عاثي M13 لبكتريا *E.coli*

العاثي M13 من بكتيريا *E.coli* يختلف بعدة نواحي عن العاثيات الأخرى التي تناولناها. انه واحد من اصغر العاثيات البكتيرية. يتألف مكونة الوراثي (Genome) من عشرة مورثات فقط (شكل 14-20) وجميعها أساسي. تحتوي جسيمة العاثي على جزيئة دنا حلقية (تسمى الشريط الموجب +)،طولها 6,407 نيوكليوتيدة فقط. الـ M13 ذو شكل عصوي Rod-shaped،من العاثيات الخطية تستطيع تعبئة جزيئات دنا حلقية في جسيمة العاثي أطول بعدة مرات من شريطها الفيروسي. يمدص العاثي فقط إلى السلالات المذكرة من بكتريا *E.coli* لكنة لا يحلل الخلايا المصابة. تستمر الخلايا المصابة بالنمو والانقسام، مولدة 100- 200 من العاثيات لكل خلية لكل جيل .

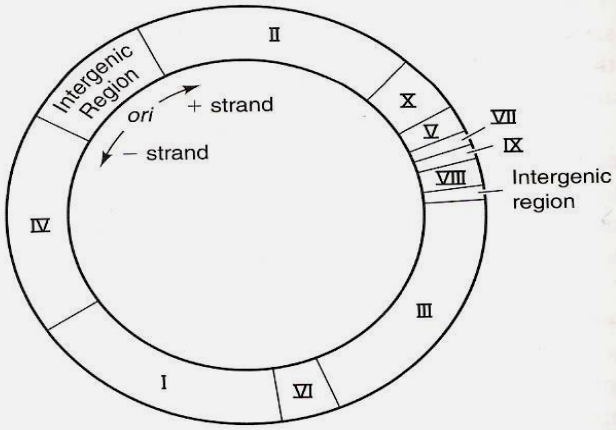

Figure 14-20 Genetic map of M13. Genes are designated by roman numerals: II-replication protein, V-single-stranded DNA binding protein, VIII-major coat protein, IX-minor coat protein. The origins of replication are in the intergenic space between genes II and IV.

الخطوة الأولى في تكرار الشريط السالب strand(–) هي تخليق بادئ رنا بواسطة إنزيم بلمرة الرنا البكتيري *E.coli* عند أصل الشريط السالب على جزيئة دنا الفيروس مفرد الشريط (الشريط الموجب +) .طول البادئ 30 نيوكليوتيدة، ثم تتم الاستطالة من الطرف 3′-OH بواسطة إنزيم بوليمريز الدنا III لبكتريا *E.coli* DNA polymerase III على طول الحلقة حتى يصل إلى الطرف 5′-P من البادي. يقوم عندها إنزيم بلمرة الدنا الأول البكتيري *E.coli* DNA polymerase I بتكسير البادي واستبداله بالنيوكليوتيدات منقوصة الأوكسجين deoxynucleotides ولحم نهايتي للشريط السالب (-) حالا بواسطة الإنزيم اللاحم البكتيري *E.coli* DNA ligase وتسمى الجزيئة مزدوجة الشريط فائقة اللف الناتجة الشكل التكراري الأول RFI (replication form I)

بروتين المورث الثاني للعاثي (gene II protein) مطلوبا لتخليق الشريط البنوي للفيروس. هذه الأشرطة تصنع من قالب الشكل التكراري الأول RFI بواسطة تبديلات في نموذج الدائرة المتدحرجة (شكل 14-21). يبدأ التخليق عندما يثلم بروتين المورث الثاني الشريط(+) عند أصل الشريط الموجب origin(+). وباستخدام بروتينات تكرار بكتريا الـ *E.coli* (DNApolymerase III, SSB , Rep) تتم استطالة الشريط الموجب(+) من طرق 3′-OH عند موقع الثلمة. كلما تمت إزاحة الشريط القديم الموجب (+) عند استطالة الشريط الموجب الجديد تتم تغطيه بالبروتينات الرابطة للشريط المنفرد ssb. و عندما يصل الشريط الموجب (+)الجديد إلى الأصل (origin)، يتم ثلمه ثانيا بواسطة بروتين المورث الثاني، محررا الشريط الموجب (+) القديم الذي يتم لحم طرفيه 3′-OH و 5′-P بواسطة ناتج المورث II.

نلاحظ إن الشكل التكراري (RF) الذي يتم تكراره لا يولد ذرية مزدوجة الشريط مباشرة. حيث يكون ناتج دورة واحد من التكرار جزيئة حلقية مفردة الشريط الموجب(+) و جزيئة الشكل التكراري (RF) مزدوجة الشريط.

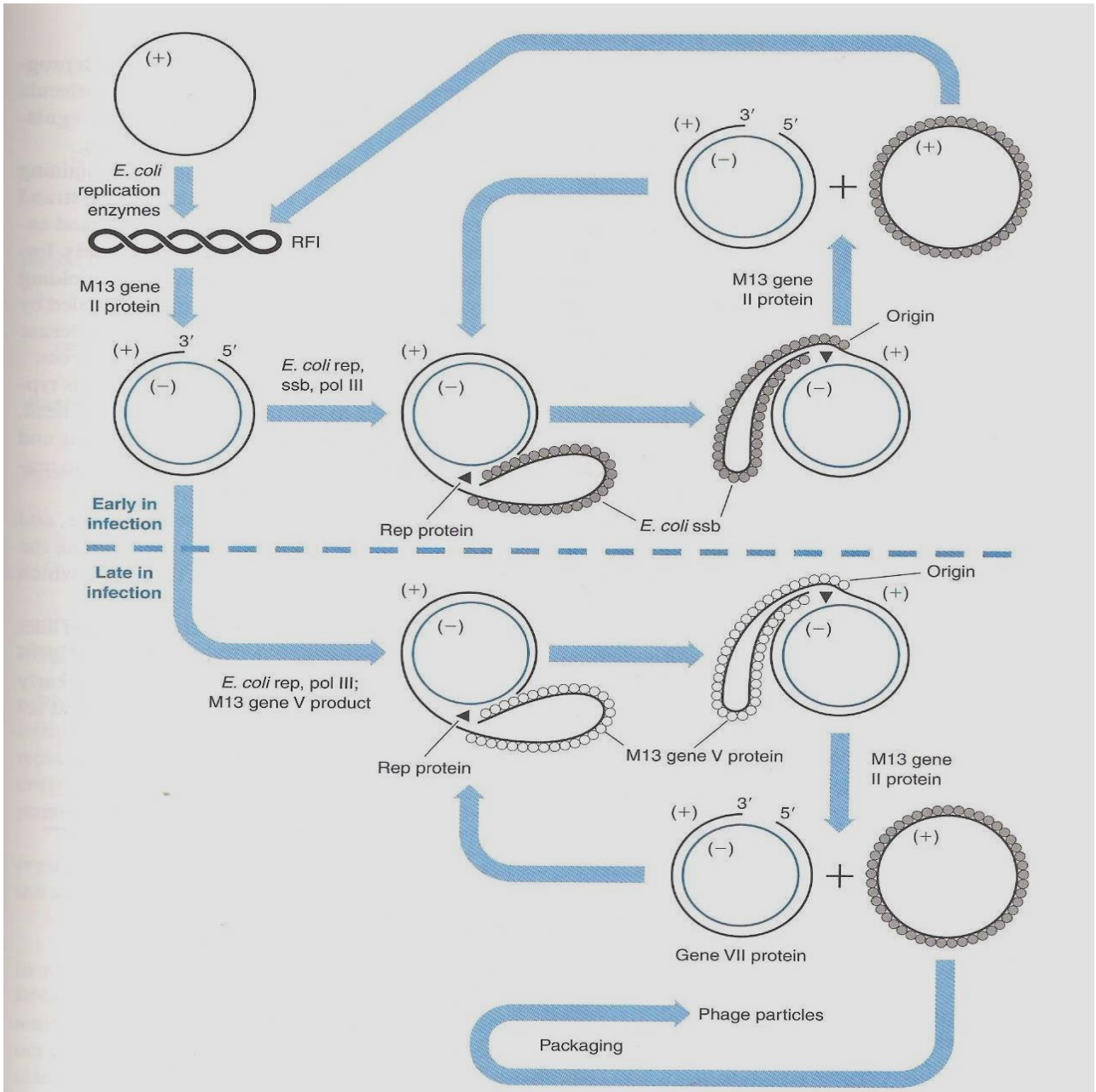

Figure 14-21 A diagram of the replication of phage M13. *E. coli* replication enzymes convert the single-stranded phage DNA into the RFI form, which is then nicked by the M13 gene II protein. Rolling circle replication (see Figure 7-9 in Chapter 7) ensues to generate a daughter strand (blue) and a displaced (+) single strand that is coated with *E. coli* ssb (filled circles) early in infection, or M13 gene V protein (open circles) late in infection. When the entire (+) strand is displaced, it is cleaved from the daughter (+) strand and circularized by the joining activity of the M13 gene II protein. The cycle is ready to begin anew. Note that the (−) strand is never cleaved. Viral (+) strands coated with M13 gene V protein are packaged into phage particles after the gene V protein is displaced by gene VII protein.

عند الزمن المبكر خلال عملية الإصابة يستخدم الشريط(+) البنوي لقالب تخليق الشريط(-)، وهو السبب لتكرار للشكل التكراري RF→RF.وخلال هذه الفترة يتم أيضا استنساخ الشكل التكراري RF، مولدا بروتينات الغطاء (ناتج المورث السابع VII) الذي يرتبط مع الغشاء السايتوبلازمي، وناتج المورث الخامس V (البروتين الرابط لشريط الدنا المفرد) الضروري للمرحلة النهائية من التكرار. يحدث التحول من إنتاج الشكل التكراري RF→RF إلى الشريط المفرد RF→SS عندما تتراكم كمية كافية من ناتج المورث الخامس (V) لربط أشرطة الفيروس الجديدة ومنعها من العمل قالب لتخليق الشريط السالب(-). وبعدها ينتقل معقد دنا الفيروس والبروتين ناتج المورث V إلى غشاء الخلية، حيث يتم استبدال البروتين ناتج المورث V ببروتين الغلاف. ويتم إفراز جسيمات الفيروس عبر جدار الخلية وبدون تحلل الخلية.

إذا تمت زيادة حجم جزيئة دنا M13 بإدخال دنا غريبة في الموقع القريب من الأصل السالب (-origin)، سوف لا تتغير أي من وظائف العاثي. يتم تكرار الجزيئة الكبيرة وتعبئتها في غلاف اكبر(خلافا للعاثي T4، حجم جزيئة الدنا هو الذي يحدد حجم جسمية العاثي). لذلك فان العاثي M13 وسيلة مهمة في كلونه الدنا. باستخدام تقنيات إعادة ارتباط الدنا، تتكرر الدنا الغريبة بصورة جزء من جزيئة M13. يمثل الدنا المعبئ في غلاف العاثي مصدر وفير للدنا المفرد الشريط لغرض تحديد التتابع sequencing و التطفير الموجه موضعيا.

العاثي لامدا λ:

الدورة التحللية:

العاثي لامدا λ عاثي معتدل لبكتريا *E. coli* يستطيع الانخراط في كلا الدورتين الدورة التحللية (Lytic) والدورة الإدغامية (Lysogenic). ميزات خاصة في نظام السيطرة البارع في λ تحدد أي من المسارين يتم استخدمه في دورة الإصابة.يمتلك دنا العاثي λ مكونين: قطعة مزدوجة الشريط تحتوي 48.489 زوج نيوكليوتيدي معلومة التتابعات. واستطالة مفردة الشريط طولها 12 نيوكليوتيدة عند النهاية 5′P في كل شريط، الاستطالتين الطرفيتين مفردتي الشريط تمتلك تتابع قواعد متمم وتدعى النهايات الدبقة (اللزجة). مباشرة بعد حقن الدنا الى الخلية العائل تزدوج النهايات الدبقة مولدة حلقة وبسرعة تلحم الأطراف المتجاورة 3′-OH و 5′-P بالإنزيم اللاحم للدنا (ligase) وثم تحول الحلقة إلى فائقة اللف بواسطة إنزيمات الصور الفراغية للخلية العائل، ولا يشترك في هذه العملية أي ناتج جيني للعاثي (شكل 14-22).

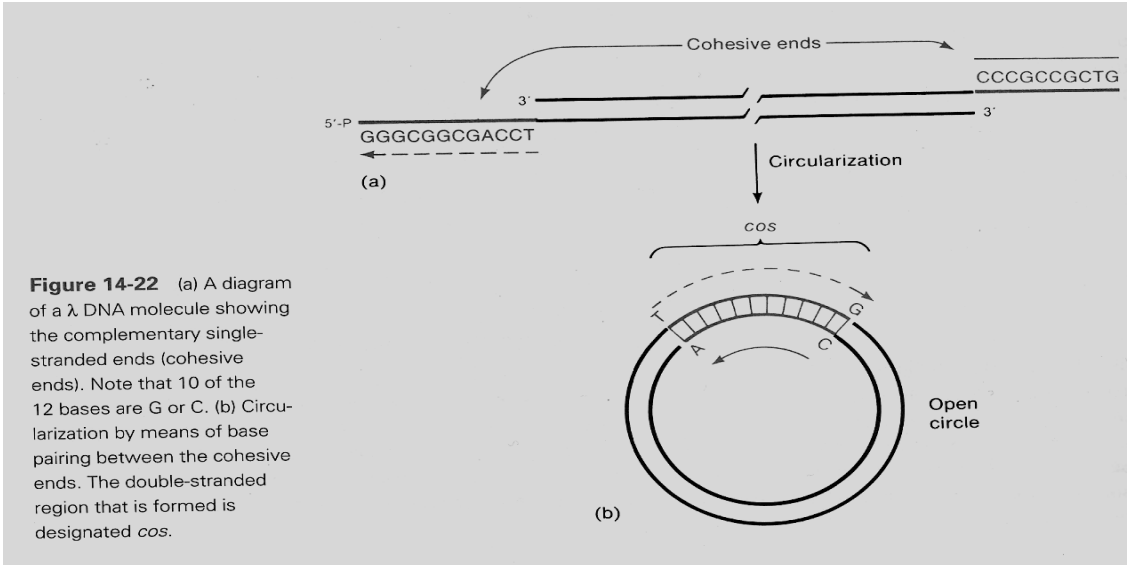

Figure 14-22 (a) A diagram of a λ DNA molecule showing the complementary single-stranded ends (cohesive ends). Note that 10 of the 12 bases are G or C. (b) Circularization by means of base pairing between the cohesive ends. The double-stranded region that is formed is designated *cos*.

ترتيب المورثات في العاثي λموضح في الشكل (14-23). كما هو شائع في العاثيات تتجمع المورثات استنادا إلى الوظيفة مثلا مجاميع مورثات الرأس والذيل ومجموعة مورثات التكرار ومجموعة مورثات إعادة الارتباط تشكل أربع تجمعات جينية مختلفة. تجميع واستنساخ أعضاء هذا التجمع من المورثات من نفس شريط الدنا يسمح للعاثي λ لتنظيم الاستنساخ بعدد قليل من المواقع التنظيمية.

سوف نتناول هنا الأحداث التنظيمية في الدورة التحللية وتكرار وإنضاج دنا العاثي λ وفي الجزء الأخر سوف نطلع على الأحداث التنظيمية لمسار الإدغام والعوامل التي تحدد إتباع أي من المسارين

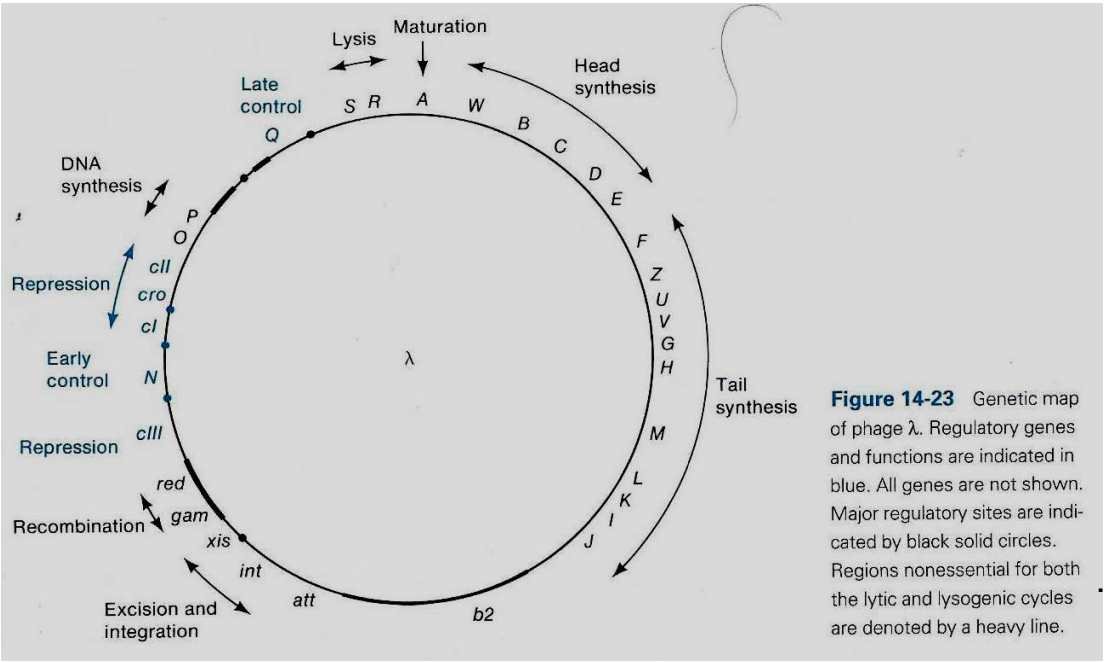

Figure 14-23 Genetic map of phage λ. Regulatory genes and functions are indicated in blue. All genes are not shown. Major regulatory sites are indicated by black solid circles. Regions nonessential for both the lytic and lysogenic cycles are denoted by a heavy line.

يحدث استنساخ العاثي λ في ثلاث مراحل زمنية ، المرحلة المبكرة جدا ، المرحلة المبكرة ، المرحلة المتأخرة . مرحلة الاستنساخ المبكرة جدا والمرحلة المبكرة تسبق قرار تحديد إتباع مسار الدورة التحللية أو الإدغامية. لذلك أنها متشابهة في كلا نوعي الإصابة. يشفر الرنا المراسل mRNA من المرحلة المبكرة جدا للبروتينات التنظيمية، ويشفر المستنسخ المبكر إنزيمات التكرار وإعادة ترتيب الدنا، ويشفر الرنا المراسل المتأخر في الدورة التحللية بروتينات تركيبية لجسيمات العاثي وبروتين التحلل (lysis proteins).

في اختلاف واضح عن العاثي T7، يستخدم العاثي λ إنزيم بلمرة الرنا البكتيري *E.coli* RNA polymerase لاستنساخ جميع جزيئاته من الرنا المراسل mRNA. وتنفذ السيطرة النوعية على مستنسخات العاثي λ بتنظيم كل من الابتداء و الإنهاء (Initiation and Termination). ينظم الابتداء بواسطة منشطات مشفر لها من العاثي λ وهي (*cI,cII*) وكابت مشفر بواسطة العاثي والتي تسيطر على الوصول إلى الحفاز.وينظم الإنهاء بواسطة مضادات الإنهاء الخاصة بالفيروس phage-specific antiterminators(N&Q) (البروتينات التي تسمح لإنزيم بلمرة الرنا بالاستنساخ خلف مواضع الإنهاء الخاصة).

التنظيم الزمني Temporal regulation (أي التنظيم من خلال الوقت) يتحقق بالتعبير التعاقبي للبروتينات المنظمة. على سبيل المثال نفترض جزيئة دنا تحتوي على التتابعات التالية *pABt1Ct2* تمثل فيها p الحفاز و ABC مورثات و t1 و t2 إشارات الإنهاء. في البدء يرتبط إنزيم بلمرة الرنا إلى الحفاز p ويستنسخ المورثات A و B وافترض إن B تشفر مضاد للإنهاء وذلك لجعل إنزيم بلمرة الرنا يتجاهل إشارة الانتهاء الأولى t1. في هذه الحالة وقبل إمكانية صنع ناتج المورث C، يجب أن يتم صنع ناتج المورث B، وبذلك فان ناتج C سوف يصنع في وقت متأخر عن ناتج A.

كما ذكر سابقا إن العاثي λ يحول إلى الشكل الحلقي بسرعة بعد الإصابة، وتزدوج النهايات الدبقة لتكون منطقة *cos* مزدوجة الشريط. من الواضح ،عند بعض مراحل دورة الحياة، يجب إعادة توليد النهايات مفردة الشريط، لان الدنا يكون خطي في رأس العاثي. وهذا ينجز بواسطة نظام قطع يسمى إنزيم الإنهاء Terminase (Ter) الذي يقطع ضمن المنطقة الدبقة *cos* في دنا الذرية. إلا إن القطع لا يحدث في حلقات دنا الذرية، بدلا عن ذلك ، تنسق عملية تكرار الدنا والقطع بالطريقة الموجودة في عدة أنواع من العاثيات. المرحلة المبكرة من تكرار العاثي λ تكون بنمط θ ثنائي الاتجاه Bidirectional θ mode. و إن حلقات الذرية الناتجة لا تستمر في التكرار في هذه الطريقة بل تتحول إلى نمط الدائرة المتدحرجة، مولدة فرع طويل (شكل 14-24).

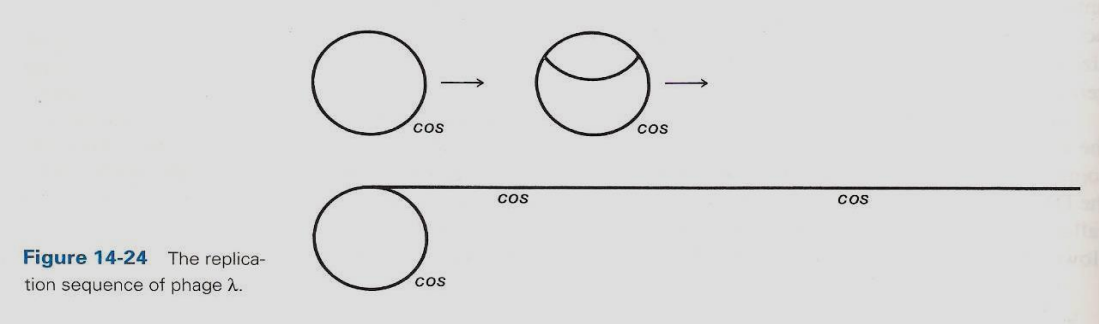

Figure 14-24 The replication sequence of phage λ.

تقطع جزيئات ذرية العاثي λ من فرع الدائرة المتدحرجة بواسطة إنزيم الإنهاء (Terminase). ولا يقطع الجزء الحلقي من الدائرة المتدحرجة (هذا سوف يمنع التكرار الإضافي) لان إنزيم الإنهاء Terminase يحتاج إلى موقعين دبقين *cos* site أو موقع *cos* واحد مع طرف حر واحد مفرد الشريط. وهكذا فان استئصال وحدات العاثي λ يحدث بالقطع المتعاقب من النهاية الحرة للفرع كما موضح في الشكل (14-25). هذه الآلية لتحديد كمية الدنا التي يتم تعبئتها تختلف من حيث الأساس عن آلية تعبئة الـ T4. آلية امتلاء الرأس للعاثي λ تكون مثل الـM13 كمية كروموسوم العاثي هي التي تحدد كمية الدنا التي يتم تعبئتها. وبذلك مثل العاثي M13 يمكن استخدام العاثي λ ناقل في الهندسة الوراثية لأنه يمكن أن يستضيف قطعة دنا مدغمة إضافية.

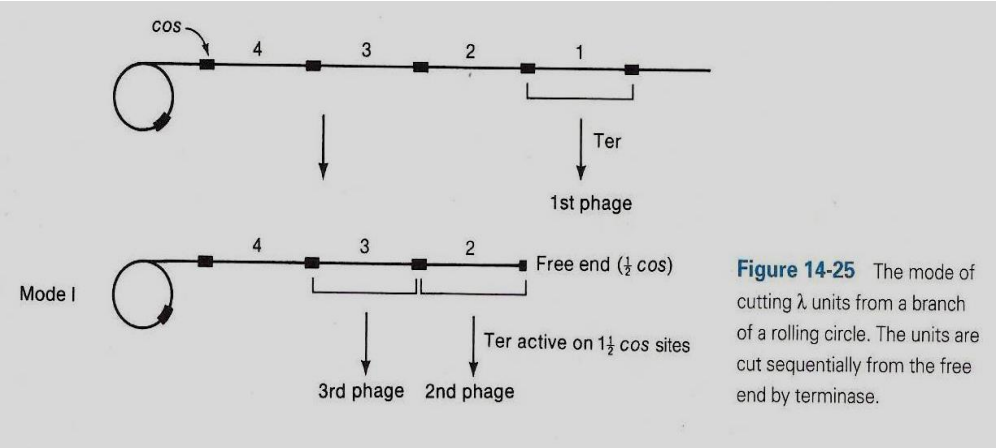

Figure 14-25 The mode of cutting λ units from a branch of a rolling circle. The units are cut sequentially from the free end by terminase.

دورة الحياة الإدغامية للعاثي λ في بكتريا *E. coli* (The Lysogenic life cycle)

هناك نوعين من دورة الحياة الإدغامية و يعد العاثي λ النمط الممثل للطريقة الأكثر شيوعا، الخصائص الأساسية لها معروضة في الشكل (14-26) وهي:

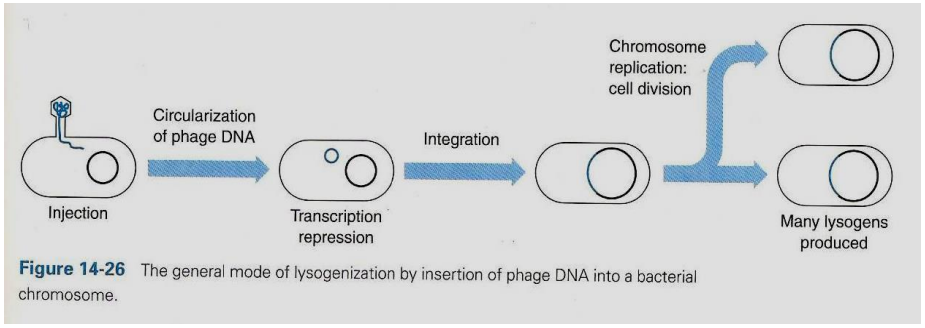

Figure 14-26 The general mode of lysogenization by insertion of phage DNA into a bacterial chromosome.

1. حقن جزيئة الدنا في البكتريا
2. بعد فترة قصيرة من الاستنساخ ، المطلوبة لتخليق إنزيم إدغام وكبت استنساخ العاثي، يتم إيقاف الاستنساخ
3. تدغم جزيئة دنا العاثي في دنا البكتريا مولدة العاثي الأولي Prophage
4. تواصل البكتريا النمو والانقسام ويكون تكرار العاثي الأولي جزء من كروموسوم البكتريا .

النوع الأقل شيوعا الذي يكون النمط الممثل له عاثي P1 في بكتريا *E. coli*، يختلف عن النوع السابق في إن جزيئات دنا العاثي تصبح بلازميد (جزيئة دنا حلقية ذاتية التكرار) بدلا من قطعة كروموسوم العائل. وسوف نتناول الطريقة الأكثر انتشارا وهي الدورة الإدغامية التي يتبعها العاثي لامدا λ.

خاصيتان مهمتان للإدغام (lysogens) هما:

تكون للخلية مناعة ضد الإصابة بعاثي من النوع الذي أصاب الخلية وادغم في الدنا الخاص بها. حتى ولو حقن دنا العاثي الإضافي إلى داخل الخلية وتم تحويله إلى الشكل الحلقي، فانه لا يتم تكراره أو ترجمته.

1. حتى ولو بعد عدة أجيال فان العاثي المدغم يمكن أن يبدأ دورة تحلليه Lytic cycle؛ في هذه العملية التي تسمى الحث (Induction)، يتم إخراج العاثي الأولي Prophage بصورة جزيئة دنا حلقية (شكل 14-27) والبدء بالنمو ألتحللي.

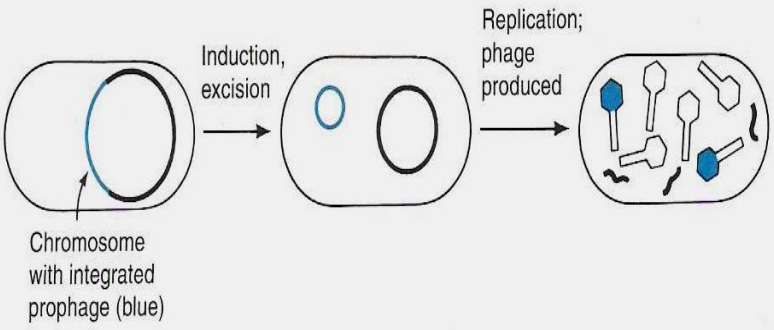

Figure 14-27 An outline of the events in prophage induction. The prophage DNA is in blue. The bacterial DNA is omitted from the third panel for clarity.

ما الذي يحدد اتجاه الإصابة بالعاثي λ إلى الدورة التحللية أو الدورة الإدغامية؟ يبدو إن المحدد الرئيسي كمية البروتين الذي يسمى *cII*. وهو منشط استنساخ يرتبط إلى مناطق حفازين للمورثات المطلوبة لعملية الإدغام. المستوى العالي للـ *cII* يعطي الأفضلية للأندغام، بينما يفضل المستوى المنخفض المسار ألتحللي. عدم استقرار بروتين *cII* يرجع إلى التكسير بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتين (البروتييزات) في الخلية. تحت ظروف النمو المناسبة تكون البروتييزات متوفرة جدا في الخلية ويتكسر البروتين *cII* لذا لا تنشط الدورة الإدغامية. وتحت ظروف النمو الضعيفة تكون البروتييزات اقل توفرا وهناك تكسير اقل لبروتين *cII* لذا يتم تنشيط تلك الحفازات، وتكون حالة الإدغام هي المفضلة.

العاثيات المحولة Transducing phage

بعض أنواع العاثيات التي تسمى العاثيات المحولة Transducing phage، قادرة على تعبئة الدنا البكتيري إضافة إلى دنا العاثي. الجسيمات الحاوية على الدنا البكتيري تسمى الجسيمات المحولة Transducing particle، لا تتكون دائما، بل تشكل عادة جزء قليل من مجتمع العاثيات. هذه الجسيمات يمكن إن تظهر من خلال نوعين من الآليات، الخروج المشوه للعاثيات الأولية Prophage من الكروموسوم أو تعبئة قطع دنا بكتيري. يوضح الشكل 14-28 الآلية الأولى التي تنشا بواسطتها الجسيمات المحولة الذي يبين تكون الشكل المحول من العاثي لامدا الذي يحمل جينات البايوتين (Biotin) و الكالكتوز (Galactose). ويسمى ***λ bio λ gal***.

عند حث العاثي الأولي لامدا (λProphage)، ينشأ ترتيب متسلسل من الأحداث التي فيها يتم إخراج دنا العاثي الأولي بدقة من دنا العائل (الشكل 14-28). في حالة العاثي λ، هذا ينجز بجهود مشتركة لـ مورثات الإدغام *int* و الاستئصال *xis* التي تعمل على يسار ويمين موقع اتصال العاثي الأولي Prophage attachment sites.وتحدث بتكرار منخفض جدا (بحدود خلية واحدة لكل 10^6-10^7خلية) عملية استئصال خاطئ من عمليتي قص غير صحيحة، أحداهما ضمن العاثي الأولي و الأخرى

قطع في الكروموسوم البكتيري. إلا إن القصيين الخاطئين لا ينتجان دائما قطعة دنا ذات طول مناسب لغلاف العاثي، إذ قد تكون اكبر من اللازم آو اصغر من اللازم، أما إذ ولد القطع من الطرفين جزيئة دنا ذات حجم يتراوح بين 79% و 106% من الطول الطبيعي لجزيئه دنا للعاثي لامدا، يمكن إن تحدث التعبئة. نظرا لموضع العاثي الأولي في كروموسوم بكتريا *E.coli* بين مورثات ***gal*** و ***Bio***، ولان القطع في دنا العائل يمكن إن يكون إلى يمين أو يسار العاثي الأولي، يكون بالإمكان ظهور جسيمات محولة تحمل مورث البايوتين Bio (القطع إلى اليمين) أو مورث الكالكتوز (القطع إلى اليسار). تشكل الجسيمات المحولة ***λ gal*** و ***λ bio*** يستلزم فقدان مورثات من العاثي λ. تفتقد جسيمات ***λ gal*** مورثات الذيل التي تقع إلى الطرف الأيمن من العاثي الأولي، وتفتقد جسيمات *bio* λ مورثات ***xis*** و ***int*** على الطرف الأيسر من العاثي الأولي. عدد المورثات المفقودة من العاثي يعتمد بالطبع على موقع القطع الذي ولد هذه الجسيمات، وبذلك مرتبطا بكمية الدنا البكتيري في الجسيمة. المورثات المفقودة من العاثي تكون من أطراف العاثي الأولي، لكن وبسب الترتيب الدائري للمورثات في العاثي الأولي وجسيمات العاثي، تشكل مورثات العاثي المحذوف دائما المنطقة الوسطية من دنا العاثي كما مبين في الشكل **14-28**.

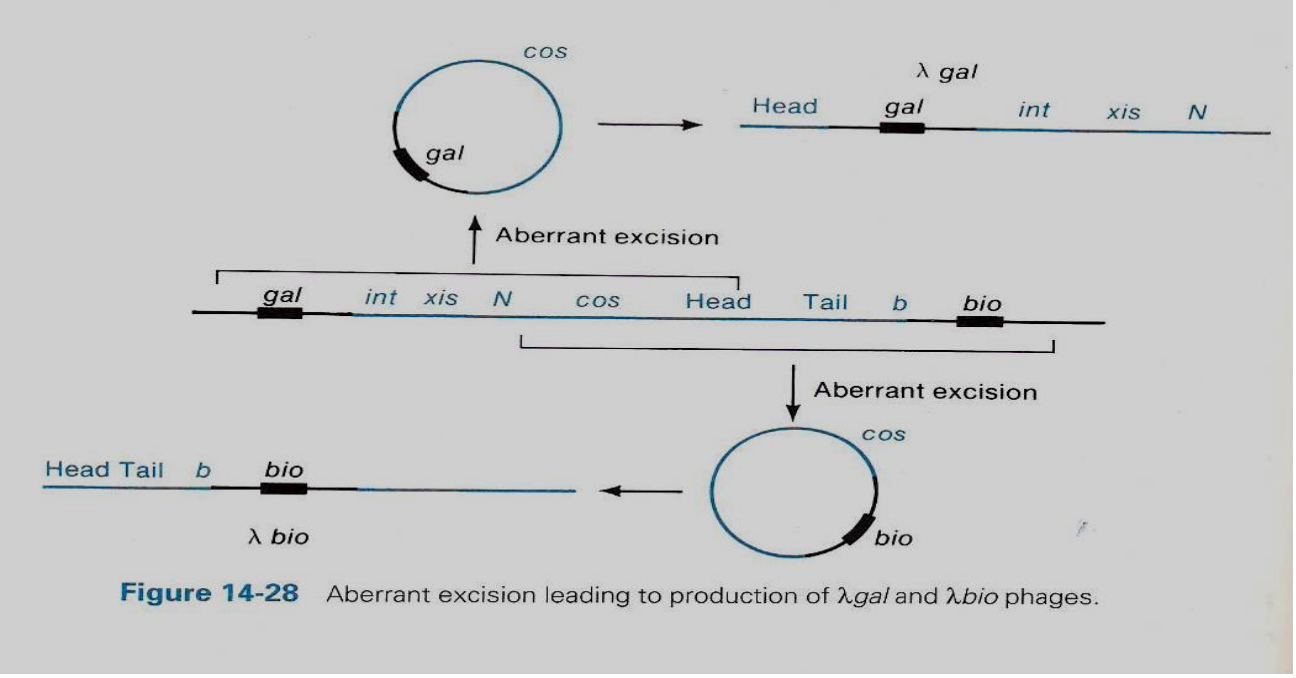

Figure 14-28 Aberrant excision leading to production of λ*gal* and λ*bio* phages.

نظرا لكون هذه الجسيمات المحولة تفتقد لبعض مورثات العاثي يتوقع إن تكون غير فعالة . وهذا بالتأكيد صحيح للنوع ***λ gal***، التي تفتقد مورثات أساسية لتخليق ذيل العاثيات (وفي حالة أستبدل\حذف أكبر) تفتقد أيضا إلى مورثات رأس العاثي. و تكون غير قادرة على توليد الذرية، حيث تكون ناقصة Defective وهذا يميز بكتابة الرمز d أمامها (**λdg** أو ***λdgal***). تحتوي الجسيمات ***λdgal*** النهايات الدبقة، وجميع المعلومات لتكرار الدنا والاستنساخ ولذلك هي تستمر في دورة الحيات العادية، بما فيها تحلل خلية البكتريا. فعليا، إذا لم تحذف مورثات الرأس، فان الفرع المتسلسل المنتج بتكرار الدائرة المتدحرجة سوف يقطع بنظام الإنهاء Ter. إلا إن الذيل لا يضاف إلى الرأس المعبأ بالدنا، ولا تنتج دقائق عاثي فعالة نتيجة تحلل خلايا البكتريا المصابة ولا تلاحظ البقع plaques في المزروع الكثيف lawn للعائل. نلاحظ انه لا يوجد تناقض بين تكوين جسيمات ***λdgal*** المحولة وقابليتها لتوليد نفسها. جسيمات ***λdgal*** تفشل في

التكاثر فقط يسبب افتقارها لمورثات الذيل، لكن مثل هذه الجسيمات تظهر من عاثيات أولية طبيعية تمتلك المجموعة الكاملة للمورثات.

الحالة مختلفة تماما مع جسيمات ***λbio***، لأنها تفتقد عادة فقط مورثات غير أساسية (***int***، ***xis*** وغيرها). هذه المورثات مطلوبة لدورة الحياة الأندغامية وليس الدورة التحليلية، لذا تكون هذه الجسيمات قادرة على التكرار وتكون البقع plaques. ولبيان ذلك تتم إضافة الحرف p إلى الجسيمات المكونة للبقع ولذلك تسمى الجسيمات ***λpbio***. الجسيمات المحولة تكون ذات فائدة عالية في التجارب الوراثية. مثلا إمكانية استخدامها لنقل مورثات بكتيرية من خلية إلى أخرى. كما تم استخدامها كوسيلة لعزل قطعة معينة من الكروموسوم البكتيري.