

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

ان عملية بناء ر ن أ Transcription في مميزة النواة عمليه على درجة عاليه 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 إلى تتابعات فعالة من ر ن أ أي في صوره ر ن أ المراسل الناضج أو التركيبي mature mRNA . وتحديث عملية الانتقاء على مستويين :

الأول : حدوث نسخ جزئي فقط لتتابعات معينه من د ن أ لانتاج ر ن أ النووي nRNA .

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

### أنواع انزيمات بلمرة ر ن أ في مميزة النواه :

على العكس مما وجد في غير مميزه النواه حيث يعمل انزيم بلمره ر ن أ واحد لانتاج الانواع المختلفه من ر ن أ : تبين أنه في مميزه النواه توجد ثلاثة أنواع مختلفه من انزيمات بلمرة ر ن أ وهي :

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

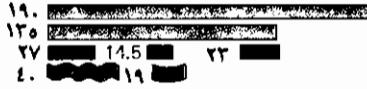
٢ - انزيم بلمره ر ن أ RNA polymerase II ويختص بنسخ سلاسل جزئيات ر ن أ المراسل mRNA .

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 الريبوسومي تقصير السلسلة (5 SrRNA).

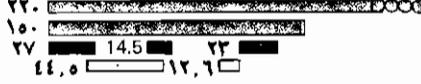
يتكون كل انزيم من هذه الانواع الثلاثة من عدد من تحت الوحدات وقد تتشابه الانزيمات الثلاثة في بعض مكوناتها من الوحدات إلا أنها تحتوى على وحدات فريدة تميز كل نوع من هذه الانزيمات كما في الشكل (٦ - ١) . وعلى العكس من انزيم بلمره ر ن أ في البكتريا الذى يمكنه مباشرة الارتباط بمنطقة تتابع ابتداء النسخ Promoter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

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

إنزيم بلمره ر ن أ I



إنزيم بلمره ر ن أ II



إنزيم بلمره ر ن أ III



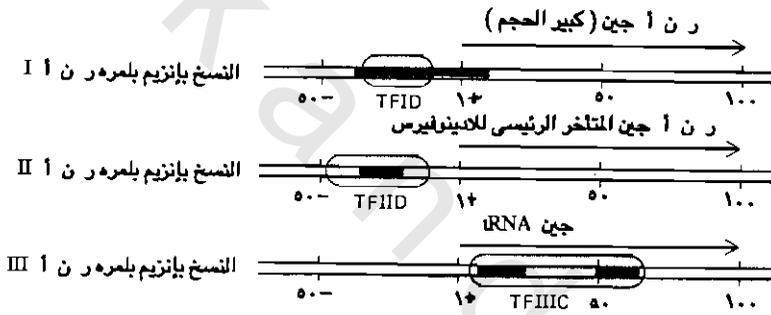
الشكل (٦-١):

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

## دور عوامل النسخ (TF) Transcription Factors في 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 معينة في د ن أ القالب لتنشيط المستبدىء وتحفيزه على الدخول في عملية النسخ . يطلق على هذه البروتينات النوعية اسم عوامل النسخ (TF) Transcription Factors وهي ضرورية لبدء بناء ر ن أ ، وهي تختلف عن عوامل بدء النسخ في غير مميزه النواه ( عامل سيجما) في أنها ترتبط بجزء د ن أ مستقلة عن انزيم بلمره ر ن أ . تتعرف كل من الانزيمات الثلاثة على المستبدىء Promoter نوعيه مختلفة ويحتاج كل منها في الغالب 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 ثابتة نسبياً وتقوم بجذب جزئيات انزيمات بلمره ر ن أ انتقائياً لمنطقة تتابع الابتداء النوعية والخاصة بكل منها . ترتبط كل من عوامل النسخ المختلفة بالمنطقة الخاصة بها على سلسلة د ن أ القالب بالنسبة للمستبدى 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 III RNA pol 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 إنشاء د ن أ حول نفسه لتكوين حبيبة كبيرة من البروتين النووى .



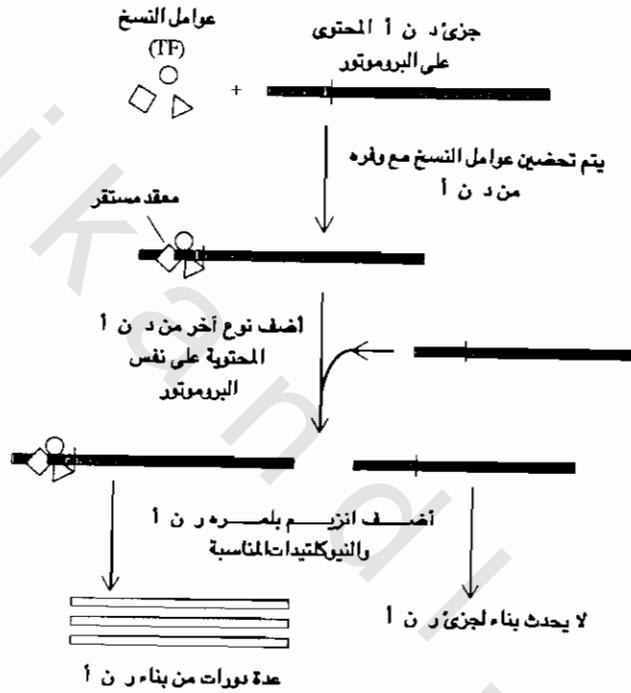
الشكل (٦-٢):

تكوين معقدات مستقرة لعوامل النسخ (TF) على الجين (فى د ن أ) . تدل المستطيلات السوداء على مواقع التتابعات الضرورية لنشاط البروموتور . والمنطقة المظلمة تدل على الجزء من الجين المرتبط بعوامل النسخ . تدل الأرقام على المواقع على جزيء د ن أ ( مقدره بعدد ازواج النيوكليوتيدات) بالنسبة لموقع بدء النسخ (١+) .

وقد تبين أنه لابد من تكوين معقد مستقر وثابت نسبياً بين عامل نسخ معين وبين منطقة المستبدى 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 المناسبه .

تبين أنه في 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 في حين لم يتسنى ذلك لنفس الجزئ من د ن أ نتيجة لعدم اتاحة الفرصة لتكوين المعقد المذكور كما في الشكل ( ٦ - ٣ ) .

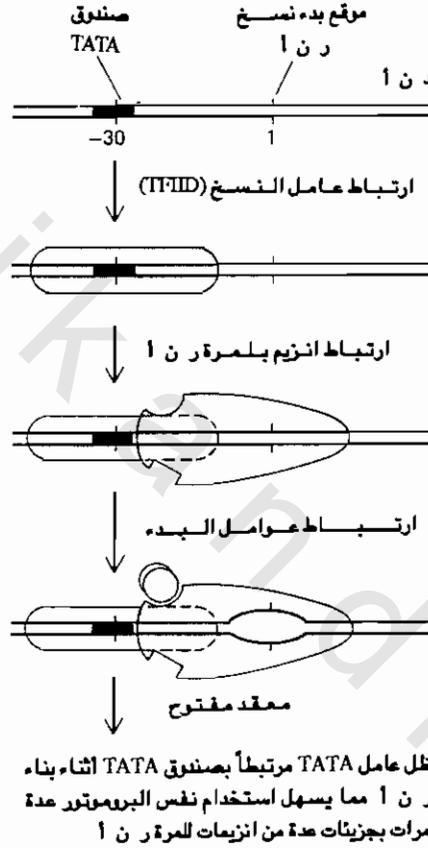


الشكل (٦-٣) .

تجربة معملية لإثبات ضرورة تكوين معقد نسخي مستقر في منطقة البريوموتور في مميزة النواة حتى يمكن بدء عملية النسخ .

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

لأنه 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 (٦ - ٤) .



الشكل (٦-٤) :

ميكانيكية التعرف على منطقة البروموتور بواسطة إنزيم بلمره ر ن ١ في مميزه النواه . لابد من ارتباط عامل النسخ (TF II D) بصندوق TATA لتكوين معقد نسخي مستقر قبل أن يتمكن الانزيم من التعرف على البروموتور

## اختلاف النشاط النسخي لأنزيم RNA pol II حسب تتابعات رن أ القالب :

وجد أن انزيم RNA pol II المشترك في عملية النسخ يبدو تحت المجهر الالكترونى كحبيبات كروية تجر وراءها ذيلا من سلسلة تمثل جزئ رن أ وجد أن هذه الحبيبات تبدو عادة كوحدات متباعدة نسبياً . يشير ذلك إلى أن معظم الجينات التى يتم نسخها إلى جزيئات رن أ أوليه (precursors) تكون ذات تكرار منخفض وقد يفسر ذلك على أساس إتاحة 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 رن أ II (مرتبطاً بها سلاسل رن 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 رن أ II ملتصقة بنواتج نسخها من سلاسل رن أ فى نفس الوقت ويكون اتجاه النسخ من اليسار إلى اليمين. يتزايد طول سلاسل رن أ المرتبطة بالانزيم فى مثل هذه التجمعات فى 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 - ٦) .



الشكل (٦ - ٦) :

وحدة نسخ نموذجية . مبيناً اتجاه النسخ ومواقع البدء والتوقف في الوحدة .

يمكن تلخيص النتائج الهامة التي توصلت إليها الدراسات البيوكيميائية الموازية للنتائج المتحصل عليها من المجهر الإلكتروني في النقاط التالية :

١ - أن جزيئات انزيمات بلمره ر ن أ في مميزه النواه ( كما في غير مميزه النواه ) تبدأ وتنتهى النسخ عند مواقع نوعية محددة على الكروموسوم .

٢ - أن متوسط طول سلسلة ر ن أ الناتجة من انزيم البلمره RNA pol II في وحدة النسخ يبلغ حوالي ٨٠٠٠ نيوكليتيده وقد يزيد إلى أكثر من ٢٠٠٠٠ نيوكليتيده . 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 نيوكليتيده (يشفر لبروتين بطول ٤٠٠ حامض امينى) . قد يعكس التركيب المعقد للجين في مميزه النواه وخاصة وجود عدد من الانترونات Introns في النسخ الأوليه لجين والتي يتم

استئصالها في المراحل اللاحقة لتجهيز mRNA النهائي أو الناضج mature mRNA كما سيأتي بعد .

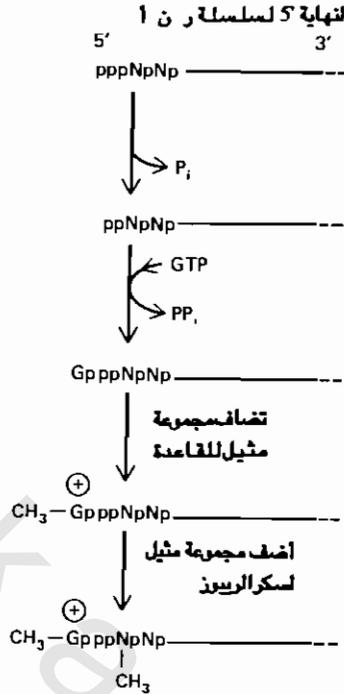
٢ - على الرغم من أن معدل استئصاله سلسله رن أ يبلغ حوالي ٢٠ نيوكليتيده في الثانية بالنسبة لجميع أنواع رن أ فإن مواقع بدء النسخ المختلفة لجزيئات انزيم بلمره رن أ II تختلف كثيرا في درجة كفاءتها بحيث يتم نسخ بعض الجينات بمعدل اسرع عن الأخرى. **تعديل أو تجهيز النسخ الأولية لسلاسل mRNA :**

تعرف النواتج الأولية لعملية النسخ بواسطة انزيم RNA pol II باسم جزيئات رن أ غير المتجانس النووي (hnRNA) وترجع التسمية إلى أن هذه الجزيئات تكون غير متجانسة في احجامها الأولية بمجرد انتاجها في النواه .

يكون مصير كثير من هذه النسخ الأولية أن تترك النواه في صورة جزيئات رن أ المراسل mRNA إلا أن ذلك لا يحدث قبل أن تتم بها عمليات تحويل تساهميه عند كل من النهاية 5' والنهاية 3' أثناء عملية النسخ وهذه التعديلات هامه جدا وضرورية لحسن اداء سلاسل mRNA لوظيفتها في الترجمة في السيتوبلازم كما سيأتي بعد .

يتم أولاً التعديل أو التحويل في النهاية 5' لسلسله رن أ (وهي النهاية المتكونة أولاً أثناء عملية النسخ) وذلك باضافة ما يسمى بقلنسوة Cap الجوانين المميثلة - G methylated nucleotide . تحدث التغطية بالقلنسوة مباشرة عقب بناء الثلاثين نيوكليتيده الأولى في سلسله رن أ النامية. وتشتمل على تكثيف مجموعة الفوسفات الثلاثية لجزء GTP مع مجموعة ثنائية للفوسفات متبقية على النهاية 5' للسلسله النامية كما في الشكل (٦ - ٧) وتقوم هذه القلنسوة بدور رئيسي في عملية استبداء بناء البروتين كما يبدو أنها تقوم بحماية النسخة النامية من رن أ من عملية التحلل والهدم .

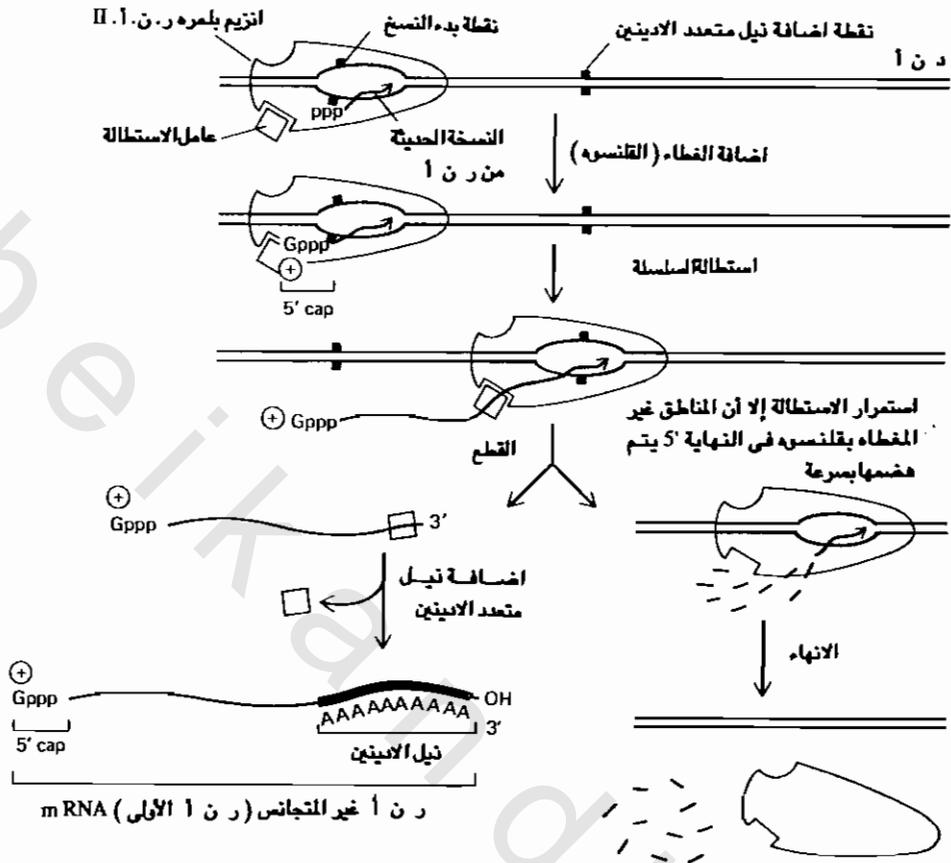
ولا تتحدد النهاية 3' لمعظم سلاسل رن أ المراسل mRNA بمنطقة انتهاء النسخ أو توقفه (حيث أن النسخ يستمر ويتجاوز هذه النهاية النوعية في الناتج الأولى hnRNA) .



الشكل (٦-٧)،

تفاعلات تكوين الغطاء (القلنسوة) عند النهاية 5' لسلسلة ر ن ١ الجارى بتلاها بواسطة انزيم بلمره ر ن ١ II .

ولكنها تتميز بتحويل أو تعديل من نوع آخر بحيث يحدث كسر نوعى للسلسلة النامية عند موقع محدد ، بحيث يضاف إلى النهاية 3' المكسوره ذيل من عديد الادينين polyA tail بواسطة انزيم بلمره مستقل بحيث يصل طول هذا الذيل 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 ١ والتي تقع على بعد ١٠ - ٢٠ نيوكليديه قبل موقع القطع واطرافه الذيل . بعد احداث الكسر أو القطع مباشرة يقوم انزيم poly A polymerase باضافة ذيل متعدد الادينين إلى النهاية 3 فى سلسلة ر ن ١ لاتمام النسخة المبدئية أو الاولى من ر ن ١ كما فى الشكل ( ٦ - ٨ ) .



الشكل (6-8) :

بناء جزيء رن أ غير المتجانس النووي hnRNA بواسطة انزيم بلمره رن أ II و إضافة نيل من متعدد الادينين poly A إلى سلسلة رن أ مما يؤدي إلى كسر السلسلة ليتسنى إضافة هذا النيل . في معيزه النواه الراقية (بعكس الخميرة ) لا يتم ايقاف النسخ نهائيا بعد هذه النقطة ولكن على العكس يستمر النسخ لعدة آلاف من النيوكليدات 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 1 RNA pol II يستمر بعد نقطة الكسر هذه في عملية النسخ بدون توقف لعدة مئات أو آلاف من النيوكلييدات 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 والتلاشي .

لم تعرف حتى الآن وظيفة ذيل Poly A على وجه التحديد ، ولكنه قد يكون له دور في تسهيل خروج ر ن 1 المراسل mRNA الناضج من النواة، كما يعتقد أنه يلعب دوراً في ثبات أو استقرار جزيئات mRNA بحيث يؤثر عملية هدمها في السيتوبلازم حتى يمكنها أن تشارك في عدد محدد من نورات الترجمة قبل هدمها .

على الرغم من أن نواتج نسخ انزيم بلمرة ر ن 1 II تمثل أكثر من نصف ر ن 1 الإجمالي المنتج في الخلية ، إلا أن معظم هذه النسخ تكون غير ثابتة وقصيرة العمر ، بحيث أن ما يتبقى منها بالفعل في وقت ما بالخلية يا يمثل إلا نسبة ضئيلة جداً من إجمالي ر ن 1 كما في الجدول (٦ - ١) .

جدول ٦ - ١ : بعض المقادير النسبية من أنواع ر ن 1 في خلية نموذجية للثدييات.

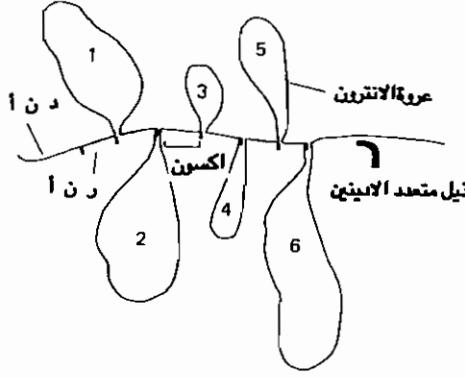
نوع ر ن 1	الكمية المنتجة الأولية ( كنسبة من إجمالي ر ن 1 )	الكمية المتبقية بالفعل ( كنسبة من إجمالي ر ن 1 )
ر ن 1 الريبوسومي	%	%
tRNA ( في النواة )	٣٩	٤
tRNA ( في السيتوبلازم )	—	٧١
hnRNA ( في النواة )	٥٨*	٧
mRNA الناضج ( في السيتوبلازم )	—	٣
tRNA	٣	١٥

\* يلاحظ أنه على الرغم من أن معظم ر ن 1 الأولى المنسوخ يكون في صورة hn RNA إلا أن معظمه يتم هدمه وبذلك فإن النسبة المتبقية في صورة mRNA الناضج تكون ضئيلة جداً ولا تتعدى ٣٪ ر ن 1 في الخلية .

تبين أن كلا من عمليتي 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 الأولى 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 ٢٠ دقيقة فقط من انتاجها (من حوالى ٦٠٠٠ نيوكليديه فى سلسله hnRNA ينخفض العدد إلى حوالى ١٥٠٠ نيوكليديه فى سلسله mRNA) . وبعد هذه الفترة القصيرة تبدأ جزئيات mRNA فى الخروج من النواه بحيث لا يصل إلى ستيوبلازم الخلية إلا حوالى 5% فقط من إجمالى hn RNA الأصيل 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 للسلسله فى مناطق وسطية وقد تحقق ذلك عند مقارنة تتابعات النيكلوتيدات فى سلسله 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 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 تتخله 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 في جينات مميزة النواة بتجربة التهجين بين  $5'$  و  $3'$  حيث يتم هنا انتاج بيتا جلوبيين mRNA ويتم عزلة وتنقيته من الخلايا المتخصصة في إنتاجه . ثم تجرى تجربة تهجين من mRNA ومنطقة  $5'$  المحتوية على هذا الجين . تبدو المناطق من جزئ  $5'$  التي لا يحدث بها تهجين مع  $3'$  كعروات ممتدة إلى الخارج وهي تمثل الانترونات في هذا الجين .

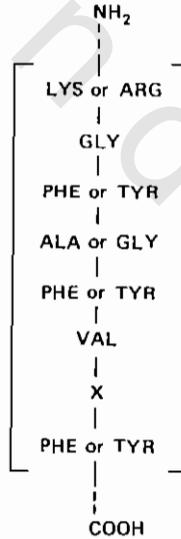
### تراكب ر ن أ المراسل RNA splicing

يتم حذف أو استبعاد تتابعات الانترونات المتخللة لجزئ hnRNA أثناء عملية تجهيز mRNA ثم توصل تتابعات الاكسونات ببعضها بعملية تشبه القص / واللصق ر ن أ RNA splicing حيث تتبعج الإنترونات للخارج في صورة عروات Lariat قبل إستبعادها من المعروف أن النسخة الأولية من hnRNA مطابقة في الطول والتتابع لمنطقة القالب من  $5'$  إلى  $3'$  المنسوخة عليه ، بحيث تحتوي هذه النسخة على جميع الإكسونات والإنترونات ؛ في حين نجد أن تلك الأخيرة تحذف أو تُستبعد أثناء تجهيز mRNA . تحدث هذه العملية في نواه الخلية قبل أن يخرج mRNA إلى السيتوبلازم ، بحيث يحتوي فقط على تتابعات الإكسونات التي تشفر لسلسله متعدد ببتيد نوعي عند الترجمة على الريبوسومات . تمثل تتابعات الإنترونات في hnRNA نسبة كبيرة جدا من الطول الكلي للجزئ ؛ ويختلف طول وعدد هذه الإنترونات من جين إلى آخر . ويفسر ذلك كيف يتبقى من الطول الكلي للنسخة الاصلية من hnRNA (حوالي ٥٠٠٠٠ نيوكليتيده) تتابع قصير فقط من mRNA يتراوح بين ٥٠٠ ، ٢٠٠٠ نيوكليتيده فقط .

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

يتم تكثيف سلسله رن أ المنسوخة حديثا بسرعة إلى مجموعات متجاوره من الحبيبات المحتوية على بروتينات . تتكون كل حبيبة من حوالي ٥٠٠ نيوكليتيده من رن أ ملتقة حول معقد بروتيني يقوم بتكثيف وتجهيز كل نسخة ناميه من رن أ وهذا المعقد يشبه إلى حد ما تركيب النيوكليوسومات في الكروماتين.

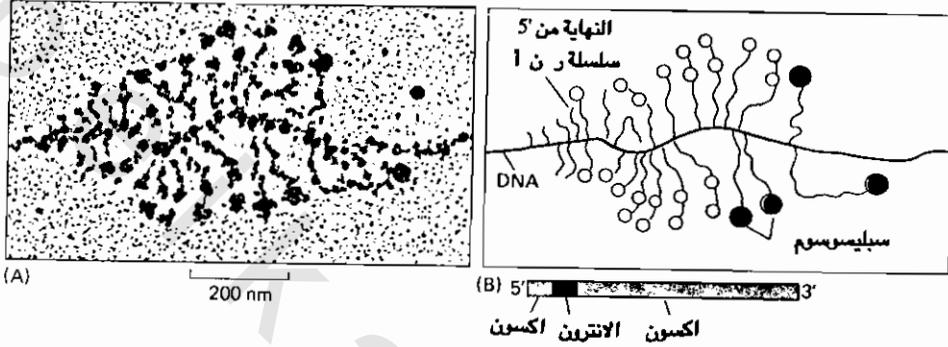
يمكن فصل وتنقية حبيبات hnRNP's الناتجة (وتسمى حبيبات الريبونيوكليوبروتين النووية غير المتجانسة) بعد معاملة النواة بإنزيم الريبونيوكلين RNase بطريقة تسمح فقط بهدم شريط رن أ الرابط بين الحبيبات. تترسب هذه الحبيبات عند 30S ويبلغ نصف قطر كل منها ضعف نصف قطر النيوكليوسوم ( أى حوالي 20 nm) . يتكون بروتين اللب أو البروتين المركزى فى كل حبيبة من حوالي ٨ أنواع مختلفة من البروتينات يتراوح مجموع وزنها الجزيئى من ٢٤٠٠٠ إلى ١٢٠٠٠٠ دالتون ، وتعد هذه البروتينات أكثر البروتينات وفرة فى النواه بعد الهستونات . تحتوى كل من هذه البروتينات الثمانية على نسخة أو أكثر من تتابع مشترك قصير ونوعى من الاحماض الامينية كما فى الشكل (٦ - ١٠) .



الشكل (٦ - ١٠)

تتابع قصير من الاحماض الامينية مميز لكثير من البروتينات المرتبطة بسلاسل رن أ في مميزة النواة .

تبين وجود بعض الحبيبات الثابتة (المستقرة) والتي تكون أقل شيوعاً في 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 الكوربون فى الروسفلا .

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 نيوكليتيده) . وقد اطلق على هذه المعقدات اسم معقدات البروتينات الريبونوية الصغيرة Small nuclear ribonucleoproteins (sn RNP's) ويرمز إليها كالاتى :

RNA'S  $U_1, U_2, U_3, \dots, U_{12}$  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

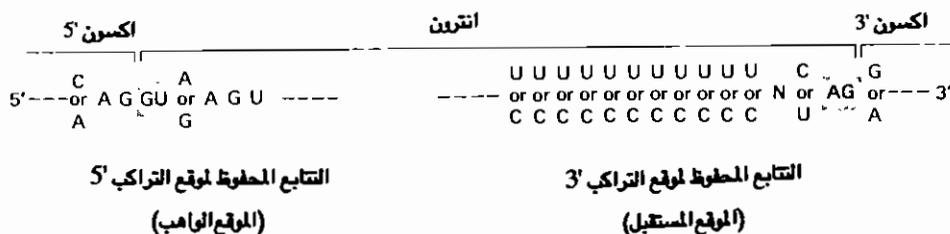
سلسلة hnRNA من خلال التزاوج التكاملي بين القواعد RNA / RNA . تشارك بعض هذه المعقدات الصغيرة في عملية التراكب Splicing كما أن بعضها يقوم بدور في تفاعلات الكسر Cleavage التي تؤدي إلى تكوين نهايات 3' لبعض سلاسل رن أ حديثه التكوين.

### يتم حذف الانترونات في شكل عروات Lariat

تختلف الانترونات في الطول ما بين ٨٠ نيوكليتيده إلى ١٠٠٠٠ نيوكليتيده أو أكثر . وتختلف عن الاكسونات في أن تتابعات القواعد فيها ليس لها قيمة أو أهمية محددة لذلك يعتقد بأن الانترونات قد تراكتت بها الطفرات بمعدل سريع أثناء التطور . كما أنه من الممكن تغيير معظم تتابعات الانترونات بدون أن يصاحبه أي تغيير يذكر في وظيفة الجين وقد أدى ذلك إلى افتراض أن الانترونات ليس لها وظيفة بالمرّة وأنها تمثل غالباً « مخلفات وراثية » ، genetic “junk” وهو ما سوف نتعرض له فيما بعد . وقد وجد أن التتابعات الثابتة أو المحفوظة أكثر في الأنترون هي تلك التتابعات المطلوبة لاستبعاد أو استئصال الأنترون حيث تبين وجود تتابع نوعي محافظ عليه consensus sequence عند كل من نهايتي منطقة الأنترون . وأن هذا التتابع المحفوظ يشابه تقريباً في جميع الانترونات المعروفة حتى الآن . وجد أن أي تغيير ( بالطفرة) في هذا التتابع المحفوظ يقلل من فاعلية عملية التراكب Splicing وفي حذف الانترونات من النسخة الأولية لجزئ رن 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 donor site وموقع التراكب 3' splice site 3' ويطلق عليه الموقع المستقبل acceptor site كما هو موضح بالشكل (٦ - ١٢) .

لا بد أن تتم تفاعلات التراكب (الحذف وإعادة الالتحام) Splicing لسلسلة رن أ بدقة متناهية حيث أن أي خطأ حتى ولو لم يتجاوز نيوكليتيده واحدة سيؤدي إلى تغيير في إطار القراءة في جزئ رن أ المراسل النهائي الناتج ويؤدي إلى طفرات عديمة المعنى .



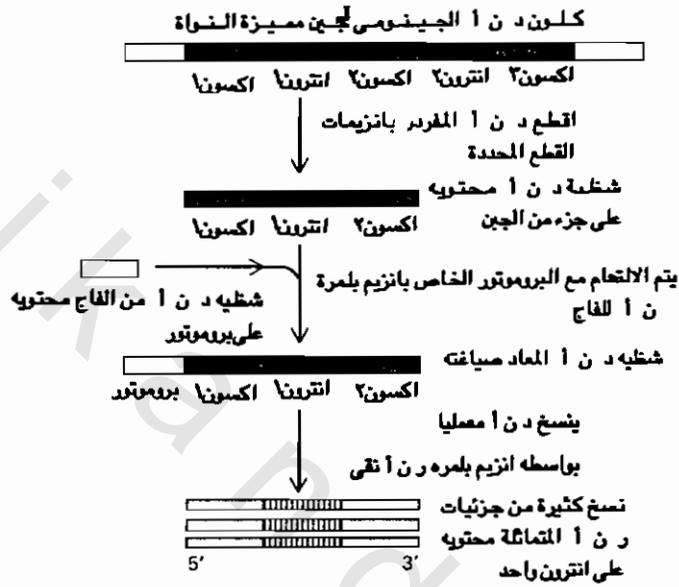
الشكل (٦-١٢)،

التتابعات النيوكليوتيدية المحفوظة Consensus Sequences لمواقع الربط 5' ، 3' المستخدمة في تجهيز سلسله ر ن أ الثنائي النيوكليوتيدى المظلل على الجانبين يكون عادة ثابتا ولا يتغير .

امكن دراسة عملية استبعاد أو حذف تتابع الإنترون بتجربة معملية *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 ر ن أ مع انزيم بلمره ر ن أ النشط كما فى الشكل (٦ - ١٢) ، 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 : U1, U2, U5, U4 / U6 sn RNP's وبعض بروتينات نوعية أخرى . وبعد اتاحة 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).

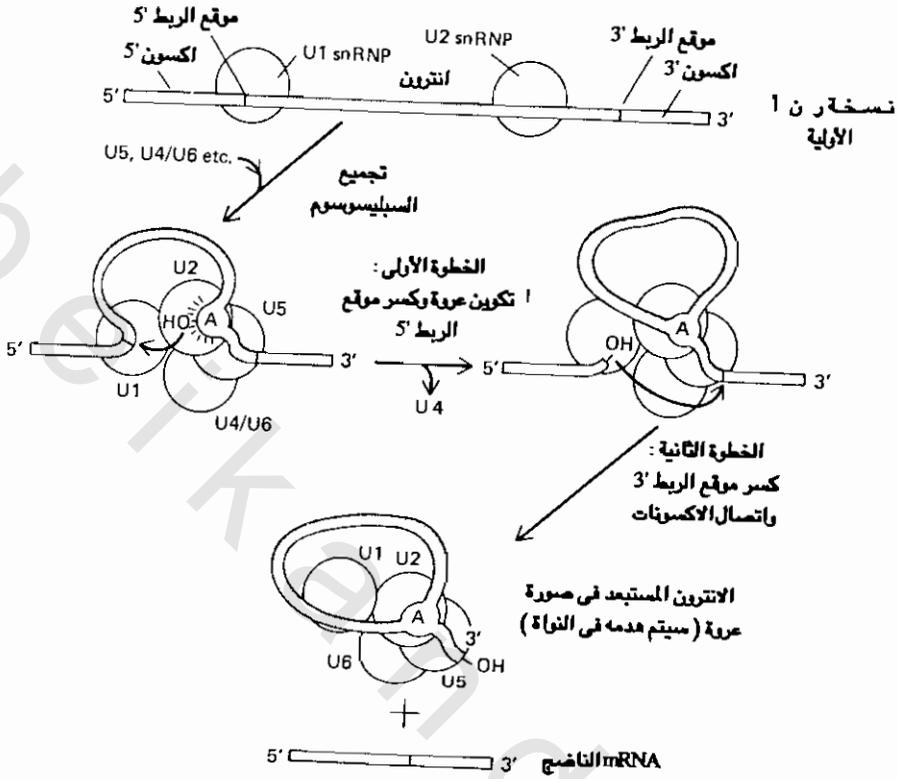
أمكن تحديد بعض الوظائف النوعية التخصصية لبعض أنواع sn RNP's فمثلا : U1 sn RNP يرتبط بموقع التراكب 5' Splice site 5' وذلك بمساعدة تتابع نيوكليوتيدى فى U1 RNA المقترن فى هذا المعقد حيث وجد أن هناك تتابع نيوكليوتيدى فى هذا المعقد الصغير تكون مكمله للتتابع النيوكليوتيدى المحفوظ المكون من ٩ نوكلتيدات فى هذا 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 هي المسئولة عن كسر وتكوين الروابط التساهمية التي تتطلبها عملية التراكب Splicing .



الشكل (٦-١٣)

شكل تخطيطي للطريقة المستخدمة لانتاج كميات وفيرة من رن أ النقي لدراسة عملية تراكب رن أ معليا . تعتمد الطريقة على القدرة على انتاج كمية كبيرة من تتابعات رن أ المرغوب بطرق الهندسة الوراثية بالإضافة إلى توفر انزيمات بلمره رن أ من الفاج T 7 أو SP 6 التي تقوم بنسخ رن أ معليا بكفاءة عالية . ويربط شظايا رن أ ممييزة النواه ببروموتور الفاج ، فإن انزيم بلمره رن أ يمكن استخدامه لإنتاج كميات كبيرة من رن أ معليا مشفرة لشظايا رن أ ويمكن إضافة الغطاء 5 الموجود في hnRNA إلى هذه الجزئيات من رن أ بالطرق البيوكيمائية .

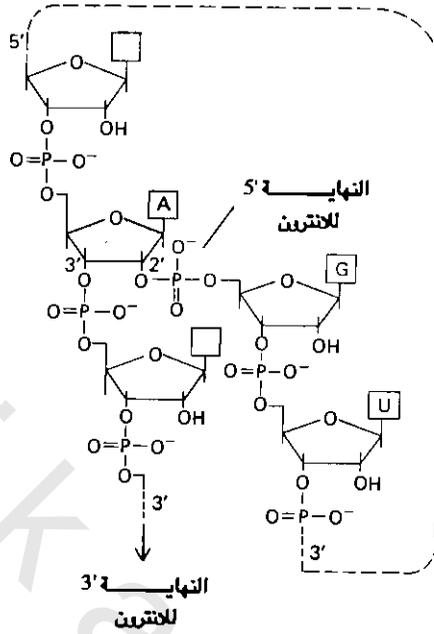


الشكل (٦-١٤):

نور السبليسوسوم (المكون من تجمع البروتينات الصغيرة U1, U2, U5, U4 / U6 وغيره من المكونات) في تراكب رن أ الأولى . بعد تجميع السبليسوسوم يتم التفاعل في خطوتين :

١- تقوم نيوكليديده ادينوسية خاصة (A) موجودة بالقرب من موقع الربط 3' بمهاجمة موقع الاستبعاد 5' مما يؤدي إلى كسره . ثم ترتبط النهاية المكسورة تساهميا بهذه القاعدة A مكونه النيوكليديده المتفرعه (المبينة في الشكل ٦-١٥) .

٢- يتم اضافة النهاية المعرضة 3'OH للإكسون الأول إلى بداية الإكسون الثاني مع إحداث كسر في جزئ رن أ عند موقع الربط 3' مما يؤدي إلى إتصال الإكسونان ببعضهما وإستبعاد الانترون في صوره عروه . تحدث هذه العمليات في النواه وتؤدي إلى إنتاج m RNA ناضج من النسخة الأولية لجزئ رن أ hnRNA .



الشكل (٦-١٥)،

تركيب سلسله رن أ المتفرعه المتكونه أثناء عملية تجهيز رن أ النيوكليديه المظلة هي A (الايدين) التي سبق الاشاره اليها في الشكل السابق . ويحدث التفرع في الخطوه ١ لتفاعل التراكب . في هذه الخطوه تنكسر النهايه 5' لتتابع الانترين وترتبط مجموعه الفوسفات فيها تساهميا مع مجموعه OH - 2' للنيوكليديه A التي تقع على بعد حوالي 30 نيوكليديه من النهايه 3' لتتابع الإنترين . تظل السلسله المتفرعه موجوده في الإنترين 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 انترين . لذلك فإن موقع التراكب 5' (الموقع المعطى) عند طرف أى إنترين معين يمكن أن يوصل بموقع التراكب 3' (الموقع المستقبل) لأى إنترين آخر أثناء عملية القطع والربط Splicing . وعلى ذلك فعندما أجريت تجربة لضم النصفين 5' ، 3' لانترولين مختلفين أمكن لانزيمات التراكب أن

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

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

اسم الجين	* حجم الجين ( نيوكليديات ) ( X1000 )	حجم hnRNA ( نيوكليديات ) ( 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
كاتاليز Catalase	٢٤	١,٦	١٢
مستقبل LDL	٤٥	٥,٥	١٧
عامل التخثر VIII	١٨٦	٩	٢٥
ثيروجلوبيولين Thyroglobulin	٢٠٠	٨,٧	٣٦
Dystrophin **	>٢٠٠٠	١٧	>٥٠

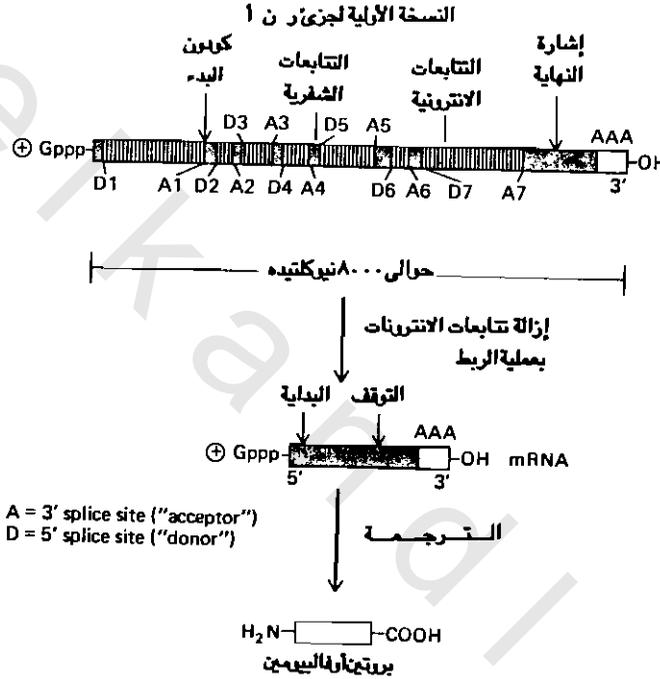
\* يمثل حجم الجين هنا التتابعات المنسوخة لكل جين بالإضافة إلى التتابعات المنظمة المجاورة الخاصة بكل جين .

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

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

وجد أنه إذا حدث خطأ فى التزاوج بين مواقع التراكب 5' , 3' أثناء عملية تراكب رن 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 كالاتى :

تبين أن ما كينة تراكب رن أ تضمن عادة أن كل موقع التراكب 5' يتزاوج فقط مع أقرب موقع تراكب 3' التالي له مباشرة في اتجاه مسار تتابع بناء رن أ ( أي من 5' إلى 3' ) كما في الشكل (٦ - ١٦) . ولم تعرف حتى الآن بطريقة محددة الطريقة التي يتم بها هذا التزاوج المتتالي بين مواقع التراكب على الرغم من أن تجمع معقد السبليسوسوم في اثناء عملية نسخ سلسله رن أ النامية يفترض أن له دور رئيسي في ضمان التزاوج الصحيح بين مواقع التراكب المناسبة .



الشكل (٦ - ١٦) :

النسخة الأولية لسلسله رن أ لجن أوفالبيومين في الدجاج مبينا الإزالة المنظمة لسبعة إنترونات للحصول على mRNA الناضج الفعال . يرمز إلى موقع الربط 5' بالحرف D وإلى موقع الربط 3' بالحرف A في هذا الشكل.

كما توجد بعض الأدلة على أن الدقة الكامنة في الشكل الثلاثي الأبعاد في سلسله رن أ والذي تتخذه تتابعات الأنترونات والإكسونات قد تلعب دوراً رئيسياً في هذا الإنضباط .

## يمكن إنتاج عدة أنواع مختلفة من ر ن أ من نفس الجزء الأولى

hnRNA

على الرغم من أن معظم تابعات الانترونات لا يبدو أن لها في حد ذاتها أى وظيفة محددة فإن حدوث عملية التراكب Splicing تجعل من الممكن إنتاج أنواع مختلفة من mRNA ، وبالتالي أنواع مختلفة من البروتينات ، من نفس جزء hnRNA الأولى مما يعطى للخلية مرونة وراثية إضافية أثناء عملية النمو والتميز في المراحل التكوينية المختلفة .

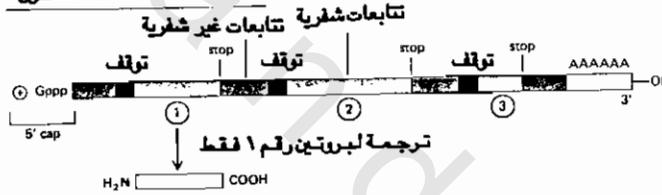
أمكن التحقق لأول مرة من حدوث هذه الظاهرة في جينوم الأدينوفيرس البشرى (يصيب الانسان) adenovirus والذي كان أول من تم فيه أيضاً إكتشاف عملية التراكب Splicing . إن جينوم الأدينوفيرس يقوم بتوجيه بناء بعض النسخ الطويلة جدا من ر ن أ التى تحتوى على التتابعات الشفرية لعدة بروتينات مختلفة . ولا يحدث ذلك عادة فى الخلايا الطبيعية مميزه النواه حيث لا ينتج أى mRNA 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 الأدينوفيرس يتم التقلب 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 البعيدة المتتالية فى السلسلة الطويلة فى إتجاه النسخ مما يؤدي إلى إنتاج أنواع مختلفة من ر ن أ المراسل . يقوم كل منها بإنتاج 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) . ويمكن هذه الطريقة الفيرس من إستخدام عدد محدود جدا من نسخ hnRNA للتشفير لعدد اكبر بكثير من البروتينات المختلفة . كما أمكن تفسير ميكانيكية حدوث تناثر بيتا ثاليسيميا -  $\beta$  - thalassaemia فى الإنسان بطريقة مشابهة تقريبا .

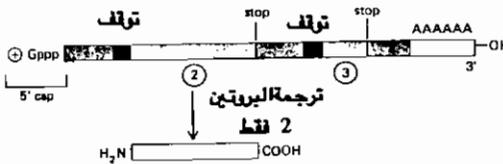
## بناء ر ن أ الريبوسومي على مجموعات مترادفه من الجينات المتماثلة

وجد أن جينوم مميزة النواة 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 نيوكليوتيد 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 سريعا فإن ذلك يؤدي إلى إنتاج عدد كبير من نسخ ر ن أ الريبوسومي للوفاء باحتياجات الخلية العالية لنسخ ر ن أ الريبوسومي التى تحتاجها لتكوين

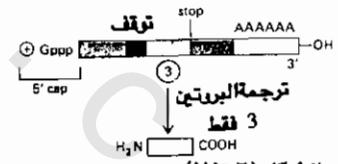
الريبوسومات اللازمة فى عملية بناء البروتين كما سيأتى بعد .  
جزئيات كاملة الطول



الجزء من mRNA المحتوى على الغطاء يتحرك إلى  
التتابع الشفرى 2 بعملية الربط



الجزء من mRNA المحتوى على الغطاء يتحرك إلى  
التتابع الشفرى 3 بعملية الربط



الشكل (٦-١٧):

كيفية إنتاج عدة أنواع مختلفة من ر ن أ الناضج mRNA من نفس النسخة الأولية لجزء ر ن أ hnRNA فى بعض الفيروسات وذلك باستخدام طرق تراكب مختلفة بحيث يترجم كل جزئ ناتج من mRNA إلى بروتين مختلف . وفى كل حالة يتم ترجمة التتابعات الشفرية الاقرب للغطاء (القلنسوة) فى جزئ mRNA

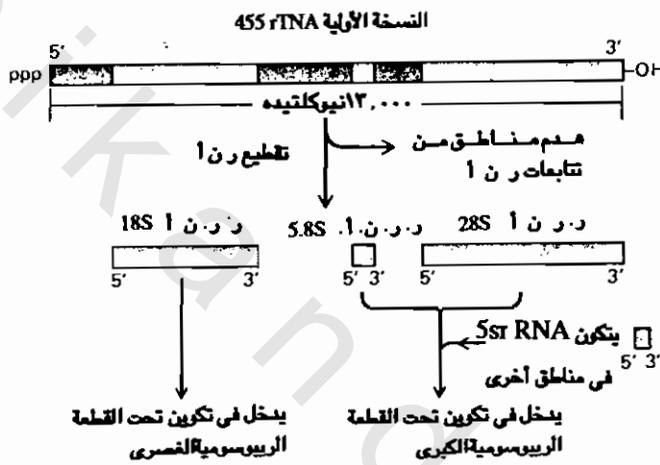
يتم نسخ جينات rRNA بواسطة إنزيم بلمره ر ن 1 (RNAPol I) وينتج كل جين نفس النسخ الأولية من rRNA يصل طول هذه النسخ الأولية في الإنسان والتي تعرف بـ 45S rRNA إلى حوالي ١٣٠٠٠ نيوكليتيده وقبل أن تترك النواه في صورة حبيبات ريبوسومية بعد إقترانها بنوعيات معينة من البروتينات في النوية يسمى البروتينات الريبوسومية Ribosomal Proteins، يتم تكسير كل وحدة من هذا المنتج الأولى 45S rRNA إلى ثلاثة انواع من rRNA بمعدل نسخة واحدة من كل نوع وهي :

28 Sr RNA (وطوله حوالي ٥٠٠٠ نيوكليتيده) .

18 Sr RNA (وطوله حوالي ٢٠٠٠ نيوكليتيده) .

5.8 Sr RNA (وطوله حوالي ١٦٠ نيوكليتيده) .

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 نيوكليتيده في النواه كما في الشكل (٦ - ١٨) . يوجد نوع رابع من rRNA وهو 5S rRNA وهو ينسخ مستقلا عن الأنواع الثلاثة السابقة وهو يوجد في نسخ متكررة في أماكن متفرقة بعيدة تماما عن منطقة 45S RNA الرئيسية ، ويكون هذا النوع من rRNA قصير جدا بطول حوالي ١٢٠ نيوكليتيده فقط وهو ينسخ بواسطة انزيم RNA pol III الذي يقوم أيضا بنسخ الجينات الخاصة بإنتاج tRNA والذي لا يزيد طول سلسله كل منها عن حوالي ٧٥ - ١٠٠ نيوكليتيده فقط والذي تتم في قواعده النتروجينية تعديلات غير عادية في عملية ما بعد النسخ Post - transcription لكي يتخذ التركيب الثالثي والفعال في الترجمة والذي يأخذ شكلاً مميزاً يعرف بشكل ورقة البرسيم clover - leaf كما سيأتى بعد .



الشكل (٦-١٨)

طريقة تجهيز جزئ رن أ الريبوسومي الأولى 45S r RNA لإنتاج الأنواع الثلاثة المختلفة من رن أ الثلاثة المختلفة من رن أ الريبوسومي . ويتم التخلص من حوالي نصف طول الجزئ الأولى في هذه التفاعلات