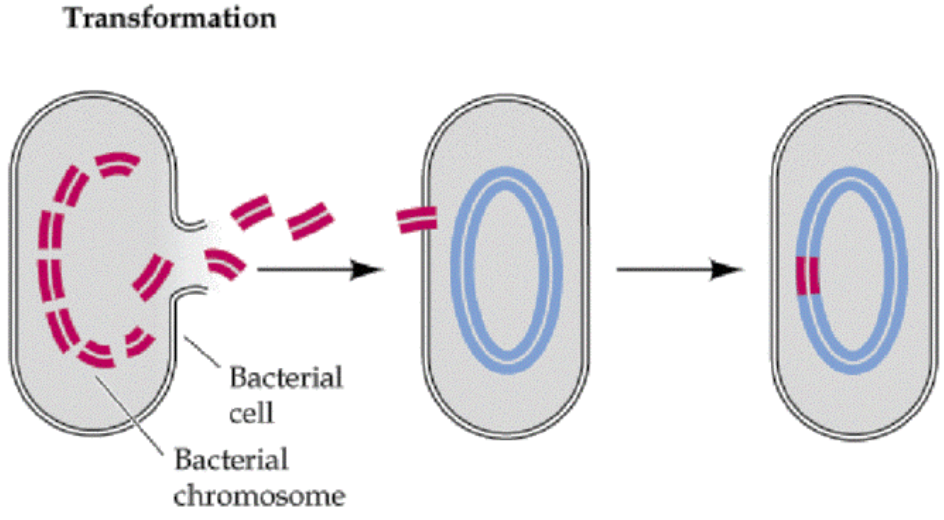
التحول البكتيري Bacterial Transformation

التحول هو مصطلح يطلق على عملية اخذ الـ DNA من الوسط المحيط و التغير في النمط الوراثي الذي يحصل للخلية المستلمة المتحولة.

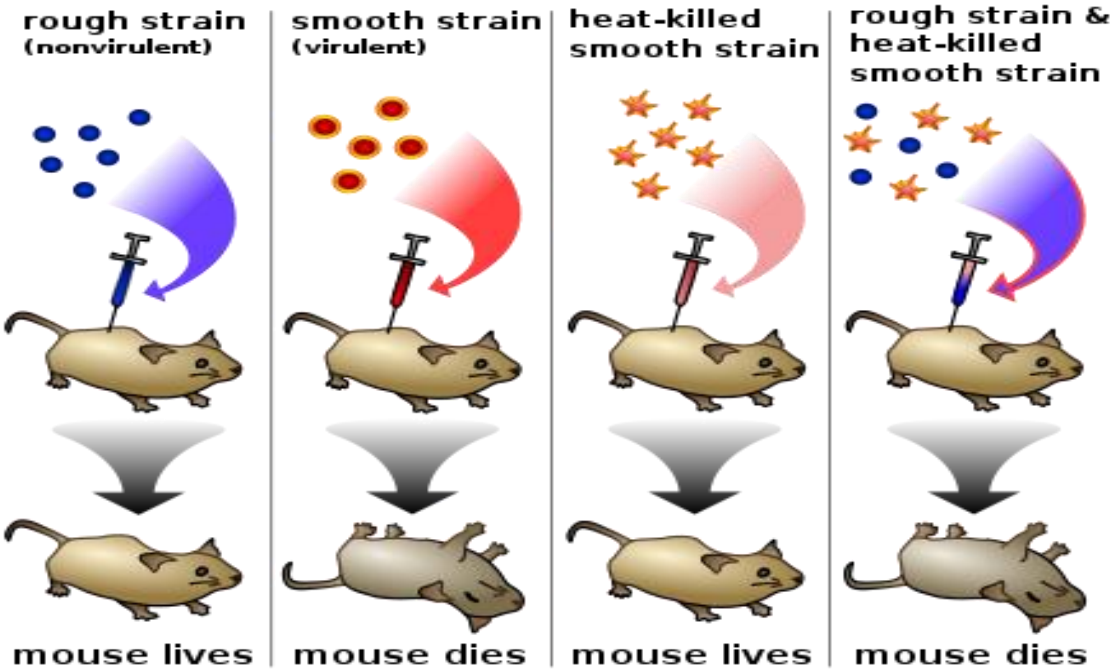
تحدث عملية التحول transformation بشكل طبيعي في العديد من أنواع البكتيريا مثل *Bacillus* و*Streptomyces* و *Haemophilus*. تكون الكفاءة او الاهلية competence (و هي القدرة على اخذ DNA خارجي) في العادة مؤقتة لأنها مرتبطة بحالة فسيولوجية معينة و تحتاج التعبير عن جينات محددة مسؤولة عن الاهلية competence. تكون بعض أنواع البكتيريا مثل الـ *E. coli* مقاومة للتحول و يمكن تغيير هذا مختبريا لجعلها تسمح بدخول الـ DNA الغريب و من ثم استعمالها في الكلونة الجزيئة. كما يمكن ان تحصل هذه العملية (التحول) في الخلايا الحقيقية النواة سواء كانت نباتية ام حيوانية بواسطة طرق مختبرية لاستعمالها في تجارب الهندسة الوراثية، و تدعى عملية التحول هنا بـ transfection (ادخال الحامض النووي الى الخلايا الحقيقية النواة و خاصة الخلايا الحيوانية).

توجد العديد من البكتريا المهيأة competent cells طبيعيا يمكنها ان تأخذ DNA من محيطها كما ان بعض البكتريا تكون competent في طور معين من النمو فمثلا بكتريا *Bacillus subtilis* تكونcompetent جدا في late log phase وهذا بسبب تعبير عدد من الجينات في هذه المرحلة تجعلها competent لاستقبال الـ DNA الخارجي ويتعلق تعبير هذه الجينات بكثافة البكتريا حيث تصبح الخلايا مهيئة عندما تكون كثافة الخلايا عالية. و هذا يعتبر شكل من اشكال quorum sensing؛ حيث تعتمد استجابة الخلية على تركيز (او عدد) البكتيريا في المنطقة المحيطة بها.



شكل مبسط يوضح عملية التحول Transformation

اكتشفت عملية التحول transformation في عام 1928 بواسطة عالم البكتريا البريطاني Frederick Griffith من خلال تجاربه التي أجراها على مسبحيات ذات الرئة *Streptococcus pneumonia* وفيما بعد اثبت كل من ماكارثي وافري ومكلويد ان المادة المسؤولة عن التحول هي الـ DNA. وقد اكتسب التحول من ذلك الحين اهمية كبيرة لدوره في رسم الخرائط الكروموسومية وفيما بعد دوره في عملية نقل الجينات وانتاج صفات جديدة.



شكل يوضح Griffith's experiment

تتم هذه العملية بين الخلية البكتيرية المستقبلة المهيأة للاستلام والـ DNA العاري وتسمى هذه الخلية بـ competent cell . ويمكن تلخيص خطوات عملية التحول بمايلي:

1- تهيئة الخلية المستقبلة: اما ان تكون الخلية مهيئة طبيعيا او اصطناعيا

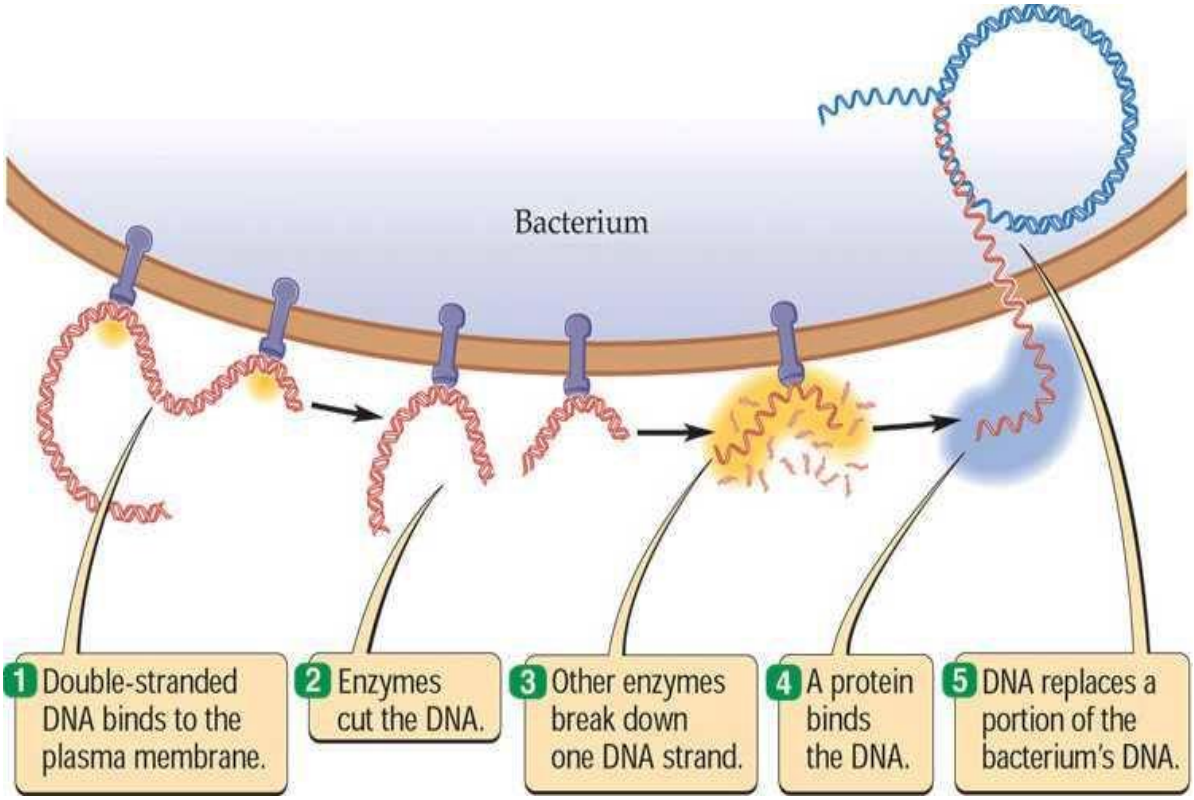
2- ارتباط الـ DNA العاري بسطح الخلية المهيئة: ان دخول الـ DNA العاري سواء كان بلازميد او قطعة من الكروموسوم يتم من خلال وجود مستقبل على سطح الخلية المهيئة. تسمى المناطق التي يرتبط عندها الـ DNA العاري بسطح الخلية المهيئة بـ zones of adhesion or Bayer's junction وتشترك عدة بروتينات بعملية اخذ الـ DNA العاري ومن أهمها translocase complex . وتتضمن هذه الخطوة تحلل الشريط الثاني (الغير مرتبط بإنتاج البروتينات)

د. احمد محمد تركي & د. احمد عبد الجبار

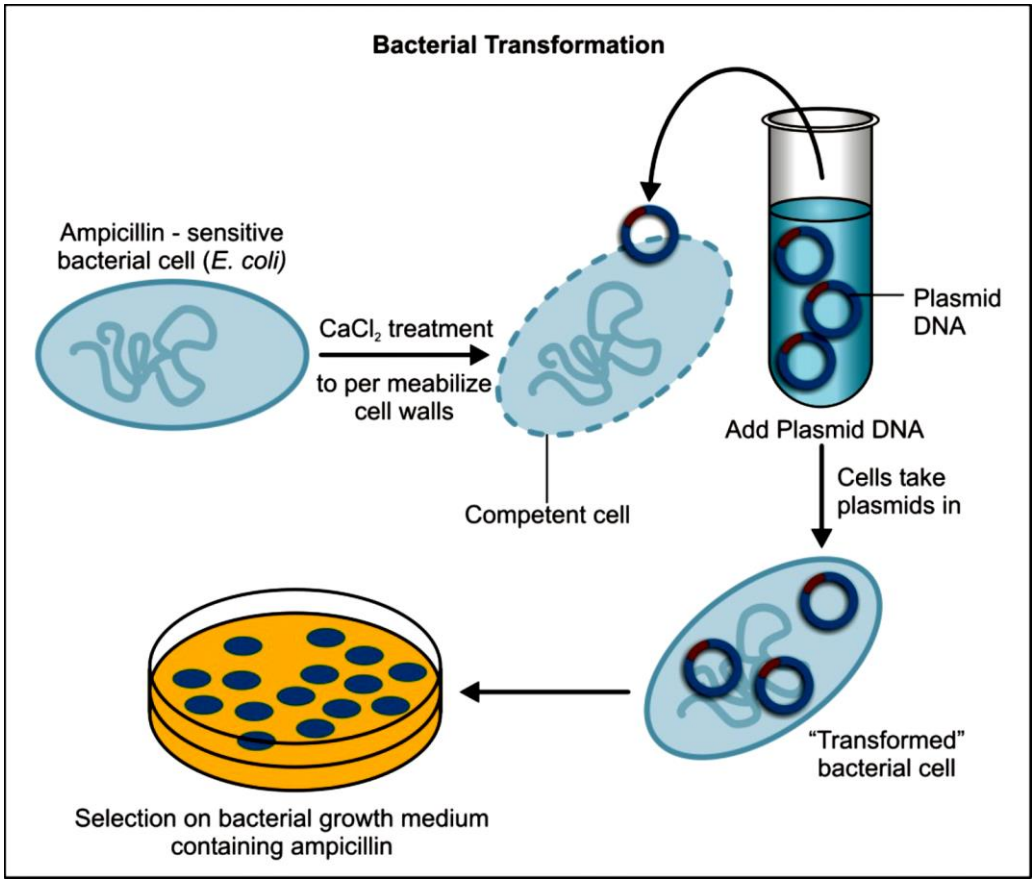
3- نقل الـ DNA الى داخل الخلية وضمان عدم تحلله من خلال البروتينات المرتبطةبه.

4- انحشار الـ DNA العاري ضمن كروموسوم الخلية المستقبلة بواسطة اعادة الارتباط المتماثل homologous recombination .

5- تضاعف DNA الخلية المتحولة وراثيا وإنتاج نمط مظهري جديد. ويمكن توضيحها من خلال المخططات التالية :



شكل يوضح عملية امتصاص الـ DNA



شكل يوضح Artificial transformation

- يجب ملاحظة مسألة مهمة هي ان الـ DNA بعد دخوله الى الخلية البكتيرية يمكن ان يتحطم بفعل الانزيمات القاطعة الموجودة في الخلية المستقبلة recipient cell.

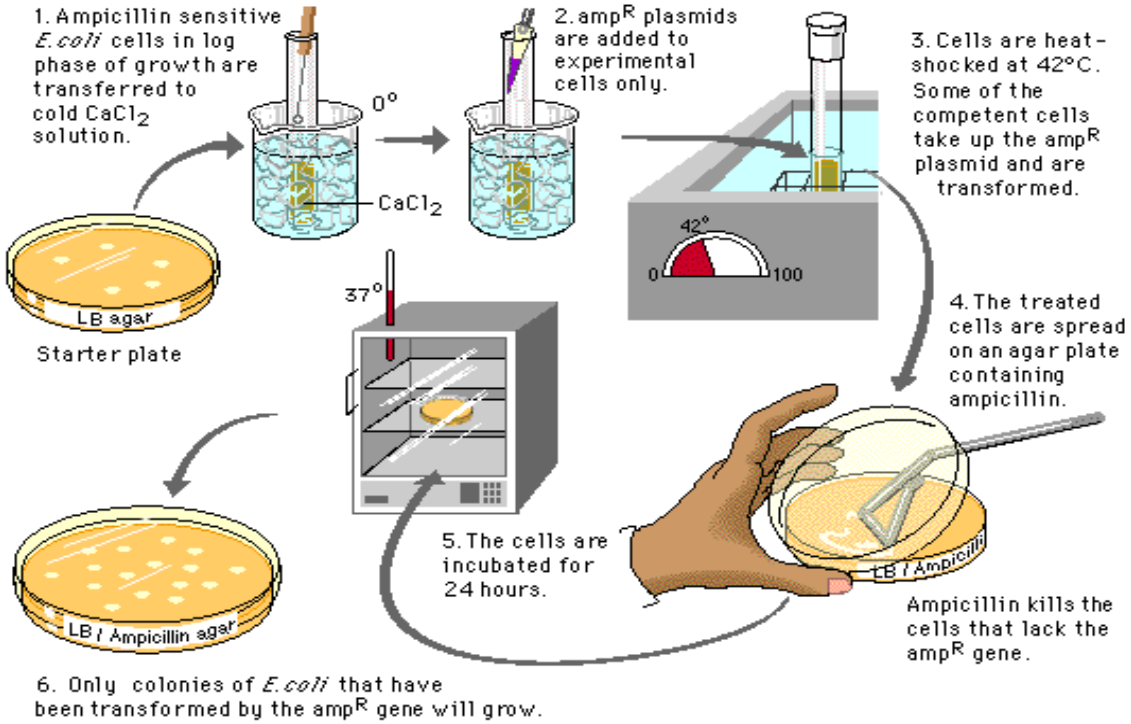
في الطبيعة، يعتمد ادخال قطع الـ DNA الى داخل الخلية المستلمة والمهيئة على وجود تسلسلات خاصة من الـ DNA تشابه جزئيا احد اطراف الـ DNA الداخل للخلية لكي يحدث site specific recombination للقطعة الداخلة وهذه التسلسلات تنتشر في جينوم البكتريا المستلمة فمثلا تحتوي بكتريا *Neisseria meningitids* على تسلسل من 10 قواعد يسمى uptake sequence ينتشر بتردد 2000 مرة في جينومها عشوائيا يكون مكان لإدخال القطع الخارجية في حين تحتوي بكتريا *Haemophilus influenza* على uptake sequence متكون من 29 قاعدة وينتشر بواقع 1500 مرة لذا فان كلا النوعين من البكتريا تستقبل DNA من نفس النوع فقط بشكل طبيعي ويمكن ان تستقبل جينات بشكل صناعي بعد ادخال مثل هذه التسلسلات الى احد اطرافها .

يمكن القول بحدوث التحول البكتيري اذا اندمج exogenous DNA في داخل الخلية البكتيرية بشكل ثابت وتضاعف بتضاعف الكروموسوم البكتيري وبهذا فان القطع الداخلة يجب ان تمتلك تماثل لقطعة

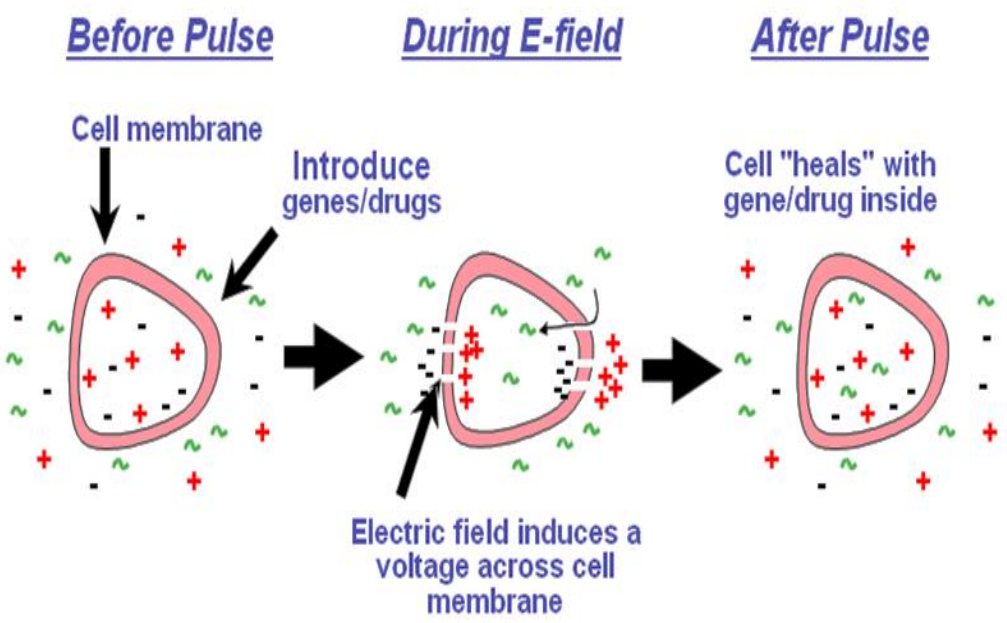
من الـ DNA البكتيري لكي تحل محلها وتستمر بالتضاعف وهذا شكل حاجز اساسي في عمليات التحول بين الانواع المتباعدة من البكتريا , تم تجاوز هذا الحاجز باستخدام التحول بالبلازميدات المتوافقة لتحول بكتريا مهيأة الى بكتريا لها صفات اخرى .

ممكن ان تحدث عملية التحول الوراثي طبيعيا او في المختبر. هنالك طريقتين لإحداث عملية التحول الوراثي بالمختبر:

1- التحول بواسطة التهيئة الكيمياويةوالفيزيائية للخلية المستقبلة: وتتم من خلال معاملة الخلية بملح كلوريد الكالسيوم $Cacl_2$بوجود البرودة والحرارة المتعاقبتينوكما موضح ادناه:

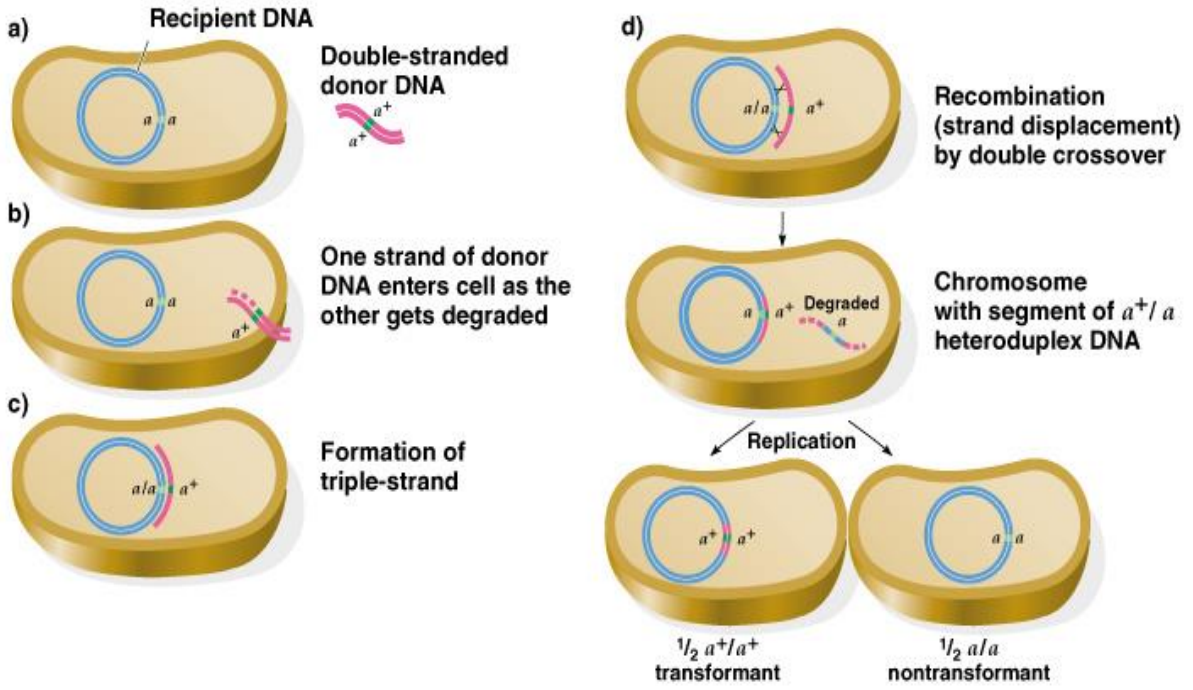


2- التحول بواسطة التهيئة الكهربائية (Electroporation) للخلية المستقبلة: وتتم من خلال معاملة الخلية بتيار كهربائي مقداره 10-20 V/cm



تأخذ الخلية البكتيرية الـ DNA الموجود في بيئتها والذي يكون بحدود 50 kb او اكثر والمتحرر من الخليةالواهبة او الخلايا الميتة . لجميع العمليات الانفة الذكر يحدث التكامل بين المادة الوراثية المكتسبة وبين جينوم الخلية البكتيرية المستلمة. ان معرفة مواقع الجينات من خلال التحول الوراثي والنقل بالعاثي هي فقط لتحديد مواقع الجينات المتجاورة وذلك لصغر القطعة الوراثية المكتسبة بتلك العمليات الوراثية.

يمكن استخدام التحول الوراثي لرسم الخارطة الكروموسومية عندما يكون رسمها بالاقتران والتنبيغ بالعاثي غير ممكنا. حيث يؤخذ الـ DNA للخلية الواهبة ويقطع الى قطع معروفة تعطي صفات لا توجد في الخلايا المستقبلة،ففي حالة حدوث تحول يتم الكشف عنه بإظهار الصفة المظهرية للخلايا الواهبة.وتأخذ بعض الخلايا الـ DNA الخارجي طبيعيا مثل *B. subtilis* فيما تحتاج خلايا اخرى الى تحفيز لأخذ الـ DNA الخارجي مثل *E. coli* ففي المثال ادناه بكتريا *B. subtilis*لا تحتوي على الجين a والبكتريا الواهبةتمتلكه(a^+)، اذا حدث تحلل لـ DNA البكتريا الواهبة نتيجة موت الخلايا قد يحدث ان يتكسر الـ DNA منتجا اليل كامل ل a^+ والذي يدخل الى الخلية المستلمة ويعمل اعادة تموضع في الموقع a^- منتج اولا شريط ثلاثي يتم هضم احد اشرطة الخلية الاصلية وبذلك يصبح الجين الجديد جزء من كروموسوم البكتريا منتجا بذلك صفة جديدة يمكن ان يكشف عنها



شكل يوضح التحول الطبيعي في بكتيريا *B. subtilis*

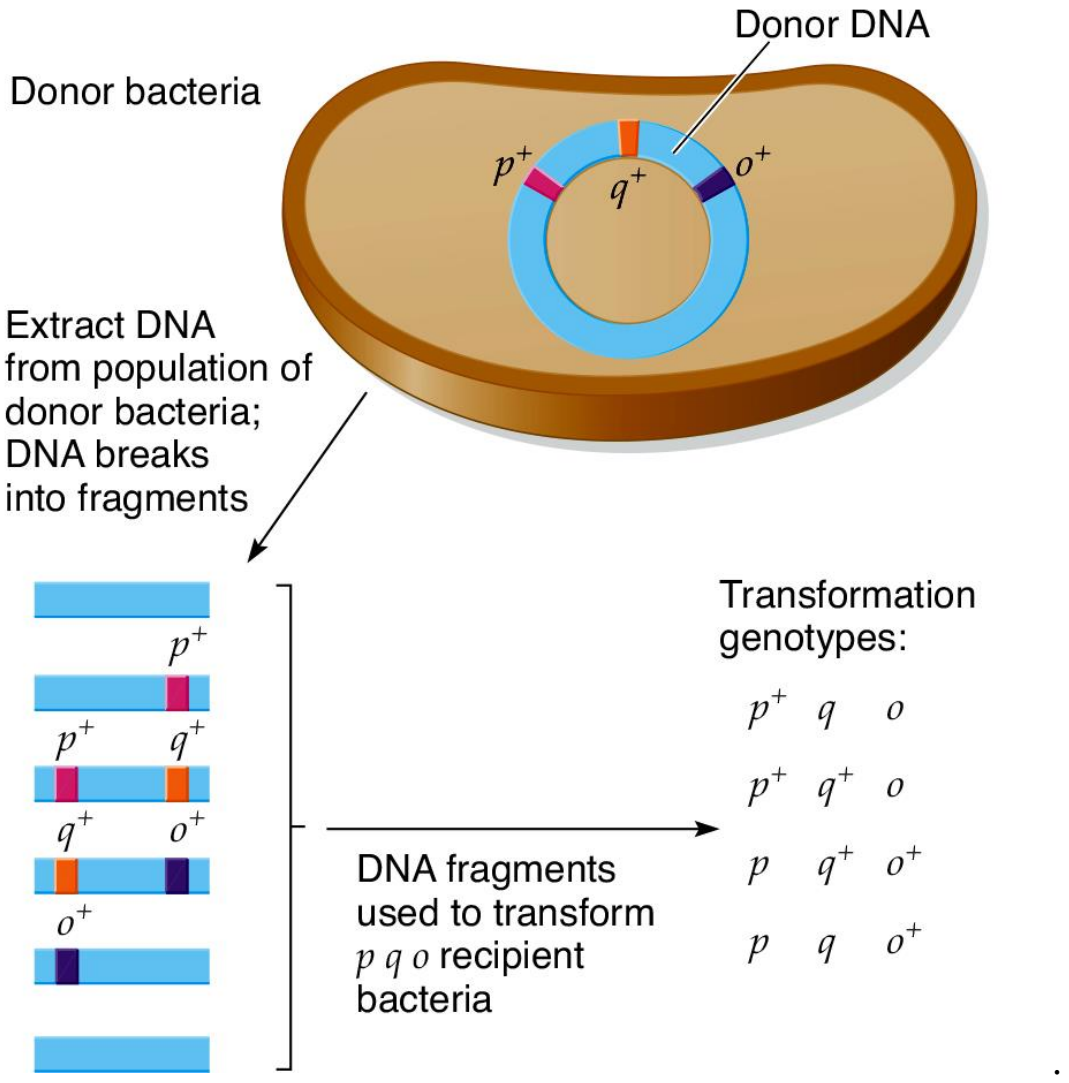
يمكن استخدام تجارب التحول للكشف عما اذا كانت الجينات مرتبطة (في هذه الحالة ،قريبة فيزيائيا من بعض في كروموسوم البكتريا) ويعمل التحول افضل مع القطع الصغيرة من الـ DNA التي تحمل عدد قليل من الجينات.

في الخلايا ذات التهيئة العالية high competent cells تكون الـ frequency لتحول معظم الجينات هي 1 خلية متحولة لكل 10^3 خلية.

تدعى حالة نقل أكثر من جين في نفس الوقت بالتحول المشترك cotransformation, والذي يمكن استثمار هلتحديد فيما إذا كان جينان مرتبطان.المبدأ الذي يعتمد عليه هو كالتالي:

اذا كان جينان، و لنفرض x^+ و y^+ ، بعيدان عن بعضهما في كروموسوم الخلية المعطية donor فسنجدهما دائما على قطع مختلفة من الـ DNA. بالتالي، اذا كان $x^+ y^+$ آتية من المانحة و x y هي المستلمة, فان نسبة حدوث تحول مشترك للخلية المستلمة الى $x^+ y^+$ ستكون حصيلة احتمالية التحول لكل جين على حدة. فاذا حصل التحول بتردد 1 جين لكل 10^3خلية, فإننا نتوقع حدوث تحول مشترك $x^+ y^+$ بتردد 1 لكل 10^6 ($10^{-3} \times 10^{-3}$). لهذا اذا كان جينان قريبان من بعض بحيث يوجدان عادة على نفس قطعة الـ DNA ، سيكون تردد التحول المشترك قريبا من تردد التحول لجين واحد.

كما يمكن ان يستخدم التحول المشترك cotransformation لمعرفة ترتب الجينات على الكروموسوم. فلو فرضنا ان لدينا جينان p و q ينتقلان مع بعض الى الخلية المستقبلة في كثير من الأحيان، اذن يجب ان يكونا مرتبطين. بنفس الطريقة, اذا كان الجين q و الجين o ينتقلان في العادة مع بعض فيجب ان يكونا قريبين من بعض. و لتحديد ترتيب الجينات p و o ، لدينا احتمالين اما p-o-q او p-q-o . فاذا كان الترتيب هو p-o-q فالمفترض ان يحدث تحول مشترك لـ p و o لانهما مرتبطان مع بعضهما اكثر من ارتباط p مع q ، اما اذا كان الترتيب p-q-o ففي هذه الحالة ينبغي ان لا يحدث تحول مشترك لـ p و oلانهما بعيدان عن بعض. يظهر من الشكل عدم حدوث تحول مشترك لـ p و o مما يشير الى ان ترتيب الجينات يجب ان يكون p-q-o.



شكل يوضح تحديد ترتيب الجينات باستعمال التحول المشترك cotransformation