الفصل الرابع

جولات مع مجموعة من العوامل المؤثرة
فى السبعينات والثمانينات والتى أسهمت
فى النهوض والإسراع بتقنيات الهندسة الوراثية

مقدمة الفصل:

لعبت العوامل العديدة السابق الإشارة إليها فى الفصلين الأول والثانى وغيرها الكثير والكثير (سواء تجارب أو اكتشافات وغيرها) دوراً أساسياً وفعالاً فى القفز بمجالات البيوتكنولوچيا والهندسة الوراثية قفزات واسعة للأمام. وشهدت فترتا السبعينات والثمانينات توسعاً هائلاً فى البيولوچيا الجزيئية تقنياً وثقافياً واقتصادياً... ويرى معظم الباحثين أنه بنهاية عقد السبعينات وباستخدام «تقنيات الدنا المُطعم» أساساً.. تزايدت عدد الكروموسومات البشرية «التى حُددت هُويتها وخرطنت على كروموسومات بذاتها أكثر من ستة أضعاف بل إلى نحو ٣٠٠ ضعف بالنسبة للچينات الأوتوزومية. وتم عرض وقبول لفكرة ومفهوم (المرض الوراثى) وأصبحنا نجد فى التسعينات طرقًا مرتكزة على الدنا تطبق روتينيًا فى مجالات الجراحة (نقل الأعضاء)، والدواء (السرطان) وطب الأطفال (التشخيص الوراثى) والتوليد لأمراض النساء (التشخيص قبل الولادة).

وبناء على هذا الأساس الذى يتفق عليه أغلب الوراثيين فى السابق بعدم الشك فى قدرة الچينات على تقرير رفاهية البشر ومن ثم، فى النهاية «تحسينها»؛ فلقد تزايد استخدام علماء الصحة والأطباء لمصطلح الوراثية فى إدراك مفهوم المرض الذى امتد الآن فى عموم مجال السلوك البشرى وتزايد حجم المجلدات الطبية عن الأمراض الوراثية وأصبح علماء الوراثة ينظرون إلى اعتبار العوامل الوراثية من بين أسباب محددات الصحة، وأنها محدد غاية فى الأهمية للصحة والمرض..

وفى أثناء هذا التحول فى المفهوم تم ضم ليس فقط العلل الوراثية التى تُعتبر أمراضًا ، وإنما أيضًا الشذوذات الوراثية التى لا ترتبط بأى علة، بجانب علل قد لا تكون وراثية ولا مرضية... كل ذلك فتح الباب على مصراعيه لظهور مجالات متعددة فى عالم الهندسة الوراثية منها : العلاج الجينى، هندسة الخلايا والأنسجة و ... و... إلخ.

وسنتناول فى جولات هذا الفصل بعضاً مما تحقق فى فترتى السبعينات والثمانينات وأسهم فى النهوض والإسراع بتقنيات الهندسة الوراثية لتصل لما هى عليه الآن:

فسنعرض فى الجولة الأولى بعض الإنجازات الهامة التى تمت فى السبعينات والثمانينات مثل كلونة الدنا المتمم (دنا ـ م) فى عام ١٩٧٥م، وخرطنة جين مرض بطريقة الرفليبات وغيرها.. أيضاً نتعرض لتقنية تهجين المادة الوراثية فى موقعها والاستفادة منها.

وفى الجولتين الثانية والثالثة نتناول موضوعاً واحداً وهو وسائل النقل التى تم استخدامها لنقل وإكثار تتابعات من الدنا. . وتختص الجولة الثانية بالتركيز على الدور الذى لعبته الفاجات والبلازميد البكتيرى كوسائل للنقل مع إبراز الدور الفعّال لباحثى مصر فى هذا المجال.

بينما يتم فى الجولة الثالثة: عرض وسائل نقل أخرى لنقل الدنا المرغوب من «الواهب» وإدخاله فى چينوم المضيف مثل الثقب الكهربائى والحقن الدقيق واستخدام أشعة الليزر فى النقل الوراثى، ومستدس الچينات... ثم نأخذك عزيزنا القارئ فى جولة مع إنزيمات القطع والتحديد وتكوين الرفليبات وذلك فى «الجولة الرابعة من الفصل». بينما تنتقل الجولة الخامسة (ما بين الرفليبات والفترات والتوصل للبصمة الوراثية).

هذه هى الخطوط العريضة لموضوعات الجولات الخمس والتى سنأخذك معنا عزيزى القارئ فيها ضيفاً كريماً .. لتحلّق معنا فى سمائها .. والمزيد من التفاصيل الشائقة ستجدها فى الجولات.. فمعنا نبدأ أولى الجولات..

الجولة الأولى:

«جولة مع بعض الإنجازات الهامة فى السبعينات والثمانينات والاستفادة من تقنية «تهجين المادة الوراثية فى موقعها»

أولاً: مع بعض الإنجازات الهامة فى السبعينات:

تم فى عام ١٩٧٥م كلونة الدنا المتمم «دنا ـ م» الخاص بالهيموجلوبين. وبنفس العام أيضًا تم التوصل إلى ابتكار طريقة سريعة (تقنيات) لمعرفة تتابع النيوكليوتيدات (سلسلة أزواج القواعد فى قطع من الدنا) وذلك بواسطة علماء أمثال «جيلبرت Gilbert» بجامعة كيمبريدج بانجلترا، «آلان م. ماكسام Maxam» إبجامعة هارفارد، و«فريد سانجر Sanger» بجامعة كيمبريدج بانجلترا و «Barrell».

٢ـ وفى عام ١٩٧٦م تم تفسير آلية تنوع الجلوبيولين المناعى وبنفس العام كان أول استخدام طبى لتكنولوچيا الدنا المطعم.

٣ـ وفى عام ١٩٧٨م تم تخليق عقار ببتيدى باستخدام الدنا المطعم .

٤ ـ وبنفس العام أيضًا تم خرطنة چين مرض بطريقة الرفليبات.

٥ـ اكتشف فى عام ١٩٧٩م چين تى بى ٥٣ {TP53} ويقع على الذراع القصيرة لكروموسوم ١٧ . وهو من الچينات الكابحة للورم وعندما يُكتشف أى سلوك شاذ فى إحدى الخلايا، ويصدر تعليمات لچينات مختلفة بأن تفكك هذه الخلية من داخلها أى أن تنتحر.

ثانياً: ابتكار تقنية «تهجين المادة الوراثية فى موقعها Insitu bybridization، فى أوائل الثمانينات والاستفادة منها فى خرطنة الچينات:

ففى عام ١٩٨٠م ابتُكرت تقنية تهجين المادة الوراثية فى موقعها، وفى نفس العام أيضاً أضافت «مارى هاربر» مادة الدكستران. (وهى من الكربوهيدرات) للتقنية السابقة لتزيدها كفاءة إحيث لاحظت أنه بوضعها مع المسبر فإنه يشكل شبكة أو كتلة تتسبب فى تعقد جزيئات المسبر، ومن ثم يصبح بالتهجين ما يكفى من الإشعاع كى يظهر بوضوح.

كيفية الاستفادة من تقنية [تهجين المادة الوراثية فى موقعها] فى خرطنة الجينات:-

أ) تستغل هذه التقنية مبدأ تكامل القواعد الآزوتية (س فقط مع ج، أ تقترن فقط مع ث). فإذا أخذنا مثلاً قطعة من دنا بشرى تحمل جيناً مُعيناً أو جزءاً محدداً من جين، وأنتجنا منها بالكلونة مثلاً قدراً معقولاً يكفى [حيث يُستفاد من البكتيريا فى كلونة الجزء أو الجين المطلوب].

ب) ويتم إعدادها وتجهيزها لتصبح مسبراً... وفى سبيل الوصول لذلك تتخذ عدة إجراءات منها: معالجتها بحيث تُفصل جدائل (الدنا) وتصبح مفردة، ومنها أنه يتم وسمها بواسم مشع أو بمادة كيماوية تُسبب تغيراً فى اللون.. وهكذا يصبح لدينا مسبر Probe.

ج) يتم أخذ دهكة من چينوم فردما - (وهو الشخص المطلوب خرطنة جين أو جزء من دنا خاص به) - ويتم معالجتها حتى تنفصل جدائل (الدنا) وتصبح مفردة.

د) يُضاف إليها المسبر المشع، نلاحظ (اشتباك) أو التصاق أو تَهَجُّن المسبر بالقواعد المكملة له عند مكان الجين بالتحديد - [وتتم عملية التكامل من خلال الترابط الكيميائى بين القواعد الآزوتية بواسطة الروابط الهيدروچينية] ويتمكن الباحث بذلك من تحديد الكروموسوم الذى يحمل الجين؛ بل والمنطقة منه التى تحمله، وذلك بأخذ صورة إشعاعية، فتظهر فى الصورة بقعة سوداء فى مكان التهجين.. وهى بذلك تحدد مكان الجين وتحدد الكروموسوم الذى يحمله.

هـ) أو بملاحظة مواقع تغير اللون إذا كانت مادة الوسم تحدث تفاعلاً يعطى لوناً.

و) وبهذه الطريقة تمكنت «مارى هاربر» واثنان من زملائها فى عام ١٩٨١م من إتمام ذلك الإنجاز وتم تحديد موضع الجين المشفر للإنسولين على الخريطة بعد أن جُهزت صورة إشعاعية ذاتية بينت لطخة سوداء مُشعة على طرف الذراع القصيرة للكروموسوم رقم (١١).

٧- ومع ظهور تقنية تهجين المادة الوراثية فى موقعها، كانت هناك خطوة تقنية

أخرى اتخذت فى عام ١٩٨٠م ومنهجها يتطلب الدقة العالية وهى تبدأ بقطعة من الدنا تحمل چيناً، أو حتى جزء صغير من چين «وكثيراً ما يبدأ «الورائى» بقطعة من دنا مرسال»، ثم يستخدم نظاماً به إنزيم نسخ عكسى، ليقرأها عكسياً إلى دنا، يكلون هذا الدنا بعدئذ فى بكتيريا تُنَمَّى لتنتج كمية منه ملائمة.

٨ ـ وفى عام ١٩٨١م أيضاً تم عزل چينات مسرطنة، وبنفس العام تم تحديد هوية طفرة مَرَضية بالطرق الجزيئية.

٩ـ وفى عام ١٩٨٣م تم عزل الفيروس المسبب لمرض الإيدز، وفى أوائل الثمانينات ابتكر العلماء بمعهد كاليفورنيا للتكنولوچيا بقيادة «ليروى هود» تكنولوچيا جديدة يمكن أن تؤتمت عملية السلسلة مع الإسراع بها، أيضًا ابتكر «تشارلز كانتور» ومعاونوه [بجامعة كولومبيا] فى أوائل الثمانينات (سنة ١٩٨٤م) تقنية تسمى التفريد الكهربائى ذى المجال النابض يستطيع بواسطتها عزل شظايا الدنا الكبيرة نسبياً .

١٠ـ وفى عام ١٩٨٧م تم إنتاج فاكسين بالتطعيم الچينى.

الجولة الثانية: جولة مع:

الفاجات والبلازميد البكتيرى.. (وسائل نقل ناجحة) وأخيراً فى مصر؟!! و .. الاحتجاج مستمر؟!!

نأخذك «عزيزنا القارئ» لتحلق معنا بين ثنايا ثلاثة موضوعات أساسية تشملها هذه الجولة وهى:

١ ـ الموضوع الأول وهو عن الفاجات والبلازميد البكتيرى.. والتي تم الاستفادة منها كوسائل نقل ناجحة للاستفادة منها فى تقنية الهندسة الوراثية.

٢ـ الموضوع الثاني: وهو لا ينفصل عن «الأول» ولكنه مكمل له وإن كان يتميز بأنه حدث أخيراً فى مصر.. حيث نقفز بجولتنا لعام «٢٠٠٣م» لنقدم لك ذلك الحدث السعيد وهو عن إنتاج بطاطس مهندسة وراثيًا فى مصر ـ باستخدام [الأجروباكتريم].

٣ـ ونستمر لبعض الوقت فى عام (٢٠٠٣) لننقل لك ذلك الاحتجاج على الأطعمة المهندسة وراثيًا.. مما يعطى لعزيزنا القارئ انطباعًا حقيقيًا عن ذلك التردد الذى يعيشه العالم اليوم ما بين الإقبال على الهندسة الوراثية ومنتجاتها بما فيها من أدوية وأطعمة مهندسة وراثياً.. وذلك الرفض والخوف من مخاطرها.

ومع الموضوع الأول نبدأ معك التحليق.. فى هذه الجولة.. فمعنا..

١ـ مع الجزء (الموضوع) الأول من الجولة:

«الفاجات والبلازميد البكتيرى.. (وسائل نقل ناجحة)»..

أولاً: المقدمة:

عقب الإعلان عن ميلاد تقنية الهندسة الوراثية (الطور الرابع من أطوار البيوتكنولوچيا)، فى عام ١٩٧٣م.. أصبح من الضرورى فى بداية العهد بهذه التقنية والتى يُطلق عليها أيضاً [الدنا المطعوم]. أن يتمكن الباحث من إجراء معالجات الحامض النووى DNA manipulation (منابلة الدنا الوراثى) والتى تشمل أو تتضمن أو يدخل فى إطارها «مجموعة تقنيات تضم استنساخ الجين أو الدنا المنقول Gene Cloning وتطويل جزىء الدنا وتقصيره بإضافة أو حذف أجزاء منه.

وحتى يتم الأمر للباحث فإنه يستلزم أن يتوافر لديه مايلى:

١ـ طريقة لعزل مقطع الدنا المرغوب من الواهب، وهو يستلزم معرفة طرق كسر ووصل أو لحم جزيئات محددة من الدنا الناتجة من مصادر مختلفة، ويتم ذلك تحت تحكم كامل.

٢ـ معرفة تتابع النيوكليوتيدات DNA Sequencing.

٣ـ وسيلة لحمل هذا الدنا وإدخاله فى جينوم المضيف أى توفير ناقل ملائم للدنا المرغوب. وهذا يستلزم أن تشتمل وسيلة النقل أو الحامل أو الناقل على د ن أ، يمكنه أن يستقبل الدنا الواهب، وهو يستلزم معرفة طريقة لقطع الدنا الخاص بالناقل ولصق الدنا الواهب فى منطقة القطع ليصبح جزءاً من الدنا الناقل الذى يجب أن تكون له القدرة على التناسخ الذاتى حتى يمكن أن تتناسخ قطعة الدنا التى يحملها.

٤ـ طريقة لإدخال الناقل بما يحتويه من الدنا الغريب داخل خلايا المضيف التى يجب أن تكون نشطة وفعّالة ليتمكن الدنا المطعم من التعبير عن نفسه وإظهار خصائصه.

٥ـ وسيلة لانتخاب خلايا المضيف التى تحتوى على الدنا المطعَّم المطلوب، من بين ملايين خلايا النسل التى ينتجها المضيف.

وفى بداية العهد بهذه التقنية لم يكن البحث عن هذه المتطلبات وتوفيرها للمهندس الوراثى. (الباحث فى مجال الهندسة الوراثية) بالأمر السهل، وبالبحث عن تقنية لتقطيع جزيئات الدنا إلى مقاطع جينية ثم إعادة اللصق، كان الحل الأمثل هو فى إنزيمات التحديد والقطع والوصل ومن بين هذه الإنزيمات مجموعة الـ "Endonucleases» مثل «Endonuclease R» الذى يوجد فى بكتيريا القولون والذى يسمى "EcoRI".

(ولقد سبق الحديث عن هذه الإنزيمات فى جولة سابقة).

ثانياً: الاستفادة من البلازميدات والفاجات:

وحلاً لمشكلة «الناقل Vactor» المناسب: نذكر أن الحل الأمثل كان ـ وقتها ـ بالاستفادة من البلازميدات والفاجات (والتى من خصائصها أنها كيانات ذات تضاعف ذاتى وذلك إضافة لما سبق وأبرزناه فى جولة سابقة).

وفيما يلى نذكر أمثلة (تطبيقات) تبرز حسن الاستفادة من البلازميدات وذلك بتكوين (البلازميد الهجين).

ثالثاً: أمثلة:

١ـ تكوين البلازميد الهجين:

وأولى الخطوات لتحقيق ذلك تتمثل فى توفير إنزيمات التحديد والبتر والتى تعمل كمقصات، أيضًا توفير البلازميدات البكتيرية المناسبة، فعندها يصبح بإمكان الباحث بعد تتبعه وقطعه لتتابعات معينة (جينات) من جزيئات الدنا المعقدة الموجودة فى الخلية الواهبة، يستطيع أن يستعمل نفس إنزيمات التحديد أيضاً فى قطع وفتح البلازميدة البكتيرية، يلى ذلك أن يتمكن المهندس الورائى من دمج مقاطع الواهب داخل دنا البلازميدة ـ وتسمى هذه القطعة من الدنا (موجة Insert) ـ، ولأن النهايات المقطوعة فى البلازميد وفى الجين القادم من الواهب هى نهايات لزجة، فإنها تلتصق ببعضها ويتم تثبيتها بالمعاملة بإنزيم الليجيز الذى يلصق نهايات الأطراف.. وهكذا تتكون بلازميدة هجينة متضخمة (لإضافة قطعة الدنا الموجة) وتسمى أيضًا البلازميدة المطعمة "recombined" أو «بلازميدة مهندسة وراثيًا» ويتم إدخالها داخل البكتيريا وإعطائها الظروف لتتكاثر وتتضاعف مستقلاً عن الدنا الأساسى للبكتيرة ـ وبخاصة أن الخلية البكتيرية تتميز بقدرتها الفائقة على التضاعف الذاتى السريع فى وقت قصير، حتى أن البكتيرة الواحدة من الممكن أن تعطى ربع مليون بكتيرة فى ظرف ١٢ ساعة إذا توافرت لها الظروف المثلى للنمو والتكاثر. لذا فإنه يحدث تكاثر بعدد وفير، ليتم فى النهاية إكثار واستنساخ الجين "Gene cloning" الذى تم إيلاجه من الخلية الواهبة بأعداد وفيرة، أو لجعله يُعبر عن نفسه بطرق خاصة مناسبة لتنتج

البروتينات المرغوبة سواء إنزيمات أو هرمونات يختص بالتكويد لها هذا الچين. كل ذلك يتطلب ظروفًا وأدوات خاصة للحصول على أعلى النتائج.

افتراض... لتوضيح كيفية إجراء كلونة چين مطلوب داخل بلازميد بكتيرى:

سنفترض أننا سنستخدم إنزيم Hind III وهو يقطع بين القواعد أ، أ ومستخرج من بكتيريا Heamopilus influenzae ... والأطراف بعد البترتكون لزجة (وسنرمز لمكان القطع بنقط).

١ـ التتابع على الجديلتين وموقع البتر:

هَأ . أج س ث ث

ث ث س ج أ . أ

٢ـ الجديلة (١) هَأ . أج س ث ث أ . أج س ث ث ـ ٣َ

الجديلة (ب) ٣َ ث ث س ج أ . أ الچين البشرى ث ث س ج أ . أ ـ هَ

سيبتر إنزيم Hind III بعد القاعدة أ (فى الاتجاه من هَ إلى ٣َ)، ليخرج الچين البشرى بحده فى الجديلة الأولى من الناحية هَ التتابع [أج س ث ث]، ومن الناحية ٣َ القاعدة أ، ويحده فى الجديلة (٢) القاعدة (أ) من اليمين والتتابع ث ث س ج أ فى الاتجاه (٣َ ـ ٥َ) من اليسار، وبقايا التتابع على الجديلتين تشكل أطرافًا لزجة، لأنها غير مقترنة بالقواعد المكملة، وتبحث عنها لتلتصق بها. سيكون الچين إذًا بعد عملية البتر بالإنزيم فى الصورة التالية تحيط به الأطراف اللزجة:

الجديلة (١) ٥َ أج س ث ث ـ أ ٣َ

٣َ أ الچين البشرى . ث ث س ج أ ٥َ

سنستخدم نفس الإنزيم (إنزيم القطع) أيضًا على حلقة الدنا البلازميدية التى تحمل نفس موقع التعرف، فيقطعها بنفس الشكل وتصبح:

٥َ ـ أ أج س ث ث ـــ ٣َ

٣َ ـ ث ث س ج أ أ ـــ ٥َ

(سنستعمل الحروف السوداء لدنا البلازميدة لتمييزه عن الدنا البشرى). فإذا مزجنا نواتج البتر من الدنا البشرى والدنا البلازميدى وأضفنا إنزيم الليجيز، قام الإنزيم بلحام الأطراف اللزجة فيهما، فأولج الچين البشرى بأطرافه اللزجة فى الفراغ بحلقة البلازميد الذى تحده أيضًا أطراف لزجة تتكامل مع ما حول الچين.

٥َ ـــ أ أ ج س ث ث ـــ أ أ ج س ث ث ـــ ٣َ

٣َ ـــ ث ث س ج أ أ الچين البشرى ث ث س ج أ أ ـــ ٥َ

نلاحظ الآن أن البلازميد قد تضخم بعد أن أولج فيه الچين البشرى، وأصبح دناه مطعماً.

كما نلاحظ أن التتابع الذى يعرفه إنزيم Hind III لا يزال يحد الچين البشرى فى موقعه الجديد داخل دنا البلازميد. من الممكن الآن أن يُسمح لهذا البلازميد الهجين المطعّم بالولوج insert، إلى البكتيريا، حيث يمكن أن يتضاعف ذاتياً ومع انقسام الخلية البكتيرية لتنتج من الچين البشرى ما نشاء من النسخ، وهذا يسمى الكلونة Cloning ولقد كان لهذه الطريقة دورها البارز إلى أن ظهرت طريقة الـ {PCR} كطريقة أخرى لاستنساخ الچين.

ونلاحظ أن ما يتبقى من تتابع قطعة الدنا البشرى بعد أن بُتر منها الچين بأطرافه اللزجة، يمكن أن يعاد التئامه بإنزيم الليجيز.

الجديلة (١) ٥َ ـــ أ أ ج س ث ث ـــ ٣َ

الجديلة (٢) ٣َ ـــ ث ث س ج أ أ ـ ٥َ

لتكون النتيجة هى قطعة الدنا البشرى الأصلية وقد نزع منها الچين (ومعه تتابع واحد من (أ أ ج س ث ث) بالهندسة الوراثية، أى بتكنولوچيا التطعيم الچينى نستطيع إذن أن ننقل چيناً من مادة وراثية لكائن إلى المادة الوراثية لكائن آخر.

البلازميد الصناعى (المركبة) أو (المركبة صناعياً)

تم تكوين هذا البلازميد نتيجة رغبة الباحثين فى زيادة كفاءة البلازميد الطبيعى وتحسينه (المستخرج من الخلية البكتيرية مثل o1EI). لذلك تم صنع بلازميدات مركبة مكونة صناعياً، ويفضل هنا تلك البلازميدات التى تحمل عوامل وراثية معينة

يُستدل منها على وجود البلازميدة وعلى أنها تحمل قطعة الدنا المطلوبة.. بالإضافة لمميزات أخرى. ومن هذه البلازميدات المصنعة: البلازميدة PBR_{322}. ومصدر هذه البلازميدات المصنعة: Col EI ويبلغ طولها {٤٣٦٢ زق}.

«مكتبة الجينات Genome Library»

حيث أمكن تكوين عدد كبير من سلالات بكتيريا E.Coli تحمل بلازميدات هجينة وقد تم الحصول على تركيب وراثى كامل فى هذه البلازميدات الهجينة من خلال إدخاله على هيئة مقاطع من الدنا للبلازميد. وذلك بتوافر ظروف وتكنيك عال.

رابعاً: الشركات الاستثمارية تستفيد من «البلازميد» فى إنتاج هرمونات مثل (السوماتوستاتين والسوماتوتروبين والإنسولين):

ولقد ظهرت شركات خاصة للاستثمار فى هذا المجال مثل شركة (چين تك) ثم (سيتس وبيوجن). وتلاها ظهور شركات أخرى لاستغلال هذه التقنية الجديدة حيث عالم من الإمكانات يمتد أمام هذا المجال الجديد للأعمال؛ فيمكن حث البكتيريا على إنتاج بروتينات بشرية للطب أو للغذاء أو الاستخدام الصناعى. ويُذكر أن هرمون (السوماتوستاتين Somatostatin) ـ {وهو هرمون مثبط لإنتاج هرمون النمو الذى يفرزه الفص الأمامى من الغدة النخامية Pituitary gland} ـ هو أول هرمون بشرى تنتجه بكتيريا E.Coli فى عام ١٩٧٧م (ليس تجاريًا) ولقد تم إيلاج الچين المشفر لهذا الهرمون بجانب عشر نوتيدات تحمل إشارات العمل، وأولجوا الچين فى بلازميد ليدخل جسم البكتيريا، والبلازميد المستعمل كان من نوع يسمى "PBR322" أولجت فى البكتيريا وبتوفير ظروف خاصة تمكن الچين من العمل.

وفى عام ١٩٧٩م تم إيلاج الچين البشرى المسئول عن هرمون النمو البشرى "human growth hormone" ويسمى {سوماتوتروبين Somatotropin}، فى بكتيريا إ ـ كولاى لتنتج نوعية عالية الجودة ليعالج القزمية وفى الإسراع من التئام

الجروح والكسور والحروق إلخ، ومع حلول أواخر الثمانينات من القرن العشرين صُنع هذا الهرمون بواسطة البكتيريا بكميات معقولة ليحل مكان مثيله الغالى الذى كان يُستخلص من الجثث وثبت حتى وقتذاك أن المخاوف الأخلاقية ومخاوف الأمان لا أساس لها.

وبالنسبة لهرمون الإنسولين.. فلقد أنتج العلماء (صنّعوا جزىء دنا مشفر لسلسلتي أ، ب ـ المكونتين لبروتين الإنسولين)، يربطهما كودون أ ث ج (المشفر لحمض الميثيونين) ويتصل بهما چين بكتيرى أيضًا عن طريق كودون أ ث ج. أولج هذا الچين التركيبى المكبر فى بلازميد، وأُدخل فى البكتيريا (بكتيريا إ. كولاى) وتم توفير الظروف المثلى لتكاثر هذه البكتيريا، وتنميتها فى خزانات كبيرة [خزانات التخمر]، لتنتج بروتيناً مختلطاً بكميات وافرة، وهذا البروتين يتألف من سلسلتى الإنسولين متصلتين ومتصلاً بهما البروتين الذى يُشفِّر له چين البكتيريا ـ وموقعا الاتصال يحملان حمض المثيونين. ثم يضاف بروميد السيانوچين ليحطم الميثيونين، (لأن سلسلتى الإنسولين لا تحملان أصلاً هذا الحمض)، ينقسم جزىء البروتين الطويل إلى قطَعه الثلاث لتوصل سلسلتى الإنسولين بعد ذلك فى تفاعل يكوِّن قنطرتى الدايسلفايد بينهما. ويمكن للبكتريا إذا أُحسنت هندستها أن تنتج من الإنسولين البشرى الكثير جداً، والجدير بالذكر أنه منذ عام ١٩٨٢م، والإنسولين البشرى الناتج عن البكتيريا كان أول بروتين أُنتج ويُسوَّق تحت اسم (هوميلين "humulin") والذى لم تظهر أى آثار جانبية نتيجة استعماله، ويتميز بسعر أرخص وفى متناول مرضى السكر للعلاج به.

خامساً: استخدام البلازميد فى نقل أول صفة للنبات (وهى صفة المقاومة للمضادات الحيوية)

ـ النقل باستخدام البلازميد «تى» الخاص ببكتيريا الأجروباكتيريم:

Agrobacterium _ mediated transformation:

الأجروباكتيريوم... هى:

نوع من البكتيريا موجودة فى التربة وتتبع عائلة الريزوبيا وتسمى:

«الأجروباكتيريوم» وهى كائنات أولية بدائية الأنوية Prokaryotic واسمها العلمى Agrobacterium tume faciens وهى تسبب أورامًا سرطانية تعرف بمرض التدرن التاجى Crown gall وذلك لبعض أنواع النباتات الراقية حقيقية النواة. وبعض أنواع الأجروباكتريم تتسبب فى تكوين الجذور الشعيرية كما فى حالة Agrobacterium rhizogenus وترجمة اسم البكتيريا هو "Agro" تعنى التربة (Soil) و bacterium تعنى بكتيريا، و "tume" تعنى ورمًا (tumer) وبالتالى فمعنى الاسم هو بكتيريا التربة محفزة الأورام "Soil _ borne bacterium induce tumors".

ولقد كان العالمان (Smith and Townsend) هما أول من اكتشفا المرض فى عام ١٩٧٠م حيث لاحظا وجود ورم نباتى فى التفاح يسببه نوع من البكتيريا ثم فى عام ١٩٧٧م اكتشف Chilton ومساعده أن السبب فى ذلك الانتقال بلازميد خاص ببكتيريا الأجروباكتيرم ـ (طوله نحو ٢٠ كيلو قاعدة) ويسمى البلازميدات Tiplasmid (tumor inducing plasmid).

ومن خلال الدراسات العديدة تبين أن انفراد بعض هذه البلازميدات من البكتيريا عندما تصيب النبات؛ فتدخل خلاياه، ويندمج بعض من تتابعها الدناوى فى أحد كروموسومات النبات ويعبر عن نفسه ونتيجة هذا التعبير هو أن يصاب النبات الراقى بالنمو السرطانى المرضى.

ولقد ظهرت العديد من التجارب الناجحة والتى تهدف إلى استخدام هذا البلازميد فى نقل چين غريب، أو أى تتابع دناوى غريب، إلى خلايا النبات، وذلك بأن نُطعِّم هذا الچين (المرغوب فيه) فى البلازميد بعد حذف ما يحمله من الچينات المسببة للمرض النباتى ويقوم الباحثون فى هذا المجال بإعادة تشييد بلازميد Ti لاستخدامه فى النقل الوراثى ويتم ذلك بنزع منطقة "Ti" الممرضة ويوضع بدلاً منها بلازميد آخر من E.coli يحتوى على الچين الدال (الكاشف) والچين المراد نقله (المطلوب) ثم يعاد لصق البلازميدين ويعرف هذا البلازميد الجديد باسم Binary vactor ويتميز بصفات منها صغر حجمه مقارنة بـ Ti plasmid فيسهل نقله للخلية

النباتية وأنه متكامل حيث يحتوى على الجينات الكاشفة والـ "Borders" وبالتالى فكفاءة النقل عالية ويمكن حفظه وإكثاره فى بكتيريا E.coli وذلك ليسهل التعامل معه وأنه يتم نقل قطع معلومة وبذلك نتجنب نقل قطع غير معلومة كما كان يحدث عند استخدام بلازميدتى، ويتم استزراع البلازميد المهجن بتقنية زراعة الأنسجة Tissue Culture مع مراعاة أنه يجب قطع النسيج النباتى كأساس أولى فى عملية النقل الوراثى باستخدام الأجروباكتيرم، ويفضل استخدام «الثالب الفلينى» للحصول على أقراص من أنسجة أوراق النبات المراد النقل إليه حيث تزيد مساحة الأماكن المجروحة وبالتالى فرص زيادة كفاءة النقل الوراثى، وفى النهاية نحصل على نباتات كاملة تحمل الجين الغريب المعنى.

وفى عام ١٩٨٣م أمكن نقل جين من بكتيريا إ. كولاى إلى خلية نباتية [من «نبات الطباق»، ليصبح مُحوَّرا وراثياً] وذلك تقليداً لبكتيريا الأجروباكتيرم وعليه فكانت أول صفة نقلت عن طريق البكتيريا إلى النبات هى [المقاومة للمضادات الحيوية] وعلى الرغم من أن صفة المقاومة للمضاد الحيوى ليست ذات أهمية اقتصادية إلا أنها فتحت الباب لإمكانية استعمال هذه التقنية فى تحسين الإنتاج النباتى.

وبعدما تم التعرف على هذا الكشف الخطير ومعرفة تلك الخاصية غير المعتادة فى قدرة الأجروباكتيريام على أن تعدى النباتات بلازميد **(Ti)** والتى تدمج نفسها فى كروموسومات النبات، فقد أصبح كل ما على الباحث هو أن يضيف ببساطة بعض جينات للبلازميد، ويحكه فوق ورقة النبات، وينتظر حتى تثبت فيها العدوى فينمو نبات جديد من خلايا الورقة، ثم يمرر النبات الجينات الجديدة داخل البذور وكما عرفنا فإن هذه الطريقة استخدمت فى عام ١٩٨٣م لتحور وراثياً نبات الطباق أولاً وبعدها نبات البيتونيا ثم نبات القطن.. إلخ

الموضوع (الجزء) الثانى: «أخيراً فى مصر..؟!!»:

أولاً: تمهيد:

لتعلم عزيزى القارئ أن بلادنا العربية ليست بعيدة عن هذه الأحداث... وكما نقلنا لكم العديد من التجارب والإنجازات التى تمت على أيدى علماء من دول عدة (كألمانيا ومن أمريكا وفرنسا وانجلترا.. أيضاً لعلنا نذكر أيضًا الباحث الإندونيسى وتوصله إلى العدد الحقيقى للكروموسومات).

فإننا سنذكر لكم الآن ذلك الإنجاز السعيد والذى تم منذ فترة قريبة على أيدى علمائنا من (مصر) والذى كان عن تمكُّن فريق علمى من إنتاج بطاطس مهندسة وراثيًا.. أما كيف؟ معنا (فى النقطة الثانية) نعرف المزيد.

ثانياً: تعاون مصرى ألمانى لإنتاج بطاطس مهندسة وراثياً:

ففى عام ٢٠٠٣م تم الإعلان عن إنتاج بطاطس مهندسة وراثياً مقاومة للفيروس (Pvy) باستخدام الأجروباكتيريم، وتم اختبار النباتات المحورة وراثياً بمعرفة الجانب الألمانى وتم الاتفاق على تقييم سلوك هذه النباتات فى الحقل واختبار مدى مقاومته للإصابات الفيروسية تحت الظروف المصرية وذلك بكلية الزراعة جامعة القاهرة. وعرض د. «خضر» آفاقاً جديدة للشراكة والتعاون فى مجال التكنولوجيا الحيوية النباتية مع الجانب الألمانى تتضمن إنتاج نباتات فول خالية من مسببات أنيميا الفول باستخدام التقنيات الحيوية وإنتاج نخيل مهندس وراثياً مقاوم لسوسة النخيل الحمراء.

ولقد كان من المعلوم أن بكتيريا الأجروباكتيريم لا تصلح مع النباتات ذات الفلقة الواحدة (كالغلال مثل القمح والذرة والأرز)، (إلا أنه قد تم مؤخراً نشر بحث حول إمكانية استخدام الأجروباكتيريم فى النقل الوراثى لنباتات الفلقة الواحدة)، ولقد كان على الباحثين أن ينتظروا اختراعًا أكثر ملاءمة، ولقد تم ذلك (بابتكار وسائل عديدة سيتم عرضها بالجولة الثانية) وظهرت لدينا نوعية من الطماطم يقل احتمال عطبها على الأرفف، وقطن يقاوم خنفساء القطن، وبطاطس تقاوم خنفساء

كلورادو، وذرة تقاوم ثاقبات الذرة ونباتات كثيرة مُهندسة وراثياً.

سار التقدم مع النباتات من المعمل إلى التجارب الحقلية ثم إلى بيعها تجارياً (وسيكون لنا معها جولات تالية)، وأحياناً أدت التجارب إلى جذب الاحتجاج من نشطاء حماية البيئة، وكانت المقاومة أشد فى أوروبا عنها فى أمريكا، وفجأة أصبح فى عام ١٩٩٣م قضية كبيرة عن الطعام المحور وراثياً، وسيكون لنا لقاء مع الجانب السئ من الهندسة الوراثية لـ (الوجه الآخر)، وحتى هذا اللقاء نُطلعك عزيزى القارئ على آخر أخبار تلك الاحتجاجات على الأطعمة المهندسة وراثياً.

(٣) الموضوع (الجزء) الثالث من الجولة..

«...الاحتجاج مستمر»؟!!

أولاً: تمهيد:

قبل أن نغادر سماء عام ٢٠٠٣ ونعاود بك عزيزى القارئ التحليق بجولاتنا فى فترة السبعينات والثمانينات .. أثار انتباهنا حدث هام ينقل لك «عزيزنا القارئ» وجهة نظر البعض الآن للأطعمة المهندسة وراثياً رغم إقبال الكثير من الباحثين على إدخال المزيد من التطورات والتقنيات الحديثة على الهندسة الوراثية لحسن استثمارها فى كافة ميادين الحياة.. وفيمايلى نعرف المزيد عن أخبار هذا الاحتجاج .

ثانياً: الاحتجاج مستمر!!

هذا الاحتجاج تمثل فى شخص رئيس فيدرالية المزارعين فى فرنسا وزعيم حركة مناهضى العولمة، وكانت الصحف قد نشرت خبر إلقاء القبض عليه وكان نشر هذا الخبر فى ٢/ ٧/ ٢٠٠٣.

وكان مما نشر فى هذا الخبر أنه فى ساعة مبكرة من صباح يوم الأحد (قبل الماضى) تجمَّع مئات من رجال الشرطة حول منزل «چوزيه بوفيه» فى مقاطعة (إيفرون) فى الجنوب الفرنسى، وتم إيقاظه وأخذه عنوة وبعد دقائق وجد نفسه على متن طائرة هليكوبتر باتجاه السجن ليقضى به عقوبة الحبس عشرة أشهر والتهمة هى اقتلاعه أكثر من ثلاثة آلاف شتلة أرز.. ومساحة لا تقل عن فدانين مزروعة بالذرة ولقد شاركت مجموعة من الرفاق چوزيه بوفيه فى اقتلاع هذه الأشجار لأنها من وجهة نظرهم ليست إلا قنابل موقوتة تفتك بصحة الصغار والكبار باعتبار أنها ثمار لعملية دقيقة من الهندسة الوراثية.

ولقد أطلق بوفيه على هذه النباتات الأطعمة المعدلة وراثياً وحذر من مخاطرها فى أكثر من مناسبة إلا أن كبريات الشركات المستثمرة فى الحقل الزراعى لم تلتفت إلى تحذيراته، واستمرت فى إجراء تجاربها التى تستهدف زيادة الإنتاجية عبر التلاعب

بالجينات الوراثية والتى ترجح الدراسات العالمية أنها تشكل خطراً حقيقيًا على الجسم البشرى.

والمعروف أن نجم بوفيه كان قد لمع عقب قيامه بالاعتداء على أحد مطاعم الوجبات الأمريكية السريعة فى مدينة «ميو» الفرنسية احتجاجًا على السياسة الزراعية الظالمة بين أمريكا ودول الاتحاد الأوروبى والتى بمقتضاها ردت واشنطن على رفض أوروبا السماح باستيراد اللحوم المهرية من أمريكا، بفرض ضرائب بنسبة ٦٠٪ على أنواع الجبنة الفرنسية، مما تسبب فى الإضرار بأكثر من ٣٦٠ ألف أسرة تتخصص فى إنتاج هذه الأنواع فى جنوب فرنسا ، وكان جوزيه بوفيه قد أمضى نحو أربعة أشهر فى السجن كعقوبة على تحطيمه لهذا المطعم وها هو يتكرر المشهد معه، ولكن فى ظروف وسياقات أخرى.

ردود فعل

وقد أثار اعتقال بوفيه ردود فعل متباينة فى مختلفة الأوساط السياسية والزراعية، وأعلنت عشرات النقابات والفيدراليات تضامنها معه، وحشدت أعضاءها للتجمهر أمام مقر العدالة فى باريس ورفعت شعارات قاسية منها: المافيا تجلس على مقاعد السلطة بينما بوفيه المناضل يُلقى به فى السجن، واتهم نفر من أنصار زعيم فيدرالية المزارعين للحكومة الفرنسية بالتواطؤ مع الأمريكان لأن إيداع بوفيه فى السجن هو أمر لا يطرب له سوى الأمريكيين الذين يعتبرونه عدوهم الأول، الرافض للحوم المهرمنة والغذاء المعدل جينيًا وطالب النقابيون بضرورة إطلاق سراحه فى أقصى سرعة لأنه ليس مجرمًا . وسخروا من الإجراءات الصارمة التى اتخذت ضده وقالوا: إن الحكومة تتهاون مع الأشخاص المتهمين بأعمال إرهابية، ومرتكبى الجرائم ضد الإنسانية، بينما تتشدد ـ دون أدنى مبرر ـ مع المناضلين النقابيين أمثال جوزيه بوفيه.

ولقد أثارت واقعة الاعتقال نقاشات عديدة حول قيام المزارع الكبرى بإجراء تجارب لإنتاج أطعمة معدلة وراثيًا مما يجعلها تدخل تحت شعار «الطعام الرديء»

الذى كان أطلقه جوزيه بوفيه قبل سنوات وهو يحذر من تسليح الإنسان والعالم (كان ذلك فى كتاب له بعنوان: العالم ليس سلعة).

ومن جانب آخر تشهد أروقة منظمة التجارة العالمية منذ فترة جدلاً حول الأطعمة المعدلة وراثيًا خصوصًا فى ضوء الدعوى التى أقامتها أمريكا ضد أوروبا وانضم إليها عدد من دول العالم.

والمعروف أن أمريكا ليست بريئة تماماً من مثل هذا الاتهام فهى من جانبها تتحمس لإنتاج اللحوم المهرمنة.. (التى ترفضها أوروبا) .. ولذلك فهى تتعمد أن تقف لأوروبا بالمرصاد وتثير قضية الأطعمة المعدلة چينياً بدعوى أنها باتت ضرورة للتغلب على المجاعة التى تنخر فى عظام أكثر من ثلث العالم.

وعلى صعيد آخر رفض عدد من الوزراء فى فرنسا وأوروبا التعليق على اعتقال جوزيه بوفيه واعتبر أن الملف برمته يقع فى اختصاص وزارة العدل، وإن لم يخف ضرورة أن دخول بوفيه كنقابى بارز إلى السجن ليس فى صالح الديمقراطية لكن القانون ، فى كل الأحوال ـ يجب أن يُطبق دون عقد.

الغريب أن أقدار جوزيه بوفيه زعيم فيدرالية المزارعين فى فرنسان جعلته مرغوبًا ومرفوضًا فى آن واحد، فأوروبا تقسو عليه، وتتعامل معه كخارج على القانون، لكنها فى نفس الوقت تتمسك بمنطقه وحججه فى أروقة المنظمات الدولية خوفًا من أن ينتشر الطعام الرديء الذى يسكن فى جوف المستهلكين فيكون قنبلة موقوتة، بمعنى آخر: سيظل بوفيه رمزًا لنضال دعاة ألسنة العولمة فى مواجهة الاحتكار والرأسمالية وفرض الأمركة بالقوة.

سادساً:

المثال الثانى:

استخدام الفيروسات لنقل مقاطع الدنا من الواهب

نترك عام ٢٠٠٣م ونعود مرة أخرى لنحلق بجولاتنا لفترة السبعينات والثمانينات... ونذكرك «عزيزى القارئ» بأن محور جولتنا الأولى هو «استخدام

الفاجات والبلازميد البكتيرى» كوسائل نقل ناجحة فى فترة السبعينات والثمانينات.. ولقد تحدثنا فى النقاط السابقة عن استخدام البلازميد البكتيرى كوسيلة نقل ناجحة وبقى لنا أن نتحدث عن استخدام الفاجات كوسيلة نقل ناجحة... والحديث هنا ليس جديداً فلقد أشرنا فى جولة سابقة إلى ذلك التقدم والنجاح الذى تم بميلاد العلاج الجينى وما يحدث فى استخدامه الآن من تطورات تبشر بإمكانية تطبيقه على المستوى العام فى المستقبل القريب وأن هذا الميلاد للعلاج الجينى تحقق بعد أن تم اكتشاف إنزيم النسخ العكسى بالفيروسات الارتجاعية وأشرنا إلى أنه لا زال هناك تخوف من مدى الأمان فى استخدام الفيروسات فى العلاج الجينى.. وفى المقابل هناك جرأة من قِبَل آخرين لم يمنعهم الحرص على حياة المرضى من الإقدام فى استخدام أسلوب العلاج الجينى وتطويره مستفيدين من خصائص بعض أنواع الفيروسات .. وتناولنا فيما سبق قصة الطفلة «أشانجى» ونجاح استخدام أسلوب العلاج الجينى فى علاجها.

أيضاً أفردنا جزءاً من جولة سابقة للحديث عن ظاهرة «الاستنقال» (وهى النقل الوراثى بالفاج P_{22}).

ولعلنا نستنتج من كل ما سبق سعى الباحثون لحسن الاستفادة من خصائص الفيروسات وتزايد قيمة أنواع عديدة منها، مما أدى إلى اعتبار بعضها وسائل جيدة لنقل أجزاء من المادة وسنضيف هنا مزيداً من المعلومات عن بعض هذه الخصائص والمميزات التى تم استنتاجها من خلال التجارب والأبحاث العديدة على الفيروسات والتى منها ما يلى:

١ـ تقع الفيروسات فى منطقة ما بين الكائنات الحية (حيث يمكنها أن تتكاثر وتتضاعف بتوافر الظروف المناسبة). وبين المواد الغير حية (حيث يعيش الفيروس فى صورة مُتبلرة كالجماد إذا لم تتوفر الظروف المناسبة).

٢ـ وهذه الظروف (المناسبة) هى أن يجد الفيروس عائلاً مناسباً يتطفل عليه ويعيش بداخل خلاياه. هذا العائل هو كائن حى يناسبه حيوان أو نبات أو بكتيريا لذا فنحن نقول إن «الفيروسات كائنات متخصصة».

٣ـ يتكون الفيروس من مادة وراثية يحيط بها غلاف بروتينى Protein Coat من الجليكوبروتين glycoprotein، وتكون المادة الوراثية عادة من الدنا، الذى يؤلف عدداً من الجينات فى صورة شريط أو حلقة.

٤ـ تمت سلسلة الجينومات الكاملة للكثير من الفيروسات، وعُرف عدد القواعد بها، ولعلنا نتذكر أنه فى عام ١٩٧٧م كان قد تمت سلسلة ونشر أول جينوم كامل النص للفيروس (فاى ـ إكس ١٧٤} {وكان قد تم النشر فى مجلة نيتشر}، وتبلغ عدد أزواج القواعد فى الجينوم الخاص به {٥٣٨٦}، وهناك الفاج {5V40} وتبلغ عدد أزواج قواعده {٥٢٤٣}، والفيروس «لمدا» وتبلغ عدد أزواج القواعد فى الجينوم {٨٥١٣}.

٥ـ ومعنى «الفاج» هو {تلك الفيروسات التى تهاجم البكتيريا}، فتسمى الفاجات أو لاقمات البكتيريا».

٦ـ يعتمد الفيروس فى تكاثره على الخلية الحية العائلة hostcell فيسخر آليات النسخ بهذه الخلية وآليات الترجمة والتضاعف للإكثار (من جيناته)، فتخرج فيروسات جديدة من الخلية ربما بعد أن تقتلها وتحللها وتصيب غيرها.

٧ـ الفيروسات الارتجاعية (retroviruses) هى نوع من الفيروسات تتميز مادتها بأنها من (الرنا وحيد الجديلة وليس مادة الدنا) وهذه الفيروسات عندما تهاجم خلايا الكائن الحى المناسب فإنها تصيب من خلايا هذا الكائن خلاياها التى تنقسم. وعن طريق إنزيم النسخ العكسى الخاص بها تتمكن فى النهاية من تشكيل فيروسات جديدة تخرج من الخلية لتصيب غيرها . ومن هذه الفيروسات (فيروس الإيدز).

٨ـ من أمثلة الفاجات التى أمكن استغلالها الفاج لمدا "Lambda Phage".

٩ـ كان يعتمد «بشكل أساسى» على البلازميد البكتيرى والفاجات كحاملة للمادة الوراثية المنقولة، نظراً لإمكانية تضاعف المادة الوراثية الهجينة (الدنا الهجين أو المطعوم) بهذه البلازميدات أو الفاجات لما تتميز به من مقدرتها الفائقة على التضاعف الذاتى السريع فى وقت قصير، وبالتالى يتضاعف ما بها من الدنا المطعوم

ليصل لكمية معقولة ليمكن بالتالى فصله والحصول عليه. أيضًا هناك چينومات الفيروسات الحيوانية «مثل Sv40» حيث يستخدم فى النقل والاستزراع بالخلايا الحيوانية.

١٠ـ هناك فيروسات يُحدث بها الباحث اقتضابًا (أى نقصًا فى چينوم الفيروس الفاج) لتصبح نتيجة حدوث هذا الاقتضاب بها أكثر تطويعاً، ويستفاد منها أكثر فى التجارب المختلفة.. وبالتالى يمكن استزراع قطع دنا مختلفة عند مراكز القطع المستنقصة ويسمى هذا الفاج المقتضب {gtc}.

١١ـ هناك دراسات تم إجراؤها فى الثمانينات أدت إلى تكوين سلسلة الفاجات لمدادات قابلة لاحتواء ونقل مقاطع أطول من الدنا وتسمى سلسلة شارون Charon Series، كما أمكن أيضًا استعمال الفاج المسمى M13 لنقل مقاطع طويلة نسبياً من الدنا.

الجولة الثالثة: مع وسائل أخرى لنقل الدنا المرغوب من الواهب وإدخاله فى جينوم المضيف:

حيث أصبحت هناك وسائل أخرى متعددة إضافة للبلازميد البكتيرى والفاجات نذكر منها:

١ـ تم تحويل خلايا الخميرة بنجاح لاستزراع جينات الكائنات مميزة النوى وذلك باستعمال البلازميد المسمى 2um الموجود فى كثير من سلالات الخميرة وذلك بعد إدماجه مع أحد البلازميدات البكتيرية.

٢ـ الكوزميدات Cosmids :

وهذه هجن ما بين بلازميدات وفاجات لنضا ، ويمكنها أن تحمل قطعاً من الدنا الغريب يصل طولها إلى ٤٠ ألف زق ومنها كروموزومات الخميرة الاصطناعية.

كروموسومات الخميرة الاصطناعية (الياكات yeast artificial Chro (YACs) mosomes: **وهذه الياكات قد تحمل بضع مئات الآلاف من الدنا الغريب)**.

٣ـ دمج البروتوبلاست Proto Plast Fusion (خاصة بالنبات):

حيث تستخدم بعض البوليمرات والأيونات لتزيد من نفاذية غشاء البلازما الخاص بالخلايا المختلفة النوع والمطلوب دمجها أو يحدث خلل فى تركيب الجدار ليزال وبالتالى بعد إزالة الجدر السميكة تصبح البروتوبلاست (المحتوى الموجود بالخلية ـ عارياً) ثم يتم اندماج كل خليتين معاً (كل خلية من نوع نبات غير الثانى).. ويتكون (هجين جسمى Somatic hybryids)؛ وإذا حدث اندماج للبروتوبلاست دون أن تندمج الأنوية، بمعنى اندماج السيتوبلازم فقط يتكون (سيبرد Cybrid)؛ واندماج البروتوبلاست بمساعدة الكيماويات ـ دمج كيماوى Chemical indeced} {fusion ويمكن أيضاً اندماج البروتوبلاست بمساعدة تيار كهربى مستمر وتُعرف هذه العملية بالدمج الكهربى (Electro fusion)، وفى كلا الحالتين يتكون هجين جسمى يحتوى جميع الصفات الموجودة فى النباتين (المعطى والمستقبل) بغض النظر

عن التوافق الجنسى بينهما، ويمكن من خلال هذه التقنية نقل أكثر من جين أو الصفات التى يتحكم فيها العديد من الجينات (Polygenic) ولا تتوافر هذه الخاصية مع أى وسائل نقل أخرى.

٤. الحقن الدقيق واستخدام أشعة الليزر فى النقل الوراثى:

Microinjection and UV Laser microbeam - mediated transformation:

هى طرق أكثر صلاحية فى حالة الحيوان أو الإنسان عندما يكون الهدف هو نقل جين لبويضة واحدة أو عدة بويضات على الأكثر، وهى تحتاج لمهارات خاصة، وفى حالة الحقن الدقيق (Microinjection) تستخدم أنبوبة شعيرية دقيقة لنقل البلازميدات إلى نواة الخلية. وفكرة استخدام شعاع الليزر فى النقل الوراثى مأخوذة من استخدام شعاع الليزر فى الجراحة حيث يستطيع شعاع الليزر عمل ثقوب فى جدار الخلايا ومن خلال هذه الثقوب تدخل البلازميدات أو الحقن الدقيق للجينات فى الخلايا.

ويُضح الحقن الدقيق الطريق إلى تكنيك أكثر حذقًا، له ميزة واضحة واحدة، إنه يمكّن من أن يولج الجين فى موضع محدد بدقة، تحوي مضغة الفأر، وهي فى عمر ثلاثة أيام، خلايا تعرف بالخلايا الجذعية للمضغة، وإذا استخلصنا إحدى هذه الخلايا وحقنّاها بجين، كما اكتشف ذلك لأول مرة ماريو كابتشي عام ١٩٨٨، فإن الخلية ستصل أطراف هذا الجين بداخلها عند النقطة نفسها بالضبط التى ينتمى إليها الجين، ليحل مكان نسخة الجين الموجودة من قبل، أخذ كابتشى من فأر مستنسل جينًا ورمياً اسمه إنت ـ ٢ (int-2) وأولجه فى خلية فأر بأن فتح مسام الخلية لزمن وجيز، فى مجال كهربائى، ثم راقب ما يحدث، الجين الجديد يعثر على الجين المغلوط ليحل محله. وتسمى هذه العملية «التوليف المتماثل» homologous recombination وهى تستغل حقيقة أن الميكانيزم الذى يصلح أمر دنا المعطوب كثيراً ما يستخدم الجين الإضافى على الكروموسوم النظير كقالب للطبع. ويُخطأ فى فهم الجين الجديد على أنه هذا القالب ويُصحح الجين الموجود من قبل حسب ذلك. وبعد

تعديل الخلية الجذعية هكذا، يمكن أن يعاد وضعها داخل مضغة لتنمو إلى فأر كيميرى ـ فأر تحوى بعض الخلايا فيه الچين الجديد.

يتيح التوليف المتماثل للمهندس الوراثى، لا أن يرمم الچينات فحسب وإنما أن يفعل أيضاً عكس ذلك، أى أن يعطب عن عمد چينات شغالة بأن يولج نسخاً مغلوطة مكانها، ونتيجة ذلك هى ما نسميه فأراً مضروباً ضربة قاضية، حيث ينشأ، وقد أُسكت چين واحد فيه، الأمر الذى يتيح الكشف عن الهدف الحقيقى لذلك الچين، ويدين اكتشاف ميكانيزمات الذاكرة ديناً كبيراً للفئران التى ضربت ضربة قاضية، كما تدين لها أيضاً مجالات أخرى من البيولوچيا الحديثة.

٥ـ الثقب الكهربائى Electro Poration:

حيث يتم دخول الدنا المراد نقله إلى الخلية من خلال نفاذية غشاء البلازما للبروتوبلاست التى تزداد نتيجة وجود البروتوبلاست فى مجال كهربى وبمعنى آخر يفتح ثقوباً فى أغشية الخلايا تمر منها الچينات المطلوب نقلها، ومن ذلك يتضح أن هذا النظام من أنظمة النقل الوراثى يتطلب :

(أ) مزارع بروتوبلاست. (ب) مصدر تيار كهربائى مستمر.

٦ـ مسدس الچينات Gene gun:

توظف هذه الطريقة سرعة اندفاع غاز الهيليوم والقادم من أسطوانة هيليوم من خلال صمام تحكم فى دفع جزيئات دقيقة جداً من الذهب أو التنجستين، ومُحمَّل فوق سطح هذه الجسيمات ـ (مُغطاة) بالدنا المراد نقله للخلية بمساعدة مادة غروية لاصقة تزيد من التصاق الدنا على جزيئات الذهب (الحاملة)، فيمر إلى السيتوبلازم من خلال جدر الخلايا وأغشيتها، وتُعرف هذه الجزيئات بالقذيفة الدقيقة Microprojectle وبمرور القذيفة خلال شبكة معدنية تتشعب إلى مجموعة من القذائف الدقيقة التى تصطدم بالنسيج النباتى وتخترق خلاياه.

٧ـ النقل المباشر Direct gene transfer فى النبات:

كانت هناك محاولات لنقل البلازميد (الدنا) إلى الخلية النباتية مباشرة دون

الحاجة إلى استخدام عائل حيوى مثل الأجروباكتريم أو الفيروس ولعل أول تجربة ناجحة على النقل المباشر إلى البروتوبلاست كانت فى عام ١٩٨٢م.

ويلزم لنجاح النقل المباشر أن تكون الخلية فى حالة البروتوبلاست [والبروتوبلاست كما سبق وأوضحنا هو : خلية تم نزع جدارها الخلوى]، وبالتالى نكون قد منعنا أول عائق يمنع وصول الدنا المطلوب إيلاجه إلى داخل الخلية النباتية، بعد إزالة الجدار الخلوى، ويتبقى الغشاء البلازمى ويتم معاملته بمواد خاصة تضاف إليه فى المعمل من «بوليميرات وأيونات فتزيد من نفاذية غشاء البلازما وتحدث ثقوب أو خلل فى تركيبه وبالتالى يزداد معدل مرور الدنا المولج من هذا العائق، مما يسمح بمرور الجزيئات كبيرة الحجم مثل البلازميدات (الدنا).

٩- الكروموسوم البشرى الاصطناعى Artificial human chromosome:

ففى عام ١٩٩٧م استطاع فريق من الباحثين الأمريكيين تصنيع كروموسوم بشرى اصطناعى - بأن أخذوا بعضاً من دنا كرات دم بشرى بيضاء، ثم قاموا بتصنيع تيلوميرين بربط آلاف من وحدات دناوية.. (تم تصنيعها آلياً) كما صنعوا أيضاً بنفس الطريقة سنترومير ا. غلفوا هذه المكونات الثلاثة باللبيدات حتى يمكن تمريرها من غشاء الخلية، ثم أولجوها فى خلية سرطانية بشرية (تم تربيتها فى مستنبت بالمعمل) فإذا بالخلية تقوم أوتوماتيكياً بتجميع هذه المكونات فى صورة كروموسوم اصطناعى، ثم وجدوا أن هذا الكروموزوم الاصطناعى يورَّث، عند انقسام الخلية، إلى الخلايا الجديدة، تماماً مثل غيره من كروموزومات الخلية. وكان الكروموزوم الاصطناعى يورث وكان فعالاً. ويعتبر الباحثون الكروموسوم البشرى الاصطناعى فتحاً جديداً فى مجال علاج البشر بالجينات، ففيه يمكن أن يُنقل الجين الذى يحتاجه المريض إلى خلايا دمه، دون اللجوء إلى الفيروسات التى قد تولج مادتها الوراثية فى غير المكان الصحيح إضافة إلى العديد من المخاوف المحتملة.

الجولة الرابعة:

مع إنزيمات القطع والتحديد وتكوين الرفليبات:

بدأت فى عامى ١٩٧٨م، ١٩٧٩م دراسات قام بها «دافيد بوتشتاين» [من معهد ماساتشوستس التكنولوجى] فى ذلك الوقت ثم انتقل بعدها لجامعة ستانفورد، وكان معه مجموعة من الباحثين، واستنتج من هذه الدراسات أنه نتيجة لاستعمال إنزيم تحديد على الدنا الورائى (والتى تم اكتشافها فى عام ١٩٧٠م) لبضعة أشخاص ينتج زمراً من الشظايا (قطع متباينة وغير متساوية الأطوال) تختلف أحياناً اختلافاً بيناً من فرد إلى آخر.. على عكس المُتوقع وهو أن تُقطع هذه الإنزيمات عند مواقع محددة فتنتج أطوال متساوية.. ولكن النتيجة توضح أن هذه الإنزيمات تعرفت على الأماكن التى تقطع بها [وهى تسمى مواقع البتر التى تتعرف عليها إنزيمات التحديد {Recognition Sites} ذلك فى أماكن متفرقة بالدنا وهى تختلف من شخص لآخر.. فقطعت عندها؛ لذا نتجت أطوال غير متساوية.. وفى ضوء بحث العلماء عن تفسيرات تفسر السبب فى اختلاف «مواقع أو أماكن» تعرف الإنزيمات القاطعة؛ نجدهم عللوها لعدة أسباب:

١ـ إما لأسباب طبيعية تحدث للكروموسوم أثناء عملية الانقسام وهى خاصية العبور بينه وبين الكروموسوم الأخوى المقابل له فيتبادلا الأجزاء بينهما.

٢ـ أن موضع «مواقع التحديد» [موضع التتابعات التى يعرفها الإنزيم] تتباين من شخص إلى آخر بسبب حدوث طفرات حدثت فى تتابعات النيوكليوتيدات بشريط الدنا لهؤلاء الأفراد [وعلى وجه الدقة فى تتابعات القواعد].

٣ـ إما السبب طبيعى أو بتدخل ملوثات ومؤثرات عديدة من البيئة.

ولقد أُطلق على هذه الزُمر من الشظايا مصطلح [الرفليبات]، وبما أن هذه الرفليبات تتباين من شخص إلى آخر. (كما سبق وذكرنا بأعلى) بسبب طفرات حدثت فى تتابعات القواعد، فهذا يعنى أن كل رفليب يعادل طفرة، بل هو طفرة.

ولقد أتاحت هذه الاكتشافات (التى قام بها دافيد بوتشتاين وغيره) الفرصة إلى إيجاد مجال جديد وفريد للتباين بين الأفراد يمكن الاستفادة منه.. «وهو ما سنعرفه بعد قليل».

فالرفليبات إذن {RFLPS} هى: كلمة مختصرة من مصطلح أطلقه الباحثون على زمر من شظايا الدنا والمصطلح الأساسى هو: {Restriction Fragment length polymorphisms} ومعناها هو: «تباينات طول شظايا التحديد» أو الرفليبات. أو (التباين بين الأفراد فى حجم شظايا الدنا التى تقطعها إنزيمات تحديد معينة، ولقد أمكن تحديد مواقع نحو ٣ آلاف رفليب مبعثرة على طول كروموزومات الجينوم البشرى، أمكن رسم خرائط توضح مواقعها لتصبح بمثابة مجموعة ضخمة من الواسمات تشكل شبكة موزعة على الكروموسومات البشرية يمكن أن ننسب إليها الجينات وأن نخرطنها (وسنلقى عليها مزيداً من الضوء بعد قليل).

والسؤال الذى يتبادر للذهن هو:

١ـ هل تختلف الرفليبات فى نفس الشخص كما قد تختلف بين الأفراد؟ وكيف تم الاستفادة منها؟ وهل ظهر ما هو أحدث من الرفليبات؟ وكيف تم الاستفادة من الأحدث؟!! وسنجيب عن هذه الأسئلة. بالترتيب..

أولاً: الدور الذى تلعبه إنزيمات التحديد والاختلاف فى نفس الفرد:

سبق وأن عرفنا من الجولة الخاصة بإنزيمات التحديد أنه يوجد على جديلتى الدنا مواقع تعرف "recognition sequences"، وعندما يعثر إنزيم التحديد المعين على موقعه الخاص (مواقع تعرفه الخاصة به). والمتفرد بشريط الدنا الوراثى (المأخوذ من شخص ما)، فإن هذا الإنزيم يبتر الدنا فى الموضع بالضبط، وكأنه (أى الإنزيم) مقص صغير منمم.. وتشظى إنزيمات التحديد جينوم أى كائن حى إلى عدد كبير من القطع قد يصل فى الإنسان إلى ما يزن قطعة وتتراوح أطوال هذه الشظايا (أو المُزق) ما بين عشرات الآلاف وبضع آلاف من أزواج القواعد.

ومن خلال الدراسات العديدة والمتواصلة استنتج الباحثون أنه عند استخدام إنزيم تحديد معين على مقطعى دنا "DNA Segments" من نفس الموقع فى كروموزومين شقيقين لفرد، يحمل كل منهما أليلاً مختلفاً لجين.

والآليل Allele: واحدة من صور بديلة متعددة للجين ويشغل موقعاً محدداً على الكروموسوم يرث الفرد آليل واحداً لكل موقع من كل من الأبوين وبذا يحمل

كل فرد آليلين لكل جين] إن الشظايا الناتجة عن البتر قد تختلف طولاً (قطع متباينة وغير متساوية الأطوال) ذلك أن أحد الأليلين قد يحمل حروف تتابع التعرف، فيُبتر عندها، بينما لا يحمله الأليل الآخر فينجو من البتر، ومن بين التفسيرات لسبب هذا الاختلاف أنه: ـ نتيجة لحدوث طفرة فى موقع القطع تسببت فى عدم تعرف إنزيم التحديد على الموضع فلم يقطع، وأضف إلى ذلك الاختلاف فى نفس الفرد، اختلاف آخر ولكنه بين الأفراد؛ فقد يختلف فردان فى مكان الموقع الذى يقوم فيه إنزيم تحديد معين بقطع الدنا، ونتيجة لذلك سيتباين طول شظايا الدنا الناتجة من الشخصين باستخدام إنزيم تحديد واحد على نفس المنطقة الكروموزومية، ويستفيد الباحثون من كل ما سبق ذكره من اختلافات كثيراً ومنها أن ثمة اختلافات يمكن كشفها بين الأفراد عند سلسلة الدنا تُظهرها الرفليبات، لكنها لا تظهر فى شكله الخارجى (الذى تستخدمه خرائط الارتباط). ومعنى ذلك أن المظهر الواحد (الذى قد يكون مرضًا وراثيًا) قد ينجم عن أليلات مختلفة دناوية كلٌّ منها ينشأ عن طفرة mutation فى مكان مختلف من نفس الجين تفسد عمله. أيضًا من الممكن أن تستخدم الفروق فى حجم الشظية نتيجة استخدام إنزيم تحديد يبتر دنا شخصين أو عدة أشخاص] فى تمييز فرد عن آخر، وكروموسوم عن آخر، وهذه الفروق (الرفليبات) تمتاز بأنها تورث، مثلما الجينات بطريقة مندلية عادية، ونظراً لما سبق من خصائص فإن الباحثين يمكن أن يستعملوا الرفليبات ويستفيدوا منها كواسمات فى دنا الفرد، بل هناك من يُطلقون عليها نفس المصطلح أى أنها [واسمات دنا عديدة الصور ـ أو بوليمورفية، «إذا استخدمنا مصطلح علم الوراثة»، [والبوليمورفية «تعدد المظهر» Polymorphism هى: اختلاف فى تتابع دناوى بين الأفراد والتباينات الوراثية التى توجد بالعشيرة بنسبة تزيد على ١٪ تعتبر بوليمورفيات مفيدة لتحليل الارتباط الوراثى].

ملحوظة هامة:

«تقدمت البحوث فى هذا المجال كثيراً منذ سبعينات القرن العشرين وحتى بدايات القرن الواحد والعشرين، وأصبحنا نجد أنواعًا كثيرة من واسمات لا تتطلب إنزيمات التحديد وتقوم أيضاً بمهمة تحديد هوية مناطق خاصة فى الدنا».

وبما أن كل رفليب سبق وذكرنا أنه طفرة فإنه يمكن تتبعها بتحليل الدنا فى الأجيال المتتابعة بل ومن الممكن أن تستخدم فكرة العبور وخرائط الارتباط فى تحديد مواقع الرفليبات: كلما تباعدت مواقعها على الكروموسوم ازدادت نسبة العبور بينها. بل وقد يمزج بين مواقع الجينات فى هذا الشأن؛ فنقدر المسافة بين كل رفليب وجين. ولقد أفاد الرفليبات كثيراً فى تشخيص العديد من الأمراض الوراثية، بل إن رفليباً قريبًا جداً من جين مرض ما قد يصلح كدليل قوى إلى تشخيص مرض وراثى «وسنذكر بعد قليل أمثلة لاستخدام الرفليبات فى الأمراض الوراثية».

مواقع تعرف إنزيمات التحديد

"Restriction Enzymes Cleavage Sites":

قد توجد مواقع التعرف فى جوار الجينات، وليس بالضرورة فى تتابعها المشفر، فقد نجدها فى تتابعات التنظيم وفى الإنترونات **introns** كان يُعتقد أنها مناطق لغو لا تُشفر لشىء نعرفه (لكن هناك بوادر تفيد بأهميتها الآن)، وفى سقط الدنا **Junk DNA**.

أمثلة للاستخدامات المتعددة للرفليبات:

ومن بين هذه الأمثلة نذكر سبعة استخدامات وهى:

أولاً: اعتبار مجموعة الشظايا التى يخلفها إنزيم التحديد من الخصائص المميزة لهذا الجينوم.

ثانيـــاً: عندما تصبح الرفليبات شبكة من الواسمات والبحث عن جين مرض هنتنجتون.

ثالثاً: استخدام الرفليبات فى الكشف عن أمراض أخرى.

رابعاً: فوائد أخرى للخرطنة الوراثية مثل القدرة على تطوير أدوية خاصة بكل فرد.

خامساً: الاستفادة من أحد الإنزيمات فى الكشف عن چين مرض وراثى بالحيوان.

سادساً: فى البحث عن أصول الإنسان.

سابعاً: فى إنشاء مكتبة للچينوم البشرى.

وفيما يلى نلقى الضوء على كل مثال:

أولاً: إن مجموعة الشظايا التى يخلفها أى إنزيم تحديد بعد عمله على چينوم أى كائن، تعتبر من الخصائص المميزة لهذا الچينوم، ومن الممكن بسهولة إذا كان حجم الچينوم صغيراً أن تستخدم فى رسم خريطة فيزيقية له، أما إذا كان حجم الچينوم كبيراً، فمن الممكن أن يُستعان بالكمبيوتر لرسم مثل هذه الخريطة، وفى أحد الأوقات تم بالفعل تطوير تقنية تؤتمت تحليل بوليمورفية الدنا باستخدام محطة عمل روبوتية يمكنها أن تتعامل مع أطباق بكلٍّ ٩٦ نقرة صغيرة ـ وبذا ففى المقدور أن تحلل ٩٦ واسماً وراثيًا فى نفس الوقت أوتوماتيكياً. مكنت هذه الإجراءات من: (١) تكثير مقطع الدنا المطلوب اختباره للبوليمورفية عن طريق تفاعل البوليميريز المتسلسل. (٢) تحليل البوليمورفات لتحديد الصور الموجودة. (٣) قراءة النتائج أوتوماتيكيًا وتخزينها مباشرة فى الكمبيوتر.

ثانيًا: عندما تصبح الرفليبات شبكة من الواسمات والدالات الوراثية أو: [خرطنة الچينات باستخدام الواسمات الرفليبات والبحث عن چين مرض هنتنجتون]:

١ـ كانت سلسلة القواعد مهمة عسيرة؛ فقد تطلب الأمر فى عام ١٩٧١م سنتين لتحديد تتابع طوله ٢٠ زفًّا لا أكثر لذا كانت حيرة الباحثين فإذا كان الأمر قد تطلب سنتين لتحديد تتابع الـ ٢٠ زفًّا فكيف يتسنى لهم سلسلة ٣٠٠٠ ـ ٣٥٠٠ مليون زق؟

٢ـ ومن خلال الأبحاث الناجحة التى استهدفت الرفليبات؛ منذ نهاية السبعينات من القرن الماضى، رأى عدد من الوراثيين ومن بينهم البيولوچى «دافيد بوتشتاين» وعدد آخر من زملائه أهمية حُسن الاستفادة من التباينات الموجودة فى أى مكان مجاور للچين، وأنه يمكن استخدامها كدالات قريبة من الچينات للكشف عن

الجينات المطلوبة ومنها تلك الجينات المتسببة في حدوث الأمراض، ذلك لأن الرفليبات مُبعثرة عبر كل الكروموزومات، وبالتالى فيمكن أن تحل الرفليبات محل الواسمات ، [أى محل جينات الصفات المظهرية التى بنى عليها مورجان مثلاً خرائط العبور فى حشرة الدروسوفيلا والتى تتألف من تتابع معين من القواعد]، وهكذا تُستخدم الرفليبات بنجاح كشبكة من الواسمات الوراثية، والتى يمكن أن تكون مرجعاً لوضع كل جين على الخريطة الوراثية. وبالفعل تم استخدامها أثناء البحث عن جين مرض كوريا هنتنجتون..

٣ـ ولقد كانت فكرة الخرطنة باستخدام الواسمات الرفليبية جديدة تماماً فى عام ١٩٧٩م وذلك أثناء البحث عن جين (مرض كوريا هنتنجتون أو رقص هنتنجتون Huntington's chorea Disease).

٤ـ وعن هذا المرض نذكر:

أنه يُنسب اسم هذا المرض للطبيب الأمريكى الذى اكتشفه وهو [جورج سمنر هنتنجتون] وهو من الأمراض الوراثية التى تم دراستها وظهورها فى الغرب ودرجة الإصابة به بمعدل «إ» من كل مائة ألف شخص).

ويحدث هذا المرض نتيجة عيب فى جينة موروثة واحدة سائدة وليست متنحية مثل مرض تاى ساكس.

بداية ظهور المرض وأعراضه:

تبدأ فى الظهور من سن ٣٠ ـ ٥٠ سنة وغالباً ما تستمر هذه الأعراض مع المريض وتزداد تدريجياً من ١٥ ـ ٢٥ سنة.. وهو لا ينتقل إلا فى نحو الأربعين أو بعد ذلك بفترة.. ومن أعراضه ظهور الاكتئاب والمتاعب النفسية ثم يفقد بعدها المريض قدرته على السيطرة على عضلاته وتظهر عليه حركات غير إرادية وغير متناسقة فى الأطراف حتى أنه يصاب بالعجز وعدم النطق واضطرابات عاطفية، وبتطور المرض تحدث اضطرابات عاطفية واختلال عقلى مطرد وتشنجات تجعل المريض يُصاب بالاكتئاب الانتحارى والهذيان والجنون والصراخ المتواصل.

وفى عام ١٩٧٩م لم يكن ثمة من حدد بالفعل ـ وقتها ـ موقع جين باستخدام

واسمات الدنا، وإن كان ثمة من عثر على چينات بفضل الواسمات التقليدية ـ وهى [أنتيچينات كرات الدم الحمراء]... تُرى ماذا حدث؟

لإتمام البحث عن چين مرض كوريا هنتنجتون؟!!

إن الذى حدث نحاول إلقاء الضوء عليه فى السطور التالية:

(أ) فى عام ١٩٧٩م بدأ مجموعة من الباحثين استخدام الدنا المطعم... ولم يكن معروفاً وقتها إلا واسم رفليبى واحد... ونذكر من مجموعة الباحثين: «چيمس جوزيلا J.Gusella» من [كلية طب بهارفارد].

وكان لديه معمل فى بوسطن طور فيه رفليبات مشعة ـ وكانت معه «نانسى ويكسلر N.Wexler» [أخصائية العلاج النفسى والعصبى]. من جامعة كولومبيا ـ (والتى كان لديها اهتمام خاص لأن والدتها ماتت متأثرة بمرض كوريا هنتنجتون)، ومعهم عدد خاص من المعاونين... وعُهد إليها بتنفيذ برنامج بحثى عن المرض والسفر إلى فنزويلا حيث ابتليت بهذا المرض إحدى العائلات هناك.

(ب) ولقد عمل هذا الفريق البحثى فى وقت لم يكن الادعاء فيه بوجود آلاف الواسمات بالچينوم البشرى يقع بعض منها قرب چين يهم المختصين إلا أمراً نظرياً مبنيًا على ما تم التوصل إليه من نتائج الأبحاث على أنواع من كائنات أخرى.

(جـ) وبالفعل ذهب الفريق العلمى للبحث عن المرض والذى كان شائعًا فى ٣ قرى على شواطئ بحيرة ماراكايبو بفنزويلا، واستمر العمل عدة سنوات من العمل الشاق المتواصل، وتم من خلال الدراسة المتأنية معرفة وتعقب أصل المرض (أى تتبع المسئول عن توارث هذا المرض عبر عدة أجيال) حتى وصلوا للعقد الأول من القرن الماضى وكانت امرأة تسمى ماريا كونسبسيون M. Concepcion، وهذه السيدة وصل عدد أحفادها إلى ١١ ألف منهم ٩ آلاف على قيد الحياة.

(د) وأتاح ذلك الفرصة لأخذ عينات من دمائهم لفحصها باستخدام المجس الوراثى المناسب الذى تم التوصل إليه بمعمل چيمس چوزيلا الذى كان قد طور طريقة الرفليبات بالواسمات المشعة.

وكان من نتائج هذه المجموعة البحثية ما تم نشره:

أولاً فى سنة ١٩٨٠م، عندما نشرت الأبحاث الأساسية عن الخرطنة الرفليبية للچينات، وكان عدد الچينات البشرية التى وضعت على الخريطة هو ٤٥٠؛ حيث كانت الخرطنة أساساً بالطرق السيتولوچية. وأدت الأبحاث المكثفة خلال هذه الفترة إلى الاعتقاد بإمكانية استخدام الرفليبات فى كشف چينات الأمراض، فقد يوجد الواسم الرفليبى فى صورة على كروموسوم طبيعى وفى صورة أخرى على الكروموزوم الحامل لچين المرض. فإذا كانت الصورة الأخيرة وثيقة الارتباط بالچين، فإن العثور على الرفليب يعطى الإشارة بوجود الچين. وتكون الخطوة التالية هى حساب بُعده التقريبى عن الرفليب الواسم، الأمر الذى يمهد الطريق إلى تعقب الچين، والچينومات البشرية متعددة الصور إلى حد بعيد.. ؛ ثمة واحدة من بين كل خمس قواعد تختلف بين أى فردين، (ويبلغ طول الچينوم البشرى حوالى ٣٣٠٠ سنتيمورجان).

(هـ) ووفقاً لذلك فإذا ارتبط چين هنتنجتون فى دنا المرضى برفليب مُشع معين كان ذلك معناه أن الچين قريب من هذا الرفليب، ولقد نجح الفريق البحثى من خلال توظيفه الخريطة الرفليبية فى الكشف عن وجود الچين الخاص بمرض هنتنجتون، وأُعلن عن هذا الفتح فى نوفمبر من عام ١٩٨٣م. حيث أثبتوا أن بالمرضى من أفراد العائلات ـ (التى فحصوها) ـ نموذجاً مميزاً من الرفليبات كما اتضح أن لدى البعض من الأقارب (لهذه العائلة) ممن لم يُصبهم المرض بعد نفس نموذج الرفليبات المميز، (ولقد أصابهم المرض فى نهاية الأمر) وحدد الباحثون موقع الچين المسبب للمرض بأنه يقع على الطرف الأعلى للذراع القصير للكروموسوم الرابع). وأصبح من الممكن باستخدام المسبر الملائم كشف وجوده فى (دنا) أى شخص.

(و) لقد عزز ذلك التقرير ـ بما يحمله وقتها من إثارة بالغة وفريدة ـ من الجهود الجارية للخرطنة بالرفليبات؛ بعدما كانت الفكرة المسيطرة على أذهان الباحثين خلال هذه المرحلة الزمنية. (وفى ضوء الإمكانيات المتاحة وقتها) ـ أن خرطنة الچينوم البشرى تتطلب تعقب الكثير من الواسمات والچينات وهى تتحرك عبر الأجيال ـ

كمثل المسبب «ج٨» وچين هنتنجتون، وحفَّز هذا التقرير الباحثين على القيام بدراسات جديدة لدراسة الأمراض والعلل والتى منها ما يفترض أن يكون وراثيًّا، ومنها دراسات استغلت العائلات من هذه العشيرة فى رسم خريطة واسمات [للكروموسوم ٢١]، وكانت الخريطة مفيدة فى تحديد موقع چين مرض الزهايمر، وموقع چين مرض التصلب الجانبى الضامر (مرض لو جيريج) وفى رسم خريطة لكل من الكروموزومين [١٧، ٢٢] حيث تقع چينات تسبب صورتين من الورم الليفى العصبى، وفى رسم خريطة للكروموسوم [١١] استُخدمت فى البحث عن موقع محتمل لمرض الهوس الاكتئابى. ولقد اختُبرت مائة عائلة أو أكثر على طول العالم وعرضه ـ فى أوروبا وأمريكا الشمالية والجنوبية، وحتى فى بابوا، غينيا الجديدة، وكان چين هنتنجتون فيها جميعاً على نفس الموقع على الكروموسوم الرابع، ونذكر من بين تلك العائلات قصة الأمريكية «چوليس كوريفار» والتى مات جميع أفراد أسرتها بمرض هنتنجتون والذى من بين ما يسببه هو إصابة خلايا المخ بالضمور، ورغم الاستفادة من تلك الوسيلة المعملية للتنبؤ بحدوث هذا المرض.. وكانت نتيجة الاختبار سلبية فإن (كوريفار) خرجت من هذه التجربة محطمة تماماً.

ولم يُكشف عن تركيب الطفرة المسببة لمرض هنتجتون إلا فى عام ١٩٩٣م، وكان عبارة عن امتداد مميز لثلاثية من القواعد هى: (س أ ج) ـ تتضاعف داخل الچين مع تقدم عمر المريض فتفسد عمل البروتين الناتج عنه، وهكذا تظهر الأعراض القاتلة على المريض.

(ز) أيضاً يُذكر أن البروتين الذى يكود له الچين المسبب للمرض، يطلق عليه اسم بروتين «هنتجتين» والعلماء يعرفون الآن أن هذا البروتين فى حالته الغير سوية هو المسئول عن تدهور الأعصاب ويعرفون كيف يفعل وكيف يُسبب لعصب واحد بمفرده أن يموت.. لكن لا زال العلماء يجهلون وظيفة هذا البروتين وهو فى حالته السوية.

(ح) والجدير بالذكر.. أن الباحثين قد تمكنوا؛ على منتصف الثمانينات، وبعد

توظيف مناهج الرفليب، من الوصول بعدد الچينات التى تم خرطنتها باستخدام الواسمات الرفليبية إلى ١٥٠٠ چين (أى تضاعف العدد ثلاث مرات).

ثالثاً: استخدام الرفليبيات فى الكشف عن أمراض أخرى:

لقد أثمرت نفس الطرق عند تطبيقها على مرض التليف الكيسى ومرض الكلية متعدد الأكياس، وخَلَل دوتشين العضلى، وغيرها، أمكن بهذه الطريقة، فى حالات كثيرة تحديد الكروموسوم الذى يقع عليه الچين. وبالتالى أعطى هذا الموضوع الضوء الأخير للوراثيين لإمكانية الاستفادة من الرفليبيات فى خرطنة الچينوم البشرى (إلا أنه تطورت التقنيات وأصبح هناك أدوات أسرع وأعقد تم استخدامها فى مشروع الچينوم) وترتب على ذلك المزيد من الجهد أملاً فى إمكانية عزل الچين نفسه المسبب للمرض وتحديد تتابعاته ومن ثم تحديد هوية ما ينتجه، والتوصل لطريقة عمل الچين وليلتقى مع تقنية مثل العلاج الچينى بما يتيح وسائل علاجية أفضل.

رابعاً: فوائد أخرى للخرطنة الوراثية:

ومن بين فوائد الخرطنة الوراثية نذكر أيضاً القدرة على تطوير دواء مُفصَّل خصيصاً للفرد: «عقاقير بلا آثار جانبية»: إذ أنه كثيراً ما ترجع الآثار الجانبية للعقاقير إلى اختلافات حقيقية فى استجابة الفرد إلى المادة الكيماوية، ففى التباين بين الأفراد من الاتساع ما يسمح بوجود بيوكيميا مختلفة. وعلى سبيل المثال هناك چين متنح فى العشائر الأوروبية يتحكم فى الحساسية لعلاج ضغط الدم المرتفع ونسبة من تظهر بهم هذه الصفة فى تلك العشائر هى (٥٪) وهؤلاء لا يمكنهم استخدام علاج ضغط الدم إلا بكميات فى حدود (١٪) من الجرعة العادية. والتصنيف الوراثى لمثل هذه الفروق سيثمر أدوية جديدة تلائم مرضى معينين.

ومما ساعد على تحقيق الأمل فى الوصول لخريطة وراثية للچينوم البشرى ما تم من خلال تطوير تقنية صبغ كيماوية تُفرِّق بوضوح كامل بين كل كروموسوم والآخر إذ نجد أن لكل كروموسوم نمطاً من الشرائط اللاصقة يميزه عن غيره مما أعطى

الباحثين الأمل وقتها فى إتاحة الفرصة بمزيد من الأبحاث لرد چينات بذاتها إلى كروموسوم بذاته بطرق خاصة فى زراعة الخلايا.

خامساً: الاستفادة من أحد إنزيمات التحديد فى الكشف عن چين مرض وراثى بالحيوان:

ظروف المرض:

هو مرض بومب Pompe disease، وهو مرض وراثى يسبب ضموراً خطيراً فى العضلات يودى بحياة العجول بعد الفطام بنحو ستة أشهر، ووراء هذا المرض چين متنح يتسبب فى الأفراد الأصيلة له فى عجز الجسم عن إنتاج إنزيم ألفا جلوكوسيديز alpha glucosidase الذى يحرر الجلوكوز من الجليكوچين ليستخدمه الجسم فى إنتاج الطاقة. وعندما يرث الحيوان تركيبًا وراثيًا أصيلاً بهذا الچين المتنحى يموت مبكراً، بينما تعيش الأفراد التى تحمل الچين المعيب مع الچين الطبيعى (خليط heterozygotes) وتبلغ نسبتها فى عشيرة الماشية نحو ١٥٪. وبالطبع فذلك يؤدى لإصابة مُربى الماشية بالخسارة ومن المهم بالنسبة له ألا يحدث تزاوج بين فردين خليطين يحمل كل منهما الچين المعيب لازدياد المخاوف من احتمال أن ربع النسل الناتج سيقتله المرض.

وتتجه الأنظار لما يقدمه العلم هنا من حل لهذه المشكلة..

العثور على إنزيم تحديد وبداية حل المشكلة:

حيث عثر الباحثون على إنزيم تحديد مناسب هو إنزيم (MSPI) له داخل الچين الطبيعى موقع تعرف ـ أما الچين المعيب فيحمل طفرة نقطية واحدة (تحيل حمض البرولين فى البروتين الذى يشفِّر له الچين الطبيعى، إلى حمض جلوثامين) فى موقع التعرف هنا، فلا يميزه الإنزيم.

لذا تختلف نتائج التشظية بالإنزيم بين الأفراد الأصيلة للچين الطبيعى و بين حاملى چين المرض. أمكن إنتاج المسبر المشع لكشف الچين المرضى، وغدا من الممكن فى ظرف ساعات ـ عن طريق دنا مأخوذ من خلايا الدم كشف وجود الچين من عدمه.

سادساً: في البحث عن أصول الإنسان باستخدام الرفليبيات وإنزيمات التحديد؟!!

س: كيف تدخَّل علماء الوراثة في مناقشة أصل الإنسان؟ وما هو دور إنزيمات التحديد؟!

(جـ) تدخلوا من خلال دراسة التنوع الوراثي للجماعات البشرية الحالية، وبالنسبة إلى هذه الجماعات وُجد أن الجينة ذاتها أو حتى الجزء ذاته من الدنا يظهر بعدة أشكال، وأن الجينات المغايرة (الألائل alleles) تُظهر كذلك تنوعاً (في حالة الجينات المكودة، تكود الألائل بروتينات وظيفية تكون مختلفة بعضها عن بعض، ومع ذلك تؤمن الوظيفة نفسها). وهذا التنوع في الواقع الاعتقاد الشائع له الآن أنه نتيجة طفرات في الدنا حدثت في الماضي، وتراكمت مع مرور الزمن، وأصبحت متكررة الحدوث نوعاً ما في الجماعات البشرية. ومن المفيد هنا أن يقوم هؤلاء الباحثون المتخصصون بتحديد كمية الطفرات المتراكمة في تسلسلات الدنا لأفراد مختلفين موجودين حالياً، مما يسمح بعرض تاريخ تعاقب هذه التسلسلات من جهة ومن جهة أخرى سمح بتقدير مدى اختلاف تكرار الألائل بين الجماعات المتنوعة الحالية، مما يمكِّن من إعادة صياغة التاريخ الوراثي لهذه الجماعات.

ولقد درس علماء الوراثة هذا التنوع على مستوى البشرية المنتشرة على كوكب الأرض. ومنذ سنة ١٩٨٠م تحققت معرفة الاختلافات الوراثية باستخدام «إنزيمات التحديد restriction enzymes» التي تقطع عادة جزيء الدنا في مواقع خاصة يطلق عليها «مواقع التحديد» كما أن وجود مثل هذه المواقع أو غيابها على امتداد جزيء الدنا يختلف من شخص لآخر وبالتالي تقوم إنزيمات التحديد بإنتاج شوب من الدنا بأطوال مختلفة بحسب الشخص. وفي عام ١٩٩٠م أصبحت التقانات المستخدمة في التحاليل الوراثية أكثر إتقاناً، مما سمح للباحثين بتنسيق النيوكليوتيدات وترتيبها إلى وحَيدات تشكل جزيء الدنا؛ أي: أصبح بالإمكان معرفة التنوع الوراثي بشكل أدق (حتى بين نيوكليوتيدة ومجاورة).

سابعاً: إنشاء مكتبة للجينوم البشرى:

حيث يستطيع العلماء بواسطة استخدام إنزيمات التحديد أن يشظوا الجينوم البشرى بأكمله إلى مئات الآلاف من الشظايا، يمكن أن تفصل تبعاً للحجم باستخدام تقنية التفريد الكهربى Electro phoresis، وأن يتم إيلاج كل شظية فى بكتيريا أو خلية خميرة مناسبة ليُخزن بها، لينشئوا مكتبة كاملة للجينوم يمكن سلسلتها قطعة قطعة.

الجولة الخامسة:

ما بين الرفليبيات والفنترات والتوصل للبصمة الوراثية:

أولاً: تمهيد:

كان التوصل إلى تكوين الرفليبيات من الدنا الوراثى من أكثر النتائج نفعاً وإفادة بعدما تمكن الباحثون من اكتشاف إنزيمات القطع والتحديد واستخدموها فى قطع المادة الوراثية ، وباستمرار سعى الباحثين وجهودهم المبذولة فى فترة الثمانينات توصلوا لنوع منها أسموه (مواقع العدد المتباين من المكررات الترادفية وهى ترجمة عربية للمصطلح بالإنجليزى وهو: ـ "Variable number of repeats" وتُقرأ مختصرة {$VNTR_s$} ونقرؤها باللغة العربية الفنترات.

تُرى ما هى حكاية الفنترات؟!! معاً ننتقل للنقطة الثانية لنعرف ..

ثانياً: علماء الطب الشرعى يفضلون الفنترات:

والإجابة نأخذها من نتائج أبحاث العلماء فى هذه الفترة حيث توصلت إلى أنه كثيراً ما يحدث أن يقع جينوم الكائن الحى على تتابع بلا معنى (يعتقدون أنه بلا معنى لكن ظهر أن له أهمية)، تتابع مؤلف من عدد يتراوح عادة ما بين زوجين و ٦٠ زوجًا من القواعد فيكرره مرات ومرات متجاورة يختلف عددها كثيراً بين الأفراد ويتراوح ما بين ٣ ـ ٦٠ مرة، وإذا ما بتر دنا هذه الكروموسومات بإنزيم تحديد معين فإنه يقطع على جانبى مواقع المكررات وتتكون الشظايا، وهذه الشظايا الناتجة تختلف فى الحجم كثيراً بين الأفراد بسبب العدد المتغاير من المكررات التى يحملها كلٌ.

وقد تحمل بعض الكروموزومات ٣٠ نسخة مترادفة، ويحمل غيرها ٣١ نسخة،

وهكذا. ولقد اتجه الباحثون وبخاصة علماء الطب الشرعى للعمل على الفنترات واستخدامها باعتبارها رفليات عالية البوليمورفية، وذلك كبديل عن استخدام الرفليات العادية والسبب فى ذلك يرجع إلى أن الفنترات تسهل التمييز بين الأفراد، لأنه يوجد عند الكثير من مثل هذه المواقع عشرات من الأطوال البديلة وبالتالى فهناك كثرة للتباين فى عدد المكررات بينهما، أما فى حالة الرفليبات العادية فهناك حذر وخوف من احتمال أن يحمل شخصان [عشوائياً] نفس النموذج من الرفليات [عند نفس الموقع الرفليبى]، بمعنى أنه فى الرفليبات العادية نجد أن قطع الدنا الناتجة عن البتر بإنزيم التحديد ستتماثل ما بين الأفراد، ما لم تكن طفرة قد أفسدت موقع التعرف، فلا تتسم الاختبارات بالدقة المطلوبة، بينما يمكن تحقيق الدقة المطلوبة والتمييز بدقة بين الأطوال المختلفة باستخدام الفنترات.

ثالثاً: تعيين البصمة الوراثية بعد ظهور الفنترات:

ولقد ترتب على ذلك أن أصبح بين يد الباحثين المختصين نظام فعال لتحديد بصمة الدنا.

أى أن هذه الفنترات تخدم فى تعريف هوية ما يسمى بالبصمة الوراثية (Genetic Fingerprint)، والتى لا يمكن تزويرها أو إخفاؤها، وفى فترة نهاية الثمانينات والتسعينات كانت معظم معامل بصمات الدنا تكتفى باختيار أربعة مواقع من هذه الفنترات، ويرى فيها علماء الطب الشرعى أنها كافية لتوفير قدر كبير من المعلومات عن الهوية فى ساحات القضاء.

- وأصبح بالإمكان - بعد ظهور الفنترات إجراء وتعيين البصمة الوراثية لمعرفة الجانى وذلك بأن تؤخذ عينة من مسرح الجريمة. يكون الجانى قد تركها كأن تكون نقطة دم أو شعرة أو .. إلخ، ثم تعرض لإنزيم تحديد يُشظِّى الدنا حول فنتر فى العينة وكذا فى عينة أخرى من دم المشتبه فيه أو يستخدم التفاعل المتسلسل للبوليميريز فى تكثير فنتر تتابعين على جانبيه نستخدمهما طليعتين لكل من العينتين، وبعدها تُغمر شظايا كل من العينتين فى مسابر مشعة تحمل تتابعاً قصيراً من منطقة أحد الفنترات، فتقترن بالتتابعات المكملة لتظهر شرائط مشعة تتطابق فى العينتين إذا كان

المشتبه فيه هو المجرم (من الممكن بهذه الطريقة تمييز عدد من المكررات فى كروموزومى الفرد ـ فقد يختلف العدد فى الكروموزوم الآتى من الأب عن الآتى من الأم). وعادة تُفحص أربعة مواقع لفتترات لتقليل احتمالات الخطأ.

ملحوظة: وإذا كنا عزيزى القارئ قد تحدثنا عن البصمة الوراثية بصفة عامة على أنها نوعية عالية البوليموفية من الرفليبات وتسمى الفتترات وأنها مكررات وكان حديثنا هنا فى ضوء الاستفادة من إنزيمات التحديد (التى تحدثنا عنها باستفاضة)، فإننا سنتناول الحديث عن البصمة الوراثية بصورة أعمق، وكيف تم اكتشافها (قصة الاكتشاف)، وسيكون ذلك بعد التمهيد لها بالدخول للچين نبحث فى أغواره لنعرف المزيد عن البصمة الوراثية.. ومعه الجديد من أسرار الچين (سبحان الله).