

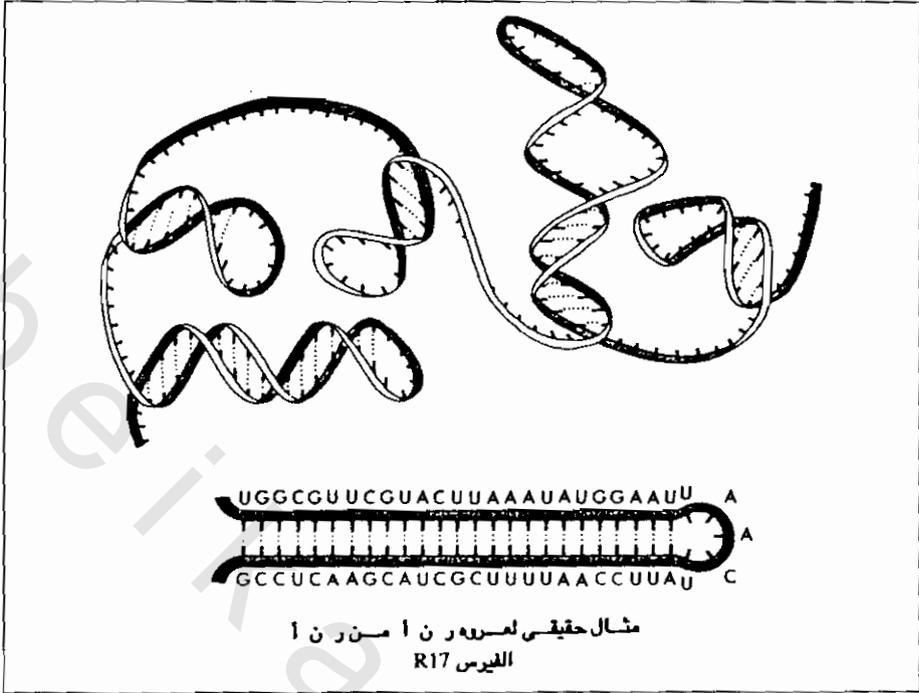
الفصل السادس

بناء ر. ن. أ في غير مميزة النواة RNA Synthesis in Prokaryotes

تركيب جزئ ر. ن. أ:

يتكون جزئ ر. ن. أ عادة من سلسلة مفردة بعكس د. ن. أ وهو ينسخ على قالب 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 التي تربطها علاقة وظيفية مشتركة فيما يسمى بالأوبرون Operon كما سيأتي بعد. على الرغم من أن جزئ ر. ن. أ يكون أحادي السلسلة إلا أنه قد يتشكل في تركيبات مختلفة أكثر تعقيداً. توجد في معظم أنواع ر. ن. أ مناطق قصيرة تأخذ شكل قريب من الحلزون المزدوج والتي تتكون نتيجة لتكون ما يسمى بتركيب دبوس الشعر Hairpin بين تتابعات متكاملة بحيث تتزوج عند التوائها وتكون منطقة مزدوجة السلسلة كما في الشكل (٦-١).

بالإضافة إلى أزواج القواعد الثابتة AU, GC فإنه قد يتكون تزواج ضعيف من نوع GU والتي تساهم أيضاً في التركيب الثانوي (الثاني) لجزئ ر. ن. أ.



الشكل (٦-١): إنشاء سلسلة ر.ن. أ مينا مناطق عديدة مزدوجة الحلزون مرتبطة ببعضها بروابط هيدروجينية

من المعروف أنه توجد ثلاث أنواع رئيسية من ر.ن. أ وهي ر.ن. أ انمراسل mRNA، ر.ن. أ الريبوسومي rRNA ر.ن. أ الناقل tRNA ويقوم كل منها بدور محدد في عملية الترجمة وبناء البروتين كما سيأتي بعد.

في حالة tRNA مثلاً نجد أن طبيعة تكوينه ووظيفته تحتم أن تنتهي السلسلة لتكوين عدد من العروات (فيما يعرف بشكل ورقة البرسيم Clover Leaf Shape كما سيأتي بعد) ولذلك يوجد عدد كبير من التتابعات المتكاملة الداخلية

حتى يمكنها أن تتزاوج عند تقابلها في هذه العروات حتى يتسنى للجزئ أن يأخذ هذا الشكل المميز في التركيب الثالثي Tertiary.

تحتوى كل خلية غير مميزة النواة على عدد كبير ومختلف من جزيئات ر.ن. أ والتي تتراوح في الطول بين ٧٠ نيوكلييدة إلى عشرات الالاف من النيوكلييدات. 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 نيوكلييدات (U, A, C, G) إلى افتراض أن المعلومات الوراثية المخزونة فى سلاسل د.ن. أ يتم انتقالها إلى تتابع مكمل من نيوكلييدات ر.ن. أ.

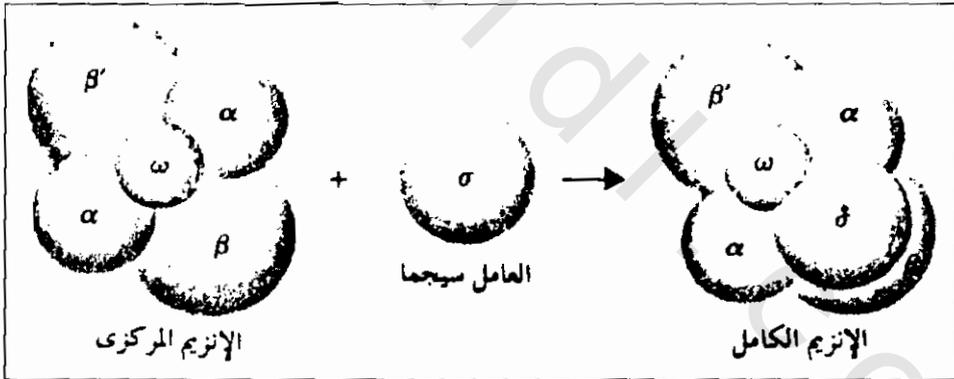
وطبقاً لهذه الفرضية فإنه لا بد أن يحدث انفصال بين سلسلتى د.ن. أ فى مرحلة معينة من دورة الخلية لتعمل السلاسل المفردة كقالب يتم عليها بناء ر.ن. أ تكاملياً مع تتابع القواعد الموجودة على القالب بحيث يتقابل A مع U, G مع C, ولا بد من وجود ضوابط لمعرفة إذا كانت سلسلة د.ن. أ المنفصلة ستعمل كقالب لإنتاج سلسلة مكمل 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 سمي فى البداية انزيم النسخ Transcriptase ثم أصبح اسمه انزيم بلمرة ر.ن. أ RNA Polmerase والذى

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

تركيب انزيم بلمرة ر. ن. أ RNA Polymerase :

يتكون انزيم بلمرة ر. ن. أ من عدد من تحت الوحدات وتتكون الصورة النشطة للانزيم والمسماه بالإنزيم الكامل Holoenzyme من خمس سلاسل من متعددات الببتيد المختلفة وهي ($\alpha, \beta', \beta, \sigma, \omega$) وترتبط مع بعضها بروابط ثانوية غير تساهمية. وتمثل كل وحدة مرة واحدة في الجزء الكامل فيما عدا الوحدة σ التي تمثل بوحدين ويكون الوزن الجزيئي للإنزيم الكامل حوالي 500,000 دالتون (الشكل 6-3) ويلخص الجدول (6-1) الوحدات الداخلة في تركيب الانزيم في بكتريا القولون ووظيفة كل منها في عملية النسخ.



الشكل (6-3): رسم توضيحي للتركيب المعقد لانزيم بلمرة ر. ن. أ.

الجدول (٦-١) تحت وحدات subunits لانزيم بلمرة ر. ن. أ
في بكتريا القولون وعوامل النسخ ووظيفة كل منها

تحت الوحدة	اسم الجين	الموقع على الخريطة (دقائق)*	الوزن الجزيئي (Dalton)	عند تحت الوحدات في الاتزيم	الوظيفة
β' (بيتا)	rpo C	٨٩,٥	١٥٥,٠٠٠	١	الارتباط مع د. ن. أ؟
β (بيتا)	rpo B	٨٩,٥	١٥١,٠٠٠	١	موقع التفاعل لبلمرة ر. ن. أ
σ (سيجما)	rpo D	٦٦,٥	٧٠,٠٠٠	١	التعرف على تتابع promoter وبدء البلمرة
∞ (الفا)	rpo A	٧٢	٣٦,٥٠٠	٢	؟
w (أو ميغا)	--	—	١١,٠٠٠	١	؟
عوامل النسخ					
(Rho) P	rho	84.5	٤٦,٠	٦	انتهاء أو وقف البلمرة
nus A	nus A	٦٥	٦٩,٠٠٠	١	الاستطالة والانتهاء.

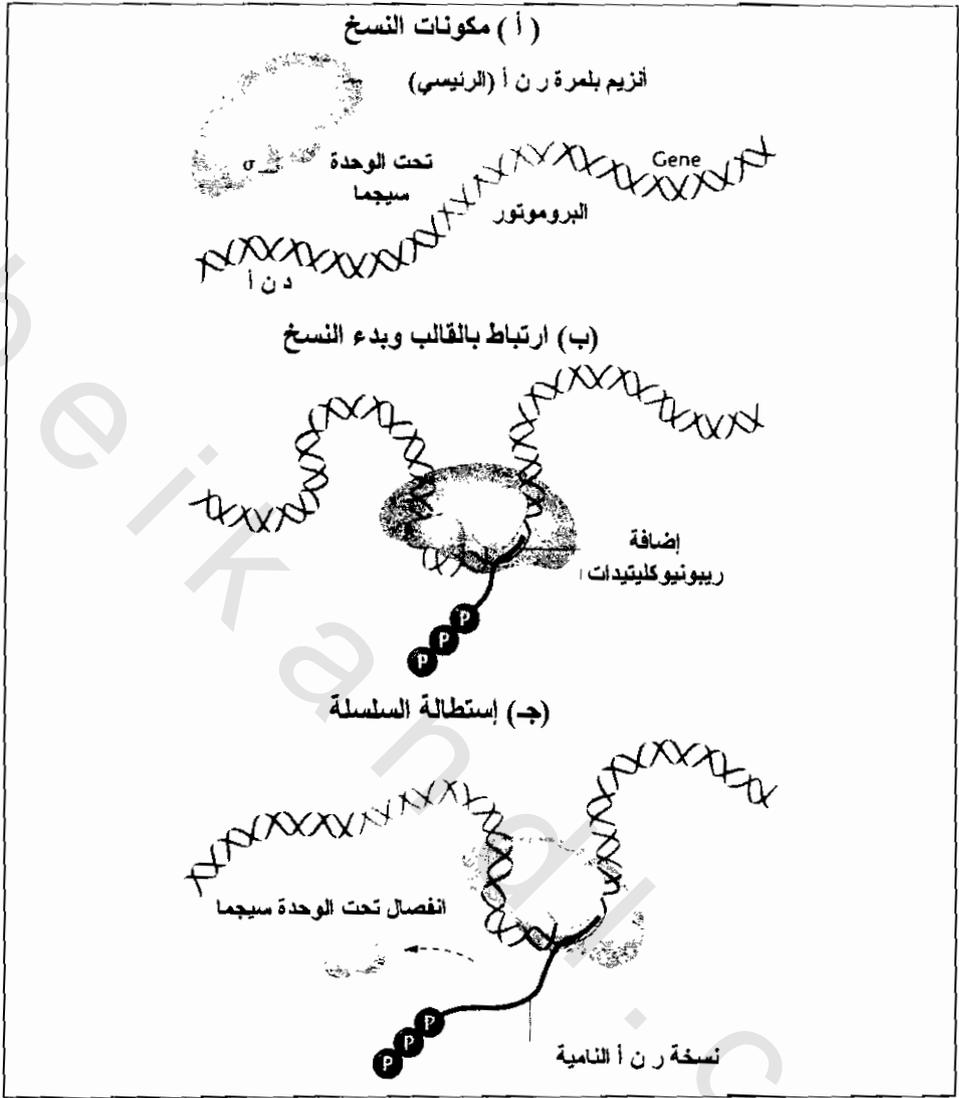
* يشير إلى الموقع على الخريطة المعروفة عن التركيب الحلقى لجزئ د. ن. أ. في بكتريا القولون والذي يمثل بستين دقيقة.

لا يوجد ارتباط قوى بين تحت الوحدة سيجما (σ) مع بقية مكونات الإنزيم. لذلك يمكن فصل معقد إنزيمي مكون من (β' , B, ∞ , w) بدون الوحدة σ ويطلق على هذا المعقد الإنزيم المركزي core enzyme حيث تبين أن باستطاعة أن

يقوم بتكوين الروابط الفوسفودايستر اثناء بناء سلسلة ر.ن. أ بنفس الكفاءة التي يقوم بها الإنزيم الكامل أى فى وجود أو غياب الوحدة سيجمما 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 بدءبناء السلسلة على قالب د.ن. أ والمعروفة بأسم منطقة تتابع المستبدئ Promoter كما سيأتى بعد. ويبين الشكل (٦-٤) رسماً تخطيطياً لعملية بناء ر.ن. أ بواسطة إنزيم بلمرة ر.ن. أ.

ويظهر من الشكل المراحل الثلاثة للنسخ وهى البدء والاستطالة والانهاء.



الشكل (٦-٤): المراحل المبكرة للنسخ في غير مميزة النواة

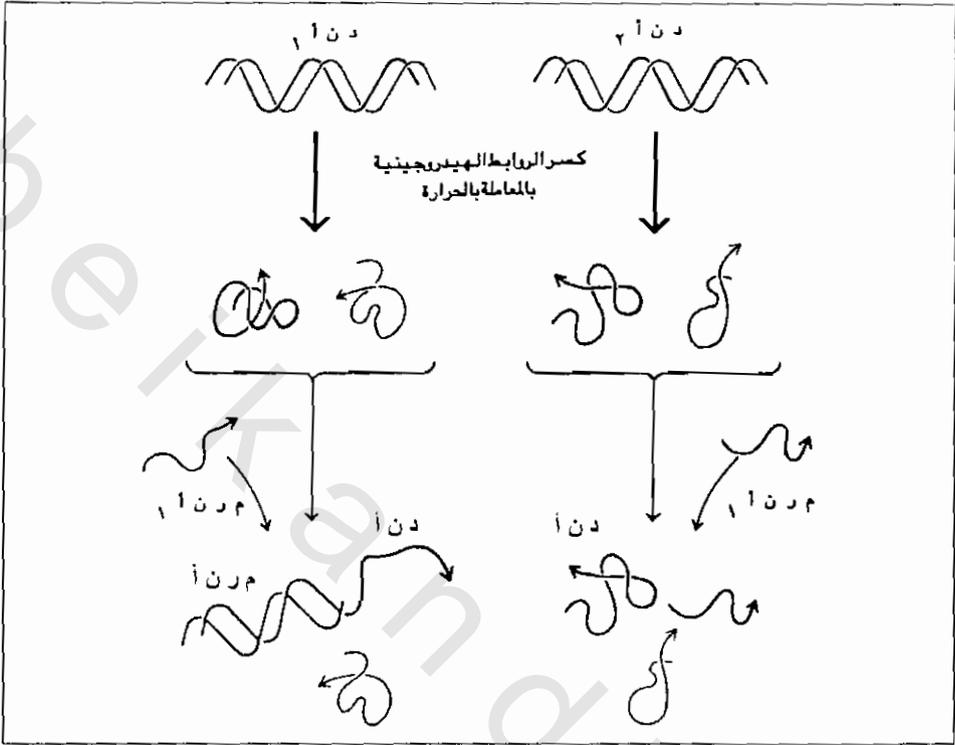
- أ - مكونات العملية.
- ب- ارتباط القالب عند الموقع (-١٠) وتشمل تحت الوحدة سيجما لإنزيم بلمرة رن أ وبدء بناء رن أ.
- ج - إستطالة السلسلة بعد انفصال تحت الوحدة سيجما من معقد النسخ ويتحرك الإنزيم على طول قالب د ن أ.

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

في حين يحتوى جزئ د. ن. أ عادة على عدد كبير جداً من الجينات فإن كل جزئ من ر. ن. أ يمثل عادة تتابعات ريبونيوكلتيديّة 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 تُجمع 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 التي سيتم بنائها أو إذا كان لا بد 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 التي 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.

استخدمت فى ذلك تقنية تهجين ر. ن. أ مع د. ن. أ RNA/ DNA Hybridization حيث تَخلط جزئيات ر. ن. أ مع السلاسل المفردة من د. ن. أ الناتجة عن عملية الدنترة للحلزون المزدوج Denaturation بالتسخين. عند إجراء عملية إعادة الاتحاد Renaturation بالتبريد البطئ لهذا الجزئ المدنتر فى وجود سلاسل ر. ن. أ التي سبق بناؤها على قالب د. ن. أ الفيروس نفسه فإن

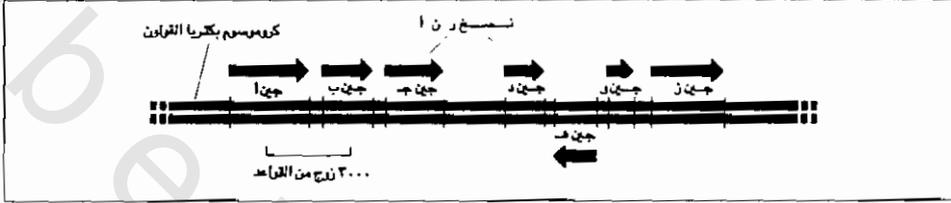
بعضاً من ر. ن. أ سينجذب إلى مناطق دن. أ المكملة في إحدى السلسلتين فقط ويكون حلزون مزدوج كما في الشكل (٥-٦).



الشكل (٥-٦): استخدام هجين د. ن. أ / ر. ن. أ لبيان التكامل في تتابع القواعد من جزئ ر. ن. أ. واحد سلسلتى د. ن. أ القالب. يبين الجانب الأيسر من الشكل التخطيطى تكوين جزئ هجينى بين جزئ ر. ن. أ. وأحد السلسلتين للقالب. ويبين الجانب الأيمن لماذا يمسح 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 المبنى حيويًا فى الخلية سيتجه إلى تكوين هجين مع إحدى السلسلتين من د. ن. أ للفيروس 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 واحد بالنسبة لجين معين. وبصفة عامة فإن إحدى السلسلتين من د. ن. أ في الكائنات غير مميزة النواة تستخدم كقالب لمجموعة من الجينات في حين قد تستخدم السلسلة الأخرى كقالب لنسخ عدد آخر من الجينات كما في الشكل (٦-٦).



الشكل (٦-٦): منطقة قصيرة من كروموسوم بكتيري تبين عملية نسخ عدة جزيئات من ر. ن. أ على قالب د. ن. أ المحتوى على عدة جينات متجاورة

ويتم ذلك الاختيار بتوجيه من منطقة تتابع المستبدئ Promoter الموجودة على سلسلة د. ن. أ التي تؤدي إلى ارتباط إنزيم بلمرة ر. ن. أ بالسلسلة القالب الصحيحة لجين معين كما سيأتي بعد.

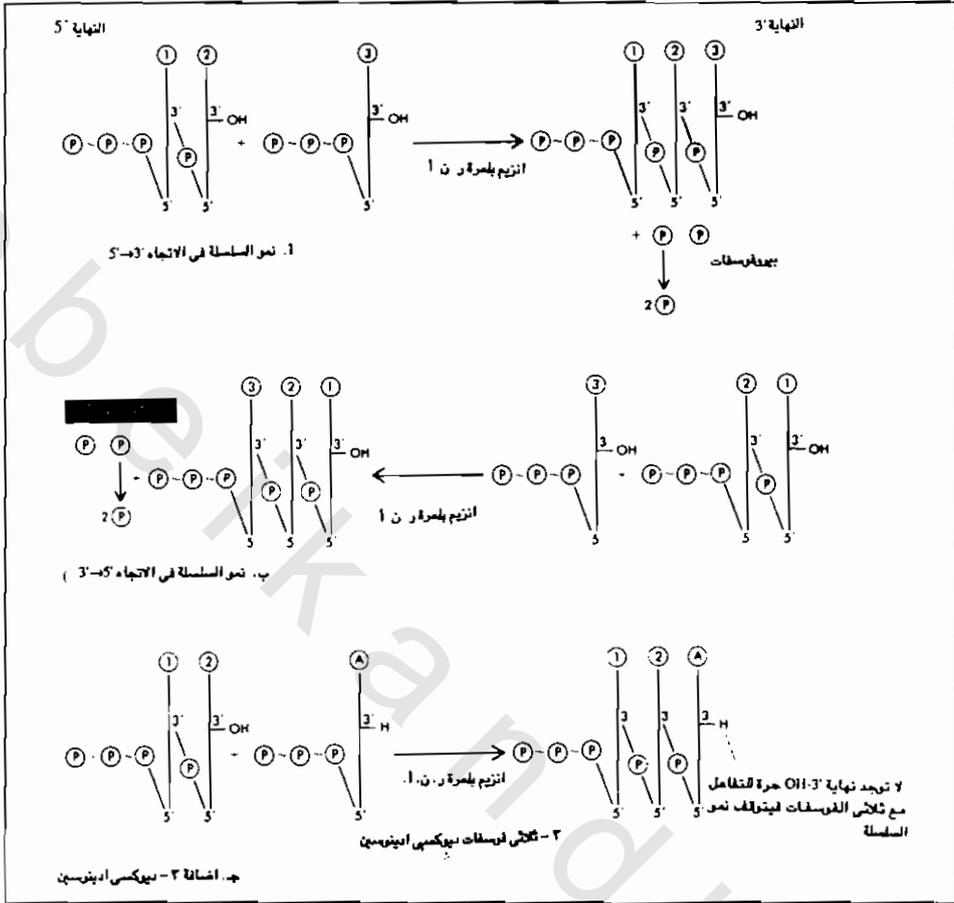
إتجاه البناء في جزئ ر. ن. أ:

إن اتجاه البناء في جزئ ر. ن. أ يتحدد (كما في د. ن. أ) باتجاه ارتباط السكر الريبوزي بالفوسفات في الهيكل الأساسي للجزئ فإذا انتهت السلسلة بذرة كربون رقم 5' فيطلق عليها النهاية 5' في حين يطلق على النهاية المحتوية على الذرة رقم 3' النهاية 3'.

هناك احتمالان فقط لاتجاه البناء في ر. ن. أ. أما في الاتجاه 3'→5' أو 5'→3' فإذا كان النمو في الاتجاه 3'→5' فإنه من المتوقع أن تكون النيوكلييدة الأولى في السلسلة محتوية على مجموعة ثلاثية من الفوسفات P - P - P ولكن

إذا كانت السلسلة ستنمو فى الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ فإنه من المتوقع أن تكون النيوكلييدة التى تنتهى بها السلسلة هى المحتوية على مجموعة فوسفات ثلاثية P - P - P.

تبين أن الاحتمال الأول هو الصحيح حيث وجد أنه فى السلاسل الحديثة البناء تكون أحدث نيوكلييدة مضافة للنهاية النامية عند النهاية $3'$ فى حين تكون مجاميع الفوسفات الثلاثية P - P - P مرتبطة بالنيوكلييدة التى ابتداء بها بناء السلسلة. كما أمكن البرهنة على الاتجاه البنائى $3' \rightarrow 5'$ باستخدام المثبط الأيضى Deoxyadenosine $3'$ وهو مشابه لقاعدة الأدينين ولكن مع عدم وجود ذرة الأوكسجين على ذرة الكربون $3'$ والتى تشارك فى تكوين أحد الروابط الهيدروجينية بين القواعد. عند اضافة هذا المثبط إلى الخلايا البكتيرية فإنه يتم أولاً فسفرته إلى P - P - P deoxyadenosine phosphate $3'$ ثم يتم ارتباطه بعد ذلك بالنهاية $3'$ النامية من السلسلة وحيث أنه لا يحتوى على مجموعة OH $3'$ فإنه لا يمكنه استقبال نيوكلييدات جديدة فتقف سلسلة ر. ن. أ عن النمو والاستطالة مما يؤكد أن البناء لابد أن يتم فى الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ فقط كما فى الشكل (٦-٧).

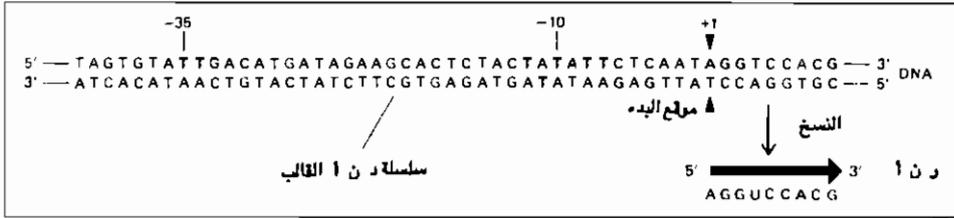


الشكل (٦-٧): رسم تخطيطي لأكتبات أن اتجاه النسخ هو 3' → 5' باستخدام 3- ثلاثي فوسفات ديوكسي أدينوسين

دور منطقة تتابع المستبدئ Promoter في بناء ر. ن. أ:

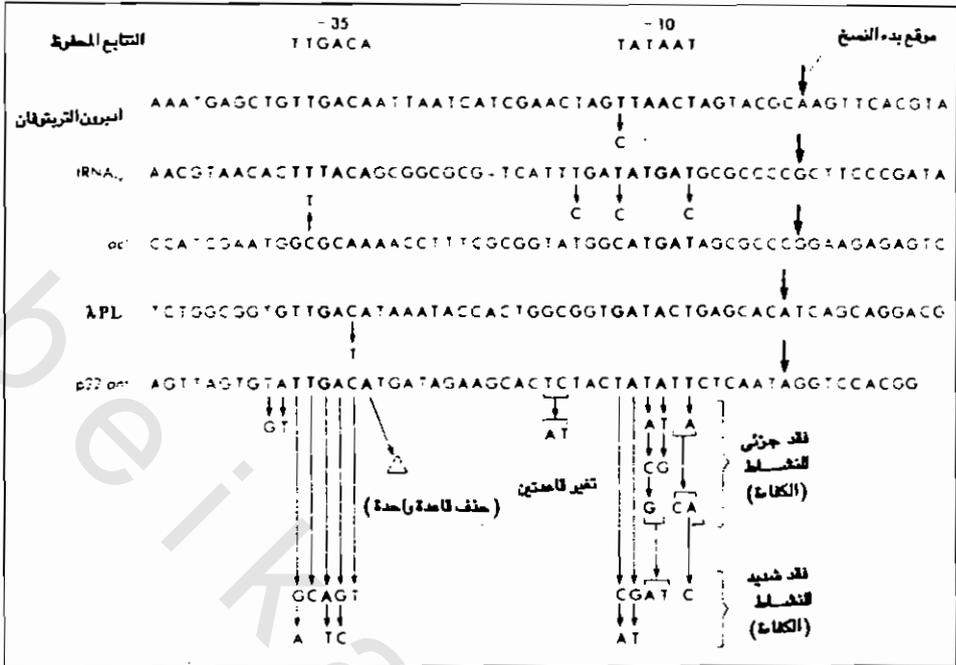
في حين انه لا يوجد أي دور بنائي للوحدة سيجما (σ) في إنزيم ر. ن. أ الكامل إلا أن لها وظيفة هامة جداً حيث تقوم بالتعرف على إشارات البدء على

طول جزئ د. ن. أ قالب. وقد أظهرت نتائج التجارب المعملية *In Vitro* أنه في 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 المركزي Core Enzyme بأماكن عشوائية على طول قالب د. ن. أ مما يعطى ر.ن. أ بتتابعات غير صحيحة وبالتالي نحصل على منتج غير فعال. ولكن وجود الوحدة σ مع بقية الوحدات فى الإنزيم يؤدي الى التعرف على الموقع الصحيح لبداية النسخ مما يدل على أن الإنزيم الكامل Holoenzyme لديه المقدرة على الارتباط نوعياً مع تتابع البدء على جزئ د. ن. أ الذى يعرف بمنطقة تتابع المستبدئ Promoter. تتكون هذه المنطقة فى بكتريا القولون من حوالى ٥٠-٦٠ نيوكليتيده ويرتبط بها إنزيم بلمرة ر. ن. أ فى منطقة تمتد حوالى ٤٠ قاعدة قبل بدء النسخ Upstream إلى حوالى ٢٠ قاعدة بعد بدء النسخ Downstream. تبين أن هناك تتابعات نوعية محفوظة فى منطقة تتابع الابتداء هذا ويطلق عليها التتابع الكشاف المحفوظ Consensus Sequence، لايد أن يتعرف عليها إنزيم بلمرة ر.ن.أ وهى تتكون من تتابعين طول كل منهما ٦ نيوكليتيديات وتقعان قبل موقع بدء النسخ بحيث يفصل بينهما حوالى ١٧ نيوكليتيده من التتابعات غير المحددة من د.ن.أ كما فى الشكل (٦-٨).



الشكل (٦-٨): منطقة تتابع البروموتور على سلسلة د. ن. أ القالب التي يتعرف عليها إنزيم بلمرة ر. ن. أ لبدء النسخ لسلسلة ر. ن. أ. تتكون منطقة البروموتور من تتابعين قصيرين على بعد حوالي -٣٥ إلى -١٠ نيوكليديده من نقطة بدء نسخ سلسلة ر. ن. أ. وتحدد هذه التتابعات موقع ارتباط إنزيم بلمرة ر. ن. أ. وتكون هذه التتابعات مع موقع البدء منطقة البروموتور. ويؤدي حدوث طفرات في أي من هذه التتابعين المحفوظين إلى توقف نشاط البروموتور في حين لا يتأثر هذا النشاط إذا حدثت التغيرات في أي تتابعات أخرى

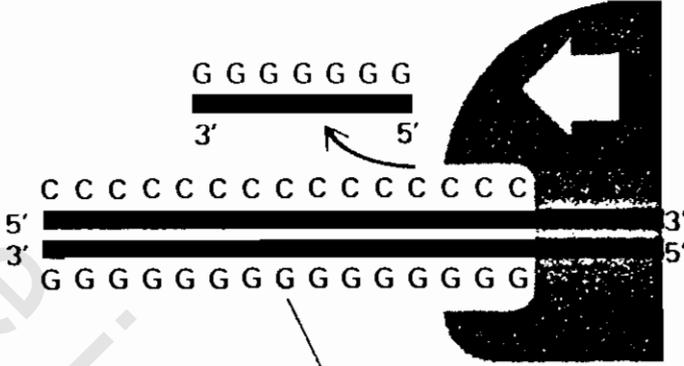
يبدأ التتابع السداسي الأول عند موقع النيوكليديده رقم -٣٥ قبل بدء النسخ وتتكون غالباً من التتابع (TTGACA) في حين يقع التتابع السداسي الثاني عند النيوكليديده رقم -١٠ قبل بدء النسخ وتتكون من التتابع (TATATT). وجد أنه لا بد أن يرتبط إنزيم البلمرة ر. ن. أ بهذين الموقعين قبل أن تبدأ عملية النسخ الفعلية عند نيوكليده البدء في الموقع رقم +١ على سلسلة د. ن. أ القالب. وقد تبين أن أي تغيير (طفور) في أي من هذين التتابعين السداسيين يؤدي إلى توقف نشاط البروموتور وبالتالي توقف بدء النسخ بإنزيم بلمرة ر. ن. أ في حين لا تتأثر عملية النسخ كثيراً إذا حدث تغير في التتابعات الأخرى في منطقة الابتدء Promoter كما في الشكل (٦-٩).



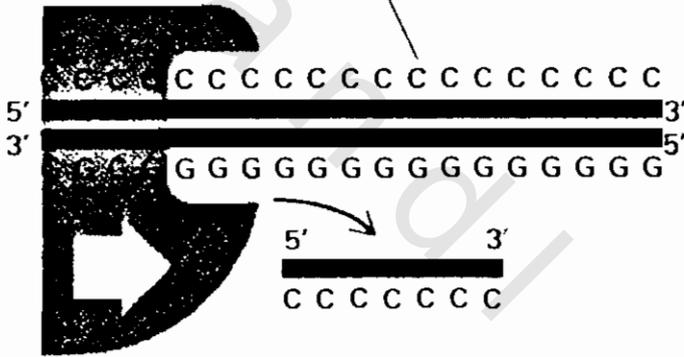
الشكل (٦-٩): مواقع الطفرات التي تؤدي إلى خفض أو توقف نشاط البروموتور في عملية بدء النسخ (الأسهم إلى أسفل) أو زيادة النشاط (الأسهم إلى أعلى) في خمس بروتوتورز مختلفة. كما يظهر تتابع القواعد في سلاسل ر.ن. أ.

وكما سبق القول، يتم اختيار السلسلة القالب بتوجيه من تتابع المسبدي Promoter حيث تؤدي حقيقة أن البناء يتم في الاتجاه 3'→5' إلى أنه يلزم على إنزيم بلمرة ر.ن. أ أن يتجه إلى السلسلة التي يكون فيها تتابع المسبدي الحرج Consensus Sequence في الاتجاه الصحيح (Forward and Upstream) مما يسمح بارتباط قوى بينه وبين الانزيم كما في الشكل (٦-١٠).

تحرك إنزيم بلمرة ر ن أ من اليمين إلى اليسار
يؤدي إلى تكوين سلسلة ر.ن.أ. باستخدام
السلسلة العليا لجزئ د ن أ كقالب



الحلزون المزدوج لجزئ د ن أ



تحرك إنزيم بلمرة ر ن أ من اليسار إلى اليمين
يؤدي إلى إنتاج سلسلة ر ن أ باستخدام
السلسلة السفلى لجزئ د ن أ كقالب

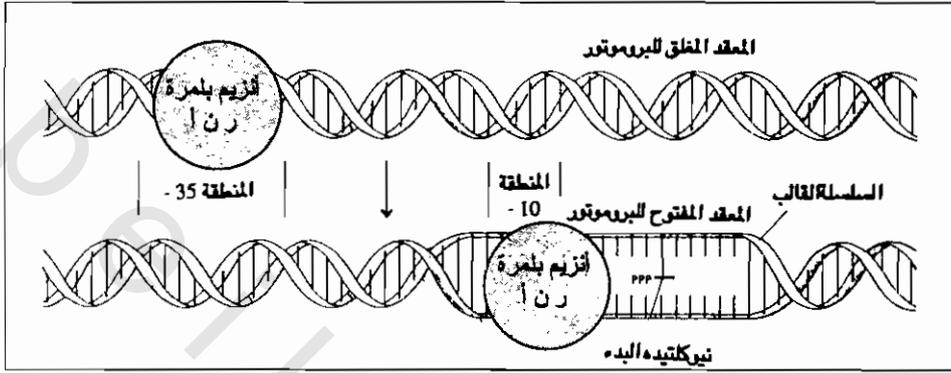
الشكل (٦-١٠): أهمية اتجاه تتابع القواعد في البروموتور في اختيار سلسلة د. ن. أ القالب الصحيح
لنسخ سلسلة ر. ن. أ بواسطة إنزيم بلمرة ر. ن. أ.

تأثير ارتباط إنزيم البلمرة مع تتابع المستبدئ Promoter فى فك حلزنة د.ن. أو بدء عملية النسخ:

تبين فى بكتيريا القولون أن إنزيم بلمرة ر.ن. أ يرتبط بمنطقة تتابع المستبدئ Promoter فى خطوتين محددتين: حيث يبحث أولاً عن منطقة الابتدء ويرتبط بها ارتباطاً مبدئياً ضعيفاً فى المعقد المقفول (Closed) أى قبل فك الحلزون المزدوج لجزئ د.ن. أ ويحدث هذا التعرف المبدئى غالباً فى المنطقة (-35) حيث تبين أن الطفرات التى تمنع الارتباط مع تتابع المستبدئ 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 المستبدئ Promoter. فى هذه المرحلة من التحول يتم فك حلزنة حوالى 17 زوج من القواعد وتتكون ما يسمى فقاعة التناسخ Transcription Bubble بدءاً من منطقة (-10) مما يجعل السلسلة المفردة للقالب معرضة ومكشوفة لفعل إنزيم بلمرة ر.ن. أ لاستخدامها كقالب لتوجيه تتابع نسخ القواعد فى سلسلة ر.ن. أ النامية.

تبين أن المنطقة (-10) تكون عادة غنية فى أزواج القواعد AT ومعروف أنها تكون أسهل فى الأنفكاك بالدنترة عن الأزواج GC. وقد تبين أن الطفرات التى تمنع تكوين المعقد المفتوح تقع فى نفس هذه المنطقة إذ تحدث هذه الطفرات تغير فى تتابع المنطقة (-10) ولكنها تحافظ على محتواها من أزواج القواعد AT مما يشير إلى أن هذه المنطقة تأخذ شكلاً مميزاً ونوعياً بحيث يتعرف عليها إنزيم البلمرة بالإضافة إلى كونها سهلة الأنصهار. يؤدى فك الحلزنة الجزئى فى حلزون د.ن. أ عند تكوين المعقد المفتوح إلى امتداد منطقة

د. ن. أ التي تلامس إنزيم بلمرة ر. ن. أ بحيث تشمل النيوكليوتيدات التي تلى منطقة (-١٠) التي كانت سابقاً على الجانب الآخر من حلزون د. ن. أ بالنسبة لجهة الارتباط كما فى الشكل (٦-١١).



الشكل (٦-١١): ارتباط إنزيم بلمرة ر. ن. أ بالمعدن المقفول والمفتوح للبروموتور
يبين الشكل منطقة تلامس الإنزيم بالبروموتور عند بداية الارتباط (المعدن المقفول) وبعد انفصال سلسلتى د. ن. أ للسماح ببدء نمو سلسلة ر. ن. أ (المعدن المفتوح) تبدو مواقع التلامس داكنة اللون

يلى ذلك تحرك إنزيم بلمرة ر. ن. أ خطوة خطوة على قالب د. ن. أ (الخطوة = إضافة ريبونيوكلتييدة واحدة) مع استمرار الانفكاك الجزئى للحلزون أمام الإنزيم حتى يمكن أن تستمر عملية النسخ. وبذلك تنمو السلسلة بمعدل نيوكلييدة فى كل خطوة فى الاتجاه $3' \rightarrow 5'$. وبمجرد بدء استطالة سلسلة ر. ن. أ تنفصل الوحدة سيجما σ من المعقد الإنزيمى وتصبح حرة للارتباط بإنزيم مركزى آخر Corezyme. وقد يفسر ذلك على أساس إما أنها قد أدت دورها فى التعرف على منطقة تتابع المستبدى Promoter عند نقطة بدء النسخ وبذلك لم يعد لها دور تقوم به أو أن استمرار وجودها فى المعقد الإنزيمى الكامل قد يؤدي إلى استمرار الارتباط القوى بين الإنزيم الكامل وبين ألى Promoter مما يحول دون سهولة حركة الإنزيم على القالب لبدء رحلة البلمرة

في حين يكون هذا الارتباط ضعيف في غياب الوحدة σ مما يتيح للإنزيم حرية الحركة في اتجاه استطالة سلسلة ر.ن.أ.

وعلى العكس من ذلك، وجد أن الارتباط بين الإنزيم الكامل و Holoenzyme وبين مناطق د.ن.أ غير المحتوية على تتابع المستبدئ Promoter يكون ضعيفاً جداً مما يسمح بتحريك الإنزيم على القالب بسرعة بحثاً عن منطقة المستبدئ. أى أن دور الوحدة سيجما في هذه الحالة هو تثبيط الارتباط غير النوعي بين د.ن.أ القالب وبين الأنزيم.

ظهر حديثاً أنه إلى جانب الوحدة سيجما الرئيسية ($\sigma 70$) المسؤولة عن التعرف على مناطق المستبدئ Promoter الرئيسية في جينوم بكتريا القولون توجد وحدات نوعية أخرى من الوحدة سيجما مثل ($\sigma 28, \sigma 32, \sigma 38, \sigma 54$) تكون متخصصة في التعرف على نوعيات خاصة من تتابع المستبدئ غير العادية والتي تمثل نقطة بدء النسخ لأنواع غير عادية من ر.ن.أ مسؤولة عن إنتاج بروتينات متخصصة تحتاجها الخلية تحت الظروف غير العادية مثل ظروف الإجهاد البيئي.

الكفاءة النسبية لتتابعات المستبدئ Promoters:

تبين وجود فروق كبيرة في فعالية ونشاط المستبدئ 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 تتابعات المستبدئ المختلفة Promoter ما بين مرة واحدة كل عشرة دقائق أو أكثر إلى بدء الارتباط مرة كل

ثانية أو ثابيتين فقط. تعد هذه احدى وسائل 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 منظم regulated. يتم تنظيم النسخ فى بكتريا القولون عن طريق بعض البروتينات النوعية التى يودى ارتباطها بجزئ د.ن.أ بالقرب من أو داخل المستبدئ promoter إلى زيادة أو انخفاض فى معدل البناء لإنزيم بلمرة ر.ن.أ. وتشمل هذه البروتينات المنظمة المثبطات repressors والتى تقوم بإيقاف أو منع الارتباط بين إنزيم بلمرة ر.ن.أ مع تتابع المستبدئ وبالتالي توقف عملية النسخ. كما تشمل المنشطات Activators التى ترتبط بإنزيم بلمرة ر.ن.أ وتحفز نشاطه. وجد أن المستبدئ Promter الذى يحتاج إلى منشطات لكى يعمل بكفاءة أكبر يكون فيه التتابع المحفوظ consensus sequence فى النقطة (-35) 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 كمنشط المستبدئ معين فى حين قد يقوم هذا البروتين نفسه بدور المنشط لمستبدئ آخر والعكس صحيح، ويتوقف ذلك على الموقع الدقيق لنقطة ارتباطه.

نيوكلتيدات بدء بناء سلسلة ر.ن.أ:

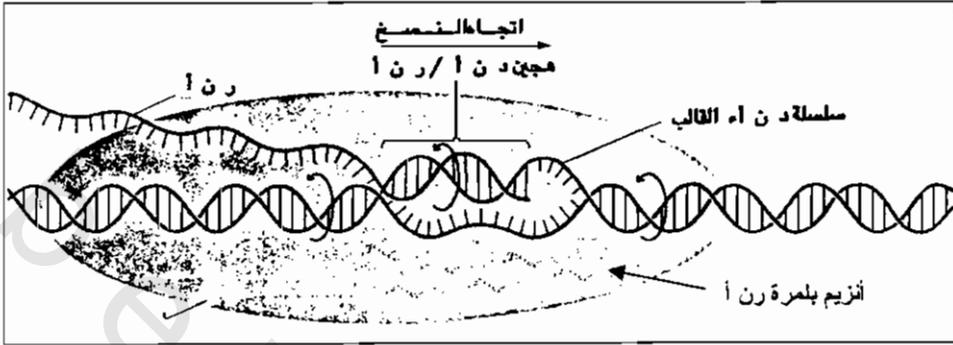
إن بدء النسخ الحقيقي يحدث عادة عند حافة المنطقة التي يرتبط فيها إنزيم بلمرة ر.ن.أ ب قالب د.ن.أ ذو السلسلة المفردة وعلى بعد حوالي ١٣ إلى ١٣ قاعدة من بداية منطقة (-١٠) وبذلك يبدو أن مركز النشاط لهذا الإنزيم يقع في النهاية البعيدة له في اتجاه بناء ر.ن.أ. وقد وجد أن أول نيوكلتيده يتم اضافتها في سلسلة ر.ن.أ حديثة البناء تكون عادة إما ثلاثي فوسفات الأدينين أو ثلاثي فوسفات الجوانين. وفي بعض الأحيان قد تبدأ بثلاثي فوسفات السيتوسين (PPPC). وفي أحيان نادرة قد تكون قاعدة البدء ثلاثي فوسفات اليوراسيل (PPPU). ولكن قد يحدث إزالة لهذه القاعدة الأولى في المراحل التالية من نضج السلسلة وذلك بفعل إنزيمات التحليل المائي للأحماض النووية Nucleases في 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 في عملية النسخ على القالب لبناء سلسلة ر.ن.أ واستطالته وذلك لكي تصبح نيوكلتيدات القالب معرضة للنسخ. تبدأ نقطة النمو والاستطالة لسلسلة ر.ن.أ بمنطقة مكونة من هجين ر.ن.أ / د.ن.أ بطول حوالي ١٢ قاعدة والتي تنفك عندما تترك سلسلة ر.ن.أ السلسلة القالب وتعود سلسلتى حلزون د.ن.أ إلى التحلزن مرة أخرى حول بعضهما البعض في حلزون مزدوج كما في الشكل (٦-١٢).

إلا أن المنطقة من د.ن.أ التي 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 المستبدئ Promoter.

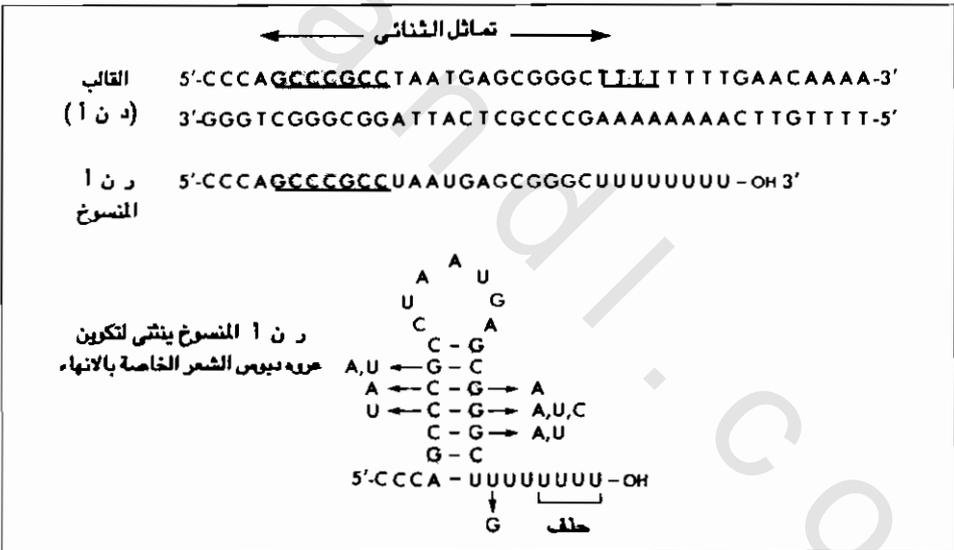


الشكل (٦-١٢): نموذج لمعقد الاستطالة المكون من إنزيم بلمرة ر.ن.أ و د.ن.أ القالب وسلسلة ر.ن.أ النامية. يدل اتجاه الاسهم على الدوران الذى يجب أن يحدث فى جزئ د.ن.أ لتنفك الحلزونة كلما تعرضت السلسلة القالب للإنزيم ولتكوين هجين مؤقت من د.ن.أ و ر.ن.أ ولكى تتحلزن سلاسل د.ن.أ مرة أخرى عندما تنحدر سلسلة ر.ن.أ.

دور اشارات الإنهاء أو التوقف فى إنهاء النسخ:

توجد إشارات فى جزئ د.ن.أ البكتيرى تسمى الموقوفات أو مواقع الإنهاء Terminators والتي تكون وظيفتها وقف بناء ر.ن.أ عند نقطة محددة على قالب د.ن.أ. فعند موقع الانهاء يتوقف إنزيم بلمرة ر.ن.أ عن إضافة نيوكلييدات جديدة إلى سلسلة ر.ن.أ وتنفك السلسلة عنه ويترك الإنزيم د.ن.أ القالب لى يبدأ دوره جديدة من النسخ. وفى 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 في منطقة الايقاف في سلسلة د.ن. أ القالب تتكون من تتابع ثنائي تماثل Dyad Symmetry في د. ن. أ على مسافة ١٥ إلى ٢٠ نيوكليتيده قبل نهاية منطقة نسخ ر.ن. أ يليه تتابع من ٦ قواعد أدينين A في سلسلة د. ن. أ القالب والتي يتم نسخها إلى ست قواعد من اليوراسيل U عند نهاية سلسلة ر. ن. أ كما في الشكل (٦-١٣) يتوقف إنزيم بلمرة ر. ن. أ عن اضافة أى نيوكلييدات جديدة عندما يتم نسخ منطقة الايقاف هذه حيث يتكون بسرعة حلزون بتركيب دبوس الشعر Hairpin في هذه المنطقة مما يؤدي 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 ويبين الشكل (٦-١٤) دور كل من إنزيم بلمرة ر. ن. أ وعامل سيجما σ وعامل ρ و Rho في بناء ر. ن. أ.



الشكل (٦-١٣): تتابع منطقة انتهاء النسخ المستقلة عن العامل ρ وتركيب سلسلة ر.ن.أ التي توقف نموها. الطفرات التي تحتها خط تؤدي إلى منع جزئي أو كلي لعملية الايقاف

