4

الفصل الرابع

استنساخ الجين

راهب ينسخ مخطوطة: مؤلف معجزات نوتردام في مكتبه مستخدماً سكينة رسم و ريشة (مكتبة صور ماري أيفان/لندن)

مقدمة

ان عمليـــة تخليـــق الـــ RNA مـــن الـــ DNA القالـــب تـــدعى بالاستنســـاخ transcription،وهي مفهومة بشكل أفضل في الكائنات بدائية النواة. ولو ان تنظيم تخليق الـ RNA في خلايا اللبائن هو مختلف عنه في بدائيـة النـواة، ولكن عملية تخليق الـ RNA في

بدائية النواة سوف يكون قابل للتطبيق على حقيقية النواة حتى ولو كانت الإنزيمات والإشارات المنظمة للعملية مختلفة.

ان تسلسل الـ ribonucleotides في جزيئة الـ RNA هو مكمل لتسلسل الـ deoxyribonucleotides في شريط واحد في حلزون الـ DNA المزدوج. يكون الـ RNA مماثلاً في تسلسله لأحد شريطي الـ DNA باستثناء وجود اليوراسيل بدلاً عن الثايمين، والذي يدعى بالشريط المشفر coding strand. بينما يكون مكملاً للشريط الآخر، والذي يوفر القالب template لتخليقه.

إن الإنزيم الأساسي المسؤول عن عملية الاستنساخ هو RNA polymerase . ان إنزيم DNA dependent RNA polymerase أو ما يعرف بـ RNA polymerase هو إنزيم مسؤول عن بلمرة الـ ribonucleotides إلى تسلسل مكمل للشريط المشفر في الجين (شكل 1.4). يرتبط الإنزيم بمناطق متخصصة تعرف بالبروموتر promoter ، والواقعة على الشريط المشفر.يتبع هذا ببدء تخليق الـ RNA عند نقطة بدء الاستنساخ transcription starting point ، وتستمر العملية حتى يتم الوصول إلى تسلسل الانتهاء termination sequence . تعرف وحدة الاستنساخ transcription unit بأنها المنطقة التي تمتد بين البروموتر promoter والمنهي terminator. ان الـ RNA الناتج، والذي يخلق بالاتجاه من 5′ إلى 3′ يدعى بالمنتج الأولي primary transcript . وفي الكائنات بدائية النواة، فان هذا المنتج الأولي يمثل ناتج عدة جينات، بينما في خلايا اللبائن، فانه يمثل عادة ناتج جين مفرد.

من الـ DNAإلى الـ RNA

ان الاستنساخ transcription والترجمة translation، هما وسائل تستطيع من خلالهما الخلية أن تعبر عن المحتوى الوراثي لجيناتها. ولان العديد من نسخ الـ RNA النموذجية يمكن لها أن تصنع من نفس الجين، ولأن جزيئة الـ RNA يمكن لها أن توجّه تخليق العديد من جزيئات البروتين المماثلة، لذا يمكن للخلايا أن تخلّق كميات كبيرة من البروتينات بسرعة عند الضرورة. ولكن كل جين يمكن له أيضا أن يستنسخ ويترجم بكفاءة مختلفة مانحاً الخلية القدرة على صنع كميات كبيرة من بعض البروتينات وكميات قليلة من بروتينات أخرى. وعلاوة على ذلك، وكما سنرى ذلك لاحقا، يمكن للخلية أن تغيّر (أو تنظم) كل من جيناتها حسب الحاجة – ويتم ذلك بالأعم الأغلب من خلال التحكم بإنتاج الـ RNA التابع لها (أنظر الفصل السادس).

ان الخطوة الأولى التي تتخذها الخلية هو نسخ مكان محدد من الـ DNA– الجين – إلى تسلسل من RNA. ولو ان المعلومات في الـ DNA، تستنسخ إلى شكل كيمياوي آخر(RNA)، ولكنها ما تزال مكتوبة أساسا بنفس اللغة التي كانت عليها – وهي لغة التسلسل النيوكليوتيدي. ومن هنا سمّيت هذه العملية بالاستنساخ.

وكما هو عليه الحال في الـ DNA، فان الـ RNA هو بوليمر خطّي يكون من أربعة أنواع مختلفة من النيوكليوتيدات المرتبطة مع بعضها البعض بأواصر فوسفات ثنائية الأستر phosphodiester bonds . يختلف الـ RNA عن الـ DNA بأربعة فروقات أساسية: 1) إن النيوكليوتيدات في الـ RNA هي ribonucleotides – هذا يعني بأنها تحتوي على سكر رايبوز ribose (ومن هنا جائت تسميتها بالـ ribonucleic acid) بدلا من deoxyribose ، 2) ولو ان الـ RNA، كما هو الحال في الـ DNA ، يحتوي على القواعد A و G و C ولكنه يحتوي على اليوراسيل U بدلا من الثايمين T الموجود في الـ DNA. 3) وعلى الرغم من هذه الاختلافات الصغيرة، يختلف كل من الـ DNA والـ RNA عن بعضهما بشكل مثير تماماً في تركيبهما العام. فبينما يتواجد الـ DNA في الخلايا بصورة حلزون مزدوج، يتواجد الـ RNA بصورة مفردة الشريط. ولهذا تنطوي سلاسل الـ RNA إلى أشكال متعددة، كما سنرى ذلك لاحقا. 4) بما أن جزيئة الـ RNA هي مفردة الشريط ومكملة لشريط واحد فقط من شريطي الجين، فليس من الضرورة أن يكون محتوى الكوانين يساوي محتوى السايتوسين، ولا محتوى الأدنين يساوي محتوى اليوراسيل. وهنا يبرز لنا سؤالين مهمين، أولهما: لماذا يحتوي الـ RNA على يوراسيل بدلاً عن الثايمين بدلاً عن الثايمين بينما تكون الحالة معاكسة في الـ DNA؟ والسؤال الثاني هو: لماذا تكون الـ DNA منقوص الأوكسجين في الموقع ′2 والـ RNA غير منقوص الأوكسجين في نفس هذا الموقع؟ لإجابة السؤال الأول راجع الفصل السابع، أما إجابة السؤال الثاني فهي ربما يمكن إجمالها بسببين: الأول يستخدم هذا الموقع كواسم طبيعي قد وفرته الخلية لكل الإنزيمات الخلوية التي تتداخل مع هذه الأحماض النووية، وهذا يعطي بالتالي وظائف خلوية مختلفة ومتخصصة لكل من هذين الحمضين النوويين. أما السبب الثاني من وجود ذرة الأوكسجين الإضافية هذه في الـ RNA يعمل على زيادة تفاعليتها (reactivity) وفي نفس الوقت الإقلال من استقرارها مقارنة بجزيئة الـ DNA (لاحظ إذا وضعت جزية الـ RNA في درجة حرارة الغرفة لفترة قصيرة قد يؤدي ذلك إلى تحللها الذاتي autolysis، بينما لا تحدث مثل هذه الظاهرة في جزيئة الـ DNA إذا ما وضعت في نفس الظروف). ولهذا السبب، وكمقارنة بالـ RNA، يعد الـ DNA أكثر ملائمةً لكي يعمل كمستودع للمعلومات الوراثية على المدى الطويل.

تخلق كل أشكال الـ RNA في الخلية بواسطة استنساخ الـ DNA، وهي عملية تمتلك مشتركات عديدة مع عملية تضاعف الـ DNA. يبدأ الاستنساخ بفتح التفاف unwinding جزء صغير في حلزون الـ DNA المزدوج لكي يكشف القواعد النتروجينية

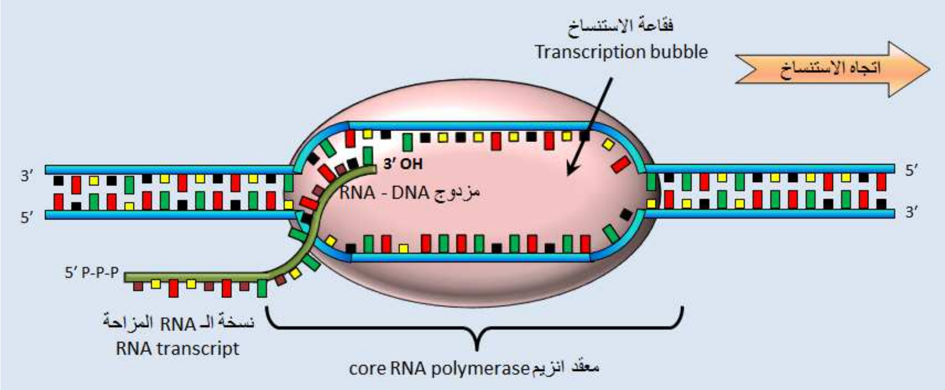
في كل شريط DNA. وكما هو الحال في عملية تضاعف الـ DNA، يتحدد التسلسل النيوكليوتيدي في سلسلة الـ RNA من قبل الازدواج القاعدي حسب قاعدة Watson – Crick بين النيوكليوتيدات القادمة وقالب الـ DNA. وعندما تكون النيوكليوتيدة القادمة مناسبة للنيوكليوتيدة القالب، فإنها ترتبط تساهميا بسلسلة الـ RNA النامية وذلك بواسطة تفاعل محفز إنزيمياً يفقد به pyrophosphate عند إضافة كل نيوكليوتيدة. وبهذا تكون السلسلة النامية مكملة تماماً لشريط الـ DNA المستخدم كقالب.

يختلف الاستنساخ، على أية حالٍ، عن عملية تضاعف الـ DNA بعدة طرق مهمة. وبشكل مغاير عن شريط الـ DNA المتكون حديثاً، لا يبقى شريط الـ RNA مرتبط هيدروجينياً بشريط الـ DNA القالب. ولكن بدلاً من ذلك، وخلف المنطقة التي تضاف بعدها النيوكليوتيدات ، تزال سلسلة الـ RNA وتستبدل بحلزون الـ DNA المزدوج. وهكذا، تتحرر جزيئات الـ RNA المنتجة من قبل الاستنساخ من الـ DNA القالب بصورة أشرطة مفردة (شكل 1.4)، بالإضافة إلى ذلك، ولأن جزيئات الـ RNA تستنسخ من منطقة محدودة من الـ DNA، تكون جزيئات الـ RNA أصغر بكثير من جزيئات الـ DNA. ان جزيئة الـ DNA في كروموسوم اللبائن من الممكن أن تكون أكثر من عدة ملايين نيوكليوتيدة طولاً، وبالتناقض، فان معظم جزيئات الـ RNA ليست في طولها أكثر من عدة الآلاف من النيوكليوتيدات، والعديد منها أقصر بشكل ملحوظ.

إن العديد من جزيئات الـ RNA من الممكن أن تصنع من نفس الجين بوقت قصير، حيث يبدأ تخليق جزيئات RNA إضافية قبل أن يكتمل تخليق أول جزيئة RNA. عندما تتبع إنزيمات RNA polymerase بجد أعقاب بعضها البعض بهذه الطريقة، فان كل منها يتحرك بسرعة كبيرة، وفي النتيجة، تخلّق الآلاف النسخ من جين مفرد في وقت قصير كما سنرى ذلك لاحقاً.

على الرغم من كون إنزيم RNA polymerase يحفز أساسا نفس التفاعل الكيمياوي الذي يحفزه إنزيم DNA polymerase، حيث يحفز كلا الإنزيمان تفاعل البلمرة من الاتجاه ′5 إلى ′3، لكن هنالك بعض الاختلافات بين الإنزيمين. أولاً، وبشكل أكثر وضوحاً، يحفز إنزيم RNA polymerase بلمرة الـ ribonucleotides، وليس الـ deoxyribonucleotides. ثانياً، وبشكل مغاير لإنزيم DNA polymerase الداخل في عملية تضاعف الـ DNA، يمكن لإنزيم RNA polymerase أن يبتدأ بلمرة سلسلة الـ RNA بدون باديء. وبدلاً من ذلك، يبدأ إنزيم الـ RNA polymerase الاستنساخ آنياً *de novo*عند نقاط محددة في بداية الجين (البروموتر). يمكن أن يوجد مثل هذا الاختلاف لأن الاستنساخ لا يتصف بالدقة التي يتصف بها التضاعف. وخلافاً للـ DNA، ففي الاستنساخ لا تخزن المعلومات الوراثية في الخلايا، ولهذا، يخطأ إنزيم RNA polymerase بمعدل

خطأ واحد لكل عشرة الآلاف نيوكليوتيدة مستنسخة إلى الـ RNA (مقارنة بالخطأ الذي يرتكبه إنزيم DNA polymerase بمعدل نيوكليوتيدة واحدة لكل عشرة ملايين نيوكليوتيدة)، ويتّضح من هذا ان الخطأ الحاصل في عملية الاستنساخ هو أقل أهمية من ذلك الحاصل أثناء عملية التضاعف.



شكل (1.4): إزالة سلسلة الـ RNA المتولدة حديثاً بحلزون الـ DNA المزدوج. تزال نسخة الـ RNA الحديثة بعد تولدها خلف بصيلة الاستنساخ (transcription bubble).يشير اللون الأخضر للنويكليوسيدات ثلاثية الفوسفات الغيرمنقوصة الأوكسجين الى الكوانين والأصفر للسايتوسين والأحمر للأدنين والبنفسجي لليوراسيل (تصميم المؤلف).

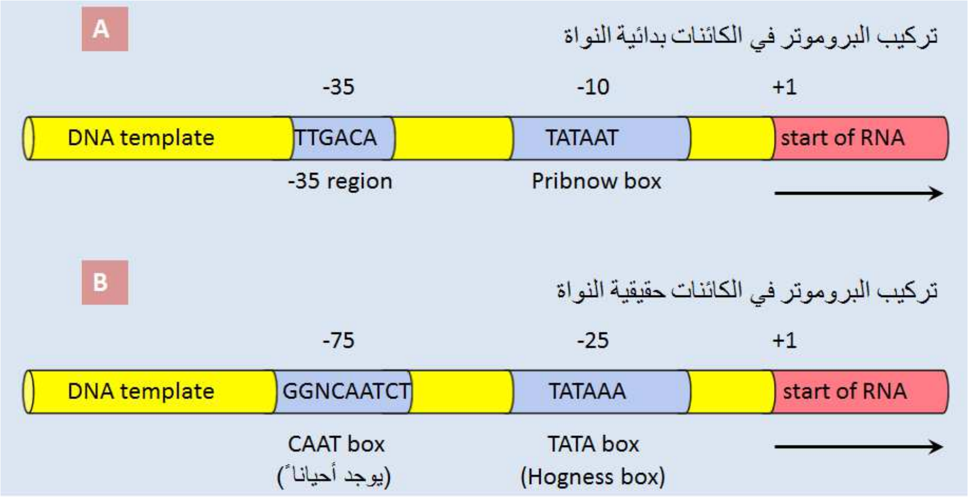
البروموتر the promoter

إن البروموتر هو تسلسل قصير، ومتميز، يقع فقط قبل (upstream) نقطة بداية الاستنساخ، ويكون ضروري لعملية الاستنساخ. ويبلغ من الأهمية بمكان بحيث ان استبدال قاعدة مفردة بصندوق TATA (وهو من أهم تسلسلات البروموتر في حقيقية النواة) يعمل كطفرات قوية قاتلة. ان منطقة البروموتر تحتوي على المعلومة التي تخبر إنزيم RNA polymerase متى يبدأ، وكم مرة يصنع سلسلة الـ RNA ، وكيف يرتبط بعناية.

1. في بدائية النواة:

إن البروموتر المثالي في بدائية النواة ذو مكونين: المكون الأول يتألف من تسلسل سداسي hexamere الواقع في المكان 35- قبل نقطة بداية الاستنساخ (إن الإشارة السالبة تدل على المناطق الواقعة قبل نقطة بدأ الاستنساخ upstream of the transcription start point، حيث كلما اقتربت التسلسلات من هذه النقطة كلما قل الرقم الذي تحملها وصولاً إلى نقطة الصفر أي إلى نقطة بداية الاستنساخ transcription start point،

وهذا يعني أن الموقع 10- هو أقرب إلى نقطة بداية التضاعف من الموقع 35-). والمكون الثاني هو تسلسل سداسي آخر يقع 10- قبل نقطة بداية الاستنساخ (شكل 2.4).



شكل (2.4): مناطق البروموتر الضرورية لبد الاستنساخ في كلا A بدائية النواة و B حقيقية النواة. يبين هذا الشكل التسلسلات المتفق عليها consensus sequences. ترقم أول نيوكليوتيدة تستنسخ بالرقم 1+. أما النيوكليوتيدة المجاورة على الجانب ′5 منها فترقم بالرقم 1-.يشير الخط الأخضر الى تخليق شريط الـ RNA (تصميم المؤلف).

إن وظيفة التسلسل الواقع 35- هو لكي يوفر الإشارة والتي تمكن إنزيم RNA polymerase من تمييز تسلسل البروموتر، لذا تدعى هذه المنطقة بمقاطعة التمييز recognition domain . أما وظيفة التسلسل 10- أو الذي يعرف أيضاً بـ Pribnow box نسبة إلى مكتشفه فتتضح من خلال ملاحظة انفتاح unwinding شريط الـ DNA عند هذا الموقع وذلك عند وصول إنزيم RNA polymerase إليه، لذا تدعى هذه المنطقة بمقاطعة فتح الشريط unwinding domain. يتألف الموقع 10- حصراً من الأزواج القاعدية A=T والتي تساعد على صهر الـ DNA المزدوج إلى شريطين مفردين، حيث أن الطاقة الضرورية لتحطيم الازدواج القاعدي A=T تكون واطئة مقارنة بطاقة تحطيم الازدواج القاعدي CG ≡ ، إذن، إن ازدواج A=T يحتاج إلى الحد الأدنى من الطاقة لتحطيمه.

2. في حقيقية النواة:

أما تسلسلات البروموتر في الخلايا حقيقية النواة، فإنها أكبر، وأكثر تعقيدا، ومتنوعة أكثر مقارنة بتلك الموجودة في بدائية النواة. تحتوي جينات حقيقية النواة على مواقع بروموتر تدعى بالـ TATA box أو بالـ Hogness box ذو التسلسل TATAAA المتفق عليه والذي يتمركز بالموقع ‎-25 أي الموقع الذي يقع على بعد 25 زوج قاعدي قبل نقطة بداية الاستنساخ (شكل 2.4). تحتوي مواقع البروموتر في حقيقية النواة كذلك على CAAT box ذو التسلسل المتفق عليه GGNCAATCT والذي يتمركز بالموقع ‎-75.

مما يزيد من تعقيد مواقع البروموتر في الكائنات حقيقية النواة هو وجود تركيب أخر يدعى بالمسرّع enhancer. يحتوي DNA الفقريات على العناصر المسرّعة enhancers ، والتي تنشّط البروموتر، حيث تزداد فعالية الأخير بشكل هائل بوجود الـ enhancer والذي يزيد من تركيز عوامل الاستنساخ بالقرب من البروموتر. تتواجد المسرّعات enhancers عند كلا الموقعين: قبل upstream وبعد downstream نقطة بداية الاستنساخ، ولها تأثير كبير على الاستنساخ يصل إلى بعد 10 كيلو زوج قاعدي (الكيلو زوج = ألف زوج) بعيدا عن البروموتر، أي لـ enhancer القدرة على تشغيل مسافات بعيدة من الـ DNA.

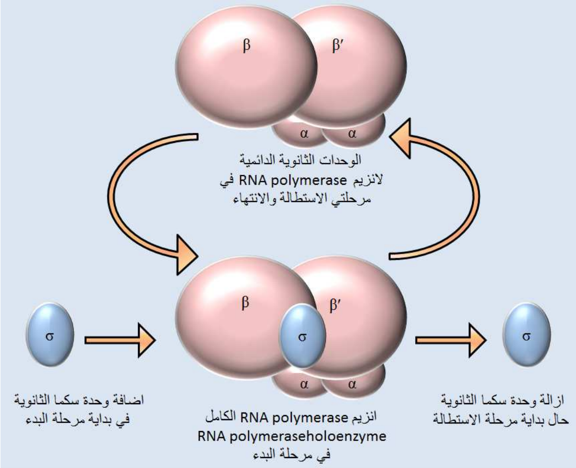
إن الفرق بين الـ enhancer والـ promoter هو ليس بالآلية mode of action ، وإنما الفرق هو تشغيلي operational ، حيث يستطيع الـ enhancer أن يحفّز الاستنساخ لمسافات ضخمة، بينما لا يستطيع الـ promoter أن يحفّز إلا المسافات القريبة منه وبشكل فوري. كما تمتاز المسرعات بقدرتها على تحفيز استنساخ الجين في كلا الاتجاهين، أي سواء كان وقعها قبل الجين upstream أو بعد الجين downstream، حيث تم إثبات ذلك مختبرياً، فعندما أزيلت المسرعات ووضعت باتجاه معاكس لاتجاهها التي كانت عليه، لوحظ بأنها تعمل بنفس الكفاءة. ومن الملاحظ عدم امتلاك البروموتر لهذه الخواص الفريدة، فليس له القدرة على تحفيز استنساخ الجين إلا إذا كان واقعاً قبله (upstream only). لكن توصف الـ enhancers بأنها مشوشة (موجودة في كل مكان) promiscuous ، وذلك لأنها بالإضافة إلى وظيفتها الرئيسية عبر تحفيز مناطق بعيدة جدا عنها، فإنها تستطيع أن تحفز الـ promoter حتى في المناطق المجاورة. إن آلية عمل العديد من المسرعات هي غير معروفة، ولكن يقترح البعض بأن ارتباط البروتينات المنشطة (activator proteins) للاستنساخ بالمسرعات يسبب بتكوين عروة إلى الخارج (looping out) بين المسرع من جهة والبروموتر من جهة أخرى، وهذا هو الذي يجلبهما معاً ليصبحا قريبين جداً من بعضهما البعض، وبهذا تستطيع البروتينات المنشطة للاستنساخ من التداخل بشكل مباشر مع جهاز الاستنساخ الواقع على البروموتر.

ومما زاد تعقيد عملية التنظيم الجيني في الكائنات حقيقية النواة، هو احتوائها (كما في اللبائن) على عناصر تدعى بالمسكتات silencers، والتي تعمل عكس عمل المسرعات تماماً، وهي تتشابه مع المسرعات في كونها تعمل بشكل مستقل عن الموقع وعن الاتجاه.

إنزيم الـ RNA polymerase:

1. في بدائية النواة:

ان إنزيم RNA polymerase في بكتريا القولون يحفّز على تصنيع كل أنواع الـ RNA، والتي تشمل: mRNA وهو مختصر لـ messenger RNA، وtRNA وهو مختصر لـ transfer RNA، وrRNA وهو مختصر لـ ribosomal RNA، يستثنى من ذلك الباديء RNA primer والذي يرتبط عند النهاية 5′ لقطع أوكازاكي حيث انه يصنع بواسطة نوع مختلف من إنزيمات RNA polymerases يطلق عليه RNA primase (راجع الفصل الثالث). لا يوجد هنالك أنواع متعددة من إنزيمات RNA polymerases على غرار إنزيمات DNA polymerases وإنما هنالك نوعية واحدة من هذا الإنزيم تضطلع بتصنيع أنواع الـ RNA الثلاثة. يتألف إنزيم بوليمريز الرنا الكامل RNA polymerase holoenzyme من خمسة وحدات ثانوية. إن كل من وحدتي β و β' هما وحدتان كبيرتان جدا. أما وحدتي α فهما وحدتان متماثلتان. ويطلق على الوحدات التي تؤلف الإنزيم الصميمي core enzyme بالوحدات الدائمة permanent subunits والتي يحتاجها الإنزيم ولا يستغني عنها في كل مراحل الاستنساخ الثلاثة (مرحلة البدء والإطالة والنهاية)، وهذا يختلف بالنسبة للعامل σ حيث يحتاجه الإنزيم في مرحلة البدء فقط (شكل 3.4).



شكل 3.4: مكونات إنزيم RNA polymerase في بكتريا القولون. يحفز إنزيم RNA polymerase بلمرة النيوكليوتيدات إلى تسلسل الـ RNA المكمل للشريط القالب في الجين. يتألف إنزيم RNA polymerase في بكتريا القولون من المعقد الصميمي core complex والذي يتألف بدوره من الوحدتين الثانويتين β و β′. يتألف الإنزيم الكامل holoenzyme من وحدة σ الثانوية المرتبطة بالصميم β $\alpha 2$(تصميم المؤلف).

على الرغم من عدم التوصل إلى معرفة الدور الدقيق للعديد من وحدات الإنزيم الصميمي، ولكن وبشكل أساسي يمكن القول بأن:

1- وحدة بيتا برايم β' subunit : ذات الشحنة الموجبة (positively charged)، وهي عبارة عن متعدد ببتيدي polypeptide يعتقد بأنه يدخل في الارتباط الحاصل مع الـ DNA.

2- وحدة بيتا β subunit : هو موقع الارتباط بالعديد من مثبطات الاستنساخ transcription inhibitors، و يعتقد بأنه يحتوي على أغلب أو كل المواقع الفعالة active sites لتكوين آصرة الفوسفات ثنائية الأسترphosphodiester bond ، ولها القابلية على تكوين ارتباط عرضي مع الـ DNA.ان كل من وحدتي βوβ' يؤلفان مركز الحفز catalytic center، والذي يأخذ على عاتقه انشطار شريطي الـ DNA.

3- وحدتي ألفا α subunit: تكون ضرورية لإعادة تركيب الإنزيم من وحدات منفصلة، أي أنها ضرورية لتحمي الإنزيم الصميمي core enzyme . ومن المقترح بأن هذه الوحدة تلعب دورا في تمييز البروموتر promoter، وذلك لأنه عندما يخمج العاثي T4 خلايا بكتريا القولون، فان وحدةα تتحور منقبل العاثي، ان هذا التحوير يؤدي إلى اختزال ألفة إنزيم بكتريا القولون في تمييز الـ promoter. وبهذه الطريقة، خدع العاثي T4 بكتريا القولون، (فبدلا ً من أن يرتبط ببروموتر بكتريا القولون بإنزيم RNA polymerase البكتيري ليخلق من الجينات البكتيرية، فانه ارتبط بإنزيم T4 RNA polymerase وخلّق الجينات الفايروسية). وبالإضافة إلى ذلك، تمثل وحدة α الثانوية موقعا ً للاتصال بعدد من عوامل الاستنساخ transcription factors الضرورية لحدوث عملية الاستنساخ.

4- أما وحدة سكما σ subunit : لكي نتعرف على وظيفة هذه الوحدة لابد من معرفة ماذا يحدث عند غيابها. يتميز الإنزيم الصميمي الغير حاوي على وحدة سكما بإمكانيته الكاملة على تحفيز بلمرة النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات إلى الـ RNA، وهذا يعني بان الإنزيم لا يحتاج هذه الوحدة في تفاعلاته الحفزية catalytic activity الأساسية. ولكن من المثير للاهتمام هو انه على الرغم من قدرة الإنزيم الصميمي على الارتباط بالـ DNA ، إلا ان هذا الارتباط غير متخصص، أي ليس للإنزيم القدرة على تمييز التسلسلات المتخصصة التي يبدأ عندها الاستنساخ. تم معرفة ذلك عندما أزيلت وحدة سكما الثانوية من إنزيم RNA polymerase ، حيث لوحظ بأن هذا الإنزيم يرتبط بشكل غير متخصص بتسلسلات الـ DNA وبألفة واطئة low affinity. ولهذا السبب، يعد عامل سكما ضروري لتشخيص المناطق الصحيحة لبدء الاستنساخ، وهي مناطق الـ promoter التي يعجز الإنزيم الصميمي عن تشخيصها. فعند ارتباط وحدة سكما الثانوية بالإنزيم الصميمي فإنها تعمل على توجيه الإنزيم الصميمي إلى البروموتر، وذلك بواسطة الارتباط بشكل متخصص بتسلسلات البروموتر 10- و 35-، وهذا يؤدي إلى بدء عملية الاستنساخ عند بداية الجين.

هنالك أكثر من صنف من عامل سكما، كل منها يتخصص لنوع مختلف من البروموتر. وتظهر التغييرات في عامل سكما في بعض الحالات. وعلى سبيل المثال، خلال تغيير نمط الحياة (مثلا زيادة درجات الحرارة)، حيث أن بكتريا القولون لا تعاني من تغييرات مثيرة، ولكنها بدلا من ذلك، تستخدم فقط عوامل سكما بديلة لكي تستجيب للتغيرات البيئية العامة. ومن الملاحظ هو طريقة تسمية عوامل سكما، حيث أنها تسمى أما بواسطة الوزن الجزيئي MW ، أو تسمى باسم الجين الذي ينتجها). إن عامل سكما من نوع $\sigma 70$ هو المسؤول عن استنساخ معظم الجينات في الظروف الاعتيادية. ان عوامل سكما البديلة هي $\sigma 32$ و $\sigma 54$ و σE وغيرها، والتي يتم تنشيطها لكي تستجب للتغييرات البيئية المختلفة. نلاحظ عند زيادة درجات الحرارة (الصدمة الحرارية heat shock) يقف تصنيع البروتينات الاعتيادية، وفي نفس الوقت، تصنّع مجموعة جديدة من البروتينات وتنتج من جينات يطلق عليها بجينات الصدمة الحرارية heat shock proteins، حيث إنها تلعب دوراً مهماً في حماية الخلية من الضغط البيئي. ان الجين *rpo* H هو عبارة عن منظم مفيد في الاستجابة للصدمة الحرارية. ان ناتج هذا الجين هو العامل $\sigma 32$ والذي يعمل كعامل سكما بديل، والذي يسبب استنساخ جينات الصدمة الحرارية بزيادة كمية $\sigma 32$عندما تزداد الحرارة، وتقل فعاليته عندما ينعكس التغيير الحراري الحادث. ان الإشارة الأساسية التي تحت إنتاج العامل $\sigma 32$ هو تراكم البروتينات الممسوخة جزئيا partially denatured proteins وهي البروتينات الناتجة عن زيادة الحرارة. يمتاز بروتين العامل $\sigma 32$ بأنه غير ثابت unstable ، ان هذا يسمح بنقصان أو زيادة كميته بسرعة. ان العاملين $\sigma 70$ و $\sigma 32$ من المكن أن يتنافسان على الإنزيم الصميمي الموجود في كل الحالات.

وبهذا، فان مجموعة الجينات المستخدمة خلال الصدمة الحرارية تعتمد على التوازن الحادث بينهما. وهنالك مجموعة أخرى من الجينات المنظمة للحرارة، والتي تنظم بواسطة العامل σE والذي يستجيب لزيادات حرارية أكبر من العامل $\sigma 32$، والذي ينتج عن تراكم البروتينات الممسوخة جزئيا والموجودة في الفراغ ما بين البلازمي periplasmic space والغشاء الخارجي outer membrane . وقليل هي المعلومات المتوفرة عن هذا العامل وعن الجينات التي تنظمه.هنالك عامل سكما آخر ينتج تحت ظروف التجويع النتروجيني nitrogen starvation . تحتوي خلايا بكتريا القولون على كمية صغيرة من العامل $\sigma 54$ والذي يتنشط عندما تغيب الأمونيا عن الوسط الزرعي، وفي هذه الظروف تسمح الجينات بالانتفاع من مصادر النتروجين البديلة. هنالك حالة أخرى من الحفاظ التطوري لعوامل سكما ممثلة بالعامل σF والذي يوجد بكميات قليلة ويسبب قيام إنزيم RNA polymerase باستنساخ الجينات التي تدخل في الانسمام الكيمياوي chemotaxis والتركيب السوطي.

2. في حقيقية النواة:

في الكائنات حقيقية النواة، تبدو المسألة أكثر تعقيدا، حيث يوجد أصنافاً ثلاثة هنالك بالإضافة إلى إنزيم RNA polymerase التابع للمايتوكوندريا، وهذه الأصناف هي كالآتي:

1- إنزيم RNA polymerase I والذي يقوم باستنساخ معظم أنواع الـ rRNA
2- إنزيم RNA polymerase II والذي يقوم باستنساخ mRNA
3- إنزيم RNA polymerase III والتي تكون وظيفته الرئيسية هي استنساخ الـtRNA.

وضحت خواص إنزيمات RNA polymerases في اللبائن بالجدول (1.4). كل من تلك الإنزيمات تكون مسؤولة عن استنساخ مجموعة مختلفة من الجينات (أنظر أعلاه). إن تلك الإنزيمات أكثر تعقيداً بكثير من إنزيمات بوليمريز الرنا الموجودة في بدائية النواة. حيث تمتلك كلها وحدتين ثانويتين كبيرتين وعدداً من الوحدات الأصغر (توجد 14 وحدة ثانوية صغيرة على سبيل المثال في إنزيم RNA polymerase II). وهنالك سم ببتيدي peptide toxin تم استخلاصه من العرهون *Amanita phalloides* (شكل 4.4)، حيث تعتبر مادة الـ amanitin مثبط تفريقي لإنزيمات الـ RNA polymerases الموجودة في حقيقية النواة وبهذا تعتبر أداة بحثية ذات أهمية كبيرة في التفريق بينها.

شكل (4.4). عرهون *Amanitaphalloides* الذي تستخلص منه سم الـ amanitin والذي يستخدم للتفريق بين انزيمات الـ RNA polymerase الرئيسية الثلاث في حقيقية النواة (تصميم المؤلف).

اعتبر إنزيم RNA polymerase II الإنزيم الأكثر حساسية لمادة الـ amanitin التي تمنع انتقال الإنزيم خلال عملية الاستنساخ.

جدول (1.4): تسمية وخواص إنزيمات RNA polymerases الموجودة في أنوية اللبائن (المؤلف).

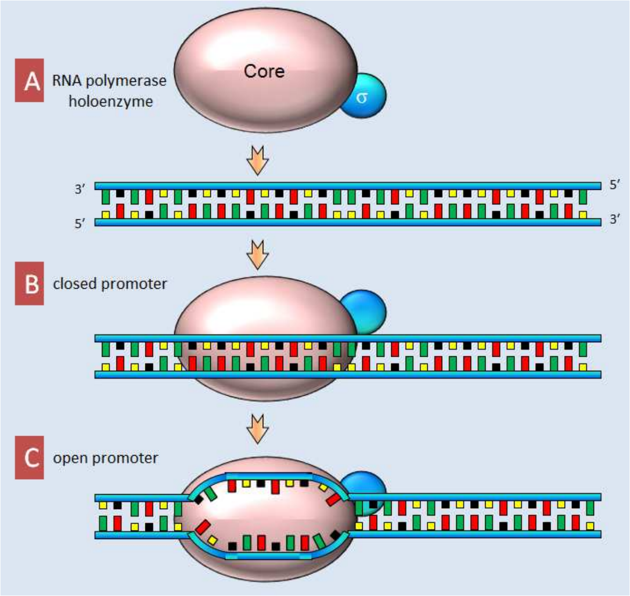
نوع الـ RNA polymerase	الحساسية للـ α amanitin	النواتج الرئيسية
I	غير حساس	rRNA
II	حساس بشكل عال	mRNA
III	حساس بشكل متوسط	tRNA/5S rRNA

وصف عملية الاستنساخ

لتسهيل دراسة عملية الاستنساخ تم تقسيمها إلى ثلاثة مراحل وكالآتي:

مرحلة البدء initiation stage

يبدأ الاستنساخ عندما يرتبط الإنزيم RNA polymerase مع عامل "سكما" لكي ينتج الإنزيم الكامل holoenzyme. يسمح عامل "سكما" لإنزيم RNA polymerase من أن يرتبط بشكل متخصص بتسلسل البروموتر للجين. إن عملية تخليق الـ RNA المبينة في الشكل (5.4) تتضمن ارتباط إنزيم RNA polymerase holoenzyme بالشريط القالب المشفر عند منطقة البروموتر. فعند ارتباط وحدة سكما الثانوية بالإنزيم الصميمي فإنها تعمل على توجيه الإنزيم الصميم إلى البروموتر، وذلك بواسطة الارتباط بشكل متخصص بتسلسلات البروموتر 10- و 35- وهذا يؤدي إلى بدء عملية الاستنساخ عند بداية الجين. يدعى الارتباط الأولي بين إنزيم RNA polymerase holoenzyme والبروموتر بمعقد البروموتر المقفل closed promoter complex بسبب عدم فتح التفاف الـ DNA. ثم يبدأ إنزيم RNA polymerase holoenzyme بفتح التفاف الحلزون المزدوج بمعدل 15 زوج قاعدي حول منطقة بداية الاستنساخ ليكون معقد البروموتر المفتوح open promoter complex ، ان انفتاح شريطي الحلزون المزدوج يوفر شريط DNA قالب لكي يعمل عليه إنزيم RNA polymerase في عملية الاستنساخ.

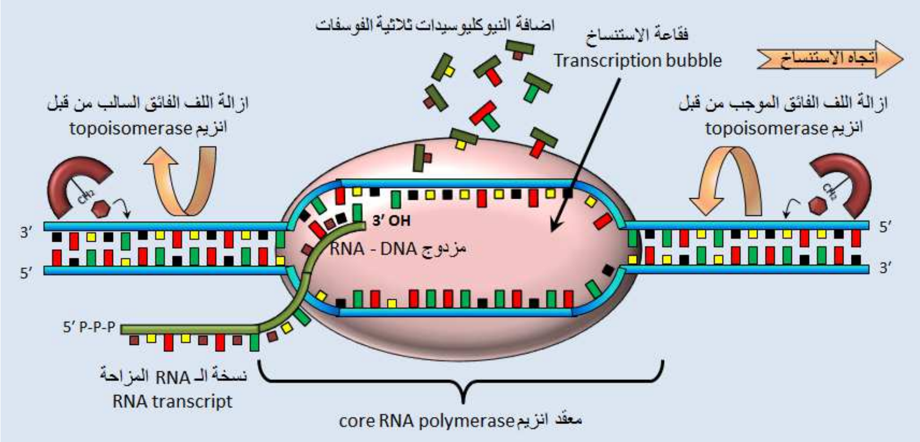


شكل (5.4)a و b و c: ارتباط إنزيم RNA polymerase زائدا عامل "سكما" بالـ DNA. تتكسر الأواصر الهيدروجينية التي تربط شريطي الـ DNA ويتكون معقد البرومتر استعداداً لتخليق الـ RNA (تصميم المؤلف) .

مرحلة الاستطالة elongation stage

تبدأ مرحلة الاستطالة عند تحرر عامل سكما. بعد إضافة أول نيوكليوسيدة ثلاثية الفوسفات (والتي تكون من نوع purine عادة)، يترك إنزيم RNA polymerase البروموتر ويتحرك إلى الأمام على طول شريط الـ DNA القالب ويستمر بإطالة سلسلة الـ RNA. وعند حركته، يفتح إنزيم RNA polymerase التفاف unwind الحلزون المزدوج أمامه ويسد التفاف rewind الحلزون المزدوج خلفه. بينما تقوم إنزيمات topoisomerases– وكما هو الحال في عملية التضاعف- بتخفيف اللف الفائق الموجب المتولد أمام فقاعة الاستنساخ، وبتخفيف اللف الفائق السالب المتولد خلف فقاعة الاستنساخ (شكل 6.4).

تتبلمر النيوكليوتيدات بتسلسل متخصص ملقن من قبل الشريط المشفر ويفسر من قبل قوانين Watson – Crick . تجهز الطاقة الضرورية لتخليق الـ RNA من قبل النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات ribonucleoside triphosphates، حيث تعتبر هي مصدر الطاقة وهي أحجار البناء building blocks بالإضافة إلى كونها تشكل المكونات المعلوماتية في سلسلة الـ RNA الناتج (تذكر إن هذا ما يحدث في حالة التضاعف، ما عدا كون النيوكليوتيدات منقوصة الأوكسجين dNTPs بدلاً من NTPs المضافة هنا). يتحرر الـ pyrophosphate من تفاعل البلمرة كما هو الحال في عملية تخليق الـ DNA. وفي خطوة الاستطالة، يستمر فتح unwinding الحلزون المزدوج حيث يتكون ما يعرف بفقاعة الاستنساخ transcription bubble بواقع 17 نيوكليوتيدة متحركة بالاتجاه من 5′ إلى 3′. قدر الباحثين معدل تخليق جزيئة الـ mRNA فوجدوا أنها تتخلق بسرعة 20 إلى 50 نيوكليوتيدة بالثانية، وبمعدل خطأ يقدر بنيوكليوتيدة واحدة لكل مئة ألف. إن معدل الخطأ هذا هو عالي نسبياً لما هو موجود في عملية التضاعف، ولكن "يمكن تحمّل" معدل الخطأ في تخليق جزيئة الـ mRNA بسبب: (1) إن معظم الجينات تستنسخ بشكل متكرر، وبهذا فان احتمالية أن نفس الخطأ سوف يتكرر هي احتمالية صغيرة. (2) هنالك بعض الشفرات الوراثية الفائضة عن الحاجة redundant genetic code والتي فيها تشفر أكثر من شفرة لنفس الحامض الأميني (صفة الانحلال أو التفسخ degeneracy في الشفرة الوراثية) فعلى الرغم من التغيير النيوكليوتيدي إلا أن الحامض الأميني الناتج قد لا يتغير، وحتى لو تغير، فغالباً ما يكون استبدال الأحماض الأمينية في سلسلة متعددة الببتيد لا تغير من الفعالية البايولوجية (أنظر الفصل السابع).

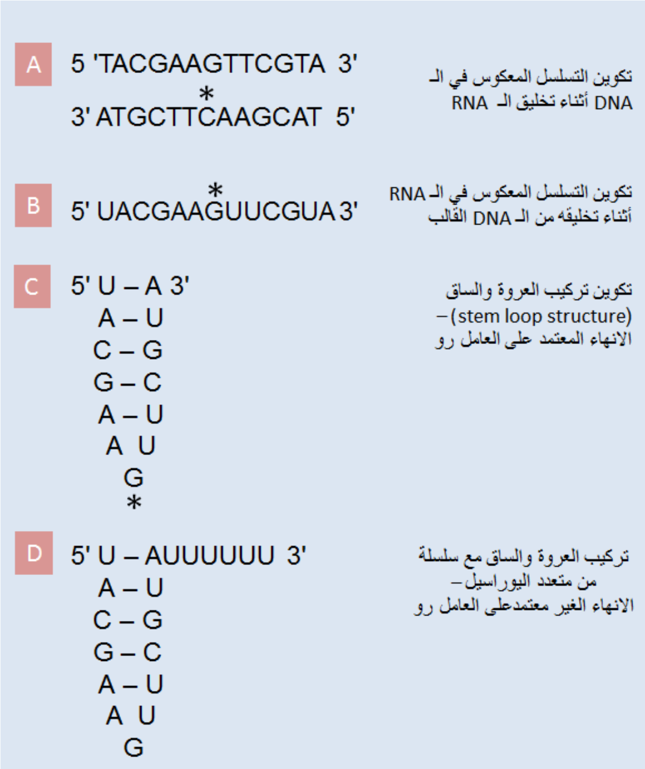


شكل (6.4) : ملخص لمرحلة الاستطالة elongation في عملية الاستنساخ، (تذكر بأن إنزيم RNA polymerase المشار إليه في الشكل هو الإنزيم الصميمي core enzyme وليس الإنزيم الكامل holoenzyme بسبب ازالة وحدة سكما حال بدء مرحلة الاستطالة) (تصميم المؤلف).

مرحلة الانتهاء termination stage

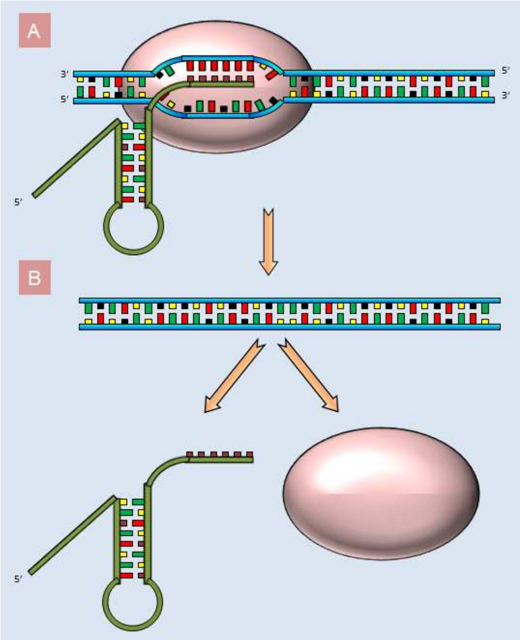
إن آخر مرحلة في تخليق الـ RNA هي مرحلة إنهاء نمو السلسلة. ينتهي تخليق الـ RNA وذلك بواسطة طريقتين مختلفتين واللذين سيرد ذكرهما في أدناه. إن مايعرف بتسلسلات الـ DNA المنهية أو بمنهيات الاستنساخ transcription terminators أما أن تكون معتمدة على العامل رو rho-dependent (ρ dependent) أو غير معتمدة على العامل "رو" rho-independent. وفي كلتا الحالتين، يتكون ما يعرف بتركيب العروة والساق stem-loop structure أو بتركيب دبوس الشعر hairpin loop structure. ينتهي تخليق الـ RNA بعد تكوين هذا التركيب بقليل. يتكون تركيب العروة والساق عند النهاية ´3 لجزيئة الـ RNA ، لأنه عند النهاية ´5 لشريط الـ DNA القالب يوجد تسلسل غير اعتيادي من النيوكليوتيدات. يعرف هذا التسلسل بالتكرار المعكوس inverted repeat. سميت هذه التكرارات بالمعكوسة لأنه إذا قرئت من الاتجاه ´5 إلى ´3 في كلا شريطي الـ DNA فانهما يعطيان نفس القراءة. تشير النجمة إلى أن ازدواج الكوانين بالسايتوسين G-C هو نقطة التناظر (شكل A7.4). وعندما يستنسخ الـ RNA من شريط الـ DNA القالب (ذو الاتجاه من ´3 إلى ´5)، يكون التسلسل الناتج هو تسلسل معكوس أيضاً (شكل B7.4). وهذا التناظر يؤدي الى أن تكون الجزيئة الناتجة (جزيئة الـ RNA) ذات تكامل ذاتي self-complementary حول نقطة التناظر *G (شكل C7.4). وبهذا، يمكن أن يتكون تركيب الدبوس، أو تركيب العروة والساق.وبسبب الالتفاف الحادث في قاع

تركيب العروة والساق، فان آخر ازدواج بين U – A سوف لا يتكون ، ولكن تتكون العروة رغماً عن ذلك.وفي الإنهاء الغير معتمد على العامل رو rho-independent termination ، يتبع شريط الـ DNA القالب بسلسلة من الأدنين. تنتج هذه السلسة دفقاً يتكون من نصف دزينة من مخلفات اليوراسيل في جزيئة الـ RNA (شكل D7.4).



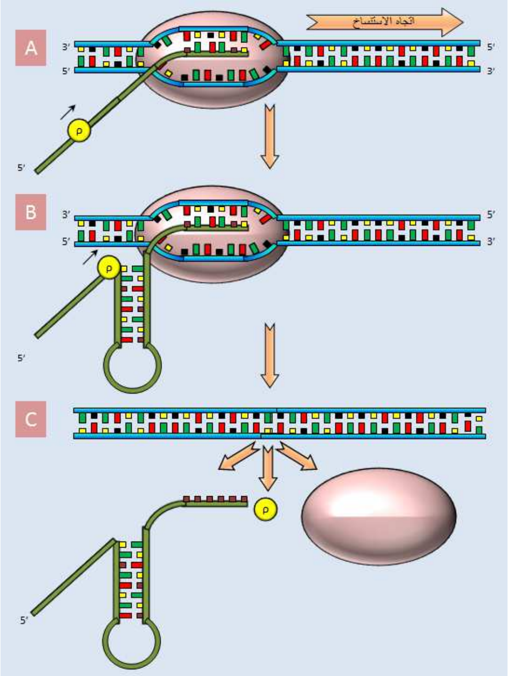
شكل (7.4): دورالتسلسلات المعكوسة في انهاء عملية تخليق الـ RNA (تصميم المؤلف).

عند النقطة التي يرتبط بها تسلسل متعدد اليوراسيل poly-U sequence بتسلسل الـ DNA يكون هجين DNA – RNA المتكون ضعيف بشكل غير اعتيادي (تكون روابط U – A ضعيفة) ، وتحتاج إلى طاقة قليلة جداً لكسر الأواصر الهيدروجينية الماسكة للشريطين مع بعضهما البعض. وعندها تحدث عملية الفصل ليتوقف تخليق الـ RNA. يكون هذا النوع من الإنهاء مستقل عن العامل "رو" ، حيث لا يحتاج هذا النوع من الإنهاء إلى أي عامل إنهاء (شكل 8.4).



شكل (8.4): عملية انتهاء تخليق الـ RNA المستقلة عن العامل "رو" . (a) يخلق إنزيم RNA polymerase متعدد اليوراسيل عند النهاية ´3 لسلسة الـ RNA. (b) ينسحب الـ RNA المخلق حديثاً والإنزيم عن الشريط القالب (تصميم المؤلف)

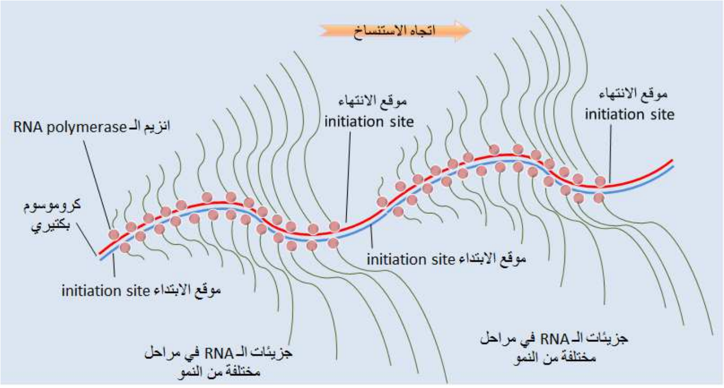
أما عملية الإنهاء المعتمدة على العامل "رو" (شكل 9.4) والتي هي أقل شيوعاً وأعقد من الانهاء الغير معتمد على العامل "رو"، فإنها تستخدم كذلك تكوين تركيب دبوس الشعر، ولكن انفكاك هجين DNA – RNA يحتاج إلى تعاون البروتين "رو" ، كما لا تتبع تكرارات متعدد اليوراسيل تركيب دبوس الشعر كما في الطريقة السابقة. يبدو أن العامل "رو" والذي يمتلك فعالية فتح التفاف الحلزون المزدوج (helicase activity) يربط نفسه بالـ RNA الذي ما زال قيد التشييد، ويحدث هذا الارتباط بعد تحرر العامل "سكما". يتحرك العامل "رو" على طول شريط الـ RNA وخلف إنزيم RNA polymerase (ويحتاج العامل "رو" في حركته هذه إلى التحلل المائي لـ ATP، والذي يوفر الطاقة اللازمة لحركة هذا العامل على طول شريط الـ RNA). إن تكوين هذا الدبوس يعيق إنزيم RNA polymerase عند العروة أو بعد تكوين العروة بقليل. تسمح هذه الإعاقة للعامل "رو" بأن يصل إلى الإنزيم. وعند وجود هذا العامل، وباستخدام فعالية الـ helicase التي يمتلكها فانه يفك ارتباط الـ RNA من الحلزون المزدوج وهكذا، يتسبب العامل "رو" بتحرر إنزيم RNA polymerase وجزيئة الـ RNA المخلقة حديثاً من الـ DNA القالب. وفي هذا النوع من الإنهاء يكون العامل "رو" ضروري بسبب عدم وجود تسلسل متعدد اليوراسيل.



شكل (9.4): عملية انتهاء تخليق الـ RNA المعتمدة على العامل "رو" . (a) يرتبط العامل "رو" بالـ RNA وهو ما زال في مرحلة التخليق. (b) يتوقف إنزيم RNA polymerase بعد تخليق الدبوس، سامحاً للعامل "رو" بأن يلتقطه. (c) بواسطة آلية معينة، يتسبب العامل "رو" بتحرر الـ RNA والإنزيم (تصميم المؤلف)

بعد انتهاء تخليق جزيئة الـ RNA ينفصل الإنزيم الصميمي عن شريط الـ DNA القالب، وبمساعدة عامل سكما آخر، يميز الإنزيم الصميمي البروموتر والذي تبدأ عنده تخليق جزيئة RNA جديدة.

ان أكثر من جزيئة RNA polymerase ربما تستنسخ نفس الشريط المشفر للجين بصورة متزامنة، ولكن العملية ذات أطوار زمنية وفراغات مكانية، بحيث في أية لحظة كل RNA polymerase يستنسخ جزء مختلف من تسلسل الـ DNA.فكلما يترك إنزيم RNA polymerase بروموتر يرتبط به إنزيم RNA polymerase آخر. إن هذا يعطي شكلا يشبه النصل (10.4).



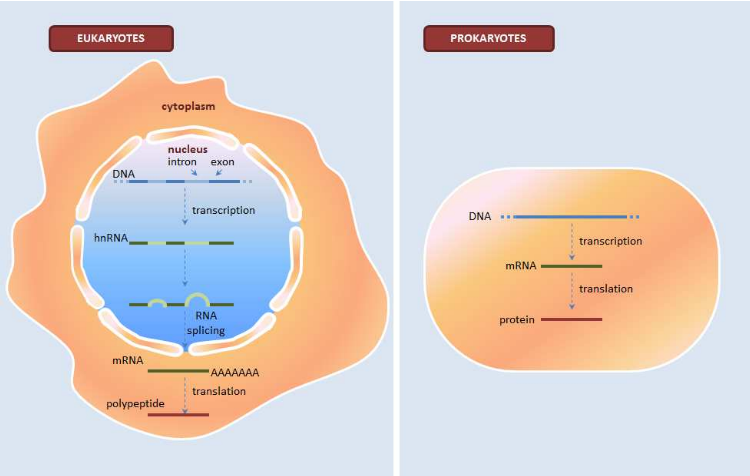
شكل (10.4):مخطط يوضح عدة نسخ من جينات rRNA البرمائيات وهي ما زالت في طور الاستنساخ. لاحظ ازدياد طول الشريط المستنسخ بزيادة تقدم إنزيم RNA polymerase على طول جينات الـ rRNA. يكون بإنزيم RNA polymerase الغير مبين هنا، عند قاعدة شريط الـ RNA المتولد حديثاً، وهكذا، فان النهاية القريبة للجين المستنسخ تكون بها جزيئات الـ RNA قصيرة، بينما ترتبط جزيئات الـ RNA الأكثر طولاً بالنهاية القاصية للجين. توضح الأسهم اتجاه عملية الاستنساخ والتي تتقدم من 5´ إلى 3´. ويبين يبين هذا الشكل ايضاً إمكانية تخليق الـ RNA بشكل متسلسل وبكميات كبيرة عند الحاجة (تصميم المؤلف).

عملية معالجة جزيئات الرناRNA processing

إن معظم جزيئات الـ RNA المخلقة حديثاً يجب أن تتحور بأساليب متغايرة لكي تتحول إلى أشكالها الوظيفية. ما عدا الـ mRNA البكتيري والذي يمثل استثناء لهذه القاعدة، حيث انه يستخدم فورا كقالب لتخليق البروتين بينما ما تزال عملية الاستنساخ جارية عليه. أما النسخ الأولية من tRNA و rRNA في خلايا الكائنات حقيقة وبدائية النواة يجب أن تعاني سلسلة من خطوات المعالجة (الطهي). إن النسخ الأولية لـ mRNA حقيقية النواة يعاني أيضا تحويرات مكثفة، والتي تتضمن إزالة الانترونات بواسطة عملية وصل الأطراف بالتراكب splicing. ثم تنتقل من النواة إلى السايتوبلازم لتعمل كقوالب لتخليق البروتين. وهنا سنركز على عمليات المعالجة الجارية في mRNA حقيقية النواة بدلا من tRNA و rRNA وذلك لكون جزيئة الـ mRNA هي التي تحمل المعلومات الوراثية الضرورية لترجمتها في عملية تخليق البروتين.

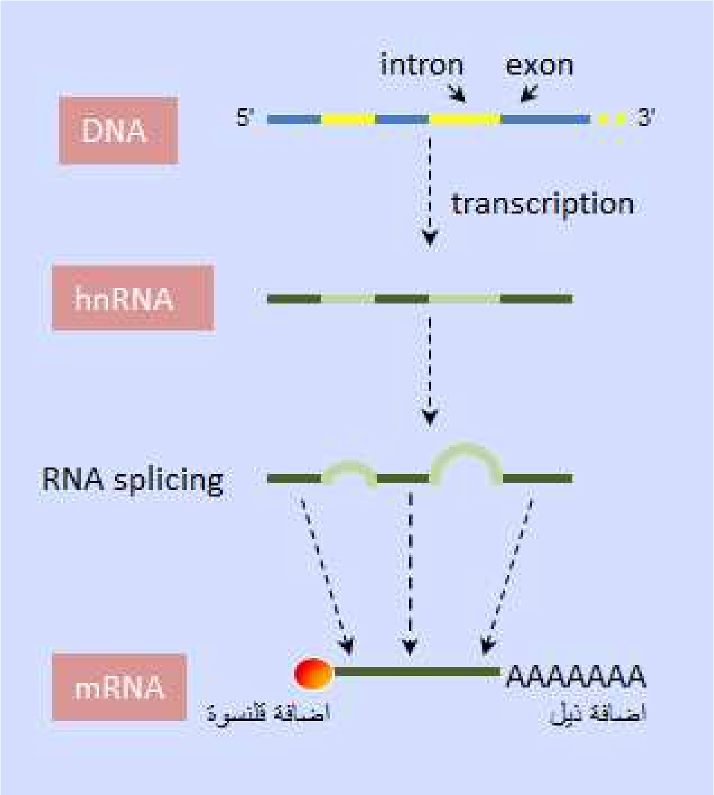
معالجة الرنا الرسول processing of messenger RNA (mRNA)

بالتناقض مع عمليات معالجة rRNA و tRNA ، فان معالجة mRNA يمثل فرقاً رئيسيا بين الخلايا حقيقية وبدائية النواة. ففي البكتريا، يمتلك الرايبوسوم القدرة في العمل على جزيئة الـ mRNA مباشرة، حيث تبدأ الترجمة على سلسلة الـ mRNA الناشئة في الوقت الذي ما زال فيه الاستنساخ يعمل على أجزاء أخرى من جزيئة الـ mRNA الغير مكتملة. وهكذا، تزدوج عمليتي الاستنساخ والترجمة معاً في آن واحد، (شكل 11.4).



شكل (11.4): ازدواج عملية الترجمة مع عملية الاستنساخ في بدائية النواة(يمين الشكل) وانفصالها في حقيقية النواة (يسار الشكل) (تصميم المؤلف)

وفي الكائنات حقيقية النواة، يجب أن تنتقل جزيئة الـ mRNA المخلقة في النواة إلى السايتوبلازم قبل أن يتم استخدامها كقالب لعملية تخليق البروتين. علاوة على ذلك، يتم تحوير منتجات الاستنساخ الأولية في الخلايا حقيقية النواة (pre-mRNA) بشكل مكثف قبل أن يتم تصديرها من النواة إلى السايتوبلازم (شكل 12.4).



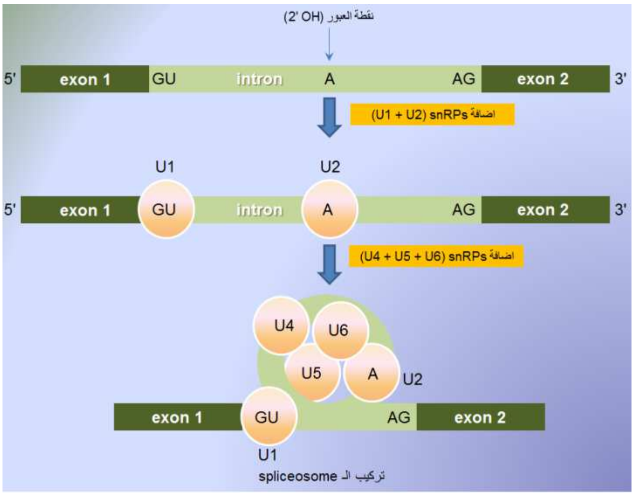
شكل (12.4): مخطط لعملية معالجة الـ mRNA في الكائنات حقيقية النواة: يتضح من الشكل انه بعد أن ينتهي إنزيم RNA polymerase II من عملية استنساخ النيوكليوتيدة الأولى للاكسون الأول من الجين، تضاف قلنسوة إلى النهاية 5′ للـ RNA. ينهي إنزيم RNA polymerase II عند مناطق الانتهاء لآخر اكسون نهائي، يصل إلى موقع يدعي بمتعدد الأدنين poly (A) site ، والذي يقع بالنهاية 3′ من النسخة الأولية، يضاف هنالك امتداد من الأدنين. يحتوي ذيل الأدنين على 250 نيوكليوتيدة في اللبائن. ثم تزال الانترونات وتربط الاكسونات ببعضها البعض في عملية الـ splicing (تصميم المؤلف)

تتحور النهاية 5′ لجزيئة pre-mRNA حالاً بعد تخليقها وذلك بإضافة قلنسوة. تقوم هذه القلنسوة بتسهيل ارتباط جزيئات الـ mRNA حقيقية النواة بالرايبوسوم عند عملية بدء الترجمة (أنظر الفصل الخامس). كما إنها تعمل في تثبيت جزيئة الـ mRNA ، حيث لوحظ ان جزيئات الـ mRNA عديمة القلنسوة ذات عمر نصف half life أقل. كما تحتوي النهاية 3′ لمعظم mRNA حقيقية النواة على ذيل متعدد الأدنين poly-A tail (شكل 12.4)، والذي يضاف بتفاعل معالجة يدعى بتفاعل إضافة متعدد الأدنين polyadenylation. حيث يقوم إنزيم يدعى poly A polymerase– والذي لا يحتاج إلى قالب – بإضافة ذيل متعدد الأدنين بطول 200 إلى 250 نيوكليوتيدة إلى نهاية هذا المستنسخ. يبدأ هذا الإنزيم بإضافة متعدد الأدنين قرب التسلسل ...AAUAAA... الواقع قرب النهاية 3´ لجزيئة الـ

mRNA الناشئة. ولم تعرف وظيفة هذا الذيل على وجه التحديد، ولكن تبين انه بعد انتقال جزيئة الـ mRNA الناضجة mature mRNA إلى السايتوبلازم، يتقصر الذيل بطريقة ما ليصبح طوله 100 إلى 150 نيوكليوتيدة فقط. من هذا يتبين دور الذيل الحساس في حماية المادة الوراثية من هجوم إنزيمات التكسير الداخلية والخارجية exonucleases and endonucleases أثناء انتقاله من النواة إلى السايتوبلازم. إن التحوير الأكثر إثارة لجزيئة الـ pre-mRNA هو إزالة الانترونات بواسطة عملية وصل الأطراف بالتراكب splicing . وكما هو مناقش سلفا، فان التسلسلات المشفرة لمعظم الجينات حقيقية النواة تكون متخللة بتسلسلات غير مشفرة (انترونات)، والتي يتم قصّها من جزيئة الـ mRNA الناضجة. ثم تربط الأجزاء الغير مقصوصة (الاكسونات) مع بعضها البعض لتكون ما يعرف بجزيئة mRNA الناضجة (راجع شكل 12.4).

وصل أطراف الرنا الغير متجانس بالتراكب (Splicing of hnRNA)

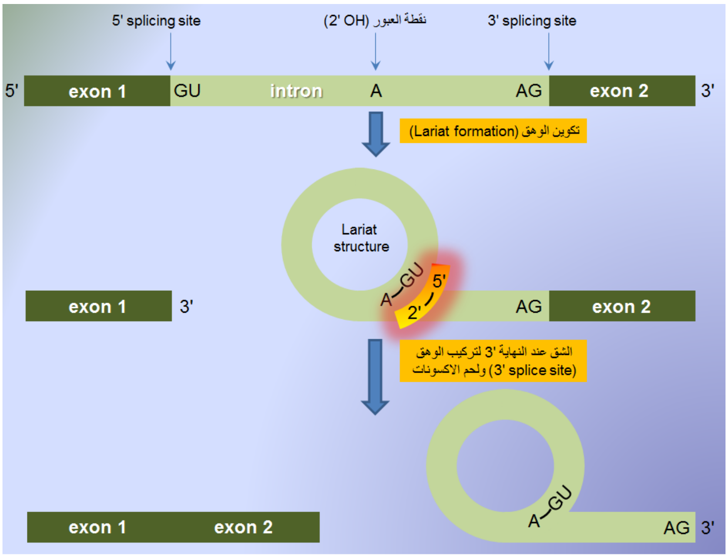
تزال الانترونات من جزيئة hnRNA بعد عملية الاستنساخ فوراً وترتبط الاكسونات مع بعضها البعض لكي تكون تسلسل مشفر مستمر. تدعى هذه العملية بوصل الأطراف بالتراكب أو splicing، والتي تتم بواسطة معقدات من نوع بروتين – رنا protein-RNA complexes في النواة، وتعرف تلك المكائن العملاقة بالـ spliceosomes. يكون نوع الـ RNA الذي يرتبط مع البروتينات ليكون الـ spliceosomes بـ small nuclear RNA snRNA (أنظر أنواع الـ RNA). والذي يتواجد بخمسة أشكال مختلفة (U1، U2، U4، U5، و U6). وتتألف كل منها من بروتينات متعددة وجزيئة واحدة من snRNA (شكل 13.4).



شكل (13.4): كيفية تكوين معقد الـ spliceosome (تصميم المؤلف)

لضمان عدم تدمير رسالة الـ mRNA، تحدث عملية وصل الأطراف بالتراكب بنمط دقيق جداً، حيث تميز بداية ونهاية كل انترون في جزيئة الـ hnRNA بتسلسلات محددة عند النهاية 5´ و3´. وهنالك تركيب آخر يدعى بنقطة العبور branching point داخل الانترون ولكن تسلسله غير ثابت ولكنه يحتوي مخلفة ادينوسين واحدة (A) دائماً، وتلعب نقطة العبور هذه دوراً مهماً أيضاً في هذه العملية ، فخلال عملية وصل الأطراف بالتراكب، تهاجم مجموعة OH 2´ لمخلفات الأدينوسين لنقطة العبور بمساعدة معقد الـ spliceosome مجموعة الفوسفات ثنائية الأستر عند النهاية 5´ للانترون وتشطرها (شكل 13.4 خطوة a وخطوة b). وفي نفس الوقت، تتكون آصرة غير اعتيادية (2´→5´) داخل الانترون، والتي بهذه الطريقة تتخذ شكل الوهق (حبل في طرفه عروة) lasso shape (شكل 13.4).

وكنتيجة لعملية وصل الأطراف بالتراكب، تهاجم النهاية 3´ للانترون. وبالنهاية، يرتبط الاكسونين مع بعضهما ويتحرر الانترون، والذي ما زال بشكل الوهق. أما الخطوة الأخيرة فهي انحلال الوهق وتلاشيه.



شكل (14.4):عملية وصل الأطراف بالتراكب splicing: ويحدث فيها إزالة الانترونات وربط الاكسونات ببعضها البعض وتتم عن طريق تكوين شكل الوهق (حبل في طرفه عروة) في كل انترون قبل عملية ازالته (تصميم المؤلف).

أنواع الـ RNA:

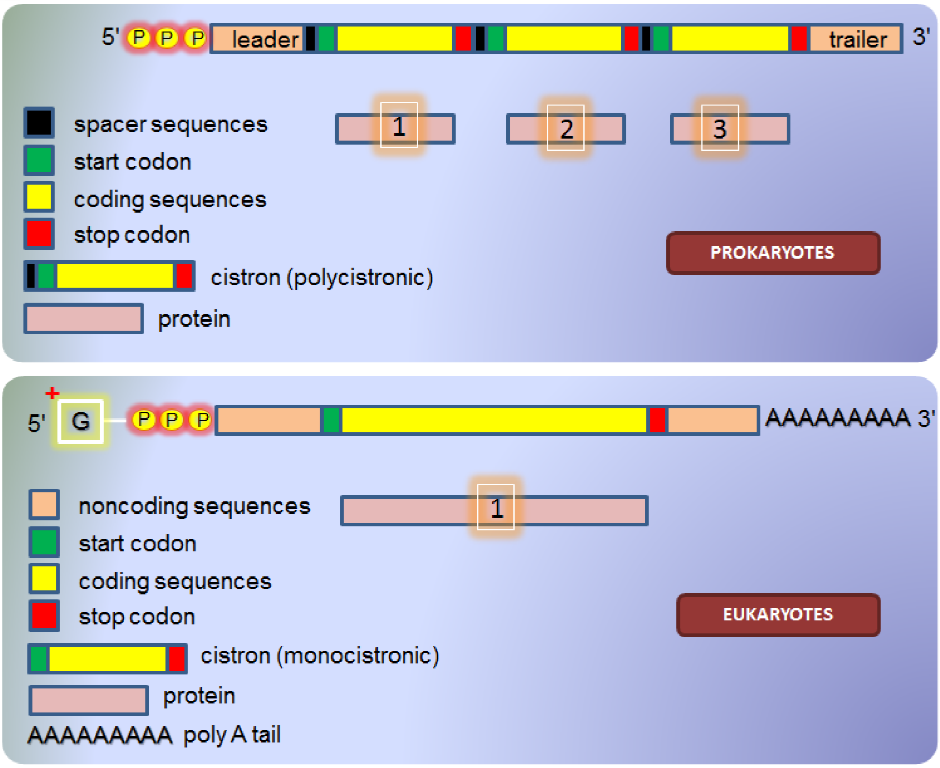
إن هنالك ثلاث أنواع رئيسية من الـ RNA الخلوي تدخل في تخليق البروتين وهي: mRNA و tRNA و rRNA . بالإضافة إلى ان هنالك أنواع RNA أخرى تعمل كبوادىء primers لتخليق الـ DNA، والتي يتم تخليقها من قبل إنزيم RNA primase (راجع الفصل الثالث)، وأنواع أخرى أهمها هو snRNA.

الرنا المراسل Messenger RNA (mRNA)

يحتوي تسلسل الـ mRNA على المعلومات الوراثية التي تترجم إلى تسلسلات الأحماض الأمينية في البروتين. تمتلك الخلايا بدائية النواة جزيئات mRNA غير ثابتة والتي تنتهي بمتوسط عمري يبلغ 3 – 1 دقيقة، بينما في الخلايا حقيقية النواة، يتميز الـ mRNA بثباتية أكبر حيث يصل عمر الـ mRNA النموذجي في الكائنات حقيقية النواة إلى ثلاث ساعات، لماذا؟ يجب على جزيئة mRNA حقيقية النواة من أن تنتقل من النواة إلى الشبكة الاندوبلازمية الداخلية في السايتوبلازم حيث تخليق البروتين. تستوجب هذه العملية استصحاب بروتينات أخرى مع جزيئة الـ mRNA لتعينها في عملية الانتقال هذه. تستغرق هذه العملية بعض الوقت مقارنة بـ mRNA بدائية النواة، والذي تبدأ ترجمته في الوقت الذي مازالت عملية الاستنساخ جارية عليه. يشكل الـ mRNA مايقارب الـ 5% فقط من الـ RNA الإجمالي الموجود في الخلية.

على الرغم من التغاير في أطوال الـ mRNA، ولكن يمكن القول بأن مقدار المعلومات الوراثية التي يحملها الـ mRNA في بدائية النواة يكون كافياً لأن يشفر لأكثر من جين واحد، بينما تكفي تلك المعلومات الوراثية التي يحملها mRNA حقيقية النواة لأن تشفر لجين واحد فقط (شكل15.4). وبالطبع إذا كانت جزيئة الـ mRNA لجين واحد (كما في حقيقية النواة)، فأن هذا يؤدي بالضرورة إلى إنتاج بروتين واحد، وتدعى هذه الحالة بالسسترون المفرد monocistronic. أما إذا كانت جزيئة الـ mRNA لجينات متعددة (كما في بدائية النواة)، فان هذه يؤدي إلى إنتاج عدة بروتينات، وتدعى هذه الحالة بالسسترون المتعدد polycistronic.

وفي الكائنات بدائية النواة، وكما أوضحنا ذلك سابقا، ينشغل الـ mRNA في عملية تخليق البروتين حتى قبل أن يتم الانتهاء من تخليق جزيئة الـ mRNA بالكامل. ان الاستفادة السريعة من مستنسخ الـ mRNA الناشيء يقلل من فرصة معالجته. وبالتناقض مع ذلك، ففي الكائنات حقيقية النواة ، حيث تنفصل عملية الاستنساخ عن عملية الترجمة بشكل حاد، يعاني مستنسخ الـ mRNA الناشيء نظام مسهب من المعالجة، قبل أن يتم نقله إلى السايتوبلازم لكي يستخدم كقالب لعملية الترجمة.



شكل (15.4): مقارنة بين تركيب جزيئة الـ mRNA في بدائية وحقيقية النواة. ولو أن كلا جزيئتي الـ mRNA قد تم تخليقهما بنهاية 5′ ثلاثية الفوسفات، إلا أن جزيئة الـ mRNA حقيقية النواة تحتاج إلى قلنسوة من نوع 5′ ، والتي هي جزء من التركيب المميز من قبل وحدة الرايبوسوم الثانوية الصغير small ribosomal subunit. ولهذا يبدأ تخليق البروتين في كودون البدء start codon قرب النهاية 5′ لجزيئة الـ mRNA. أما في بدائية النواة يحدث التناقض، بحيث لا تمتلك النهاية 5′ فائدة محددة، ويمكن أن يوجد عدة مناطق للارتباط بالرايبوسوم (تسلسلات Shine-Dalgarno) في داخل سلسلة الـ mRNA، ينتج كل منها في تخليق بروتين مختلف (تصميم المؤلف).

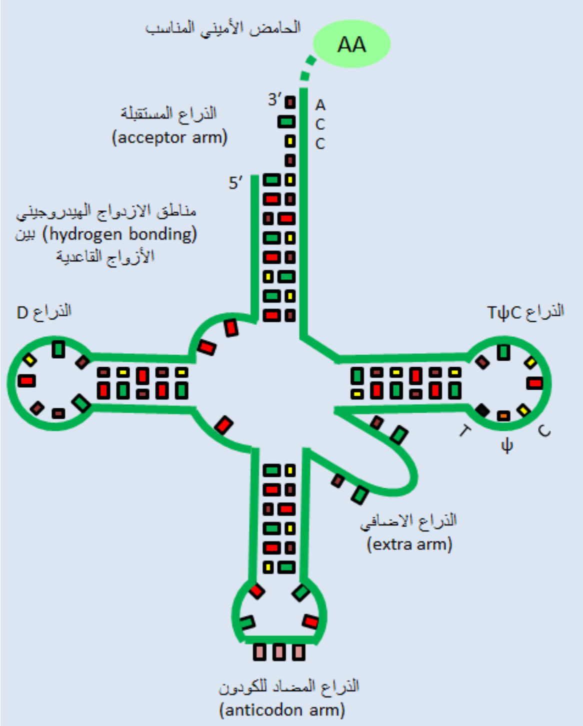
الرنا الرسول (tRNA) transfer RNA

إن النوع الأساسي الثاني من الـ RNA هو الـ tRNA، وهو أقصر أنواع الـ RNA طولاً، حيث يبلغ طوله 76 نيوكليوتيدة في الكائنات بدائية النواة. وتتلخص وظيفته بحمل الأحماض الأمينية إلى القالب الـ mRNA ، حيث ترتبط الأحماض الأمينية بنمط خاص. أن ما يؤهل هذه الجزيئة لحمل أعباء هذه المهمة الخطرة والتي تتوسط بها بين الأحماض النووية الموجودة في الـ mRNA والأحماض الأمينية الموجودة في البروتينات هو أنها تحتوي على كلا الموقعين، موقع الارتباط بالأحماض الأمينية والذي يعرف بالذراع

المستقبل acceptor arm والذي يوجد في النهاية 3′ ، وموقع أو ذراع الشفرة المضادة anticodon arm ، والذي يميز الكودون codon (أنظر الفصل الخامس) المطابق ثلاثي القواعد الموجود في جزيئة الـ mRNA (شكل16.4).

إن هنالك ما يقارب 20 نوع مختلف من الـ tRNA في كل خلية. كل حامض أميني يرتبط إنزيمياً بالنهاية 3′ لواحد أو أكثر من جزيئات الـ tRNA وذلك بواسطة تفاعل إنزيمي سيأتي ذكره في الفصل القادم. وعلى الرغم من اختلاف جزيئات الـ tRNA عن بعضها البعض بتسلسلها النيوكليوتيدي، لكن تجمعها العديد من الصفات المشتركة. كل جزيئات الـ tRNA تنطوي على نفسها بصورة متشابهة لتعطي تركيباً يشبه ورقة البرسيم (الجت) cloverleaf (شكل16.4). تشكل جزيئات الـ tRNA أكثر من 15% من الـ RNA الإجمالي الموجود في الخلية.

كل أنواع الـ tRNA تتألف من أربعة أذرع رئيسية. يتألف الذراع المستقبل acceptor arm من ساق stem ذو قواعد نتروجينية مرتبطة ببعضها البعض، وينتهي هذا الذراع بالتسلسل (5′ to 3′) CCA ، حيث ترتبط مجموعة الكاربوكسيل carboxyl group للأحماض الأمينية بمجموعة الهيدروكسيل hydroxyl group الموجودة في مخلفات الأدنين A في النهاية 3′ للذراع المستقبل في جزيئة الـ tRNA. أما الأذرع الأخرى فتحتوي على قدم بقواعد نتروجينية مزدوجة ببعضها البعض بالإضافة إلى إنشوطة غير مزدوجة unpaired loop (شكل 16.4). يضطلع ذراع الشفرة المضادة anticodon arm بتمييز الكودون (النيوكليوتيدات الثلاثية) الموجودة في جزيئة الـ mRNA . أما الذراع الثالثة فيطلق عليها الاسم D arm ، وسميت بهذا الاسم بسبب وجود القاعدة النتروجينية dihydrouridine ، وهي الذراع التي يرتبط بها إنزيم aminoacyl-tRNA synthetase وذلك عند إضافته الحامض الأميني المناسب لجزيئة الـ tRNA (أنظر الفصل الخامس)، وسميت الذراع الرابعة بالاسم TψC arm وذلك بسبب وجود التسلسل ثايمين T و pseudouridine والسايتوسين C ، وتدخل هذه الذراع في ربط جزيئة الـ tRNA المحملة بالحامض الأميني (aminoacyl tRNA) بسطح الرايبوسوم خلال عملية تخليق البروتين. وهنالك ذراع إضافي extra arm ويعد من أكثر الصفات المتغايرة ما بين جزيئات الـ tRNA لذا، فانه يوفر أساساً للتصنيف، لذا فانه يدعى لهذا السبب أحيانا بالذراع المتغاير variable arm.



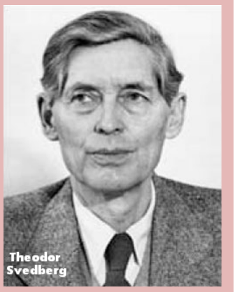
شكل (16.4): تركيب الحامض النووي المراسل tRNA (تصميم المؤلف)

يلاحظ من المناقشة أعلاه، بأن هنالك صفة مميزة لتركيب جزيئة الـ tRNA ، إلا وهي تلك النسبة العالية من الـ ribonuucleotide bases التي تختلف عن القواعد الأربعة الاعتيادية كما في قواعد الـ dihydrouridine و pseudouridine والتي نتجت بسبب التحوير الإنزيمي المكثف الذي تعرضت له جزيئة الـ tRNA من قبل العديد من الإنزيمات المشتركة في معالجة هذه الجزيئة.ولقدرة هذه الجزيئة على تكوين تركيب ثانوي secondary وثالثي tertiary من خلال طياته الكثيرة المشابهة نسبياً لطيات البروتين، جعل العالم Francis Crick يعلق على هذه الجزيئة قائلا: " هو RNA يحاول أن يكون بروتين." ويمكن قول نفس الشيء حول جزيئة الـ rRNA (أنظر ملحق هذا الفصل).

الرنا الرايبوسومي Ribosomal RNA (rRNA)

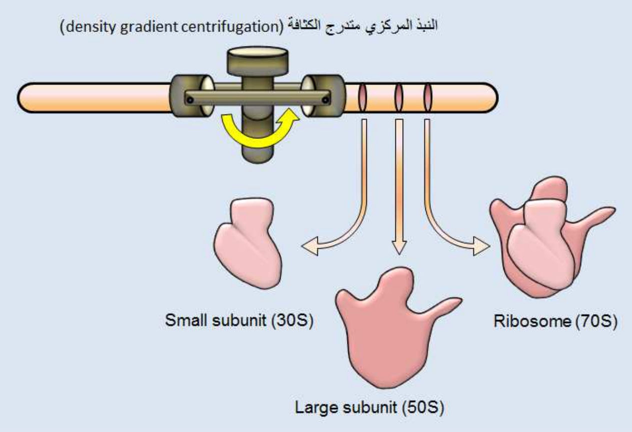
تعد جزيئات الـ rRNA هي المكون التركيبي والوظيفي للرايبوسومات، والرايبوسومات أجسام كبيرة من معقدات rRNA وبروتينات والتي تشكل الماكنة التي تأوي معظم التفاعلات المرتبطة بتخليق البروتين.

للرايبوسوم تركيب معروف جيدا سواء في الكائنات بدائية وحقيقية النواة ً وهو وحدتان ثانويتان two subunits كل منهما يتألف من RNA وبروتين. كل من الوحدات الثانوية الكبيرة والصغيرة يتألف من RNA يعرف بالـ ribosomal RNA (rRNA) والعديد من البروتينات الرايبوسمية ribosomal proteins. تحتوي الوحدة الثانوية الكبيرة على مركز إنزيم الـ peptidyl transferase ، والذي هو مسؤول عن تكوين الأواصر الببتيدية. تحتوي الوحدة الثانوية الصغيرة على مركز فك الشفرة decoding center وفيه تقوم جزيئات الـ tRNA بقراءة أو بفك شفرة وحدات الكودون بالـ mRNA. وكما هو دارج، تسمى وحدات الرايبوسوم بالكبيرة والصغيرة على أساس سرعة ترسيبها عند تعرضها الى قوة نبذ مركزية. تعرف الوحدة المستخدمة لقياس سرعة الترسيب تعرف بوحدة سفيدبيرغ Svedberg unit والتي سميت على اسم مخترع جهاز النبذ المركزي ذو السرعة الفائقة Theodor Svedberg (شكل 17.4).



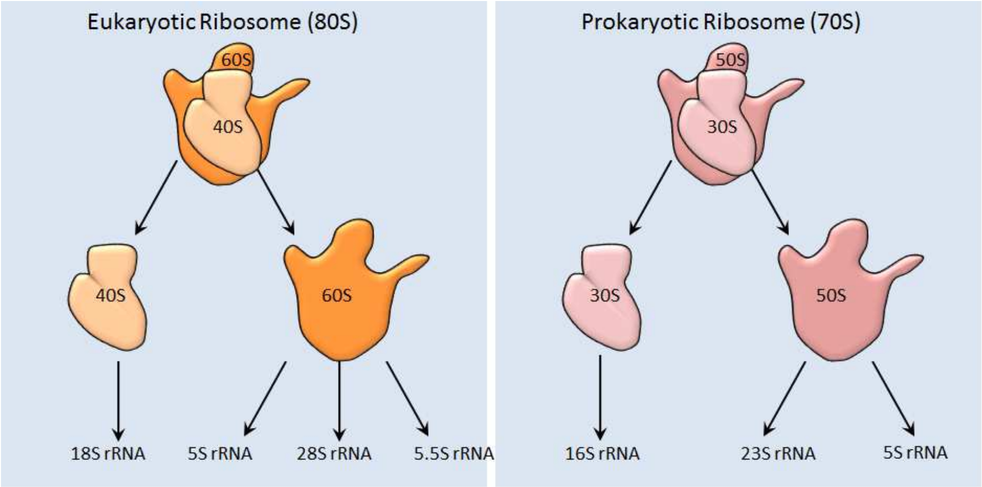
Theodor Svedberg

في البكتريا، ان الوحدة الثانوية التي تمتلك سرعة ترسيب بقدر 50 Svedberg units تعرف الوحدة الثانوية على هذا الاساس بـ 50S، بينما تعرف الوحدة الثانوية الصغيرة بـ 30S. يشار الى الرايبوسوم البكتيري الكامل بـ 70S ribosome. لاحظ أن 70S ribosome هو أقل من مجموع 50S زائداً 30S ! ان تفسير ما يبدو من تناقض ظاهر في هذه المسألة الأخيرة هو أن سرعة الترسيب تحدد من قبل الشكل والحجم وهنا هي ليست قياساً للكتلة. ان الرايبوسوم في حقيقية النواة هو نوعا ما أكبر من ذلك الذي في بدائية النواة، حيث يتألف من الوحدات الثانوية 60S و 40S والتي تؤلف مع بعضها البعض 80S ribosome. هذا يعني بأن أكثر أنواع الـ RNA تواجداً في الخلية هو rRNA.



شكل (17.4):الترسيب بواسطة جهاز النبذ المركزي الفائق السرعة وذلك لفصل وحدات الرايبوسوم الثانوية والرايبوسوم الكامل في بدائية النواة (تصميم المؤلف)

تتألف الوحدة الثانوية الكبيرة 50S subunit بدورها في رايبوسومات بدائية النواة من 23S و 5S من جزيئات الـ rRNA. بينما تحتوي الوحدة الثانوية الصغيرة 30S subunit على جزيئات rRNA من نوع 16S rRNA فقط. أما رايبوسومات حقيقية النواة، فإنها مشابهة بالتركيب لتلك التي في بدائية النواة، ولو أنها أكبر نسبيا (80S)، وتحتوي على rRNA أطول وتشمل 25S rRNA و 18S rRNA و 5S rRNA وغيرها. إذن هنالك ثلاثة أنواع مميزة من جزيئات الـ rRNA في خلايا بدائية النواة (23S و 16S و 5S)، بينما في الخلايا حقيقية النواة (شكل 18.4) هنالك أربعة أنواع أو أحجام من الـ rRNA (28S و 18S و 5.8S و 5S). تشكل جزيئات الـ rRNA80% من الـ RNA الإجمالي الموجود في الخلية، إذن هي أكثر أنواع الـ RNA تواجداً في الخلية.



شكل (18.4): مقارنة بين تركيب الرايبوسومات بدائية وحقيقية النواة. صنفت المكونات الرايبوسومية عموماً على أساس قيم S والتي تدل على معدل ترسيبها. على الرغم من الاختلاف الموجود في عدد وحجم المكونات البروتينية والـ rRNA. كلا نوعي الرايبوسوم لهما نفس التركيب وتعمل بأساليب متشابهة جداً (تصميم المؤلف).

الرنا الصغير الثابت Small stable RNA (ssRNA)

وهي جزيئات RNA صغيرة توجد في خلايا الكائنات حقيقية النواة. إن معظم هذه الجزيئات تكون معقدات مع البروتينات لتكون ما يعرف بالـ ribonucleoproteins، والتي تتوزع في النواة، أو في السايتوبلازم، أو في كليهما.

إن ما يعرف بالـ small nuclear RNA (snRNA) هي مجوعة ثانوية من ذلك النوع من الـ RNA والتي تدخل في عملية معالجة الـ mRNA وفي التنظيم الجيني. وهو على عدة أنواع (أنظر أعلاه) تدخل تلك الأنواع في عملية إزالة ومعالجة جزيئة hnRNA

إلى جزيئة mRNA. وكما هو موضح في هذا الفصل، يكون هذا النوع من الـ RNA مع البروتينات المصاحبة معقد الـ spliceosome والذي يقوم كما بينا بإزالة الانترونات وربط الاكسونات ببعضها، وفي هذا المعقد لا تلعب به بروتينات المعقد دوراً أساسياً وإنما دوراً مساعدا فقط، بينما يتمثل الدور الرئيسي في تحفيز هكذا تفاعلات إنزيمية بالمكون RNA، تسمى تلك الجزيئات بالرايبوزايم (أنظر ملحق هذا الفصل)

ملحق الفصل الرابع

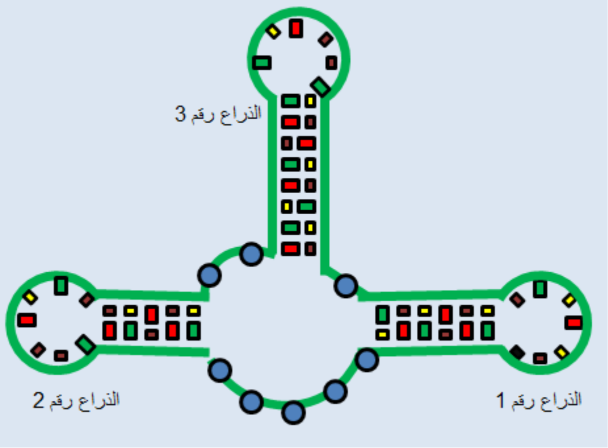
الرايبوزايم (The Ribozyme)

كان يعتقد منذ العديد من السنوات بأن البروتينات فقط يمكن لها أن تكون إنزيمات. يجب أن يكون الإنزيم قادراً على الارتباط بالمادة الأساس substrate والقيام بالتفاعل الكيميائي وتحرير الناتج وإعادة هذا التسلسل من الأحداث للعديد من المرات. تعتبر البروتينات جزيئات مناسبة جداً لمثل هكذا مهمة لأنها متألفة من أنواع مختلفة من الأحماض الأمينية والتي يبلغ عددها العشرون عموماً ويمكن لها أن تنطوي لتكون تراكيب ثلاثية معقدة مع مواقع ارتباطية بالمادة الأساس وأخرى للعوامل المساعدة cofactors وموقع فعال لتحفيز التفاعل. والآن نحن نعرف بأن جزيئات الـ RNA يمكن لها وبشكل مشابه من أن تتبنى تراكيب ثلاثية معقدة complex tertiary structures ويمكن لها أيضاً أن تعمل كمحفزات بايولوجية. كما في إنزيمات الـ RNA المعروفة بالـ ribozymes. تبدي هذه التركيبات العديد من الخواص الموجودة في الإنزيم التقليدي، كما في الموقع الفعال وموقع الارتباط بالمادة الأساس وموقع الارتباط بالعامل المساعد كما في الايون المعدني. ان أول ribozyme تم اكتشافه هو الـ RNAse P، وهو عبارة عن إنزيم محلل للرنا ribonuclease والذي يدخل في توليد جزيئات الـ tRNA الناضجة من مولداتها الأصل precursor RNAs الأكبر حجماً.

يتألف الرايبوزايم RNAse P من RNA وبروتين. وعلى الرغم من وجود البروتين إلا أن الـ RNA وحده هو المحفز، أما الجزء البروتيني في الرايبوزايم RNAse P فانه يسهل التفاعل وذلك بواسطة الحفاظ على بقاء الشحنات السالبة بالـ RNA.

تقوم عدة جزيئات RNA أخرى بالتفاعلات الداخلة في إزالة الانترونات من الجزيئات البادئة precursor molecules لكل من mRNA والـ tRNA والـ rRNA بعملية إزالة الأطراف بالتراكيب السالفة الذكر في هذا الفصل. يتخذ الرايبوزايم الذي يضطلع بهكذا تفاعلات شكلاً مميزاً يطلق عليه برأس المطرقة (hammerhead ribozyme) والذي يتألف من ثلاث أرجل مزدوجة قاعدياً محاطة بجزء مركزي يتألف من

نيوكليوتيدات غير مكملة لبعضها البعض وهي التي تكون ضرورية للتحفيز (شكل 19.4) . وهنالك أمثلة كثيرة على وجود جزيئات RNA لها مقدرة حفزية كما في تفاعل إضافة التيلوميرات المحفز من قبل المكون RNA في إنزيم التيلوميريز (أنظر الفصل الثالث) وتفاعل الاستطالة والمذكور المحفز من قبل إنزيم terminal transferase (أنظر الفصل الخامس).



شكل (19.4): تركيب رأس المطرقة ، تشير الكرات الزرقاء الى نيوكليوتيدات متنوعة (تصميم المؤلف)

غيّر اكتشاف الرايبوزايم نظرة العلماء عن كيفية نشوء الحياة. يمكن لنا أن نتخيل بأن هنالك شكل بدائي للحياة اعتمد بشكل كامل على الـ RNA. في هذا العالم، يعمل الـ RNA كمادة وراثية وكآلة إنزيمية. ان عالم الـ RNA هذا ربما قد سبق الحياة التي نعرفها اليوم، والتي يعتمد فيها نقل المعلومات على الـ DNA ثم الـ RNA ثم البروتين. أما الفرضية التي تقول بأن عالم البروتين قد نشأ من عالم الـ RNA فقد تجذرت من اكتشاف ان المكون الرايبوسومي المسؤول عن تكوين الآصرة الببتيدية، وهو الـ peptidyl transferase هو عبارة عن جزيئة RNA (أنظر الفصل الخامس). وبشكل غير مشابه للرايبوزايم RNAse P ورأس المطرقة والرايبوزومات المعروفة الأخرى والتي تعمل على المراكز الفسفورية phosphorous centers، يعمل الرايبوزايم peptidyl transferase على المركز الكاربوني لكي يخلّق الآصرة الببتيدية. وبهذه الكيفية، يرتبط كيمياء الـ RNA بأكثر التفاعلات أهمية في عالم البروتينات، ألا وهو تكوين الآصرة الببتيدية. وربما يعد رايبوزايم الرايبوسوم مجرد رفات لشكل للحياة ممعن في القدم والتي تكون كل الإنزيمات فيه هي عبارة عن جزيئات RNA.

أسئلة الفصل الرابع

السؤال الأول: علل ما يلي

- تنطوي جزيئة الـ RNA إلى أشكال متعددة بينما لا تحدث هذه الحالة عادة لجزيئة الـ DNA؟