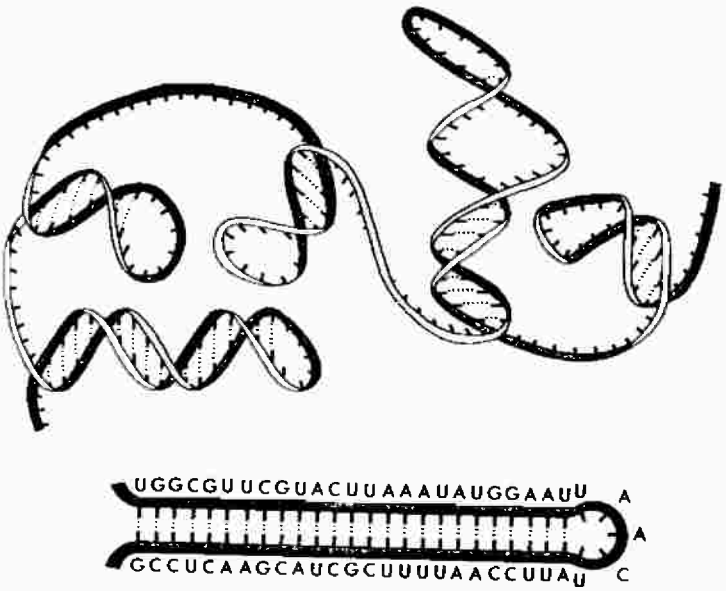
بناء ر ن أ فى غير مميزة النواة

تركيب جزئ ر ن أ:

يتكون جزئ ر ن أ عادة من سلسلة مفردة بعكس د ن أ وهو ينسخ على قالب من د ن أ وتعد سلاسل ر ن أ قصيرة جداً بالمقارنة بجزئ د ن أ حيث تمثل كل سلسلة من ر ن أ عادة تتابعات خاصة بجين واحد أو بمجموعة من الجينات التى تربطها علاقة وظيفية مشتركة فيما يسمى بالأوبرون Operon كما سيأتى بعد . على الرغم من أن جزئ ر ن أ يكون أحادى السلسلة إلا أنه قد يتشكل فى تركيبات مختلفة أكثر تعقيداً . توجد فى معظم أنواع ر ن أ مناطق قصيرة تأخذ شكل قريب من الحلزون المزدوج والتى تتكون نتيجة لتكوين ما يسمى بتركيب دبوس الشعر hairpin بين تتابعات متكاملة بحيث تتزاوج عند التواءها وتكون منطقة مزدوجة السلسلة كما فى الشكل ٥ – ١ .

بالإضافة إلى أزواج القواعد الثابتة GC , AU فإنه قد يتكون تزاوج ضعيف من نوع GU والتى تساهم أيضاً فى التركيب الثانوى (الثانى) لجزئ ر ن أ.

من المعروف أنه توجد ثلاث أنواع رئيسية من ر ن أ وهى ر ن أ المراسل mRNA ، ر ن أ الريبوسومى rRNA ، ر ن أ الناقل tRNA ويقوم كل منها بدور محدد فى عملية الترجمة وبناء البروتين كما سيأتى بعد .



مثــال حقيقــي لعــروه ر ن أ مــن ر ن أ
الفيرس R17

الشكل (٥ - ١):

انثناء سلسلة ر ن أ مبيناً مناطق عديدة مزدوجة الحلزون مرتبطة ببعضها بروابط هيدروجينية

فى حالة tRNA مثلاً نجد أن طبيعة تكوينه ووظيفته تحتم أن تنثنى السلسلة لتكوين عدد من العروات (فيما يعرف بشكل ورقة البرسيم Clover leaf shape كما سيأتى بعد) ولذلك يوجد عدد كبير من التتابعات المتكاملة الداخلية حتى يمكنها أن تتزاوج عند تقابلها فى هذه العروات حتى يتسنى للجزئ أن يأخذ هذا الشكل المميز فى التركيب الثالثى Tertiary .

تحتوى كل خلية غير مميزة النواة على عدد كبير ومختلف من جزيئات ر ن أ والتى تتراوح فى الطول بين 70 نيوكلتيده إلى عشرات الآلاف من النيوكلتيدات . وهى فى الغالب من نوع السلاسل الطولية المفردة ولكن يوجد القليل منها الذى يأخذ شكلاً حلقياً .

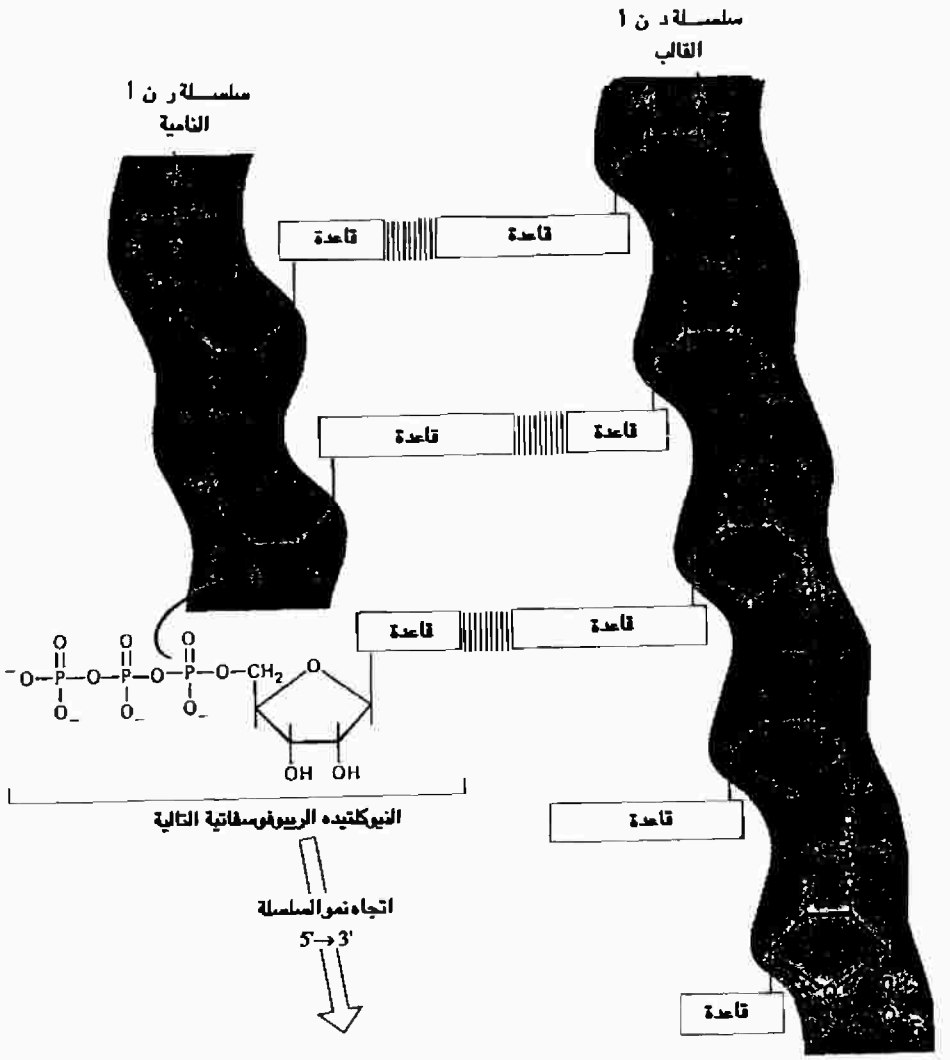
البناء الأنزيمى لجزئ ر ن أ على قالب د ن أ:

تدعو حقيقة أن ر ن أ مثله مثل د ن أ يتكون من سلسلة طويلة غير متفرعة مكونة من تتابعات مختلفة لأربعة نيوكلتيدات (U, A, C, G) إلى افتراض أن المعلومات الوراثية المخزونة فى سلاسل د ن أ يتم انتقالها إلى تتابع مكمل من نيوكلتيدات ر ن أ.

وطبقاً لهذه الفرضية فإنه لابد أن يحدث انفصال بين سلسلتى د ن أ فى مرحلة معينة من دورة الخلية لتعمل السلاسل المفردة كقالب يتم عليها بناء ر ن أ تكاملياً مع تتابع القواعد الموجودة على القالب بحيث يتقابل A مع U ، G مع C . ولابد من وجود ضوابط لمعرفة إذا كانت السلسلة د ن أ المنفصلة ستستعمل كقالب لانتاج سلسلة مكملة من د ن أ أو فى بناء سلسلة من ر ن أ.

أمكن التحقق من وجود تلك الضوابط عندما تم اكتشاف الانزيم المسئول عن التخليق الحيوى لجزئ ر ن أ والذى سمى فى البداية انزيم النسخ Transcriptase ثم أصبح اسمه انزيم بلمرة ر ن أ RNA polymerase والذى يوجد فى جميع خلايا غير مميزة النواة . فمثلاً وجد أن خلية بكتريا القولون الواحدة تحتوى على حوالى ٣٠٠٠ جزئ من هذا الانزيم . يقوم هذا الانزيم بربط الوحدات البنائية لسلاسل ر ن أ وهى الريبونيوكلتيدات Ribonucleotides ببعضها وذلك بتكوين روابط 5' , 3' فوسفودايستر التى تعمل على ثبات الهيكل الأساسى لجزئ ر ن أ كما فى الشكل ٥ – ٢ .

إلا أن ذلك لا يمكن أن يحدث إلا فى وجود قالب من د ن أ مما يدل على أن د ن أ لابد أن يقوم بترتيب النيوكلتيدات التى تدخل فى تتابع ر ن أ بمعلومية تتابع القواعد فى السلسلة د ن أ القالب وذلك حتى يستطيع انزيم بلمرة ر ن أ من العمل بكفاءة فى عملية البناء .



الشكل (٥-٢):

دور انزيم بلمرة ر ن أ فى بكتريا القولون فى إضافة النيوكلتيدات الريبوسية لاستطالة سلسلة ر ن أ على أساس قانون تزاوج القواعد مع القواعد فى د ن أ القالب ويكون البناء فى الاتجاه 3' <-- 5' .

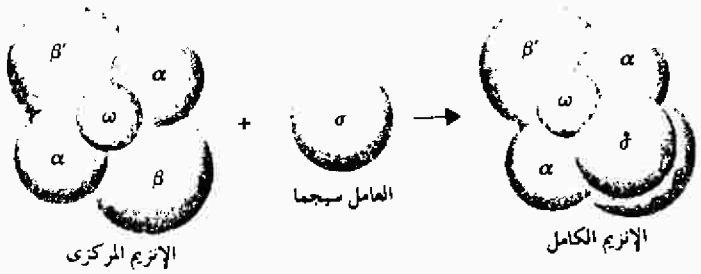
تركيب انزيم بلمرة ر ن أ RNA polymerase

يتكون انزيم بلمرة ر ن أ من عدد من الوحدات وتتكون الصورة النشطة للانزيم والمسماه بالإنزيم الكامل Holoenzyme من خمس سلاسل من متعددات الببتيد مختلفة وهى ($\alpha,\beta',\beta\sigma,w$) وترتبط مع بعضها بروابط ثانوية غير تساهمية . وتمثل كل وحدة مرة واحدة فى الجزئ الكامل فيما عدا الوحدة α التى تمثل بوحدتين ويكون الوزن الجزيئى للانزيم الكامل حوالى ٤٥٠,٠٠٠ دالتون (الشكل ٥ - ٣) . ويلخص الجدول(٥ ـ ١) الوحدات الداخلة فى تركيب الانزيم فى بكتريا القولون ووظيفة كل منها فى عملية النسخ .

الجدول تحت وحدات Subunits لانزيم بلمرة ر ن أ فى بكتريا القولون وعوامل النسخ ووظيفة كل منها .

	اسم الجين	الموقع على الخريطة (دقائق) *	الوزن الجزيئى (Dalton)	عدد تحت الوحدات فى الانزيم	الوظيفة
تحت الوحدة :					
β' (بيتا)	rpoC	٨٩,٥	١٥٥,٠٠٠	١	الارتباط مع د ن أ؟
β (بيتا)	rpoB	٨٩,٥	١٥١,٠٠٠	١	موقع التفاعل لبلمرة ر ن أ
σ (سيجما)	rpoD	٦٦,٥	٧٠,٠٠٠	١	التعرف على تتابع Promoter وبدء
α (الفا)	rpoA	٧٢	٣٦,٥٠٠	٢	البلمرة
ω (أوميجا)	--	—	١١,٠٠٠	١	؟
عوامل النسخ:					؟
(Rho) P	rho	٨٤,٥	٤٦,٠	٦	انهاء أو وقف البلمرة
nus A	nusA	٦٥	٦٩,٠٠٠	١	الاستطالة والانهاء

* يشير الموقع على الخريطة إلى الخريطة المعروفة عن التركيب الحلقي لجزئ د ن أ فى بكتريا القولون والذى يمثل بستين دقيقة .



الشكل (٥-٣)،

رسم توضيحى يشرح التركيب المعقد لانزيم بلمرة ر ن أ

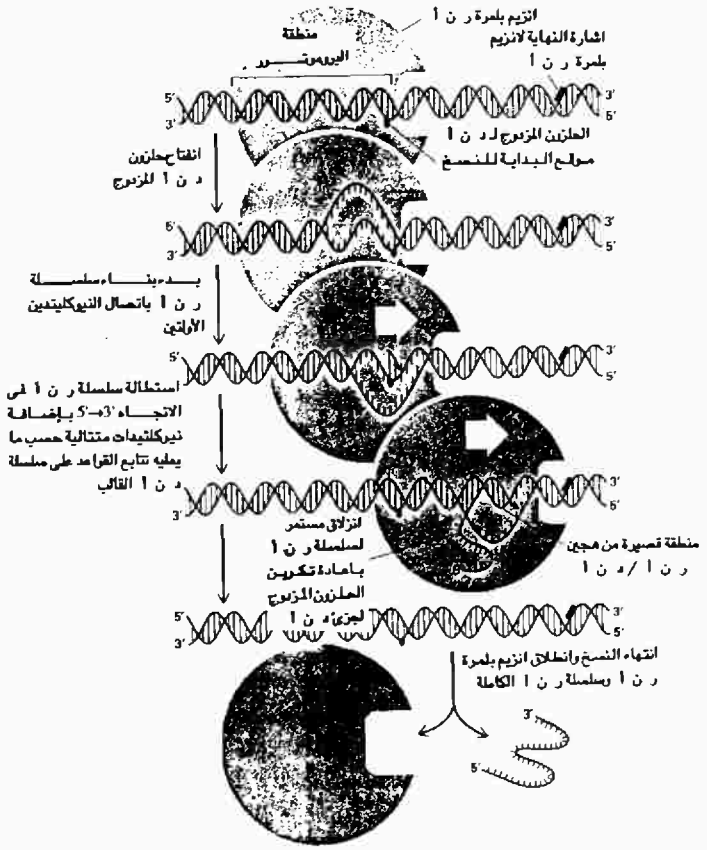
لا يوجد ارتباط قوى بين تحت الوحدة سيجما (σ) مع بقية مكونات الإنزيم لذلك يمكن فصل معقد إنزيمى مكون من ($\beta' B \alpha_2$) بدون الوحدة σ ويطلق على هذا المعقد الإنزيم المركزى core enzyme حيث تبين أن باستطاعته أن يقوم بتكوين الروابط الفوسفودايستر أثناء بناء سلسلة ر ن أ بنفس الكفاءة التى يقوم بها الإنزيم الكامل أى فى وجود أو غياب الوحدة سيجما σ ويعتقد بأن مركز النشاط الإنزيمى يقع فى الوحدة β للإنزيم المركزى .

إلا أن تحت الوحدة σ تلعب دوراً رئيسياً وهاماً فى التعرف على نقطة بدء بناء السلسلة على قالب د ن أ والمعروفة باسم منطقة تتابع الابتداء Promoter كما سيأتى بعد . ويبين الشكل رقم ٥ – ٤ رسماً تخطيطياً لعملية بناء ر. ن. أ. بواسطة إنزيم بلمرة ر ن أ.

اختيار سلسلة واحدة من د ن أ للعمل كقالب لبناء ر ن أ

فى حين يحتوى جزئ د ن أ عادة على عدد كبير جداً من الجينات فإن كل جزئ من ر ن أ يمثل عادة تتابعات ريبونيوكلتيدية مكملة محدودة تمثل جين واحد محدد وعلى ذلك فإنه إذا افترضنا أن كل من سلسلتى د ن أ يمكن أن تستخدمان كقالب لبناء سلسلة معينة من ر ن أ فإن معنى ذلك أن كل جين سينتج منه نسختين من ر ن أ بتتابعات مكملة . وحيث أن كل الأدلة الوراثية تجمع على أن كل جين يتحكم فى جزئ واحد من البروتين (متعدد الببتيد) فإن ذلك سيضعنا أمام أحد احتمالين : إما أن واحدة فقط من سلاسل ر ن أ هى التى سيتم بنائها أو إذا كان لابد من بناء السلسلتين فإن إحداهما فقط ستكون نشطة وفعالة. ولكن تبين

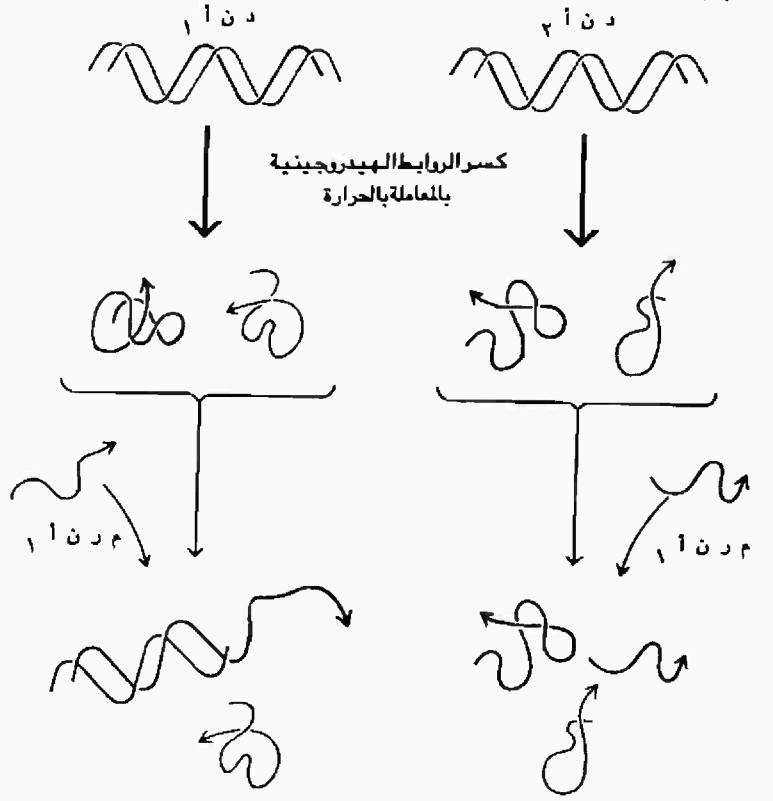
أن الاحتمال الأول هو الصحيح ففى الخلية الحية *In vivo* لا يوجد إلا نوع واحد من سلسلة ر ن أ التى تمثل جين معين . كما أمكن البرهنة على ذلك بدراسة ر ن أ المتكون فى الخلية البكتيرية بواسطة فيرس SP8 الذى يتكاثر فى الخلية البكتيرية *Bacillus subtilis* . يتميز الحلزون المزدوج لهذا الفيرس باحتواء كل سلسلة على قواعد مختلفة ومميزة بحيث يمكن التعرف على كل منهما بطرق جزيئية خاصة كما يمكن فصل السلسلتين بسهولة وبذلك يمكن معرفة ما إذا كان ر ن أ المتكون يحتوى على تتابعات من القواعد مكملة لسلسلة واحدة فقط أم لكلا السلسلتين .



الشكل (٥-٤):

رسم تخطيطى لعملية بناء ر ن أ بواسطة انزيم بلمرة ر ن أ يبدأ الإنزيم عملية البناء من نقطة بداية نوعية على د ن أ تسمى البروموتور ويستكمل البناء عند نقطة انهاء (توقف) حيث يتحرر عندها الانزيم وتنزلق سلسلة ر ن أ

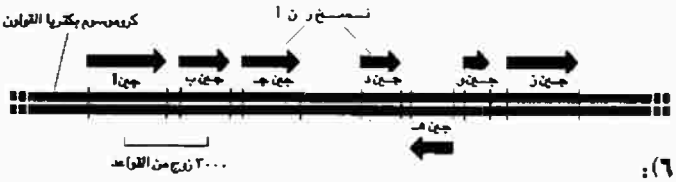
استخدمت فى ذلك تقنية تهجين ر ن أ مع د ن أ RNA / DNA hybridization حيث تخلط جزئيات ر ن أ مع السلاسل المفردة من د ن أ الناتجة عن عملية الدنتره للحلزون المزدوج denaturation بالتسخين . وعند إجراء عملية إعادة الاتحاد Renaturation بالتبريد البطئ لهذا الجزئ المدنتر فى وجود سلاسل ر ن أ التى سبق بناؤها على قالب د ن أ الفيروس نفسه فإن بعضاً من ر ن أ سينجذب إلى مناطق د ن أ المكملة ويكون حلزون مزدوج كما فى الشكل رقم (٥ - ٥) .



الشكل (٥-٥):

استخدام الهجين د ن أ / ر ن أ لبيان التكامل فى تتابع القواعد من جزئ ر ن أ وأحد سلسلتى د ن أ القالب . يبين الجانب الأيسر من الشكل التخطيطى تكوين جزئ هجينى بين جزئ ر ن أ واحد السلسلتين للقالب . ويبين الجانب الأيمن لماذا يسمح تكوين هجين د ن أ / ر ن أ بالكشف عن التكامل فى التتابع . إذا تم خلط نفس جزئ ر ن أ مع د ن أ غريب فإنه لن يتكون جزئ هجين .

تبين أن ر ن أ المتخلق حيوياً فى الخلية سيتجه إلى تكوين هجين مع إحدى السلسلتين من د ن أ الفيرس SP8 فقط ، مما يعنى أنه بالنسبة لجين ما يتم التخليق الحيوى لتتابعات ر ن أ على إحدى السلسلتين من د ن أ فقط . أى أن النسخ لا يتم إلا على سلسلة قالب واحدة بالنسبة لجين معين . وبصفة عامة فإن إحدى السلسلتين من د ن أ فى الكائنات غير مميزة النواة تستخدم كقالب لمجموعة من الجينات فى حين قد تستخدم السلسلة الأخرى كقالب لنسخ عدد آخر من الجينات كما فى الشكل رقم ٥ - ٦ .



الشكل رقم (٥ - ٦):

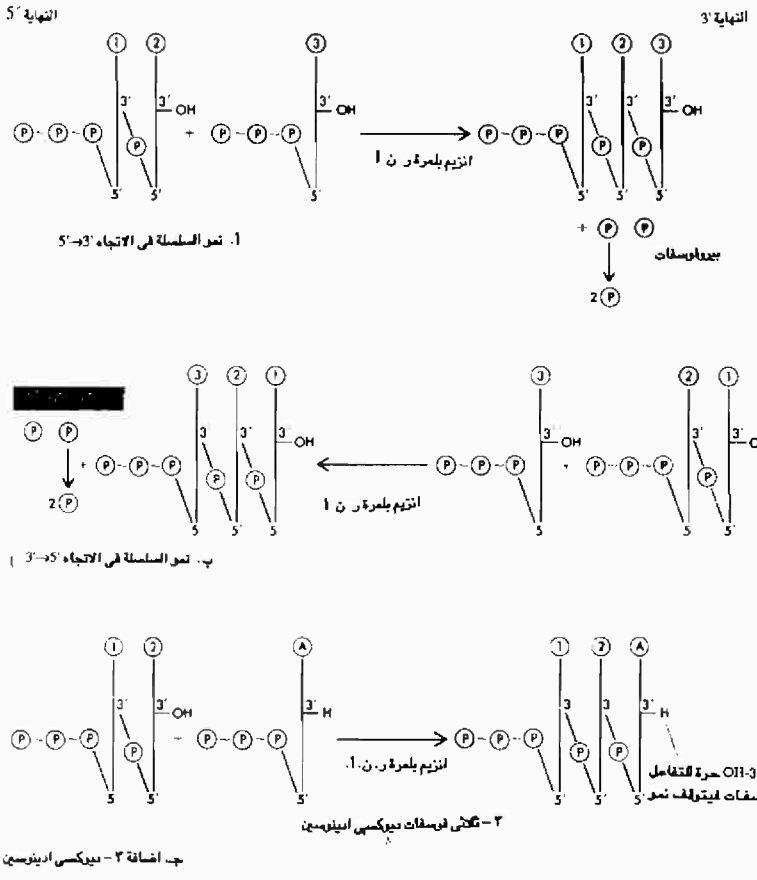
منطقة قصيرة من كروموسوم بكتيرى تبين عملية نسخ عدة جزيئات ر ن أ على قالب د ن أ المحتوى على عدة جينات متجاورة .

ويتم ذلك الاختيار بتوجيه من منطقة تتابع ابتداء النسخ Promoter الموجودة على سلسلة د ن أ التى تؤدى إلى ارتباط إنزيم بلمرة ر ن أ بالسلسلة القالب الصحيحة لجين معين كما سيأتى بعد .

إتجاه البناء فى جزئ ر ن أ

إن اتجاه البناء فى جزئ ر ن أ يتحدد (كما فى د ن أ) باتجاه ارتباط السكر والفوسفات فى الهيكل الأساسى للجزئ فإذا انتهت السلسلة بذره كربون رقم '5 فيطلق عليها النهاية '5 فى حين يطلق على النهاية المحتوية على الذرة رقم '3 النهاية '3 .

هناك احتمالان فقط لاتجاه البناء فى ر. ن. أ. إما فى الاتجاه '3 <-- '5 أو '5 <-- '3 فإذا كان النمو فى الاتجاه '3 <-- '5 فإنه من المتوقع أن تكون النيوكلتيده الأولى فى السلسلة محتويه على مجموعة ثلاثية من الفوسفات Ⓟ—Ⓟ—Ⓟ ولكن إذا كانت السلسلة ستنمو فى الاتجاه '5 <-- '3 فإنه من المتوقع أن تكون النيوكلتيده التى تنتهى بها السلسلة هى المحتويه على مجموعة فوسفات ثلاثية Ⓟ—Ⓟ—Ⓟ



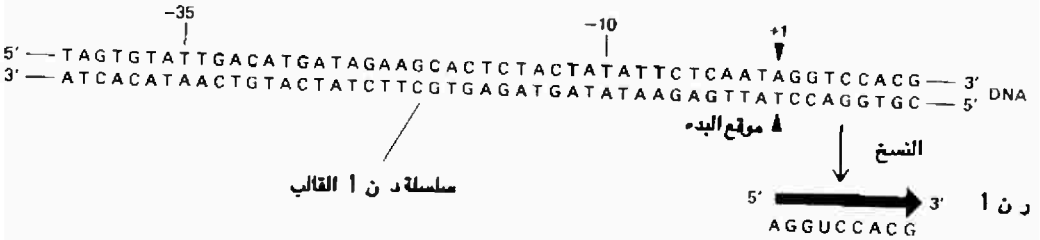
الشكل (٥-٧).

رسم تخطيطى لأثبات أن اتجاه النسخ هو 3' ← 5' باستخدام ٣ – ثلاثى فوسفات ديوكسى أدينوسين .

تبين أن الاحتمال الأول هو الصحيح حيث وجد أنه فى السلاسل الحديثة البناء تكون أحدث نيوكلتيده مضافة للنهاية النامية عند النهاية 3' فى حين تكون مجاميع الفوسفات الثلاثيـــة Ⓟ–Ⓟ–Ⓟ مرتبطة بالنيوكلتيده التى ابتدأ بها بناء السلسلة . أمكن البرهنة على الاتجاه البنائى 3' <-- 5' باستخدام المثبط الأيضى 3'-deoxyadenosine وهو مشابه لقاعدة الأدينيين ولكن مع عدم وجود ذرة الأوكسوجين على ذرة الكربون رقم 3' والتى تشارك فى تكوين أحد الروابط الهيدروجينية بين القواعد . عند إضافة هذا المثبط إلى الخلايا البكتيرية فإنه يتم أولاً فسفرته إلى Ⓟ–Ⓟ–Ⓟ 3' - deoxyadenosine ثم يتم ارتباطه بعد ذلك بالنهاية 3' النامية من السلسلة وحيث أنه لا يحتوى على مجموعة 3' - OH فإنه لا يمكنه استقبال ر ن أ مما يؤكد أن البناء لابد أن يتم فى الاتجاه 3' <-- 5' فقط كما فـى الشكـل (٥ – ٧) .

دور منطقة تتابع المستبدىء Promoter فى بناء ر ن أ

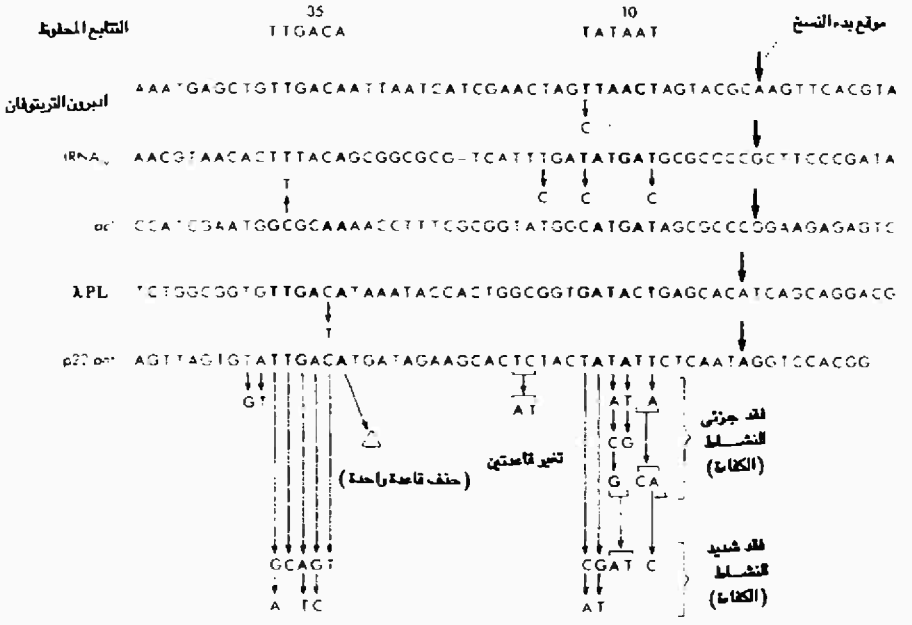
فى حين لا يوجد أى دور بنائى للوحدة سيجما (σ) فى إنزيم بلمرة ر ن أ الكامل إلا أن لها وظيفة هامة جداً حيث تقوم بالتعرف على أشارات البدء على طول جزئ د ن أ القالب . وقد أظهرت نتائج التجارب المعملية *In vitro* على أنه فى غياب الوحدة σ قد يتم بناء سلسلة ر ن أ ولكن ببدايات غير صحيحة مما يجعل السلسلة الناتجة غير صالحة لعملية بناء البروتين المطلوب حيث يتم ارتباط الإنزيم المركزى core enzyme بأماكن عشوائية علـى طـول قالـب د ن أ مما يعطى ر ن أ بتتابعات غير صحيحة وبالتالى نحصل على منتج غير فعال . ولكن فى وجود وحدة سيجما σ مع بقية الوحدات فى الإنزيم فإن الموقع الصحيح لبداية النسخ يتم التعرف عليه مما يدل على أن الإنزيم الكامل Holoenzyme لديه المقدرة على الارتباط نوعياً مع تتابع البدء على جزئ د ن أ والذى يعرف بمنطقة تتابع الابتداء Promoter . تتكون هذه المنطقة فى بكتريا القولون من حوالى ٥٠ – ٦٠ نيوكلتيده يرتبط بها انزيم بلمرة ر ن أ فى منطقة تمتد حوالى ٤٠ قاعدة قبل بدء النسخ upstream إلى حوالى ٢٠ قاعدة بعد بدء النسخ down stream . تبين أن هناك تتابعات نوعية محافظاً عليها فى منطقة تتابع الابتداء هذه يطلق عليها التتابع الكشاف المحفوظ consensus sequence لابد أن يتعرف عليها إنزيم بلمرة ر ن أ وهى تتكون من تتابعين طول كل منهما ٦ نيوكلتيدات وتقعان قبل موقع بدء النسخ بحيث يفصل بينهما حوالى ١٧ نيوكلتيده من التتابعات غير المحددة من د ن أ كما فى الشكل (٥ – ٨) .



الشكل (٥-٨):

منطقة تتابع البروموتور على سلسلة د ن أ القالب التى يتعرف عليها إنزيم بلمرة ر ن أ لبدء النسخ لسلسلة ر ن أ تتكون منطقة البروموتور من تتابعين قصيرين على بعد حوالى - ٣٥ إلى -١٠ نيوكلتيده من نقطة بدء نسخ سلسلة ر ن أ وهذه التتابعات تحدد موقع ارتباط انزيم بلمرة ر ن أ وتكون هذه التتابعات مع موقع البدء منطقة البروموتور . ويؤدى حدوث طفرات فى أى من هذين التتابعين المحفوظين إلى توقف نشاط البروموتور فى حين لا يتأثر هذا النشاط إذا حدثت التغيرات فى أى تتابعات أخرى .

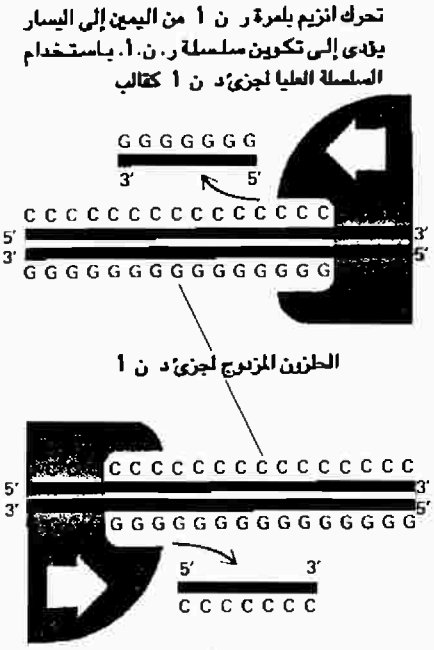
يبدأ التتابع السداسى الأول عند موقع النيوكلتيده رقم -٣٥ قبل بدء النسخ وتتكون غالباً من التتابع (TTGACA) فى حين يقع التتابع السداسى الثانى عند النيوكلتيده رقم -١٠ قبل بدء النسخ وتتكون من التتابع (TATATT) . وجد أنه لابد أن يرتبط إنزيم البلمرة ر ن أ بهذين الموقعين قبل أن يبدأ عملية النسخ الفعلية عند نيوكلتيده البدء فى الموقع رقم + ١ على سلسلة د ن أ القالب . وقد تبين أن أى تغيير (طفور) فى أى من هذين التتابعين السداسيين يؤدى إلى توقف نشاط تتابع الابتداء وبالتالى توقف بدء النسخ بإنزيم بلمرة ر ن أ فى حين لا تتأثر عملية النسخ كثيراً إذا حدث تغير فى التتابعات الأخرى فى منطقة الابتداء Promoter كما فى الشكل (٥ - ٩) .



الشكل (٥-٩):

مواقع الطفرات التى تؤدى إلى خفض نشاط البروموتور فى عملية بدء النسخ (الأسهم إلى أسفل) أو زيادة النشاط (الأسهم إلى أعلى) فى خمس بروموتورز مختلفة . كما يظهر تتابع القواعد فى سلاسل ر ن أ

وكما سبق القول يتم اختيار السلسلة القالب بتوجيه من تتابع الابتداء Promoter حيث تؤدى حقيقة أن البناء يتم فى الاتجاه 3' <-- 5' إلى أنه يلزم على إنزيم بلمرة ر ن أ أن يتجه إلى السلسلة التى يكون فيها تتابع الابتداء الحرج Consensus sequence فى الاتجاه الصحيح مما يسمح بارتباط قوى بينه وبين الانزيم كما فى الشكل (٥ – ١٠) .



الشكل (٥-١٠):

أهمية اتجاه تتابع القواعد فى البروموتور فى اختيار سلسلة د ن أ القالب الصحيحة لنسخ سلسلة ر ن أ بواسطة إنزيم بلمرة ر ن أ

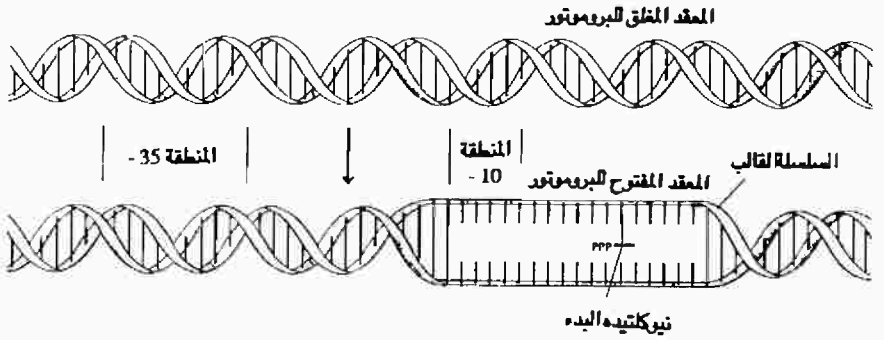
تأثير ارتباط إنزيم البلمرة مع تتابع المستبدىء Promoter فى فك حلزنة د ن أ وبدء عملية النسخ :

تبين فى بكتريا القولون أن إنزيم بلمرة ر ن أ يرتبط بمنطقة تتابع الابتداء Promoter فى خطوتين محددتين : حيث يبحث أولاً عن منطقة الابتداء ويرتبط بها ارتباطاً مبدئياً ضعيفاً فى المعقد المقفول (Closed) أى قبل فك الحلزون المزدوج لجزئ د ن أ يحدث هذا التعرف المبدئى غالباً فى المنطقة (-٣٥) حيث تبين أن الطفرات التى تمنع الارتباط مع تتابع الابتداء هى تلك التى تؤدى إلى تغيير القواعد فى هذه المنطقة . والخطوة الثانية تتم عند تحول المعقد المقفول إلى معقد مفتوح ويتم فيه ارتباط إنزيم بلمرة ر ن أ بقوة بتتابع الابتداء Promoter . فى هذه المرحلة من التحول يتم فك حلزنة حوالى ١٧ زوج من القواعد بـدءاً مـن منطقـة (ـ ١٠) مما يجعل السلسلة المفردة للقالب معرضة ومكشوفة بفعل إنزيم بلمرة ر ن أ لاستخدامها كقالب لإملاء تتابع نسخ القواعد فى سلسلة ر ن أ النامية .

تبين أن المنطقة (-١٠) تكون عادة غنية فى أزواج القواعد AT ومعروف أنها تكون أسهل فى الأنفكاك بالدنترة عن الأزواج GC . وقد تبين أن الطفرات التى تمنع تكون المعقد المفتوح تقع فى نفس هذه المنطقة إذ تحدث هذه الطفرات تغير فى تتابع المنطقة (-١٠) ولكنها تحافظ على محتواها من أزواج القواعد AT مما يشير إلى أن هذه المنطقة تأخذ شكلاً مميزاً ونوعياً بحيث يتعرف عليه إنزيم البلمرة بالأضافة إلى كونها سهلة الأنصهار . يؤدى فك الحلزنة الجزئى فى حلزون د ن أ عند تكوين المعقد المفتوح إلى أمتداد منطقة د ن أ التى تلامس إنزيم بلمرة ر ن أ بحيث تشمل النيوكلتيدات التى تلى منطقة (-١٠) التى كانت سابقاً على الجانب الآخر من حلزون د ن أ بالنسبة لجهة الارتباط كما فى الشكل (٥ - ١١) .

يلى ذلك تحرك إنزيم بلمرة ر ن أ خطوة خطوة على قالب د ن أ (الخطوة = اضافة ريبونيوكلتيده واحدة) مع استمرار الانفكاك الجزئى للحلزون فى مقدمة الإنزيم حتى يمكن أن تستمر عملية النسخ ، وبذلك تنمو السلسلة بمعدل نيوكلتيده فى كل خطوة فى الاتجاه <-- 5' 3' . بمجرد بدء استطالة سلسلة ر ن أ تنفصل الوحدة سيجما σ من المعقد الإنزيمى وتصبح حرة للارتباط بإنزيم مركزى آخر Core enzyme . قد يفسر ذلك على أساس إما أنها قد أدت دورها فى التعرف على منطقة تتابع الابتداء Promoter حيث نقطة بدء النسخ وبذلك لم

يعد لها دور تقوم به أو أن استمرار وجودها فى المعقد الانزيمى الكامل قد يؤدى إلى استمرار الارتباط القوى بين الإنزيم الكامل وبين إلى Promoter مما يحول دون سهولة حركة الإنزيم على القالب لبدء رحلة البلمرة فى حين يكون هذا الارتباط ضعيف فى غياب الوحدة σ مما يتيح للانزيم حرية الحركة فى اتجاه استطالة سلسلة ر ن أ.



الشكل (٥-١١):

ارتباط إنزيم بلمرة ر ن أ بالمعقد المقفول والمفتوح للبروموتور . يبين الشكل منطقة تلامس الإنزيم بالبروموتور عند بداية الارتباط (المعقد المقفول) وبعد انفصال سلسلتى د ن أ للسماح ببدء نمو سلسلة ر ن أ (المعقد المفتوح) تبدو مواقع التلامس داكنة اللون .

وعلى العكس من ذلك وجد أن الارتباط بين الإنزيم الكامل holoenzyme وبين مناطق د ن أ غير المحتوية على تتابع الابتداء Promoter يكون ضعيفاً جداً مما يسمح بتحرك الإنزيم على القالب بسرعة بحثاً عن منطقة المستبدىء . أى أن دور الوحدة سيجما فى هذه الحالة هو تثبيط الارتباط غير النوعى بين د ن أ القالب وبين الانزيم .

ظهر حديثاً أنه إلى جانب الوحدة سيجما الرئيسية (σ) المسئولة عن التعرف عن مناطق المستبدىء Promoter الرئيسية فى جينوم بكتريا القولون ، توجد وحدات نوعية أخرى من الوحدة سيجما (مثل σ^{70} ، σ^{32}) تكون متخصصة فى التعرف على نوعيات خاصة من تتابع الابتداء غير العادية والتى تمثل نقطة بدء النسخ لأنواع غير عادية من ر ن أ مسئولة عن انتاج بروتينات متخصصة تحتاجها الخلية تحت الظروف غير العادية مثل ظروف الإجهاد البيئى .

الكفاءة النسبية لتتابعات المستبدىء Promoters

تبين وجود فروق كبيرة فى فعالية ونشاط المستبدىء بحيث قد يعمل بعضها بكفاءة أكبر عن البعض الآخر بحيث تسمح بحدوث دورات أكثر وأسرع لبدء بناء ر ن أ وقد تبين أن معدل حدوث كلا من خطوتى الارتباط الأولى وتكوين المعقد المفتوح تختلف بين المستبدىء Promoter ما بين مرة واحدة كل عشرة دقائق أو أكثر إلى بدء الارتباط مرة كل ثانية أو ثانيتين فقط . تعد هذه أحدى الوسائل فى التحكم فى معدل التعبير الجينى Regulation of gene expression.

دور البروتينات المنظمة Regulators فى التأثير على بدء النسخ

إن معدل النسخ لجين ما ليس من الضرورى أن يكون ثابتاً ولكنه يمكن أن يتغير حسب احتياجات الخلية تحت الظروف المختلفة من النمو . يقال لمثل هذا الجين بأنه مُنظم Regulated. يتم فى بكتريا القولون تنظيم النسخ عن طريق بعض البروتينات النوعية التى يؤدى ارتباطها بجزئ د ن أ بالقرب من أو داخل المستبدىء Promoter إلى زيادة أو انخفاض فى معدل البناء لإنزيم بلمرة ر ن أ تشمل هذه البروتينات المنظمة المثبطات Repressors والتى تقوم بإيقاف أو منع الارتباط بين إنزيم بلمرة ر ن أ مع تتابع الابتداء وبالتالى توقف عملية النسخ . كما تشمل المنشطات Activators التى ترتبط بإنزيم بلمرة ر ن أ وتحفز نشاطه. وجد أن المستبدىء Promoter الذى يحتاج إلى منشطات لكى يعمل بكفاءة أكبر يكون فيه التتابع المحفوظ Consensus sequence فى النقطة (-٣٥) غير متطابق أو غير متشابه مع التتابع النموذجى مما يعنى أن المنشط يعمل كبديل لتعويض النقص الوظيفى لهذا الجزء من موقع الارتباط .

يمكن أن يعمل بروتين ما كمثبط المستبدىء معين فى حين قد يقوم هذا البروتين نفسه بدور المنشط لمستبدىء آخر والعكس صحيح ، ويتوقف ذلك على الموقع الدقيق لنقطة ارتباطه.

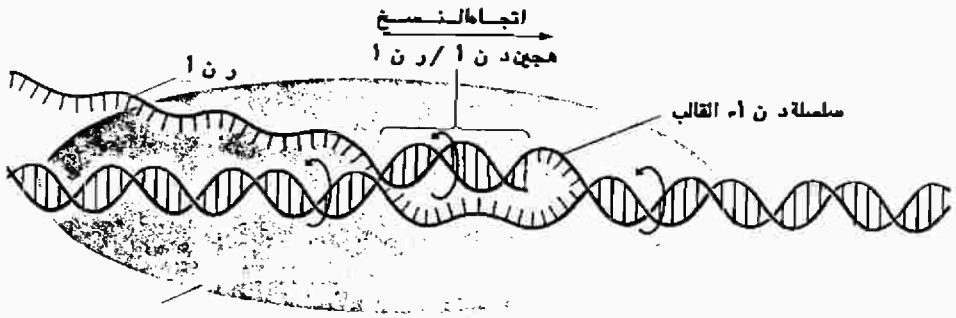
نيوكلتيدات بدء بناء سلسلة ر ن أ :

إن بدء النسخ الحقيقى يحدث عادة عند حافة المنطقة التى يرتبط فيها إنزيم بلمرة ر ن أ بقالب د ن أ نو السلسلة المفردة وعلى بعد حوالى ١٢ إلى ١٣ قاعدة من بداية منطقة (-١٠)

وبذلك يبدو أن مركز النشاط لهذا الإنزيم يقع فى النهاية البعيدة له فى اتجاه بناء ر ن أ وقد وجد أن أول نيوكلتيده يتم اضافتها فى سلسلة ر ن أ حديثة البناء تكون عادة إما ثلاثى فوسفات الأدينين أو ثلاثى فوسفات الجوانين . وفى بعض الأحيان قد تبدء بثلاثى فوسفات السيتوسين (PPPC) . وفى أحيان نادرة قد تكون قاعدة البدء ثلاثى فوسفات اليوراسيل (PPPU) . ولكن قد يحدث إزالة لهذه القاعدة الأولى فى المراحل التالية من نضج السلسلة وذلك بفعل إنزيمات التحليل المائى للأحماض النووية nucleases فى الخلية .

فك الحلزنة وإعادتها أثناء تقدم إنزيم بلمرة ر ن أ

يقوم إنزيم بلمرة ر ن أ بفك حلزنة د. ن. أ. باستمرار أثناء تقدمه فى عملية النسخ على القالب لبناء سلسلة ر ن أ واستطالتها وذلك لكى تصبح نيوكلتيدات القالب معرضة للنسخ . تبدأ نقطة النمو والاستطالة لسلسلة ر ن أ بمنطقة مكونة من هجين ر ن أ / د ن أ بطول حوالى ١٢ قاعدة والتى تنفك عندما تترك سلسلة ر ن أ السلسلة القالب وتعود سلسلتى حلزون د ن أ إلى التحلزن حول بعضهما البعض فى حلزون مزدوج كما فى الشكل رقم ٥ - ١٢ .



الشكل (٥-١٢)،

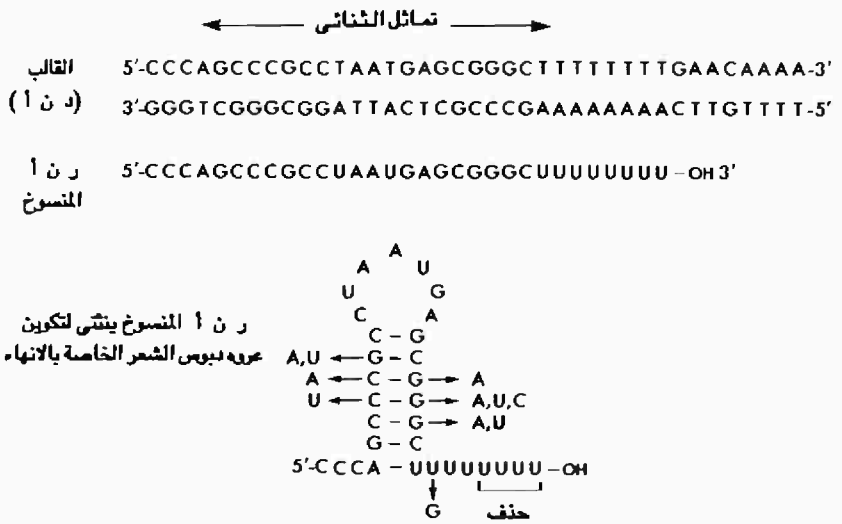
نموذج لمعقد الاستطالة المكون من إنزيم بلمرة ر ن أ و د ن أ القالب وسلسلة ر ن أ النامية . يدل اتجاه الأسهم على الدوران الذى يجب أن يحدث فى جزئ د ن أ لتنفك الحلزنة كلما تعرضت السلسلة القالب للإنزيم ولتكوين هجين مؤقت من د ن أ و ر ن أ ولكى تتحلزن سلاسل د ن أ مرة أخرى عندما تنطلق سلسلة ر ن أ

إلا أن المنطقة من د ن أ التى تكون غير متحلزنة بمرور إنزيم البلمرة عليها تكون أطول قليلاً من طول منطقة هجين ر ن أ / د ن أ إذ تكون بطول حوالى ١٧ قاعدة وهى تساوى المسافة التى تنفك عند بداية بدء تكوين المعقد المفتوح عند منطقة المستبدىء Promoter.

دور اشارات الإنهاء أو التوقف فى إنتهاء النسخ

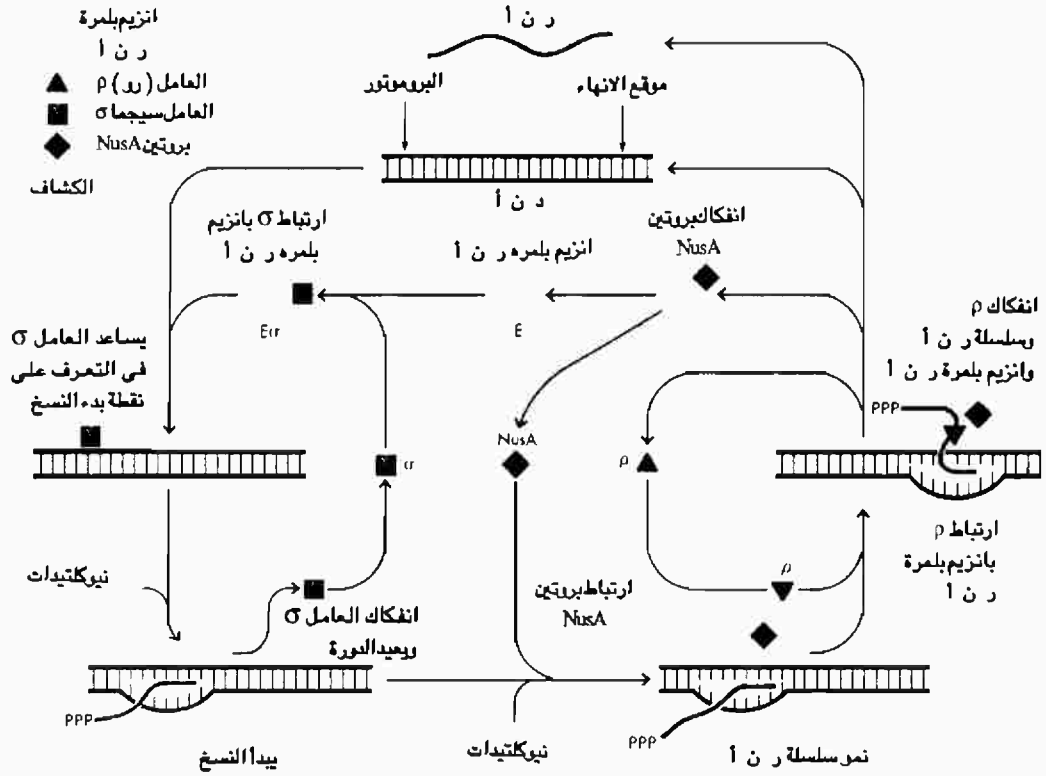
توجد إشارات فى جزئ د ن أ البكتيرى تسمى الموقفات أو مواقع الإنهاء Terminators والتى تكون وظيفتها وقف بناء ر ن أ عند نقطة محددة على قالب د ن أ عند موقع الانهاء يتوقف إنزيم بلمرة ر ن أ عن إضافة نيوكلتيدات جديدة إلى سلسلة ر ن أ وتنفك السلسلة عنه ويترك الإنزيم د ن أ القالب لكى يبدأ دوره جديدة من النسخ . فى بعض مواقع الانهاء تحتاج عملية الايقاف إلى بروتين إضافى يسمى عامل ρ (رو Rho) . فى حين قد يقوم الإنزيم المركزى نفسه core enzyme بهذا الدور بدون الحاجة إلى عوامل إضافية.

.توجد تتابعات معينة فى منطقة الايقاف فى سلسلة د ن أ القالب تتكون من تتابع ثنائى متماثل dyad symetry فى د ن أ على مسافة ١٥ إلى ٢٠ نيوكلتيده قبل نهاية منطقة النسخ ر ن أ يليه تتابع من ٦ قواعد أدينين A فى سلسلة د ن أ القالب والتى يتم نسخها إلى ست قواعد من اليوراسيل U عند نهاية سلسلة ر ن أ كما فى الشكل (٥ - ١٣). يتوقف إنزيم بلمرة ر ن أ عن اضافة أي نيوكلتيدات جديدة عندما يتم نسخ منطقة الايقاف هذه حيث يتكون بسرعة حلزون بتركيب دبوس الشعر hairpin فى هذه المنطقة مما يؤدى إلى توقف النسخ وانزلاق إنزيم بلمرة ر ن أ عن السلسلة القالب لجزئ د ن أ ؛ كما يحدث إنفكاك لسلسلة ر ن أ المبنية حديثاً وتصبح حرة . يبين الشكل (٥ - ١٤) دور كل من إنزيم بلمرة ر ن أ وعامل سيجما σ وعامل ρ رو Rho فى بناء ر ن أ.



الشكل (٥-١٣)،

تتابع منطقة انهاء النسخ المستقلة عن العامل ρ وتركيب سلسلة ر ن أ التى توقف نموها . الطفرات المظللة تؤدى إلى منع جزئى أو كلى لعملية الايقاف .



الشكل (٥ - ١٤):

دور إنزيم بلمرة ر ن أ والعامل سيجما σ والعامل ρ (رو) والبروتين NusA فى عملية بناء سلسلة ر ن أ