Remove Watermark Now

المحاضرة الثانية عشر

الطفرة الوراثية Genetic mutation

تعرف الطفرة الوراثية بأنها تغير مفاجئ وكابت في الصفات الوراثية للكائن الحي، والذي يحتفظ به خلال عملية إعادة تركيبه أو تضاعفه، على ألا يكون هذا التغير في التركيب الوراثي ناتجاً عن اتحادات وراثية أو انتقال الحامض النووي منقوص الأكسيجين (DNA) من خلية إلى أخرى. الطفرة: هي تغير مفاجئ في طبيعة العوامل الوراثية المتحكمة في الصفات الوراثية مما يسبب تغير الصفة. معظم الطفرات تسبب صفات غير مرغوب فيها / ولا تعتبر الطفرة حقيقية الا اذا توارثت على مدى الاجيال.
الطفرة الحقيقية: هي الطفرة التي تظل متوارثة على مدى الأجيال المختلفة.
ويمكن تعريف الطفرة الوراثية بأنها تغير في تسلسل أو عدد النيوكليوتيدات في الحامض النووي الـ DNA يؤدي الى تكوين تسلسلات جديدة من التسلسلات من النيوكليوتيدات فتنتقل اثارها بصفات معينة الى الابناء .ان اصغر وحدة وراثية قابلة لإحداث طفرة وراثية يطلق عليها ميوتون muton والذي يمثل أصغر عدد من النيوكليوتيدات المتنقلة والقادرة على انتاج طفرات مظهرية. وان الميوتون يمكن ان يكون من الصغر لحد نيوكليتيدة واحدة، تؤدي اغلب الطفرات الى اختلاف في عدد الكروموسومات أو التغيرات في تركيب الكروموسوم الواحد وإن هذه التغيرات ممكن أن تحدث بصوره تلقائية او بصورة مستحثة من خلال المطفرات (mutagens) الاشعاع والمواد الكيمياوية. إذا كان التغير على مستوى الجين قد يؤدي إلى تغير في صورته أي تحول الى حاله أخرى، وقد يكون هذا التغير خطراً يؤدي وقف عمل الجين لعملية معينة كإنتاج انزيم او هرمون ويصبح موقوف النشاط او قد يقلل هذا التغير من إنتاج الجين أو قد يزيد هذا التغير من مقدرة الجين في انتاج نشاط معين.

تحدث الطفرة نتيجة تغير في ترتيب القواعد النيتروجينية بالفقد أو الاضافة أو الإستبدال، مما يؤدي إلى تغير في تركيب المورثة وبالتالي تغيير في تكوين البروتين الذي تشفره، فينتج عنه تغير في الصفات مثل عدم القدرة على تخليق بعض الأحماض الأمنية أو الفيتامينات أو ظهور حساسية أو مقاومة تجاه المضادات الحيوية أو الملتهمات، أو تغير في الخصائص الأنزيمية. قد تكون الطفرات في الخلايا البكتيرية تلقائية (Spontaneous mutation) وهي التي تحدث طبيعيا بدون سبب معلوم **الطفرة التلقائية**: تنشأ طبيعيا دون تدخل الانسان / بسبب تغيرات بيئية كالأشعة الكونية والأشعة فوق البنفسجية /تلعب دورا هاما فى تطور الاحياء
أما الطفرات المستحدثة (Induced mutation) التي تحدث نتيجة معاملة البكتيريا بالعوامل المطفرة مثل الأشعة أو الحرارة أو بعض المواد الكيميائية التي تتفاعل مع المادة الوراثية. **الطفرة المستحدثة** : يستحدثها الانسان ليجنى صفات مرغوبة / يستخدم مثلا أشعة-X وأشعة جاما أو مادة الكولشيسين او غاز الخردل او حمض النيتروز لمعالجة النبات / تنتج عن هذه المعالجة ضمور خلايا القمة النامية للنبات وموتها ويتجدد تحتها أنسجة جديدة تحتوى على عدد مضاعف من الصبغيات (يحدث تضاعف صبغي) فتتكون ثمار كبيرة الحجم جيدة الطعم / وأيضا احداث طفرات لكائنات دقيقة كالبنسيليوم لها القدرة على إنتاج كمية كبيرة من البنسلين (مضاد حيوي)
لمحة تاريخية: شاهد الانسان حدوث الطفرات الوراثية في الكثير من الكائنات الحية، واستفاد منها أحيانا دون معرفة حقيقتها أو أسبابها، نذكر على سبيل المثال ملاحظة مزارع أمريكي عام 1791م قصر واعوجاج أرجل أحد الحملان، وعدم استطاعة ذلك الحمل القفز عبر الاسيجة أو الركض بسرعة مما أدى إلى زيادة واضحة في وزن

Remove Watermark Now

وصوف ذلك الحمل، دفعه ذلك إلى استخدام ذلك الحمل- عندما أصبح كبشا - لتوليد سلالة من الأغنام القصيرة الأرجل تمتاز بكثرة لحومها وغزارة صوفها. لكن ليست جميع الطفرات المكتشفة مفيدة للإنسان بل أن بعضها يسبب إنتاج حيوانات أو نباتات ذات أمراض وراثية مستعصية تسبب خسائر اقتصادية هامة مما يستوجب القضاء عليها لمنع انتقالها إلى الأجيال التالية.

ولكن التقصي العلمي الحقيقي بالطفرات بدأ عندما أعلن العالم الهولندي "هوجود يفريز" أحد مكتشفي نظرية مندل سنة 1901م أن ملاحظاته وتجاربه على النبات أثبتت حقيقة التطور (Evolution) من خلال تغيرات مفاجئة في وراثة الكائن الحي، أطلق عليها اسم الطفرة Mutation. ويعود الفضل في وضع نظرية الطفرات إلى العالم Devries عام 1901،.... وبعد ذلك أجريت أبحاث عديدة حول الطفرات التلقائية في الكائنات الحية، ساهمت ذبابة الخل (Drosophila melanogater) بكونها مادة علمية ممتازة لهذه الدراسات إذ تم التعرف فيها على المئات من الآليلات الطبيعية والطافرة (أليلات لون العين، قد الأجنحة، لون الجسم...).

ومع اكتشاف الشكل الحلزوني لـ DNA وثباته الكيميائي/ واكتشاف عملية تضاعفه أصبح من الواضح أن أي تغير مفاجئ أو "طفرة" تحدث أثناء عملية تكوين أو تضاعف DNA يجب أن تصحح و إلا تتفاقم الأضرار في هذه الجزيئة و بالتالي الخلية بصفة عامة.

نتـــــــــائج الطفرة

أ- تظهر صفات غير مرغوبة (أي غير مطلوبة ولا نود ظهورها (مثل : 1- إصابة النباتات بالعقم ونقص المحصول 2- بعض التشوهات الخلقية في الإنسان).

ب- وتظهر صفات مرغوب فيها ويتم إكثارها

مثال: في سلالة الأغنام الأمريكية (سلاله أنكن) لاحظ أحد المربين ظهور طفرة نتج عنها ظهور خروف ذو ارجل قصيرة مقوسة / فلم تستطع تسلق سور مزرعة الفلاح الامريكى / فاعتبرها طفرة مفيدة فاعتني واهتم بها و انتج منها سلالة كاملة وهي مرغوبة لعدم تسلقها سور الحظيرة.

وفي نوع من الماشية الأيرلندية ظهرت أفراد كثيرة اللحم (سميت دكستر) من سلالة قليلة اللحم (تسمى كري) فتم الاهتمام بها حتى أصبح معظم الماشية كثيرة اللحم.

تفسير الطفرة : قد تحدث الطفرة عن طريق :

1- تغير تركيب العامل الوراثى . (طفرة جينية).
2- تغير عن تأثير البيئة.
3- تغير عن انعزال الجينات وإعادة اتحادها.

تقسم الطفرات الى :

1- Small Scale mutation: كالطفرات التي تحدث في واحد او اكثر من النيوكليوتيدات، وتشمل

أ- الطفرات النقطية point mutation

ب: طفرات الإزاحة frame shift mutation

2- Large scale mutation وتشمل الطفرات الكروموسومية

ويمكن تقسيم الطفرات على اساس تأثيراتها المظهرية إلى:

1- الطفرات المميتة lethal mutation وهي التي تسبب موت الكائن الحي في اي مرحلة من مراحل نموه

2- الطفرات الشكلية : وهي الطفرات التي تؤدي الى تغير في اللون او الشكل او الحجم

3- الطفرات الفسيولوجية: تؤدي الى تغيرات في الوظيفة كالتغيرات في معدل نمو الفرد او في مقدرته على مقاومة ظروف بيئية كالحرارة والمنبهات الكيمياوية وغيرها

pdfelement

Remove Watermark Now

4- الطفرات الكيمياوية: تؤثر على قابلية الكائن الحي على انتاج ماده أيضية مثل نيوكليوتيدة او سكر او حامض اميني
5- الطفرات الشرطية: التي يظهر تأثيرها على الكائن في حالة وضع الكائن تحت ظروف نمو معينة كالطفرات الشرطية الحساسة للحرارة التي تؤثر على نمو الكائن في درجة حرارة معينة وليس غيرها
كما يمكن تقسيم الطفرات على اساس سبب حدوثها :
1- الطفرات التلقائية : وتسمى ايضا بالطفرات الذاتية، وهي التي تحدث عند عدم تعرض الكائن لمادة مطفرة معروفة وقد يكون سبب حدوثها :
أ - تعرض الكائن الحي للإشعاعات الموجودة في الطبيعة
ب -تفاعلات بايوكيمياوية تجري داخل الخلية
ج- حصول تبدلات طبيعية في درجات الحرارة
والطفرات التلقائية على المستوى الجزيئي ربما تحدث بسبب:
أ- Tautomerism : وهو تغير يطرأ على القاعدة النتروجينية نتيجة تغير في موقع ذرة الهيدروجين مما يؤدي الى تغير في نمط الاواصر الهيدروجينية بين زوج القواعد اثناء التضاعف
ب- Depurination : فقدان قاعدة البيورين (الادنين او الجوانين) لتكوين (AP site) apurinic site
ج- deamination: تغير في القاعدة النتروجينية بحيث تكون حاوية على مجموعة الكيتون بدل مجموعة الامين على سبيل المثال تحول الادنين الى الهايبوزانثين والتي يمكن تصحيحها بواسطة ميكانيكية اصلاح الضرر في الـ DNA
د: Slipped strand mispairing : ويحدث مسخ في شريط الدنا الجديد من قالب الدنا المتضاعف، ثم اعادة اصلاح من نقط مختلفة مما يؤدي الى اضافة او حذف بعض القواعد النتروجينية.
2- الطفرات المستحدثة: وهذه الطفرات تحدث نتيجة تعرض الكائن الى بعض المواد الكيمياوية او الفيزياوية

2-1 أنواع الطفرات الوراثية:

قد تحدث الطفرة الوراثية أثناء تضاعف DNA أو بعده أو خلال عملية تصحيحه، والتغيرات الأكثر شيوعا هي الحذف و الاضافة و الاستبدال وإعادة الترتيب لقاعدة أو أكثر،
والطفرة الجينية : هي تغير فى ترتيب القواعد النيتروجينية فى جزىء DNA / يؤدى الى تغير فى الصفات / فتتحول الصفة السائدة لمتنحية غالبا / وقد يحدث العكس
ويمكن تقسيم الطفرات على أساس عدة اعتبارات إلى عدة أنواع:

1.2.1. الطفرة النقطية (Point mutation):

الطفرة النقطية هي التي تنتج عن تغير قاعدة أو زوج واحد من النيوكليوتيدات وقد تتكرر عدة مرات ضمن نفس المورثة في خيط DNA. وتتمثل الطفرة النقطية في الاستبدال أو الحذف أو الإضافة.
وتحدث الطفرة النقطية بسبب المواد الكيمياوية المطفرة أو خلل في عملية التضاعف: وهو تغير بسيط في قاعدة نتروجينية واحدة أو عدد قليل منها، ويكون هذا التغير كاستبدال قاعدة نتروجينية بأخرى. ويتم استبدال القواعد النتروجينية اما بالانتقال (الاستبدال متكافئ) transition او بالتحول (الاستبدال غير المتكافئ) transversion . والانتقالات عبارة عن طفرات ناجمة من احلال البيورينات محل البيورينات الاخرى او بريميدينات محل بيريميدينات اخرى، وهذا النوع يكون اكثر شيوعا من التحول ويحدث بسبب التعرض للـ nitrose acide او احلال مماثلات القواعد base analog . اما التحول فيكون اقل شيوعا، وفيها يتم احلال البيورين بالبريميدين او العكس.

Remove Watermark Now

1.1.2.1 طفرات استبدال قاعدة (طفرات الإحلال القاعدي) (Base substitution):

تحدث هذه الطفرات عندما تستبدل قاعدة نيتروجينية في سلسلة DNA بأخرى بحيث يحدث تزاوج خاطئ بين النيوكليوتيدات ويكون هذا الاستبدال متكافئ (Transition) أو غير متكافئ (Transversion).

أ - طفرات الاستبدال المتكافئ (الاستبدال المتماثل) transition:

إذ يتم استبدال قاعدة نيتروجينية بيورينية أو بيريميدية بقاعدة أخرى مكافئة لها كميائيا (تحل قاعدة بيورين محل أخرى من نفس النوع و قد تحل قاعدة بيريميدين محل قاعدة أخرى من البريميدين) حيث تبقى نسبة أنماط القواعد (بيورينية وبيريميدية) ثابتة داخل خيط DNA (شكل 1).

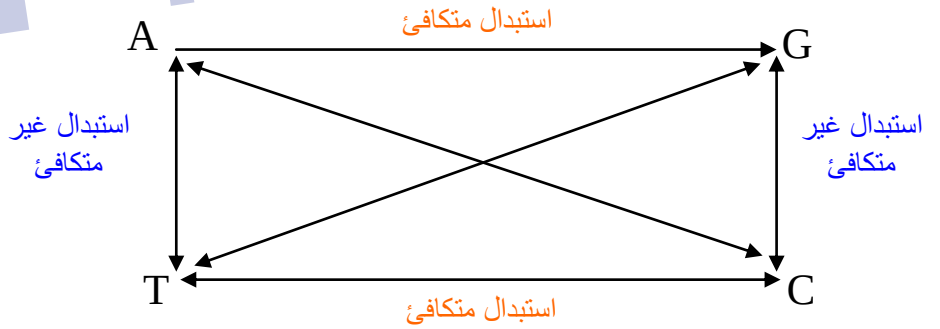
A.T → G.C G.C → A.T T.A → C.G

ب - طفرات الاستبدال غيرالمتكافئ (الاستبدال المتباين) transversion:

وفيه تستبدل قاعدة بيورين بقاعدة بيريميدين أو العكس، مما يؤدي إلى اختلال في نسبة أنماط القواعد داخل DNA، بالإضافة إلى ذلك تحدث معظم الاستبدالات غير المتكافئة تزاوجات خاطئة تخل كثيرا بتركيب وتجانس الحلزون المزدوج لـ DNA . وعلى كل حال يوجد عدد قليل من المواد المطفرة تسبب هذه الاستبدالات وتبقى آلية تأثيرها غير معروفة.

A.T C.G , A.T T.A, G.C T.A , G.C C.G

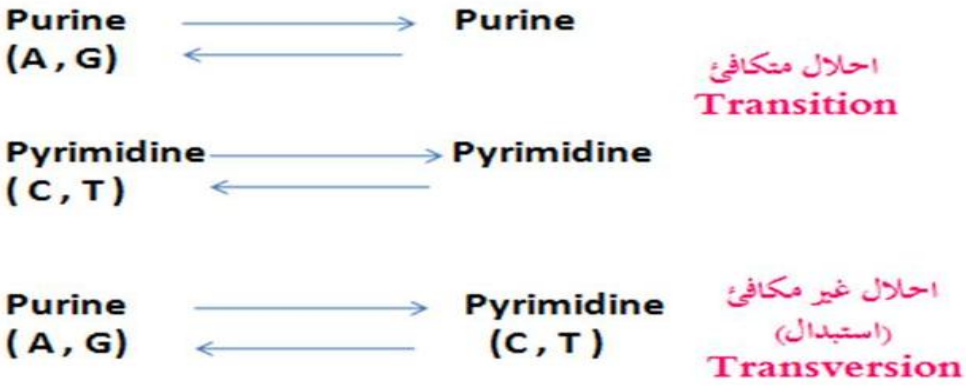
T.A G.C , T.A A.T , C.G A.T , C.G G.C



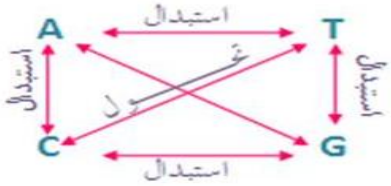
الشكل1: الاستبدال المتكافئ وغير متكافئ بين قواعد DNA .

الشكل يمثل الاستبدال بين القواعد النتروجينية في الحلزون المزدوج DNA : اضلاع المستطيل يمثل التحول، وأقطاره تمثل الانتقال

Remove Watermark Now



تعرف هذه الظاهرة بالاستبدال و التحول Tautomerism



أما فيما يخص ترجمة المراسيل فتختلف الاستبدالات النقطية حيث تصنف الطفرات النقطية التي تحدث في منطقة تشفير البروتين الى ثلاث انواع بالاعتماد على تشفير الكودون الطافرالى

أ - الطفرات الخاطئة (Faux sens) :

هي الطفرات التي تؤدي إلى تغير الحمض الأميني بعد ترجمة الثلاثية المشفرة في مستوى الريبوزومات وتكون مرادفة أو غير مرادفة.

- طفرات خاطئة غير مرادفة (non synonyme):

هي التغير في قاعدة واحدة في مستوى الشفرة (الثلاثية) بحيث يؤدي إلى تغير في الحمض الأميني. يكون هذا الأخير مختلف كيميائيا عن الحمض الأميني الأصلي :

…GAG… AAG

Glu Lys

تحدث هذه الطفرة بصفة عامة في إحدى القاعدتين الأولى أوالثانية من الثلاثية المشفرة، واحتمال حدوثها في القاعدة الثالثة ضعيف جدا لأن أغلب الأحماض الأمينة لها أكثر من ثلاثية مشفرة تختلف فقط في القاعدة الثالثة.

- طفرات خاطئة مرادفة (synonyme):

يحدث استبدال ثلاثية مشفرة لحمض أميني بأخرى مشفرة لحمض أميني آخر من نفس المجموعة الكيميائية (حمضية، قاعدية، متعادلة):

AAA AGA

Lys Arg

الحمضين الأمينين (Lys, Arg) من مجموعة الأحماض الأمينة القاعدية.

ب -الطفرة عديمة المعنى أو عديمة المدلول (الطفرات غير المحسوسة) (non sense mutation): وهي طفرات تؤدي الى تكوين شفرات الانهاء مما

يؤدي الى تكوين بروتين مقطوع غير فعال؛ تؤدي هذه الطفرات إلى تغيير ثلاثية مشفرة لحمض أميني إلى ثلاثية نهاية الترجمة (Codon stop) :

…TGC… TGA

Cys stop

يؤدي الاحلال القاعدي إلى تغير الشفرة الوراثية إلى واحد من الشفرات الثلاثة و التي تقوم بإنهاء عملية الترجمة في بناء البروتين و تسمى Stop Codon و هذه الشفرات لا تترجم إلى أحماض أمينية بل مهمتها انهاء عملية البروتين . مثل: UAA , UAG , UGA تنشأ بواسطة الإحلال القاعدي باستبدال القاعدة G بالقاعدة A في الموقع الثاني لشفرة الحمض تربتوفان UGG و يحولها إلى شفرة أمبير UAG .

ج - الطفرة الصامتة (Silence mutation) وتسمى أيضاً طفرات صحيحة المدلول: وهي تشفر لنفس الحامض الامينى

تحدث بعض الطفرات على مستوى القاعدة الثالثة للشفرة دون أي تأثير على ترجمة الحمض الأميني :

…CCC… …CCT…

Pro pro

تحدث نتيجة الإحلال القاعدي لأحد القواعد النيتروجينية في الشفرة و لكنها لا تؤدي إلى تغير نوع الحامض الأميني و يعود ذلك إلى ظاهرة كثرة عطاء الشفرة degeneracy حيث أن للحامض الأميني الواحد أكثر من شفرة تؤدي إلى استقطابه.

مثال :

د - الطفرة المفقودة mis sense mutation وهي تشفر لحامض امينى مختلف. حيث يحدث الاحلال القاعدي الذي يسبب احلال حامض أميني محل حامض أميني آخر .. مثال :

UGG → UGU

Tryptophane Cystine

2.1.2.1 . طفرات هيكلية - طفرات الحذف والإضافة - طفرات إضافة أو نقص قاعدة أو عدد من القواعد - طفرات تغير الإطار - طفرات الإزاحة Frame shift mutation

طفرة الحذف Deletion حيث يستقطع جزء من الجين و يفقد.

و طفرة الإدخال Insertion حيث يتم إدخال نيوكليوتيدة إضافية.

عندما تنزع (تحذف) أو تضاف قاعدة نيتروجينية في التسلسل النيوكليوتيدي، فإن إطار القراءة سيتغير بالنسبة لجميع الثلاثيات التي تلي منطقة الإضافة أو الحذف، وهذا يؤدي إلى تغيير كبير في تسلسل الأحماض الأمنية والمكونة للبروتين، وإذا استمرت عملية الإضافة أو الحذف حتى عدد القواعد المضافة أو المحذوفة ثلاث قواعد (أي ثلاثية واحدة) فإن هذا يؤدي إلى عودة العبارة الموالية إلى ترتيبها الأصلي.

في طفرات الإزاحة يحدث اضافة او حذف لقاعدة نتروجينية واحدة او اكثر، وبما ان شريط الـDNA المشفر للبروتين يتألف من الشفرات الوراثية المؤلفة من ثلاث نيوكليوتيدات،

Remove Watermark Now

مما يؤدي الى تغير في تسلسل القواعد النتروجينية الواقعة بين شفرة البدء وشفرة الانهاء وبذلك يحدث تغير في ناتج التعبير الجيني .
وتحدث الاضافة اما بسبب العناصر الطافرة transposable elements او خطأ اثناء عملية التضاعف والإضافة في منطقة التشفير لذلك الجين يؤدي الى تغير في عملية تنضيج mRNA اذ تدعى بالـ splice site mutation ، ومن الممكن ان تكون عملية الاضافة انعكاسية بإزالة العناصر القافزة. اما عملية الحذف فتكون غير انعكاسية
تـؤدي طفـرات الحـذف والإضـافة (طفـرات الإزاحـة) إلـى نمـط ظـاهري طـافر، يكـون الحذف هو السبب في أغلب الأمراض الوراثية أما الإضافة فهي نادرة، فمثلاً التتابع:

ACT CAT CGG GCA ACT TGA
Stop Val Ala Arg Stop Thr

يتغير تماما عند إضافة قاعدة G في الوضع الرابع ليصبح:

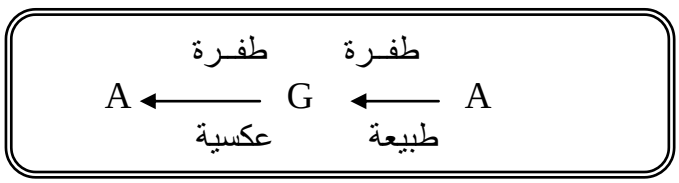
ACT CGA TCG GGC AAC TTG A
Stop Arg Ser Pro Leu Asn

و يستمر التغيير في قراءة العبارات بعد هذه الإضافة حتى تصل القواعد المضافة إلى ثلاثية كاملة، عندئذ تعود الثلاثيات الموالية لمكان الإضافة إلى صورتها الأصلية:

ACT GGC ACT GGG CAA CTT GA
Stop Pro Stop Pro Val Glu

ACT GGG CAT CGG GCA ACT TGA
Stop Pro Val Ala Arg Stop Thr

ومثـال ذلـك الطفـرة التـي تحـدث فـي الثلاثيـة 138 (UCC) مـن السلسـلة a للهيموغلـوبين حيـث تفقـد القاعـدة C، ممـا يـؤدي إلـى تغيـر إطـار القـراءة للثلاثيـات الباقيـة مـن السلسـلة، وتتحول إلى السلسلة a تحتوي على 5 أحماض أمنية زائدة.
الطفرة العكسية (Reversion mutation):
د- الطفـرة العكسـية هـي تلـك التـي يتغيـر خلالهـا الطـابع الظـاهري مـن الشـكل الطـافر إلـى الطبيعي والطفرات العكسية على نوعين:
- طفـرة الموقـع الواحـد و فيهـا تحـدث الطفـرة العكسـية فـي نفـس المكـان الـذي حـدثت فيـه الطفرة الطبيعية.



- أمـا النـوع الثـاني فتحـدث فيـه الطفـرة العكسـية فـي مكـان غيـر الـذي حـدثت فيـه الطفـرة الطبيعيـة تسـبب عـودة ظهـور الـنمط الطبيعـي مـن جديـد، أي أن الطفـرة الثانيـة كبتـت الطفـرة الأولـى وقـد تحـدث الطفـرة الكابتـة ضـمن نفـس المورثـة فـي قاعـدة مختلفـة تعيـد الـنمط الطبيعـي. **الطفـرة الكابتـة:** و هـي تحـدث تغييـر فـي موقـع مـا غيـر موقـع الطفـرة الأماميـة الاصـلى بحيـث يـؤدى ذلـك إلـى تصـحيح أو إلغـاء مـا تحدثـه الطفـرة الأماميـة و استعادة التعبير الطبيعى للجين فى موقع الطفرة الأمامية.

Remove Watermark Now

3.1.2.1. الطفرات التي تخص قطع DNA الطويلة:

تتضمن تغير مجموعة كبيرة من القواعد النيتروجينية في المورثة وقد يشمل التغير جزء من DNA وذلك بالزيادة أو النقصان أو الانعكاس في الترتيب، وتحدث تغيرات جوهرية في البروتين المشفر، وبالتالي تؤدي إلى نمط ظاهري طافر. يحدث حذف أو فقد لقطعة من DNA، قد يشمل في بعض الأحيان مورثة بأكملها. كما يتم إدماج سلاسل نيوكليوتيدية في سلسلة DNA غالبا ما يكون مصدرها منطقة أخرى من مناطق الكروموزوم.

- إعادة الترتيب (Réarrangement):

تحدث في بعض الأحيان طفرات عن طريق تبادل قطع DNA داخل أو خارج المورثة، مثال ذلك حالات القلب التي يتم فيها قطع جزء من DNA ثم إعادة إدماجه في نفس الموقع لكن بشكل معكوس.

كما تنتقل قطع DNA تدعى بالمتحركة (Transposons) من جزئية DNA أو كروموزوم لآخر أو من بلازميد إلى كروموزوم والعكس صحيح فتحدث طفرات .

توجد هذه القطع عند الخلايا بدائيات وحقيقيات النواة، و قد يؤدي اندماجها في مستوى المورثة إلى إبطال مفعول هذه الأخيرة. ولا تعني بالضرورة إزالة العنصر المتنقل استرجاع المورثة نشاطها لأنه من الممكن أن تنقل هذه القطع المتنقلة معها سلاسل من المورثات.

ومن جهة أخرى لهذه العناصر دورا هاما في تطور العتاد الوراثي باكتسابه قطع جديد وإعادة ترتيبها.

خصائص الطفرة البكتيرية:

للطفرة الوراثية البكتيرية عدة خصائص أهمها ما يلي:

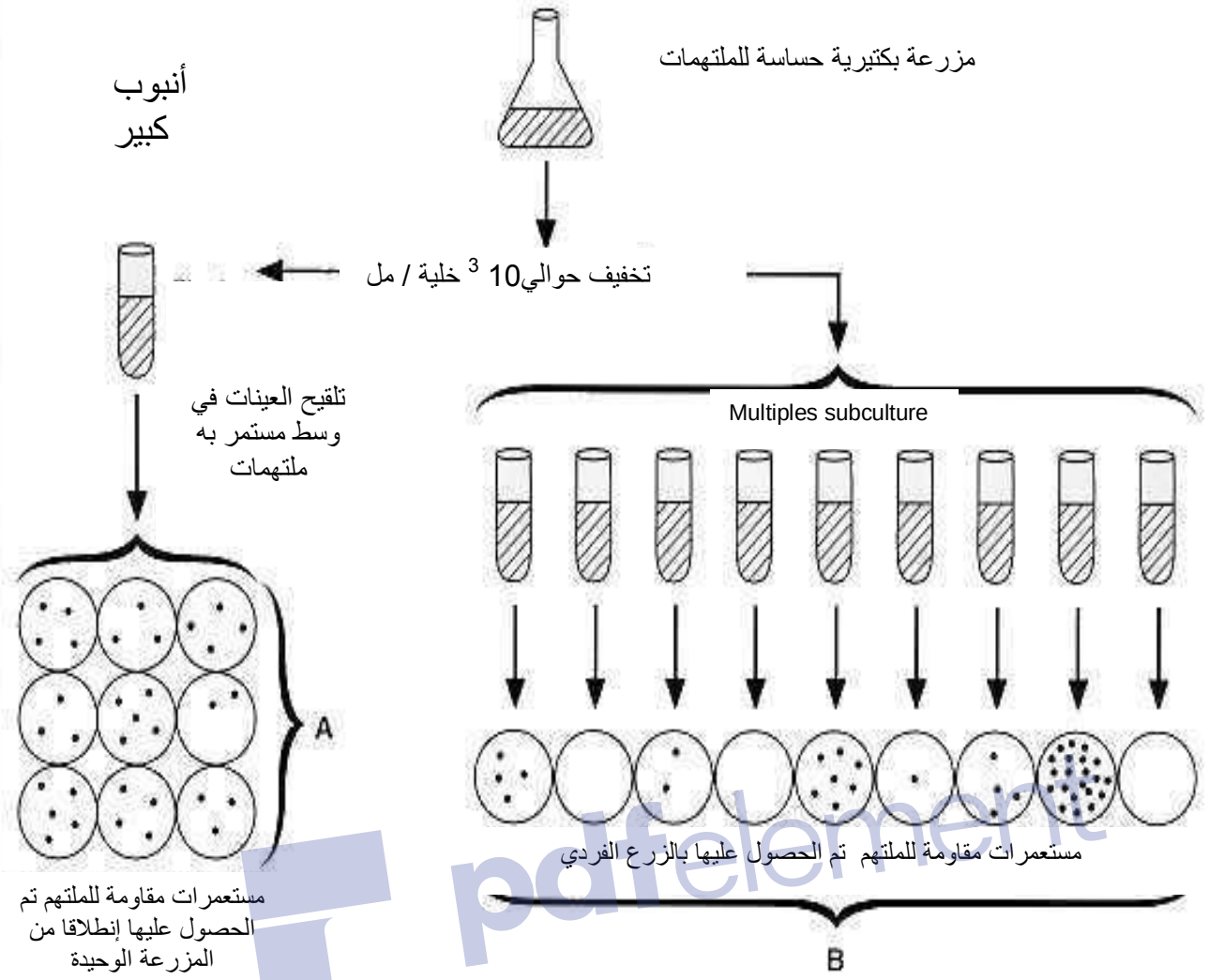
- التلقائية:

للكشف عن وجود الطفرة الوراثية من الضروري استعمال عامل انتقائي (مضاد حيوي، ملتهم) لأن ذلك يمكننا من معرفة إذا كانت الطفرة تلقائية أو تسبب فيها هذا العامل، ولهذا الغرض نعتمد على اختبارين هما: اختبار التذبذب، واختبار النقل بالقماش.

- اختبار التذبذب (test de fluctuation) :

قام كل من DELBRUCKو LURIA بدراسة مقاومة E-coli للملتهم. يؤدي هذا الأخير إلى تدمير الخلية بعد العدوى ابتداء من المزرعة البكتيرية السائلة الحساسة للملتهم. يقسم الوسط (مرق مغذي) إلى جزئين متساويين على أن يحتوي كل جزء (10 مل) على 1000 خلية. يترك الجزء الأول على حاله في وعاء أما الجزء الثاني فيقسم على 50 أنبوب صغير بحيث يحتوي كل أنبوب على 0.2 مل، تحضن كل المزارع في 37 م° لمدة 48 ساعة لغرض التكاثر. يزرع بعد هذا النمو محتوى كل أنبوب في طبق بتري به وسط جيلوزي يحتوي على الملتهم، ثم تحضن حتى ظهور المستعمرات المقاومة (الطافرة). أظهرت النتائج أن عدد المستعمرات البكتيرية المقاومة للملتهم تقريبا نفسه (3-7 مستعمرات مقاومة) في كل الأطباق (50 طبق) المزروعة من الأنبوب الكبير (الجزء الأول) ، بينما لوحظ تذبذب في عدد المستعمرات المقاومة في أوساط الجيلوز المزروعة ابتداء من الأنابيب الخمسين الصغيرة ، فالبعض من الأطباق لا تظهر فيها مستعمرات مقاومة، أما البعض الآخر فتظهر فيها المئات.

إذا افترضنا أن الملتهمات هي التي تحرض الطفرة في اتجاه مقاومة الملتهم، فلا بد أن الأطباق كلها ستحتوي على نفس العدد من المستعمرات البكتيرية المقاومة للملتهمات، لكن في الحقيقة لم يكن عدد الخلايا الطافرة متساويا في الأنابيب الصغيرة فلم يحتوي بعضها على بكتيريا طافرة، أما الأنابيب التي ظهرت فيها الطفرة الوراثية مبكرا خلال



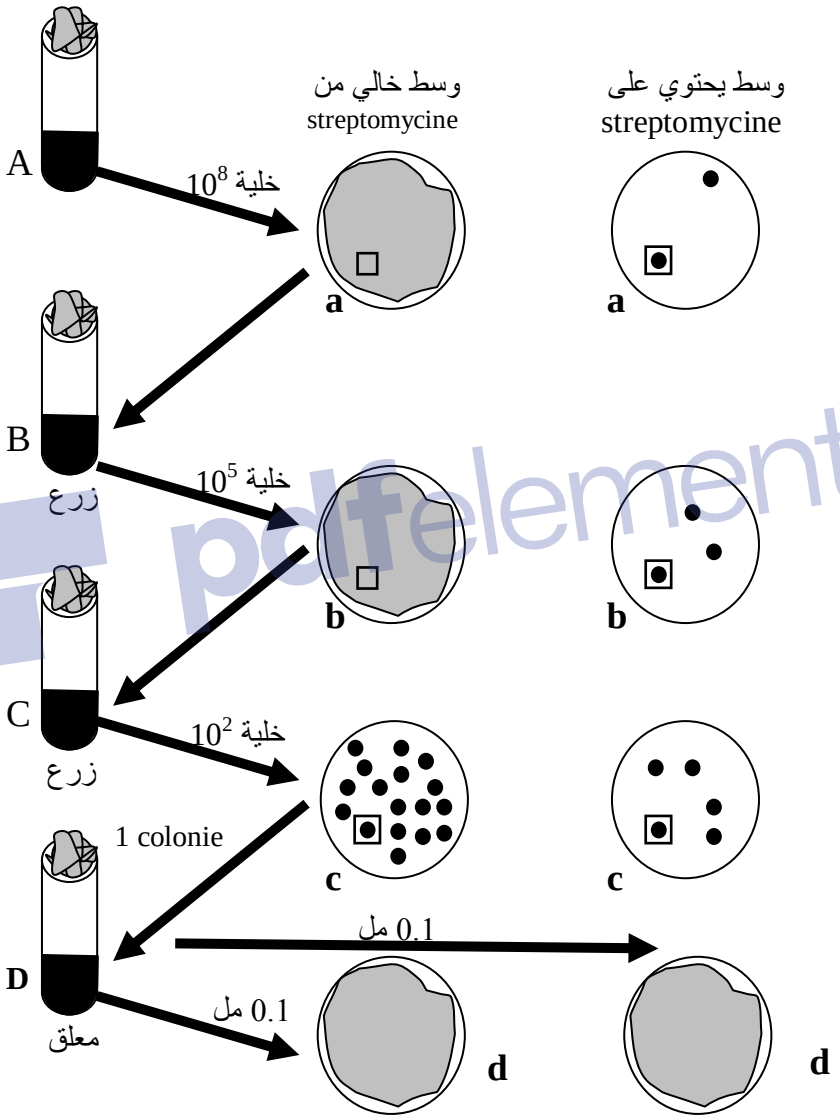
الشكل 2: خاصية التلقائية للطفرة الوراثية (تجربة LURIA وDELBRUCK)

- اختبار النقل بالقماش (Culture par réplique)

استعمل كل من LEDERBERGوLEDERBERG في هذه الطريقة أسطوانة من حديد أو خشب ذات قطر أصغر بقليل من قطرعلبة بتري، تغطي هذه الأسطوانة بقطعة قماش معقمة ثم يضغط بها خفيفا على سطح وسط جيلوزي في طبق بتري يحتوي على مستعمرات بكتيرية تتكون من خلايا حساسة لـStreptomycine ، يستقبل القماش إذن جزء من كل مستعمرة، حيث تشبه هذه العملية أخذ "بصمة"، يضغط مرة ثانية بهذه الاسطوانة على طبق بتري يحتوي على وسط جيلوزي به المضاد Streptomycine بعد حضن هذا الأخير تظهر مستعمرات مقاومة للمضاد الحيوي والتي تحتل أماكن معينة تسمح لنا بتحديد مكان المستعمرات الأصلية في الطبق الأول (الخالي من المضاد الحيوي)، يؤخذ من هذا الأخير مسحة من المكان الذي يفترض أنه يحتوي على خلايا مقاومة، ويزرع في وسط سائل (مرق مغذي)، ثم يترك لمدة كافية لتكاثر البكتيريا،

تؤخذ من هذا الأنبوب عينة وتنشر على وسط جيلوزي لا يحتوي على المضاد السابق، بعد النمو تستعمل نفس طريقة نقل البكتيريا بالقماش لزرع طبق يحتوي على وسط به ذلك المضاد الحيوي، نلاحظ في هذه المرة نسبة أعلى من المستعمرات المقاومة مقارنة بالمرة السابقة، إذا كررنا هذه العملية عدة مرات يتم الحصول على أعداد أكثر فأكثر من المستعمرات المقاومة حتى الوصول إلى مزارع نقية من الخلايا المقاومة.

سمحت الأوساط الحاوية على المضاد الحيوي بتحديد مكان الخلايا المقاومة في الأوساط الخالية من المضاد الحيوي، فرغم عدم حدوث تماس بين البكتيريا والمضاد ظهرت المقاومة، إذن لم يكن المضاد محرضا لظهور هذه المقاومة بل كانت هذه الأخيرة تلقائية.



شكل 3: إظهار خاصية التلقائية للطفرة الوراثية (تجربة Lederberg و Lederberg)

Remove Watermark Now

- الندرة (Rarete):
تعتبر الطفرة ظاهرة جد نادرة، يعود ذلك إلى الثبات الكيميائي لجزيئة DNA. ففي الحالات العادية للنمو تحدث الطفرة تلقائيا بنسب تتراوح بين 10^{-6} إلى 10^{-10} (خلية/مليون خلية إلى خلية/10 بلايين)، وفي هذه الظروف يحجب العدد الكبير من الخلايا العادية (الطبيعية) العدد القليل من الخلايا الطافر، تظهر هذه الأخيرة خاصة حينما تنتخب على وسط يحتوي على العامل الذي يعمل على إنتقائها كالملتهم، وتختفي كل الخلايا الحساسة بينما تبقى الخلايا المقاومة (الطافرة) وتكوّن مستعمرات.
- الثبات والرجعية:
تعتبر الطفرة ظاهرة ثابتة، فمثلا من بين الخلايا الحساسة لـ Streptomycine تظهر خلايا المقاومة له .تنتقل هذه الخاصية الجديدة من جيل لآخر، وتتكاثر هذه الخلايا المقاومة عدة أجيال محتفظة بمقاومتها المكتسبة، إنها إذن ظاهرة ثابتة. لكن من بين الخلايا المقاومة المنماة في وسط خال من Streptomycine تظهر خلايا حساسة للمضاد الحيوي (الطفرة العكسية)، إذن الطفرة ظاهرة رجعية.
- النوعية والاستقلالية:
تمتاز الطفرة بالنوعية لخاصية معينة من خصائص الخلية التي حدثت فيها من جهة وهي مستقلة من جهة أخرى، أي عندما تخضع الخلية إلى طفرة خاصة فإنه من الممكن أن تتغير خاصية أخرى (طفرة مضاعفة). فإذا كان لدينا بكتيريا حساسة لمضادين حيويين A و B وتقدر نسبة ظهور سلالات مقاومة لهذين المضادين مثلا بـ 10^{-8} و 10^{-7} على الترتيب، وبما أن الخاصيتين مستقلتين فإن إحتمال ظهور مقاومة مضاعفة يساوي $10^{-8} \times 10^{-7} = 10^{-15}$. هذه النسبة الأخيرة جد ضئيلة، أي أكثر وأكثر ندرة، الأمر الذي يقودنا إلى التأكد من أهمية استعمال عدة مضادات حيوية معا لعلاج الأمراض المعدية عند الانسان والحيوان.

4.1. المطفرات:
تؤثر المطفرات الوراثية بطريقة غير مباشرة، يتمثل هذا التأثير في آليتين مختلفتين.
- استبدال قاعدة في سلسلة DNA
- تغيير قاعدة بحيث يؤدي ذلك إلى خطأ في التزاوج مع قاعدة أخرى تصبح غير قادرة على الارتباط مع أي من القواعد في الحالات العادية.

آليات استحداث الطفرات:
لكي تورث الخلية العدة الوراثية يجب على DNA (حامل المعلومة الوراثية) أن يتضاعف بوفاء، إلا أنه غالبا ما تحدث أخطاء خلال هذا التضاعف تعرف بالطفرات الوراثية التلقائية (Mutation spontanées) لأنها تتعلق بعوامل داخلية، أما العوامل الخارجية كالإشعاع والمواد الكيميائية فتسبب في طفرات أو تشوهات في القواعد النيوكليوتيدية لجزيئة DNA كما يمكن أن تتغير هذه الأخيرة نتيجة تغير:
- للقواعد نفسها أو
- للروابط السكرية الأزوتية (N-glycosidique) بين القواعد والريبوز منقوص الأكسجين المجاور لها.
تحدث أضرار مختلفة أيضا بسبب العوامل البيئية (الكيميائية أو الفيزيائية) التي تتلف جزيئات DNA وبذلك تخل بوفاء التضاعف.

الطافرات والمطفرات:
أظهرت التجارب أن الطفرات في المورثات A Pol و dnaQ تخفض من نسبة التصليح، و ترفع من نسبة الطفرات، حيث تتمثل الطافرات dnaQ في فقدان نشاطية التصليح بالنسبة لـ DNA polymérase وهي طافرات قوية. تؤدي إضافة تحت الوحدة ε المشفرة من طرف dnaQ إلى ارتفاع كبير في وفاء التضاعف، علمًا

أن تحت الوحدة هذه مسؤولة عن وظيفة القطع الطرفي 3´ ← 5´ التصحيحي في حالة إضافة قاعدة خاطئة، أما الطافرات Pol A لأنزيم DNA polymérase فهي ايضا ناقصات بالنسبة لنشاطية الهدم النيوكليوتيدي الطرفي (exonuclease) 3´ ← 5´ وترفع نسبة حدوث الطفرة من 1000 إلى 100.000 مرة.

كما تم التعرف عند E.coli على عدة مورثات التي إذا تعرضت إلى طفرات تتسبب في ظهور مفرط لطفرات في كامل العدة الوراثية تسمى هذه المورثات بالمطفرات Mutateurs .

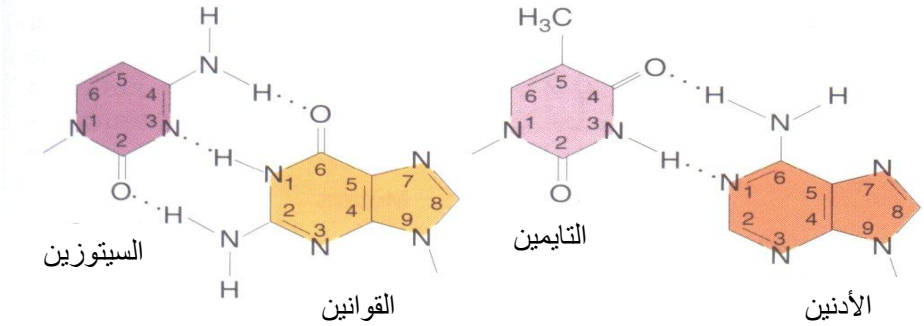
كما توجد مورثات مطفرة أخرى لكن هذه المرة بالنسبة لآليات التصحيح بعد التضاعف. تؤدي الطفرات في المورثة dam المسؤولة عن مثيلة DNA بنظام تصليح أخطاء التزاوج، إلى أن يختار الخيط القالب فيغيره عوض تصحيح خيط DNA حديث البناء، ويتعلق الأمر كذلك بمورثات (ABC) uvr التي تتدخل في التصليح بالقطع وإعادة البناء. والطفرات في المورثات mut (U.S.L.H) (سميت هكذا لأنها اكتشفت على أساس نمطها الظاهري الطافر) المسؤولة عن تصليح أخطاء التزاوج بعد التضاعف.

1.4.1. تماكب القواعد الأزوتية:

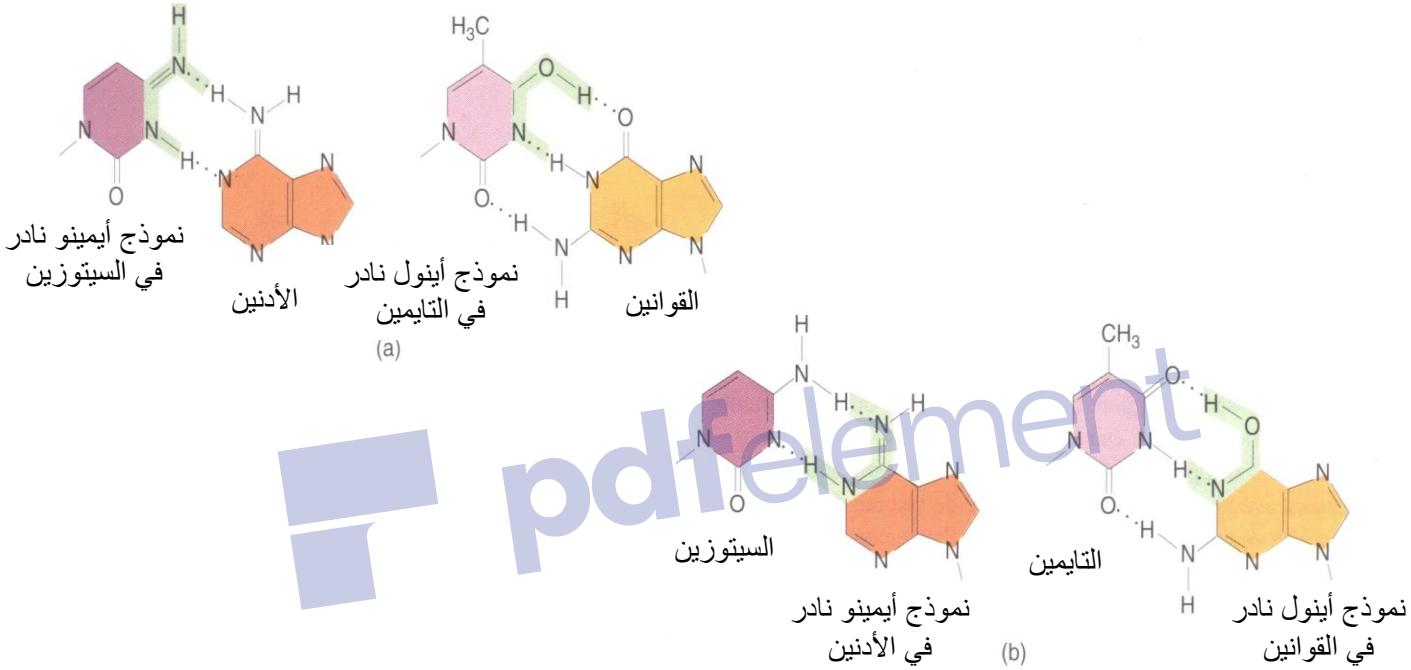
تستطيع نيوكليوتيدات DNA أن تكون على شكلين متماكبين مختلفين، في أغلب الأحيان تكون على الشكل الكيتوني (cétone) إلا أنه في حالات نادرة تتخذ الشكل الإينولي (énole) أو الإيميني (imino)، إذا حدث وتحولت القواعد إلى الشكلين الأخيرين بصفة تلقائية فإن القواعد لا تقيم نفس الروابط الهيدروجينية كالشكل الكيتوني وبذلك ترتبط السيتوزين (C) بشكلها Imino بالأدنين A عوض الغوانين G، كما ترتبط التايمين T في الشكل enol بالغوانين وليس بالأدنين (الأشكال 4 و5 و6).

يلاحظ نفس الشيء بالنسبة للبيورينات بحيث ترتبط الأدنين بصفة غير عادية بالسيتوزين، أما الشكل الإينولي للغوانين فيرتبط بالتيمين عوض السيتوزين.

تؤدي أخطاء التزاوج هذه إن لم تصحح إلى طفرات متكافئة transition، فتعوض بيورين ببيورين أو بيريميدين ببيريميدين.



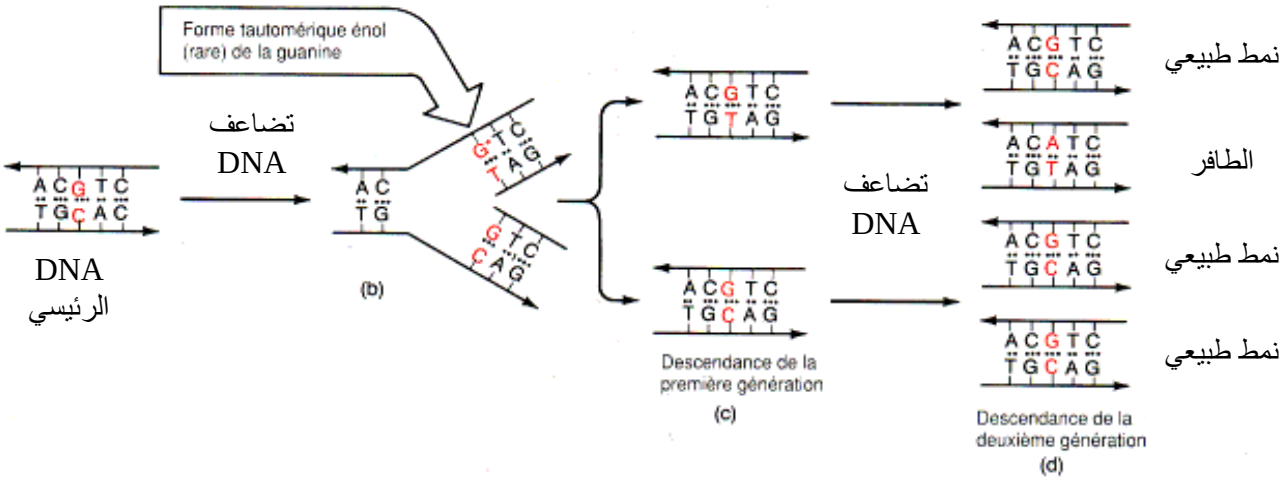
الشكل رقم 4: التركيب الكيميائي العادي للقواعد النتروجينية



الشكل 5

a - الثنائيات الناتجة عن الشكل التماكبي النادر للبيريميدين الثنائي

b - الثنائيات الناتجة عن الشكل التماكبي النادر للبيورين الثنائي



الشكل 6 : الطفرات الناتجة عن التحول التماكبي لقواعد DNA

العوامل المطفرة

1 - العوامل الفيزياوية

2 - المواد الكيمياوية

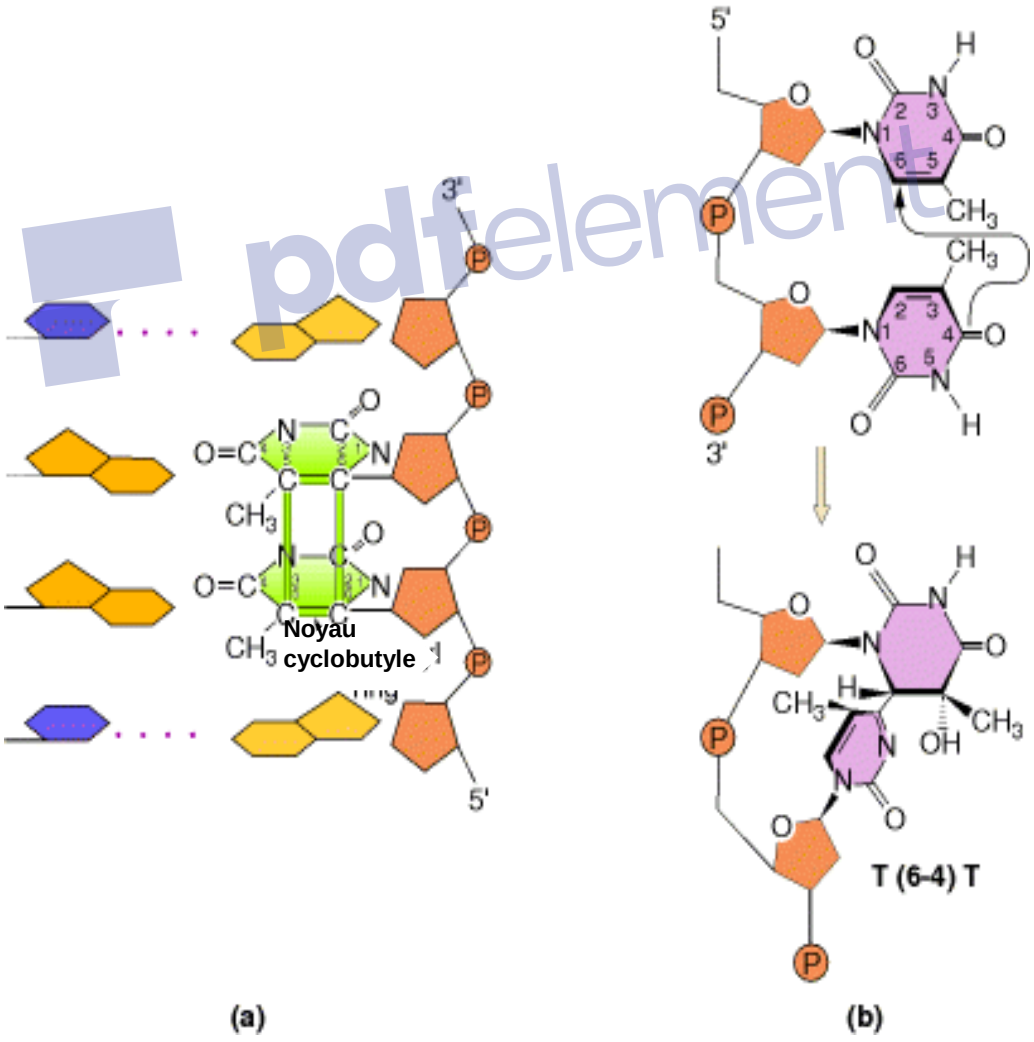
2.4.1 . العوامل الفيزيائية:

1.2.4.1. الأشعة فوق البنفسجية Ultra violet light :(UV)

تحدث الأشعة فوق البنفسجة تأثيرات عديدة في DNA أهمها تكوين روابط كيميائية تكافؤية بين جزيئتين من البيريميدين متجاورتين، وعندما ترتبط القاعدتان أو تلتويان فإن وضعهما في حلزون DNA يصبح غير مستقر لدرجة أنهما لا تكونان قادرتين بعد ذلك على تكوين روابط هيدروجينية مع البيورينات المقابلة، ومن ثم فإن الحلزون يصاب بتشوهات مميتة ما لم تزال .

ولهذه الأشعة العديد من النواتج الضوئية الأخرى كارتباط جزئتين متجاورتين من البيريميدين في نفس الخيط على شكل Cyclobutane pyrimidine وثنائي البيريمدين 6-4 اللذان يعيقان الارتباط العادي مع القواعد المطابقة .

تعمل الاشعة فوق البنفسجية على انتاج دايمرات الثايمين thymine dimmer المتجاورة لنفس الشريط وبالتالي لا تستطيع قواعد الثايمين على تكوين اواصر هيدروجينية مع الادنين وبالتالي يختل ترتيب او تنظيم الخيط الحلزوني



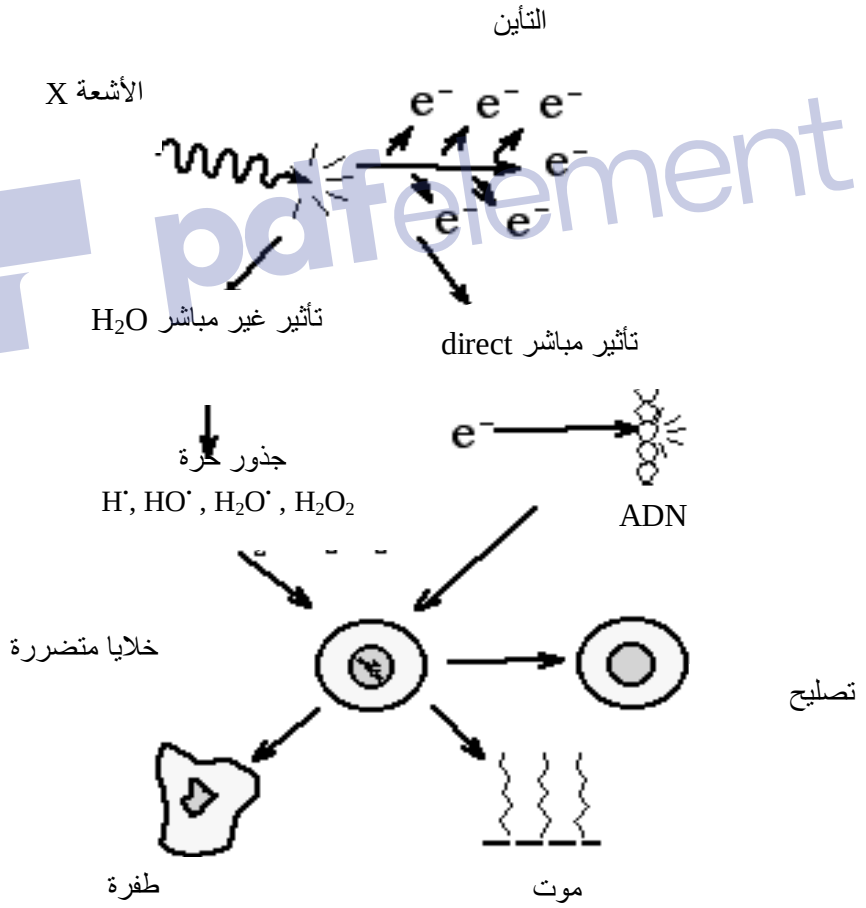
الشكل 7: ثنائي الجزيئ: Cyclobutane pyrimidine (أ) وثنائي (البيريميدين6-4) (ب)

Remove Watermark Now

2.2.4.1. الأشعة المؤينة:

تشمل الأشعة المؤينة موجات كهرومغناطسية إما بأطوال موجية قصيرة جدا كالأشعة X أو جزيئات ذات طاقة عالية وهي الأشعة (α، β، δ) Gamma ray, beta ray, alpha particles واكتشفت الأشعة السينية (X) X-ray في القرن التاسع عشر من قبل روتانجن، يتراوح طول موجاتها بين 0.1 A° و 10 A° استخدمت في المجال الطبي نظرا على قدرتها على اختراق الأجسام، وأثناء اختراقها لأجسام تنتج هذه الأشعة أيونات عند اصطدامها بذرات الجسم فتحرر بعض الالكترونات التي تحول الذرات من حالة مستقرة إلى حالة شاردية لذلك تسمى هذه الأشعة بالمؤينة. تسبب هذه الأخيرة كسور مختلفة في الصبغيات مؤدية إلى تكوين قطع صغيرة، تعود هذه القطع لترتبط ببعضها بصورة خاطئة بفعل أنزيمات التصليح.

أثناء التفاعل بين الأشعة X والأشعة δ مع المادة تتحرر الكترونات من مدارها بتأثير كامبتون (Effet Compton) أو كهرو ضوئي (Photo Electrique) وتكتسب طاقة حركية معينة، تفقد الهدف الالكتروني وتصبح أيوناً موجباً، تصطدم الالكترونات المحررة بالالكترونات الأخرى طوال مسارها وتكوين العديد من الأيونات، كما تصدر معظم الأيونات المكونة في الحقيقة عن الالكترونات وليس عن الأشعة X نفسها لذلك تسمى الأشعة X و δ بإشعاعات مؤينة غير مباشرة.



الشكل 8: تأثير الأشعة المؤينة

Remove Watermark Now

تؤثر الاشعة المؤينة على بعض جزيئات الـ DNA وتؤدي الى تغير في بناءها الكيمياوي، لقد وجد ان معدل الطفرات المستحدثه تتناسب طرديا مع الاشعاع ومن هذه الاشعات الفا وبيتا وكاما في تأين بعض الجزيئات وتقاس بوحدات الراد وroentgen رونتيجن وحدات جرعة الاشعاع . ان للاشعة المؤينة تأثير بايولوجي مباشر وغير مباشر ويقصد بالتأثير المباشر الضرر الذي يلحق بالجزيئات المهمة في الخلية الحية والتي تتأين مباشرة او تصبح بحالة تهيج وقد تؤدي الى تلف جزيئات الحامض النووي، اما التأثير غير المباشر يؤدي الى ضرر لجزيئات الخلية بفعل الجذور الحرة free radicals والتي تنشأ من تأين جزيئات الماء فهذا يؤدي الى نشوء ايونات وجزيئات مختلفة مثل H_2O_2, H^* , O_2^- , OH^- والتي تتفاعل مع نواة الخليه والسايتوبلازم وتؤدي الى تفكك الرابطة الكيمياوية لذرات الكاربون بسهولة فجرعة صغيرة من الاشعة الايونية تؤدي الى تغيرات كبيره في جزيئة الـ DNA او حصول ضرر بالغ في بنية الكروموسوم .

تتمثل الأخطار الناتجة عن الاشعاعات الأيونية خاصة في تأثيرها على DNA، إذ تغير بنيته وتؤدي إلى ظهور أخطاء في الشفرة الوراثية التي تؤدي إلى ظهور الطفرات أو موت الخلايا، لشرح حدوث هذه التشوهات هناك آليتين مختلفتين:

للإشعاعات المؤينة أثار مباشرة على جزيئة DNA، يحدث تأين ذرة مكونة لـ DNA تغير في التركيبة الكيميائية، يكون التأثير المباشر مهما بالنسبة للإشعاعات من النمط α ، بينما لا يكون هاما بالنسبة للإشعاعات X و δ.

تتمثل الالية الثانية في تأين جزيئة الماء فتنتج جذورا حرة قد تحدث بدورها تشوهات بنوية في DNA.

يمكن أن لا يكون لهذه التشوهات أثر على قراءة الشفرة الوراثية أو أنها تصلح من طرف الخلية،في هذه الحالة يقتصر التأثير البيولوجي للإشعاعات على مستوى الجزيئي وتبقى الخلية سليمة، إلا أنه عندما تؤدي الإشعاعات المؤينة إلى تغيرات في DNA تتعلق بالشفرة الوراثية والتي لا يتم تصليحها فإنها تؤدي إلى الطفرة أو موت الخلية. لا يكون موت الخلية آنيا فطالما لا تنقسم الخلية تبقى حية بوظائفها العادية، نتحدث في هذه الحالة عن الموت المؤخر وحينما تدخل الخلية في الانقسام تصبح عملية التضاعف مستحيلة وتموت الخلية.

تتعلق حساسية الخلايا بـ:

- خصائص الاشعاع (طاقته، منسوبه، وتقسيم الجرعات).
- الوسط (الأكسجين)
- الخلية نفسها (حيث أن للأشعة أثر تراكمي في إحداث الطفرات، أي أن نسبة حدوث الطفرات تخضع لكمية الأشعة الكلية التي يتلقاها الكائن الحي، ووجود علاقة طردية بين نسبة حدوث الطفرات وكمية الأشعة المستخدمة)

تكون الخلايا أكثر حساسية خلال الانقسام، فحسب قانون Tribondeau Bergorierو فإن الخلايا تكون أكثر حساسية في المراحل الأولى من التمايز وكلما إزداد عدد إنقساماتها، بينما تكون أكثر مقاومة خلال الراحة (GO) أو خلال المرحلة البينية.

3.4.1 . المواد الكيميائية:

هناك العديد من المواد الكيمياوية لها القدرة على احداث طفرات وراثية او تغيرات كروموسومية ففي السنوات الاخيرة تم اكتشاف تأثير العشرات من تلك المواد التي لها القدرة على احداث تغيرات كروموسومية اذا ما تعرضت لها الخلية او النسيج وبتراكيز محددة ولفترة معينة من الزمن. ان هذه الكيمياويات مثل غاز الخردل وحامض النتروز HNO_2 وهيدروكسيل الامين والعوامل الالكيلية alklating agent التي تتفاعل مع مناطق معينه من المادة الوراثية ضمن الكروموسوم مسببة بذلك تغير في بنائه الوراثي وتأثيرها يكون اخطر من الاشعة المؤينة

Remove Watermark Now

حيث تؤدي الى تغيرات نوعية وكمية في المادة الوراثية تقود الى الطفرات الوراثية وذلك لقدرتها على النفاذ الى داخل النواة والتفاعل مع المادة الوراثية

يمكن لكثير من المواد الكيميائية أن تغير بنية القواعد النيتروجينية المكونة للـ DNA وبذلك تغير من قابلية التزاوج الطبيعي، ونذكر على سبيل المثال المواد الكيميائية التالية:

1. 3.4 .1. عوامل الألكلة:

هناك العديد من المواد الكيميائية التي تسبب حدوث الطفرة، أول مركب محدث للطفرة تم اكتشافه كان غاز الخردل الذي (Mustard gas) له نفس الأثر الذي تسببه الأشعة X والذي يتمثل في احداث كسور كروموزومية ثنائية الخيط مطفرة. استعمل كأول غاز سام عام 1915 أثناء الحرب العالمية الأولى. و لأول مرة تم استعماله كعامل قاعدي في التجارب الوراثية سنة 1943، حيث أنه يمنع الانقسام الاختزالي (meiosi) . يلي ذلك االستعمال عوامل أخرى منها سلفونات الايثان الإثيلية (EES) وسلفونات الميثان الإثيلية (EMS) وكلاهما يحول الزوج G :C إلى A :T . أما MNNG فيقوم بحذف عدد من القواعد النتروجينية فضلا عن كونه عاملا سرطانيا فعالا.

هذه المواد وكثير من أمثالها تكون مجموعة من المركبات الكيميائية عالية التفاعل، حيث تضيف مجموعات ألكايل (CH_3-CH_2 , CH_3) إلى القواعد النتروجينية في مواضع عديدة على القاعدة.

معظمها يتفاعل مع القواعد البيورينية، خاصة الغوانين مما يجعل هذه القواعد غير ثابتة، ويسهل انفصالها من سلسلة الحامض النووي، تتكون بسبب هذا الحذف فجوات في DNA مما يؤدي إلى سهولة تفككه، أو يتم ملأ الفراغ بقواعد نتروجينية غير مناسبة فتتبدل الشفرة الوراثية. تعتبر هذه المواد من العوامل المسببة للسرطان عند الانسان والحيوان، ومن بين نواتج الألكلة المختلفة نذكر ألكيل غوانين وألكيل تايمين، وهي أكثرها احتمالا للدخول في تزاوج خاطئ، حيث أن ألكيل غوانين يمكنه التزاوج مع التايمين، في حين أن ألكيل تايمين يمكنه أن يتزاوج مع الغوانين ليعطي كلاهما استبدالات متكافئة.

2.3.4.1. مشابهات القواعد:

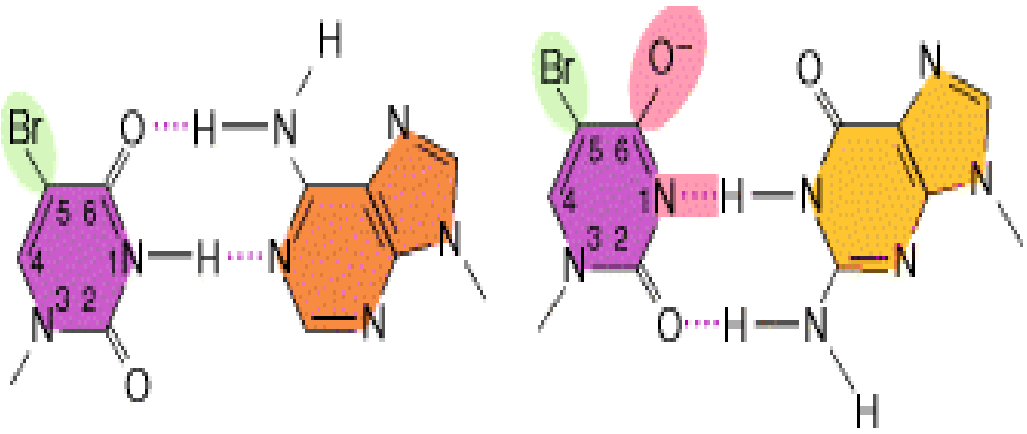
هنالك مواد كيمياويه لها صيغه تركيبه تشبه بعض القواعد النتروجينيه تدعى مشابهات القواعد base analogs ان هذه المواد تختلف عن القواعد النتروجينيه الاعتياديه كونها تستطيع ان تزيد من احتمال حصول اخطاء تزاوجيه في حالة توفرها في الخليه اثناء التضاعف قد تؤدي الى حصول تغيرات كروموسوميه.

تتمثل مشابهات القواعد في جزيئات مطفرة تشبه القواعد العادية، حيث بإمكانها أن تدرج في سلاسل DNA أثناء عملية التضاعف، وتختلف عن القواعد العادية في أنها تزيد من احتمال حدوث استبدالات متكافئة، إذ تؤدي إلى إدماج نيوكليوتيدات غير صحيحة تتزواج بطريقة خاطئة مع قواعد أخرى .

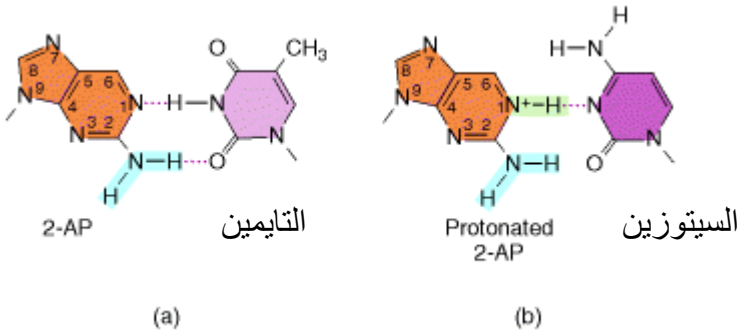
تعتبر كل من 5 بروموبوراسيل (5BU) 5-bromodeoxyuracil و 2 - أمينوبيورين (2AP) 2-aminopurin من أهم مشابهات القواعد، حيث 5BU يكون مشابها للتايمين وبإمكانه أن يدمج مكانه خلال التضاعف. يملك هذا المركب بروم على مستوى ذرة الكربون رقم 5 مكان مجموعة CH_3 التي توجد في التايمين. المخطط B10

يغير هذا البروم توزيع الشحنات على القاعدة ليرتبط بالغوانين، يشبه شكله الاينولي (enole) والمؤين (ionisee) التايمين ويرتبط بالغوانين فيحول التسلسل A :T إلى G :C. أما إذا وجد 5BU في حالة كيتون (cetone) الأقل حدوثا فإنه يحل محل السيتوزين ثم يرتبط بالأدنين مسببا استبدالا متكافئا G :C إلى A : (شكل 10 a b) المخطط A10

وعليه فإن 5BU يسبب استبدال متكافئا في كلا اتجاهين G :C ⇄ A :T
أما 2 أيمينوبيورين فهو مشابه للأدنين ويستطيع الارتباط مع التايمين ليغير التسلسل A :T إلى G :C ولكن في حالته المتؤينة يحدث تزاوج مع السيتوزين ليغير التسلسل G :C إلى A :T .



الشكل 10: الاحتمالات المتعاقبة لظهور 5 بروموويوراسيل



الشكل 11: الاحتمالات المتعاقبة لظهور 2 أيمينو بيورين

Remove Watermark Now

3.3.4.1 . الهيدروكسيل أمين:

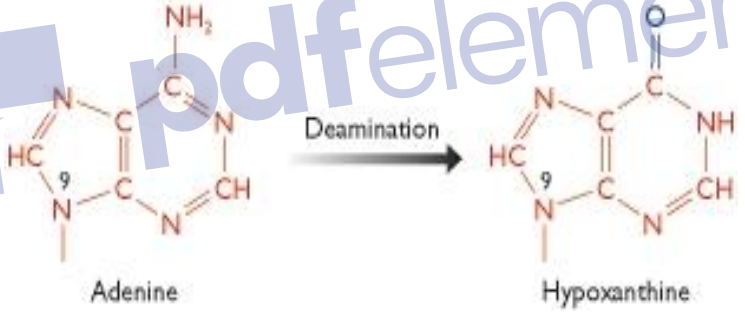
يتفاعل الهيدروكسيل أمين مع البيريميدينات ويتسبب في حدوث طفرات عند تفاعله مع السيتوزين حيث أن هذا المركب يهاجم مجموعة الأمين محولا إياها إلى هيدروكسيل أمين، والقاعدة الناتجة (هيدروكسي يوراسيل) تتزاوج اختياريا مع الأدنين لتعطي استبدالا متكافئاً .

4.3.4.1. حمض النتروز:

يسبب حمض النتروز إزالة المجاميع الأمينية للقواعد لتحل محلها مجموعة كيتون، فتؤدي إزالة NH_2 للسيتوزين إلى تكوين اليوراسيل (U)، مما يؤدي إلى تحويل الزوج G :C إلى A :T ، وذلك الخاص بالأدنين إلى تكوين Hypoxanthine (قاعدة غير عادية) مشابهة للغوانين مما يؤدي إلى اتحاده بسهولة مع السيتوزين وتحويل الزوج A :T إلى G :C . يقوم حمض النتروز أحيانا بتحويل الأدنين إلى xanthine الذي لا يستطيع الاتحاد مع أي قاعدة نتروجينية، مما يؤدي إلى حدوث طفرة مميتة للكائن الحي. كما أن باستطاعة حمض النتروز تكوين عدد من القواعد من السلسلة، كما يمكن أن تنزع مجاميع الأمين من القواعد أيضا تلقائيا، ويؤدي هذا النزع إلى تغير في ارتباط القواعد.

جدول: تحويل حمض النتروز للقواعد بإزالة مجاميعها الأمينية و الطفرات الناتجة عنه

القــواعد		تغـــير الثنائية
أدنين	Hypoxanthine	H-C C-G
سيتوزين	Uracile	U-A G-C
غوانين	Xanthine	X-C



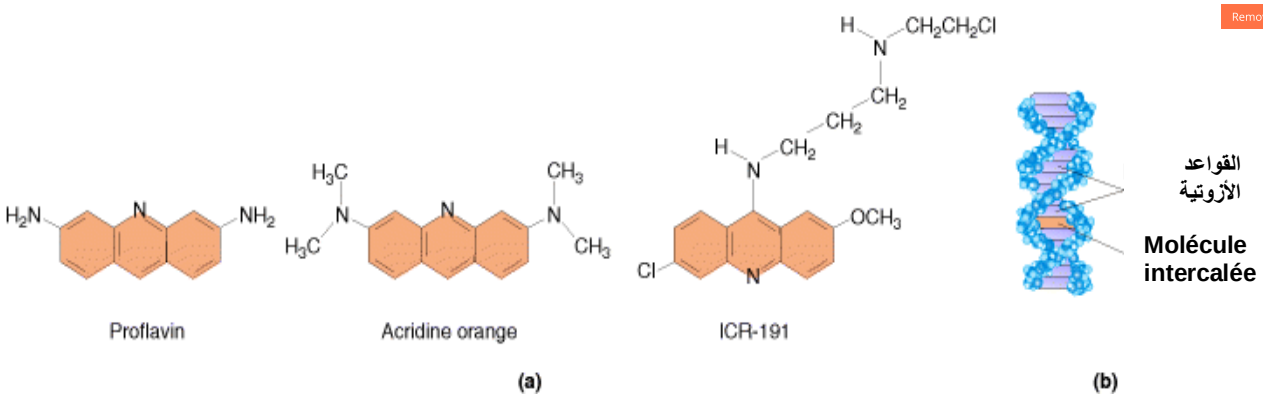
شكل يوضح تأثير حامض النتروز في ازالة مجموعة الامين من القاعدة النتروجينية الادنين

3.4.1. 5. المواد المتخللة:

تستحدث الاضافات والاقتضابات بكفاءة عالية بواسطة مجموعة من المطفرات تعرف بالأكريدينات (مثل البروفلافين (Proflavine)). تعتبر هذه الأخيرة جزيئات عطرية مسطحة تتفاعل مع DNA حيث اقترح شتر ايسنجر أنها قد تثبت مناطق من DNA المفروض انبعاجها والتي تسبق الاضافات والاقتضابات.

تقوم هذه المركبات بالتخلل بين شريطي DNA وإبعادهما عن بعضهما، مما يؤدي إلى حدوث ارتخاء في حلزون DNA ، كما يؤدي ارتباط المركبات الأكريدينية بالقواعد النتروجينية في حلزون DNA إلى حدوث عمليات عبور خاطئة تنتج عنها تكوين لولبين حلزونين غير متساويين في الحجم عند عملية التضاعف .

Remove Watermark Now



الشكل 12: العوامل المتخللة (المتداخلة)

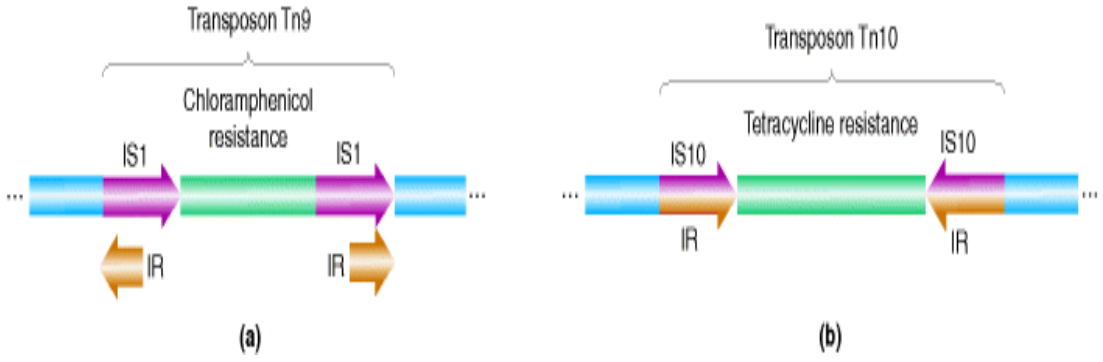
4.4.1. العناصر الوراثية المتنقلة:

تتمثل العناصر الوراثية المتنقلة في قطع من DNA يبلغ طولها حوالي 800 إلى 1400 زوج من القواعد، تستطيع الحركة داخل العدة الوراثية وتوجد عند معظم البكتيريا والكائنات الراقية، تنتقل هذه العناصر أيضا من كروموزوم إلى بلازميد والعكس صحيح ومن كروموزوم البكتيريا إلى عدة الملتهم الوراثية كما يمكنها أن تتحرك أيضا من كروموزوم إلى آخر في الخلايا حقيقية النواة.

بالرغم من أن اكتشافها كان أول مرة في بعض آليلات نبات الذرة، إلا أنه تم تحديد طبيعتها الجزيئية عند البكتيريا، بين كل من Jordan و Saedler و Starlinger أن الطفرات الخاصة بمورثة استعمال غالاكتوز تعود إلى إدخال قطع من DNA داخل هذه المورثات. سميت هذه القطع بسلاسل الدمج (IS) وتعتبر هذه الأخيرة أبسط العناصر المتنقلة لأنها لا تحتوي إلا على مورثات Transposasse المسؤولة عن دمج العناصر داخل DNA البكتيري.

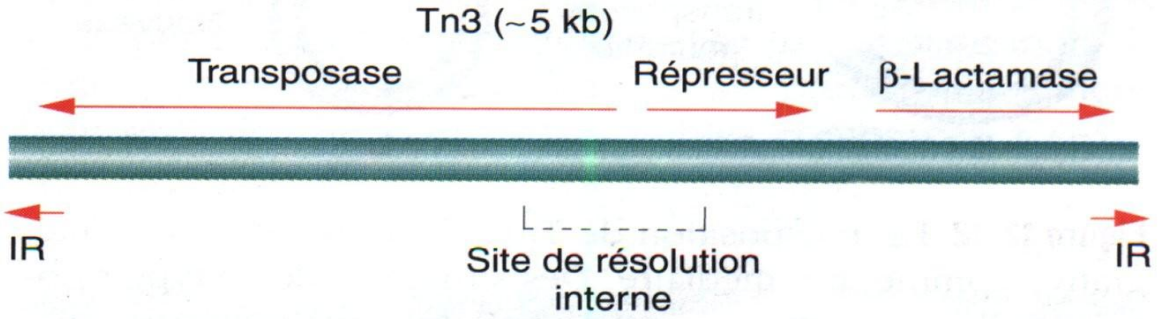
* تختلف العناصر المتنقلة حسب تركيبها وحسب طريقة دمجها إلى ثلاثة أقسام:

- سلاسل الدمج IS التي يمكن ان تكون وحيدة أو مركبة تحتوي على مورثة أو عدة مورثات كتلك الخاصة بمقاومة المضادات الحيوية.



الشكل 13

Remove Watermark Now



- عناصر متنقلة من العائلة Tn_3 التي تحتوي بالإضافة إلى مورثات Transposasse (TnpA) مورثة Résolvase (TnpR) المسؤولة عن إعادة التشكيل الوراثي النوعي ويبلغ طولها أكثر من 2000 زوج قاعدي، ومورثات مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة.
- الملتهمات البكتيرية المعتدلة التي تقوم بدورة إدماجية داخل البكتيريا .

4.1. 5. التطفير الموجه:

من أكثر تقنيات التطفير المخبري استعمالا التطفير الموجه، الذي يسمح بإحداث الطفرات في أي نقطة أو سلسلة نيوكليوتيدية من المورثة أو منطقة جينية معلومة التسلسل الأصلي (الطبيعي). هذه الأخيرة تستعمل من أجل بناء كيميائي لقطع DNA قصيرة التي تستعمل بدورها لتهجين أي موقع داخل المورثة. قد تحتوي قليلات النيوكليوتيد المصنعة على الطفرة المرغوب فيها، وتستعمل كبادئة للاستطالة مخبريا بفضل إنزيم DNA polymérase فنحصل على الطفرة في الخيط حديث البناء. من الممكن أيضا برمجة إي تغيير نيوكليوتيدي في هذه البادئة. وبالرغم من وجود قاعدة أو عدة قواعد غير مكملة، فإن التهجين يبقى ممكننا في درجة حرارة منخفضة وبوجود تراكيز ملحية عالية.

يمكن إذن للبادئات المصنعة مخبريا والتي تستعمل في عملية التطفير الموجه أن تحتوي على مناطق مضافة أو محذوفة، ثم تتم استطالتها ثم يمكن أن تدمج داخل عدة وراثية أحادية الخيط كتلك الخاصة بالملتهم M13 لتغيره .

إن لمعرفة مواقع القطع بواسطة الإنزيمات الشرطية أهمية بالغة أيضا لتعديل مورثة مستنسخة، لأنه من الممكن أيضا إحداث حذف صغير باستبعاد القطعة المحررة بالقطع في مستوى موقعي قطع شرطي واستبدالها إذا أردنا بقطعة أخرى تحتوي على نفس النهايات النيوكليوتيدية اللاصقة.

وهناك طريقة أخرى تتمثل في الهدم الطرفي الأنزيمي للنهاية الحرة، ثم قطعها بواسطة إنزيم شرطي لإحداث إقتضابات مختلفة الأطوال.

نستطيع كذلك استعمال التفاعل المتسلسل لإنزيم البوليميراز (PCR). وذلك باستعمال بادئة تحتوي على طفرة تستعمل في الدورة الأولى من PCR ، ثم يستعمل ناتج الدورة الأولى كبادئة لدورة ثانية من تفاعل PCR، بحيث يكون الناتج النهائي طافراً.

Remove Watermark Now

الطفرات الكروموسوميه (الصبغية) Chromosomal mutations

هي تغيرات كبيره تحصل في عدد او تركيب الكروموسوم وتشمل مايلي:

1- الطفرات النوعية (التركيبية) Qualitative (structural) aberration

تشمل التغيرات التي تطرأ على الكروموسوم وتؤثر على مواقع الجينات وترتيبها على الكروموسوم

2-الطفرات الكمية (العددية) Quantitative (numerical) aberration

التغيرات التي تطرأ على العدد الكروموسومي او جزء من الكروموسوم الواحد اي انها تؤثر من الناحية الكمية وليس على الموقع او الترتيب الجيني على الكروموسوم

التغيرات النوعية

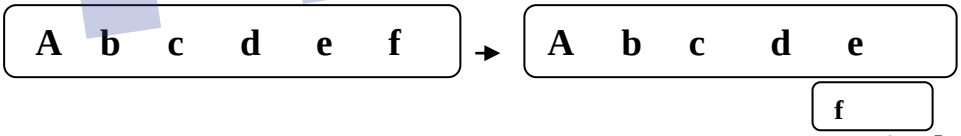
يمكن ان تحدث تلقائيا او مستحدثة بعوامل الحرارة او بعض المواد الكيمياوية او الاشعاع . ان حدوث كسر قبل مرحلة بناء الـ DNA (S-phase) اي في مرحلة G تسبب حدوث كسر في الكروموسوم اما تلك الكسور التي تحدث بعد مرحلة (S-phase) اي بعد تضاعف الماده الوراثية فإنها تؤدي الى كسر في الكروماتيد

تأثير التغيرات في الكروموسوم يعتمد على طبيعة القطعة المكسورة ففي حالة التحام القطع المكسورة لا يحدث اي تغير ملحوظ فإنها تسبب تغيرات ملحوظة وكذلك الحال اذا ما التحمت مع نهايات اخرى لنفس الكروموسوم او التحمت مع نهايات اخرى لكروموسوم اخر.

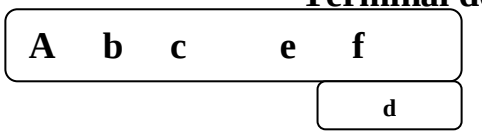
التغيرات النوعية

1-النقص او الاقتضاب Deletion or deficiency

تغير كروموسومي يحدث نتيجة فقدان قطعة من الكروموسوم اما تكون بينيه الموقع interstitial او طرفيه terminal ، والقطع المكسورة التي لا تلتحم او تكون فاقده للقطعة المركزيه تفقد في السايتوبلازم مما يؤدي الى نقص بيني او طرفي. ينتج الاقتضاب البيني نتيجة لحصول كسر والتحام نهايتها مع البعض، اما النهائي فيحدث نتيجة حصول كسر مفرد في طرف الكروموسوم . اما اذا كان الكسر صغيرا فلا يمكن تحسسه اما اذا كان النقص كبيرا فقد يؤدي الى ظهور شخص غير طبيعي



Terminal deletion



Interstitial deletion

النقص البيني في حالة تزاوج الكروموسومات المتماثلة في الانقسام الاختزالي فانه يؤدي الى تكوين حلقات- عروات النقص او الحذف deletion loops

أمثلة على الانتقاصات.

و هى فقد أو حذف لقطعة كروموسومية عن بقية الكروموسوم. و من أهم الأمثلة عليها:

1. تناذر ولف Wolf syndrome و ينتج عن نقص جزئى فى الذراع القصير للكروموسوم رقم4 . والطفل الناتج مصاب بتخلف عقلى و ملامح غير طبيعية فى شكل الوجه و تشوه فى قزحية العين.

2. تناذر مواء القط Cri du chat syndrome

و ينتج عن نقص فى الذراع القصير للكروموسوم رقم 5. يصدر من الطفل صراخ مؤلم يشبه مواء القط بالإضافة إلى الرأس الصغير الحجم و الوجه العريض والأنف المفلطح و العيون المتباعدة المسافة مع تخلف فى النمو الجسماني و العقلي.

Remove Watermark Now

3- الإضافة او التكرار Duplication or addition

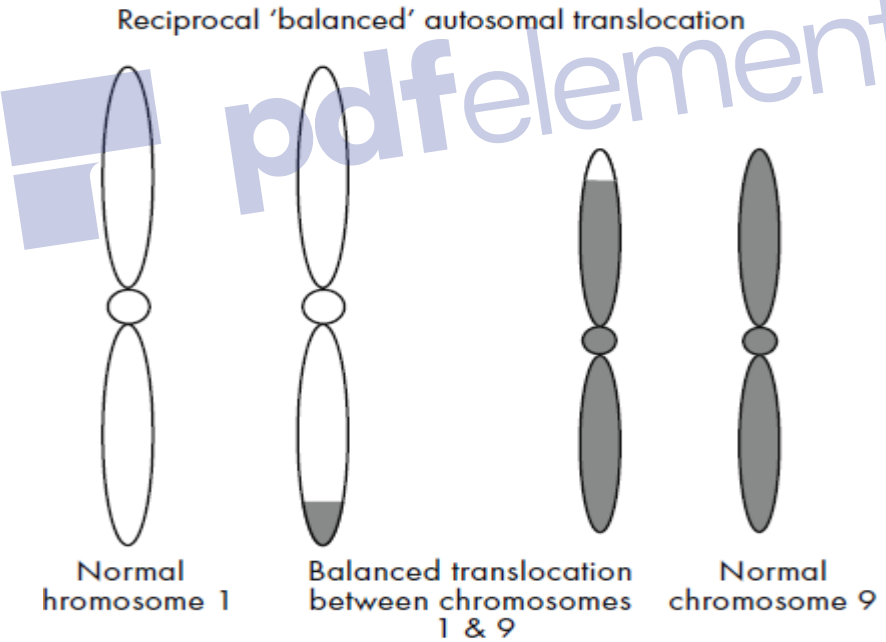
يحدث التضاعف عندما تتواجد او تتكرر قطعه كروموسومية تابعة في تركيبها وترتيبها الجيني لكروموسوم واحد مرة او اكثر او الى وجود قطعة كروموسومية مزاحة من كروموسوم الى كروموسوم غير مماثل مما يؤدي الى زيادة الجينات في ذلك الكروموسوم، وقد تشمل الاجزاء المضافة على القطعة المركزية ولهذا تظهر كأنها كروموسوم إضافي، تختلف الكروموسومات المضافة عن مثيلاتها بانبعاجها الى الخارج في الطور التمهيدي من الانقسام الاختزالي

4-الانتقال translocation

الانتقالات Translocations هي عبارة عن تبادل قطع كروموسومية بين الكروموسومات غير المتناظرة حيث يحدث كسر في كل من الكروموسومين المشتركين في الانتقال ثم يلي ذلك انتقال الجزء من الذراع المكسور من الكروموسوم أ والتحامه مع النهاية اللزجة الناتجة عن الكسر فى الكروموسوم ب وفي نفس الوقت انتقال القطعة المكسورة من الكروموسوم ب و التحامها بالنهاية اللزجة بالكروموسوم أ.

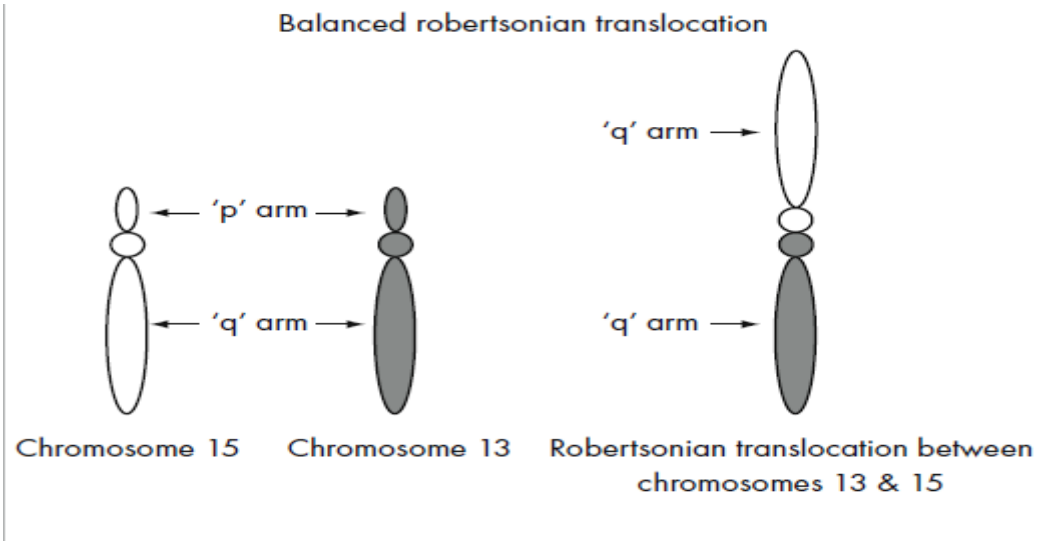
الانتقال هو عبارة عن اعادة ترتيب مواقع الجينات على الكروموسومات غير المتماثلة وتوجد نوعين من الانتقال :

1- انتقال متبادل reciprocal trnslocation : يحدث تبادل للمادة الوراثية بين اي من الكروموسومات وتشمل القطع الكروموسومية التي تكون غير محددة بالحجم ويدعى ايضا بالمتوازن balanced وفي هذا النوع من الانتقال لا يحدث اي تغيرات ملحوظة على الكروموسوم من فقدان او اكتساب للمادة الوراثية.



A person with this chromosome arrangement has a 'balanced translocation' with the equivalent of two chromosomes each of numbers 1 and 9.

2- Robersonian tanslocation : ويشمل تبادلات القطع الكروموسومية للكروموسومات 13،14،15،21،22 اذ تدعى هذه الكروموسومات acrocentric حيث يكون موقع القطعة المركزية على حافة الكروموسوم مما يؤدي الى تكوين ذراع طويل وذراع قصير جدا والتبادل يكون بفقدان الاذرع القصيرة للكرموسومين المتبادلين والتحام الاذرع الطويلة فينتج عنه كروموسوم يحوي اذرع طويلة اما يحتوي واحد او اثنان من القطع المركزية. وهكذا يتم فقدان الجينات الموجودة على الذراع القصير.



Robertsonian translocation between chromosomes 13 and 15, giving this individual the equivalent of two copies of chromosomes 13 and 15 re-arranged as one long chromosome.

4- **الانقلابات Inversions** يحدث الانقلاب Inversion عندما يتم حدوث كسر فى نقطتين على طول الكروموسوم ثم تدور القطعة بين نقطتى الكسر 180° ثم تلتئم النهايات اللزجة مرة اخرى بحيث يكون ترتيب الجينات معكوسا بالنسبة لوضعها الاصلي. والتي تؤدي بالنتيجة الى تغير في موقع بعض الجينات ويقسم الانقلاب الى

أ- الانقلاب المتضمن القطعة الكروموسومية pericentric inversion : عندما يحدث على مسافات متساوية من القطعة المركزية

ب- الانقلاب غير المتضمن القطعة المركزية paracentric inversion

التغيرات الكمية

يكون العدد الكروموسومي ثابتا للنوع الواحد من الكائنات الحيه حيث يعتمد هذا العدد في تحديد النوع والعلاقات الوراثية والتصنيفية ضمن المجموعة يمثل العدد الكروموسومي الاساس (المحتوى الجيني Genome بالحرف 2n) او ثنائي المجموعه الكروموسومية diploid ، وأثناء الانقسام الاختزالي ينصف العدد الكروموسومي الى النصف فان ناتج العملية احادي المجموعه الكروموسومية Haploid او n . ان التعدد الكروموسومي او التضاعف المجموعي polyploidy يحصل عندما تمثل المجموعه الكروموسومية بأكثر من مرتين 3n, 4n, 5n

الهيئه الكروموسوميه	التسميه
92,XXYY	Tetraploidy
69,XXY	Triploidy
47,XX,21	Trisomy 21
47,XY,18	Trisomy 18
47,XX,13	Trisomy13
47,XX,16	Trisomy 16
47,XXY	Klinefelter sydnrom
47,XXX	Trisomy,X
45, X	Turner s syndrome
49,XXXXY	Variant of Klinefelter syndrome

فائدة الكائنات احادية المجموعة الكروموسومية من الناحية الوراثية والتضريبية

1 - امكانية تضاعف كروموسوماتها لا جنسيا باستخدام الكولشسين

2 - تكوين البذور نتيجة الاخصاب الذاتي فيحصل تضاعف في عدد كروموسوماتها وبذلك نحصل على نباتات ثنائية المجموعة الكروموسومية بعد المعاملة بالكولشيسين نحصل على رباعي المجموعة الكروموسومية وتكون هذه المجموعة متماثلة ومتجانسة في جميع جيناتها تجانسا تاما وتدعى Autopolyploidy

3 - لمعرفة طبيعة المجموعة الكروموسومية الاساسية كالعدد الاساسي الحقيقي وكشف التكرارات بدراسة سلوكها اثناء الانقسام الخيطي الجسمي والاختزالي

التعدد الكروموسومي polyploidy

تمتلك الحيوانات والنباتات في هذه الحاله اكثر من مجموعتين احاديتين من الكروموسومات في فرد ثنائي المجموعة وهذه تحصل اما من خلال

1- تضاعف جسمي somatic doubling : تحصل نتيجة تضاعف كروموسومات الخلية الجسمية وهذه تحصل اما

أ- بسبب اجتماع خليتين بنويتين دون انقسام السايتوبلازم

ب- عدم انفصال الكروماتيدات الشقيقة

ج- تحفيز الخلايا عن طريق المعامله بالكولشيسين او المواد الكيمياوية التي تمنع تكوين الياف المغزل والتي تمنع حركة الكروموسومات من منطقة استواء المغزل نحو القطبين

2- تضاعف مشيجي Gametic doubling : تنتج من تزاوج مشيجين لم تختزل كروموسوماتها في كليهما او احدهما ويكون حدوثها اكثر من النوع الاول وينشا من عدم حدوث انقسام اختزالي في مرحلة تكوين الامشاج او نشوء امشاج من خلايا امية حدث فيها تضاعف كروموسومي لسبب ما وكذلك من عدم انفصال الكروماتيدات الشقيقة عن بعضها في مرحلة تكوين النطف

تصنيف التغيرات الكروموسومية العددية

1 - التضاعف المجموعي الكامل او الحقيقي Euploidy

تبقى المجموعة الكروموسومية في حالة توازن دون زيادة او نقصان كروموسوم واحد او اكثر من المجموعه بعد تضاعفها

2 - التضاعف المجموعي غير الكامل او غير الحقيقي Aneuploidy

وفيه يفقد التوازن للمجموعة الكروموسومية بسبب زيادة او نقصان لواحد او اكثر من الكروموسومات (2n+1)

التضاعف المجموعي الحقيقي يضم

أ - التعدد المجموعي الذاتي Autopolyploidy : تتميز خلاياها باحتوائها على مجاميع كروموسومية متماثلة ولكل كروموسوم اكثرمن نظير واحد ويحدث نتيجة لفشل في الانقسام الاختزالي او الخيطي او باستعمال الكولشيسين ، او قد تحتوي احد الامشاج على مجموعه ثنائية فإذا خصبت بنوع من الامشاج يحتوي على مجموعه احاديه ينتج بيضه مخصبه تحتوي على ثلاث مجاميع كروموسومية triploidy .

ب- التعدد المجموعي الخلطي Allopolyploidy: ناتجة من وجود مجاميع كروموسومية مختلفة تابعة الى اجناس او انواع مختلفة وهذه الحالة شائعة الحدوث في النباتات بسبب حالة التهجين.

التضاعف المجموعي غير الحقيقي: ويحدث تضاعف لجزء من المجموعة الكروموسومية التابعة لفرد ثنائي المجموعة الكروموسومية ويحدث بسبب:

أ- اخفاق انفصال الكروماتيدات لأحد الكروموسومات في الانقسام الاختزالي

ب- عدم اقتران احد الكروموسومات في الطور التمهيدي الاول الذي ينشأ عنه توزيع عشوائي لكروموسومين وبالتالي يذهب كلا الكروموسومين الشقيقين الى احد الاقطاب فيتكون مشيجان احدهما يمتلك كروموسوم اضافي والأخر ناقص الكروموسوم وعند اتحادهما بمشيج اعتيادي في الحاله الاولى يكون ثلاثي الكروموسوم trisomy والآخر يكون ناقص الكروموسوم احادي الكروموسوم monosomic

امثله على التغيرات في المجموعه الكروموسوميه

متلازمة داون (المنغوليا) Down s syndrome (mongolism) : تنتج هذه الحالة بسبب زيادة كروموسوم واحد في الزوج الحادي عشر (كروموسوم جسمي) والذي يصبح بثلاثة كروموسومات بدلا من الحاله الثنائيه والزيادة هذه ناشئة من عدم انفصال زوج الكروموسومات الجسميه رقم 21 انفصالا طبيعيا في احد الابوين اثناء الانقسام الاختزالي . يمكن تشخيص هذه الحاله عن طريق تحليل الهيئة الكروموسومية karyotype . يتصف المصاب بهذا المرض بالتخلف العقلي وقصر القامة وذا وجه متسع دائري وذا جبهة بارزة وانف مضغوط .

متلازمة تيرنر Turner s syndrome : تنتج هذه الحاله المرضيه من اتحاد بيضه خاليه من كروموسوم X فالطراز الوراثي هو X0 او 45,X والطراز المظهري لهذه المتلازمة هي انثى رغم وجود كروماتين الجنس او جسم بار Barr body ونادرا ما تصل الى مرحلة البلوغ الجنسي ، قصر القامه ، انتفاخ الرقبة والصدر العريض تخلف عقلي

اما في حالة اتحاد تلك البويضة مع نطفه ذكريه تحمل كروموسوم Y فان البيضه المخصبه تتطور الى ذكر طرازه الوراثي Y0 يفارق الحياة بعد فتره وجيزة .

تصليح DNA:

اليات اصلاح DNA المتضرر

المقدمة: من احدى اهم صفات الماده الوراثية هي انها تخزن المعلومات الوراثية وتضاعفه وتظهرها بشكل امن الى الاجيال اللاحقة ولكن مسألة اظهار المعلومات وخزنها بشكل امن ونقله الى الاجيال اللاحقة مسألة نسبيه اذ انه قد تحدث اخطاء في احدى مراحل التضاعف:

1- قبل التضاعف
2- اثناء التضاعف
3- بعد التضاعف

هذا وقد يحدث تغير في تركيب DNA اثناء التعرض للمواد الكيمياوية او العوامل الفيزياوية مما قد يودي الى ضرر يثبط التضاعف او الاستنساخ وربما يؤدي لحصول طفرة. ولأجل الحفاظ على تكميلية الماده الوراثية طورت الاحياء المجهرية اليات اصلاح DNA المتضرر.

بالرغم من أن لإنزيمات بناء DNA (DNA polymerases) نشاطية تصليح تكمن في إزالة النيوكليوتيدات الخاطئة إلا أن البعض من الأزواج القاعدية الشاذة الناتجة تفلت من نظام التصليح هذا، بالإضافة إلى ذلك يحدث خطأ التزاوج من التماكب التلقائي (tautomerisation) للقواعد النيوكليوتيدية، لا تؤدي كل هذه الأخطاء حتما إلى ظهور طفرات في الخصائص، لأن الخلية تمتلك أنظمة تسمح لها بإزالة هذه الأخطاء تسمى بأنظمة تصليح أخطاء التزاوج.

مصادر الضرر: يتعرض DNA داخل الخلية إلى أنواع مختلفة من الأضرار، فقد تهدمه انزيمات هاضمة أو يتعرض لكسور مختلفة أثناء الانقسام، كما يمكن للعوامل الخارجية مثل المركبات الكيميائية والإشعاعات (X, UV...) أن تحدث الكثير من الأضرار في DNA لذلك يتطلب تصليح التشوهات الناتجة لإبقاء أي طابع وراثي في صورته السليمة الموروثة عن الآباء.

أ - عوامل داخليه نتيجة للفعاليات الحيوية للخلية وتشمل

1 - اكسدة القواعد النتروجينية لجزيئة DNA ، مثال 8- oxoguanine
2 - الالكلة alkalation ويتم فيها اضافة مجموعة المثيل ،مثال 7- methyl guanine
3 - تحلل القواعد النتروجينية، مثل ازالة مجموعة الامين للقاعده النتروجينيه
4 - فقدان التزاوج بين القواعد النتروجينية mismatch

ب -عوامل خارجية وتشمل

1 - الاشعة فوق البنفسجية UV light

2 - UV-A light تؤدي الى تكوين الجذور الحره، وبذلك يحدث ضرر غير مباشر

3 - الاشعة الايونية ionizing radiation

4 - العرقلة الحرارية temperature disruption. دائما تؤدي الى حذف القواعد البورينية من شريط الدنا وتكوين AP sites

5 - المواد الكيماوية الصناعية

جدول: الأنظمة والمورثات المسؤولة عن التصليح:

طريقة العمل	المورثة المسؤولة ووظائفها	نوع الضرر المصلح	الآلية
الإزالة المباشرة للضرر	Alkyltransferase	0-6 Alkylguanine	تغير المجموعات الألكيلة في 0-6 Alkylguanine لبقية السيستين للترونس فيران
	Photolyase	Photoproduit 6-4	كسر الروابط 6-4 يحفظ ويصلح القواعد العادية
		ثنائي البيريمدين الناتج عن UV	قطع les diméres في وجود الضوء الأبيض
القطع المعمم	النظام Excinuléase المشفر بالمورثات (uvrABC)	ثنائي البيريمدين الناتج عن UV	يتم القطع بواسطة Endonucléolytiques إلى قطع وهناك أخطاء والنتيجة تكون التصحيح بـ DNApolymérase و DNAligase
القطع النوعي	Endonucléases AP		يتم القطع Endonucléolytiques
	DNAglycosylase	مواقع منقوصة البيريمدين أو اليوراسيل أو الهيوكزاتين والقواعد المتغيرة	تنزع القواعد وتصصح الأخطاء بـ EndonucléasesAp
التصليح بعد البناء التضاعف	تصحيح أخطاء التزاوج بواسطة المورثات (mut.L, mut.S) Endonucléases (mut.H) Hélicase (mut.U)	قواعد مرتبطة بصفة خاطئة	نعلم أن سلسلة DNA الجديدة Y تكشف جزيئات الأدينين غير الممثيلة في السلسلة 5´GATC 3´ تقطع بعد ذلك قواعد السلسلة الجديدة عندما تكشف الثنائيات.
	- تحديد موقع الأزواج G :T وإزالته بواسطة (mut.L, mut.S…)	أزواج G :T الناتجة عن إزالة NH_2 من $5CH_3$Cytosine	
	- التصليح بإعادة التشكيل الوراثي (RecA, Ruv)	وجود ثغور في خيوط DNA الجديد في مستوى الأضرار في DNA الأب	
	- التصليح بإعادة التشكيل الوراثي (RecA, RecN)	كسر ثنائي الخيط	
	- نظام SOS (RecA, umu D,umu C)	وجود ثغور في خيط DNA الجديد 4 مستوى الأضرار في DNA الأب => تضاعف غير وفي للسلسلة المتضررة	- استمرار التضاعف رغم وجود الأضرار.

Remove Watermark Now

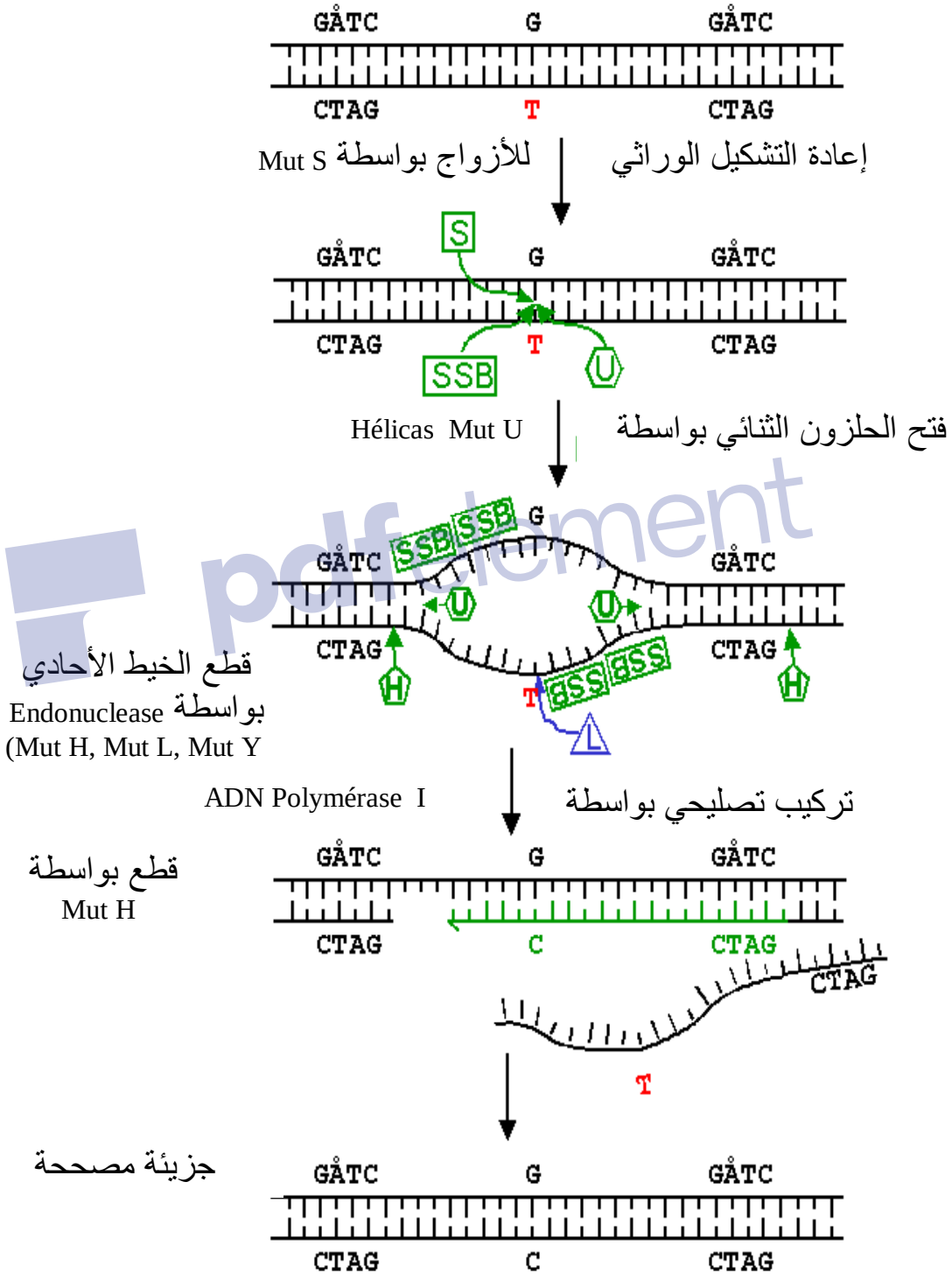
1.أ . تصليح اخطاء التزاوج:

- التصليح الموجه بالتسلسل « GATC » الممثيل:

تتعرف نواتج مورثي mut. S و mut. L التي تميز خيط DNA بدرجة مثيلتها على أخطاء التزاوج ، ويقطع بعدها الأنزيم mut.H قطعا داخليا (Endonucléase) الخيط النصف ممثيل (أي خيط حديث النشأ) على بعد معين من جهتي الخطأ يقطع الإنزيم exonucléase I في الاتجاه 5َ← 3َ نيوكليوتيدات الخيط بين نقطتي القطع أما الفراغ الناتج فيملأ بالتطابق بفعل DNA polymérase حسب الخيط الأبوي الذي يتخذ كقالب، ثم يقوم الإنزيم DNA ligase بتلحيم الأطراف. تستعمل طبعا بروتينات أخرى مساعدة كإنزيم mut. H الذي يعمل على فك ضفيرة DNA (helicase) لإزالة الخيط الذي تم قطعه، و بروتين SSB (single binding protiene) الذي يعمل على إبقاء خيوط DNA على شكلها الخطي.

يجب لهذا النظام أن يكون قادرا على تمييز القاعدة الصحيحة، أي المحمولة على الخيط الأبوي من القاعدة الخاطئة الموجودة على الجزيئة الحديثة البناء، ويكون ذلك ممكننا بفعل الإنزيم Dam methylase (تلف = damage = Dam) التي تتعرف على السلاسل GATC وتمثيل الأدنين في الموقع N_6 فقط خلال التضاعف لكن بعد مفرقه، فتكون هذه المثيلة متأخرة نوعا ما وينتج بذلك فارق في الزمن وفي المجال، يكون حينئذ الخيط القالب كامل المثيلة (تمت مثيلته في التضاعف السابق)، بينما يظهر في الخيط حديث النشأ تدرج في المثيلة فيكون ممثيلا في أجزائه التي تضاعفت منذ زمن بينما لا يكون كذلك بالقرب من مفرق التضاعف.

pdfelement



الشكل 16. تصليح القطع الموجه بواسطة التسلسل GATC

Remove Watermark Now

1.ب التصليح بقص سلاسل قصيرة: (Short path repair)

يشتغل هذا النظام على DNA كامل المثيلة ويستطيع التصليح خارج عملية التضاعف. يعمل هذا النظام فقط على الأزواج المتواجدة في نقطتين بالضبط في سلسلة 3´ CCAGG 5´ الممثيلة وتخص عملية القص و إعادة البناء سلاسل ققصيرة جدا حول الزوج الخاطئ. يتمثل دور هذا النظام في الخفض من نسبة الطفرات الناتجة عن إزالة مجموعة NH_2 من 5 ميثيل سيتوزين ($5CH_3$ Cytosine) .

1.ج التصليح بالقص ثنائي الخيط المتبوع بإعادة التشكيل الوراثي:

يشتغل هذا النظام على DNA غير الممثيل، أين تقطع Mut H كلا الخيطين (بدلا من الخيط نصف الممثيل) بالقرب من القواعد الخاطئة، تملأ الثغور الناتجة بإعادة التشكيل الوراثي، يصحح هذا النظام الأخطاء المتواجدة سواء في الخيط الأبوي أو في الخيط الابن.

تصليح الأضرار:

تقوم الخلايا البكتيرية بتصليح أتلاف DNA كثنائي البيريميدين أو أضرار أخرى كإرتباط القواعد بمواد سامة أو مطفرة مثل B_1 Aflatoxine و Benzopyrene و ذلك بالقطع وإعادة البناء (التصليح الاستئصالي) إلا أن هذا النظام يختلف عن سابقه (إزالة أخطاء التزاوج) كما يصلح تلف المادة الوراثية أيضا بأنظمة أخرى منها استعادة التنشيط الضوئي photo reactivation والتصحيح عقب التضاعف.

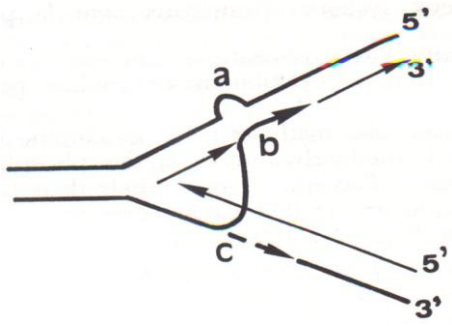
الازالة المباشر للضرر:

الاصلاح الاستئصالي (القطع المتبوع بإعادة البناء):

يتضمن الاصلاح الاستئصالي عدة خطوات متتالية من النشاطات الإنزيمية، يتم خلالها إزالة ثنائيات التايمين الناتجة عن الأشعة فوق البنفسجية (UV) من جزيء DNA ثم بناء قطعة جديدة. يحدث التفاعل الاستئصالي بفعالية في الظلام لذلك سميت العملية بالتصحيح الظلام (dark repair) ، كما تحدث في وجود الضوء الأزرق.

الخطوة الأولى من الاصلاح التفاعل الاستئصالي هي حدوث قطع بواسطة إنزيمات الهدم الداخلي (endonuclease) المشفرة من طرف ثلاث جينات هي uvr (A.B.C) . تتعرف uvr (A.B.C) عند E.coli على ثنائيات التايمين أو على تلف آخر في جزيئة DNA، وتكسر الرابطة النيوكليوتيدية في نقطتين، حيث تقطع الرابطة النيوكليوتيدية الثامنة من الجهة 5´ والرابطة الرابعة من الجهة 3´ للضرر، محررة قطعا صغيرة من النيوكليوتيدات (12 أو 13 قاعدة). يتم هدم القطع الحاملة للضرر بفعل إنزيم قطع الخارجي (Exonucléase) من المحتمل أن يكون الإنزيم DNA polymérase، أما الإنزيم Hélicase (mut. H) المشفر من طرف uvrD فهو مهم لإزالة القطعة المحررة، تملأ الثغرة الناتجة بواسطة البناء النيوكليوتيدي المصلح بواسطة DNA polymérase I إبتداء من النهاية 30H الحرة إلى غاية النهاية 5'P في مستوى القطع. وفي الأخير يعمل الإنزيم DNA ligase على تلحيم القطع النيوكليوتيدية الجديدة والقديمة.

يكون نظام التصحيح هذا عاما إذ أنه لا يزيل فقط ثنائي البيريميدين الناتجة عن الأشعة فوق البنفسجية، لكن يزيل أيضا المواد الكيميائية السامة (B_1 Aflatoxine و Benzopyréne)



الشكل 17

وقد تم عزل الإنزيمات المسؤولة عن الاستئصال عند العديد من الكائنات ويبدو ان أنظمة التصليح في الخلايا حقيقيات النواة أكثر تعقيدا من تلك الخاصة بالبكتيريا و التي تستعمل بدون شك عددا أكبر من الإنزيمات. تتجلى أهمية هذا النظام بظهور العديد من الأمراض البشرية التي تتبع عن عدم القدرة على القيام بهذا التصليح الاستئصالي كحدوث سرطان الجلد Xeroderma pigmentosum نتيجة قصور في واحد من الآليات التصحيحية إذ يكون الأشخاص المصابين بهذا المرض جد حساسين للأشعة فوق البنفسجية.

- العكس المباشر للتفاعل الكيمياوي Direct reversal for chemical reaction:

يكون هذا النوع من الاصلاح متخصص بنوع الضرر من دون تأثير على هيكلية بناء شريط DNA. اذ يمكن اصلاح ثنائيات الثايمين الناتجه بفعل الاشعة فوق البنفسجية بواسطة ميكانيكية تدعى **التنشيط الضوئي photoreactivation**، تعمل على العكس المباشر للضرر من خلال فعالية انزيم يدعى photolyase الذي يتنشط بفعل الطاقة الممتصة على طول موجي 300-500 نانوميتر، بعدها يقوم بازالة الضرر.

يقوم تفاعل التنشيط الضوئي بتصحيح وإصلاح ثنائيات البيريميدين الناتجة عن الأشعة فوق البنفسجية (خاصة ثنائيات التايمين T=T)ن وذلك بتشكيل معقد ترتبط فيه إنزيمات DNA polymérase بـDNA . ثم عزل هذا الإنزيم تقريبا من كل الخلايا :من البكتيريا إلى الخلايا الحيوانية. ويعمل في وجود الأشعة المرئية ويستعمل طاقتها في تفكيك الروابط الناتجة عن تشكيل هذه الثنائيات بإحداث كسر مباشر، دون استبعاد أي من النيوكليوتيدات. لا يقدر هذا المعقد أن يحدث إنشطارا في الروابط دون طاقة ضوئية خاصة الضوء المحتوي على الطيف الأزرق. وقد أثبتت العديد من الدراسات عند الانسان ان الأفراد الذين يعانون من بعض الأمراض الجلدية تكون لديهم مستويات منخفضة من إنزيم Photolyase.

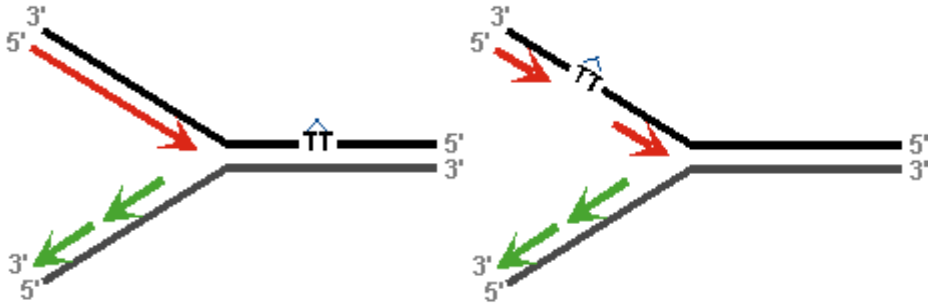
- إزالة و اصلاح الضرر بعد التضاعف : postreplication repair

- التصليح بعد التضاعف (إعادة التشكيل الوراثي):

تعتمد هذه الالية مبدأ اعادة التشكيل الوراثي المتجانس genetic recombination homologous لتحل قطعة DNA المتكاملة او الصحيحة محل قطعة DNA المتضررة . عند تضاعف جزيئة DNA الحاويه على ثنائية الثايمين thymine dimmer (lesion) يقوم انزيم بلمرة DNA باستئناف عمله اسفل منطقة الضرر فيكون هنالك فسحه في شريط DNA الجديد مقابل ثنائية الثايمين، وفي الدوره الثانيه من تضاعف DNA تتكون جزيئتين DNA ، احدهما متكامله والأخرى حاويه على منطقه غير متزاوجه مع القواعد النتروجينيه في منطقة الضرر. ان عملية الاصلاح تتضمن تكوين تلاقيات هوليداي Holliday junctions ،الذي يقوم بعملية اعادة التشكيل بين جزيئ DNA وفيه تستبدل المنطقه غير المتزاوجه unpairing region في

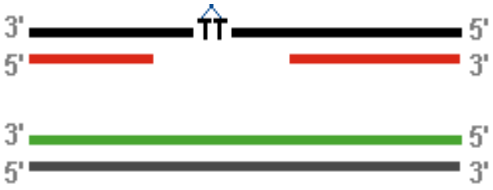
جزيئة DNA المتضررة بتسلسل مماثل من النيوكليوتيدات لشريط DNA الاصلي من الجزيئه الثانيه. وهكذا يتم الحصول على جزيئتين DNA احدهما حاويه على ثنائية الثايمين وشريط مصحح وراثيا و الجزيئه الاخرى حاويه على فسحه يتم ملأها بواسطة انزيم بلمرة DNA وإنزيم الايكيز

Now also supose that this molecule is being replicated. **DNA polymerase II** will be unable to correctly copy the thymine dimer. Rather than stall at this point, it may simply skip over the problem:

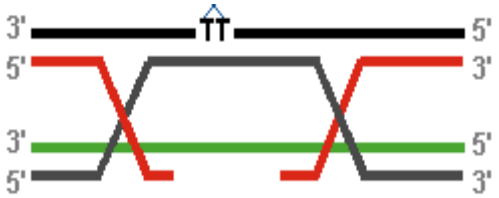


It is now believed that DNA polymerase II (PolII) reinitiates DNA synthesis downstream of lesions such as thymine dimers.

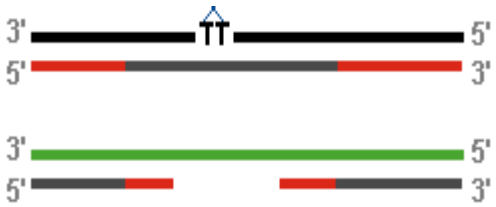
Now, we are left with two daughter molecules, one of which is complete and one of which has an unpaired region containing a thymine dimer:



This cannot be repaired by the usual repair systems. However, the exposed ssDNA can be bound by the RecA protein which can then catalyse strand exchange with the correctly synthesised daugthter molecule:



This intermediate contains two Holliday junctions which can be cleaved (resolved) by the Ruv proteins to give:



One daughter molecule still contains the thymine dimer but the opposite strand has the correctgenetic sequence. The other daughter now conatins a gap but this gap can be repaired correctly by the usual repair systems

يتوقف التضاعف عند تأخر عملية الإصلاح بسبب نقص في حيوية الخلية أو كون الضرر كبيرا كما في حالة ثنائي الوحدات الضوئي Photodimére أو المضافات الكيميائية الكبيرة ثم يتواصل التضاعف ما بعد موقع الضرر. يتم قطع الجزء المتضرر من DNA تاركا مكانا فارغا في الخيط حديث النشأ لعدم القدرة على ملأ الفراغ. عندئذ تلجأ الخلية إلى إعادة التشكيل الوراثي بين مفرقي (ذراعي) التضاعف، حيث يعوض ذلك الفراغ في DNA الابن بالمنطقة المناسبة التي تؤخذ من خيط DNA الأب أين يترك فراغا أيضا و الذي يملأ بواسطة DNA polymérase باستعمال DNA الابن كقالب.

تستعمل هذه الآلية نواتج عدة مورثات منها RecA الذي يربط السلاسل المجاورة للضرر بالسلاسل المطابقة لها.

تصليح الإغاثة: SOS

يعتبر التصليح SOS عملية معقدة تسمى بالتصليح غير الوفي لأنه يسمح بمواصلة التضاعف رغم وجود أضرار في حلزون DNA الناتج عن ثنائية التايمين، فهو نظام يولد أخطاء في التسلسل ولا يزيلها. يبدأ هذا النظام في العمل عندما لا يستطيع نظام التصليح الاستئصالي ولا التصليح بعد التضاعف إزالة الأضرار الكثيرة والخطيرة بعد توقف عملية التضاعف، يظهر إذن كحل إغاثة لمنع موت الخلايا.

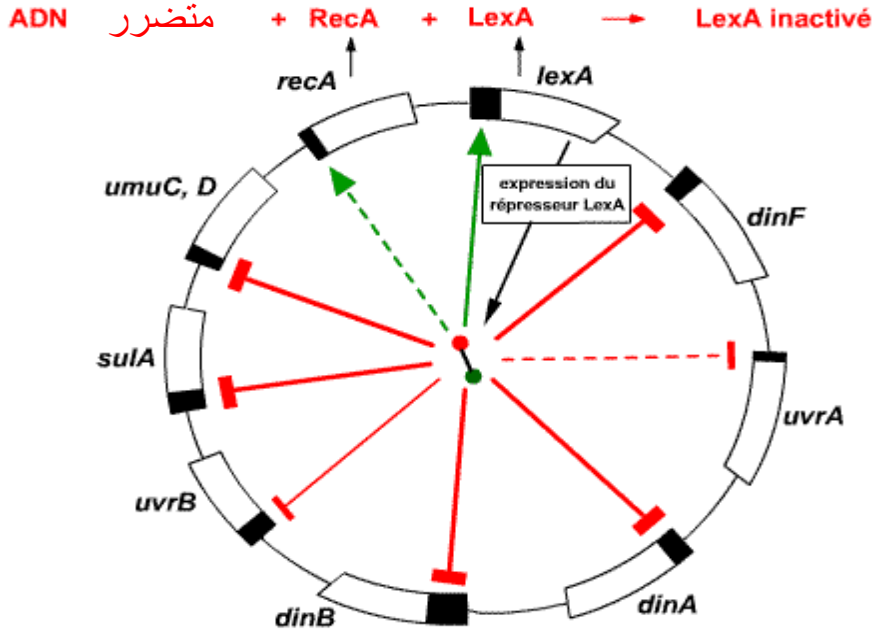
لا تعرف بالتحديد آلية نظام الإغاثة إلا انه عند E.coli يرتبط هذا النظام على الأقل بثلاث مورثات هي Rec A التي تلعب دورا رئيسيا في عملية إعادة التشكيل الوراثي و Umu C و Umu D.

- حث النظام SOS:

عندما تكون الأضرار خطيرة بمقدار كاف لتوقف بناء DNA، يحث استنساخ مجموعة من المورثات المهمة تسمى مورثات SOS، يسبب توقف التضاعف و تظهر سلاسل DNA أحادية الخيط، فيتم التعرف عليها بواسطة إنزيم Rec A، لهذا الأخير عدة أدوار:

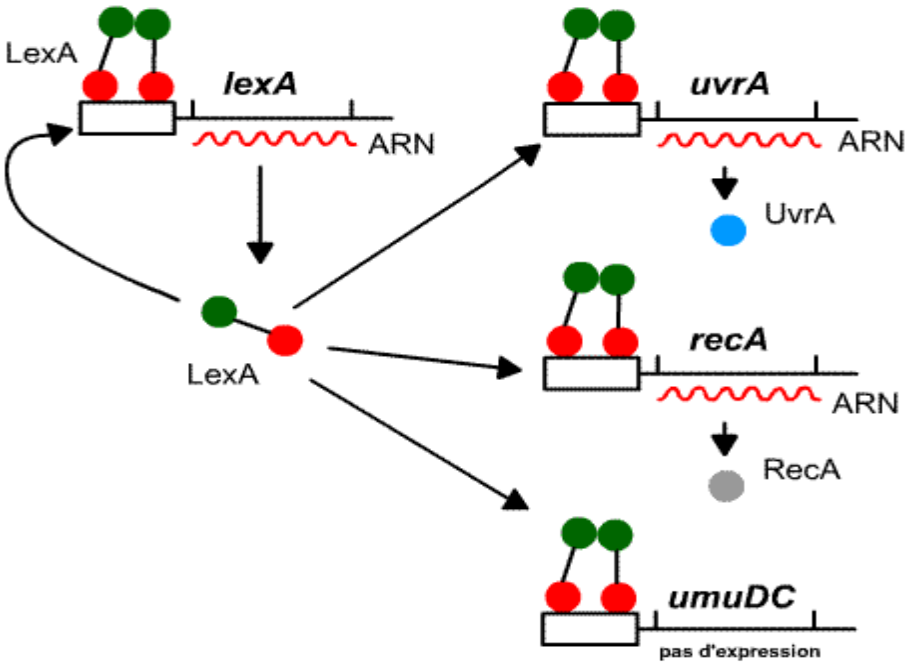
- المساهمة في إعادة التشكيل الوراثي من جهة.
- تخريب البروتين Lex A الكابح الرئيسي لمورثات نظام الاستغاثة SOS.

يحث إنزيم Rec A بذلك استنساخ حولي 20 مورثة كل منها دور هام في عملية تصحيح DNA.



الشكل 18: جينات أنظمة التصليح وجينات إضافية أخرى

في الظروف المثالية للنمو البكتيري يكبح Lex A مورثات نظام التصليح فلا يستنسخ أو يترجم البعض منها بصفة جد ضعيفة فقط. تنتج البروتينات Lex A و Rec A و Uvr A عاديا بتراكيز منخفضة، تكون كمية Lex A الموجودة كافية لكبح بقية مورثات SOS كليا، لكن عندما تتضرر جزئية DNA بفعل الأشعة فوق البنفسجية مثلا، تظهر مناطق DNA أحادية الخيط فتجذب البروتين Rec A ثم الكابح Lex A اللذان يرتبطان بها ، يخرب Rec A المرتبط البروتين Lex A . يؤدي اختفاء هذا الأخير إلى الترجمة العالية لبروتين Rec A وبقية مورثات SOS، من بينها نواتج ضرورية لتصليح DNA.



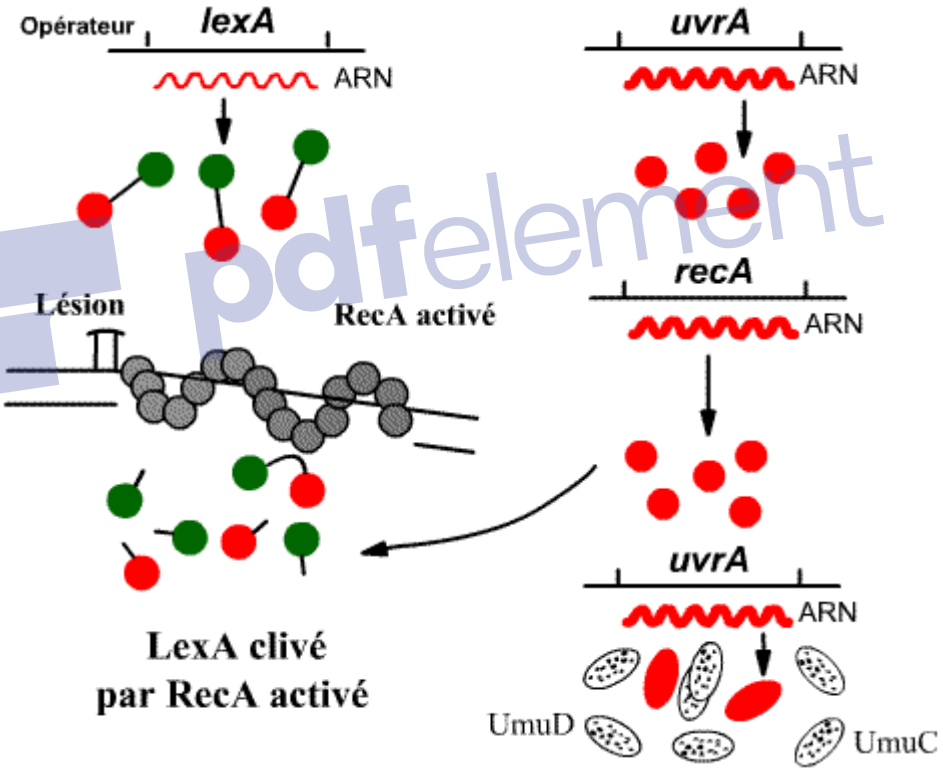
الشكل 19: تنظيم استنساخ الجينات المسؤولة عن التصحيح sos

Remove Watermark Now

- تخريب Lex A وتنشيط نظام SOS:

يحيط Rec A خيط DNA الأحادي على شكل حلزون ليكون الشكل النيوكليوبروتيني ، ثم يرتبط بروتين Lex A ويهدمه. يعتبر هذا الهدم إشارة إغاثة، وتترجم مورثات الإغاثة العشرون التي تتدخل في مختلف عمليات التصليح، كل منها بحركية خاصة.

يصبح نظام الإغاثة ممكنا بعد تدخل مركب مكون من نواتج المورثتين Umu C و Umu D، في الوهلة الأولى،وبعد إنتاج كميات كبيرة من البروتينات Umu C و Umu D يعمل البروتين RecA على إنضاج هذه البروتينات بالقطع، تجتمع جزيئتين من Umu D مع جزيئة Umu C لتكون المركب Umu D'2C (المركب المطفر)، ثم يرتبط هذا الأخير بإنزيم DNA polymérase فيغير نوعيته إذ يصبح متسامحا إتجاه قانون تطابق القواعد فيجعله قادرا على تخطي التلف الموجود بالإضافة العشوائية للنيوكليوتيدات. في هذه الحالة الطارئة يتجاهل مركب التضاعف DNA polymérase – Umu D'2C الضرر الموجود على الخيط الأبوي لينتج خيطا مقابلا له، يتعلق التضاعف الوفي إذن مؤقتا لتبقى الخلية حية ولو بثمن فساد المعلومة الوراثية.



الشكل 20: العوامل المؤثرة على نظام sos

Remove Watermark Now

الضرر والطفرات الوراثية DNA damage and genetic mutation

يختلف هذان المصطلحان جوهريا عن بعضهما بالرغم من ان كلاهما خلل في الماده الوراثية وتغير عن الحالة الطبيعية. والفروقات هي كالاتي :

DNA damage	Mutation
1- ضرر DNA هو تغيرات فيزياويه مثل تغير في القاعده النتروجينيه التي يمكن ازالتها عن طريق اليات الاصلاح	1- تغير في تسلسل القواعد النتروجينية او تغير في التركيب الجيني او المحتوى الوراثي
2- يمكن تمييزها من خلال انزيمات نظام الاصلاح باستخدام المعلومات الوراثيه الموجوده على شريط DNA المتمم	2- لايمكن تمييزها بواسطة الانزيمات حال وجود التغير في كلا الشريطين
3- الضرر ممكن ان يؤدي الى موت الخليه اذا ما احتفظت الخليه بتلك التغيرات	3- تتكرر الطفرات بتضاعف الخليه ويمكن ان تسب تغيرات في وظيفة البروتين وليس بالضرورة ان تؤدي الى موت الخلية
4- عدم اصلاح الضرر في الخلايا بطيئة الانقسام او غير المنقسمه يكون تأثيرها تراكمي ، في حين عدم اصلاح الضرر في الخلايا سريعة الانقسام ربما يؤدي الى احداث الطفرة	4- يمكن فقد الخلايا الطافرة اثناء تضاعفها او انها تنقسم لتكون نسائل خلوية طافرة محدثة بذلك السرطان

pdfelement

********** انتهت المحاضرة **********