P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2012 ,(6), (1) :29-34

(*JUAPS*) **مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة**

Open Access

الكشف عن انظمة اصلاح الخطا في الـDNA في بكتريا *Pseudomonas aerugenosa*

خلف جاسم محمد

جامعة الانبار - كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2011/12/20
تاريخ القبول: 2012/7/14
تاريخ النشر: 30/ 10 / 2012
DOI: 10.37652/juaps.2012.62279

الكلمات المفتاحية:

انظمة اصلاح الخطا ،
DNA ،
Pseudomonas aerugenosa.

الخلاصة:

عرضت بكتريا Pseudomonas aeruginosa الى الاشعه فوق البنفسجيه بطول موجي مقداره (254 nm) لفترات زمنيه مختلفه (100, 150, 200، 50 ثانيه) وعرض جزء من الخلايا المشعه الى ضوء الشمس وعرض جزء اخر الى الظلام . كا نت نسبة بقاء الخلايا المعرضه الى ضوء الشمس اكثر من نسبة بقاءها في الظلام مما يؤكد امتلاك البكتريا لنظام الاصلاح الضوئي. للتحري عن وجود نظام الاصلاح بالاستئصال تم دراسة التركيز المثبط الادنى لمادة caffeine بتعريض البكتريا الى تراكيز مختلفه منه (20, 15, 10, 25 ملي مولار) وكان التركيز المثبط الادنى 20 ملي مولار ثم عرضت البكتريا الى جرع مختلفه من الاشعه فوق البنفسجيه بوجود caffeine واثبتت الدراسه ان نسبة بقاء الخلايا في الوسط الزرعي بوجود caffeine كان اقل منه بعدم وجوده مما يشير الى امتلاك البكتريا لنظام الاستئصال للكشف عن نظام الاصلاح بالتكرار عرضت البكتريا الى التراكيز 2..3,..0.4،..مايكروغرام/ مللتر من مادة acriflavine وكان التركيز المثبط الادنى.3. مايكروغرام /مللتر ثم عرضت البكتريا الى جرع مختلفه من الاشعه فوق البنفسجيه بوجود مادةacriflavine وكانت نسبة بقاء الخلايا في الوسط الحاوي على مادةacriflavine اقل منه بغيا به مما يؤكد امتلاك البكتريا لهذا النظام . لدراسة نظام الاصلاح بالانقاذ SOS عرضت البكتريا الى مطفرات مباشره متمثله بحامض النتروز ومطفرات غير مباشره متمثله بالاشعه فوق البنفسجيه لعزل طفرات مقاومه للمضادات Chloramphenicol و Rifampicinالحساسه لها واثبتت الدراسه حساسية البكتريا للتطفير بالمطفرات مما يؤكد امتلاك البكتريا لنظام الاصلاح بالانقاذ SOS.

المقدمه

يشير نظام اصلاح الخطا في الDNA الى مجموعة العمليات التي بواسطتها تتمكن الخليه من تمييز وتصحيح الضرر الذي يصيب جزيئة DNA., تسبب الفعاليات الايضيه الاعتياديه والعوامل البيئيه مثل الضوء فوق البنفسجي والاشعاع ضرر في جزيئة DNA بنسبة مليون افه جزيئيه لكل خليه في اليوم [1]. معظم هذه الافات تسبب ضرر تركيبي لجزيئة DNA التي تستطيع استبدال او حذف قابلية الخلايا على استنساخ الجين وافات اخرتسبب طفرات منها طفرات الخساره الوظيفية وطفرات الزياده الوظيفية والطفرات المميته والتي تؤثر على بقاء الخلايا البنويه بعد عملية الانقسام.

عندما يفشل نظام الاصلاح الاعتيادي وحصول سكته خلويهcellular apoptosis فان الضرر يتعذر اصلاحه ويشار اليه Irreparable DNA Damage كما في حالة حدوث كسر في كلا شريطي DNA والارتباط المستعرض لهما [2].

يعتمد معدل اصلاح الخطا في DNAعلى جمله من العوامل منها نوع الخليه، عمر الخليه والظروف البيئيه الخارجيه وان الخلايا التي تحدث فيها تراكمات من الضررفيDNA او التي لا تملك نظام اصلاح فعال يمكن ان تدخل في احدى ثلاث امور منها الدخول في حاله غير رجعيه من السكونdormancy او ما يعرف بالشيخوخهsenescence او انتحار خلوي او ما يعرف بالسكتهapoptosis او الموت الخلوي المبرمج او اصابتها باورام سرطانيه [3]

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Science;
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5859-6212 .Mobil:777777
E-mail address:

هناك عدة مصادر لاحداث الضرر في الDNA منها مصادر داخليهdamage endogenousتتمثل بمجاميع الاوكسجين الفعاله الناتجه عن عمليات الايض محدثه طفرات تلقائيهspontaneous mutation وخصوصا عمليات نزع مجموعة الامين التاكسديه oxidative deamination بالاضافه الى اخطاء التضاعف ومصادر خارجيه للضرر exogenous damage تتسبب بعوامل خارجيه منها الضوء فوق البنفسجي القادم من الشمس (UV 200-300 nm) والاشعاعات الاخرى مثل اشعة اكس واشعة كاما والتحلل المائي او التحطم الحراري للقواعد والسموم النباتيه والمواد الكيمياويه المسرطنه المصنوعه من قبل الانسان وخصوصا المركبات الاروماتيه التي تؤثر كعوامل كلابيه مع جزيئةDNAوالمواد العلاجيه الكيمياويه وامشعه السرطانيه بالاضافه الى الاصابه بالفيروسات [4] . هناك اربعة انواع من الضرر الذي يصيب DNA نتيجة العمليات الداخليه للخلايا منها اكسدة القواعد مثل 8-oxo-7,8dihydroguanine (8-oxoG) واضافة مجموعة الكيل للقواعد وخصوصا مجموعة مثيل كما في حالة تكوين 6-o-methylguanine, 7-methylguanine, 1-methyladenine والتحلل المائي للقواعد مثل ازالة مجموعة امين او ازالة مجموعة بيورين او ازالة مجموعة برميدين، واخطاء متناضره mismatch في ازدواج القواعدنتيجة حدوث اخطاء في تضاعف DNA .

اما الضرر الذي ياتي من مصادر خارجيه فيكون على عدة اشكال منها حالة تكوين روابط مستعرضه بين القواعد النتروجينيه، السايتوسين والثايمين المتجاوره مكونه ما يعرف pyrimidine dimer وهو نوع مباشر للضرريحدث بفعل الاشعه فوق البنفسجيه التي يمكن ان تحدث ضرر بسبب تكوينها جذور حره وهو ضرر غير مباشر او احداث كسور في DNA بفعل الاشعه الكونيه المتاينه او حالة التحطيم الحراري للقواعد التى تزيد من معدل ازالة البيورين من بنية DNA واحداث كسور في احدى شريطيDNA كما في حالة التحلل المائي وازالة البيورين من البكتريا المحبه للحراره Thermus thermophilusالتي تنمو في درجات حراره تتراوح بين 85 –250 م حيث تفقد300قاعده بيورينيه من المجموع الكلي للماده الوراثيه لكل جيل[5] .

هناك ثلاث ميكانيكيات تستخدمها الخلايا لازالة الضرر الذي يحدث في DNA كيميائيا دون اللجوء الى استخدام قالب DNA في حالة كون الضرر قد استهدف احد القواعد النتروجينيه الاربعه دون احداث كسر في بنية الاصره الفوسفاتيه ثنائية الاستر كما في حالة مستعرض الثايمين(thymine dimmer) الناتج عن الضوء فوق البنفسجي والذي يكون اصره تساهميه بين قاعدتين متجاورتين من الثايمين. يتم اصلاح هذا النوع من الضرر عن طريق الاصلاح الضوئي photoreactivation repair عن طريق فعالية الانزيمphotolyase الذي يتحفز عن طريق الطاقه الممتصه من الضوء الازرق عند الطول الموجي[6] (300-500 nm). الميكانيكيه الثانيه التي تزيل الضرر المتسبب عن اضافة مجموعة مثيل الى قاعدة الكوانين تتمثل بفعالية الانزيم methyl guanine methyl transferase (MGMT) [7] . والنوع الثالث من الضرر يتمثل باضافة مجموعة مثيل الى القواعد سايتوسين وادنين يتم اصلاحه بواسطة الانزيم alkylation repair enzyme [8]. اما الضرر الذي يؤدي الى تكسر احدى او كلا شريطي الDNA فيتم اصلاحه عن طريق نظام الاستئصال Excision repair او عن طريق لحم النهايات الغير متماثله non-homologous end joining (NHEJ) [9] او عن طريق توسط ميكانيكية لحم النهايات المتماثله الدقيقه microhomology-mediated end Joining(MMEJ) [10] او عن طريق اعادة الارتباط المتماثل (نظام الاصلاح بالتكرار) homologous recombination بمساعدة الانزيم اللاحم DNA ligase [7] وهي انظمه خاليه من الخطاerror free repair او عن طريق نظام الاصلاح الميال للخطا(SOS) error prone repairالذي يتضمن اضافةنيوكليوتيدات الى منطقة الضرر بصوره عشوائيه[11]

المواد وطرق العمل

الكشف عن نظام الاصلاح الضوئي

عرضت البكتريا Pseudomonas aerugenosa المعزوله والمشخصه في مختبر البكتريا المرضيه– كلية العلوم –جامعة الانبار للاشعه فوق البنفسجيه(254nm) للفترات 200,150,100,50 ثانيه ثم اخذ 2 مل من كل معامله. ترك 1 مل منها في الظلام و 1 مل في الضوء لمدة ساعه ثم اجريت سلسله من التخافيف لها وزرعت على الاكار المغذي وغطيت الاطباق بورق الالمنيوم وحضنت بدرجة حرارة37C لمدة 24 ساعه[12]

الكشف عن نظام الاستئصال

عرضت البكتريا الى تراكيز مختلفه من مادةcaffeine (25,20,15,10) ملي مولار من اجل تحديد التركيز المثبط الادنى ثم عرضت البكتريا الى فترات زمنيه مختلفه من الاشعه فوق البنفسجيه وزرعت على الاكار المغذي الحاوي على التراكيز تحت المثبط الادنى من مادة caffeine وغطيت الاطباق بورق الالمنيوم وحضنت بدرجة حرارة37C لمدة 24 ساعه [13]

الكشف عن نظام الاصلاح بالتكرار

عرضت البكتريا الى تراكيز مختلفه من مادة acriflavine..4,0.3,0.2,0.1)) مايكروغرام / مللتر من اجل تحديد التركيز المثبط الادنى ثم عرضت البكتريا الى فترات زمنيه مختلفه من الاشعه فوق البنفسجيه وزرعت على الاكار المغذي الحاوي على التراكيز تحت المثبط الادنى من مادة acriflavine وغطيت الاطباق بورق الالمنيوم وحضنت بدرجة حرارة37C لمدة 24 ساعه[13]

الكشف عن نظام الاصلاح بالانقاذ

عرضت البكتريا الى مطفرات مباشره متمثله بحامض النتروز ومطفرات غير مباشره متمثله بالاشعه فوق البنفسجيه لعزل طفرات مقاومه للمضادات الحياتيه Chloramphenicol، Rifampicin الحساسه لها [14] [15]

النتائج

الكشف عن نظام الاصلاح الضوئي

منحنى البقاء للبكتريا بعد التعريض للاشعه فوق البنفسجيه في الضوء والظلام يبينها شكل (1) حيث ان نسبة بقاء البكتريا كانت 80 % في الضوء و40 % في الظلام بعد50ثانيه وانخفضت هذه النسبه الى50% في الضوء و25% في الظلام بعد 100ثانيه في حين كانت نسبة البقاءفي الضوء بعد150 ثانيه 25 % مقارنة بنسبة بقاء مقدارها 10% في الظلام مما يثبت امتلاك البكتريا لنظام الاصلاح الضوئي

الكشف عن نظام الاستئصال

كان التركيز المثبط الادنى لمادة caffeine (20) ملي مولار في حين لم تتاثر البكتريا بالتراكيز15,10 ملي مولار منحنى بقاء البكتريا بعد التعريض للاشعه فوق البنفسجيه في الاكار المغذي الحاوي على مادة caffeine انخفض بشكل حاد بعد 50 ثانيه ليصل الى 30% و 10% مقارنة بنسبة بقاء مقدارها 80 % في الوسط الخالي من مادة caffeine والمشعع لنفس الفتره ليصل بعد100ثانيه الى2 % و. مقارنة بنسبة بقاء مقدارها 50 % في الوسط الخالي من مادة caffeine والمشعع لنفس الفتره (شكل 2)0 هذه النتائج تؤكد وجود نظام الاصلاح بالاستئصال في البكتريا

الكشف عن نظام الاصلاح بالتكرار

لم تتاثر البكتريا عند تعريضها للتراكيز 0.2,0.1 مايكروغرام / مللتر من مادةacriflavine في حين كان التركيز0.3مايكروغرام / مللتر تركيز مثبط ادنى للبكتريا. بعد تعريض البكتريا للاشعه فوق البنفسجيه بوجود acriflavine لمدة50 ثانيه كانت نسبة البقاء50 % و 25 % مقارنة ب 80 %كنسبة بقاء للبكتريا بدون acriflavine والمشععه لنفس الفتره ليصل بعد ذلك الى 20 % و10% بعد 100 ثانيه مقارنة بنسبة بقاء للبكتريا مقدارها 50% بدون acriflavine والمشععه لنفس الفتره الى ان وصلت نسبة البقاء الى0 بعد150 ثانيه من التشعيع بوجودacriflavine مقارنة بنسبة بقاء للبكتريا مقدارها 25% بدون acriflavine والمشععه لنفس الفتره (شكل 3)0 هذه النتائج تبرهن امتلاك البكتريا لنظام الاصلاح بالتكرار

الكشف عن نظام الاصلاح بالانقاذ (SOS)

كانت البكتريا حساسه للتطفير باستخدام الاشعه فوق البنفسجيه وحامض النتروز في عزل طفرات مقاومه للمضاداتrifampicin و chloramphenicol بعد اجراء اختبارالحساسيه للبكتريا تجاه المضادات الحساسه لها مما يثبت امتلاك البكتريا لهذا النظام

المناقشه

بعد تعرض الDNA للضرر تتنشط نقاط تفتيش دورة الخليهcell cycle checkpoints والتي توقف دورة الخليه لبرهه من الزمن لتعطي الخليه وقت لاصلاح الضرر قبل الاستمرار بالانقسام وتقع عند حدود الاطوار G1/S و0G2/M يتحكم بتنشيط نقاط التفتيش عن الضرر نوعين من الانزيمات الناقله لمجموعة الفوسفات phosphorylate kinase (ATM) و(ATR). ATM يستجيب للضرر المتسبب عن كسور في كلا شريطي الDNA وعن الضرر الحاصل في مرحلة الانتشار من تكوين الكروماتين [16] بينما تحصل استجابة ATR لتوقف شوكة التكرار اثناء تضاعف ال DNA. شخصت اصناف اخرى من البروتينات التي تتوسط نقاط التفتيش تتضمن BRCA1 وMDC! و 53BP1 تعمل على ارسال اشارات الى

الانزيمات الناقله لمجموعة الفوسفات التي تنشط نقاط التفتيش عن الضرر [17].

يعتبر نظام الاصلاح الضوئي نظام خالي من الخطا error– free repair وجد في بعض اجناس البكتريا المتحمله للملوحه Micrococcus sp [12] التي تستخدم الضوء الازرق بوجود انزيم photolyase لاصلاح مستعرضات الثايمين thymine dimer التي تتكون بفعل الاشعه فوق البنفسجيه كما وجد خلو البكتريا Deinococcus radiodurans المقاومه للاشعاع من هذا النظام [18]

يعمل ال caffeine و acriflavine على الارتباط بقوه مع الDNA المشعع فيمنع عمل انزيم endonuclease الذي يعمل على تمييز المستعرضات dimers ثم يحدث كسر عند احد جوانب المستعرض dimer ليتحطم بواسطة انزيمات اخرى مثل exonuclease ثم يتم بناء DNA جديد. وجد نظام الاستئصال ونظام الاصلاح بالتكرار في بكتريا[13] Escherechia coli وفي البكتريا المتحمله للملوحه Micrococcus [12]

ينظم نظام الاصلاح بالانقاذ (SOS) في الكائنات بدائية النواة بواسطة نوعين من البروتينات هما LexA و RecA. ينظم البروتين LexA استنساخ ما يقرب من 48جين في بكتريا Escherechia coli من بينها جيناتlexA وrecA . يعمل الجين lexA على ابقاء الاصلاح في حالة كبح في حالة عدم وجود ضرر في جزيئة الDNA . في حالة حدوث ضرر لجزيئة الDNA يحدث وبشكل غير معروف تعبير للجينrecA منتجا البروتين RecA (الانزيم المحلل للبروتينات protease) والذي يحلل ناتج الجينlexA (بروتينِLexA) محفزا بذلك نظام الاصلاح [19]0 ينتشر نظام الاصلاح بالانقاذ بشكل واسع في البكتريا الا ان هناك دراسات حديثه اثبتت غيابه في انواع اخرى من البكتريا كما في البكتريا الحلزونيه spirochetes [20]

المصادر

[1] Lodish H, Berk A, Matsudaria P,Kaiser CA,Krieger M,Scott MP,Zipursky SL,Darnell J.(2004).Molecular Biology of the Cell, p963.WH Freeman : New york,NY.5th ed.

[2] Browner WS,Khan AJ,Ziv E,Reiner AP,Oshima J,Cawthon RM,Hsueh WC,Cummings SR.(2004)-Thegenetics of human longevity.AmJ Med 117 (11): 851-860.

[3] Braig M,Schmitt CA.(2006).Oncogene-induced senescence:putting the brakes on tumor development.Cancer Res 66:2881-2884.

[4] Roulston A,Marcellus RC,Pranton PE.(1999).Viruses and apoptosis.Annu.Rev.Microbiol.53:577-628.

[5] Toshihiro Ohta,Shin-ichi Tokishita,Kayo Mochizuki,Jun Kawase,Masahide Sakahira and Hideo Yamagata(2006).UV sensitivity and mutagenesis of the extremely thermophilic eubacterium Thermus thermophilus HB27,Genes and Environment;Vol.28,No.2:p.56-61.

[6]Sancar A.(2003).Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue light photoreceptors.Chem Rev 103(6):2203-2237.

[7] Watson JD,Baker TA,Bell SP,Gann A,Levine M,Losick R.(2004).Molecular Biology of the Gene.ch.9 and 10.Peason Benjamin Cummings;CSHL press.5th ed.

[8] Volkert MR.(1988)Adaptive response of Escerechia coli to alkylation damage.Environ Mol Mutation 11(2):241-255.

[9]Budman J,Chu G.(2005).Processing of DNAfor nonhomologous end-Joining by cell free extract-EMBOJ.;24(4):849-860.

[10] Wilson TE,Grawunder U,and Lieber MR.(1997).Yeast DNA ligase IV mediates microhomologous DNA end joining .Nature 388، 495-498 .

[11] Boulton SJ,Jackson SP.(1996).Saccharomyces cerevisiae ku 70 potentiates illigitimateDNA double- strand break repair and serves as a barrier to error – proneDNA repair pathways. EMBOJ.15(18):5093-5103.

[12] Al-Dolaimi KJ.(1997)On the molecular biology of a novel halotolerant bacterium (Micrococcus sp.).M.Sc. thesis . Al – Nahreine Univ.

[13] Fong K, andBockrath RC.(1979).Inhibition of Deoxy ribo nucleic acid repair in Escherechia coli by caffeine and acriflavine after ultraviolet irradiation.J.Bacteriol.,:671-674.

[14] Al-Bakri GH,Umran MA.(1994).Mutagenesis of a novel halotolerant bacteria (Micrococcus sp.) using ultraviolet light and N-Methyl-N-nitro-N-Nitrosoguanidine.Iraqi Journal of Microbiology,Vol.6(2):55-64.

[15] الدليمي، خلف جاسم محمد.(2007). تطفير بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام حامض النتروز. مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفه. المجلد الاول .العدد الثا لث ص 45-50.

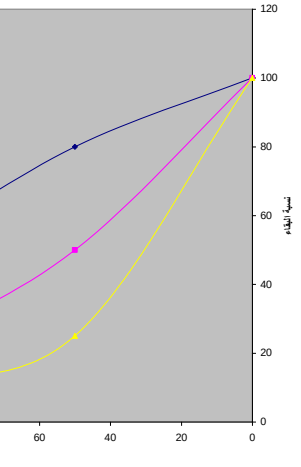
[16]Bakkenist CJ,Kastan MB.(2003).DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimmer dissociation.Nature 421(6922):499-506.

[17]Wei, Qingyi;Lei Li David Chen(2007). DNA repair, Genetic Instability, and cancer.World Scientific.

[18] Moseley BEB.(1983)Photobiology and radiobiology of Micrococcus (Deinococcus) radiodurans. Photochemical and photobiological review,7:223-274.

[19] Janion C.(2001).Some aspects of the SOS response system-acritical survey.Acta Biochim Pol.48(3):599-610.

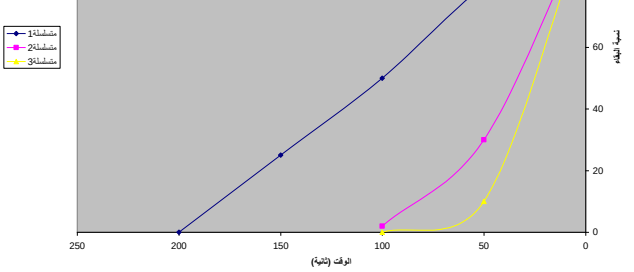
[20] Erill I,Campoy S,Barbe J.(2007).Aeons of distress:an evolutionary perspective on the bacterialSOS response.FEMS Microbiol Rev.31(6):637-656.



شكل (1) منحنى بقاء البكتريا*Pseudomonas aeruginosa* بعد التشعيع بالضوء فوق البنفسجي في الضوء والظلام.

ضوء _____♦_____

ظلام _____▲_____



شكل (2) منحنى بقاء البكتريا*Pseudomonas aeruginosa* في تراكيز مختلفه من مادة caffeine بعد التشعيع بالضوء فوق البنفسجي.

متسلسله 1 :.mM
متسلسله 2 : 10 mM
متسلسله 3 : 15 mM

شكل (3) منحنى بقاء بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* في تراكيز مختلفه من مادة acriflavine بعد التشعيع بالضوء فوق البنفسجي.

متسلسله 1 :.µg /ml
متسلسله 2 :.1 µg /ml
متسلسله 3 :.2 µg /ml

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2012 ,(6), (1) :29-34

DETECTION OF DNA REPAIR SYSTEMS OF THE BACTERIUM *PSEUDOMONAS AERUGENOSA*

KHALAF JASIM MOHAMMED

ABSTRACT:

The bacterium Pseudomonas aeruginosa was irradiated with ultraviolete light with wave length (254 nm) for different periods (50، 100، 150، and 200 sec) . part of irradiated bacterial culture was exposed to sun light and the other part was kept in the dark . The survivors of the cells exposed to the sun light was more than in the dark and this ensure possessing the bacterium photoreactivating repair system To investigate the excision repair system, the minimal inhibitory concentration (MIC)of caffeine against bacteria was studied by exposing the bacterium to different concentrations of caffeine (10، 15، 20 and 25 mM) and the MIC was 20 mM، then the bacterium was exposed to different doses of U.V. light in the presence of caffeine and the study ensured the survivors of the cells in the medium with caffeine was less than the medium with absence of caffeine and this refers to possess the bacterium excision repair system. To detect the recombination repair system، the bacterium was exposed to the concentrtions..1،0.2،..3،..4 µg / ml of acrivlavine and the MIC was..3 µg / ml، then the bacterium was exposed to different doses of U.V. light in the presence of acrivlavine . The survivors of the cells in the medium with acrivlavine was less compared with the absence of acrivlavine and this indicate possessing bacterium recombination repair system . To study SOS repair system the bacterium was mutated with direct mutagens represented with nitrous acid and indirect mutagens represented with U.V. light to isolate rifampicin and chloramphenicol mutants. The study ensured the sensitivity of bacterium for mutagenesis then possessing SOS repair system .