**RNA’nın İŞLENMESİ**

RNA sentezi sürecinde, şablon DNA zincirinden çıkarılan transkipt, primer RNA transkipti adını alır. Çoğu primer RNA transkripti transkipsiyon tamamlandığında aktif formda değildir. Yapısal ve fonksiyonel açıdan olgunlaşmaları için yoğun düzenlemelere tabi tutulurlar. Bu düzenlemeler 3 genel tiptedir:

1. Primer RNA transkriptinden bazı RNA dizilerinin (sekanslarının) ayrılması.
2. İlgili gende kodlu olmayan bazı RNA sekanslarının ilavesi.
3. RNA yapısında bulunan bazı bazların kovalent modifikasyonu.

Primer RNA transkriptinden, olgun RNA moleküllerinin oluşturulduğu bu süreç RNA’nın işlenmesi adını alır. RNA’nın işlenmesi, gen ifadesinin bir aşamasıdır. Prokaryot hücrelerde tRNA ve rRNA moleküllerinin, ökaryot hücrelerde ise tüm RNA moleküllerinin işlenmesi zorunludur. Yalnız bazı mRNA molekülleri prokaryotlarda tamamen olgun şekilde transkribe edilir.

Ökaryotik hücrelerde RNA moleküllerinin işlenmesi esnasında, yalnız 5′ ve 3′ uçlardaki bazı nükleotitler değil, primer transkriptin içindeki bazı bölgeler de RNA yapısından çıkarılır. Ökaryotik genlerdeki bilgi, çoğu kez, nihai (olgun) RNA ürününde bulunmayan (kod içermeyen) bazı serilerle kesintiye uğrar. Bu seriler, intron ya da araya giren düzenleyici seriler adını alır. RNA moleküllerinden intronların çıkarılması, RNA işlenmesi sürecinin bir parçasıdır ve RNA düzenlenmesi adını alır. Diğer RNA işlenme süreçlerinden daha karmaşık olan RNA düzenlenmesinde ilk aşama, bir RNA transkriptinde iki fragment (DNA parçası) arasındaki bölge kesimidir. Ara bölge çıktıktan (intron) sonra, bu iki fragment birleştirilir. Ökaryotik primer RNA transkriptlerinde çok sayıda intron bölge bulunabilir ve tümü düzenlemeye tabi tutulur. Olgun RNA molekülünün fonksiyonel olabilmesi için, intronların doğru bölgelerden kesilmesi ve ekzonların (kod içeren bölgeler) birleştirilmesi gerekmektedir. Bir tek nükleotit bakımından meydana gelebilecek bir hata, tRNA ya da rRNA gibi yapısal RNA ya da mRNA moleküllerinin fonksiyonunu engeller. Bu durumda mRNA’dan aktif proteinin sentezi yapılamaz. RNA işlenmesine katılan enzimlerin bazısı, enzimatik aktivite gösteren RNA molekülleridir. RNA yapısındaki bazı enzimler intronların içerisinde lokalize olurlar. Böyle RNA molekülleri, intron bölge ayrılmalarını kendi kendine katalize eder (otokatalitik etki). RNA’nın aynı zamanda bir enzim gibi davranabileceğini gösteren bu buluş, genlerin ve protein yapıların evrimi üzerindeki görüşleri köklü değişikliklere uğratmıştır.

Yüksek düzeyde RNA işlenmesi, yüksek düzeyde RNA stabilitesine yol açar. Yani, RNA stabilitesi ikincil yapı ile doğrudan ilişkilidir. tRNA ve rRNA molekülleri, saatlerden-günlere uzayan yüksek bir stabilite gösterir. Bu moleküller, yoğun baz eşleşmeleri ile karakterize edilen ikincil (sekonder) ve oldukça düzenli üçüncül (tersiyer) yapıları sayesinde, hücrede bulunan nukleaz enzimlerine karşı dirençli hale gelmektedir. tRNA ve rRNA molekülleri, prokaryot ve ökaryot hücrelerin her ikisinde de, primer transkriptin yüksek oranda işlemeye tabi tutulması sonucu üretilmektedir. Diğer yandan, prokaryotik hücrelerde yarılanma ömürleri dakikalarla ifade edilen birçok mRNA molekülü neredeyse hiç işlenmeye tabi tutulmaz. Söz konusu moleküllerde ikincil yapılar oluşmaz. Ökaryotik mRNA moleküllerinde de ikincil yapılar yoktur, ancak, yüksek düzeyde işlenmeye tabi tutularak üretildikleri için bu moleküllerin yarılanma ömürleri saatler ile ifade edilir. Tüm bu veriler, RNA stabilitesinin, işlenme düzeyi ile ilgili olduğunun kanıtlarıdır.

RNA işlenmesi sonucu; hem RNA molekülleri, yapısal değişmelere uğratılarak, olgunlaşma aşamalarında enzimler tarafından parçalanmaktan korunur ve hem de hücresel bileşiklerle RNA molekülünün interaksiyonuna olanak sağlanır. Örneğin, olgunlaşmamış (işlenmemiş) ökaryotik mRNA’nın 5′ uç bölgesinin işlenmesi, hem uç bölgeyi ekzonukleolitik aktiviteden korur ve hem de protein sentezi esnasında ribozomların mRNA moleküllerini tanımasını sağlar. Ayrıca, transkripsiyon ile translasyon arasına işlenme sürecinin ilavesi sonucu, bu aşamada da gen ifadesinin regülasyonu olanaklı hale gelir.

Olgun tRNA molekülleri, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin her ikisinde de, primer transkriptlerin işlenmesi yolu ile meydana getirilir. *E. coli’*de saptandığı gibi, prokaryotik hücrelerde primer tRNA transkriptlerinin çoğu, birden fazla tRNA öncüsü içerir. Bu primer transkriptlerin yaklaşık yarısı rRNA ya da mRNA öncüleri de taşımaktadır. Monomerik tRNA öncüleri, büyük primer transkriptten kesilirler ve ribonukleazlar (Rnaz’lar) tarafından uç bölgeleri budanarak olgun molekül boyutuna getirilirler. *E. coli’*de, şimdiye dek 9 adet RNaz enziminin (Çizelge 4), tRNA moleküllerinin olgunlaştırılmasında görev aldığı saptanmıştır (ökaryotlarda primer transkriptte yalnız bir tRNA molekülü bulunmasına rağmen, olgun tRNA molekülünün oluşturulabilmesi için bu primer transkriptin de 5′ ve 3′ uç bölgelerden işlenmesi gerekmektedir).

Çizelge 4. *E. coli*’ de tRNA işlenmesine katılan Ribonukleazlar

Ribonukleaz Aktivite Fonksiyon

RNaz P Endonukleaz tRNA 5′ uç bölgesinin oluşturulması

RNaz PC Endonukleaz Multimerik T4 faj tRNA’ inin ayrılması

RNaz D 3′ →5′ ekzonukleaz tRNA 3′ uç bölgesinin oluşturulması

RNaz BN 3’ →5’ ekzonukleaz T4 faj tRNA’ inin 3’ ucunun işlenmesi

RNaz T 3’ →5’ ekzonukleaz Olgun tRNA’ in 3’ uç bölgesinin oluşturulması

RNaz O Endonukleaz Multimerik tRNA öncülerinin ayrılması

RNaz F Endonukleaz Multimerik tRNA öncülerinin ayrılması

RNaz P2 Endonukleaz Multimerik tRNA öncülerinin ayrılması

RNaz III Endonukleaz Düşük aktivite, T4 tRNA’ nın 5’ ucunun oluşturulması

Monomerik tRNA öncüleri, çoğu kez, prokaryotların multimerik primer transkriptinden salınır. Bu salınma, RNazO ve RNaz P aktivitesi ile meydana gelir. RNaz P, primer transkriptin üçüncül (tersiyer) yapı düzenlemeleri gösteren bölgelerini tanır. Bu endonukleaz, primer transkriptte yer alan her bir tRNA öncüsünün 5’ bölgesinin kesilmesini katalizler. Böylece olgun 5’ uç içeren monomerik tRNA öncüleri primer transkriptten ayrılır. Eğer primer transkriptte bir tRNA öncüsünü, bir başka tRNA öncüsü değil, rRNA öncüsü izliyor ise; tRNA monomerinin 3’ ucu, Ribonukleaz III enziminin katalitik aktivitesi ile salınır. Ribonukleaz III, rRNA öncülerinin primer transkriptten salınımını katalizler (Şekil 27). RNaz P’nin in-vivo kesimi oldukça hızlıdır ve bu enzim, muhtemelen, transkript sentezi bitmeden aktivite göstermektedir. Zira, hücrelerde işlenmemiş uca sahip tRNA molekülleri tanımlanamamaktadır. RNaz P detaylı bir şekilde araştırılan ilk ribonukleazdır. Bu enzim 20 kilo Dalton (kDa) moleküler büyüklükte bir protein ve 337-nukleotit uzunlıkta RNA’dan oluşan bir nukleoproteindir (130 kDa). RNaz P’nin RNA bileşeni enzimatik (katalitik) aktivite gösterir. Protein bileşeni ise, RNA’nın üç boyutlu yapısının stabilitesini sağlar ve negatif yüklü katalitik RNA molekülünü, aynı yüke sahip substratın itmesinden, elektrostatik bir kalkan gibi korur. RNaz P katalitik aktivite için, Mg2+ ya da Mn2+ iyonlarına ihtiyaç duyar. Söz konusu iyonlar, aktif bölgede fosfodiester bağlarına etkili bir nukleofil oluşturarak kesim reaksiyonuna katılırlar. Rnaz P aktivitesi çok sayıda prokaryotik hücre yanında insan ve maya gibi ökaryotik hücrelerde de saptanmıştır. Endonukleaz enziminin RNA nukleotit serileri (sekansları) organizmadan organizmaya farklılık göstermektedir. Ancak, proteinler tarafından stabil hale getirildiği için, üçüncül (tersiyer) yapı korunmuştur. Bu özelliğinden dolayı, farklı prokaryotik organizmalardan elde edilen alt ünitelerin birleştirilmesi ile enzimin aktif RNA bileşeni meydana getirilebilmektedir. RNaz P, monomerik tRNA öncülerini primer transkriptten ayıran tek endonukleaz değildir. RNaz P2, O ve F de eş zamanlı olarak aynı aktiviteyi göstermektedir. Ayrıca T4 fajı tarafından kodlanan tRNA’nın işlenmesi RNaz PC enzimi tarafından katalize edilmektedir. *E coli*’de tRNA öncülerinin 3’ uçlarının işlenmesine katılan; Rnaz D, BN ve T olmak üzere 3 ribonukleaz tanımlanmıştır. RNaz D; tRNA yapısının 3’ ucuna erişinceye dek, monomerik tRNA öncüsünün 3’ ucundan nukleotitleri ayırır. Prokaryotik ve ökaryotik olgun tRNA moleküllerinin tümü, 3’ uç bölgelerinde CCA serileri içerirler. Bu bölgede RNazD kesimini limitleyen sinyal henüz belirlenememiştir (Şekil 27). RNaz D aktivitesi, hücre gelişmesi inhibe edilmeksizin kaybolabilir. Bu durum, diğer RNaz enzimlerinin, RNaz D aktivitesinin yerini aldığına işaret etmektedir. RNaz BN *E.coli* genomunda kodlanmaktadır. Ancak, T2 , T4 gibi fajların tRNA öncülerinin işlenmesi, bu enzimin birincil görevidir. RNazT’nin hücresel işlevi çok açık bir şekilde henüz bilinmemekle birlikte, tRNA öncüsünün 3’ ucundan ekzonukleaz aktivitesi ile birkaç nukleotidi ayırdığı saptanmıştır. Süreklilik arz eden bu süreç, uç dönüşümü olarak adlandırılmaktadır. Bazı fajlarda ve memeli hücrelerinde tRNA genleri 3’ uç bölgelerinde CCA serileri içermezler. Bu seri, tRNA fonksiyonu için zorunlu bir seri olduğu için; transkripsiyon sonrasında, tRNA nukleotidil transferaz enzimi tarafından tRNA molekülünün 3’ uç bölgesine ilave edilir. *E. coli*’de bu enzim, bir önceki aşamada RNaz T aktivitesi ile kaldırılan terminal adenin (A) uzamalarının, yeniden tRNA’ya yerleştirilmesinden de sorumludur.

Bazı bitkilerde, hayvanlarda ve tek hücreli ökaryotlarda bulunan tRNA öncüleri, ilave nukleotitlerin ayrılması için, transkripsiyon sonrası bir işlemeye gereksinim duyarlar. Bu işleme, tRNA öncülerinin yalnız 5’ ya da 3’ uçlarında değil, transkript içindeki bazı serilerde de gerçekleştirilmektedir. Bu iç seriler DNA’da ve primer RNA transkriptinde bulunmakla birlikte, olgun RNA moleküllerinde yer almazlar. İntron ya da araya giren seriler adını alan bu bölgeler, protein sentezini yönlendiren RNA yapısından çıkarılırlar. Hem DNA’da hem de olgun RNA moleküllerinde bulunan seriler ise ekzon olarak adlandırılmaktadır. İntronların çıkarılıp ekson bölgelerinin bağlanması ile süreklilik arz eden RNA molekülünün oluşturulması süreci “RNA splicing” (RNA düzenlenmesi) adı verilmektedir. RNA düzenlenmesi; mRNA, tRNA ve rRNA’ in her üçünün işlenme sürecinde de yer alır. Ancak işlenme mekanizmaları, söz konusu 3 molekülde değişiklik gösterir. RNA işlenmesi için referans nokta, intronun içinde yer alır. Primer transkriptte bir intron 5’ ve 3’ ucunda yer alan iki ekzonu ayırır. 5’ ekzon ile intronunun 5’ ucu temas bölgesi , birleşme bölgesi ya da 5’ düzenleme bölgesi adını alır. 3’ ekzon ve intronun 3’ ucu arasındaki birleşme bölgesi de 3’ düzenleme bölgesi adını alır (Şekil 28). Düzenleme süresince, düzenleme bölgelerinde yer alan fosfodiester bağları kırılır. Şimdiye kadar, düzenleme reaksiyonlarına özel iki adet nukleotit belirlenmiştir. Ancak bu bölgelerde konsensüs serilerinin daha uzun olduğu düşünülmektedir.

Mayalar yaklaşık 400 çekirdek tRNA geni içerir. tRNA genlerinin yaklaşık %10’ unda tek intron bulunmaktadır. Bu intronlar 14-16 baz çifti uzunluktadır ve tümü tRNA antikodon halkasını oluşturacak bölgelerin (serilerin) içinde yer alır. Söz konusu intronlar konsensüs serileri (hepsinde aynı olan bazı korunmuş seriler) içermez. Ancak tümü, birbiri ile H bağı oluşturabilen nukleotit uzamalarına sahiptir. Bu uzamalar, RNA’nın işlenmesine katılan enzimler için tanıma bölgesi teşkil eden ilmek (halka) formunun oluşumuna yol açar. Mayalarda tRNA öncülerinin işlenmesinde iki ana aşama bulunmaktadır. İlk aşamada öncü molekül; intron ile ekzonun çakışma bölgelerinden kesilir. Bu bölgeler, 5’ ve 3’ düzenleme bölgeleridir. Kesim işlemi sonunda ekzon ve intronlar artık kovalent bir şekilde bağ içermez. Ancak, RNA öncüsünün tersiyer yapısından dolayı bir arada kalırlar. İkinci aşamada iki ekzon, ligasyon reaksiyonu sonucu, kovalent bir şekilde birbirine bağlanır. İlk aşamada fosfodiester bağlarının hidrolizi ile enerji salınımı gerçekleşir. İkinci aşamada meydana gelen ligasyon reaksiyonunda ise, 2 mol ATP harcanır. Düzenleme bölgelerinde gerçekleşen kesim reaksiyonu, çok fonksiyonlu bir enzimin aktivitesi ile katalize edilir. 5’ bölgesindeki kesim sonucu, 5’ ekzonun 3’ ucundaki 2’, 3’ siklik fosfat ve intronun 5’ ucundaki 5’ OH grubu ayrılır. Benzer bir kesim sonucunda da, 3’ ekzonun 5’ ucundaki OH grubu ve intronun 3’ ucunda yer alan 2’ ,3’ siklik fosfat ayrılır. Kesim reaksiyonlarını katalize eden çok fonksiyonlu enzim, siklik fosfodiesteraz aktivitesi de içerir. Bu sayede, 5’ ekzonun 2’ ,3’ siklik fosfatı hidrolize edilerek, 2’ - fosfat ester oluşumu gerçekleştirilir. Çok fonksiyonlu enzimin bir diğer aktivitesi de, 3’ ekzonun solundaki 5’ OH grubuna ATP’den bir fosforil grubunun transferi, yani kinaz aktivitesidir. Maya tRNA ligasyon aktivitesi, RNA ligaz enzimi tarafından katalizlenir. ATP bağımlı bir enzim olan RNA ligaz, 3’ ekzonun 5’ fosfat bölgesine AMP grubunu taşır. Transfer edilen AMP, daha sonra, 5’ eksonun serbest 3’ OH grubu ile yer değiştirerek, iki ekzon arasında 5’ →3’ fosfodiester bağını oluşturur. Son aşamada fosfataz enzimi, 2’ fosfat ester hidrolizini katalizleyerek tRNA düzenlenmesini sonlandırır.Tüm ökaryotlarda bu mekanizma tamamen aynı değildir. İnsan doku kültürü hücrelerinde önce intronların 5’ OH ve 3’ fosfat grupları kırılır ve daha sonra ATP siklaz aktivitesi ile 2’ ,3’ siklik fosfat oluşturulur. Bu reaksiyonda 2’ fosfat meydana gelmez. Bunun yerine, orijinal tRNA kökenli fosfat grubunun katıldığı bir ligasyon reaksiyonu ile 5’ →3’ fosfodiester bağlanması gerçekleştirilir.

Hem prokaryot ve hem de ökaryot hücrelerde olgun tRNA molekülleri, yapılarındaki kovalent modifikasyonlar açısından, diğer RNA moleküllerinden büyük farklılıklar gösterir. *E.coli*  tRNA molekülünde, 26-30 adet arasında kovalent olarak modifiye edilmiş nukleozit bulunmaktadır (N6-Metil adenozin, N6-izopentil adenozin, inozin, 7-metil guanozin, Dihidrouridin, Pseudouridin, Uridin, 3’ -metilsitidin, 5’ -metilsitidin ve 2’ -o-metillenmiş nukleozitler gibi). Bu modifiye nukleozidler, yaklaşık 45 enzim (*E.coli* genomunun %1’i) tarafından katalizlenen reaksiyonlarla oluşturulmaktadır (Şekil 28). *E. coli*’de bu enzimlerin 6 adeti tanımlanmıştır. Tanımlanan enzimler; küçük asidik proteinlerdir ve aktiviteleri sistein amino asitlerinin sülfidril gruplarına (-SH) bağlıdır. tRNA işlenmesine katılan diğer enzimler gibi, kovalent modifikasyonları katalizleyen enzimler de tRNA moleküllerini hem primer ve hem de tersiyer yapı özelliklerinden ve hedef nukleotidin yakın bir bölgesinden tanımaktadır. Prokaryotik tRNA moleküllerinde, ökaryotlarınkinden daha çok kovalent modifikasyon meydana gelmektedir. Bu modifikasyonların yalnız bir kaçı tüm organizmalarda ortaktır. En yaygın kovalent modifikasyonlar, metilasyon ve thiolasyondur. Dolayısıyla kovalent modifikasyonlar; metil (CH3) ya da thiol(-SH) gruplarını içeren sistein, metionin ve treonin gibi amino asitlerin varlığına bağlıdır.. Genellikle bir bölgede, bir tip kovalent modifikasyon meydana gelir. Ancak, aynı bölgede birden çok farklı tip kovalent modifikasyonun meydana geldiği de, hem prokaryotik ve hem de ökaryotik tRNA molekülleri için tanımlanmıştır. tRNA’daki kovalent modifikasyon bölgeleri, genellikle molekül içi baz eşleşmeleri içermezler. Hücre için yaşamsal öneme sahip olmayan bu kovalent modifikasyonlar, tRNA molekülünün yüzey alanını yaklaşık %20 artırarak, tRNA’nın translasyon sistemine yapısal uyumunu sağlamaktadır.

Tüm organizmalardaki ribozomal RNA (rRNA) transkriptleri; büyük bir primer transkriptin nukleazlarla (endonukleaz ve ekzonukleaz) kesimi ve metilasyon reaksiyonları, bazen de düzenleme sürecinin ilavesi (intron içeren primer transkriplerde), sonucu üretilir. Ökaryotik ve prokaryotik rRNA öncülerinin işlenmesi detaylarda farklılıklar gösterse de, iki sistem büyük oranda benzerdir. rRNA öncülerinin prokaryotlardaki işlenmesi ribozoma bağlanma ile ilgili olduğu için, bir sonraki bölümde incelenecektir. Burada daha çok ökaryotik rRNA primer transkriptlerinin işlenmesi üzerinde durulacaktır. Ökaryotik rRNA primerlerinin işlenmesinde RNA’nın enzim olarak aktivite göstermesi çok ilginçtir. Ökaryotik rRNA primer transkriptleri 35 S ve 47 S arası büyüklükte olup, 18 S, 5.8 S, ve 28 S rRNA türlerini içerir (dördüncü ökaryotik rRNA türü olan 5S rRNA ise, RNA polimeraz III tarafından monomer halinde transkribe edilir ve bağımsız bir şekilde işlenmeye tabi tutulur). Multimerik primer transkript tamamen sentezlenmeden ve yüksek oranda korunan seriler içerisinde bulunan yaklaşık 100 riboz grubu metillenmeden, alt ünitelerine ayrılmaz. Sentezi tamamlanan ve metillenen multimerik rRNA transkripti, çekirdekçik bölgesinde kesilerek üç parçaya (transkriptteki 3 farklı ökaryotik rRNA türünü içeren parçalar) ayrılır. Multimerik transkriptin kesimden sorumlu enzimler ve kesim düzeni bilinmemektedir. Ancak doğru kesim için, rRNA öncülerinin bir seri proteine bağlanması gereklidir. Bu proteinler, olgun ribozom oluşumunda, rRNA alt birimlerinin ilişkilenmesini sağlar.

Bazı prokaryotlarda, tek hücreli ökaryotlardaki çekirdek RNA’larında ve *Neurospora crassa* gibi bazı küflerin mitokondriyal mRNA öncülerinde intronlara rastlanmıştır. Bu intronların bazısı, RNA öncüsünün kendi kendine katalizlediği reaksiyonlarla düzenlenmektedir. Silli bir protozoa olan *Tetrahymena thermophila* ve maya mitokondrilerinde bulunan sitokrom oksidaz mRNA öncülerinde örneklendiği gibi, bu kendi kendine düzenleme reaksiyonu iki farklı mekanizma ile meydana gelebilmektedir. *Tetrahymena thermophila*’daki 26 S rRNA’nın primer transkripti 413 nukleotit uzunluğunda bir intron içerir. Bu intron; ikincil yapısı ve evrimsel süreçte korunmuş serileri dikkate alınmak suretiyle, I. sınıf intron olarak tanımlanmıştır. Diğer I. sınıf intronlar ise; küf mitokondriyel sitokrom oksidaz genlerinde kodlanan intronlar, *Physarum polycephalum* küfündeki çekirdek rRNA intronları, fasulye ve mısır kloroplast tRNA öncülerinin intronlarıdır. Tüm I. sınıf intronlar kendi kendini düzenleme aktivitesi göstermez. Büyük olasılıkla kendi kendini düzenleme aktivitesini içerenler ile bu aktiviteye sahip olmayan intronlar ortak bir kökene sahip değildir. Kendi kendine düzenleme aktivitesi göstermeyen intronlarda RNA’nın doğru konformasyonda düzenlenmesine yardımcı proteinler bulunmaktadır.

rRNA öncülerinin işlenmesinin ilk aşamasında, intron kesilerek lineer bir molekül haline getirilir. Tom Cech ve çalışma arkadaşları, *Tetrahymena*’da yürüttükleri araştırmalarda, intron kesiminin proteinden bağımsız meydana geldiğini ve reaksiyonun yalnız Mg2+ iyonlarına ihtiyaç duyduğunu belirlemiştir. Divalent katyonun (Mg2+); rRNA öncüsünün üç boyutlu yapısını koruyarak, guanozin kofaktörün bağlanmasına yardımcı olduğuna ya da reaksiyonun meydana geldiği aktif bölgede rol aldığına inanılmaktadır. Kendi kendini düzenleme mekanizması, mutlaka guanozin kofaktörüne ihtiyaç duyar. Ancak, nukleozit analoglarının kullanımı sonucu; guanozin kofaktörünün G, GMP, GDP veya GTP olabileceği belirlenmiştir.

Düzenlemede rol oynayan reaktantlar rRNA öncülerinin ikincil (sekonder) yapısına etkilidir. 5’ düzenleme bölgesinin hemen arkasında yer alan primidince zengin serinin (CUCUCU), intron içinde tamamlayıcı serisi bulunmaktadır. İntronun tamamlayıcı serisi yakınındaki nukleotitler, 3’ ekzonun başlangıcındaki nukleotitlerle eşleşir. Böylece 5’ -3’ düzenleme bölgeleri birbirine yakınlaşır ve rRNA öncüleri iki transesterifikasyon reaksiyonu ile kendi kendini düzenler. Bu reaksiyonların birincisi; guanozin kofaktörün nukleofilik 3’ OH grubunun, 5’ düzenleme bölgesindeki α-fosfora etkisi ve introndan 5’ ekzonu ayırmasıdır. İntronun 5’ ucu serbest kaldığında, 5’ eksonun 3’ ucundaki uridinin 3’ OH grubu, 3’ düzenleme bölgesine saldırır. Bu ikinci transesterifikasyon reaksiyonu intronu lineer (düzlemsel) bir molekül halinde serbest bırakır ve iki ekzon birbiri ile bağlanır. Söz konusu iki transesterifikasyon reaksiyonu fosfodiester bağlarının sayısını değiştirmez. Bu reaksiyonda ATP’nin hidrolizine ihtiyaç duyulmaz. İntronlar serbest kaldıktan sonra da, iki tip otosiklizasyon (kendi kendini çevrimsel hale sokma) reaksiyonu için katalitik aktivite gösterirler. Her iki reaksiyonda da siklizasyon, intronun 3’ ucundaki guanozinin 15 ya da 19 nukleotit uzaklıktaki 5’ ucuna saldırması sonucu meydana gelir (Şekil 29a). Bu reaksiyonlarda; 15 nukleotit (C-IVS-15) ve 19 nukleotit (C-IVS-19) uzunlukta iki farklı oligomer oluşur. Çevrimsel intron IVS-19’un, RNA üzerinde RNazP düzeyinde kesim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. IVS-19, ayrıca, kendi molekülünün 3’ ucuna nukleotitleri ilave etme aktivitesi de (polimeraz aktivitesi) göstermektedir. Bu sayede intronun düzlemsel-çevrimsel form dönüşümü kendi aktivitesi ile sağlanabilmektedir (Şekil 29b). Günümüzde, her iki tip intronun da, çevrimsel hale geldikten sonra, RNaz aktivitesi göstererek, tekrar RNA düzenlemesine katıldığı düşünülmektedir.

Grup II intronlar , özellikle mayaların mitokondriyel sitokrom oksidazları için üretilen öncü mRNA transkriptinde çalışılmıştır (Maya mitokondriyel sitokrom oksidaz genleri aynı zamanda kendi kendini düzenleyebilen Grup I intronlar da içerir). Grup II intronlar; korunmuş seri (sekans) motifleri esas alınarak tanımlanmaktadır. Tüm grup II intronlar kendi kendini düzenleme aktivitesi göstermez. Bu intronların in-vitro düzenlenmesinde magnezyum ve spermidine ihtiyaç duyulduğu, ancak guanozinin gerekmediği saptanmıştır. Grup II intronların kesimi, grup I intronlarında olduğu gibi bir transesterifikasyon reaksiyonu ile başlatılır. Ancak bu aşamada ne kofaktör olarak kullanılabilecek serbest nukleozitler, ne de 5’ düzenleme bölgesine etki edecek serbest OH grupları mevcuttur. Bunun yerine, bir adenozinin nukleofil özellikteki 2 alt grubu intronun içindeki korunmuş saç tokası kıvrımı yapısı içerisinde lokalize olmuştur. 2’ OH grubu, 5’ düzenleme bölgesindeki fosfora etki ederek ekzonun 5’ ucunu serbest bırakır ve 2’ ,5’ fosfodiester bağı için ortam hazırlar. Ekzonun 5’ ucunda serbest OH grubunun oluşması, 3’ düzenleme bölgesine etki etmesini ve böylece iki ekzonun birbirine bağlanmasını sağlar. Grup II intronlar lineer değil, lariat (ilmek yapılar içeren molekül) yapılar olarak kesilirler. Grup I intronlarında olduğu gibi, grup II intronlarda da fosfodiester bağ sayısı korunur ve reaksiyonlar için ATP’ye ihtiyaç duyulmaz.

Ökaryotik mRNA molekülleri de uzun primer transkriptleri halinde üretilir ve olgun mRNA moleküllerine dönüştürebilmek için işlenmeleri gerekir. Bu primer transkriptler heterojen çekirdek RNA molekülleri (hnRNA) adını alır. İşlenmelerinde; nukleotitlerin modifikasyonu, nukleotidlerin ilavesi, nukleotitlerin uzaklaştırılıması ve düzenleme reaksiyonları, tipiktir. hnRNA işlenmesini, RNA’nın çekirdek membranından stoplazmaya transferi izler. Ökaryotlardaki transkripsiyon ve translasyon bölgelerinin farklılığı; bu transport sürecinde mRNA moleküllerinin nukleaz aktivitesine maruz kalarak parçalanma olasılığını ve gen ifade sürecini uzattığı için bir dezavantaj gibi görülebilir. Ancak bölge farklılığı, işleme tamamlandıktan sonra mRNA’nın translasyon sistemine dahil olmasını sağlayarak, abortif (eksik, kesilmiş) translasyonu önemli ölçüde engellemektedir. Ökaryotik heterojen RNA (hnRNA) değişik şekillerde modifiye edilerek, stabilitesi artırılır. RNA’yı parçalama özeliğindeki hücresel enzimlerin büyük çoğunluğu ekzonukleaz aktivitesi içerir. Dolayısı ile RNA moleküllerinin uç bölgelerinin modifikasyonu, RNA stabilitesinde önemli rol oynar. Ökaryotik hnRNA’nın 5’ uç bölgeleri, transkripsiyonun tamamlanmasından hemen önce, kovalent bir şekilde modifiye edilir. Primer transkriptin 5’ ucunda genellikle bir purin nukleozit trifosfat bulunur (zincir uzamasını sağlayan RNA polimeraz enzimi için primer). Bu nukleozit trifosfatın modifikasyonu, fosfohidrolaz aktivitesi sonucu, 5’ uçtaki trifosfatlardan terminal fosfat grubunun ayrılması ile başlatılır. Kalan 5’ difosfat grubu, daha sonra GTP molekülünün α fosforu ile reaksiyon vererek, 5’ -5’ trifosfat bağını oluşturur. Bu reaksiyon guaniltransferaz enzimi ile katalizlenir ve oluşan yapıya “kapak” adı verilir. “Kapak” yapısı, daha sonra değişik yollarla ve kovalent olarak modifiye edilir. Ökaryotların bazı türlerinde bulunan mRNA moleküllerinin çoğunluğu, metil grup donörü olan S-adenozin metioninden (SAM) türeyen bir metil grubunun, N7 pozisyonundaki guanine ilavesi sonucu kovalent bir şekilde modifiye edilir. Bu metillenen yapı “O” kapak olarak adlandırılır. Diğer modifikasyonlarla alternatif kapak yapıları da oluşturulmaktadır. Daha nadir rastlanan bu kovalent modifikasyonlar, orijinal transkriptteki son nukleoitidin ya da son iki nukleotidin metilasyonu yolu ile oluşturulmaktadır. Bu yolla yalnız mRNA öncüleri modifiye edilir. rRNA ve tRNA moleküllerinde kapak yapısı oluşmaz. Küçük çekirdek RNA’ları olan U1, U2, U4, U5 ve U6 ise, daha değişik kapak yapıları içerir. Kapak yapısı üç temel süreçte fonksiyoneldir;

1. Kapak yapısında bulunan 5’ -5’ trifosfat bağı, mRNA moleküllerini 5’ ekzonukleaz aktivitesinden korur.

2. 5’ -5’ trifosfat bağı, çekirdekte mRNA’ nın düzenlenmesi için uygun substrat yapısının oluşumuna yol açar.

3. Olgun mRNA molekülündeki kapak yapısı, ribozomlara bağlanma bölgesi olarak görev görür.

Ökaryotik mRNA öncülerinin, 3’ uç bölgeleri de modifiye edilemektedir. RNA polimeraz II enziminin DNA’nın 3’ bölgesini transkribe etmesinden hemen sonra, sentezlenen RNA konsensüs serisi (AAUAA) yakınından bir endonukleaz ile kesilir. Söz konusu kesim, bu serinin 10-20 nukleotit ilerisinden yapılır. Konsensüs serisinin, mRNA öncüsünün ikincil yapısının oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir. Endonukleaz kesimi ile oluşturulan yeni 3’ uç bölgesine, çok sayıda adenozin bağlanır. Bu bağlanma reaksiyonu poliadenozin polimeraz enzimi tarafından katalizlenir. ATP’ye bağlı bu reaksiyonla 50-250 kadar adenozin 3’ bölgeye bağlanarak poliadenin (poli A) kuyrukları oluşturulur. poli A kuyrukları, mRNA’nın saflaştırılmasında önemli ölçüde kolaylık sağlamaktadır. Poliadenin kuyruklarındaki adenin sayısı, türlere ve hücrenin gelişme fazı gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Poli A kuyrukları, mRNA işlenmesi sürecinde kısaltılır ve mRNA sitoplazmaya ulaşıncaya değin, 50-100 adenin poli A yapısından çıkarılabilir. Bu çıkarma işlemi 3’ ekzonuklaeazların aktivitesi ile olur. Dolayısıyla poli A kuyrukları, mRNA’nın amino asit kodu içeren 3’ bölgesine 3’ ekzonukleazların ulaşmasını engeller (Şekil 30). Öncü ve olgun mRNA moleküllerinin poli A kuyruklarının, 7800 Daltonluk stabil bir protein kompleksi ile kombine olduğu belirlenmiştir. Bu RNA: protein kompleksinin, mRNA’yı stabilize ettiği düşünülmektedir.

Ökaryotik mRNA öncü molekülleri, olgun mRNA molekülerinde bulunmayan ve intron olarak adlandırılan bölgeler içerir. Prokaryotik genlerde intron yapısı nadir görülen bir durumdur. Ancak, bitki ve memeli genlerinde intron yapısı kuraldır. *D. melanogester* intronlu ve intronsuz gen yapısının her ikisini de yaygın bir şekilde içerirken, mayalar ve algler gibi basit ökaryotlarda ancak birkaç gende intron bulunur. Isı-şok ve histon proteinleri gibi belirli bazı proteinlere ait genler, hiçbir organizmada intron yapısı içermez. Ekzon bölgeler ise, protein sentezi için gerekli bilgiyi içeren bölgelerdir ve olgun mRNA molekülleri yalnız ekzon bölgelerden oluşur. İntronların 1970’li yılların ortalarında keşfedilişi, bu zamana dek kabul edilen gen kavramında devrim yaratmıştır. Zira bu ana değin bilim adamları, mRNA moleküllerinin; bakterilerde olduğu gibi, tüm canlılarda şablon DNA zincirinin tam bir kopyası olduğuna inanmaktaydı. Çoğu ökaryotik gen birden fazla intron içerir. Mısır bitkisinde bulunan glikolitik enzim triyoz fosfat izomeraz geninin dizi analizi sonucu; intronların rastgele organize olmadığı ve her bir ayrı ekzonun, proteinin birincil yapısındaki belirli bir bölgeyi meydana getirdiği saptanmıştır. Bu bölgeler bir bütünün alt birimleri olarak tanımlanmıştır. Yumurta akı kanalbumin geni, bu gen tarafından üretilen olgun mRNA molekülü ile hibridize edildiğinde; mRNA ile hibridizasyon vermeyen DNA bölgelerinin (intron bölgeler) ilmek şekli aldığı, elektron mikroskop incelemeleri sonucu saptanmıştır. Bu RNA:DNA hibridizasyon tekniği “**R-ilmek tekniği”** adını almaktadır. İntron sayısı bazı ökaryotik genlerde 50 adedin üzerine çıkabilmektedir. Bir intronun uzunluğu ise, 65 baz çiftinden 10.000 baz çiftine kadar değişiklik göstermektedir. İntronların, konsensüs serileri dışında kalan diğer nukleotit serileri, RNA düzenlemesi ya da diğer işleme süreçlerinde rol oynamaz. Bir çok yakın akraba türdeki aynı genlerde intron serilerinin oldukça farklı oluşu, bu serilerin seçici bir baskı altında olmadığına işaret etmektedir.

mRNA öncülerindeki düzenleme bölgeleri konsensüs serisi (sekansı) özelliği göstermektedir. Bu bölgelerin bir kaçı konsensüs serisi ile tamamen aynıdır. Büyük bir çoğunluğu ise, konsensüs serisi ile büyük oranda benzerlik göstermektedir. Ayrıca, intronların 3’ uç bölgelerinde yer alan kısa bir konsensüs serisi belirlemiştir. Bu seri, ayrılma bölgesi adını almaktadır. Ayrılma serisi, RNA düzenlemesinde önemli rol oynamaktadır. Mayalarda ve omurgalılarda bulunan düzenleme bölgelerine ait konsensüs serilerinin, 3 önemli özellik bakımından ortak olduğu saptanmıştır;

1. İstisnalar hariç, tüm ökaryotik genlerde; intronların 5’ bölgelerinin, 5’ekzon ile çakıştığı yerde GU sekansı bulunmaktadır.
2. İntronun 3’ bölgesi ile 3’ ekzonun çakışma bölgesinde AG sekansı bulunmaktadır.
3. Bir adenozin, ayrılma bölgesinin bir bölümünü oluşturur ve 3’ düzenleme bölgesinin yaklaşık 40 nukleotit gerisinde yer alır (Şekil31).

Bu ortak özellikler, söz konusu canlıların evrimsel kökeninin aynı olduğunun kanıtı olarak kabul edilmektedir. Bu konsensüs serilerinin düzenlemede önemli olduğu, deneysel olarak belirlenmiştir. Zira, konsensüs serilerindeki nukleotitlerin değiştirilmesi, düzenlemenin durmasına ya da bozulmasına yol açmıştır. İntronların sonunda yer alan ve yüksek oranda korunan dinukleotit serilerin herhangi bir değişime uğratılmasının, RNA’nın düzenlenmesini özellikle etkilediği belirlenmiştir. RNA düzenlenmesi bir çok türde doğal mutasyonlarla da değişikliğe uğrayabilmektedir. Bu mutasyonlar, ya bazları modifiye ederek ya da düzenleme bölgelerindeki bazı bazların çıkmasına neden olarak hnRNA’nın işlenmesini durdurmaktadır. Örneğin; insan α-globin ya da β-globin genlerindeki bazı mutasyonlar, söz konusu genden üretilen hnRNA’nın işlenmesini engelleyerek, kalıtsal hemoglobin eksikliğine yol açmaktadır. Bu mutasyonların omurgalılarda konsensüs serileri içinde oluştuğu saptanmıştır.

Ökaryotik mRNA molekülleri, grup II intronların kendi kendine düzenlenme reaksiyonunun benzeri bir mekanizma ile işlenirler. İntron, iki transesterifikasyon reaksiyonu ile mRNA yapısından çıkarılır;

1. Adenilat ayrılma bölgesi ile 5’ işleme bölgesi arasında gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonu.

2. 5’ ekzon ile 3’ düzenleme bölgesi arasında gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonu

Bu iki reaksiyon sonucu ekzon bölgeler eklenir ve çıkarılan intronlar çevrimsel molekül formu oluşturur. Söz konusu reaksiyonlar, intronlar tarafından değil “düzenleyici” (splicosome) olarak adlandırılan büyük protein:RNA komplekslerince katalizlenir. Düzenleyici’ler 3x103 kDa moleküler büyüklükte çok alt üniteli komplekslerdir. 45 adet protein ve 5000 nukleotit uzunukta RNA’dan oluşur. Küçük çekirdek RNA molekülleri (snRNA) proteinlerle birleşerek, küçük çekirdek nukleoproteinlerini (snRNPs) oluşturur. Değişik tip snRNP’leri, yalnız mRNA öncülerinin düzenlenmesine değil, aynı zamanda diğer hücresel süreçlerde de rol oynamaktadır. Örneğin; henüz tam anlamı ile karakterize edilmemiş olan ve U11 adını alan snRNP, poliadenilasyon reaksiyonuna katılmaktadır.