الفصل الخامس

نواقل الجينات المستخدمة فى العلاج الجينى - كلونة الجين

Vectors in Gene Therapy – Gene Cloning

يتطلب الأمر فى تقنية العلاج بالجينات تحميل الجين السليم - المراد نقله - تركيبا صغير الحجم له القدرة على التكاثر الذاتى داخل الخلايا، ويعمل هذا التركيب - وهو مادة وراثية غالبا - كحامل Carrier أو ناقل vector للجين المطلوب إدخاله إلى الخلية المراد علاجها جينيا.

وغنى عن القول أننا فى حالة علاج خلايا جسمية نحتاج ملايين النسخ من الجين السليم، ومن هنا فإنه بعد تحميل الجين السليم على ناقل vector فإن الأمر يستلزم نسخ cloning الجين (كلونته).

وإذا أجريت الكلونة باستخدام الحمض النووى DNA من الجينوم ذاته وصفت بأنها (genomic cloning)، أما إذا بدأت التقنية باستخدام حمض m-RNA، وتم منه تخليق c-DNA باستخدام إنزيم reverse transcriptase ثم تم كلونة c-DNA، وصفت الكلونة بأنها (c-DNA cloning) ويلاحظ أنه فى الحالة الأخيرة لا تتم كلونة التتابعات الدخيلة (الانترونات) introns.

ويجب أن يراعى دائما أن يكون الناقل المستخدم على درجة عالية من الكفاءة efficacy والأمان safety. ويجب أن يحتوى الناقل على موقع أو أكثر يستوعب فيه الجين المراد نقله يعرف باسم restriction site. كما يجب أن يكون التعرف على الجين - المحمول على الناقل- ممكنا، وأن تكون استعادة الجين من الناقل عملاً متاحًا. ومن أشهر هذه النواقل البلازميدات Plasmids والكوزميدات Cosmids والفيروسات Viruses وكروموسوم الخميرة الاصطناعى Yeast Artificial Chromosome (YAC) والكروموسوم البشرى الاصطناعى Human Artificial Chromosome (HAC) والليبوسومات Liposomes.

البلازميدات The Plasmids

توجد البلازميدات بصورة طبيعية فى سيتوبلازم البكتيريا، والبلازميد عبارة عن حلقة من مادة DNA تقع خارج جزىء المادة الوراثية الأساسية للبكتيريا. ويحتوى البلازميد على عدد محدود من الجينات يصل أقصاه إلى بضع مئات، بينما يصل عدد الجينات فى كروموسوم البكتيريا إلى عدة آلاف.

ويحتوى البلازميد على منشأ للتضاعف Origin of Replication (ori) فهو بذلك لديه القدرة الذاتية على التكاثر. ولا تعتبر البلازميدات ضرورية لحياة البكتيريا.

ويرجع الفضل إلى العالم ستانلى كوهين Stanley Cohen (شكل ٤٦) من جامعة ستانفورد Stanford University فى التوصل إلى تقنية لفتح حلقة البلازميد وربط طرفيها بقطعة من الحمض النووى DNA (DNA Fragment) غريبة عن البكتيريا لإنتاج ما يعرف باسم بلازميد معاد الاتحاد recombined plasmid.

شكل (٤٦): العالم ستانلى كوهين Stanly Cohen استخدم البلازميدات فى تكنولوجيا الحمض النووى DNA وحصل على جائزة نوبل.

ومن المفضل دائما استخدام البلازميدات صغيرة الحجم، فهى عادة لا تنكسر أثناء إجراء عمليات العزل، كما أن عملية إدخالها إلى الخلايا - بعد تحميلها بالجين المطلوب - تكون أسهل. إلاّ أن البلازميدات بصفة عامة صغيرة الحجم ولا يمكن تحميل مادة جينية حجمها أكبر من (٢٠) كيلوبيز، وإلاّ حدث تفكك فى موضع الالتحام.

والبلازميدات التى تستخدم كناقل للجينات هى تلك التى تحتوى على جينات مقاومة للمضادات الحيوية antibiotics حيث يمكن عن طريقها التعرف على البكتيريا المحتوية على البلازميد - الذى يحمل الجين المنقول - والتى تقاوم المضاد الحيوى عند تعريضها له. فعلى سبيل المثال، هناك بلازميدات تحمل جينا مقاوما للأمبسلين أو جينا مقاوما للتتراسيكلين.. وهكذا.

ولكلونة جين باستخدام اللازميدات يستخدم (إنزيم قص) معين لفتح حلقة البلازميد (قطع جزىء الـ DNA) (شكل ملون ٤٧) وكذلك يستخدم إنزيم القصر نفسه فى الحصول على جزء

مادة DNA (DNA fragment) المراد تحميله على البلازميد. ويتم ربط البلازميد والمادة الوراثية المطلوب تحميلها معًا باستخدام إنزيم ربط DNA-ligase الذى يقوم بربط جوانب الجزيئين معا أى ربط sugar-phosphate backbones of the plasmid and cDNA. ثم يتم إدخال البلازميد المعدل إلى البكتيريا، وهى العملية التى تعرف باسم تحول transformation. ويجرى عزل للبكتيريا التى دخل إليها البلازميد فعلا عن طريق تعريض البكتيريا للمضاد الحيوى الذى يحمل البلازميد جينا لمقاومته، وبذلك تموت البكتيريا التى لم يدخل البلازميد إليها. بعد ذلك تنقل البكتيريا حاملة البلازميد إلى مزرعة لإكثارها وبالتالى إكثار الجين المراد كلونته.

ويوضح (شكل ملون ٤٨) البلازميد (pBR322) الذى كثيرا ما يستخدم فى حمل مادة وراثية وكلونتها. ويحمل هذا البلازميد جين مقاومة المضاد الحيوى أمبسلين amp^R، وجين مقاومة المضاد الحيوى تتراسكيلين tet^R، ويحتوى كل من الجينين على عدة مواقع تعمل عندها إنزيمات القصر، ويطلق على كل موقع اسم restriction site كما ذكرنا من قبل. فإذا اخترنا فتح البلازميد داخل مادة الجين tet^R عن الموقع (*Sal*1 562) مثلا، وأدخلنا المادة الوراثية المطلوب تحميلها، فإن جين مقاومة التتراسيكلين لن يعمل. تدخل البلازميدات إلى البكتيريا، ثم يتم اختيار البكتيريا التى دخل فيها البلازميد باستخدام المضاد الحيوى أميسلين. وفى مرحلة تالية يتم التعرف على البكتيريا التى حمل البلازميد فيها المادة الوراثية المنقولة بتعريض البكتيريا الحاملة للبلازميد على المضاد الحيوى تتراسيكلين، حيث لن تتمكن البكتيريا الحاملة للمادة الوراثية من مقاومة التتراسيكلين، وبالتالى تعزل مستعمرتها ويتم إكثارها وبالتالى يتم مزيد من كلونة الجين المطلوب.

كما يوضح (شكل ملون ٤٨) أيضا البلازميد (pUC 18) وهو كثيرًا ما يستخدم أيضا فى حمل مادة وراثية وكلونتها. ويحمل هذا البلازميد جين مقاومة المضاد الحيوى أمبسلين amp^R، كما يحمل الجين المسئول على تخليق إنزيم *B*-galactosidase. والنقطة الهامة هنا هى أن العلماء أدخلوا فى وسط مادة هذا الجين الأخير مادة وراثية تحمل العديد من المواقع المعروفة باسم restriction sites والتى يمكن أن يعمل عندها عدد من إنزيمات قصر منها *Xba*1. ويطلق على هذا الجزء ذو الخصائص الفريدة اسم (متعدد التواصل Polylinker). ومن الجدير بالذكر أن إضافة (متعدد التواصل) إلى البلازميد فى هذا الموقع لا يحول دون تخليق إنزيم β-galactosidase حيث إن البروتين المخلق بجزأى الجين يرتبطان بعضهما ببعض بصورة تؤدى إلى تكوين الإنزيم فى حالة طبيعية. وتجدر الإشارة إلى أن هناك مادة خاضعة substrate يرمز إليها بالأحرف X-Gal يعمل عليها هذا الإنزيم ويحولها إلى صبغ ذى لون أزرق blue dye. فإذا أضيفت هذه المادة الخاضعة إلى محلول حضن Culture medium الخاص بالبكتيريا التى تحمل هذا البلازميد صبغت المزرعة بلون أزرق. ومن ناحية أخرى فإن تحميل الجين على

منطقة polylinker يعوق عملية تخليق الإنزيم β-galactosidase. ولاستكمال الخطوات بعد إجراء خطوة transformation للبكتيريا لتحديد تلك التى تحتوى الجين، يضاف لمزارع البكتيريا المضاد الحيوى أمبسلين والمادة الخاضعة X-Gal. فالمزرعة التى ينتج فيها صبغ أزرق تشير إلى أن الإنزيم قد أدى فعله بما يعنى أن الجين لم يحمل على البلازميد. أما المزرعة التى لم ينتج فيها هذا اللون وظلت بيضاء فإن الإنزيم بها لم يعمل بسبب وجود الجين المنقول والذى عطل تكوين إنزيم β-galactosidase. تؤخذ المزرعة الأخيرة وتنمى لكلونة الجين.

٢ - الكوزميد The Cosmid

الكوزميد هو عبارة عن تركيب حلقى circular مؤلف من الأجزاء اللاصقة من المادة الوراثية للفيروس Cohesive sites مع بلازميد Plasmid، ومن هنا اشتق اسمه. ويجمع الكوزميد بين قدرة البلازميد على التضاعف الذاتى وقدرة الأجزاء اللاصقة على الدخول إلى الأغلفة الفيروسية. ويوضح شكل ملون ٤٩ كوزميد يتركب من مادة وراثية حلقية تحمل منشأ للتضاعف (ori) وجين مقاوم للأمبسلين (amp^R) وموقع عمل أحد إنزيمات القصر (وكل ذلك من صفات البلازميد)، الأجزاء اللاصقة (COS) (وهى مأخوذة من المادة الوراثية للفيروس). وتتلخص خطوات العمل بالكوزميد فى تحميل الجين - المراد كلونته - على الكوزميد، ثم يقطع الكوزميد فى موقع (COS) ليصبح الكوزميد ذا تركيب خطى ويوجد (COS) عند طرفيه، وبذا يسهل دخوله إلى الأغلفة الفيروسية. تدخل الفيروسات إلى البكتيريا، وفيها يعود الكوزميد المحمل بالجين ليصبح حلقيا circular مرة ثانية. يجرى فصل البكتيريا المحتوية على الكوزميد باستخدام الأمبسلين، تنمى البكتيريا المحتوية على الكوزميد فى المزارع لكلونة الجين. ويتميز الكوزميد بأنه يستطيع حمل مادة وراثية كبيرة تصل إلى (٤٥) كيلوبيز.

٣ - الفيروسات The Viruses

تمثل الفيروسات التى تصيب البكتيريا (البكتيريوفاجات Bacteriophages) نواقل جيدة تستخدم فى حمل الجينات المطلوبة للعلاج الجينى، وهى قادرة على حمل قطع من المادة الوراثية DNA أكبر مما يمكن أن تحمله البلازميدات. وقد يكون الفيروس المستخدم من طراز Adenovirus ومادته الوراثية DNA، أو من طراز Retrovirus ومادته الوراثية RNA.

فيروسات حمض DNA (Adenoviruses)

تتميز هذه الفيروسات بكونها ثابتة Stable ويسهل تنقيتها ويمكنها أن تحمل قطعا كبيرة من المادة الوراثية تصل إلى ٣٦ كيلوبيز. كما أن هذا الطراز من الفيروسات يُدخل بنجاح فى الخلايا التى لم تعد تنقسم. ويعيب استخدامها كنواقل فى علاج الجينات أنها قد تسبب التهابات وتثير الجهاز المناعى، ولا ترتبط المادة الوراثية المنقولة بجينوم الخلية، وبالتالى فإن

تعبيرها يكون غير ثابت، كما قد تحمل هذه الفيروسات جينات تحفز على حدوث سرطانات. ومن أمثلة هذه الفيروسات phage lambde (phage λ).

ويوضح (شكل ملون ٥٠) آلية استخدام هذا الفيروس فى الكلونة، حيث يعامل حمض DNA الفيروسى بإنزيم قصر، (وغالبا ما يستغنى عن الجزء الأوسط من المادة الوراثية حيث لا دور له فى عملية المضاعفة replication أو تعبئة المادة الوراثية فى الغلاف الفيروسى)، كذلك يقطع الجينوم المراد تحميله وتخلط المادتان الوراثيتان معًا. ويلاحظ أن أطراف الأجزاء المجمعة تكون لاصقة cohesive sites (cos) مما يسهل لهذه الأجزاء معاودة التعبئة packaged داخل الأغلفة الفيروسى، ثم يدخل كل فيروس معاد الاتحاد recombinant phage إلى إحدى البكتيريا، ثم تنمى البكتيريا فى مزارع بكتيرية، وبذا تحدث كلونة لأجزاء المادة الوراثية المحملة على الفيروسات.

فيروسات حمض RNA (Retroviruses)

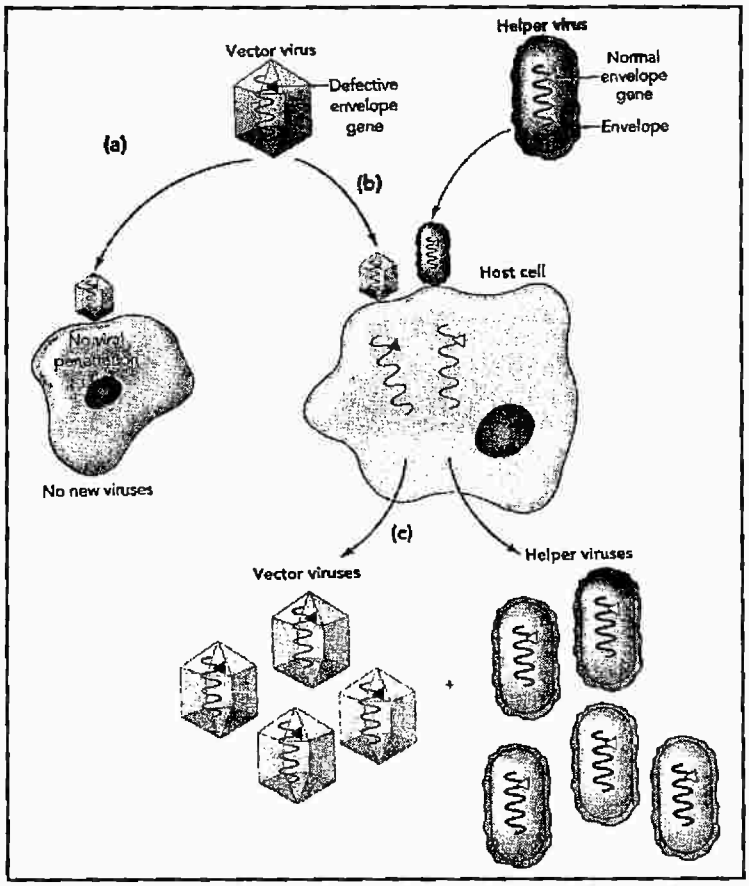
عند استعمال هذه الفيروسات يؤخذ فى الاعتبار أن تكون المادة الوراثية المطلوب نقلها على صورة RNA وليس DNA. ويقوم العلماء بهندسة الفيروس بجينات تجعله يرتبط بطراز معين من الخلايا وليس بكل خلايا الجسم. ويلاحظ أنه بعد دخول فيروس retrovirus إلى الخلية فإن حمض RNA الخاص بالفيروس يستخدم كقالب لتخليق حمض DNA وذلك بمساعدة إنزيم النسخ العكسى reverse transcriptase الذى يدمج نفسه مع المادة الوراثية DNA الخاصة بالخلية، ويعرف عندئذ باسم provirus، ويقوم هذا الأخير بإنتاج m-RNA ومواد فيروسية، وكذا بالعمل كجينوم للفيروس.

وعادة لا يمكن أن تحمل هذه الفيروسات مادة جينية أكبر من ٧ كيلوبيز، كما لا يمكن تنقيتها بصورة كاملة دون التأثير على قدرتها على الدخول فى الخلايا Transduction، كما أن هذه الفيروسات غير ثابتة Unstable.

ومن الأمور التى تحبط شيوع استخدام الفيروس من طراز retrovirus كناقل للجين المطلوب فى العلاج بالجينات أنه لا يؤدى عمله إلا فى الخلايا التى تقوم بالانقسام الخلوى وذلك يحد من استخدامه فى حالات الخلايا العصبية والخلايا العضلية، كما أن هذا الطراز من الفيروسات يرتبط عشوائيا فى أى موقع فى جينوم الخلية مما قد ينشط جينات سرطانية كما سبق القول.

ويعمل العلماء على إزالة الجينات التى تسبب ضررًا بالخلية التى سيدخل إليها الفيروس لضمان سلامة الخلية. وعلى سبيل المثال يقوم العلماء بنزع الجينات الخاصة بغلاف الفيروس، وبذلك يصبح الفيروس غير قادر على الارتباط بالخلية أو قيامه بعمليه التضاعف. ولكن بما أن هناك حاجة إلى ملايين الفيروسات الناقلة vectors لإجراء عملية العلاج بالجينات، فإن الأمر يتطلب مضاعفة الناقل بدرجة عظيمة حتى تنتج الأعداد المطلوبة منه. ويتم ذلك فى الأطباق

العملية باستخدام خلايا حية. ويتطلب الأمر (شكل ٥١) هنا استخدام فيروس إضافي يطلق عليه اسم (الفيروس المساعد) helper virus يقوم بتسهيل دخول الفيروس الناقل vector virus إلى الخلية ويسهل عملية تضاعفه. وبعد إتمام إنتاج أعداد كبيرة (تقدر بالبلايين) من الفيروس الناقل والفيروس المساعد يراعى فصل الفيروسات المساعدة تجنبًا للأضرار الناتجة عن استخدامها، وبهذا يتم ضمان الحصول على أعداد وفيرة وآمنة من الفيروس الناقل vector virus.

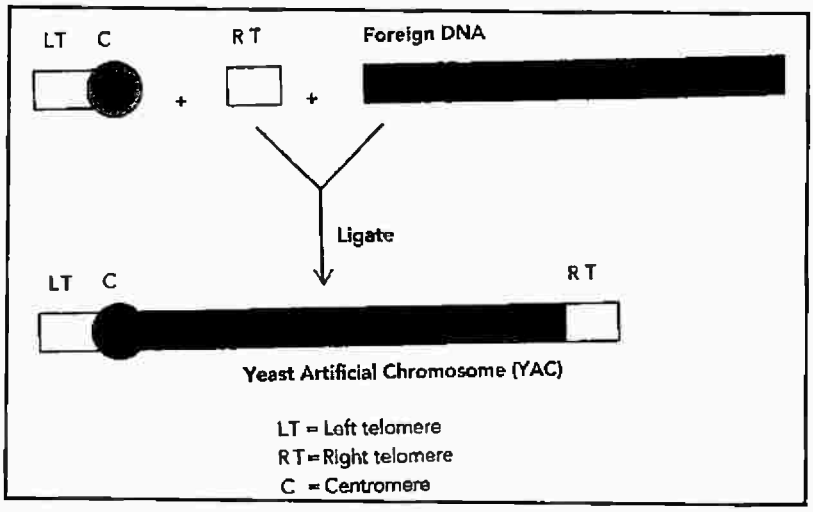


شكل (٥١): إنتاج فيروسات حاملة للجين Vector viruses وفيروسات مساعدة helper viruses (انظر المتن).

٤- كروموسوم الخميرة الاصطناعي Yeast Artificial Chromosome (YAC)

تم ابتكار هذا الكروموسوم بواسطة Maynard Olson وزملائه في جامعة واشنطن Washington University في عام ١٩٨٧ (شكل ٥٢). ويستطيع هذا الكروموسوم حمل مادة وراثية لنقلها تصل إلى ٥٠٠,٠٠٠ من أزواج القواعد النيتروجينية. ويحمل كروموسوم الخميرة

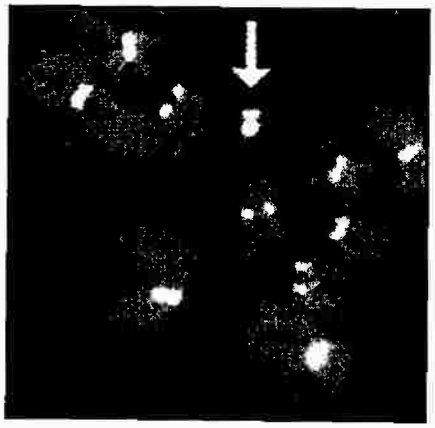
الاصطناعى أقل من ١٪ من المادة الوراثية للخميرة، وهذا القدر يمثل جينات التيلوميرات telomeres وجينات السنترومير centromere، وجين منشأ التضاعف Origin of Replication.



شكل (٥٢): بناء كروموسوم الخميرة الاصطناعى.

٥ - الكروموسوم البشرى الاصطناعى Human Artificial Chromosome (HAC)

فى العدد رقم (١٥) لعام ١٩٩٧ من مجلة Nature Genetics أعلن خمسة باحثين منهم هارنجتون، ولارد J. Harrington and Huntington Willard من جامعة Case Western Reserve University أنهم استطاعوا تخليق كروموسومًا بشريًا اصطناعيًا Human Artificial Chromosome يحتوى على القطع الطرفية Telomeres للكروموسوم، والسنترومير Centromere وعلى التتابعات اللازمة لتضاعفه، وذلك لاستخدامه فى نقل الجين المراد فى حالات العلاج الجينى. وتعتبر هذه أول مرة يمكن فيها الحصول على كروموسوم اصطناعى للثدييات Mammalian Artificial Chromosome (MAC). (شكل ٥٣). ويستطيع هذا الناقل حمل مادة وراثية كبيرة الحجم لا يستطيع حملها فيروس أو بلازميد.



شكل (٥٣): السهم يشير إلى كروموسوم بشرى اصطناعى.

ويتراوح حجم هذا الكروموسوم بين $\frac{1}{5}$ إلى $\frac{1}{10}$ حجم الكروموسوم البشرى الطبيعى، وهو يتصرف كالكروموسوم الطبيعى عبر الانقسامات الخلوية. وتجدر الإشارة إلى أن هذا الكروموسوم لا يحتوى هستونات، ولكن الخلايا التى يدخل إليها تقوم بإضافة الهستونات إليه! ويفتح استخدام هذا الكروموسوم الاصطناعى كناقل آمالا عريضة فى العلاج الجينى.

٦ - الليبوسومات The Viruses

فى تطور آخر لجأ العلماء إلى إعداد تراكيب كروية الشكل يصل قطرها أقل من ١٠٠ نانومتر ويتكون جدار كل منها من طبقتين من جزيئات الدهون بينما يمتلىء داخلها بسائل. ويطلق على هذه التراكيب الكروية اسم (ليبوسومات) Liposomes (شكل ٥٤ ملون)، وهى تعد وفق تقنية معينة. ويستخدم العلماء هذه الليبوسومات فى حمل الجينات التى يراد إدخالها إلى الخلايا، حيث يتحد جدار الليبوسومة مع الغشاء الخلوى بينما يجد الجين طريقه إلى السيتوبلازم. والليبوسومات وإن كانت أقل كفاءة من الفيروسات فى هذا الصدد إلا أنها أكثر أمنا. وقد تم استخدامها بنجاح فى حالة العلاج بالجينات لمرض التليف الحوصلى Cystic Fibrosis - الذى استخدمت معه أيضا الفيروسات من طراز Adenovirus التى سبقت الإشارة إليها. وقد تناولت مقالة فى مجلة Scientific American فى يونيو ١٩٩٧ ومقالة أخرى فى ملحق عدد ٣٠ أبريل عام ١٩٩٨ من مجلة Nature النواقل غير الفيروسية التى تستعمل فى نقل الجينات بغرض علاج الأمراض الوراثية.

خاتمة:

من الاشتراطات لصلاحية الناقل للقيام بوظيفته أن يحتوى على منشأ للتضاعف Origin of Replication، وأن يحتوى على موقع واحد فقط يعمل عنده إنزيم القصر تجنبًا لتفتته، وأن يضاف إلى الناقل جين دال a marker gene يدل على وجوده مثل مقاومته لمضاد حيوى، أو أن يخلق هذا الجين بروتينا يصدر عنه وميض أخضر إذا ما سلط عليه ضوء أزرق.

وكما ذكرنا من قبل فإن حمض m-RNA فى البكتيريا خال من الإنترونات، وبالتالى فالبكتيريا تفتقد إلى آلية التعامل مع الإنترونات، وطالما أن الجينات المنقولة إليها بغرض الكلونة هى جينات حقيقيات النواة، فإن الأمر يستلزم من العلماء التدخل لحذف الإنترونات القيام بعملية الترجمة.

وتعرف عملية إدخال الجين اعتمادًا على نواقل حمض DNA باسم infection، بينما يعرف إدخال المادة الوراثية بطرق فيزيائية مثل الحقن الدقيق microinjection والقذائف البيولوجية biolistics (biological ballistic)، والاختراق الكهربى electroporation، والليبوسومات liposomes باسم Transfection.