بناء ر ن أ فى مميزة النواة

RNA Synthesis in Eucaryotes

ان عملية بناء ر ن أ Transcription فى مميزة النواه عمليه على درجة عاليه من الانتقائية Selective ففى معظم الثديات على سبيل المثال لا يتم نسخ أكثر من حوالى ١ ٪ من مجموع التتابعات التى توجد فى د ن أ الخلية إلى تتابعات فعالة من ر ن أ أى فى صوره ر ن أ المراسل الناضج أو التركيبى mature mRNA . وتحدث عملية الانتقاء على مستويين :

الأول : حدوث نسخ جزئى فقط لتتابعات معينه من د ن أ لانتاج ر ن أ النووى nRNA .

الثانى : بقاء نسبه صغيرة فقط من هذه التتابعات المنسوخة نتيجة لإجراء عمليات تجهيز وتعديل وحذف لتتابعات كثيرة من ر ن أ النوى قبل خروج ر ن أ النهائى إلى السيتوبلازم .

أنواع انزيمات بلمرة ر ن أ فى مميزه النواه :

على العكس مما وجد فى غير مميزه النواه حيث يعمل انزيم بلمره ر ن أ واحد لانتاج الانواع المختلفة من ر ن أ ؛ تبين أنه فى مميزه النواه توجد ثلاثة أنواع مختلفة من انزيمات بلمرة ر ن أ وهى :

١ - انزيم بلمره ر ن أ RNA polymerase I ويختص ببناء السلاسل الطويلة الخاصة بجزئيات ر ن أ الريبوسومى rRNA .

٢ - انزيم بلمره ر ن أ RNA polymerase II ويختص بنسخ سلاسل جزئيات ر ن أ المراسل mRNA .

٣ – انزيم بلمره ر ن أ RNA polymerase III ويقوم ببناء عدد من سلاسل ر ن أ القصيرة مثل ر ن أ الناقل و ر ن أ الريبوسومى تقصير السلسلة (5 SrRNA).

يتكون كل انزيم من هذه الانواع الثلاثة من عدد من تحت الوحدات وقد تتشابه الانزيمات الثلاثة فى بعض مكوناتها من الوحدات إلا أنها تحتوى على وحدات فريدة تميز كل نوع من هذه الانزيمات كما فى الشكل (٦ – ١) . وعلى العكس من انزيم بلمره ر ن أ فى البكتريا الذى يمكنه مباشرة الارتباط بمنطقة تتابع ابتداء النسخ Promoter . نجد أن انزيمات بلمره ر ن أ فى مميزة النواه لا يمكنها أن ترتبط بتتابع الابتداء إلا فى وجود بعض البروتينات النوعية الموجودة بالفعل على جزئ د ن أ نفسه .

تحتوى خلية الثدييات عاده على حوالى ٤٠٠٠٠ جزئ من انزيم البلمره RNA polymerase II وعلى نفس العدد تقريبا من انزيم البلمره I وحوالى ٢٠٠٠٠ جزئ من انزيم البلمره RNA polymerase III . علما بأن التركيز الفعلى لانزيمات البلمرة يختلف حسب معدل نحو الخلية .

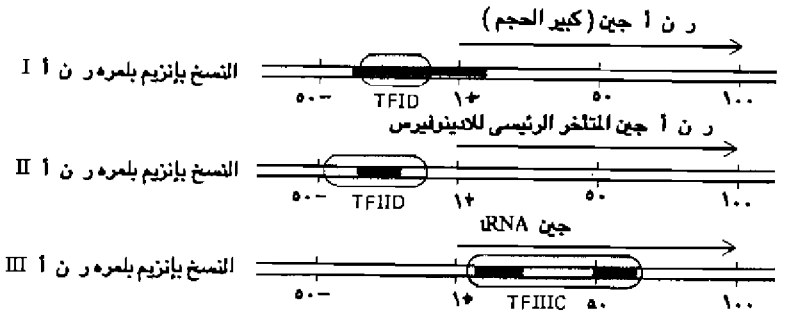
الشكل (٦-١):

رسم تخطيطى يبين الإختلافات فى تركيب تحت الوحدات البروتينية المكونة لإنزيمات بلمره ر ن أ فى مميزه النواه (الخميرة) . تظهر تحت الوحدات المتشابهة بنفس المظهر . يظهر الوزن الجزيئى لتحت الوحدات بالكيلو دالتون . وتأخذ تحت الوحدات الثلاثة المتماثلة الوزن الجزيئى فى الانزيمات الثلاثة اللون الاسود .

دور عوامل النسخ Transcription Factors (TF) فى الارتباط المستبدىء Promoter :

لا يمكن لانزيمات بلمره ر ن أ التعرف مباشرة على منطقة بالمستبدىء ولكن لابد أولا من حدوث ارتباط لبروتينات نوعية مع تتابعات معينه فى د ن أ القالب لتنشيط المستبدىء وتحفيزه على الدخول فى عملية النسخ . يطلق على هذه البروتينات النوعيه اسم عوامل النسخ Transcription Factors (TF) وهى ضرورية لبدء بناء ر ن أ ، وهى تختلف عن عوامل بدء النسخ فى غير مميزه النواه (عامل سيجما) فى أنها ترتبط بجزىء د ن أ مستقلة عن انزيم بلمره ر ن أ تتعرف كل من الانزيمات الثلاثة على المستبدىء Promoter نوعيه مختلفة ويحتاج كل منها فى القالب إلى عوامل نسخ (TF) مختلفة عن الآخر ويرمز اليها بـ TF I ، TF II ، TF III على الترتيب . ويكون الرمز متبوعا بحرف يدل على اسبقيه اكتشافه . فمثلا TF III A كان أول عامل نسخ اكتشف للعمل مع انزيم RNA polymerase III .

دلت الدراسات المعملية *in vitro* على أن عوامل النسخ TF تكون بمثابة معقدات نسخ ثابته نسبيا وتقوم بجذب جزئيات انزيمات بلمره ر ن أ انتقائيا لمنطقة تتابع الابتداء النوعية والخاصة بكل منها . ترتبط كل من عوامل النسخ المختلفة بالمنطقة الخاصة بها على سلسلة د ن أ القالب بالنسبة للمستبدىء Promoter . يكون كلا من انزيم البلمره ر ن أ I ، وانزيم بلمره ر ن أ II معقدات مع كل من عوامل النسخ النوعية الذى يرتبط به قبل موقع بدء النسخ (upstream) مباشرة . إلا أن عوامل النسخ الرئيسية لانزيم بلمره ر ن أ RNA pol. III ترتبط فى نقطة لاحقة downstream بعد موقع بدء النسخ مباشرة مما يعنى أن انزيم RNA pol III لابد أن يقوم بنسخ منطقة ارتباط عامل النسخ بدون أن يزيح أو يزيل عامل النسخ من على قالب د ن أ كما فى الشكل (٦ - ٢) . يبدو أن هذا العامل (TF III C) يؤدى إلى إنثناء د ن أ حول نفسه لتكوين حبيبة كبيرة من البروتين النووى .



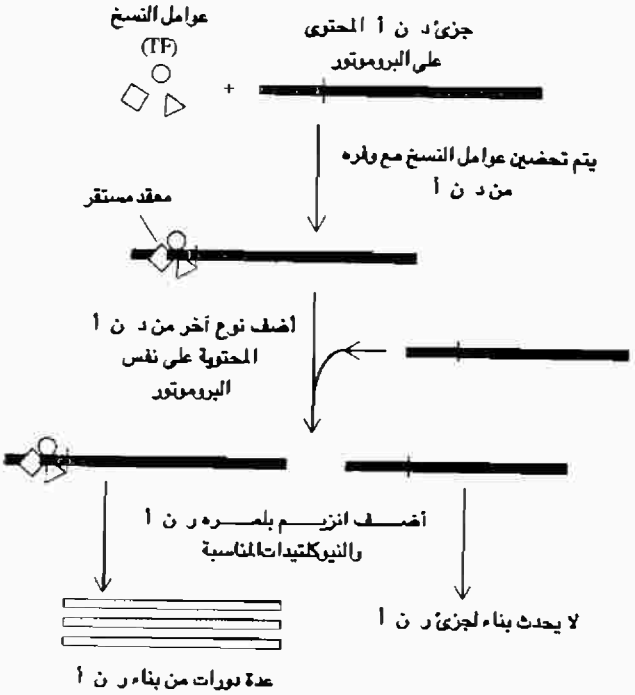
الشكل (٦ - ٢):

تكوين معقدات مستقرة لعوامل النسخ (TF) على الجين (فى د ن أ) . تدل المستطيلات السوداء على مواقع التتابعات الضرورية لنشاط البروموتور . والمنطقة المظللة تدل على الجزء من الجين المرتبط بعوامل النسخ . تدل الارقام على المواقع على جزئ د ن أ (مقدرة بعدد ازواج النيوكلتيدات) بالنسبة لموقع بدء النسخ (+١) .

وقد تبين أنه لابد من تكوين معقد مستقر وثابت نسبيا بين عامل نسخ معين وبين منطقة المستبدىء Promoter حتى يمكن ضمان انتظام عملية النسخ بصفة مستمرة . وقد امكن التحقق من ذلك بتجربة معملية تم فيها مقارنة تأثير تحضين د ن أ مع عامل النسخ المناسب ،

فى حين اضيف العامل نفسه إلى نفس د ن أ فى التجربة المقارنة ولكن بدون اعطاء فترة التحضين المناسبه .

تبين أنه فى الحالة الأولى كانت فترة التحضين كفيله بتكوين معقد ثابت ومستقر من د ن أ وعامل النسخ ، وبذلك نشطت عملية النسخ عدة مرات لهذا الجزئ من د ن أ فى حين لم يتسنى ذلك لنفس الجزئى من د ن أ نتيجة لعدم اتاحة الفرصة لتكوين المعقد المذكور كما فى الشكل (٦ - ٣) .

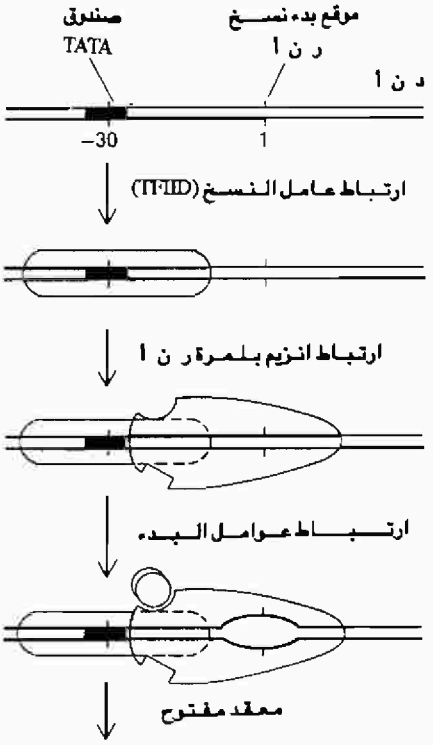


الشكل (٦ - ٣)،

تجربة معملية لإثبات ضرورة تكوين معقد نسخى مستقر فى منطقة البروموتور فى مميزه النواه حتى يمكن بدء عملية النسخ .

يوجد عامل نسخ هام جداً لعدد كبير من تتابعات الابتداء Promoter لانزيم RNA pol II وهو TF II D والذى يتكون من معقد بروتينى كبير الحجم ويطلق عليه عاده عامل TATA

لأنه يرتبط نوعيا بتتابع نوعى محفوظ Consensus Sequence غنى فى A-T يسمى صندوق [TATA box] يتمركز عند حوالى (-٢٥) قاعدة قبل موقع بدء النسخ (+١) ويؤدى نشاط عامل النسخ TATA إلى تحفيز النشاط النسخى لانزيم RNA pol II كما هو مبين فى الشكل (٦ - ٤) .



الشكل (٦ - ٤):

ميكانيكية التعرف على منطقة البروموتور بواسطة إنزيم بلمره ر ن أ II فى مميزه النواه . لابد من ارتباط عامل النسخ (TF II D) بصندوق TATA لتكوين معقد نسخى مستقر قبل أن يتمكن الانزيم من التعرف على البروموتور

اختلاف النشاط النسخى لأنزيم RNA pol II حسب تتابعات د ن أ القالب :

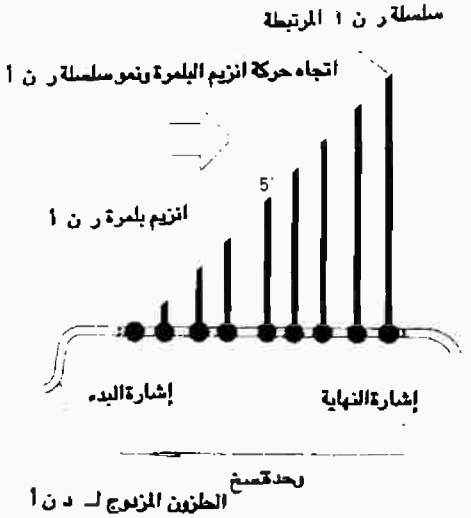
وجد أن انزيم RNA pol II المشترك فى عملية النسخ يبدو تحت المجهر الالكترونى كحبيبات كروية تجر وراءها ذيلا من سلسلة تمثل جزئ ر ن أ وجد أن هذه الحبيبات تبدو عادة كوحدات متباعدة نسبياً . يشير ذلك إلى أن معظم الجينات التى يتم نسخها إلى جزئيات ر ن أ أوليه (precursers) تكون ذات تكرار منخفض وقد يفسر ذلك على أساس اتاحة الفرصة لوحدة من انزيم البلمره لاتمام عملية النسخ لجين معين قبل أن تبدأ وحدة انزيمية أخرى فى عملية النسخ . ولكن يحدث احيانا أن عدداً كبير نسبيا من جزيئات انزيم بلمره ر ن أII (مرتبطاً بها سلاسل ر ن أ النامية) تكون متجمعة مع بعضها . تظهر هذه التجمعات بصفة خاصة فى التتابعات التى تمثل عدد محدود من الجينات التى يتم نسخها بتكرار اكبر كما فى الشكل (٦ - ٥) .

الشكل (٦-٥):

منطقة من الكروماتين تحتوى على جين يتم نسخه بمعدل عالى جدا بحيث تظهر عدة جزيئات من انزيم بلمره ر ن أ II ملتصقة بنواتج نسخها من سلاسل ر ن أ فى نفس الوقت ويكون اتجاه النسخ من اليسار إلى اليمين.

يتزايد طول سلاسل ر ن أ المرتبطة بالانزيم فى مثل هذه التجمعات فى اتجاه النسخ مما

يعطيها طرازاً مميزا بحيث يحدد هذا الطراز مواقع بدء وإنهاء أو توقف انزيم بلمره ر ن أ II بالنسبة لكل وحدة نسخ نوعية Transcription unit كمـا فى الشكـل (٦ – ٦) .



الشكل (٦-٦):

وحدة نسخ نموذجية . مبيناً اتجاه النسخ ومواقع البدء والتوقف فى الوحده .

يمكن تلخيص النتائج الهامة التى توصلت إليها الدراسات البيوكيماوية الموازية للنتائج المتحصل عليها من المجهر الالكترونى فى النقاط التالية :

١ – أن جزئيات انزيمات بلمره ر ن أ فى مميزه النواه (كما فى غير مميزه النواه) تبدأ وتنهى النسخ عند مواقع نوعية محددة على الكروموسوم .

٢ – أن متوسط طول سلسلة ر ن أ الناتجة من انزيم البلمره RNA pol II فى وحدة النسخ يبلغ حوالى ٨٠٠٠ نيوكلتيده وقد يزيد إلى أكثر من ٢٠٠٠٠ نيوكلتيده . أن هذا الطول الكبير نسبيا ، والذى يزيد كثيرا عن الطول المتوسط لسلسلة mRNA الناضج الذى يدخل فعلا فى عملية الترجمة إلـى بروتـين والـذى يـبلغ حـوالى ١٢٠٠ نيوكليتـده (يشفر لبروتين بطول ٤٠٠ حامض امينى) . قد يعكس التركيب المعقد للجين فى مميزه النواه وخاصه وجود عدد من الانترونات Introns فى النسخ الأوليه لجين والتى يتم

استئصالها فى المراحل اللاحقة لتجهيز mRNA النهائى أو الناضج mature mRNA كما سيأتى بعد .

٣ – على الرغم من أن معدل استطاله سلسله ر ن أ يبلغ حوالى ٣٠ نيوكلتيده فى الثانية بالنسبة لجميع أنواع ر ن أ فإن مواقع بدء النسخ المختلفة لجزئيات انزيم بلمره ر ن أ II تختلف كثيرا فى درجة كفاءتها بحيث يتم نسخ بعض الجينات بمعدل اسرع عن الأخرى.

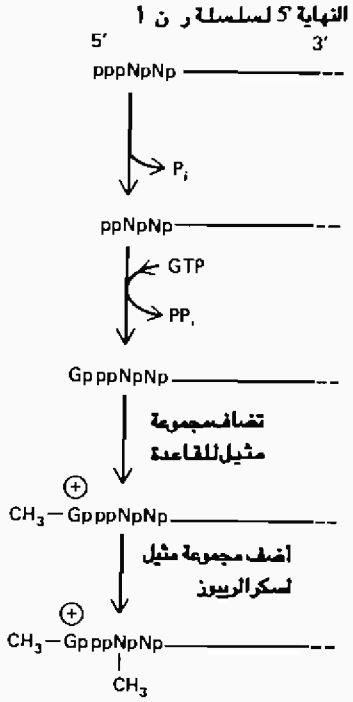
تعديل أو تجهيز النسخ الأولية لسلاسل mRNA :

تعرف النواتج الأولية لعملية النسخ بواسطة انزيم RNA pol II باسم جزئيات ر ن أ غير المتجانس النووى (hnRNA) وترجع التسمية إلى أن هذه الجزيئات تكون غير متجانسة فى احجامها الأولية بمجرد انتاجها فى النواه .

يكون مصير كثير من هذه النسخ الأوليه أن تترك النواه فى صورة جزئيات ر ن أ المراسل mRNA إلا أن ذلك لا يحدث قبل أن تتم بها عمليات تحوير تساهميه عند كل من النهاية 5' والنهاية 3' أثناء عملية النسخ وهذه التعديلات هامه جدا وضرورية لحسن اداء سلاسل mRNA لوظيفتها فى الترجمة فى السيتوبلازم كما سيأتى بعد .

يتم أولاً التعديل أو التحوير فى النهاية 5' لسلسله ر ن أ (وهى النهاية المتكونة أولا أثناء عملية النسخ) وذلك باضافة ما يسمى بقلنسوة Cap الجوانين المميثلة methylated - G nucleotide . تحدث التغطية بالقلنسوة مباشره عقب بناء الثلاثين نيوكلتيده الأولى فى سلسلة ر ن أ النامية. وتشتمل على تكثيف مجموعة الفوسفات الثلاثية لجزىء GTP مع مجموعة ثنائية للفوسفات متبقية على النهاية 5' للسلسلة النامية كما فى الشكل (٦ – ٧) وتقوم هذه القلنسوة بدور رئيسى فى عملية استبداء بناء البروتين كما يبدو أنها تقوم بحماية النسخة النامية من ر ن أ من عملية التحلل والهدم .

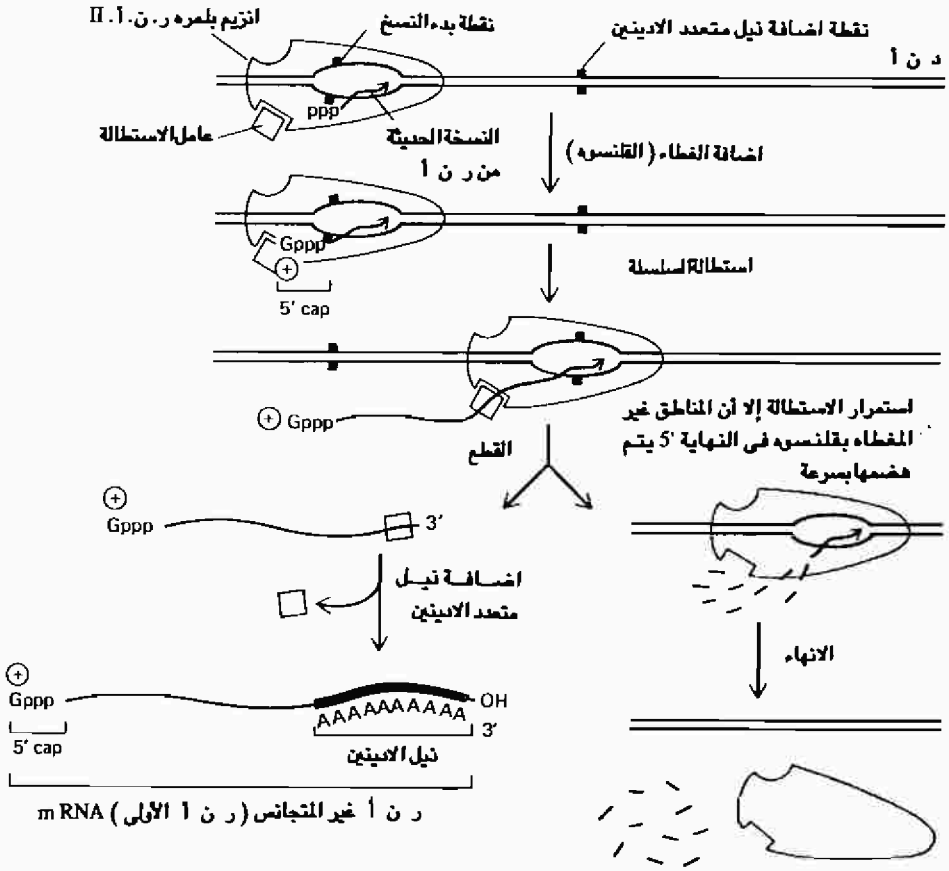
ولا تتحدد النهاية 3' لمعظم سلاسل ر ن أ المراسل mRNA بمنطقة انتهاء النسخ أو توقفه (حيث أن النسخ يستمر ويتجاوز هذه النهاية النوعية فى الناتج الأولى hnRNA) .



الشكل (٦-٧)،

تفاعلات تكوين الغطاء (القلنسوه) عند النهاية 5' لسلسلة ر ن أ الجارى بنائها بواسطة انزيم بلمره ر ن أ II .

ولكنها تتميز بتحوير أو تعديل من نوع آخر بحيث يحدث كسر نوعى للسلسلة النامية عند موقع محدد ، بحيث يضاف إلى النهاية 3' المكسوره نيل من عديد الادينين polyAtail بواسطة انزيم بلمره مستقل بحيث يصل طول هذا النيل إلى حوالى ١٠٠ – ٢٠٠ من قواعد الادينين . يتم التعرف على نقطة الاشاره المميزة لمكان الكسر أو القطع بظهور التتابع النوعى القصير : AAUAAA فى سلسلة ر ن أ والتى تقع على بعد ١٠ – ٣٠ نيوكلتيده قبل موقع القطع واضافة الذيل . بعد احداث الكسر أو القطع مباشرة يقوم انزيم poly A polymerase باضافة نيل متعدد الأدينين إلى النهاية 3 فى سلسلة ر ن أ لاتمام النسخة المبدئية أو الأولية من ر ن أ كما فى الشكل (٦ – ٨) .



الشكل(٦-٨) :

بناء جزىء ر ن أ غير المتجانس النووى hnRNA بواسطه انزيم بلمره ر ن أ II واضافة نيل من متعدد الادينين poly A إلى سلسلة ر ن أ مما يؤدى إلى كسر السلسله ليتسنى إضافة هذا النيل . فى مميزه النواه الراقية (بعكس الخميرة) لا يتم ايقاف النسخ نهائيا بعد هذه النقطة ولكن على العكس يستمر النسخ لعده آلاف من النيوكلتيدات قبل أن يصل إلى نقطة النهاية ويتم بعد ذلك هضم الأجزاء الزائدة من السلسلة بعد نقطه إضافة النيل

ومن المدهش أن انزيم بلمرة ر ن أ II RNA pol II يستمر بعد نقطة الكسر هذه فى عملية النسخ بدون توقف لعدة مئات أو الاف من النيوكلتيدات الزائدة إلى أن يحدث إيقاف أو إنهاء للنسخ عند موقع آخر متقدم . وحيث أن هذا الجزء الأخير من السلسلة المنفصلة بعد موقع الكسر يكون خالياً من قلنسوه الجوانين على النهاية '5 فإنه يكون معرضاً للتحلل السريع والتلاشى .

لم تعرف حتى الآن وظيفة ذيل Poly A على وجه التحديد ، ولكنه قد يكون له دور فى تسهيل خروج ر ن أ المراسل mRNA الناضج من النواه، كما يعتقد أنه يلعب دوراً فى ثبات أو استقرار جزيئات mRNA بحيث يؤخر عملية هدمها فى السيتوبلازم حتى يمكنها أن تشارك فى عدد محدد من دورات الترجمة قبل هدمها .

على الرغم من أن نواتج نسخ انزيم بلمرة ر ن أ II تمثل أكثر من نصف ر ن أ الإجمالى المنتج فى الخلية ، إلا أن معظم هذه النسخ تكون غير ثابتة وقصيرة العمر ، بحيث أن ما يتبقى منها بالفعل فى وقت ما بالخلية يا يمثل إلا نسبة ضئيلة جداً من إجمالى ر ن أ كما فى الجدول (٦ ـ ١) .

جدول ٦ – ١ : بعض المقادير النسبية من أنواع ر ن أ فى خلية نموزجية للثديا.ت

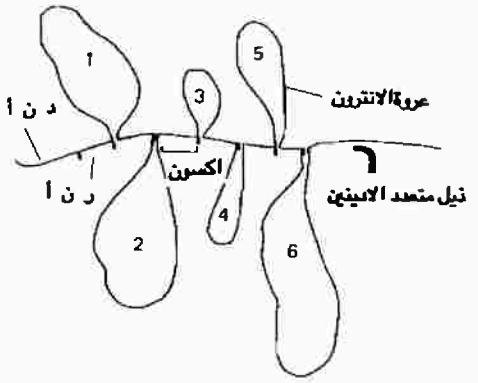
نوع ر ن أ	الكمية المنتجة الأولية (كنسبة من إجمالى ر ن أ)	الكمية المتبقية بالفعل (كنسبة من إجمالى ر ن أ)
	٪	٪
ر ن أ الريبوسومى		
rRNA (فى النواة)	٣٩	٤
rRNA (فى السيتوبلازم)	—	٧١
hnRNA (فى النواة)	٥٨*	٧
mRNA الناضج (فى السيتوبلازم)	—	٣
tRNA	٣	١٥

• يلاحظ أنه على الرغم من أن معظم ر ن أ الأولى المنسوخ يكون فى صورة hn RNA إلا أن معظمه يتم هدمه وبذلك فإن النسبة المتبقية فى صورة mRNA الناضج تكون ضئيلة جداً ولا تتعدى ٣ ٪ ر ن أ فى الخلية .

تبين أن كلا من عمليتى اضافة القلنسوه G على النهاية '5 وإضافة الذيل poly إلى النهاية '3 تحتاجان إلى نشاط انزيم RNA pol II بالاضافة إلى أحد عوامل الاستطاله elongation factor الذى يكون مرتبط بالانزيم اثناء عملية النسخ .

حذف تتابعات كبيره متخلله من hnRNA اثناء تجهيز mRNA فى النواه :

ثبت أن النسخة الأولية الناتجة فى النواه من hn RNA تكون غير ثابتة إذ تبين أن طول جزئيات hnRNA الحديثة البناء ينخفض بسرعة بحيث يصل إلى طول جزئيات mRNA السيتوبلازمى بعد حوالى ٣٠ دقيقة فقط من انتاجها (من حوالى ٦٠٠٠ نيوكلتيده فى سلسلة hnRNA ينخفض العدد إلى حوالى ١٥٠٠ نيوكلتيده فى سلسلة mRNA) . وبعد هذه الفترة القصيرة تبدأ جزيئات mRNA فى الخروج من النواه بحيث لا يصل إلى ستيوبلازم الخلية إلا حوالى 5 % فقط من إجمالى hn RNA الأصلى الذى انتج فى النواه فى حين يتم هدم معظم ما تبقى منه إلى شظايا قصيرة فى النواه على مدى حوالى ساعة . تبين أن هذه التتابعات الطويلة التى يتم هدمها لاتقع بالمره على أى من طرفى السلسله '5 أو '3 ولكنها تكون متخلله للسلسلة فى مناطق وسطية وقد تحقق ذلك عند مقارنة تتابعات النيكلوتيدات فى سلسلة mRNA معين بالتتابعات المقابلة فى د ن أ المستخدم كقالب للنسخ بإستخدام تقنية التهجين بين ر ن أ / د ن أ والتحليلات الجزيئية للمقارنة بين تتابعات د ن أ الاصلية وتتابعات mRNA النهائى حيث ظهر وجود تتابعات وسطية فى د ن أ غير موجودة فى mRNA المنسوخ عليها وذلك فى حالات متعددة مثل جين Ovalbumin ، B - globulin فى الفقاريات أى أن الجين فى مميزه النواه لا يتكون من تتابعات شفرية مستمر. بل تتخلله تتابعات غير شفرية طويله ، بعكس جينات غير مميزه النواه التى تتكون من تتابع شفرى مستمره يطلق على التتابعات التى توجد فى د ن أ مميزه النواه ولكنها تحذف من mRNA اسم الانترونات Introns فى حين تسمى التتابعات الموجودة فى mRNA تتابعات الاكسونات exons كما فى الشكل (٦ – ٩) .



الشكل (٦-٩).

اثبات وجود انترونات فى جينات مميزه النواة بتجربة التهجين بين د ن أ و ر ن أ حيث يتم هنا انتاج بيتا جلوبين mRNA ويتم عزلة وتنقيته من الخلايا المتخصصة فى إنتاجه . ثم تجرى تجربة تهجين من mRNA ومنطقة د ن أ المحتويه على هذا الجين . تبدو المناطق من جزئ د ن أ التى لا يحدث بها تهجين مع ر ن أ كعروات ممتده إلى الخارج وهى تمثل الانترونات فى هذا الجين .

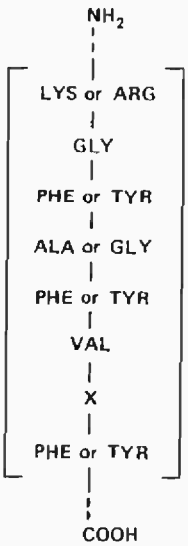
تراكب ر ن أ المراسل RNA splicing

يتم حذف أو استبعاد تتابعات الانترونات المتخلله لجزىء hnRNA أثناء عملية تجهيز mRNA ثم توصل تتابعات الاكسونات ببعضها بعملية تشبه القص / واللصق ر ن أ RNA splicing حيث تنبعج الإنترونات للخارج فى صورة عروات Lariats قبل إستبعادها من المعروف أن النسخة الأولية من hnRNA مطابقة فى الطول والتتابع لمنطقة القالب من د ن أ المنسوخة عليه ، بحيث تحتوى هذه النسخة على جميع الإكسونات والإنترونات ؛ فى حين نجد أن تلك الأخيرة تحذف أو تُستبعد أثناء تجهيز mRNA . تحدث هذه العملية فى نواه الخلية قبل أن يخرج mRNA إلى السيتوبلازم ، بحيث يحتوى فقط على تتابعات الإكسونات التى تشفر لسلسله متعدد ببتيد نوعى عند الترجمة على الريبوسومات . تمثل تتابعات الإنترونات فى hnRNA نسبه كبيرة جدا من الطول الكلى للجزئ ؛ ويختلف طول وعدد هذه الإنترونات من جين إلى آخر . ويفسر ذلك كيف يتبقى من الطول الكلى للنسخة الأصلية من hnRNA (حوالى ٥٠٠٠٠ نيوكلتيده) تتابع قصير فقط من mRNA يتراوح بين ٥٠٠ ، ٣٠٠٠ نيوكلتيده فقط .

دور البروتينات النووية الصغيرة snRNP فى عملية التراكب Splicing :

يتم تكثيف سلسله ر ن أ المنسوخة حديثا بسرعة إلى مجموعات متجاوره من الحبيبات المحتوية على بروتينات . تتكون كل حبيبة من حوالى ٥٠٠ نيوكلتيده من ر ن أ ملتفة حول معقد بروتينى يقوم بتكثيف وتجهيز كل نسخة ناميه من ر ن أ وهذا المعقد يشبه إلى حد ما تركيب النيوكليوسومات فى الكروماتين.

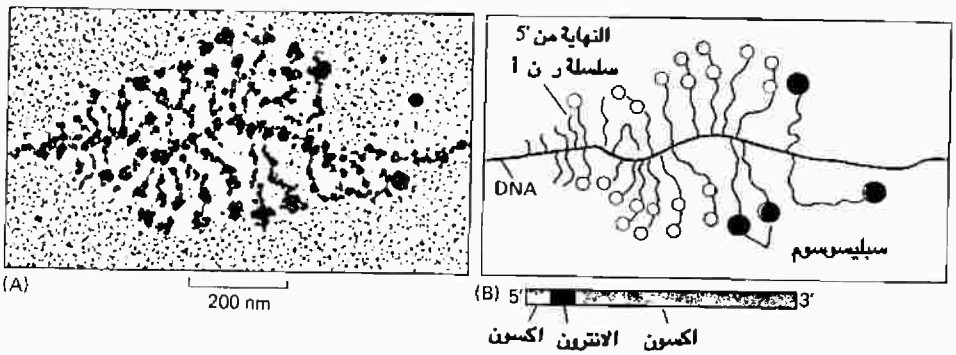
يمكن فصل وتنقية حبيبات hnRNP's الناتجة (وتسمى حبيبات الريبونيوكليوبروتين النووية غير المتجانسة) بعد معاملة النواة بإنزيم الريبونيوكليز RNase بطريقة تسمح فقط بهدم شريط ر ن أ الرابط بين الحبيبات. تترسب هذه الحبيبات عند 30S ويبلغ نصف قطر كل منها ضعف نصف قطر النيوكليوسوم (أى حوالى 20 nm) . يتكون بروتين اللب أو البروتين المركزى فى كل حبيبة من حوالى ٨ أنواع مختلفة من البروتينات يتراوح مجموع وزنها الجزيئى من ٣٤٠٠٠ إلى ١٢٠٠٠٠ دالتون ، وتعد هذه البروتينات أكثر البروتينات وفره فى النواه بعد الهستونات . تحتوى كل من هذه البروتينات الثمانية على نسخة أو أكثر من تتابع مشترك قصير ونوعى من الاحماض الأمنية كما فى الشكل (٦ – ١٠) .



الشكل (٦-١٠)،

تتابع قصير من الاحماض الأمينية مميز لكثير من البروتينات المرتبطة بسلاسل ر ن أ فى مميزة النواة .

تبين وجود بعض الحبيبات الثابتة (المستقره) والتى تكون أقل شيوعاً فى النواه عن الحبيبات السابقة . وتوحى مواقعها على سلاسل ر ن أ بأنها تقوم بدور هام فى عملية التراكب Splicing . تتكون هذه الحبيبات بسرعة جدا عند نقاط الالتقاء بين تتابعات الانترونات والاكسونات، وكلما استطالت سلسله ر ن أ يحدث التحام بين هذه الحبيبات فى أزواج لتكوين معقد كبير يسمى Spliceosome الذى يقوم بعملية التراكب Splicing (القطع والربط) فى سلاسل ر ن أ كما فى الشكل (٦ – ١١) .



الشكل (٦ - ١١):

صورة بالمجهر الالكترونى لتحضير من الكروماتين تبين تكوين السبليسوسوم :

أ – جين يشفر لبروتين الكوريون فى الدروسفلا .

ب – معظم سلاسل ر ن أ تحتوى على واحد أو إثنين من بروتينات RNP بالقرب من النهاية 5'

أظهرت نتائج التجارب البيوكيماوية أن النواه تحتوى على عدد من المعقدات المتكونة من بروتينات مقترنة مع ر ن أ قصير السلسله (لا يزيد طول السلسله عن ٢٥٠ نيوكلتيده) . وقد اطلق على هذه المعقدات اسم معقدات البروتينات الريبونووية الصغيرة Small nuclear ribonucleoproteins (sn RNP's) ويرمز إليها كالآتى :

U_1 , U_2 , U_3 , ... U_{12} RNA'S وهى تشبه فى تركيبها الريبوسومات من حيث حدوث اقتران فى كل منها بين ر ن أ والبروتينات إلا أنها أصغر بكثير فى الحجم عن الريبوسومات حيث يصل وزنها الجزيئى إلى حوالى ٢٥٠٠٠٠ دالتون مقابل ٤,٥ مليون دالتون للريبوسوم .

تبين أن كل من هذه الأنواع من sn RNP's تقوم بالتعرف على تتابع نوعى فى

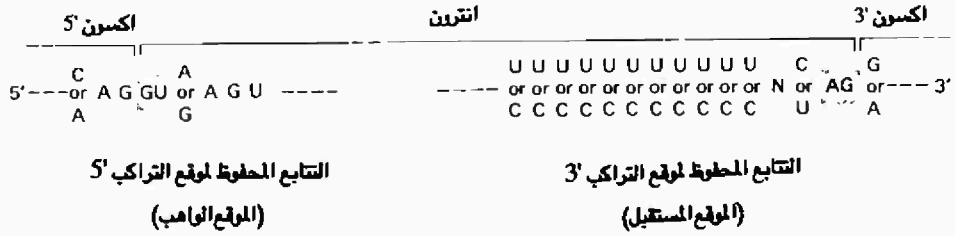
سلسلة hnRNA من خلال التزاوج التكاملى بين القواعد RNA / RNA . تشارك بعض هذه المعقدات الصغيرة فى عملية التراكب Splicing كما أن بعضها يقوم بدور فى تفاعلات الكسر Cleavage التى تؤدى إلى تكوين نهايات '3 لبعض سلاسل ر ن أ حديثه التكوين.

يتم حذف الانترونات فى شكل عروات Lariat

تختلف الانترونات فى الطول ما بين ٨٠ نيوكلتيده إلى ١٠٠٠٠ نيوكلتيده أو أكثر . وتختلف عن الاكسونات فى أن تتابعات القواعد فيها ليس لها قيمة أو أهمية محددة لذلك يعتقد بأن الانترونات قد تراكمت بها الطفرات بمعدل سريع أثناء التطور . كما أنه من الممكن تغيير معظم تتابعات الانترونات بدون أن يصاحبه أى تغيير يذكر فى وظيفة الجين وقد أدى ذلك إلى أفتراض أن الانترونات ليس لها وظيفة بالمرة وأنها تمثل غالباً « مخلفات وراثية » "genetic junk" وهو ما سوف نتعرض له فيما بعد . وقد وجد أن التتابعات الثابتة أو المحفوظة اكثر فى الانترون هى تلك التتابعات المطلوبة لاستبعاد أو استئصال الأنترون حيث تبين وجود تتابع نوعى محافظ عليه consensus sequence عند كل من نهايتى منطقة الأنترون . وأن هذا التتابع المحفوظ يتشابه تقريباً فى جميع الانترونات المعروفة حتى الآن . وجد أن أى تغيير (بالطفرة) فى هذا التتابع المحفوظ يقلل من فاعلية عملية التراكب Splicing وفى حذف الانترونات من النسخة الأولية لجزئ ر ن أ hnRNA .

توجد هذه التتابعات الطرفية عند موقعين نوعيين من مواقع التراكب Splice site وهما موقع التراكب '5 splice site 5' ويسمى الموقع المعطى أو الواهب donner site وموقع التراكب '3 3'splice site ويطلق عليه الموقع المستقبل acceptor site كما هو موضح بالشكل (٦ - ١٢) .

لابد أن تتم تفاعلات التراكب (الحذف وإعادة الالتحام) Splicing لسلسلة ر ن أ بدقة متناهية حيث أن أى خطأ حتى ولو لم يتجاوز نيوكلتيدة واحدة سيؤدى إلى تغيير فى إطار القراءة فى جزئ ر ن أ المراسل النهائى الناتج ويؤدى إلى طفرات عديمة المعنى .



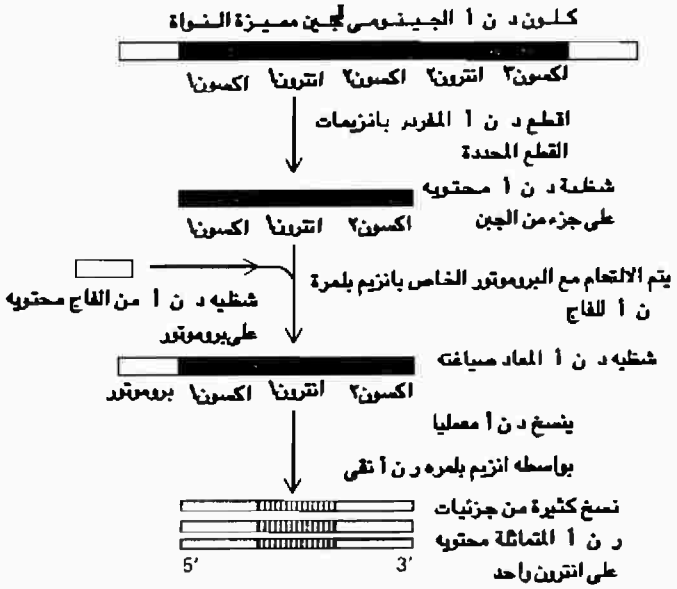
الشكل (٦ - ١٢)،

التتابعات النيوكلتيدية المحفوظة Consensus Squences لمواقع الربط 5' ، 3' المستخدمة فى تجهيز سلسله ر ن أ الثنائى النيوكلتيدى المظلل على الجانبين يكون عاده ثابتا ولا يتغير .

امكن دراسة عملية استبعاد أو حذف تتابع الإنترون بتجربة معملة *In vitro* حيث تم الحصول على احد الانواع التركيبية من سلاسل ر ن أ الأولى المحتوى على انترون واحد عن طريق تحضين تتابع محدد من د ن أ مع انزيم بلمره ر ن أ النشط كما فى الشكل (٦ - ١٣) ، وعند إضافة هذه الجزيئات الناتجة من ر ن أ الأولى إلى مستخلص خلوى تبين أنه يتم فيها عملية التراكب Splicing فى تفاعل انزيمي من خطوتين وفى وجود ATP وبعض الأنواع المختارة من البروتينات النووية الصغيرة وخاصة : sn RNP's UI, U2, U5, U4 / U6 وبعض بروتينات نوعية أخرى . وبعد اتاحه فترة تحضين طويلة نسبيا تتجمع هذه المعقدات أولاً فى معقد كبير يسمى سبليسوسوم Spliceosome . وقد أدى امكان التعرف على انواع ر ن أ التى تظهر كنواتج وسطية اثناء التفاعل بالاضافة إلى تحديد انواع sn RNP's المطلوبة لانتاجها إلى اكتشاف ان الانترون يستأصل فى صوره عروه Lariat كما يتبين فى مسار التراكب Splicing فى الشكل (٦ - ١٤) والشكل (٦ - ١٥).

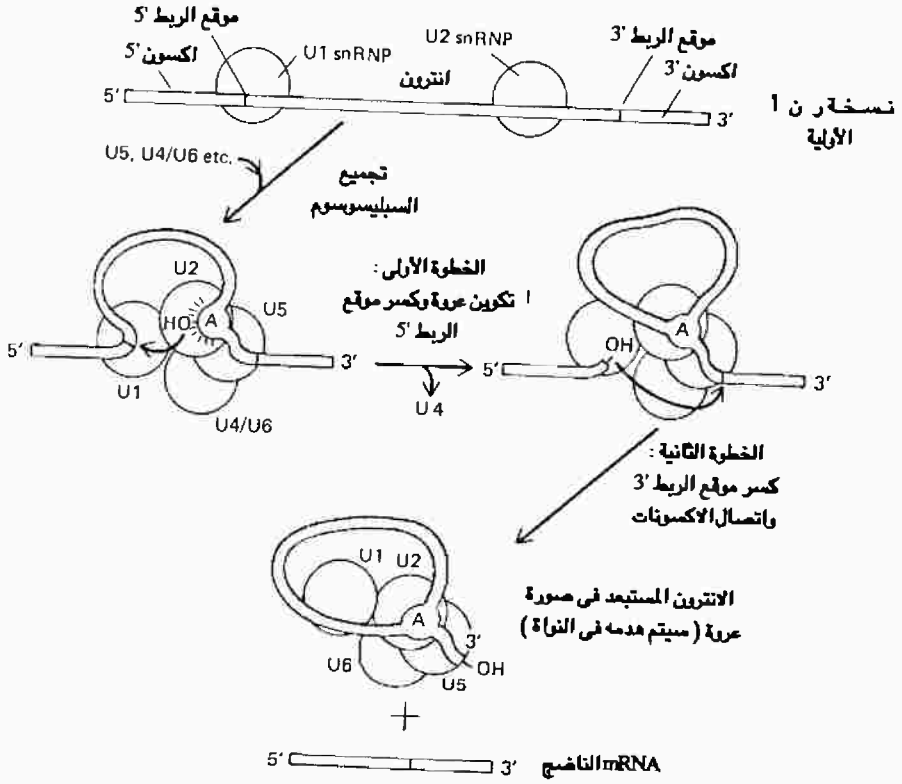
أمكن تحديد بعض الوظائف النوعية التخصصية لبعض أنواع sn RNP's فمثلا : U1 sn RNP يرتبط بموقع التراكب 5' Splice site 5' وذلك بمساعدة تتابع نيوكلتيدى فى U1 RNA المقترن فى هذا المعقد حيث وجد أن هناك تتابع نيوكلتيدى فى هذا المعقد الصغير تكون مكمله للتتابع النيوكليتدى المحفوظ المكون من ٩ نوكلتيدات فى هذا الموقع من الانترون . وحيث أنه قد تبين أن RNA يمتلك خاصية العمل كانزيم فإنه من المحتمل أن يكون ر ن أ .

نفسه أو المكونات البروتينية للسبليسوسوم هى المسئولة عن كسر وتكوين الروابط التساهمية التى تتطلبها عملية التراكب Splicing .



الشكل (٦-١٣)،

شكل تخطيطى للطريقة المستخدمة لانتاج كميات وفيرة من ر ن أ النقى لدراسة عملية تراكب ر ن أ معمليا . تعتمد الطريقة على القدرة على انتاج كمية كبيرة من تتابعات د ن أ المرغوب بطرق الهندسة الوراثية بالإضافة إلى توفر انزيمات بلمره ر ن أ من الفاج T 7 أو SP 6 التى تقوم بنسخ د ن أ معمليا بكفاءه عالية . ويربط شظايا د ن أ مميزه النواه ببروموتور الفاج ، فإن انزيم بلمره ر ن أس يمكن استخدامه لإنتاج كميات كبيرة من ر ن أ معملياً مشفرة لشظايا د ن أ ويمكن إضافة الغطاء 5 الموجود فى hnRNA إلى هذه الجزيئات من ر ن أ بالطرق البيوكيماوية .

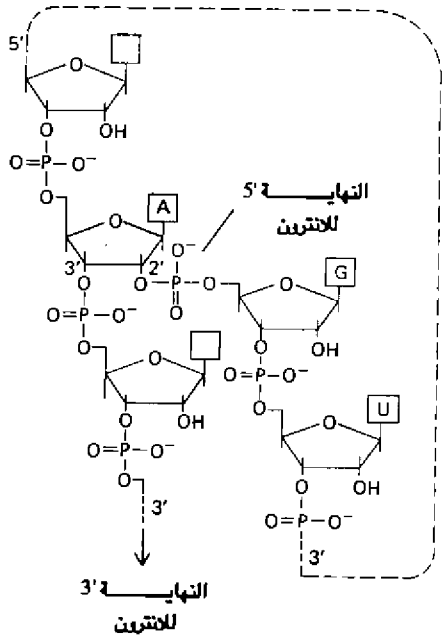


الشكل (٦-١٤):

دور السبليسوسوم (المكون من تجمع البروتينات الصغيرة U5, U2, U1 و U4 / U6 وغيره من المكونات) فى تراكب ر ن أ الأولى . بعد تجميع السبليسوسوم يتم التفاعل فى خطوتين :

١- تقوم نيوكلتيده ادينوسية خاصة (A) موجودة بالقرب من موقع الربط '3 بمهاجمه موقع الاستبعاد '5 مما يؤدى إلى كسره . ثم ترتبط النهاية المكسوره تساهميا بهذه القاعدة A مكونه النيوكلتيده المتفرعه (المبينة فى الشكل٦- ١٥) .

٢ - يتم اضافة النهاية المعرضة 3'oH للإكسون الأول إلى بداية الإكسون الثانى مع إحداث كسر فى جزئ ر ن أ عند موقع الربط '3 مما يؤدى إلى إتصال الإكسونان ببعضهما وإستبعاد الانترون فى صوره عروه . تحدث هذه العمليات فى النواه وتؤدى إلى انتاج m RNA ناضج من النسخة الأولية لجزئى ر ن أ hnRNA .



الشكل (٦-١٥):

تركيب سلسله ر ن أ المتفرعه المتكونة أثناء عملية تجهيز ر ن أ النيوكلتيدة المظللة هى A (الادينين) التى سبق الاشاره اليها فى الشكل السابق . ويحدث التفرع فى الخطوه ١ لتفاعل التراكب . فى هذه الخطوه تنكسر النهاية 5' لتتابع الانترون وترتبط مجموعة الفوسفات فيها تساهميا مـع مجموعة 2' - OH للنيوكلتيده A التى تقع على بعد حوالى 30 نيوكلتيده من النهاية 3' لتتابع الإنترون . تظل السلسله المتفرعة موجودة فى الإنترون المستبعد وهو المسئول عن تكوين شكل العروه .

حذف عده إنترونات من كل جزئ من hnRNA.

حيث أن السبليسوسوم يتعرف أساساً على التتابع المحفوظ عند حدود كل انترون . لذلك فإن موقع التراكب 5' (الموقع المعطًى) عند طرف أى إنترون معين يمكن أن يوصل بموقع التراكب3' (الموقع المستقبل) لأى إنترون آخر أثناء عمليةالقطع والربط Splicing . وعلى ذلك فعندما أجريت تجربة لضم النصفين 5' ، 3' لانترونين مختلفين أمكن لانزيمات التراكب أن

تتعرف على تتابع الانترون الهجين وتقوم بحذفها . على ضوء هذه النتيجة أمكن معرفة أن جينات الفقاريات بصفة عامه تحتوى على عدد من الإنترونات قد تصل إلى ٥٠ إنترون كما فى الجدول (٦-٢) .

الجدول (٦-٢) حجم بعض الجينات البشرية وعدد الانترونات بها

اسم الجين	* حجم الجين (نيوكلتيدات) (X1000)	حجم hnRNA (نيوكلتيدات) (X1000)	*** عدد الإنترونات فى
بيتا جلوبين β-globin	١,٥	٠,٦	٢
انسولين Insulin	١,٧	٠,٤	٢
بروتين كينيز C(P.K.C.)	١١	١,٤	٧
البيومين Albumin	٢٥	٢,١	١٤
كتاليز Catalase	٣٤	١,٦	١٢
مستقبل LDL	٤٥	٥,٥	١٧
عامل التخثر VIII	١٨٦	٩	٢٥
ثيروجلوبيولين Thyroglobulin	٣٠٠	٨,٧	٣٦
** Dystrophin	>٢٠٠٠	١٧	>٥٠

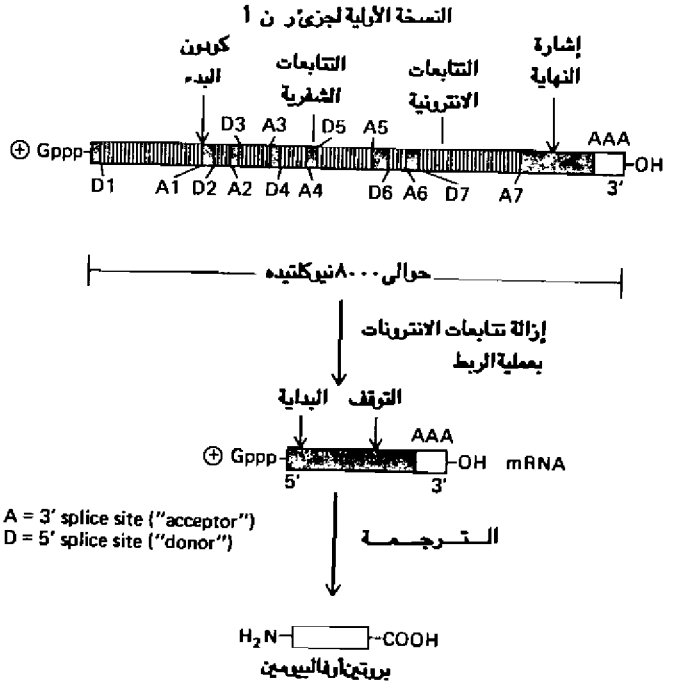
* يمثل حجم الجين هنا التتابعات المنسوخة لكل جين بالاضافة إلي التتابعات المنظمة المجاوره الخاصة بكل جين.

** يؤدى حدوث طفره فى هذا الجين إلى مرض ضمور العضلات Duchene M.D. .

*** تعتبر جينات الهستونات من الأمثلة النادرة فى جينات مميزة النواة التى تخلو من الإنترونات.

وجد أنه إذا حدث خطأ فى التزاوج بين مواقع التراكب 5' , 3' أثناء عملية تراكب ر ن أ Splicing . فإن ذلك سيؤدى حتما إلى غياب بعض التتابعات الشفرية الهامة من mRNA الناتج مما يؤدى إلى عدم إنتاج بروتين فعال عند الترجمة . ولكن يحدث بطريقة ما أن هذا الخطأ يمكن تلافيه كالآتى :

تبين أن ما كينة تراكب ر ن أ تضمن عادة أن كل موقع التراكب '5 يتزاوج فقط مع أقرب موقع تراكب '3 التالى له مباشرة فى اتجاه مسار تتابع بناء ر ن أ (أى من '5 إلى '3) كما فى الشكل (٦ – ١٦) . ولم تعرف حتى الآن بطريقة محددة الطريقة التى يتم بها هذا التزاوج المتتالى بين مواقع التراكب على الرغم من أن تجمع معقد السبليسوسوم فى اثناء عملية نسخ سلسله ر ن أ النامية يفترض أن له دور رئيسى فى ضمان التزاوج الصحيح بين مواقع التراكب المناسبة .



الشكل (٦ - ١٦):

النسخة الأوليه لسلسله ر ن أ لجين أوفالبيومين فى الدجاج مبينا الإزاله المنظمة لسبعه إنترونات للحصول على m RNA الناضج الفعال . يرمز إلى موقع الربط '5 بالحرف D وإلى موقع الربط '3 بالحرف A فى هذا الشكل.

كما توجد بعض الأدلة على أن الدقة الكامنة فى الشكل الثلاثى الأبعاد فى سلسلة ر ن أ والذى تتخذه تتابعات الأنترونات والإكسونات قد تلعب دوراً رئيسياً فى هذا الإنضباط .

يمكن انتاج عدة أنواع مختلفة من ر ن أ من نفس الجزئ الأولى hnRNA

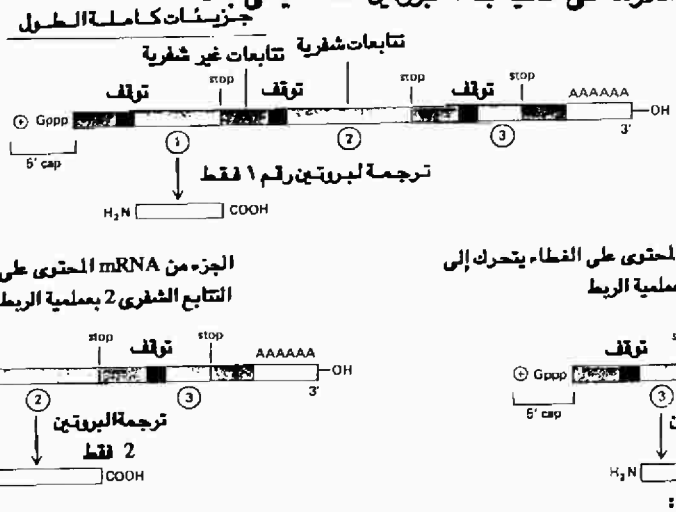
على الرغم من أن معظم تابعات الانترونات لا يبدو أن لها فى حد ذاتها أى وظيفة محددة فإن حدوث عملية التراكب Splicing تجعل من الممكن إنتاج أنواع مختلفة من mRNA ، وبالتالى أنواع مختلفة من البروتينات ، من نفس جزئ hnRNA الأولى مما يعطى للخلية مرونه وراثية إضافية أثناء عمليه النمو والتمايز فى المراحل التكوينيه المختلفة .

أمكن التحقق لأول مره من حدوث هذه الظاهرة فى جينوم الأدينوفيرس البشرى (يصيب الانسان) adenovirus والذى كان أول من تم فيه أيضاً إكتشاف عملية التراكب Splicing . إن جينوم الأدينوفيرس يقوم بتوجيه بناء بعض النسخ الطويلة جدا من ر ن أ التى تحتوى على التتابعات الشفرية لعدة بروتينات مختلفة . ولا يحدث ذلك عادة فى الخلايا الطبيعية مميزه النواه حيث لا ينتج أى m RNA معين إلا نوع واحد من البروتين . ويحدث عادة فى الخلايا مميزه النواه أن الترجمة تبدأ فقط بالقرب من موقع الغطاء 5' Cap site بحيث تتوقف الترجمة عادة عند الوصول إلى أول شفره لإنهاء الترجمة . إلا أنه فى الادينوفيرس يتم التغلب على هذه الحالة بواسطة ماكينة التراكب Splicing التى تعتبر بعض التتابعات الشفرية كما لو كانت انترونات وتقوم بحذفها وذلك بتحريك منطقة الغطاء 5' Cap بالقرب من التتابعات الشفرية البعدية المتتالية فى السلسلة الطويلة فى إتجاه النسخ مما يؤدى إلى إنتاج أنواع مختلفة من ر ن أ المراسل . يقوم كل منها بانتاج نوع معين من البروتين عند الترجمة .

ومعنى ذلك أن هذه العملية البديلة للتراكب Splicing تسمح باستخدام نفس الغطاء 5' Cap كإشارة بدء لبناء أنواع مختلفة من البروتين كما فى الشكل (٦ – ١٧) . وتمكن هذه الطريقة الفيرس من إستخدام عدد محدود جدا من نسخ hnRNA للتشفير لعدد اكبر بكثير من البروتينات المختلفة . كما أمكن تفسير ميكانيكية حدوث تنافر بيتا ثاليسيميا β - thalaesa-mia فى الإنسان بطريقة مشابهه تقريبا .

بناء ر ن أ الريبوسومى على مجموعات مترادفه من الجينات المتماثلة

وجد أن جينوم مميزة النواه يحتوى على نسخ متكررة ترادفيا من جينات r RNA موزعة فى مجموعات على الكروموسومات المختلفة عند مناطق تنظيم النويات nucleolus organizer region (NOR) ، بحيث يكون كل جين (بطول يختلف من حوالى ٨٠٠٠ إلى ١٣٠٠٠ نيوكليتد حسب الكائن) منفصل عن الجين المجاور بتتابعات غير منسوخة تُعرف بخيط د ن أ الرابط Spacer الذى يختلف بدوره كثيرا فى الطول وفى تتابع القواعد . ونتيجة للنظام التكرارى المترادف ووجود عدد كبير نسبياً من النسخ لكل من جينات rRNA، ونظرا لأن معدل النسخ فيها يكون سريعاً فإن ذلك يؤدى إلى إنتاج عدد كبير من نسخ ر ن أ الريبوسومى للوفاء باحتياجات الخلية العالية لنسخ ر ن أ الريبوسومى التى تحتاجها لتكوين الريبوسومات اللازمة فى عملية بناء البروتين كما سيأتى بعد .



الشكل (٦-١٧):

كيفية انتاج عدة أنواع مختلفة من ر ن أ الناضج m RNA من نفس النسخة الأولية لجزىء ر ن أ hnRNA فى بعض الفيرسات وذلك باستخدام طرق تراكب مختلفة بحيث يترجم كل جزئ ناتج من m RNA إلى بروتين مختلف . وفى كل حالة يتم ترجمة التتابعات الشفرية الاقرب للغطاء (القلنسوه) 5' فى جزىء mRNA

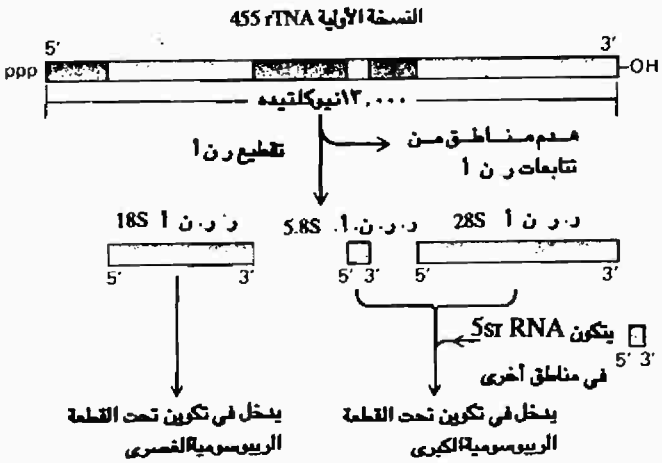
يتم نسخ جينات rRNA بواسطة إنزيم بلمره ر ن أ (RNApol I) وينتج كل جين نفس النسخ الأولية من r RNA يصل طول هذه النسخ الأولية فى الإنسان والتى تعرف بـ 45S r RNA إلى حوالى ١٣٠٠٠ نيوكليتده وقبل أن تترك النواه فى صورة حبيبات ريبوسوميه بعد إقترانها بنوعيات معينه من البروتينات فى النوية يسمى البروتينات الريبوسومية Ribosomal Proteins، يتم تكسير كل وحدة من هذا هذه المنتج الأولى 45S rRNA إلى ثلاثة انواع من r RNA بمعدل نسخة واحدة من كل نوع وهى :

28 Sr RNA (وطوله حوالى ٥٠٠٠ نيوكلتيده) .

18 Sr RNA (وطوله حوالى ٢٠٠٠ نيوكلتيده) .

5.8 Sr RNA (وطوله حوالى ١٦٠ نيوكلتيده) .

وتوجد ضوابط لكى ينتج من كل نسخة أولية من 45S RNA نسخة واحدة من كل من هذه الأنواع الثلاثة، بحيث يتم هدم وتحليل ما يتبقى من فائض من التتابعات فى الوحدة الأولية والذى يقدر بحوالى ٦٠٠٠ نيوكليتده فى النواه كما فى الشكل (٦ - ١٨) . يوجد نوع رابع من r RNA وهو 5S rRNA وهو ينسخ مستقلا عن الأنواع الثلاثة السابقة وهو يوجد فى نسخ متكررة فى أماكن متفرقة بعيده تماما عن منطقة 45S RNA الرئيسية ، ويكون هذا النوع من r RNA قصير جدا بطول حوالى ١٢٠ نيوكلتيده فقط وهو ينسخ بواسطة انزيم RNA pol III الذى يقوم أيضا بنسخ الجينات الخاصة بانتاج t RNA والذى لا يزيد طول سلسله كل منها عن حوالى ٧٥ - ١٠٠ نيوكلتيده فقط والذى تتم فى قواعده النتروجينية تعديلات غير عادية فى عملية ما بعد النسخ Post - transciption لكى يتخذ التركيب الثالثى والفعال فى الترجمة والذى يأخذ شكلاً مميزا يعرف بشكل ورقة البرسيم clover - leaf كما سيأتى بعد .



الشكل (٦-١٨):

طريقة تجهيز جزئ ر ن أ الريبوسومى الأولى 45S r RNA لإنتاج الأنواع الثلاثة المختلفة من ر ن أ الثلاثة المختلفة من ر ن أ الريبوسومى . ويتم التخلص من حوالى نصف طول الجزئ الأولى فى هذه التفاعلات