

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΚΑΙ
ΕΙΔΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΕΝΟΤΗΤΑ ΤΡΙΤΗ

Γ. Ν. Παγουλάτος
Ι. Λαζαρίδης
Θ. Τζαβάρας



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΚΑΙ
ΕΙΔΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΕΝΟΤΗΤΑ ΤΡΙΤΗ

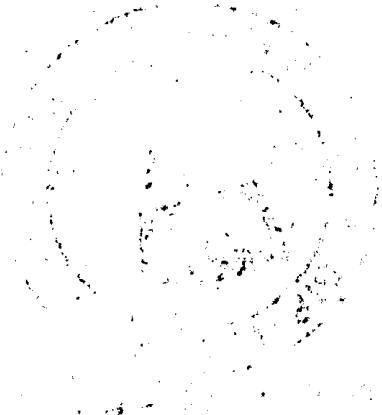
Γ. Ν. Παγουλάτος
Ι. Λαζαρίδης
Θ. Τζαβάρας



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
Τ. Παπαθανάσης &
ΑΔΡΕΑ:..... Μ. Νζογούνα
Αρ. Πρωτ.:..... 10015/2013..

Από:.....

Στο:.....



ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

Στά προηγούμενα κεφάλαια είδαμε ότι ή πληροφορία πού είναι κωδικοποιημένη στό DNA μεταγράφεται σέ RNA καί μεταφράζεται κατόπι σέ πρωτεΐνες. Στό κεφάλαιο αυτό θά αναλύσουμε τούς μηχανισμούς μέ τούς όποιους τά κύτταρα ρυθμίζουν τήν έκφραση τών γονιδίων.

Ή ικανότης ενεργοποιήσεως καί καταστολής τής λειτουργίας τών γονιδίων είναι μεγάλης σημασίας γιά τά κύτταρα έφ' όσον τούς έπιτρέπει νά ανταποκρίνονται στίς αλλαγές του περιβάλλοντος καί άποτελεϊ τήν βάση γιά τούς μηχανισμούς τής κυτταρικής αύξήσεως καί διαφοροποιήσεως.

Θά αναλυθῆ πρώτα ή ρύθμισις τής έκφράσεως τών γόνων στό βακτηρίδια. Οι περισσότερες γνώσεις μας γιά τόν τρόπο ρυθμίσεως τών γονιδίων στό βακτηρίδια προέρχονται από τήν μελέτη τών γόνων πού υπεισέρχονται στήν χρησιμοποίηση του σακχάρου λακτόζης (συνεργείωμα λακτόζης τής E.coli); θά μελετήσουμε λοιπόν τά γονίδια αυτά κάπως λεπτομερώς.

Ή ταχύτης έκφράσεως ενός βακτηριακού γόνου ρυθμίζεται στό επίπεδο τής συνθέσεως του αντίστοιχου άγγελιοφόρου RNA. Ή ρύθμισις μπορεί νά λαμβάνει χώρα στό σημεία έναρξεως τής συνθέσεως του mRNA (τῆ δράση μιās πρωτεΐνης πού όνομάζεται καταστολέας καί πού έμποδίζει τήν RNA πολυμεράση νά συνδεθῆ μέ τό DNA) ή στή λήξη τής πολυνουκλεοτιδικής άλύσεως του RNA (όπως θά δοῦμε πλιό κάτω αυτό συμβαίνει στούς γόνους πού υπεισέρχονται γιά τήν σύνθεση τής τρυπαράνης). Έφ' όσον τά βακτηρίδια είναι μονοκύτταροι όργανισμοί πού παραλαμβάνουν τήν τροφή τους από τό υλικό καλλιεργείας πού τούς περιβάλλει ή ρύθμισις τών βακτηριακών γονιδίων είναι φτιαγμένη έτσι ώστε νά ανταποκρίνεται ταχύτατα σέ μεταβολές του περιβάλλοντος.



Στους ανώτερους οργανισμούς τα κύτταρα περιβάλλονται από ένα σταθερό "milieu interieure" και προσαρμογές, όπως η ανταπόκριση σε ορμόνες ή έρεθίσματα από το νευρικό σύστημα καθίστανται πιο σημαντικές. Το γονιδίωμα των εύκαρυωτικών κυττάρων είναι πολύ πιο πολύπλοκο από αυτό των βακτηριδίων. Ένα ανθρώπινο κύτταρο περιέχει 1000 φορές περισσότερο DNA από ότι η E.coli. Ένα μεγάλο όμως μέρος του γονιδιώματος των εύκαρυωτικών κυττάρων βρίσκεται υπό την μορφή του έπαναλαμβανόμενου DNA για το οποίο θα μιλήσουμε παρακάτω. Η πολυπλοκότητας του γονιδιώματος των εύκαρυωτικών κυττάρων εξηγεί γιατί οι γνώσεις μας για το πώς ρυθμίζονται τα γονίδια τους είναι ακόμη τόσο άτελείς.

ΡΥΘΜΙΣΙΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

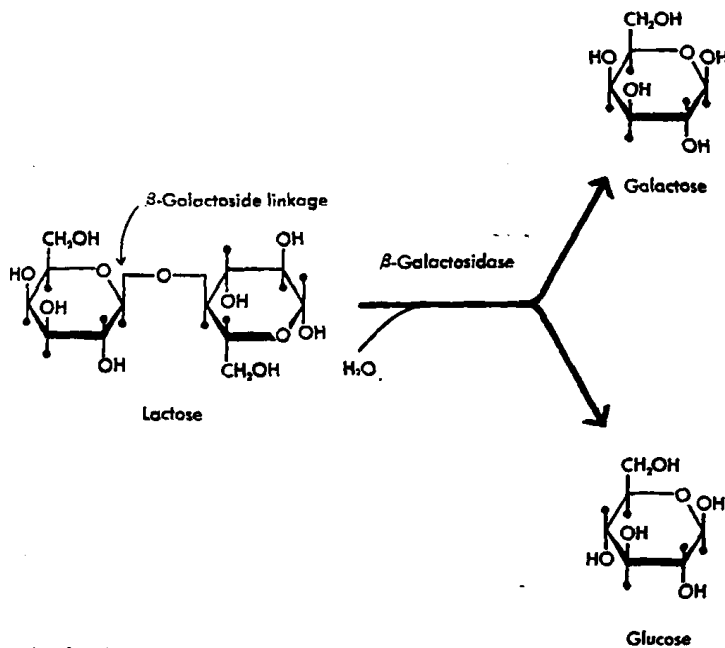
1.- Ένζυμική έπαγωγή και καταστολή - Οι καταστολείς "repressors" ενώνονται στους χειριστάς "operators".

Τό κυκλικό χρωμάτωμα της E. coli περιέχει τήν πληροφορία για ένα σύνολο 3.000 περίπου πρωτεϊνών. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες ονομάζονται δομικά γονίδια (structural genes). Τό DNA μεταγράφεται σε κομμάτια που περιλαμβάνουν 1 έως 20 δομικά γονίδια συγχρόνως, τά δέ σημεία έναρξεως και λήξεως της μεταγραφής είναι καθορισμένα. Τό σημείο έναρξεως π.χ. αντιστοιχεί στο τμήμα του DNA όπου συνδέεται ή RNA πολυμεράση και ονομάζεται υποκλινητής (promoter). Φυσιολογικά, μόνον όρισμένα γονίδια του όλου γονιδιώματος είναι ένεργά. Πράγματι εάν όλα τά γονίδια ήσαν συνεχώς ένεργά τότε τό κύτταρο θά γέμιζε με άχρησιμοποίητες πρωτεΐνες.

Άλλάζοντας τά θρεπτικά ύλικά της καλλιέργειας είναι δυνατόνά ένεργοποιήσουμε ή νά καταστείλουμε όρισμένα γονίδια και μέ τόν τρόπο αυτό τό κύτταρο προσαρμόζεται στις άλλαγές του

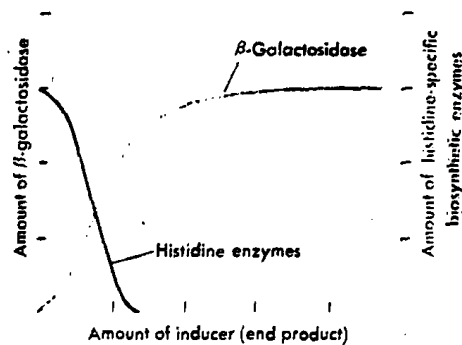


περιβάλλοντος: π.χ. ή *E. coli* που αυξάνεται παρουσία γλυκερόλης αυξάνει την παραγωγή των ένζυμων εκείνων που διασπούν την ουσία αυτή, ενώ άλλα ένζυμα παράγονται σε πολύ μικρά ποσά. Έπίσης αν τό βακτηρίδιο καλλιεργηθεί παρουσία του δισακχαρίτου λακτόζης τό ένζυμο β-γαλακτοσιδάση που ύδρολύει τόν δισακχαρίτη σε γαλακτόζη και γλυκόζη αυξάνει 1.000 φορές. Η μεταβολή αυτή ή όποια συνεπάγεται την αύξηση τής συνθέσεως ενός ένζυμου όνομάζεται ένζυμική έπαγωγή (είκόνα 1 και 2).



Εικόνα 1

The sugar lactose can be hydrolytically cleaved to galactose and glucose by the enzyme β -galactosidase. Mutants that fail to make this protein cannot utilize lactose as a carbon source.



Εικόνα 2

Variation in the amount of enzyme per cell as a function of the amount of inducer (end product) present in the growth medium.



Ἡ ρύθμιση διὰ ένζυμικῆς ἐπαγωγῆς παρατηρεῖται σέ πολλά καταβολικά συστήματα κατά τὰ ὅποια ἀποικοδομοῦνται σάκχαρα, ἀμινοξέα, λιπίδια. Τό πιό γνωστό σύστημα ἐπαγωγῆς εἶναι αὐτό τῆς β-γαλακτοσιδάσης τό ὁποῖο θά συζητήσουμε μέ λεπτομέρεια. Ἀντίθετα μέ τήν ἐνζυμική ἐπαγωγή ἐργάζεται ἕνας ἄλλος τρόπος ρυθμίσεως ἡ ένζυμική καταστολή κατά τήν ὁποία ἡ σύνθεση ὀρισμένων ἐνζύμων εἰδικῶς ἀναστέλλεται ἀπό τό τελικό προϊόν μιᾶς μεταβολικῆς ἀλύσεως. Ἐνα παράδειγμα ἐνζυμικῆς καταστολῆς δίδεται ἀπό τὰ πέντε ἐνζυμα πού χρειάζονται γιά τήν σύνθεση τοῦ ἀμινοξέως τρυπτοφάνης.

Ὅταν ἡ τρυπτοφάνη βρίσκεται μέσα στό ὑλικό καλλιέργειας καταστέλει τήν ἔκφραση τῶν πέντε ἐνζύμων πού ὑπεισέρχονται στήν σύνθεσή της. Μέ τόν τρόπο αὐτό ἡ E. coli συνθέτει τὰ ἐνζυμα μόνο ὅταν χρειάζονται ἐξοικονομώντας κατά τόν τρόπο αὐτό πολύτιμη ἐνέργεια.

Πολλά ἀναβολικά συστήματα πού ὑπεισέρχονται στήν σύνθεση ἀμινοξέων ἢ προδρόμων νουκλεϊνικῶν ὀξέων ρυθμίζονται μέ ἐνζυμική καταστολή. Καί οἱ δύο τρόποι ρυθμίσεως δηλαδή ἡ ένζυμική ἐπαγωγή καί ἡ ένζυμική καταστολή ἔχουν τό κοινό χαρακτηριστικό ὅτι λειτουργοῦν τῆ δρᾶση εἰδικῶν πρωτεϊνῶν πού ὀνομάζονται "repressors" καταστολεῖς καί οἱ ὁποῖες ἐμποδίζουν τήν σύνθεση τῶν mRNA διὰ τῆς συνδέσεώς τους μέ ἀλληλοδιαδοχές τοῦ DNA πού ὀνομάζονται χειρισταί "operators" καί πού βρίσκονται κοντά στήν ἀρχή τῶν γονιδίων πού ρυθμίζουν.

Ἀντίθετα μέ τὰ ἀγγελιοφόρα τῶν εὐκαρυωτικῶν κυττάρων τὰ περισσότερα ἀγγελιοφόρα στά προκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν τήν πληροφορία γιά πολλές πρωτεΐνες εἶναι δηλαδή πολυσιστρονικά. Ὅπως οἱ καταστολεῖς ρυθμίζουν τήν σύνθεση τῶν ἀγγελιοφόρων αὐτῶν κάθε καταστολέας ρυθμίζει τήν σύνθεση πολλῶν

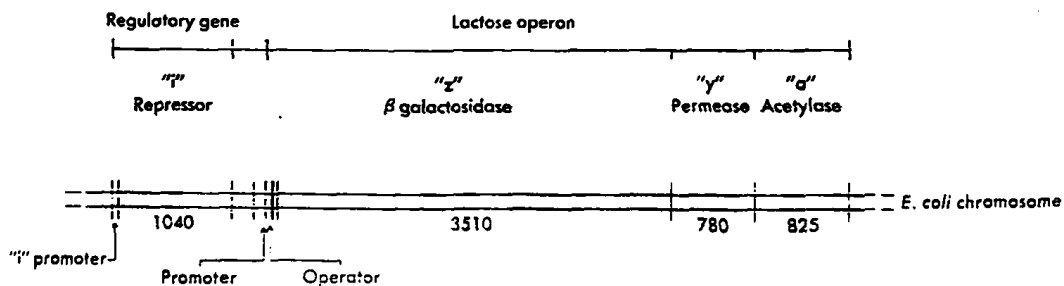


ένζύμων μιᾶς μεταβολικῆς ἀλύσεως:

2.- Τό συνεργίωμα τῆς λακτόζης κωδικοποιεῖ γιά τήν β-γαλακτοσιδάση τήν περμεάση καί τήν ἀκετυλάση

Τό 1961 οἱ Jacob καί Monod ἀπέδειξαν τήν ὕπαρξη μιᾶς νέας γενετικῆς μονάδος τοῦ συνεργιώματος "operon". Τό συνεργίωμα εἶναι μία ὁμάς γονιδίων συνενωμένων μεταξύ τους στό χρωμάτωμα καί πού ρυθμίζονται μέ ἕνα συντονισμένο τρόπο. Τό πιό γνωστό συνεργίωμα εἶναι αὐτό τῆς λακτόζης (lac-operon) καί ὑπεισέρχεται στήν χρησιμοποίηση τοῦ δισακχαρίτου αὐτοῦ ἀπό τό μικροβιακό κύτταρο. Τό συνεργίωμα τῆς λακτόζης περιλαμβάνει τρία δομικά γονίδια τά Z, Y, A καί παράγει ἕνα πολυσιστρονικό mRNA. Τό ἀγγελιοφόρο αὐτό κωδικοποιεῖ γιά τίς τρεῖς πρωτεΐνες β-γαλακτοσιδάση, περμεάση καί ἀκετυλάση.

Ἡ β-γαλακτοσιδάση εἶναι ἕνα τετραμερές ένζυμο μέ ὑπομονάδες μοριακοῦ βάρους 130.000 daltons πού σπάει τόν δισακχαρίτη λακτόζη σέ γαλακτόζη καί γλυκόζη. Ἡ περμεάση εἶναι μία πρωτεΐνη πού δρᾷ σάν φορέας γιά τήν εἴσοδο τῆς λακτόζης στό κύτταρο καί ἡ ἀκετυλάση μέ δύο ὑπομονάδες καταλύει τήν μεταφορά ἑνός ἀκετυλίου ἀπό τό ἐκετυλο-CoA στήν γαλακτόζη.



εἰκόνα 3

The lactose operon and its associated regulatory gene drawn to scale based on known sizes of their gene products. The numbers give the number of base pairs found in the several genes.



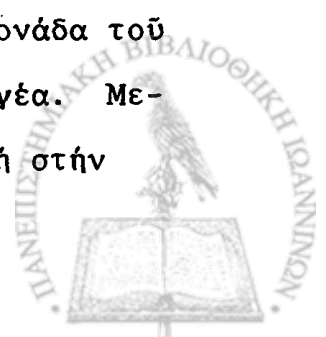
Ἡ ὁμάς τῶν τριῶν δομικῶν γονιδίων ρυθμίζεται ἀπὸ τρία τμήματα τοῦ DNA πού δροῦν σάν ρυθμιστικά στοιχεῖα. Αὐτά εἶναι τὸ ρυθμιστικό γονίδιο ἢ πού κωδικοποιεῖ γιὰ τὸν καταστολέα ὁ ὑποκλινητής "promotor" καὶ ὁ χειριστής "operator" (εἰκόνα 3)

3.- Τὸ ρυθμιστικό γονίδιο κωδικοποιεῖ γιὰ τὴν πρωτεΐνη καταστολέα πού ἐνώνεται μὲ τὸν ἐπαγωγέα

Τὸ στοιχεῖο κλειδί γιὰ τὸ μοντέλο τοῦ συνεργιώματος εἶναι ἡ ὕπαρξη ἑνὸς ρυθμιστικοῦ γονιδίου πού ρυθμίζει τὴν ταχύτητα ροῆς τῆς πληροφορίας ἀπὸ τὰ δομικά γονίδια στὶς πρωτεΐνες. Ἡ ταχύτης ἐκφράσεως τοῦ συνεργιώματος τῆς λακτόζης ρυθμίζεται ἀπὸ τὸ προϊόν τοῦ γόνου ἢ πού κωδικοποιεῖ γιὰ τὸν καταστολέα.

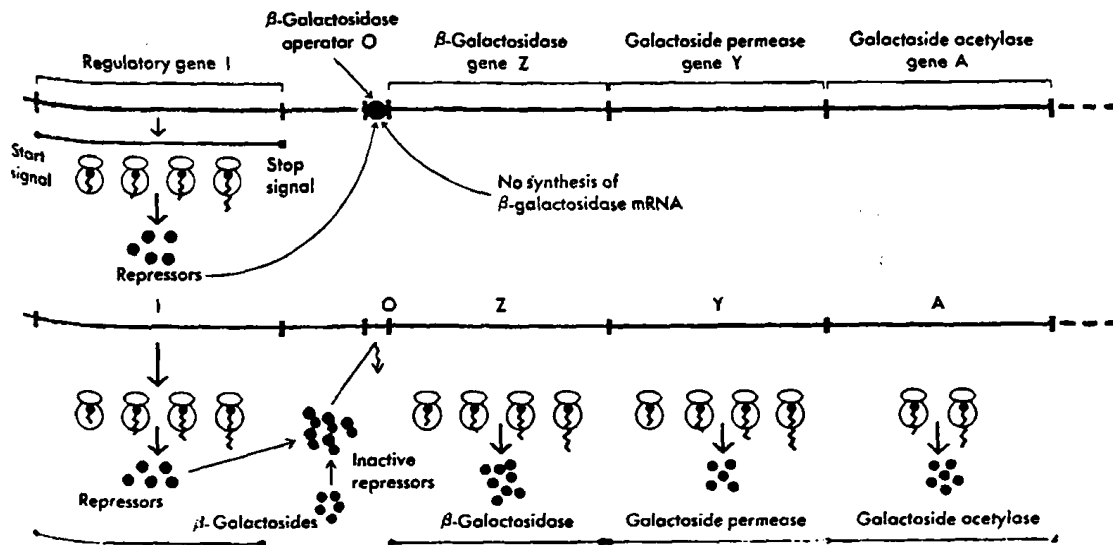
Ὁ καταστολέας εἶναι μίᾳ πρωτεΐνη πού ἀπεμονώθη καὶ καθαρίστηκε. Βρέθηκε πῶς ἀποτελεῖται ἀπὸ τέσσαρες ὑπομονάδες μοριακοῦ βάρους 40.000 daltons. Ὑπάρχουν περίπου δέκα μόρια τοῦ καταστολέα τῆς λακτόζης σέ κάθε κύτταρο *E. coli*. Ὁ καταστολέας ἐνώνεται ἰσχυρά καὶ εἰδικά σέ ἕνα βραχὺ τμήμα τοῦ DNA πού ὀνομάζεται χειριστής καὶ βρίσκεται πολὺ κοντὰ στὴν ἔναρξη τοῦ πρώτου δομικοῦ γονιδίου. Μὲ τὴν ἔνωσή του αὐτὴ ὁ καταστολέας ἐμποδίζει τὴν σύνδεση τῆς RNA πολυμεράσης καὶ ὡς ἐκ τοῦτου καταστέλει τὴν σύνθεση τοῦ ἀγγελιοφόρου τοῦ lac-operator (εἰκόνα 4).

Ἡ συγγένεια γιὰ τὴν σύνδεση τοῦ καταστολέα μὲ τὸν χειριστή ρυθμίζεται ἀπὸ τὴν παρουσία τοῦ ἐπαγωγέα. Ὁ φυσικὸς ἐπαγωγέας τοῦ lac-operator εἶναι ἡ λακτόζη πού ὅταν εἰσέλθῃ στὸ κύτταρο ἐνώνεται μὲ τὸν καταστολέα. Κάθε μίᾳ ὑπομονάδα τοῦ καταστολέα ἔχει ἕνα κέντρο συνδέσεως γιὰ τὸν ἐπαγωγέα. Μετὰ τὴν σύνδεση ὁ καταστολέας ὑφίσταται μίᾳ μεταβολή στὴν



εικόνα 4

How the interaction of repressor, inducer, and operator controls the synthesis of the *E. coli* proteins β -galactosidase, β -galactoside permease, and galactoside acetylase.

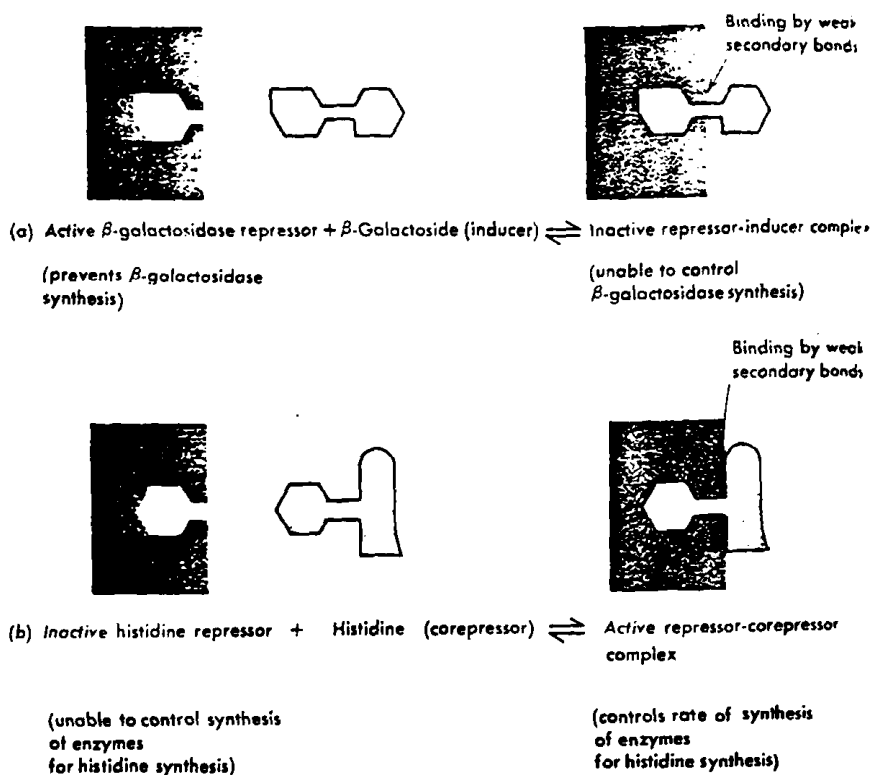


τρισδιάστατη δομή του δια της οποίας καθίσταται άνικανος νά ένωθει μέ τόν χειριστή. Έτσι παρουσία της λακτόζης έπάγεται ή σύνθεση τών ένζύμων του συνεργιώματος.

Τό άποτέλεσμα αύτης της άλλαγής στην δομή του καταστολέα έχει δραματικά άποτελέσματα, ένω κατά την έλλειψη λακτόζης ή *E. coli* περιέχει κατά μέσον όρο 3 μόρια β -γαλακτοσιδάσης ανά κύτταρο μετά την έπαγωγή περιέχει 3.000 μόρια/ανά κύτταρο.

Τά φαινόμενα της έπαγωγής και της καταστολής έχουν τόν ίδιο κοινό μηχανισμό ένωσης του έπαγωγέα (inducer) και του συγκαταστολέα (corepressor) μέ την ρυθμιστική πρωτεΐνη του καταστολέα "repressor". Η διαφορά έγκειται στό ότι στην μέν έπαγωγή ή ένωσις του έπαγωγέα μέ τόν καταστολέα τόν κάνει άνενεργό για σύνδεση μέ τόν χειριστή ένω στην καταστολή ό συγκαταστολέας ενεργοποιεί τόν καταστολέα για νά ένωθει μέ τόν χειριστή (εικόνα 5).





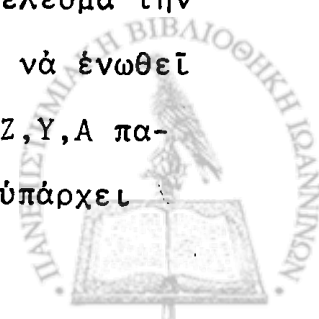
εἰκόνα 5

Schematic drawing illustrating the opposite effects of corepressors and inducers upon the activity of repressors. We see here that, depending upon whether the enzymes are inducible or repressible, the free repressors are either active or inactive.

4.- Ὁ χειριστής εἶναι μία ἀλληλοδιαδοχή τοῦ DNA μέ διπλή συμμετρία

Ὁ χειριστής εἶναι τό τμήμα τοῦ DNA ὅπου συνδέεται ὁ καταστολέας. Ὁ χειριστής εἶναι ἀνάγκη νά βρίσκεται πολύ κοντά στά δομικά γονίδια πού ρυθμίζει ἐνῶ ἀντίθετα τό ρυθμιστικό γονίδιο πού παράγει τήν πρωτεΐνη καταστολέα μπορεῖ νά βρίσκεται σέ μεγάλη ἀπόσταση ἀπό τά δομικά γονίδια. Τόσο τό ρυθμιστικό γονίδιο ὅσο καί ὁ χειριστής ἀνεκαλύφθησαν μέ γενετικά πειράματα ὅπου μελετήθηκαν στελέχη φέροντα μεταλλάξεις στά τμήματα αὐτά τοῦ DNA.

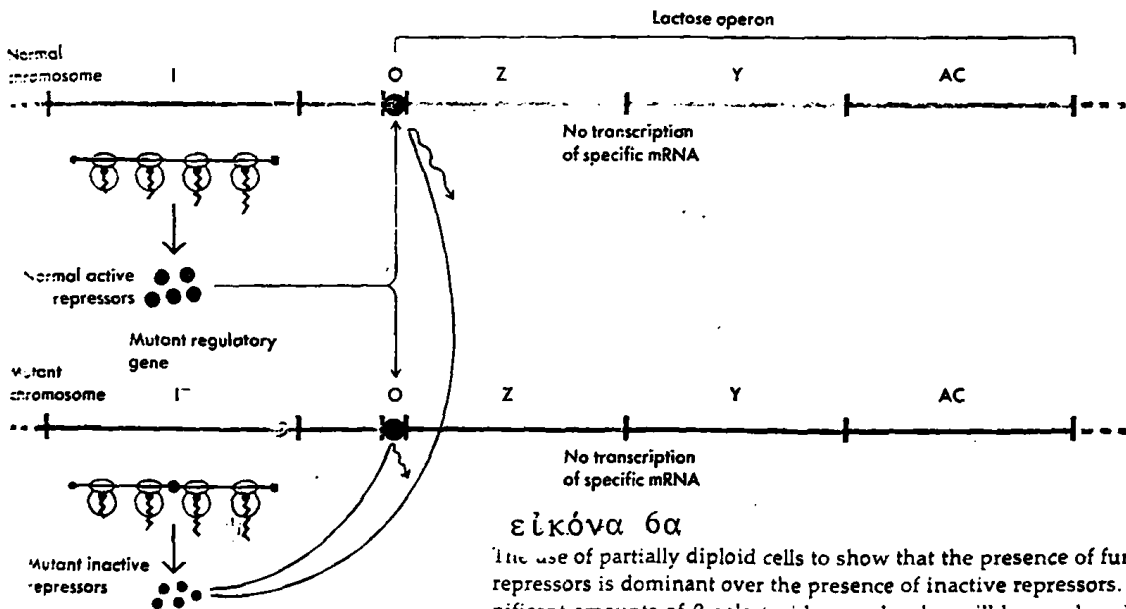
Μεταλλαγή στό ρυθμιστικό γονίδιο I^- ἔχει σάν ἀποτέλεσμα τήν παραγωγή ἐνός ἀνενεργοῦ καταστολέα πού δέν μπορεῖ νά ἐνωθεῖ μέ τόν χειριστή. Στήν περίπτωση αὐτή τά γονίδια Z, Y, A παράγουν συνεχῶς τά προϊόντα τους ἀκόμη καί ἂν δέν ὑπάρχει



λακτόζη. Λέμε στην περίπτωση αυτή ότι η σύνθεση των ενζύμων γίνεται κατά τρόπο αδιάφορο (constitutive).

Μεταλλαγή στον χειριστή O^C επίσης αλλάζει την σύσταση του τμήματος αυτού του DNA με τρόπο που να μην αναγνωρίζεται από τον καταστολέα οπότε πάλι τα ένζυμα Z, Y, A παράγονται με τον πιο ταχύ ρυθμό και η σύνθεση είναι πάλι αδιάφορος (constitutive).

Η διάκρισις μεταξύ των δύο αυτών μεταλλαγών γίνεται με την χρήση μεροδιπλοειδικών κυττάρων που περιέχουν δύο αντίγραφα του lac-operon. Πράγματι εάν τέτοια κύτταρα είναι I^-/I^+ τότε είναι επαγωγίμα δηλαδή φτιάχνουν τα ένζυμα μόνον όταν υπάρχει λακτόζη και αυτό γιατί παράγουν ένα καταστολέα (τά I^+) που είναι ενεργός. Λέμε ότι η παρουσία ενός φυσιολογικού καταστολέα είναι επικρατής επί της παρουσίας του μεταλλαγμένου (εικόνα 6α).



Αντιθέτως μεροδιπλοειδικά κύτταρα του τύπου O^C/O^+ δηλαδή με ένα φυσιολογικό και ένα μεταλλαγμένο χειριστή είναι αδιάφορα (constitutive) γιατί πάντοτε το ένα από τα δύο συνεργιώματα δεν συνδέει τον καταστολέα και τα γονίδια του δουλεύουν

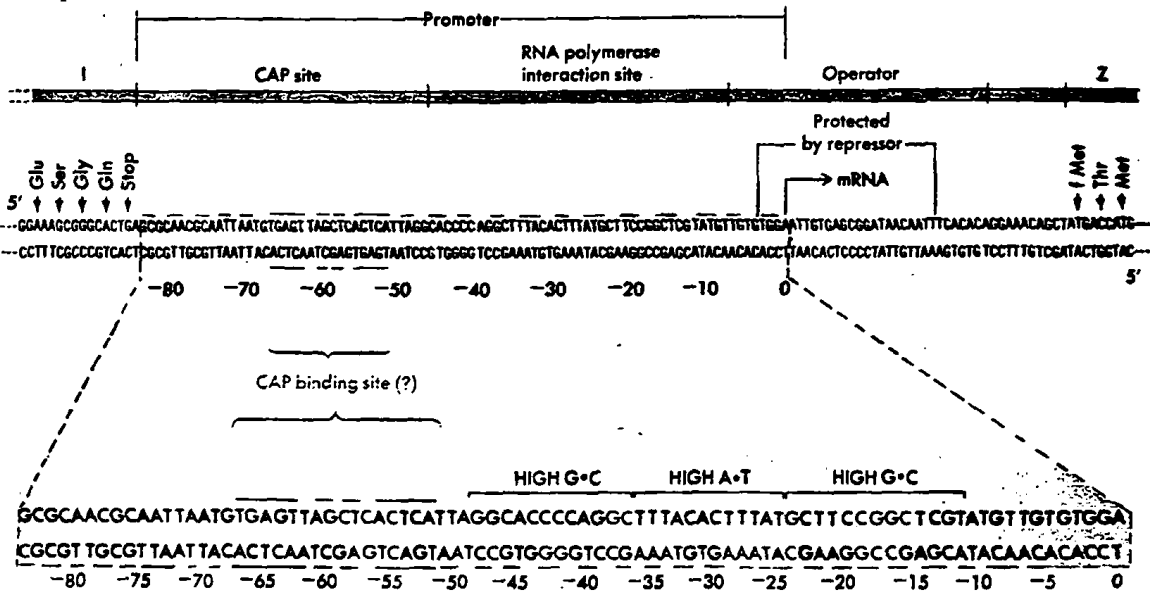
μονάδες.

Τά συμμετρικά τμήματα προφανώς αντιπροσωπεύουν αναγνωριστικά τμήματα για διάφορες υπομονάδες.

5.- Οι καταστολείς ενώνονται εντός τών υποκλινητῶν καί
έμποδίζουν τήν σύνδεση τῆς RNA πολυμεράσης

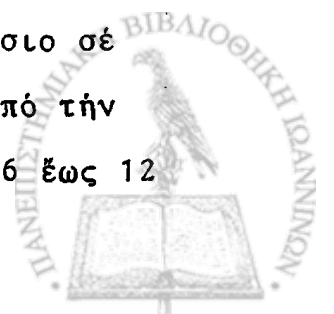
Ἐο υποκλινητής (P) εἶναι τό τμήμα τοῦ DNA στό ὁποῖο ἡ RNA πολυμεράση συνδέεται κατ'ἀρχάς ὅταν ἀρχίζει τήν μεταγραφή τοῦ δομικοῦ γονιδίου. Ἡ ἀλληλοδιαδοχή τῶν βάσεων τοῦ υποκλινητή για τό συνεργίωμα τῆς λακτόζης δίδεται στήν εἰκόνα 8.

Εἰκόνα 8
The sequence of the *E. coli* promoter, showing its relation to the overlapping operator sequences.



Ἡ RNA πολυμεράση ἐνοῦται μέ τόν υποκλινητή μόνον ὅταν μία πρωτεΐνη πού ἐνοῦται μέ τό κυκλικό AMP (πρωτεΐνη CAP) εἶναι ἐνωμένη στό ἀριστερό τμήμα. Ἡ λειτουργία τῆς πρωτεΐνης CAP καί τοῦ κυκλικοῦ AMP θά συζητηθῇ παρακάτω.

Δύο τμήματα τοῦ υποκλινητή φαίνεται ὅτι εἶναι σημαντικά για τήν σύνδεση τῆς RNA πολυμεράσης. (1) ἕνα τμήμα πλούσιο σέ A-T ἀλληλοδιαδοχές βρίσκεται 25 μέ 35 βάσεις πρὶν ἀπό τήν ἀρχή τοῦ γόνου Z (2) ἡ ἀλληλοδιαχή TATGTTG βρίσκεται 6 ἔως 12



βάσεις πριν από την αρχή του γόνου Z.

Μεταλλάξεις στην πρώτη περιοχή ισχυρώς αναστέλουν την έκφραση του lac-operon. Η περιοχή ή πλούσια σε AT φαίνεται πως διευκολύνει την τοπική αποδιάταξη των αλύσεων του DNA ένα μηχανισμό που είναι απαραίτητος για την σύνθεση RNA.

Η εικόνα (8) δείχνει ότι ο καταστολέας που ενώνεται με το DNA καλύπτει το αρχικό τμήμα που πρέπει να αντιγραφεί σε mRNA. Επίσης υπάρχει επικάλυψη μεταξύ του υποκινητή και του χειριστή. Πειράματα in vitro απέδειξαν ότι η RNA πολυμεράση εμποδίζεται να ενωθεί στον υποκινητή όταν ο χειριστής είναι κατειλημένος από τον καταστολέα.

6. - Τό μοντέλο των Jacob - Monod είναι ένας μηχανισμός αρνητικής ρυθμίσεως.

Τό μοντέλο των Jacob και Monod του operon είναι βασισμένο σε ένα μηχανισμό αρνητικής ρυθμίσεως που δρα στο επίπεδο της μεταγραφής. Πράγματι στην ενεργό του μορφή ο καταστολέας έχει ανασταλτική δράση στην σύνθεση του mRNA, π.χ. σε μία καλλιέργεια E.coli που αναπτύσσεται σε ένα θρεπτικό υλικό χωρίς λακτόζη ο καταστολέας είναι ενεργός, ένοϋται στον χειριστή και εμποδίζει την RNA πολυμεράση να μεταγράψει τα δομικά γονίδια του συνεργιώματος. Αποτέλεσμα είναι ότι η β-γαλακτοσιδάση και οι άλλες πρωτεΐνες δεν συντίθενται. Αντιθέτως παρουσία λακτόζης ο καταστολέας είναι ανενεργός δεν ένοϋται στον χειριστή με αποτέλεσμα σύνθεση σε μεγάλα ποσά της β-γαλακτοσιδάσης και των άλλων ένζυμων.

Αυτές οι προσαρμογές λαμβάνουν χώρα πολύ γρήγορα γιατί τα βακτηριακά mRNA έχουν πολύ βραχεία ήμισια ζωή και επομένως κάθε αλλαγή στην ταχύτητα συνθέσεώς τους ταχέως αντανakλάται στην ταχύτητα συνθέσεως των αντίστοιχων πρωτεϊνών.



7.- Θετική ρύθμιση του συνεργιώματος της λακτόζης γίνεται με το σύμπλεγμα πρωτεΐνη CAP - cAMP

Τό κυκλικό AMP (cAMP) έχει ένα ρυθμιστικό ρόλο στα βακτηρίδια ενεργοποιώντας επαγωγίμα συνεργιώματα στο επίπεδο της μεταγραφής. 'Η E. coli έχει μία πρωτεΐνη υποδοχέα του cAMP πού είναι ικανή νά ένώνετε με τό cAMP με ύψηλή συγγένεια.

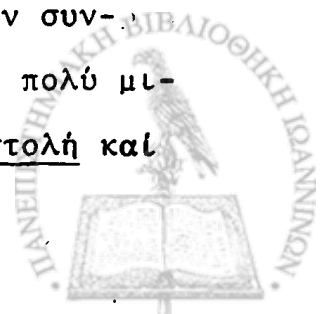
'Η πρωτεΐνη αυτή είναι γνωστή σάν CAP πρωτεΐνη ή "γονιδιακή ενεργοποιός πρωτεΐνη από καταλύτας". Πρόκειται για μία διμερής πρωτεΐνη με δύο υπομονάδες 45.000 dalton έκαστη πού όταν ένωθει με τό cAMP μπορεί νά συνδεθῆ σέ ένα είδικό σημείο του υποκλινητή άριστερά της RNA-πολυμεράσης.

'Η RNA πολυμεράση αναγνωρίζει τόν υποκλινητή του συνεργιώματος της λακτόζης μόνον όταν τό σύμπλεγμα CAP-cAMP είναι ήδη συνδεδεμένο στον υποκλινητή. 'Ως έκ τούτου στο συνεργίωμα της λακτόζης έκτός από την άρνητική ρύθμιση με τόν καταστολέα υπάρχει καί μία θετική ρύθμιση με τό σύμπλεγμα CAP-cAMP.

'Ο μηχανισμός αυτός είναι κοινός για την έκφραση καί πολλών άλλων επαγωγίμων συνεργιωμάτων όπως είναι αυτά πού υπεισέρχονται στην χρησιμοποίηση της μαλτόζης, γαλακτόζης, άραβινόζης. Παρ' όλα ταυτα τό cAMP δέν είναι άπαραίτητο για την σύνθεση εκείνων των ένζύμων πού χρειάζονται για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης σάν πηγή ενεργείας.

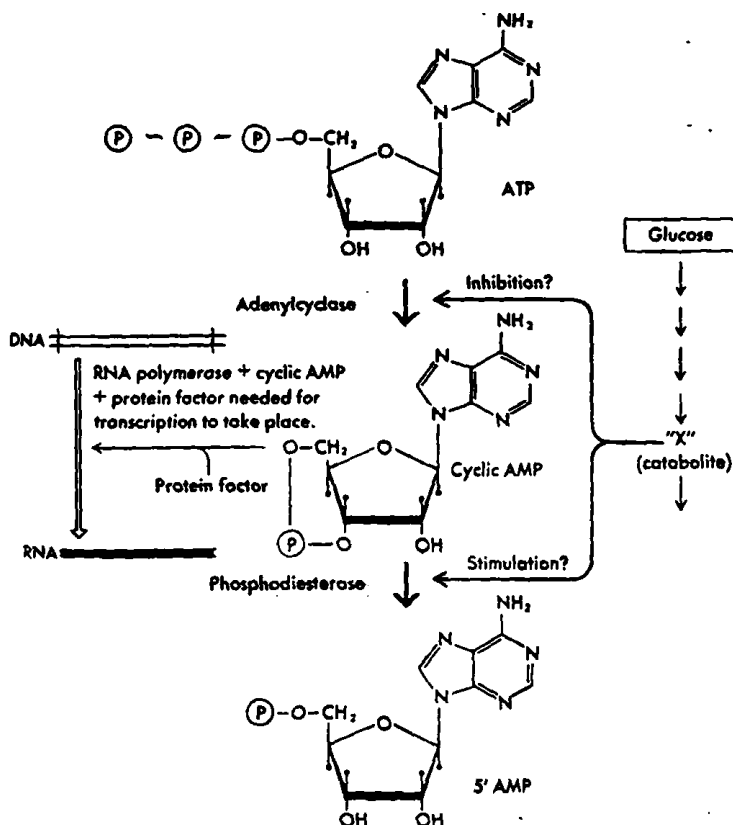
Ποιά είναι ή αίτία για ένα δεύτερο μηχανισμό ρυθμίσεως του συνεργιώματος της λακτόζης; 'Η άπάντηση στην έρώτηση αυτή συνδέεται με ένα από μακροῦ γνωστό φαινόμενο.

'Όταν βακτηρίδια αναπτύσσονται παρουσία γλυκόζης ή ταχύτης συνθέσεως των επαγωγίμων ένζύμων όπως είναι αυτά των συνεργιωμάτων της λακτόζης, μαλτόζης, άραβινόζης είναι πολύ μικρή. Τό φαινόμενο αυτό όνομάζεται καταβολική καταστολή καί



μπορεί τώρα να εξηγηθῆ στο μοριακό επίπεδο. Τὰ βακτηρίδια πού ἀναπτύσσονται παρουσία γλυκόζης ἔχουν ἕνα πολύ μικρό ποσό cAMP σέ σχέση μέ αὐτά πού ἀναπτύσσονται παρουσία μιᾶς πιά φτωχῆς πηγῆς ἐνεργείας ὅπως εἶναι ἡ λακτόζη.

Ὅταν τὸ ἐνδοκυτταρικό ἐπίπεδο τοῦ cAMP εἶναι χαμηλό ἢ πρωτεΐνη δέκτης τοῦ cAMP ἢ πρωτεΐνη CAP δέν μπορεῖ νὰ ἐνωθεῖ στὸν ὑποκινητὴ τοῦ lac-operon καὶ ἐπομένως τὸ συνεργίωμα αὐτὸ δέν ἐνεργοποιεῖται ἀκόμη καὶ παρουσία λακτόζης. Ἡ κατάσταση αὐτὴ ἀνατρέπεται ἐάν προστεθεῖ ἐκ τῶν ἔξω cAMP. Ἐάν ἡ E.coli ἀναπτύσσεται παρουσία γλυκόζης καὶ λακτόζης τὸ ἐπίπεδο τοῦ cAMP θὰ εἶναι χαμηλό καὶ τὰ βακτηρίδια θὰ χρησιμοποιήσουν μόνον τὴν γλυκόζη πού εἶναι ἐνεργειακά πιά πλούσια. Ὁ τρόπος μέ τὸν ὁποῖο ὁ καταβολισμὸς τῆς γλυκόζης χαμηλώνει τὸ ἐπίπεδο τοῦ cAMP δέν εἶναι τελείως γνωστός. Φαίνεται πάντως πὼς κάποιος καταβολίτης τῆς γλυκόζης ἐπιδρᾷ καὶ ἀναστέλει τὴν σύνθεση ἢ αὐξάνει τὴν καταστροφή τὸ cAMP (εἰκόνα 9).



εἰκόνα 9
Control of catabolite-sensitive transcription through cyclic AMP.

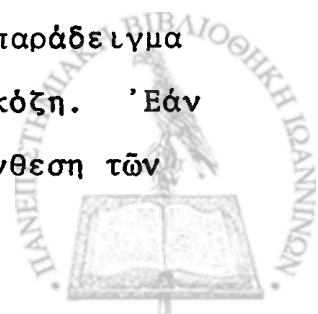


κατά τήν λήξη τῆς συνθέσεως τοῦ RNA. Τό σημαντικό εὑρημα ἦτο ὅτι μεταλλαγές ἐλλείψεως δεξιά τοῦ χειριστή εἶχαν σάν ἀποτέλεσμα αὐξηση τῆς συνθέσεως τῶν ἐνζύμων τοῦ συνεργιώματος. Οἱ ἐλλείψεις αὐτές ἀφαιροῦσαν μία ἀλληλοδιαδοχή λήξεως πού ὀνομάσθηκε "έκτροχιαστής" (attenuator) καί βρίσκεται μέσα σέ μία "ὁδηγό" ἀλληλοδιαδοχή (leader sequence) μεταξύ τοῦ τμήματος τοῦ RNA τοῦ ὑποκινητή-χειριστή καί τοῦ πρώτου δομικοῦ γονιδίου τοῦ συνεργιώματος (εἰκόνα 10).

Φυσιολογικά τά 90% τῶν μορίων τῆς RNA πολυμεράσης πού ἀρχίζουν τήν μεταγραφή στόν ὑποκινητή τελειώνουν τήν μεταγραφή στό σημεῖο τοῦ "έκτροχιαστή" δίνοντας ἕνα μικρό RNA 140 νουκλεοτιδίων πού δέν κωδικοποιεῖ γιά τά ἐνζυμα τοῦ συνεργιώματος. Μόνον 10% τῶν μορίων τῆς πολυμεράσης προχωροῦν πέραν τοῦ έκτροχιαστοῦ γιά νά δώσουν πλήρη ἀγγελιοφόρα. Ὁ τερματισμός στόν έκτροχιαστή χρειάζεται τόν παράγοντα λήξεως ρ καί ρυθμίζεται ἀπό τό ὑπάρχον ποσόν τρυπτοφάνης. Ὄταν τό ποσόν τῆς τρυπτοφάνης εἶναι χαμηλό τό ποσοστό τῶν πλήρων ἀγγελιοφόρων αὐξάνει. Ἀντίθετα ὑψηλά ποσά τρυπτοφάνης ἔχουν σάν ἀποτέλεσμα πρόωρο τερματισμό τῆς μεταγραφῆς. Ὁ τρόπος μέ τόν ὁποῖον γίνεται αὐτό δέν εἶναι γνωστός ἀλλά φαίνεται ὅτι ὑπεισέρχεται ἕνας συμπληρωματικός ρυθμιστικός παράγων ὁ ὁποῖος ἐνεργοποιεῖται ὅταν τό ποσόν τῆς τρυπτοφάνης εἶναι χαμηλό καί ἐπιτρέπει τήν παραγωγή πλήρων ἀγγελιοφόρων.

9.- Ρύθμισις στό ἐπίπεδο τῆς λειτουργίας τῶν ἐνζύμων

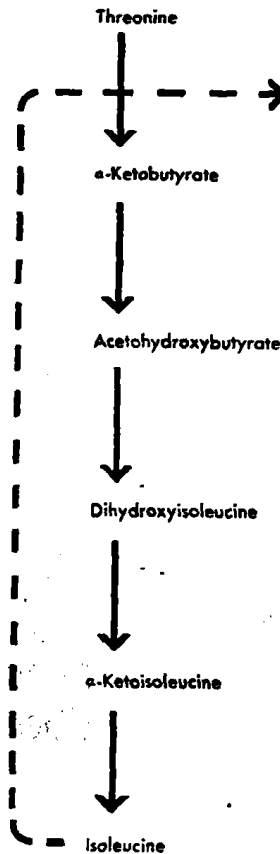
Ἡ ρύθμισις τοῦ μεταβολισμοῦ τοῦ κυττάρου δέν γίνετε μόνον στό ἐπίπεδο τῆς μεταγραφῆς τῶν ἀγγελιοφόρων μέ τήν ἐπαγωγή ἢ καταστολή τῆς συνθέσεώς τους. Ἄς πάρουμε σάν παράδειγμα τήν E. coli νά αὐξάνετε σέ ἕνα ὑλικό περιέχον γλυκόζη. Ἐάν στό ὑλικό αὐτό προσθέσουμε ἰσολευκίνη ἀμέσως ἢ σύνθεση τῶν



άγγελιοφόρων που κωδικοποιούν για τα ένζυμα που υπεισέρχονται στην βιοσύνθεση της ισολευκίνης σταματά. Χωρίς κανένα άλλο μηχανισμό ρυθμίσεως τα ήδη υπάρχοντα ένζυμα (που έχουν και μεγάλο χρόνο ήμισιάς ζωής) θα εξακολουθήσουν να παράγουν ισολευκίνη με διατάραξη της ενεργειακής οικονομίας του κυττάρου. Αυτό όμως δεν συμβαίνει διότι υψηλά ποσά ισολευκίνης έχουν σαν αποτέλεσμα να αναστέλουν την ενεργητικότητα του ενζύμου που υπεισέρχετε στο πρώτο βήμα της βιοσυνθέσεως της ισολευκίνης από την θρεονίνη (είκόνα 11).

είκόνα 11

The pathway of isoleucine biosynthesis starting from threonine. The dotted colored line shows that isoleucine inhibits the enzyme (threonine deaminase) which transforms threonine into α -ketobutyrate.



Η αναστολή αυτή γίνεται γιατί η ισολευκίνη συνδέεται με το ένζυμο απαμινάση της θρεονίνης. Το ένζυμο υπό αυτές τας συνθήκας δεν μπορεί να μετατρέψει την θρεονίνη σε α -κετοβουτυρικό όξύ όποτε παύει να λειτουργεί ολόκληρος ο βιοσυνθετικός κύκλος.

Αυτή η πολύ ειδική αναστολή ονομάζεται ανάδραστική αναστολή

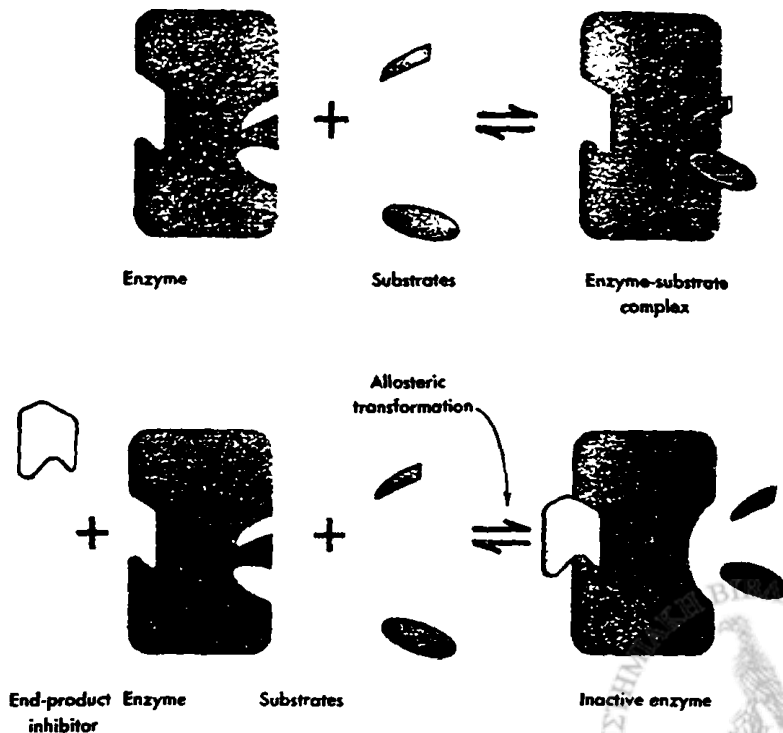


(feedback inhibition) γιατί η συσσώρευση του τελικού προϊόντος μιᾶς μεταβολικῆς ἀντιδράσεως ἀναστέλει τὴν παραγωγή του.

Τὸ τελικό προϊόν μιᾶς μεταβολικῆς ὁδοῦ διαφέρει χημικῶς ἀρκετά ἀπὸ τὸ ἀρχικό προϊόν γιατί ὑφίσταται πολλές μεταβολές ἀπὸ σειρά ἐνζύμων. Ἔτσι τὸ ἐνζυμο πού δρᾷ στό πρῶτο βῆμα μιᾶς σειρᾶς ἐνζυμικῶν ἀντιδράσεων δέν μπορεῖ νά ἀναγνωρίσει τὸ τελικό προϊόν μέ τὸ ἴδιο ἐνεργό κέντρο πού ἀναγνωρίζη τὸ πρόδρομό του μόριο. Πράγματι τὰ ἐνζυμα αὐτά ἔχουν δύο ἐνεργά κέντρα ἓνα γιὰ τὴν ἐνζυματική τους δράση στό ὑπόστρωμα καί ἓνα δεύτερο ὅπου τὸ τελικό προϊόν συνδέεται. Ἡ σύνδεση τοῦ τελικοῦ προϊόντος προκαλεῖ μία μεταβολή στήν τρισδιάστατο δομή τοῦ ἐνζύμου μέ μεταβολή τοῦ σχήματος τοῦ ἐνεργοῦ κέντρου ἐνζυματικῆς δράσεως. Ἔτσι τὸ ἐνζυμο δέν μπορεῖ πιά νά ἀναγνωρίση τὸ ὑπόστρωμα καί ἡ ἐνζυματική του δράσις ἀναστέλειται. Τὰ ρυθμιστικά αὐτά ἐνζυμα ὀνομάζονται ἀλλοστερικά (εἰκόνα 12).

εἰκόνα 12

Schematic view of how the binding of an end-product inhibitor inhibits an enzyme by causing an allosteric transformation.



Ἐπειδὴ ἡ σύνδεσις μὲ τὸ τελικὸ προϊόν γίνεται μὲ ἀσθενεῖς δεσμούς Van der Waals, δεσμούς ὑδρογόνου κ.λ.π. ἡ ἀναδραστικὴ ἀνστολή εἶναι ἀντιστρεπτή καὶ σταματᾷ ὅταν ἡ συγκέντρωσις τοῦ τελικοῦ προϊόντος ἐλλατῶνεται. Ἔτσι ἡ παραγωγή τοῦ τελικοῦ προϊόντος ρυθμίζεται στό ἐπίπεδο τῆς δράσεως τῶν ἐνζύμων.



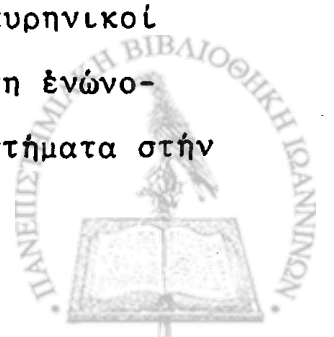
ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

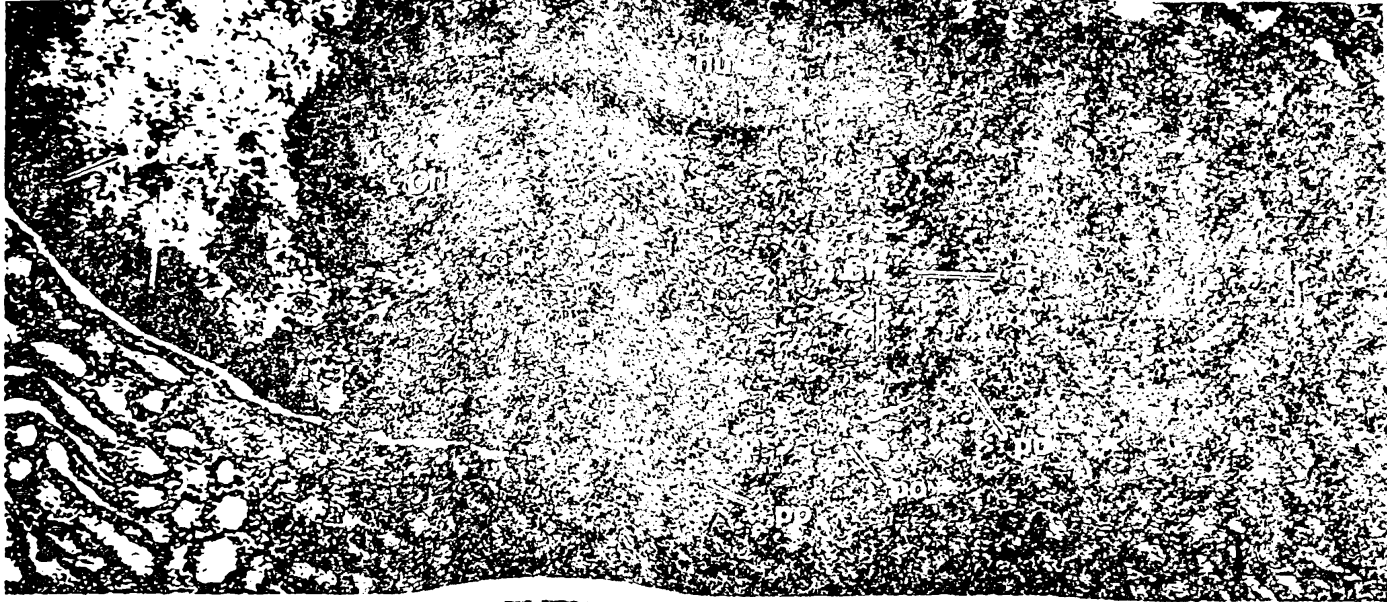
Α. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΜΕΣΟΦΑΣΗ

1.- Πυρηνική μεμβράνη

Ὁ πυρήν τῶν εὐκαρυωτικῶν κυττάρων κατὰ τὴν μεσόφαση περιβάλλεται ἀπὸ μίᾳ διπλῇ μεμβρᾶνῃ ἢ ὁποῖα ἀποτελεῖ συνέχεια τῶν μεμβρανῶν τοῦ ἐνδοπλασματικοῦ δικτύου. Τὸ τμῆμα τῆς μεμβράνης πρὸς τὴν πλευρὰ τοῦ πυρήνος ὀνομάζεται ἐσωτερικὴ πυρηνικὴ μεμβράνη τὸ τμῆμα πρὸς τὸ κυτταρόπλασμα ἐξωτερικὴ πυρηνικὴ μεμβράνη. Τὸ διάστημα ποῦ σχηματίζεται ἀπὸ τίς δύο μεμβράνες λέγεται περιπυρινικὸ διάστημα καὶ συγκοινωνεῖ μὲ τὰ διαστήματα τοῦ ἐνδοπλασματικοῦ δικτύου (εἰκόνα 12). Ἡ σύστασις τῆς πυρηνικῆς μεμβράνης περιλαμβάνει δύο ἄλλα στοιχεῖα τοὺς πυρηνικοὺς πόρους καὶ μίᾳ πρωτεϊνικῇ μεμβρᾶνῃ (lamina) ποῦ εἶναι συγκολλημένη στό μέσα μέρος τῆς ἐσωτερικῆς πυρηνικῆς μεμβράνης. Πράγματι ἐάν ἐπιδράσουμε στό κύτταρο μὲ μὴ ἰονικά ἀπορρυπαντικά ὅπως τὸ tween-100 ἢ τὸ NP40 διαλύουμε τίς κυτταρικές λιποδιαλυτές μεμβράνες (ἐξωτερικὴ μεμβράνη, ἐνδοπλασματικὸ δίκτυο, ἐσωτερικὴ καὶ ἐξωτερικὴ πυρηνικὴ μεμβράνη) ἀλλὰ ὁ πυρήνας τοῦ κυττάρου διατηρεῖται ἀνέπαφος. Αὐτὸ ὀφείλεται στὴν ὑπαρξὴ τῆς ἐσωτερικῆς πρωτεϊνικῆς μεμβράνης ποῦ διατηρεῖται ὑπὸ αὐτές τίς συνθῆκες καὶ κρατᾷ τὴν μορφή τοῦ πυρήνος ἀνέπαφη. Ἡ μεμβράνη αὐτὴ εἶναι συνδεδεμένη ἰσχυρὰ μὲ τὴν χρωματίνη τοῦ πυρήνος καὶ φαίνεται πὼς ἡ σύνδεση γίνεται μὲ τὸ DNA. Ἄρα καὶ τὸ DNA τῶν εὐκαρυωτικῶν κυττάρων εἶναι συνδεδεμένο μὲ μεμβράνες. Ἡ σύστασις τῆς lamina ἔχει μελετηθεῖ καὶ ἀποτελεῖται ἀπὸ τὴν συνένωση τριῶν κυρίως πρωτεϊνῶν μὲ μοριακὰ βάρη 70.000, 67.000, 60.000.

Τὸ ἄλλο στοιχεῖο τῆς πυρηνικῆς μεμβράνης εἶναι οἱ πυρηνικοὶ πόροι. Ἡ ἐσωτερικὴ καὶ ἐξωτερικὴ πυρηνικὴ μεμβράνη ἐνώνονται μεταξύ τους καὶ δημιουργοῦν κατὰ κανονικὰ διαστήματα στὴν





▲ εἰκόνα 1 α

Structure de l'enveloppe nucléaire.

a) Portion de noyau dans une cellule acineuse de pancréas de souris. Des masses de chromatine Ch sont accolées à l'enveloppe nucléaire sauf au niveau des pores po ; nu, nucléole ; re, réticulum endoplasmique ; × 25 000 (micrographie électronique J. André).

b) Portion d'enveloppe nucléaire dans une cellule méristématique de racine d'oignon. La membrane nucléaire interne mni et la membrane nucléaire externe mne délimitent l'espace périnucléaire ep. Au niveau des pores po est localisé un matériel dense formant les complexes des pores (flèches) ; Ch, chromatine ; Hy, hyaloplasme ; Np, nucléoplasme ; × 150 000 (micrographie électronique W.W. Franke et U. Scheer, 1974).

1 β

Structure du pore nucléaire.

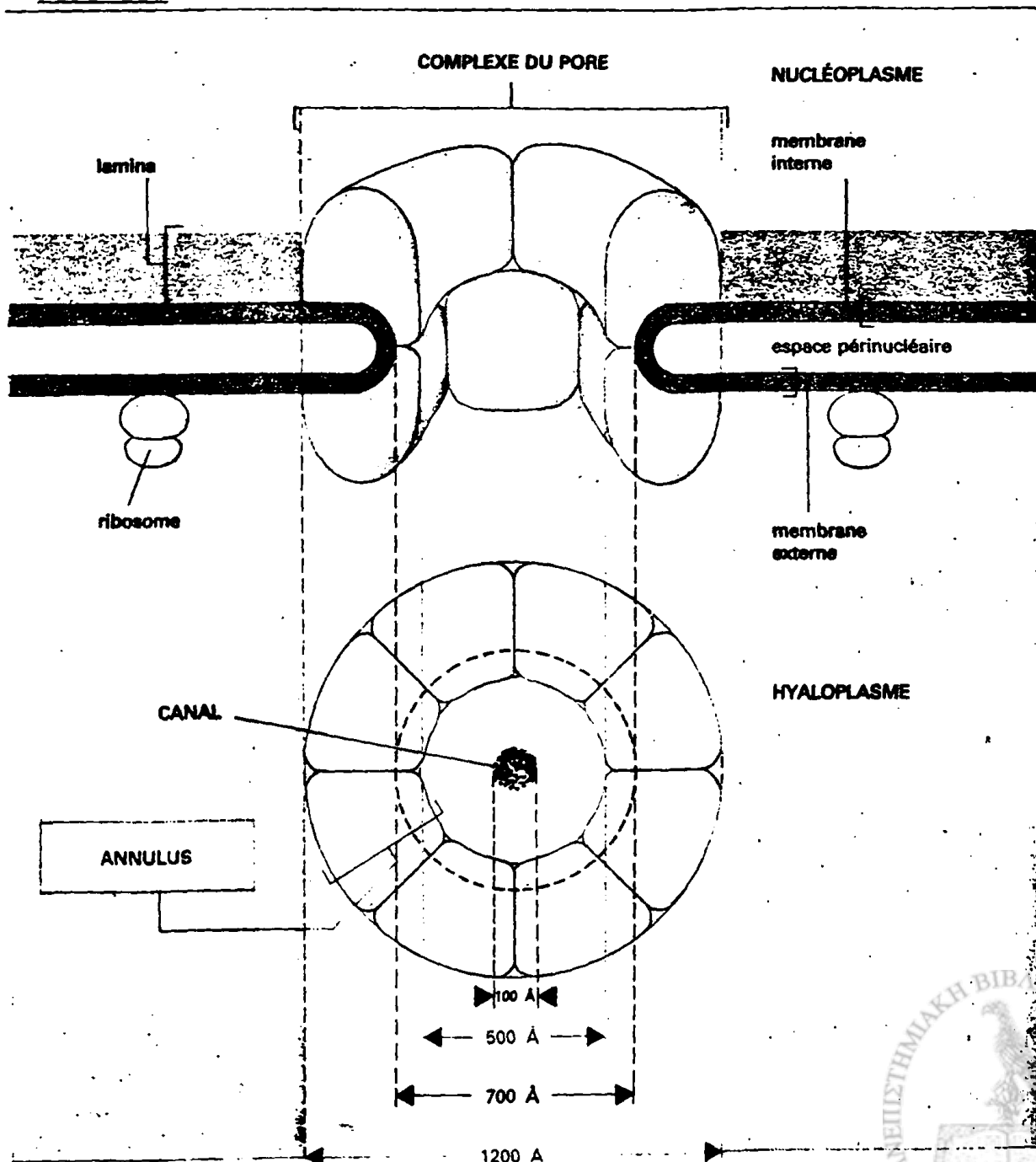
a) Bloc diagramme montrant un pore nucléaire et le complexe qui lui est associé. La lamina est accolée à la membrane nucléaire interne ; des ribosomes sont attachés à la membrane externe. Le complexe du pore est formé de sous-unités disposées en deux étages de part et d'autre de l'enveloppe ; chaque étage comporte probablement 4 sous-unités qui sont décalées d'un étage à l'autre. b) Aspect du complexe du pore en vue frontale.

Les sous-unités forment un anneau : c'est pourquoi le complexe du pore est aussi appelé annulus. Le diamètre externe du complexe est supérieur à celui du pore, son diamètre interne inférieur à celui du pore. Les échanges entre le nucléoplasme et le hyaloplasme se font à travers un canal de 100 Å de diamètre ; le matériel qui délimite la lumière du canal n'est pas mis en évidence par les techniques actuelles.



πυρηνική μεμβράνη πόρους. Έτσι ο πυρήνας συγκοινωνεί
 δια των πόρων αυτών με το πρωτόπλασμα. Στο έσωτερικό κάθε
 πόρου υπάρχει ένα δακτυλοειδές υλικό κάθετο στο πυρηνικό
 περίβλημα που διαπερνά τον πόρο και προεξέχει στο έσωτερι-
 κό και το έξωτερο του πυρήνος. Το δακτυλοειδές αυτό υλι-
 κό έχει όκταγωνικό σχήμα και αποτελείται από 8 υπομονάδες.
 Έτσι οι πυρηνικοί πόροι μικραίνουν σε διάμετρο και ο άνοικτός
 αύλος τους δια την επικοινωνία πυρήνος και πρωτοπλάσματος
 είναι της τάξεως των 100Å, (εικόνα 13).

εικόνα 13



Ο αριθμός των πυρηνικών πόρων διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο καθώς και στο ίδιο κύτταρο ανάλογα με την φάση λειτουργίας του π.χ. στα κύτταρα HeLa κατά την διάρκεια της συνθέσεως του DNA ο αριθμός των πόρων διπλασιάζεται, (εικόνα 14).
εικόνα 14

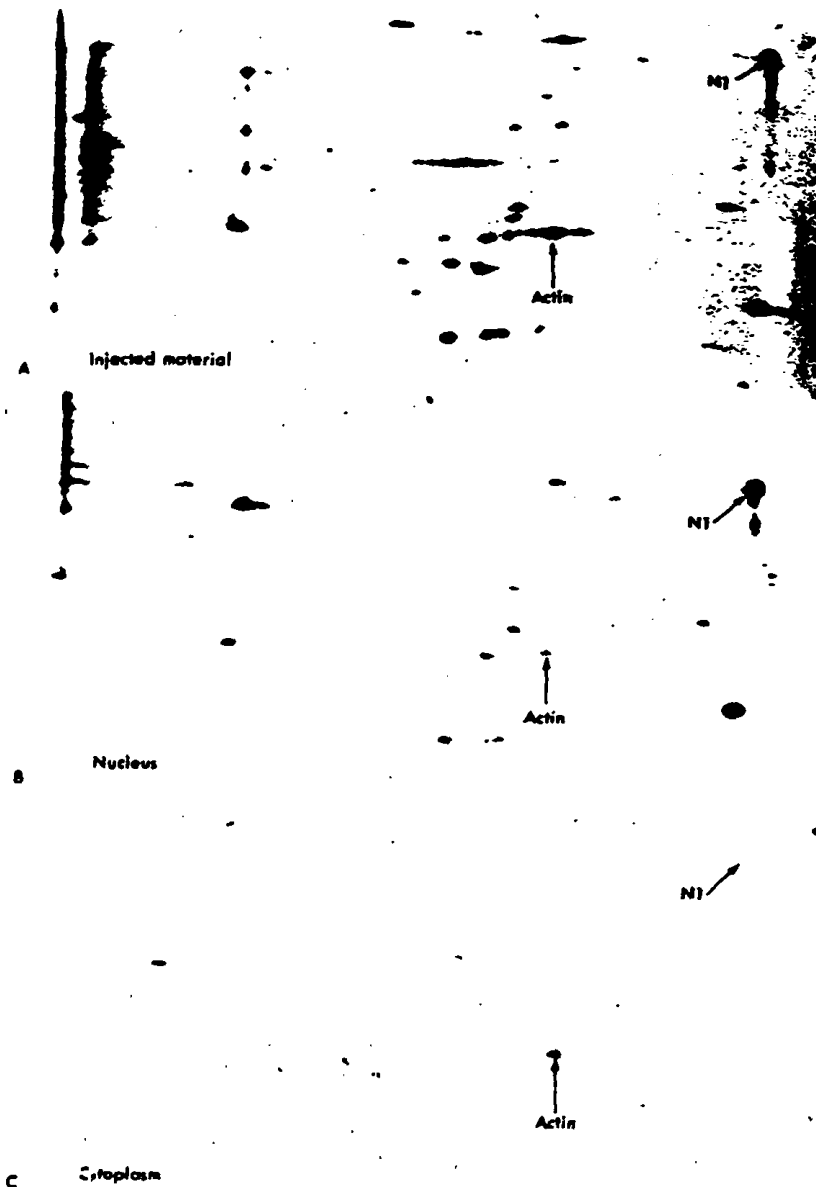
	diamètre du noyau (μm^2)	surface de l'enveloppe nucléaire (μm^2)	nombre de pores par μm^2 d'enveloppe	nombre total de pores par noyau	pourcentage de la surface nucléaire occupée par des pores
lymphocyte humain	5,5	90	3	270	1,4
cellule HeLa phase G ₁	9	250	8	2 000	4
cellule HeLa fin de phase S	10,5	350	11	4 000	5,7
hépatocyte de rat	10	300	30	9 000	15
ovocyte d'amphibien en fin de croissance	500	800 000	50	40 millions	25

Οι πόροι επιτρέπουν την διέλευση των μορίων μεταξύ πυρήνος και πρωτοπλάσματος με παθητική διάχυση. Για την διέλευση των μεγάλων μορίων υπάρχουν πολλά σκοτεινά σημεία. Οι πρωτεΐνες όπως γνωρίζουμε παράγονται στο πρωτόπλασμα και μεταφέρονται κατόπιν στον πυρήνα έφ' όσον είναι πυρηνικές πρωτεΐνες που πέρνουν μέρος στην σύσταση της χρωματίνης ή του πυρηνίσκου. Γιατί οι πρωτεΐνες αυτές κινούνται από το πρωτόπλασμα στο έσωτερικό του πυρήνος δεν είναι γνωστό. Φαίνεται ότι περιέχουν στην μοριακή τους δομή ένα "σύνθημα" που τους επιτρέπει να συγκεντρώνονται έκλεκτικά μέσα στον πυρήνα.

Πειράματα που έγιναν σε ώοκύτταρα με μικροενέσεις στο κυτταρόπλασμα τους πυρηνικών πρωτεϊνών ίχνηθετιμένων με ραδιοϊσότομα απέδειξαν την μεταφορά των πρωτεϊνών αυτών στον πυρήνα. Πρωτεΐνες όπως η άκτινη που βρίσκεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο πρωτόπλασμα δεν συναθροίζονται έκλεκτικά στον πυρήνα, (εικόνα 15);



εικόνα 15



a) Ήλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων των πρωτεϊνών του πυρήνος ψοκυτάρων *Xenopus* ίχνηθετημένων με ^{35}S μεθειονίνης.

b) Μεταφορά στον πυρήνα των ίχνηθετημένων πρωτεϊνών που εξήχθησαν στο κυτταρόπλασμα.

c) Κυτταρόπλασμα του ίδιου κυττάρου 24 ώρες μετά την ένεση των πρωτεϊνών.

Selective migration of nuclear proteins. Two dimensional gel analysis of ^{35}S -methionine-labeled nuclear proteins microinjected into *Xenopus* oocytes. An autoradiograph of this experiment is shown in Figure 15-5. A. A preparation of ^{35}S -*Xenopus* nucleoplasmic proteins that was injected into oocytes. Note that it contains actin and many nuclear proteins. B. The nuclear fraction reisolated from unlabeled oocytes injected 24 hours earlier into the cytoplasm with the ^{35}S proteins shown in A. Note that the nuclear proteins re-enter the nucleus, while actin decreases in relative amount. C. Cytoplasmic fraction from the same microinjected oocytes. Note that actin is the most prominent protein, while the nuclear proteins are not detectable in the cytoplasm. (From E. M. De Robertis)

Τό κύτταρο έχει την ικανότητα να τοποθετεί ειδικές πρωτεΐνες σε ειδικά διαμερίσματα. Αυτό συμβαίνει σε πολλές πρωτεΐνες όπως αυτές που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια ή τους χλωροπλάστες ή πρωτεΐνες που πρόκειται να απεκριθούν. Για τις τελευταίες γνωρίζουμε τον μηχανισμό γιατί παράγονται από ριβοσωμάτια που είναι ένωμένα με τό ένδοπλασματικό δίκτυο και περιέχουν ένα υδρόφοβο πεπτίδιο που τις αναγκάζει να εισέρχονται μέσα στην μεμβράνη του ένδοπλασματικού δικτύου. Από εκεί μετα-

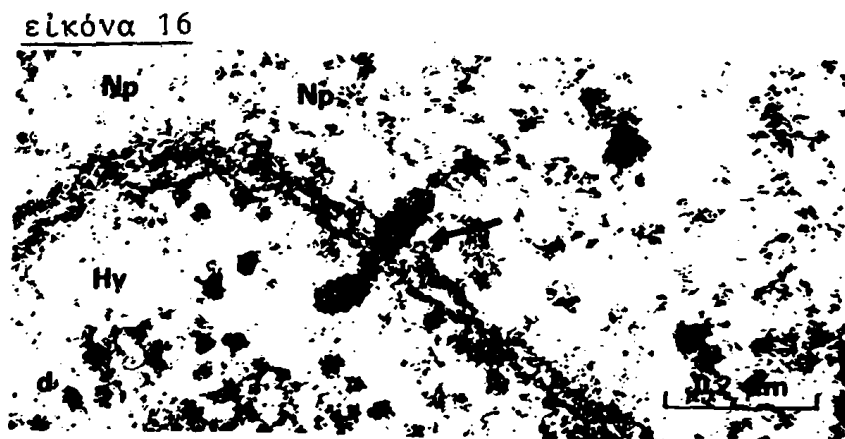


φέρονται εκτός του κυττάρου αφού τό πεπτίδιο "σινιάλο" άποκοπεϊ μέ μία πεπτιδάση.

Ό μηχανισμός αυτός δέν άφορᾶ τίς πρωτεϊνες του πυρήνα πού πρέπει νά περιέχουν κάποιο σινιάλο πού δέν άποκόπτετε.

Ένα άλλο πρόβλημα άφορᾶ τήν έξοδο τών νουκλεοπρωτεϊνών πού παράγονται στόν πυρήνα καί πρέπει νά μεταφερθοῦν στό πρωτόπλασμα. Συχνά πρόκειται γιά πολύ μεγάλα μόρια διαμέτρου 1000Å καί έτσι πολύ μεγαλύτερα άπό τούς πυρηνικούς πόρους. Όπως δείχνουν όρισμένες φωτογραφίες στό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται ότι τά συμπλέγματα αυτά μεταβάλλουν σχήμα γιά νά περάσουν άπό τούς πυρηνικούς πόρους.

(είκόνα 16).



Β. ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ

1.α.- Δομικά μοριακά συστατικά

Τό DNA τών εύκαρυωτικῶν κυττάρων δέν εἶναι γυμνό μέσα στόν πυρήνα ἀλλά ἐνωμένο μέ πρωτεΐνες γιά νά δώση μία δομή γνωστή μέ τό ὄνομα χρωματίνη. Ἡ χρωματίνη παρασκευαζόμενη βιοχημικῶς ἀπό ἀπομονωμένους πυρήνας σέ ὑποτονικά διαλύματα εἶναι μία ἰξώδης ζελατινώδης οὐσία πού περιέχει DNA, RNA βασικές πρωτεΐνες ὀνομαζόμενες ἰστόνες καί ἄλλες πρωτεΐνες περισσότερο ὀξίνες.

Τό περιεχόμενο σέ RNA καί σέ πρωτεΐνες μή ἰστόνες διαφέρει στά διάφορα παρασκευάσματα χρωματίνης ἀπό διαφόρους ἰστούς ἢ διάφορα εἶδη κυττάρων, ἀντίθετα οἱ ἰστόνες καί τό DNA βρίσκονται πάντοτε σέ μία σταθερή σχέση μεταξύ τους πού εἶναι περίπου ἕνα πρὸς ἕνα (πίνακας 1).

πίνακας 1

Σύστασις χρωματίνης ἐπὶ τῆς % ξηροῦ βάρους		
Συστατικό	Σικότι ἐπὶ μύος	ἔμβρυο μπιζελιοῦ
DNA	31	31
RNA	5	17,5
ἰστόνες	36	33
Πρωτεΐνες μή ἰστόνες	28	18

β.- Οἱ ἰστόνες

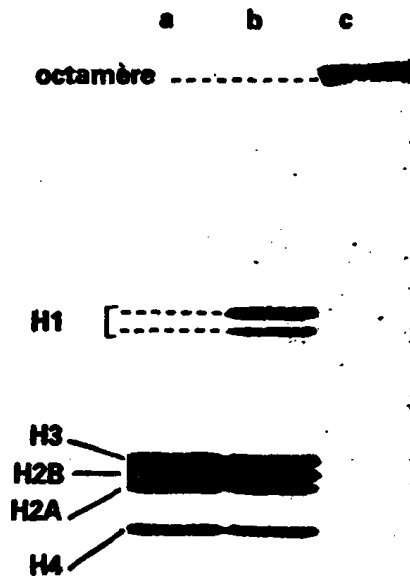
Οἱ ἰστόνες εἶναι περιορισμένες στόν ἀριθμό, μόνον 5 τύποι ὑπάρχουν καί καθεμία βρίσκεται στήν χρωματίνη σέ μεγάλα ποσά. Αὐτό ὑποδηλοῦν κάποιο δομικό ρόλο. Οἱ ἰστόνες εἶναι μικρά



μόρια με μοριακά βάρη πού κειμένονται από 11.000 έως 21.000. Είναι είδικως πλούσιες σε δύο βασικά αμινοξέα στην λυσίνη και την άργινίνη πού μαζί αποτελούν περίπου τὰ 25% τῆς πολυπεπτιδικῆς τους ἀλύσεως.

Ἡλεκτροφόρησις ἱστονῶν σε πήκτη ἀκρυλαμιδίου (εἰκόνα 5)

Séparation des histones nucléosomiques.
Électrophorèse d'histones extraites de la chromatine de foie de rat. a) histones du noyau nucléosomique; b) histones totales; c) histones du noyau nucléosomique converties par le diméthyl subérimidate en une espèce moléculaire qui migre comme un octamère formé par deux exemplaires des quatre histones nucléosomiques (cliché J.O. Thomas et P.J.G. Butler, 1977).



Οἱ πέντε ἱστόνες εἶναι ἡ H₂A, H₂B, H₃, H₄ πού βρίσκονται μαζί στήν χρωματίνη καί ἡ ἱστόνη H₁ πού βρίσκεται χωριστά. Τά χαρακτηριστικά τῶν ἱστονῶν φαίνονται στόν παρακάτω πίνακα (πίνακας 2)

Πίνακας 2 ἱστόνες θύμου ἀδένοσ βοός

histone	P.M.	lysine pourcentage molaire (1)	arginine pourcentage molaire (1)	acides aminés basiques/acides (2)	acides aminés hydrophobes hydrophiles (2)	nombre total d'acides aminés
H1	21.000	24,8	2,6	5,90	—	216
H2A	13.960	10,9	9,3	1,50	53-42	129
H2B	13.700	16,0	6,4	1,93	44-45	125
H3	15.273	9,6	13,3	1,65	55-47	135
H4	11.236	10,8	13,7	2,45	34-38	102



Οι διάφορες ιστόνες πλὴν τῆς H_1 ἔχουν σύσταση ἀμινοξέων πού ἐλάχιστα διαφέρει μεταξύ τῶν διαφόρων εἰδῶν ζῶων καί φυτῶν π.χ. ἡ ἀλληλοδιαδοχή ἀμινοξέων τῆς ιστόνης H_3 ἀπό ἐπίμη διαφέρει μόνο κατὰ δύο ἀμινοξέα ἀπό τὴν H_3 τοῦ μπιζελιοῦ.

Αὐτὴ ἡ διατήρησις τῆς δομῆς πού ἀποτελεῖ χαρακτηριστικό φαινόμενο τῶν πρωτεϊνῶν αὐτῶν δείχνει πὼς κάθε ἀμινοξύ εἶναι σημαντικό γιὰ τὴν λειτουργία τῆς πρωτεΐνης καί σημαίνει συγχρόνως πὼς οἱ ιστόνες ἔχουν ἓνα ὁμοιο ρόλο σέ ὅλα τὰ εἶδη ζῶων καί φυτῶν.

Ἡ ιστόνη H_1 παρουσιάζει τὴν ἰδιαιτερότητα ὅτι δέν ἔχει τὴν ἴδια πρωτοδομή γιὰ ὅλα τὰ εἶδη καί ἡ σύστασις τῆς ἐπίσης διαφέρει μεταξύ τῶν διαφόρων ιστῶν. Ἡ ιστόνη αὐτὴ ὅπως εἴπαμε δέν βρίσκεται μαζί με τίς ἄλλες στὴν χρωματίνη καί εἶναι μᾶλλον ἀσθενῶς συνδεδεμένη με τὸ DNA.

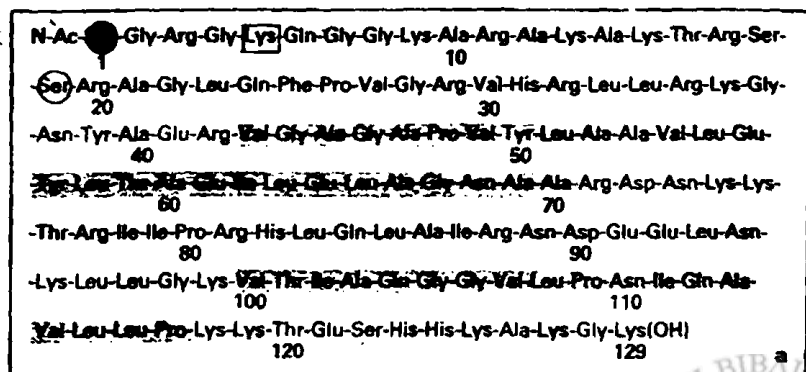
Ἡ μελέτη τῆς ἀλληλοδιαδοχῆς τῶν ἀμινοξέων στίς διάφορες ιστόνες ἀπέδειξε ὀρισμένες ἰδιότητες τοῦ μορίου τους. Εὐρέθη ὅτι τὰ βασικά ἀμινοξέα βρίσκονται κυρίως στὰ ἄκρα τῆς πολυπεπτιδικῆς ἀλύσεως με μικρές διαφορές ἀνάμεσα στίς διάφορες ιστόνες, (εἰκόνα 18).

εἰκόνα 18

Structure des histones.

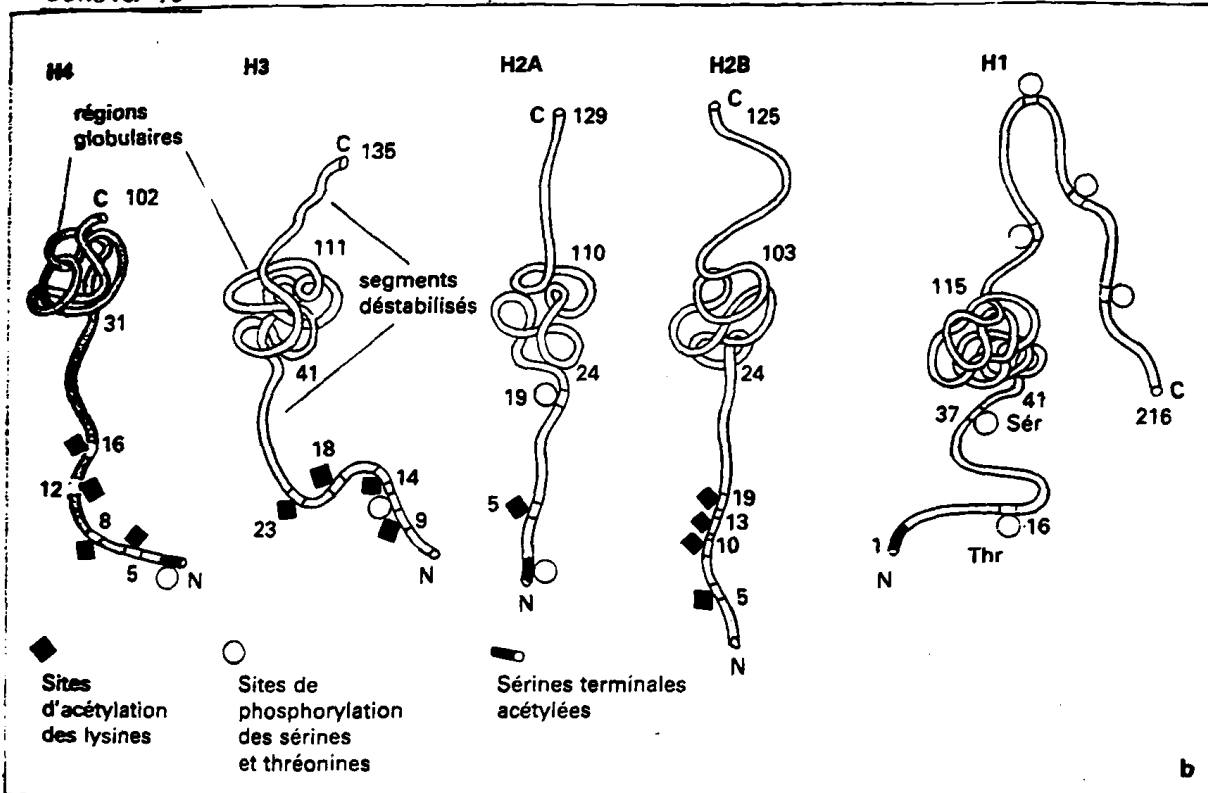
a) *Séquence des 129 acides aminés de l'histone 2A de thymus de veau.*

La chaîne contient dans sa partie moyenne deux régions hydrophobes, l'une va de la valine 43 à l'alanine 70; l'autre de la valine 100 à la proline 117. Noter également le bloc contenant cinq résidus basiques près de l'extrémité carboxylique histidine 123-lysine 129. La sérine constituant l'extrémité aminée est acétylée. La lysine 5 est un site d'acétylation réversible, la sérine 19 un site de phosphorylation (d'après P. Sautière et coll., 1974).



Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μη πύκωση της αλύσεως στα άκρα αμινοτελικό και καρβοξυτελικό αντίθετως τó κέντρο του μορίου είναι υδροφορό και πτυχαίνεται για να δώσει τή δομή σφαιρικής πρωτεΐνης. Τά άκρα πού είναι ηλεκτροθετικά είναι εκείνα πού αντιδρούν ισχυρά μέ τó άρνητικά φορτισμένο DNA, (είκόνα 19).

είκόνα 19



β2. - Χημικές μεταβολές τών Ιστονών

Οί Ιστονές ύφίστανται μετά τήν σύνθεσή τους όρισμένες χημικές μεταβολές τού μορίου τους πού όφείλονται σέ ένζυματικές αντιδράσεις. Οί μεταβολές αυτές είναι κυρίως ή άκετυλίωσις, ή φωσφορυλίωσις και ή μεθυλίωσις. Οί μεταβολές αυτές γίνονται κυρίως στόν πυρήνα και είναι αντίστρεπτές. Ή άκετυλίωσις άφορά τίς άμινομάδες τής λυσίνης και ή φωσφορυλίωσις ένώνει μία όμάδα φωσφορική στά άμινοξέα σερίνη και θρεονίνη και τούς προσδίδη όξινο χαρακτήρα. Οί χημικές αυτές μεταβολές γίνονται κυρίως στά άκρα τών αλύσεων τών Ιστονών πού δέν πτυχοούνται είναι ηλεκτροθετικά και συνδέονται ισχυρά μέ τó DNA (βλέπε είκόνα 19)



Σάν αποτέλεσμα τῶν χημικῶν αὐτῶν μεταβολῶν ἔχουμε μεταβολές στήν σχέση τῶν μορίων τῶν ἱστονῶν μέ τό DNA ἀφοῦ ἀλλάζει τό φορτίο τῶν μορίων τους καί ὕψοσδήποτε θά ἔχουμε μεταβολές τῶν δομῶν τῆς χρωματίνης πού ἔχουν σχέση μέ τήν λειτουργία της. Φαίνεται πώς ἡ ἀκετυλίωσις ἔχει σχέση μέ τήν ἐνεργότητα τῆς χρωματίνης κατά τά φαινόμενα τῆς μεταγραφῆς ἐπιτρέπει δηλαδή στήν χρωματίνη νά μεταγράφεται σέ RNA.

γ. - Πρωτείνες τῆς χρωματίνης μή ἱστόνες

Οἱ πρωτείνες μή ἱστόνες εἶναι ἀντικείμενο ἐντατικῆς μελέτης γιατί θεωρεῖται ὅτι μεταξύ τῶν πρωτεϊνῶν αὐτῶν βρίσκονται οἱ πρωτείνες πού ρυθμίζουν τήν λειτουργία τῶν εὐκαρυωτικῶν γονιδίων καί τήν διαφοροποίηση. Οἱ πρωτείνες αὐτές εἶναι πολύ ἑτερογενεῖς περιλαμβάνουν ἀρκετές ἑκατοντάδες μόρια καί διαφέρουν στούς διάφορους ἱστούς. Ἡ διαίρεσίς τους σέ κατηγορίες εἶναι ἀρκετά δύσκολη γιατί ὀλίγα γνωρίζουμε σήμερα γι' αὐτές. Πάντως στήν κατηγορία αὕτη ἀνήκουν:

- 1) Οἱ πρωτείνες πού ὑπεισέρχονται στήν ἀρχιτεκτονική δομή τῶν χρωματοσωμάτων.
- 2) Οἱ πρωτείνες τοῦ ἀναδιπλασιασμοῦ τοῦ DNA.
- 3) Οἱ πρωτείνες πού ἀφοροῦν τήν μεταγραφή μεταξύ τῶν ὁποίων θά πρέπει νά βρίσκονται καί οἱ ρυθμιστικές πρωτείνες γιά τήν ἐνεργοποίηση εἰδικῶν γονιδίων.

2. - Τρισδιάστατος δομή τῆς χρωματίνης

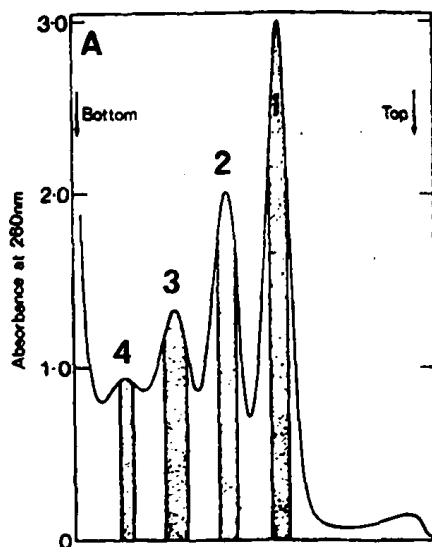
Ἡ ὕπαρξις μιᾶς συμμετρικῆς ὀργανώσεως τῆς χρωματίνης σέ ὑπομονάδες πού ἐπαναλαμβάνονται προῆλθε ἀπό βιοφυσικές καί βιοχημικές μελέτες καί ἀπό παρατηρήσεις στό ἠλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ἀπό τό 1959 τά διαγράμματα διαθλάσεως τῶν ἀκτινῶν Χ δείχνουν μία περιοδικότητα τῶν νημάτων τῆς χρωματίνης πού

έπαναλαμβάνεται κάθε 10nm περίπου.

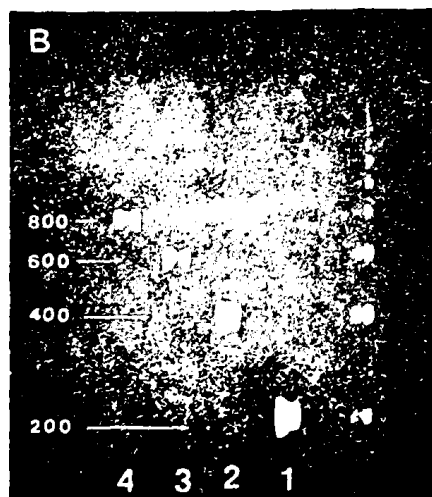
Ἡ δεύτερη προσέγγις τοῦ προβλήματος ἔγινε μέ βιοχημικές μεθόδους πού στηρίζονται στήν ἐνζυματική πέψη τῆς χρωματίνης ἀπό διάφορες νουκλεάσες.

Παρατηρήθη ὅτι ἐπίδρασις τῆς δεσοξυριβονουκλεάσης τοῦ σταφυλοκόκκου ἐπί τῆς χρωματίνης ἔχει σάν ἀποτέλεσμα τήν μερική καταστροφή τοῦ DNA πού κόβετε σέ κομμάτια 200 ζευγῶν βάσεων ἢ πολλαπλάσια τοῦ ἀριθμοῦ αὐτοῦ. Αὐτό ὀφείλετε στό ὅτι ἡ χρωματίνη εἶναι ὀργανωμένη σέ σωματίδια ἀποτελούμενα ἀπό DNA καί ἰστόνες πού ἐμποδίζουν τήν πλήρη πέψη τοῦ DNA ἀπό τήν νουκλεάση. Ἐάν μετά τήν πέψη μέ τό ἐνζυμο φυγοκεντρίσουμε τήν χρωματίνη σέ κλίση πυκνότητος σακχαρόζης θά πάρουμε ἕνα διάγραμμα ὀπτικῆς πυκνότητος μέ πολλές κορυφές πού θά ἀντιστοιχοῦν σέ μονομερῆ καί πολυμερῆ τῶν σωματιδίων τῆς χρωματίνης, (εἰκόνα 20 α).

Ἐάν τώρα ἀπό τά διάφορα κλάσματα τῆς χρωματίνης ἀπομονώσουμε τό DNA καί τό ἠλεκτροφορήσουμε σέ πηκτὴ ἀγαρόζης θά πάρουμε ζώνες DNA πού θά ἀντιστοιχοῦν σέ κομμάτια 200 βάσεων καί πολλαπλάσια αὐτῶν (εἰκόνα 20 β).



εἰκόνα 20α

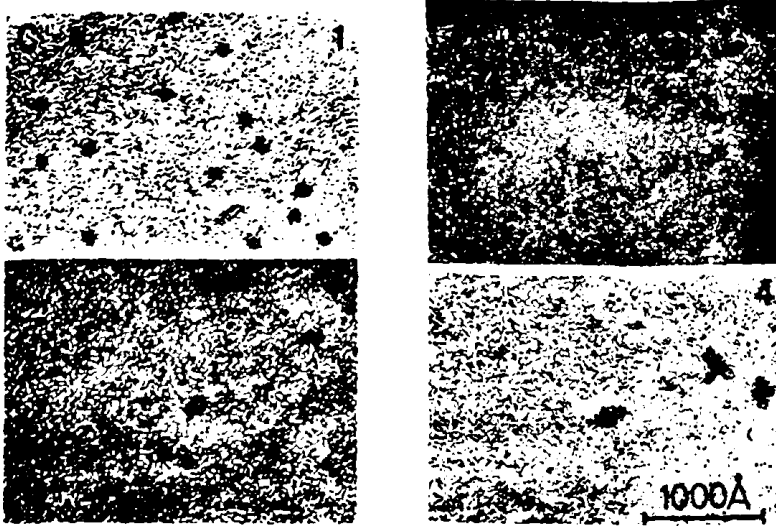


20β

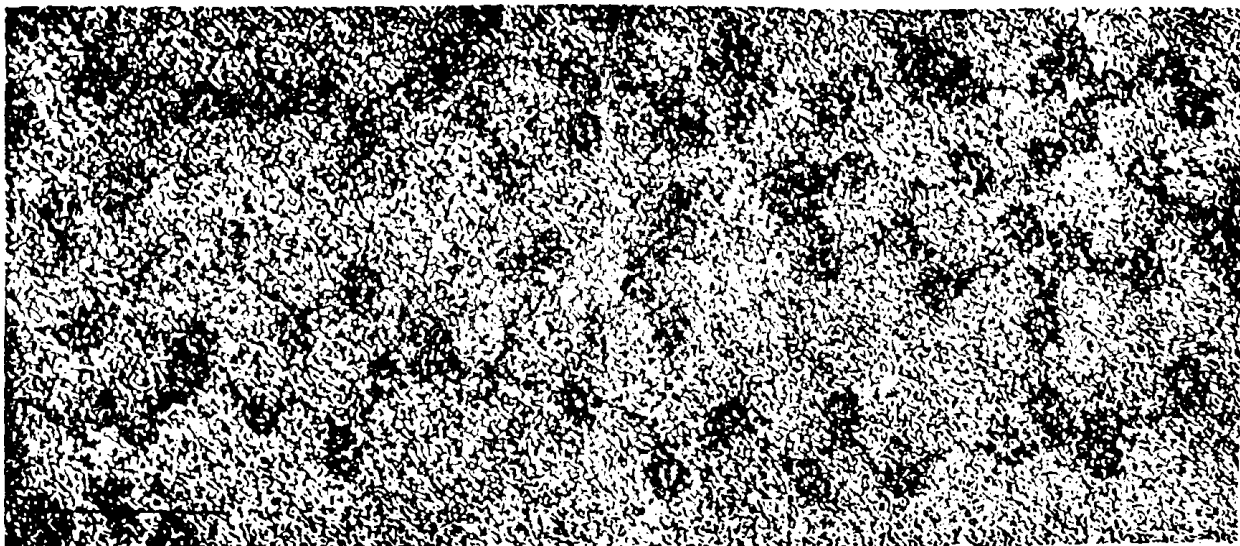


Παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τῶν σωματιδίων πού ἐλευθερώνονται κατόπιν δράσεως τῶν νουκλεασῶν (εἰκόνα 20γ).

εἰκόνα 20γ



Τέλος παρατηρήσεις τῆς χρωματίνης στό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ἀπό σπασμένους πυρήνες σέ χαμηλῆς ἰονικῆς δύναμης διαλύματα δείχνη τήν ὕπαρξη σωματιδίων 100\AA πού βρίσκονται κανονικά διατεταγμένα κατὰ μήκος τῶν ἰνῶν τοῦ DNA (εἰκόνα 21)



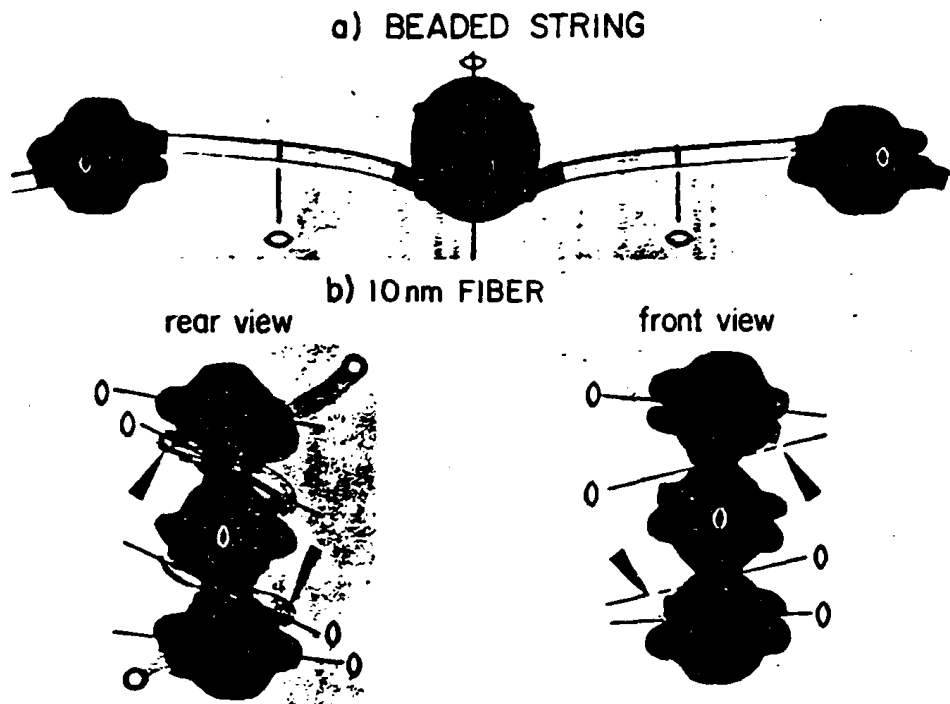
εἰκόνα 21

Structures nucléosomiques d'un noyau d'érythrocyte de poulet.
Fibre nucléosomique formée par un « collier » de particules de 100\AA de diamètre, reliées par des filaments de 140\AA de longueur; coloration négative à l'acétate d'uranyle. $\times 500\,000$
(micrographie électronique D.E. Olins et A.L. Olins, 1978).



Στηριζόμενος στα δεδομένα αυτά και επειδή οι διάφορες ιστόνες βρίσκονται στο DNA σε ίσα ποσά και μάλιστα 2 μόρια από την κάθε μία ιστόνη (έκτός της H_1) για κάθε 200 βάσεις του DNA. Ο R. Kornberg πρότεινε το 1974 ένα μοντέλο του νουκλεοσωματίου στο οποίο οι τέσσερις ιστόνες H_2A , H_2B , H_3 και H_4 είναι διατεταγμένες σε ένα όκταμερές περιέχον 2 μόρια από κάθε ιστόνη. Το όκταμερές αυτό σωματίδιο επαναλαμβάνετε κάθε 200 βάσεις του DNA.

Οι ιστόνες του όκταμερούς σωματιδίου είναι σε στενή έπαφή με το DNA το οποίο περιελύσσεται στην έξω πλευρά του νουκλεοσωματίου (είκόνα 22)



είκόνα 22

A model showing the two possible appearances of chromatin under the electron microscope. The nucleosome is represented by tennis balls, and the DNA, by plastic tubing. It is important to note that the DNA is wound on the *outside* of the nucleosome. A, The beads-on-a-string configuration that results from the unwinding of part of the DNA during sample preparation. B, The 10 nm fiber, in which nucleosomes are in close contact and is the natural configuration of chromatin. (Courtesy of A. Worcel, from *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 42:313, 1977.)



Ἡ μορφή καμβολογίου δέν εἶναι ἡ πραγματική δομή τῆς χρωματίνης ἀλλά ὀφείλεται στήν παρασκευή τοῦ δείγματος τῆς χρωματίνης γιά τήν παρατήρηση στό ἠλεκτρονικό μικροσκόπιο καί ἔχει σάν ἀποτέλεσμα τήν ἀποκόλληση τῆς ἱστόνης H_1 ἀπό τήν χρωματίνη. Ἡ ἱστόνη H_1 ὅπως εἶπαμε δέν περιλαμβάνεται στήν δομή τοῦ νουκλεοσωματίου ἀλλά ἐνώνεται μέ τό DNA μεταξύ τῶν διαδοχικῶν νουκλεοσωματίων. Μέ πιά προσεκτική παρασκευή τῆς χρωματίνης τά νουκλεοσωμάτια φαίνονται κολλημένα τό ἓνα στό ἄλλο δίνοντας ἓνα ἰνίδιο ἱστονῶν - DNA διαμέτρου 10nm.

Τό ἰνίδιο τῶν 10nm ἀντιπροσωπεύει ἐπομένως τό πρῶτο ἐπίπεδο ὀργανώσεως τῆς χρωματίνης.

Τό νουκλεοσωμάτιο ἀποτελεῖται ἀπό δύο τόπους, τόν πυρήνα πού φέρει τίς τέσσερις ἱστόνες σέ ζεύγη καί τήν γέφυρα τοῦ DNA πού ἐνώνει μεταξύ τους τά διάφορα νουκλεοσωμάτια. Κατά τήν πέψη μέ τό ἔνζυμο μικροκοκκική νουκλεάση (ἡ DNAση τοῦ σταφυλοκόκκου) τό DNA κόβεται μεταξύ τῶν νουκλεοσωματίων ὅπου εἶναι γυμνό ἀπό ἱστόνες (γέφυρα).

Μέ πιά ἐκτεταμένη ἐπίδραση τοῦ ἐνζύμου ἔχουμε μεγαλύτερη ἀποικοδόμηση τοῦ DNA πέραν τῶν τμημάτων τῶν 200 ζευγῶν βάσεων.

Ἡ πέψη μέ τό ἔνζυμο πάντως σταματᾷ σέ κομμάτια 140 βάσεων πού μαζί μέ τίς 4 ἱστόνες ἀποτελοῦν τό πραγματικό πυρήνα τοῦ νουκλεοσωματίου. Ὑπάρχουν διαφορές στό ὅλικό ποσό DNA ἀνά νουκλεοσωμάτιο ἀνάμεσα στά διάφορα εἶδη ζῶων καί φυτῶν ἀλλά καί ἀνάμεσα στούς διαφόρους ἱστούς ἐνός καί τοῦ αὐτοῦ εἶδους. Οἱ διαφορές αὐτές ὁμως ἀφοροῦν πάντοτε τό DNA μεταξύ νουκλεοσωματίων καί ποτέ τό DNA τοῦ πυρήνος τῶν νουκλεοσωματίων τό ὁποῖο πάντοτε περιέχει 140 ζεύγη βάσεων (πίνακας 3).



πίνακας 3

Longueur de l'ADN des nucléosomes de quelques types cellulaires.

	ADN du nucléosome	ADN du noyau nucléosomique	ADN des liens internucléosomiques
<i>Aspergillus</i>	154	140	14
cellules HeLa	188	140	48
neurones du cortex de lapin	162	140	22
cellules gliales du cortex de lapin	197	140	57
cellules de l'oviducte de poule	196	140	56
érythrocytes de poule	212	140	72
spermatozoïdes d'oursin	241	140	101

Αυτό φαίνεται να οφείλεται στην ιστόνη H₁ και στις διαφορές της μεταξύ διαφόρων ειδών και διαφόρων ιστών καθώς και στις ιστόνες H₂A και H₂B που έρχονται επίσης σε σχέση με την γέφυρα του DNA μεταξύ των νουκλεοσωμάτων.

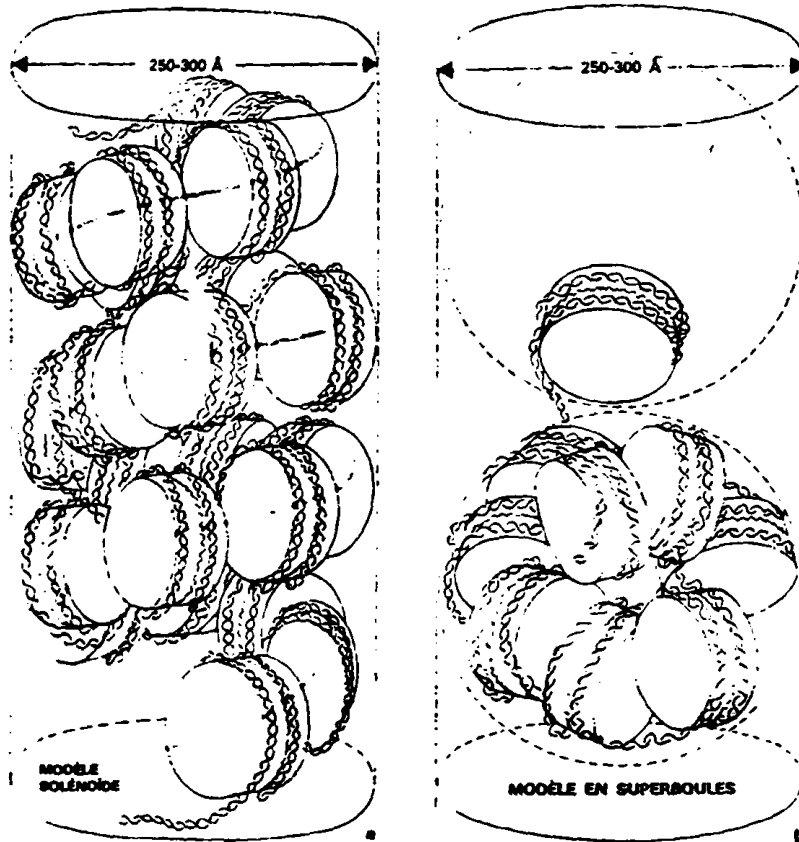
Τό DNA στα νουκλεοσωμάτια που φτιάχνουν τό νημάτιο τών 10nm είναι περίπου 6-7 φορές περισσότερο συνεπτυγμένο από ότι στην έλευθέρα άλυσό του (χωρίς πρωτεΐνες). Αυτό εξάγεται από τό ότι οι 200 βάσεις του DNA έχουν μήκος 680Å ενώ τό μήκος του νουκλεοσωματίου είναι 100Å. Η σύμπτωση αυτή του DNA στην χρωματίνη δέν αποτελεί πάντως τήν μόνη όργάνωση που παρατηρούμε εάν λάβουμε υπ'όψιν ότι στα μεταφασικά χρωματοσώματα φτάνουμε σε ένα βαθμό συμπίξεως 1000 φορές άνωτερο.

Η όργάνωση της χρωματίνης σε νημάτια τών 10nm δέν είναι ή μόνη. Μελέτη στό ήλεκτρονικό μικροσκόπιο νηματίων χρωματίνης προερχομένων από ξεδίπλωμα μεταφασικών χρωματοσωμάτων αλλά και από πυρήνες στην μεσόφαση προερχόμενους από κύτταρα μέ πολύ άνενεργό χρωματίνη όπως τά έρυθροκύτταρα της κόττας (πού είναι έμπύρνηνα) απέδειξαν τήν ύπαρξη ενός παχύτερου ινιδίου 20-30nm που άντιπροσωπεύει φαίνεται τήν δομή της άνενεργούς χρωματίνης.



Τά νημάτια τῶν 20-30nm προέρχονται ἀπὸ μία μεγαλύτερη πτύχωση τοῦ ἀρχικοῦ νηματίου τῶν 10nm ὑπὸ μορφήν ἑνός σωληνοειδοῦς πού ἔχει περίπου 6 νουκλεοσωμάτια ἀνά περιστροφή ἑλικος.

(εἰκόνα 23,24)

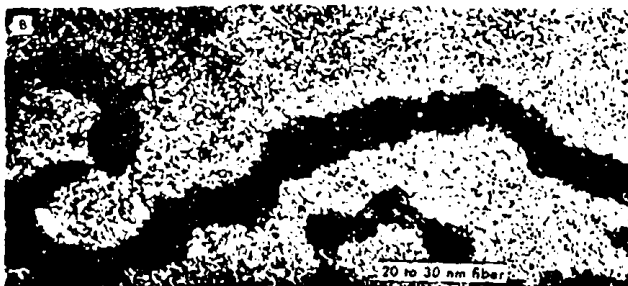


Modèles d'organisation de la fibre chromosomique de 250 à 300 Å.

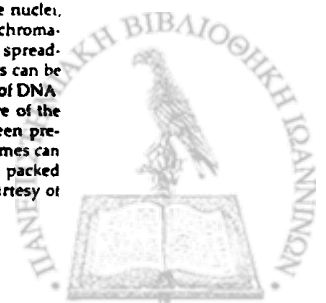
a) *Modèle solénoïde* (Finch et Klug). Le nucléofilament est enroulé en une hélice dont le pas est de 110 Å et le diamètre extérieur de 250 à 300 Å. Chaque tour de ce solénoïde contient 6 à 8 nucléosomes.

b) *Modèle en superboules* (Hozier). Dans cette interprétation la fibre de 250-300 Å serait constituée par la juxtaposition de segments de nucléofilament comprenant 10-12 nucléosomes et organisés en masses sphériques - les superboules.

Dans ces modèles l'histone H1 participe au contrôle ou à la stabilisation de l'agencement du nucléofilament.



Chromatin from chicken erythrocyte nuclei, negative staining. A, the chromatin has stretched during spreading, and the nucleosomes can be seen as beads on a string of DNA $\times 500,000$. B, the structure of the 20 to 30 nm fiber has been preserved, and the nucleosomes can be visualized closely packed within it. $\times 250,000$. (Courtesy of A. L. Olins.)



Τά τμήματα τῶν χρωματοσωμάτων πού παραμένουν σέ συμπαγή μορφή εἶναι κυρίως τὰ κεντρομέρη ἀλλά καί τὰ τελομέρη καθώς καί ἐνδιάμεσα μέρη τῶν χρωματοσωμάτων. Πολλές φορές καί ὁλόκληρα χρωματοσώματα μπορεῖ νά παραμείνουν στήν μεσόφαση ὑπό συμπαγή μορφή καί αὐτό συμβαίνει στά φυλετικά χρωμοσώματα.

Γενικῶς θεωρεῖται ὅτι ἡ έτεροχρωματίνη εἶναι ἀνενεργός ὅσον ἀφορᾷ τήν σύνθεση RNA καί ἄρα τὰ γονίδια της δέν ἐκφράζονται. Αὐτό δέν ὀφείλεται στό ὅτι οἱ ιστόνες ἀποτελοῦν ἀναστολεῖς τῆς ἐκφράσεως τῶν γονιδίων μᾶλλον ἢ συμπύκνωση τῆς χρωματίνης εἶναι ἐκείνη πού προκαλεῖ τήν ἀναστολή τῆς ἐκφράσεως τῶν γονιδίων. Ἐνα γενετικό παράδειγμα τῆς ἀνενεργίας τῆς χρωματίνης ὅταν βρίσκεται ὑπό μορφή έτεροχρωματίνης εἶναι ἡ ἀνενεργοποίηση τοῦ ἑνός X χρωματοσώματος στά θηλυκά ἄτομα καί ὁ σχηματισμός τοῦ σωματιδίου Barr. Τά γονίδια τοῦ χρωματοσώματος αὐτοῦ δέν λειτουργοῦν.

Διακρίνουμε δύο εἴδη έτεροχρωματίνης τήν θεμελιώδη (constitutive) καί τήν περιστασιακά ἐκφραζόμενη (facultative) καί οἱ δύο αὐτές έτεροχρωματίνες εἶναι μορφολογικά ὅμοιες καί ἀνενεργεῖς ἢ διαφορά τους ἔγκειται στό ὅτι ἡ περιστασιακά ἐκφραζόμενη ἄλλοτε συμπεριφέρεται σάν θεμελιώδης καί ἄλλοτε σάν εὐχρωματίνη. Ἔτσι δέν εἶναι ἀνενεργῆς σέ ὅλα τὰ κύτταρα ἑνός ὀργανισμοῦ οὔτε σέ ὅλα τὰ στάδια ἀναπτύξεως. Ἡ θεμελιώδης έτεροχρωματίνη ἀντίθετα βρίσκεται σ'αὐτήν τήν μορφή συνεχῶς σέ ὅλα τὰ κύτταρα ἀποτελεῖ δέ τόν πῶς συχνό τύπο έτεροχρωματίνης. Κυρίως ἀφορᾷ τὰ κεντρομερῆ τῶν χρωματοσωμάτων πού παραμένουν συμπεπυκνωμένα κατά τήν μεσόφαση καί ὅπως θά δοῦμε σέ ἄλλο κεφάλαιο περιέχει ἐπαναλαμβανόμενες ἀλληλοδιαδοχές DNA.



3.- Δεδομένα για τήν λειτουργία τής χρωματίνης κατά τήν μεταγραφή

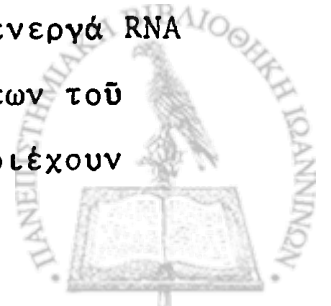
Ένα ενδιαφέρον έρώτημα είναι τό πώς μεταγράφεται ή χρωματίνη. Δηλαδή τό DNA παραμένει ένωμένο μέ τό νουκλεοσωμάτιο κατά τήν διάρκεια τής μεταγραφής; Στο έρώτημα αυτό δέν υπάρχουν ακόμη ολοκληρωμένη και σαφής απάντησις. Ή έρευνα όμως επί του προβλήματος αυτού έχει δώση όρισμένες ενδιαφέρουσες πληροφορίες.

Δύο κυρίως έρευνητικές προσεγγίσεις για τήν μελέτη του προβλήματος υπάρχουν 1/ Ή μελέτη τής μεταγραφομένης χρωματίνης διά του ήλεκτρονικού μικροσκοπίου 2/ Ή βιοχημική μελέτη τής μεταγραφομένης χρωματίνης διά τής χρησιμοποιήσεως DNA νουκλεασών.

A. Ή μελέτη μέ τό ήλεκτρονικό μικροσκόπιο στηρίζεται κυρίως στην τεχνική του O. Miller κατά τήν όποία μεμονομένοι πυρήνες κυττάρων διαρίγνυνται διά τής χρησιμοποιήσεως λίαν ύποτονικών διαλυμάτων και παρουσία άπορρυπαντικών ουσιών και τό περιεχόμενό τους φυγοκεντρεϊται κατ'εύθείας επί του πλέγματος πού χρησιμοποιεϊται για τήν παρατήρηση στο ήλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ύπό τας συνθήκας αυτές ή χρωματίνη έξαπλουται στο μεταλλικό πλέγμα του ήλεκτρονικού μικροσκοπίου και ψάχνουμενά βρούμε νήματα χρωματίνης μέ πλαγίους άλύσεις νεοσυνθετομένου RNA. Οι παρατηρήσεις έγιναν τόσο σε μεταγραφομένους γόνους ριβοσωματικού DNA όσον και μή ριβοσωματικού DNA.

Τά άποτελέσματα μέ τήν μέθοδο αυτή δείχνουν όρισμένες διαφορές μεταξύ ριβοσωματικών και μή ριβοσωματικών γονιδίων.

Στά ριβοσωματικά γονίδια γόνου πού παράγουν πολύ ένεργά RNA (αυτό φαίνεται από τήν πυκνότητα των πλαγίων άλύσεων του νεοσύνθετομένου RNA ανά μονάδα μήκους DNA) δέν περιέχουν



νοκλεοσωμάτια. Τά μή ριβοσωματικά γονίδια (ή μελέτη έγινε κυρίως στά γιγαντιαία χρωματοσώματα τής δροσόφιλας) αν μὲν παράγουν πολὺ ἐνεργά RNA δὲν βλέπουμε στό ἠλεκτρονικό μικροσκόπιο τυπικά νουκλεοσωμάτια ἀν ὁ γόνος δὲν εἶναι πολὺ ἐνεργός στήν σύνθεση RNA τότε βλέπουμε ὀλίγα νουκλεοσωμάτια. Σέ ὅλες τίς περιπτώσεις ὑπάρχει μία ἐπιμύκνωση τοῦ νηματίου τής χρωματίνης στοὺς ἐνεργοὺς σέ μεταγραφή γόνους. Πράγματι γνωρίζουμε ὅτι ἡ συμπύκνωση τοῦ DNA λόγω περιελύξεως του στά νουκλεοσωμάτια εἶναι περίπου 5 πρὸς 1 σέ σχέση μέ τό γυμνό DNA. Ἡ συμπύκνωση αὐτή κατόπιν μελέτης στό ἠλεκτρονικό μικροσκόπιο εἶναι περίπου 1,5-2.

Τά ἀποτελέσματα αὐτά δὲν σημαίνουν ὅτι τά νουκλεοσωμάτια λείπουν ἀπό τήν χρωματίνη πού μεταγράφεται εἶναι δυνατόν οἱ ἱστόνες νά ἔχουν ἀλλάξη δομῆ καί νά μὴ φαίνονται ὑπό τήν μορφή τῶν νουκλεοσωματίων. Πράγματι μέ ἀνοσοχημικές τεχνικές μπορούμε νά βροῦμε ἱστόνες στήν μεταγραφομένη χρωματίνη. Μία ἄλλη πιθανότητα εἶναι ὅτι τά ἀλλοιωμένα νουκλεοσωμάτια τής μεταγραφομένης χρωματίνης ὑπό τὰς συνθήκας μελέτης στό ἠλεκτρονικό μικροσκόπιο δηλαδή χαμηλή ἰονική δύναμη διαλυμάτων καί χρήσις ἀπορρυπαντικῶν, ἔχουν ἐγκαταλείψη τό μεταγραφόμενο DNA χωρίς αὐτό νά σημαίνει ὅτι τό ἴδιο πράγμα συμβαίνει καί *in vivo*.

B. Ἡ βιοχημική μελέτη τής μεταγραφομένης χρωματίνης πού ἐγινε μέ τήν μελέτη τής ἐπιδράσεως διαφόρων DNA νουκλεασῶν ἔδωσε σχετικά διαφορετικά καί πῶς σαφῆ ἀποτελέσματα.

Θά ἀναφερθοῦμε κυρίως στά πειράματα μέ τήν DNάση τοῦ σταφυλοκόκκου καθώς καί τήν παγκρεατική DNAση I.

Ἀναφέραμε προηγουμένως πὼς ἡ DNάση τοῦ σταφυλοκόκκου ἔχει ἐπιδράση ἐπὶ τής χρωματίνης κόβη τό DNA σέ κομμάτια 200 ζευ-



γῶν βάσεων καί ἐλευθερώνει μονομερῆ νουκλεοσωμάτια. Περαιτέρω δράσις τοῦ ἐνζύμου ἔχει σάν ἀποτέλεσμα τό κόψιμο τοῦ DNA σέ κομμάτια 140 bp πού εἶναι τό DNA πού ἐλίσσεται στό νουκλεοσωμάτιο. Τό ἐνζυμο αὐτό εἶπαμε ὅτι ἐπιδρᾷ στίς γέφυρες τοῦ γυμνοῦ DNA πού ἐνώνει μεταξύ τους τά νουκλεοσωμάτια.

Ἡ μελέτη τῆς δράσεως τοῦ ἐνζύμου αὐτοῦ στά ἐρυθροκύτταρα πτηνῶν πού παράγουν αἰμοσφαιρίνη ἔχει σάν ἀποτέλεσμα τήν ἀπελευθέρωση μονομερῶν νουκλεοσωματίων μέ σταθερά καθιζήσεως 11S πού περιέχουν κομμάτια DNA 200 pb.

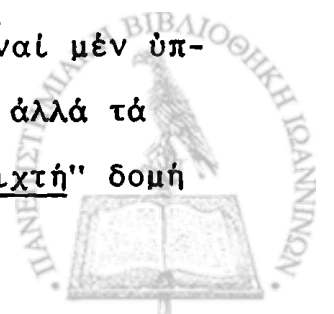
Μεταξύ τῶν κομματιῶν αὐτῶν εὑρέθηκε DNA πού ἀντιστοιχεῖ στόν γόνο τῆς αἰμοσφαιρίνης. Τά ἴδια ἀποτελέσματα παίρνουμε ἐάν μελετήσουμε ἕνα ἄλλο γονίδιο πού παράγει ὠλευκοματίνη καί εἶναι ἐνεργό σέ ἀντίστοιχο ἰστό τῶν πτηνῶν (ὡαγωγός).

Τά ἀποτελέσματα αὐτά δείχνουν ὅτι τά νουκλεοσωμάτια ὑφίστανται καί στά γονίδια ἐκεῖνα πού εἶναι ἐνεργά γιά μεταγραφή καί ἐπομένως ὅτι ἡ ἐνεργός χρωματίνη διατηρεῖ τήν ὀργάνωση σέ νουκλεοσωμάτια.

Ἡ DNAση I σέ ἀντίθεση μέ τήν σταφυλοκοκκική νουκλεάση ἐπιδρᾷ τόσο στό DNA τῆς γέφυρας ὅσο καί στό DNA πού προστατεύεται ἀπό τά νουκλεοσωμάτια καί τό κόβη σέ κομμάτια τῶν 10bp.

Ἐάν μελετήσουμε τήν δράση τοῦ ἐνζύμου αὐτοῦ στούς ἴδιους μέ παραπάνω ἰστούς (ἐρυθροκύτταρα ὡαγωγούς) γιά νά δοῦμε τήν δράση του πάνω στά ἐνεργά γονίδια τῆς αἰμοσφαιρίνης καί ὠλευκοματίνης βρίσκουμε πώς τό ἐνζυμο καταστρέφει κατά προτίμηση τά ἐνεργά αὐτά γονίδια σέ σχέση μέ τήν ὀλική μή ἐνεργό χρωματίνη.

Ἀπό τά δύο αὐτά ἀποτελέσματα φαίνεται λοιπόν ὅτι ναι μέν ὑπάρχουν νουκλεοσωμάτια στήν μεταγραφομένη χρωματίνη ἀλλά τά νουκλεοσωμάτια αὐτά ἔχουν μία διαφορετική πιά "ἀνοιχτή" δομή



πού καθιστά πιά εύάλωτο τό DNA στίς νουκλεάσες. Ἡ εὐαίσθη-
σία αὐτή τοῦ DNA τῶν μεταγραφομένων γονιδίων εἶναι ἀνεξάρτη-
τος τοῦ φαινομένου τῆς μεταγραφῆς αὐτοῦ καθ'ἑαυτοῦ. Δέν ὀ-
φείλεται δηλαδή στήν παρουσία τῶν μορίων τῆς RNA πολυμεράσης
πάνω στό DNA τῶν γονιδίων.

Πράγματι μελέτη διαφοροποιημένων ἰστών ἀπέδειξε πώς ὅλα τά
γονίδια πού εἶναι εἰδικά γιά τόν ἰστό αὐτό εἴτε μεταγράφονται
εἴτε ὄχι εἶναι εὐαίσθητα στήν DNase I. Ἐρυθροκύτταρα ἐμβρίου
κόττας 18 ἡμερῶν πού δέν συνθέτουν αἰμοσφαιρίνη καί κύτταρα
ἀπό τούς ὡαγωγούς κόττας ὅταν δέν ἐπιδροῦν τά οἰστογόνα καί
ἐπομένως οἱ γόνιοι ὡλευκωματίνης δέν μεταγράφονται ἔχουν τά
γονίδια αἰμοσφαιρίνης καί ὡλευκωματίνης σέ κατάσταση εὐαίσθη-
σίας στήν DNase I.

Αὐτό σημαίνει πώς ὑπάρχει μία εἰδική ὀργάνωση γιά τήν χρωμα-
τίνη τῶν γονιδίων πού ἀντιστοιχεῖ σέ ἕνα "πρόγραμμα μεταγρα-
φῆς" ὅπως αὐτό ὑπάρχει στούς διαφοροποιημένους ἰστούς ἀνεξάρ-
τητα τοῦ ἂν οἱ γόνιοι αὐτοί μεταγράφονται ἤ ὄχι.

Ἡ φύσις τοῦ φαινομένου αὐτοῦ εἶναι μεγάλης σημασίας γιά τήν
μελέτη τῆς κυτταρικήs διαφοροποιήσεως καί οἱ ἔρευνες σ'αὐτόν
τόν τομέα δείχνουν πώς τόσο οἱ ἰστόνες ὅσο καί οἱ πρωτεΐνες
μή ἰστόνες ὑπεισέρχονται στήν λειτουργική ὀργάνωση τῆς χρωμα-
τίνης.

Ἀπό τίς χημικές μεταβολές πού ὑφίστανται οἱ ἰστόνες ἡ μεθυ-
λίωσις καί φωσφορυλίωσις δέν φαίνεται νά ἔχουν σχέση μέ τήν
μεταγραφή ἀντίθετα ὑπάρχουν πολλές ἐνδείξεις ὅτι ἡ ἀκετυλίω-
σις τῶν ἰστονῶν εἶναι ἕνα φαινόμενο πού προηγεῖται τῆς μετα-
γραφῆς.

Λεμφοκύτταρα στά ὁποῖα ἔχουν ἐπιδράση μιτογόνα ὅπως ἡ φυτο-
αιμαγλουτινίνη καί κονκαναβαλίνη παρουσιάζουν πρῶτα αὐξηση



της άκετυλιώσεως τών Ιστονών και κατόπιν αύξηση της συνθέσεως του RNA.

Τό φαινόμενο της άκετυλιώσεως είναι άμφίδρομο (άκετυλίωσις \rightleftharpoons άποακετυλίωσις) και πολύ ταχύ 1-2 λεπτά. Εύρέθη ότι μία ούσία τό βουτυρικό νάτριο ένα λιπαρό όξύ άναστέλει την άποακετυλίωση τών Ιστονών 3 και 4 στις φυσιολογικές θέσεις άκετυλιώσεώς τους και έτσι οι Ιστονες αυτές μετά την δράση της ούσίας βρίσκονται υπερακετυλιομένες.

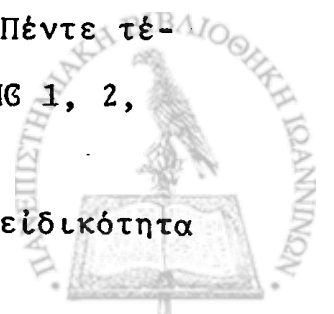
Έάν επιδράσουμε σε κύτταρα μέ βουτυρικό νάτριο και υπερακετυλιώσουμε τις Ιστονες 3 και 4 μελετήσουμε δέ κατόπι την εύαισθησία της χρωματινης στην νουκλεολιτική δράση της DNase I βρίσκουμε ότι ή εύαισθησία αυτή έχει αύξηθῆ περίπου 10 φορές.

Επίσης ή νουκλεάση του σταφυλοκόκκου κόβη τό DNA στην υπερακετυλιομένη χρωματινη και την φυσιολογική χρωματινη με την ίδια εύαισθησία αλλά άποσπᾶ κατά προτίμηση υπερακετυλιωμένα νουκλεοσωμάτια. Υπάρχει επομένως μία συσχέτιση μεταξύ άκετυλιώσεως τών Ιστονών και μεταγραφῆς άφου και στις δύο αυτές καταστάσεις έχουμε υπερευαισθησία στις νουκλεάσες.

Η υπερακετυλίωσις τών Ιστονών αλλάζοντας τις σχέσεις Ιστονης - DNA μπορεί νά προσδίδη στα νουκλεοσωμάτια μία ἄλλη όργάνωση όμοια με εκείνη της μεταγραφομένης χρωματινης.

Μεταξύ τών πρωτεϊνών μη Ιστονών της χρωματινης (NHP=non histone proteins) υπάρχει μία ομάδα που αναφέρεται ως HMG (high mobility group proteins) και ή όποια περιλαμβάνει πρωτεϊνες της χρωματινης που εκλούονται με 5% υπερχλωρικό όξύ ή 0,35M NaCl. Οι πρωτεϊνες αυτές έχουν μοριακό βάρος περίπου 30.000 και περιέχουν 25% βασικά και 30% όξινα άμινοξέα. Πέντε τέτοιες πρωτεϊνες μελετήθηκαν κυρίως και είναι οι HMG 1, 2, 14, 17 και 20.

Οι πρωτεϊνες αυτές όπως οι Ιστονες δέν φέρουν μία ειδικότητα



είδους ούτε ειδικότητα ιστοῦ καί ἄρα ὅπως οἱ ιστόνες θά πρέπει νά ἔχουν μίαν δομική λειτουργία στήν χρωματίνη. Πάντως ἐπειδή τό ποσό τους εἶναι μικρό ἔπεται ὅτι δέν μποροῦν νά εἶναι παρούσες παρά μόνον στό 10% τῶν νουκλεοσωματίων.

Εἶναι δυνατόν ἐπομένως νά ἔχουν κάποιο δομικό ρόλο γιά μία εἰδική ὑποομάδα νουκλεοσωματίων ὅπως π.χ. αὐτῶν πού ἐνεργῶς παράγουν RNA. Τά κάτωθι πειράματα τῆς ομάδος τοῦ Weintraub ἀφοροῦν αὐτήν τήν ομάδα πρωτεϊνῶν.

Ἐάν ἀφαιρέσουμε ἀπό τά ἐρυθροκύτταρα κατόπιν ἐκκλήσεως τῆς χρωματίνης μέ 0,35M NaCl τίς πρωτεΐνες αὐτές οἱ γόνιοι τῆς αἰμοσφαιρίνης χάνουν τήν ὑπερευαισθησία τους στήν DNase I.

Ἐάν ξαναπροσθέσουμε στήν χρωματίνη αὐτή τό ἐκπλυμα τῶν 0,35M NaCl τότε ἡ ὑπερευαισθησία ἐπανέρχεται. Τό ἐκπλυμα χρωματίνης ἀπό κύτταρα ἐγκεφάλου ὅπου οἱ γόνιοι αἰμοσφαιρίνης δέν εἶναι ἐνεργεῖς, ἐπίσης ἀποκαθιστά τήν ὑπερευαισθησία τῶν γόνων αἰμοσφαιρίνης ἐρυθροκυττάρων στήν DNase I.

Τό ἀντίστροφο ὅμως πείραμα δηλαδή ἡ προσθήκη ἐκπλύματος 0,35M NaCl ἀπό χρωματίνη ἐρυθροκυττάρων στά κύτταρα ἐγκεφάλου δέν ἐπάγει τήν εὐαισθησία τῶν γόνων αἰμοσφαιρίνης στά κύτταρα αὐτά. Συμπεραίνουμε ὅτι οἱ πρωτεΐνες τοῦ ἐκπλύματος (κυρίως HMG 14 καί 17) ἴον) δέν ἔχουν εἰδικότητα ιστοῦ 2ον) δέν ἔχουν ἱκανότητα ἀναγνωρίσεως εἰδικῶν γόνων στό DNA γιατί τότε τό ἐκπλυμα ἐρυθροκυττάρων θά ἔπρεπε νά αὐξήσῃ τήν εὐαισθησία τοῦ γόνου αἰμοσφαιρίνης στά κύτταρα ἐγκεφάλου.

Ἄρα φαίνεται ὅτι οἱ ἐν ἐνεργείᾳ γόνιοι περιέχουν ἄλλα στοιχεῖα (πρωτεΐνες) πού ἀναγνωρίζονται ἀπό τίς HMG καί τοῦς προσδίδουν εἰδικότητα γιά νά προκαλέσουν τήν μετατροπή στήν ὀργάνωση τῆς χρωματίνης ἐνός γονιδίου.



Γ.

DNA

Τό DNA εἶναι τό κυριότερο μεγαλομόριο τοῦ πυρήνος τῶν εὐκαρυωτικῶν κυττάρων καί τῶν χρωματοσωμάτων καί ἀποτελεῖ τήν παρακαταθήκη τῆς γενετικῆς πληροφορίας τοῦ κυττάρου. Ἀποτελεῖ τό κυριότερο συστατικό τοῦ πυρήνος τόσο ἀπό δομική ὄσο καί ἀπό λειτουργική σκοπιά.

1.- Ποσόν ἀνά κύτταρο καί μέγεθος τῶν μορίων τοῦ DNA

Τό ποσόν τοῦ DNA στόν πυρήνα τῶν κυττάρων εἶναι διαφορετικό στά διάφορα εἶδη ζώων καί φυτῶν ἀλλά πάντοτε τό ἴδιο γιά τά διάφορα εἶδη κυττάρων ἑνός καί τοῦ αὐτοῦ ὄργανισμοῦ.

Ἡ σταθερότης αὐτή τοῦ ποσοῦ τοῦ DNA στά διάφορα κύτταρα ἑνός ὄργανισμοῦ ὑπέδειξε τόν γενετικό ρόλο τοῦ DNA καθώς καί τό ὅτι ἡ διαφοροποίησις τῶν σωματικῶν κυττάρων δέν ὀφείλεται σέ χάσιμο μέρους τῆς γενετικῆς πληροφορίας.

Ἡ σταθερότης αὐτή τοῦ ποσοῦ τοῦ DNA ἀνά κύτταρο ἀπεδείχθη ἀπό πολύ παλιά μέ κυτταροφωτομετρικές μεθόδους. Τό DNA τῶν πυρήνων χρωματίσθηκε μέ μία εἰδική χρώση γιά τό DNA τήν ἀνφίδραση Feulgen καί τό ποσόν τῆς χρωστικῆς μετρήθηκε μέ μικροκύτταροφωτομετρία. Ἔτσι ἀπεδείχθη ἡ σταθερότης τοῦ ποσοῦ τοῦ DNA στά διάφορα κύτταρα ἑνός ὄργανισμοῦ. Τό ποσό αὐτό εἶναι βέβαια συνάρτησις τοῦ ἀριθμοῦ τῶν χρωματοσωμάτων ὁ ὁποῖος εἶναι σταθερός στά σωματικά κύτταρα (2n διπλοειδισμός).

Στά γενετικά κύτταρα (σπερματοζωάρια) ὅπου ὁ ἀριθμός τῶν χρωματοσωμάτων εἶναι n (ἀπλοειδισμός) τό ποσόν τοῦ DNA εἶναι ἀκριβῶς τό ἡμισὴ τῶν σωματικῶν κυττάρων. Ὑπάρχουν καί μερικές ἄλλες ἐξαιρέσεις ὅπως π.χ. σέ ὀρισμένους ἱστούς (ἥπαρ) βρίσκονται πολυπλοειδικά κύτταρα (4n ἢ 8n) καί οἱ πυρήνες τους περιέχουν ἀνάλογα πολλαπλάσια τοῦ ποσοῦ τοῦ DNA.

Ἀντίθετα μέ τήν σταθερότητα τοῦ ποσοῦ στά κύτταρα τοῦ ἰδίου



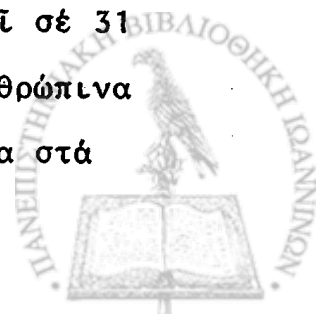
πολυκυττάρου οργανισμού τό ποσόν τοῦ DNA στά διάφορα εἶδη ζώων καί φυτῶν εἶναι διαφορετικό καί ἀποτελεῖ χαρακτηριστικό γνώρισμα τοῦ κάθε οργανισμού. Κατά γενικό κανόνα ὅσο ἀνεβαίνουμε στήν βιολογική κλίμακα ἀπό τά κατώτερα πρὸς τά ἀνώτερα εἶδη εὐκαρυωτικῶν κυττάρων τό ποσόν τοῦ DNA αὐξάνει ὅπως ἐπίσης αὐξάνει ἀπό τοὺς κατωτέρους οργανισμούς στοὺς ἀνωτέρους π.χ. ἡ δροσοφίλα περιέχει 40 φορές περισσότερο DNA ἀπὸ τὴν *E. coli*. Τὰ κύτταρα τῶν σπονδυλωτῶν περιέχουν 700-1000 φορές περισσότερο DNA (εἰκόνα 25).

(εἰκόνα 25)

species	haploid genome size in			
	picograms	daltons	base pairs	
phages:				
ϕ X 174		1.6×10^6	5,500	
lambda		30×10^6	45,000	
T4		130×10^6	200,000	
animal virus:	adenovirus 12	14×10^6	21,000	
procaryotes:	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	0.2×10^9	0.3×10^6	
	<i>B. subtilis</i>	1.3×10^9	2.1×10^6	
	<i>E. coli</i>	2.8×10^9	4.6×10^6	
unicellular eucaryote:	<i>S. cerevisiae</i>	6.5×10^9	10×10^6	
higher organisms:	<i>D. melanogaster</i>	0.18	0.11×10^{12}	0.18×10^9
	<i>Zea mays</i>	15	10×10^{12}	15×10^9
	<i>X. laevis</i>	22	14×10^{12}	22×10^9
	mouse	2.3	1.5×10^{12}	2.3×10^9
	man	2.8	1.8×10^{12}	2.8×10^9
	(smallest chromosome)		0.03×10^{12}	4.5×10^7
	(largest chromosome)		0.15×10^{12}	2.3×10^8

Ἐπὶ τῶν εὐκαρυωτικῶν κύτταρα ὁρισμένες παρεκλίσεις ἀπὸ τὸν γενικό κανόνα, κύτταρα ὁρισμένων εἰδῶν πού βρίσκονται χαμηλότερα στήν βιολογική κλίμακα ἔχουν ἀσυνήθως πολὺ περισσότερο DNA. Τὸ μεγαλύτερο ποσὸ ἀνά κύτταρο ἔχει ἓνα εἶδος σαλαμάνδρας ἡ *Amblystoma* μὲ 168 picograms DNA ἀνά πυρήνα δηλ. λαδὴ 40.000 φορές τό ποσὸ τῆς *E. coli*.

Ἐάν λάβουμε ὑπ' ὄψιν ὅτι ἓνα picogram DNA ἀντιστοιχεῖ σὲ 31 cm μπορούμε νὰ ὑπολογίσουμε τό μῆκος τοῦ DNA στά ἀνθρώπινα κύτταρα σὲ 174cm, 52 μέτρα στήν *Amblystoma* καί 97 μέτρα στά



γιγαντιαία πολυταινικά χρωματοσώματα τῶν σιελογόνων ἀδένων τῆς δροσόφιλας. Τό ποσό τοῦ DNA στά χρωματοσώματα εἶναι ἀνάλογο μέ τό μέγεθος τῶν χρωματοσωμάτων. Τά μεγάλα χρωματοσώματα τοῦ ἀνθρώπου πού ἔχουν μήκος 10 μ m περιέχουν περίπου 7,2cm DNA. Κάθε χρωμόσωμα περιέχει μόνον ἕνα γραμμικό μόριο DNA αὐτό σημαίνει ὅτι 1ον) τό DNA κάθε χρωματοσώματος εἶναι ἕνα συνεχές μόριο καί 2ον) ὅτι ὑπάρχει μόνον ἕνα τέτοιο μόριο κατά μήκος ἑνός χρωματοσώματος.

Ἡ ἀπόδειξις εἶναι ἔμμεσος καί ἄμεσος. Τά ἔμμεσα ἐπιχειρήματα εἶναι κυρίως γενετικῆς φύσεως (χαρτογραφία χρωματοσωμάτων στήν δροσόφιλα). Ὑπάρχουν ὅμως καί ἄμεσα ἐπιχειρήματα ἀπό τό ἠλεκτρονικό μικροσκόπιο καθώς καί βιοχημικά δεδομένα ἀπό τά χρωματοσώματα τῆς δροσόφιλας ὅπου ἀποδεικνύεται ὅτι τό μέγεθος τοῦ μορίου τοῦ DNA εἶναι ἀνάλογο τοῦ μεγέθους τοῦ ἀντιστοίχου χρωματοσώματος.

Τό σημαντικό πρόβλημα πού θέτει τό DNA τῶν χρωματοσωμάτων εἶναι τό πρόβλημα τῆς ὀργανώσεως καί τῆς κατανομῆς τῆς πληροφορίας κατά μήκος τοῦ μορίου του. Οἱ γενετικοί μέθοδοι πού τόσο βοήθησαν γιά τήν χαρτογράφηση τῶν χρωματοσωμάτων τῶν προκαρυωτικῶν κυττάρων καί ἰῶν δέν προσφέρονται γιά τήν μελέτη τῆς λεπτῆς δομῆς τοῦ γονιδώματος τῶν εὐκαρυωτικῶν κυττάρων 1ον) λόγω τοῦ μεγάλου ποσοῦ τοῦ DNA καί 2ον) λόγω τοῦ διπλοειδισμού τῶν κυττάρων αὐτῶν πού καθιστᾷ δύσκολο τήν ἀπομόνωση μεταλλαγμένων στελεχῶν ἐφ' ὅσον οἱ περισσότερες μεταλλάξεις δέν ἐκφράζονται.

Ἔτσι ἡ μεθοδολογία γιά τήν μελέτη τῆς ὀργανώσεως τῶν εὐκαρυωτικῶν χρωματοσωμάτων χρησιμοποίησε τίς νεώτερες μεθόδους τῆς μοριακῆς βιολογίας.



2.- Μέθοδοι μελέτης του DNA

Γιά να μπορέσουμε να μελετήσουμε την οργάνωση και την φυσιολογία του χρωματοσώματος καθώς και τους μηχανισμούς έκφρασης της πληροφορίας θά πρέπει:

1ον. Να μπορούμε να απομονώσουμε σε καθαρή μορφή τα προϊόντα έκφρασης των γονιδίων που είναι τα αγγελιοφόρα RNA και τα πρόδρομα των αγγελιοφόρων μόρια.

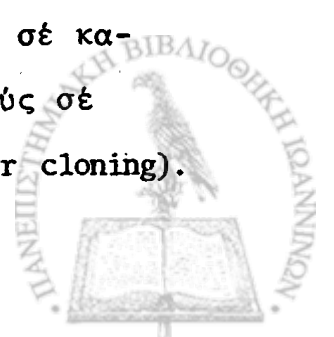
2ον. Να μπορούμε να κόψουμε τα μεγάλα μόρια του DNA σε καθορισμένα τμήματα και να τα χαρτογραφήσουμε και αυτό γιατί τό μέγεθος του μορίου είναι τέτοιο που δεν επιτρέπει την ανάλυση της δομής του με άλλο τρόπο.

3ον. Να μπορούμε να μελετήσουμε την αλληλοδιαδοχή των βάσεων του DNA.

Οι έρευνες της μοριακής βιολογίας στον τομέα αυτό έκαναν κατά τα τελευταία χρόνια τεράστιες προόδους. 'Η επανάσταση αυτή στην μοριακή βιολογία του γονιδίου οφείλεται στην ανάπτυξη μιας πολύπλοκης μεθοδολογίας που περιλαμβάνει τρεις ομάδες τεχνικών:

α) Την χρησιμοποίηση μορίων ίχνηθετών (molecular probes) για την μελέτη των αλληλοδιαδοχών των βάσεων του DNA. Οι τεχνικές αυτές στηρίζονται στην ακριβή αναγνώριση μεταξύ των συμπληρωματικών αλύσεων νουκλεοτιδίων είτε DNA/DNA είτε DNA/RNA (μελέτη δηλαδή της "έπανασυνδέσεως" των συμπληρωματικών αλύσεων του DNA ή της "ύβριδοποιήσεως" συμπληρωματικών αλληλοδιαδοχών RNA και DNA).

'Η μεθοδολογία του ανασυνδιασμένου DNA (recombinant DNA) επέτρεψε έξ άλλου τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση σε καθαρή μορφή των μορίων ίχνηθετών διά της εισαγωγής τους σε βακτηρίδια και την απομόνωση καθαρών κλώνων (molecular cloning).



β) Ἡ δεύτερη ὁμάς τεχνικῶν ἀναφέρεται στήν φυσική καί χημική χαρτογράφηση τοῦ DNA καί ὀφείλεται στήν ἀνακάλυψη τῶν περιοριστικῶν ἐνδονουκλεασῶν πού ἐπιτρέπει τό σπάσιμο τοῦ μορίου σέ καθορισμένα τμήματα καθώς καί στήν ἀνάπτυξη τεχνικῶν ταχείας μελέτης τῆς ἀλληλοδιαδοχῆς τῶν βάσεων τοῦ DNA.

γ) Τέλος ἡ τρίτη ὁμάς ἀφορᾷ τεχνικές παρατηρήσεως τῶν μορίων τοῦ DNA μέ τό ἠλεκτρονικό μικροσκόπιο.

ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ - ΕΠΑΝΑΣΥΝΔΕΣΗ - ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

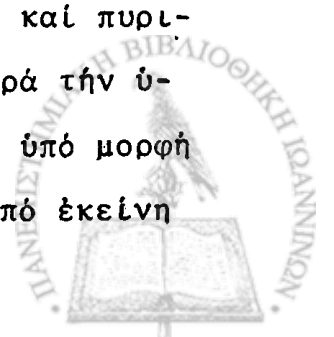
1.- Ἀποδιάταξη

Ἡ δομή τῆς διπλῆς ἑλικος τοῦ DNA στηρίζεται στήν ἀναγνώριση τῶν συμπληρωματικῶν δομῶν τῶν ἀλληλοδιαδοχῶν βάσεων σέ κάθε ἑλικά (ἀδενίνη ἐνοῦται μέ θυμίνη καί κυτοσίνη μέ γουανίνη). Οἱ δεσμοί πού συνδέουν τίς δύο ἑλικες δέν εἶναι ἰσχυροί ὁμοιοπολικοί δεσμοί ἀλλά ἀσθενεῖς δεσμοί κυρίως ὑδρογόνου μεταξὺ τῶν συμπληρωματικῶν βάσεων.

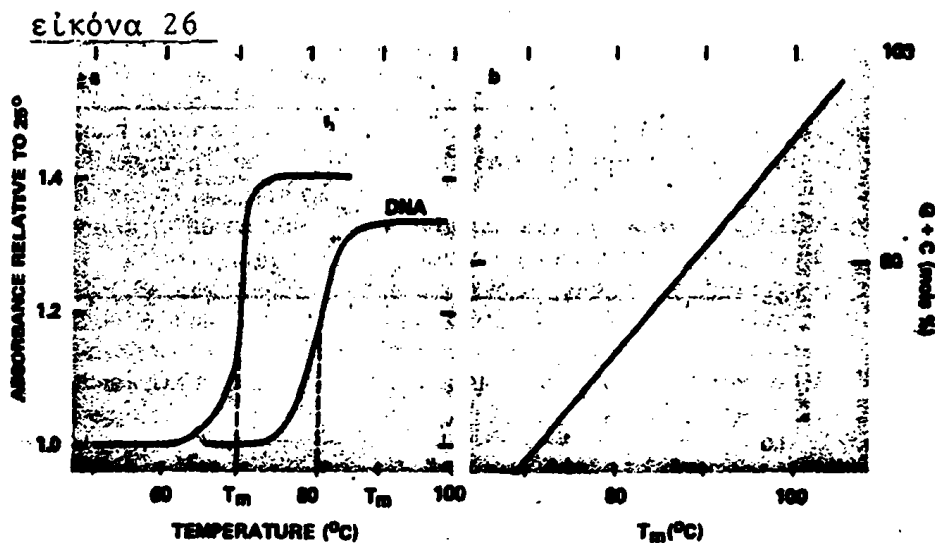
Εἶναι ἐπομένως εὐκόλο νά προκαλέσουμε τήν ἀποδιάταξη τῆς διπλῆς ἑλικος τοῦ DNA ἂν ἐπιδράσουμε μέ θερμότητα ἢ ἀλκαλικό περιβάλλον (οἱ βάσεις φορτίζονται ἀρνητικά καί ἀπωθοῦνται).

Ἄλλοι παράγοντες πού ἐπιδρῶν στήν ἀποδιάταξη τοῦ μορίου εἶναι ἡ μείωσις τῆς ἰονικῆς δυνάμεως τοῦ διαλύματος (φωσφορικές ὁμάδες μένουν ἀκάλυπτες καί ἀπωθοῦνται) καθώς καί ἡ ἐπίδρασις ὀργανικῶν οὐσιῶν ὅπως ἡ οὐρία καί τό φορμαμίδιο (διατάραξις ὑδροφῶβων καί ὑδρογονικῶν δεσμῶν).

Τήν ἀποδιάταξη τοῦ DNA μπορούμε νά τήν μελετήσουμε παρακολουθώντας τίς μεταβολές στήν ἀπορρόφηση τοῦ ὑπεριώδους φωτός στά 260nm. Γνωρίζουμε ὅτι οἱ βάσεις πουρίνης καί πυριμιδίνης καθώς καί τά νουκλεοτίδια ἀπορροφοῦν ἰσχυρά τήν ὑπεριώδη ἀκτινοβολία. Ὄταν τό DNA ὅμως βρίσκεται ὑπό μορφῆς διπλῆς ἑλικος ἡ ἀπορρόφηση αὐτή εἶναι μικρότερη ἀπό ἐκείνη



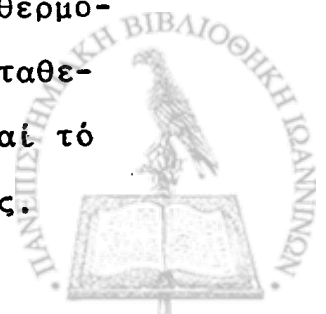
πού θα έδιναν οι ελεύθερες βάσεις που αποτελούν το μόριο του DNA. Αυτό οφείλεται στην διάταξη των βάσεων στην διπλή έλικα κάθετα προς τον άξονά της. Όταν αποδιατάξουμε το DNA αύξάνει η απορρόφηση στα 260. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται υπερχρωμικότητα ((hyperchromicity). Καί μās έπιτρέπει νά παρακολουθήσουμε την αποδιάταξη στό σπεκτροφωτόμετρο παράλληλα μέ την αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος του DNA. Η αποδιάταξις του DNA γίνεται άποτομα σέ ένα μικρό εύρος θερμοκρασίας (είκόνα 26).



DNA melting curves (left) and dependence on GC content or mole percentage (right).

Χαρακτηρίζουμε ως T_m (melting temperature) τό σημείο της καμπύλης πού άντιστοιχεί στην αποδιάταξη του ήμίσεως ποσού του DNA.

Η θερμοκρασία αποδιατάξεως διαφόρων DNA δέν είναι ή ίδια. Τό T_m έξαρτάται από την περιεκτικότητα του DNA σέ βάσεις G/C καί μάλιστα μέ γραμμικό τρόπο. Όσο μεγαλύτερη είναι ή περιεκτικότης σέ G/C τόσο τό T_m βρίσκεται σέ ύψηλότερη θερμοκρασία καί αυτό γιατί όπως γνωρίζουμε οι βάσεις G/C σταθεροποιούνται στην διπλή έλικα μέ 3 δεσμούς ύδρογόνου καί τό ποσοστό τους αύξάνει την σταθερότητα της διπλής έλικος.



2. - Έπανασύνδεση

Ἡ ἀποδιάταξη: τῶν δύο κλώνων τοῦ DNA εἶναι ἓνα φαινόμενο ἀντιστρεπτό. Ὄταν ἡ θερμοκρασία χαμηλώσει κάτω ἀπό τό T_m οἱ δύο ἑλικες τοῦ DNA ἐπανασυνδέονται μεταξύ τους καί ξαναφτιάχουν τήν διπλή ἑλικά. Αὐτό δέν σημαίνει ὅτι οἱ ἴδιες ἀκριβῶς ἑλικες πού ὑπέστησαν στήν ἀποδιάταξη θά ξανασυνδεθοῦν μεταξύ τους μπορεῖ νά συνδεθοῦν δύο ἄλλες ἑλικες πού προέρχονται ἀπό ὁμοια μόρια.

Ἡ ἐπανασύνδεσις τῶν ἐλίκων τοῦ DNA (reassociation) γίνεται σέ δύο στάδια. Τό πρῶτο στάδιο εἶναι ἡ δημιουργία ἑνός δι-κλώνου πυρήνος ὅταν ἓνας ἀριθμός συμπληρωματικῶν βάσεων κατά τήν θερμική κίνηση τῶν μορίων ἔλθῃ σέ ἐπαφή μεταξύ τους. Τό δεύτερο στάδιο εἶναι τό κλείσιμο τῆς διπλῆς ἑλικος σάν φερμουάρ ἀπό τήν περιοχὴ τοῦ δικλώνου πυρήνος.

Ἀπό τά δύο φαινόμενα τό δεύτερο εἶναι πολύ ταχύ. Ἀντίθετα ἡ πυρήνωση ἐπειδὴ προϋποθέτει τήν τυχαία συνάντηση μεταξύ τους δύο συμπληρωματικῶν ἀλύσεων DNA καθυστερεῖ καί εἶναι ἐκείνη πού χαρακτηρίζει τήν κινητικὴ τῆς ἀντιδράσεως.

Τὴν ἐπανασύνδεση μετράμε μέ πολλοὺς τρόπους. Εἶναι δυνατόν νά μετρηθεῖ φασματοφωτομετρικῶς ἀπὸ τήν ὀπτική πυκνότητα τοῦ διαλύματος τοῦ DNA στά 260nm λόγω τοῦ φαινομένου τῆς ὑποχρωμικότητας (ἐλάττωσις τῆς ἀπορροφητικότητας λόγω σχηματισμοῦ διπλῶν ἀλύσεων). Ἐπίσης μποροῦμε νά διαχωρίσουμε τό μονόκλωνο ἀπὸ τό δίκλωνο DNA κατά τήν διάρκειά τῆς ἀντιδράσεως μέ βάση τήν διαφορική πρόσδεση τους στὸν ὕδρο-ξυαπατιτῆ (κρυσταλικὴ μορφή φωσφορικοῦ ἀσβεστίου). Ὁ ὕδρο-ξυαπατιτῆς προσροφᾷ καί συγκρατεῖ τὰ νουκλεϊνικά ὀξέα, ἀλληλεπιδρώντας μέ τίς φωσφορικές τους ρίζες. Τὰ δίκλιωνα μόρια ὅπου οἱ φωσφορικές ρίζες βρίσκονται σέ κανονικὴ διάταξη, συγκρατοῦνται πιὸ ἔντονα. Ἄν προσθέσουμε σὸ διάλυμα φωσφο-

ρικά άλατα, αυτά συναγωνίζονται τις φωσφορικές ρίζες των νουκλεϊνικών όξεων και έτσι τά έλευθερώνουν από τον ύδρο-φωσφορικό οξύ. Ξυλαπατίνη. Μονόκλωνο DNA έλευθερώνεται με διάλυμα 0,12M φωσφορικών ένών δίκλωνο σε 0,4M. Μπορούμε λοιπόν να περάσουμε τό δείγμα του DNA παρουσία 0,12M φωσφορικού όποτε συλλέγουμε τό μονόκλωνο DNA. Μετά προσθέτουμε 0,4M φωσφορικού και συλλέγουμε τό δίκλωνο DNA.

Άπό τήν σχέση μεταξύ των δύο κλασμάτων μπορούμε να ύπολογίσουμε κατά τήν διάρκεια τής αντίδράσεως τό έκάστοτε ποσοστό του άρχικού DNA πού έχει μετατραπει σε δίκλωνο.

Τέλος ένας τρίτος τρόπος είναι ή χρησιμοποίηση ειδικής νουκλεάσης (S_1) πού ύδρολύει μόνο τό μονόκλωνο DNA. Έτσι τό άνθεκτικό DNA μάς δίδει τό ποσό του DNA πού έχει έπανασυνδεθει.

Η έπανασύνδεσις ενός ζεύγους συμπληρωματικών άλύσεων του DNA είναι άποτέλεσμα τής συγκρούσεως τους και ώς εκ τούτου ή ταχύτης έπανασυνδέσεως εξαρτάται από τήν συγκέντρωσή τους. Μία δεύτερη παράμετρος πού ύπεισέρχεται στην έπανασύνδεση δύο συμπληρωματικών άλύσεων είναι ο χρόνος έπώσεως.

Οί παράμετροι συγκέντρωσις και χρόνος μπορεί να εκφρασθουν σαν ένας παράγων από τό γινόμενό τους πού όνομάζεται Cot (δηλαδή άρχική συγκέντρωσις DNA $C_0 \times$ χρόνος) και εκφράζεται σε μοριακότητα νουκλεοτιδίων X χρόνο σε δευτερόλεπτα / ανά λίτρο.

Σάν $Cot_{\frac{1}{2}}$ καθορίζεται ή τιμή του Cot κατά τήν όποία ή αντίδρασις έπανασυνδέσεως είναι 50% δηλαδή τό $\frac{1}{2}$ του DNA έχει έπανασυνδεθει.

Η τιμή $Cot_{\frac{1}{2}}$ είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος DNA γιατί καθορίζει τήν πολυπλοκότητα ενός γονιδιώματος.



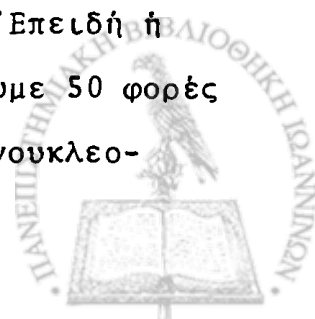
2.α. - Όρισμός της έννοιας της πολυπλοκότητας

Σάν πολυπλοκότητα ενός γονιδιώματος καθορίζουμε τό συνολικό μήκος τών άλληλοδιαδοχών βάσεων τοῦ γονιδιώματος αὐτοῦ πού δέν ἐπαναλαμβάνονται. Ἐάν π.χ. ἔχουμε ἕνα γονιδίωμα πού ἀποτελεῖται ἀπό μία ἀλληλοδιαδοχή 100 βάσεων χωρίς ἐσωτερικές ἐπαναλήψεις στή σειρά τών βάσεων αὐτῶν τότε λέμε ὅτι ἡ πολυπλοκότης τοῦ γονιδιώματος αὐτοῦ εἶναι 100bp (ζεύγη βάσεων). Ἐάν ἔχουμε ἕνα γονιδίωμα πού ἀποτελεῖται ἀπό 100bp πού δέν ἐπαναλαμβάνονται καί 10bp πού ἐπαναλαμβάνονται 10 φορές τό μήκος τοῦ γονιδιώματος αὐτοῦ θά εἶναι 200bp ἀλλά ἡ πολυπλοκότης του θά εἶναι μόνον 110bp.

2 β. - Τό C₀t καθορίζει τήν πολυπλοκότητα ἐνός DNA

Εἶπαμε ὅτι τό C₀t καί πίο συγκεκριμένα τό C₀t_{1/2} σχετίζεται ἀμεσα μέ τήν πολυπλοκότητα. Ἐάν θεωρήσουμε τήν ἐπαναδιάταξη δύο εἰδῶν DNA τῶν ὁποίων τά μόρια δέν περιέχουν ἐσωτερικές ἐπαναλήψεις τῶν ἀλληλοδιαδοχῶν τῶν νουκλεοτιδίων τους. Π.χ. τό DNA ἐνός φάγου μέ 10⁵ νουκλεοτίδια καί τό DNA ἐνός βακτηριδίου μέ 5·10⁶ νουκλεοτίδια.

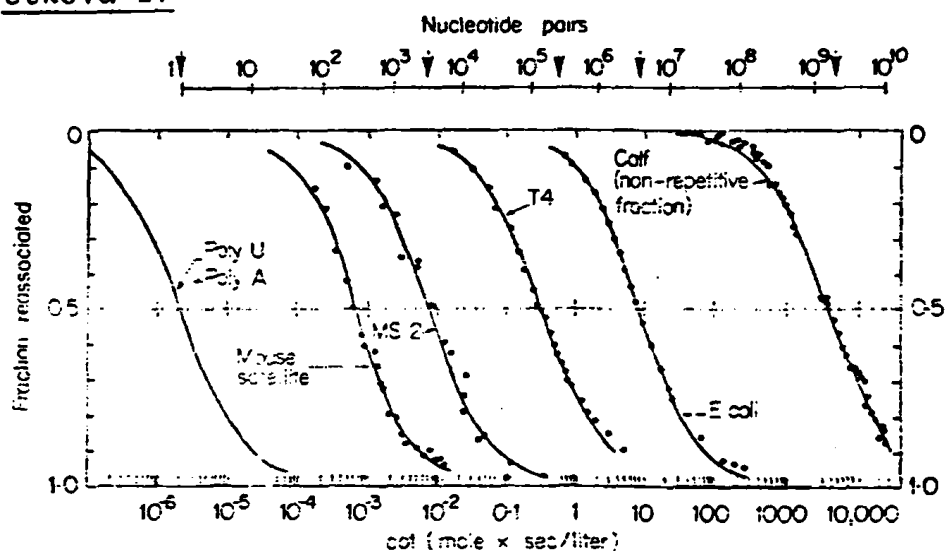
Ἐπειδή τό μήκος τῆς ἀλύσεως τοῦ DNA ἐπηρεάζει τήν ἐπαναδιάταξη γιά νά ἔχουμε συγκρίσημα ἀποτελέσματα σπᾶμε τά DNA αὐτά σέ κομμάτια 500bp. Ἐάν ἐξετάσουμε τίς συγκεντρώσεις ἐνός ἐκάστου τμήματος 500 νουκλεοτιδίων ἀπό τά δύο DNA θά δοῦμε ὅτι γιά τό DNA τοῦ φάγου κάθε κομμάτι ἀντιπροσωπεύει τό 0,005 τοῦ ὅλικοῦ DNA ἐνῶ γιά τό DNA τοῦ βακτηριδίου ἀντιπροσωπεύει τό 0,0001 δηλαδή ἡ σχέση εἶναι 1/50². Γιά νά ἔχουμε τήν ἴδια ἀρχική συγκέντρωση DNA (C₀) θά πρέπει νά βάλουμε 50 φορές περισσότερο DNA φάγου ἀπό DNA βακτηριδίου. Ἐπειδή ἡ ἀρχική συγκέντρωσις τῶν δύο DNA εἶναι ἴδια θά ἔχουμε 50 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση ἐνός ἐκάστου τμήματος 500 νουκλεοτιδίων ἀπό τό DNA τοῦ φάγου



σέ σχέση μέ τήν αντίστοιχη συγκέντρωση τῶν διαφόρων τμημάτων DNA τοῦ βακτηριδίου καί ἄρα ὁ χρόνος $t_{1/2}$ γιά τήν ἐπανάσυνδεση τοῦ DNA τοῦ φάγου θά εἶναι 50 φορές μικρότερος ἀπό τόν χρόνο $t_{1/2}$ τοῦ DNA τοῦ βακτηριδίου. Γιά τόν ἴδιο λόγο $Cot_{1/2}$ φάγου θά εἶναι $1/50$ $Cot_{1/2}$ βακτηριδίου.

Ἡ καμπύλη ἐπανάσυνδέσεως τοῦ DNA τοῦ φάγου θά εἶναι ἐπομένως μετατοπισμένα πρός τά ἀριστερά (μικρότερα Cot) σέ σχέση μέ τήν καμπύλη ἐπανάσυνδέσεως τοῦ DNA τοῦ βακτηριδίου (εἰκόνα 27).

εἰκόνα 27



Εἶπαμε ὅτι ἡ Cot εἶναι ἀνάλογος τῆς πολυπλοκότητος ἑνός DNA. Γιά DNA πού δέν περιέχουν ἐπαναλαμβανόμενα τμήματα ἀλληλοδιαδοχῶν ἢ πολυπλοκότης ἀντιστοιχεῖ καί μέ τό μέγεθος τοῦ γονιδιώματος σέ ἀριθμό ζευγῶν βάσεων.

Μποροῦμε ἐπομένως μελετώντας τήν ἀπανάσυνδεση ἑνός ἀγνώστου DNA νά ὑπολογίσουμε τό μέγεθος τοῦ γονιδιώματός του σέ ζεύγη βάσεων.

Πειραματικῶς σ'αὐτήν τήν περίπτωση χρησιμοποιοῦμε καί ἕνα standard τό ὁποῖον εἶναι ἕνα DNA γνωστοῦ μεγέθους γονιδιώματος καί συγκρίνουμε τήν ἐπανάσυνδεση τῶν κομματιῶν τοῦ DNA αὐτοῦ μέ τό ἀγνώστο DNA.



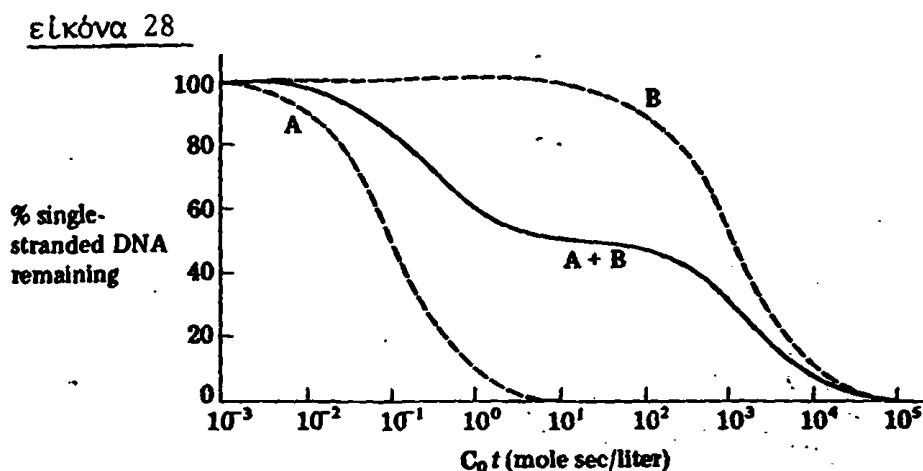
2 γ. - Οι καμπύλες C₀t αποκαλύπτουν την ύπαρξη επαναλαμβανόμενων αλληλοδιαδοχών βάσεων στο DNA

Άς εξετάσουμε τώρα την περίπτωση ενός DNA πού φέρει επαναλαμβανόμενες αλληλοδιαδοχές βάσεων και άς πάρουμε σαν παράδειγμα ένα DNA πού αποτελείται από δύο στοιχεία:

α) από 50% επαναλαμβανόμενες αλληλοδιαδοχές συνολικής πολυπλοκότητας 10^5 bp και πού επαναλαμβάνονται 10^4 φορές στο γονιδίωμα του DNA αυτού (στοιχείο A) και β) από 50% όχι επαναλαμβανόμενες αλληλοδιαδοχές (μοναδικές) όλικής πολυπλοκότητας 10^9 bp (στοιχείο B).

Τό μέγεθος του γονιδιώματος αυτού θά είναι 2×10^9 bp και ή όλική πολυπλοκότης του 1000100.000 bp.

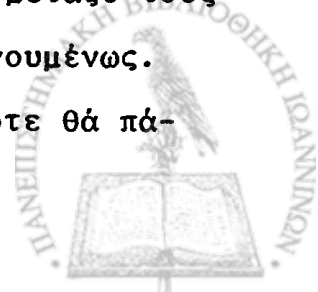
Έάν τά δύο στοιχεία A και B του DNA αυτού μπορούσαν νά ξεχωρισθούν και νά μελετηθεί χωριστά ή επανασύνδεσις ενός έκαστου θά έδιναν τίς 2 καμπύλες C₀t πού παρουσιάζονται στήν εικόνα 28.



C₀t curves for whole DNA (solid line) and isolated frequency components (dashed lines) from a hypothetical eucaryotic organism.

Οι άξίες C₀t_{1/2} των δύο αυτών στοιχείων θά διέφεραν μεταξύ τους κατά ένα παράγοντα 10^4 σύμφωνα μέ όσα είπαμε προηγουμένως.

Έάν ή επανασύνδεσις των A και B γίνει συγχρόνως τότε θά πά-



ροyme τήν συνισταμένη τῶν δύο καμπυλῶν Cot A καί B πού θά εἶναι μία διφασική καμπύλη (εἰκόνα 28). Τά ἐξῆς συμπεράσματα μπορεῖ νά βγάλουμε ἀπό τήν καμπύλη αὐτή.

1ον. Ὅτι τό ὑπό μελέτη DNA εἶναι σύνθετο ἀποτελούμενο ἀπό μοναδικές καί ἐπαναλαμβανόμενες ἀλληλοδιαδοχές.

2ον. Ἐφ' ὅσον ξεχωρίζουμε καθαρά δύο στοιχεῖα στήν καμπύλη (διφασική καμπύλη) τό DNA ἀποτελεῖται ἀπό δύο στοιχεῖα. Τό τμήμα τοῦ DNA πού ἀντιστοιχεῖ στό κάθε στοιχεῖο μπορεῖ νά ὑπολογισθῆ. Ἐάν ἐπεκτείνουμε μία νοητή γραμμή ἀπό τό τελικό σημεῖο τῆς καμπύλης ἐπανασυνδέσεως τοῦ κάθε στοιχείου πρός τόν ἄξονα τῶν y πού μετράει ποσοστά ἐπανασυνδέσεως. Στό ἐν λόγω παράδειγμα τά ποσά (fractions= f) κάθε στοιχείου τοῦ DNA εἶναι ἴσα μεταξύ τους

3ον. Μποροῦμε νά προσδιορίσουμε τήν $Cot_{\frac{1}{2}}$ (καθαρή) γιά τό κάθε στοιχεῖο ἐάν ἐπεκτείνουμε μία γραμμή ἀπό τό μέσο σημεῖο τῆς καμπύλης ἐπανασυνδέσεως τοῦ κάθε στοιχείου στόν ἄξονα τῶν x πού μετράει τήν Cot σέ μοριακότητα νουκλεοτιδίων ἀνά δευτερόλεπτο στό λίτρο. Βρίσκουμε ἔτσι ὅτι τό στοιχεῖο $A=2 \times 10^{-1}$, ἐνώ τό $B=2 \times 10^3$ ἄρα ἡ διαφορά Cot μεταξύ δύο στοιχείων εἶναι τῆς τάξεως τοῦ 10^4 (δηλαδή τό B εἶναι 10^4 φορές πιά πολύπλοκο ἀπό τό A).

4ον. Μποροῦμε νά προσδιορίσουμε τήν ἐπαναλληπτικότητα τῶν δύο στοιχείων ἐάν γνωρίζουμε ὅτι τό ἕνα στοιχεῖο ἀποτελεῖται ἀπό μή ἐπαναλαμβανόμενες ἀλληλοδιαδοχές ἀπό τήν διαφορά $Cot_{\frac{1}{2}}$ μεταξύ τῶν δύο στοιχείων ὑπολογίζουμε τήν ἐπαναλληπτικότητα. Ἐδῶ εἶναι γιά τό $B=10^4$.

Ἡ μελέτη ἐπανασυνδέσεως διαφόρων DNA ἀπέδειξε ὅτι τά DNA τῶν ἰῶν τῶν φάγων καί τῶν βακτηριδίων ἐπανασυνδέονται μέ ἀπλές καμπύλες. Ἀντίθετα τά DNA τῶν εὐκαρυωτικῶν κυττάρων φυτῶν καί ζῶων παρουσιάζουν σύνθετες καμπύλες ἐπανασυνδέσεως

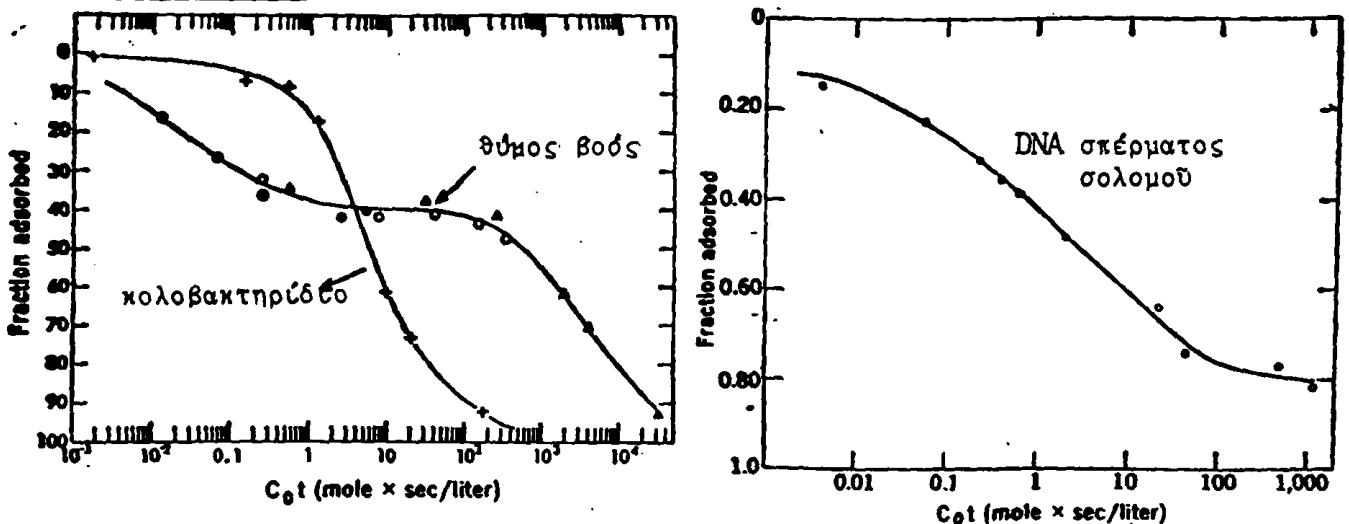


πού υποδεικνύουν την ύπαρξη διαφόρων "οικογενειών" επαναλαμβανομένων αλληλοδιαδοχών με διαφόρους επαναληπτικότητες.

Ἡ ἀνακάλυψις αὐτὴ ἐγένε ἀπὸ τοὺς Britten καὶ Kohne καὶ τοὺς Britten καὶ Davitson πού ἐνῶ περίμεναν νὰ βροῦν πολὺ ὑψηλὰ C_{ot} γιὰ τὸ DNA τῶν εὐκαρυωτικῶν κυττάρων λόγω τῆς μεγάλης πολυπλοκότητός του βρῆκαν ὅτι αὐτὸ ἀποτελεῖται ἀφ' ἑνός μὲν ἀπὸ μὴ επαναλαμβανόμενες αλληλοδιαδοχές (μεγάλες C_{ot}) ἀλλὰ καὶ ἀπὸ ἓνα μείγμα επαναλαμβανομένων αλληλοδιαδοχῶν, (εἰκ. 28α).

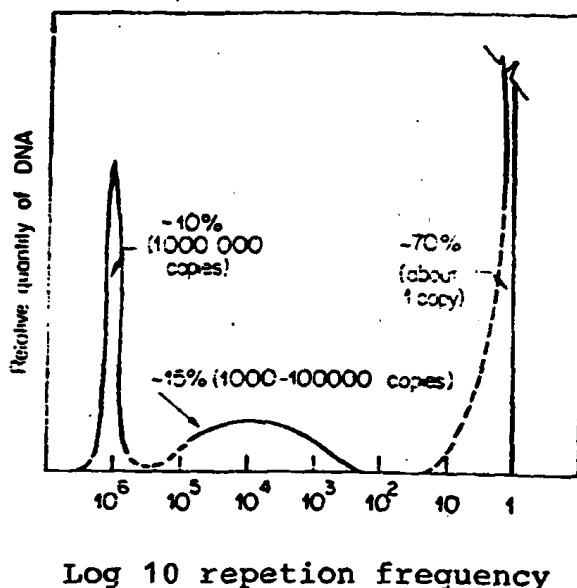
Ὅλες τὸ DNA τῶν εὐκαρυωτικῶν κυττάρων δὲν ἀνήκει στὴν κατηγορία τοῦ επαναλαμβανομένου DNA. Ἀλλὰ ἐπίσης κάθε DNA δὲν παρουσιάζει τίς ἴδιες οἰκογένειες μὲ τὴν ἴδια κατανομὴ επαναλαμβανομένων αλληλοδιαδοχῶν.

Εἰκόνα 28α



Ἡ εἰκόνα 29 δείχνει μίαν καμπύλη κατανομῆς τῆς επαναληπτικότητος στὸ DNA ποντικοῦ. Ἐάν σπάσουμε τὸ DNA σὲ κομμάτια τῶν 400-500bp μπορούμε μὲ τὴν μέθοδο τοῦ ὑδροξυλαπατίτου νὰ διαχωρίσουμε τίς διάφορες οἰκογένειες αλληλοδιαδοχῶν ἀνάλογα μὲ τὴν επαναληπτικότητά τους. Παίρνουμε τότε ἓνα φάσμα πού εἰκονίζεται στὴν εἰκόνα 29 καὶ δείχνει ἀφ' ἑνός τὸ ποσοστὸ τῶν διαφόρων επαναλαμβανομένων αλληλοδιαδοχῶν ἀφ' ἑτέρου τὸν βαθμὸ επαναλήψεώς τους. Μία κατηγορία τέτοιων αλληλοδιαδοχῶν

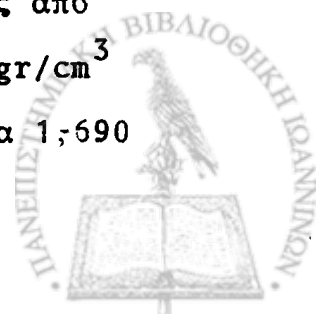
εικόνα 29

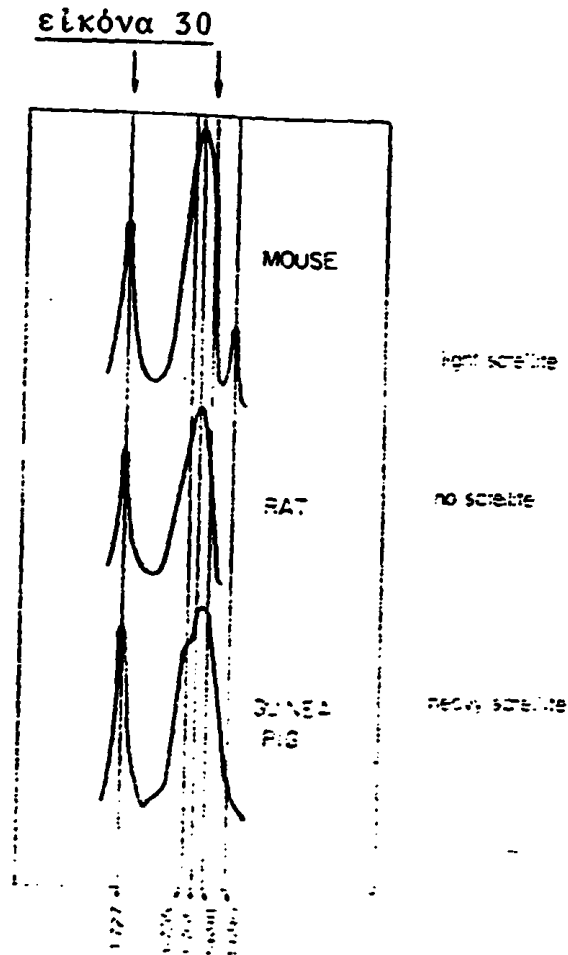


είναι πολύ όμοιογενής και αποτελείται από άλληλοδιαδοχές με βαθμό έπαναλήψεως 10^6 . 'Η κατηγορία αυτή αποτελεί πιά 10% του γονιδιώματος του ποντικού. 'Ακολουθεί μία πολύ άνομοιογενής κατηγορία αποτελουμένη από διάφορες "οίκογένειες" άλληλοδιαδοχών με βαθμούς έπαναλήψεως πού κειμένονται από 10^3 - 10^5 και πού αποτελεί τά 15% του γονιδιώματος. Τέλος τό υπόλοιπο DNA του ποντικού ποσοστό περίπου 70% συμπεριφέρεται σαν "μοναδικό" DNA.

'Η Κατηγορία του DNA με την μεγαλύτερη έπαναληπτικότητα μπορεί νά διαχωρισθεί και διαφορετικά.

Στό DNA του ποντικού ή κατηγορία αυτή διαφέρει από τό υπόλοιπο DNA όσον αφορά την σύσταση σε βάσεις $\frac{A + T}{G + C}$ Είναι γνωστό ότι ή πυκνότης ίσορροπίας (buoyant density) του DNA κατά την φυγοκεντρήσεως σε κλίση πυκνότητος χλωριούχου καισίου έξαρτάται από την σύστασή του σε βάσεις. Όσο πιά πλούσιο είναι τό DNA σε ζεύγη A + T τόσο πιά έλαφρό είναι. Έτσι άν φυγοκεντρήσουμε DNA ποντικού σε χλωριούχο καισιο εκτός από την κυρία ζώνη πυκνότητος πού σχηματίζεται στά $1,701 \text{ gr/cm}^3$ CsCl παρουσιάζεται και μία μικρότερη ζώνη σε πυκνότητα $1,690 \text{ gr/cm}^3$ (εικόνα 30).





Τό DNA αυτό ονομάσθηκε δορυφόρο DNA καί αποτελείται από έπαναλαμβανόμενες άλληλοδιαδοχές 8-13 ζευγών βάσεων πού έπαναλαμβάνονται 10^6 φορές στό γονιδίωμα του ποντικού.

Τά DNA δορυφόρα διαφέρουν στά διάφορα είδη ζών καί φυτών άλλοτε είναι πλούσια σε A + T άλλοτε πλούσια σε G + C (ίνδικό χοιρίδιο) καί άλλοτε ή σύστασις σε βάσεις δέν διαφέρει άρκετά από τό κύριο DNA ώστε να διαχωρισθούν σε κλίση πυκνότητας CsCl. Είναι δυνατόν να αύξησουμε την διαχωριστική ικανότητα πού όφείλεται σε διαφορά συστάσεως βάσεων A + T ή G + C προσθέτοντας ίόντα Ag^+ πού ένώνονται ειδικότερα στα ζεύγη A + T ή ίόντα Hg^{++} πού ένώνονται ειδικότερα στα ζεύγη G + C καί αύξάνουν την διαφορά πυκνότητας. Έτσι κατόπιν φυγοκεντρήσεως σε θεϊκόν κάλιο CS_2SO_4 παρουσία των ίόντων αυτών μπορούμε να άπομονώσουμε δορυφόρα DNA πού καλύπτονται



από κύριο DNA στην φυνοκεντρηση σε CsCl.

Είδαμε μελετώντας την χρωματίνη ότι η θεμελιώδης έτεροχρωματίνη πού ως φαίνεται δέν εκφράζεται περιέχει έπαναλαμβανόμενο DNA. Ή χρωματίνη αυτή κατά την μετάφαση έντοπίζεται κυρίως στα κεντροσώματα των χρωματοσώματων.

Οι Gall και Pardue έκαμαν τό ακόλουθο πείραμα για νά έντοπίσουν στα χρωματοσώματα του ποντικού την θέση του δορυφόρου DNA. ΄Απεμόνωσαν δορυφόρο DNA ποντικού και παρήγαγαν ραδιενεργό RNA μεταγράφοντας in vitro τό δορυφόρο DNA. Τό RNA αυτό τό ύβριδοποίησαν σε χρωματοσώματα ποντικού στην μετάφαση. Γι'αυτό επέδρασαν στα χρωματοσώματα μέ άλκάλι για νά αποδιατάξουν τό DNA επικάλυψαν τό παρασκεύασμα μέ τό ραδιενεργό RNA και επανέφεραν τό PH στα φυσιολογικά όρια. Στην περίπτωση αυτή τό DNA του δορυφόρου ύβριδοποιήθηκε μέ τό ραδιενεργό RNA και στην αυτοραδιογραφία βρέθηκε πώς τό δορυφόρο DNA βρίσκεται έντοπισμένο στα κεντρομερίδια των χρωματοσώματων (είκόνα 31).

είκόνα 31



Ἡ τεχνική αὐτή τῆς ἱστολογικῆς ὑβριδοποιήσεως θά ἦταν πολὺ ἐνδιαφέρουσα γιὰ τὴν ἐντόπιση γονιδίων πάνω στὰ χρωματοσώματα. Δυστυχῶς ὁμως δέν μπορεῖ νὰ ἐφαρμοσθεῖ παρά μόνο γιὰ ἐπαναλαμβανόμενες ἀλληλοδιαδοχές βάσεων στό DNA. Ἡ ραδιενέργεια δέν εἶναι ἀρκετά ἰσχυρή ὅταν πρόκειται γιὰ μοναδικό DNA ὅποτε μόνο ἓνα ραδιενεργό μόριο RNA ὑβριδοποιεῖται σέ μία θέση τοῦ χρωματοσώματος.

Ἡ ἐντόπιση τοῦ δορυφόρου DNA στὰ κεντρομερίδια τῶν χρωματοσωμάτων, ἡ μελέτη τῆς ἀλληλοδιαδοχῆς τῶν βάσεων του καθὼς καί τὸ ὅτι δέν εὔρεθη RNA στὸν πυρήνα τοῦ κυττάρου πού νὰ ὑβριδοποιεῖται μέ τὸ δορυφόρο DNA ἀποτελοῦν ἐνδείξεις ὅτι τὸ DNA αὐτό εἶναι σιωπηρό στὰ χρωματοσώματα τῶν κυττάρων καί δέν κωδικοποιεῖ γιὰ πρωτεΐνες (δέν ἀποτελεῖται ὡς ἐκ τούτου ἀπὸ δομικά γονίδια). Ὁ ρόλος τοῦ DNA αὐτοῦ μᾶς εἶναι πρὸς τὸ παρὼν ἄγνωστος. Ἴσως νὰ ἔχει δομικὸ ρόλο στὸν σχηματισμὸ τῶν χρωματοσωμάτων (house-keeping DNA) ἐφ' ὅσον λαμβάνει μέρος στὴν δημιουργία τῶν κεντρομεριδίων. Τελευταίως εὔρεθη ὅτι τὸ DNA ὀρισμένων δορυφόρων μεταγράφεται στὰ ψευδοτροειδῆ χρωματοσώματα τῶν ὠαρίων.

Τὸ DNA τῶν δορυφόρων ἀνήκει στὴν κατηγορία τοῦ highly repetitive DNA λίαν ἐπαναλαμβανόμενο DNA. Τὸ DNA αὐτό ὅπως εἶπαμε ἀποτελεῖται ἀπὸ ἓνα μοτίβο 8-13 βάσεων ἐπαναλαμβανόμενο 10^6 φορές στό DNA. Μποροῦμε ὁμως τὸ DNA αὐτό νὰ τὸ ἀπομονώσουμε ὑπὸ μεγαλομοριακῆ μορφῆ πού δείχνει πὼς σχηματίζει μεγαλομοριακὸ DNA καί ὄχι διάσπαρτες ἀλληλοδιαδοχές στό γονιδίωμα τοῦ κυττάρου.

Ἐκτός ἀπὸ τὴν κατηγορία αὐτὴ τοῦ ἐπαναλαμβανομένου DNA ὑπάρχει τὸ middle repetitive DNA μέσης ἐπαναληπτικότητος DNA τὸ ὁποῖο ὅπως εἶδαμε ἀποτελεῖται ἀπὸ "οἰκογένειες" ἀλληλοδιαδοχῶν μέ συχνότητα ἐπαναλήψεως 10^5 ἕως 10^3 . Ἀντίθετα

μέ τό λίαν έπαναλαμβανόμενο DNA τό DNA αυτό αποτελείται από βραχείες σχετικώς άλληλοδιαδοχές (διαφορετικού μήκους στα διάφορα είδη πού μελετήθηκε) 300-6000bp πού βρίσκονται διάσπαρτες στό γονιδίωμα μεταξύ του μοναδικού DNA. Ή μελέτη του τύπου διασποράς γίνεται πάλι μέ τήν ύβριδοποίηση ή όποία μας δίνει μία γενική εικόνα του τύπου διασποράς π.χ. εύρέθη ότι στόν χεπορυσ ό τύπος όργάνωσης του DNA είναι άλληλουχίες 300 bp από έπαναλαμβανόμενες άλληλοδιαδοχές διάσπαρτες μεταξύ μοναδικού DNA 800-1000bp. Στην δροσόφιλα έχουμε μεγαλύτερες έπαναλαμβανόμενες άλληλοδιαδοχές 6000bp μεταξύ μοναδικού DNA μέσου μήκους 10.000bp. Τό 1968 οί Britten καί Davidson έπρότειναν μία θεωρία για τόν ρυθμιστικό ρόλο στην μεταγραφή των διεσπαρμένων έπαναλαμβανομένων άλληλοδιαδοχών. Ότι δηλαδή τό DNA αυτό αποτελείται από ρυθμιστικά στοιχεία τά όποία ρυθμίζουν τήν έκφραση του μοναδικού DNA τό όποιο καί αποτελείται από δομικά γονίδια. Πράγματι τά περισσότερα γονίδια στα εύκαρυωτικά κύτταρα αποτελούνται από μοναδικό DNA αλλά υπάρχουν καί εξαιρέσεις πού θα δούμε παρακάτω όπως για τά γονίδια των ίστονων των ριβοσωματικών RNA των ανασοσφαιρινών. Ή υπόθεση των Britten καί Davidson είναι άληθοφανής αλλά δέν γνωρίζουμε άκόμη πόση άλήθεια περιέχει.

Ή μελέτη της όργάνωσης του εύκαρυωτικού DNA μέ τίς τεχνικές πού αναφέραμε, υπό τήν μορφή δηλαδή του όλικού γονιδιώματος, δέν έπιτρέπει τήν κατά βάθος προσέγγιση του προβλήματος.

Ή λεπτομερής περιγραφή καί ή κατανόηση της λειτουργίας των διαφόρων τύπων άλληλοδιαδοχών θα προέλθη μελλοντικά από μελέτη συγκεκριμένων γονιδίων καί περιοχών του DNA. Οί μελέτες αυτές γίνονται σήμερα μέ καινούργιες πειραματικές μεθοδολογίες πού θα άναπτυχθούν παρακάτω.



3. - Ύβριδοποιήσις

Όταν οί δύο συμπληρωματικές άλυσίδες πού έπανασυνδέονται αποτελοϋνται από RNA και DNA τότε όμιλοϋμε για ύβριδοποίηση. Ή ύβριδοποίηση είναι μία τεχνική με μεγάλη χρησιμότητα στην μοριακή βιολογία γιατί μās έπιτρέπει να μελετήσουμε τά άμεσα προϊόντα της λειτουργίας τών γονιδίων πού είναι τά μόρια του RNA και μέσω αυτών να βγάλουμε συμπεράσματα τόσο για την όργάνωση όσο και για την λειτουργία του γονιδιώματος.

Οί τεχνικές ύβριδοποιήσεως μās έπιτρέπουν π.χ.

- 1ον. Να υπολογίσουμε τόν άριθμό τών γονιδίων στό DNA ενός κυττάρου πού παράγουν ένα συγκεκριμένο μόριο RNA όπως π.χ. ριβοσωματικό RNA ή άγγελιοφόρο RNA αιμοσφαιρίνης.
- 2ον. Να μελετήσουμε τόν χρόνο έκφράσεως τών γονιδίων: πότε κατά την διαφοροποίηση παράγεται ένα mRNA ή στόν κύκλο ζωής ενός λου ποιά γονίδια έκφράζονται πρώτα και ποιά έκφράζονται άργότερα.
- 3ον. Να συγκρίνουμε δύο RNA μεταξύ τους εάν τό ένα άποτελει πρόδρομο μορφή του άλλου κ.λ.π.

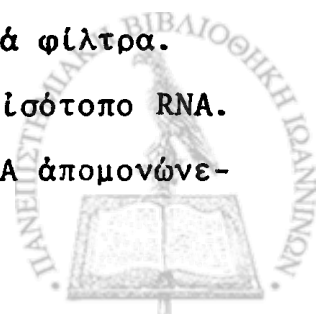
Ύπάρχουν πολλές παραλλαγές στις τεχνικές ύβριδοποιήσεως

A 1. Ύβριδοποιήσις κορεσμοϋ σε στερεό υπόστρωμα

Ή νιτροκυτταρίνη έχει την ιδιότητα να κατακρατεί μονόκλωνο DNA. Αντιθέτως δίκλωνο DNA καθώς και RNA δέν κατακρατούνται και διέρχονται από τούς πόρους του φίλτρου. Ή ιδιότης αυτή έπιτρέπει την χρησιμοποίηση τών φίλτρων νιτροκυτταρίνης για την μελέτη ύβριδοποιήσεως RNA/DNA. Τό DNA ύφίσταται άποδιάταξη και υπό την μορφή αυτή καθλώνεται στα φίλτρα.

Μελετοϋμε την ύβριδοποίηση ίχνηθετημένου με ένα ισότοπο RNA.

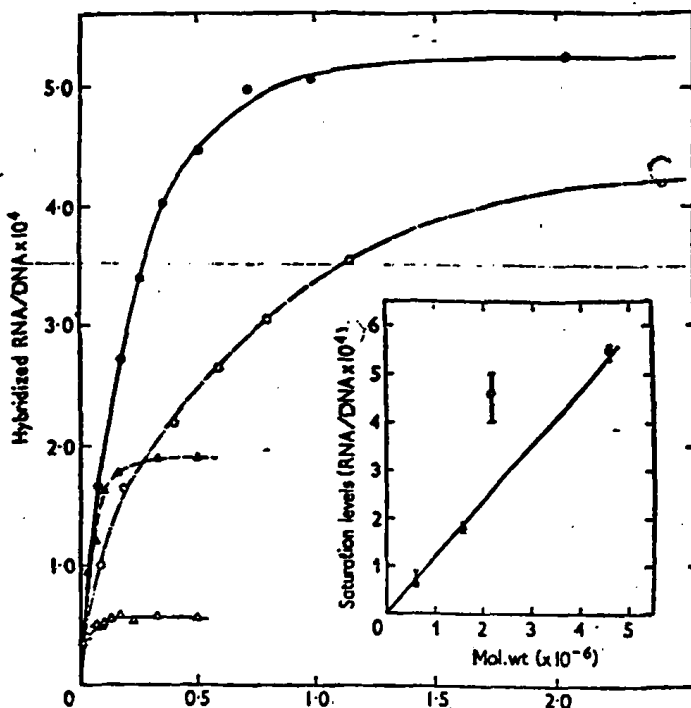
Ή ίχνηθέτησις γίνεται συνήθως in vivo και τό RNA άπομονώνε-



ται κατόπιν σέ καθαρά μορφή. Θα πάρουμε σάν παράδειγμα ένα ριβοσωματικό RNA τό όποιο έπειδή παράγεται στά κύτταρα σέ μεγάλα ποσά είναι εύκολο νά άπομονωθει σέ καθαρή μορφή. Μετράται ή είδική ραδιενέργεια τοϋ RNA (άριθμός κρούσεων ανά μg RNA) οϋτως ᾧστε από τήν ραδιενέργεια πού μετράται στά φίλτρα μετά τήν ύβριδοποίηση νά μπορούμε νά ύπολογίσουμε τό ποσόν τοϋ ύβριδοποιηθέντος RNA. Προσδιορίζεται τό μέγιστο ποσό RNA πού μπορεί νά ύβριδοποιηθει σέ ένα σταθερό ποσό DNA άκίνητοποιημένου στά φίλτρα νιτροκυτταρίνης (καμπύλη κορεσμοϋ) Άπό τό μέγιστο ραδιενεργείας στά φίλτρα ύπολογίζουμε τό ποσοστό τοϋ DNA πού εύρίσκεται ύπό μορφήν ύβριδίου. Έφ' όσον γνωρίζουμε τό ποσόν τοϋ DNA ανά κύτταρο καί τό μοριακό βάρος τοϋ RNA μπορούμε νά ύπολογίσουμε τόν άριθμό τών γόνων πού άντιστοιχοϋν στό ύπό μελέτην RNA. Π.χ. κατά τήν ύβριδοποίηση 28S ριβοσωματικοϋ RNA σέ DNA από κύτταρα HeLa εύρίσκουμε ότι $1,8 \cdot 10^{-4}$ μg 28S ριβοσωματικοϋ RNA

εικόνα 32

RELATIONSHIP BETWEEN rRNA AND ITS PRECURSORS



Υβριδοποίηση ριβοσωματικοϋ RNA.
Τά έπίπεδα κορεσμοϋ είναι άνάλογα μέ: τό μοριακό βάρος.



ύβριδοποιούνται σε 1μg DNA. Αυτό σημαίνει ότι σε 1μg DNA υπάρχουν $1,8 \cdot 10^{-4}$ μg ριβοσωματικοί γόννοι ή ότι το $1,8 \cdot 10^{-2}\%$ του DNA είναι ριβοσωματικό. Εάν το DNA των κυττάρων HeLa είναι $1,2 \cdot 10^{13}$ dalton και το μοριακό βάρος του 28S $1,6 \cdot 10^6$ dalton τότε ο αριθμός των γόννων για το 28S θα είναι:

$$1,2 \cdot 10^{13} \cdot \frac{1,8 \cdot 10^{-4}}{1,6 \cdot 10^6} = 1250$$

A 2. Συναγωνιστική ύβριδοποίησης σε στερεό υπόστρωμα

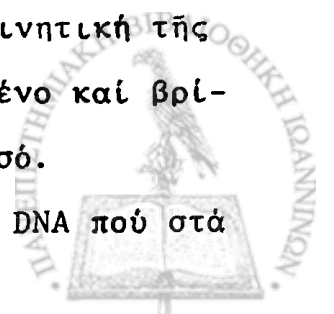
Υπό τās αυτές συνθήκας χρησιμοποιώντας φίλτρα νιτροκυτταρίνης και καθηλωμένο σε άποδιάταξη DNA μπορούμε να συγκρίνουμε μεταξύ τους δύο RNA εκ των οποίων το ένα θεωρείται πρόδρομο μόριο του άλλου.

Το ένα εκ των δύο RNA προστίθεται σε αύξανόμενα ποσά και υπό μη ραδιενεργό μορφή (συναγωνιστής competitor) ενώ το δεύτερο που είναι ίχνηθετημένο με ένα ραδιοϊσότοπο προστίθεται σε ένα σταθερό ποσό. Εάν υπάρχει σχέσις προδρόμου-παραγώγου μεταξύ των δύο RNA θα πάρουμε μία καμπύλη αναστολής της ύβριδοποίησης του ίχνηθετημένου RNA. Αν τὰ δύο RNA δέν προέρχονται από τούς ίδιους γόνους του DNA αλλά είναι άσχετα μεταξύ τους ο συναγωνιστής δέν θά επηρεάση τήν ύβριδοποίηση του ίχνηθετημένου RNA και ή ύβριδοποίησης θά είναι μία σταθερή εύθεια.

B. Ύβριδοποίησης σε περίσσεια DNA σε υγρά φάση

Μπορούμε να υπολογίσουμε τόν αριθμό των γονιδίων για ένα ορισμένο RNA και με μία άλλη τεχνική ύβριδοποίησης που στηρίζεται στην επανασύνδεση του DNA σε υγρά φάση. Το DNA βρίσκεται σε μεγάλη περίσσεια και καθορίζει τήν κινητική της αντίδρασεως ενώ το υπό μελέτη RNA είναι ίχνηθετημένο και βρίσκεται στο μείγμα της αντίδρασεως σε πολύ μικρό ποσό.

Η αντίδρασις είναι όμοια με τήν επανασύνδεση του DNA πού στά



εὐκαρυωτικά κύτταρα γίνεται σέ διάφορα Cot. Παρακολουθώντας παράλληλα τήν ἐπανάσυνδεση DNA/DNA καί τήν ὑβριδοποίηση RNA/DNA πού μετριέται ἀπό τήν ραδιενέργεια τῶν ὑβριδίων μποροῦμε νά βροῦμε ἄν τό RNA ὑβριδοποιεῖται σέ Cot πού ἀντιστοιχεῖ σέ ἐπαναλαμβανόμενο ἢ μοναδικό DNA.

Ἔτσι ὑπολογίστηκε ὅτι τό ριβοσωματικό RNA στόν Xenopus ἔχει ἐπαναληπτικότητα περίπου 450. Τό mRNA τῶν ἱστονῶν ἀντιστοιχεῖ σέ 30 γονίδια στόν Xenopus καί τό mRNA αἰμοσφαιρίνης ὑβριδοποιεῖται μέ κινητική πού ἀντιστοιχεῖ σέ μοναδικό DNA.

Οἱ τεχνικές πού ἀναφέραμε μέχρι τώρα προϋποθέτουν τήν παρασκευή τῶν ἱχνηθετῶν RNA σέ καθαρή μορφή γιά νά μελετηθεῖ ἡ ὑβριδοποίησίς τους στό DNA. Ὅσον ἀφορᾷ τό ριβοσωματικό RNA εἶναι εὐκόλο νά τό παρασκευάσουμε χωρίς προσμίξεις ἀπό ἄλλα μόρια RNA. Δυσκολότερο εἶναι νά παρασκευασθοῦν τά ἀγγελιοφόρα RNA. Ἐδῶ διακρίνουμε δύο περιπτώσεις α) ἀγγελιοφόρα RNA πού παράγονται κυρίως ἀπό διαφοροποιημένα κύτταρα καί βρίσκονται στό κυτταρόπλασμα σέ μεγάλα ποσά ὅπως π.χ. τό mRNA τῆς αἰμοσφαιρίνης ἢ τό mRNA τῆς ὠλευκωματίνης καθώς καί mRNA πού παράγονται ἀπό ὅλα τά κύτταρα ἀλλά καί αὐτά ὑπάρχουν στό κυτταρόπλασμα σέ μεγάλα ποσά π.χ. mRNA ἱστονῶν καί β) ἀγγελιοφόρα RNA πού παράγονται στό κύτταρο σέ μικρές ποσότητες καί κωδικοποιοῦν π.χ. γιά διάφορα ἔνζυμα ἢ ἄλλες πρωτεΐνες τοῦ κυττάρου πού δέν ὑπάρχουν σέ μεγάλα ποσά.

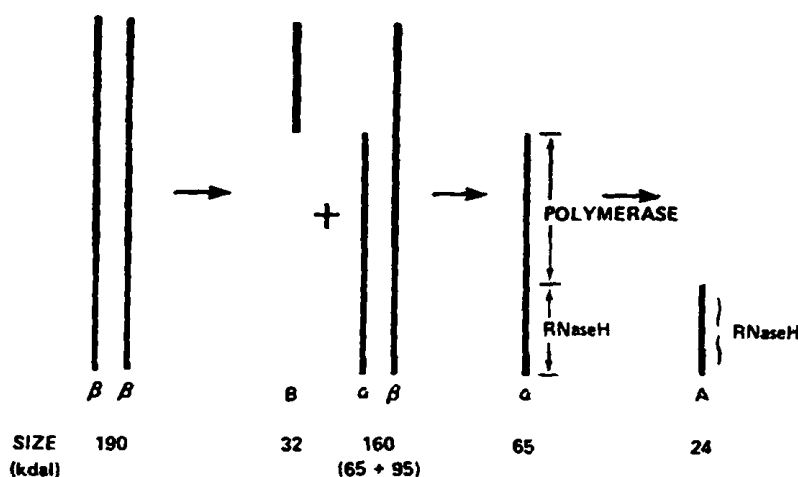
Ἡ ἀπομόνωσις κυρίως τῶν mRNA τῆς δεύτερης κατηγορίας σέ καθαρή μορφή εἶναι πολύ δύσκολη. Γιά τήν μελέτη τους καταφεύγουμε σέ ἄλλες τεχνικές.



ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΙΣ ΙΝ VITRO ΕΝΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ:

ΤΟ cDNA

Ἡ ἀνακάλυψις στoύς RNA ὀγκογόνους ἰoύς ἑνός ἐνζύμου τῆς ἀντίστροφης μεταγραφάσης παρείχε στoύς μοριακοὺς βιολόγους ἕνα σημαντικό ἐργαλεῖο γιὰ τὴν ἐνζυματικὴ σύνθεση DNA in vitro. Τὸ ἐνζυμο αὐτὸ εἶναι μὲν DNA-πολυμεράση πού ἔχει τὴν ἱκανότητα νὰ συνθέτει DNA μὲ μῆτρα τὸ RNA (εἰκόνα 33).



εἰκόνα 33

Avian reverse transcriptase holoenzyme, subunits, and derivatives. The $\alpha\beta$ holoenzyme may be derived from a less active $\beta\beta$ precursor by proteolytic removal of fragment B (possessing endonuclease activity) from one of the subunits. RNaseH activity is identified with a small fragment (A) produced upon further proteolysis.

Τὸ ἐνζυμο αὐτὸ ὑπεισέρχεται στὸν κύκλο ζωῆς τοῦ ἰοῦ γιὰ νὰ κατασκευάσει μέσα στὸ κύτταρο ἕνα ἀντίγραφο DNA μὲ μῆτρα τὸ RNA τοῦ ἰοῦ. Τὸ DNA αὐτὸ ἐνσωματοῦται σὲ μίᾳ δεύτερη φάση στὰ χρωματοσώματα τοῦ κυττάρου πού ἐξαλάσσεται σὲ καρκινικά. Ἐκτός ἀπὸ τὴν μῆτρα RNA τὸ ἐνζυμο ἔχει ἀνάγκη καὶ ἀπὸ μίᾳ πριμοδοτικὴ ἀλληλοδιαδοχὴ πού στὴν περίπτωσι τῆς μεταγραφῆς τοῦ RNA τοῦ ἰοῦ εἶναι ἕνα tRNA.

Ἡ ἀντίστροφος μεταγραφάση χρησιμοποιήθηκε γιὰ τὴν σύνθεση DNA μὲ καλούπι διάφορα mRNA τοῦ κυττάρου. Ὡς γνωστὸν τὰ



Τό DNA πού συνθέσαμε ἔτσι *in vitro* εἶναι δίκλωνο ἀντίγραφο ἑνός mRNA καί ὀνομάζεται ds-cDNA (double stranded copy DNA).

ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΙΣ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ DNA

Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΟΥ DNA

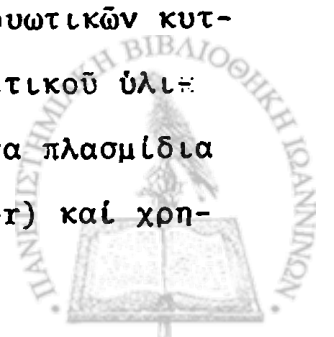
Τήν τελευταία δεκαετία ἀνεπτύχθη στήν μοριακή Βιολογία μία καινούργια τεχνολογία ἡ ὁποία συνίσταται στήν δημιουργία χιμαιρικῶν μορίων DNA ἀπό διαφόρους ὀργανισμούς. Ἡ τεχνολογία αὐτή ἡ ὁποία ὀνομάζεται καί μηχανική γενετική (genetic engineering) δέν ἀφορᾷ ἕνα τελείως καινούργιο φαινόμενο ἀλλά ἐπεκτείνει ὀρισμένα φαινόμενα μεταφορᾶς γενετικοῦ ὕλικου πού συμβαίνουν στήν φύση καί χρησιμοποιήθηκαν πολύ ἀπό τούς μοριακοὺς βιολόγους σάν μέσα μελέτης τῶν προκαρυωτικῶν γονιδιωμάτων.

Πράγματι ἡ πρόοδος στήν κατανόηση τῆς ἐκφράσεως τοῦ γονιδιώματος τῶν προκαρυωτικῶν κυττάρων ὀφείλεται κυρίως σέ μελέτη τῶν βακτηριοφάγων καί τῶν πλασμιδίων τῶν βακτηριδίων.

Ἀπό τούς φάγους ὁ φάγος λ τῆς *E. coli* εἶναι ἴσως ὁ ποιοδὸ πολύ μελετημένος. Ὁ λυσιγόνος αὐτός φάγος ὅπως γνωρίζουμε εἶτε ἀναπτύσσεται στά βακτηρίδια σάν λυτικός εἶτε ἐνσωματώνεται στό χρωμόσωμα τοῦ βακτηριδίου καί δρᾷ σάν λυσιγόνος.

Ἐάν ἀπό ἕνα τέτοιο βακτηρίδιο ὁ ἐνσωματωμένος φάγος ἐξέλθῃ τοῦ χρωματοσώματος εἶναι δυνατόν πολλές φορές νά παρασύρει καί τμῆμα τοῦ χρωματοσώματος τοῦ βακτηριδίου μολύνοντας δέ ἕνα ἄλλο κύτταρο νά μεταφέρει σ'αυτό τά γονίδια τοῦ πρώτου.

Τό φαινόμενο αὐτό τῆς μεταγωγῆς (transduction) χρησιμοποιήθηκε πολύ γιά τήν μελέτη γονιδίων τῶν προκαρυωτικῶν κυττάρων ὅπως καί ἕνα ἄλλο φαινόμενο μεταφορᾶς γενετικοῦ ὕλικου πού ἀφορᾷ τήν σύζευξη καί γίνεται μέ ὀρισμένα πλασμίδια "τούς παράγοντας γονιμότητος" (F=fertility factor) καί χρη-



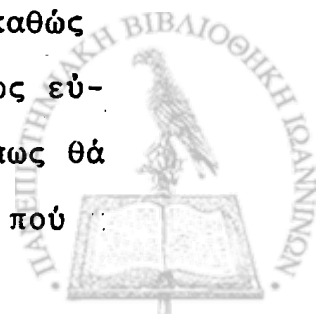
σιμοποιήθηκε στην μελέτη της γενετικής της *E. coli*. Πολλές φορές ο παράγων F εξέρχεται του χρωματοσώματος του Hfr βακτηριδίου συμπαρασύρωντας και όρισμένα γονίδια του. Τέτοια F' πλασμίδια μπορούν να μεταφέρουν ειδικά γονίδια από ένα κύτταρο *E. coli* σε άλλο σχηματίζοντας μεροδιπλοειδικά κύτταρα τα όποια ως γνωστόν επέτρεψαν την κατανόηση της λειτουργίας πολλών βακτηριακών συνεργισμάτων.

Οι τεχνικές του ανασυνδιασμένου DNA (recombinand DNA technology) παρουσιάζουν την διαφορά ότι γίνονται *in vitro* και ότι καθιστούν δυνατό νά εισαγάγουμε DNA από όποιοδήποτε οργανισμό σε ένα πλασμίδιο ή στο DNA ενός φάγου ή ενός ιού.

Κατασκευάζουμε έτσι ένα χιμαιρικό μόριο τό όποιο μπορεί να πολλαπλασιασθή στον οργανισμό ενός καταλλήλου δέκτου πού δυνατόν να είναι είτε ένα προκαρυωτικό είτε ένα εϋκαρυωτικό κύτταρο.

Η ανάπτυξις της νέας αυτής τεχνολογίας όφείλεται κυρίως στην πρόοδο της ένζυμολογίας του DNA (ανάκαλυψις των περιοριστικών ένδονουκλεασών καθώς και πολλών άλλων ένζύμων) και στις συσσωρευθήσες γνώσεις μας πάνω στα πλασμίδια και την γενετική της *E. coli*. Πολύς θόρυβος έγινε κυρίως στην αρχή της χρησιμοποιήσεως της τεχνικής αυτής για τούς κινδύνους πού δυνατόν να έγκυμονεί. Οι λόγοι όφείλονται στό ότι ή *E. coli* είναι ένα φυσιολογικό παράσιτο του έντέρου του ανθρώπου και θα μπορούσε να συμβάλλει στην διάδοση πιθανώς επικινδύνων γονιδίων είτε από όγκογόνους ιούς (SV40) είτε από αυτό τοϋτο τό γονιδίωμα των εϋκαρυωτικών κυττάρων.

Οι φόβοι αυτοί απέδειχθησαν με τον καιρό υπερβολικοί καθώς οι γνώσεις μας προήχθησαν. Έτσι σήμερα γνωρίζουμε πώς εϋκαρυωτικά γονίδια δέν έκφράζονται στην *E. coli* γιατί όπως θα δοϋμε έχουν μία ειδική όργάνωση. Αφ'έτερου ή *E. coli* πού

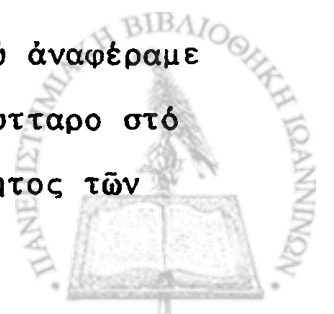


χρησιμοποιείται στα εργαστήρια για τους σκοπούς. Έχει χάσει την ικανότητα ανάπτυξεως στο έντερο του ανθρώπου. Τέλος ειδικώς κατασκευασμένα εργαστήρια που προφυλάσσουν από την διάδοση των βακτηριδίων χρησιμοποιούνται με πολλές κατηγορίες ασφαλείας ανάλογως του διεξαγομένου πειράματος. Οι χρήσεις της νέας αυτής τεχνολογίας είναι πολλές, κατ' αρχάς αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την μελέτη του ευκαρυωτικού γονιδιώματος τόσο όσον αφορά την οργάνωση όσο και την λειτουργία του. Άλλά εκτός της μεγάλης σημασίας της για την βασική έρευνα ή τεχνολογία αυτή έχει και πρακτικές εφαρμογές που συνίστανται στην παραγωγή σε μεγάλα ποσά σημαντικών πρωτεϊνών για την φαρμακοβιομηχανία όπως ινσουλίνης, ίντερφερόνης αύξητικής ορμόνης κ.λ.π. Τέλος δεν γνωρίζουμε ποιές μπορεί να είναι οι προεκτάσεις της τεχνικής αυτής για το μέλλον όπως π.χ. ή θεραπεία γενετικών ανωμαλιών κ.λ.π.

1. Πλασμίδια

Τα πλασμίδια είναι γενετικά στοιχεία τα οποία αναδιπλασιάζονται ξεχωριστά από το χρωμάτωμα του βακτηριδίου μέσα στο οποίο εύρισκονται. Πρόκειται για μικρά κυκλικά χρωμάτωμα DNA. Στην κατηγορία των πλασμιδίων ανήκουν οι παράγοντες γονιμότητος των βακτηριδίων (F factors) οι R-factors που φέρουν τα γονίδια ανθεκτικότητος των βακτηριδίων σε διάφορα αντιβιοτικά, οι C-factors που φέρουν τα γονίδια για την παραγωγή κολισινών που είναι βακτηριοστατικές ουσίες εκρινόμενες από όρισμένα βακτηρίδια.

Πολλά από τα πλασμίδια σε όλες τις κατηγορίες που αναφέραμε έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται από το ένα κύτταρο στο άλλο. Παράδειγμα αποτελούν οι παράγοντες γονιμότητος των



βακτηριδίων πού φέρουν στό χρωματόσωμά τους τά γονίδια γιά τόν σχηματισμό τής πρωτεϊνικής γέφυρας πού σχηματίζεται κατά τήν σύζευξη.

Γιά τήν χρησιμοποίηση ενός πλασμιδίου σάν δέκτη ξένου DNA συνήθως προτιμούμε πλασμίδια πού δέν έχουν τήν ικανότητα μεταφοράς.

Άπό τό DNA τοῦ πλασμιδίου σημασία ἔχει ἡ περιοχή πού ρυθμίζει τήν ἀναπαραγωγή του δηλαδή ἡ ἀλληλουχία πού ἀναγνωρίζεται ἀπό τά βακτηριακά ἔνζυμα συνθέσεως τοῦ DNA. Ἐπίσης γιά νά μπορέσουμε νά ἀπομονώσουμε τά βακτηρίδια πού περιέχουν τό πλασμίδιο, θά πρέπει τό πλασμίδιο νά περιέχει ἕνα γονίδιο ἀνθεκτικότητος σέ ἕνα ἀντιβιοτικό.

Τέλος τό πλασμίδιο θά πρέπει νά περιέχει μοναδικές θέσεις ἀναγνωρίσεως σέ περιοριστικές ἔνδονουκλεάσεις σέ σημεία ὀχι σημαντικά τοῦ γονιδιώματός του δηλαδή ἐκτός τής περιοχῆς ρυθμίσεως τής ἀναπαραγωγῆς του καί ἐκτός τοῦ γονιδίου ἀνθεκτικότητος στά ἀντιβιοτικά. Ὅρισμένα πλασμίδια μποροῦν νά πολλαπλασιασθοῦν μέσα στά βακτηρίδια ὅταν ἡ σύνθεσις τοῦ DNA τοῦ βακτηριδίου σταματήσει (π.χ. ἐπίδρασις χλωραμφενικόλης). Τό DNA τοῦ πλασμιδίου μπορεῖ νά ἀποτελέσῃ τά 50% τοῦ ὅλικου DNA τοῦ βακτηριδίου 2.000-3.000 μόρια ἀνά κύτταρο.

2. Συνδιασμός DNA πλασμιδίου καί ξένου DNA.

Μετά τήν ἀπομόνωση τοῦ καταλλήλου πλασμιδίου ἡ συνένωσις DNA πλασμιδίου καί ξένου DNA γίνεται μέ πολλούς τρόπους.

Ἐάν τό πλασμίδιο περιέχει μία ἀλληλοδιαδοχή βάσεων πού ἀναγνωρίζεται ἀπό ἕνα περιοριστικό ἔνζυμο πού παράγει κολλόμενα ἄκρα π.χ. Eco-Ri καί τό τμήμα τοῦ DNA πού θέλουμε νά ἐνώσουμε μέ τό πλασμίδιο ἔχει παρασκευασθῆ μέ τόν ἴδιο τρόπο καί περιέχει ἐπίσης κολλόμενα ἄκρα ἀπό τήν ἐπίδραση τοῦ ἴδιου



ένζυμου είναι εύκολο νά συνενώσουμε DNA πλασμίδιου και ξένο τμήμα DNA. (είκόνα 34).

origine microbienne	dénomination	séquences cibles des enzymes
<i>Escherichia coli</i>	EcoRI	5'-G A A T T C-3' 3'-C T T A A G-5'
<i>Haemophilus influenzae</i>	Hind II	5'-G T P _y P _u A C-3' 3'-C A P _u P _y T G-5'
	Hind III	5'-A A G C T T-3' 3'-T T C G A A-5'
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I	5'-G T T A A C-3' 3'-C A A T T G-5'
	Hpa II	5'-C C G G-3' 3'-G G C C-5'
<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	Bam H I	5'-G G A T C C-3' 3'-C C T A G G-5'

5'-G- A A T T C-3'	5'-G T T A A C-3'
3'-C T T A A G-5'	3'-C A A T T G-5'

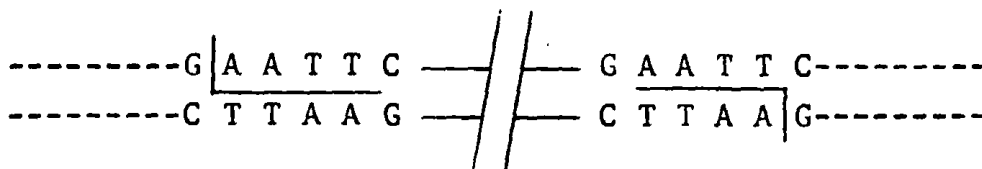
coupure libérant des extrémités cohésives (EcoRI) *coupure libérant des bords francs (Hpa I).*

ΕΙΚΟΝΑ 34

Séquences de coupure et modes de clivage d'endonucléases de restriction.

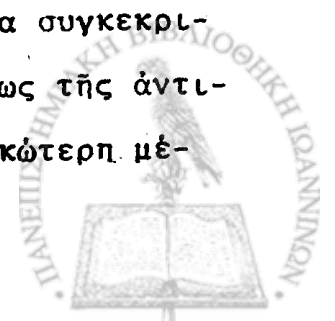
Les flèches localisent les points de coupure sur chaque chaîne

Τό πλασμίδιο έπωάζεται μέ τό ένζυμο Eco-R I και μετατρέπεται από κυκλικό σέ γραμμικό DNA. Πλασμίδιο και ξένο DNA έπωάζονται σέ συνθήκες έπανασύνδεσης του DNA (χαμηλή θερμοκρασία) όποτε τά συμπληρωματικά άκρα μποροϋν νά κολλήσουν.



Γιά νά κλείσουμε τελικά τά άνασυνδιασμένα αυτά DNA μέ όμοιοπολικούς δεσμούς έπιδροϋμε μέ τό ένζυμο DNA δεσμάση.

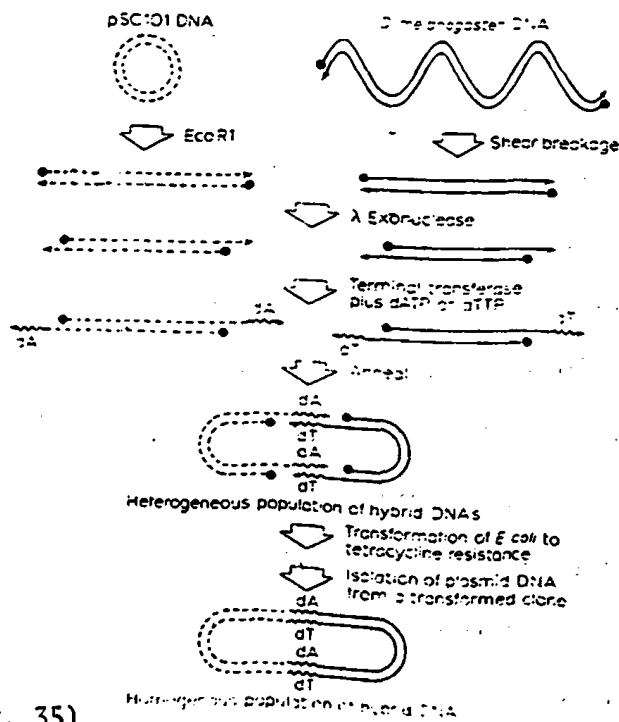
Σέ περίπτωση πού δέν έχουμε κολλόμενα άκρα στα υπό άνασυνδιασμό DNA και κυρίως αυτό συμβάλνει για τό ξένο DNA πού μπορεϊ π.χ. νά είναι ένα cDNA πού παρήχθη από ένα συγκεκριμένο mRNA εύκαρυωτικων κυττάρων κατόπιν έπιδράσεως της αντίστροφης μεταγραφάσης χρησιμοποιοϋμε μία πιο γενικότερη μέ-



θοδο για να δημιουργήσουμε συμπληρωματικά άκρα.

Τό ένζυμο άκραία δεσοξυριβονουκλεοτιδική τρανσφεράση μπορεί να μεταφέρει στα άκρα 3' ενός DNA τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτιδία. Αντίθετα με τις DNA-πολυμεράσες τό ένζυμο αυτό δέν χρειάζεται καμμία μήτρα αλλά προσθέτει όλα ανεξάρτητα τά τριφωσφορικά νουκλεοτιδία ανεξαρτήτως σειράς. Τό ένζυμο αυτό εύρέθη στόν θύμο αδένα καί στό μυελό τών όστών καί ή φυσιολογική χρησιμότης του μάς είναι ακόμη άγνωστος. Στόν μοριακό βιολόγο τό ένζυμο αυτό είναι σήμερα πολύ χρήσιμο για την παρασκευή πολυμερών.

Εάν επώασουμε γραμμικό DNA πλασμιδίου με τό ένζυμο αυτό παρουσία ενός μόνον τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου, π.χ. dTTP τότε στα 3' άκρα του δικλώνου DNA του πλασμιδίου θά δημιουργηθούν ούρες από πολύ-(dT).



(είκ. 35) The homopolymer tailing technique (from [16]; copyright M I T)



Αντίστοιχα δημιουργούμε ούρες πολύ-(dA) στο ξένο DNA.

Τά δύο DNA τίθενται υπό συνθήκας επανασυνδέσεως DNA όποτε δημιουργούνται κυκλικά μόρια πού περιέχουν τό πλασμίδιο μέ τό ξένο DNA. (είκ. 35) Η τεχνική αυτή έχει και ένα άλλο πλεονέκτημα σέ σχέση μέ τήν προηγούμενη ότι κατά τήν μετατροπή τών γραμμικών DNA σέ κυκλικά δέν δημιουργούνται κυκλικά πλασμίδια πού νά μήν περιέχουν τό ξένο DNA.

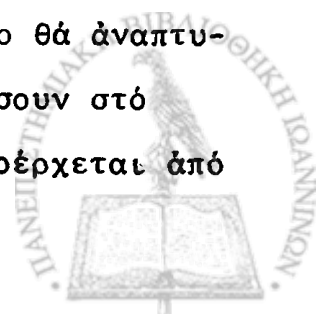
Μεταμόρφωσις βακτηριδίων και πολλαπλασιασμός του πλασμιδίου
Επιλογή συνδιασμένων κλώνων.

Τό πλασμίδιο μέ τό ξένο DNA χρησιμοποιούνται για νά μεταμορφώσουν βακτηρίδια E-coli. Εύρέθη ότι είναι δυνατόν νά εισαγάγη κανείς DNA μέσα στα βακτηρίδια χρησιμοποιώντας $CaCl_2$ πού κάνει τά τοιχώματα του βακτηριδίου διαπερατά στο DNA.

Επειδή ή πιθανότης μόλυνσεως ή μεταμορφώσεως είναι σχετικά σπάνιο φαινόμενο είναι δυνατόν μέ μόλυνση σέ μεγάλη άραίωση νά καταφέρουμε νά εισέλθη ένα μόνον πλασμίδιο ανά βακτηρίδιο E-coli. Αυτό είναι σημαντικό κατόπιν για τήν επιλογή τών κλώνων νά έχουμε ανάπτυξη E-coli πού έχουν δεχθῆ ένα μόνον πλασμίδιο και αυτό γιατί τό αρχικό ξένο DNA πολλές φορές είναι έτερογενές και μάς ενδιαφέρει νά παραγάγουμε σέ μεγάλο ποσό ένα είδικό κομμάτι ξένου DNA.

Τά βακτηρίδια άραιώνονται και έμβολιάζονται σέ τριβλία petri τά όποια περιέχουν στερεό θρεπτικό υλικό μέ τό αντιβιοτικό για τό όποιο έχουμε καταστήση άνθεκτικά τά βακτηρίδια μόλυνοντας τα μέ τό πλασμίδιο πού φέρει τόν γόνο άνθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αυτό.

Μόνον τά βακτηρίδια πού μόλυνθηκαν μέ τό πλασμίδιο θά αναπτυχθούν παρουσία του αντιβιοτικού και θά δημιουργήσουν στο στερεό θρεπτικό υλικό άποικίες. Κάθε άποικία προέρχεται από



τήν ανάπτυξη ενός βακτηριδίου. πού δέχτηκε ένα μόνο πλασμίδιο. Ἡ τεχνική αὐτή ἔχει δύο σκοπούς τόν πολλαπλασιασμό ενός τμήματος ξένου DNA καί τόν καθαρισμό αὐτοῦ τοῦ τμήματος ἀπό ἄλλα στό ἀρχικό μείγμα.

Γιά τήν μελέτη τοῦ γονιδιακοῦ DNA μποροῦμε νά ξεκινήσουμε μέ τό DNA ενός ὀλοκλήρου γονιδιώματος. Τό DNA αὐτό τό σπᾶμε σέ κομμάτια μέ μηχανικά μέσα καί τά κομμάτια αὐτά τά εἰσαγάγουμε σέ ένα πλασμίδιο.

Στήν περίπτωση αὐτή θά ἔχουμε ένα ἑτερογενές πληθυσμό πλασμιδίων ένα ἕκαστο δέ ἀπό αὐτά θά φέρει ένα διαφορετικό κομμάτι DNA τοῦ ὀλικοῦ γονιδιώματος ὑπό μελέτη. Στήν περίπτωση αὐτή ὀμιλοῦμε γιά τόν σχηματισμό μιᾶς 'βιβλιοθήκης' τοῦ γονιδιώματος ενός ὀργανισμοῦ διότι ἔχουμε δημιουργήση μία σειρά κλώνων βακτηριδίων πού καθένα περιέχει ένα κομμάτι τοῦ ξένου γονιδιώματος ἐνῶ ὄλοι οἱ κλώνοι μαζί περιέχουν τό ὀλόκληρο γονιδίωμα. Πῶς μποροῦμε τώρα νά ἀναγνωρίσουμε ένα εἰδικό κομμάτι τοῦ γονιδιώματος καί νά τό μελετήσουμε;

Αὐτό γίνεται μέ ἄλλη τεχνική πού ὀνομάσθηκε ὕβριδοποίηση ἀποικιῶν (colony hybridization)

Ἡ τεχνική αὐτή συνίσταται στήν δημιουργία ενός ἀποτυπώματος τῶν ἀποικιῶν κάθε τριβλίου τῆ χρήση ενός φίλτρου νιτροκυτταρίνης. Τά βακτηρίδια πού μεταφέρθηκαν στήν νιτροκυτταρίνη ἀπό κάθε ἀποικία λύνονται τῆ χρήση ἀπορρυπαντικῶν τό DNA τους ὕφίσταται ἀποδιάταξη μέ ἀλκαλικό περιβάλλον καί τό φίλτρο νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιεῖται σέ ὕβριδοποίηση μέ ένα συγκεκριμένο ραδιενεργό μόριο ἰχνηθέτη. Π.χ. ριβοσωματικό DNA ἐάν θέλουμε νά ἀπομονώσουμε τοὺς ριβοσωματικούς γόνους ἢ mRNA ἢ cDNA αἰμοσφαιρίνης ἢ ὀλευκωματίνης ἐάν θέλουμε νά ἀπομονώσουμε τοὺς ἀντίστοιχους γόνους.



Ἡ αὐτοραδιογραφία μᾶς δείχνη ποιά ἀποικία περιέχει τή ζητούμενη ἀλληλουχία ἀπό τό ὅλικο DNA.

Ἡ ἀποικία αὐτή παραλαμβάνεται καί καλλιεργεῖται σέ ὑγρό θρεπτικό ὑλικό. Μέ τήν προσθήκη χλωραμφενικόλης στήν καλλιέργεια μετά ἀπό ἕνα ὀρισμένο χρονικό διάστημα μπορούμε νά σταματήσουμε τόν πολλαπλασιασμό τοῦ DNA τῶν βακτηριδίων καί νά ἐπιτρέψουμε τόν ἀναδιπλασιασμό τοῦ DNA τοῦ πλασμιδίου μέσα σέ κάθε βακτηρίδιο μέχρι 2.000-3.000 πλασμίδια ἀνά βακτηρίδιο.

Ἡ καλλιέργεια σταματάει καί προβαίνουμε στήν ἀπομόνωση τοῦ πλασμιδίου ἀπό τό ὅλικο DNA χρησιμοποιώντας τήν τεχνική φυγοκεντρήσεως τοῦ DNA σέ κλίση πυκνότητος CsCl παρουσία βρωμιούχου ἕθιδιου.

Ἀπό τό πλασμίδιο μπορούμε νά ἀφαιρέσουμε τό ξένο DNA σπάζοντας το μέ τό ἴδιο περιοριστικό ἐνζυμο πού χρησιμοποιήσαμε γιά τήν παρασκευή τοῦ χιμαιρικοῦ μορίου.



Παραγωγή ενός μορίου ίχνηθετημένου ύψηλης ραδιενεργείας
μέ τήν μέθοδο τής nick-translation

Μέ τήν μέθοδο τοῦ ἀνασυνδιασμένου DNA μπορούμε ὅπως ἀναφέρα-
με νά πολλαπλασιάσουμε τό DNA ἑνός γονιδίου μέσα σέ ἕνα πλα-
σμίδιο. Ἐνα τέτοιο DNA μπορεῖ νά προέρχεται ἀπό τήν ἀντι-
γραφή ἑνός mRNA μέ τό ἔνζυμο ἀντίστροφος μεταγραφάση. Μετά
τήν ἀπομόνωση τοῦ πλασμιδίου μπορούμε νά ίχνηθετήσουμε τό
DNA αὐτό in vitro μέ μεγάλη εἰδική ραδιενέργεια χρησιμοποιό-
ντας τήν τεχνική τής nick-translation. Ἡ τεχνική αὐτή στη-
ρίζεται στήν δημιουργία διακοπῶν στό δίκλωνο DNA κατόπιν ἐ-
πιδράσεως μικρῶν ποσῶν DNase I. Προσθέτουμε μετά στό DNA
DNA-πολυμεράση I τής E-coli καθώς καί τά 4 τριφωσφορικά νου-
κλεοτίδια τοῦ DNA ίχνηθετημένα στόν φώσφορο α με p^{32} .

Ἡ πολυμεράση I τοποθετεῖται στίς θέσεις 3' τῶν διακοπῶν καί μέ
τήν ἐξωνουκλεασική της δράση ἀρχίζει νά βγάζει τά νουκλεοτί-
δια στό 5' ἄκρο τῶν διακοπῶν καί νά προσθέτει ραδιενεργά μέ-
φορά 5'→3'. Μ'αὐτό τόν τρόπο ὅλα τά νουκλεοτίδια τοῦ DNA
μποροῦν νά ἀντικατασταθοῦν μέ ραδιενεργά καί νά κατασκευά-
σουμε ἔτσι ἕνα DNA μέ ὑψηλή ραδιενέργεια πού εἶναι χρήσιμον
σάν ίχνηθετης.

Μωσαϊκά γονίδια εὐκαρυωτικῶν κυττάρων

Ὁ ὡαγωγός τής κόττας ἐκρίνη ὑπό τήν ἐπίδραση ὁρμονῶν τίς
πρωτεΐνες τοῦ λευκοῦ τοῦ αὐγοῦ δηλαδή τήν ὡλευκωματίνη τήν
κοναλμπουμίνη τήν ὀβομουκοεΐδη καί τήν λυσοζύμη.

Ἡ βιοσύνθεσις τής ὡλευκωματίνης προέχει στά κύτταρα τοῦ
ὡαγωγοῦ πού περίπου τά 60% τῶν πρωτεϊνῶν πού παράγουν ἀποτε-
λοῦνται ἀπό αὐτήν τήν πρωτεΐνη. Τό mRNA τής ὡλευκωματίνης
ἀποτελεῖ τό 50% τῶν ἀγγελιοφόρων τῶν κυττάρων αὐτῶν καί ὡς



έκ τούτου ή απομόνωσις καί ό καθαρισμός του άγγελιοφόρου αυτού είναι έφικτός. Τό άγγελιοφόρο αυτό παρεσκευάσθη άντιγράφηκε μέ τήν άντίστροφο μεταγραφάση σέ cDNA καί dsDNA ένώθηκε μέ ένα πλασμίδιο καί πολλαπλασιάσθηκε στήν E-coli. Μελέτη του ds DNA όσον άφορᾷ τήν ύπαρξη άλληλοδιαδοχῶν πού νά άναγνωρίζονται άπό διάφορα περιοριστικά ένζυμα απέδειξε ότι τά ένζυμα Eco Ri καί Hind III δέν κόβουν καθόλου τό dsDNA. Αυτό σημαίνει ότι τό γονίδιο τής ώλευκωματίνης δέν περιέχει τίς άλληλοδιαδοχές πού άναγνωρίζονται άπό τά δύο αυτά ένζυμα. Η ομάδα του Pierre Chambon στό Στρασβούργο ήθελε νά μελετήση τό γονίδιο τής ώλευκωματίνης σέ δύο διαφορετικά κύτταρα του όργανισμοῦ δηλαδή στά έρυθροκύτταρα όπου τό γονίδιο δέν είναι ένεργό καί στά κύτταρα του ώαγωγοῦ όπου εκφράζεται. Η μελέτη αυτή έγινε για νά δοῦμε μήπως υπάρχουν διαφορές πού νά έξηγοῦν τήν διαφοροποίηση. Όλικό DNA άπό έρυθροκύτταρα κόττας καθώς καί κύτταρα ώαγωγῶν παρασκευάσθη καί κόπηκε μέ τά δύο άνωτέρω ένζυμα πού άφίνουν άνέπαφο τό γονίδιο τής ώλευκωματίνης.

Τά δύο αυτά ένζυμα κόβουν τό DNA τής κόττας σέ πάρα πολλά άνομοιογενή κομμάτια καί για τόν διαχωρισμό καί τήν μελέτη τους χρησιμοποιήθηκε ή τεχνική μεταφορᾶς κατά Southern.

Τά κομμάτια του όλικοῦ DNA ύφίστανται κατ'άρχάς μία ήλεκτροφόρηση σέ πηκτή άγαρόζης πού τά διαχωρίζη άνάλογα μέ τό μέγεθός τους.

Μετά τήν ήλεκτροφόρηση δημιουργείται μέ διηθητικό χαρτί μία ροή ρυθμιστικοῦ διαλύματος δια μέσου τής άγαρόζης ή όποία παρασύρη τά τμήματα του DNA σέ ένα φύλλο νιτροκυτταρίνης τό όποίο έχει άπλωθῆ πάνω στήν άγαρόζη. Όλο τό DNA μεταφέρεται στήν νιτροκυτταρίνη χωρίς νά αλλάζει ή σχετική θέσις των κομματιῶν μεταξύ τους όπως διεχωρίσθησαν μέ τήν ήλεκτροφόρηση

Τό DNA ύφίσταται άποδιάταξη, πρό τής μεταφοράς του στήν νιτροκυτταρίνη, διά έπιδράσεως άλκαλικού περιβάλλοντος στήν πηκτή άγαρόζης όποτε μεταφερόμενο στήν νιτροκυτταρίνη είναι έτοιμό νά μελετηθεΐ μέ τήν τεχνική τής ύβριδοποιήσεως. 'Η ύβριδοποίησης γίνεται μέ τό dsDNA τής ώλευκωματίνης τό όποΐον έχει καταστεί ραδιενεργό in vitro μέ τήν τεχνική τής nick-translation.

'Η αύτοραδιογραφία σ' αυτό τό πείραμα απέδειξε ότι άντί για μία ζώνη ύβριδοποιήσεως πού θά έδειχνε μία μόνον κατηγορία κομματιών DNA πού φέρουν τό γονΐδιο τής ώλευκωματίνης παρουσιάστηκαν 4 διαφορετικά κομμάτια μέ μήκη 9,5Kb 2,35Kb 1,8Kb καί 1,3Kb. (είκόνα 36).



είκόνα 36



Αυτό σημαίνει ότι στο γονιδιακό DNA ή όργανωσις του γονιδίου της ώολευκωματίνης είναι διαφορετική. Τό γονίδιο περιέχει τις άλληλοδιαδοχές του ώριμου mRNA σε 4 διαφορετικά κομμάτια DNA συγχρόνως δέ μεταξύ αύτων των 4 κομματιών υπάρχουν άλλες άλληλοδιαδοχές πού δέν βρίσκονται στό ώριμο mRNA γιατί άναγνωρίζονται από περιοριστικές ένδονουκλεάσες πού δέν κόβουν τό dsRNA. Άρα τό φυσικό γονίδιο της ώολευκωματίνης έχει μία διακεκομένη όργάνωση και άποτελείται από τμήματα πού κωδικοποιούν για άμινοξέα πού βρίσκονται και στό ώριμο mRNA και ένδιάμεσες άλληλοδιαδοχές πού ένώνουν μεταξύ τους αυτά τά τμήματα αλλά δέν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες.

Χρησιμοποιοήσις της τεχνικής των άγκυλών R στό ήλεκτρονικό μικροσκόπιο για τήν μελέτη διακεκομένων γονιδίων.

Ή μελέτη του φυσικού γονιδίου της ώολευκωματίνης συμπληρώθηκε με παρατηρήσεις στό ήλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τό τμήμα του γονιδιακού DNA πού φέρει τον γόνο της ώολευκωματίνης επελέγη από τήν "βιβλιοθήκη" πού είχε δημιουργηθεί του γονιδιακού DNA της κόττας και χρησιμοποιήθηκε για μελέτη στό ήλεκτρονικό μικροσκόπιο.

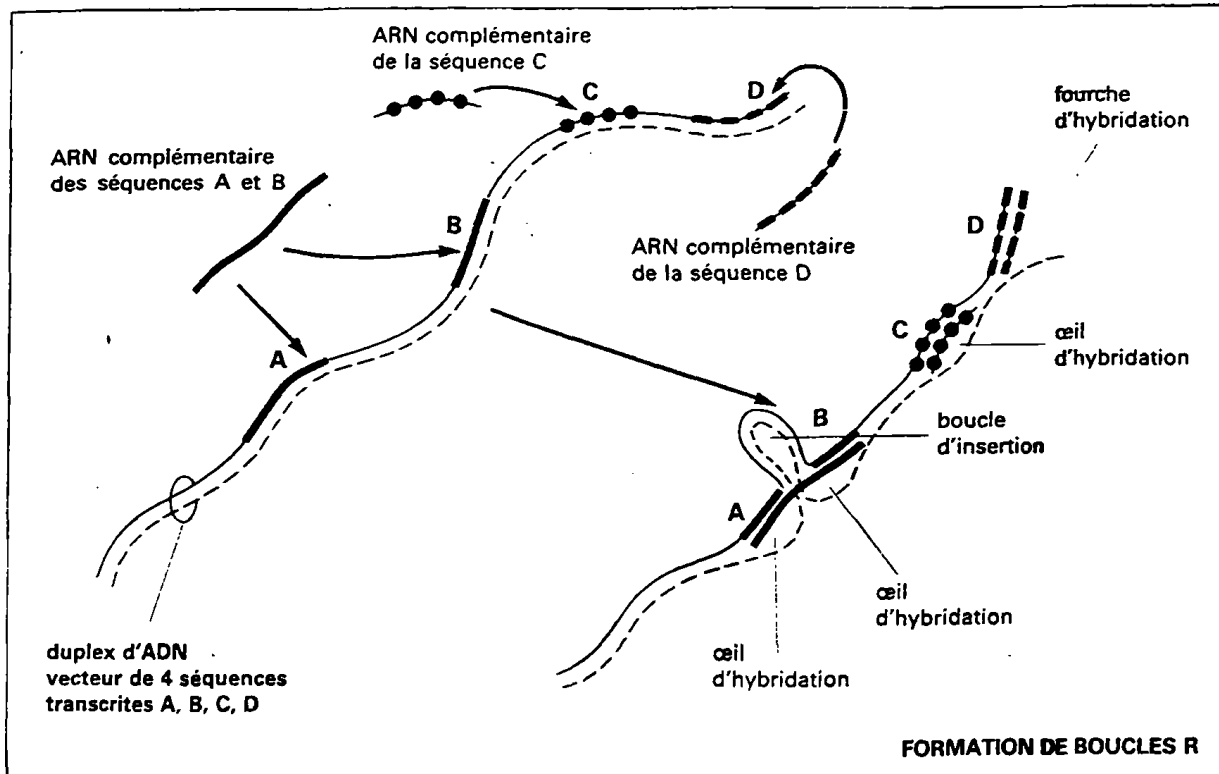
Έχει παρατηρηθεί ότι υπό όρισμένης συνθήκας παρουσία φορμαμιδίου και θερμοκρασία πλησίον του T_m τά υβρίδια RNA/DNA είναι πιο σταθερά από τά αντίστοιχά τους DNA/DNA. Έάν λοιπόν επώασουμε σ' αυτές τις συνθήκες ένα mRNA με τό αντίστοιχο του γονίδιο υπό μορφήν δικλώνου DNA ο ένας κλώνος του DNA θά έκτοπισθεί από τό συμπληρωματικό του mRNA και θά δημιουργηθεί ένα δίκλωνο μόριο RNA/DNA με μία άγκύλη, του έκτοπισθέντος μονοκλώνου DNA.

Έάν όμως τό DNA μόνον μερικώς είναι συμπληρωματικό του mRNA



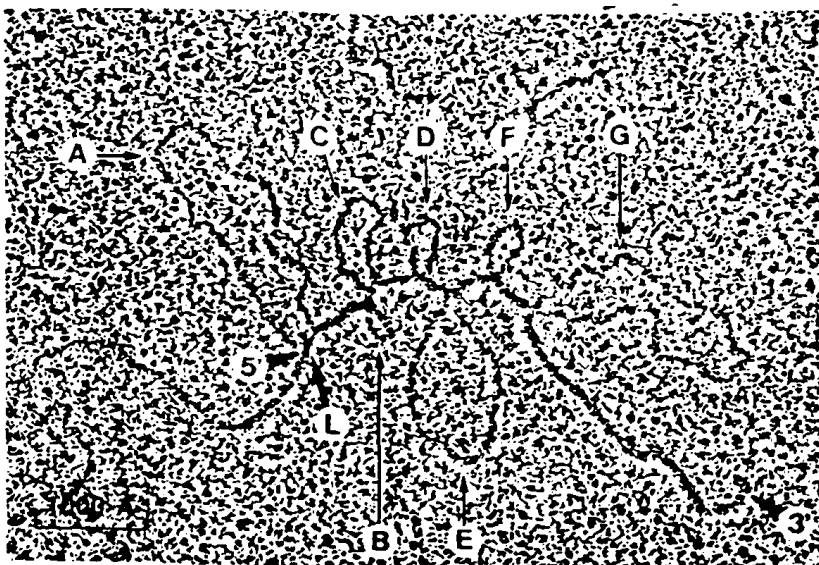
καί περιέχει καί ένδιάμεσα τμήματα μή συμπληρωματικά τότε
θά δοῦμε καί ένδιάμεσες άγκύλες άπό δίκλωνα μόρια DNA.

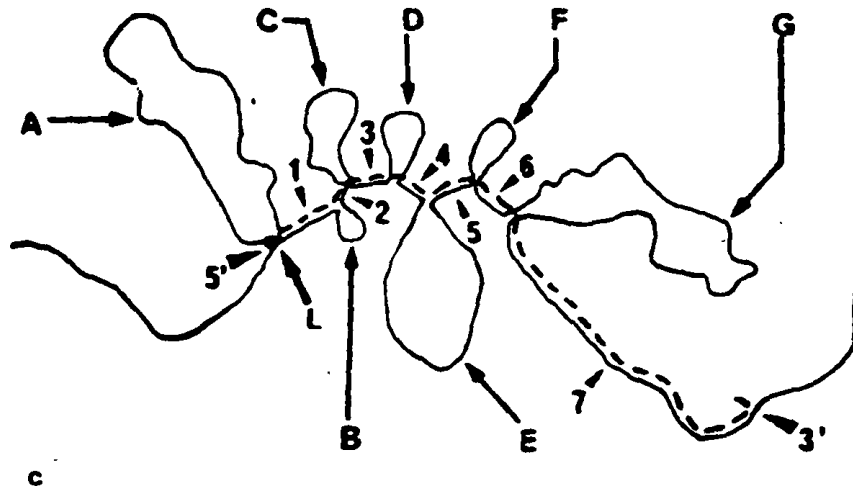
(εικόνα 37)



εικόνα 37

Ἡ μέθοδος αὐτή χρησιμοποιήθηκε γιά τό φυσικό γονίδιο τῆς
ώολευκωματίνης καί τό ώριμο mRNA καί εὔρέθη, (εικόνα 38).





είκόνα 38

δτι αποτελείται από 7 τμήματα συμπληρωματικά του mRNA που χωρίζονται από 7 ένδιάμεσες αλληλοδιαδοχές που δεν βρίσκονται στο ώριμο mRNA (στήν ηλεκτρονική φωτογραφία αποτελούν 7 R-άγκύλες). Το μέγεθος του γονιδίου της ώλευκωματίνης είναι περίπου 7.700bp, περίπου 10 φορές μεγαλύτερο από το μέγεθος του mRNA.

Τά τμήματα που κωδικοποιούν για αμινοξέα και διατηρούνται στο παραγόμενο ώριμο mRNA ονομάσθηκαν έξόνια (exons) ενώ τά τμήματα που αποτελούνται από αλληλοδιαδοχές που δεν κωδικοποιούν αμινοξέα και δεν διατηρούνται στο ώριμο mRNA ονομάσθηκαν ιντρόνια (introns).

Τό φαινόμενο των διακεκομένων γονιδίων είναι αρκετά γενικό στους εϋκαρυωτικούς οργανισμούς. Ύπό αυτήν τήν μορφή βρίσκεται στο γονιδίωμα, τό γονίδιο της αιμοσφαιρίνης, των ανοσοσφαιρινών, τό ριβοσωματικό 28S DNA στην Δροσοφίλα και όρισμένα γονίδια tRNA τής ζύμης.

Σέ όρισμένα γονίδια όπως στά γονίδια των Ιστονών στην Δροσοφίλα και τόν άχινό δεν βρέθηκαν ένδιάμεσες αλληλοδιαδοχές.

Έκτός από τά γονίδια των εϋκαρυωτικών κυττάρων τό φαινόμενο παρατηρείται και στους λούς που αναπτύσσονται σε εϋκαρυω-



τικά κύτταρα όπου και τό φαινόμενο αυτό άνεκαλύφθη πρώτα. Δέν γνωρίζουμε ακόμη ποιός είναι ό λόγος πού πολλά γονίδια εϋκαρυωτικῶν κυττάρων είναι διακεκομένα οϋτε ποιός είναι ό ρόλος τῶν ένδιαμέσων άλληλοδιαδοχῶν (έξέληξις; διαφοροποιήσις;)

Μελέτη πρωτοδιάταξις DNA.

Μέχρι πρό όλίγων έτών ή μελέτη τῆς άλληλοδιαδοχῆς τῶν βάσεων σέ μόρια DNA δέν αντιμετώπιζετο 1ον/ λόγω τοϋ μεγάλου μεγέθους τῶν μορίων και 2ον/ λόγω έλλείψεως καταλλήλων τεχνικῶν ταχείας μελέτης τῆς άλληλοδιαδοχῆς.

Ἡ ανακάλυψις τῶν περιοριστικῶν ένδονουκλεασῶν έλυσε τό ένα από τά δύο αυτά προβλήματα γιατί έπιτρέπει τό σπάσιμο ενός DNA σέ καθορισμένα μικρότερα κομμάτια τά όποία μπορούν νά αναλυθοϋν εϋκολώτερα. Τό δεύτερο πρόβλημα έλύθη τελευταίως (1976) μέ τήν ανακάλυψη τεχνικῶν ταχείας μελέτης τῆς πρωτοδιάταξης τῶν μορίων DNA.

Ἔστω π.χ. ότι θέλουμε νά μελετήσουμε τήν πρωτοδιάταξη τοϋ DNA τοϋ μικροϋ όγκογόνου ίοϋ τῶν θηλαστικῶν SV40. Θά πρέπει πρώτα νά κατασκευάσουμε ένα φυσικό χάρτη τοϋ χρωματοσώματος τοϋ ίοϋ όπου θά αναφαίνονται οι διάφορες θέσεις ένζύμων περιορισμοϋ για διάφορες νουκλεάσες. Ἔτσι ή άλληλοδιαδοχή βάσεων κάθε κομματιοϋ θά μπορεῖ νά έκφρασθεῖ τελικά σέ μία όλική άλληλοδιαδοχή βάσεων τοϋ χρωματοσώματος έφ' όσον θά ξέρουμε τήν θέση πού τά διάφορα κομμάτια κατέχουν στό χρωμάτωμα τοϋ ίοϋ.

Χρήσις τῶν περιοριστικῶν ένδονουκλεασῶν για τήν φυσική χαρτογράφηση ενός DNA

Οί περιοριστικές ένδονουκλεάσες άνεκαλύφθηκαν τά τελευταία χρόνια. Σήμερα ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων ένζύμων έχει ά-



πομονωθεί από διάφορα είδη βακτηριδίων.

Η φυσιολογική λειτουργία των ένζυμων αυτών στα αντίστοιχα βακτηρίδια από όπου απομονώθηκαν είναι άμυντική.

Τά βακτηρίδια δηλαδή περιέχουν τά ένζυμα αυτά για να άμύνονται έναντίον τής είσόδου ξένου DNA όπως π.χ. του DNA φάγων. Τό ίδιο τό DNA του βακτηριδίου προστατεύεται από τήν δράση του ένζυμου από μία είδική μεθυλάση πού μεθυλιώνει τίς βάσεις του DNA πού αναγνωρίζονται από τό ένζυμο περιορισμού (restriction-and-modification).

Μέ τήν είσοδο του ξένου DNA ή μεθυλάση δέν προλαβαίνει να μεθυλιώσει τό DNA αυτό πού κόβεται από τήν περιοριστική νουκλεάση.

Η χαρτογράφηση όπως είπαμε και προηγουμένως είναι ένα πρώτο βήμα για τήν μελέτη τής αλληλοδιαδοχής των βάσεων ενός DNA αλλά εκτός αυτού μάς δίνει και άφ' έαυτής σημαντικά αποτελέσματα. Μπορούμε χρησιμοποιώντας τήν χαρτογράφηση και σε συνδιασμό με τήν ύβριδοποίηση κατόπιν μεταφοράς κατά Southern να έντοπίσουμε γονίδια πάνω στον χάρτη ενός όρισμένου DNA. Χρησιμοποιώντας δηλαδή αντίστοιχα γνωστά mRNA μπορούμε να βρούμε σε πιά κομμάτια ύβριδοποιούνται και γνωρίζοντας στον χάρτη τήν θέση των κομματιών αυτών να καθορίσουμε τήν αρχή και τό τέλος έκάστου mRNA και να έντοπίσουμε έτσι τά αντίστοιχα γονίδια.

Επίσης με τήν μέθοδο αυτή μπορούμε να μελετήσουμε μεταβολές μέσα στα ίδια τά γονίδια ή σε γειτονικές περιοχές των γονιδίων όπως π.χ. μεταλλαγές έλλείψεως.

Π.χ. DNA από άτομα πού πάσχουν από μεσογειακή άναιμία και παρουσιάζουν σηνήθως μεταλλαγές έλλείψεως στο γονιδιακό DNA πού γειτονεύει με τον γόνο τής β-σφαιρίνης.



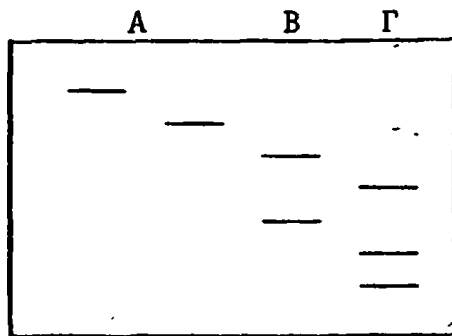
Ἡ μέθοδος μπορεῖ νά χρησιμοποιηθεῖ καί γιά προγενετική διάγνωση.

Μέθοδοι χαρτογράφησης

Ἄς λάβουμε π.χ. ἕνα μικρό κυκλικό DNA πού θέλουμε νά χαρτογραφήσουμε (SV40). Ἐπιδρούμε μέ διάφορα ἔνζυμα περιορισμοῦ καί ἀναλύουμε μέ ἠλεκτροφόρηση τά κομμάτια πού δημιουργοῦνται ἀπό τήν ἐπίδραση καθέ ἔνζυμου. Τά κομμάτια φαίνονται κατόπιν χρώσεως τῆς πηκτικῆς ἀγαρόζης μέ τήν εὐαίσθητη χρωστική βρωμιούχο αἰθίδιο.

Συγχρόνως μέ τό ἄγνωστο DNA ἠλεκτροφοροῦμε καί ἕνα δείγμα ἀπό μείγμα θραυσμάτων γνωστοῦ μήκους καί ἀπό τήν κινητικότητα τῶν ζωνῶν μπορούμε νά ὑπολογίσουμε τό μέγεθος τῶν ἀγνώστων θραυσμάτων σέ bp.

Ἐστῶ ὅτι χρησιμοποιήσαμε 3 ἔνζυμα τά A, B, Γ, τό A δίνει ἕνα κομμάτι DNA, τό B 2 καί τό Γ 3 ἄρα τό A ἔχει μία θέση ἀναγνωρίσεως στό DNA τό B δύο θέσεις καί τό Γ 3 θέσεις.



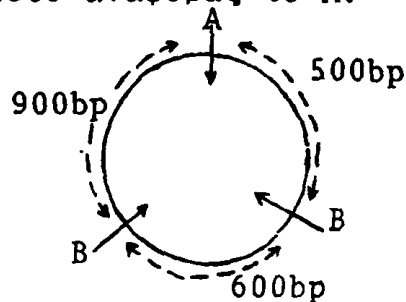
Γιά νά καθορίσουμε τίς θέσεις ἀναγνωρίσεως τῶν ἔνζυμων στό κυκλικό DNA χρησιμοποιοῦμε σάν σημείο ἀναφορᾶς τό μοναδικό σημείο A.

1. Κόβουμε τό DNA μέ τό ἔνζυμο A.
2. Σημαίνουμε τά δύο ἄκρα τοῦ A μέ $\gamma\text{-p}^{32}\text{-ATP}$ καί τό ἔνζυμο κινάση πολυνουκλεοτιδίων.
3. Ἐπιδρούμε στό σημασμένο κομμάτι μέ τό ἔνζυμο B. Τό DNA θά σπάσει σέ τρία κομμάτια. Ἀπό τά 3 αὐτά κομμάτια τά δύο θά εἶναι ραδιενεργά καί τό τρίτο ὄχι ραδιενεργό. Ὑπο-



λογίζουμε τα μοριακά βάρη και τα bp έκαστου κομματιού από την ηλεκτροφόρηση.

Μπορούμε τώρα να καθορίσουμε την θέση των κομματιών B στον κυκλικό χάρτη με σημείο αναφοράς τό A.



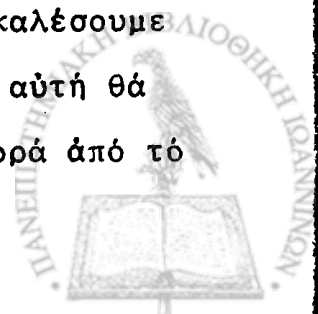
Τα δύο ραδιενεργά κομμάτια B θα αρχίζουν υποχρεωτικά από τη θέση A. Έστω ότι τα ονομάζουμε B-άριστερά 900bp και B-δεξιά 500bp.

4. Απομονώνουμε τα δύο κομμάτια B και επιδρούμε σ'αυτά με τό ένζυμο Γ. Τό ένζυμο αυτό είπαμε αρχικά πως κόβει τό DNA σε 3 τμήματα και άρα αναγνωρίζει 3 θέσεις. Άς υποθέσουμε ότι και οι τρεις αυτές θέσεις βρίσκονται στα δύο σημασμένα κομμάτια B.

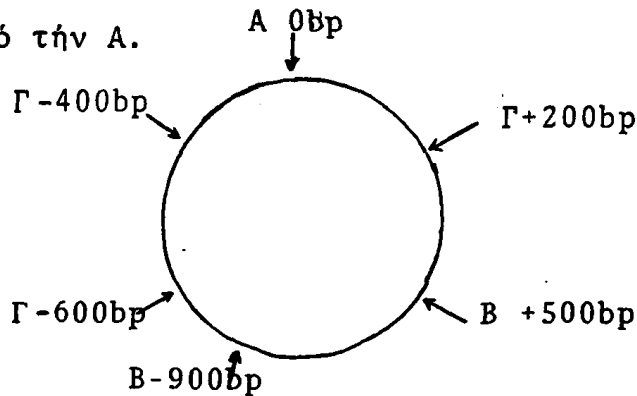
Τό κομμάτι B- άριστερά 900bp σπάει σε δύο τμήματα ένα ραδιενεργό 200bp και ένα ραδιενεργό 300bp. Ή μία θέση Γ είναι άρα γνωστή. Τό κομμάτι B-άριστερά 900bp σπάει σε τρία κομμάτια τό ένα ραδιενεργό 400bp και τά δύο άλλα μή ραδιενεργά. π.χ. 300bp και 200bp. Ή δεύτερη θέση Γ βρίσκεται επομένως 400bp από τό A αλλά ή τρίτη θέση Γ μπορεί να βρίσκεται είτε σε απόσταση $400+300=700bp$ είτε σε απόσταση $400+200=600bp$

5. Για να βρούμε την τρίτη αυτή θέση μπορούμε να κάνουμε ένα άλλο πείραμα.

Επιδρούμε στο κομμάτι B-άριστερά-900bp είτε με λιγότερο ένζυμο Γ είτε με λιγότερο χρόνο, έτσι ώστε να προκαλέσουμε άτελει πέψη του κομματιού αυτού. Στην περίπτωση αυτή θα υπάρξουν κομμάτια του B που θα κοπούν μόνον μία φορά από τό



ένζυμο Γ και θα είναι ραδιενεργά. Αν βρούμε ραδιενεργά κομμάτια των 400bp και 600bp τότε η δεύτερη θέση Γ καθορίζεται 600bp από την Α.



Μελέτη της αλληλοδιαδοχής των βάσεων του DNA

Η χαρτογράφηση του DNA με περιοριστικές ένδονουκλεάσεις μας επιτρέπει να μελετήσουμε εν συνεχεία την πρωτοδιάταξη σε βάσεις του κάθε τμήματος του όλικου DNA.

Ας υποθέσουμε ότι έχουμε ένα τμήμα DNA το οποίο φέρει μία θέση για μία περιοριστική ένδονουκλεάση.

Ιχνηθετούμε το DNA αυτό στα 5' άκρα του με ^{32}P χρησιμοποιώντας το ένζυμο κινάση-πολυνουκλεοτιδίωv και μεταφέροντας ένα γ φωσφόρο από $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$.

Εν συνεχεία το διπλά σημασμένο αυτό κομμάτι σπᾶμε με το ένζυμο περιορισμού που αναγνωρίζει μία θέση στο DNA αυτό.

Τὰ δύο σημασμένα τμήματα χωρίζουμε με ηλεκτροφόρηση ακρυλαμιδίου και έκλούμε από το άκρυλαμίδιο.

Έχουμε τώρα δύο κομμάτια DNA σημασμένα μόνο στο ένα άκρο 5' με φωσφόρο 32.

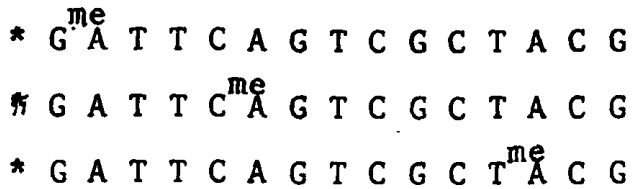
Υπάρχουν ορισμένες χημικές αντιδράσεις που τροποποιούν μία από τις 4 βάσεις του DNA και αποσταθεροποιούν το πλησίον εύρισκόμενο φωσφοριεστερικό δεσμό. Π.χ. η μεθυλίωση της αδενίνης είναι ένα τέτοιο παράδειγμα.

Έστω η αλληλοδιαδοχή βάσεων

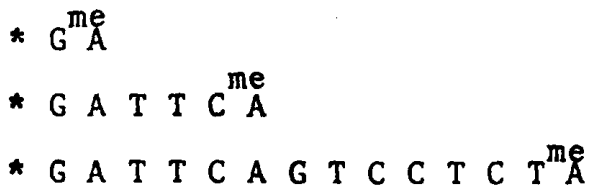
G A T T C A G T C G C T A C G



Έάν ρυθμίσουμε τις συνθήκες μεθυλίωσης ώστε να έχουμε άτελη τροποποίηση τότε μπορούμε να επιτύχουμε να έχουμε κατά μέσον όρο μία τροποποίηση A ανά μόριο DNA. Η άνωτέρω αλληλοδιαδοχή θα μεταβληθεί ως εξής:



Υδρόλυσις του μείγματος αυτού θα σπάσει τους δεσμούς δίπλα στις αδενίνες και θα μας δώσει κομμάτια DNA που όλα θα αρχίζουν από ένα ραδιενεργό άκρο και όλα θα τελειώνουν σε αδενίνη.



Θα έχουμε βέβαια και κομμάτια ενδιάμεσα που θα δημιουργηθούν από έσωτερικά σπασίματα αλλά αυτά δε μας ενδιαφέρουν γιατί δεν θα είναι ραδιενεργά.

Χρησιμοποιούμε τώρα το ίδιο DNA για να σπάσουμε στις G, T, και C+T (δεν υπάρχει αντίδραση ειδική για T μόνον)

- Τα θράσματα από τις 4 αντιδράσεις υποβάλουμε σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε γειτονικές θέσεις.
- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό τέτοιες συνθήκες που επιτρέπει διαχωρισμό δύο κομματιών που διαφέρουν μόνον κατά ένα νουκλεοτίδιο.
- Μετά την ηλεκτροφόρηση κάνουμε αυτόραδιογραφία και διαβάζουμε από κάτω προς τα πάνω την αλληλοδιαδοχή των βάσεων.



A	G	C	C+T
	— G		— T
— A			— T
		— C	— T
	— G		— T
		— C	— C
— A	— G		— T
		— C	— C
		— C	— C
— A			
	— G		



ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ HIV

Θ. ΤΖΑΒΑΡΑΣ Ph.D



ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΤΟΥ HIV

Το καλοκαίρι του 1980 πέθανε ένας ασθενής στην Νέα Υόρκη μετά από κάποια παρατεταμένη ασθένεια που στα τελευταία της στάδια συνοδεύθηκε από λοιμώξεις, που με την τρέχουσα ιατρική πρακτική θα μπορούσε να ιαθεί. Αυτή ήταν η πρώτη επίσημη παρατήρηση -ανακοίνωση για μια νέα ασθένεια που εκ των υστέρων βρέθηκε να έχουν παρατηρηθεί και άλλα περιστατικά από το 1978. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε ένα σημαντικό σταθμό στην όλη ιστορία της ιατρικής επιστήμης. Μια επιδημία διαπιστώνεται να κάνει την εμφάνισή της σε όλα σχεδόν τα μέρη του πλανήτη και να απειλεί μαζικά την ανθρώπινη ζωή.

Ένα χρόνο αργότερα η έρευνα έδειξε ότι η νέα αυτή ασθένεια ήταν το αποτέλεσμα της καταστροφής του ανοσοποιητικού συστήματος με το οποίο ο ανθρώπινος οργανισμός αντιστέκεται στις λοιμώξεις. Η ασθένεια ονομάστηκε AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). Στα Ελληνικά: σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας.

Ερευνητές από όλο το κόσμο άρχισαν αμέσως την έρευνα ανακάλυψης του αιτιολογικού παράγοντα. Στις αρχές του 1983 εμφανίστηκαν τα πρώτα σημαντικά αποτελέσματα. Μια χαλασική ερευνητική ομάδα καθοδηγούμενη από τον δρ. Luc Montagnier στο Ινστιτούτο Pasteur του Παρισιού απομόνωσε ένα νέο ιό από ασθενή που έπασχε από ένα σύνδρομο λεμφαδενοπάθειας που συνήθως προηγείται της πλήρους εμφάνισης της ασθένειας AIDS. Ο νέος αυτός ιός αναπτύχθηκε σε κυτταροκαλλιέργεια και ονομάστηκε LAV., Lymphadenopathy-associated virus: ιός σχετιζόμενος με λεμφαδενοπάθεια.

Αργότερα τον ίδιο χρόνο 1983, οι ίδιοι ερευνητές απομόνωσαν και πάλι ιούς από ασθενείς με πλήρη ανάπτυξη της ασθένειας AIDS και έκαναν σύγκριση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με τους προηγούμενους απομονωμένους. Ήσαν ακριβώς οι ίδιοι ιοί και έτσι παρέμεινε η αρχική τους ονομασία LAV.

Στην Μ. Βρετανία ο Abraham Karpas στο Πανεπιστήμιο του Cambridge απομόνωσε και αυτός έναν ιό που έμοιαζε με το στέλεχος του LAV και τον ονόμασε C-LAV (Cambridge LAV). Περίπου την ίδια εποχή ο Paul Fiorino στις Ηνωμένες Πολιτείες απομονώνοντας τον ιό έκανε την παρατήρηση ότι ο ιός του AIDS φαινόταν διαφορετικός από τους άλλους ανθρώπινους ιούς, αναπτυσσόταν δύσκολα σε κυτταροκαλλιέργεια και



έμοιαζε περισσότερο με τους αντίστοιχους των ζώων που ονομάζονται Λεντιοί (Lentivirus = αρχός ιός) λόγω του ότι χρειάζονται μεγάλο χρόνο για να αναπτυχθούν.

Εν τω μεταξύ ο Robert Gallo στο Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου στο Maryland-ΗΠΑ, ερευνούσε την ύπαρξη ενός άλλου ιού στους ασθενείς του AIDS που πιθανόν να ανήκε σε μια υποομάδα των ρετροϊών που ονομάζονται RNA ογκογόνοι ιοί. Χαρακτηριστικό των ιών αυτών (ρετροϊών) είναι ότι μπορούν να συνθέτουν DNA έχοντας σαν μοριακή μήτρα RNA (αντί DNA) ανατρέποντας το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας: DNA - RNA - πρωτεΐνη. Όταν ο Gallo δημοσίευσε τα ευρήματά του τον Μάιο του 1984 ονόμασε τον ιό του AIDS, HTLV-III (Human T-Cell Leukaemia/Lymphoma virus III) δηλ. ανθρώπινο ιό λευχαιμίας/λεμφώματος III των T-λεμφοκυττάρων θέλοντας να δείξει ότι ο ιός του AIDS είναι το τρίτο είδος των γνωστών ανθρώπινων ρετροϊών HTLV-I και HTLV-II.

Όταν όλοι οι παραπάνω ερευνητές συνέκριναν την παρόμοια δομή των ιών τους σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και αρχότερα την αλληλουχία των βάσεων DNA, κατέστη πλέον σαφές ότι πρόκειται για τον ίδιο ιό και θα πρέπει να δοθεί ένα κοινώς αποδεκτό διεθνές όνομα για τον / τους ιούς όπως και για την ασθένεια. Έτσι ο ιός ονομάσθηκε HIV (Human immune deficiency virus): ανθρώπινος ιός της ανοσοανεπάρκειας και η ασθένεια AIDS.

Πιθανή προέλευση του HIV

Κρίνοντας από το γεγονός ότι ο HIV μοιάζει αρκετά με ένα άλλο ιό της ίδιας ομάδας Lentivirinae, αλλά που προσβάλλει αποκλειστικά και μόνο τον σημιίδη (Simian) πίθηκο προκαλώντας Simian AIDS πιστεύεται ότι ο HIV είχε κοινό πρόγονο με άλλους ιούς που προσβάλλουν αφρικάνικους πιθήκους. Η προέλευση του ιού πιθανόν να προέρχεται από την τροπική Αφρική όπου για κάποιο ανεξήγητο λόγο μπόρεσε και έσπασε το "φράγμα" του είδους κάπου στην Κεντρική Αφρική, πιθανόν κοντά στην δυτική όχθη της λίμνης Βικτώρια, όπου η ασθένεια του AIDS είναι ενδημική. Πιθανόν εκεί για πρώτη φορά ένας λεντιϊός μόλυνε άνθρωπο και άρχισε να εξαπλώνεται τοπικά. Η μετακίνηση πληθυσμών δεν άρχισε να δώσει στην μόλυνση παγκόσμιες διαστάσεις.

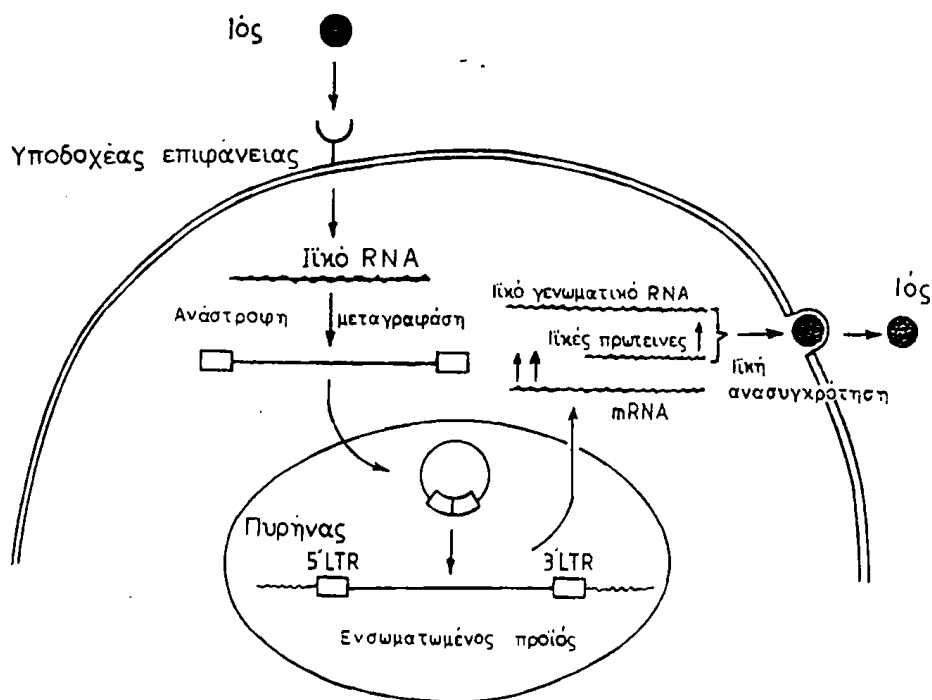
Ο κύκλος ζωής των ρετροϊών

Γενικά οι ιοί χωρίζονται σε δυο κατηγορίες ανάλογα με το αν φέρουν DNA ή RNA ως γενετικό τους υλικό. Οι ρετροϊοί αποτελούν την κατηγορία των RNA ιών που, στον αναπαραγωγικό τους κύκλο, χαρακτηρίζονται από την μετατροπή του γενωματικού των RNA σε DNA με το ενδογενές ένζυμο ανάστροφη μεταγραφή.



Κάθε σωματίδιο ιού φέρει ένα αντίγραφο μονόκλωνου RNA που περιβάλλεται από πρωτεΐνες σχηματίζοντας μια κεντρική πυρηνική δομή. Η δομή αυτή με την σειρά της περιβάλλεται από την εξωτερική κάψα του ιού που αποτελείται από ειδικές πρωτεΐνες που ονομάζονται χλωκοπρωτεΐνες. Ονομάζονται δε έτσι διότι είναι ενωμένες με μόρια σακχάρου.

Η μόλυνση ενός κυττάρου - στόχου αρχίζει με την αντίδραση των χλωκοπρωτεϊνών της εξωτερικής κάψας του ιού με ειδικές πρωτεΐνες της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης που ονομάζονται υποδοχείς. Αν και η λειτουργία, γενικά, των υποδοχέων δεν έχει πλήρως ερμηνευθεί η ύπαρξη των όμως είναι απαραίτητη για μια ιϊκή μόλυνση. Κύτταρα χωρίς ειδικούς υποδοχείς για τον ανάλογο ιό δεν μπορούν να μολυνθούν. Την αντίδραση του ιού με τον υποδοχέα ακολουθεί μια τοπική σύντηξη του ιού/κυτταρικής μεμβράνης που επιτρέπει την είσοδο του ιού αλλά και την απελευθέρωση του ιϊκού RNA στο κυτταρόπλασμα. Στο στάδιο αυτό το ενδογενές ιϊκό ένζυμο ανάστροφη μεταγραφή μετατρέπει το χένωμα του ιού σε γραμμικό δίκλωνο DNA που μπορεί να μεταφερθεί στον κυτταρικό πυρήνα όπου μετατρέπεται σε ένα κυκλικό μόριο DNA. Κάθε κυκλικό μόριο μπορεί να ενσωματωθεί στο κυτταρικό DNA με μηχανισμούς που ακόμη δεν έχουν πλήρως διελευκανθεί αλλά φαίνεται όμως ότι υπάρχει μια πιθανή προτίμηση σε χενωματικές θέσεις με έντονη μεταγραφική δραστηριότητα. Στις περισσότερες περιπτώσεις ενσωματώνεται σε εντελώς τυχαίες θέσεις. Η ενσωμάτωση του ιού συνήθως είναι μόνιμη για όλη την διάρκεια της ζωής του κυττάρου και στην μορφή αυτή ονομάζεται προϊός.



ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΡΕΤΡΟΙΟΥ

Σ.χίμα 1



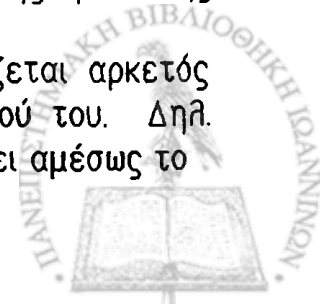
Ο πολλαπλασιασμός του ρετροϊού, δηλαδή η παραγωγή ιϊκών σωματιδίων, από την στιχμή που θα ενσωματωθεί στο χένωμα του κυττάρου εξαρτάται αποκλειστικά από αυτό. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι ο ρετροϊός είναι ατελής όσον αφορά τους μηχανισμούς αλλά και τους παράγοντες που απαιτούνται τόσο για την μεταγραφή όσο και την μετάφρασή του. Έτσι η εξάρτησή του από το ευκαρυωτικό κύτταρο συνίσταται στο να χρησιμοποιεί την μηχανή πολλαπλασιασμού του κυττάρου στο οποίο έχει ενσωματωθεί σαν προϊός. Δηλαδή ένας ρετροϊός μεταγράφεται (RNA πολυμεράση II) και μεταφράζεται (ριβοσώματα) σαν ένα μέρος της συνολικής μεταγραφής και μετάφρασης του κυττάρου. Επομένως απαραίτητη προϋπόθεση για τον πολλαπλασιασμό του ρετροϊού είναι η πολλαπλασιαστική ενεργότητα του ευκαρυωτικού κυττάρου. Η λήξη επομένως ή η ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού του κυττάρου συνεπάγεται και την αντίστοιχη λήξη ή παραγωγή ιϊκών σωματιδίων. Στις περισσότερες περιπτώσεις παράγονται δύο ειδών RNA περίπου σε ίση αναλογία: ένα μεταγράφημα πλήρους μήκους και ένα μικρότερο υπο-γενωμικό RNA που παράγεται μετά από ανασύνδεση (splicing) του πλήρους μεταγραφήματος και χρησιμεύει για την μετάφραση των πρωτεϊνών της εξωτερικής κάψας. Από το μεταγράφημα πλήρους μήκους ένα μέρος χρησιμοποιείται για την μετάφραση των εσωτερικών δομικών πρωτεϊνών και του ενδογενούς ενζύμου ανάστροφη μεταγραφή (βλέπε παρακάτω), ενώ ένα άλλο μέρος πακετάρεται σε νέα καψίδια για να δώσουν τους αποχόνους-ιούς, που μπορούν να διαπεράσουν την εξωτερική μεμβράνη και να δώσουν δευτερογενή μόλυνση σε άλλα κύτταρα (βλέπε σχήμα 1).

Περιγραφή και μοριακή βιολογία του HIV

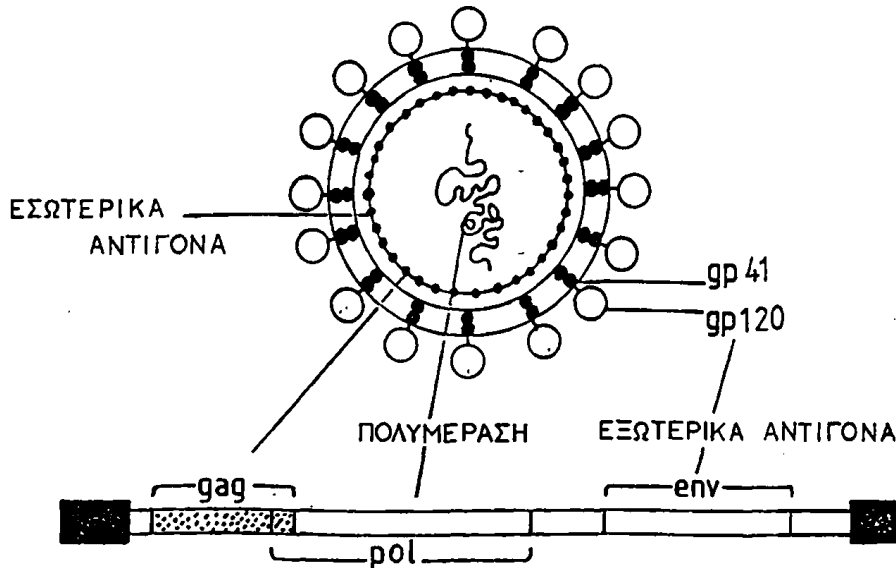
Ο HIV ανήκει στην υποομάδα Lentivirinae, των ρετροϊών, που κυρίως περιλαμβάνει ιούς ζώων. Μοιάζει με τους ρετροϊούς στην ιδιότητά τους να συνθέτουν DNA από RNA χρησιμοποιώντας το ένζυμο ανάστροφη μεταγραφή. Η διάμετρός του είναι περίπου 100 νανόμετρα ($1\text{nm} = 1 \times 10^{-9}\text{m}$). Η τρισδιάστατη δομή του HIV φαίνεται να έχει κανονικό γεωμετρικό σχήμα.

Πιστεύεται ότι η κατανομή των πρωτεϊνών στην ιϊκή επιφάνεια μοιάζει αρκετά με μπάλα ποδοσφαίρου με 12 πεντάχωνα και 20 εξαχώνω συσκολλημένα μεταξύ των σχηματίζοντας μια σφαίρα. Σε κάθε χωνιά του εξαχώνου και στο κέντρο τους βρίσκεται και ένα μόριο της πρωτεΐνης gp 120 (σχήμα 2). Τα χαρακτηριστικά του ιού HIV είναι:

1. Αφ' ής στιχμής μόλυνει ένα κύτταρο-στόχο χρειάζεται αρκετός σχετικά χρόνος για την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού του. Δηλ. είναι ένας αρχά πολλαπλασιαζόμενος ιός που δεν καταστρέφει αμέσως το



μολυσμένο κύτταρο. Σε αντίθεση με πολλούς άλλους ρετροϊούς που αμέσως ενσωματώνονται στο DNA του κυττάρου ένας μεγάλος αριθμός σωματιδίων του HIV παραμένει στο κυτταρόπλασμα. 2. Παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στον τρόπο που τα ιικά σωματίδια - απόγονοι εξέρχονται της κυτταρικής μεμβράνης του μολυσμένου κυττάρου. 3. Παρουσιάζει συχνές αντιγονικές αλλαγές που εντοπίζονται στις πρωτεΐνες της εξωτερικής επιφάνειας του ιού. Η ιδιότητά του αυτή αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή στο να πιστοποιεί και να πολεμά με αντισώματα αυτές τις πρωτεΐνες του ιού (τα αντιγόνα του ιού). Εδώ δε εντοπίζεται η αδυναμία στο να αναπτυχθεί κάποιο αποτελεσματικό εμβόλιο. 4. Παρουσιάζει ένα ασυνήθιστο τρόπο ρύθμισης πολλαπλασιασμού του, που περιλαμβάνει και αυτοανασταλτικό μηχανισμό μη συναντώμενο σε άλλους ιούς (γονίδιο nef). 5. Τα βασικά του δομικά γονίδια είναι τρία: (βλέπε σχήμα 2)



ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΑ ΔΟΜΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ/ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ HIV

Σχήμα 2



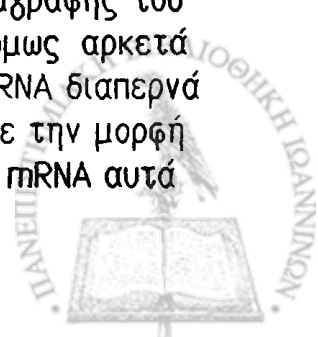
- α) gag: κωδικοποιεί για εσωτερικές δομικές πρωτεΐνες του ιού.
 β) pol: κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη με τρεις βασικές λειτουργίες: πρωτεάσης, ανάστροφης μεταγραφάσης και ενδονουκλεάσης.
 γ) env: κωδικοποιεί για πρωτεΐνες της εξωτερικής κάψας του ιού. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω το γονίδιο αυτό χαρακτηρίζεται από πολυμορφικότητα και παράχεται σαν μιά πρόδρομη γλυκοπρωτεΐνη (gp) με μοριακό βάρος 160 που μεταγενέστερα δίνει τις πρωτεΐνες gp120 και gp41.

Τα δομικά αυτά γονίδια βρίσκονται μεταξύ δύο πανομοιότυπων αλληλοουσιών DNA, που αποτελούν ένα βασικό χαρακτηριστικό των ρετροϊών, και είναι υπεύθυνες για την μεταγραφή και την ρύθμιση του ιού. Είναι συγκεκριμένες περιοχές DNA μήκους περίπου 500 ζευχών και ονομάζονται LTR (Long terminal repeats). Βλέπε σχήματα 1,2 και 3. Κάθε LTR διακρίνεται σε τρία τμήματα: U₃, R και U₅. Ο ρόλος του U₅ δεν είναι διευκρινισμένος. Αντίθετα, είναι γνωστό ότι στο 5' άκρο του R εντοπίζεται η αρχή της RNA μεταγραφής για όλους τους ρετροϊούς που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Το U₃ αποτελεί την κύρια ρυθμιστική περιοχή του LTR όπου ευρίσκονται οι υποκινητές CAAT και TATA για την δέσμευση της RNA πολυμεράσης II, ενώ ανωδικότερα οι επαυξηντές για την δέσμευση κυτταρικών trans-ενεργοποιητών. Το 5' LTR ρυθμίζει την μεταγραφή του ιού, ενώ το 3' LTR φέρει τα απαραίτητα στοιχεία πολυαδενυλίωσης των μεταγραφημάτων.

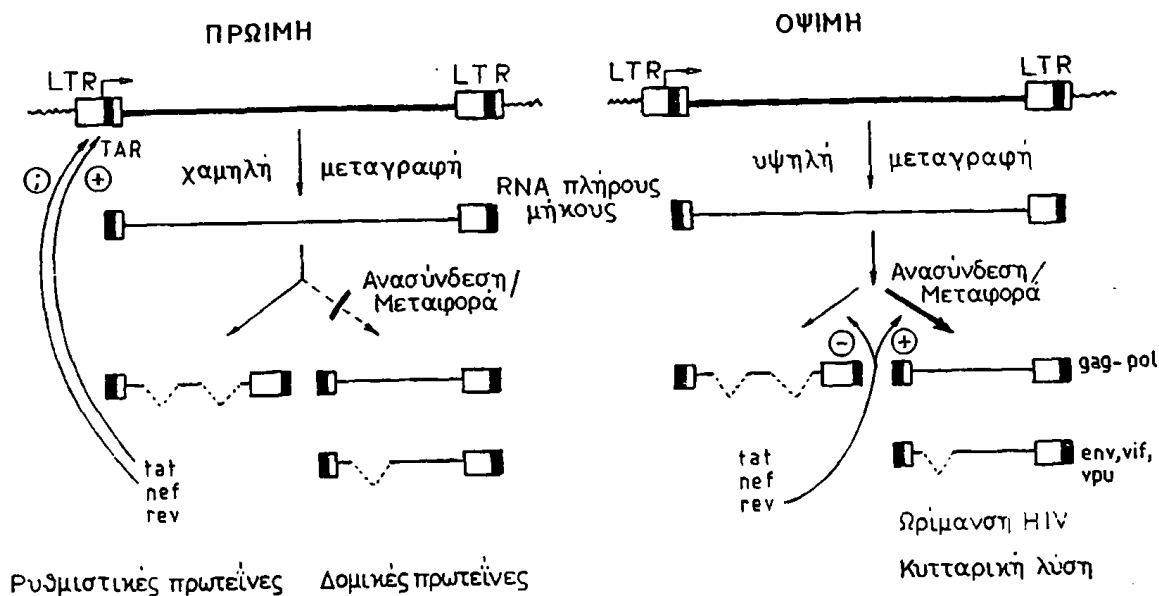
Ενώ οι περισσότεροι ρετροϊοί, κυρίως των ζώων, χαρακτηρίζονται μόνο από τα τρία δομικά γονίδια gag, pol και env ο HIV φέρει τουλάχιστον 6 επιπλέον: tat, rev, vif, vpr, vpu, και nef που η έκφρασή των ρυθμίζει την ιική πρωτεϊνική παραγωγή και ανάπτυξη. Τα γονίδια tat, rev και nef κωδικοποιούν για σημαντικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες ενώ για το vif πιστεύεται ότι ελέγχει την μοθυσματικότητα του HIV. Ο ρόλος των γονιδίων vpr και vpu παραμένει τελείως άγνωστος.

Η ρύθμιση του HIV, σε αντίθεση με όλους τους άλλους ρετροϊούς που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, παρουσιάζει σημαντική πολυπλοκότητα που ακόμη δεν έχει εξηγηθεί πλήρως. Συνδέεται δε άμεσα με την γονιαική του έκφραση και μπορεί να χωρισθεί σε δύο φάσεις:

1. Πρώτη φάση. Η ενεργοποίηση ενός λεμφοκυττάρου συνεπάγεται και την άμεση συνδυασμένη δράση των βασικών και επαχώξιμων παραχόντων της μεταγραφής του που οδηγεί και στην αύξηση της μεταγραφής του προιού. Το επίπεδο αύξησης είναι σχετικά χαμηλό αλλά όμως αρκετά σημαντικό. Ο παραχόμενος πληθυσμός των γενωμικών ιικών mRNA διαπερνά την πυρηνική μεμβράνη και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα με την μορφή διηλά ανασυνδεδεμένου mRNA που έχει μοριακό βάρος 2Kb. Τα mRNA αυτά



κωδικοποιούν για τρεις ρυθμιστικές πρωτεΐνες tat (trans-activator), nef (negative regulator factor) και rev (regulator of virion expression) όπως φαίνεται στο σχήμα 3.



ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ HIV

Σχήμα 3

Η πρωτεΐνη tat, που αποτελείται από 86 αμινοξέα και είναι πλούσια σε κυστεΐνες, έχει μοριακό βάρος 15,5 Kd και είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη που δρα μετά από την πρόσδεσή της σε ειδικές αλληλουχίες υποκινητών των LTR αυξάνοντας τον ρυθμό της μεταγραφής του. Είναι δηλαδή ένας trans ενεργοποιητής και αυξάνει την έκφραση πολλών χονδίων συμπεριλαμβανομένου και του εαυτού της (θετική αυτορύθμιση). Όσον δε αυξάνει η έκφρασή της, τόσο αυξάνει και ο βαθμός ενεργοποίησης. Δρα δηλαδή με ένα μηχανισμό ανάδρασης (Feedback mechanism) που μπορεί να αυξήσει την χονιδιακή έκφραση του ιού μέχρι 1000 φορές παραπάνω.

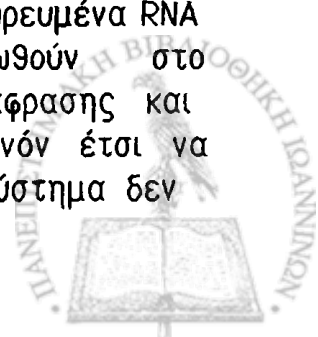
Η ειδική αλληλουχία DNA στην οποία προσδένεται η tat ευρίσκεται στα LTR του ιού και ονομάζεται TAR (trans activation response element) που είναι μία μεταγραφόμενη περιοχή και ευρίσκεται πάντα στα πρώτα 59 νουκλεοτίδια όλων των μεταγραφημάτων RNA του ιού. Χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης tat είναι ότι προσδένεται με την περιοχή TAR των RNA, που αποτελεί ένα τελείως νέο μηχανισμό αλλά ο ακριβής ρόλος της ακόμη παραμένει άγνωστος. Πιστεύεται ότι δρα σαν αναστολέας της λήξης της μεταγραφής.



Σε αντίθεση με τον ουσιαστικό ρόλο της πρωτεΐνης tat, το πρωτεϊνικό παράγωγο του γονιδίου nef δεν χρειάζεται για τον πολλαπλασιασμό του HIV. Η πρωτεΐνη nef έχει μοριακό βάρος 27 Kd και φέρει λιπαρά οξέα στο μόριό της που την κάνει ικανή να συνδέεται με τις μεμβρανικές δομές του κυττάρου. Πιστεύεται ότι ανήκει σε εκείνες τις μεμβρανικές πρωτεΐνες που υδρολύουν GTP και χρησιμεύουν για την μεταφορά ερεθισμάτων από την μεμβράνη στον πυρήνα. Η δράση της nef συνίσταται στην καταστολή της ιϊκής μεταγραφής που, πιθανόν, γίνεται μετά την πρόσδεσή της σε ειδικές αλληλουχίες των LTR. Ο κατασταλτικός της χαρακτήρας έχει σαν αποτέλεσμα την αντιστάθμιση του υψηλού βαθμού έκφρασης από την tat, συμπεριλαμβανομένης όμως και της ίδιας (αρνητική αυτορύθμιση). Σαν επιπρόσθετο στοιχείο του ρόλου της θεωρείται η συμβολή της στην μετάπτωση του HIV από ενεργό σε λανθάνοντα.

2. Όψιμη φάση. Το τρίτο μέλος των ρυθμιστικών πρωτεϊνών της πρώιμης φάσης είναι η πρωτεΐνη rev που είναι υπεύθυνη για την επαγωγή της μετάπτωσης από την πρώιμη στην όψιμη φάση της ιϊκής έκφρασης. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την υπερέχουσα έκφραση των δομικών πρωτεϊνών (βλέπε σχήμα 3). Η πρωτεΐνη rev έχει μοριακό βάρος 19 Kd, είναι φωσφορυλιωμένη (φέρει φωσφορικές ομάδες) και εντοπίζεται στους πυρηνίσκους των ενεργοποιημένων CD₄ λεμφοκυττάρων. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της είναι ότι έχει διαφορετική δράση. Συγκεκριμένα, επάγει την έκφραση των μη ανασυνδεδεμένων gag- pol ή μονά ανασυνδεδεμένων env, vif RNA ενώ συγχρόνως αναστέλλει την έκφραση των διπλά ανασυνδεδεμένων RNA που κωδικοποιούν για τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Έτσι η πρωτεΐνη rev ρυθμίζει αρνητικά και την δική της έκφραση (αρνητική αυτορύθμιση). Αν και θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι ρυθμίζει την ισορροπία των μη ανασυνδεδεμένων και ανασυνδεδεμένων μορίων RNA, σε τελευταίες μελέτες φαίνεται ότι η rev ενεργοποιεί την πυρηνική έξοδο ενός αριθμού μη ανασυνδεδεμένων μορίων RNA από βασικά γονίδια που κανονικά δεν μπορούν να περάσουν από την πυρηνική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα.

Η αλληλουχία DNA- στόχος της rev ευρίσκεται μέσα στην περιοχή του γονιδίου env που ονομάζεται RRE (rev response element). Είναι πάντως άγνωστο ακόμη αν η πρόσδεση γίνεται όταν το RRE ευρίσκεται στην μορφή του DNA (προϊός) ή στην μορφή RNA (μεταγράφημα env γονιδίου). Είναι πολύ πιθανό να χρειάζεται ένα οριακά υψηλό επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης rev πριν την μετάπτωση στην όψιμη φάση. Κατά την σχετικά σύντομη χρονική στιχμή δράσης της rev όλα τα ήδη συσσωρευμένα RNA των δομικών πρωτεϊνών από την tat θα απελευθερωθούν στο κυτταρόπλασμα με συνέπεια τα επίπεδα της ιϊκής έκφρασης και παραγωγής ιϊκών σωματιδίων να είναι πολύ υψηλά. Πιθανόν έτσι να εξηγείται και το γεγονός ότι το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα δεν



προλαβαίνει να πιστοποιήσει και να εξουδετερώσει, μέσω αντισωμάτων, τον ιό και να έχουμε τον κυτταρικό θάνατο.

Είναι φανερό ότι η έκφραση καθενός από τα τρία ρυθμιστικά γονίδια tat, rev και nef επηρεάζει τα άλλα δύο. Η αλληλοεπίδρασή των έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την συνολική ρύθμιση του ιικού πολλαπλασιασμού.

Το γένωμα του HIV είναι ετερογενές

Διαφορετικές απομονώσεις του ιού HIV από ασθενείς AIDS και μελέτη της αλληλουχίας των βάσεων DNA έχει αποκαλύψει ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών, αλλά φυσικά σχετιζομένων μεταξύ των, ιών HIV. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι ο ιός παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια που οφείλεται σε μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο γένωμά του.

Η εξήγηση της ετερογένειας αυτής βασίζεται κυρίως στο ενδογενές ένζυμο ανάστροφη μεταγραφή και λιγότερο σε άλλους μεταλλαξιόχονους παράγοντες. Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την ανάστροφη μεταγραφή, ευρίσκεται σε όλους τους ρετροϊούς και είναι επιρρεπές στο λάθος κατά την μεταγραφή του γενωμικού RNA σε DNA. Η συχνότητα λάθους έχει μετρηθεί σε πειράματα in vitro και βρέθηκε ότι είναι 10^{-4} /βάση, δηλ. κάθε 10.000 βάσεις μεταγράφεται και μία λάθος βάση. Επιπρόσθετες μεταλλάξεις σημείου, αναδιπλασιασμοί και ανασυνδυασμοί με άλλους ιούς ή και με αλληλουχίες κυτταρικών γονιδίων, όταν συνδυασθούν με τα λάθη της ανάστροφης μεταγραφής μπορούν να αυξήσουν την συχνότητα της ετερογένειας.

Αν η ίδια συχνότητα λάθους συμβαίνει in vivo τότε σε κάθε μεταγραφή του γενώματος θα παράγεται και ένας διαφορετικός ιός (τουλάχιστον κατά μία βάση). Μεταλλάξεις μη σημαντικές για τον αναπαραγωγικό κύκλο του ιού θα συνεχίσουν την παραγωγή νέων μεταλλάξεων, ενώ οι σημαντικές θα σταματούν τις παραπέρα μεταλλάξεις λόγω του ότι θα παράγονται ατελείς ιοί. Έτσι μπορεί να εξηγηθεί και το γεγονός ότι ωρισμένοι ιοί HIV παρουσιάζουν υψηλή και άλλοι χαμηλή αναπαραγωγικότητα.

Σχετικές μελέτες για γενετικές αλλαγές στο γένωμα του HIV υπάρχουν πολλές. Από χρόνιες μολύνσεις δύο ατόμων έχουν απομονωθεί 39 διαφορετικοί αλλά γενετικά παρόμοιοι ιοί. Απομόνωση ιού ακόμη και από το ίδιο άτομο σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα έχει αποκαλύψει διαφορετικούς ιούς. Επίσης το ίδιο δείχνει και η σύγκριση ιών από διαφορετικές περιοχές.

Προϊκή θανάτουσα κατάσταση και ενεργοποίηση του HIV

Τα ανθρώπινα CD₄ - T λεμφοκύτταρα είναι η υποομάδα των λεμφοκυττάρων που αποτελούν τα κύτταρα-στόχο δράσης του HIV. Τα λεμφοκύτταρα αυτά

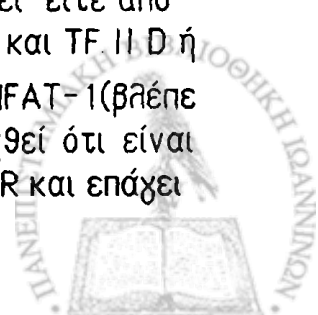


παραμένουν στην φάση G_0 του κυτταρικού κύκλου, που είναι η φάση ηρεμίας μετά την μίτωση και πριν την νέα σύνθεση DNA για τον νέο κυτταρικό κύκλο, και πολλαπλασιάζονται επαγωγικώς μόνο μετά την επίδραση κάποιου αντιχόνου. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την έκφραση μόνο των βασικών γονιδίων του κυττάρου λόγω της χαμηλής συνολικά μεταγραφής και μετάφρασης ενώ η ιϊκή παραγωγή σωματιδίων, όπως συμβαίνει για πολλούς ιούς, διακόπτεται. Μπορεί όμως και πάλι να αρχίσει μόνο μετά από αντιχονική ενεργοποίηση οπότε το κύτταρο στην νέα επαγωγική διεργασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, θα εκφράσει τα γονίδια του ιού σαν μέρος της συνολικής του γονιδιακής έκφρασης.

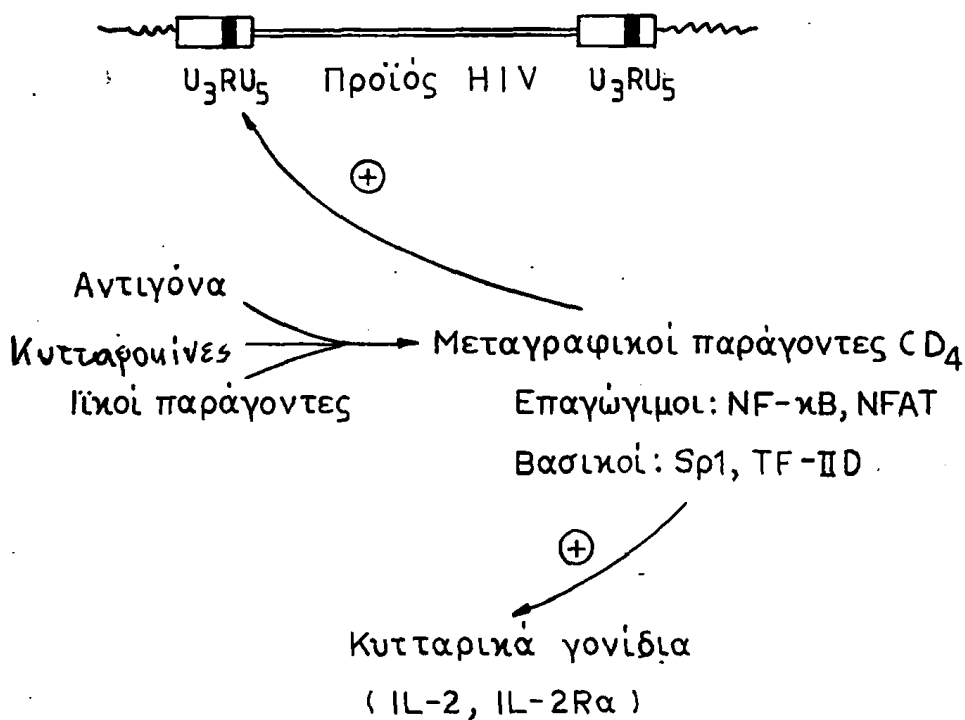
Η φάση G_0 δεν χαρακτηρίζεται μόνο από την αναστολή του ιϊκού πολλαπλασιασμού αλλά και από την αδυναμία μόλυνσης ενός κανονικού λεμφοκυττάρου. Τα κύτταρα της φάσης αυτής στερούνται εκείνων των κυτταρικών παραχόντων που απαιτούνται για την σύνθεση του πλήρους μήκους DNA του προιού αλλά και της αποτελεσματικής του ενσωμάτωσης στο γένωμα του ξενιστή κυττάρου. Κατ' αυτή την έννοια ο HIV αν και δεσμεύεται αποτελεσματικά στην πρωτεΐνη επιφάνειας CD_4 των T λεμφοκυττάρων, που είναι ο υποδοχέας του, δεν μπορεί όμως να κάνει μόλυνση και μεταγενέστερα να πολλαπλασιασθεί. Έτσι, η αντίδραση του HIV με τα λεμφοκύτταρα στη φάση G_0 του κυτταρικού κύκλου αποτελεί τον πρώτο τύπο λανθάνουσας μόλυνσης που καθορίζεται από την έλλειψη ειδικών κυτταρικών παραχόντων. Η παρουσία των μη ενσωματωμένων ιϊκών σωματιδίων στην κυτταρική μεμβράνη μπορεί να διατηρηθεί για αρκετό χρονικό διάστημα ενώ μία μεταγενέστερη αντιχονική ενεργοποίηση του T λεμφοκυττάρου θα είχε σαν αποτέλεσμα την ενσωμάτωση του ιού στο γένωμα αλλά και την παραγωγή νέων ιϊκών σωματιδίων.

Η αντιχονική ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός του T λεμφοκυττάρου είναι μία μεταπτωτική κατάσταση που τελικά οδηγεί και πάλι στην κατάσταση ηρεμίας G_0 του κυτταρικού κύκλου οπότε διακόπτεται η παραγωγή του ιού. Στην περίπτωση αυτή έχουμε τον δεύτερο τύπο λανθάνουσας κατάστασης όπου ο ιός είναι ήδη ενσωματωμένος σαν προϊός και δεν παράγεται μέχρι την έναρξη του επόμενου κυτταρικού κύκλου. Μία όμως μεταγενέστερη επανεργοποίηση του κυττάρου από κάποιο αντιχόνο, κυτταροκινάσες (Cytokines), ή άλλους ετερόλογους trans ιϊκούς ενεργοποιητές μπορεί να επανεργοποιήσει τον προϊό του HIV και να έχουμε ιϊκή παραγωγή.

Η ενεργοποίηση του HIV στο T λεμφοκύτταρο μπορεί να γίνει είτε από βασικούς (Constitutive) μεταγραφικούς παράγοντες όπως SP_1 και $TF_{II}D$ ή από άλλους επαγωγικούς παράγοντες όπως $NF-\kappa B$ και $NFAT-1$ (βλέπε παρακάτω σχήμα 4). Για τον παράγοντα $NF-\kappa B$ έχει αποδειχθεί ότι είναι μία πρωτεΐνη που προσδέεται στον ειδικό επαυξηνητή των LTR και επάγει



την μεταγραφή του HIV. Παράλληλα όμως ο NF-κΒ επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την παραγωγή της ιντερλευκίνης-2 (IL-2) όπως και την α-υπομονάδα του υποδοχέα της. Κατά συνέπεια ο προϊός του HIV ενεργοποιείται και πολλαπλασιάζεται από τους ίδιους επαγωγίσιμους κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες που επάχουν και το συνολικό πρόγραμμα πολλαπλασιασμού του κυττάρου.



Σχήμα 4

Αντισώματα Αντι-HIV

Ο καλύτερος τρόπος πιστοποίησης της μόλυνσης από HIV είναι η ανίχνευση του ίδιου του ιού ή του γενετικού του υλικού στο αίμα. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποια άμεση εργαστηριακή εξέταση αλλά προς αυτή την κατεύθυνση κινούνται πολλές εταιρίες βιοτεχνολογίας και ίσως στο άμεσο μέλλον να επινοηθεί κάτι τέτοιο.

Κείνο που γίνεται αυτή τη στιγμή είναι η έμμεση ανίχνευση του ιού στο ορρό του μολυσμένου ατόμου με την παρουσία αντισωμάτων. Το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως σε όλες τις μολύνσεις, αντιδρά παράγοντας αντί-HIV αντισώματα που είναι πρωτεΐνες υψηλής ειδικότητας ως προς την

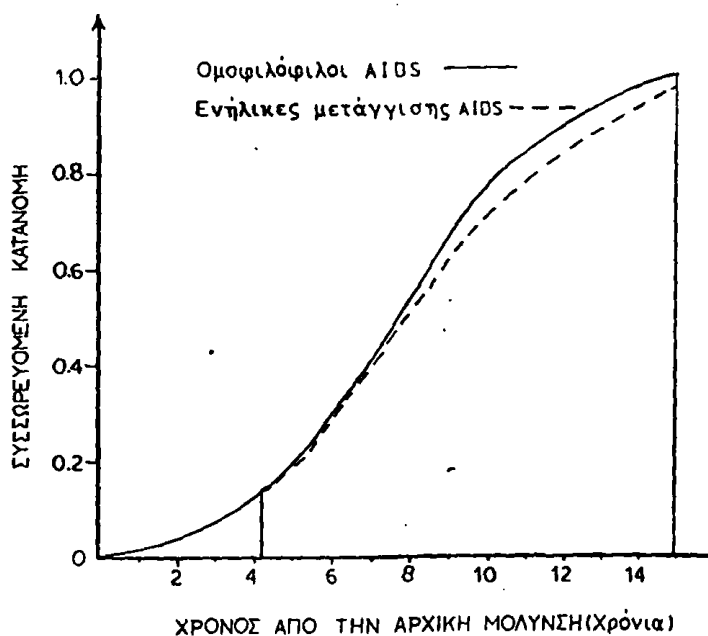


δέσμευσή τους με τα αντιγόνα του ιού. Σε αντίθεση με άλλες ιικές λοιμώξεις, τα παραχόμενα αντισώματα κατά του HIV δεν παρέχουν προστασία στο μολυσμένο άτομο. Είτε γιατί παράγονται αρκετά αργά σε σχέση με τον χρόνο της αρχικής μόλυνσης, είτε εμφανίζονται όταν πλέον ο ιός έχει μολύνει άλλα κύτταρα παρουσιάζοντας διαφορετική δομή (στην πρωτεΐνη κάψας gp 120), είτε αν και μπορούν να τον δεσμεύσουν δεν τον εξουδετερώνουν πλήρως.

Η εξέταση αίματος για την ανίχνευση του HIV είναι απλή και στηρίζεται στην χαρακτηριστική αντίδραση: αντιγόνο (πρωτεΐνες του HIV) + αντίσωμα (αντί-HIV) - σύμπλοκο αντιγόνου/αντισώματος που είναι εξειδικευμένη και πολύ σταθερή. Ως αντιγόνο χρησιμοποιούνται εργαστηριακά καθαρισμένες πρωτεΐνες του HIV και ως αντίσωμα ο ορός του υπό εξέτασιν ατόμου.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται σήμερα για την ανίχνευση αντισωμάτων ονομάζεται ELISA, που είναι τεχνική επινόηση πάνω στην βασική αντίδραση αντιγόνου/αντισώματος και χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία. Αν ο ορός περιέχει αντισώματα (αντί-HIV) που θα δεσμευθούν στις ιικές πρωτεΐνες τότε το άτομο χαρακτηρίζεται θετικό ή φορέας μετά όμως από μία δεύτερη ανάλυση που ονομάζεται Western blotting. Η ανίχνευση αντισωμάτων HIV σε ένα άτομο δεν σημαίνει κατ'ανάγκη ότι πάσχει ήδη από AIDS. Σημαίνει απλώς ότι έχει μολυνθεί από τον ιό HIV. Αυτό πρέπει να τονισθεί γιατί ο χρόνος επώασης του ιού μέχρι την εμφάνιση της πλήρους νόσου πολλές φορές είναι μεγάλος.

Λόγω της ιδιαιτερότητας του ιού στην εξάπλωση (κυρίως σεξουαλική επαφή) ήταν δύσκολο να υπολογισθεί ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνιση της νόσου. Πολλά όμως στοιχεία ήρθαν από τράπεζες αίματος σχετικά με μεταγχίσεις μολυσμένου αίματος σε αιμοφιλικά ή μη άτομα. Η ακριβής καταγραφή των περιστατικών επέτρεψε τον υπολογισμό του χρόνου εμφάνισης της νόσου που κυμαίνεται από 4.2 μέχρι 15 χρόνια, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 5. Ο μέσος όρος δε υπολογίζεται, με μαθηματικά μοντέλα, περίπου 8 χρόνια.



Σχήμα 5



Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι η πρώτη ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού στον ιό HIV μπορεί να παρέχει προστασία από μεταγενέστερες επαναμολύνσεις με μεταλαχμένα στελέχη. Αυτό είναι σημαντικό για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου στο μέλλον.

Η εξέταση ανοσοανίχνευσης έδωσε μεγάλη ώθηση στην παγκόσμια χαρτογράφηση της νόσου και ελαχιστοποίησε τον κίνδυνο μόλυνσης από μεταγχύσεις αίματος. Σήμερα όλες οι Τράπεζες Αίματος ελέγχουν τα αποθέματα τους όπως και τους αιμοδότες.

Η εμφάνιση αντισωμάτων στην δεδομένη ιϊκή μόλυνση HIV ποικίλει κυμαινόμενη συνήθως από περίπου 20-30 ημέρες μέχρι 4 μήνες και ίσως ένα χρόνο. Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι η πρώτη εξέταση στην αρχή μιάς υπόπτου μόλυνσης μπορεί να είναι αρνητική αλλά χρειάζεται να επαναληφθεί μετά από μερικούς μήνες.

Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου ένας μολυσμένος οργανισμός δεν ανέπτυξε αντισώματα αλλά απ' ευθείας την πλήρη νόσο AIDS. Οι περιπτώσεις αυτές αφορούν βρέφη που έφεραν την μόλυνση από την μητέρα. Δεν ανέπτυξαν δε αντισώματα λόγω του νεαρού της ηλικίας των όπου το ανοσοποιητικό των σύστημα είναι ακόμη ατελές.

Η μόλυνση του ανοσοποιητικού συστήματος

Η αμυντική ικανότητα του οργανισμού στις διάφορες λοιμώξεις εξασφαλίζεται από εξειδικευμένα κύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα και την λέμφο και ονομάζονται λεμφοκύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: α) τα Β λεμφοκύτταρα που παράγονται στον μυελό των οστών και β) τα Τ λεμφοκύτταρα που προέρχονται από τον θύμο.

Όταν μια ξένη ουσία (αντιγόνο) εισχωρήσει στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να απαντά σε δυο μορφές. Είτε να κυκλοφορεί ελεύθερα ή να προσληφθεί από κάποιο κύτταρο και να προβάλλει σαν αντιγόνο στην εξωτερική του κυτταρική μεμβράνη. Την εξουδετέρωση του αντιγόνου της πρώτης μορφής αναλαμβάνουν τα Β-λεμφοκύτταρα που ενεργοποιούμενα, από το ίδιο το αντιγόνο, παράχουν αντισώματα. Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες υψηλής ειδικότητας που σκοπό έχουν την δέσμευση του αντιγόνου και την μετέπειτα καταστροφή του μέσω των μακροφάγων. Η ενεργοποίηση μέσω του αντιγόνου έχει ένα επιπλέον αποτέλεσμα, την παραγωγή μνημονικών Β λεμφοκυττάρων. Αυτά "θυμούνται" το δεδομένο αντιγόνο και σε μια μεταγενέστερη μόλυνση η ανοσοαντίδραση στην παραγωγή αντισωμάτων είναι ταχύτερη.

Την εξουδετέρωση του αντιγόνου της δεύτερης μορφής αναλαμβάνουν τα Τ λεμφοκύτταρα που διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

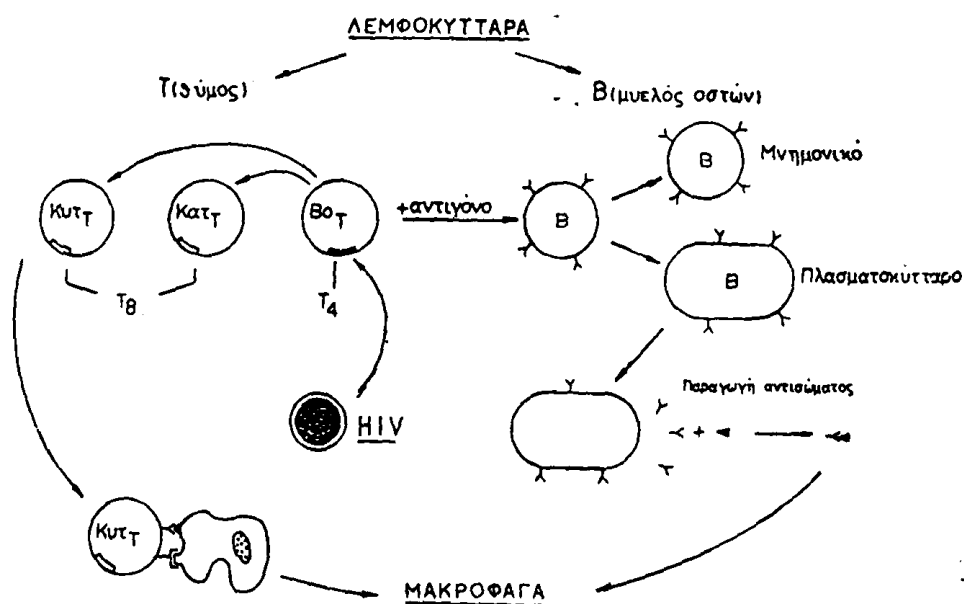


1. Τα κυτταροτοξικά (κυτ Τ) 2. Τα κατασταλτικά (κατ Τ) και 3. Τα βοηθητικά (Bo Τ).

Τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα δρουν άμεσα και είναι κατ' εξοχήν υπεύθυνα για την δέσμευση και την λύση ενός μολυσμένου κυττάρου που στην συνέχεια θα καταστραφεί από τα φαγοκύτταρα. Τα κατασταλτικά φέρουν τους απαραίτητους μηχανισμούς που χρειάζονται για την σήμανση του τέλους μιας ανοσοαντίδρασης όταν πλέον το αντιγόνο έχει εξουδετερωθεί και καταστραφεί.

Τα σημαντικότερα, από τις τρεις κατηγορίες, είναι τα βοηθητικά που παίζουν συντονιστικό ρόλο. Η αντιγονική τους ενεργοποίηση έχει σαν αποτέλεσμα την έκκριση λεμφοκινών (πρωτεΐνες) που ενεργοποιούν τόσο τα κυτταροτοξικά, για άμεση κυτταροτοξική δράση, όσο και τα κατασταλτικά για την καταστολή της ανοσοαντίδρασης. Τα βοηθητικά εκτός από την ενεργοποίηση των ομολόγων Τ λεμφοκυττάρων (κυτταροτοξικά και κατασταλτικά) ενεργοποιούν και τα Β λεμφοκύτταρα για την παραγωγή αντισωμάτων.

Τα Τ λεμφοκύτταρα μπορούν να χωρισθούν σε δυο υποομάδες ανάλογα με τις πρωτεΐνες-δείκτες που φέρουν στην εξωτερική κυτταρική τους μεμβράνη. Τα κυτταροτοξικά και κατασταλτικά φέρουν την πρωτεΐνη - δείκτη CD₈ ενώ τα βοηθητικά την CD₄.



Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HIV ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ
Σχήμα 6



Ικανή και αναγκαία συνθήκη για την μόλυνση ενός κυττάρου από ένα ιό είναι η παρουσία υποδοχέων. Οι υποδοχείς είναι πρωτεΐνες υψηλής ειδικότητας αυστηρά καθορισμένες για κάθε ιό.

Η έρευνα της δράσης του HIV στο ανοσοποιητικό σύστημα αποκάλυψε ότι ο ιός χρησιμοποιεί σαν υποδοχέα του την πρωτεΐνη CD4 και μολύνει τα CD4 T-λεμφοκύτταρα όπως και τα κύτταρα της νευρογλοίας του Κ.Ν.Σ. που εξελικτικά προέρχονται από τον μυελό των οστών και εκφράζουν και αυτά την πρωτεΐνη CD4. Τα δύο αυτά είδη κυττάρων ονομάζονται επιτρεπτικά στην μόλυνση από HIV σε αντίθεση με άλλα ανθρώπινα κύτταρα που δεν εκφράζουν την CD4 και ονομάζονται μη επιτρεπτικά.

Το 1986 ο Maddon απέδειξε ότι η πρωτεΐνη CD4 είναι ο υποδοχέας του HIV με το ακόλουθο πείραμα: Εισήγαγε με τεχνικές μεταφοράς εξωγενούς DNA το ειδικό cDNA, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη CD4, σε μη επιτρεπτικά ανθρώπινα κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά εξέφρασαν το cDNA και επομένως ανέπτυξαν στην εξωτερική τους κυτταρική μεμβράνη την πρωτεΐνη-υποδοχέα CD4. Ενώ πριν την εισαγωγή του cDNA τα κύτταρα δεν μολύνονταν, τώρα μπορούσαν να μολυνθούν από HIV που σημαίνει ότι η πρωτεΐνη CD4 αποτελεί τον ειδικό υποδοχέα του HIV.

Μετά από μελέτες αποδείχθηκε ότι η δέσμευση του HIV με την CD4 αποτελεί μια αντίδραση υψηλής χημικής συσχέτισης με σταθερά διάστασης $k_d=10^{-9}$ M που χαρακτηρίζει την μεγάλη σταθερότητα της δέσμευσης. Η δέσμευση αποτελεί το πρώτο στάδιο στην διαδικασία της μόλυνσης. Για την είσοδο όμως του ιού στο κύτταρο δύο κυρίως μοριακές διεργασίες απαιτούνται: 1. Η φωσφορύλιση του υποδοχέα και 2. η αντίδραση με την κυτταρική μεμβράνη που χαρακτηρίζεται από την σύντηξη του διλιπιδικού στρώματος της κάψας του ιού με αυτή. Η σύντηξη αυτή διευκολύνεται μέσω της ιικής γλυκοπρωτεΐνης gp41.

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο θα ακολουθήσει τον κύκλο ζωής των ρετροϊών με την προϋπόθεση ότι το κύτταρο θα ενεργοποιηθεί για τον πολλαπλασιασμό του από παράγοντες που προαναφέρθηκαν. Η μόλυνση έχει σαν σύνηθες αποτέλεσμα την δημιουργία συγκυτιωμένων κυττάρων (κύτταρα που συντήκονται και παρουσιάζουν πολλούς πυρήνες με κοινή εξωτερική κυτταρική μεμβράνη) και τελικά την λύση και καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων.

Αυτονόητο είναι ότι η απώλεια του κεντρικού ρόλου, που παίζουν τα βοηθητικά λεμφοκύτταρα (βλέπε σχήμα 6) στο ανοσοποιητικό σύστημα, αφήνει τον οργανισμό τελείως απροστάτευτο, όσον αφορά τις κάθε είδους ευκαιριακές μολύνσεις. Θα πρέπει να τονισθεί ότι ο HIV δεν σκοτώνει ένα ανθρώπινο οργανισμό απ' ευθείας. Απλώς προκαλεί ανοσοανεπάρκεια που τον αφήνει τελείως εκτεθειμένο σε τυχαίες μολύνσεις που φυσικά δεν μπορεί να καταπολεμήσει. Μολύνσεις δηλαδή που για ένα υγιές άτομο θα περνούσαν ίσως απαρατήρητες.



Μία κακοήθεια που σχετίζεται άμεσα με το AIDS είναι το σάρκωμα Kaposi. Αυτό περιγράφεται σαν μία αγγειακή κακοήθεια, πιθανόν, λεμφοενδοθηλιακής προέλευσης που πιστοποιείται από καρκινικά κύτταρα ατρακτοειδούς μορφής με χρήγορη μετάσταση στους λεμφαδένες, σπλαχνικά όργανα και δέρμα. Κλινικές παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι το σάρκωμα Kaposi ενεργοποιείται μετά από ιατρική ανοσοκαταστολή ιδίως σε περιπτώσεις νεφρικών μεταμοσχεύσεων. Η παύση όμως της ανοσοκαταστολής κάνει την ασθένεια κλινικά ελεγχόμενη. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι το σάρκωμα Kaposi μπορεί να ελεγχθεί στην πορεία της κακοήθειάς του, αν το ανοσολογικό σύστημα του ασθενούς επαναφερθεί στην φυσιολογική του κατάσταση. Έτσι η ανάπτυξη εμβολίου στον HIV θα έχει και άμεση εφαρμογή στην αντιμετώπιση του σαρκώματος Kaposi.

Ο HIV δεν προσβάλλει μόνο το ανοσοποιητικό σύστημα αλλά και τον εγκέφαλο. Οι οργανικές κακώσεις στον εγκέφαλο αναφέρονται σε φθεχμονές, μνηιχίτιδα, ανάπτυξη όγκων και λευκοεγκεφαλοπάθεια. Γενικά οι ιοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο δεν μπορούν να διαπεράσουν τον εγκέφαλο και να μολύνουν τα νευρικά κύτταρα. Ο HIV είναι ο μόνος ιός που μπορεί να προσβάλλει εγκεφαλικά κύτταρα, η δε μόλυνσή του πιστεύεται ότι γίνεται όχι άμεσα, αλλά μέσω των ήδη μολυσμένων μακροφάγων που μπορούν να μεταφερθούν εκεί με την κυκλοφορία του αίματος. Η δράση του HIV στον εγκέφαλο συνίσταται στην καταστροφή των κυττάρων της νευρογλοίας που προστατεύουν τα άλλα νευρικά κύτταρα.

Προβλήματα ανάπτυξης εμβολίου στον HIV

Κάθε ξένη ουσία, που προσβάλλει ένα οργανισμό, αντιμετωπίζεται με την φυσιολογική παραγωγή αντισωμάτων που σκοπό έχουν την ανενεργοποίηση της. Επειδή ο καλύτερος τρόπος στην αντιμετώπιση μιας ασθένειας είναι η πρόληψή της, τα εμβόλια εξυπηρετούν την λογική της προσχεδιασμένης φυσιολογικής παραγωγής αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν σε μια μελλοντική μόλυνση. Η παραγωγή αντισωμάτων ή ανοσοαντίδραση που θα προκληθεί από την πρώτη εφαρμογή του εμβολίου μπορεί να διαρκέσει αρκετά χρόνια λόγω παραγωγής μνημονικών Β-λεμφοκυττάρων και πάντα έχουμε επιτυχή αντιμετώπιση μιας μεταγενέστερης μόλυνσης.

Πολλά ιικά εμβόλια έχουν αναπτυχθεί άλλοτε με μικρή ή μεγάλη επιτυχία και απαντώνται σε τρεις κυρίως μορφές:

1. Χορήγηση τελείως ανενεργού ιού. Στην μορφή αυτή ο ιός καταστρέφεται σε βαθμό που να μην μπορεί να αναβιώσει και να μολύνει



οργανισμό. Τα αντιγόνα του όμως μπορούν να προκαλέσουν ανοσοαντίδραση. Εμβόλια αυτής της μορφής είναι της λύσσας και της πολιομυελίτιδας.

2. Χορήγηση εξασθενημένου ιού, όπου ο ιός διατηρεί την μολυσματικότητά του και την πρόκληση ανοσοαντίδρασης αλλά δεν είναι παθογόνος. Τέτοια εμβόλια χρησιμοποιήθηκαν για την ιλαρά, παρωτίτιδα και πολιομυελίτιδα.

3. Χορήγηση μιάς δομικής υπομονάδος του ιού. Είναι η πιο μοντέρνα χρησιμοποιούμενη στρατηγική μετά την ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας. Είναι γνωστό ότι δεν είναι απαραίτητο να χορηγηθούν όλα τα αντιγόνα του ιού για την πρόκληση της ανοσοαντίδρασης. Ένα εμβόλιο είναι εξ ίσου αποτελεσματικό αν είναι ικανό να προκαλέσει ανοσοαντίδραση για κάποια απαραίτητη πρωτεΐνη της ζωής του ιού. Αντισώματα κατά της πρωτεΐνης αυτής θα καταπολεμήσουν, κατά συνέπεια, και τον ίδιο τον ιό. Η μορφή αυτή εμβολίου είναι η πιο ενδεδειγμένη για τις περιπτώσεις των ρετροϊών που όπως είναι γνωστό φέρουν στο γονιδίωμά τους, μερικές φορές, ογκογονίδια. Έτσι θα ήταν επικίνδυνο να χρησιμοποιηθούν οι δυο προηγούμενες μορφές εμβολιασμού που ασφαλώς μπορεί μεν κανείς να προκαλέσει ανοσοαντίδραση πλην όμως είναι πιθανό να προκαλέσει και ογκογένεση.

Οι προσπάθειες ανάπτυξης εμβολίου για τον HIV άρχισαν το 1984 και τα περισσότερα εμβόλια αν και ακόμη είναι υπό δοκιμασία, φαίνονται αναποτελεσματικά μέχρι σήμερα.

Η ιστορία των επιδημιών δείχνει ότι όταν ένας μολυσμένος πηθυσμός φθάσει σε υψηλά επίπεδα θνησιμότητας (όπως τώρα στις ΗΠΑ, όπου το 43% των μολυσμένων πεθαίνει) τότε ωρισμένα άτομα μπορούν να ξεπεράσουν την μόλυνση και να επιζήσουν. Πράγματι αυτό συμβαίνει και σήμερα όπου στην Βαλτιμόρη από τα 1000 άτομα, που βρέθηκαν θετικά για HIV, 3 αυτή την στιγμή παρουσιάζονται αρνητικά και παραμένουν έτσι για τουλάχιστον 3 μήνες. Αυτό σημαίνει ότι στα άτομα αυτά η ενεργός μόλυνση παύει να υπάρχει γιατί έχει ήδη προκληθεί αποτελεσματική ανοσοαντίδραση και είναι πλέον άνοσα. Πιθανόν όμως τα άτομα αυτά είχαν μολυνθεί από κάποιο εξασθετισμένο στέλεχος και όχι από τον τυπικό ιό HIV. Αυτό βέβαια αφήνει ανοιχτή την δυνατότητα χρήσης εξασθετισμένων ιών HIV για την κατασκευή εμβολίου. Μια τέτοια στρατηγική όμως παρουσιάζει δυσκολίες, επιπλέον των όσων αναφέρθηκαν παραπάνω, λόγω της βασικής ιδιότητας των ρετροϊών να ανασυνδυάζονται με τους ίδιους ιούς μιάς δευτερογενούς μόλυνσης και την πιθανή παραγωγή ενεργών ιικών στελεχών. Εκτός των δυο προηγουμένως αναφερθέντων λόγων (δηλ. ογκογεννητικότητας και ανασυνδυασμού) η στρατηγική αυτή παρουσιάζει δυο επιπλέον μειονεκτήματα: 1. Τέτοια



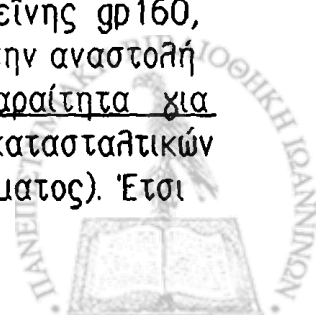
πρακτική δεν έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για ρετροϊούς και 2. η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ιού δεν είναι εύκολη λόγω του ότι ο ιός πολλαπλασιάζεται πολύ αργά αλλά και εμπεριέχει υψηλό βαθμό επικινδυνότητας.

Παίρνοντας το παράδειγμα κατασκευής του εμβολίου έναντι μιας υπομονάδος του ιού της ηπατίτιδας Β, οι ερευνητές προσπαθούν να αναπτύξουν ένα εμβόλιο έναντι του πρωτεΐνης - αντιχόνου gp160 (gp=γλυκοπρωτεΐνη) που είναι η πρωτεΐνη της εξωτερικής επιφάνειας της κάψας του ιού η οποία διακρίνεται σε δυο υπομονάδες την gp120 και gp41. Το μεγάλο πρόβλημα όμως εδώ είναι ότι η πρωτεΐνη gp120 παρουσιάζει μεγάλη πολυμορφικότητα που ανέρχεται στο 25% στα αμινοξέα που την αποτελούν μεταξύ των ιικών στελεχών που μέχρι τώρα έχουν απομονωθεί.

Η πολυμορφικότητα αυτή εντοπίζεται σε μια περιοχή περίπου 18 αμινοξέων που φαίνεται ότι αλλάζει περισσότερο αλλά είναι και ο περισσότερο ανοσογεννητικός επίτοπος (Επίτοπος είναι μια περιοχή αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη που δίνει καλύτερη ανοσοαντίδραση σε σχέση με παρακειμένες περιοχές). Πιθανόν η πολλαπλή κατασκευή εμβολίων για πολλούς πιθανούς συνδυασμούς, αυτών των 18 αμινοξέων, να δώσει ένα αποτελεσματικό εμβόλιο.

Η ανάπτυξη εμβολίου σε ένα συγκεκριμένο συνδυασμό αμινοξέων μπορεί να εκχυμονεί έναν επιπλέον κίνδυνο. Είναι γνωστό ότι ένα αντίσωμα μπορεί να προκαλέσει την ανερχοποίηση ενός αντιχόνου ή την καταστροφή ενός μόλυσμένου κυττάρου πηλόν όμως μπορεί να ενεργοποιήσει τα μακροφάγα και μονοκύτταρα που είναι το μέρος όπου καταστρέφονται μερικοί ιοί. Η μόλυνση όμως των μακροφάγων / μονοκυττάρων θα μπορούσε να προκαλέσει την μεταφορά του HIV σε άλλα όργανα του σώματος όπως τον μυελό των οστών και τον εγκεφαλο. Αυτός σε πιστεύεται να είναι και ο μηχανισμός μόλυνσης του εγκεφάλου που σε άλλες περιπτώσεις δεν θα μπορούσε να συμβεί.

Όσον αφορά την ανάπτυξη εμβολίου έναντι της gp160 υπάρχουν δύο επιπλέον δυσκολίες 1. η πρωτεΐνη gp160 παρουσιάζει μερική αμινοξική ομοιότητα με την κατηγορία II των ανθρωπίνων λεμφοκυτταρικών αντιχόνων (HLA-II) που απαντώνται στην επιφάνεια πολλών κυττάρων του ανθρωπίνου οργανισμού. Έτσι η ανάπτυξη αντισωμάτων στην gp160 θα μπορούσε να επαχάξει αυτοανοσία. Δηλαδή αντισώματα που θα "καταπολεμούν" τα κύτταρα του ίδιου του οργανισμού όπως στην περίπτωση της αυτοανοσίας του συστηματικού ερυθματώδη λύκου (Lupus erythematosus) και 2. Από πειράματα που έχουν γίνει με την υπομονάδα gp41, της πρωτεΐνης gp160, φαίνεται ότι η χρησιμοποίησή της σαν εμβόλιο να προκαλεί την αναστολή πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων (που είναι απαραίτητα για ανοσοαντίδραση) μέσω της ενεργοποίησης των κατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων (βλέπε μόλυνση του ανοσοποιητικού συστήματος). Έτσι



η χρησιμοποίηση του μορίου της gp160 σαν εμβολίου θα μπορούσε να καθυστερήσει ή και να εμποδίσει την παραγωγή αντισωμάτων.

Εκτός των δυσκολιών που παρουσιάζει η πρωτεΐνη gp160, ένα επιπρόσθετο πρόβλημα παρουσιάζει και μια ιδιότητα του ιού να "κρύβεται" σε κυτταροπλασματικές κρύπτες-"τσέπες" χωρίς να προδίδει την αντιγονική του παρουσία έναντι ενός αποτελεσματικού αντισώματος.

Η ελπίδα για την κατασκευή εμβολίου δεν έχει εκλείψει. Εκείνο όμως που κάνει εμφανή την απουσία του είναι η απουσία ενός ζώου-μοντέλου για την δοκιμασία υποψηφίων εμβολίων. Μερικά εργαστήρια χρησιμοποιούν χιμπατζήδες, που και αυτοί προσβάλλονται από HIV, αλλά η αντικειμενική δυσκολία είναι προφανής. Το, 1988, απομονώθηκε ένας παρόμοιος ιός HIV που όμως προσβάλλει αποκλειστικά και μόνον γάτες και ονομάζεται FIV, η δε ανάλογη ασθένεια FAIDS (F=feline=γατίσιος). Το σύστημα της γάτας θα μπορούσε να προσφέρει αρκετή πληροφορία στην μελέτη του FIV αλλά κυρίως στην δοκιμασία εμβολίων που με την σειρά τους θα δώσουν την κατεύθυνση κατασκευής εμβολίου έναντι του HIV.

Αν και σήμερα δοκιμάζονται πιθανά εμβόλια, οι άμεσες ανάγκες θεραπείας του AIDS, ώθησαν την χρήση πιθανών φαρμάκων που είχαν σχεδιασθεί για άλλες περιπτώσεις κακοηθειών. Την μεγαλύτερη δράση παρουσιάζει το AZT που είναι αντικαρκινικό φάρμακο και το μοναδικό μέχρι σήμερα με θετικά κλινικά αποτελέσματα. Η ακριβής του δράση δεν είναι γνωστή αλλά χρησιμοποιείται λόγω του ότι επιφέρει επιβράδυνση στην εμφάνιση της νόσου παρότι παρουσιάζει κάποια σχετική τοξικότητα. Ένα άλλο φάρμακο με παρόμοια δομή είναι η δις-δεοξυκυτοσίνη που παρουσιάζει μικρότερη τοξικότητα αλλά ακόμη δεν είναι σε κλινική χρήση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. AIDS A Basic Guide for Clinicians, Edited by Ebbesen-Biggar-Melbye 1th Edition, 1984 Munksgaard, Copenhagen.
2. AIDS- Special issue, Scientific American, October 1988.
3. Harold Varmus. 1988. Regulation of HIV and HTLV gene expression (Review), Genes and Development (2), 1055-1062.
4. Bryan Cullen and Warner Greene, 1989, Regulatory Pathways Governing HIV -1 Replication (Minireview), Cell(58), 423-426.
5. Mc Cune J.M. HIV-1: The infective process In vivo. (Review) Cell 64: 351-363, 1991.





Τυπώθηκε στο Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο
με δαπάνη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ
Τυπογραφείο

Διανέμεται Δωρεάν στους φοιτητές.





ΕΚΤΥΠΩΣΗ
Τυπογραφείο
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

