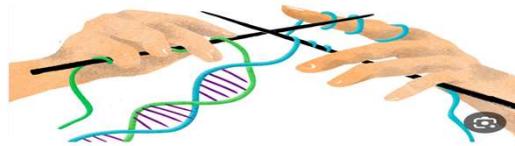


جامعة حماة
كلية الصيدلة
السنة الخامسة

تطبيقات التقنية الحيوية (2)

Applications of Biotechnology (2)



المحاضرة السابعة
الدكتورة ظلال محمد قطان

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

1

ثالثاً- إنتاج عامل التجلط Recombinant Factor VIII:

يلعب عامل التجلط Factor VIII دوراً رئيسياً في عملية تجلط الدم. ويؤدي عدم قدرة الجسم على بناء هذا العامل (نتيجة لغياب النسخة السائدة من هذا الجين الموجود على الكروموزوم الجنسي X) إلى صعوبة وقف نزف الدم عند التعرض لجرح قطعي نتيجة عدم قدرة الجسم على تكوين جلطة لوقف النزيف وخاصة في الأفراد المصابين بمرض النازف Haemophilia (هيموفيليا).

يتميز هذا الجين بأنه يتكون من 186 ك قاعدة ويحتوي على 26 إكسون و25 إنترون كما أن mRNA يُشفر لسلسلة طويلة مكونة 2351 حمض أميني.

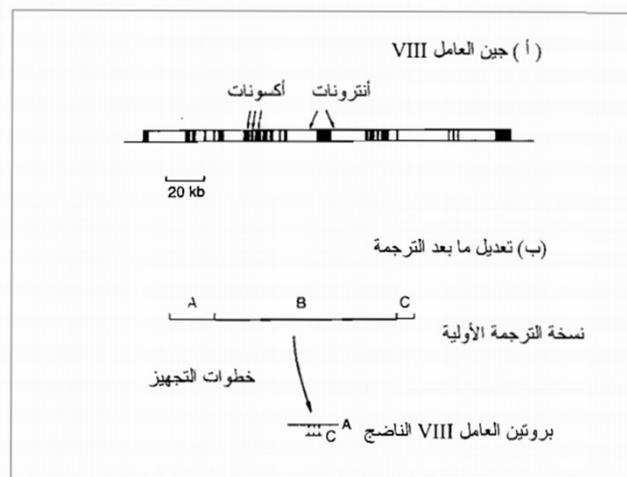
2

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

ويتم تعديل بروتين العامل VIII بصورة مُعقدة بعد الترجمة -Post- Translational Processing بحيث يُعطي بالنهاية بروتين ثنائي الجزيء Dimeric مكوناً من تحت وحدة كبيرة مُشتقة من المنطقة Upstream لمتعددة الببتيد الأولية وتحت وحدة صغيرة من المنطقة اللاحقة Downstream ثنائي الجزيء Dimeric. وتحتوي تحت الوحدتين على 17 رابطة كبريتيدية Disulphic Bonds وعدد من السلاسل الغليكوزيدية القصيرة. من الواضح أن مثل هذا البروتين المُعقد الكبير الحجم لا يُمكن للجهاز الوراثي لبكتريا القولون أن يقوم بإنتاجه لافتقاره إلى الكثير من العناصر المسؤولة عن إنتاج مثل هذا البروتين لذلك لابد من استخدام مزارع خلايا ثديية للقيام بهذه العملية.

3

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024



الشكل 37: عامل التجلط VIII وناتج ترجمته (البروتين)

4

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

وقبل أن نتطرق إلى عملية بناء هذا البروتين المعدل وراثياً في الخلايا الثديية، تجدر الإشارة إلى الأسباب التي اقتضت ضرورة إنتاج هذا البروتين بطرق تكنولوجيا الجين، حيث أنه حتى وقت قريب كانت الطريقة الوحيدة لعلاج الهيموفيليا هي الحقن ببروتين عامل التجلط VIII النقي والمستخلص من الدماء البشرية لأفراد مُتبرعين، وهذه التقنية تُعتبر مُعقدة والعلاج مُكلف جداً. والأخطر من ذلك أنه بالرغم من دقة عمليات التنقية فإنها كانت قاصرة عن التخلص من الفيروسات المرضية التي قد تكون موجودة في دم المُشْرِع.

إذ تبين أن فيروسات التهاب الكبد الوبائي Hepatitis وفيروس HIV المسؤول عن الايدز (AIDS) يمكن أن تمر مع البروتين المُستخلص.

5

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

وبالتالي حدثت بالفعل إصابات بهذه الأمراض الخطيرة للأفراد المعالجين بالحقن ببروتين عامل التجلط المُستخلص بهذه الطريقة. لهذا فإن عامل التجلط المُعدل والمُنتج بتكنولوجيا الجين يكون خالي من هذه الملوثات الخطيرة مما يُعد إنجازاً مهماً في مجال البيوتكنولوجيا.

المحاولات الأولى لإنتاج هذا البروتين المعدل وراثياً باستخدام خلايا الثدييات، تمت كلونة جزيء cDNA بأكمله في مزرعة من خلايا الهامستر Hamster Cells إلا أن الكميات المنتجة من البروتين كانت ضئيلة جداً وغير مشجعة.

وقد يرجع ذلك إلى أن العمليات ما بعد الترجمة Post-Translational.

6

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

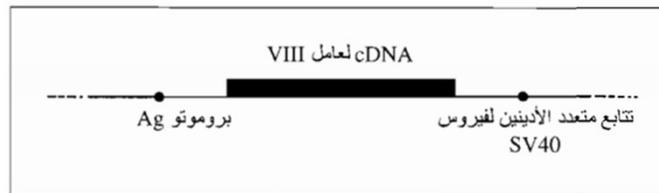
على الرغم من أنها تحدث بطريقة صحيحة في خلايا الهامستر، إلا أنها لا تستطيع على تحويل كل النتائج الأولية إلى الصورة النشطة مما يؤدي إلى انخفاض حاد في كمية الناتج النهائي.

للتغلب على هذه المشكلة، استخدمت قطعتين منفصلتين من cDNA تشفر إحداها لتحت الوحدة الكبيرة من سلسلة متعددة الببتيد والثانية تشفر لتحت الوحدة الصغيرة، بعد أن يتم التحام Ligation كل من قطعتي cDNA في ناقل تعبيرى Expression Vector بحيث تكون تحت تأثير Downstream بروموتور قوي وتسبق Upstream إشارة من متعدد الأدينين Poly A من فيروس SV 40 وتم إدخال البلازميد إلى مزرعة من خلايا الهامستر حيث أنتجت كميات توازي 10 أضعاف الكمية المُنتجة

7

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

من الخلايا التي احتوت على cDNA الكامل الطول، كما أن بروتين عامل التجلط الناتج كان فعالاً ولا يختلف في ذلك عن البروتين في صورته الأصلية.



الشكل 38: إشارات التعبير المستخدمة في إنتاج العامل VIII المؤشب. يتكون البروموتور من هجين صناعي من تتابعات حين بيتا اكتين للدجاج وبيتا غلوبين للأرنب وتستخدم إشارة متعدد الأدينين Poly A الخاصة بفيروس SV40 (وهي مهمة للتجهيز الصحيح لجزيء mRNA قبل الترجمة إلى بروتين).

8

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

إنتاج بروتينات بشرية معدلة أخرى:

Synthesis of Other Recombinant Human Proteins

توالت عمليات إنتاج بروتينات معدلة بتكنولوجيا الجين و يبين الجدول التالي بعض الأمثلة لهذه البروتينات.

9

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

البروتين	الغرض من استخدامه في العلاج
الانسولين	مرض البول السكري
السوماتوستاتين	إختلال النمو
السوماتوتروفين	إختلال النمو
عامل التجلط VIII	هيموفيليا
عامل التجلط IX	مرض Christmas
الفا انترفيرون	اللوكيميا وأنواع أخرى من السرطان
بيتا انترفيرون	السرطان والايذز
جاما انترفيرون	السرطان و الروماتويد
انترليوكين	السرطان و إختلال المناعة
عامل نمو Epidermal	القرحة ulcer
منشط البلازمونجين النسيجي (tpA) Tissue Plasmonigen Activator	الذبحة الصدرية heart attack
سوبر أوكسيد ديسميونيز (SOD)	التخلص من التلف الناتج من الشوارد المؤكسدة في عملية زرع الكلية.
الببومين السيرم	يستخدم كإضافات للبلازما Plasma Supplement
ريلاكسين Relaxin	يستخدم في المساعدة على الولادة To aid Child birth
إنزيم ديوكسي ريبونوكليبيز	لعلاج مرض التليف الحويصلي Cystic Fibrosis

الجدول يبين بعض البروتينات البشرية التي أنتجت من جينات مكلونة في البكتريا أو في خلايا حقيقيات النوى أو بواسطة Molecular Pharming

10

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

إنتاج لقاحات بتكنولوجيا الجين Recombinant Vaccins:

تتلخص عملية التحصين Vaccination ضد مرض معين في حقن الدم بتحضير من Antigen الذي يؤدي إلى تحفيز الجهاز المناعي للجسم لبناء أجسام مضادة Antibodies لحماية الجسم من الإصابة. وقد جرت العادة حتى وقت قريب على استخدام صورة غير نشطة أو ميتة من الميكروب المعدّي في تحضير اللقاح.

فمثلاً: كانت اللقاحات ضد الفيروس تتكون من وحدات فيروس تم إيقاف نشاطها Attenuated بمعاملات حرارية أو عمليات مماثلة إلا أنه نشأت مشكلتين من استخدام هذه اللقاحات:

1- لا بد من أن تكون عملية إيقاف النشاط فعالة بنسبة 100%،

11

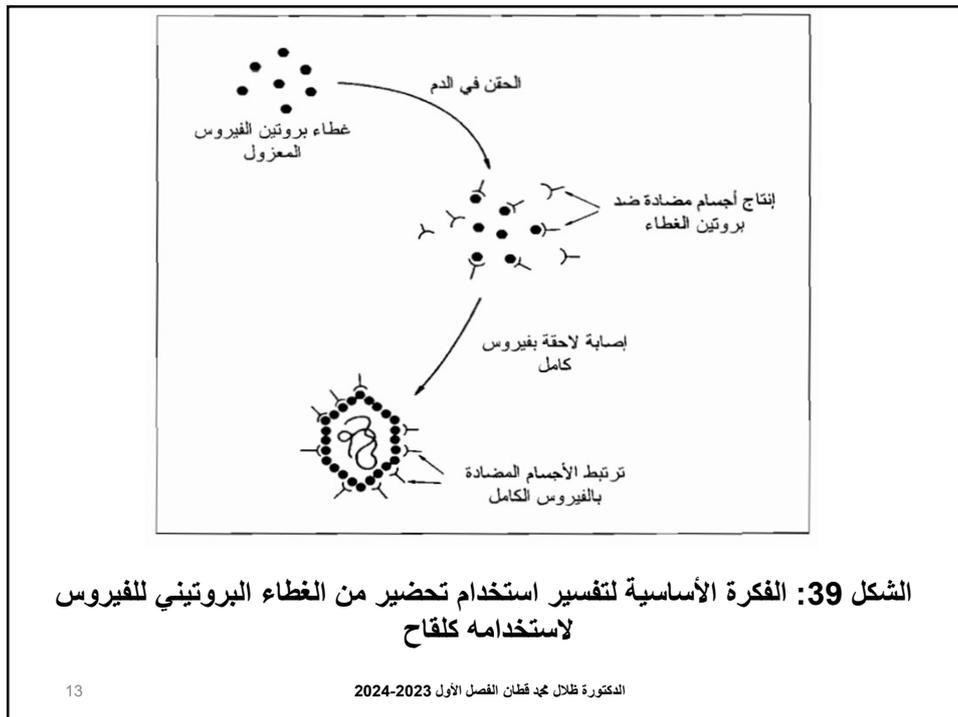
الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

وإلا فإن وجود حبيبة فيروس واحدة حية في الطعم المستخدم ستؤدي إلى الإصابة. وقد كانت هذه المشكلة في لقاحات الحمى القلاعية في الأبقار.

2- لا بد من الحصول على كميات كبيرة من حبيبات الفيروس لإنتاج اللقاح وهذه الأخيرة يتم الحصول عليها عادةً من مزارع الأنسجة. إلا أن بعض الفيروسات وخاصة فيروس التهاب الكبد B لا تنمو في مزارع الأنسجة. للتغلب على هذه المشاكل استخدمت تقانة كلونة الجينات وخاصةً بعد اكتشاف أن تحفيز الجهاز المناعي في الجسم لإنتاج أجسام مضادة يعتمد أساساً على مُستضدات (Antigens) موجودة في بروتينات غطاء الفيروس Coat Protein. لذلك يتم تحديد الجين المُشفّر لهذا البروتين ويكُون في ناقل تعبير مناسب لإنتاج بروتينات معدلة وراثياً تُستخدم كلقاحات.

12

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024



تمتاز تلك اللقاحات بعدم وجود الفيروس الحي كما يمكن إنتاجها بكميات كبيرة.

وقد أمكن الحصول بهذه التقنية على لقاح ضد التهاب الكبد B وذلك بكونته في ناقل تعبيري $2 \mu\text{m}$ وإدخاله في خلايا فطر الخميرة.

وقد أمكن الحصول على كميات كبيرة نسبياً من هذا البروتين المعدل وأثبتت فعاليته عند حقن القرود به، وقد تمت الموافقة على استخدام هذا اللقاح في الإنسان.

استنباط لقاحات حية مُعدلة وراثياً **Live Recombinant Vaccines**:

يرجع استخدام فيروس فاكسينيا **Vaccinia** كلقاح ضد فيروس مرض الجدري **Smallpox** إلى عام 1796 حتى اكتشف **Edward Jenner** لأول مرة هذا الفيروس، غير الضار بالإنسان، الذي يمكنه تحفيز الجهاز المناعي ضد فيروس مرض الجدري الخطير.

وقد أُشتق كلمة فاكسين (بالتعريب لقاح) من فاكسينيا، وقد أدى استخدام هذه التقنية إلى التخلص تماماً من مرض الجدري على المستوى العالمي في عام 1980.

تطور استخدام فيروس الفاكسينيا مؤخراً بحيث يمكن استعماله كلقاح ضد أمراض أخرى.

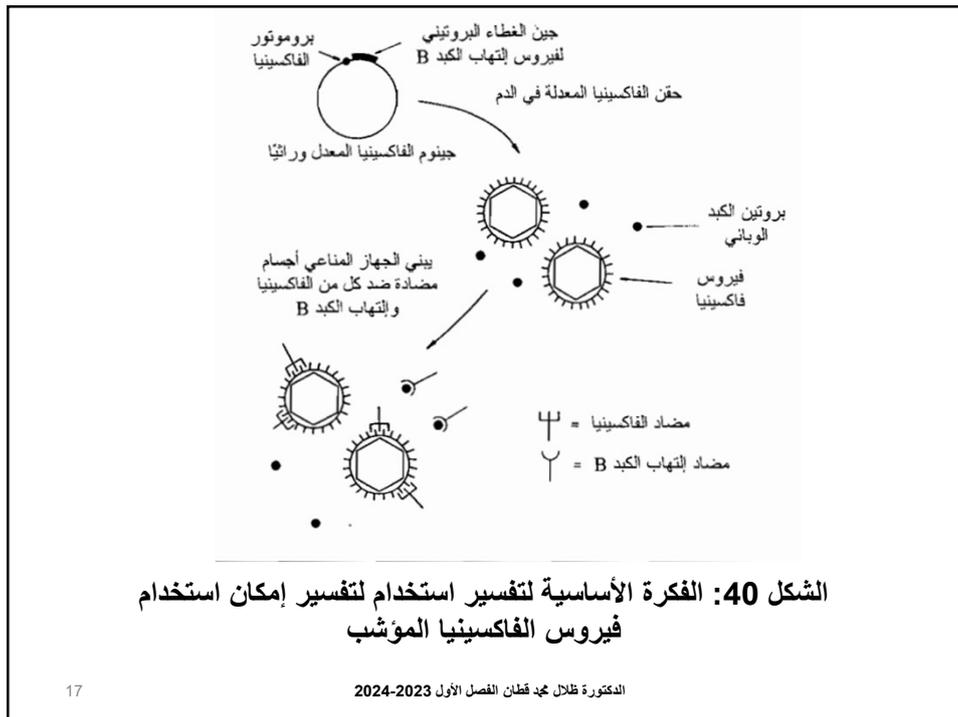
15

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

فإذا تم إلحاق جين بروتينات الغطاء لفيروس التهاب الكبد الوبائي B في جينوم الفاكسينيا تحت تحكم بـ **بروموتور** الفاكسينيا مما يؤدي إلى تعبير الجين. وبعد الحقن في الدم سيؤدي تكاثر الفيروس المعدل وراثياً إلى إنتاج حبيبات فاكسينيا جديدة بالإضافة إلى إنتاج كميات كبيرة من الأنتيجين التهاب الكبد B. سيؤدي ذلك إلى اكتساب المناعة ضد الجدري والتهاب الكبد الوبائي B معاً.

16

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024



أيضاً لهذه التقانة التي تُمثل استخدام جينوم الفاكسينيا الحية لكلونة عدد من الجينات المسؤولة عن اكتساب المناعة ضد عدد من الأمراض.

مثال:

تبين أن فيروس فاكسينيا المعدل وراثياً والذي يتم فيه تعبير عدد من الجينات لبروتينات أنتيجينات مختلفة مثل فيروس الأنفلونزا والتهاب الكبد B والهيربس Herpes Simplex.

قد أعطى مناعة ضد كل من هذه الأمراض مجتمعه في القرود. إلا أن هناك تخوف من أن إطلاق مثل هذه الفاكسينيا المعدلة وراثياً في البيئة من خلال برنامج تطعيم، خشيةً أي مخاطر على سلامة البيئة.

إنتاج بروتينات مُعدلة وراثياً في الحيوانات الحية

Recombinant Protein From Live Animals

أمكن مؤخراً استخدام الحيوانات الحية مثل الأبقار والخنازير والأغنام كمفاعلات بيولوجية **Bioreactors** لإنتاج بروتينات مُهندسة وراثياً. في هذه التقنية يتم كلونة جين البروتين المرغوب تحت تحكم البروموتور الخاص بجين **B-Lactoglobulin** ويتم إدخال ناقل التعبير هذا إلى الحيوان المحول وراثياً **Transgenic Animal** والذي يتم إنتاجه بالحقن المجهري **Microinjection** للخلية البيضية المُخصبة ويؤدي وجود الجين المرغوب تحت تحكم هذا البروموتور إلى أن يصبح إنتاج البروتين المرغوب قاصراً على أنسجة الضرع فقط بحيث يُفرز هذا البروتين مع اللبن.

19

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

يمكن استخلاص وتنقية البروتين المرغوب من اللبن بسهولة نسبية. أيضاً استطعنا بهذه الطريقة إنتاج بروتين عامل التجلط VIII فيما يُسمى **Molecular Pharming** حيث تم إلحاق **cDNA** الخاص بهذا الجين بأكمله تحت تحكم البروموتور في الخنزير (التي تم ذكره في بداية هذه الفقرة). وقد أدى ذلك إلى بناء هذا البروتين في خلايا الضرع وإفرازه في اللبن، وقد تبين أن البروتين الناتج له نفس الخواص ونفس فاعلية البروتين الطبيعي لعامل التجلط VIII.

20

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024



إنتاج بروتينات معدلة وراثياً في النبات:

Recombinant Proteins From Plants

كما يحدث في الحيوان فإنه يمكن استخدام النبات كمفاعل بيولوجي لإنتاج بروتينات مرغوبة خاصة وأنه ثبت أن معظم البروتينات الحيوانية التي يتم إنتاجها في خلايا النبات يحدث لها نفس التعديلات لما بعد الترجمة -Post-Translational Modifications. يمكن زراعة النباتات بكثافة عالية في الحقل مما يعطي محصولاً جيداً من البروتين المعدل وإمكان التخزين لبعض الأجزاء النباتية المحتوية على هذا البروتين مثل الدرنات أو في الفاكهة التي تكون عادةً غنية بالبروتين.

بغض النظر عن الطريقة التي يتم فيها إنتاج البروتين المعدل في النباتات

فإن النبات يوفر تقنية رخيصة وغير معقدة للإنتاج الكبير **Mass Production** من البروتينات المعدلة وراثياً. وقد تم إنتاج بروتينات مختلفة على نطاق تجريبي مثل بعض المنتجات الصيدلانية كالانترليكون و الأجسام المضادة كما تجري بعض التجارب لإنتاج لقاحات في النبات (مثل اللقاح ضد الملاريا) مما يُعد خطوة كبيرة لاستنباط برنامج تطعيم رخيص وفعال. وقد أُستخدم نبات الدخان **Tobacco** بالفعل لإنتاج أجسام مضادة، وتتخلص الطريقة في إدخال كلون للجين الخاص بالسلسلة الخفيفة في أحد النباتات، في حين أُدخل كلون الجين الخاص بالسلسلة الثقيلة في نبات آخر. وأمكن بالفعل الحصول على كميات لا بأس بها من السلسلتين كل في النبات المعدل وراثياً.

23

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

ثم تم التهجين بين النباتين وعند حصاد نبات الجين الأول الناتجة وُجدت كميات معقولة من الأجسام المضادة كاملة حيث حدثت داخل نباتات الجيل الأول عملية تعديل كاملة بحيث أصبح تركيب الأجسام المضادة مشابه للبروتين الأصلي وبنفس الفاعلية.

24

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

تحديد الجينات المسؤولة عن الأمراض البشرية:

Identification of Genes Responsible for Human Diseases

لا شك أن الأمراض الوراثية كانت وستظل موجودة في الكائنات البشرية، إلا أنها اكتسبت أهمية أكبر في السنوات الأخيرة وذلك لأن برامج التطعيم واستخدام المضادات الحيوية وتحسين النواحي المعيشية والصحية قد أدت إلى انخفاض في معدلات الإصابة بالأمراض المعدية مثل الجدري والسل والكوليرا والتي كانت السبب الرئيسي في الوفاة في أوائل القرن العشرين. ونتيجة لذلك أصبحت نسب أعلى من أفراد الكائنات الحية تموت من أمراض ذات مكون وراثي وخاصة الأمراض التي تظهر أعراضها في عمر متأخر من حياة الفرد نتيجة لارتفاع متوسط العمر.

25

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

تعود أهمية التعرف على الجينات المسؤولة عن الأمراض الوراثية إلى ما يأتي:

- 1- قد يُعطي تحديد أو تعريف الجين مؤشراً عن الأساس البيوكيميائي للمرض مما يُساعد على تصميم إستراتيجية العلاج.
- 2- إن تحديد الطفرة الموجودة في جين معيب Defective يمكن أن يستخدم لاستنباط برنامج للمسح Scanning والمتابعة حتى يمكن التعرف على وجود الجين في الأفراد الحاملة Carriers أو تلك التي لم يظهر بها المرض بعد. ويمكن تقديم استشارة طبية وراثية Genetic Counseling لحاملي الطفرة لتوعيتهم بفرص توريث المرض لأطفالهم. كما أن التعرف المبكر على الطفرة في الأفراد التي لم يظهر فيها المرض بعد تسمح باتخاذ

26

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

احتياطات لتقليل مخاطر تقدم المرض لأطفالهم.

3- يعتبر تعريف أو تشخيص الجين أحد المتطلبات المبدئية **Prerequisite**

للعلاج بالجينات كما سيأتي بعد.

ولكي يتم تحديد الجين المسؤول عن مرض ما فإنه يمكن للكائنات البشرية اللجوء إلى تحليلات شجرة النسب **Pedigree Analysis** والتي يتم فيها دراسة توريث الجين المرغوب في عائلات تتميز بمعدلات إصابة عالية بالمرض المطلوب دراسته.

يُفضل الحصول على عينات **DNA** مأخوذة من ثلاثة أجيال على الأقل من كل عائلة وكلما زاد عدد أفراد العائلة كلما كان ذلك أفضل.

27

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

تتم دراسة الارتباط بين ظهور أو غياب المرض وبين وجود أو عدم وجود واسمات **DNA (DNA Markers)** في تحليل شجرة النسب. يمكن توضيح ذلك باستعراض الخطوات التي اتخذت للتعرف على أحد الجينات المسؤولة عن سرطان الثدي.

بدأت التجارب المُبشرة عام 1990 عندما تبين أنه في عائلات تتميز بارتفاع نسبة الإصابة بسرطان الثدي، وجود عدد من الإناث المُصابة، والتي ظهر في تحليلات عينات **DNA** الخاصة بهنّ ظهور الواسم **RFLP (D17S74)** والذي كان قد سبق تحديد موقعه على الذراع الطويل للكروموزوم رقم 17. مما يشير إلى أن الجين المراد تحديد موقعه (**BRCA1**) لا بُدَّ أن يقع في مكان على الذراع الطويل للكروموزوم 17.

28

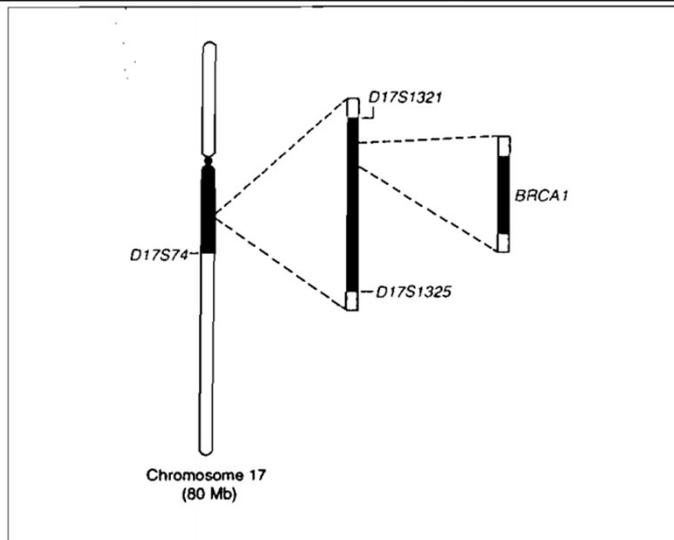
الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

كانت تلك بداية مُبشرة إلا أنها لم تكن كافية لتحديد الموقع الدقيق لهذا الجين إذ تبين أن أكثر من 1000 جين آخر تقع في تلك المنطقة نفسها والتي تمتد حوالي 20 مليون قاعدة على كروموزوم 17. استدعى ذلك القيام بتجارب ارتباط أخرى لتحديد موقع الجين BRCA1 بدقة أكثر.

تم ذلك بدراسة المنطقة التي تحتوي على BRCA1 و البحث عن وجود واسمات (STS) فيها والتي تُفيد في التحديد الدقيق لرسم خريطة هذا الجين. وقد أدى استخدام هذه الواسمات إلى خفض المسافة التي يقع فيها الجين من 20 مليون قاعدة إلى 600 ألف قاعدة فقط، وتسمى عملية تحديد مكان الجين بهذه الطريقة **Positional Cloning** أي الكلونة الموضعية.

29

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024



الشكل 42: الخريطة الوراثية الفيزيائية لجين سرطان الثدي

30

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

لكي يتم تحديد الجين بدقة أكثر لابد من التعرف على جين BRCA1 من بين 60 جين موجود في المنطقة المكونة من 600 ألف قاعدة.

ويمكن استخدام واحدة أو أكثر من التقنيات التالية للوصول إلى هذا الهدف:

1- استخدام cDNA (RT-PCR) الذي نحصل عليه من استخلاص mRNA من أنسجة مختلفة وإجراء تجارب Hybridization Probing. فقد تبين مثلاً أن جين BRCA1 يمكن أن يتجهن مع DNA من نسيج الثدي وأيضاً مع RNA من المبيض وقد وُجد ارتباط بين الإصابة بسرطان المبيض وسرطان الثدي.

2- تحليلات Southern باستخدام DNA مُستخلص من أنواع مختلفة وتسمى Zooblot على اعتبار أن أي جين هام في الإنسان ممكن أن يكون

31

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

له مثل متطابق معه نسبياً في الثدييات الأخرى بحيث يمكن التعرف عليه بالكشف بالتجهين Hybridization Probing باستخدام الواسمات المناسبة.

3- يمكن مقارنة تحليلات التتابعات النيوكليوتيدية في أفراد سليمة وأفراد مُصابة لمعرفة إذا كان الجين في الأفراد المُصابة يحتوي على طفرات قد تُوضح سبب حدوث المرض فيهم.

4- للتحقق من هوية الجين المحتمل Candidate Gene، قد يتم إجراء تجارب إسكات تعبير الجين Gene Silencing (إما بحذفه) Gene Knockdown في الفئران أو القضاء عليه Gene Knockdown (siRNA) كما سبق.

32

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

ومتابعة ظهور أعراض مرضية على الفأر مُشابهة لما يحدث للمرضى
البشريين لكي يستطيع الباحثون التأكد ما إذا كان هذا الجين هو بالفعل الجين
المطلوب.

وقد أدى استخدام هذه التحليلات على المنطقة المحتوية على جين سرطان
الثدي إلى تحديد جين بطول 100 ك قاعدة مكون من 22 إكسون و يُشفر
لبروتين بطول 1863 حمض أميني والذي يُعد جين مُحتمل قوي للجين
BRCA1.

وقد وُجد نسخ من هذا الجين بالفعل في أنسجة الثدي والمبيض وُجِدَت
مُتشابهات له في الفئران والجرذان والأرانب والأغنام والخنازير
(Zooblots)

وقد تبيّن وجود عدد من الطفرات (مثل طفرات تحريك الإطار Frame Shift
وطفرات عديمة المعنى None Sense) في العائلات الحساسة للإصابة،
مما يؤدي إلى إنتاج بروتينات غير فعالة مما يُسبب الإصابة بالسرطان.
وقد أجمعت هذه النتائج على أن هذا الجين BRCA1 هو المسؤول عن
سرطان الثدي.