التحول Transformation

ان اكتشاف التحول (اخذ قطعة DNA) من قبل الخلية البكتيرية هو بدية دراسة وراثة البكتريا والبايولوجي الجزيئي . في عام 1928 عندما كان كرفث Griffith يجري تجارب على البكتريا ذات الرئة pneumococcus (*Streptococcus pneumoniae*) اكتشف ان السلالات غير الضاريه a virulent يمكن ان تتحول الى ضارية virulent بواسطة حضنها مع مستخلص خلايا ضارية مقتولة. ثم بعد 16 سنة بين افري ومكلوريد ومكارتي ان اساس التحول هو الدنا DNA وهو الذي اثبت دور الدنا بصفته المادة الوراثية في خلية البكتريا.

اصبح التحول مهما في التحليل الوراثي لبعض الانواع البكتيرية ثم بدرجة اكثر لدوره الاساسي في كلونه الجنين.

في بكتريا *Streptococcus pneumoniae* تصبح الخلايا بصورة ذاتية مؤهلة competent لألتقاط الدنا.

ودرس هذا التحول الطبيعي ايضاً وبشكل كبير في بكتريا *Bacillus subtilis* و *Haemophilus infleunzae* وكان يعتقد لفترة ان العملية محصورة بهذه الانواع والانواع القريبة منها ولكن اصبح الان معلوما انها اكثر انتشارا.

مثلا يساهم التحول بدرجه كبيرة في التنوع المستضدي Antigenic variation الملاحظ في بكتريا gonococcus (*Neisseria gonorrhoeae*) من خلال نقل مورثا الخمل *pil* genes المشفرة للوحدة البروتينية الثانوية الكبيرة من الخمل (pili هو زوائد بروتينية موجودة على السطح تتمكن من خلالها البكتريا الالتصاق على الخلايا الطلائية). وعلى الرغم من محدودية عدد الانواع التي تبين حدوث التحول الطبيعي فيها، الا انه يعتقد ان هذه العمليه تحدث (لكن بمستوى قليل) في انواع بكتيرية عديدة اخرى.

ان تفاصيل عملية التحول تتغاير بين الانواع، الان ان بعض العموميات موجودة : يحدث التأهل (Competence) عادة عند مرحلة معينه من النمو، غالبا في الطور اللوغارتمي المتأخرو تقريباً عند دخول الخلايا في طور الثبات Stationary phase. وهذا قد يكون استجابة لزيادة كثافة الخلايا بدلا من طور النمو. مثلاً في بكتريا *B.subtilis* بعض الجينات المشتركه في نشوء حالة التأهل تكون مشتركة ايضا في المراحل المبكرة من تكوين السبورات (الابواغ).

ان تطور حالة التأهل في هذه المرحلة لايكون فقط

- مرافقاً لنفاذ المواد الغذائية
- ولكن ايضاً مع تراكم نواتج اقرازية خاصة (عوامل التأهل Competence factors والتي تعمل من خلال نظامين متظمنين على تحفيز تعبير مورثات اخرى مطلوبة لحدوث التأهل والذي يتطور فقط عند تراكيز عالية للخلايا. وهذا هو نوع من التحسس للوسط ، الذي تكون قيمة استجابة الخلية المنفردة محكومه بتركيز البكتريا في الوسط المحيط بها.

بعد تطور التأهل في الخلية، تربط قطع الدنا ثنائية الشريط الى مستقبلات عل سطح الخلية، لكن شريط واحد فقط يدخل الى داخل الخلية. في بعض الانواع تكون هذه العملية انتخابية لدنا من نفس الانواع وذلك من خلال الحاجة الى وجود تتابعات قصيرة خاصة بالنوع مهمه لدخول قطع الدنا مثلا اخذ الدنا من قبل meningococcus (*Neisseria meningitides*) يعتمد عل وجود تتابعات التقاط خاصه مؤلفة من 10 ازاج قواعد.

ويحتوي الجينيوم في بكتريا *N. meningitides* تقريبا 2000 نسخة من هذه التتابعات . وهذه التتابعات تحدث بشكل نادر واحياناً بالصدفة في المكون الوراثي للانواع الاخرى. في بكتريا *Haemophilus infleunzae* بوجود تتابعات التقاط بحدود (29-bp) والتي تتواجد تقريباً 1500 مرة في المكون الوراثي ل *H .infleunzae* وهذا بدوره يسهل ويسرع عملية التحول وبالتالي فأن هذه الاحياء سوف تتحول بكفأة فقط عند وجود الدنا من نفس النوع.

وفي المقابل تستطيع الانواع *B.subtilis* و *Str .pneumoniae* اخذ اي جزيئة دنا خطية تقريباً الا ان اخذ جزيئة الدنا ليس سوى البداية في هذه العملية. ولكي تتحول الخلية بشكل ثابت يجب ان يتم تكرار قطعة الدنا الجديدة وتوارثها. كما في قطع الدنا الكروموسومي (وليس البلازميد) وان تكرار الدنا يحدث فقط في حالة تركيب قطعه الدنا الداخلية مع كروموسوم الخلية المستقبلة. وهذا يتطلب تماثل (Homology) بين الدنا المحول والكروموسوم المستقبل وهذا لايشكل مانعا مطلقا للتحول بالدنا من انواع اخرى وذلك لان هناك تماثل كافي في بعض مناطق الكرمومسوم يجعله يمتلك القدرة على الدخول في عملية اعادة الارتباط مع كرمومسوم الخلية المستقبلة (Recombination). وكلما اقتربت القرابة التصنيفية زاد احتمال كونه متماثل بشكل مناسب. واحد الامثلة ذات الاهمية النطبيقية العالية على ذلك هو تطور مقاومه البنسلين في بكتريا *Str. pneumoniae* والذي يبدو انه حدث باستبدال اجزاء من الموروثات المشفرة للانزيمات المستهدفة بالبنسيلين مع قطع دنا مماثلة من المكورات المسبحية في الفم ذات المقاومة الطبيعية.

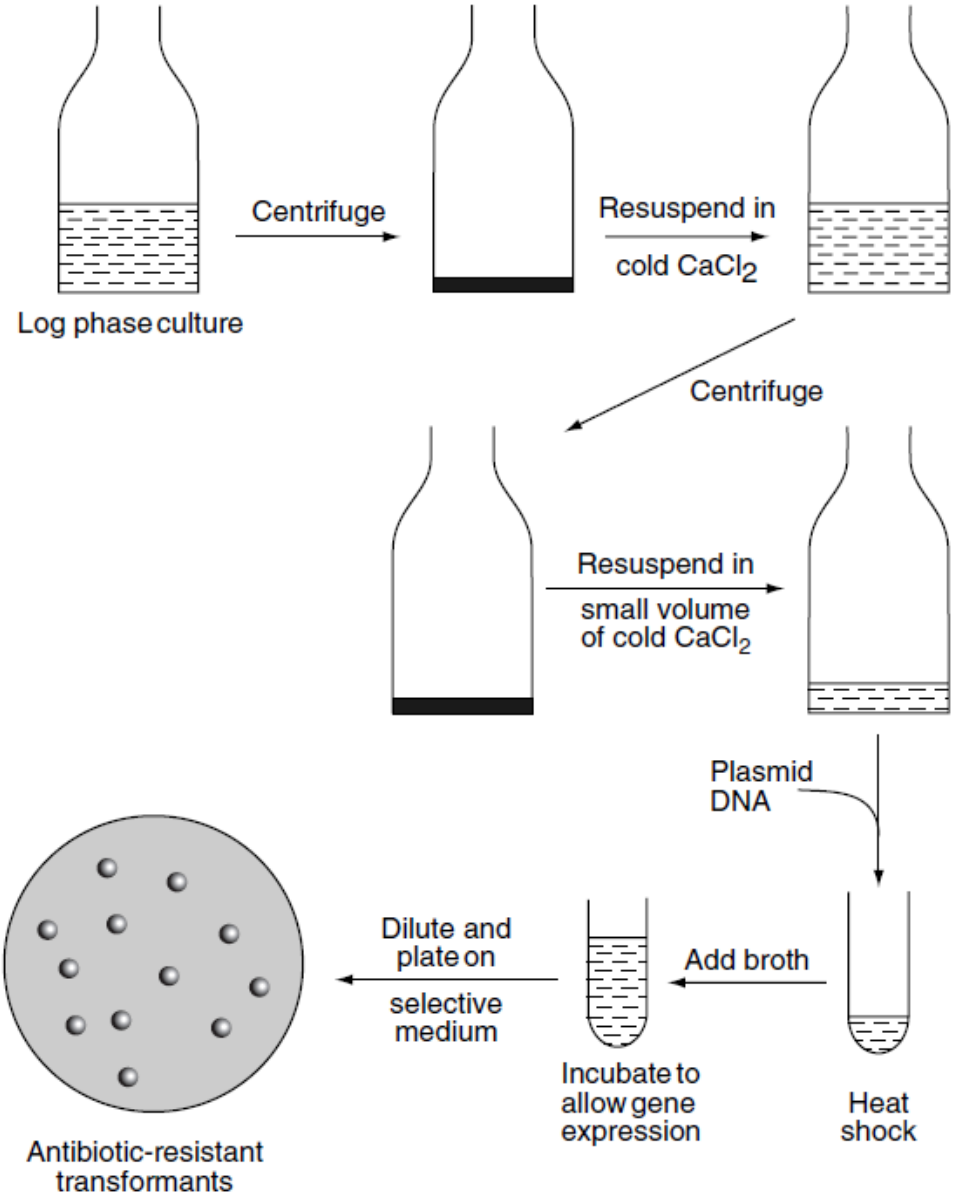
ان التحول الطبيعي ذو فائدة محدودة للتحوير الوراثي الصنعي في البكتريا وذلك لكونه بالاساس يعمل بشكل امثل مع قطع الدنا الخطي Linear بدلاً من دنا البلازميدات الحلقي التي تستخدم في التحوير الوراثي. ولأدخال مورثات غريبة الى العائل البكتيري تستخدم تقنيات مختلفة لحث حالة صنعية من التأهل.

التقنيات المستخدمة بالحصول على الخلايا المؤهلة :

1. ان توليد بلازميدات مركبة (بعملية كلونة الجينات) يتطلب بعد ذلك ادخالها الى الخلية المعيلة.ان عملية التحول الطبيعة تكون غير مناسبة لهذا الغرض في جانب منها ترجع لعدم كفاءة العملية مع جزيئات الدنا البلازميدي الحلقية وجزئياً بسبب عدم تكون الخلايا المؤهلة بصورة طبيعيه (ومنها بكتريا *E.coli*) في هذه البكتريا يتطلب التحول حث صنعي لحدوث التأهل. وهناك عده طرق لاحداثه واسهل هذه الطرق هي الموضحة في الشكل المرفق والتي تتضمن غسل الخلايا المتكرر بمحلول كلوريد الكالسيوم البارد. ثم تمزج الخلايا المؤهلة مع محلول ال DNA وتعرض لصدمة حرارية مثلاً تسخينها الى 42C لمدة 1-2 دقيقة ثم نقلها ثانية الى الوسط بالميرد بالثلج. ثم تخفف بعد ذلك بالمرق المغذي وتحضن عند 37C للسماح بتعبير الدنا المكتسب حديثاً قبل زراعتها في الاطباق على الوسط الملائم.

2. النوع الاخر من التحول (المسامية الكهربائية Electroporation) يكون ملائما بشكل خاص لانواع البكتريا من غير ال E.coli. اذ قد يعرض خليط الخلايا والدنا بشكل سريع (قصير) لفولتية عالية تمكن الدنا من دخول الخلية (وتسمى هذه العملية بالمسامية الكهربائية Electroporation. وعلى الرغم من اختلاف اشكال هذه الطرائق الا ان الخاصية المشتركة بينها هي التقاط قطع الدنا (العارية) من قبل الخلايا ولذلك تسمى ايضا بالتحول Transformation.

بذلت جهود كبيرة لتضبيط هذا النظام لتحول بكتريا *E.coli* منها تطوير سلالات خاصة اظهرت كفأة تحول عالية، تصل الى 10^9 تحول لكل 1 µg من الدنا. ومع ذلك فأنه نسبة قليلة من الخلايا سوف تأخذ جزيئات الدنا من الوسط



الشكل (1) يوضح الخطوات الاساسية قي تحول بلازميد الى بكتريا القولون

3. الطريقة الاخرى تعرف بتحول البروتوبلاست Protoplast transformation وفيها يتم أزاله جدار الخلية انزيمياً بوجود مثبت ازموزي مثل السكروز، تولد خلايا protoplast واضافة محلول

الدنا DNA مخلوطا مع البولي اثيلين كلايكول(PEG polyethylene glycol) يجعل الخلايا تلتقط الدنا . ثم يزال بعد ذلك ال PEG ويسمح للخلايا باعادة تكوين الجدار في وسط ازموزي مثبت. وفي حالة استخدام الظروف الصحيحة فأن نسبة عالية من المستعمرات الناتجة سوف تكون متحولة. وهذه التقنية يمكن ان تستخدم لتحول عدة انواع من البكتريا مثل *Streptomyces* وانواع Streptococcus. ومع ذلك فان كفأة هذه العملية تكون متابينة عند تطبيقها على انواع مختلفة وتكون في بعض الحالات منخفضة جداً .

في الاستخدام التطبيقي. كما يمكن ان يكون من الصعب مقايسة الظروف لتكوين وتكاثر البروتوبلاست.حيث تكون الطريقة المسامية الكهربائية اكثر سهولة والتي يكون فيها خلط خلايا البكتريا مع الدنا البلازميدي ويعرض الى فولتية عالية متقطعة (نبضات). وهذا ربما يؤدي الى حدوث ثقوب صغيرة في الغشاء الخلوي يدخل من خلالها الدنا للخلية.