تنقية البروتينات 3 + الناعور

د. مجد الجمالي

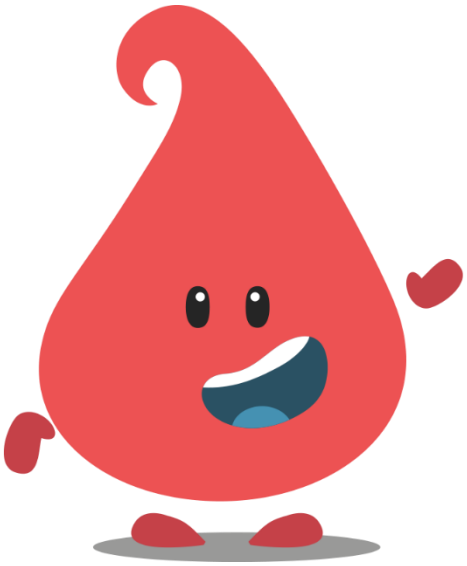
تقانة حيوية | نظري

سنتعرَّف في هذه المحاضرة للطرف الأُخرى المُستَخدَمة في تنقية البروتينات....بالإضافة إلى أنَّ هذه المحاضرة تتضمَّن طرق علاج مرض الناعور.....نتمنَّى لكم دراسة موفقة....لنبدأ.....

فهرس المحاضرة:

- الفعاليَّة النوعيَّة 2
- IEF 6
- 2D-GE 11
- الناعور 16
- العلاج بالعامل FIX 16
- العلاج بالعامل aFVII 18

خلونا نبلش محاضرتنا اليوم بقصة تخيّلية صغيرة



لنفرض أنو بكرا بالأيام كان مطلوب منكن تشترو كاشف معيّن، ورحتو دورتو عليه بالسوق قام طلع في شركتين بس بيعملو هل الكاشف: واحد 50 ul والتاني 1 ml والتنين نفس السعر.

هون بيخطر بالبال أنو أكيد رح جيب يلي حجمو 1 ml لأنو حجمو أكبر ونفس السعر فبتوقف عليي أرخص بكتير، بس لا أحبائي ماعم نشتري بطاطا.... هون الشغلة مو بالكيلو....ليش؟؟؟

- عندما تُم إجراء التفاعل وُجِد أنه يحتاج إلى 1 ml من الكاشف الأول أو 50 ul من الكاشف الثاني، والسبب أن التفاعل لا يعتمد على الحجم المأخوذ من الكاشف بل على كمية الأنزيمات الفعالة ضمن هذا الكاشف ويتم تحديد كمية الأنزيمات الفعالة عن طريق ما يسمى الفعالية النوعية.

الفعالية النوعية Specific activity

- هي فعالية الأنزيم (أو البروتين) نسبة إلى تركيز البروتين الكلي، أي أنها ناتج قسمة فعالية الإنزيم Enzyme activity على كمية البروتين Amount of protein.
- ترتفع هذه القيمة كلما كانت نقاوة البروتين أكبر ← تكون عالية في حال البروتينات المُنقَّاة بالاستشراب بالإلفة، وأقل في حال البروتينات المنقاة بالاستبعاد أو بمبادلة الشوارد.

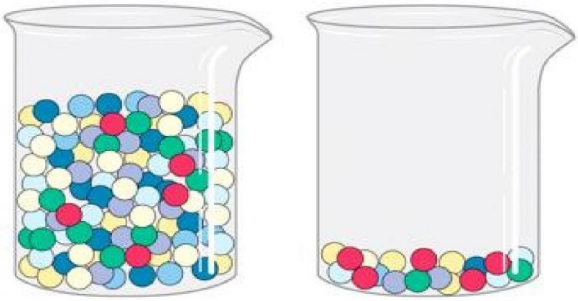
وتُعرّف فعالية الأنزيم بأنها كمية الإنزيم اللازمة لتحويل كمية معينة من الركيزة إلى مُنتج.

الفعالية activity في الجدول تدل على فعالية البروتين المرغوب في رشاحة البروتين الكلي وتقدر الفعالية النوعية بـ(Units/mg).
لا نهتم بكمية البروتين بقدر ما نهتم بالكمية الفعالة منه، لاحظ الجدول التالي:

TABLE 3–5 A Purification Table for a Hypothetical Enzyme

Procedure or step	Fraction volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

Note: All data represent the status of the sample *after* the designated procedure has been carried out. Activity and specific activity are defined on page 94.



Specific activity=
enzyme activity / amount of protein (mg)

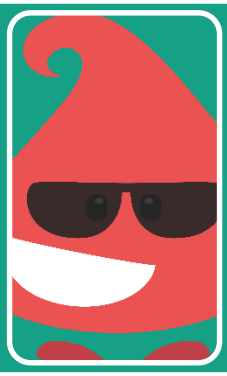
- **الحجم الكلي للسائل الطافي[1]: يساوي 1400 مل وتحوي 10.000 ملغ من البروتين الكلي، وبالنسبة للفعالية تساوي 100.000، فالفعالية النوعية تكون:**

Activity/Total Protein = 100.000/10.000 = 10 Units/mg

أي كل 1 ملغ بروتين يحتوي على 10 وحدات فعالة فقط.

- **تُم أخذ نفس الحجم من المحلول وتنقيته بعدة طرق موضحة في الجدول، وبعد التنقية نأخذ الرشاحة المُنقَّاة (التي ستكون ذات حجم أقل من الرشاحة البدئية) ونحسب نسبة البروتينات الكلية وفعالية البروتين المرغوب والفعالية النوعية له.**
- **نلاحظ انخفاض حجم الرشاحة (280 مل) عند الترسيب بالملح بسبب ترسب الكثير من البروتينات ← ستكون كمية البروتينات الكلي أقل، وعند قياس الفعالية الأنزيمية كانت 96.000 وحدة.**

[1] يُقصد بالسائل الطافي: السائل الذي حصلنا عليه بعد القيام بعملية استخلاص البروتين من الخلايا (أي بعد التحطيم والتنبيذ) ويُشار إليه في الجدول بمصطلح crude.



مما يعني أننا رسَّبنا 4٪ من البروتين المرغوب، ولكن في المقابل رسبنا حوالي 7000 ملغ من البروتينات غير المرغوبة

- لذلك نلاحظ زيادة الفعالية النوعية *ثلاث* أضعاف بسبب زيادة نسبة البروتين المرغوب نسبة إلى البروتين الكلي بعد الترسيب أي زادت النقاوة.

بطريقة IEC أصبح الحجم 90 مل والبروتين الكلي 400 والفعالية الأنزيمية 20.000والفعالية النوعية 200.

أما بطريقة SEC أصبح الحجم 80 مل والبروتين الكلي 100 ملغ والفعالية الأنزيمية 60.000 والفعالية النوعية 600.

أما بطريقة الاستشراب بالألفة نلاحظ أن الفعالية النوعية وصلت حتى 50.000 أي ازدادت 1500 ضعف عن فعالية الخلاصة الخلوية قبل التنقية.

إذا نستنتج أن الحجم ليس هو المهم؛ بل كمية الأنزيم أو البروتين الفعال ضمن هذا الحجم

فهذا البروتين أو الأنزيم لن يكون لوحده؛ بل سيكون هناك العديد من البروتينات، لذلك نعتمد على قياس الفعالية النوعية وليس فقط الفعالية الأنزيمية.

أعزائي إلى هنا تنتهي طريقة تنقية البروتينات بالاستشراب بالألفة والتي ضمَّت قسمَين:

A. الترسيب المناعي.

B. الارتباط بالبروتين المُندَمِج[2].

أمَّا الآن فسنتابع طرق تنقية البروتينات ولكن قبل البدء نودُّ أن نذكِّركم بها...

2 نودُّ التنويه هنا أعزائي إلى أنَّنا اعتبرنا خطأً أنَّ طريقة الارتباط بالبروتين المُدمَج طريقة مُنفَصِلة عن الاستشراب بالألفة ولكن سيرد تصحيح في ذلك في نهاية هذه المحاضرة.

أهم طرق تنقية البروتينات methods of protein purification:

1. طحن/سحق الخلايا Grinding of cells والتنبيذ التفاضلي Differential Centrifugation.

سنضطرُّ لسحق الخلايا في حال كانت تلك الخلايا غير مُفرزَة للبروتين الذي ننتُجِهُ بها ← نطحن الخلايا لتخريب الغشاء الخلوي ← نطبّق طرق التنقية.

2. الترسيب بالملح Salting out والترسيب بالمحل Solvent precipitation:

3. الاستشراب على العمود Column Chromatography:

- الاستشراب بالاستبعاد الحجمي Size Exculusion Chromatography (SEC) (Gel Chromatography).
- الاستشراب المبادل للشوارد Ion Exchange Chromatography (IEC).
- الاستشراب بالألفة Affinity Chromatography:

الارتباط بضد البروتين المدمج + الارتباط بالضد أو اللجين

4. طرق أُخرى:

Iso Electric Focusing (IEF)
التبئير متساوي الشحنة (البأر متساوي التكهرب)

+

الرحلان الكهربائي ثنائي الأبعاد 2D Gel Electrophoresis.

شرحنا جميع الطرق السابقة ووصلنا للطرق الأخرى المُستَخدَمة بالتَّنقية.....دعونا نتابع....

أولاً: Isoelectrical Focusing (IEF)
التبئير (البأر) متساوي التكهرب (متوازي الشحنة)

- تُعرَّف نقطة تساوي التكهرب Isoelectrical Point (PI) بأنها درجة الـPH التي تتساوى عندها الشحنات الموجبة والسالبة في جزيء البروتين ويكون البروتين غير مشحون، وتُحسَب ببرامج خاصة.
- عند نقطة الـPI يكون البروتين **قريباً من الترسُّب** بسبب عدم امتلاكه لشحنات تمكِّنه من التآثر مع الشوارد الموجودة في المحلول، ويمكن للأملاح أن تثبِّط التآثرات بين جزيئات البروتينات نفسها وتعزِّز بذلك تكدُّس البروتينات aggregation وترسيبها precipitation.

يمكن استخدام نقطة الـPI للبروتينات لترسيبها (أي يمكن ترسيب البروتينات بتعديل الـPH ومنع التآثرات بينها).

- كما يمكن اعتماد الاختلاف في نقاط الـPIs بين البروتينات لفصلها وتنقيتها في درجات PH معينة، **وهو الأساس لتقنية التبئير متساوي الشحنة (التكهرب)** IEF والتي تُستَخدم عادة كخطوة في *الرحلان الكهربائي ثنائي الأبعاد*.

عرفنا سابقاً أنَّه في طرق تنقيةٍ سابقة كنَّا نرسِّب البروتين الهدف درجة Ph معيَّنة أو البروتينات الغير مرغوبة ثمَّ ننقِّي البروتين الهدف..... الآن سنعتمدُ على درجة الـ Ph ولكن هناك عاملُ جديد سيُضفي دقَّة كبيرة للتنقية....

- يتم فصل البروتينات في تقنية IEF باستخدام هلامة تحتوي على مدروج من درجات الـPH بحيث **تتوزع البروتينات وفقاً لشحنتها** بين القطبين السالب والموجب إلى أن تصل إلى منطقة Ph تتساوى عندها الشحنات **الكُليَّة** في البروتين، وبالتالي يصبح غير قادراً على الرحلان نحو أي قطب منهما.

أي بمعنى آخر العاملان المؤثِّران على الرحلان متساوي التكهرب:

مدروج الـ Ph + الشحنة بسبب وجود القطبين السالب والموجب

لاحظوا IPs الخاصة ببعض البروتينات في الجدول التالي:

- الـpepsin يملك PI منخفضة لأنه أنزيم معديّ يتواجد ضمن وسط حمضي ← نقطة ترسيبه منخفضة.
- أما الـLysozyme و Chymotrypsinogen يملكان PI مرتفعة لتواجدهما ضمن وسط قلوي.

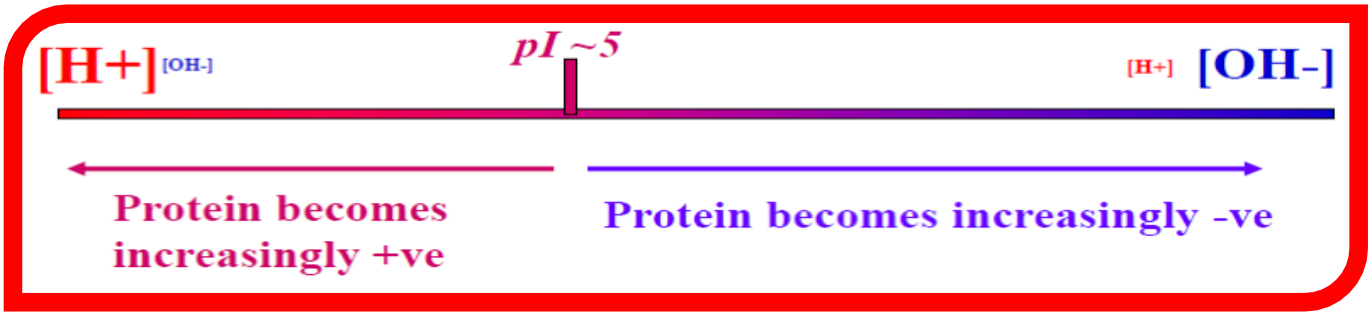
TABLE 3–6 The Isoelectric Points of Some Proteins

Protein	*pI*
Pepsin	<1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β-Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome *c*	10.7
Lysozyme	11.0

الخطوات:

- تُحضَّر هلامة gel تحوي مدروج تراكيز من شوارد الهيدروجين (بروتونات) بحيث تكون:

حامضية جداً من جهة وقلوية من الجهة الأخرى.



- نلاحظ كما في الصورة أن:

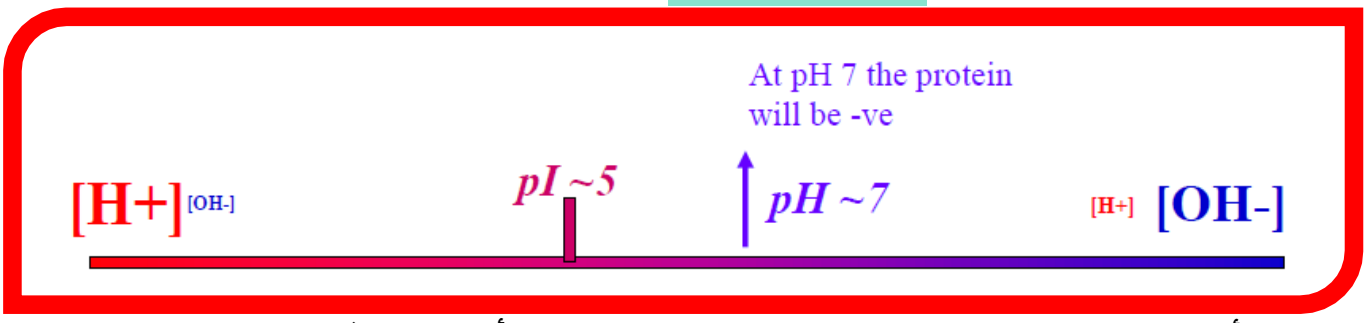
الجهة اليُمنى تكون قلوية أي Ph مرتفع وتركيز $[OH^-]$ مرتفع ويوضع القطب السالب.

الجهة اليسرى تكون حامضية أي Ph منخفضة وتركيز $[H^+]$ مرتفع وهنا أيضاً يوضع القطب الموجب (+).

ملاحظات:

☒ عادة ما توضع البروتينات منتصف الهلامة فتبدأ بالرحلان، حيث يرحل كل بروتين نحو القطب المعاكس لشحنته.

☒ يمكن أيضاً وضع البروتينات عند أحد الأقطاب.



☺ لنفرض أننا وضعنا بروتين تغلب عليه الشحنة الموجبة لأنه غني بثمالات الليزين والأرجنين ← عند إجراء الرحلان سينتقل نحو القطب السالب ولكن عند نقطة معينة سيتوقف ولن يكمل الرحلان.

ما السبب يا تُرى؟؟؟؟

بانتقال البروتين نحو القطب السالب أصبح ضمن المنطقة التي يرتفع فيها تركيز شوارد الهيدروكسيل

↓

كلما اقترب من القطب السالب أكثر كلما ازدادت شوارد الهيدروكسيل المحيطة به وهذه الشوارد سالبة الشحنة ستعمل على تعديل شحنة البروتين

↓

عندما يصل البروتين إلى منطقة يكون فيها تركيز شوارد الهيدروكسيل كافٍ لتغطية كامل شحنة البروتين، سيتوقف عن الرحلان (أصبح معتدل الشحنة)

↓

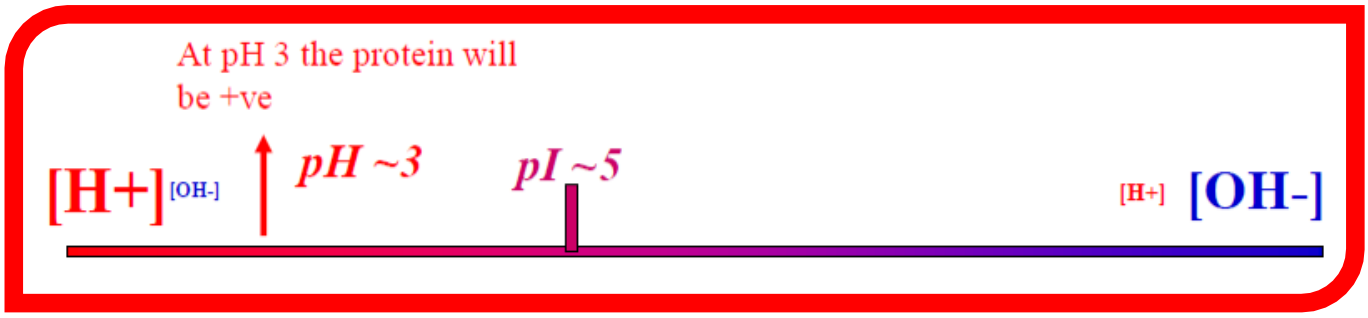
هذه النقطة التي توقف عنها البروتين تسمى نقطة تساوي التكهرب IP.

☺ ليكن لدينا بروتين أحدهما يحوي ثمالتي أرجنين والآخر يحوي أربع ثمالات أرجنين (شحنته الموجبة أكبر)، فالسؤال الذي يطرح نفسه هنا:

عند إجراء رحلان لهذين البروتينين فأيهما سيرحل لمسافة أكبر؟

البروتين ذو الأربع ثمالات أرجنين بالتأكيد، لأن شحنته الموجبة أكبر فسيحتاج تركيز أعلى من شوارد الهيدروكسيل لتعديل شحنته.

العكس صحيح بالنسبة للبروتينات التي تغلب عليها الشحنة السالبة.



فمثلاً بروتين يحوي العديد من ثمالات الغلوتامات ← ستغلب عليه الشحنة السالبة وعند إجراء رحلان كهربائي لهذا البروتين سيرحل نحو القطب الموجب، ويتوقف عندما يصبح تركيز شوارد الهيدروجين المحيطة به كافٍ لتعديل شحنته.

وهذه النقطة التي سيتوقف عندها البروتين هي IP.

نستنتج أنَّ الرحلان متساوي التكهرب أدق من الرحلان العادي لأننا بالرحلان العادي نستخدم الـSDS لجعل جميع البروتينات ترحل نحو القطب الموجب فيصبح الرحلان يعتمد فقط على الوزن الجزيئي.

سنجمع أفكارنا.....

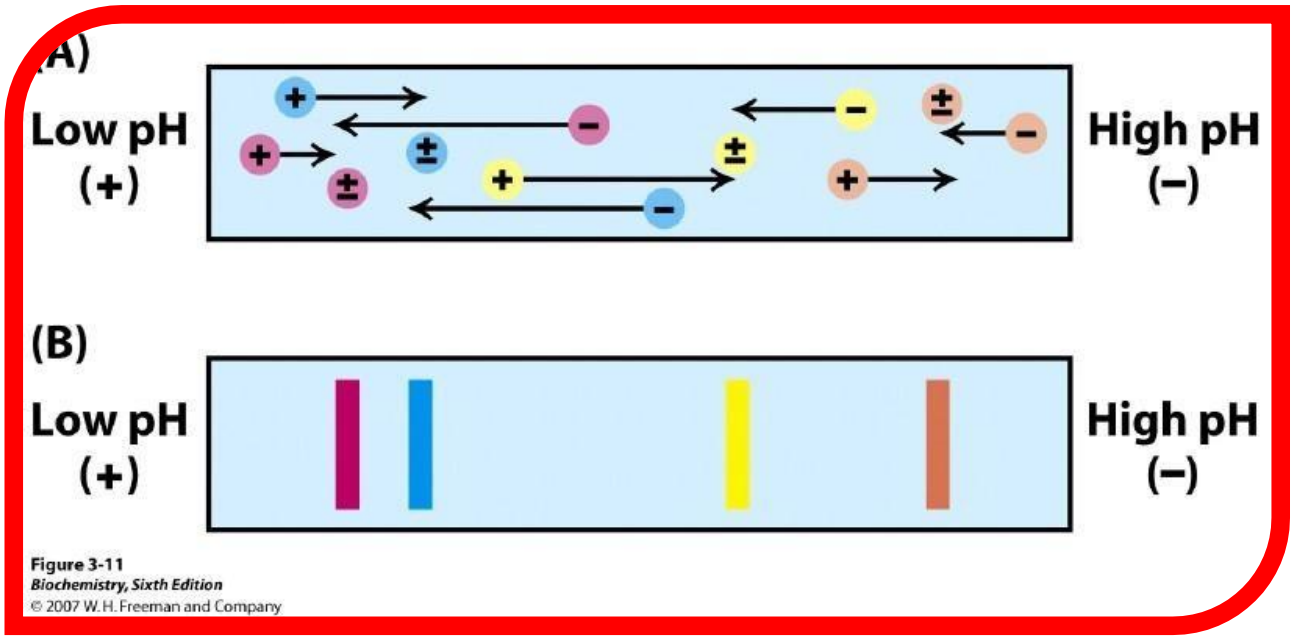
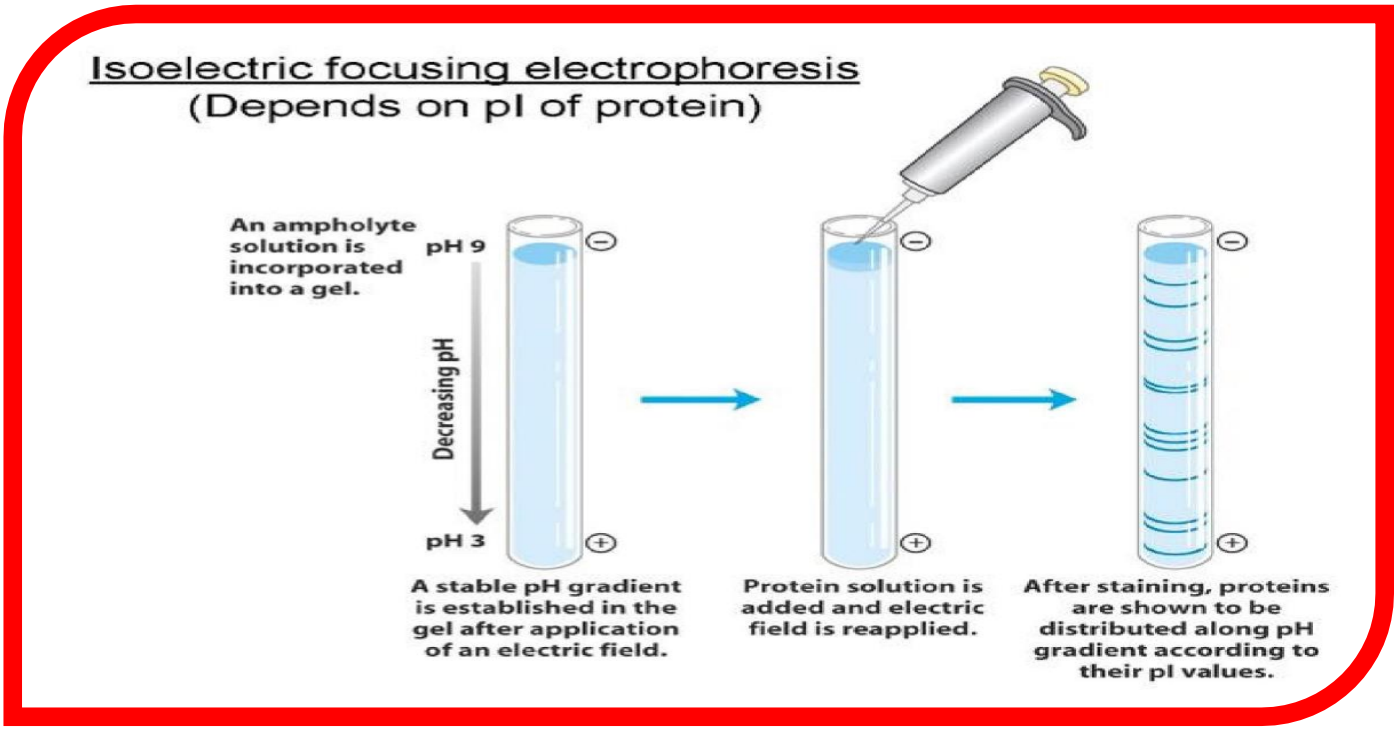


Figure 3-11
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

أيضاً لدينا هلامة للرحلان متساوي التكهرب:

- في الصورة الأولى نلاحظ أن كل بروتين، يُمثَّل بدائرة مرتبطة بسهم يشير إلى نقطة PI التي سيتوقف عندها البروتين.
- نلاحظ أن كل عصابة تمثل بروتينَين أحدهما مشحون سلباً والآخر إيجاباً ولكن توقفا في المكان ذاته لامتلاكهما نقطة تساوي التكهرب ذاتها فتظهر بشكل عصابة واحدة.

توضح هذه الصورة عملية التبئير متساوي التكهرب: (من اليسار لليمين)



الصورة الأولى

توضّح تحضير الهلامة في أنبوب وفي قعره يوضَع القطب الموجب وعند الفوهة يوضَع القطب السالب.

نلاحظ انخفاض الـPH عند الاتجاه من القطب السالب نحو القطب الموجب أي ارتفاع تركيز شوارد الهيدروجين كلما اتجهنا نحو القطب الموجب.

الصورة الثانية

بعد تحضير الهلامة وُضع محلول البروتينات عند القطب السالب وتم تطبيق حقل كهربائي لبدء الرحلان

الصورة الثالثة

بعد الانتهاء من *الرحلان* وإظهار العصابات التي تدل على مكان تواجد البروتينات، نجد أن البروتينات تم فصلها بحسب النقطة تساوي التكهرب لكل بروتين.

هذه الهلامة التي فصلنا بها البروتينات حسب IP يتم أخذها كما هي وتوضع على هلامة أخرى، وهذه الهلامة الجديدة كالهلامة المستخدمة في الرحلان الكهربائي العادي أي لا تحوي تراكيز مختلفة من شوارد الهيدروجين، إنما فقط قطب سالب وقطب موجب ← سترحل البروتينات (التي رحلت أول مرة حسب IP) مرة أخرى حسب الوزن الجزيئي.

توضيح: البروتينات رحلت مرتين:
- الأولى حسب الـIP
- الثانية حسب الوزن الجزيئي

وهذا ما يسمى بالرحلان الكهربائي ثنائي الأبعاد

ملاحظة:

عملية التبئير متساوي التكهرب هي خطة أولى للقيام بالرحلان ثنائي الأبعاد.

ثانياً: 2D Gel Electrophoresis (2D GE)
الرحلان الكهربائي ثنائي الأبعاد

تعتمد تقانة 2D GE على خطوتين، يتمُّ في كل منهما فصل البروتينات حسب خواصها المختلفة :

في الخطوة الأولى: تُفصل البروتينات بالتبئير متساوي الشحنة وباستخدام مدروج من درجات الباهاء[3].

← في الخطوة الثانية: تفصل البروتينات بالرحلان الكهربائي تبعاً لاختلاف أوزانها الجزيئية.

غالباً ما يجرى رحلان كهربائي أفقي في الخطوة الأولى ← تؤخذ الهلامة ((الحاوية على البروتينات المفصولة تبعاً لنقاط PI المختلفة)) لتلك البروتينات وتوضَع على سطح هلامة ثانية شاقولية يتم بواسطتها تطبيق الرحلان الكهربائي العادي standard الذي يفصل البروتينات تبعاً **لأوزانها الجزيئية**.

3 نوَّه الدكتور إلى أننا في هذه الخطوة قد نجد أكثر من بروتين (بروتينات متراكمة) لامتلاكها نفس نقطة تساوي التكهرب بالرغم من اختلافها بالوزن الجزيئي وهذا ما دفعنا للخطوة الثانية.

- تكمن الفائدة الجمّة من تطبيق **2D-GE** في فصل دقيق للبروتينات عن بعضها البعض، وتعد هذه التقانة إحدى المرتكزات الأساسية لـ:

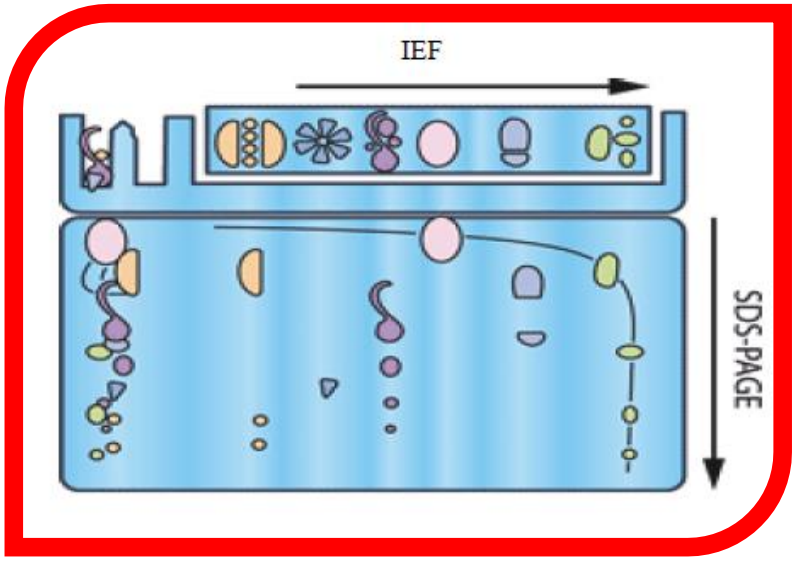
A. لدراسة البروتيوم proteome لخلايا أو نسج معيّنة.

B. أو لدراسة التغيّر في التعبير الجيني بين شروط مختلفة، حيث يلاحظ ظهور أو اختفاء عصابات البروتين لدى تعرُّض الخلايا لظروف مختلفة (غذاء، دواء، شدّة stress، إلخ).

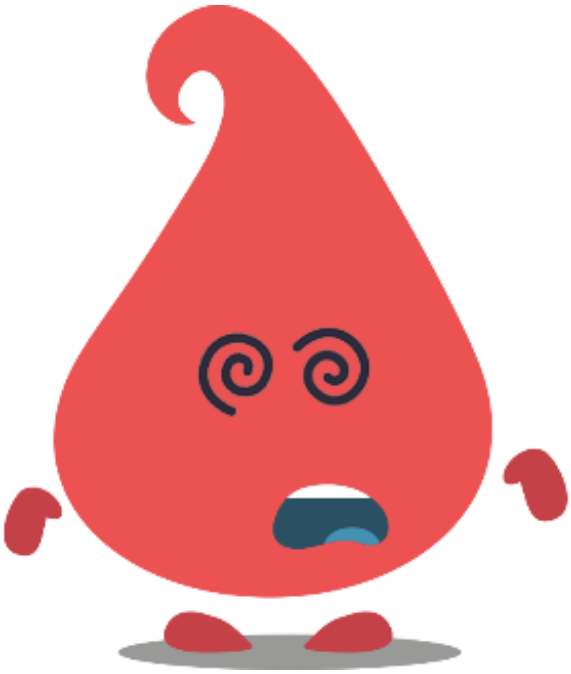
ملاحظة: الهلامة المستخدمة في الخطوة الثانية هي SDS-PAGE، أي أنها تعطي شحنة سالبة لكل البروتينات حتى يتم الفصل بالاعتماد على الوزن الجزيئي فقط.

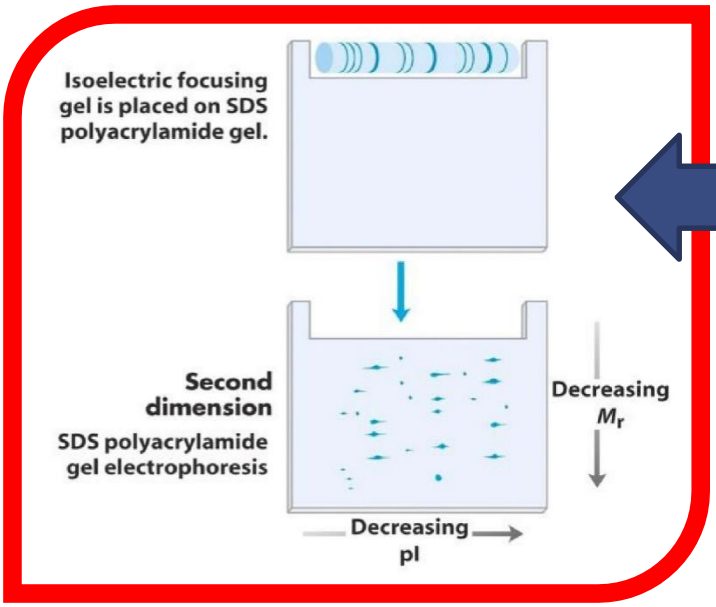
سيخطر في بالنا أنَّه ما الهدف من القيام بكل هذه المراحل؟

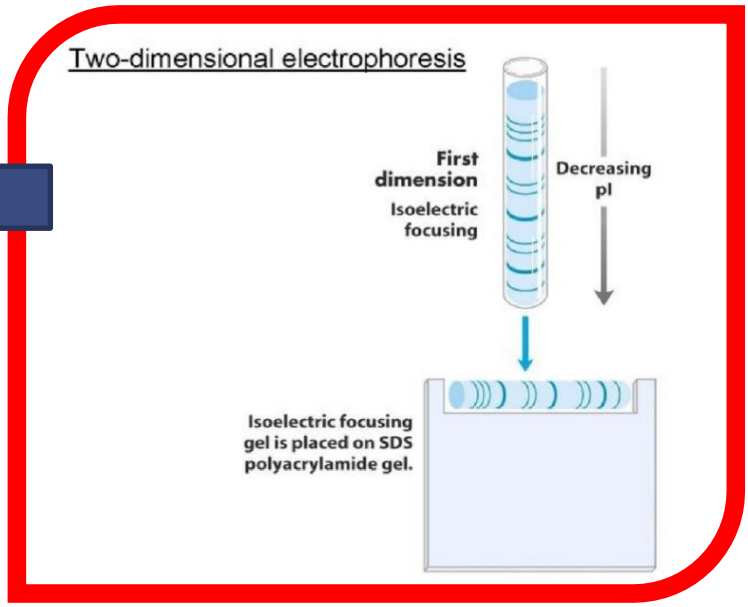
- عند فصل البروتينات في الرحلان وحيد البعد (IEF أو SDS_PAGE) تتم عملية الفصل بناءً على *صفة معينة*، وقد يتشابه أكثر من بروتين في هذه الصفة فيعطي البروتينان عصابة واحدة (مثل ما شفنا قبل بشوي ممكن نشوف أكثر من بروتين بنفس نقطة تساوي التَّكهرُب أو بنفس الوزن الجزيئي مثلاً)، أما بهذه الطريقة يتم الفصل بناءً على أكثر من صفة فتكون الدقة أكبر.



- بعد القيام بعملية IEF لمجموعة بروتينات كانت بعض العصابات لأكثر من بروتين لأنها تملك الـIP ذاتها، ولكن بعد القيام بـSDS_PAGE نلاحظ انفصال بروتينات العصابة الواحدة عن بعضها بسبب اختلاف وزنها الجزيئي.







توضح هذه الصور مراحل 2D GE:

IEF ← SDS_PAGE ← عملية الإظهار

بعد الإظهار لن نرى عصابات بل لطخات، وكل لطخة تدل على مكان بروتين الذي يختلف حسب: ***PI البروتين ووزنه الجزيئي***.

← كلما انتقلنا من اليسار لليمين تتناقص PI البروتينات أي:
☜ بروتينات الجهة اليسرى من الهلامة تملك PI مرتفعة
☜ بروتينات الجهة اليمنى وتملك PI منخفضة.
← كلما انتقلنا من الأعلى إلى الأسفل يتناقص الوزن الجزيئي.

يا تُرَى هل ستختلف نوعيّة البروتينات التي تعبِّر الخلايا أو البكتيريا باختلاف نوعِ المواد التي تتغذّى عليها؟؟؟؟؟.....دعونا نعرف الجواب في تجربتنا هذه.....

توضح الصورة عملية الرحلان الكهربائي ثنائي الأبعاد لجميع البروتينات الخلوية، وقد أُخِذت هذه الصورة بعد القيام بتجربة على البكتريا وذلك بتغيير مصدر الكربون أو الغذاء:

في حال حبّيتو تشوفوا الألوان نزلوها pdf

في المرحلة الأولى:

تم تغذية البكتريا بالـAcetate وبعدها تم إجراء رحلان كهربائي ثنائي الأبعاد 2D-GE للبروتينات التي عبَّرت عنها البكتريا بعد التغذية، ومن ثم تمَّ إظهار اللطخات وتصويرها.

في المرحلة الثانية:

تم تغذية البكتريا بالفورمات formate وتم إجراء 2D-GE للبروتينات التي عبرت عنها البكتريا بعد التغذية، وأيضاً أُظهِرَت اللَّطخات وتم تصويرها.

عند الانتهاء من المرحلتين كان لون اللطخات الناتجة عن الأسيتات ← أحمر

عن الفورمات ← أخضر

ووُضِعَت الصورتان فوق بعضهما.

في الصورة لدينا لطخات بثلاثة ألوان:

اللطخات السوداء	• تعود لبروتينات لا يختلف التعبير عنها حتى لو اختلف نوع التغذية.
اللطخات الخضراء	• تعود لبروتينات جديدة تعبرعنها البكتريا فقط عند التغذية بالفورمات.
اللطخات الحمراء أو الزهريّة اللون	• تعود لبروتينات تُنتَج فقط في حال تم تغذية البكتريا بالأسيتات.

ولكن يا تُرى ما أهميَّة مثل تلك التجربة لنا؟؟؟؟

- تظهر أهمية ما سبق عند تطبيق التقنية السابقة لمعرفة الفرق بين إنتاج خلية سرطانية من البروتينات وبين خلية طبيعية، فمن المنطق مثلاً أن نجد أنَّ التعبير عن جينات البروتينات المولدة للورم oncogenes سيزداد في الخلية السرطانية بينما سينخفض التعبير عن جينات البروتينات الكابحة للورم.....ماذا يعني ذلك؟؟
يعني وجود بروتين معيَّن مثلاً يتمُّ التعبير عنهُ بشكلٍ كبيرٍ عند الخلايا السرطانيَّة مع التعبير عنه بشكل قليل جداً عند الخلايا الطبيعيَّة ← سيشكِّل البروتين هدفاً علاجيّاً أو دوائيًّاً Drug target.
- من الممكن معرفة البروتين وفصله عن البروتينات الخلويَّة الأخرى بإجراء 2D-GE ومن ثمَّ نقوم بمعرفة تسلسل الحموض الأمينيَّة الخاصَّة بالبروتين من خلال تقنيَّات عديدة منها HPLC ولكنَّه أمرٌ صعبٌ جدّاً ويحتاج لخبرة كبيرة جداً، لذلك نلجأ لمعرفة تسلسل الـDNA أو عند الشكِّ بهويَّة البروتين نلجأ لتقنيَّة الـ Silencing RNA.

Silencing RNA تعني أن نُصمِّت الـ mRNA الخاص ببروتين معيَّن[4] بطريقةٍ ما وفي حال لم تظهر لطخة spot للبروتين ← توقُّعي لهويَّة البروتين صحيح.

ملاحظة من الأرشيف:
كما تظهر أهميته في أننا بعد تحديد تسلسل الحموض الأمينية لبعض البروتينات المنتجة في الخلايا السرطانية يمكن لنا الرجوع منها للجينات المعبرة عنها بدراستها، وهذه الطريقة أسهل بكثير من دراسة mRNA كله أو الـDNA للخلية السرطانية بشكل مباشر لأننا كما نعلم في البروتين النهائي حتى نصل إليه ممكن أن نمر بالعديد من التعديلات.

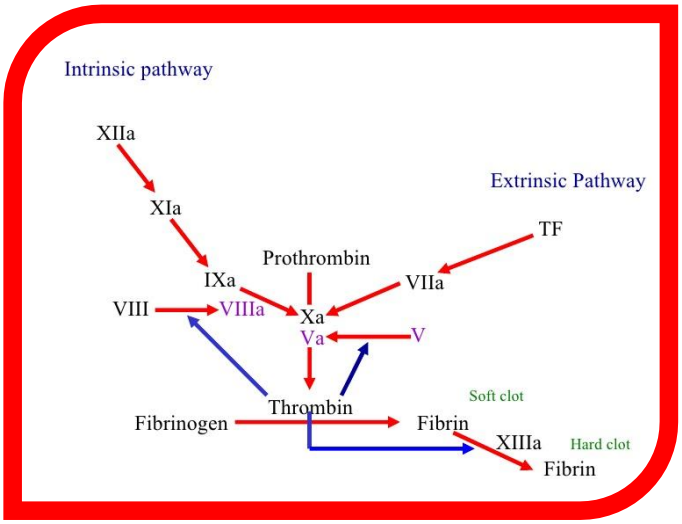
إلى هنا ننتهي من تنقية البروتينات والآن سنتحدَّث عن موضوع جديد هو الناعور....وجب التنويه إلى أن جميع الصور الموجودة في الصفحات التالية مصدرها من النت وليس من سلايدات الدكتور لأنَّه لم يُعطِنا إياها....كما أن الدكتور نوَّه إلى أن عدد الأسئلة من فقرة الناعور سيكون قليل ((كم سؤال مشان ينعرف مين عم يحضر))...بالتوفيق

4 طبعاً نحنا هنا يكون لدينا توقُّعٌ أوَّليٌ لهويَّة البروتين ونعرف الـ mRNA الخاص به ونريد التأكُّد فقط.

Hemophilia الناعور

- ينتج مرض الناعور عن عوز أحد عوامل التخثر (التاسع hemophilia B FIX أو الثامن hemophilia A FVIII)[5].
- قد تم تصنيع عوامل التخثر وإعطائها لمرضى الناعور لتعويض هذا النقص، ولكن هذه العوامل هي بروتينات مما سبب رد فعل مناعي نحوها لأن جسم مريض الناعور لم يسبق له وتعرف على هذه العوامل.

ملاحظة: خطورة مرض الناعور لا تقتصر على النزف فقط بل على ما ينتج من هذا النزف أيضاً، فمثلاً يترسب الحديد ضمن المفاصل ويسبب التهاب مفصل شديد لا يكون علاجه إلا بتبديل المفصل.



تذكر:

شلال التخثر يتكون من: سبيل داخلي وسبيل خارجي ← يلتقيان عند العامل العاشر ← فتتشكل الخثرة.

- السبيل الخارجي هو الذي يقدح زناد السبيل الداخلي (أي يفعِّله) حيث أن السبيل الخارجي يشكل خثرات ولكنها ليست متماسكة، وهذه الخثرات الغير متماسكة لن تصمد أمام تدفق الدم وضغطه ← ستزول الخثرة ويستمر النزف.
- أما السبيل الداخلي، فبالإضافة لتشكيل الخثرات مع السبيل الخارجي، فهو أيضاً يمنح هذه الخثرات تماسك.

فيما يلي تجارب لعلاج مرض الناعور.....

تجربة أولى: علاج مرضى الناعور B بالعامل التاسع

أجرى بعض الباحثون تجربة في المعالجة الجينية Gene Therapy لمرض الناعور، حيث تم نقل الجين المعبر عن العامل التاسع إلى جينوم فايروس ومن ثم إعداء الخلايا الكبدية لمريض ناعور.

[5] العوز نتيجة طفرة بالجينات المرمِّزة لهذه العوامل.

عندها ستبدأ الخلايا الكبدية بإنتاج العامل التاسع على الرغم من أن مستوياته منخفضة (لا تتجاوز 8٪) إلا أنه يخفض مستوى الخطورة عند هذا المريض وينقله من مستوى شديد الخطورة sever إلى مستوى متوسِّط moderate or mild.

عوامل التخثر يجب إنتاجها حصراً في الكبد ولا يتم إعداء خلايا غير كبدية بالفايروس.

بدايةً سنستغرب هل يكفي نقل مستوى الخطورة من sever ← mild؟؟

الفرق بين المستويين أن مريض الـ mild لا يملك اختطارات نزوف تلقائيَّة، إلَّا بحال تعرُّضه لعمل جراحي فمن المحتمل أن ينزف بشكل كبير، ولكن تُعتَبَر الحالة ضمن السيطرة.

أما بالنسبة لمريض Sever فإنَّ ما نخشاه هو نسبة تعرُّضه لنزوفات تلقائيَّة، ومنها ما يكون داخليّاً وبالتالي احتمال الوفاة أكبر.

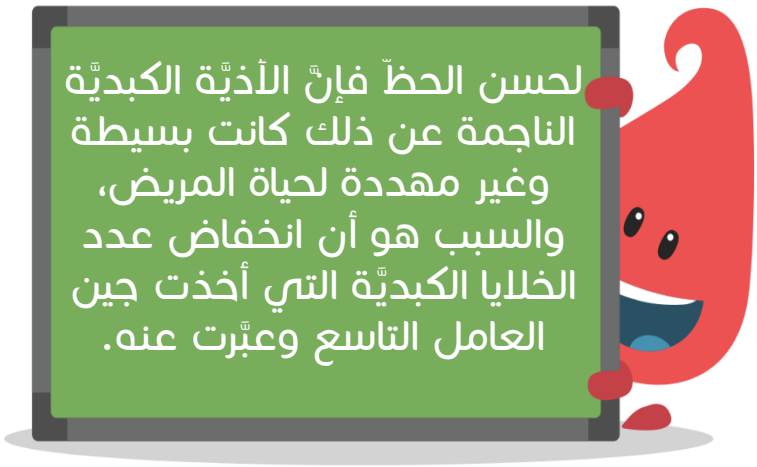
بالعودة لتجربتنا: لاحظنا بعد فترة أن العامل التاسع بدأ بالانخفاض وبدأت الأنزيمات الكبدية بالارتفاع؛ فما هو السبب؟

قبل أن نبدأ بالحديث عن السبب...علينا أن نعلم أن الخلايا الكبديّة هي فقط من يقوم بالتعبير عن العامل التاسع في تجربتنا والسبب هو أننا قمنا بربط جين العامل التاسع بـ promoter خاص بالخلايا الكبديَّة لذلك لم يتمّ التعبير عنه في خلايا أخرى...

بشكلٍ عام هنالك ما يُدعَى Tissue Specific promoter أي promoter خاص بالنسيج، فلكل خلايا نسيج promoter خاص بها، وهو السبب بالتعبير عن عوامل التخثر في الخلايا الكبدية دون الخلايا الأخرى.

بالنسبة لتجربتنا، اعتُقد بالبداية أنَّ السبب هو تعرُّف الخلايا المناعيَّة للخلايا الكبديَّة المُنتِجة للعامل التاسع ومهاجتمها (أي أن السبب الرئيسي هو العامل التاسع).

لا ننسى أن الجملة المناعيَّة الخاصَّة بمريض الناعور بعوز العامل التاسع لم تتعرَّف من قبل على العامل التَّاسع، لذلك فإنّه يُعتَبَرُ مستضداً بالنسبة لها ← ما يحرِّضها لمهاجة الخلايا المُنتِجة له بهدف حماية الجسم.



لحسن الحظّ فإنَّ الأذيَّة الكبديَّة الناجمة عن ذلك كانت بسيطة وغير مهددة لحياة المريض، والسبب هو أن انخفاض عدد الخلايا الكبديَّة التي أخذت جين العامل التاسع وعبَّرت عنه.

فيما بعد؛ تبيَّن أن السبب الرئيسي لمهاجمة المناعة للخلايا الكبديَّة ليس إنتاجها للعامل التاسع؛ بل هو السبب هو الكابسيد الخاص بالفيروس[6] الناقل vector فهو كان المحرِّض الأساسي لذلك....فقد قامت الخلايا المناعيَّة بتتبُّع الكابسيد وصولاً للخلايا الكبديَّة وهاجمتها.

في كلتا الحالتَين هنالك أذيَّة كبديَّة سبَّبت ارتفاع الخمائر.

لذلك لا بد من اللجوء لطريقة تساعد على إيقاف رد الفعل المناعي، وحالياً تم أخذ الموافقة لإعادة التجربة باستخدام بريدنيزولون لمدة شهر حتى يمنع حدوث رد فعل مناعي إلى حين انتهاء دورة حياة الفايروس وتلاشي الكابسيد.

وفي النّهاية نجحت التجربة تمّ الحصول على مستويات جيِّدة من العامل التَّاسع (4-10٪) كانت كفيلة بنقل المريض لمستوى mild.

طيب إذا اطلعنا على الصورة الأكبر ....بنفكر أنو ليش ما بنعمل بمعالجة جينية لمرضى السكري كمان؟

لأنه في حال قامت الخلايا بالتعبير عن كمية كبيرة من الأنسولين فإن المريض قد يموت بـ hypoglycemia، أما مرضى الناعور لن تحصل وفاة حتى لو تم إنتاج كمية كبيرة من العامل التاسع وذلك لأن المجال العلاجي واسع.

تجربة ثانية: علاج الناعور باستخدام العامل السابع الفعَّال VIIa

تتواجدُ عوامل التخثُّر بشكل Zymogen[7] أي بشكل غير فعَّال (تكون منحلَة وموجودة بالدم ولكنها غير فعالة) وتتفعَّل مباشرةً عند وجود أذيَّة نسيجيَّة.

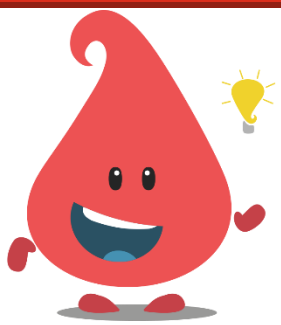
بالنسبة للطريق الخارجي فإنَّه يتفعَّل بدايةً عن طريق Tissue Factor (TF) حيث يشكِّل معقَّداً مع العامل السابع.

إثرء للتوضيح: Tissue Factor (TF) هو مستقبل عابر للغشاء خاص بالعامل السابع (سواء أكان العامل السابع المُنتَج بالجسم أو الذي نستخدمه عند العلاج VIIa) ويتمّ التعبير عن TF من قبل الخلايا المحيطة بالأوعية الدّمويَّة، حيث تشكِّل الخلايا البطانيَّة endothelium حاجزاً فيزيائيًّا يمنع ارتباط الـ TF بالعامل السابع الجائل في الدَّوران بهدف منع تفعيل شلالات التخثُّر بالحالات الطبيعيَّة أي دون وجود أذيَّة ← بالتالي عند حصول أذيَّة سينكسر هذا الحاجز ← يرتبط TF بالعامل السابع ← تفعيل سريع لشلال التخثُّر.

6 الفيروس الناقل هو Adeno-associated virus – AAV.
7 طلائع خاملة inert precursor من العوامل.

TF هو عامل خارجي المنشأ ضروري لتفعيل عوامل التخثُّر في البلازما (أي يتطلَّب التفعيل تماس البلازما مع شيء خارجي) لذلك تم اعتبار طريق التخثُّر ((خارجي)) في هذه الحالة.

عند ارتباط العامل السابع بالـ TF فإنّه سيتحوَّل من شكله الغير فعَّال Zymogen إلى شكله الفعَّال.



بالتالي السؤال الذي يطرح نفسه هنا: هل العلاج بالعامل السابع oral Factor VII يجب أن يكون بشكله الفعال مباشرة أم بالشكل غير الفعال؟

حقيقةً أصدقائي أنو لازم يكون بالشكل الفعَّال ولكن بتراكيز منخفضة، حيث وُجد بالتجارب أن الشكل غير الفعَّال يحتاج فترة طويلة حتى يبدأ بالعمل ← بالتالي ستكون هنلك مشاكل بديناميكيَّة تشكُّل الخثرة.

ملاحظة: مريض الناعور قد يتشكل لديه خثرات ولكن هذه الخثرات غير متماسكة مما يسبب استمرار النزف.

نعود إلى التجربة:

- يتم التعبير أولاً عن العامل السابع بالهندسة الجينية[8].
- باستخدام Site-direted- mutagenesis وضعنا تسلسل[9] sequence يشفر 6 حموض أمينية هي:

أرجنين ← ليزين ← أرجنين ← أرجنين ← ليزين ← أرجنين

- تتعرَّف intracellular protease (بروتياز داخل الخلية) على هذا التتالي اسمها paired amino acid–cleaving enzyme (PACE)/furin حيث يشكِّل هذا التتالي موقع شطر بالنسبة لها cleavage site.

ملاحظة: يُطلَق على آي تسلسل آو تتالي تمّ إدخاله لجين ما باسم transgene

[8] الـ promoter المُستَخدم عبارة عن sequence لا ترتبط به سوى عوامل الالتصاق الكبدية، وبالتالي حتى لو رحل الجين إلى خلايا غير كبدية فلن يتم التعبير عنه --> وهي نقطة إيجابية.....

[9] علماً أنّ هذا التسلسل أو التتالي هو من طبيعة العامل السابع، أي أنّه وُضِعَ في الموقع الذي تتعرَّفُ إليه البروتيازات الداخل خلويَّة بطبيعة الحال ((إثراء: التسلسل وُضِعَ في الموقع 152)).

تشطر البروتياز التتالي، والهدف من شطره هو تحويل العامل السابع من الشكل غير المفعَّل إلى الشكل المفعَّل.

ما هو الفرق هنا بين العامل السابع المفعَّل وغير المفعَّل Zymogen؟

الغير مُفعَّل يتألف من سلسلة واحدة

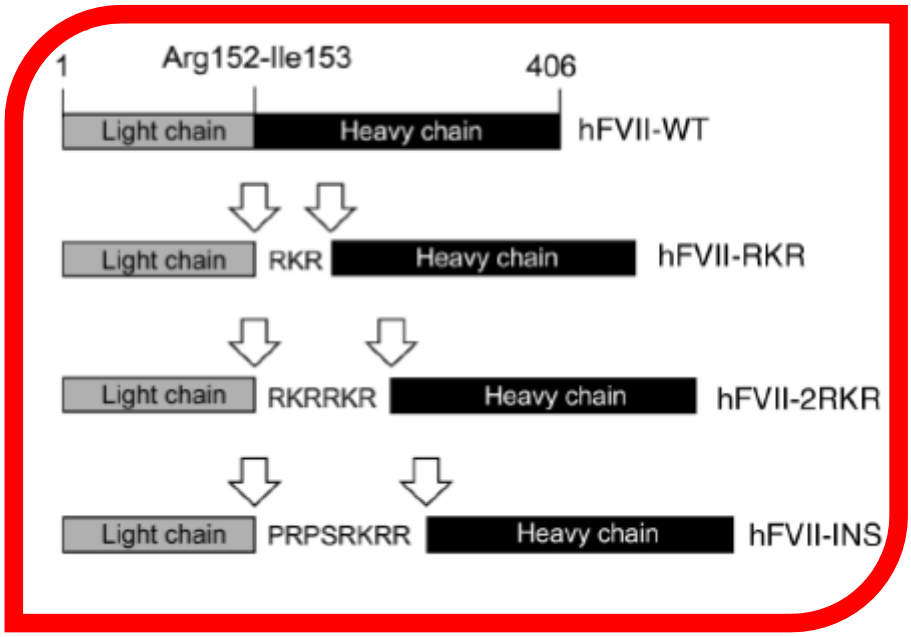
أما المُفعَّل من سلسلتين مرتبطتين بجسر كبريتي disulfide bridges.

بعد أن تمَّ الشطر؛ يقوم الكبد بإفراز secretion العامل السابع الفعَّال.

كيف تمَّ معرفة التسلسل المناسب للشطر؟؟؟

تمَّ اختبار ثلاثة مواقع مُحتَمَلَة تشطرها البروتيازات داخل الخلويَّة.

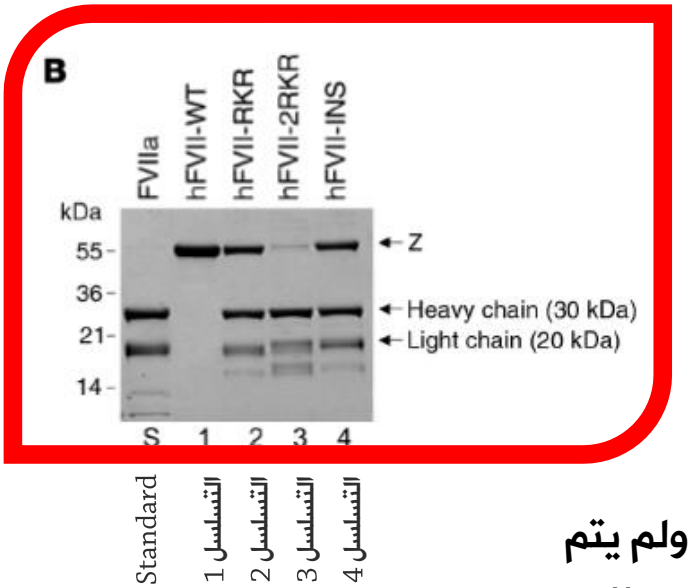
- ✓ التسلسل الأوَّل هو تسلسل العامل السابع[10] hFVII-WT.
- ✓ التسلسل الثاني والثالث والرابع هي التسلسلات التي اختبرناها.



التسلسل الثالث هو التسلسل الذي تحدَّثنا عنه في الصفحة السابقة...أي هو الذي أعطى الفعاليَّة الأكبر.

[10] يُشير الرمز WT إلى Wild Type أي النمط الشائع أو الطبيعي.

تم اختبار فعاليّة مواقع الشطر لنرى هل بالفعل تمّ الشطر بها أم لا

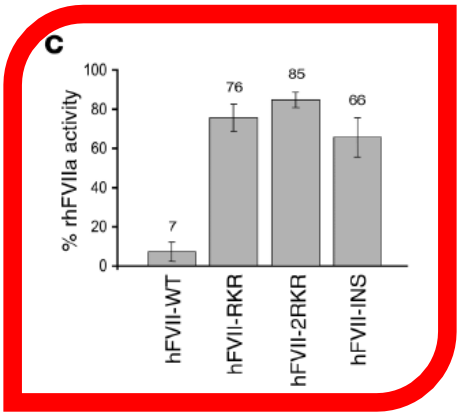


كما نلاحظ من خلال الصورة...

- تمّ شطر التسلسل الثاني والثالث والرابع وحصلنا على سلسلتين من خلال الرحلان....

إثراء: حيث تمَّ ذلك باستخدام هلامة PAGE مع استخدام عياري Standard (نلاحظ رحلان العياري بسلستين)...

- نلاحظ رحلان التسلسل الأول بسلسلة واحدة ولم يتم شطره...ولاحظو أنَّه رحل على شكل Zymogen ((غير فعَّال)).



بقي الآن معرفة الفعاليَّة

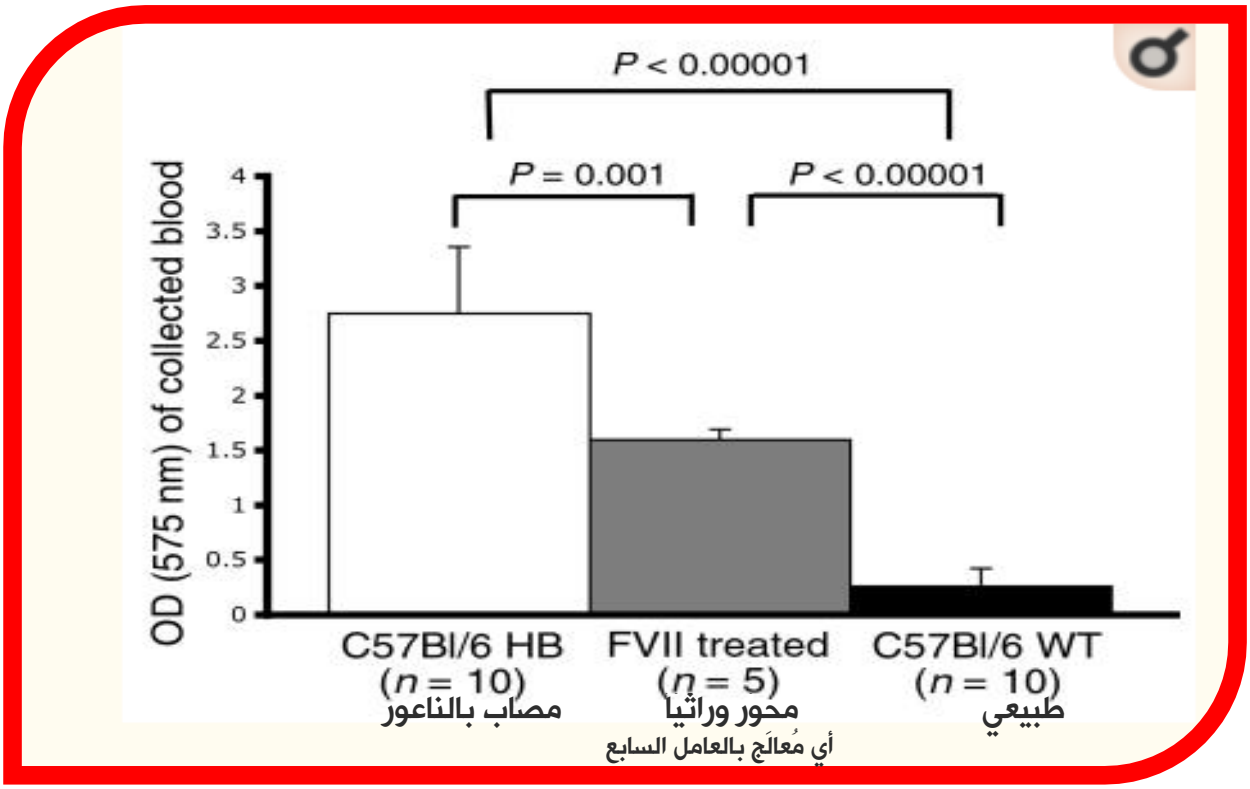
تمّ قياس الفعاليَّة ونلاحظ كما في الصورة أن التسلسل الثالث أعطى الفعاليَّة الأكبر..أما الأول فغير فعَّال أبداً.

تجربة لمعرفة فعالية العامل السابع

نأخذ 3 فئران:

- ***فأر مصاب بالناعور***: بعد قطع ذيله ووضعه في ماء فاتر 37° يستمر النزف، وقد يتوقف بعد 13 دقيقة أو 15 أو يستمر حتى وفاة الفأر.
- ***فأر آخر طبيعي wild-type***: بعد قطع ذيله ينزف لأقل من دقيقة غالباً ثم يتوقف النزف أو قد يستمر لمدة دقيقتين.
- فأر ***مصاب بالناعور ولكنه محوَّر وراثياً Hemophilia B genic mouse*** أي قادر على التعبير عن العامل السابع (بنفس الطريقة التي شُرِحَت)، عند قطع ذيله سنرى أن زمن النزف أقل وكمية الدم المنزوف أقل أيضاً.

وفي كلِّ مرة تمّ قياس امتصاصيَّة الهيموغلوبين[11] ولوحظ تحسُّن الفأر المُعدَّل أو المحوَّر مقارنةً بالفأر الأول، حيث أنه قد قلَّ زمن النزف وقلَّت كميَّة الدَّم النازف.



عرض الدكتور فيديو عن إحداث أذيَّة في وعاء دموي عند فأر وسنشرحه.....

عن طريق الليزر يتم إحداث أذية في وعاء دموي لفأر، ويوجد الوعاء على العضلة المغلِّفة لخصية الفأر cremaster muscle[12].

بعد إحداث الأذية في جدار الوعاء الدموي نراقب تشكُّل الخثرة من حيث تماسكها والزمن اللازم لتشكُّلها.....ولكن كيف ذلك؟؟؟؟؟؟؟

هناك بروتينات تُسمَّى بعناقيد التمايز Cluster of Differentiation تتواجد على سطح الخلايا وحسب نوع البروتينات يتمُّ تمييز الخلايا عن بعضها.

الصفيحات تملك CD41 تميِّزها عن غيرها من الخلايا.

[11] إثراء: طول الموجة 575 nm.
[12] السبب باختيارها لأنها رقيقة ويمكن مشاهدة الأوعية تحت المجهر بوضوح.

قبل البدء بالاختبار تم حقن أضداد مفلورة لـ CD41

ستتوضَّع هذه الأضداد على جميع الصُّفيحات

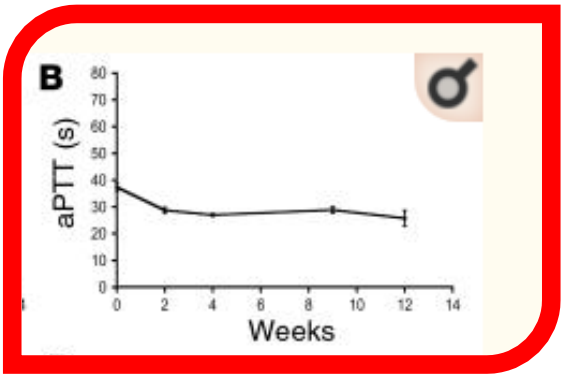
يمكن تتبُّع track جميع الصفيحات ومشاهدتها عندما تبدأ بتشكيل الخثرة

أي قياس الفلورة بمكان الأذية يعني وجود صفيحات تقوم بتشكيل خثرة.

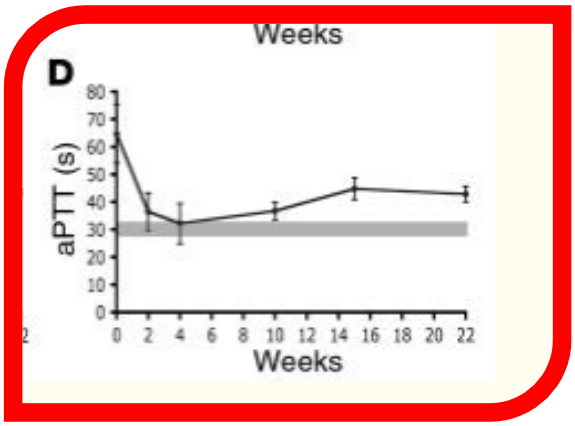
قبل البدء بقياس الفورة، نقوم بأخذ لقطة للوعاء المُتأذّي للتأكُّد من فلورة الصُّفيحات

عادةً يستغرق تشكيل الخثرة بعد الأذيَّة حوالي الدقيقة إلى دقيقتين.

نقيس ديناميكيَّة الخثرة أيضاً، أي سرعة تشكل الخثرة ومدى ثباتيتها stability للفأر الذي أجري عليه الاختبار ومعالَج بالعامل السابع، أما لوكان الفأر مصاب بالناعور وغير معالج ← لن تتشكل خثرة متماسكة وسيستمر النزف.



- هنالك طريقة أخرى تعتمد على مقياس دوبلر، فنستطيع مثلاً قياس activated partial thromboplastin time -aPTT أي نقيسه عند الفأر الطبيعي (B).
- كما نقيسه عند الفأر المُصاب بالناعور (D).



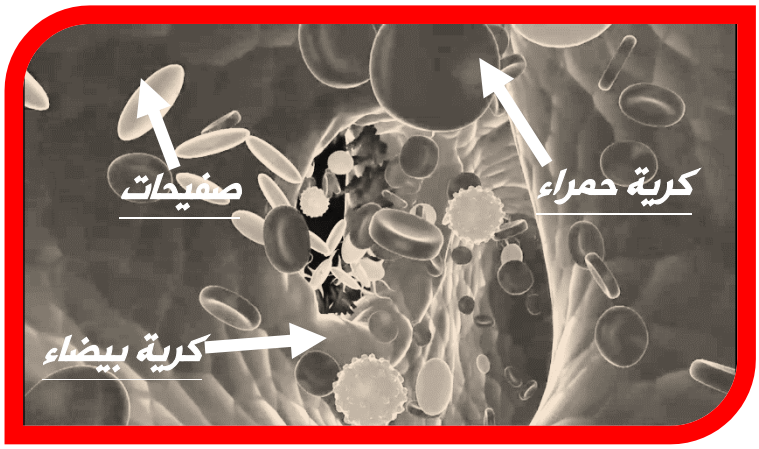
نلاحظ ارتفاعهُ عند الفأر المصاب بالناعور (الخط الرمادي الموجود بالشكل D يعود لحدود aPTT عند الفأر الطبيعي).

- هناك تطبيقات عديدة للعامل السابع المفعل (مو بس لمرض الناعور) مثلاً عند إجراء عمليات القلب أو في الحروب من أجل إيقاف النزف عند الجرحى.

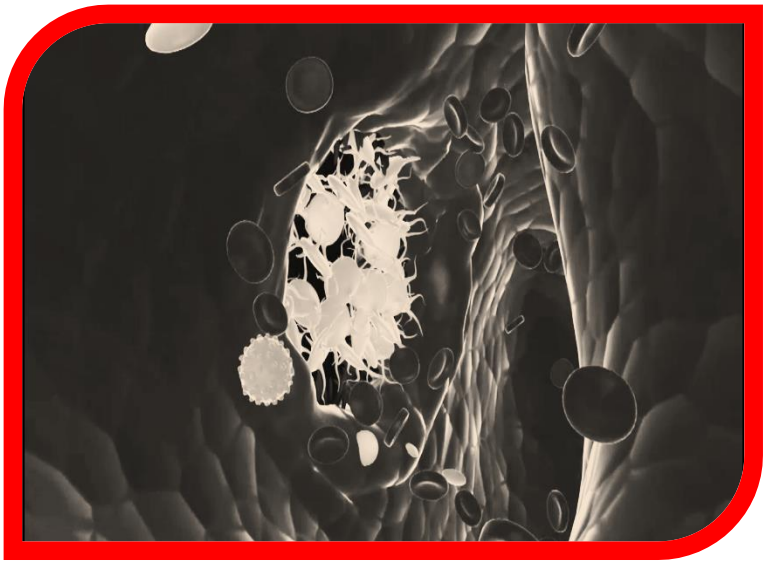
طبعاً سينخفض aPTT عند الفئران المعالَجَة جينياً.

NovoSeven[13]

- تحصل الأذية في الوعاء الدموي وتبدأ بالكريات بالخروج ← نزف.
- تبدأ الصفيحات بالتجمُّع وترتبط بمستقبلاتها على سطح الألياف مثل الكولاجين.



لنتذكر: تتواجد في المطرس خارج الخلوي أليافٌ ومنها أليافٌ خاصَّة بالصُّفيحات، حيث تتواجد مستقبلاتٌ خاصَّة بتلك الألياف[14] على سطح الصُّفيحات، وعند حدوث أذية في النسيج تنكشف هذه الألياف بسبب الأذية وتلتصق بها الصفيحات.



- بعد ارتباط الصفيحات بالألياف تتفعَّل هذه الصُّفيحات، وتنتقل الفوسفوليبيدات الداخلية نحو سطح الصفيحات ليصبح ذو شحنة سالبة واضحة.

تذكرة:

- يتألَّف غشاء الخلية من طبقتين من الفوسفوليبيدات:

العلوية (نحو الخارج) *أقل* سلبية

السفلية (نحو الداخل) *أكثر* سلبية.

يوجد في الأسفل حموض أمينيَّة سالبة كالسيرين واللوسين

13 هو عبارة عن عامل سابع مُفعَّل وقد وافقت عليه الـ FDA لعلاج النازور إلَّا أنَّهُ قد يُستخدَم بشكل offlabel أي لاستخدامات مختلفة عن استطبابه كاستخدامه بحالات النزوف الشديد حيث كان يُستَخدَم من قبل الجنود الأمريكيين في العراق بحالات النزف الشديد كبتر القدم مثلاً، وبالفعل جرعةٌ منه كانت كافية لإيقاف النَّزف .....وقد عرض الدكتور فيديو عنه وسنقوم بشرحه.

14 ومنها ألياف الكولاجين.

عند تفعيل الصُّفيحات[15] ينقلبُ غشائها بآليَّة تُدعَى Membrane flip-flop mechanism فيُصبح اللوسين والسيرين بالأعلى، أي أصبح الغشاء مشحوناً من الأعلى بشحنة سالبة.

- **عوامل التخثر هي Gla domin factors أي بمعنى أنَّها غنية بالغلوتاميك أسيد ذو الشحنة السالبة.**

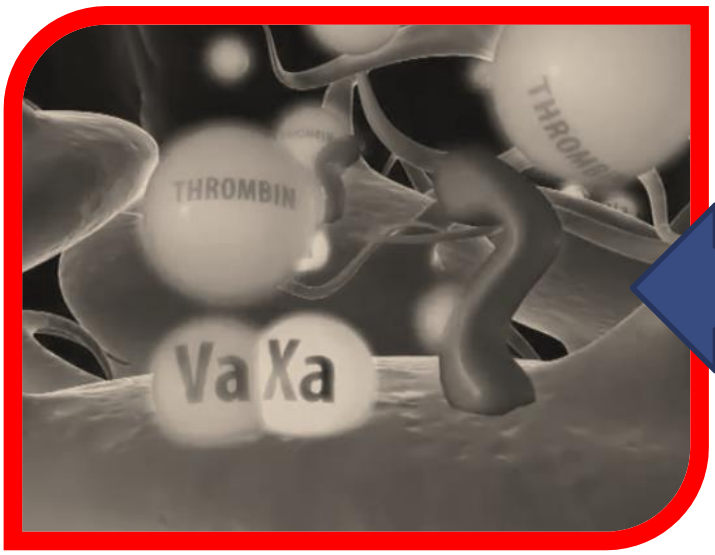
أصبح لدينا شحنة سالبة مع شحنة سالبة ← تنافر، ولكن يأتي الكالسيوم Ca^{+2} البطل الذي يملك شحنتين موجبتين، ويربط بين عوامل التخثر والفوسفوليبيدات (سطح الصفيحات).

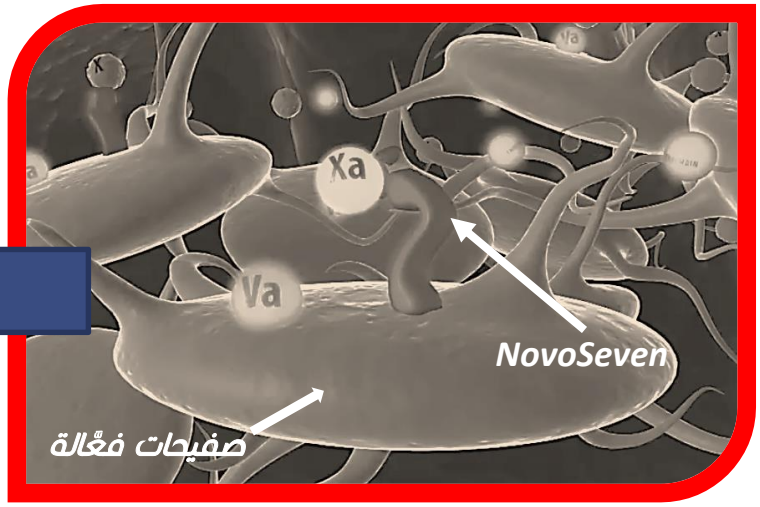
نستنتج: أن وجود Ca^{+2} ضروري لعملية التخثر سواء في العضوية الحية in vivo أو المخبر in vitro.

تبدأ عوامل التخثر ببناء شبكة الفيبرين أي الخثرة.

بداية تكون الخثرة بيضاء ثم تصبح حمراء بسبب احتباس الكريات الحمراء ضمن شبكة الفيبرين

عند استخدام NovoSeven أي العامل السابع الفعَّال فإنَّه سيرتبط على سطح الصُّفيحات وسيقوم بتفعيل العامل العاشر X أي يُصبِح Xa، وكنتيجة لذلك سيتحول البروثرومبين إلى ثرومبين.





[15] تُشكِّل الصُّفيحات الفعَّالة مرتكزاً هامّاً لتفعيل عوامل التخثُّر.

☜ بعد تشكل الخثرة تبدأ مرحلة جديدة ← هي تثبيت وانكماش الخثرة (وهي عملية مهمة جداً).

- فطالما الخثرة غير منكمشة ← تصطدم بها الكريات الحمراء وباقي مكونات الدم ← لزوالها وعودة النزف

مريض الناعور يملك عامل سابع وتتشكل خثرة ولكنها غير متماسكة مما يسبب زوالها.

إثراء للفهم لم يشرحه الدكتور ويُفضَّل قراءته

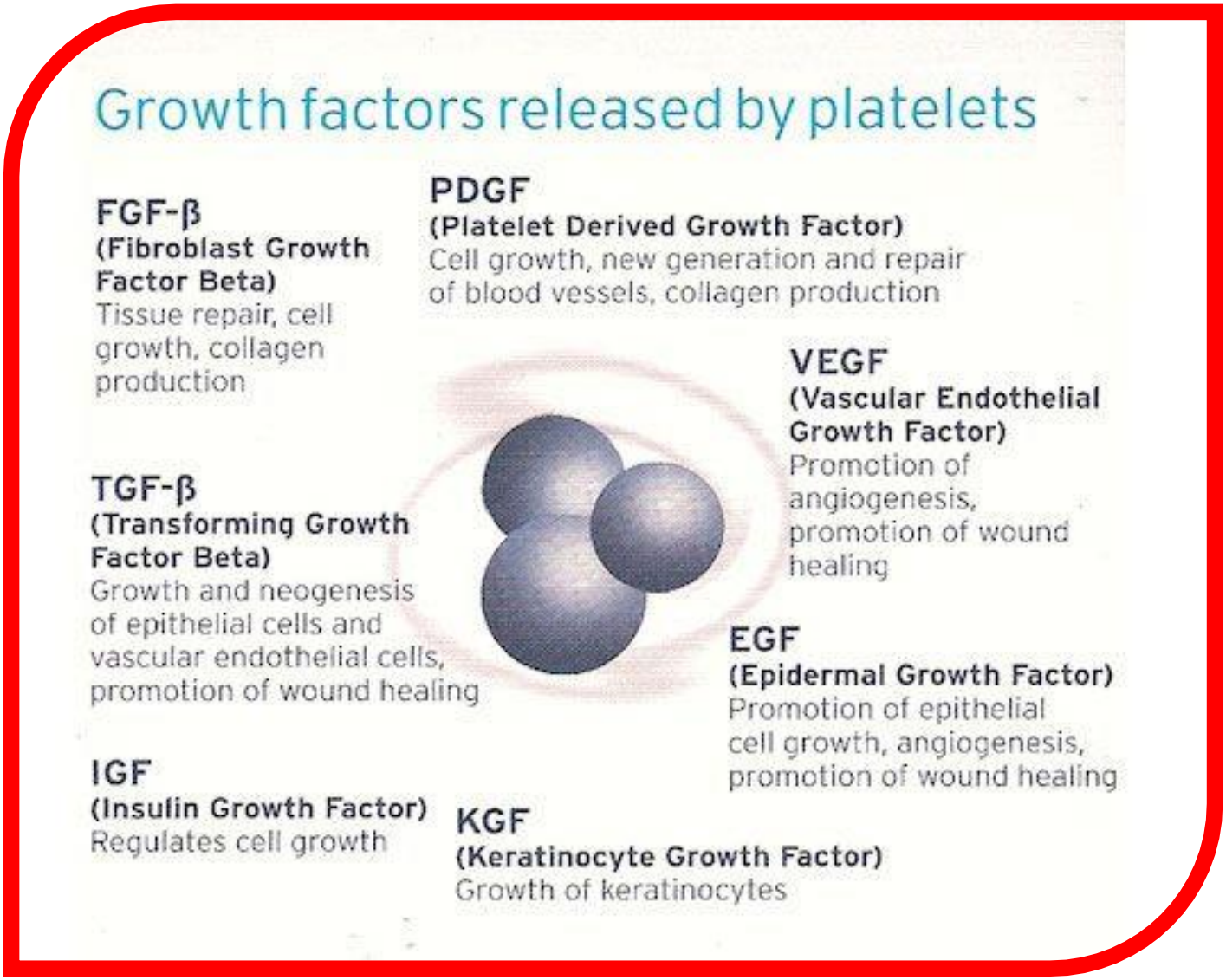
السبب في عدم تثبُّت الخثرة عند مريض الناعور هو غياب العامل الثامن أو التاسع فهما ضروريان جداً لتثبيت الخثرة حيث أنَّهما يرتبطان (بعد تفعيلهما أي VIII يصبح VIIIa وَ IX يُصبح IXa) على سطح الصُّفَيحات المُفعَّلة ويقومان بثبيت الخثرة وتحريضها على الانكماش عبر تشكيل **معقَّد ثابت** على سطحها، وهذا المُعقَّد الثابت يقوم بدوره بتفعيل العامل العاشر X محوِّلاً إيَّاه لـ Xa ← يلي بعدها ارتباط Xa بالعامل الخامس المُفعَّل Va ((الموجود على سطح الصُّفيحات منذ بداية تفعيلها أي قبل VIIIa وَ IXa)) ومن ثمَّ يحوِّلان البروثرومبين لثرومبين.

عند استخدامنا لـ NovoSeven فإنَّه سيؤدِّي دور العاملَين التاسع والثامن وهو من سيقوم بتثبيت الخثرة وتحريضها على الانكماش، فضلاً عن أنه سيزيد من تشكُّل الفيبرين.

ملاحظة:

✓ الصفيحات مُفرز مهم لعوامل النمو كالـ TGF-β1 و vascular endothelial growth factor (VEGF) و Platelet-derived growth factor (PDGF) التي تزيد انقسام ونمو الخلايا ← ترتبط هذه العوامل بخلايا البطانة الوعائية endothelial وتحرضها على الانقسام وإصلاح مكان حدوث الأذية ← ترميم المنطقة المصابة.

الصورة للاطلاع فقط:



✓ بعض السرطانات تفرز نفس عوامل النمو التي تفرزها الصفيحات ((خاصةً VEGF))
وذلك بهدف إنشاء أوعية دمويَّة جديدة لتغذية الورم.

لدينا جيل كامل من الأدوية السرطانية المُصنَّفة بعنوان angiogenesis inhibitors والتي تقوم بالارتباط بـ VEGF ومنعه من الارتباط بمستقبلاته على سطح الخلايا البطانيَّة

وقد عرض الدكتور بعضاً من أسئلة الدورات الجميلة

جميع العبارات التالية المتعلقة باستخلاص البروتينات صحيحة عدا: A. يُعد الألبومين أسهل البروتينات استخلاصاً من البلازما. B. تحتوي البلازما حوالي 36 غ/ليتر من بروتين الألبومين. C. جميع بروتينات البلازما قابلة للاستخلاص. D. يشكِّل الألبومين حوالي 60٪ من بروتينات البلازما. E. تشكِّل البروتينات الكليَّة أقل من10٪ من حجم البلازما.	C
يتمُّ جمع البروتينات المأشوبة المُنتَجة في E.Coli في: A. بداية الطور اللوغاريتمي لنموّ الجراثيم. B. نهاية الطور اللوغاريتمي. C. طور التلكُّؤ لنمو الجراثيم. D. بداية طور الثبات للنمو. E. يمكن جمع البروتينات في جميع الأطوار السابقة.	D
عند نقطة تساوي التكهرُب Isoelectrical point للبروتين: A. تتساوى الشحنات الموجبة في البروتين مع الشحنات السالبة في جزيئات المحل. B. تتساوى باهاء المُحِلّ مع درجة تشرُّد البروتين pKa. C. تزداد انحلاليَّة البروتين بشكل كبير. D. يسهل ترسيب البروتين عند تركيز ملح مناسب. E. تنخفض ثابتة ثنائيَّة التكهرُب dielectric constant للمُحلّ مع الماء.	D

فقرة الكريات البيضاء لبلعمة الأخطاء:

المحاضرة	الصفحة	السطر	الخطأ	الصواب
3	16	الرابع من الأسفل	الطبقة	الطبخة

8	26	2	-----	إضافة كلمة ((أولاً)) قبل الترسيب المناعي
8	28	6 عنوان فقرة التعبير عن البروتين المندمج		حذف كلمة ((ثامناً)) ووضع كلمة ثانياً بدلاً منها....يعني صار الاستشراب بالإلفة بضم الترسيب المناعي والتعبير عن البروتين.

أضف ملاحظاتك :

لإرسال ملاحظاتكم:
goo.gl/forms/Hl8slZEmLSZvySq92

لتحميل محاضراتنا:
www.Rbcsteam.org/lectures

للاستفسار عن هذه المحاضرة على غروب الفريق على الفيس بوك:
RBCs Pharmacy 2019 www.facebook.com/groups/rbcs2019

RBCs' Quote

The best way to do great work is to love what you do