

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Έδρα Γενικής Βιολογίας
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Γ. Ν. ΠΑΓΟΥΛΑΤΟΣ

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ

Γ. Παγουλάτος, M. D., Ph. D.

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000345350

S71.6
ΠΑΓ
Τ.2



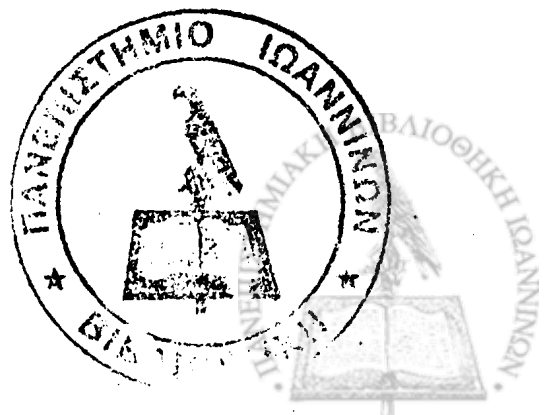
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Έδρα Γενικής Βιολογίας
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Γ. Ν. ΠΑΓΟΥΛΑΤΟΣ

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ

Γ. Παγουλάτος, M. D., Ph. D.

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
Γ. Παπαθανάσης &
ΔΩΡΕΑ: Μ. Ν. Γαλιάνου
ΑΡ. ΕΙΣ.: 9946/2013



ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΩΝ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ

ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ

ΣΑΝ ΜΗΤΡΕΣ

Μέχρι τώρα είδαμε ένα μεγάλο μέρος των πρωτοπλασματικών συστατικών του κυττάρου και είδαμε πώς λειτουργούν, κυρίως στις μεταβολικές εργασίες του κυττάρου. Είδαμε την μεγάλη αξία ωρισμένων πρωτεϊνών, των ένζυμων, που χρησιμεύουν για να μεταβάλλουν είτε διά διασπάσεων είτε διά συνθέσεων όλα τα μικρά μόρια που υπεισέρχονται στο μεταβολισμό του κυττάρου.

Υπάρχουν ορισμένα μυστικά κλειδιά της ζωής ύλης που είναι :

1ον/ Η ύπαρξη μεμβρανών ώστε να απομονώνονται από το περιβάλλον και να βρίσκονται μαζεμένες σε μεγάλη συγκέντρωση οι βιολογικές ουσίες.

2ον/ Η χορήγηση ενέργειας από τον ήλιο και από την τροφή για να γίνουν οι αντιδράσεις του κυττάρου.

3ον/ Η ύπαρξη των ένζυμων για τις κατάλληλες αντιδράσεις του κυττάρου.

Σε όλες αυτές τις διεργασίες υπεισέρχονται οι πρωτεΐνες και γεννάται τώρα το ερώτημα πώς τα μόρια των πρωτεϊνών δημιουργούνται. Αυτό αποτελεί το τέταρτο μυστικό κλειδί της ζωής ύλης. Όπως θα δούμε παρακάτω η σύνθεση των πρωτεϊνών δεν ακολουθεί τους κανόνες συνθέσεως των άλλων μικρών μορίων. Για να δούμε πώς παράγονται οι πρωτεΐνες θα πρέπει να ρίξουμε μία σύντομη ματιά στο πώς είναι κατασκευασμένες. Οι πρωτεΐνες είναι πολύ πολύπλοκα μόρια. Δημιουργούνται



διά συνενώσεως μεταξύ τῶν 20 διαφορετικῶν δομικῶν λίθων πού ὀνομάζονται ἀμινοξέα. Δύο προβλήματα τῶν πρωτεϊνῶν ἀφοροῦν τόν χημικό πού τίς παρατηρεῖ

1ον/ πώς ἐνώνονται τά ἀμινοξέα

2ον/ πώς καθορίζεται ἡ σειρά τῶν ἀμινοξέων μέσα σέ κάθε μόριο πρωτεΐνης.

Ἡ πρώτη πρωτεΐνη πού ἀναλύθηκε πλήρως καί εὐρέθη καί ἡ σειρά τῶν ἀμινοξέων της τό 1953 εἶναι ἡ ἰνσουλίνη, περιέχει 51 ἀμινοξέα. Τελευταίως μέ τήν ἀνάπτυξη καλλιτέρων τεχνικῶν γιά τήν εὐρεση τῆς ἀλληλουχίας τῶν ἀμινοξέων στίς πρωτεΐνες ἕνας σχετικά σημαντικός ἀριθμός πρωτεϊνῶν εἶναι γνωστός ὅσον ἀφορᾷ τήν πρωτοδιάταξή τους. Οἱ πρωτεΐνες ὅμως ἐκτός ἀπό τήν πρωτοδιάταξή τους ἔχουν καί μία διάταξη στόν χῶρο πού ὀνομάζεται τρισδιάστατη δομή ἢ στερεοδιάταξη. Κυρίως ἀπό τήν στερεοδιάταξη αὐτή ἐξαρτᾶται ἡ λειτουργία κάθε πρωτεΐνης. Ἡ στερεοδιάταξη ὀφείλεται στό ὅτι ὁ πολυπεπτιδικός σκελετός (δηλαδή ἡ διά τοῦ πεπτιδικοῦ δεσμοῦ συνένωση τῶν διαφόρων ἀμινοξέων) δέν εἶναι ἀκαμπτος ἀλλά ἀντίθετα ἐπιτρέπει μία κινητικότητα στά ἀμινοξέα πού συνδέει, καθώς καί τήν περιστροφή τους γύρω ἀπό τόν δεσμό. Ἡ στερεοδιάταξη μιᾶς πρωτεΐνης εἶναι μοναδική καί ὀφείλεται στήν τάση πού ἔχουν τά διαφόρα ἀμινοξέα νά πτύσσονται καί νά δημιουργοῦν μεταξύ τους ἀσθενεῖς χημικούς δεσμούς. Ἡ ἐξέταση τῶν πρωτεϊνῶν μέ τήν μέθοδο τῆς περιθλάσεως ἀκτίνων X ἀπέδειξε ὅτι πράγματι κάθε πρωτεΐνη ἔχει πάντοτε τήν ἴδια στερεοδιάταξη. Ἡ τρισδιάστατος δομή τῆς μυοσφαιρίνης ἔχει βρεθεῖ διά τῆς χρήσεως αὐτῆς τῆς μεθόδου.

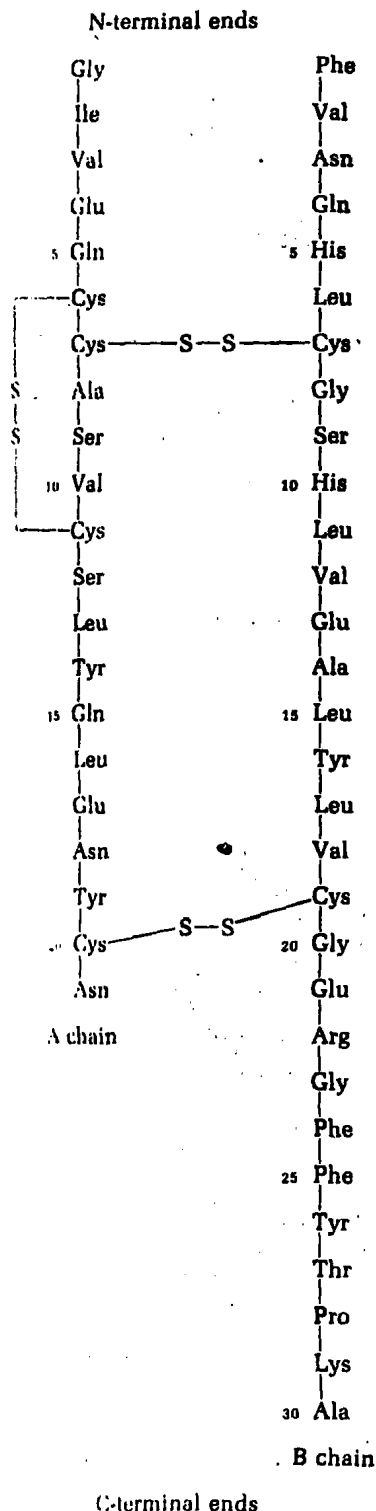


1.- Πρωτοταγής δομή

Πολλές πρωτεΐνες περιέχουν μόνον μία πολυπεπτιδική αλυσίδα άλλες περιέχουν περισσότερες της μιᾶς ὅπως π.χ. ἡ αἱμοσφαιρίνη πού περιέχει τέσσαρες μέ ἓνα τελικό μοριακό βάρος 64500 Mw. Ἡ ἀλληλουχία τῶν ἀμινοξέων καί ὁ ἀριθμός τῶν πολυπεπτιδικῶν ἀλύσεων ἀποτελεῖ τήν πρωτοταγή δομή τῆς πρωτεΐνης (εἰκόνα 113)

(εἰκόνα 113)

The amino acid sequence of bovine insulin and the positions of the —S—S— cross-links.

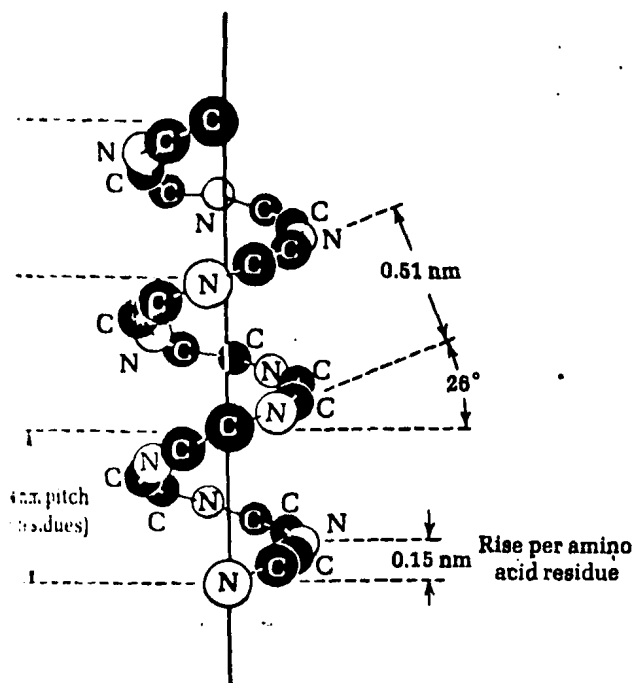


Έκτός από περισσότερες πολυπεπτιδικές αλύσεις μία πρωτεΐνη μπορεί να περιέχει και μία προσθετική ομάδα κατάλληλα διατεταγμένη στο μόριό της (π.χ. αιμοσφαιρίνη, κυτοχρώματα κλπ.) Η προσθετική ομάδα στην αιμοσφαιρίνη, κυτοχρώματα και μυοσφαιρίνη καλεϊται αίμη και ένώνεται με τό O_2 . Οι προσθετικές ομάδες πολλές φορές δέν έχουν τίς ίδιες ιδιότητες όταν είναι ελεύθερες και όταν είναι συνδεδεμένες στην πρωτεΐνη π.χ. ή αίμη συμπεριφέρεται διαφορετικά πρός τό όξυγόνο δηλαδή συνδέει τό O_2 μόνιμα ενώ ή αιμοσφαιρίνη μπορεί να τό αποδώσει.

2.- Δευτεροταγής δομή

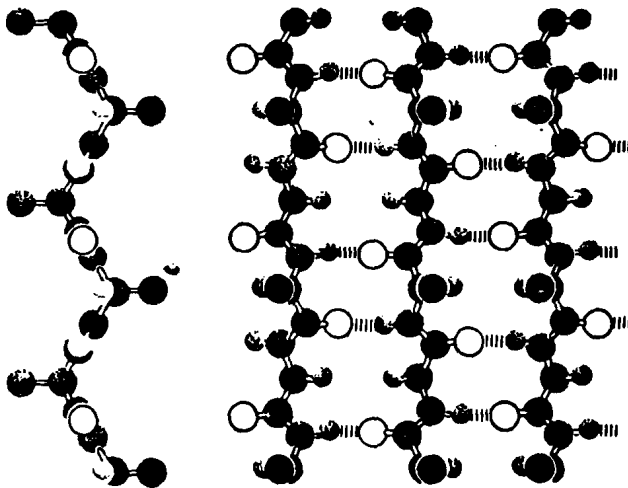
Ό όρος δευτεροταγής δομή μιās πρωτεΐνης άναφέρεται σέ μία όμαλή διαμόρφωση τοῦ πολυπεπτιδικοῦ σκελετοῦ τῆς πρωτεΐνης. Η πιο σημαντική όμαλή διαμόρφωση δημιουργεϊται με δεσμούς ύδρογόνου μεταξύ τών άμινοξέων τοῦ μορίου τῆς πρωτεΐνης και όνομάζεται α-έλιξ (εϊκόνα 114)

(εϊκόνα 114)



Υπάρχει όμως ένιστε δυνατότης νά υπάρχουν δεσμοί καί μεταξύ υδρογόνων δύο διαφορετικῶν πολυπεπτιδικῶν αλύσεων καί ἔχουμε τότε τήν β δομή πού παρατηρεῖται σέ ὀρισμένες πρωτεΐνες π.χ. στήν μέταξα (εἰκόνα 115)

(εἰκόνα 115)



An example of extended polypeptide chains held together in sheets by hydrogen bonds (β configuration). (Redrawn from L. Pauling, *The Nature of the Chemical Bond*, 3rd ed., Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y., p. 501, with permission.)

3.- Τριτοταγῆς δομή

Ἀντίθετα μέ τήν δευτερογενή δομή πού ἔχει μία ὁμοιομορφία ἡ τριτογενῆς δομή εἶναι τελείως ἀκανόνιστος καί δημιουργεῖται διότι ἡ πολυπεπτιδική ἀλυσίδα πτυχοῦται καί δημιουργεῖ ἀσθενεῖς δεσμούς μεταξύ τῶν ἀμινοξέων τοῦ μορίου οἱ ὁποῖοι θερμοδυναμικά εἶναι οἱ πῶ κατάλληλοι. Τελικῶς μικρό τμήμα μιᾶς πρωτεΐνης ἢ καί καθόλου παρουσιάζει τήν α ἔλινα. Πολλοί λόγοι ὑπεισέρονται γιά νά μήν ἀκολουθεῖται στήν πτύχωση ἡ α-ἔλιξ.

1ον/ τό ἀμινοξύ προλίνη δέν φέρει ἀμινοομάδα καί στά σημεία πού ὑπάρχει προλίνη ἡ α ἔλιξ καταστρέφεται.



2ον/ Ἡ ὑπαρξης σουφλιδριλοομάδων τῆς κυστεΐνης καί κυστίνης δημιουργεῖ μέ ἄλλες τέτοιου εἴδους ὁμάδες δεσμούς S-S ὁπότε ἡ ἔλιξ χαλάει σ' αὐτά τὰ σημεῖα.

3ον/ Ὁ κυριότερος λόγος ὀφείλεται στήν ὑπαρξη τῶν πλευρικῶν ἀλύσεων τῶν ἀμινοξέων πού καθένα ἔχει τήν τάση νά δημιουργήσει τοὺς πιό εὐνοϊκοὺς ἐνεργειακὰ δεσμούς (π.χ. τὸ ὑδροξύλιο τῆς τυροσίνης πρέπει νά φτιάξει ἓνα δεσμό ὑδρογόνου καί δέν θά μπορούσε νά τόν κάνει ἂν βρισκότανε δίπλα στήν ἰσολευκίνη π.χ.).

4ον/ Τέλος ὑπάρχουν πλευρικές ἀλυσίδες τῶν ἀμινοξέων πού ἄλλες εἶναι ὑδρόφιλες καί ἄλλες ὑδρόφοβες, αὐτό τίς ἀναγκάζει νά πέρνουν θέση πρὸς τὸ ἐσωτερικό ἢ τὸ ἐξωτερικό τμήμα τοῦ μορίου.

Γιὰ ὅλους αὐτοὺς τοὺς λόγους ἡ στερεοδιάταξη κάθε πρωτεΐνης εἶναι ἀκατανόητος, μοναδική καί εἰδική ἐξαρτᾶται δέ τελείως ἀπὸ τὴν πρωτογενή δομή δηλαδή τὴν εἰδική γιὰ κάθε ^{πρωτεΐνη} ἀλληλοδιαδοχή ἀμινοξέων. Αὐτὸ ἀποδεικνύεται καί πειραματικῶς, διὰ ἀποδιατάξεως μέ θερμότητα ἢ ἄλλα μὴ φυσιολογικά μέσα τῆς στερεοδιατάξεως τῆς πρωτεΐνης, ἡ ἐπάνοδος σέ φυσιολογικὸ περιβάλλον, κάνει τὴν πρωτεΐνη νά ξαναπάρει τὴν πρωταρχική της διάταξη καί νά ξανάβρει τὴν φυσιολογική της λειτουργία, πού χάνεται ὅταν τὰ πολυπεπτίδια τῆς πρωτεΐνης βρίσκονται στήν ἀποδιαταχθεῖσα μορφή (εἰκόνα 116)

Στὶς περισσότερες περιπτώσεις ὅταν μία πρωτεΐνη ὑποστῇ ἀποδιάταξη (denaturation) καί μετὰ ἐπανεέλθῃ στήν πρωταρχική της μορφή ὄχι μόνον οἱ ἀσθενεῖς δεσμοὶ μεταξὺ τῶν τμη-



(εἰκόνα 116)

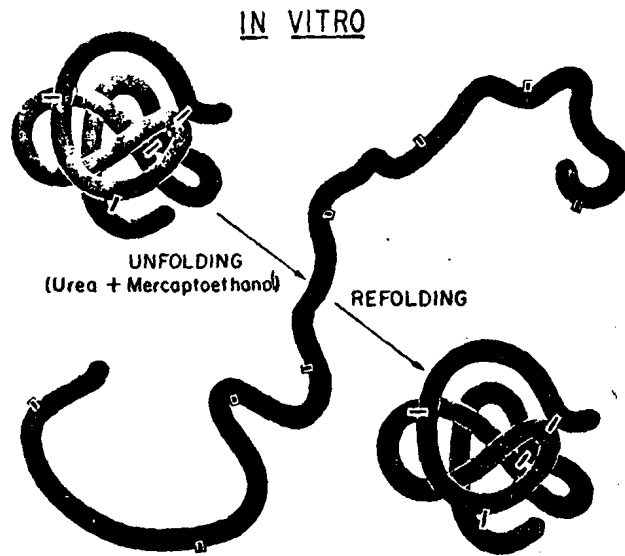


FIGURE 2. Model system for studying the conversion of a linear polypeptide chain to a folded protein. A native protein, with intramolecular disulfide bonds, is reduced and unfolded with β -mercaptoethanol and 8 M urea. After removal of these reagents, the reduced protein is allowed to undergo spontaneous refolding and reoxidation.

μάτων της ξαναγίνονται αλλά και οι γέφυρες του θείου δηλαδή οι δεσμοί S-S που είναι ισχυροί δεσμοί επανέρχονται στην προτέρα τους θέση. Το πείραμα έγινε με ένα ένζυμο την ριβονουκλεάση. Το ένζυμο αυτό περιέχει 124 αμινοξέα και 4 γέφυρες θείου S-S. Εάν επιδράσουμε με ένα αναγωγικό μέσο όπως η β-μερκαπτο^αθανόλη και σε περιβάλλον 8 μοριακής ούριας τότε το ένζυμο υφίσταται πλήρη αποδιάταξη. Απομάκρυνσις της ούριας και μερκαπτοαιθανόλης ξαναφέρει το ένζυμο στην παλιά του διαμόρφωση με πλήρη ένζυματική ενέργεια. Πολύ σπάνια οι γέφυρες θείου νά μην σχηματισθοῦν στην φυσιολογική τους θέση. Εξ αὐτῶν συμπεραίνουμε ότι οι γέφυρες αυτές δέν ἔχουν καμία επίδραση πάνω στην στερεοδιάταξη ἑνός μορίου πρωτεΐνης, ἀπλῶς ἐνισχύουν τήν κατάλληλη στερεοδιάταξη πού ὀφείλεται στούς ἀσθενεῖς δεσμούς μεταξύ τῶν πλευρικῶν ἀλύσεων τῶν ἀμινοξέων. Σάν συμπέρασμα βγαίνει ὅτι ἡ πρωτοδιάταξη δηλαδή ἡ ἀλλουχία τῶν ἀμινοξέων μιᾶς πρωτεΐνης καθορίζει καί τήν

Καμία άλλη πληροφορία δέν υπάρχει μέσα στην πρωτεΐνη εκτός από την πληροφορία της πρωτοδιατάξεως. Τό έρώτημα πού τίθεται λοιπόν είναι πώς καθορίζεται ή πρωτοδιάταξη αυτή. Τό έρώτημα αυτό στο χημικό επίπεδο είναι διπλό.

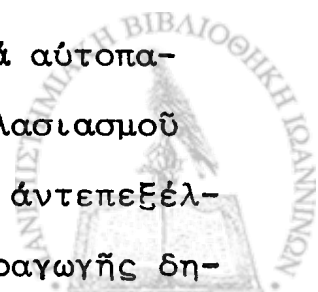
1ον/ πώς ένώνονται τά άμινοξέα μεταξύ τους

2ον/ πώς καθορίζεται ή τοποθέτηση τών άμινοξέων σέ μία είδική γιά την κάθε πρωτεΐνη σειρά.

Τό πρώτο πρόβλημα είναι σχετικά άσήμαντο σέ σχέση μέ τό δεύτερο γιατί γνωρίζουμε πώς τά άμινοξέα έχουν σαν μόρια ένα κοινό τμήμα τό όποϊον χρησιμεύει γιά νά γίνη ή ένωση μεταξύ τους δηλαδή ό πεπτιδικός δεσμός ό όποϊος είναι κοινός γιά όλες τίς πρωτεΐνες. Δηλαδή ένα ή λίγα μόνον ένζυμα είναι άρκετά γιά νά τόν φτιάξουν.

Τό δεύτερο πρόβλημα είναι καί τό βασικό πρόβλημα της πρωτεϊνοσυνθέσεως. 'Η τοποθέτηση τών άμινοξέων στην σειρά τους δέν μπορεί νά γίνει μέ την χρησιμοποίηση ένζύμων πού τό καθένα θά είναι είδικό γιά κάθε άμινοξύ της πρωτεΐνης γιατί στην περίπτωση αυτή θά χρειαζόντουσαν τόσα ένζυμα όσα καί τά άμινοξέα κάθε πρωτεΐνης καί έφ'όσον καί τά ένζυμα είναι πρωτεΐνες θά μπαίναμε σέ ένα "κακοήθη κύκλο". Για νά γίνει λοιπόν ή καθορισμένη τοποθέτηση χρειάζεται ένα καλούπι, μία μήτρα, πού νά λέει σέ κάθε άμινοξύ πού νά τοποθετηθεϊ καί τότε ένα ένζυμο κοινό γιά όλες τίς πρωτεΐνες θά μπορούσε νά κάνει τόν πεπτιδικό δεσμό.

Συγχρόνως θά πρέπει τά καλούπια αυτά νά μπορούν νά αυτοπα-
ραχθοϋν δηλαδή νά έχουν την ικανότητα τοϋ αυτοδιπλασιασμοϋ
γιά νά αναπαράγουν νέα όμοια καλούπια καί έτσι νά άντεπεξέλ-
θουν στην άπαίτηση της κληρονομικότητας, της άν παραγωγής δη-



λαδή από κύτταρο σέ κύτταρο καί από οργανισμό σέ οργανισμό.

Ἡ ὕπαρξη ἐπομένως πρωτεϊνῶν προϋποθέτει καί τήν ὕπαρξη εἰδικῶν μορίων πού δροῦν σάν μῆτρες. Οἱ μῆτρες αὐτές θά πρέπει νά εἶναι μεγαλομόρια τουλάχιστον τόσο μεγάλα ὅσο καί οἱ πρωτεΐνες πού θά παράγουν. Οἱ δυνάμεις ἀπό τήν ἄλλη μεριά πού θά πρέπει νά χρησιμοποιοῦνται γιά τήν ἔνωση τῶν διαφόρων ἀμινοξέων πάνω στίς μῆτρες δέν μπορεῖ νά εἶναι ἰσχυροί ὁμοιοπολικοί δεσμοί, θά πρέπει νά εἶναι ἀσθενέστεροι δεσμοί γιά νά ἐπιτρέπουν στά διάφορα ἀμινοξέα νά ἀφίνουν τά καλούπια τους μόλις ἐνωθοῦν μεταξύ τους ἀφίνοντας ἔτσι ἐλεύθερη τήν θέση γιά καινούργιο πολυμερισμό ἄλλου μορίου πρωτεΐνης (εἰκόνα 118).

(εἰκόνα 118)

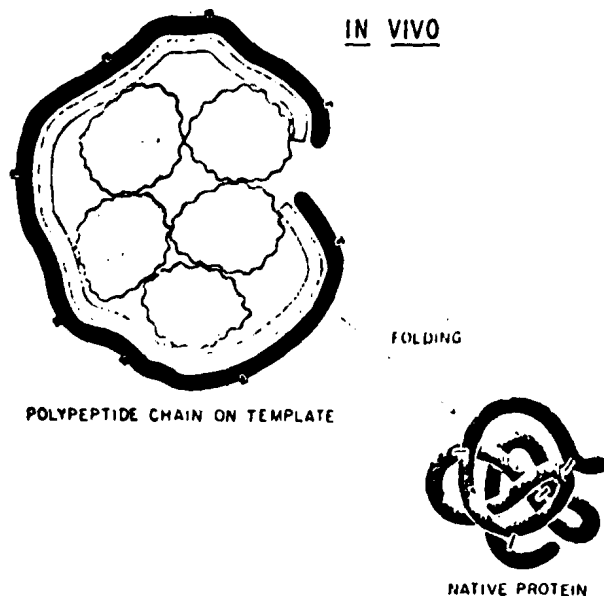


FIGURE 1. Schematic diagram of the conversion of a newly synthesized polypeptide chain to a folded "native" protein containing disulfide bonds.

Οἱ δεσμοί αὐτοί εἶναι:

- 1ον/ δεσμοί ὑδρογόνου,
- 2ον/ δεσμοί ἰονικοί καί
- 3ον/ δεσμοί Van der Waals.



Όλοι οι δεσμοί αυτοί δρούν σε πολύ μικρή απόσταση $5\text{\AA}$ ^ο άρα οι μητρες μπορούν να καθορίζουν την τάξη των μικρών μορίων μόνον όταν τα μόρια αυτά έλθουν σε στενή έπαφή με την μήτρα άρα και τα μεγέθη των έπιφανειών της μήτρας θά πρέπει να είναι της αύτης τάξεως με τα άμινοξέα πού καθορίζουν.

Τό έρώτημα πού τίθεται τώρα είναι εάν οι πρωτεΐνες θά μπορούσαν να άποτελέσουν μητρες για τον έαυτό τους. Τα πράγματα θά άπλοποιόντουσαν πολύ για την ζώσα ύλη στην περίπτωση αυτή γιατί ή πρωτεϊνική σύνθεση και ο άυτοδιπλασιαμός της μήτρας θά ήταν ένα και τό αυτό πράγμα. Η καλύτερη παρατήρηση όμως μιās πρωτεΐνης μας, λέει ότι αυτό δέν είναι δυνατόν γιατί δέν υπάρχει κανένας χημικός λόγος γιατί μία βαλίνη στην σειρά των άμινοξέων μιās πρωτεΐνης θά είχε την δυνατότητα να τραβήξει μία άλλη βαλίνη για να την βάλει στην σειρά της. Πράγματι καμία από τις προσθετικές ομάδες των άμινοξέων δέν έχει χημικούς λόγους να τραβήξει την ίδια προσθετική ομάδα του άυτου άμινοξέως.

Χρειάζεστε έπομένως να φαντασθοῦμαι μόρια πού να έχουν αντίθετες συμπληρωματικότητες για να έλκουν τό ένα τό άλλο. Άρνητικά φορτία έλκονται από αντίθετα φορτία, άτομα ύδρογόνου φτιάχνουν δεσμούς με ήλεκτροαρνητικά άτομα και δυνάμεις Van der Waals δρούν όταν υπάρχουν συμπληρωματικές έπιφάνειες πού να είσχωρουν ή μία μέσα στην άλλη.

Οι πρωτεΐνες λοιπόν δέν φαίνονται να παίζουν ούτε να έχουν την δυνατότητα να παίξουν τό ρόλο μορίων με κληρονομικές ιδιότητες. Τόν ρόλο αυτό παίζουν μόρια DNA και στο έπομενο κεφάλαιο θά έξετάσουμε με τί τρόπο λειτουργούν και με τί τρόπο κατευθύνουν την σύνθεση των πρωτεϊνών τα μόρια αυτά.

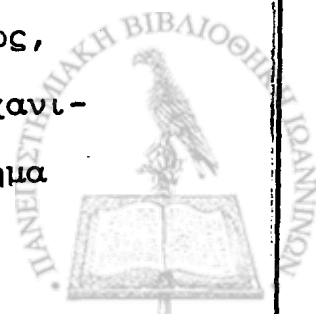
ΑΝΑΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ DNA

1.- Δεδομένα για την γενετική φύση του DNA.

Ἡ γενετική σήμερα μάς λέει ὅτι ἡ πληροφορία πού καθορίζει τήν ἀλληλουχία τῶν ἀμινοξέων στίς πρωτεΐνες βρίσκεται κωδικοποιημένη σέ μακριές ἀλύσεις ἀπό ἓνα πολυμερές μόριο τό δεσοξυριβονουκλεϊνικό ὀξύ (DNA).

Παρ' ὅλο ὅμως πού ἡ ὕπαρξη τοῦ DNA στά χρωματοσώματα εἶχε ἀναγνωρισθεῖ ἐδῶ καί 70 χρόνια, μόλις ἐδῶ καί 30 χρόνια ἀπεδείχθη ὅτι παίζει γενετικό ρόλο καί ἀκόμη μερικοί γενετισταί πίστευαν τότε ἀκόμη, ὅτι ὀρισμένες πρωτεΐνες τῶν χρωματοσωμάτων εἶχαν καί αὐτές γενετικό ρόλο.

Σήμερα βέβαια δέν ὑπάρχει καμμία ἀμφιβολία ὅσον ἀφορᾷ τόν γενετικό ρόλο τῶν νουκλεϊνικῶν ὀξέων. Αὐτό γεννάει τό ἐρώτημα πῶς τά μόρια τοῦ DNA ἀντιγράφονται ἀκριβῶς κατά τόν διπλασιασμό τῶν χρωματοσωμάτων καί πῶς ἡ πληροφορία μεταφέρεται στό μοριακό ἐπίπεδο ἀπό τό DNA στίς πρωτεΐνες. Οἱ ἐρωτήσεις αὐτές δέν μποροῦσαν νά πάρουν ἀπάντηση τό 1943 ὅταν ἀπεδείχθη ὁ γενετικός ρόλος τοῦ DNA, γιατί ἐκείνη τήν ἐποχή πολύ λίγα πράγματα γνωρίζαμε ὅσον ἀφορᾷ τήν δομή του. Συγχρόνως ἐπιστεύετο ὅτι ἡ γνώση τῆς δομῆς τοῦ DNA θά ἦτο πολύ δύσκολο νά εὑρεθεῖ καί ἀκόμη καί ἂν τό πρόβλημα αὐτό ἐλύετο δέν θά μάς ἔδινε εὐκολα τήν λύση τῆς λειτουργίας του. Εὐτυχῶς οἱ φόβοι αὐτοί ὑπῆρξαν ὑπερβολικοί καί ἀπεδείχθη ὅτι μέ τήν γνώση τῆς δομῆς τοῦ DNA τό 1953 καταλάβαμε πολύ γρήγορα ὅτι οἱ βασικοί χαρακτῆρες τῆς διπλῆς ἑλικος ἦσαν ἀπλοί. Πράγματι ἔδειξαν ἀμέσως, πῶς τό DNA διατηρεῖ τήν πληροφορία καί ὑπέδειξαν μηχανισμούς γιά τόν ἀναδιπλασιασμό του. Τό δεύτερο πρόβλημα



γιά τό πῶς δηλαδή τό DNA χρησιμεύει γιά τήν μεταφορά τῆς πληροφορίας στίς πρωτεΐνες ἐπειδή ἦταν πιά δύσκολο ἔκαμε περισσότερο χρόνο γιά νά διαλευκανθεῖ.

Ἀλλά ἄς ἔλθουμε στά πρῶτα πειράματα καί στίς πρῶτες ἐνδείξεις πού μᾶς ἔκαμαν νά πιστέψουμε ὅτι τό DNA ἀποτελεῖ τό γενετικό ὕλικό τοῦ κυττάρου.

Τό 1920 ὁ Frederick Griffith ἀνεκάλυψε τήν βακτηριακή μεταμόρφωση (bacterial transformation) πού ὑπῆρξε ἕνας ἀπό τούς κυριότερους παράγοντες πού ἔφεραν στό φῶς τόν ρόλο τοῦ DNA. Ὁ Griffith δούλευε μέ στελέχη πνευμονιοκώκων. Ἐνα στέλεχος περιεβάλλετο ἀπό περίβλημα πολυσακχαριτῶν καί ἦτο παθογόνο καί ἕνα ἄλλο δέν περιεβάλλετο ἀπό τέτοιο περίβλημα καί δέν ἦτο παθογόνο.

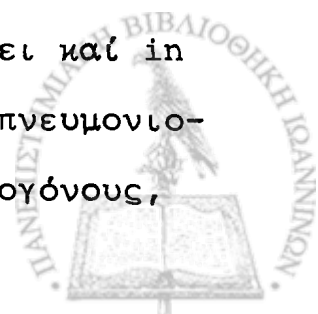
Ὁ Griffith ἔκαμε τό ἀκόλουθο πείραμα, ἐμβολίασε μία ὁμάδα ποντικῶν μέ μή παθογόνους πνευμονιοκώκους, μία ἄλλη ὁμάδα μέ παθογόνους πνευμονιοκώκους πού τούς εἶχε καταστρέψει διά θερμάνσεως καί μία τρίτη ὁμάδα μέ μή παθογόνους καί μέ ἀνενεργούς θερμανθέντας παθογόνους.

Παρατήρησε ὅτι ἐνῶ οἱ δύο πρῶτες ὁμάδες δέν ἔπαθαν τίποτα ἡ τρίτη ὁμάδα παρουσίασε σοβαρά σηψαιμία.

Ὁ Griffith ἀπεμόνωσε ἀπό τά ποντίκια αὐτά παθογόνους πνευμονιοκώκους πού ἔφεραν πολυσακχαριδικό περίβλημα.

Ἄρα κάποιο στοιχεῖο ἀπό τούς ἀνενεργούς παθογόνους πνευμονιοκώκους μπόρεσε νά μεταφέρει τήν πληροφορία γιά τό πολυσακχαριδικό περίβλημα στούς ζωντανούς μή παθογόνους μέσα στόν ὀργανισμό τῶν ποντικῶν, εἰκόνα (119).

Τό σημαντικό ἦτο ὅτι τό πείραμα μποροῦσε νά γίνει καί *in vitro*. Δηλαδή ὅταν ἀναμειγνύονταν μή παθογόνοι πνευμονιοκώκοι μέ ὁμοιογεννοιοποιημένους ἀνενεργούς παθογόνους,



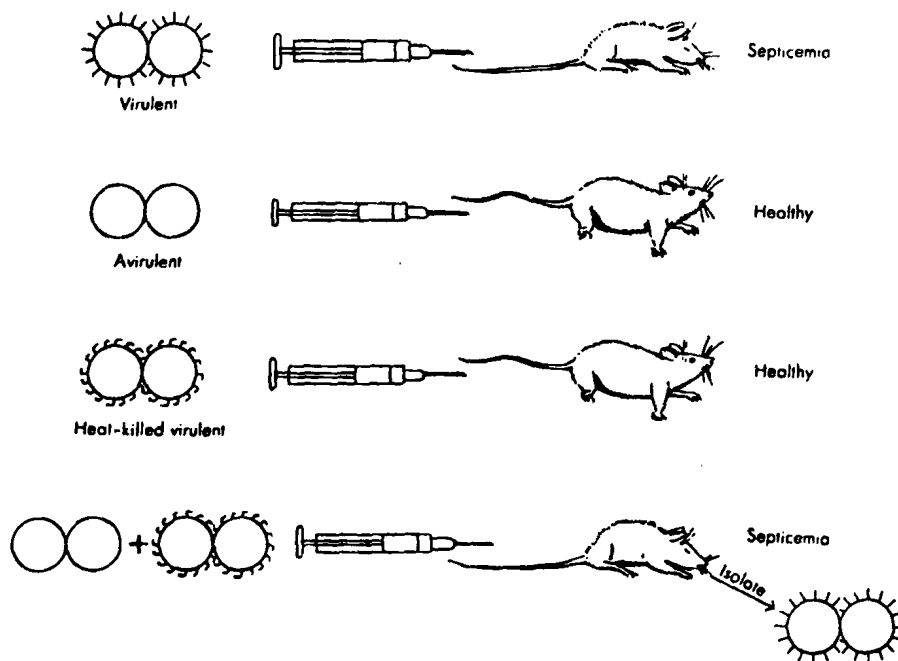


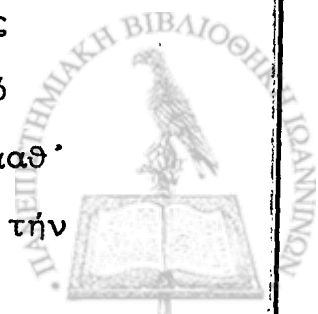
Fig. 2.1. Bacterial transformation in living animals (in vivo). Avirulent cells and heat-killed virulent cells interact in the mouse to produce living virulent cells. This figure is based on Fig. 5 in David M. Bonner's *Heredity* (Prentice-Hall, 1961).

(εικόνα 119)

ώρισμένοι παθογόνοι με περίβλημα από πολυσακχαρίτες παρουσιάζονται στις καλλιέργειες. Αύτη υπήρξε η ανακάλυψη της βακτηριακής μεταμορφώσεως (bacterial transformation).

Τό 1944 οι Avery, MacLeod και McCarty ανέκοίνωσαν τα αποτελέσματα 10 ετών εργασίας τους πάνω στην ανάλυση του μηχανισμού της βακτηριακής μεταμορφώσεως. Έχώρισαν τα ομοιογεννοιοποιημένα μικρόβια σε διάφορα χημικά συστατικά και παρατήρησαν ότι μόνον τό DNA ήτο ικανό να μεταφέρει την πληροφορία για την δημιουργία του παθογόνου περιβλήματος εκ πολυσακχαριτών των πνευμονιοκόκκων (εικόνα 120) :

Δύο υποθέσεις εδόθησαν είτε ότι τό DNA ήτο ένα είδος μεταλοξογόνου ουσίας που μετέτρεπε τό γενετικό υλικό των μη παθογόνων πνευμονιοκόκκων είτε ότι ήτο αυτό καθ' έαυτό τό γενετικό υλικό των κυττάρων. Έπειδή ακόμη την



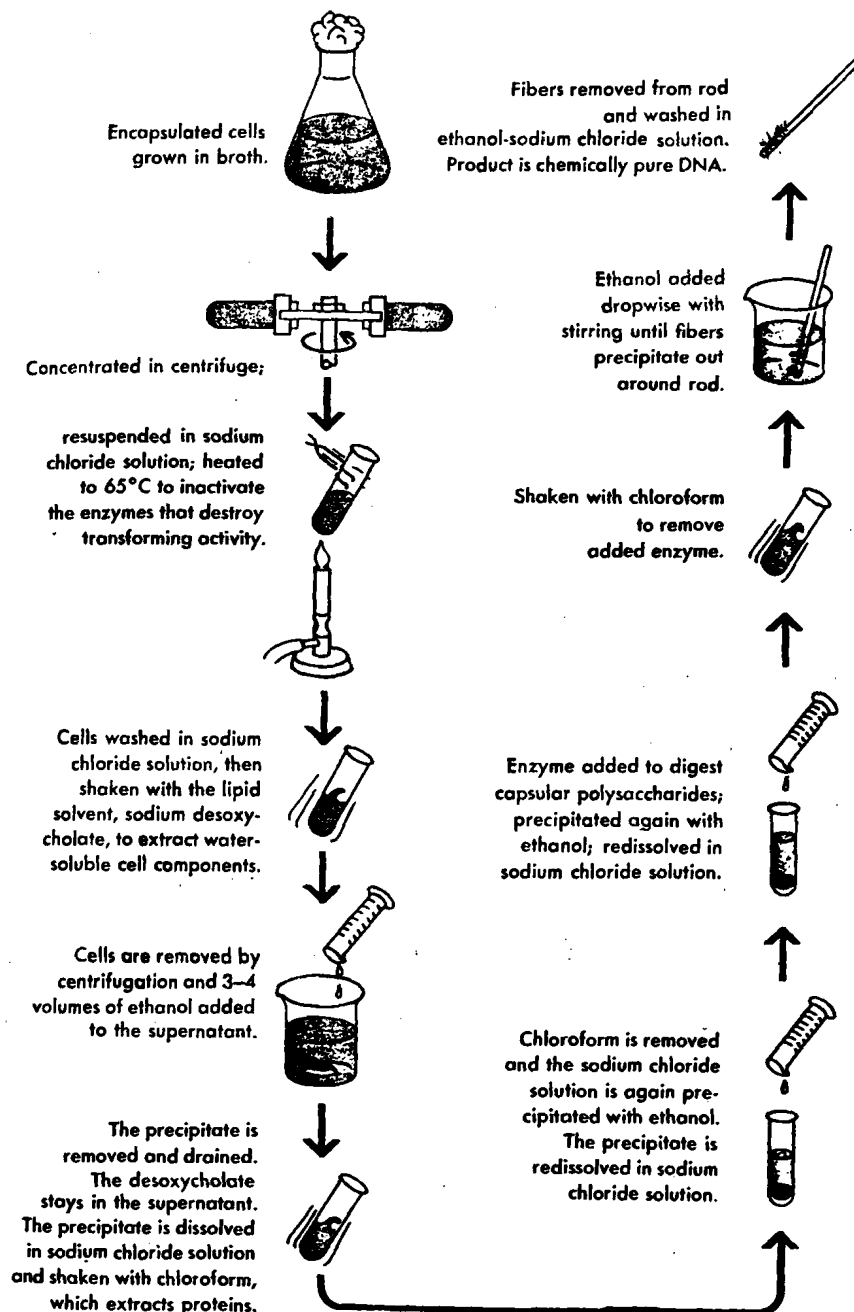


Figure 9-2
The chemical method used in the original isolation of a chemically pure transforming agent. [Redrawn from F. W. Stahl, *The Mechanics of Inheritance*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1964, Fig. 2.3, with permission.]

(εἰκόνα 120)

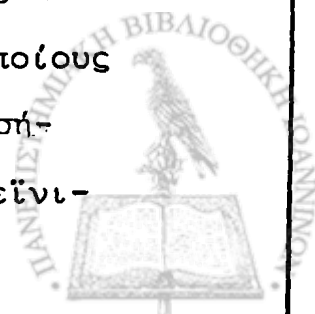
ἐποχή ἐκείνη ἐπιστεύετο ἀπὸ τὸν περισσότερον ἐπιστημονι-
κὸ κόσμον πὼς οἱ πρωτεΐνες ἦσαν τὸ γενετικὸ ὕλικο τοῦ



κυττάρου ή ανακάλυψη του Avery δέν έγινε δεκτή μέ μεγάλο ένθουσιασμό. Χρειάσθηκαν λοιπόν καί άλλες ένδείξεις για νά αλλάξει ή γνώμη τών έπιστημόνων.

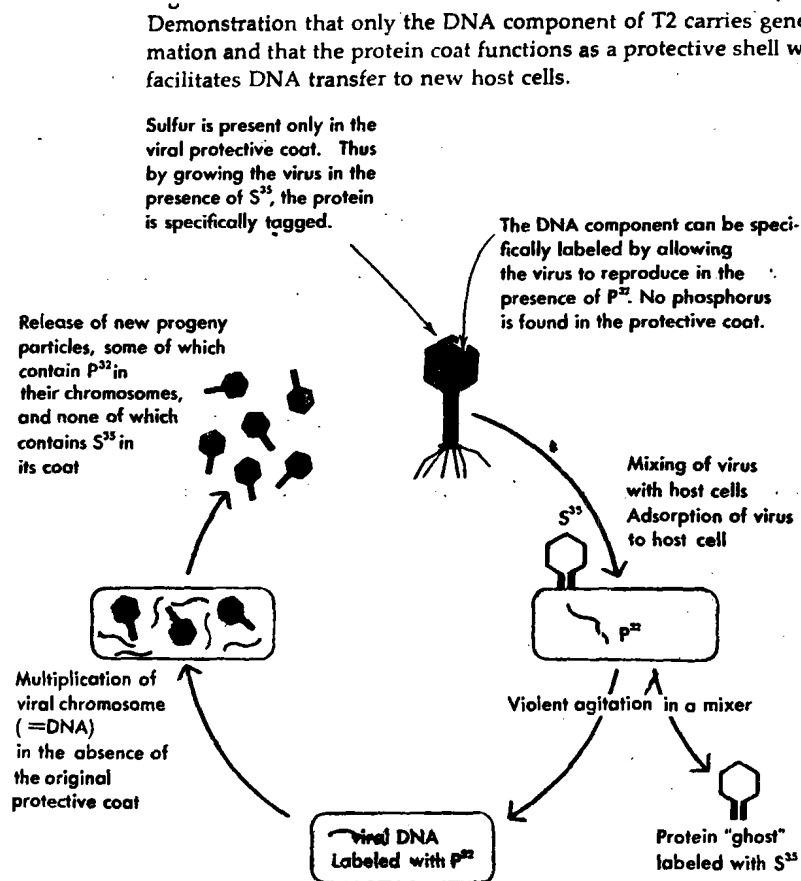
Όρισμένες ένδείξεις προέρχονταν από τήν μελέτη τών χρωματοσωμάτων. Μία σημαντική απόδειξη προήλθε από τήν μελέτη τής χημικής συστάσεως τών χρωματοσωμάτων. Άπεδείχθη ότι τό DNA ύπήρχε πάντοτε στόν πυρήνα του κυττάρου καί δέν ύπήρχε ποτέ όταν δέν ύπήρχαν χρωματοσώματα. Επίσης τό ποσόν του DNA στά διπλοειδικά κύτταρα ήταν διπλάσιο από ότι στά άπλοειδικά όπως είναι τά κύτταρα του σπέρματος. Τέλος τό DNA είναι ένα σταθερό μόριο δέν παράγεται καί δέν καταστρέφεται όπως άλλα μόρια του κυττάρου, ή σταθερότης δέ αυτή είναι άπαραίτητη για ένα μόριο μέ κληρονομικές ιδιότητες π.χ. όταν ένα ισότοπο εισέρχεται στό DNA παραμένει, δείχνοντας τήν μεταβολική σταθερότητα του μορίου.

Μία άλλη σημαντική ένδειξη προήλθε από πειράματα που έγιναν μέ λούς καί κυρίως μέ λούς μικροβίων δηλαδή μέ βακτηριοφάγους. Γύρω στά 1950 οι Hershey καί Chase μελετούσαν τόν τρόπο ανάπτυξεως τών λών τών βακτηριδίων δηλαδή τών βακτηριοφάγων μέσα στά βακτηρίδια. Έδούλευαν μέ τόν φάγο T₂ που αναπτύσσεται στό κολοβακτηρίδιο. Ο φάγος αυτός αποτελείται περίπου από 50% πρωτεΐνες καί από 50% νουκλεϊνικών όξυ (DNA). Οι Hershey καί Chase προσπάθησαν νά δοϋν πώς αναπτύσσεται ο βακτηριοφάγος αυτός στά κολοβακτηρίδια. Παρασκεύασαν φάγους τούς όποιους ίχνηθέτησαν χρησιμοποιώντας μεθειονίνη S³⁵ για τήν σήμανση τών πρωτεϊνών καί P³² για τήν σήμανση τών νουκλεϊνι-



κῶν ὀξεῶν δηλαδή τοῦ DNA.

Ὅταν ἔβαλαν τέτοιους φάγους σέ ἐπαφή μέ κολοβακτηρίδια παρετήρησαν ὅτι μόνον ὁ P^{32} εἰσέρχεται στό βακτηρίδιο ἐνῶ 90% τῶν πρωτεϊνῶν ἔμεναν ἀπ' ἔξω πάνω στήν ἐπιφάνεια τοῦ βακτηριδίου (εἰκόνα 121). Αὐτό ἀπεδείχθη γιατί



(εἰκόνα 121)

ἐάν ἀνακοινοῦσαν ἰσχυρῶς τά βακτηρίδια ὅλη σχεδόν ἡ ραδιενέργεια τοῦ S^{35} ἔφευγε ἀπό τά βακτηρίδια καί μόνον ὁ P^{32} παρέμενε. Ἄρα στούς φάγους αὐτούς μόνον τό DNA εἰσέρχεται στό βακτηρίδιο καί παρ' ὅλα αὐτά μετά ἀπό μικρό χρονικό διάστημα, 20 περίπου λεπτά, τό βακτηρίδιο σπάει καί ἕνας μεγάλος ἀριθμός καινούργιων φάγων ἐλευθερώνεται. Τό πείραμα αὐτό ἔδειχνε μέ πολύ καθαρό τρόπο ὅτι τό γενετικό ὕλικό τοῦ φάγου εἶναι τό DNA γιατί μόνο του εἰσερχόμενο στό βακτηρίδιο μπορεῖ νά παράγει τίς πρωτεΐνες τοῦ φάγου.

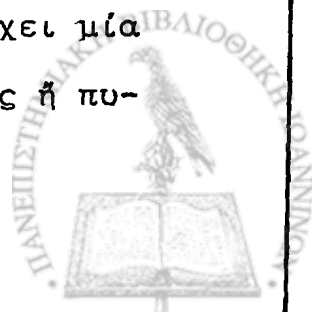


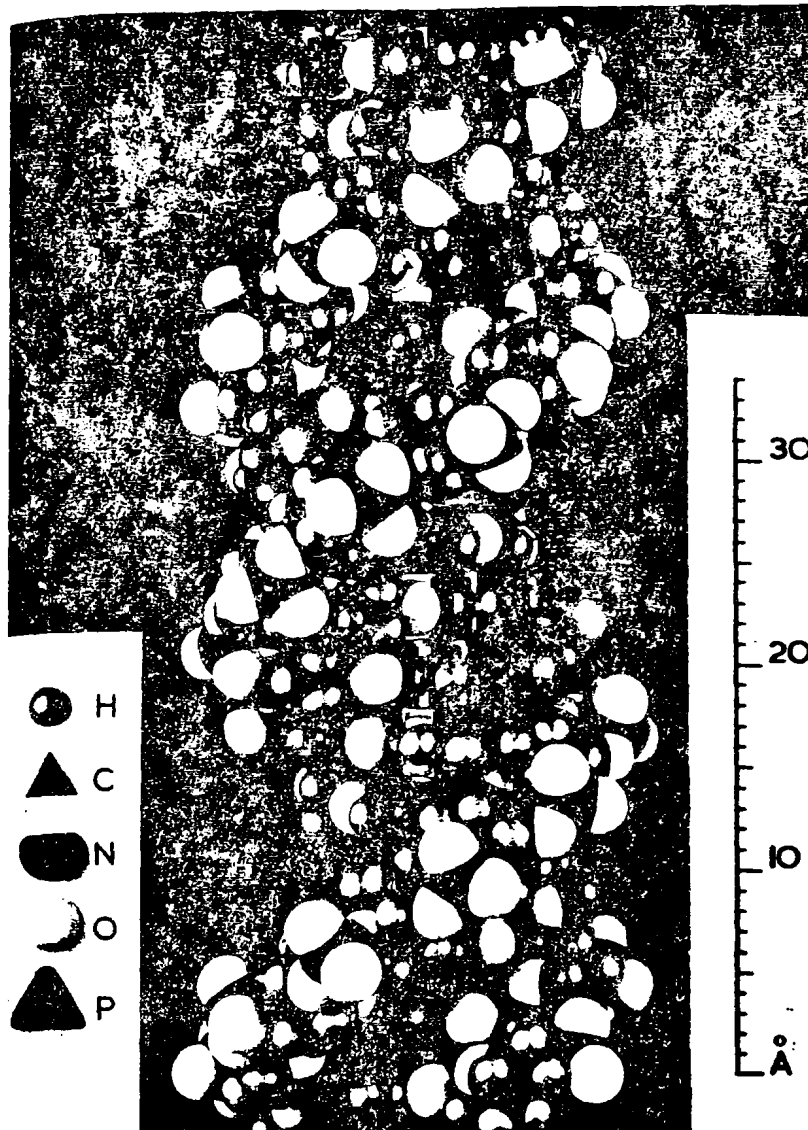
Σήμερα μέ ὀρισμένους ιούς εὐκαρυωτικῶν κυττάρων μποροῦ-
με νά κάνουμε ἕνα παρόμοιο πείραμα, π.χ. μποροῦμε νά πα-
ρασκευάσουμε καθαρό DNA ἀπό τόν λόν τοῦ πολυώματος (ἐνός
καρκινογόνου ιοῦ) καί νά βάλουμε τό DNA αὐτό σέ ἐπαφή μέ
εὐαίσθητα κύτταρα (permissive cells). Ἐνας καρκινογόνος
ιός μπορεῖ νά συμπεριφέρεται εἴτε σάν λυτικός ιός (lytic
infection) γιά τά κύτταρα ἐνός εἶδους ζώου εἴτε σάν καρ-
κινογόνος γιά τά κύτταρα ἄλλου εἶδους (abortive infection).
Τό DNA εἰσερχόμενο σέ εὐαίσθητα κύτταρα (permissive cells)
μετά μερικές μέρες ἀναπτύσσετε καταστρέφοντας τά κύτταρα καί
ἐλευθερώνοντας νέους ιούς (lytic infection). Ἄρα οἱ πρωτεΐ-
νες δέν χρησιμεύουν στούς ιούς παρά γιά νά προφυλάσσουν τό
γενετικό ὕλικό τους χωρίς νά ἔχουν καμμία γενετική λειτουρ-
γία.

2.- Δομή τοῦ μορίου τοῦ DNA

Ὁ σπουδαιότερος χαρακτήρας τοῦ μορίου τοῦ DNA εἶναι ὅτι συ-
νήθως ἀποτελεῖται ἀπό δύο συμπληρωματικές πολυμερεῖς ἀλυσί-
δες οἱ ὁποῖες ἐλίσσονται μεταξύ τους ὑπό τήν μορφή μιᾶς κα-
νονικῆς διπλῆς ἑλικος. Ἡ διάμετρος τῆς ἑλικος αὐτῆς εἶναι
περίπου $20\text{\AA}$. Κάθε ἀλυσίδα εἶναι ἕνα πολυνουκλεοτίδιο στό ὁ-
ποῖο τό σάκχαρο κάθε νουκλεοτιδίου εἶναι ἐνωμένο διά μέσου
μιᾶς φωσφορικής ὁμάδος μέ τό σάκχαρο τοῦ ἐπομένου νουκλεοτι-
δίου. Ὑπάρχουν 10 νουκλεοτίδια σέ κάθε ἄλυσσος γιά κάθε στροφῇ
τῆς ἑλικος δηλαδή γιά κάθε $34\text{\AA}$. Ἡ ἀπόσταση ἄρα μεταξύ κά-
θε νουκλεοτιδίου εἶναι $3,4\text{\AA}$ (εἰκόνα 122).

Ὑπάρχουν τέσσερα κύρια νουκλεοτίδια, καθένα δέ περιέχει μία
δεσοξυριβόζη μία φωσφορική ὁμάδα καί μία βάση πουρίνης ἢ πυ-
ριμιδίνης. Ὑπάρχουν δύο πυριμιδίνες, ἡ θυμίνη





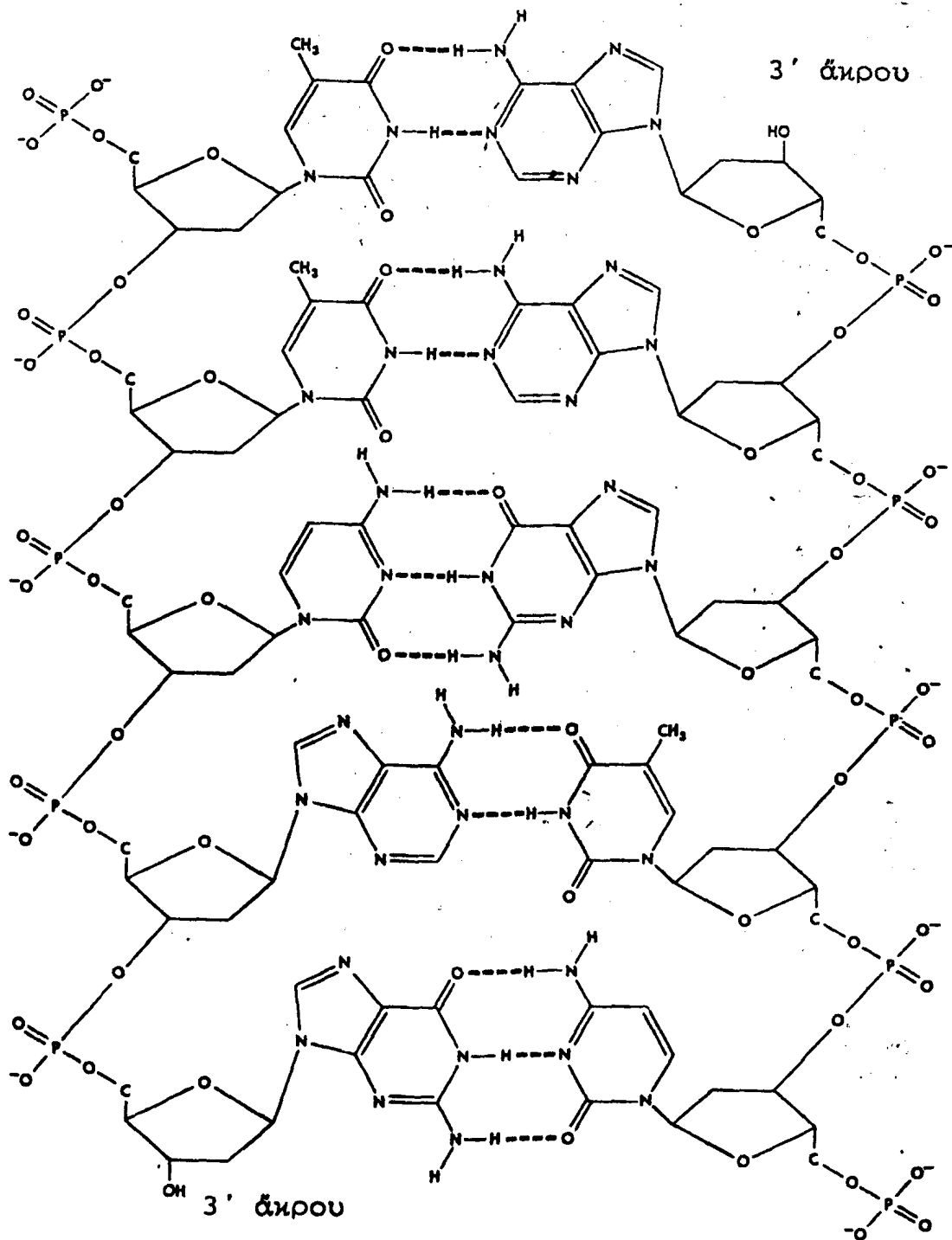
A space-filling model of double-helical DNA. The size of the circles reflects the van der Waals radii of the different atoms.
[Courtesy of M. H. F. Wilkins.]

(εἰκόνα 122)

καί ἡ κυτοσίνη καί δύο πουρίνες ἡ ἀδενίνη καί ἡ
Εἰς τήν πολυνουκλεοτιδική ἀλυσίδα τό σάκχαρο κα
σφορος ἀποτελοῦν μία ἔνωση πού ἐπαναλαμβάνεται
ἴδια καί ἀποτελεῖ ἓνα κανονικό χημικό σκελετό (

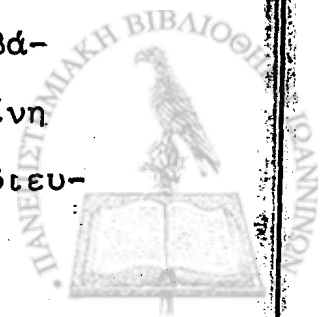
Ἀντίθετα ἡ τάξις τῶν πουρινικῶν καί πυριμιδικῶ
κατά μήκος τῆς ἀλύσεως εἶναι τελείως διάφορη κα
σέ κάθε μόριο. Τόσον οἱ πυριμιδικές ὅσον καί οἱ
κές βάσεις εἶναι ἐπίπεδες, σχετικά ὑδρόφοβες κα





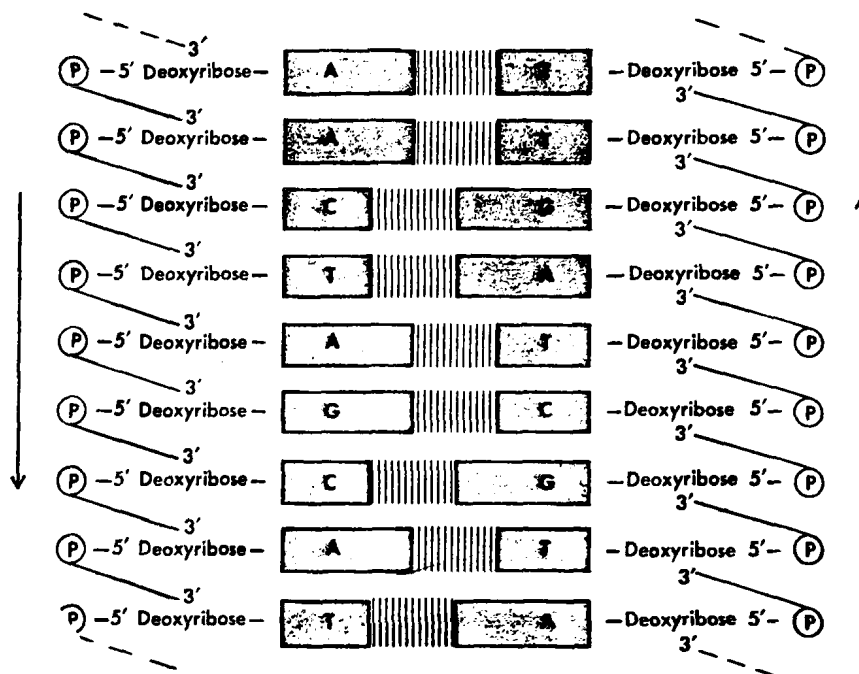
(εικόνα 123)

νά είναι τοποθετημένες ή μία πάνω στην άλλη κάθετες προς την κατεύθυνση του έλικοειδούς άξονος και προς τό έσωτερικό του μορίου, οι δύο άλυσίδες είναι ένωμένες μεταξύ τους μέ δεσμούς υδρογόνου πού σχηματίζονται ανάμεσα σέ ζευγάρια από βάσεις. Ή άδενίνη βρίσκεται πάντοτε άπέναντι στην θυμίνη και ή κυτοσίνη άπέναντι στην γουανίνη. Μόνο αύτή ή διευ-



θέτηση τῶν βάσεων εἶναι δυνατή διότι ἀλλιῶς δύο πουρί-
νες θά ἔπιαναν πολύ θέση καί δύο πυριμιδίνες ἡ μία ἀπέ-
ναντι στήν ἄλλη θά ἔπιαναν πολύ λίγη θέση γιά νά ἐπιτρέ-
ψουν μία κανονική ἐλικοειδή μορφή στό μόριο τοῦ DNA.

(εἰκόνα 124)

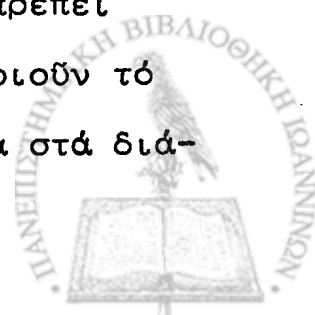


(εἰκόνα 124)

Ἔτσι ἂν στήν μία ἀλυσίδα ἔχουμε τήν ἀλληλοδιαδοχή
A T G T C στήν ἄλλη ἀλυσίδα ἀναγκαστικά θά ἔχουμε
T A C A G.

Ἐνα στερεοχημικό ἀποτέλεσμα τοῦ σχηματισμοῦ τῶν ζευγῶν
A-T καί G-C εἶναι ὅτι οἱ δύο πολυνουκλεοτιδικές ἀλύσεις
ἔχουν ἐκ διαμέτρου ἀντίθετες κατευθύνσεις. Ἔτσι ἂν ἡ
ἐλιξ γυρίση κατά 180° φαίνεται νά εἶναι ἡ ἴδια.

Σέ ἀντίθεση μέ τά ποιλίκα A/T καί G/C τά ὁποία πρέπει
πάντοτε νά ἰσοῦνται μέ τήν μονάδα γιά νά ἱκανοποιοῦν τό
ζευγάρωμα τῶν βάσεων ὑπάρχει μία μεγάλη ποικιλία στά διά-



φορα DNA όσον άφορά τό ποιλίκον $\frac{A+T}{G+C}$. Τά άνώτερα φυτά καί ζώα έχουν όλα παραπάνω A+T από ότι G+C αντίθετα οί ίοί καί τά βακτηρίδια έχουν μεγαλύτερη ποικιλία στόν λόγο αυτό καί υπάρχουν ύψηλά καί χαμηλά A+T. Οί διαφορές αυτές δέν είναι τυχαίες καί ταξινομικώς όργανισμοί πού μοιάζουν μεταξύ τους έχουν καί παραπλήσια ποιλίκα $\frac{A+T}{G+C}$

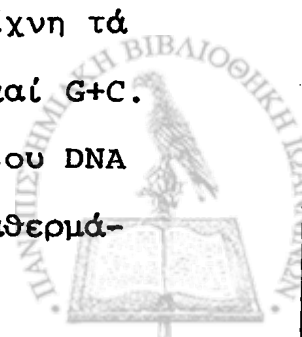
Όταν μόρια DNA θερμανθοϋν πλησίον τών 100° τότε οί γέφυρες ύδρογόνου σπάνε καί οί συμπληρωματικές άλυσίδες χωρίζουν (άποδιάταξη DNA-denaturation).

Μόρια DNA πού περιέχουν ύψηλά G+C είναι περισσότερο άνθεκτικά στήν θερμική τήξη ένω τά πλούσια σέ A+T DNA χωρίζουν τίς άλύσεις τους εύκολότερα κατώπιν θερμάνσεως.

Ό λόγος γιά τόν όποϊον συμβάλνει αυτό είναι ότι τά ζεύγη G+C κρατοϋνται μεταξύ τους μέ 3 γέφυρες ύδρογόνου καί χρειάζονται ύψηλότερη θερμοκρασία γιά νά σπάσουν, γι' αυτό μόρια DNA μέ ύψηλή περιεκτικότητα σέ G+C άποδιατάσσονται σέ ύψηλότερη θερμοκρασία από πλούσια σέ A+T DNA μόρια.

Σέ ένδιάμεσες θερμοκρασίες τά τμήματα ενός μορίου πού είναι πλούσια σέ A+T άνοίγουν ένω παραμένουν ένωμένα τμήματα πλούσια σέ G+C. Αυτό γίνεται όταν τά μόρια βρεθοϋν παρουσία όρισμένων ούσιών πού άποσταθεροποιοϋν τήν διπλή έλικά όπως ή φορμαμίδη ή άλκαλικό περιβάλλον. Δημιουργείται τότε τό φαινόμενο τό όποϊο όνομάζουμε μερική άποδιάταξη πού χρησιμεύει γιά τήν δημιουργία ενός χάρτη άποδιάταξεως τών μορίων τοϋ DNA. Ό χάρτης αυτός μάς δείχνη τά σημεία τοϋ μορίου πού είναι πλούσια σέ ζεύγη A+T καί G+C.

Άκόμη καί ή όλική άποδιάταξη τών έλίκων ενός μορίου DNA δέν είναι ένα φαινόμενο μή άντιστρεπτό. Όταν ξαναθερμά-



νουμε τὰ μόρια τοῦ DNA οἱ δύο ἀλυσίδες ξαναβρίσκονται με-
ταξύ τους καί τὰ μόρια ξαναδημιουργοῦνται. Πολλές φορές
μπορεῖ νά ἀποδιατάξουμε δύο μόρια DNA ἀπό διαφορετικά εἶ-
δη π.χ. ποντικός καί ἄνθρωπος καί νά τὰ ἀφήσουμε νά ξανα-
δημιουργηθοῦν, τότε σχηματίζονται πολλές φορές ὑβρίδια.

Ὁ βαθμός σχηματισμοῦ τέτοιων ὑβριδίων καί ἡ τελειότης
τους δείχνει τόν βαθμό συγγενείας μεταξύ τῶν δύο αὐτῶν ὁρ-
γανισμῶν.

Ἡ δυνατότης τήν ὁποία ἔχουν οἱ συμπληρωματικές ἀλυσίδες
DNA νά ἀποδιατάσσονται καί νά ξαναβρίσκουν τήν φυσιολογι-
κή τους διάταξη σέ κατάλληλες συνθήκες μᾶς δείχνει ὅτι ὁ
ἀναδιπλασιασμός τοῦ DNA μπορεῖ εὐκολά νά γίνεται μέ τόν
ἴδιο τρόπο δηλαδή μέ τό ἀνοιγμα τῶν ἀλύσεων σέ κάποιο ση-
μεῖο καί τήν δημιουργία συμπληρωματικῶν ἀλύσεων κατόπιν
συνθέσεως σέ κάθε κλῶνον. Δέν χρειάζεται ἐπομένως καμμία
συμπληρωματική εἰδική μήτρα γιά τήν ἀναπαραγωγή τοῦ DNA
καί κάθε ἀλυσίδα του, ἀποτελεῖ μήτρα γιά τήν σύνθεση τῆς
συμπληρωματικῆς της.

Ἐπομένως τό DNA φέρνει μέσα στήν δομή του τόν ἴδιο τό
μηχανισμό τῆς ἀκριβοῦς ἀναπαραγωγῆς του.

Ἡ δυνατότητα λάθους στό ζευγάρωμα τῶν βάσεων εἶναι πολύ
μικρή καί ἔχει ὑπολογισθεῖ ὅτι μόνον 10^{-8} πιθανότητες ὑ-
πάρχουν γιά μία βάση νά μὴν ἐνωθεῖ μέ τήν σωστή της ἀντί-
στοιχο βάση.

Τό ὅτι γιά τήν σύνθεση τοῦ DNA δέν χρειάζεται παρά μόνον
τό καλούπι τῆς συμπληρωματικῆς ἀλυσίδας DNA καί ἓνα ἐν-
ζυμο ἡ DNA πολυμεράση βγαίνει καί ἀπό πειράματα συνθέ-
σεως DNA in vitro. Τέτοια πειράματα ἔγιναν καί δέν ὑπει-
σέρονται ἄλλες πρωτεΐνες γιά τήν σύνθεση τῆς διπλῆς ἔλι-
κος.

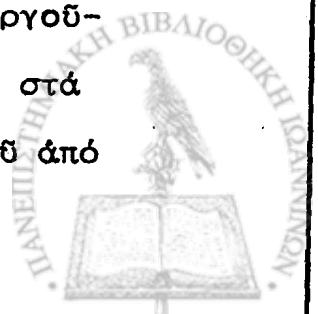


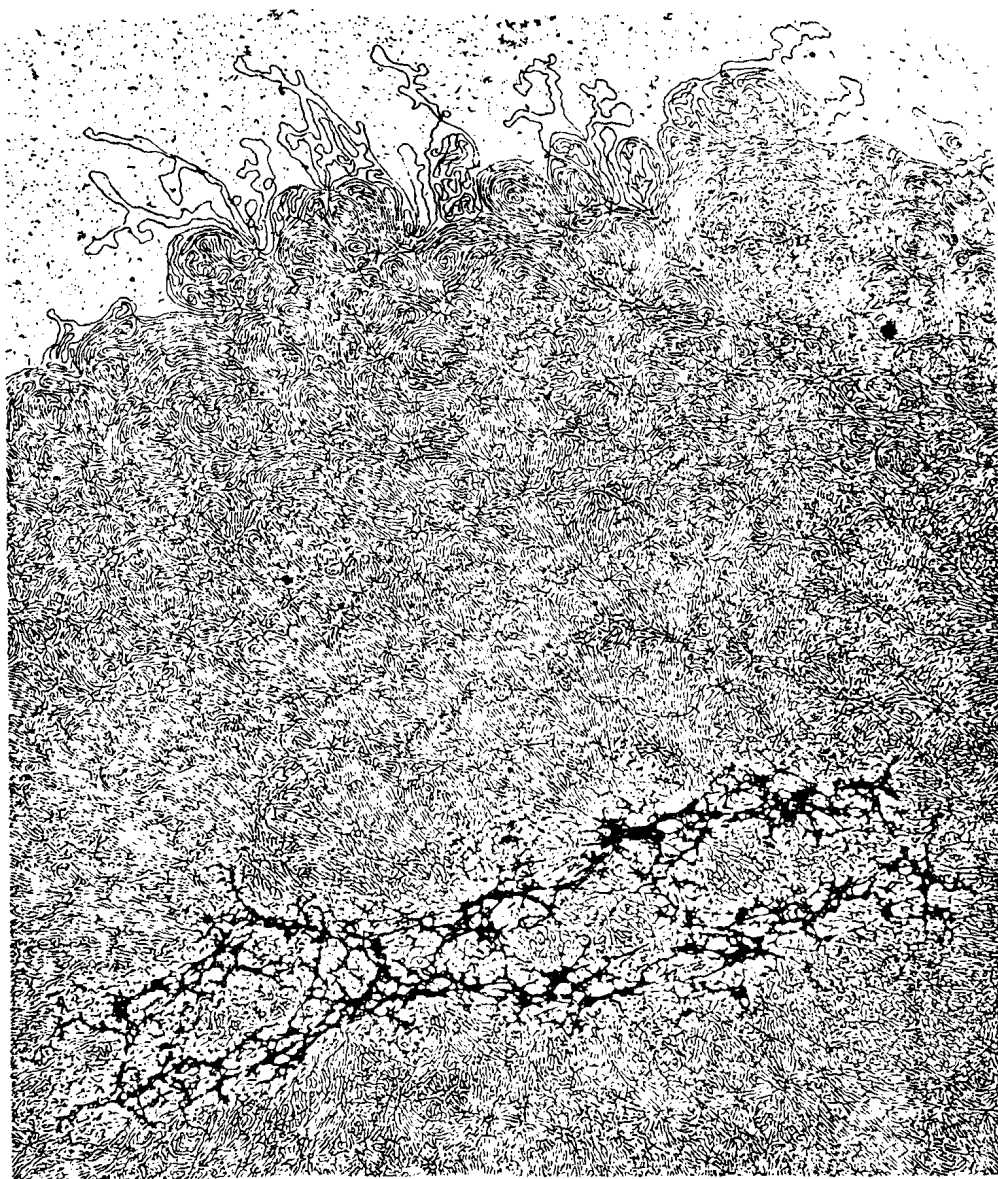
3.- Μέγεθος, σχήμα και οργάνωση τών μορίων του DNA.

Στήν αρχή νομίζαμε ότι τό μέγεθος του DNA ήταν σχετικά περιορισμένο π.χ. περίπου 10^6 Mw ανάλογα μέ τό μέγεθος ενός γόνου όπως μπορεί νά υπολογισθεῖ από τό μέγεθος τών πρωτεϊνών. Όταν οἱ τεχνικές ἀπομονώσεως του DNA ἔγιναν καλλίτερες, ἀπεδείχθη ὅτι τό DNA εἶναι πολύ μεγάλο μόριο καί ὅτι τουλάχιστον γιά τούς ἰούς καί τά βακτηρίδια τό DNA ἀποτελεῖται ἀπό ἕνα μοναδικό μόριο π.χ. τό DNA του μικροῦ εὐκαρυωτικοῦ ἰοῦ SV₄₀ ἔχει μέγεθος 3×10^6 ἐνῶ τό μόριο του φάγου T₂ $1,2 \times 10^8$. Τό μοριακό βάρος του DNA τῆς E.coli εἶναι 2×10^9 . Δέν ξέρουμε ἀκόμη πόσα μόρια DNA ὑπάρχουν στό χρωματόσωμα τών ἀνωτέρων κυττάρων ἀλλά πρόσφατες ἐργασίες δείχνουν πώς καί ἐκεῖ τό DNA κάθε χρωματοσώματος ἀποτελεῖται ἀπό ἕνα μοναδικό μόριο.

Ἡ εἰκόνα (125) δείχνη τήν πολύπλοκον δομή τών χρωματωμάτων του ἀνθρώπου ὅπου πολλά εἶδη πρωτεϊνών ὑπεισέρονται στήν δομή τους.

Ἀρχικῶς νομίζαμε πώς ὅλα τά μόρια DNA εἶναι γραμμικά ὅταν ὅμως μπορέσαμε νά παρασκευάσουμε DNA χωρίς σπασίματα τών ἀλύσεων ἀπεδείχθη πώς μερικά ἀπό αὐτά ἦσαν κυκλικά μόρια. Αὐτό συμβαίνει σέ πολλούς ἰούς καί ἀκόμη στά περισσότερα βακτηρίδια. Τά κυκλικά μόρια του DNA εἶναι συνήθως περιτυλιγμένα γύρω ἀπό τόν ἑαυτό τους γιά νά σχηματίσουν ὑπερέλικες (supercoils). Οἱ ὑπερέλικες αὐτές εἶναι τό ἀποτέλεσμα μιᾶς μεταβολῆς στόν μέσο ἀριθμό ζευγῶν νουκλεοτιδίων κατά περιστροφή τῆς ἑλικος καί δημιουργοῦνται ὅταν οἱ πρωτεΐνες πού βρίσκονται ἐνωμένες πάνω στά χρωματοσώματα ἀφαιρεθοῦν, κατά τήν παρασκευή καθαροῦ ἀπό





(είκονα 125) Χρωματοσώματα ανθρώπου (HeLa Cells) στην μετά ραση μετά από απομάκρυνση των ιστονών και παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Παραμένει ο σκελετός του χρωματοσώματος που αποτελείτε από μή βασικές πρωτεΐνες και από τόν όποιο έλευθερώνονται θηλείες γυμνού DNA των όποιων τό μήκος κυμαίνεται μεταξύ 15 και 30 μ.

πρωτεΐνες DNA (είκονα 126)

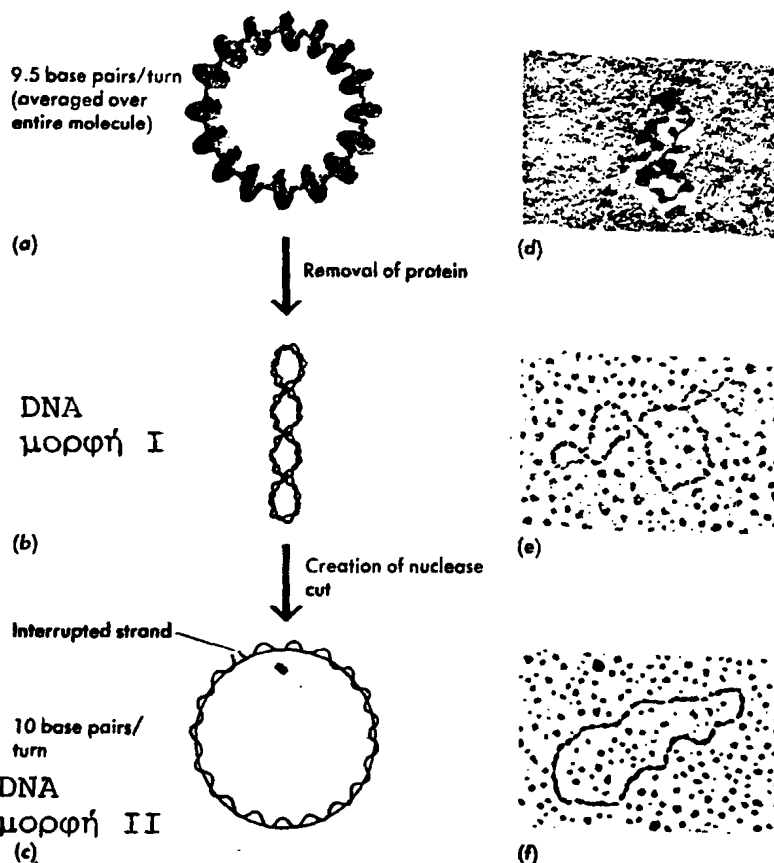
Οι υπερέλικες γίνονται κατά την αντίστροφο φορά της κανονικής έλικος του DNA. Έάν ένα κυκλικό DNA δέν φέρει υπερέλικες τότε σημαίνει ότι ένα σπάσιμο υπάρχει σέ κάποιο σημείο της μιās από τίς διπλές έλικες.

Οι δύο αυτές μορφές DNA όνομάζονται DNA μορφή I και DNA μορφή II (όταν φέρει ένα σπάσιμο στην μία από τίς δύο έλικες).



Figure 9-12

Different conformations of SV40 DNA. a) Complexed with protein to form a minichromosome characterized by repeating packets of folded double-helical DNA and protein. b) Purified DNA that takes up a superhelical conformation. c) Relaxed DNA created by a cut in one strand. d) EM view of a minichromosome. Note that it does not have a superhelical form [from Germond, *et al.*, PNAS 72, 1975]. e) EM photo of covalently closed superhelix. [Courtesy E. Daniell.] f) EM photo of relaxed form created by mild nuclease treatment. [Courtesy E. Daniell.]



(εἰκόνα 126)

Τά κυκλικά DNA μπορούν νά διαχωρισθοῦν ἀπό τά γραμμικά μόρια DNA χρησιμοποιώντας ὀρισμένες χρωστικές πού ἔχουν τήν ιδιότητα νά παρεμβάλλονται μεταξύ τῶν βάσεων (intercalating dyes). Στήν περίπτωση αὐτή ἡ χρωστική ἐξουδετερώνει τήν ἑλικοειδῆ μορφή τοῦ μορίου π.χ. ἡ χρωστική ethidium bromide. Ὄταν τό DNA βρίσκεται σέ γραμμική μορφή τό ποσόν μιᾶς τέτοιας χρωστικῆς πού παρεμβάλεται ἀνάμεσα στίς βάσεις εἶναι μεγαλύτερο ἀπό ἐκεῖνο πού δύναται νά παρεμβληθῇ μεταξύ τῶν βάσεων ἐνός κυκλικοῦ DNA (μορφή I) γιατί στό γραμμικό DNA τά ἄκρα εἶναι ἐλεύθερα καί μπορούν νά περιστρέφονται ἀπεριόριστα (τό ἴδιο γιά τό DNA μορφῆς II). Ὅσον περισσότερη χρωστική ἐνοῦται μέ τό DNA τόσο ἡ πυκνότης ἰσορροπίας σέ CsCl ἐλαττοῦται, ὥς ἐκ τούτου, κατὰ τήν φυγοκέντριση παρουσία περισσεύας χρωστικῆς τό

γραμμικό DNA ένοϋται μέ μεγαλύτερο ποσόν χρωστικής και καθίσταται έλαφρότερο ένω τό κυκλικό DNA I παραμένει βαρύτερο και μπορεί νά άπομονωθεί. Ή τεχνική αύτή χρησιμοποιείται για άπομόνωση τοϋ DNA όρισμένων όγκο- γόνων ίων σέ καθαρά μορφή άπειλαγμένων από κυτταρικό DNA.

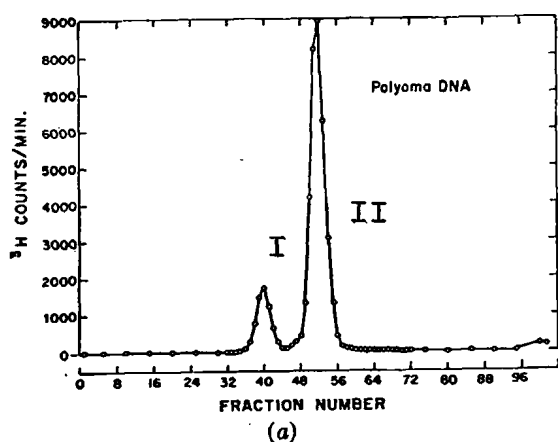


FIG. 4.—A mixture of purified polyoma DNA I and II, 3.00 ml, 1.558 gm/ml CsCl, 100 μ g/ml ethidium bromide, 48 hr at 43 krpm, 20°. (a) The band maxima are separated by 12 fractions and 0.36 ml. The calculated buoyant densities are 1.592 and 1.556 gm/ml. (b) A photograph of the centrifuge tube prior to drop collection. The tube contains a total of 4 μ g of DNA, and 0.64 μ g of component I.

(είκόνα 127)

Σέ όρισμένους ίούς και βακτηρίδια ύπάρχει μία μετάπτωση από τήν κυκλική στήν γραμμική μορφή τους. Ο βακτηριοφάγος λ ύπάρχει μέσα στά σωματίδια τοϋ ίοϋ υπό μορφή γραμμική έτσι εισέρχεται πιο εύκολα μέσα στό βακτηρίδιο. Έντός τοϋ βακτηριδίου όμως παίρνει κυκλική μορφή και υπό τήν μορφή αύτή πολλαπλασιάζεται.

Ή μετατροπή από τήν κυκλική στήν γραμμική μορφή γίνεται διά τής δράσεως όρισμένων είδικών ένζύμων τά όποϊα κό- βουν κάθε ένα από τούς δύο κλώνους τοϋ DNA σέ πολύ πλησίον εύρισκό- μενα σημεία. Ο κύκλος τότε άνοίγει γιατί ή σύνδεση στό μικρό αυτό μήκος πού κρατάει τόν κύκλο κλειστό είναι άσθενής και δημιουργείται έτσι ένα γραμμικό μόριο πού τά άκρα του είναι συμπληρωματικά (κολλώμενα άκρα "sticky ends")

(είκόνα 128) Ένα άλλο ένζυμο συνδέει τότε τίς νουκλεο- τιδικές άλυσίδες τοϋ DNA, ή DNA "δεσμάση" (ligase).

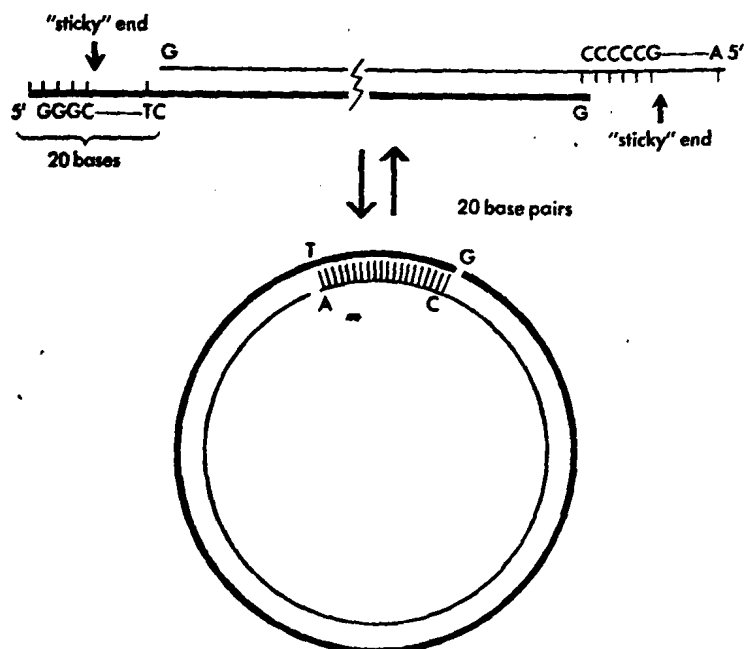


Figure 9-13
Interconversion of the linear and circular forms of λ DNA.

Solid evidence exists that λ DNA interconverts between its circular and rod forms, using precisely this mechanism. Later we shall see that the duplication of such "sticky" DNA's involves circular replicative intermediates. So the rod form most likely is an adaptation for injection of the viral chromosome through the narrow phage tail. It is

(εἰκόνα 128)

Ἡ μετάπτωση ἀπὸ τὴν κυκλικὴ στὴν γραμμικὴ μορφή παρατηρεῖται σὲ πολλές περιπτώσεις καὶ ἀποτελεῖ τόσο στὰ βακτηρίδια καὶ τοὺς λούς τους ὅσο καὶ στοὺς λούς τῶν εὐκαρυωτικῶν κυττάρων τὴν ἀπαρχὴ σημαντικῶν φαινομένων ὅπως ἡ σύζευξη στὰ βακτηρίδια καὶ ἡ μεταλλαγή στὰ εὐκαρυωτικά κύτταρα πού εἶναι εὐαίσθητα σὲ καρκινογόνους λούς. Τὸ DNA τῶν ἰῶν αὐτῶν ἀπὸ κυκλικό γίνεται γραμμικό κατὰ τὴν εἰσοδὸ τοῦ στό DNA τῶν χρωματοσωμάτων τοῦ κυττάρου.

3.1.- Περιοριστικά ἐνδονουκλεϊνικά ἐνζυμα

Μία καινούργια τεχνολογία ἀναπτύχθηκε τελευταίως ἡ ὁποία εἶναι πραγματικὰ ἐπαναστατικὴ γιὰ τὴν μελέτη τῶν μορίων τοῦ DNA. Τὰ ἐνζυμα πού κόβουν τοὺς φωσφοδιεστερικούς δε-



σμούς στο DNA ονομάζονται νουκλεάσες.

Οι νουκλεάσες που κόβουν το DNA έσωτερικώς ονομάζονται ένδονουκλεάσες και έκεϊνες που αποκόπτουν διαδοχικώς τὰ τελικά νουκλεοτίδια έξωνουκλεάσες. Έπιστεύετο μέχρι πρότινος πώς οι ένδονουκλεάσες δέν είχαν καμμία είδικότητα και έκοβαν τυχαίως το DNA σέ οποιοδήποτε σημείο στο έσωτερικό του μορίου.

Τελευταίως όμως βρέθηκαν ένζυμα από βακτηρίδια τὰ οποια έχουν μία είδικότητα στο έσωτερικό κόψιμο του DNA. Τά ένζυμα αυτά έχουν είδικότητα είδους, χρησιμεύουν δέ στά βακτηρίδια για νά τὰ προστατεύουν έναντια στην είσοδο ξένου DNA τό όποιο καταστρέφουν κόβοντάς το σέ κομμάτια μέ τὰ ένζυμα που διαθέτουν. Η είδικότης αυτή έξαρτάται από την άλληλοδιαδοχή των βάσεων στά σημεία της επίδράσεως του ένδονουκλεασικού ένζύμου. Τά ένζυμα αυτά ονομάσθηκαν περιοριστικές ένδονουκλεάσες (restriction enzymes) και έπιδρούν στά σημεία του DNA όπου υπάρχει μία διπλή συμμετρία στην άλληλοδιαδοχή των βάσεων στους δύο κλώνους του μορίου (πίνακας 6) :

Έπειδή η αυτή άλληλοδιαδοχή υπάρχει και στους δύο κλώνους του DNA τὰ ένζυμα αυτά κόβουν συμμετρικά και τούς δύο κλώνους. Ένας μεγάλος άριθμός από τέτοια ένζυμα έχει ήδη ανακαλυφθεί και μάς έπιτρέπει νά κόβουμε μεγάλα μόρια DNA σέ πολλά κομμάτια μέ είδικό τρόπο π.χ. τό περιοριστικό ένζυμο Eco RI αναγνωρίζει μία άλληλουχία η οποία υπάρχει μόνο μία φορά στο χρωμόσωμα του ίου SV₄₀ άρα τό ένζυμο αυτό σπάει τό χρωμόσωμα του ίου σέ ένα σημείο και από κυκλικό τό μετατρέπει σέ γραμμικό. Αντίθετα τό ένζυμο Hind II σπάει τό μόριο του DNA SV₄₀ σέ πέντε είδικά κομμάτια (πίνακας 6) .

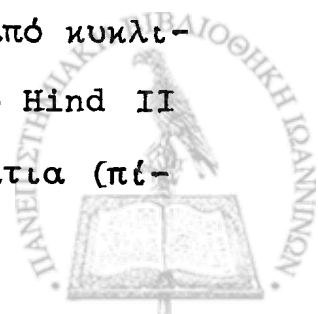


Table 9-3 Recognition Sequences of Several Restriction Endonucleases

Microbial Origin	Enzyme	Recognition Site	Number of Recognition Sites per Viral Genome		
			SV40 ¹	λ ²	Adenovirus 2 ³
<i>Escherichia coli</i> KY13	Eco RI	5' ↓ GAA CTT	1	5	5
		↑ TTC AAG			
<i>Hemophilus influenzae</i> Rd	Hind II	5' ↓ GTPy CAPu	5	34	720
		↑ PuAC PyTG			
	Hind III	5' ↓ AAG TTC	6	6	11
		↑ CTT GAA			
<i>Hemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I	5' ↓ GTT CAA	3	11	6
		↑ AAC TTG			
	Hpa II	5' ↓ CC GG	1	750	750
		↑ GG CC			
<i>Hemophilus aegyptius</i>	Hae III	5' ↓ GG CC	17	750	750
		↑ CC GG			

¹ MW = 3 × 10⁶.

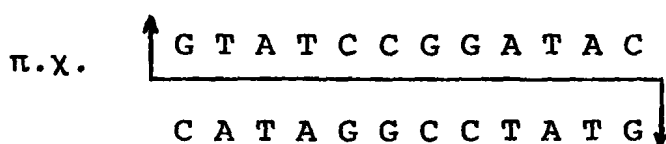
² MW = 32 × 10⁶.

³ MW = 25 × 10⁶.

(πίνακας 6).

Είναι δυνατό μία άλληλουχία πού υπάρχει σέ ένα DNA νά μήν υπάρχει σέ ένα άλλο έτσι ή Eco RI δέν δρᾷ καθόλου στό DNA τοῦ ιοῦ T₇ γιατί ὁ ιός δέν περιέχει τήν εἰδική αὐτή ἀλληλουχία. Σήμερα τά ένζυμα αὐτά χρησιμοποιοῦνται πολύ γιά νά σπᾶμε DNA σέ μικρότερα κομμάτια καί νά μελετᾶμε τήν ἀλληλοδιαδοχή τῶν βάσεων τους.

Ἡ μελέτη τῶν ἀλληλοδιαδοχῶν τῶν βάσεων διαφόρων DNA πού κατέστη δυνατή χάρις στίς περιοριστικές ένδονουκλεάσες ἀπέδειξε τήν ὕπαρξη στό DNA ὀρισμένων ἀλληλοδιαδοχῶν ὅπου ἡ σειρά τῶν βάσεων παρουσιάζει ἀντιπαράλληλο συμμετρία



Οι άλληλοδιαδοχές αυτές ονομάζονται παλινδρομικές, όρι-
σμένες από αυτές αρκετά βραχείες αποτελούν αναγνωριστι-
κά σημεία για τις περιοριστικές ένδονουκλεάσες άλλες πο-
λύ μακρύτερες μπορεί νά σχηματίζουν είδικές στερεοοργα-
νώσεις τοϋ DNA πού αναγνωρίζονται από είδικές πρωτεΐνες.
Μπορεί νά σχηματίζονται έτσι στο DNA είδη άναδιπλώσεων
(hairpin loops) (πίνακας 7).

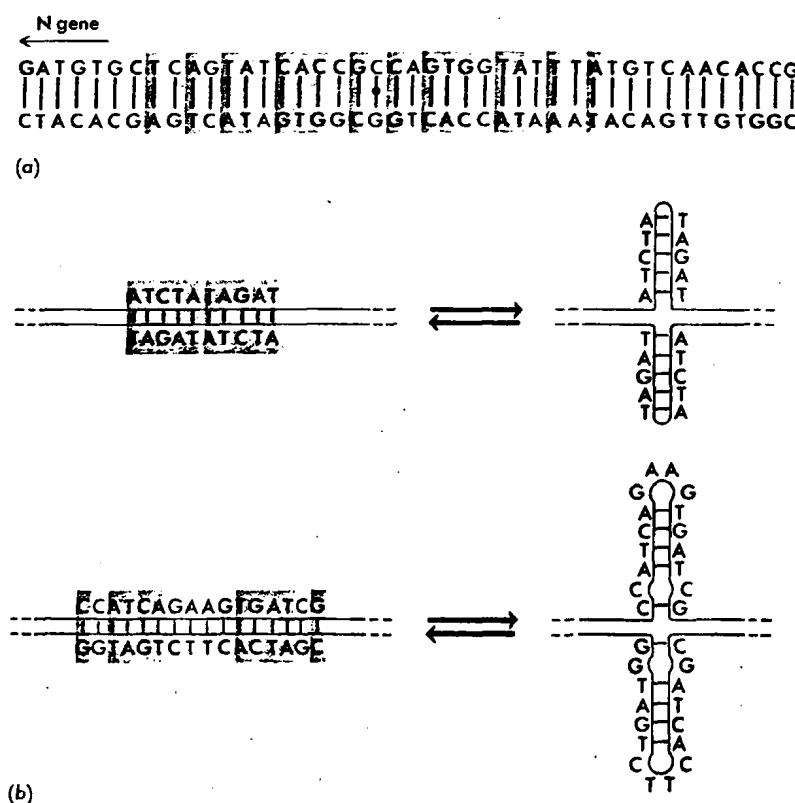


Figure 9-15

a) A 45 base-pair length of λ DNA from the operator (O_L) involved in the control of gene expression. In blocks are illustrated an imperfect palindrome centered about the black dot. b) How inverted repetitions (palindromes) can produce hairpin loops. Note in the lower example how an imperfect palindrome leads to imperfect loops.

(πίνακας 7)

ή οι ανάλογες άναδιπλώσεις νά παρουσιάζονται στο RNA πού σχηματίζεται από τό DNA αυτό καί νά παίζουν ρόλο στο μό-
ριο αυτό σάν σήματα ή σημεία άναγνωρίσεως όρισμένων πρω-
τεϊνών (πίνακας 7)

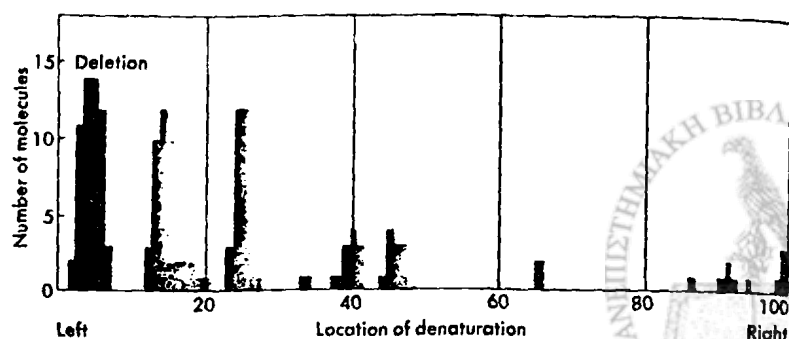
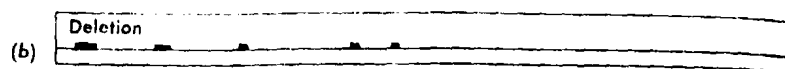
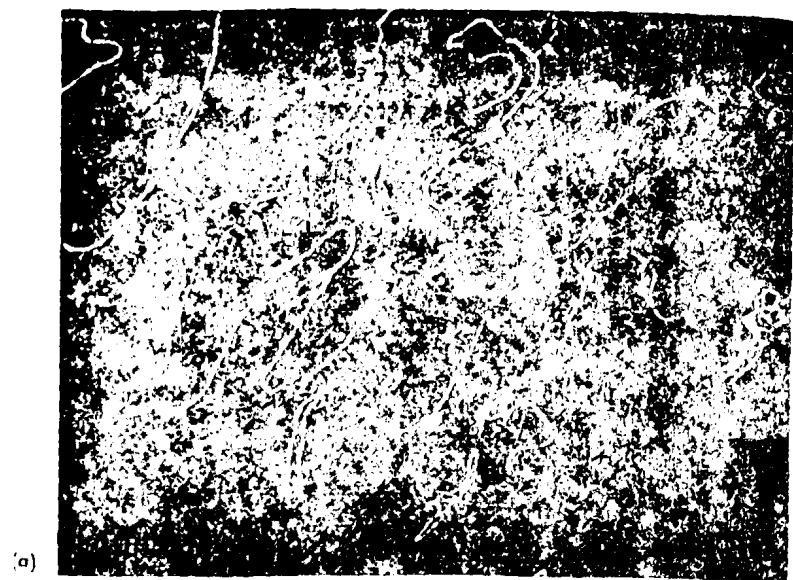


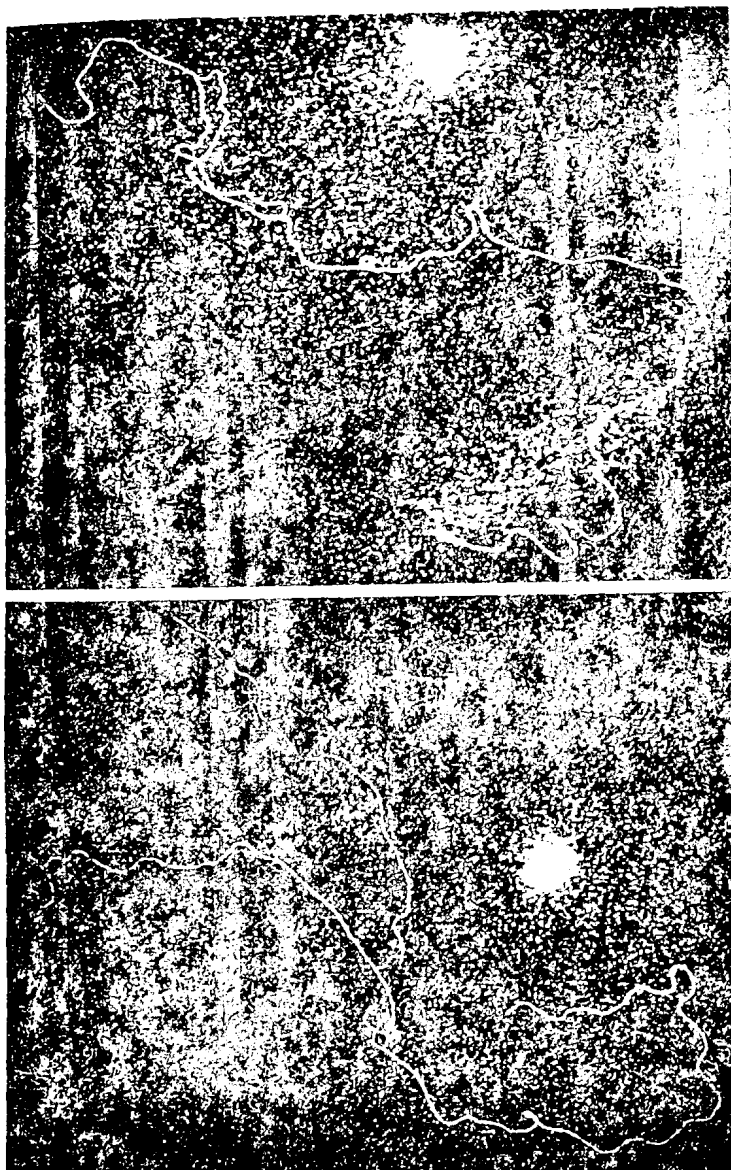
3.2.- Χάρτης μερικής αποδιατάξεως (partial denaturation map)

Είναι γνωστό ότι οι δεσμοί μεταξύ των δύο αλύσεων του DNA που όφειλονται όπως ήδη αναφέραμε σε δεσμούς υδρογόνου έχουν άλλοτε άλλη ισχύ ανάλογα με την ειδική αλληλοδιαδοχή των βάσεων σε διάφορα σημεία του μορίου.

Οι βάσεις A-T κρατιούνται από 2 δεσμούς υδρογόνου ενώ οι G-C από 3 δεσμούς υδρογόνου. Μία αλληλουχία που περιέχει πολλές αλληλοδιαδοχές A-T είναι πιο εύκολο να υποστεί αποδιάταξη. Θερμαίνοντας μερικώς το DNA (σε ενδιάμεσο θερμοκρασία από εκείνη που χρειάζεται για πλήρη αποδιάταξη) παρουσιάζονται ορισμένα ανοίγματα της διπλής έλικας που βρίσκονται στα πλούσια σε A-T σημεία. Μπορούμε τότε να επιδράσουμε με φορμαλδεΰδη που σταθεροποιεί τα ανοίγματα γιατί ενώνεται με τις ελεύθερες αμινοομάδες (NH_2) της

a) Electron micrograph of a partially denatured T7 DNA molecule. b) Mapping of the location of the denatured regions shown in (a). c) A histogram summarizing the location of single-stranded regions in a large number of denatured molecules. The arrow in (a) points to a single-stranded loop-out that is present in the DNA molecule even before partial denaturation. The loop-out occurs because this was not just an ordinary T7 DNA molecule but a "heteroduplex" molecule (see Chapter 10) derived by reannealing separated strands from wild-type T7 DNA with strands from T7 DNA molecules that contained a deletion known by genetic mapping to be located near the left end. It is this additional physical landmark that allows us to say that the AT-rich, partial denaturation sites are located in the left end of the bacteriophage chromosome. [Courtesy of Drs. John Wolfson and David Dressler.]





(είκονα 130)

άδενίνης και έμποδίζει τόν έπανασχημ
τά μόρια αυτά έξεταζόμενα στό ήλεκτρο
νουν τά σημεία τά όποϊα είναι πλούσι
Η μέθοδος αυτή μάς έπιτρέπει νά βροί
όπου αρχίζει ό άναδιπλασιασμός τοῦ DI
στόν ίό T₇ ή έναρξης τής συνθέσεως το
τό άκρο τοῦ μορίου τοῦ DNA όπως θά ή
άλλά από τό έσωτερικό τοῦ μορίου και
Τό σημείο έναρξεως τοῦ άναδιπλασιασμο
17% στό άριστερό άκρο τοῦ ίοῦ. (είκόν



4.- Μηχανισμός αντιγραφής

Τό πώς γίνεται ή αντιγραφή τοῦ DNA σέ σχέση μέ τήν μήτρα απέδειξαν τά πειράματα τῶν Meselson & Stahl τό 1957.

Τρία μοντέλα ἦσαν δυνατά γιά νά γίνει ή σύνθεσις τοῦ DNA

1ον Ὁ ἡμισυντηρητικός τρόπος αντιγραφῆς

2ον Ὁ συντηρητικός τρόπος αντιγραφῆς

3ον Ὁ διάσπαρτος τρόπος αντιγραφῆς

Στόν πρῶτο τρόπο ή διπλή ἔλिका ἀνοίγει καί οἱ δύο συμπληρωματικές ἀλυσίδες συντίθενται, κάθε μία πάνω στόν ἀντίστοιχο κλῶνο τοῦ ἀνοιγμένου μορίου.

Συντηρητικός τρόπος αντιγραφῆς θεωρεῖται ή περίπτωση πού οἱ δύο καινούργιες ἀλυσίδες σχηματίζονται πάνω στό παλιό μόριο χωρίς ἀνοιγμα τῶν ἀλύσεων του.

Στόν τρίτο τρόπο ή διάσπαρτο αντιγραφή θά παρήγοντο ἀλυσίδες μέ παλιά καί νέα τμήματα. Τό κλασικό πείραμα τῶν Meselson καί Stahl (1957) απέδειξε ὅτι στήν πραγματικότητα ὁ ἀναδιπλασιασμός τοῦ DNA εἶναι ἡμισυντηρητικός καί ἀπέκλεισε τά δύο ἄλλα πιθανά μοντέλα.

Τό πείραμα ἔγινε ὡς ἑξῆς: Βακτηρίδια *E. coli* ἀνεπτύχθησαν σέ ἕνα θρεπτικό ὑλικό γιά πολλές γενεές πού περιεῖχε σάν μοναδική πηγή ἀζώτου $^{15}\text{NH}_4$. Τό ἀποτέλεσμα ἦτο νά δημιουργηθεῖ DNA τό ὁποῖο ἦταν βαρύτερο τοῦ φυσιολογικοῦ.

Ἐάν ἀπομονώσουμε αὐτό τό DNA καί τό φυγοκεντρίσουμε σέ ἕνα διάλυμα χλωριούχου καισίου πού δημιουργεῖ κατά τή φυγοκέντριση μία βαθμίδωση πυκνότητος (ή συγκέντρωση τοῦ καισίου εἶναι μεγαλύτερη στόν πυθμένα τοῦ σωληναρίου καί ή πυκνότης του ἐλαττοῦται πρός τήν ἐπιφάνεια) τότε τό DNA πού περιέχει ^{15}N ἐπειδή εἶναι βαρύ ἰσορροπεῖ σέ μία ζώνη στό βάθος τοῦ σωληναρίου (στό βαρύ τμήμα τοῦ gradient)

Κύτταρα *E. coli* μεταφέρθηκαν μετά, ἀπό τό ὑλικό πού πε-

ριεΐχε ^{15}N σέ φυσιολογικό ύλικό πού περιεΐχε άζωτο ^{14}N . Μετά από μία γενεά στο νέο ύλικό, παρελήφθη πάλι τό DNA καί έξετάσθηκε ή πυκνότητά του. Βρέθηκε ότι τό DNA είχε ένδιάμεσο βάρος μεταξύ του βαρέως καί του έλαφρου. Στην τρίτη γενεά παρουσιάστηκε DNA μέ ένδιάμεσο βάρος καί έλαφρύ DNA. Τό πείραμα αυτό δείχνει ότι ο τρόπος άναδιπλασιασμοΰ του DNA είναι ήμισυντηρητικός. Έάν έπρόκειτο για συντηρητικό μηχανισμό στην δεύτερη γενεά δέν θα βρίσκαμε ύβριδια αλλά βαρύ καί έλαφρύ DNA. (είκόνα 131).

Duplication of DNA 41

(είκόνα 131)

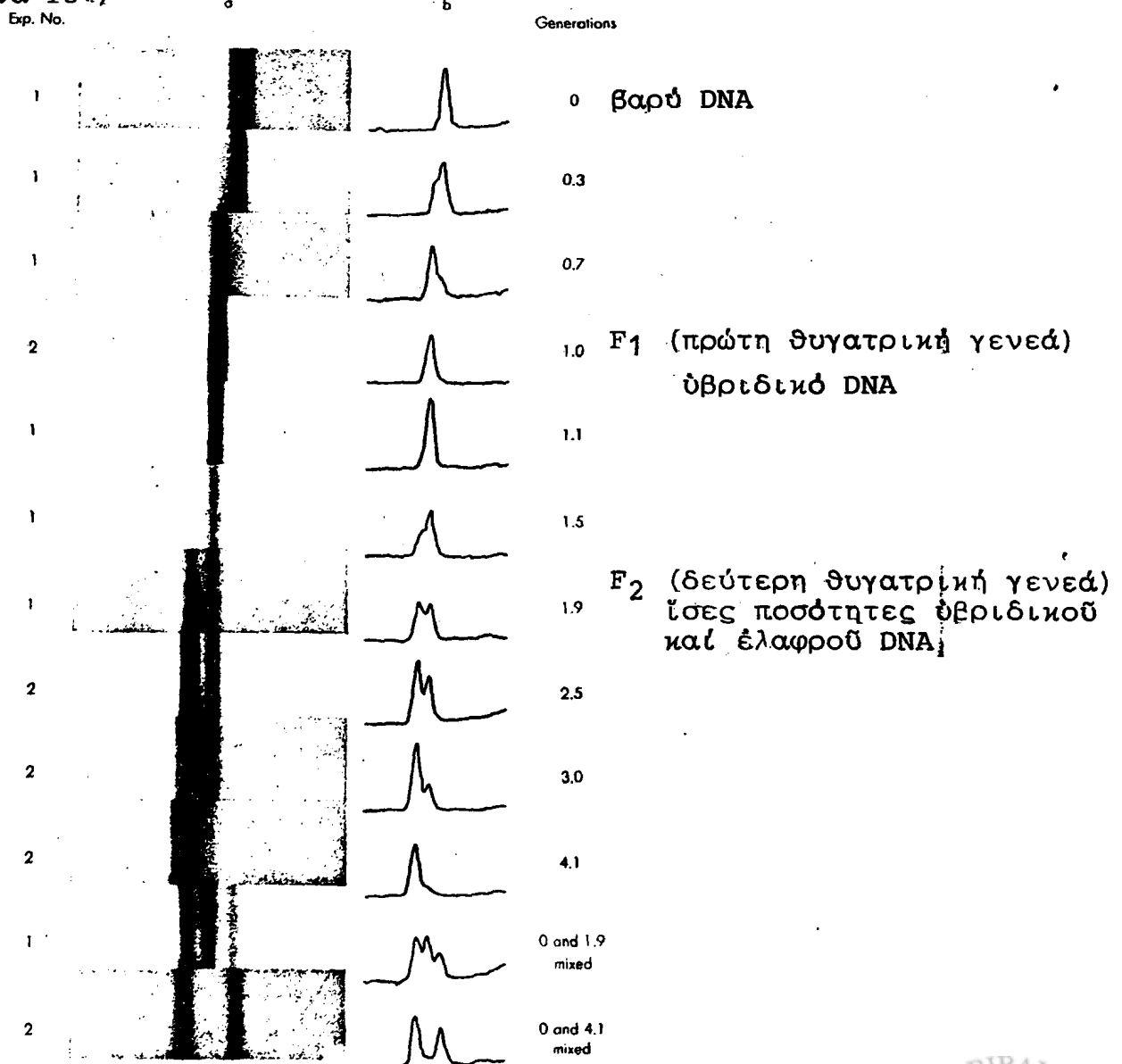


Fig. 4.1. (a) Ultraviolet absorption photographs showing DNA bands resulting from density gradient centrifugation of lysates of bacteria sampled at various times after the addition of an excess of N^{14} substrates to a growing N^{15} -labeled culture. The density of the CsCl solution increases to the right. Regions of equal density occupy the same horizontal position on each photograph. (b) Microdensitometer tracings of the DNA bands shown in the adjacent photographs. The microdensitometer pen displacement above the base line is directly proportional to the concentration of DNA. The degree of labeling of a species of DNA corresponds to the relative position of its bands between the bands of fully labeled and unlabeled DNA in the lowermost frame, which serves as a density reference. This figure, reproduced with permission of M. S. Meselson, appeared in *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 44 (1958), 675.



Είδαμε μέ τά πειράματα τών Meselson καί Stahl πώς γιά νά γίνη ἡ ἀντιγραφὴ τοῦ DNA ἡ διπλὴ ἔλικο ἀνοίγει καί κάθε παλαιά ἔλικο χρησιμεύει σάν μήτρα γιά τήν παραγωγή τῆς συμπληρωματικῆς νέας ἀλυσίδας. Πώς γίνεται ὅμως ὁ ἀναδιπλασιασμός σέ μόρια DNA πού ἔχουν μόνον μία ἀλυσίδα. Σέ μερικούς ιούς αὐτό πράγματι συμβαίνει καί τέτοιοι ιοί εἶναι ὁ Φ X 174 ὁ S13 F1 καί M13. Οἱ ιοί αὐτοί εἶναι ιοί ὀρισμένων βακτηριδίων καί ὁ τρόπος πού τό DNA τους συντίθεται εἶναι πάλι διὰ τοῦ σχηματισμοῦ συμπληρωματικῶν ἀλύσεων κατὰ τόν ἀκόλουθο τρόπο. Μόλις τό DNA τοῦ ιοῦ εἰσέλθῃ στό βακτηρίδιο ἡ θετικὴ ἀλυσος (+) πού ἀποτελεῖ τό γενετικό ὕλικό τοῦ ιοῦ χρησιμεύει σάν μήτρα γιά τόν σχηματισμό μιᾶς ἀρνητικῆς ἀλύσεως (-). Τότε σχηματίζεται ἓνα κανονικό μόριο DNA μέ δύο ἀλυσίδες τό ὁποῖο πολλαπλασιάζεται. Τά ὑπάρχοντα κυκλικὰ δίκλωνα DNA χρησιμοποιοῦνται

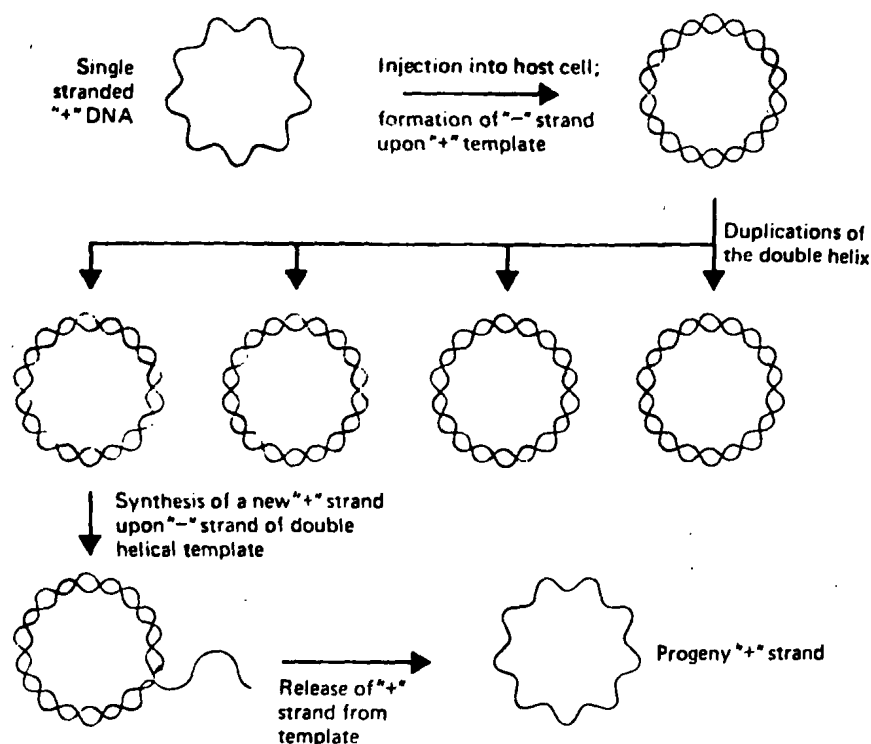


Figure 9-10

The replication of a single-stranded DNA molecule. Each double helix generally serves as the template for the formation of a large number of new "+" strands.



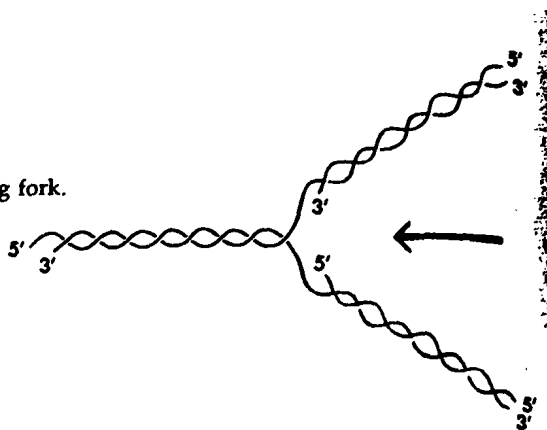
τώρα για μητρες προς παραγωγή του (+) κλώνου ο οποίος παράγεται σε μεγάλη ποσότητα από το (-) κλώνο της διπλής έλικας. Μετά το κλείσιμο του νεοπαραχθέντος DNA σε ένα κανονικό κύκλο το μόριο περιβάλλεται από τις πρωτεΐνες του ιού και το νέο σωματίδιο είναι τώρα έτοιμο να αρχίσει ένα καινούργιο κύκλο σε ένα άλλο κύτταρο που θα μολύνει. Έτσι βλέπουμε πως στους ιούς αυτούς μόνον ο ένας κλώνος DNA ο αντίθετος από τον φυσιολογικό χρησιμοποιείται για την παραγωγή του ιού. (εικόνα 132)

Αυτό που παρατηρείται βεβαίως σε μερικούς ιούς αποτελεί εξαίρεση και το DNA των περισσότερων κυττάρων και οργανισμών είναι δίκλωνο.

4.1.- Κατεύθυνση συνθέσεως DNA

Για να γίνει η αντιγραφή του DNA θα πρέπει τα δύο μονόκλιωνα μόρια DNA που ανοίγουν να αντιγραφούν. Έφ' όσον όμως είναι αντιπαράλληλα θα πρέπει το ένζυμο που επιτελεί την σύνθεση να εργάζεται προς δύο αντίθετες κατευθύνσεις την κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$ και την κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$ (εικόνα 133).

Figure 9-18
Overall direction of progeny chain growth at a replicating fork.



(εικόνα 133)

Παρ' όλες τις έρευνες όμως μόνον ένζυμα που εργάζονται προς την κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$ βρέθηκαν. Όπως ανοίγει το



DNA για να αντιγραφούν οι δύο κλώνοι θα πρέπει επομένως ο ένας τουλάχιστον να συντίθεται σε μικρά κομμάτια που να ενώνονται κατόπιν μεταξύ τους. Πράγματι βρέθηκε ότι το DNA δέν συντίθεται σε συνεχείς κλώνους αλλά σε μικρότερα κομμάτια τα οποία κατόπιν ενώνονται μεταξύ τους τη χρήση ενός ένζυμου της DNA δεσμάσης (DNA ligase). Ένομιόσθη κατ'αρχάς ότι μόνον ο ένας κλώνος του DNA παράγεται με μικρά κομμάτια αργότερα όμως ευρέθηκε πως και οι δύο κλώνοι παράγονται κατ'αυτόν τον τρόπο. Τα κομμάτια αυτά βρέθηκαν από τον Okazaki και ονομάζονται κομμάτια του Okazaki.

(είκονα 134)

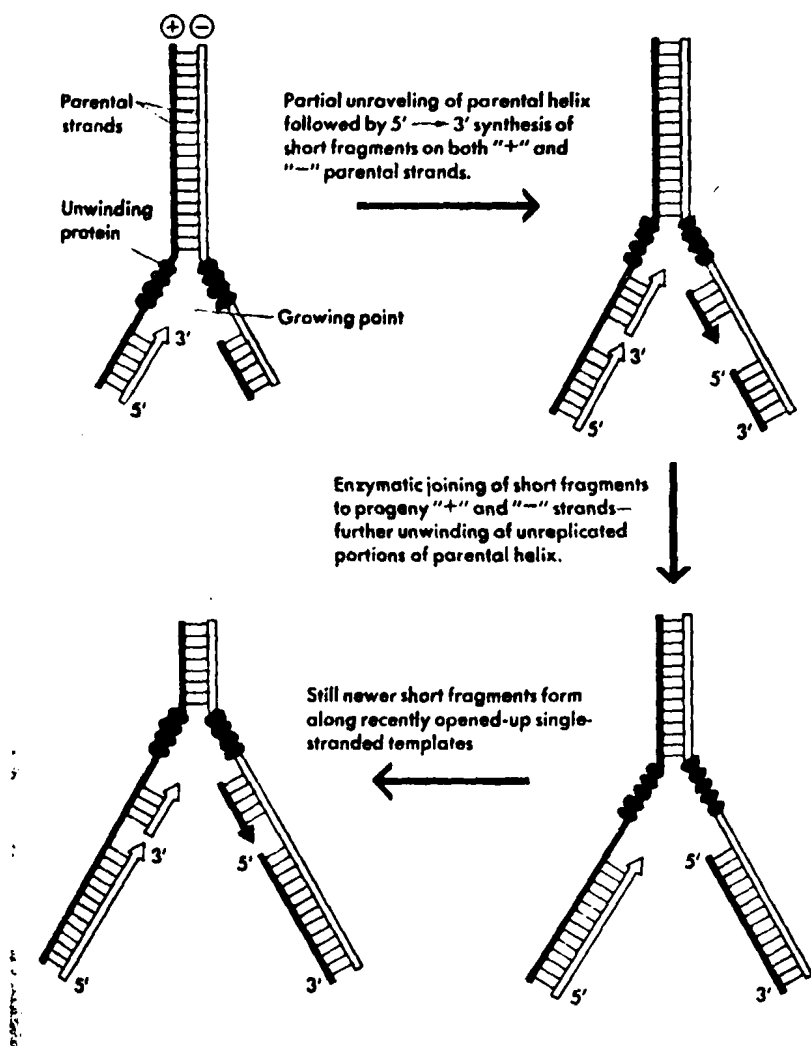


Figure 9-20
Hypothesis that replication of both progeny strands involves joining together of short fragments each synthesized in the 5'-to-3' direction.

(είκονα 134)



Γιὰ τὸ ξετύλιγμα τοῦ δικλῶνου DNA χρειάζονται εἰδικές πρωτεΐνες πού λέγονται *unwinding proteins* (πρωτεΐνες ξετυλίγματος) ὁ ἀριθμὸς τῶν πρωτεϊνῶν αὐτῶν σέ κάθε μονόκλωνο DNA εἶναι ἀρκετὰ μεγάλος. Κάθε μία ἐνώνεται μὲ 10 περίπου νουκλεοτίδια. Ὑπάρχουν περίπου 200 μόρια τέτοιων πρωτεϊνῶν σέ κάθε κλῶνο DNA πού ξετυλίγεται, δηλαδή περίπου 2.000 νουκλεοτίδια ξετυλιγμένου DNA χρησιμοποιούνται συνεχῶς γιὰ τὴν σύνθεση τῆς ἀντιπαράλληλης ἀλυσίδας (εἰκόνα 134).

4.2.- DNA πολυμεράσαι

Ἡ ὁμάδα τοῦ Kornberg μετὰ τὴν ἀνακάλυψη τῆς δομῆς τοῦ DNA ἄρχισε νὰ ἐρευνᾷ στὰ βακτηρίδια γιὰ ἐνζυμα πού ἔχουν σχέση μὲ τὴν σύνθεσή του. Ἀνακαλύφθηκε ἔτσι, Ἡ DNA πολυμεράση I. (εἰκόνα 135).



Figure 9-19
Reaction of a nucleoside triphosphate with
the 3'OH of a growing DNA chain.

(εἰκόνα 135)



Απεδείχθη αργότερα ότι και άλλα ένζυμα υπεισέρχονται στην σύνθεση του DNA και άνεκαλύφθησαν και άλλαι πολυμεράσαι αι II και III. Ο πίνακας (8) δείχνη τίς ιδιότητες τών τριών πολυμερασών τής E.coli.

<u>Χαρακτήρες πολυμερασών E. coli</u>			
<u>λειτουργικότης</u>	<u>πολυμεράση I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>
5' → 3' πολυμερισμός	+	+	+
5' → 3' έξωνουκλεάση	+	-	-
3' → 5' έξωνουκλεάση	+	+	+
Μοριακό βάρος	μία άλυσος	μία άλυσος	δύο άλυσοι
	109.000	120.000	140.000
			40.000
Μόρια/ανά κύτταρο	400	100	10
Ένεργητικότης			
προστιθέμενα νου- κλεοτίδια/37°/ανά μόριο DNA	~1.000	~50	~15.000

(πίνακας 8)

Διά πειραμάτων του Cairns ο οποῖος χρησιμοποίησε μεταλλαγμένα βακτηρίδια E.coli στά οποῖα ἡ πολυμεράση I καί II ἦσαν άνενεργεῖς ἀπεδείχθη τελικῶς πῶς ἡ πολυμεράση III εἶναι τό πραγματικό ένζυμο τής συνθέσεως τοῦ DNA. Κάθε μία ἀπό τίς τρεῖς πολυμεράσεις ἔχει εἰδική λειτουργία ἡ I φαίνεται ὅτι χρησιμοποιεῖται γιά νά ένώνει μεταξύ τους τά κομμάτια τοῦ DNA ἡ δράσις της II δέν εἶναι καλῶς γνωστή ἡ δέ III ἀποτελεῖ τό πραγματικό ένζυμο συνθέσεως DNA. Ἡ παρασκευή καθαρῶν ενζύμων πολυμεράσης I, II, III απέδειξε ὅτι καί τά τρία ένζυμα ἔχουν μίαν ένεργητικότητα έξω-

νουκλεάσης μέ τήν αντίθετον κατεύθυνσιν δηλαδή $3' \rightarrow 5'$, μέ άλλα λόγια τά ένζυμα αυτά καταστρέφουν καί συνθέτουν συγχρόνως μέ αντίθετες κατευθύνσεις. Ἡ ταχύτης συνθέσεως ὅμως εἶναι πάντοτε μεγαλύτερη ἀπό τήν ταχύτητα τῆς δράσεως τοῦ ένζύμου σάν ἐξωνουκλεάση. Τό ἐρώτημα γεννᾶται τί χρειάζεται ἡ τελευταία δραστηριότης. Εὐρέθη ὅτι ἡ ἐξωνουκλεασική δραστηριότης εἶναι μεγαλύτερη γιά κακά συνδεδεμένες βάσεις (misspairing). Ἔτσι ἡ δράση αὐτή μπορεῖ νά ἐξηγηθεῖ σάν ἓνας ἐπιπρόσθετος μηχανισμός καλῆς ἀντιγραφῆς. Ἐάν μία βᾶσις προστεθῇ χωρίς νά εἶναι στήν σωστή της θέση δηλαδή Τ ἀπέναντι σέ Α καί C ἀπέναντι σέ G τότε ἡ ἐξωνουκλεασική δραστηριότης τοῦ ένζύμου τήν ἀφαιρεῖ.

4.3.- Πριμοδοτικές ἀλληλουχίες RNA

Ἡ ἑναρξη τῆς συνθέσεως τοῦ DNA εἶναι πολύπλοκον φαινόμενον τό ὁποῖο δέν ἔχει ἀκόμη ξεκαθεριθεῖ. Εὐρέθη ὅτι ὅλαι αἱ DNA πολυμεράσαι δέν μποροῦν νά ἀρχίσουν τήν σύνθεση τοῦ DNA ἐπάνω σέ μονόκλωνο DNA. Ἡ μήτρα αὐτή καθ' αὐτή δέν ἀρκεῖ γιὰτί ὅλα τά ένζυμα χρειάζονται μίαν πρωτοδοτική ἀλληλουχία μέ ἓνα ἐλεύθερο $3'OH$ γιά νά προσθέσουν δεσοξυριβονουκλεοτίδια. Κανένα ένζυμο δέν βρέθηκε πού νά συνθέτει τήν πρωτοδοτική αὐτή ἀλληλουχία. Ἀντιθετα βρέθηκε πῶς στήν ἀρχή κάθε συντιθεμένου κομματιοῦ DNA ὑπάρχει μία πριμοδοτική ἀλληλουχία ἀπό ριβονουκλεοτίδια (RNA) πού μπαίνουν ἐκεῖ ἀπό μία "εἰδική RNA πολυμεράση (εἰκόνα 136). Τά κομμάτια αὐτά καταστρέφονται κατόπιν ἀπό τήν DNA πολυμεράση I πού διαθέτει μία ἐξωνουκλεασική δράση $5' \rightarrow 3'$ καί μπορεῖ νά ἀφαιρεῖ τόσο ριβο ὅσο καί δεσοξυριβονουκλεοτίδια, κατόπιν συμπληρώνει τά "χάσματα"

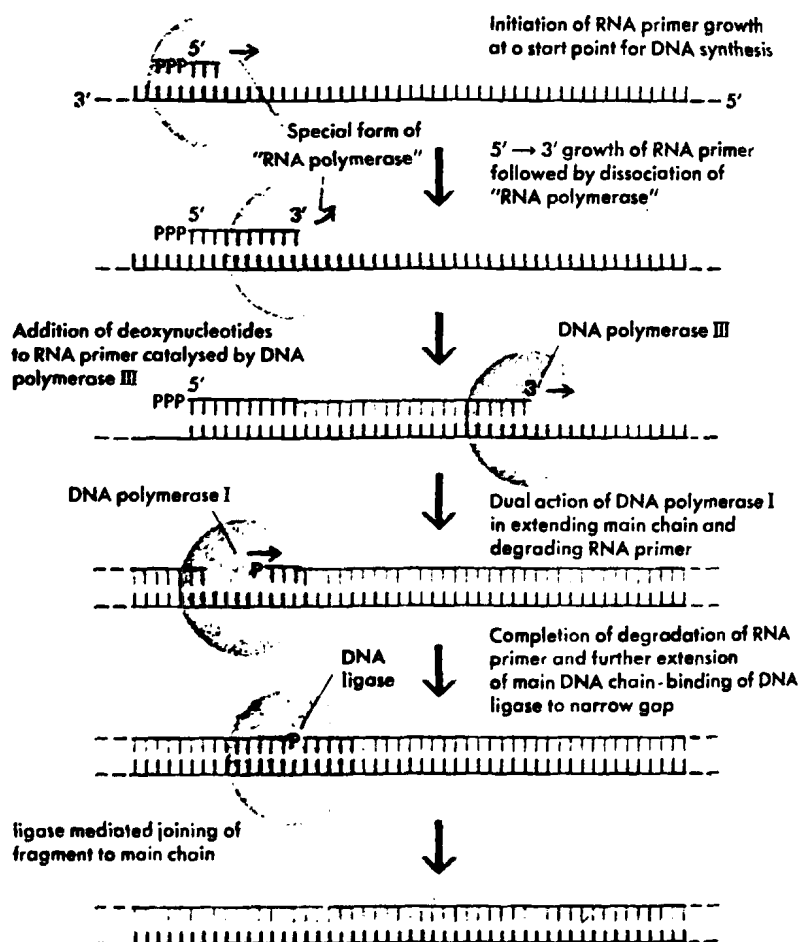


Figure 9-22
Use of an RNA primer in the initiation of DNA synthesis.

(εικόνα 136)

(gaps) και ένα άλλο ένζυμο ή DNA δεσμάση ενώνει τελικά τα κομμάτια. Σε ορισμένες περιπτώσεις όταν η πριμοδοτική αλληλουχία RNA βρίσκεται συνδεδεμένη με το DNA και από τα δύο άκρα της 5' και 3' η εξωνουκλεασική δράση της DNA πολυμεράσης I δεν δύναται να αφαιρέσει το RNA τότε χρησιμοποιείται η ριβονουκλεάση H για να καταστρέψει το RNA του υβριδίου RNA/DNA. Η DNA πολυμεράση I λειτουργεί και σαν επανορθωτικό ένζυμο σε βεβλαμένο DNA από υπεριώσεις ακτινοβολίες.

Η φύσις των αλληλοδιαδοχών που σημαίνουν έναρξη της συνθέσεως του DNA δεν είναι ακόμη γνωστή. Η μελέτη ορισμένων ιών DNA των οποίων οι αλληλοδιαδοχές τους με τις νέες

ταχείες τεχνικές (DNA sequencing) γίνονται γνωστές θά επι-
τρέψει την λύση αυτού του προβλήματος. Τέλος ολίγα γνωρί-
ζουμε για την είδική RNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται
για την έναρξη της συνθέσεως του DNA. Γιατί μία RNA πολυμε-
ράση; ίσως για λόγους πιστότητας αντιγραφής (περισσότερα
λάθη στην έναρξη από μία DNA πολυμεράση).

4.4.- Σύνθεση κυκλικών μορίων DNA.

Η αντιγραφή των κυκλικών DNA δέν προϋποθέτει τόν προσχη-
ματισμό γραμμικού DNA δηλαδή ο κύκλος αντιγράφεται υπό την
κυκλική του μορφή. Η αντιγραφή αρχίζει από ένα σημείο του
κυκλικού DNA μέ άνοιγμα της διπλής έλικος καί κατευθύνεται
πρός δύο διευθύνσεις έκ του σημείου έναρξεως. Ένας τέτοιος
μηχανισμός προκαλεί βέβαια τόν σχηματισμό υπεριλίκων στο
υπόλοιπο μόριο καί η τάσις πού δημιουργείται θά προκαλούσε
τό σταμάτημα της αντιγραφής.

Χρειάζεται επομένως νά λάβει χώρα διακοπή της διπλής έλικος
σέ κάποιο σημείο για νά αναδιαταχθούν οι σχηματισμένες υπε-
ρέλικες καί νά λήψει η δημιουργούμενη τάσις πού τείνει νά
σταματήσει την σύνθεση. Την δουλειά αυτή,τό σπάσιμο της μιας
έκ των δύο έλικων, την κάνουν ορισμένα ένζυμα πού λέγονται
"swivelase" στροφιδάσαι. Στην αρχή νομίζαμε πώς ένα σπάσι-
μο μόνιμο υπήρχε στο DNA αλλά όταν η αντιγραφή φθάνει σαυτό
τό σπάσιμο θά ήταν υποχρεωμένη νά σταματήσει πράγμα πού δέν
γίνεται. Σήμερα πιστεύουμε ότι τά σπασίματα αυτά γίνονται
για πολύ μικρό χρονικό διάστημα καί αποκαθίστανται άμέσως.
Την δουλειά αυτή την κάνουν οι στροφιδάσες. Δέν γνωρίζου-
με ακόμη αν οι στροφιδάσες εργάζονται παντοῦ ή σέ καθορι-
σμένα σημεία. (είκόνα 137 καί 138).



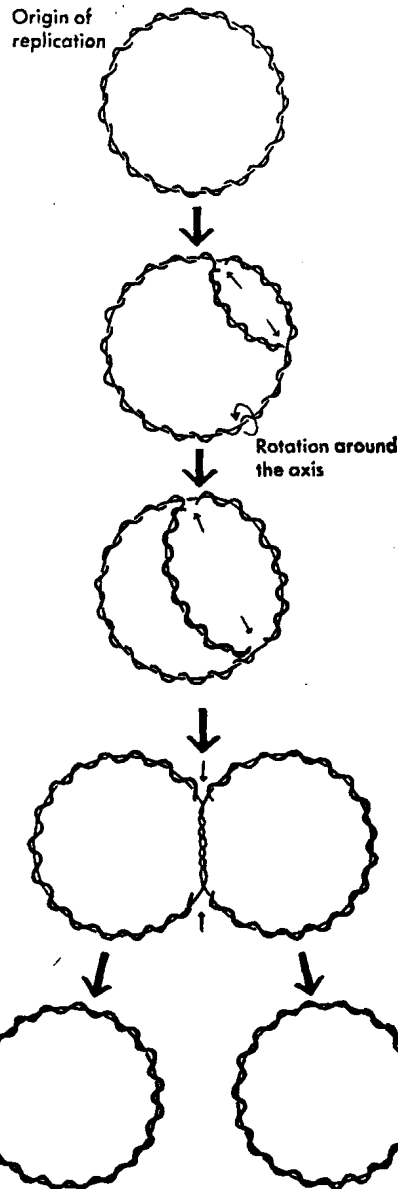


Figure 9-27
Simplified version of the bidirectional replication of circular DNA molecules. Only a fraction of the replication intermediates are so visualized in the EM, since those molecules which possess intact parental strands take up supercoiled configurations.

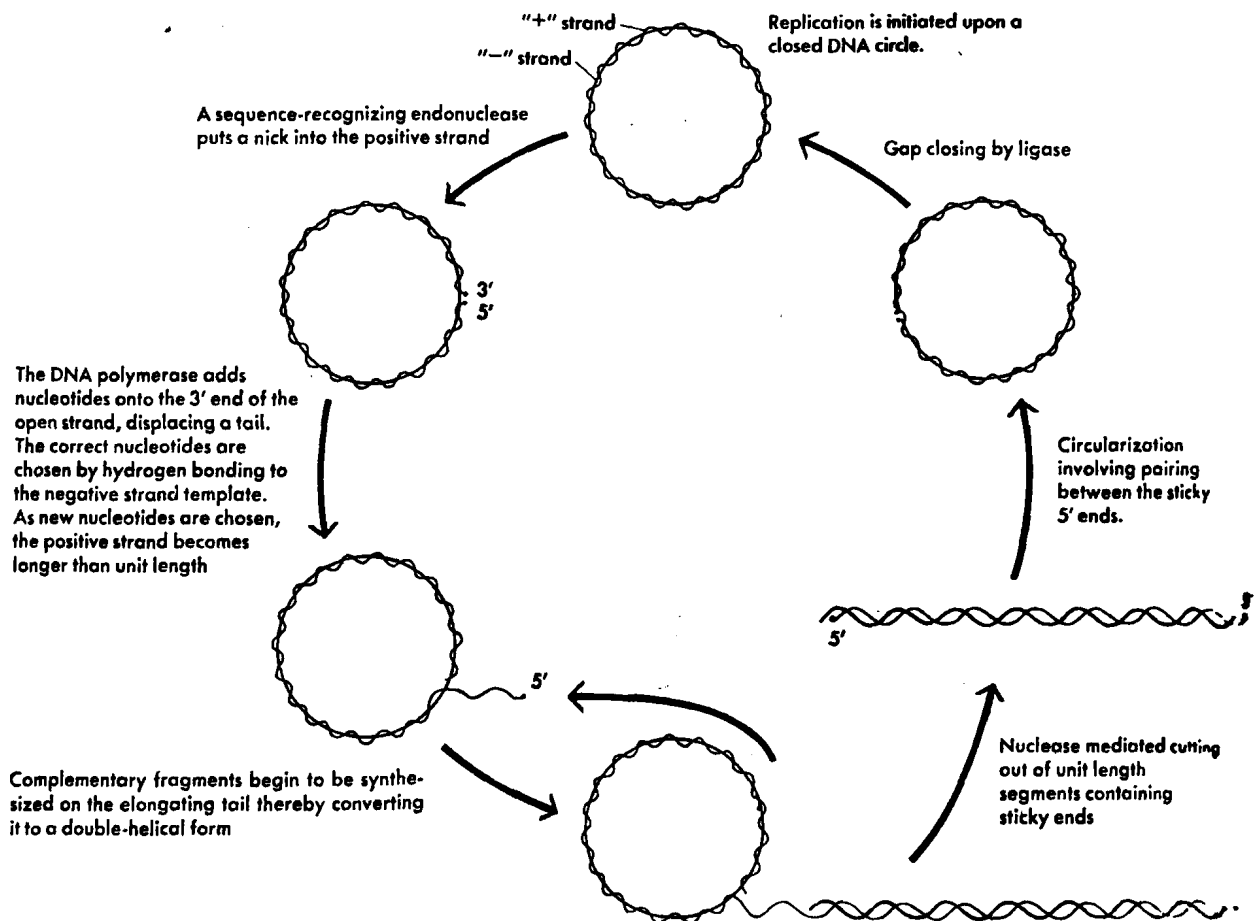
(εἰκόνα 137)



Figure 9-26
Autoradiograph showing the Y-shaped growing points A and B of an *E. coli* chromosome. The DNA was labeled with H^3 -thymidine for two generations of DNA replication. The θ -shaped appearance is the result of looking at a circular chromosome which has been two-thirds duplicated. The scale shows 100 μ . [Reproduced from J. Cairns, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* XXVIII, 44 (1963), with permission.]

(εἰκόνα 138)





(ΕΙΚΟΝΑ 138 α)

Duplication of circular DNA using the rolling circle mechanism

4.5.- Άντιγραφή περιστρεφόμενου κύκλου

Σε πολλούς ιούς καθώς και κατά την σύζευξη (mating) στα βακτηρίδια παρατηρείται ένας άλλος τρόπος αντιγραφής του DNA καλούμενος rolling-circle (περιστεφόμενος κύκλος). Το κυκλικό DNA υφίσταται σπάσιμο της μίας έλικος σε κάποιο σημείο οπότε δημιουργούνται δύο άκρα ένα 3'-OH και ένα 5' φωσφορικό. Το ένζυμο που δημιουργήσε το σπάσιμο τραβάει το 5' άκρο προς τα έξω του κύκλου οπότε το 3'-OH χρησιμοποιείται σαν πρωτοδοτική αλληλοδιαδοχή για να γίνει σύνθεση της συμπληρωματικής έλικος πάνω στον κύκλο. Το ελεύθερο άκρο που τραβιέται προς τα έξω χρησιμοποιείται και σαν μήτρα για τη σύνθεση της διπλής έλικος από μικρά κομμάτια DNA τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με την δεσμάση. Η αντιγραφή αυτή λαμβάνει χώρα και κατά την σύζευξη των βακτηριδίων. Όταν δημιουργηθεί η γέφυρα μεταξύ άρσενικών και θυλικών βακτηριδίων το χρωματόσωμα του άρσενικού εισέρχεται στο θυλικό σαν μονόκλωνο DNA. Η αντιγραφή δεν γίνεται με τον μηχανισμό του περιστρεφόμενου κύκλου στο χρωματόσωμα του άρσενικού βακτηριδίου. Μέσα στο θηλυκό βακτηρίδιο το μονόκλωνο άρσενικό DNA αντιγράφεται σε δίκλωνο και λαμβάνει χώρα ανασύνδεσις (recombination) μεταξύ του DNA του άρσενικού και θυλικού βακτηριδίου. Ο τρόπος αυτός της αντιγραφής σε συνδιασμό με την σύζευξη επitrρέπει ώστε να μην δημιουργούνται ποτέ γεννητικώς έλλειπεί (deficient) άρσενικά βακτηρίδια (εικόνα 138 α).

4.6.- Επιδιόρθωση του DNA

Έκτός από την σύνθεση του DNA στην αντιγραφή υπάρχουν και συνεχείς μικροσυνθέσεις που γίνονται για την επιδιόρθωση



βλαβών του DNA π.χ. από δράση ακτινοβολιών. Ἡ ἐπιδιόρθωση γίνεται σέ πολλά στάδια καί ἐπιδροῦν πολλά ἔνζυμα. Ἡ πιο συχνή βλάβη ἀπό ὑπεριώδη ακτινοβολία εἶναι ὁ σχηματισμός διμεροῦς θυμίνης (εἰκόνα 139)

Στήν περίπτωση αὐτή ἂν ἡ ἐπιδιόρθωση δέν λάβη χώρα ἡ βλάβη εἶναι θνησιγόνος γιά τό κύτταρο, γιατί στό σημεῖο τοῦ διμεροῦς γίνεται κακός σχηματισμός τῆς διπλῆς ἑλικος.

Ἡ ἐπιδιόρθωση γίνεται ὡς ἑξῆς: ἕνα πρῶτο ἔνζυμο μία ἐνδονουκλεάση κόβει τό DNA σέ ἕνα σημεῖο. Ἡ DNA πολυμεράση I μέ τήν $5' \rightarrow 3'$ ἑξωνουκλεασική δράση τῆς καταστρέφει τό DNA, τό ἴδιο ἔνζυμο προκαλεῖ τήν σύνθεση καί τέλος ἡ δεσμάση συνδέει τό DNA (εἰκόνα 140):

Ἡ ἀσθένεια, ξυρόδερμα ὀφείλεται στήν ἔλλειψη ἐπιδιορθωτικῶν ἐνζύμων. Πρόκειται γιά γενετική ἀσθένεια πού κληρονομεῖται σάν ἕνας αὐτοσωματικός ὑπολειπόμενος χαρακτήρας κατὰ τήν ὁποίαν προκαλοῦνται βλάβες τοῦ δέρματος μετά ἀπό ἐκθεση στό φῶς πού μποροῦν νά ὀδηγήσουν σέ καρκίνους.

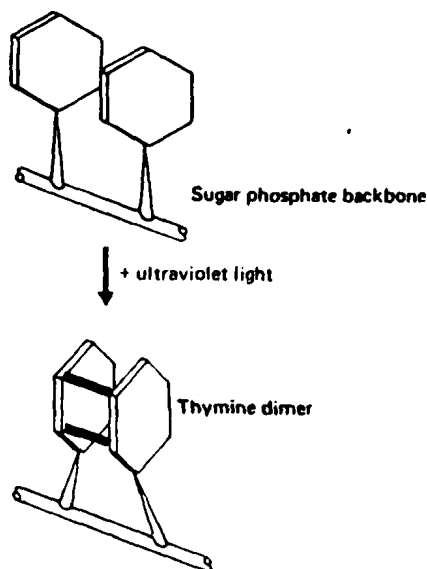


Figure 9-36
Formation of thymine dimers by uv irradiation.

(εἰκόνα 139)

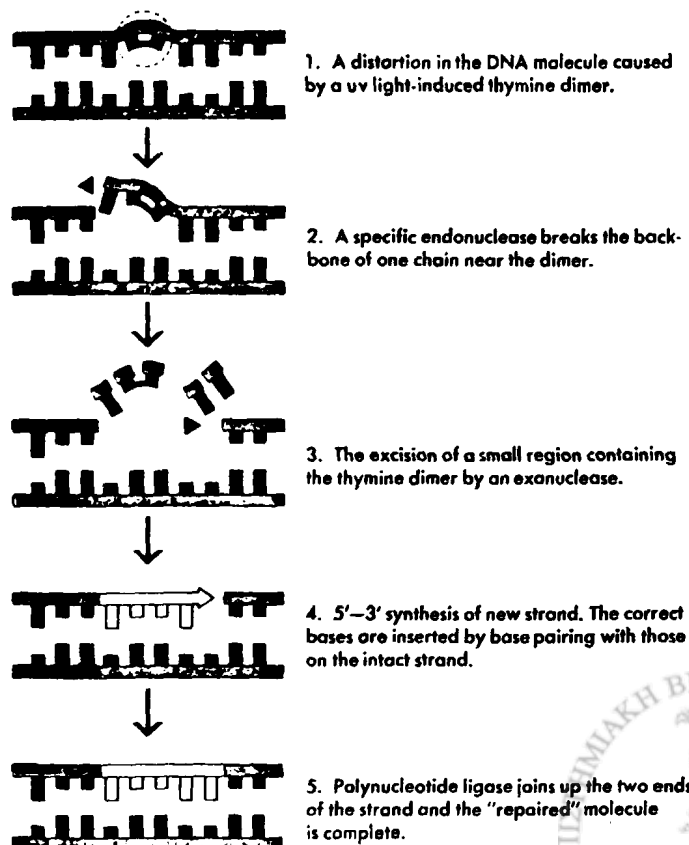


Figure 9-37

Some of the enzymatic steps involved in the repair of DNA molecules containing thymine dimers.

(εἰκόνα 140)

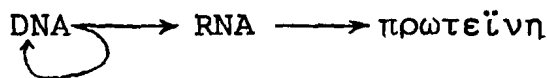
ΣΥΝΘΕΣΗ RNA - ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

1. Ρόλος του RNA στην μεταφορά πληροφορίας

Μπαίνουμε τώρα στο πρόβλημα της μεταφοράς της πληροφορίας από τις αλληλοδιαδοχές των βάσεων του DNA που είναι κωδικοποιημένη. Το πρόβλημα έδω είναι πολύ πιο πολύπλοκο από εκείνο του αναδιπλασιασμού του DNA γιατί οι πλάγιες αλυσεις των αμινοξέων δεν έχουν καμμία δυνατότητα να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου ή άλλους ασθενής δεσμούς με τα καλούπια τους δηλαδή τα νουκλεϊνικά όξέα. Παρ' όλα αυτά η σωστή αλληλοδιαδοχή αμινοξέων μπαίνει μέσα στην κατασκευή κάθε πρωτεΐνης με πιθανότητα λάθους λιγότερη από 1 για χίλια αμινοξέα. Έτσι το πρόβλημα της πρωτεϊνικής συνθέσεως είναι πολύπλοκο και χρειάστηκε πολύ περισσότερη δουλειά για να λυθεί.

Κατ' αρχάς θα δοῦμε τις αποδείξεις που μᾶς κάνουν να καταλάβουμε ότι το DNA δεν είναι το άμεσο καλούπι για την κατασκευή των πρωτεϊνών. Αντίθετα η γενετική πληροφορία μεταφέρεται σε μία άλλη ομάδα μορίων που αποτελούν τα τελικά καλούπια. Τα μόρια αυτά είναι τα ριβονουκλεϊνικά όξέα ή RNA. Τα μόρια του RNA είναι και αυτά μεγάλα πολυμερή μόρια και χημικῶς πολύ συγγενή πρὸς το DNA.

Το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας ἀφορᾷ τὴν κατεύθυνση μεταφοράς της πληροφορίας και λέει πῶς ἡ πληροφορία μεταφέρεται ἀπὸ τὸ DNA εἰς τὸ RNA καὶ κατόπι στὶς πρωτεΐνες



ἐπειδὴ ὅμως ὑπάρχουν ὁρισμένες ἐξαιρέσεις γιὰ τὸ πρῶτο στάδιο τῆς μεταφοράς καὶ ὑπάρχουν παραδείγματα πού τὸ RNA εἶναι τὸ πρωταρχικὸ πληροφοριακὸ μακρομόριο γι' αὐτό



τό δόγμα σήμερα είναι νουκλεϊνικά όξέα $\longrightarrow$ πρωτεΐνες
Ή πρωτεϊνική σύνθεση γίνεται έν άπουσία τοῦ DNA. Ή καλύτερη απόδειξη προέρχεται από μελέτη εύκαρυωτικών κυττάρων όπου ο διαχωρισμός πυρήνος καί πρωτοπλάσματος είναι έμφανής. Στα κύτταρα αυτά ή πρωτεϊνική σύνθεση γίνεται στο πρωτόπλασμα ενώ όλο σχεδόν τό DNA βρίσκεται στα χρωματοσώματα τοῦ πυρήνος, χρειάζεται έπομένως ένα ένδιάμεσο προϊόν για τήν μεταφορά τής πληροφορίας.

Έάν ίχνηθετήσουμε π.χ. ένα κύτταρο μέ ένα πρόδρομο τοῦ RNA π.χ. ούρακίλη βλέπουμε ότι σέ 15' λεπτά ή ραδιενέργεια βρίσκεται στόν πυρήνα καί σέ 90 λεπτά περνάει όλη στό πρωτόπλασμα γενικώς αποδεικνύεται ότι τό DNA δέν είναι τό άμεσο καλούπι για παραγωγή πρωτεϊνών είκονα 141



είκ.141 α) Αὐτοραδιογραφία ενός κυττάρου κατόπιν σημανσεως μέ ραδιενεργόν (H^3) κυτοσύνη για 15 λεπτά.
β) τό ίδιο κύτταρο κατόπιν 12 λεπτῶν σήμανση καί 88 λεπτά σέ ὕλικο μή περιέχον ραδιενέργεια. Πρακτικῶς όλη ή ραδιενέργεια τοῦ RNA έγκατέληψε τόν πυρήνα καί βρίσκεται μόνον στό πρωτόπλασμα.

Τό ένδιάμεσο μόριο πού παράγεται για νά γίνει πρωτεϊνική σύνθεση είναι RNA. Κατ'άρχας υπάρχουν αποδείξεις από πολλά είδη εύκαρυωτικών κυττάρων ότι όλη ή σύνθεση RNA γίνεται στόν πυρήνα ο οποῖος περιέχει DNA. Τό RNA δέν παράγεται στό κυττόπλασμα από όπου λείπει καί τό DNA.



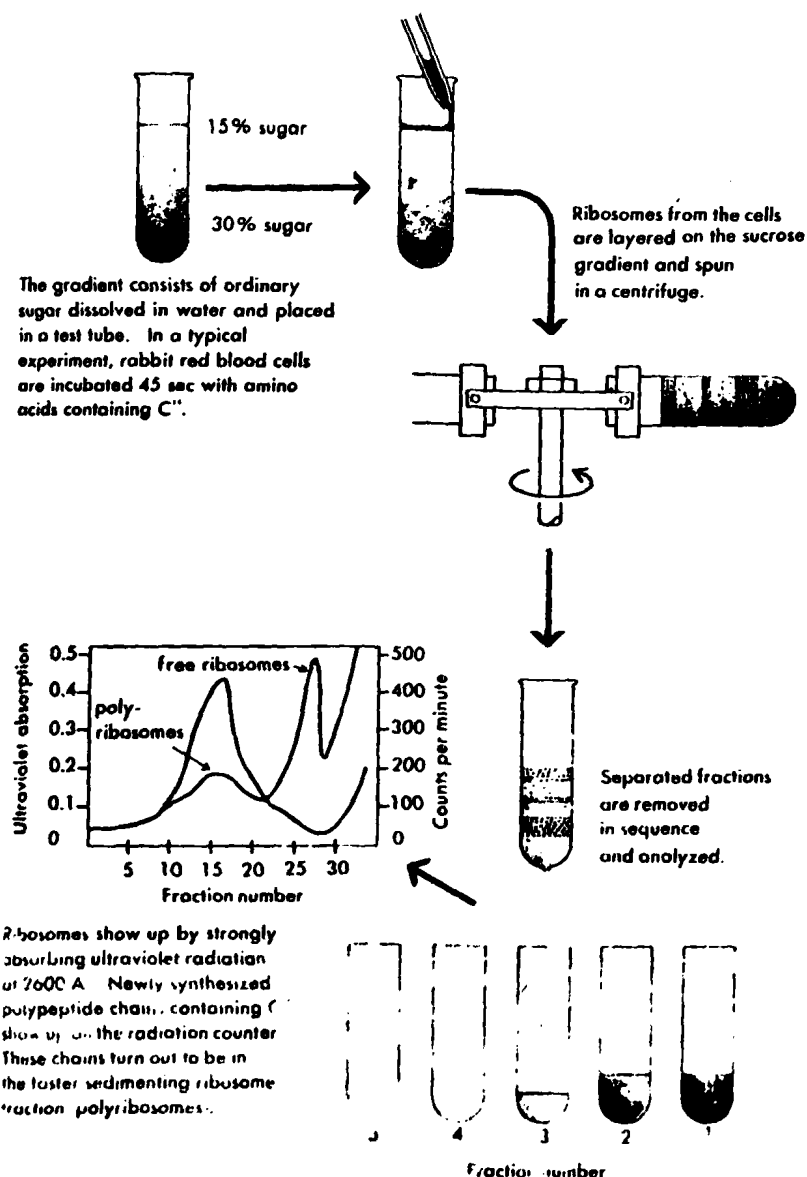
Μετά την σύνθεσή τους τὰ μόρια τοῦ RNA μεταφέρονται στό κυττόπλασμα ὅπου λαμβάνει χώρα ἡ πρωτεϊνική σύνθεση. Τό ποσόν ἐξ ἄλλου τῆς πρωτεϊνικῆς συνθέσεως εἶναι ἀμεσα σχετικό μέ τήν ποσότητα τοῦ RNA τοῦ κυττάρου. Δηλαδή κύτταρα πού περιέχουν πολύ RNA παράγουν καί πολλές πρωτεΐνες ἀντίθετα κύτταρα ὅπως τοῦ μυϊκοῦ ἰστοῦ πού δέν περιέχουν πολύ RNA δέν παράγουν καί πολλές πρωτεΐνες.

Διά πειραμάτων ἱχνηθετήσεως εἶναι δυνατόν νά ἐντοπίσουμε μέ ἀκρίβεια τήν θέση τῆς πρωτεϊνικῆς συνθέσεως μέσα στό κυτταρόπλασμα. Ἐάν πάρουμε κύτταρα καί τοὺς δώσουμε ραδιενεργά ἀμινοξέα γιά πολύ μικρό χρονικό διάστημα κατόπι τὰ σπάσουμε καί διαχωρίσουμε ὑποκυτταρικές μονάδες βρίσκουμε πῶς ὅλη ἡ ραδιενέργεια βρίσκεται συγκεντρωμένη σέ ὁρισμένα στοιχεῖα τοῦ πρωτοπλάσματος πού ὀνομάζονται πολυριβωσώματα εἰκόνα 142, 143.



· εἰκ. 142. Τμήμα κυττάρου παγκρέατος ὅπως φαίνεται στό ἠλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται λίαν ἀνεπτυγμένο ἐνδοπλασματικό δίκτυο περιέχον ριβωσώματα. Ὑπάρχουν καί ἐλεύθερα ριβωσώματα.





είκ.143. Φυγοκέντρωση σε κλίση πυκνότητας σακχαρώδους υποκυτταρικών μονάδων κατόπιν από βραχεία σήμανση με ραδιενεργά αμινοξέα. Αποδεικνύεται ότι η ραδιενέργεια βρίσκεται στα πολυριβωσώματα.

Τό αυτό πείραμα μπορεί νά γίνει καί *in vitro* σε καλῶς παρασκευασμένες κυτταρικές μονάδες. Ερίσκουμε πάλι ὅτι ἡ σύνθεση τῶν πρωτεΐνων γίνεται στά πλούσια σε RNA σφαιρικά σωμάτια πού εἶναι τά πολυριβωσώματα. Τά πολυριβωσώματα φαίνονται στό ἠλεκτρονικό μικροσκόπιο σάν μία ἀλυσίδα ἀπό σφαιρικά σωμάτια τά ριβωσώματα τά ὁποῖα κρατιοῦνται ἑνωμένα μεταξύ τους διά ἑνός μορίου RNA πού ὀνομάζεται ἀγγελιοφόρο RNA. θά δοῦμε ἀργότερα πιά ἀκριβῶς εἴ-

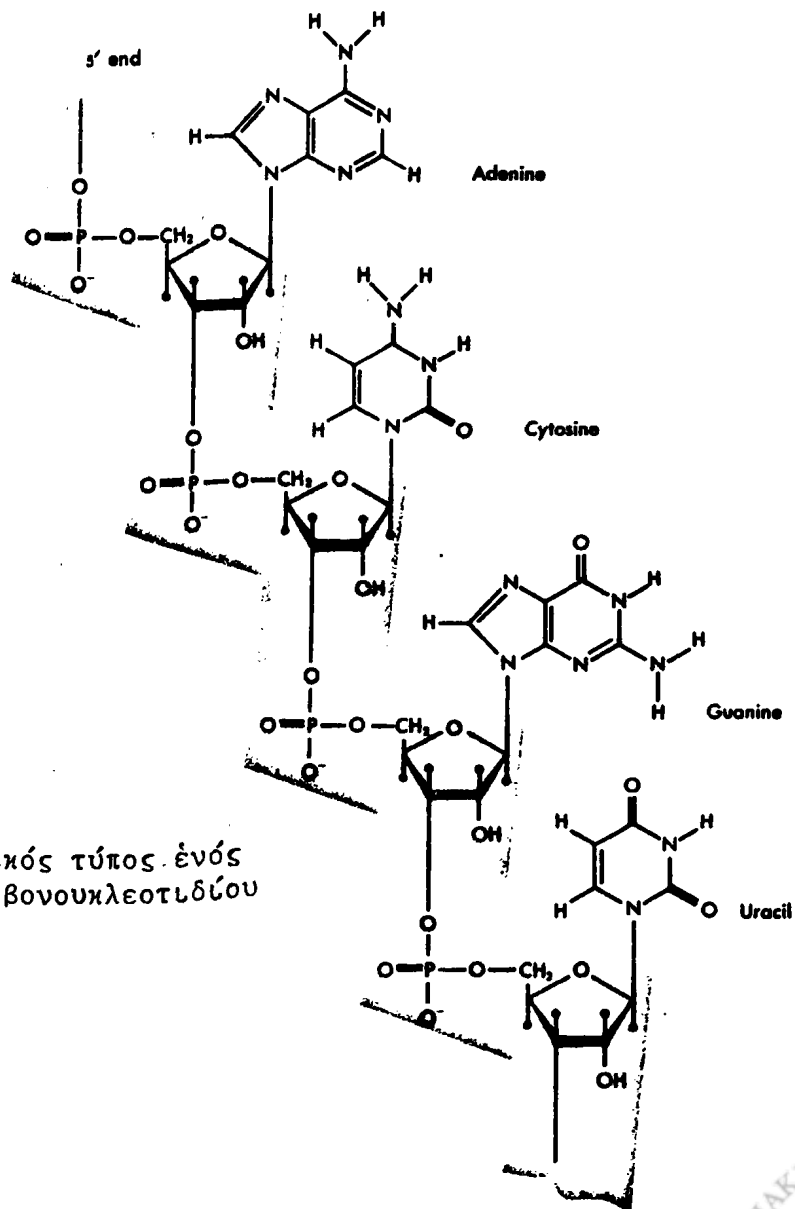


ναι ή δομή καί λειτουργία τών πολυριβωσωματίων.

2. Χημική σύσταση του RNA. Δομή του μορίου.

Τό RNA είναι χημικώς πολύ όμοιο μέ τό DNA. Παρατήρηση τής δομής του RNA δείχνει πώς ή σύνθεσή του μπορεί νά γίνει χρησιμοποιώντας σάν μήτρα τό DNA.

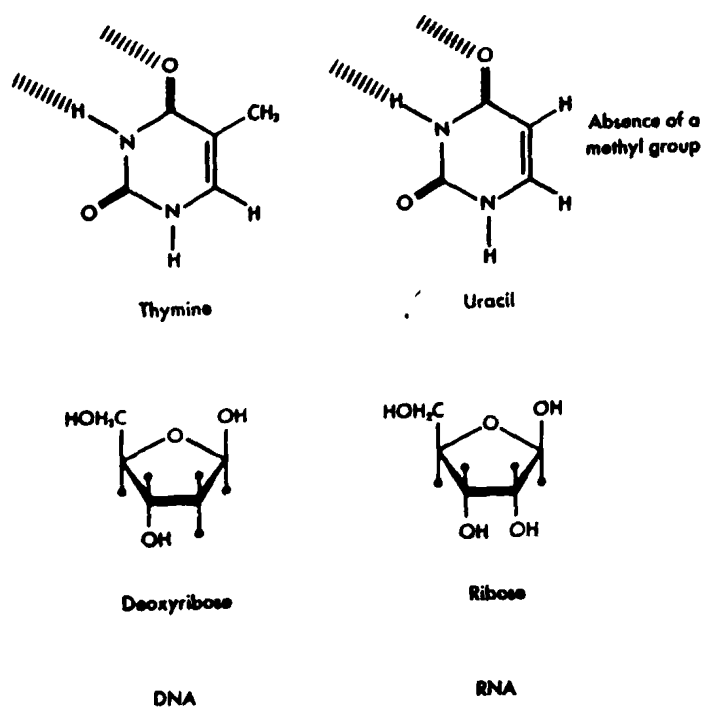
Αποτελείται από μακριά χωρίς διακλαδώσεις μόρια τά όποία περιέχουν 4 τύπους νουκλεοτιδίων ένωμένων μεταξύ τους μέ 3' - 5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. είκόνα 144.



είκ.144. Ο χημικός τύπος ενός πολυριβονουκλεοτιδίου

Δύο διαφορές στις χημικές ομάδες διακρίνουν τα μόρια του RNA από το DNA 1ον/ Μία μικρή διαφορά στα σάκχαρα. Το σάκχαρο του DNA είναι δεσοξυριβόζη ενώ το RNA περιέχει ριβόζη, η διαφορά συνίσταται σε ένα OH που βρίσκεται στο δεύτερο άτομο άνθρακος του σακχάρου.

2ον/ Το RNA δεν περιέχει θυμίνη αλλά αντί αυτής περιέχει την πολύ όμοια με την θυμίνη ούρακίλη, η διαφορά καί εδώ έγκειται στην παρουσία μιας μεθυλομάδος στην θυμίνη που δεν παρατηρείται στην ούρακίλη. είκονα 145.



είκ. 145. Δομή ούρακίλης καί της ριβόζης. Έλειψις ενός μεθυλίου από την ούρακίλη καί τό πρόσθετον OH της ριβόζης.

Παρόλες αυτές τίσ διαφορές τά πολυριβονουκλεοτίδια δύνανται νά σχηματίσουν συμπληρωματικές έλικες του ίδιου τύπου μέ τό DNA δηλαδή διπλές έλικες άρκεϊ ή σειρά των βάσεων νά είναι συμπληρωματική δηλαδή ούρακίλη άπέναντι στην άδενίνη καί κυτοσίνη άπέναντι στην γουανίνη. Άρα οί δύο χημικές διαφορές δέν έμποδίζουν τό RNA νά σχηματίζει τίσ ίδιες διπλές έλικες όπως τό DNA. Παρόλην όμως

τήν ομοιότητά τους με τό DNA τά μόρια RNA δέν σχηματίζουν διπλές έλικες μεταξύ τους πού νά συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου. Αυτό αποδεικνύεται από τό ότι τό ποσόν τής ουρακίλης στό RNA δέν ίσοῦται με τό ποσόν τής άδενίνης καί τό αυτό ίσχύει καί με τά ποσά κυτοσίνης καί γουανίνης.

Άρα τό RNA άνευρίσκεται σάν άπλή άλυσος πολυνουκλεοτιδίων. Ή διαφορά αυτή κάνει έτσι ώστε ή τρισδιάστατος δομή τοῦ μορίου τοῦ RNA νά εἶναι πολύ άκανόνιστος σέ σχέση με τό DNA. Αυτή ή άστάθεια στήν τρισδιάστατο δομή τοῦ μορίου τοῦ RNA έκανε πολλούς νά άντιμετωπίσουν με άπεσιοδοξία τό πρόβλημα τοῦ τρόπου με τόν όποιο τό RNA φτιάχνει τίς πρωτεΐνες γιατί νομίζανε πώς έπρεπε πρώτα νά δοῦμε τό καλούπι γιά νά μπορέσουμε νά καταλάβουμε πώς δρᾷ.

Εύτυχως άπεδείχθη ότι οι φόβοι αυτοί ήσαν άδικαιολόγητοι καί θά δοῦμε άργότερα πώς βρέθηκε ο μηχανισμός τής πρωτεϊνικής συνθέσεως.

3. Ένζυμική σύνθεση τοῦ RNA με μήτρα τό DNA.

Τό γεγονός ότι τό RNA όπως καί τό DNA εἶναι μία μακριά χωρίς διακλαδώσεις άλυσος χρησιμοποιούσα 4 διαφορετικά νουκλεοτίδια άμέσως δείχνει ότι ή γενετική πληροφορία πού εἶναι γραμμένη στό DNA μεταφέρεται σέ μία συμπληρωματική άλυσίδα νουκλεοτιδίων στό RNA. Σύμφωνα με αυτή τήν υπόθεση οι κλώνοι τοῦ DNA σέ μία ή περισσοτέρους περιόδους τοῦ κυτταρικοῦ κύκλου θά πρέπει νά άνοίγουν σέ όριμένα σημεία καί νά εργάζονται σάν μήτρες γιά τήν παραγωγή τοῦ RNA.

Επίσης σύμφωνα με αυτήν τήν υπόθεση θά πρέπει νά υπάρχουν ρυθμιστικοί μηχανισμοί πού νά καθορίσουν πότε τό DNA θά ύφίσταται διπλασιασμό (άντιγραφή) όταν άνοίγει καί πότε



μεταγραφή καί θά χρησιμοποιεῖται σάν μήτρα γιά παραγωγή RNA. Ἡ καλύτερη ἀπόδειξη τῆς ὑποθέσεως τῆς μεταγραφῆς τοῦ DNA σέ RNA προήλθε ἀπό τήν ἀνακάλυψη τοῦ ἀντιστοίχου ἐνζύμου δηλαδή τῆς RNA πολυμεράσης.

Τό ἐνζυμο αὐτό ἐνώνει μεταξύ τους τά διάφορα ριβονουκλεοτίδια καταλύοντας τόν σχηματισμό τῶν 3' - 5' φωσφοδιεστερικών δεσμών πού ἀποτελοῦν τόν σκελετό τῶν μορίων τοῦ RNA.

Τήν ἐργασία αὐτήν τήν κάνει ὅμως μόνον παρουσία τοῦ DNA πράγμα πού σημαίνει ὅτι τό DNA εἶναι ὑπεύθυνο γιά τήν σειρά μέ τήν ὁποία τά νουκλεοτίδια θά διαταχθοῦν τελικά στήν συνθετομένη ἄλυσσο τοῦ RNA.

Ἡ ἀπόδειξη τοῦ γεγονότος αὐτοῦ βρίσκεται ἀπό τήν μελέτη τῆς συστάσεως σέ βάσεις τοῦ DNA καί τοῦ RNA δηλαδή τοῦ λόγου $\frac{A+T}{G+C}$ καί τοῦ ἀντιστοίχου στό RNA $\frac{A+U}{G+C}$. Οἱ λόγοι αὐτοί χρησιμοποιώντας διαφόρων τύπων DNA δείχνουν ὁμοιότητα μεταξύ ἐνός DNA καί τοῦ RNA τό ὁποῖον παράγει *in vitro* πίνας 8. Καί ἄλλου τύπου πειραμάτα ἀποδεικνύουν ὅτι ἡ μήτρα εἶναι ἕνα μονόκλωνο DNA π.χ. ἐάν χρησιμοποιήσουμε σάν μήτρα τό μονόκλωνο DNA τοῦ ἰοῦ ΦX174. Πάνω στό DNA τοῦ ἰοῦ αὐτοῦ ἡ RNA πολυμεράση φτιάχνει ἕνα RNA μέ τήν ἀντιπαράλληλο σύσταση. Στήν περίπτωση δέ αὐτή τό RNA μένει ἐνωμένο πάνω στό DNA καί ἐπιτρέπει τήν ἀπομόνωση ἐνός ὑβριδίου DNA/RNA.

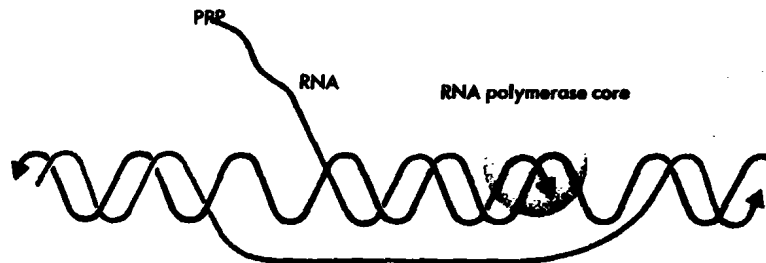
Table 11-2 Comparison of the Base Composition of Enzymatically Synthesized RNA's with the Base Composition of Their Double-Helical DNA Templates

Source of DNA Template	Composition of the RNA Bases				$\frac{A+U}{G+C}$	$\frac{A+T}{G+C}$
	Adenine	Uracil	Guanine	Cytosine	Observed	in DNA
T2	0.31	0.34	0.18	0.17	1.86	1.84
Call thymus	0.31	0.29	0.19	0.21	1.50	1.35
<i>E. coli</i>	0.24	0.24	0.26	0.26	0.92	0.97
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> (a bacterium)	0.17	0.16	0.33	0.34	0.49	0.39



Τό αποτέλεσμα αυτό έρχεται σέ αντίθεση μέ τά πειράματα πού χρησιμοποιούν δίκλωνο DNA. Έδω τό παραγόμενο RNA ταχέως αποχωρίζεται από τήν μήτρα καί οί δύο κλώνοι του DNA ξαναενώνονται μεταξύ τους στά σημεία πού άνοιξαν .

είκόνα 146.



είκ.146. Η σύνδεσις του ένζυμου, RNA πολυμεράση, στο DNA δια-
νούγει τήν διπλή έλικα σέ ένα περιορισμένο τμήμα καί
έπιτρέπει τήν σύνθεση του RNA. Τό RNA πού συντίθεται έκ-
διώκεται από ξανακλείσιμο της διπλής έλικας του DNA καί
τό 5' άκρο του είναι έλεύθερο για νά άρχίση τήν πρωτεϊ-
νική σύνθεση ένούμενο μέ ριβοσωμάτια.

Φαίνεται πώς ή ένωση DNA/DNA είναι ισχυροτέρα της ένωσης
DNA/RNA καί εύνοείται θερμοδυναμικά έτσι ή άλυσος του
RNA έκδιώκεται από τήν ένωση μέ τό DNA καί έλευθερώνεται
όπως προχωρεί ή σύνθεσή του. Βλέπουμε έπομένως πώς βασι-
κά ο μηχανισμός για τήν σύνδεση RNA είναι πολύ όμοιος μέ
τόν μηχανισμό συνθέσεως του DNA καί στίς δύο περιπτώσεις
τά άμεσα πρόδρομα είναι νουκλεοτίδια τριφωσφορικά.

Έπίσης καί στίς δύο περιπτώσεις ένα είδικό ένζυμο χρη-
σιμοποιείται για τήν σύνθεση, ή DNA καί ή RNA πολυμεράση,
ή σειρά δέ των νουκλεοτιδίων καθορίζεται πάντοτε από μία
μήτρα DNA τήν αντιπαράλληλο άλυσος DNA στην σύνθεση DNA/
DNA καί στην σύνθεση DNA/RNA.

Η σύνθεση του RNA είναι καί αυτή μία σύνθεση άρκετά πι-
στή. Η έρευνα απέδειξε βέβαια πώς δέν υπάρχει μηχανισμός
έπιδιορθώσεως λαθών στην RNA πολυμεράση αλλά πρέπει νά λά-

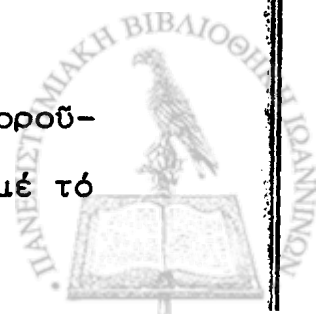


βουμε ὑπ' ὄψιν ὅτι λάθος στό RNA δέν εἶναι τόσο σημαντικό ὅπως ἓνα λάθος στό DNA γιατί τό RNA δέν αὐτοπαραγάγεται καί τό λάθος δέν πολλαπλασιάζεται.

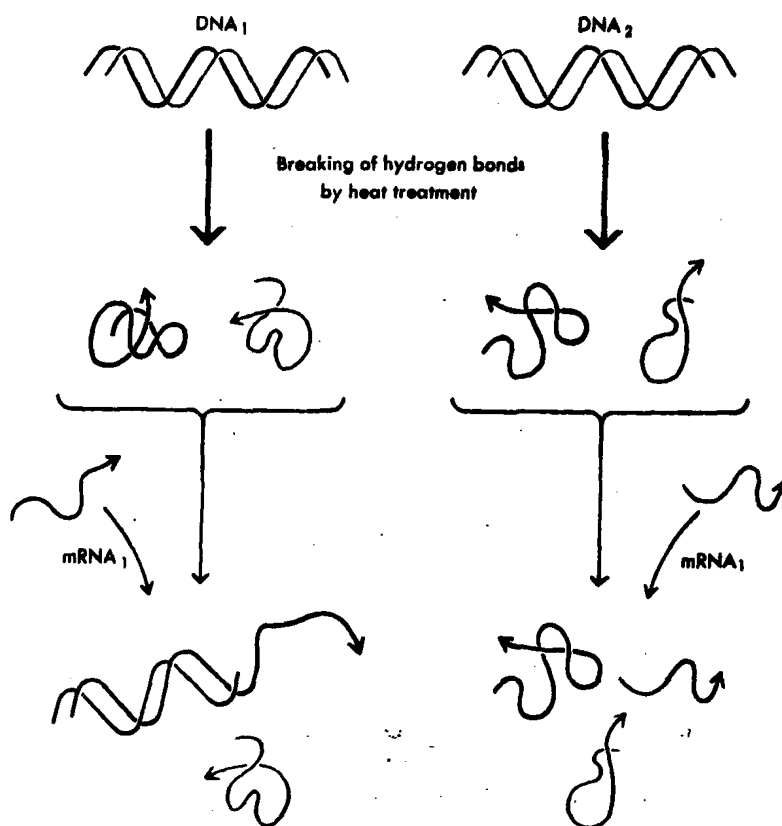
4. Σέ κάθε γόνο μόνον ὁ ἓνας κλώνος τοῦ DNA
χρησιμοποιεῖται σάν μήτρα γιά σύνθεση τοῦ RNA.

Ἐάν καί οἱ δύο κλώνοι τοῦ DNA χρησιμοποιόντουσαν σάν μήτρα γιά σύνθεση ἀντιστοίχου RNA καί αὐτό χρησιμοποιεῖτο γιά νά φτιάξει τό καθένα μία πρωτεΐνη τότε κάθε γόνος θά ἐφτιαχνε δύο πρωτεΐνες πράγμα πού γενετικῶς δέν στέκει γιατί γνωρίζουμε πῶς κάθε γόνος φτιάχνει μόνον μία πρωτεΐνη. Ἐπομένως θά πρέπει ἢ μόνον ἓνας κλώνος τοῦ DNA νά ἀντιγράφεται σέ RNA ἢ ἂν καί οἱ δύο κλώνοι ἀντιγράφονται τό ἓνα RNA νά καταστρέφεται καί νά μήν χρησιμοποιεῖται σάν καλούπι γιά σύνθεση πρωτεΐνης. Τά πειραματικά δεδομένα μᾶς λένε ὅτι ἀπό τίς δύο αὐτές ὑποθέσεις ἡ πρώτη εἶναι ἡ σωστή. Αὐτό ἔχει ἀποδειχθεῖ μέ πολλούς τρόπους. Π.χ. ὑπάρχει ἓνας ἴος (SP8) ὁ ὁποῖος ἀναπτύσσεται στό θαυμαστόν βακτηρίδιον (*bacillus subtilis*) καί ὁ ὁποῖος περιέχει δύο κλώνους DNA πού ἔχουν μεγάλη διαφορά συστάσεως σέ βάσεις καί μποροῦν εύκολα νά διαχωρισθοῦν ὁ ἓνας ἀπό τόν ἄλλο. Χρησιμοποιώντας αὐτόν τό φάγο μποροῦμε νά ρωτήσουμε ἂν τά παραγόμενα RNA προέρχονται καί ἀπό τούς δύο κλώνους ἢ μόνον ἀπό τόν ἓνα. Γιαυτό τό σκοπό τό DNA τοῦ ἴου θερμένεται, λίγο κάτω ἀπό τούς 100° , ὁπότε οἱ δεσμοί ὕδρογόνου καταστρέφονται καί οἱ δύο ἀλύσεις τοῦ DNA διαχωρίζονται. Φυγοκέντριση σέ χλωριούχο καΐσιο ἐπιτρέπει τήν ἀπομόνωση τῶν δύο ἀλύσεων τοῦ DNA αὐτοῦ.

Ἐχοντας ἔτσι ξεχωρίση τούς δύο κλώνους τοῦ DNA μποροῦμε νά δοῦμε ποιός ἀπό τούς δύο σχηματίζει ὑβρίδια μέ τό

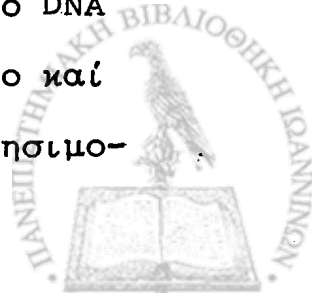


RNA πού παράγεται *in vivo* κατά την μόλυνση του βακτηρι-
δίου από τον φάγο. Τό αποτέλεσμα του πειράματος είναι
πώς μόνον ὁ ἕνας κλώνος τοῦ DNA τοῦ ἴου σχηματίζει ὑβρί-
δια μέ τό RNA καί ἄρα μεταγράφεται. εἰκόνα 147.



εἰκ. 147. Χρησιμοποίησις τοῦ ὑβριδισμοῦ γιά τήν ἀποδείξη
συμπληρωματικότητος μεταξύ ἑνός mRNA καί τοῦ ἀντι-
στοίχου κλώνου τοῦ DNA. Ὅταν τό RNA₁ ἀναμυγνύεται
μέ τούς κλώνους ἑνός DNA₂ δέν γίνεταί ὑβριδοποίησις.

Τό ὅτι μόνον ὁ ἕνας κλώνος τοῦ DNA ἐκάστου γόνου μεταγρά-
φεται ἐξηγεῖ καί γιατί ἡ συχνότης τῶν βάσεων τοῦ RNA δέν
ἀκολουθεῖ τόν κανόνα τῆς συχνότητος στό DNA δηλαδή ἐνῶ
στό DNA $A=T$ καί $G=C$ στό RNA $A \neq U$ καί $G \neq C$ πράγμα πού σημαί-
νει ἐπίσης μεταγραφή μόνον ἑνός κλώνου τοῦ DNA καί μή ὁ-
παρξη συμπληρωματικῶν RNA. Ἀντιγραφή τοῦ ἑνός μόνον ἀπό
τούς δύο κλώνους παρατηρεῖται καί *in vitro* ἀρκεῖ τό DNA
πού χρησιμοποιεῖται γιά μεταγραφή νά εἶναι ὁλόκληρο καί
χωρίς σπασίματα στήν διπλή ἑλικά. Πειράματα πού χρησιμο-



ποιοῦν τὸ DNA τοῦ φάγου T7 δείχνουν ὅτι ὁ κλῶνος τοῦ DNA πού μεταγράφεται *in vitro* εἶναι ὁ ἴδιος μέ αὐτόν πού μεταγράφεται *in vivo* βλέπουμε τίς παραγόμενες ἀλυσίδες RNA σέ παρασκευάσματα στό ἠλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Ἡ μεταγραφή ἄλλων DNA ἐκτός τοῦ T7 καί τοῦ ἰοῦ SP8 δέν εἶναι βέβαια τόσο ἀπόλυτος στήν χρησιμοποίηση τῶν κλῶνων.

Υπάρχουν περιπτώσεις πού ἡ μεταγραφή γίνεται ἀλλοῦ στόν ἓνα κλῶνο καί ἀλλοῦ στόν ἄλλο κλῶνο ὅπως συμβαίνει στούς ἰούς T4 καί λ καί ἀκόμη καί στό DNA τῆς E.-coli. Πάντως ποτέ δέν γίνεται στόν ἴδιο γόνο νά ἔχουμε καί τὰ δύο DNA νά μεταγράφονται. Ἐπίσης ἡ φορά πάνω στό χρωματόσωμα τῆς μεταγραφῆς μπορεῖ νά γίνεται σέ διαφορετικές κατευθύνσεις (ἰός Sv40)

5. Χαρακτῆρες τοῦ μεταγραφομένου RNA

Σέ ἀντίθεση μέ τὸ DNA πού μπορεῖ πολλές φορές νά εἶναι ἓνα κυκλικό μόριο τὰ RNA εἶναι πάντοτε γραμμικά καί ποτέ κυκλικά.

Ἡ τρισδιάστατος δομή τοῦ RNA εἶναι ἐξ ἄλλου πολύ ἀκανόνιστος καί διαφέρει στά διάφορα μόρια.

Πολλές φορές σχηματίζονται ἀναδιπλώσεις τῆς μονῆς ἑλικος τοῦ RNA μέ σχηματισμό μερικῶς διπλῆς ἀλύσεως. Οἱ σχηματισμοί αὐτοί προσδίδουν χαρακτηριστικές τρισδιάστατες δομές στά μόρια τοῦ RNA καί συχνά χρησιμεύουν γιά τήν ἔκ-
κωση μέ εἰδικές πρωτεΐνες πού ἀναγνωρίζουν τμήματα τοῦ RNA.

Ἡ σύνθεση τοῦ RNA ὅπως καί ἡ σύνθεση τοῦ DNA γίνεται ἀύ-
στηρά πρὸς μία ὠρισμένη κατεύθυνση στήν σύνδεση τοῦ φωσ-
φοδιεστερικοῦ δεσμοῦ. Μία ἀλυσίδα RNA περιέχει δύο ἄκρα
τὸ 5' ἄκρο καί τὸ 3' ἄκρο, ἀν ἡ σύνθεση ἔχει τήν φορά 5'
πρὸς 3' τότε τὸ ἄκρον 5' θά ἀρχίζει μέ μίαν ὁμάδα (P~P~P)

τριφωσφορική.

Εάν όμως η φορά είναι 3'πρός 5'τότε τό άκρον πού αύξάνεται θά έχει τήν τριφωσφορική ομάδα. Έχει άποδειχθεϊ τελευταίως πώς η φορά συνθέσεως του RNA είναι 5'πρός 3'. Χρησιμοποίησις π.χ. του μεταβολίτου 3'-δεσοξυαδενοσίνης πού δρᾷ άνασταλτικά στην σύνθεση του RNA δείχνει τήν φορά συνθέσεως γιατί μόλις εισέλθη στο κύτταρο φωσφορυλιώνεται σε 3'-δεσοξυαδενοσίνη-τριφωσφορική καί εισέρχεται στο αύξανόμενο 3'άκρο η δέ σύνθεση σταματάει γιατί ο μεταβολίτης αυτός δέν περιέχει 3'-OH για νά επιτρέψει τήν συνέχιση της αλύσεως.

6. RNA πολυμεράση

Ενώ η DNA πολυμεράση άποτελεϊται από μίαν μόνον πεπτιδική αλυσίδα η RNA πολυμεράση είναι ένα πολύ πολύπλοκο ένζυμο πού άποτελεϊται από πέντε διαφορετικές υπομονάδες τίς β', β, σ, α, καί ω μέ αντίστοιχα μοριακά βάρη 160.000, 150.000, 90.000, 40.000 καί 10.000. Οι υπομονάδες αυτές ένώνονται μεταξύ τους μέ χαλαρούς δευτερεύοντας δεσμούς. Ο παράγων σ είναι η πιο χαλαρά συνδεδεμένη υπομονάδα έτσι μπορεί κανείς νά άπομονώσει τό ένζυμο χωρίς τόν παράγοντα σ. Τό όλοένζυμο περιέχει καί τόν παράγοντα σ ενώ τό βασικό ένζυμο περιέχει τίς άλλες υπομονάδες μέ τήν σύσταση (β'βα₂ω) είκόνα 148.

Τό βασικό ένζυμο καταλύει τόν σχηματισμό των φωσφοδιεστερικών δεσμών έξ ίσου καλά είτε παρουσία είτε άπουσία του παράγοντος σ.

Ο παράγων σ δέν έχει καμμία καταλυτική λειτουργία, ο ρόλος του όμως είναι πολύ σημαντικός γιατί αναγνωρίζει τά σημεϊα έναρξεως της συνθέσεως από τήν RNA πολυμεράση.



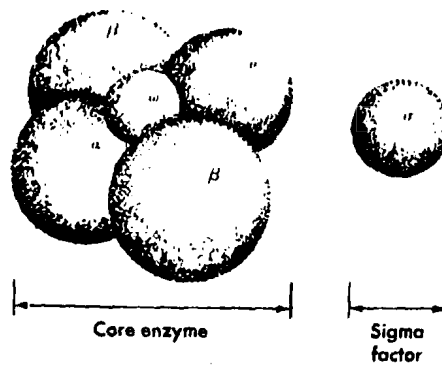


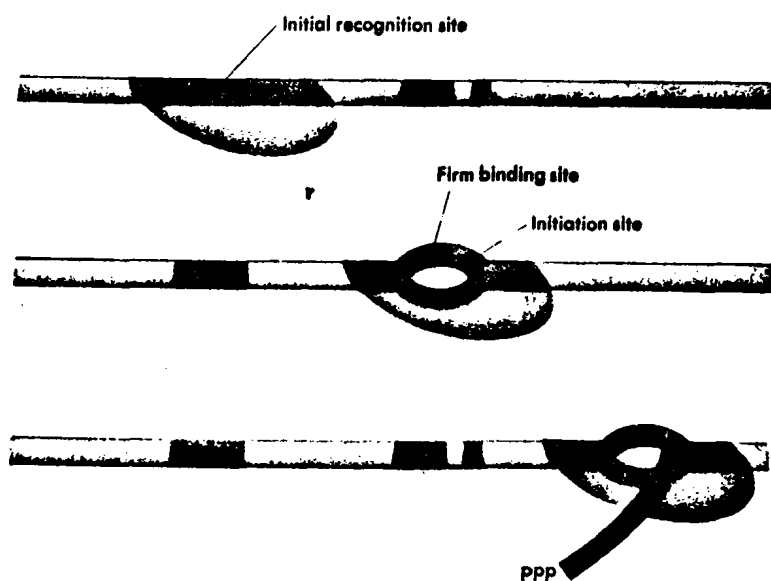
Figure 11-13
Schematic picture of RNA polymerase
showing subunit construction.

είκ. 148.

Πειράματα *in vitro* αποδεικνύουν ότι έλλείψη του παράγοντος σ τό βασικό ένζυμο μπορεί περιστασιακά νά προκαλέσει έναρξη συνθέσεως αλλά πρόκειται για λανθασμένες έναρξεις πού γίνονται σέ οποιοδήποτε κλώνο του DNA καί οίανδήποτε σημείο. Όταν ο παράγων σ είναι παρών ή έναρξη γίνεται στόν σωστό κλώνο καί σέ ορισμένο σημείο αυτού όπου ή RNA πολυμεράση συνδέεται μέ τό DNA καί αναγνωρίζει μία ειδική αλληλοδιαδοχή βάσεων. Δέν είναι γνωστό ακόμη εάν ή αναγνώριση γίνεται από τόν ίδιο τόν παράγοντα σ ή άν γίνεται από τό βασικό ένζυμο στό οποίο ή σύνδεση μέ τόν σ προκάλεσε τρισδιάστατο μεταβολή ώστε νά μπορεί νά αναγνωρίση μία ωριμένη αλληλουχία βάσεων στό DNA (τόν *promotor* υποκινητή). Τό αρχικό σημείο αναγνώρισεως από τήν πολυμεράση δέν είναι τό ακριβές σημείο έναρξεως τής μεταγραφής. Ή πολυμεράση συνδέεται ισχυρά στό σημείο αυτό ίσως αναγνωρίζοντας ζευγαρομένες βάσεις. Άμέσως μετά τήν σύνδεση οί βάσεις χαλαρώνουν μεταξύ τους για νά έπιτρέψουν τήν μεταγραφή αλλά ή μεταγραφή αυτή αρχίζει λίγο πιά πέρα από τήν αρχική σύνδεση μέ μετατόπιση του ένζυμου.



μέχρι πριν από δύο χρόνια η φύσις της αλληλοδιαδοχής πού ενώνεται ή πολυμεράση ήτο τελείως άγνωστος. Σήμερα όμως ένας αριθμός από αλληλοδιαδοχές βάσεων διαφόρων υποκινητών είναι γνωστός. Έτσι έγινε γνωστό ότι οι βάσεις πού αναγνωρίζει ή πολυμεράση δέν μεταγράφονται σέ RNA. Άμέσως μετά τήν συνένωσή της μέ τό DNA ή πολυμεράση προχωρή καί μετατοπίζεται λίγο σέ ένα άλλο σημείο όπου συνδέεται ακόμη πιο ισχυρά καί εκεί αρχίζει τήν μεταγραφή. Υπάρχουν λοιπόν δύο σημεία τό σημείον αναγνωρίσεως καί τό σημείον συνδέσεως εικόνα 149.



είκ.149 Σημεία αναγνωρίσεως καί συνδέσεως της RNA πολυμεράσης κατά τήν μεταγραφήν.

Καί τά δύο αúτά σημεία είναι αλληλοδιαδοχές πλούσιες σέ ζεύγη A-T πού εύνοούν τήν αποσύνδεση των δύο κλώνων του DNA. Υπάρχει μία βασική αλληλουχία βάσεων πού βρίσκεται σχεδόν ή ίδια σέ διαφόρους υποκινητάς καί ή όποία είναι ή 5'TAT Pu ATG

3'ATA Py TAC

Οι παραλαγές σ'αúτήν τήν αλληλουχία μπορεί νά σημαίνουν διαφόρους ταχύτητας συνδέσεως της πολυμεράσης μέ αποτέλε-



σμα ώρισμένοι γόννοι νά μεταγράφονται πιο συχνά από άλλους. (πίνακας 9).

Η έναρξης της συνθέσεως του RNA δεν αρχίζει ακριβώς από τό σημείο της ισχυράς συνδέσεως αλλά 6-7 νουκλεοτίδια παρακάτω. Η έναρξη φαίνεται νά αρχίζει μέ μία πουρίνη πού είναι ή pppG ή pppA. Τό ότι σέ μερικές περιπτώσεις ή αρχή του RNA γίνεται μέ πυριμιδίνη ώφείλεται στό ότι τά περισσότερα RNA μετά τήν σύνδεσή τους κόβονται από ώρισμένες ένδονουκλεάσες κατά τά στάδια της "ώριμάνσεως" του RNA πρίν νά χρησιμοποιηθοῦν γιά περαιτέρω λειτουργία αυτό φαίνεται από τό ότι τό 5' άκρο τους δεν περιέχει ppp πράγμα πού δειχνη ότι ένα κομμάτι του RNA απέκόπη.

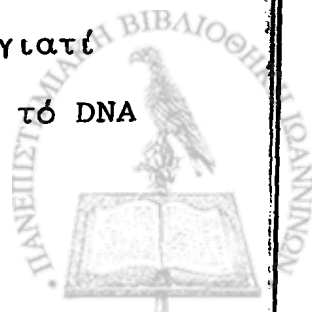
RNA Polymerase binding site sequences

fd	TGCTTCGTGAC	TATAATA	GACAGGG	TAAAGACCTGATTTTGA
T7A3	AAGTAAACACGG	TACGATG	TACCA CA	TGAAACGACAGTGAGTCA
T7A2	AGTAACATGCAG	TAAAGATA	CAAA T CG	CTAGGTAACTAGCAG
Lac-UV-5	GCTTCGGCTCG	TATAATG	TGTGGAA	TGTGAGCGGATAACAA
Lambda P _R	ACCTCTGGCGGT	GATAATG	GTTGCA T	GTAATAAGGAGGTG
SV40	TTTATTCAGCT	TATAATG	GTTACAA	ATAAAGCAATAGCATC
Lambda P _L	ACCAC TGGCGGT	GATACTG	AGCACA T	CAGCAGGACGCACTGAC
E coli Tyr tRNA	CGTCA TTTGA	TATGATG	CGCCC CG	CTTCCCGATAAGGGAGCAG
Lac Wildtype	GCTTCGGCTCG	TATGTTG	TGTGGAA	TGTGAGCGGATAACAA

Figure 11-15
RNA polymerase binding site sequences for different viral and bacterial DNA's. The initially transcribed base is shown in color.

Πίνακας 9. Άλληλοδιαχές βάσεων στά σημεία συνδέσεως της πολυμεράσης στό DNA διαφόρων ίών καί βακτηριδίων. Αναφαίνεται μία άλληλοδιαδοχή πού παρατηρείται σταθερά σέ πολλά διάφορα DNA.

Κατά τήν περίοδο της έπιμυκήνσεως της αλύσεως του RNA ο παράγων σ άποσπάται από τό βασικό ένζυμο 1ον/ γιατί δεν έχει κανένα ρόλο νά παίξει στην περίοδο αυτή 2ον/ γιατί ή παρουσία του ένισχύει τήν σύνδεση του ένζυμου μέ τό DNA καί έμποδίζει τήν ταχεία αύξηση της αλύσεως.



7. Σημεία για τη λείξη της μεταγραφής

Έκτός από τα σημεία έναρξεως υπάρχουν και σημεία που σημαίνουν λείξη της μεταγραφής άλλως ή μεταγραφή θα συνεχιζότανε σε μεγάλα τμήματα του DNA.

Η λείξη γίνεται κατά δύο τρόπους 1ον/ αναγνώριση από την πολυμεράση μιας αλληλουχίας βάσεων στο DNA που σημαίνει λείξη, ή αλληλουχία αυτή στο RNA είναι UUUUUU (A) δηλαδή ή σειρά βάσεων στο DNA που σημαίνει λείξη είναι ένα πολυ-A 2ον/ υπάρχει ένας πρωτεϊνικός παράγων που ονομάζεται παράγων ρ και αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα μοριακού βάρους ≈ 50.000 .

Ο παράγων είναι μία πολυμερής πρωτεΐνη φτιαγμένη από πολλά μόρια του ρ και φαίνεται να αναγνωρίζει όπως και τα περιοριστικά ένζυμα μία αλληλοδιαδοχή στο DNA που να είναι συμμετρική. Δεν γνωρίζουμε ακόμη αν ο ρ δρᾶ απ'ευθείας στο DNA ή δρᾶ διά συνδέσεώς του με την RNA πολυμεράση.



Πρωτεϊνική σύνθεση και ρόλος του RNA

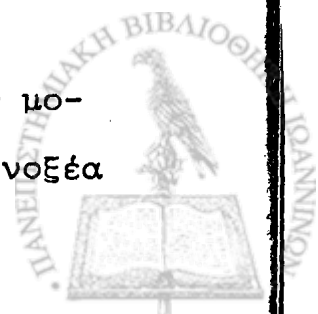
Όταν τό κεντρικό δόγμα τής μοριακής βιολογίας έγινε γενικώς παραδεκτό γύρω στά 1950 δηλαδή ότι ή μεταφορά τής πληροφορίας γίνεται από τό DNA → RNA → πρωτεΐνες υπήρχε ή γενική ιδέα πώς όλα τά RNA εΐναι RNA καλούπια και πώς όταν ή δομή του RNA θά γινότανε γνωστή, άπλή παρατηρήσεις τής δομής του θά άρκοΰσε για νά καταλάβουμε πώς χρησιμοποιείται σαν μήτρα για τήν σύνθεση τών πρωτεΐνων.

Οι έρευνες πάνω στην πρωτεΐνοσύνθεση στά μετέπειτα χρόνια έδειξαν πώς ή ιδέα αυτή ήτο μάλλον άφελής και ο μηχανισμός τής πρωτεΐνοσυνθέσεως εΐναι πολύ πιο πολύπλοκος από ότι άρχικά είχαμε φαντασθεΐ. Έξ άλλου σιγά-σιγά άπεδείχθη ότι τά RNA δέν χρησιμοποιούνται άμεσα σαν μήτρες για τήν σύνθεση τών πρωτεΐνων και όλα τά RNA δέν εΐναι καλούπια αλλά έχουν και άλλες λειτουργίες πολλές από τίς οποίες έχουν σχέση και εΐναι βοηθητικές για τήν πρωτεΐνοσύνθεση. Δύο κατηγορίες π.χ. από RNA παΐζουν σημαντικό ρόλο στην πρωτεΐνοσύνθεση και όπως θά δοΰμε πρόκειται για τά RNA μεταφοράς ((transfer RNA) και τά ριβοσωματικά RNA (ribosomal RNA)

1. RNA μεταφοράς (tRNA)

Τά RNA δέν έχουν ίδιαιτέρα συγγένεια μέ τά άμινοξέα. Οι πλάγιες δηλαδή αλύσεις τών άμινοξέων δέν έχουν κανένα λόγο νά ένώνονται ή νά σχηματίζουν χημικούς δεσμούς μέ τίς πουρινικές και πυριμιδικές βάσεις τών ριβονουκλεϊνικών όξέων.

Τά άμινοξέα προσαρμόζονται στό RNA διαμέσου είδικών μορίων πού δροΰν σαν προσαρμοστές. Πρίν δηλαδή τά άμινοξέα



πάρουν τήν ὀρισμένη σειρά πού ἔχουν σέ μία πρωτεΐνη ἐνώ-
νεται διά ἐνός μοναδικοῦ ὁμοιοπολικοῦ δεσμοῦ μέ ὀρισμέ-
να μόρια προσαρμοστές πού τούς ἐπιτρέπουν νά συγγενέψουν
μέ τό RNA καλούπι πού καθορίζει τήν σειρά πού πρέπει νά
πάρουν. Ἐνα μόνον ἐνζυμο χρειάζεται γιά νά γίνει αὕτη
ἡ ἐνωση ἐνῶ ἂν οἱ πλευρικές ἀλύσεις τῶν ἀμινοξέων ἔπρεπε
νά ἀλλάξουν χημικῶς γιά νά συγγενέψουν μέ τό RNA πολλά
ἐνζυμα θά χρειαζόντουσαν καί θά ἔπρεπε μετά νά ξαναφέ-
ρουμε τά ἀμινοξέα στήν προηγουμένη τους κατάσταση ἐφ' ὅσον
ἡ πρωτεΐνη θά εἶχε σχηματισθεῖ.

1.1. - Εἰδικά ἐνζυμα ἀναγνωρίζουν κάθε εἰδικό ἀμινοξύ

Δέν ὑπάρχει ἀνάγκη καμμιάς φανερῆς σχέσεως μεταξύ τῆς
πλευρικής ἀλύσεως τοῦ ἀμινοξέως καί τοῦ μορίου πού χρη-
σιμοποιεῖται σάν προσαρμοστής καί τά δύο αὐτά μόρια δη-
λαδή ἀμινοξύ καί κατάλληλος προσαρμοστής ἀναγνωρίζονται
ἀπό μία πρωτεΐνη, ἓνα ἐνζυμο πού σάν σκοπό ἔχει νά ἀνα-
γνωρίσει ἀκριβῶς τά σχήματά τους (τρισδιάστατο δομή) καί
νά προκαλέσει τήν ἐνωση τους. Ἡ πρωτεΐνη-ἐνζυμο πού χρη-
σιμοποιεῖται γι' αὕτη τήν δουλειά εἶναι λίαν κατάλληλος
γιατί ἡ ἐνεργός περιοχή της εἶναι πλούσια σέ ὑδρόφιλες
ἢ ὑδρόφοβες ομάδες καί δέν εἶναι δύσκολο ἡ ἀναδιπλωμένη
πολυπεπτιδική ἀλυσίδα νά παρουσιάζει ἐγκολπώματα ἱκανά
γιά νά ἀναγνωρίζουν τήν πλευρική ἀλυσίδα ἐνός ἀμινοξέως.
Ὑπάρχουν ὅμως ἀμινοξέα πού μοιάζουν πολύ μεταξύ τους
σ' αὐτήν τήν περίπτωσι, τό θέμα τίθεται στό ἐπίπεδο δεσμῶν
π.χ. ἡ τυροσίνη μπορεῖ νά διακριθεῖ ἀπό τήν φαινυλαλανί-
νη ἀπό ἓνα ἐνζυμο πού νά ἔχει μία εἰδική κοιλότητα καί νά
περιέχει ἓνα ἄτομο πού νά μπορεῖ νά σχηματίσει ἓνα δεσμό
ὕδρογόνου μέ τό ὑδροξύλιον τῆς τυροσίνης.



Ἡ ἐνέργεια γι' αὐτόν τόν δεσμό εἶναι περίπου 4 μέ 5 Kcal/
/mole καί εἶναι ἀρκετή γιά νά ἀναγκάσει τήν ἀναγνώριση
νά γίνη σωστά μέ πιθανότητα λάθους 1:1000. Πιό δύσκολα
μπορεῖ νά καταλάβουμε πώς δύο ἀμινοξέα πού διαφέρουν με-
ταξύ τους μόνον ἀπό μία ὁμάδα μεθυλίου μποροῦν νά ξεχω-
ρίσουν γιατί ἡ ὁμάς αὐτή δέν φτιάχνει οὔτε ἰονικούς δε-
σμούς οὔτε δεμούς ὑδρογόνου. Ἔτσι εἶναι δύσκολο νά δια-
κριθοῦν μεταξύ τους τά ἀμινοξέα γλυκίνης καί ἀλανίνης
ὥς καί βαλίνης καί ἰσολευκίνης. Βέβαια ὑπάρχει διαφορά
στό μήκος τῆς πλευρικῆς ἀλύσεως, ἡ ἀλανίνη δέν μπορεῖ νά
εἰσχωρήσει στήν κυλότητα τήν φτιαγμένη γιά μία γλυκίνη
ἀλλά τό ἀνάποδο εἶναι δυνατό δηλαδή ἡ γλυκίνη νά μπεῖ
στήν κυλότητα τῆς ἀλανίνης. Στήν περίπτωση αὐτή θά ἔχου-
με μιὰ χαλαρή σύνδεση καί θά χαθοῦν οἱ δυνάμεις Van der
Waals πού θά ἐλάμβανον χώρα φυσιολογικά. Οἱ δυνάμεις αὐ-
τές εἶναι περίπου 2 μέ 3 Kcal/mole καί θερμοδυναμικῶς
ὄχι ἀρκετές γιά νά ἐξηγήσουν τήν ἀκρίβεια μέ τήν ὁποία
ἓνα ἀμινοξύ παίρνει τήν σειρά του μέσα σέ μία πρωτεΐνη.
Τώρα ὑποψιαζόμαστε ὅτι ἡ συχνότης λάθους στήν σειρά τῶν
ἀμινοξέων εἶναι 1/1000 μέχρι 1/10000.

Αὐτό μᾶς λέει ὅτι ἡ ἐνέργεια πού χρειάζεται γιά νά γίνη
ἡ σωστή ἐκλογή πρέπει νά εἶναι περίπου 4-5 Kcal/mole
δηλαδή πολύ μεγαλύτερη ἀπό ὅτι εἶναι ἡ ἐνέργεια τῶν δε-
σμῶν Van der Waals. Ἄρα ὁ τρόπος μέ τόν ὁποῖο ἐκλέγονται
τά ἀμινοξέα εἶναι φαίνεται πιό πολύπλοκος. Ὡς φαίνεται
καί ὅπως θά δοῦμε καί παρακάτω ἡ τελική ἐκλογή γίνεται
σέ περισσότερα ἀπό ἓνα στάδια ἔτσι πολλαπλασιάζεται ἡ
διαδικασία ἐκλογῆς καί φθάνουμε τελικῶς νά ἔχουμε λάθη
τῆς τάξεως τῶν 1/1000 - 1/10000.



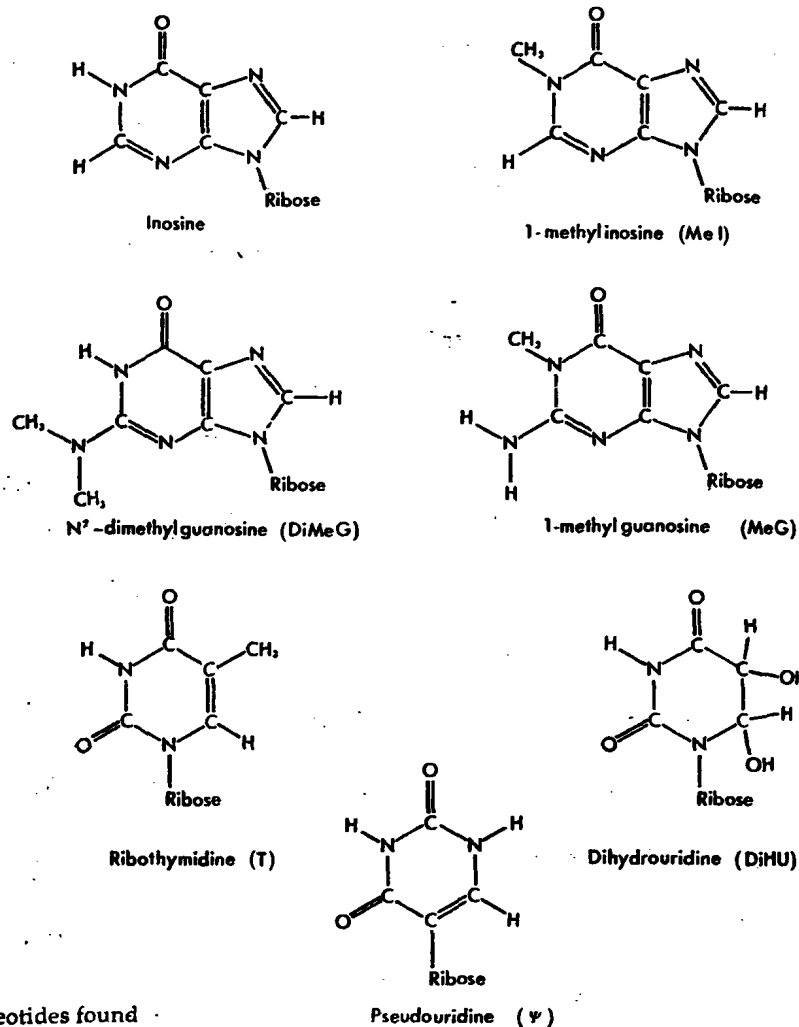
1.2.- Τά μόρια του προσαρμοστή είναι μόρια RNA.

Όπως είδαμε μέχρι τώρα μόνον ένα RNA μπορεί να συνδεθεί με ένα άλλο RNA, λόγω της συμπληρωματικότητας των βάσεων, και να καθορίσει ακριβώς την θέση και την σειρά ενός αμινοξέως, με τό όποιο είναι ένωμένο, πάνω στο καλούπι που είναι πάλι RNA. Άρα τά μόρια του προσαρμοστή είναι μόρια είδικών RNA που όνομάζονται μεταφορικά RNA. Τά μεταφορικά RNA για τά είκοσι διαφορετικά αμινοξέα έχουν διαφορετικές δομές καθένα δηλαδή περιέχει μία διαφορετική ομάδα βάσεων για την ένωση με τό καλούπι. Κάθε μεταφορικό RNA περιέχει περίπου 80 βάσεις και έχει μοριακό βάρος =25.000. Άποτελεϊται από μία άλυσσ βάσεων με ένα 3' και ένα 5' άκρον. Τό άκρο 3' τελειώνει πάντα σε μία σταθερά άλληλοδιαδοχή βάσεων που είναι ή CCA. Ή τελική βάσεις στο 5' άκρο είναι συνήθως γουανίνη (είκόνα 150)

Παρ'όλο ότι τά RNA μεταφοράς αποτελοϋνται από μίαν μονή άλυσσ RNA ό μεγαλύτερος άριθμός από τίς βάσεις τους σχηματίζουν μεταξύ τους δεσμούς ύδρογόνου και έχουν πολλά τμήματα που σχηματίζουν διπλή έλικα. Έτσι στα μόρια αυτά του RNA τό ποσόν της άδενίνης συνήθως πλησιάζει τό ποσόν της ούρακίλης και τό ποσόν της κυτοσίνης, τό ποσόν της γουανίνης όπως συμβαίνει και στο DNA. Ή σύμπτωση αύτή των βάσεων δέν είναι πάντως τέλεια και μερικά μέρη του μορίου παραμένουν στην μορφή της άπλης έλικος και έπιτρέπουν την προσωρινή όπως θά δοϋμε ένωση με τό καλούπι.

Στην άρχή ένομίσθη ότι ή τρισδιάστατος δομή καθενός μεταφορικού RNA θά ήτο πολύ διαφορετική. Τό εϋρημα όμως πώς





Εικόνα 151

The structures of the rare nucleotides found in yeast alanine tRNA.

των κανονικών δια της παρουσίας μιας ή περισσότερων μεθυλοομάδων. Η μεθυλίωση των βάσεων είναι κάτι που γίνεται μετά την σύνθεση του μορίου του t-RNA δια καταλλήλων ένζυμων. Οι άλλες ασυνήθεις βάσεις κατά πάσαν πιθανότητα θα σχηματίζονται κατά τον ίδιο τρόπο δηλαδή δια ένζυμα-τικής μετατροπής αφού γίνη η σύνθεση του μορίου του t-RNA. Η λειτουργία των ασυνήθων αυτών βάσεων δεν είναι τελείως γνωστή. Φαίνεται όμως πως η ύπαρξής τους έχει σχέση με την δυνατότητα σχηματισμού ζευγών. Οι ασυνήθεις βάσεις έμποδίζουν τον σχηματισμό ζευγών άρα έπιδρούν στην διαμόρφωση της τρισδιάστατης δομής του μορίου γιατί ανά-λογα με τα σημεία που έμφανίζονται καθορίζουν τα μέρη του μορίου που παραμένουν υπό μορφήν απλής αλύσεως. Έτσι στα



σημεία αυτά τό μόριο μπορεί νά κάνει δεσμούς μέ τίς ελεύθερες αμινοομάδες καί κετοομάδες πού διαθέτει. Τέτοιοι δεσμοί μπορεί νά γίνουν μέ τήν μήτρα RNA, μέ τά ριβοσωματικά RNA, μέ τά ένζυμα πού χρησιμοποιούνται γιά νά ένώσουν τό t-RNA, μέ τό αντίστοιχο αμινοξύ.

1.3. - Τρισδιάστατος δομή τών μορίων τοῦ μεταφορικοῦ RNA

Ἡ ἀκριβῆς ἀλληλοδιαδοχή βάσεων τοῦ tRNA δέν ἐπιτρέπει τήν δημιουργία ἐνός μοντέλου τῆς τρισδιάστατης δομῆς του.

Όταν ὁμως περισσότερα t-RNA ἔγιναν γνωστά στήν πρωτοδιαταξή τους ἀνεφάνη ὅτι περιεῖχαν κοινές ἀλληλοδιαδοχές σέ πολλά σημεία καί ἡ συγκριτική μελέτη τών μορίων ἀπέδειξε ὅτι ὑπῆρχε ἕνας τρόπος νά ἀναδιπλώνεται ἡ αλυσος τοῦ μορίου ἐν εἶδη φύλλων τριφυλίου δηλαδή μέ τρεῖς θηλειές καί ἐνδιαμέσους σχηματισμούς διπλῆς ἑλικος.

Κάθε t-RNA περιέχει τά κάτωθι τμήματα μονῆς ἀλύσεως:

1ον Τό ἄκρον 3' πού περιέχει τήν ἀλληλουχία CCA καί ἀκολουθεῖτε ἀπό ἄλλα 4 νουκλεοτίδια πού ἀλλάζουν σέ κάθε t-RNA. Τό αμινοξύ πάντοτε ἐνώνεται μέ τό ἄκρο αὐτό τοῦ t-RNA δηλαδή στό τελευταῖο ἐλεύθερο νουκλεοτίδιο.

2ον Ἐν συνεχείᾳ καί μέ φορά $3' \rightarrow 5'$ ὑπάρχει ἡ πρώτη θηλειά πού περιέχει 7 βάσεις πού δέν σχηματίζουν ζεύγη καί περιέχουν πάντοτε τήν ἀλληλοδιαδοχή $-5' T \Psi C G -3'$.

Αὐτή ἡ θηλειά χρησιμεύει γιά τήν ἔνωση μέ τό ριβοσωματικό RNA (ριβοσωμάτια).

3ον Ἀκολουθεῖ μιά ἄλλη θηλειά πού ἔχει ἐκάστοτε ἄλλο μέγεθος.

4ον Ἡ τρίτη θηλειά περιέχει ἐπίσης ἀσύζευκτα 7 νουκλεο-



τίδια και τό αντικοδικόνιο δηλαδή τρεῖς βάσεις πού θά συναντήσουν τίς ανάλογές τους στό καλούπι άγγε- λειοφόρου RNA. Τό αντικοδικόνιο περιβάλετε άπό μία ούριδίνη και μία πουρίνη πού έχει ύποστή μεταβολή σέ άσυνήθη βάση.

5ον Ἡ τετάρτη θηλειά περιέχει 8 μέ 10 βάσεις άσύζευκτες και περιέχει πολλές διυδροουριδίνες. Φαίνεται ότι χρησιμεύει γιά τήν ένωση μέ τό ένζυμο πού άναγνωρίζει και τό άνάλογο άμινοξύ.

1.4. - Κρυσταλλική δομή τοῦ t-RNA

Τό μοντέλο πού είδαμε μέχρι τώρα δημιουργήθηκε άπό τά δε- δομένα πού είχαμε άπό τήν μελέτη τῆς πρωτοδιατάξεως τοῦ μορίου τοῦ t-RNA; Δέν μάς λέει όμως τό t-RNA τί είναι στό χῶ- ρο δηλαδή τήν άκριβή τριτοδιάταξη. Γι'αυτό χρειάζεται με- λέτη μέ διάθλαση άκτίνων X δηλαδή κρυσταλογραφία τοῦ μο- ρίου. Στήν άρχή νομίσθηκε ότι τό t-RNA δέ θά μπορούσε νά παρασκευασθεῖ ύπό μορφή κρυσταλλική, αλλά αυτό διεψεύσθει και τό 1974 ἡ κρυσταλλική δομή τοῦ t-RNA τῆς φαινυλαλανί- νης έγινε γνωστή.

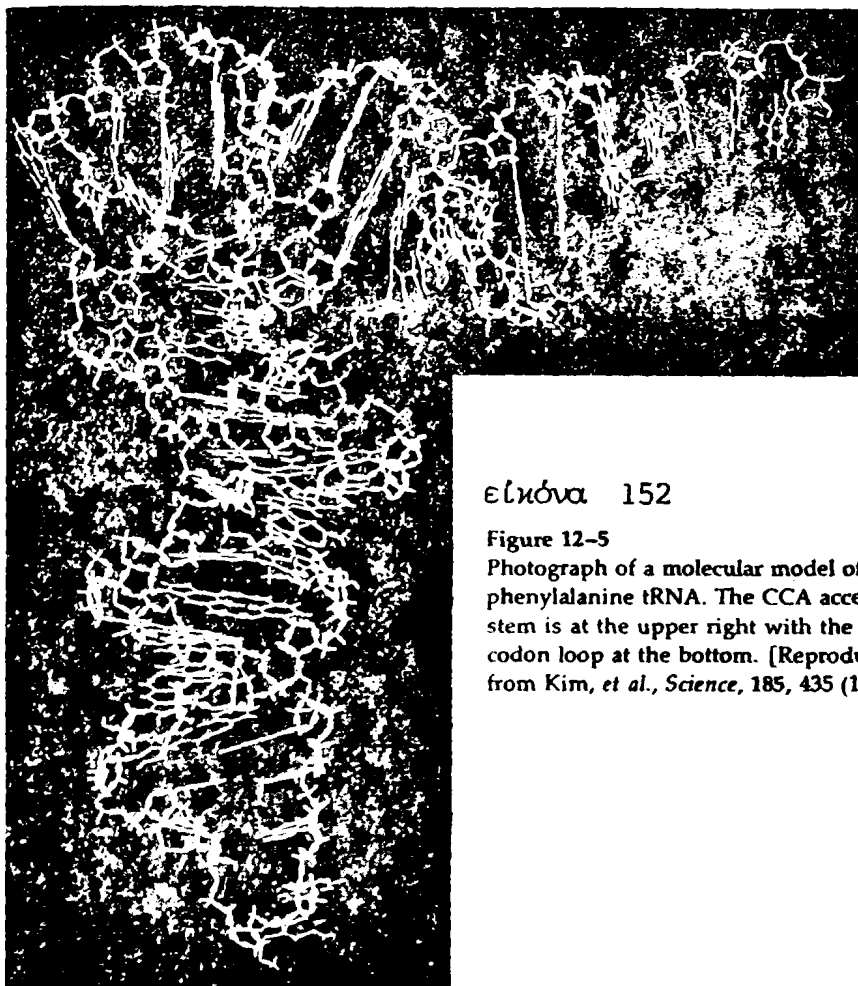
Εύτυχῶς δέν άλλαξε πολύ τά ἤδη γνωστά ὅσον άφορᾷ τό σχῆ- μα πού βγήκε άπό τήν μελέτη τῆς πρωτοδιατάξεως.

Ἡ τρισδιάστατη δομή τοῦ μορίου έχει σχῆμα L, εἰκόνα 152 και διακρίνουμε:

1ον Τό άκρον πού δέχεται τό άμινοξύ είναι τό ένα άκρον τοῦ L, ένῶ τό άλλο περιέχει τό αντικοδικόνιο.

2ον Οἱ δύο θηλειές ἡ περιέχουσα τίς βάσεις T Ψ C (ριβο- σωμάτια) και τήν πλουσία σέ διυδροουριδίνες άλληλο- διαδοχή (ένζυμο άμινοξέων) βρίσκονται στήν γωνία τοῦ L.





είκονα 152

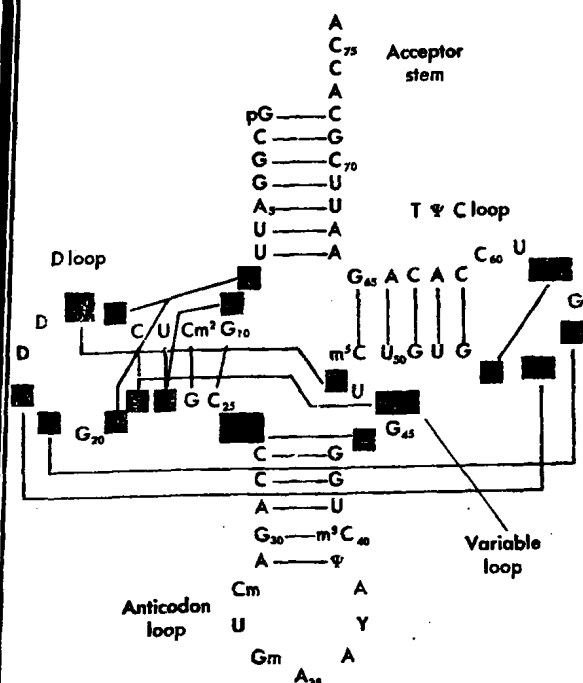
Figure 12-5
Photograph of a molecular model of yeast phenylalanine tRNA. The CCA acceptor stem is at the upper right with the anticodon loop at the bottom. [Reproduced from Kim, *et al.*, *Science*, 185, 435 (1974).]

Υπάρχουν πολλοί δεσμοί υδρογόνου που υπεισέρχονται στην τρισδιάστατο δομή του μορίου. Οι δεσμοί αυτοί γίνονται κυρίως μεταξύ βάσεων που είναι κοινές σε όλα τα t-RNA και έτσι προσδίδεται μία τρισδιάστατος δομή στο μόριο του t-RNA.

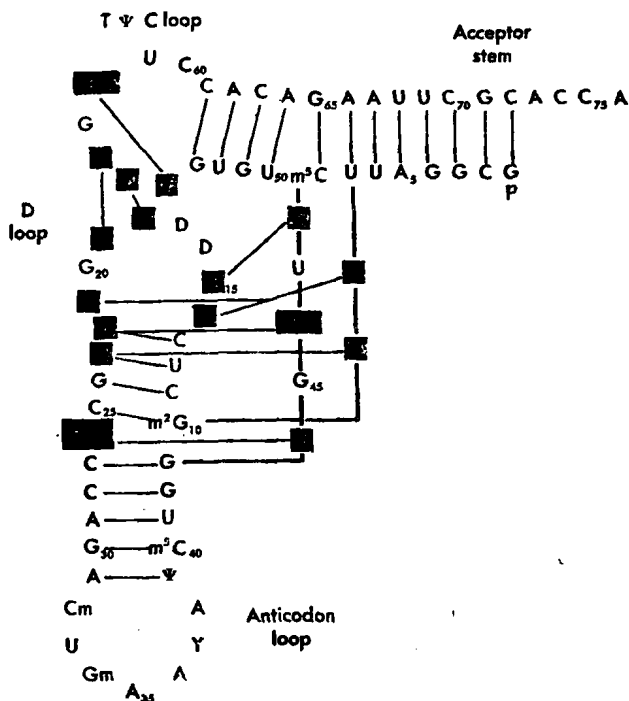
Οι δεσμοί αυτοί υδρογόνου που υπεισέρχονται στην τρισδιάστατο δομή δεν είναι μεταξύ των συνηθών ζευγών δηλαδή A-T και G-C, είκονα 153.

Χεδόν όλες οι βάσεις είναι έτσι προσανατολισμένες στε να κολλάνε ή μία με την άλλη με τις επίπεδες επιφάνειές τους. Τό αντικοδικόνιο στέκεται στην θέση





(a)



(b)

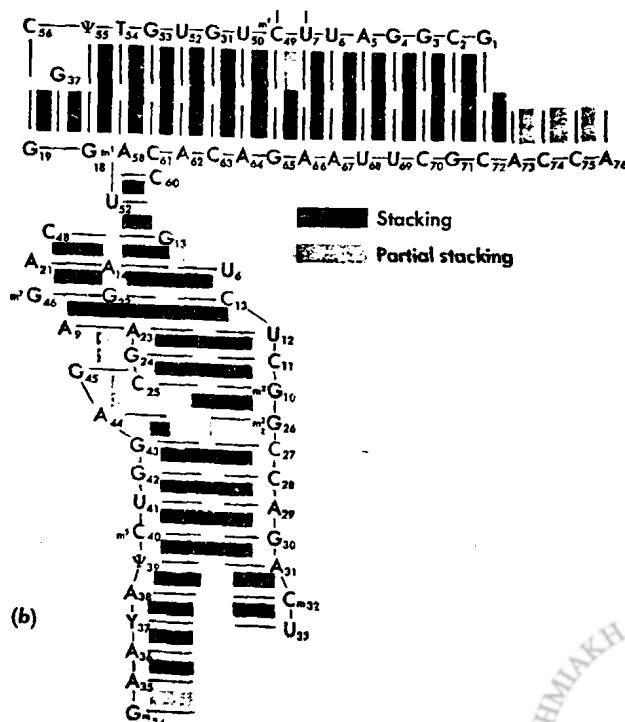
είκονα 153

Figure 12-4

The tertiary interactions in yeast phenylalanine tRNA are indicated by solid lines connecting bases that are hydrogen bonded. (a) Conventional cloverleaf configuration. (b) Sequence rearranged to illustrate the close interaction between the TΨC and D loops. [Reproduced from Kim, *et al.*, *Science* 185, 435 (1974).]

του κυρίως με δεσμούς υδρογόνου αλλά έχει μία σχετική
εύχερεία προσανατολισμού που τό κάνει νά μπορεί νά εί-
ναι εύέλικο κατά τήν ένωσή του με τό καλούπι είκ. 154

A schematic diagram illustrating the hydrophobic stacking interactions between the nucleotides of yeast tRNA^{Phe}. Full stacking and partial stacking are indicated. In this orientation the anticodon is at the bottom, the CCA acceptor stem is at the upper right, and the TΨC loop is shown at the upper left corner. Where adjacent stacking nucleotides are connected by a ribose-phosphate chain, the linkage is noted by a thin line. The heavy solid lines attached to the nucleotide symbols represent in schematic fashion the purine or pyrimidine bases, while the hydrophobic interaction is indicated by the blocks between the bases. The connectivity of the molecule is indicated only by the numbering scheme. This accounts for the fact that many nucleotides appear to be unconnected. Bases not involved in stacking (bases 16, 17, 20, 47) are omitted from the figure. [Redrawn from Kim, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71, 4970 (1974).]



(b)



1.5. - Ένωση του ένζυμου με το άμινοξύ και το t-RNA

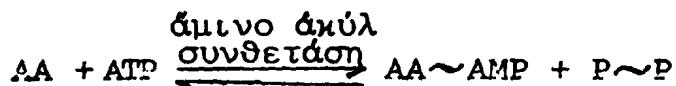
Η ένωση μεταξύ της 3'άδενοσύνης και του άμινοξέως είναι ένας ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ του καρβοξυλίου του άμινοξέως και της τελικής ριβόζης του RNA.

Η χρήση του καρβοξυλίου για την ένωση αυτή είναι δικαιολογημένη για πολλούς λόγους:

1ον Πρίν το καρβοξύλιο χρησιμοποιηθεί για τόν σχηματισμό ενός πεπτιδικού δεσμού τό μόριο του προσαρμοστού δηλαδή τό t-RNA πρέπει νά έλευθερωθεϊ. Έτσι ό σχηματισμός του δεσμού αυτού και ή άπελευθέρωση του t-RNA συντονίζονται.

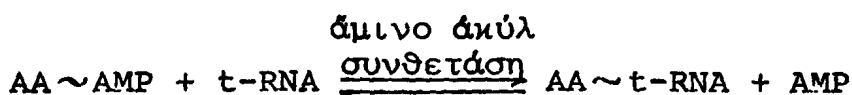
2ον Ό δεσμός αυτός είναι ύψηλής ένεργείας και έπιτρέπει έτσι νά γίνει ό πεπτιδικός δεσμός μέ κατανάλωση της ένεργείας του σπασίματος του πρώτου αυτού δεσμού.

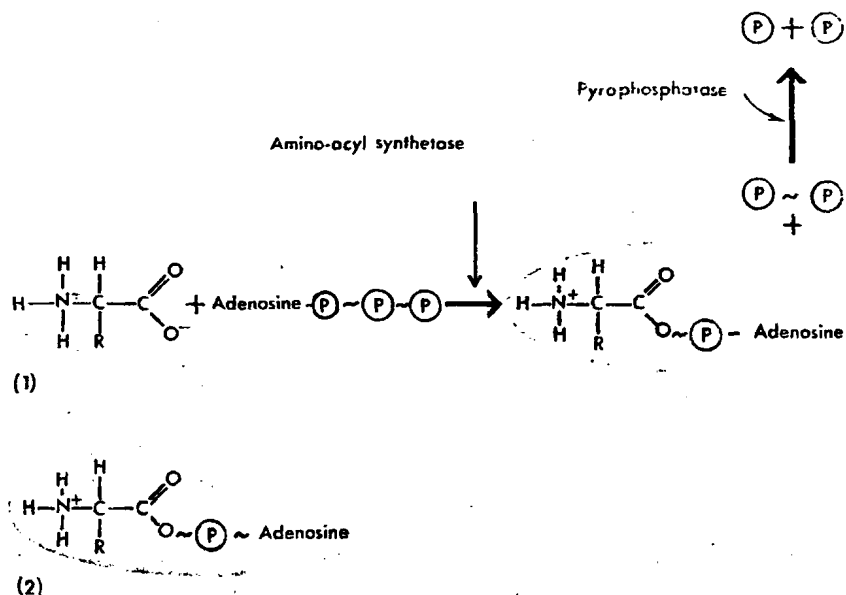
Η ένέργεια για νά γίνει ό δεσμός άμινοξύ-t-RNA δίδεται από τό ATP πού μετατρέπεται σέ AMP μέ έλευθέρωση ενός πυροφωσφορικού και μέ κατάλυση από τό ένζυμο πού αναγνωρίζει κάθε άμινοξύ, τήν "άμινοακυλοσυνθετάση". Σχηματίζεται έτσι κατ'άρχάς ένα άμινοξύ ένεργοποιημένο, τό άμινο-ακυλο-αδενυλικό όξύ, είς τό όποϊο τό καρβοξύλιο του άμινοξέως είναι ένωμένο μέ ένα AMP



Τό ένδιάμεσο αυτό προϊόν άμινοακυλοαδενυλικό όξύ παραμένει ίσχυρά συνδεδεμένο μέ τό ένζυμο και ψάχνει για νά βρεϊ τό κατάλληλο t-RNA για νά μεταφερθεϊ είκ. 155

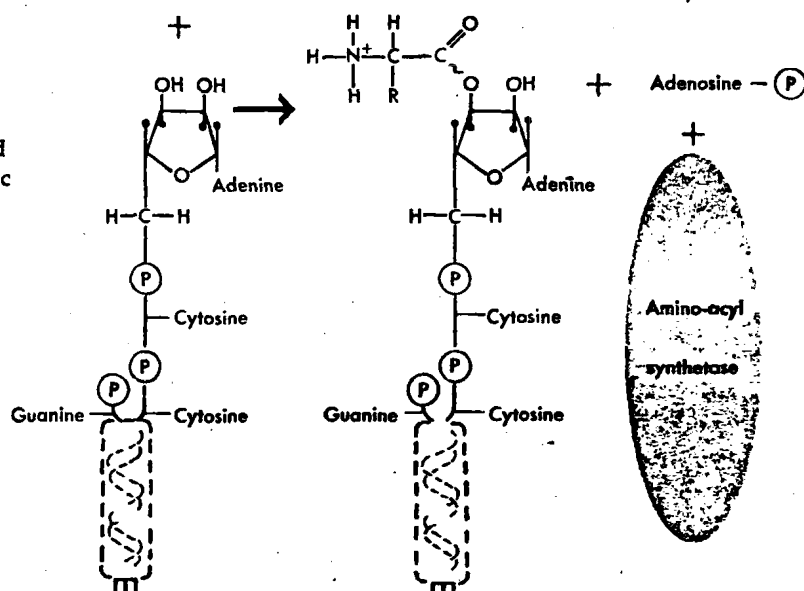
Τότε τό ίδιο ένζυμο μεταφέρει τό ένεργοποιημένο άμινοξύ στό 3'άκρο του κατάλληλου t-RNA





εικόνα 15 5

Activation of an amino acid by ATP and its transfer to the CCA end of its specific tRNA adaptor.



Βλέπουμε επομένως πώς τό ένζυμο είναι ικανό νά αναγνωρί-
ζει ένα άμινοξύ καί τόν προσαρμοστή του t-RNA στόν όποίο
τό μεταφέρει. Τό ένζυμο γιαυτό τό λόγο πρέπει νά έχει δύο
ένεργά κέντρα: Ένα πού νά αναγνωρίζει τό άμινοξύ καί ένα
νά αναγνωρίζει τό t-RNA.

Τό t-RNA έξ άλλου έχει καί αυτό δύο σημεία ένεργά για ά-
ναγνώρηση: Ένα για τό κατάλληλο ένζυμο καί ένα για τήν
μήτρα πού λέει σέ πιά σειρά θά εισέλθει στήν πρωτεΐνη τό
άμινοξύ.

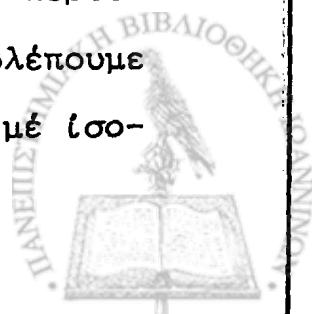
Τό άμινοξύ επομένως ποτέ δέν έρχεται σέ άμεσο έπαφή μέ

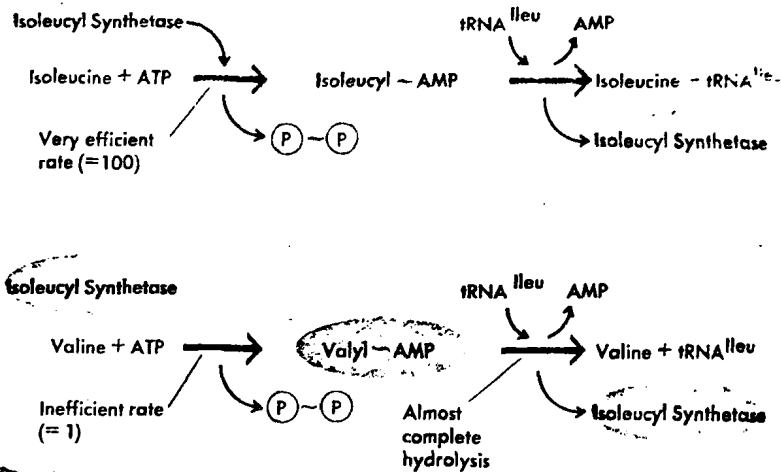


τό καλούπι αλλά μόνο μέσον του προσαρμοστή δηλαδή του t-RNA. Κάθε κύτταρο χρειάζεται τό όλιγότερο 20 t-RNA, κα-
θένα είδικό για ένα άμινοξύ. Στην πραγματικότητα όμως έ-
χουμε περισσότερα από 20 t-RNA για τά 20 άμινοξέα. Αυτό
σημαίνει πως για ένα και τό αυτό άμινοξύ μπορεί νά υπάρ-
χουν περισσότερα του ενός t-RNA. Αυτό συμβαίνει γιατί ό
γεν ετικός κώδικας είναι έκφυλισμένος, υπάρχουν δηλαδή
περισσότερα του ενός κωδικόνια που σημαίνουν τό ίδιο
άμινοξύ. Έπειδή όμως ή άλληλουχία του άντικωδικονίου εί-
ναι διαφορετική από την άλληλουχία που άναγκάζει τό ένζυ-
μο δέν χρειάζεται νά υπάρχουν και περισσότερα από 20 ένζυ-
μα. Έτσι, ένα ένζυμο μπορεί νά ενώνει δύο ή περισσότερα
t-RNA που έχουν την D θηλειά ίδια και διαφέρουν ως προς
την θηλειά του άντικωδικονίου τους.

1.6. - Άκρίβεια του σχηματισμού του AA - t-RNA

Τό πως ή άμινοακυλοσυνθετάση έκλέγει μέ άκρίβεια άμινοξέα
πού διαφέρουν λίγο μεταξύ τους άποτελοϋσε ένα πρόβλημα.
Πειράματα που έγιναν πάνω σ' αυτό τό πρόβλημα μέ τά άμινο-
ξέα βαλίνη και ίσολευκίνη έδωσαν μία άπάντηση. Τά άμινο-
ξέα αυτά διαφέρουν μεταξύ τους μόνο κατά ένα μεθύλιο και
έτσι ή διαφορά που προκύπτει σέ ενέργεια συνδέσεως στο
ένζυμο είναι μόνον 2-3 Kcal/mole δηλαδή άρκετά μικρά
για νά μπορέσει νά γίνει σαφής διαχωρισμός από τό ένζυμο
των δύο άμινοξέων. Πράγματι αν πάρουμε τό ένζυμο ίσολευ-
κινο- συνθετάση και τό βάλουμε σέ ένα διάλυμα που περιέ-
χει στην αυτή μοριακότητα βαλίνη και ίσολευκίνη βλέπουμε
ότι σχηματίζονται 100 φορές περισσότερες ενώσεις μέ ίσο-
λευκίνη παρά μέ βαλίνη. είκόνα 156.





εικόνα 156

Discrimination between isoleucine and valine in the formation of isoleucine-tRNA.

Άρα η δυνατότης λάθους ανέρχεται σέ 1:100 πράγμα πού είν-
ναι πολύ μεγάλη. Παρ'όλα ταύτα εάν τά ενεργοποιημένα κα-
τά λάθος μόρια βαλίνης προστεθούν στό t-RNA τής ισολευκί-
νης παρατηρούμε ότι τό μεγαλύτερο ποσό από αυτά δέν μετα-
φέρεται στό t-RNA. Αντίθετα κατά τήν μεταφορά σπάει ο
δεσμός μέ τό ένζυμο καί η βαλίνη χωρίς νά ένωθει μέ τό
t-RNA έλευθερώνεται. Η δυνατότης λάθους είναι έδω 1:100
δηλαδή μία μόνον βαλίνη στίς 100 ένώνεται μέ τό t-RNA ί-
σολευκίνης. Άρα τό λάθος έλαττώνεται σ'αυτό τό δεύτερο
στάδιο γιά ακόμη 1:100 καί τό όλικό λάθος είναι τής τάξεως
του 1:10.000 πράγμα πού δείχνει τελικά ότι η ακρίβεια είν-
ναι αρκετά μεγάλη.

2. - Ριβοσωμάτια.

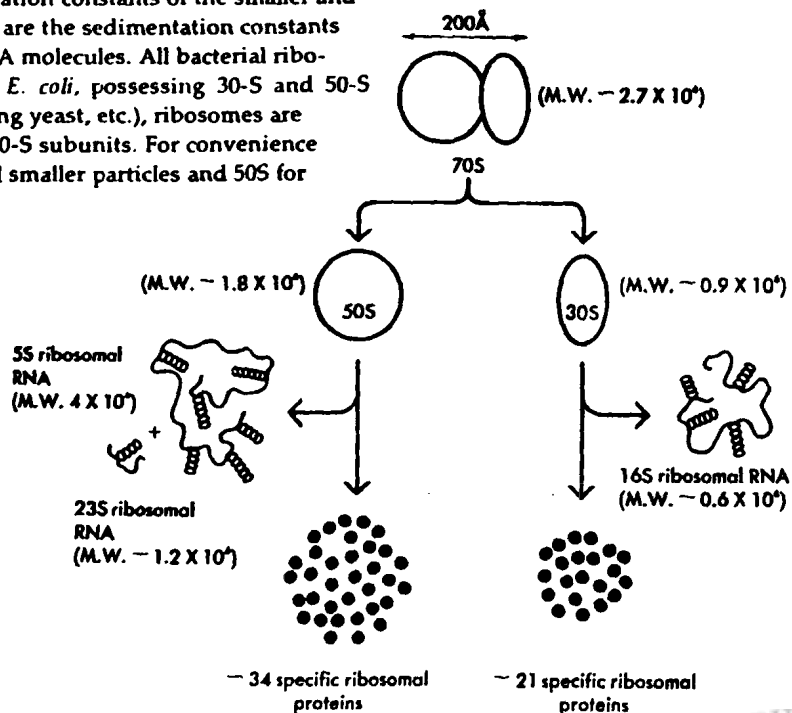
Όταν τά αμινοξέα ένωθούν μέ τά αντίστοιχα t-RNA πηγαίνουν
έπάνω στά ριβοσωμάτια πού είναι σφαιρικά σωματίδια στήν
έπιφάνεια των οποίων γίνεται η σύνθεση των πρωτεϊνών. Πρω-
τεϊνική σύνθεση στό κυτταρικό διάλυμα δέν γίνεται ποτέ έν
άπουσία των ριβοσωμάτων. Τά σφαιρικά αυτά σώματα χρησι-
μεύουν λοιπόν γιά νά φέρουν σέ έπαφή μεταξύ τους τά διάφο-
ρα μόρια πού υπεισέρχονται στήν πρωτεϊνοσύνθεση δηλαδή τό

άμινοξύ μέ τό t-RNA του, τό άγγελειοφόρο νουκλεϊνικό όξύ καί τήν πεπτιδική άλυσο πού σχηματίζεται.

Ύπάρχουν περίπου 15.000 ριβοσωμάτια στό βακτηρίδιο *E. coli* καί κάθε ένα έχει περίπου μοριακό βάρος 3.000.000. Τά ριβοσωμάτια άντιπροσωπεύουν περίπου τό 1/4 τής μάζης τοϋ βακτηριδίου άρα ή κυρία έργασία τοϋ βακτηριδίου ό- πως καί άλλων κυττάρων είναι νά φτιάχνουν πρωτεΐνες. Ή ταχύτης τής πρωτεΐνοσυνθέσεως είναι μεγάλη. Ή σύνθεση μιās πολυπεπτιδικής άλύσεως 40.000 MW γίνεται περίπου σέ 10". Μόνο μία πολυπεπτιδική άλυσος παράγεται ανά ριβο- σωμάτιο, έλευθερώνεται καί μπορεϊ νά άρχίσει μία καινούρ- για σύνθεση. Τά ριβοσωμάτια άποτελοϋνται άπό δύο υπομο- νάδες μέ σταθερά καθιζήσεως (μονάδες svedberg) 30 καί 50S.

είκόνα 157

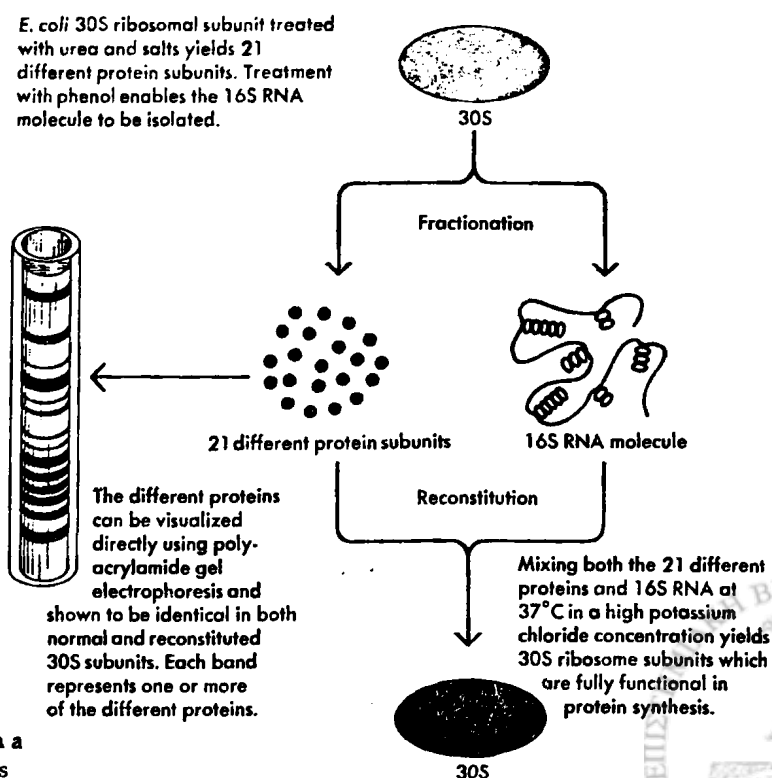
The structure of the *E. coli* ribosome. It is usually called the 70S ribosome since 70S (Svedbergs) is a measure (the sedimentation constant) of how fast this ribosome sediments in the centrifuge. Likewise, the designations 30S and 50S are the sedimentation constants of the smaller and larger ribosomal subunits; 16S and 23S are the sedimentation constants of the smaller and larger ribosomal RNA molecules. All bacterial ribosomes have sizes similar to those of *E. coli*, possessing 30S and 50S subunits. In higher organisms (including yeast, etc.), ribosomes are somewhat larger (80S), with 40S and 60S subunits. For convenience below, we shall use 30S to designate all smaller particles and 50S for larger particles.



Οι υπομονάδες αυτές περιέχουν τόσο πρωτεΐνες όσο καί ρι- βοσωματικών RNA σέ ένα λόγο $\frac{\text{RNA}}{\text{πρωτεΐνη}}$ πού είναι γιά τήν *E. coli* 2:1. Σέ άλλα κύτταρα ό λόγος αυτός είναι 1:1 δη-

λαδή πολύ περισσότερες πρωτεΐνες (εύκαρυωτικά κύτταρα). Οι πρωτεΐνες του ριβοσωματίου έχουν δομικό ρόλο κυρίως (δέν είναι ένζυμα). Υπάρχουν στην μικρή υπομονάδα 30S 21 πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί και 34 πρωτεΐνες στην μεγάλη υπομονάδα. Κάθε μία από τις πρωτεΐνες αυτές παρατηρείται μόνον μία φορά σε κάθε ριβοσωμάτιο. Τα ριβοσωματικά RNA είναι το 16S ριβοσωματικό RNA της μικρής υπομονάδας και το 23S και 5S της μεγάλης υπομονάδος με αντίστοιχα μοριακά βάρη $16S = 0,6 \times 10^6$, $23S = 1,2 \times 10^6$ και $5S = 4 \times 10^4$. (εικόνα 157)

Είναι δυνατόν να αποσυνδέσουμε τις πρωτεΐνες από το ριβοσωματικό RNA και να τις ξαναβάλουμε μαζί οπότε η υπομονάδα 30S ξανασχηματίζεται και εξακολουθεί να είναι ενεργός για την πρωτεϊνική σύνθεση. Τα πειράματα ανασυνδέσεως είναι πολύ σημαντικά γιατί μας επιτρέπουν να κάνουμε ανασυνδέσεις με έλλειψη π.χ. μιας πρωτεΐνης και να δούμε πιά η χρήση μιας εκάστοτε των πρωτεϊνών των ριβοσωμάτων. εικόνα 158.



εικόνα 158

Reconstitution of the 30S ribosome from a mixture of 21 specific ribosomal proteins and a 16S rRNA molecule.

3. - Άγγελιοφόρο RNA - mRNA

Όταν έγινε γνωστό πώς τὰ ριβοσωμάτια παίζουν ρόλο στην πρωτεϊνοσύνθεση ένομίσθη ότι τó ριβοσωματικό RNA ήτο τó καλούπι γιά τήν πρωτεϊνοσύνθεση. Ένομίζαμε τότε πώς δ-λο τó RNA του κυττάρου υπάρχει στά ριβοσωμάτια καί τó RNA πού ήταν έλεύθερο στά κύτταρα ήταν προϊόν κατασκευής των ριβοσωμάτων καί έπομένως ριβοσωματικό RNA.

Τó ποσόν του ριβοσωματικού RNA αποτελεί τó 80% του κυτταρικού RNA. Γρήγορα όμως απέδείχθει ότι τó ριβοσωματικό RNA δέν έπαιζε κανένα ρόλο μήτρας άπλως χρειάζεται γιά τήν δημιουργία των υπομονάδων του ριβοσώματος.

Τó 1956 εύρέθη τó t-RNA καί τó 1960 μάθαμε γιά τó άγγελιοφόρο m-RNA. Ή ανακάλυψις του άγγελιοφόρου RNA (m-RNA) έγινε μετά από πειράματα μέ τόν φάγο T₂ του κολοβακτηριδίου (Volkin καί Astrachan). Όταν δ φάγος εισέλθει στό μικροβιακό κύτταρο πρέπει νά φτιάξει m-RNA γιά τήν σύνθεση των πρωτεϊνων του ίου. Παρατηρήθη τότε ότι νέον ριβοσωματικό RNA δέν παρήγετο στά κύτταρα ούτε καινούργια ριβοσωμάτια άρα δ ίός χρησιμοποιούσε τά παλαιά ριβοσωμάτια του κυττάρου γιά νά φτιάξει τήν πρωτεΐνη του, καί έπομένως τó ριβοσωματικό RNA δέ μπορούσε νά είναι ή μήτρα γιά τήν πρωτεϊνοσύνθεση.

Έξ' άλλου άνευρέθει ότι τó νεοσυνθετόμενον RNA δέν όμοιάζει μέ τó RNA του βακτηριδίου όσον άφορā τήν σύσταση σε βάσεις αλλά μέ τó RNA του φάγου (ή όμοιότης άφορā τήν σύνθεση σε βάσεις του m-RNA). Έπίσης τó RNA αυτό δέν είναι σταθερό γρήγορα δηλαδή παράγεται καί καταστρέφεται καί μπορούμε νά τó δούμε μόνο μέ βραχείας διαρκείας ίχνηδέ-τηση. Έτσι βρέθηκε μέ έπόμενα πειράματα τó m-RNA σε



κύτταρα μολυσμένα με ιούς και κατόπιν στα φυσιολογικά κύτταρα.

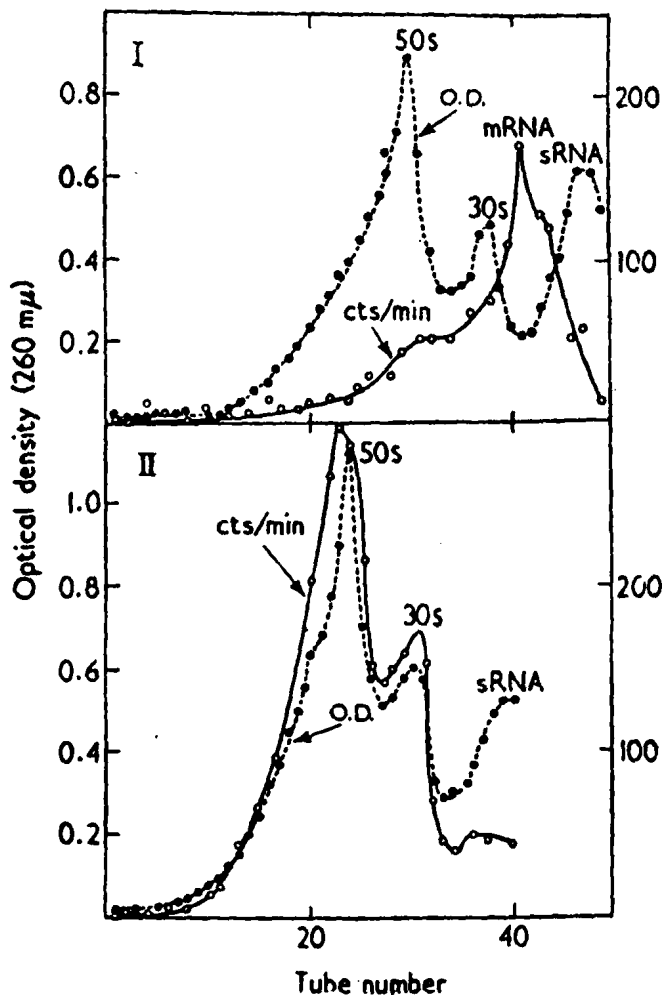
Τό m-RNA πρέπει να έχει τούς κάτωθι χαρακτήρας (στά βακτηρίδια και ιούς).

1. Να είναι ριβοπολυνουκλεοτίδιο
 2. Να έχει μεγάλη ετερογένεια μεγέθους $\approx 5 \times 10^5$ MW (γιατί οι πρωτεΐνες είναι ετερογενείς).
 3. Η σύνθεση σε βάσεις να αντικατοπτρίζει την σύνθεση σε βάσεις του ολικού DNA του κυττάρου.
 4. Να βρίσκεται σε κάποια στιγμή πάνω στα ριβοσώματα γιατί εκεί γίνεται η πρωτεϊνική σύνθεση.
 5. Να έχει ταχεία ημισίαν ζωής (turnover) (βακτηρίδια $\approx 3'$)
- εικόνα 159

Τό m-RNA ενώνεται με την μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος κατά αντιστρεπτό τρόπο. Είναι δυνατόν δηλαδή υπό ορισμένες συνθήκες (ελάττωσις της συγκεντρώσεως των ιόντων Mg^{++}) να απελευθερώσουμε τό m-RNA χωρίς να καταστραφούν τά ριβοσώματα.

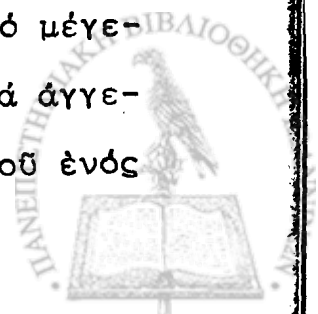
Σε αντίθεση με τά ριβοσωματικά και τό μεταφορικό RNA τά m-RNA δέν έχουν καθορισμένο μήκος. Αυτό είναι εύνόητο γιατί οι πρωτεΐνες έχουν διαφορετικά μοριακά βάρη. Οι μικρές πρωτεΐνες έχουν τουλάχιστον 100 αμινοξέα. Άρα περίπου 300 νουκλεοτίδια στο m-RNA, Υπάρχουν όμως έκτός από την διαφορά στον αριθμό των αμινοξέων και άλλοι λόγοι πού κάνουν να διαφέρει τό μέγεθος του άγγελιοφόρου. Κάθε άγγελιοφόρο περιέχει μία 5' οδηγόν άλληλοδιαδοχή (leader sequence) ή οποία παραμένει άμετάφραστος και παίζει ρόλο στην ρύθμιση της πρωτεϊνικής συνθέσεως. Υπάρχουν οδηγοί άλληλοδια-





είκονα 159 . Πείραμα ανιχνεύσεως του mRNA διά ραδιοεργού σημάνσεως του βασιζόμενο στον ταχύ χρόνο ήμισείας ζωής του (turnover). Κατόπιν σημάνσεως για 5''μέ ούρακίλη σπάσιμο των κυττάρων και φυγοκεντρηση σε κλίση πυκνότητας σακχαρώδους παρατηρούμε την ραδιενέργεια και την οπτική πυκνότητα κατά μήκος του gradient. Μετά την 30S υπομονάδα των ριβοσωματίων που καταγράφεται από την οπτική πυκνότητα παρατηρείται ραδιενέργεια που οφείλεται στα μόρια του ταχέως συνθετούμενου mRNA (I). Εάν επώασουμε τα μικρόβια μετά τα 5''σημάνσεως για 15'παρουσία μή ραδιενεργού ούρακίλης ή ραδιενέργεια εξαφανίζεται από το mRNA λόγω καταστροφής του και περνάει στα ριβοσωματικά RNA των υπομονάδων 30 και 50S που σημαίνονται πιο αργά (II).

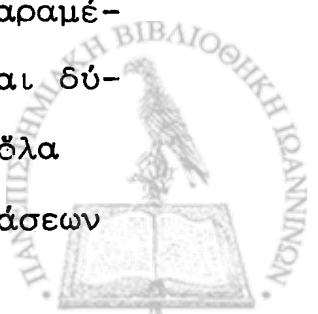
δοχαί διαφόρου μήκους π.χ. m-RNA γαλακτόζης 26 βάσεις και m-RNA τρυπτοφάνης 150 βάσεις. Στην E. coli το μέσον μέγεθος m-RNA περιέχει τόν κώδικα για πολυπεπτίδια από 300-500 αμινοξέα και έχει μήκος 1.000 έως 2.000 νουκλεοτίδια. Υπάρχει και άλλος λόγος άνομοιογένειας στο μέγεθος του m-RNA. Στην E.coli υπάρχουν πολυσιστρονικά άγγελιοφόρα m-RNA που περιέχουν δηλαδή περισσότερα του ενός πολυπεπτίδια σε ένα κοινό μόριο.



Μεταξύ τους υπάρχουν πολύ οδηγοί αλληλοδιαδοχής που δέν μεταφράζονται όπως οι leader Sequences στην αρχή των αγγελειοφόρων π.χ. τό m-RNA που καθορίζει την σύνθεση των ένζύμων που υπεισέρχονται στον μεταβολισμό της ίστιδίνης περιέχει 12.000 νουκλεοτίδια mw $\approx$ 4.000.000.

4. - Δομή καί λειτουργία ριβοσωματικών RNA

Όσον αφορά τό μέγεθος, δύο είδη ριβοσωματικού RNA έχουν απομονωθεί στά ριβοσώματα των βακτηριδίων. Τά ριβοσωματικά RNA δέ μπορούν νά απομονωθοῦν από τά ριβοσώματα όπως τό m-RNA αφίνοντάς τα άθικτα. Άντίθετα ή απομόνωσή τους προκαλεί την καταστροφή της δομής των σωματιδίων των ριβοσωμάτων. Η μικρή υπομονάδα των ριβοσωμάτων 30S περιέχει ένα ριβοσωματικό RNA 16S μέ μοριακό βάρος περίπου $0,6 \times 10^6$, ενώ ή μεγάλη υπομονάδα περιέχει ένα 23S μόριο μέ μοριακό βάρος $1,2 \times 10^6$. Η μεγάλη υπομονάδα περιέχει επίσης καί ένα μικρό RNA τό RNA 5S. Όλα τά ριβοσωματικά RNA είναι μονόκλινα καί περιέχουν διαφορές στην σύσταση των βάσεων. Η τρισδιάστατος δομή τους όμως είναι πολύπλοκος καί σχηματίζουν πολλά τμήματα διπλής αλύσεως έναλασσόμενα μέ τμήματα μονής αλύσεως όπως καί τά t-RNA. Η τρισδιάστατος δομή τους όμως δέν είναι τόσο γνωστή όπως ή δομή τοῦ t-RNA γιατί είναι πολύ πιο μεγάλα καί πολύπλοκα μόρια καί δέν κατορθώνεται ό σχηματισμός άπλών κρυστάλλων γιά νά γίνη μελέτη με διάθλαση ακτίνων X. Τά αυτά προβλήματα παρουσιάζει ακόμη περισσότερο ή μελέτη της τρισδιαστάτου δομής των m-RNA. Ο μόνος τρόπος γιά μελέτη της δομής των ριβοσωματικών RNA παραμένει ή μελέτη της πρωτοδομής τους καί αυτή όμως είναι δύσκολη νά γίνη γιατί ή άλυσος είναι πολύ μεγάλη. Παρ'όλα αυτά έχει ήδη συμπληρωθεί ή μελέτη αλληλοδιαδοχής βάσεων



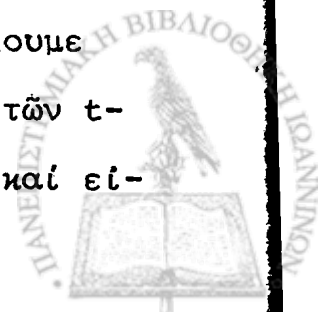
του 16S RNA καί πλησιάζει νά γίνη γνωστή καί αὐτή τοῦ 23S RNA. Ἡ πρωτοδομή αὐτή δείχνει πολλά σημεῖα πού μποροῦν νά σχηματίσουν ἀναδιπλώσεις τοῦ μορίου (hairpin loops).

Μέχρι πρό τινος δέν ξέραμε καθόλου γιατί ὑπάρχουν ριβοσωματικά RNA στά ριβοσωμάτια καί ὄχι μόνο πρωτεῖναι τώρα πιστεύουμε πώς τμήματα ἀπλῶν ἀλύσεων τῶν r-RNA χρησιμεύουν γιά νά ἀναγνωρίσουν τμήματα τοῦ t-RNA καί τοῦ m-RNA.

Ἐνα τμήμα τοῦ r-RNA κοντά στό 3' ἄκρο του χρησιμεύει γιά νά κάνει μία προσωρινή ἔνωση μέ τό m-RNA, τό τμήμα αὐτό εἶναι γνωστό σάν ριβοσωματικό προσδετικό τμήμα τοῦ m-RNA πού βρίσκεται κοντά στό τμήμα "ἐνάρξεως" τῆς μεταφράσεως. Αὐτά δέν ἐξηγοῦν πάντως πλήρως τούς λόγους τῆς ὑπάρξεως τῶν ριβοσωματικῶν RNA φαίνεται δέ πώς οἱ ὑπόλοιπες μονοδιάστατες δομές τοῦ m-RNA χρησιμεύουν γιά νά κάνουν ἐνώσεις μέ πρωτεῖνες ριβοσωματικές καί ἔτσι νά κρατάει μία ὀρισμένη δομή στά ριβοσωμάτια, παρέχοντας ἕνα δομικό σκελετό.

Τόσο τά ριβοσωματικά RNA ὅσο καί τά RNA μεταφορᾶς παράγονται ἀπό τό DNA τοῦ κυττάρου ὅπου εὐρίσκονται. Ἐνῶ στήν ἀρχή ὑπῆρχε ἡ ἰδέα πώς τά RNA αὐτά μιά καί ἔχουν εἰδική λειτουργία στήν πρωτεϊνική σύνθεση καί ὑπάρχουν σέ πάρα πολλά ἀντίτυπα μέσα στό κύτταρο θά πρέπει νά παράγονται δι' αὐτοδιπλασιασμοῦ δηλαδή τό ἴδιο τό RNA νά χρησιμεύει σάν καλούπι γιά τήν σύνθεσή του, ἀπεδείχθει μέ πειράματα ὑβριδοποιήσεως πώς ὑπάρχουν εἰδικοί γόνοι στό DNA γιά τήν σύνθεσή τους.

Ἄν θερμάνουμε τό DNA στούς 100 βαθμούς καί τό ψύξουμε κατόπι βαθμιαίως παρουσία τῶν ριβοσωματικῶν RNA ἢ τῶν t-RNA δημιουργοῦνται ὑβρίδια RNA-DNA τά ὁποῖα εἶναι καί εἰ-



δικά για κάθε κύτταρο δηλαδή τό DNA ενός είδους κυττάρων δέν δίδει υβρίδια μέ τό RNA άλλου είδους.

Έκείνο τό όποιο πρέπει νά έπισημάνουμε είναι ότι ένώ τά δύο RNA τό ριβοσωματικό καί τό RNA μεταφοράς άποτελοϋν τό 98%, τών RNA τοϋ κυττάρου μόνον 1%, τοϋ DNA χρησιμεύει για τήν παραγωγή τους πράγμα πού σημαίνει πώς ό άριθμός τών γόνων είναι σχετικά μικρός αλλά εργάζεται συνεχώς για παραγωγή αύτών τών RNA.

Έπίσης ή διαφορά αύτή έξηγεΐται καί μέ τό ότι τά RNA αύτά είναι σταθερά καί δέν παράγονται για νά καταστραφοϋν λίγο άργότερα όπως τά m-RNA.

Τόσο τά ριβοσωματικά RNA όσο καί τά RNA μεταφοράς δέ παράγονται άπό τά DNA υπό τήν τελική μορφή υπό τήν όποία εϋρίσκονται στίς θέσεις λειτουργία τους δηλαδή στό κυττόπλασμα.

Αντίθετα τά RNA αύτά στόν πυρήνα τοϋ κυττάρου παράγονται υπό μορφήν προδρομών μορίων πού είναι πολύ μεγαλύτερα.

Έτσι τά δύο ριβοσωματικά RNA τό 16 καί τό 23S παράγονται άπό ένα πρόδρομο 30S RNA τό όποιο κόβεται κατόπι άπό ειδική ριβονουκλεάση σέ ένδιάμεσες μορφές 17S καί 25S καί τελικώς στά ώριμα μόρια 16S καί 23S.

Η μεταγραφή άρχίζει μέ τό 16S καί τελειώνει μέ τό 23S καί σέ κάποιο σημείο τοϋ μορίου 30S ύπάρχει καί μία θέση για τό 5S. Τά μεταφορικά t-RNA καί αύτά παράγονται υπό μορφή προδρομών μορφών, άλλα άπό αύτά παράγονται σάν μεγαλύτερα μόρια ($\approx$ 40 βάσεις μεγαλύτερα), άλλα παράγονται σάν πολύ μεγαλύτερα μόρια περιέχοντα διάφορα t-RNA τό καθένα οϋτως ώστε μέσα στό κύτταρο, ή συγκέντρωση τοϋ καθενός t-RNA νά είναι όμοία.



Στό DNA της *E.coli* μόνο ένας γόνος υπάρχει για κάθε ένα t-RNA αντίθετα περισσότεροι γόννοι υπάρχουν σε διάφορα σημεία του χρωματοσώματος για την παραγωγή των r-RNA.

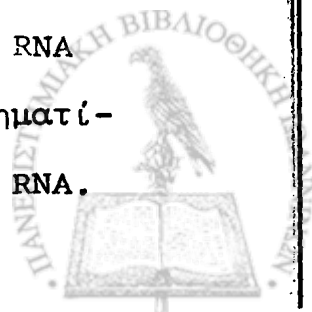
Η χρήση του DNA προς παραγωγή r-RNA και t-RNA μάς λέει και ένα άλλο πράγμα ότι δηλαδή όλοι οι γόννοι στο DNA δεν καθορίζουν πρωτεΐνες, υπάρχουν δηλαδή και γόννοι που καθορίζουν απλώς RNA.

Στά ευκαρυωτικά κύτταρα τα ριβοσωματικά RNA παράγονται στα νουκλεόλια του πυρήνος. Τα νουκλεόλια σχηματίζονται από τον νουκλεολικό οργανωτή ενός ή περισσοτέρων χρωματωμάτων και εκεί παράγονται τα r-RNA και ενώνονται με τις πρωτεΐνες των ριβοσωμάτων για να παράγουν τα προριβοσωμάτια. Οι γόννοι των r-RNA εύρισκονται μαζεμένοι σε ώρισμα σημεία δημιουργώντας (clusters) γονιδιακά συγκροτήματα.

Τά συγκροτήματα αυτά αποτελούνται από ένα σιωπηρόν τμήμα του DNA που δεν μεταγράφεται (spacer) και ακολουθεί τό μεταγραφόμενο τμήμα με τους δύο γόνους του 18S και 28S RNA που έδω παράγονται υπό την μορφήν ενός προδρόμου του 45S. Εικόνα 160, 161.

Τό 5S RNA παράγεται χωριστά και δεν βρίσκεται μαζί με τό 28 και 18S. Τά t-RNA έχουν περισσότερους γόνους για καθένα από αυτά και σχηματίζουν επίσης συγκροτήματα (clusters) χωριζόμενα μεταξύ τους από σιωπηρούς γόνους τά (spacers). Εικόνα 160.

Ο σχηματισμός των ριβοσωμάτων γίνεται κατά στάδια. Οι πρωτεΐνες αρχίζουν να ενώνονται με τό ριβοσωματικό RNA κατά την διάρκεια της συνθέσεώς του. Στην αρχή σχηματίζονται πρόδρομα ριβοσωμάτια περιέχοντα τά πρόδρομα RNA.



εικόνα 160

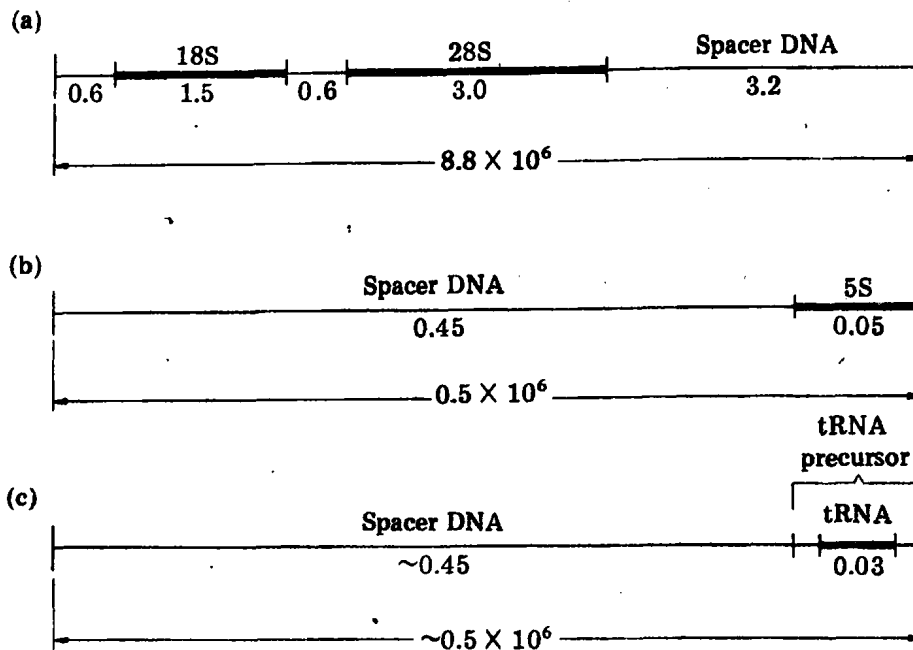


Figure 2-15. Repeating units for rRNA and tRNA. Numbers indicate approximate molecular weights of RNA. (a) Schematic diagram of one repeating unit of rRNA genes from *Xenopus laevis*. The 18S and 28S gene regions are denoted by heavy lines. These genes are co-transcribed as a 45S precursor, which is processed before transport to the cytoplasm (see Essential Concept 5-11). (b) Schematic diagram of one repeating unit of 5S rRNA genes from *Xenopus laevis*. (c) Schematic diagram of a tRNA gene repeat unit of *Xenopus laevis*. [Parts (a) and (b) adapted from D. Brown and K. Sugimoto, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 38, 501, 1973. Part (c) adapted from S. Clarkson and M. Birnstiel, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 38, 451, 1973.]

Ἡ ὠρίμανσις ἀφορᾷ ἀφ' ἑνός τό RNA πού ὑφίσταται σμίκρυνσι τοῦ μορίου καθὼς καί προσθήκη νέων πρωτεϊνῶν. Οἱ πρωτεΐνες πού ἐπιτρέπουν τή σύνδεση μέ t-RNA καί m-RNA προσθέτονται τελευταίες.

Ἔτσι δέν ὑπάρχει περίπτωση νά ἔχουμε πρόδρομα ριβοσωμάτια πού νά ἔχουν ἐνωμένα μαζί τους t-RNA.



εικόνα 161

Electron micrograph of nucleolar genes of an amphibian egg cell. These genes, which code for ribosomal RNA, repeat along the DNA. They are identifiable because each is undergoing transcription into rRNA, about 100 strands of the latter being formed simultaneously as the RNA polymerase molecules move along the gene. The segments between transcribed genes are probably regulatory or "pacer" DNA.



O. L. Miller, Jr. and B. R. Beatty



B. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΕΩΣ

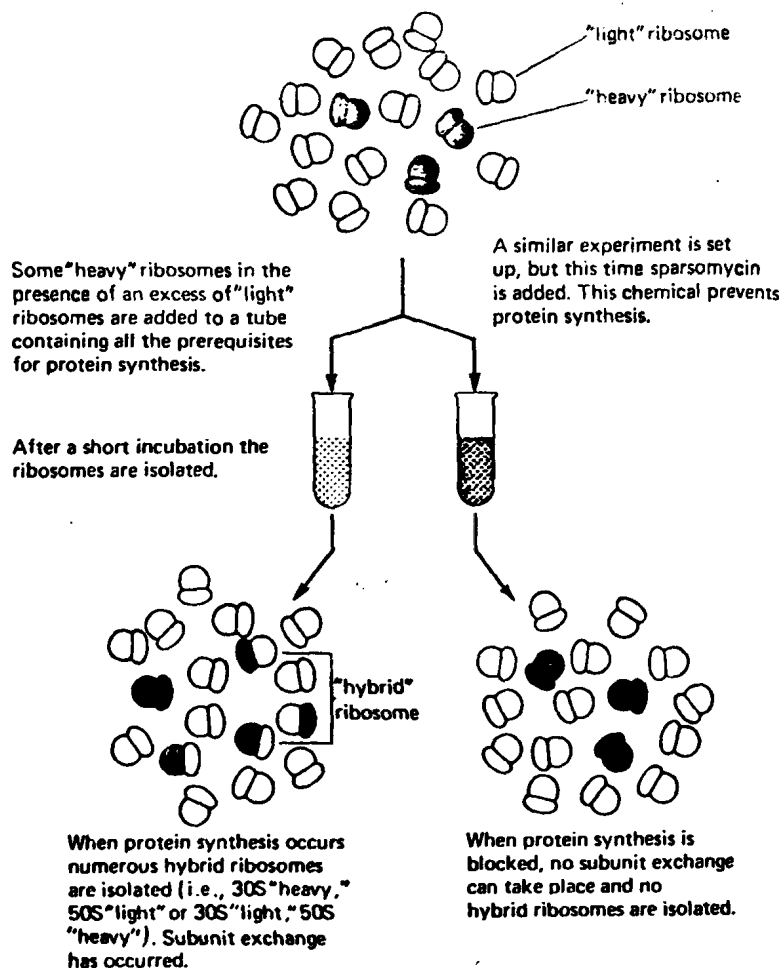
1.- Κυκλική χρησιμοποίηση υπομονάδων τών ριβοσωμάτων

Ἡ κατασκευή ὅλων τών ριβοσωμάτων ἀπὸ υπομονάδες πού εὐκολα διΐστανται δείχνει ὅτι ὑπάρχει κάποιος κυκλικὸς μηχανισμὸς στὴν χρησιμοποίηση τών υπομονάδων. Πράγματι φαίνεται ὅτι κατὰ τὴν διάρκεια τῆς πρωτεΐνικης συνθέσεως λαμβάνει χώρα διαχωρισμὸς καὶ ἐπανασχηματισμὸς τών υπομονάδων τών ριβοσωματίων. Αὐτὸ ἀπεδείχθη ἀπὸ πειράματα μὲ βαρέα ἰσότοπα. Ἀνάπτυξη βακτηριδίων σὲ ὑλικὸ περιέχον βαρέα ἰσότοπα (π.χ. N^{15}) δημιουργεῖ τὸν σχηματισμὸ βαρέων ριβοσωμάτων. Ὄταν τὰ βακτηρίδια μεταφερθοῦν σὲ ἓνα ὑλικὸ φυσιολογικόν, τότε τὰ καινούργια ριβοσωμάτια πού παράγονται εἶναι ἐλαφρά. Παρατήρηση τών ριβοσωμάτων τών βακτηριδίων δείχνει ὅτι δέν ὑπάρχουν μόνο βαρέα καὶ ἐλαφρά ριβοσώματα ἀλλὰ καὶ ὑβρίδια πού περιέχουν μία βαριά καὶ μία ἐλαφρά υπομονάδα. Αὐτὸ δείχνει ὅτι κατὰ τὴν πρωτεΐνικὴ σύνθεση λαμβάνει χώρα διαχωρισμὸς καὶ ἐπανασχηματισμὸς τών υπομονάδων, εἰκόνα 162.

Ἡ ταχύτης αὐτοῦ τοῦ φαινομένου μᾶς λέει ὅτι γίνεται κάθε φορά πού μία καινούργια πολυπεπτιδικὴ ἄλυσίδα ἀρχίζει νὰ συντίθεται. Δηλαδή ὅταν ἓνα ριβοσωμάτιο τελειώσει τὸ διάβασμα τοῦ m-RNA φθάσει στὸ τέλος καὶ ἐλευθερωθεῖ φέροντας μία πολυπεπτιδικὴ ἄλυσίδα τελειωμένη διΐσταται στίς δύο υπομονάδες 30 καὶ 50S καὶ ἐπανασυνδέεται ξανά μόλις ἐνωθεῖ μὲ τὸ νέο m-RNA.

Σ'αὐτὸ τὸ ἐπίπεδο δρᾷ καὶ ἓνα ἀντιβιοτικὸ ἢ σπαρσομυκίνη (sparsomycin). Παρουσία σπαρσομυκίνης ἢ πρωτεΐνικὴ σύνθεση σταματᾷ (μπλοκάρισμα τῆς πολυπεπτιδικῆς ἐπιμυκύνσεως) συγχρόνως παρατηρεῖται ὅτι οἱ υπομονάδες τών ριβοσωματίων





είκονα 162

The obligatory dependence of subunit exchange on protein synthesis.

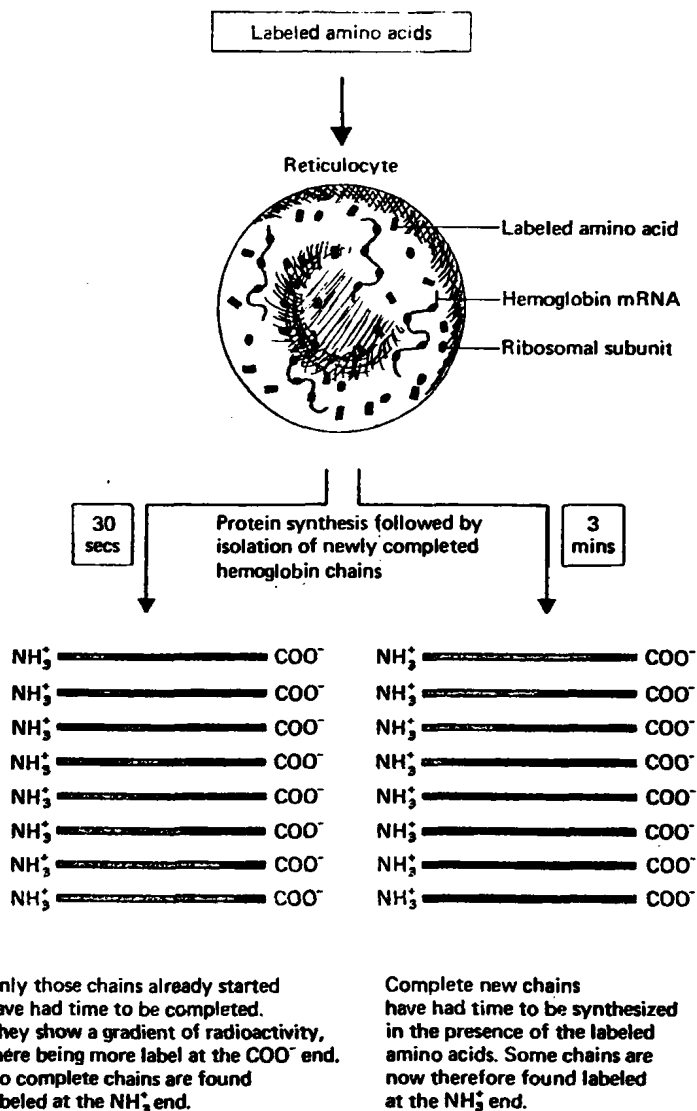
δέν χωρίζουν και έλαφρά-βαριά ύβριδια δέ σχηματίζονται. 'Η είκονα.(162) μάς δείχνει in vitro πειράματα πού δείχνουν αυτό τό φαινόμενο. Ριβοσωμάτια βαριά και πολλά έλαφρά αναμειγνύονται μεταξύ τους και προστίθενται σέ ύλικο κατάλληλο γιά πρωτεϊνική σύνθεση. Λίγο μετά τά ριβοσωμάτια απομονώνονται και έξετάζονται γιά ύβριδια. 'Η δρᾶσι τής σπαρσομυκίνης έμποδίζει τόν σχηματισμό ύβριδίων.

2. - Αύξεις τής πολυπεπτιδικής αλύσεως από τήν άμινοομάδα

Σέ μιά δλοκληρωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα έχουμε ένα άκρο πού αρχίζει μέ μιά άμινοομάδα και τελειώνει μέ μιά καρβοξυλοομάδα. 'Η φορά τής αύξήσεως είναι από τήν άμινοομάδα



πρός τήν καρβοξυλοομάδα. Αυτό αποδεικνύεται από πειράματα του Dintzis ὁ ὁποῖος ἔδωσε σέ βραχέα διαστήματα ραδιενεργά ισότοπα σέ κύτταρα πού συνδέτουν πρωτεΐνες καί μετά ἀπεμόνωσε τίς πολυπεπτιδικές ἀλυσίδες. Βρῆκε πώς τά καινούργια ραδιενεργά ἀμινοξέα εἰσέρχονται πρὸς τὸ ἄκρο πού φέρει τήν καρβοξυλοομάδα ἐνῶ τά ἀμινοξέα πρὸς τὸ ἄκρο τῆς ἀμινοομάδας παραμένουν χωρίς ραδιενέργεια εἰκόνα 163.



εἰκόνα 163.

Experimental demonstration that hemoglobin chains grow in the NH₂ → COOH direction.

Ἐάν ὁ χρόνος σημάτων εἶναι πῶς μεγαλύτερος τότε βρίσκουμε καί πολυπεπτίδια πού εἶναι ραδιενεργά σέ ὅλο τους τὸ μήκος.

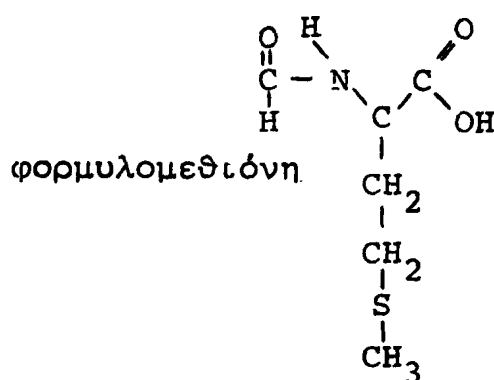
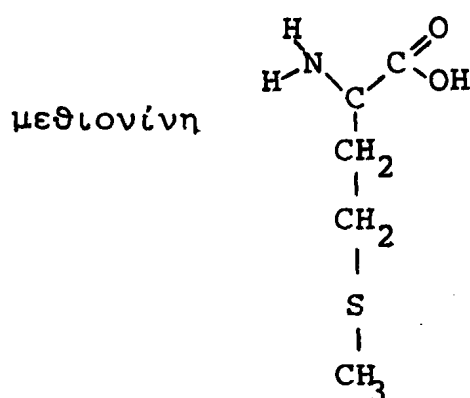


Γιὰ τὰ πειράματα αὐτὰ χρησιμοποιήθηκε ἡ αἰμοσφαιρίνη πού γινώριζαμε ἤδη τήν σύνθεσή της σέ ἀμινοξέα. Ὑστερα ἀπό διάφορα χρονικά διαστήματα ληνηθετήσεως μέ ραδιενεργό λευκίνη σέ χαμηλή θερμοκρασία (γιὰ νά ἐλαττώσουμε τήν ταχύτητα συνθέσεως της) ἀπομονώθησαν τὰ ὁλόκληρα πολυπεπτιδια καί ἐγινε πέψης μέ θρυψίνη. Κατόπιν δέ μέ ἠλεκτροφόρηση καί χρωματογραφία ἐγινε διαχωρισμός τῶν ὀλιγοπεπτιδίων. Ἡ χαρτογράφηση αὐτή ἦτο ἤδη γνωστή ἔτσι μπορούσαμε νά ξέρουμε πιά ὀλιγοπεπτίδια ἀνήκουν στό ἓνα ἄκρο τῆς ἀλύσεως καί πιά στό ἄλλο. Ἀπό τήν ραδιενέργεια τους βρέθηκε πῶς ὅσο πιά κοντά στό καρβοξυλικό ἄκρο βρίσκεται τό πεπτίδιο τόσο περισσότερη ραδιενέργεια περιέχει. Ἀρα ἡ σύνθεση γίνεται μέ φορά $\text{NH}_2 \rightarrow \text{COOH}$.

Ἡ εἰκόνα (1) ¹⁶² δείχνει ἓνα τέτοιο πείραμα σέ δικτυοερυθροκύτταρα (ἄωρα ἐρυθρά αἰμοσφαίρια). Γίνεται σύνθεση αἰμοσφαιρίνης παρουσία ραδιενεργῶν ἀμινοξέων, σέ βραχύ χρονικό διάστημα τό ἀμινικό (NH_2) τέλος δέν περιέχει ραδιενέργεια, ἐνῶ σέ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σημάτων περιέχει.

3. Ἐναρξεις τῆς συνθέσεως μέ N - φορμυλομεθιονίνη

Ἡ ἔναρξις τῆς πρωτεϊνικῆς συνθέσεως στά βακτηρίδια γίνεται μέ ἓνα ἀμινοξύ μέ μεταβεβλημμένο τό NH_2 ἄκρο του τήν φορμυλομεθιονίνη



Πρόκειται για μία αλλαγμένη μορφή της μεθιονίνης που έχει μία ομάδα φορμυλίου ενωμένη στο αμινικό άκρο της.

Τό αμινοξύ αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για την έναρξη της πρωτεϊνικής συνθέσεως έφ' όσον δεν περιέχει μία ελεύθερη αμινοομάδα για να δημιουργήσει ένα πεπτιδικό δεσμό στο έσωτερικό της πρωτεϊνικής αλύσεως. Ή ομάδα φορμυλίου προστίθεται ένζυματικά στην μεθιονίνη αφού ή μεθιονίνη προσδεθεί στο t-RNA της.

Όλα όμως τά t-RNA-μεθιονίνης δεν μπορούν να υποστούν φορμύλωση μόνον ένα είδος από αυτά υφίσταται. Άρα υπάρχουν δύο είδη t-RNA μεθιονίνης. Ή μελέτη τους επέδειξε πώς δεν διαφέρουν στο αντικωδικόνιο αλλά έχουν διαφορές σε άλλα σημεία που επέτρέπουν την αναγνώριση από είδικό ένζυμο που προκαλεί την φορμύλωση.

Παρ' όλο που ή πρωτεϊνοσύνθεση σε βακτηρίδια αρχίζει με φορμυλομεθιονίνη ή μελέτη πολλών πρωτεϊνών δείχνει πώς δεν έχουν φορμυλιόμενο άκρο ή δεν έχουν καθόλου μεθιονίνη στην αρχή. Αυτά συμβαίνουν γιατί υπάρχει ένα ένζυμο που μετά την σύνθεση αφαιρεί την ομάδα φορμυλίων και επίσης υπάρχουν πεπτιδάσαι που σε πολλές πρωτεΐνες αφαιρούν την τελική μεθιονίνη ή ένα μεγαλύτερο τμήμα της αρχικής πολυπεπτιδικής αλύσεως. Έτσι πολλές πρωτεΐνες δεν αρχίζουν με μεθιονίνη. Στα εύκαρυωτικά κύτταρα ή πρωτεϊνοσύνθεση παρουσιάζει ώρισμένες διαφορές και εκεί αρχίζει με μεθιονίνη αλλά όχι με φορμυλιομένη μεθιονίνη. Παρ' όλα ταύτα και έδω υπάρχουν διαφορετικά t-RNA ένα για την έναρξη της πρωτεϊνοσυνθέσεως και ένα για την επιμήκυνση της αλύσεως.

4. - Σημεία ένώσεως ριβοσωματικού RNA και m-RNA

Ή έναρξης της πρωτεϊνικής συνθέσεως στα βακτηρίδια αρχί-



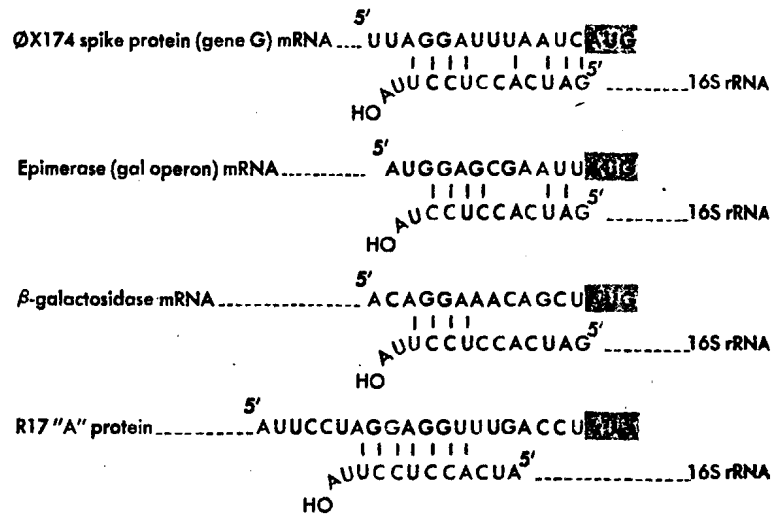
ζει μέ τόν σχηματισμό ενός συμπλέγματος μεταξύ τῆς μικροτέρας ὑπομονάδος τοῦ ριβοσώματος 30S τοῦ φ-μεθ-*t*-RNA καί τοῦ *m*-RNA. Ἀφοῦ γίνεται αὕτη ἡ σύνδεση τότε ἡ ὑπομονάς 50S προσδένεται στήν 30S γιά νά σχηματίσει ἕνα 70S ριβοσωμάτιο. Κάθε *m*-RNA περιέχει ἕνα ἢ περισσότερα σημεῖα προσδέσεως μέ τό ριβοσωμάτιο. Κάθε τέτοιο σημεῖο προσδέσεως ἀποτελεῖται ἀπό μία ἀλληλουχία βάσεων πού ἐπιτρέπει στό *m*-RNA νά πάρει τήν κανονική θέση πάνω στήν ἐπιφάνεια τοῦ σωματίου 30S.

Ἐάν τό *m*-RNA περιέχει πληροφορία γιά μία μόνον πολυπεπτιδική ἀλυσίδα (ἕναν γόνον) τότε ἕν μόνον σημεῖον προσδέσεως ὑπάρχει σ'αυτό. Ἐάν περιέχει τήν πληροφορία γιά περισσότερα πολυπεπτίδια (πολυσιστρονικό *m*-RNA) τότε ὑπάρχουν τόσα ὁμημεῖα προσδέσεως στό ριβοσωμάτιο ὅσες καί οἱ πολυπεπτιδικές ἀλυσίδες γιά τίς ὁποῖες πληροφορεῖ τό *m*-RNA καί στήν ἀρχή τῆς κάθε μία ἀπ'αυτές.

Ἡ μελέτη τῶν σημείων αὐτῶν προσδέσεως καί ἡ εὕρεση τῆς ἀλληλουχίας τους βρέθηκε μέ τόν ἑξῆς τρόπο:

Τό *m*-RNA προσδέθηκε *in vitro* σέ ριβοσωμάτια (ἡ ἔνωση γίνεται αὐτομάτως). Κατόπιν ἐπιδράσαμε μέ ριβονουκλεάση. Ἕνα ἔνζυμο πού καταστρέφει τό μονόκλωνο RNA. Στά σημεῖα πού τό *m*-RNA ἦτο προσδεδεμένο στό ριβοσωμάτιο, ἡ ριβονουκλεάση δέν τό κατέστρεψε καί ἀπεμονώθει τό τμήμα αὐτό τοῦ *m*-RNA, ἐμελετήθει δέ ἡ ἀλληλουχία τῶν βάσεων του εἰκ. 164. Στό ἄκρο 3' τοῦ κομματιοῦ αὐτοῦ βρέθηκε τό κωδικόνιο ἑναρξιν *AUG* πού σημαίνει μεθιονίνη. Πρός τό ἄκρο 5' βρέθηκε μία ἀλληλουχία πού δέν χρησιμοποιεῖται γιά ἐνσωμάτωση ἀμινοξέων, ἀποτελεῖται ἀπό 3 ἕως 4 πουρίνες καί περιέχει τήν σταθερά ἀλληλοδιαδοχή *A, G, G, A*.





είκονα 164

Ribosome binding sequences from viral and bacterial mRNA molecules, showing their pairing with bases at the 3' tail of 16-S rRNA.

Ἡ ἀλληλοδιαχὴ αὐτὴ βρίσκεται σὲ ἀπόσταση 8 ἕως 13 νου- κλεοτίδια ἀπὸ τὸ ἐναρκτήριο κωδικόνιο AUG (βλέπε σχῆμα) καὶ ἐνώνεται μὲ μία ἀντίστοιχη ἀλληλοδιαδοχὴ στὸ ἄκρο 3', τοῦ ριβοσωματικοῦ RNA (στὴν οὐρὰ τοῦ r-RNA).

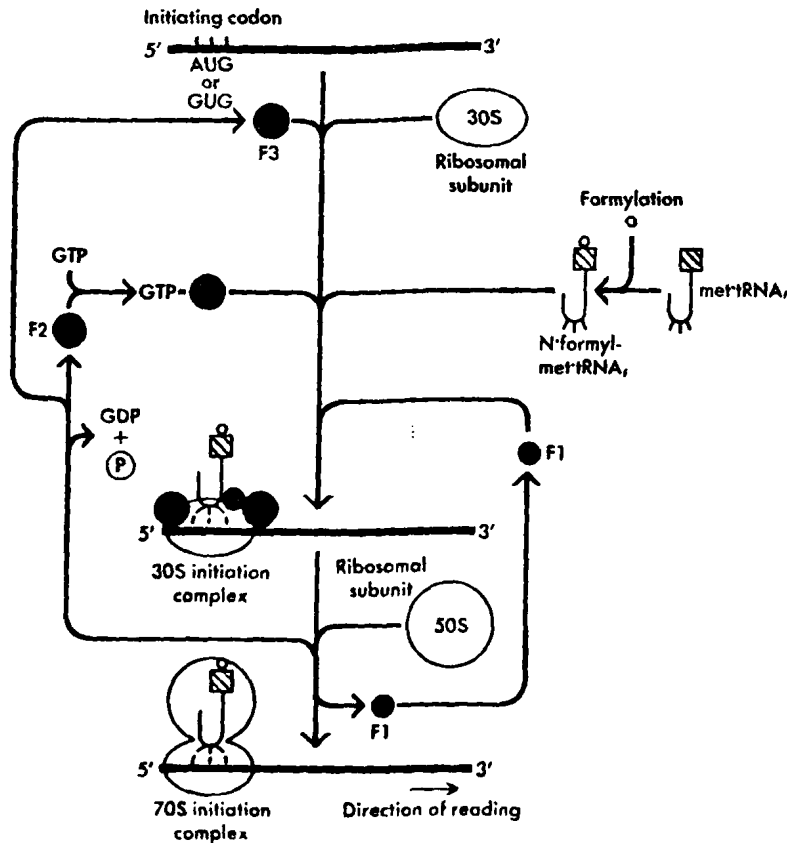
Ὅταν ἀρχίσει ἡ ἐπιμύκνωση τῆς πεπτιδικῆς ἀλύσεως ἡ ἔνω- ση αὐτὴ διασπᾶται καὶ τὸ m-RNA ἀρχίζει νὰ κινεῖται πάνω στὴν ἐπιφάνεια τοῦ ριβοσώματος καὶ νὰ φέρνει στὴν ἐπιφά- νεια τοῦ ριβοσώματος τμήματα τοῦ m-RNA πού θὰ μπορέσουν νὰ ἐνωθοῦν μὲ τὰ t-RNA. Πολλές διπλές ἑλικες καὶ διαμορφώ- σεις τοῦ m-RNA διασπῶνται ὅταν εἶναι νὰ περάσουν πάνω στὸ ριβοσωμάτιο καὶ δημιουργοῦνται ἔτσι ἀπλές ἑλικες πού μπο- ροῦν νὰ συνδέσουν τὸ t-RNA.

5. - Παράγοντες ἐνάρξεως καὶ κατεύθυνση ἀναγνώσεως τοῦ m-RNA

Ἡ συνένωση τοῦ t-RNA ἐνάρξεως τοῦ m-RNA καὶ τοῦ ριβοσώ- ματος δέν ἀρκεῖ γιὰ τὴν ἐναρξη τῆς πρωτεϊνοσυνθέσεως. Χρειάζεται καὶ ἡ παρουσία τριῶν πρωτεϊνῶν πού δέν ἔχουν καμμιά σχέση μὲ τίς πρωτεΐνες τοῦ ριβοσώματος καὶ πού



παίζουν ρόλο στην έναρξη της πρωτεϊνοσυνθέσεως. εικόνα 165



εικόνα 165

Diagrammatic view of the initiation process in protein synthesis. [Only one of the two tRNA binding sites is shown on the ribosome. It is not known which site (A or P) the f-met-tRNA enters first.]

Όπως φαίνεται στην εικόνα (165) η έναρξης αρχίζει με τον σχηματισμό ενός συμπλέγματος μεταξύ της υπομονάδας 30S και του παράγοντος IF₃. Το t-RNA μεθιονίνη ενώνεται με τον παράγοντα IF₂ - GTP και το σύμπλεγμα m-RNA-t-RNA-30S συμπληρώνεται και με τον τρίτο παράγοντα IF₁. Αφού όλο αυτό το σύμπλεγμα σχηματισθεί στην 30S υπομονάδα τότε η υπομονάδα 50S προστίθεται στο ριβοσωμάτιο και ελευθερώνεται GTP, καθώς και οι τρεις παράγοντες IF₁, IF₂, IF₃. Αφού το πρώτο αυτό στάδιο λάβει χώρα η κατεύθυνση κινήσεως του m-RNA είναι καθωρισμένη από το 5' άκρο. Το άκρο 5' που ενώνεται πρώτα με το ριβόσωμα όπως ξέρουμε είναι και το άκρο του m-RNA που παράγεται πρώτο. Έτσι είναι



δυνατό πριν ακόμη ελευθερωθεί ένα m-RNA από το DNA που συντίθεται να ενωθεί με ριβοσωμάτια και να αρχίσει να διαβάζεται για να δώσει πρωτεΐνες. Αυτό πράγματι συμβαίνει στα βακτηρίδια κατά την φάση της ταχείας ανάπτυξης όταν η πρωτεϊνική σύνθεση είναι πολύ ταχεία.

Στά εύκαρυωτικά κύτταρα αντιθέτως αυτό δεν συμβαίνει ποτέ γιατί πρωτεϊνική σύνθεση μέσα στον πυρήνα του κυττάρου δεν λαμβάνει χώρα και το m-RNA που παράγεται, ενώνεται μετά με ειδικές πρωτεΐνες, περνάει στο πρωτόπλασμα και εκεί ενώνεται με τα ριβοσωμάτια για να αρχίζει να χρησιμοποιείται στην πρωτεϊνική σύνθεση.

6. - Προσδετικές θέσεις για το t-RNA στα ριβοσώματα
και σχηματισμός των πεπτιδικών δεσμών.

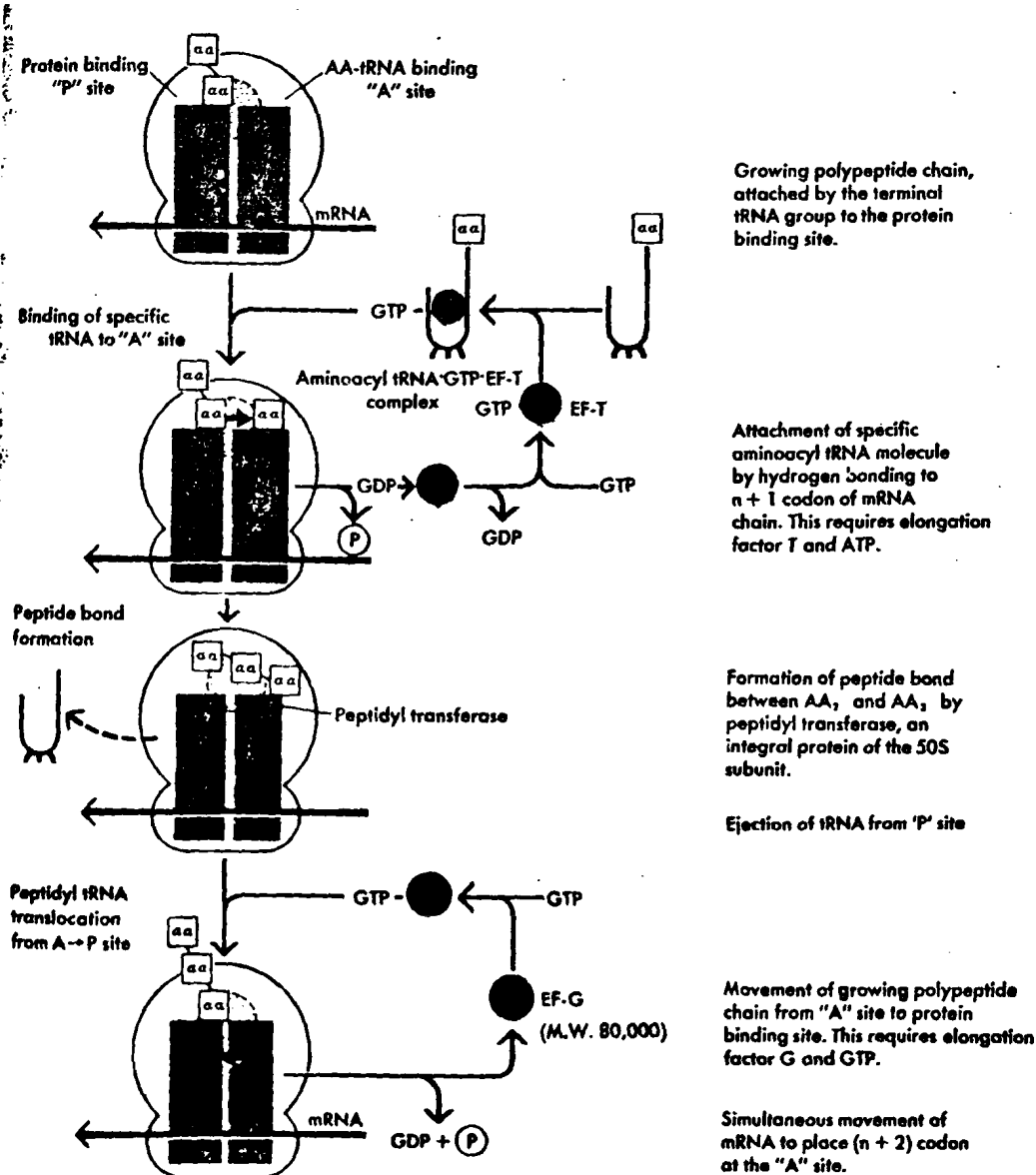
Κάθε 70S ριβοσωμάτιο έχει δύο κοιλώματα στην επιφανειά του στα οποία προσαρμόζονται τα t-RNA. Τα κοιλώματα αυτά είναι το P (πεπτιδικό) και το A (άνιμοακυλικό). Κάθε κοίλωμα περιλαμβάνει τμήμα της επιφανείας της 30S υπομονάδος και τμήμα της 50S υπομονάδος και περιορίζεται στην 30S υπομονάδα από το κωδικόνιο που εμφανίζει σ' αυτό το μέρος το m-RNA.

εικόνα 166.

Έτσι και ενώ η επιφάνεια του ριβοσώματος μπορεί να δεχθεί οιονδήποτε t-RNA γιατί η σύνδεση με το ριβόσωμα δεν είναι ειδική ή ειδικότης προσδίδεται από το κωδικόνιο του m-RNA που περιορίζει το ένα άκρο της κοιλότητας.

Δέν γνωρίζουμε αν το πρώτο t-RNA- μεθιονίνη εισέρχεται στην κοιλότητα A ή P πάντως για να εισέλθει το δεύτερο, το πρώτο πρέπει να πάρει οποσδήποτε την θέση P. Μόλις το δεύτερο t-RNA πάρει την θέση A ένας πεπτιδικός δεσμός γίνεται που ενώνει τα δύο αμινοξέα τα ενωμένα με το t-RNA, το πρώτο





Εικόνα 166

Diagrammatic view of peptide bond formation showing the role of the elongation factors.

- t-RNA τότε έλευθερώνεται και τό δεύτερο πού κατέχει τώρα την θέση P (έχει περάση στην θέση P) φέρει ένωμένο έπάνω του ένα διπεπτίδιο. Τά κάτωθι σημεία χρήζουν προσοχής.
- 1ον. Τό αύξανόμενο καρβοξυλικό άκρο της παραγωμένης πολυπεπτιδικής άλυσίδας είναι πάντοτε ένωμένο μέ ένα t-RNA πού βρίσκεται είτε στό P είτε στό A κοίλωμα.
 - 2ον. 'Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού κάνει νά μεταπέσει ή πολυπεπτιδική άλυσίδα από την θέση P στην θέση A.



3ον. Τήν στιγμή αὐτή ἐλευθερώνεται τό t-RNA ἀπὸ τήν θέση P καί ἐκδιώκεται.

4ον. Τό νέο τελικό t-RNA τότε περνάει ἀπὸ τήν θέση A στήν θέση P καί συγχρόνως τό m-RNA κινεῖται ἐπίσης κατὰ ἓνα κωδικόνιο.

5ον. Ἡ θέση A πού τώρα εἶναι ἐλεύθερη δέχεται ἓνα καινούργιο t-RNA-ἀμινοξύ πού ἐνώνεται εἰδικά στήν θέση τοῦ καινούργιου κωδικονίου.

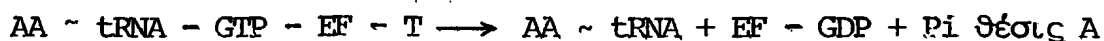
Ἐπειδὴ τὰ ἀμινοξέα εἶναι ἤδη ἐνεργοποιημένα ἐνομίζετο ὅτι δέν χρειάζεται ἄλλη ἐνέργεια γιὰ νά γίνη ὁ πεπτιδικός δεσμός καί ὅτι ἓνα ἐνζυμο θά ἦτο ἀρκετό γιὰ νά γίνη ἡ σύνθεσή του. Ἀπεδείχθει ὅμως ὅτι καί ἄλλη ἐνέργεια χρειάζεται ὑπὸ μορφή GTP καί ἄλλα δύο ἐνζυμα ὑπεισέρχονται στὸν σχηματισμὸ τοῦ δεσμοῦ αὐτοῦ.

Οἱ πρωτεΐνες αὐτές χρειάζονται κυρίως γιὰ τήν σύνδεση τοῦ t-RNA μέ τό ριβοσωμάτιο καί γιὰ τήν μεταφορά του ἀπὸ τήν θέση A στήν θέση P τό ἴδιο καί ἡ ἐνέργεια ὑπὸ μορφή GTP.

Ἔτσι τό πρῶτο t-RNA πού πάει στήν θέση A (δηλαδή τό δεύτερο γιὰτί τό πρῶτο εἶναι τό t-RNA-μεθειονίνης καί βρίσκεται ἤδη στήν θέση P) χρειάζεται τὸν παράγοντα T ἢ EF - T (elongation factor T).

AA-tRNA-GTP-EF-T καί τό σύμπλεγμα αὐτό πέρνει τήν θέση A.

Ὅταν γίνη αὐτό τότε ἐλευθερώνονται EF - T - GDP καί φωσφορικό P_i.



Ὁ παράγων T παίζει κάποιο ρόλο στήν ἀκρίβεια τῆς συνδέσεως τοῦ AA-tRNA στήν θέση A ἂν ἓνα t-RNA λανθασμένο πάρει αὐτή τήν θέση τότε ἀπομακρίνεται.



Ο πεπτιδικός δεσμός τώρα γίνεται στην επιφάνεια της 50S υπομονάδος και γι' αυτό χρησιμοποιείται μία πρωτεΐνη της υπομονάδος αυτής. Ακόμη δέν γνωρίζουμε πιά από τίς πρωτεΐνες του 50S παίζει αυτό τον ρόλο, τό ένζυμο αυτό όνομάζεται πεπτιδυλοτρανσφεράση.

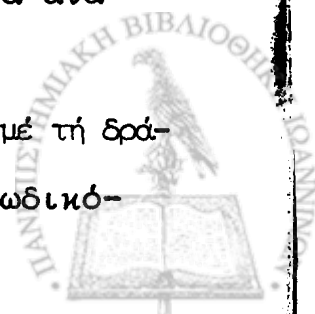
Η μετακίνηση από την θέση Α στην θέση Ρ χρειάζεται τέλος μία άλλη πρωτεΐνη τον παράγοντα G, EF-G (elongation factor G) την τρανσλοκάση. Στην περίπτωση αυτή χρειάζεται τό σύμπλεγμα EF- G - GTP - ριβόσωμα και ό παράγων αυτός μεταφέρει τό t-RNA στην θέση Ρ μέ άπελευθέρωση GDP και Ρ.

Συγχρόνως τώρα μέ όλο αυτόν τον μηχανισμό θά πρέπει και τό m-RNA νά μεταφερθεϊ κατά τρεΐς βάσεις δηλαδή ένα κωδικόνιο. Δέν υπάρχει ειδικός μηχανισμός πάνω στό ριβόσωμα γι' αυτήν την κίνηση άπλως τό m-RNA έξαναγκάζεται νά προχωρήσει γιατί τραβιέται από τό t-RNA πού έχει ένωμένο τό άντικωδικόνιο του μέ τό m-RNA. Αυτό άπεδείχθει από πειράματα μέ ειδικά t-RNA τά "κατασταλτικά t-RNA τών μεταλλαγών άλλαγής φάσεως".

Αυτά τά t-RNA άντί νά έχουν ένα άντικωδικόνιο μέ τρία νουκλεοτίδια έχουν ένα μέ τέσσερα και στην περίπτωση αυτή τό m-RNA προχωρεϊ κατά 4 βάσεις.

Υπό κανονικής συνθήκας ή πολυπεπτιδική άλυσίδα αρχίζει νά παίρνει την τρισδιάστατο δομή της ένω ακόμη βρίσκεται πάνω στά ριβοσώματα. Έτσι μικρά ποσά ένζυματικής δράσεως βρίσκονται πάνω στά ριβοσώματα πού παράγουν τά άνάλογα ένζυμα.

Ο τερματισμός μιās πολυπεπτιδικής άλύσεως γίνεται μέ τη δράση παραγόντων λήξεως. Κατ' αρχάς υπάρχουν ώρισμένα κωδικό-



νια στο m-RNA πού σημαίνουν λήξη αλλά δέν υπάρχουν είδικά t-RNA πού νά μὴν φέρουν ἀμινοξέα καί νά ἐνώνονται μέ τὰ κωδικόνια λήξεως. Ἀντίθετα υπάρχουν ὁρισμένοι πρωτεΐνικοί παράγοντες πού ἀναγνωρίζουν τὰ κωδικόνια λήξεως καί ἴσως νά κόβουν καί τήν σύνδεση τῆς πολυπεπτιδικῆς ἀλύσεως μέ τό τελευταῖο t-RNA ἀπό τό ὁποῖο κρέμεται πάνω στό ριβοσώματιο. Γιά τήν ἐργασία αὐτή πάλι χρειάζεται ἐνέργεια ἀπό τό GTP.

Ὁ τρόπος πού δρᾷ τό GTP σέ ὅλα αὐτά τὰ στάδια τῆς πρωτεϊνοσυνθέσεως εἶναι διαφορετικός ἀπό τόν ρόλο τοῦ ATP.

Τό GTP δέν δίδει τελικῶς ἐνέργεια γιά νά γίνουν δεσμοί ὑψηλῆς ἐνεργείας ὅπως δρᾷ πάνω σέ ἐπιφάνειες ἀλλάζοντας τρισδιάστατες δομές π.χ. ὅταν τό GTP μετατρέπεται σέ GDP αὐτό προκαλεῖ ἀλλαγὴ δομῆς καί ἀπελευθέρωση τῶν πρωτεϊνικῶν συμπλεγμάτων τῶν διαφόρων παραγόντων πού δροῦν στήν πρωτεϊνοσύνθεση.

Τέλος πρέπει νά ποῦμε ὅτι κάθε m-RNA περιέχει περισσότερα τοῦ ἑνός ριβοσώματα σχηματιζομένων τῶν πολυριβοσωματίων.

Ὁ ἀριθμός τῶν ριβοσωμάτων ἀνά m-RNA ἐξαρτᾶται ἀπό τό μήκος του, πρέπει νά ὑπολογίσουμε ἕνα ριβοσώματιο, κάθε 80 περίπου νουκλεοτίδια τοῦ m-RNA, ἔτσι τό m-RNA τῆς αἰμοσφαιρίνης περιέχει περίπου 4-6 ριβοσώματα τό m-RNA, τῆς μυοσίνης περιέχει περίπου 20 ριβοσώματα.

7. - Ἐπίδρασις ἀντιβιοτικῶν πάνω στήν πρωτεϊνική σύνθεση

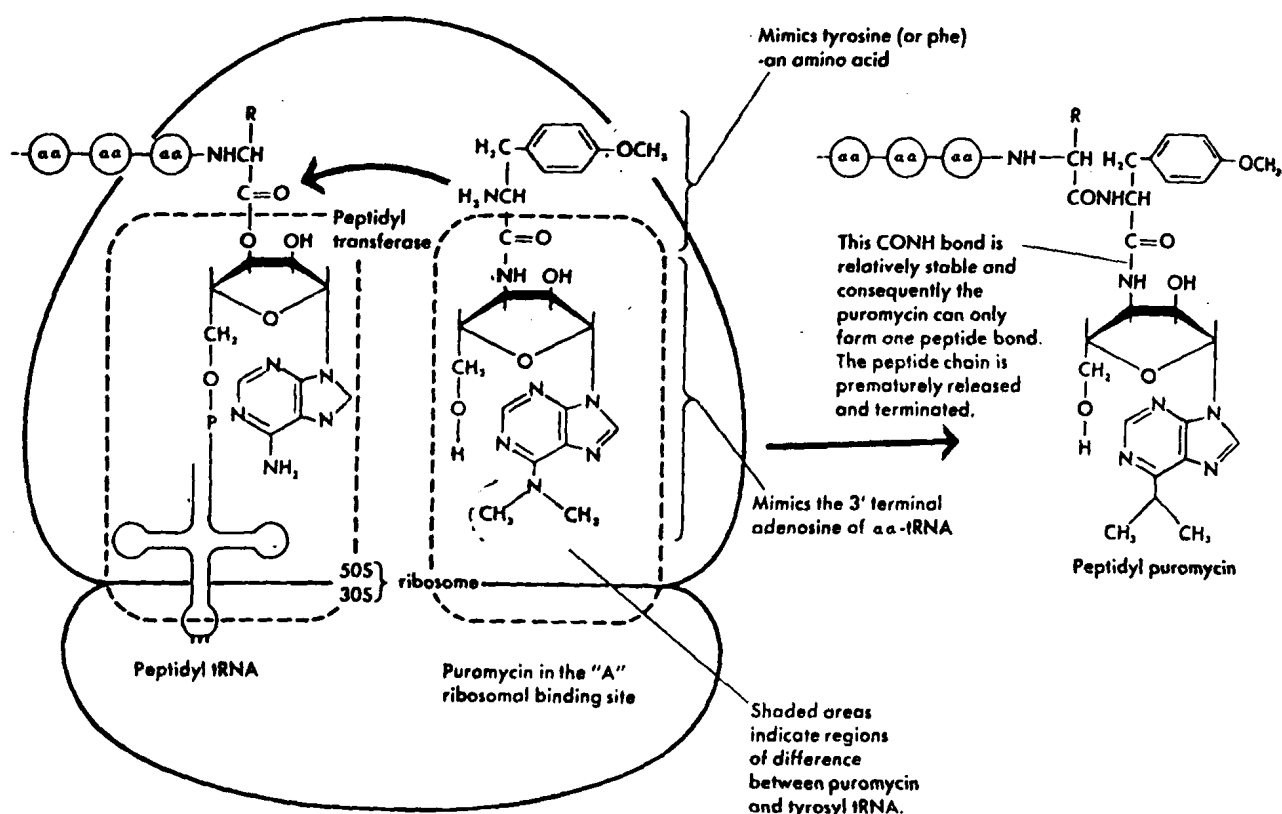
Ἡ δρᾷσι πολλῶν ἀντιβιοτικῶν ἔχει σχέση μέ διάφορες φάσεις τῆς πρωτεϊνικῆς συνθέσεως. Ἐτσι π.χ. ἡ πουρομυκίνη εἶναι ἕνα ἀντιβιοτικό πού μοιάζει πολύ μέ τό ἄκρο ἑνός t-RNA καί μπορεῖ νά πάρει τήν θέση του πάνω στό ριβοσώμα-



τιο στήν θέση Α. Τότε γίνεται ένωση τῆς πουρομυκίνης μέ τήν ἄλυσο πού βρίσκεται στή θέση Ρ μέ ἕνα πεπτιδικό δεσμό ἡ ἄλυσος μεταφέρεται στήν θέση Α καί ἐπειδὴ ἡ πουρομυκίνη δέ συνδέεται ἰσχυρά σ' αὐτήν τήν θέση, ἡ ἄλυσος ἐλευθερώνεται καί φεύγει ἀπό τό ριβοσωμάτιο. Ἔτσι ἡ πουρομυκίνη σταματᾷ τήν πρωτεϊνική σύνθεση προκαλώντας πρόωρο σταμάτημα τῶν πολυπεπτιδικῶν ἀλύσεων, εἰκόνα 167.

εἰκόνα 167

Premature peptide chain termination by puromycin.



Ὅρισμένα ἄλλα ἀντιβιοτικά δροῦν σέ ἄλλα στάδια. Τό φουσιδικόν ὀξύ ἀμποδίζει τήν λειτουργία τοῦ παράγοντος G (τρανσλοκάση), ἡ σπαρσομυκίνη ἀαστέλει τήν πεπτιδυλοτρανσφεράση, τό ἴδιο καί ἡ λινομυκίνη ἐνώνονται δέ στίς 50S ὑπομονάδες, ἡ στρεπτομυκίνη εἶναι ἀναστολεύς τῆς ἐνάρξεως καί ἐπιδρᾷ πάνω στήν ὑπομονάδα 30S.



ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ

Παρ'όλο πού από τό 1960 είχαμε γενικές γνώσεις πώς τό RNA χρησιμοποιείται στήν πρωτεϊνική σύνθεση, έθεωρείτο ότι θά ήταν πολύ δύσκολο νά αποκρυπτογραφήσουμε τόν γενετικό κώδικα.

Ένομιζετο ότι γι'αυτό θά χρειαζότανε νά μάθουμε συγχρό- νως τήν πρωτοδιάταξη μιᾶς ὀρισμένης πρωτεΐνης καί τοῦ ἀντιστοιχοῦ γόνου τοῦ DNA ἢ τοῦ m-RNA.

Καί ἐνῶ ἡ δυνατότης τῆς πρωτοδιάταξης μιᾶς πρωτεΐνης, παρ'ὅτι πολύ δύσκολη χημική ἐργασία ἦτο δυνατή, ἐκείνη τήν ἐποχή δέν ὑπῆρχαν ἀντίστοιχες μέθοδοι γιά τήν μελέ- τη τῆς πρωτοδιατάξεως ἐνός νουκλεϊνικοῦ ὁξέως.

Εὐτυχῶς ἡ δυσκολία αὕτη παρεκάμφθει μέ ἄλλον τρόπο καί καταφέραμε νά αποκρυπτογραφήσουμε τόν γενετικό κώδικα μέ ἀπλές μεθόδους. Ἔτσι τό 1961 μόνον ἓνα χρόνο μετά ἀπό τήν ἀνακάλυψη τοῦ m-RNA ἡ χρησιμοποίηση τεχνητῶν m-RNA κατάφερε νά λύση τό πρόβλημα τοῦ γενετικοῦ κώδικα καί αὐ- τό ἄρχισε μέ τήν ἀδιάσηστο ἀπόδειξη τοῦ πρώτου κωδικονίου πού ἀνευρέθει καί καθορίζει τό ἀμινοξύ φαινυλαλανίνη.

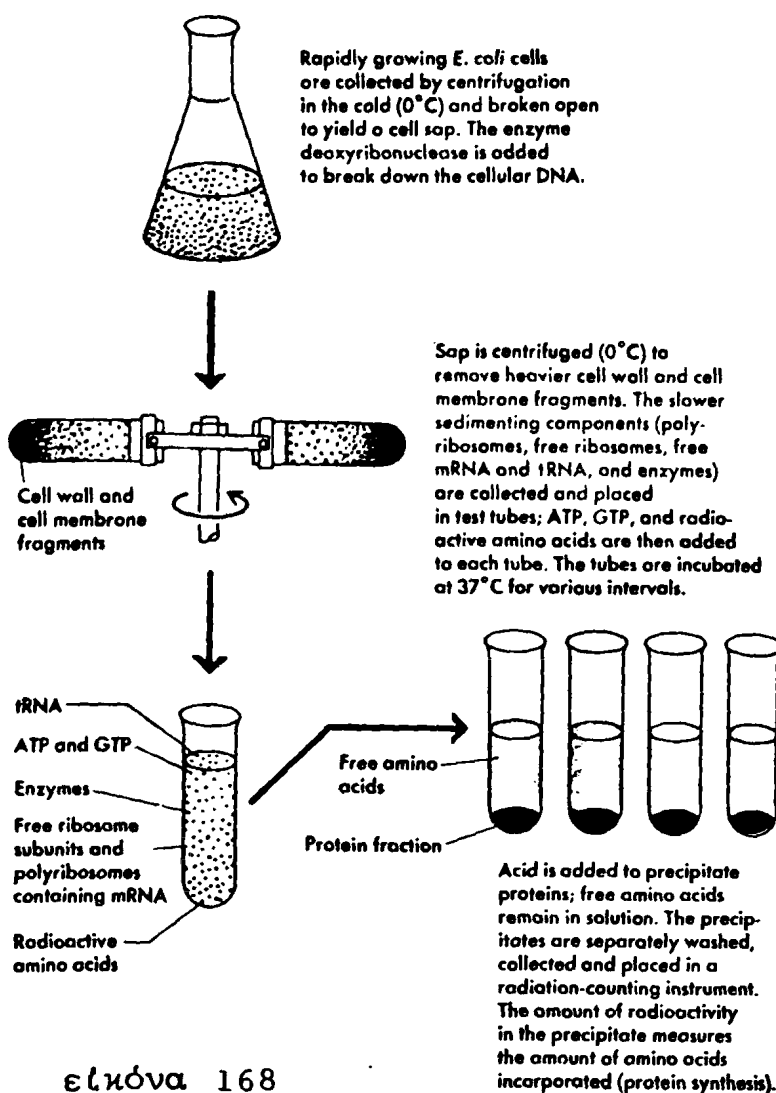
Γιά νά δοῦμε πώς ἐγίνε αὕτη ἡ ἀνακάλυψη θά πρέπει νά μι- λήσουμε λίγο γιά τήν πρωτεϊνική σύνθεση *in vitro* καί γιά πιά ἦταν τά ἀρχικά πειράματα πάνω σ'αὐτήν.

1. - Ἡ προσθήκη m-RNA ἐνεργοποιεῖ τήν *in vitro* πρωτεΐνοσύνθεση

Ἡ ἀνάγκη ὑπάρξεως τῶν τριῶν RNA, t-RNA, r-RNA καί m-RNA γιά τήν πρωτεϊνική σύνθεση ἀπεδείχθει μέ πειράματα πρωτεΐ- νοσυνθέσεως *in vitro* χρησιμοποιώντας κυτταρικά στοιχεῖα ἀπό κύτταρα πού ἦσαν ἐνεργά στήν σύνθεση πρωτεϊνῶν.



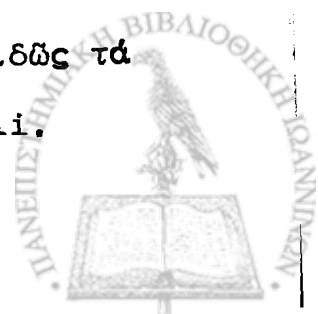
Τά κύτταρα σπάζονται προσεκτικά ώστε τα συστατικά τους να μὴν καταστραφούν καί διάφορα τμήματα τοῦ κυττάρου χρησιμοποιούνται γιά νά μελετηθεῖ ἡ δρᾶσις τους στήν σύνθεση πρωτεϊνών. Ἐπειδή ἡ πρωτεΐνοσύνθεση *in vitro* εἶναι ἀκόμη καί σήμερα ἓνα σύστημα ὄχι πολύ ἀποδοτικό δηλαδή ἡ ποσότης τῶν συνθετομένων πρωτεϊνών εἶναι πολύ μικρή, χρησιμοποιούνται ραδιενεργά ἀμινοξέα γιά νά ἀνηχνευθοῦν πολύ μικρές ποσότητες ἀπό νεοσυνθετόμενες *in vitro* πρωτεΐνες εἰκόνα 168 .



εἰκόνα 168

Experimental details of *in vitro* studies of protein synthesis.

Ἡ εἰκόνα 168 δείχνει πῶς παρασκευάζονται χονδροειδῶς τά ἐνεργά στοιχεῖα γιά τήν πρωτεΐνοσύνθεση, ἀπό *E. coli*.

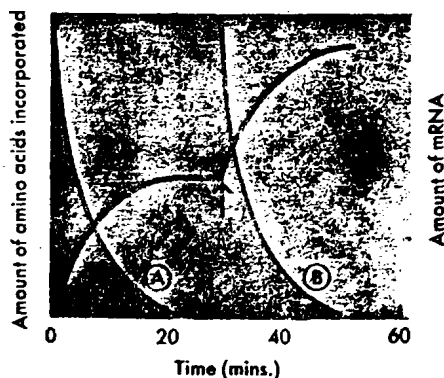


Εάν στα πολυριβωσώματα προστεθούν ραδιενεργά αμινοξέα και κατά διάφορα χρονικά διαστήματα παραλαμβάνουμε δείγματα από το μίγμα αυτό της πρωτεϊνοσυνθέσεως και μετρήσουμε την ραδιενέργεια πέρνουμε μία καμπύλη πρωτεϊνοσυνθέσεως μέσα στον χρόνο.

Παρατηρούμε ότι η ραδιενέργεια αυξάνει για ένα χρονικό διάστημα και κατόπι παραμένει σταθερά και αυτό δείχνει ότι καινούργια ραδιενεργά αμινοξέα παύουν να εισέρχονται σε συνθετόμενες πρωτεΐνες. Το σταμάτημα αυτό της πρωτεϊνοσυνθέσεως οφείλεται σε καταστροφή του ένδογενούς m-RNA γι' αυτό αν προσθέσουμε στο μίγμα από έξω παρασκευασμένο m-RNA ή πρωτεϊνοσύνθεση ξαναρχίζει μέχρι που το καινούργιο αυτό m-RNA να καταστραφεί. Το σύστημα αυτό λοιπόν κατά το στάδιο της καταστροφής του ένδογενούς m-RNA ύστερα από ορισμένο χρόνο είναι πολύ κατάλληλο για την μελέτη της δράσεως έξωγενούς m-RNA, είκόνα 169.

είκόνα 169

Ⓐ indicates the breakdown of endogenous mRNA, while Ⓑ shows the breakdown of exogenously added mRNA whose time of addition is indicated by the arrow.



Σ' αυτό το σημείο η χρησιμοποίηση RNA από ορισμένους ιούς βοήθησε πολύ τις μελέτες πρωτεϊνοσυνθέσεως in vitro.

Από τούς ιούς πράγματι μπορούμε να πάρουμε σε αρκετό ποσό



είδικά m-RNA πού θά παράγουν τίς πρωτεΐνες τοῦ ἰοῦ. Τά RNA αὐτά χρησιμοποιήθηκαν σέ in vitro συστήματα καί ἀπεδείχθει ὅτι πράγματι παράγονται in vitro ἱηκές πρωτεΐνες. Αὐτό ἀποτελεῖ ἀπομίμηση τῶν ὁσων γίνονται καί in vivo.

Π.χ. οἱ ἰοί RNA παράγουν ἓνα ἔνζυμο τήν RNA ρεπλικάση ἡ ὁποία τοὺς χρησιμεύει γιά τόν ἀναδιπλασιασμό τοῦ γενετικοῦ τοῦς ὑλικοῦ, ἀλλά γιά νά παραχθεῖ αὐτή ἡ πρωτεΐνη θά πρέπει τό RNA τοῦ ἰοῦ νά ἔνωθεῖ πρῶτα μέ τά ριβοσώματα τοῦ κυττάρου ξενιστοῦ καί νά τό χρησιμοποιήσῃ γιά νά παράγει τίς ἱηκές πρωτεΐνες.

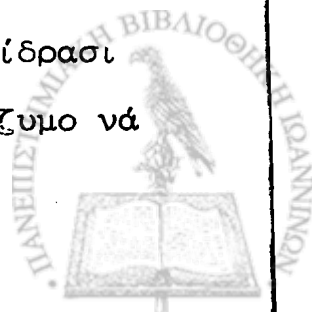
Πρῶτα χρησιμοποιήθηκε τό RNA τοῦ φάγου F_2 in vitro σάν m-RNA στά ριβοσώματα τῆς E.coli καί ἀπεδείχθει ὅτι πράγματι παράγεται μία πρωτεΐνη τοῦ ἰοῦ πού ἔχει ἀκριβῶς τήν ἴδια πρωτοδιάταξη σέ ἀμινοξέα μέ τήν πρωτεΐνη πού παράγεται in vivo.

Ἄρα ὁ γενετικός κώδικας λειτουργεῖ κανονικά στά in vitro συστήματα.

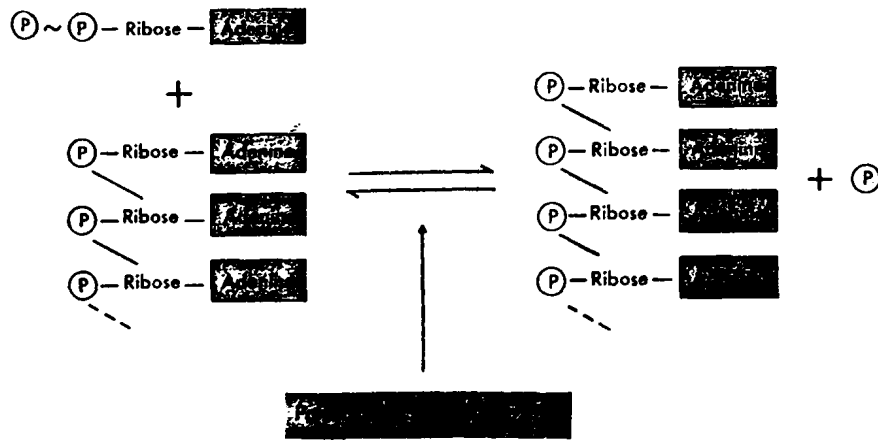
2. - Χορησιμοποίηση συνθετικῶν m-RNA γιά τήν μελέτη τοῦ γενετικοῦ κώδικα

Γιά νά λύσουνε τά προβλήματα τοῦ γενετικοῦ κώδικα οἱ ἐρευνηταί ἐσκεύφθησαν νά χρησιμοποιήσουν τό in vitro σύστημα τῆς πρωτεΐνοσυνθέσεως στό ὁποῖο νά χορηγήσουν γνωστά στήν σύνθεσή τους συνθετικά m-RNA.

Ἐπάρχει ἓνα ἔνζυμο πού λέγεται πολυνουκλεοτιδική φωσφορυλάση τό ἔνζυμο αὐτό βρίσκεται σέ ὅλα τά βακτηρίδια καί ὡς ἐπὶ τό πλεῖστον χρησιμοποιεῖται καταβολικά διασπῶντας RNA σέ μονονουκλεοτίδια. Κάτω ἀπό εἰδικές ὁμως συνθῆκες δηλαδή, in vitro, παρουσία περισσεύας μονοκλεοτιδίων ἡ ἀντίδρασι μπορεῖ νά γίνει πρὸς τήν ἄλλη κατεύθυνση καί τό ἔνζυμο νά



κάνει σύνθεση, εικόνα 170.



εικόνα 170

Synthesis (degradation) of RNA molecules
using the enzyme polynucleotide phos-
phorylase.

Έτσι είναι δυνατό να φτιάξουμε *in vitro* RNA χρησιμοποιώ-
ντας τό ένζυμο καί τά διάφορα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια.

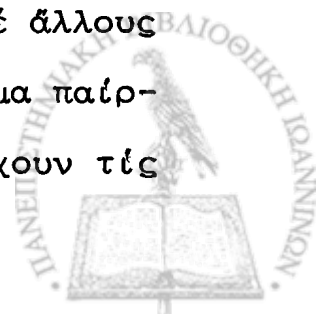
Ή σύσταση τοῦ RNA αὐτοῦ θά εἶναι βέβαια τυχαία ἀλλά θά
ἐξαρτᾶται ἀπό τά νουκλεοτίδια πού θά ὑπάρχουν στό μείγμα.

Έτσι ἀν ὑπάρχει μόνο ἀδενοσίνη θά γίνη σύνθεση poly A
κ.λ.π. Τά συνθετικά αὐτά RNA μποροῦν νά χρησιμοποιηθοῦν
ἀπό τά ριβοσωμάτια σάν m-RNA καί νά προκαλέσουν σύνθεση
πρωτεϊνῶν. Τό πρῶτο συνθετικό m-RNA πού χρησιμοποιήθηκε
ἔτσι ἀπό τούς Nirenberg καί Matthaei ὑπῆρξε τό πολύ - U.

Όταν ἔβαλαν τό πολύ - U σέ ἕνα σύστημα *in vitro* πρωτεϊνο-
συνθέσεως εἶδαν ὅτι ἦταν ἐνεργό γιά σύνθεση πρωτεϊνῶν καί
βρῆκαν νά σχηματίζεται ἕνα πολυπεπτίδιο πού ἦταν φτιαγμέ-
νο ἀπό ἕνα μόνο ἀμινοξύ τήν φαινυλαλανίνη. Σχηματίσθηκε
δηλαδή πολυφαινυλαλανίνη.

Τό πρῶτο κωδικόνιο τοῦ γενετικοῦ κώδικα ἔτσι βρέθηκε νά
εἶναι UUU πού σημαίνει φαινυλαλανίνη. Μέ τόν ἴδιο τρόπο
τό CCC βρέθηκε νά εἶναι προλίνη καί τό AAA νά εἶναι λυσίνη.

Ή χρησιμοποίηση τῆς μεθόδου αὐτῆς ἐπεξετάθει καί σέ ἄλλους
συνδιασμούς βάζοντας π.χ. δύο νουκλεοτίδια στό μείγμα παίρ-
νει κανεῖς μιά σειρά ἀπό πολυνουκλεοτίδια πού περιέχουν τίς



δύο βάσεις.

Π.χ. A + C δίδει: CCC, CCA, CAC, ACC, CAA, ACA, AAC και AAA
οπότε παράγεται μία πρωτεΐνη πού περιέχει ορισμένα αμινο-
ξέα. Μέ αυτόν τόν τρόπο όμως δέν μπορεί κανείς νά βρεΐ
τό ακριβές κωδικόνιο γιά τό καθένα από αυτά.

3.-Χρησιμοποίηση τής συνδέσεως τών t-RNA γιά τήν άποκρυπτογράφιση.

Τό 1964 ή ομάδα τοῦ Nirenberg ἀνεκάλυψε μία ἄλλη μέθοδο
γιά τήν μελέτη τοῦ κώδικα. Εὐρέθη ὅτι μία τριπλέτα δέν
μπορεΐ βέβαια νά προκαλέσῃ τήν σύνθεση μιᾶς πρωτεΐνης ἀλ-
λά εἶναι ἀρκετή γιά νά συνδέσῃ πάνω στό ριβόσωμα τό ἀνά-
λογο ἀμινοακυλο-t-RNA.

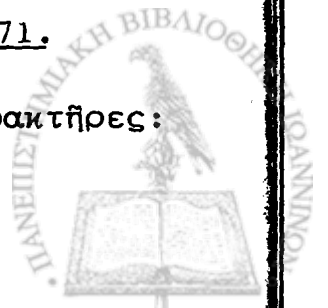
Ἔτσι ἂν προστεθεΐ μία εἰδική τριπλέτα σέ ἕνα μεΐγμα ριβο-
σωματίων καί ἀμινοακυλο-t-RNA πού φέρουν ραδιενεργά ἀμι-
νοξέα μόνο τό ἀμινοακυλο - t-RNA πού θά ἀναλογεΐ στό προ-
στιθέμενο κωδικόνιο θά ἐνωθεΐ πάνω στό ριβοσωμάτιο. Μετά
φιλτράρεται τό μεΐγμα καί τά ριβοσωμάτια παραμένουν στόν
λθμό ὁπότε ἀπομονώνεται τό ἀμινοξύ πού κατεκρατήθει καί
ἀναγνωρίζεται.

Χρησιμοποιώντας αὐτή τήν μέθοδο τά περισσότερα κωδικόνια
βρέθηκαν.

Μέ ὅλες τίς μεθόδους αὐτές βρέθηκε ὅτι ὑπάρχουν 61 κωδι-
κόνια πού καθορίζουν ἀμινοξέα. Ὁ ὁλικός ἀριθμός τών κω-
δικονίων γιά τριπλέτες εἶναι 64 ($4^3 = 64$) τά τρία ὑπολοι-
πόμενα κωδικόνια εἶναι nonsense ὅπως λέμε κωδικόνια καί χρη-
σιμεύουν σάν σημεῖα λήξεως (UAA, UAG, UGA) εἰκόνα 171.

Ὁ γενετικός κώδικας ἔχει τούς τρεῖς ἀκολούθους χαρακτηρισ-

1ον. Εἶναι γενικευμένος



είκονα 171
The Genetic Code

First Position (5' End)	Second Position				Third Position (3' End)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Term*	Term	A
	Leu	Ser	Term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	GluN	Arg	A
	Leu	Pro	GluN	Arg	G
A	Ileu	Thr	AspN	Ser	U
	Ileu	Thr	AspN	Ser	C
	Ileu	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

2ον. Είναι σταθερός

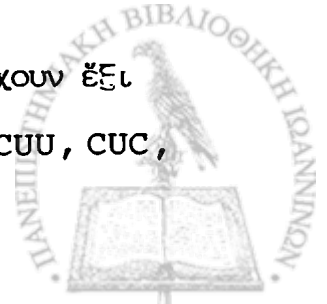
3ον. Είναι έκφυλισμένος

Λέγουμε ότι ο γενετικός κώδικας είναι γενικευμένος γιατί είναι ίδιος για όλους τους έμβιους οργανισμούς, έτσι εάν σέ ένα έκχύλισμα E.coli προστεθεί ένα μήνυμα από ένα ιό π.χ. τό m-RNA της μωσαϊκής του καπνού ή τό m-RNA της αίμοσφαιρίνης του ανθρώπου τά ριβοσωμάτια της E.coli θά κατασκευάσουν τίς πρωτεΐνες πού φέρουν αυτά τά μηνύματα. "Αρα τά μηνύματα είναι τά ίδια. Τά t-RNA είναι τά ίδια καί ένσωματώνουν τά σωστά άμινοξέα.

Ο γενετικός κώδικας είναι σταθερός γιατί έχει παραμείνει ο ίδιος διά μέσου της εξέλιξης.

Τέλος ο κώδικας είναι έκφυλισμένος γιατί υπάρχουν μόνον 20 άμινοξέα καί 61 κωδικόνια. "Αρα κάθε άμινοξύ άντιστοιχεί σέ περισσότερα του ενός κωδικόνια.

Ο βαθμός έκφυλίσεως δέν είναι ομοιόμορφος, έτσι ενώ υπάρχουν έξι διαφορετικά κωδικόνια για την λευκίνη δηλαδή UUA, UUG, CUU, CUC,



CUA, CUG, καθώς και για την αργινίνη και σερίνη, άλλα αμινοξέα διαθέτουν μόνον δύο κωδικόνια όπως τό γλουταμινικό όξύ ή τυροσίνη και ή ιστιδίνη και υπάρχει μόνο ένα για την μεθιονίνη τό AUG, καθώς και για την τρυπτοφάνη.

Ό έκφυλισμός τοῦ κώδικος ὑπῆρξε ὅπωςδήποτε ένας παράγων ἐπιβιώσεως. Εάν ὑπῆρχε ένα κωδικόνιο για κάθε αμινοξύ 20 μόνον κωδικονια από τά 64 θά χρησιμοποιοῦντο, και οἱ περισσότερες σημειακές μεταλλαγές θά προκαλούσαν τριπλέτες λήξεως πού δέν κωδικοποιοῦν για κανένα αμινοξύ. Αντίθετα στόν υπάρχοντα κώδικα οἱ σημειακές μεταλλαγές δημιουργοῦν είτε μία τριπλέτα πού κωδικοποιεῖ για ένα άλλο αμινοξύ ή μία τριπλέτα πού κωδικοποιεῖ για τό ίδιο αμινοξύ.

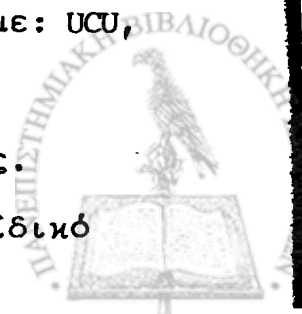
Στήν πρώτη περίπτωση ή πρωτεΐνη συχνά ἐξακολουθῇ νά εἶναι λειτουργική και μπορεῖ μάλιστα νά ἀντιπροσωπεύει και μία πρόοδο ὡς πρός τόν πρωταρχικό (ἄγριο τύπο wild type). Ό έκφυλισμένος λοιπόν κώδικας ἐπιτρέπει μία προοδευτική καλλιτέρευση τοῦ γονιδιόματος και τῶν παραγῶν του, ἀφοῦ οἱ μεταλλάξεις μποροῦν νά προκαλέσουν ἀντικαταστάσεις αμινοξέων μεταξύ τῶν ὁποῖων οἱ πιό εὐνοϊκές για τήν ἐπιβίωση θά ἐπιλεγχοῦν.

4. - Ἡ θεωρία τῆς ἀσταθείας τοῦ ἀντικωδικονίου (Wobble theory.)

Παρατηρήθη ὅτι μόνον τά δύο πρῶτα νουκλεοτίδια τοῦ κωδικονίου εἶναι σημαντικά για τόν καθορισμό τοῦ αμινοξέως ἐνῶ τό τρίτο μπορεῖ νά ἀλλάξει. Π.χ. UUU σημαίνει φαινυλαλανίνη ὅπως ἐπίσης και UUC, στήν σερίνη ὅμως ἔχουμε: UCU, UCC, UCA, UCG ἀλλά ἐπίσης και AGU και AGC.

Ό κανόνας αὐτός ἐπομένως μόνον μερικά εἶναι σωστός.

Στήν ἀρχή ἐνομίσθαι ὅτι θά πρέπει νά υπάρχει ένα εἰδικό



άντικωδικόνιο για κάθε κωδικόνιο δηλαδή να υπάρχουν και 61 διαφορετικά t-RNA. Απεδείχθει όμως πως ένα καθαρά απομονωμένο t-RNA π.χ. το t-RNA της αλανίνης μπορεί να αναγνωρίζει περισσότερα διαφορετικά κωδικόνια.

Προβλήματα ανέκυψαν επίσης όταν βρέθηκε ότι πολλές φορές μία από τις βάσεις του αντικωδικονίου δεν ήταν φυσιολογική βάση αλλά ασυνήθης βάση από αυτές που ανευρέθησαν στα t-RNA.

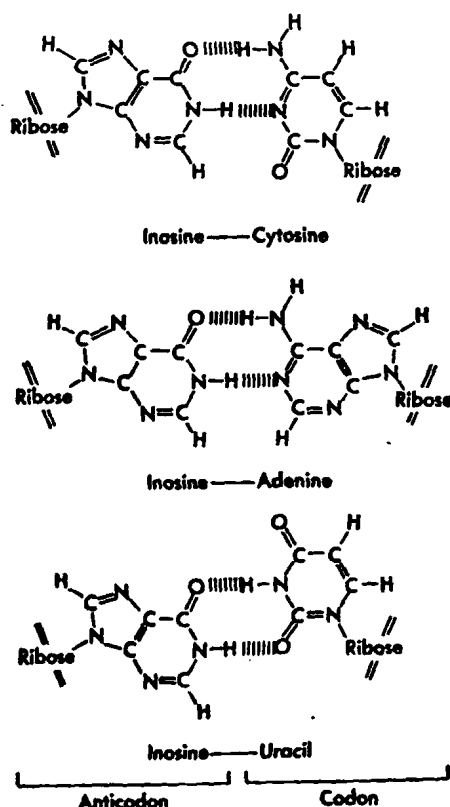
Για να εξηγήσουμε αυτά τα φαινόμενα η θεωρία της άσταθειας (Wobble) προτάθηκε και λέει ότι η βάση στο άκρο 5' του αντικωδικονίου δεν είναι σταθερή στον χώρο όπως οι άλλες δύο βάσεις και της επιτρέπεται να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με περισσότερες μη ανάλογες βάσεις στο 3' άκρο του κωδικονίου.

Όλοι οι συνδιασμοί δεν είναι βέβαια δυνατοί και οι δυνατοί συνδιασμοί δίνονται στον κατωτέρω πίνακα.

Άντικωδικόνιο	κωδικόνιο
G	U ή C
C	G
A	U
U	A ή G
I	A U ή C

Έτσι το U στην θέση άσταθειας μπορεί να ενωθεί με άδενίνη ή γουανίνη και η ινোসίνη μπορεί να ενωθεί με U, C και A. Αυτός ο κανόνας δεν επιτρέπει σε ένα t-RNA να αναγνωρίσει 4 διαφορετικά κωδικόνια και τρία κωδικόνια μπορεί να αναγνωρισθούν μόνον όταν η ινোসίνη περιέχεται στην τρίτη θέση σε ένα t-RNA, εικόνα 172, 173.





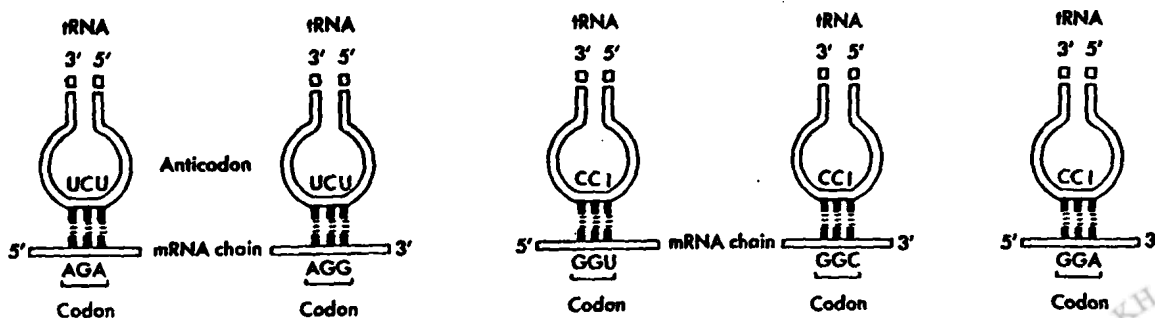
"Wobble" enables this base to form hydrogen bonds with bases other than those in standard base pairs.

(e)

Εικόνα 172

Examples of wobble

Ἡ ἀστάθεια συνδέσεως τῆς τρίτης βάσεως ἔχει ἐπίδραση στὴν ἰσχυρότητα τῆς συνδέσεως. Ἐτσι ὅταν τὸ κωδικόνιο ἐνώνεται μέ ἓνα t-RNA ὄχι πολύ ἰσχυρά λόγω ἀσταθείας τῆς συνδέσεως τῆς τρίτης 5'βάσεως τότε τὸ ἀνάλογο ἀμινοξύ θά



(b) U in the third anticodon position can pair with A or G.

(c) I in the third position can pair with U, C, or A.

Εικόνα 173

μπαίνει μέσα σέ μία πρωτεΐνη μέ μικρότερη ταχύτητα καί



ή ταχύτης συνθέσεως της πρωτεΐνης μπορεί έτσι να ρυθμίζεται εν μέρη από τα πιά κωδικόνια χρησιμοποιούνται από ένα m-RNA για να σχηματισθεί μία πρωτεΐνη.

5. - Κωδικόνια έναρξεως και λήψεως.

Έχουμε ήδη αναφέρει ότι η έναρξις της πρωτεϊνικής συνθέσεως γίνεται με t-RNA μεθειονίνη και ότι το κωδικόνιο έναρξεως είναι το AUG τελευταίως ευρέθει και ένα άλλο κωδικόνιο για έναρξη το GUG ή ύπαρξις αυτού του κωδικονίου δεν είναι ακόμη βέβαια.

Για την λήξη υπάρχουν τρία κωδικόνια το UAA, το UAG και το UGA, αυτά δεν αντιστοιχοῦν σέ κανένα γνωστό αμινοξύ.

Όπως είπαμε για τα τρία αυτά κωδικόνια δεν υπάρχουν t-RNA αλλά αναγνωρίζονται από ειδικές πρωτεΐνες λήξεως. Δύο τέτοιες πρωτεΐνες μέχρι τώρα έχουν απομονωθεί.

Πάνω στο m-RNA συνήθως υπάρχει μόνον ένα κωδικόνιο λήξεως. Πολλές φορές όμως υπάρχουν δύο για λόγους ασφαλείας στην λήξη μιᾶς πρωτεΐνης.





Τυπώθηκε στο Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο
με δαπάνη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ
Τυπογραφείο

Διανέμεται Δωρεάν στους φοιτητές.





ΕΚΤΥΠΩΣΗ
Τυπογραφείο
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

