العناصر الانتقالية Transposable elements

تمكن العلماء من تصميم الخارطة الوراثية وذلك لثبات الترتيب الخطي للمورثات على كروموسومات أفراد النوع الواحد. إن هذه الخارطة تعطي انطباعاً بان المكون الوراثي (Genome) يكون ثابتاً، ويتعرض أحياناً إلى تغيرات في أزواج القواعد نتيجة أخطاء التكرار أو الأضرار الوراثية الأخرى. إلا إن هذه ليست الحقيقة أو الحالة، هناك صنف خاص من تتابعات الدنا الانتهازية تطورت في جميع الأحياء، تمتلك هذه التتابعات الوراثية قابلية خاصة على الحركة بهيئة وحدات منفصلة من موقع معين على الجينوم إلى آخر. ويطلق على هذه القدرة على الانتقال التحول الموضوعي Transposition وتسمى هذه التتابعات العناصر الانتقالية Transposable elements آو (**Tn** elements).

وجدت العناصر الانتقالية Tn elements في البلازميدات والفيروسات فضلا عن المكون الوراثي لبدائية النواة وحقيقية النواة. أول اكتشافها في اوبرون الكالكتوز في البكتريا بهيئة طفرات تؤدي إلى إيقاف وظيفة جميع المورثات في هذه الأوبرون. وكانت الطفرات ناشئة عن إدغام (إدخال) تتابعات دنا محددة إلى اوبرون الكالكتوز *gal* operon وكان طول هذه التتابعات بحدود 800 زوج قاعدي وحددت تتابعات أخرى طولها 1300 زوج قاعدي. وكانت الراجعات إلى النمط البري Revertant التي تم الحصول عليها من هذه الطافرات لا تحتوي (اختفى) كامل التتابع الذي تم إدغامه. وسميت قطع الدنا المدغمه هذه بـ تتابعات الغرس Insertion sequences.

وصف أنواع مختلفة من تتابعات الغرس في بكتريا الـ *E. coli* (جدول 14-1)، وتتدرج هذه العناصر في الحجم من عدة مئات إلى آلاف أزواج القواعد، وتتصف بقابليتها على الحركة من موضع معين على الجينوم إلى اخر. إلا أنها لا تحمل إي صفة مظهرية وراثية معينه. ويمكن تحديدها وراثيا من خلال تأثيرها على وظيفة المورث عند اندغاغمها (غرسها) في الكروموسوم أو البلازميد. و يمكن الكشف عن وجودها في موضع معين إما بواسطة تجارب التهجين Hybridization experiment أو بواسطة مجس(probe) مناسب أو بتحديد تتابع القواعد المباشر Sequencing.

TABLE 14-1 PROPERTIES OF SEVERAL *E. coli* INSERTION ELEMENTS

Element	Number of Copies and Location	Size in Base Pairs
IS1	5–8, chromosome	768
IS2	5, chromosome; 1 in F plasmid	1,327
IS3	5, chromosome; 2 in F plasmid	Approximately 1,400
IS4	1 or 2, chromosome	Approximately 1,400
IS5	Unknown	1,250
γλ	1 or more, chromosome; 1 in F	5,700

تحتوي تتابعات الغرس على حفازات Promoters و إشارات إنهاء الاستنساخ وإنهاء الترجمة. واعتماداً على موضع و اتجاه أندغام (Position and Orientation) تتابعات الغرس تستطيع إشارات السيطرة في تتابعات الغرس (IS) من التداخل مع التعبير الطبيعي للمورثات المستهدفة عند مستوى الاستنساخ أو عند مستوى الترجمة. وغالباً يتعرض الناتج ألبروتيني للمورث إلى التثبيط لان التتابعات المضافة تتداخل مع الانطواء الملائم للبروتين. وإذا كان المورث الذي حصل فيه الغرس جزءً من اوبرون فان تعبير الجينات الواقعة بعد موضع الغرس قد يتعرض للغلق. أما إذا كان موضع تتابعات الغرس يقع قبل المورث أو الأوبرون ، فانه قد يغير تعبير الجينات (التعبير عنها بمستوى أعلى أو اقل من المعدل). أو أن تكون الحالة كما في طفرات أوبرن الكالكتوز، حيث يتم غلق التعبير عن جميع مورثات الأوبرون نتيجة إشارات السيطرة على الاستنساخ الموجودة في تتابعات الغرس نفسها.

ما هي الخاصية في تتابعات الغرس IS المسئولة عن هذه القابلية على الانتقال؟

كشف تحليل تتابعات الدنا في العديد من عناصر تتابعات الغرس خاصية مهمة هي إن جميع تتابعات الغرس تحتوي ما يسمى التتابعات الطرفية المعكوسة Terminal inverted sequences. يتباين حجم التتابعات الطرفية المعكوسة حسب نوع تتابع الغرس IS المنتقل، إلا إن جميع تتابعات الغرس التي تنتمي إلى نفس النوع تحمل نفس التتابع. \مثلاً\ IS 1 تمتلك تتابع طرفي مكرر مؤلف من 23 زوج قاعدي شكل (1) أما IS 2 فتمتلك تتابع حجمه 41 زوج قاعدي. و تكونا النسختان من التتابعات الطرفية المعكوسة على طرفي العنصر الانتقالي متطابقة أو قريبه من التطابق. وان تمام كامل التتابع الطرفي المعكوس أساسي لانتقال تتابعات الغرس IS.

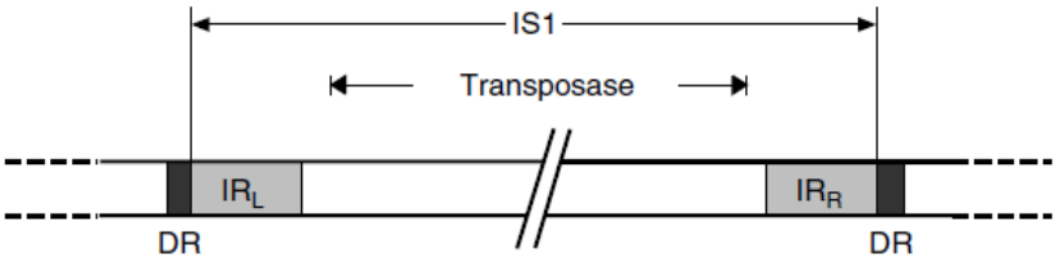

Figure.1 Structure of the insertion sequence ISl. DR, direct repeat (duplicated target sequence); IR, inverted repeats

جميع تتابعات الغرس قادرة على التشفير لـ بروتين ارتباط بالدنا خاص يسمى بروتين الغرس Transposase. وهو المكون ألبروتيني الأساسي المسئول عن القيام بعملية الانتقال. و بروتينات الغرس Transposases هي بروتينات ارتباط بالدنا لها قدرة خاصة لتميز التتابعات المعكوسة الموجودة في تتابعات الغرس IS. و هذه القدرة على تميز حدود تتابعات الغرس IS خاصية مهمة من الآلية، وتسمح لـ IS بالحركة بصورة وحدة منفصلة. وعموما إن استنساخ الـTransposase تحت سيطرة حفازات ضمن الـ IS ولأهمية التفاعل الذي تقوم به فان التعبير عنها منظم بدقه عاليه، أو أن يكون تركيزها في الخلية قليل جدا.

الميزة الثانية المهمة لتتابعات الغرس IS تتعلق بموقع إدغام العنصر. حيث كشف تحليل عدد كبير من مواقع أندغام عنصر معين من تتابعات الغرس (IS) إن عملية الغرس تولد تكرر لتتابع قصير يحيط بالعنصر المنتقل من الجانبين مباشرة (Direct repeat) في الموقع الجديد. إن طول المكرر المحاذي المباشر هو خاصية مميزة لنوع عنصر الغرس IS، حيث يتراوح الحجم بين 3-13 زوج قاعدي. هذا التتابع المكرر المحاذي هو ليس جزء من عنصر الغرس نفسه، بل تتابع موجود في الموقع المستهدف من قبل إنزيم الغرس Transposase enzyme. حقيقة وجود تتابع مستهدف يتكرر بعد انتهاء عملية الغرس قدم توضيح مهم للآلية التي ينتقل بواسطتها عنصر الغرس IS. اغلب الظن إن التكرار المباشر للتتابع المستهدف من قبل إنزيم الغرس Transposase هو نتيجة القطع الناتئ المتداخل في شريطي الدنا كما موضح في الشكل 14-2.

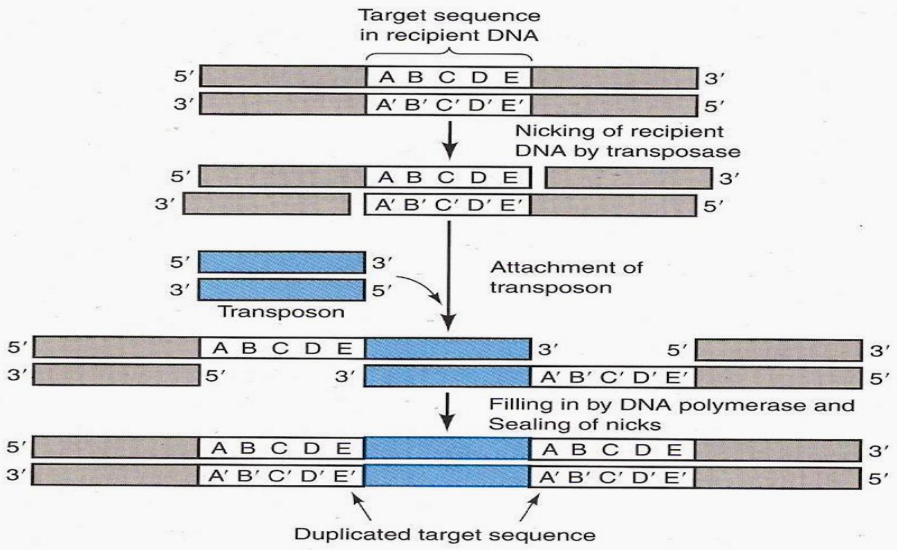

Figure 14-2 A schematic diagram indicating how target sequences might be duplicated by formation of a staggered cut at the target sequence. Capital letters represent the nucleotides of the target sequence (A′ represents the nucleotide that is the complement of A). Following attachment, the free 3′ ends on the transposon can serve as primers for the DNA synthesis, which duplicates the target sequence. Note: a terminal repeat sequence (Fig. 14-1) is located at both ends of the transposon.

إن خاصية تميز الدنا المستهدف من قبل إنزيم الغرس Transposase الذي يشفر له العنصر الانتقالي نفسه هي المسئول بشكل كبير عن تحديد المكان الذي يدغم فيه عنصر الغرس IS. تمتلك معظم الـ Transposases خاصية تميز مدى واسع من التتابعات و تتوسط في الانتقال إلى تتابعات مستهدفة متنوعة. وللعديد من تتابعات الغرس IS تكون عملية اختيار تتابعات الموقع الأندغام قريبة من العشوائية، مع ذلك فان إنزيمات Transposases تمتلك عادة بعض التفضيل للأندغام في مواقع ذات خصائص تتابع معينة. تسمى مثل هذه المناطق البقع الساخنة للأندغام Hot spots for Insertion.

العناصر الانتقالية المعقدة Complex transposable element

تتابعات الغرس من نوع IS1 – IS2 –IS3 ..... هي مثال للعناصر الانتقالية البسيطة نسبية. حيث تحتوي على التتابعات الطرفية المعكوسة ويشفر كل منها لإنزيم الغرس Transposase ذو تخصص موضعي معين. لذلك هي قادرة على الانتقال من موضع معين إلى اخر لكنها لا تمتلك إي صفة مظهرية أو وراثية مميزة لها. وقد تم ملاحظة نوعين آخرين من العناصر الانتقالية الأكثر تعقيداً ضمن المكونات الطبيعية للبلازميدات.

النوع الأول من العناصر الانتقالية المعقدة Complex Tn يتألف من مورث أو عدة مورثات تشفر عادة لصفة مقاومة للمضادات الحياتية تكون محاطة بين عنصرين غرس IS أو عناصر شبيهة. مثلاً العنصر الانتقالي المسمى Tn9 يتألف من المورث الذي يمنح مقاومة الكلورامفنيكول محاط بتتابع الغرس IS1 ذات اتجاه مباشر، ويحتوي الـ Tn10 مورث يمنح مقاومة التتراسايكلين ومحاط بتتابع الغرس (IS 10) باتجاه معكوس. وبغض النظر عن اتجاه تتابعات الغرس المحيطة بالمورث تكون نهاية العنصر الانتقالي المركب بصورة إجمالية معكوسة لان نهاية كل تتابع غرس متواجد تكون مقلوبة (شكل 2). إن كل من تتابعي الغرس المحيطان بمورث مقاومة المضادات الحياتية قادراً على الانتقال بشكل مستقل. وفي بعض العناصر الانتقالية يمكن أن يكون احدهما طافر، حيث يعد عديم الوظيفة (اثري) ويوفر فقط التتابعات الطرفية المعكوسة اللازمة لعملية انتقال العناصر الانتقالية. يولد انتقال العناصر الانتقالية المعقدة Tn (مثل قريباتها الأبسط تركيباً IS) تتابع مكرر مباشر في المكون الوراثي المستهدف، طول هذا التكرار خاصية مميزة للعنصر الانتقالي Tn. التفكير في كيفية ظهور مثل هذه العناصر يقود إلى الاعتقاد بان هذه العناصر تم انتخابها تحت ظروف التعرض للمضادات الحياتية، وحدث قبل عملية الانتخاب أن أحاط اثنين من تتابعات الغرس IS بمورث مقاومة المضاد الحياتي وتسبب الضغط الانتخابي في إمساك المورث بتتابعي الغرس IS وقدم العنصر الانتقاليTn وسيلة الانتقال الأفقي للمقاومة إلى الأفراد الآخرين في المجتمع. موروثات أخرىات عدا مورثات المقاومة يمكن ان تكون جزء من هذه العناصر الانتقالية. العنصر الانتقالي Tn 1681 يحتوي مورث يشفر للذيفان الداخلي Enterotoxin الذي له دوراً في إحداث الإسهال في الإنسان. ويحتمل انه واستجابة لضغط انتخابي ملائم، أن يتم الكشف عن وجود عناصر انتقالية معقدة تحتوي من حيث المبدأ أي مورث بكتيري. القابلية من هذا النوع من آلية الاستجابة للتغيرات البيئية يوفر المرونة الوراثية وله علاقة عميقة مع التطور البكتيري.

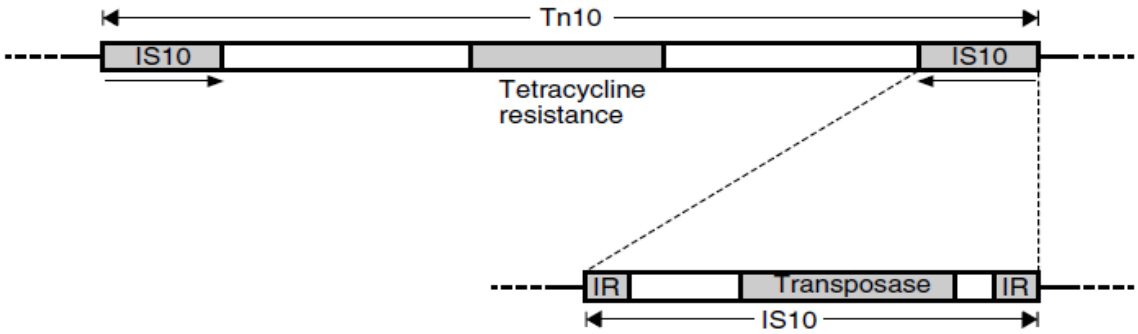

Figure.2 Structure of a composite transposon Tn10

عناصر انتقالية أكثر تعقيداً :

نوع ثاني له تركيب وراثي أكثر تعقيداً. أكثر العناصر من هذا النوع دراسة عنصر انتقالي حجمه 5kb يسمى Tn3 (شكل 3). هذا النوع من العناصر لا تكون محاطة بتتابعات الغرس IS ولكن بدلاً عنها تمتلك تسلسل اقصر من التتابعات المعكوسة. طول التتابع المعكوس للعنصر الانتقالي Tn3 يبلغ 38 زوجا قاعديا. و توجد بين التتابعات المعكوسة ثلاثة مورثات، اثنان منها متشابهة في الوظيفة للأنواع المورثات التي ذكرت سابقاً، المورث *bla* يشفر لإنزيم β Lactamase الذي يمنع المقاومة للبنسلين والمورث الثاني يسمى *tnpA* يشفر لإنزيم الغرس Transposase الذي يتعرف بشكل خاص على التتابعات

المعكوسة لـ Tns خلال عملية الانتقال. والمورث الثالث يسمى *tnp*R يشفر لبروتين ثنائي الوظيفة يسمى Resolvase ويكتب اختصارا (TnpR) له وظيفة في عملية الانتقال، وهو بروتين متخصص يرتبط بالدنا يميز موقع تتابع قصير من الـ DNA يسمى موقع الانحلال أو الإزاحة الداخلي Internal resolution site (IRS). و يقوم بروتين الإذابة (TnpR) أيضا بكبت تخليق المستنسخ الخاص به و مستنسخ المورث *tnp*A من خلال الفتة الارتباط إلى المواقع I ,II ,III في العنصر نفسه.

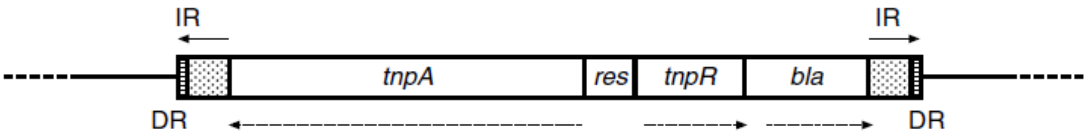

Figure .3 Structure of the transposon Tn3. DR, five-base pair direct repeat (target duplication); IR, 38-base pair inverted repeats; res, resolution site; tnpA, transposase; tnpR, resolvase; *bla*, *β*-lactamase (ampicillin resistance)

آلية الانتقال Transposition

تتضمن عملية الانتقال حركة قطعة محددة من الدنا (DNA) من موقع معين على الجينوم إلى موقع اخر، إما على نفس الجينوم أو على جينوم اخر، مثل بلازميد أو فيروس. الطريقة المعتادة لقياس تكرار الانتقال تستفيد من حقيقة إن الانتقال يمكن أن يحصل بين الكروموسوم و البلازميد الاقتراني مثل البلازميد F. وفي حالة حصول الانتقال فان البلازميد F يصبح قادرا على إظهار صفة مظهرية سهلة الكشف (مثل مقاومة المضادات الحياتية). التكرار الذي يحصل فيه استهداف البلازميد F موضعا للانتقال يمكن تحديده بقياس تكرار تحول المستقبلة للبلازميد F وتسمى الخلايا المؤنثة (Female) إلى خلايا مذكرة مقاومة المضادات الحياتية(Male F) بعد عملية الاقتران. فقط في حالة انتقال العنصر الانتقالي Transposone من الكروموسوم في الخلية المذكرة إلى البلازميد F سوف يستطيع البلازميد F منح صفة المقاومة للمضاد إلى الخلية المستقبلة (Female) بعد الاقتران. وبينت التجارب إن تكرار انتقال بحدود 10^{-5} – 10^{-7} لكل عنصر لكل جيل في العنصر الانتقالي Tn10. هذا التكرار هو بنفس معدل حدوث الطفرات التلقائية الملاحظة في المورثات البكتيرية.

الانتقال المحافظ Conservative Transposition والانتقال التكراري Replicative Transposition

يحدث الانتقال من خلال نوعين من الآليات. ويعتمد نوع الإلية المستخدمة على نوع العنصر الانتقالي. في الإلية الأبسط، يتضمن الانتقال استئصال العنصر الانتقالي Tn element من خلال القطع عند النهاية الطرفية المعكوسة بواسطة إنزيم الغرس Transposase ويعقب هذا الاستئصال إدغام العنصر في الموقع الجديد. هذه الآلية المتضمنة القطع واللصق تعد عملية محافظة Conservative process لأنها لا تتضمن أي تكرار للعنصر الأصلي فيما عدا الكمية الصغيرة من الدنا المطلوبة لإنشاء التكرار المباشر المحيط بالعنصر في الموقع الجديد. في هذه العملية يمكن أن تتعرض الجزيئة المانحة للعنصر الانتقالي إلى الفقدان (وذلك لتعرضها لقطع الشريطين في كلا طرفي العنصر الانتقالي) خلال

العملية. ولغرض الدخول إلى الجزيئة الجديدة يقوم إنزيم الغرس بعمل قطع ناتئ ومتداخل في الشريطين (Staggered cut). طول قطعة الشريط الناتئة بعد القطع صفة خاصة حسب نوع العنصر الانتقالي، مثلا التكرار المباشر الذي يحيط بالـ Tn10 وطوله 9 قواعد يتم عمله بواسطة إنزيم الغرس Tn10 Transposase الذي يعمل قطع متداخل ناتئ ذو 9 زوج قاعدي في الدنا المستهدف. ويتم بعدها لحم نهايتي العنصر الانتقالي إلى النهايات المقطوعة من الدنا المستهدف بواسطة إنزيم الغرس نفسه. حيث يولد ربط القطع فجوة في الشريط المفرد طولها 9 زوج قاعدي تحيط بالعنصر في الموقع الجديد يتم تعبئتها بواسطة إنزيم بلمرة الدنا في الخلية المضيفة(شكل 14-2). تستخدم آلية للانتقال المحافظ بواسطة العناصر الانتقالية و Tn9 و Tn10.

تم توضيح وجود آلية ثانية للتنقل من خلال ملاحظة إن انتقال عناصر انتقالية معينة مثل Tn3 يتضمن وجود مركب وسطي خاص من الدنا يسمى Cointegrate (المندمج) ينتج من التحام الجزيئة الواهبة ذاتية التكرار(Replecon) مع الجزيئة المستقبلة ذاتية التكرار(Replecon)بمساعدة إنزيم الغرس. الميزة المهمة في الشكل الاندماجي هي احتواءه على نسختين من العنصر الانتقالي وبالاتجاه المباشر عند منطقة التحام التتابعات الواهبة والمستهدفة. أي انه في الشكل الاندماجي (Cointegrate) تم تكرار العنصر الانتقالي.

الشكل الاندماجي هو حالة وسطية في عملية الانتقال يتم فصله لاحقا بعملية إعادة ترتيب Recombination خاصة إلى جزيئاتي دنا منفصلتين تحتوي كل منها على نسخة من العنصر الانتقالي ، هذا العمل لا يتم بواسطة إنزيم الغرس Transposase بل ينفذ من قبل ناتج المورث *tnp*R في الـ Tn3 الذي يسمى المذيب Resolvase. خطوة إعادة الترتيب التي تسمى Resolution تحدث في مواضع IRS في النسختين المزدوجة من Tn3 في الشكل الاندماجي (شكل5). تسمى موضع الإذابة *res* site. وبذلك هي عملية تكرارية يتم فيها إنتاج نسخة ثانية من العنصر. يولد الـ Tn3 تكرار محيط مباشر مؤلف من 5 أزواج قواعد في موقع إنغراسه بالتتابع المستهدف وهذا يبين إن إنزيم الغرس الخاص يعمل قطع ناتئ متداخل في الدنا المستهدف. مثل إنزيم الغرس في العنصر الانتقالي Tn10.

تنظيم تكرار الانتقال :

من المهم لحياة الخلية أن تتم السيطرة بقوة على تكرار حركة العناصر الانتقالية لمنع تراكم نسخ إضافية من العناصر في المكون الوراثي. واحد طرق تنظيم الانتقال بواسطة تحديد إنتاج إنزيم الغرس Transposase حيث ينتج إنزيم الغرس Tn10 Transposase بمستوى منخفض جداً (اقل من نسخة واحدة لكل جزيئة لكل خلية لكل جيل)، يتم مستوى الإنتاج المنخفض هذا من خلال السيطرة عند كل من مستوى استنساخ مورث إنزيم الغرس وترجمة الدنا الرسول لإنزيم الغرس Transposase mRNA. و بذلك في معظم الخلايا التي تحمل Tn10 **يتم منع الانتقال ببساطة لغياب إنزيم الغرس**. طريقة ثانية يتم فيها السيطرة على تكرار الانتقال هي حصر العملية بدرجة كبيرة عند نافذة زمنية صغيرة في دورة الخلية البكتيرية. **تحدث عملية الانتقال بأفضليه حالاً بعد تكرار دنا العنصر الانتقالي نفسه**. يكون دنا *E. coli* عادة بحالة الأمثلة Methylated في مواقع خاصة نتيجة فعل إنزيم يسمى DNA adenine methylase. وعندما تمر شوكة التكرار على منطقة من الدنا يكون شريط الدنا المخلق حديثاً منخفض الأمثلة مؤقتا. وبعد فترة قصيرة من التكرار يقوم إنزيم dam methylase بأمثلة الدنا المخلق حديثاً ليحولها إلى حالة الأمثلة الكاملة. إن إنزيم الغرس Transposase ضعيف الترابط مع الدنا كامل الأمثلة لكنه يترابط بقوة مع الدنا جزيئي الأمثلة. وخلال هذه الفترة الزمنية القصيرة وقبل إن تكتمل أمثلة

الدنا المخلقة حديثا تحدث عملية الانتقال. وهكذا فان الفترة القصيرة المتاحة لفعل إنزيم الغرس تستخدم في السيطرة على تكرار الانتقال .

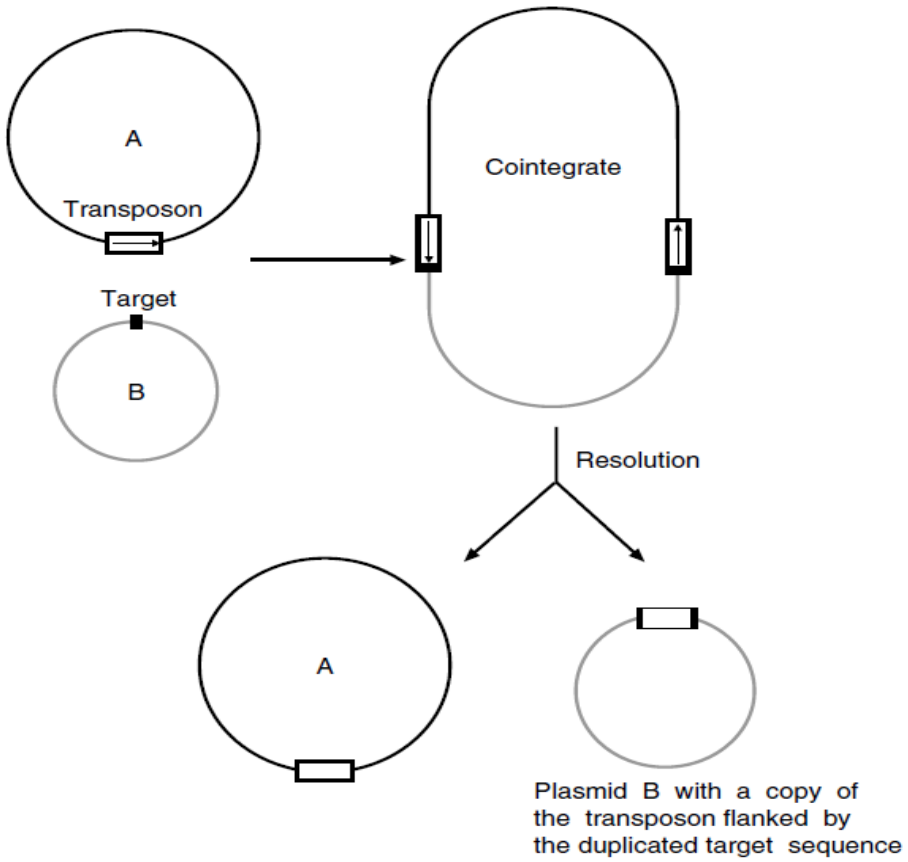

Figure .4 Schematic diagram of replicative transposition. The first step shows formation of a cointegrate structure, carrying two copies of the transposon, with duplication of the target sequence. Recombination between the two transposon copies leads to separation into two plasmids, each having a copy of the transposon. The direct repeats flanking the original copy of the transposon are not shown