الأساس الجزيئى للطفور وطرق إصلاح أخطاء التناسخ

حيث أن أمكانات نمو وتمايز أى كائن تتحدد بما يحتويه جينومة من الجينات ، لذلك فإنه يتحتم أن يحدث تغير (طفور) فى المادة الوراثية د ن أ لملائمة تطور الكائنات مع البيئة المحيطة بها . الا أنه من المعروف أن التغيرات التطورية عادة تكون نادرة الحدوث . لهذا يتميز جزئ د ن أ بالثبات والاستقرار أثناء تخزينه وتناسخه فى الخلية علي مدى الأجيال . حيث أن ذلك من شأنه المحافظة على بقاء الكائنات ونموها . ان المحتوى الجينى للخلية يترجم عادة الى آلاف من البروتينات المختلفة والتى قد يؤدى أى تغير فى أى منها الى آثار ضارة بالخلية والكائن نفسه . وعلى ذلك فان على الخلية أن تقابل تحد من شقين :

الأول : لابد أن تكون النظم الأنزيمية الخاصة بتناسخ د ن أ فيها دقيقة جدا .

الثانى : أن يكون بمقدور الخلية استنباط نظم دقيقة لاصلاح الأخطاء العارضة التى قد تحدث فى جزئ د ن أ أثناء حفظه أو تناسخه .

ان جزئ د ن أ عبارة عن مركب عضوى معقد ذو قدرة محدودة على الثبات حيث أنه لايعانى فقط من الاتلاف التلقائى المتمثل فى فقدان بعض القواعد النتروجينية بل أنه معرض أيضا للهجمات الموجهة اليه من الكيماويات الطبيعية (وغير الطبيعية) والاشعاع الذى قد يحطم هيكله الأساسى أو يحدث تغيرا كيماويا فى قواعده . معروف أن الطفرات تنشأ بصفة عامة عندما يؤدى التلف الحادث الى تغيير فى الخواص الشفرية للقواعد . ونظرا لأن قدرة الكائن على احتمال أو مقاومة المعدل الطبيعى للتلف فى المادة الوراثية محدودة ، فلابد أن تتواجد فى

الخلية ميكانيكيات انزيمية تخصصية لاصلاح الأماكن التالفة فى جزئ د ن أ تخصص البكتيريا وغيرها من الكائنات نسبة لابأس بها من جينومها لانتاج وتنظيم عمل النظم الانزيمية الاصلاحية بها .

طبيعة الطفرات :

تتضمن الطفرات التلقائية معظم التغيرات التى قد تحدث فى تتابعات القواعد فى جـزئ د ن أ إذ نجد أن بعض الطفرات قد يكون لها تأثير طفيف على الناتج النهائى للجين مثل طفرات الحساسية للحرارة Temperature - sensitive التى تنتج عادة من تغير قاعدة بأخرى.

الا أن كثير من الطفرات التلقائية قد تقضى على وظيفة الجين تماما . مثل هذه الطفرات المدمرة والتى يطلق عليها « الطفرات اللاغية » null mutations لاتقتصر فقط على تبديل قواعد أو اضافة أو حذف قاعدة ما ولكنها تشمل اضافات أو اقتضابات كبيرة الحجم نسبيا كما قد تتضمن اعادة ترتيب بعض أجزاء الكروموسوم .

طفرات تغير القاعدة الواحدة Single base mutation :

يعد هذا النوع من الطفرات من أبسط أنواع الطفرات . وترجع اهميتها الى أن حدوث تغير فى قاعدة واحدة بما ينتج عنه من تغير فى أحد البروتينات يعكس دقة تناسخ جزئ د ن أ كما أن هناك العديد من الطفرات الهامة تعطى تأثيرها عن طريق احداث تغييرا فى قاعدة واحدة ، هذا بالاضافة الى أن طفرات تغير القاعدة الواحدة تعتبر حرجة وضرورية بالنسبة للتطور لأنها تقوم بتغيير الجينات تدريجيا وبطرق غير حادة وطفيفة بحيث تنتج تباين وراثى مفيد للكائن .

يمكن متابعة أنواع طفرات القاعدة الواحدة التلقائية عن طريق دراسة طفرات ايقاف الترجمة translation stop codon . ففى الجين المنظم لانتاج اللاكتوز والذى يدخل ضمن مكونات أوبرون اللاكتوز فى بكتريا القولون Lactose operon (I) والمسئول عن انتاج البروتين المثبط Repressor لنشاط أوبرون اللاكتوز (وسوف نتناول ذلك بالتفصيل فيما بعد) امكن اثبات أن هذه الطفرات ناتجة عن تغيرات فى قواعد مفردة فى بعض الشفرات الثلاثية التى كانت متطابقة فى الأصل مع شفرة إيقاف النسخ (nonsense) وذلك فى اثنتان من ثلاث

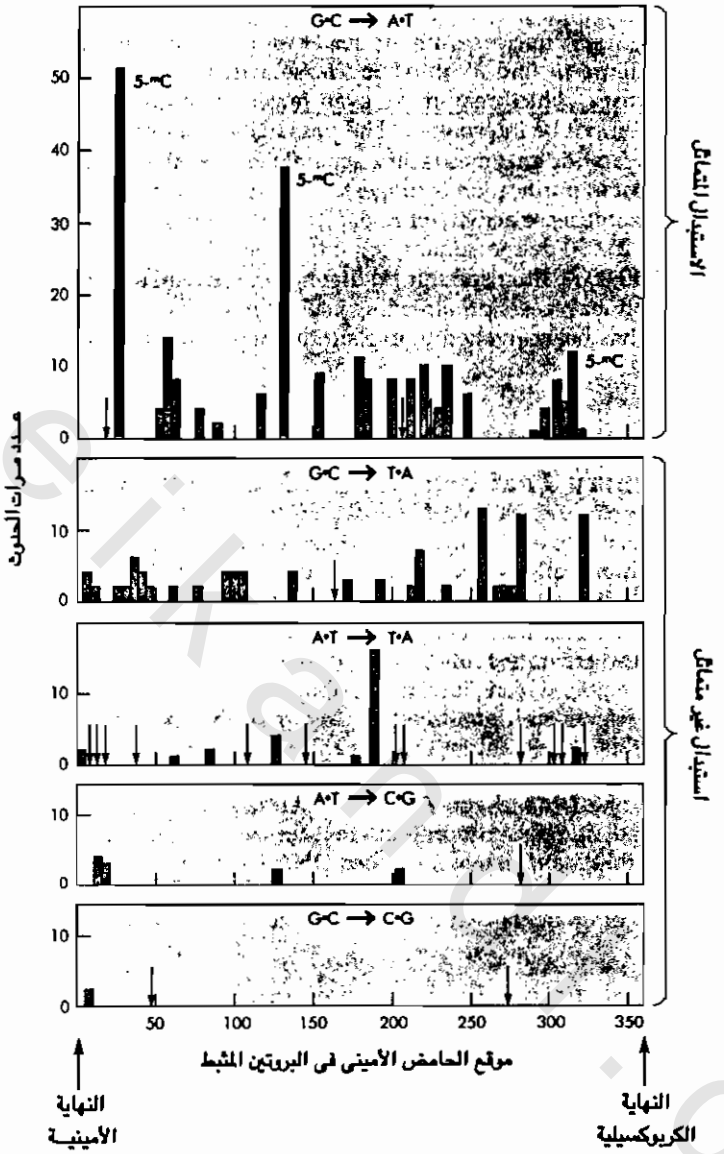
مواضع للقواعد . كما أمكن اثبات أن المثبط الفعال ينتج مرة أخرى من الجين الطافر فى الخلية المحتوية على جين كابت suppressor (وهو ذلك الجين الذى يسمح بترجمة شفرة الايقاف على أنها شفرة لأحد الأحماض الأمينية (missense) وبذلك تستمر عملية النسخ وبالتالى الترجمة إلى البروتين المعين) .

أظهرت هذه التجارب والتحليلات أن بالامكان الحصول على جميع أنواع التغيرات فى القواعد فى تتابع جزئ د ن أ فمثلا طفرة الاستبدال المتماثل transition تنتج عندما تحل قاعدة بيورينية محل أخرى من نفس المجموعة (A ↔ G) أو تحل قاعدة بيريميدينية محل أخرى بيريميدينيـــة (C ↔ T) ونحصل على طفرة الاستبدال المغاير transversion عندما تستبدل قاعدة بيورينية بقاعدة بيرميدينية أو العكس كما فى الشكل (٤-١) .

تبين أن هناك اختلاف فى معدل الطفور بين المواقع المختلفة التى يمكن أن يحدث بها طفور حيث ظهر أن هناك « مواقع ساخنة » (hot spots) يحدث بها الطفور بمعدل أعلى بكثير عما فى باقى المواقع الأخرى .

تكون تغيرات القواعد المفردة عادة من النوع العكسى reversible ويكون معدل الطفرة الرجعية back mutation الى القاعدة الأصلية الطبيعية مماثلا فى المقدار لمعدل التغير الى القاعدة الطافرة . تمثل هذه الحقيقة فرقا جوهريا للتمييز بين تغير القاعدة المفردة والتغيرات الأكثر شدة مثل الاقتضابات الكبيرة deletions التى لايمكن أن تسترجع بالطفور العكسى . وهناك حالة وسطية تتم فى حالة اضافة insertion or addition أو حذف deletion لقاعدة واحدة إذ قد يحدث هنا طفور عكسى ولكن بمعدل أقل بكثير عما فى حالة تغير القاعدة المفردة (طفرات الاستبدال) .

تمثل معظم حالات طفرات الاستبدال هذه حالات فشل نادرة فى عملية تناسخ د ن أ وذلك عندما يحدث اضافة النيوكلتيدة غير الصحيحة الى السلسلة النامية على الرغم من أنها لاتتزاوج طبيعيا مع القاعدة المقابلة على القالب .



الشكل (٤-١):

توزيع أنواع الطفرات التلقائية التى تؤدى الى احداث كودون التوقف فى جين المنظم المنتج للبروتين المثبط لأوبرون اللاكتوز . ويتبين هنا الأنواع الأربعة لطفرات الاستبدال غير المتماثل Transversion وواحدة من النوعين المحتملين لطفرة الاستبدال المتماثل Transition . والتجارب الأخرى تبين أن الاستبدال الآخر المتماثل (AT → GC) يمكن أن يحدث أيضا تلقائيا . تدل الأسهم الرأسية على مواقع الطفرات المحتملة . السيتوسين المميثل (5 me-C) تعتبر مواقع ساخنة للطفور .

معدل الخطأ عند اضافة النيوكلتيدات أثناء عملية التناسخ :

حيث أن نظام Lac I يكشف حالات طفور القاعدة الواحدة فى أى من ٨٠ موقع محدد فإنه يصبح من اليسير حساب معدل ظهور كل طفرة عند تناسخ د ن أ وبالتالى المعدل الذى يخطئ فيه نظام التناسخ فى كل موقع . وجد أن متوسط معدل الخطأ هذا لجميع المواقع الثمانين يكون حوالى $١٠^{-٩}$ لكل دورة تناسخ . ولكن لو أخذنا فى الاعتبار أن البقع الساخنة تعطى طافرات بمعدل يزيد ٢٥ ضعف عن المعدل المتوسط فى حين توجد مواقع أخرى تعطى معدل للطفور أقل بحوالى ٢٥ ضعف عن المتوسط . كما ظهر من حساب طفرات الاستبدال فى مواقع معينة فإن معدل الخطأ بصفة عامة يتراوح بين $١٠^{-٧}$ الى $١٠^{-١١}$ لكل عملية تناسخ.

طرق التحكم فى مستويات الطفور :

قد يبدو للوهلة الأولى أن تكرار الأخطاء يعكس مباشرة مدى الدقة الموروثة فى تزاوج القواعد AT , GC إلا أنه عندما يتعين على انزيم بلمرة د ن أ أن يقوم باضافة ٩١٠ نيوكلتيده مثلا فإنه من المتوقع أن يحدث خطأ نادر فى تزاوج قاعدة أو عدد قليل من القواعد أثناء التناسخ . بالاضافة الى ما يمكن أن يحدثه التغير فى صور التناظر بين القواعد من حدوث تزاوجات خاطئة يصل معدلها أحيانا الى $١٠^{-٤}$ وهو أعلى بكثير من التكرار الفعلى للطفرة التلقائية . أمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق نشاط انزيم بلمرة د ن أ فى تصحيح الأخطاء Proofreading أو المراجعة والتى سبق الاشارة اليها . حيث يؤدى نشاط الهدم الطرفى 5' → 3' Exonuclease الموجود ضمن وظائف انزيمات البلمرة الى ازالة القواعد المضافة بالخطأ الى النهاية النامية للسلسلة الجديدة أولا بأول .

أثبتت دراسات على جزيئات انزيمات البلمرة الطافرة أن معدل الطفور قد يكون محكوما بالعلاقة بين معدل نشاط الهدم الطرفى الخلفى (5' → 3') ومعدل نشاط البناء (3' → 5') بمعنى أنه اذا انخفضت كفاءة النشاط الهدمى الطرفى (5' → 3') ارتفع معدل الطفور بدرجة كبيرة وغير عادية . من جهة أخرى ، اذا ارتفعت كفاءة نشاط الهدم الطرفى (3' → 5') فسيؤدى ذلك الى انخفاض حاد فى معدل الطفور . وعلى الرغم من وجود نظام تصحيح أخطاء التناسخ proofreading فى البكتريا وغير مميزة النواة الا أن وجود هذا النظام فى مميزة النواة لم يتحقق بعد .

الجينات المطفرة Mutators :

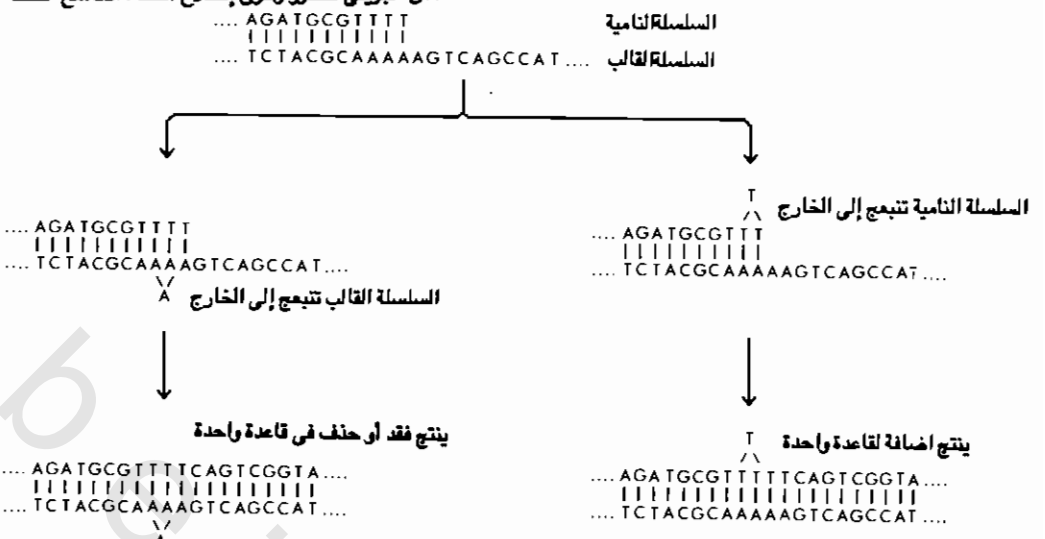
توجد فى البكتريا بعض الطفرات التى تكون وظيفتها زيادة معدل الطفور فى جينات أخرى ويطلق عليها mutators . وعموما فإن هذه الجينات المطفرة تحدث زيادة فى معدل الطفور فى جميع الجينات التى تمت دراستها وبالتالى فلابد أنها تؤثر على البروتينات التى تدخل ضمن ماكينة التناسخ . من أفضل الجينات المطفرة المعروفة فى بكتريا القولون الجين Mut D الذى يؤدى نشاطه الى حدوث تغيير فى الوحدة E فى انزيم بلمرة د ن أ DNA Pol III مما يؤدى الى انخفاض معدل الهدم الطرفى 5' → 3' وتقل كفاءة الانزيم فى التعرف على وازالة القاعدة غير الصحيحة التى تضاف الى النهاية النامية لسلسلة د ن أ.

كما أن الجينات المطفرة Mut H و Mut L و Mut S تتدخل فى تركيب ونشاط نوعيات البروتينات التى تعمل فى اصلاح أخطاء التزاوج بين القواعد . وهى العملية التى يقوم أثناءها انزيم بلمرة د ن أ بعملية مسح scanning لجزئ د ن أ الحديث البناء لاكتشاف القواعد المضافة بالخطأ وتصحيحها .

نتائج أخطاء الإنزلاق Slippage errors أثناء التناسخ :

إن أخطاء التناسخ بواسطة انزيم بلمرة د ن أ لاتكون عادة مقصورة على تغيرات فى زوج واحد من القواعد اذ يحتمل أن يتم حذف أو اضافة واحد أو عدد قليل من أزواج القواعد كنتيجة لحدوث إزاحة للقواعد « الانبعاج للخارج » (Looping out) سواء فى السلسلة القالب (معطية اقتضاب أو حذف) أو فى السلسلة الجديدة النامية (معطية إضافة) . تحدث هذه الأخطاء بصفة خاصة عند وجود تتابعات لقواعد مترادفة فى جزئ د ن أ ويمكن بهذا الجزء المنبعج (المنزلق) أن يستقر بالتزاوج الطبيعى بين القواعد فى المنطقة التى تلى القاعدة غير المتزاوجة كما فى الشكل (٤-٢) .

عندما يجيئ الدور على جزئ د ن أ المحتوى على هذا الخطأ لكى يعمل كقالب فإن الاقتضاب أو الاضافة سيتم نسخها بدقة مما يؤدى فى النهاية الى تثبيت الطفرة . تؤدى الطفرة الناتجة عن إضافة أو اقتضاب زوج واحد أو عدد قليل من أزواج القواعد الى تغير أطار القراءة داخل بعض التتابعات الشفرية للبروتين مسببة إخلال كامل فى عملية بناء ذلك البروتين . وتسمى هذه الطفرة طفرة تحرك الإطار frame shift mutation .



الشكل (٤-٢)،

يحدث اضافات أو حذف بسبب الإزاحة (الخطأ) عند النهاية النامية للتناسخ .

الطفرات الناتجة عن تغيرات كبيرة نسبيا فى تتابعات القواعد :

توجد كثير من الطفرات التى يرتفع فيها عدد القواعد المتغيرة بحيث تشمل اعادة ترتيب كبيرة فى تتابعات هذه القواعد . وتوجد هذه التغيرات فى الطفرات المسئولة عن تدمير وظيفة ونشاط الجين . يمكن اقتطاع أجزاء كبيرة من د ن أ والتى قد تصل الى آلاف النيوكلتيدات من خلال عملية غير طبيعية لنشاط انزيمات الاتحادات الجديدة أثناء عملية العبور أو نتيجة لحدوث أخطاء فى عملية تناسخ سلسلة د ن أ القالب .

من جهة أخرى يمكن لبعض أجزاء جزئ د ن أ أن تنقلب Inverted من خلال عملية تكوين الاتحادات الجديدة داخل جزئ د ن أ أو قد يحدث تبادل بين أجزاء من الكروموسومات غير المتناظرة فى مميزة النواة بحيث يترتب على ذلك أن الجينات القريبة من مكان التبادل لايتسنى تنظيمها بدقة .

وحيث أن الكروموسومات تتميز بالثبات فى تركيبها فان التغيرات الكروموسومية لابد أن تمثل حوادث نادرة .

أهمية دراسة المطفرات الكيماوية :

لاشك أن المطفرات الكيماوية تؤدى الى زيادة هائلة فى معدل حدوث الطفرات مما يعنى أنها تتدخل بطريقة مباشرة فى مسارات تناسخ د ن أ بالخلية . لذلك يُفيد استحداث طافرات بمطفرات معينة فى دراسة أهمية كل من بروتينات ماكينة التناسخ فى عملية بناء د ن أ كما أن المطفرات الطبيعية تؤثر على جميع الكائنات بما فيها الانسان .

تمتلك البكتريا والفيروس نظم وراثية خاصة يمكن استخدامها بكفاءة فى دراسة ميكانيكية عمل عدد كبير من المطفرات كما أنها تقدم طرق مباشرة وسهلة نسبيا لاختبار مدى قدرة أى مادة كيماوية على إحداث الطفور (مطفر كيماوى) بحيث يمكن تجنب استخدامه واستبعاده أو اتخاذ الاحتياطات عند استخدامه .

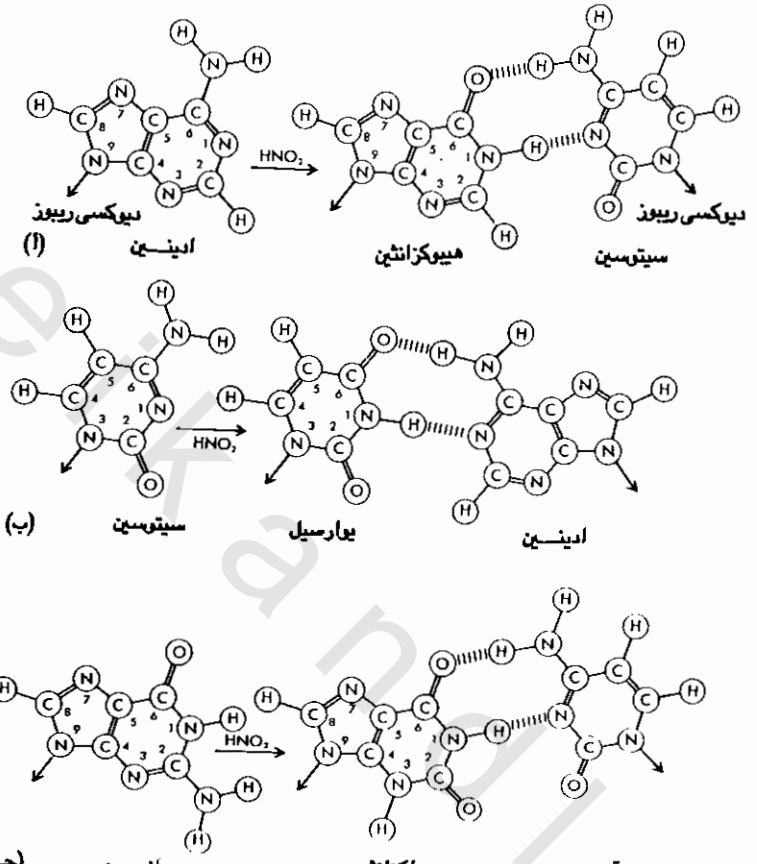
تعمل المطفرات اما بطريقة مباشرة على جزئ د ن أ لتغيير خواص القالب أو عن طريق تخريب عملية التناسخ بحيث تؤدى الى اضافة القاعدة الخطأ .

تتفاعل الكيماويات النشطة مع د ن أ DNA-reactive chemicals مثل حامض النيتروز (HNO_2) أو ناقلات الألكيل أو المؤلكلة Alkylating agents مثل ميثيل نيتروزو جوانيدين methyl nitrosoguanidine مباشرة مع د ن أ بحيث تؤثر على القواعد فتغيرها الى تراكيب كيماوية جديدة . وهذه التراكيب الجديدة (القواعد الجديدة) تتزاوج غالبا بطرق مختلفة عن القواعد الأصلية المشتقة منها . أى أن المطفر قد أدى فى النهاية الى تغيير فى التتابع الشفرى لجزئ د ن أ(الشكل ٤-٣) .

الا أن بعض القواعد المشتقة لايمكنها أن تتزاوج بالمرة . ويؤدى التلف أحيانا الى ازالة القاعدة نهائيا من الهيكل الأساسى لجزئ د ن أ كما فى الشكل رقم (٤-٤) ، فى هذه الحالة تنشأ الطفرة عندما تحاول ماكينة التناسخ اصلاح الضرر الذى تعرض له جزئ د ن أ بطرق خاصة بحيث تؤدى ميكانيكية الاصلاح نفسها الى احداث طفرات فيما يعرف بالاصلاح القابل للخطأ Error-Prone Repair كما سيأتى بعد .

توجد مجموعة أخرى من المطفرات تسمى مشابهات القواعد Base analogs والتى يؤدى تشابهها مع القواعد الطبيعية الى اضافتها بالخطأ كما لو كانت نيوكلتيدات ثلاثية الفوسفات

فى سلسلة د ن أ أثناء التناسخ الطبيعى . الا أن تركيبها الشاذ يؤدى الى تزاوج بين القواعد بطريقة غير صحيحة وغير دقيقة مما يؤدى الى حدوث أخطاء متكررة أثناء عملية التناسخ .



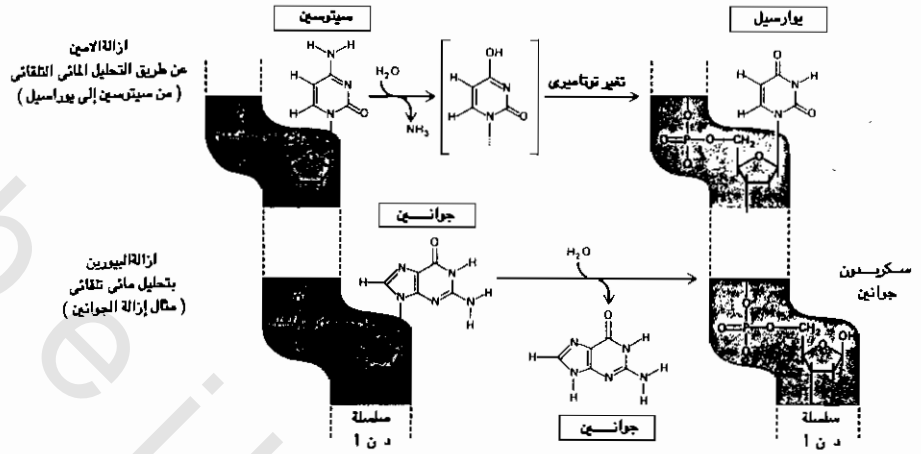
الشكل (٤-٣):

عملية ازالة مجموعة الأمين بالأكسدة فى قواعد جزئ د ن أ بواسطة حامض النيتروز وتأثيرها على تزاوج القواعد :

أ – يتحول الأدينين الى الهيبوكزانثين الذى يتزاوج مع السيتوسين بدلا من الثايمين .

ب – يتحول السيتوسين الى اليوراسيل الذى يرتبط بالادينين بدلا من الجوانين .

جـ – يتحول الجوانين الى الاكزانثين الذى يستمر فى الارتباط بالادينين ولكن برابطتين هيدروجينيتين فقط . لايحتوى الثايمين واليوراسيل لجزئ د ن أ على مجموعة أمينو لذلك لايحدث بهما تغير .



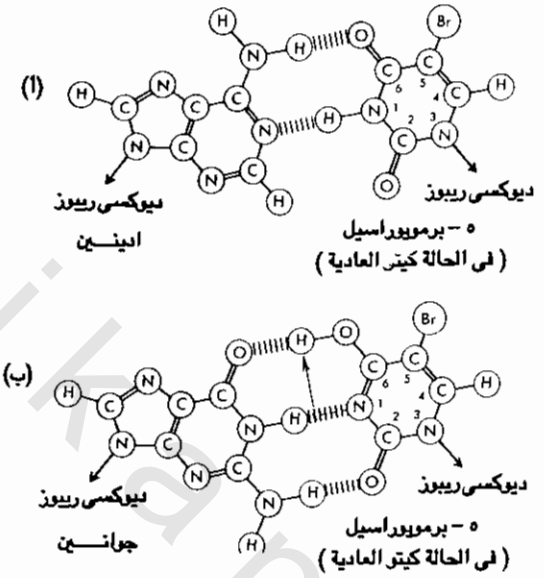
الشكل (٤-٤):

تفاعلان كيماويان يحدثان تلقائيا بكثرة ويؤديان الى احداث تلف خطير فى تركيب جزئ د ن أ فى الخلية ، وهما تفاعل ازالة مجموعة الأمين أو ازالة البيورين . ويمثل كل تفاعل بمثال نوعى .

ومن أمثلة أشباه القواعد ذات التأثير القوى فى احداث الطفرات مادة 5-bromouracil وهى مشابهة للقاعدة النيتروجينية الثايمين . يعتقد أن قدرتها الطفرية ترجع الى أن ذرة الهيدروجين فى الموقع رقم ١ بها ليست ثابتة بدرجة كافية مثل ذرة الهيدروجين المقابلة فى الثايمين بحيث يحدث أحيانا لهذه الذرة أن ترتبط بذرة الاكسوجين المتصلة بذرة الكربون رقم 6 (الشكل ٤-٥) مما يؤدى الى تزاوج البروموويوراسيل مع الجوانين .

توجد مجموعة ثالثة من المطفرات الكيماوية تشمل مطفرات تحريك الاطار frame shift mutagens مثل البروفلافين Proflavin الذى يحدث إقتضاب أو حذف أو إضافة لقاعدة واحدة أو أحيانا لعدد قليل من القواعد . تتميز مطفرات تحريك الاطار بأن جزيئاتها مفلطحة ومتعددة الحلقات Polycyclic مما يمكنها من الارتباط بالأسطح المفلطحة للقواعد بطريقة مماثلة لقوى التراص بين القواعد فى الحلزون المزدوج . قد تعمل هذه المطفرات أيضا عن طريق الارتباط

بالقواعد المنبعجة الى الخارج Looping-out إما فى سلسلة د ن أ القالب أو السلسلة الجديدة أثناء عملية بناء الجزئ مما يؤدى الى تثبيت العروات المنبعجة بحيث تتزايد فرصة حدوث طفرات فى المنطقة المزاحة .



الشكل (٤- ٥):

نتائج تزاوج ٥– بروموبوراسيل مع القواعد :

(أ) فى الحالة الكيتو العادية فى وجود ذرة هيدروجين فى الموقع (N) يرتبط البروموبوراسيل بالأدينين .

(ب) فى الحالة الاينول النادرة فإن التحرك التوتاميرى لذرة الهيدروجين هذه يحدد التزاوج النوعى مع الجوانين.

ميكانيكيات اصلاح الأخطاء فى د ن أ :

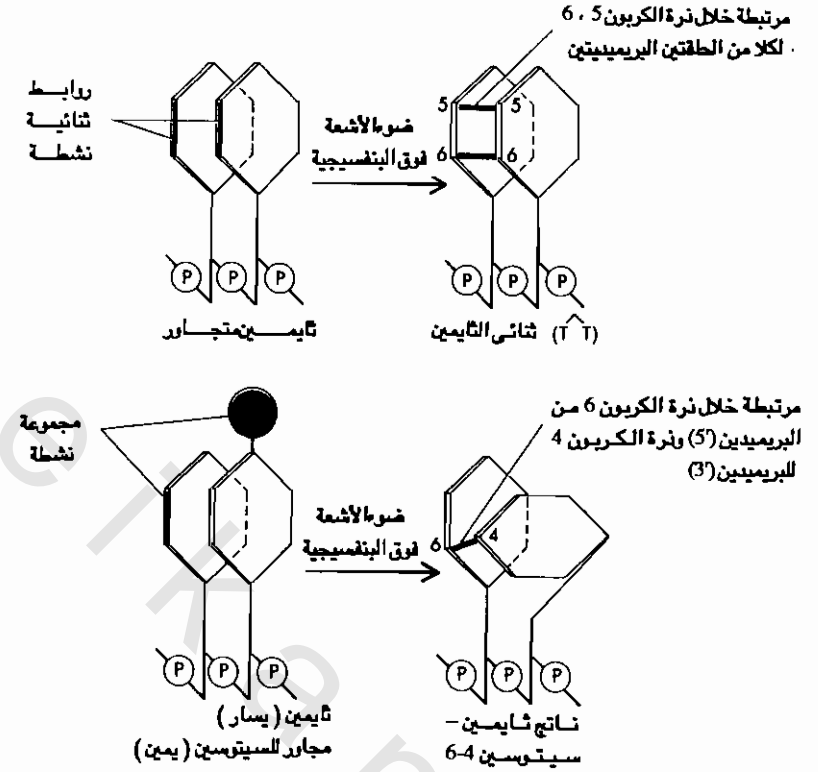
يمكن للطفرة أن تستمر وتبقى عندما يكون التغير الوراثى الذى أحدثته ليس ضارا أو فى حالات نادرة عندما يكون مفيدا ولكن غالبية الطفرات تكون ضارة ومدمرة ولاتقوى الخلية على احتمالها ولذلك لابد من توفر ميكانيكيات انزيمية متخصصة لاصلاح ما أفسدته التغيرات الطارئة .

سبق الاشارة الى أن بعض القواعد قد تزال منها مجموعات معينة ومثال ذلك ما يحدث لقاعدة السيتوسين عندما تحدث ازالة تلقائية لمجموعة الأمين بها deamination (الشكل ٤-٤) بحيث تتحول الى يوراسيل الذى يتزاوج فى د ن أ مثل الثايمين مما يؤدى الى تحول زوج القواعد GC لكى يصبح AT عند تناسخ د ن أ وإذا لم يحدث تصحيح سريع لهذه التغيرات فإن قاعدة سيتوسين من كل ١٠٠٠ قاعدة فى الجينوم البشرى يمكن أن تتحول الى يوراسيل فى فترة حياة الانسان مما يعنى ارتفاع معدل الطفور الى مستويات لاتحتمل .

كما أن هناك نوع آخر من التغيرات أشد خطورة مثل ذلك الذى يؤدى الى كسر فى الهيكل الأساسى للجزئ (Sugar / phosphate) أو الذى يحدث تغيرا كبيرا جدا فى أحد القواعد لدرجة أنها تفقد أى شبه أو صلة بأى قاعدة نتروجينية تماما .

طبيعى أن مثل هذه التغيرات الشديدة تحول دون الحصول على التعبير الصحيح للجين بالاضافة الى أنها تمنع استمرار عملية تناسخ د ن أ حيث أن انزيم بلمرة د ن أ يتوقف عن البناء عندما يصل الى تزاوج قواعد خاطئ . وفضلا عن ذلك فان انكسار الهيكل الأساسى يجعل السلسلة غير صالحة للعمل كقالب .

من التغيرات النموذجية التى تمنع تزاوج القواعد تكون ثنائى بيريميدينى Pyrimidine dimer . وجد أن الأشعة فوق البنفسجية (200 nm) تمتص بشدة بالقواعد ويترتب على ذلك تفاعل كيماوى ضوئى Photochemical يؤدى الى الاتحاد بين قاعدتين بيريميدينتين متجاورتين فى تراكيب غير قابلة للتزاوج مثل ثنائى الثايمين كما فى الشكل (٤-٦) . يمكن لجزيئات د ن أ فى خلايا الجلد المعرضة لأشعة الشمس العادية على سبيل المثال أن تكتسب الآلاف من هذه الثنائيات فى اليوم الواحد . واذا لم يتم التخلص منها بانزيمات الاصلاح المناسبة فى الخلية ينشأ مرض جلدى يسمى الجفاف الجلدى الملون Xyroderma pigmentosa الناتج عن خلل وراثى فى الانزيمات المسئولة عن فك الثنائيات وغيرها من الأخطاء التى تحدث بفعل الأشعة فوق البنفسجية . ويؤدى المكون فوق البنفسجى من أشعة الشمس الى حدوث نسبة عالية من موت وضمور خلايا الجلد ويتسبب فى نمو خلايا سرطانية عديدة فى الأفراد المصابين (شكل ٤-٧) .



الشكل (٤-٦) :

تكوين ثنائيات البريميدين الناتجة عن التفاعل الضوئى عند التعرض للأشعة فوق البنفسجية .

بعض الانزيمات المتخصصة فى اصلاح أخطاء د ن أ :

على الرغم من أن معظم التلف فى جزى د ن أ يكون خطيرا وغير قابل للإصلاح إلا أنه يوجد نوعين شائعين من هذه الأضرار أو الأخطاء التى يمكن اصلاحها مباشرة بواسطة انزيمات متخصصة تقوم بعملية عكسية تمحو بها أثر التغير المتلف . فمثلا نجد أن ثنائيات البريميدين تكون هدفا لانزيم الفوتوليز Photolyse الذى يرتبط بهذه الثنائيات ويساعد على حدوث تفاعل ضوئى كيماوى آخر مستخدما فى هذه الحالة الضوء العادى مما يؤدى الى فك ارتباط الثنائيات وتحويلها الى قواعد بيريميدينية مفردة عادية وتسمى هذه العملية التفاعل التنشيطى الضوئى Photoreactivation .

الشكل (٤-٧):

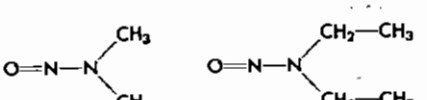
التأثيرات المظهرية للمرض الوراثي Xeroderma pigmentosum الأفراد الحاملة لهذا المرض تحتوى على أورام جلدية بعد التعرض لضوء الشمس . الأفراد الأصيلة للطفرات الجسمية المتنحية المسئولة عن هذا المرض تكون أقل فعالية فى إصلاح الاخطاء فى DNA الناتجة عن التعرض لضوء الأشعة فوق البنفسجية .

ينتج النوع الثانى من التلف أو الضرر فى جزئ د ن أ من عملية نقل الالكيل Alkylation حيث تنتقل مجموعة ميثيل أو إيثيل الى مواقع نشطة فى القواعد أو الى الفوسفات فى الهيكل الأساسى للجزئ . تشمل الكيماويات المؤلكلة نيتروزامين Nitrosamine والمطفر الكيماوى الفعال ميثيل نتروز جوانيدين Methyl-1-nitrosoguanidine (الشكل ٤-٨) .

من أكثر القواعد حساسية لعملية نقل الألكيل قاعدة الجوانين التى تتعرض لنقل مجموعة ميثيل Methylation فى ذرة الاوكسوجين المرتبطة بذرة الكربون رقم ٦ وينتج المركب O^6-methylguanine الذى يخطئ كثيرا فى التزاوج بحيث يتزاوج مع الثايمين مما يؤدى الى تغير الزوج GC الى AT عند تناسخ د ن أ كما فى الشكل (٤-٩) . يلاحظ أنه رغم أن

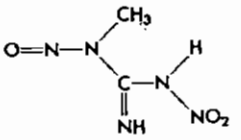
النتيجة واحدة الا أن الاختلال الحادث هنا ينتج عن عملية Methylation فى حين أن نفس النتيجة تحدث عندما يتم ازالة مجموعة الأمين Deamination من قاعدة السيتوسين (كما سبق الاشارة) .

نيتروسـامين



ثنائى ميثيل نيتروسامين ثنائى ايثيل نيتروسامين

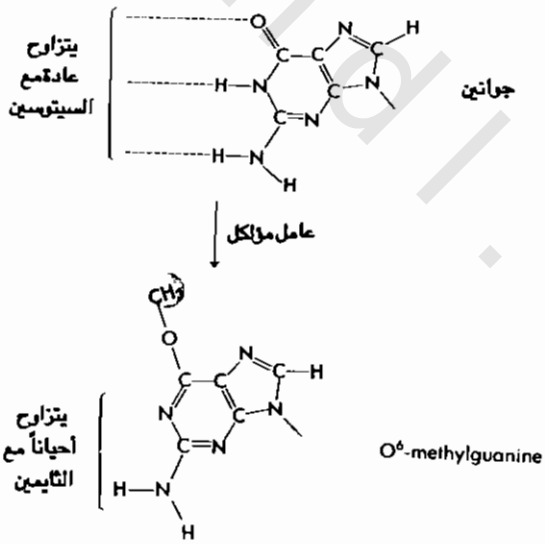
نيتروسوجوانيـدين



ن – ميثيل – ن – نيترو – ن – نيتروسوجوانيدين

الشكل (٤-٨):

بعض المطفرات المؤلكلة . تظهر مجموعات الألكيل النشطة مظللة .



الشكل (٤-٩):

تفاعل الجوانين بعامل مؤلكل لتكوين O^6-methylguanine .

تتم ازالة هذا الخطأ أو الضرر بفعل انزيم O^6-methylguanine methyltransferase الذى يتحكم فى انتاجه الجين (ada) . يتعرف هذا الانزيم على O^6-methylguanine فى الحلزون ويقوم بازالة مجموعة الميثيل عن طريق نقلها الى أحد الأحماض الأمينية الموجودة ضمن تركيب بروتينات الانزيم نفسه ومن المحتمل أن هذا الانزيم ينشط أيضا فى ازالة مجاميع الميثيل من الهيكل الفوسفاتى لجزئ د ن أ تجدر الاشارة هنا الى أن جزئ الانزيم الذى يشترك فى مثل هذا التفاعل لايستعيد نشاطه فى ازالة الميثيل مرة أخرى نظرا لبقاء مجموعة الميثيل فى تركيبه نفسه بعد انتهاء التفاعل مما يعنى أنه يلزم استهلاك جزئ انزيم جديد كل مرة لإزالة مجموعة ميثيل واحدة .

عند تعريض بكتريا القولون النامية لتركيز منخفض وغير ضار من النيتروزوجواندين فإنها تصبح بعد المعاملة أكثر مقاومة للتأثير المطفر والسام لهذه المادة . يطلق على هذه المقاومة المستحدثة الاستجابة التكيفية Adaptive response وهى تنتج من ارتفاع مقداره الف ضعف فى محتوى الخلية من انزيم O^6-methylguanine methyltransferase يصاحبه استبداء فى انزيم Glycosylase الذى يزيل القواعد المؤلكلة من الهيكل الأساسى لجزئ د.ن.أ. يتم وقف استبداء كلا من الانزيمين بطفرات فى الجين ada مما يشير الى أن نواتج هذا الجين عبارة عن انزيم الترانسفيريز ومنظم موجب للجين نفسه ولانزيم الجليكوسيليز .

أهمية السلسلة المكملة فى عملية الاصلاح :

ان تركيب جزئ د ن أ من سلسلتين متكاملتين هو الذى يسمح بإصلاح معظم الأخطاء فى د ن أ بغض النظر عن طبيعة التغير الكيماوى المصاحب للتلف . إذ أن فقد بعض المعلومات الوراثية من أحد السلسلتين يمكن تعويضه بنسخ هذه المعلومات نفسها من السلسلة المكملة لتجديد المنطقة التى حدث بها التلف . ينطبق هذا بصفة خاصة اذا اقتصر التلف على قاعدة واحدة فى احدى السلسلتين المتكاملتين .

توجد مسارات متعددة للاصلاح بالاستئصال Excision repair أو الحذف التى يتم فيها ازالة قاعدة تالفة أو قطعة خاطئة من الهيكل الأساسى . تؤدى جميع هذه المسارات الى نفس النواتج الوسطية حيث يحدث كسر أو فجوة فى سلسلة احادية من د ن أ فى موقع الضرر مما يهيئ نهاية 3' OH حره تمكن انزيم بلمرة د ن أ DNA polymerase من بدء البناء لتتابع

جديد يحل محل الجزء التالف معتمدا فى ذلك على التتابع المقابل فى السلسلة المكملة التى لم يلحقها أى ضرر .

تبين أن الخلايا الطافرة للجين المسئول عن إنتاج إنزيم البلمرة DNA polI تكون كفاءتها فى الإصلاح بالاستئصال منخفضة جداً مما يؤكد أن هذا الإنزيم هو الذى يقوم بالدور الأساسى فى هذا النوع من الإصلاح حيث أنه يكون بالكثرة والسرعة اللازمة لملئ الفراغات أو الفجوات الصغيرة بكفاءة فى المناطق التالفة المنتشرة على الجزئ والتى يستدعى الأمر إصلاحها بسرعة . فى حين نجد أن إنزيم البلمرة DNA Pol III ولو أن به نشاط exonuclease 3' --> 5' إلا أنه نظراً لكبر حجمه وتعقيده ولضرورة أن يظل مرتبطاً بشوكة التناسخ النامية لفترة طويلة ووجوده بعدد قليل نسبياً من النسخ فى الخلية فإنه لا يقوم عادة بهذا الدور .

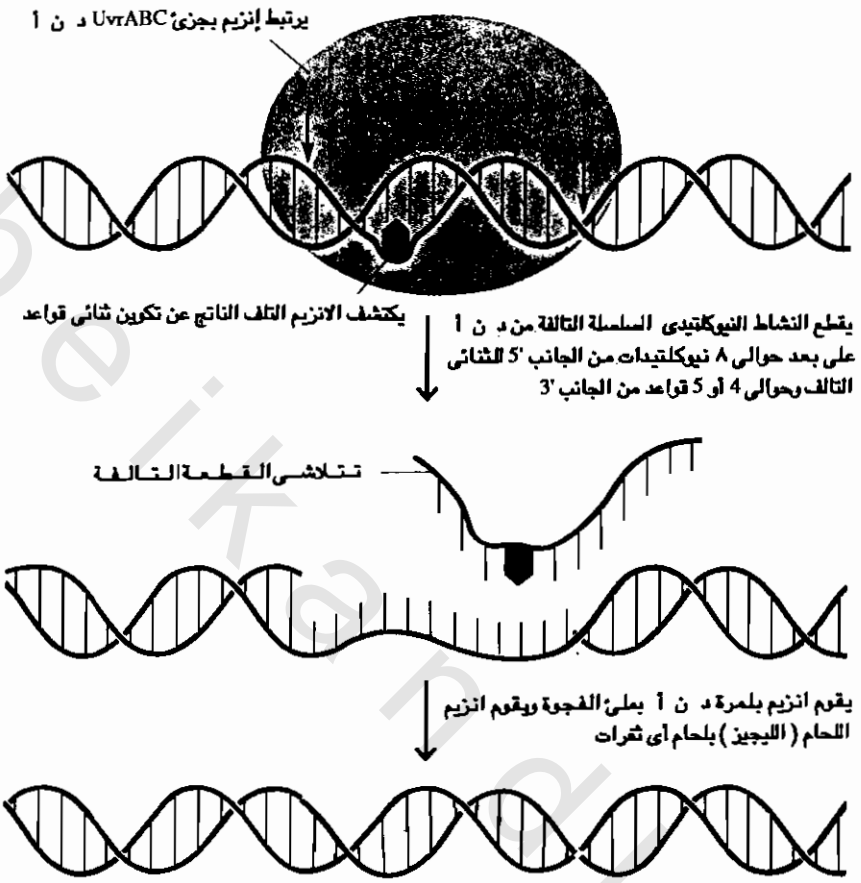
والإنزيم الآخر الهام فى هذه العملية هو إنزيم الليجيز (اللحام) DNA Ligase الذى يقوم بلحام الأجزاء ببعضها بعد أن ينتهى إنزيم البلمرة من عمله .

دور أنزيم Uvr ABC endonuclease فى الإصلاح بالاستئصال Excision repair :

فى حالة الأخطاء الناتجة عن التعرض للأشعة فوق البنفسجية وجد أنه إلى جانب الطفرات التى تحدث فى الجين الخاص بانزيم الفوتوليز Phr والتى تؤدى إلى تعطيل عملية الإصلاح نجد فى بكتريا القولون أن الطفرات الحساسة للأشعة فوق البنفسجية (وبالتالى تفشل فى إصلاح هذا التلف) تحدث فى ثلاث مواقع وراثية uvrA, uvrB, uvrC وبعكس التنشيط الضوئى السابق الاشارة إليه نجد أن نظام الإصلاح الذى تشفر له هذه الجينات ليس مختصاً بإصلاح التلف الناتج من الأشعة فوق البنفسجية فقط ولكنه يتعرف على أى تلف شديد ينتج عنه تشويه فى الحلزون المزدوج للجزئ .

تشفر هذه الجينات الثلاثة لثلاث تحت وحدات Subunits منفصلة لإنزيم واحد وهو uvrABC nuclease يقوم بإزالة الجزء التالف من د ن أ عن طريق قطع السلسلة المحتوية على هذا التلف ، ويحدث ذلك بأن يقوم الإنزيم بعمل قطع على جانبى الجزء التالف مما يؤدى إلى أطلاق ١٢ قاعدة أوليجونيوكلتيديه محتوية على الجزء التالف ويتم ملئ الفجوة الناتجة

بانزيم البلمرة DNA PolI ثم تلحم بانزيم اللحام (الليجيز) كما فى الشكل (٤ – ١٠) .



الشكل (٤-١٠):

نظام الإصلاح بالاستئصال للثنائيات وبعض أنواع التلف الكبيرة وذلك بواسطة انزيمات uvr ABC .

اتضح حديثاً أن انزيم uvr ABC nuclease لا يتعرف على الجزء التالف مباشرة ولكنه يتعرف عليه من خلال الشكل غير الطبيعى لجزئ د ن أ ولكن كيف يتم ذلك :

تبين أن الكسرين اللذين يحدثهما الانزيم يحدثان على نفس الجانب من الحلزون بحيث يبعدان عن بعضهما بمسافة تزيد قليلاً عن دورة كاملة للحلزون فى حين أن التلف يكون أقرب

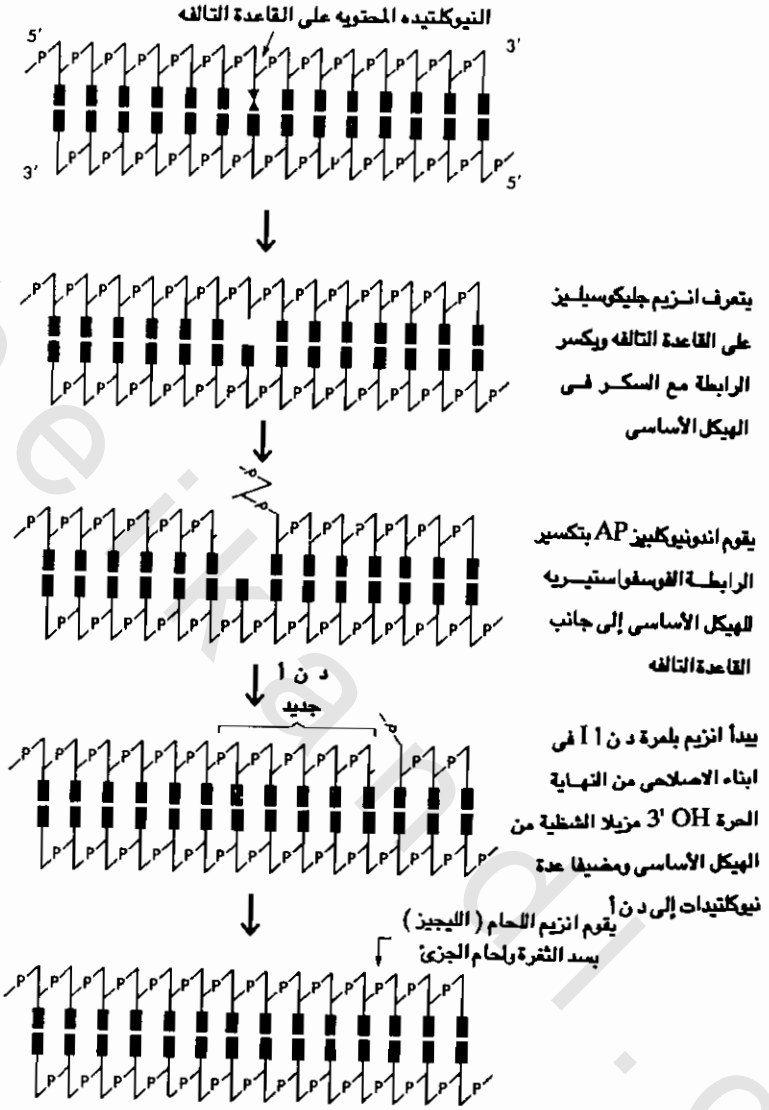
إلى الجهة الأخرى من الحلزون . من الممكن أنه لكى تقترب المواقع النشطة للانزيم بالحلزون فإنه يقوم باحاطة الحلزون لكي يلمس الجانب الاخر مما يؤدى إلى أن تكون المسافة 12 قاعدة.

دور انزيمات الجليكوسيليز Glycosylases فى الاصلاح بالاستئصال Excision Repair

توجد طريقة أخرى لإزالة القواعد التالفة حيث تقوم انزيمات الجليكوسليز بالتعرف على قاعدة واحدة غير صحيحة وإزالتها من الهيكل الأساسي لجزىء د ن أ تاركة ثغرة أو ثقب hole يطلق عليه موقع AP وهو اختصار لـ apurine (أى يفتقر إلى A أو G) أو apyrimidine (يفتقر إلى C أو T) ثم يتم التعرف على الثقب بواسطة انزيم AP endo-nuclease الذى يكسر الرابطة الفوسفواستيرية الثنائية فى الهيكل الأساسي تاركاً نهاية بادئه منها انزيم البلمرة Pol 1 DNA فى البناء لتعويض النيوكلتيدات المفقودة بالإضافة إلى بعض النيوكلتيدات المجاورة (الشكل ٤ ـ ١١).

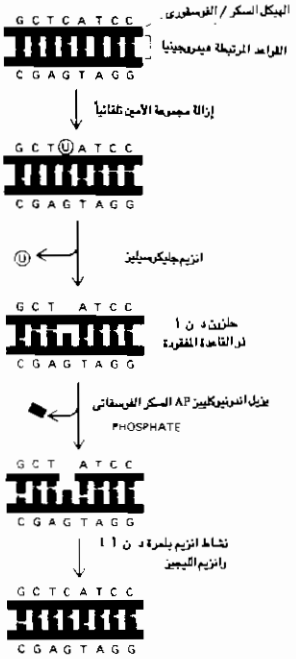
توجد عدة أنواع مختلفة من إنزيمات الجليكوسيليز يختص كل منها فى إزالة نوع معين من القواعد غير الطبيعية أو التالفة وعلى الأخص القواعد المميثله methylated bases . كما يقوم انزيم Uracil - DNA glycosylase بتصحيح الخطأ الناشئ عن عدم الثبات الطبيعى للسيتوسين حيث أنه يحدث أحياناً عملية نزع تلقائى لمجموعة الأمين من السيتوسين بمعدل منخفض جداً ليعطى يوراسيل . يتعرف الجليكوسيليز على اليوراسيل ويزيله مما يتيح الفرصة لإحلال C بانزيم البلمرة كما فى الشكل (٤ – ١٢) .

غير أن هذا النظام الإصلاحى يخفق أو يضعف بشكل ملحوظ إذا كان السيتوسين مميثل على ذرة الكربون رقم 5 كما يحدث مثلاً فى التتابعات المحمية من تأثير انزيمات (Restriction endonucleases) (كما سيأتى بعد) . يتزاوج السيتوسين المميثل على ذرة كربون 5 - methyl Cytosine طبيعياً أثناء تناسخ د ن أ ولا يمكن إزالته بانزيم glycosylase ولكن عملية إزالة مجموعة الأمين من السيتوسين ينتج عنها ثايمين وليس يوراسيل . وحيث أن الثايمين قاعدة طبيعية من قواعد د ن أ فإنه لا يمكن إزالتها بانزيم Uracil DNA glycosylase أو أى انزيم آخر (الشكل ٤ – ١٣) ولكنها تبقى وتتزاوج مع الادينين فى الجيل التالى للخلية مما يؤدى إلى حدوث الطفرة واستمرارها وعلى ذلك فإن 5 methylcytosine - يعتبر بقعه ساخنه للطفرة التلقائية .



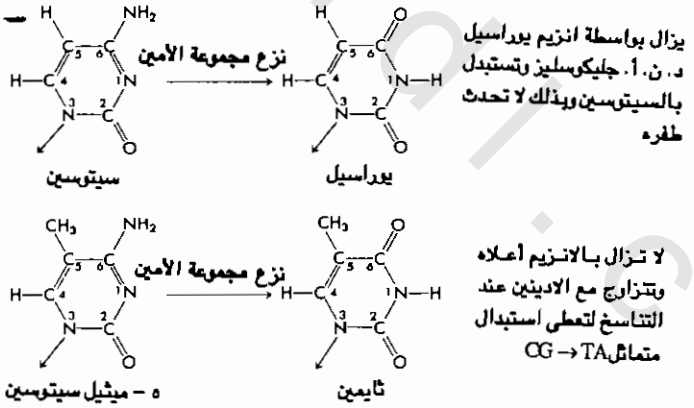
شكل (٤ ـ ١١):

الاصلاح بالاستئصال عن طريق انزيم جليكوسيليز الذى يتعرف على ويزيل القواعد التالفة. ويتضح أنه إلى جانب إزالة النيوكلتيده التالفة فإنه يزيل معها بعض النيوكلتيدات المجاورة حيث يقوم باستبدالها. وعندما يرتبط انزيم د ن أ بالنهاية الحرة للبادىء فإن نشاطه الهدمى 3' --> 5' يقوم بقطع قليل من النيوكلتيدات قبل القاعدة المفقودة ويتولى موقع نشاط البلمرة فيه بعلىء الفجوة الناتجة بأكملها والتى تشتمل على عدة نيوكلتيدات ويسمى مثل هذا النشاط الثانى لانزيم بلمرة د ن أ بـترجمة الثـغرة nick translation.



الشكل (٤ - ١٢):

مسار الإصلاح بانزيم يوراسيل د ن أ جليكوسيليز الذى يؤدى إلى استعادة قاعدة السيتوسين التى سبق إزالة مجموعة الأمين بها . وبعد هذه الخطوة يتم استقطاع الهيكل السكرى الفوسفورى مع القاعدة المفقودة بنشاط انزيم اندونيكليز AP ثم يلى ذلك نشاط انزيم بلمرة د ن أ I. وانزيم الليجيز .

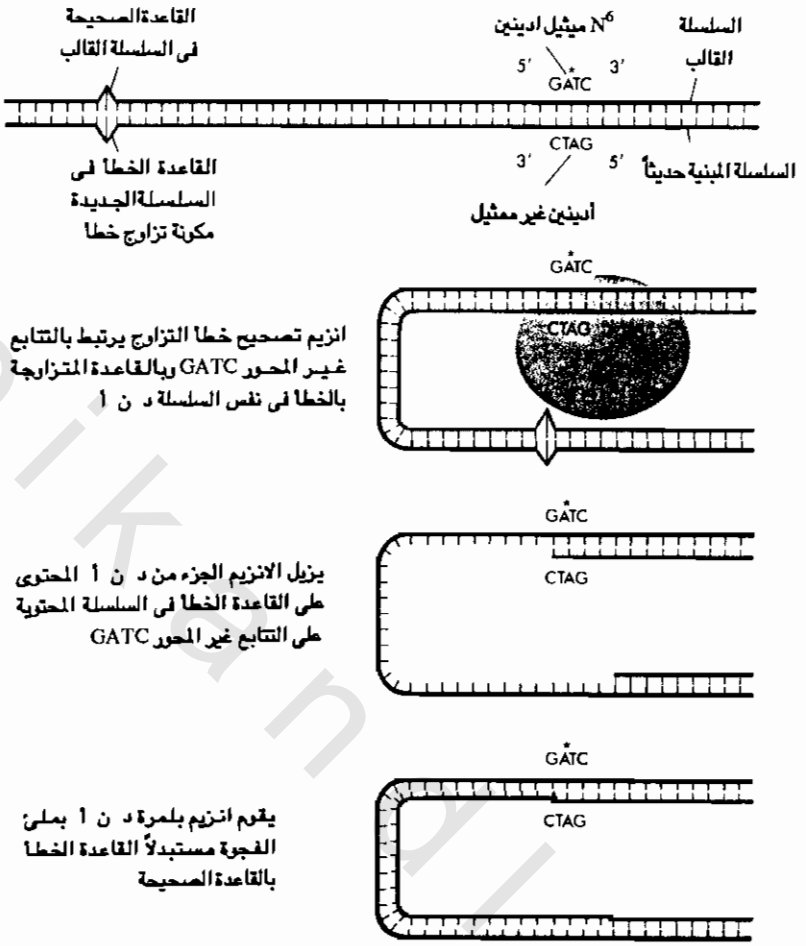


الشكل (٤ - ١٣):

الأساس الجزيئى للبقعة الساخنة للقاعدة ٥ - مثيل سيتوسين .

دور انزيم تصحيح عدم التطابق Mismatch correction enzyme في تصحيح الأخطاء

إن بعض حالات أخطاء التزاوج بين القواعد قد لا يتم اكتشافها بميكانيكية المراجعة Proofreading التى تقوم بها انزيمات البلمرة DNA polymerase إذ أن هناك حد أقصى لما يمكن أن تقوم به هذه الانزيمات فى مجال التصحيح حيث يقدر معدل الخطأ الطبيعى لها بحوالى ١ × ١٠-٨ أي زوج قواعد خطأ لا يكتشف لكل ١٠ ٨ زوج متناسخ . لذلك اكتشف فى بكتريا القولون انزيم آخر على جانب كبير من الدقة يقوم باكتشاف الأخطاء المتهربة من عملية المراجعة ويسمى انزيم تصحيح عدم التطابق mismatch correction enzyme والذى ينتج بواسطة الجينات mut S, mut L , mut H . يقوم الإنزيم بعملية مسح وإعادة مراجعة لجزئ د ن أ حديث التناسخ ليتعرف على أزواج القواعد غير الصحيحة ويقوم بإزالة منطقة أحادية السلسلة تحتوى على النيوكلتيدة الخطأ مما يعطى الفرصة لإنزيم البلمرة لإدخال (أو إضافة) القاعدة الصحيحة وملئ الفجرة الناتجة . ولكن برزت مشكلة هامة وهى التعرف على أى من القاعدتين فى الزوج هى الخطأ حيث أن كلاهما مكونان طبيعيان لجزئ د ن أ إذا أزيلت أحدى القاعدتين من الزوج عشوائياً فإن معدل إحتمال أن تزال القاعدة الصحيحة بدلاً من الخطأ يصل إلى ٠,٥ وبالتالى تكون الطفرة قد استقرت بدلاً من تصحيحها وإزالتها . وللتغلب على هذه المشكلة تبين وجود اشارة خاصة محكومة بتوقيت محدد تقوم بتوجيه عملية إزالة التزاوج الخطأ لتعمل على السلسلة الحديثة البناء فقط بحيث يزيل الانزيم الجزء من د ن أ المحتوى على القاعدة غير الصحيحة وذلك من السلسلة المحتوية على التتابع النوعى GATC مجاوراً لهذا القاعدة المطلوب إزالتها كما فى الشكل (٤ - ١٤) وعامل الوقت له أهمية بالغة فى توجيه نشاط انزيم التصحيح للسلسلة المطلوبة حيث أن الانزيم لا يستطيع التعرف على التتابع الكشاف إذا كان الادينين فى التتابع القصير قد تمت ميثلته إلى N^6 methyladenine بانزيم الميثلة methylase المشفر بالجين dam . قبل وصول انزيم التصحيح إليه وبالتالى لا يمكن إزالة القاعدة غير الصحيحة . والمدهش هنا أن معظم تتابعات GATC فى الخلية يحدث بها تحوير من هذا النوع (أى مثيلة الأدينين) بعد تناسخها ولكن بعد فترة قصيرة جداً من التأخير قد لا تزيد عن ثوان أو دقائق قليلة إلا أن هذه الفترة الزمنية الوجيزة تكون كافية لكى يرتبط انزيم التصحيح بهذا التتابع ولذلك فإن الإنزيم لابد أن يتجه إلى سلسلة د ن أ التى تم بناؤها للتو والتى لم يتحور فيها التتابع الكشاف بعد بدلاً من التوجه إلى السلسلة القالب التى يكون فيها .



الشكل (٤-١٤):

نموذج يبين كيف يقوم نظام إصلاح أخطاء عدم التطابق mismatch فى بكتريا القولون باستبدال قاعدة خاطئة ومتزاوجة بالخطأ فى الحلزون المزدوج لجزئ د ن أ.

التحوير قد تم منذ فترة يتعرف انزيم التصحيح هنا ليس فقط على القاعدة الخطأ ولكنه يتعرف أيضاً على بعض الاضافات أو الاقتضابات القصيرة وبالتالى فإنه يقلل من فرص حدوث طفرات تحرك الإطار بالاضافة إلى طفرات الاستبدال .

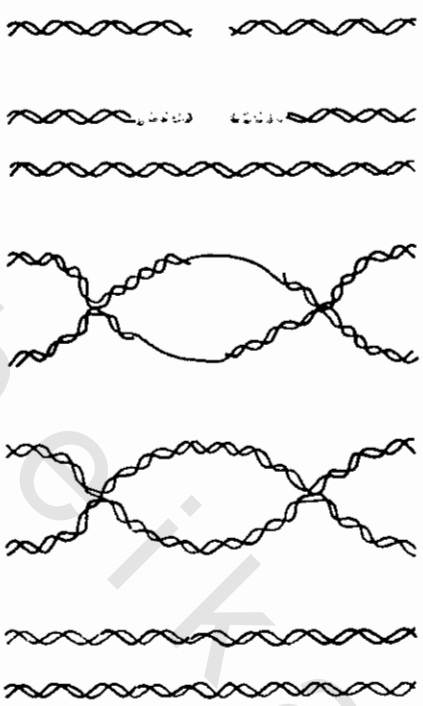
دور الاتحادات الجديدة فى تصحيح د ن أ

عرفنا أن الإصلاح الاستئصالى Excision repair يستخدم السلسلة المكملة كقالب لإحلال جزء جديد بدلاً من الجزء التالف من د ن أ ولكن يحدث أحياناً أن هذا القالب نفسه لا يكون متوفراً كما يحدث مثلاً عندما تتقابل شوكة التناسخ مع منطقة مشوهة أو تالفة (مثل ثنائى البيريميدين) بحيث تنقطع العلاقة بين السلسلتين فى منطقة التشوه قبل أن يتمكن الإصلاح الاستئصالى من الوصول إليها . بالإضافة إلى ذلك إذا كانت كلتا القاعدتين فى الزوج النيوكلتيدى قد تغيرتا كأن ترتبطان تصالبيا Crosslinked بمادة كيماوية مثل العقار المسرطن mitomycin ، فإن أي منهما لا تستطيع أن تستخدم كقالب للأخرى .

ومن جهة أخرى فإن الحلزون المزدوج حين يحدث به كسر مستعرض يشمل السلسلتين ويصاحبه فقد لجزء من الحلزون المزدوج نهائياً يصعب تصليح المنطقة التالفة مباشرة بالدقة المطلوبة .

فى جميع هذه الحالات نجد أن جميع المعلومات الأصلية والمكملة قد فقدت فى مكان التلف ولا يمكن استرجاعها إلا عن طريق البحث عن جزء آخر مناظر فى جزئ د ن أ منفصل فى الخلية نفسها ولكنه متطابق مع الجزء التالف . يسمى ذلك بالاصلاح التالى لعملية الاتحادات الجديدة Recombinational Repair ، حيث يتوفر دائماً مصدر مناسب لاحتياطى د ن أ فى الخلية فمثلاً عندما تترك منطقة تالفة فى قطعة مفردة من د ن أ عند مرور شوكة التناسخ فإن د ن أ البنوى الآخر سيحمل نفس التتابع . وإذا حدث تلف لكلا السلسلتين فى منطقة غير متناسخة فإن البكتريا النشطة فى النمو يكون لديها عادة نسخة إضافية أو أكثر من كروموسوماتها يمكن استخدامها فى هذه الحالة . وبديهى أن مميزة النواة ثنائية المجموعة الكروموسومية سيتوفر لديها نسخ اضافية من د ن أ لاستخدامه فى عملية مماثلة للاصلاح .

وجد أن العنصر الأساسى في عملية التصحيح بالاتحادات الجديدة عبارة عن انزيم يقوم بإعادة الاتحاد annealing بين تتابعات كل من جانبى المنطقة التالفة وتلك المكملة لها فى جزئ د ن أ السليم وبذلك يحدث التطابق الحرج الذى يتعرف على الجزء الذى يحمل المعلومات الناقصة . وجد أن هذا النشاط الانزيمى يتم فى بكتريا القولون عن طريق Rec A protein كما فى الشكل رقم (٤ – ١٥) .



الشكل (٤-١٥): نموذج لإصلاح كسر فى الحلزون المزدوج لجزئ د ن أ بواسطة نشاط بروتين Rec A .

استبداء جينات الانقاذ S. O. S. فى إصلاح د ن أ

من المعروف أن الخلية يمكنها غالباً تنظيم تعبير الجينات حسب الحاجة لمنتجات هذه الجينات . لذلك فليس مستغرباً أن نجد الكثير من إنزيمات الإصلاح لجزئ د ن أ يتم تنشيطها عند الطلب والمتمثل فى حدوث تلف د ن أ وعلى سبيل المثال تنشط إنزيمات ميثيل ترانسفيريز methyltransferase عند وجود د ن أ مؤلكل Alkylated بطريقة غير عادية . ولكن أهم وأكبر مجموعة يتم استبدائها أو « استنفارها » تتكون من مجموعة من الجينات يطلق عليها جينات الانقاذ S. O. S. والتى يتم استبدائها عند حدوث تدمير شديد فى جزئ د ن أ يؤدى إلى ايقاف بناء د ن أ تماماً . من أمثلة أنواع التلف الذى يحفز جينات الانقاذ ذلك التلف الناتج عن تكوين ثنائى البريميدين الذى يحول دون حدوث تزاوج بين القواعد تماماً بحيث عندما تصل إليه شوكة التناسخ فإنها تتوقف وتتركه ثم تبدأ من جديد بعد مسافة من هذا

التشوه الحادث مما يؤدى إلى نشوء فجوة فى د ن أ والتى لا يلبث أن يرتبط بها Rec A protein وفضلاً عن بدء التبادل بين سلاسل د ن أ عن طريق الاصلاح بالاتحادات الجديدة فإن الارتباط الحادث بين Rec A protein وبين سلسلة مفردة من د ن أ يؤدى إلى استبداء Rec A protein لكى يقوم بوظيفة انزيمية مختلفة تماماً عن وظيفة الاتحادات الجديدة وهى : هدم (بالتحليل المائى) للمثبط الخاص بجينات الانقاذ S. O. S. (والمعروف باسم مثبط Lex A) وبهذه الطريقة يقوم Rec A protein بتحفيز عملية اصلاح د ن أ بكل من طريقة الاتحادات الجديدة ومن خلال تسببه فى استبداء نشاط حوالى ١٥ جين من جينات الانقاذ S.O.S. نتيجة لتخليصه لها من البروتين المثبط . والجدول ٤ ـ ١ يبين عدد من جينات الانقاذ وملخص لدور كل منها فى الاصلاح .

جدول ٤ ـ ١ جينات الانقاذ S. O. S. ودورها فى اصلاح د ن أ

اسم الجين	دوره فى اصلاح د ن أ
١ -	**جينات معروفة الوظيفة**
uvr A uvr B uvr C	تشفر لانزيم الاستئصال excision endonuclease
umu D umu C	يشفر للبروتين المطلوب لاصلاح د ن أ الناتج من عملية الاصلاح القابل للخطأ error - prone repair ولمعظم مسببات الطفور
su1 A	يشفر للبروتين المثبط لانقسام الخلية (ربما لتعطى فرصة زمنية لاصلاح د ن أ)

تابع جدول ٤ ـ ١

اسم الجين	دوره فى اصلاح د ن أ
٢ -	**جينات داخلة فى تمثيل د ن أ ولكن دورها المحدد فى الاصلاح غير معروف**
SSb	ينتج البروتينات المرتبطة بالسلسلة المفردة SSB
uvr D	ينتج انزيم هيليكيز II الذى يقوم بفصل السلسلتين أمام شوكة التناسخ
him A	يشفر لأحدى البروتينات الداخلة فى الاتحادات الجديدة المحددة الموقع
rec N	يدخل فى اصلاح د ن أ بالاتحادات الجديدة
٣ -	**جينات غير معلومة الوظيفة**
din A	
din B	
din D	
din F	

الاصلاح القابل للخطأ Error - Prone Repair

على الرغم من أنه معروف الآن كيف أن مشابهات القواعد وبعض القواعد المحورة (المعدلة) تسبب طفرات من خلال التزاوج غير الصحيح إلا أنه لم يتضح بعد كيف تنشأ الطفرات عندما تكون القواعد مشوهه وتالفة جداً لدرجة أنها تفقد القدرة علي التزاوج تماماً . ولكن هذه الحالة هى أهم العمليات على الأطلاق لأن معظم المطفرات الطبيعية والتالى معظم المسرطنات Carcenogens تعمل على أن تظل الخلايا فى إنتاج سلاسل د ن أ بالرغم من غياب القالب بما يحتويه من معلومات وراثية لازمة للتناسخ فى مواقع التلف .

سبقت الاشارة إلى عملية هدم قاعدة وغيابها بالمرة من السلسلة apyrimidine, apu-rine وقد أمكن اصلاح مثل هذا الخطأ فى تجارب معملية *In vitro* حيث تم الحصول على د ن أ فاقد لقاعدة بيورينية apurine وذلك بالمعاملة بالحامض لجزئ د ن أ الفاج مما أدى إلى إزالة قاعدة بيورينية depurination واحدة أو أكثر من جزئ د ن أ الفاج ١٧٤ ØX . وبإدخال هذا الفاج إلى البروتوبلاست أمكن التحقق عما إذا كان باستطاعة البروتوبلاست (خلية منزوعة الجدار) اصلاح جزئ د ن أ الفاج .

وقد تبين أن جزيئات نسل الفاج لا تكون فعالة إلا إذا تم اضافة نيوكلتيده فى مكان الثقب الناتج عن إزالة القاعدة البيورينية . وقد أستأنف الفاج نشاطه داخل الخلية مما يدل على أن الاصلاح قد تم . إلا أنه تبين أن عملية الاصلاح نفسها قد أدت إلى حدوث طفرة أخرى نتيجة لأن عملية الاصلاح قد تمت فى غياب القالب المناسب لأن جزئ هذا الفاج وحيد السلسلة . تسمى هذه العملية الاصلاح القابل للخطأ error - prone repair . يبدو أن هذا النوع من الاصلاح يعد بمثابة الملاذ الأخير الذى تلجأ إليه الخلية ويستخدم فقط عندما لا يتوفر القالب اللازم للاصلاح الدقيق . وهذا يعنى أن الخلية قد لجأت إلى أخف الضررين أى أن تضع قاعدة غير صحيحة (مسببه طفرة) من أجل استمرار تناسخ د ن أ بدلاً من توقف التناسخ تماماً . من الطبيعى أن تكون فرصة الطفور عالية جداً وقد تصل إلى $\frac{٣}{٤}$. ومن المدهش أن الاصلاح هنا هو نفسه بسبب الطفرة .

بروتينات الاصلاح القابل للخطأ

تحتاج عملية الاصلاح هنا إلى اشتراك النواتج البروتينية لجينين من جينوم بكتريا القولون وهما umu C, umu D (أى غير حساسة للطفور بالأشعة فوق البنفسجية UV nonmutable) حيث عرفت هذه الجينات فى البداية على أنها مواقع للطفرات التى تمنع حدوث الطفور بالأشعة فوق البنفسجية . وهى ضمن مجموعة جينات الانقاذ S.O.S. . ولذلك فإن استيدائها يحتاج إلى وجود المحفزات inducers الخاصة بجينات الانقاذ (يطلق احياناً على الاصلاح القابل للخطأ اصلاح الانقاذ S.O.S) وجد أن الخلايا الطافرة لأى من الجينين تكون أكثر تعرضا للموت عند التعرض للأشعة فوق البنفسجية عن الخلايا الوحشية غير الطافرة مما يشير إلى أن umu C umu D , تساعدان الخلية على البقاء عن طريق اصلاح التلف أو الخلل . ونظراً لأن هذين الجينين من جينات الانقاذ فإنهما يحتاجان لاستبدائهما إلى

نشاط Rec A protein بالاضافة إلى أنه تبين أن Rec A protein يقوم أيضاً بدور مباشر فى هذا النوع من الاصلاح .

ولكن ماهى الميكانيكية التى يتم بها الاصلاح ؟ نعلم أن الطفرات التى تنتج عن هذا الاصلاح تكون عادة عبارة عن تغير فى قاعدة واحدة فى موقع التلف ولا تتضمن عادة تتابعات كبيرة من د ن أ بحيث لا يصل الأمر إلى استخدام ميكانيكية الحذف والاضافة الكبيرة Splicing . ولكن يبدو أن بروتينات umu D , umu C تسبب إدخال أو اضافة قاعدة فى السلسلة النامية على الرغم من عدم وجود قاعدة قالب مقابلة وهى عملية لا يسمح بحدوثها فى الظروف العادية . تسمى هذه العملية البناء الفرعى أو الجانبى by pass synthesis . يقترح أحد النماذج التى تفسر هذا النوع من البناء الفرعى أن بروتينات umu D , umu C قد تعمل على تثبيط عملية المراجعة Proofreading التى يقوم بها عادة انزيم البلمرة (3' --> 5' exonuclease) . كما يوجد فرضية أخرى تقول أن هذين البروتينين يشفران لانتاج نوع آخر جديد تماماً من انزيمات البلمرة DNA polymerase التى تقع فى الأخطاء .

ولكن ماهو الدور الذى يقوم به Rec A protein فى هذه العملية ؟ هناك تفسير يعتمد على معرفة أن Rec A protein يرتبط بجزئ د ن أ فى الفجوة الناتجة عن توقف البناء لعدم القدرة على التزاوج فى المنطقة التالفة . لذلك فإن Rec A protein قد يرتبط أيضاً مع بروتينات umu D, umu C وبالتالى يقوم بتوجيههما إلى الموقع الذى يتطلب فيه الأمر أجراء الاصلاح المصحوب بالخطأ .

المطفرات الطبيعية وطرق التعرف عليها

من المهم التعرف على المطفرات وتفادى تعرض الإنسان لها لسببين وهما : (١) أن التغيرات الوراثية العشوائية تكون عادة ضارة فى الأجيال المقبلة . ولكن حتى الطفرات الجسدية Somatic mutations أي تلك التى تحدث فى الخلايا اللاجنسية قد تهدد حياة الكائن نفسه . إذ من المعروف أن السرطان ينتج غالباً من طفرات جسدية تؤدى إلى نمو غير منظم للخلايا . وقد يكون هناك ارتباط بين بعض الأمراض المرتبطة بالشيخوخة مثل التصلب atherosclerosis وبين تراكم د ن أ تالف لم يمكن اصلاحه . بل هناك فرضية بأن عملية الشيخوخة بكاملها قد تعكس تلف غير عكسى فى د ن أ فى الخلايا الجسدية .

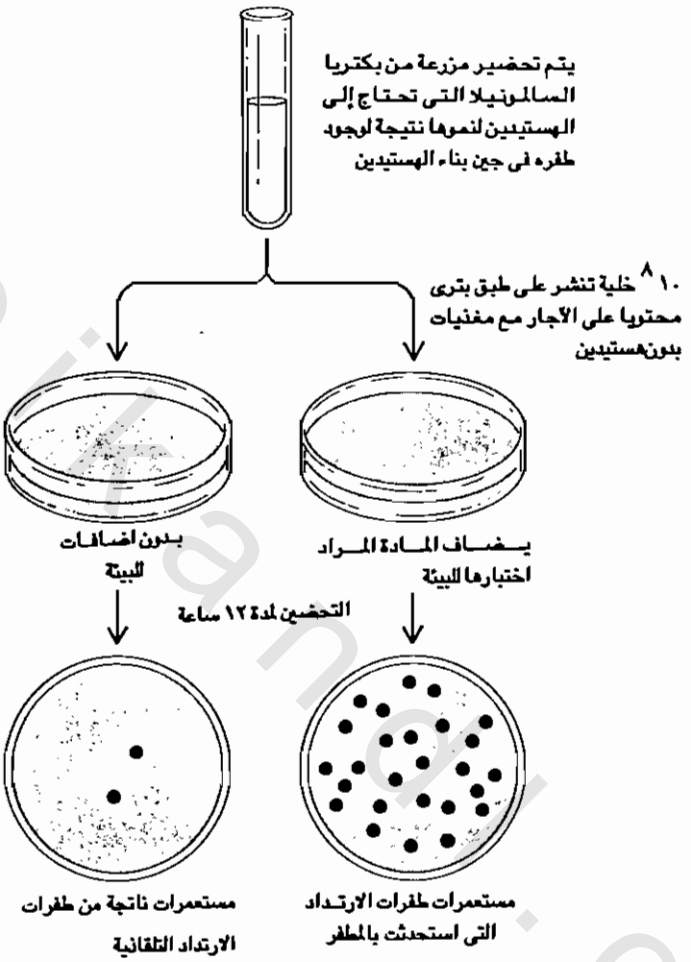
ثبت أن معظم المطفرات تكون فى نفس الوقت مسرطنات . وقد تم التوصل إلى طريقة

سهلة لتحديد ما إذا كانت مادة ما مسرطنة أم لا وذلك عن طريق استخدام سلالات بكتيرية معينة فى اختبار القدرة الطفرية لهذه المادة ، فقد استنبط Ames اختبار سمى باسمه Ames test (الشكل ٤ – ١٦) وقد استفاد إيميز من عدة خواص مميزة لسلاله من بكتريا السالمونيلا *Salmonella* بحيث يسهل قياس معدل الطفور الرجعى Reversion إلى المظهر الوحشى للبكتريا فى طفرة عوز للهستدين كما أن هذه السلاله تحتوى على بلازميد باستطاعته التعبير بكفاءة عن صور مظهرية مغايرة يحكمها چينين umu C , umu D والتى تكون ضرورية فى حالة ما إذا كان التلف من النوع المطفر . إلا أنه تبين أن معظم المركبات المسرطنة وخاصة النواتج الطبيعية لا تظهر نشاطاً مسرطناً إذا تمت اضافتها مباشرة إلى البكتريا النامية ولكن لابد أن يحدث لها تنشيط أولا عن طريق التحضين Incubation مع مستخلص من كبد الثدييات . وهى عملية مشابهه لما يحدث فى الطبيعة عندما يتم تمثيل المواد الغريبة فى الكبد . أثناء عملية التنشيط هذه يتم تحويل المواد المسرطنة إلى مشتقات محبة للماء تتفاعل بسهولة مع القواعد فى جزئ د ن أ ولكن هل جميع المواد المطفرة الهامة لابد أن تكون بالتالى مسرطنة ؟

تبين من الدراسات على الأمراض الوبائية بأن تدخين السجائر من أهم المواد المسرطنة التى تواجه الإنسان وقد تبين من اختبار إيمز أن التدخين مطفر شديد .

كما أن الخطر الكامن لبعض المطفرات من الكيماويات الصناعية مثل ethylene dichloride معروف تماماً . وهناك الكثير من ملوثات البيئة قد تكون مسرطنة . ولكن تبين حديثاً أن معظم مصادر المطفرات والمسرطنات تأتى من الأغذية وحتى فى الغذاء العادى مثل الخضروات الشائعة .

إذ أن النبات يقوم بإنتاج مواد سامة للدفاع ضد المفترسات مثل الحشرات ثم يقوم الكبد بتمثيلها بحيث تكون النواتج مطفرات فعالة . تبين أن معظم المطفرات تكون مؤكسدات Oxidants مثل شق الأكسوجين Oxygen radicals الذى يتفاعل مع قواعد د ن أ وهناك مصدر غذائى آخر يمكن أن يؤدى إلى الطفور بل وإلى السرطان وهو الدهون التى يتم تمثيلها إلى مؤكسدات نشطة فى الكبد إلا أن الأمل يكمن فى تفادى هذه المخاطر المحتملة عن طريق بعض مضادات المؤكسدات الطبيعية antioxidants مثل الجلوتاثيون glutathione .



الشكل (٤-١٦):

اختبار إيمز لتقدير المقدرة الطفرية (المسرطنة) لمادة مطفرة على أساس قدرتها على إحداث الطفور الرجعى إلى الطراز الوحشى فى بكتريا السالمونيلا .