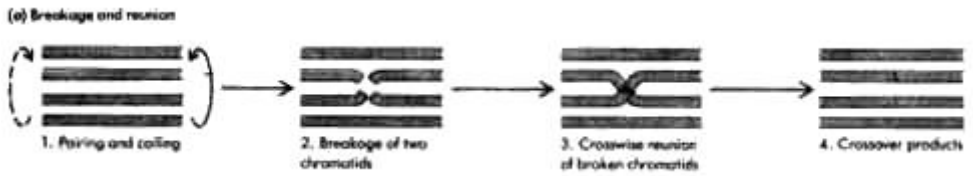
نوترکیبی مولکولی

DNA در طول تکامل خویش دستخوش نوترکیبهای فراوانی شده است. در مهندس ژنتیک با ترکیب و اصلاح قطعات DNA در لوله آزمایش می‌توان بیان ژن‌ها را تا حدی تغییر داد ولی باید دانست که در حقیقت عمل ما در آزمایشگاه تحریک روندهای طبیعی نوترکیبی و جهش است که در طول تکامل سبب ایجاد کروموزوم‌های پیچیده شده‌اند. تبادل ژنتیکی (تعویض قطعاتی از DNA) به طور مداوم سبب اختلاط و بازآرایی کروموزوم‌ها می‌شود که بارزترین نوع تبادل در هنگام میوز صورت می‌گیرد. بدین ترتیب که با کنار هم قرار گرفتن کروموزوم‌های همولوگ، کراسینگ‌اور (تبادل قطعه) انجام می‌شود. اولین اطلاعات واقعی ما در مورد ساختمان کروموزوم، حاصل اندازه‌گیری فراوانی عمل تبادل قطعه بین ژنهای مختلف می‌باشد و بدین ترتیب به کمک مطالعات فوق روشن شد که ژن‌ها به صورت خطی و ثابتی به دنبال یکدیگر قرار گرفته‌اند. تحقیقات اخیر نشان داده است که ردیف ژن‌ها به صورت خطی و ثابتی به دنبال یکدیگر قرار گرفته‌اند. تحقیقات اخیر نشان داده است که ردیف ژن‌ها اگر چه بندرت ولی به هر حال تغییر می‌یابد: قطعات قابل تحرک DNA به نام ترانسپوزون خوانده می‌شوند که بندرت در اطراف کروموزوم پرش داشته و با وارد و خارج شدن در کروموزوم‌های مختلف، ساختمان آنها را به طور اساسی تغییر می‌دهند. ترانس‌پوزون‌ها علاوه بر جابجا کردن ژن‌ها (ژنهایی که توسط آنها حمل می‌شود)، سبب افتادگی معکوس شدن و سایر انواع بازآرایی در DNA می‌گردند. تصور می‌شود که چنین تغییراتی از خصوصیات بارز تکاملی کروموزوم خصوصاً در سلول‌های یوکاریوتی است.

امروزه ثابت شده است که نوترکیبی امری تصادفی نبوده بلکه یک روند اساسی سلولی می‌باشد که توسط آنزیم‌های اختصاصی که به وسیله سلول ساخته و تنظیم می‌شوند انجام می‌گیرد. این آنزیم‌ها علاوه بر ایجاد تنوع ژنتیکی به سلول‌ها امکان جبران توالیهای صدمه دیده را می دهند و بدین ترتیب قطعاتی از DNA که در اثر تشعشعات یا عوامل شیمیایی صدمه دیده‌اند با قطعات سالم موجود در کروموزوم همولوگ تعویض می‌شوند. همچنین بعضی از نوترکیبی‌ها باعث تنظیم ژن می‌گردند. بدین معنی که در اثر بعضی از انواع نوترکیبی‌ها ژن‌های خفته موجود در کروموزوم به نواحی خاصی انتقال داده شده، امکان بیان می‌یابند و حتی ممکن است نواحی کدکننده پروتئین جدیدی ایجاد گردد. بعلاوه تحقیقات انجام شده در مورد مکانیسم های مولکولی نوترکیبی، ابزار جدیدی را جهت دستکاری عمدی ژن‌ها در اختیار ما گذارده است.

تبادل قطعه در اثر شکست و اتصال مجدد مولکول DNA صورت می‌گیرد

تا همین اواخر حتی به طور سطحی نمی‌توانستیم اساس مولکولی عمل تبادل قطعه را توضیح دهیم. در دهه ۱۹۳۰ با کمک مشاهدات سلولی، فرضیه تبادل قطعه به صورت کلاسیک مطرح شد. بر طبق فرضیه در طی تقسیم میوز کروموزوم‌های همولوگ جفت شده گاه به طور فیزیکی و در اثر کششی که در نتیجه انقباض آنها بوجود آمده است شکسته می‌شوند. شکستگی فوق که در کروماتیدها رخ داده است، سبب تعدیل فشار وارد بر آنها می‌شود و سرانجام انتهاهای قطع شده مجدداً به صورت جدیدی به یکدیگر متصل می‌شوند (شکل ۱).



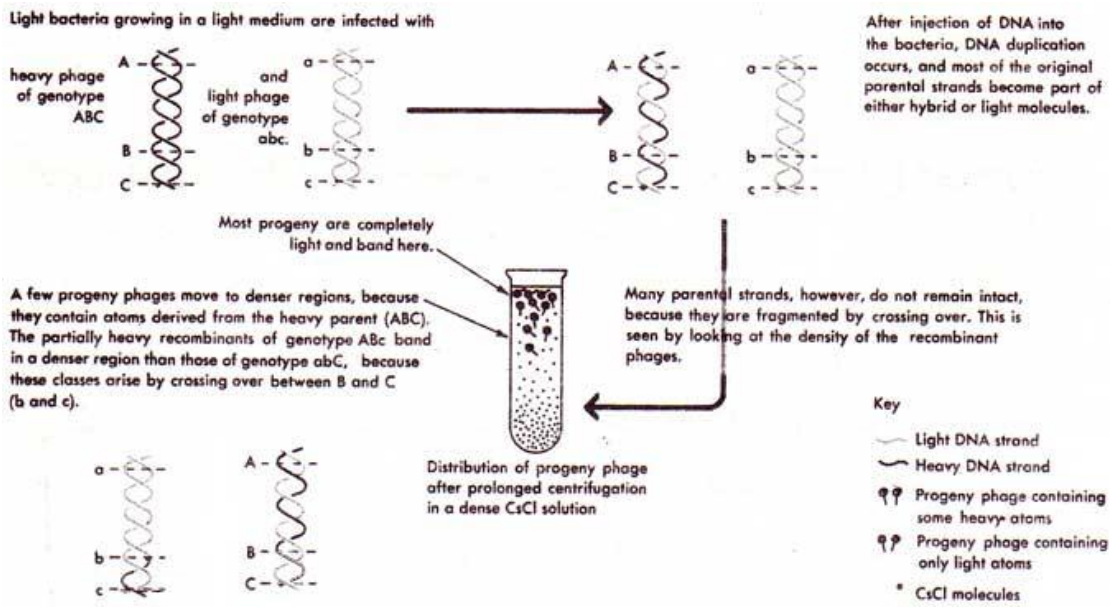
نمایش مکانیسم احتمالی تبادل قطعه بین کروموزوم‌ها. براساس نظر موجود هر کروماتید واجد یک مولکول مارپیچ مضاعف DNA است و همانندسازی DNA نیمه حفاظتی می‌باشد. مکانیسم انتخاب کپی ساده بدون آنکه قطعی صورت گیرد غیرممکن است.

طبق این مدل، نوترکیبی بعد از کامل شدن همانندسازی کروموزوم‌ها یعنی هنگامی که چهارکروماتید یک جفت کروموزوم همولوگ در کنار هم قرار گرفته باشند صورت می‌گیرد. در حدود سال ۱۹۵۵ فرضیه فوق خدشه‌دار شد. در این زمان ژنتیک‌دانان دریافتند که پدیده تبادل قطعه در ژن‌ها که خود جزیی از DNA هستند اتفاق می‌افتد. برای آنکه کروموزومهای نو ترکیب طول یکسانی داشته باشند و تبادل قطعه به صورت متعادل صورت گیرد باید لزوماً نقاط قطع بین نوکلئوتیدهای مشابه در دو کروماتید همولوگ باشد، چه در غیر این صورت مولکول‌های نوترکیب حاصل طولی متفاوت با مولکول‌های اولیه خواهند داشت.

در نتیجه چنین استدلالی، توجه دانشمندان به فرضیه دیگری که مربوط به نوترکیبی در حین همانندسازی کروموزومی بود معطوف گردید. براساس این فرضیه در طی عمل همانندسازی کروموزوم‌های جفت شده (در تقسیم میوز)، رشته DNA جدیدی که در طول کروموزوم مادر در حال تشکیل است به سمت کروموزوم همولوگ که آن نیز در حال همانندسازی است متوجه می‌شود و حالا از روی این الگو همانندسازی می‌کند. اگر رشته مقابل نیز همین عمل را انجام دهد (از کروموزوم همولوگی که توسط رشته مقابل به عنوان الگو انتخاب شده است به کروموزوم همولوگ دیگر متوجه شود) درست

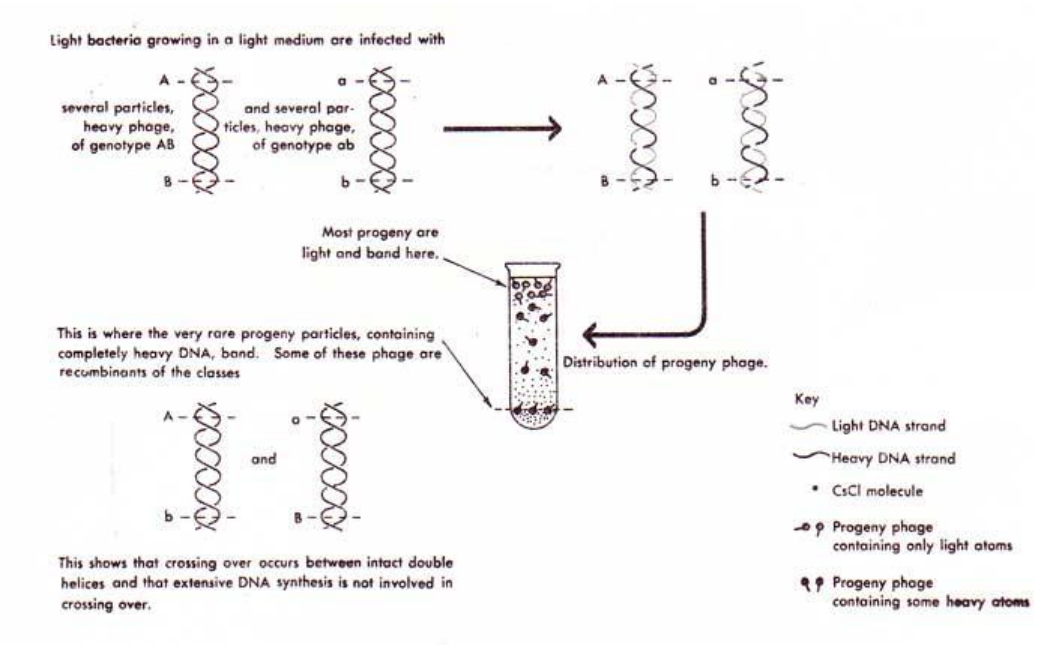
در همان نقطه عمل تعویض الگو صورت گرفته، دو رشته نوترکیب متعادل به وجود خواهند آمد. این فرضیه به نام فرضیه انتخاب کپی خوانده می‌شود. تفاوت اصلی این دو فرضیه در مورد پیش‌بینی مبدأ فیزیکی نوترکیبی کروموزومی است: اینکه آیا کروموزوم‌های نوترکیب مواد خود را از دو کروموزوم همولوگ اولیه بعد از قطع و اتصال مجدد آنها به ارث برده‌اند و یا در اثر انتخاب کپی با استفاده از مواد جدید تولید شده‌اند.

این دو فرضیه با استفاده از فاژهای لامبدای مادر که حاوی ایزوتوپهای سنگین (N^{15}, C^{13}) بودند مورد آزمایش قرار گرفتند (شکلهای $2,3$). علت استفاده از ایزوتوپهای سنگین این است که بتوان با استفاده از گرادیان کلرید سزیوم $(CsCl)$ بین رشته‌های مادر و دختر تمایز قائل شد. آمیزش ژنتیکی فاژهای سنگین (یا سنگین و سبک) در سلول کلی‌باسیلی که در محیط سبک (N^{14}, C^{12}) رشد می‌نمود، صورت گرفت. در چنین شرایطی تمام رشته‌های DNA ویروسی تازه سنتز شده از پیش‌سازهای سبک بوجود می‌آیند. بنابراین اگر مکانیسم انتخاب کپی صحیح باشد، تمام فاژهای نوترکیب باید سبک باشند و اگر مکانیسم شکست و اتصال مجدد صحیح باشد، بعضی از فاژهای نو ترکیب باید دارای اتم‌های سنگین مربوط به کروموزوم‌های والد خویش باشند. محصولات این آمیزشها را بر روی محلول غلیظ کلرید سزیوم قرار داده، سپس بسرعت سانتریفوژ کردند و بدین ترتیب مولکول‌های با چگالیهای مختلف از یکدیگر جدا شدند. در مرحله بعد فاژهای با چگالی مختلف جمع‌آوری و از طریق ژنتیکی مورد آزمایش قرار گرفتند تا انواع نوترکیب شناخته شوند. علی‌رغم انتظار اکثر زیست‌شناسان مولکولی نتایج قاطع حاصل نشان داد که فاژهای نوترکیب دارای اتم‌های سنگین هستند (شکل۲).



بکارگیری ایزوتوپ‌های سنگین در مطالعه مکانیسم عمل تبادل قطعه. (بعد از تزریق DNA فاژ به باکتری، همانندسازی آغاز می‌شود و اکثر DNA والدین جزیی از رشته هیبرید و یا رشته سبک را تشکیل می‌دهند.

ضمناً آزمایشهای دیگری که در این زمینه صورت گرفت نشان دادند که نوترکیبی می‌توانـد بـین مولکول‌های DNA ای که در حال همانندسازی نیستند نیز رخ دهد (شکل۳).



تبادل قطعه و همانندسازی به طور مستقل انجام می‌شوند. بعد از تزریق DNA فاژ به باکتری اکثر رشته‌ها جزیی از رشته‌های هیبرید (دو رگه) می‌گردند. بندرت مولکول‌های تزریق شده همانندسازی می‌کنند و در این صورت رشته‌هیا اولیه از یکدیگر جدا نشده و به وسیله پوسته پروتئینی احاطه می‌گردند. به این ترتیب ما می‌توانیم از خود سئوال کنیم که آیا مولکول‌های DNA سنگین نادر نوترکیب هستند؟ در این مطالعه نیز از گرادیان کلرید سزیوم جهت جداسازی مولکول‌های مختلف استفاده شده است. نحوه عمل بدین ترتیب می‌باشد که انواع فاژهای به دست آمده را در لوله آزمایش حاوی کلرید سزیوم به مدت طولانی سانتریفوژ می‌نمایند. فاژهایی که ته لوله آزمایش قرار می‌گیرند آنهایی هستند که هر دو رشته DNA آن‌ها سنگین است. در میان این فاژها بندرت فاژهایی قرار می‌گیرند که نوترکیب هستند.کمی بالاتر از این ناحیه فاژهای دو رگه و بالاتر از آن فاژهایی قرار می گیرند که هر دو رشته آنها سبک می‌باشند. در قسمت چپ شکل تبادل قطعه بین دو DNA از والدین سنگین اولیه رخ داده است و این امر نشان‌دهنده امکان انجام تبادل قطعه در زمانی می‌باشد که همانندسازی صورت نگرفته است.

بنابراین بنظر می‌رسد مکانیسم اصلی تبادل قطعه در باکتریوفاژ، قطع و اتصادل مجدد مارپیچ‌های مضاعف DNA دست نخورده باشد. در واقع این امر در مورد باکتری‌ها و جانداران عالی‌تر نیز صادق است. تعویض فیزیکی DNA بین کروماتیدهای خواهری سلول‌های پستانداران را بخوبی بـا اسـتفاده از روش رنگ‌آمیزی خاصی که از کروماتیدهای خواهری را قابل تشخیص می‌نماید میتوان نشان داد (شکل۴).

عمل تبادل قطعه متعادل را میتوان بخوبی در کشت سلولی هامستر نشان داد. کروموزوم‌هایی که هر دو زنجیره *DNA* آنها به جای تیمیدین دارای برومو دزواکسی یوریدین است در اثر رنگ‌آمیزی گیمسا به رنگ روشن و آنها که تنها یک زنجیره *DNA* آنها یان ترکیب را دارد به رنگ تیره در می‌آیند. بعد از دوبار تقسیم سلولی در محیط واجد برومودزواکسی یوریدین در یک کروماتید تازه همانندسازی کرده، تنها یکی از زنجیره‌ها حاوی ترکیب فوق است، در حالی که کروماتید خواهری آن در دو زنجیره دارای برومو دزواکسی یوریدین می‌باشد. بنابراین کروماتیدهای خواهری را می‌توان از یکدیگر تمیز داد. در نتیجه چنانچه تبادل قطعه‌ای در چنین شرایطی رخ دهد (این نوع تبادل قطعه به نام تعویض کروماتید خواهری خوانده می‌شود) بخوبی با مشاهده قطعات تیره و روشن موجود در هر کروماتید قابل تشخیص است (عکس بالا) چنین تبادلاتی در هنگام وجود عواملی که به *DNA* آسیب وارد می‌کنند (مانند داروی آدریامایسین) افزایش می‌یابند (عکس پایین). توجه داشته باشید که تعویض کروماتید خواهری همان عمل تبادل قطعه بین کروموزوم‌های همولوگ در حین تقسیم میوز نیست که سبب تنوع ژنتیکی می‌شد بلکه پدیده مشابهی است که در هنگام تقسیم میتوز و قبل از آنکه کروماتیدهای خواهری از یکدیگر جدا شوند، در آنها اتفاق می‌افتد. این عمل سبب ترمیم ضایعات وارد بر *DNA* می‌شود.