آلية إسكات الجينات

The Mechanism of Gene Silencing

بقلم أ.د. محمد لبيب سالم
أستاذ المناعة
مدير مركز التميز لأبحاث السرطان
جامعة طنطا – مصر

mohamedlabibsalem@yahoo.com

اعتمدت العلاجات التقليدية على استهداف البروتينات الممرضة في علاج الأمراض المختلفة ولكن على العكس وفى الآونة الأخيرة يعد اكتشاف آلية تعطيل الجينات في خلايا الكائنات الحية من أهم الاكتشافات العلمية وسرعان ما أصبحت هذه الآلية من الطرق المهمة في تحليل وظائف الجينات في الكائنات حقيقية النواة كما أنة من المتوقع خلال السنوات القادمة أن يؤدى اكتشاف هذه الآلية إلى وجود علاجات جينية لكثير من الأمراض والأورام. ولان جائزة نوبل في العلوم (علم وظائف الأعضاء (الفسيولوجي) و الطب) والتي تمنح من معهد كارولينسكا في دولة السويد للعلماء الذين يساهمون بشكل مباشر في تقديم اكتشافات جديدة وذات صلة مباشرة بتقدم البحث العلمي وتوجيهه نحو حل المشاكل الصحية العديدة التي تحيط بالإنسان مثل الأمراض المعدية (Infectious Diseases) والأورام (Tumors) وأمراض المناعة الذاتية (Auto-immune diseases), فقد منحت جائزة نوبل في هذا المجال لعام 2006 لكل من الدكتور/ أندرو فاير والدكتور/ جريج ميلو وذلك لاكتشافهم آلية تعطيل الحمض النووي الريبوزى RNAi وآلية إسكات الجينات Gene Silence بواسطة الشريط المزدوج من الحمض النووي الريبوزى dsRNA. لقد تم اختيارهم بناءا على ما توصلوا إليه من أبحاث هامة والتي يتم استخدامها حديثا في العلوم الأساسية والأبحاث الطبية بصورة واسعة الانتشار كطريقة حديثة لدراسة وظائف الجينات والتي قد تؤدى إلى اكتشاف علاجات جديدة في المستقبل القريب. ومن الجدير بالذكر أن العلاج باستخدام تقنيات إل siRNA قد استخدم حديثا لعلاج أورام البنكرياس وذلك لعدم وجود علاج بديل إلى الآن لهذا الورم المميت. ولأهمية هذا الموضوع في الآونة الأخيرة فقد لزم علينا الإشارة إلية حتى يستطيع القارئ العربي من مواصلة ومواكبة الحديث في الأبحاث العلمية في العلوم البيولوجية والطبية.

في البداية تعالوا سويا نتعرف على المادة الوراثية في الخلية الحية وتوضيح الأهمية البيولوجية لها حيث من المعرف إن المعلومات الوراثية في الخلية توجد على شريط مزدوج من الحمض النووي الدى اوكسى ريبوزى (Double-stranded DNA) حيث تخزن هذه المعلومات في تتابعات محددة من النيوكليوتيدات Nucleotides والتي تعتبر الوحدة التركيبية في الشريط المزدوج ويوجد في النواة Nucleus ويحتوى هذا الشريط على الشفرات الوراثية التي تنسخ أولا إلى الحمض النووي الريبوزى الرسول mRNA بعملية تسمى بعملية النسخ Transcription وبمجرد تكوين الحمض النووي الريبوزى الرسولmRNA فانه سرعان ما يغادر إلى خارج النواة متجها إلى السيتوبلازم Cytoplasm حيث يتم هناك وبالاشتراك مع كل من الحمض النووي الريبوزى الناقل t.RNA والحمض النووي الريبوزى الريبوسومى r.RNA ترجمة الشفرات الموجودة على شريط الحمض النووي الريبوزى الرسول والمنسوخة إليه سابقا في النواة من الحمض النووي الدي اوكسى ريبوزى إلى بروتينات متنوعة على حسب حاجة الخلية والخلايا المجاورة وتسمى هذه العملية بعملية الترجمة Translation. وبمجرد تكوين البروتينات في السيتوبلازم فإنها تعمل على خدمة الخلية حيث تقوم بجميع الوظائف الحيوية في داخل الخلية وخارجها حيث تستطيع الخلية مواصلة عملها الموكل إليها وكذلك التواصل مع باقي الخلايا المجاورة وذلك لتلبية حاجة بعض الخلايا الأخرى أو التنسيق معها للعمل المشترك في حاله الإصابة بالأمراض المختلفة.

والجدير بالذكر أن الخطوة التي يتم فيها تصنيع ألحمض النووي الريبوزى mRNA من أل DNA تسمى أيضا بالتعبير الجيني Gene expression ومن المعروف لدى علماء البيولوجي والمهتمين بالدراسات الحيوية Biochemistry والطبية أن شفرات الجينوم البشرى تقريبا 35000 جين ولكن كل هذه الجينات لا يتم التعبير عنها بأكملها في كل خلية في الكائن الحي حيث أن الوقت ومكان تعبير الجين يتم التحكم فيه بصورة فائقة . ففي أي خلية نجد أن بعض الجينات فقط تكون نشطة (معبرة عن نفسها) بينما يكون البعض الآخر غير نشط (ليس معبر عن ذاته) وذلك تماشيا مع ما تقوم به الخلية من وظائف مختلفة ولذلك فان أي خطا في تنظيم الجينات (اى من ناحية التعبير عن نفسها أم لا) قد ينتج عنه تتابعات ممرضة للكائن الحي.

تعالوا سويا نتعرف على عملية تداخل إل رن أ RNA interference (RNAi):

إن آلية تعطيل الحمض النووي الريبوزى RNA-interference قد اكتشفت حديثا للتحكم في التعبير عن الجينات حيث يوجد جزئ صغير جدا من الحمض النووي الريبوزى مزدوج الشريط dsRNA يسمى بالحمض النووي

الريبوزى المتداخل الصغير small interfering RNA (siRNA) والذي يمكنه أن يقوم بتكسير(تحلل) الحمض النووي الريبوزى الرسول ولكن بشرط وجود تشابه عكسي على شريط الحمض النووي الريبوزى الرسولmRNA وبالتالي يمنع تكوين البروتين المطلوب لبناء وإعداد الوظائف الخلوية.

بداية الاكتشاف:

وبداية اكتشاف ال siRNA يعود إلى سنة 1986 حيث وجد عالمان في علوم البيولوجي في جامعة ستانفورد بالولايات المتحدة الأمريكية أن إدخال جين له نفس الشفرات الوراثية ولكن مرتبة عكسيا مع جين أساسي داخل الخلية قد أدى إلى انخفاض تعبير الجين الاساسى وذلك لان الجين الذي يحتوى على التركيب العكسي المشابه قد اعتبر كجين عكسي anti-sense mRNA وان الجين الموجود أساسا على الحمض النووي الرسول الداخلي-Sense mRNA وهذه الطريقة سميت باسم anti-sense technology. وهذه التكنولوجيا سرعان ما أصبحت طريقة شائعة في الهندسة الوراثية Genetic Engineering للنباتات وفى مجال الزراعة الحديثة.

ومع بدايات 1990 قد لاحظ العلماء في كل من الولايات المتحدة الأمريكية وهولندا ظاهرة غريبة جدا في احد النباتات التي يتم عليها بعض الدراسات الجينية وهى أن تلك النباتات في الحالة الطبيعية تعطى أزهار لونها بنفسجي وفى محاولة من العلماء ولكي يزيدوا من شدة اللون الموجود فقد قاموا بتعديل النبات جينيا وذلك بوضع عدد كبير من الجين المسئول عن تكوين الصبغة في النبات المستنسخ ولكن المفاجئة أنهم قد وجدوا أن هناك انخفاض شديد في شدة لون الزهور بدلا من الزيادة المتوقعة وبدأت النباتات في أن تفقد اللون نهائيا في بعض المناطق ومن ذلك قد فسر العلماء هذه الظاهرة على أساس تداخل الجينات. ولقد قام كل من فاير وميلو بوضع جزئ الحمض النووي الريبوزى RNA strand عن طريق عملية حقن دقيقة micro-injection في داخل تجويف جسم ديدان من النيماتودا Nematodes ففي البداية حقنوا شريط مفرد من الحمض النووي الريبوزى وهو عبارة عن جين يسمى ب UNC-22 وهذا الجين موجود أساسا في الخلايا العضلية للدودة بشكل طبيعي. وبالرغم من فقدان الوظيفة المحددة لل UNC-22 لم تمت الديدان ولكنها أدت إلى انحناء ملحوظ في جسم الدودة أثناء حركتها مما يؤكد أن هذا الجين والموجود بداخل جسم الدودة لم يعد في حالته الوظيفية بعد عملية الحقن. وقد زاد من دهشتهما أنه في حالة حقن كل من الشريط والشريط المعاكس sense and anti-sense RNA قد أدى إلى انحناء شديد في حركة الدودة وقد

استنتجا أن هذا الانحناء الشديد قد يكون نتيجة ازدواج القواعد النيكلوتيدية المفردة في ثنائيات Base-pairing of sense RNA and anti-sense RNA وفي تجربة أخرى قاموا بحقن جزئ مزدوج الشريط من إل RNA ,ومن خلال هذه التجربة فقد لاحظوا هذا الانحناء الشديد. وبالتالي اكتشف العلماء أن جزئ إل siRNA عبارة عن ناتج تكسير جزئ أخر اسمه إل sh.RNA أو جزئ إل mi.RNA. إن عدد جزيئات إل siRNA التي تبدأ عملية التداخل تكون صغيرة جدا ولا تتعدى إل 20 نيكليوتيدة في الطول ومع هذا تستطيع أن تعمل على تحلل الحمض النووي الريبوزى الرسول الذي يصل طوله إلى 100 مرة أطول منها ومن ثم فان جزيئات الحمض النووي الرسول المسئولة عن تخليق بروتينات عندما تتحلل سوف تهدر هذه البروتينات على الخلية وبالتالي فان هذه الخلية تفقد جزء من وظائفها

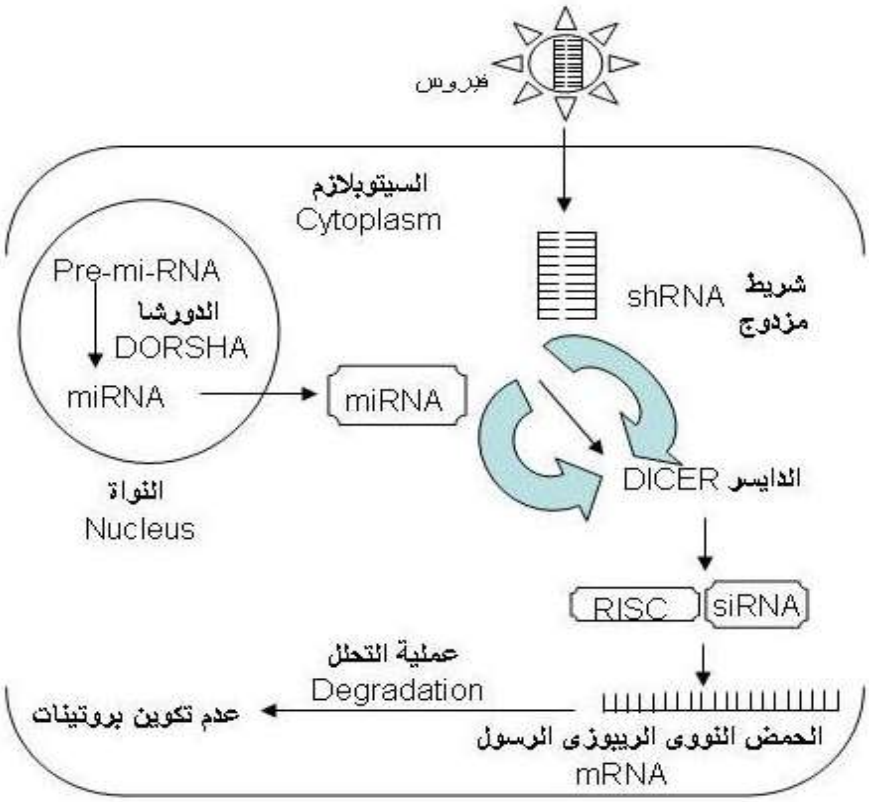
ولماذا استخدمت تلك الديدان بالتحديد في إجراء هذه التجارب؟

استخدمت الديدان في هذه الدراسة وذلك نظرا لبساطة الطريقة التي تستطيع من خلالها وضع الجين المراد إدخاله في جسم الدودة. والسبب في هذا يرجع إلى أن هذه الديدان يمكنها أن تعيش في المعمل وتتغذى على البكتريا ايشيرشيا كولاى E. coli وبالتالي لو احتوت هذه البكتريا على dsRNA المكملة للجينات الأساسية الموجودة في جسم الدودة فانه بكل بساطة سوف يتم إطعام الدودة على هذه البكتريا وهذا النوع من إدخال الجينات يعد من ابسط الأشكال الموجودة لإدخال الجين داخل هذا الكائن الحي.

والآن ما هي آلية عمل تعطيل الحمض النووي الريبوزى The mechanism of RNA-interference

ما الذي حدث بالفعل عندما قرر كل من فاير وميلو حقن الشريط المزدوج من RNA في جسم الديدان؟ لماذا حدث تكسيرDegradation لجزيئات الحمض النووي الريبوزى الرسولmRNA؟ لماذا تم التحلل بواسطة الشريط المزدوج فقط dsRNA بينما كان الأثر الضعيف نتيجة لاستخدام الشريط المفرد Single Stranded RNA؟ كل هذه الأسئلة وأكثر قد تم الإجابة عليها من خلال الأبحاث التي تمت في المعامل البحثية المختلفة على مستوى العالم حيث أن تكنولوجيا الsiRNA قد انتشرت بصورة واسعة في الآونة الأخيرة. أوضحت الدراسات الوراثية والكيمياء الحيوية التي تمت على الدودة والتي اختيرت لتكون حيوان التجارب المعملي في أبحاث العديد من العلماء وكذلك على حشرة الدروسيفلا Drosophila والخمائر Yeasts خلال إل 7-8 سنوات الماضية الآلية الخلوية التي تكمن وراء RNAi في الكائنات حقيقية النواة. وتوصلت الدراسات أيضا إلى أن الخلية الحية تحتوى على آلية لتدمير وتحلل

المحتوى النووي الريبوزى كما إن هناك آلية أخرى لتدمير المحتوى البروتين في الخلية ومن الجدير بالذكر إن اكتشاف آلية تدمير البروتين قد أوصل مكتشفيها إلى نيل جائزة نوبل لعام 2004 م وكانت من نصيب آرون سيكانوفر و ارفام هيرشكو و اروين روز. إن عملية التحلل بواسطة الشريط الثنائي تحدث في السيتوبلازم حيث انه يتم التعرف على الشريط المزدوج بواسطة إنزيم يسمى دايسر DICER وهذا الإنزيم يعمل على فصل أجزاء إل RNA وله



شكل توضيحي يوضح كيفية تكوين جزئ الsiRNA من الادخال الفيروسي للخلية او من الجزيئات الدقيقة من الحمض النووى الريبوزى المصنع فى النواة. كما يوضح عملية تكسير الحمض النووى الرسول بواسطة جزئ الsiRNA وبالتالى عدم القدرة على تكوين البروتينات فى الخلية وهذا قد يؤدى الى اكتشاف علاجات جينية فى المستقبل القريب.

القدرة على الالتحام مع الشريط المزدوج من RNA في وجود بروتين أخر وبالتالي يعمل على تقطيع الشريط المزدوج إلى جزء صغير يسمى ب siRNA وبعد ذلك يتم نقل siRNA إلى جزئ كبير مكون من بروتين بالإضافة إلى الحمض النووي يسمى ب RNA-Induced-Silencing-Complex (RISC) وفى داخل هذا التركيب يتم فك siRNA الى شريطين منفصلين ويعمل بعد ذلك على التخلص من احد الشريطين ويبقى على الآخر ومن خلال هذا المركب الجديد الذي يحتوى على شريط مفرد من siRNA بداخلة فأنة يبدأ بالتعرف على الحمض النووي الريبوزى الرسولmRNA والذي يحتوى على تتابعات نيكليوتيدية مشابهة عكسية لتلك التي على siRNA ويبدأ في الازدواج

معها ومن ثم يبدأ في تحلل Degradation of mRNA وبالتالي لا يمكن تكوين البروتين المطلوب وهذه هي الظاهرة التي تعرف باسم إسكات الجينات. وكذلك في بعض الأحيان يتم نسخ جينات في الخلية تسمى بالجينات المنظمة أو التنظيمية والتي لا يمكن أن تترجم إلى بروتينات وتعرف باسم (Micro-RNA(miRNA وعادة ما يكون Pre-miRNA كبير في الحجم يتم إعداده في داخل النواة, ولكي يصبح حجمه صغير يتم التعامل معه بواسطة إنزيم يشبه ال DICER ويسمى ب دورشا DORSHA كما أن هناك شريط مزدوج آخر يسمى ب rasiRNA وكل من miRNA or rasiRNA يتم التعرف عليهم في السيتوبلازم بواسطة إنزيم إل دايسرDICER . ومع التقدم العلمي في استخدام تكنولوجيا ال siRNA فانه يتم استخدامه في العلاج إما على صورة Oligos اى تتابعات محددة من النيكلوتيدات المصنعة كيميائيا وهى إلى حد ما باهظة التكليف أو في صورة shRNA ويتم تحميلها على ناقل Vector فيروسي أو بلازميد Plasmid وحديثا قد تم استخدام جزيئات متناهية الصغر Nano-particles في عملية إدخال الجين المراد إلى داخل الخلية

أهم التطبيقات على تكنولوجيا إسكات الجينات وآليتها

قد منحت وقدمت تكنولوجيا إسكات الجينات وآليتها احتمالات جديدة في مجال العلوم الأساسية والبيتكنولوجى والطب والزراعة. إن هناك العديد من الأبحاث التي تم نشرها في هذا المجال منذ أن نشر فاير وميلو بحثهما وعندما تقوم بالبحث على محرك إل Pubmed بكلمة RNA interference فانك سوف تجد 16149 بحثا قد نشر في مجلات مختلفة حتى يوم 2008/5/30 ولعل هذا الرقم سوف يتزايد سريعا ومن المتوقع أن هذه التكنولوجيا سوف تحدث ثورة في مجال الطب والصحة إن العديد من **الدراسات على التعبير الجيني**. باستخدام إل siRNA قد أدى إلى تقديم طريقة بسيطة لكي يتم من خلالها حذف الجين من خلال وقف التعبير عنة في الخلية Knock-down gene expression وبالتالي يمكن دراسة وظيفة هذا الجين في كل من المملكة الحيوانية و المملكة النباتية على حد سواء وكان لاكتشاف هذه الظاهرة الأثر الكبير في المجالات البيولوجية والطبية حيث انه يمكن أن نوقف عمل جين محدد قد يكون من احد العوامل المسببة للأمراض المعدية أو الأمراض السرطانية وحديثا باستخدام نماذج كمبيوترية نجح العلماء في تصميم siRNA قد يحدث إسكات لنواتج جين معين بشكل ممتاز وهذا التكنيك يستخدم حاليا لكي يتم تثبيط الجينات الفيروسية ويعمل على منع انتشار وتكاثر الفيروسات التي قد تسبب الأمراض للإنسان مثل الأورام والحصبة

والأنفلونزا والأمراض الكبدية. إن استخدام تكنولوجيا siRNA قد باتت من الأشياء المهمة في عملية العلاج بالجينات في المجالات الطبية.