الفصل السابع

بناء ر. ن. أ. فى مميزة النواة
RNA Synthesis in Eucaryotes

أن عملية بناء ر.ن.أ Transcription فى مميزة النواة عملية على درجة عالية من الانتقائية Selective. ففى معظم الثدييات على سبيل المثال لا يتم نسخ أكثر من حوالى ١% من مجموع التتابعات التى توجد فى د.ن.أ الخلية الى تتابعات فعالة من ر.ن.أ أى فى صورة ر.ن.أ المراسل 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 فى 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:

obeikandi.com

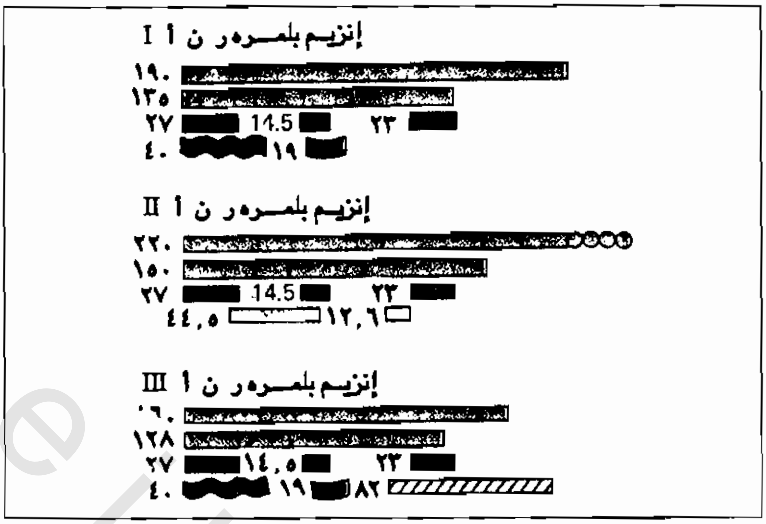
١- انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase I ويختص ببناء السلاسل الطويلة الخاصة بجزئيات ر.ن.أ الريبوسومى rRNA.

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 الريبوسومى قصير السلسلة (5\ SrRNA).

يتكون كل انزيم من هذه الانواع الثلاثة من عدد من تحت الوحدات. وقد تتشابة الانزيمات الثلاثة فى 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 المستبدئ Promoter، نجد أن انزيمات بلمرة ر.ن.أ فى مميزة النواة لا يمكنها أن ترتبط بتتابع المسبتدئ 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 تخطيطى يبين الاختلافات فى تركيب تحت الوحدات البروتينية المكونة لإنزيمات بلمرة ر.ن.أ فى مميزة النواه (الخميرة). تظهر تحت الوحدات المتشابهة بنفس المظهر. يظهر الوزن الجزيئى لتحت الوحدات بالكيلو دالتون. وتأخذ تحت الوحدات الثلاثة المتماثلة فى الوزن الجزيئي في الإنزيمات الثلاثة اللون الأسود الداكن

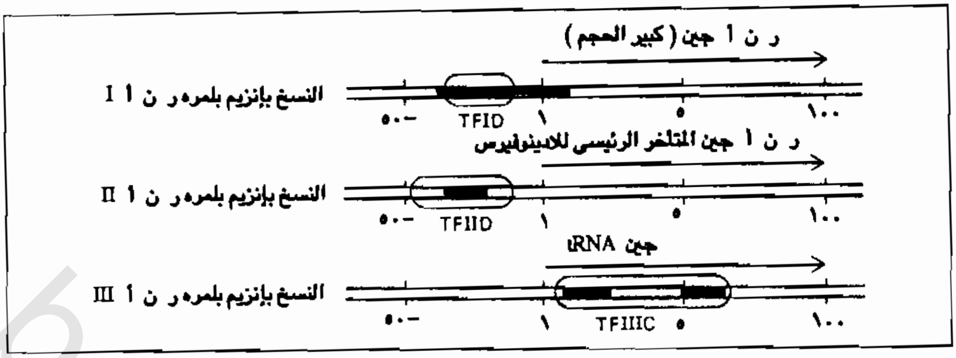
دور عوامل النسخ Transcription Factors فى الارتباط بالمستبدئ :Promoter

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

obeikandi.com

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

دلت 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 الذى يرتبط به قبل موقع بدء النسخ (Upstream) مباشرة. إلا أن عوامل النسخ الرئيسية لانزيم بلمرة 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 (٢-٧) يبدو أن هذا العامل (TFIII C) يؤدى إلى إنثناء د. ن. أ حول نفسه لتكوين حبيبة كبيرة من البروتين النووى.

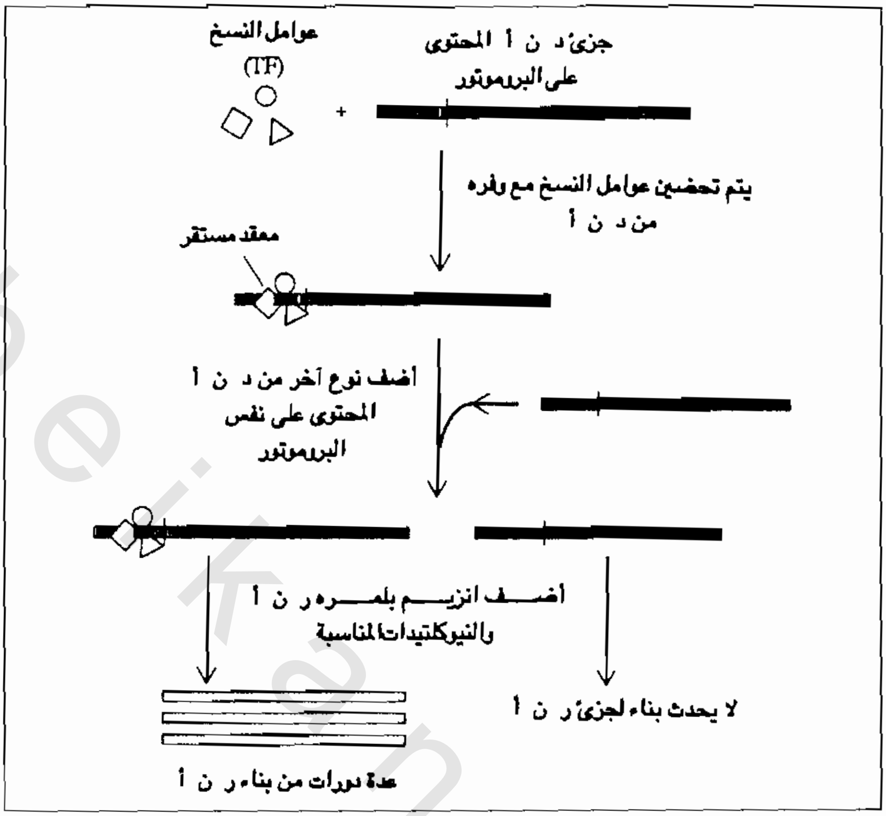


الشكل (٧-٢): تكوين معقدات مستقرة لعوامل النسخ (TF) على الجين (فى د.ن.أ) تدل المستطيلات السوداء على مواقع التتابعات الضرورية لنشاط البروموتور. والمنطقة المظللة تدل على الجزء من الجين المرتبط بعوامل النسخ. تدل الارقام على المواقع على جزئ د.ن.أ (مقدرة بعدد ازواج النيوكلتيدات) بالنسبة لموقع بدء النسخ (+١).

وقد تبين أنه لابد من تكوين معقد مستقر وثابت 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، 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 كافية لتكوين 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 الجزئ من د.ن.أ نتيجة لعدم اتاحة الفرصة لتكوين المعقد المذكور كما فى الشكل (٧-٣).

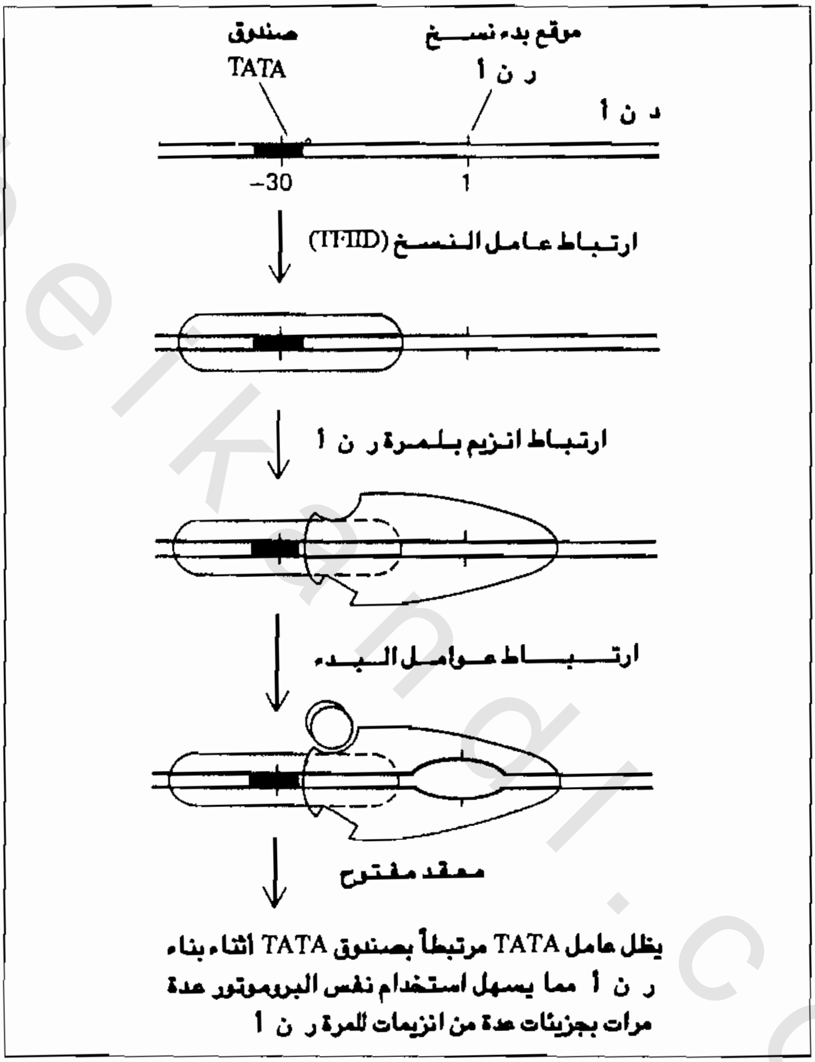
obeikandi.com



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

يوجد عامل نسخ هام جداً لعدد كبير من تتابعـات المـستبدئ Promoter لانزيم RNA PoI II وهو TFIID والذى يتكون من معقد بروتينى كبير الحجـم ويطلق عليه عادة عامل TATA لانه يرتبط نوعيـا بتتـابع نـوعى محفـوظ Consensus Sequence غنى فى A-T يسمى صـندوق [TATA Box] يتمركـز 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 (٧-٤).

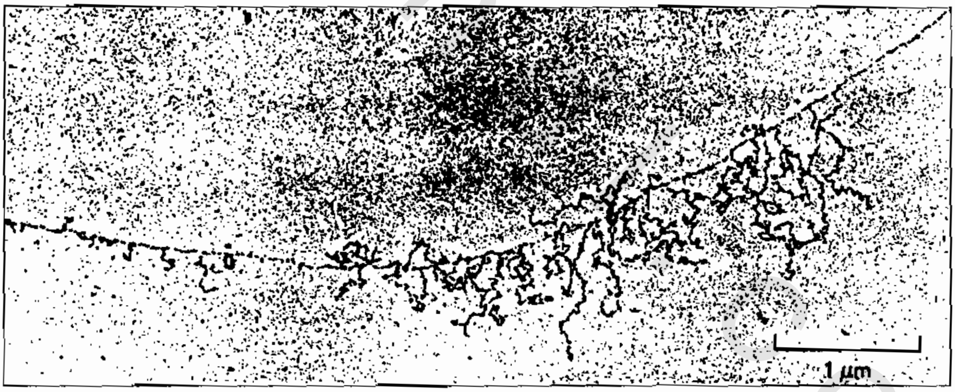


الشكل (٧-٤): ميكانيكية التعرف على منطقة البروموتور بواسطة إنزيم بلمرة ر.ن.أ II فى مميزة النواه. لابد من ارتباط عامل النسخ (TFIID) بصندوق TATA لتكوين معقد نسخى مستقر قبل أن يتمكن الانزيم من التعرف على البروموتور

obelkandl.com

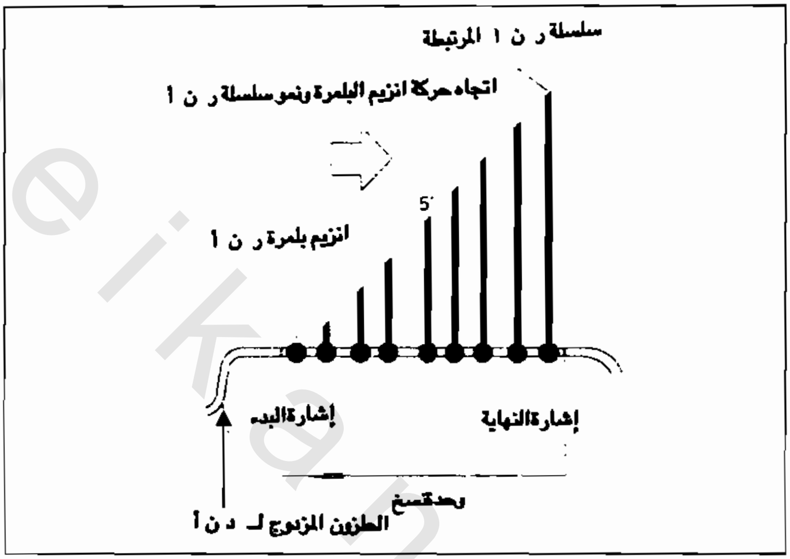
اختلاف النشاط النسخى لأنزيم RNA Pol. II حسب تتابعـات د.ن.أ القالب:

وجد أن انزيم RNA Pol. II المشترك فى عملية النسخ يبدو تحت المجهر الالكترونى كحبيبات كروية تجر وراءها ذيلا من سلسلة تمثل ر.ن.أ وجـد أن هذه الحبيبات تبدو عادة كوحدات متباعدة نسبياً. ويشير ذلـك إلـى أن معظـم الجينات التى يتم نسخها إلى جزئيات ر.ن.أ أوليـة (Precursors) تكـون ذات تكرار منخفض وقد يفسر ذلك على أساس اتاحة الفرصة لوحدة من انزيم البلمرة لاتمام عملية النسخ لجين معين قبل أن تبدأ وحدة انزيمية أخـرى فـى عمليـة النسخ . ولكن يحدث احيانا أن عدداً كبير نسبياً من جزيئات انزيم بلمرة ر. ن. أ II (مرتبطاً بها سلاسل ر.ن.أ النامية) تكون متجمعة مع بعضها. تظهـر هـذه التجمعات بصفة خاصة فى التتابعات التى تمثل عدد محدود من الجينات التى يتم نسخها بتكرار أكبر كما فى الشكل (٧-٥).



الشكل (٧-٥): منطقة من الكروماتين تحتوى على جين يتم نسخه بمعدل عالى جداً بحيث تظهر عدة جزيئات من انزيم بلمرة 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 هـذه التجمعـات فى اتجاه النسخ مما يعطيها طرازاً مميزا بحيث يحدد هذا الطراز مواقـع بـدء وإنهاء أو توقف انزيم بلمره ر. ن. أ II بالنـسبة لكـل وحـدة نـسخ نوعيـة Transcription Unit كما فى الشكل (٧-٦).



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

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

١- أن جزئيات انزيمات بلمرة ر.ن.أ فى مميزة النواه (كما فى غير مميـزة النواة) تبدأ وتنهى النسخ عند مواقع نوعية محددة على الكروموسوم.

٢- أن متوسط طول سلسلة ر. ن. أ الناتجة من أنزيم البلمرة RNA Pol II فى وحدة النسخ يبلغ حوالى ٨٠٠٠ نيوكلتيدة وقد يزيد إلى أكثر من ٢٠٠٠٠ نيوكلتيدة. أن هذا الطول الكبير نسبيا، والذى يزيد كثيـراً عـن الطـول

المتوسط لسلسلة mRNA الناضج الذى يدخل فعلاً فى عملية الترجمة إلى بروتين والذى يبلغ حوالى ١٢٠٠ نيوكليتده (يشفر لبروتين بطـول ٤٠٠ حامض امينى). قد يعكس التركيب المعقد للجين فى مميزة النواة وخاصة وجود عدد من الانترونات Introns فى النسخ الأولية للجين والتـى يـتم استئصالها فى المرحلة اللاحقـة لتجهيـز mRNA النهـائى أو الناضـج Mature mRNA كما سيأتى بعد.

٣- على الرغم من أن معدل استطالة سلسلة ر.ن.أ يبلغ فى المتوسط حـوالى ٣٠ نيوكلتيده فى الثانية على مستوى جميع أنواع ر.ن.أ فإن مواقع بـدء النسخ المختلفة لجزئيات انزيم بلمره ر.ن.أ II تختلف كثيراً فـى درجـة كفاءتها بحيث يتم نسخ بعض الجينات بمعدل اسرع عن الآخرى.

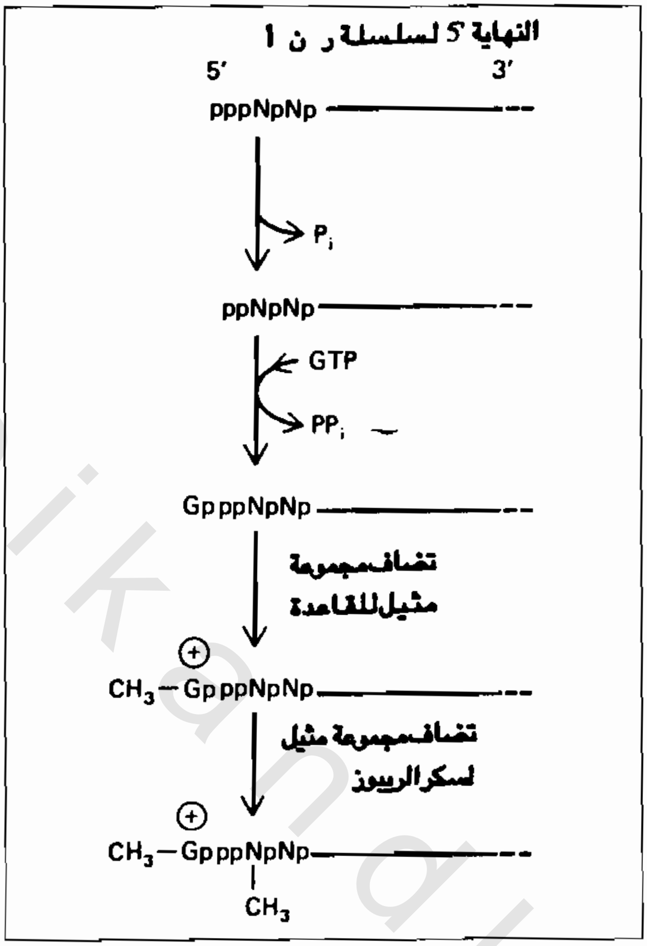
تعديل أو تجهيز النسخ الأولية لسلاسل mRNA: RNA Processing

تعرف النواتج الأولية لعملية النسخ بواسطة انـزيم RNA Pol. II باسـم جزئيات ر.ن.أ غير المتجانس النووى (hnRNA) وترجع هـذه التـسمية إلـى أن هذه الجزيئات تكون غير متجانسة فى احجامها الأولية بمجرد انتاجهـا فـى النواه.

يكون مصير قليل من هذه النسخ الأولية أن تترك النـواه فـى صـورة جزئيات ر. ن. أ المراسل mRNA إلا أن ذلك لا يحدث قبل أن تتم بها عمليـة تحوير تساهمية عند كل من النهاية 5’ والنهاية 3’ أثناء عمليـة النـسخ وهـذه التعديلات هامة جداً وضرورية لحـسن اداء سلاسـل mRNA لوظيفتهـا فـى الترجمة فى السيتوبلازم كما سيأتى بعد.

يتم أولاً التعديل أو التحوير فى النهاية 5' لسلسلة ر. ن. أ (وهى النهاية المتكونة اولاً أثناء عملية النسخ) وذلك بإضافة ما يسمى بقلنسوة Cap الجوانين المميثلة Methylated – G Nucleotide. وتحدث التغطية بالقلنسوة مباشرة عقب بناء الثلاثين نيوكلتيدة الأولى فى سلسلة ر. ن. أ النامية. وتشتمل على تكثيف مجموعة الفوسفات الثلاثية لجزئ GTP مع مجموعة ثنائية للفوسفات متبقية على النهاية 5' للسلسلة النامية كما فى الشكل (٧-٧) وتقوم هذه القلنسوة بدور رئيسى فى 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 فى الناتج الأولى hnRNA).



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

ولكنها تتميز بتحوير أو تعديل من نوع آخر بحيث يحدث كسر نوعى للسلسلة النامية عند موقع محدد، ثم يضاف إلى النهاية 3' المكسوره ذيل من عديد الادينين polyAtail بواسطة انزيم بلمرة مستقل بحيث يصل طول هذا الذيل إلى حوالى ١٠٠-٢٠٠ أو أكثر من قواعد الادينين. يتم التعرف على نقطة

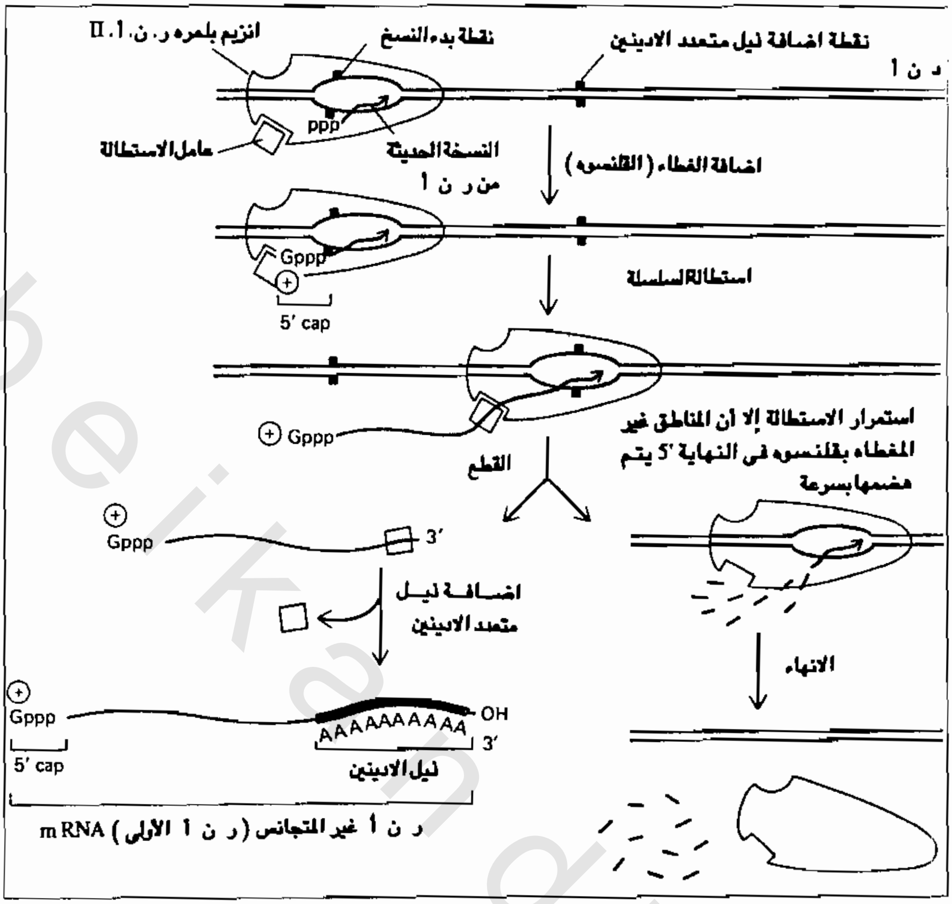
obeikandl.com

الاشارة 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 مباشر يقوم انزيم Poly A Polymerase باضافة ذيل متعدد الأدينين إلى النهاية 3 فى سلسلة ر.ن.أ لاتمام النسخة المبدئية أو الأولية من ر.ن.أ كما فى الشكل (٧-٨).

لم تتحدد حتى الآن وظيفة ذيل polyA على وجه الدقة، 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 في السيتوبلازم حتى يمكنها أن تشارك فى عدد محدد من دورات الترجمة قبل هدمها. وقد تبين بالفعل أنه فى 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 الاجمالى المنتج فى الخلية، إلا إن معظم هذه النسخ تكون غير ثابته وقصيرة العمر، بحيث أن ما يتبقى منها بالفعل فى وقت ما بالخلية لا يمثل إلا نسبة ضئيلة جداً من إجمالى ر. ن. أ كما فى الجدول (٧-١).

obeikandl.com



الشكل (٧-٨): بناء جزئ ر.ن.أ غير المتجانس النووى **hnRNA** بواسطة انزيم بلمره ر.ن.أ **II** واضافة ذيل من متعدد الادينين **polyA** إلى سلسلة ر.ن.أ مما يؤدى إلى كسر السلسلة ليتسنى إضافة هذا الذيل

obeikandi.com

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

نوع ر.ن.أ	الكمية المنتجة الأولية (كنسبة من إجمالى ر.ن.أ)	*الكمية المتبقية بالفعل (كنسبة من إجمالى ر.ن.أ)
	%	%
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 hnRNA إلا أن معظمة 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 القلنسوة 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.

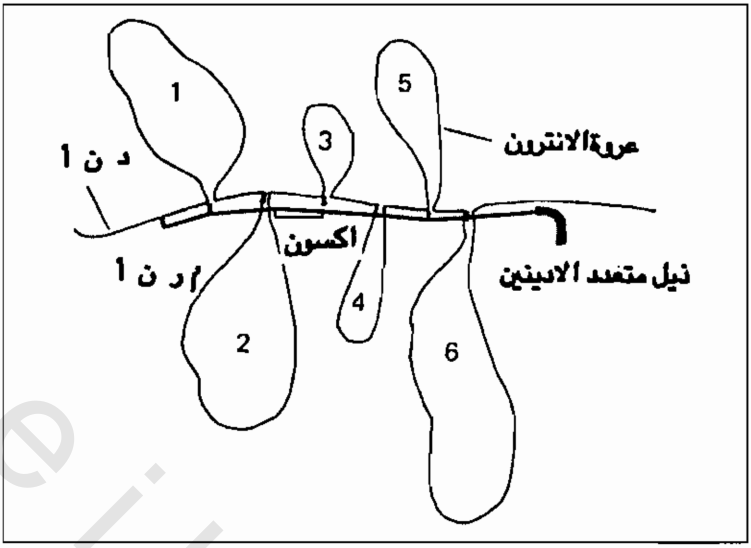
حذف تتابعات كبيرة متخللة من hnRNA أثناء تجهيز mRNA فى النواة:

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 نيوكلتيده فى سلسلة hnRNA ينخفض العدد إلى حوالى ١٥٠٠

obeikandi.com

نيوكلتيده فى سلسلة mRNA). وبعد هذه الفترة القصيرة تبدأ جزيئات mRNA فى الخروج من النواه بحيث لا يصل إلى ستيوبلازم الخلية إلا حوالى ٥% فقط من إجمالى hnRNA 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 لا تقع بالمره على أى من طرفى السلسلة 5' أو 3' ولكنها تكون متخللة للسلسلة فى مناطق وسطية. وقد تحقق ذلك عند مقارنة تتابعات النيوكليتيدات 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 متخلله فى د. ن. أ غير موجودة فى mRNA المنسوخ عليها وذلك فى حالات متعددة مثل جين β-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).

obeikandl.com



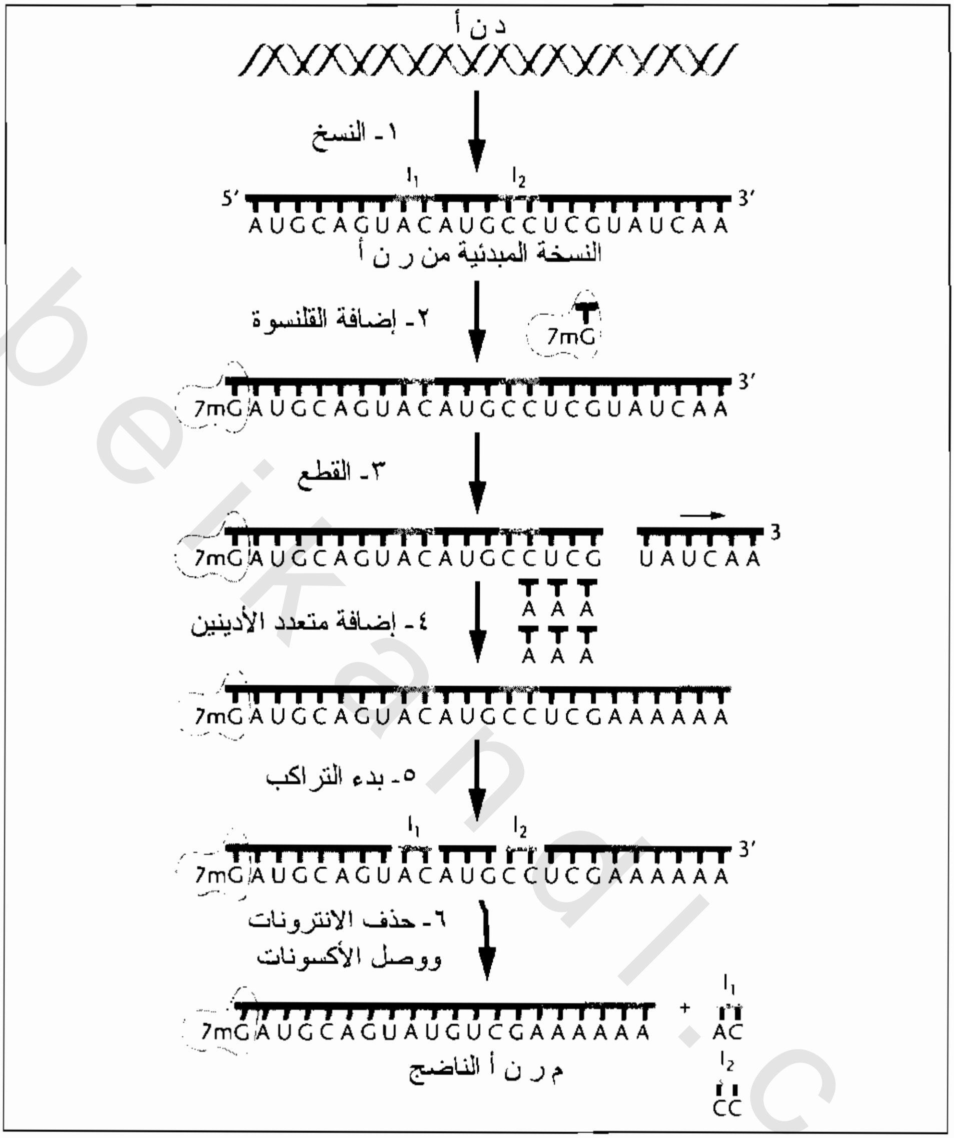
الشكل (٧-٩): اثبات وجود انترونات فى جينات مميزة النواة بتجربة التهجين بين د.ن.أ و ر.ن.أ حيث يتم هنا انتاج بيتا جلوبين mRNA ويتم عزله وتنقيته من الخلايا المتخصصة فى انتاجه. ثم تجرى تجربة تهجين من mRNA ومنطقة د.ن.أ المحتوية على هذا الجين. تبدو المناطق من جزئ د.ن.أ التى لا يحدث بها تهجين مع ر.ن.أ كعروات ممتدة إلى الخارج وهى تمثل الانترونات فى 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 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 النسخه على جميع الأكسونات والإنترونات، فى حين نجد أن تلك الأخيرة تحذف أو تستبعد أثناء تجهيز mRNA. تحدث هذه العملية فى نواه

الخلية قبل أن يخرج mRNA إلى السيتوبلازم، بحيث يحتوى فقط على تتابعات الإكسونات التى 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 نيوكلتيده) تتابع قصير فقط من mRNA يتراوح بين ٥٠٠، ٣٠٠٠ نيوكلتيدة فقط. ويبين الشكل (٧-١٠) مراحل عملية تجهيز ر. ن. أ بعد نسخه Postranscriptial Processing.

obeikandl.com



الشكل (٧-١٠): عملية تجهيز جزئ ر ن أ بعد النسخ فى مميزة النواةPost transcription.
يتم تعديل جزئ ر ن أ النووى غير المتجانس (hnRNA) و تحويله إلى mRNA الذى يحتوى 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 حبيبية من حوالى ٥٠٠ نيوكلتيده 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 الريبونيوكليوبروتين النووية غير المتجانسة) بعد معاملة النواة بإنزيم الريبونيوكلييز 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) 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 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 نيوكلتيده). 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 ٢٥٠٠٠٠ دالتون مقابل ٤,٥ مليون دالتون للريبوسوم.

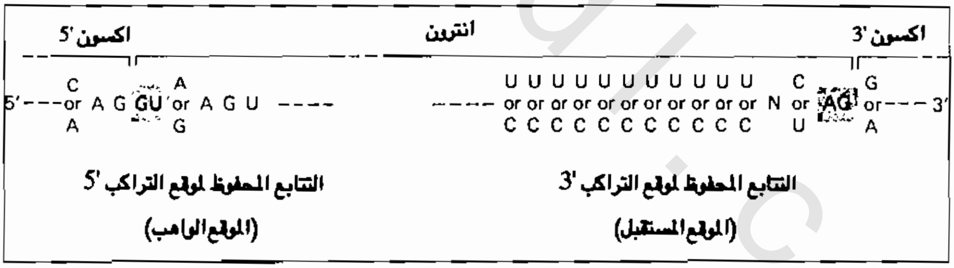
تبين أن كل من هذه الأنواع من sn RNP's تقوم بالتعرف على تتابع نوعى فى سلسلة hnRNA من خلال التزاوج التكاملى بين القواعد RNA/ RNA وتشارك بعض هذه المعقدات الصغيرة فى عملية التراكب Splicing كما أن بعضها يقوم بدور فى تفاعلات الكسر Cleavage التى تؤدى إلى تكوين نهايات 3' لبعض سلاسل ر.ن.أ حديثة التكوين.

يتم حذف الانترونات فى شكل عروات Lariat:

تختلف الانترونات فى الطول ما بين ٨٠ نيوكلتيده إلى ١٠٠٠٠ نيوكلتيده 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 الطفراف

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 افتـــراض أن الانترونات ليس لها وظيفة بالمرة وأنها تمثل غالباً "مخلفات وراثية" Genetic Junk وهو ما سوف نتعرض له فيما بعد. وقد وجد أن أهم التتابعات الثابتـــة أو المحفوظة في الانترون هى تلك التتابعات المطلوبـــة لاســـتبعاد أو استئـــصال الانترون حيث تبين وجود تتابع نوعى محفوظ Consensus Sequence عند كـــل من نهايتى منطقة الأنترون. وأن هذا التتابع المحفوظ يتشابه تقريباً فـــى جميـــع الانترونات المعروفة حتى الآن. وجد أن تغيير (بـــالطفرة) فـــى هـــذا التتـــابع المحفوظ يقلل من فاعلية عملية التراكب Splicing ويؤثر ســـلبيًا علـــى حـــذف الانترونات من النسخة الأولية لجزئ ر.ن.أ hnRNA.

توجد هذه التتابعات الطرفية عند موقعين نوعيين مـــن مواقـــع التراكـــب Splice Site وهما مواقع التراكب 5' Splice Site ويسمى الموقـــع المعطـــى أو الواهب Donner Site وموقع التراكب 3' Splice Site ويطلـــق عليـــه الموقـــع المستقبل Acceptor Site كما هو موضح بالشكل (٧-١١).



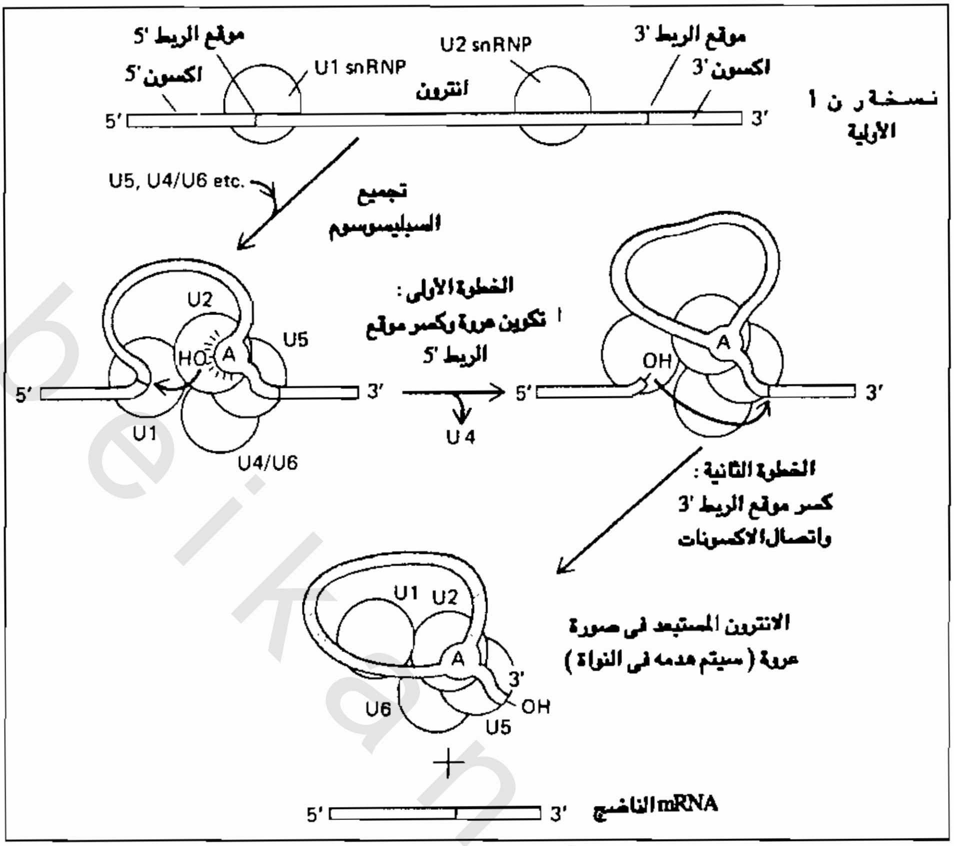
الشكل (٧-١١): التتابعات النيوكلتيدية المحفوظة Consensus Squences لمواقع الربط 3', 5' المستخدمة فى تجهيز سلسلة ر.ن.أ ويلاحظ أن الثنائى النيوكلتيدى المظلل على الجانبين يكون عادة ثابتاً ولا يتغير

obeikandi.com

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 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 د.ن.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 إمكان 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 لانتاج كميات وفيرة من ر.ن.أ النقي لدراسة عملية تراكب ر.ن.أ معملياً. تعتمد الطريقة على القدرة على انتاج كمية كبيرة من تتابعات د.ن.أ المرغوب بطرق الهندسة الوراثية بالإضافة إلى توفر انزيمات بلمرة ر.ن.أ من الفاج T7 أو SP6 التي تقوم بنسخ د.ن.أ معمليا بكفاءة عالية. وبربط شظايا د.ن.أ مميزة النواة ببروموتور الفاج، فإن انزيم بلمرة ر.ن.أ يمكن استخدامه لإنتاج كميات كبيرة من ر.ن.أ معملياً مشفرة لشظايا د.ن.أ ويمكن إضافة الغطاء ٥ الموجود في hnRNA إلى هذه الجزيئات من ر.ن.أ بالطرق البيوكيماوية



الشكل (٧-١٣): دور السبليسوسوم (المكون من تجمع البروتينات الصغيرة U1 U2, U5, 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 بمهاجمة موقع الاستبعاد '5 مما يؤدى إلى كسره. ثم ترتبط النهاية المكسورة تساهمياً بهذه القاعدة A مكونة نيوكلتيده متفرعة.

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 اتصال الإكسونين ببعضها واستبعاد الانترون فى صورة عروة. تحدث هذه العمليات فى النواه وتؤدى إلى انتاج mRNA ناضج من النسخة الأولية لجزئ ر.ن.أ hnRNA.

أمكن تحديد بعض الوظائف النوعية التخصصية لبعض أنـــواع sn RNP's فمثلاً: U1 snRNP يرتبط بموقع التراكب 5' Splice Site وذلك بمساعدة تتـــابع نيوكلتيدى فى U1 RNA المقترن فى هذا المعقد، حيث وجـــد أن هنـــاك تتـــابع نيوكلتيدى فى هذا المعقد الصغير يكون مكملاً للتتـــابع النيوكليتـــدى المحفـــوظ المكون من ٩ نوكلتيدات فى هذا الموقع من الانترون وحيث أنه قـــد تبـــين أن RNA يمتلك خاصية العمل كانزيم (Ribozyme) فإنه من المحتمل أن يكون ر . ن. أ نفسه أو المكونات البروتينية للسبليسوسوم هى المسئولة عن كسر وتكـــوين الروابط التساهمية التى تتطلبها عملية التراكب splicing.

حذف عدة إنترونات من كل جزئ من hnRNA:

حيث أن السبليسوسوم يتعرف أساساً على التتابع المحفوظ عند حدود كـــل انترون، لذلك فإن موقع التراكب 5' (الموقع المعطى) عند طـــرف أى إنتـــرون معين يمكن أن يوصل بموقع التراكب 3' (الموقع المستقبل) لأى إنتـــرون آخـــر أثناء عملية القطع والربط Splicing. وعلى ذلك فعندما أجريت تجربـــة لـــضم النصفين 5' ,3' لانترونين 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 ٥٠ إنترون كما فى الجدول(٧-٢).

obeikandi.com

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

اسم الجين	* حجم الجين (Kbp)	حجم hmRNA (Kbp)	*** عدد الإنترونات
بيتا جلوبين β-globin	١,٥	٠,٦	٢
انسولين Insulin	١,٧	٠,٤	٢
بروتين كينيز (P.K.C)C	١١	١,٤	٧
البيومين Albumin	٢٥	٢,١	١٤
كتاليز Catalase	٣٤	١,٦	١٢
كولاجين Collagen	٣٨	٥	٥٠
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 إلى التتابعات المنظمة المجاورة الخاصة بكل جين.

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

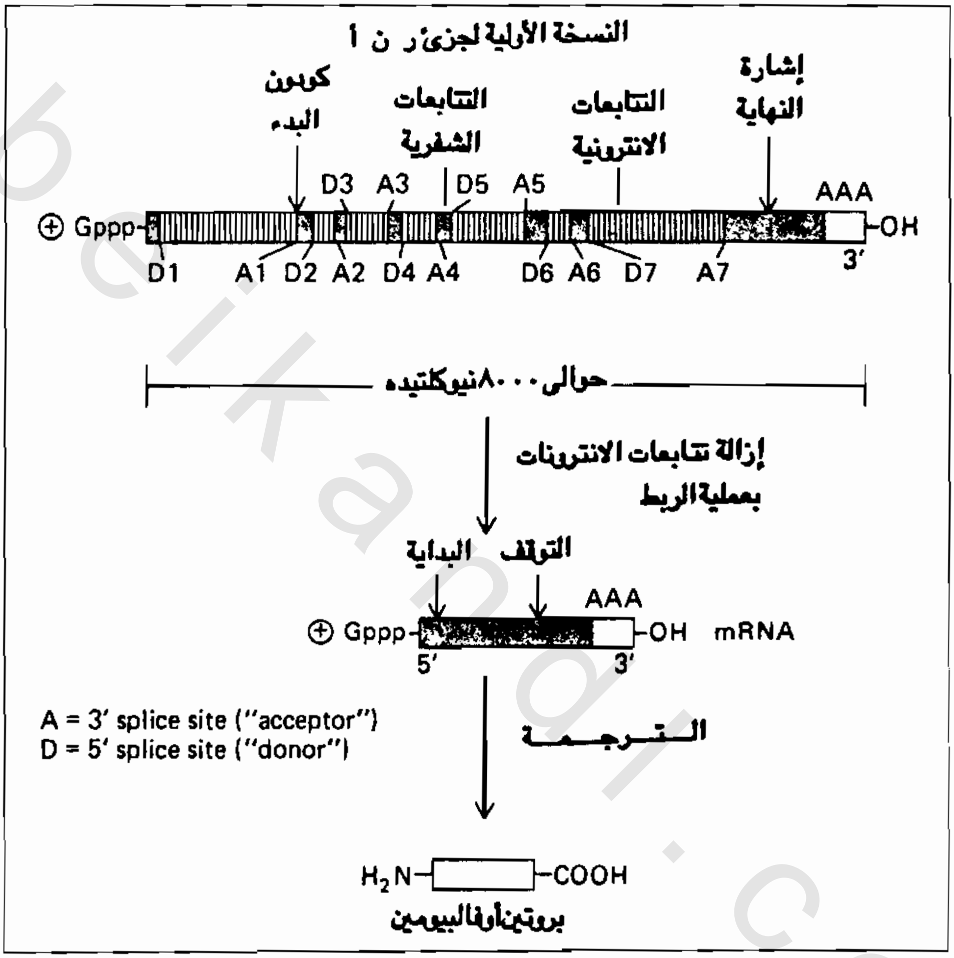
*** تعتبر جينات الهستونات والانتروفيرون من الأمثلة النادرة فى جينات مميزة النواة التى تخلو من الإنترونات.

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 كالأتى:

تبين أن ماكينة 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 (٧-١٤) ولم تعرف حتى الان بطريقة محددة

obeikandl.com

الطريقة التى يتم بها هذا التزاوج المتتالى بين مواقع التراكب على الرغم من أن تجمع معقد السبليسوسوم فى اثناء عملية نسخ سلسلة ر.ن.أ النامية يفترض أن له دور رئيسى فى ضمان التزاوج الصحيح بين مواقع التراكب المناسبة.



الشكل (٧-١٤): النسخة الأولية لسلسلة ر.ن.أ لجين أوفالبيومين Ovalbumin فى الدجاج مبينا الإزالة المنتظمة لسبعة إنترونات للحصول على mRNA 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.

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

وجد أنه جينوم مميزة النواة يحتوى على نسخ متكررة ترادفيا من جينات rRNA 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 تعرف بخيط د.ن.أ الرابط spacer الذى يختلف بدوره كثيراً 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 من جزئيات ر. ن. أ الريبوسومى التى تحتاجها لتكوين الريبوسومات اللازمة فى 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 فى الإنسان والتى تعرف بـ 45S RNA إلى حوالى ١٣٠٠٠ نيوكليتده، وقبل أن تترك النواه فى صورة حبيبات ريبوسومية بعد إقترانها بنوعيات معينة من البروتينات فى النوبة والتى يسمى البروتينات الريبوسومية

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

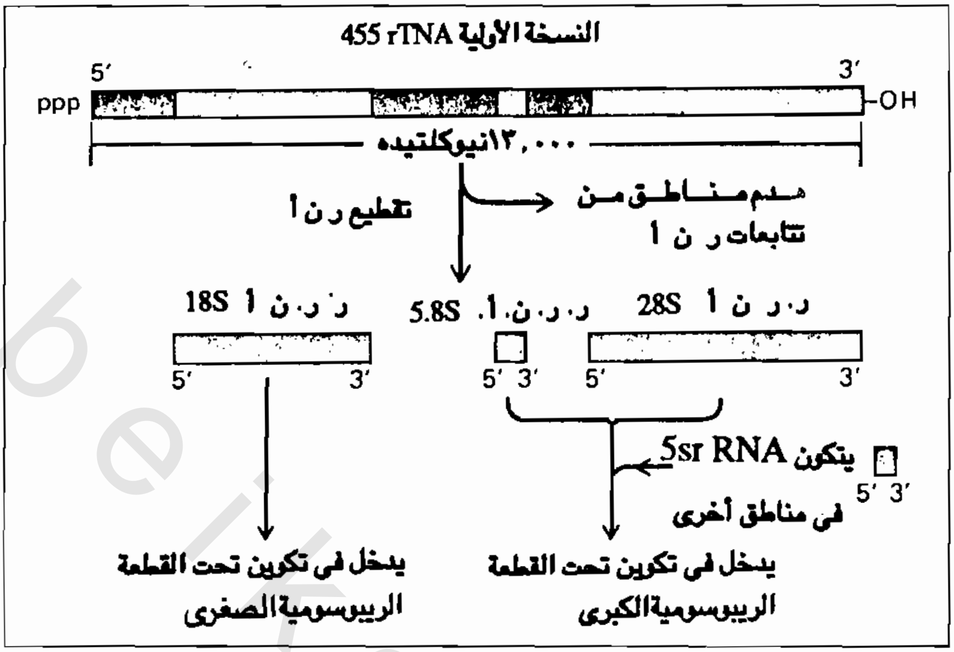
28 Sr RNA (وطوله حوالى ٥٠٠٠ نيوكتيدة).

18 Sr RNA (وطوله حوالى ٢٠٠٠ نيوكلتيده).

5.8 Sr RNA (وطوله حوالى ١٦٠ نيوكلتيده).

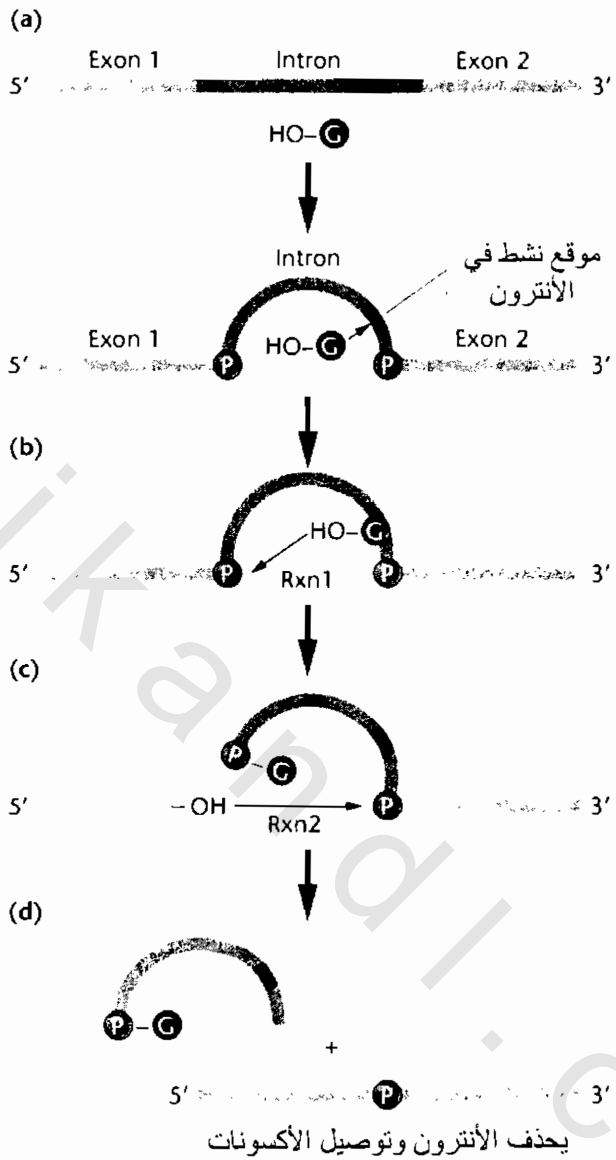
وتوجد ضوابط لكى ينتج من كل نسخة أولية من 45S RNA نسخة واحدة من كل من هذه الأنواع الثلاثة، بحيث يتم هدم وتحليل ما يتبقى من فائض مـــن التتابعات فى الوحدة الأولية والذى يقدر بحوالى ٦٠٠٠ نيوكليتده فى النواه كمـــا فى الشكل (٧-١٥). يوجد نوع رابع من r RNA وهو 5S r RNA وهو ينـــسخ مستقلا عن الأنواع الثلاثة السابقة وهو يوجد فى نسخ متكررة فى أماكن متفرقة بعيدة تماماً عن منطقة 45S RNA الرئيسية،. ويكون هذا النـــوع مـــن r RNA قصير جداً بطول حوالى ١٢٠ نيوكلتيده فقط، وهو ينسخ بواسطة انـــزيم RNA pol III الذى يقوم ايضاً بنسخ الجينات الخاصة بانتاج tRNA والـــذى لا يزيـــد طول سلسلة كل منها عن حوالى ٧٥-١٠٠ نيوكلتيده فقط والذى تتم فى قواعده النتروجينية تعديلات غير عادية فى عملية ما بعـــد النـــسخ Post-Transciption لكى يأخذ التركيب الثالثى والفعال فى الترجمة والذى يأخذ شكلاً مميزا يعـــرف بشكل ورقة البرسيم clover- Ieaf كما سيأتى بعد.

obeikandl.com



الشكل (٧-١٥): طريقة تجهيز جزئ ر.ن.أ الريبوسومى الأولى 45S r RNA لإنتاج الأنواع الثلاثة المختلفة من ر.ن.أ الريبوسومى. ويتم التخلص من حوالى نصف طول الجزئ الأولى فى هذه التفاعلات

وتجدر الاشارة إلى أن عملية استبعاد أو حذف الانترونات من جزئيات rRNA الأوليه (وكذلك mRNA في الميتوكندريا و tRNA الميتوكندريا) يتم بعملية استئصال ذاتى حيث تحتوى الانترونات نفسها على النشاط الانزيمي اللازم لإزالتها ويسمى RNA الذى يحتوى على نشاط تحليل ذاتي Autocatalytic بالريبوزيم Ripozyme ويبين 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 إستنصال ذاتية يشترك فيها تفاعلان للأسترة العابرة Transestrification