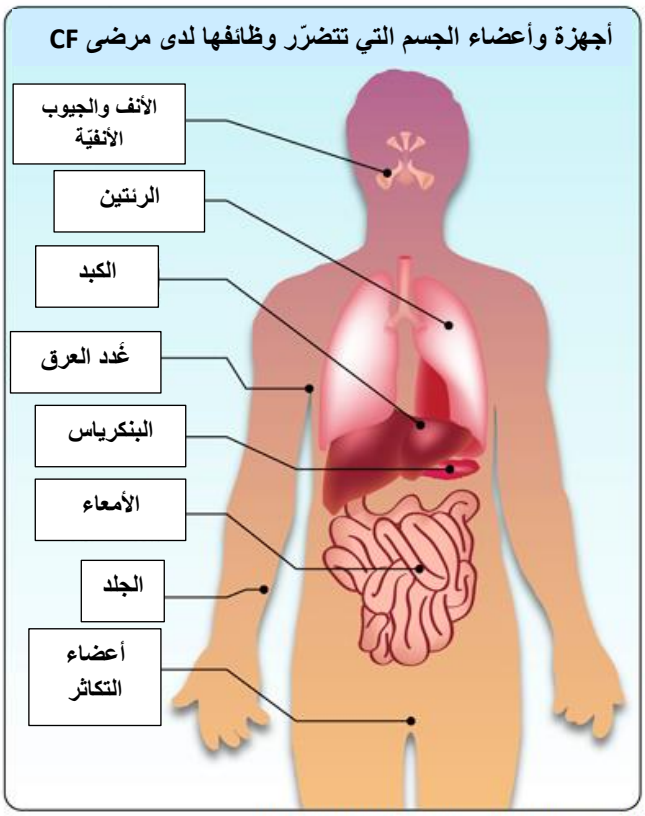
مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

للمُعلّم: تتناول الفعاليّة بحث مبنى ووظيفة بروتين CFTR

(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). بروتين CFTR عبارة عن مُنظِّم نقل(וסת הולכה) مُثبَّت في غشاء الخليّة، وجود الطفرات في هذا البروتين تؤدّي إلى تطوُّر مرض التليّف الكيسي. سنتعلَّم من خلال الفعاليّة عن أدوات بيوإنفورماتيّة، وعن تأثير ال DNA، الRNA، البروتين والخلية على النسيج وعلى الكائن أيضًا، كذلك سنتعلم عن العلاقة بين الطراز الجيني (الجينوتيب) والطراز المظهري (الفينوتيب). هكذا سيتعرَّف الطلاب على أدوات بيوإنفورماتيّة جديدة وفي نفس الوقت يستعملون المعلومات البيولوجيّة التي اكتسبوها خلال تعليمهم.

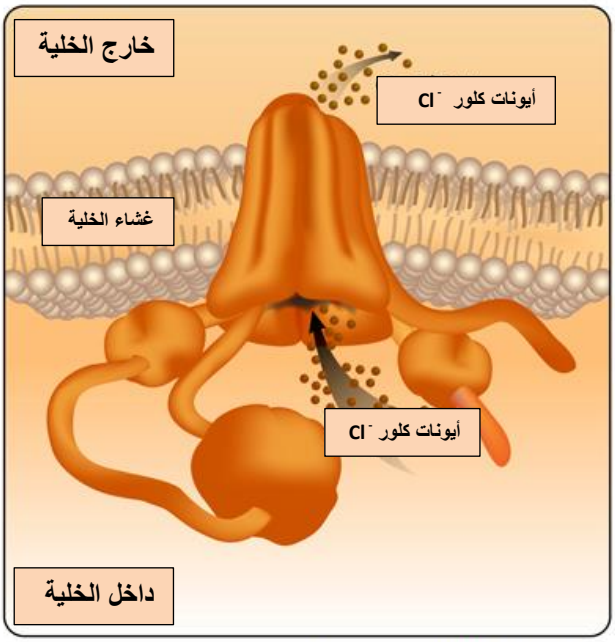
بإمكان المُعلِّم اختيار افتتاح الفعاليّة بمراجعة قصيرة عن انتقال المعلومات البيولوجيّة من الجين (DNA) إلى البروتين، تُعرض هذه المعلومات في فصل " المُقدمة البيولوجيّة– מבוא ביולוגי". يجب التشديد على موضوع مبنى البروتينات، وتذكير الطلاب بالمبنى الأوليّ (تسلسل الأحماض الأمينيّة)، المبنى الثانوي (مثل لولب ألفا ومُسطَّح صفائح بيتا....) والمبنى الثُلاثي(الطيّ للمبنى الفراغي الذي يمنح البروتين القدرة على تنفيذ وظيفته). من المُهّم أنْ نذكر أيضًا وجود مناطق مبنويّة ومواقع ذات أهميّة وظيفيّة(אתרים תפקודיים) تُعتَبر أساس فعاليّة البروتين. بالإمكان الاستعانة بالكتاب"גנטיקה מולקולרית וביוטכנולוגיה" ص37–38، للكاتبة ארנה מוקדי שביט أو أيَّ كِتاب آخر. بالإضافة لذلك من المُهمّ أنْ نُشدِّد على العلاقة بين التغييرات في تسلسل ال DNA – أي الطفرات على أنواعها وتأثيرها على تسلسل ال RNA رسول، وبشكل خاص على مبنى وأداء البروتين– وبين الطراز المظهري (الفينوتيب) على مُستوى الخليّة وعلى مُستوى الكائن أيضًا.

التليّف الكيسي (Cystic fibrosis أو باختصار CF. بالعبرية לְיָפֶת כִּיסְתִית) هو أحد الأمراض الوراثيّة קישור المُنتشرة جدًّا والتي تظهر في 1 من بين 2500 ولادة. يتجلّى هذا المرض بضرر في أجهزة مُتعدِّدة كالرئتين، البنكرياس، غُدد إفراز العرق، جهاز الهضم وجهاز التناسل(رسم 1).



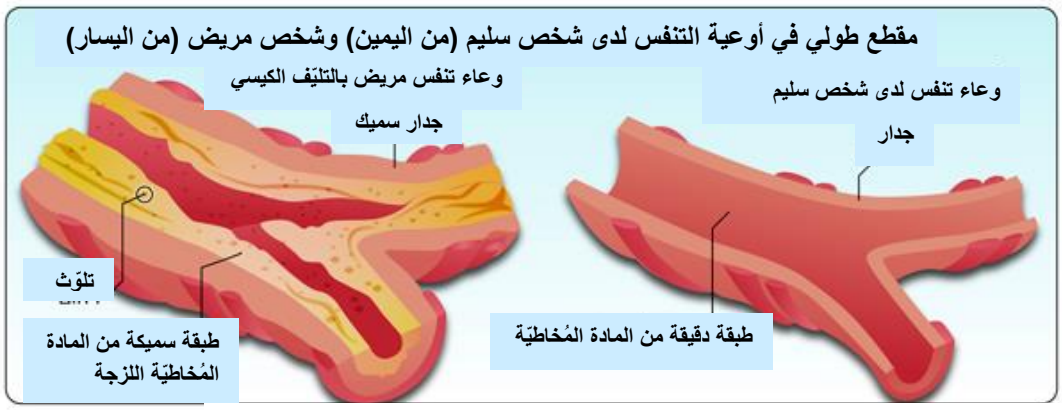
الرسم 1: تحديد خصائص مرض التليّف الكيسي (CF)

التليّف الكيسي هو مرض وراثي ينتقل بصورة مُتنحية קישור غير مُرتبطة بالجنسקישור (אוטוזומלי רצסיבי)، ينتج بسبب خلل في بروتين CFTR (اختصار ل Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator، بالعبرية וסת הולכה של סיסטיק פיברוזיס מעוגן בקרום התא) هذا البروتين هو بروتين مُثبت في غشاء קישור الخلايا الطلائية (إبيثيلية) קישור ويُنتج قناة تشترك في نقل الأيونات، وبالذات أيونات الكلور (رسم 2)



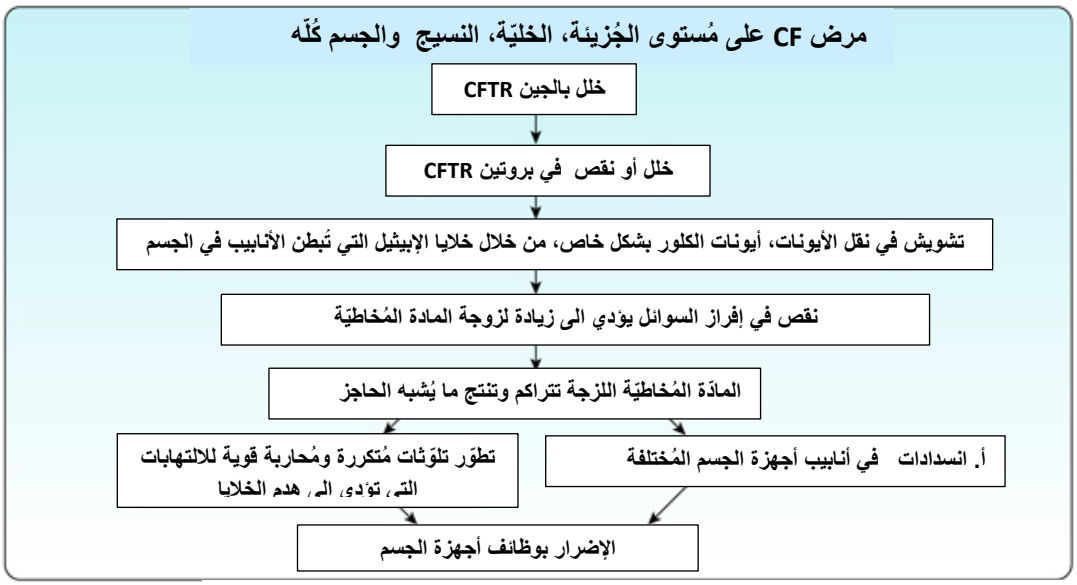
الرسم 2: بروتين CFTR يُشكّل قناة أيونات في الغشاء

تُفرز الخلايا الإبيثيلية لدى الأشخاص الأصحاء مادة مُخاطيّة وظيفتها حماية الجدران الداخليّة للأعضاء المُختلفة من مُسبِّبات الأمراض. القناة التي تقوم بنقل الأيونات لا تعمل بشكل سليم لدى مرضى CF، مما يؤدّي إلى إفراز قليل لأيونات الكلور من داخل الخليّة إلى خارجها. بسبب التغيير في الضغط الأسموزي קישור تدخل السوائل إلى الخلايا ونتيجة لذلك تُصبح المادة المُخاطيّة التي تُفرز من خلايا الإبيثيل لزجة وسميكة. تتراكم هذه الإفرازات وتمنع انتقال السوائل بشكل سليم وعندها تُشكِّل وسطًا مريحًا ومُغذيًا لتكاثر البكتيريا وبالتالي لتطوُّر التلوّثات والالتهابات (رسم 3).



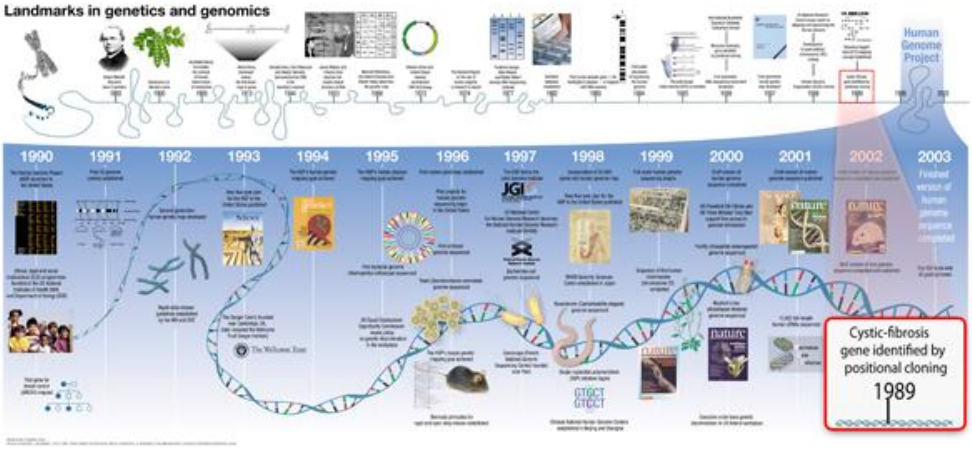
الرسم 3: المادة المُخاطيّة اللزجة التي تُفرز من الخلايا الإبيثيلية تؤدي إلى تطوُّر التلوّثات لدى المرضى

من هنا نستنتج أنَّ الطفرة في جين CFTR تؤدي إلى الإضرار بوظيفة قناة نقل الأيونات الموجودة في أغشية الخلايا الإبيثيلية وبالتالي إلى انسدادات الأنابيب (الأوعية)، إلى تطوّر تلوّثات والتهابات في الأنسجة المُختلفة ومن ثمّ إلى الإضرار بوظائف أجهزة الجسم (الرسم 4).



الرسم 4: مرض CF، ابتداءً من الطفرة في جين CFTR وحتّى الإضرار بوظائف أجهزة الجسم

أدى ارتفاع الوعي بالنسبة للمرض، التشخيص المُبكّر له، مُراقبته الشديدة وإيجاد طُرق علاج ناجعة له إلى زيادة مُتوسط عُمر مرضى CF وإلى تحسين جودة حياتهم. حدث تقدُّم كبير في فهم مُسبِّبات المرض وتطوّره، كما تمَّ تطوير علاجات للتغلُّب عليه، جميع هذه الأمور مَكَّنت مرضى CF من التفاؤل بالمُستقْبَل. بالرَّغم من تشخيص المرض مُنذ سنة 1938، إلا أنَّ اكتشاف الجين المُشفِّر لبروتين CFTR كان بعد ذلك ب 50 سنة تقريبًا، عندما قامت الباحثة الإسرائيلية בת-שבע כרם קישור بدوْر رئيسيّ في تشخيص الجين. كان هذا الاكتشاف إنجازًا مُهمًّا وأُعتُبر حدثًا بارزًا في علْم الوراثة والجينوم لسنة 1989 من قِبَل المجلَّة العلميّة Nature(رسم 5).



الرسم 5: تمَّ اختيار الاكتشاف لجين CFTR كحدث بارز في علم الوراثة لسنة 1989 **من قبل** المجلّة Nature العلميّة

حتّى اليوم تمَّ اكتشاف أكثر من 1800 طفرة קישור مُختلفة تُسبِّب المرض. تختلف نسبة انتشار المرض بين الدول المُختلفة وبين الخلفيّات العرقيّة المُختلفة. مثلًا في إسرائيل، ينتشر المرض عند اليهود من أصل غربي (אשכנזים) ولكنَّه نادر جدًّا عند اليهود الشرقيّن. هناك فرق كبير في نسبة انتشار الطفرات المُختلفة المُسبِّبة للمرض في الأماكن المُختلفة، أي أنَّ الطفرات المُنتشرة في منطقة مُعيّنة تختلف عن الطفرات المُنتشرة في منطقة أخرى. الطفرات في الجين (في الDNA) تؤدّي إلى تغييرات في تسلسل ال RNA رسول، ويتمَّ التعبير عنها في تسلسل البروتين ممّا يؤثر على مبنى البروتين وأدائه. يعتمد تشخيص وجود أليل קישור طافر لدى شخص مُعيّن على تشخيص الطفرات في ال DNA. وتتمّ مُلائمة العلاج للمرضى بالاعتماد فهم العلاقة بين الطفرة في ال DNA وبين تأثيرها على مبنى وأداء البروتين.

كجُزء من مشروع طبي وطني يهدف إلى فهم العوامل التي تؤدّي إلى مرض التليّف الكيسي وعِلاجه، قام الباحثون بتحديد مواضع طفرات الجين CFTR (מיפוי)קישור وشَّخصوا الطفرات المُنتشرة في هذا الجين لدى سكان إسرائيل. يطمح هؤلاء الباحثين أنْ يعرفوا كيف تؤثِّر التغييرات في تسلسل الجين קישור على مبنى البروتين קישור وأدائه لوظيفته، وعندها بإمكانهم التنبؤ بشدَّة المرض وتطوير أدوية للمرضى بما يتلاءم مع الطفرة التي يحملونها. لكنْ قبل أنْ يُباشر الباحثون بإجراء تجارب مُكلفة في المُختبر، يقومون بجمع معلومات كثيرة وضروريّة للبحث باستعمال الأدوات البيوانفورماتيّة.

في هذه الفعاليّة سنستعين بأدوات بيوإنفورماتيّة لفحص جانبين أساسيّيْن يتعلقّان بالطفرات التي تُسبِّب المرض: الأول وصف الخلل الموجود في البروتين، والثاني تشخيص وجود الطفرة (נשאות למוטציה). نبحث في البداية مبنى البروتين CFTR ونُحاول أنْ نعرف كيف تؤثِّر الطفرات المُختلفة الموجودة في جين CFTR على تسلسل البروتين وعلى مبناه. بالإضافة إلى ذلك نُصمِّم أدوات لتشخيص وجود الأليل الطافر (נשאות לאלל מוטנטי).

مراحل تحقيق الأهداف:

المَهمّة الأولى: بحث مبنى البروتين – نبحث بمُساعدة الأداة Prosite عن موتيفات مبنويّة ووظفيّة (מוטיבים מבניים ותפקודיים) في بروتين CFTR.

المَهمّة الثانية: تشخيص وجود الأليل CFTR الطافر(נשאות לאליל מוטנטי) - تصميم بادئات بمُساعدة الأداة Primer3Plus لاستخدامها في تفاعل PCR.

للمُعلِّم:

نبحث في الفعاليّة الأولى عن موتيفات (motifs) ذات أهميّة من ناحية المبنى أو الوظيفة والموجودة في بروتين CFTR سليم وفي بروتينات CFTR طافرة بمُساعدة الأداة Prosite. يتعرَّف الطلاب على طريقة تشغيل الأداة وعلى طريقة تحليل المعلومات التي يحصلون عليها.

نستعين في الفعاليّة الثانية بتفاعل سلسلة البوليميراز (PCR) كأداة لتشخيص الطفرات في الأليلات المُختلفة. نقوم بمُساعدة الأداة البيوإنفورماتيّة Primer3Plus وبحسب الطفرات المُختلفة بتصميم بادئات لتفاعل PCR.

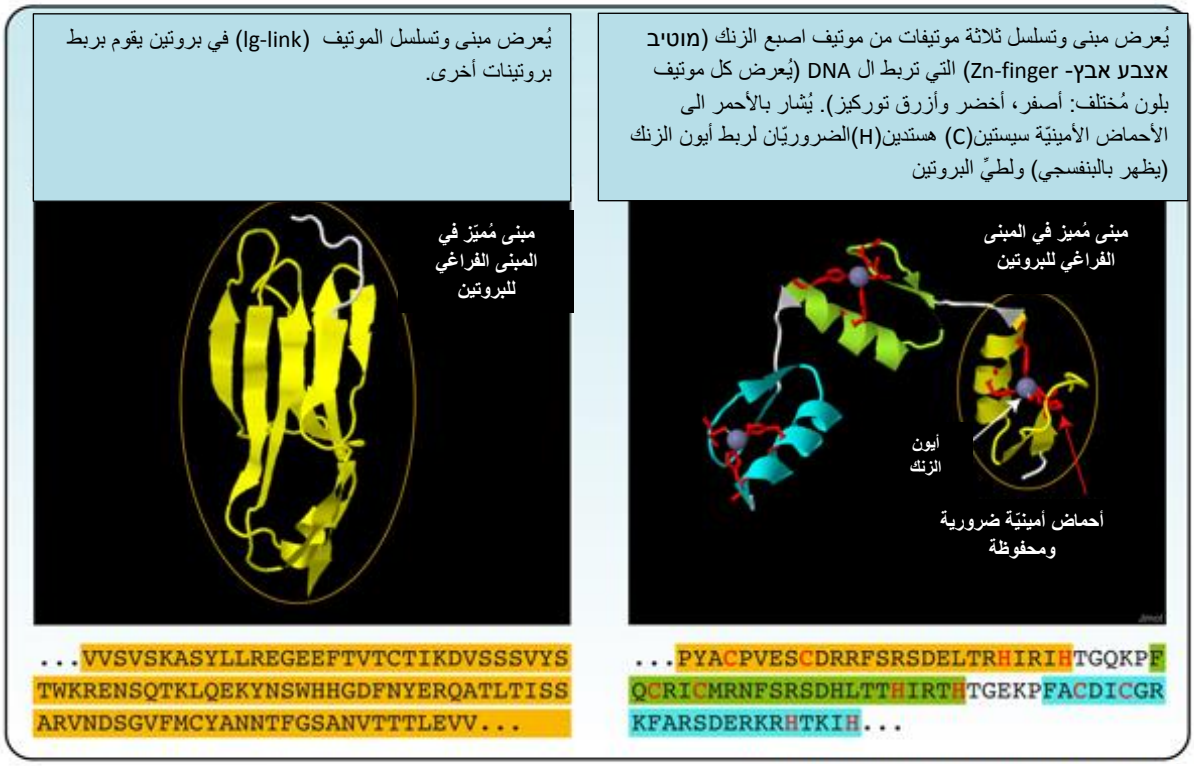
الجولات الإرشاديّة لهذه الأدوات موجودة داخل الفعاليّات. بإمكانك التوجّه إلى الجولات الإرشاديّة قبل كل فعاليّة.

سيبحث الطلاب تأثير طفرات مُختلفة في جين CFTR على تسلسل ال RNA رسول وعلى تسلسل البروتين، مبناه وأدائه لعمله. من خلال ذلك سيتعلمون عن العلاقة بين الطراز الجيني والطراز المظهري (الجينوتيب والفينوتيب). في النهاية سيُصمِّم الطلاب أدوات لتشخيص الطفرات التي يبحثونها. هكذا عمليًا سنقوم بإغلاق الدائرة التي تبدأ بفهم مبنى البروتين ومُلائمته لوظيفته، ومرورًا بعلاقته بظهور المرض، بمُلائمة العلاج وتطوير الأدوية، ونهايته بتصميم أداة للتعرُّف على الأليلات الطافرة (נשאות אללים מוטנטיים).

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

مهمّة 1: البحث عن موتيفات في بروتين CFTR بواسطة الأداة Prosite (صفحة 1 من 7)

عندما يعرف الباحثين تسلسل الأحماض الأمينيّةקישור للبروتين يستعينون بأدوات بيوإنفورماتيّة كي يستخلصوا معلوماتً حيويّةً عنه. يقوم الباحثين بتشخيص موتيفات קישור مهمّة موجودة في البروتين ذات وظيفة أو مبنى معروف. موتيف (motif) هو مجموعة من الأحماض الأمينيّة الضروريّة والمحفوظة في تسلسل البروتين أو مبنى مُميّز في المبنى الفراغي للبروتين يمنحه وظيفة مُعيّنة (رسم 1). في كلا الحالتين (عندما يكون الموتيف عددًا من الأحماض الأمينيّة الضروريّة أو عندما يكون مبنى مُميّز في المبنى الفراغي للبروتين) يكون تسلسل الأحماض الأمينيّة محفوظًا، لذلك بإمكاننا التعرُّف على الموتيفات بالاعتماد على تسلسل الأحماض الأمينيّة دون الحاجة الى المبنى الفراغي للبروتين קישור . عمليّة تحديد المبنى الفراغي للبروتين هي عمليّة مُعقَّدة وتحتاج إلى زمنٍ طويل وتكلفة كبيرة، بالمُقابل فإنَّ تحليل البروتين بطريقة بيوإنفورماتيّة هو عمليّة بسيطة، لا تحتاج إلى وقت طويل أو أجهزة مُعقَّدة، تكلفتها قليلة وتعطي نتائج يُمكننا أنْ نثق بها ونعتمد عليها.



الرسم 1: تسلسل ومبنى موتيفات بروتينيّة

إحدى الطرق المركزيّة للتعرُّف على الموتيفات البروتينيّة هي مُقارنة تسلسل البروتين קישור الذي نبحثه مع مُستودع موتيفات بروتينيّة معروفة. بإمكان مُقارنةٍ من هذا النوع أنْ تُشخِّص وجود تشابه بين منطقة في تسلسل البروتين الذي نبحثه وبين تسلسل موتيف موجود في المُستودع. إذا وجد بالفعل تشابه بين التسلسلين بإمكاننا أنْ نستنتج أنَّ مبنى أو وظيفة البروتين الذي نبحثه تُشبه مبنى أو وظيفة الموتيف الموجود في المُستودع، كذلك بإمكاننا أنْ نعرف ما هي المناطق الهامّة من أجل أداء البروتين لوظيفته. تضُمُّ أداة Prosite مُحرِّك بحث يقوم بمُقارنة تسلسل بروتين مُعطى مع تسلسلات الموتيفات المبنوية والوظيفيّة الموجودة في مستودع الموتيفات، وهكذا بإمكان الأداة التعرُّف على الموتيفات الموجودة في البروتين وإيجاد العائلات البروتينيّة קישור التي ينتمي إليها البروتين الذي نبحثه.

أهداف المَهمّة

تهدف المَهمّة إلى التعرُّف على موتيفات ذات أهميّة لمبنى ووظيفة البروتين CFTR كقناة تشترك في نقل الأيونات عبر غشاء الخلية، والتعلُّم من خلال ذلك عن التلاؤم بين موتيفات مبنى البروتين وبين وظيفته. تهدف المَهمّة أيضًا إلى فحص تأثير الطفرة في جين CFTR (DNA) على تسلسل، مبنى ووظيفة البروتين، وبالتالي التعرُّف على العلاقة بين الجينوتيب קישור (طفرة في الجين) والفينوتيب קישור (المرض).

نستعمل الأداة Prosite كي:

1. نُشخِّص في بروتين CFTR الموتيفات الضَّروريّة لمبناه ولفعاليّته كقناة لنقل الأيونات.
2. نفحص تأثير الطفرة في CFTRعلى الموتيفات المبنويّة والوظيفيّة الموجودة في البروتين.

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

مهمّة 1: البحث عن موتيفات في بروتين CFTR بواسطة الأداة Prosite (صفحة 2 من 7)

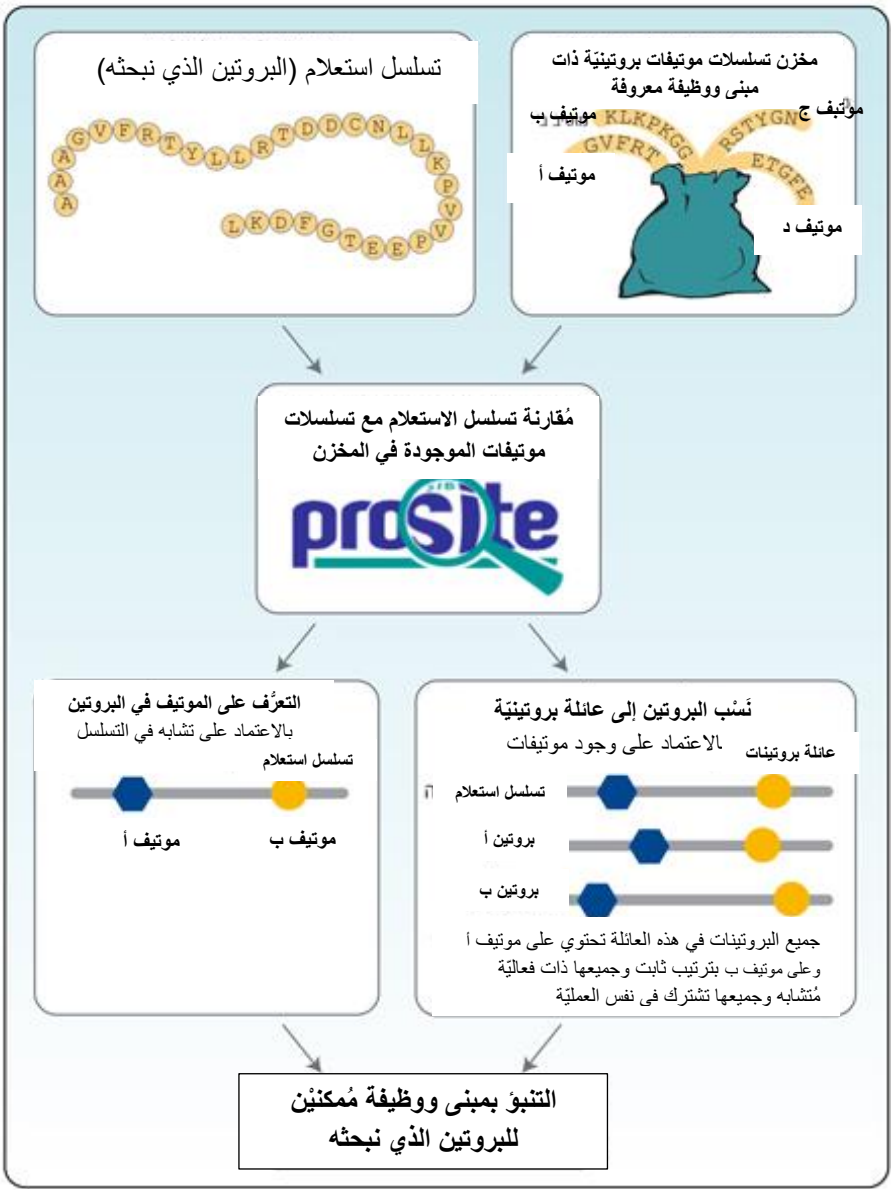
1. التعرُّف على موتيفات هامّة لمبنى ولفعالية بروتين CFTR كقناة لنقل الأيونات

للمُعلِّم: بشكل مُشابه لتحليل سِجلّات نوكلوئتيدات (انظروا المَهمّة الأولى في فعاليّة " الطفرات تُنقذ الحياة ")، بإمكاننا انْ نُحلِّل سِجلّات بروتينات (انظروا المَهمّة الثالثة في فعاليّة "سباق التسلُّح"). تحتوي سِجلّات البروتينات على معلومات عن تسلسل الأحماض الأمينيّة وعن موتيفات هامّة لمبنى البروتين ووظيفته، كالموقع الفعّال للإنزيم، وموتيف رابط للأيونات وغيرها. عندما نرغب ببحث تسلسل البروتين، نحن مُقيَّدين بالبروتينات ذات سِجلّ في مُستودع معلومات تسلسلات البروتينات. تتنبأ الأداة Prosite بوجود موتيفات مبنويّة ووظيفيّة في البروتين بالاعتماد على التشابه الموجود بين تسلسل الاستعلام (تسلسل البروتين الذي نبحثه) وتسلسلات موتيفات شُخِّصت في الماضي وجُمعت في مُستودع معلومات للموتيفات البروتينيّة. تتمتَّع الأداة Prosite بميزة إضافيّة حيث تُمكِّن من تحليل تسلسلات البروتينات حتَّى لو لم تتواجد سِجلّات تابعة لها في مُجمَّعات تسلسلات البروتينات. تستقبل الأداة Prosite من المُستخدم تسلسل من الأحماض الأمينيّة دون الحاجة لمعرفة مصدره أو حتّى معرفة إنْ كان هذا التسلسل كاملًا أم ناقصًا، وتبحث عن موتيفات بروتينيّة ذات أهميّة من حيث المبنى أو من حيث الوظيفة. يُمكن مثلًا أنْ نبحث بمُساعدة الأداة أيضًا تسلسلًا طافرًا أو تسلسلًا جُزئيًا من بروتين عُزِل في المُختبر- أي تسلسلات لا نعرف عنها أي معلومات أو نعرف عنها معلومات قليلة فقط.

كيف بإمكان الأدوات البيوإنفورماتيّة، كالأداة Prosite أنْ تُساعد في تحليل وفهم مبنى ووظيفة البروتين؟

المبدأ الأساسي في البيوإنفورماتيكا ينصُّ على أن التشابه بين التسلسلات (الحفظ في التسلسل) يدلُّ غالبًا على تشابه في مبنى ووظيفة البروتينات. عندما نقوم بمُقارنة تسلسل الأحماض الأمينيّة للبروتين الذي نبحثه مع تسلسل أحماض أمينيّة ذات مبنى معروف أو وظيفة معروفه، تمّ تحديدها سابقًا بواسطة تجارب مُعيّنة وخُزنت في مخازن المعلومات، يُمكن أنْ نقوم بنَسْب البروتين الذي نبحثه إلى عائلات بروتينيّة معروفة وكذلك التنبؤ بمبنى ووظيفة البروتين كلُّه أو جُزء منه. إذا وُجد تشابه بين تسلسل مُعيّن في البروتين الذي نبحثه مع بروتينات شُخصَّت في الماضي، بإمكاننا أنْ نفترض أنَّ للأجزاء المُتشابهة في التسلسل يوجد مبنى مُتشابه ووظيفة مُتشابهة أيضًا.

هكذا، ومن خلال مُقارنة تسلسل البروتين الذي نبحثه مع التسلسلات الموجودة في مُستودع الموتيفات البروتينيّة كِيشور نستطيع أنْ نتعرَّف على الموتيفات التي تنمح البروتين فعاليّة أو وظيفة مُعيّنة (رسم 2).



الرسم 2: الأداة Prosite تتنبأ بالموتيفات الموجودة في البروتين الذي نبحثه، تفحص هل ينتمي هذا البروتين إلى عائلة بروتينات، كما تتنبأ بمبنى ووظيفة مُمكنة للبروتين

الأداة Prosite קישור تتنبأ بالموتيفات الموجودة في البروتين الذي نبحثه وتفحص إذا كان هذا البروتين ينتمي إلى عائلة بروتينات من خلال البحث في مُستودع معلومات الموتيفات والعائلات البروتينيّة (الرسم2). سنستعين بالأداة Prosite للتعرُّف على الموتيفات الموجودة في بروتين CFTR وللتعرف على وظائف هذه الموتيفات.
حتى الآن نعرف أنَّ البروتين هو قناة لنقل الأيونات، لكنَّنا لا نعرف ما هي الموتيفات الموجودة في البروتين والتي تُمكِّنه من إنتاج القناة في غشاء الخلية؟ ما الذي يُمكِّن من نقل الأيونات عبرها؟ سنُحاول أنْ نفحص كيف تتأثَّر هذه الموتيفات من الطفرات المُختلفة في الجين، وما هي علاقتها بظهور المرض.

من المُفضَّل قبل مُتابعة المَهمّة مُشاهدة الجولة الإرشاديّة للأداة Prosite التي تشرح مبادئ الاستعمال الأساسيّة للأداة

בטרם נמשיך בפעילותנו מומלץ לצפות בסיור המודרך של הכלי Prosite המסביר עקרונות שימוש בסיסיים בכלי.

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

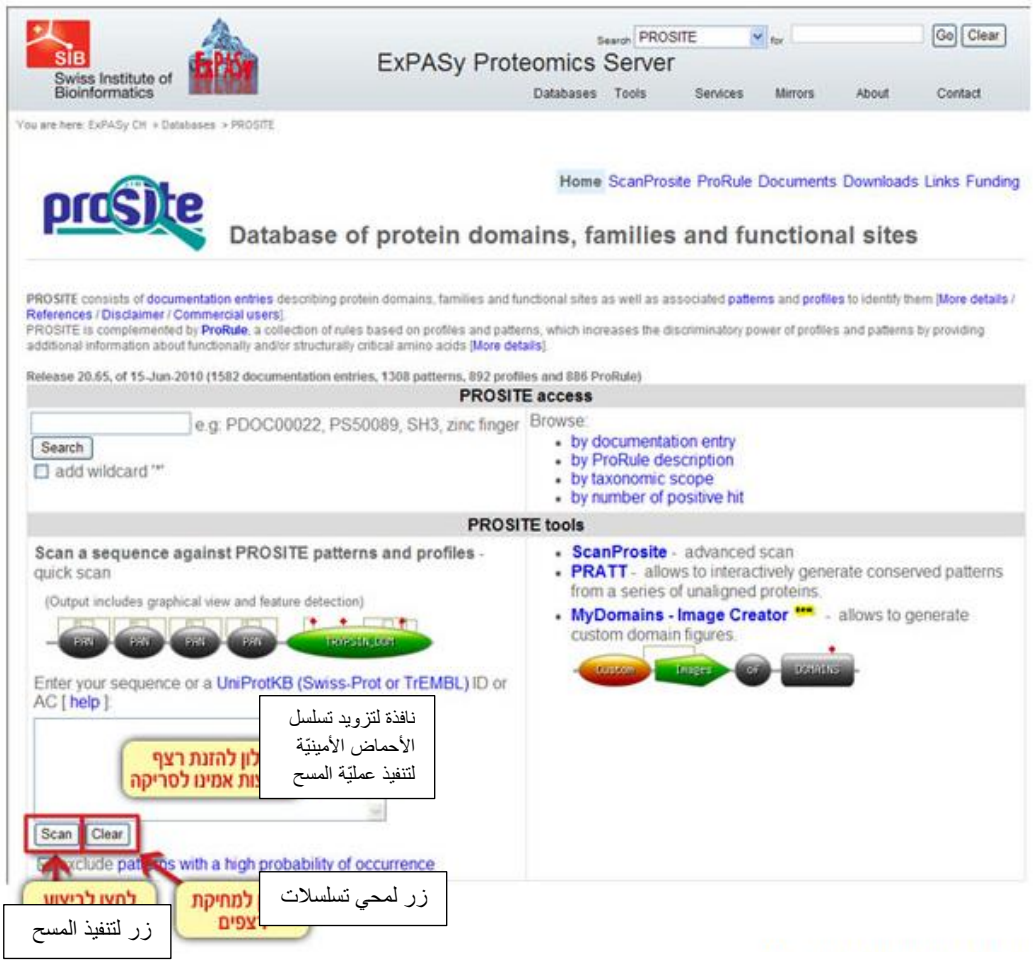
مهمّة 1: البحث عن موتيفات في بروتين CFTR بواسطة الأداة Prosite (صفحة 3 من 7)

البحث عن موتيفات بروتينيّة

افتح واجهة الأداة الأداة (ממשק הכלי) Prosite في صفحة جديدة في مُتصفّح الإنترنت (דפדפן האנטרנט).

اضغط على الرابط http://www.expasy.org/prosite. انتبه أنَّ الأداة Prosite لا تتمّ صيانتها من قبل NCBI لذلك لا يُمكن الوصول إليها من خلال الصفحة الرئيسيّة لموقع NCBI.

تُمكِّن واجهة الأداة من تنفيذ عمليّات بحث مُتنوِّعة تتعلق بالموتيفات البروتينيّة. سنُركِّز على البحث عن موتيفات في تسلسل بروتين الذي يُنفَّذ بواسطة القسم السُفلي من الواجهة (شاشة 1). يوجد لدى الباحثين تسلسل أحماض أمينيّة لبروتين CFTR السليم קישור، كما هو موجود في مُستودع المعلومات קישור ، بصيغة FASTAקישור. انسخ تسلسل البروتين السليم، ألصقه في النافذة المُناسبة في القسم السُفلي من واجهة الأداة PROSITE واضغط على "SCAN" لتنفيذ البحث (مُقارنة تسلسلات) والتعرُّف على الموتيفات الموجودة في البروتين.



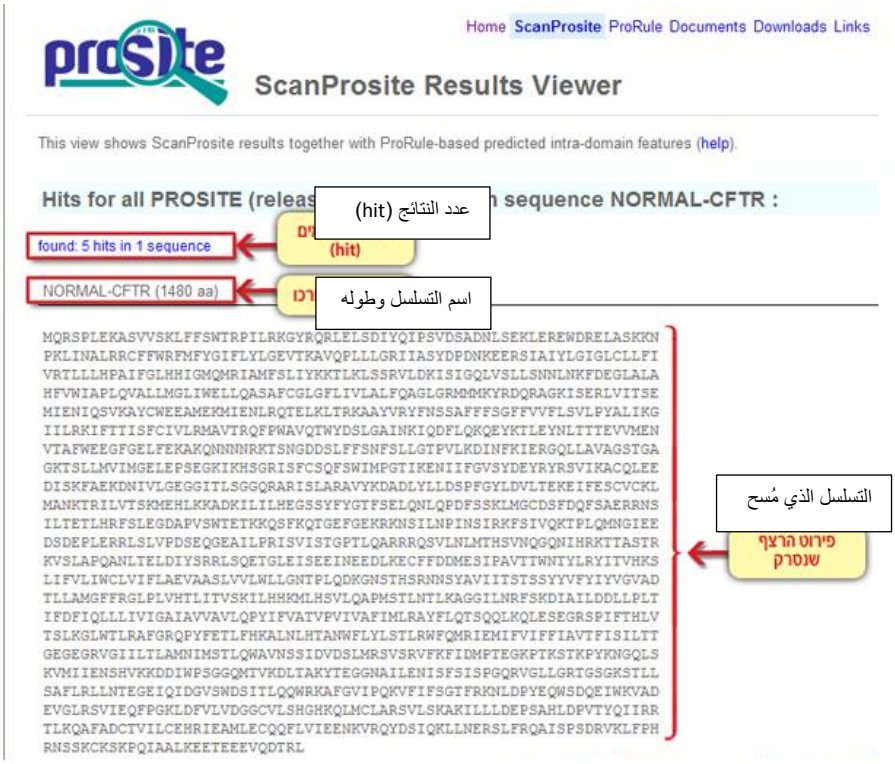
الشاشة 1: واجهة الأداة Prosite

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

مهمّة 1: البحث عن موتيفات في بروتين CFTR بواسطة الأداة Prosite (صفحة 4 من 7)

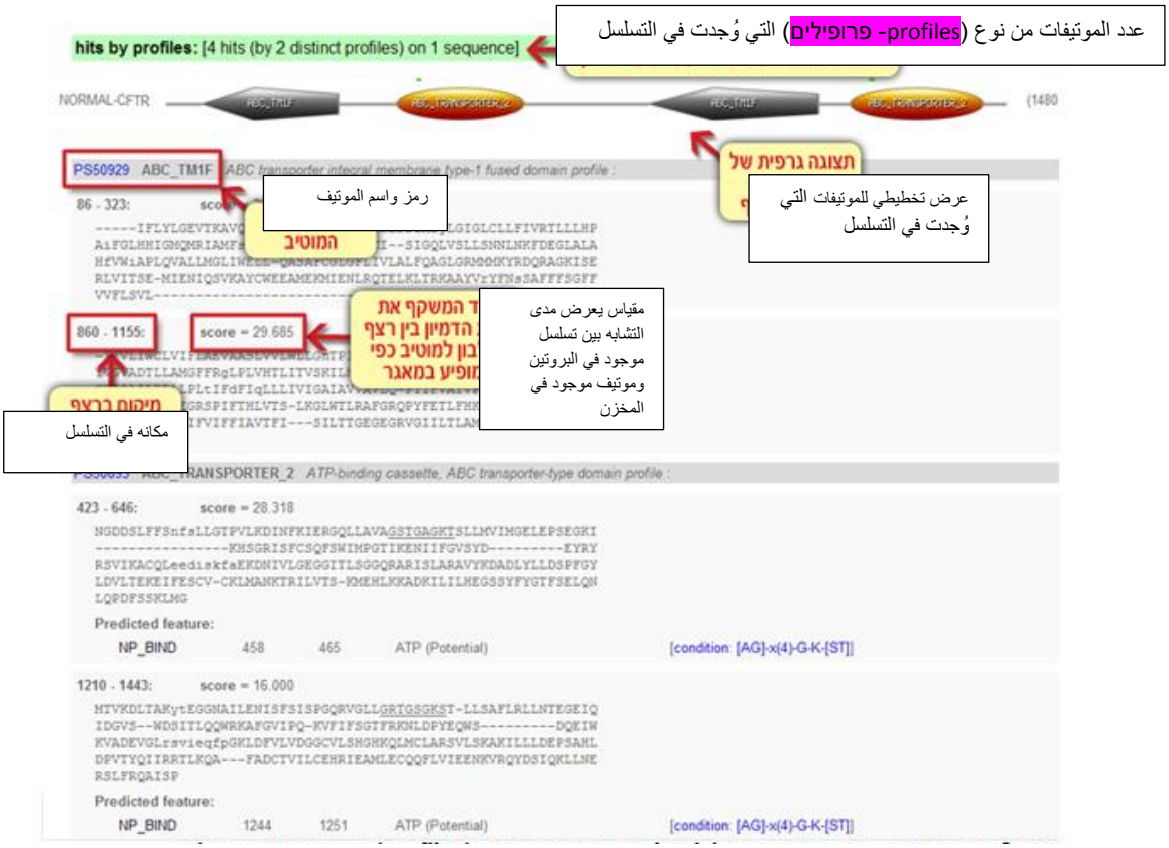
تحليل صفحة النتيجة

تُعرض في القسم الأول من صفحة النتيجة معلومات عامة عن تسلسل الاستعلام: اسم التسلسل، طول التسلسل وتسلسل الاستعلام (شاشة 2)



الشاشة 2: صفحة النتيجة – معلومات عامّة عن تسلسل الاستعلام

تُعرض في القسم الثاني من صفحة النتيجة تفاصيل موتيفات وظيفيّة أو مبنويّة وُجدت في التسلسل، بشكل تخطيطيٍّ وكلامي (عرض التسلسل نفسه)(شاشة 3). يتمُّ عرض رمز التعرُّف على الموتيف، اسم الموتيف، مكانه في تسلسل الاستعلام وعلامة (score) هي بمثابة مقياس لمدى التشابه بين تسلسل البروتين الذي نبحثه وتسلسل الموتيف الموجود في المستودع. يتمّ التمييز في صفحة النتيجة بين الموتيفات الطويلة (التي تُعرض بواسطة פרופילים{profiles})، والموتيفات القصيرة (التي تُعرض بواسطة תבניות{patterns}). سنتركَّز في الموتيفات الطويلة، لذلك التوجيهات في هذه الفعاليّة تتعلق بهذه الموتيفات ما عدا في الحالات التي يُذكر فيها غير ذلك.



الشاشة 3: صفحة النتيجة – وصف تخطيطي وكلامي للموتيفات الطويلة (profiles) الموجودة في تسلسل البروتين

أنظروا إلى شاشة النتيجة وأجيبوا عن الأسئلة التاليّة:

1. ما هو عدد الموتيفات الطويلة (**profiles**) الموجودة في تسلسل بروتين CFTR؟

- أ. يوجد نوعان من الموتيفات (ABC_TM1F و ABC_TRANSPORTER_2)، يظهر كل نوع مرتين في تسلسل CFTR.
- ب. يوجد 4 أنواع من الموتيفات (لكل واحد منها مكان ،علامة تشابه، وتسلسل مُختلف)، يظهر كل نوع مرةً واحدةً.
- ج. يوجد في تسلسل البروتين CFTR موتيف واحد (ABC) ويظهر 4 مرات.
- د. يوجد نوعان من الموتيفات (ABC_TM1F و ABC_TRANSPORTER_2)، يظهر كل نوع 4 مرات في تسلسل CFTR.

الجواب هو: أ. نلاحظ وجود نوعان من الموتيفات في تسلسل بروتين CFTR، موتيف من نوع ABC_TM1F ، وموتيف من نوع ABC_TRANSPORTER_2 ، يظهر كل نوع منهما مرتين في بروتين CFTR.

2. أين يتواجد الموتيف ABC_TM1F؟

- أ. يظهر مرَّة واحدة في المواضع 323-86.
- ب. يظهر مرتان، في المواضع 323-86، وأيضًا في المواضع 1155-860.
- ج. يظهر 4 مرّات، في المواضع 323-86، 1155-860، 646-423، 1443-1210.
- د. لا يظهر موتيف بهذا الاسم بتاتًا في البروتين.

الجواب هو: ب. يظهر مرَّتان، في المواضع 323-86، وأيضًا في المواضع 1155-860.

تقوم الأداة Prosite أيضًا بتزويدنا بعلامة لمدى التشابه بين المنطقة الموجودة في تسلسل البروتين الذي نبحثه وتسلسل الموتيف الموجود في المُستودع. كلَّما كانت العلامة أعلى يكون التشابه بين التسلسلين أكبر.

3. يظهر الموتيف ABC_TM1F مرَّتان في تسلسل بروتين CFTR. ماذا يُمكن القول عن التشابه بين التسلسل الموجود في البروتين وتسلسل الموتيف ؟

- أ. تشابه تسلسل البروتين في المواضع 323- 86 مع الموتيف ABC_TM1F أكبر بقليل من تشابه تسلسل البروتين في المواضع 1155-860 مع الموتيف ABC_TM1F.
- ب. تشابه تسلسل البروتين في المواضع 323- 86 مع الموتيف ABC_TM1F أقل من تشابه تسلسل البروتين في المواضع 1155-860 مع الموتيف ABC_TM1F.
- ج. التسلسلات في المواضع323-86 و 1155-860 تتشابه بنفس المقدار مع الموتيف ABC_TM1F.
- د. لا يُمكن أنْ نعرف أي من التسلسلين يُشبه تسلسل الموتيف ABC_TM1F أكثر.

الجواب هو: أ. تشابه تسلسل البروتين في المواضع 323- 86 مع الموتيف ABC_TM1F أكبر بقليل من تشابه تسلسل البروتين في المواضع 1155-860 مع الموتيف ABC_TM1F.

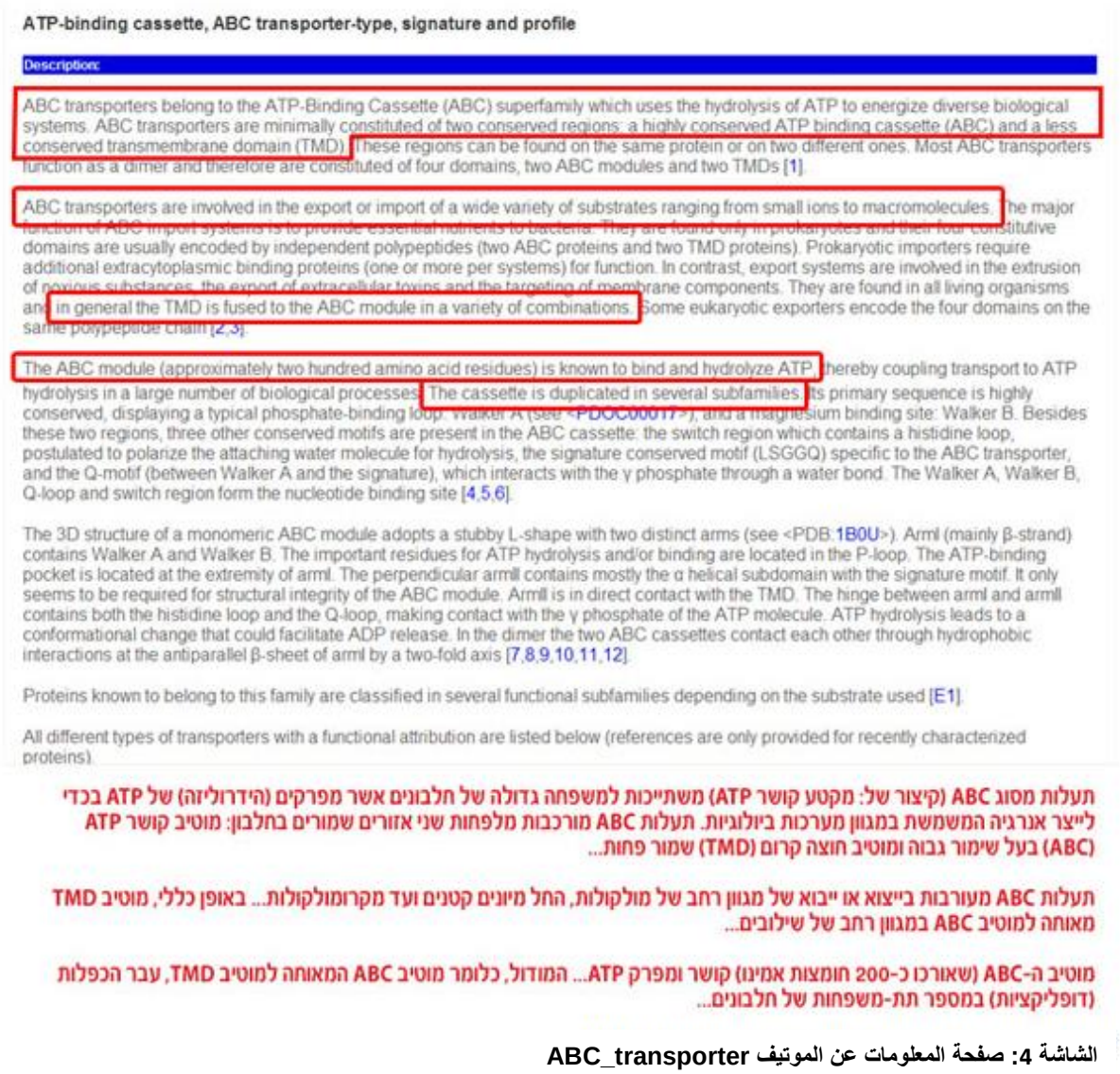
تُعرض أسماء الموتيفات بشكل مُختصر، لكن عادةً يدلُّ الاسم على مبنى ووظيفة الموتيف. اسم الموتيفان في هذا المثال يبدئان بالأحرف ABC وهذا يدلُّ على انتسابهما إلى نفس العائلة البروتينيّة.

4. بالاعتماد على المعلومات الموجزة المُرفقة لرمز الموتيف ABC_TM1F، أين يتواجد هذا الموتيف داخل الخليّة؟

- أ. في السيتوبلازم.
- ب. في النواة.
- ج. في الميتوكندريا.
- د. في غشاء الخلية.

الجواب هو: د. بإمكاننا أنْ نعرف أنَّ الموتيف مُثبت في غشاء الخلية ("integral membrane ") وهو عبارة عن قناة لنقل الجُزيئات ("transporter ").

الضغط على رمز الموتيف ينقلنا إلى صفحة تفاصيل المعلومات. لنتعرَّف على الموتيف من نوع ABC_TRANSPORTER_2 نضغط على الرابط PS50893 الذي يظهر في الجهة اليُسرى لاسم الموتيف. في صفحة المعلومات التابعة له (شاشة 4) بإمكاننا أنْ نجد وصفًا (Description) لعائلات البروتينات التي يتواجد فيها هذا الموتيف، معلومات عن آليّة عمل الموتيف والمبنى الفراغي له (في حالة معرفة مثل هذه المعلومات من قبل) كما ويُمكن أنْ نجد أسماء بروتينات إضافيّة تحتوي على هذا الموتيف. تظهر المعلومات عادةً في فقرة الافتتاحيّة مع أنَّه بإمكاننا أنْ نجد معلوماتً إضافيّة في الفقرات التي تليها كمعلومات تقنيّة تتعلق بالموتيف ومُميِّزاته (Technical section) كما نجد قائمة مصادر (References) وأمور أخرى.



الشاشة 4: صفحة المعلومات عن الموتيف ABC_transporter

بالاعتماد على اسم الموتيفان والمعلومات المُشار إليها (المُشدَّدة باللّون الأحمر) أعلاه:

5. مَنْ مِنْ بين الموتيفان ABC_TM1F أم ABC_TRANSPORTER_2 بإمكانه أنْ يربط ATP קישור وما هو الهدف من ذلك؟

- أ. الموتيف ABC_TM1F يربط ATP. تفكيك ATP يُحرِّر الطاقة لتُستغلّ في عمليّات مُتنوِّعة.
- ب. الموتيف ABC_TM1F يربط ATP، الذي يُنقل إلى داخل الخلية.
- ج. الموتيف ABC_TRANSPORTER_2 يربط ATP، الذي يُنقل بواسطة ABC_TM1F إلى خارج الخلية.
- د. الموتيف ABC_TRANSPORTER_2 يربط ATP. تفكيك ATP يُحرِّر الطاقة لتُستغلّ في عمليّات مُتنوِّعة.

> الجواب هو: د. موتيف ABC_TRANSPORTER_2 يربط ATP. تفكيك ATP يُحرِّر الطاقة لتُستغلّ في عمليّات مُتنوِّعة.

نعود إلى صفحة النتائج الرئيسيّة. بالإضافة إلى اسم الموتيف، مكانه في تسلسل البروتين وعلامة التشابه، يُعرض أيضًا لكل موتيف موجود في بروتين CFTR، التسلسل الذي وُجد مُشابهًا لتسلسل الموتيف. ننظر إلى التسلسلات الموجودة في بروتين CFTR والتي وُجدت مُشابهةً للموتيف ABC_TRANSPORTER_2 (شاشة 5). يُمكن أنْ نرى في كل واحد من التسلسلين عددًا من الأحماض الأمينيّة المُشار اليها بخط. هذه الأحماض الأمينيّة ذات فعاليّة هامّة في الموتيف الكامل. تُعرض وظيفة هذه الأحماض ومكانها الدقيق تحت Predicted feature الذي يعني ميزة (מאפיין).

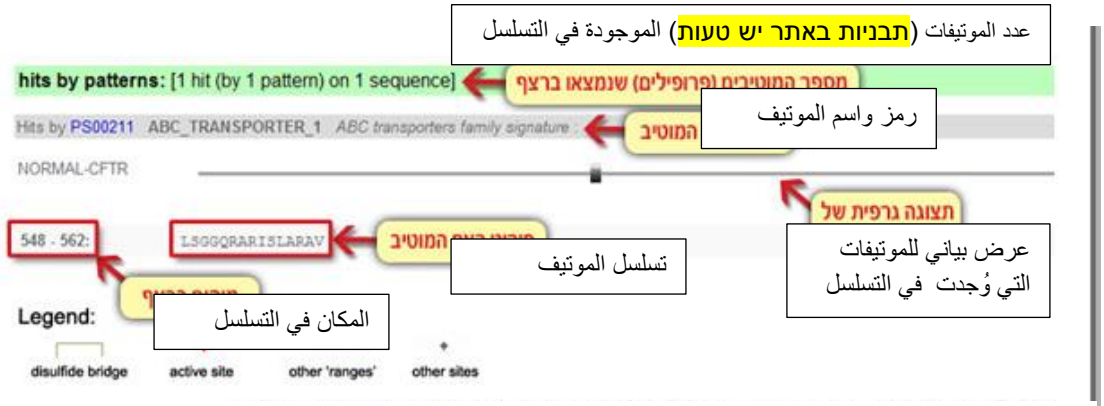
الشاشة 5: مّيزات في تسلسل الموتيف ABC_transporter في بروتين CFTR

6. حسب ما هو معلوم عن فعاليّة الموتيف ABC_TRANSPORTER_2 وحسب اسم الميّزة NP_BIND (اختصار ل Nucleotide-phosphate binding region)، ما هي وظيفة الأحماض الأمينيّة المهمّة في الموتيف؟

- أ. نقل أيونات معدن.
- ب. ربط جُزيئات ATP.
- ج. ربط أيون معدن ضروري لمبنى الموتيف.
- د. منح ثبات لمبنى الموتيف.

الجواب هو: ب. الأحماض الأمينيّة المهمّة المُشار لها بخط تشترك في ربط جُزيئات ATP. كما لاحظنا الموتيف ABC_TRANSPORTER_2 يربط ATP، بينما الميّزة NP_BIND تعرض المنطقة (region) أو الأحماض الأمينيّة في الموتيف التي ترتبط فعليًا (binding) الـATP (كما نعلم ATP هو نوكلوئتيد (nucleotide))

أظهر البحث في مستودع المعلومات وجود موتيف قصير يُعرض بواسطة (תבנית-pattern)



الشاشة 6: صفحة النتيجة- عرض تخطيطي وكلامي للموتيفات القصيرة التي وُجدت في تسلسل البروتين

7. ماذا يُمكن أنْ نعرف عن هذا الموتيف من اسمه ومكانه بالنسبة للموتيفات الطويلة التي تعلَّمنا عنها في السابق؟

- أ. الموتيف ذا أهميّة لتثبيت البروتين في غشاء الخلية، وهو جُزء من الموتيف ABC_TM1F.
- ب. حسب مواضع هذا الموتيف في التسلسل فهو موجود كجُزء من الموتيف الأول ABC_TRANSPORTER_2 ومن المُحتمل أنَّه ذا أهمية لأداء البروتين لربط أو لتحليل ATP.
- ج. لا توجد أيْ علاقة بين الموتيفات القصيرة (المعروضة على شكل patterns) والموتيفات الطويلة (المعروضة على شكل **profiles**).
- د. حسب المواضع في التسلسل فهو موجود كجُزء من الموتيف ABC_TRANSPORTER_2 الثاني ومن المُحتمل أنَّه ذا أهمية لأداء البروتين لربط أو لتحليل ATP.

الجواب هو: ب. حسب موضع هذا الموتيف في التسلسل فهو موجود كجُزء من الموتيف الأول ABC_TRANSPORTER_2 ومن المُحتمل أنَّه ذا أهمية لأداء البروتين لربط أو لتحليل ATP.

للمُعلِّم: يُجسِّد هذا المثال بصورة جيِّدة أنَّ هُناك أهميَّة للموتيفات القصيرة أيضًا بالنسبة لوظيفة البروتين، حيث بإمكانها أنْ تكون جُزءً من تسلسل أطول يُشكِّل موتيف ذا أهميَّة لمبنى البروتين. وهُنا نحن شُهود على حالة مُثيرة للاهتمام فيها يضمَّ موتيف طويل نسبيًا طوله أكثر من 200 حامض أميني

(ABC_TRANSPORTER_2)، موتيفات قصيرة طولها عدة أحماض أمينيّة وهي مسؤولة عن ربط ATP (المميّزة NP_BIND) وعن تحليل ATP (الموتيفABC_TRANSPORTER_1 من نوع patterns)

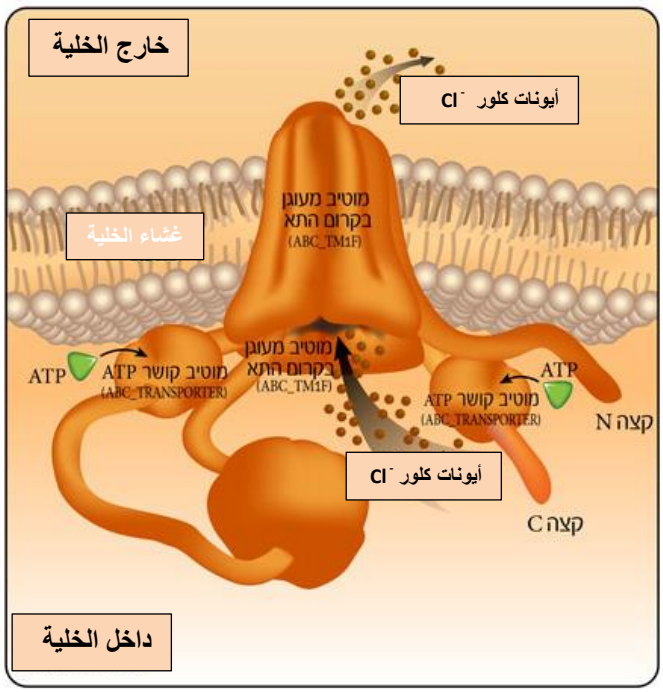
لا تُغلقوا نافذة نتائج البحث في Prosite للتسلسل CFTR، من أجل مُتابعة الفعاليّة

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

مهمّة 1: البحث عن الموتيفات في بروتين CFTR بواسطة الأداة Prosite (صفحة 5 من 7)

إجمال فرعي:

أظهر البحث بواسطة الأداة Prosite في مخزن المعلومات للموتيفات والعائلات البروتينيّة أنَّ البروتين CFTRهو قناة لنقل الأيونات وهو ينتمي إلى عائلة البروتينات المُسمَّاة ABC (ATP-Binding Cassette). لبروتينات هذه العائلة نوعان من الموتيفات المحفوظة: الأول يُثبِّت البروتين في غشاء الخلية (ABC_TM1F) والثاني يربط ATP اللازم لنقل الأيونات بعكس اتجاه مُنحدر التراكيز מפל הריכוזים קישור (ABC_TRANSPORTER_2) (الرسم 3).



رسم 3: لبروتين CFTR أربعة موتيفات ضروريّة لقيام البروتين بوظيفته كقناة موجودة في الغشاء لنقل الأيونات تنتمي هذه الموتيفات إلى نوعين مُختلفين. موتيف مُثبت في غشاء الخلية (يُسمَّى ABC_TM1F) الذي يكوِّن مبنى قناة لنقل الأيونات عبر غشاء الخلية، أما الموتيف الذي يربط ويُفكِّك ATP (المُسمَّى ABC_TRANSPORTER) وهكذا يُمكِّن نقل الأيونات عكس مُنحدر التراكيز.

يتواجد في بداية البروتين، في الطرف N קישור موتيف يُثبِّت البروتين في غشاء الخلية، وبعده يظهر موتيف يربط ATP؛ ثُمَّ موتيف آخر يُثبِّت البروتين في غشاء الخليّة، بعدها يظهر في الطرف C קישור موتيف إضافي يربط ATP. بالرّغم من أنَّ الموتيفات غير مُتعلِّقة الواحدة بالأخرى من ناحية المبنى، إلا أنَّها " تشترك مَع بعضها لأداء عملها". الموتيفات المُثبَّتة في غشاء الخليّة تُنتج قناة لنقل الأيونات. الطاقة التي تتحرَّر من تفكيك

ATP من قبل الموتيف الذي يربط ال ATP تُمكِّن من نقل أيونات الكلور عبر غشاء الخليّة بعكس مُنحدر التراكيز. لدينا الآن نموذج يعتمد على مبنى البروتين ويشرح كيف يعمل البروتين CFTR كقناة لنقل أيونات الكلور. تُمكِّن الأداة Prosite من تشخيص الموتيفات الهامَّة في البروتين؛ بواسطة هذه الأداة تعرَّفنا على وظيفة ومكان كل موتيف من الموتيفات الموجودة في بروتين CFTR، كذلك تعرّفنا على الأحماض الأمينيّة المُشتركة في فعاليّة البروتين كربط ATP مثلًا.

للتلخيص، بواسطة الأداة Prosite تعرَّفنا على الموتيفات في بروتين CFTR وتعلَّمنا عن أهميَّة هذه الموتيفات لمبنى وفعاليّة البروتين كقناة لنقل الأيونات عبر غشاء الخلية.

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

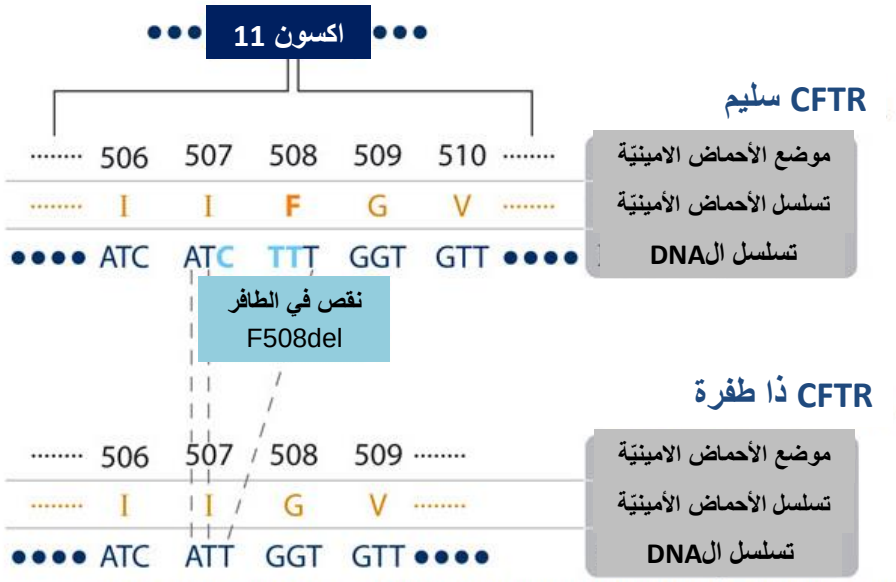
مهمّة 1: البحث عن الموتيفات في بروتين CFTR بواسطة الأداة Prosite (صفحة 6 من 7)

2. فحص تأثير الطفرة في CFTR على الموتيفات المبنويّة والوظيفيّة في البروتين

اكتشفت الأبحاث حتى الآن ما يزيد عن 1800 طفرة مُختلفة في الجين CFTR. وُجد أيضًا أنَّ طفرات مُختلفة تنتشر في دول مُختلفة وبين خلفيّات عرقيّة مُختلفة، تختلف هذا الطفرات فيما بينها بطابعها وبمُستوى انتشارها أيضًا. الطفرة F508del هي الأكثر شيوعًا في العالم كلِّه وأيضًا في إسرائيل، وتُشكِّل تقريبًا ثُلُثي الأليلات الطافرة. بعد أنْ شُخِّصت الطفرة على مُستوى ال DNA وعلى مُستوى ال RNA، يرغب الباحثون بفحص تأثير الطفرة على مبنى ووظيفة البروتين CFTR. يتساءل الباحثين: هل والى أيْ مدى يُمكن أنْ نعرف، بالاعتماد على التغيير الموجود في تسلسل البروتين الطافر، أيْ من الموتيفات المهمّة، من ناحية المبنى أو من ناحية الوظيفة ستتضرَّر بوجود هذه الطفرة؟ هل بالإمكان التنبؤ بخُطورة المرض بالاعتماد على تسلسل البروتين الطافر فقط؟ حتَّى تتمّ الإجابة على هذه الأسئلة سيقوم الباحثون بتجنيد الأداة Prosite لبحث الطفرة الشائعة F508del.

للمُعلِّم: في هذه المرحلة وكجُزء من المُقدمة يُمكن إجراء نقاش في الصف يتعلَّق بالأنواع المُختلفة للطفرات (طفرة نقص، طفرة استبدال، طفرة إضافة وغيرها)، مكان الطفرات في الجين (في الاكسونات، في الانترونات، في CDS في UTR وغيرها) وتأثيراتها المُمكنة على تسلسل البروتين ومبناه.

تُعرض في الرسم 4، تسلسلات ال DNA للأليل السليم لCFTR والأليل الطافرF508del، والبروتينات التي تُشفَّر بواسطة هذه التسلسلات.



رسم 4: تسلسل النوكلوئتيدات (لون أزرق) والأحماض الأمينيّة (لون بُني) في CFTR السليم وفي الطافر F508del. يُشار إلى النوكلوئتيدات التي تنقص في الأليل الطافر باللون الأزرق السماوي

للمُعلِّم: طفرة معروفة وشائعة أخرى هي طفرة تنقص فيها النوكلوئتيدات TCT، أي نقص النوكلوئتيدات الثلاثة يبدأ قبل موضع واحد من الموضع الذي يبدأ فيه النقص في الطفرة السابقة. تسلسل ال DNA وتسلسل البروتين الناتجان كنتيجة لهذه الطفرة مُطابقان للذان ينتجان من نقص CTT، ولذلك هذا الطافر أيضًا يُسمَّى F508del.

8. بالاعتماد على المعلومات التي تظهر في الرسم 4، ماذا يُمكن أنْ نقول عن الطفرة في الأليل F508del وعن تأثيرها على البروتين؟

- أ. أدّى نقص النوكلوئتيدات الثلاثة في اكسون 11 إلى إنتاج بروتين CFTR طافر تمَّ فيه استبدال الحامض الأميني فنيل ألانين (رمزه F) الموجود في الموضع 508 بالحامض الأميني جليسين (رمزه G).
- ب. أدّى نقص النوكلوئتيدات الثلاثة في أكسون 11 إلى إنتاج بروتين CFTR ينقصه الحامض الأميني فنيل ألانين (رمزه F) الذي وُجد في الموضع 508.
- ج. لأنَّ النوكلوئتيدات الثلاثة الناقصة في أكسون 11 تمتدُّ على شيفرتين (كودونان) لحامضين أمينيّين، سيختلف بروتين CFTR الطافر عن البروتين CFTR السليم بالحامضين الأمينيين اللذان يُشفَّران بواسطتهما.
- د. طفرة النقص في الاكسون 11 تؤدّي إلى تغيير في إطار القراءة **קישור**، وكنتيجة لذلك يكون تسلسل البروتين الطافر مُختلفًا كُليًّا من الموضع 508.

الجواب هو: ب. في الأليل الطافر يوجد نقص في 3 نوكلوئيدات في الاكسون 11 (CTT في الرسم 4). الشيفرات CTT وATC في الأليل السليم التي تُشفِّر إلى حامضين أمينيّين I في الموضع 507 وF في الموضع 508 (F508I507)، تتحول إلى شيفرة **קישור** واحدة ATT في الأليل الطافر، الذي يُشفِّر إلى حامض أميني واحد I507. هذا تفسير لاسم الأليل الطافر – F508del: ينقص الحامض الأميني فنيل ألانين (رمزه F الذي وُجد في الموضع 508 من قبل (del هو اختصار لكلمة deletion)).

9. هل تغيّر إطار القراءة في الأليل F508del، بعد حدوث طفرة النقص؟

- أ. لم يتغيّر إطار القراءة - نقصت 3 نوكلوئتيدات، والشيفرة الوراثية تُقرأ على شكل ثُلاثيات (كودونات)، ولذلك فإن ترجمة البروتين تستمر بشكل عادي ابتداءً من الكودون GTT.
- ب. تغيّر إطار القراءة - لأنَّ النوكلوئتيدات الناقصة هي جُزء من كودونيْن.
- ج. لم يتغيّر إطار القراءة - لأنَّ الموضع 507 يحتوي على الحامض الأميني أيزوليسين (I) في البروتين السليم والبروتين الطافر أيضًا.
- د. تغيّر إطار القراءة – فقط الطفرة التي يتمُّ فيها استبدال نوكلوئتيد بنوكلوئتيد آخر لا تُغيّر إطار القراءة، بينما طفرة الإضافة أو طفرة النقص تُغيِّر إطار القراءة.

الجواب هو: أ. بما أنَّ النقص هو 3 نوكلوئتيدات فإنَّ إطار القراءة لا يتغيَّر، وتسلسل البروتين يبقى كما كان (مُشابه للتسلسل – ابتداءً من الموضع 509 في بروتين CFTR السليم).

10. كيف تمَّ الحفاظ على الحامض الأميني (I) في الموضع 507 في الأليل الطافر بالرّغم من التغيير في الكودون المُشفِّر له بالمُقارنة مع الأليل السليم؟

- أ. لأنَّ المواضع التي تشترك بالتشفير للحامض الأميني هي الموضع الأيسر والمركزيّ من الكودون، وهذه المواضع لم تتغيَّر.
- ب. بما أنَّه لا يوجد تغيير في إطار القراءة فلن يكون هُناك أي تغيير في الأحماض الأمينية.
- ج. الكودون ATC الموجود في الأليل السليم وأيضًا الكودون ATT الذي ظهر بعد حُدوث الطفرة يُشفِّران إلى نفس الحامض الأميني أيزوليسين (I).
- د. بما أنَّه ينقص 3 نوكلوئتيدات وهي بمثابة كودون واحد، يتغيّر تسلسل البروتين في موضع واحد فقط - في الموضع 508 وليس في الموضع 507.

الجواب هو: ج. الكودون ATC الموجود في الأليل السليم وأيضًا الكودون ATT الذي ظهر بعد حُدوث الطفرة يُشفِّران إلى نفس الحامض الأميني أيزوليسين (I).

حتى نفحص أي الموتيفات الموجودة في البروتين تتأثر من الطفرة، نقوم بإجراء تحليل بواسطة الأداة Prosite، نُقارن النتائج التي نحصل عليها من البروتين الطافر F508del مع النتائج التي نحصل من بروتين CFTR السليم. يُسمَّى هذا التوجُّه باسم بحث المُقارنة.

فيما يلي تسلسل الأحماض الأمينيّة لبروتين F508del CFTR קישור.

نفتح نافذة جديدة لمُتصفِّح الإنترنت(Ctrl+N) وندخُل من جديد إلى Prosite بدون أنْ نُغلق نتائج البحث التّابعة لتسلسل CFTR السليم (للذكير: http://www.expasy.org/prosite). ننسخ تسلسل F508del CFTR ونُلصقه في نافذة الإدخال (חלון קלט) ونضغط على "Scan" لتنفيذ البحث. الآن نقوم بمُقارنة النتائج التي نحصل عليها عند إلصاق تسلسل الطافر F508del مع تلك الناتجة عند استعمال البروتين السليم. انتبهوا في كلِّ موتيف إلى علامة التشابه بين تسلسل البروتين وتسلسل هذا الموتيف.

11. تمعَّنوا في صفحة نتيجة البروتين الطافر F508del. هل تعرَّفت الأداة Prosite على 4 موتيفات في البروتين الطافر؟

- أ. نعم
- ب. لا

الجواب هو: أ. نعم.

نعتقد للوهلة الأولى أنْ الطفرة لم تُؤثِّر على مبنى البروتين، حيث نُلاحظ أنَّ نتائج البحث بواسطة Prosite مُتشابهة عند استعمال البروتين السليم والبروتين الطافر.

أنظروا بِدقّة إلى صفحتيّ النتائج وقارنوا علامة التشابه بالنسبة لكل مقطع (score)، بين البروتين السليم والبروتين الطافر.

12. أي من بين المناطق الموجودة في البروتين الطافر CFTR F508del تتأثّر من الطفرة، كيف تتأثَّر؟

- أ. الموتيف ATP ABC_TRANSPORTER_2 الأول (الطرف N، في بداية البروتين). علامة التشابه في البروتين الطافر أعلى من علامة التشابه في البروتين السليم.
- ب. الموتيف ATP ABC_TRANSPORTER_2 الثاني (الطرف C، في نهاية البروتين). علامة التشابه في البروتين الطافر أعلى من علامة التشابه في البروتين السليم.
- ج. الموتيف ATP ABC_TRANSPORTER_2 الأول (الطرف N، في بداية البروتين). علامة التشابه في البروتين الطافر أقل من علامة التشابه في البروتين السليم.
- د. الموتيف ATP ABC_TRANSPORTER_2 الثاني (الطرف C، في نهاية البروتين). علامة التشابه في البروتين الطافر أقل من علامة التشابه في البروتين السليم.

الجواب هو: ج. الموتيف الأول الذي يربط ATP هو الموتيف المُتأثّر من الطفرة F508del. يتركَّب هذا الموتيف من الأحماض الأمينيّة الموجودة في المواضع 646-423، ومن ضمنها ذلك الموجود في الموضع 508. بما أنَّ هذه الطفرة تؤثِّر على الحامض الأميني فنيل ألانين (F) الموجود في الموضع 508 فمن المُتوقّع أنْ يتأثَّر هذا الموتيف من الطفرة.

13. ما معنى التغيير في علامة التشابه لموتيف البروتين الطافر؟

- أ. انخفاض علامة التشابه – يعني أنَّ التسلسل الموجود في البروتين أقل شبهًا بتسلسل الموتيف الموجود في مخزن المعلومات.
- ب. انخفاض علامة التشابه – يعني أنَّ التسلسل الموجود في البروتين أكثر شبهًا بتسلسل الموتيف الموجود في مخزن المعلومات.
- ج. ارتفاع علامة التشابه – يعني أنَّ التسلسل الموجود في البروتين أقل شبهًا بتسلسل الموتيف الموجود في مخزن المعلومات.

- د. ارتفاع علامة التشابه – يعني أنَّ التسلسل الموجود في البروتين أكثر شبهًا بتسلسل الموتيف الموجود في مخزن المعلومات.

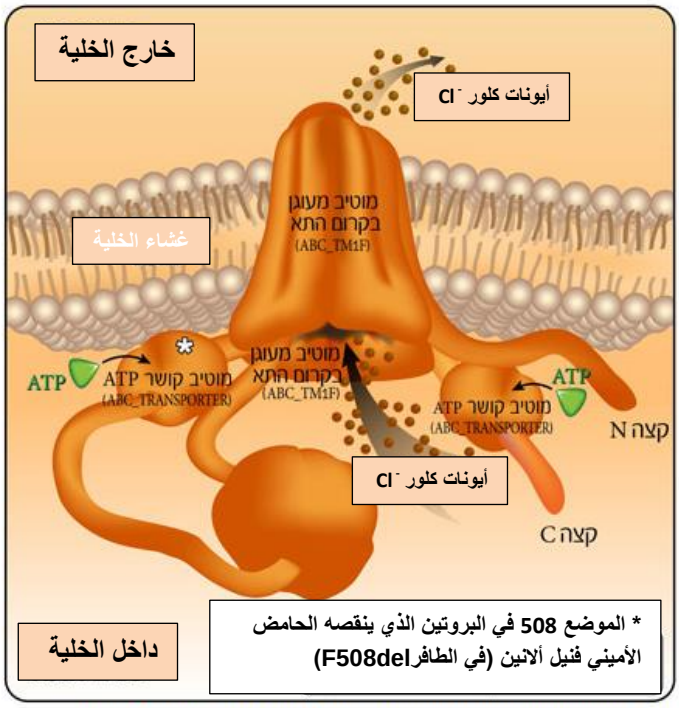
الجواب هو: أ. كلما كانت علامة التشابه أعلى، يكون التسلسل الموجود في البروتين الذي نبحثه مُشابهًا أكثر للموتيف الموجود في مخزن المعلومات. أدَّت الطفرة F508del إلى انخفاض في علامة التشابه للموتيف الأول الذي يربط ATP، لذلك بإمكاننا أنْ نستنتج أنَّ تسلسل الموتيف في البروتين الطافر أقل شبهًا بتسلسل الموتيف الموجود في مخزن المعلومات.

للمُعلِّم: بشكل مبدئي الإجابة أ و د صحيحتان. في الحالة الموجودة أمامنا، أدَّت الطفرة إلى انخفاض في العلامة التي تعكس مدى التشابه ولم تؤدي إلى ارتفاعها، لذلك الإجابة أ هي الإجابة الأصح.

أحدى الفرضيّات الأساسيّة والأكثر أهميّة في البيوإنفورماتيكا تدّعي أنَّ التشابه بين تسلسلات الأحماض الأمينيّة يدُّل على التشابه في ووظيفة البروتين وفي مبناه الفراغي. التسلسلات ذات الأهميّة من ناحية مبنى أو فعاليّة البروتين ووظيفته هي في الغالب تسلسلات محفوظة، حيث حدثت فيها طفرات قليلة خلال عملية النشوء والارتقاء. عمليًا، حتّى نقوم بتحديد تسلسل موتيف مُعيّن، تقوم الأداة Prosite بالمُقارنة بين مقاطع تسلسلات بروتينيّة محفوظة تم توصيف (אפ'וון) مبناها أو وظيفتها. عندما نقوم بمُقارنة تسلسل استعلام مُقابل مخزن الموتيفات، كلما حصلنا على تشابه أكبر مع تسلسل موتيف مُعيّن تكون علامة التشابه التي تُحتسب أكبر.

بالرّغم من أنَّ الانخفاض في علامة التشابه ليس كبيرًا، حيث أنَّ التغيير الذي حدث هو نقص حامض أميني واحد فقط من موتيف بطول 220 حامض أميني، لكنَّ هذا النقص يُمكن أنْ يكون كافيًا في حالات مُعيّنة للإضرار بوظيفة البروتين. في هذه الحالة نرى أنَّه بسبب النقص في الحامض الأميني فنيل ألانين في الموضع 508، لا تتمّ عمليّة **طيِّ البروتين** بالشكل السليم مما يؤدي إلى **تفكيكه**. ونتيجة لذلك **تقريبًا لا يوجد بروتين CFTR فعّال في غشاء الخلية.**

الآن بإمكاننا تحديد تأثير الطفرة F508del على الموتيفات البروتينيّة في CFTR (رسم 5).



الرسم 5: مكان الحامض الأميني الناقص في بروتين CFTR الطافر (F508del)

أظهر البحث بواسطة الأداة Prosite أنَّ الحامض الأميني فنيل ألانين الموجود في الموضع 508 هو جُزء من الموتيف الموجود في طرف N للبروتين (بداية البروتين) وهو موتيف يربط ATP (ABC_TRANSPORTER_2). بسبب طفرة أدَّت إلى نقص في الحامض الأميني الموجود في هذا الموضع، أصبح تسلسل الموتيف الموجود في البروتين أقل شبهًا بتسلسل الموتيف الموجود في مخزن المعلومات، ظهر هذا الأمر بواسطة علامة تشابه أقل من علامة التشابه التي نتجت في البروتين السليم. التغيير في التسلسل أدَّى إلى عدم طيّ البروتين بشكل السليم وبالتالي إلى عملية تفكيك البروتين. بسبب عدم وجود بروتين سليم وفعّال في غشاء الخليّة، يُعاني المرضى من أعراض شديدة للمرض.

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

مهمّة 1: البحث عن موتيفات في بروتين CFTR بواسطة الأداة Prosite (صفحة 7من 7)

تلخيص الأداة Prosite

للمُعلِّم: أُعِدت هذه الأسئلة لتلخيص استعمال الأداة Prosite، من المُفضَّل إجراء نقاش صفي لتلخيص الأداة.

بالاعتماد على المعلومات التي اكتسبتموها في هذه المَهمّة-

14. ما هو الهدف من استعمال الأداة Prosite؟

للمُعلِّم: كما ذُكر، تتنبأ الأداة Prosite بالموتيفات الموجودة في البروتين الذي نبحثه بالاعتماد على البحث في مخزن معلومات للموتيفات وعائلات البروتينات. عند وجود تشابه بين منطقة في تسلسل البروتين الذي نبحثه وتسلسل موتيف مُعيّن في المخزن، نستطيع الاستنتاج أنَّ مبنى أو وظيفة تسلسل البروتين الذي نبحثه مُشابه لهذا الموتيف. إيجاد موتيفات مُهمّة ذات وظيفة أو مبنى معروف في تسلسل البروتين يمنح الباحثين معلومات عن الوظائف المُمكنة للبروتين، عن مبناه وعن مكانه في الخليّة وغيرها من المعلومات. كذلك فبإمكان هذه الأداة أنْ تتنبأ بالمناطق الهامّة في البروتين التي تشترك في أدائه لوظيفته. رأينا أيضًا أنَّ تحليل تسلسل البروتين الطافر بواسطة الأداة Prosite يُظهر أنَّ التغيير في تسلسل أحد الموتيفات (الذي تجسَّد بنقص حامض أميني واحد) أدّى الى انخفاض في علامة التشابه للموتيف، مما يعكس تأثير هذا التغيير على مبنى البروتين والإضرار بوظيفته نتيجةً لطيّ البروتين بشكل غير سليم، الأمر الذي يؤدّي في نهاية الأمر إلى تفكيك البروتين.

15. ما هو مبدأ عمل الأداة Prosite؟

للمُعلِّم: يُقارن مُحرِّك بحث الأداة Prosite، تسلسل الاستعلام (تسلسل البروتين الذي نبحثه) بتسلسل موتيفات بروتينيّة ذات أهميّة من ناحية المبنى أو الوظيفة والتي تُعرض بواسطة patterns و profiles ، ويعرض تلك الأكثر شبهًا بمناطق مُعيّنة في تسلسل الاستعلام. لذلك نستنتج أنَّ استعمال Prosite يُمكِّن من التعرَّف على موتيفات ذات مبنى أو وظيفة معروفة في البروتين الذي نبحثه. تُزوِّد الأداة Prosite معلومات عن مكان ومميِّزات الموتيف في البروتين وعن ووظائفه. بالإضافة إلى ذلك تُعبِّر علامة التشابه التي تُمنح لكل موتيف عن مدى التشابه الموجود بين التسلسل البروتين الذي نبحثه وتسلسل الموتيف الموجود في المخزن.

16. هل تعتمد الأداة Prosite على المبنى ثلاثي الأبعاد للبروتين من أجل التعرُّف على موتيف في البروتين الذي نبحثه؟

للمعلِّم: لا. الأداة Prosite تعتمد على استعلام من تسلسل أحماض أمينيّة. من المُمكن أنْ يَضُم الموتيف بضع أحماض أمينيّة تقوم بأداء وظيفة مُعيَّنة، كالموقع الفعّال في الإنزيم مثلًا. ومن المُمكن أنْ يحتوي الموتيف على عشرات من الأحماض الأمينيّة أو حتَّى المئات منها والتي تنطوي إلى مبنى مُميّز (מבנה אופייני). في كلا الحالتين تكون الأحماض الأمينيّة التي تُركِّب الموتيف محفوظة (إذا كان هذا التسلسل قصيرًا يكون محفوظًا بدرجة كبيرة أما في الحالة التي يكون الموتيف مبنوي كبير فيكون محفوظًا بشكل أقل). هذا الحِفظ يُمكِّن من التعرُّف على الموتيف وتحديد تسلسله في المخزن، وهذا أيضًا ما يُمكِّن من التعرّف على الموتيفات الموجودة في تسلسل الاستعلام بواسطة البحث عن تسلسلات ومُقارنة التسلسلات بواسطة الأداة Prosite. عمليّة تحديد مبنى البروتين هي عمليّة مُعقَّدة، مُكلفة وتحتاج إلى وقت طويل. عمليًا هنالك عدد قليل من البروتينات ذات مبنى معروف، لذلك فإنَّ إمكانيّة التعرُّف على الموتيفات من خلال تسلسل البروتين وبالاعتماد على التشابه في التسلسل ودون الحاجة إلى تحديد مبناه الفراغي، تُمكِّننا من التعرُّف على فعاليّة البروتينات وعلى وظائفها المُحتملة بشكل سهل وغير مُكلف.

17. هل يُمكننا استعمال أداة بيوإنفورماتيّة من الأدوات الموجودة في مخزن الأدوات (ארגז כלים)، حتّى نحصل على المعلومات (أو على جُزء من المعلومات) التي نتجت من تحليل التسلسل بواسطة الأداة Prosite؟

للمُعلِّم: هناك تداخل جُزئي بين المعلومات التي يُمكن أنْ نحصل عليها من استعمال الأدوات البيوإنفورماتيّة المُختلفة، الأدوات البيوإنفورماتيّة المُختلفة تستعمل برامج وطُرق مُختلفة، وتعرض النتائج بطريقة مُختلفة أيضًا. مثلًا تحليل سِجلّات البروتين الموجود في مخزن تسلسلات الأحماض الأمينيّة يُمكِّننا التعرُّف على ميّزات مبنويّة ووظيفيّة من خلال الحقول Features (الميّزات (מאפיינים) في الحقل[region] والموقع الفعّال في الحقل [site]). استعمال هذه الطريقة الكلاميّة للعرض ليس سهلًا بالنسبة للمُستخدِم، كما وأنَّه لا يُظهر تسلسل الموتيف ذاته. في أغلب الأحيان لا نستطيع بهذه الطريقة تحليل تسلسلات بروتينات طافرة كاملة، إلا أذا وُجد لها سِجلّ في مخزن البروتينات. بالمُقابل فإنَّ استعمال Protein Blast (باختصار BLASTp) يكشف عن بروتينات ذات تسلسل مُشابه لتسلسل بروتين CFTR. قِسْم من هذه البروتينات تحتوي على موتيفات مُشابهة لتلك الموجودة في CFTR، ممّا يدلُّ على وظائفها المتُشابهة. من ناحية أخرى نحن لا نستطيع أنْ نعرف بشكل واضح تسلسل هذه الموتيفات والطريقة التي تترتّب فيها في تسلسل بروتين CFTR. هذه الأدوات، Entrez لتحليل السِجلّ، أو BLASTp للبحث عن تسلسلات مُشابهة (רצפים הומולוגיים)، لا تّزوِّدنا بمعلومات كافية عن الموتيف البروتيني نفسه أو عن وظيفته وفعاليّته، ولا تتطرّق إلى العائلات البروتينيّة. بإمكاننا أنْ نُلخِّص ذلك بما يلي: الأدوات البيوإنفورماتيّة الأخرى بإمكانها أحيانًا أنْ تُزوِّدنا بقسم من المعلومات الناتجة من التحليل باستخدام الأداة Prosite، لكِّن ل Prosite أفضليّة عليها لأنَّها قادرة على تحليل كلَّ تسلسل من الأحماض الأمينيّة، بالإضافة إلى ذلك فهي ليست بحاجة إلى وجود سِجلّ لهذا التسلسل في مخزن معلومات مُلائم؛ التسلسل يُزوِّد معلومات مُفصَّلة عن الموتيف المُشابه للمنطقة الموجودة في تسلسل البروتين الذي نبحثه وعن التشابه فيما بينهما؛ أفضليّة أخرى هي أنَّ الأداة Prosite تعتمد على مخزن موثوق به تمَّ فحصه من قِبَل مُختصّين، بينما يقوم قِسْم من المخازن الأخرى باستيعاب المعلومات بشكل آليٍّ.

18. ما هي الأداة البيوإنفوماتيّة التي تُذكرنا بالأداة Prosite من خلال طريقة عملها؟ بماذا تتشابه الأداتان وبماذا تختلفان؟

للمُعلِّم: تُذكِّرنا الأداة Prosite بطريقة عمل الأداة protein BLAST. في الحالتين نقوم باستعمال مُحرِّك بحث يقوم بمُقارنة تسلسل استعلام – تسلسل من الأحماض الأمينيّة – مع تسلسلات في مخازن المعلومات. في الحالتين أيضًا يتمّ عرض النتائج الأكثر شبهًا بتسلسل الاستعلام، تتمّ الإشارة إلى منطقة التشابه بين التسلسلات، وتُعطى علامة للتشابه بينهم. الفرق الأساسي هو أنَّ Prosite يُنفِّذ البحث في مخزن لتسلسل الموتيفات والعائلات البروتينيّة، ويُعطي معلومات مُفصَّلة عن موتيفات ذات مبنى أو فعاليّة معروفة والمُهمّة لفعاليّة البروتين. بالمُقابل فإنَّ الأداة BLASTp تقوم بعرض سِجلّات البروتينات المُشابهة لتسلسل الاستعلام، ومن خلال التشابه يُمكنْ أنْ نخمن المبنى أو الوظيفة المُمكنة للبروتين الذي نبحثه، وبشكل غير مُباشر العلاقة بين المبنى والوظيفة.

بحثنا في هذه المَهمّة بروتين CFTR. الطفرات في هذا البروتين يُمكن أنْ تُؤدّي إلى تطوّر مرض التليّف الكيسي. فحصنا في البداية الموتيفات المبنويّة والوظيفيّة الموجودة في البروتين السليم وأهميّتها لفعاليّته بواسطة الأداة Prosite. تقوم الأداة Prosite بمُقارنة تسلسل الاستعلام مع تسلسلات موجودة في مخزن موتيفات بروتينيّة . بالاعتماد على التشابه بين التسلسلات تقوم الأداة Prosite بتشخيص الموتيفات الموجودة في تسلسل الاستعلام ومكانها في التسلسل، وهكذا تُزوِّدنا بمعلومات عن المبنى والوظائف المُمكنة للبروتين الذي نبحثه.

وجدنا أنَّ البروتين CFTR الذي يُشكِّل قناة لنقل الأيونات ينتمي إلى عائلة بروتينيّة تُسمّى ABC (اختصار للاسم:ATP-Binding Cassette).لبروتينات هذه العائلة نوعان من الموتيفات المحفوظة: الأول يقوم بتثبيت البروتين في غشاء الخليّة (ABC_TM1F)، والثاني يربط ATP اللازم لنقل الأيونات بعكس مُنحدر التراكيز(ABC_TRANSPORTER_2). بروتين CFTR يحتوي على موتيفان من كل نوع. بعدها تعرَّفنا على الطفرة F508del في جين CFTR، المُنتشرة لدى اليهود وفي العالم كُلِّه، فحصنا بمُساعدة الأداة Prosite كيف تؤثِّر هذه الطفرة على الموتيفات في البروتين. لاحظنا أنَّ الطفرة F508del أدَّت إلى تغيير صغير جدًّا في تسلسل البروتين (نقص في حامض أميني واحد)، إلا أنَّ هذا التغيير كان كافيًا لطيِّ البروتين بشكل غير سليم مما يؤدّي إلى تفكيكه وبالتالي إلى فقدان فعاليّة البروتين CFTR في الخليّة. المرضى الذين يحملون هذا الأليل الطافر يُعانون عادة من فينوتيب شديد للمرض.

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

مهمّة II: تشخيص الطفرة في جين CFTR بواسطة تفاعل PCR والأداة Primer3Plus (صفحة 1 من 8)

للمُعلِّم: يمكن أنْ تؤثِّرالطفرات في الجين على الآليات الجُزيئيّة المُختلفة في مسار إنتاج البروتين: على مُعالجته، على نقله إلى غشاء الخليّة، على ثباته ووظيفته. أي أنَّ العامل الأساسي الذي يُحدِّد شدَّة المرض هو كميّة البروتين السليم أو فعاليّته.

بعد قليل سنقوم بمُناقشة التوجُّهات لمُلائمة الدواء للمرضى بحسب الطفرة الموجودة لدى المريض أو بحسب آلية تطوّرالمرض. كمثال لذلك سنعرض الطفرات التي تؤدّي إلى وقف الترجمة المُبكِّر. الطفرات المعروفة التي تنتمي لهذا النوع هي W1282X أو CFTR 3849+10kb C→T.

هناك أدوية مُختلفة تُمكِّن من القراءة خلال كودون وقف الترجمة المُبكِّر، الذي نتج بسبب الطفرة، وحتى كودون وقف الترجمة الأصلي وعندها يتمُّ الحصول على بروتين ذا تسلسل سليم وطول سليم أيضًا.

توجد أليلات طافرة كثيرة في جين CFTR تحمل طفرات مُختلفة، يؤدّي قسم من هذه الطفرات إلى تغيير كبير في تسلسل ال RNA رسول קישור أو في تسلسل البروتين. بالرّغم من التغييرات الكبيرة في التسلسل، إلا أنَّه في بعض الأحيان يتمّ المُحافظة على قسم من فعاليّة CFTR في الخلايا. مُعظم الاشخاص الذين يحملون أليلات طافرة من هذا النوع يُعانون من فينوتيب קישור بسيط نسبيًا للمرض. هناك أهميّة بالغة لنوع الطفرة (نقص، إضافة، استبدال وغيرها) ولمكانها في الجين.

بما أنَّ الحديث عن مرض يُورَّث بشكل مُتنحٍ (רצסיבי)، فإنَّ المرضى يحملون - أليلان طافران للجين (كل أليل يحمل طفرة أيًا كانت)، إنَّ للدمج بين أليلات مُختلفة للجين تأثير كبير على الطراز المظهري للمرض. رأينا في الفعاليّة السابقة كيف يُمكننا أنْ نقوم بتجنيد الأدوات البيوإنفورماتيّة لتشخيص الخلل في مبنى البروتين الطافر، والاستنتاج من خلال ذلك عن الخلل الوظيفي في البروتين وعن شدَّة المرض، يوجد لذلك تأثيرات إضافيّة أيضًا تتعلَّق بعلاج المرض والشفاء منه.

في أيامنا، يُحاول الأطباء والباحثين إيجاد طُرق للشفاء من المرض، ليس فقط لعلاجه وتقليل أعراضه، يُحاولون في الأساس مُلائمة العلاج والأدوية للطفرة الموجودة لدى المريض. في أيامنا يتمّ تطوير أدوية مُتنوِّعة تُلائم أنواع خلل مُختلفة موجودة في عملية إنتاج CFTR في الخلايا. مثلًا وُجد أنَّ تناول المُضادّات الحيوية קישור من النوع أمينوغليكوزيد كالجنتامايسين، يُساعد مرضى التليّف الكيسي الذين يحملون طفرات تؤدّي إلى وقف الترجمة المُبكِّر. علاج من هذا النوع يُمكِّن أجهزة الترجمة من القراءة عبر كودون الوقف קישור المُبكِّر وحتى كودون وقف الترجمة الأصلي وإنتاج بروتين بطول سليم (للتعمق اضغط هنا קישור). بعد التحسُّن بوضع المرضى الذين عولجوا بجنتامايسين، طُوِّرت جُزيئات مُحسَّنة لا تنتمي للمُضادّات الحيوية، مثل PTC124، والتي أدّت إلى نتائج أفضل وبدون أعراض جانبيّة (للتوسّع اضغط هنا קישור وأيضًا هنا קישור). بالإضافة إلى ذلك تُختبر الفائدة من استعمال جُزيئات وظيفتها المُساعدة في طيِّ بروتين CFTR معطوب (مثل F508del) ونقله إلى غشاء الخليّة، أو جُزيئات تهدف إلى تحسين فعاليّة CFTR كقناة في غشاء الخليّة. في الواقع، الدواء الموجّه– للخلل جيني (תרופה מונחית-פגם גנטי) يمرُّ بمراحل تطويره الأولى عن طريق بحث يدمج بين أدوات بيوإنفورماتيّة مُتنوّعة، هدفها ليس فقط بحث تأثير الطفرات على مبنى البروتين ووظيفته، وإنَّما أيضًا التعرّف على نوعيّة الطفرة في الجين.

تطبيق آخر للأدوات البيوإنفورماتيّة يتعلَّق بفهم وتحليل الطفرات هو أداة تشخيص حمل الأفراد للطفرات (נשאות למוטציה)، أي أداة تفحص إذا كان إنسان مُعيّن يحمل طفرة أيًا كانت في الجين. تشخيص الطفرات في أليلات CFTR هو عمليّة مُهمّة ليس فقط لإجل مُلائمة الدواء للمريض بما يتلائم مع الخلل الموجود في آليّة إنتاج البروتين لديه، وإنَّما أيضًا كجُزء من عملية تخطيط تكوين الأُسرة. مثلًا يصل الزوجان إلى التشخيص الوراثي بهدف معرفة كونهما حاملان لطفرة في جين CFTR، من أجل تقدير احتمال ولادة طفل مريض في العائلة.

بحث حالة

وصل إلى مُختبر مُستشفى أنبوبيّ اختبار، على كل أنبوب اسم وفيه عيّنة DNA. أرفق مع الأنابيب مكتوب من الاستشارة الوراثيّة (יעוץ גנטי). كما يبدو، انتهى الحبر من الطابعة واستصعب الباحثون في المُختبر فَهْم ما كُتِب. فهموا أنَّ ال DNA في أحد الأنابيب تابع لشخص سليم، دون طفرات في جين CFTR، بينما ال DNA الموجود في الأنبوب الثاني تابع لشخص مريض يحمل طفرة من نوع F508del، ولكنهم لم ينجحوا في قراءة اسم الأشخاص. يترتب على الباحثين في المُختبر (عليكم الآن) تحديد أي من الشخصين هو المريض وأيُّهما هو السليم، يجب القيام بذلك بأسرع وقت مُمكن وبأقل تكلفة مُمكنه أيضًا. كان مفهومًا منذ البداية أنَّه على الباحثين تحديد تسلسل الأليل CFTR في منطقة الطفرة F508del في كل عيّنة DNA، ومُقارنة التسلسل الناتج مع تسلسل الأليل السليم ومع تسلسل الأليل الطافر، ومن ثمَّ تحديد العيّنة التابعة للشخص السليم والعينة التابعة للشخص المريض من خلال مُقارنة التسلسلات، عرف الباحثون أيضًا أنَّ عيِّنات الDNA تحتوي على كميّة قليلة من الDNA فقط وهم بحاجة إلى كميّة أكبر من الDNA من أجل تحديد التسلسل.

1. أي أداة بيوإنفورماتيّة على الباحثين استعمالها لمُقارنة تسلسل مقاطع ال DNA الناتجة (بعد تعزيز بتفاعل ال PCR קישור وتحديد التسلسل קישור) مع تسلسل الأليل CFTR السليم وتسلسل الأليل CFTR الطافر؟

- أ. Entrez - مُحرِّك بحث بواسطة كلمات بحث.
- ب. BLAST - مُحرِّك بحث بواسطة استعلام مكوَّن من تسلسل.
- ج. Prosite - أداة بحث عن موتيفات وظيفيّة ومبنويّة في تسلسل البروتين.
- د. ClustalW - أداة تراصف تسلسلي.

الإجابة هي: د. ClustalW - أداة تراصف تسلسلي.

2. بأي طريقة يُمكن تحديد تسلسل نوكلوئتيدات مقطع من ال DNA؟

- أ. قطع بواسطة إنزيمات التحديد.קישור
- ب. تعزيز بواسطة PCR (تفاعل سلسلة البوليميراز).
- ج. تحديد التسلسل بطريقة سانجر.
- د. استنساخ DNA بواسطة مكتبة جينوميّة.

الإجابة هي: ج. للتوسع عن هذه الطريقة شاهد الفيديو المُرفق קישור الذي يظهر برفقة شرح في موقع דוידסון און-ליין

3. بأي طريقة يُمكننا أنْ نُضاعف مقطع DNA مُحدَّد داخل أنبوب اختبار؟

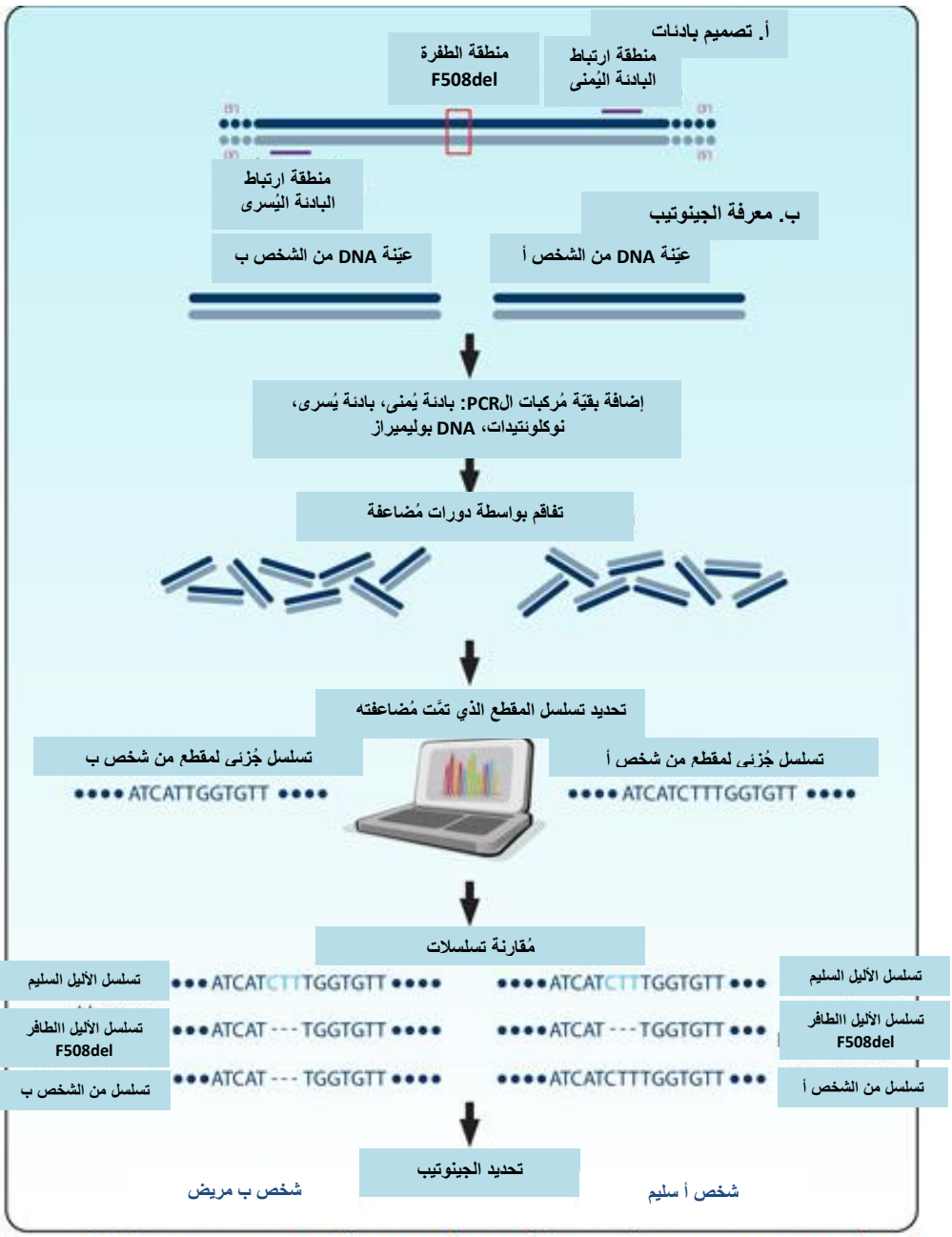
- أ. قطع بواسطة إنزيمات التحديد.
- ب. تعزيز بواسطة PCR (تفاعل سلسلة البوليميراز).
- ج. تحديد التسلسل بطريقة سانجر.
- د. استنساخ DNA بواسطة مكتبة جينوميّة.

الإجابة هي: ب. للتوسع عن هذه الطريقة شاهد الفيديو المُرفق קישור الذي يظهر برفقة شرح في موقع דוידסון און-ליין

اختار الباحثون استعمال تفاعل سلسلة البوليميراز(polymerase chain reaction باختصار PCR) لتعزيز مقطع الجين الذي يحوي منطقة الطفرة (لدى إنسان مريض)، وطريقة سانجر لتحديد تسلسل النوكلوئتيدات. تأمل الباحثون أنْ يستطيعوا التعرُّف على الشخص السليم والشخص المريض من خلال مُقارنة تسلسلات النوكلوئتيدات التي يحصلون عليها مع تسلسل جين CFTR السليم وتسلسل الأليل الطافر F508del (الرسم 1).

للمُعلِّم: في هذه المرحلة بإمكاننا مراجعة مراحل عمليّة الPCR وتطبيقاتها (مثلًا في كتاب " الهندسة الوراثيّة – من الأسس والطُرق إلى البحث والتطبيق הנדסה גנטית - מעקרונות ושיטות למחקר ויישומים" ،

تأليف ד"ר דן מיכאל ופרופ' ענת ירדן, فصل 6 وخصوصًا الصفحات 122-131)، وأيضًا مراجعة أسس تحديد التسلسل (فصل 5، خاصة الصفحات 97-100 في الكتاب المذكور). بالإمكان أيضًا الاستعانة بالروابط التي ذُكرت "الفيديو" وبروابط بمُحاكاة بالموضوع אנימציות בנושא



الرسم 1: طريقة تشخيص الأليل السليم والأليل الطافر بواسطة PCR، تحديد التسلسل ومُقارنة التسلسلات

مراحل المَهمّة

علينا في البداية تصميم بادئات لتفاعل PCR بمُساعدة الأداة Primer3Plus لتشخيص وجود الطفرة F508del في جين CFTR. بعدها نُقارن نواتج ال PCR ونُحدِّد من هو الشخص المريض ومن هو الشخص السليم.

مَهمّة II: تشخيص الطفرة في جين CFTR بواسطة تفاعل PCR والأداة Primer3Plus (صفحة 2 من 8)

تصميم بادئات لتفاعل PCR لتشخيص وجود الطفرة في CFTR، بمُساعدة الأداة Primer3Plus

تُمكّن طريقة ال PCR من مُضاعفة دوريّة لمقاطع مُحدَّدة في ال DNA داخل أنبوب اختبار، تؤدّي هذه المُضاعفة إلى إنتاج كميّات هائلة من هذه مقاطع DNA. نجاعة وحساسيّة الطريقة الكبيرتان إلى جانب بساطة تشغيلها، حوّلت طريقة ال PCR إلى أداة حيويّة ومُنتشرة في مجالات بحث كثيرة ومُختلفة (العلم، الطب، القانون والقضاء).

4. ما هي المُركّبات التي نحتاجها لمُضاعفة الDNA في أنبوب الاختبار؟

- أ. DNA الهدف، زوج بادئات קישור، نوكلوئتيدات קישור من نوع dNTP.
- ب.RNA الهدف، زوج بادئات، نوكلوئتيدات من نوع dNTP وإنزيم DNA بوليميراز קישור.
- ج.DNA الهدف، زوج بادئات، نوكلوئتيدات من نوع dNTP، إنزيم DNA بوليميراز وبوفر.
- د.DNA الهدف، زوج بادئات، نوكلوئتيدات من نوع dNTP، إنزيم RNA بوليميراز קישור وبوفر.

الإجابة هي: ج. المُركّبات المطلوبة تضُم الDNA الهدف الذي يحتوي على المقطع الذي نرغب بمُضاعفته. زوج بادئات يضمّ تسلسلات مُميّزة ترتبط بمواقع مُعيّنة في جدائل الDNA ويُحدِّد زوج البادئات تسلسل المقطع الذي تتمّ مُضاعفته. نوكلوئتيدات من نوع dNTP التي تُشكل حجارة بناء ال DNA. كذلك نحتاج إلى إنزيم DNA بوليميراز الذي يقوم بإطالة البادئات بواسطة إضافة نوكلوئتيدات بحسب تسلسل جديلة ال DNA الهدف.

5. تضُمّ دورة مُضاعفة نموذجيّة في تفاعل PCR 3 مراحل. ما هو تسلسل المراحل وبأي درجة حرارة تتمُّ كل مرحلة؟

- أ. فصل الجدائل (في 95°C)، ارتباط البادئات (في 50-65°C)، استطالة البادئات وبناء ال DNA(في 72°C).
- ب. ارتباط البادئات (في 50-65°C)، فصل الجدائل (في 95°C)، استطالة البادئات وبناء ال DNA (في 72°C).
- ج. فصل الجدائل (في 72°C)، ارتباط البادئات (في 72-95°C)، استطالة البادئات وبناء ال DNA (في95°C).
- د. ارتباط البادئات (في95°C)، استطالة البادئات وبناء ال DNA (في 72°C)، فصل الجدائل (في 65°C).

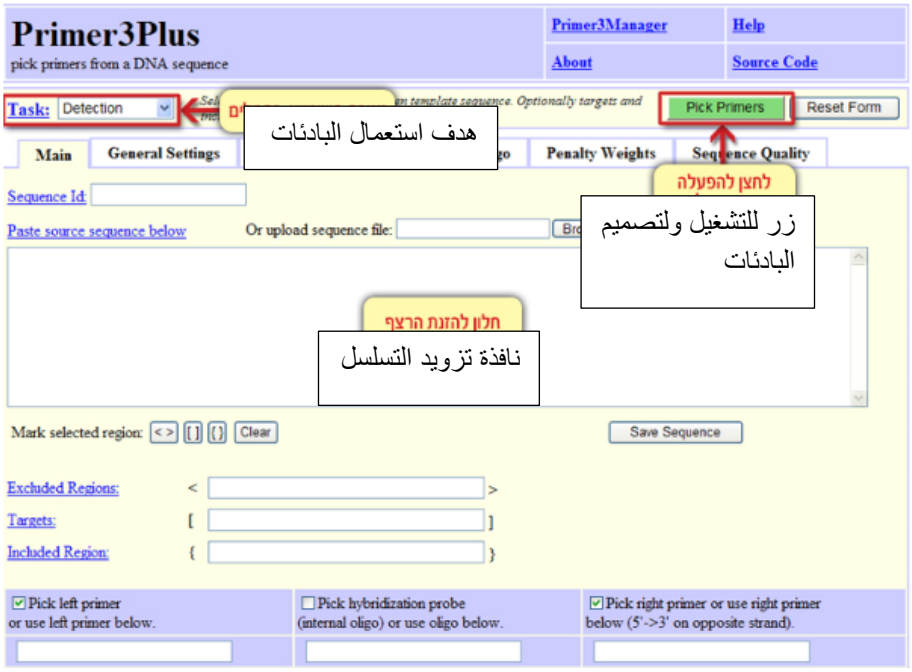
الإجابة هي: أ. يتمّ في البداية فصل جدائل الDNA في درجة حرارة عالية مُساوية ل 95°C للحصول على جُزيئتي DNA أحادي الجديلة. في المرحلة التالية ترتبط البادئات بتسلسل مُكمّل لتسلسل البادئة، بحيث ترتبط كل بادئة بجديلة مُختلفة من جدائل ال DNA. يتمّ هذا الارتباط في درجة حرارة مُنخفضة نسبيًا تتراوح بين 50°C إلى 65°C (يتم تحديد درجة الحرارة الدقيقة بحسب تسلسل البادئات)، تُحدِّد البادئات حدود التسلسل الذي يُضاعف وطوله. بعد ذلك يقوم إنزيم DNA بوليميراز بإطالة البادئات بواسطة إضافة نوكلوئتيدات بحسب المعلومات الموجودة في جديلة الDNA. تحدث هذه المرحلة عادة في درجة حرارة 72°C، وتُعتبر درجة الحرارة المثاليّة لعمل الإنزيم. بعد عدَّة دورات كهذه (عادة 20-30 دورة) نحصل على عدد كبير من النُسخ الجديدة من ال DNA الذي نُضاعفه.

كما ذُكِر، قرَّر الباحثون تعزيز مقطع مُحدَّد من عيّنات الDNA الموجودة لديهم، قرَّروا مُضاعفة مقطع مُحدَّد موجود في جين CFTR، هذا المقطع يحتوي على نقص بثلاثة نوكلوئتيدات في الأليل الطافر F508del.
بواسطة تحديد التسلسل الذي تمَّت مُضاعفته ومُقارنته بتسلسل الأليل السليم والأليل الطافر يُمكن التحديد إذا كان مصدر عيّنة ال DNA من إنسان مريض أم من إنسان سليم.

من المُفضَّل قبل مُتابعة المَهمّة مُشاهدة الجولة الإرشاديّة للأداة Primer3Plus التي تشرح مبادئ الاستعمال الأساسيّة للأداة

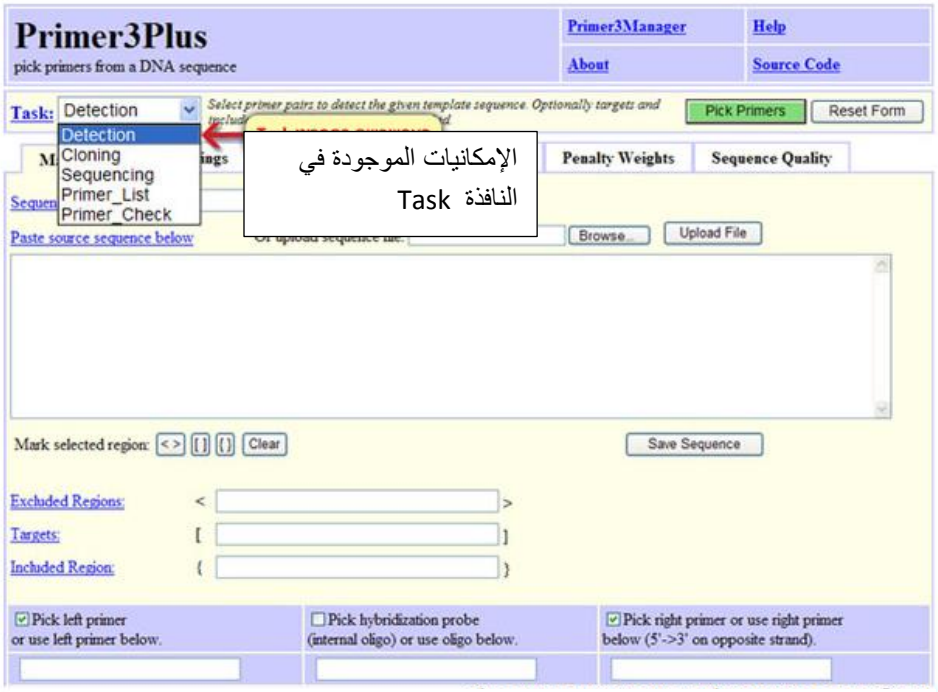
בטרם נמשיך בפעילותנו מומלץ לצפות בסיור המודרך של הכלי Primer3Plus המסביר עקרונות שימוש בסיסיים בכלי.

لتصميم البادئات التي سنستعملها لتعزيز المقطع المرغوب بواسطة PCR، نستعين بالأداة Primer3Plus، في العنوان http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi. نضغط على الرابط، تُفتح أمامنا واجهة الأداة Primer3Plus (شاشة 1). تحتوي واجهة الأداة بالإضافة إلى نافذة تزويد تسلسل الDNA، على نوافذ إضافيّة: لتحديد هدف استعمالنا للبادئات التي سنُصمِّمها، زر تشغيل لتصميم البادئات وغيرها من المركَّبات التي سنتعرف عليها لاحقًا.



الشاشة 1: واجهة الأداة Primer3Plus التي تُستعمل لتصميم بادئات لعمليّة PCR

يجب علينا في البداية تحديد هدف استعمال البادئات في النافذة Task. يُمكن أنْ تُستعمل البادئات في عمليّات مُختلفة ولأهداف مُتنوعة، مثل: تحديد تسلسل (Sequencing) بطريقة سانجر קישור، أو في تفاعل PCR لتعزيز تسلسل שיבוט(Cloning) קישור أو بهدف تشخيص مقطع (Detection) وغيرها. بحسب هدفنا من استعمال البادئات نقوم بتصميم بادئات مُختلفة تُلاءم هذا الاستعمال. في النافذة Task نختار الإمكانيّة "Detection" التي تعني تشخيص (شاشة2)، لأنَّنا نرغب بتشخيص مصدر ال DNA المُضاعف (من إنسان مريض أم من إنسان سليم).



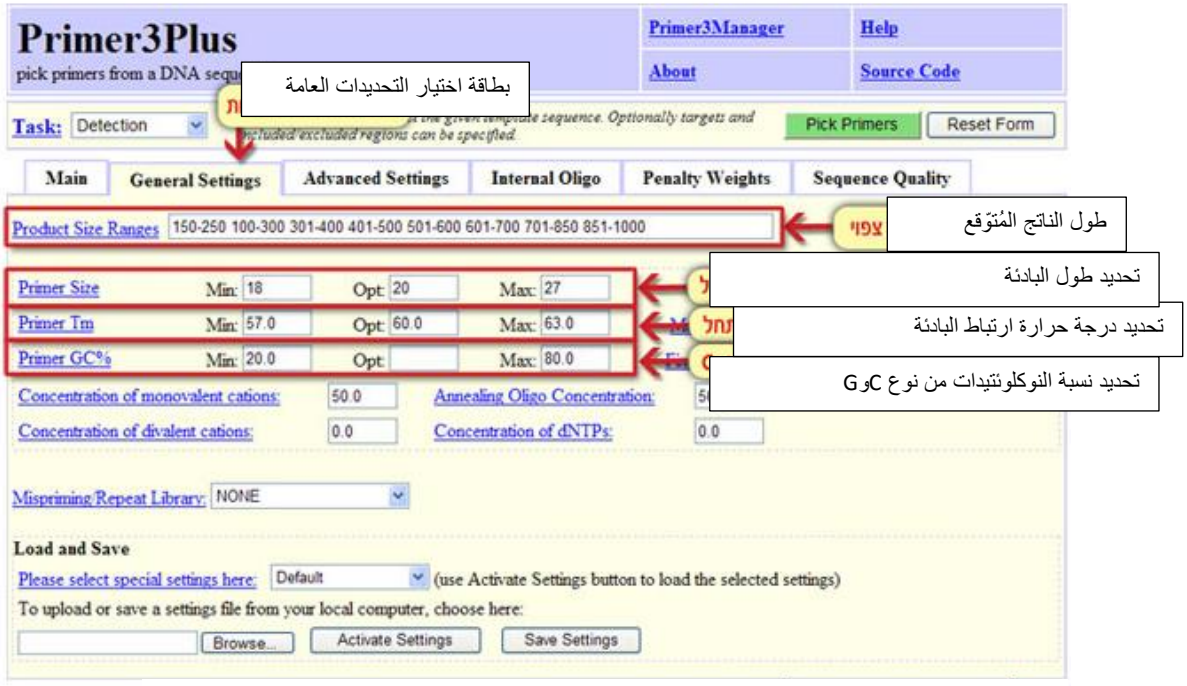
الشاشة 2: اختيار الهدف من تصميم البادئات

مَهمّة II: تشخيص الطفرة في جين CFTR بواسطة تفاعل PCR والأداة Primer3Plus (صفحة 3 من 8)

مُميّزات البادئات وناتج التعزيز (المُفاقمة)

تقوم الأداة بمسح تسلسل الDNA المُزوَّد لها من قِبل المُستخدِم، وتُصمِّم بادئات تستجيب لعدد من التحديدات والاعتبارات، بما يتلاءم مع احتياجات تفاعل ال PCR. التحديدات الأساسيّة مُفصّلة في بطاقة الاختيار General Settings.

تمعّنوا في تحديدات الخيار التلقائي (הגדרות ברירת המחדל) المقبولة والمُفصلَّة في نافذة General Settings (شاشة 3)، أجيبوا عن الأسئلة التاليّة التي تتعلَّق بمُميّزات البادئات والناتج المُضاعفة المُتوقّع.



الشاشة 3: تحديد مُميّزات البادئات وناتج التعزيز المُتوَّقع

يُعرَّف في النافذة Primer size، الطول الأدنى (Min)، الطول الأكبر (Max) والطول المثالي (Opt) لكل بادئة.

6. ما هي التحديدات المقبولة بالنسبة لطول البادئات؟

- أ. طول بادئة أدنى : 18 نوكلوئتيد، أكبر: 20 نوكلوئتيد، مثالي: 27 نوكلوئتيد.
- ب. طول بادئة أدنى : 18 نوكلوئتيد، أكبر: 27 نوكلوئتيد، مثالي: 20 نوكلوئتيد.
- ج. طول بادئة أدنى : 27 نوكلوئتيد، أكبر: 20 نوكلوئتيد، مثالي: 18 نوكلوئتيد.
- د. طول بادئة أدنى : 57 نوكلوئتيد، أكبر: 63 نوكلوئتيد، مثالي: 60 نوكلوئتيد.

الإجابة هي: ب. تحديدات الأداة المقبولة هي بادئات يتراوح طولها بين 18- 27 نوكلوئتيد، والطول المُفضَّل (المثالي)هو 20 نوكلوئتيد.

وُجد أنَّ بادئات بهذا الطول هي تخصصيّة، أي أنَّ الاحتمال الأكبر أنْ ترتبط هذه البادئات فقط إلى منطقة ذات تسلسل مُكمِّل في مقطع الDNA المطلوب، ولن ترتبط بمقاطع DNA أخرى في التسلسل.

تُعرَّف في نافذة Primer Tm حرارة ارتباط البادئات الدُنيا (Min)، القُصوى (Max) والمثاليّة (Opt). حرارة الارتباط هي الحرارة التي فيها ترتبط فيها نصف البادئات إلى التسلسلات المُكمِّلة لها. بإمكان البادئات الارتباط بالتسلسل المُكمِّل في درجة حرارة الارتباط أو في درجة حرارة أقل منها.

للمُعلِّم: عمليّة عكسيّة لارتباط البادئات بجدائل ال DNA هي عملية الانصهار(תהליך התכה) حرارة الانصهار هي درجة الحرارة التي يكون فيها تقريبًا نصف البادئات مُنفصلة عن التسلسلات المُكملّة لها. في درجات حرارة أعلى من درجة حرارة الانصهار، تنفصل أكثر من نصف البادئات عن التسلسلات المُكمّلة، بينما في درجة حرارة أقل من درجة الانصهار تتمّ عمليّة عكسيّة. يجب أنْ ننتبه أنَّ هذا التعريف واسع ويتطرق إلى تسلسل مُكمّل وليس بالضرورة إلى تسلسل مُكمّل في القالب، حيث أنَّ تعريفات مُشابهة تنطبق على تسلسل DNA ثُنائي الجديلة أيًا كان، مثل تسلسل بلاسميد أو حتى تسلسل ناتج ال PCR، حيث نعتبر عملية الانصهار هي عملية انفصال جدائل الDNA عن بعضها.

7. أي من بين الأمور التالية تُحدد درجة حرارة الارتباط لكل واحدة من البادئات؟

- أ. مكان البادئة على قالب ال DNA.
- ب. طول البادئة وتسلسلها، أي كميّة النوكلوئتيدات من نوع G و C.
- ج. طول ناتج المُضاعفة المُتوقّع.
- درجة الحرارة المُثلى لفعاليّة البوليميراز.

الإجابة هي: ب. تسلسل البادئة وطولها أيضًا يُحدِّدان حرارة ارتباط البادئة. كلما احتوت البادئة على نوكلوئتيدات أكثر من نوع G و C، تكون حرارة ارتباطها أعلى، لأنَّ النوكلوئتيدات من النوع G و C تُنتج 3 روابط هيدروجينيّة مع نوكلوئتيدات الجديلة المكمّلة في قالب الDNA (النوكلوئتيدات من نوع A وT تُنتج رابطيْن هيدروجينيّين مع نوكلوئتيدات الجديلة المُكمّلة في ال DNA). كلّما كانت البادئة أطول، تكون حرارة الارتباط أعلى، لان عدد النوكلوئتيدات التي ترتبط بقالب ال DNA أكبر. لذلك فإنَّ تسلسل البادئة وطولها يُحدِّدان قوة الارتباط بينها وبين قالب ال DNA، ممّا يُحدِّد حرارة الارتباط. تحديدات الأداة المقبولة تُشير إلى حرارة تتراوح بين 57°C إلى 63°C، والحرارة المُفضَّلة هي 60°C.

بإمكاننا تحديد النسبة الصُغرى (Min) والقُصوى (Max) للنوكلوئتيدات من النوع جوانين (G) وسيتوزين (C) في تسلسل البادئة، في النافذة Primer GC%. التحديدات (القيود) في هذه الحالة أكثر مرونة، وغالبًا تُمكِّن من الحصول على بادئات فيها نسبة النوكلوئتيدات من نوع C و G تتراوح بين 20% إلى 80%.

8. لماذا من المُهمّ أنْ نُحدِّد نسبة النوكلوئتيدات من نوع C و G (GC%) في البادئة؟

- أ. لأنَّ هذا يُحدِّد قوة الارتباط بين البادئة وقالب ال DNA (G و C يُنتجان 3 روابط هيدروجينيّة קישור، بينما A و T يُنتجان رابطيْن هيدروجينييّن فقط).
- ب. لأنَّ هذا يُحدِّد قوة ارتباط البادئتين ببعضهما (G و C يُنتجان 3 روابط هيدروجينيّة ، بينما A و T يُنتجان رابطيْن هيدروجينييّن فقط).
- لأنَّ هذا يُحدِّد قوة الارتباط بين البادئة وقالب ال RNA (G و C يُنتجان 3 روابط هيدروجينيّة ، بينما A و T يُنتجان رابطيْن هيدروجينييّن فقط).
- لأنَّ C و G شائعان أكثر في الطبيعة ولذلك تكلفة استخدامهما أقل.

الإجابة هي: أ. لأنَّ هذا يُحدِّد قوة الارتباط بين البادئة وقالب ال DNA (G و C يُنتجان 3 روابط هيدروجينيّة، بينما A و T يُنتجان رابطيْن هيدروجينييّن فقط).

9. في أي من الحقول التالية يجب أنْ تتشابه البادئات ولماذا؟

- أ. من المُهمّ أن تكون البادئتان بنفس الطول (Length) حتى ترتبطان الواحدة بالأخرى على امتدادهما.
- ب. من المُهمّ أن يكون في البادئتين نفس النسبة من النوكلوئيتيدات من نوع C و G، حتى ترتبطان بنفس المنطقة على قالب ال DNA.
- ج. من المُهمّ أنْ يكون للبادئتين نفس حرارة الارتباط (Tm)، حتى ترتبط البادئتان بالقالب في نفس درجة الحرارة.
- د. من المُهمّ أنْ يكون تسلسل (Sequence) بادئة واحدة مُكمّلًا لتسلسل البادئة الأخرى حتى تتمكنان من الارتباط ببعضهما البعض.

الإجابة هي: ج من المُهمّ أنْ يكون للبادئتين نفس حرارة الارتباط (Tm)، حتى ترتبط البادئتان بالقالب في نفس درجة الحرارة.

للمُعلِّم: من المُهمّ في هذه المرحلة أنْ نُشدِّد على أنَّ البادئات ترتبط بالقالب، كل بادئة ترتبط بموقع مُختلف ذا تسلسل مُكمّل لها، ولا ترتبط البادئات ببعضها البعض. إذا تمَّ ارتباط البادئات ببعضها البعض لن تتمَّ مُقاومة المقطع المطلوب الموجود في القالب. من المهمّ أنْ تكون الظروف التي ترتبط فيها البادئتان مُتشابهة حتى يكون هناك ارتباط مثالي لكلتيهما في نفس الظروف. طول كل بادئة وتسلسلها (نسبة النوكلوئتيدات من نوع G و C وترتيبها) يُحدِّد حرارة ارتباطها. هذه الحرارة تُحدِّد حرارة الارتباط في مرحلة ارتباط البادئات. من المُهمّ أيضًا الإشارة أنَّ الأداة تُصمِّم عدَّة أزواج من البادئات، بحيث أنَّ كل زوج يستجيب لشروط الخيار التلقائي المقبولة. على الباحثين اختيار زوج البادئات الملائم لحاجاتهم.

بالإمكان تحديد طول المقطع الذي نرغب بمُقاومته في النافذة Product Size، أي طول الناتج ابتداءً من البادئة الأولى وحتى البادئة الثانية. في البداية تُصمِّم الأداة بادئات تؤدّي إلى إنتاج ناتج بطول 150-250 نوكلوئتيد. طول بادئة كهذا طويل بما فيه الكفاية حتى يُمكِّن من التعرُّف على التسلسل من جهة، وقصير بشكل كافٍ حتى

يُمكِّن حدوث تفاعل PCR سريع وناجع من جهة أخرى. بالإمكان تغيير التعريفات التي تُحدِّد مُميّزات البادئات ونواتج المُفاقمة المُتوقّعة، ولكن بما أنَّ التحديدات مُناسبة لتصميم بادئات مثاليّة لا توجد حاجة إلى تغيرها.

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

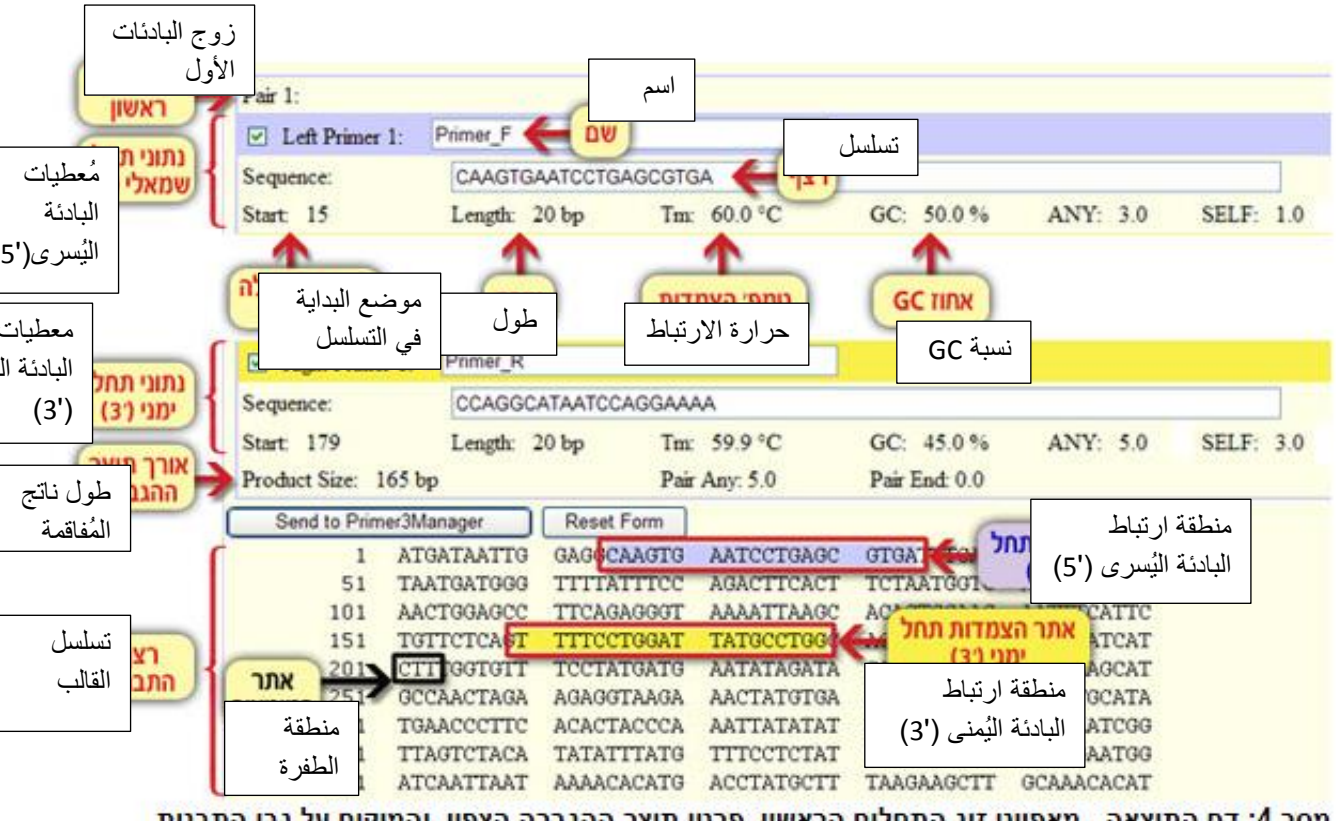
مَهمّة II: تشخيص الطفرة في جين CFTR بواسطة تفاعل PCR والأداة Primer3Plus (صفحة4 من 8)

تحليل صفحة النتائج

نعود إلى الشاشة الرئيسيّة (بطاقة Main).

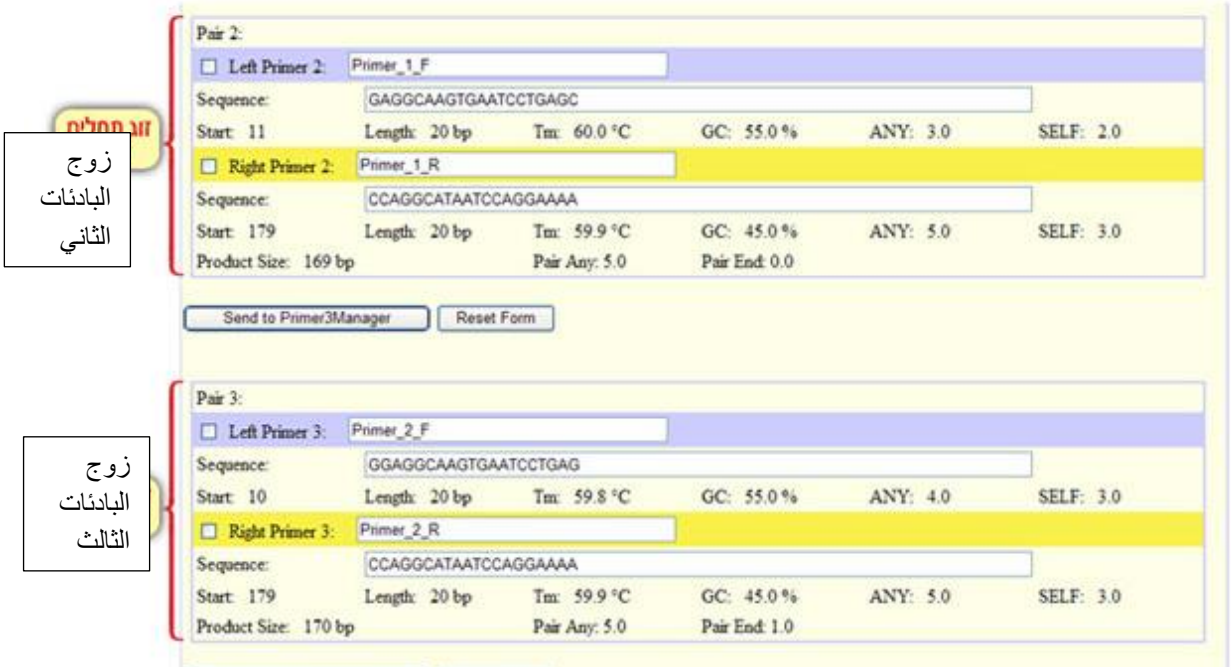
تستقبل الأداة إدخال (קלט) مكوَّن من تسلسل DNA يضمّ المقطع الذي نرغب بتعزيزه. وجد الباحثون بالاعتماد على مخزن معلومات تسلسل الجينات، المنطقة في الجين التي تحتوي على طفرة النقص في الأليل F508del. اختاروا مقطعًا بطول 450 نوكلوئتيد، يضمَّ منطقة طفرة النقص (الموجودة في المواضع 201-203 في تسلسل ال DNA). ننسخ ونُلصق التسلسل الذي اخترناه من الجين CFTR لدى شخص سليم קישור في النافذة المُعدّة لذلك (يجب نسخ التسلسل بدون السطر الذي يضمّ العنوان). نضغط على الزر " Pick Primers" لتصميم البادئات بواسطة الأداة. النتائج معروضة في الشاشات 4-6.

تعرض الأداة 5 أزواج من البادئات المُمكنة بحسب المعاييرالتي حدّدناها من قبل، وتعرض أيضًا مُميّزات البادئات وناتج المُضاعفة المُتوقّع بالنسبة لكل زوج منها. في البداية يُمكن أنْ نرى بالنسبة لزوج البادئات الأول تسلسل كل بادئة (في الحقل Sequence)، الموضع في التسلسل الذي تبدأ منه البادئة (Start)، وطولها (Length)، حرارة ارتباطها (Tm) وغيرها. يُعرض أيضًا طول ناتج التعزيز المُتوقّع من استعمال زوج البادئات (Product Size) (شاشة 4). بعد ذلك يُمكن رؤية تفصيل ومكان كل بادئة من زوج البادئات الأول على تسلسل القالب بشكل بيانيّ.



الشاشة 4: صفحة النتيجة – مُميّزات زوج البادئات الأول، تفاصيل ناتج المُفاقمة المُتوقّع، أماكن البادئات على قالب ال DNA

بعدها يتم عرض المُعطيات بالنسبة لكل بادئة ونواتج التعزيز المُتوقّعة، لكل زوج من البادئات المُصمَّمة (شاشة 5).



الشاشة 5: صفحة النتيجة – مُميّزات بقيّة أزواج البادئات وتفاصيل نواتج المُفاقمة المُتوقّعة

نتمعّن في الأزواج الخمسة للبادئات التي صُمِّمت بواسطة الأداة Primer3Plus.

10. ماذا يُمكن أن نقول عن أزواج البادئات التي صمَّمتها الأداة؟

- أ. طول كل واحدة من البادئات هو 20 نوكلوئوتيد، وحرارة ارتباطها 58-60°C تقريبًا.
- ب. طول كل واحدة من البادئات هو 20 نوكلوئوتيد، وحرارة ارتباطها 45-50°C تقريبًا.
- ج. طول كل واحدة من البادئات هو 20 نوكلوئوتيد، وحرارة ارتباطها 45-55°C تقريبًا.
- د. بالصدفة كانت مُميّزات أزواج البادئات مُتشابهة.

الإجابة هي: أ. طول كل واحدة من البادئات 20 نوكلوئتيد وحرارة ارتباطها هي 58-60°C بحسب التحديدات المقبولة للبادئات (كما يظهر في بطاقة الاختيار General Settings).

11. ماذا يُمكن أنْ نقول عن النواتج المُتوقعّة؟

- أ. طول كل واحد من النواتج المتوقّعة 165 bp تقريبًا (bp = base pairs ، زوج قواعد).
- ب. كل ناتج من النواتج المتوقّعة يحتوي على التسلسل الموجود في المواضع 20 حتى 170.
- ج. طول كل واحد من النواتج المتوقّعة 20 bp.
- د. كل ناتج من النواتج المتوقّعة يحتوي على التسلسل الموجود في المواضع 20 حتى 230.

الإجابة هي: ب. في كل زوج من أزواج البادئات الخمسة التي صُمِّمت، بداية البادئة اليُسرى موجودة قبل الموضع 20، بينما البادئة اليُمنى تبدأ في الموضع 179 أو في موضع أبعد منه. يجب أنْ نتذكَّر أنَّ البادئات تُحدِّد حدَّ المقطع المُضاعف في تفاعل PCR. لذلك المواضع 20 حتى 170 موجودة بالتأكيد داخل المجال المُضاعف. ننتبه أنَّ القول أ خاطئ، لأنَّ ناتج المُضاعفة من زوج البادئات الخامس بطول 235bp؛ القول ج غير صحيح لأنَّ القيمة المذكورة (20bp) تتطرق إلى طول البادئات وليس لطول الناتج؛ القول د خاطئ لأنَّه صحيح فقط بالنسبة لزوج البادئات الخامس.

12.تتواجد طفرة النقص في أليل F508del في المواضع 201-203 في تسلسل ال DNA المكوّن من 450 نوكلوئتيد الذي يركِّز الباحثين بحثهم فيه. يظهر في تسلسل الجين لدى إنسان سليم في هذه المواضع التسلسل CTT، بينما في التسلسل الطافر تكون هذه النوكلوئتيدات محذوفة، ويأخذ مكانها التسلسل TGG الموجود في المواضع 204-206 في التسلسل السليم، هل ستتمَّ مضاعفة مقطع ال DNA الذي يحوي بداخله منطقة الطفرة بواسطة زوج واحدٍ على الأقل من بين أزواج البادئات التي صُمِّمت؟

للمُعلِّم: من المُتوقّع أنْ يقوم زوج البادئات الخامس بمُضاعفة المقطع من الموضع 15 (بداية البادئة اليُسرى) وحتى الموضع 249 (بداية البادئة اليُمنى)، ولذلك فهو يحوي منطقة الطفرة في الأليل F508del. بقيّة أزواج البادئات تُضاعف مقاطع طرفها الأيمن في الموضع 179، أي مقاطع تنقصها منطقة الطفرة ذات الصلة بالبحث.

عمليًّا، الزوج الخامس من بين أزواج البادئات التي صُمِّمت يؤدّي إلى مُضاعفة مقطع يضمُّ بداخله منطقة الطفرة في الأليل F508del (شاشة 6). لكن ليس بالضرورة أنْ البادئات المُصمَّمة بواسطة الأداة بالفعل تحوي المقطع المطلوب. لهذا الهدف يجب أنْ نُحدِّد للأداة بشكل واضح المقطع الذي نرغب بمُضاعفته.

الشاشة 6: زوج بادئات مُمكن (الزوج الخامس) لمُضاعفة مقطع يضُمّ بداخله منطقة الطفرة

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

مَهمّة II: تشخيص الطفرة في جين CFTR بواسطة تفاعل PCR والأداة Primer3Plus (صفحة 5 من 8)

إمكانيّات التقييد

نعود الآن إلى الشاشة الرئيسيّة للأداة بواسطة الضغط على زر Back.

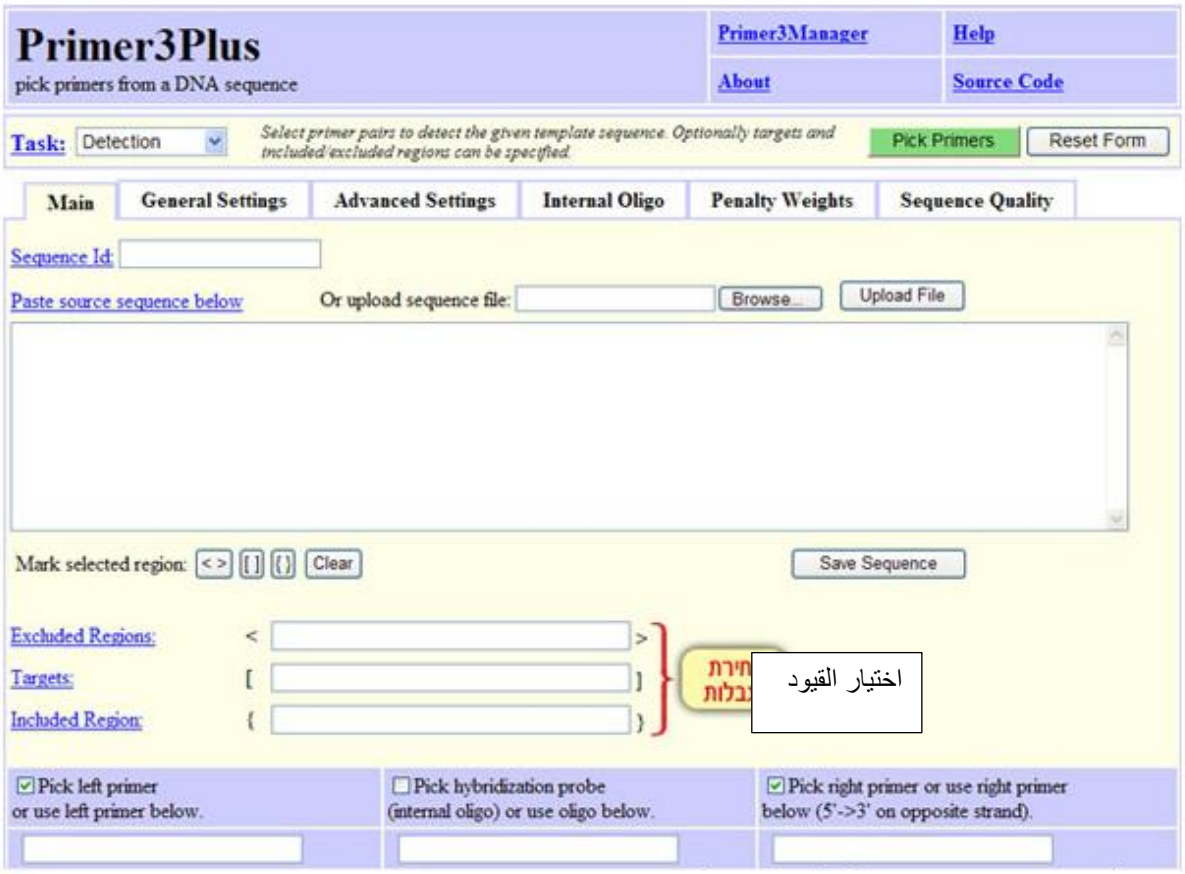
في بعض الأحيان في الحالات التي نرغب فيها بمُضاعفة مقطع بحسب مُتطلبات مُعيّنة، أزواج البادئات التي تعرضها الأداة لا تُلاءم احتياجاتنا، وعلى المُستخدِم أنْ يُحدِّد مطالبه بشكل دقيق.

في بطاقة الاختيار الرئيسيّة (Main) بالإمكان تحديد 3 قيود أساسيّة (شاشة 7)، هذه القيود هي:

Excluded regions – يُشير إلى التسلسل الذي لا يتم فيه تصميم بادئات. الرقم من اليسار يُشير إلى الموضع الأول، والرقم من اليمين يُشير إلى عدد النوكلوئتيدات من هذا الموضع فصاعدًا، أي طول التسلسل الذي لا تُصمَّم فيه بادئات. مثلًا: 151,200- البادئات لا تُصمَّم في التسلسل الذي يبدأ بالموضع 151، وعلى امتداد 200 نوكلوئتيد، أي حتى الموضع 350 في التسلسل. أو بالإمكان الإشارة إلى التسلسل المطلوب وبعدها الضغط على < >.

Targets- يُشير إلى المنطقة في التسلسل التي تُصمَّم على طرفيها البادئات. الرقم الأيسر يُشير إلى الموضع الأول ، والرقم عن اليمين يُشير إلى عدد النوكلوئتيدات من هذا الموضع فصاعدًا، أي طول التسلسل الذي على طرفيه ستتواجد البادئات. مثلًا 151,200 – البادئة الأولى ستُصمَّم في المنطقة قبل الموضع 151(في المجال 150-1)، والثانية ستُصمَّم في المجال بعد الموضع 151 ب200 نوكلوئتيد، أي بعد الموضع 350 (في المجال بين 351 وحتى نهاية التسلسل). أو بالإمكان الإشارة إلى المنطقة المرغوبة وعندها الضغط على [ ].

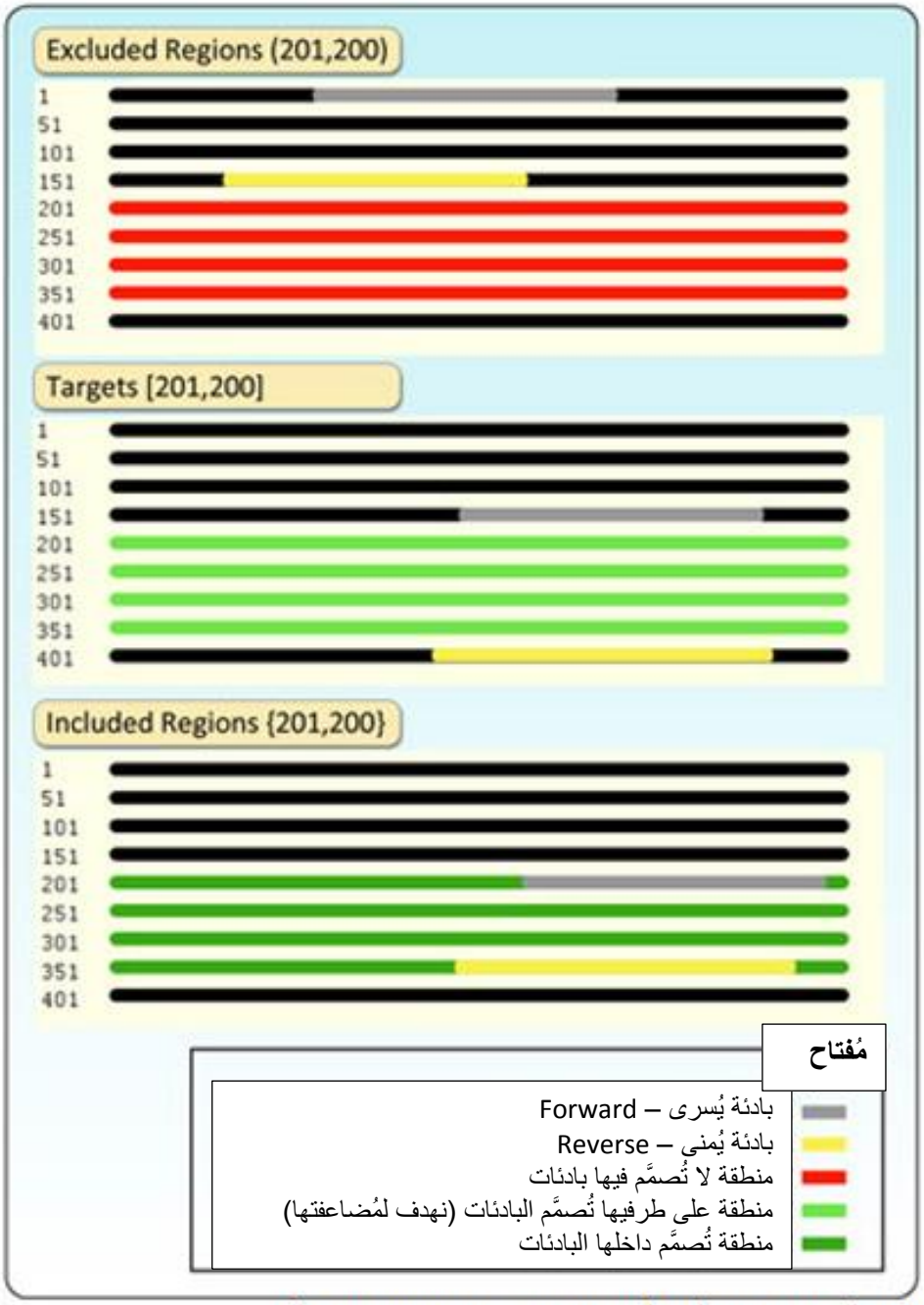
Included Region- يُشير إلى المنطقة في التسلسل التي ستُصمَم فيها البادئات. الرقم من اليسار يُشير إلى الموضع الأول، والرقم من اليمين يُشير إلى عدد النوكلوئتيدات من هذا الموضع فصاعدًا، أي طول التسلسل الذي ستُصمَّم فيه البادئات. مثلًا 151,200 – البادئتان ستُصمَّمان في مجال بين الموضع 151 وعلى امتداد 200 نوكلوئتيد، أي بين المواضع 151 و350. أو بالإمكان الإشارة الى المنطقة المرغوبة في التسلسل والضغط على { }.



اختيار القيود

الشاشة 7: اختيار إمكانيّات التقييد لتصميم البادئات

يُمكن أنْ نرى شرحًا بيانيًا لإمكانيّات التقييد في الرسم 2



الرسم 2: تصميم بادئات باستعمال إمكانيّات التقييد

13. نحن معنيون أنْ تقوم البادئات بمُضاعفة مقطع يضمُّ داخله المواضع 203-201، بحيث أنَّ النوكلوئتيدات في هذه المواضع ناقصة في الأليل الطافر F508del. ما هو التقييد الأكثر مُلائمة لتحقيق هذا الهدف؟

- أ. Excluded Regions <3,201> .
- ب. Targets [3,201] .
- ج. Included Region {201,3} .
- د. Targets [201,3] .

الإجابة هي: د. نحن معنيون بمُضاعفة مقطع يضمّ المواضع 203-201، لذلك على البادئات أنْ تتواجد على طرفي هذا المقطع، لذلك نختار إمكانيّة التقييد Targets. في البداية (من اليسار) نحدِّد مكان الموضع الأول في التسلسل، أي 201، بعدها (من اليمين) عدد النوكلوئتيدات ابتداءً من هذا الموضع أي 3.

للمُعلِّم: في البند أ لا نحصل على بادئات في المواضع 3 حتى 203، وزوج البادئات سيتواجد في المنطقة الموجودة بعد الموضع 204.في البند ب البادئات يجب أنْ تتواجد على طرفي المقطع من الموضع 3 حتى 203، لكنَّ البادئة يجب أنْ تتكوّن من 18 نوكلوئتيد على الأقل، لذلك ليس بالإمكان تصميم البادئة اليُسرى لأن أحد حدود المنطقة يقع في بداية التسلسل. أيضًا في البند ج ليس بالإمكان تصميم بادئات إطلاقًا، لأنَّ مقطع بطول 3 نوكلوئتيدات هو مقطع قصير جدًّا لا يُمكننا أنْ نُصمِّم داخله بادئتين (الطول الأدنى للبادئة هو 18 نوكلوئتيد) وناتج المُضاعفة يكون مكوَّن من 150 نوكلوئتيد على الأقل.

نقوم بتزويد القيود، نضغط على Pick Primers. انتبهوا أنَّ المواضع 201 حتى 203 (النوكلوئتيدات CTT في الأليل السليم) مُشدَّدة بخلفيّة خضراء اللون. تأكَّدوا بأن البادئة اليُسرى في كل أزواج البادئات التي صُمِّمت موجودة في بداية المقطع قبل الموضع 200 (الحقل Start للبادئة اليُسرى Left الملون باللون الرمادي)، وأنَّ البادئة اليُمنى موجودة في مركز المقطع وبعد الموضع 203 (الحقل Start للبادئة اليُمنى Right الملونة باللون الأصفر).

14. فكروا وتناقشوا- هل هذا هو التقييد الوحيد الذي يُزوِّدنا ببادئات لمُضاعفة المقطع المطلوب؟

علِّلوا! إذا كانت هُناك شروط إخرى، أكتبوا مثالًا لشرط كهذا.

للمُعلِّم: بالإمكان كتابة عدد من القيود المناسبة. المثال الأكثر سهولة هو اختيار الإمكانيّة Target في مجال واسع أكثر يضمّ داخله المواضع 203-201. فيما يلي عدد من الأمثلة: Target[201,10] (المواضع 201 حتى 210)، أو Target[198,8] (المواضع 198حتى 205) وهكذا. إمكانيّة بديلة هي استعمال الإمكانية Excluded Regions لتحديد مجال كبير نسبيًّا لا تتواجد فيه البادئات، بحيث لا يمكن تصميم بادئتين من جهة واحدة (اليمين أو اليسار) للمنطقة التي نمنع تصميم البادئات فيها(مع الأخذ بالحسبان أنَّ الطول الأدنى لناتج المُضاعفة هو 100 زوج من النوكلوئتيدات)، هذا الأمر سيؤدّي بالضرورة إلى إنتاج بادئات على طرفي المنطقة التي نمنع احتوائها على بادئات. مثلًا Excluded Regions <101,250>. بادئة واحدة ستُصمَّم في المنطقة المُمتدَّة في المواضع 100-1 والثانية في المنطقة التي تمتد في المواضع 450-351. إمكانيّة إضافيّة هي استعمال Included Region للإشارة إلى مجال صغير نسبيًّا فيه يُصمَّم زوج البادئات وفي مركزه منطقة الطفرة، وعندها بالتأكيد ستكون البادئتان على طرفيّ الطفرة . مثلًا Included Region {100,200}. بادئة واحدة ستُصمَّم في مواضع موجودة في المجال 170-100 والثانية ستُصمَّم في مواضع في موجودة في المجال 299-230، حتى نُمكِّن انتاج ناتج مُضاعفة طوله المثالي 150 زوج من النوكلوئتيدات.

في هذه المرحلة لدى الباحثين 5 أزواج من البادئات. استعمال كل زوج منها في تفاعل PCR- بالإضافة إلى المُركَّبات الأخرى المطلوبة (إنزيم DNA بوليميراز، بوفر، قالب DNA، نوكلوئتيدات من نوع dNTP))- يُمكِّن من مُضاعفة مقطع الجين CFTR الذي يحوي منطقة طفرة النقص في الأليل الطافر F508del. بعدها سيتمُّ تحديد تسلسل النوكلوئيتيدات الموجودة في المقطع بطريقة سانجر קישור.ثمَّ مُقارنة التسلسل الناتج من كل عيّنة DNA مع تسلسل الجين السليم ومع تسلسل الأليل الطافر، الموجودان في مخزن معلومات تسلسلات النوكلوئيتيدات ، مما يُمكِّن من تحديد مصدر كل عيّنة (من إنسان سليم أم من إنسان سليم).

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

مهَّمة II: تشخيص الطفرة في جين CFTR بواسطة تفاعل PCR والأداة Primer3Plus (صفحة 6 من 8)

تزويد تسلسل بادئة

عندما جلس الباحثون لطلب (להזמין) أحد أزواج البادئات التي صمَّموها، دخل إلى الغرفة باحث معروف يعمل في المُختبر المُجاور. عندما سمع عن توجّه تجربة الباحثين، قال:" بالطبع توجّهكم جيّد ويُزوّدكم بالإجابة المطلوبة. ولكن هُناك توجّه بديل، أسرع وذا تكلفة أقل، يُزوّدكم بإجابة بالنسبة لجينوتيب الأشخاص، أي يُجيب عن السؤال من هو الشخص المريض ومن هو السليم. يجب عليكم فقط أنْ تُصمَّموا بادئات تكوّن نواتج PCR ذات أطوال مُختلفة لدى الشخص السليم والمريض. يجب تحريك وفصل النواتج في الجل بواسطة حقل كهربائي (الكتروفوريزا بالجل קישור)... وها قد عرفنا الإجابة! بدون الحاجة لتحديد تسلسل الناتج الذي يحتاج إلى وقت ومال... بكل بساطة وسهولة. بالنجاح يا أصدقاء، أنا مُضطر للذهاب". وعاد إلى مُختبره. تحمَّس الباحثون من بساطة المَهمّة وباشروا بها. فكَّروا بالاقتراح مرّة أخرى وتردَّدوا كثيرًا.

15. مع أخذ مُميّزات الطفرة بالحسبان، هل نواتج المُضاعفة بواسطة ال PCR للأليل السليم والأليل الطافر F508del، بواسطة استعمال البادئات التي صُمِّمت من قبل والموجودة على طرفيّ الطفرة- لديها أطوال مُختلفة بشكل يُمكِّن من التمييز بينها في الجل؟

- أ. لا، لأن ناتج المُضاعفة الناتج من الأليل الطافر أقصر ب3 نوكلوئتيدات (CTT) فقط من ناتج المُضاعفة الناتج من الأليل السليم، الفرق ليس كبيرًا ولا يُمكن تمييزه بالجل.
- ب. لا، لأن ناتج المُضاعفة الناتج من الأليل الطافر أقصر بنوكلوئتيد واحد (F) فقط من ناتج المُضاعفة الناتج من الأليل السليم، الفرق ليس كبيرًا ولا يُمكن تمييزه بالجل.
- ج. لا، لأنَّه لا يوجد فرق بتاتًا بين نواتج المُضاعفة الناتجة من مضاعفة الأليل السليم ونواتج المُضاعفة الناتجة من مُضاعفة الأليل الطافر.
- د. نعم، لأنَّ تسلسل البروتين المُشفَّر بواسطة الأليل الطافر يختلف عن تسلسل البروتين السليم، ولذلك نُلاحظ فرق بين نواتج المُضاعفة في الجل.

الإجابة هي: أ. لا، لأن ناتج المُضاعفة الناتج من الأليل الطافر أقصر ب3 نوكلوئتيدات (CTT) فقط من ناتج المُضاعفة الناتج من الأليل السليم، الفرق ليس كبيرًا ولا يُمكن تمييزه بالجل.

بما أنَّ الطفرة في الأليل الطافر هي طفرة نقص لثلاثة نوكلوئتيدات فقط، لا يُمكن التمييز بين طول نواتج المُضاعفة بواسطة البادئات التي صُمِّمت من قبل (بادئات موجودة على طرفيّ منطقة الطفرة)، لأنَّه لا يوجد فرق كبير بين أطوال هذه النواتج. في الالكتروفوريزا بالجل (في ظروف معياريّة- תנאים סטנדרטיים) بإمكاننا أنْ نُميّز بين مقاطع DNA تختلف بطولها على الأقل بعشرات النوكلوئتيدات. عندما يكون الفرق بطول المقاطع عدَّة نوكلوئتيدات لا يُمكن أنْ نُلاحظ فرقًا في المسافة التي تقطعها هذه المقاطع.

توجّه الباحثون المُصابين بخيبة أمل إلى الباحث الذي يعمل في المُختبر المُجاور وعرضوا المشكلة أمامه – عندما نستعمل بادئات موجودة من جهتين مُختلفتين لمنطقة الطفرة، يكون ناتج المُضاعفة من الأليل السليم أطول ب3 نوكلوئتيدات فقط من ناتج المُضاعفة للأليل الطافر. فكَّر الباحث وحالًا لمعت عيناه: " لا توجد مُشكلة يا أصدقاء. استغلّوا الفرق بين تسلسل الأليل السليم وتسلسل الأليل الطافر لتصميم بادئات، بحيث يضمُّ تسلسل إحدى البادئات منطقة الطفرة (التي تنقص فيها النوكلوئتيدات الثلاثة)، وعندها نحصل على ناتج PCR فقط من الأليل الطافر، بينما لا نحصل على ناتج مُضاعفة من الأليل السليم. رائع. والآن إلى العمل!". عاد الباحثين إلى مُختبرهم مُفعمين بالأمل. حتى نُميّز بين تسلسل DNA سليم (من إنسان سليم) وبين تسلسل DNA طافر (من حامل أليل الطافر أو أو من مريض CF) على الباحثين، وعليكم أيضًا تصميم زوج بادئات جديد، إحدى البادئات تحتوي على موقع الطفرة (ينقص 3 نوكلوئتيدات)، ولذلك تكون البادئة تخصُّصية لأحد التسلسلين فقط.

16. إذا استعملنا في تفاعل PCR زوج بادئات إحداهما تضمّ موقع الطفرة وتتكون من تسلسل مُكمّل للتسلسل الطافر، بالإضافة إلى بقيّة مُركَّبات التفاعل و DNA من إنسان سليم- هل تتوقعوا أنْ تتمَّ مُضاعفة المقطع؟

- أ. نعم.
- ب. لا.

الإجابة هي: ب. لا، لأنَّ البادئة التي تُكمِّل التسلسل المُميّز الموجود في الأليل الطافر (وتضمُّ موقع الطفرة) لن ترتبط بالمرَّة إلى قالب DNA من إنسان سليم.

17. للحصول نواتج مُضاعفة مقطع في تفاعل PCR يجب أنْ نُضيف للأنبوب (بالإضافة إلى الإنزيم، بوفر ونوكلوئتيدات)؟

- أ. زوج من البادئات، إحداهما تضمّ موقع الطفرة وتُكمِّل تسلسل الأليل الطافر و DNA من شخص سليم.
- ب. زوج من البادئات، إحداهما تضمّ موقع الطفرة وتُكمِّل تسلسل الأليل السليم وDNA من حامل للأليل الطافر أو مريض CF.
- ج. زوج بادئات، إحداهما تضمّ موقع الطفرة وتُكمِّل تسلسل من الأليل الطافر، وDNA من حامل للأليل الطافر أو مريض CF.
- د. نحصل دائمًا على ناتج مُضاعفة ولا يوجد تأثير لل DNA والبادئات التي نستخدمها.

الإجابة هي: ج. لمُضاعفة مقطع بواسطة PCR، يجب أنْ نُضيف للأنبوب بادئات تسلسلها مُكمِّل لتسلسل القالب. تتمُّ مُضاعفة كبيرة لمقطع ال DNA الموجود بين البادئات فقط عندما تستطيع كل واحدة من البادئات الارتباط بإحدى جديلتي القالب.

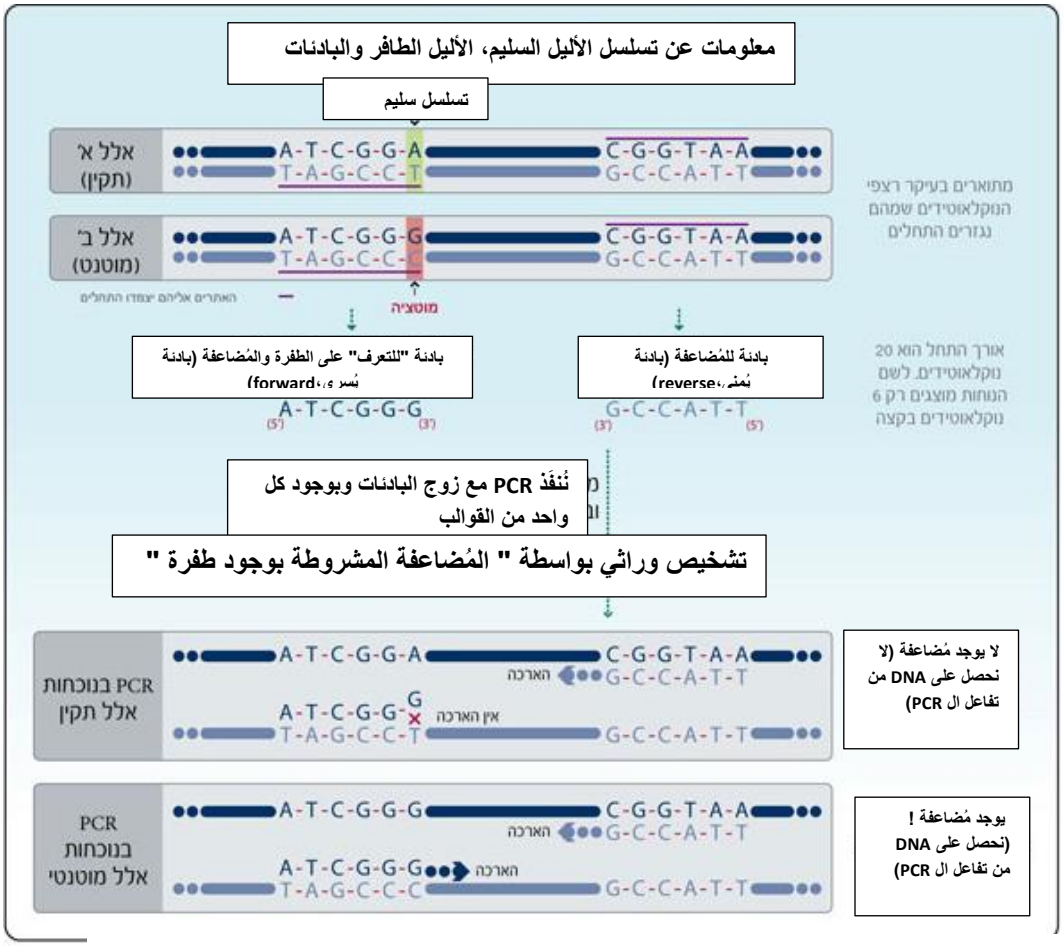
18. هل تُمكِّن الاستراتيجيّة التي اقترحها الباحث الذي يعمل في المُختبر المُجاور، أي الاعتماد على بادئة تضمّ منطقة الطفرة، من التمييز بين DNA سليم (من شخص سليم) وDNA طافر(من حامل أليل طافر أو مريض CF)، بواسطة التحريك بالجل ودون الحاجة إلى تحديد التسلسل؟

- أ. نعم
- ب. لا.

الإجابة هي: أ. نعم.

للمُعلِّم: في هذه المرحلة يُمكن إجراء نقاش في الصف وتحليل الاستراتيجيّات المُختلفة التي اقترحها الباحث من المُختبر المُجاور، وأيضًا الحصول على استراتيجيّات بديلة من قبل الطلاب (إنْ وُجدت كهذه). يجب أن نكون مُنفتحين للأفكار المُختلفة، ولكن علينا توجيه الطلاب لفهم أنَّ " المُضاعفة المشروطة بوجود طفرة" (הגברה מותנית מוטציה) هي الاستراتيجيّة الأكثر مُلائمة. بإمكانكم توجيه الطُلاب لقراءة إضافيّة (ص 131-129 في كتاب الهندسة الوراثيّة "הנדסה גנטית - מעקרונות ושיטות למחקר ויישומים). في هذه الطريقة تُصمَّم إحدى البادئات لتلاءم موقع الطفرة، بحيث تكون تخصُصيّة للتسلسل من الأليل الطافر، وهكذا نحصل على ناتج PCR فقط من قالب DNA من عيّنة تابعة لشخص يحمل هذا الأليل الطافر (في هذه الحالة F508del)، بينما لا نحصل على ناتج مُضاعفة من عيّنة للأليل السليم. أو بالإمكان تصميم البادئة لتتلاءم مع موقع الطفرة في تسلسل الأليل السليم (أي تحتوي على تسلسل مُكمّل لCTT والناقص في الأليل الطافر)، وهكذا نحصل على ناتج من الأليل السليم فقط، ولا نحصل على ناتج من الأليل الطافر.

تُسمّى هذه الاستراتيجيّة **"المُضاعفة المُشروطة بوجود طفرة"** (رسم 3). هذه استراتيجيّة سهلة وسريعة طُوِّرت من أجل تشخيص طفرات نُقطيّة موجودة في مواضع مُحدَّدة وذات طابع معروف من قبل. تُمكِّن هذه الطريقة من مُضاعفة ال DNA فقط في الحالات التي تتواجد فيها طفرة مُعيّنة في التسلسل. لهذا الهدف يتم استعمال بادئة خاصة بحيث يكون الطرف '3 קישור للبادئة مُكملًا للتسلسل الخاص الموجود في الأليل الطافر، وغير موجود في الأليل السليم. ترتبط هذه البادئة بتسلسل DNA مكمِّل في الأليل الطافر ولا ترتبط بتسلسل الأليل السليم. البادئة الأخرى ترتبط بالDNA التابع للأليل السليم وأيضًا بال DNA من الأليل الطافر، ولكن من أجل الحصول على ناتج مُضاعفة، من الضروري أنْ يتمَّ ارتباط البادئتان بالقالب! لذلك نحصل على ناتج مُضاعفة فقط من الأليل الطافر.



الرسم 3: تشخيص الطفرة في الجين بمُساعدة PCR الذي أعد لمُضاعفة مشروطة بوجود طفرة

لهذا الهدف علينا تصميم بادئات تُكمل إحداها التسلسل الموجود موقع الطفرة، في الطرف '3 أو بقربه. أمامكم التسلسل المُختار للجين CFTR من الأليل F508del קישור. الحديث عن نفس التسلسل الذي استعملناه في المرحلة السابقة ، لكن تنقصه النوكلوئتيدات CTT في المواضع 203-201. الصقوا التسلسل في النافذة المُناسبة. لتحديد تسلسل البادئة لأداة Primer3Plus وليحتوي تسلسل البادئة اليُسرى على موقع الطفرة، نقوم بكتابة التسلسل المطلوب للبادئة في النافذة "Pick left primer or use left primer below" في أسفل الشاشة (شاشة 8).

الشاشة 8 : واجهة الأداة تُمكِّن المُستخدِمين من تحديد تسلسل أحدى البادئات أو كلتيهما

19. على فرض أنَّ البادئة اليُمنى (Reverse) موجودة في الطرف '3 للمقطع الذي نرغب بمُضاعفته، تقريبًا في نهايته، ما هي المواضع التي من المُفضَّل أنْ تتواجد فيها البادئة اليُسرى (Forward) حتى نُمكِّن مضاعفة مُشروطة بوجود الطفرة من نوع F508del؟

- أ. من المُفضَّل أنْ تتواجد البادئة اليُسرى في المواضع 1-24، حتى نحصل على ناتج مُضاعفة طويل قدر الإمكان.
- ب. من المُفضَّل أنْ تتواجد البادئة اليُسرى في المواضع 230-254، حتى نحصل على ناتج مُضاعفة بطول 200 نوكلوئتيد تقريبًا.
- ج. من المُفضَّل أنْ تتواجد البادئة اليُسرى في المواضع 180-202، حتى يضمّ موقع طفرة النقص.
- د. لا توجد أهميّة لمكان وجود البادئة؛ في كل الأحوال سنحصل على فرق كبير بين طول ناتج مُضاعفة الأليل السليم وناتج مُضاعفة الأليل الطافر.

الإجابة هي: ج. في المُضاعفة المشروطة بوجود طفرة، الطرف '3 للبادئة اليُسرى يُلائم التسلسل المُميّز للأليل الطافر. في الحالة الموجودة لدينا، منطقة الطفرة في مقطع الأليل الطافر F508del هي الموضع 201، من المهم أنْ يحتوي طرف البادئة على النوكلوئتيدات من هذا الموضع فصاعدًا. بقيّة البادئات المُقترحة – في المواضع 1-24 أو في المواضع 230-250- مُكملَّة لتسلسل متطابق لدى الأليل السليم والأليل الطافر، لذلك سنحصل على نواتج مُضاعفة من شخص سليم ومن شخص مريض أيضًا. في الحالة الأولى يكون طول النواتج مُختلفًا ب3 نوكلوئتيدات (في الحالة الثانية تكون الأطوال مُتطابقة)، على كل الأحوال ليس بالإمكان تشخيص هذا الفرق بواسطة الالكتروفوريزا بالجل. المُضاعفة المشروطة بوجود طفرة التي نحصل فيها على ناتج فقط من ال DNA الذي يحمل الطفرة، مُمكنة فقط عندما تتواجد البادئة في المنطقة التي تضمّ بداخلها منطقة الطفرة.

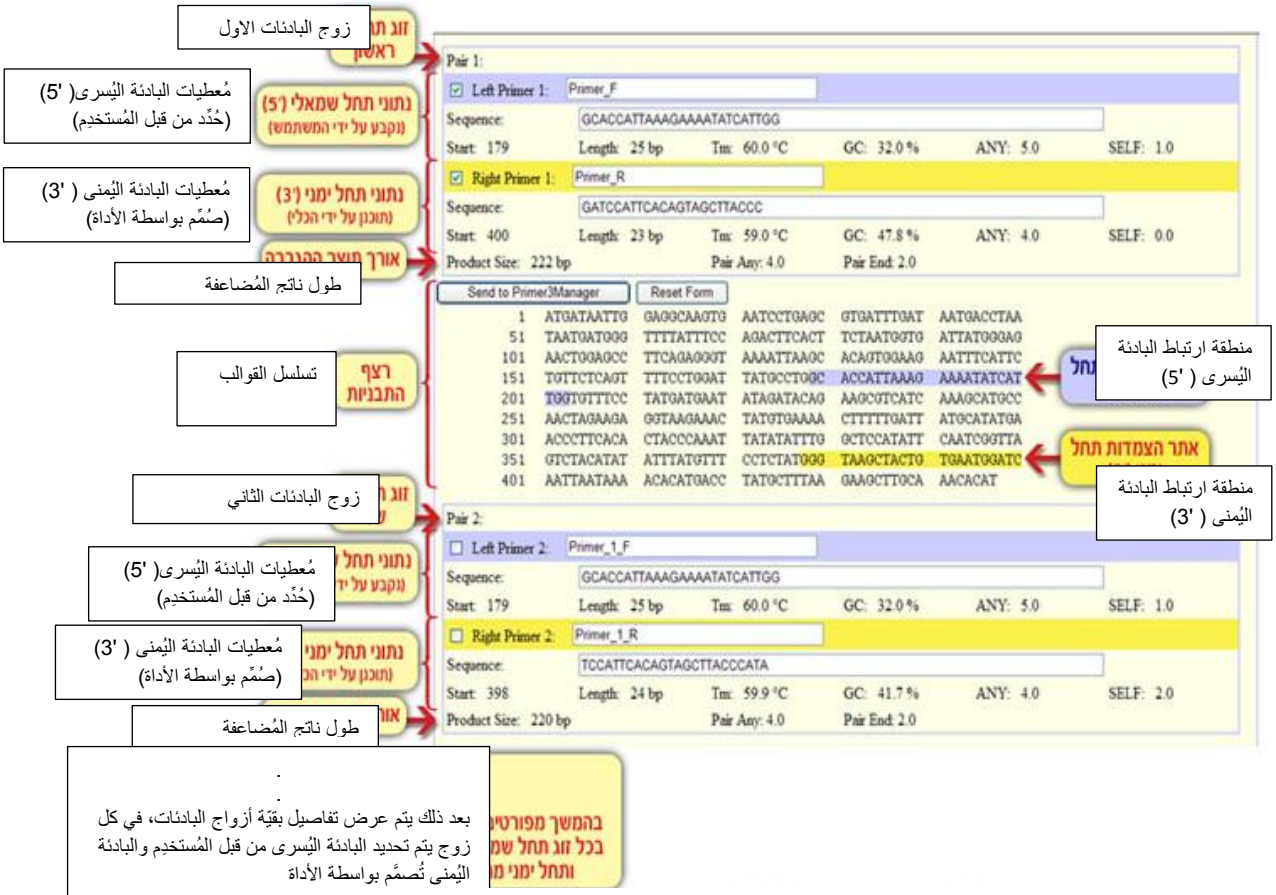
عندما يُحدِّد المُستخدمون تسلسل إحدى البادئات للأداة Primer3Plus، تفحص الأداة تلاءم تسلسل البادئة المُزوّدة مع المعايير المقبولة لطول البادئة، حرارة ارتباطها وغيرها (كما هو مُفصَّل في بطاقة الاختيار General Settings). في الحالة التي لا تستجيب فيها البادئة المُزوّدة لأحد المعايير، تقوم الأداة بالتحذير بواسطة ملاحظة تدل على حدوث خطأ. مثلًا تزويد بادئة قصيرة تؤدي إلى ظهور ملاحظة حدوث خطأ "primer too short" ، بينما الملاحظة "Tm too low" تظهر عندما تكون حرارة ارتباط البادئة مُنخفضة أكثر مما يجب. عندما لا يتواجد في القالب تسلسل مُكمِّل لتسلسل البادئة المُزوَّدة، تظهر الملاحظة " primer not in sequence"، أما المُلاحظة "High end self complementarity" فتُشير إلى بادئة فيها التسلسل الموجود في بدايتها مُكمِّل لذلك الذي في نهايتها، لذلك من الممُكن أنْ ترتبط البادئة بالأخرى بدلًا من ارتباطها بقالب DNA.

20. مع الاهتمام أنَّ طول البادئة مكوَّن من 18 نوكلوئتيد على الأقل، وأنَّ منطقة الطفرة تتواجد في الطرف '3 ، أمامكم 4 بادئات مُمكنة. انسخوا بادئة واحدة في كل مرّة والصقوها في النافذة "Pick left primer or use left primer below" ، اضغطوا على "Pick Primers" واذكروا في أي حالة من الحالات الأربعة تمَّ تصميم بادئات ولم تحصلوا على ملاحظة بحدوث خطأ (تظهر بلون أحمر- برتُقالي في أعلى الشاشة: **Left primer is unacceptable**)

- أ. GCACCATTAAAGAAAATATCATTG
- ب. GCACCATTAAAGAAAATATCATTC
- ج. GCACCATTAAAGAAAATATCATTGG
- د. CACCATTAAAGAAAATATCATTGGTG

الإجابة هي: ج. تعلّمنا خلال التجربة أنَّه توجد أهميّة كبيرة لتسلسل البادئة ويكفي تغيير نوكلوئتيد واحد فقط حتى تتحوّل البادئة من بادئة غير مُناسبة إلى بادئة مُناسبة. نمتنع عن استعمال بادئات حرارة ارتباطها مُنخفضة نسبيًا (Tm too low) مثلًا البادئة أ؛ وعن استعمال بادئات لا تُلاءم تسلسل القالب (Not in sequence) مثل البادئة ب أو عن استعمال بادئات تحتوي في أوّلها على تسلسل مُكمِّل لذلك الذي في آخرها، عندها من المُمكن أنْ ترتبط البادئة بالأخرى بدلًا من ارتباطها بالقالب (High end self complementarity) كما في البادئة د.

اختروا البادئة المُناسبة من السؤال السابق، تلك التي لم تُظهر على الشاشة مُلاحظة تُشير إلى حُدوث خطأ . انسخوا من جديد تسلسل البادئة إلى النافذة "Pick left primer or use left primer below"، واضغطوا على "Primers Pick" لتفحصوا أنَّ البادئة مناسبة ولتصمِّموا بادئات إضافيّة مُمكنة في زوج البادئات. في أزواج البادئات الخمسة التي صُمِّمت تسلسل البادئة اليُسرى مُتطابق (التسلسل الذي زوّدناه)، بينما تسلسل البادئة اليُمنى مُختلف (شاشة 9)



الشاشة 9: صفحة النتيجة- تصميم بادئة إضافيّة مُمكنة (بادئة يُمنى) للبادئة التي يُزوِّدها المُستخدِمين (بادئة يُسرى)

21. ماذا يُمكن القول عن أزواج البادئات التي صُمِّمت؟

- أ. في كل الأزواج تستجيب البادئات لتحديدات الأداة من ناحيّة: الطول، حرارة الارتباط، نسبة النوكلوئتيدات من النوع GC وغيرها.
- ب. في جميعها صُمِّمت البادئة اليُمنى للمنطقة الموجودة بين المواضع 370-400 في التسلسل.
- ج. من استعمال جميع الأزواج نحصل على ناتج مُضاعفة بطول 220 نوكلوئتيد تقريبًا، فقط من استعمال الأليل الطافر F508del.
- د. جميع الإجابات صحيحة.

الإجابة هي: د. جميع الإجابات صحيحة.

للمُعلِّم : في المُضاعفة المُتعلِّقة بالطفرة ليس بالضرورة أنْ تحوي البادئة اليُسرى على منطقة الطفرة. بالإمكان تزويد الأداة Primer3Plus بتسلسل البادئة اليُمنى (يُسمّى أيضًا البادئة '3 أو reverse) على أنَّه التسلسل المطلوب والذي يضمّ منطقة الطفرة. في هذه الحالة يجب أنْ نكتب تسلسل البادئة اليُمنى في النافذة "Pick right primer or use right primer below". كما أنَّ تسلسل البادئة التي تُكتب هو تسلسل معكوس للتسلسل المُكمِّل الموجود، لأنَّ الحديث عن البادئة اليُمنى.

أو بالإمكان استخدام التوجّه لمُضاعفة مشروطة بوجود تسلسل سليم، وذلك عندما نملك تسلسلًا سليمًا. نختار أنْ يكون تسلسل البادئة اليُمنى أو اليُسرى، عندما يكون الطرف '3 للبادئة موجودًا على منطقة الطفرة، لكنه مُناسب لتسلسل الأليل السليم. في هذه الحالة نحصل على ناتج مُضاعفة من الأليل السليم ولا نحصل على ناتج من الأليل الطافر(بشكلٍ عكسيّ لما نتج في الأعلى).

يجب أنْ نذكر أنَّه في المُضاعفة المشروطة بوجود طفرة نحصل على ناتج فقط من تعزيز مقطع أليل ذا طفرة مُعيّنة. إنْ لم نحصل على ناتج، يجب أنْ نفترض أنَّ لدينا أليلان سَليمان. مع هذا فإنَّ الاحتمال لوجود طفرة أخرى في التسلسل المُكمِّل لإحدى البادئتان أو إلى وضع فيه لم يعمل تفاعل الPCR بالمرة ممّا يؤدي إلى عدم انتاج ناتج، موجود لكنَّه صغير جدًّا. لهذا علينا إضافة عيّنة DNA من إنسان يحمل بالتأكيد الطفرة المذكورة كضابط إيجابي. عادة بالإضافة إلى ال PCR الذي يستخدم بادئات تخصّصيّة لأليل طافر مُعيّن يتمّ أيضًا إجراء PCR إضافي يستخدم بادئات تخصصية للأليل السليم، للتأكُّد من أنَّ الأليل سليم فعلًا.

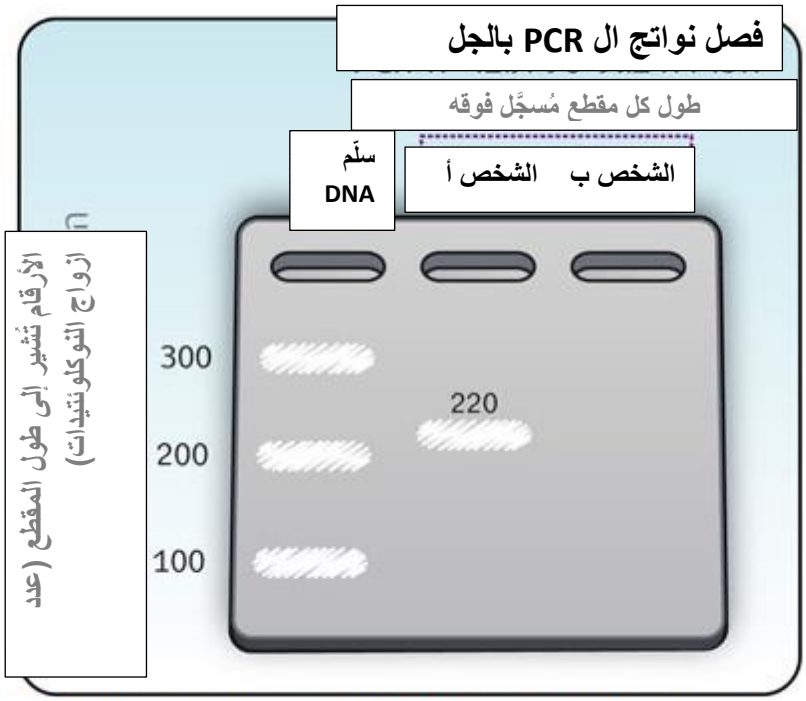
اختار الأطباء الموجودين في المُختبر زوج البادئات الأول الذي نتج من استخدام البادئة اليُسرى المُلائمة. تسلسل البادئة اليُسرى يبدأ من الموضع 179 وطولها 25 نوكلوئتيد (حتى الموضع 203)، بينما تسلسل البادئة اليُمنى يبدأ بالموضع 400 وطولها 23 نوكلوئتيد (حتى الموضع 378). طول الناتج المُتوقّع من الأليل الطافر هو 222 نوكلوئتيد، بينما لا نحصل على ناتج من الأليل السليم.

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

مَهمّة II: تشخيص الطفرة في جين CFTR بواسطة تفاعل PCR والأداة Primer3Plus (صفحة 7 من 8)

تحليل نتائج PCR كما تظهر في الالكتروفوريزا

نفذ الأطباء تجربة مكوّنة من تفاعليّ PCR لتشخيص وجود الطفرات المُختلفة بواسطة البادئات التي اخترناها. تم فصل نواتج المُضاعفة بالاكتروفوريزا بالجل. فيما يلي النتائج (رسم 4):



الرسم 4: الفصل بالجل لنواتج PCR من المُضاعفة المشروطة بوجود طفرة من عيّنة DNA لشخص أ و ب

22. ماذا يُمكن أنْ نعرف من نتائج المُضاعفة المشروطة بوجود الطفرة؟

- أ. الشخص أ حامل للطفرة F508del في جين CFTR (على الأقل في أليل واحد)، بينما الشخص ب غير حامل للطفرة.
- ب. الشخص ب حامل للطفرة F508del في جين CFTR (على الأقل في أليل واحد)، بينما الشخص أ غير حامل للطفرة.

الإجابة هي: أ. في المُضاعفة المشروطة بوجود الطفرة نحصل على ناتج مُضاعفة فقط من استعمال قالب DNA يحتوي على الأليل الطافر، وليس من قالب DNA يحتوي على الأليل السليم، لأن إحدى البادئات تكمِّل تسلسل موجود في الأليل الطافر والذي يضمُّ بداخله منطقة الطفرة. بما أنَّ عيّنة الDNA من الشخص أ أدَّت إلى إنتاج ناتج مُضاعفة، أي أنَّه على الأقل أحد أليلات CFTR للشخص أ يحمل الطفرة F508del. في هذه المرحلة لا يُمكن أنْ نعرف إذا كان الأليل الإضافي لCFTR لدى الشخص أ هو أليل سليم، أليل يحمل الطفرة F508del أم أليل يحمل طفرة أخرى. بما أنَّ الحديث عن مرض وراثي يورَّث بشكل مُتنحي، لا يُمكن أنْ نستنتج إذا كان الشخص أ مريض أم سليم. أما بالنسبة للشخص ب فيمكن أنْ نقول أنَّه بالتأكيد لا يحمل الطفرة F508del في أي من أليلي CFTR.

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

مَهمّة II: تشخيص الطفرة في جين CFTR بواسطة تفاعل PCR والأداة Primer3Plus (صفحة 8 من 8)

تلخيص الأداة Primer3Plus

اسئلة للنقاش

للمُعلِّم: أُعدَّت هذه الأسئلة لتلخيص استعمال الأداة ومن المُفضَّل إجراء نقاش في الصف يلخص مبادئ عمل الأداة.

23. بالاعتماد على المعلومات التي اكتسبتموها في هذه المَهمّة – ما هي مبادئ عمل الأداة Primer3Plus؟ عدِّدوا أهداف استخدام الأداة وطريقة استعمالها.

للمُعلِّم: كما ذُكِر الأداة Primer3Plus تُمكِّن من تصميم بادئات، مثلًا بهدف استعمال هذه البادئات في تفاعل PCR لمُضاعفة مقطع DNA (أو مقطع DNA مُكمِّل). تستقبل الأداة (כקלט) تسلسل القالب وتُصمِّم عدَّة أزواج من البادئات بحسب تحديدات الخيار التلقائي للأداة (הגדרות ברירת המחדל). بالإمكان إضافة تقييدات على

مقطع في التسلسل، لا نرغب أنْ تتواجد فيه البادئات، أو على مقطع في التسلسل نرغب بمُضاعفته لذلك تُصمَّم البادئات على طرفيْ هذا التسلسل وهكذا.

24. تعلمنا في هذه المهمّة أنَّه لا يُمكن استخدام كل تسلسل مكوّن من 20-25 نوكلوئتيد كبادئة. أذكروا عددًا من المُميّزات الهامة للتسلسلات التي تُستخدم كبادئات، واكتبوا كيف تؤثر هذه المُميِّزات على ظروف ال PCR.

للمُعلِّم: للبادئات عدد من المُميِّزات الهامّة. أولًا تسلسل كل واحدة من البادئات مُكمِّل لتسلسل من جديلة مُختلفة من جديلتي القالب: البادئة اليُسرى ترتبط بجديلة الanti-sense أما البادئة اليُمنى فترتبط بجديلة ال sense. حرارة ارتباط كل بادئة تتحدَّد بحسب طول وتركيبة النوكلوئتيدات فيها، وتكون مُتشابهةً لكلتا البادئتين. هذه الحرارة تُحدِّد درجة حرارة مرحلة ارتباط البادئات (annealing) في ال PCR، تكون حرارة الارتباط عادة في المجال 54-60°C. مكان البادئات على القالب يُحدِّد حُدود المقطع المُضاعف وطوله. كلّما كان طول المقطع المُضاعف أكبر، تكون مرحلة الاستطالة (elongation) في تفاعل الPCR أطول. كذلك من المُهمّ أنْ لا تحتوي البادئات على تسلسلات مُكمّلة داخل البادئة ذاتها أو لتسلسلات موجودة في البادئة الأخرى، فعندها بدلًا من الارتباط بجديلة القالب ترتبط البادئات ببعضها البعض. نُلاحظ أنَّ ظروف طريقة ال PCR ثابتة إلى حدٍّ مُعيّن، ونُلاحظ أنَّ الظروف الأساسيّة التي تُميِّز بين تفاعل PCR معيّن وتفاعل PCR آخر هي حرارة الارتباط وزمن الاستطالة اللتان تتحدَّدان بما يتلاءم مع مُميّزات البادئات ومكانها على قالب ال DNA، في حين تبقى الظروف الأخرى لتفاعل الPCR ثابتة في جميع تفاعلات الPCR.

25. أحد مُميّزات الأداة أنَّها بالإضافة لقدرتها على تصميم أزواج البادئات، فهي تعرض مكان كل بادئة على قالب الDNA، حتى لو تمَّ تزويد الأداة بتسلسل البادئة المطلوب من قبل المُستخدِم. أي أدوات بيوإنفورماتيّة أخرى من بين الأدوات التي تعرَّفتم عليها ذات مُميّزات مُشابهة؟ بماذا تتشابه هذه الأدوات فيما بينها؟

للمُعلِّم: عمليًا لتحديد مكان البادئة على قالب الDNA، تقوم الأداة Primer3Plus بتنفيذ عمليّة تُسمّى تراصف تسلسلي (העמדת רצפים). هذه العمليّة تتمّ أيضًا في الأداة BLAST التي تعمل كمُحرِّك بحث بحسب تسلسل استعلام (بالإمكان تشبيه العمليّة لعملية البحث عن تسلسل البادئة التي زوّدها المُستخدم للأداة في تسلسل القالب)، وكذلك للأداة ClustalW التي تقوم بمُحاذاة تسلسلات مُختلفة (في هذا المثال تسلسل البادئة وتسلسل القالب) لإيجاد مناطق تشابه ومناطق اختلاف.

استعننا في هذه المُهمّة بالأداة البيوإنفورماتيّة Primer3Plus لتصميم بادئات لاستخدامها في عمليّة PCR من أجل تشخيص طفرات في جين CFTR. كما ذُكِر هناك أهميّة بالغة لمعرفة نوع الطفرة في أليلات CFTR بهدف مُلائمة الأدوية للمرضى. في البداية صمَّمنا بادئات على طرفي منطقة الطفرة من أجل مُضاعفة مقطع DNA ذا تسلسل مُختلف في الأليل الطافر عنه في الأليل السليم. بالإمكان تحديد تسلسل نواتج المُضاعفة ومُقارنة التسلسلات مع مخازن المعلومات ومعرفة كونها تتبع لشخص مريض أم لشخص سليم. بعد ذلك استعملنا توجّه " المُضاعفة المشروطة بوجود طفرة" فيها تسلسل إحدى البادئتين يضمّ منطقة الطفرة ويحمل التسلسل المُناسب للأليل الطافر، لذلك هذه البادئة سترتبط فقط بقالب DNA مصدره من الأليل الطافر وفقط عندها نحصل على ناتج مُضاعفة (لا نحصل على ناتج مُضاعفة من قالب مصدره من الأليل سليم).

تُمكِّن الأداة Primer3Plus من تصميم بادئات بحسب معايير وشروط تتعلق بطول البادئة، حرارة ارتباطها تسلسلها وغيرها. الأمر الذي لا يقلّ أهميّة عن هذا هو أنَّ بإمكاننا تحديد قيود لتصميم البادئات مثل المنطقة في التسلسل التي نرغب بمُضاعفتها (Targets)، في أي مجال في التسلسل يُمكن أنْ تتواجد البادئات (Included Region) أو لا تتواجد البادئات (Excluded Region). الأداة تُمكِّن المُستخدمين أيضًا من تزويد تسلسل بادئة مُعيّن، تقوم بفحص مُلائمتها وتُصمِّم البادئة الأخرى المناسبة لها.

بسبب كثرة الطفرات في جين CFTR، لكل طفرة – ليس بالضرورة طفرة نُقطيّة – يوجد زوج بادئات مُعيّن يُمكِّن من تشخيص هذه الطفرة بشكل تخصُصيّ. بهدف التشخيص الوراثي، يجب تنفيذ التجربة (להריץ ניסוי) على قالب DNA من شخص معيّن واستخدام جميع أزواج البادئات التي صُمِّمت لتشخيص الطفرات المُختلفة. في بعض الأحيان بهدف تشخيص طفرات مُعيّنة يتمّ استعمال طريقة RT-PCR بحسبها مصدر تسلسل ال DNA المُستخدم كقالب من جُزيئةRNA، وهذا لأن الطفرة تكون واضحة بشكل خاص على مُستوى ال RNA (مثلًا الطفرة التي تؤثِّر على عملية الوَصْل (שחבור) أو على ثبات وتفكيك جُزيئات ال mRNA) أيضًا في هذه الحالة نستعين بالأداة Primer3Plus لتصميم البادئات. كما لاحظنا خلال الفعاليّة فإنَّ النجاح في استعمال تفاعل الPCR مشروط باختيار استراتيجيات بحث مُناسبة وبتصميم البادئات بذكاء.

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

تلخيص الفعاليّة

ركَّزنا في هذه الفعاليّة على بروتين CFTR والذي تؤدّي الطفرات فيه إلى تطوّر مرض التليّف الكيسي. استعننا بأدوات بيوإنفورماتيّة لفحص توجُّهين أساسيّيْن يتعلقان بالطفرات المُسبِّبة للأمراض: الأول هو توصيف الخلل في البروتين والثاني هو فحص حمل الشخص (الجين) للطفرة .

بحثنا بمُساعدة الأداة Prositeعن موتيفات مبنويّة ووظيفيّة في بروتين CFTR. ووجدنا أنَّ هذا البروتين ينتمي إلى عائلة بروتينات تُسمَّى ABC (ATP-Binding Cassette). تتميَّز بروتينات هذه العائلة بنوعين من الموتيفات المحفوظة: الأول يُثبِّت البروتين في غشاء الخلية (ABC_TM1F) ويُنتج ما يُشبه القناة، والثاني يربط ATP اللازم لنقل الأيونات عبر القناة بعكس مُنحدر التراكيز (ABC_TRANSPORTER_2). من خلال التعرُّف على الموتيفات في البروتين وظائفها وأماكنها تعلمنا عن التلاؤم بين مبنى البروتين ووظيفته. تحليل مُشابه لتسلسل البروتين الطافرF508del بواسطة الأداة Prosite أدّى إلى الكشف عن الموتيف المُتأثِّر من الطفرة.

بعد ذلك استعننا بالأداة Primer3Plus لتصميم بادئات لتفاعل PCR بهدف التمييز بين DNA مصدره من الأليل السليم وDNA مصدره من الأليل الطافر الذي يحمل الطفرة F508del. هكذا صمَّمنا بادئات بعدَّة توجُّهات: أ. بادئات موجودة على طرفي موقع الطفرة بهدف مُضاعفة مقطع، تحديد تسلسله ومن ثُمَّ تحديد مصدره بواسطة مُقارنته مع الأليل السليم والأليل الطافر؛ ب. المُضاعفة المشروطة بوجود طفرة وفيها يتواجد تسلسل إحدى البادئتين على موقع الطفرة ولذلك هو تخصصي للأليل الطافر، هذا الأمر يُمكِّن من تحديد مصدر ال DNA بواسطة تحريك نواتج ال PCR في الجل، حيث نحصل على ناتج مُضاعفة في تفاعل ال PCR فقط لدى الشخص الذي يحمل أليل الطفرة التي نفحصها، في أحد أليلات الجين أو في كليهما. التصميم الذكي للبادئات هو مرحلة مُهمّة في نجاح تفاعل ال PCR.

مرض التليّف الكيسي (סיסטיק פיברוזיס)- هل كثرة الطفرات أمر مثير للقلق؟

مصادر وإثراء

- מאגר המוטציות הגורמות למחלתCF
- האתר של איגוד סיסטיק פיברוזיס בישראל
- האתר של איגוד סיסטיק פיברוזיס בארה"ב
- פרופ' בת שבע כרם
  - כתבת דיוקן ,מתוך BioInform, גיליון 5, אוקטובר 2010
  - מתוך אתר ויקיפדיה
  - מתוך אתר פרס אמ.ת
- הרצאה של פרופ' בת שבע כרם בקריה הרפואית רמב"ם (שנת 2008), בנושא- טיפול ספציפי חדשני במוטציות פסק - (non-sense) סיסטיק פחברוזיס כמודל
- הרצאה של פרופ' איתן כרם מבית חולים הדסה הר הצופים בכנס של אגודת סיסטיק פיברוזיס (שנת 2014), בנושא - טיפול חדשני לתיקון הפגם הגנטי בCF-