Gene therapy

أ.د فوزة منعم

تقانة حيوية | نظري

تهانينا الحارّة ليلي وصّل لهون ... باين عليك التعب
المحاضرة مهمة .. وأطول من العادة بشوي ..بس مقدور عليها

بالتوفيق

فهرس المحاضرة :

2 • مفهوم المعالجة الجينية

21 • أنواع المعالجة الجينية

II • النواقل المستخدمة

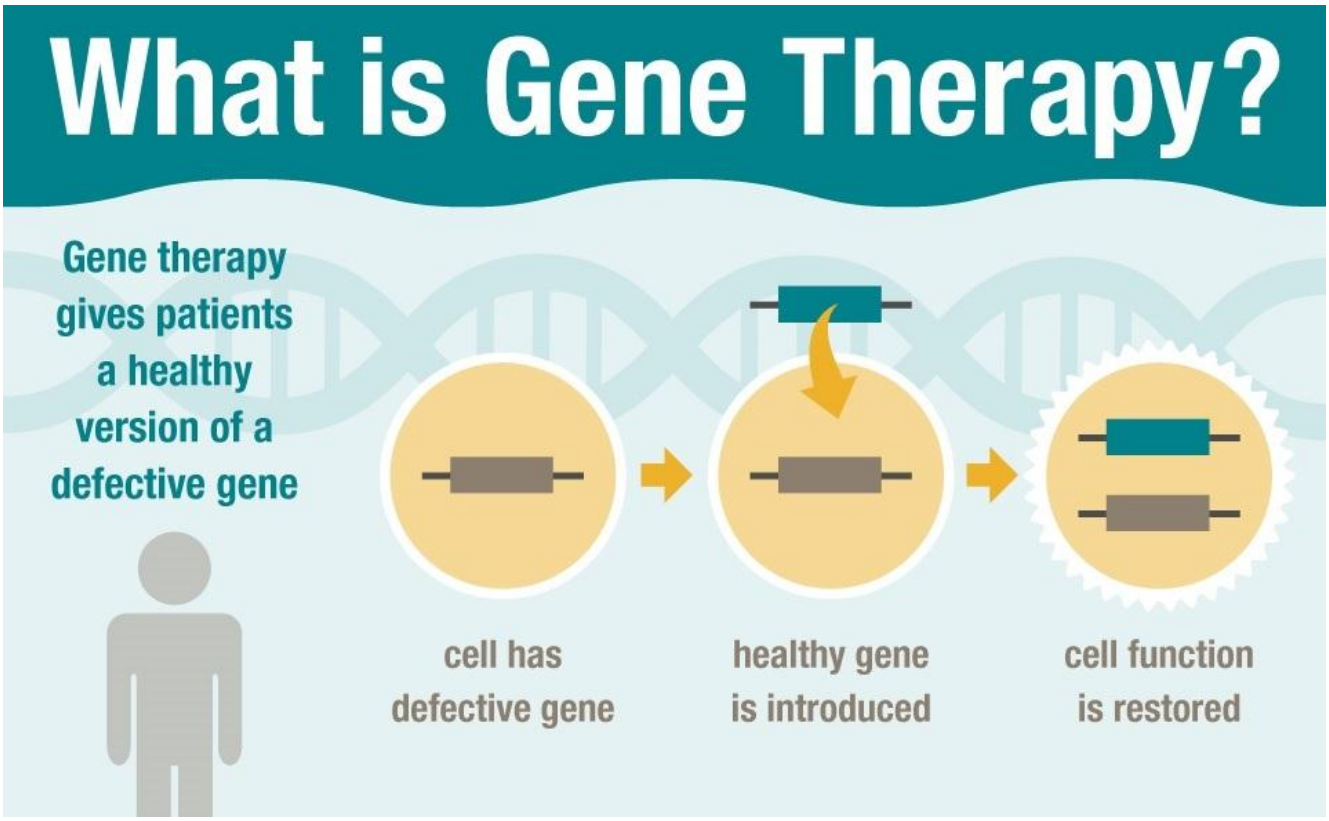
29 • إضافات

المعالجة بالجينات Gene therapy

مفهوم المعالجة بالجينات

هي إدخال جينة ما إلى خلايا فرد (قد يتم إدخال الجينة المرغوبة داخل النواة وإقحامها في DNA الكروموزومي أو تبقى ضمن الهيولى) لعلاج مرض معين.

تهدف المعالجة بالجينات إلى إحداث تغيير على المستوي الجيني في الخلية لإصلاح الجينات التي قد تكون طافرة وتؤدي إلى التعبير عن بروتين معطوب أو تؤدي إلى حدوث تأثيرات غير مرغوب بها على مستوى العضوية الحية، أو استبدال هذه الجينات الطافرة والاستعاضة عنها بجينات سليمة.



الفقرة التالية من الأرشيف

حيث أدى تطور العلاجات إلى ظهور مقاربات جديدة في مجال العلاج بالجينات وأصبح أمراً واقعياً على المستوى السريري وليس مجرد أفكار أو أبحاث وهناك العديد من الأدوية التي وافقت عليها الـ FDA وأخرى قيد الدراسة ومن الأمراض التي استهدفت من خلال المعالجة بالجينات منها:

- ✓ التليّف الكيسي Cystic fibrosis.
- ✓ الناعور Hemophilia.
- ✓ الحثل العضلي Muscular dystrophy.
- ✓ فقر الدم المنجلي Sickle cell anemia.
- ✓ فرط الكوليسترول العائلي Familial hypercholesterolemia
- ✓ عوز المناعة الشديد المختلط (SCID) (وهو اضطراب يصيب الخلايا التائية و البائية {SCID: Severe Combined Immunodeficiency Disease}
- ✓ أمراض اضطراب الهيموغلوبين Hemoglobinopathy.

كما يتضمن مفهوم المعالجة بالجينات عملية إسكات الجينات المعيبة (أي إيقاف التعبير عنها) وتسمى antisense therapy والتي تتضمن تصنيع تتالي RNA مكمل لـmRNA التابع للجينة المعيبة وبالتالي يرتبط antisense RNA مع mRNA ويمنع ترجمته، وبهذه الطريقة تم إسكات الجينة عن التعبير عن البروتين المعيب المرمز له.

انتهت الفقرة

Gene delivery توصيل الجينات

- تتكون الجينات كما نعلم من الـ DNA ويتطلب نجاح إيصال الجينات إلى الخلية استخدام وسيلة فعالة efficient تمكن هذه الجينة من الدخول إلى الخلية وأن تقوم بوظيفتها، ويشير العلماء إلى المَركَبات الحاملة Vehicles التي تستخدم في توصيل الـDNA بـ: النواقل Vectors .

- لا يوجد ناقل مثالي Perfect vector بإمكانه علاج كل الاضطرابات، وبشكل مشابه لأي علاج طبي فإنه يجب أن يتم إعداد الناقل الجيني بما يوافق المعايير الفريدة للحالة المرضية التي يستخدم في علاجها، وجزء من التحدي في مجال العلاج بالجينات يكمن باختيار الناقل الأكثر ملائمة لعلاج هذا المرض.

صفات الناقل الجيد:

1) يستهدف الخلايا الصحيحة Target the right cells.

2) يحشر الجينة في الخلايا المطلوبة Integrate the gene in the cells، فيجب أن نضمن أن تنحشر الجينة أو تصبح جزءاً من المادة الوراثية للخلية المقصودة، أو أن تجد الجينة طريقاً آخر ضمن النواة لتعبِّر عن نفسها بشرط ألا يتم سحقها وتهضيمها.

3) تفعيل الجينة Activate the gene: يجب على الجينة أن تصل إلى نواة الخلية وأن يتم تفعيلها بمعنى أن يتم انتساخها Transcription وترجمتها Translation لتعبِّر عن البروتين الذي ترمّزه، بالإضافة إلى أن البروتين الناتج يجب أن يعمل بشكل جيد كي تنجح المعالجة.

4) تجنب التأثيرات الضارة Avoid the harmful side effects: فعندما تطبّق معالجة باستخدام مادة غير مألوفة أو غريبة عن الجسم فهناك خطر دائم أن تكون سامة Toxic أو أن تستجيب الجملة المناعية للجسم ضدها وتخربها.

النواقل الفيروسية Viral vectors

إن الطبيعة الأم هي عالم مذهل Brilliant scientist حيث طُورت في الثلاثة مليارات السنة الأخيرة وسائل مذهلة وكفيئة لإيصال الجينات الغريبة إلى الخلايا، وهي الفيروسات Viruses.

مزايا استخدام النواقل الفيروسية Advantages of viral vectors

1. جيدة في الاستهداف Targeting والدخول Entering إلى الخلايا (لأن هذا العمل جزء من دورة حياتها) .
2. بعضها يستهدف أنماطاً معينة من الخلايا (كخلايا الكبد مثلاً).
3. يمكن تدويرها بحيث لا تتضاعف وتدمر الخلية.

عوائق استخدام النواقل الفيروسية Drawbacks Of Viral vectors

- يمكنها حمل كمية محددة فقط من المادة الوراثية، لذلك فإذا كان حجم الجينة كبيراً جداً فسيكون من الصعب إدخالها إلى بعض الفيروسات.
- يمكنها أن تسبب استجابة مناعية لدى بعض المرضى، مما يؤدي إلى ظهور إحدى مشكلتين:
  - فإما أن تسبب حوادث مرضية للمريض.
  - أو يمكن للجملة المناعية أن تحجب دخول الفيروس إلى خلايا المريض، أو حتى أن تُقتل هذه الخلايا عندما تصل الجينة إليها.

النواقل غير الفيروسية Non-viral vectors

- يمكن للنواقل الفيروسية أن تقوم بإيصال الجينة بشكل كفؤ إلى خلايا المريض، لكن لها بالمقابل بعض المحدوديات ويمكن التغلب عليها باللجوء إلى النواقل غير الفيروسية.

- من النواقل غير الفيروسية التي يمكن استخدامها جزيئة DNA حلقية تدعى البلازميد Plasmid وهي الجزيئات التي تتبادلها الجراثيم بشكل طبيعي فيما بينها من أجل نقل الصفات الوراثية.

- ويمكن أن يتم تغليف هذه البلازميدات ضمن ما يعرف بالليبوزومات Liposomes من أجل أن يكون دخولها أسهل إلى الخلية الهدف.

والليبوزومات هي عبارة عن جيوب صغيرة محاطة بغشاء فوسفوليبيدي "مشابه لغشاء الخلية البشرية" Small membrane-wrapped packets و التي تقوم بإيصال محتواها من خلال الاندماج بغشاء الخلية المضيفة.

ومن مزايا الليبوزومات أنها قادرة على حمل جينات أكبر مقارنة بالفيروسات، وأنها لا تحرض استجابة مناعية، أما سيئتها فتكمن في أنها أقل كفاءة من الفيروسات في إيصال الجينات إلى الخلايا.

الفقرة التالية من الأرشيف

- تم إيجاد نواقل صنعية عُرفت بالجسيمات الفيروسية Virosomes وهي مكوّنة بشكل أساسي من ليبوزومات مغطاة ببروتينات سطحية، حيث جُمعت هذه النواقل بين صفات البلازميد في سعة حمولته وتجنبه للاستجابة المناعية من جهة، وبين صفات الفيروس في نوعيته وكفاءته من جهة ثانية.

❖ حيث تتآثر البروتينات الفيروسية مع البروتينات الموجودة على سطح الخلايا الهدف Target-cell surface مما يساعد الجسيم الفيروسي على الاندماج بغشاء الخلية وإفراغ حمولته إليها وبتغيير أنماط البروتين الفيروسي المستخدم يمكن استهداف أنماط متعددة من الخلايا بشكل نوعي.

انتهت الفقرة

داخل العضوية أم خارج العضوية In-vivo vs Ex vivo:

يمكن أن يتم إيصال الجينات إلى مجموعة من الخلايا في جسم المريض بطريقتين:

1. الطريقة الأولى in vivo :

والتي تتم بحقن الناقل بشكل مباشر إلى المريض مستهدفاً الخلايا المعطوبة.

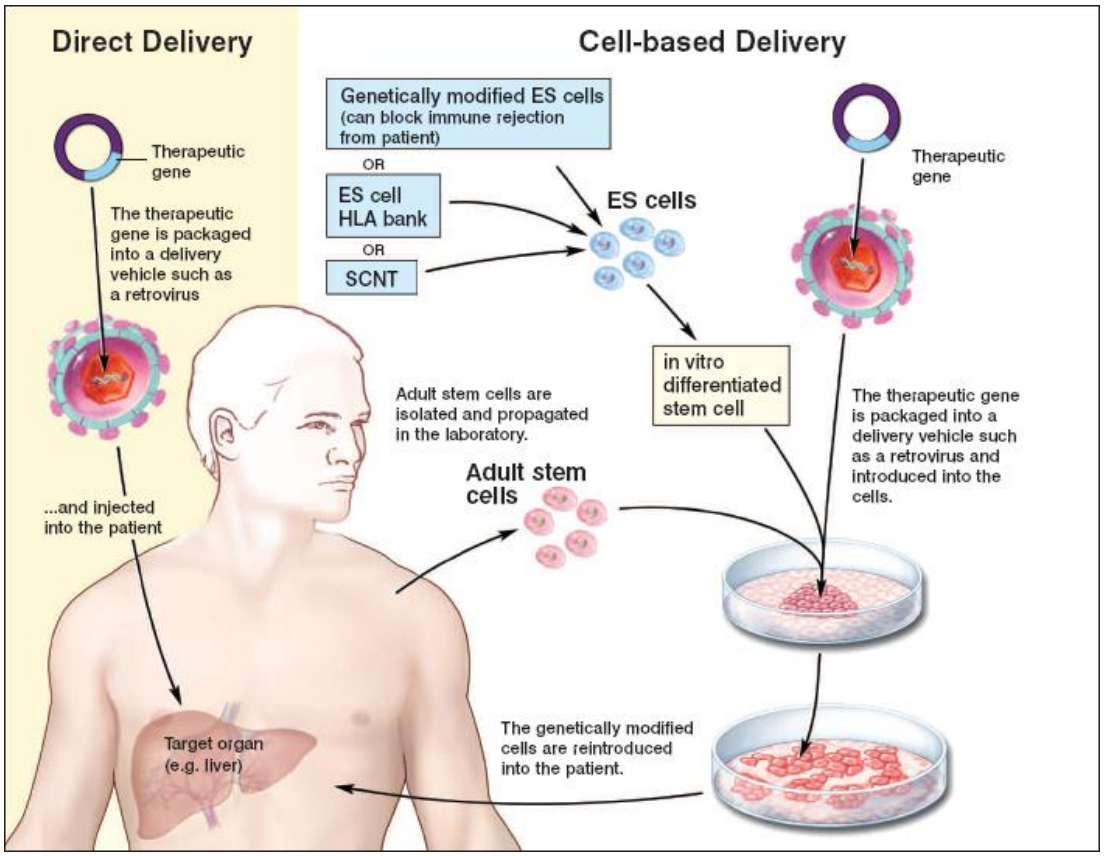
2. الطريقة الثانية خارج العضوية ex vivo:

- والتي تتم بعزل النسيج المراد إدخال الجينة إليه من جسم المريض ومن ثم تنميته في مزارع خلوية، وبعد أن يتم إيصال الجينات والتأكد من انحشارها وتفعيلها يتم إعادة الخلايا إلى داخل جسم المريض.
- تتميز طريقة خارج العضوية أنها أقل احتمالية في أن تسبب استجابة مناعية كونه لا يوجد فيروسات دخلت إلى داخل جسم المريض وأنها أيضاً تتيح للباحثين أن يضمنوا سلامة عمل الخلايا قبل إدخالها إلى داخل جسم المريض.
- وقد أحرزت نجاحات في إيصال الجينات بطريقة خارج العضوية الحية بشكل أغنى عن الاستعانة بمتبرع أو معطي في عمليات زرع نقي العظم bone marrow transplants حيث يحتوي نقي العظم كما نعلم على الخلايا

الجذعية التي تتمايز إلى العديد من أنماط الخلايا الدموية لذلك يُستخدم زرع نقي العظم في علاج العديد من الاضطرابات الجينية لاسيما تلك التي تتضمن عيباً في الخلايا الدموية.

إلا أن عمليات زرع نقي العظم تتطلب توافقاً مثالياً بين المعطي -وهو غالباً ما يكون أحد أقرباء الآخذ- وبين الآخذ، لأنه كلما زادت نسب التوافق قل احتمال رفض الطعم من قبل الجهاز المناعي للمريض. إلا أنه ليس دائماً يكون بمقدورنا إيجاد توافق بين المعطي والمريض لذلك يمكننا في هذه الحالة عزل خلايا نقي العظم للمريض نفسه وتصحيح الجينة المعطوبة باستخدام المعالجة الجينية ومن تم إعادة الخلايا السليمة إلى داخل جسم المريض.

من الأمثلة على الاضطرابات الوراثية التي يمكن علاجها في بعض الحالات باستخدام زرع نقي العظام تتضمن:
مرض فقر الدم المنجلي Sickle Cell disease، والعوز المناعي الشديد المختلط SCID الناجم عن عوز أنزيم الأدينوزين دي أميناز ADA deficiency.



تهيئة الناقل الفيروسي ومسيرة دخوله الى الخلايا الهدف:

أول خطوة في المعالجة بالجينات هي تهيئة الناقل الفيروسي وتحويره حيث نلجأ إلى تقانات الهندسة الوراثية Genetic engineering التي تمكننا من إجراء بعض التغيرات على الناقل منها:

- إزالة الكود الجيني للفيروس الذي يعطيه صفة الإمراضية واستبداله بجين علاجي مصمم من أجل التعبير عن البروتينات السليمة المعوزة لدى المريض.
- إضافة Anti-receptors على سطح الفيروس من أجل أن يرتبط مع مستقبلات الخلية Receptors المراد إيصال الجينة إليها.

وبذلك يصبح الفيروس جاهز ليكون ساعي بريد للكود الجيني الجديد.

- تبدأ الرحلة بحقن الفيروس الحامل للجينة الجديدة في النسيج الهدف للمريض.

مثلاً إذا كان هدف المعالجة بالجينات تدبير حالة سرطان في الدماغ يقوم الأطباء بحقن الجينة داخل النسيج الورمي الموجود في الدماغ.

- سيواجه الفيروس صعوبات خلال مسيره إلى الهدف وهو أن يتحاشى النظام المناعي الذي يمكن أن يهاجمه قبل أن تسنح له الفرصة بالوصول إلى الخلايا الهدف.
- إذا تمكّن الفيروس من تجنب النظام المناعي والوصول إلى الهدف عندها سيدخل الفيروس حصراً إلى الخلايا التي تملك المستقبل Receptor الموافق الذي يتكامل مع الـ Anti-receptor الموجود على الفيروس وسيتجاهل الفيروس الخلايا التي لا تملك هذا المستقبل.

- بعد دخول الفيروس إلى الخلية بعملية البلعمة Endocytosis سيتحرر الكابسيد داخل الخلية الهدف ومن ثم يحرّر الفيروس حمولته الجينية التي تدخل إلى نواة الخلية الهدف.

- تملك الفيروسات معلومات جينية مرمّزة لأنزيم الـ Integrase التي تقطع الـ DNA عند الجينة المعيبة وتحشر ضمنه الجين العلاجي للفيروس وبالتالي ستصبح هذه الخلايا خلايا سليمة ستبدأ بالتعبير عن البروتين الذي يحارب المرض.

- أهم العقبات التي واجهت المعالجة بالجينات في التطبيق السريري هو الرفض Rejection، فما إن دخلت الجينة إلى الخلايا وعُبّر عنها بالشكل المطلوب حتى بدأ الجسم بالتعرف على هذه الجينة كجسم غريب، فإما دمرت الخلية نفسها أو هاجمت أضداد الجهاز المناعي هذه الخلية التي تحمل الجين المعدل.

يسمى الـ DNA الذي يحشر بجينوم الفيروس والذي سيتحرر داخل الخلايا الهدف وسيدخل إلى النواة لاستبدال الجين المعطوب بالدواء الجيني Gene drug.

سندرس الآن بشيء من التفصيل اهم النواقل المستخدمة في المعالجة بالجينات ... وهي:

- الفيروسات الرجعية Retroviruses
- الفيروسات الغدية Adenovirus
- الفيروسات المرتبطة بالفيروسات الغدية Adeno Associated virus
- فيروسات الحلأ البسيط Herpes simplex virus
- الليبوزومات (Non-Viral Vector) Liposomes
- Non-Viral Vector: Naked DNA (الـDNA العاري)

الفيروسات الرجعية Retroviruses

الفيروسات العكسية هي مجموعة من الفيروسات مادتها الوراثية هي عبارة عن RNA أكثرها شهرة هو فايروس الـ HIV الذي يسبب مرض الـ AIDS.

ميزة هذا النوع من الفيروسات أنها قادرة على حمل المادة الوراثية على هيئة RNA ثم تحولها ضمن الخلية المضيفة إلى DNA بواسطة أنزيم الـ Reverse transcriptase وتحشرها ضمن DNA الخلية بواسطة أنزيم الـIntegrase .

الخلايا الهدف Target:

- ✓ إن هذه الفيروسات تعدي فقط الخلايا المنقسمة Dividing cells، وبالتالي لا تستطيع أن تستهدف الخلايا التي توقفت عن الإنقسام (كالخلايا العصبية).
- ✓ نستطيع استهداف نمط محدد من الخلايا من خلال هندسة بروتينات على سطح الفايروس لتميز بروتينات محددة على سطح الخلايا الهدف (أي تغليف الفايروس ببروتينات تميز بروتينات نوعية على سطح الخلايا الهدف وهو ما نسميه Gene pullet. (أي بنفس آلية عمل Receptor-Anti Receptor).
- ✓ الطول الأعظمي للـ RNA الممكن إدخاله إلى الـ Retrovirus هو 8000 base pairs (8 kilobase pairs).

التفعيل Activation:

عندما يدخل الفيروس العكسي إلى خلية ما، ينتقل الـ RNA الفيروسي إلى النواة، وهذه الـ RNA يجب أن يتم تحويله إلى DNA قبل أن تقوم بعملية تفعيل الجينات، والفيروس العكسي يملك الأنزيمات القادرة على إنجاز عملية التحويل هذه.

الاندماج Integration:

- ✓ يحشر الـ DNA الناتج عن الـ RNA الفيروسي ضمن جينوم الخلية المضيفة في موقع عشوائي، وبعد أن يُحشر سوف يتضاعف مع بقية الـ DNA عندما تنقسم الخلية.
- ✓ يعتبر الانحشار ميزة لهذا الناقل لأنه يتيح استمرارية التعبير عن الجينة مع انقسام الخلية لأن الخلية تورّث هذا الناقل لأنسالها التي تنتج عن انقسامها.

✓ وهذا النمط من النواقل هو النمط المستخدم في المعالجة الجينية لمرض السرطان.

التأثيرات الجانبية Side effects:

✓ بما أن الجينوم الفيروسي ينحشر بشكل عشوائي ضمن جينوم الخلية المضيفة وبالتالي من الممكن أن ينحشر في موقع يعطّل فيه عمل جينة أخرى، والذي من الممكن أن يؤثر على قدرة الخلية على الإنقسام بشكل صحيح ومن الممكن أن يسبب أورام Tumors.

✓ كذلك من الممكن أن تسبب الفيروسات العكسية استجابةً مناعية لدى المريض، وهذه الاستجابة من الممكن تقليلها من خلال إزالة البروتينات التي تحرض هذه الاستجابة من على سطح الفيروس.

الفيروسات الغدية Adenovirus

وهي فيروسات الزكام Common cold، مادتها الوراثية عبارة عن dsDNA.

الخلايا الهدف Target:

✓ هذه الفيروسات تعدي الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة بشكل كفؤ.

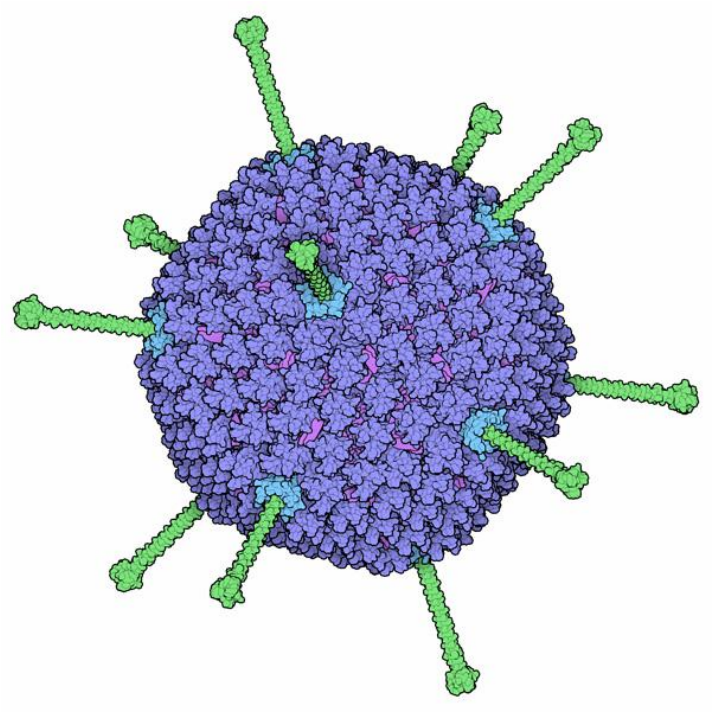
✓ نستطيع استهداف نمط محدد من الخلايا من خلال هندسة بروتينات على سطح الفيروس لتميّز بروتينات محددة على سطح الخلايا الهدف.

✓ الطول الأعظمي من الـ DNA الذي نستطيع أن نحشره ضمن الفيروسات الغدية هو 7500 base pairs (7.5 kilobase pairs).

التفعيل Activation:

بعد أن يُعدي الفيروس الغدي الخلية، ينتقل الـ DNA الفيروسي إلى نواة الخلية حيث تتفعل جيناتها.

الاندماج Integration:



✓ إن DNA الفيروس الغدي لن يندمج ضمن جينوم الخلية المضيفة وبالتالي ستتخلص منه الخلية (تطرحه) بعد أسبوع أو أسبوعين ويتوقف التفعيل الجيني، لأن الخلية لن تورّث الجينة لأنسالها الناتجة عن انقسامها وحتى لو لم تنقسم لن تكون الجينة ثابتة لمدة طويلة مالم تدخل إلى الجينوم وستكون معرّضة للتخريب والحلمهة.

✓ أي أنه إذا كنا نستخدم الفيروس الغدي كناقل في العلاج الجيني يجب تجديد الجرعة كل أسبوعين.

التأثيرات الجانبية Side effects:

من الممكن أن تسبب الفيروسات الغدية استجابة مناعية لا يستهان بها لدى المريض، وهذه الاستجابة من الممكن تقليلها من خلال إزالة البروتينات التي تحرّض هذه الاستجابة من على سطح الفايروس.

الفيروسات المرتبطة بالفيروسات الغدية Adeno Associated virus

هذه الفيروسات على خلاف الغدية والعكسية لا تسبب أي مرض للإنسان، وهي تحمل مادتها الوراثية على شكل ssDNA.

الخلايا الهدف Target:

- ✓ هذا النوع من الفيروسات قادر على عدوى مجال واسع من الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة بشكل كفؤ.
- ✓ تتميز هذه الفيروسات بأنها تحتاج لمساعدة فيروس آخر Helper virus لتتضاعف ضمن الخلية.
- ✓ نستطيع استهداف نمط محدد من الخلايا من خلال هندسة بروتينات على سطح الفيروس لتميّز بروتينات محددة على سطح الخلايا الهدف.
- ✓ الطول الأعظمي من الـ DNA الممكن إدخاله إلى الفيروسات المرتبطة بالفيروسات الغدية هو 5000 base pairs (5 kilobase pairs).

التفعيل Activation:

عند دخول هذه الفيروسات إلى الخلية، ينتقل الـ DNA الفيروسي إلى نواة الخلية حيث تتفعّل جيناتها.

الاندماج Integration:

يندمج الـ DNA الفيروسي ضمن جينوم الخلية المضيفة، في 95% من الحالات يندمج الجينوم الفيروسي في مكان محدد على الصبغي 19، وبالتالي فإن استخدام هذا النمط

من الفيروسات يقلل احتمال أن يعطل اندماج الجينوم الفيروسي عمل جينات أخرى ضمن الخلية.

التأثيرات الجانبية Side effects:

لا تسبب هذه الفيروسات رد فعل مناعي عند المريض.

فيروسات الحلأ البسيط Herpes simplex virus

يوجد كما نعلم نمطين من فيروسات الحلأ البسيط:

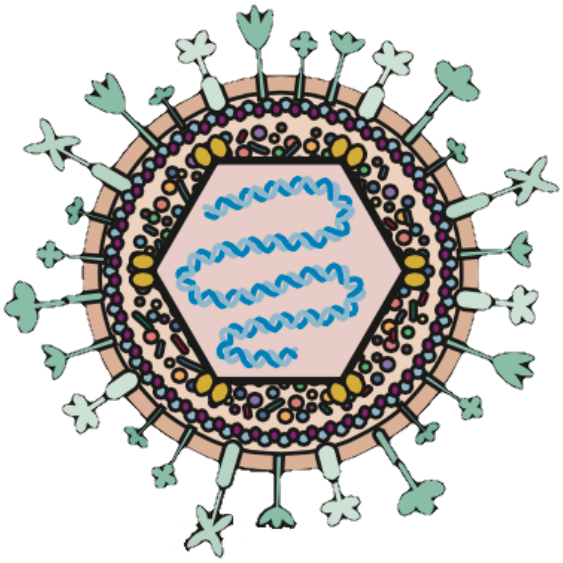
- فيروس الحلأ البسيط من النمط الأول Herpes simplex virus type 1 (HSV 1) وهو النمط الفموي Oral (يصيب منطقة الفم).
- فيروس الحلأ البسيط من النمط الثاني Herpes simplex virus type 2 (HSV 2) وهو النمط التناسلي Genital (يصيب المناطق التناسلية).

تحمل هذه الفيروسات مادتها الوراثية بشكل dsDNA أي DNA مضاعف الطاق.

الخلايا الهدف Target:

هذه الفيروسات تعدي فقط خلايا الجهاز العصبي Nervous system.

الطول الأعظمي من الـ DNA الممكن إدخاله ضمن هذه الفيروسات هو 20000 base pairs (20 kilobase pairs).



التفعيل Activation:

عندما يدخل إلى الخلية، ينتقل الـ DNA الفيروسي إلى نواة الخلية حيث تتفعّل جيناتها.

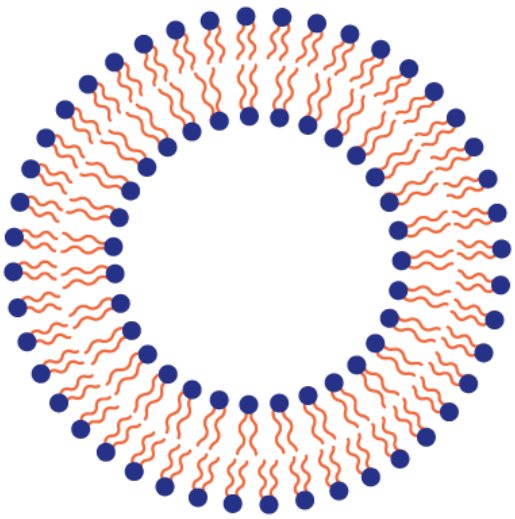
الاندماج Integration:

- ✓ على الرغم من أن الـ DNA الفيروسي لن يندمج ضمن جينوم الخلية المضيفة، مع ذلك سيبقى ضمن نواة الخلية لوقت طويل على شكل قطع حلقية منفصلة من الـ DNA تتضاعف عند انقسام الخلية.
- ✓ وبالتالي لن تؤثر على وظيفة الجينات الأخرى في الخلية المضيفة.

التأثيرات الجانبية Side effects:

من الممكن أن تسبب فيروسات الحلأ البسيط استجابة مناعية لدى المريض، وهذه الاستجابة من الممكن تقليلها من خلال إزالة البروتينات التي تحرّض هذه الاستجابة من على سطح الفيروس.

الليبوزومات Liposomes (Non-Viral Vector)



كما ذكرنا يحتوي على قطع من الـ dsDNA وهي البلازميدات Plasmids وعند إضافة الخلايا سوف يندمج هذا الغلاف مع الغشاء الخلوي وينتقل الـ DNA إلى الخلية.

حيث تصنف الليبوزومات ضمن زمرة النواقل غير الفيروسية.

الخلايا الهدف Target:

- ✓ ليست نوعية لأي نوع من أنواع الخلايا.
- ✓ تدخل الخلايا بشكل أقل كفاءة من الفيروسات.
- ✓ لا يوجد طول أعظمي من الـ DNA الممكن إدخاله ضمن الليبوزوم.

التفعيل Activation:

بعد الدخول إلى الخلية سوف ينتقل الـ DNA البلاسميدي إلى النواة حيث تتفعّل جينات الخلية.

الاندماج Integration:

لن يندمج البلاسميد مع جينوم الخلية إلا إذا تمت هندسته ليقوم بذلك (Engineered)، وحتى بعد الهندسة تكون كفاءة الإندماج قليلة جداً.

التأثيرات الجانبية Side effects:

- ✓ لن تسبب أي استجابة مناعية في جسم المريض.
- ✓ بعض أنماط الليبوزومات من الممكن أن تكون سامة.
- ✓ على العموم إن هذه الأنماط تكون مناسبة أكثر في العلاج الجيني خارج العضوية Ex-vivo gene therapy.
- ✓ من سلبيات الليبوزومات أيضاً صعوبة تصنيعها بشكل تكراري.

Non-Viral Vector: Naked DNA (الـ DNA العاري)

- ✓ الـ DNA العاري هو قطعة بلاسميد تكون غير معبأة ضمن فيروس أو ليبوزوم لينقلها إلى الخلية.
- ✓ حيث وجد بعض العلماء أن الخلايا قادرة على ربط وإدخال هذا الـ DNA العاري Transformation.
- ✓ تصنف ضمن زمرة النواقل غير الفيروسية Non-viral vectors.

الخلايا الهدف Target:

- ✓ ليست نوعية لأي نوع من أنواع الخلايا.
- ✓ تدخل الخلايا بشكل أقل كفاءة من الفيروسات.
- ✓ لا يوجد طول أعظمي من الـ DNA الممكن استخدامه في الـ DNA العاري.

التفعيل Activation

بعد دخول الـ DNA البلاسميديّ إلى الخلية سوف ينتقل إلى النواة حيث تتفعّل جيناتها.

الاندماج Integration:

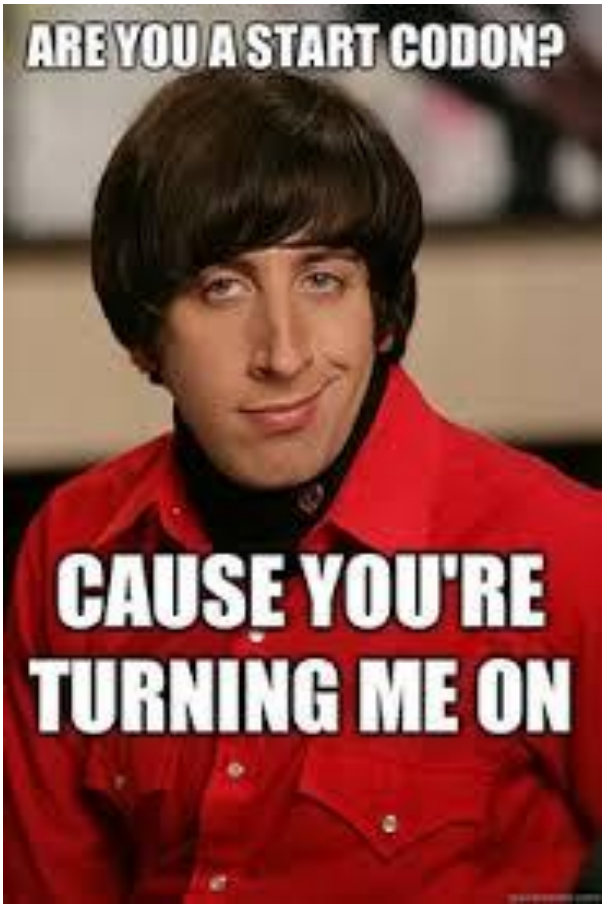
لن يندمج البلاسميد مع جينوم الخلية إلا إذا كنا قد هندسناه ليقوم بذلك (Engineered)، وحتى بعد الهندسة تكون كفاءة الاندماج قليلة جداً.

التأثيرات الجانبية Side effects:

- ✓ لن تسبب أي استجابة مناعية في جسم المريض بسبب عدم وجود بروتينات تفعل جملة المناعة.

✓ لا يسبب سمية.

✓ من الأفضل استخدامه في المعالجة الجينية خارج العضوية Ex-Vivo.



أنواع المعالجة الجينية:

1. المعالجة الجينية للخلايا الجنسية Germline gene therapy

- في المعالجة الجينية للخلايا الجنسية Germline (اي البيوض والنطاف) يتم تعديل الأعراس (البيوض والنطاف) بإدخال جينات وظيفية فعالة تندمج مع جينومها، هذا التغيير الحاصل من جراء العلاج سيكون موروثاً Heritable وسيُمرر إلى الأجيال التالية.
- هذه العملية نظرياً ممتازة لمعالجة الاضطرابات الجينية المتوارثة، لكن هذا الخيار من المعالجة ممنوع التطبيق في البشر على الأقل في الوقت الحاضر لأسباب أخلاقية وتقنية عديدة.

2. المعالجة الجينية للخلايا الجسمية Somatic gene therapy

- في العلاج الجيني للخلايا الجسمية Somatic cell (أي كل الخلايا عدا النطفة والبيضة) يتم إدخال الجينة المصلّحة فقط في الخلايا الجسمية وتحديداً في خلايا الأنسجة التي يتم فيها التعبير عن الجينة المرضية.
- يؤدي تعبير الجينة المدخلة إلى زوال أعراض الاضطراب، لكن هذا التأثير ليس متوارثاً ولا يتضمن الخلايا الجنسية.
- حالياً علاج الخلايا الجسمية هو الخيار الممكن الوحيد وقد بدأت التجارب السريرية التي تعالج أمراض كثيرة باستخدام العلاج الجيني للخلايا الجسمية.

آليات العلاج الجيني

توجد طرق عديدة للاستعاضة أو تصليح الجينات المستهدفة في العلاج الجيني:

1) **إدخال جينة طبيعية بموقع غير نوعي داخل الجينوم للاستعاضة عن جينة لا تقوم بوظيفتها، هذه الطريقة هي الأكثر شيوعاً.**

لا مشكلة في أن يكون الموقع غير نوعي لأننا ندخل الجينة مع التسلسلات المنظمة لها (Promoter, Enhancer, Silencer...)
بحيث أن كل ما يلزم الجينة يدخل معها وبالتالي مهما كان المكان المدخلة فيه فلن يؤثر ذلك، وتعتبر طريقة سهلة.

2) **إزالة الجينة المعطوبة ونضع مكانها جينة طبيعية بحيث نجري تأشيب متجانس** Homologous recombination.

3) **يمكن أن تصلّح الجينة غير الطبيعية عبر طفرة عكوسة انتقائية** Selective Reverse mutation **تعيد للجينة وظيفتها الطبيعية.**

4) **تعديل تنظيم** Regulation **جينة معينة (أي تعديل الدرجة التي تعمل بها الجينة أو تتوقف عن العمل).**

عرضت الدكتورة في النهاية أنيميشن عن كائنات فضائية مصابة بأمراض وراثية اسماؤها تشبه أسماء أمراض حقيقية ((كما سنرى مثلاً Slushophilia بدلاً من Hemophilia ومرض أخر أسمه مشتق من الـ Cystic fibrosis)). الرابط:

https://learn.genetics.utah.edu/content/genetherapy/doctor/

يظهر في الأنميشن ثلاث مرضى فضائيين، كل منهم مصاب بمرض جيني معين، نريد معالجتهم بالـ Gene therapy، و حسب الدكتورة فإن هذا الأنميشن قد يكون مفيداً في وضع الأسئلة، حيث تأتي لنا بجين بطول معين تعود لنسيج معين (معطيات) ويطلب منا معرفة الفيروس الأنسب كـ Vector والأمثلة التالية هي أمثلة على هذا النمط من الأسئلة:

المريض الأول :

- **اسمه:** Gomer zaius.
- المرض الخاص به اسمه Hyperthumblism يصيب جينة THUM[1]، وهي جينة بطول 451.1 bp (قصيرة نوعاً ما).
- وهو مرض يصيب خلايا مناعية تدعى Tatorcytes، ينتج عنه فرط حساسية لبعض المواد (صديقنا غومير كان مزارع).

العلاج: اختيار نسيج

- **تم تخييرنا بين عدة نسج (عظمي -هضمي -كلوي) أيها نختار؟**

العظمي لأن الخلايا المناعية موجودة في نقي العظام bone marrow (وتم التوجيه خلال الأنميشن معلومة من عندن إلى أن الـ Ex vivo بهذه الحالة هي ناجحة لهذا المرض).

[1] "لم نستطع نحن والدكتورة معرفة ما المرض البشري الذين اشتقوا هذا الاسم الخيالي منه، لكن المهم من الفكرة هو ان نعرف النسيج وطول الجينة ومنها نختار الفيروس المناسب"

- **ثم يجب أن تختار من أحد الفيروسات التالية:**

(Retrovirus- Adenovirus- Adeno Associated virus- Herpes virus)

هذه الفيروسات نفسها ستكون الخيارات لباقي الأمراض، وعند اختيار الـ Vector المناسب يجب أن نبقي ببالنا أن الـ Tatorcyte تنقسم بانتظام .

لنناقش هذه الخيارات حسب المعطيات:

Retrovirus

- يمكن استخدامه لإيصال الجين Thum، حيث أن طول الجين صغير ممكن ادخاله ضمنه ((تذكر انه يسع حتى ٨ كيلو bp)).
- ثم نضيف الفيروس إلى الـ petri dish الحاوي على خلايا Tutorcytes.
- يحدث دخول (infection) للفيروس للخلايا المنقسمة.
- ثم حشر لجينومه الحاوي على جينة Thum.
- تعبير عن الجينة بشكل جيد.
- نستطيع إعادة الخلايا للجسم وقيامها بعملها.
- **النتيجة Outcome : نجاح العملية Success.**

Adenovirus

- طول الجينة مناسب (تذكر أنه يسع ٧,٥ كيلو bp) لإدخالها ضمن جينوم الفيروس
- ثم وضعنا الفيروس على خلايا Tatorcyte.
- حدث infection للخلايا بشكل كفؤ Efficiently أنتج البروتين، لكن هنا لم ينحشر جينوم الفيروس Integrate مع جينوم الخلية (أي ان جينوم الفيروس دخل للخلية لكن لم يصبح جزءاً من جينومها عكس سابقه).
- لا يكون الأثر مستديم (يتوقف انتاج البروتين بعد أسبوعين two weeks) لتكون بحاجة لإعادة العملية كل أسبوعين.
- **العملية ليست ناجحة ١٠٠٪ كونها لن تدوم.**

Adeno-associated virus

- طول الجينة مناسب (تذكر أنه يسع ٥ كيلو bP) لتدخل ضمن جينوم الفيروس.
- حدوث infection لخلايا الـ Tutorcytes.
- تنحشر الجينة Integrate في منطقة محددة بالكروموزوم ١٩ بطريقة Non-disruptiveدون تخريب لجينة أخرى.
- تعبير عن الجينة.
- **النتيجة Outcome : نجاح العملية Success.**

Herpes virus

- الطول مناسب لتدخل الجينة THUM إلى جينوم الفيروس.
- عند إضافة الفيروس للخلايا Tatorcyte.
- لا يحدث infection، حيث أن فيروس الـHerpes فقط يصيب الخلايا العصبية Nervous system.

المريض الثاني:

- **الأميرة** Glug glug.
- **المرض:** Slushophilia، **جينة** CLOT **(تخص عامل تخثر مصنع من الكبد** Liver، **وخلاياه منقسمة) طولها** 7.350 bp.

العلاج:

- **خُيرنا بين عدة أنسجة (كبد-أمعاء-معدة).**

نختار الكبد والذي يصنع عوامل تخثر ويحررها للمجرى الدموي.

- **الآن في اختيار الفيروس من الفيروسات الأربعة السابقة نفسها:**

❖ **نستبعد فيروس الـ** Herpes **لأنه يعدي الخلايا العصبية فقط** Nervous.

❖ **فيروس الـ** Adeno - associated virus **لا يستطيع حمل الجين لأن (طوله أكبر من 5 كيلو** bp).

Adenovirus

- بما أنه هنا في الـ In vivo، فمن الأفضل إزالة بروتينات الفيروس التي تحرض Trigger الاستجابة المناعية.
- نضيف جينة الـ CLOT لجينوم الفيروس، ثم نحقنه بالمريضة.
- تنتقل لتصل من الـ Portal vein (وريد بابي).
- يصل الفيروس إلى الكبد.
- يدخل إليه infection.
- لكن لن يحدث Integration لجين (فيروس + CLOT) على جينوم الخلايا.
- سيحدث تعبير عن البروتين لمدة أسبوعين فقط (حيث تتخلص الخلايا من جينوم الفيروس الموجود ضمنها وغير مندمج مع جينوم الخلايا).
- فالعلاج هنا عابر Transient، كل أسبوعين حقنة للأميرة.
- **لا يوجد مطاوعة.**

Retrovirus

- الخطوات السابقة نفسها البدئية.
- سيصيب الـ Retrovirus الخلايا المنقسمة.
- يحشر جينومه ضمن جينوم الخلايا.
- الـgene CLOT أصبح موجود.
- إنتاج البروتين وتحريره لمجرى الدم (الشفاء يستمر حوالي ٦ أشهر أي من عمر الخلايا).
- لكن هنا يدخل الـ Retrovirus إلى الخلايا في مواقع مختلفة، في بعض الخلايا سينحشر في مواقع تعطل جينة Stop division.
- لا يعبر عن بروتين Stop.
- تنقسم دون انضباط out of control ثم يحصل لدى المريض Tumor(هنا كان Benign حسب الأنميشن).

المريض الثالث:

- **المريض** Balderfum، **عمله** Gas technician.
- **مرضه** Sisslic Dilliosis (**عم يشبهوه للـ** Cystic fibrosis)، **جينة** SL00 **على الكروموزوم** 8، **طوله** 4,4 Kilo bP.

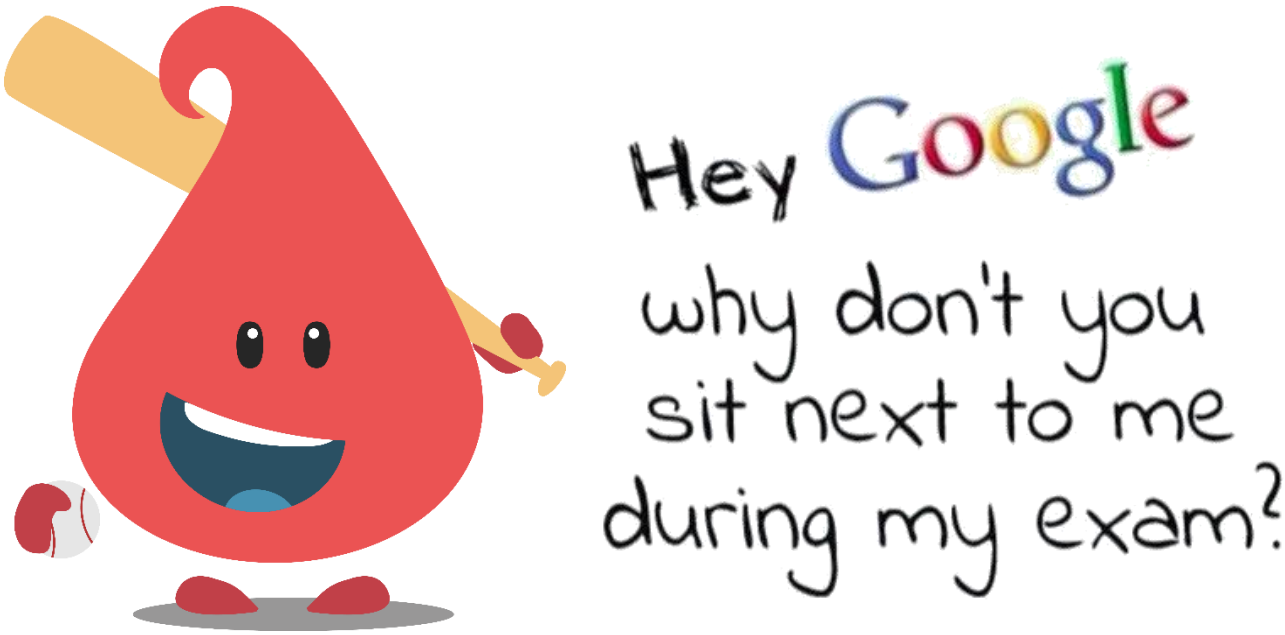
تذكر أن الـ Cystic fibrosis يصيب الرئتين وأعضاء أخرى (كالبنكرياس والأمعاء)، لكن تأثيراته المهددة للحياة تأتي من الإنتانات التي تصيب الرئتين.

العلاج:

- **خُيّرنا بين 3 أنسجة (رئتين-أمعاء-بنكرياس).**

نختار الرئتين كون المضاعفات المهددة للحياة لمرض الـ Cystic fibrosis **تعود للانتانات الرئوية.**

وتذكر هنا أن خلايا الرئتين تنقسم ببطء، إن انقسمت أساساً ...



- **أي برأيك من الـ4 الفيروسات السابقة مَن هو الملائم ؟؟**

Herpes	• لا يعمل إلا على الخلايا العصبية.
Retrovirus	• يحتاج خلايا منقسمة حصراً. • لا تنجح العملية.
Adeno - associated virus	• هو الخيار الأفضل. • تحسن دائم (بسبب حشر جينومه بجينوم الخلية).
Adenovirus	• ينجح أول مرة لأنه يعمل على المنقسمة + غير المنقسمة، لكن يحتاج تكرار العملية بعد أسبوعين (غير مستديمة not Presistant). • لكن تكرار العملية هنا لم تكن ناجحة لأن الجسم شكّل استجابة مناعية تجاه الـ Adenovirus (لذا نكون بحاجة لنزع البروتينات التي تقدم Trigger الاستجابة المناعية).

إلى هنا تنتهي

المحاضرة الأخيرااااا

للأسف أصدقائي فيما يلي بعض المعلومات الإضافية عن أنزيمات الاقتطاع Restriction enzyme لم تذكرها الدكتورة لكن وجدناها بالأرشيف وأسئلة الدورات .. لذلك يفضل درساتها

خصائص أنزيمات الاقتطاع Restriction enzymes properties:

1. الخاصّة الأولى:

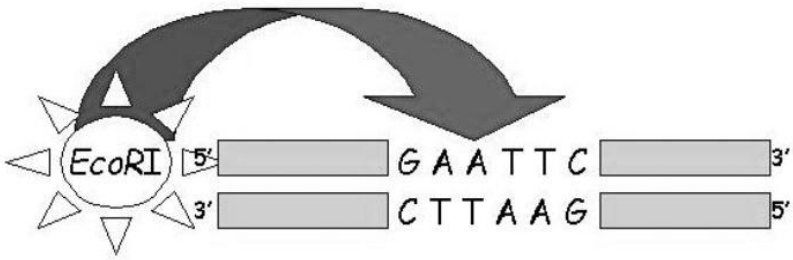
تميّز أنزيمات الاقتطاع تتالي نوكليوتيديّ محدّد ونوعيّ وقصير (يعرف هذا التتالي بموقع الاقتطاع).

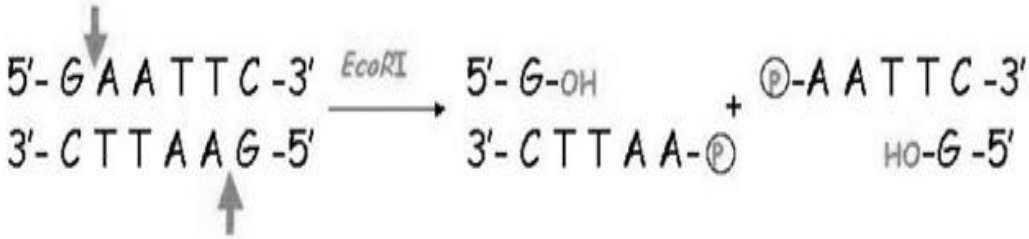
Restriction enzymes recognize a specific short nucleotide sequence (This is known as Restriction Site).

2. الخاصّة الثانية:

تتوسّط أنزيمات الاقتطاع شطر الرابطة الفوسفوديأستريّة المتشكّلة بين أسس محدّدة كلّ منها يقع على أحد طاقي الـDNA، ويكون ناتج التفاعل عبارة عن شدفتين من الـDNA مضاعفتي الطاق.

The phosphodiester bond is cleaved between specific bases, one on each DNA strand, The product of each reaction is two double stranded DNA fragments.





3. الخاصّة الثالثة:

لا تميّز أنزيمات الاقتطاع بين DNA الكائنات المختلفة، فهي ستقطع تسلسل الـDNA إذا كان يحتوي موقع الاقتطاع مهما كان مصدره.

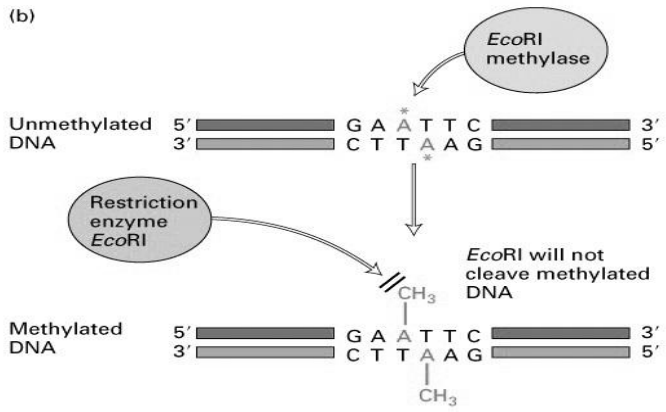
Restriction enzymes don't discriminate between DNA from different organisms, most restriction enzymes will cut DNA which contains their recognition sequence, no matter the source of the DNA.

4. الخاصّة الرابعة:

تعتبر أنزيمات الاقتطاع جزء طبيعيّ من النظام الدفاعيّ للجرثوم.

Restriction endonuclease are a natural part of the bacterial defence system.

- **تنتمي هذه الأنزيمات بالتحديد إلى ما يسمى نظام الاقتطاع والتعديل لدى الجراثيم** Restriction-modification system (RM system).
- **تسهم الأنزيمات التي تنتمي إلى هذا النظام بحصر (تقييد[2]) قدرة أيّ DNA غريب (مثل DNA فيروس آكل الجراثيم Bacteriophage) على غزو أو عدوى الخليّة الجرثوميّة المُضيفة، وذلك عن طريق تقطيعه (تدريكه).**
- **وكما ذكرنا سابقاً يتم تعديل الـDNA الجرثوميّ بعملية المتيلة على التتاليات التي تميّزها هذه الأنزيمات[3]، حيث تضاف جذور الميتيل إلى النكليوتيد A أو C من أجل حمايته من التدرك بوساطة أنزيمات الاقتطاع الخاصة بها.**



[2] من هنا جاءت تسميتها بأنزيمات التقييد.

[3] وليس شرطاً أن تتمّ المتيلة على نفس النوكليوتيد الذي تشطره هذه الأنزيمات كما نلاحظ في الصورة لموقع متيلة أنزيم Eco RI.

أنواع أنزيمات الاقتطاع Types of restriction enzymes:

صُنِّفت أنزيمات الاقتطاع بحسب التسلسل الزمنيّ لاكتشافها إلى عدّة أنواع:

أنزيمات الاقتطاع من النمط الأول Type I:

♠ تتعرّف هذه الأنزيمات على مواقع محدّدة من الـDNA إلا أنّها لا تجري الاقتطاع عند هذا الموقع مباشرة وإنّما تنزلق على طول الـDNA وتسحب معها موقع التعرّف مشكلة عروة مسافة حوالي 1000-5000 زوج أساس بعدها تقوم بقطع أحد طاقي الـDNA بشكل عشوائيّ وتحرّر حوالي 75 نكليوتيد في منطقة القطع.

♠ ويجب أن يتوافر أنزيم آخر يتحرّك بالاتجاه المعاكس من أجل اقتطاع الطاق الآخر من الـDNA.

من الأمثلة عليها: أنزيم .EcoK

♠ تتطلّب هذه الأنزيمات مساعدات أنزيميّة Cofactors كي تتمكّن من أداء وظيفتها تشمل: شوارد المغنزيوم Mg++، الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP، S-أدينوزيل ميتيونين .S-adenosyl methionine (SAM)

أنزيمات الاقتطاع من النمط الثاني Type II:

♠ تتعرّف على تتالي محدّد في الـDNA ثم تقطع كلا طاقي الـDNA داخل أو قريب جداً من موقع الاقتطاع، ونشير إلى أنّ أغلب تقانات البيولوجيا الجزيئيّة تستخدم الأنزيمات من النمط الثاني .Type II

مثال عليها: .EcoRI

♠ هذا النمط يتطلّب عادة شوارد المغنزيوم .Mg+2 وهو النمط المستخدم في عمليات البيولوجيا الجزيئية Molecular Biology.

أنزيمات الاقتطاع من النمط الثالث Type III:

♠ له صفات مشتركة بين Type I و Type II، فهو يقطع كلا طاقي الـDNA بمسافة محدّدة من موقع التمييز. فمثلاً قد تكون قادرة على قطع طاق واحد من الـDNA في موقع بعيد قليلاً عن موقع التعرف.

مثال عليها: HgaI.

♠ هذا النوع يتطلب Mg+2 والأدينوزين ثلاثيّ الفوسفات ATP.

لاحظ أنه في حال كان الأنزيم ينزلق على الـDNA فإنها يحتاج إلى طاقة تؤمنها ATP.

تمّ حالياً عزل وتمييز مئات أنزيمات الاقتطاع

- تساعد أنزيمات الاقتطاع في التعامل مع الـDNA لأنّها تحوّله إلى قطع صغيرة يسهل التحكّم بها.
- هذه الأنزيمات متوافرة حاليّاً في الأسواق للبيع (وهي مكلفة بعض الشيء).

<<<

نعود لنتابع الخواص

5. الخاصّة الخامسة:

- يتعرّف كل نوع من أنزيمات الاقتطاع على موقع خاصّ به.

Each restriction enzymes recognize its own particular site.

♥ بعض هذه الأنزيمات يميّز تتاليات قصيرة جداً[4] تتألّف فقط من 4 أزواج من الأسس Base pair، وهذه الأنزيمات تميل لأن تقطع الـDNA بشكل أكثر تواتراً منتجة أجزاء

[4] أشارت الدكتورة أنّ هذا النمط من الأنزيمات مفيد عند إجراء سلسلة DNA Sequencing وسنتحدّث عن كيفيّة إجرائه في محاضرة لاحقة.

أصغر وقطع كثيرة، فاحتمال وجود موقع التمييز في أيّ مسافة من تتالي الـDNA كبير (تقريباً يتمّ القطع على موقع واحد من كل 256 أساس).

تذكر حسب قوانين الاحتمالات فاحتمال تكرار قطعة مكونة من 4 نكليوتيدات يكون ¼×¼×¼×¼=1/256. والرقم 4 لأنه في الـDNA لا يوجد سوى 4 احتمالات لكل نكليوتيد T,G,C,A.

♥ والبعض الآخر من هذه الأنزيمات تتطلّب موقع تمييز طويل يصل حتى 8 أزواج أسس، وهكذا تقلّ احتماليّة تواجد التسلسل وبالتالي يقل تواتر القطع، فتقريباً يتمّ القطع في موقع واحد بكل $(¼)^8$=65536 أساس، وهذا النمط من الأنزيمات نسمّيه القصّاصات النادرة Rare Cutter وذلك لأنها تعطي قطع قليلة بأطوال كبيرة.

هذا النوع الثاني من الأنزيمات غير مفضّل، فطول القطع الناتجة قد يكون كبير جدّاً (بحدود 65536)، ونحن نريد أن نجري لها PCR ونحشرها بـDNA آخر.. وهذه العمليّات تكون صعبة جدّاً مع مثل هذا الطول.

♥ تبقى مواقع التمييز هذه أكثر عشوائيّة ممّا نتوقّع (فالمسافات التي ذكرناها هي احتمالات وليست مسافات ثابتة)، لذلك فإنّ التهضيم بأحد هذه الأنزيمات سيعطي أجزاء متباينة وليست متساوية الطول من الـDNA.

6. الخاصّة السادسة:

– تميّز بعض هذه الأنزيمات أكثر من تسلسل واحد وهذه الخاصة قد تسبب مشاكل في عمليات التأشيب.

Some recognize more than one sequence.

– حيث يوجد بعض أنزيمات الاقتطاع التي تسمح بوجود استبدالات في واحد أو أكثر من مواقع التعرّف.

وفيما يلي أكثر الاستبدالات شيوعاً والرموز المستخدمة فيها:

نكتب R في التتالي في حال كان الأساس بورينيّ أي إما A أو G .

نكتب Y في التتالي في حال كان الأساس بيرميديني أي إما C أو T .

نكتب N عندما نقصد وجود أي نكليوتيد أي قد يكون A أو G أو C أو T.

مثلاً : الأنزيم Hinc II يسمح باستبدالين في موقعين، وبالتالي يميّز أربع تسلسلات (أي أربع مواقع تعرف) ويقطع الاحتمالات الأربعة الآتية:

5'-GTC|GAC-3'	5'-GTT|GAC-3'	5'-GTC|AAC-3'	5'-GTT|AAC-3'
3'-CAG|CTG-5'	3'-CAA|CTG-5	3'-CAG|TTG-5'	3'-CAA|TTG-5'

– لاحظ أنّ هذا الأنزيم يسمح للنكليوتيد الموجود بالاتجاه 3' لموقع التعرّف بأن يكون أي من الأساسين الأدينين والغوانين وهما من البيورينات لذلك يمكن نرمّز لهذا النكليوتيد R، أما من النكليوتيد الواقع في الاتجاه 5' لموقع التعرف فيسمح له أن يكون أي من الأساسين السيتوزين والتايمين وهما من البيرميدينات لذلك يمكن أن نرمز له Y.

وبالتالي يمكن كتابة موقع التعرّف لهذا الأنزيم على الشكل التالي:

5'-GTY|RAC-3'	
3'-CAR|YTG-5'	

– في حين نلاحظ أنّ أنزيم الاقتطاع HgaI له تتالي محدّد مكوّن من 15 زوج من الأسس، ويسمح فيه باستبدال 10 أزواج من الأسس في موقع التعرّف إلى أيّ نكليوتيد

سواءً أكان بيوريني أو بيرميديني، فيصبح الجزء الثابت من موقع التعرّف الخاصّ به هي خمسة أزواج أسس كما نلاحظ في الشكل التالي:

5'- G A C G C N N N N N N N N N N -3'

3'- C T G C G N N N N N N N N N N -5'

7. الخاصّة السابعة:

– تتعرف أنزيمات الاقتطاع من النمط الثاني II على تسلسلات تعرف بـ: التسلسلات المتناوبة Palindromic sequences وهي تسلسلات تقرأ من اليمين إلى اليسار في أوّل طاق تماماً كما تقرأ من اليسار لليمين في الطاق الآخر والعكس بالعكس (مثل كلمات: توت، خوخ...).وتكون القراءة دوماً من 5' باتجاه 3'.

Many type II restriction endonucleases recognize "palindromic" sequences. Palindromic sequences: symmetrical sequences which read in the same order of nucleotide bases on each strand of DNA, keep reading from 5' to 3'.

مثال: موقع التعرّف الخاصّ بأنزيم EcoRI فعندما تقرأ تسلسلها من 5' باتجاه 3' يكون الطاقين متماثلين.

5'-G A A T T C-3'

3'-C T T A A G-5'

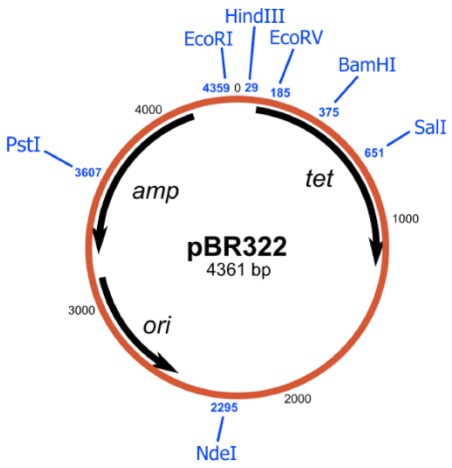
نستخدم هذه الأنزيمات لمعرفة التسلسلات الـPalindromic على الجينوم المجهول المدروس.

8. الخاصّة الثامنة:

– تتطلّب قدرة أنزيمات الاقتطاع على التعرّف على مواقعها بنوعيّة عالية أن تقطع هذه الأنزيمات الـDNA إلى شدف محدّدة **بطريقة قابلة للتكرار** (أي يمكن التنبؤ بأحجام الشدف الناتجة وتكون الشدف عملياً موافقة للتنبّؤات ولو كرّرنا العمليّة أكثر من مرّة).

The high specificity for their recognition site means that DNA will be cut reproducibly into defined fragments.

وهذه الخاصّة هي التي تتيح عند استخدام أنزيمات الاقتطاع:



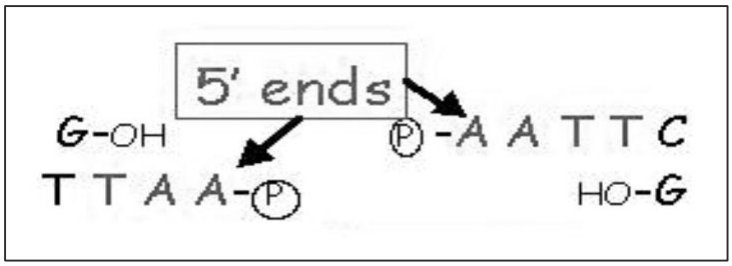
- أن نحصل على ما يعرف **بخريطة الاقتطاع** Restriction map: وهي خريطة توضح مواقع الاقتطاع Restriction sites الموجودة في تسلسل محدد من الـDNA لكل من الأنزيمات المستخدمة.
- والقدرة على **عزل وتنسيل** شدف DNA محدّدة لأننا أصبحنا قادرين على عزل هذه الشدف بأنزيمات الاقتطاع.

9. الخاصّة التاسعة:

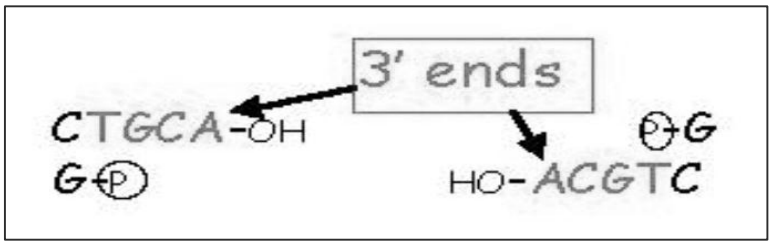
تشطر الأنواع المختلفة من أنزيمات الاقتطاع الحمضَ النوويّ **بمواقع مختلفة وبطرق مختلفة** فيمكن أن تؤدي إلى تشكل نهاية حاوية على DNA وحيد الطاق (نهايات لصوقة Sticky ends تقطع بشكل مترنح أو غير متساوي) أو نهايات مضاعفة الطاق (نهايات حادّة Blunt ends تقطع بشكل حاد Blunt).

Different enzymes cut at different position and can creat single stranded end (sticky ends) or double stranded end (blunt ends):

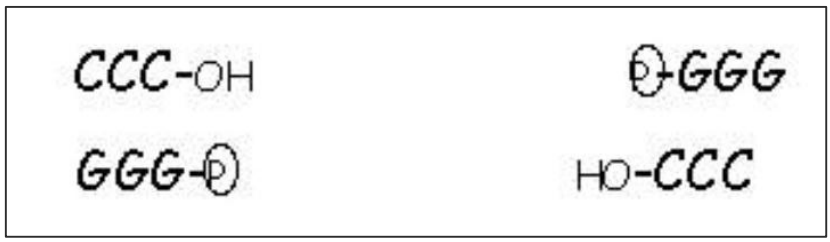
– تتميّز النهاية اللصوقة بأنّها تشكّل طاق الـDNA مفرد نتيجة القطع ويمكن لهذه الطاق أن يحوي على نهاية حرة '5 حاملة لزمرة فوسفات كما في أنزيم Eco R1:



– أو يمكن أن يحوي على نهاية حرة '3 حاملة لمجموعة هيدروكسيل:



– أما أنزيم Sma I فهو أحد الأمثلة على الأنزيمات التي تشطر الـDNA مؤدّية إلى تشكّل نهايات حادّة Blunt Ends:



يوضّح الجدول التالي أمثلة عن أنزيمات الاقتطاع والمعلومات الخاصّة بكل منها:

المصدر الميكروبيّ Source microorganism	الأنزيمات Enzyme	موقع التعرّف Recognition Site	نوع النهايات الناتجة Ends produced
Arthrobacter luteus	Alu I	AG-CT	Blunt
Bacillus amyloiquefaciens H	Bam HI	G-GATCC	Sticky
Escherichia coli	Eco RI	G-AATTC	Sticky
Haemophilus gallinarum	Hga I	GACGC(N)5-	Sticky
Haemophilus infulenzae	Hind III	A-AGCTT	Sticky
Nocardia otitiscaviaruns	Not I	GC-GGCCGC	Sticky
Staphylococcus aureus 3A	Sau 3A	-GATC	Sticky
Serratia marcesans	Sma I	CCC-GGG	Blunt
Thermus aquaticus	Taq I	T-CGA	Sticky

تُعرف النهايات اللصوقة أيضاً **بالنهايات الملتحمة** Cohesive ends، إذ يمكن لهذه السلسلة مفردة الطاق أن تلتحم Anneal مع أيّة نهاية **متتمّة** وحيدة الطاق بغضّ النظر عن مصدرها، وهذه أحد خواصّ الـDNA الفريدة الذي تشكّل أساس تقنيّة الـDNA المأشوب (لأنّنا بحاجة دوماً إلى تشكيل الـDNA من مصدرين مختلفين).

سميت بالنهاية اللاصقة أو اللصوقة لأنها قادرة على الارتباط فوراً بالتتالي المتمم لها عكس الـBlunt.

10. الخاصّة العاشرة:

– تعتبر أنزيمات الاقتطاع أدوات مفيدة لتحليل الـDNA المأشوب.

Restriction enzymes are a usefull tool for analyzing recombinant DNA:

– أي أنّ أنزيمات الاقتطاع ليست أداة أساسيّة في تشكيل الـDNA المؤشّب وحسب، وإنّما هي أيضاً أداة هامّة في الاختبارات التي تجري لتحليل هذه الجزيء ودراسة العديد من الأمور المتعلقة به منها:

♥ من الضروريّ بعد لحم تسلسل الـDNA وإدخاله في ناقل[5] مناسب للتنسيل Cloning vector أن يتمّ التحقّق أنّ الشدفة الصحيحة قد أُدخلت إلى الناقل (لأنّ هناك شدف عديدة قد تمّ اقتطاعها بالأنزيم المستخدم وستدخل جميعاً إلى الناقل "قد يكون بلاسميدات أو فيروسات").

♥ وأحياناً يكون من الضروريّ التأكّد أنّ تسلسل الـDNA الغريب قد توضّع بشكل صحيح في الناقل المستخدم من حيث:

1. **قياس** Size الشدفة المحشورة.
2. **اتّجاه** Orientation القطعة المحشورة.
3. تحديد وجود **مواقع اقتطاع** داخل جزيئة الـDNA المرغوبة لأنزيم الاقتطاع Restriction enzyme المستخدم فإذا وُجد مثل هذا الموقع سيؤدّي ذلك إلى قطع التسلسل المرغوب وبالتالي يتعذّر إنتاج البروتين.

[5] سنتحدّث عن التنسيل Cloning فيما بعد والنواقل Vectors المستخدمة فيه، لكن للفهم حالياً نشير إلى أنّ البلاسميد هو من أشهر النواقل المستخدمة في التنسيل.

تجزئة الDNA DNA fractionation:

– تهدف تجزئة الـDNA إلى **فصل** شدف الـDNA الناتجة عن استخدام أنزيمات الاقتطاع عن بعضها بغية عزلها وتحليلها، وهي طريقة **غير نوعيّة** بمعنى أنّها تعطي فكرة تقريبيّة عن أطوال الشدف الناتجة ولا تعزل الشدفة المرغوبة بدقّة (كما في التلطيخ الذي سندرسه في المحاضرة القادمة) وتعتمد تجزئة الـDNA على تقنيّة:

الرحلان الكهربائي Electrophoresis :

- يعتمد مبدأ هذه التقنيّة على اختلاف شدف الـDNA الخطّيّة Linear الناتجة بأطوالها وبالتالي في **وزنها الجزيئيّ** لذلك يمكن فصلها أو تمييزها Resolving بتقنيّة الرحلان الكهربائيّ على هلامة البولي أكريل أميد Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) أو الأغاروز[6] Agarose وكلاهما من أشهر البوليمرات المستخدمة في تحضير الهلامات.

- وكما نعلم أنّ الـDNA يكتسب شحنة **سلبيّة** عند وضعه في وقاء الرحلان لذلك يتمّ ترحيل الـDNA على هلامة الآغاروز من القطب السالب أي المهبط (الكاثود Cathode) إلى القطب الموجب أي المصعد (الآنود Anode) عندما يطبَّق الحقل الكهربائيّ.

- وبعد أن يتمّ فصل شدف الـDNA باستخدام الرحلان يتمّ **تظهير** الـDNA باستخدام محلول حاوٍ على مادّة **الإيتيديوم بروماید**[7] Ethidium bromide وهي عبارة عن مادّة مخلّبة للـDNA (DNA chelator) ترتبط بقوّة إليه وتعطي **تألّق** Fluoresces تحت أشعّة الـUV مما يسمح برؤية وكشف الـDNA.

---

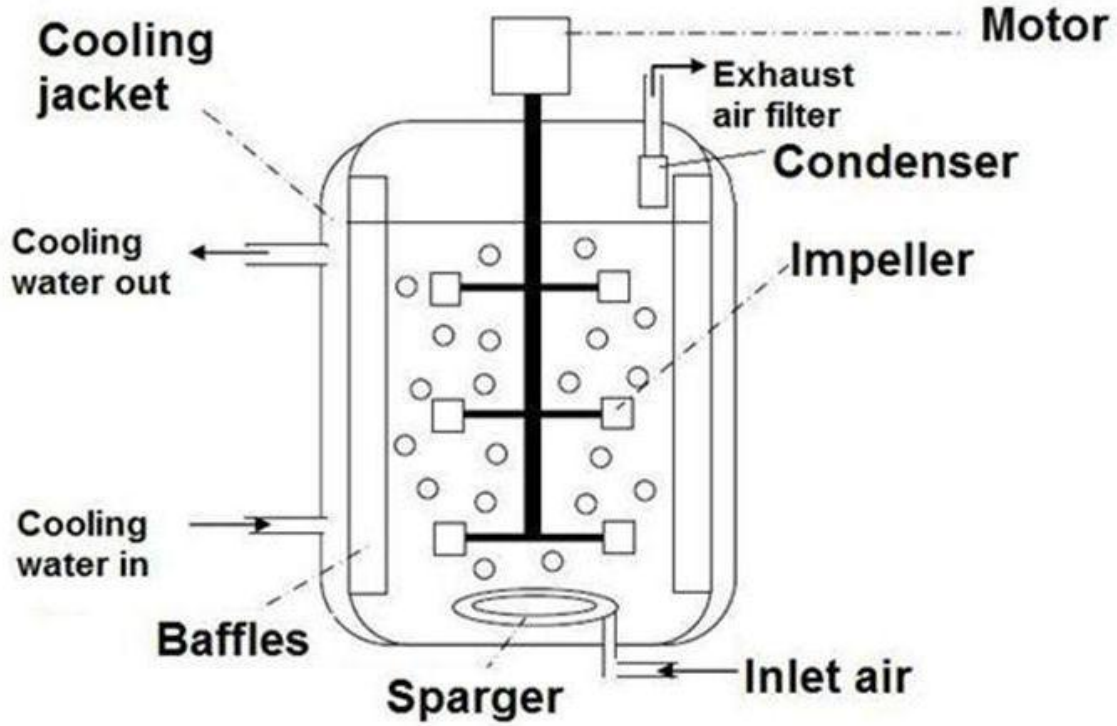
[6] يشتقّ الآغاروز من بعض الأعشاب البحريّة Seaweed ويستخدم بشكل هلامة بتركيز (0.5-2%) لفصل الأطوال المختلفة من شدف الDNA. وكما نعرف كلما زاد التركيز تزيد قدرة الفصل (الميز Resolution)، أي في حال وجود شدف متقاربة كثيراً في الوزن الجزيئي والشحنة وأردنا فصلها نستخدم تركيز عالي من الهلامة.

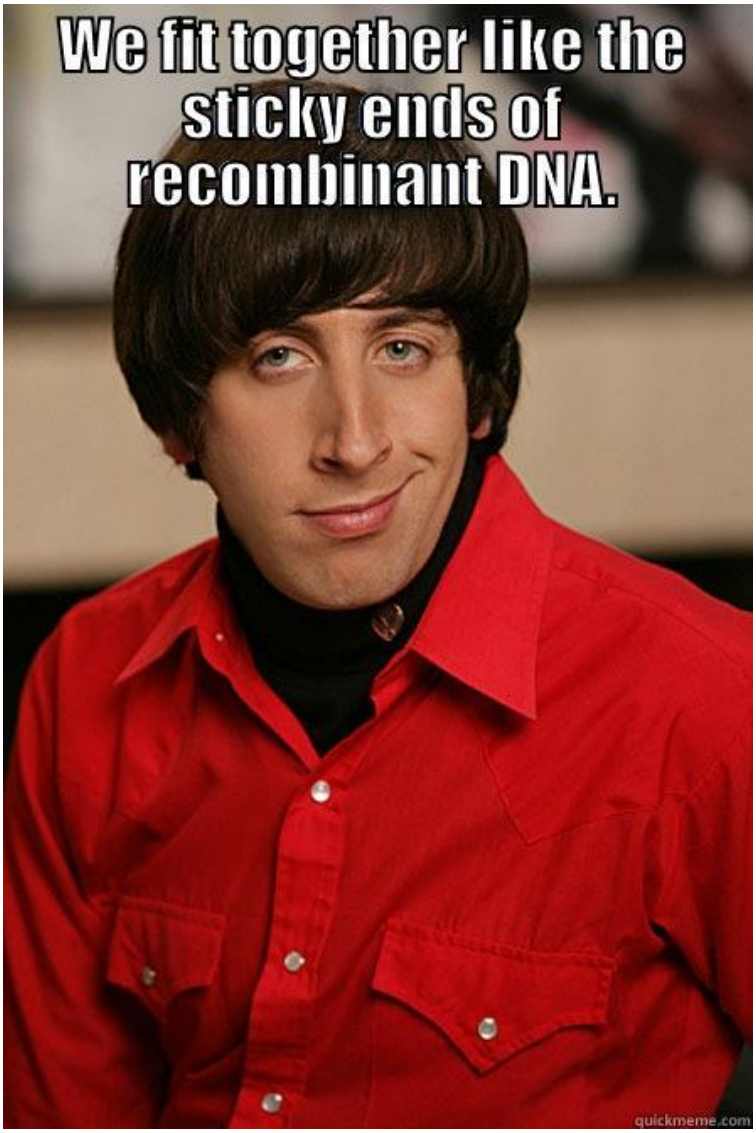
[7] مادّة الإيتيديوم بروماید شأنها شأن أيّة مادّة ترتبط إلى الDNA تعتبر خطيرة ومولّدة للطفرات ومسرطنة.

الفوسفاتاز القلويّة Alkaline phosphatase	تقوم بإزالة مجموعة فوسفات من النهاية الحرّة '5 من الـــDNA وبالتالي تمنع إعادة الالتحام غير المرغوب Unwanted re-ligation لمواقع اقتطاع الـــDNA.
DNA ligase	تصل النهايات المتوافقة Compatible fragments لشدف الـــ) DNAسواء أكانت حادّة أو نهايات لصوقة متتامّة (Complementaryبحاجة لـــ ATP.
DNA polymerase I	تصنّع طاق DNA متمّم لطاق DNA مرصاف بالاتّجاه '5 لـــ '3 وتبتدئ من النهاية الحرّة '3 لمشرع الـــDNA.
Exonuclease III	تشطر النكليوتيدات بالتتابع من طاق الـــDNA بالاتجاه من '3 لـــ'5
Polynucleotide Kinase	تضيف مجموعة فوسفات إلى النهاية الحرّة '5 للـــDNA مفرد أو مضاعف الطاق أو الـــRNA بحاجة لـــ ATP.
RNase A	أحد أنواع Nuclease التي تخرّب الـــRNA فقط وليس الـــDNA.
Taq DNA polymerase	هي عبارة عن أنزيمة DNA polymerase معزولة من جراثيم ثابتة بالحرارة (وهي Thermus Aquaticus).

أحبائي وهي آخر إضافة ..صورة جايبة عليها الدكتورة أسئلة ، هية تابعة للمحاضرة التانية .. و بأسئلة الدورات رح تلاقوا كمان مع اسئلتا

Schematic Diagram of a Stirred Tank Bioreactor





أضف ملاحظاتك :

RBCs' Quote

"دمشقُ وأنتِ الثَرى الطيّبُ

غضبتِ وما أجمل!

فكنت السلامَ إذا يغضبُ"

-سعيد عقل-

لإرسال ملاحظاتكم:
goo.gl/forms/Hl8slZEmLSZvySq92

لتحميل محاضراتنا:
www.Rbcsteam.org/lectures

للاستفسار عن هذه المحاضرة على غروب الفريق على الفيس بوك:
RBCs Pharmacy 2019 www.facebook.com/groups/rbcs2019