاه حيث أعاد بالاتفاق مع واطسن تشكيل النموذج اللازم مستنداً إلى الحقائق الكثيرة التي توفرت حول الحامض النووي. وتكللت جهودهما في وضع نظرية النموذج الثلاثي الأبعاد.

وبعد مضي سنين طويلة على اكتشاف الحلزون المزدوج فإننا نعتقد الآن بأن تركيب الحامض النووي ليس بالسهولة التي افترضت فيه أول الأمر. حيث أثبتت البحوث العلمية المنشورة حول الحامض النووي إلى يومنا هذا بأن هناك أشكالاً تشذ عن النموذج الأصلي. فهناك العديد من الرواشح التي تتألف مادتها الوراثية من شريط مفرد وأن البعض الأخر مؤلف من حامض نووي ريبوزي. كما أن بعض الأحياء تتألف مادتها الوراثية من مزدوج تلتف أشرطته نحو اليسار وليس اليمين كما في نموذج الحلزون المزدوج. بالإضافة إلى أن بعض جزئيات الحامض شريطية وأخرى حلقية وقد تنتظم هذه بطريقة معقدة كما هو الحال في الالتفاف الفائق وغير ذلك. وعلى الرغم من أنه تم

تفسير جميع هذه الأشكال إلا أنها بقيت أمثلة للشذوذ عن النموذج الأصلي.

استند نموذج الحلزون المزدوج الذي وضعه العالمان واطس وكريك إلى العديد من المعلومات الكيميائية والفيزيائية التي نشرت حول الحامض النووي. حيث تم التعرف على التركيب الأولي لشريط متعدد النيوكليوتيد المفرد والتي من خلاله ازداد الظن بوجود الحامض النووي كأشرطة متعددة النيوكليوتيدات متداخلة مع بعضها. إلا أن الشكل الذي ظهر من خلال صورة أشعة إكس (X-ray) الذي أخذ لبلورات من الحامض النووي من قبل العالمان فرانكلين وروزيلند جوسلنك (Franklin & Gosling 1953) بين ما يلي:

أ. مكونات الحامض النووي موزعة بطريقة منظمة تنظيماً دقيقاً جداً.

ب - إن كل جزئية حامض نووي مؤلفة من شريطين أو أكثر بشكل حلزون.

جـ - إن الأشرطة تلتف في الحلزنة من اليمين.

كانت هذه النتائج بحق أول اللبنات الاساسية لصياغة نموذج الحلزون المزدوج. كما أن نتائج الدراسات البايوكيميائية حول التحلل الكيميائي المائي للحامض النووي التي قام بها العالم شارجاف (Chargaff, 1950) والتي أظهرت بأن هناك نسبة مئوية معينة من القواعد النيتروجينية خاصة لكل نوع من الحامض حيث تختلف هذه النسبة من حامض نووي لكائن إلى حامض نووي لكائن آخر. وجد شارجاف بأن الحامض النووي بشكل عام يحتوي على كمية من الادنين مساوية لكمية الثايمين (A = T) وكمية من الجوانين مساوية للسايتوسين (G = C) ولكن كمية الادنين والثايمين معاً (A+T) والجوانين والسيتوسين معاً (G+C) تختلف من مصدر حامض نووي إلى آخر.

إن ذلك يوضح بأن نسبة الادينين إلى الثايمين والجوانين إلى السايتوسين

متساوية G:C أو A:T ولكن نسبة كلاً من الادنين والثايمين معاً (AT) تختلف عن نسبة الجوانين والسايتوسين معاً (GC).كان على واطس وكريك الاستفادة من هذه المعلومات التفصيلية في بناء النموذج الجزيئي بطريقة منطقية وعلمية.

كان أبسط نموذج يمكن أن يبنى من سلاسل عديد النيوكليوتيدات هو أن ترتبط سلسلتان مع بعضهما بحيث تكون روابط الفوسفور ثنائي الاستر التي تربط النيوكليوتيدات نحو الخارج بينما ترتبط القواعد من الداخل. وظهر الحلزون المزدوج بعد أن تم التأكد بأن قواعد الثايمين والجوانين لا بد أن تدخل في النموذج بصورة كيتو (Keto) وليس اينول (Enol) وهكذا تم ربط الادنين والثايمين والجوانين مع السايتوسين ليظهر في النهاية نموذج الحلزون المزدوج الذي تلتف أشرطته نحو اليمين وهو ما يؤكد ما ظهر من أشعة إكس التي أخذت سابقاً للحامض النووي. لقد وجد بأن قطر الحلزون المزدوج والذي يفي بإرتباط الادنين والثايمين A - T والجوانين والسايتوسين G - C خلال الفراغ بين سلاسل السكر – فوسفور هو 2 نانوميتر(120 انجستروم) حيث كانت نسبة الادنين إلى الثايمين والجوانين إلى السايتوسين في هذا النموذج 1 : 1. ومع ظهور هذا النموذج فإنه أصبح النموذج الرسمي والعلمي لتركيب الحامض النووي. وليس هناك من طريقة لإثبات صحة التفاف السلاسل نحو اليمين وأن الروابط الهيدروجينية هي التي تربط أزواج القواعد من هذا التركيب. لقد جاءت الإجابة على ذلك بعد أكثر من 25 عاماً من ظهور النموذج حيث تمكن علماء في الكيمياء العضوية من بناء سلاسل قصيرة معروفة التتابع من الحامض النووي مختبرياً. دعيت هذه بالنيوكليوتيدات القليلة (Oligonucleotides). وجد بأن خليط النيوكليوتيدات القليلة مع أخرى متممة أدى إلى تكوين حلزونات مزدوجة وتم الحصول على هذه بهيئة بلورية يمكن استخدامها في التقاط صورة بأشعة إكس.

أكد تحليل هذه الصور بأن الحلزونات المزدوجة ذات التفاف يميني و أن أزواج القواعد ترتبط مع بعضها بطريقة يكون فيها أحد القواعد منحرفاً عن الثاني . أثبتت هذه الصور أيضاً بأن جزيئة الحامض النووي لا تترتب بشكل حلزون مزدوج منتظم تماماً .

لاحظ واطس وكريك من خلال نموذجهما للتركيب الجزيئي للحامض النووي منقوص الأكسجين بأنه يمتلك صفات يمكن أن تساهم في توضيح أربعة أمور مهمة للمادة الوراثية وهي :

1- الثبوتية خلال العمليات الأيضية المختلفة .

2- تضاعف محكم .

3- تنوع جزيئي .

4- سعة كافية لحصول طفرات وراثية .

هذه الصفات المهمة للحامض النووي هي :

أولاً - إن الحامض النووي لا يتبدل خلال العمليات الأيضية المختلفة داخل الخلية على الرغم من تحلل واندثار عدد من الجزيئات الأخرى داخل الخلية خلال حياة الخلية .

ثانياً - إن كل من أشرطة الحلزون داخل المزدوج للحامض النووي يمكن أن يخدم كقالب (template) لتصنيع نسخة مطابقة تماماً للخيوط الأبوية وهو ما ساعد على تفسير كيفية انتقال الصفات من خلية إلى أخرى .

ثالثاً - جزيئات الحامض النووي مطابقة تماماً للاحتياجات الوراثية للتباين وعلى الرغم من محدودية أزواج القواعد النيتروجينية في الجزيئة إلا أن الترتيب المستقيم للقواعد أو الأزواج القاعدية غير محدود . إن مع وجود أربعة قواعد نيتروجينية أو أربعة أزواج من القواعد في أي طول من المزدوج

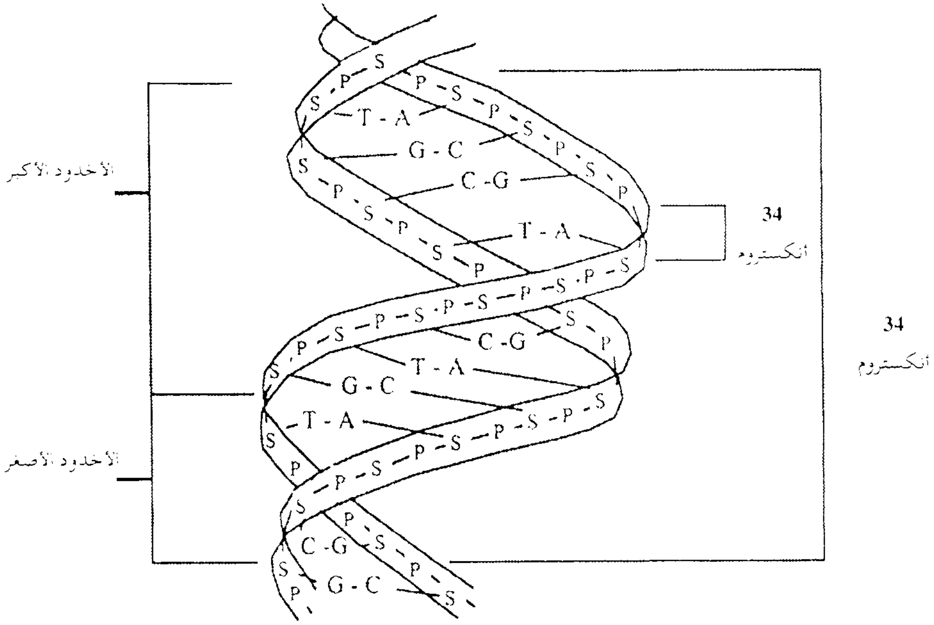
فإن العدد النظري لمختلف الجزيئات سيكون 4^n فإذا كان معدل حجم المورث هو 500 زوج قاعدي (bp) فإنه سكيون هناك 4^{500} من التتابعات المختلفة أو المورثات.

هذا يعني أننا سنتمكن من بناء 4^{500} مورث أو تتابع من 500 زوج قاعدي في كل تتابع محتمل (Permuted sequence) للقواعد أو الأزواج القاعدية الأربعة. وهو ما يؤكد بأن للحامض النووي تنوع كافٍ لاعتباره المادة الوراثية.

5- إن الطفرات الوراثية يمكن أن تحصل عن طريق استبدال القواعد (Bases subsitution) خلال عملية التضاعف حيث يمكن أن ترتبط قاعدة نيتروجينية مع أخرى غير ملائمة مثل ارتباط الادنين والسايتوسين A-C بدلاً من الادنين والثايمين A-T كما هو طبيعي بطريق الخطأ. وينتقل هذا الخطأ عبر الأجيال الجديدة (راجع الفصول الأخرى).

إن النموذج الثلاثي الأبعاد الذي وضعه العالمان واطس وكريك للحامض النووي بين أنه مؤلف من شريطين متعددي النيوكليوتيدات ملتفين على بعضهما لإعطاء حلزون مزدوج متناظر.

إن كل شريط يلتوي من الجهة اليمنى بإتجاه عقارب الساعة كل 34 انجستروم (34 A°) وتشغل القواعد النيتروجينية مسافة 3.4 انجستروم بين واحدة وأخرى على طول الشريط. هذا معناه بأن هناك عشرة قواعد نيتروجينية بعد كل استداره للشريط أي أن هناك عشرة قواعد تتقابل مع بعضها البعض في الشريط المزدوج لغاية الاستدارة. ترتبط كل قاعدتين متقابلتين برابطة هيدروجينية لتتمكن في النهاية من ربط الشريطين مع بعضهما. يظهر من خلال التواء الاشرطة أخدود يدعى الأخدود الأصغر (Minor groove) بينما يدعى الأخدود الذي يليه بالأخدود الأكبر (Major groove) شكل (3 - 6).



شكل (3 - 6) : رسم تخطيطي لنموذج واطس وكريك لتركيب الحلزون المزدوج في الحامض النووي (DNA)

التركيز المولاري للقواعد النيتروجينية في الحامض النووي

إن التحلل المائي للحامض النووي والذي أوضح نسب القواعد النيتروجينية إلى بعضها فيه برهن على أن التركيز المولاري للقواعد والذي يعبر عنه بالقوسين [ ] يمتلك ثلاث صفات هي :

1- إن تركيز قواعد البيورينات مساوي لقواعد البيرميدينات [C] + [T] = مجموع البارميدينات = [G] + [A] = مجموع البيورينات .

2- إن تركيز الادنين والثايمين متساوي كما هو الحال في تركيز الجوانين والسايتوسين. [C] = [G] و [T] = [A]

3- تركيب القاعدة يمكن أن يعبر عنه بالمعادل التالية :

$$\frac{[G] + [C]}{[G] + [C] + [A] + [T]}$$

ويطلق عليه أيضاً بنسبة الجوانين والسايتوسين وهي نسبة ثابتة في أفراد النوع الواحدة ولكنها تختلف من نوع إلى آخر جدول (3-1) .

إن التساوي في نسب البيورينات والبيرميدينات لا يكون مضبوطاً تماماً بسبب عدم دقة الأجهزة الحالية مما يوجد فروقاً بسيطة في هذه النسبة حيث لوحظ بأن الحيوانات والنباتات تحتوي على نقص في نسبة G+C مقارنة مع نسبة T+A في الحامض النووي حيث تكون نسبة G + C فيها تساوي 38 و 47 . وتظهر البكتريا والرواشح فروقاً معنوية تتراوح بين 31 (نسبة G+C)إلى 72 وتكون هذه النسب متقاربة أو متشابهة بين الأنواع ذات العلاقات التطورية .

جدول (3 - 1) : نسب القواعد النيتروجينية في الحامض النووي لأحياء مختلفة .

الكائن	A	T	G	C	نسبة G+C
العاثي T7	26	24	24	24	48
بكتريا القولون	24.7	23.6	26	25.7	51.7
مكورات ذات الرئة	30.3	29.5	21.6	18.7	40.3
الخميرة	31.7	32.6	18.3	17.4	35.7
الحنطة	27.3	27.1	22.7	22.8	45.7
حيمن بشري	30.7	31.2	19.3	18.8	38.1

الحامض النووي الريبوزي Ribonucleic acid

كان يعتقد لسنوات بعد إكتشاف الأحماض النوويه بأن الحامض النووي الريبوزي موجوداً في الخلايا النباتية فقط فيما يوجد الحامض النووي منقوص الأكسجين في الخلايا الحيوانية. لكن بعد تطور الأدوات والطرق العلمية وجد بأن كلا الحامضين موجودين في جميع الخلايا.

يمثل الحامض النووي الريبوزي 10% من مجموع الأحماض النووية في الخلية. ولا يختلف تركيبه الكيميائي كثيراً عن الحامض النووي منقوص الأكسجين. فهو مؤلف من جزيئة مفردة طويلة غير متفرعة وتمثل النيوكليوتيدات وحداته التي تحتوي على اربعة قواعد نيتروجينية. ترتبط النيوكليوتيدات مع بعضها برابطة الفوسفات ثنائية الاستر. يختلف هذا الحامض عن الحامض النووي منقوص الأكسجين كيميائياً في نقطتين. الأول هو أن السكر الخماسي للنيوكليوتيدات هو ريبوز (يحتوي على مجموعتي هيدروكسيل) فيما يكون هذا السكر منقوص الأكسجين (ذو مجموعة هيدروكسيل واحدة) في الحامض النووي منقوص الأكسجين النقطة التالية هو أن الحامض النووي الريبوزي لا يحتوي على ثايمين ويحل محله اليوراسيل (قاعدة شبيهة بالبرميدينات) شكل (3 - 7).

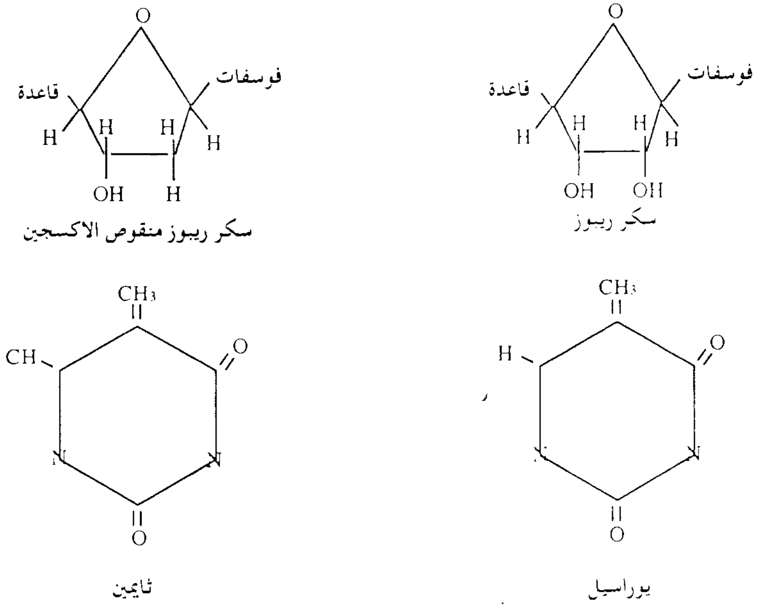
كان يعرف بعد سنوات قليلة من إكتشاف الحامض النووي الريبوزي بأن لهذا الحامض علاقة في عملية تصنيع البروتينات. كان ذلك استناداً إلى التشابه الكبير بين الأحماض النووية والبروتينات حيث أن كلا منهما مؤلف من سلسلة عديدة الوحدات وأن هذا الوحدات تتكرر في السلسلة ولكن يختلف موقع الوحدة في الترتيب في السلسلة. ولكن الذي لم يعرف هو كيفية نشؤ الحامض النووي الريبوزي وآلية قيامه ببناء البروتينات.

بعد الإنتهاء من وضع نموذج الحلزون وضع كريك عام 1956 فرضيته حول

كيفية بناء الحامض النووي الريبوزي والتي أطلق عليه (Central dogma) . نصت هذه على أن الحامض النووي الريبوزي يبنى من قالب حامض نووي منقوص الأكسجين بعملية تدعى بالاستنساخ وأنه ينفصل بعد ذلك من القالب ليقوم بدوره في بناء البروتين.

ولم يترك كريك الموضوع سائباً عند هذا الحد بل أشار إلى فرضيته الأولى التي وضعها قبل ذلك بعام واحد والتي تحدث فيها على أن الحامض النووي الريبوزي لا يقوم ببناء البروتين مباشرة بل إن هناك جزيئات أخرى أطلق عليها اسم الموصلات (Adaptors) ترتبط معها الأحماض الأمينية أولاً ثم ترتبط معقدات الموصلات مع مناطق متخصصة على الحامض النووي الريبوزي. وفي الحقيقة كان العمل على اكتشاف هذه الجزيئات جارياً قبل وضع هذه الفرضية. حيث قام العالم زامخنيك (Zamecnik) وجماعته عام 1953 بدراسة احتمالية وجود مثل هذه الموصلات عن طريق استخدام النظائر المشعة في تتبع بناء البروتينات. وفي عام 1958 نشر هؤلاء العلماء بحوثهم حول الموضوع وأكدوا وجود مثل هذه الجزيئات وأثبتوا بأنها نوع من الأحماض النوويه الريبوزيه أطلقوا عليها اسم الحامض النووي الريبوزي الناقل [(tRNA) Trainsfer RNA]. ولم تنتهي قصة الحامض النووي الريبوزي والبروتين عند هذا الحد بل أمتدت للبحث عن إحتمالية وجود أنواع أخرى من جزيئات الحامض النووي الريبوزي في الريبوسومات أطلق عليها الحامض النووي الريبوزي الريبوسومي [(rRNA)(RibosomalRNA] . وبعد تحليل الريبوسومات وجد بأنه يمثل نسبة كبيرة منها. كما وجدت الدراسات التالية بأن هذا النوع من الأحماض النووية الريبوزية يمثل 58% من مجموع الأحماض النووية الرايبوزية. وكنتيجة لاكتشاف الأنواع المختلفة من الأحماض النووي الريبوزية فقد أطلق على الحامض النووي الريبوزي المستنسخ من قالب الحامض النووي منقوص الأكسجين بالحامض النووي المرسال [(mRNA) Messenger RNA].

ولأجل المزيد من التفصيل حول أدوار هذه الأنواع راجع فصل تعبير المورثات.



شكل (3 - 7) : الاختلاف في تركيب الحامض النووي الريبوزي ومنقوص الأكسجين.

الفصل الرابع

تضاعف الحامض النووي منقوص الأكسجين

DNA replication

المحتويات

- الشكل العام لتضاعف الحامض النووي منقوص الأكسجين
- التضاعف شبه المحافظ في الأحياء
- التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي في البكتريا
- التضاعف شبه المحافظ في الرواشح والعاثيات
- التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي في حقيقات النوى
- التظهير بالإشعاع الذاتي لعملية تضاعف الحامض النووي
- آلية تضاعف الحامض النووي
- التضاعف من موقع أصل واحد
- التضاعف من مواقع أصل متعددة
- الأنزيمات المرافقة لعملية تضاعف الحامض النووي

مقدمة :

إن من أهم الصفات التي من المفترض توفرها في جزئية المادة الوراثية هو قدرتها على نقل المعلومات الوراثية بصورة أمينة ودقيقة للأجيال الجديدة. كان هناك شك قبل ظهور نموذج الحلزون المزدوج وقبل ظهور تفاصيل التركيب الكيميائي للأحماض النووي والأمينية فيما إذا كان الحامض النووي يقوم بمهمة قالب لبناء بروتين معين يؤدي هذا دوره كقالب لبناء جزئية حامض نووي متممة. أهمل هذا الاعتقاد دور البروتينات في تضاعف الحامض النووي مباشرة بعد تقديم نموذج الحلزون المزدوج. في هذا النموذج افترض بأن كل من سلسلتي الحلزون تخدم كقالب لبناء سلسلة متممة جديدة وأثبت علماء الأنزيمات بأن الحامض النووي يخدم كقالب لبناء السلاسل الجديدة دون أن يكونْ للبروتينات دوراً في عملية تكوين الأجيال الجديدة من السلاسل كما كان يعتقد سابقاً.

وما بقي في موضوع تضاعف الحامض النووي هو كيفية حصول هذا التضاعف والأنزيمات ذات العلاقة وإثبات بأن ما جاءت به نظرية الحلزون المزدوج حول التضاعف شبه المحافظ هو حقيقة ثابتة في جميع الأحياء.

في هذا الفصل والفصل القادم سنتحدث عن التضاعف شبه المحافظ في الأحياء المختلفة وآلية حصوله وكذلك التجارب العملية التي أجريت حوله في مختلف المجاميع الحياتية. فيما سيتم الحديث عن آلية البناء والأنزيمات اللازمة في الفصل اللاحق.

الشكل العام لتضاعف الحامض النووي منقوص الأكسجين (DNA)

إن عملية تضاعف الحامض النووي هي ببساطة أن يصبح فيها كل شريط منفصل من أشرطة الحلزون كقالب لتصنيع نسخة جديدة من الشريط شكل (4 - 1) . تحتاج هذه العملية تحطيم روابط الهيدروجين الموجود بين القواعد لفصل الشريطين عن بعضهما وتوفر النيوكليوتيدات الاربعة لغرض ربطها لتشكيل أزواج مع الشريط الأصلي (القالب) . إن الروابط الهيدروجينية التي تربط شريطي الحامض النووي ذات نوعية خاصة لكنها ضعيفة وسهلة الكسر بواسطة العديد من العوامل . هذه الروابط تتكون بشكل آلي عند توفر ظروف معينة ولكن في ظروف الخلية فإن عملية تحطيم وبناء تلك الروابط يخضع للعديد من الأنزيمات والبروتينات .

وعند تلائم نيوكليوتيدات حرة مع أقرب نيوكليوتيدات أبوية مناسبة (من شريط القالب) (كأن يكون A مع T أو C مع G) فإن النيوكليوتيدات الحرة تترتب بطريقة يتم معها ربط مكوناتها مع السكر والفوسفات مع تلك الموجودة في الشريط الأبوي . هكذا يستمر ربط النيوكليوتيدات الحرة على طول الشريط الابوي حتى اكتمال الشريط الجديد شكل (4 - 1) . ويقال عن مثل هذا التضاعف بأنه تضاعف شبه محافظ (Semiconservative repliation) أي أن شريط واحد أبوي يبقى دائماً مع كل مزدوج حلزوني جديد .

شخص العالم ارثر كورنبرج (Kornberg 1980) عدداً من القواعد الأساسية التي تسيطر على عملية تضاعف الحامض النووي في أي نظام حياتي وهذه القواعد هي :

1- إن عملية التضاعف هي عملية شبه محافظة .

2- إن كلاً من شريطي الحامض النووي تتضاعف عن طريق إضافة النيوكليوتيدات من النهاية الخامسة إلى النهاية الثالثة 5 ⟵ 3.

3- تضاعف الحامض النووي يحدث بشكل مستمر (continuous) في أحد الأشرطة الذي يدعى الدال (Leading strand) بينما يكون متقطعاً في الشريط الثاني الذي يدعى بشريط التحميل (Lagging sytrand).

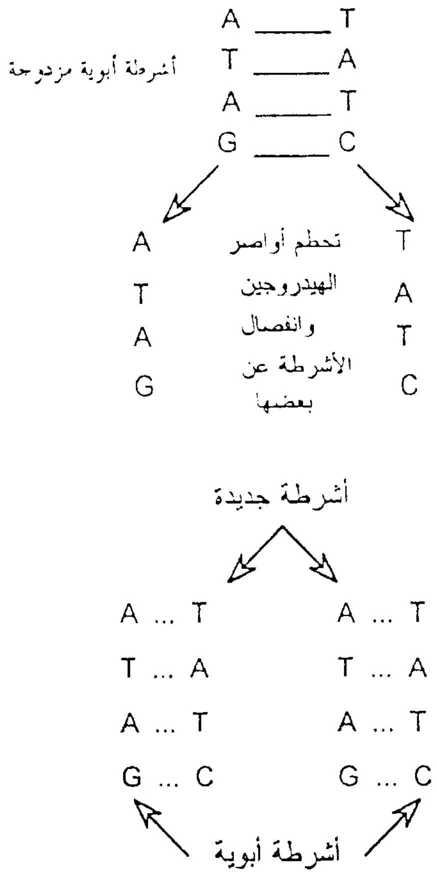
4- إن عملية التضاعف في قطع صغيرة تحتاج لبدئها قطعة من الحامض النووي تعمل كبادئة (Primer) لعملية التضاعف.

5- إن التضاعف يبدأ من موقع يدعى بالأصل (Origin) وقد تحتوي جزئية الحامض النووي على موقع أصل واحد أو أكثر.

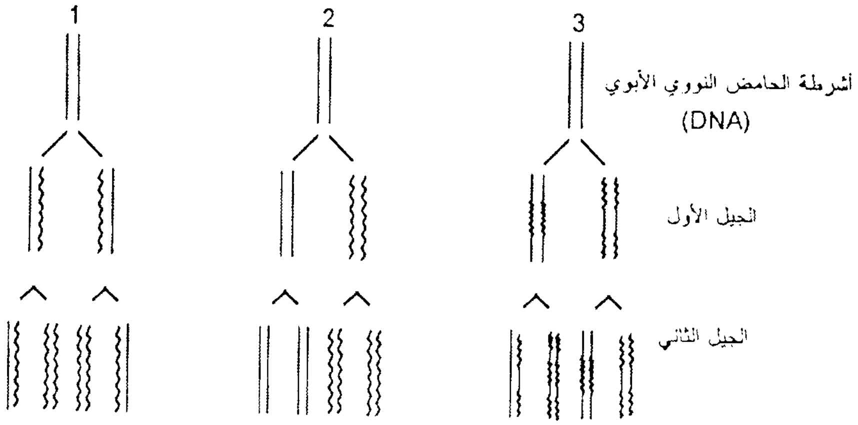
6- يبدأ التضاعف من موقع الاصل بإتجاه واحد أو إتجاهين وهو الغالب.

إن كل واحد من هذه القواعد الأساسية جاء من خلال جملة أبحاث علمية أجريت خلال الأربعين سنة الماضية وذلك ابتداءاً من افتراض واطسون وكريك والقاضي بأن كل شريطين من أشرطة مزدوجة الحامض النووي تعمل كقالب لتضاعف شريط جديد لتنتهي العملية بزوج جديد من الأشرطة. ولم تنتهي هذه القصة لحد الآن وخصوصاً بعد اكتشاف أن هناك العديد من المورثات المسؤولة عن هذه العملية.

قبل ظهور الأدلة العلمية حول تضاعف الحامض النووي شبه المحافظ والتي افترضها واطسون وكريك ظهر افتراضان، ينص الأول والذي يدعى بالتضاعف المحافظ (conservative replication) على أن كلا الشريطين المرتبطين يعملان كقالب لإنتاج زوج جديد من الأشرطة بينما الافتراض الثاني الذي يدعى بالتضاعف التشتتي (dispresive replication) على أن قطع وثلم من الحامض النووي المصنع حديثاً تلتئم مع ثلم وقطع من الحامض النووي الأبوي لتكوين شريطين جديدين شكل (4 - 2).



شكل (4-1) : ارتباط النيوكليوتيدات الحرة مع الأشرطة المفردة الأبوية لتكوين سلاسل جديدة.



شكل (4 - 2) : افتراضات طرق تضاعف الحامض النووي.

1- التضاعف شبه المحافظ 2- التضاعف المحافظ 3- التضاعف التشتتي.

التضاعف شبه المحافظ في الأحياء

التضاعف شبه المحافظ استناداً إلى نظرية الحلزون المزدوج هو أن أشرطة الحلزون تنفصل عن بعضها حيث يقوم كل شريط مفرد بدور قالب لبناء نسخة متممة شبيهة تماماً لنسخة القالب أو الشريط الأبوي. تنتهي هذه العملية بتكوين زوجين من الأشرطة المزدوجة. يحتوي كل زوج على شريط أبوي وشريط جديد مماثل له. أثبتت التجارب العملية التي أجريت لمعرفة تضاعف الحامض النووي حصول مثل هذا النوع من التضاعف في جميع الأحياء.

التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي في البكتريا

تمت الإشارة ولأول مرة لمثل هذا النوع من التضاعف عام **1958** من قبل العالمان ميسلسون وستال **(Meselson & Stahl,1958)** وذلك من خلال تجربة استخدما فيها النيتروجين **14 & 15** **(N^{14} , N^{15})** لتمييز الأشرطة الأبوية عن

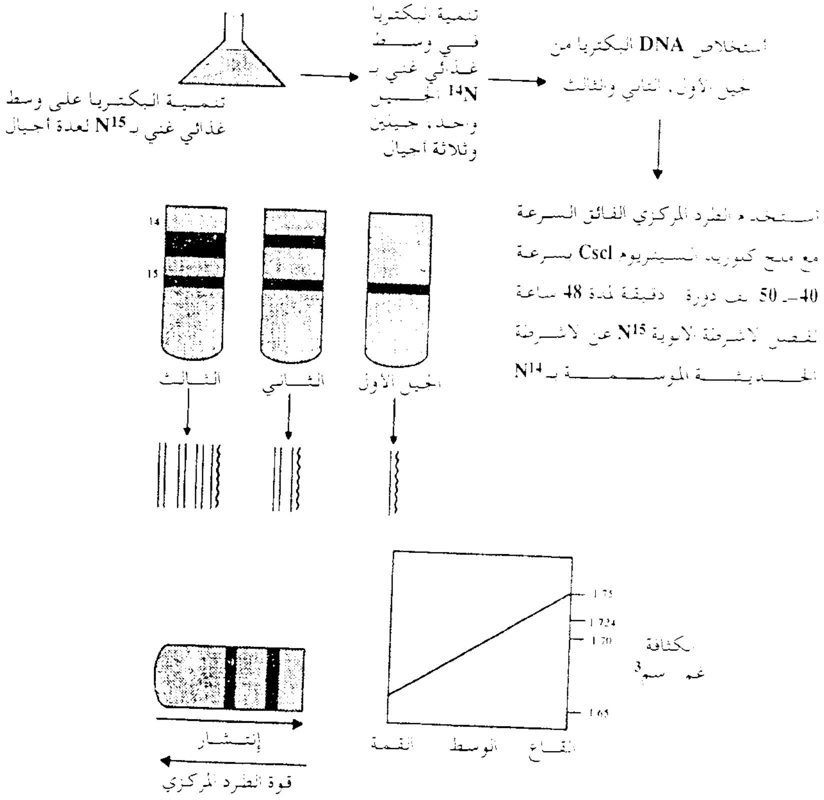
الأشرطة الجديدة فيزيائياً.

تم في هذا التجربة تنمية بكتيريا القولون على وسط غذائي يحتوي على نظير النيتروجين 15 الثقيل (N^{15}) كمصدر وحيد للنيتروجين لغرض تعليم جميع الحامض النووي الأبوي بعدها نقلت البكتيريا إلى وسط زرعي يحتوي على نظير النيتروجين 14 (N^{14}) لغرض تعليم الحامض النووي المصنع حديثاً. تركت البكتريا لتنمو لدورة جيلية واحدة تم بعدها استخلاص الحامض النووي. لقد تم فصل الحامض الأبوي المعلم بنظير النيتروجين 15 (N^{15}) من الحامض النووي المصنع حديثاً والمعلم بنظير النيتروجين 14 (N^{14}) عن طريق الطرد المركزي التوازني (**Equilibrium centrifugation**) باستخدام محلول مركز من ملح السيزيوم (CsC1) (المولارية 5.6M)

يتم في طريقة الفصل التوازني خلط الحامض النووي مع تركيز عالي من ملح السيزيوم في أنبوبة سليلوز خاصة معاملة بمادة الـ **EDTA** وبعد ذوبان جميع الملح يتم التخلص من الهواء المتبقي في الأنبوبة بواسطة إضافة البرافين السائل حيث تغلق الأنبوبة غلقاً محكماً ويتم بعدها استخدام جهاز الطرد المركزي فائق السرعة (**ultracentrifuge**) لمدة 48 - 72 ساعة شكل (4 - 3). إن جزيئات الحامض النووي تمتلك نفس كثافة التركيز الملحي العالي للسيزيوم، حيث أن كثافة كلوريد السيزيوم عندما تكون مولاريته 5.6M هي 1.7غم / سم3. بينما تبلغ كثافة الحامض النووي الحاوي على نظير النيتروجين 14 حوالي 1.708غم / سم3. إن استبدال نظير النيتروجين 14 بنظير النيتروجين الثقيل 15 يعمل على زيادة كثافة الحامض النووي إلى 1.722 غم / سم3 . خلال عملية الطرد المركزي الفائق السرعة فإن أيونات السيزيوم CS^+ تترسب تدريجياً بإتجاه قاع الأنبوبة. هذه الحركة تترافق مع حركة عشوائيةلجزئيات المذيب مما يعيق الترسب الكلي لأيونات السيزيوم. وبعد حوالي 48 ساعة فإن عملية ترسب الأيونات وانتشار الجزيئات تتوازن في المحلول ولا يحدث بعدها

أي حركة انتقال للأيونات بإتجاه القاع حيث نحصل بعدها على مدرج من تراكيز أيونات السيزيوم يبدأ من القاع (الأكثر تركيزاً) بإتجاه السطح (الاقل تركيزاً).

إن تركيز المحلول في السطح يبلغ **1.65** غم/سم3 بينما يبلغ في القاع



شكل (**4 - 3**) : تخطيط لتجربة ميسلسون وستال التي أثبتت التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي. عند استخدام الطرد المركزي الفائق بوجود ملح كلوريد السيزيوم فإنه يتكون مدرج كثافة يبدأ من القاع حيث الكثافة العالية **56.1** غم/سم3. ينفصل الحامض الأبوي **N15** عند كثافة **1.724** غم/سم3 بينما ينفصل الحامض الجديد **N^{14}** عند كثافة **1.710** غم/سم3.

1.75 غم / سم3 . إن الحامض النووي المخلوط مع محلول ملح السيزيوم يتحرك أيضاً بإتجاه الأعلى والاسفل تماماً مثل حركة أيونات السيزيوم حتى يستقر في مستوى معين يتناسب مع تركيزه بالضبط، وبعد تلوين المحلول بإستخدام بروميد الاثيديوم Ethidium bromide (EthBr) الذي يعمل على تلوين حزم الحامض النووي باللون الأحمر ويمكن ملاحظة وجود حزمتين أحداهما تعود للحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 14 وتكون قريبة من السطح لكونها أخف والأخرى قريبة من القاع وتعود للحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 15 . في تجربة ميسلسون وستال فإن بكتريا القولون تم تنميتها أولاً ولعدة أجيال على وسط غذائي يحتوي على نظير النيتروجين 15 بعدها تنقل البكتريا على وسط غذائي يحتوي على النيتروجين 14 وجيل واحد فقط (جولة واحدة من التضاعف) حيث تنقسم البكتريا إلى الضعف، ولذلك فإن جميع الحامض النووي الناتج من جولة واحدة من التضاعف يمتلك كثافة هي وسط بين كثافة الحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 15 والحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 14 . إن ذلك يدل على أن الحامض النووي الحديث يحتوي على كمية متساوية من نظائر النيتروجين 15، 14 .

لاحظ العالمان بأن الحامض النووي المستخلص من البكتريا بعد جيلين من النمو في وسط غذائي يحتوي على نظير النيتروجين 14 له كثافتين مختلفتين حيث وجدا بأن نصفه له كثافة الحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 14 ولكلا شريطي الحامض بينما النصف الآخر له كثافة وسط بين كثافة الحامض المعلم بنظير النيتروجين 14 والحامض المعلم بنظير النيتروجين 15 .

كما وجدا بأنه عند ترك البكتريا لتنمو لجيل ثالث على وسط غذائي يحتوي على نظير النيتروجين 14 فإن ثلاثة أرباع الحامض النووي له كثافة مساوية لكثافة الحامض المعلم بنظير النيتروجين 14 والربع المتبقي هو وسط بين كثافة الحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 14 والمعلم بنظير النيتروجين 15 .

توزيع ذرات نظير النيتروجين 14 في هذه التجربة يؤكد الافتراض الذي وضعه واطسون وكريك حول التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي.

إن التضاعف شبه المحافظ في التجربة الثانية والممثلة بأشرطة الحامض النووي ذات الكثافة والوسط يدل على أن الحامض النووي لا بد أن يحتوي على شريط أبوي واحد معلم بنظير النيتروجين 15 وآخر جديد معلم بنظير النيتروجين 14. وعندما تفصل تلك الاشرطة عن بعضها (بواسطة غلي أنبوبة محلول الحامض النووي في ماء لمدة عشر دقائق وثم تبريده بدرجة حرارة الغرفة) وتطرد مركزياً بسرعة فائقة مع محلول كلوريد السيزيوم فإنه يتم الحصول على موضعين للحامض النووي وبكميات متساوية، الأول مساوي لكثافة الحامض المعلم بنظير النيتروجين 14، والثاني مساوي لكثافة الحامض المعلم بنظير النيتروجين 15 مثلما توقعت نظرية التضاعف شبه المحافظ.

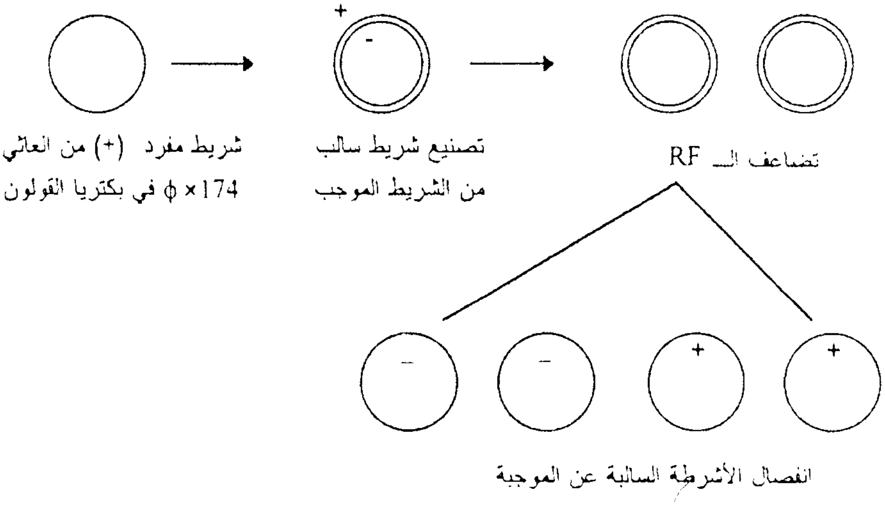
إن البحوث التي أجريت على أنواع مختلفة من الحامض النووي المأخوذ من الرواشح والبكتريا والأحياء حقيقية النوى أثبتت بأن هذا النوع من التضاعف هو طريقة عامة.

التضاعف شبه المحافظ في الرواشح والعاثيات

إن هناك بعض الفروقات في تضاعف الرواشح والعاثيات حيث أن هناك رواشح وعاثيات تتألف مادتها الوراثية من الحامض النووي منقوص الأكسجين مفرد الشريط. والبعض الآخر مزدوج الشريط. بينما تتألف المادة الوراثية لرواشح وعاثيات أخرى من الحامض النووي الريبوزي مفرد الشريط أو مزدوج. ولأجل معرفة تلك الفروقات فإنه لا بد من الخوض عميقاً في الاختلافات بين هذه الكائنات. إن أفضل الأحماض النووية (DNA) المدروسة في هذا المجال هو الحامض النووي منقوص الأكسجين للعاثي ø X174 الذي يصيب بكتريا القولون. عندما يصيب العاثي البكتريا فإن الشريط المفرد للحامض النووي

ينتقل إلى البكتريا حيث يتضاعف ويصبح بشكل لفة مزدوجة (double strand circular DNA) ويدعى عندئذ هيئة التضاعف (Replication Form). أن شريط الحامض النووي (DNA) الأبوي يدعى بالشريط الموجب (+) ويخدم كقالب لتصنيع الشريط الثاني والذي يدعى بالشريط السالب (−) حيث يدعى الشريطان عندئذ بهيئة التضاعف (RF) . ويعمل هيئة التضاعف في المرحلة الثانية كقالب لإنتاج أشرطة موجبة (+) حيث يتم استخدامها وتعبئتها لتكوين رواشح جديدة تخرج بعد تحلل خلايا البكتريا شكل (4 - 4) .

في مثل هذا النظام فإن كلا الشريطين يخدمان كقالب لإنتاج الأشرطة الجديدة . والاختلاف الرئيسي في عملية تضاعف هذه الرواشح هو في الأنزيم



شكل (4 - 4) : تضاعف الحامض النووي العاثي 174× ϕ .

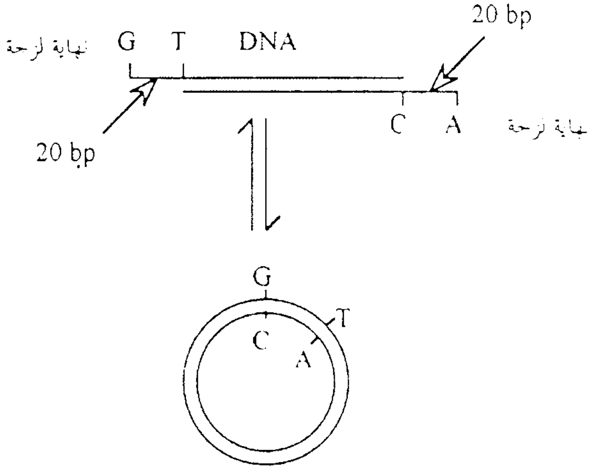
المستخدم في هذه العملية. بعض هذه الرواشح تقوم بتشفير أنزيمها لجعله ملائم في نوع معين من البكتريا والبعض الآخر يقوم بتشفيره بطريقة يعمل مع مورثات الكائن المضيف حيث تقوم أنزيمات المضيف على العمل على تضاعف الرواشح. أما في راشح السميان 40 (SV40) فإن مادته الوراثية مؤلفة من زوج من أشرطة الحامض النووي منقوص الأكسجين. يتضاعف الحامض النووي لهذا الراشح عن طريق استخدام أنزيمات خلايا المضيف نعدم وجود مورثات مشفرة لهذه الأنزيمات في مادته الوراثية.

أما في العاثي لامبدا الذي تتألف مادته الوراثية من حلقة من الحامض النووي منقوص الأكسجين فإن الحامض النووي يتحول من الحلقي إلى الشكل الخطي أو المستقيم ويرتبط مع الحامض النووي البكتيري. يدعى العاثي في هذه المرحلة بالمرحلة التمهيدية (Prophase state) ويدعى الحامض النووي بالحامض المستقيم Linear DNA. وعند تضاعف الحامض النووي البكتيري فإنه يتم تضاعف الحامض النووي الخاص بالعاثي المرتبط معه. وعند إكتمال التضاعف ينفصل الحامض النووي الخاص بالعاثي عن البكتيري ويتحول إلى الشكل الحلقي. ولذا فإن الحامض النووي لهذه العاثيات يوجد بصورتين داخل المضيف.

إن قدرة الحامض النووي على تشكلية هيئتين (حلقي ومستقيم) يعود لوجود النهايات اللزجة التي تمكنه من الألتحام والإنفصال شكل (4 - 5). أما الرواشح التي تتألف مادتها الوراثية في الحامض النووي الريبوزي مفرد الشريط أو مزدوج فإن عملية التضاعف فيها تتم بواسطة انزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي (RNA Ploymerase). إن أحسن التفصيلات حول عملية التضاعف هذا الحامض في هذه المجموعة من الرواشح تم دراستها في رواشح السرطان المفردة الشريط مثل راشح سرطان العضلات الذي يصيب الطيور [(ASV) Avian (Rous) Sarcoma Virus]. يتألف الراشح ASV من حامض نووي ريبوزي

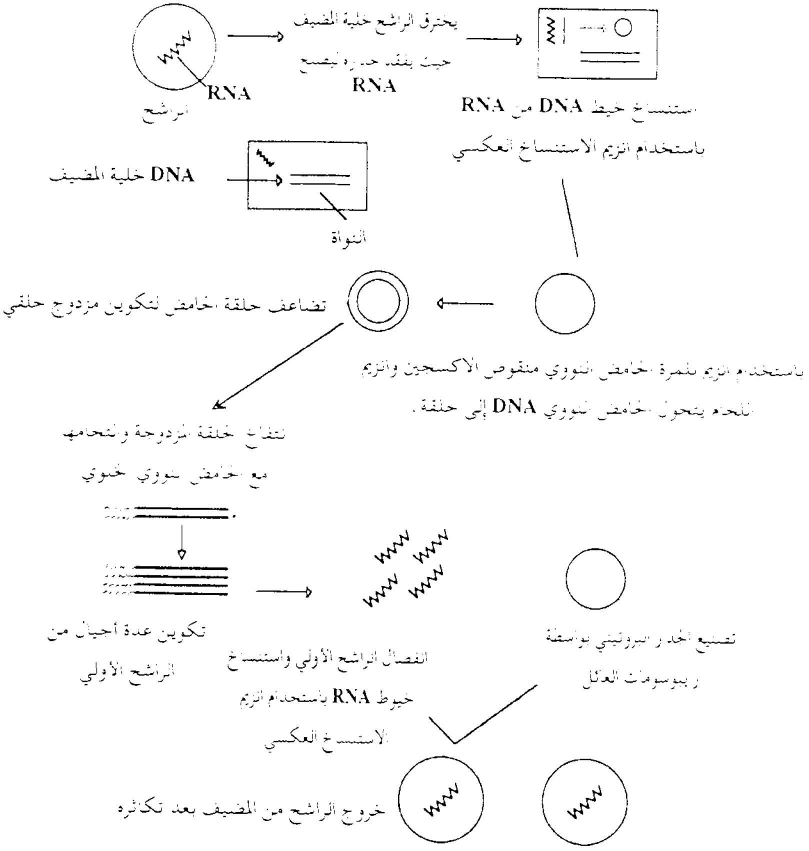
محاط بالبروتين. وعندما يبدأ الراشح بإضافة خلايا المضيف فإن الحامض النووي ينفصل عن البروتين ثم يبدأ الحامض بإختراق جدران خلايا المضيف ليستقر بداخلها حيث يتحول إلى شريط حامض نووي منقوص الأكسجين متمم (Complementary DNA) بواسطة أنزيم الاستنساخ العكسي (Reverse transcriptase) (وله القابلية على استنساخ شريط حامض نووي منقوص الأكسجين من حامض نووي ريبوزي أو العكس) ويخدم الحامض الريبوزي كقالب لتصنيع شريط حامض نووي منقوص الأكسجين شكل (4 - 6) .

إن المعلومات التي توفرت عن هذا الراشح عملت على تغير الكثير من الأمور التي كانت معروفة حول المعلومات الوراثية. حيث إنه في معظم الكائنات يتم استنساخ شريط حامض نووي ريبوزي من الحامض النووي منقوص الأكسجين وتذهب هذه إلى الريبوسومات لتصنيع البروتين أما الآن فإن دراسات رواشح الحامض النووي الريبوزي أثبتت بأنه من الممكن تصنيع حامض نووي منقوص الأكسجين من نسخة حامض نووي ريبوزي.



شكل (4 - 5) : قدرة العاثي لامبدا على تكوين حامض حلقي أو مستقيم بواسطة النهايات اللزجة.

كما أنها أثبتت بإمكانية تصنيع البروتين مباشرة من الحامض النووي الريبوزي الخاص بالرواشح. إن الحامض النووي منقوص الأكسجين المصنع بواسطة أنزيم الاستنساخ العكسي يعمل على مضاعفة نفسه لتكوين مزدوج حلقي حيث تخدم الحلقة الأولى كقالب لبناء حلقة ثانية. يدعى المزدوج الحلقي بالراشح الأولي (Provirus) يلتحم الراشح الأولي مع الحامض النووي للمضيف بطريقة متشابهة لما يحدث مع العاثي لامبدا عند إصابته لبكتريا القولون. بعد اكتمال التضاعف تنفصل الرواشح الأولية ثم يتم تصنيع نسخ

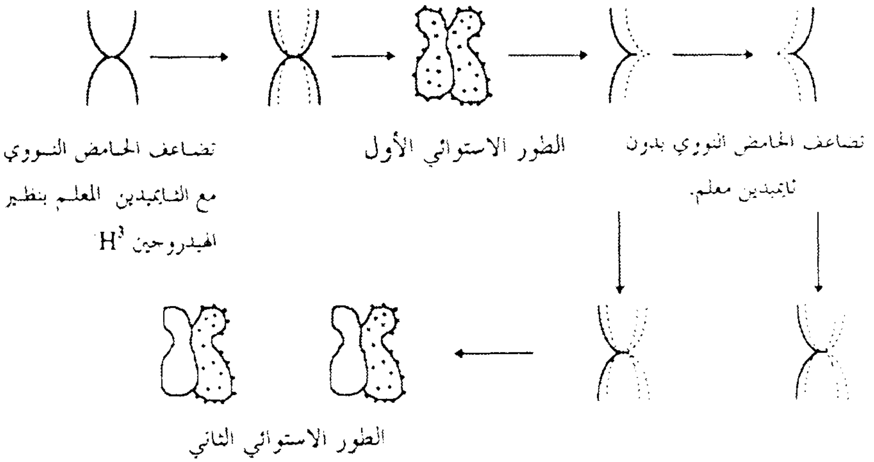


شكل (4 - 6): دورة تضاعف راشح سرطان العضلات ASV. يستخدم الراشح أنزيم الاستنساخ العكسي للتحول إلى نسخة حامض نووي منقوص الأكسجين بدلاً من حامض نووي ريبوزي ليتضاعف ثم يتحول إلى حامض نووي ريبوزي ليخرج بعدها الراشح من المضيف.

عديدة من الحامض النووي الريبوزي الخاص بالراشح عن طريق استخدام أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي الثاني الخاص بالمضيف (RNApolymerase II). إن بعض الحامض النووي الريبوزي المنتج يتحول إلى حامض نووي ريبوزي مرسال يستخدم لتصنيع بروتينات راشحية تستخدم لإنتاج أجيال جديدة من الرواشح يتم إطلاقها فيما بعد من الخلايا.

التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي في حقيقيات النوى

تم إثبات وجود التضاعف شبه المحافظ في حقيقيات النوى من قبل العلماء تايلور وودز وهاك عام 1957 (Taylor, woods & Hughes). قام هؤلاء العلماء بتنمية القمم النامية لجذور الباقلاء (vica faba) على وسط غذائي يحتوي على الثايميدين الموسم أو المعلم بنظير الهيدروجين H^3 (Tritium) ولفترة أقل من دورة خلوية (5 - 8 ساعات). حيث أن الثايميدين موجود فقط في الحامض فإنه من السهولة عندئذٍ تعقب وتشخيص موقع الثايميدين على صبغيات خلايا القمم النامية وذلك من خلال تعقب النشاط الإشعاعي للثايميدين على الصبغيات عبر شريط فوتوغرافي حساس للإشعاعات التي يبعثها نظير الهيدروجين الثالث (H^3) شكل (4 - 7). بعد تعليم الخلايا بالثايميدين المشع تنقل القمم النامية للجذور بعد غسلها بالماء جيداً إلى وسط غذائي يحتوي على الثايميدين الاعتيادي ومادة الكولسين Coliehcine (مادة كيميائية تعرقل تكوين خيوط المغزل مما يمنع الصبغيات الشقيقة من الدخول في الطور الانفصالي (Anaphase) ومن ثم الحصول على خلايا ذات صبغيات مكررة في دورة خلوية واحدة (6 صبغيات ثنائية الكروماتيدات) ويسمح للخلايا بالنمو في هذا الوسط لدورة خلوية واحدة (Cycle of doubling) تنقل بعدها الخلايا إلى شرائح زجاجية نظيفة معقمة حيث يتم تثبيت الخلايا.



شكل (4 - 7) : تخطيط التضاعف الحامض النووي في الباقلاء حيث يلاحظ وجود كروماتيده واحدة حاوية على البقع الفضية (أبوية) . بينما تمثل الكروماتيدة الثانية الكروماتيدة المتضاعفة .

بواسطة مزيج من حامض الخليك الثلجي وكحول الايثانول . تغطى طبقة الخلايا بعدها بطبقة من الهلام الفوتوغراقي الحساس للإشعاعات القصيرة المنبعثة من ذرات نظير الهيدروجين الثالث . بعد تحميض الشرائح الزجاجية المغطاة بالهلام فإن يتم مشاهدة مواقع الثايميدين المعلم بنظير الهيدروجين الثالث بواسطة المجهر على شكل بقع فضية .

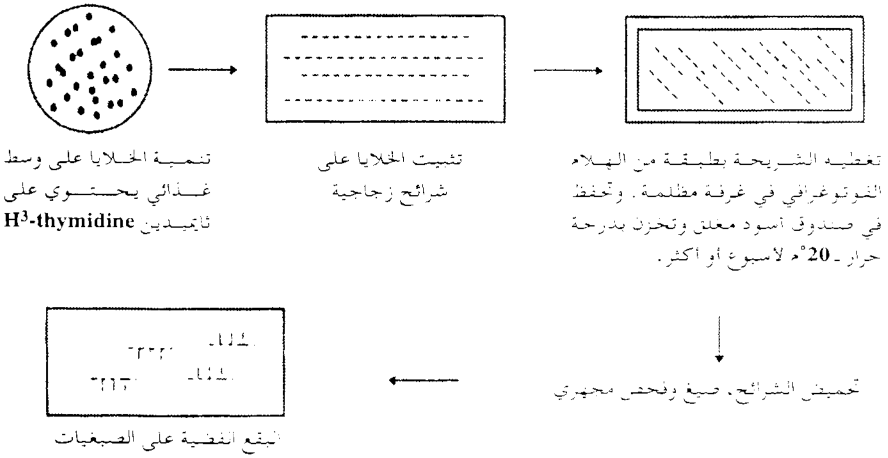
أثبتت نتائج الفحص المجهري لهذه الشرائح الزجاجية بأن البقع الفضية موجود على طول كروماتيدة واحدة في حين تختفي من الكروماتيدة الأخت الثانية شكل (4 - 8) . إن هذه النتائج أثبتت بأن الكروماتيدة الحاوية على البقع الفضية قد جاءت من الخلية الأبوية الأولى التي تم تنميتها على وسط غذائي حاوي على الثايميدين المعلم بنظير الهيدروجين الثالث أما الكروماتيدة الثانية قد جاءت من التضاعف شبه المحافظ للكروماتيدة الابوية حيث كان انقسام الخلية الأبوية في وسط غذائي يحتوي على الثايميدين عادي . إن وجود

البقع الفضية على جانب واحد من كل صبغي (كروماتيدة واحدة) يؤكد نظرية التضاعف شبه المحافظ. ولو كان تضاعف الحامض النووي محافظاً بشكل كلي لكانت البقع الفضية على كلا من الكروماتيدتي **50٪** من الصبغيات، وهذا ما لم يحصل في تلك التجارب.

التظهير بالإشعاع الذاتي لعملية تضاعف الحامض النووي

يمكن متابعة عملية التضاعف في البكتريا أو غيرها باستخدام طريقة التظهير بالإشعاع الذاتي. يمكن من خلال هذه الطريقة مشاهدة خيال توزيع ذرات المواد المشعة في التراكيب الخلوية. يعتبر نظير الهيدروجين الثالث H^3 من أكثر النظائر المشعة فائدة في هذه الطريقة وذلك لأن الطاقة الإشعاعية له ضعيفة وقصيرة المدى. يمكن الحصول على حامض نووي معلم بالنظائر عن طريق تربية الخلايا في أوساط زراعية تحتوي على الثايميدين المعلم بنظير الهيدروجين الثالث (حيث استبدلت بعض ذرات الهيدروجين في الثايميدين بنظير الهيدروجين الثالث H^3).

ولأن الثايميدين يتركز على الحامض النووي دون سواه من الجزئيات الأخرى فإنه سوف يتم تعليم الحامض النووي فقط وبذلك يتم مراقبة ومشاهدة عملية تضاعفه بسهوله. فمثلاً لأجل متابعة عملية تضاعف الحامض النووي في بكتريا القولون فإنه يتم تنمية البكتريا على أوساط زراعية تحتوي على الثايميدين الحاوي على نظير الهيدروجين الثالث ثم يستخلص الحامض النووي منها بعد أوقات مختلفة من النمو ويثبت كل نموذج حامض نووي على ورقة ترشيح خفيفة حيث يتم تثبيت تلك الأوراق على شرائح زجاجية. تغطى الشرائح بطبقة رقيقة من الهلام الفوتوغرافي الحساس وتحفظ في الظلام لمدة شهرين لأعطاء الفرصة لأكبر عدد من ذرات الهيدروجين بالتحلل وإطلاق المزيد من الالكترونات. تحمض الشرائح الزجاجية الحاوية على طبقات الهلام الفوتوغرافي وسوف يشاهد الحامض النووي المعلم بنظير الهيدروجين الثالث



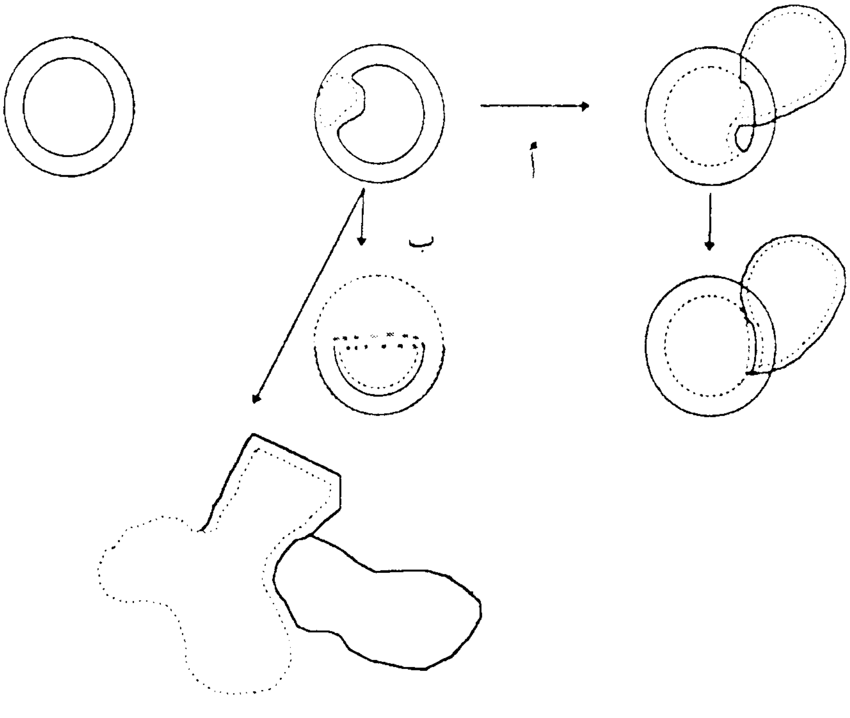
شكل (4-8) : التضاعف شبه المحافظ في الأحياء حقيقية النوى. استخدم في هذه الطريقة نظير الهديروجين H3 لتعليم الثايميدين ومن ثم تعقبه باستخدام لوح فوتوغرافي حساس.

يظهر على شكل نقاط سوداء فضية شكل (4 - 9). إن فحص الشرائح الزجاجية تحت المجهر الضوئي سوف يعطينا صورة عن مراحل التضاعف (بسبب استخلاص الحامض النووي من خلايا نامية لأوقات مختلفة في الوسط الزرعي الحاوي على الثايميدين المعلم بنظير الهيدروجين). حيث يظهر الحامض النووي المستخلص من خلايا نامية لفترة زمنية.قصيرة بشكل جزيئة مفردة بينما يترتب الحامض النووي المستخلص من خلايا نامية لوقت أطول على هيئة تشبه الحرف اليوناني ثيتا وهي المرحلة الوسطية من التضاعف حيث ينفصل شريطي النيوكليوتيدات عن بعضها في منطقة معينة ويستمر بالإنفصال لتكوين حرف الثيتا اليوناني ɸ.

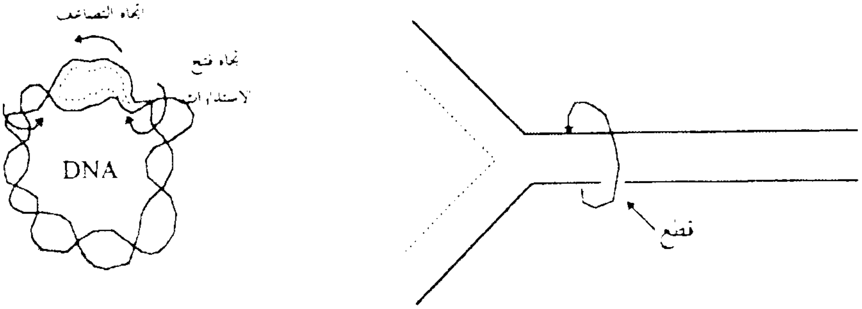
لقد أثبت الفحص بواسطة المجهر الإلكتروني بأن تشكيل الحامض النووي بالطريقة التي تم فيها هو تشكيل ثابت في الحامض النووي للعاثي لامبدا والرواشح والبكتريا.

إن الحلزون المزدوج للحامض النووي في بكتريا القولون يحتوي على 40.000 استدارة. إنه لا بد من التخلص من الحلزنة قبل التضاعف لذلك لا بد أن يكون هناك أنزيم ما يعمل على عدم السماح للأشرطة المنفصلة بالالتفاف مرة ثانية. إن الأدلة الحديثة تقترح بأن محور دوران الأشرطة غير المحلزنة يحتوي على مناطق سبق تكسيرها ولحامها تقع على أحد الأشرطة ويتم لحام هذه المناطق بعد الإنتهاء من فك الحلزنة شكل (4 - 10).

إن مثل هذه الأنزيمات المسؤولة عن التقطيع والتصليح قد استخلص من البكتريا واللبائن وأطلق عليها بأنزيمات الجايريز أو التوبوايزوميريز.



شكل (4 - 9): الإشعاع الذاتي لمراحل تضاعف الحامض النووي الخلوي لبكتريا القولون النامية على وسط غذائي يحتوي على الثايميدين المعلم نظير الهيدروجين H^3 لأقل من انقسامين خلويين. يظهر الحامض النووي الجديد ذو نقاط فضية لماعة أثناء الفحص المجهري ويأخذ التضاعف شكلاً خاصاً (ب) ويمثل الشكل (أ) توضيحاً لما يحدث.



شكل (4 - 10) : حركة وإتجاه أشرطة الحامض النووي أثناء عملية فك اللفات .

آلية تضاعف الحامض النووي

إن الموقع الذي يبـــدأ عنده تضـــاعف الحـــامض النـووي يدعى بأصل التضاعف (replication Origin) ويطلق على المنطقة التي تنفصل فيها الأشرطة الأبوية والتي يبدأ فيها التضاعف بشوكة التضاعف (replication Fork) . بينما يطلق على عملية تكوين شوكة التضاعف بالتأسيس، وقد تتكون شوكة تضاعف واحدة أو عدة أشواك في مناطق مبعثرة .

التضاعف من موقع أصل واحد

إن تحليل تضاعف الحامض النووي للعاثيات أظهر بأن جميع العاثيات الحاوية على الحامض النووي مزدوج الأشرطة يحتوي على أصل تضاعف فريد (unique origin) وعند بدء التضاعف بتأسيس شوكة فإنه إما أن يحصل بإتجاه واحد أو تتكون شوكتا تضاعف ذات حركه ثنائية الاتجاه وهو السائد في تضاعف العاثيات . إن معظم جزيئات الحامض النووي تحتوي على مواقع معينة تكون فيها أزواج القواعد AT أو GC هي السائدة . إن هذه الملاحظة هي الأساس في طريقة المجهر الالكتروني التي تدعى بالتخريط المتمسخ الجزئي (Partial denaturation mapping) والمستخدمة في تعيين مواقع الأصل في عملية التضاعف .

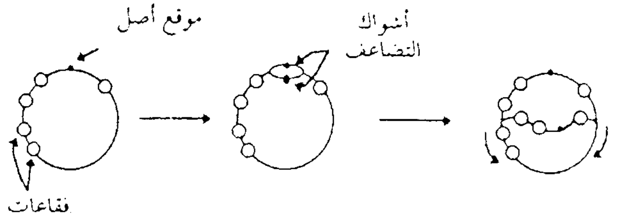
إن شريطي الحامض النووي يمكن أن ينفصلا باستخدام درجات الحرارة العالية أو المعاملة بالمواد القاعدية القلوية. وباستخدام درجة حرارة معينة أو قلوية معينة (PH) بحيث يسمح لعملية فصل الشريطين بالبدء فقط فإنه يتم الحصول على فصل الأشرطة في المناطق الغنية بأزواج القواعد AT فقط (التي تحتوي على ثلاث أواصر هيدروجينية) حيث تحتاج إلى طاقة عالية لكسرها).

إن مثل تلك الجزيئات تدعى بالجزيئات ذات التمسخ الجزئي. أما إذا كانت درجة الحرارة المستخدمة أو درجة الـ PH أقل فإن الجزيئات سترتبط من جديد لتكوين حلزون مزدوج. إلا أنه عند معاملة الحامض النووي الحاوي على فصل جزئي بالفورمالدهايد فإن المناطق المنفصلة سوف تحافظ على استقرارها ولا تتحد من جديد لأن الفورمالدهايد يتحد مع مجموعة الأمين (NH2) في قواعد الادنين مما يمنع اتحادهامع الثايميدين لتكوين أزواج قاعدية (AT). إن فحص مثل هذا الحامض النووي المعامل بهذه الطريقة بواسطة المجهر الالكتروني يمكننا من مشاهدة المناطق المنفصلة على شكل فقاعات أحادية الشريط مختلفة الأحجام وفي أماكن خاصة بكل نوع من الحامض النووي. إن تلك الفقاعات زودتنا بمميزات فيزيائية للتعرف على كل نوع من الأحماض. إن أول حامض نووي مفحوص بهذه الطريقة ذو تضاعف في كلا الاتجاهين ومن أصل واحد وهو الحامض النووي للعاثي لامبدا الذي يصيب بكتريا القولون شكل (4 - 11). إن الحامض النووي لهذا العاثي يكون حلقياً قبل إصابة البكتريا لكنه يتحول إلى شكل خيطي داخل البكتريا. إن الشكل الخيطي للحامض النووي لهذا العاثي يحتوي على توصيلات مفردة السلسلة مكونة من 12 نيوكليوتيد في نهاية P - 5 فقط لكل شريط حيث يكون تردد القواعد النيتروجينية في توصيلات كلا الخيطين متكاملاً حيث يمكن لها تكوين

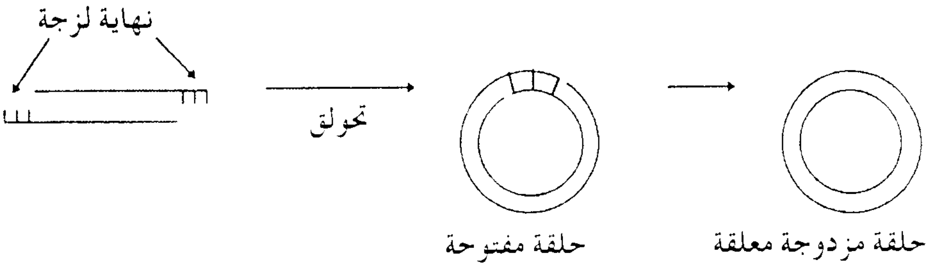
أزواج قاعدية مع بعضها. يطلق على مثل هذه النهايات بالنهايات اللزجة.

إن أزدواج القواعد بين النيوكليوتيدات المتكاملة النهائية ينتج تركيباً حلقياً ذو تأصر هيدروجيني مع فجوات تكون الأشرطة فيها غير مزدوجة حيث يتم اكتمال تلك الفجوات داخل خلية المضيف باستخدام أنزيم اللحام بعدها يكون الحامض النووي بشكل حلقة كاملة تدعى بالجزئية الدائرية المغلقة تساهمياً **(Covalently closed circles)** شكل (4 - 12). إن تضاعف العاثي لامبدا يتم أيضاً بتكوين الحرف اللاتيني ثيتا الذي تم التحدث عنه في تضاعف بكتريا القولون.

مثال آخر على آلية تضاعف الحامض النووي من موقع أصل واحد هو تضاعف العاثي **T7** الذي يصيب بكتريا القولون أيضاً. يكون الحامض النووي لهذا العاثي مزدوج الشريط وعندما يبدأ التضاعف فإنه يبدأ دائماً من النقطة **17** من النهاية المعروفة بالنهاية اليسرى. إن التضاعف يكون في كلا الاتجاهين اعتباراً من نقطة الاصل حيث ينتج شريط مفرد مرتبط مع الشريط الاصلي ومكوناً ما يشبه اللفة. وبعد وصول تضاعف الشريط إلى أحد النهايات يكون شكلاً يشبه الحرف **Y** حيث ينفصلان من أحد النهايات ويرتبطان في منتصف الخيط الأصلي وبعده يكتمل الانفصال لتوليد أثنان من أجيال الحامض النووي.



شكل (**4 - 11**) : استخدام الفصل الجزيئي للمناطق الغنية بـ **A-T** بواسطة قاعدة كيميائية لإثبات تضاعف **DNA** العاثي لامبدا من منطقة أصل واحدة وحركة أشواك التضاعف باتجاهين.

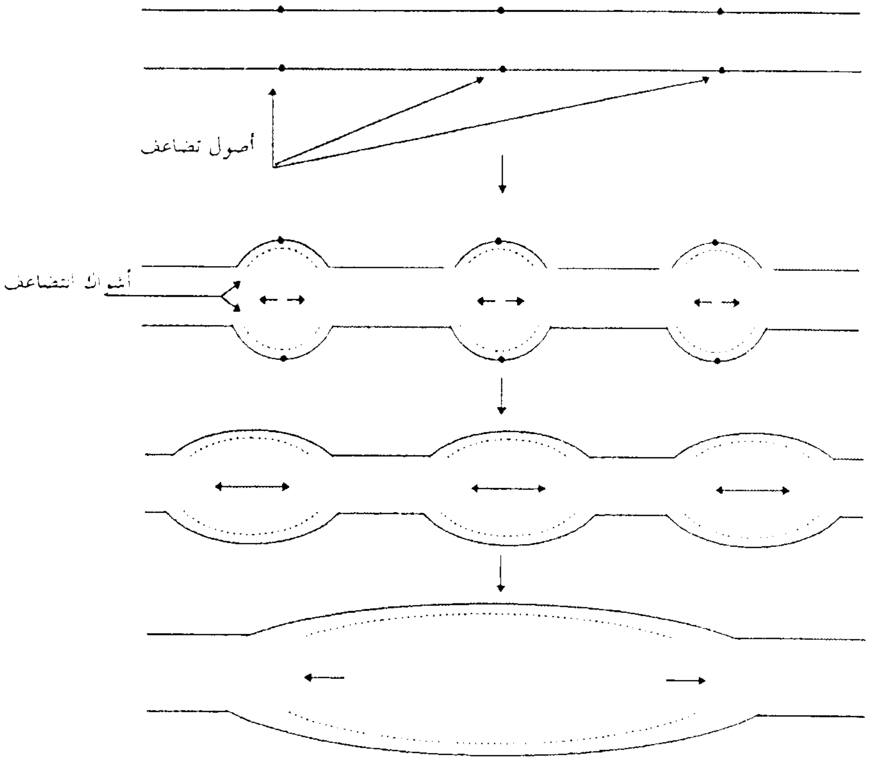


شكل (4 - 21) : DNA العاثي لامبدا الحاوي على النهايات اللزجة وآلية تحوله إلى DNA حلقي .

التضاعف من مواقع أصل متعددة

هناك نوعاً آخر من التضاعف لوحظ في بعض الرواشح والنبائن والحشرات والعديد من الأحياء شكل (4 - 13) . يبدأ التضاعف في هذه الأحياء من العديد من مواقع الأصل المبعثرة وبالتالي فإن التضاعف يتم في فترة قياسية قصيرة مقارنة مع ما يحصل من تضاعف الحامض النووي في بكتريا القولون الذي يحتوي على 4×10^6 زوج قاعدي (bp) (Base Pair) والذي يحتاج إلى 40 دقيقة تحت الظروف المثالية لإكمال التضاعف حيث إن شوكتا التضاعف المتكونة من موقع الأصل تتحرك بمعدل حوالي 50.000 زوج قاعدي في كل دقيقة وهو تقريباً نفس معدل الحركة بجميع الحامض النووي للعاثيات التي تم دراستها . إلا أن حركة شوكة التضاعف في الحامض النووي في الأحياء حقيقية النوى أقل كثيراً . فمثلاً في حشرة الدروسلافيلا **Drosophila melanogaster** تكون حركة الأشواك حوالي 2600 زوج قاعدي لكل دقيقة في درجة الحرارة 24°م . حيث أن أكثر الصبغيات في خلايا هذه الحشرة يحتوي على 7×10^7 زوج قاعدي . إن في كل أنقسام مبكر من الانقسامات الاثنى عشر لجنين الدروسوفيلا يحتاج تضاعف الحامض النووي إلى 2 - 3 دقائق لإكمال العملية حيث تنقسم النوى بشكل متزامن كل عشر دقائق . خلال

فحص حامض نووي متضاعف من هذه النوى لوحظ بأن المواقع التي بدأ منها التضاعف تشغل حيزاً معدلة 8000 زوج قاعدي.



شكل (4 ـ 13) : تضاعف الحامض النووي بواسطة مواقع أصل متعددة وآلية التحام أشواك التضاعف وحركتها.

وذلك أكبر بحوالي 8500 مرة من أصول التضاعف التي يجب استخدامها في مثل هذه الجزئيات الكبيرة. إن عدد مواقع تأسيس التضاعف يختلف من نوع خلايا إلى أخرى. كما أنه يختلف خلال مراحل تطور الكائن الحي. حيث أن الحامض النووي في الانقسام المبكر لنوى الدروسوفيلا ذو مواقع تأسيس تضاعف خمسة مرات أكثر مما هو في النوى المنقسمة في التفلج المتأخر (Late cleavage) من مراحل التطور. إن معدل الحيز (Spacing) بين أقرب

نقاط الأصل في خلايا منقسمة لكائن بالغ في زرع نسيجي حوالي 40.000 زوج قاعدي. ولا نعرف العوامل التي تحكم عدد الأصول الضرورية للتضاعف في ظروف مختلفة.

الأنزيمات المرافقة لعملية تضاعف الحامض النووي

هناك العديد من المعجلات من التراكيب البروتينية التي ترتبط مع عملية التضاعف بالإضافة لأنزيمات البلمرة وللحام التي تم ذكرها. لقد وجد بأن إنتاج أكثر من خمسة عشر مورثاً له علاقة بعملية التضاعف في بكتريا القولون فيما تم تشخيص أكثر من 24 مورثاً تسيطر على عملية تضاعف في العاثي T4ولا يزال الاحتمال بوجود المزيد غير المكشتف من هذه البروتينات قائماً.

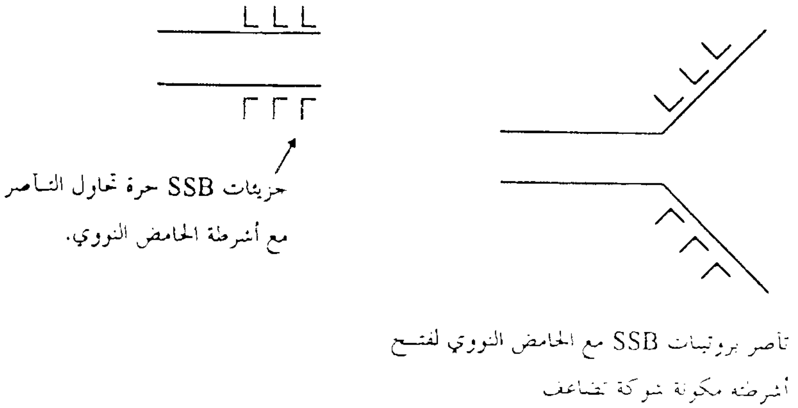
إن معظم هذه البروتينات تأخذ حيزاً من العمل في منطقة الأشواك المتضاعفة وهي مناطق انفصال أشرطة الحامض النووي عن بعضها وبداية تصنيع أشرطة جديدة. ومنذ اكتشاف هذه البروتينات في العاثي T4 عام 1970 من قبل العالم ألبرت بروس، فإنه تم اكتشاف أنواع أخرى من هذه البروتينات في البكتريا والأحياء حقيقية النوى والتي ترتبط مع عملية التضاعف. أحد هذه البروتينات والذي هو ليس عاملاً معجلاً بل يرتبط مع الأشرطة المفردة للحامض النووي وتدعى البروتينات المتآصرة مع شريط الحامض النووي المفرد (SSB) single strand binding proteins . تعمل هذه البروتينات على اختلال توازن الحلزون المزدوج ومن ثم فصل الأشرطة المزدوجة. إن تآصر هذه البروتينات يؤدي إلى عدم التفاف (unwinding) شريطي الحامض النووي من خلال تحطيم روابط الهيدروجين دون الاضرار بالروابط التساهمية (Covalent bonds).

يتم تأصر هذه البروتينات مع سلسلة السكر – فوسفات المكونة للعمود الفقري للحامض النووي. ولا توجد منطقة محدودة في هذه السلسلة

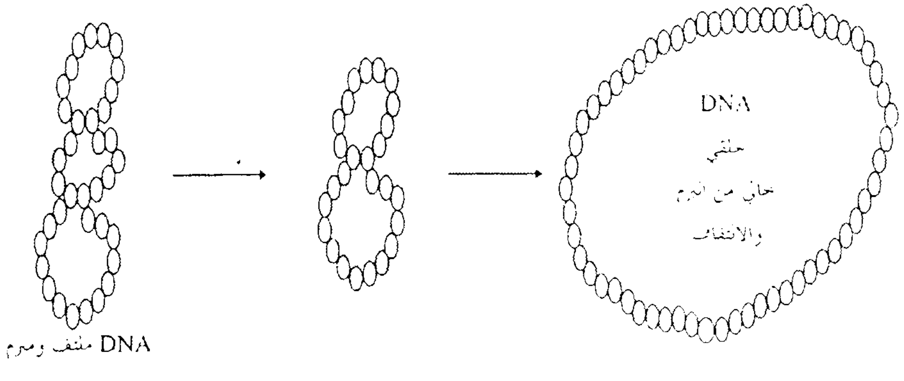
لارتباط هذه البروتينات . ونظراً للشكل الطولي للبروتين فإنه يلتصق بقوة مع السلسلة حيث يشغل مساحة حوالي 10 نيو كليوتيدات طولاً . وتترتب جزيئات البروتين الواحد بجنب الأخرى على شريط الحامض النووي مؤدية إلى فصل أشرطته عن بعضها شكل (4 - 14) . أما في أنواع الحامض النووي الشديد الأنطباق فإن عملية التضاعف تحتاج إلى إزالة البرم منه وجعله طولياً لتتمكن بروتينات التآصر من الارتباط وتكوين شوكة تضاعف . هناك نوعين من الأنزيمات التي تقوم بهذه المهمة وقد تم وصفها عام 1971 . إن أول هذه الأنزيمات تم اكتشافها في بكتريا القولون عام 1971 من قبل العالم واخ ومن ثم تم اكتشاف أنزيمات أخرى في أحياء أخرى لها نفس الوظيفة .

تقوم هذه الأنزيمات في بكتريا القولون بوظيفة قطع وغلق مزدوج الحامض النووي مما يؤدي إلى إزالة الالتفاف الشديد لمزدوج الحامض النووي مكونة حامض نووي حلقي غير ملتف شكل (4 - 15) جاهز لاستقبال بروتينات التآصر التي ترتبط لفك أشرطة الحامض النووي مؤذنة بداية عملية التضاعف .

تعمل الأنزيمات على التخلص من الالتفافات والبرم في الحامض النووي الحلقي من خلال كسر أواصر السكر - فوسفات المكونة للعمود الفقري لشريط منفرد واحد والتأصر مع النهايات المفتوحة للشريط والتحرك بعكس إتجاه البرم حيث تنتهي العملية بإزالة الالتفاف . يقوم بهذه الوظيفة الأنزيم **Topoisomerase1** فيما يقوم الأنزيم (**Topoisomerase 11** أو **Gyrase**) بلحام نهايات الشريط بعد الانتهاء من إزالة البرم . ويذكر بأن هذه العملية تحصل في كل موقع يحتوي على برم وعلى ذلك فإنه يتم كسر ولحام مناطق مختلفة من الحامض النووي لاتمام إزالة البرم كلياً . وبالإضافة للبروتينات التي سبق ذكرها فإن هناك أنواعاً أخرى من الأنزيمات التي تدعى **Helicases** والتي لها نشاط أنزيمات إطلاق الطاقة (**Apase**) تعمل هذه الأنزيمات على تحطيم جزيئات الادنين ثلاثي الفوسفات (**Adenosintriphosphate ATP**). وإطلاق الطاقة في منطقة مفرق

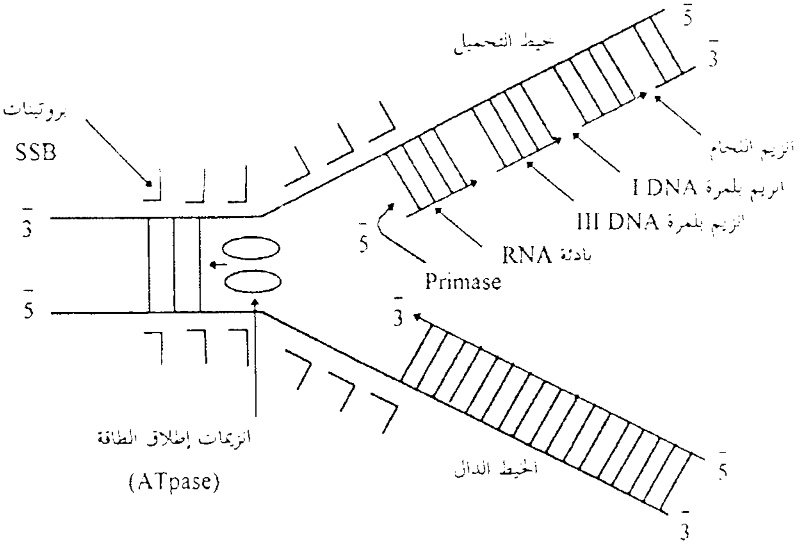


شكل (4 - 14) : بروتينات التآصر مع شريط الحامض النووي المفرد SSB التي تساهم في فتح شريطي الحامض النووي من خلال الإخلال في توازن المزدوج الحلزوني .



شكل (4 - 15) : عملية فك لفات الحامض النووي بواسطة أنزيمات التوبوأيزوميريز حيث تقوم هذه الأنزيمات بكسر أواصر السكر – فوسفات في شريط واحد ومن ثم لحامها بعد التخلص من اللفات والبرم .

شوكة التضاعف مؤدية إلى تحطيم روابط الهيدروجين بين أزواج القواعد النيتروجينية فاسحةً المجال أمام مفرق الشوكة للامتداد وفصل الأشرطة عن بعضها شكل (4 - 16) وبالإضافة لهذه البروتينات فإن هناك العديد غير المعروف .



شكل (4 - 16) : الأنزيمات المرافقة لعملية التضاعف وأماكن عملها خلال تصنيع أشرطة الحامض النووي الجديدة .

الفصل الخامس

بناء الحامض النووي

DNA Synthesis

المحتويات

- بناء أشرطة الحامض النووي المنقوص الأكسجين
- بناء الحامض النووي في القطع الصغيرة (قطع أوكازاكي)
- تأسيس أشرطة الحامض النووي بإستخدام بادئات حامض نووي رايبوزي

مقدمة:

يتعرض هذا الفصل إلى آلية تضاعف الحامض النووي من خلال بناء أشرطة الحامض النووي الجديدة. يعتبر اكتشاف أنزيمات بلمرة الحامض النووي والأنزيمات المرافقة لعملية التضاعف الكشف الثاني الرئيسي فيما يخص الحامض النووي. لقد مكننا هذا الاكتشاف من سبر أغوار عملية التضاعف وبالتالي تمكيننا من تصنيع أو بناء الأحماض النووي مخبرياً. إن ما وفرته لنا المعلومات الكيميائية حول الحامض النووي وما وفره نموذج الحلزون ساعدنا كثيراً في خلق تصور علمي مقبول حول آلية تضاعف الحامض النووي. لكن الذي لم نكن نعرفه منها هو طبيعة الأنزيمات التي تقوم بهذا الدور وظروف عملها ومتطلباتها الكيميائية والفيزيائية. بالإضافة إلى عدم تأكدنا من حصول آلية واحدة لبناء الحامض النووي الجديد في كلا شريطي القالب. إن الاكتشافات التي توالت بعد وضع نموذج الحلزون المزدوج خلقت ثورة في عالم الوراثة. إذ ساهمت هذه الاكتشافات في رسم الصور التفصيلية لعملية بناء الحامض النووي ودور الأنزيمات في ذلك. وتجاوزت مساهمة هذه الاكتشافات عملية بناء الحامض النووي لتخلق علماً جديداً من علوم الوراثة ألا وهو الهندسة الوراثية. في هذا الفصل سيتم تفصيل الصورة العامة حول التضاعف شبه المحافظ التي تم الحديث عنها في الفصول السابقة عن طريق توضيح دور الأنزيمات والآلية الجزيئية لبناء الأشرطة الجديدة من الحامض النووي.

بناء أشرطة الحامض النووي المنقوص الأكسجين

يتم بناء الحامض النووي بواسطته التفاعلات الكيميائية التي تسيطر عليها الأنزيمات مثل أغلب التفاعلات الأيضية في الخلايا الحية. إن الأنزيمات عبارة عن بروتينات ذات نشاط مساعد (catalytic) ولها القابلية على تسريع التفاعلات لإمتلاكها مواقع نشطة. إن العديد من الأنزيمات تكون متخصصة فمثلاً يقوم البعض بتحطيم سكر الحليب فقط ولا يتمكن من تحطيم أنواع أخرى من السكر مثل سكر القصب. بينما للبعض الآخر صفة العموم في التأثير على الجزيئات. كما هو الحال في الأنزيمات المحطمة للكحولات.

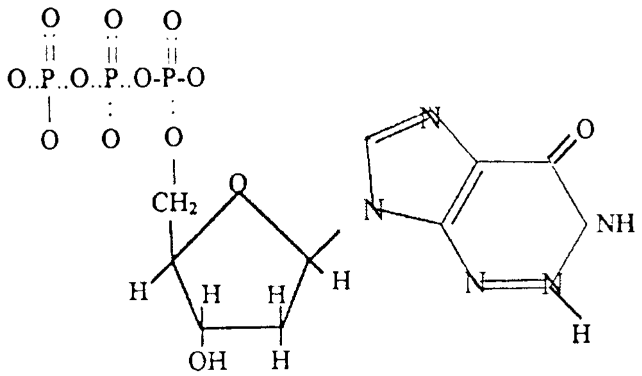
إن معظم الأنزيمات التي تدخل في عملية بناء أشرطة الحامض النووي هي من الأنزيمات العمومية. تعتبر أنزيمات بلمرة الحامض النووي (DNA Polymerases) أهم هذه الأنزيمات حيث تعمل على تكوين أواصر السكر – فوسفات بين النيوكليوتيدات المتجاورة في شريط الحامض النووي وقد تم استخلاص العديد من هذه الأنزيمات. إن أنزيمات بلمرة الحامض النووي منقوص الأكسجين لا تتمكن من العمل على البناء ما لم تتوفر بعض الاحتياجات الضرورية وهي:

1- وجود النيوكليوتيدات الأربعة شكل (5 - 1). إن هذه النيوكليوتيدات في شكلها الحر قبل البناء تحتوي على ثلاث ذرات فوسفات لذا فإنها تفقد ذرتي فوسفور لتصبح مفردة الفوسفور لتتمكن من الدخول في عملية البناء.

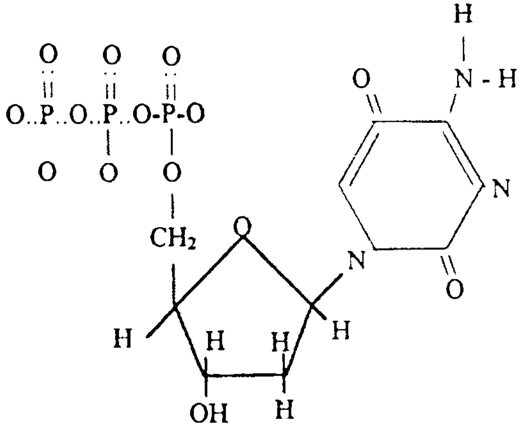
2- وجود شريط مفرد من الحامض النووي لاستخدامة كقالب لبناء نسخة جديدة.

3- وجود قطعة صغيرة من الحامض النووي والتي تدعى بالبادئة (Primer) شكل (5 - 2) حيث أن جميع أنزيمات بلمرة الحامض النووي المعروفة غير قادرة على تأسيس شريط جديد بدون بادئة. إن مثل هذه البادئات يجب أن

تحتوي على نهاية هيدروكسيل OH - 3 حرة وهي ضرورية جداً لابتداء العملية.

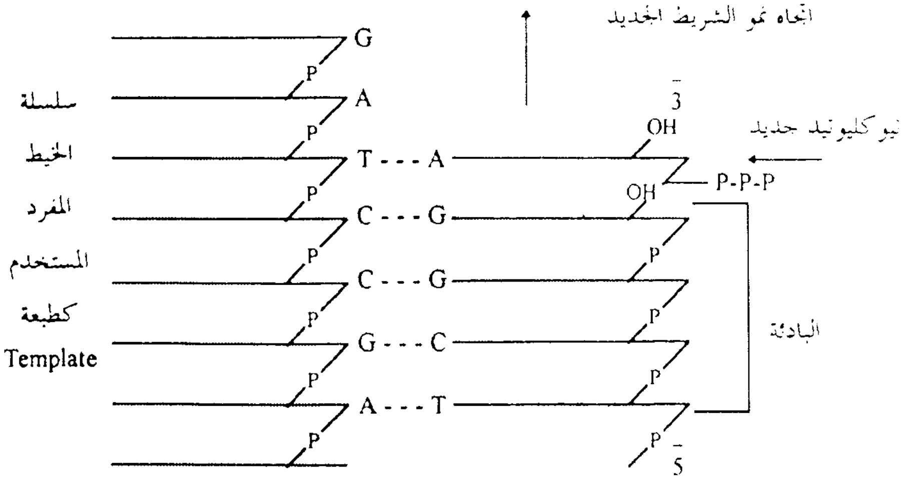


dGTP



dCTP

شكل (5 - 1): بعض النيوكليوتيدات المستخدمة في عملية بناء الحامض النووي حيث يتم إزالة جزيئتي فوسفور (منقطة في الرسم) عند ارتباطها لتكوين شريط الحامض النووي.



شكل (2.5) : ارتباط وعمل بادئة الحامض النووي لبناء شريط جديد .

إذ تعمل هذه الأنزيمات على تكوين روابط السكر-فوسفات بين نهاية الهيدروكسيل الحرة للبادئة وذرات الفوسفور في النيوكليوتيدات المتوفرة في التفاعل . تبدأ عملية تصنيع الحامض النووي عن طريق إطالة البادئة حيث تزدوج النيوكليوتيدات الحرة مع القواعد المناسبة الموجودة في شريط القالب . ولا يتم تكوين أواصر السكر-فوسفات بين قاعدة وأخرى إلا إذا كان وضع النيوكليوتيدات واتجاهها صحيحاً حيث يتم تحرير مجموعتي الفوسفور النهائية في كل نيوكليوتيد جديد يتم وضعه في البناء الجديد .

يمكن لأنزيمات البلمرة العمل مع أي قالب ومن أي كائن. فمثلاً الأنزيم المستخلص من بكتريا القولون يمكن استخدامه لبناء شريط حامض نووي عند وجود قالب حامض نووي مأخوذ من النباتات أو الحيوانات . إن أول أنزيم تم أكتشافه من أنزيمات بلمرة الحامض النووي هو أنزيم البلمرة الأول **POL-1** والذي يدعى أيضاً بأنزيم كورنبرج **(Kornberg enzyme)**. على الرغم من أن هذا الأنزيم له تأثير معجل لعملية بناء الحامض النووي في المختبر إلا أن الأشرطة

المنتجة تكون متفرعة. ولا تتكون مثل هذه التفرعات في الخلايا الحية. لهذا يعتقد بأن لهذا الأنزيم وظيفة في بناء الحامض النووي لكنه غير مسؤول عن العملية الكاملة لإنتاج أشرطة الحامض النووي. إن قدرة هذا الأنزيم على المساعدة في إنتاج الأشرطة غطت على احتمالية وجود أنزيمات بلمرة أخرى حتى اكتشاف طفرة وراثية في بكتريا القولون حيث لا تتمكن هذه البكتريا من إنتاج هذه الأنزيم. تدعى هذه الطفرة الوراثية بعوز أنزيم بلمرة الحامض النووي ويرمز لها بـ POL-A⁻. لقد تم وصف هذه الطفرة الوراثية في بكتريا القولون من قبل العالم كارينز عام 1969 (Jogn Carins, 1969). لاحظ هذا الباحث بأن البكتريا ذات الطفرة POL-A⁻ تتمكن من تصنيع الحامض النووي بنفس المعدل على الرغم من وجود نقص أو فقدان في إنتاج أنزيم البلمرة الأول. كان ذلك دليلاً ساطعاً على أن هذا الأنزيم غير مسؤول تماماً عن بناء الحامض النووي في الخلايا. مما حدا بالعلماء إلى استخدام الطفرة الوراثية للبحث عن أنزيمات بلمرة أخرى. لقد تم اكتشاف أن خلايا بكتريا القولون تحتوي على أنزيمين آخرين لبلمرة الحامض النووي تدعى أنزيم بلمرة الحامض النووي الثاني POL-II وأنزيم البلمرة الثالث POL-III. أثبتت الدراسات التي أجريت على خلايا بكتريا ذات طفرة وراثية لهذين الأنزيمين بأن أنزيم البلمرة الثالث هو المسؤول عن عملية بناء الحامض النووي. حيث لم تتمكن الخلايا الحاوية على الطفرة الوراثية (POL-C) الخاصة بأنزيم البلمرة الثالث من تصنيع الحامض النووي وتتوقف عملية بناء الحامض النووي كلياً في هذه الخلايا. بينما لا تتأثر هذه العملية عند وجود طفرة بأنزيم البلمرة الثاني (POL-B). إلا أنه ثبت بأن لأنزيم البلمرة الأول أهمية كبيرة أيضاً في عملية البناء وخصوصاً بعدما لوحظ بأن هذا الأنزيم يعمل على ربط قطع الحامض النووي التي يتم صنعها من قبل أنزيم البلمرة الثالث بعملية تدعى ملأ الفراغات (Filling gaps). إن التجارب التي أجراها العالم أوكازاكي عام 1969 (R. Okazaki, 1969) حول عملية بناء الحامض

النووي أثبتت بأن هذه العملية لا تحصل كعملية بناء مستمر لشريط الحامض النووي. بل بناء قطع صغيرة منه ومن ثم ربطها مع بعضها البعض. يتراوح طول كل واحدة من هذه القطع من 1000-2000 نيوكليوتيد وتدعى حالياً بقطع أو كازاكي تخليداً لمكتشفها أو بالقطع الطلائعية (Precursor fragments). قام أو كازاكي بعزل تلك القطع باستخدام بكتريا القولون الحاوية على طفرة وراثية لأنزيم الحامض النووي الأول المسؤول عن ربط قطع الحامض النووي (لاحظ بناء الحامض النووي في القطع الصغيرة). ويطلق على عملية البناء بواسطة هذه القطع بالبناء غير المستمر (Discontinuous Replication). إن تأسيس بناء كل قطعة من قطع أو كازاكي لا يمكن أن يتم بواسطة أنزيمات الحامض النووي ما لم يكن هناك بادئة. كانت هذه مشكلة لفترة قصير من الزمن لعدم معرفة كيفية تكوين هذه البادئات حتى اكتشاف أن تأسيس هذه القطع يتم بواسطة بادئة في خيوط قصيرة في الحامض النووي الريبوزي يتم تصنيعها بواسطة أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي RNA Polymerase. وما أن يتم تأسيس هذه البادئات حتى يبدأ أنزيم البلمرة الثالث POL-III في بناء قطع أوكازاكي. حيث أن أشرطة الحامض النووي المنتجة لا تحتوي على قطع الحامض النووي الريبوزي المستخدمة كبادئة فإن ذلك يؤكد بأنه هذه البادئات يتم إزالتها حال ربط قطع الحامض النووي منقوص الأكسجين ببعضها البعض. إن إزالة هذه البادئات يولد فراغاً بين القطع في شريط الحامض النووي، لذا فأن أنزيم بلمرة الحامض النووي الأول يقوم بمهمة ملأ هذه الفراغات. إن لأنزيمات البلمرة الأول والثالث نشاطاً يبدأ بإتجاه 3 ← 5 ونشاط هدم بعكس الإتجاه 5 ← 3 ويعتقد بأن هذه الأنزيمات هي المسؤولة عن إزالة الحامض النووي الريبوزي من الشريط الجديد باستخدام نشاط الهدم فيها. أما نشاط ربط قطع الحامض النووي ببعضها فإنه يبدأ بالربط قطعة بعد أخرى حال اكتمالها ولا يتم ربطها مرة واحدة بعد اكتمالها جميعاً. إن الأنزيمات البلمرة

الأول والثالث وظيفة ثانية تتعلق بعملية ضبط وتصحيح عملية بناء الحامض النووي حيث تقوم هذه الأنزيمات بتحطيم أواصر السكر-فوسفات عند النهاية الثالثة عن ازدواج القواعد النيتروجينية بطريق الخطأ (كأن يرتبط الادنين مع السايتوسين AC بدلاً من الثايمين (AT) راجع الفصول اللاحقة لتوضيح آلية حول ذلك) مستخدمة نشاط الهدم فيها ثم يقوم أنزيم البلمرة بترميم الفراغ المتكون بإضافة نيوكليوتيدات متوافقة. تدعى عملية قراءة وتصحيح ازدواج النيوكليوتيدات بالمراجعة (Proof readind) أو وظيفة التحرير (Editing Function).

إن احتواء أنزيم بلمرة الحامض النووي الثالث لبكتريا القولون على نشاط البناء والهدم بنفس الوقت يعبر عن تعقيد تركيب جزيئة هذا الأنزيم. إلا أنه لا يوجد مثل هذا التعقيد في أنزيمات البلمرة في الأحياء الأخرى. فمثلاً أنزيمات بلمرة الحامض النووي في الأحياء حقيقية النوى لا تمتلك نشاط الهدم الموجود في أنزيم بكتريا القولون بل إن هناك أنزيمات أخرى تقوم بهذه المهمة. ويذكر بأن الأحياء حقيقية النوى تمتلك ثلاثة أنزيمات لبلمرة الحامض النووي وهي أنزيمات ألفا وبيتا وجاما، ويعتبر الأنزيم ألفا هو المسؤول عن عملية بناء الحامض النووي في الصبغيات. كما إن هناك أنزيمات أخرى تمتلك نشاط هدم أواصر السكر- فوسفات حيث يدعى الطراز الأول في هذه الأنزيمات بأنزيمات الهدم الخارجي (Exonucleases) وهي الأنزيمات التي لها القدرة على إزالة النيوكليوتيدات في نهاية أشرطة الحامض النووي بينما يدعى الطراز الثاني بأنزيمات الهدم الداخلي (Endonucleases). حيث لها القدرة على تحطيم أواصر السكر-فوسفات وإزالة النيوكليوتيدات من أية منطقة داخل شريط الحامض النووي.

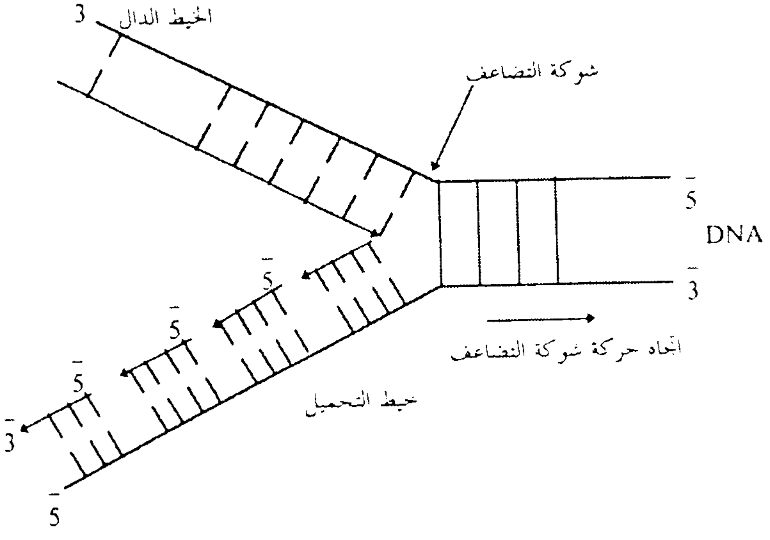
بناء الحامض النووي في القطع الصغيرة (قطع أو كازاكي)

من خلال فحص تضاعف الحامض النووي للعاثي T7 باستخدام المجهر الالكتروني (لاحظ التضاعف من موقع أصل واحد) لوحظ بأن الحامض

النووي وهو في أحد مراحل التضاعف يكون بشكل الحرف الانجليزي **Y**. حيث ينفصل شريطي الحامض النووي عند امتداد عملية التضاعف ووصولها إلى أحد النهايات مكونة هذا الشكل. يطلق على أحد الاشرطة المنفصلة بالشريط الدال **(Leading strand)** بينما يطلق على الشريط المنفصل الثاني بشريط التحميل **(lagging strand)** شكل (**5 - 3**).

أثبتت الدراسات التي أجريت على العاثي **T7** وغيره بأن عملية بناء نسخة جديدة عند الشريط الدال يكون بشكل عملية تضاعف مستمر بينما يحصل التضاعف عند خيط التحميل بشكل غير مستمر عبر تكوين قطع أوكازاكي يتم لحامها بواسطة أنزيم اللحام **(DNA Ligases)**.

إن الدليل على وجود القطع كمرحلة وسطية في عملية بناء الحامض النووي جاء من خلال تجارب استخدام النظائر المشعة في دراسة تضاعف الحامض النووي. قام العالم أوكازاكي بتنمية بكتريا القولون لعدة ثواني في



شكل (**5 - 3**) : بناء الحامض النووي المستمر عند الخيط الدال وغير المستمر عند خيط التحميل ويلاحظ بأن البناء غير المستمر يتم عن طريق بناء قطع صغيرة منفصلة لا تلبث أن تلتحم بواسطة نشاط أنزيم بلمرة الحامض النووي.

وسط غذائي مشبع بالثايميدين المعلم نظير الهيدروجين الثالث. تم بعدها استخلاص الحامض النووي ومعاملته بقاعدة كيميائية (NaoH مثلاً) لفصل أشرطته.

وباستخدام طريقة الإشعاع الذاتي التي تم وصفها سابقاً وجد بأن معظم النشاط الإشعاعي موجود في قطع حامض نووي صغيرة أقل من 2000 نيوكليوتيد في الطول. وعندما أعاد التجربة بتنمية البكتريا لفترة أطول في الوسط الغذائي المشبع بالثايميدين المعلم بنظير الهيدروجين الثالث لاحظ بأن النشاط الإشعاعي موجوداً في قطع أطول من سابقتها مما يدل على أن قطع الحامض النووي الصغيرة التي شاهدها في التجربة الأولى التحمت في التجربة الثانية مكونة شريط من الحامض النووي أكثر طولاً. إن الدليل على ارتباط هذه القطع مع بعضها بواسطة أنزيم اللحام جاء من خلال تجربة استخدمت فيها خلايا تحتوي على طفرة في مورث إنتاج أنزيم اللحام حيث لا تتمكن هذه الخلايا من إنتاج هذا الأنزيم في درجات الحرارة أكثر من 40° م. وعن إعادة التجارب السابقة مع هذه البكتريا تحت درجة حرارة أكثر من 40° م فإن فحص الحامض النووي أثبت وجود القطع الصغيرة في كلا التجربتين. مما يؤكد عدم التحام هذه القطع لإعطاء شريط طويل مثلما حصل في التجربة الثانية مع الخلايا الطبيعية والسبب يعود لعدم إنتاج خلايا الطفرة الوراثية لأنزيم اللحام مما ترك هذه القطع دون ربطها مع بعضها.

تأسيس أشرطة الحامض النووي باستخدام بادئات حامض نووي ريبوزي

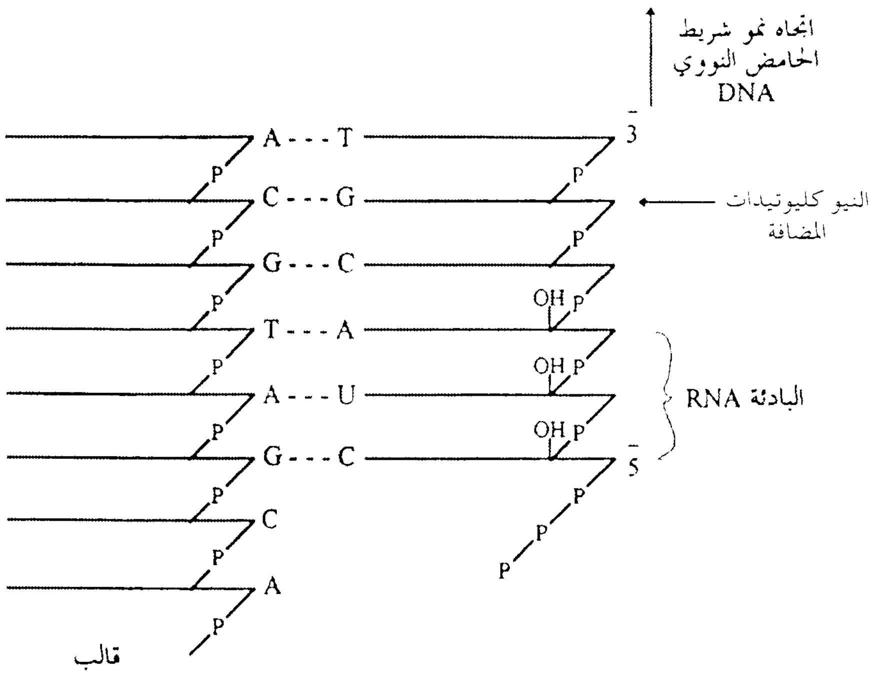
من المعروف بأنه لا يوجد أنزيم بلمرة حامض نووي له القدرة على تأسيس أو بناء أشرطة من غير وجود نهاية هيدروكسيل حرة. إن الحامض النووي الريبوزي هو حامض نووي أحادي الشريط يحتوي على نفس التركيب للحامض النووي منقوص الأكسجين إلا أنه يختلف عنه في نقطتين: الأول هو أن السكر الموجود فيه هو ريبوز (Ribose) وهو مماثل لسكر الريبوز منقوص

الأكسجين (Deoxyribose) الموجود في الحامض النووي منقوص الأكسجين عدا وجود مجموعة هيدروكسيل (OH -) في ذرة الكربون الثانية. أما نقطة الاختلاف الثانية فهي أن الثايميدين (T) الموجود في الحامض النووي منقوص الأكسجين يستبدل في الحامض النووي الريبوزي باليورراسيل (U) وهو تركيب مشابه للثايميدين.

يتم بناء الحامض النووي الريبوزي بواسطة استنساخ تتابع القواعد في شريط الحامض النووي منقوص الأكسجين (القالب) وتكوين شريط مماثل عدا إحلال اليوراسيل بدلاً من الثايميدين.

يتم مثل هذا الاستنساخ بواسطه أنزيمات تدعى بأنزيمات بلمرة الحامض النووي الريبوزي (RNA Ploymerases). تختلف هذه الأنزيمات عن أنزيمات بلمرة الحامض النووي منقوص الأكسجين في أنها تستطيع تأسيس بناء خيوط حامض نووي ريبوزي دون الاستعانة ببادئة كما هو الحال في أنزيمات بلمرة الحامض النووي منقوص الأكسجين. عند تصنيع الحامض النووي الريبوزي فإنه ينفصل مباشرة من شريط الحامض النووي منقوص الأكسجين تاركاً قطعة صغيرة منه ملتصقة بالقالب حيث تخدم هذه القطعة كبادئة لأنزيم بلمرة الحامض النووي منقوص الأكسجين لإضافة نيوكليوتيدات جديدة شكل (5 - 4).

إن أول دليل على الحاجة إلى بادئة الحامض نووي ريبوزي لتأسيس شريط حامض نووي منقوص الأكسجين جاء من دراسة الظروف الملائمة لتضاعف الحامض النووي الحلقي للعاثي M13 الذي يصيب بكتريا القولون. فقد لوحظ بناء قطعة حامض نووي ريبوزي بواسطة أنزيم يدعى بالبادئة (Primase) عند خيط التحميل. إن شريط الحامض النووي منقوص الأكسجين المصنع لا يحتوي على هجين من الحامض النووي الريبوزي المنقوص الأكسجين ولكنه يتألف فقط من حامض نووي منقوص الأكسجين مما يدل على استئصال بادئة



شكل (5 - 4) : تأسيس شريط DNA من بادئه RNA حيث يبدأ نمو الشريط الجديد من النهاية OH - 3 للبادئة باتجاه النهاية 3 .

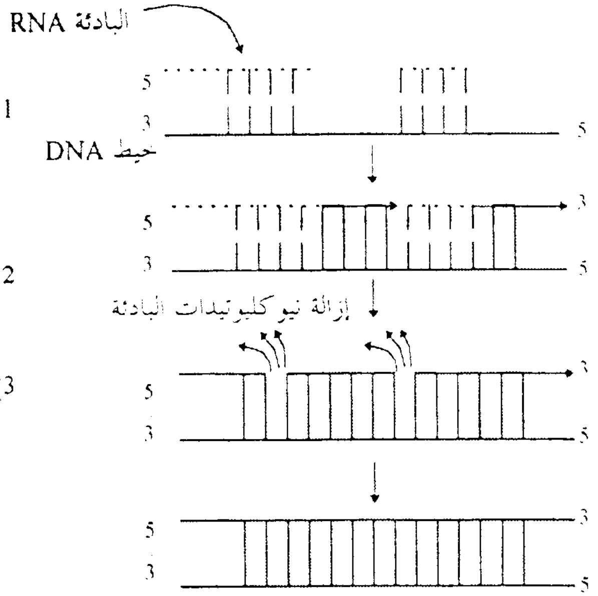
الحامض النووي الريبوزي المستخدمة في البناء. إن عملية الاستئصال هذه تم دراستها بشكل واضح في بكتريا القولون شكل (5 - 5) . تزال نيوكليوتيدات البادئة اعتباراً من النهاية الخامسة إلى النهاية الثالثة عن طريق نشاط الهدم في أنزيم بلمرة الحامض النووي منقوص الأكسجين الأول. بعدها يتم إحلال قواعد ملائمة للحامض النووي بدلاً عنها باستخدام نشاط البناء في أنزيم البلمرة الثالث ويستخدم أنزيم اللحام لربط القطعتين مع بعضهما. في بعض أنظمة الأحياء حقيقية النوى والعاثيات هناك أنزيم خاص لاستئصال بادئة الحامض النووي الريبوزي. إن الآلية الأكثر شيوعاً في مثل هذا الاستئصال هو باستخدام أنزيم هدم الحامض النووي الريبوزي (RNase H) وهو أنزيم له القدرة على تمييز قواعد الحامض النووي الريبوزي الملتصقة بشريط الحامض النووي

منقوص الأكسجين واستئصالها ولكن الأشرطة الكاملة للحامض النووي الريبوزي لا تتأثر في نشاط هذا الانزيم.

1) تكوين بادئة RNA بواسطة انزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي على شريط القالب.

2) نمو شريط الحامض النووي منقوص الأكسجين.

3) استئصال البادئة وبناء قطعة DNA مكانها.



شكل (5 - 5) : عملية بناء بادئة **RNA** لتصنيع شريط من الحامض النووي **DNA** في بكتريا القولون ثم استئصالها في نهاية العملية.

إن استخدام قطعة حامض نووي ريبوزي كبادئة في بناء شريط حامض نووي منقوص الأكسجين قد تم معرفته في تضاعف أشرطة الحامض النووي منقوص الأكسجين في العديد من العاثيات وصبغيات الأحياء حقيقية النوى. عند تضاعف الحامض النووي في صبغيات الخلايا حقيقية النوى فإن كل صبغي يسلك سلوك وحدة تكرار واحدة (Replicon). يظهر الصبغي عن التضاعف مؤلف من بدايات متعددة ذات اتجاهين للبناء (حركة الأشواك التضاعفية باتجاهين من نقطة البداية). وينشأ في كل بداية ما يسمى بالشكل

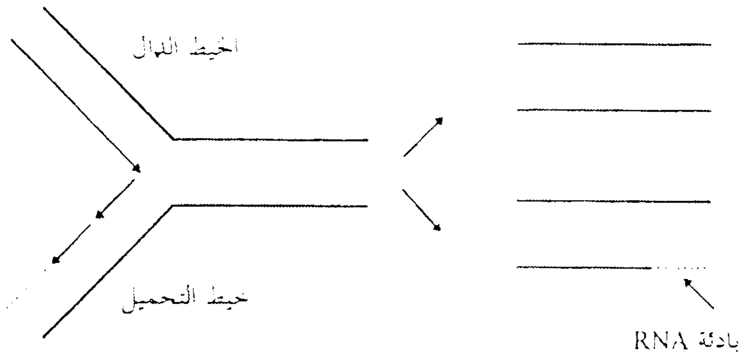
٢ . حيث يبدأ البناء بشكل سريع في الشريط الدال لتكوين الشريط الأول الجديد فيما يتم بناء الشريط الثاني الجديد عند شريط التحميل بعد تأسيس بادئة حامض نووي ريبوزي وعند اكتمال الشريط الثاني فإنه ينتهي بقطعة حامض نووي ريبوزي شكل (5 - 6). حيث يظهر الشريطان الجديدان متماثلان تماماً فيما عدا إن أحدهما ينتهي بقطعة حامض نووي ريبوزي.

هناك العديد من الطرق لإزالة قطعة الحامض النووي الريبوزي النهائية في هذا الشريط ولكن الذي لم يعرف هو كيفية إحلال قطعة حامض نووي منقوص الأكسجين بدلها دون استخدام بادئة كما هو معروف عن أنزيمات بلمرة الحامض النووي منقوص الأكسجين. إلا أن هناك عدد من المقترحات حول ذلك منها :

1- إزالتها وترك نهاية الشريط المزدوج بشكل نهاية مفردة الشريط.

2- إزالة البادئة مع وجود أنزيم غير مكتشف بعد يعمل على بناء قطعة حامض نووي منقوص الأكسجين بدلها.

3- حصول آلية مختلفة كلياً عما هو معروف عن آليات التضاعف.



شكل (5 - 6) : قطعة **RNA** موجودة في أحد أشرطة الجيل الجديدة من الحامض النووي **DNA**.

إن المعلومات المتوفرة حول هذا الموضوع لا زالت غير كافية ويكتنفها الغموض عدا المقترح الأول حيث يمكن إزالة البادئة باستخدام نشاط الهدم في أنزيمات بلمرة الحامض النووي كما تم شرحه سابقاً.

الفصل السادس

تعبير المورثات

Genes expression

المحتويات

- البروتينات والأحماض الأمينية
- الاستنساخ
- أنزيمات بلمرة الحامض النووي الرايبوزي
- استنساخ الحامض النووي الرايبوزي المرسال
- أهمية منطقتي المحفز والمنهي في عملية الاستنساخ
- ملخص عملية استنساخ الحامض النووي المرسال
- عملية ما بعد استنساخ الحامض النووي المرسال
- عمليات القطع والأضافة في الحامض النووي المرسال الأولي
- استنساخ الحامض النووي الناقل
- استنساخ الحامض النووي الريبوزي الريبوسومي
- الترجمة وبناء البروتين
- الشفرة الوراثية
- نظرية الأرجوحة
- ملخص

الفصل السادس
الفصل السادس

مقدمة :

إن جميع البروتينات والأنزيمات الموجودة في الخلايا هي نواتج لعملية تعبير المــورثــات (Genes expression) . تتــرتب مكونـات هذه البــروتينات بـشكل شفرات خاصة بتتابعات معينة تحملها المورثات وعند الحاجة إلى نوع معين من البروتينات فإن المورث المسؤول أو المورثات المسؤولة تقوم بنسخ نفسها ضمن عملية معقدةهي عملية تعبير المورثات ينتج في النهاية البروتين المطلوب. تتضمن عملية التعبير عكس المعلومات التي تحملها المورثات إلى جزيئات تدخل في العملية الأيضية والتركيبية وتكوين الخلايا .

هذه المعلومـات تستنسخ أولاً إلى جـزيئـة حـامض نووي ريبـوزي ثم تستـخدم في المرحلة الثـانيـة لتكوين تتابعـات الأحـمـاض الأمينية المكونة للبروتينات . إن جزيئة الحامض النووي الريبوزي يتم بناؤها باستخدام شريط مفرد من الحـامض النووي منقوص الأكسجين لكي يخدم كقالب بواسطة أنزيمات بلمرة الحـامض النووي الريبـوزي بينمـا يتم بناء جزيئـة البـروتين في الريبوسومات . أي أن عملية تعبير المورثات تتم بخطوتين هما :

1. بناء نسخة مماثلة لتتابعات المورث على شكل شريط اللحامض النووي الرايبوزي المرسال تدعى هذه العملية بالاستنساخ **(Transcription)**.

2. أما الخطوة الثانية التي تدعى بالترجمة **(Translation)** فإنه يتم خلالها تصنيع سلاسل الببتيدات المتعددة الخاصة بالبروتينات إعتماداً على ما يحمله

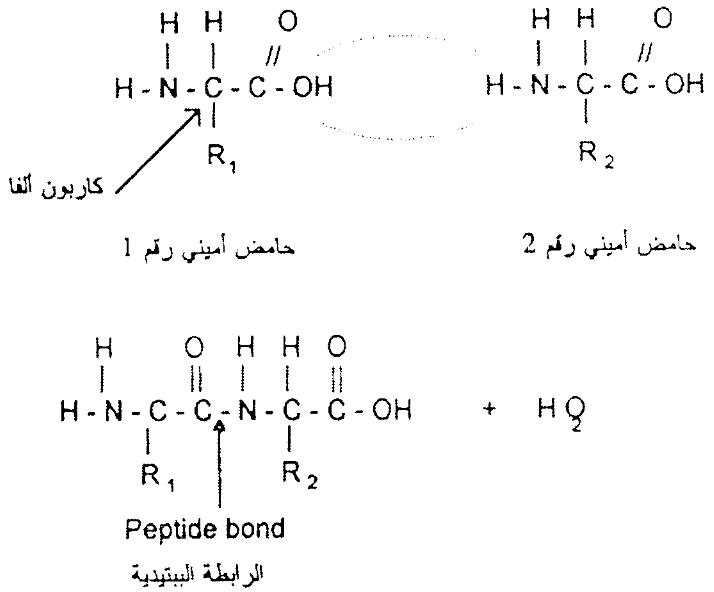
الحامض النووي المرسال من معلومات وتتم هذه العملية في الريبوسومات. ولأجل الدخول في تعبير المورثات فإنه لا بد من الخوض قليلاً في التركيب الكيميائي للبروتينات والأحماض الأمينية.

البروتينات والأحماض الأمينية

البروتينات هي جزيئات تعمل كعوامل مساعدة (catalyzing) مسؤولة عن معظم التفاعلات الكيميائية الخلوية. تتكون البروتينات من سلسلة من الأحماض الأمينية المرتبطة مع بعضها البعض. إن أغلب البروتينات الطبيعية مكونة من عشرين حامضاً أمينياً مختلفاً. وبما أن جزيئة البروتين مكونة من 100 - 1000 حامض أميني فإن عدد البروتينات المختلفة التي من المحتمل تكوينها يكون غير محدود. إن كل حامض أميني مكون من ذرة كربون تدعى ألفا (αC) مرتبطة مع مجموعة كاربوكسيل (COOH -)ومجموعة أمين - (NH_2)وسلسلة جانية تدعى بمجموعة (R) (R-group).

$$
\begin{array}{ccccccc}
 & & H & & & O & \\
 & & | & & & // & \\
NH_2 & - & C & - & C & - & OH \\
 & & | & & & & \\
 & & R & & & &
\end{array}
$$

مجموعة R في الحامض الأميني عادة هي سلسلة أو حلقة من ذرات الكربون التي تحتوي على مختلف المجاميع الكيميائية. وأبسط مجموعة R هو ما موجود في الحامض الأميني الجلايسين (Glycine) حيث تتألف من ذرة هيدروجين. أما في الالنين (Alanin) فإنها تتألف من مجموعة مثيل -(CH3). تتولد سلسلة عديد الببتيدات عندما ترتبط مجموعة كاربوكسيل -(COOH لحامض أميني مع مجموعة أمين -(NH2) لحامض أميني آخر. تسمى تلك الرابطة بالرابطة الببتيدية (peptid bond) وهكذا تتكون سلسلة الببتيدات التي تعتبر ذرة كربون ألفا (αC) فيها العمود الفقري لها (Back bond).



إن لكل جزيئة بروتين نهايتين مختلفتين حيث تكون النهاية الأولى تحتوي على مجموعة أمين حرة وتدعى بالنهاية الأمينية (Amino terminus) بينما تحتوي النهاية الأخرى على مجموعة كاربوكسيل حرة وتدعى بالنهاية الكاربوكسيلية (**Carboxyl termonus**).

يتم بناء البروتين بواسطة إضافة أفراد من الأحماض الأمينية إلى نهاية الكاربوكسيل لتكوين سلسلة متعددة الببتيدات المكونة للبروتين حيث تلتف سلاسل متعددة الببتيدات على بعضها بأشكال مختلفة وخاصة بكل نوع من البروتينات .

إن نوعية وشكل هذا الالتفاف يمثل صفة شكلية ووظيفية مهمة للبروتين ان معظم البروتينات مكونة من اكثر من سلسلة من سلاسل متعددة الببتيدات . تدعى مثل هذه البروتينات بأنها تحتوى على تحت وحدات (**Subunits**) وقد تتشابه هذه التحت وحدات أو تختلف عن بعضها البعض .

فمثلاً بروتين الهيموجلوبين يحتوي على أربعة تحت وحدات كل أثنان تمثلان زوج متشابه يختلف عن الزوج الثاني بينما يحتوي أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي في بكتريا القولون على ستة تحت وحدات ذات أربعة طرز مختلفة. وتحتوي أنزيم بلمرة الحامض النووي منقوص الأكسجين على عشرة تحت وحدات مختلفة عن بعضها البعض.

الاستنساخ Transcription

على الرغم من أن عملية بناء الحامض النووي الريبوزي لا تختلف من الناحية الكيميائية عن بناء الحامض النووي منقوص الأكسجين حيث أن كلا العمليتين تتضمنان إضافة نيوكليوتيدات لبناء شريط الحامض النووي مع الأختلاف في بعض التفاصيل إلا أنهما تختلفان على مستوى الوظيفة.

فعملية التضاعف تتضمن نقل دقيق وأمين للمعلومات الوراثية بينما تتضمن عملية الاستنساخ نسخ تلك المعلومات لأجل تعبير المورثات عن نفسها وتلك أكثر تعقيداً. إن معظم معلوماتنا حول تعبير المورثات جاءت من دراسات قراءة تتابع الحامض النووي منقوص الأكسجين والبروتينات التي تنظم الاستنساخ وخصوصاً أنزيمات بلمرة الحامض النووي الريبوزي.

أنزيمات بلمرة الحامض النووي الريبوزي

تدعى الأنزيمات المسؤولة عن عملية الاستنساخ بأنزيمات بلمرة الحامض النووي الريبوزي حيث يخدم شريط مفرد من الحامض النووي منقوص الأكسجين كقالب لتصنيع نسخة مماثلة من الحامض النووي الريبوزي. إن أفضل أنواع أنزيمات البلمرة المعروفة تفصيلياً هو أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي في بكتريا القولون. يتكون هذا الأنزيم من ست تحت وحدات من عديد الببتيد وهي بيتا (β), $(\bar{\beta})$، جاما (ϖ) ، سجما (σ) وسلسلتان من ألفا (α). تبدأ عملية الاستنساخ من موقع معين يدعى بموقع التأسيس**(Initiation)**

على منطقة المحفز (Promoter). تقوم تحت وحدة سجما في بادئ الأمر بتمييز موقع التأسيس حيث تلتحق بها بقية تحت الوحدات التي تكون مسؤولة عن النشاط الكيميائي لربط النيوكليوتيدات مع بعضها البعض. تدعى بقية تحت الوحدات عدا تحت وحدة سجما لب الأنزيم (Core Enzyme). يبدأ الاستنساخ من الشريط المشفر (Coding strand). إن موقع المورثات الخاص بأنزيمات بلمرة الحامض النووي الريبوزي في بكتريا القولون غير متجاورة إلا أنها جميعاً تقع بين الموقع المعروف بالدقيقة 66 والدقيقة 89. (ترسم الخرائط الوراثية لهذه الأحياء على هيئة دائرة تقسم إلى مواقع متساوية (دقائق) يرمز لها بالأرقام. تبدأ بالصفر وتتسلسل بالأرقام باتجاه عقارب الساعة لتنتهي بأعلى رقم يجاور موقع الصفر. وتقسم خريطة المادة الوراثية لبكتريا القولون إلى 100 دقيقة). أما في الأحياء حقيقية النوى فإن عملية الاستنساخ يتم السيطرة عليها من قبل ثلاثة أنزيمات بلمرة نووية مختلفة. تدعى هذه الأنزيمات بأنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي الأول (RNA PlymeraseI) وأنزيم البلمرة الثاني (RNA Ploymerase II) وأنزيم البلمرة الثالث (RNA Polymerase III). يمكن تمييز هذه الأنزيمات عن بعضها من خلال موقعها الخلوي حيث يقع أنزيم البلمرة الأول في النوية (Nucleous) بينما يقع أنزيم البلمرة الثاني والثالث في الجدار النووي كما تختلف وظيفة كل منهما حيث يكون الأنزيم الأول مسؤولاً عن استنساخ الحامض النووي الريبوزي الريبسومي (rRNA) (18S, 28S) (S: وحدة سافبرج التي تستند إلى معامل الترسيب في الطردالمركزي وتستخدم لوصف الحامض النووي الريبوزي). والأنزيم الثاني يكون مسؤولاً عن استنساخ الحامض النووي المرسال بينما يكون الأنزيم الثالث مسؤولاً عن استنساخ الحامض النووي الرايبوسومي 5S والحامض النووي الناقل (tRNA).

كما يمكن تمييز هذه الأنزيمات الثلاثة من خلال حساسيتها لمضادات حياتية معينة.

استنساخ الحامض النووي الريبوزي المرسال (mRNA)

إن الأحماض الأمينية ليست متآصراً مع الحامض النووي منقوص الأكسجين بل إن هناك خطوة وسطية تعمل على ترتيب الأحماض الأمينية في سلسلة عديد الببتيد وكما هو منظم في تتابع الحامض النووي منقوص الأكسجين (المورثات). تبدأ هذه الخطوة بإنفصال أشرطة الحامض النووي منقوص الأكسجين عن بعضها البعض في الموقع المراد استنساخه. تبدأ بعدها عملية الاستنساخ في شريط مفرد واحد من مزدوج الحامض النووي منقوص الأكسجين يدعى بالشريط المشفر أو الشريط الحساس (DNA coding or sense strand) لتنتهي بتكوين حامض نووي يمتلك نفس تتابع القواعد في شريط الحامض النووي الحساس. يستخدم الشريط المشفر فقط في عملية الاستنساخ لأنه يحتوي على معظم مورثات الكائن بينما يحمل الشريط الثاني الذي يدعى بالشريط غير الحساس (Antisense strand) بعض المورثات.

لقد تم تمييز هذه الأشرطة عن بعضها وإثبات الدور المهم لشريط الحامض النووي المشفر في عملية الاستنساخ بواسطة طريقة تدعى بتهجين الحامض النووي الجزيئي. استخدمت هذه الطريقة في بداية الستينات من قبل العالمان هال وسبيكلمان (Hall & Spiegelman. 1969). يتم في هذه الطريقة فصل أشرطة الحامض النووي منقوص الأكسجين عن بعضها بواسطة استخدام قاعدة كيميائية مثل هايدروكسيد الصوديوم أو درجة حرارة عالية.

يتم بعدها تبريد محلول الحامض النووي بدرجة حرارة الغرفة (25°م) حيث تعمل القاعدة الكيميائية أو درجة الحرارة العالية على تحطيم الروابط الكيميائية التي تربط شريطي الحامض النووي مؤدية إلى انفصالهما. ويساعد التبريد المتدرج بدرجة حرارة الغرفة على بقاء الأشرطة منفصلة دون عودتها إلى الأرتباط مرة أخرى. تفصل الأشرطة بعد ذلك بواسطة الطرد المركزي العالي باستخدام مدرج ملح كلوريد السيزيوم القاعدي حيث ينفصل

الشريطان عن بعضهما في المدرج على شكل حلقتين إحداهما تقع في الأعلى قريبة من السطح وهي ذات وزن جزيئي منخفض والأخرى في موقع أدنى وذات وزن جزيئي أثقل. أطلق على الشريط المتجمع في المنطقة العلوية بالشريط الخفيف (L) أطلق على الثانية الشريط الثقيل (H). لقد وجد من التحليل الكيميائي المائي لهذه الأشرطة بأن الشريط الثقيل غني بقواعد الجوانين والادنين فيما يحتوي الشريط الخفيف على كمية أقل من هذه القواعد. إن الأشرطة الثقيلة والخفيفة يمكن أن تتهجن بشكل منفصل مع الحامض النووي الريبوزي. يتم ذلك بفصل طبقتي الأشرطة الثقيلة والخفيفة عن بعضهما من المدرج بسحب كل طبقة بشكل منفصل من المدرج الملحي باستخدام محقنة طبية. يتم بعدها مزج كل منهما مع حامض نووي معلم بنظير الهيدروجين H^3 ويسخن المزيج بدرجة حرارة عالية ثم يبرد بشكل مفاجئ بواسطة حمام ثلجي حيث يتكون هجين الأحماض النووي (RNA-DNA) شكل (6-1).

يتكون الهجين (RNA-DNA) نتيجة تماثل في تتابع القواعد النيتروجينية في كل من شريطي الحامض النووي منقوص الأكسجين والحامض النووي الريبوزي مما يسمح بتكوين روابط كيميائية لإنتاج مزدوج هجين من الأحماض النووي. إن حصول الهجين يؤكد بأن الحامض النووي الريبوزي في الهجين هو مستنسخ من شريط الحامض النووي منقوص الأكسجين المرتبط معه. إن تحليل مزيج الهجين لكل من الشريط الخفيف والثقيل باستخدام محلول فوتوغرافي حساس جداً أثبت بأن طبقة الشريط الثقيل هي الطبقة التي كونت الهجين لوجود نسبة كبيرة من الإشعاع الناتج من نظير الهيدروجين H^3 المرتبط مع الحامض النووي الريبوزي بينما كانت طبقة الشريط الخفيف لا تحتوي إلا على نسبة ضئيلة جداً من النشاط الإشعاعي. أكدت نتائج هذا التحليل بأن الشريط الثقيل هو في حقيقة الأمر الشريط الفعال في عملية استنساخ

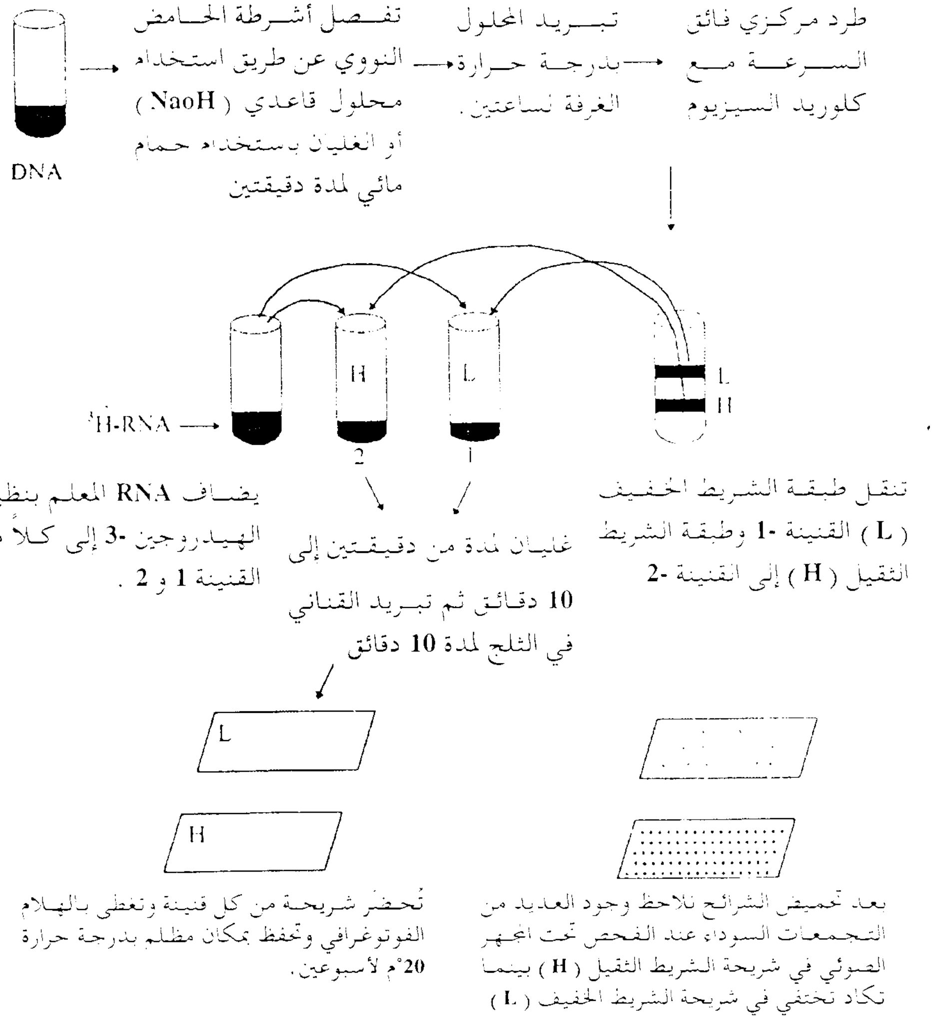
الحامض النووي الريبوزي وهو ما يطلق عليه بالشريط المشفر أو الشريط الحساس. شكل (6-1).

في بعض الرواشح والمايتو كوندريا والكلوروبلاست وجد بأن هناك بعض المورثات المشفرة موجودة على الشريط غير الحساس (L). في مثل هذه الحالة فإن الاستنساخ يحصل في كلا الشريطين.

وفي جميع الأحوال فإن الاستنساخ يتسم باتجاه 3َ ⟵ 5َ على طول القالب حيث تضاف النيوكليوتيدات الجديدة إلى النهاية الثالثة. بما أن أشرطة الحامض النووي منقوص الأكسجين متعاكسة كما أن اتجاه الاستنساخ لتكوين الحامض النووي الرايبوزي يكون من النهاية الخامسة 5 إلى النهاية الثالثة 3 فإن تردد المورث يجب أن يبدأ من النهاية 3.

إن ذلك مهم جداً عند مقارنة تتابع قواعد الأحماض النووية، (mRNA DNA) مع سلسلة عديد الببتيد الناتجة. إن قراءة تتابع قواعد الحامض النووي الريبوزي المرسال والحامض النووي منقوص الأكسجين النقيان بواسطة استخدام طريقة قراءة تتابعات القواعد (Base sequencing) يوضح بأن المناطق غير المشفرة (noncoding regions) تجاور المناطق المشفرة الخاصة بسلسلة عديد الببتيد. ويظهر من خلال قراءة تتابع القواعد بأن منطقة الدال (Leader) في الحامض النووي الريبوزي تقع في المنطقة العلوية (upstream) قبل المنطقة المشفرة. منطقة الدال هي عبارة عن منطقة تتألف من 20 إلى أكثر من 600 نيوكليوتيد تمتد من النهاية الخامسة 5 - end لتنتهي بمنطقة تأسيس. تتألف منطقة التأسيس من النيوكليوتيدات الحاوية على القواعد AUG. وتحتوي منطقة الدال أيضاً على عدد من التتابعات المتممة (Complementary sequences) التي تتكامل مع تتابعات متممة أخرى موجودة في النهاية الثالثة 3 - end للحامض الريبوسومي 16S(16S, rRNA) الموجود على سطح الريبوسومات. هذه الحقيقة تؤكد بأن أحد وظائف منطقة الدال في نسخة الحامض الريبوزي

المرسال هو لتوجيه هذا الحامض بالاتجاه الصحيح للريبوسومات. يتم ذلك من خلال إرتباط القواعد المتممة في النهاية الخامسة **5 - end** للحامض الريبوزي المرسال مع القواعد المتممة الموجودة في النهاية الثالثة **3 - end** للحامض الريبوزي الريبوسومي.



شكل (6-1) : طريقة التهجين الجزيئي **(RNA-DNA)** لأثبات دور الشريط الحساس أو الشريط المشفر في عملية استنساخ الحامض النووي المرسال.

تعتبر هذه أول وظائف الرسائل التي يحملها الحامض النووي المرسال ألا وهو الأرتباط الصحيح في منطقة مناسبة في الريبوسوم لأجل ترجمة المناطق المشفرة من النهاية الخامسة حتى النهاية الثالثة.

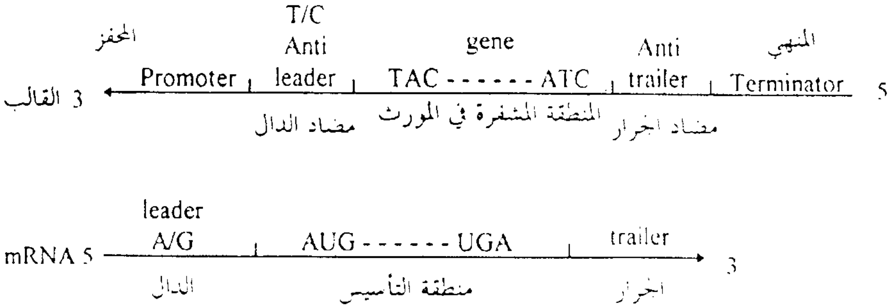
أما في المنطقة السفلية أو المجرى السفلي (Down stream) التي تلي المنطقة المشفرة بإتجاه النهاية الثالثة فإنه تقع منطقة أخرى غير مشفرة تدعى بمنطقة الجرار (Trailar region). تبدأ هذه المنطقة مباشرة بعد شفرات الانتهاء (Termination condons) والتي تقع مباشرة في نهاية المنطقة المشفرة في المورث والتي تحتوي على التتابعات التالية UAA أو UAG أو UGA. بالاضافة لمنطقتي الدال والجرار فإنه توجد مناطق أخرى مجاورة لا يمكن استنساخها وهي منطقة (المحفز) والمنهي (Terminator) شكل (6 - 2).

أهمية منطقتي المحفز والمنهي في عملية الاستنساخ

تعتبر منطقة المحفز في كل من مورثات الأحياء بدائية النوى والأحياء حقيقة النوى ذات أهمية كبيرة في عملية تأسيس الاستنساخ.

يختلف طول منطقة المحفز من مورث إلى آخر إلا أنها مكونة من 10 - 20 قاعدة نيتروجينية طولاً. تحتوي قواعد المحفز على عدد من القواعد (7 قواعد) (Heptanucleotides) تدعى في الأحياء بدائية النوى بصندوق بريبنو (Pribnow box). أما في الأحياء حقيقية النوى فيطلق عليها صندوق هوجنز (Hogness box) نسبة إلى مكتشفها في الأحياء حقيقية النوى. وعادة يطلق على هذه التتابعات السبعة أسم شائع هو صندوق تاتا (TATA box) نسبة إلى وجود تلك القواعد فيها ففي البكتريا على سبيل المثال فإن تتابعات صندوق تاتا تكون كالأتي (TATAATG) فيما تكون في الأحياء حقيقية النوى TATAATA. ويعتقد بأن هذه التتابعات توفر المكان اللازم لإرتباط أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي لأجل ابتداء عملية استنساخ حامض النووي

الريبوزي.



شكل (6 - 2) : قالب الحامض النووي منقوص الأكسجين والحامض النووي المرسال.

تختلف قوة ارتباط الأنزيم مع هذه المنطقة من محفز إلى آخر ويعتبر ذلك أساسياً في عملية تنظيم تعبير المورثات. إن آلية ارتباط أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي لمنطقة المحفز غير واضحة تماماً. إلا أنه كما أسلفنا فأن تحت الوحدة سجما تعمل على تمييز منطقة المحفز ثم ترتبط معه ليتم بعد ذلك تأسيس منطقة الاستنساخ. أما في الأحياء حقيقية النوى فأنه يظهر بأن لمنطقة صندوق تاتا علاقة بارتباط أنزيم البلمرة الثاني لمنطقة المحفز. وربما يكون هذا الارتباط هو إشارة لتصنيع نسخة حامض نووي مرسال وليس نسخاً أخرى من الأحماض النووية الريبوزية كالحامض النووي الريبوسومي والناقل. تبدأ عملية استنساخ الحامض النووي المرسال حالة تأسيس منطقة الاستنساخ على المحفز. وتسير هذه العملية من النهاية الخامسة حتى النهاية الثالثة وعلى طول شريط القالب وعكس اتجاهها. وتنتهي عملية الاستنساخ عندما يصل أنزيم البلمرة إلى منطقة المنهي التي تقع وراء منطقة مضاد الجرار في المورث. أن أغلب مناطق مضاد الجرار الموجودة في مورثات الأحياء بدائية النوى تحتوي على أوتار **(Strings)** مؤلفة من أزواج من قواعد السايتوسين والجوانين **(GC)** متعاقبة مع أزواج قواعد الادنين والثايمن **(AT)** تقع في النهاية الخامسة. بينما تحتوي النهاية الثالثة للحامض النووي المرسال على تتابعات **3 - uuuuuuA - 5**. ويعتقد

بأن تتابعات النهاية الثالثة له علاقة بإشارة معينة يتم من خلالها إنفصال أنزيم البلمرة من القالب أو الشريط المشفر الحساس. حيث تتميز أزواج القواعد (GC) بقوة الرابطة مقارنة بالرابطة الضعيفة لأزواج القواعدAT.

هناك نوعان من مناطق الانتهاء الأولى تدعى بمنطقة المنهي الذاتي (self-termination) تقوم بغلق شريط الحامض النووي الريبوزي المستنسخ ذاتياً أعتماداً على تتابعات القواعد فيها. فيما تكون منطقة الإنتهاء من النوع الثاني حاوية على بروتين يدعى ببروتين الانتهاء (rho) (Termination Protein) تتمكن من خلاله من إيقاف نمو شريط الحامض الريبوزي. يتم الإنتهاء في النوع الأول (الذاتي) عندما يصل شريط الحامض الريبوزي منطقة تحتوي على تتابعات من القواعد المكونة من ادنين متبوع مع تتابع قواعد يدعى بتتابع بلاندروم (Palindrome sequences) وهو تتابع مكون من قواعد معينة مثل ATGC تتعاكس في التتابع القادم لتصبح CGTA مع وجود فواصل من القواعد تفصل كل تتابع والتتابع المعاكس له كالآتي :

ATGC (تتابع) AT (فاصلة) CGTA (تتابع معاكس) ←.

إن حصول طفرة وراثية في أي من القواعد المكونة لمناطق الانتهاء أو المناطق القريبة منها قد يؤدي إلى ظهور مناطق انتهاء جديدة توقف عملية استنساخ الحامض الريبوزي المرسال وبالتالي تؤدي إلى ظهور حامض نووي ريبوزي قصير أو مشوه. وقد يتفاقم الأمرلتصبح هذه المنطقة الجديدة (منطقة الانتهاء الجديدة) مؤشراً سلبياً على عملية استنساخ أحماض نووية ريبوزية مرسالة لمورثات أخرى تقع بعدها في اتجاه عملية الاستنساخ.

تدعى مثل هذه الطفرات الوراثية التي تؤدي إلى ظهور مناطق انتهاء جديدة بطفرات الانتهاء (Terminator mutations) فيما تدعى الطفرات الوراثية ذات التأثير الجانبي على تعبير مورثات أخرى بالطفرات

القطبية (Polar mutations) . إن مثل هذه الطفرات أعطت دليلاً على أن بعض الحامض النووي المرسال هو ناتج عن نشاط أكثر من مورث واحد .

ملخص عملية استنساخ الحامض النووي المرسال

تتضمن عملية استنساخ الحامض النووي الريبوزي المرسال أربعة مراحل متميزة وهي :

1- ارتباط أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي مع منطقة المحفز حيث ترتبط تحت الوحدة سجما من الأنزيم مع هذه المنطقة ويعتبر هذا الارتباط هو ارتباط تأسيس (Initial binding sits).

2- يعتبر موقع إضافة أول نيوكليوتيد في بناء شريط الحامض النووي عند نهاية صندوق التاتا هو موقع بدء البلمرة (Ploymerization start site).

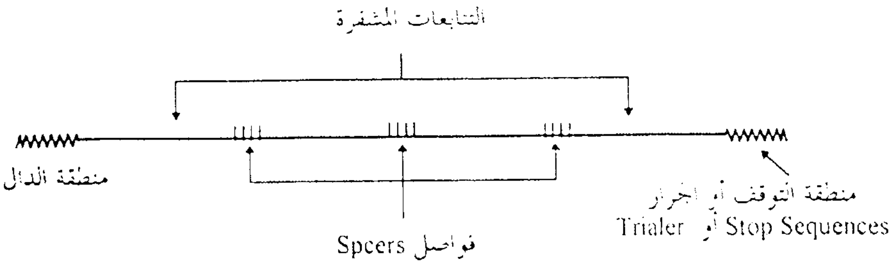
3- إطالة شريط الحامض النووي المستنسخ عبر الأنزيم على طول شريط القالب وتدعى هذه بإطالة السلسلة (chain elongation).

4- إيقاف عملية الاستنساخ عندما يصل أنزيم البلمرة مناطق الإنتهاء تقع مباشرة بعد نهاية المنطقة المشفرة لشريط القالب .

عملية ما بعد استنساخ الحامض النووي المرسال

نظراً لعدم وجود غلاف نووي يحيط بالمادة الوراثية في الأحياء بدائية النوى فإن جزيئة الحامض النووي المرسال تبقى قريبة من قالب الحامض النووي للمورث أو المورثات المنتجة لها . ذلك لإحاطة السايتوبلازم بشكل مباشر للمادة الوراثية . لذا فإن عملية الترجمة تحصل مباشرة بعد استنساخ الحامض النووي المرسال عدا بعض الوقت لإحداث بعض التحويرات في الحامض النووي قبل عملية الترجمة . إن جزيئة الحامض النووي المرسال في الأحياء بدائية النوى تحتوي على شفرات لتتابع الأحماض الأمينية لعدد مختلف من سلاسل

عديد الببتيد . تدعى مثل هذه الجزيئة بالحامض النووي الريبوزي المرسال عديد السسترونك **(Polycistronic mRNA-PC mRNA)** شكل (6 - 3) .



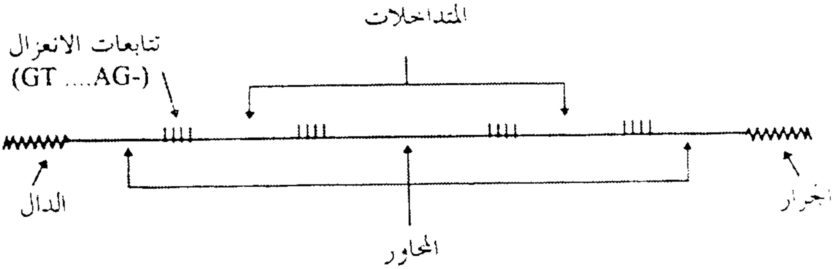
شكل (6 - 3) : الحامض النووي المرسال عديد السسترونك **PCmRNA.**

ففي بكتريا القولون على سبيل المثال فإن جميع الأنزيمات العشرة اللازمة لتصنيع بروتين الهستدين **(Histidine)** مشفرة في حامض نووي مرسال واحد .

مع العلم بأن تتابع الشفرات الخاصة بكل أنزيم في جزيئة الحامض النووي المرسال يأتي من مورث أو أكثر منفصل عن المورثات الأخرى الخاصة بالأنزيمات المتبقية . يعتبر استخدام مثل هذا الحامض النووي طريقة سريعة لتصنيع سلاسل عديد الببتيد . حيث أنه باستخدام الحامض النووي عديد السسترونك فإنه يتم تصنيع عدد من البروتينيات ذات العلاقة باستخدام إشارة واحدة لذا فإنه يتم تصنيع عدد من سلاسل عديد الببتيد بنفس الوقت . تدعى مثل هذه العملية بالتنظيم المترابط **(Coordinate regulation).** تفصل الشفرات الخاصة بكل سلسلة عديد الببتيد عن الشفرات الأخرى الموجودة في تتابع الحامض النووي المرسال بواسطة فاصلة **(Spacer)** مؤلفة من عدد من القواعد يتراوح عددها ما بين **10 - 30** قاعدة . يتراوح طول التردد المشفر المثالي في جزيئة الحامض النووي المرسال بـ **300 - 2,500** قاعدة طولاً ولكن بسبب وجود الفواصل وترددات أخرى فإن هذه الجزيئة تبلغ

400 - 20,000 قاعدة. بينما يبلغ طولها العام بـ 1,000 - 9,000 قاعدة. إن الحامض النووي المرسال للأحياء بدائية النوى على الرغم من احتوائه على تتابعات مختلفة تمثل تتابعات مشفرة لعدد من سلاسل عديد الببتيد إلا أنه يبقى فعالاً لفترة قصيرة لا تتجاوز العدة دقائق يتحطم بعدها. أما في الأحياء حقيقية النوى فإنه نظراً لإحاطة النواة بغلاف نووي يفصلها عن السايتوبلازم. لذا فإن عملية الاستنساخ تتم بشكل منفصل في النواة ينفصل بعدها الحامض النووي المرسال من القالب وينتقل عابراً الغلاف النووي إلى السايتوبلازم. تحاط جزيئات الحامض النووي المرسال المهاجرة نحو السايتوبلازم بعدد من جزيئات البروتين تدعى بالبروتين النووي الريبوزي **(Ribonucleo Proteins)**.

تعمل هذه البروتينات على حماية جزيئة الحامض النووي من التحطيم بواسطة أنزيمات الهدم وكذلك تساعدها في اختراق الجدار النووي. يتكون الحامض النووي المرسال الأولي الناتج شكل (6 - 4) من عملية الاستنساخ في الأحياء حقيقية النوى من تتابعات قواعد محاطة بمنطقتي الدال الواقعة في النهاية الخامسة والمنهي في النهاية الثالثة. تحتوي تتابعات الحامض النووي المرسال في هذه الأحياء على عدد من التتابعات المشفرة التي تدعى بالمحاور **(Exons)** محاطة بتتابعات أخرى غير مشفرة تدعى بالمتداخلات **(Introns)**. يختلف عدد المحاور والمتداخلات في الحامض النووي المرسال الأولي **(Primary mRNA)** من كائن إلى آخر. تفصل المحاور عن المتداخلات بواسطة عدد من التتابعات الخاصة التي تدعى بتتابعات العزل **(Consensus sequences)**. يعتقد بأن لهذه التتابعات دوراً رئيسياً في عملية تحوير الحامض النووي المرسال الأولي لأجل التخلص من قطع المتداخلات أو التتابعات غير مشفرة. تتكون تتابعات العزل من قواعد مثل التتابع **TCAGGT** تقع بين مناطق ارتباط المحور بالمتداخل. تعتبر جزيئة الحامض النووي المرسال في الأحياء حقيقية النوى مسؤولة عن تصنيع سلسلة عديدة ببتيد واحدة وناتجة من مورث واحد. وليس كما هو



شكل (6 - 4) : الحامض النووي المرسال الإبتدائي في حقيقيات النوى.

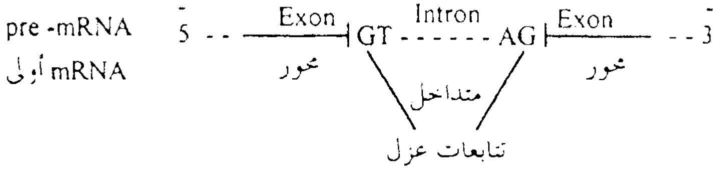
الحال في الأحياء بدائية النوى لذلك فإن عملية التنظيم المترابط أكثر تعقيداً عما هو عليه الحال في البكتريا بسبب وجود العديد من التتابعات غير المشفرة في الحامض النووي المرسال الأولي في حقيقيات النوى وضرورة إزالتها قبل حصول الترجمة لتصنيع البروتين وكذلك هجرة الحامض النووي من النواة إلى السايتوبلازم فإن الحامض النووي المرسال في الأحياء حقيقية النوى يبقى لمدة ساعات قبل أن يتحطم ويعتقد بأنه قد يستمر لمدة أيام لاحقة.

عمليات القطع والإضافة في الحامض النووي المرسال الأولي

تحصل عمليات القطع والإضافة في جزيئة الحامض النووي المرسال الأولي (Pre-mRNA) في الأحياء حقيقية النوى. إذ أن الناتج الأولي لهذه الجزيئة بعد عملية الاستنساخ يحتوي على العديد من المناطق غير المشفرة والتي لا يمكن ترجمتها وبالتالي فإنه لا بد من إزالتها كخطوة أولية ولحام التتابعات المشفرة قبل عملية الترجمة. كما أن المنتج الأولي للحامض النووي المرسال يخضع أيضاً لبعض التحويرات في النهاية الخامسة والثالثة.

يتم ذلك بإضافة أجزاء كيميائية لهما. من المعروف كما تم ذكره سابقاً بأن الحامض النووي المرسال الأولي لحقيقيات النوى يحتوي على تتابعات مشفرة تدعى بالمحاور وأخرى غير مشفرة تدعى بالمتداخلات تفصل المحاور عن

المتداخلات بواسطة مناطق قصيرة تدعى بتتابعات العزل والمكونة من التتابع TCAGGT شكل (6 - 5) . تتم عملية فصل المتداخلات عن المحاور من خلال هذه التتابعات لذلك يعتقد بأنها تمثل إشارات خاصة . وليس من المعروف فيما إذا كانت هذه التتابعات تمثل مناطق لأنزيمات قاطعة معينة . وفي كل الأحوال فإن عملية فصل المتداخلات تتم مباشرة في النهاية الخامسة للـGT والنهاية الثالثة للـAG الموجودة في تتابعات العزل . فمثلاً في مورث بيتا-جلوبين (β-globin) في الأرانب فإن هناك 550 نيوكليوتيد غير مشفرة تقع بين الشفرات الخاصة بالحامض الأميني رقم 104 والحامض الأميني 105 علماً بأن عدد المناطق المشفرة المسؤولة عن الأحماض الأمينية المكون لسلسلة بيتا - جلوبين يبلغ 149 . وعند إزالة التتابعات غير المشفرة (المتداخلات) فإن موقع الشفرة الوراثية 104 سيجاور موقع الشفرة الوراثية 105 في الحامض النووي المرسال النهائي . أما في مورث زلال البيض في الطيور فإن الحامض النووي المرسال الأولي لهذا المورث يتكون من 7564 نيوكليوتيد تمثل ثمانية محاور وسبعة متداخلات . في حين يتألف الحامض النووي النهائي أو الناضج (Mature mRA) بعد إزالة المتداخلات من 1872 نيوكليوتيد 64 نيوكليوتيد منها تمثل منطقة الدال في النهاية الخامسة و 650 نيوكليوتيد آخر تمثل تتابعات الانتهاء والجرار في النهاية الثالثة . فيما تمثل النيوكليوتيدات المتبقية (عددها 1158) 386 شفرة وراثية ثلاثية تمثل عدد الأحماض الأمينية المكونة لبروتين زلال البيض والتي تبلغ 386 حامضاً أمينياً .



شكل (6 - 5) : تتابعات العزل في الحامض النووي المرسال الأولي .

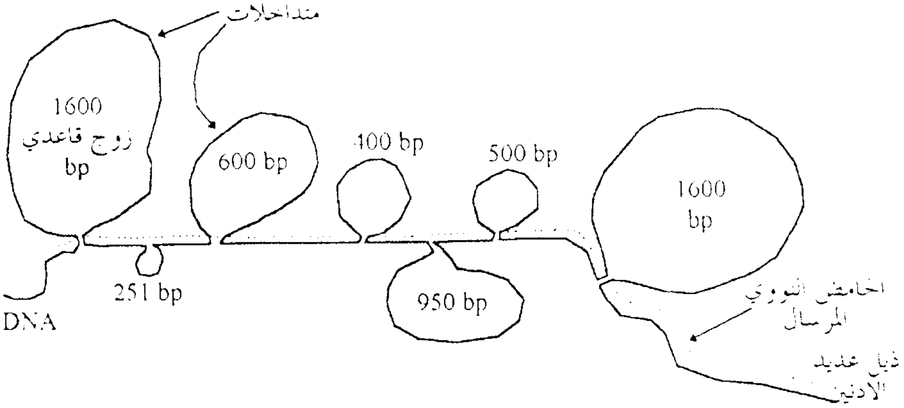
أما المتداخلات المزالة فيتراوح طولها بين 52 إلى 1589 نيوكليوتيد شكل (6 - 6). أما العملية الثانية فهي إضافة قبعة (Capping) لنهاية البيورين في النهاية الخامسة للحامض النووي المرسال التي يعتقد بأنها تؤدي إلى خصول الترجمة بطريقة ما. كذلك إضافة ذيل من قواعد الادنين (Poly (A) tail في النهاية الثالثة. يعتقد بأن إضافة ذيل يعمل على ربط جزئية الحامض النووي المرسال مع جدار الشبكة الاندوبلازمية. ولكن تبقى كل من عملية التقبيع وإضافة ذيل الادنين لغزاً يحتاج الكثير من التمحيص والدراسة لمعرفة أسرارها. تتم إضافة قبعة الجوانسين [7 - methylguansin (mG7)] شكل (6 - 7) بعد تحوير القاعدة النيتروجينية الأخير لمنطقة الدال التي تقع في النهاية الخامسة. فيما يتم إضافة حوالي 200 نيوكليوتيد متتابعة من الادنين إلى النهاية الثالثة. لا تحتوي جميع جزيئات الحامض النووي المرسال على غطاء في النهاية الخامسة. كما أنه ليست لجميعها ذيول عديد الادنين وذلك ما يجعل من الصعب تحديد وظيفة هذه التحورات. بعد اكتمال التحورات المذكورة على الحامض النووي المرسال الأولي يكون شريط الحامض النووي المرسال الناضج قد أصبح جاهزاً لعملية الترجمة لإنتاج البروتين.

لذلك يهاجر الحامض النووي من النواة إلى السايتوبلازم حيث يرتبط مع الريبوسومات التي هي بيوت تصنيع البروتين. يدعى الحامض النووي في هذه المرحلة بالحامض النووي المرسال الناضج شكل (6 - 8).

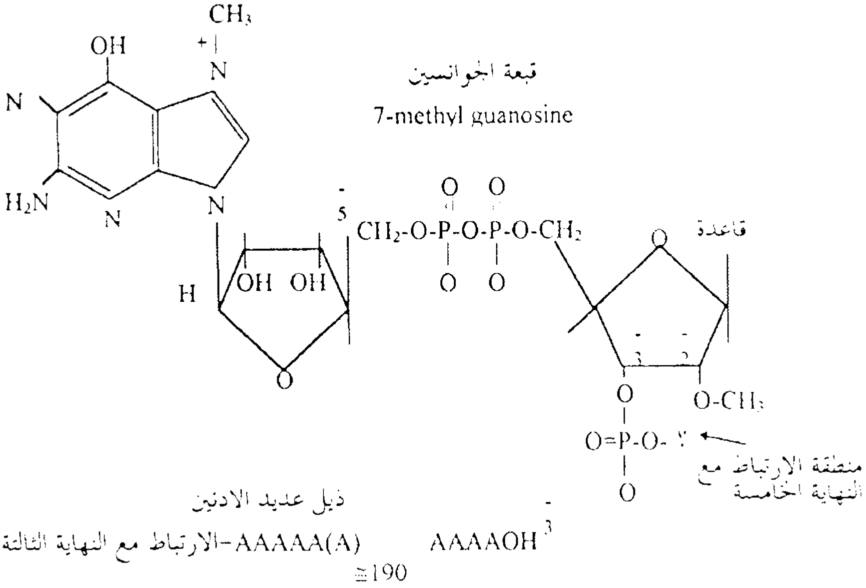
استنساخ الحامض النووي الناقل (tRNA)

أشارت نتائج التفاعلات الكيميائية التي أجريت حول ترجمة الشفرات الوراثية التي يحملها الحامض النووي المرسال إلى بروتينات بأنه لا يوجد أي تفاعل مباشر بين هذه الشفرات والأحماض الأمينية لإنتاج سلاسل عديد الببتيد وأن هناك وسيطاً آخر يتدخل لإتمام العملية. لقد وجد بأن هذا الوسيط هو نوع من الأحماض النووي الريبوزية القصيرة التي يصل حجمها

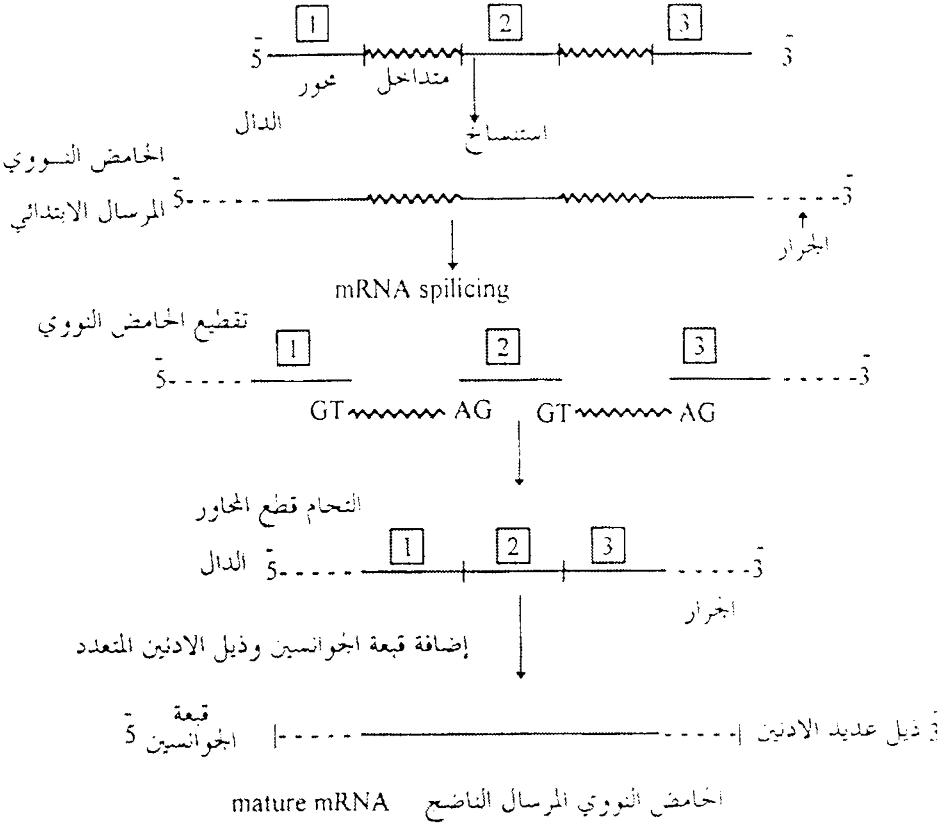
إلى 4 وحدات سفيدبرج (4S) .تتألف هذه الوحدات من 70 - 80 نيوكليوتيد طولاً. تحمل هذه الأحماض تتابعات ثلاثية القواعد تدعى الشفرة المضادة (Anticodon) ويتوقع وجود واحد إلى أربع من هذه الجزيئات لكل حامض



شكل (6-6) : استنساخ الحامض النووي المرسال وعمليات ما بعد الاستنساخ في مورث زلال البيض ويلاحظ انثناء منطقة المتداخلات أثناء عملية الاستنساخ.



شكل (6-7) : التركيب الكيميائي لبقعة الجوانين 5 - mG7 في النهاية الخامسة لجزيئة الحامض النووي المرسال وذيل الادنين في النهاية الثالثة.



شكل (6-8) : عمليات القطع والتحوير في الحامض النووي المرسال الابتدائي في الخلايا الحقيقية النوى.

أميني. يتم استنساخ الحامض النووي الناقل من المورثات الموجودة على الصبغيات. تستنسخ هذه الجزيئات داخل النواة لإنتاج الحامض النووي الناقل الأولي **(Pre-rRNA)**. تتم هذه العملية بنفس طريقة استنساخ الحامض النووي الناقل يتم بواسطة أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي الثالث وليس الثاني. إن جزيئة الحامض النووي الناقل الأولي ليست أطول كثيراً من جزيئة الحامض النووي الناقل الناضج **(mature tRNA)** بعد إزالة التتابعات غير المشفرة الزائدة. ففي عملية تقطيع الحامض النووي الريبوزي فإنه يتم إزالة التتابعات التي تمثل

منطقة الدال من النهاية الخامسة. تضاف بعدها القواعد ACC إلى النهاية الثالثة وتزال عند ذلك التتابعات غير المشفرة لتكوين الحامض النووي الناقل الذي يحتوي على التتابع الثلاثي القواعد أو مضاد الشفرة المحمول على ذراع. إن التتابع الثلاثي القواعد في الحامض النووي الناقل يمثل الموقع الذي يحمل الحامض الأميني في النهاية الثالثة والذي يكون مكملاً للشفرة الوراثية المحمولة على الحامض النووي المرسال. إن عملية ما بعد الاستنساخ التي تتم على جزيئة الحامض النووي الناقل الأولي تتضمن استبدال بعض القواعد الشائعة مثل الادنين. سايتوسين، جوانين ويوراسيل إلى قواعد غير شائعة مثل الايونسين (1) (Ionisine) الذي يشتق أصلاً من الادنين بعد تحوير ذرة الكربون السادسة. وبالإضافة للأيونسين فإن هناك قواعد غير الشائعة أخرى مثل اليوردين الكاذب واليوردين ثنائي الهيدروجين والجوانسين أحادي المثيل وغيرها.

استنساخ الحامض النووي الريبوزي الريبوسومي (rRNA)

إن إحدى أكبر جزيئات الحامض النووي الريبوزي التي لها أهمية في تصنيع البروتين هي جزيئة الحامض النووي الريبوسومي. حيث تتألف طول جزيئة من جزيئات هذه الحامض من عدة آلاف من النيوكليوتيدات مقارنة مع 70 - 80 نيوكليوتيد تؤلف الحامض النووي الناقل. فيما يختلف طول الحامض النووي المرسال إعتماداً على طول التتابعات المشفرة وغير المشفرة فيه. فمثلاً إن الحامض النووي المرسال الخاص بمورث زلال البيض والذي يتألف من 1872 نيوكليوتيد فإنه لا يساوي إلا نصف طول أطول جزيئات الحامض النووي الريبوسومي. إن الطريقة التقليدية لوصف ومعرفة نوع جزيئات الحامض النووي الريبوزي والريبوسومي هو استناداً إلى معامل ترسيبها (sedimentation coeffcient) والذي يسمى بوحدة سافبرج (Svedbreg unit) ويرمز لها بـ (S). تحسب هذه المعاملات من ترسب هذه الجزيئات في الطرد المركزي لمدرج

ســـكـــري (Sucrose-gradient) ويمكن وصف الريبـوسـومـات وتحت الـوحـدات الريبوسومية باستخدام قيمة (S). إن كل ريبوسوم يتألف من تحت وحدتين غير متساوية وهما تحت الوحدة 50 S وتحـت 30 S كما هو الحال عليه في الأحياء بدائية النوى ولهما القيمة 70 S . أما الريبوسوم في الأحياء حقيقية النوى فإنه ذو قيمة 80 S ويتألف من تحت الوحدات 60 S، 40 S .

وبما أن الهيئة والوزن الجزيئي هما العوامل المهمة لتحديد الترسيب فإن قيمة (S) لكلا تحت الوحدتين هو أكبر من قيمة (S) للريبوسوم في ترسيب اختباري. لذلك فإن طول الحامض النووي الريبوسومي 16S لا ينعكس على قيمة (S) لها. وفي كلا الأحياء بدائية النوى وحقيقية النوى فإن عملية الاستنساخ تؤدي إلى تكوين جزيئة حامض نووي ريبوسومي طويلة تدعى بالحامض النووي الريبوسومي الأولي. ويقوم أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي باستنساخ الحامض الريبوسومي 28S، 18S فيما يقوم أنزيم البلمرة الثالث باستنساخ الحامض النووي الريبوسوي 5S. وتؤدي عمليات ما بعد الاستنساخ إلى انشطاره إلى أجزاء بواسطة الأنزيمات. بالإضافة لعمليات الانشطار التي تحدث بعد الاستنساخ فإنه يحدث إضافة مجاميع المثيل للكثير من نيوكليوتيدات الحامض. ففي بكتريا القولون فإن كل مورث من المورثات السبعة المسؤولة عن تكوين الحامض النووي الريبوزي والتي تدعى بـ(rrn) تستنسخ لتعطي جزيئة 30S من الحامض النووي الريبوزي الأولي وهي ما يمكن إيجادها بشكل نادر حيث يتم شطرها في المرحلة القادمة. أو تنشطر جزيئة الحامض الريبوسومي 16S يليها انفصال جزيئات الحامض النووي الريبوسومي 23S، 16S شكل (6 - 9).

أما في الأحياء الحقيقة النوى فإن طول الحامض النووي الريبوسومي الأولي يختلف حسب الأنواع. ففي الحشرات يكون 37S والبرمائيات 40S واللبائن 45S وفي جميعها فإن عمليات ما بعد الاستنساخ تؤدي إلى تقطيعه إلى

جزيئتين هما جزيئة الحامض النووي الريبوسومي 18S وجزيئة أخرى تتراوح بين 25S - 28S. هناك العديد من نسخ المورثات الخاصة بالحامض النووي الريبوسومي في المادة الوراثية للأحياء جميعاً. ففي بكتريا القولون فهناك 5-10 نسخ من مورثات الحامض النووي الريبوسومي التي تدعى (rrn) حيث توجد نسخة واحدة على الأقل في 3 مواقع صبغية. أما في الأحياء حقيقية النوى فإن نسخ المورثات الخاصة بالحامض النووي الريبوسومي موجودة في تكرارات خاصة يطلق عليها بالكروماتين النووي (Nucleolar chromation) وهي جزء من منطقة تدعى بمنطقة تنظيم نووي (م.ث.ن) (Nucleolar - organization - NOR)

الترجمة وبناء البروتين

إن عملية تصنيع كل جزيئة بروتين يتم إدارتها بواسطة الحامض النووي المرسال وتتضمن هذه العملية عدد من الخطوات التي تتبع استنساخ الحامض النووي المرسال ويمكن وضع هذه الخطوات على شكل مرحلتين هما :

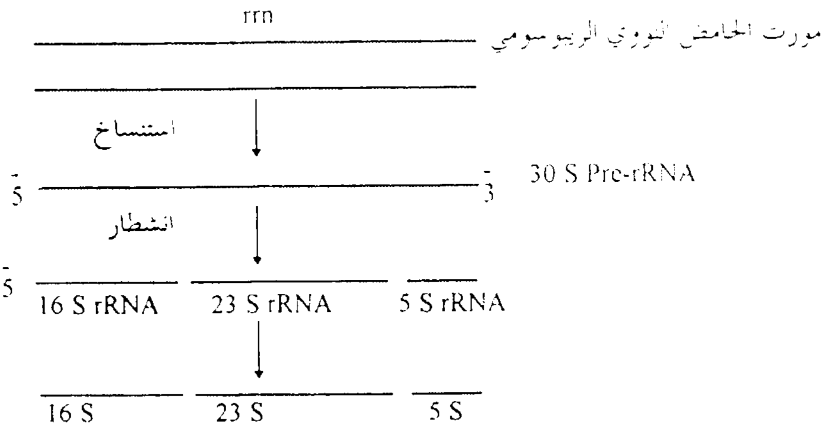
1. مرحلة انتقال المعلومات Information-transfer وفيها يتم تصميم تتابع الأحماض الأمينية اعتماداً على تتابع شفراتها في الحامض النووي المرسال.

2. مرحلة العمليات الكيميائية حيث يتم من خلال ربط الأحماض الأمينية مع بعضها. وتدعى كلا المرحلتين بالترجمة (Translation).

يتضمن نظام الترجمة أربعة مكونات :

أولاً ـ الريبوسومات: وتمثل منضدة العمل التي يتم فيها تصنيع البروتينات. تنتشر الريبوسومات في سايتوبلازم الخلايا بدائية النواة فيما تتركز بكثافة على سطوح أغشية الشبكة الاندوبلازمية في حقيقيات النوى شكل (6 - 10). تحتوي الريبوسومات على الأنزيمات الضرورية لتكوين الروابط الببتيدية بين الأحماض الأمينية. وتوفر المكان المناسب لارتباط الحامض النووي المرسال.

ثانياً ـ الحامض النووي الناقل **tRNA**: إن الأحماض الأمينية ليست مرتبطة مع شريط الحامض النووي المرسال بل أن هناك شفرات معينة ضمن الحامض النووي المرسال يتم التعرف عليها ليبدأ بناء سلسلة عديدة الببتيد . إن عملية التعرف على هذه الشفرات يتم بواسطة مجموعة من الجزيئات التي تدعى بالحامض النووي الناقل. تتمكن هذه الجزيئات من قراءة شفرات الحامض النووي المرسال باستخدام مضاد الشفرة الذي تحمله. تتكامل مضادات الشفرات مع الشفرات الوراثية بحيث يقابل كل شفرة وراثية معينة مضاد للشفرة مكمل له .

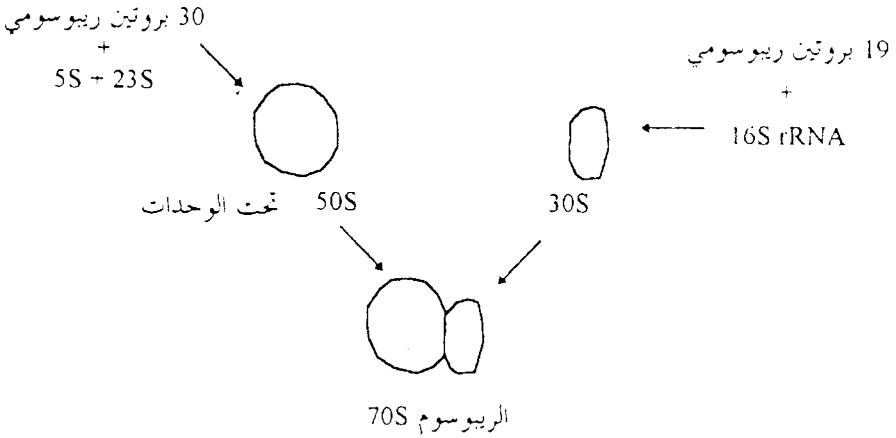


شكل (٦-٩) : استنساخ الحامض الريبوسومي وعمليات ما بعد الاستنساخ التي تتضمن شطر جزيء الحامض الريبوسومي الأولي إلى جزيئات أصغر.

ثالثاً ـ أنزيمات تصنيع مركب الحامض النووي الناقل – أمينوأسيل **(Aminoacyl-tRNA Synthetases)** : وهي مجموعة من الأنزيمات المسؤولة عن إرتباط حامض أميني مع جزيئة حامض نووي ناقل مناسب. يرتبط الحامض الأميني مع جزيئة الحامض النووي الناقل الخاصة به برابطة قوية تنشأ من إرتباط مجموعة الكربوكسيل **(-COOH)** في الحامض الأميني مع مجموعة

الهيدروكسيل (OH-) في الطرف الثالث من جزيئة الحامض النووي الناقل لإنتاج مركب الامينوأسيل- الحامض النووي الناقل. يتكون هذا المركب بخطوتين الأولى بتنشيط الحامض الأميني بواسطة الطاقة العالية في الادينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP). والثانية بارتباط الحامض الأميني المنشط بجزيئة الحامض النووي الناقل المناسب وإطلاق المركب الوسيط الادنين أحادي الفوسفات (AMP). تتم كلتا الخطوتين بوجود أنزيم تصنيع مركب الحامض النووي الناقل - امينو أسيل شكل (6 - 11) . إن المعقد الكيميائي المتكون من الحامض النووي الناقل والامينوأسيل يعمل كوسيط لبناء سلسلة عديد الببتيد حيث يتمكن كل جزيء من هذا المعقد الكيميائي من تمثيل الشفرة الصحيحة في الحامض النووي المرسال ليضع الحامض الأميني في الوضع الصحيح .

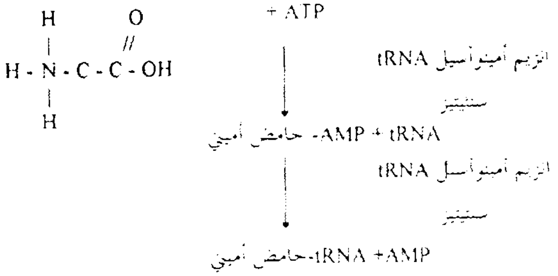
رابعاً - تأسيس وإطالة سلسلة عديد الببتيد : يحتوي كل ريبوسوم على موقعين الأول هو الموقع الببتيدي (Piptidyl site) الذي ترتبط به سلسلة عديد الببتيد النامية والثاني هو موقع الحامض الأميني المنشط (A) الذي ترتبط به



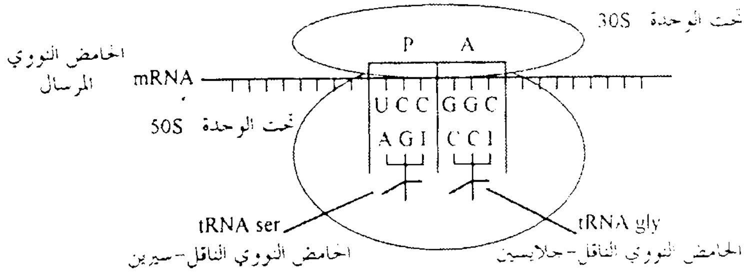
شكل (6 - 10) : تركيب ريبوسوم بكتريا القولون .

جزيئة الحامض النووي الناقل-امينوأسيل الحاملة للحامض الأميني .

ترتبط جزيئات الحامض النووي الناقل - امينوأسيل بالموقع A اعتماداً على مضاد الشفرة التي يحملها والشفرة الوراثية المحمولة على الحامض النووي المرسال شكل (6 - 12) . وعلى ذلك فأن جزيئات الحامض النووي الناقل-امينوأسيل تتغير بتحرك الشفرات الوراثية للحامض النووي المرسال . وهكذا يتوالى ارتباط جزيئات الحامض النووي الناقل - امينوأسيل مع كل تغير في



شكل(**11 - 6**) : دور انزيم الامينو أسيل **tRNA** في تصنيع معقد الحامض الأميني - **tRNA**

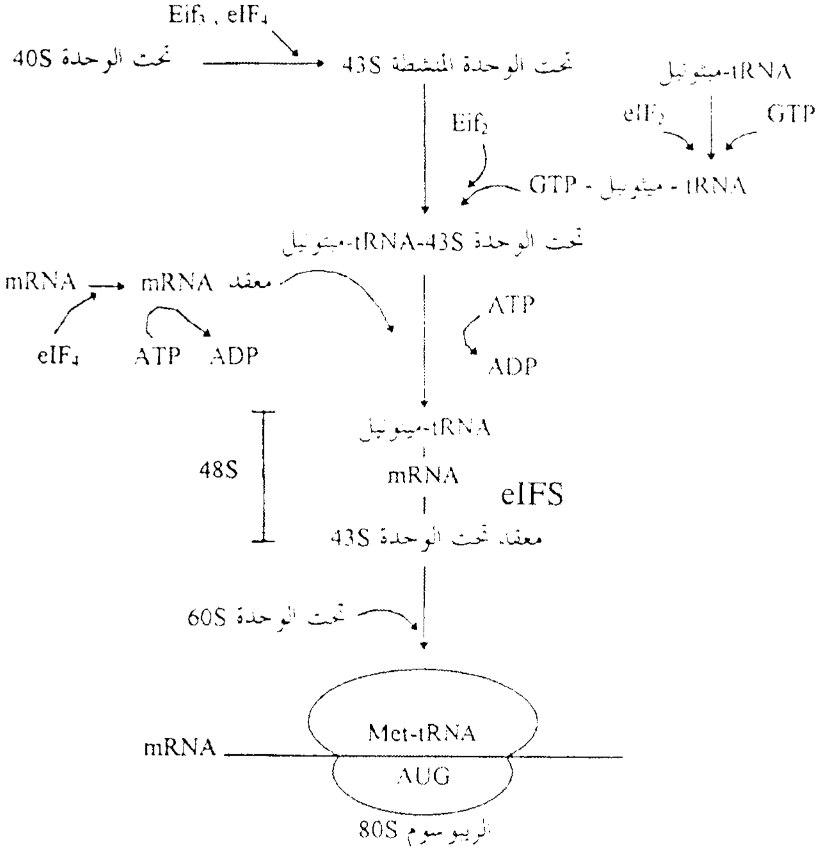


شكل (6 - 12) : مناطق ارتباط مركب الحامض النووي الناقل- امينوأسيل على الريبوسوم ويظهر بأن الموضع A مشغولاً بمركب الحامض النووي الناقل- جلايسين فيما يكون الموضع P مشغولاً بمركب الحامض النووي الناقل-سيرين حيث يرتبط الجلايسين والسيرين . بعدها يتحرك مركب الحامض الناقل- جلايسين ليحل في الموضع P ليرتبط مركب جديد من الحامض الناقل -امينوأسيل في الموضع A بعد تحرك جزيئة الحامض النووي المرسال .

الشفرة الوراثية في الموقع A. وتشابه حركة شفرات الحامض النووي المرسال وجزيئات الحامض النووي الناقل – امينوأسيل حركة شريط الطابعة اليدوية فيما تشبه إضافة الحامض النووي الناقل – امينوأسيل طبع الحروف لتنتهي العملية بكلمة مفهومة ومرتبطة مع بقية الكلمات لإنتاج سطر كتابي يقابل سلسلة عديد الببتيد النامية. يبدأ بناء البروتين بواسطة بادئ خاص من جزيئة الحامض النووي الناقل والذي يرمز له ب tRNAfmet (Methionyl-tRNAF). كما ترتبط جزيئة الميثونين مع مجموعة أخرى هي مجموعة الفورميل.

إن ذلك يؤدي إلى أن جميع سلاسل عديد الببتيد الناتجة تبدأ بالحامض الأميني ميثونين (عدا البروتينات الوظيفية). ينفصل هذا بعد الانتهاء من سلسلة عديد الببتيد.

وبالإضافة للحامض النووي الناقل – ميثونين فإنه وجد بأن هناك طرازاً ثانياً منه في السايتوبلازم حقيقيات النوى يكون خالياً من مجموعة الفوميل ويرمز له (RNAi الناقل – ميثونيل). يتفاعل الطراز الثاني الخالي من مجموعة الفورميل فقط مع عوامل بناء البروتين (IFI,IF2,IF3) في حين يتفاعل الطراز الأول مع عوامل الإطالة (Elongation Factors Ts, Tu) EF-TU. EF-TS) والانتهاء في كل من الأحياء بدائية النوى وحقيقيات النوى جدول (٦ - ١). يرتبط معقد جزيئة الحامض النووي الناقل – ميثونيل الخاص بتحت الوحدة الصغيرة مع الحامض النووي المرسال عن طريق الارتباط مع القواعد الثلاث الأولى التي تلي منطقة الدال في الحامض النووي المرسال. تدعى هذه القواعد الثلاث بشفرة الابتداء وهي إما أن تكون AUG أو GUG. تحتاج هذه العملية عوامل البناء السابق ذكرها بالإضافة للجوانين ثلاثي الفوسفات (GTP)الذي يتم نزع الماء منه ليتحول إلى جوانين ثنائي الفوسفات GDP. ينتقل معقد تحت الوحدة الصغيرة – الحامض النووي الناقل – ميثونيل لينضم إلى تحت الوحدة الكبيرة ليصبح جزيء الحامض النووي الناقل – ميثونيل مرتبطاً بالموقع (P على



شكل (6 - 13) : عوامل تأسيس بناء البروتين في الأحياء حقيقة النوى ومواقع عملها .

الريبوسوم شكل (6 -13) . إن وجود شفرة الابتداء مع مضاد الشفرة في موقع **P** يؤدي إلى ترك الموقع **A** فارغاً حيث تتعرف عليه جزيئة الحامض النووي الناقل – امينوأسيل لترتبط به . تحتاج عملية الارتباط هذه إلى نزع الماء من الجوانين ثلاثي الفوسفات بالإضافة لوجود عوامل الاستطالة **EF-Ts, EF-Tu (EF1BY, EF1a)** في الأحياء حقيقية النوى) . وفي الخطوة التالية يتم ربط المجموعة الكاربوكسيلية للحامض الأميني المحمول على جزيئة الحامض النووي الناقل – امينوأسيل المرتبطة في الموقع **P** مع مجموعة الأمين

للحامض الأميني المحمول على جزيئة الحامض النووي الناقل –امينوأسيل في الموقع A لتكوين آصرة ببتيدية بين الحامضين .

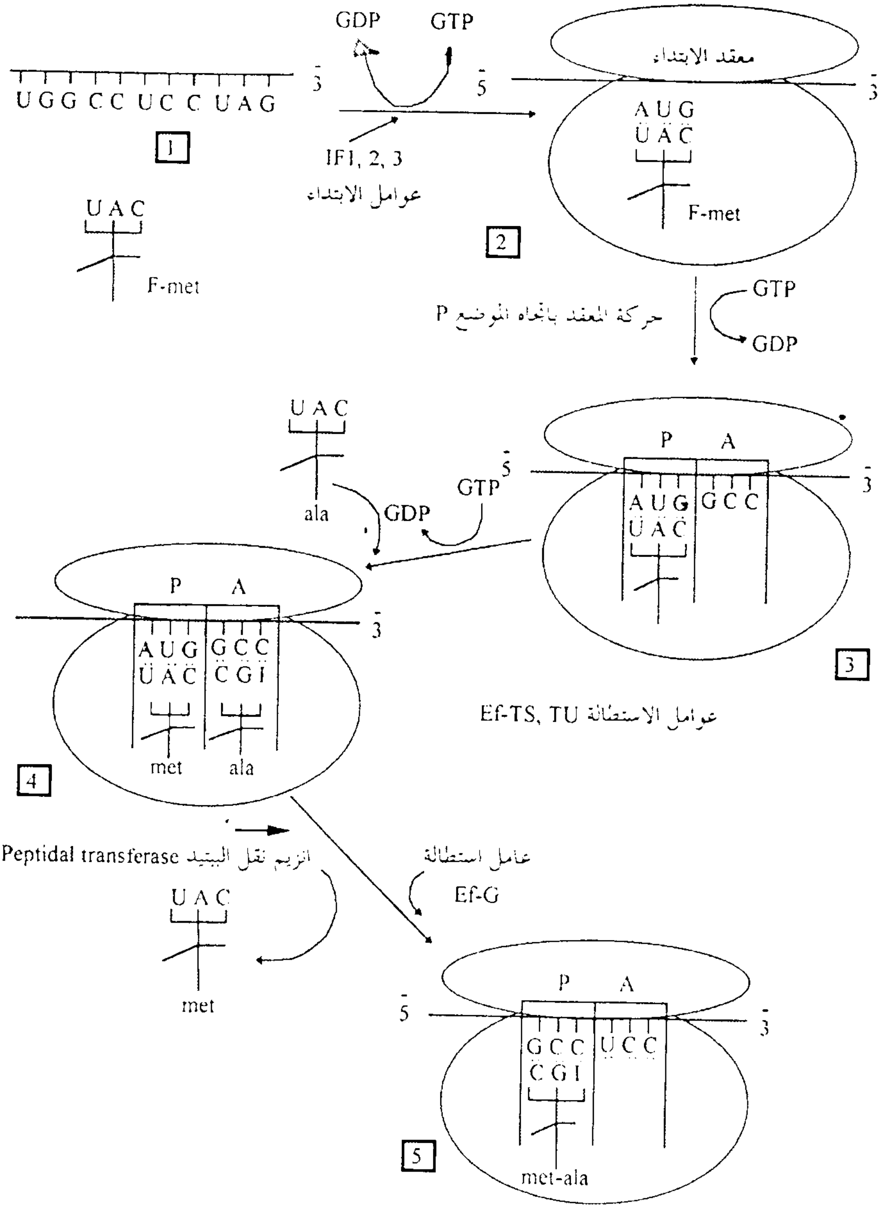
يلعب الأنزيم (Piptidyl transferase) الموجود على تحت الوحدة الكبيرة دوراً في نشوء هذه الروابط شكل (6 - 14) . تتضمن الخطوة اللاحقة انتقال جزيئة الحامض النووي الناقل–امينوأسيل المرتبطة مع سلسلة عديد الببتيد من موقع A للموقع P نتيجة لتحرك الحامض النووي المرسال لثلاث قواعد وبالتالي كشف الشفرة الوراثية التالية التي تأخذ مكانها في الموقع A. تتعرف على هذه الشفرة جزيئة جديدة من جزيئات الحامض النووي الناقل – امينوأسيل لتربطها معها . تحتاج هذه العملية إلى نزع الماء من جزيئة الجوانين ثلاثي الفوسفات وكذلك عامل الاستطالة EF (EF- 2 في الأحياء حقيقية النوى). تتكرر بعدها الخطوات السابقة مع كل ارتباط جديد لجزيئة جديدة من جزيئات الحامض النووي الناقل – امينو وأسيل حتى اكتمال جميع الشفرات الوراثية للحامض النووي المرسال . يتم بعدها إيقاف عملية البناء عن طريق ارتباط عوامل محررة (Releasing Factors) يرمز لها بـ RF) RF1-RF2 في الأحياء حقيقية النوى) . تنفصل بعدها الوحدة المؤلفة للريبوسوم لتتحرر سلسلة عديد الببتيد . ومن الجدير بالذكر أن ترجمه جزيئات الحامض النووي المرسال قد تتم بواسطة العديد من الريبوسومات (يطلق على مجموعة الريبوسومات المرتبطة مع جزيئة الحامض النووي المرسال بالبوليسومات) في نفس الوقت حيث يأخذ كل ريبوسوم حيزاً معلوماً من الحامض النووي المرسال ليباشر عملية الترجمة . كما أن عملية الترجمة تقف عندما تصل الموضع A حيث يتم نزع مجموعة الفورميل من على مجموعة الأمين في حامض الميثولين عن طريق أنزيم نزع الفورميل (Deformylase).

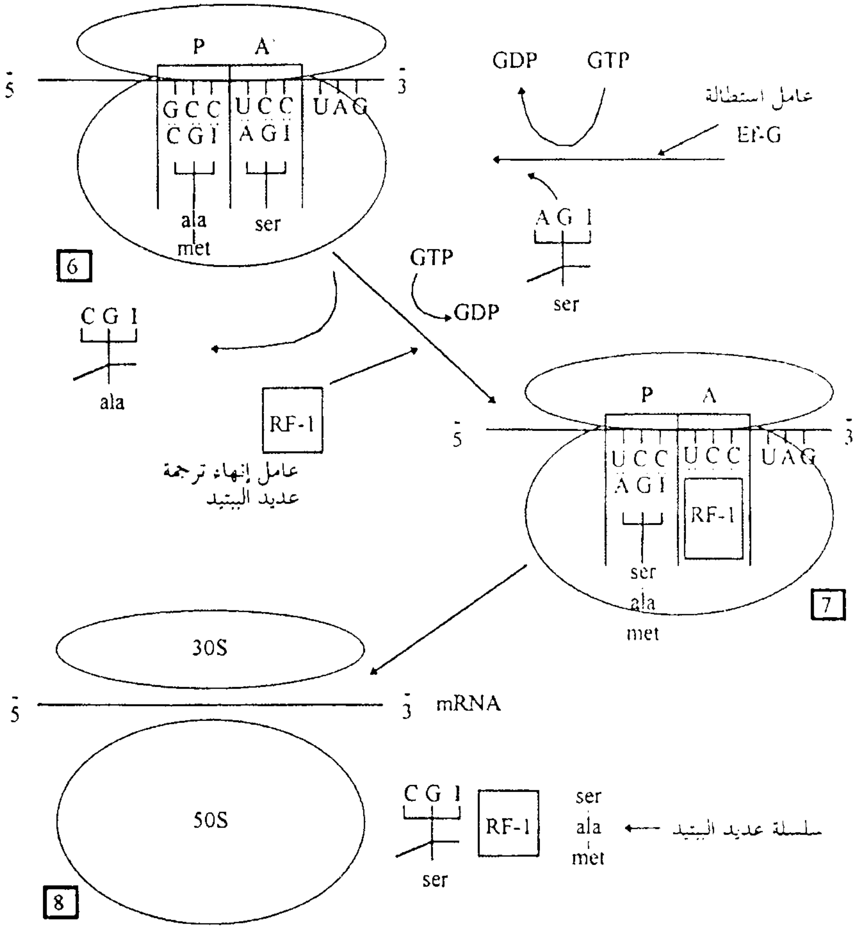
جدول (٦-١) : عوامل البناء والإطالة والإنتهاء المستخدمة في بناء سلاسل عديد الببتيد في الأحياء بدائية النوى وحقيقية النوى

الوظيفة	العامل: في الأحياء بدائية النوى	العامل: في الأحياء حقيقية النوى
عوامل مهمة لتنشيط تحت الوحدة الصغيرة .	IFI	eIFI
ربط الجوانين ثلاثي الفوسفات GTP مع جزيئة الحامض النووي الناقل - ميثونيل .	IF2	eIF2
ربط معقد الحامض النووي الناقل - ميثونيل بتحت الوحدة الصغيرة . تأصر الحامض النووي المرسل مع تحت الوحدة الصغيرة وأخيراً ربط تحت الوحدة الصغيرة مع تحت الوحدة الكبيرة لتكوين الريبوسوم والبدء بالعمل	IF3	eIF3 eiF4 eIF5
إطالة سلسلة عديد الببتيد	EF-TU EF-TS EF-G	EF-Iα EFIβ,Y EF2
لايقاف نمو سلسلة عديد الببتيد وإنتهاء التصنيع	RF1 RF2 RF3	RF Releasing Factor

الشفرة الوراثية Genetic Code

من المعروف بأن جزيئة البروتين مكونة من تتابع عشرين حامضاً أمينياً مترتباً بطريقة خاصة اعتماداً على الشفرات الوراثية التي يحملها شريط الحامض النووي المرسال (وقد تشترك أكثر من سلسلة عديد الببتيد ناتجة من أكثر من شريط للحامض النووي المرسال في تشكيل البروتين) . والسؤال هنا هو كيف تتمكن أربعة قواعد نيتروجينية فقط من تشكيل شفرات وراثية مناسبة تقابل العشرين حامضاً أمينياً المكونة للبروتين؟

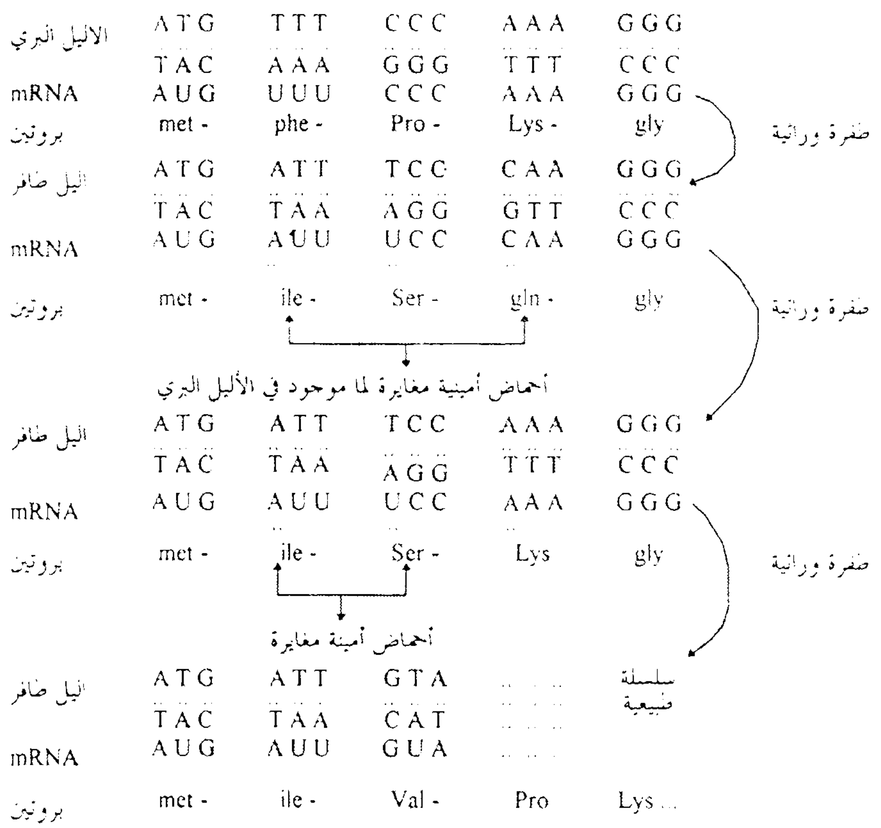

GDP
GTP
UGG CC UC C UAG
1
IF1, 2, 3
عوامل الابتداء
معقد الابتداء
AUG
UAC
F-met
2
UAC
F-met
حركة المعقد باتجاه الموضع P
GTP
GDP
UAC
ala
GTP
GDP
P A
AUG GCC
UAC
3
عوامل الاستطالة Ef-TS, TU
P A
AUG GCC
UAC CGI
met ala
4
Peptidal transferase انزيم نقل البيتيد
UAC
met
عامل استطالة
Ef-G
P A
GCC UCC
CGI
met-ala
5



شكل(6 - 14) : مراحل وتفاصيل الترجمة وإنتاج سلاسل عديد الببتيد .

فلو افترضنا بأن الشفرة الوراثية الواحدة مكونة من قاعدتين فقط فإن عدد الشفرات الوراثية الناتجة المحتملة سيكون هو **16** شفرة وراثية وهو بطبيعة الحال غير كافٍ مقارنة بعشرين حامض أميني. لكن لو أن الشفرة الوراثية ناتجة من ثلاث قواعد فإن عدد الاحتمالات الناتجة هو **64** شفرة وراثية وهو ما يزيد من الحاجة المفترضة لتصنيع الأحماض الأمينية العشرين. إلا أن كلا الافتراضين لم يتم اثباتهما حتى عام **1961** حيث تمكن العالم كريك وزملاءه من إثبات أن الشفرة الوراثية مكونة من ثلاث قواعد نيتروجينة (ثلاثية) استناداً إلى تحليل الطفرات الصناعية باستخدام الفلافين الأولي **(Proflavin)** شكل (5 - 15). تبين من خلال التحليل الوراثي لهذه الطفرات بأنها ترجع في الأصل إلى إضافة زوج قاعدي أو نقصان زوج قاعدي وذلك يؤدي إلى تغيير زوج قاعدي واحد في الشفرة الوراثية المحمولة على جزيئة الحامض النووي المرسال. وعند إعادة التجربة عدة مرات تم الحصول على طفرات معزولة تمثل نقص في زوج قاعدي (–) أو إضافة زوج قاعدي (+) . بعد ذلك قام كريك وزملاءه ببناء احتمالات مختلفة من الطفرات (+) و(–). ووجد بأن الاتحادات الجديدة التي تحمل طفرتين موجبة أو سالبة تمثل شكلاً مظهرياً مماثلاً للطفرة الأحادية الا أن الاتحادات الناتجة من ثلاث طفرات وراثية موجبة أو سالبة تمثل شكلاً مظهرياً مماثلاً للطراز البري. وهذا يدل على أن إضافة 3 أزواج قاعدية أو إزالة 3 أزواج قاعدية لا يغير من الشفرة الوراثية التالية وهو ما يؤكد بأن الشفرة الوراثية ثلاثية القواعد. لقد تم التأكد من الشفرة الثلاثية القواعد من العديد من التجارب العملية الأخرى التي تم القيام بها. حيث وجد بأن جزيئة الحامض النووي الناقل– أمينوأسيل تتحفز بوجود نيوكليوتيدات ثلاثية. واستناداً إلى العديد من نتائج التجارب المختبرية التي أجريت من قبل العديد من العلماء لكشف لغز الشفرة الوراثية فإنه تم التوصل إلى صياغة جدول خاص يمثل الشفرات الوراثية وما يقابلها من الأحماض الأمينية المسؤولة عنها.

لقد افترض أن المعلوات المثبتة في هذا الجدول تنطبق على جميع الأحياء ولم يجد العلماء لحد الآن أي دليل على وجود اختلاف في الشفرات الوراثية الخاصة بهذه الأحماض فيما أكدت دراسات الطفرات الوراثية دقة المعلومات جدول (2 - 6) .



شكل (6 - 15) : تجربة كريك وزملاءه التي تثبت بأن الشفرة الوراثية مكونة من ثلاث قواعد حيث يلاحظ بأن الأليل البري يستعيد تسلسل أحماضه الأمينية الطبيعية بعد إضافة أو حذف ثلاث أزواج قاعدية فردية فيما يبقى الأليل ذو الطفرة الوراثية محافظاً على الطفرة عند إضافة أو حذف زوج واحد أو زوجين من القواعد .

نظريـة الأرجوحة Wobble Hypothesis

استناداً إلى الشفرة الوراثية الثلاثية فإنه لا بد من وجود 64 جزيئة حامض نووي ناقل يحتوي كل منها على تردد فريد من مضاد الشفرة الذي يتمكن من الارتباط مع الشفرة الوراثية التي يحملها شريط الحامض النووي المرسال والتي تمثل رمزاً لحامض أميني معين. لكن في الواقع فإن هذه العملية تتم بواسطة 32 جزيئة حامض نووي ناقل مختلف. لقد تم تفسير هذا العدد القليل من جزيئات الحامض النووي الناقل من قبل العالم كريك سنة 1966 ووضع نظريته التي تدعى بنظرية الأرجوحة التي فسر فيها العدد القليل غير المتوقع من جزيئات الحامض النووي الناقل وكذلك القواعد المحورة غير الشائعة في تتابعات مضاد الشفرات. استناداً إلى هذه النظرية فإن القاعدة النيتروجينية القريبة من النهاية الخامسة في تتابع مضاد الشفرة هي الشفرة هي قاعدة الأرجوحة (Wobble base). تتمكن هذه القاعدة من الازدواج بأشكال مختلفة مع أكثر من قاعدة نيتروجينية من القواعد المكملة في النهاية الثالثة لتتابع الشفرة في الحامض النووي المرسال. فمثلاً نتوقع أن تتابع مضاد الشفرة 3 - AGU - 5 لجزئية الحامض النووي الناقل بأن يرتبط مع تتابع الشفرة 5 - UCA - 3 للحامض النووي المرسال. لكن استناداً إلى نظرية الأرجوحة فإن اليوراسيل في النهاية الخامسة U - 5 لتتابع مضاد الشفرة يتمكن من الارتباط مع الجوانين في النهاية الثالثة G - 3 تتابع شفرة أخرى موجودة على الحامض النووي المرسال. لذلك فإن التتابع 5 - AGU - 3 يتمكن من تمييز والارتباط مع التتابع 3 - UCG - 5، لذلك فإن 5 - U هي قاعدة أرجوحة وتكون غير مقيدة بالارتباط عندما تكون في النهاية الخامسة. إن قاعدة الأرجوحة لا تتمكن من الارتباط مع جميع الاحتمالات بل إن الـ U - 5، G - 5 الموجودة في تتابع مضاد الشفرة تتمكن فقط من الارتباط مع قاعدتين مختلفتين لكل منهما.

أما بالنسبة لـ A - 5، C - 5 فيرتبط حسب الموقع مع G - 3، U - 3 على

التـوالي . فيما تتمكن قـاعـدة الأينوسـين (I - 5) من الارتبـاط مع C - 3، 3 - U، A - 3 الموجودة في الحامض النووي المرسال . لقد استندت هذه النظرية إلى التشابه بين الشفرة الوراثية المحمولة على الحامض النووي المرسال والمتمثلة في التتابعات الثلاثية وتتابع الأحماض الأمينية . إن تتابعات هذه الشفرة تماثل في القاعدتين الأولى والثانية الواقعة في النهاية الخامسة ولكنها تختلف في القاعدة الثالثة الواقعة في النهاية الثالثة . فمثلاً هناك أربع شفرات وراثية للحامض الأميني الفالين وهي 5 - GUU,GUC,GUA,GUG - 3 تتماثل جميعاً في

جدول (2 - 6) : الأحماض الأمينية الطبيعية وشفراتها الوراثية . إن كل شفرة مكونة من تتابع ثلاثي النيوكليوتيد ويلاحظ وجود أكثر من شفرة لبعض الأحماض وكذلك شفرات الابتداء والانتهاء .

	U	C	A	G	
U	UUU } Phe	UCU	UAU } TYR	UGU } Cys	U
	UUC	UCC Ser	UAC	UGC	C
	UUA } Leu	UCA	UAA منتهية OChre	UGA Opal	A
	UUG	UCG	UAG منتهية OChre	UGG Tryp	G
C	CUU	CCU	CAU } Tyr	CGU	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC	CGC Arg	C
	CUA	CCA	CAA } GluN	CGA	A
	CUG	CCG	CAG	CGG	G
A	AUU } Leu	ACU	AUU } Aspn	AGU } ser	U
	AUC	ACC Thr	AAC	AGC	C
	AUA	ACA	AAA } Lys	AGA } Arg	A
	AUG بادئ	ACG	AAG	AGG	G
G	GUU } Val	GCU	GAU } Asp	GGU Gly	U
	GUC	GCC Ala	GAC	GGC	C
	GUA	GCA	GAA } Glu	GGA	A
	GUG بادئ	GCG	GAG	GGG	G

القاعدتين الأولى والثانية القريبة من النهاية الخامسة ولكنها تختلف في القاعدة الثالثة القريبة من النهاية الثالثة. وعلى الرغم من ذلك فإن هناك شواذ في هذه النظرية فيما يخص الحامض الأميني الميثونين والتربتوفان والتي يمثل كل منهما بشفرة واحدة. هذا بالإضافة إلى ثلاثة أحماض أمينية أخرى وهي السيرين والليوسين والارجنين حيث أن لكل منها ست شفرات وراثية. ففي حالة الأحماض الثلاثة الأخيرة فإن أربع من الست شفرات الخاصة بكل منهما لها نفس القاعدتين الأوليتين في النهاية الخامسة بينما تمتلك الشفرتان المتبقيتان على تتابع مختلف. إن وجود القاعدتين المتشابهتين في النهاية الخامسة لمعظم الشفرات الوراثية أدى إلى افتراض أن القاعدة الثالثة الموجودة في النهاية الثالثة قد تكون غير مقيدة نسبياً عند الارتباط مع القاعدة الموجودة في النهاية الخامسة من تتابع الأرجوحة في مضاد الشفرة جدول (6-3).

جدول (6-3) : أزواج القواعد بين القاعدة في النهاية الخامسة - 5 مضاد الشفرة والقاعدة في النهاية الثالثة - 3 للشفرة الوراثية استناداً لنظرية الأرجوحة.

القاعدة في الشفرة الوراثية	القاعدة في مضاد الشفرة
mRNA	**tRNA**
U or C	**G**
G	**C**
U	**A**
A or G	**U**
A, U or C	**I**

ـ ملخص

يقصد بتعبير المورثات هو قدرة المورثات على التعبير عن نفسها بتكوين سلاسل عديد الببتيدات استناداً إلى الشفرات المحمولة على الحامض النووي. لا يتم بناء هذه السلاسل مباشرة من المورثات بل يتطلب الأمر سلسلة طويلة من العمليات تنتهي ببناء هذه السلاسل. يدخل في هذه العمليات عدة أنواع من الحامض النووي الريبوزي وأشكال مختلفة من الأنزيمات والبروتينات. يمكن تمييز مرحلتين في عملية تعبير المورثات الأولى الاستنساخ حيث يتم بناء نسخة متممة من الحامض النووي المرسال من قالب شريط الحامض النووي من منقوص الأكسجين والثانية الترجمة التي تتضمن ترجمة الشفرات الوراثية المحمولة على الحامض النووي المرسال إلى أحماض أمينية يتم ربطها لإنتاج سلسلة عديد الببتيد وتتم هذه المرحلة في الريبوسومات.

يتم الاستنساخ عن طريق بناء شريط مفرد متمم من الحامض النووي الريبوزي من قالب عبارة عن شريط مفرد من الحامض النووي منقوص الأكسجين يدعى بالشريط الحساس أو المشفر. يتم البناء عن طريق أنزيمات بلمرة الحامض النووي الريبوزي وهي عبارة عن أنزيم واحد في الأحياء بدائية النوى وثلاثة أنزيمات في الأحياء حقيقية النوى. تختلف وظيفة الأنزيمات الثلاثة في الأحياء حقيقية النوى حيث يقوم أنزيم البلمرة الأول باستنساخ الحامض النووي الريبوزي الريبوسومي (18S, 28S) ويقوم الأنزيم الثاني باستنساخ الحامض النووي المرسال بينما يقوم الأنزيم الثالث باستنساخ الحامض النووي الناقل والريبوسومي (5S). يتم الاستنساخ بعد ارتباط أنزيم البلمرة مع منطقة المحفز على شريط القالب حيث يبدأ بناء شريط الحامض النووي الريبوزي ويتوقف عند منطقة تدعى المنهي أو الغالق. يختلف الحامض النووي الريبوزي الناتج من عملية الاستنساخ في الأحياء حقيقية النوى عنه في الأحياء بدائية النوى. يعود هذا الاختلاف أصلاً إلى تركيب المورثات في كل من

المجموعتين.

إذ تشترك في الأحياء بدائية النوى عدة مورثات في محفز واحد ومنهي أو غالق واحد كذلك فإن الحامض النووي الريبوزي الناتج يمثل جميع هذه المورثات. أما في الأحياء حقيقية النوى فإن لكل مورث محفز ومنهي مستقل لذا فإن الحامض النووي الريبوزي الناتج يمثل مورثاً واحداً فقط.

إن الحامض النووي الريبوزي الناتج في المجموعتين من الأحياء لا يمكن استخدامه بصورته الأولية في بناء سلاسل عديد الببتيد بل يتم تهذيبه أولاً. يتم ذلك في الأحياء حقيقية النوى عن طريق تقطيع الحامض النووي الريبوزي والتخلص من المناطق التي تمثل متداخلات المورث. وثم ربط قطع المحاور مع بعضها لإنتاج شريط يحتوي على جميع المناطق المشفرة بالمورث ثم يضاف إلى النهاية الثالثة لهذا الشريط ذيل متعدد الادنين وللنهاية الخامسة قبعة جوانسين. أما في الأحياء بدائية النوى فإنه يتم إضافة ذيل الادنين للنهاية الثالثة للحامض النووي الريبوزي وقبعة جوانسين للنهاية الخامسة. إن الصورة العامة للاستنساخ التي تم الحديث في هذا الملخص هي صورة لاستنساخ الحامض النووي الريبوزي المرسال ويختلف استنساخ الحامض النووي الناقل والريبوسومي قليلاً عن ذلك وفي عملية التهذيب حصراً.

ففي استنساخ الحامض النووي الناقل فإنه يتم إزالة تتابعات منطقة الدال التي تقع في النهاية الخامسة للحامض النووي الأولي ويضاف القواعد **ACC** للنهاية الثالثة ثم تستبدل بعض القواعد الشائعة بقواعد غير شائعة مثل الايونسين (**I**) واليوردين ويتم إضافة ذيل متعدد الادنين وقبعة جوانسين واحدة أو أكثر للنهايتين الثالثة والخامسة على التوالي.

أما في استنساخ الحامض النووي الريبوسومي فإن الحامض الأولي ينشطر إلى جزيئتين أو أكثر ويضاف مجاميع مثيل للعديد من القواعد ولا تختلف

في التذيل بالادنين والتقبيع بالجوانسين. أما الترجمة فتتم عن طريق ارتباط الحامض النووي الريبوزي المرسال بمنطقة معينة على الريبوسوم يتم بعدها تصميم تتابع الأحماض الأمينية إعتماداً على شفراتها الوراثية المحمولة على الحامض النووي المرسال لإنتاج سلسلة عديد الببتيد. لا ترتبط الأحماض الأمينية مباشرة على الحامض النووي المرسال بل يتم ذلك عبر جزيئة موصلة تدعى الحامض النووي الريبوزي الناقل **tRNA**. يرتبط كل حامض أميني معين مع جزيئة حامض نووي ناقل اعتماداً على الشفرة المضادة المحمولة على الحامض النووي الناقل. يتم هذا الارتباط عبر أنزيم بناء امينوأسيل ـ حامض نووي ناقل الذي يقوم بتوفير رابطة قوية بين مجموعة الكربوكسيل في الحامض الأميني مع مجموعة هيدروكسيل في النهاية الثالثة للحامض النووي الناقل. يحتوي الريبوسوم على موقعين هما **P** و **A**. الموقع **A** يمثل منطقة ارتباط معقدات الامينوأسيل–حامض نووي ناقل بينما يمثل الموقع **P** منطقة سلسلة عديد الببتيد النامية. يبدأ البروتين بارتباط جزيئة معقد حامض نووي ناقل – ميثونين– فورميل مع أول شفرة وراثية في الموقع **A** (هناك طراز آخر من هذا المعقد خالي من الفورميل). يتحرك شريط الحامض النووي المرسال ليكشف شفرة وراثية ثانية في الموقع **A** ويزيح منطقة معقد الحامض الأميني ميثونين – فورميل المرتبط مع الشفرة الوراثية الأولى نحو منطقة **P**. .يرتبط بعدها الحامض الأميني ميثونين مع الحامض الأميني التالي برابطة ببتيدية لتنطلق جزيئات الحامض النووي الناقل فارغة نحو السايتوبلازم للبحث عن جزيئات أحماض أمينية جديدة.

ويتوالى ارتباط الأحماض الأمينية الجديدة في الموقع **A**. وهكذا تنمو سلسلة عديد الببتيد حتى انتهاء الشفرات الوراثية حيث يتم عندها تحرير السلسلة من الحامض النووي المرسال. إن عملية بناء الريبوسومات وإطالة تحرر سلسلة عديد الببتيد تحتاج إلى العديد من البروتينات كبروتينات التأسيس

والإطالة والتحرر وبالإضافة لمعقدات الأحماض الأمينية– أحماض ناقلة. ومن الجدير بالذكر فإنه يتم التخلص من مجموعة الميثونين–فورميل من معظم سلاسل عديد الببتيد الناتجة.

إن من المعروف بأن جزيئات البروتين تتألف من تتابع عشرين حامضاً أمينياً بتتابعات مختلفة اعتماداً على الشفرات الوراثية. وجد بأن الشفرة الوراثية مؤلفة من ثلاثة قواعد نيتروجينية استناداً إلى تجارب حول الطفرات الوراثية. واستناداً إلى ذلك فإن هناك **64** شفرة وراثية تمثل الأحماض الأمينية العشرون وأنه من المفترض وجود نفس العدد من جزيئات الحامض النووي الناقل التي يحتوي كل منها على شفرة مضادة (أي وجود **64** شفرة مضادة). ولكن في الواقع لا يوجد سوى **32** جزئية حامض نووي ناقل. لقد تم تفسير العدد القليل من جزيئات الحامض النووي الناقل إلى وجود قاعدة أرجوحة حرة الارتباط نسبياً تقع في النهاية الخامسة حسب نظرية الأرجوحة التي وضعها العالم كريك عام **1966**.

تتمكن قاعدة الأرجوحة من الأزدواج بأشكال مختلفة مع أكثر من قاعدة من القواعد المتممة في النهاية الثالثة للتابع الشفرة في الحامض النووي المرسال. تختلف حرية قاعدة الأرجوحة من قاعدة إلى أخرى. فمثلاً عندما يكون الاينوسين قاعدة أرجوحة فإنه يكون حراً في الارتباط مع القواعد **A,U,C** للنهاية الثالثة من الحامض النووي المرسال. أما إذا كان **G** و **U** هما قاعدتي أرجوحة فإنهما يتمكنان من الارتباط مع قاعدتين مختلفتين فقط في النهاية الثالثة. أما بالنسبة للقواعد **C,A** فإن الأول يرتبط مع **G** والثاني مع **U** للنهاية الثالثة. وعلى الرغم من ذلك فإن هناك شذوذاً في هذه النظرية فيما يخص الميثونين والتربتوفان والليوسين والارجنين. ووجد استناداً إلى هذه النظرية بأن العدد الزائد في الشفرات الوراثية مقارنة بعدد الأحماض الأمينية يعود إلى وجود أحماض أمينية مشفرة بأكثر من شفرة وراثية واحدة.

الفصل السابع

تنظيم تعبير المورثات

Genes Expression Regulation

المحتويات

- آلية الحث والكبت
- أوبرون اللاكتوز القابل للحث
- دور بروتين تنشيط الهدم وأحادي فوسفات الادينوسين الحلقي في التحكم الموجب في أوبرون لاك
- أوبرون التريتوفان
- أوبرون الارابينوز
- التخصص الوظيفي والأختلاف المظهري في خلايا النوع الواحد
- السيطرة الهرمونية في عملية الاستنساخ
- التحكم الوراثي في الخلايا السرطانية
- ملخص

مقدمة:

من المعروف بأن مجين نوع معين من الأحياء يحمل نفس مجموعة المورثات في جميع أفراد هذا النوع. وعلى الرغم من ذلك فإنه لا يمكن ملاحظة أن هناك اختلافاً في الصفات المظهرية في بعض الأفراد. يظهر الاختلاف المظهري واضحاً خلال مراحل تطور ونمو نوع معين. وقد يظهر الاختلاف المظهري بشكل شديد في الأنواع الراقية من الأحياء. فمجرد فحص مجاميع من الخلايا المأخوذة من أنسجة مختلفة من الإنسان والأرنب أو الفأر أو النبات فإن الفحص المجهري لخلايا تلك الأنسجة سوف يوضح الفرق الكبير بينهما وبين خلايا نسيج آخر لنفس الحيوان أو النبات. فمثلاً إن الشكل المظهري النجمي للخلايا العصبية في الإنسان لا يشابه الأشكال المظهرية للخلايا العضلية أو الدموية أو غيرها على الرغم من أن جميع هذه الخلايا تمتلك نفس مجموعة المورثات. فما هو سر هذا الاختلاف المظهري في هذه الخلايا؟! ويصبح الموضوع أكثر تعقيداً عند مراقبة ودراسة الأطوار الجنينية. فما الذي يدفع الخلايا إلى هذا الانقسام السريع لإنتاج هذا الكم الهائل من الخلايا في المراحل الجنينية فيما يلاحظ تطور مختلف في مراحل أخرى؟ إن الإجابة المستفيضة على مثل هذه الأسئلة يتطلب الخوض عميقاً في معرفة أسرار المورثات وخصوصاً ذلك النظام الدقيق الذي يتحكم فيها. لكن تبقى الإجابة المحدودة على مثل هذه الأسئلة استناداً على ما هو معروف ومتوفر من المعلومات محصورة في أنه على الرغم من تشابه مجموعة مورثات في خلايا

أفراد النوع الواحد إلا أنه لا يتم استخدام جميع هذه المورثات مرة واحدة. أي أن هناك خلايا تعمل على تشغيل مجموعة مورثات معينة وتثبط عمل المجاميع الأخرى الموجودة لديها فيما تقوم أخرى بتشغيل مجاميع أخرى وتثبط عمل مجاميع ثانية ولهذا السبب نجد الاختلاف في شكل الخلية العصبية والدموية والجلدية والعضلية وهكذا الحال بالنسبة لبقية الأنواع. على الرغم من أن مثل هذه الإجابة المحدودة قد تعطي تصوراً عما يحصل من أختلاف في الشكل المظهري إلا أن الخوض في الأختلاف في العمليات الفسيولوجية والأيضية وعلاقتها في المورثات يضعنا أمام تصور واضح هو بأنه لا بد من وجود آلية معينة أو عدة آليات تتضمن السيطرة على عمل المورثات.

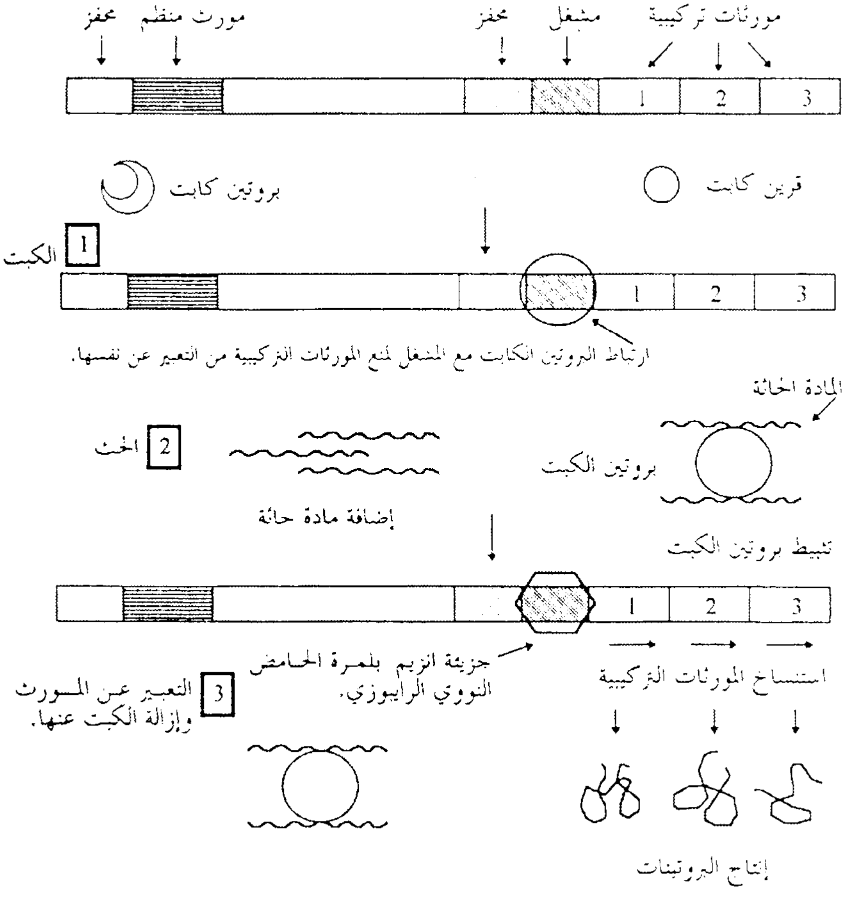
آلية الحث والكبت Induction and Repression Mechanisme

تحتاج الخلايا إلى العديد من الأنزيمات والهرمونات وغيرها للقيام بوظائفها. ولا بد من إنتاج هذه المواد باستمرار. لذلك فإن المورثات المسؤولة عن هذه المواد تستمر في التعبير عن نفسها لرفد الخلية بمنتجاتها. تدعى مثل هذه المورثات بأنها دائمة التعبير. فيما تحتاج الخلايا نواتج مورثات أخرى تحت ظروف حياتية خاصة. فمثلاً عند حدوث إصابة معينة فإن الخلايا تسارع إلى إنتاج مواد معينة تعمل على حمايتها حيث تقوم المورثات المسؤولة عندئذٍ بالتعبير عن نفسها لإنتاج هذه المواد فيما لا تحتاج هذه الخلايا تشغيل مثل تلك المورثات في الظروف الاعتيادية. مثل ذلك ينطبق أيضاً على الأمور الأخرى. فمثلاً نجد أن بكتريا القولون قادرة على التحكم على تعبير المورثات الخاص بأنزيمات تحطيم المواد الكربوهيدراتية اعتماداً على نوع سكريات المتوفرة في الوسط الزرعي. فإذا ما تم تنمية هذه البكتريا في وسط زرعي يحتوي على سكر اللاكتوز كمصدر وحيد للطاقة والكربون فإنها تنتج أنزيم بيتا-جلاكتوسايديز (B-galactosidase) الذي يعمل على تحطيم سكر اللاكتوز إلى سكر الكلوكوز والجلاكتوز وأنزيم الجلاكتوسايدبرايميز B-galactosidase)

Permease) لتمثيل الأنواع السكرية الثانويةالناتجة من عملية هدم سكر اللاكتوز. إلاّ أن هذه البكتريا لا تحتاج إلى مثل هذه الأنزيمات فيما إذا ما تم تنميتها في وسط زرعي لا يحتوي على سكر اللاكتوز. وقد تستخدم أنزيمات أخرى تتناسب مع نوع السكريات المتوفرة في وسطها الزرعي. وعلى ذلك فإن البكتريا تتمكن من السيطرة على تعبير المورثات لهذه الأنزيمات حسب حاجتها. تدعى مثل هذه العملية التي يتم فيها تعبير المورثات بوجود مادة معينة بالحث Induction فيما تسمى المورثات التي يتم التعبير عنها في هذه العملية بالمورثات المستحثة Inducible genes وتسمى نواتج المورثات بنواتج المورثات المستحثة Inducible gene products. فيما تسمى المواد المسؤولة عن الحث بالمستحثات Inducers. وتسمى عملية إيقاف تعبير المورثات بالكبت (repression) وتسمى هذه المورثات عندئذ بالمورثات المكبوتة. إن آلية تنظيم تعبير المورثات التي تسيطر على عمل المورثات الخاصة بإنتاج الأنزيمات الضرورية لتحطيم سكر اللاكتوز في بكتريا القولون قد تم الكشف عنها منذ عام 1960 من قبل العالمين جاكوب ومناد. حيث ذكرا بأن عملية تنظيم تعبير مورث واحد أو مجموعة مورثات تركيبية متراصة تخضع لمورث كابت (repressor gene) يقوم بإنتاج بروتين معين يرتبط مع موقع آخر يدعى بموقع المشغل (operator) مسبباً إيقافه عن العمل. عندئذٍ لا يتمكن أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي من الارتباط مع المحفز وبالتالي تفشل عملية استنساخ مورث أو مجموعة المورثات المتجاورة. يقع المشغل بين المحفز والمورث أو المورثات التركيبية وتدعى المورثات وتتابع المشغل والمحفز بالاوبرون(Operon).

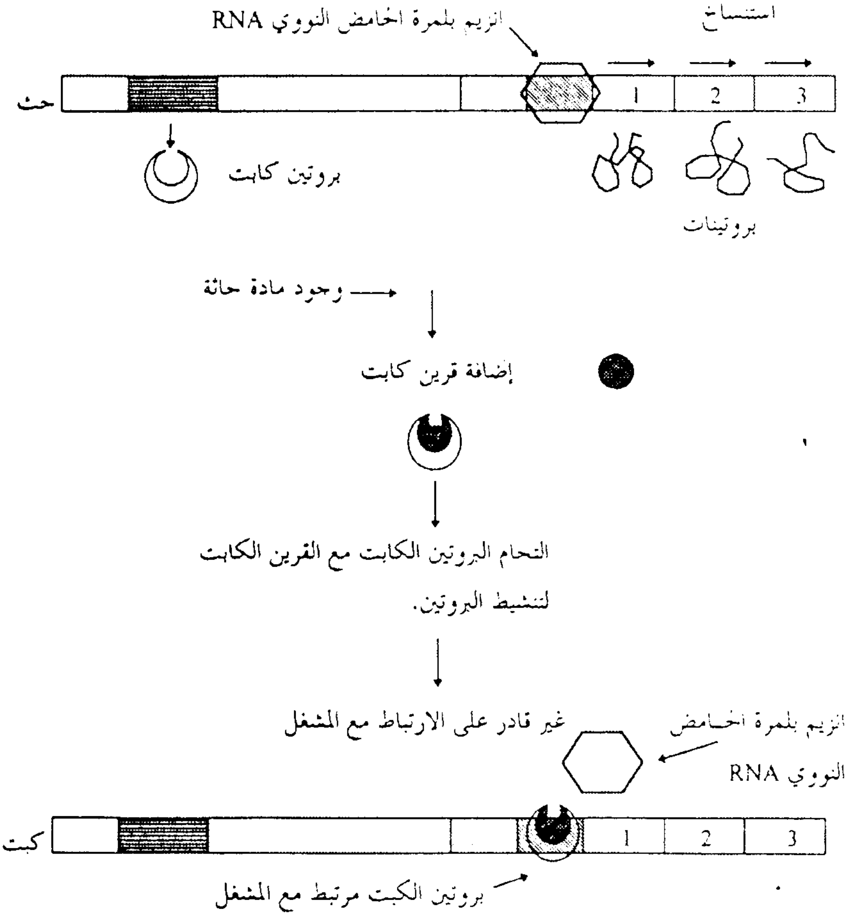
هناك نوعان من الاوبرونات هما أوبرونات الحث واوبرونات الكبت. تختلف هذه الاوبرونات في قابلية البروتين الكابت (والذي يعمل بوجود جزيئات تدعى بالجزيئات المؤثرة effector molecules أو قرائن الكابت (co-repressors فيما إذا كان يعمل استناداً إلى المادة الحاثة في الوسط الغذائي

أو إلى جزيئات قرائن الكبت . ففي الاوبرون القابل للحث فإن البروتين الكابت يتمكن من الارتباط مع المشغل مؤدياً إلى كبت مجموعة المورثات وذلك عندما يكون هذا البروتين حراً . إلا أن إضافة مادة حاثة أو مستحثة مثل السكريات أو الأحماض الأمينية فإن هذه المادة تعمل على الارتباط مع البروتين الكابت مؤدية إلى فك ارتباطه من منطقة المشغل مما يحرر المورثات ويمكنها من التعبير عن نفسها شكل (7-1) .



شكل (7-1) : الاوبرون القابل للحث ويلاحظ بأن بروتين الكبت قادر على منع المورثات التركيبية من التعبير عن نفسها حيث يرتبط مع المشغل عند عدم وجود مادة حاثة ولكن إضافة مادة حاثة تؤدي إلى فك ارتباطة بالمشغل لتحريره وبالتالي تمكين المورثات التركيبية من التعبير عن نفسها .

أما الاوبرون القابل للكبت فإن بروتين الكبت لا يتمكن من الارتباط مع المشغل عندما يكون حراً بل لا بد له أولاً من الارتباط مع جزئية قرين الكابت co-repressor ليتمكن بعد ذلك من الارتباط مع المشغل لكبت مجموعة المورثات في الاوبرون. تعتبر هذه النماذج من الاوبرون. تعتبر هذه النماذج من الاوبرونات التي يتحكم في تنظيمها بروتين الكبت أنظمة سالبة التحكم شكل (7 - 2).

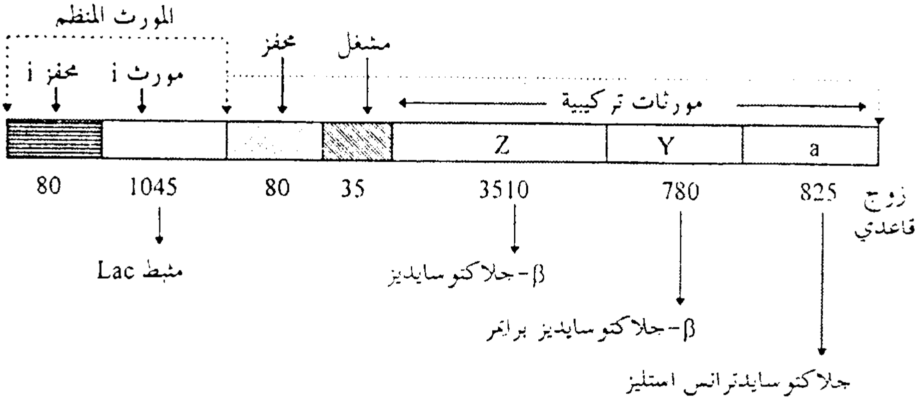


شكل (7 - 2) : نموذج لاوبرون التثبيط حيث لا يتمكن بروتين الكبت من منع المورثات التركيبية عندما يكون لوحدة ولكن بالارتباط مع قرين الكبت يتمكن من تنظيم عمل المورثات التركيبية.

اوبرون اللاكتوز القابل للحث Lactose Inducible Opron (Lac)

يتكون هذا الاوبرون من ثلاثة مورثات يرمز لها بـ z, y, a مسؤولة عن إنتاج الأنزيمات الثلاثة اللازمة لتحطيم سكر اللاكتوز. هذه الأنزيمات هي بيتا جلاكتوسيديز وبيتا جلاكتوسايد ترانس استيليز (β - galactosid tranacetylase) وبيتا جلاكتوسايديز وبرايمييز.

وبالإضافة لهذه المورثات يحتوي هذا الاوبرون على مورث كابت ومشغل ومحفز. إن المورث الكابت أو المنظم في هذا الاوبرون يكون مسؤولاً عن إنتاج بروتين كابت طوله حوالي 360 حامضاً أمينياً. توجد أربعة طرز من هذا البروتين يتم إنتاجها جميعاً من مورث الكبت الذي يرمز له في هذا الاوبرون بالحرف (i) حيث أنه في غياب المادة الحاثة فإن هذا البروتين يرتبط مع المشغل لمنع عمل هذه المورثات عبر إيقاف عملية الاستنساخ فيها. لقد ظهر من تحليل العديد من التجارب بأن هذه المورثات تتمكن من التعبير عن نفسها بإنتاج مستوى منخفض من أنزيماتها على الرغم من عدم وجود سكر جلاكتوز كمادة حادثة. كما وجد بأن هناك اوبرون آخر هو اوبرون الالولاكتوز (Allolactose) يوفر مستوى منخفض من الجلاكتوز الذي يعمل على فك كبت المورثات التركيبية لاوبرون الجلاكتوز مما يسمح لها بالتعبير عن نفسها بمستوى منخفض. يحكم هذه العملية أنزيم بيتا - جلاكتوسايديز شكل (7 - 3). وباستخدام الطفرات الوراثية في هذه المورثات تمكن العلماء من تحديد جميع مكونات الاوبرون وثم وضعها على شكل خريطة وراثية. وبالإضافة لاوبرون الجلاكتوز (Gal) فإن هناك العديد من الاوبرونات كاوبرون التربتو فان (TRP) والارابينوز (Ara).

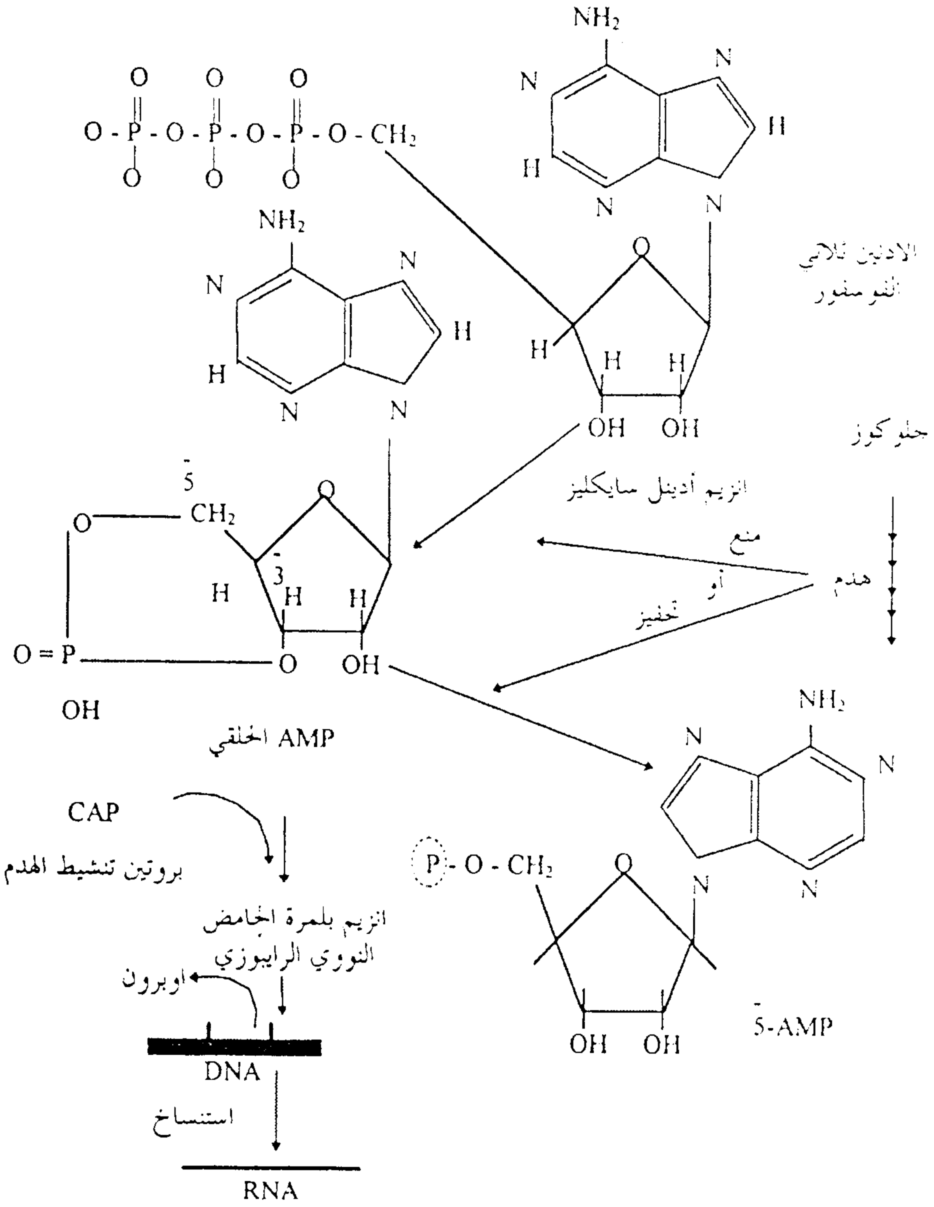


شكل (7-3): نموذج أوبرون اللاكتوز في بكتريا القولون

دور بروتين تنشيط الهدم وأحادي فوسفات الادينوسين الحلقي في التحكم الموجب في أوبرون (Lac)

من المعروف بأن عمل البروتين الكابت وارتباطه مع منطقة المشغل في الاوبرون Lac يعتبر تحكم سالباً ويحدث ذلك بغياب سكر اللاكتوز في الوسط الغذائي. بينما وجد بأن توفر سكر الجلوكوز يؤدي إلى كبت الأوبرون Lac ويمنع حثه. ويدعى مثل هذا النوع من الكبت بالكبت الهدمي وهو تحكم موجب. يحدث الكبت الهدمي من خلال تحكم موجب لبروتين تنشيط الهدم catabolitic activator protein (CAP) مرتبط مع جزيء يدعى أحادي فوسفات الادينوسين الحلقي (cAMP). يرتبط معقد cAMP+CAP في منطقة معينة من محفز الاوبرون وبالقرب من منطقة ارتباط أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي في المحفز. ولا يستطيع بروتين الهدم من العمل لوحده ما لم يرتبط أولاً مع جزئية cAMP. بذلك فإن توفر جزئية cAMP يخضع لتأثير تركيز الجلوكوز ويعتبر أساسياً لإكمال العملية.

إن زيادة تركيز سكر الجلوكوز يحدث انخفاَض كبيراً في تركيز جزيئات الـــ cAMP مما يوقف تكوين معقد cAMP+CAP و يؤدي إلى غياب ارتباط المعقد في منطقة المحفز وبالتالي يعمل على انخفاض كفاءة أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي بشكل كبير بحيث أن نسخ الاوبرونَ لا يزيد أكثر من 2% عن معدل النسخ بغياب الجلوكوز. وعلى الرغم من أن عملية أنخفاض تركيز جزيئات cAMP بوجود تراكيز عالية من سكر الجلوكوز غير مفهومة بشكل واضح إلا أنه يعتقد بأن سكر الجلوكوز له تأثير مثبط على أنزيم الادينايل سايكليز (Adenylcyclase) المسؤولة عن إنتاج وحدات cAMP من وحدات ATP شكل (7 - 4).

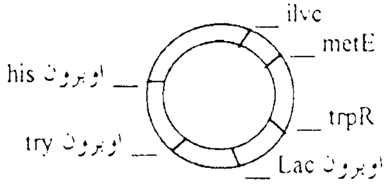


شكل (7 - 4) : دورة الادنين أحادي الفوسفور الحلقي **cAMP** وأهميته في تنظيم التحكم في اوبرون اللاكتوز **Lac** .

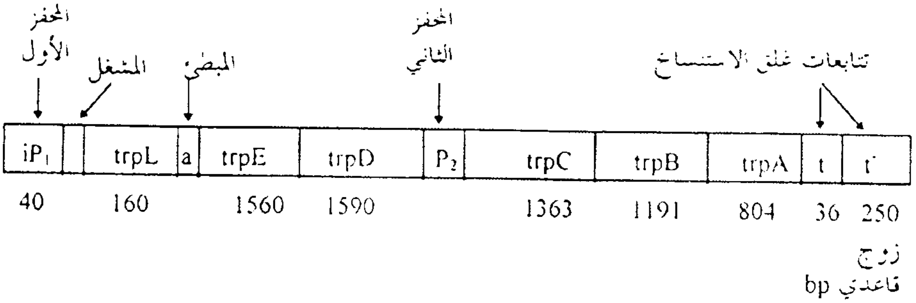
ابرون التربتوفان Tryptophan Operon (TRP)

يعتبر أوبرون التربتوفان من الاوبرونات القابلة للكبت في بكتريا القولون شكل (7 - 5) . يتكون هذا الاوبرون من خمسة مورثات تركيبية يرمز إليها بـ trpE, trpD, trpC, trpA. يتراوح طول هذه المورثات حوالي 6508 زوج قاعدي . هذا بالإضافة للتابعات المكملة للاوبرون التي ورد ذكرها في الاوبرون Lac شكل (7 - 6) .

يتكون البروتين الكابت في هذا الاوبرون من مورث ملاصق لمنطقة الاوبرون يسمى مورث trpR. وكما ذكر سابقاً فإن عملية الكبت تتم عندما يرتبط قرين الكابت مع البروتين بتوفر المادة الحالة (التربتوفان) حيث يرتبط هذا المعقد في منطقةالمشغل في الاوبرون مؤدياً إلى كبت استنساخ المورثات التركيبية الخمسة بسبب عدم تمكن أنزيم البلمرة من الارتباط مع منطقة المحفز في الاوبرون . أما عند توفر مادة التربتوفان في الوسط الغذائي فإن البروتين الكابت لا يتمكن من الارتباط مع المشغل مما يفسح المجال أمام أنزيم البلمرة بالعمل في منطقة المحفز والبدء بالاستنساخ . لقد وجد بأن معدل استنساخ الاوبرون في غياب التربتوفان يساوي 70 مرة أو أكثر عن معدل الاستنساخ بوجوده .



شكل(7 - 5) موقع الاوبرونات في بكتريا القولون

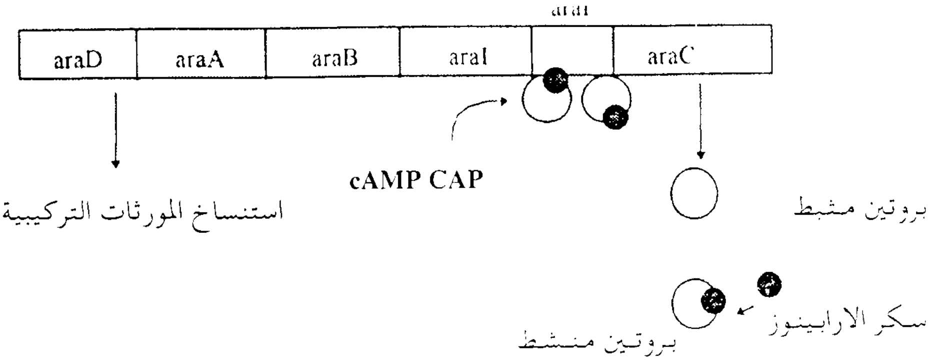


شكل (7-6) : تركيب أوبرون التربتوفان في بكتريا القولون حيث يظهر أن هناك المحفز رئيسي iP1 والمحفز P2 لزيادة استنساخ مورثات التربتوفان trp C,B A والمبطىء a الواقع بعد مورث المنظم trpL ولا يظهر مورث المنظم trpR لأنه بعيداً عن الاوبرون.

اوبرون الارابينوز Arabinose Operon

يتكون أوبرون الارابينوز Ara من ثلاثة مورثات تركيبية يرمز لها ara, A,B,D مسؤولة عن تكوين الأنزيمات الضرورية لعملية تكسير سكر الارابينوز. يحتوي الاوبرون بالإضافة لذلك على مورث كابت مسؤولة عن إنتاج البروتين المنشط للهدم (CAP) وبروتين آخر يرمز له ara C.

بالإضافة لذلك فإن هناك منطقة تتابعات محصورة بين المورث المنظم ara C والمورثات التركيبية تدعى هذه المنطقة ara 1. تعتبر هذه منطقة لارتباط أنزيم البلمرة أو المعقد المنشط من البروتين المنظم شكل (7 - 7). يتم التحكم بتعبير المورثات في هذا الاوبرون بطريقة التحكم الموجبة بواسطة كلٍ من البروتين المنشط للهدم والادينوسين الأحادي الفوسفات الحلقي. لقد وجد بأن معقد البروتين المنشط للهدم والادينوسين الأحادي الفوسفات الحلقي cAMP-CAP لا يتمكن من الارتباط مع منطقة ara I ما لم يتوفر سكر الارابينوز. يقوم سكر الارابينوز بتنشيط البروتين المنتج من مورث ara C لأجل الارتباط في منطقة ara 1 يساهم ذلك في ارتباط معقد cAMP-CAP بنفس المنطقة لتبدأ بعدها عملية الاستنساخ في المورثات التركيبية وعلى



شكل (7-7) : التحكم الموجب لاوبرون الارابينوز في بكتريا القولون بوجود سكر الارابينوز .

ذلك أن البروتين الناتج ذو تأثير أيجابي عند وجود الارابينوز على عملية أستنساخ المورثات التركيبية وسلبياً عند غياب الارابينوز . بالإضافة لأنواع التحكم في تعبير المورثات الوارد ذكرها سابقاً فإن هناك نوعاً آخر من التحكم يعتمد أصلاً على وجود تراكيز عالية من الناتج النهائي في أحد تفاعلات الأيض . إذ يؤدي ذلك إلى تثبيط نشاط الأنزيم وبالتالي إيقاف العملية الأيضية بشكل كامل . يدعى هذا النوع من التحكم بالمنع الامدادي الرجعي **Feed back inhibition**. ويعتقد بأن الناتج النهائي يتمكن من الارتباط في موقع خاص في الأنزيم مؤدياً إلى تثبيطة . إن جميع هذه الآليات التي تم التطرق إليها هي آليات تحكم تعبير المورثات في الأحياء بدائية النوى التي تنتظم فيها المورثات على شكل اوبرونات . لكن نظام الاوبرون غير موجود في الأحياء حقيقية النوى وخصوصاً الراقية منها وإنما يوجد لديها نظام المورث الواحد .

التخصص الوظيفي والأختلاف المظهري في خلايا النوع الواحد

إن التنوع الكبير في الشكل المظهري والتخصص الوظيفي لخلايا نوع معين من الأحياء حقيقية النوى وخصوصاً الراقية منها يؤكد الدقة المتناهية في

عملية تنظيم تعبير المورثات. تختلف المورثات القادرة على التعبير عن نفسها في نوع خلايا معينة عن المورثات في أن أنواع أخرى من الخلايا التخصصية.

فمثلاً إن مورثات الهيموجلوبين في الإنسان يمكن أن تعبر عن نفسها بشكل خاص في خلايا كريات الدم فيما يتم كبت المورثات الأخرى في هذه الخلايا. بينما لا تتمكن هذه المورثات من التعبير عن نفسها مثلاً في خلايا الجهاز العضلي أو العصبي حيث تأخذ مورثات أخرى مكانها في التعبير ويتم كبت ما تبقى من المورثات الأخرى. ولكن هذا التحكم المضبوط والدقيق الذي يرافق التخصص الوظيفي والمظهري للخلايا لا يعني الاختلاف الوراثي بينهم. حيث أن جميع خلايا الكائن الواحد تحتوي على نفس المادة الوراثية والفرق الوحيد بينهما هو في نظام التحكم في تعبير المورثات بطريقة تناسب الخلايا. وقد أمكن التثبت من ذلك باستخدام تجارب تهجين الحامض النووي عن طريق استخدام التهجين حامض نووي منقوص الأكسجين - حامض نووي ريبوزي حيث يتم تعليم جزيئات الحامض النووي الريبوزي المستخلصة من نوع معين من الخلايا بالنظائر المشعة كنظير الهيدروجين الثالث **H3**. لقد وجد بأن جزيئات الحامض النووي المعلمة تتمكن من الارتباط مع المواقع المتممة لها في تتابع الحامض النووي منقوص الأكسجين المأخوذ من خلايا أخرى لنفس النوع. وقد أعيدت هذه التجارب عدة مرات باستخدام جزيئات حامض نووي معلمة من خلايا وجزيئات حامض نووي منقوص الأكسجين من خلايا أخرى تعود لنفس النوع. لقد أثبتت جميع هذه التجارب ثبات المجين في جميع الخلايا الداخلة في التجارب مما يؤكد بأن الاختلاف هو في نظام تشغيل المورثات نفسها.

لقد أثبتت هذه التجارب وغيرها بأن هناك ما لا يزيد **10%** فقط من تتابعات الحامض النووي منقوص الأكسجين قادرة على تكوين نسخ من الحامض الريبوزي. أي أن **90%** من تتابعات الحامض النووي منقوص

الأكسجين لا يمثل في جزيئات الحامض الريبوزي. إن معظم أو جميع التتابعات الكابتة 90% يتم حفظها مطمورة في كروماتين الصبغيات. وأن هناك نظاماً خاصاً لا تتوفر معلومات تفصيلية عنه يعمل على تنشيط المورثات المطمورة عند الحاجة إليها. من المعروف بأن هناك نوعين من البروتينات المكونة لكروماتين الصبغيات هما الهستونات (خمسة أنواع) وبروتينات غير الهستونية. لقد وجد بأن معظم البروتينات الهستونية تكون محفوظة بدرجة كبيرة في جميع الخلايا حقيقية النوى. بينما تختلف البروتينات غير الهستونية في هذه الأحياء وهذا ما أدى إلى الاعتقاد بأن البروتينات غير الهستونية هي في الحقيقة بروتينات يمكن أن يكون لها دور في تعبير المورثات. فيما يعتقد آخرون بأن عمليات كيميائية تحويرية مختلفة تحصل لبروتينات الهستون تجعلها قادرة على تنظيم عملية تعبير المورثات مثل عمليات الفسفرة وأضافة المجاميع الكيميائية. إلا أن كل من الافتراضين يحتاج لإثبات.

إن أفضل الأنظمة التي يمكن التطرق إليها فيما يخص نظام التحكم في تعبير المورثات في الأحياء حقيقية النوى هو ما يحصل في بيوض البرمائيات. حيث أن البيوض المخصبة للضفدع تعمل على بناء كميات هائلة من البروتين حال حصول الإخصاب يعقبها انقسام سريع في المراحل الجنينية. علماً بأن دراسات العالم دافيدسون وزملاءه 1969 على بيوض الضفادع **Xenopus Laevis** غير المخصبة أثبتت عدم وجود عمليات استنساخ عالي للحامض النووي المرسال (التي تترافق عادة مع بناء كميات كبيرة من البروتين) وكذلك عدم وجود هذا الاستنساخ في البيوض المخصبة وخلال مرحلة النمو الجنيني المعروف بالبلاستولا. إلأا أنه تم التثبيت بوجود جزيئات الحامض النووي المرسال في المراحل اللاحقة. إن عملية بناء هذه الكمية الهائلة من البروتين لابد أن تحتاج إلى توجيه وتنظيم ولا بد من وجود جزيئات الحامض النووي

المرسال بشكل من الأشكال. إن الدراسات المتعلقة ببيوض الضفدع أثبتت بأن البروتينات التي تستخدم أثناء المراحل الجنينية هي في حقيقة الأمر موجودة في البيوض وقبل عملية الإخصاب. ولا بد من وجود جزيئات كامنة من الحامض النووي المرسال بهيئة أو أخرى. ويبدو بأن عملية بناء مثل هذه الجزيئات اللازمة لتوجيه بناء البروتين لا بد وأن يحدث أثناء عملية تكوين البيوض حيث عمليات الاستنساخ سريعة وهائلة خلال مراحل الانقسام المايوزي. ويمكن ملاحظة مثل هذه العملية في كريات الدم الحمراء حيث أنه لوحظ بأن هناك عملية استنساخ وترجمة مكثفة لمورثات الهيموجلوبين قبل عملية نضج الكريات الحمراء. إذ أن كريات الدم الحمراء تفقد نوياتها الحاوية على الحامض النووي في المرحلة الناضجة. لذلك فإنها لا تحتاج إلى عملية استنساخ وترجمة خلال فترة حياتها البالغة حوالي **120** يوم. بل تعتمد على ما موجود من الهيموجلوبين الذي تم إنتاجه قبل بلوغها. ومن خلال الفحص الدقيق لصبغيات بيوض الضفدع وجد بأن الصبغيات تأخذ شكل الفرشاة حيث تتميز بوجود مناطق معينة منتفخة لها امتدادات جانبية بشكل حلقات حول الانتفاخ. إن الفحص الدقيق والتحليل أثبت بأن هذه الحلقات هي في الواقع جزيئات حامض نووي منقوص الأكسجين محاطة بجزيئات حامض نووي ريبوزي وبروتين على شكل طبقات.

ومن الواضح بأن هذه المنطقة هي في الواقع مجموعة المورثات اللازمة لتوفير النواتج النهائية أثناء المراحل الجنينية الأولى. وعلى ذلك فإن نظام التحكم في تعبير المورثات يعتمد على برامج وراثية يتم تهيئتها أثناء تكون البيوض فيما تحتاج المراحل الجنينية الأخرى برامج وراثية أخرى تحكم تعبير المورثات. كما ذكرنا سابقاً فأنه لا يحدث أي استنساخ لجزيئات الحامض النووي المرسال بعد عملية الإخصاب والبلاستولا. لذا فإنه لا بد من وجود كميات هائلة من جزيئات الحامض النووي الريبوسومي يتم صنعها خلال

عملية تكوين البيوض. لقد وجد من تحليل بيوض الضفدع بأنها تحتوي على 10^{12} من جزيئات الحامض النووي الريبوسومي حيث يتم التعبير عن مورثات هذا الحامض بحوالي ألف مرة أكثر من المعدل العادي.

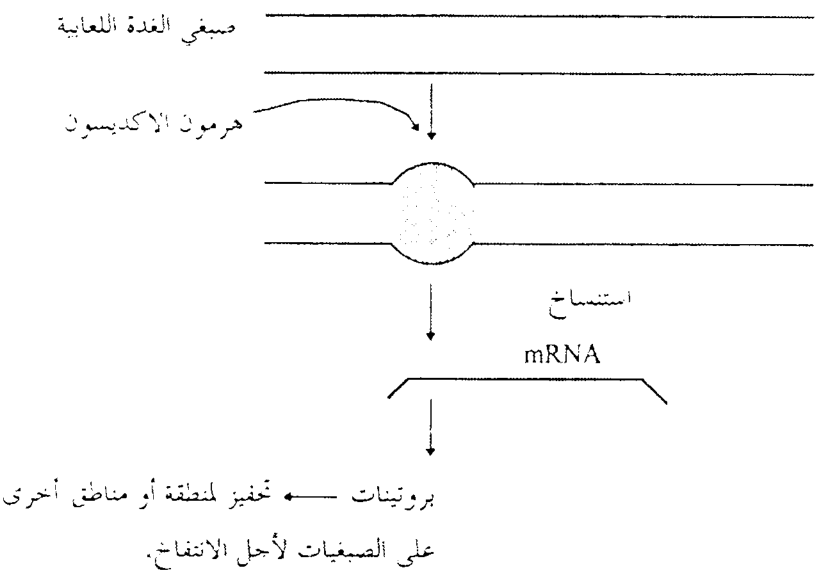
السيطرة الهرمونية في عملية الاستنساخ

الهرمونات أحد نظم التحكم المهمة في العمليات الأيضية المختلفة حيث تعمل الهرمونات كإشارة لبدء أو إنتهاء لعمليات معينة. تعتبر هرمونات الانسولين والاستروجين من أفضل نظم الإشارة المستخدمة في الخلايا. يتم إفراز هذه الهرمونات من الغدد الخاصة بها إلى الدم لتصل بعد ذلك إلى الخلايا حيث لا تتمكن الهرمونات الكبيرة الحجم مثل الانسولين من الدخول إلى الخلية بل يتم استلام الإشارة منها عن طريق أنواع مختلفة من المستقبلات الخاصة. تقوم هذه المستقبلات كساعي البريد حيث تستلم الإشارة الخاصة بفاعلية أيضية معينة عن طريق التصاق جزيئة الهرمون بها لتنتقل بعد ذلك إلى النواة حيث تعمل هذه الإشارة بطريقة ما على نسخ مورث معين أو مجموعة مورثات لإنتاج بروتينات معينة. ولا تزال الطريقة التي يتم من خلالها التحكم بنشاط المورثات عن طريق الهرمونات غير واضحة. ولكن يعتقد بأن الهرمونات تعمل كمنظمات موجبة حيث تعمل على التفاعل مع البروتينات غير الهستونية لأجل تنشيط المورثات ومع وجود بعض البراهين البسيطة لدعم هذه الفرضية إلا أنه لا توجد لحد الآن الأدلة الكافية لمثل هذا التحكم.

إن هناك الكثير من الأدلة التي تثبت أهمية الهرمونات في عملية التحكم بتعبير المورثات. وتعتبر دراسات أجنة حشرات ذبابة الفاكهة (الدروسوفيلا) وتأثير الهرمونات من أمتع هذه الدراسات.

ففي دراسة لمعرفة تأثير هرمون الاكديسون **(Ecdysone)** على صبغيات

الغدد اللعابية التي يعتقد بأن لها دوراً مهماً في النمو الجنيني لحشرات ذبابة الفاكهة، وجد بأن معاملة اليرقات بواسطة هرمون الاكديسون يؤدي إلى ظهور انتفاخات على الصبغيات شبيهة بتلك الانتفاخات الموجودة أثناء عملية التحول الطبيعي . إن هرمون الاكديسون يؤدي إلى حث المورثات الموجودة في هذه المناطق على التعبير عن نفسها مما يؤكد بأن هناك برامج وراثية جاهزة لا تحتاج إلا إلى إشارة معينة وهي في هذه الحالة إشارة هرمونية لبدء بتعبير المورثات شكل (7 - 8) .



شكل (7 - 8) : استحداث الانتفاخات في صبغيات الغدد اللعابية ليرقات ذبابة الفاكهة بواسطة هرمون الاكديسون حيث يعمل الهرمون كإشارة بدء لتنشيط مجموعة من المورثات في موقع الإنتفاخ .

التحكم الوراثي في الخلايا السرطانية

إن عملية الانقسام الخلوي في جميع الخلايا تخضع لبرامج وراثية دقيقة إذ لا بد من وجود إشارات معينة تعمل على تحفيز برنامج الإنقسام الخلوي. وعلى الرغم من معرفتنا الواسعة بمراحل انقسام الخلايا والتطورات الوراثية والمظهرية التي تحصل للخلايا المنقسمة إلا أن فهمنا لانقسام الخلايا السرطانية لا يزال غير كاملاً وتعوزه الكثير من المعلومات. إن أحدث المعلومات المتوفرة التي يمكن أن تساهم في رسم صورة بسيطة عن عملية التحكم في الانقسام الخلوي هو ما جاء من دراسات الخلايا السرطانية الناشئة بسبب الإصابة بالرواشح السرطانية. لقد أثبتت الدراسات التي أجريت على الرواشح بأن هناك مجموعة رئيسية من الرواشح تدعى بالرواشح المرتدة **Retroviruses** لها القابلية على إحداث السرطان في الدواجن. أدى أكتشاف المورثات السرطانية **(oncogenes)** في هذه المجموعة من الرواشح إلى زيادة الدراسات المعمقة حول تأثير هذه المورثات على عملية انقسام الخلايا. خصوصاً إن معظم الأورام السرطانية ناتجة عن إنقسام خلوي غير طبيعي وسريع وغير مسيطر عليه.

لقد وجد بأن المادة الوراثية لهذه المجموعة من الرواشح مكونة من شريط من الحامض النووي الريبوزي يحتوي على (3 - 4) مورثات راشحية. الأول يشفر لبروتين الراشح **(capsid protein)** يدعى **(gag)** والثاني يشفر لأنزيم الاستنساخ العكسي **(Reverse transcriptase)** ويدعى **(POL)** والذي يعمل على تحويل شريط الحامض الريبوزي إلى شريط حامض نووي منقوص الأكسجين أو بالعكس بعد دخول الراشح إلى خلية العائل والثالث يكون مسؤولاً عن تكوين بروتين مستقبلات محفظة الراشح **(Protein spikes)** ويدعى **(env)** ومورث رابع هو المورث السرطاني **(oncogene)** والذي يختلف من راشح إلى آخر وقد يكون مفقوداً في البعض منها. إن الأبحاث السرطانية التي أجريت على أنواع من السرطانات الناشئة من المعاملة بالمواد الكيميائية أثبتت وجود

تتابعات متشابهه لما هو موجود في المورثات السرطانية وذلك عن طريق استخلاص المادة الوراثية للخلايا السرطانية وتحطيمها بواسطة الأنزيمات المحطمة واستخدام المورثات الراشحية المعلمة بالنظائر المشعة كمجس.

إن ذلك يدل على أن الرواشح ليست مسؤولة بشكل كامل عن ظهور السرطان وأن الخلايا العادية لا بد وأن تحتوي على مورثات شبيهة بالمورثات السرطانية الراشحية. إن أشباه المورثات السرطانية الراشحية هذه موجودة في الخلايا العادية كمورثات مثبطة أو مكبوتة وأن المواد الكيمياوية سببت آلية معينة لتنشيط هذه المورثات وبالتالي أدت إلى ظهور السرطان.

أدت هذه النتائج المثيرة إلى ثورة في الأبحاث العلمية حول السرطان وكان من نتيجتها اكتشاف وجود مورثات مشابهة للمورثات الراشحية السرطانية في معظم الخلايا الحيوانية المفحوصة. إن هذه المورثات النظيرة ذات تتابعات شبيهة بنسبة كبيرة لتلك الموجودة في مورثات الرواشح. سميت هذه المورثات الشبيهة بالمورثات السرطانية الابتدائية (**Proto-onocogenes**). لقد تم أكتشاف أكثر من 80 مورثاً سرطانياً ابتدائياً لحد الآن ولا تزال القائمة قابلة للزيادة. إن اكتشاف المورثات السرطانية الابتدائية في كائنات متطورة مثل الإنسان وأخرى بسيطة مثل الخميرة أدى إلى التأكد من أن الرواشح السرطانية اكتسبت مورثاتها السرطانية من الإنسان وبقية الأحياء من خلال الإصابة المتكررة عبر الآلاف من السنين وعملت على تحويرها بطريقة تناسبها تماماً. أدت الدراسات والأبحاث التي استخدم فيها تقنيات حديثة مثل الهندسة الوراثية واستخدام المجسات المصنعة مختبرياً وكذلك استخدام طرق تهجين الحامض النووي إلى معرفة العديد من الآليات التي تؤدي إلى تحول المورثات السرطانية الابتدائية وهي المورثات الطبيعية في جميع الخلايا إلى مورثات سرطانية مماثلة في التأثير لمورثات الرواشح السرطانية. إحدى هذه الآليات تعتمد أساساً على التشوهات الصبغية التي ترافق السرطان (**Chromosomal**

abberations).

إن من المعروف بأن لجميع المورثات مناطق محفزة تدعى بالمحفز. تختلف قوة المحفز من مورث لآخر وإذا ما أنتقل مورث معين لسبب أو لآخر من محفز ضعيف إلى منطقة ذات محفز قوي فأن تعبيره سيكون قوياً ويسبب ذلك إنتاج كمية كبيرة من البروتين المسؤول عنه هذا المورث. لقد وجد من خلال فحص مواقع المورثات السرطانية الابتدائية بأن العديد من كسور الصبغيات ترتبط بطريقة معينة بانتقال أحد هذه المورثات الابتدائية إلى موقع جديد. ويعتقد بأن المواقع الجديده لهذه المورثات تؤدي إلى تنشيطها وتحويلها إلى مورثات سرطانية. فمثلا سرطان الدم اللمفاوي المزمن **(Chronic Lymphocytic Leukemia)** يترافق مع حصول كسور في الصبغيات (11)، (14) وانتقال جزء من الصبغي (14) **(q13 - q32) (11;4) t** 14 حيث ينتقل جزء الذراع القصير**(q13)** أو كسور صبغية بحيث ينتقل جزء الذراع الصغير **(q32)** للصبغي (14) إلى المنطقة **(q21)** من الذراع القصير للصبغي 18 **t (14,18)q32-q21**. إن خرائط المورثات التي تم دراستها على هذه الصبغيات الثلاثة أثبتت بأن هناك موقع مناعي يقع على الصبغي (14) وفي المنطقة **q32** وهو موقع مورث السلسلة الثقيلة للجلوبيولين المناعي **(Immunoglobulin heavy chain)** وموقعين للمورثات **bcL2, bcL-1** اللذان يقعان على الصبغي (11) **(11 q13)** والصبغي **(18) 18 q21** وعلى التوالي. لقد وجد من خلال استخدام مجس معلم بالنظائر المشعة بأن المورث **bcL-1** الواقع على الذراع القصيرة للصبغي **(11) q13** ينتقل في هذا النوع من السرطان إلى جنب مورث السلسلة الثقيلة للجلوبيولين المناعي في الذراع القصير للصبغي **(14)q32**. وكذلك الحال في إنتقال المورث **bcl-2** الموجود على الذراع القصير للصبغي **(18)q21** إلى جنب مورث السلسلة الثقيلة للجلوبيولين المناعي على الصبغي **14 q32**.

ومثال آخر على تنشيط المورثات السرطانية الابتدائية الكامنة عن طريق

الانتقال الصبغي هو ما يحدث في صبغي فلادلفيا المرتبط مع سرطان اللوكيميا Chronic myelogenous Leukemia (CML) حيث أكتشف هذا الصبغي 1960 من قبل نويل واعتقد بأنه صبغي مستقل مجهول التكوين. إلا أن تطور الأدوات والتقنيات أدى إلى اكتشاف أن هذا الصبغي هو عبارة عن الصبغي (9) زائد الذراع القصير (22). إن إدخال تقنيات تلوين الصبغيات وطرق تعيين مواقع المورثات على الصبغيات أدت إلى نتائج مهمة فيما يخص صبغي فلادلفيا وغيره من الصبغيات غير الطبيعية. إذ تم تعيين موقع مناعي ذو محفز قوي يدعى bcr يقع على الذراع القصيرة للصبغي 22. فيما تحتوي نهاية الذراع الطويل للصبغي (9) للمورث السرطاني الابتدائي c-abl. وكنتيجة للانتقال الحاصل بين تلك الأذرع في الصبغيين فإنه وجد بأن المورث السرطاني الابتدائي C-abl ينتقل بالقرب من الموقع المناعي. ويعتقد بأن هذا التجاور بين المورث السرطاني الابتدائي والموقع المناعي يؤدي إلى وقوعه تحت تأثير المحفز القوي للموقع المناعي مما يؤدي إلى تنشيطه واستنساخ العديد من نسخ الحامض النووي المرسال الخاص بالبروتين المسؤول عنه وبالتالي يؤدي تراكم هذا البروتين إلى التأثير السريع على مجريات حياة الخلايا محولاً إياها إلى خلايا سرطانية سريعة الانقسام. إن مثل هذه ألآلية التي تؤدي إلى تنشيط المورثات السرطانية الابتدائية الكامنة تؤكد بأن هذه المورثات لها علاقة وطيدة بالبرامج الوراثية الخاصة بانقسام الخلايا. مع ذلك فإن الحاجة لا تزال كبيرة لدراسة المواد البروتينية التي تمثل منتجات هذه المورثات وكذلك معرفة الدور الذي تلعبه في الحياة الخلوية. على الرغم من اكتشاف العديد من المنتجات الخاصة لهذه المورثات مثل أنزيمات الكاينيز ومنظمات النمو والمستقبلات لا أنه لم يتم التمكن من إثبات الطريقة أو الآلية التي تسلكها هذه البروتينات وغيرها لأجل الايعاز بانقسام الخلية. تمثل الطفرات الوراثية التي تحصل لزوج من القواعد النيتروجينية في هذه المورثات أيضاً أحد الأمثلة المهمة لدراسة كيفية

حصول التعبير لهذه المورثات ونظام الإشارة اللازمة لانقسام الخلايا. لقد وجد بأن أكثر من 60% من أنواع السرطان تحتوي على مورثات سرطانية ابتدائية ذات طفرة وراثية مفردة. إن مثل هذا التغيير البسيط في إحدى الشفرات الوراثية التي يحملها تتابع مورث يؤدي إلى تغيير في أحد الأحماض الأمينية في تسلسل عديد الببتيد. لذلك فإن البروتين النهائي يكون إما معطلاً أو ذو تأثير سلبي. وفي مثل هذه المورثات فإن الناتج النهائي لهذه المورثات المطفرة وراثياً يكون ذو تأثير سرطاني. إذا تعمل هذه النواتج على تحويل الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية ولا يعرف لحد الآن كيف تتمكن شفرة واحدة مختلفة عن الشفرة الطبيعية في تغيير سياق الانقسام في الخلية.

إن جميع المؤشرات التي تم الحصول عليها من الدراسات الخاصة بالمورثات السرطانية الراشحية والمورثات السرطانية الابتدائية تؤكد ضلوع هذه المورثات في عملية انقسام الخلايا وخصوصاً بأن هناك اعتقاداً شبه مؤكد بأن هذه المورثات من المحتمل بأنها ذات تعبير كبير خلال مراحل التكون الجنيني إلا أنه يتم كبتها بطريقة ما بعد انتقاء الحاجة إليها. ومما يدعم هذا الافتراض هو الانقسام الهائل الذي تنقسم فيه الخلايا السرطانية وهو ما يماثل الانقسامات الكبيرة خلال المراحل الجنينية المبكرة.

ملخص

تختلف أشكال الخلايا في الكائن الحي اختلافاً كبيراً وخصوصاً في الأحياء متعددة الخلايا. فعلى الرغم من امتلاك خلايا كائن حي معين مجين واحد إلا أنها تختلف مظهرياً عن بعضها. فالخلايا العصبية في الإنسان لا تشابه خلاياه الدموية أو العضلية. لقد وجد بأن هذا الاختلاف المظهري يعود إلى الاختلاف في تشغيل مجاميع المورثات. فبعض الخلايا تشغل مجموعة مورثات معينة وتكبت أخرى وخلايا أخرى تشغل مجموعة أخرى وتكبت ثانية وهكذا. إن الاختلاف في الشكل المظهري لخلايا النوع الواحد وكذلك

الاختلاف في وظيفتها يؤكد وجود آليات عديدة تتضمن السيطرة على عمل المورثات.

يمكن تمييز نوعين من المورثات في الخلايا. الأولى تعرف بأنها دائمة التعبير وهي التي تقوم برفد الخلية بمنتجاتها باستمرار. أما الثانية فهي المورثات المؤقتة التعبير ويتم التعبير عنها تحت ظروف حياتية خاصة. يختلف تنظيم تعبير المورثات في الأحياء النوى عن ما هو موجود في الأحياء حقيقية النوى. إذ يتم التنظيم في الأول عن طريق الأوبرونات والمنع الامدادي الرجعي بينما لا تمتلك الأحياء حقيقية النوى نظام الاوبرونات إنما توجد أنظمة أخرى للتحكم. يتألف نظام الاوبرونات من مجموعة من المورثات التركيبية زائد مورث كابت. هناك نوعان من الاوبرونات هما الاوبرونات القابلة للحث والاوبرونات القابلة للكبت. تعمل الاوبرونات القابلة للحث بطريقة التحكم السالب والموجب. يتم التحكم السالب عن طريق وجود المادة الحاثة أو غيابها حيث أن وجود المادة الحاثة يؤدي إلى تثبيط عمل بروتين ويطلق عمل الاوبرونات بينما يؤدي غيابها إلى إطلاق عمل بروتين الكبت الذي يرتبط مع مشغل المورثات التركيبية ويوقف عملية استنساخها.

أما التحكم الموجب فيتم من خلاله حث الاوبرون على العمل في حالة وجود المادة الحاثة ويتم الحث عن طريق تكوين معقد بروتين الهدم **CAP** - أحادي فوسفات الادنين الحلقي **cAMP**الذي يرتبط مع محفز المورثات التركيبية للاوبرونات ويحثها على العمل. أما غياب المادة الحاثة فيؤدي إلى توقف تكوين المعقدات مما يسمح لبروتين الكبت بالارتباط مع مشغل المورثات التركيبية ومن ثم إيقاف الاوبرون عن العمل.

ويذكر بأن غياب المادة الحاثة في التحكم الموجب ليس كافياً لكبت الاوبرون بل لا بد من وجود مادة أخرى. ويعتبر اوبرون اللاكتوز من أفضل الأمثلة على التحكم السالب والموجب في الاوبرونات القابلة للحث كما يعتبر

اوبرون الارايبنوز مثال على التحكم الموجب. أما الاوبرونات القابلة للكبت فتعمل بطريقة مختلفة إذ يتمكن البروتين الكابت من إيقاف عمل الاوبرون بعد ارتباطه مع جزئية ثانية تدعى القرين. وتتكون جزيئات القرين عند وجود المادة الحاثة. بينما يتم تحفيز الاوبرون على العمل عند غياب المادة الحاثة لعدم تكوين جزيئات القرين. ويعتبر اوبرون التربتوفان أفضل الأمثلة على هذا النوع من الاوبرونات.

أما النظام الثاني المعتمد في تنظيم تعبير مورثات الأحياء بدائية النوى فهو نظام المنع الامدادي الرجعي. يعتمد هذا النظام على إيقاف عمل المورثات عندما تتكون نواتج ثانوية أيضية بمستوى عالي. أما في الأحياء حقيقية النوى فلا وجود لنظام الاوبرونات فيها ويعتمد نظام التحكم فيها على برامج أخرى أكثر تعقيداً ولا يزال الغموض يحيط بهذا النظام على الرغم من معرفة بعض جوانبه.

أثبتت تجارب تهجين الحامض النووي بأن خلايا النوع الواحد لا تختلف في مجينها ولكن الاختلاف المظهري فيها يعود إلى نظام تشغيل المورثات.

لقد وجد بأن نظام تشغيل المورثات أو السيطرة على تعبيرها يختلف تبعاً لمجموعة المورثات المطلوب التعبير عنها ولا توجد تفصيلات كثيرة حول أنظمة التحكم هذه ولكن نظراً للتشابه الكبير في البروتينات غير الهستونية في الأحياء حقيقية النوى لذلك فإنه يعتقد بأن لها دوراً في هذه العملية. يعتبر نظام السيطرة الهرمونية أفضل الأنظمة المعروفة الآن في الأحياء حقيقية النوى المتطورة حيث تعمل الهرمونات كإشارة لحث المورثات على التعبير أو إيقافه. يعتبر هرمون الاكديسون من الأمثلة المعروفة في نظام السيطرة الهرموني حيث وجد بأن معاملة يرقات ذبابة الفاكهة أدت إلى ظهور الانتفاخات التي تشبه الفرشاة على صبغيات الغدة اللعابية وهو ما يؤكد لهذا الهرمون دوراً في حث المورثات. ويمكن أن يمثل الهرمون في هذه الحالة إشارة معينة لإطلاق برامج

وراثيــة جـاهـزة كـامـنـة. وعلى الرغم من ورود العـديـد من الأدلة حـول دور الهـرمونات في تنظيم تعبير المورثات إلا أن الموضوع أعـقد كـثيراً من ذلك. إن أفـضـل الأمـثلة التي يمكن سـيـاقـهـا في هذا المجـال هي المورثـات السـرطانـيـة الابتدائية. تمثل هذه المورثات الطبيعية النظيرة للمورثات السرطانية الراشـحـيـة الموجـودة في الرواشح المرتدة. لقـد وجـد بأن نسـبـة كـبـيـرة من السرطانات يعود سببها إلى تنشيط المورثات السرطانية الابتدائية. إذ تتحول هذه المورثات الكامنة إلى مورثات نشيطة جداً حيث تبدأ بالتعبير عن نفسها بقوة. لقد وجد بأن آلية تنشيط مثل هذه المورثات مختلفة حتى في المورث الواحد. إذ يتمكن مورث معين مكبوت من التحول إلى الصورة أنشطة عبر طفرة وراثية لزوج واحد من القواعد النيتروجينية أو عبر انتقال المورث إلى جنب محفز قوي لمورث أخر من خلال الانكسار الصبغي وحصول الانتقال الصبغي. كـما أن هناك طرقاً أخرى لحدوث التنشيط. أن أختلاف هذه الآليات يؤكد تعقيد نظام السيطره على تعبير المورثات. أن أحدث ما يمكن أن يبحث في هذا المجال هو المورثات الكابتة والتي يعتقد بأنها تمثل أحد أنظمـة السـيطرة على التعـبـيـر. ولا يزال يتسـابق العلماء في إبراز دور هذه المورثات ويعلقون عليها آمال كبيرة للسيطرة على السرطان.

الفصل الثامن

الآلية الجزيئية للارتباط والعبور

مقدمة :

كانت أحد أسباب نجاح مندل في تجاربه هو وقوع أزواج عوامل الصفات التي درسها على كروموسومات مختلفة دون أن يعي ذلك. وقد تبين فيما بعد أن المورثات المحمولة على كروموسوم واحد لا تخضع في توزيعها لقانون الانعزال الحر الذي وضعه مندل حيث تتوارث المورثات المحمولة على نفس الكروموسوم على هيئة مجاميع. فعندما يدخل التلقيح اليلات مثل Aو B عن طريق نفس الأب (AABB) فأنهما يميلان إلى البقاء في جاميته واحدة وإلى الانتقال سوية (AB). أما إذا جاءا عن طريق أبوين مختلفين aaBB أو Aabb فأنهما يميلان إلى دخول جاميتات مختلفة وإلى البقاء منعزلين aBأو Ab. يعود ذلك إلى أن هناك تجاذباً بين الاليلات A , B وبين الالبلين a و bوبقاءهما معاً في جاميتات الجيل الأول مما يؤدي إلى ظهور نسبة عالية غير متوقعة لهذه الصفات في الجيل الثاني.

سميت هذه الظاهرة بالتجاذب Copuling. أما في الحالة الثانية فإن الاليلات السائدة A و B المتنحية a , b لا تميل إلى البقاء في جاميته واحدة مما يؤدي إلى انخفاض نسبة هذه الصفات كثيراً عن النسب المتوقعة تبعاً لقانون مندل وأطلق على هذه الظاهرة بالتنافر Repulsion. لقد فسر العالم مورجان وتلاميذه هاتين الظاهرتين إلى ميل المورثات المرتبطة إلى البقاء بتراكيبها الأصلية بسبب وجودها على نفس الكروموسوم وأن الظاهرتين ما هما إلا حالتين لظاهرة واحدة أطلقوا عليها بالارتباط Linkage.

لقد وجد مورجان وتلاميذه بأن قوة الارتباط تعتمد على المسافة بين هذه المورثات فكلما أصبحت المورثات أكثر قرباً من بعضها ازداد ارتباطها.

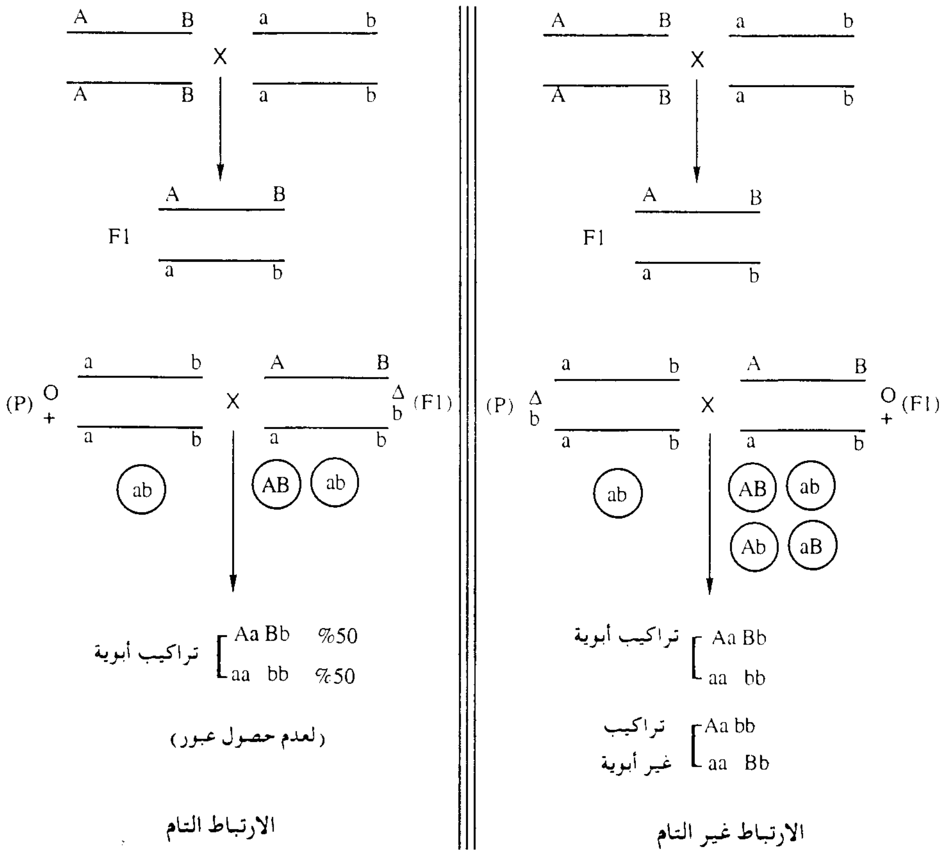
يؤدي الارتباط إلى ظهور نسب مئوية من الاتحادات الجديدة ويتراوح ما بين صفر و 50% حيث تكون نسبة الاتحادات الجديدة صفراً في حالة الارتباط التام وتختلف قيمتها في حالة الارتباط غير التام ويعود وذلك إلى أنه في الارتباط التام لا يحصل عبور لذلك فإن قيمة الاتحادات الجديدة يساوي صفراً.

مجموع النباتات	* نباتات قرمزية الأزهر طويلة حبوب اللقاح	نبتات قرمزية مستديرة الحبوب	نبت حمراء الأزهار طويلة الحبوب	** نباتات حمراء الأزهار مستديرة الحبوب	التكرار
6952	4831	390	393	1338	الحقيقي
6952	3910,5	1303,5	1303,5	434,5	المتوقع

* : صفات أبوية ويلاحظ ارتفاع عددها الحقيقي عما هو متوقع بسبب تجاذب الصفات قرمزية وحبوب لقاح طويلة وأحمر الأزهار وحبوب لقاح مستديرة.

مجموع النباتات					التكرار
419	226	92	97	1	الحقيقي
419	235,5	78,5	78,5	26,5	المتوقع

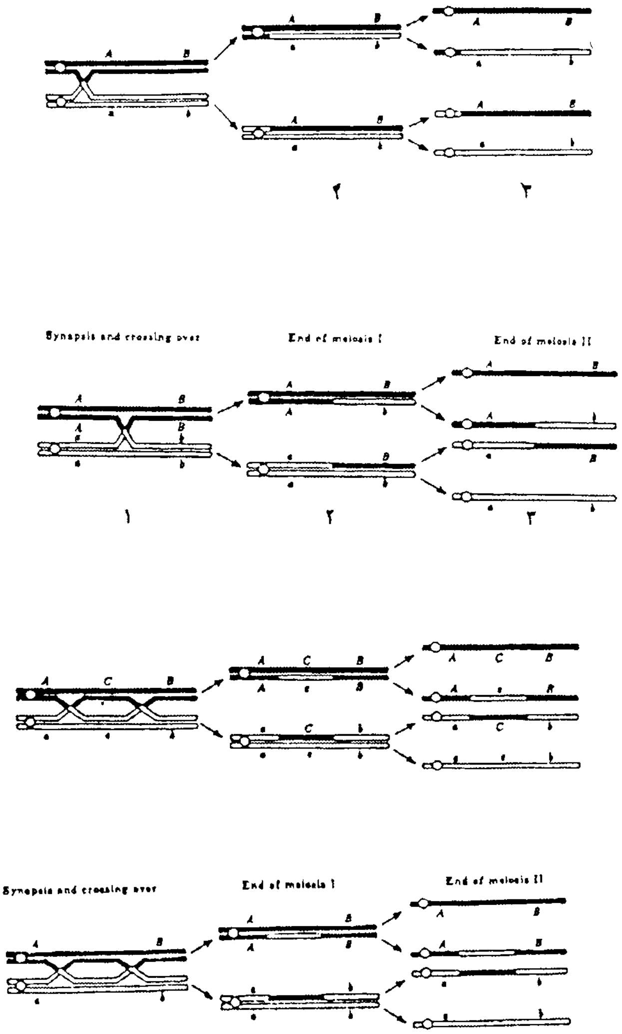
** : صفات أبوية ويلاحظ أنخفاض العدد الحقيقي لها عما هو متوقع بسبب تنافر الصفات.



لقد وجد بأن مورثات كل نوع من الأحياء تكون ممثلة بمجاميع يقع كل منها على كروموسوم ويتساوى عدد هذه المجاميع مع العدد الأحادي للكروموسومات **Haploid**.

تنتج الاتحادات الجديدة نتيجة حصول عبور **Crossing Over** قطع كروموسومية بصورة متبادلة عند نقاط تقاطع أو تصالب **Chiasmate** أثناء الانقسام الاختزالي الأول. يختلف عدد الكيازمات اعتماداً على طول الكروموسوم وتحدث التبادلات بين الكروماتيدات غير الشقيقة **Non-Sister Chromatids** في الكروموسومات المتناظرة. يمكن أن يحدث العبور

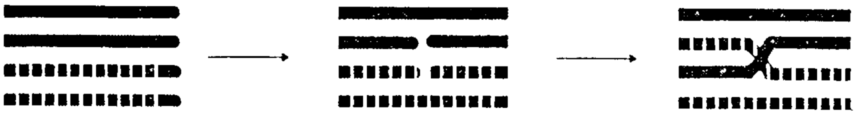
كعبورمزدوج بين الكروموسومات أو ثلاثي بين ثلاثة كروماتيدات أو رباعي . والغالب هو العبور الثنائي لوجود أثنتين من الفئات غير الأبوية ويرتفع عدد هذه الفئات بزيادة عدد الكروماتيدات الداخلة في العبور (شكل 8-1) .



شكل 8-1: أشكال مختلفة من الاتحادات التي تحصل أثناء العبور في الإنقسام الاختزالي .

الآلية الجزيئية للعبور:

إن الصورة التقليدية التي رسمت لكيفية حصول العبور لا تعود للوقت الحاضر بل تعود لسنوات الثلاثينات. حيث أن الافتراض القائم على الملاحظات السايتولوجية خلال مرحلة الانقسام الاختزالي وازدواج الصبغيات والتفافها نص على أن الصبغيات تنكسر على مستوى الكروماتيدات في بعض الأحيان فيزيائياً كنتيجة للشد الحاصل بسبب تقلصها. تلتحم بعدها ويحصل الالتحام بين كروماتيدات مختلفة مكونة كروماتيدات التحامية شكل (8-2).

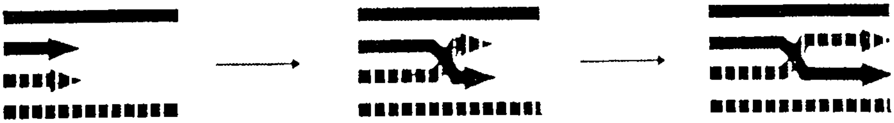


شكل (8-2) : آلية نظرية الكسر وإعادة الالتحام لتفسير العبور.

واستناداً إلى هذا النموذج فإن الاتحادات تحصل بعد أن يتم تضاعف الصبغيات كلياً. وعلى ذلك فإن مكان الكسر لا بد أن يكون عند نفس النيوكليوتيدات في كل من الكروماتيدات المتبادلة في الأزواج القرينة. وإلا فإن الاتحادات ستكون ذات أطوال مختلفة عن أطوال الكروماتيدات الأبوية.

وكنتيجة لذلك فإنه تم وضع افتراض ثاني له علاقة بتضاعف الصبغيات. نص هذا الافتراض على أنه خلال تضاعف الصبغيات فإن الأشرطة الجديدة للحامض النووي المتكون على طول الصبغي الأبوي تغير من اتجاهها نحو الصبغي الأمي. إن أشرطة الحامض النووي الجديدة المتولدة على طول الصبغي الأمي تغير اتجاهها على نفس النقطة نحو الصبغي الأبوي حيث يحدث تقاطع الخيوط الجديدة وتدعى هذه النظرية بنظرية اختيار النسخة (Copy

choice) شكل (8 - 3) .



شكل (8 - 3) : آلية نظرية اختيار النسخة لتفسير العبور .

إن الإختلاف الجوهري بين النظريتين يكمن بتخمين الاصل الفيزيائي لحصول الاتحادات الصبغية . فإما أن الصبغيات الاتحادية تتوارث المواد الفيزيائية من الصبغيات الأبوية بعد الكسر وإعادة الالتحام أو أن هذه الاتحادات الناتجة تبعاً لنظرية اختيار النسخة مصنعة من مواد جديدة .

لقد اختبرت النظريتين تجريبياً باستخدام الحامض النووي العاثي لامبدا المعلم بالنظائر المشعة (النيتروجين N14,N15 تجربة ميسلسون وستال) . تحت ظروف هذه التجربة فإن جميع الحامض النووي العاثي المصنع حديثاً سيتم تصنيعه باستخدام النيتروجين الخفيف N14 وعلى ذلك فإنه إذا كانت نظرية اختبار النسخة صحيحة فإن جميع الاتحادات لا بد أن تكون ذات نظائر مشعة خفيفة N14 أو أن الاتحادات ناتجة عن الكسر وإعادة الالتحام عندئذٍ فإنه لا بد أن تكون بعض الاتحادات حاوية على نظائر ثقيلة مشتقة من الأباء . إن الأجيال الناتجة قد تم مزجها مع محلول كلوريد السيزيوم وطردت مركزياً بسرعة فائقة لفصل الحامض النووي اعتماداً على كثافته (ينفصل الحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 15 في مكان يختلف عن مكان تجميع الحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 14) جمعت حزم الحامض النووي بشكل منفصل وفحصت لمعرفة الأصل الوراثي لها كانت النتائج واضحة تماماً حيث أن بعض الاتحادات كانت تحتوي على نظائر مشعة ثقيلة N^{15} (الأبوية) وهذا يؤكد وجود آلية منظمة تعمل على الكسر وإعادة الالتحام هي الأساس الأول لحصول عملية

العبور في العاثي.

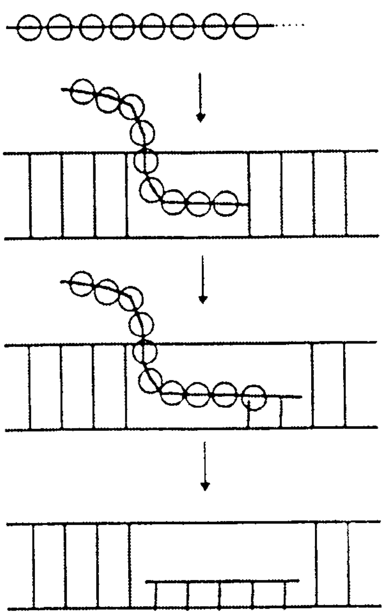
إن جميع التحليلات الوراثية في مختلف الكائنات أثبتت وجود نشاط انزيمي في هذه العملية.

إن معظم فهمنا المفصل حول آلية حصول الاتحادات جاء من دراسات الأنزيم المشفر من المورث **recA** في بكتريا القولون. يعتبر هذا الأنزيم المسؤول عن التفاعل الأساسي في تكوين الاتحاد حيث يعمل على ازدواج القواعد الهجينة التي تؤدي إلى التحام جزيئين من الحامض النووي. إن صفات أنزيم **rec A** توضح لماذا يكون الكسر في الحامض النووي ضرورياً لإنشاء الاتحاد. إن بروتين **rec A** يعمل على تمييز الحامض النووي المفرد الشريط على وجه الخصوص ويعمل على تحولقه مع الشريط المتمم الثاني لإنتاج مزدوج متماثل شكل (8 - 4). يتآصر بروتين **rec A** أولاً مع الشريط المفرد بنسبة ثابتة تبلغ حوالي متعدد ببتيد واحد لكل خمسة نيوكليوتيدات حيث يتولد شريط حامض نووي - بروتين. وعند وجود الادنين ثلاثي الفوسفات فإن البروتين يتمكن من فتح أجزاء المزدوج لأجل التحام الشريط المتآصر معه.

وحال ازدواج جز صغير فإن طاقة الادنين ثلاثي الفوسفات تعمل على إكمال الازدواج حيث يسير التفاعل من النهاية 5→3 للشريط المفرد.

تمتلك بعض العاثيات مثل العاثي **T7** ولامبدا نفس آلية العبور. أما بالنسبة للأحياء حقيقية النوى الراقية فيتوقع احتوائها على أنزيم مماثل لبروتين **rec A**. أن هناك أدلة على وجود مثل هذا الأنزيم في الفطريات إلا أن البحث يحتاج إلى المزيد من التجارب للكشف عنه.

إن حصول العبور بالطريقة التي تم توضيحها في شريطين من الحامض النووي يمكن أن يحصل لربط مزدوجين من الحامض النووي في إتحاد يحتوي على أربعة أشرطة تعمل على الازدواج في منطقة الربط لتكون تقاطع أشرطة



شكل (8 - 4) : آلية عمل بروتين **Rec A** حيث تلاحظ أهميته في تكوين الاتحادات الوراثية .

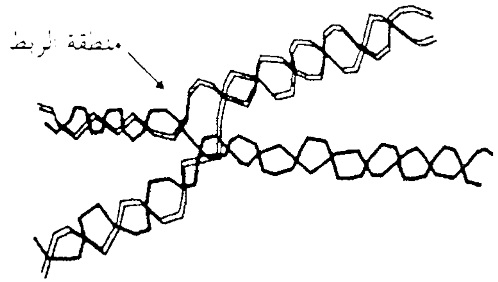
يطلق عليه العبور الوسطي أو تركيب هوليداي (**Holloday Structure**) شكل (8 - 5) .

تم افتراض هذا التركيب بعد اكتشاف وجود مناطق مزدوجة غير متماثلة (**Heteroduplexes**) في الحامض النووي للاتحادات الوراثية في عدد من التجارب الوراثية . إن مناطق المزدوجات غير المتماثلة هي جزيئات الحامض النووي معادة الالتحام حيث تكون الأشرطة في هذه المناطق غير مكملة لبعضها البعض .

ولأجل معرفة آلية حركة منطقة الربط أو نقطة تقاطع الأشرطة فقد بني نموذج يوضح حركة اهتزازية محورية (**Rotation**) لهيكل التقاطع تسمح

للأشرطة بالحركة من أحد المزدوجات إلى المزدوج الأخر في منطقة تقاطع هوليداي. وحال ارتباط المزدوجين فإن منطقة تقاطع الارتباط تتمكن بسهولة من الانتشار بطريقة مماثلة لحركة غلق سحاب السروال شكل (8-6). ونتيجة لذلك فإن مقاطع كبيرة من شريط تنتقل إلى الشريط الآخر مؤدية إلى تكوين هجين طويل من المحتمل أن يحتوي على مناطق غير متماثلة (Heteroduplex regions).

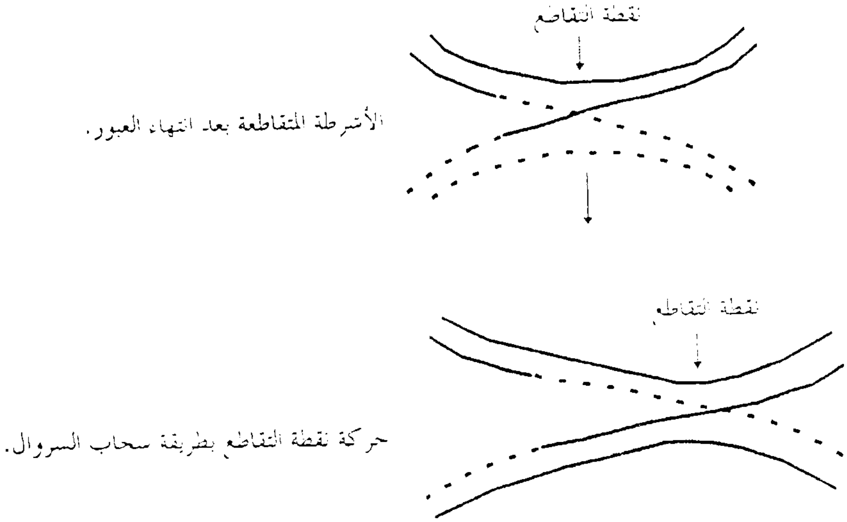
إن هذه الأشرطة يمكن استبدالها فيما بين مزدوجي الحامض النووي لبعض المسافة من نقطة الكسر. ويتم إعادة الالتحام لكلا المزدوجين من خلال



شكل (6-5) : اتحاد أربعة أشرطة تعود لمزدوجين من الحامض النووي لتكوين تركيب العبور الوسطي أو ما يدعى هوليداي.

الخاصية الفيزيائية الثانية للتركيب وهي قابليته الايزوميرية (Isomerization) شكل (8-7). تحصل الايزوميرية بشكل متكرر فإذا قام أنزيم القطع بقطع منطقة العبور بشكل كامل فإنه سيؤدي إلى إنتاج مفرد لجميع الخيوط أو الأشرطة الأربعة.

ويلعب بروتين RecA دوراً مهماً وبالطريقة السابق وصفها حيث يقوم أنزيم بلمرة الحامض النووي بملأ الفراغات بين القطع المتبادلة ثم يقوم أنزيم اللحام بربط القطع مع بعضها. وبالإضافة لبروتين Rec A فإن هناك بروتينين آخرين لهما أهمية في العملية هما بروتين Rec B و Rec C الموجودين في بكتريا



شكل (6-8) : حركة منطقة تقاطع الارتباط بطريقة مماثلة لحركة غلق سحاب السروال نتيجة للحركة الاهزازية المحورية لهيكل التركيب المتقاطع. تؤدي هذه الحركة إلى زيادة حجم المناطق غير المتماثلة **Heteroduplexs** .

القولون الذي يؤدي عدم وجودهما إلى نقص الاتحادات البكتيرية أثناء التزواج إلى 100 مرة. تمتلك هذه الأنزيمات القابلية للعمل على فك الالتفاف وكسر الحامض النووي.

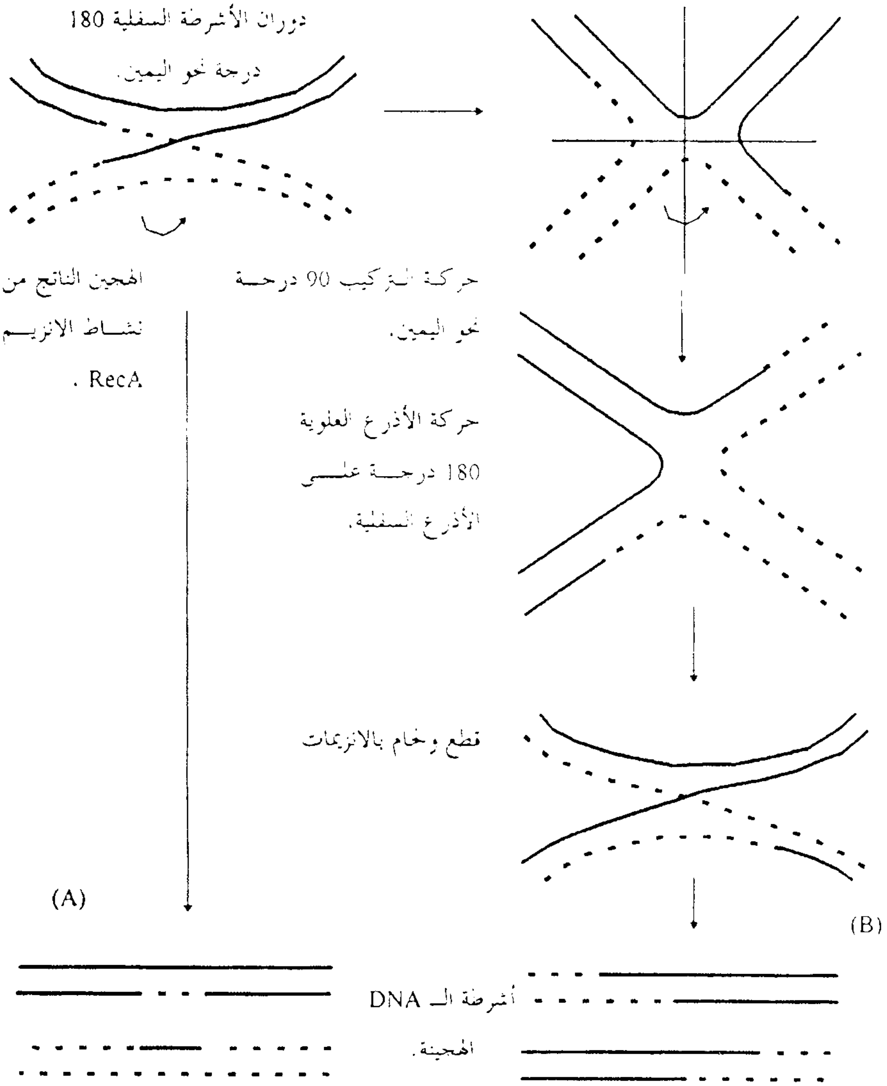
تؤسس هذه الأنزيمات منطقة فك التفاف في المزدوج الحاوي على نهاية حرة وترتبط هذه البروتينات أولاً مع النهاية المزدوجة. يتم بعدها استخدام الطاقة المأخوذة من الادنين ثلاثي الفوسفات للحركة على طول المزدوج يؤدي إلى فك الالتفاف وإرجاعة مرة أخرى على طول طريقها (تفك الالتفاف للحركة نحو الأمام ثم تلف الأشرطة من خلف حركتها بعد المرور وهكذا) .

إن هذه البروتينات تفك الالتفاف أسرع مما تعيده لذا فإن قطعة مفكوكة الالتفاف ستبقى متخلفة بسبب بطئ قدرة هذه البروتينات على إعادة الالتفاف وتكبر هذه القطعة كلما تحركت البروتينات نحو الأمام وتظهر مثل

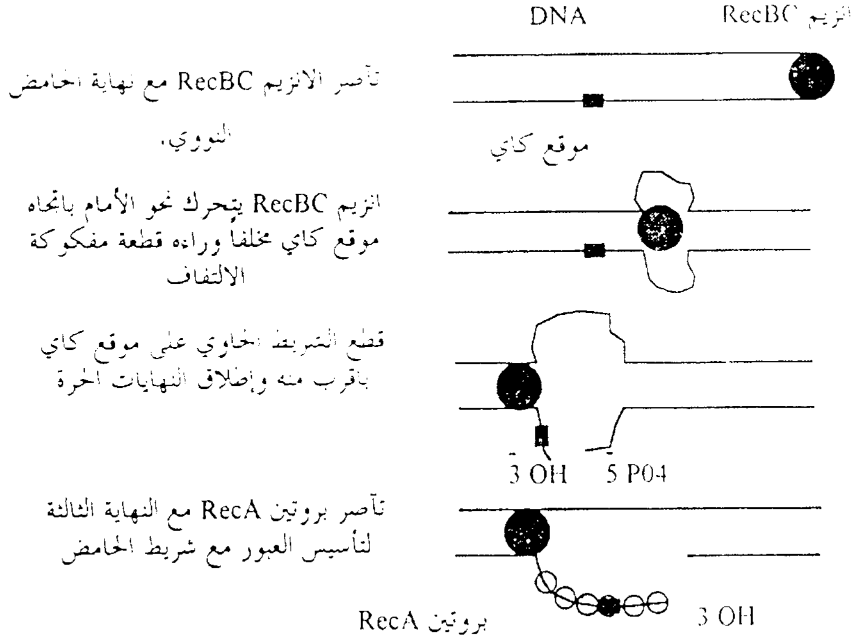
هـذه القطع كـأذني الأرنـب عند الفـحـص تحـت المجـهـر الالكـتـرونـي. شكل (8-8).

تمتلك أنزيمات Rec B,C القدرة على كسر الحامض النووي في موقع معين يدعى بموقع كاي Chi site يقع على أحد الأشرطة. يتألف هذا الموقع في التتابع 3 - GCTGGTGG - 5 وعند وجود هذا الموقع في الشريط غير الملتف فأن النشاط الأنزيمي لهذه البروتينات يعمل على قطع الشريط عند هذا الموقع. وهذا ما يمنع إعادة الالتفاف مرة أخرى وبالنتيجة فإنه سيخلف ذيل حر من الحامض النووي المفرد وفراغ بعد حركة البروتينات بإتجاه الأمام وكلاهما سيكونان الموقع الذي سيعمل البروتين Rec A على الارتباط معه لإحداث التبادل أثناء العبور.

تحتوي بكتريا القولون على حوالي ألف من مواقع كاي أو موقع لكل خمسة مورثات. هذه المواقع لا تكون متوفرة في العادة للأنزيمات في الخلية العادية التي لا تمتلك نهايات حرة في مادتها الوراثية. لكنها مهمة جداً في الاقتران البكتري (Conjugaion) حيث يعتقد بأن بروتينات Rec, B, C تتآصر مع نهاية الحامض النووي المتبرع وتبدأ عملها لتكوين النهايات الحرة وبالتالي حصول الاتحادات الجديدة مع الحامض النووي للخلية المستلمة. وبالإضافة لبروتينات Rec, A,B,C فإن هناك العديد من البروتينات الأخرى التي لها علاقة بحصول عملية العبور وتكوين الاتحادات الجديدة كما هو الحال في أنزيمات قطع الحامض النووي ولحامه وملئ الثغرات بين الاشرطة وبروتينات التوازن وغيرها.



شكل (8-7) : أهمية الايزوميرية في إنتاج تبادلات مزدوجة لإثنان من الخيوط البنوية **(A)**أو تبادل لجميع الخيوط الأربعة **(B)**.



شكل (8 - 8) : دور بروتينات **Rec ABC** في عملية تكون الإتحادات حيث يقوم الأنزيم **Rec BC** بإطلاق النهايات الحرة اللازمة لتآصر بروتين **Rec A** الذي يعمل تأسيس تبادل بين أشرطة الحامض.

الفصل التاسع

الطفرات الوراثية

وإصلاح الحامض النووي

المحتويات

- الطفرات التلقائية والمستحدثة
- الطفرات الوراثية في الخلايا الجسمية والجنسية
- التغييرات المظهرية المرافقة للطفرات الوراثية
- أخطاء الأيض الموروثة
- مرض البول الاسود
- مرض البول الكيتوني الوراثي
- مرض الخلايا المنجلية الوراثي
- تجارب العالمان بيدل وتاتوم على عفن الخبر (نيوروسبورا)
- الطفرات المستحدثة
- الطفرات المستحثة بواسطة عوامل حيوية
- الطفرات المستحثة بواسطة عوامل فيزيائية
- الأصابة المفردة
- الطفرات المستحثة كيميائياً
- فحص إيمز للمواد الكيمياوية المسرطنة
- الآلية الجزيئية لحدوث الطفرات الوراثية
- الآلية الجزيئية لحدوث الطفرات الوراثية التلقائية
- الآلية الجزيئية للطفرات الوراثية المستحثة
- إصلاح أضرار الحامض النووي
- آليات إصلاح أضرار الحامض النووي
- تفاعل التنشيط الضوئي
- الاستئصال
- إزالة المجاميع الكيميائية
- إصلاح الحامض النووي للاتحادات الجديدة

مقدمة:

الطفرات الوراثية هي تغييرات تركيبية في المورثات تؤدي إلى ظهور تغيير في الصفة الأصلية. تتضمن هذه التغييرات أصلاً تغييراً في بعض أزواج النيوكليوتيدات المكونة لتتابع المورث. يشمل هذا التغيير انفصال قاعدة أو إحلالها في الشفرة أو إدخال قواعد إضافة إلى الشفرة. إلا أن معظم الطفرات تشتمل على تغييراً في زوج قاعدي واحد.

يشير مصطلح الطفرة **Mutation** إلى كل التغييرات التي تحصل في المادة الوراثية. ويدعى الكائن الذي يبدي تغييراً مظهرياً استناداً إلى طفرة وراثية بالطافر **Mutant**. ولا يشمل تعريف الطفرة الوراثية الاتحادات الوراثية التي تحصل طبيعياً أثناء الانقسام كالارتباط والعبور. إن الطفرة الوراثية عادة ما تكون عشوائية ولا يمكن التنبؤ بحصولها كما أنها في الغالب ضارة إلا أن بعضها يكون نافعاً ويعمل الانتخاب الطبيعي على تمريرها كصفات نافعة وهي الأساس في الظهور المستمر للاختلافات بين الأفراد. وعادة ما تكون الاليلات الحاوية على طفرة وراثية متنحية حيث تكون تأثيرها محجوباً بالاليل السائد ولا يمكن لها التعبير عن نفسها إلا في حالة حصول الالتقاء النقي لهذه الاليلات الطافرة. وإذا ما كانت هذه الاليلات الطافرة ملائمة لحياة وتطور الفرد وبقاؤه فإنها تنذر بظهور أفراد ذوي صفة وراثية مختلفة عن بقية أفراد العشيرة. أما إذا كانت هذه الصفة تمثل عنصر قوة انتخابي في البيئة بحيث تكون تلك الأفراد أنجح في الحياة من الأفراد الأخرى عندئذ فمن المحتمل أن تتكاثر تلك الأفراد مؤدية إلى انتشار الصفة الجديدة. وإذا كانت تمثل الطفرة عنصراً سلبياً فإنها تؤدي إلى الموت. وعلى الرغم من أن الطفرات الوراثية يمكن أن تكون عشوائية أو لا فإن معدل الطفرات وموقعها مختلف كما أن هناك بعض المورثات تمتلك احتمالات أكبر لحصول الطفرة فيها كما

هو الحال في المورثات ذات الحجم الكبير مقارنة بالمورثات الصغيرة. فمثلاً تحدث الطفرة في المورثات البشرية بمعدل طفرة واحدة لكل 100.000 أنقسام/ مورث حيث أن الصبغي البشري يحتوي ما معدله 100.000 مورث فإن هناك مورثاً طافراً على الأقل في كل فرد بشري. إلا أن معظم هذه الطفرات متنحية كما أسلفنا إلا إذا تدخلت الصدفة في حصول تماثل في اليلين لهما نفس الطفرة وبتكرار متزايد وعندها ستختفي بموت الكائن في الغالب.

الطفرات التلقائية والمستحدثة Spontaneous and Iduced Mutations

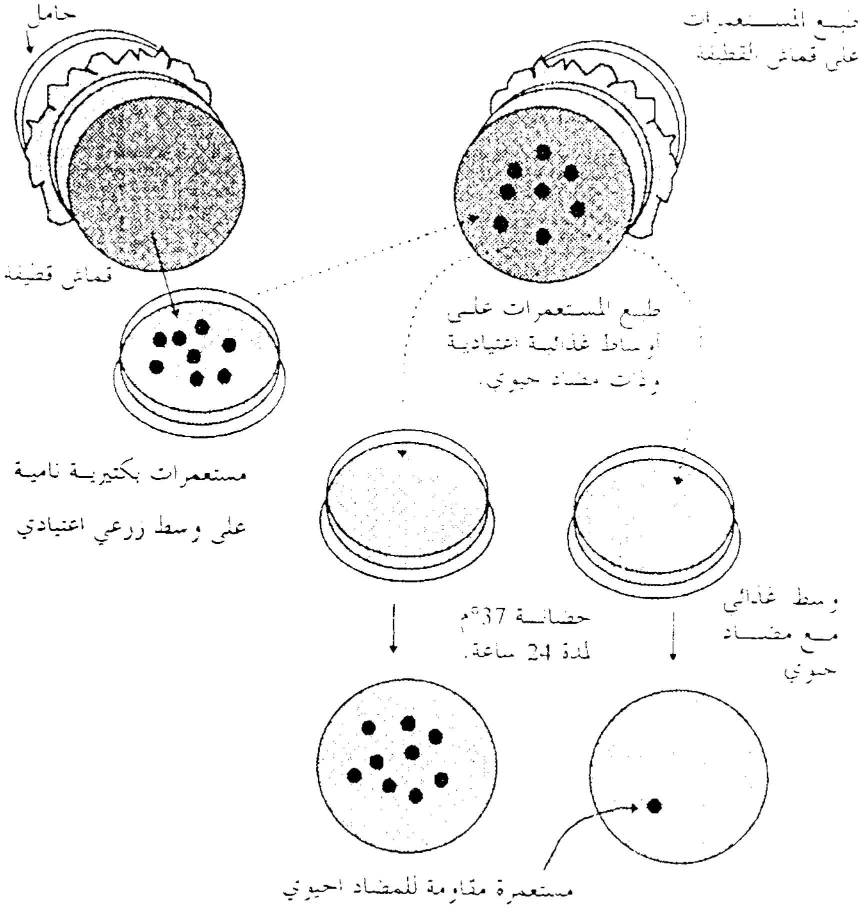
يمكن تمييز نوعان من الطفرات الوراثية. النوع الأول: الطفرات الوراثية التلقائية Spontaneous وهي تحدث لأسباب غير معروفة قد تكون ناتجة من تأثير بيئي معين أو أخطاء في عملية تضاعف الحامض النووي. وعلى الرغم من ندرة حدوث مثل هذه الطفرات إلا أنها تتراوح بين 10^{-8} و 10^{-10} لكل زوج من القواعد النيتروجينية في الأحياء بدائية النوى كما هو الحال في البكتريا والرواشح والعاثيات. بينما يبلغ هذا المعدل في الأحياء حقيقية النوى بين 10^{-7} و10^{-9} لكل زوج قاعدي/ جيل. وقد ينخفض هذا المعدل كثيراً بسبب وجد آلية إصلاح الأجزاء المعطوبة في الحامض النووي واستبدالها بالقواعد الصحيحة. أما النوع الثاني من الطفرات الوراثية فهو الطفرات الوراثية المستحدثة Induced mutations. تنشأ هذه أساساً نتيجة تعرض الخلايا إلى عوامل فيزيائية أو كيميائية تؤدي إلى التفاعل مع الحامض النووي منقوص الأكسجين أو الحامض النوي الريبوزي مؤدية إلى تغيير في ترتيب القواعد النيتروجينية في بعض المواقع أو استبدال في القواعد النيتروجينية في موقع معين كما هو الحال في تعريض الخلايا الجلدية إلى الاشعة الفوق بنفسجية وأشعة X والإشعاعات المؤينة والمواد الكيميائية المختلفة. يمكن التمييز بين الطفرات الوراثية التلقائية والمستحدثة من خلال معدلات الطفرة حيث أن الطفرات التلقائية تكون عادة منخفضة المعدل ونسبة حصولها منخفض بينما

تكون الطفرات المستحدثة ذات معدلات ونسبة عالية. كما أن العديد من الطفرات التي تبدو تلقائية هي في الواقع طفرات مستحدثة بسبب خارجي ومع ذلك فإنه يبقى من الصعب التمييز بين النوعين من الطفرات في فرد وليس على مستوى العشيرة. للبيئة تأثير كبير في ظهور العديد من الصفات الوراثية الجديدة. فصفة مقاومة المضادات الحيوية المنتشرة في البكتريا وخصوصاً تلك الموجودة في المستشفيات والتي لها القدرة على مقاومة البنسلين، والتتراسايكلين، الاستربتومايسين، والكانامايسين ناتجة عن تعرضها بإستمرار لهذه المضادات. كذلك مقاومة المبيدات التي تظهر في الحشرات والأعشاب النباتية وغيرها من صفات المقاومة هي في الاصل ناشئة من تأثير البيئة أو الضغط البيئي. إلا أن تأثير البيئة في مثل هذه الأحوال لا يتعدى كونه تأثيراً لانتخاب وإبراز طفرة معينة موجودة أصلاً ولا يتجاوز ذلك إلى التأثير على مستوى المادة الوراثية. لذلك فإن الطفرة الوراثية عشوائية إلأا أن الضغط البيئي يعمل على انتخاب المناسب فيها. يمكن إثبات ذلك بإجراء تجارب مقاومة المضادات الحيوية للبكتريا باستخدام طريقة ليدربرج والتي تدعى الطبع المتكرر على الصحون **Replica Plating**. يتم من خلال هذه الطريقة زراعة تخافيف معين 10^{-6} - 10^{-10} من البكتريا على أوساط زرعية (صحون بتري) خالية من المضادات الحيوية. بعد فترة حضانة كافية 24 - 48 ساعة بدرجة حرارة 37.5°م تكون المستعمرات البكترية قد تكونت بشكل جيد يتم بعدها طبع هذه المستعمرات على سطح قماش من القديفة المعقم والمثبت على اسطوانه خشبية أو معدنية ذات قطر أقل بقليل من قطر صحون بتري. تطبع هذه المستعمرات مرة أخرى على أوساط غذائية ذات مضاد حيوي معين. يعمل المضاد الحيوي على السماح لمستعمرات البكتريا الحاوية على مورث المقاومة على النمو وعلى ذلك يتم تصفية وتشخيص المستعمرات البكترية الحاوية على صفة المقاومة وهي عادة ما تكون إعداد قليلة جداً من المستعمرات

مقارنة بالمستعمرات الأصلية النامية على أوساط غذائية خالية من المضاد الحيوي. وإذا ما تم إعادة طبع المستعمرات مرة أخرى فإن النتيجة تكون دائماً بأن المستعمرات البكتيرية النامية على الوسط الغذائي غير الحاوي على مضاد حيوي التي أعطت خلايا مقاومة للمضاد الحيوي تستمر بإعطاء صفة المقاومة كلما تم إعادة الطبع مرة أخرى. بينما المستعمرات البكتيرية التي لم تتمكن من النمو نهائياً في الأوساط الغذائية الحاوية على المضاد الحيوي في المرة الأول لا تتمكن أيضاً في النمو في المرات المتتالية من الطبع على أوساط غذائية حاوية على المضاد الحيوي. هذا ما يؤكد بأن المضاد الحيوي قام بانتخاب المستعمرات الحاوية على مورث المقاومة شكل(9 - 1).

طفرات الوراثية في الخلايا الجسمية والجنسية

تحدث الطفرة الوراثية في كلا من الخلايا الجسمية والجنسية ولكنها في الحالة الأولى لا تنتقل إلى الأجيال الجديد بل تؤدي إلى حصول تغييرات مظهرية محدودة. كما هو الحال في العديد من الطفرات الوراثية في الخلايا الجلدية والخلايا الجسمية الأخرى حيث أن الأثر الذي تتركه هذه الطفرات لا يتعدى المكان الذي حصلت فيه الطفرات الوراثية. فسرطان الجلد مثلاً ناتج من طفرات مستحدثة بواسطة الأشعة فوق البنفسجية في الخلايا الجلدية. لا ينتقل هذا المرض إلى الذرية الجديدة وكذلك الحال في العديد من الأمراض الناشئة بسبب طفرات وراثية مستحدثة في الخلايا الجسمية. يعتبر العديد من الأصناف النباتية وخصوصاً الفاكهة ناشئة من طفرات وراثية في الخلايا الجسمية أدت إلى ظهور هذه الأصناف. إن انتشار هذه الأصناف هو ليس عن طريق زراعة البذور بل عن طريق التكاثر الخضري حيث أن مثل هذه الطفرات فيما إذا تكاثرت في أحد الفروع النباتية فإنها تؤدي إلى ظهور فرع خضري يحمل الصفات الجديدة في ثمراته ويمكن عندها فقط قطع هذا الفرع وتكثيره. على أية حال لا يعتبر ذلك انتقالاً للطفرة الوراثية للذرية الجديدة



شكل (9 - 1) : تأثير البيئة في انتخاب الأفراد الطافرين حيث أن المضاد الحيوي يعمل على انتخاب الأفراد الحاوية على طفرة مقاومة المضاد الحيوي.

حيث أن آلية الزراعة بواسطة الفروع الحفزية والأقلام لا تشابه آلية الإخصاب بواسطة الخلايا الجنسية (وهي وسيلة انتقال الصفات) . أما إذا حصلت الطفرة الوراثية في الخلايا الجنسية فإنها ستؤدي إلى انتقالها إلى جميع الامشاج الناتجة في حالة حصولها في الخلايا الجرثومية الأمية المسؤولة عن توليد الأمشاج. ويعتمد ظهور صفات الطفرة الوراثية سواءً في الخلايا الجسمية أو

أو الجنسية على السيادة وكذلك المرحلة التي حصلت فيها الطفرة الوراثية. تعتبر الطفرات الوراثية أحد الأسس المهمة في إنتاج سلالات جديدة من النباتات والحيوانات حيث يتم عزل الأفراد الطافرة وتكثيرهم عن طريق تضريبهم مع بعضهم أو مع غيرهم لإنتاج أفراد هجينة في المرحلة الأولى ثم عزل الأفراد حاملي الطفرة بعد عدة مرات من التضريب. وقد أمكن الحصول على العديد من القطعان الحيوانية ذات الصفات الجيدة مثل غزارة الحليب وكثافة الصوف والولادات ومقاومة الأمراض. أما بالنسبة للنباتات فقد أنتجت العديد من الأصناف المقاومة للأمراض والملوحة والجفاف ذات إنتاجية عالية.

التغييرات المظهرية المرافقة للطفرات الوراثية

تتسبب الطفرات الوراثية في ظهور الكثير من التنوعات المظهرية التي يمكن ملاحظتها على الأفراد الطافرين. كما هو الحال في الطفرات الوراثية المسببة للأشكال والألوان المختلفة لعيون حشرات ذبابة الفاكهة أو أشكال أجنحتها. كما أن بعض هذه التأثيرات المظهرية تبدو بشكل اختلالات في الأيض الفسيولوجي ناتجة عن نقص أو تشوه في بعض الأنزيمات الداخلة في الأيض. وبالتالي تؤدي إلى حصول اختلالات وعلل جسمية تظهر بشكل أمراض وراثية. فيما يصعب اكتشاف بعض الطفرات التي تؤدي إلى اختلالات بسيطة كالطفرات الوراثية التي تؤدي إلى إنتاج أنزيمات ضعيفة النشاط إلا أنها تقوم بوظيفتها ولكن ببطء مقارنة بالأنزيم الطبيعي. لقد أدت دراسات الطفرات الوراثية إلى معرفة الآلاف من الصفات المظهرية التي ترافق هذه الطفرات. لا بل إن بعضها يتعدى صفة مظهرية واحدة إلى التأثير على صفات أخرى. ومع أن معظم الطفرات الوراثية هي متنحية إلا أن بعضها وبسبب الحاجة البيئية والفسيولوجية وضرورة التكيف والتطور تصبح طفرة ذات أهمية للكائن الحي ويمكن أن تساعده على العيش والتكاثر أكثر مما كان

عليه وضع الفرد الطافر قبل حصول الطفرة. وبتكاثر الأفراد الحاصلين على هذا المورث يصبح المورث الطافر بعد عدة أجيال طرازاً برياً.

تعتبر الطفرات الوراثية التي تؤدي بموت الخلايا أو الأفراد من أهم الطفرات الوراثية المستخدمة في التحليل الوراثي. حيث أن هناك طفرات وراثية مميتة وكونها تسبب في توقف إنتاج أنزيم معين أو إنتاجه بشكل غير فعال بحيث يؤدي إلى عدم القدرة على تصنيع ناتج أيضي معين هام تتوقف عليه حياة الخلية أو الفرد. لا تتمكن هذه الخلايا أو الأفراد من المعيشة بسبب نقص الأنزيم ما لم يتوفر لها بيئة غذائية خاصة تحتوي على المادة التي لا تتمكن من تصنيعها. إن مثل هذه الطفرات المميتة تكون شرطية **Conditional lethal mutations** حيث أن بقاء الخلايا أو الأفراد الطافرة مشروط بتوفر مادة غذائية ما. تدعى هذه الطفرات المشروطة بالغذاء بطفرات العوز الغذائي أو التغذية المعتمدة (**Auxotrophic mutations**). إن أفضل أمثلة لطفرات العوز الغذائي هي الطفرات التي عزلها العالمان بيدل وتاتوم التي سيتم الحديث عنها لاحقاً حول العفن النيوسبورا. حيث قاما بعزل سلالات من النيوسبورا ذات طفرة وراثية في مورث معين مسؤول عن تمثيل مادة معينة. ووجدا بأن هذه السلالات لا تتمكن من النمو ما لم تتوفر مادة غذائية معينة في الوسط الغذائي. وبالإضافة لطفرات العوز الغذائي فإن هناك طفرات التحسس الحراري (**Temperature sensitive mutations**) التي لا تنمو فيها الأفراد الطافرة إلا بدرجة حرارة معينة ثابتة وتموت عند إرتفاعها أو انخفاضها. يعتقد بأن درجات الحرارة غير الملائمة تؤدي إلى توقف عملية أيضية معينة بسبب انخفاض نشاط أنزيم معين مقترن بالطفرة الوراثية. كذلك الطفرات الوراثية المميتة المشروطة بوجود مورثات كابتة للتحسس (**Suppressor-sensitive mutations**) حيث أن الأفراد الطافرة لا تتمكن من العيش والنمو ما لم توجد طفرة وراثية أخرى تعمل على كبت الطفرة المميتة. إن من المعروف بأن الطفرة الوراثية يمكن أن ترتد أذ

يتم حصول طفرة وراثية ثانية في نفس موقع حصول الطفرة الأولى على نفس المورث بحيث يتم إعادة الترتيب الاصلي (البري) للمورث . أو أن تأثير الطفرات الأولى يمكن أن يحجب بتوفر طفرة أخرى في موقع آخر على نفس الصبغي أو على صبغي آخر. بحيث يتوقف تأثير الطفرة الأولى وتدعى مثل هذه الطفرات بالطفرات الكابتة .

أخطاء الأيض الموروثة Inborn errors of metabolism

هي أخطاء ناتجة عن طفرات وراثية في المورثات والتي تؤدي إلى تكوين أنزيمات غير فعالة أو عديمة النشاط مؤدية إلى أمراض مثل البول الأسود، البول الكيتوني الوراثي والخلايا المنجلية وغيرها . أعتبرت هذه الأمراض أبلغ دليل على علاقة المورثات بالبروتينات كما أنها ساهمت في بروز نظرية مورث واحد لسلسلة عديد الببتيد واحدة .

مرض البول الأسود Alkaptonuria diseas

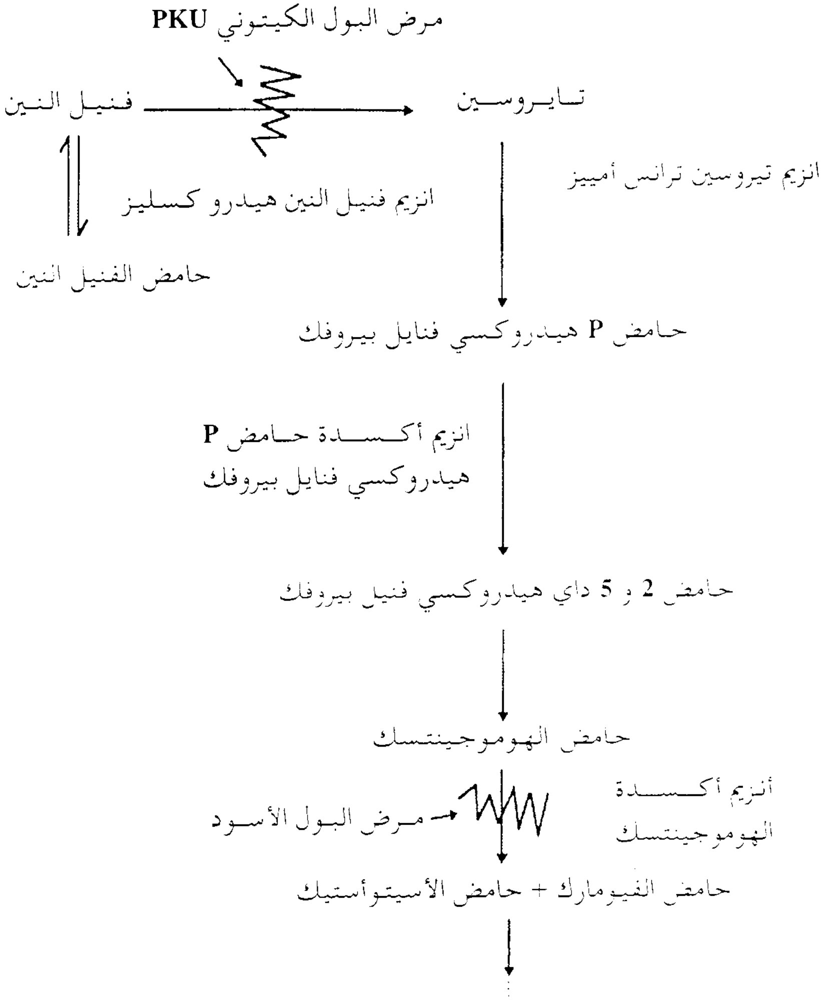
إن المعلومات التي قدمها العالم جارود عام **1900** حول هذا المرض الذي يصيب الإنسان والذي يؤدي إلى اسوداد البول عند تعرضه للهواء وكذلك اصطباغ الأنسجة الرابطة أكدت بأن المرض هو نتيجة لإفراز حامض الهوموجنتيسك (Homogentisic acid) . إن خلايا الأفراد الطبيعيين لا تفرز مثل هذا الحامض وذلك لأنه أحد النواتج التمثيلية للحامض الأميني فنيل النين والتيروسين . إن عملية تحطم هذه الأحماض الأمينية في الأفراد المصابين بهذا المرض لا تكتمل حتى النهاية بل تقف عند تكوين حامض الهوموجنتيسك (Homogentisic acid) بسبب وجود طفرة وراثية في أحد المورثات المسؤولة عن تكوين أنزيم أكسدة حامض الهوموجنتيسك (Homogentisic acid oxidase) حيث يتوقف بناء مثل هذا الأنزيم مما يجعل عملية التمثيل غير كاملة وبالتالي يتم تكوين الحامض غير الطبيعي المسؤول عن الحالة المرضية وإفرازه إلى البول .

مرض البول الكيتوني الوراثي Phenyl Keton Urea (PKU)

ينتج هذا المرض عن تراكم مادة الفنيل النين في دم الافراد المصابين. وقد يصل إلى أكثر من 100 مرة أكثر من الطبيعي مما يؤدي إلى تكوين العديد من المشتقات الأيضية السامة للمخ والجهاز العصبي التي تؤدي في حالة تراكمها إلى ظهور حالات التخلف العقلي لدى الأطفال. ينتج هذا المرض عن فقدان نشاط أنزيم فنيل النين هيدركسليز (Phenyl alenin hydroxylase) الذي يعمل على تحويل حامض الفنيل النين وهي المادة الأولى الناتجة من تحليل البروتين إلى حامض التايروسين. وعلى الرغم من خطورة الإصابة بهذا المرض إلا أنه يمكن تجنب المضاعفات العصبية بتجهيز الأطفال حديثي الولادة بنوع من الغذاء الخاص الذي يحتوي على كمية كافية لتخليق بروتين الجسم من الفنيل النين ولكنها لا تسمح ببناء مشتقات من الفنيل النين شكل (9 - 2).

مرض الخلايا المنجلية الوراثي Sickle cells-B-globin

الهيموجلوبين عبارة عن بروتين معقد مكون من أربعة سلاسل من الجلوبين المرتبطة مع مجموعة حديد. يمثل الهيموجلوبين أحد المركبات الرئيسية لكريات الدم الحمراء في الحيوانات الفقرية حيث يكون مسؤولاً عن نقل الأكسجين عبر خلايا الجسم. يمكن تمييز طرازين من الهيموجلوبين الأول ويظهر خلال المرحلة الجنينية ويدعى بالهيموجلوبين الجنيني (HbF) ويستبدل بعد مرور ستة أشهر من الولادة بالنوع الثاني الذي يدعى بالهيموجلوبين البالغ (HbA). على الرغم من أن جزئية كلا الطرازين مكونة من أربعة سلاسل عديدة الببتيدات إلا أن الهيموجلوبين البالغ مكون من سلسلتين متماثلتين من سلاسل ألفا وسلسلتين متماثلتين من سلاسل بيتا فيما يتكون الهيموجلوبين الجنيني من سلسلتين متماثلتين من سلاسل ألفا شبيهه بتلك الموجودة في الهيموجلوبين البالغ وسلسلتين جاما وليست بيتا كما هو الحال في الهيموجلوبين البالغ. لقد ساعدت دراسات استخدام الترحيل الكهربائي

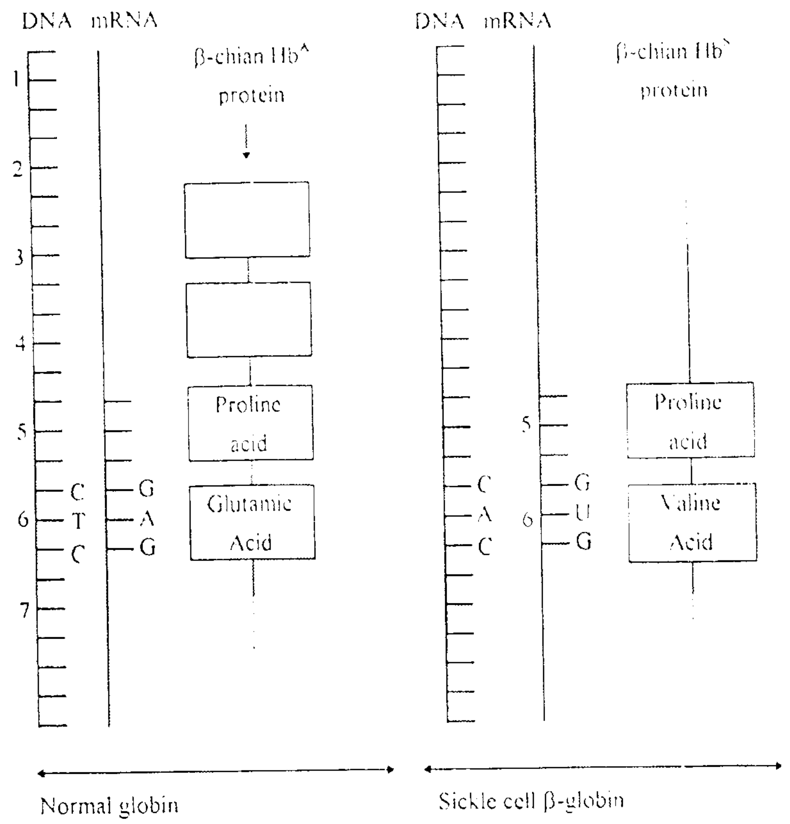


شكل (9 - 2) : توقف أيض الفنيل النين المسبب لمرض البول الكيتوني وأيض حامض الهوموجنتيسك المسبب لمرض البول الأسود وكلا المرضين من الأمراض الوراثية الناشئة عن طفرة وراثية في مورثات الأنزيمات المسؤول.

في دراسة العديد من الاختلافات بين تلك الطرز. أما هيموجلوبين الخلايا الدموية المنجلية الذي يرمز له Hbs فإن احدى سلاسل بيتا جلوبين تحتوي على تبدل في أحد الأحماض الأمينية في هذه السلسلة. تعاني كرات الدم الحمراء

الحاوية عليه حالات تشوه حيث أن إزالة الأكسجين من الهيموجلوبين يؤدي إلى ظهور تجمعات بروتينية تؤدي إلى استطالة الكريات. ثم تأخذ الشكل المنجلي ويؤدي ذلك إلى انخفاض كفاءتها في نقل الأكسجين علاوة على عرقلتها مرور كرات الدم الأخرى عبر الأوعية الدموية الناقلة. يتضمن الاستبدال الحاصل في سلسلة البيتاجلوبين لهيموجلوبين كرات الدم الحمراء المنجلية استبدال حامض الجلوتاميك (Glutamic acid) بحامض الفالين (Valine acid) وعندما يتم استنساخ الاليل الطبيعي HbA لسلسة البيتاجلوبين العائد للهيموجلوبين لتكوين حامض نووي مرسال فإنه يتم نسخ الشفرة المسؤولة عن حامض الجلوتاميك بشكل مضبوط في موقع الحامض الأميني السادس في سلسلة متعدد الببتيد. وعندما تتم الترجمة فإن حامض الجلوتاميك يأخذ موقعه الصحيح في السلسلة الجديدة وينتج ذلك بسبب ازدواج الشفرة الخاصة بالحامض الموجودة في الحامض النووي الناقل.

أما في الاليل غير الطبيعي Hbs لسلسلة البيتاجلوبين في الأفراد المصابين بأنيميا الخلايا المنجلية الوراثي فإن موقع الشفرة الوراثية العائد لحامض الجلوتاميك مختلفة بسبب طفرة وراثية أدت إلى استبدال الثايمين CTC (T) في الشفرة الطبيعية إلى أدنين C A C (A) مما جعل هذه الشفرة مسؤولة عن تكوين حامض الفالين Valine. لذا فإنه عند استنساخ هذا الاليل غير الطبيعي فإن نسخة الحامض النووي المرسال الناتجة تحمل شفرة لحامض الفالين في الموقع السادس بدلاً من حامض الجلوتاميك شكل (9 - 3). هذه الطفرة الوراثية البسيطة تؤدي إلى تغيير في شكل البروتين النهائي بسبب التصاق هذه السلاسل المعطوبة لتكون في النهاية الشكل المنجلي لكرات الدم الحمراء وبالتالي التأثير على سعة حمل الأكسجين Oxygen-carrying capacity لجزيئات جلوبين الخلايا المنجلية.



شكل (9 - 3) : موقع الشفرة الوراثية 6 في المورث الطبيعي المشفر لبروتين الجلوبين حيث تمثل الشفرة 6 فيه حامض الجلوتاميك بينما يستبدل بحامض الفالين في جلوبين اللوكيميا الوراثي حيث تستبدل القاعدة T في الشفرة الطبيعية بالقاعدة A في الشفرة الطافرة.

تجارب العالمان بيدل وتاتوم على عفن الخبز (نيوروسبورا)

أهملت نتائج أبحاث العالم جاردو التي نشرها عام 1900 حول أخطاء الأيض الموروثة وبالأخص مرض البول الاسود حتى أعيد اكتشافها من جديد على يد العالمان بيدل وتاتوم عام 1941 بعد نشرهما بحوثهما المتعلقة بعفن الخبز نيوروسبورا **Neurospora**. إن عفن نيوروسبورا **Neurospora crassa** الذي يعيش في وسط زرعي بسيط مكون من ملح لا عضوي وسكر وبايوتين **Biotin**

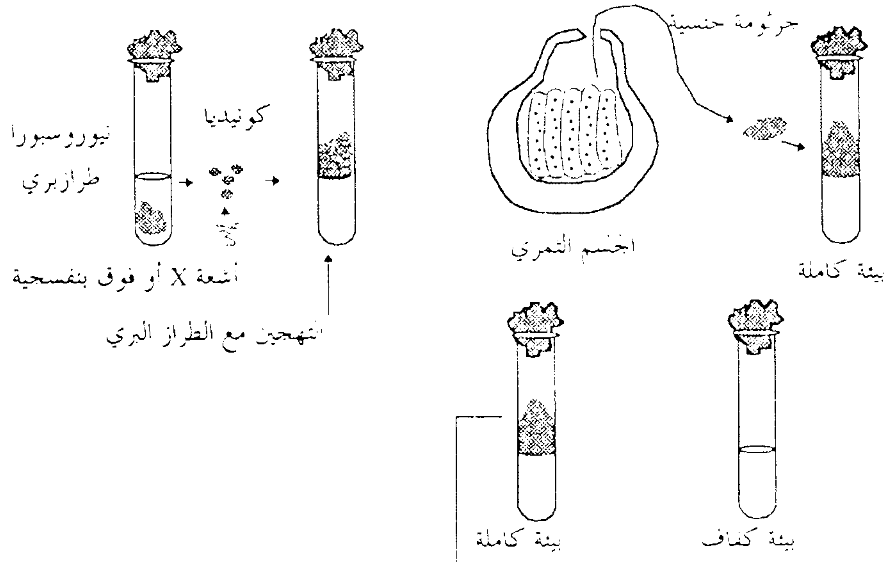
له القابلية على تمثيل هذه المكونات عدا البايوتين. إن هذا التمثيل واقع تحت سيطرة المورثات. لذا فإنه إذا ما حدثت طفرة وراثية في أحد المورثات المسؤولة عن تمثيل أحد هذه المكونات فإن السلالة الجديدة ستحتاج إلى مادة جاهزة ممثلة أصلاً من هذه المكونات لأجل العيش، وإلا فإنها ستموت بوجود المادة بشكلها الأولي شكل (9 - 4). قام هذان العالمان بتعريض الأجزاء الجنسية Conidia لهذا العفن لأشعة إكس أو الأشعة الفوق بنفسجية لغرض عزل طفرات وراثية وكان أن حصلوا على عدد من السلالات ذات الطفرة الوراثية. إن كل طفرة مسؤولة عن عدم إنتاج أنزيم معين مسؤول عن تحطيم مادة معينة. إن جميع هذه الحالات ناتج عن عدم قدرة بناء مركب كيميائي معين لحالة معينة بسبب طفرة وراثية متنحية في مورث.

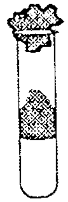
الطفرات المستحثة Induced mutations

تنشأ هذا الطفرات بسبب تعرض الخلايا إلى عوامل فيزيائية أو كيميائية أو حياتية ولا تنشأ إلا بوجود مادة حاثة. تقسم الطفرات المستحثة إلى ثلاثة أنواع اعتماداً على نوع المادة الحاثة وهي :

الطفرات المستحثة بواسطة عوامل حيوية

تنتج هذه الطفرات بسبب حيوي كالإصابة بالرواشح والايبوسومات والبلازميدات وغيرها. سجلت العديد من أنواع الرواشح كعوامل حيوية قادرة على إحداث أضرار وراثية في الخلايا التي تصيبها. تعتبر مجموعة الرواشح المعروفة بالرواشح المرتدة أو الرجعية (Retrovirsues) ومجموعة رواشح الحمة الغدية (Adeno viruses) من أكثر الرواشح قدرة على إحداث أنواع مختلفة من السرطانات الناتجة بسبب الطفرات الوراثية. تتكون المجموعة الأولى من الرواشح (المرتدة أو الرجعية) من الحامض النووي الريبوزي كمادة وراثية بينما تتكون المجموعة الثانية (رواشح الحمة الغدية) من الحامض النووي الريبوزي



بيئات مضاف إليها :										
كولين	حامض نووي	حامض فوليك	أنوسيتول	حامض أمينوبنزويك	نياثين	بيرودكسين	رايبوفلافين	ثيامين	كفاف	حامض
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ 

شكل (9 - 4) : تجربة بيدل وتاتوم حيث تم عزل طافرات النيوروسبورا الناتجة من تعريض الكونيديا لأشعة X أو فوق البنفسجية بتهجين المعرضة للإشعاع رجعياً مع الطراز البري ثم تنميتها في بيئة كاملة وكفاف حيث تنمو الطافرات فقط في البيئة الكاملة بينما ينمو الطراز البري في كلا البيئتين وبعمل تهجين رجعي للسلالة الطافرة وتنميتها في بيئات ذات احتياجات غذائية مختلفة يتم عزل سلالات ذات طفرة واحدة فقط. أثبتت هذه التجربة إن كل طفرة ينتج عنها فقدان أو عدم نشاط أنزيم واحد فقط.

منقوص الأكسجين. وإن كلا من المجموعتين تقوم بمهاجمة الخلايا مؤدية إلى تسخيرها لأجل تكاثر الراشح وبالتالي تؤدي إلى تنشيط الخلايا عبر التأثير على مادتها الوراثية عبر التحام الراشح بعد فترة وجيزة من دخوله مع المادة الوراثية للخلية المصابة. يقوم بعدها الراشح بتأثير من أحد مورثاته التي يحملها والذي يعرف بالمورث السرطاني (Oncogenes) بإنتاج مواد محفزة للإنقسام مؤدياً إلى إنقسام الخلايا المستمر. كنتيجة للإنقسام غير الطبيعي للخلايا فإنه تحدث العديد من الأخطاء الوراثية في الخلايا المصابة. هذه الأخطاء تظهر كطفرات وراثية أو عيوب صبغية أو أخطاء مختلفة الأشكال.

وعلى الرغم من أن بعض هذه الرواشح تغادر خلايا العائل بعد فترة من الإصابة إلا أنهاتترك الخلايا في دوامة من الأخطاء الوراثية. تعتبر الطفرات الوراثية من أكثر الحالات التي تم تشخيصها في العديد من الخلايا السرطانية الناشئة بفعل الإصابة بالرواشح كما هو الحال في سرطان المثانة(Bladder carcinoma) الناتجة عن طفرة وراثية في المورث C-H-ras وسرطان القولون والرئة (Lung and colon carcinoma) الناتج عن طفرة وراثية في المورث C-K-ras. بالإضافة للعديد من السرطانات الأخرى كسرطان الغدد اللمفاوية والدم وأنواع من السرطانات الحليمية (Papillomas) والتي يظهر معظمها بسبب طفرات وراثية في أحد المورثات المهمة حيوياً. لذلك فإن هذه الرواشح خصوصاً تلك التي تلتحم مع المادة الوراثية للعائل مثل العاثيات mu, Ti4, Ti2 تسلك كمطفرات وراثية. وعلى الرغم من أن آلية حصول الطفرة الوراثية من خلال الرواشح غير مفهومة تماماً إلا أنه يعتقد بأن للعناصر الانتقالية وعناصر الاندماج) أنظر فصل الحامض النووي البلازميدي وغيرها- العاشر) دوراً مهماً في حصول الطفرة الوراثية الراشحية والذي يؤدي إلى ظهور اتحادات وراثية غير طبيعية وأن نسبة هذه الاتحادات تزداد بوجود هذا الالتحام مقارنة بعوامل حاثة أخرى.

الطفرات المستحثة بواسطة عوامل فيزيائية

وهي الطفرات الوراثية الناشئة عن أسباب فيزيائية كالأشعة الفوق بنفسجية والإشعاعات المؤينة كأشعة إكس، جاما بيتا، ألفا والأشعة الكونية. يتراوح الطول الموجي لهذه الإشعاعات بين اقل من **0.1** إلى **1** نانوميتر. تتمكن هذه الإشعاعات بسبب الطاقة العالية لها من النفاذ عبر الأنسجة بسهولة مسببة تأيين الذرات برفع الطاقة الالكترونية لها. تترك هذه الإشعاعات على طول طريق مرورها جذورياً حرة (**Free radicals**) ذات شحنات مختلفة تعمل على تنشيط تفاعلات كيميائية معينة مؤدية إلى ظهور الطفرات الوراثية. أما بالنسبة للأشعة الفوق بنفسجية ذات الطاقة المنخفضة فإنها بسبب هذه الطاقة الضعيفة فلا تتمكن إلا من التأثير على الخلايا السطحية مؤدية إلى إثارة مركبات البيورين والبيرميدين حيث تتكون أشكال غير طبيعية منها. يؤدي ذلك إلى دخولها في الحامض النووي بحيث لا تتمكن الخلايا من إصلاح هذا الخلل. لقد تم عزل أشكال مختلفة من مركبات البيورين والبيرميدين غير الطبيعية من خلايا معرضة إلى الأشعة فوق البنفسجية وأشعة إكس وغيرها من الأشعة ولقد وجد بأن معظم هذه المركبات هي مركبات ثنائيه **Dimers** يرتبط منها قاعدتين متماثلتين مع بعضها بدلاً من ارتباط قواعد مكملة كما هو الحال في ثنائيات الثايمين **T-T** والسيتوسين **C-C** وغيرها. أو قواعد متميعة أومركبات ذات صور توتوميرية (مركبات لها القدرة في التشكيل بهيئة كيتو أو اينول) شكل (**9 - 5**).

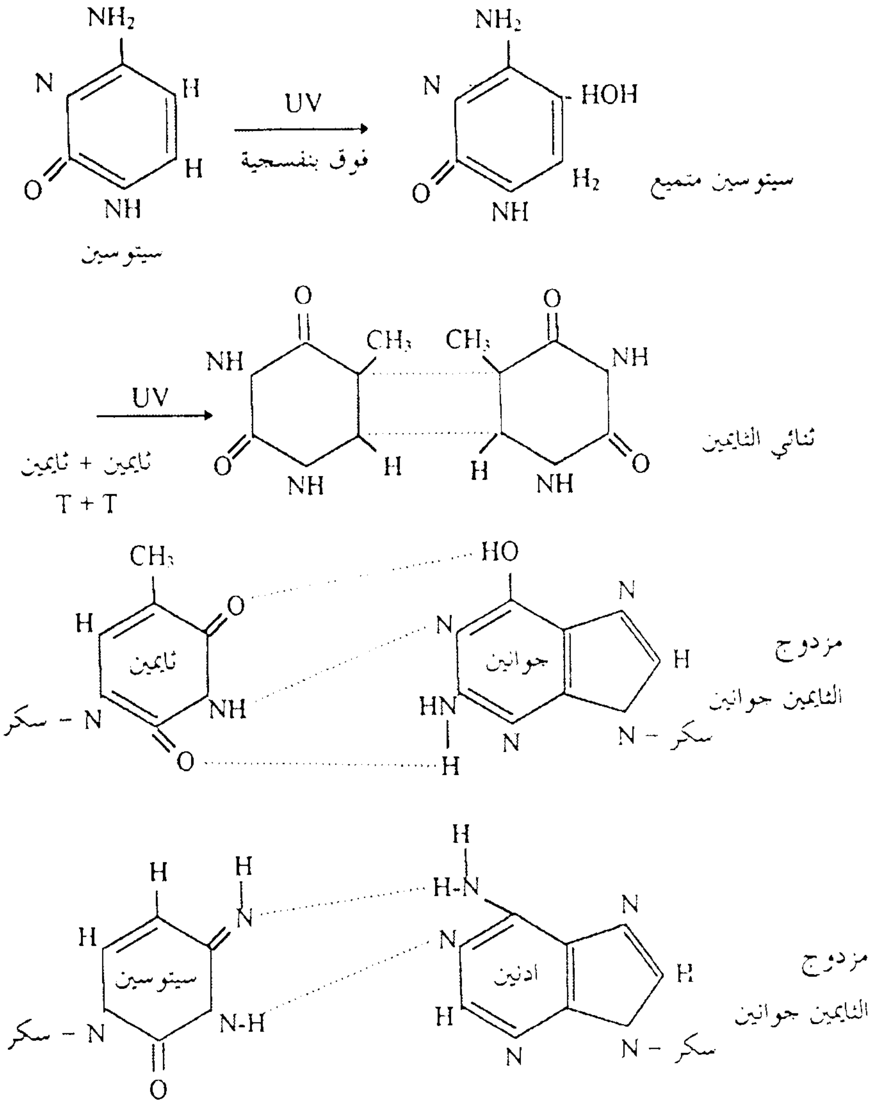
الإصابة المفردة Single hit theroy

تنص هذه النظرية بأن وحدة تأينية واحدة كافية لإحداث طفرة وراثية واحدة. تقاس جميع الإشعاعات بعدد التأينات في وحدة حجم وفي ظروف معينة ويدعى هذا المقياس بوحدة روتنجن (**Roentgen unit (r)**) وهي تمثل كمية الأشعة المتأينة التي تنتج وحدة كهروستاتيكية من الشحنات في حجم سم^3

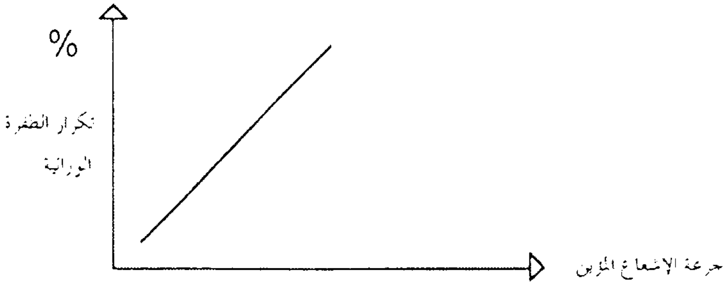
واحد. لا تعتمد هذه الوحدة على زمن التعريض ولذلك فإنه من المحتمل الحصول على جرعة من الإشعاع بكثافة قليلة ولزمن أطول والحصول على نفس الجرعة بكثافة أكبر ولزمن أقصر. وهو ما أثبتته معظم الأبحاث العلمية حيث وجد بأن هناك علاقة خطية بين النسبة المئوية للطفرات الوراثية وجرعة الإشعاع حيث تزداد هذه النسبة بزيادة جرعة الإشعاع المؤين شكل (9 - 6) وهو ما يثبت نظرية الإصابة المفردة. إلا أنه هناك العديد من العوامل التي يمكن أن تؤثر على فعالية الإشعاع في إحداث الطفرة الوراثية. فلقد لوحظ بأن قابلية الأطوار المختلفة للخلايا للطفر الوراثية تختلف من طور إلى طور. تعتبر الخلايا التي تمر بالإنقسام الخلوي وخصوصاً تلك التي تكون في مرحلة تضاعف الحامض النووي (S-phase) أكثر حساسية للإشعاع من الأطوار الأخرى. لقد وجد سبارو 1951 من خلال عمله على نباتات النجيليات بأن تكرار الطفرة الوراثية في مرحلة التضاعف يزداد 60 مرة عنها هو عليه في الخلايا التي في الأطوار الأخرى. كما أن تركيز الأكسجين ودرجة الحرارة أثناء عملية التشعيع تؤثر على معدل تكرار الطفرات الوراثية فزيادة تركيز الأكسجين يؤدي إلى زيادة تأثير الإشعاع.

الطفرات المستحثة كيميائياً

تعتبر المواد الكيميائية من أكثر المواد أهمية في إحداث الطفرات الوراثية. تكمن تلك الأهمية في سهولة تداولها بأشكال مختلفة كالمبيدات والأصباغ وحافظات غذائية ومخصبات تربة ومواد مختبرية وغيرها بالإضافة للملوثات البيئية. تحتفظ المواد الكيميائية المطفرة بالصدارة في قائمة المواد الكيميائية الخطرة وأشهر هذه المواد المواد هي العوامل الالكيلية والهيدروكسيلية، ومتشابهات القواعد النيتروجينية. إن المجموعة الأولى وهي مجموعة غاز الخردل التي تعمل على نقل مجاميع المثيل (CH3) ومجاميع الاثيل (CH2) التي تمتلكها إلى القواعد النيتروجينية مكونة قواعد نايتروجينية مشابهه أو غريبة



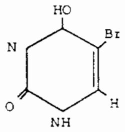
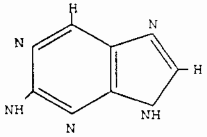
شكل (9 - 5) : مركبات البيورين والبايريميدين غير الطبيعية الناتجة عن التعرض للإشعاعات حيث تعمل هذه المركبات على التآصر في مزدوج الحامض النووي بطريقة تؤدي إلى الطفرة الوراثية بآلية الاستبدال المكافئ **Transition** أو غير المكافئ **Transversion**.



شكل (9 - 6) : العلاقة بين جرعة الإشعاع المؤين وتكرار الطفرة ويلاحظ أن العلاقة خطية بينهما حيث يزداد تكرار الطفرة بزيادة جرعة التشعيع .

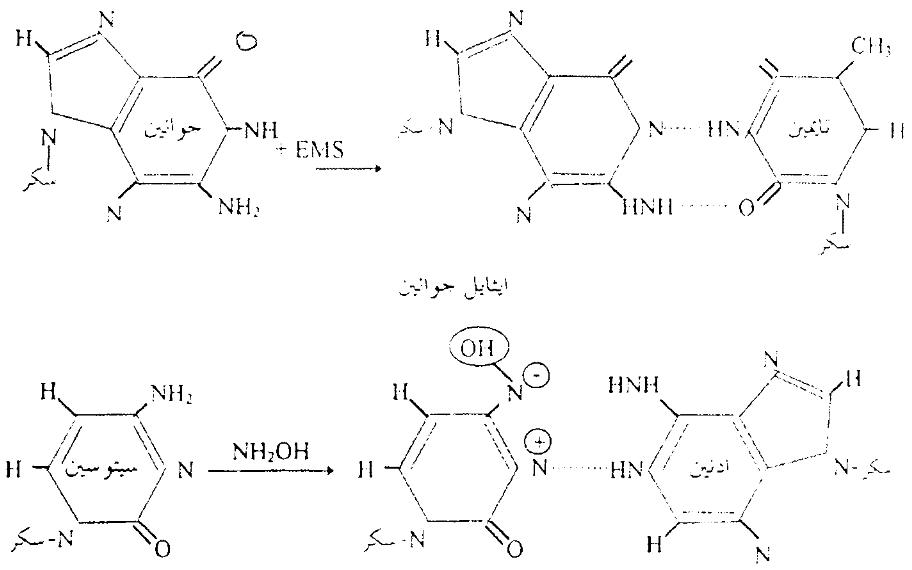
يمكن أن تدخل في الحامض النووي عند تضاعفه بسبب تركيبها الكيميائي المشابهة لتركيب القواعد النيتروجينية جدول (9 - 1) . تعتبر المواد الالكيلية مواد مطفرة غير متخصصة بسبب استحداثها أنواع مختلفة من الطفرات الوراثية . تتمكن هذه المواد من نقل مجاميع الاثيل أو المثيل الموجودة فيها إلى القواعد النيتروجينية مؤدية إلى استبدال غير متكافئ (مغاير) في ازدواج هذه القواعد في شريط الحامض النووي . علاوة على أن المجاميع الكيميائية المضافة للقواعد النيتروجينية يمكن أن تساعد أيضاً على تكوين ثنائيات من القواعد النيتروجينية مثل ثنائي الجوانين وثنائي السيتوسين وغيرها بحيث أنها تتموضع في أشرطة الحامض النووي و تعمل على إيقاف بناء الشريط أثناء التضاعف أو تمر كطفرات وراثية أو انها تعمل على تكوين ثنائيات غير طبيعية كمزدوج الجوانين – ثايمين أو الادنين– سيتوسين .

جدول (9 - 1) : مجموعة العوامل الالكيلية ومشابهات القواعد النيتروجينية التي لها دور كبير في حصول الطفرات الروائية .

١ـ المواد الاكليلية : غاز الخردل الكبريتي		Cl Cl $CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2$
غاز الخردل النيتروجيني		Cl CH_3 Cl $CH_2-CH_2-N-CH_2-CH_2$
ايثايل ميثان سلفونات	EMS	$CH_3-CH_2-O-SO_2-CH_3$
ايثايل ايثان سلفونات	EES	$CH_3-CH_2-O-SO_2-CH_2-CH_3$
نتروزجوانيدين	NTG	$HN= C-NH=NO_2$ $O=N-NCH_3$
٢ـ المواد المشابهة للقواعد النيرتوجينية :		
٥ـ برومويوراسيل	5 - BU	
٢ـ أمينوبيورين	2 - AP	

أما الكيميائيات الهيدروكسيلية فهي أكثر تخصصاً من الكيميائيات الالكيلية . تعمل هذه على إحداث استبدال مكافئ (مماثل) في قواعد الجوانين والسيتوسين عن طريق استبدالهما بالادنين والثايمين بارتباط مجموعة الهيدروكسيل للمادة الكيميائية مع مجموعة الامين للسيتوسين حيث يرتبط المركب الناتج مع الادنين بدلاً من الجوانين ليعطي الاستبدال **GC ⟶ AT** شكل (9 - 7) .

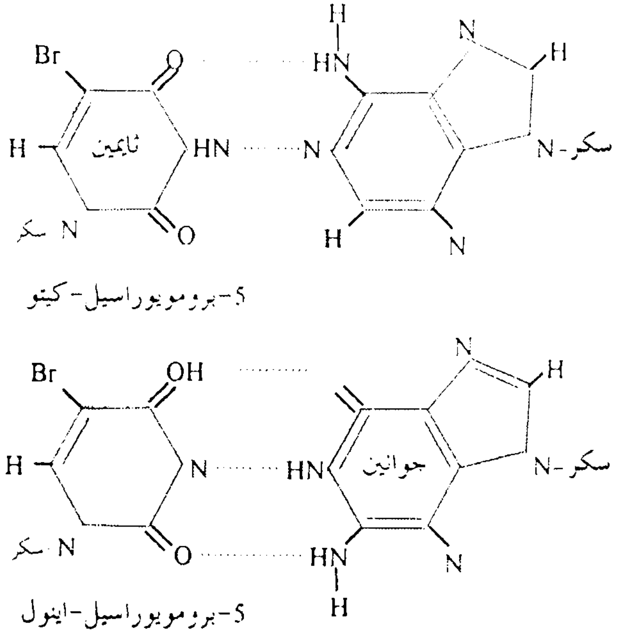
أما المجموعة الثانية وهي مجموعة متشابهات القواعد النيتروجينية والتي



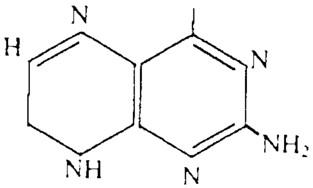
شكل (9 - 7) : تأثير المواد الالكيلية والهيدروكسيلية على القواعد النيتروجينية وآلية إحداث الطفرة الوراثية من خلال الاستبدال المكافئ للقواعد .

تتكون من مشابه اليوراسيل 5- برومويوراسيل **(5-bromouracil)** ومشابه أمينو البيورين **(2-amino purine)** . إن لكل منهما القدرة على وجوده في صورتين هما الكيتو والاينول . تدعى مثل هذه المركبات بالمركبات التوتوميرية . إن لكلٍ صورة من صور هذه المركبات أهمية في حصول الاستبدال المكافئ . فمثلاً يستطيع المركب 5 - برومويرواسيل عند وجوده في صورة الكيتو بالارتباط مع الادنين مسبباً طفرة وراثية بالاستبدال المكافئ **AT ← GC**. أما عندما يكون في صورة الاينول فإنه يرتبط مع الجوانين مسبباً الاستبدال المكافئ **GC ← AT**.

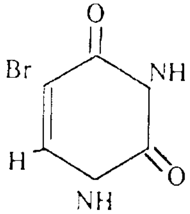
وهكذا فإن هذا المركب يسبب الطفرة الوراثية بالاستبدال المكافئ المتعاكس اعتماداً على الصورة الموجودة فيها لحظة التضاعف شكلي (٩ - ٩، ٩ - ٨). يعمل مشابه البيورين بنفس الطريقة التي يعمل فيها مشابه اليوراسيل.



شكل (٩ - ٨) : تآصر المركب **5-** برومويوراسيل مع الادنين والجوانين عند وجوده في صورة كيتو أو اينول.

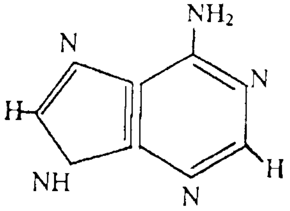


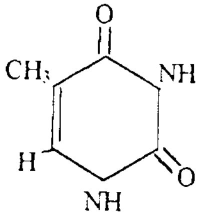
2-أمينوبيورين



5-برومويوراسيل

القواعد المشابهة





القواعد الطبيعية

شكل (9 - 9) : القواعد النيتروجينية المشابهة التي تنتجها بعض المواد الكيميائية المطفرة حيث تحل هذه المركبات بدلاً من القواعد الطبيعية مؤدية إلى الطفرة الوراثية .

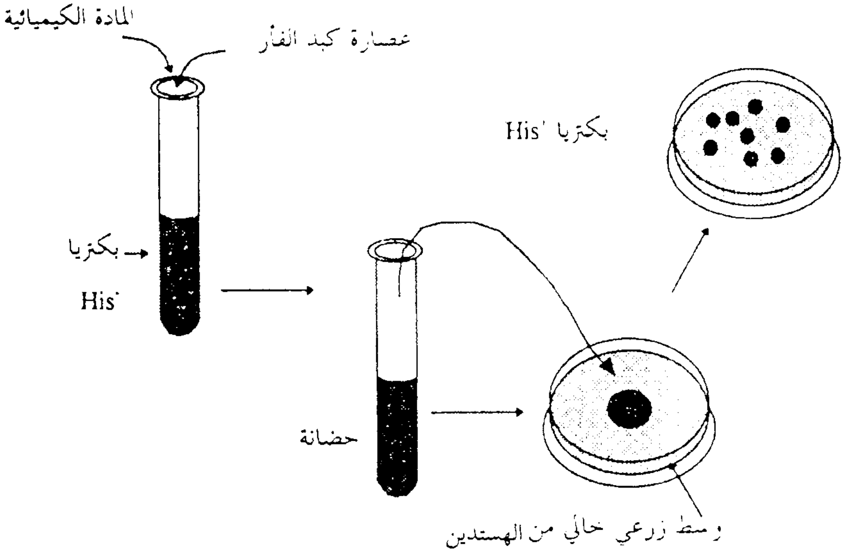
وبالإضافة للمجموعتين السابقتين فهناك مواداً أخرى مطفرة لا تنتمي إلى أي من هاتين المجموعتين من هذه المواد حامض النتروز (HNO2) والاكريدينات (وهي مجموعة من الصبغيات مثل البروفلافين والاكريدين البرتقالي) . تعتبر هذه المواد مطفرة قوية . فحامض النتروز يؤثر على الحامض النووي من خلال الأكسدة وإزالة مجاميع الامينو من القواعد النيتروجينية المحتوية عليها مثل قواعد الادنين والجوانين والسيتوسين وتحويلها إلى صور كيتو . فيتحول الادنين إلى هيبوزانثين يزدوج مع السيتوسين بدلاً من الثايمين ويتحول السيتوسين بعد زوال مجموعة الامينو إلى يوراسيل يزدوج مع الادنين بدلاً من الجوانين . فيما يتحول الجوانين بعد إزالة مجموعة الامينو إلى زانثين يزدوج مع السيتوسين . أما الاكريدينات فإنها تؤدي إلى حصول إضافة أو فقدان للقواعد من خلال تداخلها مع القواعد النيتروجينية في أشرطة الحامض النووي ويؤدي ذلك إلى

حصول طفرة وراثية في منطقة التداخل وإزاحة الإطار (**Frame Shift**) بعد موقع الطفرة.

فحص إيمز للمواد الكيمياوية المسرطنة Ames test

المواد الكيميائية المسرطنة (**Carcinogens**) هي المواد التي تسبب السرطان للأنسان والحيوانات. وقد وجد بأن معظم المواد الكيميائية المسرطنة (**Mutagens**) هي مواد مطفره في نفس الوقت. لقد أنتشر استخدام العديد من المواد الكيميائية التي ينضم الكثير منها إلى المجاميع المسرطنة والمطفرة. لقد أدى هذا الانتشار الواسع لاستخدام المواد الكيميائية إلى انتقالها إلى البيئة وأصبحت تهدد الكائنات ومن ضمنها الإنسان بالإصابة بالسرطان. لأجل معرفة المواد المسرطنة واكتشافها فقد تم استحداث طريقة سريعة وبسيطة تعتمد أصلاً على استخدام البكتريا كأدلة لمعرفة قابلية المواد الكيميائية على أحداث السرطان. سمي هذا الاختبار باسم مكتشفه باختبار ايمز (**Ames test**). يعتمد هذا الاختبار أساساً على قابلية البكتريا ذات الطفرة على استعادة وضعها الطبيعي والتخلص من الطفرة الوراثية والرجوع إلى الحالة الطبيعية. تستخدم في هذا الطريقة بكتريا التايفوئيد (**Salmonella typhimurium**) الحاوية على طفرة وراثية تدعى بطفرة الهستدين - **His**. لا تتمكن البكتريا الحاوية على هذه الطفرة من تصنيع الهستدين من المواد الأولية المتوفرة في الوسط الغذائي. ولا تعيش إلا في أوساط غذائية تحتوي على الهستدين. لهذه البكتريا القدرة على الرجوع إلى الحالة الطبيعية عند خلط هذه البكتريا مع المواد الكيميائية. وتمثل القراءات العالية عن المعدل الطبيعي تطوراً بحصول طفرات راجعة ناتجة عن المادة الكيميائية. تصنف مثل هذه المواد عادة كمواد مسرطنة. وتتلخص الطريقة في أنه يتم خلط المادة الكيميائية المراد فحصها مع البكتريا ذات الطفرة - **His** بوجود مادة منشطة (لتحويل المادة الكيميائية المفحوصة إلى شكل كيميائي نشط) وهي عصارة

كبد الفأر الغنية بالأنزيمات المنشطة. تحضن المكونات لمدة 24 - 48 ساعة بدرجة حـــــــرارة 37°م بعد توزيعها بتخافيف مناسبة على وسط زرعي خالي من الهستدين. يتم حساب عدد المستعمرات النامية His وتعتبر المادة الكيميائية المفحوصة مطفرة إذا كان معدل تحول البكتريا إلى الحالة الطبيعية (من -His إلــى +His) أكثر من المعدل الطبيعي للتحول (التحول التلقائي Spontaneous reversion) شكل(9 - 10) .



شكل (9 - 10) فحص ايمز الذي يستهدف حساب معدل الطفرات الراجعة $His^- \leftarrow His^+$ مقارنة بالمعدل الطبيعي التلقائي .

ويمثل معدل البكتريا الراجعة درجة قوة المادة الكيميائية كمادة مطفرة. لقد وجد بأن أكثر من 90% من المواد المثبتة كمواد مطفرة بهذه الطريقة هي مواد مسرطنة. ومن الجدير بالذكر أن جميع المواد المسرطنة هي مواد مطفرة ولكن ليس كل مطفر مسرطن.

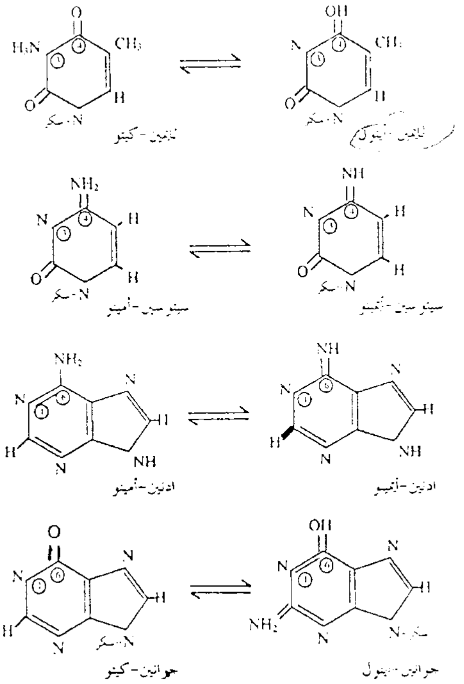
الآلية الجزيئية لحدوث الطفرات الوراثية

الآلية الجزيئية لحدوث الطفرات الوراثية التلقائية

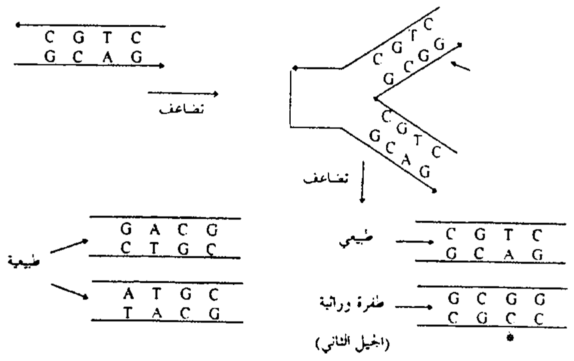
افترضت نظرية الحلزون المزدوج التي وضعها واطسن وكريك إلى أن الحامض النووي يتمكن من خلال نموذجهما من التضاعف شبه المحافظ. ويتضمن هذا النموذج أيضاً حدوث الطفرات. لقد أفترض حدوث هذه الطفرات إلى تحرك ذرات الهيدروجين ضمن القواعد النيتروجينية بحيث يؤدي هذا التحرك إلى وجود القواعد النيتروجينية بصورتين. تعتبر صورة الكيتو للثايمين والجوانين وصورة الامينو للادنين والسيتوسين هما الصور الطبيعية التي ترتبط لاعطاء الترتيب الطبيعي لأشرطة الحامض النووي. إلا أن هذه الصور تتحول إلى صور أقل ثباتاً ولفترة وجيزة جداً وهما صورتي الاينول والايمنو ويدعى مثل هذا النظام بالنظام المتوتر للقواعد (Tautomeric shift of Bases) شكل (9 - 11). وفي حالة دخول القواعد النيتروجينية بصورها غير الطبيعية (اينول وإيمينو) في عملية التضاعف فإنها ستؤدي إلى حصول الطفرة الوراثية شكل (9 - 12).

يسمى إحلال قاعدة بصورتها الطبيعية بدلاً من صورتها غير الطبيعية كإحلال جوانين-اينول بدلاً من جوانين-كيتو بالاستبدال المتكافئ فيما يسمى استبدال قاعدة نيتروجينية بأخرى مخالفة بالاستبدال غير المتكافيء. ويظهر من عدد الصور التي تتواجد بها القواعد النيتروجينية بأن هناك اثنى عشر حالة مختلفة من الإحلال تمثل أربعة حالات منها استبدال متكافيء فيما تمثل الثمانية المتبقية استبدال غير متكافيء شكل (9 - 13).

كما أن هناك طرازاً آخر من الطفرات الوراثية يؤدي إلى تغيير كامل في قراءة الشفرات الوراثية وليس في شفرة وراثية واحدة كما هو الحال في الاستبدال المكافئ أو غير المكافئ ألا وهو طفرات إزاحة الإطار (Frame shif mutation). تنتج هذه من إضافة أكثر من قاعدة نيتروجينية

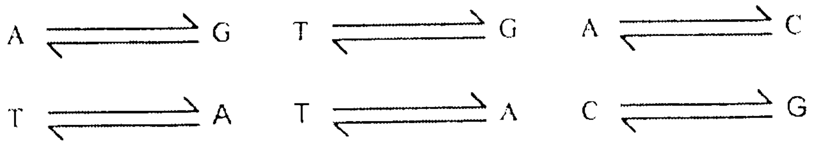


شكل (٩-11) : النظام المتواتر للقواعد النيتروجينية الأربعة والذي يرجع إلى تحريك ذرات الهيدروجين في مواقع ذرات الكربون رقم **1.6.4.3** .

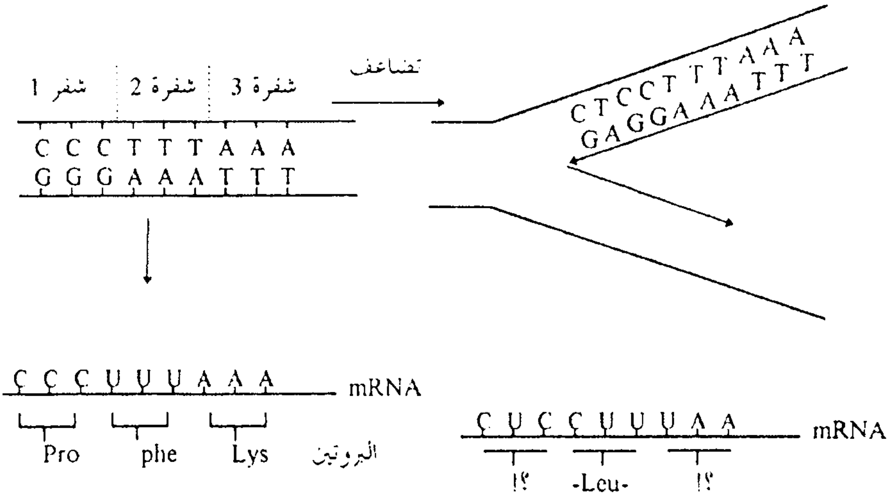


شكل (٩-12) : حصول الطفرة الوراثية نتيجة دخول قاعدة نيتروجينية (جوانين– اينول) بصورتها غير الطبيعية حيث ارتبط الجوانين – اينول مع الثايمين بدلاً من الادنين في الجيل الأول ثم نقلت الطفرة الوراثية إلى الجيل الثاني حيث ظهرت بصيغة ارتباط جوانين مع سيتوسين بدلاً من ثايمين– ادنين.

واحدة للتتابع الطبيعي للمورث والذي يؤدي إلى إنتاج بروتين مشوه تماماً مختلف عن البروتين الطبيعي شكل (9 - 14) .



شكل (9 - 13) : حالات الانتقال المختلفة للقواعد النيتروجينية التي تؤدي إلى حدوث الطفرات الوراثية .



شكل (9 - 14) : الطفرة الوراثية الناشئة من إضافة زوج قاعدي ويلاحظ اختلاف قراءة الشفرات الوراثية التي تلي الطفرة .

الآلية الجزيئية للطفرات الوراثية المستحثة

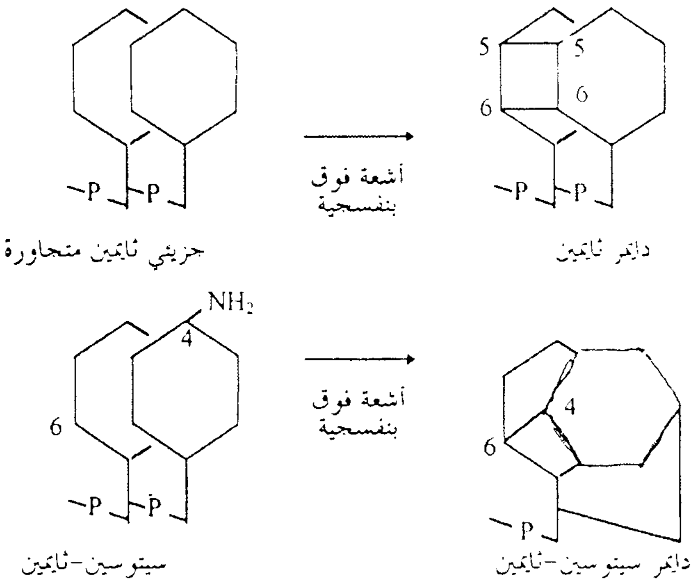
تعمل معظم العوامل الفيزيائية والكيميائية على استحداث مركبات كيميائية مشابهة للقواعد النيتروجينية أو ثنائيات قاعدية . لقد تم شرح معظم هذه الأشكال غير الطبيعية أثناء تعرضنا للعوامل الفيزيائية والكيميائية . إن هذه الأشكال تؤدي إلى الارتباط بدلاً من القواعد الطبيعية

أو أن الثنائيات تدخل في عملية بناء الحامض النووي مؤدية إلى إحلال الزوج غير الطبيعي بدلاً من زوج القواعد الطبيعي مسببة إما طفرة وراثية ناتجة عن تغيير زوج واحد أو تغيير ألإطار. يؤدي التغيير الأخير إلى تغيير في قراءة الشفرات الوراثية. إن بعض العوامل الفيزيائية أو الكيميائية تؤدي إلى زيادة نسبة تحول القواعد الطبيعية بصورتها المستقر (كيتو و امينو) إلى الصورة غير المستقرة (أينول وايمينو). كذلك زيادة زمن وجودهما في هذه الصورة مما يعطي فرصة أكبر للصورة غير المستقرة بالدخول في عملية بناء الحامض النووي أكبر مما يحصل في الظروف الطبعية.

اصلاح أضرار الحامض النووي DNA repair

تحتاج الخلايا للقيام بعملها إلى الآلاف من البروتينات التي تساهم في ضبط سياقات الحياة داخل الخلية. وقد تتعرض المورثات إلى ظهور طفرات وراثية مؤدية إلى تدمير النشاط الخاص بالبروتين الناتج .ونظراً لتعرض الخلايا للعديد من العوامل التي تؤدي إلى ظهور الطفرات الوراثية إلا أن الطفرة يمكن أن تحدث تلقائياً بمعدل يتراوح بين 10^{-7} إلى 10^{-11} لكل تضاعف. وعلى ذلك فإن الخلايا لا بد من امتلاكها جهازاً أنزيمياً خاص يعمل على تصليح المواقع المتضررة ويسمح أيضاً للخلايا الطافرة بإصلاح أخطائها الوراثية. يعتبر نشاط أنزيم الهدم الداخلي ونشاط أنزيم الهدم الخارجي ونشاط أنزيم الهدم البناء وأنزيم اللحام من أهم الأنشطة الحياتية التي تساعد في عملية إصلاح الحامض النووي. حيث إن قلة كفاءة أحد هذه الأنزيمات يؤدي إلى زيادة معدل الطفرات الوراثية عن المعدل الطبيعي. يمكن ملاحظة ذلك في الحامض النووي المايتوكونديري الذي يفتقد إلى نظام المراجعة حيث يزداد معدل الطفرات فيه عن المعدل الطبيعي. أو في الطفرات الوراثية في المورثات المشفرة لأنزيمات إصلاح الحامض النووي أو تضاعفه كما هو الحال في الطفرات **mut H5** التي لها علاقة ببروتينات تقوم بوظائف في عملية إصلاح ازدواج القواعد غير

الصحيحة (mismatch repair). يمكن تصور الأضرار التي تحدث في الحامض النووي لخلايا الجلد عند تعرضه لأشعة الشمس حيث يتم امتصاص الأشعة الفوق بنفسجية عند طول موجي 260 نانوميتر ما لم تمتلك الخلايا جهازاً كفءً لتصليح الحامض النووي. إن إشعاع الأشعة الفوق بنفسجية بهذا الطول يتم امتصاصه بقوة من قبل قواعد الحامض النووي مؤدياً إلى حصول اتحاد كيميائي ضوئي (photochemical fusion) لاثنين من قواعد البيرميدين المتجاورة شكل (9 - 15) وبالتالي فإن التعرض اليومي للضوء العادي يؤدي إلى تكوين الآلاف من الدايمرات كل يوم حيث يتم التخلص منها عن طريق نظام إصلاح الحامض النووي الأنزيمي الذي يفتقده المصابين بمرض الجفاف الجلدي (Xerodrema pigmentosum).



شكل (9 - 15) : أثنان من دايمرات البايريميدين الناتجة بسبب التعرض للأشعة الفوق بنفسجية.

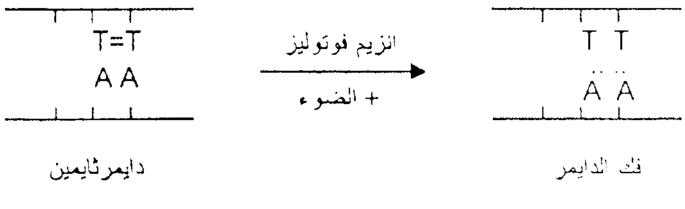
آليات إصلاح أضرار الحامض النووي

نظراً لاختلاف آليات حصول الأضرار الوراثية فإن هناك عدة طرق لإصلاح هذه الأضرار يشترك فيها أنواعاً مختلفة من الأنزيمات. يتم إصلاح الحامض النووي عن طريق تفاعلات كيميائية ونظرا لاختلاف آليات حصول الأضرار وأختلاف تفاعلات إصلاح الحامض النووي فقد تم تمييز أربعة أنواع من طرق إصلاح الحامض النووي وهي :

1. تفاعل التنشيط الضوئي **Photoreactivation repair**.
2. الاستئصال **Excision repair**.
3. إزالة المجاميع الكيميائية **Chemical groups removing**.
4. إصلاح الحامض النووي للاتحادات الجديدة **Recombinational repair**.

تفاعل التنشيط الضوئي

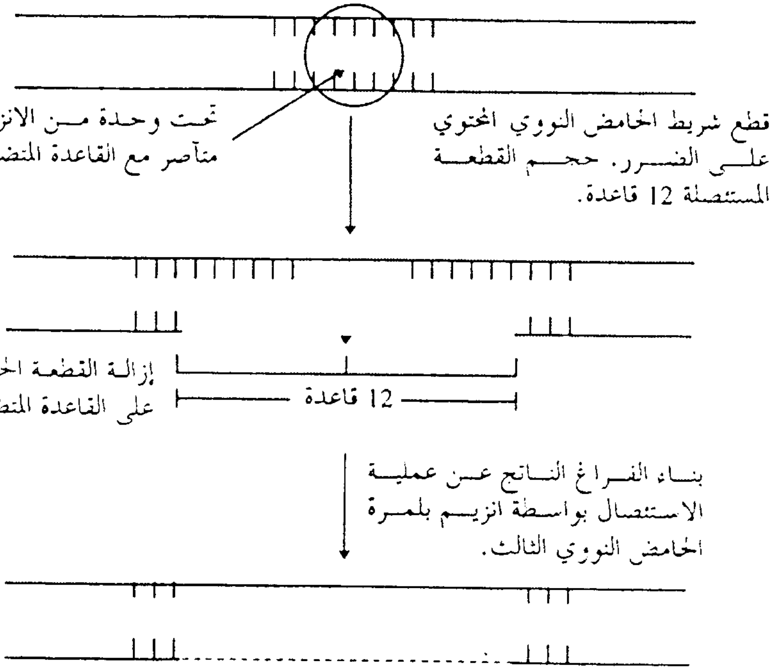
إن دايمرات البيرميدين المتكونة بسبب إشعاعي أو كيميائي يتم إصلاحها عن طريق التخلص من الروابط غير الطبيعية المكونة للدايمر. تعتبر مثل هذه الروابط هدفاً مهماً لأنزيم الفوتوليز (photolyase) الذي يعمل على الارتباط مع الدايمر مؤدياً إلى فك الترابط مستخدماً الضوء المرئي الذي يساعد على تغيير حلقة السايكلوبيوتين إلى قاعدة بيرميدين في عملية تدعى بالتنشيط الضوئي (photoreacitivation) شكل (9 - 16).



شكل (9 - 16) : إزالة الأواصر المكونة لدايمر الثايمين بواسطة أنزيم الفوتوليز **Photolase** بوجود الضوء الاعتيادي.

الاستئصال

هناك أنزيم آخر يعمل على فك روابط الدايمرات ولكنه غير متخصص لإصلاح الدايمرات الناشئة عن الأشعة الفوق بنفسجية فقط ولكن أيضاً يتحسس جميع أضرار الحامض النووي. يؤدي هذا الأنزيم عمله بطريقة الاستئصال (Excision) ويدعى بأنزيم الهدم الداخلي UVrABC. يتكون هذا الأنزيم في بكتريا القولون من ثلاثة تحت وحدات تشفر في ثلاث مورثات هي UVrA, UVrB, UvrC. كان يعتقد ولسنوات طويلة أن هذا الأنزيم يعمل على تكوين قطع واحد في منطقة الضرر حيث تمثل نهاية القطع مكان عمل أنزيم بلمرة الحامض النووي الثالث الذي يقوم بإزالة الجزء المتضرر. بقيت هذه الآلية غير معروفة حتى ظهور تقنيات الهندسة الوراثية التي سمحت بهندسة هذه المورثات وبالتالي الحصول على نواتجها من البروتينات بصورة نقية. إن استخدام هذه البروتينات مختبرياً بمزجها مع حامض نووي يحتوي على دايمرات بيردين أدى إلى قطع الجزء المتضرر من الجانبين مطلقاً قطعة مكونة من 12 قاعدة تاركاً فراغاً يعمل أنزيم بلمرة الحامض النووي الثالث على إملاءه ثم لحام نهايتيه بأنزيم اللحام شكل (9 - 17).



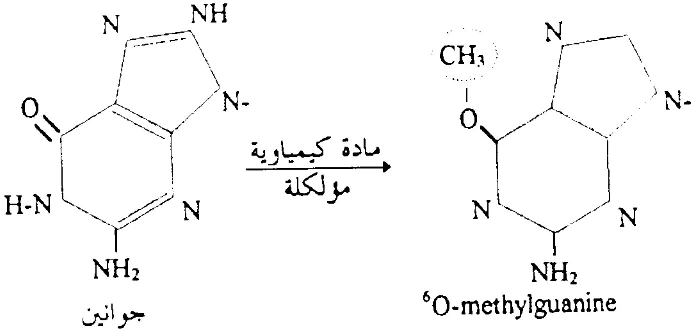
شكل (9 - 17) : استئصال الدايمر والمناطق المجاورة باستخدام نشاط الهدم الداخلي لأنزيم **UvrABC**.

على الرغم من وجود نشاط تصليح الأضرار الوراثية (المراجعة) إلا أن درجة الضبط **Accuracy** الخاصة بحصول التضاعف بأقل ما يمكن من الأخطاء الوراثية في بكتريا القولون تعود لأنزيم تصليح الخطأ **(Mismatch correction enzyme)** المشفر بالمورثات **mut H, L, S** . يعمل هذا الأنزيم على مسح الحامض النووي الجديد المتضاعف لمعرفة الأخطاء الوراثية الناتجة عن أخطاء ازدواج القواعد . ثم يقوم باستئصال القطعة الحاوية على الضرر من شريط واحد من المزدوج . يتم قطع هذه المنطقة من خلال أقرب موقع ذو تتابع **GATC** لغاية القواعد المتضررة أو المزدوجة خطأ . وفي حالة ميثلة قاعدة الادنين في هذا التتابع بواسطة أنزيم الميثلة **(Methylase)** بحيث تصبح **N-6** - مثيل ادنين

فإن الأنزيم لا يتمكن من إحداث القطع في هذا التتابع. (N6-methyladenine)

إزالة المجاميع الكيميائية

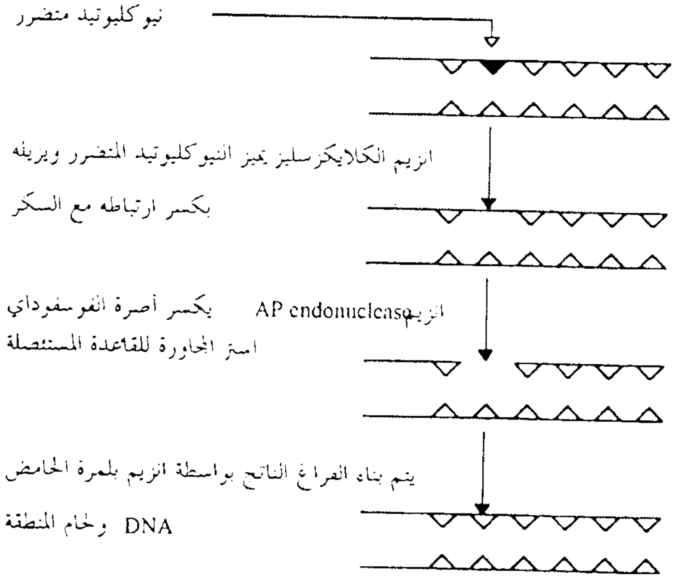
أما بالنسبة للأضرار الناتجة عن الالكلة **(Alkylation)** والميثلة **(Methylation)** حيث يتم خلالها نقل مجموعة اثيل أو مثيل للموقع النشط في القواعد والفوسفات المكونة للعمود الفقري للحامض النووي. يعتبر الجوانين الأكثر عرضة لحصول الميثلة فيه حيث تحصل لذرة الأكسجين التابعة لذرة الكربون السادسة مؤدياً إلى تكوين 6-أوكسجين – مثيل جوانين **(O6-methylguanine)** الذي يتمكن من الازدواج مع الثايمين مؤدياً إلى تغيير الزوج القاعدي **GC** إلى **AT** عند تضاعف الحامض النووي شكل (9 - 18) .



شكل (9 - 18) : تأثير المواد الكيميائية المؤلكة في إنتاج الـ O6-methylguanine .

يتم إزالة مثل هذه الأضرار باستخدام الأنزيم 6- أوكسجين - مثيل جوانين–مثيل ترانسفيريز **(O6-methylguanine methyltransferase)** (المشفر من قبل المورث **ada**) الذي يميز التركيب **(O6-methylguanine)** ويزيل مجموعة المثيل عبر نقلها إلى وحدات الأنزيم. كما أن نفس الأنزيم يزيل مجاميع الاثيل من فوسفات هيكل الحامض النووي. أما إزالة مجاميع الالكيل فيتم عبر تكوين كمية كبيرة من الأنزيم السابق الذي يعمل على تنشيط أنزيم الكلايكوسيليز

(Glycosylase) الذي يقوم بإزالة القواعد المؤلكلة **(Alkylated bases)** من هيكل الحامض النووي . يتم إيقاف نشاط كل من أنزيم مجاميع الايثيل والميثيل وأنزيم إزالة مجاميع الالكيل عند حصول طفرة في المورث **ada** المشفر لها . بالإضافة لنشاط أنزيم الكلايكوسيليز فإن له نشاطاً آخر وهو أنه قادر على فصل القاعدة غير الطبيعية المفردة وإزالتها تاركاً هيكل السكر–فوسفات–فوسفات سليماً . إن الثغرة المتروكة تدعى بموقع **AP site Ap** مختصرة لكلمة **Apurnic** (فقدان **A** أو **G**) وكلمة **Apyrimidinic** (فقدان T أو C)] .يتم تمييز هذه الثغرة بواسطة أنزيم الهدم الداخلي **AP- (Ap-endonuclease)** الذي يقطع الهيكل تاركاً نهاية البادئة التي سيقوم أنزيم بلمرة الحامض النووي عندها بتأسيس تضاعف لتعويض القواعد المفقودة شكل (9 - 19) .



شكل (9 - 19) : إصلاح الحامض النووي بالاستئصال باستخدام أنزيم الكلايكوسيليز **Ap-endonuclease.**

هناك العديد من أنزيمات الكلايكوسيليز التي تعمل على إزالة أضرار معينة بشكل خاصة. فمثلاً أنزيم يوراسيل -DNA جلايكو سيليز (uracil-Dᴺ A-glycosylase) يعمل على تصليح الأضرار الناشئة عن عدم استقرار صورة السيتوسين. حيث يتمكن السيتوسين بالتشكل كيوراسيل بسبب عدم استقراره ويدخل هذا الشكل في التضاعف بدلاً من الشكل الطبيعي السيتوسين. ويقوم هذا الأنزيم بإزالة مثل تلك الأخطاء وإتاحة الفرصة أمام السيتوسين للإحلال في موقعه الصحيح.

إصلاح الحامض النووي للاتحادات الجديدة

بالإضافة للطرق السابقة فإن هناك مجموعة من المورثات تدعى بمورثات النجدة (SOS) التي تتضمن المورثات Uvr A,B,C السابق توضيحها التي لها دوراً هاماً في عملية إصلاح الحامض النووي. تشتمل هذه المجموعة على 15 مورثاً جدول (2 - 9) يتم تحفيزها عند حصول توقف عمل أنزيمات بلمرة الحامض النووي كما هو الحال عند وجود دايمرات في طريق الأنزيم حيث تتوقف شوكات التضاعف في هذا الموقع وتبدأ بتأسيس منطقة بناء بعيداً عن منطقة الدايمر تاركة هذا الموقع يرتبط مع بروتين Rec A (راجع الارتباط والعبور– الفصل الثامن). يعمل هذا البروتين على إزالة المثبط Lex A الخاص بإيقاف عمل مورثات النجدة SOS حيث يتم إطلاق عمل هذه المورثات بعدها. تشتمل هذه المجموعة بالإضافة لمورث uvr A,B,C السابق ذكرها على مورثات تشفر بروتينات لها دور في عملية إصلاح الأضرار الناتجة عن إصلاح الحامض النووي (Error-prone DNA) من قبل أنزيمات أخرى وكذلك إصلاح الأضرار الناتجة عن الكيميائيات المطفرة. تدعى هذه المورثات بمورثات Umu C, D. ويعتقد بأن البروتين Rec A يتآصر مع بروتينات هذه المورثات لتوجيه إلى موقع الضرر. كما أن هناك مورثان إضافيان مسؤول عن إصلاح الحامض النووي للاتحادات الجديدة (Recombinational DNA) وهو المورث Rec-N. بينما

يعتقد بأن المورث الثاني SULA يشفر لبروتين يعمل على إيقاف انقسام الخلية لإعطاء فرصة لإصلاح أضرار الحامض النووي. وبالإضافة لهذه المورثات فإن هناك عدداً من المورثات التي لا تزال لم يثبت أهميتها ولكن هناك شكوك حول دورها في اصلاح الحامض النووي.

جدول (2 - 9) : مورثات النجدة SOS التي تتحفز للإصلاح عند حدوث أضرار في الحامض النووي.

المورث	أهميته في إصلاح الحامض النووي DNA
Uvr A Uvr B Uvr C	تشفر ثلاث وحدات ثانوية لأنزيم هدم داخلي.
Umu C Umu D	تشفر بروتينات لها أهمية في إصلاح أضرار الكيمياويات المطفرة وأضرار أخطاء الأيض الموروثة.
Sul A	يشفر بروتين يوقف انقسام الخلية لإصلاح الأضرار.
Ssb UvrD HimA	تشفر بروتينات لها أهمية في استقرار حلزون الحامض النووي DNA.
UvrN	يشفر بروتين له أهمية في إصلاح الاتحادات
Din A, B, B,F	غير معروفة الوظيفة حالياً.

الفصل العاشر
الحامض النووي البلازميدي والمايتوكوندري والبلاستيدي

المحتويات

- بلازميدات الخصوبة
- العناصر الانتقالية وعناصر الإدخال
- الحامض النووي الما يتوكوندري
- الحامض النووي البلاستيدي

مقدمة :

البلازميدات هي جزيئات حامض نووي منقوص الأكسجين حلقية لها القدرة على التضاعف المستقل عن الصبغيات. لذلك يمكن اعتبارها وحدة تكرار (**Replicon**). يتراوح حجم البلازميد من **0.05** إلى **10 - 20%** من حجم الصبغي. شوهدت البلازميدات في عدة مئات من البكتريا ومن المحتمل وجودها في كل أنواع البكتريا. تعتبر البلازميدات مواد وراثية غير ضرورية لنمو الخلايا ولكنها قد تحمل بعض المورثات الضرورية للنمو في ظروف خاصة. إن تنمية البكتريا الحاوية على البلازميدات مع أخرى خالية منها سيؤدي إلى إنتقال البلازميدات إلى البكتريا الخالية. إلا أن عدداً قليلاً جداً يتراوح حوالي **100%** من البكتريا النامية ستفشل في الحصول على البلازميد. يعتمد البلازميد في تضاعفه على أنزيمات تضاعف الحامض النووي الخاصة بالخلية البكترية التي يتواجد فيها. لكن عملية تأسيس التضاعف يتم السيطرة عليها من قبل مورثات البلازميد. وكنتيجة لذلك فإن عدد نسخ البلازميد (**copy number**) تختلف من خلية إلى أخرى ومن بلازميد إلى آخر. تحتوي بعض الخلايا على أكثر من **50** نسخة تدعى هذه بالبلازميدات عالية النسخ (**High copy number plasmids**) أو على نسخة أو نسختين. يمكن مضاعفة أعداد البلازميدات في الخلايا عن طريق مثبطات لعملية بناء البروتين البكتيري في الوسط الزرعي. تعمل هذه المثبطات على منع تضاعف الصبغي البكتيري من خلال إيقاف تكوين بروتينات ضرورية لتضاعفه ولكنها لا تؤثر

على تضاعف البلازميد وبالتالي فإن عدد نسخ البلازميدات في هذه الخلايا يمكن أن يصل إلى الآلاف. لقد أزدادت الأهمية الحيوية للبلازميدات وخصوصاً بعد التعرف وتشخيص العديد منها في البكتريا المختبرية والصناعية نتيجة احتوائها على مورثات لها أهمية تطبيقية طبية وصناعية كما هو الحال في البلازميدات المقاومة (Resistant plasmids) التي تعمل على اكساب الخلايا البكتيرية القدرة على مقاومة المضادات الحيوية. وقد يتخصص البعض من هذه البلازميدات في مقاومة عدد من المضادات الحيوية فيما تحتوي أخرى على مورث واحد مقاوم لمضاد حيوي واحد. ومن أمثلة هذه البلازميدات بلازميدات مقاومة الستربتومايسين والامبسلين والتتراسايكلين وغيرها. كما أن هناك مجموعة بلازميدات طبية أخرى تدعى بالبلازميدات الكوليسينية (Col-plasmids) (Colicin plasmids). تنتج هذه البلازميدات مادة الكولسين البروتينية القادرة على قتل الخلايا البكتيرية ذات العلاقة التطورية المقاومة أو أفراد نفس النوع الحساسة والتي تفتقر لهذا البلازميد. كذلك البلازميدات القادرة على قتل بكتريا الكوليرا (Vibrio Cholerae). أما في المجال الصناعي فإن هناك أنواعاً من البكتريا كبكتريا الحليب العنقودية Streptococcus Lactis التي تحتوي على بلازميدات قادرة على إنتاج أنزيمات ذات أهمية كبيرة في عمليات التخمر وصناعة الجبن. تلعب تلك البلازميدات في الوقت الحاضر دوراً كبيراً في الصناعات الغذائية والطبية حيث يتم استخدامها لأجل هندستها وراثياً داخل المختبر والاستفادة من المورثات الحاوية عليها والتي يمكن استخدامها كدلائل لتمييز الخلايا المهندسة وراثياً وباستخدام أوساط زرعية انتخابية خاصة.

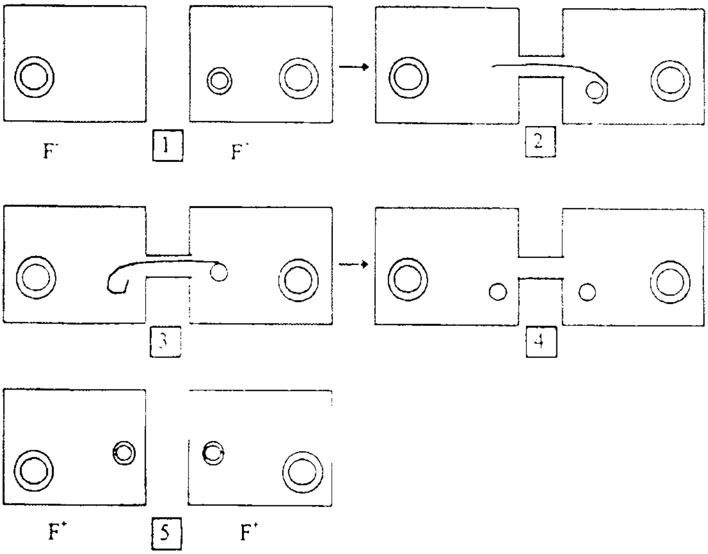
تقسم البلازميدات اعتماداً على قدرتها على إحداث الاقتران من عدمه. فهناك بلازميدات اقتران وبلازميدات غير مقترنة. ويمكن إيجاد كلا النوعين في البلازميدات المقاومة أو بلازميدات F (بلازميدات مشفرة لبروتين يساعد

على اتحاد البكتريا) أو البلازميدات الكوليسينية في خلية بكتيرية واحدة. كما أنه لا بد التمييز بأنه ليس كل جزيئات الحامض النووي الحلقية في البكتريا هي بلازميدات حيث أن البلازميدات هي الوحدات الوراثية الخاصة التي لها القدرة على التضاعف المستقل عن الصبغي البكتيري.

بلازميدات الخصوبة Fertility Plasmids (F-plasmids)

يطلق عليها أيضاً البلازميدات الجنسية (Sex plasmids) لقابلية البكتريا الحاوية عليها على الاقتران (Conjugation) مع الافراد الخالية منها. يبلغ طول القواعد النيتروجينية المكونة لهذه البلازميدات حوالي 94500 زوج قاعدي ويرمز للبكتريا الحاوية على هذه البلازميدات بـF^+ بينما يرمز للبكتريا غير الخالية منها بـF^-. تتمكن هذه البلازميدات من التضاعف بطريقة مستقلة عن تضاعف البكتريا (Autonomous) أو أنها تندمج مع الحامض النووي البكتيري للتضاعف معه (Integrated). عند تلامس خلية بكتيرية F^+ مع أخرى F^- تعمل على تكوين أنبوب لترتبط مع الخلية F^- ينتقل بعدها أحد أشرطة مزدوج الحامض النووي البلازميد F^+ عبر أنبوب الاقتران ليدخل الخلية البكتيرية F^- عندها يتضاعف كلا الشريطين في الخليتين مكوناً بلازميد F^+ مزدوج الشريط في كل من الخلية الواهبة والمستلمة. بذلك تتحول البكتريا F^- إلى خلية بكترية F^- شكل (10 - 1).

تتمكن بلازميدات الخصوبة من الاتحاد مع الحامض الصبغي البكتري من وقت إلى آخر. ترجع قابليتها الاتحادية هذه إلى وجود منطقة تتابعات في الحامض النووي البلازميدي تدعى بالعناصر الانتقالية(Transposable elements) أو تتابعات الادخال (Insersion sequences) (IS) متممة لتتابعات مماثلة أخرى موجودة في الحامض النووي البكتيري. يتم الاتحاد بين بلازميد الخصوبة F والصبغي من خلال فك حلقة الحامض النووي بالأنزيمات القاطعة ومن منطقة العناصر الانتقالية في كل من البلازميد والصبغي. بعدها يتم التحام أطراف



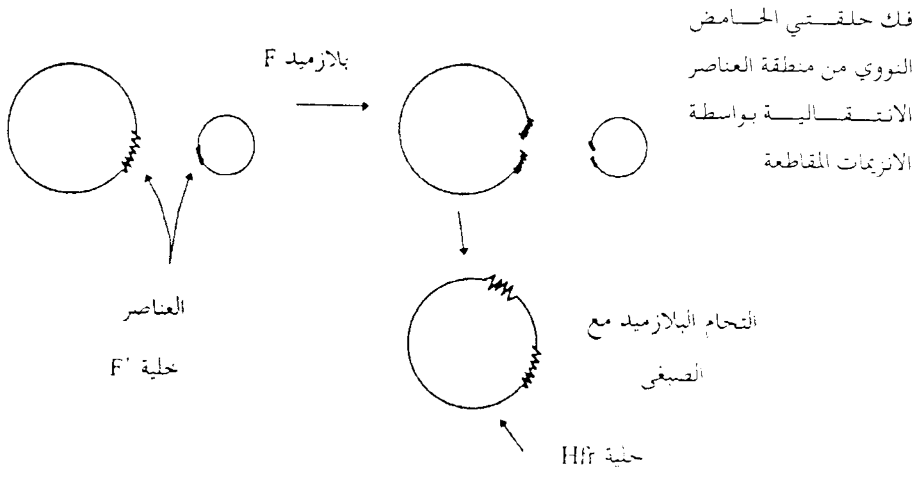
شكل (10 - 1) : اقتران خلايا بكتيرية من النوع F^+ مع خلايا من النوع F^- حيث يتم انتقال بلازميد الخصوبة إلى الخلايا F^- لتتحول بعدها هذه الخلايا إلى خلايا F^+.

العناصر الانتقالية لكل من البلازميد والصبغي. تدعى عندئذ الخلية بالخلية ذات الاتحاد العالي التردد (High frequency recombination) (Hfr) شكل (10 - 2) شكل (10 - 3).

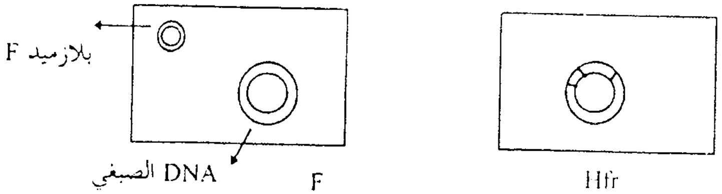
إن عملية الاتحاد هذه تمكن الخلية من مضاعفة البلازميد عند تضاعف الحامض النووي الصبغي.

تتمكن هذه الخلايا من نقل البلازميد إلى الأجيال الجديدة. كما تتمكن من نقل بلازميد الخصوبة إلى خلايا F^9، F^- مع بعض الفروقات. إذ لا يتحول الحامض النووي البلازميدي في الأخيرة إلى حلقة بل يبقى مندمجاً مع الصبغي وينتقل سوية معه إلى الخلية الثانية شكل (10 - 4). كما أن هناك فروقاً أخرى هي :

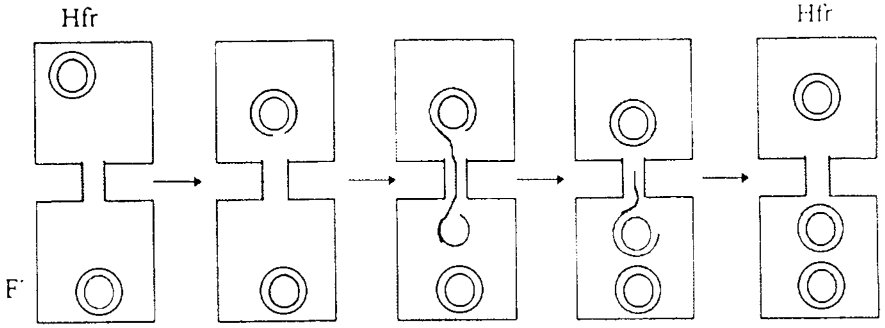
1- إن عملية انتقال Hfr إلى الخلية F^- تستغرق حوالي 100 دقيقة مقارنة بدقيقتين في أقتران خلية F^+ مع F^-.



شكل (10 - 2) : مراحل اتحاد الحامض النووي البلازميدي لبلازوميد الخصوبة **F** مع الحامض النووي الصبغي لخلية بكتريا وتحولها من خلية **F** إلى خلية اتحاد عالي التردد **Hfr.**



شكل (10 - 3) : تحول خلايا **F+** إلى خلايا **Hfr** نتيجة اندماج الحامض النووي البلازميدي **F** مع جزيئة الحامض النووي الصبغي للخلية .



شكل (10 - 4) : الاقتران بين خلية Hfr مع أخرى -F ويلاحظ انتقال شريط الحامض النووي مفرد من الخلية Hfr إلى الخلية -F لا يلبث أن يزدوج ويتحولق لتتحول خلية -F إلى خلية HFr.

ويعزي هذا الوقت الطويل في الحالة الأولى إلى حجم الحامض النووي الصبغي.

2- تنتقل جزيئة Hfr من الخلية إلى خلية -F بواسطة عملية تعتمد على حركة جزيئات المذيب بين الخليتين وتدعى هذه العملية بحركة بروان (Brownain motion).

3- لا تتحول جميع الخلايا المستلمة -F إلى خلايا +F عند الاقتران مع خلية Hfr وذلك لعدم اكتمال انتقال كافة أجزاء شريط الحامض النووي البلازميدات إلى الخلية الجديدة بسبب حصول الانفصال في بعض الأحيان قبل اكتمال عملية الانتقال فيما تتحول الخلايا -F إلى خلايا +F عند الاقتران.

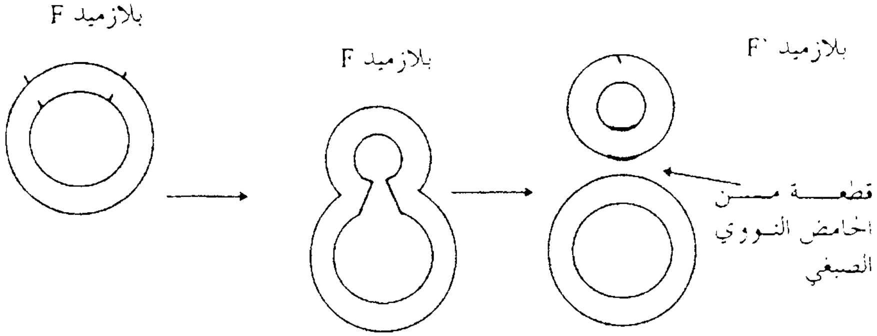
4- في عملية الانتقال بين Hfr و F^- فإنه قد تحصل خلايا F^- على قطع صبغية حاوية على مورثات مختلفة العدد تلتحم مع جزيئة الحامض النووي التابعة لها. وبذلك تحصل اتحادات بكترية جديدة فيما لا يتم ذلك في حالة اقتران F^+ مع F^-.

لقد جاءت معظم المعلومات حول الاقتران بين خلايا Hfr و F من التجارب التي أجراها العالمان وولمان وجاكوب عام **1961** اللذان قاما بالتهجين بين خلايا Hfr ذات الطراز الوراثي (thr- -leu- - azi-r - TI-r - Lac-gal- -str-r) [str-s/str-r : مورثات مقاومة حساسية الستربتومايسين، azi-s.azi-r : مورثات مقاومة وحساسية الازاسايتدين، tl-s/Tl-r مورثات مقاومة وحساسية للعاثي Ti thr-.leu-. gal-: طفرات العوز الغذائي للجلاكتوز والليوسين والثيرونين، Lac مورث القدرة على استخدام اللاكتوز] حيث أن مورثات Leu. thr مسؤولان عن انتاج حامض الثيرونين والليوسين على التوالي بينما الازواج الآليلية azi-s/azi-r و str-s/str-r وtI-s/TI-r تسيطر على مقاومة الحساسية للازاسايتدين Azacytidin والعاثي T1والستربتومايسين على التوالي. فيما تحكم القدرة (+) أو عدم القدرة (−) على استعمال الجلوكوز والجلاكتوز. يتم المزج بين الخلايا لأجل التزاوج وتترك لفترة معينة يتم بعدها رجها عدة مرات بقوة لأجل تحطيم أنابيب الاقتران وانفصال الخلايا. تؤخذ عينة أو نموذج من المزرعة وتنمى على أوساط انتخابية زرعية حاوية على الستربتومايسين وخالية من الأحماض الأمينية الثيرونين والليوسين. إن الأوساط الانتخابية سالفة الذكر سوف تؤدي إلى نمو خلايا الاتحادات الجديدة التي تحمل المورثات مقاومة الستربتومايسين str-r. أما الخلايا Hfr الواهبة والخلايا F فإنها لا تتمكن من النمو لوجود الستربتوماسين الذي يؤدي إلى قتل خلايا Hfr الواهبة بينما تموت خلايا F لعدم وجود الأحماض الأمينية الثيرونين والليوسين في الوسط الزرعي. وعلى ذلك فإن الاتحادات الجديدة ذات الصفات الوراثية Leu+. Leu+. Str-r

تنتقل إلى أوراق الترشيح ليتم طبعها كمزارع على أطباق زرعية انتخابية مختلفة أخرى لتشخيص المورثات المنتقلة من الخلايا Hfr إلى خلايا الاتحادات الجديدة. تحتوي هذه الأوساط الزرعية الانتخابية إما على الازاسايتدين أو عدمه لتشخيص الخلايا الحاوية على المورثات azi-r أو azi-s أو تحتوي على العاثي T1 لعزل الخلايا الحاوية على المورثات Tl-r وtl-s. أو مقواة باللاكتوز لعزل الخلايا الحاوية على المورثات gal+. gal-. أو مقواة باللاكتوز لعزل الخلايا الحاوية على المورثات Lac+ و Lac- .

لقد وجد من خلال أخذ نماذج من عينات الاقتران بأوقات مختلفة وزرعها على الاوساط الغذائية الانتخابية بأن خلايا الاتحادات الجديدة تحصل على المورثات من الخلايا Hfr الواهبة بمراحل وترتيب معين حيث لوحظ بأن المورثات thr+. Leu+. Str-r تنتقل بعد ثماني دقائق ونصف إلى الخلايا المستلمة من النوع F بينما يبدأ المورث azi-s بالظهور في الخلايا الاتحادية الجديدة بعد مرور تسعة دقائق والمورثات gal+. Lac+. Tl-s بعد 11 دقيقية و18 و 25 دقيقة على التوالي شكل (10 - 5) . يتمكن بلازميد الخصوبة F من الانفصال من جزيئة الحامض النووي خلية Hfr باستخدام نفس المناطق التي استخدمت في الالتحام (العناصر الانتقالية) مع حصول بعض المتغييرات في جزيئة الحامض النووي البلازميدي حيث تبقى قطع من الحامض النووي الصبغي في البلازميد F المتحرر. تختلف أطوال هذه القطع من مورث واحد إلى عدة مئات من المورثات التركيبية ويدعى مثل هذا البلازميد بالبلازميد المميز (F-prime) ويرمز له بالبلازميد، F' تمييزاً له عن البلازميد F شكل (10- 5) .

شكل (10 - 5) : مراحل وترتيب انتقال المورثات azi-s+. Tl-s. Lac+. Gal+
بعد اقتران خلايا Hfr مع-F.



شكل (10 - 6) : نشوء البلازميد، F^9 من خلايا Hfr ويلاحظ أن البلازميد المتحرر يحتوي على قطع من الحامض النووي الصبغي.

إن اقتران البلازميد، F^9 يتم بنفس آلية اقتران خلايا +F و -F أو Hfr مع -F
إن تكرار انفصال البلازميدات وتحررها بالطريقة السابقة يمكن أن يهيئ مجموعة من البلازميدات الحاوية على قطع متكاملة من المورثات التي يمكن استخدامها في عزل المورثات وإثبات الأليلات وتجارب الهندسة الوراثية.

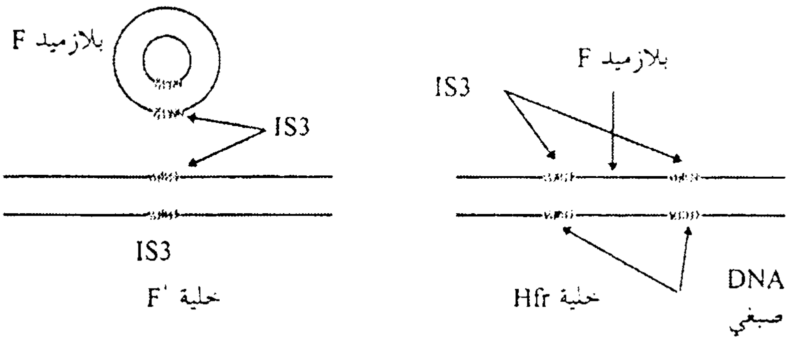
العناصر الانتقالية وعناصر الإدخال Transposable and insersion elements

أثبتت العديد من الدراسات بأن قابلية الاندماج لدى الايبوسومات يعود أصلاً إلى تتابعات صغيرة من الحامض النووي تسمى بعناصر الإدخال ويرمز لها (IS-elements). يبلغ طول هذه التتابعات حوالي 800 - 1400 زوج قاعدي. يوجد العديد من هذه التتابعات ويرمز لها بأرقام. فهناك التتابع ISI والذي يبلغ طوله 768 زوج قاعدي و IS² و IS³و IS⁴ و IS⁵ التي يتراوح طولها بين 1200 - 1400 زوج قاعدي. تقع هذه التتابعات في مناطق مختلفة من الايبوسومات وكذلك على صبغي العائل. تمتلك هذه الترددات قابلية الحركة والانتقال من موقع إلى آخر ضمن الصبغي أو الإنتقال إلى صبغي آخر مختلف. لذلك فإن لها أهمية كبيرة في حصول الاتحادات الوراثية الجديدة بسبب قابليتها على الادخال والحركة. فهي على سبيل المثال تستطيع التحرك والانتقال من صبغي خلية العائل إلى البلازميد أو العاثي. كما أن لها القدرة على تحطيم العمل الوظيفي لبعض المورثات مسببة الطفرات الوراثية.

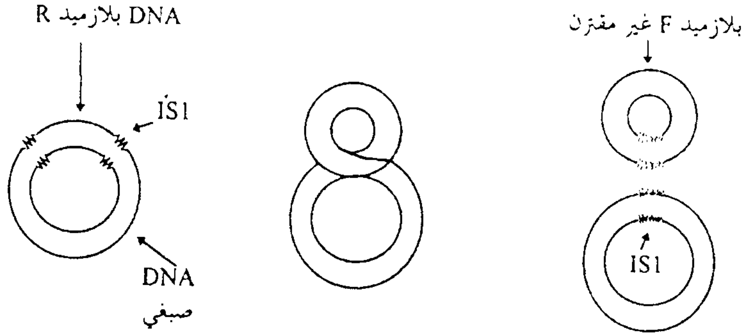
يختلف عدد نسخ عناصر الاندماج من بكتريا إلى أخرى. فمثلاً في بكتريا القولون السلالة K12 تحتوي على ثمانية نسخ من العنصر IS1وخمسة نسخ من العنصر IS2 ونسخة واحدة أو اكثر من العناصر IS4-IS3. أما العناصر الانتقالية Tn فهي وحدات معقدة مكونة من أكثر من 2000 زوج قاعدي قادرة على التنقل والحركة بطريقة مماثلة لعناصر الادخال. إلأ أن العناصر الانتقالية تكون حاوية على ورث مقاوم لمضاد حيوي معين أو أكثر.

تشترك العناصر الانتقالية Tnوعناصر الادخال Is-E في الكثير من الصفات حتى يمكن اعتبارها عناصر انتقالية واحدة حيث تمتلك جميع هذه العناصر على تتابعات متشابهه طرفية وفي كلا الطرفين تدعى بالتكرارات النهائية أو الطرفية (Terminal repeats). تحتوي هذه التكرارات على 9 - 40 زوج قاعدي يمكن قراءته بنفس التتابع ومن الأتجاهين حيث تدعى هذه التتابعات

بالتكرارات المنعكسة (Inverse repeats) . تلعب هذه التكررات دوراً رئيسياً في عملية الانتقال شكل (10 - 7) . بالإضافة إلى استخدام عناصر الإدخال في حصول اقتران الحامض النووي البلازميدي مع آخر صبغي فإن عناصر الإدخال هذه يمكن استخدامها أيضاً في اندماج أيبوسومين مع بعضهما أو انفصالهما شكل (10 - 8) .



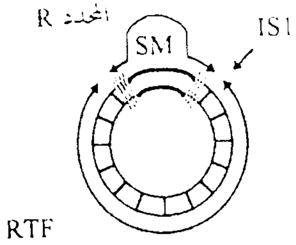
شكل (10 - 7) : اندماج البلازميد F مع الحامض النووي للبكتريا ويلاحظ توافق عناصر الادخال **IS3** بين البلازميد والصبغي وتحول الخلية من **F+** إلى **Hfr** .



شكل (10 - 8) : التحام وانفصال بلازميد المقاومة من الحامض النووي الصبغي للبكتيريا باستخدام تتابعات الادخال **IS1** الموجودة في كل من البلازميد والبكتريا .

تمتلك جميع بلازميدات المقاومة (والتي لها قابلية الاقتران والتصرف كأيبوسومات) R-plasmids مقطعين الأول يتضمن المنطقة الحاوية على مورث مقاومة المضاد الحيوي يدعى بعامل محدد المقاومة (Resistance determinant) ويرمز له R-determinant بينما يمثل المقطع الثاني المورثات المتضمنة في عملية انتقال الحامض النووي المقترن ويدعى بعامل انتقال المقاومة(Resistance transfer factor) ويرمز له RTF شكل (10 - 9) . يتشابه مقطع عامل انتقال المقاومة RTF في أغلب بلازميدات المقاومة المقترنة .

كما تتماثل العناصر الانتقالية والاندماجية بدرجة كبيرة في التركيب في الكائنات بدائية النوى كالبكتريا وحقيقية النوى كالخميرة والدروسوفيلا .



شكل (10 - 9) : الوحدة الوراثية للبلازميد R ممثلة في المقطع محدد R الذي يحتوي على مورث مقاومة الستربتومايسين والمقطع RTF الذي يمثل المورثات المتضمنة في عملية الاقتران .

الحامض النووي المايتوكوندري Mitochondrial DNA (mtDNA)

يعتبر الحامض النووي المايتوكوندري الذي يرمز لها mtDNA أحد أجزاء الحامض النووي الخلوي الذي يقع خارج النواة . يتميز هذا الحامض بكونه مكون من جزء صغير ثنائي الأشرطة حلقي ويختلف حجمه من كائن إلى

آخـر. إلا أنه وجـدة أنه يبلغ 16.596 زوج قاعـدي في الإنسـان بينما يبلغ في الخمائر حوالي خمسة مرات ذلك (حوالي 50 كيلو زوج قاعدي) ويمثل أكبر مجين مـايتوكونـديري في الطبيـعة. لكن في كل الأحوال فإن حجم مجين المايتوكونديريا يساوي تقريباً مجين البكتريا الصغيرة الحجم ويمثل بالنسبة للخـمـائر 10 - 20% من مجين خلية الخميرة. يختلف الحامض النووي المايتوكونديري في بعض خصائصه الفيزيائية عن نظيره الصبغي.

إذ يكون أقل كثافة حيث تبلغ كثافته في الخميرة حوالي 1.683 غم/سم3 مقارنة بـ 1.699 غم/سم3 بالنسبة للحامض النووي الصبغي. كما أنه يحتوي على نسبة عالية من أزواج القواعد GC حيث تبلغ حوالي 40%. يتضاعف الحامض النووي الميتوكونديري بصورة مستقلة عن الحامض النووي الصبغي شأنه شأن البلازميد والبلاستيدات. إذ يمكن للميتوكونديريا إن تتضاعف على الرغم من عدم انقسام الخلايا. وهذا ما يؤكد بأن البروتينات اللازمة لتضاعف الخلية تختلف ولو جزئياً عن تلك المستخدمة في تضاعف الحامض النووي المايتوكونديري. كما أنه يستغرق وقتاً طويلاً لإكماله بحيث يساوي أكثر من الوقت اللازمة لدورة خلوية كاملة.

ND1	________UA	AAAn
ND2	________U	AAAn
ND3	________U	AAAn
ND4	________U	AAAn
Cytb	________U	AAAn
COIII	________U	AAAn
ATPase6	________UA	AAAn

شكل (10-10): الحامض النووي المرسال المايتوكونديري في الإنسان ويلاحظ تكون تتابعات التوقف UAA بعد إضافة ذيل متعدد الادنين (يمين الخط المتقطع).

وعلى الرغم من حجم الحامض النووي الميتوكونديري إلا أنه لا يشفر إلا

لعدد قليل من البروتينات (سبعة بروتينات في الخميرة) وجزيئتان من الحامض النووي الريبوسومي (S 15و S 21) وجميع جزيئات الحامض النووي الناقل اللازمة لتصنيع هذه البروتينات (24 - 25 جزيئة حامض نووي ناقل). أما البروتينات الداخلة في الميتوكوندريا وجزيئات انزيم بناء الامينوأسيل (20 جزيئة) الموجودة فيها وجميع أنزيمات تضاعف واستنساخ الحامض النووي الميتوكوندري فإنها مشفرة في مورثات موجودة في الحامض النووي الصبغي. وعلى ذلك فإن حجم مجين الميتوكوندريا أكبر من حاجتها وهذا ما يجعل الأمر لغزاً محيراً على الرغم من وجود الكثير من التتابعات غير المشفرة في الأحياء حقيقية النوى مثل تتابعات الحامض النووي التابعي (Satellite DNA) والمتداخلات. لكن يعتقد بأن السبب ربما يعود إلى الدور التطوري للميتوكوندريا من خلال إضافة تتابعات متطورة جديدة للأحياء. حيث أن معدل الطفرات الوراثية فيها عالي. إن الحامض النووي الميتوكوندري في جميع اللبائن لا يمتلك متداخلات ضمن مورثاته إلا أنه يمكن ايجاد مثل هذه التتابعات في الأحياء حقيقية النوى البدائية. إن وجود المعدل العالي للطفرات الوراثية في الحامض النووي الميتوكوندري ساعد في دراسة بعض الجوانب الجزيئية له. فقد وجد بأن حصول الطفرات الوراثية التي تسمى أفرادها بتيت (Petite) يتميز أفرادها بصغر الحجم وقلة استفادتها من الأكسجين عند تمثل الهيدروكربونات ولا تنمو إلا بوجود وسط غذائي مقوى بالجلوكوز) ينتج عن فقدانه نشاط أنزيم أكسدة السايتوكروم (Cytochrome Oxidase) الذي يؤدي إلى تقزم هذه الخلايا. إن مثل هذه الطفرات أعطت دليلاً على أهمية هذا الحامض النووي في حصول تغيرات موروثة. كما أن الدراسات السايتولوجية لبعض الأحياء كالبراميسيوم أثبتت بأن لهذا الحامض النووي دوراً مهماً في توارث بعض الصفات كمقاومة المضاد الحيوي الارثومايسين.

يختلف الحامض النووي الميتوكوندري عن الحامض النووي الصبغي في

بعض النقاط كاختلاف قراءة الشفرة الوراثية. فقد وجد من دراسة الحامض النووي الميتوكونديري في الإنسان والخميرة بأن هناك اختلافاً في قراءة الشفرة الوراثية في الحامض النووي الميتوكونديري لهما عن الشفرات الوراثية الكونية المعروفة بالنسبة للحامض النووي الصبغي. ففي الحامض النووي الميتوكونديري في الإنسان وجد بأن هذه الاختلافات تتضمن النقاط التالية :

أ. الشفرة الوراثية UGA ليست شفرة توقف ولكنها تشفر للحامض الأميني تربتوفان ولذلك فإن مضاد الشفرة الخاص بالحامض النووي للتربتوفان الميتوكونديري يميز كلا من UGA ، UGG طبقاً لنظرية الأرجوحة (راجع الفصول السابقة).

2. الميثونين الداخلي يشفر بواسطة AUA, AUG بينما يشفر أصلاً بواسطة الشفرات AUA و AUU و AUC.

3. الشفرات AGA و AGG التي تمثل الارجنين (هناك شفرات أخرى للارجنين) تمثل بالنسبة للحامض النووي المرسال الميتوكونديري تتابعات توقف وهذا يؤدي إلى وجود أربعة تتابعات توقف في الميتوكونديريا وهي UAA. UAG. AGA. AGGويظهر بأن الحامض النووي الناقل الميتوكونديري يختلف اختلافاً جوهرياً عن جزيئات الحامض النووي الناقل الأخرى فيما يخص تنظيمه وتعامله مع الريبوسوم الميتوكونديري (Mitoribosomes). وهذا يؤكد وجود اختلاف في عملية استنساخ الحامض النووي المرسال ووظيفته وهذا الاختلاف كما يلي :

أ. يتم استنساخ شريطي الحامض النووي المرسال الميتوكونديري في منطقة المحفز الواقعة قرب منطقة أصل التضاعف لإنتاج جزيئات طويلة جداً من الحامض النووي المرسال التي تنفصل من النهاية الخامسة والثالثة للتتابعات المشفرة للحامض النووي الناقل.

2ـ شفرات التأسيس تقع مباشرة على أو مجاورة للنهاية الخامسة للحامض النووي المرسال بعد انفصاله يتم إضافة ذيل الادنين وهذا ما يؤدي إلى خلق تتابع توقف UAA سيقع مباشرة عند الارتباط مع ذيل الادنين شكل (10 - 10).

أما في الخميرة فأن الاختلاف في قراءة الشفرة الوراثية عن الشفرات الوراثية العامة يكمن في النقاط التالية:

1ـ الشفرة UGA تمثل التربتوفان بدلاً من كونها شفرة توقف.

2ـ الشفرات CUG, CUA, CUC, CUU الممثلة للحامض ليوسين تمثل الثيرونين في بعض الأحيان.

وحيث أن هناك حوالي 25 جزيئة حامض نووي ناقل مستخدمة. لذا فإنه لا بد من وجود فرصة أكثر لحدوث التأرجح تبعاً لنظرية الأرجوحة مما هي في الحامض النووي الناقل في النواة.

ـ الحامض النووي البلاستيدي Plastids DNA

اكتشف هذا الحامض نتيجة لوجود انحرافات وراثية عن النسب المندلية في بعض النباتات كما هو الحال في نبات الساعة الرابعة **Mirabilis jalapa** حيث كان هناك تدرج في ألوان الأوراق النباتية وكذلك وجود تبرقش في حاملات البذور لنباتات أخرى. وعلى الرغم من عدم توفر تفاصيل كاملة عن هذا الحامض إلا أنه لوحظ وجود العديد من النسخ منه داخل البلاستيدات. تتراوح هذه النسخ بين 30-60 نسخة بينما تحتوي بعض أنواع الطحالب على حوالي 100 نسخة في كل بلاستيدة خضراء.

يبلغ حجم الحامض النووي البلاستيدي ما يكفي لتشفير حوالي 126 بروتيناً. إلا أنه وجد بأن حوالي 12% فقط من تتابعاته كافية لتشفير محتويات البلاستيدة. إن التجارب المعملية دلت على إمكانية تمثيل البروتينات داخل البلاستيدات بوجود الادينوسين ثلاثي الفوسفات والضوء مما يدل على

امتلاكها نظاماً كاملاً لتصنيع البروتينات.

وهذا يثير الاعتقاد بأن هذا الحامض النووي ربما يحتوي على مناطق مشفرة أكثر مما موجود في الحامض النووي الميتوكونديري. إلا أن عملية تضاعفه واستنساخه لا تزال غير واضحة.

الفصل الحادى عشر

الهندسة الوراثية

المحتويات

- مقدمة
- المبادى العامة في الهندسة الوراثية
- أنزيمات الهندسة الوراثية
- أنزيمات هدم الأحماض النووية
- الانزيمات المقيدة أو القاطعة
- أنزيمات بلمرة الحامض النووي
- أنزيمات اللحام
- تحوير النهايات العمياء
- الروابط
- التوصيلات
- التذييل بالبوليمر المتجانس
- أنزيمات تحوير الحامض النووي
- أنزيمات أزالة الانطباق
- أستخلاص الحامض النووي DNA و RNA
- نواقل الهندسة الوراثية
- البلازميدات
- العاثيات
- الكوزميدات
- نواقل التعبير
- تقطيع الأحماض النووية بالانزيمات
- أستخلاص القطع المناسبة
- بنك المورثات
- حساب حجم بنك المورثات
- تشخيص الكلونات المطلوبة
- تطبيقات الهندسة الوراثية

مقدمة:

إن إعادة أكتشاف قوانين مندل عام 1900 لم يكن سوى الصيحة الأولى في المجال الوراثي التي أدت إلى فتح مجال جديد أمام العلماء كان مغلقاً تقريباً حتى ذلك التاريخ. بدأ بعده المد الوراثي في التقدم سريعاً خلال العشرة سنوات التي تلت ذلك وتكشفت عنه العديد من الحقائق التي أبهرت العالم وقدمت من خلالها التفسيرات العلمية الدقيقة لما يحدث للاختلافات بين الأنواع. كان أول فتح علمي بعد مندل هو تحديد مورثات بعض الصفات على كروموسومات حشرة الدروسوفيلا الذي قام بها العالم توماس مورجان عام 1915 والذي قاد فيما بعد إلى وضع أول خريطة وراثية. تبين لمورجان وزملاؤه بأن بعض الصفات التي درسوها تنتقل إلى الذكور الأبناء عبر الأم فقط وفسرا ذلك إلى حدوث تبادل وراثي بين زوج كروموسومات X التي تعود للأم وأطلقوا عليه بالعبور. وكانت هذه الفكرة جديدة كلياً لم يسبقهم إليها أحد ثم أوضحت الأبحاث التي أجريت فيما بعد من قبل غيرهم بأن العبور لا يقتصر على كروموسومات X بل يحصل أيضاً في أزواج الكروموسومات الأخرى. ساهمت الأبحاث السابقة كثيراً في التحرك نحو جزيئية الوراثة من خلال تسليط الضوء على الطفرات الوراثية وطبيعتها وآلية حصولها وأثارت الكثير من الأسئلة حول ذلك كان أبرزها ما هو المورث؟ كيف يعمل؟ وما الذي يسبب حصول الطفرات فيه؟ كان هذا النوع من الأسئلة جريئاً وجديداً ولم تكن الإجابة عليه سهلة لعدم وجود تفصيلات

لازمة لمثل ذلك. إلا أنه عرف الكثير من المواد الكيميائية والفيزيائية التي تعمل على أحداث الطفرات. كان أول أقتراب نحو الإجابة عن مثل هذه الأسئلة هو ما طرحه العالم جارود حول العلاقة ما بين العمليات الكيميائية التي تجري في الخلية والمورثات. أعتبر جارود أن فهم طبيعة المورثات يكمن في فهمنا لما يجري من فعاليات ايضية وداخل الخلايا.

كانت جزيئات البروتين هي أكثر الجزيئات البايولوجية الكبيرة إثارة من بقية الجزيئات الأخرى حيث تم التعرف على تركيبها وتنظيمها الفريد المؤلف من وحدات متكررة سميت بالاحماض الأمينية والتي عُرف منها أكثر من عشرين نوعاً. والأهم دورها الرئيسي في الخلية فالهرمونات بروتينات والانزيمات بروتينات والبروتينات مؤلف أساسي في تركيب الخلايا. بينما بقيت جزيئات الأحماض النووية **DNA** و **RNA** التي أكتشفت في أواخر القرن التاسع عشر مهملة وأعتبرها البعض جزيئات غبية ذات وظائف ثانوية ولا أهمية كبيرة لها. وهكذا أستغرق العالم أكثر من أربعين سنة في البحث عن الدور الوراثي للبروتينات دون طائل. إلا أن هذه الأبحاث ساهمت بصورة كبيرة في الكشف عن المادة الوراثية من خلال تحديدها لدور ما للمورثات في النشاط البروتيني وكان هذا في حد ذاته اقتراباً مهماً نحوا النمط المندلي. إذ تمكن العامل جورج بيدل وادوارد تاتوم عام **1941** من خلال عملهما على سلالات طافرة لصفات مختلفة من النيوسبورا من إيضاح العلاقة بين البروتينات والمورثات مما ساعد كثيراً على نبذ فكرة أن البروتينات هي المادة الوراثية وتركيز الأبحاث نحو مادة أخرى غيرها.

وهكذا تحولت أنظار العلماء إلى جزيئة بايولوجية كبيرة جديدة سبق وأن اعتبرت بأنها ليست ذات أهمية تذكر ألا وهي الأحماض النووية. ساهمت نتائج الأبحاث العلمية التي أجريت حول هذه الجزيئات البايولوجية من قبل العامل فريدريك جرفش وأفيري وجماعته وهيرش وشاس وسانجر وكونرات

وغيرهم في تحديد الدور الوراثي لجزيئة الحامض النووي DNA. وفي عام 1953 قدم واطسون وكريك نموذجهما عن التركيب الثلاثي الأبعاد للحامض النووي DNA ثم تبعاه بأفكارهما عن التضاعف الشبه المحافظ ودور الحامض النووي RNA في عملية نسخ المورثات المحمولة على الـ DNA. وهكذا ابتدأ عصر وراثي جديد في ظهور ثورة البايولوجيا الجزيئية تمكن خلالها العلماء من الأقتراب كثيراً من فك طلاسم المادة التي كانت تعتبر حتى عهد قريب كمادة مقدسة.

وهكذا بدأ الحديث عن تركيب المورثات وأنها ليست سوى ترددات معينة داخل تركيب الـ DNA وأنها توجد بإعداد غفيرة جداً تتوزع على أزواج الكروموسومات في الأحياء حقيقية النواة وفي الكروموسوم الوحيد في الأحياء بدائية النواة. وأن تعقد الكائنات الحية يعود إلى تعقد مادته الوراثية ممثلة في المورثات. وبدأت بعد ذلك آلية عمل المورثات بالوضوح وظهرت الكثير من التفاصيل الدقيقة لتتابع المورثات تبين بأن المورثات تحمل في جنباتها شفرات ثلاثية تشفر لأحماض أمينية معينة وأن الريبوسومات هي موقع ترجمة هذه الشفرات والتي تستنسخ عبر جزيئة وسيطة أخرى هي جزيئة الحامض النووي RNA. وأصبح التفصيل حول هذا الموضوع متوفراً حتى في كتب المدارس الثانوية وربما المتوسطة أيضاً. وهكذا تمكن البايولوجيون من الإجابة على معظم الأسئلة الحائرة التي كان يعتقد سابقاً بإستحالة الوصول إلى إجاباتها. تمكن العلماء الوراثيون خلال الحقبة السابقة التي تم خلالها تحديد المادة الوراثية وتركيب ودور المورثات من توفير الهيكل المتماسك لتفسير دور الوراثة في العمليات الأيضية الخلوية وانتقلوا بعد ذلك إلى حقل جديد تمثل في تقنية الـ DNA المتراكب أو الهندسة الوراثية التي هي بحق ثورة ضخمة.

بدأ العلماء ومنذ العام 1970 في الأعلان عن سلسلة من الاكتشافات

الصغيرة والتي تضمنت أكتشاف انزيمات قاطعة ولاحمة وبنائية مختلفة. وقد كان لهذه الأكتشافات قيمة تجمعية هائلة حيث وفرت للعلماء عدة عمل رائعة مكنتهم من تحقيق أحد معجزات القرن العشرين. أذ تمكنوا من خلال ذلك من تقطيع المادة الوراثية ونقل أجزاء منها من كائن إلى آخر وأصبح ايلاج المورثات من خلية إلى أخرى عملاً روتينياً لا يحتاج أحتراف كبير وأصبح من السهل الآن تحديد التتابعات الخاصة بالمورثات والوصول إليها. ودخلت الهندسة الوراثية بعدها كمشروع كبير في النواحي الزراعية والصناعية والطبية.

المبادئ والطرق العامة في الهندسة الوراثية :

تهدف الهندسة الوراثية إلى التلاعب بالمورثات بطريقة تسمح بظهور صفات جديدة مفضلة في كائن لم يكن يمتلكها أو إزالة صفة غير مرغوبة موجودة. تؤدي هذه التقنية إلى انتاج كائنات حية متواضعة بصفات متقدمة وتستخدم لهذا الهدف وسائل عديدة متنوعة.

تتم عملية الهندسة الوراثية بخطوات متتالية متتابعة يمكن وضعها حسب الترتيب التالي :

أولاً : استخلاص الحامض النووي DNA أو RNA كخطوة رئيسية لعزل مورث معين لازم لعملية الهندسة.

ثانياً : استخدام الانزيمات القاطعة والفصل بالهجرة الكهربائية عبر هلام لعزل المورث المطلوب أو قطع الـ DNA المحتوية عليه.

ثالثاً : استخدام ناقل مناسب لربط المورث المطلوب معه وأدخاله إلى مضيف مناسب لتضخيمه وزيادة عدده.

رابعاً : أدخال النواقل الهجينة إلى المضائف المطلوب تعديل صفاتها.

خامساً : الكشف عن عمل المورث الجديد.

وتختلف تفاصيل كل خطوة من هذه الخطوات وذلك أعتماداً على الهدف من الهندسة الوراثية والوسيلة المستخدمة في تحقيق هذا الهدف.

أنزيمات الهندسة الوراثية :

تعتمد الهندسة الوراثية في كثير من طرقها على الأنزيمات ونظراً لاختلاف وظائف هذه الأنزيمات فقد قسمت اعتمادا على ذلك إلى خمسة مجاميع هي :

1. أنزيمات هدم الأحماض النووية Nucleic acids hydrolysis enzymes or Nucleases
2. أنزيمات بلمرة الحامض النووي Polymerases
3. أنزيمات اللحام Ligases
4. أنزيمات التحوير Modifying Enzymes
5. أنزيمات إزالة الأنطباق Topoisomerases

أنزيمات هدم الأحماض النووية Nucleases :

تعمل هذه الأنزيمات على تحطيم أواصر الفوسفات ثنائي الاستر التي تمثل العمود الفقري لسلاسل الأحماض النووية.

قسمت هذه الأنزيمات إلى مجموعتين هما مجموعة أنزيمات الهدم الداخلي Endonucleases التي تهاجم أواصر الفوسفات ثنائي الاستر من داخل سلاسل الحامض النووي وتؤدي إلى إنتاج قطع مختلفة الحجم من الحامض النووي وأنزيمات الهدم الخارجي Exonucleases التي تفصل النيوكليوتيدات من نهايات سلاسل الحامض النووي مؤدية إلى إنتاج وحدات مفردة على الأغلب

من النيوكليوتيدات. وفي كلا المجموعتين هناك أنزيمات هدم متخصصة بالـ DNA تدعى DNases وأخرى خاصة بالـ RNA تدعى **RNases.**

أنزيمات هدم الحامض النووي RNA RNases :

هناك ثلاثة أنزيمات من هذا النوع قد أستخلصت من بكتريا القولون E.coli وهي **RNase I,II,III**. يعمل الأنزيم الأول على هدم سلسلة الحامض النووي RNA داخلياً أعتباراً من النهاية الثالثة لإنتاج قطع مؤلفة من نيوكليوتيده واحدة. أما الأنزيم الثاني فإنه يعمل على هدم سلسلة الحامض داخلاً وخارجياً أعتباراً من النهاية الخامسة لإنتاج قطع مؤلفة من نيوكليوتيدة مفردة ويعمل الأنزيم الثالث على الهدم الداخلي للمناطق المزدوجة من الحامض النووي. إضافة لهذه الأنزيمات فقد تم استخلاص أنزيم هدم داخلي من بنكرياس الحيوانات سمي **RNase A** يهاجم مواقع أرتباط البيرميدينات مع ذرة الكاربون الثالثة في السكر الخماسي حصراً لإنتاج قطع حامض نووي مؤلفة من نيوكليوتيدات بيرميدينية مفردة إضافة لقطع حامض نووي مختلفة الطول.

كما تم عزل أنزيم هدم داخلي آخر من فطر الاسبرجلس **Aspergillus oryzae** سمي **RNase T1** يعمل على مهاجمة روابط الفوسفات الموجودة في مواقع نيوكليوتيدات تحتوي على الجوانين فقط ومن النهائي الخامسة.

أنزيمات هدم الحامض النووي DNA DNases:

عزلت ثلاثة أنواع من أنزيمات الهدم الخارجي للـ DNA من بكتريا القولون E.Coli أطلق عليه Exonuclease I,II,III. يعمل الأنزيم الأول على مهاجمة روابط الفوسفات في السلاسل المفردة للحامض النووي DNA (أو RNA) مؤدياً إلى تقطيعها إلى وحدات ثلاثية النيوكليوتيدات ومن النهاية التي ترتبط فيها مجاميع الهيدروكسيل مع ذرة الكاربون الثالثة للسكر. أما أنزيم الهدم الثاني

فأنه يهاجم السلاسل المزدوجة للـ DNA عند نفس مواقع عمل الأنزيم الأول ويهاجم هذا الأنزيم الروابط الفوسفاتية في السلاسل المزدوجة المحلزنة.

كما تم استخلاص نوعين من أنزيمات الهدم الداخلي من الطحال وبعض الغدد الحيوانية سميت DNase I,II يهاجم أنزيم الهدم الأول الروابط الداخلية للحامض النووي مؤديا إلى إنتاج وحدات لا يتجاوز طولها أربعة نيوكليوتيدات تحتوي كل وحدة منها على مجموعة فوسفات مرتبطة مع ذرة الكاربون الخامسة ومجموعة هيدروكسيل مرتبطة مع ذرة الكاربون الثالثة للسكر.

أما الأنزيم الثاني فأنه يؤدي إلى إنتاج وحدات لا يزيد طولها على ستة نيوكليوتيدات تحتوي على مجاميع هيدروكسيلية مرتبطة مع ذرة الكاربون الخامسة بينما ترتبط مجاميع الفوسفات مع ذرة الكاربون الثالثة.

إضافة لهذه الأنزيمات فأنه هناك أنزيمات أخرى ذات أهمية بالغة في الهندسة الوراثية وهي الأنزيمات المقيدة أو المحددة أو القاطعة Restriction Enzymes وهي أنزيمات أكثر تخصصاً في قطع سلاسل الحامض النووي DNA.

الأنزيمات المقيدة أو القاطعة Restriction Endonucleases or Enzymes

ترجع أول ملاحظة حول هذه الأنزيمات إلى عام 1962 حيث تم تفسير ظاهرة المناعة Host-controlled Restriction التي تبديها بكتريا القولون E.coli من السلالات E,K عند أصابتها بالعاثيات إلى وجود أجهزة تقييد تعمل على منع أو عرقلة نمو وتكاثر العاثيات.

فقد وجد دو سيوكس و آربر Dussiox & Arber عام 1962 أثناء عملهم مع بكتريا القولون والعاثي لامبدا بحصول أنخفاض كبير في كفاءة أصابه العاثي عندما يراد أصابة بكتريا القولون سلالة K بعاثيات معزولة من السلالة E أو العكس. وكذلك انخفاض في كفاءة الإصابة عند تربية عاثيات معزولة من

السلالة K في السلالة E وإعادة الإصابة للسلالة K أو العكس.

فسر هذان الباحثان ذلك بالفعل المناعي للمضيف الأخير والمتمثل بتحديد فعالية العاثيات عن طريق أنزيمات مقيدة أو محددة. أستخلص أول هذه الأنزيمات من بكتريا القولون عام 1970 ووجد بأن له قدرة عجيبة على قطع أشرطة الحامض النووي ومن أي مصدر كانت. إلا أنه وجد بأن الأجزاء الناتجة كانت عشوائية وأن الأنزيم لا يستهدف أماكن خاصة معينة بل له نشاط عام وأطلق على هذا الأنزيم بالأنزيم المقيد.

كان هذا لاكتشاف بمثابة الحلم الذي أراده العلماء الباحثون في هذا المجال أن يتحقق مما دفع بالكثير منهم إلى إعادة المحاولة مع أنواع أخرى.

نجحت المحاولة الأولى في نفس السنة التي أكتشف فيها الأنزيم الأول حيث أستخلص نوع ثاني من هذه الأنزيمات ومن بكتريا الرشح **Haemophilus Influenzae**. وجد بأن هذا الأنزيم يختلف في نشاطه عن الأنزيم الأول حيث أنه يستهدف مواقع محددة على شريط الحامض النووي دون سواها. توالت بعدها عمليات اكتشاف أنزيمات أخرى حتى وصل عددها لحد الآن إلى أكثر من 300 أنزيم قادرة على تمييز أكثر من 155 موقع تقييد على الحامض النووي DNA.

أنواع الأنزيمات القاطعة:

قسمت الأنزيمات القاطعة إلى ثلاثة مجاميع إعتماداً على قدرتها على القطع المتخصص واحتياجاتها للقيام بوظيفتها وهي :

أ- انزيمات القطع – النوع الأول:

تقطع هذه الأنزيمات الحامض النووي بصورة عشوائية وتحتاج إلى عوامل مساعدة مثل أيون المغنيسيوم Mg^{+2} وادينوسين ثلاثي الفوسفات ومادة كبريتات الادينوسيل – ميثونين (S-adenosyl-methionine) وتعتبر هذه الأنزيمات

غير مهمة في الهندسة الوراثية لعدم إمكانيتها على القطع المتخصص.

ب ـ انزيمات القطع - النوع الثاني :

تعتبر هذه الأنزيمات أهم أنزيمات القطع وذلك لقدرتها على قطع أشرطة الحامض النووي في مواقع متخصصة فقط بحيث تعطي عدد من القطع الثابتة لكل نوع من الأحياء. تستخدم هذه الانزيمات بصورة واسعة في الهندسة الوراثية ويتم بواسطتها عزل مورثات معينة دون غيرها بعد عدة عمليات قطع وإستخدام وسائل أخرى. ويمكن حساب الوزن الجزيئي للقطع الناتجة من هذه الأنزيمات.

تستهدف هذه الأنزيمات تتابعات معينة بحيث أنها تتعرف على هذه التتابعات وتقوم بالقطع قبل أو بعد هذا التتابع مباشرة. فمثلاً أنزيم **EcoR1** يتعرف على التتابع **5-G*AATTC** ويقوم بالقطع بين **G** و **A**. وهكذا فإن هذا الأنزيم يقطع أشرطة الحامض النووي في المناطق التي تحتوي هذا التتابع وبنفس المنطقة تماماً. تختلف عدد التتابعات التي يتم القطع قبلها أو بعدها. فبعض الأنزيمات تميز تتابعات سداسية كما هو الحال في أنزيم **EcoRl** وبعضها يميز تتابعات مختلفة جدول (II-1).

تنتج بعض هذه الأنزيمات قطعاً ذات نهايات لزجة (**Cohesive ends** أو**Sticky ends**) وهي نهايات يمكن من خلالها الالتحام مرة ثانية. بينما تنتج أنزيمات أخرى قطعاً ذات نهايات عمياء (**Blunt ends**) لا تتمكن من الالتحام إلا إذا أجريت لها بعض التحويرات لجعلها لزجة.

ونظراً للأعداد الكبيرة التي أكتشفت من هذه الأنزيمات فأنه تم إقتراح نظام تسمية وضعه كل من سميث وناتان **Smith & Nathan** عام **1937** وعلى النحو التالي :

1. يرمز لجنس الكائن الذي أكتشف فيه الأنزيم بالحرف الأول من أسم

جدول (11-1) : مواقع قطع بعض الأنزيمات (مؤشر عليها بسهم) في تتابعات الحامض النووي DNA.

الانزيم	تتابع القطع ومكانه
EcoRl	G↓AATTC
BamH1	G↓GATCC
HindIII	A↓AGCTT
HpaI	C↓CGC
Mbol	↓GATC
Pstl	CTGCA↓G

الأنزيم ويرمز لنوع الكائن بالحرفين الثاني والثالث من أسم النوع.

فمثلاً الأنزيم Eco مأخوذ من البكتريا E.coli فالحرف الأول من أسم الأنزيم مأخوذ من جنس البكتريا Escherichia والحرفين الثاني والثالث مأخوذين من أسم نوع البكتريا coli وكذلك الحال بالنسبة للأنزيم Hin المأخوذ من أسم البكتريا Haemophilus Influenzae.

2- في حالة أحتواء السلالة البكترية على بلازميد أو عاثي فيجب إضافة أسم البلازميد أو العاثي لأسم الأنزيم. فمثلاً الأنزيم Eco R1 مستخلص من بكتريا القولون E.coli التي تحتوي على البلازميد R1.

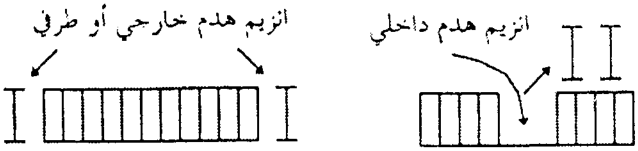
3- في حالة وجود أكثر من أنزيم لنفس النوع من البكتريا فأنه تستخدم الأرقام الرومانية بعد نهاية الأسم كما هو الحال في الأنزيم EcoRI و EcoRII و EcoRIII .

جـ - انزيمات القطع النوع الثالث :

وهي أنزيمات وسط في صفاتها بين النوع الأول والثاني حيث تقوم بقطع الحامض النووي في أماكن معينة وتحتاج إلى عوامل مساعدة كأيونات المغنيسيوم والادنين ثلاثي الفوسفات وكبريتات الادينوسيل - ميثونين إلا أن حاجتها للعامل المساعد الاخير جزئية .

أنزيمات بلمرة الحامض النووي DNA Polymerases :

تعتبر هذه أنزيمات من أهم الأنزيمات اللازمة لتضاعف واستنساخ الحامض النووي . لقد تم الحديث عن هذه الأنزيمات في فصل تضاعف الحامض النووي . بالإضافة لدور هذه الأنزيمات في تضاعف الحامض النووي فإن البعض منها يمتلك وظائف أخرى ذات أهمية كبيرة في الهندسة الوراثية . فانزيمات بلمرة الحامض النووي منقوص الأكسجين في بكتريا القولون تمتلك نشاط هدم بإتجاه 3 5 بالإضافة لنشاط البناء . ينتج ذلك من وجود وحدتين في هذا الأنزيم الأول تقوم بالبناء وتدعى بقطعة كلينو (Klenow Fragment) بينما تدعى الوحدة الثانية بوحدة الهدم (Nuclease). لقد تم الآن بإستخدام تقنيات جديدة قطع هاتين الوحدتين وتنقيتهما حيث يمكن الآن استخدامهما على انفراد، أما في الأحياء حقيقية النوى فكما سبق الحديث فإن أنزيمات بلمرة الحامض النووي فيها لا تمتلك نشاط الهدم بل توجد أنزيمات مستقلة تقوم بذلك . وجد بأن هناك أنزيمين في هذه الأحياء يقومان بوظيفة الهدم . الأول هو أنزيم الهدم الداخلي (Endonuclease) ويقوم بإزالة النيوكليوتيدات من داخل أشرطة الحامض النووي . والثاني هو أنزيم الهدم الخارجي (Exonuclease) الذي يقوم بإزالة النيوكليوتيدات من نهايات الأشرطة شكل (11 - 1) . وبالإضافة لهذه الأنزيمات فإن لإنزيم الاستنساخ العكسي المعزول من الرواشح المرتدة أهمية في الهندسة الوراثية حيث يمكن بواسطته نسخ حامض نووي ريبوزي من قالب حامض نووي منقوص الأكسجين .



شكل (II-1) : نشاط الهدم في أنزيمات الهدم الداخلي والخارجي.

أنزيمات اللحام Ligases:

تعمل هذه الأنزيمات على إعادة روابط الفوسفات ثنائي الاستر بين النيوكليوتيدات وهي بهذه الوظيفة تكون عكس وظيفة الأنزيمات القاطعة أو المقيدة التي تحطم هذه الروابط. يتوفر نوعان من هذه الأنزيمات هما **DNA Ligase** المعزول من أنواع مختلفة من الكائنات الحية. يعمل هذه الأنزيم على إعادة ارتباط قطع الحامض النووي ذات النهايات اللزجة فقط ويحتاج إلى العامل المساعد **NAD+** في هذه العملية. أما الأنزيم الآخر فهو الأنزيم **T4 Ligase** المعزول من العاثي **T4** بعد إصابته لبكتريا القولون **E.coli**. يتميز هذا الأنزيم عن الأنزيم الأول في أن له القدرة على إعادة التحام قطع الحامض النووي ذو النهايات اللزجة أوا لعمياء على حد سواء. إضافة لاحتياجه للعامل المساعد **ATP** لإتمام عمله. ونظراً لعزل المورثات المشفرة لهذه الأنزيمات فقد تم هندستها وراثياً وأصبح بالإمكان الحصول على كميات كبيرة منه مختبرياً وبطرق سهلة نسبياً.

إن الوظيفة الطبيعية لأنزيمات اللحام في الخلايا الحية هو لحام مناطق مجاميع الهيدروكسل في النهاية الثالثة **3-OH** في النيوكليوتيدات مع مجاميع الفوسفات في النهاية الخامسة **5-H** للنيوكليوتيدات المجاورة لها وتكوين روابط الفوسفات ثنائية الاستر وذلك أثناء تضاعف الحامض النووي **DNA**. كما أن لها نفس الدور أثناء عمليات تصليح الحامض النووي **DNA Repair** حيث تقوم

هذه الأنزيمات بتكوين روابط الفوسفات ثنائي الاستر بين النيوكليوتيدات المستصلحة. تحتاج هذه الأنزيمات في سبيل إقامة هذه الروابط إلى عوامل مساعدة تُتحول كيميائياً إلى مركب الادنين أحادي الفوسفات (AMP) Adenosine Mono Phoshate الذي يرتبط مع الأنزيم محفزاً أياه على توليد هذه الروابط. لا تعمل أنزيمات اللحام على توليد الروابط الهيدروجينية التي تربط القواعد النتروجينية للنيوكليوتيدات المتكاملة لشريطي الحامض النووي DNA بل أنها تعمل فقط على تكوين روابط الاستر النهائية في موقع الالتحام. كما أن أنزيمات اللحام لا تعمل الا بعد التقاء النهايات الصحيحة وهو ما تحدده الصدفة. لذلك فأنه يستخدم تركيز عالي من الحامض النووي مختبرياً في عمليات اللحام لزيادة هذه الفرصة وخصوصاً عندما تكون نهايات القطع عمياء. بينما تكون فرصة الالتقاء الصحيح لهذه النهايات كبيرة في حالة وجود النهايات اللزجة. إذ تساعد أواصر الهيدروجين بين قواعد النيوكليوتيدات المتكاملة على توفير هذه الفرصة. ومع ذلك فإنه في حالة عدم بناء رابطتي الاستر في النهايات المتقاربة في الوقت المناسب فإن هذه القطع ربما تنفصل مرة أخرى بسبب ضعف روابط الهيدروجين. وعلى ذلك فإن تركيز قطع الحامض النووي المطلوب لحامها سوى كانت نواقل وقطع أخرى أو قطع مختلفة وتركيز أنزيم اللحام ونوع النهايات لها دور كبير في سرعة حصول العملية. هذا إضافة للظروف الفيزيائية الصحيحة اللازمة لمثل هذه التفاعلات. وتبقى في جميع الأحوال عملية لحام النهايات اللزجة أسهل بكثير من لحام النهايات العمياء. إلا أنه من الممكن تحوير هذه النهايات بأساليب مختلفة بحيث يمكن تحويلها إلى نهايات لزجة.

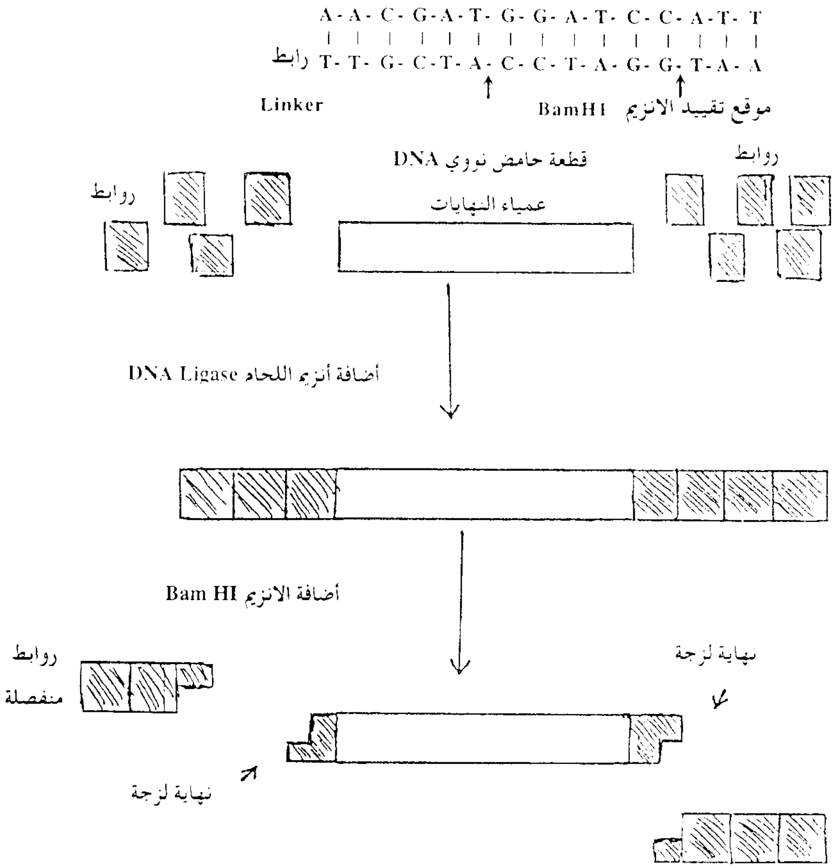
ومن أهم أساليب التحوير هذه استخدام جزئيات رابطة **Linkers** أو توصيلات **Adaptors** أو ذيول متجانسة **Home polymer tails**.

تحوير النهايات العمياء في قطع الحامض النووي DNA:

في عمليات الهندسة الوراثية يفضل استخدام قطع حامض نووي وناقل ذات نهايات متجانسة بحيث يمكن أجراء الهندسة في أفضل صورة ممكنة. وعلى الرغم من أن هذه النهايات يمكن توفيرها عن طريق قطع الحامض النووي المراد هندسته والناقل بنفس الأنزيم القاطع أو بأنزيمات متناظرة إلا أن ذلك لا يمكن حصوله دائماً. إذ أن الصورة الأكثر توفراً في تجارب الهندسة الوراثية هي وجود نهايات لزجة للناقل ونهايات عمياء لقطع الحامض النووي المراد هندستها. لذلك فأنه تحت مثل هذه الظروف فأنه يتطلب تحوير النهايات العمياء لجعلها متجانسة مع النهايات اللزجة للناقل. وسنتحدث عن أشهر طرق التحوير هذه وتطبيقاتها.

أولاً : الروابط Linkers

الروابط هي جزيئات حامض نووي **DNA** مزدوجة معروفة التردد ومصنعة مختبرياً، وهي أيضاً جزيئات ذات نهايات عمياء إلا أن ترددها يحتوي على موقع تقييد مفرد لأنزيم تقييد معين أو أكثر من موضع لأكثر من أنزيم. يتم العمل باستخدام هذه الروابط عن طريق توفيرها في التفاعل بتركيز عالٍ مع وجود قطع الحامض النووي ذات النهايات العمياء المراد تحويرها ووجود أنزيم اللحام **T4**والظروف المناسبة لأجراء هذا التفاعل. يتم التحام أكثر من جزيئة رابط في كل نهاية من النهايات العمياء لقطع الحامض النووي. وبعد الانتهاء من هذه التفاعل يتم تنقية نواتج التفاعل ثم معاملتها مع الأنزيم الذي له موقع تقييد في الروابط حيث يعمل هذا الأنزيم على قطع جزء من الروابط بصورة غير متناظرة منتجاً النهايات اللزجة. فلو أفترضنا بأن الروابط المستخدمة في هذا المثال تحتوي على موقع تقييد للأنزيم **BamHI** فإن النهايات اللزجة الناتجة من تفاعل هذا الأنزيم مع الروابط ستحتوي على التردد **5-GATCC-3** كنهاية لزجة في كل نهاية من نهايات قطع الحامض النووي (شكل 11 - 2).



شكل (11 - 2) : آلية استخدام الروابط **Linkers** لخلق نهايات لزجة لقطع حامض نووي **DNA** عمياء النهايات.

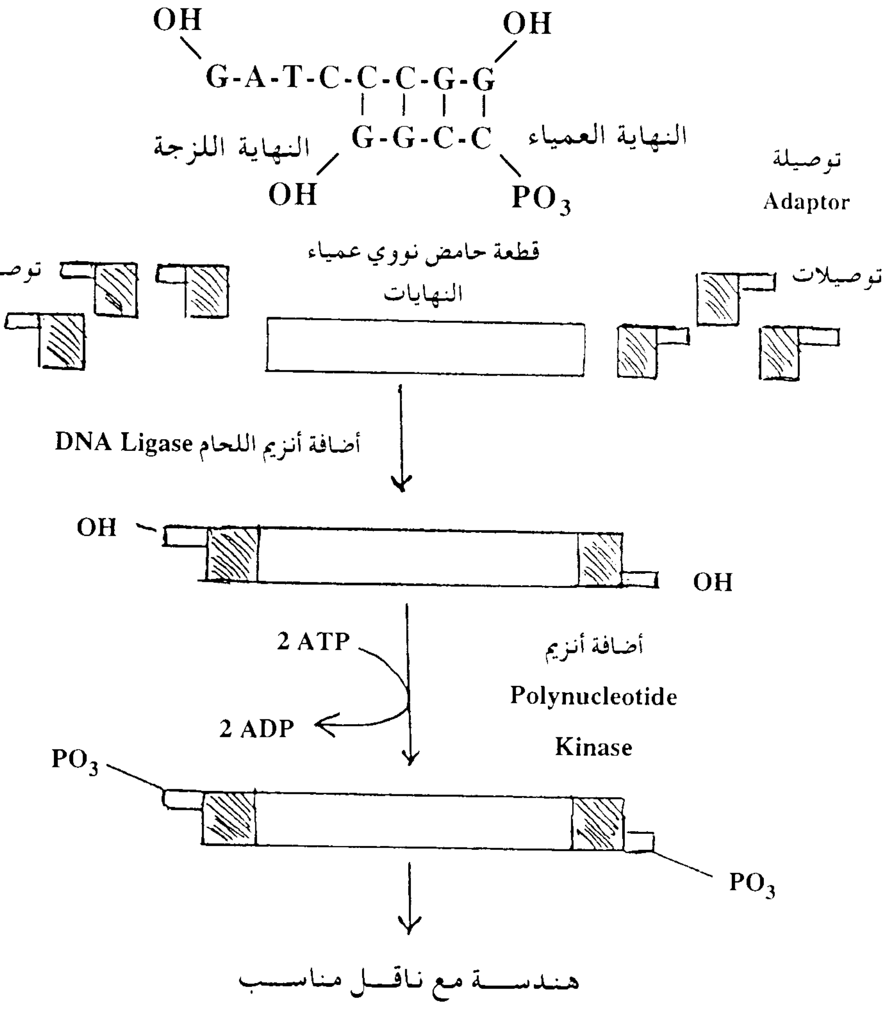
ثانياً : التوصيلات Adaptors :

إن استخدام الروابط في عملية خلق نهايات لزجة لنهايات عمياء تعتبر وسيلة ممتازة لزيادة كفاءة اللحام وكفاءة الكلونه أيضاً. ولكن مع جميع المزايا الجيدة للروابط يبقى استخدامها محفوفاً بالمشاكل في حالة أحتواء قطع الحامض النووي ذات النهايات العمياء على مواقع تقييد لنفس الأنزيم الذي له موقع تقييد في جزيئة الرابط. ويمكن أن تكون المشكلة مستحيلة الحل في

حالة أن قطع الحامض النووي المراد تحوير نهاياتها كبيرة الحجم ويمكن أن تحتوي على العديد من مواقع التقييد الخاصة بهذا الأنزيم. لذلك فأن الروابط لا تعتبر الحل المناسب على الإطلاق في مثل هذه الحالات ويتوجب استخدام طرقاً أخرى للتحوير. وتعتبر التوصيلات أحد أنجع هذه الطرق والتي يمكن استخدامها بنجاح دون الوقوع في المشاكل التي تواجهنا عند استخدام الروابط. التوصيلات كالروابط في أنها جزئيات حامض نووي DNA مزدوج معروفة التردد ومصنعة مختبرياً.

لكنها تختلف عن الروابط في أن لها نهاية عمياء وأخرى لزجة. ويهدف استخدامها في لحام نهاياتها العمياء مع النهايات العمياء لقطع الحامض النووي المراد تحوير نهاياته وهكذا تمتلك هذه القطع نهايات لزجة جديدة. أن النهاية اللزجة للتوصيلات لا تحمل مجموعة فوسفات نهائية في النهاية الخامسة لذلك فأنه لا توجد فرصة أمام هذه النهايات على الالتحام مع النهايات العمياء لقطع الحامض النووي المراد تحويرها وتبقى فرصة الالتحام مفتوحة تماماً أمام النهاية العمياء للتوصيلات. لذلك فأنه يتوجب إضافة مجموعة فوسفات إلى النهايات اللزجة للتوصيلات بعد الانتهاء من عملية التحوير وقبل إجراء عملية الهندسة مع ناقل معين. ويتم ذلك بمعاملة القطع محورة النهايات مع أنزيم كاينيز متعدد النيوكليوتيد **Polynucleotide Kinase** بوجود جزيئة أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP حيث يقوم الأنزيم بنزع مجموعة فوسفات من جزيئة ATP وربطها مع النهاية الخامسة للنهايات اللزجة (شكل 11-3). وعلى الرغم من أن التوصيلات جيدة في مواصفاتها إلا أن العمل معها لا يخلو من صعوبات. تكمن هذه الصعوبات في إحتمال وجود مواقع تقييد للأنزيم المنتج للنهايات اللزجة للتوصيلات في قطع الحامض النووي المحور النهايات حيث يصبح من الصعوبة استخلاص التوصيلات من قطع الحامض النووي المحورة والمهندسة مع ناقل. لذلك فأنه من أجل التغلب على هذه

الصعوبات فقد صممت توصيلات تحتوي على مواقع تقييد لأنزيمات أخرى إضافة للأنزيم المنتج للنهايات اللزجة مما يسهل استخلاصها باستخدام هذه



شكل (11 - 3) : آلية استخدام التوصيلات **Adaptors** لخلق نهايات لزجة لقطعة حامض نووي **DNA** عمياء النهايات.

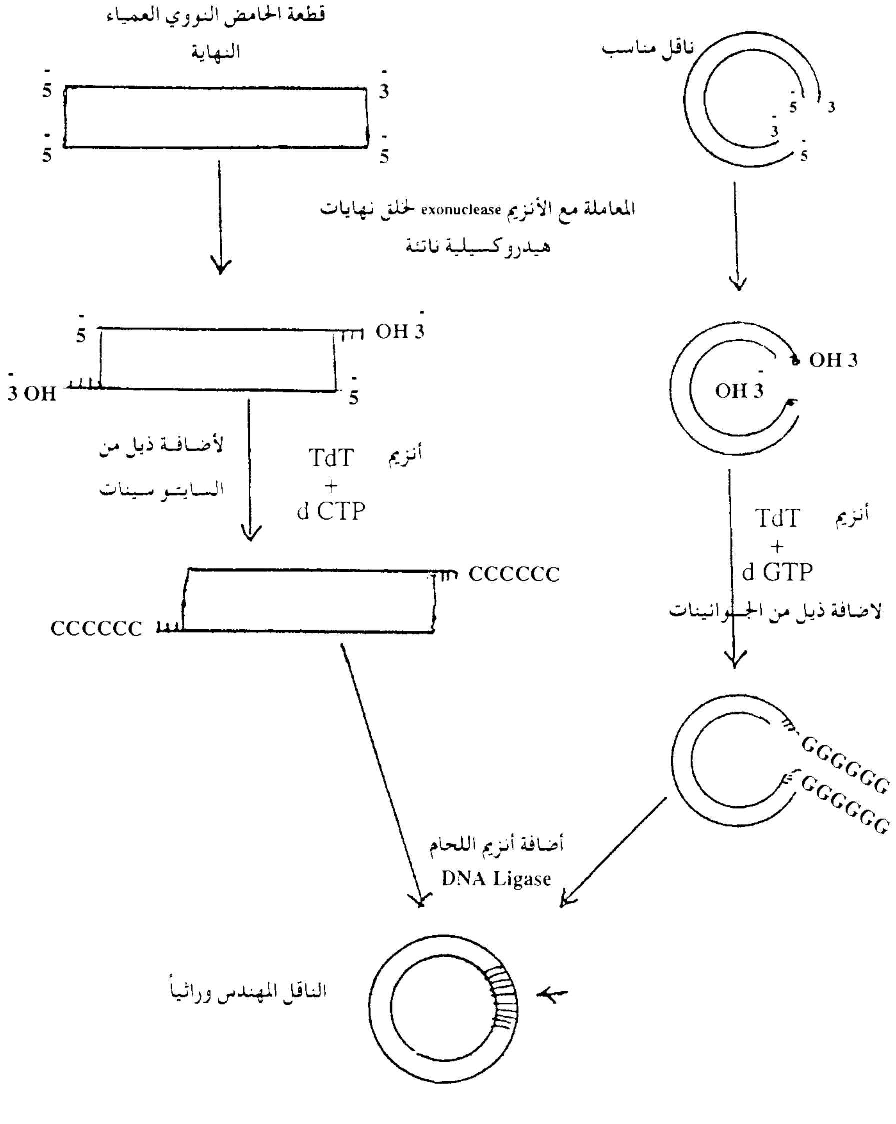
الأنزيمات .

ثالثاً : التذييل بالبوليمر المتجانس Homopolymer Tailing :

يعتبر التذييل بالبوليمرات المتجانسة طريقة جديدة تختلف عن الطرق التي ذكرت سابقاً ولكنها تؤدي إلى نفس النتيجة. البوليمرات المتجانسة هي ترددات متشابهة لنيوكليوتيد واحد يتراوح عددها بين 5 - 50 نيوكليوتيد ويتم تصنيعها مختبرياً باستخدام أنزيم الترانسفيريز النهائي أو الطرفي Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) الذي يقوم بإضافة هذه النيوكليوتيدات بصورة متعاقبة للنهاية الهيدروكسيلية الثالثة المكشوفة (3 - OH) . ونظراً لحاجة هذا الأنزيم لنهاية هيدروكسيلية مكشوفة (ناتئة) لذلك فأنه يتم معاملة قطع الحامض النووي ذات النهايات العمياء بأنزيم النيوكليينر الخارجي المعزول من العاثي لامبدا الذي يقوم بأزالة النيوكليوتيدات من النهايةالخامسة لهذه القطع مؤدياً إلى الحصول على نهايات هيدروكسيلية ناتئة أو مكشوفة وجاهزة لعمل الأنزيم TdT(شكل 11 - 4) . ولاجل تذييل هذه النهايات فأنه يتم إضافة نيوكليوتيدات تحتوي على السايتوسين مثلاً للتفاعل إضافة للأنزيم حيث يقوم الأنزيم عندها بربط هذه النيوكليوتيدات إعتباراً من النهاية الهيدروكسيلية الناتئة للقطع منتجاً ذيولاً سايتوسينيه عند هذه النهايات. كما يتم معاملة الناقل المراد هندسة هذه القطع معه بنفس الطريقة وبإضافة نيوكليوتيدات تحتوي على الجوانين لإنتاج ذيول جوانين مكملة لذيول السايتوسين في قطع الحامض النووي المراد هندسته .

كما يمكن استخدام نيوكليوتيدات تحتوي على الأدنين أو الثايمين لإنتاج ذيول وذيول مكملة لها بنفس الأسلوب السابق .

لا يمكن التكهن بعدد النيوكليوتيدات المؤلفة للذيول المرتبطة مع



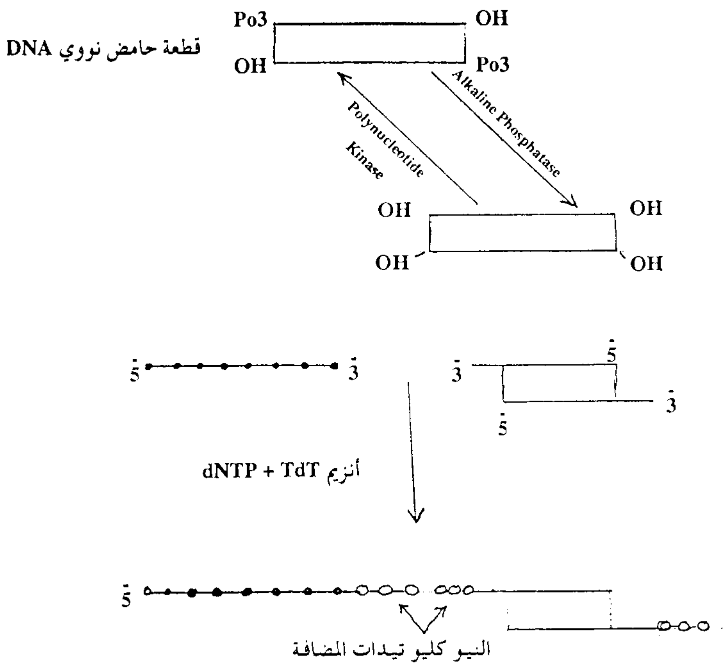
شكل (II - 4) : آلية التذييل بالبوليمر المتجانس **Homoplpoymer**.

النهايات الهيدروكسيلية لقطع الحامض النووي المراد هندسته أو الناقل. ولكن لعددها أهمية في استقرار منتجات الهندسة. أذ أنه كلما كان عدد

النيوكليوتيدات المؤلفة للذيول أكثر كلما أزداد استقرار نواتج الكلونه. وفي حالة وجود أختلاف كبير في عدد هذه النيوكليوتيدات في أطراف قطع الحامض النووي والناقل فأنه يتوجب استخدام أنزيم الكلينو **Klenow Fragments Enz.** لأجل بناء الفراغات الناتجة عن هذا الأختلاف إضافة لاستخدام أنزيم اللحام. وعلى أية حال فأنه إذا كان عدد النيوكليوتيدات المرتبطة في المناطق المتكاملة 20 نيوكليوتيد أو أكثر فأنه لا حاجة لاستخدام أنزيم البلمرة (الكلينو) ذلك لوجود استقرارية كافية في نواتج الهندسة تسمح بنقلها إلى المضائف دون عمليات إضافية حيث ستقوم إنزيمات الخلايا المضيفة بتصليح الفراغات وإجراء اللحام لها طبيعياً.

أنزيمات تحوير الحامض النووي DNA Modifying Enzymes

تتطلب بعض طرق الهندسة الوراثية تحويراً للحامض النووي المستخدم في الهندسة أو ناقلة وذلك عن طريق إضافة أو حذف بعض المجاميع الكيمياوية بواسطة الأنزيمات، وقد تم الحديث عن معظم هذه الأنزيمات خلال الفصول السابقة وخصوصاً فيما يتعلق بالمجسات أو تحوير النهايات العمياء. ويمكن أن نشير هنا إلى أهم هذه الأنزيمات وهي أنزيم الفوسفاتيز القاعدي **Alkline Phoshatese** المعزول من بكتريا القولون **E.coli** أو من أنسجة أمعاء الأبقار ويعمل هذا الأنزيم على إزالة مجموعة الفوسفات الموجودة في النهاية الخامسة لقطع الحامض النووي. تساعد هذه الإزالة في تقليل احتمالية التصاق قطع الحامض النووي اللزجة مع بعضها بعد القطع بالإنزيمات المحددة. أما أنزيم كاينيز متعدد النيوكليوتيد **Polynucleotide Kinase** فأن له القدرة لاضافة مجموعة فوسفات للنهاية الخامسة من قطع الحامض النووي. وهو هنا يؤدي وظيفة معاكسة لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي. أما الأنزيم الآخر المهم في عمليات التحوير فهو أنزيم الترانسفيريز النهائي الطرفي **TdT** الذي يقوم بإضافة نيوكليوتيد أو أكثر للنهاية الهيدروكسيلية الثالثة لقطع الحامض النووي



شكل : (5 - 11) : آلية عمل بعض الأنزيمات المستخدمة في تحوير جزيئات الحامض النووي DNA.

(شكل 11 - 5) .

أنزيمات أزالة الانطباق Topoisomerases:

هي الأنزيمات التي تعمل على إزالة البرم من أنواع الحامض النووي DNA شديدة الأنطباق Supercoiled. ونظراً إلى أن عمليات تضاعف هذا الحامض

النووي أو تصنيعه تحتاج أولاً لإزالة الإنطباقات الشديدة لتسهيل عمل أنزيمات البلمرة لذلك فأنه يتطلب أولاً إزالة الأنطباق من شريطي الحامض النووي DNA. ويتم بواسطة أنزيمات إزالة الأنطباق أو البرم.

وقد أكتشف نوعان من الأنزيمات التي لها علاقة بهذه العملية منذ العام 1971 سميت هذه بأنزيم التوبوايزميريز I .والتوبوأيزوميريز II. تقوم هذه الأنزيمات بوظيفة قطع وغلق مزدوج الحامض النووي مما يؤدي إلى إزالة الانطباقات الشديدة مؤدية إلى الحصول على حامض نووي مزدوج حلقي غير مبروم. تعمل هذه الأنزيمات على التخلص من الانطباقات من خلال كسر أواصر السكر – فوسفات المؤلفة للعمود الفقري لشريط واحد مفرد والتآصر مع النهايات المفتوحة في هذا الموقع والتحرك بعكس أتجاه البرم أو الالتفاف أو الأنطباق حيث تنتهي العملية بأزالة البرم في هذا الموقع. يقوم بهذه المهمة الأنزيم الأول فيما يقوم الأنزيم الثاني II أو ما يدعى بالجايريز Gyrase بلحام نهايات الشريط مرة أخرى. ويذكر بأن هذه العملية تحصل في كل موقع يحتوي على برم أو أنطباق وعلى ذلك فأنه يتم كسر ولحام مناطق مختلفة من الحامض النووي لأجل إزالة البرم كلياً. وعلى الرغم من أهمية هذه الأنزيمات إلا أنه لا تستخدم حالياً الا بحدود ضيقة في مجالات الهندسة الوراثية وذلك لأن الشركات العالمية تزود المختبرات بنواقل بلازميدية جاهزة للعمل.

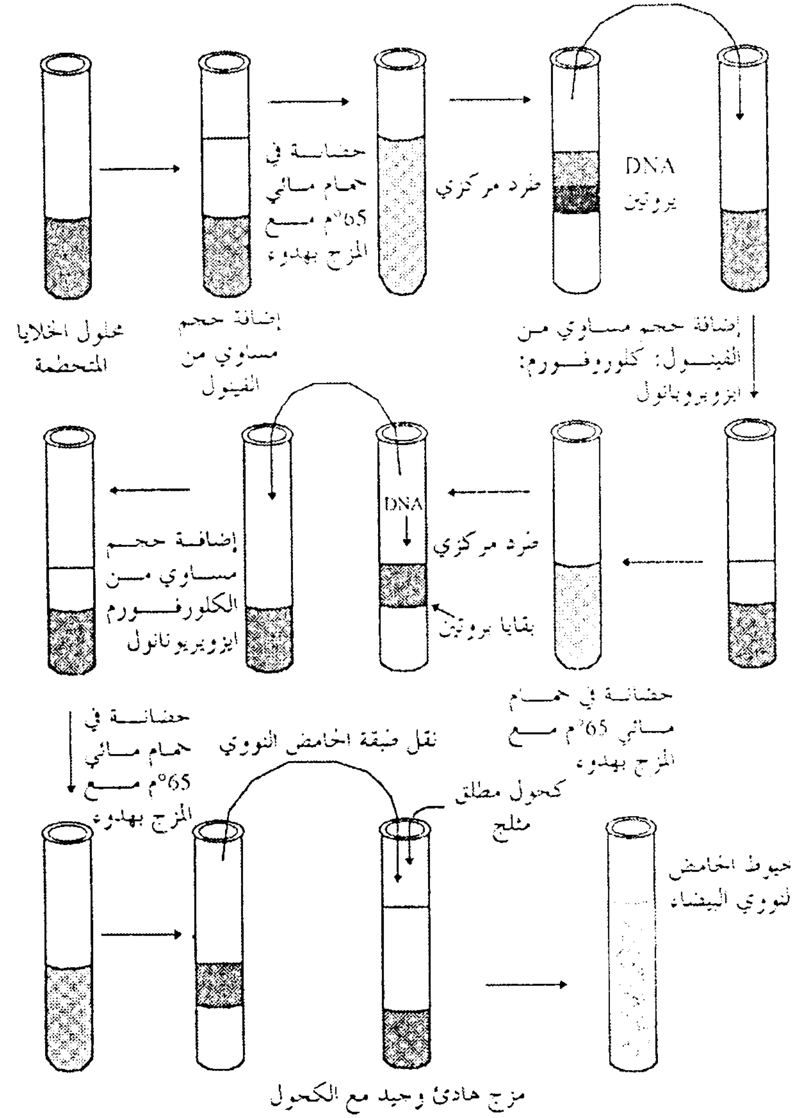
استخلاص الحامض النووي منقوص الأكسجين DNA

يعتبر استخلاص الحامض النووي منقوص الأكسجين أول خطوة في الهندسة الوراثية. حيث لا يمكن الاستفادة منه دون تنقية. ذلك لأن معظم الأنزيمات المستخدمة في الهندسة الوراثية تفقد قدرتها أو تتحطم بوجود مخلفات من البروتينات الخلوية أو أنزيمات الهدم. تستخدم طرق عديدة لاستخلاص الحامض النووي. أهمها طريقة استخدام: الفينول: كلورفورم: ايزوبروبانول التي يتم فيها تحطيم الجدران الخلوية والنووية بإستخدام محلول

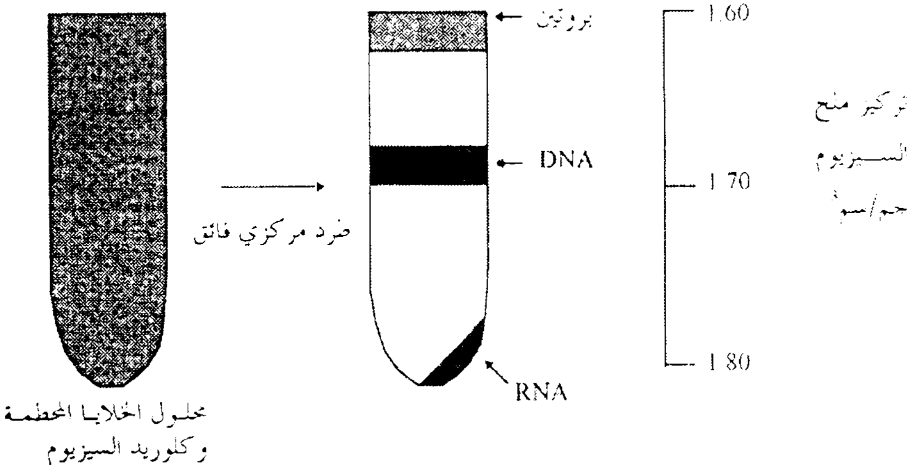
صوديوم دودوسيل سلفيت Sodium Dodocyl Sulfate (SDS) وفصل البروتينات عن الحامض النووي والتخلص من أنزيمات هدم الحامض النووي. يتم بعدها معاملة الخليط بالفينول بدرجة حرارة 65 م ويمزج الخليط جيداً بعناية وتفصل بعدها طبقة البروتين والفينول بواسطة الطرد المركزي حيث يتجمع محلول الحامض النووي في الطبقة العلوية. تجمع الطبقة بعناية ويعاد معاملتها بالفينول : كلورفورم: ايزوبروبانول مرة وأخرى بالكلورفورم: ايزوبروبانول. يتم بعدها جمع طبقة الحامض النووي التي تكون نقية وخالية من البروتين ويرسب الحامض النووي بإضافة الكحول المطلق المثلج حيث تظهر خيوط الحامض النووي البيضاء ثم تجمع بواسطة الطرد المركزي شكل (II - 6).

أما الطريقة الثانية الشائعة أيضاً فهي استخدام مدرج السيزيوم. يتم بواسطة هذه الطريقة إضافة محلول الخلايا المحطمة بالطريقة السابقة أو بأي طريقة أخرى إلى أنبوبة خاصة تحتوي على ملح السيزيوم بعيارية خاصة. يمزج المحلول جيداً حتى ذوبان جميع الملح. بعدها يتم ملىء الأنبوبة تماماً وتغلق جيداً ثم يطرد الخليط طرداً مركزياً فائقاً 50.000 دورة لمدة 48 ساعة ينفصل بعدها الحامض النووي عند مستوى كثافة السيزيوم 1.7 جم/سم3 ويستخدم بروميد الأثيديوم (Ethidium Bromide (Et Br لغرض تعيين منطقة الحامض النووي. تفصل طبقة الحامض النووي عن طريق ثقب في جدار الأنبوبة تحت الطبقة ويجمع محلول الحامض في أنبوبة خاصة. كما تستخدم نفس الطريقة لأجل فصل البلازميدات والرواشح باستخدام قاعدة كيميائية لأجل ترسيب الحامض النووي الصبغي. بينما يبقى الحامض النووي البلازميدي أو الراشحي في المحلول شكل (II - 7) ويتم التخلص من الملح الموجود في طبقة الحامض النووي عن طريق وضعه في غشاء شبه نفاذ وتركه لمدة 24 ساعة في محلول ملحي مخفف جداً حيث يتسرب ملح السيزيوم إليه خلال عملية التنافذ.

وبالإضافة لذلك فهناك طرق أخرى عديدة لاستخلاص الحامض النووي



شكل (11 - 6) : طريقة استخلاص الحامض النووي باستخدام الفينول : كلوروفورم حيث يقوم الفينول بإزالة كمية كبيرة من البروتينات ويزيد الكلوروفورم كفاءة الفينول لإزالة ما تبقى من البروتين بينما يقوم الكحول بسحب الماء من الحامض النووي ليترسب بشكل خيوط ملتفة بيضاء.



شكل (11 - 7) : فصل الحامض النووي باستخدام كلوريد السيزيوم والطرد المركزي الفائق حيث يلاحظ ترسب الحامض النووي الريبوزي فيما يطفو البروتين ويشغل الحامض النووي منقوص الأكسجين المنطقة التي يكون فيها كثافة السيزيوم **1.7** جم/سم3.

من البكتريا والنباتات والدم وغيرها.

الطرد المركزي الفائق مع قاعدة كيميائية:

تستخدم هذه الطريقة لفصل الجزيئات الصغيرة من الحامض النووي **DNA** مثل جزيئات البلازميدات والعاثيات والرواشح عن الجزيئات الكبيرة من الحامض النووي **DNA** البكتيري أو غيره.

يتم في هذه الطريقة استخدام أسس هيدروجيني **(PH)** عالي يتراوح بين **11 - 12** باستخدام هيدروكسيد الصوديوم حيث يؤدي الأسس العالي إلى فصل أشرطة الحامض النووي المزدوجة إلى أشرطة مفردة وعند تخفيض الأسس الهيدروجيني بإضافة خلات الصوديوم الحامضية **Acetic Sodium acetate** فأنه يعاد ارتباط الأشرطة المفردة مرة أخرى. ونظراً لتعقيد الجزيئات الكبيرة من الحامض النووي فأنها في هذه المرحلة ستعمل على تكوين شبكة معقدة بيضاء اللون وتتداخل مع البروتين الممسوخ **Denaturated** نتيجة معاملة محلول الخلايا المحطمة بمركب **SDS**. عند هذه المرحلة يمكن أجراء الطرد المركزي

الفائق بسرعة 48.000 دورة في الدقيقة لمدة ساعة حيث يترسب الحامض النووي الكروموسومي والبروتين والحامض النووي RNA في قعر الأنبوبة تاركين الحامض النووي البلازميدي أو غيره من الأحماض النووية الصغيرة الحجم في المحلول الرائق. يسحب المحلول الرائق وباستخدام الايثانول المثلج يرسب الحامض النووي ويجفف ثم يذاب بكمية مناسبة من محلول TE أو الماء المقطر المعقم ويحفظ بدرجة حرارة 20°م.

استخلاص الحامض النووي الريبوزي RNA المرسال:

يفضل بعض الباحثين استخدام الحامض النووي المرسال mRNA في تجارب الهندسة الوراثية وذلك عن طريق بناء حامض نووي متمم cDNA Complementary DNA من قالب الحامض النووي المرسال. يعود سبب ذلك التفضيل إلى أن الحامض النووي المرسال يمثل المورثات النشيطة القادرة على التعبير عن نفسها فقط وهو لا يمثل الأجزء صغير من الحامض النووي RNA الكلي الذي يمثل 15% من الأحماض النووية مجتمعة.

لأجل عزل الحامض النووي المرسال فإنه يتطلب عزل الحامض النووي الريبوزي الكلي Total RNA. أن أفضل وسيلة لاستخلاص الحامض النووي الريبوزي الكلي هو إستخدام طريقة الطرد المركزي الفائق بوجود ملح كلوريد السيزيوم حيث يترسب ذلك الحامض في قعر أنبوبة الطرد المركزي. بعد التخلص من المحتويات الأخرى لأنبوبة الطرد المركزي الفائق يجفف الحامض ثم يذاب بعدة مليلترات من الماء المقطر المعقم وينقل إلى عمود الفصل من النوع Oligo dT cellulose لفصل الحامض النووي المرسال mRNA عن بقية الأنواع الأخرى.

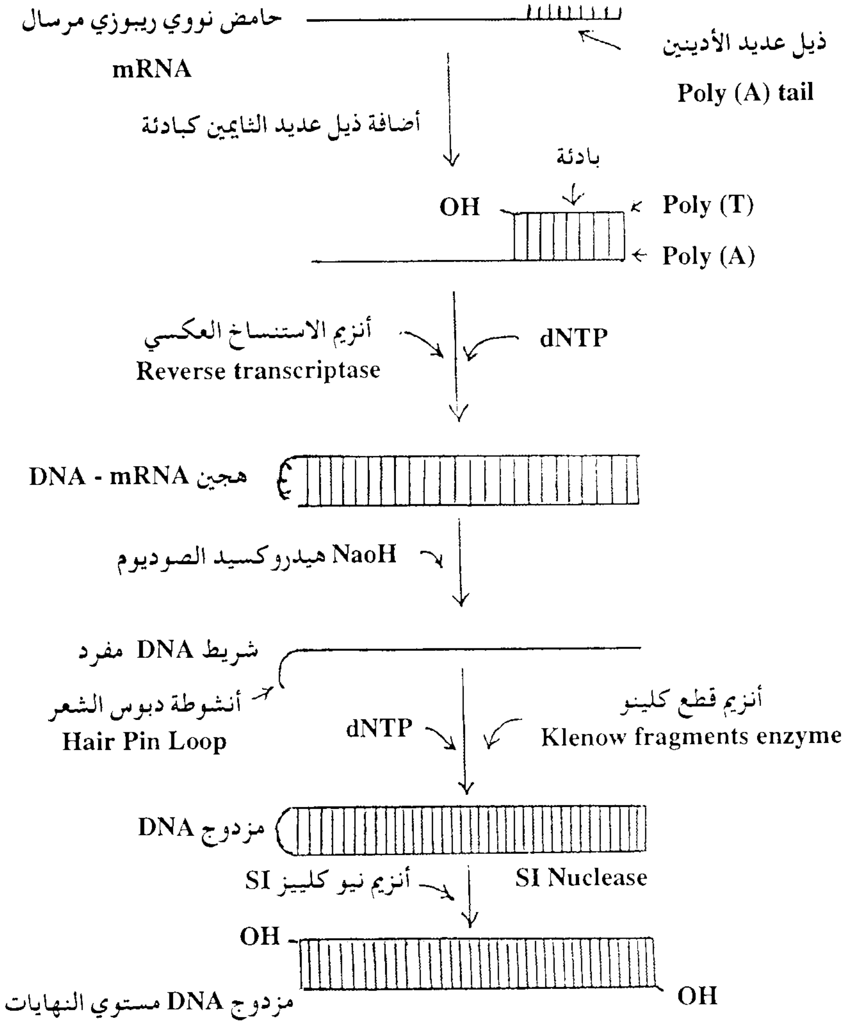
تُصنَعُ نسخ حامض نووي متمم cDNA من قالب حامض نووي مرسال اعتماداً على قدرة أنزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcriptase الذي

يتمكن من البناء بوجود بادئه ملتصقة مع قالب mRNA وذات نهاية هيدروكسيلية. تضاف البادئات المؤلفة من ذيل عديد الثايمين Poly T tail لنهاية قالب الحامض النووي المرسال المؤلف من ذيل عديد الادنين Poly A tail. وتوفر هذه البادئات النهايات الهيدروكسيلة اللازمة لعمل أنزيم الاستنساخ العكسي بوجود النيوكليوتيدات الأربعة المناسبة لبناء حامض نووي DNA.

يتم في المرحلة الأولى بناء نسخة مفردة من الحامض النووي المتمم ثم يتم التخلص من قالب الحامض النووي المرسال بإضافة هيدروكسيد الصوديوم. تنقى السلسلة الأولى المتممة من المحلول ثم تستخدم لبناء السلة الثانية بإضافة أنزيم قطع الكلينو Klenow Fregments enzyme والنيوكليوتيدات الأربعة. تحتوي السلسلة الأولى المتممة على نهاية معقوفة تشبه نهاية دبوس الشعر وتستخدم هذه النهاية كبادئة لبناء السلسلة المتممة الثانية - يتم بعدها التخلص من أنشوطة دبوس الشعر بإضافة أنزيم النيوكلييز SI Nuclease ليتم الحصول على شريط مزدوج من الحامض النووي المتمم cDNA شكل(11 - 8) تأتي أهمية الحامض النووي المتمم في أنه يمثل المحاور فقط ولذلك أهمية كبيرة في التعبير عن المورثات في حالة استخدام البكتريا كمضائف للقطع المهندسة وراثياً.

نواقل الهندسة الوراثية Vectors or Vehicles:

النواقل هي جزيئات بايولوجية كبيرة مؤلفة من الحامض النووي DNA دائري أو مستقيم وقد تتضمن بعض البروتينات كما في العاثيات والكوزميدات. تتميز هذه النواقل بقدرتها على التضاعف داخل الخلايا بصورة شبه مستقلة أو مستقلة على الأغلب ومستقرة وغير قابلة للتحلل ولها قدرة استيعابية جيدة على قبول قطع حامض نووي مختلفة الحجم. تعتبر البلازميدات والعاثيات والكوزميدات أهم النواقل المستخدمة في الهندسة الوراثية.



شكل (11 - 8) : طريقة تصنيع مزدوج حامض نووي DNA مكمل من شريط حامض نووي مرسال .

البلازميدات Plasmids:

وهي جزيئات حامض نووي DNA مزدوج حلقي ذات تضاعف مستقل عن الصبغيات وتوجد كثيراً في البكتريا وبعض الخمائر .

ويتراوح حجم البلازميدات بين 0.05 إلى أكثر من 200 كليوقاعدة . أن البلازميدات مواد وراثية غير ضرورية لنمو وتكاثر الخلايا الا أنها قادرة على تزويد الخلايا بصفات إضافية في ظروف معينة لاحتواءها على مورثات خاصة بها مثل مورثات مقاومة المضادات الحياتية (جدول 11 - 2) .

تتضاعف البلازميدات داخل الخلايا الحية مستخدمة الأنزيمات الخلوية الا أنها تسيطر على عملية تأسيس هذه التضاعف عن طريق مورثاتها الخاصة . بعض البلازميدات لها القدرة على الاتحاد مع الحامض النووي الخلوي

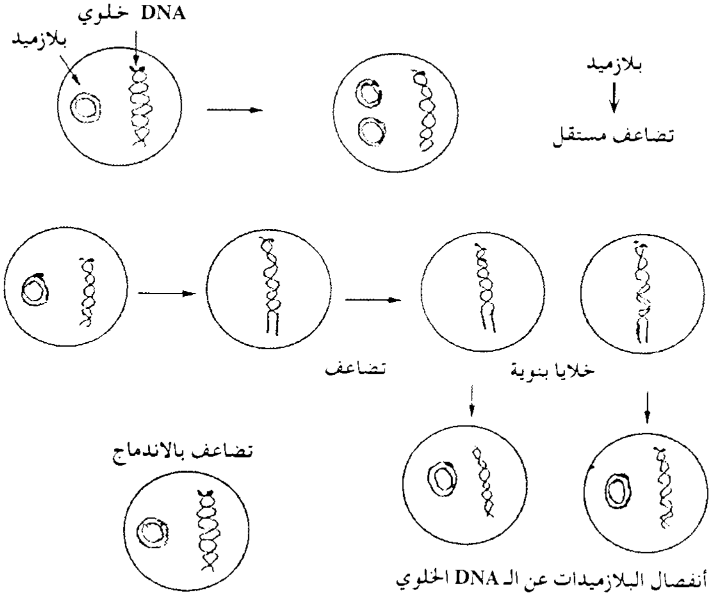
جدول (11 - 2) : البازميدات المستخدمة في الهندسة الوراثية .

البلازميد	صفة المقاومة
PSC 101	تتراسايكلين
COL E1	الكوليسين El
RSF 2124	أمبيسلين
PBR 322	أمبيسلين + تتراسايكلين
PBR 325	أمبيسلين + تتراسايكلين +كلورومفينكول
PAT 153	أمبسلين + تتراسايكلين
PUC 8	أمبسلين + Lac Z
PHP 34	أمبسلين + Lac Z
SPS 64	أمبسلين .

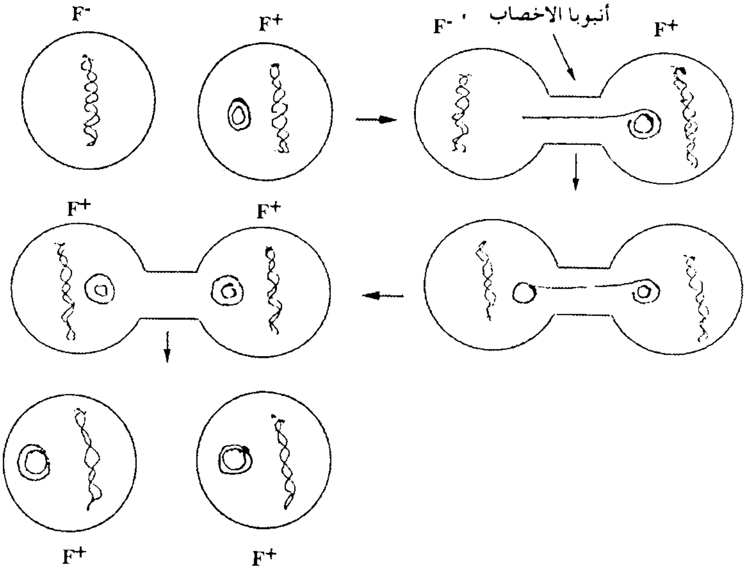
وتتضاعف عند تضاعف الخلية وتدعى هذه بالايبوسومات Eposomes وغالباً ما تكون هذه بلازميدات صغيرة الحجم. ترجع قابليتها الاتحادية هذه إلى وجود ترددات تدعى بالعناصر الانتقالية Transposable elements أو عناصر الاندماج Insersion elements . تتألف هذه العناصر من ترددات من النيوكليوتيدات لها ترددات متممة في الحامض النووي الخلوي بحيث تتمكن البلازميد من فتح نفسها ذاتياً أو بالأنزيمات من هذه الترددات وتلتحم مع نظائرها المتممه على الحامض النووي الخلوي وينفصل البلازميد بعد تضاعفة عن الخلية من نفس مواقع التحامة (شكل11 - 9) .

يمكن للبلازميدات أن تنتقل من خلايا إلى خلايا أخرى ولا يحصل ذلك لجميع البلازميدات بل لبعض منها التي تدعى بالبلازميدات الاقترانية Conjugative Plasmids وتدعى أيضاً ببلازميدات الخصوبة أو الجنس Fertility or Sex Plasmids . يمكن أيجاد الأنواع الاقترانية وغير الاقترانية في خلية واحدة أو قد تكون منفصلة. ترجع القدرة الاقترانية لبعض الخلايا التي يرمز لها +F لوجود مجموعة من المورثات البلازميدية التي تدعى tra أو المورثات الناقلة Transfer genes. تساعد هذه المورثات على بناء أنبوب أخصاب Pilus بين الخلايا الاقترانية والخلايا اللاأقترانية -F تنتقل عبره نسخة من أشرطة البلازميد نحو الخلية -F يتضاعف عندها بلازميد كل من الخليتين المرتبطتين لتتحول كل منهما إلى خلية +F (شكل11 - 10) .

تتمكن بعض أنواع البلازميدات الاقترانية من الالتحام مع الحامض النووي الخلوي والتحول إلى أيبوسومات بنفس الطريقة السابقة. تدعى مثل هذه الخلايا بالخلايا عالية التردد High Frequency Recombinants (HFr). كما تتمكن خلايا HFr من بناء أنبوب أخصاب مع خلايا -F لتزويدها بنسخة من البلازميد .



شكل (11 - 9) : تضاعف البلازميدات اللاأقترانية في البكتريا .



شكل(11 - 10): تضاعف البلازميدات الاقترانية خلال أنبوب الأخصاب .

مميزات البلازميدات المناسبة في الهندسة الوراثية :

هناك عدد من المميزات التي يجب توفرها في البلازميد المناسب للهندسة الوراثية منها أن يكون البلازميد ذو حجم مناسب يسهل معه التعامل والاستخلاص وتعتبر البلازميدات المتوسطة الحجم (**10 - 20** كليوقاعدة) أفضل هذه الأنواع. كما يجب أن يكون للبلازميد خريطة وراثية معروفة يتم من خلالها تحديد مورثاته وتحديد الموقع المناسب للغرس. وأن يحتوي على صفة واحدة انتقائية على الأقل مثل مورث للمقاومة المضادات الحياتية يساعد في تمييز الخلايا التي تحتوي عليه.

إضافة لذلك فإنه يجب أن يكون البلازميد ذو استقرارية عالية بعد الغرس وبقاءه في الخلايا المضيفة دون تحلل أو فقدانه وأن يحتوي على مواقع قطع لانزيمات مختلفة وله على الاقل منشأ تضاعفي واحد.

الهندسة الوراثية للبلازميدات :

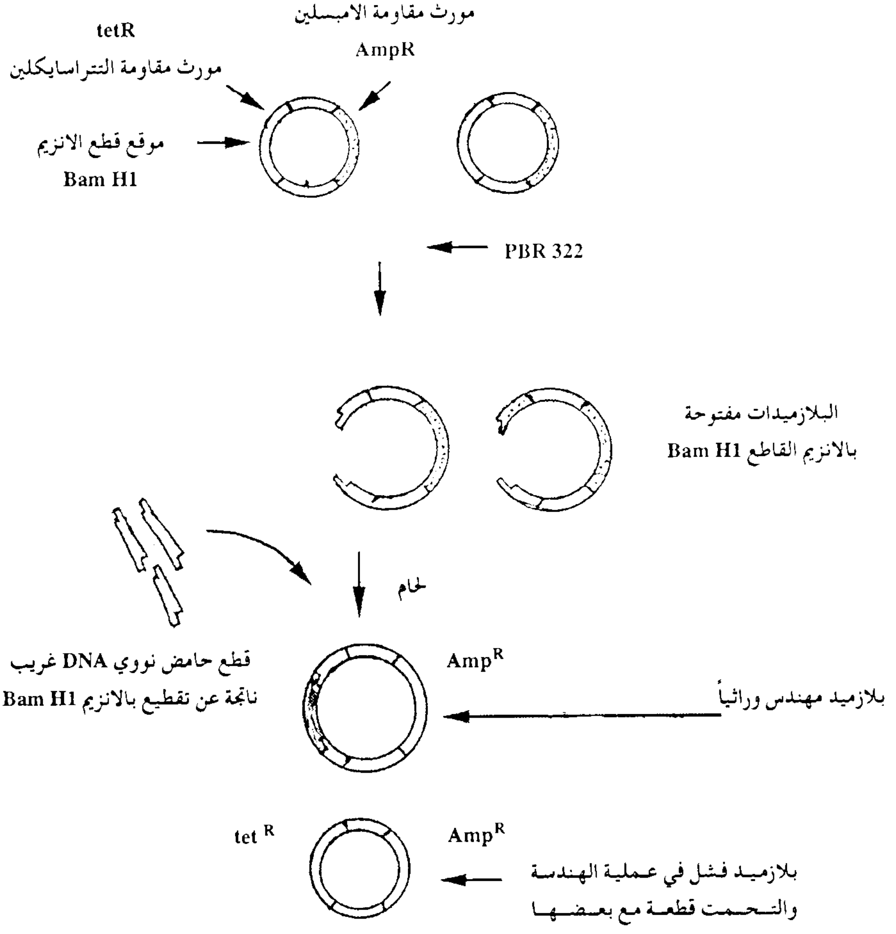
تستخدم البلازميدات في الهندسة الوراثية بطريقتين رئيسيتين هما الغرس التثبيطي والغرس دون تثبيط.

الغرس التثبيطي :

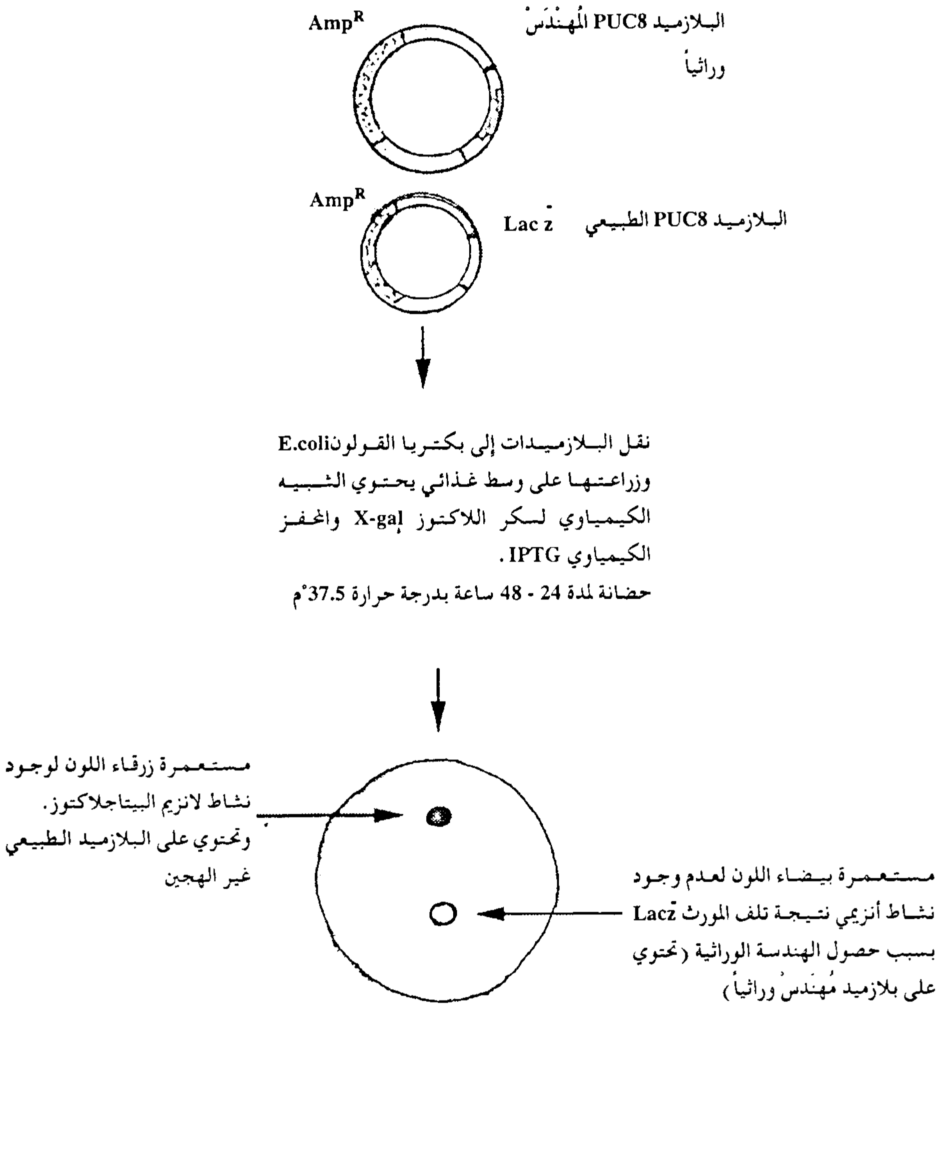
يستخدم في هذا النوع من الهندسة بلازميدات ذات صفتين أنتقائيتين مثل وجود مورثين لمقاومة مضادين حيويين يتم خلالها غرس قطعة الـ **DNA** الغريبة (المورث الجديد) بين جنبات أحد مورثات مقاومة المضادات الحيوية بحيث يؤدي ذلك إلى تلف مورث المقاومة هذا وبقاء صفة انتقائية واحدة تعود للمورث المقاوم السليم. تعزل البلازميدات المهندسة وراثياً بأستخدام الصفة الانتقائية الثانية. ويعتبر البلازميد **PBR 322** الذي يحتوي على مورثين لمقاومة الامبسلين والتتراسايكلين أفضل مثال على الغرس التثبيطي.

يحتوي هذا البلازميد على مواقع متعددة لعدد من الأنزيمات القاطعة تقع

جميعها داخل مورث التتراسايكلين. لذلك فأنه في حالة فتح البلازميد في موقع أحد هذه الأنزيمات وغرس قطعة حامض نووي DNA داخل مورث مقاومة التتراسايكلين فأنه يمكن تمييز البلازميدات الهجينة عن طريق انتقاء البلازميدات المقاومة للامبسلين فقط بينما تعتبر البلازميدات المقاومة للامبسلين والتتراسايكلين فاشلة في عملية الغرس شكل (11 - 11). كما يمكن استخدام مورث مقاومة الامبسلين في الغرس لوجود عدد إضافي من مواقع القطع الخاصة بأنزيمات قطع أخرى. لا تقتصر استخدام طريقة الغرس التثبيطي على البلازميدات المحتوية على مورثات مقاومة المضادات الحياتية بل يمكن استخدام بلازميدات ذات مورث مقاومة مضاد حياتي مفرد ومورث آخر مشفر لأنزيم غذائي معين مثل البلازميد PUC8 الذي يحتوي على مورث مقاومة الامبسلين وأخر يدعى بمورث Lac Z⁻ يشفر لجزء من أنزيم بيتا جالاكتوسايديز B-glactocidase (سلسلة الفا). تستقر القطع الغريبة المراد هندستها بين جنبات المورث LacZ⁻ وتتميز المستعمرات التي تحتوي على البلازميد الهجين بكونها مقاومة للامبسلين وغير قادرة على إنتاج أنزيم البيتاجالاكتو سايديز. ويتم الكشف عن انتاج الأنزيم باستخدام المركب x-gal الشبيه باللاكتوز مع الوسط الغذائي حيث تتلون الخلايا الفارزة لأنزيم بيتا جالاكتوسايديز باللون الأزرق نتيجة تحلل مركب X-gal. بينما تكون المستعمرات غير الفارزة للأنزيم ذات لون أبيض (تحتوي على البلازميد الهجين) شكل (11 - 12).



شكل (**11 - 11**): استراتيجية الهندسة بالغرس التثبيطي للبلازميد **PBR 322**. تؤدي الهندسة إلى أتلاف مورث المقاومة الذي يحمل بين جنباته قطعة الحامض النووي الغريب. كما قد تفشل بعض البلازميدات في الهندسة مؤدية إلى تكوين البلازميد الأصلي.



شكل (11 - 12) : استخدام الشبية الكيميائي لسكر اللاكتوز X-gal والمحفز IPTG لإنتقاء وتمييز البلازميدات الهجينة المهندسة وراثياً.

الغرس دون تثبيط :

يتم في هذه الطريقة استخدام بلازميدات ذات صفة انتقائية واحدة في الغالب مقاومة لمضاد حياتي معين. تؤدي الهندسة الوراثية لهذه البلازميدات إلى اضفاء صفة معينة مثل اللون أو أختلاف في تمييز المستعمرات ذات البلازميد الهجين.

كما يمكن استخدام طرق الهجرة الكهربائية في تمييز البلازميدات الهجنية عن غير الهجينة.

تعتبر هذه الطريقة محدودة جداً ولكن يمكن استخدامها في حالة بناء مكتبة مورثات عشوائية أو غيرها من الطرق المحدودة الهدف وتعتبر البلازميدات PAM و PsP أفضل هذه الأنواع.

العاثيات Bacteriophages:

العاثيات طفيليات أجبارية فايروسية مؤلفة من غلاف بروتيني يستقر داخله الحامض النووي DNA المزدوج أو المفرد الخيط. لا تستقر العاثيات داخل خلايا العائل بل تغادره حال أنتهاء تضاعفها . لذلك فهي تختلف كثيراً عن البلازميدات.

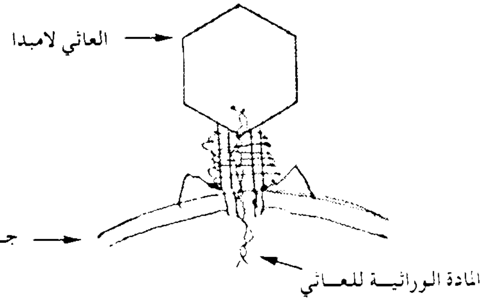
تفضل العاثيات كنواقل في الهندسة الوراثية لقدرتها على استيعاب قطع حامض نووي DNA غريب تتراوح بين 15 - 50 كيلوقاعدة وهو أكبر من القدرة الاستيعابية للبلازميدات. تنتمي العاثيات إلى مجموعتي الفايروسات المعقدة والمحلزنة. فالعاثي لامبدا Lambda ينتمي إلى مجموعة الفايروسات المعقدة ويتألف من رأس عديد الأضلاع وذيل وملحقات أخرى مؤلفة جميعاً من وحدات بروتينية خاصة ويستقر الحامض النووي DNA المزدوج الذي يبلغ حجمه 49 كيلو قاعدة في رأس العاثي. يتمكن العاثي من دخول البكتريا عن طريق استقراره بواسطة الاشواك الموجودة في نهاية منطقة الذيل على سطح

الخلية يقوم بعدها بحقن مادته الوراثية إلى سايتوبلازم الخلية شكل(**11 - 13**) .

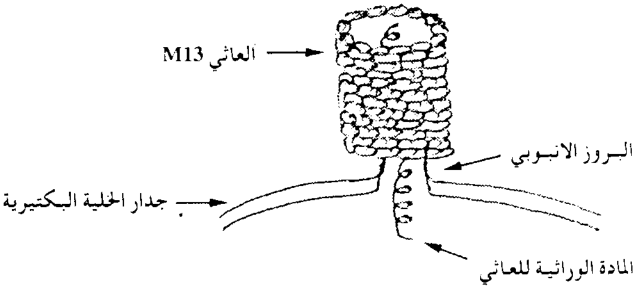
أما العاثي **M13** فينتمي إلى مجموعة الراشح المحلزنة الخيطية ويتصف بشكله العصوي وغلافه الاسطواني المجوف الذي يستقر بداخله شريط مفرد قصيرة **6.4** كيلو قاعدة من الـ**DNA** على هيئة لولب. يعمل هذا العاثي على الاستقرار على سطح الخلية المضيفة ويحفزها على تكوين أنبوب يتم من خلاله حقن مادته الوراثية نحو السايتوبلازم شكل (**11 - 14**).

تتضاعف العاثيات خلال دورات خاصة تختلف تبعاً لنوع العاثي المتضاعف. فالعاثيات التي تسلك الدورة المحللة **Lytic Cycle** والتي تستغرق حوالي عشرون دقيقة تطلق أجيال جديدة من العاثيات التي تحلل جدران الخلايا البكتيرية مؤدية إلى موتها. تتضاعف العاثيات المحللة داخل الخلايا المضيفة دون أن يلتحم حامضها النووي **DNA** مع **DNA** الخلايا ولكنها تستفيد من الأنزيمات الخلوية لأجل التضاعف شكل (**11 - 15**).

أما النوع الثاني من دورات التضاعف فهي الدورة الانحلالية **Lysogenic Cycle** حيث تلتحم المادة الوراثية للعاثي مع المادة لوراثية للخلايا وتتضاعف أثناء الانقسامات الخلوية. يدعى العاثي المرتبط بالعاثي الأولي **Prophage** وينفصل العاثي الأولي من فترة إلى أخرى عن المادة الوراثية الخلوية ليضاعف نفسه ويسلك كعاثي محلل **Lytic Phage** ويسلك العاثي لامبدا مثل ذلك شكل (**11 - 16**). أما العاثي **M13** فأنه يتضاعف داخل الخلايا دون أندماج ويخرج من الخلايا دون قتلها.



شكل (11 - 13): العاثي لا مبدا وطريقة حقنه لمادته الوراثية في خلية بكتريا.



شكل (11 - 14): العاثي M13 وطريقة حقنه لمادته الوراثية في خلية بكتريا

العاثي لامبدا

↓

أصابة البكتريا

↓

حقن العاثي لمادته الوراثية داخل البكتريا.

↓

تضاعف المادة الوراثية للعاثي داخل البكتريا دون حصول التحام.

↓

تعبئة المادة الوراثية للعاثي في البروتينات الفايروسية.

↓

تحليل خلايا البكتريا وأنطلاق العاثيات الجديدة.
نحو الخارج لإعادة الاصابة.

شكل (11 - 15): تخطيط مبسط لمراحل الدورة المحللة للعاثيات.

العاثي

↓

أصابة البكتريا بالعاثيات

↓

التحام المادة الوراثية للعاثيات مع المادة الوراثية للخلايا المصابة

↓

تضاعف الخلايا لمرات عديدة

↓

انفصال المادة الوراثية للعاثيات عن المادة الوراثية للخلايا

↓

تضاعف DNA العاثيات عدة مرات

↓

التحام DNA العاثيات مع DNA الخلايا لإعادة الدورة
أو سلوك العاثيات في دورة محللة .

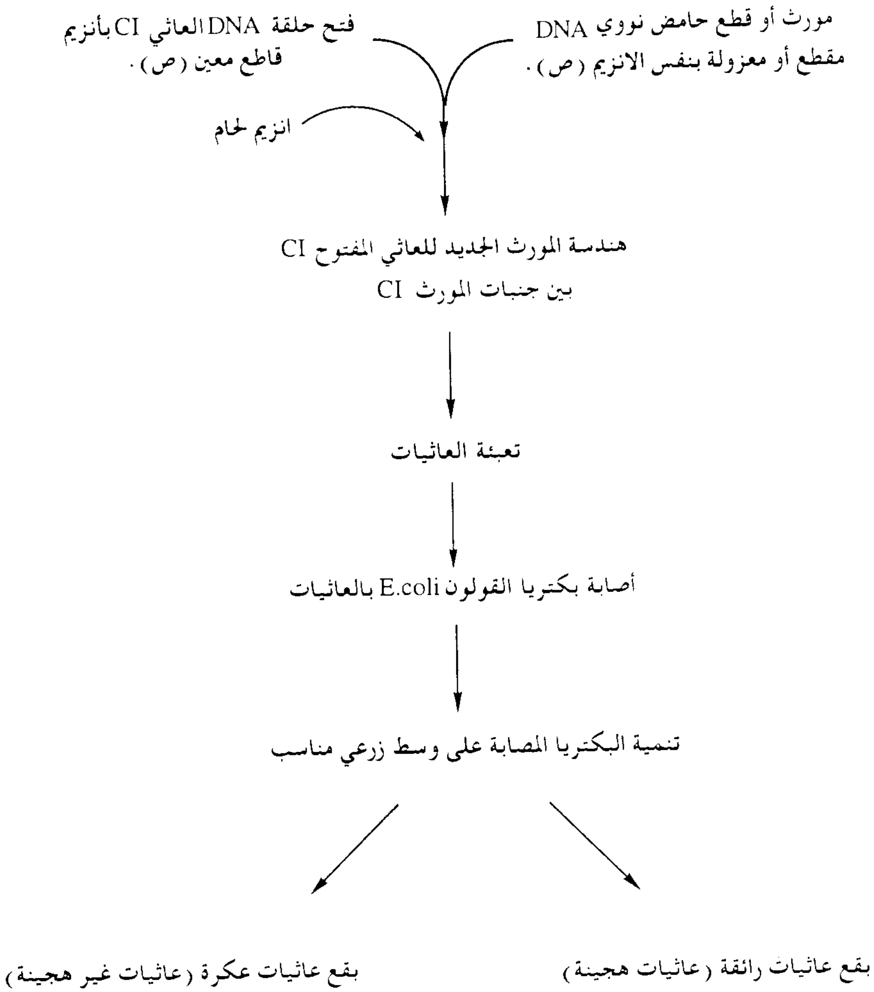
شكل (**11 - 16**) : تخطيط مبسط لمراحل الدورة التحللية .

الهندسة الوراثية للعاثيات :

كما ذكرنا سابقاً فأن العاثيات تعتبر نواقل مفضلة في العديد من تجارب الهندسة الوراثية ويعود ذلك كما سبق إلى سهول التعامل معها وقدرتها على استيعاب قطع حامض نووي **DNA** كبيرة نوعما . هذا إضافة إلى أن بعضها لابد من استخدامه كما هو الحال في العاثي **M13** وخصوصاً في تجارب قراءة ترددات الأحماض النووية وبناء سلاسل الحامض النووي المتمم **cDNA.** تستخدم العاثيات في الهندسة الوراثية بنفس الطرق التي تم الحديث عنها في استخدام البلازميدات في الهندسة الوراثية وهي طريقة الغرس التثبيطي والطبيعي .

استخدام العاثيات في الغرس التثبيطي :

تغرس المورثات أو قطع الحامض النووي **DNA** المراد هندستها بهذه الطريقة داخل موقع مورث معين في عاثي يحمل صفة مميزة معينة انتقائية ونتيجة لهذا الغرس يفقد هذا المورث قدرته على التعبير عن نفسه وبالتالي تختفي الصفة الانتقائية . يوجد العديد من العاثيات المشتقة التي تحمل مثل هذه الصفات الانتقائية مثل العاثي **M13 LacZ⁻** و **LambdaLacZ⁻** وغيرها . يؤدي غرس المورث الغريب في موقع يقع داخل المورث **LacZ⁻** إلى تثبيطه وتوقف بناء أنزيم البيتا جلاكتوسايديز . لذلك فأنه يمكن تمييز العاثيات الهجينة عن غير الهجينة بزراعة بكتريا القولون **E-coli** المصابة بالعاثيات المهجنة (وغير المهجنة التي تفشل في الهندسة) على وسط غذائي مقوى بمادة **X-gal** حيث تظهر بقع العاثيات الهجينة شفافة بينما تظهر بقع العاثيات غير الهجينة زرقاء اللون لإفراز مضائفها لأنزيم البيتا جلاكتوسايديز الذي يحلل المركب **X-gal** لإعطاء اللون . تحتوي بعض العاثيات على مورث **CI** ويؤدي تثبيطه عند كلونة مورث داخله إلى الحصول على بقع عاثيات مهجنة رائقة شفافة مقارنة مع العاثيات غير الهجينة عكرة المظهر شكل (**11 - 17**) .

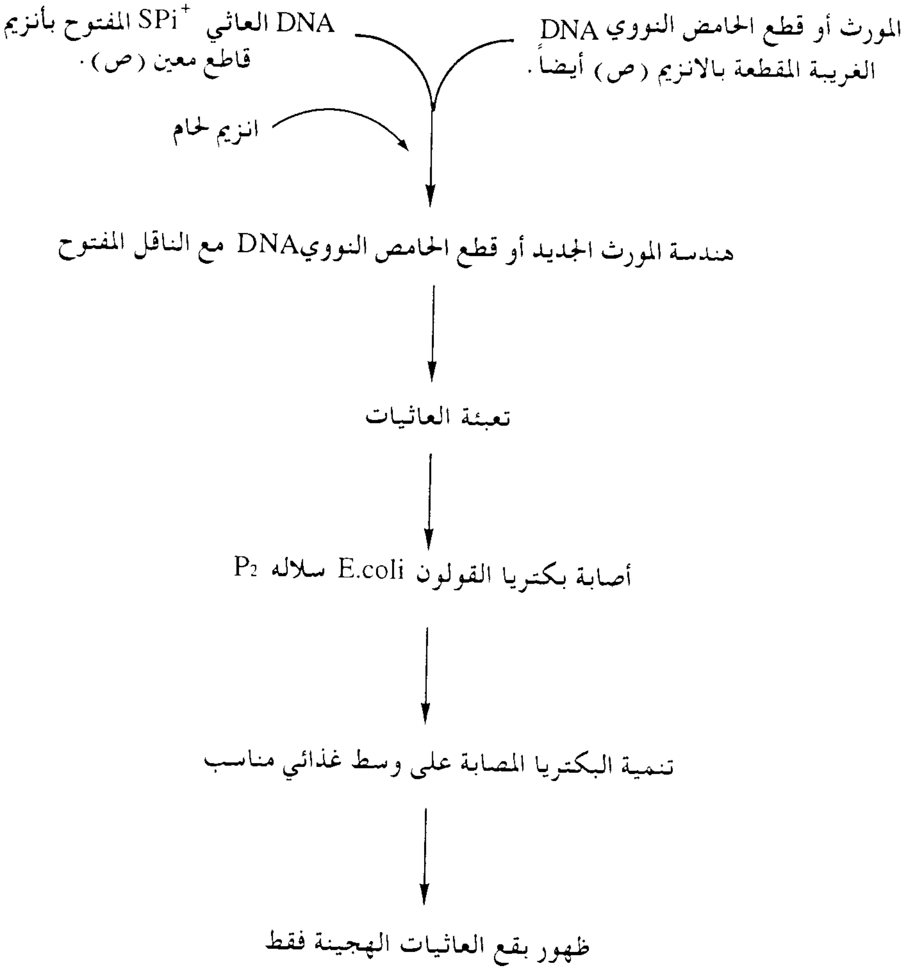


شكل **(11 - 17)**: طريقة الغرس بالتثبيط باستخدام العاثي لامبدا **CI**.

استخدام العاثيات بالغرس دون تثبيط :

تغرس المورثات المطلوب هندستها أو قطع الحامض النووي **DNA** في هذه الطريقة دون ضرر لمورثات الناقل وتستخدم أساليب أخرى لتمييز العاثيات الهجينة.

فمثلاً أن العاثي لامبدا Spi^{+} يفشل في أصابة بكتريا القولون سلالة **P2** بسبب حمايتها من الإصابة لوجود البلازميد **P2** داخلها . لقد تم تحوير هذا الناقل بحيث يتمكن من إصابة هذه السلالة من البكتريا فقط عند هندسته مع مورث أو قطعة حامض نووي جديدة . لذلك فإن جميع العاثيات الهجينة ستتمكن من إصابة بكتريا القولون غير الهجنية شكل (**11 - 18**) .



شكل(**11 - 18**) : طريقة الغرس دون تثبيط للعاثي لامبدا Spi^{+} .

الكوزميدات Cosmids:

الكوزميدات نواقل هجينة من البلازميدات والعاثيات. تحتوي الكوزميدات على مورث انتقائي وموقع للتضاعف وأخر لزج C0S وكنتيجة للتركيب الخاص للكوزميدات فأنه يتم تعبئتها تماماً كالعاثيات وتتضاعف داخل المضائف كبلازميدات دون أن تحللها أو تقتلها. تمتلك الكوزميدات صفات خاصة بها منها قدرتها على استيعاب غرس قطع DNA كبيرة الحجم أكبر من تلك التي تستوعبها العاثيات. إضافة إلى أن الكوزميدات التي تفشل في الهندسة الوراثية لا تتمكن من النمو داخل البكتريا. وتعتبر الكوزميدات PJB8 و C2 XB أفضلها وتستخدم كثيراً في بناء بنوك المورثات.

نواقل التعبير Expression Vectors:

وهي نواقل خاصة تستخدم لأجل التعبير عن المورثات في المضائف. تأتي أهمية هذه النواقل نتيجة أحتواءها على محفزات مناسبة للتعبير داخل البكتريا أو الخمائر بسبب فشل المورثات التي تعود للأحياء حقيقية النوى بالتعبير عن نفسها داخل البكتريا بسبب أختلاف المحفزات المورثية لديها عن تلك الموجودة في البكتريا. وقد تكون هذه النواقل بلازميدات أو عاثيات. توجد الآن مجموعتين من نواقل التعبير هما مجموعة نواقل التعبير البسيطة التي تحتوي على محفزات بكتيرية فقط ومجموعة نواقل الكاسيت التي تحتوي إضافة للمحفزات البكتيرية على موقع الارتباط الريبوسومي وموقع لغالق إضافة لموقع يتضمن أماكن قطع للعديد من أنزيمات التقييد.

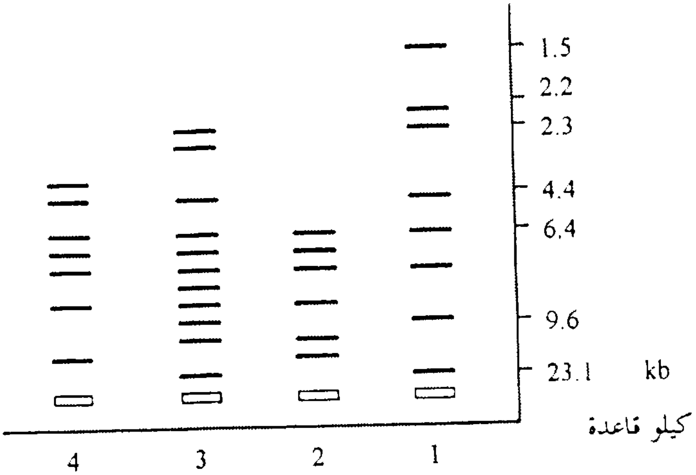
تتم السيطرة على تعبير المورثات في نواقل التعبير من خلال إضافة أو فقدان مادة غذائية معينة في الوسطة الغذائي المستخدم. فمثلاً ينظم تعبير المورثات في النواقل البسيطة التي تحتوي على المحفز trp عن طريق إضافة أو إزالة التربتوفان من الوسط الغذائي. فإضافة التربتوفان يوقف التعبير بينما

يؤدي فقدانه إلى فتح التعبير. كما تستخدم مواد كيميائية أخرى للسيطرة على التعبير مثل مادة 3- indoly acetic acid للسيطرة على تعبير المورثات في النواقل التي تحتوي المحفز trp بينما يستخدم المركب Isopropyl-B-O-thioglactoside (IPTG) لأجل حث أو أيقاف التعبير في الناقل الذي يحتوي على المحفر tac.

- تقطيع الحامض النووي بالانزيمات القاطعة

يتم خلط كمية معينة (ميكرو جرام مثلاً) مع عشرة وحدات من الأنزيم القاطع بوجود محلول دارىء (Buffer) خاص بالأنزيم في قنينة خاصة صغيرة. يحضن التفاعل بعد ذلك لفترة 2 - 24 ساعة بدرجة حرارة مناسبة للأنزيم ثم يتم عزل القطع الناتجة من التفاعل باستخدام الترحيل الكهربائي. بعد وضع القطع ممزوجة بصبغة المثيل في حفر صغيرة غير نافذة في هلام الآجار المناسب وباستخدام تيار كهربائي عإلى مار في محلول ملحي مخفف خاص يغطي هلام الأجار فإن قطع الحامض النووي سوف تهاجر بإتجاه القطب الموجب لكون الحامض النووي سالب الشحنة. تهاجر قطع الحامض النووي بسرع مختلفة اعتماداً على وزنها الجزيئي. فالقطع الكبيرة الحجم ذات الوزن جزيئي العالي تهاجر ببطئ وتتخلف في نهاية القطع بينما تهاجر القطع الصغيرة بسرعة متجهة إلى أعلى الآجار. وتتسلسل القطع الأخرى بين هاتين المجموعتين. تستخدم قطع حامض نووي صغيرة الحجم ومعلومة الوزن الجزيئي كما هو الحال في قطع الحامض النووي للعاثي لامبدا المقطعة بالأنزيم HindIII كمعيار لمعرفة الأوزان الجزيئية لقطع الحامض النووي الصبغي. يمكن رؤية الحامض النووي المقطع بعد صبغ الآجار بصبغة الاثيديوم بروومايد واستخدام الأشعة فوق البنفسجية حيث يظهر الحامض النووي بلون أحمر. إن الحامض النووي الخاص الأحياء حقيقية النوى والبدائية النواة المهاجر يظهر بشكل مسحة مستطيلة الشكل طويلة. تمثل هذه المسحة قطعاً متسلسلة الحجم جنباً

إلى جنب. بينما يظهر الحامض النووي المعياري على شكل قطع حمراء منفصلة شكل (**11 - 19**).



شكل (**11 - 19**) : الهجرة الكهربائية لقطع مجهولة الحجم (**4,3,2**) مع قطع الحامض النووي معلوم (1) (لامبدا **(Hind III)** باستخدام هلام الآجاروز.

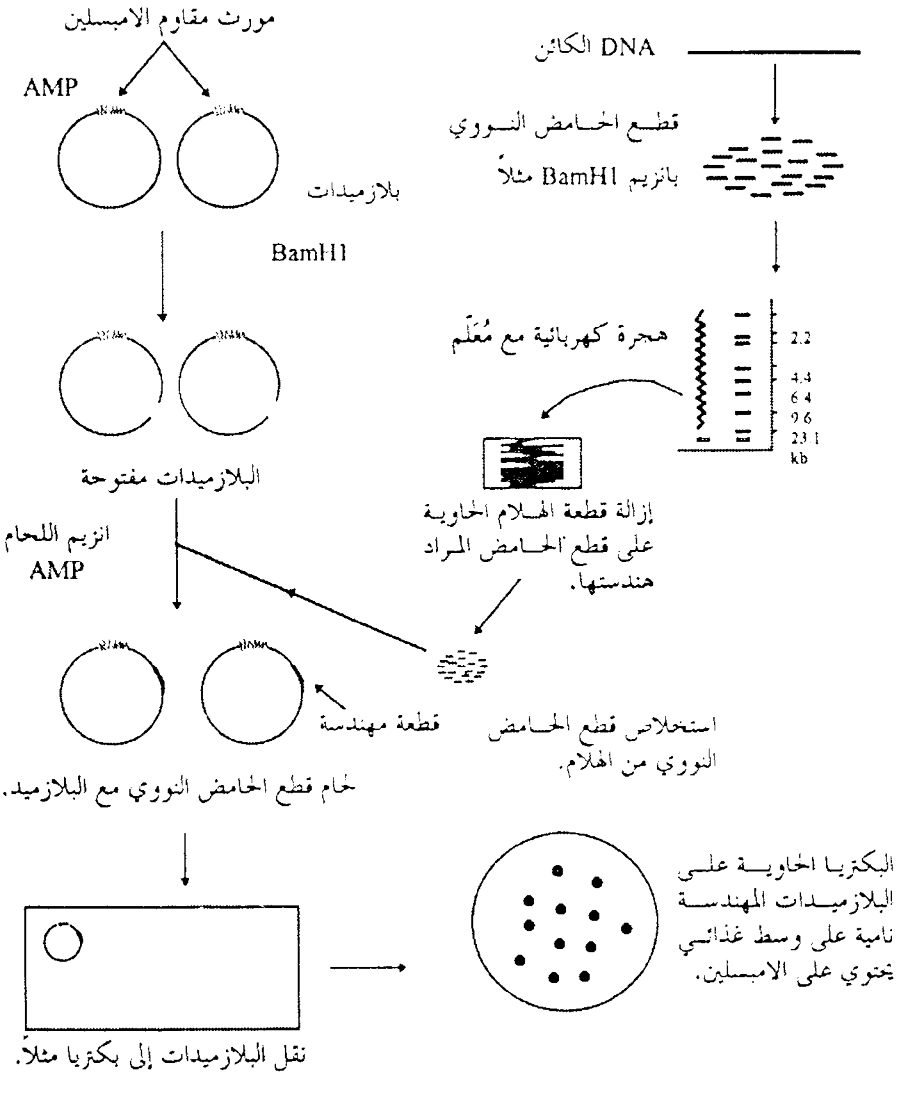
استخلاص قطع الحامض النووي المناسبة

بعد التعرف على الأوزان الجزيئية للقطع المعاملة بالأنزيم القاطع يتم فصل جزء الآجاروز الحاوي على القطع المطلوبة. يتم معاملة الآجاروز بأنزيم الآجاريز **(Agarase)** الذي يعمل على تحطيم الآجاروز مطلقاً قطع الحامض النووي المناسبة. يطرد محلول الآجار مركزياً حيث تجمع القطع المطلوبة من الراشح. كما يمكن استخلاص القطع بإضافة ملح ضعيف التركيز أو طرق كيميائية أخرى.

بنك المورثات Genes Bank

لأجل تهيئة بنك يحتوي على قطع حامض نووي تمثل معظم المورثات التركيبية في كائن معين. يجب استخدام ناقل مناسب تبعاً لحجم القطع المراد

هندستها. كما ينبغي بالناقل أن يحتوي على منطقة للقطع بنفس الأنزيم القاطع المستخدم لقطع الحامض النووي الصبغي. كذلك احتوائه على مورث مقاوم لمضاد حيوي واحد أو أكثر أو غيره من المورثات التي تساعد على انتقاء النواقل الهجينة (Clones). يتم فتح الناقل بواسطة الأنزيم القاطع ثم تخلط قطع الحامض النووي مع الناقل المفتوح ويضاف أنزيم اللحام والمحلول الداريء الخاص به ويحضن الخليط بدرجة حرارة مناسبة ولفترة مناسبة اعتماداً على نوع أنزيم اللحام المستخدم. يراعى استخدام كميات مناسبة من الناقل وقطع الأنزيمات الصبغي لأجل الحصول على كفاءة هندسة عالية. يقوم أنزيم اللحام بربط قطع الحامض النووي الصبغي مع النهايات اللزجة للناقل المتكونة من تقطيعة بالأنزيم القاطع. تنقل النواقل المهندسة وراثياً إلى مضائف (Hosts). وهي عادة البكتريا ويراعى استخدام سلالة بكتريا مناسبة للناقل. ويذكر بأنه يتم إعداد هذه البكتريا لتقبل الناقل بواسطة المعاملة بالاملاح بطريقة خاصة. تدخل النواقل إلى البكتريا المعاملة بالاملاح باستخدام طريقة خاصة تستخدم فيها درجات حرارة منخفضة–وسط منخفضة يتم بعدها زرع البكتريا على وسط غذائي حاوي على المضاد الحيوي المناسب وتحضن الأوساط الغذائية لفترة 24 - 48 ساعة بدرجة حرارة مناسبة. تنمو البكتريا الحاوية على البلازميدات المهندسة وراثياً فقط على الوسط الزراعي.بينما تفشل الأخرى التي لم تتمكن من استلام الناقل من النمو. وهكذا يتم عزل مستعمرات البكتريا الحاوية على النواقل المهندسة حيث أن كل مستعمرة ناشئة من خلية بكتريا واحدة حاوية على بلازميد واحد أو أكثر يحتوي على قطعة معينة من الحامض النووي الصبغي. وبهذه الخطوة يكون بناء البنك قد اكتمل وعندها يتم تنمية البكتريا في وسط غذائي سائل مع المضاد الحيوي ثم تجمع البكتريا بالطرد المركزي وتخزن تحت درجة حرارة منخفضة (-20) - (-70)°م بعد إضافة 50% جليسرول شكل (11 - 20).



شكل (11 - 20) : خطوات بناء بنك المورثات .

حساب عدد الكلونات الممثلة في البنك

يتم حساب سعة البنك من خلال حساب عدد الكلونات الممثلة في البنك والتي تعطي صورة عن حجم المورثات فيه. تستخدم طريقة كلارك

وكاربون 1976 لحساب عدد الكونات في البنك وحسب المعادل التالية :

$$N = \frac{In(1 - P)}{In(1 - n)}$$

حيث أن :

N = عدد الكلونات التي يجب اختيارها في البنك.

n = نسبة حجم المورث إلى حجم قطع الحامض النووي المهندسة وراثياً.

P = احتمالية وجود أي مورث في البنك.

فمثلاً : يبلغ محتوى التوريث في الإنسان **2.8×10^9** كيلو قاعدة **(Kb)** ولو افترضنا بأن حجم القطع المهندسة وراثياً هو 20 كيلو قاعدة فإن نسبة حجم أي مورث إلى حجم القطع المهندسة هو :

فإذا كانت الاحتمالية المطلوبة هي **95%** فإن قيمة **N** ستكون

$$N = \frac{In(1 - 0.95)}{In(1 - 20/2.8 \times 10^9} = 4.2 \times 10^8$$

وهذا يعني وجوب اختيار 4.2×10^8 كلون لأجل الحصول على احتمال **95%** بوجود المورث المطلوب.

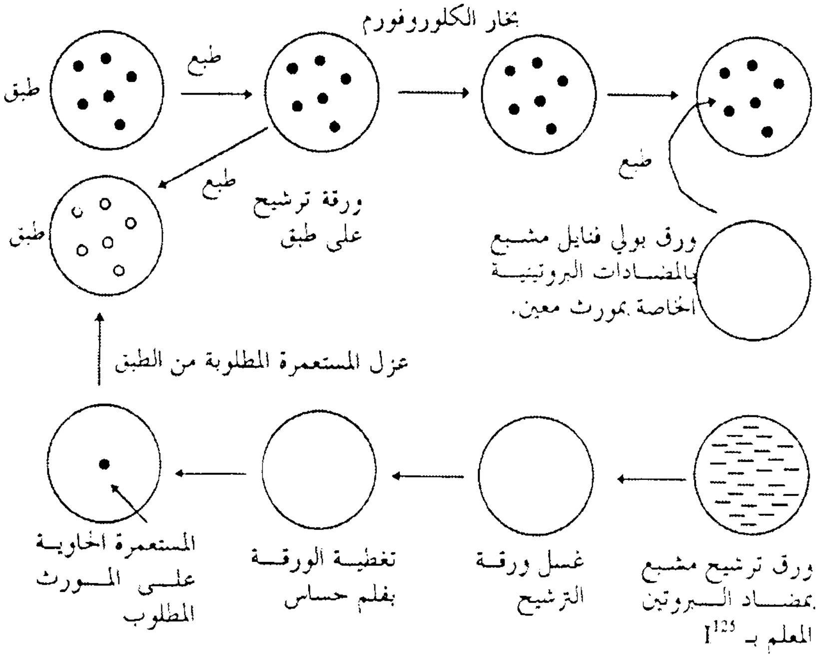
وكلما زادات درجة الاحتمال زادت احتمالية العثور على المورث.

تشخيص الكلونات الحاوية على مورث معين

تستخدم عدة طرق لتشخيص المستعمرات البكتيرية الحاوية على قطع حامض نووي هجينة. تعتبر الطرق المناعية والتهجين النووي أشهر هذه الطرق.

الطريقة المناعية

تستخدم هذه الطريقة لعزل قطع الحامض النووي المهندسة مع البلازميد والحاوية على مورث له القابلية على التعبير داخل البكتريا. أن معظم المورثات الخاصة بالأحياء حقيقية النوى لا تتمكن من التعبير عن نفسها في البكتريا لاختلاف المحفز لها عما موجود في المورثات البكترية. لذلك فإن هذه الطريقة محدودة جداً. يتم زرع كمية من خلايا بنك المورثات على طبق زرعي مناسب ويكرر زراعة نفس الطبق على طبق ثاني بواسطة ورقة ترشيح. يؤخذ طبق واحد ويعرض إلى بخار الكلوروفورم حيث يعمل البخار على تحليل المستعمرات البكتيرية وإطلاق البروتينات بضمنها بروتين المورث المطلوب عزلة. تغطى المستعمرات المتحللة بعد ذلك بطبقة من ورق البولي فنايل المشبعة بالمضادات البروتينية الخاصة ببروتين المورث المراد عزلة فقط حيث يتفاعل هذا المضاد مع البروتين المعني لتكوين معقد مناعي على الورقة. تزال الورقة بعد ذلك وتعامل مع مضاد البروتين الموسم بنظير اليود 125 (I^{125}) حيث يلتصق هذا المضاد بالمعقد المناعي في حالة وجوده. تغسل الورقة لإزالة المواد الزائدة العالقة بها. تجفف قليلاً وتغطى بشريط فوتوغرافي حساس في غرفة مظلمة وتحفظ في درجة حرارة منخفضة لعدة أيام حيث تتكون بقعة سوداء على الشريط الحساس بعد تحميضه دلالة على موقع المستعمرة البكتيرية الحاوية على البلازميد الهجين بقطعة حامض نووي الصبغي المهندسة وراثياً والتي تحتوي المورث المطلوب. تعزل المستعمرة في الطبق الأصلي (المكرر الثاني) ويعاد استخلاص البلازميدات من البكتريا بعد تنميتها بأعداد كبيرة ثم تفصل قطع الحامض النووي المهندسة وراثياً من البلازميدات ويتم استخلاصها لإعادة قطعها كما سبق لأجل عزل المورث المطلوب شكل (11 - 21).



شكل (11 - 21) : خطوات الطريقة المتاعبة لعزل قطع الحامض النووي الحاوية على ورث معين.

طريقة التهجين النووي

تعتمد هذه الطريقة على استخدام مجس معلم بنظير الفوسفور32 .(P32) المجس المستخدم هو عبارة عن المورث المطلوب عزله ولكن مأخوذ من كائن آخر. فعلى سبيل المثال يستخدم مورث الانسولين (عدد 2) المعـزولة من الفئران أو الأرانب لغرض استخدامها كمجسات للبحث عن نفس المورث في خلايا الإنسان. يتم زراعة كمية من بكتريا بنك المورثات على طبق زرعي. بعد نمو البكتريا تغطى المستعمرات الناتجة بورقة نايتروسليلوز حيث تنطبع المستعمرات عليها. تهجن الخلايا المنقولة على الورقة باستخدام محلول تهجين خاص يحتوي على المجس الموسم بنظير الفوسفور 32. تغمر الورقة بمحلول التهجين وتحضن لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة(40 - 65°م) . ثم تغسل

جيداً بمحاليل ملحية مضاف إليها صوديوم دودوسيل سلفات لإزالة المواد المشعة الزائدة. بعدها يتم تغطية الورقة بشريط حساس حيث تظهر المستعمرة الحاوية على المورث المطلوب كبقعة سوداء بسبب ارتباط المجس مع المورث المطلوب. تؤخذ المستعمرة المشخصة من الطبق وتزرع لزيادة أعداد البكتريا ثم تستخلص البلازميدات المهندسة وراثياً وتفصل قطعة الحامض النووي الحاوية على المورث بالأنزيم القاطع المناسب وتعزل ويعاد قطعها مرة أخرى بالأنزيمات لأجل عزل المورث المطلوب. بالإضافة للطريقة السابقة فإن هناك طرقاً أخرى يمكن استخدامها لاكتشاف المورثات المشخصة لأول مرة. بعد عزل وتنقية المورث المطلوب يهندس مرة أخرى في نواقل أخرى تدعى نواقل التعبير لكي يقوم المورث بالتعبير عن نفسه. يقصد بتعبير المورثات هو تمكين المورث المعزول بتصنيع البروتين المسؤول عنه حيث تتمكن المورثات المعزولة من البكتريا من التعبير وذلك لتطابق محفزات المورثات بين المورث والبكتريا بينما لا تتمكن المورثات المعزولة من الأحياء حقيقية النوى من ذلك بسبب الأختلاف في محفزاتها. لذلك لا بد من استخدام نواقل تعبير خاصة تحتوي على محفزات بكتيرية عند ربط مورثات الأحياء حقيقية النوى ثم نقلها إلى البكتريا.

تطبيقات الهندسة الوراثية

تعتبر الهندسة الوراثية أحد الثوارث العلمية في القرن العشرين ويتكهن البعض إلى أنها ستتصدر الأهمية الأولى في القرن الواحد والعشرين. أدت تقنيات الهندسة الوراثية إلى الكشف عن الكثير من المعلومات التي تتعلق بالمورثات وعملها وطرق استنساخها وغيرها من المعلومات التي كانت ولعهد ليس بعيد من المعلومات الغامضة وكان من نتيجة الكشف عنها معرفة الكثير من أسرار الكائنات الحية. بالإضافة للجانب الاكاديمي للهندسة الوراثية فقد تجمعت العديد من المعلومات والأفكار التي أهلت الهندسة الوراثية للولوج

في العالم التطبيقي للمعرفة. وهكذا دخلت الهندسة الوراثية المجال الواسع في الصناعة والطب والزراعة وغيرها من المجالات الحياتية الهامة وكان من نتيجتها إنتاج العديد من المضادات الحيوية كالبنسلين والسيفالوسبورين وعوامل النمو والعديد من الأنزيمات واللقاحات. كما استخدمت الهندسة الوراثية لإنتاج العديد من الطرز النباتية المقاومة للمبيدات وللحشرات والفطريات والتي أدت إلى تحسين الإنتاج الزراعي وتطويره. كما استخدمت هذه التقنيات في البحوث الطبية لتشخيص الأمراض ذات المنشأ الوراثي ولمعرفة الاختلالات الوراثية المرتبطة ببعض الأمراض كما هو الحال في مرض فقر الدم المنجلي الوراثي والسكر والسرطان وأشكال مختلفة من الأمراض الأخرى ونوجز عنا بعض تطبيقات الهندسة الوراثية:

1- **تشخيص الأمراض الوراثية**: تمثل الأمراض الوراثية أحد أهم الفروع الطبية نظراً لعدم توفر طرق التشخيص الملائمة وصعوبة علاج الكثير منها ومن أهم الأمراض فقر الدم المنجلي **(Sickle cell anemia)** والثالاسيما **Thalassemia** لقد أجريت حول هذين المرضين العديد من الأبحاث التي بينت أسباب حصولهما (طفرات وراثية). وباستخدام الهندسة الوراثية فإنه أصبح بالإمكان التشخيص المبكر لهذه الأمراض في المرحلة الجنينية. أذ يتم أخذ عينة من خلايا الجنين واستخلاص الحامض النووي منها بعد تكثيرها مختبرياً ثم تقطيعها بأنزيمات معينة. وباستخدام مجس معلم إشعاعياً (مورث – بيتا – جلوبين في فقر الدم المنجلي) فإن يمكن الكشف عن وجود هذا المرض. ويتم استخدام تقنية الهندسة الوراثية في متابعة العديد من الأمراض التي ترتبط بعيوب وراثية كالطفرات الوراثية أو الانتقال الصبغي أو تنشيط مورثات غير طبيعية. وتعتبر أبحاث السرطان باستخدام هذه التقنية من التطبيقات الرائدة في هذا المجال. وعلاوة على ذلك فإن الهندسة الرواثية تستخدم الآن في مشاريع كبيرة تهدف إلى وضع خرائط صبغية تبين مواقع

المورثات البشرية عليها. كما تستخدم في مجال تحديد القرابة ومتابعة المجرمين والجرائم باستخدام طريقة بصمة الحامض النووي (DNA-fingerprints).

2- **التطبيقات الصناعية**: باستخدام الهندسة الوراثية فإنه تم الآن معرفة مواقع العديد من المورثات وفي كائنات مختلفة وأصبح نتيجة لذلك بالإمكان عزلها وهندستها وراثياً ونقلها إلى كائنات جديدة وأصبح بإمكاننا اليوم إنتاج العديد من المضادات الحيوية كالبنسلين والسيفالوسبورين والستربتومايسين كما أصبح بإمكاننا إنتاج أنواع مختلفة من الهرمونات مثل الانسولين وهرمونات النمو (السوماتوتربين) وكذلك إنتاج اللقاحات وغيرها. كما أمكن اليوم من خلال الهندسة الوراثية تصنيع أنواع مهمة من البروتينات الوحيدة الخلية والأصباغ الغذائية الطبيعية وكذلك استخدامها في مجال تحليل المركبات الكيميائية السامة.

3- **التطبيقات الزراعية**: أما في المجال الزراعي فقد استخدمت الهندسة الوراثية في تطوير نباتات مقاومة للرواشح ونباتات مقاومة لمبيدات الأعشاب وذلك من خلال هندسة مورثات الرواشح أو مورثات بكتريا مقاومة للمبيدات ثم زراعتها في أنسجة النباتات. وقد انتج باستخدام هذه الطريقة نباتات تبغ مقاومة لراشح التبغ الفسيفسائي Tobacco Mosaic v. وأخرى مقاومة لمبيدات الأعشاب وغيرها من النباتات المحسنة. كما تم زراعة مورثات مهندسة وراثياً معزولة من البكتريا Serrtia marcescens في نباتات البازلاء وغيرها لمقاومة مرض الذبول Wilt. هذا بإضافة للمحاولات الناجحة العديدة في مجال تحسين الثروة الزراعية والحيوانية.

الفصل الثاني عشر

الوراثة الجزيئية للسرطان

المحتويات

- مقدمة
- نظريات نشوء السرطان
- العوامل التي تساعد على الاصابة بالسرطان
- المورثات السرطانية الابتدائية والفايروسية
- وظائف المورثات السرطانية الخلوية والفايروسية
- المورثات السرطانية المشفرة لبروتينات الكاينيز المفسفرة
- المورثات المشفرة لعوامل النمو
- المورثات المشفرة لمستقبلات عوامل النمو
- المورثات المشفرة بروتينات تآخر GTP
- المورثات المشفرة لبروتينات نووية
- اليات تنشيط المورثات السرطانية الخلوية
- تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بالفايروسات
- تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بالطفرات الوراثية
- تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بالانتقال الكروموسومي
- تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بتضخمها وزيادة تعبيرها
- تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بالتآزر الجيني
- فقدان أو عطب المورثات الكابتة للسرطان
- الموت المبرمج للخلايا والسرطان
- دور العوامل الكيمياوية والفيزياوية والبايولوجية في نشوء السرطان
- آلية انتشار النقائل السرطانية

مقدمة:

عُرف السرطان منذ زمن طويل حيث وصف في الصور والكتابات القديمة التي تركتها الحضارات الإنسانية في العراق وسوريا ومصر وأمريكا اللاتينية وربما غيرها من المناطق. ويعتبر سرطان العظام الذي شخص في مومياء مصرية أول حالة سرطان مشخصة تعود لألاف السنوات السابقة. ومع بعد المسافة بين زمن المومياء المصرية المصابة والقرن الحالي فإن السرطان لا يزال يمثل المرض الثاني المسبب للوفيات بعد أمراض القلب والأوعية الدموية.

اقترن اسم السرطان بهذا المرض لإنتشاره بطريقة مشابهة لشكل السرطان البحري حيث تنشأ في وسط الورم كتلة تمتد منها تفرعات تشبه أرجل الحيوان البحري.

ينشأ السرطان غالباً من نمو خلية واحدة على الأرجح تفقد السيطرة على ايضها البايولوجي وإنقسامها الخلوي وتبدأ بالإنقسام السريع الذي يؤدي إلى نشؤ كتلة سرطانية في هذا الموقع.

لا يلبث النسيج السرطاني أن يحفز الأوعية الدموية القريبة منه على توليد شبكة دموية خاصة به (التكوين الوعائي **(angiogensis)** تعمل على تغذيته ورعايته.

ترجع قدرة السرطان على تحفيز الجسم على رعايته لأسباب عديدة منها أن النسيج السرطاني هو نسيج جسمي لا يزال يحمل الشفرات المناعية وهي أنواع من الأجسام المناعية التي تدعى بمعقدات التطابق النسيجي الرئيسية

ذات Entity وهو ما يمنع خلايا المناعة من مهاجمته. إلا أنه لا تلبث أن تتغير الشفرات المناعية لخلايا السرطانية ويبدأ الجسم في مقاومته وغالباً ما تنشأ المقاومة بصورة متأخرة بعد أن يكون السرطان قد تمكن من الجسم وهو ما يجعل الجسم في سباق مع السرطان ونادراً ما يفوز الجسم البشري في هذا السباق. هذا إضافة إلى أن التغييرات البايولوجية التي تحصل في الخلايا السرطانية تساعدها في إفراز أنزيمات محفزة على نشوء شبكة الأوعية الدموية. أثمرت نتائج الأبحاث العلمية التي أجريت لسنوات طويلة وفي أماكن مختلفة من العالم عن اماطة اللثام عن العديد من مظاهر السرطانية وتفاصيل بايولوجية تجري داخل خلاياه. إلا أنه لم يتم لحد الآن تشخيص الأسباب الحقيقية لظهور السرطان. إلا أن هذه الأبحاث زودتنا بمعلومات واسعة عن السرطان وساهمت الكيمياء الحيوية الوراثة الجزيئية في توفير معلومات مفصلة عن الدور الوراثي في هذا المرض. أعلن خلالها العلماء وجود مورثات معينة يؤدي الأضرار بها إلى تحولها إلى مورثات ذات تأثير ضار على الخلايا تسمح بتحول الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية. سميت هذه المورثات بالمورثات السرطانية الابتدائية أو الخلوية Proto- oncogenes وشخصت كمورثات منشطة تنشيطاً غير طبيعي في أنواع مختلفة من السرطانات.

نظريات نشوء السرطان:

كرس العلماء الكثير من جهودهم في سبيل فهم طبيعة السرطان وأسبابه ونشرت في سبيل ذلك الآلاف من الأبحاث العلمية التي أستهلكت مبالغاً طائلة في سبيل إنجازها توصل خلالها العلماء إلى وضع عدد من النظريات التي تفسر نشوء السرطان وكذلك انتشاره ويمكن إيجازها كالتالي :

النظرية الأولى: النظرية الكيميائية والفيزيائية :

وجد بأن هناك علاقة وثيقة بين التعرض للعوامل الكيميائية والفيزيائية والإصابة بالسرطان حيث تزداد نسبة إصابة الاشخاص المعرضين لهذه العوامل بالسرطان أكثر بكثير من الأفراد الآخرين. فسرطان الرئة يرتبط غالباً بالتدخين وسرطان الخصية يرتبط مع العاملين بتنظيف المداخن وسرطان الدماغ يرتبط مع المواد المستخدمة في صباغة السيارات وغيرها. كما لا يخفى دور العوامل الفيزيائية مثل الاشعاعات الذرية والأشعة فوق البنفسجية والاشعة الكونية وأشعة أكس وغير ذلك في نشوء أنواع مختلفة من السرطان خصوصاً اللوكيميا.

يمكن تقدير خطورة المواد الكيميائية وقدرتها السرطانية من خلال فحص كيميائي يدعى بـ (فحص أيمز) سبق الحديث عنه ويزداد عدد المواد الكيميائية المسببة للسرطان كل يوم كما تزداد حالات الاصابة بالسرطان باستمرار تلوث البيئة والمزروعات والحيوانات والماء وكل شيء. تفترض هذه النظرية أن العوامل الكيميائية والفيزيائية تعمل على تدمير أو أحداث تغييرات وراثية تؤدي إلى فقدان الخلايا المعرضة لهذه العوامل لسيطرتها على الايض المرتبط مع الانقسام الخلوي. وقد أثبتت الأبحاث العلمية هذه النظرية وتعتبر من أكثر النظريات رواجاً في تفسير نشوء السرطان وسنأتي على تفصيل أهميتها لاحقاً.

النظرية الثانية: النظرية الجرثومية:

تستند هذه النظرية إلى الملاحظات العلمية التي نشرت حول إصابة الدواجن وحيوانات أخرى بالسرطان نتيجة لاصابتها بأنواع مختلفة من الفايروسات. وقد سجل وجود أنواع مختلفة من الاضداد في دماء الحيوانات المصابة بهذه الفايروسات. وتفترض هذه النظرية اعتماداً على ذلك نشوء

السرطان البشري بنفس الآلية. ومن المعروف بأن هناك العديد من الأنواع الفايروسية لها القدرة على غزو جسم الإنسان وترتبط بعض أنواع السرطان مع هذه الفايروسات وخصوصاً تلك التي تنتمي لمجموعة الفايروسات المرتدة أو القهقرية **Retoviruses**. فمثلاً يرتبط سرطان بيركت **Burkitts Lymphoma** مع الإصابة بفايروس ابيستين - بار وكذلك السرطانات التي تصيب الحنجرة والبلعوم. فيما ترتبط سرطانات أخرى مثل سرطان كابوسي مع فايروس الأيدز وسرطان الكبد مع فايروسات التهاب الكبد وغيرها الكثير. وسنتكلم عن دور الفايروسات في الإصابة بالسرطان بتفصيل في الفقرات اللاحقة من هذا الفصل.

النظرية الثالثة : نظرية النكوص

تعتمد هذه النظرية على حقيقة علمية معروفة وهي أن الخلايا الجنينية تنقسم بسرعة تقارب وربما تزيد كثيراً عن سرعة انقسام الخلايا السرطانية وتؤدي إلى تكوين كتل كبيرة أيضاً من الخلايا. وعلى الرغم من الاختلاف الجوهري بين طريقتي نموالخلايا السرطانية والجنينية وأهدافهما ونتائجهما ولكنهما من الناحية الانقسامية المجردة متماثلين.

يعتقد أصحاب هذه النظرية بأن الخلايا السرطانية ما هي إلا حالة نكوص الخلايا الناضجة المتخصصة نحو المرحلة الجنينية. لقد برهنت الأبحاث العلمية الحديثة إلى وجود دور كبير للمورثات التي تعرف بالمورثات السرطانية الخلوية أوالابتدائية **C-onocgenes** في المراحل الانقسامية في الخلايا الجنينية وأنه يتم التعبير عن هذه المورثات بمستويات عالية أثناء المرحلة الجنينية لما لهذه المورثات من دور في قيادة وأسراع الانقسامات الخلوية وهو ما يماثل ما يحصل في الخلايا السرطانية التي ترتبط غالباً مع وجود مورث أو أكثر ذو نشاط عالي غير طبيعي يماثل نشاطه في المرحلة الجنينية. وسنفصل ذلك في فقرات أخرى من هذا الفصل.

العوامل التي تساعد على الإصابة بالسرطان :

مع التقدم التكنولوجي الكبير في الأدوات والأجهزة العلمية الا أنه لا يعرف لحد الآن السبب المباشرة للإصابة بالسرطان ولكن هناك عدد من العوامل التي يمكن أن تلعب دوراً مهماً في الإصابة ومنها :

1- التدخين 2-الكحول 3- الغذاء الملوث

4- التعرض للمواد الكيميائية 5- التعرض للمواد الفيزيائية كالاشعاعات

6- الإصابة بالفايروسات وعوامل مرضية متعدد أخرى

7- الاختلالات الهرمونية 8- العمر والجنس والاستعداد الوراثي وغيرها .

ولسنا هنا في صدد الحديث عن هذه التأثيرات من الناحية الطبية ولكن سنوضح دور بعضها في سياق حديثنا عن بايولوجية السرطان وتفصيلاته الوراثية .

المورثات السرطانية الابتدائية والفايروسية V-Oncogenes and C-Oncogenes

تعود معرفتنا بالمورثات السرطانية الفايروسات المرتدة إلى فترة الستينات . الا أنه لم يعرف التركيب الجزيئي والدور الدقيق لها الا بعد عشرة سنوات من ذلك أو أكثر . وفي عام 1976 أكتشفت ترددات لمورثات خلوية مماثلة لترددات المورثات السرطانية الفايروسية في خلايا سرطان محفز بعوامل كيمياوية سميت تلك المورثات بالمورثات السرطانية الخلوية **Cellular Oncogenes** أو الابتدائية . **Proto-oncogenes**. شخصت الآن المورثات السرطانية الخلوية في جميع الخلايا الحيوانية والنباتية ويعتقد الآن بأن المورثات السرطانية هي مورثات سرطانية خلوية تمكنت الفايروسات من الحصول عليها من الخلايا بعد تكرار أصابتها لالاف من السنين وعملت خلال ذلك على تحويرها لتتناسب مع أهدافها الحياتية .

أن نتائج العديد من الأبحاث العلمية التي أجريت على نماذج مختلفة من الحامض النووي **DNA** المستخلص من كائنات حية متنوعة بينت بأن جميع الأحياء تمتلك المورثات السرطانية الخلوية وأن هناك تماثلاً كبيراً في ترددداتها مع تلك الموجودة في الفايروسات مما يؤكد بأنها جميعاً مشتقة من أصل واحد.

أن ترددات مورث سرطاني خلوي معين يمكن أن يكون متماثلاً في أنواع مختلفة من الأحياء وخصوصاً تلك المتقاربة وراثياً ولا يعني ذلك بالضرورة الحفاظ على تماثل في أنواع أخرى من المورثات السرطانية الخلوية.

فمثلاً المورث **C-myc** السرطاني الخلوي متماثل في التركيب العام لمحاوره ومتداخلاته في الطيور واللبائن. إلا أن مورثاتهما **C-myc** و **C-ras** مختلفة تماماً. كما يتشابه التركيب العام لمورثات العائلة **ras** السرطانية الخلوية في جميع أنواع الخمائر الا أن تركيب هذه المورثات يتماثل جزئياً مع مورثات العائلة **ras** في اللبائن وبعض الفقريات الأخرى.

لقد ذكرنا سابقاً بأن الفايروسات أشتقت مورثاتها السرطانية من مصدر حيواني على الأغلب. توضح دورة حياة الفايروسات أمكانية حصول أنتقال وراثي وبعض الأجزاء الوراثية الخلوية إلى الفايروسات.

تتضمن دورة حياة الفايروسات وخصوصاً تلك التي تلتحم مع المادة الوراثية للخلايا المصابة (الفايروس الأولي **Provirus**) فرصة كبيرة لحصول مثل ذلك الحدث. أذ أن الفايروس الأولي يمكن أن يلتحم عشوائياً مع المادة الوراثية للخلايا المصابة وعليه فأنه من المحتمل أن يجاور الفايروس الأولى مورثاً سرطانياً خلوياً وبعد تضاعف الفايروس لعدد من الدورات ينفصل من مادة الخلية الوراثية وغالباً ما يأخذ الفايروس الأولي معه أجزاء من المـــادة الوراثية الخلوية تختلف في أحجامها.

فإذا ما كانت الأجزاء المتقطعة تعود لمورث سرطاني خلوي عندها يحصل الفايروس على جزء ربما يكون كافياً من المورث السرطاني الخلوي ويضمه إلى مجينه. إن فرصة حصول الاقتطاع الوراثي لمصلحة الفايروس غير قليلة حيث أن الخلايا عادة تهاجم بأعداد كبيرة من الفايروسات وتتوزع بعد دخولها على المادة الوراثية للخلايا. أن هناك العديد من الأدلة العلمية التي تؤكد حصول مثل تلك الفرصة للفايروسات. فقد وجد بأن هناك **DNA** خلوي متراكب في النهايات الخامسة والثالثة للحامض النووي الفايروسي وشخصت أجزاء من المورث السرطاني الخلوي **C-fps** و **C-myc** مرتبطة مع فايروسات. يمكن التعرف على وجود مثل هذا التراكب الوراثي من خلال تحليل الحامض النووي المرسال حيث أن الأجزاء المتراكبة تؤدي إلى أنتاج حامض نووي مرسال هجين يعود جزء منه لمورثات الفايروس بينما يعود الباقي لترددات خلوية. وقد وجد مثل هذا الحامض الهجين بعد إصابة الخلايا بالفايروس **PRC2**. إذ وجد بأن الحامض النوي المرسال الهجين له بعد الإصابة يحتوي على ترددات تعود للمورث السرطاني الخلوي **C-fps**.

كما يعتبر التماثل بين تركيب المورثات السرطانية الخلوية وبروتيناتها والمورثات السرطانية الفايروسية وبروتيناتها دليلاً أخر على أحتمالية حصول آلية التراكب الوراثي. لا يعني دائماً أن الإصابة بالفايروسات تعني حصول السرطان. كما أنه لا يمكن إعتبار أن كل إصابة بالفاسيروسات يمكن أن تؤدي إلى حصول الفيروسات على مورثات سرطانية خلوية حيث تدخل عوامل كثيرة في وجه مثل هذا الحدث. وتحتاج الفايروسات لأقلمة المورثات الجديدة لالاف من السنين قبل إعتبارها مورثات فايروسية ويلعب الانتخاب الطبيعي دوراً كبيراً في التحكم في مثل هذه الاليات.

إن تطور الادوات والأجهزة وطرق البحث العلمي أدى إلى الكشف عن أعداد كبيرة من المورثات السرطانية الخلوية النظيرة لتلك الموجودة في

الفايروسات السرطانية ويقارب عددها حتى اليوم المئة مورث يرتبط العديد منها بأنواع معروفة من السرطان والبعض الآخر تحوم حوله الشبهات .

وظائف المورثات السرطانية الخلوية والفايروسية :

إن وجود المورثات السرطانية الخلوية في جميع الخلايا الحية يؤكد أهمية هذه المورثات في نمو وتطور وتخصص الخلايا . درس العديد من هذه المورثات الخلوية منها والفايروسية ووجد بأنه يمكن وضع جميع هذه المورثات في خمسة مجاميع أعتماداً على وظيفتها وهي :

1- المورثات المشفرة لبروتينات الكاينيز .

2- المورثات المشفرة لعوامل النمو .

3- المورثات المشفرة لمستقبلات عوامل نمو .

4- المورثات المشفرة لبروتينات تآصر جزيئات **GTP.**

5- المورثات المشفرة لبروتينات نووية .

المورثات السرطانية المشفرة لبروتينات الكاينيز المفسفرة :

إن جميع البروتينات المفسفرة المعروفة سابقاً تقوم بفسفرة البروتينات عن طريق إضافة الفوسفور إلى الثيرونين أو السيرين مستخدمة في ذلك مجاميع الفوسفوريل في جزيئات الطاقة **ATP.** وفي عام **1977** أكتشف لأول مرة بروتين يقوم بفسفرة التايروسين يعود إلى المورث **Src** ويشفر من قبله . يبلغ الوزن الجزيئي للبروتين **60** كيلو دالتن ويرمز لها **$p60^{src}$.**

يفرز هذا البروتين في الخلايا الطبيعية في مستوى منخفض مقارنة مع عشرة أمثاله في حالة إصابة الخلايا بفايروس **Rous Sarcoma V.** الذي يحتوي على النظير الفايروسي **V-Src** .

يرتبط البروتين **$p60^{src}$** على السطح الداخلي للغشاء البلازمي للخلايا عن

طريق ذيل من الأحماض الدهنية ويعتبر هذا الارتباط ضروري لقيامه بوظيفته حيث وجد بأن حصول طفرة وراثية في المورث V-Srcالفايروسي والتي تؤدي إلى إحلال الجلايسين بدلاً من الجلوتامين أو الالنين يعمل على فقدان البروتين لقدرته على الارتباط مع الغشاء البلازمي للخلايا المصابة علاوة على فقدانه لقدرته السرطانية إلا أنه يحتفظ بقدرته على الفسفرة. ولا يعرف سبب ذلك إلا أنه يعتقد بأن وجود البروتين معلقاً في السطح الداخلي لغشاء البلازما ضروري لإنجاز مهام أخرى سرطانية أو نشيطة غير مكتشفه بعد. يختلف البروتين P60 المشفر من المورث C-Src الخلوي عن نظيرة المشفر من قبل المورث الفايروسي بعدد قليل من الأحماض الأمينية التي تقع في النهاية الكاربوكسيلية C-terminus. كما أنهما يختلفان في مستوى الفسفرة لديهما وقد يعزى ذلك لوجود المتكرر الطرفي الطويل **Long terminal repeat** مرتبط مع المورث الفايروس والذي يعمل كمحفز قوي لتعبير المورث.

أوضحت نتائج الأبحاث العلمية التي أجريت حول دور هذه المورثات في نشوء السرطان إلى أن نشاط الفسفرة للبروتينات المشفرة من المورث Src له أهمية في السيطرة على النمو ولا يؤثر أرتفاع مستوى البروتين إلى زيادة ضراوته حيث لوحظ بأن ربط المحفز الفايروسي RSV-LTR إلى المورث الخلوي C-Src عن طريق الهندسة الوراثية يزيد من قوة تعبير المورث Src مع أحتفاظ البروتين p60 بمستوى فسفرة منخفض ولكنه لا يؤدي إلى تحول الخلايا المهجنة إلى خلايا سرطانية مما يدفع للإعتقاد بأن عملية نشوء السرطان عن طريق هذا المورث يتم بزيادة نشاط فسفرة بروتينة.

إلا أنه وجد بأن ربط المورث السرطاني الخلوي C-src مع قطعة Tالوسطى الخاص بفايروسات البوليما **Polyoma middle T segment** يؤدي إلى تكوين بروتين هجين له نشاطك فسفرة عالي جداً ومحفز سرطاني قوي.

ويعتقد الآن أن حدوث طفرة وراثية في الموقع 527 من المورث الخلوي

C-Src والتي تؤدي إلى استبدال التايروسين بحامض أميني آخر في بروتينية المشفر تؤدي إلى فقدان هذا المورث لقدرته على السيطرة على وظائفه ووظائف بروتينية حيث أن التايروسين في الموقع 725 يمثل موقعاً منظماً وفقدانه يؤدي إلى الابقاء على نشاط الفسفرة مفتوحاً. كما شخصت طفرات وراثية أخرى في المواقع 95 و 378 و 441 تؤدي إلى نفس النشاط غير الطبيعي لبروتين المورث C-Src.

وإضافة لما سبق فقد وجد بأن مستوى بروتين P^{60} يكون مرتفعاً في الخلايا الجنينية وخلايا السرطانات النسيجية (الخطوط النسيجية) التي تعود لسرطانات النيوروبلاستوما والرتينوبلاستوما وسرطان أيونك وسرطان القولون إضافة لسرطانات أخرى.

تضم هذه المجموعة من المورثات إضافة للمورث C-src مورثات أخرى مثل yes و fps و ros و fgr و kit و able و raf و mos وتشفر جميع هذه المورثات لبروتينات فسفرة التايروسين بأستثناء بروتينات raf و mos المفسفرة للثيرونين والسيرين على التوالي.

المورثات المشفرة لعوامل النمو:

تعتبر عوامل النمو من الجزيئات البايولوجية ذات التأثير الواسع على أيض الخلايا وتطورها. وقد أكتشف دور هذه العوامل في إنقسام الخلايا مبكراً حيث وجد بأن إضافة مصل الدم الغني بهذه العوامل إلى المزارع النسيجية يؤدي إلى زيادة أنقسام الخلايا ويختزل فترة أنقسامها أيضاً.

وعلى الرغم من معرفة العديد من هذه العوامل مثل EGF و TFG و IGF-1 و IGF-2 و IL-1 و IL-2 و PDGF إلا أنه لم يتم أثبات علاقتها مع السرطان باستثناء العامل PDGF المشفر من المورث السرطاني الخلوي C-sis مع الاعتقاد بأنها جميعاً مشفرة من مورثات سرطانية خلوية.

يبلغ الوزن الجزيئي للعامل النمو PDGF المشفر من المورث الخلوي C-sis 4.2 دالتن ويعمل على مساعدة الصفائح الدموية في بناء التجلطات الدموية في مواقع الجروح وغيرها.

لقد وجد بأنه يتم التعبير عن العامل PDGF في عدد من حالات السرطان مثل الساركوما والجيلوبلاستوما Glioblastoma إلا أنه لم تثبت علاقته مع نشوء هذه السرطانات للآن. إلا أنه وجد بأنه يؤدي إلى تنشيط المورث السرطاني الخلوي C-myc الذي يؤدي إلى زيادة بناء الحامض النووي DNA.

يختلف البروتين المشفر للمورث السرطاني الفايروسي V-sis كثيراً عن بروتين PDGF الخلوي حيث يبلغ الوزن الجزيئي للبروتين السرطاني 28 كيلو دالتن ويتألف من سلسلتين ألفا وبيتا إلا أن له نفس نشاط البروتين الخلوي.

تأتي علاقة المورث sis بالسرطان من خلال قدرة الفايروس Simian Sarcoma V. الذي يحتوي على المورث السرطاني V-sis على تحويل الخلايا إلى سرطان بعد إصابته لها. كما يعتقد بأن للإنتقال الكروموسومي 22:9 الذي يترافق مع سرطان اللوكيميا CML دور في تنشيط المورث C-sis الذي يقع على الكروموسوم البشري 22 إلا أنه لم يتم التأكد من هذا الدور.

المورثات المشفرة لمستقبلات عوامل النمو:

تحاط الخلايا بأغلفة غشائية تحتوي على العديد من المستقبلات الخلوية التي تساهم في نقل الاشارات المختلفة والتي تساعد الخلية في التفاعل مع محيطها وأداء وظائفها الخلوية بطريقة مناسبة لحياة الخلية والكائن.

لا تمتلك الخلايا جميع أنواع المستقبلات بل أن بعض هذه المستقبلات يتوزع بصورة متخصصة وعلى أنواع معينة من الخلايا. تعتبر مستقبلات النمو أحد أنواع المستقبلات التخصصية هذه. يؤدي هذا التوزيع المتخصص إلى تخصص الخلايا أيضاً. فهرمون الانسولين على سبيل المثال يرتبط فقط مع

الخلايا التي تحمل مستقبلاته وكذلك الحالة بالنسبة للهرمونات الأخرى وعوامل النمو المختلفة وغيرها. تؤدي عملية استقبال جزيئات عوامل النمو أو غيرها إلى تنشيط المستقبل الذي يعمل على أصدار أشارت ثانوية داخلية غالباً ما تكون مراسلات ثانوية تؤدي إلى تحفيز أيض معين أو عملية خلوية معينة.

أن العديد من مستقبلات عوامل النمو هي بروتينات كاينيز مفسفرة للتايروسين وترتبط مع موروثات سرطانية خلوية مشفرة لها. فمستقبلات عامل النمو EGF مشفرة من قبل المورث السرطاني الخلوي c-erbB ومستقبل عامل النمو CSE-1 مشفر من قبل المورث C-fms ومستقبل الانسولين مشفر من المورث C-ros. يعتبر مستقبل عامل النمو EGF المشفر من المورث erb-B من أكثر المستقبلات دراسة وقد تم معرفة الكثير عنها ويمكن الخوض في تفاصيله كممثل لهذه المجموعة من المورثات.

أكتشفت علاقة مستقبل عامل النمو EGF مع المورث السرطاني الخلوي c-erb-B عن طريق الصدفة حيث لوحظ بأن تردد الأحماض الأمينية لهذا المستقبل تتشابه بصورة كبيرة جداً تصل إلى أكثر من 90% مع تردد الأحماض الأمينية في البروتين الفايروسي المشفر من قبل المورث السرطاني الفايروس V-erb-B الموجود في الفايروس Avion erythroblastosis (AEV) الذي يصيب الدواجن وحيونات أخرى.

وقد بينت الدراسات اللاحقة حول هذا الموضوع بأن مستقبل عامل النمو EGF البشري مشفر فعلاً من المورث السرطاني الخلوي C-erb B. إلا أنه وجدت أختلافات متعددة بين البروتين البشري والبروتين الفايروسي أهمها إلى أن الوزن الجزيئي لبروتين مستقبل النمو EGF البشري يبلغ 175 كيلو دالتن بينما يبلغ وزن النظير الفايروسي 80 كيلو دالتن ويرجع الفرق في ذلك إلى أختفاء المنطقة C (التي تتحكم في تعبير المورث السرطاني الخلوي البشري) في

البروتين الفايروسي. كما وجد بأن النشاط السرطاني للبروتين الفايروسي يعود لهذا السبب حيث يبقى نشاط البروتين الفايروسي مفتوحاً مما يؤدي إلى إستمرار تحفيز الخلايا دون توقف.

إن الوظيفة الرئيسية لمستقبل عامل النموEGF في الخلايا البشرية هي إستقبال جزيئات عامل النمو EGF ويؤدي الارتباط بين جزيئات عامل النمو مع مستقبلاتها إلى فتح نشاط فسفرة التايروسين في الجزء السايتوبلازمي من المستقبلات. ويعتبر ذلك إشارة لبدء العمليات اللازمة لهدف وصول جزيئات عامل النمو ويختفي نشاط هذا المستقبلات بعد انفصال جزيئات عامل النمو. يتوقف نشاط الفسفرة في السايتوبلازم ويعتبر الجزء C من بروتين المستقبل مفتاح السيطرة في هذه العملية. ونظراً لفقدان البروتين الفايروسي لهذا الجزء المنظم لعملية فتح نشاط الفسفرة وغلقها لذلك فإن المستقبلات الناتجة عن الفايروس تستمر في نشاطها حتى في غياب جزيئات عامل النمو مما يؤدي إلى حصول حالة السرطان وأندفاع الخلايا نحو الانقسامات دون توقف.

أما في مستقبلات عامل النمو EGF البشرية فأن نشاطها يتحول إلى نشاط سرطاني في ثلاثة حالات سجلت في عدة أنواع من السرطانات البشرية.

أول هذه الحالات هو تضخم المورث C-erb-B الذي يؤدي إلى أرتفاع مستوى التعبير عنه بسبب زيادة عدد نسخ المورث عن العدد الطبيعي. وقد شوهد تضخم في هذا المورث يترافق مع سرطان الساركوما Adenosarcoma وسرطان الجلد Squamous cell carcinoma وسرطانات الغدد اللعابية واللبنية وبعض حالات سرطان المعدة. كما وجد بأن تضخم المورث C-erb-B يترافق دائماً مع حالة تحول سرطان الثدي إلى سرطان عدواني Aggressive cancer.

كما تم تشخيص تضخم هذا المورث في عدد من الخطوط النسيجية مثل

الخط النسيجي A431 المشتقة من السرطان Epidermoid carcinoma والخط النسيجي HN10 و HN5 المشتقة من السرطان Squamous Carcinoma.

إضافة لذلك فإنه وجد بأن مستقبلات EGF تزداد زيادة كبيرة على سطح خلايا السرطان Glioblastomas وكذلك في سرطانات الرقبة والرأس حيث بلغ عددها حوالي 5×10^{11} (معدل) مقارنة مع 1.5×10^{5} في خلايا الادمة الطبيعية.

كما يرتبط الموث C-erb-B المشفر لبروتين المستقبل EGF بأنتقال كروموسومي يتضمن كروموسوم 7 منطقة 7P11-P13 التي تحمل موقع المورث في السرطان Epidermoid carcinoma. إضافة لمستقبل عامل النمو EGF فإن مستقبل عامل النمو المشفر من قبل المورث السرطاني C-fms يرتبط مع حالةالانتقال الكروموسومي التي تتضمن الجزء q من كروموسوم 5 الذي يقع عليه المورث fms مع السرطان Myeloid dysbtasia .

المورثات المشفرة لبروتينات تآصرGTP :

تشمل هذه المورثات عائلة واحدة تدعى عائلة ras family مؤلفة من ثلاثة مورثات هي H-ras و K-ras و N-ras وقد أكتشفت نظائر أخرى لهذه المورثات حديثاً مثل K-ras 1 و K-ras 2. توجد نظائر فايروسية للمورثات السرطانية الخلوي C-H-ras و C-K-ras ولا يوجد نظير فايروسي للمورث الخلوي C-N-ras.

تشفر هذه المورثات جميعاً لبروتين يبلغ وزنه الجزيئي 21 كيلودالتين يرمز له بـ P^{21} يتألف من حوالي 189 حامضاً أمينياً. يرتبط بروتين P^{21} مع جزيئة حامض دهني Palmitic acid مما يؤكد موقعه الغشاء الداخلي. يمتلك البروتين P^{21} نشاط GTPase حيث يعمل على شطر جزيئة GTP وإطلاق ذرة فوسفور لغرض إرتباطها مع المركب Pi- Phosphatidyl inositol الذي يعمل كمراسل ثانوي داخلي لنقل الاشارات إلى مواقع التفاعلات الخلوية داخل

السايتوبلازم. ونظراً للتماثل الكبيرة بين هذه البروتين والبروتين G النظير الخلوي في الخميرة فإنه يعتقد الآن بأن لهذا البروتين وظيفة أخرى مماثلة لوظيفة بروتين G إذ لم يكن يمثل هذا البروتين أصلاً في الخلايا البشرية (بروتين G مراسل ثانوي وله دور أنزيمي GTPase يدخل في دورة كربس).

يماثل البروتين P21 المشفر من قبل المورثات الفايروسية V-ras للبروتين الخلوي في وزنه الجزيئي إلا أنه يختلف عنه في النشاط. أذ يفتقد البروتين الفايروسي لنشاط GTPase إلا أنه ذو نشاط فسفرة ذاتي.

يرتبط مع عائلة ras عدد من المورثات التي تشفر البروتينات ذات وظائف غشائية شبيهه منها مورثات ral، mel و R-ras وتشفر هذه لبروتينات يبلغ وزنها الجزيئي 23.5 و ؟ ، 24 كيلودالتين وتحتوي على تماثل مع بروتين مورثات ras يصل أحياناً إلى 55%.

ـ المورثات المشفرة لبروتينات نووية :

تضم هذه المجموعة مورثات تعود للعائلة myc -family تضم عدداً من المورثات السرطانية الخلوية المهمةمثل C-myc. N-myc ، R-myc ، C-myb ، C-fos و C-Ski ومورثات أخرى فايروسية لا يوجد لها نظائر خلوية مثل P53 ومورث T الكبير Large T fragment الخاص بفايروس Polyoma, SV40 و Adenoma V. EIA و Papyloma E6.

تشفر مورثات myc لبروتينات ترتبط مع الغشاء النووي حيث تتآصر كبروتينات ريبونووية Ribonucleic proteins (RBPs) مع الغشاء النووي جدول (12 - 1).

يبلغ الوزن الجزيئي للبروتين المشفر من المورث C-myc 49 كيلودالتن له أهمية كبيرة في تضاعف الحامض النووي DNA وكذلك استنساخ الحامض النووي RNA. يعمل هذا البروتين على تنظيم عملية دخول الخلايا مرحلة Go

إلى مرحلة تضاعف الحامض النووي DNA التي تدعى مرحلة -S حيث يحفز مستواه العالي الخلايا للدخول إلى مرحلة التضاعف S-phase. فقد وجد بأن مستواه يكون منخفضاً في خلايا المرحلة Go ولكنه يزداد في خلايا المرحلة G1و S وتقترن زيادة مستواه بزيادة مستوى جميع البروتينات النووية الأخرى. أن معاملة خلايا Go بعامل النمو PDGF أو المحفز الكيمياوي TPA- 12.0-tetradecanoyl phoropol 13-acetate. تؤدي إلى زيادة تعبير المورث C-fos خلال 2- دقيقة بعد المعاملة ثم يزداد بعد ساعات من ذلك مستوى بروتين المورث C-myc حيث تندفع بعدها الخلايا نحو مرحلة G1 و S وقد سجلت كذلك زيادة في تعبير المورث C-myb . كما وجد بأن معاملة خلايا المرحلة Go بالمضاد Anti-sense oligodeoxyribo nucleotids الذي يعمل على إيقاف تعبير المورث C-myc تؤدي إلى دخول هذه الخلايا إلى مرحلة G1 إلا أنها لاتتمكن أبداً من الدخول إلى مرحلة S مما يؤكد الدور المهم لبروتين هذا المورث في دورة تضاعف الخلايا.

إن لعملية تنظيم تعبير مورثات هذه المجموعة ذات أهمية في تخصص الخلايا. فقد وجد بأن معاملة خلايا Promyelocytic cells بالمحفز TPA يؤدي إلى تحولها إلى خلايا مكروفاج Macrophage ويترافق ذلك مع زيادة في تعبير المورثات C-fosو C-fms وتوقف تعبير المورثات Ç-myc و C-myb في حين يؤدي تحفيز هذه الخلايا بالمحفز DMS0 - Dimethylsulfoxide إلى تحولها إلى خلايا محببة ناضجة Mature granulocytes مع توقف المورث C-fos عن التعبير ووجود مستوى منخفض من تعبير المورث C-myb و C-fms .

كما تتخصص خلايا الفأر النسيجية mouse tetracarcinoma C.L-F9 بعد معاملتها بالحامض Retinoic acid إلى خلايا اندوديرمية Endoderms ويترافق ذلك مع زيادة تعبير المورث C-fos. أن ذلك يؤكد الدور الآخر التنظيمي لهذه المورثات في تخصص الخلايا مما يؤكد مرة أخرى أهميتها الخلوية.

إضافة لما سبق فقد وجد بأن زيادة التعبير لاحد مورثات هذه العائلة (N-myc) يؤدي إلى أنخفاض تعبير المورثات المسؤولة عن بروتينات المناعة Major histocompatibility Complex I (MGC) التي لها أهمية كبيرة في تمييز المستضدات Antigens الغريبة وهو ما يفسر تحول السرطان Neuroblastoma إلى حالة الانتشار Metastasize بسبب أنخفاض تمييز الخلايا السرطانية من قبل الخلايا المناعية لأنخفاض مستوى معقدات التطابق النسيجي بسبب زيادة تعبير المورث N-myc الذي يثبط المورثات المناعية ويوقفها تقريباً عن العمل.

المورث السرطاني Oncogene	الفايروس Virus	النوع Species	البروتين Protein product	التأثير Action	الموقع الخلوي Subcellular localization
SRC family					
src	Rous sarc.v.[a]	Chicken	pp60	Tyrosine kinase	Plasma membrane[b]
yes	Y73 avian sarc.v.	Chicken		Tyrosine kinase	
ros	UR2 avian sarc.v.	Chicken		Tyrosine kinase	Cytoplasm, plasma membrane
rel	Reticuloendotheliosis v.	Chicken			
fes(fps)	Snyder-Theilen feline sarc.v. (Fujinami sarc.)	Cat (chicken)	p92(p98)	Tyrosine kinase	Cytoplasm, plasma membrane
fms	McDonough feline sarc.v.	Cat			
fgr	Gardner-Rasheed feline sarc.v.	Cat		Tyrosine kinase	
abl	Abelson murine leuk.v.[c]	Mouse	p150	Tyrosine kinase	Plasma membrane
mos	Moloney murine sarc.v.	Mouse			Cytoplasm
RAS family					
H-*ras*	Harvey murine sarc.v.	Mouse	p21	Tyrosine kinase binds GDP or GTP	Plasma membrane
K-*ras*	Kirsten murine sarc.v.	Mouse	p21		
Other					
myc	Avian myelocytomatosis v. MC29	Chicken	p58	Binds DNA	Nucleus
myb	Avian myeloblastosis v. AMV	Chicken	p75		Nucleus
ets	Avian erythroblastosis v. E26	Chicken			
erb B	Avian erythroblastosis v.	Chicken	Truncated EGF[d] receptor	Growth factor receptor analog	Plasma membrane
fos	FBJ murine leuk.v.	Mouse	p55		Nucleus
raf(mil)	3611 Murine sarc.v. (avian MH2 v.)	Mouse (chicken)			
sis	Simian sarc.v.	Monkey	PDGF[e]B-chain	Growth factor analog	Cytoplasm

[a] Sarc.v. = sarcoma virus.
[b] Located on inner surface of plasma membrane.
[c] Leuk.v. = leukemia virus.
[d] EGF = epidermol growth factor.
[e] PDGF = platelet-derived growth factor.

جدول : المورثات السرطانية الخلوية والفايروسية وبعض خصائصها العامة.

ـ آليات تنشيط المورثات السرطانية الخلوية :

إن المورثات السرطانية الخلوية هي مورثات طبيعية موجودة في جميع خلايا جسم الانسان وتقوم في الحالة الطبيعية بوظائفها لخدمة الخلايا وجسم الإنسان عموماً. وقد تكلمنا سابقاً عن الدور الخلوي لهذه المورثات ووضحنا من خلاله أهمية هذا الدور. أنه وبلاشك أن هذه المورثات ذات أهمية بالغة في السيطرة على الأنظمة الأنزيمية وبالتالي فأنها تعتبر ذات وظيفة غاية في الأهمية وأن حصول أية أضرار لهذه المورثات يمكن أن يقلب حياة الخلايا رأساً على عقب ويؤدي في أغلب الأحوال إلى تحويل الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية. ونظراً لأختلاف الاسباب التي تؤدي إلى تضرر هذه المورثات فقد قسمت آليات التنشيط غير الطبيعي لهذه المورثات إلى ستة اليات وهي :

1-التنشيط بالفايروسات.

2- التنشيط بالطفرات الوراثية.

3- التنشيط بالإنتقال الكروموسومي.

4- التنشيط بالتضخم المورثي وزيادة قوة التعبير.

5- التنشيط بالتآزر الوراثي لمورثين أو أكثر.

6- التنشيط بفقدان أو عطب المورثات الكابتة.

أولاً : تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بالفايروسات:

يعتمد هذا النوع من الآليات المؤدية للسرطان على طبيعة الفايروس الذي تتعرض له الخلايا ونوعه حيث أن العديد من الفايروسات مثل الفايروسات المرتدة أو القهقرية لا تحتاج لتحويل الخلايا الطبيعية إلى سرطانية إلى تحفيز المورثات السرطانية الخلوية لأنهاتمتلك مورثات خاصة بها ذات قدرة سرطانية عالية جداً وكافية لأحداث السرطان والذي غالباً ما يكون سرطان سريع

النمووالإنتشار. ومع أن هذه الفايروسات تغادر الخلايا بعد فترة من الإصابة إلا أنها غالباً ما تترك الخلايا المصابة غارقة في دوامة من الأخطاء الوراثية التي تتراوح ما بين الطفرة الوراثية المفردة إلى الانتقال الكروموسومي والتي تعمل على ديمومة السرطان وأنتشاره.

إلا أن هناك أنواعاً أخرى من الفايروسات الخالية من مورثات السرطان الفايروسية لها القدرة على إحداث السرطان بأسلوب أخر. أن معظم هذه الفايروسات تستخدم ترددات النهاية الطويلة **(LTR) Long terminal repeats** في تحفيز المورثات السرطانية الخلوية التي تعود للخلايا المصابة. أن ترددات النهـــاية الطويلة **LTR** مؤلفة من تردد نيوكليوتيدات يبلغ **280 - 1300** نيوكليوتيد تقع في النهاية الثالثة والخامسة لمجين الفيروسات وتستخدم من قبل الفايروسات لغرض الالتحام مع المادة الوراثية للخلايا المصابة. كما أنها منظمات ومحفزات قوية جداً. تكمن قدرة هذه الأنواع من الفايروسات على أحداث السرطان في فرصتها للالتحام بجانب أو بالقرب من مورث سرطاني خلوي. ونظراً للإعداد الكبيرة من الفايروسات التي تصيب الخلايا فأن فرصة التحام الفايروسات الأولية **(Proviruses)** (اسم الفايروسات بعد دخولها للخلايا) بالقرب أو بجانب المورثات السرطانية الخلوية يكون كبيراً.

كما شرحنا سابقاً في الفصول السابقة فإن لكل مورث تقريباً في الخلايا الحقيقية النوى منظماً يعمل على السيطرة على نشاطه. وغالباً ما يكون المنظم جزء من المورث أو بالقرب منه أو ربما يكون مورثاً آخر. لذلك فإن وجود ترددات النهاية الطويلة بالقرب من مورث السرطان الخلوي يضع الأخير تحت رحمته ويصبح المورث السرطاني تحت تنظيم الجزء الفايروسي وحيث أن الأخير محفز قوي لذلك فإن المورث السرطاني الخلوي سيتوهج ويعمل بصورة عالية جداً أكبر بكثير من مستوى عمله في الحالة الطبيعية. وبما أن معظم البروتينات المشفرة من قبل المورثات السرطانية الخلوية لها دور في الانقسام

الخلوي لذلك فإن الخلايا البشرية بعد الإصابة بمثل هذه الفايروس تدخل مرحلة الانقسام الخلوي السريع وغير المنظم تتحول بعدها إلى خلايا سرطانية.

تختلف سرعة تحول الخلايا إلى المرحلة السرطانية اعتماداً على نوع الفايروس حيث أن بعضها سريع النمو والأخر بطيء. ونظراً لأختلاف مواقع أرتباط ترددات النهاية الطويلة LTR مع المادة الوراثية الخلوية لذلك فأن نوع واحد من الفايروس يمكن أن يؤدي إلى الإصابة بأنواع مختلفة من السرطانات وذلك أعتماداً على المورث السرطاني الخلوي المُحفَزْ. فقد وجد مختبرياً بأن الاصابة بالفايروس ALV تؤدي إلى ظهور السرطان (Erythroleukemia) (في الدجاج والخلايا الحيوانية النسيجية) وذلك عند إرتباط LTR الفايروسي بالقرب من المورث السرطاني الخلوي C-myc وإلى ظهور سرطان B-cell leukemia عند التحام LTR بالقرب من المورث الخلوي C-erb B

إضافة لما سبق فإن مثل هذه الفايروسات يمكن أن تؤدي إلى السرطان نتيجة لعيوب وراثية أخرى غير المورثات السرطانية الخلوية المحفزة.

ثانياً : تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بالطفرات الوراثية:

الطفرة الوراثية هي تغيير كيمياوي في المورث يؤدي إلى تغيير في البروتين المشفر منه (وكذلك تغيير في صفة ما في حالة إرتباط المورث مع صفة مظهرية). يتضمن التغيير الكيمياوي تغيير في أزواج النيوكليوتيدات المؤلفة للمورث وقد يشمل هذا التغيير أحلال قاعدة نايتروجينية واحدة بدلاً من أخرى في نيوكليوتيد واحد أو في زوج من النيوكليويتدات وقد يشمل مساحة مختلفة من المورث.

إن الطفرات الوراثية غالباً ما تكون عشوائية ولا يمكن التنبؤ في مواقع حصولها على المورثات. كما أنها في الغالب تكون ضارة وعادة ما تكون

الآليلات الطافرة محجوبة بالآليل الطبيعي ولا يمكن ظهورها إلا عند التقاء اليلين طافرين لنفس المورث.

كما أن معدل حصول الطفرة يعتمد على حجم المورث حيث يزداد معدلها في الموروثات الكبيرة ويقل في المورثات الأصغر حجماً. فمثلاً تحدث الطفرة الوراثية التلقائية في المورثات البشرية بمعدل طفرة واحدة لكل 100.000 مورث وهذا يعني أن هناك مورث طافر واحد على الأقل في كل دورة إنقسامية ذلك أن معدل عدد المورثات على الكرموسوم البشري يساوي حوالي 100.000 مورث.

يرجع سبب حصول الطفرات الوراثية إلى عوامل مختلفةمنها الكيمياوية والفيزياوية والبايولوجية وسنتحدث عنها بالتفصيل في فقرات لاحقة. كما يمكن الرجوع إلى التفاصيل في الفصل الخاص بالطفرات الوراثية في هذا الكتاب.

تمثل الطفرات الوراثية في المورثات السرطانية الخلوية نسبة كبيرة من أسباب ظهور نشوء السرطان تتراوح بين 15-35% أو أكثر وينشأ معظمها بسبب التعرض للعوامل الكيمياوية. كما أن معظم الطفرات الوراثية المسجلة في السرطان ترجع إلى عائلة ras وتبلغ نسبة الطفرات فيها حوالي 25% من مجموع الطفرات الوراثية المسجلة في أنواع السرطان.

فقد سجلت طفرة وراثية في المورث السرطاني الخلوي C-k-ras في كارسينوما الرئة والقولون والمبايض تم في هذه الطفرة استبدال الجلايسين بالارجنين. كما سجلت طفرات وراثية في محاور 12 ، 13 من المورث C-N-ras في سرطان Fibrosarcoma (جدول 12-2).

وفي إحصائية حول دور هذه المورثات (ras) عائلة في نشوء السرطان فقد وجد بأن هناك نموذجين في سرطان المثانة من مجموع 23 نموذج تحتوي على

مورث C-N-ras ذو طفرة وراثية. كما وجد بأن هناك 11 نموذج من مجموع 27 نموذج من سرطان المستقيم تحتوي على طفرة وراثية في المورث C-K-cras.كما أن خمسة نماذج من عشرة من سرطانات الرئة تحتوي على طفرة وراثية في نفس المورث. أما في سرطانات الدم فقد وجد بأن المرحلة الأولى من سرطان الدم الحاد Acute Mylogenous L والتي تدعى باللوكيميا الأولية Myeloidy Plasia تحتوي على طفرة وراثية في أحد أفراد مورثات عائلة ras وتصل نسبة هذه الطفرات إلى 50% في المرضى المصابون بهذا المرض.

إن الكثير من المواد الكيمياوية الخطرة ذات تأثير مسرطن ويعمل الكثير من هذه الكيمياويات على تحفيز نشاط المورثات السرطانية الابتدائية بالطفرات الوراثية.

المورث	مصدر المورث	الشفرات			نشوء السرطان
		Codons			
ras Allele	Emax Source of allele	12	59	61	Focus Formation
c - H - ras	Normal human	GGC	GCC	CAG	No
		Gly	Ala	Glu	
c - H - ras	Bladder carcinoma lines	GTC	GCC	CAG	Yes
		Bal	Ala	Gla	
c - K - ras	Norm human	GGT	GCA	CAA	No
		Gly	Ala	Glu	
c - K - ras	Lung carcinoma line	TGT	GCA	CAA	Yes
		Lys	Ala	Glu	
N - ras	Normal human	GGT	GCT	CAA	No
		Gly	Ala	Glu	
N - ras	Neuroblastoma lina	GGT	GCT	AAA	Yes
		Gly	Ala	Lys	

جدول (12 - 2) : بعض الطفرات الوراثية التي تحصل في عائلة المورثات السرطانية الخلوية ras.

فـــمــــركـب N-nitroso-N-methylurea-NMU والـمـــــركـب 7.12 dimethylbenz (a) antheracene-DMBA يؤديان إلى الإصابة بالسرطان وخصوصاً سرطان الثدي والنيوروبلاستوما الناتجة عن طفرات وراثية في مورث السرطان الخلوي C-H-ras والمورث C-neu. أما العوامل الفيزياوية فيؤدي التعرض إليها غالباً إلى حصول السرطان الناشئ عن طفرات وراثية على هيئة دايمرات (مزدوجات قاعدية مثل مزدوج السايتوسين C - C والجوانين G - G وغيرها) حيث تدخل هذه الديمرات في التضاعف مؤدية إلى حصول الطفرات الوراثية.

ثالثاً : تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بالأنتقال الكروموسومي :

تقترن أنواع متعدد من السرطانات بالانتقالات الكروموسومية التي تنشأ نتيجة كسور وإعادة التحام غير طبيعية لنفس الكروموسومات المكسورة أو في أخرى غيرها. وتأتي أهمية مثل هذه الانتقالات الكروموسومية بأقترانها بعلامات Markers ثابتة ومميزة لأنواع معينة من السرطان. كما تأتي خطورتها في إمكانية حصول كسر كروموسومي بالقرب من موقع مورث سرطاني خلوي وعند حصول الانتقال الكروموسومي فإنه من المحتمل وقوع المورث السرطاني الخلوي بالقرب من محفز قوي لمورث آخر وهذا يؤدي إلى تشغيل المورث السرطاني بصورة غير طبيعية.

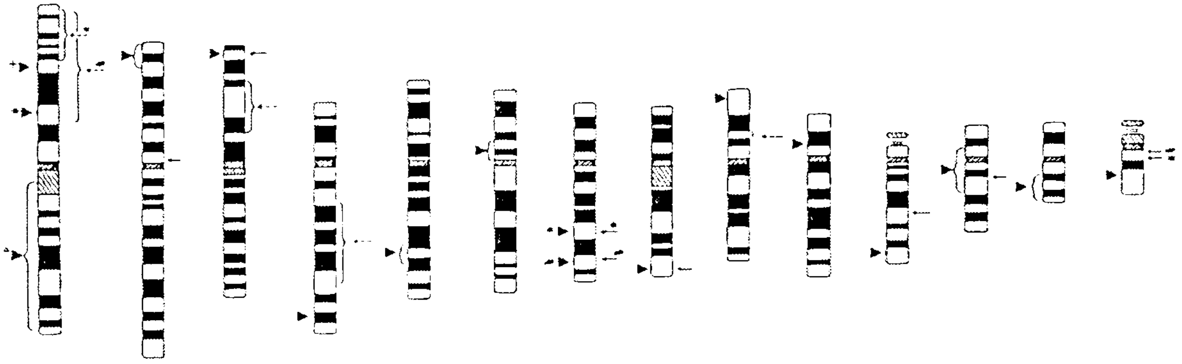
إن الكروموسومات البشرية تحتوي على العديد من المواقع الرقيقة والسهلة الكســــر Fragile Sites وقد شخص العديد من المورثات السرطانية الخلوية بالقرب من هذه المواقع وتقع أحياناً فوقها مما يجعلها عرضة للوقوع تحت تنشيط غير طبيعي في حالة حصول كسور كروموسومية في هذه المواقع.

يعتبر مرض اللوكيميا المزمن Chronic Myelogenous L.- CML أفضل الأمثلة على السرطان المترافق مع إنتقال كروموسومي. ففي عام 1960 شـــــخص كروموسوم غير طبيعي في خلايا الدم البيضاء لمريض مصاب باللوكيميا المزمنة

سمي بكروموسوم فيلادلفيا. أعتقد أولاً بأن هذا الكروموسوم ناشئ عن قطع **Deletion** في الذراع الطويل لكروموسوم 22. إلا أنه بعد سنوات تبين بأن هذا الكروموسوم ناشئ عن انتقال كروموسومي بين كروموسوم 9 وكروموسوم 22 ووجد بأن هذا الانتقال يترافق مع 90 - 95% من حالات اللوكيميا المزمنة.

بينت الدراسات الجزيئية لهذا المرض بأن الانتقال الكروموسومي المرافق لهذا المرض يؤدي إلى وجود المورث السرطاني الخلوي **C-abl** المحمول على نهاية الجزء الخاص بكروموسوم 9 بالقرب من منقطة مورثات مناعية نشيطة جداً محمولة على النهاية الثانية لكروموسوم 22.

وهكذا فإن الانتقال الكروموسومي أدى إلى وقوع المورث السرطاني الخلوي **C-abl** تحت نفوذ محفز المورثات المناعية القوية **Break point clusterregionsl (bcr)**. وقد وجد بأن التعبير عن مورث **C-abl** يؤدي إلى إنتاج بروتين هجين يضم بروتينات مناعية مشفرة من المورثات **bcr** مع بروتين مورث **C-abl**. ومثال أخر على دور الانتقال الكروموسومي في تنشيط المورثات السرطانية الخلوية هو سرطان لمفوما بركت **Burkitts L.** الذي يصيب الغدد اللمفاوية. يرتبط هذا السرطان مع الإنتقال الكروموسومي الذي يشمل الذراع الطويل لكروموسوم 8 وآخر لكروموسومات 14 أو 2 أو 22 وأن تكرار حصول الانتقال بين كروموسوم 8 و 14 الأكثر تكراراً في هذا السرطان ويصل إلى حوالي 90%. لقد تبين من الدراسات الجزيئية لهذه الانتقالات وجود المورث السرطاني الخلوي **C-myc** الذي يقع في الموقع 24 من كروموسوم 8 وهو موقع الكسر والالتحام في الإنتقال الكروموسومي. كما شخص وجود مورثات مناعية عالية التعبير على بقية الكروموسومات وبالقرب من موقع الكسور والالتحام (شكل 12 -1).



CHROMOSOME NUMBER	1	2	3	5	6	7	8	9	11	12	15	17	20	22
ONCOGENE	NRAS* BLYM* SK*	NMYC	RAF1	FMS	Myb	ERBB	MOS* MYC#	ABL	HRAS1	KRAS2	FES	ERBA1	SRC	SIS
CHROMOSOME ABERRATION	Del(1p32)* Del(1p22)# Trisomy 1q*	t(2;8)#	t(3;8)* 3p-#	5q-	6q- +8 t(6;14)#	-7 7q-	t(8;21)* t(8;14)# +8*	t(9;22)* t(6;9)#	11p-# t(11q)# t(11;22)*	+12	t(15;17)	t(15;17)* i(17q)#	20q-	t(9;22)* t(8;22)# -22*
DISEASE	NEUROBLAST* MALIG. MELAN.# MANY CA.*	BL#	PAROTID GL.* LUNG CA.#	REFRA AN. ANLL	ALL LYMPHOMA OVARIAN CA.#	ANLL	AML* BL# ANLL*	CML* ANLL#	WILMS'* AMOL# EWING*	CLL	APL	APL* CML-BC#	MPD	CML* BL# MENINGIOMA*

FIGURE 5.2. Human chromosome locations of proto-oncogenes. (Kindly provided by J. Rowley)

Del = deletion
Ca = cancer
t = translocation
ALL = acute lymphoblastic leukemia
ANLL = acute non-lymphocytic leukemia
APL = acute promyelocytic leukemia
AMOL = acute monocytic leukemia
BL =Burkitt lymphoma
CLL = chronic lymphocytic leukemia
CML = chronic myelocytic leukemia
GL = gland
MALIG. MELAN. = malignant melanoma
MPD = myeloproliferative disease
REFRA. AN. = malignant melanoma

شكل (12 - 1) : خريطة للكروموسومات البشرية توضح المواقع السهلة الانكسار ومواقع بعض المورثات السرطانية الخلوية بالقرب منها وكذلك أنواع السرطان الناشئ عن ذلك.

ويعتقد الآن بوجود تنشيط للمورث السرطاني الخلوي **C-myc** عن طريق محفزات المورثات المناعية وهو ما يؤدي إلى التعبير عن المورث **C-myc** بقوة تفوق ما هو في الحالة الطبيعية وأن حالة السرطان قد تترافق مع هذا النشاط. ولا يزال تكتشف العديد من الإنتقالات الكروموسومية ذات المعنى في أنواع أخرى من السرطانات.

رابعاً : تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بتضخمها وزيادة تعبيرها :

تنشيط بعض المورثات السرطانية الخلوية عن طريق زيادة أعداد نسخها عن الحد الطبيعي ويدعى ذلك بالتضخم الجيني **Gene amplification** وقد يصل أعداد النسخ في مثل هذه الحالة إلى عشرات وربما المئات.

تلجأ الخلايا الطبيعية تحت بعض الظروف لتضخيم بعض مورثاتها الخلوية لسد بعض الاحتياجات الحياتية ولا تلبث أعداد نسخ هذه المورثات أن ترجع إلى عددها الطبيعي. وعلى الرغم من عدم معرفة آلية انخفاض عدد نسخ المورثات المتضخمة إلا أنه في حالة حصول تضخم لمورث سرطاني خلوي لسبب غير طبيعي فإن ذلك سيعرض حياة الخلية إلى الخطر وإحتمال تحولها إلى خلية سرطانية.

تؤدي زيادة أعداد نسخ مورث ما إلى زيادة مستوى تعبيره وإذا ما اقترنت الوظيفة الفسلجية للبروتينات المشفرة من هذا المورث في دور انقسامي فأنه عندئذٍ لا بد من احتمال تدمير نظام السيطرة الانقسامي في الخلية.

يظهر التضخم الجيني بصورتين خلال تحليل الكروموسومات الأول يظهر على شكل مكورات مزدوجة حرة غير مرتبطة بالكروموسومات. تدعى هذه المكورات بالجسيمات المزدوجة **Double Minutes - DMs**. ونظراً لعدم أحتواءها على سنترومير لذلك فأنها تتوزع عشوائياً في الخلايا أثناء عملية الإنقسام. أما الصورة الثانية التي يظهر عليها التضخم الجيني فهو عبارة عن تضخم في

موقع المورث حيث تزداد أعداده وتنتظم بالقرب منه وتظهر كمناطق داكنة متجانسة الاصطباغ تدعى **Homogeneous staining regions (HSRs).**

يترافق تضخم المورثات السرطانية الخلوية مع بعض أنواع السرطان فسرطان النيوروبلاستوما يترافق مع تضخم في المورث السرطاني الخلوي **N-myc** حيث تصل نسخ هذا المورث إلى أكثر من **100** نسخة. كما شخص هذا المورث متضخماً في بعض حالات الرتينوبلاستوما وكارسينوما الخلايا الرئوية الصغيرة.

كما شخصت مورثات سرطانية خلوية أخرى متضخمة في أنواع أخرى من السرطان كما هو الحال في تضخم المورث السرطاني الخلوي **C-erb B2** الذي سجل في أكثر من **30%** من حالات سرطان الثدي وبعض حالات كارسينوما الغدد اللعابية.

خامساً: تنشيط المورثات السرطانية الخلوية بالتآزر الجيني:

إن بعض أنواع الخلايا غيرالطبيعية تمتلك بعض المظاهر السرطانية إلا أنها تفشل في الوصول إلى حالة السرطان. لوحظ مثل هذا النوع من الخلايا كثيراً في المزارع النسيجية وتدعى مثل هذه الخلايا بالخلايا المتحولة **Transformed.** وجد بأن مثل هذه الخلايا تحتوي على ضرر وراثي معين غير كافي لدخولها إلى حالة السرطان إلا أنها تدخل هذه المرحلة حال أمتلاكها لضرر وراثي آخر. أن الأبحاث الجزيئية التي أجريت على هذه الخلايا بينت أن بعضها يتحول إلى السرطان بسبب حصول تآزر بين أثنين من المورثات السرطانية الخلوية المتضررة. كما بينت هذه الأبحاث بأن مثل هذا التآزر يحصل غالباً بين أحد مورثات العائلة **ras** والمورث **C-myc**.

وتبين بأن الخلايا المتحولة تمتلك في العادة مورثاً طافراً من مورثات العائلة **ras** والذي لا يكفي لوحده لدخول الخلايا إلى مرحلة السرطان إلا أنه يساعد

في أظهار الصفات المظهرية للخلايا السرطانية وأن حصول تنشيط ثاني لمورث c-myc كخطوة ثانية يؤدي إلى تعزيز المورث الطافر **ras** مما يدفع بالخلايا نحو حالة السرطان. سجلت مثل هذه الآلية في الكثير من التجارب التي أجريت على الخلايا الزرعية النسيجية إلا أنه لم يتم لحد الآن تحديد نوع من السرطان البشري يخضع لهذه الآلية أو ناتج عنها بسبب صعوبة تحديد مراحل السرطان.

سادساً: آلية فقدان أو عطب المورثات الكابتة للسرطان:

أنه من المعروف بأن بعض الطفرات التي تحدث في بعض المورثات يعود مرة أخرى إلى الوضع الطبيعي ويزول تأثير الطفرة بعد ذلك. يتم ذلك عن طريق حصول طفرة ثانية في نفس موقع الطفرة الأولى بحيث يعود الوضع الطبيعي كما كان قبل حصول الطفرة الأولى. تدعى مثل هذه الطفرات بالطفرات الراجعة **Reversable mutations**. كما أن هناك طفرات ذات تخصص آخر حيث تقوم بعض الطفرات في السيطرة على طفرات أخرى سابقة لها وتدعى مثل هذه الطفرات بالطفرات الكابتة **Supressor mutations**. قد تحصل الطفرات الكابتة على نفس المورث الطافر أو في موقع آخر بعيد عنه. أن آلية الكبت التي تتم عن طريق هذه الطفرات غير مفهومة لحد الآن.

أما في السرطان فأنه هناك أدلة على وجود مورثات كابتة من نوع آخر تؤدي إلى كبت تحول الخلايا نحو السرطان. أن أول ملاحظة سجلت حول هذه المورثات هي في تجارب تهجين الخلايا الجسمية حيث لوحظ بأن الاندماج بين خلايا طبيعية وأخرى سرطانية يؤدي إلى تكوين خلية هجينة حميدة مما يؤكد بأن السرطان هو صفة راجعة **Recessive trait**.

شخص حصول قطع **Deletion** في الموقع **14** من كروموسومي **13** أو في أحداهما في سرطان الرتينوبلاستوما وقد وجد بأن ذلك يترافق مع أنخفاض

مستوى أنزيم الاستريز Esterase D-D أو أختفاءه ويعتمد ذلك على شمول القطع فرد واحد أو زوج من كروموسومات 13 . وقد وجد بأن ذلك يرجع إلى أختفاء مورث rb-1 المشفر لأنزيم الاسيتريز D والذي يقع في الموقع 14 من كروموسوم 13 حيث ينخفض مستوى أنزيم الاسيتريز D في حالة أختفاء فرد من هذا المورث وتوقف إنتاج الأنزيم في حالة أختفاء زوجي المورث rb-1 بسبب القطع في كلا زوج كروموسوم 13 . لقد تبين من خلال الفحوصات السايتولوجية والجزيئية لخلايا هذا المرض بأن حالة السرطان تترافق مع حالة وجود آليل غير طبيعي بمفرده وهذا ما يثبت بأن الاليل الطبيعي الآخر هو مورث كابت للسرطان .

أما في سرطان ويلمز Wilm's tumourالذي ينشأ في الكلى خلال مرحلة الطفولة فقد وجد بأنه يترافق مع قطع في الموقع 13 من كروموسوم 11 . ويعتقد بأن موقع القطع يضم مورثاً كابتاً للسرطان .

الموت المبرمج للخلايا والسرطان Apoptosis and Canar :

تمتلك الخلايا الاعتيادية برامج وراثية معينة يتم العمل بها حال تعرض الخلايا إلى أضرار يصعب أصلاحها أو وصولها إلى الشيخوخة أو حتى تعرضها لضغوط فسلجية أوغيرها ويؤدي تشغيل هذه البرامج إلى انتحار الخلايا وموتها وهو ما يدعى بالموت المبرمج للخلايا Apoptosis .

إن الآلية التفصيلية لهذه البرامج غير معروفة كلياً إلا أنه تم الكشف عن عدد من المورثات التي يعتقد بأنها تقود إلى انتحار الخلايا .

ففي أوائل التسعينات أكتشف أن نهايات الكروموسومات البشرية تحمل تجمعات من الحامض النووي DNA مرتبة على هيئة خرز أوحبات تعد ببضعة الالاف تدعى هذه تيلوميرات Telomeres. تفقد الخلايا الطبيعية حوالي 10 - 20 من هذه التيلوميرات في كل أنقسام خلوي وتبدأ بالموت بعد حوالي

100 أنقسام خلوي حيث تفقد تيلوميرات كروموسوماتها. إن فقدان التليوميرات من نهايات الكروموسومات يؤدي إلى تهرئها وتفكك محتوياتها مؤدياً إلى موت الخلايا. ولا يعرف تفصيل ما يحدث بالضبط إلا أنه لوحظ بأن الخلايا السرطانية تحافظ على تليوميراتها دون نقصان مع دخولها لالاف الدورات الانقسامية.

في عام 1994 اكتشف كالفن هارلي وجود نشاط لأنزيم التيلوميريز Telomerase في الخلايا السرطانية. يعمل هذا الأنزيم المثبط في الخلايا الطبيعية على إعادة بناء التيلوميرات التي تفقدها الخلايا السرطانية بعد كل إنقسام وهو ما يفسر بقاء عدد التيلوميرات ثابتاً في الخلايا السرطانية.

لقد وجد بأن التثبيط الخاص في إنتاج أنزيم التيلوميز في الخلايا الطبيعية له أهمية في الموت المبرمج للخلايا حيث وجد جيري شاي عام 1997 بأن الخلايا السرطانية توقظ المورث المشفر لأنزيم التيلوميريز مما يؤدي إلى أنتاج الأنزيم وهو ما يؤدي إلى إيقاف برنامج الموت المبرمج للخلايا كما وجد شاي بأن إفراز هذا الأنزيم يقترن مع أكثر من 85% من السرطانات التي درسها.

أن آلية الموت المبرمج للخلايا لا بد وأن تكون أكثر تعقيداً من ذلك ولا بد من إشتراك العديد من المورثات لاتمامها. وخلال الأعوام 1996-1998 شخص العديد من هذه المورثات منها لمورث P53 الذي يعمل بروتينه p53 على أيقاف الخلايا في مرحلة G1 لإعطاءها الفرصة لإصلاح الأخطاء الوراثية التي قد تحصل أثناء عملية تضاعف الحامض النووي DNA. لقد وجد بأن مستوى بروتين P53 في الخلايا السرطانية منخفض جداً أو غير موجود وهو ما يسبب دخول الخلايا إلى الدورات الانقسامية دون توقف ودون إعطاء الفرصة لاصلاح الأخطاء الوراثية مما يزيد من هذه الأخطاء بزيادة عدد الدورات الانقسامية. وفي عام 1997 شخص مورث آخر له علاقة بالمورث P53 دعي بالمورث P73 يعمل على تنشيط مورثات أخرى مستجيبة لبروتين P53 وتساعده في إيقاف

الخـــلايا عند مـــرحلة **G1**. ويعـتـقـد أيضـاً بأن له دور مـا في الموت المبـرمج للخلايا . كما شخص المورث **bcL-2** الذي وجد بأن زيادة التعبير عنه تؤدي إلى مقاومة الموت المبرمج مما يؤدي إلى إطالة عمر الخلايا .

أمـــا المورث **Bax** فأنه يعـمل على قـدح برنامج الموت المبـرمج وهو بذلك يعمل بوظيفة معاكسة لنشاط المورث **bcL-2** وجد بأن المورث **Bax** الذي يقع في المايتوكوندريا يعمل على تحفيز أطلاق السايتوكروم **C** الذي يعتبر إفرازه إشارة لبناء أنزيم محلل يدعى كاسبيس **Caspase** ينشط أنزيمات تحليل الحامض الـنـووي **DNA (DNase)** وبـــ **RNA (RNase)**، لذلـك يسـمى هـذا الأنزيم منشط **DNase** و **RNase** .

وجد الباحثان اليابانيان أناري وساكاهيرا عام **1998** أن أنزيم كـاسـبـيس يعمل على فك إرتباط مثبط أنزيمات **DNase**، **RNase** الذي يدعى **ICAD** عن الأنزيمات المحللة للأحماض النووي مما يطلق العنان لهذه الأنزيمات بالدخول إلى النوى وتحطيم الأحماض النووية وقتل الخلايا . كما وجد بأن المورث **bcL-2** الذي تم الحديث عنه يعمل على ايقاف إنتاج السايتوكروم **C** مما يوقف عملية تحرر أنزيمات تحليل الأحماض النووي وإيقاف عملية الموت المبرمج للخلايا برمتها .

ومع توفير مثل تلك المعلومات إلا أن عملية الموت المبرمج للخلايا لا تزال غير واضحة حيث لم يتم تفسير موت الخلايا العصبية الذاتي التي تفشل محاورها العصبية بالوصول إلى الأنسجة التي يجب تعصيبها .

دور العوامل الكيمياوية والفيزياوية والبايولوجية في نشوء السرطان :

لقد ثبت وبالنتائج الملموسة من الأبحاث العلمية التي لا تحصى بأن السرطان مرض يرتبط بصورة كبيرة مع عوامل خارجية أكثر مما هو متعلق بالأفراد ذاتهم . ويعتبر التلوث الناشئ عن الاساءة للبيئة والذي بدأنا بدفع

ثمنه غالياً رأس الحربه في نشوء السرطان. فالملوثات الكيمياوية تعتبر الأكثر خطراً على الصحة العامة لأنتشارها الواسع وأنتقالها من وسط إلى آخر دون أن نتمكن من تحديدها. ويأتي هذا الانتشار بسبب أستخدام هذه الكيمياويات في شتى نواحي الحياة. فالمبيدات الحشرية والزراعية على سبيل المثال هي مواد كيمياوية ذات خطورة أكيدة على الصحة العامة ويمكن أن تنتقل من مكان أستعمالها إلى أخر بعيداً عن طريق الرياح والمياه وقد تنتقل إلى الإنسان عن طريق ما يتناوله من نباتات وغيرها من الأغذية.

كما أن فضلات المصانع الكيمياوية من الأدخنة والفضلات السائلة لا تقل خطورة عن المبيدات بل أنها أوسع انتشاراً وأكثر ضرراً. وبعض الكيماويات المستخدمة في الاغذية كالحافظات والاصباغ ومخصبات النباتات والحيوانات وبعض العقاقير الطبية جميعها مواد ثبت خطورتها وأرتبط البعض منها مع أنواع معينة من السرطان. أن الكثير من المواد الكيمياوية يمكن أن يكون سلاح ذو حدين نافع وضار. وإذا كنا نرى النافع منه فإننا بصعوبة ندرك ضررها الكبير. ذلك أننا نحتاج لوقت طويل لأكتشافه بالإضافة لطرقه غير المباشرة في الضرر الا ما ندر.

فالتآكل في طبقة الأوزون الذي يحمي الحياة من الأشعة الكونية والفوق بنفسجية ناشئ عن الاستخدام السيء لكميات كبيرة من الغازات الفلورية الكلورية المستخدمة في التبريد والبخاخات خلال أكثر من سبعين عاماً ولم يتبين العالم خطورة هذه الغازات إلا بعد أن فتك سرطان الجلد بقاع معينة من الأرض. وهكذا أكتشفنا نفع هذه الغازات خلال فترة وجيزة إلا أننا لم نكتشف ضررها إلا بعد أن أصبح الخطر في ديارنا. وهذا هو حال الكثير من الكيمياويات.

لا يقتصر التلوث على الكيمياويات بل يتعداه إلى المواد المشعة والعوامل البايولوجية فالمياه الضرورية للحياة ضرورية أيضاً لتبريد المفاعلات النووية

وهكذا تنتج إلى جانب الطاقة المتولدة من المفاعلات الضخمة مياه ملوثة أما حرارياً أو أشعاعياً. ويمكن تصور حال الإنسان عندما يستخدم مواد غذائية حيوانية أو نباتية مسقاة من هذه المياه أو كانت تعيش فيها. وما أنفجار مفاعل تشرنوبل في أوكرانيا إلا واحداً من العديد من الحوادث التي غطت أكثر من 33% من سطح الأرض بالمواد المشعة الناشئة عن حوادثها. هذا بالإضافة إلى استخدام المواد الانشطارية النووية في الحروب القذرة وما أدت إليه من دمار في الحرث والنسل. أما العوامل البايولوجية التي تطلقها المعامل فإنها أدت إلى ظهور سلالات من الأحياء الدقيقة الممنعة والقادرة على غزو الجسم البشري دون أن تترك له فرصة للدفاع عن نفسه وهكذا ظهر الأيدز والايبولا وظهرت سلالات جديدة من الفايروسات المرتدة التي يعتبر معظمها عوامل مسرطنة قوية.

ونظراً للخطورة الكبيرة المحدقة بنا من جراء هذه العوامل المختلفة فإنه حري بنا أن نعرف آلية الضرر الناشئ عن هذه المواد على جسم الإنسان والحيوان والنبات والبيئة لكي نستطيع على الأقل من أن نقدم النصيحة الصحيحة بتجنب أثارها على الصحة العامة ويمكن الرجوع حول ذلك إلى فصل الطفرات الوراثية ودور العوامل الكيمياوية والفيزياوية في نشؤها.

آلية انتشار النقائل السرطانية Mechanism of Cancer Metastasis :

إن المشكلة الحقيقية في السرطان هو انتقاله من موضع إلى آخر ولو أن السرطان عبارة عن ورم ثابت لكان استئصالة جراحياً شافياً للمريض ولكن المشكلة السريرية هو انتقال بعض خلاياه عبر الدم وجهاز اللمف إلى مواقع أخرى لتأسيس أورام سرطانية أخرى عندئذٍ فإن السباق مع السرطان نادر ما يفوز به المريض. أن النظرة السابقة للسرطان كانت هي أن الأورام السرطانية تتوسع وتمتد في نموها لتستعمر الأنسجة والعقد اللمفاوية المجاورة وأن المستعمرات السرطانية البعيدة تنشأ بصورة مستقلة عن الورم الأول – أي

بمعنى أن وجود عدة مواقع سرطانية لا يرجع إلى انتقال خلايا ورم واحد إلى مواقع أخرى بل أن كل منها ينشأ بصورة مستقلة. إلا أنه في عام **1929** بين الطبيب الفرنس ريكاميه أن ظهور الأورام الثانوية يعود إلى إنتقال الخلايا السرطانية للورم الأول عبر الدوران واللمف إلى المواقع الأخرى. وقد أبتكر هذا الطبيب طريقة خاصة لمنع انتشار سرطان الثدي عن طريق استعمال الرباط الضاغط ظناً منه أنه يعيق بذلك انتشار الأورام.

إلا أن الأبحاث الحديثة بينت أن النقائل على عكس الفرضيات السابقة هي عملية نشيطة ولا تحدث مصادفة كنتيجة لنمو الورم.

والحقيقية أن إنتقال الخلايا السرطانية ليس بالعملية السهلة بل هي عملية شاقة وطويلة بحيث لا يستطيع البقاء على قيد الحياة منها الا عدد ضئيل جداً يقدر بخلية واحدة لكل **100.000** خلية منتقلة. تبدأ هذه بالألتصاق في موقع ملائم ثم تنمو لتحرض نمو أوعية دموية جديدة لتزويدها بما يلزمها من مواد غذائية وغيرها وهو ما يدعى بالتكوين الوعائي **Angiogenesis**. ولا يقتصر دور الأوعية الدموية الجديدة على تزويد كتلة الورم بالغذاء بل أنها تعتبر موضع لتفريغ أعداد من النقائل السرطانية في الدورة الدموية. تموت معظم النقائل خلال دورانها في الدم ولا يبقى منها سوى تلك التي تغلق الأوعية الدموية الضيقة أو التي أستقرت في قاعٍ وعاء دموي والتي تكون قد شكلت مستعمرات صغيرة جديدة. وأستناداً إلى تشريح الدوران فإن النقائل تستمر في سيرها في الأوردة والدوران اللمفي إلى أن تجد مكاناً مناسباً تستقر فيه. وقد تبين أن **60%** من النقائل السرطانية تستقر في الرئتان بينما يعتبر الكبد المكان الرئيسي لاستقرار نقائل سرطان القولون لأن الكبد يستقبل التصريف الوريدي مباشرة من القولون (المعي الغليظ). وقد تنشأ أورام في مواقع متعددة حتى مواقع غير متوقعة نتيجة وجود تربة مناسبة للنمو كأن يتوفر هرمونات أو عوامل حاثه للنمو أو تراكيز محرضة من البروتينات.

كان يعتقد بأن عملية هروب الخلايا النقيلة السرطانية من الورم هو نتيجة للضغط الحاصل في الورم بالإضافة إلى عدم ميل الخلايا السرطانية إلى الأنضمام لبعضها البعض. إلا أن هذا الاعتقاد لا يفسر وجود سرطانات كبيرة وذات ضغط داخلي عالي وغير منتقلة مثل سرطان الرحم **Leiomyomas of the uterus** وذلك ما يدفع للاعتقاد بأن عملية غزو الخلايا لا بد وأن تكون عملية معقدة وقد يكون الضغط الداخلي للورم الأول سبباً واحداً في ذلك. لا بد للخلايا المنتقلة أن تواجه العديد من الحواجز الطبيعية خارج الورم قبل أستقرارها. فالحاجز الأول هو طبقة الأنسجة المحيطة بالورم وجدران الأوعية الدموية واللمفاوية والأنسجة التي تنمو فيها الخلية النقيلة. لقد وجد من التجارب والبحوث التي أجريت حول انتقال الخلايا السرطانية أن النقائل لا تنتقل من الورم إلى مواضع أخرى عبر الأنسجة المجاورة بل تنتقل مباشرة عبر شبكة الأوعية الدموية المغذية للورم وهذا يعني أن معظم النقائل تأتي من الخلايا السرطانية المجاورة للأوعية الدموية وبهذا تكون النقائل قد اختارت طريقاً سهلاً و اجتازت بذلك الحاجز الافتراضي الأول. أما الحاجز الثاني فهو جدران الأوعية الدموية. أن النقائل تدور في الدم كما قلنا حتى تسد وعاء دموياً ضيقاً منشأة بذلك مستعمرة سرطانية جيدة وهي بذلك اختصرت اختراق الحاجز الثاني .أما الخلايا التي تخترق الأوعية الدموية فأنها تبدأ أولاً بالإستقرار في قاع الوعاء الدموي ثم تبدأ بثقب الوعاء للنفوذ إلى الأنسجة المجاورة. إن عملية ثقب الوعاء الدموي تبدأ أولاً باستقرار النقائل وقد وجد بأن طبقة الغشاء الداخلي الوعائي التي تقع تحت النقائل تبدأ بالانكماش كرد فعل لاستقرار النقائل عليه وعملية الانكماش هذه تعتبر عملية طبيعية تمثل تحفيزاً لكريات الدم المترسبة للإستمرار في الحركة والدوران إلا أنها تمثل بالنسبة للنقائل فرصة للاستقرار والتمسك بصورة أقوى بقاع الوعاء الدموي. ويتم بعدها أفراز أنزيمات محللة للأوعية الدموية.

ولا تنفرد الخلايا السرطانية النقيلة بهذا السلوك الهجومي بل أن الخلايا الطبيعية يتوجب عليها أن تغزو نسجاً أخرى من وقت إلى آخر مثل هجوم الكريات البيضاء عند أنغراز المشيمة في جدار الرحم وأثناء تشكل الأعضاء في المضغة. وفي هذه الحالة فأنه يحتمل أن تكون آلية الغزو في الخلايا الطبيعية هي نفس آلية الخلايا السرطانية النقيلة مع بعض الأختلاف. فالسلوك الهجومي للخلايا الطبيعية يزول بعد زوال المحفز بينما تستمر الخلايا النقيلة في ترحالها وأختراقها الأنسجة بثبات. وقد وجد بأن زيادة ميل الخلايا النقيلة للغزو والهجرة يعتمد على إنتاج مجموعة من الأنزيمات الحالة التي تدعى ميتالوبروتينيز Metalloroteinases (مجموعة من الأنزيمات تقوم بتحليل الأنواع المختلفة للكولاجين).

إن أنزيمات الميتالوبروتينيز تكون دائماً في مستوى عالٍ في الخلايا السرطانية النقلية مقارنة بمستوى منخفض في خلايا السرطان غير النقيلي والخلايا الطبيعية. ولكن يرتفع هذا المستوى في الخلايا البيضاء عن اختراقها للأنسجة وهو ما يفسر دور هذه الأنزيمات في اختراق الخلايا للأنسجة وقد عرف الآن ثمانية أنزيمات من عائل الميتلوبروتينيز ووجد بأن هذه الأنزيمات تحتوي على نهاية مؤلفة من تسلسل لحامض السستين (Cysteine) تلتف على الموقع الفعال للأنزيم لكبت نشاطه وتتحرر بعيداً عنه عند النشاط. كما أن هناك إحتمالاً بوجود أنماط أخرى من الكبت لهذه الأنزيمات. ويعتقد بأن الخلايا السرطانية النقيلة قادرة على إنتاج مواد تعمل على فصل الجزء المنظم للأنزيمات السابقة أو على الأقل كبت الجزء الفعال منها (الذي يرتبط مع الموقع النشط) وهو ما يجعل هذه الأنزيمات نشطة دائماً.

المراجع العربيـة

1-الفيصل، عبد الحسين مويت . 1999 .الهندسة الوراثية– دار الشروق للنشر والتوزيع والإعلان – عمان – المملكة الأردنية الهاشمية .

2-الفيصل، عبد الحسين مويت . 1999 .الوراثة العامة – الدار الأهلية للنشر والتوزيع – عمان – المملكة الأردنية الهاشمية .

3- الفيصل، عبد الحسين مويت . 1999 .الخلية – التركيب الدقيق والوظائف– الدار الأهلية للنشر والتوزيع – عمان – المملكة الأردنية الهاشمية .

4- الفيصل، عبد الحسين مويت . 1999 .التقنيات المعملية في الهندسة الوراثية – الدار الأهلية للنشر والتوزيع – عمان – المملكة الأردنية الهاشمية .

5- المتيني، أحمد يوسف . 1994 . مدخل إلى الوراثة الجزيئية – منشأة المعارف – الاسكندرية ، مصر .

6- السهريجي، محمد أحمد وجماعته . 1990 علم الوراثة – دار المطبوعات الجديدة – مصر .

7- جاردنر، أج وسنستاد، دب . 1987 . مبادىء علم الوراثة – ترجمة أحمد شوقي وجماعته – الدار العربية للنشر والتوزيع – مصر .

8- عثمان، أحمد . 1997 . الوراثة . منشورات جامعة دمشق – سوريا .

9- علي ، بهجت عباس . 1999 .عالم الجينات . دار الشروق للنشر والتوزيع والإعلان – عمان – المملكة الأردنية الهاشمية .

10- يوسف، أحمد خليل وجماعته. 1994. الوراثة وأمراض الإنسان. منشأة المعارف – الاسكندرية – مصر.

المراجع الأجنبية

1. Al-Faisal, A.H.M and Parry, J. 1998. Detection of abnormal allele of N-ras proto-oncogenes in Syrian hamster embryo cells (SHE) induced by benzo-a-pyrene (B (a) P). Cancer. Mol Biol. Vol:5 No.3.

2. Al-Faisal, A.H.M and Parry. J. 1998. Abnormal chromosomal location of K-ras and H-ras proto-oncogenes in Syrian hamster embryo cells treated with a single exposure to Benzo-a- pyrene (B (a) P). Cancer. Mol.Biol,Vol:5 No:3.

3. Al-Faisal, A.H.M. 1998 Effect of DNA concentration and plasmid size on the transformation of bacteria Staphylococcus anreus. Al-Tahadi Univ, Sci.J. No.2.: 57 - 62.

4. Al-Faisal, A.H.M. 1997. Effect of plasmid size on the transformation officiency of the bacteria E.coli. 1st conference of the Biology sciences, Bengazi - Libya-6-8 May.

* Aldridge,s. 1996. The thread life. Cambridge Univ. Press

5. Ames, B.N J. McCann and E.Yamasaki. 1975. Methods for detecting carinogens and mutagens with the Salmonella/ mammalian-microsome mutagenicity test. Mut. Res. 31:347-364.

6. Anderson. W.F and E.G, Diacumakos, 1981. Genetic engineering in mammalian cells. Sci. Amer. 245:60-93.

7. Ashweel. M. and T. W work. 1970. The biogenesis of mitochondria. Ann. Rev. Biochem. 30:251-290.

8. Avery. O.T.C.M. Macleod and M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of substance inducing transformation in pneumococcal typs. J. Expl. Med. 79.137-158.

9. Bishop. J.M. 1982. Oncogeness. Sci Amer. 246:80-92.

10. Breathnach, R and P. Chambon. 1981. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. Ann. Rev. Biochem, 50:349-383.

11. Brown, D.D 1981. Gene expression in Eukaryotes. Science 211:667-674.

12. Brown, T. A. 1986. Gene cloning An introduction. Van Nostrand Reinhold (U.K) Co. Ltd.

13. Bukhari, A.I., J.A. Shapiro and S.L. Adhya. 1977. DNA insertion elements plasmids and episomes. Cold spring Harbor Labrotary press. Cold Spring Harbor, New York.

14. Carins, J.P. Robins. B. Sedgwick and P. Talmud 1981. The inducible repair of alkylated DNA. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. Biol. 26:237:244.

15. Clarke, L. and J. Carbon. 1976. A colony bank containing synthetic Col El hybird plasmids representative of the entire E.coli genome. Cell 9:91-99.

16. Cleaver, J.E. 1967. Defective repair replication of DNA in Xerderma Pigmentosum. Nature 218:652-656.

17. Choen, S.N. .1975. The mainipulation of genes. Sci. Amer, 233:24-33.

18. Couturier. M. 1976. The intergration and excision of the bacteriophage mu-1. Cell 7:155-163.

19. Cox. M and I. Lehman. 1981. Rec A protein of E. coli promotes branch migration a kinetically distinct. Phase of DNA strand exchange. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3433-3437.

20. Crick, F.H.C. 1960. Codon-anticodon pairing the Woble hypothesis. J. Mol. Biol. 19:548-555.

21. Crick. F.H.C and J.D. Watson. 1954. The complementary structure of

DNA Proc. Roy. Sco. (A) 223:80:96.

22. Das-Gupta, C., A. Wu, R.Lahn, R. Cunningham and C. Radding 1981. Concerted strand exchange and formation of Holliday structures byE.coli Rec A protein. Cell 25:507-516.

23. Davidon, E. H. and R.J. Britten. 1979. Regulation of gene expression: possible role for repetive squences. Science 204:1052-1059.

24. Davies, R.W., R.B Waring, J.A. Ray. T. A Brown and C; Sxazzocchio. 1982. Making ends meet: a model for RNA splicing in fungal mitochondria. Nature 300:719-724.

25. Davis, M.M., S.K. Kim and L. Hood 1980. Immunoglobuling class switching: Developmentally regulated DNA rearrangments during differentiation Cell 22:1-2.

26. Denniston. C. 1982 Low level radiation and genetic risk estimation in man. Ann Rev. Genet. 16:329-355.

27. Drake, J.W. 1970. The molecular basis of mutation. Holden-Day. San Francisco.

28. Dressler, D. and H. Potter. 1982. Molecular mechanisms in genetic recombination Ann. Rev, Biochem 51:727-761.

29. Fox, M.S and M.K. Allen. 1964. On the mechanism of deoxyribonucleate integration in pneumococcal transformation. Proc. Natl Acad. Sci USA 52:412-419.

30. Freifelder, D. 1983. Molecular Biology. A comprehensive interoduction to procaryotes and Eucaryotes. Boston, MA. ScienceBooks Internations.

31. Gilbert, W. and D.Dressler. 1968. DNA replication : the rolling circle model. Cold spring Harbor symp, Quant. Bionl, 33:473:484.

32. Gold, L., D. pribnow. T. Schneider, S. Shinedling B.S. Singer and G. Stormo. 1981. Translational initiation in prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol 35:365-403.

33. Goodenuogh, U.W. and R.P Levine. 1970. The genetic activity of mitochondria and choloroplasts. Sci. Amer. 223:22-29.

* Griffin, A.M. and Griffin, H.G. 1995. Introduction to molecular biology, Blackwell science.

34. Hall, B.D., S.G. Clarkson and G. Tocchini-Valentini. 1982- Transcription initiation of eukaryotic transfer RNA genes. Cell 9:3-5.

35. Haseltine. W. 1983. UltrAviolet light repair and mutagenesis revisited. Cell 33:13-17.

36. Hershey, A.D. amd M. Chase. 1952. Independernt functions of viral protein and nucleic acid in grwth of bacteriophage. J. Gene. Physiol. 36.39.56.

37. Holloday. R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. Genet. Res. 5:282-304.

38. Howard-Flanders, P.1981. Inducible repair of DNA. Sci Amer. 245.72-80.

39. Howard- Flanders. P., S. West and A. Stasiak. 1984. Role of Rec A Protein spiral filaments in genetic recombination. Nature 309:215-220.

40. Huberman. J. A. and D. Riggs. 1968. On the mechanisim of DNA replication in mammalian chromosomes J. Mol. Biol. 32:327-341.

41. Jacob, F. and J., Monod. 1961. Gentic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3:318/356.

42. Jelinek, W.R. and C.w. Schmid. 1982. Repetive sequences in eukaryotic DNA and their expression. Ann. Rev. Biochem. 51:813:844.

43. Kleckner. N. 1981. Transposable elements in prokaryotes. Ann. Rev. Genet. 15:341-404.

44. Kolter, R. and G. Yanofsky 1982. Attenuation in amino acid biosynthetic operons. Ann. Rev. Genet 16:113:134.

* Korf, B.R. 1996. Human genetics. Blackwell Science.

45. Kornberg. A. 1980. DNA replication. W.H. Freeman. San Francisco.

46. Kornberg. R.D. and A.Klug. 1981. The nucleosome. Sci. Amer. 244-52-64.

47. Kruger, K.,P.J. Grabowski, A.J. Zaug. J. Sands, D.E. Gottschling and T,R, Cech 1982. Self-Splicing RNA : autoexcision and sequence of tetrahymana, Cell 31:147-157.

48. Lederberg, J. and E.M Lederberg 1952. Replica Plating and indirect selection of bacterial mutations. J. Bacterial. 63:399-406.

49. Lindahl. T. 1982. DNA repair enzymes. Ann Rev. Boichem. 51:61-87.

50. Little, J.W. and D.W. Mount. 1982. The SOS regulatory system of E. coli. Cell 29:11-22.

51. Maniatis, T. and M. Ptashne. 1976. A DNA operator reressor system. Sci Amer 234:64-76.

52. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Moleclar colning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.

53. Meselson, M.S. and F.W. Stahl. 1958. The replication of DNA in E.coli. Proc Natl. Acad. Sci USA, 44:671-692.

54. Nash, H.A 1981 Intergration and excision of bacteriphage Lambda: the mechanism of conservation site-specific recombination. Ann. Rev. Genet. 15:143-167.

55. Nirenberg M.W. 1963. The genetic code II. Sci. Amer. 208:80-94.

56. Novick, R.P. 1980. Plasmids. Sci Amer: 243:102-127.

57. Okazaki, T and R. Okazaki, 1969. Mechanism of DNA chain growth. IV. Diection of Synthesis of T4 short DNA chains as revealed by exonycleolytic degradation, Proc. Natl. Acad. Sci. 64:1242-1248.

58. Pabo, C.O and M. Levis. 1982. The operator-binding domain of

Lambda repressor: Structure and DNA recognition. Nature 298:443-447.

59. Platt, J. 1981. Temination of transcription and its regulation in the tryptophan operon of E. coli. Cell 24:10-23.

60. Preer, J. P. Jr. 1971. Extrachromosomal inheritance: heredity symbionts. Mitochondria, choloroplasts, Ann. Rev. Gennt. 5:361-4-6.

61. Razin A. and A. D. Riggs. 1980. DNA methylation and gene function. Science 210:604-610.

62. Roth, J.R. 1974. Frameshift mutations. Ann. Rev. Genet 8:319:346.

63. Sancar, G.B and W.D Rupp. 1983. A Novel repair enzyme: UVR ABC excision nuclease of E. coli cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. Cell 33:249-260.

64. Sharp. P.A 198. Speculations of RNA splicing. Cell 23:643-646.

65. Singl, N. and B. Alberts. 1972. Genetic recombination. The nature of a crossed stranded exchange between two homologs DNA molecules. J. Mol. Biol. 71:789-793.

66. Singer, B and J.T. Kusmierek. 1982. Chemical mutagenesis. Ann. Rev. Biochem 51:655-693.

67. Smith, H.O 1979 Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. Scienc 205:455-462.

68. Starlinger, P. and H. Saedler. 1976. IS-elements in microorganisms. Current Topics in microbiology and Immunology. 75:11-152.

* Strachan, T.and Read, A. 1996. Human molecular genetics. Bios Scientific.

* Tait, R.C. 1997. Introduction to molecular Biology. Horizon. Scientfic press.

69. Szostak, J., T. Orr-Weaver, R. Rothstein and F. stahl 1983. The double-strand break repair model for recombination Cell 33:25-35.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

salamalhelali@yahoo.com

https://www.facebook.com/salam.alhelali

https://www.researchgate.net/profile/Salam_Alhelali?ev=hdr_xprf

07807137614