مقدمــة في علم البيولوجيا الجزيئية

Introduction of the biology molecular

مقدمـــة:

الخلايا و البنى الداخلة في تركيبها صغيرة جدا" لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة أو حتى سماعها أو لمسها. ولكن بالرغم من صغر حجمها فإن أهميتها عالية جدا"، حيث أن أعداد هائلة من المقالات العلمية تنشر كل عام بصدد هذه الكائنات القزمة الفائقة الأهمية.

فالخلايا هي البنى الأساسية لتكوين الكائن الحي وعلاقته مع محيطه .

النظرية الخلوية ترتكز على ثلاثة نقاط أساسية :

- كل المتعضيات تتكون من خلية واحدة أو العديد من الخلايا.
- الخلية هي الوحدة البنيوية الأساسية للحياة.
- كل الخلايا تنتج من خلايا موجودة بشكل مسبق.

قبل عام **1970**، وجد علماء الوراثة صعوبات كبيرة لإجراء الأبحاث على الحمض الريبي النووي المنقوص الأكسجين الـ DNA، و في ذلك الوقت كانت معظم الأبحاث تجري على الحموض النووية الريبوزومية الـ RNAs وعلى البروتينات. ولكن خلال القرن العشرين توجهت الأبحاث نحو الدراسة على مستوى الخلايا والجزيئات، ولقد تم ظهور علم أكثر تطورا أطلق عليه علم البيولوجيا الجزيئية والتي تتمحور معظم أبحاثه حول دراسة تركيب و وظائف جزيئات الـ DNA عند معظم الكائنات الحية، ويتناول أيضا دراسة التغيرات الجزيئية التي تظهر على جزيئات الـ DNA و مدى انعكاساتها على وظائفها.

يمكن تعريف علم البيولوجيا الجزيئية بأنه العلم لذي يدرس الجزيئات الخلوية والآليات الوظيفية والتغيرات الجزيئية، وعلاقة ذلك بالتركيب والتفاعلات والنشاطات الكيميائية ـ الحيوية المختلفة في خلايا الكائن الحي.

ولابد من الإشارة إلى مساهمة العلوم الأخرى وتطورها واستخدام الأجهزة و التقانات الحديثة المكتشفة في تطوّر علم البيولوجيا الجزيئية، التي برزت في القرن العشرين مثل: علم الكيمياء الحيوية، علم الخلية، علم الوراثة الخلوية، علم الوراثة الجزيئية وغيرها... ونتيجة هذا التضافر والتكامل الوثيق لعلم البيولوجيا الجزيئية والتطور

السريع والهائل لوسائل البحث العلمي و التقانات الحديثة، وصل هذا العلم إلى ما هو عليه من أهمية بالغة في العصر الحالي.

ومن أهم الاكتشافات التي قادت إلى اتساع وتطور علم البيولوجيا الجزيئية هو اكتشاف أنزيمات نوعية لها تأثير على الحموض النووية (أنزيمات الاقتطاع، أنزيمات الربط، أنزيمات النسخ). ومن التقانات الحديثة (الطرد المركزي المتدرج الكثافة، الرحلان الكهربائي، الـ PCR.....).

يرتبط علم البيولوجيا الجزيئية ارتباط وثيق مع كثير من العلوم الأخرى ومن بينها بيولوجيا الخلية، الإحصاء الحيوي، الكيمياء الحيوية، علم الوراثة الجزيئي. وبالتالي أصبح من السهل تجزيء الـ DNA الكامل إلى قطع صغيرة (مورثات) ودراسة كل مورثة على حدة. ولقد انبثق من علم البيولوجيا الجزيئية علم جديد أطلق عليه علم الهندسة الوراثية Genetic Engineering، الذي يعتمد على مجموعة من التقانات التي تؤدي إلى إضافة Addition أو حذف Deletion أو إصلاح Repair قطع من المادة الوراثية.

من أجل دراسة علم البيولوجيا الجزيئية يلزمنا في البداية معرفة بسيطة عن تطور و تاريخ بعض العلوم و التقانات التي ساهمت في تفسير الكثير من الظواهر و الآليات الجزيئية لفك كثير من الألغاز الحياتية.

- في عام **1938** أطلق المصطلح العلمي للبيولوجيا الجزيئية لأول مرة.
- في عام **1943** ظهرت نظرية فعل الجين "مورثة لكل إنزيم"، والتي ربطت الكيمياء الحيوية بعلم الوراثة.
- في عام **1944** أثبت كل من **Oswald Avery** و **Colin MacLeod** و **Maclyn McCarty**, أن الجينات تتركب من الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA، كما تمكن إيفري ومساعديه من تشخيص الجزيئات الكبيرة الحاملة للمعلومات الوراثية في البكتريا.
- في عام **1952** برهن العالمان **Hershey and Chase** أن المادة الوراثية هي الـ DNA وليس البروتين كأساس للمادة الوراثية.
- في عام **1953** اكتشف تركيب الـ DNA من قبل Watson, Crick, Franklin, and Wilkins و وضعا أول نموذج له.
- في عام **1957** العالم **Arthur Kornberg** أول من عزل الأنزيم المسؤول عن نسخ الـ DNA.
- في عام **1961** وضع كلاً من العالمين **جاكوب ومونود** نموذج الاوبرون (operon) لتنظيم التعبير الجيني.
- في عام **1966** فك **جونيد خوران ومارشال نيرينبرج** رموز الشيفرة الوراثية.
- في عام **1977** تم عزل لأول مرة المورثة المسؤولة عن ترميز هرمون المخ الـ Somatostatin البشري وهو هرمون مكون من 14 حمض أميني، حيث أدخلت هذه المورثة في ناقل بلاسميدي قادر على التضاعف في الخلية الجرثومية *Escherichia Coli* (*E. Coli*) وبهذه الطريقة استطاع العلماء صنع أول خلية جرثومية معدلة وراثيا قادرة على تصنيع هرمون بشري.

- في عام **1983** صمم **كارى ميليس** جهازاً لمضاعفة المادة الوراثية في المخبر بتفاعل البوليميراز التسلسلي PCR.

- في العام **1997** تم استنساخ النعجة "دولي" من قبل **إيان ويلموت** .

ولقد شهدت السنوات الأخيرة من القرن العشرين تقدما واسعا في أبحاث الهندسة الوراثية و البيولوجيا الجزيئية وخاصة بعد اكتشاف وتطوير تقانة إعادة التشكيل الوراثي للـ DNA (تقانة تأشيب الـ DNA) (Recombinant DNA technology) على يد العالمين **Boyer** و **Cohen** وتعتمد هذه التقنية على ربط مورثات تابعة لكائنين مختلفين و تصنيع DNA مؤشب. يدخل الـ DNA المؤشب و المجهز بهذه الطريقة داخل خلية مضيفة من أجل إنتاج منتجات مفيدة للبشرية وبكميات هائلة.

وتطورت التقانات بعدها إلى استخدام الخلايا حقيقة النواة كمصانع حيوية لتصنيع البروتينات البشرية. ومن أهمها الأنسولين, هرمون النمو، عوامل تخثر الدم، اللقاحات وغيرها من البروتينات البشرية التي تنتج بشكل طبيعي ولكن بكميات قليلة جدا. وترافق ذلك بظهور علم جديد أكثر تطورا أطلق عليه علم التقانة الحيوي الجزيئي و هو بدوره يتناول مجالات بحث عديدة و من أهمها الاستنساخ المورثي، المعالجة المورثية (أي تزويد المرضى الذين يحملون مورثات طافرة بمورثات سليمة).

كل هذه العلوم والتقانات الحديثة سهلت تطوير و إنتاج عدد كبير من الأدوية و الجزيئات الضرورية للاستخدام المخبري و البحثي.

علم الخلية:

يتألف الجسم البشري من ملايين الخلايا، و الخلية هي أصغر شكل من أشكال التنظيم مهيأ للقيام بالأعمال الضرورية للحفاظ على الحالة الحية وأهمها الاستقلاب و النمو و التكاثر.

و في عام **1665** أدخل العالم **Robert Hooke** لأول مرة مفهوم الخلية ليصف فراغات الفلين التي تذكر ببنية قرص الشمع عند النحل، وذلك من خلال ملاحظة مقاطع من نسيج الفلين بواسطة المجهر الضوئي الذي صنعه بنفسه. وأطلق هوك مصطلح الخلية Cell الذي اشتق من اللاتينية Cellula على كل فراغ من الفراغات الموجودة في قطعة الفلين لكون تلك الفراغات تشبه الحجيرات التي يقطنها رهبان المعابد.

ومن خلال فحص البنية الداخلية لأنواع كثيرة من الخلايا تمكن علماء البيولوجيا من تقسيم الكائنات الحية ضمن مجموعتين تضم المجموعة الأولى الخلايا بدائيات النوى Prokaryotic cell أما المجموعة الثانية فتضم الخلايا حقيقيات النوى Eukaryotic cell وتتميز هاتان المجموعتان عن بعضهما البعض من حيث الحجم و من حيث البنى الداخلية (العضيات) التي تحويها.

الشكل 1: يظهر على اليسار المجهر الذي صنعه Robert Hooke و على اليمين خلايا الفلين حسب مشاهدة العالم Robert

<u>هناك عدة فروقات أساسية بين خلايا حقيقيات النوى و خلايا بدائيات النوى:</u>

1- النواة في حقيقيات النوى محاطة بغشاء نووي مضاعف أما في طلائعيات النوى المادة الوراثية تتواجد في سيتوبلاسم الخلية في منطقة Nucleoid region.

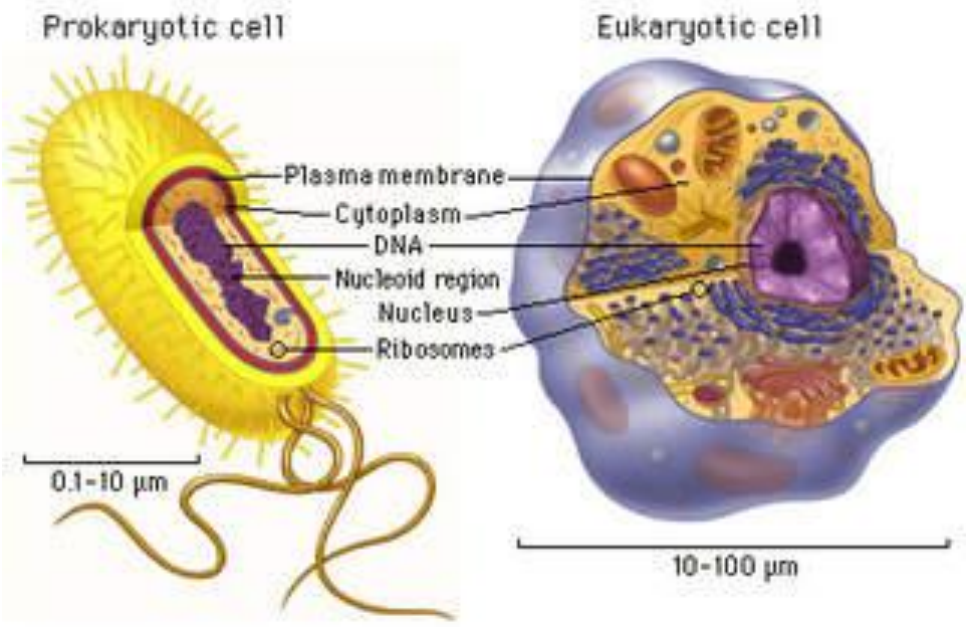
2- تتم عملية الانتساخ و الترجمة في طلائعيات النوى في آن واحد بسبب عدم وجود نواة حقيقية فالـ DNA يتواجد في السيتوبلاسم، أما في حقيقيات النوى تكون العمليتان منفصلتان، يحدث الانتساخ في النواة و تحدث الترجمة في السيتوبلاسم.

3- تتمثل بدائيات النوى بالفيروسات Viruses، الميكوبلازما Mycoplasma، البكتريا Bacteria، أما مجموعة حقيقيات النوى تمثلها الخمائر، الطحالب، الفطريات، وحيدات الخلية (الأوالي Protozoa) وكثيرات الخلايا الحيوانية و النباتية.

4- تمتاز حقيقيات النوى بكبر حجمها و تعقيد تركيبها الداخلي وتعقيد مادتها الوراثية، وتختلف حقيقيات النوى فيما بينها من حيث الحجم، الشكل، التركيب، الوظيفة.

5- معظم المادة الوراثية في طلائعيات النوى عبارة عن جزيء واحد حلقي الشكل يدعى الصبغي الجينومي بالإضافة إلى البلاسميدات الصغيرة المنتشرة في السيتوبلاسم، بينما في حقيقيات النوى تكون المادة الوراثية متوضعة في صبغيات خيطية ذات نهايات سائبة متواجدة داخل النواة.

لكننا لا نستطيع رؤية الصبغيات المنفردة داخل النواة في طور الراحة لكن عندما تدخل الخلية طور الانقسام تتكثف الصبغيات ويمكن رؤيتها حينئذ.



الشكل 2: يظهر على اليمين خلية حقيقية النواة و على اليسار وخلية بدائية النواة

سنذكر من الخلايا بدائية النوى:

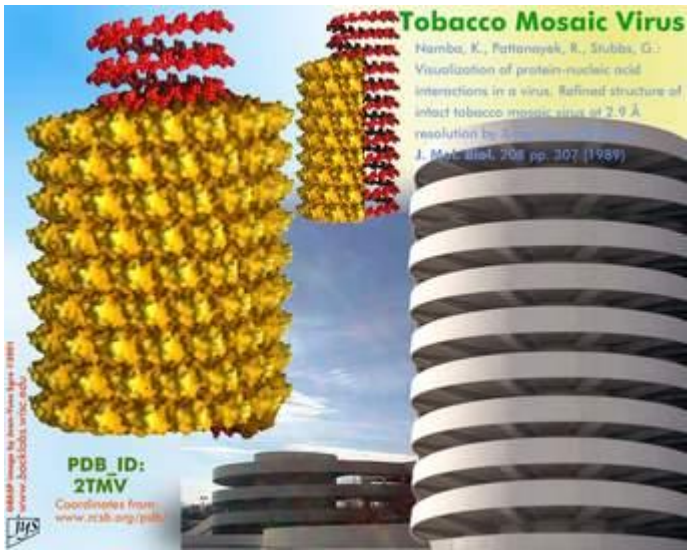
1- الفيروسات Viruses:

تعتبر الفيروسات من أصغر المخلوقات الحية من حيث الحجم حيث يتراوح حجمها ما بين **20 و 200 نانومتر**، لا ترى إلا بواسطة المجهر الالكتروني. لكي تتكاثر تحتاج إلى منابت حية (خلايا: نبات، إنسان، حيوان، جراثيم)، فهي لا تستطيع التكاثر على منابت (مزارع) اصطناعية.

تتصف بنظام خلوي أقل تعقيدا من الميكوبلازما و الجراثيم و طبعا من حقيقيات النوى، مادتها الوراثية تتألف من الـ DNA أو الـ RNA وبروتينات الغلاف الفيروسي.

يعود اكتشاف الفيروسات إلى العالم الروسي **Ivanowsky** عندما كان يبحث عن أسباب مرض تبرقش نبات التبغ فتبين أن سبب الإصابة يعود إلى كائنات دقيقة جداً تمر عبر المرشحات البكتيرية ...وهو أول من أطلق عليها اسم فيروس Virus والتي تعني السم وكان ذلك عام **1892م**.

يأخذ هذا الفيروس شكل أسطوانة صغيرة جوفاء، مؤلفة من غلاف بروتيني خارجي و من مادة وراثية تكون على شكل حمض نووي ريبي RNA. يكون هذا الأخير على شكل شريط حلقي أو حلزوني ملتف. الغلاف البروتيني، لا يشبه الغلاف البروتيني للفيروسات التي تملك الـ DNA كمادة وراثية، فهو يتألف من نوع واحد فقط من الوحدات البروتينية، التي تتحد مع بعضها البعض لتشكل الغلاف البروتيني الخارجي للفيروس.

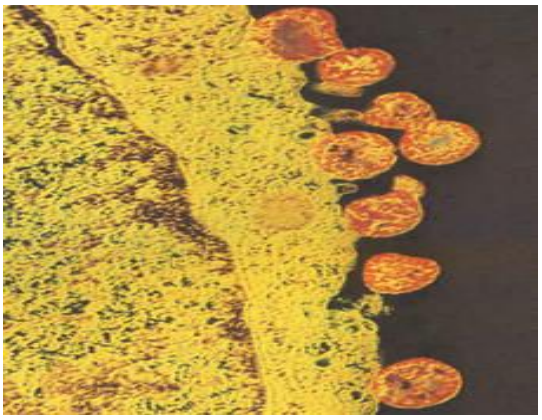


الشكل 3: فيروس فسيفساء التبغ Tobacco mosaic virus (TMV)

2- الميكوبلازما Mycoplasma:

هي كائنات حية تصنف بين الفيروسات و الجراثيم. تم اكتشافها من قبل العالم **Doi** عام **1972** حيث عزلت من لحاء النباتات المصابة. تتميز بفقدانها للجدار الخلوي و تحاط فقط بغلاف بلاسمي الذي يتكون من 70% بروتينات و 30% ليبيدات ، وتحوي السيتوبلاسم على الريبوزومات ومنطقة تحوي على مادة وراثية على شكل سلسلتين من الـ DNA الحلقي.

تتميز الميكوبلازما بصغر حجمها (ما بين **0.2 و 0.3 ميكرومتر**). وهي من أصغر المتعضيات القادرة على التضاعف الذاتي، حيث تتضاعف بطريقة الانقسام البسيط أو التبرعم، و تستطيع العيش في مزارع صناعية بقدرتها على التضاعف فيها، وفي نفس الوقت تستطيع أن تنمو و تتكاثر في خلايا النبات، الحيوان، الحشرات مسببة لها تأثيرات مرضية.



الشكل4: المايكوبلازما الرئوية Mycoplasma Pneumonia

3- الجراثيم (البكتريا): Bacteria

كائنات حية متناهية في الصغر و قطر معظمها في **حدود الميكرومتر**، لا ترى بالعين المجردة بل تحتاج إلى مجهر ذي قوة تكبيرية عالية. تتألف الجراثيم من خلية واحدة ورغم ذلك تستطيع القيام بجميع العمليات الحيوية الأساسية للحياة (تتغذى، تتنفس، تنتج طاقة وتستهلكها لتنمو و تتكاثر).

نأخذ مثال جراثيم الـ ***Escherichia coli*** التي تسكن بشكل طبيعي في الأمعاء الغليظة للإنسان، وأيضا في علب الزرع الموجودة في المخابر، حيث أن وسط الزرع هو وسط غذائي بسيط مؤلف من الكربون و الهيدروجين و بعض الشوارد غير العضوية.

السبب في ذلك هو قدرة هذه الجراثيم على تحويل المركبات العضوية البسيطة إلى مركبات معقدة لاحتوائها على جميع الأنزيمات اللازمة لذلك.

الشكل 5: يمثل جرثومة العصية القولونية Escherichia coli (E.Coli)

بنية الـ DNA، الجينات و الصبغيات

Structure of DNA – Genes - Chromosomes

تمتلك النباتات والحيوانات كمية ضخمة جدا من الـ DNA أضخم بكثير من DNA الجراثيم، مما يقع على عاتقها أن تحسن طي هذا الـ DNA من أجل أن يتسع في حجرته المخصصة له وهي النواة.
بالرغم من اكتشاف المجهر الالكتروني في بداية الأربعينات، لسوء الحظ لم يظهر أشكال الجينات بشكل دقيق.
وبفضل طريقة عزل الصبغيات بعضها عن البعض، تبين أن الصبغيات عند الإنسان تتألف بشكل أساسي من الحمض الريبي النووي المنقوص الأوكسجين Desoxyribonucleique Acid (DNA) ومن البروتينات المشحونة إيجابيا" التي تدعى الهيستونات.
و منذ اكتشاف الـ DNA عام **1869** من قبل العالم **فردريك ميشر**، و باستخدام الملون الخاص للـDNA في عام **1920** من قبل العالم الكيميائي الألماني **روبر فولجن** سمح لنا برؤية الـ DNA داخل الصبغي.

الحموض النووية Nucleic Acids:

سميت بالنووية لأنها اكتشفت لأول مرة في النواة، وهي نوعان الـDNA (الحمض النووي الريبي المنقوص الأوكسجين DNA) الذي يحمل المعلومات الوراثية والـRNA (الحمض النووي الريبي RNA) الحامل للشيفرات الوراثية من الـ DNA للمساهمة في عملية اصطناع البروتينات. تتألف الحموض النووية من وحدات يطلق عليها النكليوتيدات، التي تتألف من سكر خماسي وأساس آزوتي و مجموعة فوسفات. السكر الخماسي هو الريبوز في الـRNA والريبوز منقوص الأوكسجين في الـDNA.

<u>بنية الـ DNA (DNA Structure) :</u>

الـ DNA هو المادة الوراثية للخلايا الحية، والوحدة الأساسية لبناء الـ DNA هي النكليوتيد الذي يتألف من ثلاثة أجزاء أساسية:

1- سكر خماسي هو الريبوز المنقوص الأوكسجين Deoxyribose يتميز بعدم احتوائه على جذر هيدروكسيل على ذرة الكربون ´2. وهناك الحمض النووي الريبي الـRNA الذي يحوي سكر الريبوز Ribose الذي يملك جذر هيدروكسيل على ذرة الكربون ´2.

2- مجموعة الفوسفات، التي تكون إما أحادية الفوسفات، أو ثنائية الفوسفات، أو ثلاثية الفوسفات.

3- أساس آزوتي، وهنك أربع أسس آزوتية تدخل في بنية الـ DNA وتكون ضمن مجموعتين وهما:

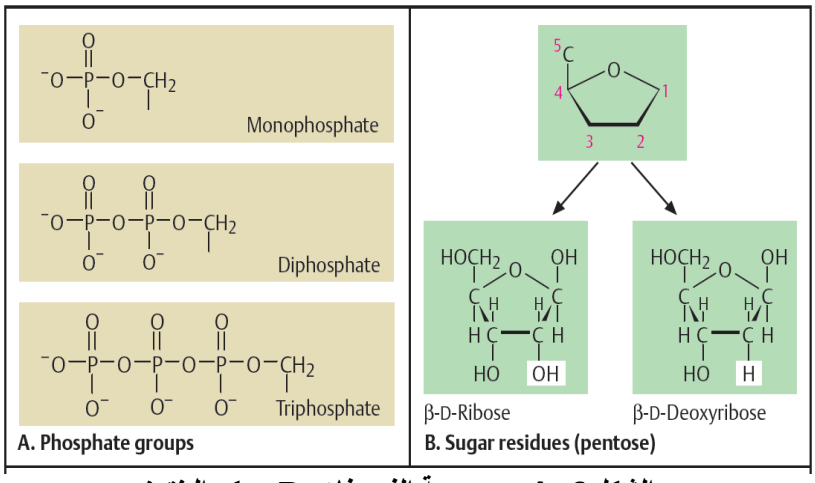
a- مجموعة البيورينات Purines : التي تتكون من حلقتين مرتبطتين سداسية و خماسية وتضم الأساس الآزوتي الأدنين Adenine و يرمز له اختصارا بـ A ، و الأساس الآزوتي الغوانين Guanine و يرمز له اختصارا بـ G.

b- مجموعة البيرميدينات Pyrimidines: التي تتكون من حلقة واحدة سداسية و تضم الأساس الآزوتي السيتوزين Cytosine و يرمز له اختصارا بـ C ، و الأساس الآزوتي الثايمين Thymine و يرمز له اختصارا بـ T.

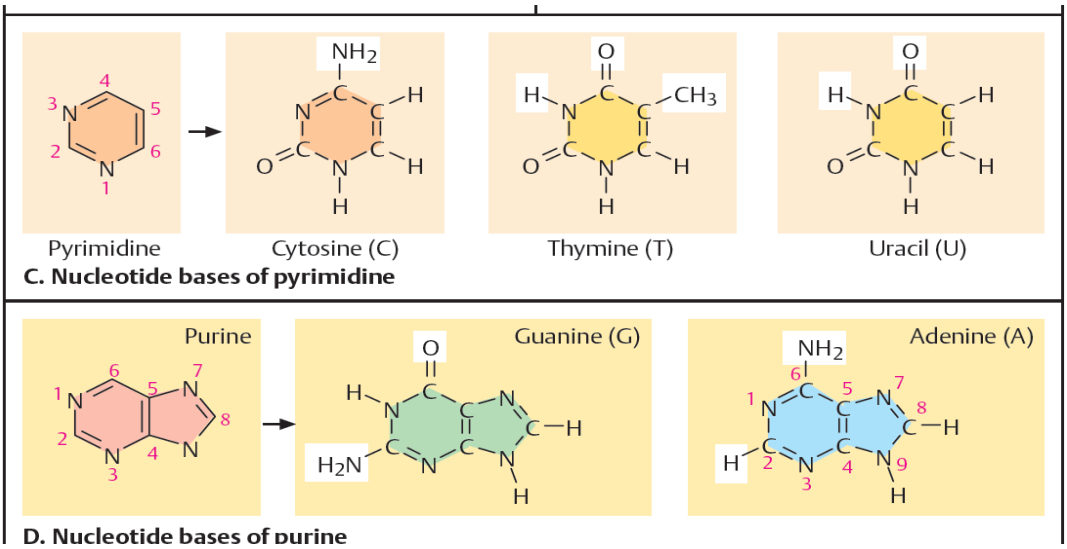
Nucleotide = ribose (or deoxyribose) + phosphate group(s) + one of the bases

هناك مصطلح آخر يدعى النكليوزيد و هو عبارة عن سكر خماسي مع أساس آزوتي (بيورين أو بيرميدين) و لا يحوي جذر الفوسفات.

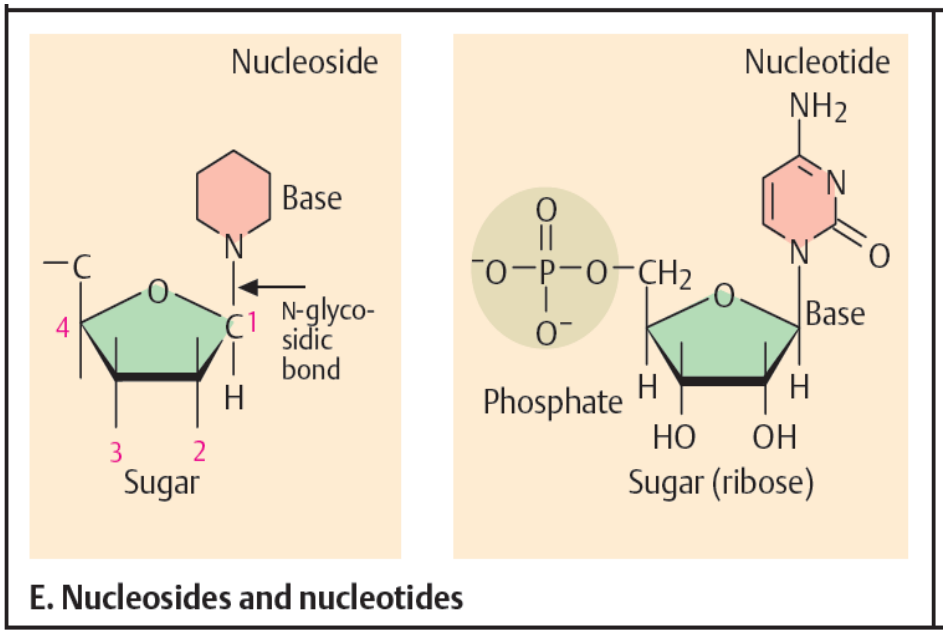
Nucleoside = ribose (or deoxyribose) + one of the bases



الشكل 6: A- مجموعة الفوسفات. B- سكر البنتوز



الشكل 7: C- البيرميدين، D- البيورين



الشكل8: E- النكليوزيد و النكليوتيد.

يعرف الـ DNA بأنه بوليمر طويل جدا مكون من تواتر متكرر من النكليوتيدات الأربعة السابقة الذكر، حيث يبلغ عرض سلسلة الـDNA من 22 إلى 26 انغستروم، و طول النكليوتيدة الواحدة 3.3 أنغستروم.

(ملاحظة : 1 انغستروم = 10^{-10} متر، وبتعبير آخر 1 متر = 10^{10} انغستروم).

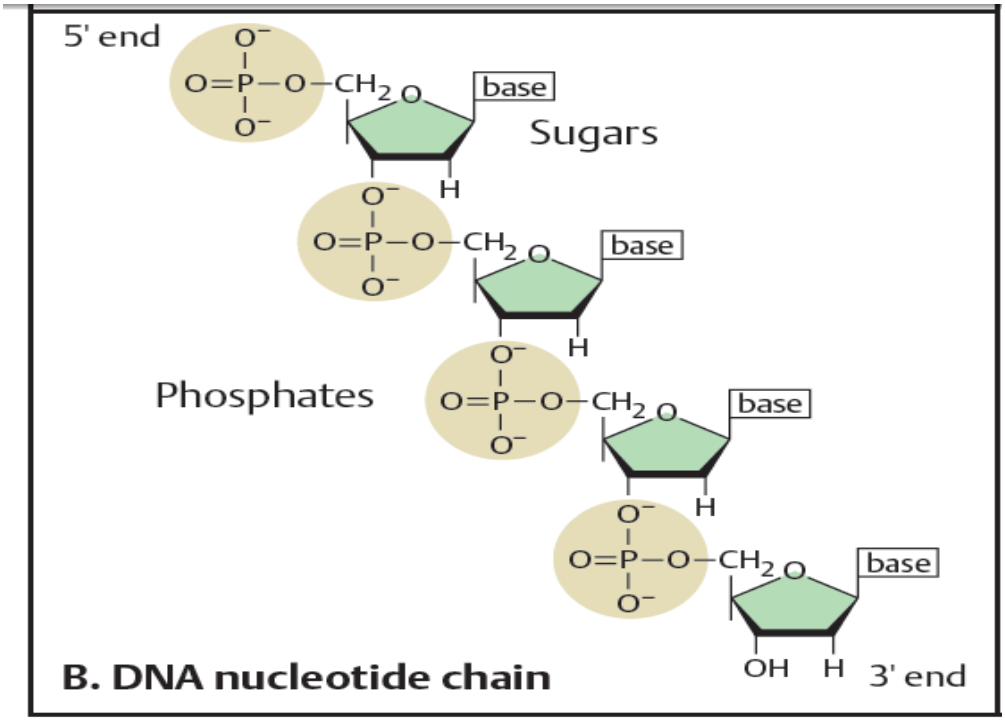
و لتمييز ذرات الكربون في سكر الريبوز في الـ RNA و سكر الريبوز المنقوص الأوكسجين في الـ DNA عن ذرات الكربون في الأسس الآزوتية المرتبطة بالسكر، توضع (´) على ذرات كربون السكر.

بنية سلسلة الـ DNA :

كما ذكر سابقا تتألف جزيئة الـ DNA من سلسلة متتابعة من النكليوتيدات، ترتبط هذه الأخيرة مع بعضها البعض لتشكل سلسلة من الـ DNA بواسطة أنزيم DNA Polymerase والذي يشكل رابطة فوسفو دي استر Phosphodiester Link وهي رابطة بين الهيدروكسيل المرتبط بذرة الكربون 3´ في سكر deoxyribose من النكليوتيد الأول مع مجموعة الفوسفات α المرتبطة بذرة الكربون 5´ من النكليوتيد التالي.

وبذلك ترتبط النكليوتيدات المتتالية برابطة Phosphodiester bond 5´-3´. و تشكل هذه الرابطة هيكل السكر- فوسفات لجزئ الـ DNA .

ونظرا لكون نهايتي سلسلة الـ DNA مختلفتين فيكون لها قطبية Polority و يعود ذلك أن النكليوتيد الأول من سلسلة الـDNA يكون الكربون 5´ من السلسلة و يحوي الطرف الآخر سكر deoxyribose ذو مجموعة هيدروكسيل حرة في الكربون 3´ ويدعى هذا الطرف بالنهاية 3´ لسلسلة الـDNA.



الشكل 9: سلسلة الحمض النووي DNA

الـ DNA هو حلزون مضاعف :

يكون الـDNA عند بعض الفيروسات سلسلة مفردة واحدة، أما عند الكائنات الأخرى يتكون من سلسلتين من النكليوتيدات حيث يأخذ شكل حلزون مضاعف وذلك وفقا ما ذكره **العالمان واطسن و كريك 1953 م**

(James Watson and Francis Crick 1953)

"Watson-Crick mode 1953" : يتكون الـDNA من سلسلتين متعددتي البوليمرات تنتظمان على هيئة السلم الملتف Twisted ladder. يتألف جانبي السلم اللولبي من تتالي سكاكر و جذور فوسفاتية مرتبطة مع بعضها البعض بروابط الفوسفو دي استر التي تم ذكرها مسبقا وتعتبر روابط تشاركيه بحاجة لطاقة كبيرة لفكها. و يرتبط السكر مع الأساس الآزوتي برابطة غليكوزيدية. ويرتبط عمودا السلم من الداخل مع بعضهما البعض بواسطة الأسس الآزوتية عبر روابط هيدروجينية Hydrogen bonds.

حيث ترتبط الأسس الآزوتية مع بعضها البعض بشكل منظم كالتالي:

A يرتبط مع T برابطتين هيدروجينيتين.
G يرتبط مع C بثلاث روابط هيدروجينية.

وعلى هذا الأساس الخيط الغني بـ G و C يحتاج إلى طاقة أكبر من أجل فكه.

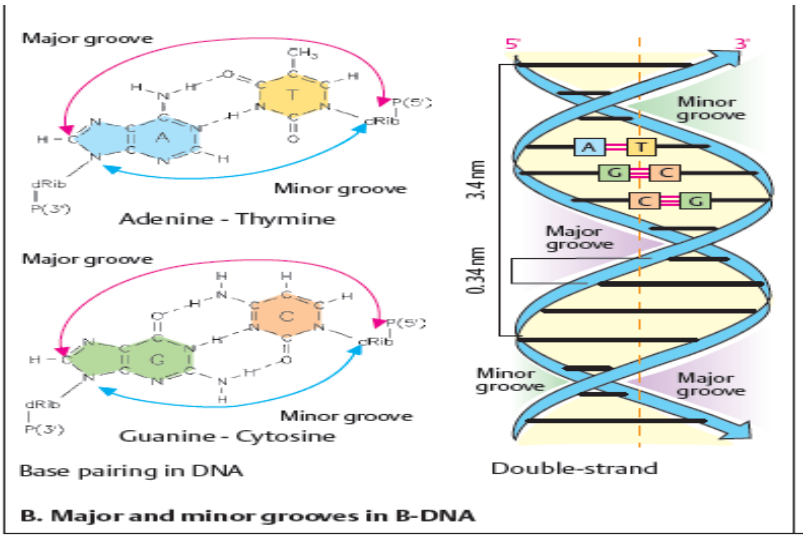
توصف سلسلتي الـDNA بأنهما متوازيتان بالتعاكس anti-parallel حيث يكون:

- اتجاه أحد السلسلتين : مجموعة الهيدروكسيل ´3 ---------- ´5 مجموعة فوسفات

- اتجاه السلسلة المقابلة : مجموعة فوسفات ´5 ---------- ´3 مجموعة الهيدروكسيل

لذا فإن قراءة تسلسل إحدى سلسلتي الـDNA تمكننا بشكل تلقائي من معرفة تسلسل السلسلة المقابلة لأنهما متتامتان، باعتبار أن الأسس A يقابل T والأساس G يقابل C (أو ما يعرف بأن سلسلتي الـ DNA متكاملتين complementary).

وتكون الأسس في هذه البنية مخفية مع وجود ثلمين grooves على طول سطح جزيء الـ DNA أحدهما عريض وعميق ويسمىmajor groove والآخر ضيق وقليل العمق ويسمى minor groove وعن طريق هذين الثلمين تتمكن البروتينات من الوصول إلى الأسس في بنية الـ DNA.



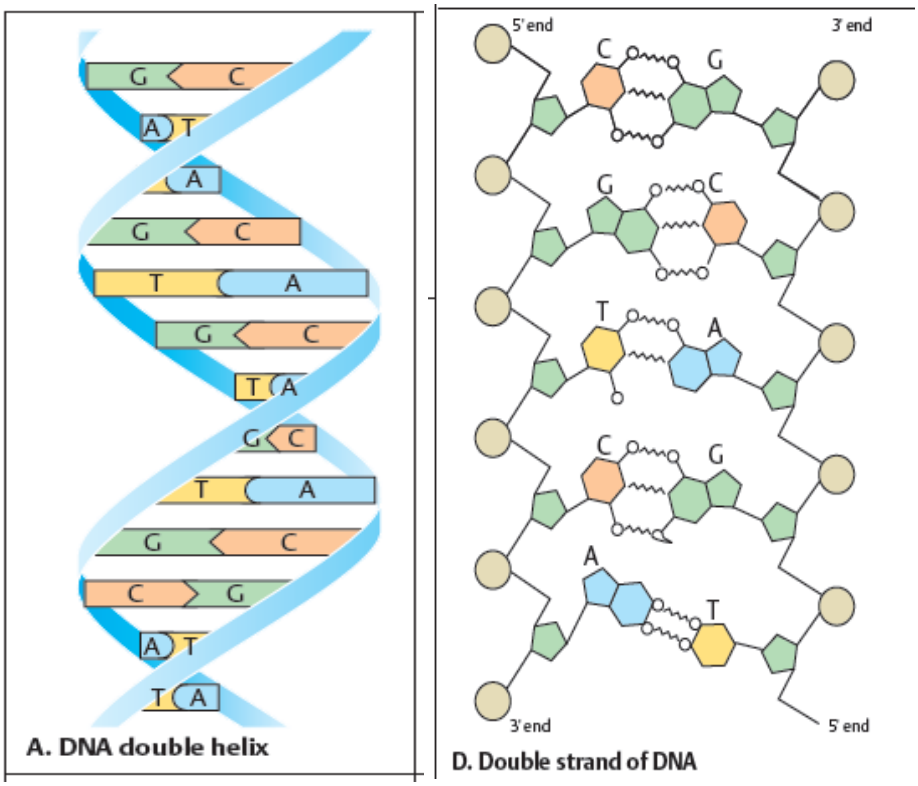
الشكل 10: يمثل الروابط الهيدروجينية بين الأسس الثلمين

الجين (المورثة) Gene:

الجين هو تسلسل نكليوتيدات تعطي الخلية معلومات محددة لاصطناع بروتين معين أو لاصطناع جزيء RNA محدد. يبلغ طول الجينات عادة 1000- 4000 نكليوتيد، مع العلم أن العلماء استطاعوا إيجاد جينات أصغر أو أكبر من ذلك. ونتيجة تحكم الجينات باصطناع البروتينات فهي بالتالي تؤثر على التحكم بنشاط الخلية فتؤثر على مظهر الخلايا و النسج و الأعضاء و أيضا على سلوكنا و شكلنا.

الجينوم Genome :

يدعى كل جزيء الـDNA الموجود في الخلية بالجينوم، ويحوي الجينوم البشري حوالي 20 000 جين موزعة على حوالي 3 بليون زوج من أسس الـDNA.



الشكل 11 : الحلزون المضاعف لجزيء الـDNA

توضع جزيئات الـDNA داخل الصبغيات Chromosomes:

أوضحت الدراسات الوراثية أن المادة الوراثية تتواجد بشكل مضغوط (compact) في تراكيب خاصة تسمى الصبغيات، وتختلف الصبغيات في عددها من نوع إلى آخر من المتعضيات، فعند الجراثيم تكون على شكل صبغي واحد، و 8 صبغيات في ذبابة الخل، أما عند الإنسان 46 صبغي.

من الناحية الجزيئية تتركب الصبغيات من نوعين من الجزيئات العملاقة وهي البروتينات و الحمض النووي DNA ، ومن الناحية الوراثية يتألف كل صبغي من جزيئه فقط من الـDNA.

فعند حقيقيات النوى : عند الخلايا البشرية تتوزع المادة الوراثية (Deoxyribonucleic acid) على ثلاثة و عشرين زوجا من الصبغيات، ويبلغ طول الحمض النووي الكلي مترين تقريبا ويتكدس في نواة لا يتجاوز قطرها 6 ميكرومتر.

وتعرف الصبغيات Chromosomes بأنها أجسام خطية غير حلقية (أو ألياف) دقيقة متشابكة مع بعضها البعض و متواجدة في النواة، ويحوي كل صبغي جزيئة DNA خطية واحدة فقط ملتفة على نفسها عدة مرات، و تتألف هذه الجزيئة من سلسلتي من متعددات النكليوتيدات الريبية المنقوصة الأكسجين.

ولقد أثبت الباحثون أن الكروموزومات أو الصبغيات تكون غير مرئية حتى بعد تلوين الأنسجة أو الخلايا بملون Feulgen أو Gieamsa. لكن أثناء الانقسام الخيطي أو المنصف تتعرض الصبغيات إلى عمليات تكثيف فتصبح مرئية حتى بالمجهر الضوئي، و بالتالي يمكن التعرف على عددها و شكلها و حجمها.

يتواجد الـDNA داخل الخلية الغير منقسمة بشكل خيوط مرتبطة مع بروتينات تسمى الهيستونات Histones بعملية تسمى التفاف الـDNA (DNA Coiling) مشكلة بنية خيطية تدعى كروماتين Chromatin ، لكن عند دخول الخلية طور الانقسام تلتف خيوط الـDNA بشكل كبير على بعضها البعض لتشكل الصبغيات (الكروموزومات Chromosomes) وهي تكون فيها الهيستونات و الـDNA ملتفة و متكدسة بشكل كبير بعملية تدعى الالتفاف الفائق DNA Super Coiling.

ولكن ما الفرق بين الشكل الطبيعي لالتفاف للـDNA والشكل فائق الالتفاف؟

1. في الالتواء الفائق يكون الـDNA مكثف ومضغوط بشكل أكبر بينما يكون الطبيعي مرتاح متمدد ويأخذ حجم أكبر.
2. سرعة الـDNA فائق الالتفاف في الرحلان الكهربائي أكبر بسبب كثافته العالية، كما يترسب بسرعة أكبر عند التثفيل.
3. الشكل الطبيعي يتواجد في البكتريا بشكل حلقي، بينما لا يتسع في خلايا حقيقيات النوى لذلك يتكثف ويلتوي فيها.

أما عند بدائيات النوى:

1- الفيروسات و آكلات الجراثيم : تختلف الفيروسات و الآكلات فيما بينها من حيث عدد الجينات الموجودة في حموضها النووية (RNA أو DNA). وبكل الحالات يكون مظهر المادة الوراثية للفيروسات بسيط و خالي من التعقيد، ويكون جينومها عبارة عن DNA وحيد أو مضاعف السلسلة و أحيانا RNA، وتعتمد الفيروسات على الخلية المضيفة لتصنيع العديد من الفيروسات. تسمى الفيروسات التي تخمج البكتريا بـ Bacteriophage.

<u>على سبيل المثال :</u> آكل الجراثيم لامدا Lamda الذي يغزو جراثيم E.Coli يحتوي على صبغي مفرد واحد حلقي (أي كائن أحادي الصيغة الصبغية)، و يكون هذا الصبغي عار من البروتينات و يحوي على الحمض النووي DNA. و أكدت الدراسات أن قطر هذا الصبغي يبلغ 20 انغستروم و طوله 17 ميكرون و وزنه الجزيئي أعلى بقليل من 30 مليون دالتون ويتألف من حوالي 000 50 زوجا من النكليوتيدات ويحتوي ما بين 50 و 65 مورثة.

تفسر البنية الحلقية للصبغي لامدا كون احتواء إحدى نهايتي صبغي لامدا على سلسلة مفردة من الـDNA تتألف من نكليوتيدات التيميديل، الأدنيل، و السيتديل، أما النهاية الأخرى لهذا الصبغي تكون بشكل سلسلة مفردة من الـDNA مؤلفة من نكليوتيدات الأدنيل، التيميديل، و الغوانيل حيث أن النهاية الأولى مكملة للنهاية الثانية.

2- الخلايا الجرثومية : تحوي أغلبية الجراثيم على صبغي حلقي واحد فقط (كائنات أحادية الصيغة الصبغية)، و يكون هذا الصبغي على شكل سلسلتين ملتفتين من الحمض النووي الـDNA مقارنة بالفيروسات و آكلات الجراثيم.

فعلى سبيل المثال : الصبغي في جرثومة E.Coli جزيء وحيد دائري يحوي حوالي 9 مليون نكليوتيد و طول محيطه حوالي 1mm و موجود في خلية أبعادها 1Mm، وكما هو الحال عند حقيقيات النوى يكون هذا الصبغي ملتف و مكدس بشدة ضمن عرى loops في منطقة Nucleoid وكل واحدة من هذه العرى ملتفة لفا فائقا مثل شريط الهاتف و البروتينات تكون مشابهة للهيستونات في حقيقيات النوى.

الخواص الفيزيائية والكيميائية للحموض النووية

+ الحمض النووي RNA

Physical and chemical properties of Nucleic acids

أولاً: الخواص الكيميائية Chemical properties:

1. الحلمهة بواسطة الحموض:

يتحلمه الـ DNA بالحموض الضعيفة وذلك عند PH=4، حيث يحصل في المرحلة الأولى برتنة (دخول بروتون) للأسس الآزوتية البيورينية ومن ثم حلمهتها (دخول جزيئة ماء) بتحطيم الرابطة الغلوكوزيدية بين الأساس وسكر الريبوز منقوص الأوكسجين وقد تستمر الحلمهة بدخول جزيئة ماء ثانية لتحرير جذر الفوسفات.

2. الحلمهة بواسطة القلويات:

لا يتحلمه DNA في المحاليل القلوية كونه ثابت فيها، على عكس RNA الذي يملك زمرة هيدروكسيل في الموقع ´2 التي تجعله أكثر قابلية للحلمهة في مثل تلك المحاليل بسبب حلمهة رابطة الفوسفو دي استر التي تربط الفوسفات بسكر الريبوز.

3. الحلمهة بواسطة الأنزيمات:

هناك العديد من الأنزيمات التي تحلمه RNA وتسمى بمجموعة Ribonuclease Enzymes (أنزيمات الريبونكلياز)، أما مجموعة الأنزيمات التي تحلمه DNA فتسمى Deoxyribonulease Enzymes (أنزيمات الديوريبونكلياز).

4. إمكانية حدوث طفرات على الأسس:

كون الأسس معزولة داخل الحلزون الثنائي تعتبر ثابتة، ولكن من الممكن أن يحدث عليها تفاعلين:

الأول: تفاعل الـ Deamination (نزع الأمين) وفيه يتم نزع الأمين التأكسدي من مجموعات الأمين فيتحول السيتوزين إلى يوراسيل.

الثاني: تفاعل الـ Tautomerization وفيه يتحول الأمين إلى إيمين في السيتوزين والأدنين أو يتحول الكيتون إلى إينول في الغوانين والتيمين.

ثانياً: الخواص الفيزيائية Physical Properties:

من أهم الخواص الفيزيائية هو **التمسخ Denaturation:** وهو عملية فصل الحلزون الثنائي لشريطي DNA إلى شريطين أحاديين. أكثر العوامل التي تساعد على تمسخ DNA هو الحرارة التي تعمل على فك الروابط الهيدروجينية المتشكلة بين الأسس.

تعتمد ثباتية حلزون DNA الثنائي على عدة عوامل:

- **تركيب الـDNA من الأسس الآزوتية:** فالـDNA التي تحوي على الزوج A-T بشكل متكرر في بنيته ينفصل بشكلٍ أكبر، لأن هذا الزوج من الأسس أقل ثباتيةً تجاه الحرارة وينفصل بسرعة وسهولة أكثر، على عكس الزوج G-C. وذلك كون الزوج الأول يرتبط برابطتين هيدروجينيتين في حين يرتبط الثاني بثلاث روابط هيدروجينية.
- **تركيز الأملاح:** تحمل زمر الفوسفات شحنة سالبة وتقاربها من بعضها يؤدي إلى حدوث تنافر فيما بينها، ولكن تعدل هذه الشحنة من قبل شوارد الأملاح وبالتالي زيادة الثباتية.
- **تأثير درجة الحموضة:** كيميائياً لا يتأثر الـDNA بالقلويات وإنما بالحموض فقط، بينما فيزيائياً يتأثر الـDNA بشكل كبير بالقلويات لذلك تستعمل هذه الخاصية لفصل الحلزون الثنائي للـDNA في المخابر.

الحمض النووي الريبي (RNA)

البنية الكيميائية للـ RNA:

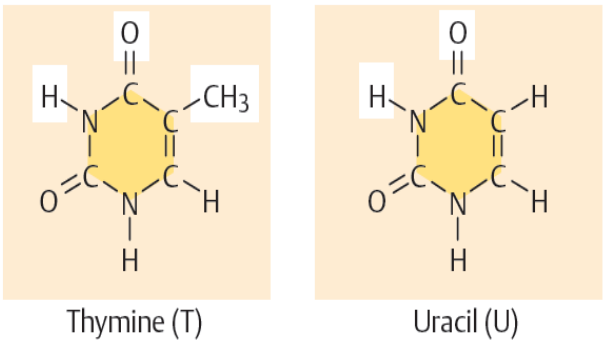
يتألف الـ RNA من تتالي نيكليوتيدات مرتبطة الواحدة بالأخرى بنفس الطريقة كما هي في الـDNA لتشكيل سلسلة متعددة النيكلوتيدات Polynucleotides، يختلف مع ذلك الـ RNA عن الـ DNA بثلاثة مظاهر:

1 ـ السكر الخماسي في البنية هو الريبوز Ribose وليس الريبوز منقوص الأوكسجين.

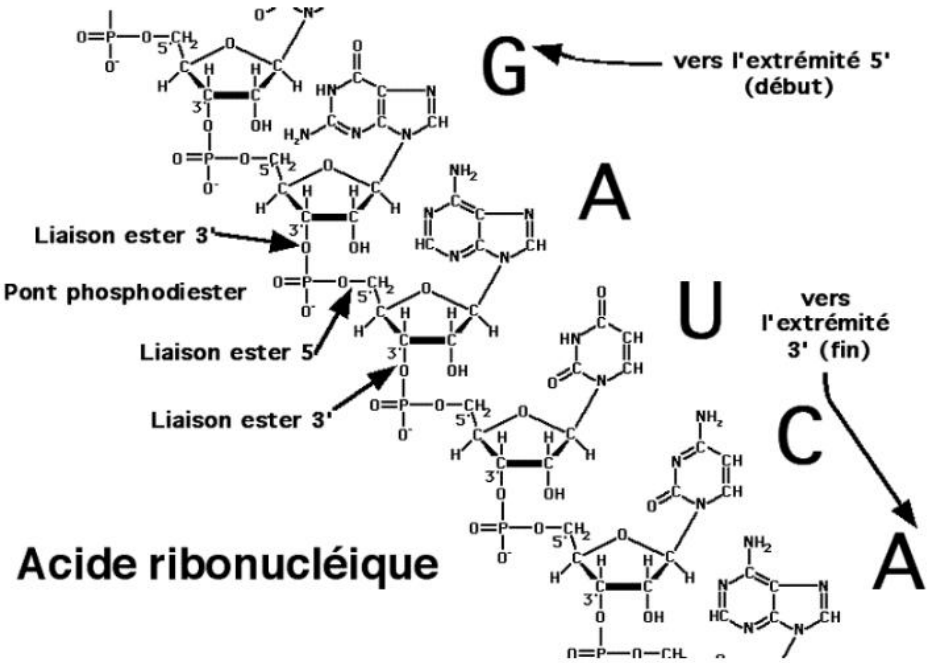
2

2 - يختلف في أحد الأسس الآزوتية الأربعة وهو اليوراسيل (U) الذي يحل محلّ التيمين في الـ DNA، وبنية اليوراسيل قريبة من تلك للتيمين، لذا يستطيع اليوراسيل تماماً مثل التيمين، أن يتحد بالأدنين بروابط هيدروجينية، والأُسس الثلاثة الباقية تتشابه بين الـ DNA والـRNA.

3 - يوجد الـ RNA طبيعياً بشكل سلسلة منفردة متعددة النيكلوتيدات، ونتيجة ذلك يستطيع الـ RNA اعتماد بنية ثلاثية Tertiaire. وفي حال وجود سلاسل متممة على نفس الذراع، تنثني السلسلة على نفسها بوساطة الروابط الهيدروجينية، حيث يلعب هذا المظهر في بعض أنواع الـ RNA دوراً هاماً.



الشكل12: بنية اليوراسيل وبنية التيميين



الشكل 13: سلسلة الـRNA

و النكليوتيدات الداخلة في تركيب الـ RNA هي :

adenosine -5´- triphosphate ATP

cytosine -5´- triphosphate CTP

guanine -5´- triphosphate GTP

uracil -5´- triphosphate UTP

و الرابطة بين النكليوتيدات هي phosphodiester link، وأيضا لسلسلة الـRNA اتجاه كما في الـDNA ، فالكربون ´5 على الريبوز في النكليوتيد الأول يكون مفسفرا و حرا وتدعى هذه النهاية بالطرف ´5 من سلسلة الـRNA ، و في النهاية الأخرى من السلسلة يكون الهيدروكسيل على ذرة الكربون ´3 من الريبوز حرا و تدعى بالطرف ´3 لسلسلة الـRNA.

نميّز ثلاث أنواع رئيسية من الـ RNA هي:

mRNA الرسول Messager، rRNA الريبوزومي Ribosomique، tRNA الناقل Transfer. حيث يلعب كل نوع منها دوراً خاصاً في تركيب البروتينات.

<u>مواقع تركيب أنواع الـRNA في النواة:</u>

تُظهر النواة بنية غير متجانسة: نُميّز تحديداً النوية، الكروماتين، يُبيّن التركيب الكيميائي للنوية أنّها غنيّة جداً بالـ rRNA، حيث يمكن للـ DNA أن يتفكك موضعياً بدون إتلاف الصبغيات، يتهجّن الـ rRNA نوعياً مع الـDNA المطابق في منطقة هي المنطقة المنظمة للنوية، يتم تصنيع المكونات البروتينية والريبية النووية للتحت وحدتين للريبوزوم في النويّة، ثم تنتقل الريبوزومات عبر الغشاء النووي إلى السيتوبلاسم. بينما يتم تركيب الـ mRNA والـtRNA من الكروماتين الحقيقي (للتذكرة: للكروماتين نوعين وهما الكروماتين المتغاير وفيه مناطق متراصة جدا" ذات تصبغ شديد وجيناتها غير فعالة، والكروماتين الحقيقي وفيه مناطق تسمح بالانتساخ والجينات التي عليها فعالة في الغالب).اذا" الـ RNA هو شريط مفرد يضم سكر الريبوز والأسس الآزوتية السيتوزين والأدنين والغوانين واليوراسيل، وله ثلاثة أنواع تتوزع بين النواة والسيتوبلاسما وهي: الـRNA الريبوزومي (rRNA) والـRNA الرسول (mRNA) والـRNA الناقل (tRNA).

1. **الـRNA الرسول (mRNA):** سلسلة مفردة يتواجد في النواة ويشكل 5% من كمية الـRNA الموجودة في الخلية، وهو الحامل للمعلومات الوراثية من جزيء الـDNA إلى الجسيمات الريبية (الريبوزومات) في السيتوبلاسما لتشكيل ما يسمى بالجسيمات المتعددة Polysomes لتصنيع البروتينات. يستنسخ الـRNA الرسول بالاتجاه من ´5 إلى ´3. من مزايا الـRNA الرسول أنه يحمل على النهاية ´5 قبعة من الميثايل غوانوزيين، أما الطرف ´3 فيكون متعدد الأدينوزين AAA.

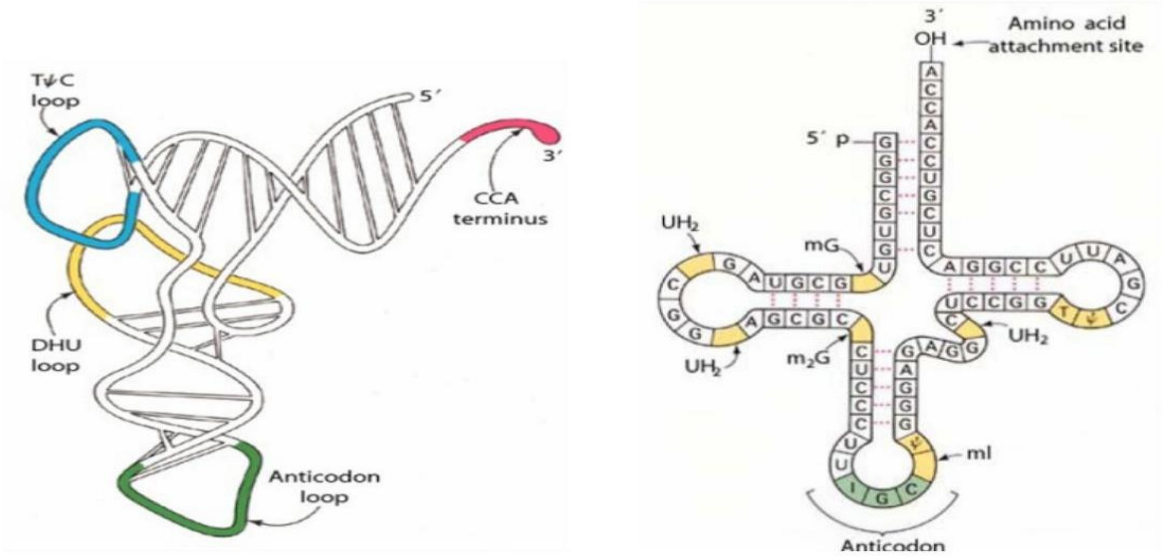
2. **الـRNA الناقل (tRNA):** يوجد في السيتوبلاسم ويشكل حوالي 15% من كمية الـRNA في الخلية، ووظيفته نقل الحموض الأمينية و فق التسلسل المحدد حسب تسلسل الكودونات في الـ mRNA .

يتألف من سلسلة قصيرة منطوية حول نفسها مشكلةً عرى، تحوي 75-90 نيكليوتيدة ترتبط مع بعضها ارتباطات ثانوية نتيجة لتشكل روابط هيدروجينية مشكلةً تركيب يشبه ورقة البرسيم والذي يتميز بالخصائص التالية:

- تحمل النهاية `3 في نهايتها التتالي C-C-A وهي مميزة لكل أنواع الـRNA الناقل.
- العروة I وتعرف بعروة ثنائي هيدرويوراسيل DHU.
- العروة II وهي عروة الشيفرة المقابلة Anticodon (مقابلة الشيفرة أو مقابلة الكودون) وهي ثلاثية تختلف حسب الحمض الأميني وتقابل الشيفرة المناسبة على الـmRNA لصنع متعددات الببتيد. وبذلك يرتبط mRNA مع tRNA بسبب تشكل روابط هيدروجينية بين الكودون و مقابلة الكودون، فعلى سبيل المثال : الكودون المشفر للحمض الأميني ميثيونين هي

3´- UAC- 5´ و هي ترتبط مع مقابلة الكودون ذات التسلسل **5´-AUG-3´**

- الذراع الإضافي III وهو غير موجود دائماً ويتغير من حمض أميني لآخر.
- العروة IV والتي تحوي على التيميدين–يوردين الكاذب-السيتوزين والتي تربط الـRNA الناقل على جسيمة الريبوزوم (الجسيم الريبي).

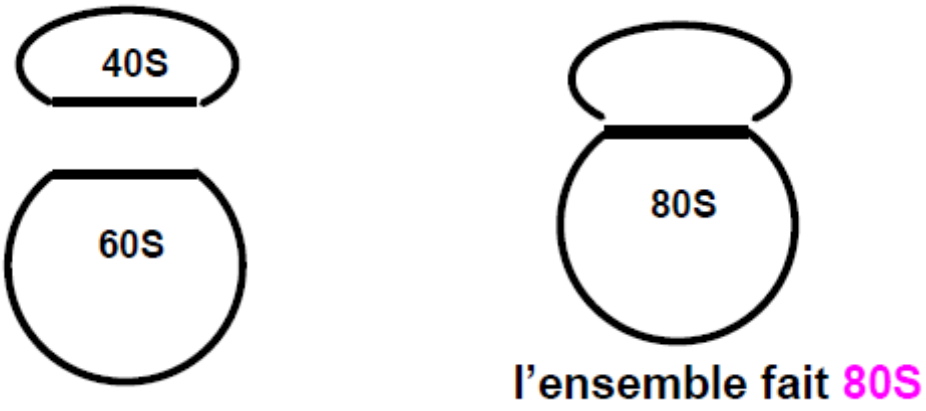


الشكل 14: البنية ثنائية وثلاثية الأبعاد للـRNA الناقل

3. الـRNA الريبوزومي (rRNA): يشكل 75-80% من كمية الـRNA في الخلية ويمكن أن نميز منه ثلاثة أنماط خفيف ومتوسط وثقيل. يرافق الـrRNA بروتين تركيبي ويشكل حوالي 35-40% منه بينما تشكل الوحدات الببتيدية 60-65%.

يتكون الريبوزوم في بدائيات النوى من تحت وحدتين لهما معامل ترسيب 70S (سفدبرغ) (30S & 50S). فتحت الوحدة الكبيرة 50S تتكون من 23S و5S و30 وحدة ببتيدية، بينما تحت الوحدة الصغيرة 30S فتتكون من 16S و20 وحدة ببتيدية.

أما الريبوزومات في حقيقيات النوى فتتكون من تحت وحدتين لهما معامل ترسيب 80S (40S & 60S) (الشكل 15). فتحت الوحدة الكبيرة 60S تتكون من 28S و5S وأكثر من 50 وحدة ببتيدية، بينما تحت الوحدة الصغيرة 40S فتتكون من 18S وأكثر من 20 وحدة ببتيدية.



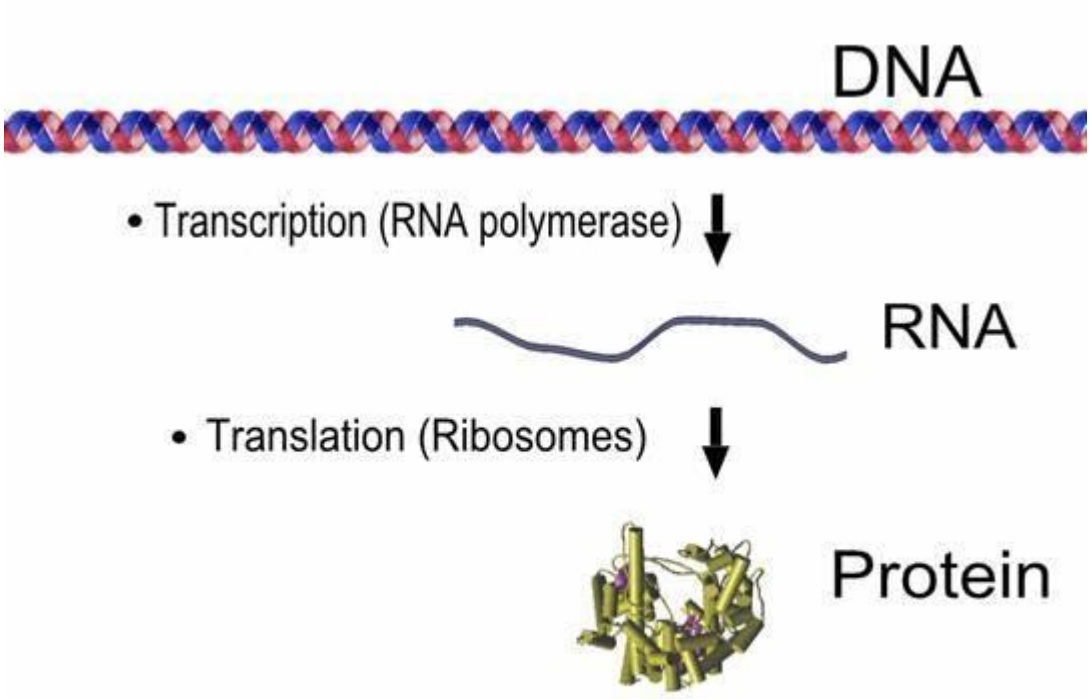
الشكل 15: الجسيم الريبي

بنية المورثات

أنواع المورثات :

هناك نوعان من المورثات في بدائيات النوى و حقيقيات النوى:

النوع الأول : تدعى السيسترونات Cistrons (أو المورثات البينية) التي تملك النسبة الأكبر من مورثات الخلية و تقدر بـ 85% من مورثات الخلية، و ذلك لكونها تنتسخ إلى حمو ض ريبية رسولية (mRNAs) و هذه الأخيرة هي الوحيدة التي تترجم في السيتوبلاسم إلى بروتينات.



الشكل 16: مسار تشكل البروتين من مورثات الـ DNA

النوع الثاني : يمثل عدد محدد من المورثات و تتراوح نسبتها 15% من مورثات الخلية، و تنتسخ هذه المورثات إلى حمو ض ريبية وظيفية و منها : الحموض الريبية الناقلة tRNAs، الحموض الريبية الريبوزمية rRNAs، الحموض الريبية الصغيرة الحجم RNAsn و RNAsc. وهذه الأخيرة تلاحظ فقط في حقيقيات النوى.

(ملاحظة : "الحموض الريبية الوظيفية لا تترجم أبدا إلى بروتينات").

الحموض الريبية الوظيفية الصغيرة الحجم :

1- RNAsn (small nuclear RNA) : تتواجد بشكل قليل في نواة جميع خلايا حقيقيات النواة، و لها وظيفة إنضاج جميع أنواع الـ RNA (mRNA، tRNA، rRNA)، حيث تعمل على قطع الانترونات ولحم الاكسونات مع بعضها البعض.

2- RNAsc (small cytoplasmic RNA) : يتواجد في السيتوبلاسم و يكثر في الخلايا المنتجة و المفرزة للأنزيمات و الهرمونات. تكمن وظيفتها في توجيه الـmRNA المشفر للبروتينات التي سوف تفرز خارج الخلايا (مثل الهرمونات و الأنزيمات الهاضمة) لأن يترجم من قبل الريبوزومات الموجودة على أغشية الشبكة البلاسمية الداخلية الخشنة، و بعد الانتهاء من عملية الترجمة، تفرز هذه البروتينات مباشرة خارج الخلية و تنقل عبر الدم إلى الخلايا المستقبلة.

مسيرة تدفق المعلومات في الخلية:

يبدأ من DNA على النحو الآتي : DNA ⟵ RNA ⟵ protein

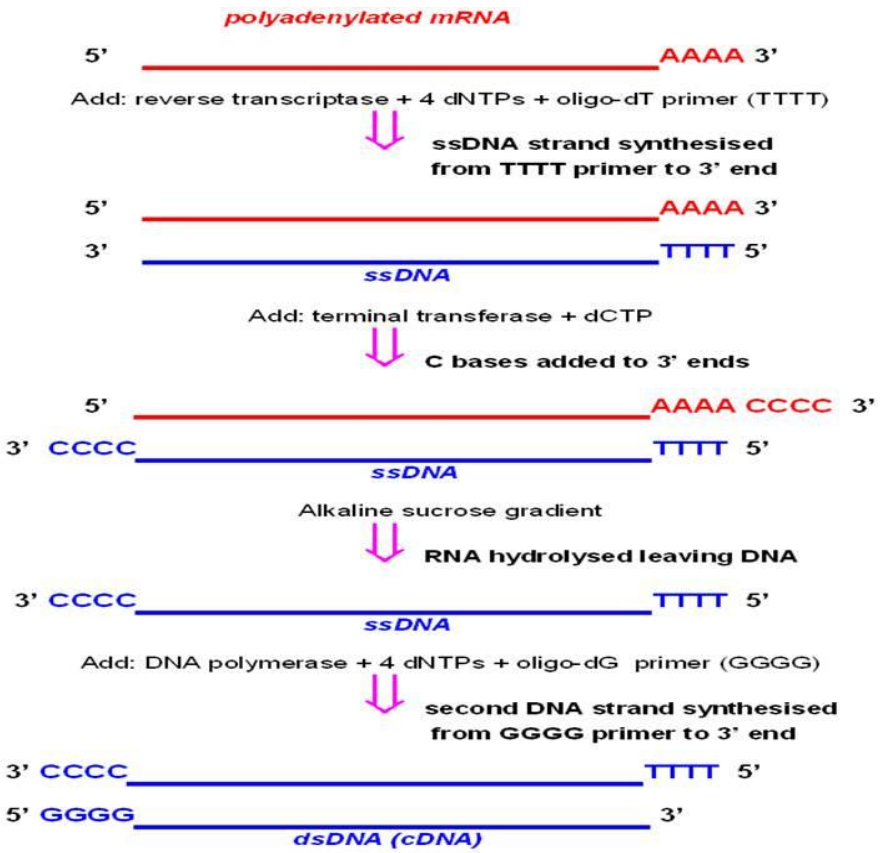
لكن هناك دائما استثناءات :

- هناك بعض الفيروسات الحاوية على المادة الوراثية RNA بدلا من DNA، و تملك هذه الفيروسات أنزيم النسخ العكسي الذي يصنع جزيء الـDNA المتمم cDNA (complementary -DNA) من RNA الفيروسي.

و من هذه الفيروسات نذكر:

فيروسات شلل الأطفال، فيروس النكاف، فيروسات الأنفلونزا، فيروس فسيفساء التبغ (TMV)، فيروسات اللوكيميا، فيروس مرض الـ AIDS.

- بروتينات تنظم الفعل الجيني : مثال عوامل الانتساخ TFs، و عدد من المستقبلات التي ينتهي شلال تنبهها ببروتينات تدخل إلى النواة و ترتبط بمواقع معينة من الـ DNA فتنشط أو تثبط انتساخ مورثات معينة و بالتالي تنظم العمل الجيني. فالمسار يكون عكسي من بروتين إلى DNA.

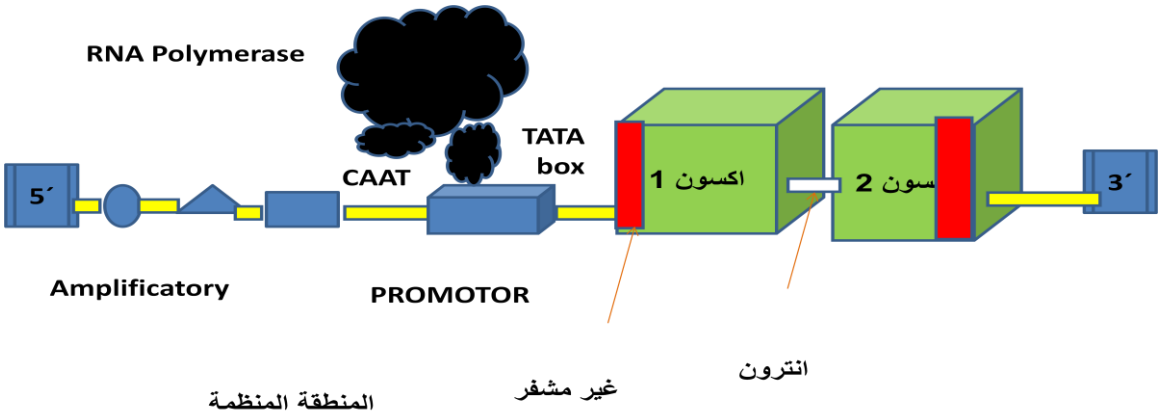


الشكل 17: عمل أنزيم النسخ العكسي

البنية العامة للجين Gene (المورثة) :

كما ذكر مسبقا المورثة (الجين) هي تسلسل معين من النكليوتيدات يؤدي وظيفة معينة أو أكثر، و يمكن للمورثة أن تشفر لأكثر من بروتين و ذلك عن طريق عملية التضفير البديل alternative splicing

يختلف طول و تركيب المورثة من بدائيات النوى إلى حقيقيات النوى، و تتألف المورثة بشكل عام من قطعتين متميزتين من DNA :



الشكل 18: البنية العامة للجين

القطعة الأولى :

الوحدة المنظمة التي تقع بالقرب من النهاية ´5 و تتكون من جزأين:

الجزء الأول **Amplificatory** (المضخم) الذي يكون متنوع من جين لأخر، ولها دور تنظيمي على المورثة و غالبا إيجابيا. أي هو الجزء المنظم الذي يظهر تسلسلات نكليوتيدية متنوعة خاصة لبروتينات التي تنظم عملية النسخ و التي تنشط بشكل مباشر أو غير مباشر من قبل الهرمونات.

الجزء الثاني Promoter (المحضض) و التي تقع بين المضخم بالقرب من النهاية ´5 و قبل بداية المنطقة المشفرة، و يتكون من تسلسلات نكليوتيدية خاصة ضرورية للتحكم بعملية انتساخ هذه المورثات إلى حموض ريبية، حيث ترتبط به أنزيمات الـ RNA Polymerase و تحفز انتساخ الـ mRNA من منطقة مجاورة يطلق عليها **1+** أو نقطة بداية الانتساخ، حيث يرتبط RNA Polymerase بالبداية بطريقة معقدة بواسطة بروتينات تدعى عوامل الانتساخ على تسلسلات تدعى TATA box و CAAT.

القطعة الثانية :

وحدة الانتساخ المنطقة الجينية الحاوية على الأجزاء المشفرة في حقيقيات النوى تكون معقدة و متنوعة، و تتألف من تتابع معين من الاكسونات Exons و الانترونات Introns. تعتبر الاكسونات التسلسلات الوحيدة في الجين المشفرة للبروتين، بينما الانترونات هي التسلسلات الغير مشفرة للبروتين والتي تقع بين الاكسونات.

خلال عملية انتساخ الـ DNA إلى الـ RNA يتم :

في المرحلة الأولى

انتساخ هذه التسلسلات (الاكسونات-الانترونات) إلى mRNA، أي يتم انتساخ كامل المورثة (الاكسونات و الانترونات معا)، و تدعى سلسلة mRNA الناتجة بطليعة الـmRNA الغير ناضجة (Primary RNA transcript أو pre-mRNA).

في المرحلة الثانية

يتم إزالة الانترونات من طليعة mRNA و يتم وصل الاكسونات بعملية تعرف RNA Splicing (تقطيع و وصل الـRNA)، ويساعد في إزالة الانترونات معقدات تدعى Spliceosomes ويتم ذلك داخل النواة، و عندما تنتهي هذه العملية تصبح جزيئة mRNA ناضجة mature وجاهزة للخروج إلى السيتوبلاسم.

ملاحظة : تتمتع الـ introns (الانترونات) بدور تنظيمي كبير.

أما عند بدائيات النوى مثل البكتريا، معظمها يملك الاكسونات فقط، و هناك بعض جينات حقيقيات النوى تملك صفات جينات البكتريا باحتوائها فقط على الاكسونات مثل الجين المشفر لمستقبلات الأدرنالين. وهذا ما جعل الباحثون يعتقدون بوجود سلف مشترك لبكتريا أو فيروسات اندمجت داخل جينوم حقيقيات النوى خلال عملية التطور.

بشكل عام: ممكن أن نقول أن المورثة تتكون من ORF (OPEN READING FRAME) و التي تقرأ من **(3´ ⟵ 5´)** و تعرف بأنها المنطقة المحصورة بين Promoter و terminater في الـDNA. المنطقة الواقعة باتجاه 5´ من المورثة تدعى up stream و المنطقة الواقعة باتجاه 3´ تدعى down stream.

تدعى النكليوتيدات المتواجدة في أسفل down stream بـ terminator و عندها يتم فك معقد الـ RNA Polymerase بعد انتهاء عملية نسخ كودونات الـ ORF.

ملاحظة هامة : الـ terminater هو الذي يعلن انتهاء عملية النسخ من الـDNA أما كودون التوقف (شيفرة التوقف) هو الذي يعلن انتهاء عملية الترجمة (اصطناع البروتينات) من الـRNA الرسول.

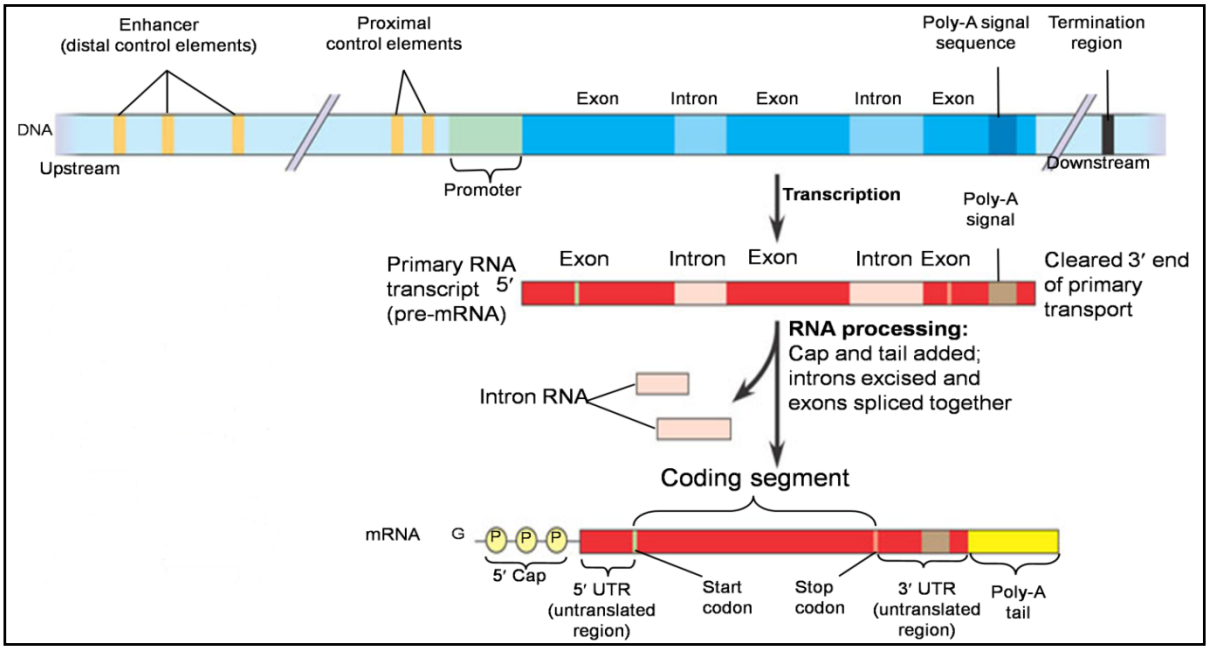
الـ promoter يمثل ذبدء عملية نسخ الـRNA من الـ DNA، أما كودون البدء هو الذي منه تبدأ عملية ترجمة الـ RNA الرسول إلى بروتينات.

الـORF في حقيقيات النواة تحوي الاكسونات و الانترونات أما في بدائيات النواة تحوي الاكسونات فقط (مع تواجد استثناءات دائما).

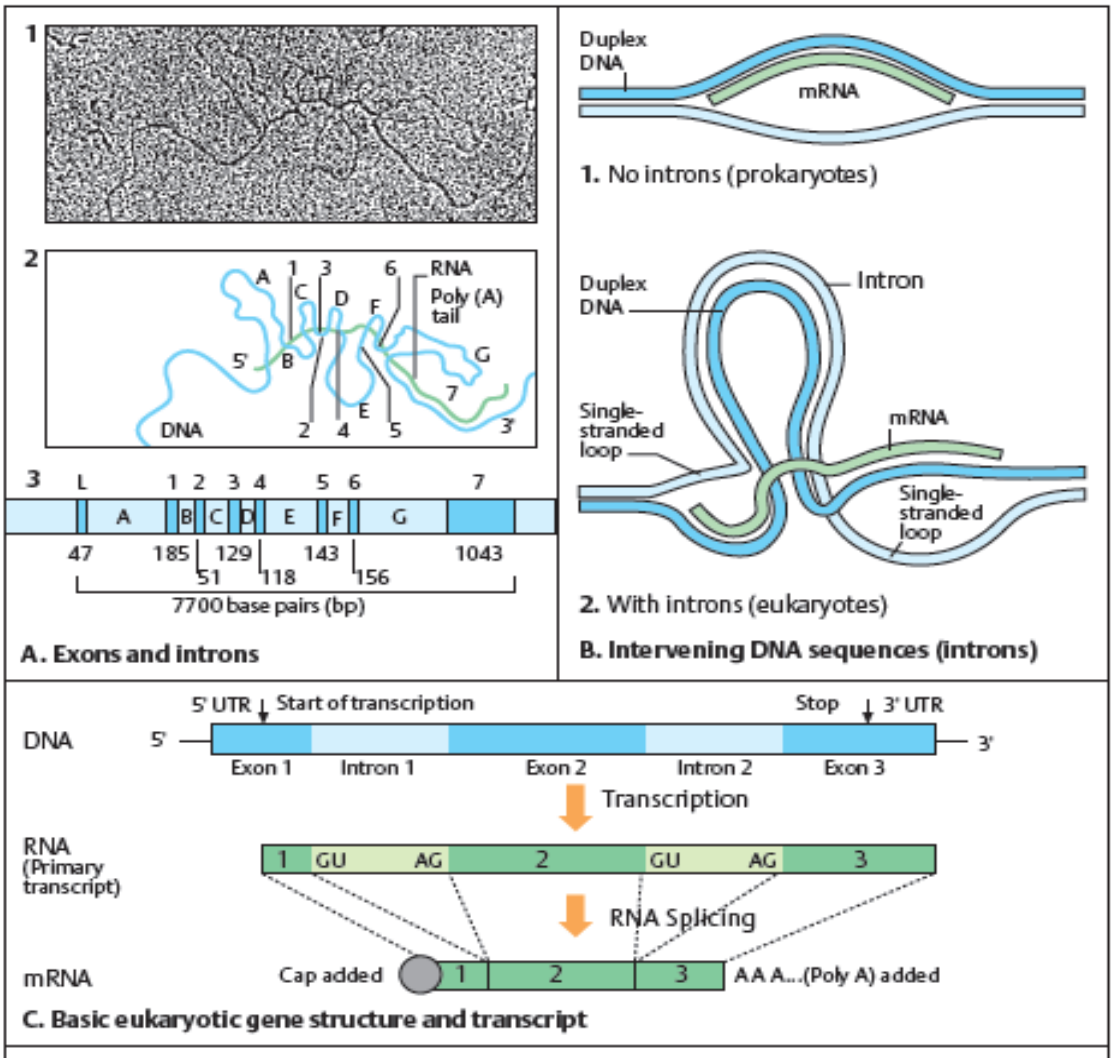
بشكل عام لا ينطبق الـ terminater على كودون التوقف، و لا ينطبق الـ promoter على كودون البدء و هذا يؤدي إلى وجود مناطق هامشية من الـDNA و الـRNA لا تترجم، و تكون خارج نطاق شفرات التوقف و البدء من الـmRNA.

- كل ثلاث نكليوتيدات تشفر حمض أميني و تسمى codon و هذا التشفير يتضمن أيضا علامات ترقيم مثل شيفرة البدء AUG و هي نفسها تشفر الميثونين، وشيفرات توقف المتمثلة بالكودونات التالية :

.UAG-UGA-UAA



الشكل 19: Genes Structure



الشكل 20: تركيب الجين في حقيقيات النوى و نسخه

انتساخ الـ DNA وترجمة الـ RNA (اصطناع البروتين)

مقدمة :

الانتساخ هو العملية التي يتم فيها نقل المعلومات الموجودة في الـ DNA إلى الـ RNA. يمتلك الـ RNA تماماً مثل الـ DNA جانبياً، تسلسلاً من الأسس الآزوتية قابلة للاقتران بروابط هيدروجينية مع تتالٍ متمم، وبما أن اليوراسيل يُظهر كما الثايمين نفس خصائص الاقتران مع الأدينين، لذا يصبح ممكناً التهجين بين الـ DNA و الـ RNA. تسمى الجينات المشفرة للـ mRNA بالجينات المشفرة للبروتين protein-coding genes و عندما تنتقل المعلومات الوراثية لجين محدد إلى الـ mRNA ومن ثم إلى بروتين نقول أن التعبير الجيني قد تم.

الريبوزومات Ribosomes:

تتألف الريبوزومات من الـ RNA الريبوزومي وعدد كبير من البروتينات.

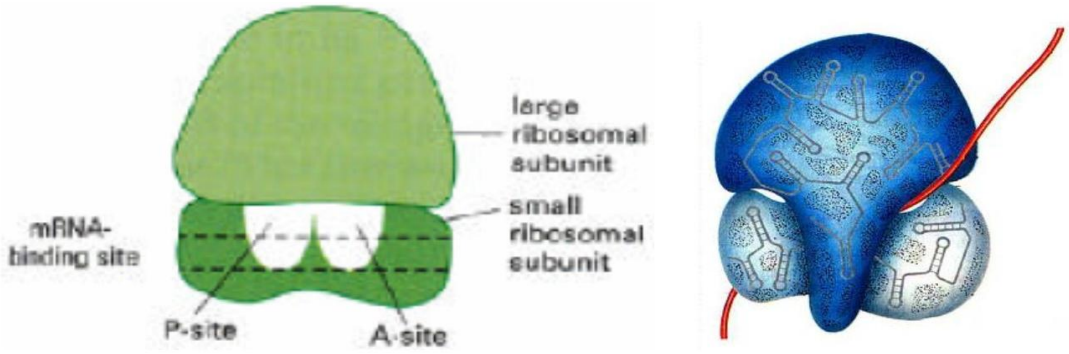
يتكون الريبوزوم في بدائيات النوى من تحت وحدتين ثانويتين لهما معامل ترسيب 70S = (30S & 50S).

فاالتحت الوحدة الكبيرة 50S بينما الصغيرة 30S .

أما الريبوزومات في حقيقيات النوى فتتكون من تحت وحدتين ثانويتين لهما معامل ترسيب 80S= (40S & 60S) فالتحت الوحدة الكبيرة 60S بينما الصغيرة 40S .

اعتمد في تسمية تحت الوحدات اعتمادا على معيار محدد يسمى Svedberg unit (سفيدبرغ) و هو عبارة عن سرعة ترسب هذه الوحدات في حقل معتمد على الجاذبية. لا تتركب التحت وحدتين الكبيرة و الصغيرة إلا أثناء تصنيع البروتين.

يمثل الجسيم الريبي الوظيفي مكان فك الشيفرة والربط الببتيدي، حيث يمتلك الجسيم الريبي الوظيفي الموضع **A** لربط الـ tRNA الحامل للأحماض الأمينية والموضع **P** لإتمام الرابطة الببتيدية والموضع **E** الذي ينفصل عنه tRNA.



الشكل 21: الجسيم الريبي الوظيفي

الشيفرة الوراثية :

الشيفرة الوراثية : هي مجموعة التعليمات التي تحدد للخلية الحموض الأمينية التي سترتبط مع بعضها البعض لتكون البروتين.

تتألف الشيفرة من تتالي الأسس الآزوتية على سلسلة الـmRNA، وتعد كل ثلاثة أسس متتالية كودوناً codon (شيفرة) ويرمز إلى إحدى الحموض الأمينية، ولبعض الحموض الأمينية أكثرمن كودون.

هناك 20 حمض أميني، و يوجد فقط أربعة أسس في الـ DNA وهي (A، T، C، G). كل 3 أسس= كودون.

(4*4*4) = 64 شيفرة (كودون).

من بين الـ64 شيفرة، هناك ثلاث شيفرات تدعى شيفرات التوقف stop signal توقف اصطناع البروتين، و 61 شيفرة تقوم بتشفير الحموض الأمينية العشرين.

فمثلا : الحمض الأميني المثيونين methionine و التريبتوفان tryptophan لهما شيفرة واحدة فقط. أما الحموض الأمينية الـ 18 الباقية تشفر إما بـ 2 أو 3 أو 4 أو 6 codons.

بافتراض أن هناك 20 شيفرة لـ 20 حمض أميني، أي شيفرة واحدة فقط لكل حمض، في هذه الحالة يبقى 44 شيفرة بدون عمل، في هذه الحالة سوف تسبب الطفرات خللا" في اصطناع البروتين و يؤدي إلى توقف الاصطناع.

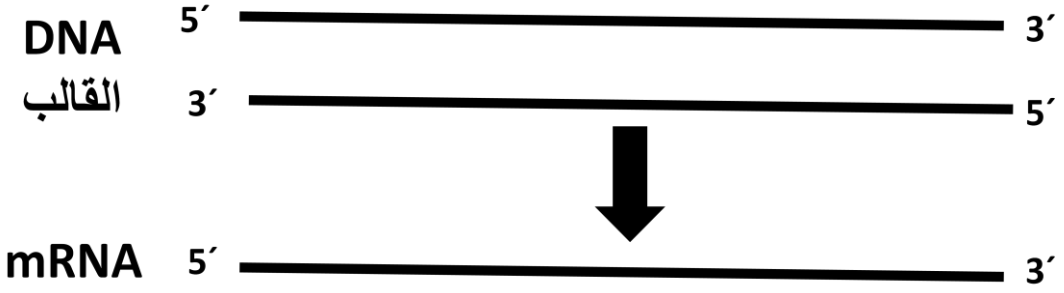
- يسمى كودون AUG : كودون البدء start codon وهو يحدد أول حمض أميني يضاف للسلسلة الببتيدية وهو حمض الميثيونين Met (في حقيقيات النوى)، و الميثيونين المعدل و المسمى فورميل الميثيونين (في بدائيات النوى).

- كودونات التوقف : stop codon وهي تحدد نهاية اصطناع البروتين وهي ثلاثة كودونات (UAA، UGA، UAG).

مراحل تركيب البروتين:

1- - الانتساخ DNA transcription

الانتساخ و هو مرحلة يتم فيه اصطناع الـ mRNA، و تعمل سلسلة واحدة فقط من سلسلتي الـ DNA كسلسلة قالب template strand لانتساخ الـ RNA، فالذراع ´5 ⟵ ´3 من الـ DNA هو الذي يقوم باصطناع الـRNA الرسول الذي يصطنع بالاتجاه ´3 ⟵ ´5



الشكل 22: عملية انتساخ الـ DNA إلى mRNA

الأنزيم المسؤول عن عملية الانتساخ هو RNA polymerase الذي يجب أن يتعرف على منطقة بدء النسخ في الـ DNA والتي تقع قبل المنطقة المشفرة وتسمى Promoter (بروموتور: منطقة البدء)، وهو منطقة معينة من الـDNA تضم تسلسل معين من النكليوتيدات يشير إلى نقطة البدء في تركيب سلسلة الـRNA، يرتبط هذا الأنزيم بالـPromoter ومن ثم يبدأ نسخ الـ RNA الرسول في هذه المنطقة. حيث ينزلق أنزيم الـ RNA Polymerase على طول سلسلة الـDNA بعد فك الحلزون الثنائي دون الحاجة إلى طاقة، و يحفز على تشكيل روابط phosphodiester links بين الريبونكليوتيدات المتتالية التي ستشكل سلسلة الـ RNA الجديدة يستمر الأنزيم بالانزلاق عل سلسلة الـ DNA حتى وصوله إلى منطقة النهاية terminater والتي تعني وقف عمل الأنزيم وانتهاء الانتساخ، وذلك إما بتدخل أو عدم تدخل عامل بروتيني خاص لهذه المنطقة يدعى العامل البروتيني ρ. ثم ينفصل أنزيم RNA Polymerase عن القالب وكذلك سلسلة الـRNA المنسوخة.

2- معالجة الـ RNA (RNA processing)

قبل بدء شرح عميلة المعالجة، يجب معرفة أن جينات خلايا حقيقيات النوى تحتوي على مناطق مشفرة تدعى اكسونات exons ومناطق غير مشفرة تدعى إنترونات introns . في المرحلة الأولى من الانتساخ يتم انتساخ سلسلة RNA تحتوي على تسلسلات الإكسونات و الإنترونات و تدعى بطليعة الـ RNA الرسول وتتميز بعدم نضجها (Primary RNA transcript أو pre-mRNA). لكن قبل أن يغادر الـ RNA الرسول المنسوخ النواة باتجاه السيتوبلاسم ليخضع لعملية الترجمة البروتينية، تطرأ عليه سلسلة من التغيرات بغية إعطائه شكله النهائي. حيث يتم إزالة الإنترونات و وصل الإكسونات بعملية تعرف بـ RNA splicing و ذلك بمساعدة معقدات تسمى spliceosomes التي تقوم بالتعرف على تسلسلات الإنترونات وتقطعها و تصل الإكسونات المتجاورة. و إضافة القبعة Cap عند النهاية `5 والذيل poly A : Tail، انظر الشكل 19.

في نهاية مرحلة المعالجة، يتشكل الـ RNA الرسول الناضج (الحامل فقط للإكسونات) الذي يمر من ثقوب النواة و يتوجه إلى السيتوبلاسم ليترجم داخل الجسيمات الريبية إلى بروتين.

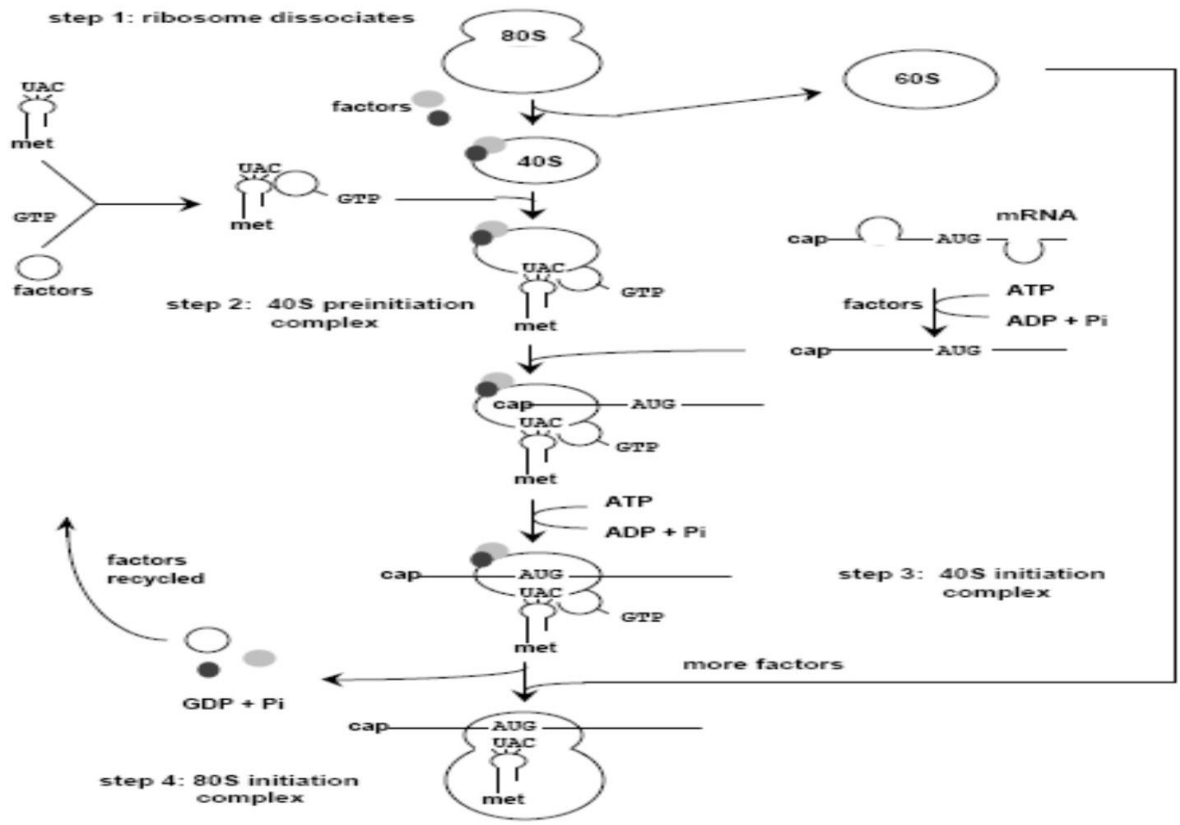
3- الترجمة Translation

وهي ترجمة الشيفرات الوراثية إلى الحموض الأمينية و تتضمن عدة مراحل:

أ- مرحلة تنشيط الحموض الأمينية: يتم خلالها تنشيط الحموض الأمينية وتشكل مركبات الـ-Aminoacyl AMP في سوية البلاسما الشفيفة بإضافة جزيئة AMP قادمة من تفكك جزيئة ATP إلى الطرف الحاوي على الزمرة الكربوكسيلية من الحمض الأميني، بواسطة أنزيم Aminoacyl-RNAt Synthetase يرتبط المعقد السابق (Aminoacyl-AMP) إلى زمرة الهيروكسيل لجزيئة السكر في الموقع 3́ لجزيئة الـ tRNA لتشكيل الـAminoacyl-tRNA(الـ tRNA حامل لحمض أميني).

ب- مرحلة بدء إنشاء سلسلة عديد الببتيد: في حقيقيات النوى

يرتبط الـRNA الناقل البادئ initiator RNAt الحامل للحمض الأميني الميثيونين مع تحت الوحدة الصغيرة **(40s)**، وبشكلٍ موازٍ يرتبط RNA الرسول mRNA مع تحت الوحدة الصغيرة **(40s)** للجسيم الريبي، والتي تنزلق على سلسلة الـRNA الرسول حتى تصل إلى كودون البدء AUG والتي يرتبط بها الـRNA الناقل البادئ initiator RNAt الحامل للحمض الأميني الميثيونين ثم ترتبط تحت الوحدة الصغيرة إلى تحت الوحدة الكبيرة والذي يؤدي بالتالي تشكل جسيم ريبي وظيفي وذلك بمساعدة شوارد المغنيزيوم Mg^{++} وعوامل البدء البروتينية وأيضا" GTP.



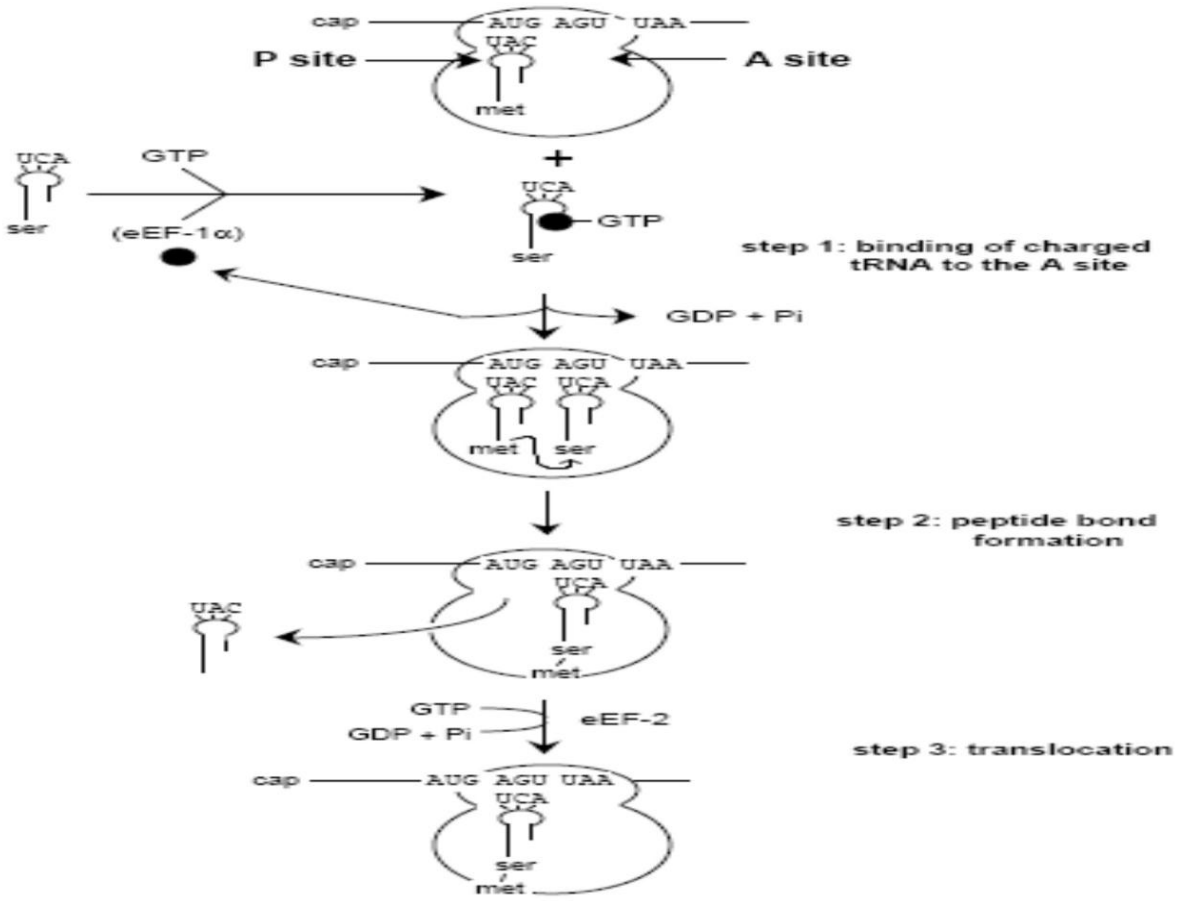
الشكل 23: بدء عملية تكوين السلاسل الببتيدية على الجسيمات الريبية

ج- مرحلة إطالة السلسلة الببتيدية Elongation of Polypeptide Chain: تتم إطالة السلسلة الببتيدية بإضافة وعلى التوالي حمض أميني إلى النهاية الكربوكسيلية للسلسلة حتى نحصل على البروتين المكون له. أي أن التفاعل الأساسي هو تشكيل الرابطة الببتيدية بين الزمرة الكربوكسيلية للحمض الأميني السابق والزمرة الأمينية للحمض الأميني القادم.

يتم اختيار كل حمض أميني ينضم إلى سلسلة متعدد الببتيد وفق قاعدة تزاوج الأسس بين الرامز Codon في جزيئة الـRNA الرسول والرامزة المقابلة Anticodon المتمم له على معقد الـ Aminoacyl-RNAt.

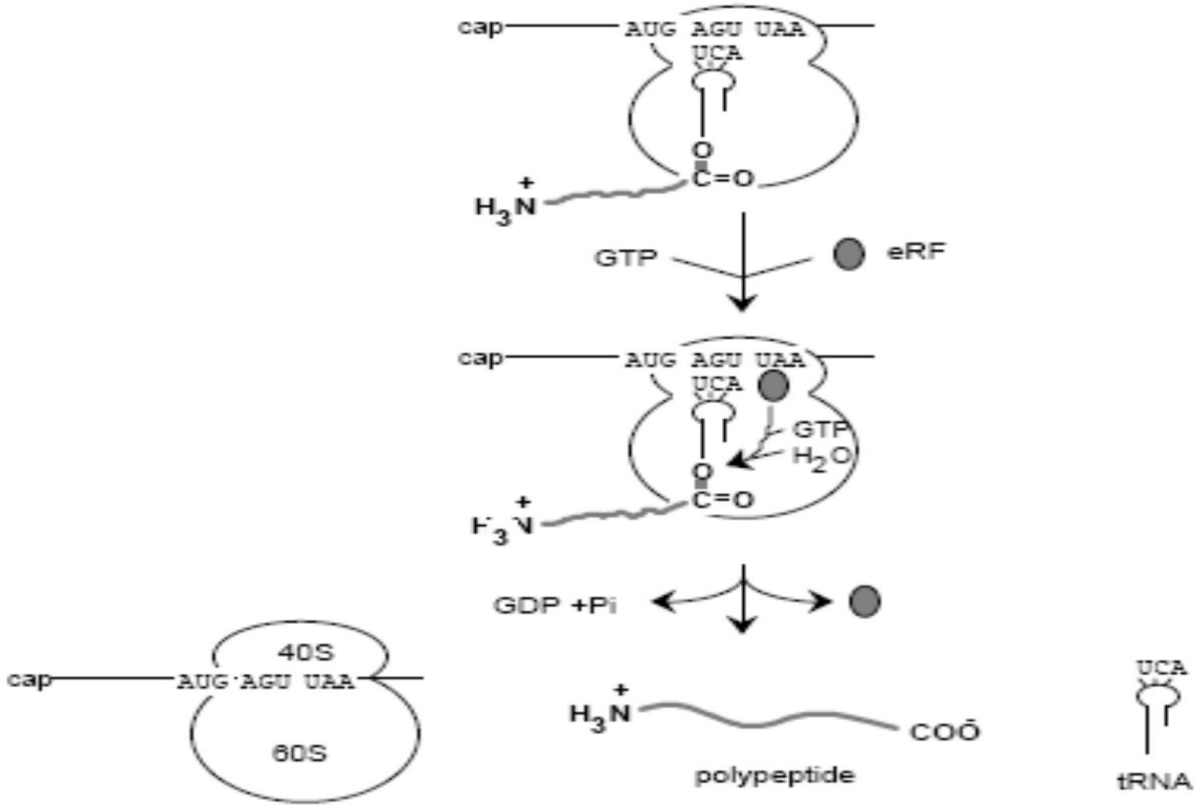
<u>وتتضمن آلية الترجمة Translation الخطوات التالية:</u>

- الـRNA الناقل الحامل لحمض الميثيونين يرتبط بموقع الارتباط P على الجسيم الريبي الوظيفي.
- يكون الريبوزوم (الجسيم الريبي) موجها بحيث يتحرك على طول سلسلة الـ RNA الرسول في الاتجاه ´5 إلى ´3.
- ارتباط RNA ناقل حامل لحمض أميني ثاني إلى الموقع A في الريبوزوم، تتوافق شيفرته المقابلة (Anticodon) مع الكودون أو الرامز الجديد على الـRNA الرسول.
- تشكيل الرابطة الببتيدية بين الحمضين الأمينيين المتوضعيين في الوقع A و الموقع P ويسمى المعقد (الـ Peptidyl-RNAt)، أي بين الميثيونين و الحمض الأميني الثاني وذلك بواسطة أنزيم الـ peptidyl transferase، فيصبح هذان الحمضان ثنائي الببتيد مرتبطين بالموقع A وتتحرر جزيئة الـRNA الناقل المستهلكة الكائنة في الموقع P (الذي كان حاملا للميثيونين) وتخرج من الموقع E فاسحةً المجال لجزيئة Aminoacyl-RNAt الجديدة بالدخول.
- انزياح سلسلة الـ mRNA ضمن الوحدة الصغيرة للريبوزوم بمسافة رامزة واحدة (ثلاث نيكليوتيدات) إلى الأمام ساحبةً معها جزيئة الـ Peptidyl-RNAt من الموقع A إلى الموقع P بحيث يصبح الموقع A شاغراً لجزيئة Aminoacyl-RNAt جديدة.
- تتكرر في هذه المرحلة الخطوات السابقة عدداً من المرات يتوافق وطول المورثة.

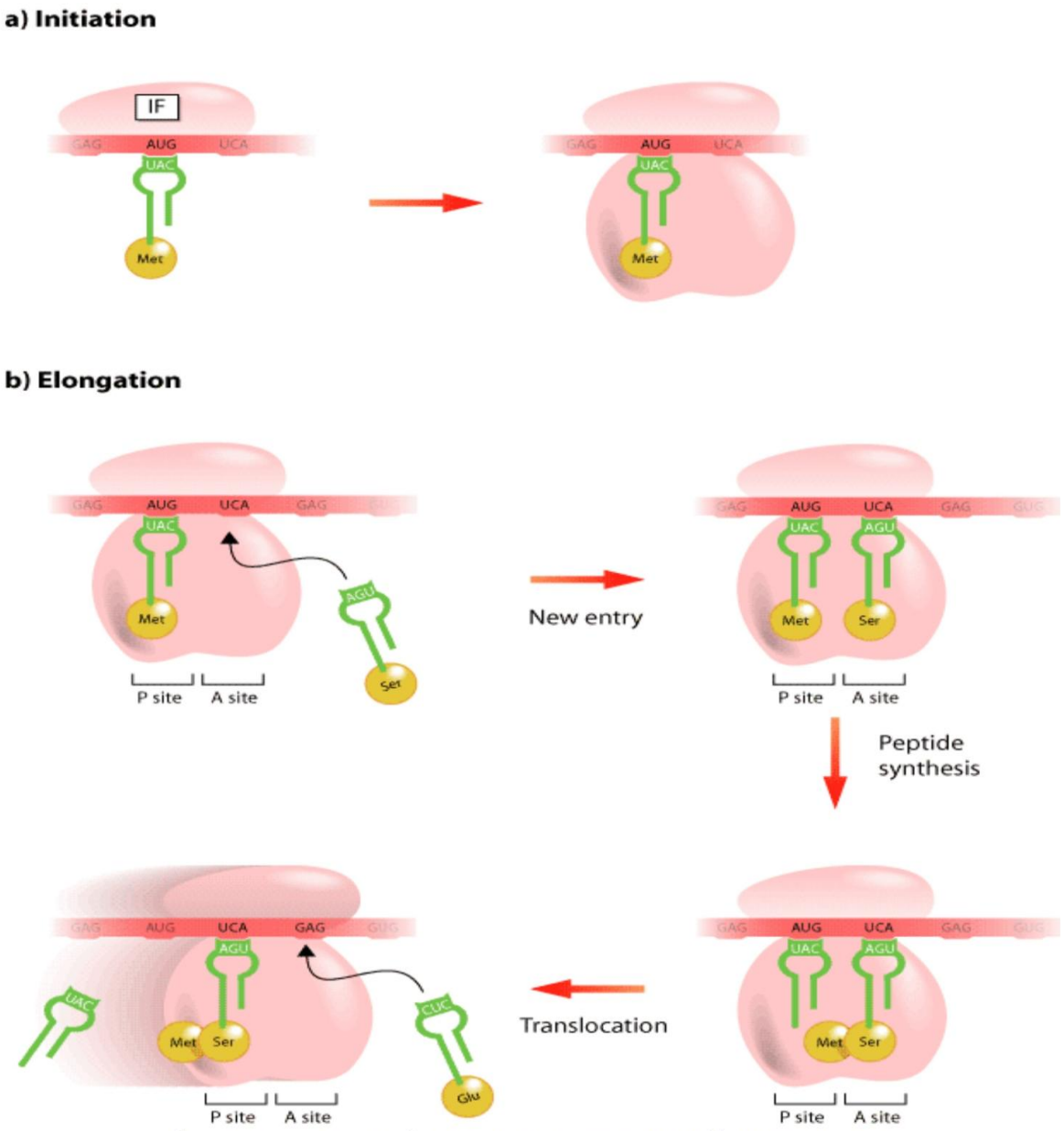


الشكل 24: تكرار إضافة الأحماض الأمينية لتطويل السلسلة الببتيدية

د- مرحلة الانتهاء Termination Phase: ويتم فيها قطع السلسلة الببتيدية المتشكلة مع الوصول إلى كودون الانتهاء، هذه الروامز لا تتعرف عليها جزيئات الـ tRNA وبالتالي لا توجد حموض أمينية خاصة بهم. بدل أن يرتبط tRNA مع أحد هذه الكودونات عنما تصل على الموقع A ترتبط معها بروتينات تسمى العوامل المحررة للسلسلة، و تملك حقيقيات النوى عاملين محررين هما eRF1 و eRF3. وفي خطوة لاحقة يتحرر الحمض الأميني البادئ الميثيونيين (الأول في السلسلة) من السلسلة بواسطة أنزيمات خاصة، وتنفصل السلسلة عن الريبوزوم وتتحرر إلى السيتوبلاسم وتبدأ بالتحول إلى بنيتها الثانوية والثالثية وقد ترتبط مع سلاسل ببتيدية أو زمر وظيفية أو مركبات أخرى لتشكيل البروتينات الوظيفية. يحرر الريبوزوم بعد ذلك جزيئة الـRNA الرسول وتنفصل الوحدتين عن بعضهما البعض لتعود وتجتمع من جديد مع جزيئة RNA رسول جديدة ليباشر اصطناع بروتين جديد وهكذا.

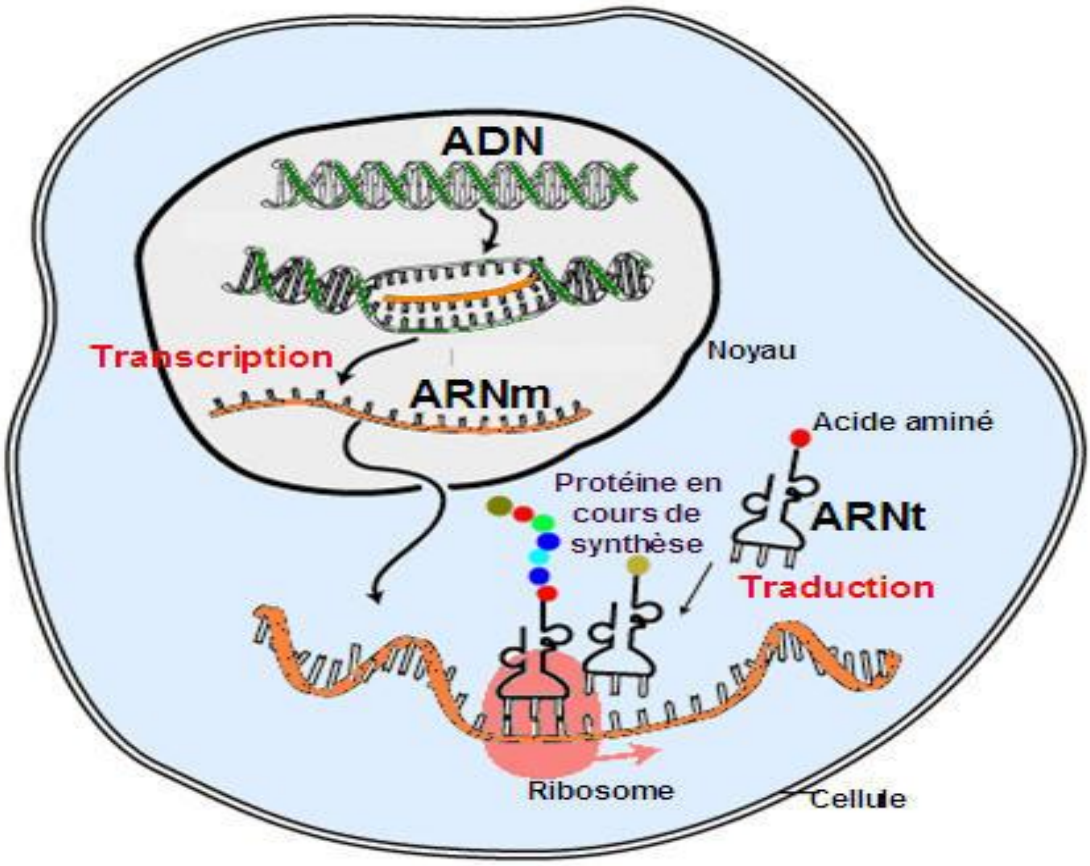


الشكل 25: المرحلة الانتهائية في نشوء السلاسل الببتيدية



المجريات المتلاحقة لتشكل ونمو السلاسل الببتيدية على الجسيمات الريبية

الشكل 26: المجريات المتلاحقة لتشكل و نمو السلاسل الببتيدية على الجسيمات الريبية



الشكل 27: شكل عام لجميع المجريات تشكل البروتين داخ الخلية ابتداء من الانتساخ و حتى نهاية تشكل البروتين

الأنزيمات المؤثرة على الـ DNA

تصنف الأنزيمات المؤثرة على جزيئات الـ DNA إلى أربعة صفوف أساسية و هي:

1- أنزيمات النوكلياز Nucleases: تقوم بالقطع و التقصير و أيضا تحلل جزيئات الأحماض النووية.
2- أنزيمات البلمرة (أنزيمات البوليميراز) Polymerase: و هي الأنزيمات التي تصنع نسخا من الحموض النووية.
3- أنزيمات التعديل Modifying Enzymes : هي الأنزيمات التي تلغي أو تضيف زمرا كيميائية.
4- الأنزيمات المماكبة الموضعية Topoisomerases: الأنزيمات التي تدخل أو تلغي التفافات من جزيئة الـ DNA الدائرية المغلقة.

أولا – أنزيمات النوكلياز:

آلية عمل تلك الأنزيمات تقوم بتحليل جزيئات الـDNA عن طريق كسر الروابط الفوسفاتية ثنائية الإستر الرابطة بين النكليوتيدات مع بعضها البعض في سلسلة الـ DNA (النكليوتيد هو الوحدة البنائية الأساسية لجزيء الـ DNA).

تتكون أنزيمات النوكلياز من نوعين :

1. أنزيمات النوكلياز الخارجي التي تلغي أو تزيل النكليوتيدات واحدا بعد الآخر انطلاقا من نهاية جزيئة الـDNA.

مثال : أنزيم النوكلياز الخارجي Exonuclease III المستخرج من جرثومة الـ *Escherichia coli* يعمل على هضم سلسلة واحدة فقط من جزيئات الـ DNA مضاعفة السلسلة. و نحصل في نهاية عملية الهضم على سلسلة واحدة فقط من الـ DNA.

2. أنزيمات النوكلياز الداخلي التي تكسر الروابط الفوسفاتية ثنائية الاستر الموجودة داخل جزيئة الـ DNA.

مثال : أنزيم النوكلياز الداخلي DNAase I (deoxyribonuclease I) المعزول من بنكرياس الأبقار. يستطيع هذا الأنزيم قطع سلاسل مفردة من الـDNA و يستطيع كذلك قطع جزيئات DNA مضاعفة السلسلة. و يعتبر هذا الأنزيم غير نوعي لأنه يهاجم الـ DNA في العديد من المواقع الداخلية بهضم الروابط الفوسفاتية ثنائية الاستر الداخلية. في المخبر عند استخدام أنزيم DNAase I لفترات حضن طويلة، يظهر في مزيج التفاعل مزيجا من النكليوتيدات الأحادية و سلاسل قصيرة جدا من متعددات النكليوتيدات.

ثانيا- أنزيمات البلمرة:

إن الكثير من أنزيمات البلمرة لها القدرة على تصنيع جزيئات DNA جديدة و تتصف في نفس الوقت باحتوائها على فعالية أنزيمية محللة مثل أنزيمات النوكلياز.

هناك أربع أنواع مختلفة من أنزيمات الـ DNA Polymerase المستخدمة بشكل روتيني في أبحاث الوراثة الجزيئية و الهندسة الوراثية و هي :

1- أنزيم الـ DNA Polymerase 1

2- قطعة Klenew

3- أنزيم النسخ العكسي

4- أنزيم Taq polymerase

❖ **أنزيم الـ DNA Polymerase 1 :**

تم التعرف ثلاثة أنماط مختلفة من أنزيم الـ DNA Polymerase مسؤولة عن تضاعف الـ DNA في الخلايا حقيقية النواة وهي I و II و III . يستخلص أنزيم الـ DNA Polymerase 1 من جرثومة الـE.coli.

من أهم تطبيقات هذا الأنزيم:

1- تحديد التسلسل النكليوتيدي للـ DNA.

2- إنتاج مسابير موسومة إشعاعيا.

3- بناء نواقل استنساخ انطلاقا من حمض نووي مفرد السلسلة.

4- اصطناع السلسلة الثانية من الـ cDNA.

ملاحظة : (cDNA و هو complementary DNA الذي يصنع اعتبارا من mRNA بواسطة أنزيم النسخ العكسي).

❖ **قطعة Klenew:**

يتألف أنزيم الـDNA Polymerase I من 928 حمض أميني، و يحتوي على فعاليتين أنزيميتين محللتين، واحدة في الاتجاه ´5 إلى ´3 و الثانية في الاتجاه ´3 إلى ´5. أوضح العالم Klenew أن السلسلة الببتيدية لهذا الأنزيم يمكن أن تشطر إلى قطعتين، واحدة كبيرة و الأخرى صغيرة، و ذلك عند استخدام أنزيم الـ Trypsin أو subtilisen. القطعة الصغيرة يبلغ طولها 323 حمض أميني ولها فعالية محللة خارجية تعمل في الاتجاه ´5 إلى ´3. بينما القطعة الكبيرة المسماة Klenew لها فعالية مبلمرة في الاتجاه ´5 إلى ´3 و فعالية محللة في الاتجاه´3 إلى ´5.

❖ **أنزيم النسخ العكسي Transcriptase Ensyme:**

تعتبر أنزيمات النسخ العكسي و أنزيمات التقطيع من أهم الأنزيمات التي طورت علوم البيولوجيا الجزيئية، الوراثة الجزيئية، و الهندسة الوراثية.

حيث يستخدم أنزيم النسخ العكسي قالبا من الـ RNA لتصنيع الـ DNA المتمم له ويسمى بـ cDNA و يستخدم بشكل خاص أثناء تشكيل مكتبات الـ cDNA في المخبر، و يلاحظ في الفيروسات الحاوية على الـ RNA بدلا من الـ DNA كمادة وراثية، مثل فيروس الإيدز.

❖ **أنزيم Taq DNA polymerase:**

يستخدم هذا الأنزيم في تقنية تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR)، و هي تقنية تستخدم لتضخيم قطعة الـ DNA المراد دراستها ملايين المرات في جهاز مقاوم لدرجات الحرارة المختلفة.

يتم عزل هذا الأنزيم من جرثومة *Thermus aquaticus* التي تعيش في المياه الحارة. ويتميز هذا الأنزيم بأنه ثابت تجاه الحرارة وبالتالي سيكون مقاوما للتمسخ (فصل سلسلتي الـ DNA في الجهاز عند رفع درجة الحرارة إلى 94ºC).

ثالثا- أنزيمات التعديل أو التغيير :

هناك العديد من الأنزيمات التي تغير جزيئات الـ DNA من خلال إضافة أو إزالة زمرا كيميائية خاصة و من أهمها :

1- أنزيم الفوسفاتاز القلوي Alkaline phosphatase

يحفز هذا الأنزيم إزالة الزمرة الفوسفاتية الموجودة على النهاية ´5 لجزيئات الـ DNA مزدوج الخيط أو سلاسل الـ RNA. تستخلص أنزيمات الفوسفاتاز القلوي المستخدمة في أبحاث البيولوجيا الجزيئية و الهندسة الوراثية من الجراثيم أو الخلايا الظهارية المبطنة لأمعاء الحيوانات المجترة.

2- أنزيم الكيناز Polynucleotide kinase

يستخلص من الجراثيم *E.coli* المصابة بآكل الجراثيم T4. ولذلك يسمى T4 Polynucleotide kinase ويستخدم لنقل الفوسفات الموجودة في جزيئة الـ ATP وله استخدامات عديدة.

3- أنزيم النقل الطرفي Terminal transferase

يستخلص أنزيم النقل الطرفي من الغدة التيموسية للعجول، يحفز هذا الأنزيم إضافة نكليوتيدات ريبية منقوصة الأوكسجين على النهاية 3´OH الحرة لجزيئة الـ DNA.

رابعا- الأنزيمات المماكبة الوضعية Topoisomerases:

تستطيع الأنزيمات المماكبة الموضعية تغيير هيئة الـ DNA المغلق الدائري (على سبيل المثال جزيئات الـ DNA البلاسميدي) من خلال إضافة أو إزالة الالتفافات.

الفيروسات الحاوية على الحمض النووي RNA

دراسات قديمة أكدت أن المادة الوراثية المسؤولة عن نقل المعلومات الوراثية عبر الأجيال هي الـ DNA، و لكن بعد اكتشاف الفيروسات التي تحتوي الحمض النووي الريبي الـ RNA كمادة وراثية عوضا عن الـ DNA، عاد الجدل بين علماء البيولوجيا الجزيئية و علماء الوراثة الجزيئية حول الطبيعة الكيميائية للمادة الوراثية.

عادت النظرية القائلة : أن البروتينات هي المسؤولة عن حمل و نقل المعلومات الوراثية عبر الأجيال. لبرهان العكس، أجرى الباحثون تجارب عديدة للتأكد من صحة هذه النظرية أو رفضها.

من الأمثلة على الفيروسات التي تملك المادة الوراثية الـ RNA:

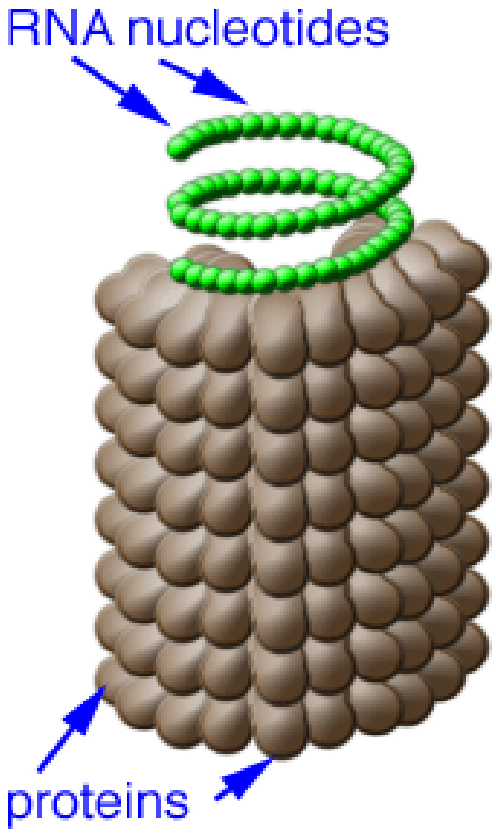
- فيروس فسيفساء التبغ (TMV)
- فيروس الأنفلونزا
- فيروس النكاف
- فيروسات شلل الأطفال
- فيروسات جرثومية مثل فيروسات Q /R17 /F2
- فيروسات اللوكيميا
- فيروس الإيدز AIDS

دراسة فيروس فسيفساء التبغ Tobacco Mosaic Virus: (TMV)

ينتمي إلى مجموعة فيروسات تبرقش الدخان، يتطفل على أوراق نبات التبغ.

يأخذ هذا الفيروس شكل أسطوانة صغيرة جوفاء، مؤلفة من غلاف بروتيني خارجي و من مادة وراثية تكون على شكل حمض نووي ريبي RNA. يكون هذا الأخير على شكل شريط حلقي أو حلزوني ملتف.

الغلاف البروتيني، لا يشبه الغلاف البروتيني للفيروسات التي تملك الـ DNA كمادة وراثية، فهو يتألف من نوع واحد فقط من الوحدات البروتينية، التي تتحد مع بعضها البعض لتشكل الغلاف البروتيني الخارجي للفيروس.



الشكل 28: فسيفساء التبغ Tobacco Mosaic Virus (TMV)

أجريت الكثير من الأبحاث للتأكد من طبيعة المادة الوراثية للفيروسات الحاوية على الـ RNA، من أهمها أبحاث فرانكل كورنات التي أجريت على فيروس فسيفساء التبغ TMV.

- لاحظ العلماء أنه يمكن فصل بروتينات الغلاف عن الـ RNA وذلك بنقع الفيروسات في مزيج من الماء و الفينول. يعمل الفينول على تفكيك الارتباط ما بين الوحدات البروتينية و المادة الوراثية للفيروس. و هذا التفكك عكوس لأنه يعاد بناء هذه الفيروسات، بضم الوحدات البروتينية و الـ RNA في أنبوب اختبار لا يحتوي على مزيج الفينول و الماء.
- أكدت الدراسات التي أجريت على فيروسات فسيفساء التبغ، أنه يوجد عدة سلالات من هذا الفيروس. تختلف عن بعضها البعض:

1- في نوع و خصائص البروتينات المكونة للغلاف البروتيني للفيروس.

2- نوع البروتين المميز الموجود في الغلاف البروتيني لهذه الفيروسات، و عن طريق هذا البروتين المميز يتم التعارف ما بين الفيروس و عائله المضيف.

تجربة فرانكل كورنات .Frankel corant et al (1955) :

- استخدم الباحثون سلالتين من فيروس فسيفساء التبغ سلالة A و سلالة B.
- نقعوا كل سلالة على حدا في مزيج من الماء و الفينول.
- فصلوا البروتينات عن المادة الوراثية، عن طريق التثفيل السريع جدا Ultra-Centrifugation.
- بعد مرحلة التثفيل تترسب الجزيئات البروتينية الثقيلة في قاع أنبوب التثفيل أما المادة الوراثية الـ RNA تبقى في المحلول الطافي.
- أجرى الباحثون تجربة التصالب العكسي، فتم الحصول على نوعين من الفيروسات الهجينة.

1- ضم الحمض النووي RNA للسلالة الأولى من الفيروسات A مع بروتينات السلالة الثانية من الفيروسات B.

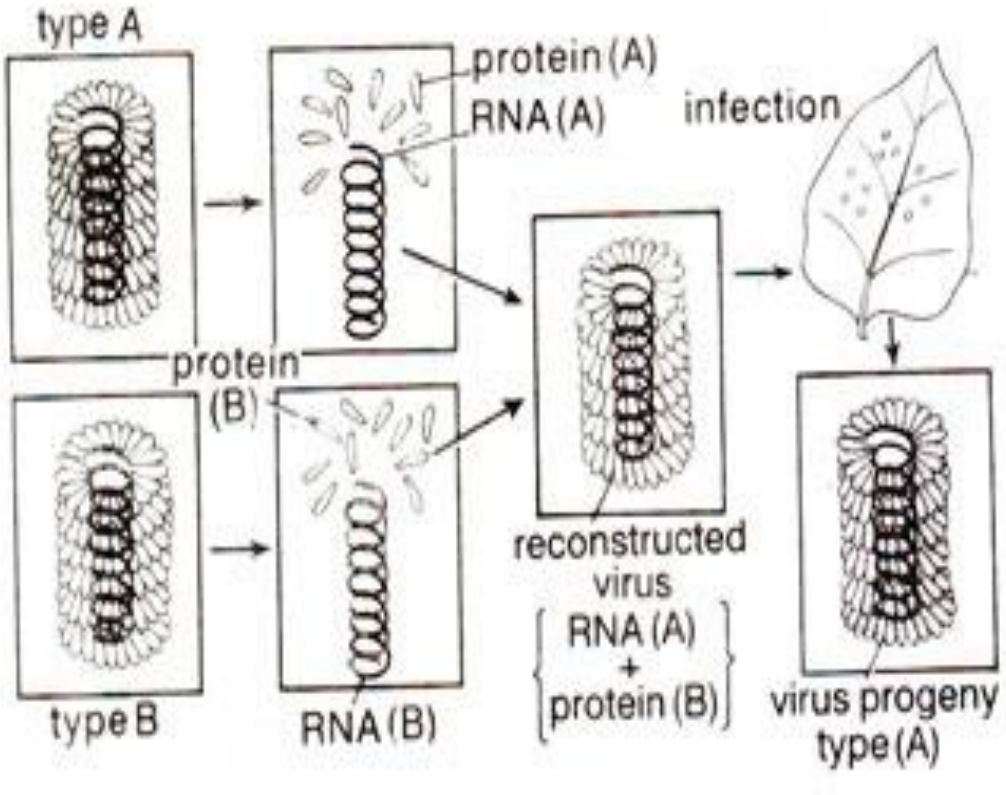
2- ضم الحمض النووي RNA للسلالة الثانية من الفيروسات B مع بروتينات السلالة الأولى من الفيروسات A.

- و من ثم، ترتبط الوحدات البروتينية B مع بعضها البعض من جديد، و تشكل غلاف بروتيني حول المادة الوراثية للفيروس A، و ترتبط الوحدات البروتينية A مع بعضها البعض من جديد، و تشكل غلاف بروتيني حول المادة الوراثية للفيروس B.
- بعد الانتهاء من تشكيل الفيروسات الهجينة الجديدة، تحضن هذه الأخيرة مع أوراق نبات التبغ.
- تقوم الفيروسات الهجينة بدورة حياتها داخل خلايا أوراق التبغ، و بعد أن تكمل دورة حياتها. يقوم الباحثون بأخذ عينات من تلك الفيروسات الهجينة الجديدة و القيام بالتحاليل المطلوبة لمعرفة طبيعة لروتيناتها و حمضها النووي.

<u>النتيجة:</u>

تبين للباحثين أن طبيعة الغلاف البروتيني الذي يحيط بالأفراد الفيروسية الجديدة الناتجة من تجربة التصالب العكسي، يتبع نمط الفيروس الذي استخلص منه الحمض النووي RNA في بداية التجربة. أي المادة الوراثية من النمط A يحيط بها البروتينات من النمط A، و المادة الوراثية من النمط B يحيط بها البروتينات من النمط B.

و بذلك أثبتت هذه التجربة أن المادة الوراثية في هذه الفيروسات هو الحمض النووي RNA و ليس البروتينات.



الشكل 29: تجربة فرانكل كورنات

دورة حياة الفيروسات الحاوية على الحمض النووي RNA

I- دورة حياة الفيروسات ذات السلسلة المفردة من الـ RNA:

تؤكد الدراسات المرجعية أن الفيروسات الحاوية على المادة الوراثية RNA تملك عد أقل و محدد من المورثات مقارنة مع الفيروسات الحاوية على المادة الوراثية DNA. لا يتجاوز عدد المورثات في الفيروسات RNA خمس مورثات.

مثال للدراسة، الفيروس آكل الجراثيم **R17** الذي يتطفل على البكتريا المعوية E.Coli، يمتلك هذا الفيروس ثلاث مورثات هي:

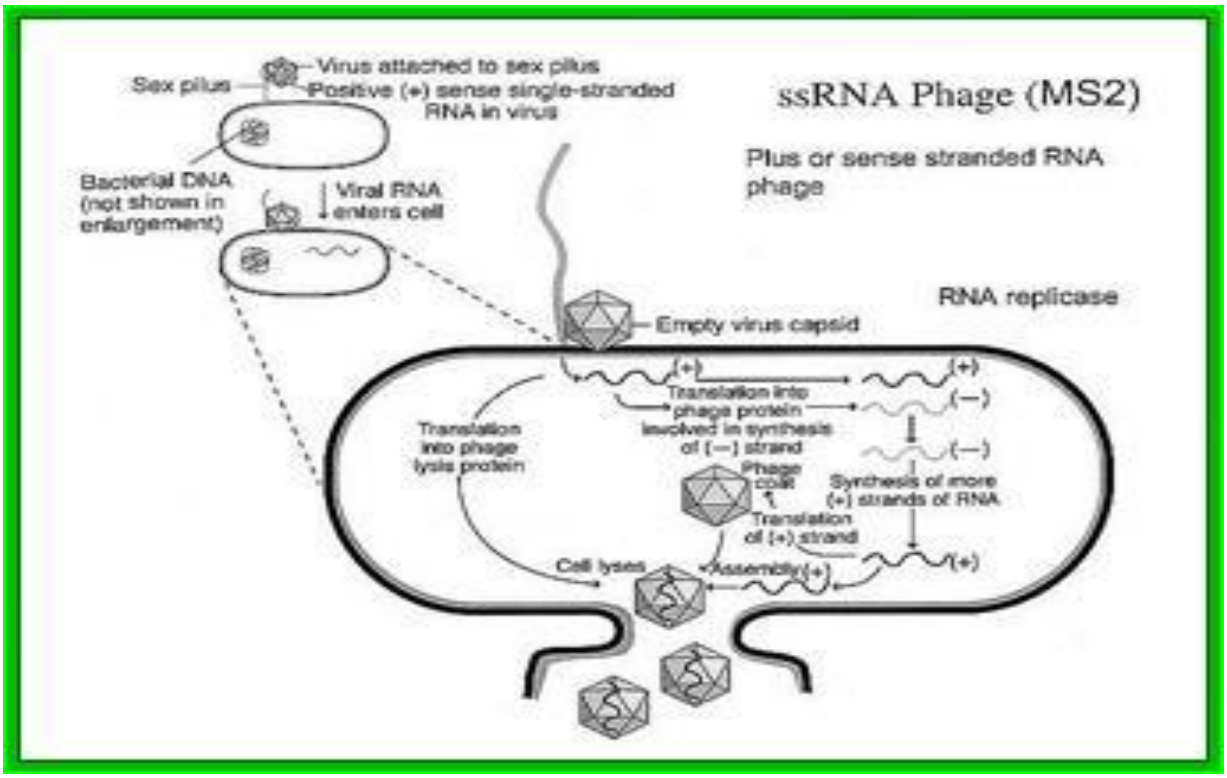
1- المورثة الأولى A: هذه المورثة مسؤولة عن تشفير البروتين A، و هذا الأخير يدعى البروتين المميز و هو بروتين وظيفي و عن طريق هذا البروتين يتعرف الفيروس على مضيفه.

2- المورثة الثانية CP: و هي المورثة المسؤولة عن تشفير البروتين الذي يدخل في تركيب الغلاف البروتيني للفيروس.

3- المورثة الثالثة SYN: التي تسيطر على تخليق أنزيم بلمرة الـ RNA الفيروسي الذي يدعى أيضا أنزيم نسخ الـ RNA الفيروسي RNA- Synthetase.

دورة حياة الفيروس آكل الجراثيم R17:

- يحمل الفيروس آكل الجراثيم **R17** سلسلة مفردة من الـ RNA يقوم بغزو خلية E.Coli و يحقن مادته الوراثية بداخلها.
- عند دخوله سيتوبلاسما الخلية المضيفة، يلتصق بجسيماتها الريبية و يستخدم أنزيماتها و حموضها الأمينية لتركيب بروتيناته الخاصة به، البروتين A و البروتين CP و أنزيم RNA-Synthetase.
- حالما يتشكل RNA-Synthetase الفيروسي، يتجه و يرتبط مع RNA الفيروسي المسمى السلسلة**(+).** و هي السلسلة القالب أي السلسلة الأصلية و هذه الأخيرة تنفصل مباشرة عن ارتباطها بالجسيمات الريبية التابعة للخلية الجرثومية.
- مباشرة يقوم أنزيم RNA-Synthetase بعمله و ذلك بنسخ السلسلة المتممة (القالب العكسي)، و تدعى السلسلة السالبة **(-).**
- بعد ذلك تنفصل السلسلة الموجبة **(+)** عن السلسلة السالبة **(-)** و تصبح هذه الأخيرة السالبة كقالب لنسخ العديد من السلاسل الموجبة **(+)**.
- قسم من السلاسل الموجبة المنسوخة الجديدة **(+)** يدخل في عملية تشكيل الأغلفة البروتينية للفيروسات الجديدة، أما القسم الثاني لتلك السلاسل تستخدم كمادة وراثية.
- في نهاية مرحلة العدوى، تتجمع المادة الوراثية الفيروسية داخل الأغلفة البروتينية، هذا الأمر يترافق مع تشكيل العديد من الأفراد الفيروسية الجديدة الفادرة على إحداث العدوى و الإصابة
- يتألف كل فرد فيروسي جديد من سلسلة مفردة من RNA وتدعى السلسلة الموجبة **(+)** و من غلاف بروتيني مماثل للأصل.
- عند وصول الخلية الجرثومية المصابة للانحلال بسبب تكاثر الفيروس فيها، تهاجم الأفراد الفيروسية الجديدة خلايا مضيفة أخرى و تعيد دورة حياتها من جديد.



الشكل 30: دورة حياة آكل الجراثيم R17

II- دورة حياة الفيروسات ذات السلسلة المزدوجة من الـ RNA:

الفيروسات الحاوية على RNA على شكل سلسلة مزدوجة، واحدة منهما سلسلة موجبة **(+)** و الثانية سلسلة سالبة **(-)**. لهذا السبب لا يتم تشكل القالب العكسي. دورة حياتها تبدأ بالتضاعف فورا بعد غزو الخلايا المضيفة، مما يؤدي إلى تحلل هذه الخلايا و تحرر أفراد فيروسية جديدة قادرة على إصابة خلايا مضيفة جديدة.

III- دورة حياة الفيروسات الإرتجاعية أو القهقرية Retroviruses:

في السبعينات من القرن العشرين اكتشفت آلية تضاعف جديدة، و هذه الآلية خاصة بالفيروسات الإرتجاعية.

ميزات الفيروسات الارتجاعية:

1- التي تتطفل فقط على خلايا حقيقيات النوى.

2- صغيرة الحجم.

3- المادة الوراثية مكونة من سلسلتين مفردتين منفصلتين و متشابهتين من الحمض النووي RNA.

4- تحوي على أنزيمات بلمرة تسمى أنزيمات النسخ العكسي Reverse Transcription التي اكتشفت لأول مرة عام 1972 على يد العالمين Temin و Baltimore.

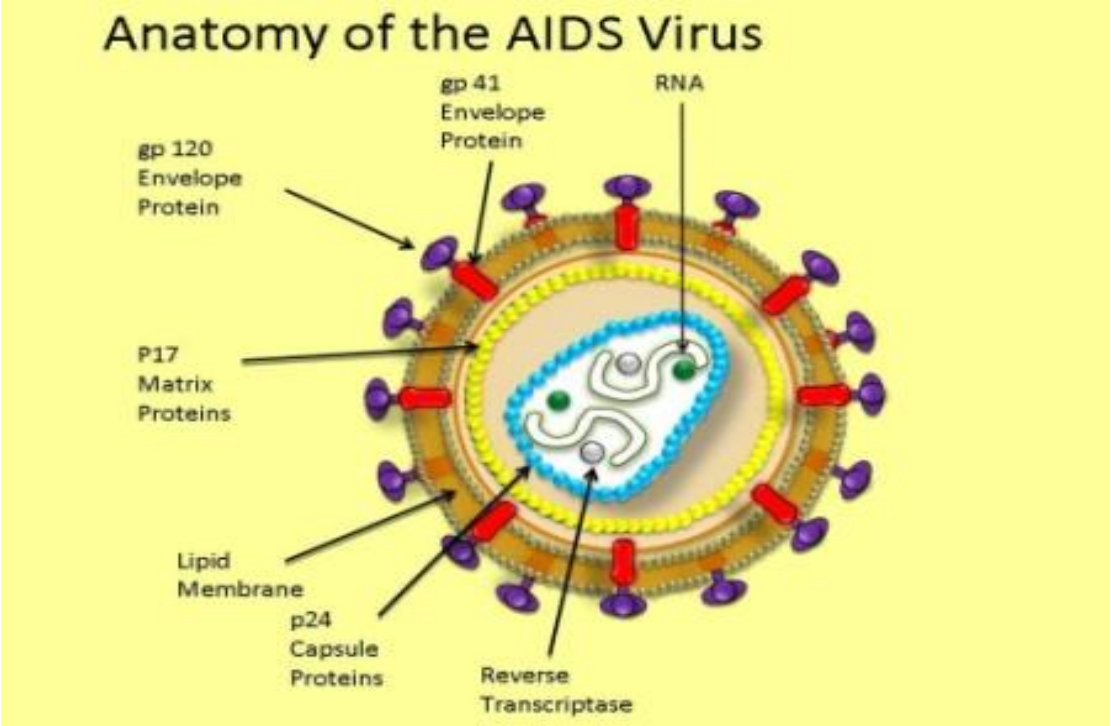
تم عزل أول فيروس قهقري عام 1910 من قبل العالم Rous، و يسبب هذا الفيروس ظهور أورام سرطانية عند الطيور.

تم عزل أول فيروس قهقري يتطفل على البشر عام 1978 و يدعى فيروس مرض الإيدز AIDA الذي يسبب عند المصابين نقص المناعة المكتسبة.

مثال للدراسة فيروس مرض الإيدز AIDS:

صفاته:

- يبلغ قطر الفيروس **0.1** ميكرومتر.
- مادته الوراثية مكونة من سلسلتين مفردتين متشابهتين و توجد في منطقة المركز التي تدعى النوكليوئيد Nucleod.
- يتكون النوكليوئيد من نوعين من البروتينات تدعى p24 وزنها الجزيئي **24000** دالتون و **p17** وزنها الجزيئي **17000** دالتون.
- يحاط النوكليوئيد بغلاف شحمي يضم بروتين سكري مكون من تحت وحدتين و هما على التوالي **p120** و **p41**.
- يحتوي على أنزيم النسخ العكسي Reverse Transcription.



الشكل 31: الشكل العام لفيروس الإيدز

- تتكون سلسلة الـ RNA من **9749** نكليوتيد، و تضم ثلاث مورثات :

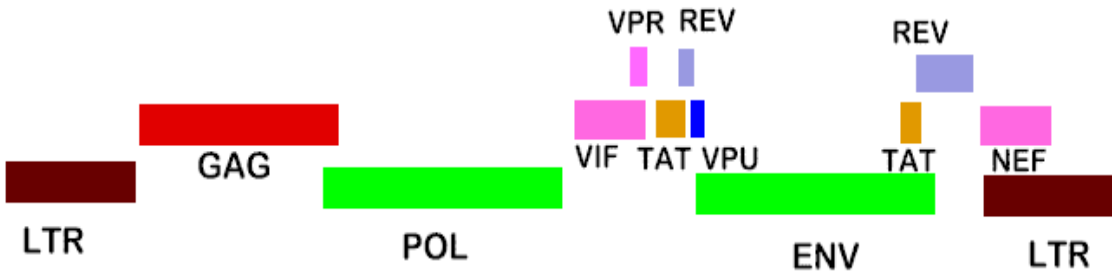
1. المورثة gag: المورثة المسؤولة عن تشفير بروتين أولي طويل الحجم، هذا الأخير ينقسم إلى بروتينين صغيرين بتحفيز من أنزيم البروتياز. و هما **p24** و **p17**.

ملاحظة، يشفر البروتياز من قبل إحدى مورثات الفيروس.

2. المورثة pol: المورثة المسؤولة عن تشفير أنزيم النسخ العكسي Reverse Transcription.

3. المورثة env: المورثة المسؤولة عن تشفير البروتينات السكرية في الغلاف الشحمي للفيروس **p41** و **P120**.

يتألف الطرفين النهائيين `**3** و `**5** لـ RNA الفيروسي، من تسلسلات نكليوتيدية مكررة يطلق عليها **TRE5** و **TRE3** أي مكرر نهائي `**3** و `**5**.



HIV-1 GENOME 9749 NUCLEOTIDES

الشكل 32: الذخيرة الوراثية لفيروس الإيدز

مرحلة (الإخماج)العدوى بفيروس الـ AIDS

I- طورالدخول:

- تبدأ مرحلة العدوى عند دخول الفيروسات داخل الكائن الحي بإحدى طرق العدوى أما عن طريق الدم أو الإفرازات المهبلية أو السائل المنوي أو حليب الأم.
- عندها يرتبط الفيروس بالخلية الهدف و هي الخلية اللمفاوية T4 التابعة للجهاز المناعي(من الخلايا ذات الأهمية الحيوية في الجهاز المناعي كونها المسؤولة عن إنتاج الأجسام المضادة) و التي تحمل على غشائها السيتوبلاسمي مستقبلات خاصة و هي البروتينات **CD4** و **CCR5**.
- بعد التعارف ما بين البروتين السكري P120 الموجود على الغلاف الشحمي للفيروس و المستقبلات **CD4** و **CCR5** الموجودة على غشاء الخلية اللمفاوية **T4**، يحصل اندماج مابين الغلاف الشحمي الفيروسي و الغلاف الشحمي للخلية اللمفاوية **T4**.

- و من ثم يدخل النكليوئيد الفيروسي سيتوبلاسما الخلية الهدف T4، و تبدأ مرحلة النسخ العكسي لجزيئات الـ RNA الفيروسية بوساطة أنزيم النسخ العكسي. و ذلك بتحويل المادة الوراثية المكونة من سلسلتين مفردتين من الـ RNA إلى سلسلة مزدوجة الـ DNA الذي يحمل المعلومات الوراثية التي كانت محمولة على RNA.

II- آلية النسخ العكسي في فيروس الـ AIDS:

يتكون أنزيم النسخ العكسي Reverse Transcription، المستخلص من الخلايا التائية T4 للأشخاص المصابة بنقص المناعة المكتسبة الـ AIDS من وحدتين بروتينيتين، و يتميز باحتوائه على ثلاث فعاليات أنزيمية مختلفة، و هي على التوالي:

1. فعالية نسخ عكسي:

بعد دخول فيروس الإيدز الخلايا المضيفة T4، بفضل فعالية النسخ العكسي لأنزيم النسخ العكسي يتم نسخ الـ DNA المتمم cDNA انطلاقا من الـ RNA، حيث يقوم هذا الأنزيم أولا بنسخ السلسلة الأولى من الـ cDNA في الاتجاه **3`** إلى **5`** بالنسبة للـ RNA الفيروسي. ينشأ عن عملية النسخ هجين DNA- RNA.

2. فعالية محللة RNase H

بفضل الفعالية المحللة لأنزيم النسخ العكسي الفيروسي، تهضم الحمض النووي RNA الموجود في جزيئة الهجين DNA- RNA. تتم عملية الهضم في الاتجاهين **3`** إلى **5`** و **5`** إلى **3`**.

3. فعالية مبلمرة للـ DNA:

بفضل فعالية البلمرة لأنزيم النسخ العكسي، يتم نسخ خيط الـ DNA في الاتجاه **5`** إلى **3`**. عندها تتشكل جزيئة مزدوجة من الخيط و التي تمثل المادة الوراثية لفيروس الـ AIDS في الخلية المضيفة.

- آلية النسخ العكسي معقدة و من خلالها يتم:
- تحويل المعلومات الوراثية الموجودة على الشريط المفرد للـ RNA إلى شرسط مزدوج من الـ DNA.
- إحداث تسلسلات نكليوتيدية خاصة يطلق عليهاLTR(Long Terminal Repeats) على طرفي جزيئة الـ DNA. لهذه التسلسلات وظيفتين أساسيتين، من جهة تساهم في عملية اندماج الـ cDNA الفيروسي ضمن الذخيرة الوراثية للخلية المضيفة T4، و من جهة أخرى لها دور هام أثناء مرحلة نسخ cDNA من قبل أنزيمات الـ RNA بوليمراز الخاصة بالعائل المضيف.

للتذكرة:

تحتوي الفيروسات الرجعية عندما تكون خارج خلايا المضيف على مادة وراثية مؤلفة من سلسلتين مفردتين من الـ RNA، لكن بعد دخول تلك الفيروسات خلايا المضيف تتجول مباشرة إلى سلسلة مزدوجة من الـ DNA بفضل الفعاليات الثلاث المختلفة لأنزيم النسخ العكسي.

III-طور الكمون:

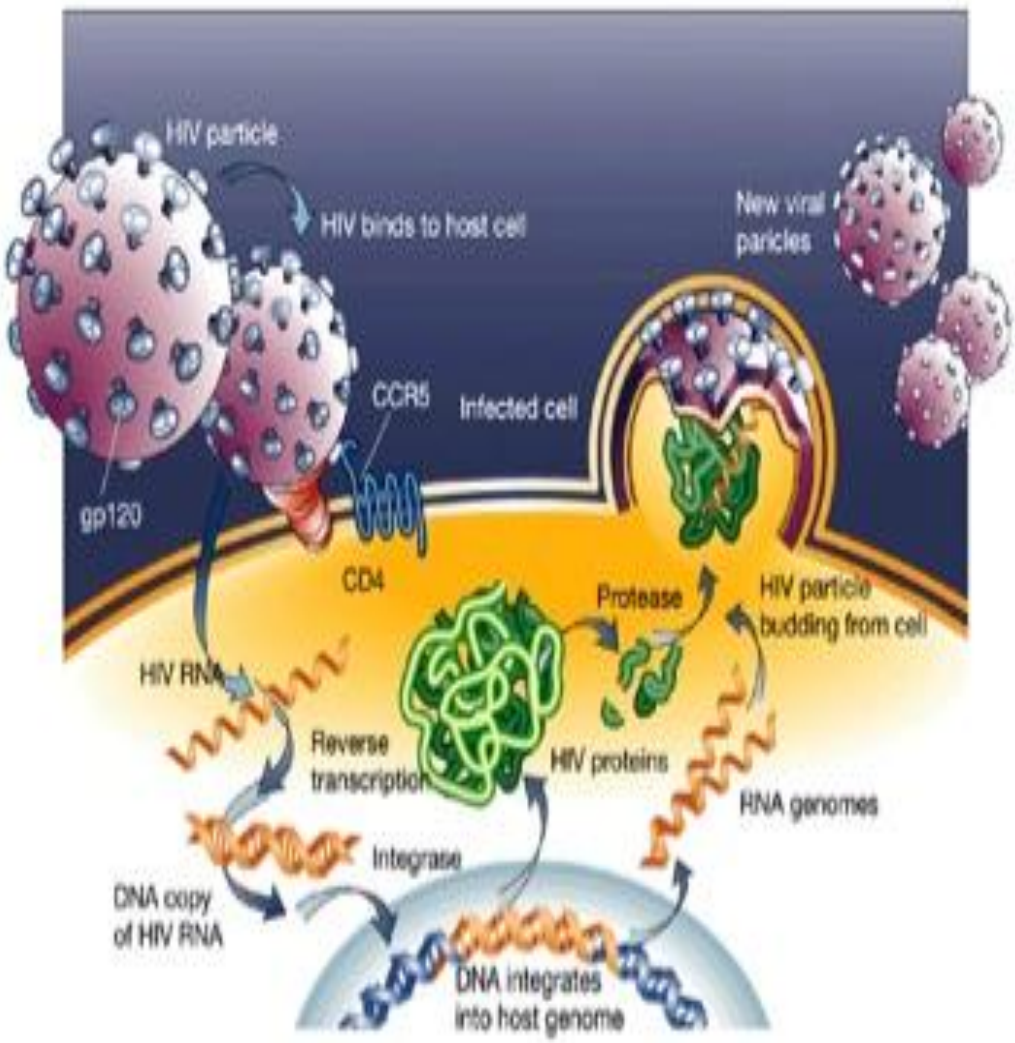
بعد مرحلة النسخ العكسي و تشكل الـ cDNA مزدوجة الخيط، تصبح هذه الأخيرة جاهزة للدخول إلى نواة الخلية المضيفة T4، لا يختصر فقط وجوده في نواة الخلية المضيفة بل تندمج جزيئة الـ cDNA داخل أحد صبغيات الخلية التائية المضيفة، عنده يصبح طفيليا ناجحا و الذي يحفز عملية الاندماج cDNA الفيروسي مع أحد صبغيات الخلية المضيفة هو أنزيم Integrase الفيروسي، و بالتالي يتشكل طليعة الفيروس الذي يصعب الكشف عنه و القضاء عليه.

في هذه المرحلة لا تظهر على الشخص المصاب أعراضا مرضية، لكنه يستطيع أن ينقل خلايا مصابة بطليعة الفيروس إلى أشخاص أصحاء.

يمكن لطليعة الفيروس البقاء بشكل خامل لفترات زمنية طويلة.

IV- طور النشاط:

- لأسباب غير معروفة بعد، تتنشط المادة الوراثية لطليعة الفيروس، و هذا ما يحفز أنزيمات الـ RNA Polymerase الخاصة بالخلية اللمفاوية T4 بنسخ جزيئة cDNA مما يترافق مع ظهور كميات كبيرة من الـ RNA الرسول الفيروسي في سيتوبلازما هذه الخلايا.
- قسم من الـ RNA الرسول الفيروسي يترجم إلى بروتينات فيروسية وظيفية في سيتوبلازما الخلية المضيفة. أما القسم الآخر يستخدم كمادة وراثية.
- تتجمع الأفراد الفيروسية الجديدة الحاملة للـ RNA داخل الخلية المصابة T4.
- تغادر أعداد كبيرة من فيروسات الإيدز الجديدة الخلية المضيفة T4 بعد أن تأخذ معها قسما من مكونات الغشاء الخلوي للخلية اللمفاوية، تموت الخلية T4 نتيجة الإصابات المتكررة الناتجة عن فقدانها قسم من مكونات غشائها البلازمي.
- تتحرر الفيروسات الجديدة و تنتشر في كل العضوية، و تهاجم خلايا تائية جديدة. و يكمل فيروس الإيدز دورة حياته داخل هذه الخلايا، مما يؤدي إلى إبادتها.
- يتحطم الجهاز المناعي و يصبح غير قادر على حماية الكائن الحي من الأخ ماج الخارجية، بسبب انخفاض كمية الخلايا T4 في الدم.
- بعض الأشخاص المصابين بمرض الإيدز تتطور عندهم أحد أنواع السرطانات مثل سرطان Kaposi الذي يصيب الأنسجة الضامة.



الشكل 33: دورة حياة فيروس الإيدز AIDS

السؤال الهام: لماذا يجد الجهاز المناعي صعوبة بالغة للتغلب على فيروس AIDS؟

الجواب: أن فيروس الإيدز يمتلك آليات تشويش للجهاز المناعي، مما يصعب التعرف عليها و القضاء عليه.

أهم هذه الآليات :

- تغيير تركيب الغشاء البروتيني للفيروس، فعند خروج الفيروس من الخلية التائية المصابة، يحاط بغشاء بروتيني مشابه للغشاء الشحمي لهذه الخلية. و هذا ما يجعل جهاز المناعة غير قادر على التعرف على الفيروس و الصعوبة في القضاء عليه.

- حدوث طفرات مستمرة على جينات الفيروس، هذا ما يجعل التغيير المستمر في بروتينات الغبلف الخارجي للفيروس، فيخدع الفيروس جهاز المناعة باستمرار.

أخيرا: من الدراسات في مخابر الأبحاث العلمية لمحاربة فيروس الإيدز، بإجراء دراسات دقيقة عن الجينات المسؤولة عن تشفير أنزيمات الفيروس التي تلعب دور حيوي إصابة الخلايا التائية و تدميرها و منها:
أنزيم البروتياز، و أنزيم النسخ العكسي، و أنزيم Integrase.

تقنية الـ PCR

تفاعل التسلسل البوليميري

أهم الأسباب التي تعيق تطبيق تقانات البيولوجيا الجزيئية هو ندرة الحموض النووية DNA و RNA في العينات المراد دراستها. و تقانة الـ PCR مكنت الباحثين من الحصول على كميات ضخمة من الحموض النووية مقدرة بعشرات إلى مئات النانوغرامات.

1. ما هو الـ PCR:

هو تقنية مخبريه تم اكتشافها عام **1983م** تقريباً تقوم على إكثار نسخ الحمض النووي (DNA) خارج النظام الحيوي. أي أنها طريقة لنسخ الحمض النووي في المختبر. و لذلك فهي تقنية حيوية لاستنساخ قطعة محددة من الحمض النووي و مضاعفة إنتاجها لكي يتسنى إجراء اختبارات و فحوصات إضافية عليها. وضعت هذه التقنية من قبل العالم كاري موليس **Kary Mullis** في عام **1983م** والذي حاز على جائزة نوبل عام **1993**.
إن المبدأ والشروط التجريبية التي تجري فيها هذه التفاعلات بسيطة، والهدف هو حصول سلسلة من تفاعلات تضاعف الـDNA ثنائي السلسلة وفي كل تفاعل يتم استخدام سلاسل أولية قليلة التعدد مؤلفة من عدد محدود من النكليوتيدات. الغاية من هذه العملية هو استخدام السلاسل الهجينة الناتجة في كل خطوة من خطوات الاصطناع كقالب من أجل الخطوة اللاحقة بدلا من إعادة السلاسل الأساسية في كل مرة.

2. متطلبات PCR :

لإنتاج الحمض النووي (DNA) بواسطة PCR يتطلب توفير :

1 - جهاز للتحكم بدرجات حرارة التفاعل بشكل دقيق و متتالي (الدورة الحرارية Thermocycle): ويقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع، لأن تغير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة هذه التقنية.

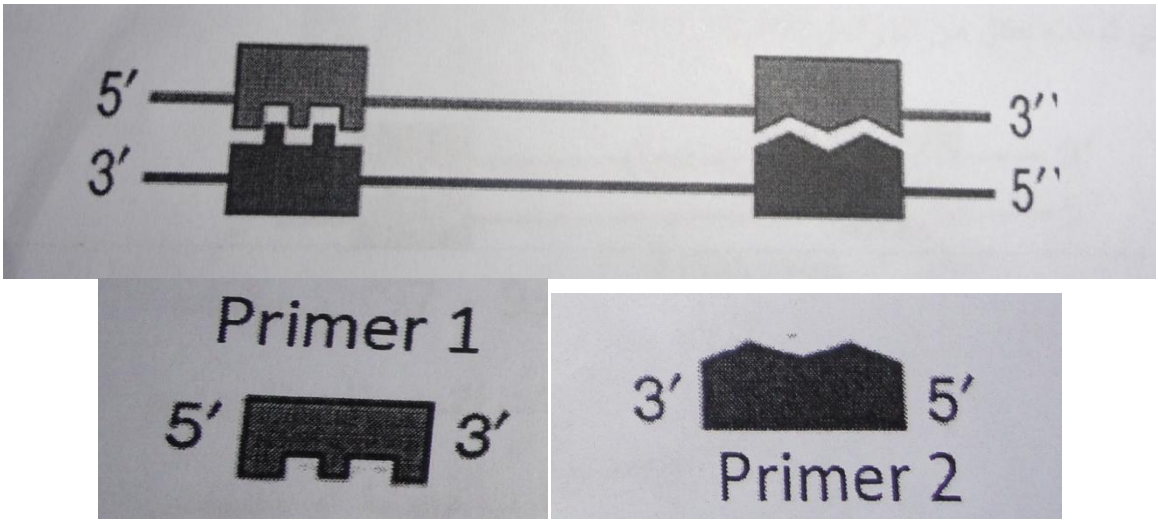
2- القالب template: شريط من الـ DNA مضاعف السلسلة قد يكون الجينوم كله أو جزء منه.

3- أنزيم Taq polymerase

4- السلاسل البادئة primers: وهو قطعة صغيرة من الحمض النووي (DNA) ليتمكن الإنزيم من بدء البناء و النسخ عليها عند النهاية ´3.

5- نكليوتيدات حرة dNTPs.

6- وقاء ليتم فيه التفاعل ويحوي شوارد المغنيزيوم.

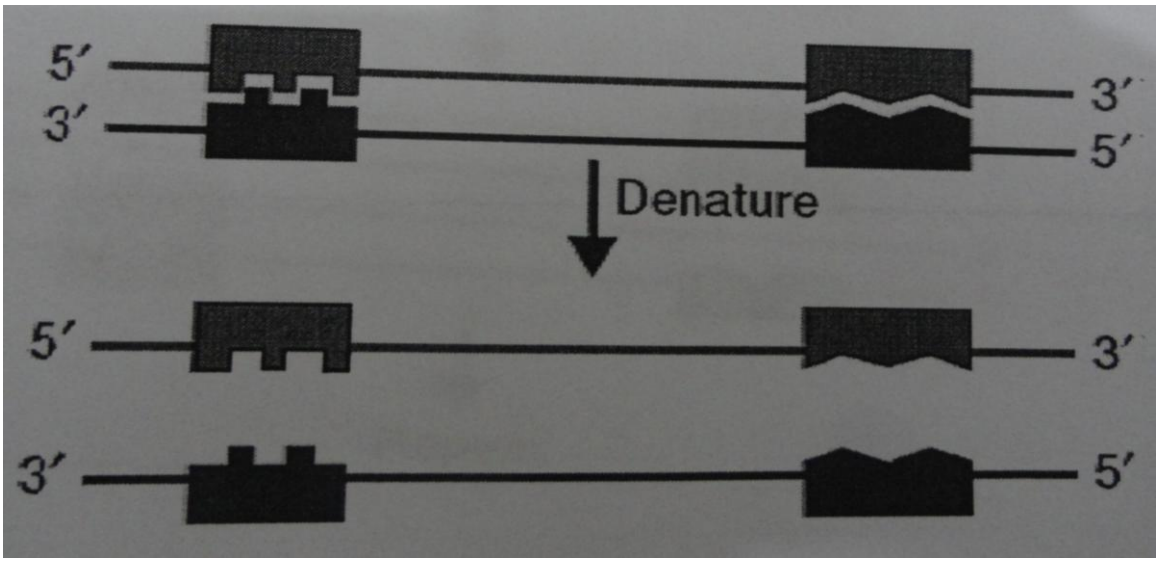


الشكل 34: البرايمر و قطعة الـ DNA

تقوم عملية الـ PCR على عدة دورات (30-24) دورة تقريبا، وتتألف الدورة الواحدة من ثلاث مراحل:

I. التمسخ أو الفصل (Denaturation):

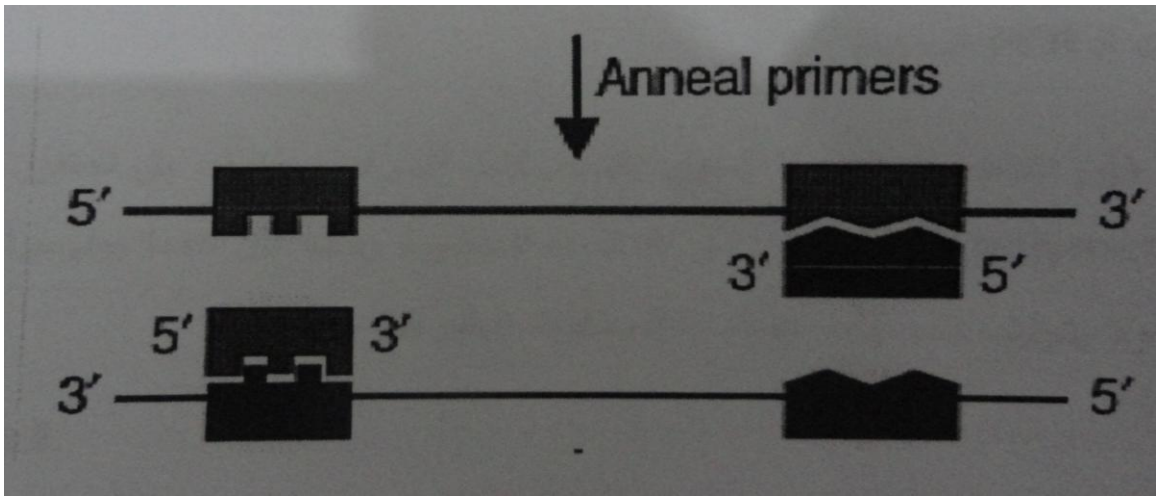
يتم الفصل بين الـ DNA المتتامين للقالب بالحرارة التي تقارب (93-95) º م. تعتمد المدة اللازمة للفصل على مصدر الجينوم (عند طلائعيات النوى لا تحتاج لزمن طويل أما حقيقيات النوى ذات الجينوم الكبير والغنية بنكليوتيدات الـ C والـ G تحتاج لزمن أطول). تستمر هذه المرحلة ما يقارب دقيقة أو دقيقتين (وهو تقريبا الزمن الذي تأخذه كل من المراحل التالية).



الشكل 35: مرحلة التمسخ

II. مرحلة التهجين Hybridization:

في هذه المرحلة تنخفض درجة الحرارة إلى ما يقارب (50 - 65) º م لتلتصق البوادئ مع متمماتها على الجينوم. وتعتمد درجة الحرارة اللازمة على تسلسل وطول البوادئ التي تضاف، فلكل بادئ درجة حرارة مناسبة لالتصاقه (فإذا انخفضت درجة الحرارة فوق اللازم سيلتصق البادئ بشكل عشوائي حتى أنه يمكن أن يلتصق مع نكليوتيدات لا تتممه، أما إذا ارتفعت درجة الحرارة كثيرا فلن يلتصق البادئ مع متممه).

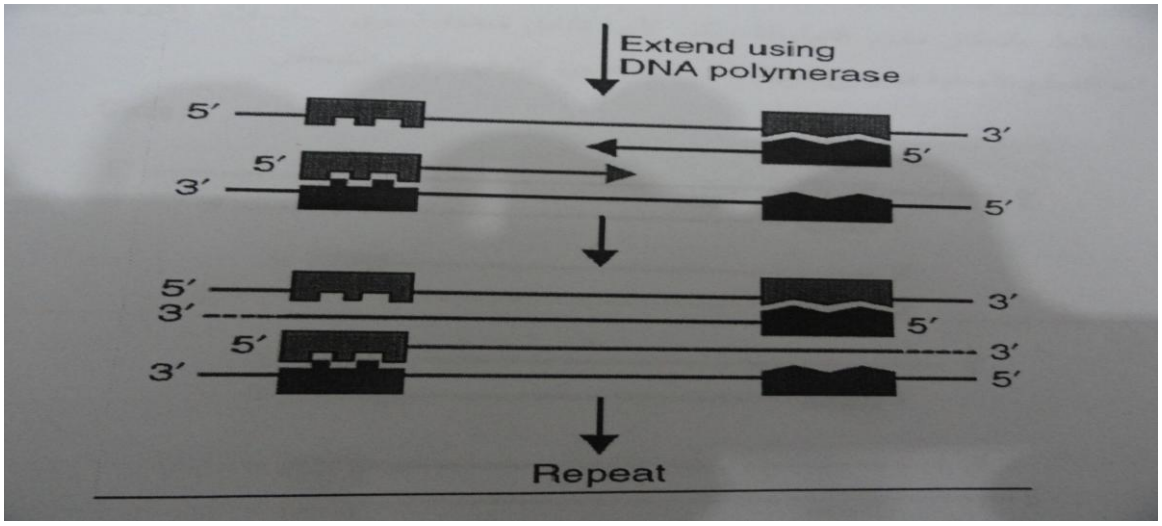


الشكل 36: مرحلة التهجين

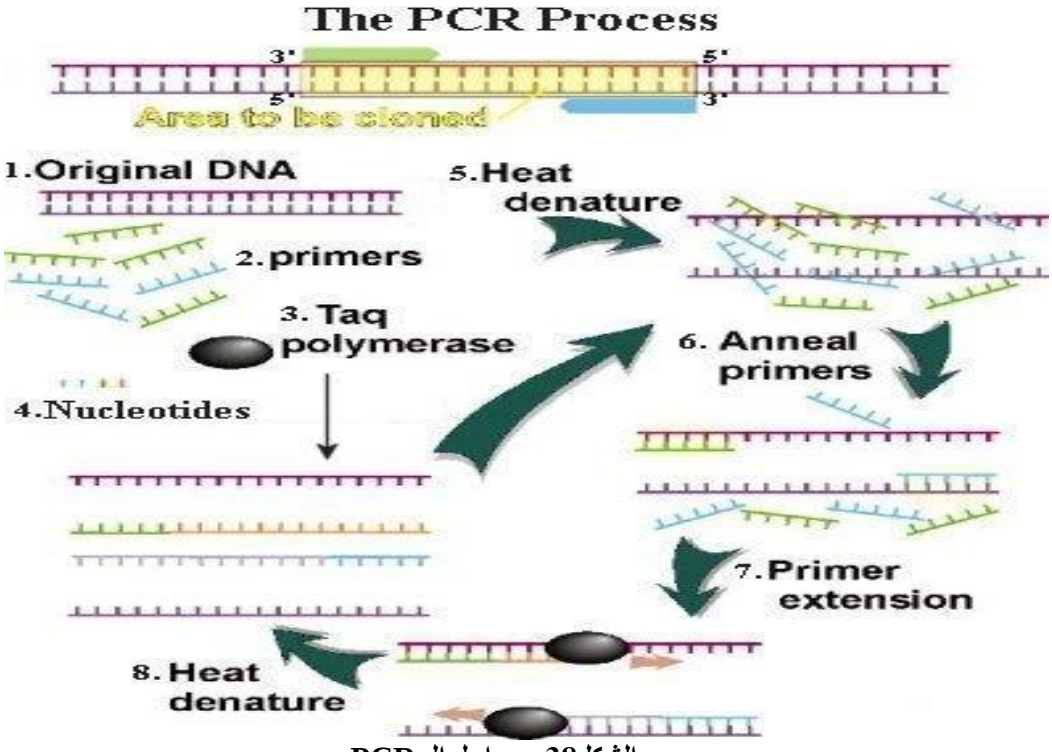
II. مرحلة الإطالة أو التصنيع Synthesis :

بعد أن يرتبط البادئ مع متتمه على القالب يأتي أنزيم الـ Taq polymerase ويتمم التسلسل على كل خيط فينتج عن كل خيط في النهاية خيط مضاعف من الـ DNA.

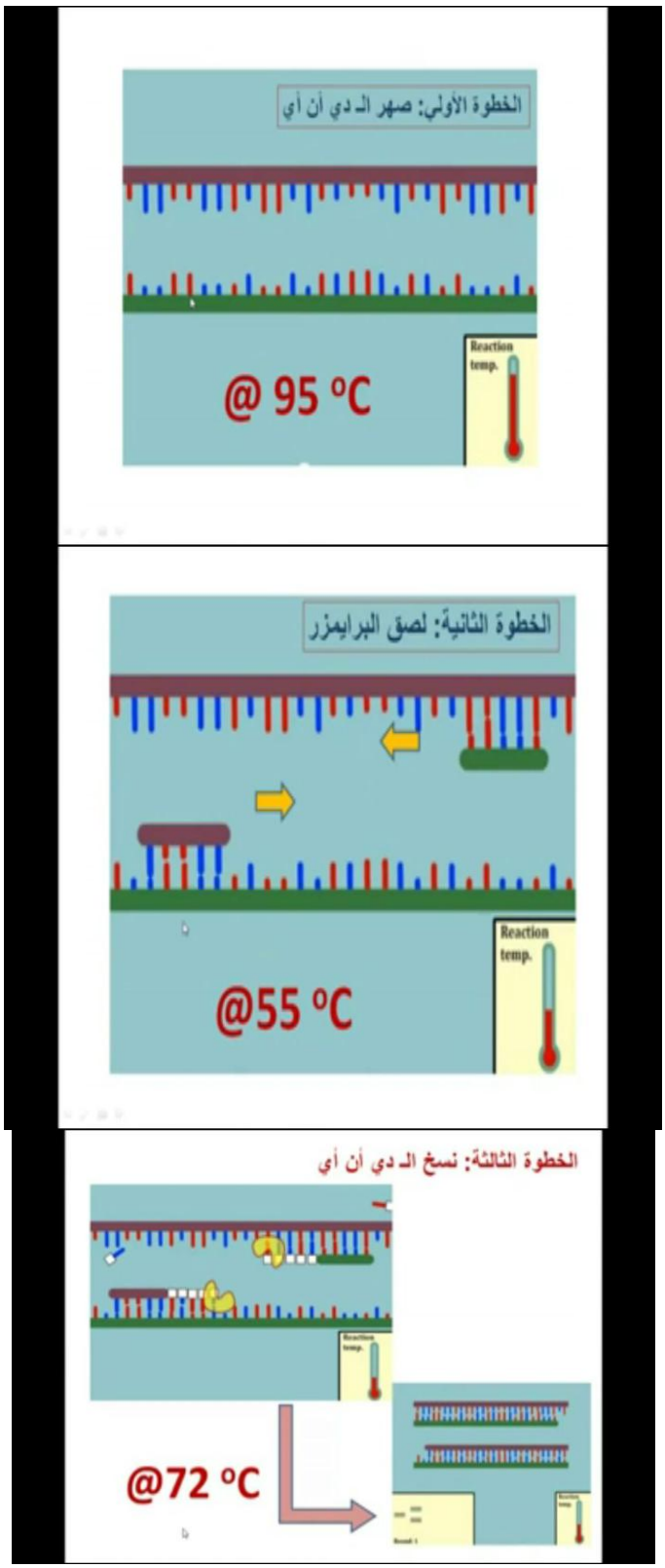
تكون درجة الحرارة في هذه المرحلة (72-75) ° م، أما الزمن يتفاوت حسب طول القطعة المراد دراستها.



الشكل 37: مرحلة الإطالة



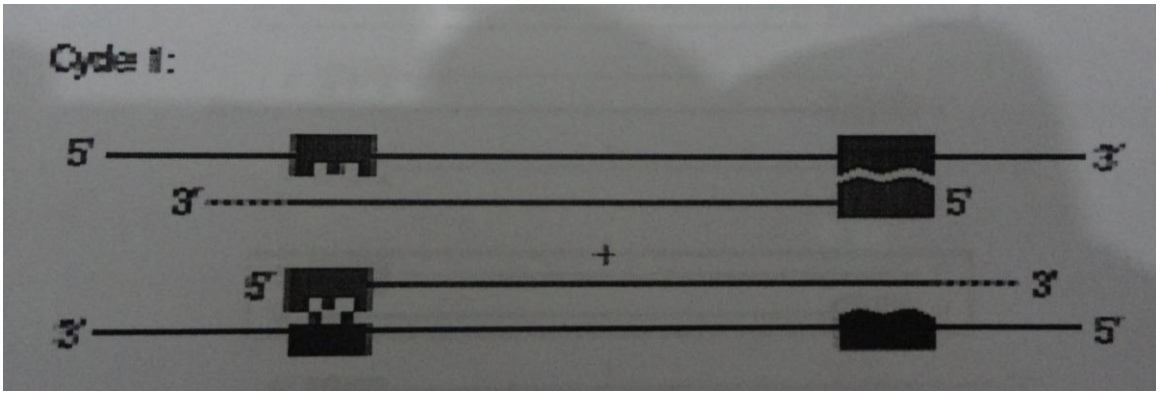
الشكل38: مراحل الـ PCR



الشكل 39: الدورة الواحدة للـPCR المكونة من ثلاث مراحل

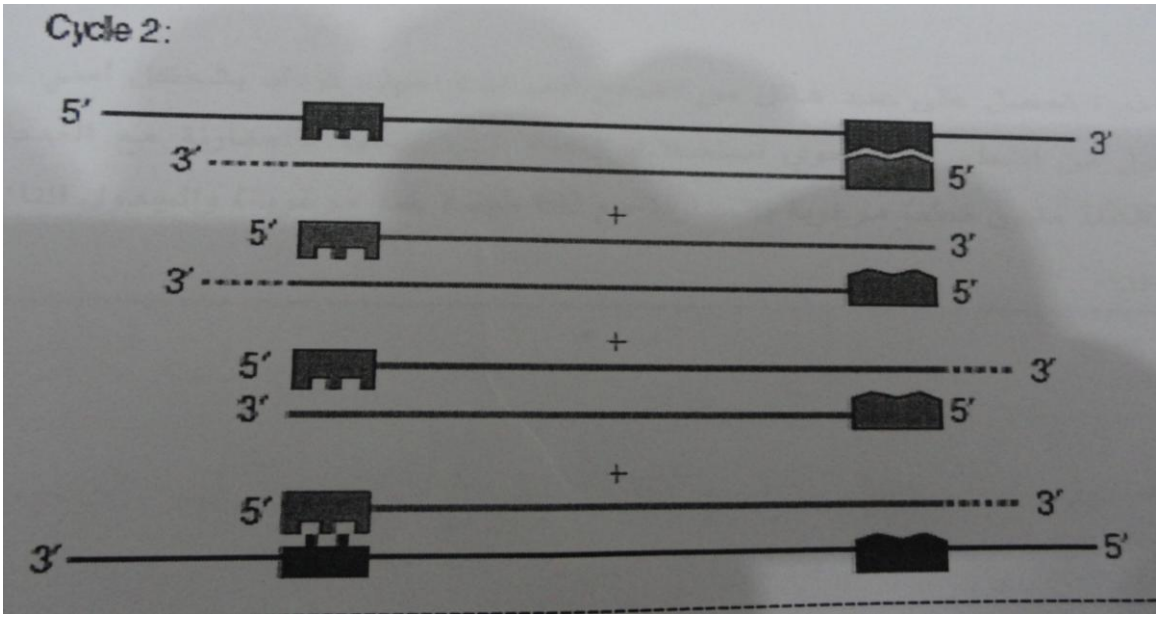
ماذا يحدث خلال دورات الـ PCR المتتابعة:

بعد الدورة الأولى: إن القطع الناتجة لا تحوي التسلسلات المرغوبة فقط، بل تكون التسلسلات التي يصطنعها الأنزيم أطول من السلسلة المطلوبة و ذلك لأن الأنزيم يتابع عمله على كل خيط من الخيطين ولا يتوقف عند نهاية السلسلة المطلوبة.



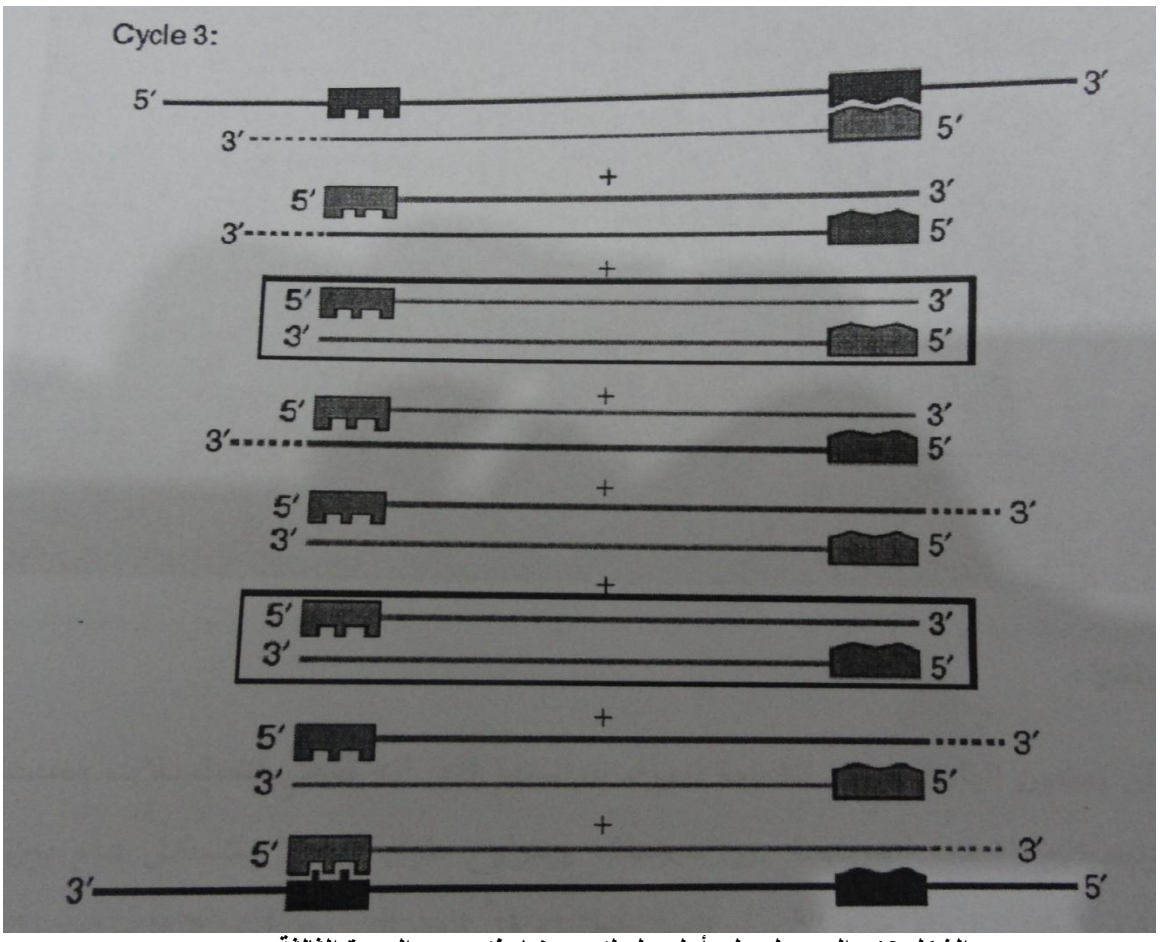
الشكل 40: بعد الدورة الأولى

بعد الدورة الثانية: بعد فصل الخيطين المتتامين فإن الخيط المتشكل من الدورة الأولى سينتج عنه القطعة المرغوبة فقط وبشكل مفرد السلسلة و ذلك لأنها تقابل قطعة تحوي تسلسلات زائدة عن التسلسلات المرغوب بها، أما القطع الأصلية ينتج عنها ما ينتج في الدورة الأولى.



الشكل 41: بعد الدورة الثانية

بعد الدورة الثالثة: ينتج أول سلسلتين مضاعفتين ومحدودتين تماما بالشكل الذي نرغب به (وهي التي وضعت ضمن إطار في الشكل 42).



الشكل 42: الحصول على أول سلسلتين مضاعفتين بعد الدورة الثالثة

وبعد حوالي 30 دورة نحصل على عدد هائل من القطع المرغوبة حيث تزداد بشكل أسي في كل دورة. بالمقارنة مع عدد قليل من القطع التي تحوي تسلسلات زائدة التي نهملها بالمقارنة مع العدد الهائل للقطع المرغوبة (ما يقارب 1000 مليون قطعة مرغوبة بالمقارنة مع 60 قطعة غير مرغوبة).

3. اختيار السلاسل الأولية (Primers)

إن اختيار السلاسل الأولية أو البادئات في تفاعلات التسلسل البوليميري يجب أن يكون دقيقا، هذه السلاسل تلعب دورا مضاعفا فهي تقوم عند تهجين سلسلة الـ DNA الأساسي (القالب) بتحديد الجزء المراد مضاعفته هذا من ناحية ومن ناحية أخرى فإنها تسمح ببدء بلمرة وتكثيف الـ DNA بواسطة النهاية الحرة لزمرة الهيدروكسيل على الموقع ´3.

إن السلاسل الأولية سيتم تهجينها عند نهايات سلاسل الـ DNA التي سيتم تضخيمها، لذلك فإنه من الضروري معرفة تسلسل النكليوتيدات عند نهايات هذه السلاسل.

من أجل تسهيل اختيار السلاسل الأولية، يوجد برامج تحليل السلاسل التي تسمح بالتأكد من النقاط التالية:

- مقارنة درجات الحرارة المستخدمة في التفاعلات حيث أن السلاسل الأولية يجب أن تكون قابلة للتهجين في نفس درجات الحرارة بالنسبة للسلاسل الأساسية (القالب).
- يجب أن لا تكون السلاسل الأولية متممة لبعضها البعض و خاصة عند النهاية ´3.
- أن لا تتضمن السلاسل الأولية سلاسل مكررة ومتعاكسة حتى لا يحدث وانطواء ضمن السلسلة نفسها.

4. درجات الحرارة المستخدمة في تفاعلات التسلسل البوليميري

إن المراحل الثلاثة من هذه التفاعلات التي تشكل حلقة الـ PCR تتم في درجات حرارة مختلفة وهذا يسمح بالتحكم بالنشاط الأنزيمي للأنزيمات المشاركة في هذه التفاعلات.

- المرحلة الأولى (تفكيك الـ DNA): تتم عادة في درجة حرارة (93-95) مئوية من أجل فصل سلسلتي الـ DNA.
- المرحلة الثانية (التهجين): يتم تحديد درجة الحرارة فيها حسب طبيعة السلسلة الأولية وهذه الحرارة تختلف بين (50 و 65) درجة مئوية و بالتالي تحدد مدى استقرار الجزيء الهجين الناتج عن ارتباط السلاسل الأولية والسلاسل الأساسية.
- المرحلة الثالثة (الإطالة أو تكثيف الـ DNA) : تتم في درجة حرارة (72-75) درجة مئوية وهي الدرجة المثلى لنشاط أنزيمات الربط وبالتالي بلمرة الـ DNA.

إن درجة حرارة التفكيك والتكثيف تبقى ثابتة بينما تتغير حرارة التهجين تبعا للسلاسل الأولية المستخدمة ومكوناتها من النكليوتيدات.

من أجل حساب درجة الحرارة اللازمة في عملية التهجين لسلسلة قليلة التعدد من النكليوتيدات (30 نكليوتيد) نستخدم العلاقة التالية :

$$Tm = 2\,(A+T) + 4\,(G+C)$$

حيث أن A، T، G ،C هو عدد كل من هذه الأسس في السلسلة الأولية قليلة التعدد.

5. سلسلتي الـ DNA الأساسي أو القالب

من الناحية العملية، نحتاج إلى عدة نسخ من الـ DNA الأساسي لكي نحصل على نتيجة جيدة.

ملاحظة : إذا كانت نوعية أو كمية الـ DNA الأساسي غير جيدة فإن ذلك قد يؤدي إلى تضخيم أجزاء غير نوعية من الـ DNA أي الأجزاء التي لا نبحث عنها وليست هي الهدف المنشود.هذا التضخيم غير النوعي يمكن تفسيره بوجود تلوث أو عدوى من العينات المستخدمة أو العناصر التفاعلية الأخرى المستخدمة في استخلاص الـ DNA.

6. أنزيم تكثيف الـ DNA (Taq -Polymerase)

تأتي هذه الأنزيمات من البكتيريا المقاومة لدرجات الحرارة المرتفعة و تدعى Thermus aquaticus هذه البكتيريا تعيش بشكل طبيعي في درجات حرارة مرتفعة تصل إلى أعلى من 90Cº مثل الينابيع المائية الحارة في أعماق المحيطات، وبالتالي فان أنزيمات تكثيف الـ DNA لا تتحطم في درجات الحرارة المستخدمة لتحطيم و تخريب جزيئات الـ DNA و أكثر الأنزيمات المعروفة هو Taq Polymerase.

7. المحلول الموقي

المحلول الموقى المستخدم من أجل تفاعلات التسلسل البوليميري تساعد على استمرارية ثبات PH المحلول في الوسط التفاعلي و أيضا تحفظ أنزيمات التكثيف من الإضاءة.(Tris-Hcl, PH = 8.5– 9)

هذا المحلول يحتوي على شوارد موجبة ثنائية التكافؤ وهي عوامل مساعدة لا غنى عنها في تفاعلات التسلسل البوليميري إلى جانب أنزيمات التكثيف. إن وجود شوارد موجبة ثنائية التكافؤ (Mg^{2+}) و أخرى أحادية التكافؤ (NH_4^+ ; k^+) يعدل من الشحنات السالبة لمجموعات الفوسفات الموجودة في الـ DNA و أيضا تؤمن استقرار جزيئات ال DNA الهجينة.

8. تقنية PCR تطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي (DNA) و الوراثة و منها :

1. الكشف عن الطفرات الوراثية : وذلك عن طريق وضع بريمر خاص للطفرة لتكثير الجين الخاص بها ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجين من الكروموزومات أو على احدهما (allele).
2. تعين البصمة الوراثية.
3. الكشف عن الفيروسات : وهذه الطريق هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.
4. هو العملية الأساس في تحديد تتابع الأسس الآزوتية في الحمض النووي (DNA).
5. معرفة طول الحمض النووي (DNA).
6. تقنية الحمض النووي (DNA) المكمل.
7. تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات.
8. في مشروع الخارطة الجينية البشرية (human genome project).
9. تقنية ارتباط الحمض النووي (DNA) – بروتين (الحمض النووي (DNA) -Protein Interaction).
10. في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة، حالات الاغتصاب، تحديد الهوية... الخ) .

وغيرها من التطبيقات المخبرية والبحثية .

9.محدودية عملية الـ PCR :

1- يجب معرفة التسلسلات المجاورة للقطعة المرغوبة لعمل بوادئ مناسبة. 2- قابليتها للتلوث، من أجل هذا يجب إجراء شاهد سلبي لكل عملية PCR (وهو أنبوب نضع فيه كل المكونات اللازمة باستثناء الـ DNA المدروس) ويجب أن لا يظهر فيه أية قطعة متضاعفة بعد انتهاء العملية.

3- أنزيم الـ Taq polymerase لا يصحح الأخطاء التي يرتكبها أثناء العمل، وذلك يؤثر على التجربة المجراة في حال كانت عملية الـ PCR تجرى لمعرفة تسلسل القطعة المدروسة، في هذه الحالة نلجأ إلى استخدام أنزيم آخر يصحح الأخطاء ولا يتخرب بالحرارة. أما إذا كانت التجربة من أجل تحديد طول القطعة فقط فالأخطاء التي تحدث لا تؤثر تأثيرا كبيرا على النتائج.

4- طول القطعة المضخمة عبر الـ PCR محدود.

تقنية الـ Cloning

من أجل دراسة مورثة معينة يتوجب عزلها وتكثيرها بشكل منعزل عن باقي تسلسل الجينوم، ولتحقيق ذلك هناك تقنيتين رئيسيتين :

1- تقنية الـ Cloning 2- تقنية الـ PCR

أولا- تقنية الـ Cloning :

يتم في هذه التقنية قص القطعة المستهدفة المراد دراستها من الجينوم بمقصات جزيئية (أنزيمات اقتطاع) ومن ثم إدخالها على الخلية ضمن ناقل Vector يحوي نقطة بدء تضاعف (ori). ندخل الناقل المحمل بالقطعة الهدف إلى خلية مضيفة (خلية جرثومية) وتترك الخلية لتتكاثر، فنحصل على نسخ عديدة من القطعة المرغوبة من الـ DNA محمولة على الناقل.

نجمع الخلايا المتكاثرة ثم نحل الغشاء الخلوي ونخرج مكونات الخلية ونستخلص نسخ الناقل الذي يحمل تسلسل الـ DNA المراد دراسته وبذلك نكون قد حصلنا على المورثة المطلوبة بكميات كبيرة.

من أجل انجاز هذه التقنية يجب إجراء التقنيتين التاليتين:

1- الـ Recombinant DNA

2- الـ Transformation

1- **الـ Recombinant DNA:** ويعرف باسم الـ DNA المأشوب والذي يشير إلى الـ DNA المعدل المرتبط بقطع والذي تم تجميعه من مصادر مختلفة أو تصنيعه.

وللحصول عليه:

- ❖ يجب عزل قطعة الـ DNA المراد دراستها من جينومها ومن أجل تحقيق ذلك لابد من قصها من شريط الجينوم بواسطة المقصات الجزيئية (أنزيمات الاقتطاع).
- ❖ يجب استخدام ناقل Vector ينقل القطعة المطلوبة إلى الخلايا المتكاثرة.

أ- أنزيمات الاقتطاع: إن اكتشاف أنزيمات الاقتطاع (Res) Restriction Endonucleases هو الذي فتح الباب أمام تقدم علم البيولوجيا الجزيئية، إذ كنا عاجزين عن التعامل مع المورثات قبل اكتشافها.

اكتشف في عام **1970** أن البكتريا تملك أنزيمات الـ nucleases التي تقوم بالتعرف على المواقع الصغيرة للنكليوتيدات في الحلزون المضاف للـ DNA وتقطع هذه المواقع في كلا الذراعين في الحلزون المضاعف و دعيت باسم Restriction Endonucleases RES أو بشكل أبسط دعيت Restrictions Enzymes

تنتج الخلايا الجرثومية هذه الأنزيمات من أجل التصدي لجينوم المعتدي والذي غالبا" ما يكون الفيروسات الملتهمة للجراثيم. وتحمي الجراثيم جينومها الخاص من خلال متيلة مواقع التعرف (متيلة: إضافة جذر المتيل (CH3) لأنزيمات الاقتطاع التي تنتجها السلالة.

عزلت الأنزيمات من عدد كبير من السلالات الجرثومية المختلفة، لذلك يدعى الأنزيم حسب السلالة الناتج عنها، فتشتق الأحرف المكونة لاسمه من جنس ونوع الجرثوم ومن السلالة المستخدمة.

بشكل عام هناك أكثر من 100 موقع نكليوتيدي تتعرف عليهم أنزيمات القطع، مختلف المواقع النكليوتيدية التي تعرف من قبل هذه الأنزيمات طولها يبلغ 4 إلى 6 نكليوتيد التي تتصف بتناظر داخلي خاص.

وتصنف أنزيمات الاقتطاع ضمن ثلاث عائلات رئيسية (ترقم I و II و III) وتشترك بصفات عامة مثل:

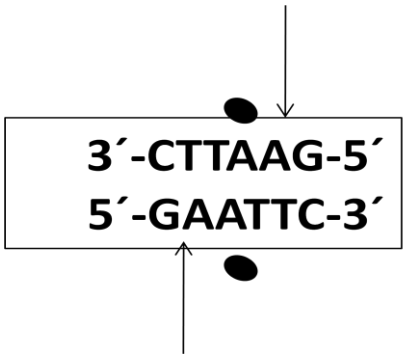
1- تتعرف على تسلسل معين من الـ DNA وترتبط بخيط الـ DNA عنده يدعى موقع التعرف (recognition site).

2- لديها موقع قطع تقوم عنده بقطع خيط الـ DNA.

تختلف طريقة القطع باختلاف العائلة. فأنزيمات العائلة الثانية REsII تتعرف وتقطع بنفس المكان دائما"، أما العائلتان الأولى والثالثة REsIII-REsI فيكون موقع التعرف مختلفا" عن موقع القطع كما ويكون موقع القطع فيها غير ثابت تماما" مما يجعل استخدامها غير موثوق به في تطبيقات البيولوجيا الجزيئية.

تتميز REsII بخاصية القطع المتناظر (تقوم بقطع الخيطين بشكل متناظر) يسمى هذا النوع من التناظر بالمعكوس ***palindrome***. (أي نحصل على نفس التسلسلات إذا حاولنا قراءتها بالاتجاه ´5 إلى ´3 من الخيط الأول وبالاتجاه ´3 إلى ´5 للخيط الثاني).

مثال : الموقع الخاص الذي يعرف من قبل أنزيم الـ ***Eco*R1** هو :

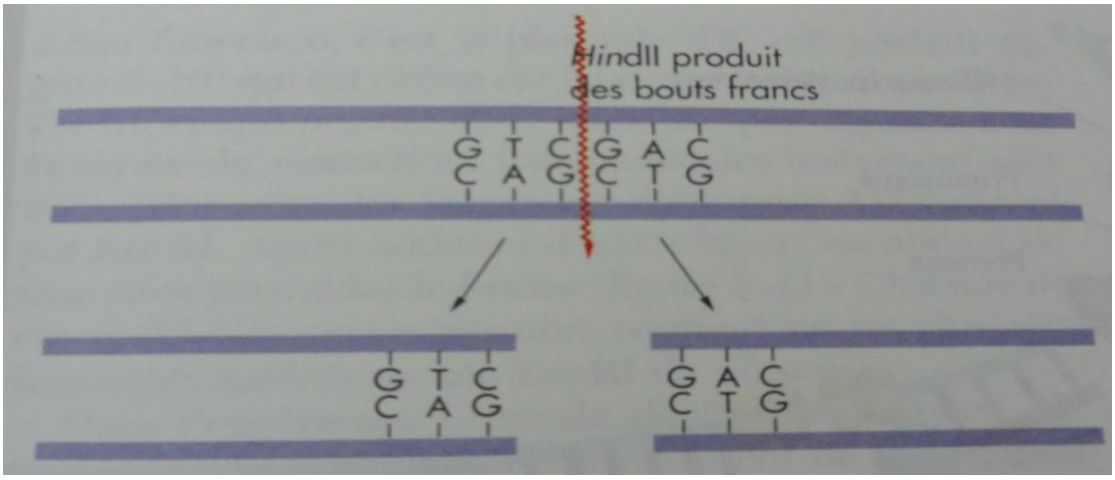


الشكل 43: الموقع الخاص الذي يعرف من قبل أنزيم الـ *Eco*R1

عندما يهاجم أنزيم الـ **EcoR1** هذا الـ***palindrome*** يحطم ذراعي القطعة في نفس المنطقة فالقطع يحصل حسب الأسهم المشار إليهما على القطعة ويكون بين A و G، النقط السوداء المعلمة فوق القطعة تشير إلى الأسس التي أجريت لها عملية متيلة من أجل حماية القطعة من الهجوم الأنزيمي لـ DNA المضيف.

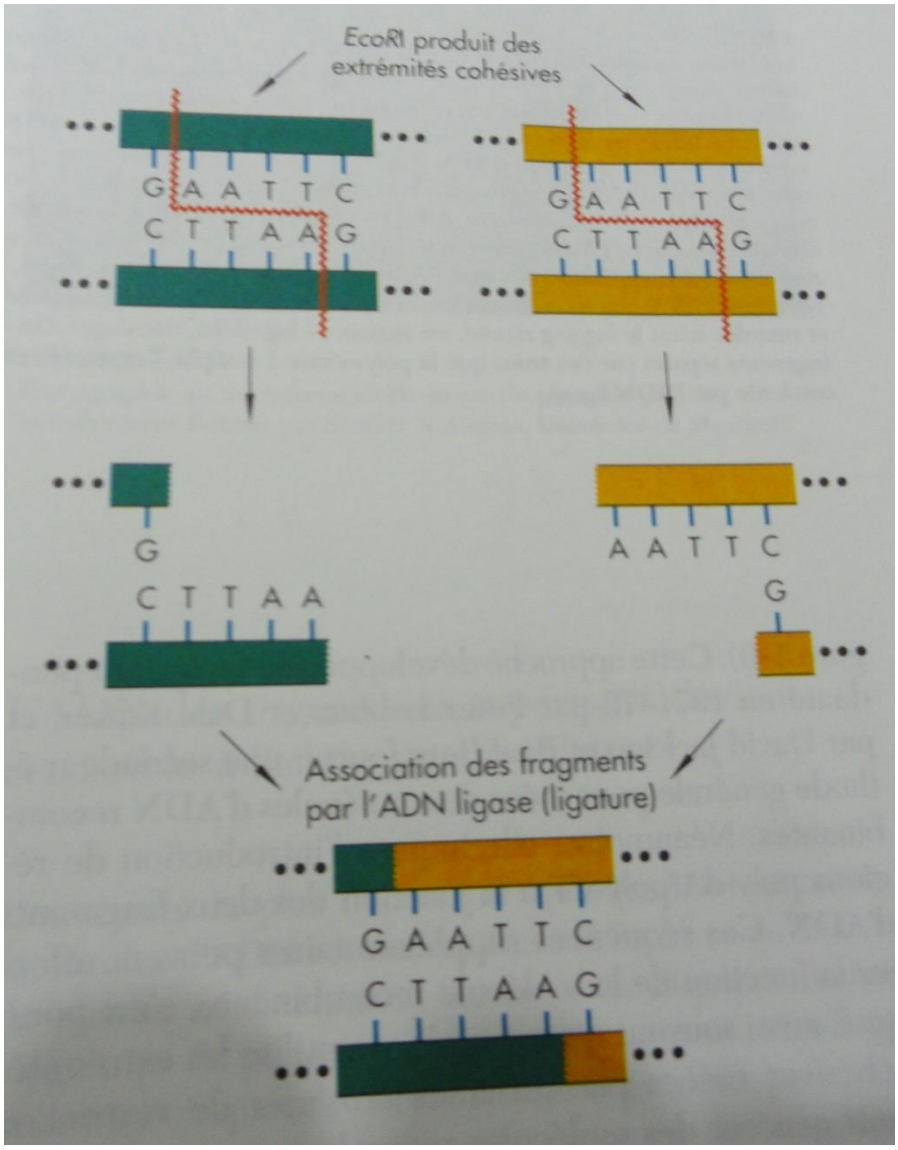
وبما أن العائلة REsII تتميز بخاصية القطع المتناظر هنا يكون لدينا احتمالين للقص:

1- يقوم الأنزيم بالقطع بشكل محوري (من المنتصف) مما يعطي نهايات كليلة Blunt ends.



الشكل 44: أنزيم القطع HindII يقطع الـDNA في المنتصف ويعطي نهايات كليلة لا تملك القدرة على إعادة الارتباط

2- أو أنه يقطع من الأطراف وينتج لدينا نهايات سائبة إما ´5 أو ´3 قادرة على الارتباط (التتام) مع النكليوتيدات المقابلة إذا ما سنحت لها الفرصة، لذا تدعى بالنهايات الالتصاقية Sticky ends.



الشكل 45: أنزيم *Eco*R1 القطع يقطع موقع التعرف بشكل متناظر وينشىء عنه نهايات سائبة و التي لها القدرة على إعادة ارتباطها مع أي نهاية أخرى منتجة من قبل نفس الأنزيم

تقوم أنزيمات الاقتطاع بعملها بغض النظر عن مصدر الجينوم ولذلك بإمكاننا أن نقطع شريطي DNA من مصدرين مختلفين بنفس الأنزيم ومن ثم وصلهما فينتج لدينا شريط DNA جديد.

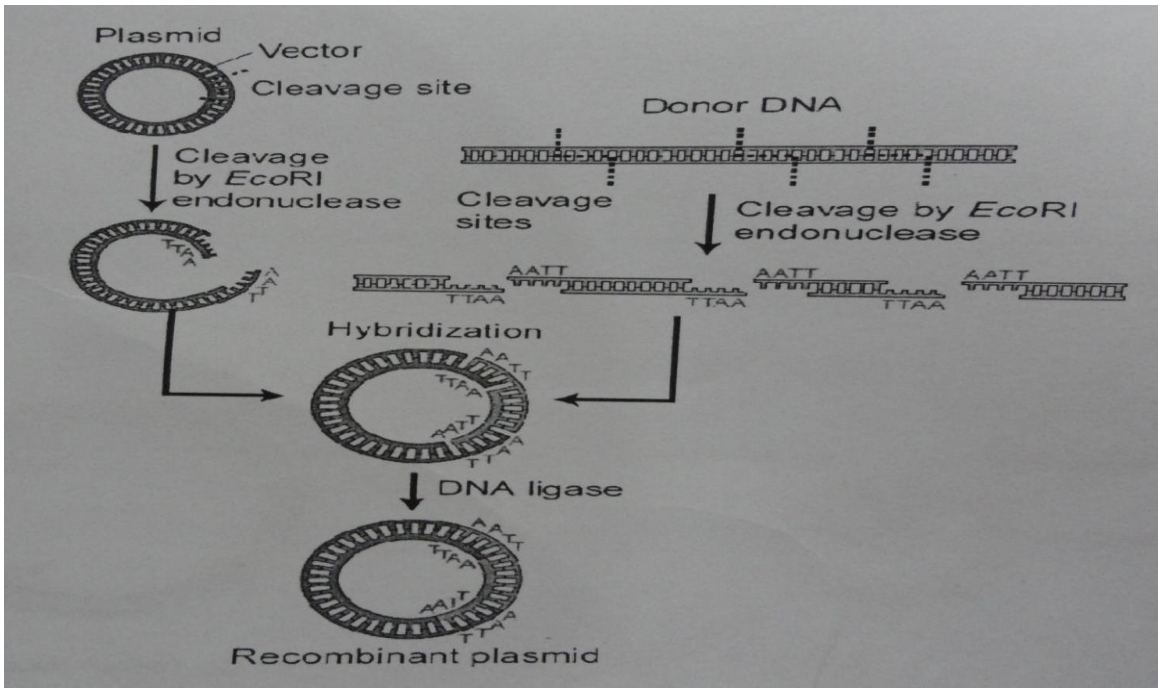
ب- الناقل Vector :

الذي يقوم ينقل القطعة المطلوبة إلى الخلايا البكتيرية المتكاثرة. ويجب أن يتمتع بالحفاظ على نفسه وقابليته للتضاعف في الخلية المضيفة من خلال امتلاكه نقطة بدء التضاعف ori .

تمتلك النواقل المشتقة من البلاسميدات هذه الصفات حيث تكون حلقية وتملك نقطة بدء التضاعف ori، و لا تستطيع أنزيمات exonuclease هضمها، أما أنزيمات الـ endonuclease تتمكن من أن تقتطعها.هذه الخاصية تفيد في إدخال قطع جديدة من الـ DNA التي تسمى inserts ويكون مصدرها من الـ DNA المعطي إلى الناقل.

من أجل إجراء عملية Cloning نقوم بقطع الـ DNA المعطي بأنزيم قطع معين فنحصل على تسلسلات مختلفة بالطول ولكنها متشابهة بالنهايات السائبة نقوم بقطع الناقل بالأنزيم ذاته، فينتج لدينا نهايات متشابهة ومتتامة مع بعضها فترتبط مع بعضها بروابط هيدروجينية ويقوم أنزيم الـ ligase بإنشاء روابط الفوسفو دي استر فنحصل على هجين من الناقل وقطعة الـDNA المعطي وهذا ما يدعى بالـ Recombinant DNA.

ولا تجري هذه العملية على خلية واحدة وناقل واحد وإنما تحتاج إلى عدد كبير من جزيئات الـ DNA المعطي وعدد كبير من جزيئات الناقل. ونتيجة لذلك نحصل بعد عملية التنسيل (Cloning) على عدد كبير من جزيئات الناقل الهجينة التي تحتوي الـ inserts.



الشكل 46: عملية قص الناقل و إعادة لحمه مع القطعة المرغوبة

هناك أنواع عديدة من النواقل المستخدمة في عمليات البيولوجيا الجزيئية سندرس منها البلاسميد الجرثومي.

تم تصنيف النواقل البلاسميدية إلى عائلتين: pBR, pUC

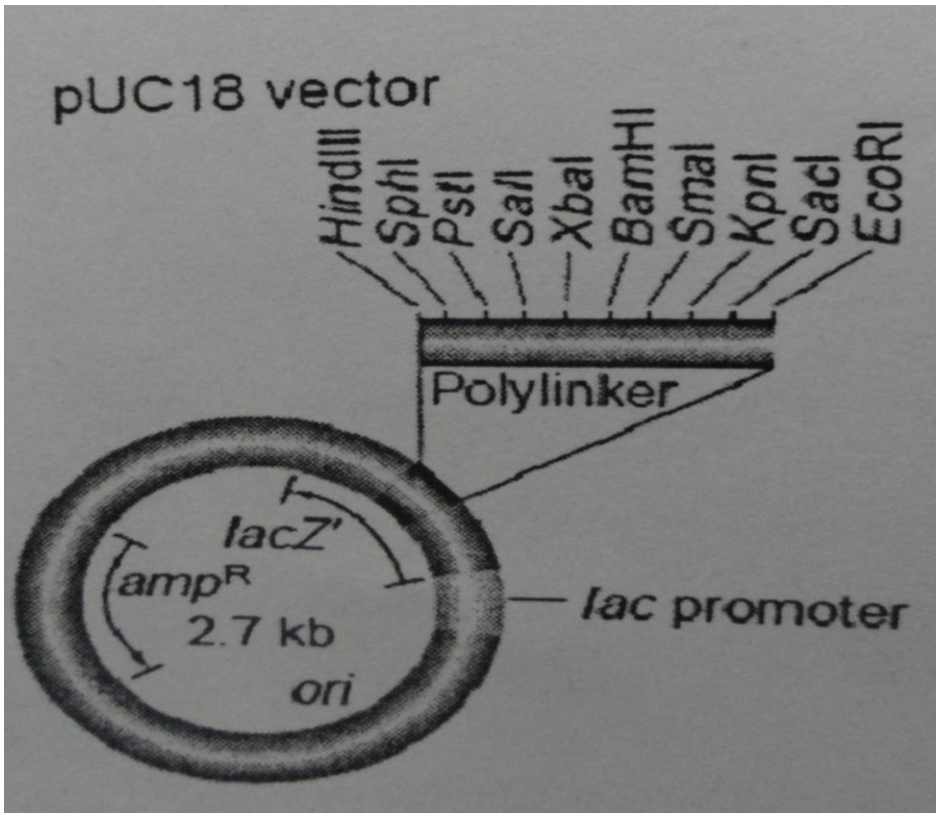
1- لكل منهما نقطة بدء التضاعف ori.

2- لكل منهما مواقع تعرف للعديد من أنزيمات الاقتطاع بحيث يكون لكل أنزيم اقتطاع موقع تعرف واحد فقط على طول البلاسميد.

3- المنطقة التي تحمل مواقع التعرف لأنزيمات الاقتطاع تدعى poly linker

أو Multiple Cloning Site (MCS)

4- توجد واصمات انتقائية (Selectable markers) كمؤشرات في عمليات التنسيل مثل مورثات المقاومة الصادات الحيوية ampR tetR. والواصمات عبارة عن مورثات من السهل اكتشاف نمطها الظاهري و يمكن أن نتتبعه بالعيان كإعطاء لون معين أو تنمو في وسط معين.....



الشكل 47: الناقل PUC18

بعد وصل القطعة المطلوبة insert بالناقل يتم دخول الجزيء الهجين إلى الخلية المضيفة بعملية تدعى الـ Transformation.

2- الـ Transformation:

عملية الـ Transformation تعتمد على دخول قطعة الـ DNA (insert) المحملة على الناقل داخل الخلية الجرثومية عبر غشائها الخلوي، لا تحدث بشكل طبيعي إلا نادرا أما في المخبر تستخدم مواد كيميائية أو عوامل فيزيائية لإجبار الخلايا الجرثومية على أخذ الـ DNA وتسمى الخلايا الجرثومية الجاهزة مخبريا لأخذه بهذه الطريقة (competent cells).

إن قطع الـinsert و قطع الناقل و محاولة وصلهما معا ومن ثم إجراء عليهما عملية الـ transformation فنكون أمام 3 احتمالات:

1- عدم دخول الناقل الهجين إلى الخلية المضيفة.

2- ارتباط الناقل مع نفسه و دخوله للخلية بدون أن يحمل قطعة الـ DNA المرغوبة (INSERT).

3- ارتباط الناقل بالـINSERT ويدخل إلى الخلية المضيفة.

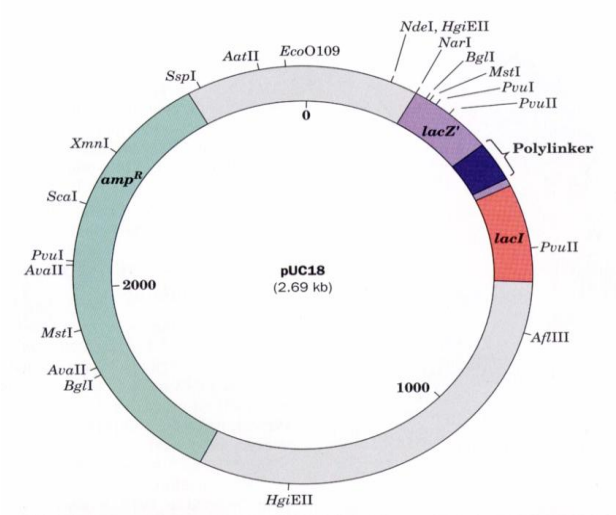
للتأكد من نجاح عملية الـ transformation يختلف الأمر باختلاف الناقل، نأخذ مثال على ذلك أحد أنماط البلاسميد pUC18 يملك ori و ampR و lacZ التي توجد بداخلها الـ Linker.

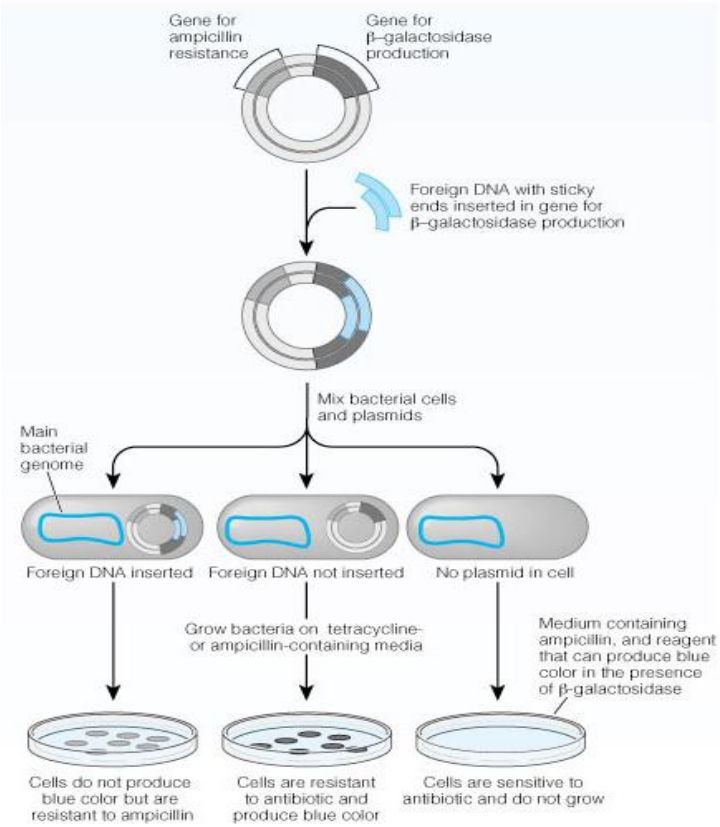
المورثتان ampR و lacZ تعتبر واصمات انتقائية تستخدم كل واحدة منهما لاستبعاد أحد الاحتمالات الثلاثة.

- تستخدم المورثة ampR لاستبعاد الاحتمال الأول حيث تزرع الخلايا على وسط يحوي الأمبيسلين فتنمو الخلايا المقاومة للأمبيسلين فقط وهذا يشير إلى دخول الناقل إلى الخلية المضيفة.

تستعمل الخلية المضيفة سكر اللاكتوز لحياتها ومن أجل هذا تحتاج إلى العديد من الأنزيمات منها أنزيم B-galactosidase الذي يعمل على ركائز طبيعية ويمكنه أن يعمل على ركائز صنعية مثل x-gal فيعطي نتيجة تفاعله مع الركازة مركب يلون أزرق والمورثة المسؤولة عن إنتاج هذا الأنزيم هي مورثة lacZ .

عند اختبار الخلايا بالركازة الصنعية أي إضافة x-gal إلى الوسط وإنتاج اللون الأزرق يشير هذا إلى وجود المورثة lacZ وعدم نجاح عملية إدخال الـ insert، أما إذا لم ينتج اللون الأزرق والحصول على مستعمرات بيضاء يشير هذا إلى غياب المورثة lacZ لأن الـ insert توضعت ضمنها وخربتها.





الشكل 48: التحقق من عملية نجاح الـ Transformation

الاستنساخ

الاستنساخ : هو عملية تكوين كائن حي باستخدام خلايا غير جينية من خلايا الجسم و نقصد هنا بالخلايا الجينية الحيوان المنوي و البويضة, و هذا الكائن المتكون يكون مطابقا من حيث الجينات للحيوان المأخوذة منه الخلية الجسمية.

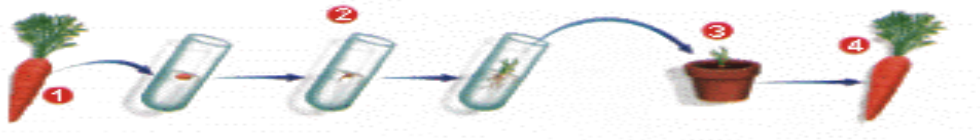
عرف الاستنساخ في الحيوانات والنباتات الأولية الدنيا ذات الخلية الواحدة حيث تنقسم الخلية إلى خليتين متماثلتين كما وجد في الخميرة والاميبا والبكتريا ومع ظهور صور الحياة الأرقى قضت حكمة الخالق أن يختار للتكاثر أسلوبا أرقى وهو التزاوج بين الإناث والذكور لتنشأ عنها أنساقا" متنوعة من النسل فحفلت الحياة بتعددية رائعة الأشكال والأنساق فاختلفت الإخوة في الأشكال وتحولت الحياة إلى متحف بديع ثري من الأشكال والألوان والأنواع والأصناف فأصبح للعنكبوت مائة ألف صنف والخنافس مائتان وسبعون ألف صنف وأصبحت الحياة ولادة تلقى بالجديد كل لحظة في غنى وثراء وتناسق وتوازن لتدل على قدرة الخالق العظيم في الخلق.

في مجال التقانة الحيوية كلمة استنساخ تعني إعادة إنتاج جينات، خلايا، أو عضيات اعتبارا" من نفس الوحدة الأصل، ومشابه تماما" لها.

بالإضافة، من الممكن إنتاج نسخ جينية طبق الأصل لجين معين (المورثة) أو لخلية أو لمتعضية.

في العالم النباتي: استخدم الاستنساخ بشكل كبير في العالم النباتي و التي تقدمت أبحاثه و أنتجت العديد من الأنواع النباتية النادرة بهذه الطريقة (الشكل 49).

ومنذ فجر البشرية حيث استخدم الإنسان أجزاء نباتية لإكثارها عدديا وتكون نسخ منها أثناء عملية إكثاره للنباتات. تم حديثا وعلى نطاق واسع جدا من خلال تقنية زراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء النباتية واعتمدت تلك التقنية على القدرة الذاتية للنبات في الاستنساخ أو تكوين نبات كامل من عضو معزول أو نسيج أو خلية أو عدة خلايا, فالنبات لا يفقد قدرته على التشكل وتميز الخلايا إلى أنسجة والأنسجة إلى أعضاء بل إن الخلايا البالغة عادة ما يكون لها القدرة على الرجوع إلى حالة الطفولة أو تكوين خلايا إنشائية يمكن بدأ التخليق من جديد.



الشكل 49: منذ 70 عام استطاع الإنسان الحصول على نباتات تشبه النبات الأصلي مثل الجزر. (2) استئصال خلية جسمية من الجزرة الأم وزرعها في وسط الزرع. (3) الخلية تعطي جزرة جديدة التي زرعت في التربة. (4) الجزرة الجديدة مطابقة وراثيا" للجزرة الأم.

إن الاستنساخ الإنساني أو الحيواني الطبيعي وجد منذ أن خلقت البشرية على وجه الأرض، مثل التوائم الحقيقية الناتجة من انقسام بيضة ملقحة واحدة، والتي بعد الانقسام إلى خليتين بنات تكونان متطابقتان وراثيا"، ومن ثم تنفصلان عن بعضهما البعض بشكل كامل، ويتطوران بشكل مستقل.

منذ عشرين عاما" طبق الاستنساخ في مجال التقانة الحيوية و البيولوجيا الجزيئية من إنتاج أدوية ولقاحات لمعالجة النوبات القلبية، وأمراض الكلى، وأنواع مختلفة من السرطانات، بالإضافة لمرض الكبد الفيروسي، والأكياس الليفية، و أمراض أخرى.

نستطيع الذكر في هذا المجال نوعين من طرق الاستنساخ:

1- الاستنساخ الجزيئي: هو استنساخ أحد أجزاء من الـDNA الذي يحوي الجينات (المورثات)، ومضاعفته داخل وسط بكتيري.

تستخدم هذه التقنية في مجال الوراثة العلاجية، لصناعة اللقاحات، الأدوية، والاختبارات الوراثية.

2- الاستنساخ الخلوي: هو إنتاج مجموعة نسخ من نفس الخلية مطابقة لها، لاستخدامها في الأبحاث الدوائية.

يوجد نمطين آخرين من الاستنساخ والتي تهمنا بشكل خاص في موضوعنا، وهذين النمطين يدعى استنساخ تكاثري والذي يعني الحصول على فرد أو متعضية متطابقة جينيا".

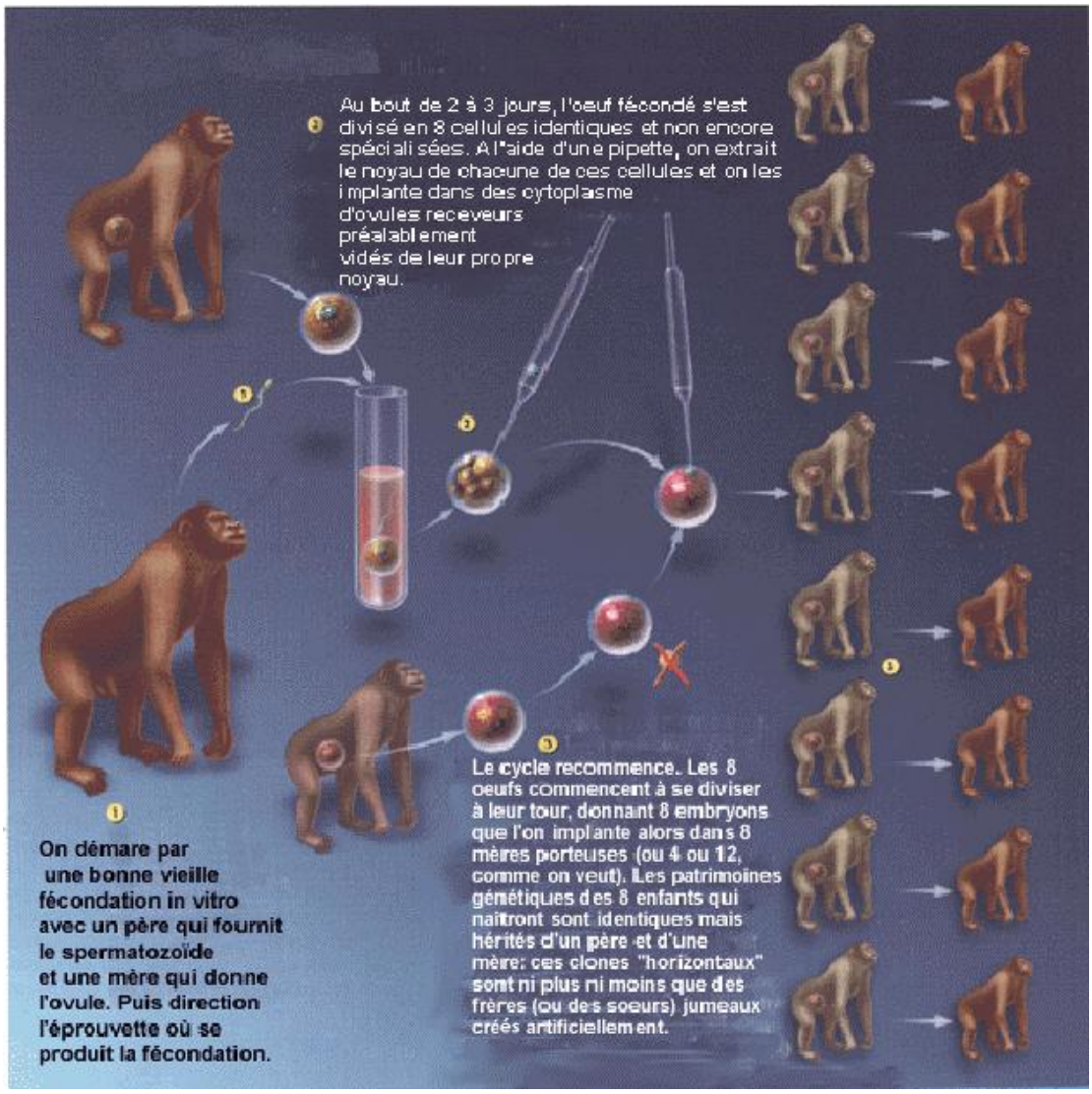
هذين النوعين هما:

1- ***التوائم الجنينية***: ويدعى أيضا" استنساخ بواسطة فصل البلاستومر (جنين في طور 2 أو 8 خلايا).

للحصول مخبريا" على هذه التوائم الجنينية وذلك عن طريق الخطوات التالية: نزع الجنين ثم قسمه إلى قسمين والحصول على توائم متشابه بشكل تام (وهذا ما يحصل في حالة التوائم الحقيقية بشكل طبيعي).

تطبق هذه الطريقة في العمل المخبري (***In Vitro***)، وتخدم لزيادة حظ نجاح الإلقاح بإنتاج أكبر عدد من الأجنة.

(استخدمت هذه الطريقة في الولايات المتحدة الأمريكية) (الشكل 50).



الشكل 50 : 1- نبدأ من عملية إلقاح صناعي في المخبر من نطفة وبويضة، 2- في نهاية اليوم الثاني أو الثالث بعد الالقاح، تنقسم البيضة الملقحة إلى ثمانية خلايا متشابهة، ولكن ليست متخصصة (ليست متمايزة)، ومن ثم نزع النواة من كل خلية بواسطة بيبت (pipette) خاصة لهذا الغرض وزرع كل نواة في سيتوبلاسما بويضة أخرى منزوعة النواة مسبقا". 3 – تبدأ من جديد دورة خلوية جديدة على البويضات الثمانية ويطرأ عليهم الانقسام وتعطي من جديد 8 خلايا جديدة، فتزرع في ثمانية إناث أو أربعة أو أثنى عشر حسب حاجة الباحث العلمي. الإرث الجيني للمواليد الثمانية هو نفسه لأن الثمانية من أب واحد و أم واحدة، وتسمى التوائم المستنسخة مخبريا".

أجريت تجربة مشابه لتلك التجربة في كانون الثاني عام 1999 وأعطت ولادة قرد واحد من بين أربعة أجنة لم تكتمل، وسمي هذا القرد تترا (Tetra) (الشكل51)، لا نستطيع القول عن القرد تترا أنه مستنسخ لأنه الوحيد الذي بقي على قيد الحياة من بين أخوته، فهو يحوي على حقيبة وراثية شخصية (50% من الأب و50% من الأم)، ولكن إذا افترضنا أن أحد من أخوته بقي على قيد الحياة، في هذه الحالة يملك نفس الـDNA، إذا" تسمى في هذه الحالة استنساخ.

استخدمت هذه التقنية للحصول على عدد كبير من الأفراد وكأنه إنتاج بشكل طبيعي في حالة التوائم الحقيقية عندما تلد بشكل طبيعي.

الشكل 51 : القرد تترا (Tetra)

2- النقل الجسمي النووي(TSN):.(SCNT (Somatic Cell Nucleus Transfer وهو عزل نواة خلية جسمية من كائن حي وحقنها في بويضة كائن حي أخر منزوعة النواة مسبقا"، هذه النواة ممكن أن تتطور إلى جنين ومن ثم إلى فرد.

فريق البحث العلمي **Ian Wilmutt** العامل في مخبر التقانة الحيوية في انكلترا، كان أول فريق عمل علمي نجح باستخدام هذه التقنية وتوجت بولادة النعجة الشهيرة دولي عام **1997** التي أحدثت ثورة في عالم الاستنساخ.

النعجة دولي (Dolly):

شباط 1997 أعلن فريق البحث العلمي **Ian Wilmutt** ولادة النعجة الشهيرة دولي التي تملك نفس الكود الجيني (DNA) لوالدتها، بفرض أن دولي ولدت من عملية جنسية طبيعية يكون نصف الكود الجيني لها من الأب والنصف الآخر من الأم.

لكن دولي تحوي نفس المحتوى الوراثي الذي تملكه والدتها، لذلك تدعى نسخة طبق الأصل عن والدتها، ممكن القول أيضا" أنها توأم حقيقي عن أمها ولكن ولدت بعدها بسنوات عديدة .

ما هو المختلف عند النعجة دولي عن غيرها؟

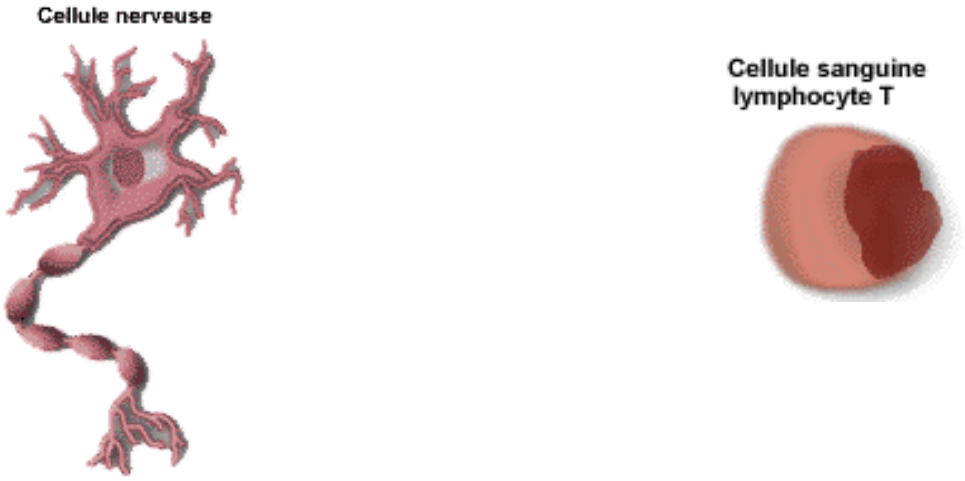
نجح العلماء منذ زمن بعيد استنساخ الكثير من المتعضيات ولكن هل هناك اختلاف عن استنساخ النعجة دولي؟ الخلاف هو أن النعجة دولي هو أول كائن حي استنسخ باستخدام خلية حيوانية متمايزة.

الخلية المتمايزة

مثال الخلايا اللمفاوية T التي تشكل جزء من نظامنا المناعي تشبه قليلا" الخلايا العصبية من حيث المنشأ ولكنها متمايزة عنها ولها وظائف متخصصة بقدرتها على مقاومة العدوى، بينما الخلايا العصبية لها القدرة على نقل واستقبال السيالات العصبية الكهربائية (الشكل 52).

يجب أن لا ننسى أن كل خلايانا ابتداء" من خلايا القلب، الرئتين، العضلات حتى الوصول إلى الخلايا العصبية، تنشأ في الأصل من خلية واحدة ليست متخصصة (ليست متمايزة) تملك المحتوى الوراثي الواحد، ولكن تتمايز الخلايا لتملك القدرة على أداء وظائفها على أتم وجه.

قبل ولادة النعجة دولي القليل من العلماء فكروا أن عملية تمايز الخلايا هي عملية انعكاسية عند الثدييات، و هذا يعني الحصول على خلايا جنينية غير متمايزة اعتبارا" من خلية متمايزة من فرد بالغ والتي تقود لولادة كائن حي جديد يشبه الأصل.



الشكل 52: يمينا" الخلية اللمفاوية T، يسارا" الخلية العصبية

السؤال الذي يطرح نفسه كيف استطاع الفريق العلمي **Ian Wilmutt** النجاح باستنساخ النعجة دولي الناتجة من خلية متمايزة من ضرع نعجة بالغة؟

للإجابة عن هذا السؤال يجب أن نتذكر قليلا" الدورة الخلوية.

الدورة الخلوية:

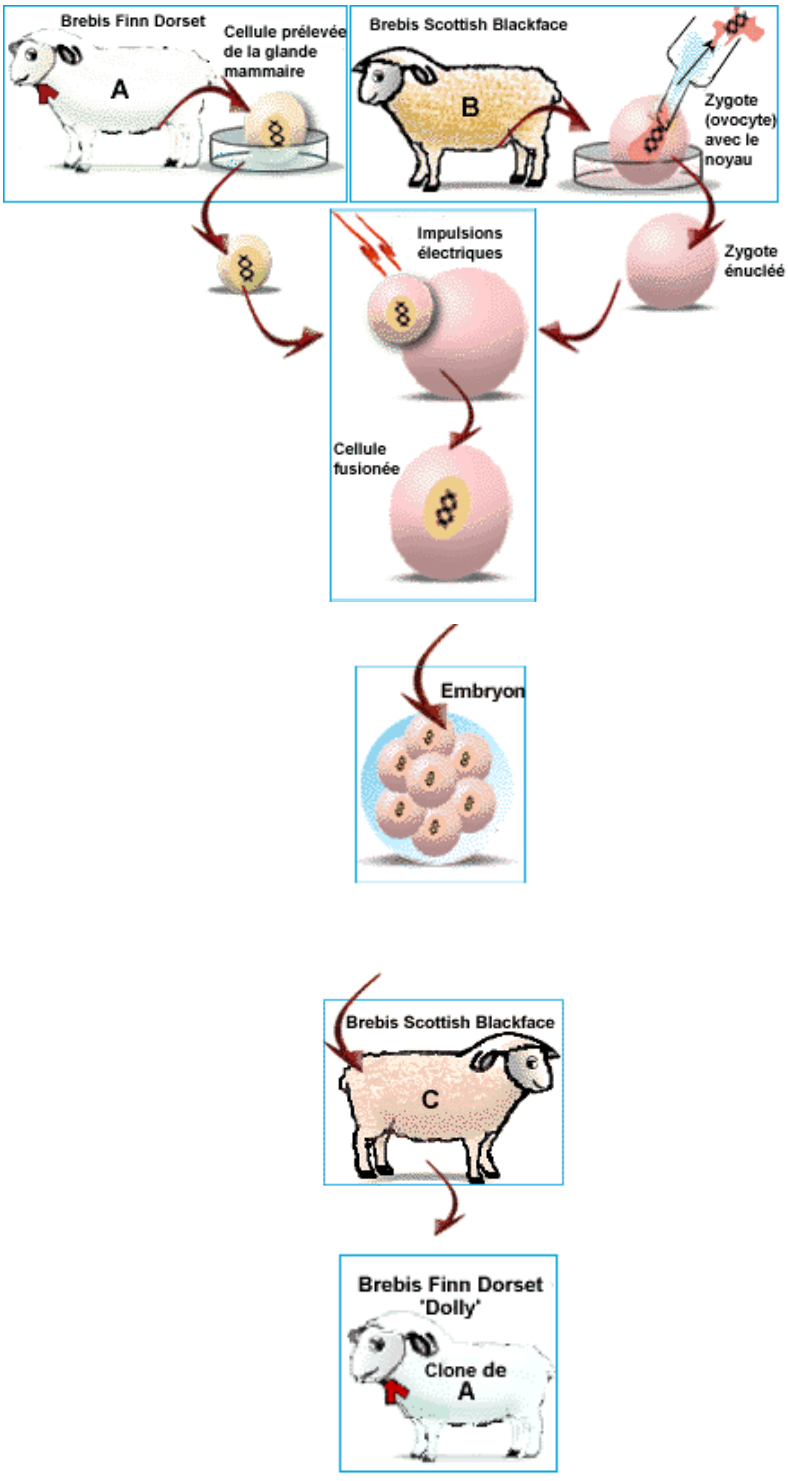
العديد من الخلايا تخضع للدورة الخلوية والتي خلالها هذه الخلايا تنمو ويتضاعف المحتوى الوراثي لها، وكل خلية تنقسم إلى خليتين بنات أصغر من الخلية الأم، هذه الخلايا البنات تنمو بدورها من جديد ويتضاعف محتواها الوراثي وتخضع للانقسام من جديد لتعيد الدورة الخلوية من جديد وهكذا.....

- بعض الخلايا تمر في هذه الدورة عدة مرات ومن ثم تصل لمرحلة السكون.تتوقف بشكل نهائي مراحل تطور الخلية الساكنة، وهذا يعني توقفها عن الانقسام وليس موتها أو تحولها لشكل غير فعال.

مثال: كل خلايا الدماغ تدعى الخلايا الساكنة، ولكن في نفس الوقت هي خلايا حية، فعالة، نشطة تنشغل بامتصاص أو هضم المواد الغذائية الضرورية لتبقى على قيد الحياة للقيام بوظائفها بإرسال السيالات العصبية الكهربائية في كل خلايا الجسم، لتسمح لنا على سبيل المثال بالحركة، الكلام، التفكير، ولكن في الوقت نفسه هذه الخلايا هي ساكنة توقفت عن الانقسام في وقت مبكر.

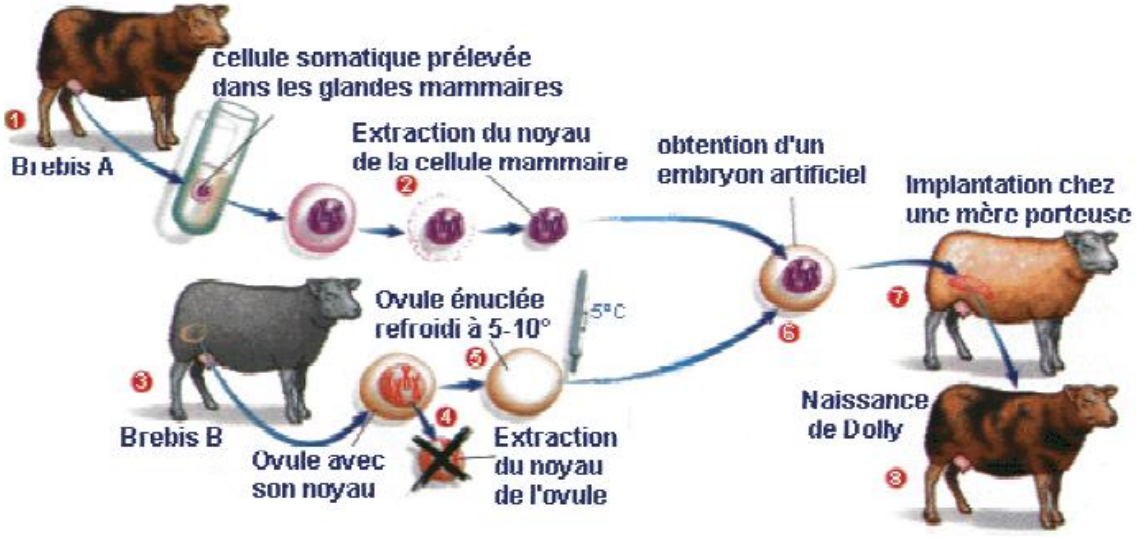
- وجود بعض الجزيئات تدعى عوامل النمو والتي تحفز الخلية على الانقسام وتسمح لها بالعبور بالمراحل المختلفة من الدورة الخلوية. بغياب هذه العوامل خلال أسبوع واحد فقط في طبق الزرع المخبري، يحرض على تحويل الخلايا إلى خلايا ساكنة.

إذا" سبب نجاح فريق العمل العلمي **Ian Wilmutt** هو قدرته على إعادة السكون للخلايا المتمايزة المأخوذة من ضرع النعجة قبل نزع نواتها ومن ثم زراعتها في بويضة منزوعة النواة، والذي أدى هذا بسبب أو بأخر لإعادة برمجة البيضة من جديد وإعطاء نسخة جديدة مطابقة للنعجة الأصل.
الشكلين الآتيين يوضحان الطريقتين المستخدمتين من قبل فريق البحث لخلق النعجة دولي (الشكل 53) و (الشكل54).



الشكل 1:53- زرع خلية منزوعة من ضرع النعجة A. 2- نزع نواة من بويضة النعجة B. 3- صهر الخلية المالكة لمخزونها الوراثي مع البويضة المنزوعة النواة عن طريق الصدمة الكهربائية. 4- الحصول على خلية واحدة مالكة للمحتوى الوراثي للخلية المتمايزة. 5- الحصول على جنين بالانقسام. س- زرع الجنين في رحم النعجة C.

الشكل 54: 1- نزع خلية جسمية من ضرع النعجة A. 2 – استخلاص النواة من الخلية الجسمية الثديية.
3 – استخلاص بويضة مع نواتها من النعجة B. 4 – نزع النواة من البويضة. 5 – إعادة تبريد البويضة المنزوعة النواة. 6 – حقن نواة الخلية الجسمية داخل البويضة المنزوعة النواة والحصول على جنين.
7 – زرع الجنين داخل رحم النعجة C. 8 – ولادة النعجة دولي.



بعد دولي:

بعد ثلاثة سنوات من ولادة النعجة دولي، تطورت بشكل كبير تقنيات الاستنساخ مع الأخذ بعين الاعتبار أن فريق البحث **M. Wilmut** أجرى 276 تجربة حتى نجح أخيرا" باستنساخ دولي.

تموز **1998** أعلن علماء هاواي في الولايات المتحدة الأمريكية عن تطبيق تقنية استنساخ معدلة قليلا" عن السابقة، والتي استخدمت من أجل استنساخ فئران.

في نفس الوقت في الصين حاولوا إنقاذ الباندا العملاق عن طريق تقنية الاستنساخ.

فوائد الاستنساخ:

1- يفيد الاستنساخ في المحافظة على السلالات النادرة سواء كانت نباتية أو حيوانية ومعرضة للانقراض بسبب التلوث الصناعي وخوفا من أن تتحمل البشرية أثار الافتقار إلى التنوع البيولوجي Biodiversity الذي قد يعرض البشرية للمخاطر فيقوم الاستنساخ هنا بمهمة لا نجد بديل عنها.

وهو ما تقوم به الدول المتقدمة وهو ما يعرف بالبنوك الوراثية والتي يتم فيها جمع السلالات والأنواع النادرة وحفظها وإكثارها واستنساخها من اجل الحفاظ على معلوماتها الوراثية والتي تعتبر مصدر لمربى النبات والحيوان للاستفادة منها والآخذ منها في استحداث وتطوير نباتاته وحيواناته من خلال التقنيات الحديثة في التربية كالهندسة الوراثية ونقل الجينات.

2- يفيد الاستنساخ في مجال البحث العلمي فمثلا إنتاج فأر ليكون موديلا لفأر آخر يعانى من مرض وراثي محدد لإجراء تجارب علاجية وراثية لتحديد أفضل سبل العلاج والتي يمكن تطبيقها على الإنسان يكون، هنا للاستنساخ فائدة عظيمة لاختيار أفضل الطرق الصالحة للبشرية.

3- إكثار الحيوانات المهندسة وراثيا لإنتاج العقاقير، بمعنى مضاعفة المصانع الحيوية عدديا لزيادة إنتاج العقاقير.

4 - إكثار التراكيب الوراثية التي أثبتت كفاءتها في إنتاج الغذاء للبشر.

عندما بدأ علم الهندسة الوراثية يخطو خطواته الأولى في التشخيص الوراثي قوبلت الأبحاث بالرفض ولكن بعد الانتهاء من مشروع الجينوم البشري ومعرفة أن حوالي 3% من الجينات بجينوم الإنسان مسئولة عن الأمراض الوراثية فقد فتحت الآفاق للعلاج الوراثي . لذلك ثمة أسباب قوية تدعونا إلى الاعتقاد والتوقع في إشراك الإنسان في تجارب الاستنساخ فهناك أناسا" يتطلعون إلى الإنجاب وآخرين يتطلعون إلى الخلود وهناك من العلماء يطمحون في إيجاد أجناس راقية أي تحقيق حلم هتلر الذي اخفق فيه وقد يقول البعض لماذا التضحية بعباقرة مثل اينشتاين إذا ما ولدوا واظهروا نبوغا خارقا لماذا لا نعمل على استنساخهم للاستفادة بعبقريتهم لأطول وقت ممكن ورغم معارضة وقلق الكثيرين فإن الكثير لا يشكون في استمرار تلك التجارب رغم المعارضة خاصة عندما يجدون أن معارضة لإنجاب أطفال الأنابيب لم تنجح في الحد من إجراء تلك البحوث.

ماذا عن الاستنساخ البشري؟

لا زالت هذه العمليات في الوقت الراهن محددة جدا بسبب القيود التي تفرضها الحكومات على هذه الأبحاث لما لها من مشاكل تهدد الجيل البشري حيث أن معظم التجارب في المجال فاشلة و هي بحاجة إلى تمويل مادي كبير و خبرات عالية المستوى حيث أن 90% من التجارب تفشل في تكوين جنين و أكثر من 100 عملية نقل نواة خلية قد تحتاج لتكوين جنين واحد ناجح.

أيضا هناك عوائق أخرى أمام هذه الأبحاث منها أن الحيوانات التي تكونت عن طريق الاستنساخ تعاني من ضعف شديد في جهاز المناعة و كذلك سرعة الإصابة بالأورام و خاصة الخبيثة منها و أمراض أخرى تصيب الجهاز العصبي ويعتقد بوجود مشاكل في القابلية العقلية و التي يصعب إثباتها بالنسبة للحيوانات المستنسخة لعدم حاجتها للقدرات العقلية مثل الإنسان كذلك وجد بعض الباحثون في اليابان أن الحيوان المستنسخ يعيش بحالة صحية رديئة و الكثير منها يصاب بالموت المفاجئ. و من الجدير بالذكر هنا أن النعجة دولي تم قتلها في شباط عام 2003 بإبرة خاصة بعد إصابتها بسرطان الرئة و عوق شديد و التهابات في المفاصل بعمر 7 سنوات رغم أن أقرانها قد تصل لعمر 11- 12 عاما و بعد تشريحها تبين خلوها من أي مشاكل عدا سرطان الرئة والتهاب المفاصل.

نتيجة لكل ما تقدم ذكره كان من الضروري اتخاذ تدابير شديدة لمنع إجراء هذه التجارب على البشر و تم إصدار قوانين صارمة في معظم دول العالم منها أميركا و أوروبا و اليابان لحظر هذه التجارب.

إذا" منع الاستنساخ البشري دينيا"، أخلاقيا" وعالميا"

سرطان الثدي عند أنثى الإنسان و عند أنثى الكلب

السرطان هو تهيج الخلايا بصورة مفاجئة و انقسامها بشكل عشوائي وغير منظم و التي تأخذ فيما بعد الصفة العدائية، و تكون قادرة على غزو أنسجة مجاورة وتدميرها، أو الانتقال إلى أنسجة بعيدة في عملية تطلق باسم الـ metastases. كمل يمكن أن يتطور الورم الحميد إلى ورم خبيث في بعض الأحيان.

هناك ثلاثة مراحل لتحول الخلية الطبيعية الحية إلى خلية سرطانية:

1مرحلة البداية : وتوافق بداية التغيير في نشاط الخلية.

2 مرحلة التطور: مرحلة إنشاء وتطور الخلايا السرطانية.

3 مرحلة الهجرة: هجرة الخلايا السرطانية، وعدم خضوعها لعملية الموت المنظم.

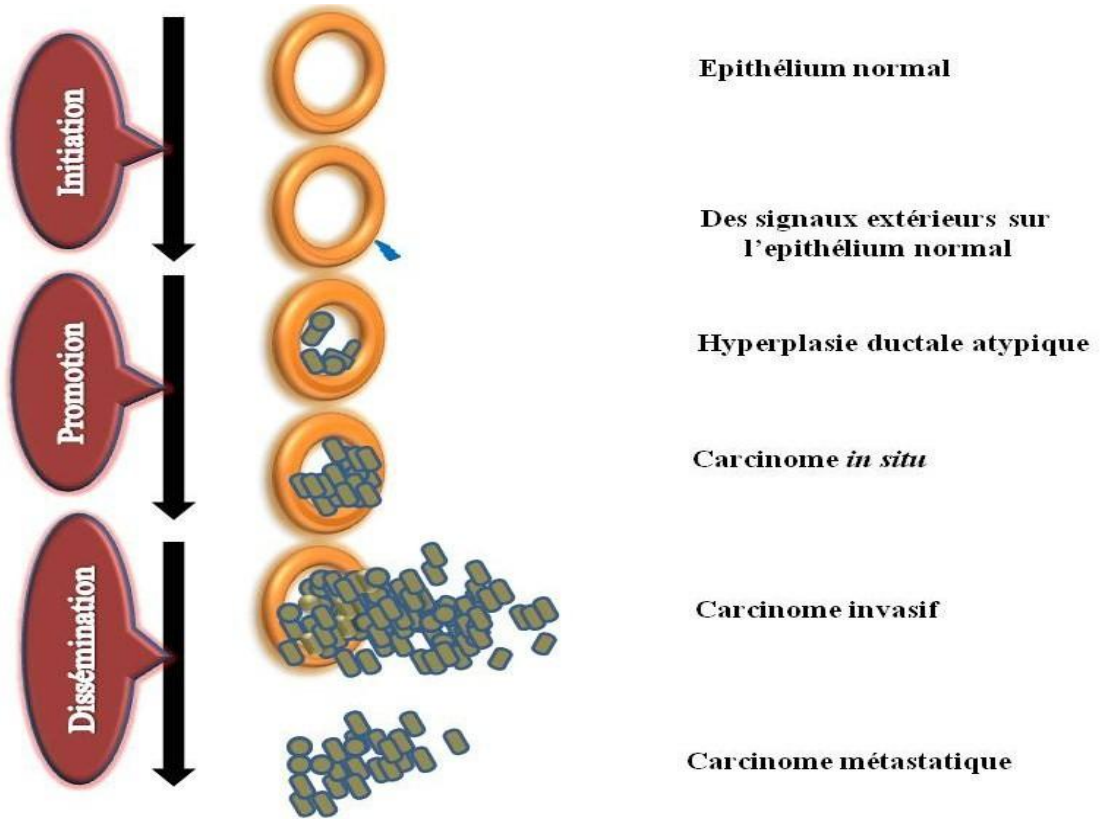
أمثلة على بعض أنواع السرطانات:

- سرطانة ظهارية Carcinoma: وهي سرطانات تنبع من الخلايا الظهارية. وتشكل اكبر مجموعة من السرطانات عامة، وخصوصا في سرطان الثدي والبروستات والرئة والبنكرياس.
- ساركومة Sarcoma: وهي سرطانات تنبع من النسيج الضام.
- ليمفوما Lymphoma و الليوكيميا Leukemia: وهما سرطانان ينبعان من الخلايا المكونة للدم.

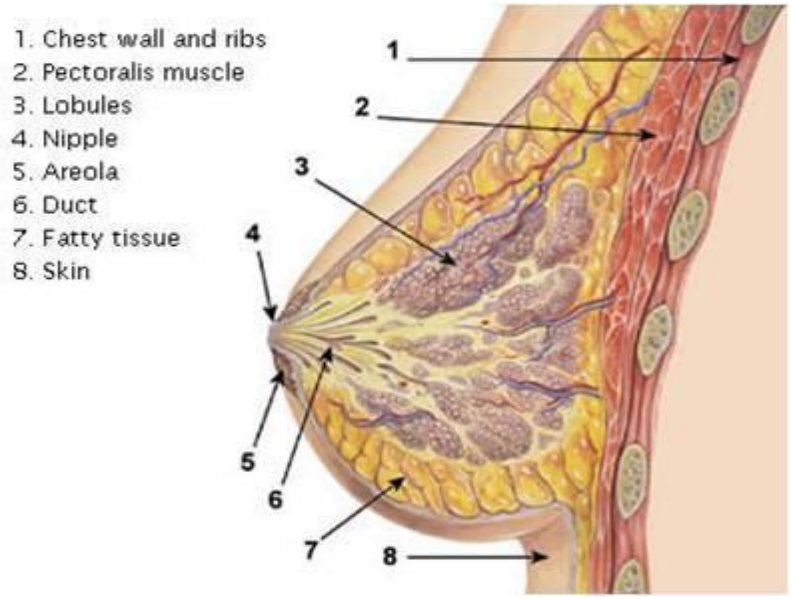
ومن بين السرطانات سنلقي الضوء على سرطان الثدي.

يعتبر سرطان الثدي في وقتنا الحالي من الأمراض التي تحتل مكانا" واسعا" في الحياة الطبية، بسبب انتشاره الكبير في العالم، مع تسجيل مليون حالة وفاة تقريبا" كل عام.

سرطان الثدي هو أحد أكثر أنواع السرطانات شيوعاً بين النساء، تنشأ أورام الثدي من الغدد الداخلية والقنوات الداخلية بالثدي المسؤولة عن إفراز الحليب ولا تنشأ من الغدد والخلايا الدهنية والتي تمثل أغلب حجم الثدي.



الشكل 55: مراحل تحول الخلية الطبيعية إلى خلية سرطانية



الشكل 56: الشكل المورفولوجي للثدي

ليس كل تغير في الثدي هو ورم وليس كل ورم هو خبيث، لكن يجب عدم إهمال أي ورم أو أي تغير في شكل الثديين ومن المهم مراجعة الطبيب في الحالات التالية:

- ظهور كتلة في الثدي.
- زيادة في سماكة الثدي أو الإبط.
- إفرازات من الحلمة.
- انكماش الحلمة.
- ألم موضعي في الثدي.
- تغير في حجم أو شكل الثدي. الغدد والخلايا الدهنية والتي تمثل أغلب حجم الثدي.

علما" بأن بعض هذه التغيرات تحدث طبيعيا" عند الحمل أو الرضاعة أو قبل الحيض وبعده عند بعض النساء.
في العالم، سرطان الثدي من السرطانات الأكثر انتشارا" وتشخيصا" مقارنة" مع السرطانات الأخرى،يظهر سنويا" **1050000** حالة إصابة بهذا المرض عالميا"، منها **580000** متواجدة في الدول المتطورة (أمريكا وأوربا) مع **400000** حالة وفاة كل عام.

أنواع سرطانات الثدي:
هناك الأورام الحميدة التي يكون تكاثرها محدود و موضعية، أما الأورام الخبيثة (تدعى السرطان) التي تميل للانتشار وتحطيم النسج المجاورة.

بشكل عام الورم الحميد ممكن الشفاء منه بسهولة، لكن الورم الخبيث ممكن أن يتطور بسرعة هائلة ويسبب الوفاة للمريض بانتشاره السريع وتحطيم الأعضاء الحية الأخرى.

هناك نوعين أساسين للأورام السرطانية الثديية الخبيثة:

1- السرطانات الثديية الموضعية Breast Cancers in-situ

وهي أورام ثديية تتكون من خلايا متهيجة خبيثة التي تتميز بعدم قدرتها على الهجرة إلى النسج المجاورة، وعدم اختراقها للطبق الأساسية التحتية للخلايا أي تبقى موضعية داخل الثدي.

وهناك نوعين من هذه السرطانات حسب موضع الإصابة:

- **Ductal Carcinoma In Situ** :

حيث يصيب هذا النوع قنوات الغدد الثديية، والنوع الآخر يدعى

- **Lobular Carcinoma In Situ**: الذي يصيب فصوص الغدد الثديية.

إن التشخيص المبكر لهذا المرض ضروري جدا" من أجل معالجته بشكل مبكر لكي لا يتطور إلى النوع العدائي، ومعالجته قبل تحوله إلى هذا النوع يسمح من الشفاء منه بشكل حتمي.

2- السرطانات الثديية العدائية (الاجتياحية): Invasive Breast Cancer

وهذا النوع من السرطانات قابلة للانتشار، ويصيب قنوات وفصوص الغدد الثديية، ولكن نسبة السرطان العدائي الذي يصيب القنوات الثديية تمثل 80% من السرطانات الثديية المهاجرة وينتشر بعدها لباقي الثدي بسرعة هائلة.

و يتم تصنيف الورم إلى أربع مراحل أخطرها المرحلة الرابعة وأفضلها المرحلة الأولى ....حيث يخترق الورم الطبقة التي نشأ منها إلى طبقه داخلية أعمق ويقوم بإرسال الفتات (الناشئ من تكسر الورم)..إلى الدم وهو مكمن خطورة السرطان.

أما السرطلن العدائي الذي يصيب فصوص الغدد الثديية لا تتجاوز نسبته الـ 4% من أنواع السرطانات الثديية الأخرى المهاجرة.

دراسة أمريكية حديثة نشرت عام 2013، أظهرت **232.340** حالة امرأة مصابة بالنوع العدائي و **64.640** بالنوع الموضعي، وسجلت حالات الوفاة لـ **39.620** حالة. و أظهرت الدراسة ذاتها وجود **2.240** من الرجال المصابين بسرطان الثدي، منهم **410** حالة وفاة.

هذا المرض منتشر بشكل كبير عند إناث الكلب مثل عند الإنسان، وهو من السرطانات الأكثر تشخيصا" مقارنة" مع السرطانات الأخرى, لأنها من السرطانات الخارجية عكس السرطانات الداخلية المنشأ التي تكون صعبة التشخيص. ونظرا" لتطور السرطانات وكثرتها في أنحاء العالم البشري، اهتم الأطباء البشريين بتطوير الأساليب الحديثة والتقنيات لمعالجة السرطانات، الأمر الذي خدم الأطباء البيطريين بشكل كبير ومفيد.

المقارنة بين سرطان الثدي عند المرأة وعند أنثى الكلب

من الصعب المقارنة بينهما، حيث أن الدراسات المرضية البيطرية تشمل دراسة الأورام الثديية الحميدة والخبيثة في آن واحد، بينما الدراسات المرضية عند الإنسان تشمل دراسة سرطان الثدي (الورم الخبيث).

سنويا" يصاب بمعدل **200** إلى **260** أنثى كلب من **000 100** أنثى، والتي تكون **20%** إلى **50%** منها أورام ثديية خبيثة. بينما عند المرأة **37,4** حالة من **000 100**.

بالإضافة إلى أن خطر الإصابة بهذا المرض يزداد بنسبة **2,5%** إلى **25%** عند أنثى الكلب، بينما عند المرأة يزداد بنسبة **10%**.

إن أسباب سرطان الثدي غير معروفة ولكن هناك عوامل تزيد من خطورة الإصابة والتي تعتبر عوامل تنبيه لحدوث سرطان الثدي.

1- العمر:

عند المرأة: تزداد احتمالية إصابة المرأة بسرطان الثدي مع التقدم في السن ، حيث أن نسبة الإصابة نادرة قبل سن الثلاثين، بالمقابل هو كثير الشيوع في الـ 60 و الـ 64 من عمر المرأة وحتى الـ74 من عمرها.

عند أنثى الكلب: العمر الوسطي للتشخيص يقع بين 8 إلى 10سنوات، وهو نادر قبل عمر السنتين.

2 – الأصل:

عند المرأة: الدراسات التي أجريت في الولايات المتحدة الأمريكية أثبتوا أن النساء ذات العرق الأبيض تملك خاصية الإصابة بهذا المرض أكثر من النساء الأمريكيات ذات العرق الأفريقي، وهذا ممكن ربطه بالحالة الاجتماعية و الثقافية.

عند أنثى الكلب: الأصل النقي معرض للإصابة بهذا المرض أكثر من الهجين، مثلا'' البيرجه الألماني من الأنواع المعرضة بشكل كبير.

3- تاريخ العائلة:

هذا يعني تاريخ مرضي عائلي سابق لهذا المرض، عندما تكون فردين من أفراد العائلة على الأقل ذات القرابة من الدرجة الأولى (الأم، الجدة، الخالة.....) قد أصيبتا بهذا المرض قبل سن الخمسين.

4 – العامل العائلي و الوراثي:

عند المرأة:

5% إلى 10% من سرطان الثدي المشخص يحمل علاقة مورثية، يميز نوعين من الجينات الكابحة لسرطان الثدي وهما BRCA1 و BRCA2 (BReast CAncer 1 and 2).

هناك طفرات أو تغيرات تطرأ على هذه المورثتين فتؤدي إلى تعطيل عملهما وبالتالي عدم قدرتهما على إيقاف التغيرات العشوائية في خلايا الثدي وبالتالي تحولهم إلى خلايا سرطانية.

أكدت الدراسات المرجعية أن احتمالية تطور سرطان الثدي عند المرأة التي تحمل طفرة على الجين BRCA1 تصل إلى 65% بينما النسبة هي 45% التي تحمل طفرة على المورثة BRCA2 وذلك قبل سن السبعين من العمر.

بالإضافة للفعل الأساسي لهاتين المورثتين، هناك مورثات أخرى ليست أساسية لها علاقة بحدوث سرطان الثدي. حيث أنه أقل من 5% من هذه العائلات تملك طفرات على:

- الجين المساهم في تنظيم الدارة الخلوية (*CHEK2* : *checkpoint homolog 2*).
- الجينات العاملة على تصليح الـ DNA (*ATM: Ataxia-Telangiectasia- Mutated* و *TP53: Tumor Protein 53*).
- الجينات الداخلة في استقلاب الهرمونات السيتروئيدية

(*CYP17, CYP19: cytochrome P450 17 et 19*)

- الجينات المساهمة في نظام إزالة التسمم بالمسرطنات

(*GSTM1* ou *glutathion S-transférase M1),*

(GSTP1 g*lutathion S-transférase p1)*

(NAT2 ou *N-acétyltransférase 2*)

النساء الحاملة لهذا النمط من الطفرات تزداد عنده احتمال الإصابة بسرطان الثدي بشكل مضاعف.

الدراسات أكدت أن سرطان الثدي المورثي يظهر بشكل عام بوقت مبكر قبل سن الأربعين.

عند أنثى الكلب: لم يدرس بشكل كبير هذا العامل عند أنثى الكلب، فقط دراسة واحدة أجريت على 28 عائلة عائلة لنفس الفصيلة (خمس أجيال)، وبعد التحليل الإحصائي للإصابة، لوحظ ظهور عائلة حساسة لهذا المرض (نسبة الإصابة 50% بالورم الخبيث عند العمر 13,5)، وظهور عائلة مقاومة (نسبة الإصابة 50% بالورم الخبيث عند العمر 17).

أما التحاليل النسيجية الكيميائية لم تظهر طفرة على المورثة P53 (المورثة الكابحة للورم)، ولم تظهر تغير على المورثة erbB-2 (المورثة المحفزة للتكاثر)، إذا" احتمال الإصابة بهذا المرض لهذه الفصيلة هو طفرة أصابت المورثات BRCA1 و BRCA2.

بشكل مختصر العامل العائلي الوراثي لم يحدد بشكل حتمي عند أنثى الكلب.

5 – العوامل الهرمونية: ومنها

أ- ***عوامل هرمونية داخلية:*** عند المرأة:

- سن البلوغ المبكر وسن اليأس المتأخر (قبل 12 عام و بعد سن الـ 50) يزيدان من خطر الإصابة بسرطان الثدي لديها.

- التأخر بالإنجاب لأول مرة بعد سن الثلاثين يزيد من خطر الإصابة بهذا المرض، فالمرأة التي تنجب لأول مرة بعد سن الثلاثين خطر الإصابة عندها يزداد خمسة أضعاف عن امرأة أخرى تنجب لأول مرة في سن مبكرة.

- فترة الإرضاع الطبيعي هو عامل حماية من هذا المرض، الخطر ينقص إلى النصف بالنسبة للنساء التي ترضع 24 شهر مقارنة مع النساء التي ترضع 6 أشهر.

عند أنثى الكلب: إن استئصال المبايض و الرحم جراحيا" لأنثى الكلب هو عامل حماية لها من الإصابة بهذا المرض.

تعقم إناث الكلاب لتجنب الآثار الجانبية لدورة الشبق، الحمل، الحمل الكاذب، الإنجاب الغير مرغوب به، ونمو سرطانات الجهاز التناسلي للأنثى وسرطان الثدي.

تبدأ أنثى الكلب أول دورة شبق لها عند 6 إلى 12شهر من العمر، ويأتي الشبق مرتين في العام، وكل دورة شبق تستمر 21 إلى 30 يوم.

إن إناث الكلاب التي لم تعقم تكون معرضة لسرطانات المبيض و الثدي. ولكن التعقيم يجب أن يكون في سن مبكرة من أجل تخفيف احتمال الإصابة بسرطان الثدي.

فإناث الكلب العقيمة قبل أول دورة شبق لها، ينقص خطر الإصابة عندها بسرطان الثدي إلى 99,5% مقارنة مع إناث الكلاب الغير عقيمة. أما إذا تم التعقيم بين السنة الأولى و السنة الثانية من العمر فخطر الإصابة ينقص إلى 92%، وإذا حدث بين السنتين و السنين والنصف فخطر الإصابة ينقص إلى 74%، أما بعد هذا العمر فعملية العقيم لا تكون مجدية أي ليست عامل حماية من هذا المرض.

ب- ***عوامل هرمونيةخارجية:*** - عند المرأة:

- الإجهاض المحرض أو الطبيعي ليس له تأثير كبير على حدوث سرطان الثدي. ولكن هناك دراسات مناقضة في هذا المجال، إحدى الدراسات تقول أن الإجهاض يخفض من نسبة الإصابة إذا حدث في الأسابيع السبعة الأولى من الحمل، ويزيد خطر الإصابة إذا حدث بعد 18أسبوع من الحمل.

- حبوب منع الحمل: دراسات تقول أنها لا تؤثر على الإصابة بسرطان الثدي, ولكن دراسات حديثة أظهرت أن استخدام حبوب منع الحمل يزيد من خطر الإصابة بسرطان الثدي بنسبة 10% إلى 30% ، و التأثير مرتبط بنوع الحب، كمية جرعة الهرمون داخله، مدة الاستعمال، العمر.....النتيجة لا توجد معطيات واضحة في هذا المجال.

لكن دراسة حديثة أكدت أن التوقف عن حبوب منع الحمل لمدة 10 سنوات متتالية، نسبة الإصابة عندهم مماثلة للواتي لم تتعاطى حبوب منع الحمل قط في حياتها.

- المعالجة الهرمونية تزيد من خطر الإصابة بهذا المرض ولكن حسب فترة العلاج وكمية الجرعة المعطاة والعمر.....مثلا" المعالجة بهرمون الاستروجين لوحده فقط أقل خطرا" من المعالجة بالهرمونيين معا" الاستروجين و البروجسترون.

عند أنثى الكلب: الدراسات متناقضة.

- دراسات تقول أن حقن البروجسترون يزيد فقط بخطر الإصابة بالسرطان الحميد، ودراسات أخرى تؤكد أن الخطر يزداد (سرطان حميد و خبيث) بالمعالجة لأربع مرات متتالية بالبروجسترون.
- حبوب منع الحمل لا يوجد دراسات مؤكدة حتى يومنا.
- الحقن بالاوستروجين وحده ليس له خطر. فقط الحقن بالاوستروجين والبروجسترون معا" ولفترة طويلة يزيد الخطر.
- و أيضا'' الحقن بالبروجسترون لوحده وبجرعة تفوق العادية يزيد الخطر.

6 – النمط الغذائي:

عند المراة: - السمنة تزيد من احتمال الإصابة بسرطان الثدي عند المرأة، لأنها تحرض على تعديل نسبة الأوستروجين في الدم، وأيضا" الطعام الغني بالدسم يزيد من احتمال الإصابة.

- الفواكه والخضار لا تحمي من سرطان الثدي حسب الدراسات الحديثة عكس الدراسات القديمة.
- استهلاك اللحوم الحمراء بكثرة تزيد الخطر.
- الدراسات متناقضة حول استهلاك البيض و الأسماك.
- زيت الزيتون وزيت عباد الشمس والصويا والذرة.....تحمي من الإصابة.
- استهلاك الألياف هو عامل حماية.
- الاستهلاك المفرط و المنظم للكحول يزيد من خطر الإصابة بسرطان الثدي، فدراسة حديثة أثبتت أن استهلاك 10 غرام أو أكثر يوميا من الكحول يزيد الخطر النسبي للإصابة بمعدل 7% إلى 12%.
- دراسة عام **2009** تؤكد أن التبغ يزيد من خطر الإصابة بسرطان الثدي بعدل 12%.

عند أنثى الكلب: الدراسات ليست واضحة بتأثير الرجيم الغذائي على خطر الإصابة بسرطان الثدي.

ولكن بشكل عام الدراسات تؤكد العلاقة إيجابية بين السمنة لإناث الكلاب صغيرة السن مع خطر الإصابة بسرطان الثدي.

7- النشاط الفيزيائي:

عند المرأة: الدراسة تؤكد أن المرأة التي تمارس المشي السريع على الأقل ساعة وربع إلى ساعتين ونصف أسبوعيا" ينقص الخطر بنسبة 18% بالنسبة للمرأة التي لا تمارس هذه الحركة.

دراسات أخرى تؤكد أن النشاط الفيزيائي ممارسة الرياضة ومدتها والعمر كلها عوامل حماية من الإصابة بسرطان الثدي.

عند أنثى الكلب: لم تدرس هذه الناحية.

8- العامل البيئي:

عند المرأة:

الاشعاعات، المواد الكيميائية، الملوثات الأميانت..... كلها عوامل تزيد من خطورة الإصابة بهذا المرض.

التعرض لأشعة الشمس (فيتامين د) بأوقات محددة ومعينة هو عامل حماية من هذا المرض.

عند أنثى الكلب: لاتوجد دراسة معتمدة و ولكن بعض التجارب أثبتت تأثير السموم على زيادة الخطر.

وهناك عوامل أخرى.....

مع تمنياتي لجميع الطلبة الأعزاء بالنجاح و التوفيق

الدكتورة ظلال محمد قطان