

## الفصل السابع

### بناء ر. ن. أ. في مميزة النواة RNA Synthesis in Eucaryotes

أن عملية بناء ر.ن.أ. Transcription في مميزة النواة عملية على درجة عالية من الانتقائية Selective. ففي معظم الثدييات على سبيل المثال لا يتم نسخ أكثر من حوالي ١% من مجموع التتابعات التي توجد في د.ن.أ. الخلية الى تتابعات فعالة من ر.ن.أ. أى فى صورة ر.ن.أ. المرسل الناضج Mature mRNA. وتحدث عملية الانتقاء على مستويين:  
الأول: حدوث نسخ جزئى فقط لتتابعات معينة من د. ن. أ. لانتاج ر.ن.أ. النووى غير المتجانس hnRNA.

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

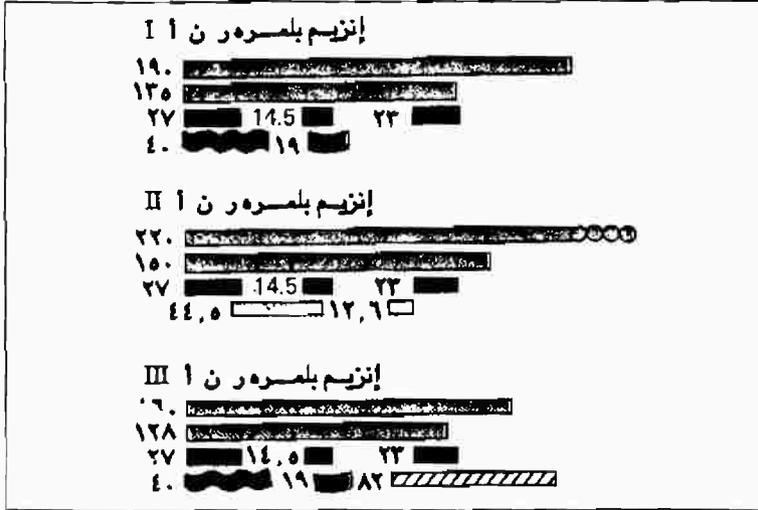
#### أنواع انزيمات بلمرة ر. ن. أ. في مميزة النواة:

على العكس مما وجد فى غير مميزة النواه حيث يعمل انزيم بلمرة ر. ن. أ. واحد لانتاج الأنواع المختلفة من ر. ن. أ. تبين أنه فى مميزة النواة توجد ثلاثة أنواع مختلفة من انزيمات بلمرة ر. ن. أ. وهى:

- ١- انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase I ويختص ببناء السلاسل الطويلة الخاصة بجزئيات ر. ن. أ الريبوسومي rRNA.
- ٢- انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase II ويختص بنسخ سلاسل جزئيات ر. ن. أ المراسل mRNA.
- ٣- انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase III ويقوم ببناء عدد من سلاسل ر. ن. أ القصيرة مثل ر. ن. أ الناقل و ر. ن. أ الريبوسومي قصير السلسلة (5\ SrRNA).

يتكون كل انزيم من هذه الانواع الثلاثة من عدد من تحت الوحدات. وقد تتشابه الانزيمات الثلاثة في بعض مكوناتها من تحت الوحدات إلا أنها تحتوى على تحت وحدات فريدة تميز كل نوع من هذه الانزيمات كما فى الشكل (٧-١) وعلى العكس من انزيم بلمرة ر. ن. أ فى البكتريا الذى يمكنه مباشرة الارتباط بمنطقة تتابع المسبدي Promoter، نجد أن انزيمات بلمرة ر. ن. أ فى ممييزة النواة لا يمكنها أن ترتبط بتتابع المسبدي إلا فى وجود بعض البروتينات النوعية الموجودة بالفعل على جزئ د. ن. أ نفسه.

تحتوى خلية الثدييات عادة على حوالى ٤٠٠٠٠ جزئ من انزيم البلمرة RNA Polymerase II وعلى نفس العدد تقريباً من انزيم البلمرة RNA Polymerase I وحوالى ٢٠٠٠٠ جزئ من انزيم البلمرة RNA Polymerase III علماً بأن التركيز الفعلى لانزيمات البلمرة يختلف حسب معدل نمو الخلية.



الشكل (٧-١): رسم تخطيطي يبين الاختلافات في تركيب تحت الوحدات البروتينية المكونة لإنزيمات بلمرة ر.ن.أ في مميزة النواة (الخميرة). تظهر تحت الوحدات المتشابهة بنفس المظهر. يظهر الوزن الجزيئي لتحت الوحدات بالكيلو دالتون. وتأخذ تحت الثلاثة المتماثلة في الوزن الجزيئي في الإنزيمات الثلاثة اللون الأسود الداكن

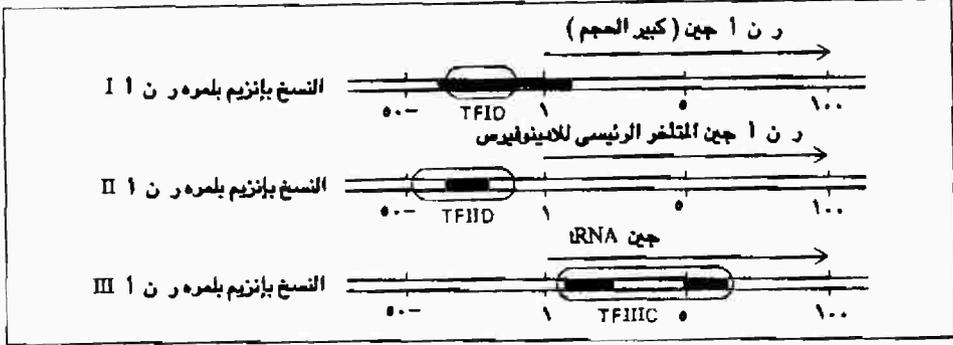
## دور عوامل النسخ Transcription Factors في الارتباط بالمستبدئ

### :Promoter

لا يمكن لإنزيمات بلمرة ر.ن.أ التعرف مباشرة على منطقة المستبدئ في مميزة النواة، ولكن لابد أولاً من حدوث ارتباط لبروتينات نوعية مع تتابعات معينة في د. ن. أ القالب لتنشيط المستبدئ وتحفيزه على الدخول في عملية النسخ. يطلق على هذه البروتينات النوعية اسم عوامل النسخ Transcription Factors (TF) وهي ضرورية لبدء بناء ر. ن. أ، وهي تختلف عن عوامل بدء النسخ في غير مميزة النواة (عامل سيجما) في أنها ترتبط بجزئ د. ن. أ مستقلة

عن انزيم بلمرة ر. ن. أ. تتعرف كل من الانزيمات الثلاثة على مستبدئ Promoter ذو نوعية مختلفة ويحتاج كل منها في الغالب إلى عوامل نسخ (TF) مختلفة عن الآخر ويرمز اليها بـ TFI, TFII, TFIII ، على الترتيب. ويكون الرمز متبوعاً بحرف يدل على اسبقية اكتشافه. فمثلا TFIIIA كان أول عامل نسخ اكتشف للعمل مع انزيم RNA Polymerase III.

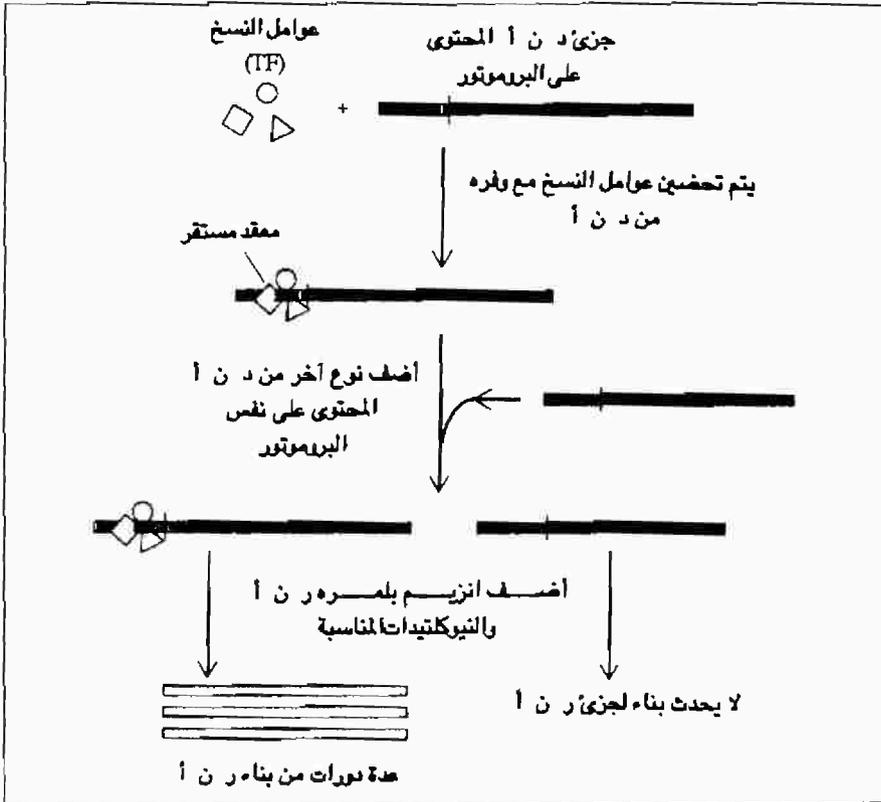
دللت الدراسات المعملية *In Vitro* على أن عوامل النسخ TF عبارة عن معقدات نسخ ثابتة نسبياً وتقوم بجذب جزئيات انزيمات بلمرة ر. ن. أ انتقائياً لمنطقة تتابع الابتداء النوعية والخاصة بكل منها. ويرتبط كل من عوامل النسخ المختلفة بالمنطقة الخاصة به في المستبدئ Promoter على سلسلة د. ن. أ القالب. ويكون كلا من انزيم البلمرة ر. ن. أ I، وانزيم بلمرة ر. ن. أ II معقدات مع كل من عوامل النسخ النوعية الذي يرتبط به قبل موقع بدء النسخ (Upstream) مباشرة. إلا أن عوامل النسخ الرئيسية لانزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Pol. III ترتبط في 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 في الشكل (٧-٢) يبدو أن هذا العامل (TFIII C) يؤدي إلى إنتشاء د. ن. أ حول نفسه لتكوين حبيبة كبيرة من البروتين النووى.



الشكل (٧-٢): تكوين معقدات مستقرة لعوامل النسخ (TF) على الجين (في د.ن.أ) تدل المستطيلات السوداء على مواقع التتابعات الضرورية لنشاط البروموتور. والمنطقة المظلمة تدل على الجزء من الجين المرتبط بعوامل النسخ. تدل الأرقام على المواقع على جزئ د.ن.أ (مقدرة بعدد أزواج النيوكليوتيدات) بالنسبة لموقع بدء النسخ (+١).

وقد تبين أنه لا بد من تكوين معقد مستقر وثابت نسبياً بين عامل نسخ معين وبين منطقة المستبدئ 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، في حين اضيف العامل نفسه إلى نفس د.ن.أ في التجربة المقارنة ولكن بدون اعطاء فترة التحضين المناسبة.

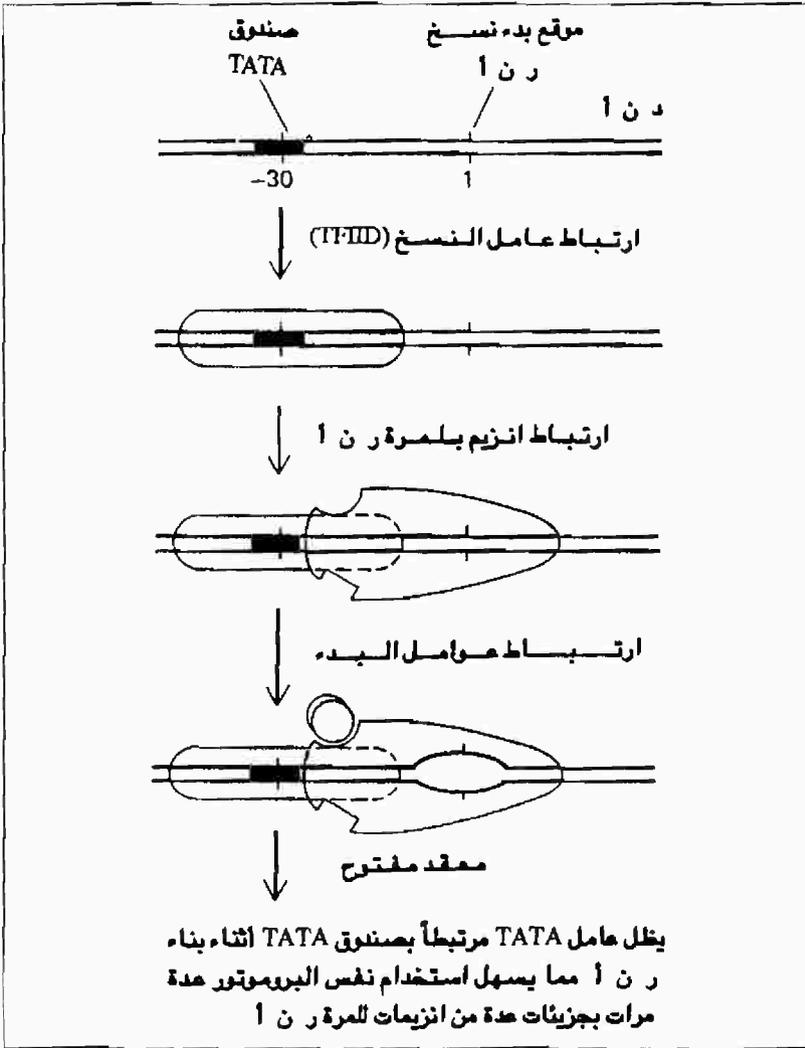
تبين أنه في الحالة الأولى كانت فترة التحضين كافية لتكوين معقد ثابت ومستقر من د.ن.أ وعامل النسخ، وبذلك نشطت عملية النسخ عدة مرات لهذا الجزئ من د.ن.أ في حين لم يتسنى ذلك لنفس الجزئ من د.ن.أ نتيجة لعدم إتاحة الفرصة لتكوين المعقد المذكور كما في الشكل (٧-٣).



الشكل (٧-٣): تجربة معملية لإثبات ضرورة تكوين معقد نسخي مستقر في منطقة البروموتور في مميزة النواه حتى يمكن بدء عملية النسخ

يوجد عامل نسخ هام جداً لعدد كبير من تتابعات المستبدى Promoter لانزيم RNA Pol II وهو TFIID والذي يتكون من معقد بروتيني كبير الحجم ويطلق عليه عادة عامل TATA لانه يرتبط نوعياً بتتابع نوعي محفوظ Consensus Sequence غني في A-T يسمى صندوق [TATA Box] يتمركز عند حوالي (-٢٥) قاعدة قبل موقع بدء النسخ (+١) ويؤدي نشاط عامل النسخ

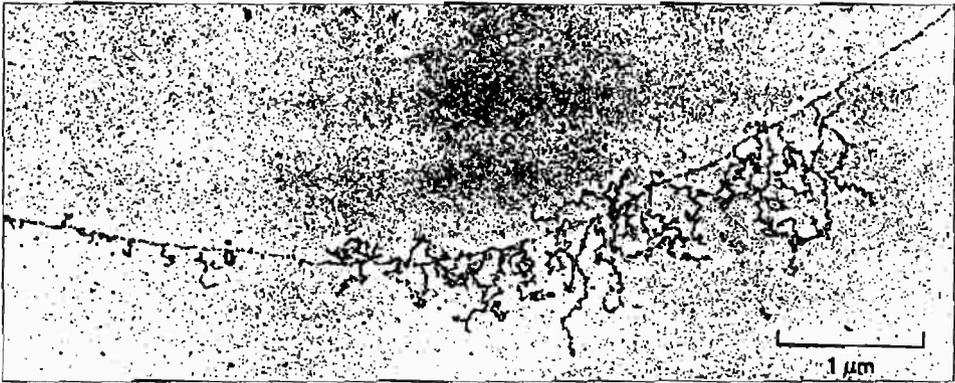
TATA إلى تحفيز النشاط النسخي لانزيم RNA Pol. II كما هو مبين في الشكل (٤-٧).



الشكل (٤-٧): ميكانيكية التعرف على منطقة البروموتور بواسطة إنزيم بلمرة ر.ن.أ. II في مميزة النواه. لابد من ارتباط عامل النسخ (TFIID) بصندوق TATA لتكوين معقد نسخي مستقر قبل أن يتمكن الانزيم من التعرف على البروموتور

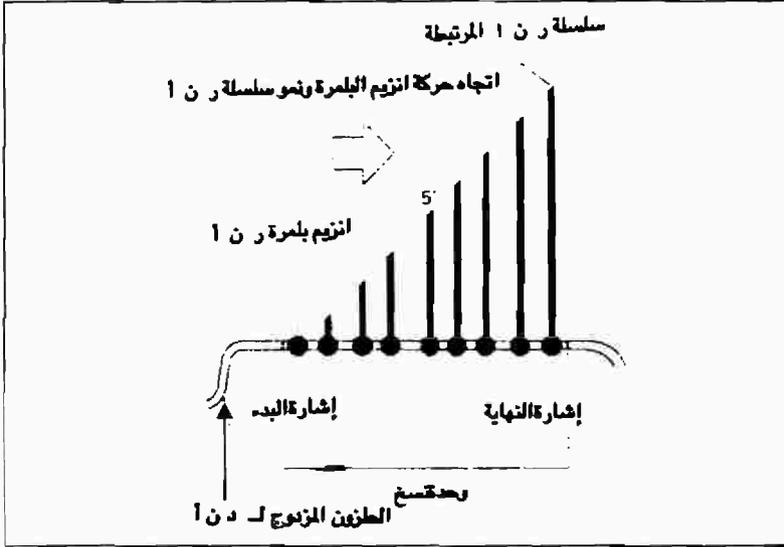
## اختلاف النشاط النسخي لأنزيم RNA Pol. II حسب تتابعات د.ن.أ. القلاب:

وجد أن انزيم RNA Pol. II المشترك في عملية النسخ يبدو تحت المجهر الإلكتروني كحبيبات كروية تجر وراءها ذبلاً من سلسلة تمثل ر.ن.أ. وجد أن هذه الحبيبات تبدو عادة كوحدات متباعدة نسبياً. ويشير ذلك إلى أن معظم الجينات التي يتم نسخها إلى جزيئات ر.ن.أ. أولية (Precursors) تكون ذات تكرار منخفض وقد يفسر ذلك على أساس إتاحة الفرصة لوحدة من انزيم البلمرة لاتمام عملية النسخ لحين معين قبل أن تبدأ وحدة انزيمية أخرى في عملية النسخ. ولكن يحدث أحياناً أن عدداً كبير نسبياً من جزيئات انزيم بلمرة ر.ن.أ. II (مرتبطاً بها سلاسل ر.ن.أ. النامية) تكون متجمعة مع بعضها. تظهر هذه التجمعات بصفة خاصة في التتابعات التي تمثل عدد محدود من الجينات التي يتم نسخها بتكرار أكبر كما في الشكل (٧-٥).



الشكل (٧-٥): منطقة من الكروماتين تحتوي على جين يتم نسخه بمعدل عالي جداً بحيث تظهر عدة جزيئات من انزيم بلمرة ر.ن.أ. II ملتصقة بنواتج نسخها من سلاسل ر.ن.أ. في نفس الوقت، ويكون اتجاه النسخ من اليسار إلى اليمين

يتزايد طول سلاسل ر. ن. أ المرتبطة بالانزيم في مثل هذه التجمعات في اتجاه النسخ مما يعطيها طرازاً مميزاً بحيث يحدد هذا الطراز مواقع بدء وإنهاء أو توقف انزيم بلمره ر. ن. أ II بالنسبة لكل وحدة نسخ نوعية Transcription Unit كما في الشكل (٦-٧).



الشكل (٦-٧): وحدة نسخ نموذجية. مبيناً اتجاه النسخ ومواقع البدء والتوقف في الوحدة

- يمكن تلخيص النتائج الهامة التي توصلت إليها الدراسات البيوكيماوية الموازية للنتائج المتحصل عليها من المجهر الإلكتروني في النقاط التالية:
- ١- أن جزيئات انزيمات بلمرة ر. ن. أ في مميزة النواه (كما في غير مميزة النواة) تبدأ وتنتهي النسخ عند مواقع نوعية محددة على الكروموسوم.
  - ٢- أن متوسط طول سلسلة ر. ن. أ الناتجة من أنزيم البلمرة RNA Pol II في وحدة النسخ يبلغ حوالي ٨٠٠٠ نيوكلييدة وقد يزيد إلى أكثر من ٢٠٠٠٠ نيوكلييدة. أن هذا الطول الكبير نسبياً، والذي يزيد كثيراً عن الطول

المتوسط لسلسلة mRNA الناضج الذي يدخل فعلاً في عملية الترجمة إلى بروتين والذي يبلغ حوالي ١٢٠٠ نيوكليوتيد (يشفر لبروتين بطول ٤٠٠ حامض اميني). قد يعكس التركيب المعقد للجين في مميزة النواة وخاصة وجود عدد من الانترونات Introns في النسخ الأولية للجين والتي يتم استئصالها في المرحلة اللاحقة لتجهيز mRNA النهائى أو الناضج Mature mRNA كما سيأتى بعد.

٣- على الرغم من أن معدل استطالة سلسلة ر.ن.أ يبلغ في المتوسط حوالي ٣٠ نيوكليوتيد في الثانية على مستوى جميع أنواع ر.ن.أ فإن مواقع بدء النسخ المختلفة لجزئيات انزيم بلمره ر.ن.أ II تختلف كثيراً فى درجة كفاءتها بحيث يتم نسخ بعض الجينات بمعدل اسرع عن الأخرى.

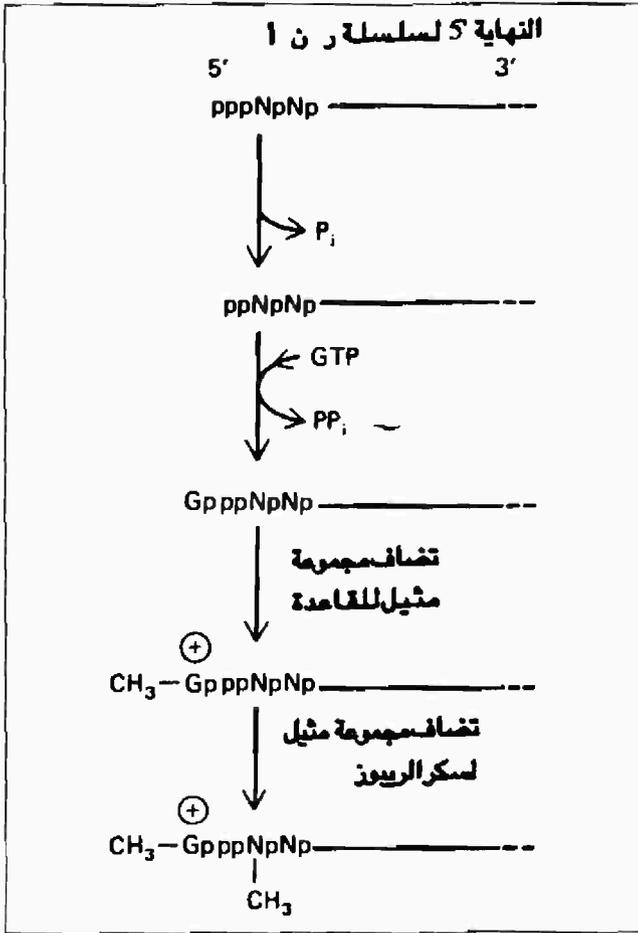
### تعديل أو تجهيز النسخ الأولية لسلاسل mRNA : RNA Processing

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

يكون مصير قليل من هذه النسخ الأولية أن تترك النواه فى صورة جزئيات ر.ن.أ المرسل mRNA إلا أن ذلك لا يحدث قبل أن تتم بها عملية تحوير تساهمية عند كل من النهاية 5' والنهية 3' أثناء عملية النسخ وهذه التعديلات هامة جداً وضرورية لحسن اداء سلاسل mRNA لوظيفتها فى الترجمة فى السيتوبلازم كما سيأتى بعد.

يتم أولاً التعديل أو التحوير في النهاية 5' لسلسلة ر.ن.أ (وهي النهاية المتكونة أولاً أثناء عملية النسخ) وذلك بإضافة ما يسمى بقلنسوة Cap الجوانين المميثلة Methylated - G Nucleotide. وتحدث التغطية بالقلنسوة مباشرة عقب بناء الثلاثين نيوكلييدة الأولى في سلسلة ر.ن.أ النامية. وتشمّل على تكثيف مجموعة الفوسفات الثلاثية لجزئ GTP مع مجموعة ثنائية للفوسفات متبقية على النهاية 5' للسلسلة النامية كما في الشكل (٧-٧) وتقوم هذه القلنسوة بدور رئيسي في عملية استبداء بناء البروتين كما يبدو أنها تقوم بحماية النسخة النامية من ر.ن.أ من عمليات التحلل والهدم.

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



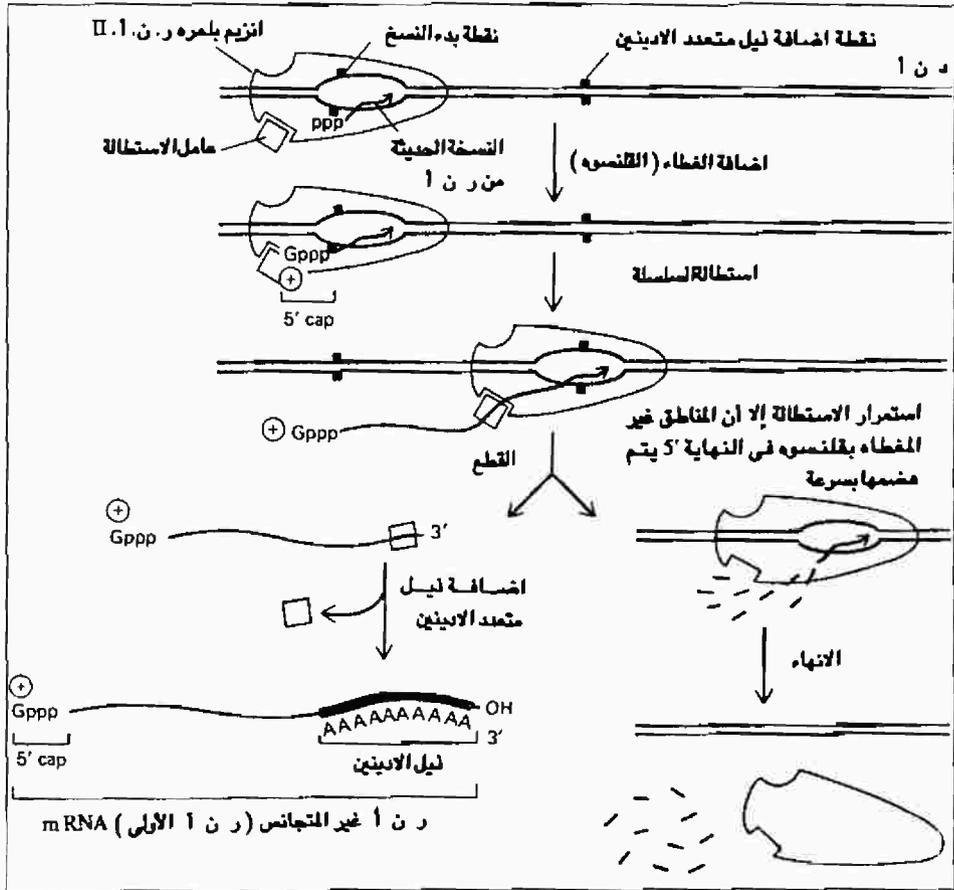
الشكل (٧-٧): تفاعلات تكوين الغطاء (القلنسوة) عند النهاية 5' لسلسلة ر.ن. الجارى بناؤها بواسطة انزيم بلمرة ر.ن. II

ولكنها تتميز بتحوير أو تعديل من نوع آخر بحيث يحدث كسر نوعي للسلسلة النامية عند موقع محدد، ثم يضاف إلى النهاية 3' المكسوره ذيل من عديد الادينين polyA tail بواسطة انزيم بلمرة مستقل بحيث يصل طول هذا الذيل إلى حوالي 100-200 أو أكثر من قواعد الادينين. يتم التعرف على نقطة

الإشارة المميزة لمكان الكسر أو القطع بظهور التتابع النوعي القصير: AAUAAA في سلسلة ر.ن. أ والتي تقع على بعد ١٠-٣٠ نيوكليتيده قبل موقع القطع وإضافة الذيل. بعد أحداث الكسر أو القطع مباشر يقوم انزيم Poly A Polymerase بإضافة ذيل متعدد الأدينين إلى النهاية 3 في سلسلة ر.ن. أ لإتمام النسخة المبدئية أو الأولية من ر.ن. أ كما في الشكل (٧-٨).

لم تتحدد حتى الآن وظيفة ذيل polyA على وجه الدقة، ولكنه قد يكون له دور في تسهيل خروج ر.ن. أ المرسل mRNA الناضج من النواه، كما يعتقد أنه يلعب دوراً في ثبات أو استقرار جزيئات mRNA بحيث يؤخر عملية هدمها في السيتوبلازم حتى يمكنها أن تشارك في عدد محدد من دورات الترجمة قبل هدمها. وقد تبين بالفعل أنه في غياب ذيل polyA فإن نسخ mRNA يتم هدمها بسرعة كبيرة.

على الرغم من أن نواتج نسخ انزيم بلمرة ر.ن. أ II تمثل أكثر من نصف ر.ن. أ الإجمالي المنتج في الخلية، إلا إن معظم هذه النسخ تكون غير ثابتة وقصيرة العمر، بحيث أن ما يتبقى منها بالفعل في وقت ما بالخلية لا يمثل إلا نسبة ضئيلة جداً من إجمالي ر.ن. أ كما في الجدول (٧-١).



الشكل (٧-٨): بناء جزيء ر.ن. أ غير المتجانس النووي hnRNA بواسطة إنزيم بلمره ر.ن. أ. II وإضافة ذيل من متعدد الادينين polyA إلى سلسلة ر.ن. أ مما يؤدي إلى كسر السلسلة ليتسنى إضافة هذا الذيل

الجدول (٧-١) بعض المقادير النسبية من أنواع ر.ن.أ. في خلية نموذجية للتدييات

نوع ر.ن.أ.	الكمية المنتجة الأولية (كنسبة من إجمالي ر.ن.أ.)	*الكمية المتبقية بالفعل (كنسبة من إجمالي ر.ن.أ.)
rRNA (في النواة)	٣٩ %	٤ %
rRNA (في السيتوبلازم)	-	٧١
hnRNA (في النواة)	٥٨*	٧
mRNA الناضج (في السيتوبلازم)	-	٣
tRNA	٣	١٥

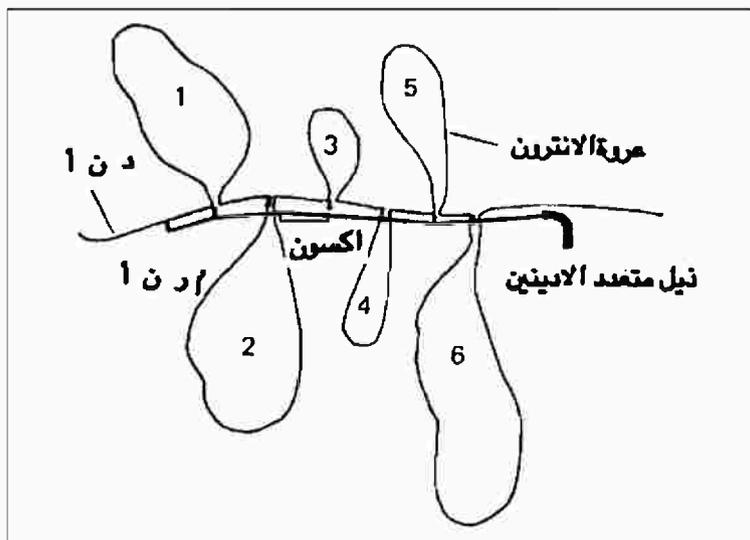
\* يلاحظ أنه على الرغم من أن معظم ر.ن.أ. الأولى المنسوخ يكون في صورة hnRNA إلا أن معظمه يتم هدمه وبذلك فإن النسبة المتبقية في صورة mRNA الناضج تكون ضئيلة جداً ولا تتعدى ٣% ر.ن.أ. في الخلية.

تبين أن كلا من عمليتي اضافة القلنوسة G على النهاية 5' وإضافة الذيل polyA إلى النهاية 3' تحتاجان إلى نشاط انزيم RNA pol II بالاضافة إلى أحد عوامل الاستطالة Elongation Factor الذى يكون مرتبط بالانزيم اثناء عملية النسخ.

حذف تتابعات كبيرة متخللة من hnRNA أثناء تجهيز mRNA فى النواة:

ثبت أن النسخة الأولية الناتجة فى النواه من hnRNA 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 نيوكليتيده فى سلسلة hnRNA ينخفض العدد إلى حوالى ١٥٠٠

نيوكلتيده في سلسلة mRNA). وبعد هذه الفترة القصيرة تبدأ جزيئات mRNA في الخروج من النواه بحيث لا يصل إلى ستيوبلازم الخلية إلا حوالي ٥% فقط من إجمالي hnRNA الأصلي الذي انتج في النواه في حين يتم هدم معظم ما تبقى منه إلى شظايا قصيرة في النواه على مدى حوالي ساعة. تبين أن هذه التتابعات الطويلة التي يتم هدمها لا تقع بالمره على أى من طرفى السلسلة 5' أو 3' ولكنها تكون متخللة للسلسلة في مناطق وسطية. وقد تحقق ذلك عند مقارنة تتابعات النيوكليوتيدات في سلسلة mRNA معين بالتتابعات المقابلة فى د. ن. أ المستخدم كقالب للنسخ باستخدام 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 متخلله فى د. ن. أ غير موجودة فى mRNA المنسوخ عليها وذلك فى حالات متعددة مثل جين  $\beta$ -globin و Ovalbumin فى الفقاريات. أى أن الجين فى مميزة النواة لا يتكون من تتابعات شفرية مستمرة بل تتخلله تتابعات غير شفرية طويلة، بعكس جينات غير مميزة النواه التى تتكون من تتابع شفرى مستمر. ويطلق على التتابعات التى توجد فى د. ن. أ مميزة النواة ولكنها تحذف من mRNA اسم الانترونات Introns فى حين تسمى التتابعات الشفرية الموجودة فى mRNA تتابعات الاكسونات Exons كما فى الشكل (٧-٩).

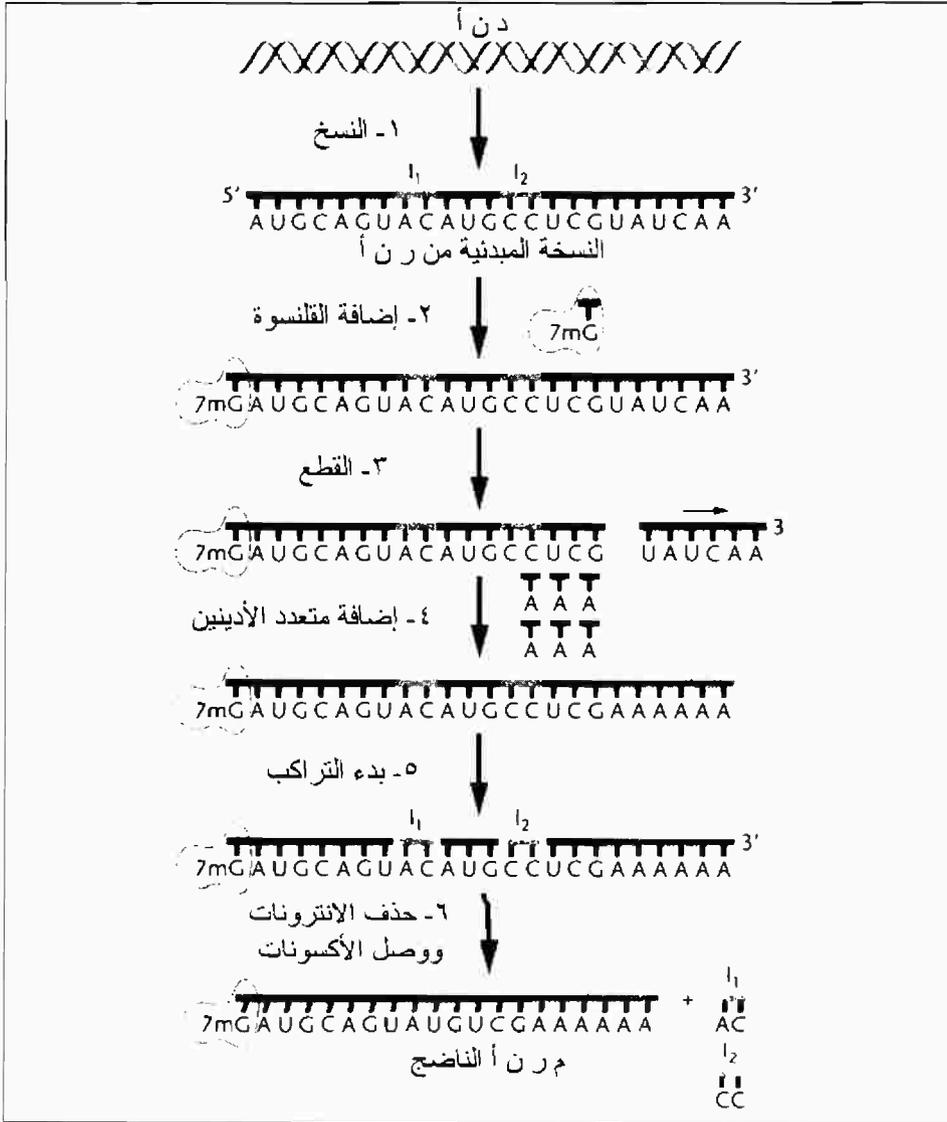


الشكل (٧-٩): اثبات وجود انترونات في جينات مميزة النواة بتجربة التهجين بين د.ن.أ و ر.ن.أ حيث يتم هنا انتاج بيتا جلوبيين mRNA ويتم عزله وتنقيته من الخلايا المتخصصة في انتاجه. ثم تجرى تجربة تهجين من mRNA ومنطقة د.ن.أ المحتوية على هذا الجين. تبدو المناطق من جزئ د.ن.أ التي لا يحدث بها تهجين مع ر.ن.أ كمعرات ممتدة إلى الخارج وهي تمثل الانترونات في هذا الجين

### تراكب ر. ن. أ المراسل RNA splicing:

يتم حذف أو استبعاد تتابعات الانترونات المتخللة لجزئ hnRNA أثناء عملية تجهيز mRNA، ثم توصل تتابعات الاكسونات ببعضها بعملية تشبهه القص/ واللصق ر. ن. أ RNA Splicing حيث تتبعج الإنترونات للخارج في صورة عروات Lariats قبل إستبعادها. من المعروف أن النسخة الأولية من hnRNA مطابقة في الطول والتتابع لمنطقة القالب من د.ن.أ المنسوخة عليه، بحيث تحتوي هذه النسخة على جميع الأكسونات والإنترونات، في حين نجد أن تلك الأخيرة تحذف أو تستبعد أثناء تجهيز mRNA. تحدث هذه العملية في نواه

الخلية قبل أن يخرج mRNA إلى السيتوبلازم، بحيث يحتوى فقط على تتابعات الإكسونات التي تشفر لسلسلة متعدد ببتيد نوعى عند الترجمة على الريبوسومات. تمثل تتابعات الإنترونات فى hnRNA نسبة كبيرة جداً 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 نيوكليتيده) تتابع قصير فقط من mRNA يتراوح بين ٥٠٠، ٣٠٠٠ نيوكليتيده فقط. ويبين الشكل (٧-١٠) مراحل عملية تجهيز ر.ن. أ بعد نسخه .Postranscriptial Processing



الشكل (٧-١٠): عملية تجهيز جزئ ر ن أ بعد النسخ في مميزة النواة Post transcription. يتم تعديل جزئ ر ن أ النووي غير المتجانس (hnRNA) و تحويله إلى mRNA الذي يحتوي على القلنسوة 5'G cap وذيل متعدد الأدينين على النهاية 3', ثم تتم إزالة الإنترونات

## دور البروتينات النووية الصغيرة snRNP فى عملية التراكب :Splicing

يتم تكثيف سلسلة ر. ن. أ المنسوخة حديثاً بسرعة إلى مجموعات متجاورة من الحبيبات المحتوية على بروتينات وتتكون كل حبيبة من حوالى ٥٠٠ نيوكليتيده من ر. ن. أ ملتفة حول معقد بروتينى يقوم بتكثيف وتجهيز كل نسخة نامية من ر. ن. أ وهذا المعقد يشبه إلى حد ما تركيب النيوكليوسومات فى الكروماتين.

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

تبين وجود بعض الحبيبات الثابتة (المستقرة) والتي 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 جداً عند نقاط الالتقاء بين تتابعات الانترونات والاكسونات. وكلما استطالت سلسلة 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.

أظهرت نتائج التجارب البيوكيماوية أن النواه تحتوى على عدد من المعقدات المتكونة من بروتينات مقترنة مع ر.ن.أ قصير السلسلة (لا يزيد طول السلسلة عن ٢٥٠ نيوكليتيده). وقد اطلق على هذه المعقدات اسم معقدات البروتينات الريبونووية الصغيرة Small Nuclear Ribonucleoproteins (sn RNP's) ويرمز اليها كالاتى:

U1, U2, U3,..... U12 RNA'S وهى تشبة 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 ٢٥٠,٠٠٠ 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 وتشارك 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 حديثة التكوين.

### يتم حذف الانترونات فى شكل عروات Lariat:

تختلف الانترونات فى الطول ما بين ٨٠ نيوكليتيده إلى ١٠٠٠٠ نيوكليتيده أو أكثر وتختلف عن الاكسونات فى أن تتابعات القواعد فيها ليس لها دور أو أهمية محددة حتى الآن لذلك يعتقد بأن الانترونات قد تراكمت بها الطرفان

بمعدل سريع أثناء التطور. كما أنه من الممكن تغيير معظم تتابعات الانترونات بدون أن يصاحبه أى تغيير يذكر فى وظيفة الجين. وقد أدى ذلك على افتراض أن الانترونات ليس لها وظيفة بالمرّة وأنها تمثل غالباً "مخلفات وراثية" Genetic Junk وهو ما سوف نتعرض له فيما بعد. وقد وجد أن أهم التتابعات الثابتة أو المحفوظة فى الانترون هى تلك التتابعات المطلوبة لاستبعاد أو استئصال الانترون حيث تبين وجود تتابع نوعى محفوظ Consensus Sequence عند كل من نهايتى منطقة الأنترون. وأن هذا التتابع المحفوظ يتشابه تقريباً فى جميع الانترونات المعروفة حتى الآن. وجد أن تغيير (بالطفرة) فى هذا التتابع المحفوظ يقلل من فاعلية عملية التراكب Splicing ويؤثر سلبياً على حذف الانترونات من النسخة الأولية لجزئ ر.ن.أ hnRNA.

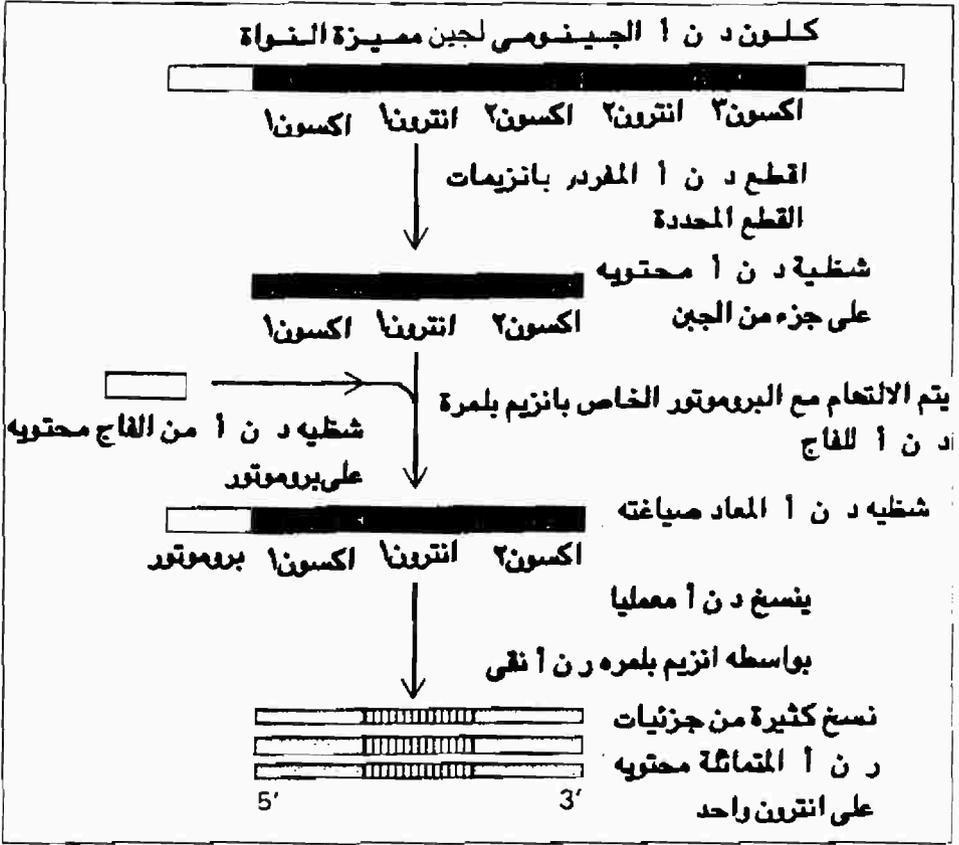
توجد هذه التتابعات الطرفية عند موقعين نوعيين من مواقع التراكب Splice Site وهما مواقع التراكب 5' Splice Site ويسمى الموقع المعطى أو الواهب Donner Site وموقع التراكب 3' Splice Site ويطلق عليه الموقع المستقبل Acceptor Site كما هو موضح بالشكل (٧-١١).

اكسون 5'	انترن	اكسون 3'
C or A G GU or A G U A G	U U U U U U U U U U U U U U or or or or or or or or or or N or C C C C C C C C C C C C U	C G or AG or U A
التابع المحفوظ لموقع التراكب 5' (الموقع الواهب)		التابع المحفوظ لموقع التراكب 3' (الموقع المستقبل)

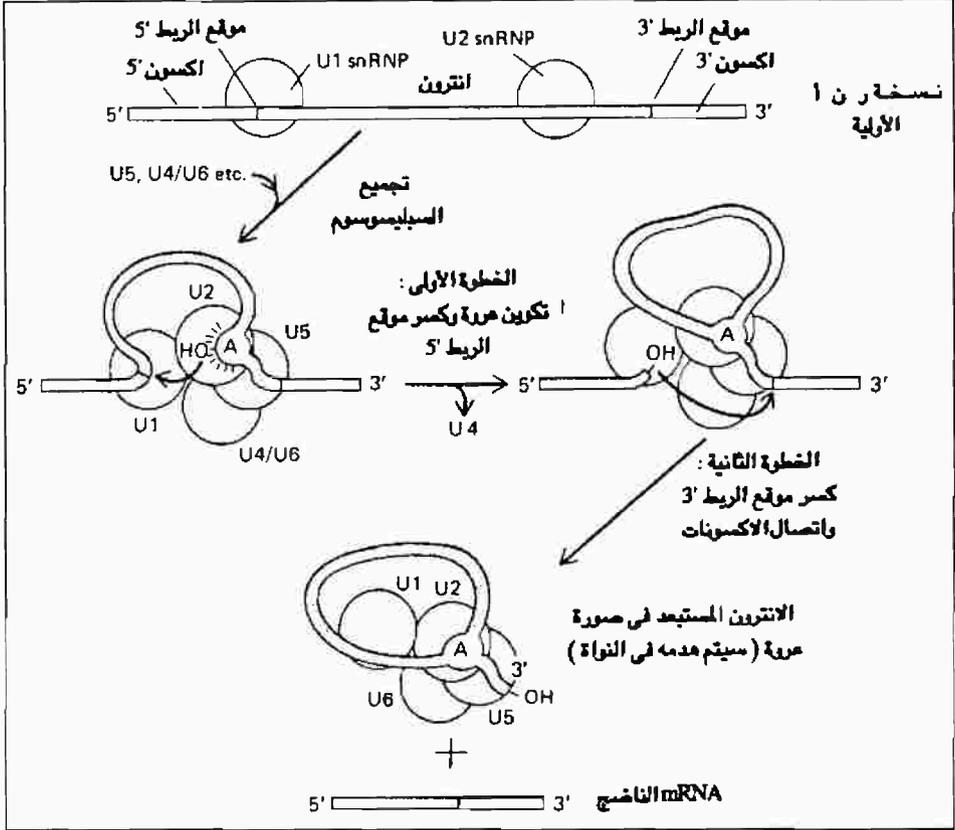
الشكل (٧-١١): التتابعات النيوكليدية المحفوظة Consensus Sequences لمواقع الربط 5', 3' المستخدمة فى تجهيز سلسلة ر.ن.أ ويلاحظ أن الثنائى النيوكليدى المظلل على الجانبين يكون عادة ثابتاً ولا يتغير

لا بد أن تتم تفاعلات التراكب (الحذف وإعادة الالتحام) Splicing لسلسلة ر.ن.أ بدقة متناهية حيث أن أى خطأ حتى ولو لم يتجاوز نيوكلييدة واحدة سيؤدى إلى تغيير فى إطار القراءة فى جزئ ر.ن.أ المرسل النهائى الناتج وقد يؤدى إلى طفرات عديمة المعنى.

أمكن دراسة عملية استبعاد أو حذف تتابعات الإنترونات بتجربة معملية *In Vitro* حيث تم الحصول على أحد الأنواع التركيبية من سلاسل ر.ن.أ الأولية المحتوية على انترون واحد عن طريق تحضين تتابع محدد من دن.أ مع أنزيم بلمرة ر.ن.أ النشط كما فى الشكل (٧-١٢) وعند إضافة هذه الجزيئات الناتجة من ر.ن.أ الأولى إلى مستخلص خلوى، تبين أنه يتم فيها عملية التراكب splicing فى تفاعل انزيمى من خطوتين وفى وجود ATP وبعض الأنواع المختارة من البروتينات النووية الصغيرة وخاصة : sn RNP's U1, U2, U5, U4/U6 وبعض بروتينات نوعية اخرى. وبعد اتاحة فترة تحضين طويلة نسبياً، تتجمع هذه المعقدات أولاً فى معقد كبير يسمى سبليسوسوم Spliceosome. وقد أدى إماكن التعرف على انواع ر.ن.أ التى تظهر كنواتج وسطية أثناء التفاعل بالاضافة إلى تحديد أنواع snRNP's المطلوبة لانتاجها إلى اكتشاف ان الانترون يستأصل فى صورة عروة Lariat كما يتبين فى مسار التراكب Splicing فى الشكل (٧-١٣).



الشكل (٧-١٢): شكل تخطيطي للطريقة المستخدمة لإنتاج كميات وفيرة من ر.ن. أ النقى لدراسة عملية تراكيب ر.ن. أ معملياً. تعتمد الطريقة على القدرة على إنتاج كمية كبيرة من نتابعات د.ن. أ المرغوب بطرق الهندسة الوراثية بالإضافة إلى توفر انتزيمات بلمرة ر.ن. أ من الفاج T7 أو SP6 التي تقوم بنسخ د.ن. أ معملياً بكفاءة عالية. ويربط شظايا د.ن. أ مميزة النواة ببروموتور الفاج، فإن انتزيم بلمرة ر.ن. أ يمكن استخدامه لإنتاج كميات كبيرة من ر.ن. أ معملياً مشفرة لشظايا د.ن. أ ويمكن إضافة القطاء  $\phi$  الموجود في hnRNA إلى هذه الجزئيات من ر.ن. أ بالطرق البيوكيميائية



الشكل (٧-١٣): دور السبليسوسوم (المكون من تجمع البروتينات الصغيرة U1، U2، U5، U4/U6

وغيره من المكونات) في تراكب ر.ن.أ الأولى. بعد تجميع السبليسوسوم يتم التفاعل في خطوتين:

- ١- تقوم نيوكليتيده ادينوسية خاصة (A) موجودة بالقرب من موقع الربط 3' بمهاجمة موقع الاستبعاد 5' مما يؤدي إلى كسره. ثم ترتبط النهاية المكسورة تساهمياً بهذه القاعدة A مكونة نيوكليتيده متفرعة.
- ٢- يتم اضافة النهاية المعرضة 3'OH للأكسون الأول إلى بداية الإكسون الثاني مع إحداث كسر في جزئ ر.ن.أ عند موقع الربط 3' مما يؤدي إلى اتصال الإكسونين ببعضها واستبعاد الانترن في صورة عروة. تحدث هذه العمليات في النواة وتؤدي إلى إنتاج mRNA ناضج من النسخة الأولية لجزئ ر.ن.أ hnRNA.

أمكن تحديد بعض الوظائف النوعية التخصصية لبعض أنواع sn RNP's  
 فمثلاً: UI snRNP يرتبط بموقع التراكب 5' Splice Site وذلك بمساعدة تتابع  
 نيوكليدي في UI RNA المقترن في هذا المعقد، حيث وجد أن هناك تتابع  
 نيوكليدي في هذا المعقد الصغير يكون مكملاً للتتابع النيوكليدي المحفوظ  
 المكون من 9 نوكلتيدات في هذا الموقع من الانترون وحيث أنه قد تبين أن  
 RNA يمتلك خاصية العمل كإنزيم (Ribozyme) فإنه من المحتمل أن يكون ر .  
 ن. أ نفسه أو المكونات البروتينية للسليوسوم هي المسؤولة عن كسر وتكوين  
 الروابط التساهمية التي تتطلبها عملية التراكب splicing.

### حذف عدة إنترونات من كل جزئ من hnRNA:

حيث أن السليوسوم يتعرف أساساً على التتابع المحفوظ عند حدود كل  
 انترون، لذلك فإن موقع التراكب 5' (الموقع المعطى) عند طرف أى إنترون  
 معين يمكن أن يوصل بموقع التراكب 3' (الموقع المستقبل) لأى إنترون آخر  
 أثناء عملية القطع والربط Splicing. وعلى ذلك فعندما أجريت تجربة لضم  
 النصفين 5'، 3' لانترنين مختلفين أمكن لانزيمات التراكب أن تتعرف على تتابع  
 الانترون الهجين وتقوم بحذفها. وعلى ضوء هذه النتيجة أمكن معرفة أن جينات  
 الفقاريات بصفة عامة تحتوى على عدد من الإنترونات قد تصل إلى 50 إنترون  
 كما فى الجدول (٧-٢).

الجدول (٧-٢) حجم بعض الجينات البشرية وعدد الإنترونات بها

عدد الإنترونات ***	حجم hmRNA (Kbp)	* حجم الجين (Kbp)	اسم الجين
٢	٠,٦	١,٥	بيتا جلوبيين $\beta$ -globin
٢	٠,٤	١,٧	انسولين Insulin
٧	١,٤	١١	بروتين كينيز C (P.K.C)
١٤	٢,١	٢٥	البومين Albumin
١٢	١,٦	٣٤	كتاليز Catalase
٥٠	٥	٣٨	كولاجين Collagen
١٧	٥,٥	٤٥	مستقبل LDL
٢٥	٩	١٨٦	عامل التخثر VIII
٣٦	٨,٧	٣٠٠	ثيروجلوبيولين Thyroglobulin
>٥٠	١٧	>٢٠٠٠	Dystrophin **

\* يمثل حجم الجين هنا التتابعات المنسوخة لكل جين بالإضافة إلى التتابعات المنظمة المجاورة الخاصة بكل جين.

\*\* يؤدي حدوث طفرة في هذا الجين إلى مرض ضمور العضلات Duchene M.D.

\*\*\* تعتبر جينات الهستونات والانتروفيريون من الأمثلة النادرة في جينات مميزة النواة التي تخلو من الإنترونات.

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

تبين أن ماكينة تراكب ر.ن.أ تضمن عادة أن كل موقع التراكب 5' يتزاوج فقط مع أقرب موقع تراكب 3' التالي له مباشرة في اتجاه مسار تتابع بناء ر.ن.أ (أي من 5' إلى 3') كما في الشكل (٧-١٤) ولم تعرف حتى الان بطريقة محددة



كما توجد بعض الأدلة على أن الدقة الكامنة في الشكل الثلاثي الأبعاد في سلسلة ر.ن.أ والذي تتخذها تتابعات الأنترونات والإكسونات قد تلعب دوراً رئيسياً في هذا الإنضباط.

## بناء ر.ن.أ الريبوسومي على مجموعة مترادفة من الجينات المتماثلة:

وجد أنه جينوم مميزة النواة يحتوى على نسخ متكررة ترادفياً من جينات rRNA موزعة في مجموعات على الكروموسومات المختلفة عند مناطق تنظيم النويات (Nucleolus Organizer Region (NOR)، بحيث يكون كل جين (بطول يختلف من حوالى ٨٠٠٠ إلى ١٣٠٠٠ نيوكليوتيد حسب الكائن) منفصل عن الجين المجاور بتتابعات غير منسوخة تعرف بخيط د.ن.أ الرابط spacer الذى يختلف بدوره كثيراً في الطول وفي تتابع القواعد. ونتيجة للنظام التكرارى المترادف ووجود عدد كبير نسبياً من النسخ لكل من جينات rRNA، ونظراً لأن معدل النسخ فيها يكون سريعاً فإن ذلك يؤدي إلى إنتاج عدد كبير من نسخ ر.ن.أ الريبوسومي للوفاء باحتياجات الخلية العالية من جزئيات ر.ن.أ الريبوسومي التي تحتاجها لتكوين الريبوسومات اللازمة في عملية بناء البروتين كما سيأتى بعد.

يتم نسخ جينات rRNA بواسطة إنزيم بلمرة ر.ن.أ (RNA pol I) وينتج كل جين نفس النسخ الأولية من rRNA. يصل طول هذه النسخ الأولية في الإنسان والتي تعرف بـ 45S RNA إلى حوالى ١٣٠٠٠ نيوكليوتيد، وقبل أن تترك النواه في صورة حبيبات ريبوسومية بعد إقترانها بنوعيات معينة من البروتينات في النوبة والتي يسمى البروتينات الريبوسومية

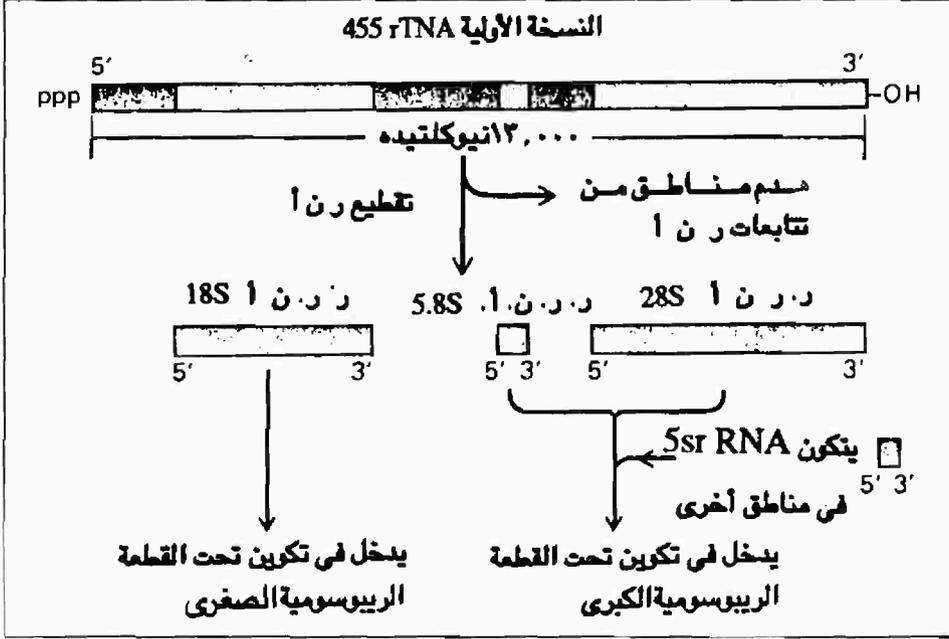
Ribosomal Proteins. تم تكسير كل وحدة من هذا المنتج الأولي 45S rRNA إلى ثلاث أنواع من rRNA بمعدل نسخة واحدة من كل نوع وهي:

28 Sr RNA (وطوله حوالي ٥٠٠٠ نيوكلييدة).

18 Sr RNA (وطوله حوالي ٢٠٠٠ نيوكلييدة).

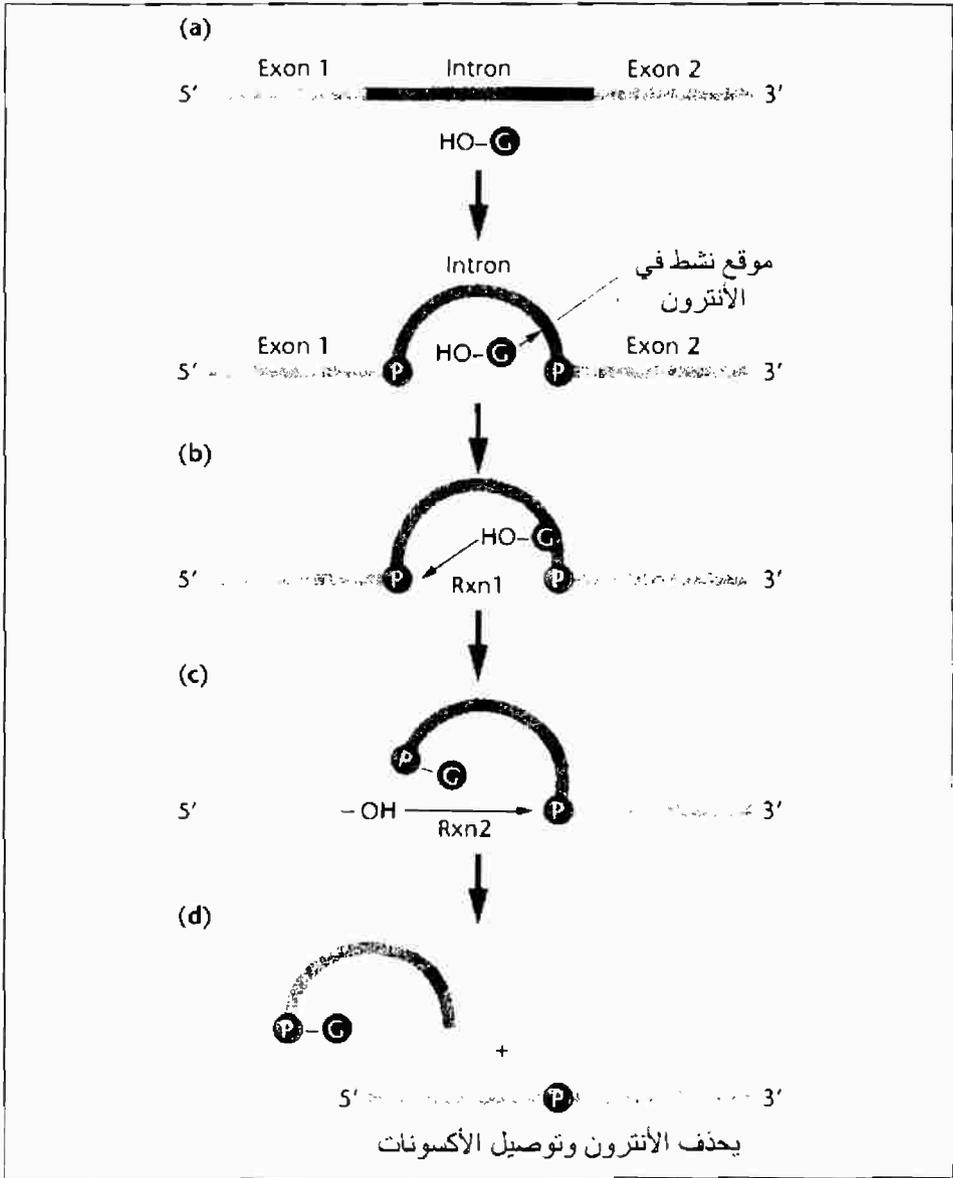
5.8 Sr RNA (وطوله حوالي ١٦٠ نيوكلييدة).

وتوجد ضوابط لكي 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 في الوحدة الأولية والذي يقدر بحوالي ٦٠٠٠ نيوكلييدة في النواه كما في الشكل (٧-١٥). يوجد نوع رابع من rRNA وهو 5S rRNA وهو ينسخ مستقلاً عن الأنواع الثلاثة السابقة وهو يوجد في نسخ متكررة في أماكن متفرقة بعيدة تماماً عن منطقة 45S RNA الرئيسية، ويكون هذا النوع من rRNA قصير جداً بطول حوالي ١٢٠ نيوكلييدة فقط، وهو ينسخ بواسطة انزيم RNA pol III الذي يقوم أيضاً بنسخ الجينات الخاصة بإنتاج tRNA والذي لا يزيد طول سلسلة كل منها عن حوالي ٧٥-١٠٠ نيوكلييدة فقط والذي تتم في قواعده النروجينية تعديلات غير عادية في عملية ما بعد النسخ Post-Transcription لكي يأخذ التركيب الثالثي والفعال في الترجمة والذي يأخذ شكلاً مميزاً يعرف بشكل ورقة البرسيم clover-leaf كما سيأتي بعد.



الشكل (٧-١٥): طريقة تجهيز جزئ رن. أ الريبوسومي الأولى 45S r RNA لإنتاج الأنواع الثلاثة المختلفة من رن. أ الريبوسومي. ويتم التخلص من حوالي نصف طول الجزئ الأولى في هذه التفاعلات

وتجدر الإشارة إلى أن عملية استبعاد أو حذف الانترونات من جزئيات rRNA الأولية (وكذلك mRNA في الميتوكوندريا و tRNA الميتوكوندريا) يتم بعملية استئصال ذاتي حيث تحتوى الانترونات نفسها على النشاط الإنزيمي اللازم لإزالتها ويسمى RNA الذى يحتوى على نشاط تحليل ذاتي Autocatalytic بالريبوزيم Ripozyme وبين الشكل (٧-١٦) عملية الاستئصال الذاتى للانترون.



الشكل (٧-١٦): ميكانيكية التراكب Splicing حيث يتم إزالة المجموعة (١) من الإنترونات من النسخة الأولية لإنتاج rRNA و يتم ذلك بعملية إستئصال ذاتية يشترك فيها تفاعلان للأسترة العابرة Transesterification