

***IN VITRO* ΚΑΙ *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΤΩΝ "ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ" ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ**

ΤΟΥ

ΜΙΧΑΗΛ Ν. ΖΟΥΜΑΛΑΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1998

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ. Μάρτιν Τάμπλερ

SUPERVISOR: Dr. Martin Tabler

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης των πειραμάτων, της συγγραφής και της παρουσίασης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, θα ήθελα να εκφράσω την βαθειά ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, **Δρ. Martin Tabler**, για την όλη υποστήριξη, την καθοδήγηση, την εποικοδομητική κριτική του και την υπομονή του, τόσο κατά την διάρκεια, όσο και μετά την πραγματοποίησή του διδακτορικού μου.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την **Δρ. Μίνα Τσαγρή**, για την ευγένεια και την καλοσύνη της, να αναλάβει το δύσκολο έργο της επίβλεψης της συγγραφής, κριτικής μελέτης και διόρθωσης αυτής της διατριβής, αλλά και να είναι μέλος της επταμελούς επιτροπής αξιολόγησης αυτής.

Ακόμα, οφείλω να ευχαριστήσω: **α)** τον καθηγητή **Δρ. Νικόλα Πανόπουλο**, μέλος της τριμελούς επιτροπής παρακολούθησης της προόδου των πειραμάτων, που αναφέρονται στην διατριβή μου και μέλος της επταμελούς επιτροπής αξιολόγησής της, ο οποίος με δέχθηκε στο εργαστήριό του και με στήριξε κατά την διάρκεια των σπουδών μου, **β)** τον καθηγητή **Δρ. Γιώργο Θηραίο**, μέλος της τριμελούς επιτροπής παρακολούθησης της προόδου των διδακτορικού και Διευθυντή του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, στα εργαστήρια του οποίου πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα και στεγαζόταν στις εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο Ηράκλειο και **γ)** τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής αξιολόγησης του διδακτορικού, την καθηγήτρια **Δρ. Καλλιόπη Ρουμπελάκη-Αγγελάκη**, και τους καθηγητές **Δρ. Νικόλα Ανάγνου**, **Δρ. Μιχάλη Κοκκινίδη**, **Δρ. Βασίλη Μπουριώτη** και **Δρ. Σήφη Παπαματθαϊάκη**, για την προσεκτική διόρθωση των κειμένων.

Τέλος, ευχαριστώ τους συνεργάτες του εργαστηρίου που εργάστηκα και ιδιαίτερα την **Σεργία Τζωρτζακάκη** για την πολύτιμη και συνεχή βοήθειά της, σε όλη την διάρκεια πραγματοποίησης του διδακτορικού μου, αλλά και τους συμμαθητές και φίλους μου, για τις αξιόλογες συζητήσεις και τις ευχάριστες στιγμές που ζήσαμε μαζί, έτσι ώστε η περίοδος αυτή να μείνει χαραγμένη στην μνήμη μου, ως μια αξέχαστη και ευχάριστη νοσταλγία.

Ως ελάχιστο φόρο τιμής και ευχαριστίας, αφιερώνω την παρούσα διατριβή,
στους πολυαγαπημένους μου γονείς μου, **Τριανταφυλλιά και Νίκο**,
στην αξιολάτρευτη σύζυγό μου, **Αντιγόνη**,
και την μονάκριβη κόρη μου, **Μαρία – Ελένη**,
που με την αγάπη τους και την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια,
μου έδωσαν το κουράγιο για να την ολοκληρώσω,
πραγματοποιώντας έτσι ένα όνειρο της ζωής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
<u>ΤΙΤΛΟΣ</u>	1
<u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</u>	2
<u>ΑΦΙΕΡΩΣΗ</u>	3
<u>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</u>	4
<u>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ</u>	12
<u>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</u>	13
<u>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ</u>	13
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	14
<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	17
- ΤΟ RNA ΩΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΤΑΛΥΤΗΣ	17
1. ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΟΥ RNA	18
1. Α) ΑΥΤΟΩΡΙΜΑΖΟΜΕΝΑ INTRONIA ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ I	19
1. Β) ΑΥΤΟΩΡΙΜΑΖΟΜΕΝΑ INTRONIA ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ II	21
2. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΑ RNA ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΣΥΜΠΛΟΚΑ RNA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	23
2. Α) ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ Ρ (RNase P)	23

2. Β) ΣΩΜΑΤΙΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ (SPLICOSOME) ΓΙΑ ΤΑ ΙΝΤΡΟΝΙΑ ΤΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΠΡΟ-mRNA	23
2. Γ) ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΟ RNA (RIBOSOMAL RNA, rRNA)	25
3. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΑ RNA ΜΕ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΔΟΜΙΚΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ	26
3. Α) ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ ΔΕΛΤΑ (HDV)	29
3. Β) “ΦΟΥΡΚΕΤΟΕΙΔΗ” ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΑ (HAIRPIN RIBOZYMES)	29
3. Γ) “ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΑ” (HAMMERHEAD RIBOZYMES)	32
- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ: Α) ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ-RNA ΚΑΙ Β) ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟ-RNA	33
- ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ	37
- ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΜΕ:	39
Α) ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΗΣ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΗΣ ΔΟΜΗΣ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ	39
Β) ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΣΤΗ ΘΕΣΗ-ΣΤΟΧΟ	41
- ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ	42
- ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ	44

ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ	47
- ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ <i>IN VIVO</i>	47
1) <i>IN VIVO</i> ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΠΟΥ ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥΣ ΗΤΑΝ ΤΟ RNA ΤΟΥ HIV-1	49
2) <i>IN VIVO</i> ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΠΟΥ ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥΣ ΗΤΑΝ ΤΟ RNA ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ Η ΑΛΛΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	55
- ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΥ	
<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	57
- ΣΤΕΛΕΧΗ	57
A. ΣΤΕΛΕΧΗ <i>E. coli</i>	57
B. ΣΤΕΛΕΧΗ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
- ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	57
A. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	57
B. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
- ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ	58
A. ΦΟΡΕΙΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	58

B. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ cDNA ΤΟΥ ΙΟΥ SENDAI	60
Γ. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ cDNA ΤΟΥ HIV	62
Δ. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΕΙΔΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ	62
- ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (COMPETENT CELLS) ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>E. coli</i>	63
- ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>E. coli</i> ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA	64
- ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ <i>E. coli</i>	64
- ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ DNA	66
- ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΩΝ 5' ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΜΕ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ (ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ)	67
- ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ 5' ΑΚΡΟΥ DNA ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ	68
- ΣΥΝΕΝΩΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΜΕ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ ΛΙΓΑΣΗ (LIGATION)	68
- ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ DNA (DNA SEQUENCING)	69
- ΠΕΨΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ	70
	Σελίδα
- ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ	70

ΑΓΑΡΟΖΗΣ

- ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	70
- ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA ή RNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ, ΜΕ ή ΧΩΡΙΣ ΟΥΡΙΑ	71
- ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ	72
- ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΟΥ DNA ΜΕ ΝΟΥΚΛΕΑΣΗ S ₁ ή MUNG BEAN	74
- ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION)	75
- <i>IN VITRO</i> ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ RNA	76
- ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΙΚΛΩΝΟΥ RNA ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ	78
- <i>IN VITRO</i> ΔΟΚΙΜΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ	78
- ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ	79
- ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ	80
- ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ	80
- <i>IN VITRO</i> ΔΟΚΙΜΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΤΑΙ <i>IN VIVO</i>	81
	Σελίδα
- ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΩΝ RNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ – ΦΟΡΜΑΛΔΕΥΔΗΣ, ΑΝΑΛΥΣΗ NORTHERN	81

- ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ (NICK TRANSLATION)	82
- <i>IN VITRO</i> ΔΟΚΙΜΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗ	83
- DNA ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ	83
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	85
(Α) ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΤΕΛΩΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΕΛΙΚΩΝ I ΚΑΙ III ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ	85
1) ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΥΧΑΙΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΟΥΣ	86
2) ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΟΥ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ	94
3) ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ-RNA ΑΠΟ ΤΟ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟ (ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟ ΑΝΤΙΚΩΔΙΚΟ RNA)	99
(Β) ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ N ΚΑΙ X ΤΗΣ ΤΡΙΠΛΕΤΑΣ ΝUX, ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΕΙ ΤΗΝ ΘΕΣΗ – ΣΤΟΧΟ	107
1) ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ 12 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ RNA ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΩΝ 4 ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ	108
	Σελίδα
2) ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΟΥ	115

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ-RNA

(Γ) <i>IN VIVO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ RIBOENZYMΩΝ ΣΤΟΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	117
--	-----

1) ΓΙΑΤΙ ΕΠΙΛΕΧΘΗΚΕ Ο <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	117
---	-----

2) ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ RNA-ΣΤΟΧΟΥ ΓΙΑ ΤΑ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΑ RIBOENZYMA	118
---	-----

A) <i>IN VITRO</i> ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ RIBOENZYMOY	122
---	-----

B) <i>IN VIVO</i> ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ RIBOENZYMOY	124
--	-----

<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	134
------------------------	-----

(A) Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΑΠΟ ΤΑ ΑΝΤΙΚΩΔΙΚΑ ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ ΣΤΑ RIBOENZYMA	134
--	-----

(B) Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΤΕΛΩΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΕΛΙΚΩΝ I ΚΑΙ III ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ RIBOENZYMΩΝ	136
---	-----

1) Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΓΥΡΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΘΕΣΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ-RNA	136
--	-----

2) ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΖΕΥΓΑΡΙΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΥΠΟΣΤΡΩ- ΜΑΤΟΣ-RNA ΚΑΙ RIBOENZYMOY ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ	137
--	-----

Σελίδα

RIBOENZYMΩΝ

3) ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ (SPECIFICITY) ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ RIBOENZYMΩΝ	138
---	-----

(Γ) ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ Ν ΚΑΙ Χ ΤΗΣ ΤΡΙΠΛΕΤΑΣ ΝUX, ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΕΙ ΤΗΝ ΘΕΣΗ-ΣΤΟΧΟ ΤΟΥ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΟΥ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ ΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ-RNA	143
1) ΜΠΟΡΟΥΝ ΟΙ ΣΧΕΤΙΚΟΙ ΡΥΘΜΟΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΝΑ ΓΕΝΙΚΕΥΘΟΥΝ;	146
(Δ) ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΤΗΣ ΚΑΛΥΤΕΡΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΚΑΙ ΘΕΣΗΣ-ΣΤΟΧΟΥ ΣΤΟ RNA ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΔΙΑΣΠΑΣΤΕΙ	150
(Ε) <i>IN VIVO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΟΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	152
(ΣΤ) ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ	157
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	159
<u>ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ</u> (ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ)	175

Σελίδα**ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ**

Σχήμα 1	20
Σχήμα 2	22
Σχήμα 3	24
Σχήμα 4	27
Σχήμα 5	28
Σχήμα 6	30
Σχήμα 7	31
Σχήμα 8	35
Σχήμα 9	36
Σχήμα 10	38
Σχήμα 11	43
Σχήμα 12	61
Σχήμα 13	73
Σχήμα 14	90
Σχήμα 15	93
Σχήμα 16	96
Σχήμα 17	98
Σχήμα 18	104
Σχήμα 19	109
Σχήμα 20	110-111
Σχήμα 21	113-114
Σχήμα 22	120-121

Σελίδα**ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ**

Εικόνα 1	92
Εικόνα 2	101
Εικόνα 3	103
Εικόνα 4	116
Εικόνα 5	123
Εικόνα 6	125
Εικόνα 7	127
Εικόνα 8	131

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1	77
Πίνακας 2	84
Πίνακας 3	88-89
Πίνακας 4	95
Πίνακας 5	105
Πίνακας 6	129
Πίνακας 7	132
Πίνακας 8	133
Πίνακας 9	148

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ικανότητα ορισμένων μορίων RNA να δρουν καταλυτικά στις χημικές αντιδράσεις διάσπασης, είτε του εαυτού τους είτε άλλων αλυσίδων RNA, τους έχει προσδώσει την ονομασία: "RNA ένζυμα" ή "ριβοένζυμα". Συναντώνται σε διάφορα βιολογικά συστήματα και μια από τις κατηγορίες, στις οποίες κατατάσσονται, είναι και εκείνη των "σφυροκέφαλων" ριβοενζύμων (hammerhead ribozymes). Περιλαμβάνει μόρια RNA που κατέχουν: **α)** μια συγκεκριμένη ριβονουκλεοτιδική περιοχή, που σχηματίζει την έλικα II και στην οποία οφείλονται οι καταλυτικές ιδιότητες διάσπασης του υποστρώματος-RNA σε ορισμένη θέση και **β)** εκατέρωθεν αυτής εκτείνονται ριβονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που είναι συμπληρωματικές με αντίστοιχες του υπό διάσπαση υποστρώματος-RNA και σχηματίζουν τις έλικες I και III. Σ' αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα καταλυτικά αντικωδικά RNA, δηλαδή εκείνα που διασπών το υπόστρωμά τους σε συγκεκριμένη θέση, αλλά οι εκατέρωθεν της καταλυτικής περιοχής ριβονουκλεοτιδικοί βραχίονες πρόσδεσης στο υπόστρωμα, έχουν μεγάλο μήκος.

Ένας από τους σκοπούς αυτής της διατριβής, ήταν να μελετηθεί η επίδραση των διαφόρων ελλείψεων ή αλλαγών στις νουκλεοτιδικές περιοχές του ριβοενζύμου, που με τις αντίστοιχες του υποστρώματος-RNA σχηματίζουν τις έλικες I και III, στην συνολική ικανότητα διάσπασης (ενζυμική ενεργότητα) των καταλυτικών αντικωδικών RNA. Για τον λόγο αυτό κατασκευάστηκαν διάφορα καταλυτικά RNA, που είχαν ως στόχο τους διαφορετικές περιοχές του γενωμικού ή αντιγενωμικού RNA του ιού Sendai, ο οποίος προσβάλλει κύτταρα θηλαστικών οργανισμών. Όλα περιείχαν την ίδια καταλυτική περιοχή, βασισμένη σ' αυτή του τύπου των "σφυροκέφαλων" ριβοενζύμων, αλλά μερικά είχαν αφαιρέσεις ή μεταλλάξεις νουκλεοτιδίων, με αποτέλεσμα τον μη κανονικό σχηματισμό των ελίκων I και III. Για τον καθορισμό των ρυθμών της διαδικασίας διάσπασης για τα διαφορετικά ριβοένζυμα χρησιμοποιήθηκαν προσχηματισμένα σύμπλοκα μεταξύ υποστρώματος-RNA και ριβοενζύμου. Βρέθηκε ότι η νουκλεοτιδική αλληλουχία, που περιβάλλει τη θέση-στόχο είχε επίδραση στην αποτελεσματικότητα της αντίδρασης διάσπασης. Αφαιρέσεις ή μεταλλάξεις των νουκλεοτιδίων 2.1 ή 15.1 και 15.2, σύμφωνα με το σύστημα αρίθμησης των "σφυροκέφαλων" ριβοενζύμων των **Hertel κ.α. (1992)**, κατάστρεφαν την καταλυτική δράση. Αφαιρέσεις του νουκλεοτιδίου 2.2 ή πρόσθετων νουκλεοτιδίων στο ριβοένζυμο στην περιοχή σχηματισμού της έλικας I δεν κατέστρεφε, αλλά μόνο ελάττωνε την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης. Παρόμοια αποτελέσματα

παρατηρήθηκαν με αφαίρεση του νουκλεοτιδίου 15.3 στην περιοχή της έλικας III. Ταυτόχρονες αφαιρέσεις νουκλεοτιδίων από το ριβοένζυμο στις περιοχές σχηματισμού των ελίκων I και III, είχαν σαν αποτέλεσμα την διάσπαση του υποστρώματος-RNA σε διαφορετική θέση. Έτσι φαίνεται ότι, η περιοχή της έλικας I είναι "ελαστικότερη" στις τροποποιήσεις των νουκλεοτιδίων της, ενώ η φύση των νουκλεοτιδίων, που περιβάλλουν τη θέση-στόχο, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ταχύτητα της αντίδρασης διάσπασης και στην απόλυτη εξειδίκευση του ριβοενζύμου για ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα-RNA.

Δεύτερος σκοπός αυτής της διατριβής ήταν η πραγματοποίηση μιας συστηματικότερης μελέτης για το, πως η οποιαδήποτε αλληλουχία των ριβονουκλεοτιδίων, όπως αυτή προκύπτει από τον τύπο NUX, όπου N= A, C, G, U και X= A, C, U, στη θέση-στόχο του υποστρώματος-RNA, επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης διάσπασης, όταν οι αλληλουχίες ριβονουκλεοτιδίων στις έλικες I και III παραμένουν όμοιες. Για τον λόγο αυτό η τριπλέτα AUC στη θέση 374-376 του RNA του ιού HIV-1 (human immunodeficiency virus type-1) χρησιμοποιήθηκε ως μεταλλάξιμη μήτρα, ώστε να δημιουργηθούν όλοι οι 12 δυνατοί συνδυασμοί, που προκύπτουν από τον τύπο NUX. Έτσι, κατασκευάστηκαν τέσσερα ασύμμετρα "σφυροκέφαλα" ριβοένζυμα, που διέφεραν στο νουκλεοτίδιο συμπληρωματικό του N, από τα οποία το κάθε ένα ήταν ειδικό για τρεις από τις 12 διαφορετικές θέσεις-στόχους του υποστρώματος-RNA. Η υπόλοιπη νουκλεοτιδική αλληλουχία στις περιοχές σχηματισμού των ελίκων I και III, τόσο του υποστρώματος όσον και του ριβοενζύμου, παρέμεινε αναλλοίωτη. Όλοι οι 12 συνδυασμοί μπορούσαν να διασπαστούν από τα αντίστοιχα ριβοένζυμα, αλλά οι σταθερές της αντίδρασης διάσπασης, όπως αυτές μετρήθηκαν στους 37⁰C, παρουσίασαν σημαντική ποικιλότητα που εξαρτώνταν από τον τύπο της τριπλέτας νουκλεοτιδίων, που υπήρχαν στη θέση-στόχο. Την καλύτερη απόδοση είχαν οι NUC τριπλέτες, με καλύτερη και των 12, την AUC. Σύγκριση με προηγούμενες μελέτες δείχνει ότι, η νουκλεοτιδική αλληλουχία που περιβάλλει τη θέση-στόχο, παίζει σημαντικότατο ρόλο στην παρατηρούμενη ικανότητα διάσπασης του υποστρώματος από το αντίστοιχο ριβοένζυμο.

Τέλος, σε μια προσπάθεια να μελετηθεί η *in vivo* δράση των αντικωδικών RNA και των "σφυροκέφαλων" καταλυτικών αντικωδικών RNA, επιλέχθηκε το βιολογικό σύστημα του σακχαρομύκητα, *Saccharomyces cerevisiae*. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε μια ευαίσθητη πειραματική διαδικασία, όπου το αποτέλεσμα θα ήταν άμεσα ορατό και μετρήσιμο. Ο στόχος ήταν μέρος του *gen4* mRNA συνδεδεμένου πριν από το *lacZ* mRNA (*gen4/lacZ*) ή ολόκληρο το *gen4* mRNA. Το προϊόν του γονιδίου *gen4* αποτελεί

έναν καλά μελετημένο μεταγραφικό ενεργοποιητή της βιοσύνθεσης των αμινοξέων. Το ίδιο το γονίδιο ενεργοποιείται κάτω από συνθήκες πείνας. Αυτό επιτυγχάνεται με την παρουσία 3-αμινο-τριαζόλης (AT) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας των κυττάρων, οπότε αναστέλλεται η δράση του προϊόντος του γονιδίου *his3* και δημιουργείται έλλειψη της ιστιδίνης. Το αντικωδικό RNA και το ριβοένζυμο μεταγράφονταν από ένα πλασμίδιο-φορέα κλωνοποίησης και έκφρασης ειδικό για τον σακχαρομύκητα, ενώ και τα δύο είδη υποστρώματος-RNA εκφράζονταν είτε από ένα άλλο ζυμοειδικό πλασμίδιο είτε από το χρωμόσωμα του σακχαρομύκητα. Η αποτελεσματικότητα της δράσης του αντικωδικού RNA και του ριβοενζύμου πάνω στο στόχο τους υπολογίστηκε με μέτρηση της ενζυμικής δράσης της β-γαλακτοσιδάσης ή με έλεγχο ευαισθησίας σε 3-αμινο-τριαζόλη (AT). Μόνο σε μια από τις περιπτώσεις, όπου το *gcn4/lacZ* mRNA εκφράζονταν από πλασμίδιο, παρατηρήθηκε σε κύτταρα, που έκφραζαν το ριβοένζυμο, μείωση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης κατά 50% περίπου, που δεν συνοδεύονταν όμως με αντίστοιχη μείωση του mRNA. Ένα τέτοιο αποτέλεσμα δεν μπορεί να βοηθήσει στην εξαγωγή συγκεκριμένων συμπερασμάτων για την δράση και την εφαρμογή της τεχνολογίας των "σφυροκέφαλων" ριβοενζύμων, στον έλεγχο ή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης στον σακχαρομύκητα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΤΟ RNA ΩΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΤΑΛΥΤΗΣ

Κάθε χημική αντίδραση χαρακτηρίζεται από μια ταχύτητα με την οποία πραγματοποιείται. Οι περισσότερες από αυτές, που συμβαίνουν στα διάφορα βιολογικά συστήματα, επιταχύνουν αυτήν την ταχύτητά τους, έτσι ώστε να εξοικονομείται ενέργεια και πολύτιμος χρόνος. Ένας από τους τρόπους για να επιτευχθεί αυτό, είναι όταν οι αντιδράσεις καταλύονται από ένζυμα, τα οποία μπορούν να ορισθούν ως τα μακρομόρια εκείνα, που **α)** επιταχύνουν το ρυθμό μιας αντίδρασης δια μέσου ενός εναλλακτικού μονοπατιού, που απαιτεί χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης των συμμετεχόντων στην αντίδραση μορίων, **β)** είναι υψηλά εξειδικευμένα ως προς τα υποστρώματα πάνω στα οποία ενεργούν και τα προϊόντα τα οποία δημιουργούν και **γ)** δεν καταναλώνονται ή μετατρέπονται σε ανενεργή μορφή, έτσι ώστε ένα ενζυμικό μόριο μπορεί συνεχώς να επεξεργάζεται πολλά μόρια υποστρώματος (**Bender κ.α., 1984**). Η βιολογική κατάλυση για πολλά χρόνια θεωρούνταν ότι προάγονταν αποκλειστικά από πρωτεϊνικά ένζυμα. Την τελευταία δεκαετία όμως έγιναν διάφορες ανακαλύψεις που εδραίωσαν το RNA ως ένα βιολογικό καταλύτη. Αυτές ήταν, η ανακάλυψη ότι ορισμένα μόρια RNA μεσολαβούν ώστε να επιτευχθεί η δική τους διάσπαση με αποτέλεσμα την ωρίμανσή τους από ολιγομερή σε μονομερή, ενώ κάποια άλλα μόρια RNA μπορούσαν να προάγουν την διάσπαση και άλλων υποστρωμάτων-RNA, όπως στην περίπτωση του αυτοωριμαζόμενου πυρηνικού ριβοσωμικού RNA (ribosomal RNA, rRNA) ιντρονίου του πρωτοζώου *Tetrahymena thermophila* και των καταλυτικών ιδιοτήτων διάσπασης από το μόριο RNA της ριβονουκλεάσης-P (RNaseP). Το RNA λοιπόν είναι το πρώτο γνωστό μόριο με διπλό σημαντικό ρόλο, δηλαδή να μπορεί να αποθηκεύει γενετική πληροφορία, όπως επίσης και να προάγει χημικές αντιδράσεις. Μπορεί να αποκτά πολύπλοκες τριτοταγείς δομές, που πιστεύεται ότι είναι το κλειδί της καταλυτικής του ενεργότητας και παρά την ομοιότητά του με το DNA, η 2' υδροξυλομάδα της ριβόζης προσδίδει στο μόριο του RNA μια εξέχουσα ικανότητα να συμμετέχει σε καταλυτικές αντιδράσεις.

Καταλυτικά RNA έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα σε διάφορα βιολογικά συστήματα, ενώ σε εκείνες τις αλυσίδες του RNA, που κατέχουν ενζυμικές ιδιότητες έχει αποδοθεί η ονομασία "RNA ένζυμα" ή "ριβοένζυμα". Αυτά κατατάσσονται σε τρεις κύριες

κατηγορίες, στις οποίες το RNA συμμετέχει όχι μόνο σαν υπόστρωμα αλλά και σαν καταλύτης, όπως:

1) των αυτοωριμαζόμενων ιντρονίων, που περιλαμβάνει:

α) τα ιντρόνια της ομάδας I και

β) τα ιντρόνια της ομάδας II,

2) των καταλυτικών RNA που βρίσκονται σε σύμπλοκα RNA/πρωτεϊνών, που περιλαμβάνει:

α) την ριβονουκλεάση-P (RNaseP),

β) το σωματίο ωρίμανσης (spliceosome), που αποτελεί την χαρακτηριστική αναγκαία δομή για την πραγματοποίηση της διαδικασίας ωρίμανσης των πυρηνικών προ-mRNA,

γ) το ριβοσωμικό RNA (rRNA) που αποτελεί τμήμα του συμπλόκου rRNA και πρωτεϊνών στο ριβόσωμα και

3) τα RNA που, όπως και σε μερικές από τις προηγούμενες κατηγορίες, καταλύουν την αντίδραση διάσπασης σε συγκεκριμένη θέση, αλλά έχουν και κάποια ιδιαίτερα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα, έτσι ώστε να συνιστούν μια ξεχωριστή γενική κατηγορία. Περιλαμβάνει:

α) το ριβοένζυμο του ιού της ηπατίτιδας δέλτα (Hepatitis Delta Virus, HDV),

β) τα ριβοένζυμα τύπου "φουρκέτας" ή "φουρκετοειδή" (hairpin) ριβοένζυμα

γ) τα ριβοένζυμα "σφυροκέφαλου" τύπου ή "σφυροκέφαλα" (hammerhead) ριβοένζυμα.

1. ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΟΥ RNA

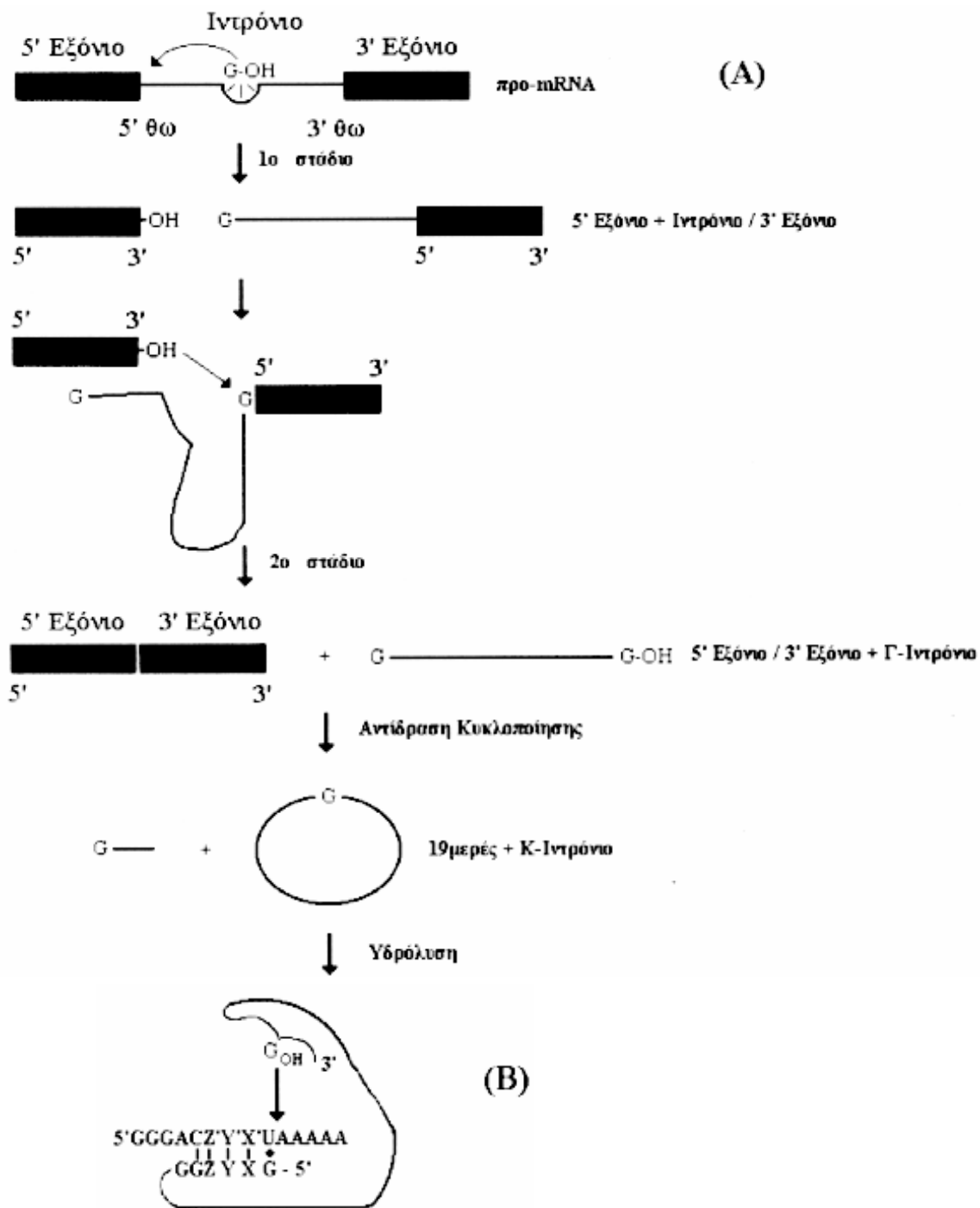
Τα γονίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών, που περιέχουν κωδικοποιημένη την πληροφορία για την σύνθεση μιας πρωτεΐνης, συχνά διακόπτονται από αλληλουχίες βάσεων που ονομάζονται, "παρεμβαλόμενες αλληλουχίες" (intervening sequences, IVS) ή "ιντρόνια" (introns). Αντίθετα, οι περιοχές του DNA που περιέχουν κωδικοποιημένη πληροφορία και διακόπτονται από ιντρόνια, ονομάζονται "εξόνια" (exons). Τα ένζυμα RNA πολυμεράσες, που πραγματοποιούν την μεταγραφή, δηλαδή την παραγωγή RNA από μήτρα DNA, μεταγράφουν και τα εξόνια και τα ιντρόνια σε ένα μεγάλο πρόδρομο μόριο RNA. Τα ιντρόνια στη συνέχεια απομακρύνονται μέσω μιας διαδικασίας που είναι γνωστή ως "ωρίμανση του RNA". Είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία απαιτεί την αναγνώριση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας στο μόριο του RNA, διάσπαση της πολυριβονουκλεοτιδικής

αλυσίδας και συγκόλλησή της σε μια διαφορετική θέση. Μια τέτοια διαδικασία όμως πρέπει να είναι και πολύ ακριβής. Οποιαδήποτε ανακρίβεια, για παράδειγμα στην ωρίμανση του προ-mRNA, θα κατάστρεφε το πλαίσιο διαβάσματος (reading frame) για την σύνθεση μιας πρωτεΐνης, ενώ ανακρίβεια στην ωρίμανση του προ-rRNA και προ-tRNA θα δημιουργούσε μη λειτουργικά ριβοσώματα και μόρια tRNA.

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί δύο κατηγορίες ιντρονίων, με βάση τα δομικά τους στοιχεία, καθώς και του μηχανισμού με τον οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση της ωρίμανσης του RNA. Αυτές είναι **α)** των αυτοωριμαζόμενων ιντρονίων της ομάδας I και **β)** των αυτοωριμαζόμενων ιντρονίων της ομάδας II. Τα βασικά τους χαρακτηριστικά αναλύονται αμέσως παρακάτω.

1. Α) ΑΥΤΟΩΡΙΜΑΖΟΜΕΝΑ ΙΝΤΡΟΝΙΑ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ I

Τα ιντρόνια της ομάδας I συναντώνται σε διάφορους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς (**Michel και Westhof, 1990**), όπως: στο πυρηνικό rRNA του πρωτοζώου *Tetrahymena thermophila* και του *Physarum polycephalum*, σε χλωροπλαστικά tRNA γονίδια από καλαμπόκι και φασόλι, σε μιτοχόνδρια μυκήτων, όπως του *Podospora anserina*, στο προ-mRNA του κυτοχρώματος b του μύκητα *Neurospora crassa*, στο προ-rRNA και στο προ-mRNA της κυτοχρωμικής οξειδάσης της ζύμης. Ο μηχανισμός της αντίδρασης έγινε γνωστός από τις εργασίες του Cech και των συνεργατών του (**Cech, 1990**). Όπως δείχθηκε αρχικά για το ιντρόνιο του rRNA του πρωτοζώου *Tetrahymena thermophila*, η αντίδραση της αυτοωρίμανσης του ιντρονίου πραγματοποιείται μέσω δύο αντιδράσεων τρανσεστεροποίησης (transesterification) (**Σχήμα 1Α**). Στο πρώτο στάδιο γίνεται διάσπαση στην 5' θέση ωρίμανσης (5' θω) με την βοήθεια ενός ελεύθερου μορίου γουανωσίνης το οποίο δεσμεύεται σε μια ειδική θέση του ιντρονίου. Αυτή η γουανωσίνη διασπά τον φωσφοδιεστερικό δεσμό στην 5' θέση ωρίμανσης και συνδέεται σταθερά με το πρώτο νουκλεοτίδιο του ιντρονίου. Στο δεύτερο στάδιο το εξόνιο, που αποκολλήθηκε και το οποίο έχει μια ελεύθερη 3'-υδροξυλομάδα, επιτίθεται στην 3' θέση ωρίμανσης. Έτσι πραγματοποιείται η δεύτερη αντίδραση τρανσεστεροποίησης, όπου η 3' θέση ωρίμανσης διασπάται και τα εξόνια συγκολλούνται μεταξύ τους. Το απελευθερωμένο ιντρόνιο μήκους 413 νουκλεοτιδίων, μπορεί επίσης από μόνο του να υποστεί τρανσεστεροποίηση, όταν η υδροξυλομάδα στο 3' άκρο του επιτεθεί στο νουκλεοτίδιο που βρίσκεται στην εικοστή θέση από το 5' άκρο του ιντρονίου, με αποτέλεσμα

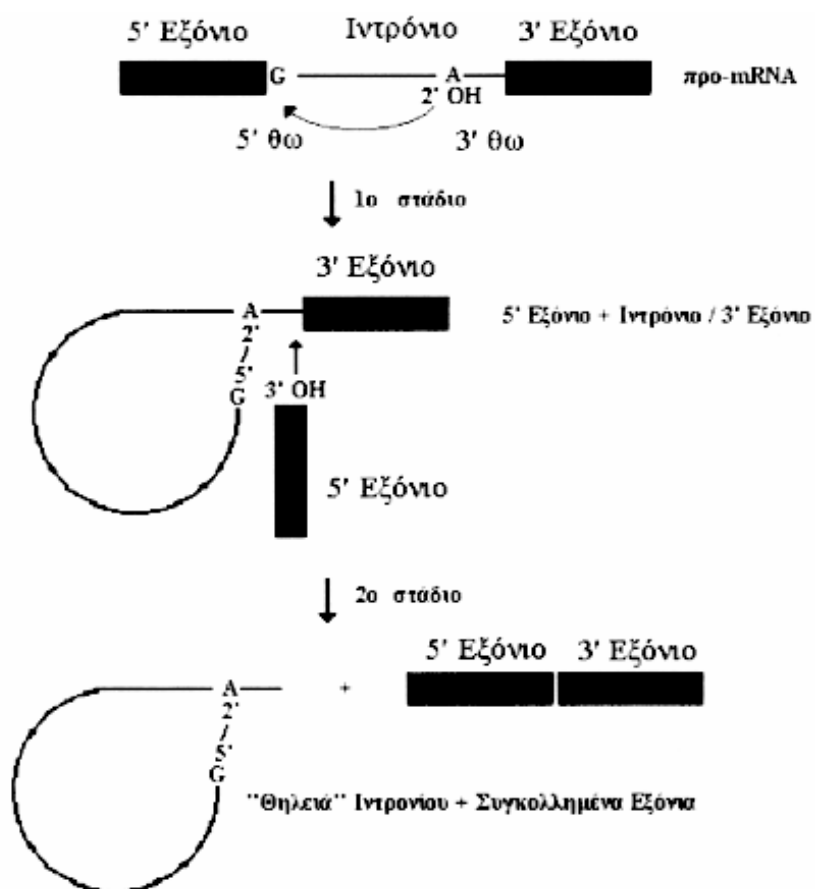


Σχήμα 1. (A) Η διαδικασία ωρίμανσης των αυτοωριμαζόμενων ιντρονίων της ομάδας I. Τα σύμβολα 5' θω και 3' θω δείχνουν την 5' και 3' θέση ωρίμανσης (θω) αντίστοιχα, ενώ Γ-Ιντρόνιο και K-Ιντρόνιο σημαίνουν γραμμικό και κυκλικό ιντρόνιο αντίστοιχα. (B) Το γραμμικό ιντρόνιο μπορεί να καταλύει την αντίδραση διάσπασης μορίου RNA, που μπορεί να δεσμεύεται στην ειδική θέση XYZ μέσω των συμπληρωματικών του βάσεων X'Y'Z'.

την κυκλοποίησή του και την ταυτόχρονη απελευθέρωση ενός ολιγονουκλεοτιδίου μήκους 19 βάσεων. Το κυκλικό τώρα ιντρόνιο μπορεί να ξαναγίνει με υδρόλυση γραμμικό και να διατηρεί πλήρως τις καταλυτικές του ιδιότητες (**Cech και Bass, 1986**). Αυτό ουσιαστικά ήταν και ένα από τα πρώτα μόρια RNA στα οποία αποδόθηκε ο χαρακτηρισμός του ριβοενζύμου, αφού οι μελέτες έδειξαν ότι είχε την ικανότητα να δρα καταλυτικά, διασπώντας μόρια υποστρώματος-RNA τα οποία δεσμεύονταν σε ειδική θέση κοντά στο 5' άκρο του. Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι η διάσπαση γινόταν στην 3' πλευρά του τετρανουκλεοτιδίου CUCU ή του CCCU που περιέχονταν στο υπόστρωμα-RNA και δεσμεύονταν στην ειδική θέση του ιντρονίου. Αργότερα, βρέθηκε ότι θα μπορούσε να ήταν και ένα οποιοδήποτε τετρανουκλεοτίδιο, αφού προηγουμένως γίνονταν ορισμένες αλλαγές στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος, έτσι ώστε να τηρείται ο κανόνας συμπληρωματικότητας των Watson-Crick (**Murphy και Cech, 1989**) (**Σχήμα 1B**).

1. B) ΑΥΤΟΩΡΙΜΑΖΟΜΕΝΑ ΙΝΤΡΟΝΙΑ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ II

Τα ιντρόνια της ομάδας II έχουν βρεθεί στα οργανίδια μυκήτων και φυτών, όπως στο μιτοχονδριακό προ-mRNA της κυτοχρωμικής οξειδάσης του ζυμομύκητα, σε φυτικούς χλωροπλάστες και τελευταία στο μονοκύτταρο χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* (**Goldschmidt-Clermont κ.α., 1991**). Ο μηχανισμός ωρίμανσης πραγματοποιείται και εδώ μέσω δυο συνεχόμενων αντιδράσεων τρανσεστεροποίησης (**Michel κ.α., 1989**) (**Σχήμα 2**). Διαφέρει από αυτόν της ομάδας I, ως προς την υδροξυλομάδα που συμμετέχει στο πρώτο στάδιο της ωρίμανσης. Δηλαδή, ενώ στα ιντρόνια της ομάδας I υπεύθυνη για το ξεκίνημα της αντίδρασης είναι η 3'-υδροξυλομάδα μιας εξωγενούς γουανοσίνης, στα ιντρόνια της ομάδας II είναι η 2'-υδροξυλομάδα μιας αδενοσίνης, που βρίσκεται κοντά στο 3' άκρο του ιντρονίου. Αυτή η 2'-υδροξυλομάδα της αδενοσίνης είναι που συμμετέχει στην διάσπαση στην 5' θέση ωρίμανσης με ταυτόχρονο σχηματισμό ενός 2'-5' φωσφοδιεστερικού δεσμού με το πρώτο νουκλεοτίδιο του ιντρονίου. Έτσι το ιντρόνιο σχηματίζει μια δομή βρόγχου (lariat) χαρακτηριστική για την διαδικασία ωρίμανσης των ιντρονίων της ομάδας II και των πυρηνικών προ-mRNA. Στο δεύτερο στάδιο η 3'-υδροξυλομάδα στο 3' άκρο του ήδη ελεύθερου εξονίου συμμετέχει στην διάσπαση στην 3' θέση ωρίμανσης. Ακολουθεί συγκόλληση των εξονίων και απελευθέρωση του ιντρονίου με την προσχηματισθείσα δομή βρόγχου.



Σχήμα 2. Η διαδικασία ωρίμανσης των αυτοωριμαζόμενων ιντρονίων της ομάδας II. Τα σύμβολα 5' θω και 3' θω δείχνουν την 5' και 3' θέση ωρίμανσης αντίστοιχα.

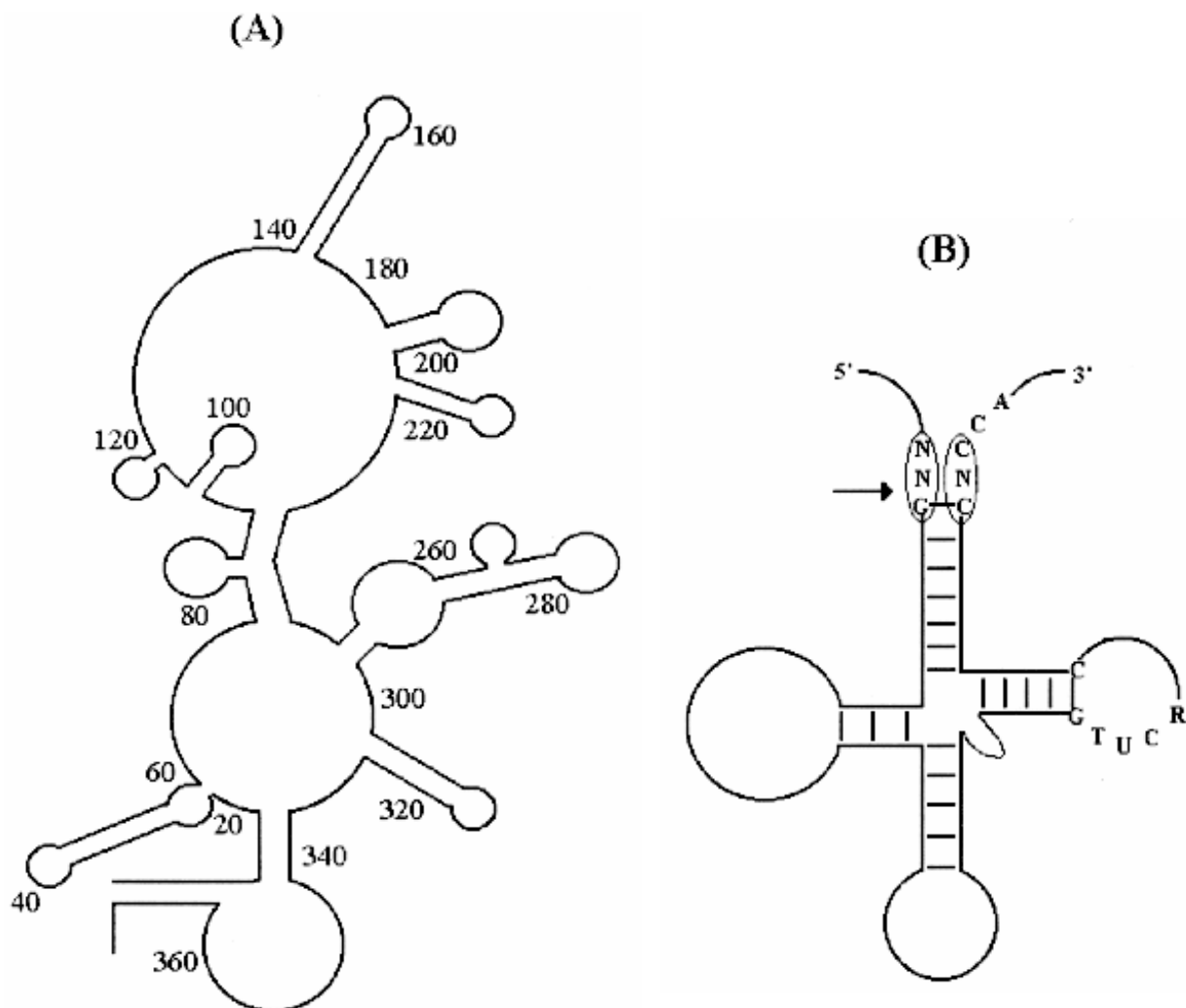
2. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΑ RNA ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΣΥΜΠΛΟΚΑ RNA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

2. Α) ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ Ρ (RNase P)

Η ριβονουκλεάση-Ρ έχει βρεθεί στα βακτήρια *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* και *Salmonella typhimurium* (Altman κ.α., 1989) (Σχήμα 3Α). Είναι μια ενδοριβονουκλεάση η οποία διασπά πρόδρομα μόρια tRNA για να δημιουργήσει το 5' άκρο των ώριμων tRNA (Σχήμα 3Β). Επίσης είναι το πρώτο ένζυμο που βρέθηκε να αποτελείται από μια αλυσίδα RNA μήκους 400 νουκλεοτιδίων, άκρως απαραίτητη για την καταλυτική ικανότητα του ενζύμου, καθώς και μια πρωτεϊνική υπομονάδα περίπου 14 kDa. Το μόριο του RNA είναι ικανό από μόνο του να καταλύει *in vitro* την αντίδραση ωρίμανσης του tRNA παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων Mg^{2+} , αλλά για την ενεργότητα του ενζύμου *in vivo* είναι άκρως απαραίτητη και η πρωτεϊνική υπομονάδα. Ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν είναι ακόμα γνωστός, αλλά είναι σίγουρο ότι για να πραγματοποιηθεί χρειάζεται οπωσδήποτε την παρουσία ιόντων Mg^{2+} , ενώ πρόσφατα αναγνωρίστηκαν στην δευτεροταγή δομή της RNA υπομονάδας της ριβονουκλεάσης-Ρ από την *E. coli*, περιοχές νουκλεοτιδίων, όπως από 60-92, 230-260 και 290-360, σαν απαραίτητες για την καταλυτική ικανότητα του μορίου (Altman κ.α., 1993).

2. Β) ΣΩΜΑΤΙΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΙΝΤΡΟΝΙΑ ΤΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΠΡΟ-mRNA

Η ωρίμανση των ιντρονίων στα πυρηνικά προ-mRNA βρέθηκε ότι γίνεται με την βοήθεια του ονομαζόμενου σωματίου ωρίμανσης. Απομονώθηκε από τα *in vitro* συστήματα μελέτης της όλης αντίδρασης ωρίμανσης, σαν ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο μεγέθους 50-60 S. Αποτελείται από μόρια RNA, τα αποκαλούμενα μικρά πυρηνικά RNA (small nuclear RNAs, snRNAs) καθώς και πρωτεΐνες. Τα μικρά πυρηνικά RNA είναι σταθερά, σχετικά άφθονα μόρια που βρίσκονται στον πυρήνα αρκετών ευκαρυωτικών οργανισμών, με μήκος 90 έως 220 νουκλεοτίδια. Κάθε μικρό πυρηνικό RNA υπάρχει σαν ένα σύμπλοκο με αρκετές πρωτεΐνες σχηματίζοντας έτσι ένα ξεχωριστό μικρό πυρηνικό ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (small nuclear RNP, snRNP) (Guthrie, 1991). Μέχρι σήμερα, ως συμμετέχοντα στο σωματίο ωρίμανσης και στην όλη διαδικασία, έχουν αναγνωριστεί τα U1 snRNP, U2 snRNP, U4 snRNP, U5 snRNP και U6 snRNP.



Σχήμα 3. (A) Προτεινόμενη δευτεροταγής δομή της RNA υπομονάδας (M1 RNA) της ριβονουκλεάσης P από *E. coli*. Οι αριθμοί υποδηλώνουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές θέσεις. Τα νουκλεοτίδια από: 60-92, 230-260 και 290-360, παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της θέσης διάσπασης, αλλά και της ταχύτητας της αντίδρασης διάσπασης από την ριβονουκλεάση P. (B) Δευτεροταγής δομή ενός πρόδρομου μορίου tRNA. Το βέλος δείχνει την θέση διάσπασης στο πρόδρομο tRNA.

Ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση ωρίμανσης των πυρηνικών προ-mRNA είναι ο ίδιος με αυτόν των αυτοωριμαζόμενων ιντρονίων της ομάδας II, που περιγράφηκε παραπάνω. Μια τέτοια ομοιότητα οδήγησε στην άποψη ότι αυτές οι δυο διαδικασίες συγγενεύουν εξελικτικά (**Jacquier, 1990**). Έχουν βρεθεί συγκεκριμένες αντιστοιχίες, μεταξύ δομών που δημιουργούνται από τις αλληλεπιδράσεις ορισμένων περιοχών των ιντρονίων της ομάδας II με τα εξόνια καθώς και των ανάλογων δομών που σχηματίζονται και των αλληλεπιδράσεων των μικρών πυρηνικών RNA U1, U2 και U5 με περιοχές των ιντρονίων και των εξονίων του προ-mRNA (**Saldanha κ.α., 1993**). Η συγγένεια όμως μεταξύ των δυο μηχανισμών υπονοεί επίσης ότι, τουλάχιστον μερικά από τα μικρά πυρηνικά μόρια RNA που αποτελούν συστατικά του σωματίου ωρίμανσης, έχουν καταλυτικές ιδιότητες. Πράγματι, βρέθηκε ότι το U6 snRNA πολύ πιθανόν να έχει τέτοιες ιδιότητες, αφού μεταλλάξεις σε ορισμένες περιοχές του μορίου αυτού, εμπόδιζαν την πραγματοποίηση της δεύτερης αντίδρασης τρανσεστεροποίησης στην διαδικασία ωρίμανσης (**Fabricio και Abelson, 1990**). Οι ίδιοι ερευνητές υποθέτουν, ότι λόγω της συνεξέλιξης των snRNAs με τις αντίστοιχες πρωτείνες στο σωματίο ωρίμανσης, θα είναι πολύ δύσκολο ναδειχθεί ότι αυτά τα μικρά μόρια RNA μπορούν να έχουν αποκλειστικά από μόνα τους τις καταλυτικές ιδιότητες που θα τους επιτρέψουν να πραγματοποιήσουν την αντίδραση ωρίμανσης σε πυρηνικά προ-mRNA.

2. Γ) ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΟ RNA (RIBOSOMAL RNA, rRNA)

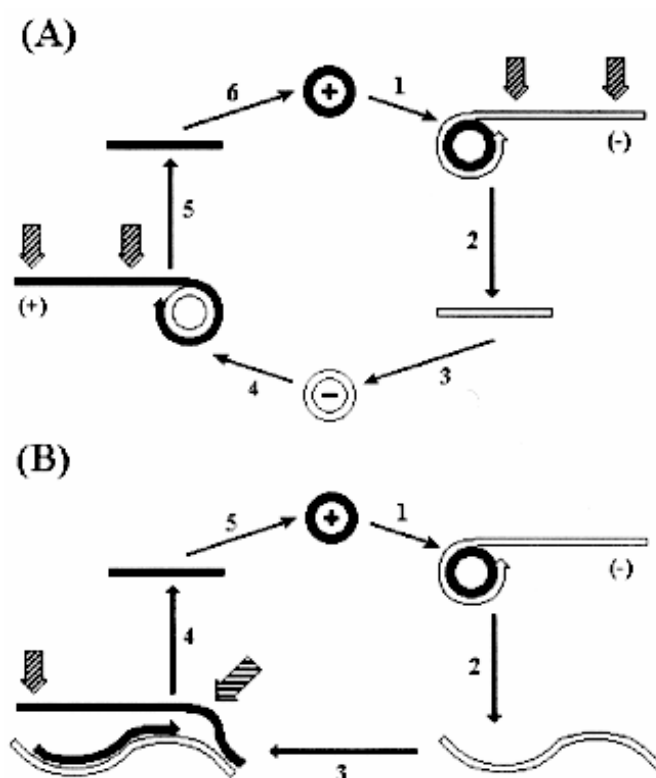
Το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο του ριβοσώματος είναι ως γνωστόν άκρως απαραίτητο για την πραγματοποίηση της μετάφρασης του mRNA. Πρόσφατες μελέτες όμως έδειξαν ότι, το RNA συστατικό αυτού του συμπλόκου είναι ικανό από μόνο του να καταλύει συγκεκριμένη αντίδραση στην διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης (**Noller κ.α., 1992**). Πιο συγκεκριμένα, μέχρι σήμερα γνωρίζαμε ότι ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ δύο αμινοξέων καταλύεται από το ένζυμο πεπτιδύλο τρανσφεράση που βρίσκεται στην 50S ριβοσωμική υπομονάδα. Όταν τέτοιες ριβοσωμικές υπομονάδες από κύτταρα του *Thermus aquaticus* επώαστηκαν με SDS, πρωτεϊνάση K και φαινόλη, διαδικασία που απομάκρυνε το 95% των πρωτεϊνών από το σύμπλοκο, το 80% της ενεργότητας της πεπτιδύλο-τρανσφεράσης υπήρχε ακόμα. Αυτή η ενεργότητα ήταν ακόμα ευαίσθητη στην χλωραμφενικόλη και την καρβομυκίνη, δυο ειδικούς αναστολείς της, καθώς και στην επώαση

με ριβονουκλεάση T1. Τα παραπάνω ευρήματα είναι τα πρώτα πειραματικά δεδομένα που μαρτυρούν τις καταλυτικές ιδιότητες του ριβοσωμικού RNA.

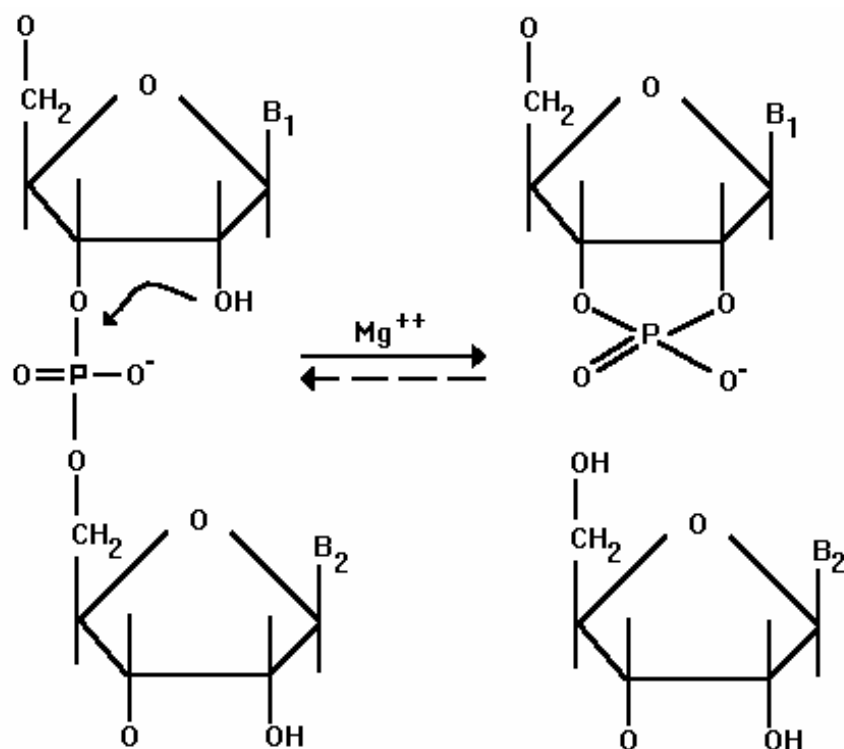
3. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΑ RNA ΜΕ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΔΟΜΙΚΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ

Μερικά μόρια RNA που συναντώνται στη φύση έχουν την ικανότητα να αυτοκαταλύουν *in vitro* την διάσπασή τους από ολιγομερή σε μονομερή. Τέτοια ριβοένζυμα έχουν βρεθεί σε ορισμένα φυτικά παθογόνα που ονομάζονται ιοειδή (viroids) και πολλαπλασιάζονται στο φυτικό κύτταρο ανεξάρτητα από την παρουσία ιού, στο δορυφορικό RNA ορισμένων φυτικών ιών που χρειάζονται όμως για να αντιγραφούν την παρουσία του ιού που συνοδεύουν στη φύση, στα μετάγραφα ορισμένων συνεχόμενων (tandem) επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του δορυφορικού DNA 2 της σαύρας (newt) και στον ιό της ηπατίτιδας δέλτα (**Bruening, 1989**). Όλα τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν, ότι το κυκλικό RNA των φυτικών παθογόνων αντιγράφεται *in vivo* μέσω του μηχανισμού του κυλιόμενου κύκλου (rolling circle) (**Σχήμα 4**). Κατά την διάρκεια της αντιγραφής κυκλικά μόρια του RNA χρησιμοποιούνται σαν μήτρες, οπότε και παράγονται πολυμερή γραμμικά μόρια RNA, τα οποία καταλύουν την διάσπαση του εαυτού τους σε συγκεκριμένη θέση για να παραχθούν τα μονομερή μόρια RNA. Τα τελευταία, αφού κυκλοποιηθούν αν χρειάζεται, αποτελούν τους απογόνους του αρχικού παθογονικού μορίου RNA που αντιγράφηκε. Στη συγκεκριμένη θέση διάσπασης του RNA είναι χαρακτηριστικό ότι δημιουργείται ένα 5'-OH και ένας 2'-3' κυκλικός φωσφοδιεστερικός δεσμός (**Symons, 1992**) (**Σχήμα 5**).

Οι τρεις διαφορετικές υποκατηγορίες καταλυτικών RNA, που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία και που είναι: **α)** το ριβοένζυμο του ιού της ηπατίτιδας δέλτα (Hepatitis Delta Virus, HDV), **β)** τα ριβοένζυμα του τύπου "φουρκέτας" ή "φουρκετοειδή" (hairpin) ριβοένζυμα και **γ)** τα ριβοένζυμα του "σφυροκέφαλου" τύπου ή "σφυροκέφαλα" (hammerhead) ριβοένζυμα, διαχωρίστηκαν αρχικά με βάση την διαφορετική δευτεροταγή δομή που παίρνει το μόριο του ριβοενζύμου, αλλά και από στοιχεία του μηχανισμού τους που ανακαλύφθηκαν.



Σχήμα 4. Μηχανισμός του κυλιόμενου κύκλου για την αντιγραφή μικρών, κυκλικών παθογονικών μορίων RNA. **(A)** Μηχανισμός κατά τον οποίο τόσο το θετικής (+) όσο και το αρνητικής (-) πολικότητας RNA καταλύουν την διάσπαση του εαυτού τους. **(B)** Μηχανισμός κατά τον οποίο μόνο το θετικής (+) πολικότητας RNA καταλύει την διάσπαση του εαυτού του. Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις διάσπασης του πολυμερούς RNA για την δημιουργία των μονομερών, που αποτελούν τους απογόνους του αρχικού μορίου που αντιγράφηκε.



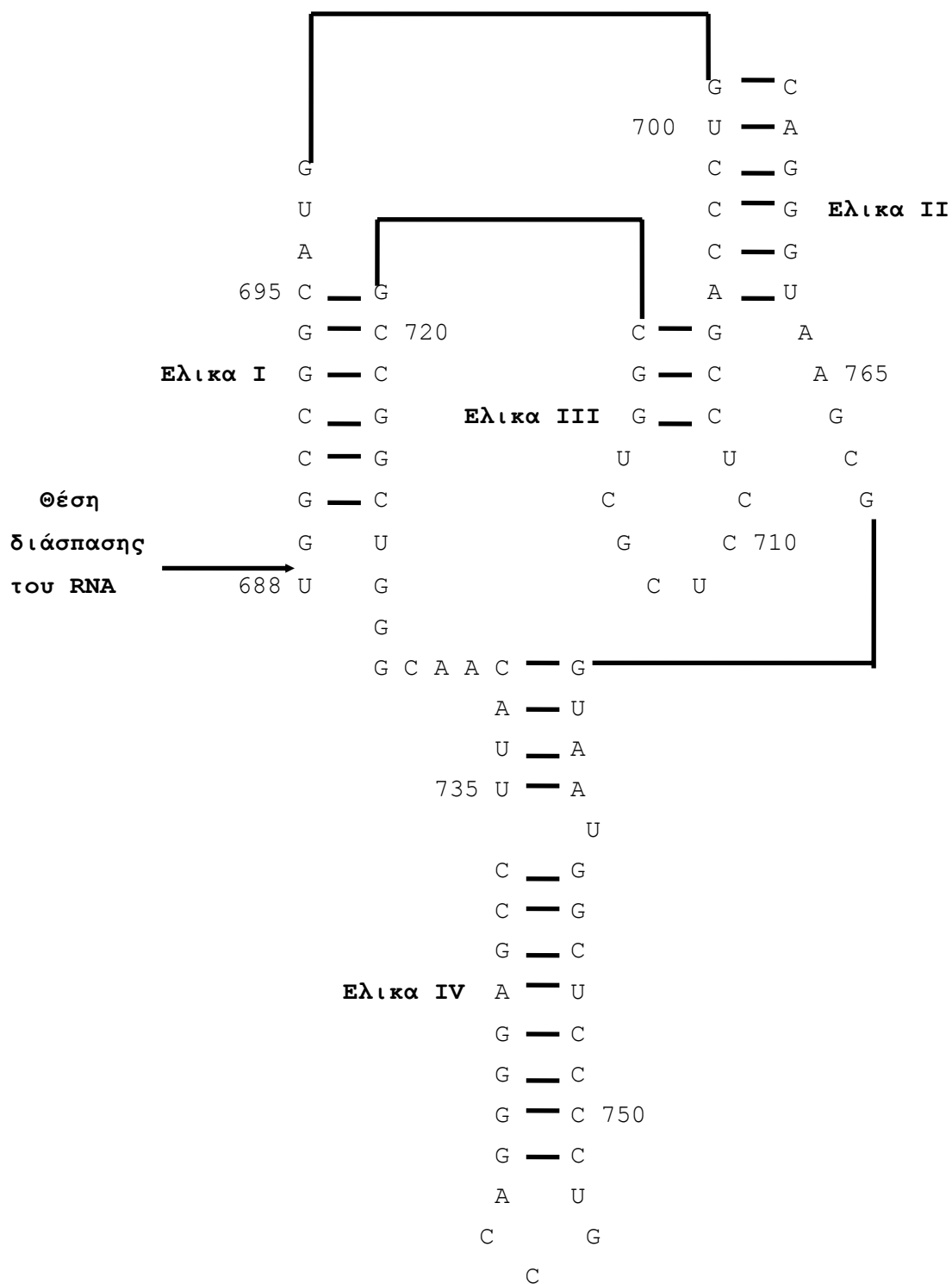
Σχήμα 5. Η αντίδραση διάσπασης του RNA καταλύομενη από το ίδιο το RNA παρουσία ιόντων Mg²⁺ ή άλλων δισθενών κατιόντων. Είναι μια μη υδρολυτική αντίδραση τρανσεστεροποίησης και είναι θεωρητικά αντιστρεπτή. Τα γράμματα B₁ και B₂ συμβολίζουν δυο τυχαίες βάσεις στο μόριο του RNA, μεταξύ των οποίων πραγματοποιείται η αντίδραση διάσπασης.

3. A) ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ ΔΕΛΤΑ (HDV RIBOZYME)

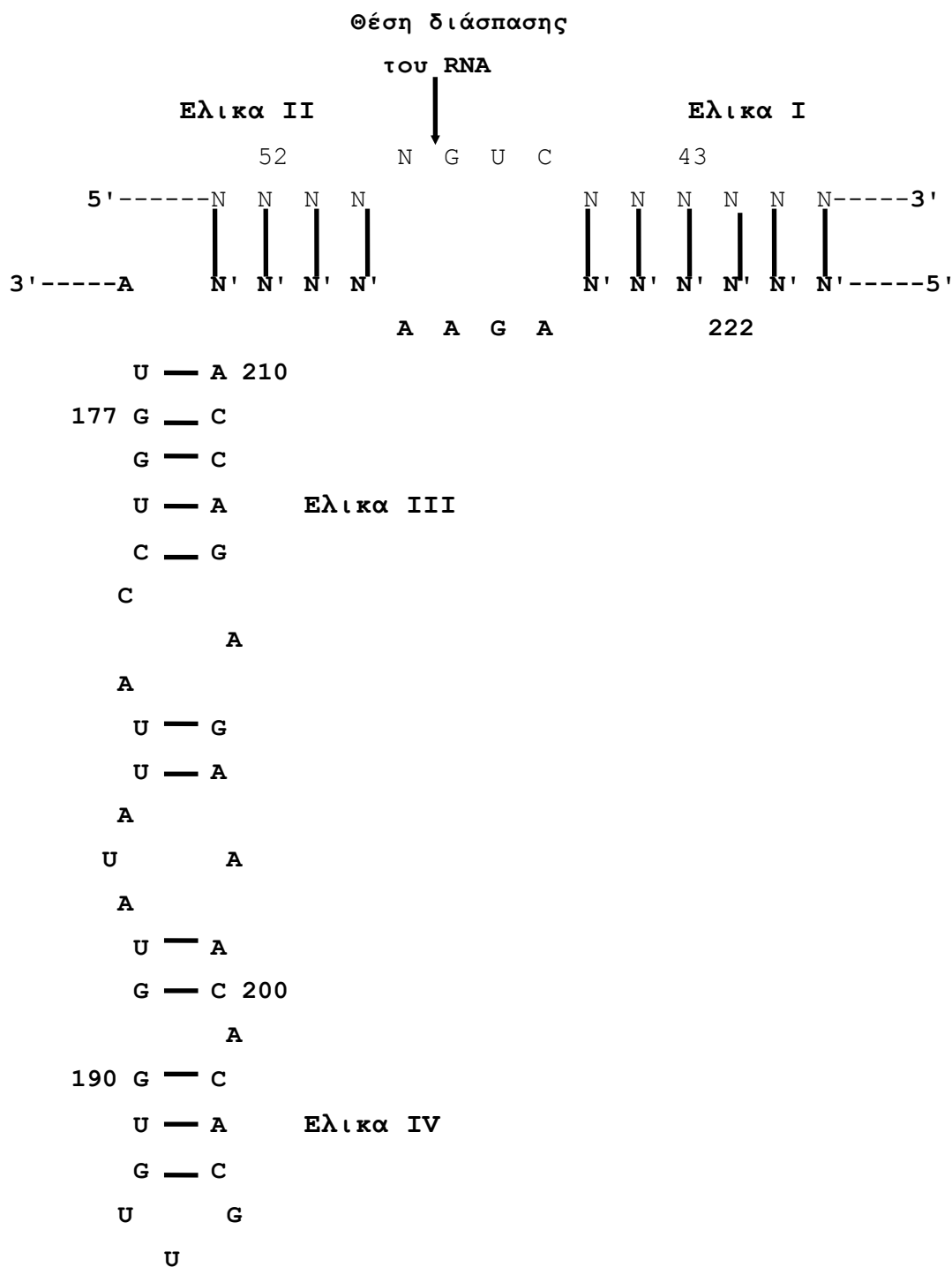
Ο ιός της ηπατίτιδας δέλτα (HDV) προσβάλλει ανθρώπινα κύτταρα και το γενετικό υλικό μέσα στο καψίδιό του είναι ένα μονόκλωνο κυκλικό μόριο RNA μήκους 1700 βάσεων, που θεωρείται αρνητικής πολικότητας [(-) HDV RNA, ενώ το θετικής πολικότητας RNA [(+) HDV RNA] περιέχει μια περιοχή που κωδικοποιεί για τα 195 αμινοξέα του HDV αντιγόνου μέσα στο ιοσωμάτιο (**Wang κ.α., 1986**). Όλα τα δεδομένα δείχνουν ότι το HDV RNA αντιγράφεται με τον μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου, αφού σε μολυσμένους ιστούς βρέθηκαν ολιγομερή HDV RNAς, τόσο θετικής όσο και αρνητικής πολικότητας (**Chen κ.α., 1986**), γεγονός που υπονοεί επίσης ότι απαιτείται διάσπαση των ολιγομερών σε μονομερή μετά την διαδικασία της αντιγραφής. Πράγματι, βρέθηκε ότι τόσο τα (+) όσο και τα (-) HDV RNA ολιγομερή έχουν την ικανότητα να αυτοκαταλύουν την διάσπασή τους, σε *in vitro* συνθήκες παρουσία ιόντων Mg^{2+} , με ταυτόχρονη δημιουργία ενός 5'-OH και ενός 2'-3' φωσφοδιεστερικού δεσμού στα προϊόντα της αντίδρασης (**Kuo κ.α., 1988**). Τα παραπάνω RNA βρέθηκε επίσης ότι έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές, που διαφέρουν από αυτές των φουρκετοειδών ριβοενζύμων ή των σφυροκέφαλων, που περιγράφονται αμέσως παρακάτω. Μπορούν δηλαδή να αναδιπλωθούν με τέτοιο τρόπο (**Σχήμα 6**), ώστε να σχηματίσουν τις χαρακτηριστικές εκείνες δομές που ονομάζονται "ψευδοκόμποι" (pseudoknots), που ίσως να είναι και η καταλυτικά ενεργή μορφή του RNA (**Perrotta και Been, 1991**).

3. B) "ΦΟΥΡΚΕΤΟΕΙΔΗ" ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΑ (HAIRPIN RIBOZYMES)

Τα "φουρκετοειδή" ριβοένζυμα βρέθηκαν στο αρνητικής πολικότητας (-) δορυφορικό RNA του ιού που προκαλεί δακτυλιδωτές κηλίδες στον καπνό (satellite Tobacco Ringspot Virus, sTobRV) (**Bruening, 1989**). Το όνομά τους προέκυψε από μια χαρακτηριστική δευτεροταγή δομή που συναντάται γύρω από τη θέση διάσπασης του RNA, η οποία είναι στην 5' πλευρά του τρινουκλεοτιδίου GUC και για τον σχηματισμό αυτής της δομής συμμετέχουν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες από δυο απομακρυσμένες περιοχές του ίδιου μορίου RNA (**Σχήμα 7**). Η φουρκετοειδής δομή όμως μπορεί να διαχωρισθεί στην περιοχή του υποστρώματος που αποτελείται από 14 νουκλεοτίδια και στην καταλυτική περιοχή που αποτελείται από 50 νουκλεοτίδια (**Hampel και Tritz, 1989**).



Σχήμα 6. Η προτεινόμενη, με την δημιουργία "ψευδοκόμπων", δευτεροταγής δομή του HDV γενωμικού RNA. Το βέλος δείχνει την θέση διάσπασης του RNA.



Σχήμα 7. Η προτεινόμενη δευτεροταγής δομή των φουρκετοειδών ριβοενζύμων. Με έντονα γράμματα δείχνονται τόσο τα μη συντηρημένα νουκλεοτίδια (N') του ριβοενζύμου, μέσω των οποίων προσδένεται στο υπόστρωμα, όσο και τα συντηρημένα νουκλεοτίδια που απαιτούνται για την δράση του. Με απαλότερα γράμματα δείχνονται τα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια (N) του υποστρώματος, που είναι αναγκαία για την αλληλεπίδραση με το ριβοένζυμο, καθώς και η αλληλουχία νουκλεοτιδίων που πρέπει να βρίσκεται στην θέση στόχο. Το βέλος δείχνει την θέση διάσπασης του υποστρώματος.

Με μεταλλαξιγένεση στο υπόστρωμα και στην καταλυτική περιοχή, αναγνωρίστηκαν συγκεκριμένα άκρως αναγκαία νουκλεοτίδια για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, όπως στις περιοχές του κορμού III και IV, ενώ με πειράματα κινητικής χρησιμοποιώντας το ριβοένζυμο μήκους 50 νουκλεοτιδίων και υπόστρωμα μήκους 14 νουκλεοτιδίων μετρήθηκαν οι πολύ καλές τιμές: $k_{cat}= 2.1/\text{λεπτό}$ και $K_m= 0.03 \mu\text{M}$ (**Hampel κ.α., 1990**). Η καταλυτική περιοχή έχει μια μονόκλωνη περιοχή στο 5' άκρο της, όπου δεσμεύεται το υπόστρωμα με ζευγάρι μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων δια μέσου Watson-Crick δεσμών. Η γουανοσίνη στην 3' πλευρά της θέσης διάσπασης είναι άκρως απαραίτητη, αφού η 2-αμινομάδα της πιστεύεται ότι συμμετέχει στο σχηματισμό μιας ενεργής θέσης για κατάλυση, σε συνδυασμό με το κοντινό ριβονουκλεοτίδιο στην 5' πλευρά της θέσης διάσπασης, η φύση του οποίου δεν έχει τόση σημασία όσο το 2'-OH του (**Chowrira κ.α., 1991**).

3. Γ) "ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΑ" RIBOENZYMA (HAMMERHEAD RIBOZYMES)

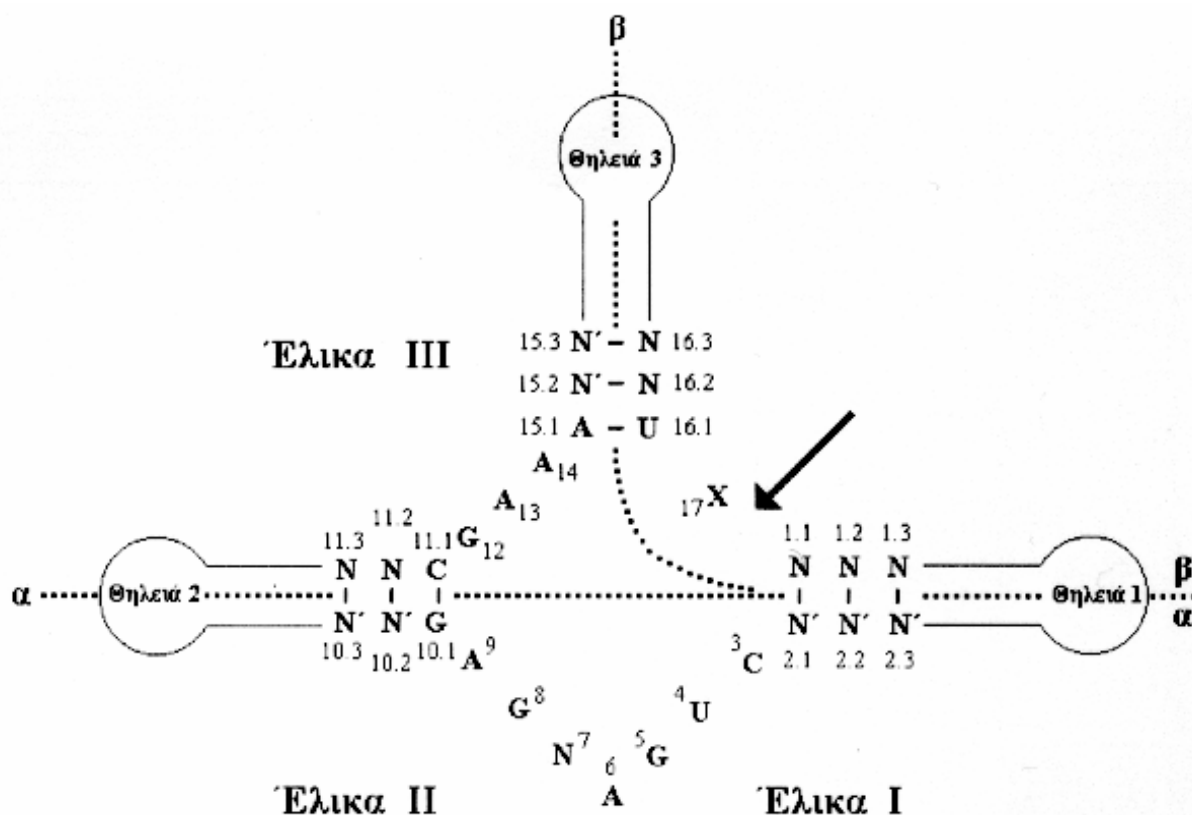
Η τελευταία υποκατηγορία των RNA με ιδιαίτερα δομικά και λειτουργικά γνωρίσματα, που καταλύουν την αντίδραση διάσπασης του εαυτού τους ή άλλου μορίου RNA σε συγκεκριμένη θέση και που αποτελεί το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής, είναι αυτή των "σφυροκέφαλων" ριβοενζύμων. Σ' αυτήν ανήκουν, το κυκλικό μόριο RNA του ιοειδούς του αβοκάντο (Avocado Sun Blotch Viroid, ASBVd) και του λανθάνοντος μωσαϊκού της ροδακινιάς (Peach Latent Mosaic Viroid, PLMVd), του δορυφορικού RNA του ιού της μηδικής (satellite Lucerne Transient Streak Virus, sLTSV) και του δορυφορικού RNA του ιού του καπνού που προξενεί δακτυλιωτές κηλίδες (satellite Tobacco Ringspot Virus, sTobRV) (**Symons, 1992**), καθώς και τα RNA μετάγραφα ορισμένων συνεχόμενων επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του δορυφορικού DNA της σάυρας (newt) (**Epstein και Gall, 1987**). Αυτά τα μόρια RNA έχειδειχθεί *in vitro*, ότι παρουσία Mg^{2+} και pH μεγαλύτερου του 7, καταλύουν την διάσπαση του εαυτού τους σε συγκεκριμένη θέση, δημιουργώντας ένα 2'-3' κυκλικό φωσφοδιεστερικό δεσμό προς την 5' πλευρά του σημείου διάσπασης και ένα 5'-OH προς την 3' πλευρά του σημείου διάσπασης (**Forster και Symons, 1987**). Οι θέσεις όπου συμβαίνει η διάσπαση είναι συγκεκριμένες και σχετίζονται με περιοχές συντηρημένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και δευτεροταγούς δομής. Για τα sTobRV (**Buzayan κ.α., 1986**), ASBV (**Uhlenbeck, 1987**) και sLTSV (**Forster και Symons, 1987**), δείχθηκε ότι ακριβώς αυτές οι συντηρημένες περιοχές απαιτούνται για την διάσπαση και έτσι πιθανόν να εμπλέκονται άμεσα στην αντίδραση. Η

κοινή σε όλα τα παραπάνω RNA, δευτεροταγής δομή που σχετίζεται με αυτές τις περιοχές, είναι η ονομαζόμενη "σφυροκέφαλη" δομή, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 8**. Πήρε το όνομά της, λόγω της ομοιότητάς της με το κεφάλι ενός αντίστοιχου τύπου σφυριού, χάριν της οποίας ονομάστηκαν έτσι και τα ριβοένζυμα αυτής της υποκατηγορίας. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία αρκετών συντηρημένων νουκλεοτιδίων κατάλληλα διατεταγμένων σε τρεις έλικες I, II και III και δυο μονόκλωνων περιοχών, η αρίθμηση των οποίων ακολουθεί το διεθνώς καθορισμένο και αποδεκτό σύστημα αρίθμησης των **Hertel κ.α. (1992)**.

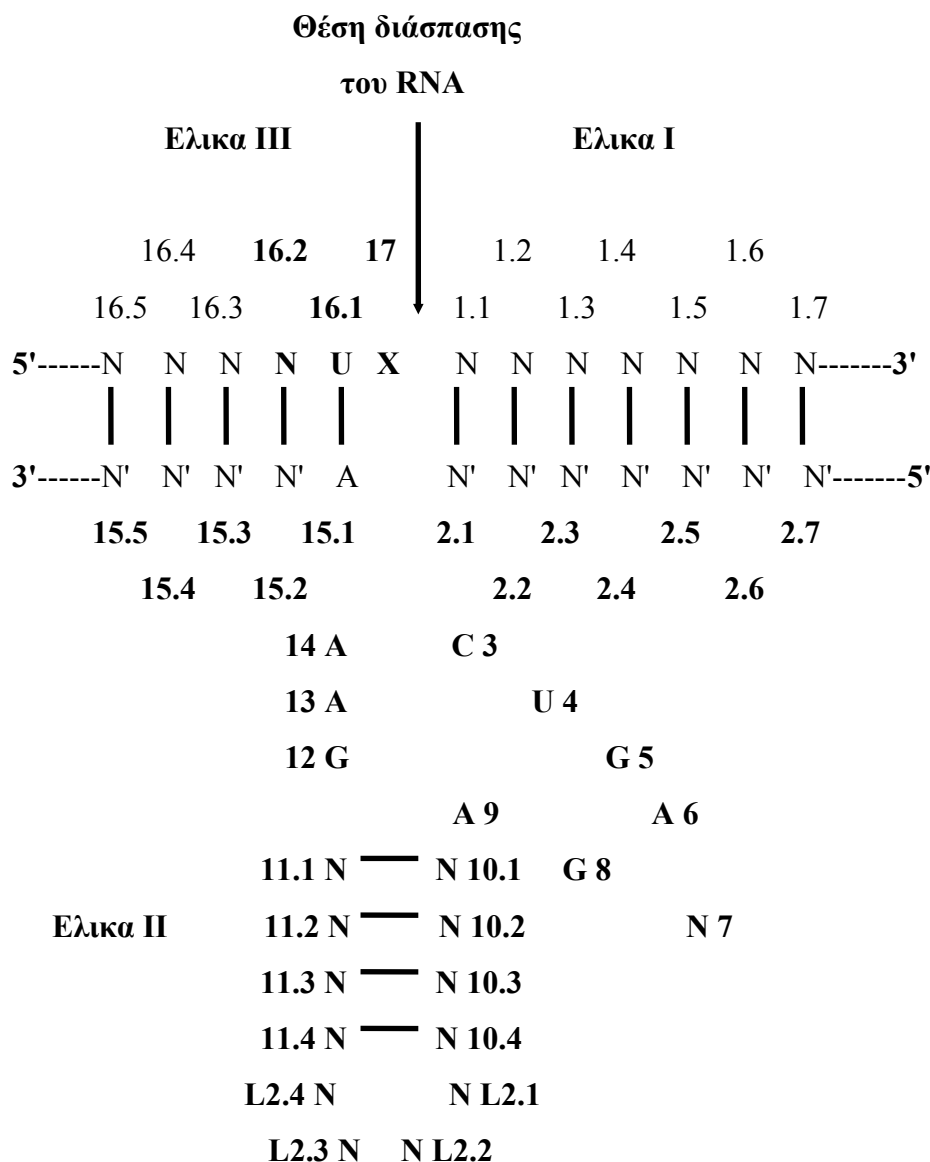
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ: Α) ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ-RNA ΚΑΙ Β) ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟ-RNA

Τα σφυροκέφαλης δομής RNA, που συναντώνται στη φύση και περιγράφησαν παραπάνω, έχουν την ικανότητα να καταλύουν την αντίδραση διάσπασης του εαυτού τους. Πρόκειται δηλαδή, για μια ενδομοριακή αντίδραση (*in cis*), όπου ένα και μόνο μόριο RNA κωδικοποιεί όλες εκείνες τις λειτουργίες που είναι απαραίτητες για να συμβεί η διάσπαση του εαυτού του σε συγκεκριμένη θέση. Πρώτος ο **Uhlenbeck (1987)**, αντιλήφθηκε ότι υπήρχε η δυνατότητα η αντίδραση να συμβεί *in trans*, όπου δυο ξεχωριστά και ανεξάρτητα μόρια RNA μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και να σχηματίσουν μια καταλυτικά ενεργή σφυροκέφαλη δομή [**Σχήμα 8, γραμμή (α)**]. Ένα τέτοιο απλό μοντέλο παρείχε επίσης τη δυνατότητα του λεπτομερέστερου χαρακτηρισμού της αντίδρασης διάσπασης που πραγματοποιείται από τα σφυροκέφαλα ριβοένζυμα. Βασίστηκε στα συντηρημένα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στο (-) πολικότητας RNA του ASBVd και απέδειξε, χρησιμοποιώντας το *in vitro* μεταγραφικό σύστημα της T₇ RNA πολυμεράσης, ότι το 19μερές ριβοένζυμο προξενούσε γρήγορη και σε συγκεκριμένη θέση διάσπαση του 24μερούς υποστρώματος-RNA στόχου του. Ακολούθησαν άλλα παραδείγματα, όπως **α)** ένα 13μερές ριβοένζυμο, το μικρότερο που έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα, διασπούσε το 41μερές υπόστρωμα-RNA (**Jeffries και Symons, 1989**), καθώς και **β)** μια τριπλή *in trans* αντίδραση, όπου ο συνδυασμός ενός 19μερούς με ένα 14μερές συνιστούσαν το ριβοένζυμο που διασπούσε το 11μερές υπόστρωμα-RNA (**Koizumi κ.α., 1988, 1989**). Προέκταση των παραπάνω πειραμάτων, αποτέλεσε η μελέτη των **Haseloff και Gerlach (1988)**, οι οποίοι σχεδίασαν μικρά ριβοένζυμα βασισμένοι στη σφυροκέφαλη δομή που βρίσκεται στο (+) πολικότητας RNA του sTobRV (**Σχήμα 8, γραμμή (β)** και **Σχήμα 9**).

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποίησαν το βακτηριακό γονίδιο της ακέτυλο-τρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης (Chloramfenicol Acetyl Transferase, CAT) σαν στόχο και σχεδίασαν ριβοένζυμα που διασπούσαν *in vitro* το υπόστρωμα σε τρία διαφορετικά σημεία. Ο σχεδιασμός βασίστηκε στην υποδιαίρεση της αρχικής μορφής ριβοενζύμου, που καταλύει μόνο μια ενδομοριακή αντίδραση (*in cis*) σε δυο τμήματα, ένα που περιέχει το καταλυτικό τμήμα (ένζυμο) και ένα άλλο που περιέχει την αλληλουχία στόχο (υπόστρωμα) (**Σχήμα 9**). Το ριβοενζυμικό μέρος περιελάμβανε όλα εκείνα τα συντηρημένα νουκλεοτίδια, που του πρόσδιδαν τελικά τις καταλυτικές ιδιότητές του, το υπόστρωμα τα τρία εκείνα νουκλεοτίδια που καθόριζαν τη συγκεκριμένη θέση-στόχο, όπου συνέβαινε η διάσπαση του μορίου RNA, ενώ τα υπόλοιπα νουκλεοτίδιά του καθόριζαν την συμπληρωματικότητα με το ριβοένζυμο. Επειδή στη φύση τα περισσότερα σφυροκέφαλα RNA πραγματοποιούσαν την διάσπαση αμέσως μετά το χαρακτηριστικό τρινουκλεοτίδιο GUC (**Bruening, 1989**), αυτό επιλέχθηκε επιτυχώς στις θέσεις του υποστρώματος που αποτελούσαν στόχο των ριβοενζύμων στα παραπάνω πειράματα.



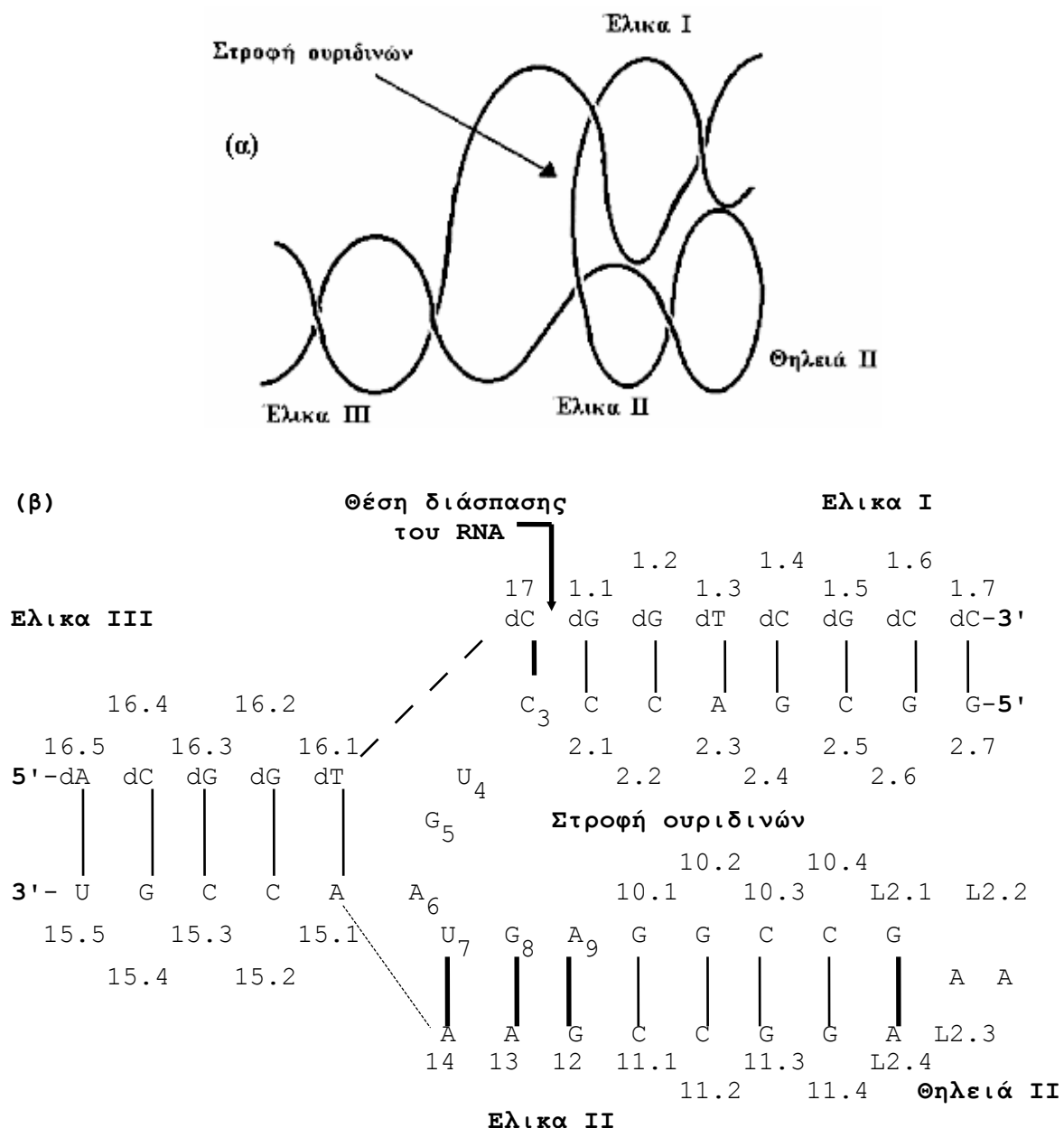
Σχήμα 8. Η χαρακτηριστική δευτεροταγής δομή των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων που συναντώνται στη φύση, όπου φαίνονται οι σχηματιζόμενες έλικες I, II και III και η αρίθμηση των νουκλεοτιδίων που παίρνουν μέρος στον σχηματισμό της δομής, σύμφωνα με το σύστημα αρίθμησης των **Hertel κ.α. (1992)**. Διακρίνονται, τα συντηρημένα νουκλεοτίδια που είναι απαραίτητα για την καταλυτική ικανότητα του RNA, τα νουκλεοτίδια (N) του υποστρώματος-RNA, που είναι απαραίτητα για την πρόσδεση στα συμπληρωματικά τους (N') του ριβοενζύμου. Οι Θηλειές 1, 2 και 3 μπορούν να ποικίλουν σε μήκος και δεν παίζουν κανένα ρόλο στην αντίδραση διάσπασης. Η διακεκομμένη γραμμή (**α**) δείχνει την υποδιαίρεση της σφυροκέφαλης δομής σύμφωνα με τον **Uhlenbeck (1987)**, ενώ η γραμμή (**β**) στην υποδιαίρεση σύμφωνα με τους **Haseloff και Gerlach (1988)**. Το βέλος δείχνει την θέση διάσπασης του υποστρώματος-RNA αμέσως μετά το νουκλεοτίδιο X.



Σχήμα 9. Μια διαφορετική απεικόνιση της υποδιαίρεσης της σφυροκέφαλης δομής σύμφωνα με τους **Haseloff και Gerlach (1988)**, όπου φαίνονται οι σχηματιζόμενες έλικες I, II και III και η αρίθμηση των νουκλεοτιδίων που παίρνουν μέρος στον σχηματισμό της δομής, σύμφωνα με το σύστημα αρίθμησης των **Hertel κ.α. (1992)**. Διακρίνονται στο υπόστρωμα-RNA με έντονα γράμματα, τα νουκλεοτίδια NUX της θέσης-στόχου καθώς και τα νουκλεοτίδια N, που είναι απαραίτητα για την πρόσδεση στα συμπληρωματικά τους N' του ριβοενζύμου. Διακρίνονται επίσης στην έλικα II, τα συντηρημένα και μη συντηρημένα νουκλεοτίδια (3-14) της περιοχής που προσδίδει τις καταλυτικές ιδιότητες στο μόριο του RNA. Το βέλος δείχνει την θέση διάσπασης του υποστρώματος-RNA αμέσως μετά το νουκλεοτίδιο X στην θέση 17 (X 17).

ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ

Η απεικόνιση των καταλυτικών RNA που συναντώνται στη φύση με δυσδιάστατη "σφυροκέφαλη" δομή αποτελεί μια απλούστευση. Πρόσφατα, η τρισδιάστατη δομή ενός σφυροκέφαλου ριβοενζύμου δημοσιεύθηκε συγχρόνως από δυο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες (**Tuschl κ.α., 1994, Pley κ.α., 1994**) (**Σχήμα 10**). Η πρώτη του Eckstein και των συνεργατών του, χρησιμοποίησε τη μέθοδο μεταφοράς ενέργειας φθορισμού για να καθορίσει την τριτοταγή δομή ενός σφυροκέφαλου ριβοενζύμου, το οποίο είχε σχηματίσει σύμπλοκο με το αντίστοιχο υπόστρωμά του σε διάλυμα. Στη θέση όμως 17, στην 3' πλευρά της οποίας συμβαίνει η διάσπαση στο υπόστρωμα-RNA, υπήρχε μια δεοξυ-κυτιδίνη, η παρουσία της οποίας δεν ευνοούσε την αντίδραση διάσπασης του υποστρώματος-RNA από το αντίστοιχο ριβοένζυμο (**Tuschl κ.α., 1994**). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το σχήμα είναι περισσότερο σαν "Y", με τις έλικες I και II πολύ κοντά η μια στην άλλη, ενώ η έλικα III έχει φορά προς την αντίθετη κατεύθυνση. Η δεύτερη ερευνητική ομάδα του McKay και των συνεργατών του, χρησιμοποίησε την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X, για να μελετήσει τη δομή ενός συμπλόκου, που αποτελούνταν από ένα σφυροκέφαλο RNA και το συμπληρωματικό του μόριο DNA, αντί υποστρώματος-RNA. Κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα όπως και η προηγούμενη ομάδα, αλλά έδειξαν επίσης ότι υπάρχει μια απότομη στροφή μεταξύ της έλικας I και II, όμοιας με αυτή της στροφής των ουριδινών στο μόριο του μεταφορικού-RNA (transfer-RNA, tRNA). Επιπλέον, βρέθηκε ότι το δισθενές μεταλλικό ιόν, Mn^{2+} ή Cd^{2+} , ήταν δεσμευμένο σε μια δίκλωνη περιοχή που σχηματιζόταν όμως από τρία ζευγάρια βάσεων, του τύπου G-A (**Pley κ.α., 1994**).



Σχήμα 10. (α) Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων σύμφωνα με τους **Tuschl κ.α. (1994)** και **Pley κ.α. (1994)**. (β) Απλουστευμένη αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής, όπου φαίνονται με κανονικές γραμμές οι δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων των δυο νουκλειικών οξέων, ενώ με παχύτερες γραμμές μεταξύ των βάσεων, δείχνονται οι αλληλεπιδράσεις που βρέθηκαν και που δεν ακολουθούν τον κανόνα συμπληρωματικότητας των Watson-Crick.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ

ΜΕ:

Α) ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΗΣ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΗΣ ΔΟΜΗΣ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ

Η πραγματοποίηση της αντίδρασης διάσπασης είναι ένας από τους περιοριστικούς παράγοντες της δράσης των ριβοενζύμων. Η αποτελεσματικότητά της εξαρτάται από τη δομή της καταλυτικής περιοχής του σφυροκέφαλου ριβοενζύμου που χρησιμοποιείται. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος και η επίδραση μεμονωμένων νουκλεοτιδίων της καταλυτικής περιοχής, δηλαδή αυτών που συμμετέχουν στο σχηματισμό της έλικας II και θηλειάς II, με τη βοήθεια μεταλλάξεων ή χημικής τροποποίησης αυτών. Τέτοιες μελέτες βοήθησαν να γίνει κατανοητό, ποιά νουκλεοτίδια είναι απόλυτα αναγκαία για την πραγματοποίηση της αντίδρασης διάσπασης και ποιά έχουν λίγη ή καθόλου επίδραση στην αποτελεσματικότητά της. Έτσι έγιναν πειράματα όπου:

1) αφαιρέθηκαν τα ριβονουκλεοτίδια από τις θέσεις G(10.1) έως και C(11.1) (**McCall κ.α., 1992**), ή ελαττώθηκαν σταδιακά τα ζευγάρια βάσεων της έλικας II από τέσσερα σε κανένα (**Tuschl και Eckstein, 1993**).

2) προστέθηκαν ριβονουκλεοτίδια όπως μεταξύ των θέσεων C(10.4)-G(11.4) και U(L2.1), A(L2.4) που εισήχθησαν ή 4, ή 12, ή 28, ή 40 ριβονουκλεοτίδια (**Homann κ.α., 1994**), ή μεταξύ των θέσεων N(2.1) και C(3) ένα C, ή μεταξύ των θέσεων C(11.1) και G(12) δυο AA (**Sheldon και Symons, 1989**).

3) αντικαταστάθηκαν από άλλα ριβονουκλεοτίδια όπως τα G(10.2)-C(11.2) από C(10.2)-G(11.2) ή U(10.2)-A(11.2) (**Fu κ.α., 1994**), ή τα G(10.1) έως και C(11.1) από UUUU, ή UGAC, ή CUCC (**Long και Uhlenbeck, 1994, McCall κ.α., 1992**), ή A(6), A(9) και A(13) από G (**Ng κ.α., 1994**), ή G(5) από I (Inosine) (**Odai κ.α., 1990**), ή των G(10.1)-C(11.1) από οποιοδήποτε συνδυασμό τους με ή από τα υπόλοιπα ριβονουκλεοτίδια, ή των C(3), U(4), G(5), A(6), U(7), G(8), A(9), G(12), A(13) και A(14) από οποιοδήποτε άλλο ριβονουκλεοτίδιο στην κάθε θέση (**Ruffner κ.α., 1990**).

4) αντικαταστάθηκαν από τα αντίστοιχα δεσοξυ-ριβονουκλεοτίδια όπως στις θέσεις U(4), G(5), A(6), G(8), A(9), G(12), A(13) και A(14) (**Perreault κ.α., 1990**), ή συνδυασμοί μεταξύ των παραπάνω θέσεων (**Perreault κ.α., 1991**), ή στις θέσεις G(5), G(8), G(11.3) και

G(12) (**Williams κ.α., 1992**), ή όλα τα ριβονουκλεοτίδια της έλικας II εκτός αυτών στις θέσεις G(5), A(6), G(8), A(9) και A(14) (**Yang κ.α., 1992**).

5) αντικαταστάθηκε το 2'-OH ορισμένων ριβονουκλεοτιδίων από 2-φθόρο ή 2-αμινο όπως στις θέσεις U(4), U(7), C(10.3), C(10.4), C(11.1) και C(11.2) (**Heidenreich κ.α., 1994**), ή των A(6), A(9) και A(13) (**Ng κ.α., 1994**), ή όλων των ουριδινών ή όλων των κυτιδινών της έλικας II (**Pieken κ.α., 1991**), ή στις θέσεις G(5), G(8), G(11.3) και G(12) (**Williams κ.α., 1992**), ή 2-O-βουτυλο όπως στις θέσεις G(10.1)-C(11.1) και G(10.2)-C(11.2) (**Fu κ.α., 1994**), ή 2-O-αλλυλο ή 2-μεθυλο όπως στις θέσεις G(10.1) έως και C(11.1), ή C(3) έως και C(10.4), ή G(11.4) έως και A(14), ή A(6) έως και C(11.2) (**Paollela κ.α., 1992**).

6) αντικαταστάθηκε ο φώσφορος των υπαρχόντων ριβονουκλεοτιδίων από θειοφώσφορο όπως στις θέσεις C(3), A(9), A(13) και A(14) (**Ruffner και Uhlenbeck, 1990**), ή C(3), U(4), G(5), G(8), G(10.1) έως και C(11.1) (**Shimayama κ.α., 1993**).

7) αντικαταστάθηκαν ριβονουκλεοτίδια από μη νουκλεοσιδικούς συνδέτες (non-nucleoside linkers), όπως στις θέσεις C(10.3) έως G(11.3) από εξα-αιθυλενιο γλυκόλη (hexaethylene glycol) ή τριαιθυλένιο γλυκόλη (triethylene glycol) ή 1,3-προπανεδιόλη (1,3-propanediol) (**Fu κ.α., 1994, Thomson κ.α., 1993**).

Σε καμμία των περιπτώσεων δεν είχαμε αύξηση της καταλυτικής ενεργότητας του ριβοενζύμου, αλλά αντίθετα στις περισσότερες από αυτές είχαμε από μέτρια έως σημαντική πτώση της. Αναγνωρίστηκε όμως η σημασία του 2'-OH των νουκλεοτιδίων A(9) και G(5), δηλαδή στη θέση 9 και 5 αντίστοιχα, καθώς και των φωσφόρων των A(9), A(13) και A(14). Πιθανόν να συμμετέχουν στην σωστή αναδίπλωση του ριβοενζυμικού μορίου ώστε να σχηματιστεί η σφυροκέφαλη δομή ή/και να δεσμευθεί και συντονισθεί το Mg^{2+} ώστε να πραγματοποιηθεί η καταλυτική αντίδραση. Η αντικατάσταση δε του 2'-OH ορισμένων ριβονουκλεοτιδίων από 2-φθόρο ή 2-αμινο ή 2-O-βουτυλο ή 2-O-αλλυλο ή 2-μεθυλο νουκλεοτίδια, συντέλεσε στην αυξημένη αντοχή του ριβοενζύμου στις ριβονουκλεάσες που δοκιμάστηκαν, γεγονός που ίσως να βοηθήσει στο σχεδιασμό και κατασκευή ανθεκτικότερων καταλυτικών RNA στις μελλοντικές *in vivo* εφαρμογές. Παρόλα αυτά, το γενικότερο συμπέρασμα είναι ότι η φύση έχει ήδη σχεδιάσει και κατασκευάσει ή επιλέξει από μόνη της την καλύτερη δυνατή έλικα II της σφυροκέφαλης δομής, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη καταλυτική ικανότητα του αντίστοιχου ριβοενζύμου.

B) ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΣΤΗ ΘΕΣΗ-ΣΤΟΧΟ

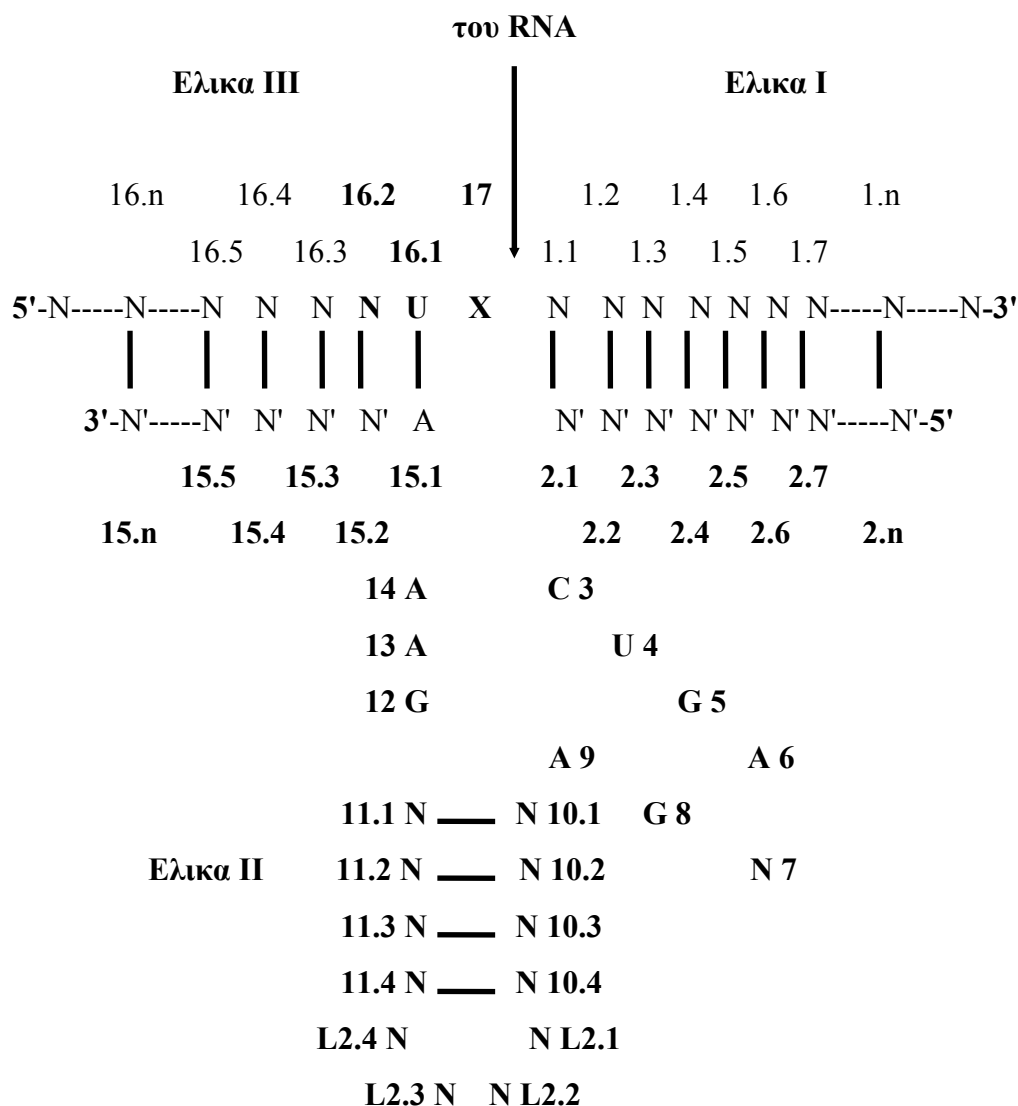
Ενας άλλος παράγοντας που βρέθηκε να επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης διάσπασης είναι η τριπλέτα νουκλεοτιδίων στο υπόστρωμα-RNA που χαρακτηρίζουν τη θέση-στόχο του ριβοενζύμου. Η τριπλέτα αυτή ορίζεται από τον τύπο NUX, όπου N= A, G, C, U και X= A, C, U, όπως δείχθηκε από τα πειράματα των **Koizumi κ.α. (1988, 1989)**, **Koizumi και Ohtsuka, (1991)**, **Ruffner κ.α., (1990)**. Πιο συγκεκριμένα, αντικατάσταση του κεντρικού νουκλεοτιδίου U, που αντιστοιχεί στη θέση 16.1 σύμφωνα με το διεθνές σύστημα αρίθμησης, από οποιοδήποτε άλλο, είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της αντίδρασης διάσπασης, ενώ η παρουσία G στη θέση 17 απέδειξε ότι η 2-αμινομάδα αυτού του νουκλεοτιδίου δεν ευνοούσε επίσης την διάσπαση. Καμμία αναστολή δεν παρατηρήθηκε όταν τηρούνταν οι δυο προηγούμενες προϋποθέσεις και το νουκλεοτίδιο N (16.2) ήταν οποιοδήποτε από τα A, G, C ή U. Στις περισσότερες των περιπτώσεων στη φύση στη θέση αυτή συναντάται GUC (**Bruening, 1989**). Άλλες τριπλέτες που έχουν βρεθεί ότι μπορούν να βρίσκονται στη θέση αυτή είναι οι GUA, GUU, CUA, CUC, UUC, AUA, AUU και AUC (**Dahm και Uhlenbeck, 1991**, **Koizumi κ.α., 1988 α), β)**, **Nakamaye και Eckstein, 1994**, **Perriman κ.α., 1992**, **Ruffner κ.α., 1990**), αλλά με διαφορετική αποτελεσματικότητα κάθε φορά, με αποκορύφωμα τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στην περίπτωση της AUC. Βρέθηκε δηλαδή, ότι στα πειράματα των **Perriman κ.α (1992)** δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί διάσπαση, ενώ ωρύτερα στα πειράματα των **Ruffner κ.α. (1990)**, είχε παρατηρηθεί το αντίθετο και μάλιστα σε ικανοποιητικό βαθμό. Η ουσιαστικότερη διαφορά μεταξύ των δυο αυτών μελετών, ήταν η διαφορετική κάθε φορά νουκλεοτιδική ακολουθία εκατέρωθεν της θέσης-στόχου. Μέχρι σήμερα δεν έχει δοθεί ιδιαίτερη βαρύτητα σ' αυτό το θέμα και ελάχιστες προσπάθειες έχουν γίνει ώστε να διελευκανθεί ο ρόλος της φύσεως των νουκλεοτιδίων εκατέρωθεν της θέσης-στόχου (**Fedor και Uhlenbeck, 1990, 1992**, **Ruffner κ.α., 1989**, **Heus κ.α., 1990**). Το συμπέρασμα στο οποίο καταλήγουν είναι ότι, οι διαφορές που παρατηρούνται στην αποτελεσματικότητα της αντίδρασης διάσπασης, οφείλονται κατά κύριο λόγο στη δημιουργία δευτεροταγών δομών, όχι μόνο στο υπόστρωμα-RNA, αλλά και στο μόριο του ριβοενζύμου, με αποτέλεσμα τον πολύ αργό ή μη σχηματισμό σταθερού συμπλόκου μεταξύ των δύο μορίων RNA.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ

Η εργασία των **Haseloff και Gerlach (1988)** καθώς και εκείνων, που όριζαν τους περιορισμούς στην δομή της έλικας II και την θέση-στόχο από τον τύπο NUX, φανέρωσαν ότι υπήρχαν περιορισμένες απαιτήσεις συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, που θα επέτρεπαν το σχεδιασμό και κατασκευή σφυροκέφαλων ριβοενζύμων κατευθυνόμενων ενάντια σε οποιοδήποτε υπόστρωμα-RNA, αλλά και οποιασδήποτε θέσης-στόχου. Το μόνο λοιπόν που χρειάζεται (**Σχήμα 11**), είναι να επιλεγεί μια θέση του τύπου NUX σε ένα μόριο RNA. Τότε το κατάλληλο ριβοένζυμο, γι' αυτή τη θέση-στόχο του υποστρώματος και το συγκεκριμένο υπόστρωμα-RNA, μπορεί να κατασκευαστεί αποτελούμενο από τρεις περιοχές: **α)** την περιοχή που σχηματίζει την έλικα I και περιλαμβάνει τα νουκλεοτίδια 2.1-2.v, που είναι συμπληρωματικά των νουκλεοτιδίων 1.1-1.v του υποστρώματος-RNA, **β)** την καταλυτική περιοχή που περιλαμβάνει τα νουκλεοτίδια 3-14 και **γ)** την περιοχή που σχηματίζει την έλικα III και περιλαμβάνει τα νουκλεοτίδια 15.1-15.v, που είναι συμπληρωματικά των νουκλεοτιδίων 16.1-16.v του υποστρώματος-RNA. Η εξειδίκευση των ριβοενζύμων για το συγκεκριμένο υπόστρωμά τους, πηγάζει από τους αντικωδικούς βραχίονες που συμμετέχουν στο σχηματισμό των ελίκων I και III και περιβάλλουν την καταλυτική περιοχή. Μέσω αυτών των βραχιόνων θα γίνει η αρχική αναγνώριση και δέσμευση του ριβοενζύμου στο υπόστρωμα, ώστε να τοποθετηθεί και να σχηματισθεί σωστά η σφυροκέφαλη δομή που θα επιτρέψει την διάσπαση του υποστρώματος-RNA στην προεπιλεγμένη θέση-στόχο.

Ο τρόπος κατασκευής όμως, με βάση την μέθοδο των **Haseloff και Gerlach (1988)**, παρουσίαζε το βασικό μειονέκτημα ότι, για κάθε εφαρμογή, έπρεπε να συντίθεται με χημική αντίδραση η μήτρα του DNA που ήταν απαραίτητη για την παρασκευή του ριβοενζύμου. Μια τέτοια διαδικασία απαιτεί αρκετό κόπο και χρόνο, αλλά έχει και αρκετές τεχνικές δυσκολίες, ειδικά όταν οι αντικωδικοί βραχίονες έπρεπε να έχουν αρκετά μεγάλο μήκος, για να επιτυγχάνεται ακριβέστερος και πληρέστερος σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ ριβοενζύμου και υποστρώματος και διάσπασης στην θέση-στόχο. Μια σημαντική τεχνική βελτίωση σ' αυτόν τον τομέα αποτέλεσε η εργασία των **Tabler και Tsagris (1991)**. Μια τέτοια μεθοδολογία εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι, η θέση-στόχος που είναι του τύπου NUX, μπορεί να αποτελεί μέρος της ακολουθίας αναγνώρισης ενός περιοριστικού ενζύμου. Έτσι είναι δυνατόν να μετατραπεί ένα κλωνοποιημένο cDNA κομμάτι, του οποίου η θέση-στόχος

Θέση διάσπασης



Σχήμα 11. Σχεδιασμός σφυροκέφαλου ριβοενζύμου ενάντια σε οποιαδήποτε θέση-στόχο του τύπου NUX του υποστρώματος-RNA, όπου φαίνονται οι σχηματιζόμενες έλικες I, II και III και η αρίθμηση των νουκλεοτιδίων που παίρνουν μέρος στον σχηματισμό της δομής, σύμφωνα με το σύστημα αρίθμησης των **Hertel κ.α. (1992)**. Διακρίνονται στο υπόστρωμα-RNA με έντονα γράμματα, τα νουκλεοτίδια NUX της θέσης-στόχου καθώς και τα νουκλεοτίδια N, που είναι απαραίτητα για την πρόσδεση στα συμπληρωματικά τους N' του ριβοενζύμου. Διακρίνονται επίσης στην έλικα II, τα συντηρημένα και μη συντηρημένα νουκλεοτίδια (3-14) της περιοχής που προσδίδει τις καταλυτικές ιδιότητες στο μόριο του RNA. Το βέλος δείχνει την θέση διάσπασης του υποστρώματος-RNA αμέσως μετά το νουκλεοτίδιο X στην θέση 17 (X 17).

είναι μέρος μίας αλληλουχίας αναγνώρισης, σε μία ριβοενζυμική κατασκευή με την ενσωμάτωση της κατάλληλης DNA "κασσέτας" (σύμπλοκο δύο ολιγονουκλεοτιδίων) σ' αυτή

την περιοριστική θέση. Αυτό μπορεί να εφαρμοσθεί για 20 περίπου διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα. Περισσότερες λεπτομέρειες αναφέρονται στο κεφάλαιο "Υλικά και Μέθοδοι", αφού η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόστηκε για την κατασκευή των ριβοενζύμων της παρούσας διατριβής. Παρατηρούμε λοιπόν, ότι ενώ μέχρι σήμερα δεν είναι ακόμα δυνατόν να σχεδιαστεί και να κατασκευαστεί *de novo* ένα πρωτεϊνικό ένζυμο, τα ριβοένζυμα αντίθετα μπορούν να σχεδιαστούν, κατασκευαστούν ή τροποποιηθούν με πολλούς τρόπους έτσι ώστε να είναι ικανά να πετυχαίνουν το στόχο τους, δηλαδή την καταλυτική διάσπαση του υποστρώματός τους.

ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ

Τα σφυροκέφαλα ριβοένζυμα λοιπόν, μπορούν να θεωρηθούν σαν ειδικά αντικωδικά (antisense) RNA, που μεταφέρουν και μια συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία που τους προσδίδει καταλυτικές ιδιότητες. Δεσμεύονται στο RNA-στόχο τους σαν τα αντικωδικά RNA, μέσω ζευγαρώματος συμπληρωματικών βάσεων, αλλά επιπλέον έχουν την ικανότητα να διασπούν το RNA κατά τρόπο μη αντιστρέψιμο. Αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό τους είναι δε, η ικανότητά τους να δρουν καταλυτικά όπως τα συνηθισμένα πρωτεϊνικής φύσεως ένζυμα. Από τη στιγμή δηλαδή, που το ίδιο το μόριο του ριβοενζύμου δεν τροποποιείται κατά την διάρκεια της αντίδρασης, μπορεί να καταλύει την αντίδραση διάσπασης πολλών μορίων υποστρώματος-RNA. Δρα σαν μια ενδονουκλεάση υψηλής εξειδίκευσης, οι αντιδράσεις της οποίας μπορούν να περιγραφούν από κινητικές του τύπου Michaelis-Menten (**Hertel κ.α., 1994**).

Τα κρίσιμα στάδια της αντίδρασης είναι τρία:

1) Το πρώτο είναι η δέσμευση του ριβοενζύμου στο υπόστρωμα-RNA με τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματιστούν στο σύμπλοκο οι περιοχές των ελίκων I και III και τελικώς να δημιουργηθεί η καταλυτικά ενεργή μορφή της σφυροκέφαλης δομής.

2) Το δεύτερο είναι η πραγματοποίηση της αντίδρασης διάσπασης του συγκεκριμένου χημικού δεσμού που στοχεύεται, οι περιορισμοί της οποίας συζητήθηκαν παραπάνω, όταν αναλύθηκε η δομή της έλικας II και της NUX θέσης-στόχου.

3) Το τρίτο είναι η αποδέσμευση του ριβοενζύμου από τα προϊόντα διάσπασης με ταυτόχρονη αποδιάταξη των ελίκων I και III, ώστε το μόριο του ριβοενζύμου να μπορεί να συμμετέχει στην αντίδραση διάσπασης και άλλου μορίου υποστρώματος-RNA.

Η δέσμευση του ριβοενζύμου με το υπόστρωμά του και ο σχηματισμός του κατάλληλου συμπλόκου είναι ίσως το κρισιμότερο βήμα για την εξέλιξη της περαιτέρω διαδικασίας. Προφανώς, εάν δεν υπάρχει δέσμευση, δεν θα παρατηρηθεί το αποτέλεσμα της δράσης του ριβοενζύμου. Εάν οι αντικωδικοί βραχίονες του ριβοενζύμου είναι μεγάλοι σε μήκος, πάνω από 20 νουκλεοτίδια ο καθένας, τότε ναί μεν είναι δυνατόν να δεσμευθούν τα δυο μόρια RNA, αλλά για τον σχηματισμό του συμπλόκου τους θα απαιτηθεί η αποδιάταξη μιας ή περισσοτέρων ενδομοριακών δευτεροταγών δομών με ταυτόχρονη κατανάλωση ενέργειας. Εάν και τα δυο μόρια είναι μικρά τότε το πρόβλημα αμβλύνεται αρκετά. Οξύνεται όμως, αν το ένα από τα δύο αλληλεπιδρώντα μόρια RNA είναι αρκετά μακρύ, με υψηλό βαθμό πολυπλοκότητας των δομών που μπορεί να σχηματιστούν σ' αυτό (**Bertrand κ.α., 1994, Goodchild και Kohli, 1991, Hertel κ.α 1994**). Ένας τέτοιος περιορισμός θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη όταν η τεχνολογία των ριβοενζύμων πρόκειται να εφαρμοσθεί *in vivo*. Το ριβοένζυμο θα πρέπει να σχεδιασθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι ικανό να ανταπεξέλθει τις δευτεροταγείς δομές του υποστρώματος-RNA, για να είναι ικανό να πραγματοποιήσει την διάσπαση στη θέση-στόχο του μορίου αυτού. Μια πρώτη προσέγγιση για τη λύση του προβλήματος αυτού ήρθε από τους **Sczakiel κ.α. (1993)**. Ανέπτυξαν μια μεθοδολογία, με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, που μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες όσον αφορά την καλύτερη περιοχή, δηλαδή με τις λιγότερο δυνατές και πολύπλοκες δευτεροταγείς δομές, στην οποία θα έπρεπε να αναζητηθεί μια θέση-στόχος για το αντίστοιχο ριβοένζυμο. Αλλά και το πρόβλημα σε σχέση με το μήκος των αντικωδικών βραχιόνων έχει αρχίσει να αντιμετωπίζεται με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Πρόσφατα, ο **Tabler και οι συνεργάτες του (1994)**, ανέφεραν ότι τα ριβοένζυμα μπορούν να σχεδιαστούν με ένα διαφορετικό τρόπο. Η περιοχή της έλικας I, μπορεί να σχηματιστεί από τρία μόνο ζευγάρια βάσεων μεταξύ ριβοενζύμου και υποστρώματος, χωρίς να έχουμε απώλεια της αποτελεσματικότητας με την οποία πραγματοποιείται η διάσπαση του υποστρώματος-RNA. Μπορούμε επομένως να έχουμε ένα μόριο ριβοενζύμου με μια αρκετά μακριά έλικα III, που θα εξασφαλίσει τη δέσμευση με το υπόστρωμα και μια πολύ κοντή έλικα I, αναγκαία να σταθεροποιήσει την σφυροκέφαλη δομή γύρω από τη θέση-στόχο. Τέτοιου τύπου ριβοένζυμα ονομάστηκαν "ασύμμετρα σφυροκέφαλα ριβοένζυμα", σε αντίθεση με τα "καταλυτικά αντικωδικά RNA" που έχουν πολύ μακριές έλικες I και III. Σημαντική όμως, είναι και η συμβολή της εργασίας των **Rittner κ.α. (1993)** στην αντιμετώπιση του προβλήματος δέσμευσης του ριβοενζύμου με το υπόστρωμα-RNA. Η τεχνική τους επιτρέπει την επιλογή *in vitro* γρήγορα υβριδοποιούμενων μορίων RNA από ένα μεγάλο σύνολο μορίων RNA, που έχουν το ίδιο 5'

άκρο. Μια τέτοια μεθοδολογία θα μπορούσε να εφαρμοσθεί και στα ασύμμετρα ριβοένζυμα. Θα βοηθούσε δηλαδή, στην επιλογή του μορίου εκείνου, που το μήκος της έλικας III του επιτρέπει γρήγορη υβριδοποίηση με το υπόστρωμα-RNA, από ένα σύνολο ασύμμετρων RNA που έχουν το ίδιο 5' άκρο, δηλαδή την έλικα I, αλλά διαβαθμιζόμενο μήκος της έλικας III.

Το τελευταίο στάδιο της όλης αντίδρασης διάσπασης, θα μπορούσε να είναι η αποδέσμευση του ριβοενζύμου από τα δυο προϊόντα διάσπασης του υποστρώματος, έτσι ώστε να συμμετέχει στην αντίδραση διάσπασης ενός δεύτερου μορίου RNA-στόχου. Για να γίνει όμως αυτό, θα πρέπει η δέσμευση μεταξύ των δυο αλληλεπιδρώντων μορίων RNA, στις περιοχές σχηματισμού των ελίκων I και III μέσω των συμπληρωματικών τους βάσεων, να είναι αρκετά χαλαρή. Εναλλακτικά, η αποδιάταξη ενός τέτοιου συμπλόκου θα μπορούσε να επιβοηθηθεί από μια ενζυμική ενεργότητα, ανάλογη αυτής που έχει βρεθεί σε ορισμένα ευκαρυωτικά κύτταρα, όταν χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία των αντικωδικών RNA για γονιδιακή καταστολή (**Helene και Toulme, 1990**). Πρόσφατα, δημοσιεύθηκε μια διεξοδική μελέτη της αντίδρασης διάσπασης *in vitro* (**Hertel κ.α., 1994**). Παρατηρήθηκε ότι για ένα ριβοένζυμο που είχε 8 νουκλεοτίδια εκατέρωθεν της κεντρικής καταλυτικής περιοχής, μέσω των οποίων δεσμευόταν με το υπόστρωμά του, η αποδέσμευση του ριβοενζύμου από τα προϊόντα της αντίδρασης ήταν ο περιοριστικός παράγοντας για να συμμετέχει το ριβοένζυμο σ' ένα δεύτερο κύκλο αντίδρασης, τουλάχιστον σε υψηλότερες συγκεντρώσεις των προϊόντων RNA. Αυτό σημαίνει ότι, όχι μόνο για την επίτευξη δέσμευσης μεταξύ ριβοενζύμου και υποστρώματος, αλλά και της αποδέσμευσης του ριβοενζύμου από τα προϊόντα, το μήκος των αντικωδικών βραχιόνων θα πρέπει να επιλεγεί και να σχεδιασθεί με ιδιαίτερη προσοχή. Μόνο έτσι θα επιτυγχάνεται το μέγιστο δυνατό αποτέλεσμα, όχι μόνο *in vitro*, αλλά και *in vivo* που ενδιαφέρει και περισσότερο σε μελλοντικές εφαρμογές.

ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ *IN VIVO*

Παράλληλα με τις *in vitro* μελέτες της δράσης των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων και της διελεύκανσης του μηχανισμού με τον οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση διάσπασης, τα

τελευταία χρόνια έγιναν και *in vivo* πειράματα ώστε να διερευνηθεί η δυνατότητα εφαρμογής μιας τέτοιας τεχνολογίας στην ρύθμιση έκφρασης διαφόρων γονιδίων αλλά και στην αντιική προστασία.

1) IN VIVO ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΠΟΥ ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥΣ ΗΤΑΝ ΤΟ RNA ΤΟΥ HIV-1

Ειδικά η περίπτωση της αντιικής προστασίας, απέσπασε το ενδιαφέρον των περισσότερων ερευνητών, στην προσπάθειά τους για την καταπολέμηση του ιού που προκαλεί το σύνδρομο του AIDS, γι' αυτό και οι περισσότερες *in vivo* εφαρμογές που έχουν δημοσιευθεί αφορούν αυτό το πρόβλημα.

Η πρώτη δημοσίευση που ανέφερε επιτυχή αποτελέσματα αναστολής της αντιγραφής του HIV-1 ήταν αυτή των **Sarver κ.α. (1990)**. Χρησιμοποιώντας τον υποκινητή της ανθρώπινης-β-ακτίνης, το ριβοένζυμο που στόχευε το γονίδιο *gag* του HIV-1, εκφραζόταν από ένα πλασμίδιο. Με τη βοήθεια λιποσωμάτων το πλασμίδιο εισερχόταν στα κύτταρα HeLa CD4⁺, τα οποία μόνο αν έκφραζαν το αντι-HIV-1 *gag* ριβοένζυμο, ήταν σαφώς λιγότερο επιδεκτικά στον πολλαπλασιασμό του HIV-1, γεγονός που δείχθηκε με την σημαντική μείωση των επιπέδων του HIV-1 *gag* RNA και του αντίστοιχου αυτού p24 αντιγόνου.

Η σημασία της χρήσης του κατάλληλου υποκινητή στην αποτελεσματική παραγωγή ριβοενζύμου στο κύτταρο, δείχθηκε από την εργασία των **Weerasinghe κ.α. (1991)**. Δοκιμάστηκαν διάφοροι ευκαρυωτικοί υποκινητές για να εκφράσουν το ριβοένζυμο στην 5' καθοδηγητική (leader) περιοχή του HIV-1 σε ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα (κύτταρα MT4). Οι υποκινητές της θυμιδικής κινάσης (thymidine kinase) του ιού HSV (Herpes Simplex Virus), του κυτταρομεγαλοϊού (cytomegalovirus) και του SV40 (Simian Virus), εξέφραζαν σε ικανοποιητικά επίπεδα το ριβοένζυμο, το οποίο όμως συνέβαλε στη μέτρια ελάττωση του ρυθμού αντιγραφής του HIV-1 και καθυστέρησε την παραγωγή ιοσωμάτων μέχρι και 14 ημέρες.

Η περιοχή *gp120* του mRNA του γονιδίου *env* του HIV-1 επιλέχθηκε επίσης σαν στόχος του ριβοενζύμου (**Chen κ.α., 1992**). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα πλασμίδιο που έκφραζε από 1 μέχρι 9 διαφορετικά ριβοένζυμα συγχρόνως σε HeLa T4 κύτταρα, με τη βοήθεια του SV40-, HIV-1 LTR- ή β-ακτίνης υποκινητή. Η δράση του τέτρα-, πέντα- ή εννέα- ριβοενζύμου είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική αναστολή της αντιγραφής

του HIV-1, όπως αυτή μετρήθηκε από την απελευθέρωση του αντιγόνου p24, ενώ παράλληλα υπήρχε δραστική μείωση του σχηματισμού συγκιτιών.

Αποτυχημένη μπορεί να χαρακτηριστεί η προσπάθεια των **Lo κ.α. (1992)**, αν συγκριθεί το αποτέλεσμα της δράσης των αντικωδικών (antisense) RNA με αυτό των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων, αφού το RNA που ήταν συμπληρωματικό (antisense) της περιοχής tat του HIV-1 RNA, ανέστειλε καλύτερα από το αντίστοιχο ριβοένζυμο ενάντια στην ίδια περιοχή, την αντιγραφή του HIV-1 σε ανθρώπινα T-κύτταρα.

Θετικό ήταν όμως το αποτέλεσμα των πειραμάτων των **Crissel κ.α. (1993)**, όπου τρία σφυροκέφαλα ριβοένζυμα, με μακρείς αντικωδικούς βραχίονες των 33 νουκλεοτιδίων ο καθένας, είτε 45 ο ένας και 70 ο άλλος, είτε 45 ο ένας και 564 ο άλλος, ήταν καλύτεροι αναστολείς της αντιγραφής του HIV-1 σε ανθρώπινα T-κύτταρα, σε σύγκριση με άλλα ριβοένζυμα, όπου το μήκος των βραχιόνων ήταν 9, ή 12, ή 15, ή 18, ή 21, ή 24, ή 27, ή 30 νουκλεοτίδια ο καθένας. Παραδόξως, η *in vitro* ικανότητα διάσπασης του υποστρώματος από τα μεγάλα σε μήκος ριβοένζυμα ήταν ασθενέστερη από αυτή των βραχύτερων. Το αντικωδικό RNA, που στην περίπτωση αυτή ήταν το ίδιο το ριβοένζυμο, αλλά μεταλλαγμένο ώστε να είναι ανενεργό, ήταν τελείως αναποτελεσματικό. Δυο ακόμα μελέτες στις οποίες οι αντικωδικοί βραχίονες του ριβοενζύμου ήταν επίσης αρκετά μεγάλοι σε μήκος, έδειξαν επιτυχή αποτελέσματα στην αναστολή της αντιγραφής του HIV-1. Στην πρώτη (**Dropulich κ.α., 1992**), στοχεύθηκε επιτυχώς μια περιοχή του HIV-1 RNA, τόσο όταν ο στόχος του ριβοενζύμου (υπόστρωμα) και το ριβοένζυμο βρίσκονταν στο ίδιο μόριο RNA (*in cis* αντίδραση) όσο και όταν υπόστρωμα-RNA και ριβοένζυμο ήταν διαφορετικά μόρια (*in trans* αντίδραση). Χρησιμοποιώντας ένα ριβοένζυμο με 16 και 200 νουκλεοτίδια μήκος αντικωδικών βραχιόνων αντίστοιχα, κατάφεραν να καταστείλουν την αντιγραφή του ιού σε ανθρώπινα T-κύτταρα. Στη δεύτερη (**Homann κ.α., 1993**), κατασκευάστηκε ένα ριβοένζυμο με μήκος αντικωδικών βραχιόνων 282 και 131 νουκλεοτίδια αντίστοιχα ο καθένας. Αυτό το καταλυτικό αντικωδικό RNA στόχευε την περιοχή *gag* του HIV-1 σε κύτταρα SW480. Παρατηρήθηκε μείωση της αντιγραφής του ιού, η οποία μάλιστα ήταν κατά 4 έως 7 φορές μεγαλύτερη της αντίστοιχης μείωσης, που σημειώθηκε από την έκφραση μεταλλαγμένου ανενεργού ριβοενζύμου. Οι παραπάνω μελέτες αποτελούν τις πρώτες επιτυχείς προσπάθειες, όπου για την κατασκευή των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων χρησιμοποιήθηκαν μεγάλοι σε μήκος αντικωδικοί βραχίονες εκατέρωθεν της καταλυτικής περιοχής. Παρόλα αυτά όμως δεν μπορούμε να εξάγουμε γενικότερα συμπεράσματα για το μήκος των βραχιόνων στον εκάστοτε σχεδιασμό ενός ριβοενζύμου.

Μια από τις πρώτες δημοσιεύσεις, όπου χρησιμοποιήθηκε ένα προκαρυωτικό σύστημα για την μελέτη της δράσης των ριβοενζύμων, με ταυτόχρονη ανίχνευση ενός από τα προϊόντα της διάσπασης του υποστρώματος, ήταν αυτή των **Sioud και Drlica (1991)**. Ένα σφυροκέφαλο ριβοένζυμο που στόχευε το mRNA της ιντεγράσης ή ενσωματάσης (integrase) του HIV-1, όταν εκφραζόταν από ένα πλασμίδιο σε ένα στέλεχος του βακτηρίου *E.coli*, που παρήγαγε την ενσωματάση, κατέστειλε την παραγωγή του mRNA στόχου του καθώς και της πρωτεΐνης που παραγόταν απ' αυτό. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε όταν το πλασμίδιο έκφραζε το αντικωδικό RNA, δηλαδή μόνο την περιοχή που αντιστοιχούσε στους αντικωδικούς βραχίονες του ριβοενζύμου.

Σημαντικότερη όμως ήταν η παρατήρηση ότι η δράση του ριβοενζύμου είχε το ίδιο ανασταλτικό αποτέλεσμα σε στέλεχος της *E.coli*, που δεν έκφραζε το γονίδιο της ριβονουκλεάσης III (RNase III). Ενισχύθηκε έτσι η άποψη, ότι η αναστολή ήταν αποτέλεσμα διάσπασης του RNA-στόχου από το ριβοένζυμο και όχι λόγω της αντικωδικής του περιοχής. Η RNase III, έχοντας εξειδίκευση για δίκλινα μόρια RNA, πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για την αναστολή της γονιδιακής έκφρασης με την χρήση αντικωδικών RNA στους προκαρυωτικούς οργανισμούς (**Krinke και Wulff, 1990**).

2) IN VIVO ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΠΟΥ ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥΣ ΗΤΑΝ ΤΟ RNA ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ Ή ΑΛΛΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Εκτός από το HIV-1 RNA, άλλα σημαντικά γονίδια, όπως αυτά που εμπλέκονται στην ογκογένεση και τον καρκίνο καθώς επίσης και το RNA γονιδίων ιδιαίτερης σημασίας, έχουν επιλεγεί σαν στόχος των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων. Όπως, τα δυο mRNA που παράγονται από την ένωση των δυο γονιδίων *BCR/ABL* που είναι η αιτία της χρόνιας μυελογενετικής λευχαιμίας (CML). Χρησιμοποιώντας κοντά συνθετικά ριβοένζυμο που στόχευαν αυτά τα mRNA και με τη βοήθεια λιποσωμάτων, τα εισήγαγαν σε CML κυτταρική γραμμή K562 που έκφραζε αυτά τα γονίδια. Η έκφραση της κινάσης της τυροσίνης, που παράγονταν από τα mRNA και είναι υπεύθυνη για τον κακοήγη κυτταρικό φαινότυπο, μειώθηκε μετά από 72 ώρες στο 23% παρουσία ριβοενζύμου και στο 43% παρουσία μεταλλαγμένου ανενεργού ριβοενζύμου (**Lange κ.α., 1994**).

Τα ριβοένζυμο θεωρήθηκαν υπεύθυνα για την αλλαγή της μορφολογίας και του τρόπου ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων από ανθρώπινη ουροδόχο κύστη σε κυτταρική καλλιέργεια και του κακοήθους δυναμικού τους σε ποντίκια, μετά από διουριθρική

εμφύτευση. Εκφραζόμενο από τον κατάλληλο φορέα έκφρασης μέσα στα κύτταρα, το ριβοένζυμο είχε σαν αποτέλεσμα την σχεδόν διπλάσια αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των συγκεκριμένων ποντικών (**Kashani κ.α., 1992**). Η ίδια ερευνητική ομάδα δημοσίευσε, ότι παρουσία ριβοενζύμου επιτεύχθηκε αντιστροφή του νεοπλασματικού φαινοτύπου κυττάρων NIH3T3 από ποντίκι, στα οποία είχε εισαχθεί DNA από FEMX-1 ανθρώπινα μελανωματικά κύτταρα που έκφραζαν το ενεργοποιημένο *H-ras* γονίδιο. Αντίθετα, παρουσία μεταλλαγμένου ανενεργού ριβοενζύμου η αλλαγή της ανάπτυξης των κυττάρων και η ογκογεννητικότητα ήταν λιγότερο δραματικές (**Kashani κ.α., 1994**). Αξιόλογη ήταν και η μελέτη των **Sioud κ.α. (1992)**, οι οποίοι χρησιμοποίησαν σφυροκέφαλο ριβοένζυμο ενάντια στο mRNA του Tumour Necrosis Factor (TNF α) σε ανθρώπινα κύτταρα προμυελοκυτικής λευχαιμίας (HL60). Το ριβοένζυμο όμως είχε στο 3' άκρο του την νουκλεοτιδική αλληλουχία λήξης της μεταγραφής του βακτηριοφάγου T7, έτσι ώστε να είναι ανθεκτικότερο στις νουκλεάσες που αποικοδομούν RNA από το 3' άκρο του μορίου. Εισαγωγή στα κύτταρα, μέσω κατιονικών λιποσωμάτων, του *in vitro* μεταγραμμένου ενεργού ριβοενζύμου, ελάττωσε το TNF α mRNA στο 10% και της αντίστοιχης πρωτεΐνης στο 15%. Παρουσία αντικωδικού RNA το mRNA ελαττώθηκε στο 60% και η πρωτεΐνη στο 40%. Ακολουθώντας την ίδια στρατηγική στην έρευνά τους, δηλαδή την χρήση συγκεκριμένων προκαρυωτικών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που δρουν σαν σταθεροποιητικές δομές, τόσο στο 5' όσο και στο 3' άκρο του RNA μορίου, οι **L'Huillier κ.α. (1992)** είχαν σημαντικά αποτελέσματα. Στοχεύοντας με σφυροκέφαλο ριβοένζυμο το mRNA της α -γαλακτοσφαιρίνης σε ποντικίσια μαστοκύτταρα (C127I), παρατήρησαν ελάττωση του mRNA κατά 60-80% με παράλληλη μείωση των αντίστοιχων επιπέδων πρωτεΐνης, όταν ο λόγος mRNA-στόχου προς ριβοένζυμο ήταν 1/1000 και όχι χαμηλότερη. Τέτοιες υψηλές αναλογίες είναι χαρακτηριστικές στις περισσότερες *in vivo* εφαρμογές. Αλλαγή στα επίπεδα του mRNA δεν παρατηρήθηκε όταν στο κύτταρο εκφραζόταν το ανενεργό ριβοένζυμο.

Το mRNA των δύο ρυθμιστικών πρωτεϊνών Rex και Tax του ιού λευχαιμίας των βοοειδών (Bovine Leukemia Virus, BLV), αποτέλεσε στόχο σφυροκέφαλου ριβοενζύμου, που εκφραζόταν από πλασμίδιο σε πνευμονικά κύτταρα μολυσμένα με τον ιό (**Cantor κ.α., 1993**). Επιβεβαιώθηκε και εδώ η διάσπαση του mRNA, κάτι σχετικά δύσκολο στις *in vivo* εφαρμογές, χρησιμοποιώντας την τεχνική της αντιστροφής μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ενώ η έκφραση της ιικής πρωτεΐνης p24 αναστάλθηκε κατά 61% και της αντιστροφής μεταγραφάσης του κατά 92%.

Με σκοπό να μελετηθεί ο ρόλος του προϊόντος Fos του πρωτοογκογονιδίου *c-fos* στα κύτταρα τα οποία εκφράζεται, σχεδιάστηκε ένα σφυροκέφαλο ριβοένζυμο ενάντια στο RNA του. Τα αποτελέσματα έδειξαν την κατά 7 φορές ισχυρότερη καταστολή του *c-fos* φαινοτύπου, από τη δράση του ενεργού ριβοενζύμου σε σύγκριση με την ανενεργή του. Εδραιώθηκε έτσι κάποιος ρόλος του *c-fos* γονιδίου, στις διαδικασίες ανθεκτικότητας των κυττάρων σε φάρμακα της χημειοθεραπείας (drug resistance), καθώς και στη σύνθεση του DNA και της επιδιόρθωσής του (Scanlon κ.α., 1991, 1994).

Επιτυχία σημείωσε και η προσπάθεια των Larsson κ.α. (1994), οι οποίοι μελέτησαν την αποτελεσματικότητα των ριβοενζύμων σε μεταγενετικά ποντίκια, δηλαδή σε οργανισμούς οι οποίοι είχαν ενσωματωμένο στο DNA των κυττάρων τους το αντίστοιχο DNA για την έκφραση του ριβοενζύμου. Χρησιμοποιώντας κοντά σφυροκέφαλα ριβοένζυμα κατάφεραν να μειώσουν κατά 80-90% τα επίπεδα του mRNA της β-2-μικροσφαιρίνης (β-2M), τόσο στην κυτταρική γραμμή NIH3T3 όσο και στα μεταγενετικά ποντίκια, που έκφραζαν το ριβοένζυμο στους πνεύμονες, τα νεφρά και τον σπλήνα. Αντίθετα, δεν στέφθηκε με επιτυχία η χρήση ριβοενζύμων στην αποικοδόμηση του πρόδρομου mRNA του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (βAPP) που σχετίζεται με την ασθένεια του Alzheimer (Denman κ.α., 1994).

Πειράματα έγιναν και στην *Drosophila melanogaster*, χρησιμοποιώντας σφυροκέφαλα ριβοένζυμα σε δυο περιπτώσεις. Στην πρώτη περίπτωση διερευνήθηκε η βιολογική λειτουργία του γονιδίου *fushi tarazu (ftz)*, το οποίο θεωρείται υπεύθυνο για το χαρακτηριστικό πρότυπο διαίρεσης και ανάπτυξης στο στάδιο του βλαστοδέρματος, όπως επίσης εμπλέκεται και στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Zhao και Pick, 1993). Κατασκευάστηκαν μεταγενετικές μύγες που έκφραζαν το ριβοένζυμο με τη βοήθεια του θερμοεπαγόμενου υποκινητή *hsp70*. Θερμοσόκ σε νύμφες *Drosophila* σε διαφορετικές φάσεις της ανάπτυξής τους, προκάλεσε διαφορετικές διασπάσεις (disruptions) του φαινοτυπικού προτύπου, όπως αυτές έγιναν αντιληπτές με μεθόδους χρωματισμού. Ανωμαλίες έγιναν αντιληπτές και κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, αφού η έκφραση του γονιδίου *ene*, που σχετίζεται με την κανονική ανάπτυξη των νευρώνων, ήταν μειωμένη σημαντικά και σε επίπεδα όμοια με στελέχη μυγών που έχουν μεταλλαγμένο το γονίδιο *ftz*. Παρόμοιου μεγέθους διαταραχές δεν παρατηρήθηκαν παρουσία αντικωδικού RNA ή μεταλλαγμένου ριβοενζύμου. Στην δεύτερη περίπτωση (Heinrich κ.α., 1993), παρατηρήθηκε ελάττωση του χρώματος των ματιών σε μεταγενετικές μύγες *Drosophila*, όπου το ριβοένζυμο στόχευε το mRNA του γονιδίου *white*. Στην μελέτη αυτή όμως, η κατασκευή

του ριβοενζύμου διέφερε σημαντικά από την προηγούμενη. Οι αντικωδικοί του βραχίονες είχαν αρκετά μεγάλο μήκος, 70 και 215 νουκλεοτίδια αντίστοιχα, σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη όπου το μήκος τους ήταν 10 νουκλεοτίδια ο καθένας. Επιπλέον στα πειράματα των **Heinrich κ.α. (1993)**, στο 5' και στο 3' άκρο του εκφραζόμενου ριβοενζύμου υπήρχαν οι χαρακτηριστικές δομές, κορμού-θηλειάς (stem-loop), οι οποίες προσδίδουν αυξημένη σταθερότητα στο μόριο του RNA.

Μια συγκριτική ανάλυση της δράσης ριβοενζύμων, αντικωδικών RNA, συμπληρωματικών DNA (cDNA) και αντικωδικών ολιγοδεοξυ-νουκλεοτιδίων πραγματοποιήθηκε από τους **Cotten κ.α. (1989)**, όπου στόχος ήταν το U7 snRNA, με σκοπό την αναστολή της ωρίμανσης του προ-mRNA της ιστόνης, εξαρτώμενης από την μικρή ριβονουκλεοπρωτεΐνη U7 (U7 snRNA). Σ' αυτό το *in vitro* σύστημα μελέτης της αντίδρασης ωρίμανσης, όπου χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα πυρήνων, το αντικωδικό RNA ήταν το πιο αποτελεσματικό. Παρατηρήθηκε πάνω από 90% αναστολή όταν η συγκέντρωσή του ήταν 10 φορές μεγαλύτερη του U7 RNA. Το cDNA μήκους 65 νουκλεοτιδίων ανέστειλε στον ίδιο βαθμό την αντίδραση ωρίμανσης όταν βρίσκονταν σε 60 φορές περίσσεια. Το ριβοένζυμο δεν ήταν πιο αποτελεσματικό από το 18μερές αντικωδικό ολιγοδεοξυ-νουκλεοτίδιο, αφού χρειαζόνταν 1000 και 600 φορές περίσσεια, αντίστοιχα, για να υπάρχει ανασταλτική δράση. Το ίδιο RNA, U7 snRNA, χρησιμοποιήθηκε σαν στόχος σε *in vivo* μελέτη από την ίδια ομάδα (**Cotten και Birnstiel, 1989**). Το ριβοένζυμο τοποθετήθηκε μεταξύ των αλληλουχιών δυο υποκινητών στο γονίδιο του tRNA^{met} του *Xenopus* και αφού μεταγράφηκε ενέθηκε μαζί με το υπόστρωμα-RNA στα ωοκύτταρα του βατράχου. Επιβεβαιώθηκε η διάσπαση U7 snRNA αλλά χρειάστηκε 500-1000 φορές περίσσεια ριβοενζύμου για να πραγματοποιηθεί κάτι τέτοιο. Τις ίδιες όμως δυσκολίες αντιμετώπισαν και οι **Cameron και Jennings (1989)**, όταν χρειάστηκε 1000 φορές μοριακή περίσσεια του ριβοενζύμου για ελάττωση της ενεργότητας του ενζύμου ακέτυλο-τρανσφεράσης της γλωραμφενικόλης (CAT), χωρίς να είναι σε θέση να ανιχνεύσουν ελάττωση του CAT mRNA ή των προϊόντων της αντίδρασης διάσπασης από το ριβοένζυμο. Βελτίωση υπήρξε όταν χρησιμοποιήθηκε πολυριβοενζυμική κατασκευή, δηλαδή μορίου RNA με 4 συγχρόνως καταλυτικές περιοχές ενάντια σε 4 διαφορετικές θέσεις του CAT mRNA. Μόνο 4 φορές περίσσεια του ριβοενζύμου ήταν ικανή να ελαττώσει την ενεργότητα της CAT στο 40% και του mRNA στο 60%, σε σχέση με το αντικωδικό RNA που ελάττωσε στο 70% την ενεργότητα του ενζύμου ενώ δεν αναφέρθηκε ελάττωση του mRNA (**Cameron και Jennings, 1994**).

Ένα σημαντικό πρόβλημα στην αποτελεσματικότητα με την οποία επιτυγχάνεται η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης με την χρήση ριβοενζύμων, είναι ο συνεντοπισμός του υποστρώματος-RNA με το ριβοένζυμο ώστε να πραγματοποιηθεί η καταλυτική διάσπαση του πρώτου. Η επίδραση της διαμερισματοποίησης των RNA-στόχων στο κύτταρο, στη διαθεσιμότητά τους για διάσπαση από το αντίστοιχο ριβοένζυμο μελετήθηκε από τους **Sullenger και Cech (1993)**. Για τον σκοπό αυτό, μολύνθηκαν κύτταρα με ένα ρετροϊκό φορέα έκφρασης, ο οποίος περιείχε κλωνοποιημένο το γονίδιο *lacZ* που κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση. Το παραγόμενο mRNA από αυτό τον φορέα, περιείχε και χαρακτηριστική ρετροϊκή ακολουθία για το πακετάρισμά του σε ισωμάτια, με αποτέλεσμα το mRNA να μπορεί ή να μεταφραστεί στο κυτταρόπλασμα ή να πακεταριστεί σε ισωμάτια. Στη συνέχεια τα παραπάνω ήδη μολυσμένα κύτταρα επαναμολύνθηκαν με ρετροϊούς που περιείχαν ριβοένζυμο ενάντια σε συγκεκριμένη θέση του γονιδίου *lacZ*. Τα ίδια ριβοενζυμικά μόρια περιείχαν την ίδια χαρακτηριστική ρετροϊκή αλληλουχία για το πακετάρισμά τους σε ισωμάτια, όπως και το *lacZ* mRNA. Παρατηρήθηκε ελάττωση του περιέχοντος το *lacZ* mRNA μολυσματικού ιού κατά 90%, αλλά δεν βρέθηκε επίδραση στη μετάφραση του κυτταροπλασματικού *lacZ* mRNA. Οι παραπάνω ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι το ριβοένζυμο ήταν σε θέση να διασπάσει το υπόστρωμά του μόνο κατά την διάρκεια ή μετά το πακετάρισμά του με το *lacZ* mRNA μέσα στα ρετροϊκά ισωμάτια, καταστρέφοντας έτσι την μολυσματική ικανότητα του ισωματίου. Εξήγηση δεν μπόρεσε να δοθεί στο ερώτημα, γιατί το ριβοένζυμο δεν μπόρεσε να διασπάσει το μη πακεταρισμένο *lacZ* mRNA στο κυτταρόπλασμα. Το γεγονός αυτό δείχνει, ότι ο συνεντοπισμός του ριβοενζύμου με το υπόστρωμα-RNA στο κύτταρο, ίσως να έχει πολύ μεγάλη σημασία στην αποτελεσματικότητα της εφαρμογής μιας τέτοιας τεχνολογίας.

Τέλος, ελάχιστες είναι οι μέχρι σήμερα δημοσιεύσεις εφαρμογής ριβοενζύμων σε φυτικά κύτταρα, σε σχέση με αυτές που έχουν γίνει με ζωικά κύτταρα. Στην πρώτη (**Steinecke κ.α., 1992**) παρατηρήθηκε μείωση του mRNA και της ενεργότητας της φωσφοτρανσφεράσης της νεομυκίνης (NPT), παρουσία ριβοενζύμου σε πρωτοπλάστες καπνού, ενώ ανιχνεύθηκε με επιτυχία και το 5' προϊόν της αντίδρασης διάσπασης. Σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα κυμάνθηκε η αντίστοιχη μείωση λόγω της δράσης του αντικωδικού RNA. Στη δεύτερη (**Mazzolini κ.α., 1992**), σημειώθηκε αποτυχία όταν ακόμα και αυξημένη έκφραση του ριβοενζύμου σε πρωτοπλάστες του φυτού *Arabidopsis*, δεν στάθηκε ικανή να αναστείλει την έκφραση του mRNA και του πρωτεϊνικού ενζύμου β-γλυκουρονιδάσης (GUS), τόσον ευρισκόμενο στο ίδιο μόριο RNA (*in cis*) το ριβοένζυμο με το υπόστρωμα-

RNA, όσο και σε διαφορετικά (*in trans*). Αντίθετα, επιτυχή θεώρησαν την προσπάθειά τους οι **Perriman κ.α. (1993)**. Με την βοήθεια πολυριβοενζυμικής κατασκευής, δηλαδή ενός μεγάλου σε μήκος μορίου RNA με πολλές καταλυτικές περιοχές, κατάφεραν να ελαττώσουν σημαντικά την ενεργότητα ακέτυλο-τρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης (CAT) σε πρωτοπλάστες καπνού, χωρίς όμως να εξετάσουν τα επίπεδα του αντίστοιχου mRNA. Προέκταση των παραπάνω πειραμάτων αποτέλεσε η επιτυχημένη προσπάθεια των **Perriman κ.α. (1995)**, οι οποίοι τοποθέτησαν την νουκλεοτιδική αλληλουχία για τον σχηματισμό ριβοενζύμου μέσα στην αλληλουχία του tRNA της τυροσίνης. Έτσι εξασφάλισαν την αυξημένη έκφραση του ριβοενζύμου μέσα στους πρωτοπλάστες του καπνού, σε σχέση με το υπόστρωμα-RNA. Το αποτέλεσμα ήταν η ελάττωση τόσο της CAT ενεργότητας όσο και του mRNA της, ενώ ανιχνεύθηκε και το 3' προϊόν της αντίδρασης διάσπασης του mRNA στόχου.

Από τα παραπάνω παραδείγματα, στα οποία σφυροκέφαλα ριβοένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για την καταστολή έκφρασης διαφόρων γονιδίων, προκύπτει ότι το ενεργό καταλυτικό RNA (ριβοένζυμο) ήταν αποτελεσματικότερο συγκρινόμενο με το μεταλλαγμένο ανενεργό ριβοένζυμο ή το καθαρά αντικωδικό RNA. Τουλάχιστον στις περιπτώσεις που αναφερόταν μια τέτοια σύγκριση το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία, αφού ενισχύεται η άποψη ότι η ύπαρξη καταλυτικής περιοχής σε μόριο αντικωδικού RNA, το καθιστά ισχυρότερο όπλο, ικανό όχι μόνο να δεσμεύεται στο υπόστρωμα-RNA, αλλά και να το διασπά με μη αναστρέψιμο τρόπο. Το μέγεθος όμως της αποτελεσματικότητας μιας τέτοιας τεχνολογίας δεν μπορεί να γενικευθεί, αφού ποικίλει αρκετά και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το σύστημα στο οποίο εφαρμόζεται και μελετάται.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΥ

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με σημαντικό αριθμό μελετών έχει διερευνηθεί μέσω μεταλλάξεων, ο ρόλος συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων της καταλυτικής περιοχής της σχηματιζόμενης σφυροκέφαλης δομής και η επίδρασή τους στις καταλυτικές ιδιότητες των αντίστοιχων ριβοενζύμων. Αντίθετα, σχετικά λιγότερη προσοχή έχει δοθεί στη φύση των νουκλεοτιδίων, που βρίσκονται γύρω από αυτήν την καταλυτική περιοχή ενός σφυροκέφαλου ριβοενζύμου και σχηματίζουν ζευγάρια βάσεων με το υπόστρωμα-RNA. Αυτά τα νουκλεοτίδια παρέχουν την απαραίτητη εξειδίκευση στο μόριο του ριβοενζύμου, ώστε να αναγνωρίσει το συγκεκριμένο υπόστρωμα-RNA, που αποτελεί τον στόχο του, αλλά μπορούν επίσης να επηρεάζουν και την καταλυτική του ικανότητα.

Ενας από τους σκοπούς αυτής της διατριβής, ήταν να μελετηθεί η επίδραση των διαφόρων ελλείψεων ή αλλαγών βάσεων στις περιοχές των νουκλεοτιδίων του ριβοενζύμου, που μαζί με τα αντίστοιχα του υποστρώματος σχηματίζουν τις έλικες I και III, εκατέρωθεν της θέσης διάσπασης και της καταλυτικής περιοχής, στην συνολική ικανότητα διάσπασης των καταλυτικών αντικωδικών RNA. Το ερώτημα λοιπόν το οποίο τέθηκε ήταν, κατά πόσο οι έλικες αυτές μπορούν να ανεχθούν διαταραχές της δομής τους χωρίς να καταστραφεί η ενεργότητα των αντίστοιχων ριβοενζύμων, καθώς επίσης και ο καθορισμός του βαθμού της επίδρασης που έχουν οι αλλοιώσεις αυτές στην καταλυτική ικανότητά τους.

Ενας δεύτερος στόχος της παρούσας εργασίας, ήταν να μελετηθεί συστηματικά, πως η αλληλουχία νουκλεοτιδίων NUX στην θέση διάσπασης επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης, όταν οι υπόλοιπες αλληλουχίες της έλικας I και III παραμένουν όμοιες. Τα δεδομένα από προηγούμενες μελέτες ήταν αντιφατικά (**Ruffner κ.α., 1990, Perriman κ.α., 1992**), αφού παρουσίαζαν σημαντικές διακυμάνσεις στην αποδοτικότητα της αντίδρασης. Χαρακτηριστικό ήταν, το ότι η παρουσία AUC στη θέση στόχο στην πρώτη δημοσίευση, να ευνοεί την διάσπαση του υποστρώματος από το αντίστοιχο ριβοένζυμο, ενώ στην δεύτερη δημοσίευση να συμβαίνει το αντίθετο. Η μόνη διαφορά μεταξύ των δυο αυτών εργασιών ήταν η νουκλεοτιδική αλληλουχία εκατέρωθεν του AUC. Συγχρόνως όμως, καμμία από αυτές δεν πραγματοποίησε συστηματική ανάλυση όλων των πιθανών συνδυασμών στην θέση-στόχο. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε μια συστηματικότερη ανάλυση, με σύγκριση των σχετικών ρυθμών των αντιδράσεων διάσπασης, όταν στη θέση-στόχο υπήρχε κάθε ένας από τους 12 δυνατούς συνδυασμούς νουκλεοτιδίων που προκύπτουν από τον τύπο NUX, όπου N= A, C, G, U και X= A, C ή U, αλλά στο ίδιο μόριο υποστρώματος-RNA. Τα αντίστοιχα ριβοένζυμα ήταν της μορφής "ασύμμετρων

σφυροκέφαλων καταλυτικών RNA", αφού οι αντικωδικοί βραχίονες είχαν μήκος 3 και 154 νουκλεοτιδίων αντίστοιχα ο καθένας.

Η απάντηση των δυο παραπάνω ερωτημάτων θα βοηθήσει σε μελλοντικές εφαρμογές, στον καλύτερο σχεδιασμό των καταλυτικών RNA και στην επιλογή των καλύτερων δυνατών θέσεων-στόχων στο υπόστρωμα-RNA, όχι μόνο για την εξασφάλιση της μέγιστης αποτελεσματικότητας της αντίδρασης διάσπασης, αλλά και της αυξημένης εξειδίκευσης του ριβοενζύμου.

Τέλος, έγινε μια προσπάθεια να μελετηθεί η δράση των ριβοενζύμων σε *in vivo* συνθήκες. Το βιολογικό σύστημα που επιλέχθηκε ήταν ο σακχαρομύκητας, ένας ευκαρυωτικός οργανισμός που είναι σχετικά εύκολος στην δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών, έτσι ώστε αφού μετασχηματισθούν να μπορούν να εκφράζουν την επιθυμητή αλληλουχία. Σαν στόχος του ριβοενζύμου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *gcn4*, που κωδικοποιεί έναν καλά μελετημένο μεταγραφικό ενεργοποιητή της βιοσύνθεσης των αμινοξέων. Το ίδιο το γονίδιο *gcn4* ενεργοποιείται σε συνθήκες πείνας και η επαγωγή του ρυθμίζεται μεταφραστικά. Η θέση-στόχος ήταν τέτοια που αφαιρούνταν από mRNA του γονιδίου όλη η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του. Μέχρι την έναρξη της εργασίας αυτής δεν υπήρχε μελέτη δημοσιευμένη, όπου γινόταν χρήση των ριβοενζύμων στον σακχαρομύκητα. Κατά την εξέλιξη της εργασίας αυτής όμως, δημοσιεύθηκε μια μελέτη (**Atkins και Gerlach, 1994**), το αποτέλεσμα της οποίας έδειξε ότι υπήρχε δράση του ριβοενζύμου μόνο όταν αυτό τοποθετήθηκε στο ίδιο μετάγραφο RNA με το γονίδιο-στόχο (*in cis*). Ενδιέφερε λοιπόν ακόμα το ερώτημα, εάν τα ριβοένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον σακχαρομύκητα για την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, όταν στόχος και καταλυτικό RNA δεν βρίσκονται στο ίδιο μετάγραφο (*in trans*).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΣΤΕΛΕΧΗ

A. ΣΤΕΛΕΧΗ *E. COLI*

JM83: F⁻ ara Δ(lac - proAB) rpsL (Str^r) [Φ80 dlac Δ(lacZ)M15]

B. ΣΤΕΛΕΧΗ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Τα στελέχη του σακχρομύκητα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- 1) αγρίου τύπου (wt)
- 2) *trp⁻ura⁻*,
- 3) *trp⁻ura⁻*, αλλά με την ένωση των γονιδίων *gcn4/lacZ* να έχει τοποθετηθεί στον γενετικό τόπο *ura* και
- 4) *trp⁻ura⁻gcn4⁻*.

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

A. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

LB (1 lt)

10 gr NaCl

5 gr Yeast extract

10 gr Bacto-tryptone

(15 gr άγαρ, μόνο για στερεό θρεπτικό υλικό)

LB + αμπικιλίνη

LB με την προσθήκη 100 μg/ml αμπικιλίνη

B. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Min (1 lt) (Ελάχιστο)

6.7 gr Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
 20 gr γλυκόζη
 (20 gr άγαρ, μόνο για στερεό θρεπτικό υλικό)

Min - AT

Min με την προσθήκη 3-αμινο-τριαζόλης σε συγκέντρωση 10 mM.

YEP (1 lt)

10 gr Yeast extract
 10 gr πεπτόνη
 20 gr γλυκόζη
 (20 gr άγαρ, μόνο για στερεό θρεπτικό υλικό)

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ**A. ΦΟΡΕΙΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ**

pUC19 (Biolabs, New England, Η.Π.Α.): Έχει προκύψει από το πλασμίδιο pBR322 και M13mp19 και έχει μέγεθος 2,7 Kb. Περιέχει **α)** την αλληλουχία *ori* (origin of replication), η οποία του παρέχει την δυνατότητα αναδιπλασιασμού στο βακτήριο *E. coli*, **β)** το γονίδιο επιλογής *bla* (amp^r , ampicillin resistance), που προσφέρει στο βακτήριο-ξενιστή ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη, **γ)** το γονίδιο *lacZ* που εκφράζει το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση και επιτρέπει την επιλογή των άσπρων βακτηριακών αποικιών που περιέχουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, από τις μπλέ βακτηριακές αποικίες που περιέχουν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και **δ)** μια ειδική αλληλουχία κατάλληλη για υποκλωνοποιήσεις, μέσα στο γονίδιο *lacZ*, η οποία περιέχει μια ποικιλία θέσεων αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα.

pBS (Stratagene, La Jolla, Η.Π.Α.): Έχει προκύψει από το πλασμίδιο pUC19 και έχει μέγεθος 2,75 Kb. Περιέχει **α)** την αλληλουχία *ori*, **β)** το γονίδιο επιλογής *bla*, **γ)** το

γονίδιο *lacZ* και **δ**) μια ειδική αλληλουχία κατάλληλη για υποκλωνοποιήσεις, μέσα στο γονίδιο *lacZ*, η οποία περιέχει μια ποικιλία θέσεων αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα, εκατέρωθεν της οποίας βρίσκονται διάφοροι εκκινητές όπως, ο αντίστροφος (reverse) εκκινητής, ο M13(-20) εκκινητής και οι ειδικοί για τις αντίστοιχες RNA πολυμεράσες T3 και T7 εκκινητές. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την υποκλωνοποίηση και τροποποίηση τμημάτων DNA, με σκοπό τον καθορισμό της πρωτοταγούς τους δομής και την μεταγραφή τους με την βοήθεια της T3 ή T7 RNA πολυμεράσης, για την παραγωγή υποστρώματος-RNA ή ριβοενζύμου.

pT3T7lac (Boehringer Mannheim, Γερμανία): Έχει προκύψει από το πλασμίδιο pUC19 και έχει μέγεθος 2,75 Kb. Περιέχει **α**) την αλληλουχία *ori*, **β**) το γονίδιο επιλογής *bla*, **γ**) το γονίδιο *lacZ* και **δ**) μια ειδική αλληλουχία κατάλληλη για υποκλωνοποιήσεις, μέσα στο γονίδιο *lacZ*, η οποία περιέχει μια ποικιλία θέσεων αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα, εκατέρωθεν της οποίας βρίσκονται οι ειδικοί εκκινητές για τις αντίστοιχες RNA πολυμεράσες T3 και T7. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την υποκλωνοποίηση και τροποποίηση τμημάτων DNA, με σκοπό τον καθορισμό της πρωτοταγούς τους δομής και την μεταγραφή τους με την βοήθεια της T3 ή T7 RNA πολυμεράσης, για την παραγωγή υποστρώματος-RNA ή ριβοενζύμου.

YCp50: Έχει προκύψει από το πλασμίδιο pBR322 και έχει μέγεθος 7,95 Kb. Περιέχει **α**) την αλληλουχία *ori*, **β**) το γονίδιο επιλογής *bla*, **γ**) το γονίδιο επιλογής *tet* (tetracycline resistance), που προσφέρει στο βακτήριο-ξενιστή ανθεκτικότητα σε τετρακυκλίνη, **δ**) το γονίδιο *ura3-52*, για την επιλογή του σε στελέχη του σακχαρομύκητα που δεν φέρουν αυτό το γονίδιο και έτσι δεν μπορούν να βιοσυνθέσουν ουρακίλη. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA του γονιδίου *gcn4* ενωμένου κατά σειρά με το γονίδιο *lacZ*, με σκοπό την παραγωγή *gcn4/lacZ* mRNA σαν υπόστρωμα του ριβοενζύμου μέσα σε κύτταρα του σακχαρομύκητα. Η αντιπροσώπευσή του είναι 1-3 αντίγραφα ανά κύτταρο.

pAAR-6: Έχει προκύψει από το πλασμίδιο pBR322 και έχει μέγεθος 7,5 Kb. Περιέχει **α**) την αλληλουχία *ori*, **β**) το γονίδιο επιλογής *bla*, **γ**) το γονίδιο επιλογής *tet*, **δ**) το γονίδιο επιλογής *trp* για την βιοσύνθεση τρυπτοφάνης σε στελέχη του σακχαρομύκητα που δεν

φέρουν αυτό το γονίδιο, **ε)** μέρος της αλληλουχίας του πλασμιδίου 2-micron circle, το οποίο συναντάται στον σακχαρομύκητα και που επιτρέπει στο πλασμίδιο να βρίσκεται στο κύτταρο σε πολλαπλά αντίγραφα και **στ)** μια περιοριστική θέση *EcoRI* κατάλληλη για υποκλωνοποιήσεις κομματιών DNA, τα οποία εκφράζονται με την βοήθεια του επαγωγέα (promoter) της αλκοολικής αφυδρογονάσης. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA, με σκοπό την παραγωγή αντικωδικού RNA ή ριβοενζύμου μέσα σε κύτταρα του σακχαρομύκητα. Στο κύτταρο υπάρχει σε 20 αντίγραφα περίπου.

B. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ cDNA ΤΟΥ ΙΟΥ SENDAI

Ο ιός Sendai κατέχει σαν γενετικό υλικό κλώνο RNA αρνητικής πολικότητας (-), αλλά οι αριθμοί των νουκλεοτιδίων παρακάτω αναφέρονται στον γενομικό κλώνο RNA θετικής πολικότητας (+) (**Shioda κ.α., 1986**) (**Σχήμα 12**). Όλα τα μετάγραφα του RNA (+) πολικότητας που περιγράφονται στη συνέχεια, αντιστοιχούν στην ίδια πολικότητα με αυτή του ιικού mRNA και μετάγραφα RNA με (-) πολικότητα, αντιστοιχούν στο γενωμικό RNA.

Τέσσερα διαφορετικά πλασμίδια, τα οποία περιείχαν κλωνοποιημένα συμπληρωματικά DNA (cDNA) κομμάτια του γενώματος του ιού Sendai [στέλεχος Fushimi (**Homann κ.α., 1990**)], χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των ριβοενζύμων ή αλλοιώς καταλυτικών αντικωδικών RNA (catalytic antisense RNA).

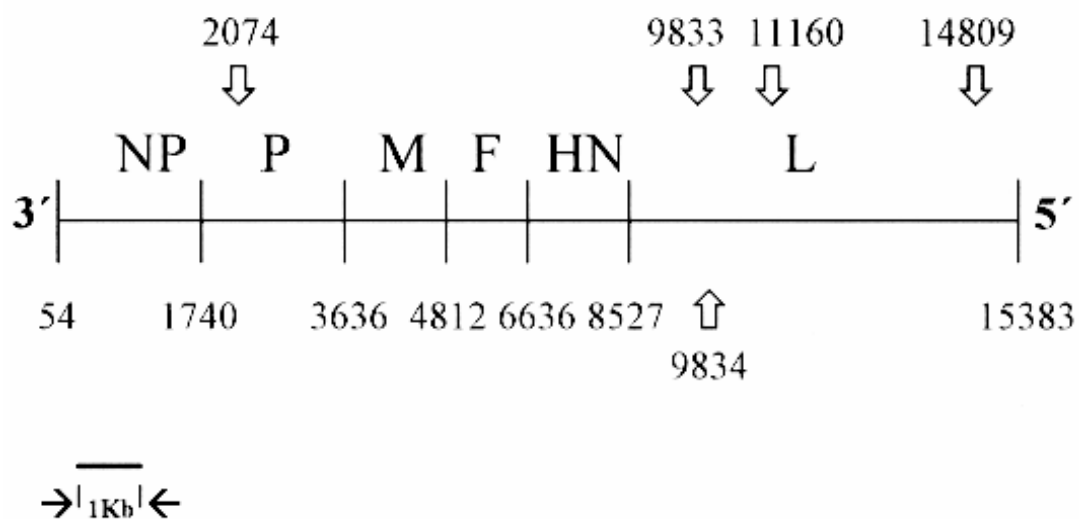
1) Το πλασμίδιο P, που περιέχει την περιοχή του P γονιδίου, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1740-3632, που αντιστοιχούν στις περιοριστικές θέσεις *KpnI* και *PstI*. Το γενωμικό αυτό κομμάτι ήταν τοποθετημένο στο πλασμίδιο-φορέα κλωνοποίησης pBS (**Homann κ.α., 1990**).

Τα υπόλοιπα τρία πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν διαφορετικά κομμάτια cDNA του ιικού γονιδίου L, τοποθετημένα στις αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις του πλασμιδίου-φορέα κλωνοποίησης pT3T7lac. Τα κομμάτια cDNA ήταν:

2) για το πλασμίδιο L, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 10479 (*EcoRI*) και 11391 (*XbaI*),

3) για το πλασμίδιο L₁, μεταξύ 14688 (*PstI*) και 14905 (*XbaI*),

4) για το πλασμίδιο L₁, μεταξύ 9720 (*HindIII*) και 10478 (*EcoRI*).



Σχήμα 12: Χάρτης του γενωμικού RNA του ιού Sendai. Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις-στόχους, όπου παρουσία ριβοενζύμου θα πραγματοποιηθεί η διάσπαση στο υπόστρωμα-RNA, όπως αυτό εκφράζεται από τις ανάλογες πλασμιδιακές κατασκευές.

Γ. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ cDNA ΤΟΥ HIV

pBS29-CX: Το πλασμίδιο αυτό περιέχει μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *SacI* και *HindIII* του φορέα κλωνοποίησης pBS, ένα cDNA μήκους 412 bp, που αντιστοιχεί στο τμήμα του HIV-RNA μεταξύ των θέσεων 222-634. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη που απαιτούσε την κατασκευή των 12 διαφορετικών υποστρωμάτων και των 4 διαφορετικών ριβοενζύμων.

Δ. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΕΙΔΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

pAAR-6: Το πλασμίδιο αυτό περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω, μαζί με τους υπόλοιπους φορείς κλωνοποίησης.

BSS-9: Έχει προκύψει από τον φορέα κλωνοποίησης pUC19, ο οποίος περιέχει μεταξύ των ειδικών περιοριστικών θέσεων *HindIII* και *BamHI*, ένα κομμάτι DNA που περιέχει την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *gcn4* καθώς και τα πρώτα 160 bp του ίδιου γονιδίου. Αποτέλεσε την βάση πάνω στην οποία κατασκευάστηκε το κατάλληλο ριβοένζυμο για τα πειράματα στον σακχαρομύκητα.

pD10: Έχει προκύψει από τον φορέα κλωνοποίησης pUC19, ο οποίος περιέχει μεταξύ των ειδικών περιοριστικών θέσεων *HindIII* και *EcoRI*, ένα κομμάτι DNA μήκους 550 bp που αντιστοιχεί στην 3' περιοχή του γονιδίου *gcn4*. Το κομμάτι αυτό, ονομαζόμενο Δ10, αφού ραδιοσημάνθηκε χρησιμοποιήθηκε σαν ανιχνευτής σε Northern ανάλυση του RNA.

Διάφορα πλασμίδια ειδικά για τον μετασχηματισμό κυττάρων σακχαρομύκητα, χρησιμοποιήθηκαν για την *in vivo* μελέτη της δράσης των ριβοενζύμων ενάντια του υποστρώματος-RNA. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν, όταν το υπόστρωμα-RNA έπρεπε να παράγεται από αυτά μέσα στο κύτταρο, ήταν:

(1) Το πλασμίδιο pGCN4/lacZ, που περιέχει κλωνοποιημένα στην περιοριστική θέση *HindIII* του φορέα κλωνοποίησης YCp50, την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *gcn4* καθώς και τα πρώτα 150 bp του ίδιου γονιδίου, ενωμένα κατά σειρά με το γονιδιο-μάρτυρα *lacZ*. Η συγκεκριμένη κατά σειρά ένωση, που περιγράφεται από δώ και πέρα ως

gcn4/lacZ, ήταν αυτή που τοποθετήθηκε όταν αυτό χρειάστηκε, στο γενετικό τόπο *ura3-52* του χρωμοσώματος του σακχαρομύκητα.

(2) Το πλασμίδιο **pGCN4-1/lacZ** είναι το ίδιο με το pGCN4/lacZ, αλλά αντί για τα 150 έχει τα πρώτα 450 bp του γονιδίου *gcn4*, ενώ η κατά σειρά ένωση περιγράφεται ως *gcn4-1/lacZ*.

(3) Το πλασμίδιο **pGCN4** που περιέχει κλωνοποιημένη στην περιοριστική θέση *HindIII* του φορέα κλωνοποίησης YCr50, όλη την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *gcn4*.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (COMPETENT CELLS) ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *E. coli*

Καλλιέργεια (100 ml) κυττάρων του στελέχους JM83 της *E. coli*, επωάζεται σε LB θρεπτικό μέσο στους 37⁰C, έως ότου η OD₅₅₀= 0,18 - 0,20. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στις 3.000 στροφές/λεπτό στους 4⁰C και επαναδιαλύονται, με ήπιο ανακάτεμα, σε 30 ml του Διαλύματος 1, θερμοκρασίας 4⁰C:

Διάλυμα 1 (100 ml)

3 ml 1 M οξικό κάλιο
 5 ml 1 M MnCl₂
 10 ml 1 M KCl
 1 ml 1 M CaCl₂
 15 ml Γλυκερίνη
 66 ml αποστειρωμένο / απεσταγμένο H₂O

Τα κύτταρα αφήνονται σ' αυτό το διάλυμα για 30 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 8 λεπτά στις 3.000 στροφές/λεπτό στους 4⁰C και επαναδιαλύονται σε 4 ml του Διαλύματος 2, θερμοκρασίας 4⁰C:

Διάλυμα 2 (100 ml)

1 ml 1 M MOPS / NaOH pH 7
 7,5 ml 1 M CaCl₂
 1 ml 1 M KCl
 15 ml Γλυκερίνη
 75,5 ml αποστειρωμένο / απεσταγμένο H₂O

Τέλος, τα 4 ml των κυττάρων μοιράζονται σε ισόποσα δείγματα (aliquots) των 100 μl, σε ήδη ψυγμένους 1,5 ml Eppendorf δοκιμαστικούς σωλήνες και τοποθετούνται αρχικά σε υγρό άζωτο και στην συνέχεια, όσον το δυνατόν γρηγορότερα στους (-) 80°C.

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *E. coli* ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA

Σε δείγμα 100 μl ήδη προετοιμασμένων κατεψυγμένων βακτηριακών επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* του στελέχους JM83 αναμιγνύονται με το κατάλληλο πλασμιδιακό DNA που περιέχει την αλληλουχία *ori*, το γονίδιο επιλογής *bla* (*amp^r*) ή/και το γονίδιο επιλογής *tet* και αφήνονται στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια το μίγμα τοποθετείται στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα και κατόπιν προστίθενται 400 μl LB θρεπτικού μέσου. Μετά από επώαση στους 37°C για 50 λεπτά στις 200 στροφές / λεπτό, το δείγμα απλώνεται σε τριβλία LB + άγαρ + αμπικιλίνη ή/και τετρακυκλίνη. Οι αποικίες των μετασχηματισμένων κυττάρων αναπτύσσονται μετά από επώαση 8-12 ωρών στους 37°C. Όταν επρόκειτο να γίνει επιλογή μετασχηματισμένων κυττάρων που περιείχαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στην περιοχή του γονιδίου *lacZ*, τότε πριν το στρώσιμο στα τριβλία προσθέτονταν στο μίγμα 20 μl διαλύματος 100 mM IPTG (IsoPropylThio-β-D-Galactoside) και 50 μl 4 % X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3 indolyl-β-D-galactoside) (διαλυμένο σε DMFO= DiMethylFOrmamide).

ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ *E. coli*

Μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα με το κατάλληλο πλασμίδιο, καλλιεργούνται σε 6 ml θρεπτικού υλικού LB + αμπικιλίνη ή/και τετρακυκλίνη για 8-12 ώρες στους 37°C.

Μετά από φυγοκέντρηση 3 λεπτά στις 14.000 στροφές / λεπτό, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 750 µl διαλύματος TM, που περιέχει:

Διάλυμα TM

10 mM Tris / HCl pH 8

10 mM MgCl₂

Το μίγμα φυγοκεντρείται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 75 µl διαλύματος S1, που περιέχει:

Διάλυμα S1

8 % σακχαρόζη

50 mM EDTA

50 mM Tris / HCl pH 8

Λυσοζύμη (2 mg/ml διαλύματος S1)

Μετά από επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 75 µl διαλύματος S2, που περιέχει:

Διάλυμα S2

8 % σακχαρόζη

50 mM EDTA

50 mM Tris / HCl pH 8

10 % Triton X-100

Αφού ανακατευτεί δυνατά το μίγμα, τοποθετείται σε βραστό νερό για 45 δευτερόλεπτα ακριβώς και στη συνέχεια στον πάγο για 5 λεπτά. Προστίθενται 750 µl από το διάλυμα S3, που περιέχει:

Διάλυμα S3

500 mM NaCl

10 mM Tris pH 8

Το δείγμα ανακατεύεται ήπια και φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 14.000 στροφές / λεπτό στους 4⁰C. Το υπερκείμενο εκχυλίζεται με φαινόλη / χλωροφόρμιο και στο νέο υπερκείμενο που προκύπτει προστίθενται 650 μl ισοπροπανόλης. Μετά από ισχυρή ανάδευση το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά και στο ίζημα προστίθεται 1 ml 70 % αιθανόλης. Το δείγμα φυγοκεντρείται αμέσως για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές / λεπτό και μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου το ίζημα στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε 80 μl διαλύματος TE:

Διάλυμα TE

10 mM Tris / HCl pH 8

1 mM EDTA pH 8

Με την μέθοδο αυτή αποδίδονται 8-10 μg πλασμιδιακού DNA.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικά κατασκευασμένες στήλες P-100 της εταιρίας Qiagen, που περιέχουν μια ρητίνη ανιοντοανταλλαγής. Το δίκλωνο DNA εκλούεται από την στήλη σε συγκέντρωση άλατος 1,4-1,6 M NaCl σε pH 7, ενώ πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια, ολιγονουκλεοτίδια, RNA και μονόκλωνο DNA εκλούνται σε συγκέντρωση άλατος από 0-1,3 M NaCl. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν αυτό που προτείνεται από την εταιρία:

Μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν το κατάλληλο πλασμίδιο, καλλιεργούνται σε 100 ml θρεπτικού υλικού LB + αμπικιλίνη ή/και τετρακυκλίνη για 8-12 ώρες στους 37⁰C. Μετά από φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 5.000 στροφές / λεπτό στους 4⁰C, το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 4 ml του διαλύματος P1, θερμοκρασίας 4⁰C και προστίθενται 4 ml διαλύματος P2:

Διάλυμα P1

100 µg/ml RNase A
 50 mM Tris / HCl pH 8
 10 mM EDTA pH 8

Διάλυμα P2

200 mM NaOH
 1 % SDS

Μετά από ήπιο ανακάτεμα, το μίγμα επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 4 ml **Διαλύματος P3** (2,55 M KAc) και μετά από ήπια ανάδευση, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές / λεπτό για 30 λεπτά στους 4°C. Αφού περάσουν από την στήλη 2 ml του διαλύματος QB, το υπερκείμενο που διατηρήσαν στον πάγο, εφαρμόζεται στην στήλη επίσης. Κατόπιν η στήλη πλένεται με 2 x 4 ml διαλύματος QC. Το DNA εκλούεται από την στήλη με 2 ml διαλύματος QF, κατακρημνίζεται με μισό όγκο ισοπροπανόλης και συλλέγεται με φυγοκέντρηση 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα πλένεται με 70 % αιθανόλη και αφού στεγνώσει, επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE.

Διάλυμα QB

750 mM NaCl
 50 mM MOPS pH 7
 15 % Αιθανόλη
 0,15 % Triton X-100

Διάλυμα QC

1 M NaCl
 50 mM MOPS pH 7
 15 % Αιθανόλη

Διάλυμα QF

1,25 M NaCl
 50 mM MOPS pH 8,2
 15 % Αιθανόλη

**ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΩΝ 5' ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΜΕ ΤΟ ENZYMO
 ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ (ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ)**

Η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης λαμβάνει χώρα σε 20 µl 1x διαλύματος αλκαλικής φωσφατάσης CIP (Calf Intestinal Phosphatase) και περιέχει συνήθως 500 ng DNA και 1-2 μονάδες ενζύμου/ µg DNA. Στην περίπτωση 5' προεξεχόντων άκρων γίνεται στους 37°C για 30 λεπτά, ενώ στην περίπτωση 3' εξεχόντων ή ισοτελών άκρων γίνεται για 15 λεπτά στους 37°C και για 45 λεπτά στους 55°C. Στην συνέχεια προστίθεται SDS σε συγκέντρωση 0,1 % και το δείγμα μεταφέρεται στους 65°C για 5 λεπτά. Ακολουθεί εκχύλιση του ενζύμου με φαινόλη - χλωροφόρμιο και κατακρημνιση του DNA με αιθυλική αλκοόλη.

10x διάλυμα φωσφατάσης (CIP)

100 mM Tris / HCl pH 8

10 mM ZnCl₂

10 mM MgCl₂

ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ 5' ΑΚΡΟΥ DNA ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

Η αντίδραση φωσφορυλίωσης στο 5' άκρο κάποιου DNA ολιγονουκλεοτιδίου γίνεται με την βοήθεια του ενζύμου T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση. Το μίγμα της αντίδρασης (20 μl) περιέχει:

500 ng DNA ολιγονουκλεοτιδίου

2 μl 10x διάλυμα κινάσης

2 μl 10 mM ATP

ενώ το διάλυμα της κινάσης αποτελείται από:

10x διάλυμα κινάσης

500 mM Tris/HCl pH 7,6

100 mM MgCl₂

50 mM DTT (dithiothreitol)

1 mM Spermidine

1 mM EDTA

Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 1μl ενζύμου (10 μονάδες/μl) και διαρκεί 30 λεπτά στους 37⁰C. Διακόπτεται με την μεταφορά του μίγματος στους 65⁰C για 5 λεπτά, ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη - χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθυλική αλκοόλη.

ΣΥΝΕΝΩΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΜΕ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ ΛΙΓΑΣΗ (LIGATION)

Πρόκειται για μια διαμοριακή συνένωση αποφωσφορυλιωμένου γραμμικού πλασμιδιακού φορέα με ένα δεύτερο γραμμικό μόριο DNA ή με κάποιο DNA ολιγονουκλεοτίδιο. Τα δύο μόρια βρίσκονται συνήθως σε μοριακή αναλογία 1 μόριο φορέα

προς 5 μόρια εντιθέμενου DNA, με συγκέντρωση φορέα 100-500 ng/μl. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl, στους 16°C για 4-16 ώρες και περιέχει εκτός του DNA, 1 μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης, το οποίο είναι διαφορετικό για την συνένωση προεξεχόντων άκρων στα μόρια του DNA (cohesive end ligation) και διαφορετικό για την συνένωση ισοτελών άκρων στα μόρια του DNA (blunt end ligation), 1 μl 10 mM ATP και 1-2 μονάδες του ενζύμου T4 DNA λιγάσης. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αναμιγνύεται κατευθείαν με τα ήδη προετοιμασμένα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα, για την πραγματοποίηση του μετασχηματισμού τους.

5x διάλυμα συνένωσης

προεξεχόντων άκρων

250 mM Tris/HCl pH 7,5
50 mM MgCl₂
50 mM DTT
250 μg/ml BSA

5x διάλυμα συνένωσης

ισοτελών άκρων

250 mM Tris/HCl pH 7,5
50 mM MgCl₂
5 mM DTT
25 % PEG 8000 (πολυαιθυλενογλυκόλη)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ DNA (DNA SEQUENCING)

Το DNA που χρησιμοποιήθηκε παρασκευάστηκε, είτε με μικρής είτε με μεγάλης κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA και για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς του δομής εφαρμόστηκε αποκλειστικά η μέθοδος των διεδόξυ- νουκλεοτιδίων (**Sanger και Coulson, 1975**). Το ένζυμο το οποίο χρησιμοποιείται ονομάζεται "Sequenase Version 2.0 T7 DNA πολυμεράση" και συνοδεύεται από το σχετικό πρωτόκολλο της αντίδρασης καθώς και τα αντιδραστήριά της παρασκευάστριας εταιρείας "United States Biochemical". Τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε 6-8 % πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (38 % ακρυλαμίδιο, 2% bis-ακρυλαμίδιο) με 8 M ουρία , διαστάσεων 40 cm x 15 cm x 0,1 cm και σε ηλεκτρικό πεδίο σταθερής ισχύος 30 Watt, σε διάλυμα 22,5 mM TBE.

1 M TBE pH 8 (10x)

1 M Tris base
830 mM Boric acid
10 mM EDTA

ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Μια τυπική αντίδραση περιέχει συνήθως: DNA σε συγκέντρωση 100-500 ng, 1 μl RNaseA (10 μg/ml), το ειδικό για το ένζυμο ρυθμιστικό διάλυμα και ενδονουκλεάση περιορισμού από 1-5 μονάδες/μg DNA, σε συνολικό όγκο 20 μl. Για όλα τα ένζυμα χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα που πρότεινε η παρασκευάστρια εταιρεία και συνόδευε πάντα το κάθε ένζυμο. Η αντίδραση διαρκεί 1-2 ώρες στη θερμοκρασία που το ένζυμο έχει την μέγιστη ενεργότητά του.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τα μόρια του DNA διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σε διάλυμα 0,5x TBE και τάση 1-10 Volt/cm (απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων), με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους. Η πυκνότητα του πηκτώματος ποικίλλει από 0,5 έως 1,5 % σε διάλυμα 0,5x TBE και καθορίζεται με βάση τα μεγέθη του κάθε δείγματος ώστε να επιτυγχάνεται ο μέγιστος δυνατός διαχωρισμός. Τα δείγματα του DNA, πριν εφαρμοσθούν στο πήκτωμα, αναμιγνύονται με διάλυμα που περιέχει 0,25 % Bromophenol Blue και 15 % Ficoll (Type 400, Pharmacia). Τα αποτελέσματα γίνονται ορατά με χρώση του πηκτώματος της αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο (0.5 μg/ml) και επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια της εταιρείας RENNER GMBH (Γερμανία) καθώς και η μεθοδολογία που προτείνεται από την ίδια και έχει ως εξής:

1) Αποκόπτεται από το πήκτωμα αγαρόζης το κομμάτι εκείνο που περιέχει το DNA που μας ενδιαφέρει. Αφού υπολογιστεί ο όγκος του, προστίθενται 3 όγκοι "διαλύματος δέσμησης" (binding buffer).

2) Ακολουθεί επώαση με ήπιο ανακάτεμα στους 55⁰C, έως ότου η αγαρόζη λειώσει εντελώς (περίπου 15 λεπτά). Το δείγμα μεταφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται η "μήτρα δέσμησης" (binding matrix) του DNA. 1 μl μήτρας δέσμησης είναι ικανό να δεσμεύσει περίπου 1 μg DNA. Συστήνεται η χρήση τουλάχιστον 5 μl μήτρας δέσμησης.

3) Πραγματοποιείται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά με περιστασιακό ήπιο ανακάτεμα.

4) Φυγοκέντρωση δείγματος για 15 δευτερόλεπτα στις 14.000 στροφές/λεπτό.

5) Στο ίζημα προστίθεται "διάλυμα πλύσης" ίσο με τρεις όγκους του αρχικού δείγματος του πηκτώματος αγαρόζης και μετά από πλήρη επαναδιάλυση του ιζήματος με ισχυρό ανακάτεμα, το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 δευτερόλεπτα στις 14.000 στροφές/λεπτό.

6) Επαναλαμβάνεται το στάδιο 5 για δύο φορές ακόμα.

7) Στο ίζημα προστίθενται 15-20 μl H₂O ή TE και αφού επαναδιαλυθεί πλήρως, ακολουθεί επώαση στους 45⁰C για 3 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα στις 14.000 στροφές/λεπτό, συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το 80 % περίπου του DNA που βρισκόταν στο αρχικό κομμάτι του πηκτώματος της αγαρόζης. Για μεγαλύτερη απόδοση, το στάδιο 7 μπορεί να επαναληφθεί.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA ή RNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ, ΜΕ ή ΧΩΡΙΣ ΟΥΡΙΑ

Οι διαστάσεις ενός συνηθισμένου πηκτώματος είναι 20 cm x 15 cm x 0,3 cm και για 5% πήκτωμα χρειάζονται 60 ml διαλύματος που περιέχει:

10 ml διαλύματος 30 % ακρυλαμιδίου, 0,75 % bis-ακρυλαμιδίου
22,5 mM TBE

8 M ουρία (μόνο όταν απαιτείται)

Το μίγμα πολυμερίζεται με την προσθήκη 250 μl διαλύματος 10 % υπερθειικού αμμωνίου και 45 μl TEMED, ενώ τα δείγματα υπόκεινται σε ειδική επεξεργασία πριν εφαρμοσθούν στο πήκτωμα. Έτσι τα δείγματα που θα διαχωρισθούν σε πήκτωμα που περιέχει ουρία, αναμιγνύονται με ποσότητα διαλύματος που περιέχει:

80 % απιονισμένη φορμαμίδη (formamide)

50 mM Tris / HCl pH 8

50 mM EDTA pH 8

0,5 % SDS

0,025 % Bromophenol Blue

0,025 % Xylene Cyanol FF

Μετά από 1 λεπτού βράσιμο τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σταθερής ισχύος 18 Watt, σε διάλυμα 22,5 mM TBE.

Όταν πρόκειται για δείγματα που θα διαχωρισθούν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου χωρίς ουρία, τότε τα δείγματα πριν εφαρμοσθούν στο πήκτωμα, αναμιγνύονται με διάλυμα που περιέχει:

0,025 % Bromophenol Blue

0,025 % Xylene Cyanol FF

40 % σουκρόζη ή 30 % γλυκερόλη

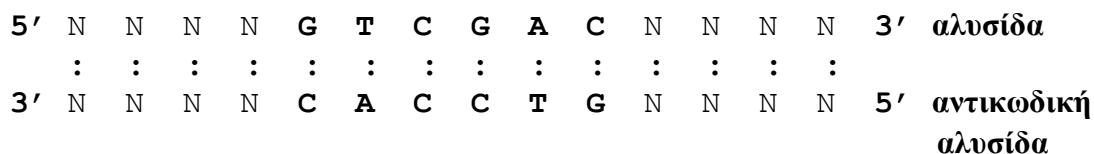
Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σταθερής ισχύος 12 Watt, σε διάλυμα 1x TBE.

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ

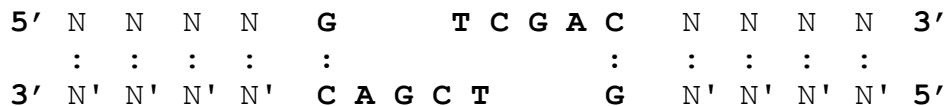
Για την δημιουργία των καταλυτικών αντικωδικών RNA, ακολουθήθηκε η στρατηγική τοποθέτησης χημικά συντιθεμένων ολιγονουκλεοτιδίων DNA ("κασσετών") σε συγκεκριμένη περιοριστική θέση ενός κομματιού cDNA, όπως ακριβώς αυτή περιγράφεται στην δημοσίευση των **Tabler και Tsagris (1991) (Σχήμα 13)**. Συγκεκριμένα, το cDNA διασπάστηκε σε μια συγκεκριμένη θέση από το αντίστοιχο περιοριστικό ένζυμο, με ακόλουθη περικοπή (trimming) των προεξεχόντων νουκλεοτιδίων, ή από την νουκλεάση S₁ ή από την νουκλεάση mung bean και τέλος αποφωσφορυλίωση του cDNA. Το πρωτόκολλο του σταδίου τροποποίησης από τις νουκλεάσες περιγράφεται λεπτομερώς παρακάτω.

cDNA

κωδική



Επώαση με *SalI*



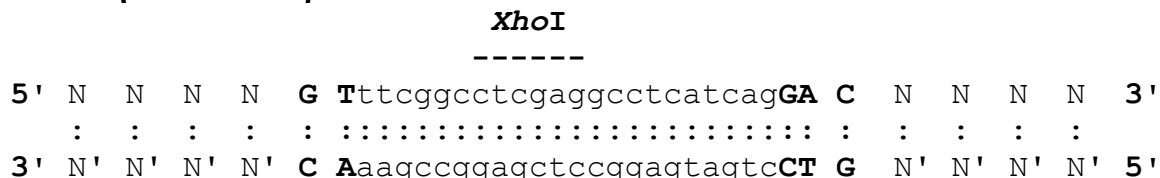
Επώαση με S_1 ή mung bean

Αποφωσφορυλίωση του cDNA



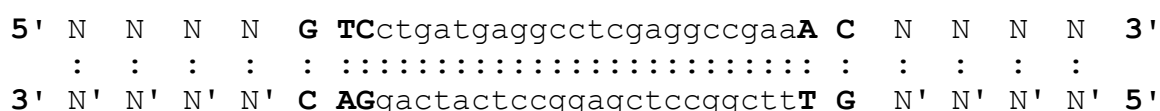
Φωσφορυλίωση της *SalI* δίκλωνης "κασσέτας" DNA

Σύνδεση ισοτελών άκρων



<----- ριβοένζυμο ενάντια στο RNA του κωδικού κλώνου του cDNA

ριβοένζυμο ενάντια στο RNA του αντικωδικού κλώνου του cDNA -->



Σχήμα 13: Η μεθοδολογία για την δημιουργία ριβοενζύμου ενάντια στην ακολουθία GUC του υποστρώματος-RNA, που αποτελεί μέρος της ακολουθίας αναγνώρισης (έντονα γράμματα) από το περιοριστικό ένζυμο *SalI* στο cDNA. Μετά από επώαση με *SalI*, τα τέσσερα νουκλεοτίδια TCGA απομακρύνονται με επώαση με S_1 ή mung bean. Τέλος, η *SalI* ειδική δίκλωνη "κασσέτα" (μικρά γράμματα) που συγκολλείται, περιέχει στα άκρα της μερικά από τα νουκλεοτίδια (T--GA), που απομακρύνθηκαν αρχικά καθώς και την περιοριστική θέση *XhoI*, όπου εισέρχεται το γονίδιο *tet*, για την ευκολότερη επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών. Ανάλογα με τον τρόπο συγκόλλησής της και την φορά μεταγραφής, όπως δείχνει το βέλος, παράγεται ριβοένζυμο ενάντια στο RNA της κωδικής ή αντικωδικής αλυσίδας του cDNA.

Στη συνέχεια, μια δίκλωνη "κασσέτα" DNA, η οποία κωδικοποιεί την καταλυτική περιοχή των "σφυροκέφαλων" ριβοενζύμων και περιέχει επίσης πρόσθετα νουκλεοτίδια, όμοια με μερικά από εκείνα τα νουκλεοτίδια που απομακρύνθηκαν στο στάδιο της περικοπής, αφού πρώτα φωσφορυλιώθηκε, εισήχθη με την εφαρμογή της μεθόδου "σύνδεσης ισοτελών άκρων" (blunt end ligation). Στην περιοριστική θέση *XhoI* της DNA "κασσέτας" είχε προηγουμένως εισαχθεί το γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (*tet*), γεγονός που διευκόλυνε την σωστή και γρήγορη επιλογή των κατάλληλων ριβοενζυμικών κατασκευών. Τελικά, το γονίδιο *tet* απομακρύνθηκε από το τελικό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, από το οποίο θα παραχθεί το τελικό καταλυτικό αντικωδικό RNA, για να συμμετέχει σε χημική αντίδραση με το αντίστοιχο υπόστρωμά του. Σημειωτέον ότι, το καταλυτικό αντικωδικό RNA διατηρεί την ενεργότητά του, ακόμα και παρουσία του γονιδίου *tet*.

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΟΥ DNA ΜΕ ΝΟΥΚΛΕΑΣΗ S₁ ή MUNG BEAN

(α) Για την περικοπή νουκλεοτιδίων από μονόκλωνο DNA με τη χρήση νουκλεάσης mung bean, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία, το ήδη κομμένο DNA με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού, επαναδιαλύθηκε σε συγκέντρωση 0.1 μg/μl στο ρυθμιστικό διάλυμα ειδικό για την νουκλεάση mung bean που συνίσταται από:

50 mM οξικού νατρίου pH 5

30 mM NaCl

1 mM ZnSO₄

Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,5 μονάδες ενζύμου (Boehringer Mannheim) ανά μg DNA, για 30 λεπτά στους 30⁰C. Η αντίδραση σταμάτησε μετά από εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και το DNA επανακτήθηκε μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη. Ακολουθώντας όμως αυτό το πρωτόκολλο, ένας μεγάλος αριθμός λανθασμένων περικοπών νουκλεοτιδίων συνέβη σε αρκετά μόρια DNA.

(β) Για την περικοπή νουκλεοτιδίων από μονόκλωνο DNA με την χρήση της νουκλεάσης S₁, το ήδη κομμένο DNA με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο, επαναδιαλύθηκε σε συγκέντρωση 1 μg/ 50 μl σε ειδικό για την νουκλεάση S₁ ρυθμιστικό διάλυμα, διατηρημένο στον πάγο, που αποτελείται από:

225 mM NaCl

30 mM οξικού καλίου pH 4,5
 200 μ M ZnSO₄
 5 % (v/v) γλυκερόλη

Μετά την πρόσθεση 1 μονάδας S₁ νουκλεάσης ανά μ g DNA, το μίγμα επώασθη για 10 λεπτά στον πάγο. Η αντίδραση διακόπηκε με πρόσθεση ίσου όγκου με αυτόν της αντίδρασης, ειδικού για το σκοπό αυτό διαλύματος, που αποτελείται από:

300 mM Tris/HCl pH 8
 50 mM EDTA pH 8

και επώασης για 10 λεπτά στους 65⁰C. Μετά την εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη, επαναποκτήθηκε το ζητούμενο DNA. Από την εφαρμογή αυτής της μεθόδου, η περικοπή των κατάλληλων νουκλεοτιδίων ήταν η σωστή σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε όγκο 50 μ l και το μίγμα περιείχε τα εξής:

40 mM Tris/HCl pH 8,8
 4 mM MgCl₂
 20 mM KCl
 20 mM (NH₄)₂SO₄
 0.2 % Triton X-100
 0.1 mg/ml ακετυλιωμένη σφαιρίνη ορού βοοειδούς (BSA)
 1 mM από το κάθε dNTP
 1 ng DNA-μήτρας
 20 pmole T7 εκκινητή
 20 pmole ενός κατάλληλου DNA ολιγονουκλεοτιδίου
 5 ενζυμικές μονάδες Taq DNA πολυμεράσης.

Στο μίγμα προστέθηκαν 50 μ l λαδιού παραφίνης και όλο μαζί τοποθετήθηκε στον ειδικό για τέτοιες αντιδράσεις επωαστήρα: DNA Thermal Cycler της Perkin Elmer Cetus version 2.1, σύμφωνα με τον κατάλληλο για κάθε περίπτωση προγραμματισμό:

(1) 7 λεπτά στους 94⁰C, 30 κύκλους με κάθε κύκλο να συνίσταται από 30 δευτερόλεπτα στους 94⁰C, 30 δευτερόλεπτα στους 50⁰C, 2 λεπτά στους 72⁰C και τέλος 1 κύκλος 5 λεπτά στους 72⁰C, ή

(2) 7 λεπτά στους 94⁰C, 5 κύκλους με κάθε κύκλο να συνίσταται από 30 δευτερόλεπτα στους 94⁰C, 30 δευτερόλεπτα στους 4⁰C, 2 λεπτά στους 72⁰C, 30 κύκλους με κάθε κύκλο να συνίσταται από 30 δευτερόλεπτα στους 94⁰C, 30 δευτερόλεπτα στους 50⁰C, 2 λεπτά στους 72⁰C και 1 κύκλο 5 λεπτά στους 72⁰C.

IN VITRO ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ RNA

Η μεταγραφή γινόταν *in vitro* με τη χρήση T3 ή T7 RNA πολυμεράσης. Περίπου 500ng γραμμικού πλασμιδιακού DNA (**Πίνακας 1**) χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση σε ένα τελικό όγκο 20 μl. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε το ειδικό για κάθε πολυμεράση διάλυμα:

T7 RNA πολυμεράσης

40 mM Tris/HCl pH 8,0
20 mM MgCl₂
5 mM DTT
100 μg/ml BSA

T3 RNA πολυμεράση

40 mM Tris/HCl pH 7,2
6 mM MgCl₂
10 mM DTT
4 mM σπερμιδίνη
100 μg/ml BSA,

αλλά περιείχε επίσης:

10-20 ενζυμικές μονάδες αναστολέα ριβονουκλεασών από ανθρώπινο πλακούντα (Promega, Madison, ΗΠΑ)

500 μM ATP, CTP, GTP

10 μM UTP

20 μCi (α-³²P) UTP (800 Ci/mmol, Amersham)

Η αντίδραση ξεκινούσε προσθέτοντας 10-20 ενζυμικές μονάδες της κατάλληλης RNA πολυμεράσης. Όταν μη ραδιενεργά σημασμένα μετάγραφα RNA έπρεπε να παραχθούν, περίπου 1,5 μg γραμμικού πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε σε όγκο αντίδρασης 50 μl, με συγκέντρωση UTP στα 500 μM. Μετά από επώαση 90 λεπτά στους 37⁰C, 10 ενζυμικές

μονάδες DNάσης I (χωρίς ίχνη ριβονουκλεασών, Boehringer Mannheim) προστέθηκαν στο μίγμα για 2 λεπτά στους 37°C.

Πίνακας 1: Αναφέρεται ο τρόπος γραμμοποίησης και *in vitro* μεταγραφής των διαφόρων πλασμιδίων, με σκοπό την παραγωγή RNA.

<u>ΟΝΟΜΑ</u> <u>ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ</u>	<u>ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟ</u> <u>ΕΝΖΥΜΟ</u> <u>ΓΡΑΜΜΟΠΟΙΗΣΗΣ</u>	<u>ΕΝΖΥΜΟ</u> <u>ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ</u> <u>(RNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ)</u>	<u>ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ</u> <u>ΠΑΡΑΓΩΜΕΝΟΥ</u> <u>RNA</u>
P	<i>KpnI</i>	T3	(-)
pP-Rz41	<i>XbaI</i>	T7	(+)
pP-Rz62	<i>XbaI</i>	T7	(+)
pP-Rz82	<i>XbaI</i>	T7	(+)
pP-Rz92	<i>XbaI</i>	T7	(+)
P	<i>XbaI</i>	T7	(+)
pP-Rz32	<i>KpnI</i>	T3	(-)
pP-Rz1 έως -7	<i>KpnI</i>	T3	(-)
L	<i>EcoRI</i>	T3	(-)
pL-Rz12	<i>HindIII</i>	T7	(+)
pL-Rz21	<i>HindIII</i>	T7	(+)
pL-Rz40	<i>HindIII</i>	T7	(+)
L _I	<i>EcoRI</i>	T3	(+)
pLI-Rz19	<i>HindIII</i>	T7	(-)
pLI-Rz142	<i>HindIII</i>	T7	(-)
L ₁	<i>XbaI</i>	T3	(+)
pL ₁ -Rz122	<i>PstI</i>	T7	(-)
pL ₁ -Rz182	<i>PstI</i>	T7	(-)
L ₁	<i>PstI</i>	T7	(-)
pL ₁ -Rz72	<i>XbaI</i>	T3	(+)
pL ₁ -Rz162	<i>XbaI</i>	T3	(+)
12 πλασμίδια ¹	<i>BamHI</i>	T7	
pRz-A	<i>EcoRI</i>	T3	
pRz-G	<i>EcoRI</i>	T3	
pRz-C	<i>EcoRI</i>	T3	
pRz-U	<i>EcoRI</i>	T3	
pS9	<i>PstI</i>	T7	
pRz32	<i>XbaI</i>	T3	

¹Πρόκειται για τα 12 διαφορετικά πλασμίδια που εκφράζουν υπόστρωμα-RNA και διαφέρουν στα νουκλεοτίδια 16.2 και 17.

Η αντίδραση σταμάτησε ύστερα από εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο. Το υπερκείμενο υποβλήθηκε σε διαδικασία χρωματογραφίας διήθησης επί πήγματος (gel filtration), δια μέσου μιας στήλης σφαιριδίων αραρόζης όγκου 2 ml (Biogel A 0,5, Biorad, ΗΠΑ), χρησιμοποιώντας σαν διάλυμα έκλουσης 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 8,0. Με τον τρόπο αυτό επιτεύχθηκε διαχωρισμός του μη ενσωματωμένου (α - 32 P) UTP από τα ζητούμενα ραδιενεργώς σημασμένα μόρια RNA.

ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΙΚΛΩΝΟΥ RNA ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ

Για την παρακολούθηση του σχηματισμού του δίκλωνου RNA συμπλόκου μεταξύ υποστρώματος-RNA και ριβοενζύμου, ένα RNA ήταν ραδιενεργώς σημασμένο και το άλλο μη σημασμένο. Το μη σημασμένο RNA ήταν σε τουλάχιστον 10πλάσια μοριακή περίσσεια και σε συγκέντρωση 50-100 nM. Τα δυο RNA επώαστηκαν σε 30 μ l διαλύματος, που περιείχε:

20 mM Tris/acetate pH 7,5

500 mM NaCl

στους 60 $^{\circ}$ C, για διαφορετικό όμως χρόνο ανάλογα με το πείραμα ή στους 37 $^{\circ}$ C για 15 λεπτά. Η αντίδραση διακόπηκε τοποθετώντας το μίγμα στον πάγο και κατακρημνίζοντας τα RNA με προσθήκη αιθανόλης και 1 μ g tRNA. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 3% που περιείχε 8 M ουρίας, χωρίς να υποστούν βράσιμο για 1 λεπτό εκτός και αν κάτι τέτοιο επισημαίνεται ειδικώς σε κάποια περίπτωση. Τα αποτελέσματα έγιναν ορατά μετά από έκθεση φωτογραφικού φιλμ με το αποξηραμένο πήκτωμα (autoradiography).

IN VITRO ΔΟΚΙΜΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ

Για να ελεγχθεί η ικανότητα διάσπασης του υποστρώματος-RNA από το αντίστοιχο ριβοένζυμο, 100-150 nM μη ραδιενεργά σημασμένου ριβοενζύμου αναμίχθηκαν με τουλάχιστον υποδεκαπλάσια μοριακή ποσότητα ραδιενεργά σημασμένου υποστρώματος RNA σε όγκο αντίδρασης 20 μ l, που περιείχε:

20 mM MgCl₂

50 mM Tris/HCl pH 8

Τα δείγματα επωάζονταν στους 37⁰C ή στους 60⁰C για 30 λεπτά και η αντίδραση σταματούσε κατόπιν προσθήκης 1 μg tRNA και οξικού νατρίου σε τελική συγκέντρωση 200 mM. Τα RNA συλλέχθηκαν ύστερα από κατακρήμνιση με αιθανόλη. Τα προϊόντα της αντίδρασης αφού βράστηκαν για 1 λεπτό, διαχωρίστηκαν σε 3-5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που περιείχε 8M ουρίας και έγιναν ορατά ύστερα από αυτοραδιογραφία.

ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ

Για τον καθορισμό της σταθεράς του ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης (cleavage rate constant), ραδιενεργά σημασμένο υποστρώμα-RNA και τουλάχιστον δεκαπλάσια μοριακή περίσσεια μη σημασμένου ριβοενζύμου (50-100 mM) επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 60⁰C, σε όγκο 30 μl που περιείχε:

20 mM Tris/acetate pH 7,5

500 mM NaCl

Όπως αποδείχθηκε, κάτω από αυτές τις συνθήκες ο σχηματισμός του δίκλωνου RNA συμπλόκου μεταξύ του υποστρώματος-RNA και του ριβοενζύμου ήταν επιτυχής σε όλες τις περιπτώσεις. Στη συνέχεια το μίγμα διατηρήθηκε στους 60⁰C ή στους 37⁰C ανάλογα με το πείραμα και η αντίδραση διάσπασης ξεκίνησε με την προσθήκη MgCl₂ σε τελική συγκέντρωση 20 mM. Σταμάτησε δε και τα αποτελέσματα έγιναν ορατά, όπως περιγράφεται και στην αμέσως προηγούμενη παράγραφο. Η ραδιενέργεια που περιείχαν τα κομμάτια του αποξηραμένου πηκτώματος που αντιστοιχούσαν στα προϊόντα της αντίδρασης διάσπασης Π1 και Π2, καθώς και του άκοπου υποστρώματος (Y), υπολογίστηκε από μετρητή υγρού σπινθηριστή. Το ποσοστό του άκοπου υποστρώματος-RNA υπολογίστηκε από τον τύπο: % άκοπου υποστρώματος = $100 - 100 (Π1+Π2)/(Π1+Π2+Y)$. Από την στιγμή που το ένα από τα δυο αντιδρώντα μόρια, δηλαδή το ριβοένζυμο βρίσκεται σε υψηλή μοριακή περίσσεια σε σχέση με το υπόστρωμα, η σταθερά του ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης (K_{cat}), υπολογίστηκε από την γνωστή σχέση: $K_{cat} = \ln 2 / t_{1/2}$, όπου $t_{1/2}$, ο χρόνος που απαιτείται ώστε το μισό ποσό της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος να έχει κοπεί από το ριβοένζυμο. Υπολογίστηκε δε, από την κλίση της καμπύλης που προέκυψε, από τη γραφική παράσταση σε ημιλογαριθμική κλίμακα, του % άκοπου υποστρώματος προς τον χρόνο που διήρκεσε η αντίδραση διάσπασης.

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

Εφαρμόστηκε η μέθοδος επεξεργασίας των κυττάρων με LiCl. Κύτταρα σακχαρομύκητα καλλιεργούνται σε 50 ml θρεπτικού υλικού YEP, μέχρις η οπτική πυκνότητα να πάρει τιμή 0,6 - 0,8 στα 550 nm και κατόπιν συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3.000 στροφές/λεπτό, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Επαναιωρούνται σε 20 ml TE και επαναφυγοκεντρούνται όπως και προηγουμένως. Κατόπιν αιωρούνται σε 5 ml διαλύματος 0,5M LiCl για 30 λεπτά στους 30⁰C. Το LiCl απομακρύνεται με φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2.000 στροφές/λεπτό και προστίθενται 0,5 ml TE. Επώάζονται στους 4⁰C για 10 λεπτά και σε 100 μl από αυτό το αιώρημα προστίθενται 1-5 μg υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA. Το μίγμα επώάζεται στους 4⁰C για 10 λεπτά. Ακολουθεί επώαση στους 42⁰C για 5 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται 1 ml διαλύματος που περιέχει:

40 % PEG

0,1 M LiCl διαλυμένου σε TE

Μετά από επώαση στους 4⁰C για 10 λεπτά, το μίγμα φυγοκεντρείται και τα κύτταρα πλύνονται με διάλυμα 0,8 % σορβιτόλης, πριν απλωθούν στα τριβλία με το κατάλληλο στερεό θρεπτικό μέσο.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

Αρχικά τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε 50 ml υγρής καλλιέργειας σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο, στους 28-30⁰C. Όταν OD₅₅₀= 0,6-0,8, τα κύτταρα φυγοκεντρούνταν και πλένονταν μια φορά με αποστειρωμένο- αποσταγμένο νερό. Μετά από φυγοκέντρωση, στο ίζημα των κυττάρων προσθέτονταν 2 ml ενός διαλύματος, που περιείχε:

8 M ουρία

2 % SDS

10 mM Tris/HCl pH 7,5

10 mM EDTA pH 7,5

0,35 M NaCl

μαζί με 2 ml μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1) και 1 ml αποστειρωμένων γυάλινων σφαιριδίων διαμέτρου 450-500 μm. Τα δείγματα ανακινούνταν ισχυρά (vortex) για 2 λεπτά και μετά από φυγοκέντρηση συλλέγονταν η υδατική φάση που επανεκχυλιζόταν με μίγμα φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1). Ακολουθούσε φυγοκέντρηση και η υπερκείμενη υδατική

φάση υπόκεινταν σε κατακρήμνιση με αιθανόλη, σε ειδικούς για τον σκοπό αυτό γυάλινους φυγοκεντρικούς σωλήνες εσωτερικά επιστρωμένους με σιλκόνη. Ακολουθώντας αυτό το πρωτόκολλο συλλέγονταν 150-250 µg συνολικού RNA σε 50 µl αποστειρωμένου-αποσταγμένου νερού.

IN VITRO ΔΟΚΙΜΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΤΑΙ IN VIVO

Για να ελεγχθεί αν το ριβοένζυμο, που παράγονταν από το κατάλληλο πλασμίδιο μέσα στα κύτταρα του σακχαρομύκητα ήταν ενεργό, δηλαδή ικανό να διασπά το υπόστρωμα-RNA, περίπου 10-15 µg συνολικού RNA επωάζονταν σε όγκο 30 µl με περίπου 5 ng ραδιενεργά σημασμένου *in vitro* μεταγραμμένου υποστρώματος-RNA από το ανάλογο πλασμίδιο, για 6 ώρες σε 30⁰C. Το υπόλοιπο μίγμα της αντίδρασης, όπως επίσης η διακοπή και το αποτέλεσμα αυτής, ελέγχονταν όπως περιγράφεται και παραπάνω, για μια κανονική *in vitro* δοκιμή δραστηριότητας ενός ριβοενζύμου.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΩΝ RNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ - ΦΟΡΜΑΛΔΕΥΔΗΣ, ΑΝΑΛΥΣΗ NORTHERN

Το πήκτωμα (200 ml) παρασκευάζεται με τήξη 3 gr αγαρόζης σε 150 ml H₂O, ενώ στη συνέχεια προστίθενται 20 ml διαλύματος 10x MOPS (pH 7) το οποίο περιέχει:

10x διάλυμα MOPS (pH 7)

200 mM MOPS

50 mM άνυδρου οξικού νατρίου

10 mM EDTA

Όταν η θερμοκρασία του πηκτώματος φθάσει τους 65⁰C, προστίθενται 30 ml φορμαλδεύδης και χύνεται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης διαστάσεων 15 cm x 20 cm. Η τάση του πεδίου που εφαρμόζεται, είναι 100-150 Volt σε διάλυμα 1x MOPS, το οποίο ανακυκλώνεται κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Το RNA μεταφέρεται από το πήκτωμα σε φίλτρο Gene Screen με διάλυμα 20x SSC, μετά από 12 ώρες, όπως περιγράφεται λεπτομερώς από τους **Sambrook κ.α. (1989)**.

20x SSC pH 7

3 M NaCl

300 mM sodium citrate

Η υβριδοποίηση γίνεται με την μέθοδο Church, με διάλυμα που περιέχει:

0,5 M διάλυμα Church (1 M= 500 mM Na₂HPO₄, 4 ml 85 % H₃PO₄)

1 % BSA

1 mM EDTA

7 % SDS

Η προ-υβριδοποίηση έγινε στους 65⁰C για 30 λεπτά και η υβριδοποίηση, με τον ραδιοσημασμένο ανιχνευτή (probe), στην ίδια θερμοκρασία για 16 ώρες.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ (NICK TRANSLATION)

Η αντίδραση ραδιοσήμανσης περιέχει τα εξής:

5-25 ng δίκλωνου μορίου DNA (ανιχνευτής)

60 mM Tris-HCl pH 7,5

6 mM MgCl₂

1 mM DTT

1 mg/ml BSA

30 μM dTTP

30 μM dGTP

2 mM (α-³²P) dATP2 mM (α-³²P) dCTP

0,01 μg/ml DNase I

1-2 μονάδες *E coli* DNA πολυμεράση I

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 20 μl και διαρκεί 60 λεπτά στους 15⁰C. Τερματίζεται με την προσθήκη 2 μl 500 mM EDTA και τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια απομακρύνονται με χρωματογραφία διήθησης επί πήγματος, όπως περιγράφεται στην παράγραφο "*In vitro* μεταγραφή του RNA". Το σημασμένο δείγμα δίκλωνου DNA θερμαίνεται στους 100⁰C για 3 λεπτά, ώστε να αποδιαταχθεί πλήρως και να γίνει μονόκλωνο πριν προστεθεί στην αντίδραση υβριδοποίησης.

IN VITRO ΔΟΚΙΜΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ

Καλλιέργεια (5 ml) στελέχους σακχαρομύκητα, μετασχηματισμένου με πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο *lacZ*, οπτικής πυκνότητας 0,5 - 0,9 στα 550 nm, φυγοκεντρείται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 ml διαλύματος (pH 7,0), που περιέχει: 60 mM Na₂HPO₄, 40mM Na₂HPO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄ και 50 mM β-Μερκαπτοαιθανόλης (14,4 M). Αφού προστεθούν 150 μl 0.1% SDS και 100 μl χλωροφορμίου, το δείγμα αναμιγνύεται ισχυρά (vortex) για 10 δευτερόλεπτα ακριβώς. Μετά από 2-3 λεπτά προεπώαση στους 28-30⁰C, προστίθενται 200 μl υδατικού διαλύματος 4 mg/ml του ο-νιτροφαινυλικού-β-D-γαλακτοσιδίου (ONPG: O-Nitrophenyl-β-D-Galactoside). Η αντίδραση διαρκεί 15-30 λεπτά στην παραπάνω θερμοκρασία, και τερματίζεται με την προσθήκη 0,5 ml διαλύματος 1 M Na₂CO₃. Το δείγμα φυγοκεντρείται και η υδρόλυση του ONPG στο υπερκείμενο υγρό μετρείται σε μήκος κύματος 420 nm. Η τιμή της δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης υπολογίζεται με βάση την εξίσωση:

β-gal μονάδες = $OD_{420} \times 1000 / OD_{550} \times V \times t$, όπου V = ο όγκος της καλλιέργειας σε ml και t = ο χρόνος της αντίδρασης σε λεπτά.

DNA ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

Το σύνολο των DNA ολιγονουκλεοτιδίων, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, περιγράφονται στον **Πίνακα 2**.

<u>ΟΝΟΜΑ DNA</u> <u>ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ</u>	<u>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ</u> (5'----->3')	<u>ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ</u> <u>ΠΕΡΙΟΧΗΣ</u> <u>ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ</u>	<u>ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ</u> <u>ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ</u>
SalI-ειδική δίκλωνη "κασσέτα"	TTTCGGCCTCGAGGCCTCATCAGGA	-	pP-Rz32, pP-Rz41 pP-Rz62, pP-Rz82 pP-Rz92
ClaI-ειδική δίκλωνη "κασσέτα"	TTCGGCCTCGAGGCCTCATCAGG	-	pL-Rz12, pL-Rz17 pL-Rz21, pL-Rz40 pL ₁ -Rz171, pL ₁ -Rz11 pL ₁ -Rz42, pL ₁ -Rz72 pL ₁ -Rz122, pL ₁ -Rz162 pL ₁ -Rz182
XbaI-ειδική δίκλωνη "κασσέτα"	TTCGGCCTCGAGGCCTCATCAGTAG	-	pL ₁ -Rz19, pL ₁ -Rz52 pL ₁ -Rz142, pL ₁ -Rz151
SendP1A SendP1B	TCGAGGCCTCATCAGCCCAAGATAAT CGATTATCTTGGGCTGATGAGGCC	-	pP-Rz1
SendP2A SendP2B	TCGAGGCCTCATCAGTTCCCAAGATAAT CGATTATCTTGGGAACTGATGAGGCC	-	pP-Rz2
Send3 Send4 Send5 Send6 Send7	ATGAGGCCTCGAGGCCGAAACGGTGTGAG ATGAGGCCTCGAGGCCGAAACGGTGTGAG ATGAGGCCTCGAGGCCGAAAGGTGTGAG ATGAGGCCTCGAGGCCGAAATGGTGTGAG ATGAGGCCTCGAGGCCGAAACGTGTGAG	pP-Rz32 -//- -//- -//- -//-	pP-Rz3 pP-Rz4 pP-Rz5 pP-Rz6 pP-Rz7
Εκφυλισμένος	[GCGGATCCCATC (A/G/T) A (A/G/T/C) CTAATTCCTCCC]	pBS29-CX	12 υποστρώματα-RNA ⁽¹⁾
A-Rz3H1 C-Rz3H1 G-Rz3H1 U-Rz3H1	CGCCTCGAGGCCGAAAACCTAATTCTC CGCCTCGAGGCCGAAAACCTAATTCTC CGCCTCGAGGCCGAAAGCTAATTCTC CGCCTCGAGGCCGAAATCTAATTCTC	p2as-RZC7 -//- -//- -//-	pRz-A pRz-C pRz-G pRz-U
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	pT3T7lac	(2)
GCN4S GCN4A	GTTTCGGCCTCAAGGCCTCATCAGAC GTCTGATGAGGCCTTGAGGCCGAAAC	- -	pRz32 -//-

⁽¹⁾ Πλασμίδια που έκφραζαν τα 12 διαφορετικά υποστρώματα-RNA, που διέφεραν στις θέσεις 16.2 και 17.

⁽²⁾ Συμμετείχε σε όλες τις κατασκευές πλασμιδίων, όπου σαν μεταλλάξιμη μήτρα σε αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιούνταν πλασμίδια παράγωγα του pT3T7lac.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

(Α) ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΤΕΛΩΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΕΛΙΚΩΝ I ΚΑΙ ΙΙΙ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ.

Στόχος της εργασίας ήταν η κατασκευή διαφορετικών καταλυτικών αντικωδικών RNA, που σαν στόχο τους θα είχαν διαφορετικές θέσεις του γενωμικού και αντιγενωμικού RNA του ιού Sendai (**Σχήμα 12**) και θα χρησιμοποιούνταν σε *in vivo* πειράματα, δηλαδή σε καλλιέργειες κυττάρων προσβεβλημένων από τον ιό, όπου θα εξεταζόταν η δυνατότητα αναστολής της αντιγραφής του ιικού RNA παρουσία των ριβοενζύμων. Ο ιός Sendai ανήκει στην οικογένεια των Παραμυξιοών, τα μέλη της οποίας προκαλούν επίμονες μολύνσεις (persistent infections) στα κύτταρα, που προσβάλλουν. Το αρνητικής πολικότητας RNA του ιού αυτού, μήκους 15.000 βάσεων (15 kb), επιλέχθηκε σαν ένας ιδανικός μελλοντικός *in vivo* στόχος των ριβοενζύμων, αφού σύμφωνα με την μελέτη των **Homann κ.α. (1990)**, βρίσκεται σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση μέσα στο μολυσμένο κύτταρο, γεγονός που αυξάνει τις πιθανότητες επιτυχούς αναστολής της αντιγραφής του ιικού RNA από τα μόρια του ριβοενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, το (-) πολικότητας ιικό RNA βρίσκεται σε 3050 αντίγραφα περίπου και το (+) πολικότητας ιικό RNA σε 750 αντίγραφα περίπου στο επίμονα μολυσμένο κύτταρο. Επίσης, το mRNA των ιικών γονιδίων P και L, που κωδικοποιούν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες P και L, οι οποίες αποτελούν τα συστατικά του συμπλόκου της ιικής πολυμεράσης που αντιγράφει το ιικό RNA, βρίσκονται σε 3200 και 275 αντίγραφα περίπου στο επίμονα μολυσμένο κύτταρο.

Η στρατηγική, που ακολουθήθηκε για την κατασκευή των ριβοενζύμων, ήταν ή ίδια με αυτή που περιγράφεται από τους **Tablet και Τσαγρή (1991)**. Πρόκειται δηλαδή, για την ενσωμάτωση σε cDNA των ολιγονουκλεοτιδίων DNA ("κασσετών"), που κωδικοποιούν την καταλυτική περιοχή του ριβοενζύμου. Η διαδικασία αυτή, σαν πρώτο βήμα απαιτεί την διάσπαση του cDNA από ένα περιοριστικό ένζυμο σε μια κατάλληλη θέση και ακολουθεί περικοπή των προεξεχόντων νουκλεοτιδίων, πριν την τελική συγκόλληση της ειδικής "κασσέτας" DNA για αυτήν την περιοριστική θέση. Για την αντίδραση περικοπής νουκλεοτιδίων εφαρμόστηκαν δυο πρωτόκολλα. Στο ένα γινόταν χρήση της νουκλεάσης mung bean και στο άλλο της νουκλεάσης S₁. Όταν χρησιμοποιήθηκε νουκλεάση mung bean, βρέθηκε ότι η "κασσέτα" DNA είχε ενσωματωθεί επιτυχώς, αλλά με μια υψηλή συχνότητα,

τα γειτονικά νουκλεοτίδια ήταν διαφορετικά από τα αναμενόμενα. Προφανώς, η νουκλεάση είχε περικόψει σε διαφορετικό βαθμό, παραπάνω νουκλεοτίδια από το ένα ή τα δυο δίκλινα άκρα του cDNA, όπως αυτά προέκυπταν μετά την επώαση του cDNA με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο, δημιουργώντας έτσι μη αναμενόμενες ελλείψεις. Μετά από ένα τέτοιο αποτέλεσμα η αναγκαιότητα ύπαρξης μιας πιο αξιόπιστης μεθόδου για την κατασκευή ριβοενζύμων, ήταν επιτακτική. Χρησιμοποιήθηκε η νουκλεάση S_1 , επιλέγοντας μάλιστα μια χαμηλότερη θερμοκρασία (0°C) για την πραγματοποίηση της αντίδρασης περικοπής νουκλεοτιδίων. Στόχος ήταν να αποφευχθεί η οποιαδήποτε "χαλάρωση" των δεσμών του υδρογόνου μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του cDNA, στα δυο άκρα που προέκυπταν από την δράση του περιοριστικού ενζύμου, έτσι ώστε η περικοπή των νουκλεοτιδίων από την S_1 νουκλεάση, να περιορίζονταν το δυνατόν περισσότερο στην μονόκλινη προεξέχουσα περιοχή νουκλεοτιδίων του cDNA. Αυτή η μέθοδος είχε σαν αποτέλεσμα την σχεδόν απόλυτα σωστή κατασκευή των ζητούμενων ριβοενζύμων. Η τυχαία όμως δημιουργία "λανθασμένων" ριβοενζύμων, έθεσε το συγκεκριμένο ερώτημα: "πόσο αναγκαίο είναι το συνεχές ζευγάρωμα βάσεων στο σχηματισμό των ελίκων I και III της όλης σφυροκέφαλης δομής, έτσι ώστε να υπάρχει καταλυτική ενεργότητα από το συγκεκριμένο ριβοένζυμο".

1) ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΥΧΑΙΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΟΥΣ.

Για την απάντηση του παραπάνω ερωτήματος χρησιμοποιήθηκαν, τόσο τα τέλεια εφαρμοζόμενα (perfectly matching) σε αυτά κατασκευασμένα ριβοένζυμα, όσο και αυτά που στο μόριό τους δημιουργήθηκαν τυχαίες ελλείψεις νουκλεοτιδίων κατά την πορεία κατασκευής τους, στο στάδιο περικοπής νουκλεοτιδίων με την βοήθεια του ενζύμου mung bean νουκλεάση, ενάντια σε κάθε συγκεκριμένο για το καθένα υπόστρωμα-RNA. Τα διαφορετικά υποστρώματα-RNA, καθώς και τα αντίστοιχα σε αυτά κανονικά ή μεταλλαγμένα ριβοένζυμά τους απεικονίζονται και περιγράφονται στον **Πίνακα 3**.

Πιο συγκεκριμένα, με την εφαρμογή της μεθόδου των **Tablet και Τσαγρή (1991)**, το πλασμίδιο P επώαστηκε αρχικά με το περιοριστικό ένζυμο *SalI* (**Σχήμα 14**), το οποίο το διασπά στην αντίστοιχη νουκλεοτιδική θέση 2074 του κλωνοποιημένου ιικού P-cDNA. Το κομμάτι μεταξύ των νουκλεοτιδίων 2870 (*EcoRI*) και 3632 (*PstI*), είχε αφαιρεθεί πριν από οποιοδήποτε περαιτέρω χειρισμό, αφού περιείχε μια *SalI* περιοριστική θέση, όμοια με αυτή στη νουκλεοτιδική θέση 2074, που είχε επιλεγεί για την κατασκευή του ριβοενζύμου. Μετά

την περικοπή των προεξεχόντων νουκλεοτιδίων, είτε με νουκλεάση mung bean είτε με νουκλεάση *S₁*, μια *SalI*-ειδική δίκλωνη DNA "κασσέτα" (**Πίνακας 2**), συγκολλήθηκε στα ισοτελή άκρα του cDNA. Από τις παραπάνω τροποποιήσεις και μετά την αφαίρεση του γονιδίου *tet* από την όλη κατασκευή, προέκυψαν τα πλασμίδια pP-Rz32 και pP-Rz82, από την μεταγραφή των οποίων συνθέτονταν τα κανονικά ριβοένζυμα ενάντια στο P (+) RNA και P (-) RNA, αντίστοιχα, ενώ από τα πλασμίδια pP-Rz41, pP-Rz62, και pP-Rz92 μεταγράφονταν "λανθασμένα" ή "μεταλλαγμένα" ριβοένζυμα ενάντια στο P (-) RNA.

Ακολουθώντας παρόμοια διαδικασία, το πλασμίδιο L επώαστηκε με το περιοριστικό ένζυμο *SfuI* (θέση 11160) και μια *ClaI*-ειδική δίκλωνη DNA "κασσέτα" (**Πίνακας 2**) και συγκολλήθηκε στα ισοτελή άκρα. Τα πλασμίδια, που προέκυψαν, ήταν τα pL-Rz17 (κανονικό) και pL-Rz171 (μεταλλαγμένο), από τα οποία μεταγράφονταν ριβοένζυμα ενάντια σε L (+) RNA, καθώς και τα pL-Rz21 (κανονικό), pL-Rz12 (μεταλλαγμένο) και pL-Rz40 (μεταλλαγμένο) από τα οποία μεταγράφονταν ριβοένζυμα ενάντια σε L (-) RNA.

Ομοίως το πλασμίδιο L₁ τροποποιήθηκε στην *SfuI* θέση (14809) με την ίδια *ClaI*-DNA "κασσέτα", δίνοντας τα πλασμίδια pL₁-Rz122 (κανονικό), pL₁-Rz182 (μεταλλαγμένο), pL₁-Rz11 (μεταλλαγμένο), pL₁-Rz42 (μεταλλαγμένο), από τα οποία μεταγράφονταν ριβοένζυμα ενάντια σε L₁ (+) RNA, καθώς και τα pL₁-Rz72 (κανονικό), pL₁-Rz162 (μεταλλαγμένο) από τα οποία μεταγράφονταν ριβοένζυμα ενάντια σε L₁ (-) RNA.

Τέλος, η *XbaI* θέση (9833) του πλασμιδίου L₁ χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή της *XbaI*-ειδικής DNA "κασσέτας" (**Πίνακας 2**), με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν τα πλασμίδια pL₁-Rz142 (κανονικό) και pL₁-Rz19 (μεταλλαγμένο), από τα οποία μεταγράφονταν ριβοένζυμα ενάντια σε L₁ (+) RNA, καθώς και τα pL₁-Rz52 (κανονικό) και pL₁-Rz151 (μεταλλαγμένο), από τα οποία μεταγράφονταν ριβοένζυμα ενάντια σε L₁ (-) RNA.

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, το ορθό της κατασκευής επιβεβαιωνόταν, είτε με χαρτογράφηση με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων, είτε με την εφαρμογή της μεθόδου προσδιορισμού της πρωτοταγούς δομής του DNA (sequencing). Τόσο τα κανονικά όσο και τα μεταλλαγμένα ριβοένζυμα υποβλήθηκαν στη συνέχεια, σε *in vitro* δοκιμή για την ύπαρξη ενεργότητας διάσπασης του αντίστοιχου υποστρώματός τους.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, που δίνονται στην τελευταία στήλη του **Πίνακα 3**, βλέπουμε ότι 4 από τα 12 "λανθασμένα" ριβοένζυμα δεν παρουσίασαν καθόλου δραστηριότητα διάσπασης ενάντια στο αντίστοιχο υπόστρωμα-RNA στόχο τους. Τρία από αυτά, δηλαδή τα L-Rz171, L₁-Rz11 και L₁-Rz42, είχαν ελλείψεις νουκλεοτιδίων στους αντικωδικούς

Πίνακας 3: Δείχνονται τα 6 διαφορετικά υποστρώματα-RNA, ενάντια στα οποία κατασκευάστηκαν και συγκρίθηκαν κανονικά και τυχαία μεταλλαγμένα ριβοένζυμα. Η σύγκριση για το κάθε μεταλλαγμένο ριβοένζυμο έγινε με το αντίστοιχο κανονικό ριβοένζυμο, που είχε πλήρη τα νουκλεοτίδια των ελίκων I και III. Η αρίθμηση έχει γίνει σύμφωνα με το σύστημα αρίθμησης των **Hertel κ.α. (1992)** για τα σφυροκέφαλα ριβοένζυμα. Η καταλυτική περιοχή δεν δείχνεται, αφού είναι ίδια για όλα τα ριβοένζυμα. Στην τελευταία στήλη δείχνεται με (+) ή (-) η ύπαρξη ή μη καταλυτικής ενεργότητας.

Υπόστρωμα-RNA^α
Ριβοένζυμο

Ενεργότητα
ριβοενζύμου

		<u>Ελικά III</u>										<u>Ελικά I</u>									
		15.10	15.8		15.6		15.4		15.2		2.1	2.3	2.5		2.7						
		15.9	15.7	15.5	15.3	15.1	2.2	2.4	2.6	2.8											
P (-) RNA	5'	A	U	U	C	U	U	G	G	G	U	C	G	A	C	G	G	U	G	U	
P-Rz82	3'	U	A	A	G	A	A	C	C	C	A		C	U	G	C	C	A	C	A	(+)
P-Rz62		U	A	A	G	A	A	C	C	C	A		C	-	G	C	C	A	C	A	(+)
P-Rz92		U	A	A	G	A	A	C	C	C	A		C	-	-	C	C	A	C	A	(+)
P-Rz41 ^β		U	A	A	G	-	-	-	-	-	A		C	-	-	C	C	A	C	A	(+)
L (-) RNA	5'	U	U	G	A	G	A	U	G	U	U	C	G	A	A	C	A	A	G	C	
L-Rz21	3'	A	A	C	U	C	U	A	C	A	A		C	U	U	G	U	U	C	G	(+)
L-Rz12 ^Υ		A	A	C	U	C	U	A	C	A	A		C	-	-	-	U	U	C	G	(+)
L-Rz40 ^{β, δ}		A	-	-	-	-	-	-	-	-	-		C	-	-	-	U	U	C	G	(+)
L-Rz17	3'	A	G	A	C	G	A	A	C	A	A		C	U	U	G	U	A	G	A	(+)
L-Rz171		A	G	A	C	G	A	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	A	(-)
L₁ (+) RNA	5'	A	U	A	C	A	A	U	C	U	U	C	G	A	A	U	G	G	G	C	
L ₁ -Rz122	3'	U	A	U	G	U	U	A	G	A	A		C	U	U	A	C	C	C	G	(+)
L ₁ -Rz182		U	A	U	G	U	U	A	G	A	A		C	-	-	A	C	C	C	G	(+)
L ₁ -Rz11		U	A	U	G	U	-	-	-	-	-		C	-	-	A	C	C	C	G	(-)
L ₁ -Rz42		U	A	U	G	U	U	A	G	-	-		C	-	-	A	C	C	C	G	(-)
L₁ (-) RNA	5'	C	U	A	G	C	C	C	A	U	U	C	G	A	A	G	A	U	U	G	
L ₁ -Rz72	3'	G	A	U	C	G	G	G	U	A	A		C	U	U	C	U	A	A	C	(+)
L ₁ -Rz162		G	A	U	C	G	G	G	U	A	A		C	-	-	-	-	-	A	C	(+)
L₁ (+) RNA	5'	U	C	A	C	G	U	G	U	G	U	C	U	A	G	A	A	C	U	A	
L ₁ -Rz142	3'	A	G	U	G	C	A	C	A	C	A		A	U	C	U	U	G	A	U	(+)
L ₁ -Rz19		A	G	U	G	C	A	C	A	C	A		-	U	C	U	U	G	A	U	(+)
L₁ (-) RNA	5'	U	U	C	C	U	U	A	G	U	U	C	U	A	G	A	C	A	C	A	
L ₁ -Rz52	3'	A	A	G	G	A	A	U	C	A	A		A	U	C	U	G	U	G	U	(+)
L ₁ -Rz151		A	A	G	G	-	-	-	-	-	-		A	U	C	U	G	U	G	U	(-)

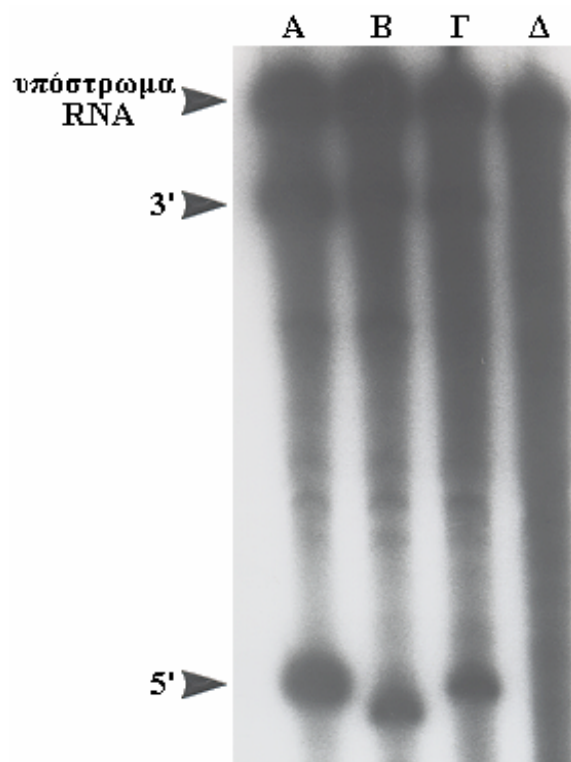
^α: Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του εκάστοτε υποστρώματος-RNA δίδεται με έντονα πλάγια γράμματα.

^β: Υπάρχει η δυνατότητα εναλλακτικής διαμόρφωσης. Βλέπε **Σχήμα 15**.

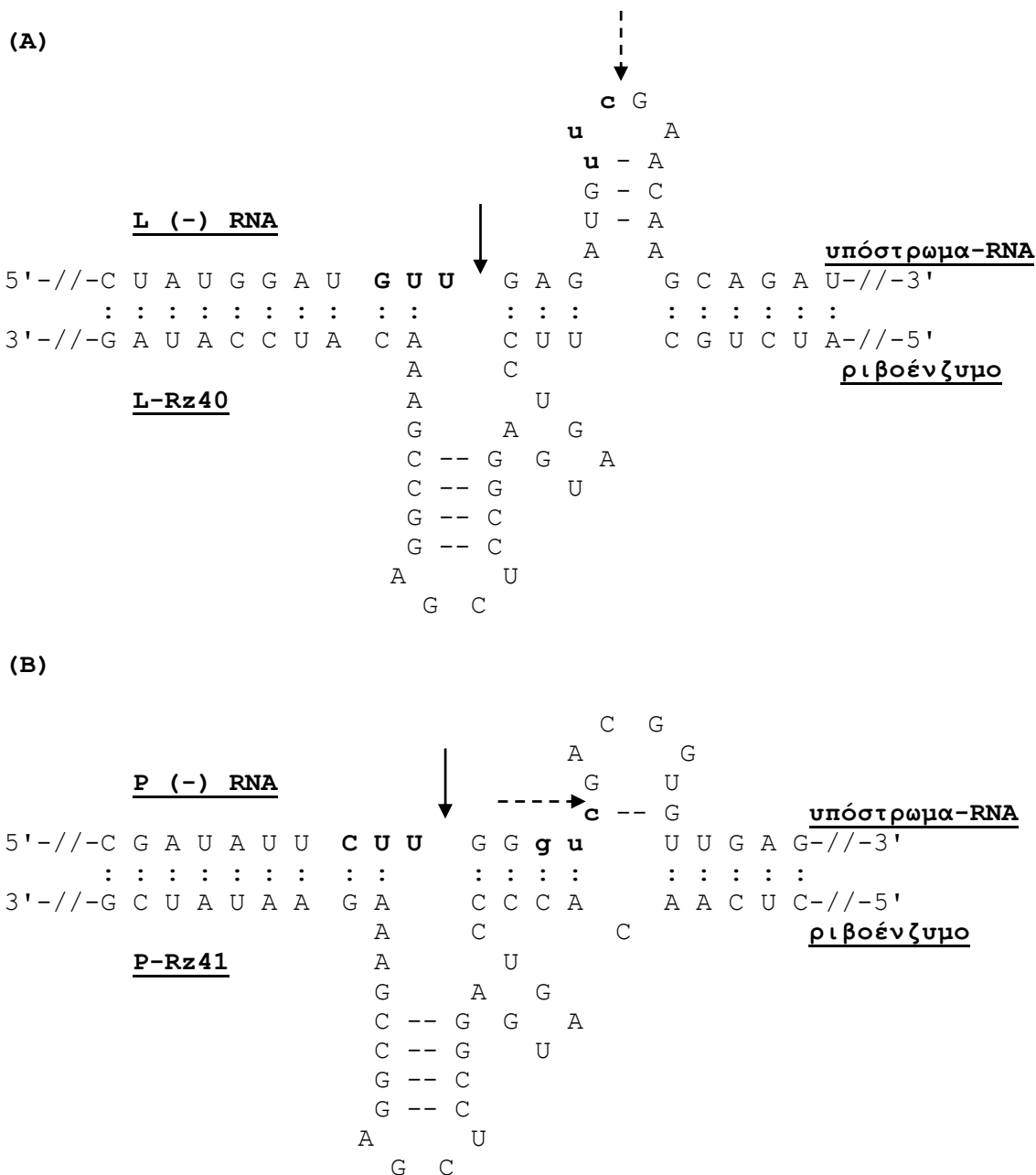
^Υ: Τα νουκλεοτίδια 2.5 και 2.6 είναι όμοια με τα 2.2 και 2.3.

^δ: Τα νουκλεοτίδια 2.5 και 2.6 είναι όμοια με τα 2.2 και 2.3, το 15.10 όμοιο με το 15.1 και τα 15.10 - 15.4 είναι όμοια με τα 15.2 - 15.6.

Βραχίονες, που συμμετέχουν στο σχηματισμό των ελίκων I και III εκατέρωθεν της θέσης διάσπασης και το ριβοένζυμο L₁-Rz151 είχε μια μόνο έλλειψη στην περιοχή σχηματισμού της έλικας III. Από την άλλη μεριά, όλα τα ριβοένζυμα τα οποία είχαν ελλείψεις στην περιοχή σχηματισμού της έλικας I, είχαν ακόμα την ικανότητα να διασπούν το αντίστοιχο υπόστρωμα-RNA τους. Σ' αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται ριβοένζυμα που είχαν έλλειψη ενός μόνο νουκλεοτιδίου, του 2.1 στο L₁-Rz19, το οποίο παρουσίασε ελάχιστη δραστηριότητα, ή του νουκλεοτιδίου 2.2 στο P-Rz62. Επίσης, με ουδεμία από τις διπλές ελλείψεις των νουκλεοτιδίων 2.2 και 2.3 στα P-Rz92 και L₁-Rz182, χάθηκε η καταλυτική ενεργότητα του ριβοενζύμου, ενώ διάσπαση του υποστρώματος-RNA παρατηρήθηκε ακόμα και στις περιπτώσεις που 3 ή 5 νουκλεοτίδια έλλειπαν στην περιοχή της έλικας I στα L-Rz12 ή L₁-Rz162, αντίστοιχα. Έτσι φαίνεται ότι, δεν απαιτούνταν ακριβές ζευγάρισμα μεταξύ των βάσεων στην περιοχή της έλικας I, αλλά οι ελλείψεις στην περιοχή της έλικας III έπαιζαν σημαντικό ρόλο στην ύπαρξη ή όχι της ριβοενζυμικής ενεργότητας. Αυτό γίνεται άμεσα αντιληπτό συγκρίνοντας το ριβοένζυμο L₁-Rz182 με τα L₁-Rz11 και L₁-Rz42. Εν τούτοις, υπάρχουν δυο αξιοσημείωτες εξαιρέσεις από ένα τέτοιο κανόνα. Αυτή του ριβοενζύμου P-Rz41 και του L-Rz40, που παρά τις σχετικά εκτεταμένες ελλείψεις που είχαν, όχι μόνο στην έλικα I αλλά και στην έλικα III, έδειξαν ότι έχουν την ικανότητα να διασπούν το υπόστρωμά τους. Προσεκτικότερη ανάλυση όμως της δομής αυτών των ριβοενζύμων, αποκάλυψε ότι στην κάθε περίπτωση μια διαφορετική εναλλακτική σφυροκέφαλη δομή μπορούσε να σχηματιστεί, με αποτέλεσμα την διάσπαση του υποστρώματος σε μια διαφορετική θέση από την αρχικά επιλεγμένη σαν στόχο. Στην **Εικόνα 1** φαίνεται η απόδειξη μιας τέτοιας υπόθεσης, που δείχνεται στο **Σχήμα 15**, όπου το μήκος του 5' παραγόμενου προϊόντος της αντίδρασης διάσπασης του L (-) RNA από το ριβοένζυμο L-Rz40, είναι σαφώς μειωμένο κατά 9 νουκλεοτίδια (**Εικόνα 1, λωρίδα Β**).



Εικόνα 1: Ανάλυση της διάσπασης του υποστρώματος L (-) RNA από τρία διαφορετικά ριβοένζυμα, όπου δείχνεται η θέση του υποστρώματος-RNA, η θέση του 3' παραγόμενου προϊόντος της αντίδρασης διάσπασης και η θέση του 5' παραγόμενου προϊόντος της αντίδρασης διάσπασης. Στην **λωρίδα A** δείχνονται τα προϊόντα διάσπασης του υποστρώματος-RNA από το κανονικό ριβοένζυμο L-Rz21, ενώ στην **λωρίδα B** και **Γ** από τα μεταλλαγμένα ριβοένζυμα L-Rz40 και L-Rz12 αντίστοιχα. Στην **λωρίδα Δ** δείχνεται το αδιάσπαστο L (-) RNA. Όπως φαίνεται, στην περίπτωση που χρησιμοποιείται το ριβοένζυμο L-Rz40, το 5' προϊόν της αντίδρασης διάσπασης είναι σαφώς μικρότερο, από τα αντίστοιχα προϊόντα των δυο άλλων ριβοενζύμων, που είναι σχεδιασμένα ενάντια στο ίδιο υπόστρωμα-RNA. Γεγονός που συμφωνεί με την υποθετική εναλλακτική διαμόρφωση σφυροκέφαλης δομής μεταξύ L (-) RNA και L-Rz40 που δείχνεται στο **Σχήμα 15 (A)**.



Σχήμα 15: Εναλλακτικές διαμορφώσεις σφυροκέφαλων δομών, που οφείλονται στις ελλείψεις νουκλεοτιδίων στην έλικα I, με αποτέλεσμα την διάσπαση του υποστρώματος-RNA μετά από μια διαφορετική τριπλέτα νουκλεοτιδίων από αυτήν που είχε αρχικά επιλεγεί σαν θέση-στόχος. Δείχνονται, το 5' και 3' άκρο του κάθε μορίου RNA που συμμετέχει στην όλη διαμόρφωση, ενώ με το συνεχόμενο βέλος δείχνεται η νέα θέση διάσπασης του υποστρώματος-RNA και με το διακεκομμένο η αρχική θέση στόχος. **(A)** Στην περίπτωση του ριβοενζύμου L-Rz40, η αρχική θέση-στόχος **uuc** μετατοπίστηκε 9 νουκλεοτίδια προς το 5' άκρο του υποστρώματος-RNA, στην τριπλέτα **GUU**. Η απόδειξη της διάσπασης του RNA, χάρη σε μια τέτοια υποθετική διαμόρφωση φαίνεται στην **Εικόνα 1**. **(B)** Στην περίπτωση του ριβοενζύμου P-Rz41, η αρχική θέση-στόχος **guc** μετατοπίστηκε 5 νουκλεοτίδια προς το 5' άκρο του υποστρώματος-RNA, στην τριπλέτα **CUU**.

2) ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΟΥ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ.

Με σκοπό να μελετηθεί πιο συστηματικά η επίδραση ελλείψεων ή των μη σωστών ζευγαρωμάτων βάσεων στην έλικα I ή την έλικα III, κατασκευάστηκαν ριβοένζυμα που είχαν αλλαγές σε συγκεκριμένες θέσεις του μορίου τους. Για την δημιουργία τους, χρησιμοποιήθηκε το ήδη κατασκευασμένο κανονικό ριβοένζυμο P-Rz32, το οποίο υποβλήθηκε σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλλαγές στο μόριό του, για την δημιουργία των μεταλλαγμένων ριβοενζύμων. Το συγκεκριμένο ριβοένζυμο P-Rz32, επιλέχθηκε κυρίως λόγω της ύπαρξης της περιοριστικής θέσης *ClaI* πολύ κοντά στην περιοριστική θέση *XhoI*, γεγονός που έκανε ευκολότερους και γρηγορότερους ορισμένους τύπους τροποποιήσεων και χειρισμούς σε επίπεδο DNA, αλλά και επειδή δεν υπήρχαν οποιοδήποτε τύπου μεταλλαγμένα ριβοένζυμα ώστε να συγκριθούν με το κανονικό ριβοένζυμο P-Rz32.

Τα αποτελέσματα των τροποποιήσεων στο μόριο του P-Rz32, ήταν οι κατασκευές των πλασμιδίων pP-Rz1, pP-Rz2, pP-Rz3, pP-Rz4, pP-Rz5, pP-Rz6 και pP-Rz7, όπως αυτά φαίνονται στον **Πίνακα 4**.

Αναλυτικότερα, για την κατασκευή του πλασμιδίου pP-Rz1, που είχε έλλειψη των νουκλεοτιδίων 2.1 και 2.2 στην περιοχή σχηματισμού της έλικας I, δύο συνθετικά DNA ολιγονουκλεοτίδια SendP1A και SendP1B (**Πίνακας 2**), φωσφορυλιώθηκαν στο 5' άκρο τους με την βοήθεια της T_4 κινάσης, βράστηκαν μαζί για 1 λεπτό και αφέθηκαν σε σταδιακή επαναφορά της θερμοκρασίας του μίγματος τους στους 25°C . Με τον τρόπο αυτό σχηματίστημαν δίκλινα σύμπλοκα μεταξύ τους μέσω των συμπληρωματικών τους βάσεων, τα οποία και συγκολλήθηκαν μετά από επώαση με το ένζυμο T_4 DNA λιγάση στο πλασμίδιο pP-Rz32. Για το σκοπό αυτό, το πλασμίδιο είχε ήδη επωαστεί με τα περιοριστικά ένζυμα *ClaI* και *XhoI* και είχε υποστεί αποφωσφορυλίωση των 5' άκρων του (**Σχήμα 16**).

Η ίδια μεθοδολογία ακολουθήθηκε, χρησιμοποιώντας όμως τα δύο ολιγονουκλεοτίδια DNA, SendP2A και SendP2B (**Πίνακας 2**), για την δημιουργία του πλασμιδίου pP-Rz2, στο οποίο τα νουκλεοτίδια C (2.1) και U (2.2) στην περιοχή σχηματισμού της έλικας I στο κανονικό ριβοένζυμο P-Rz32, αντικαταστάθηκαν από τα A (2.1) και A (2.2) αντίστοιχα, έτσι ώστε να μην προκύπτει σωστό ζευγάρι βάσεων.

Πίνακας 4: Περιγράφεται το σύνολο των μεταλλαγμένων ριβοενζύμων, όπως αυτά προέκυψαν από τις συγκεκριμένες τροποποιήσεις που έγιναν στο μόριο του κανονικού ριβοενζύμου P-Rz32. Η καταλυτική περιοχή δεν απεικονίζεται, αφού είναι η ίδια για όλα τα ριβοένζυμα και φαίνεται καλύτερα στο Σχήμα 16. Όλα είχαν σαν υπόστρωμά τους το P (+) RNA και συγκεκριμένα την τριπλέτα των νουκλεοτιδίων GUC (έντονα υπογραμμισμένα γράμματα) σαν θέση-στόχο. Δείχνονται: **(α)** οι περιοχές σχηματισμού της έλικας I και III, **(β)** η αρίθμηση των νουκλεοτιδίων σύμφωνα με το επικρατούμενο διεθνές σύστημα αρίθμησης των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων, **(γ)** το 5' και 3' άκρο του κάθε μορίου RNA που συμμετέχει στην αντίδραση, **(δ)** σε παρένθεση και με έντονη αποτύπωση φαίνονται οι αλλαγές που έχουν δημιουργηθεί στο μόριο του κάθε ριβοενζύμου σε σύγκριση με το P-Rz32 και **(ε)** στην τελευταία στήλη συμβολίζεται με (+) ή (-) η ύπαρξη ή όχι αντίστοιχα, ενεργότητας διάσπασης στο μόριο του κάθε ριβοενζύμου.

Έλικα III							Έλικα I				Ενεργότητα ριβοενζύμου
16.6	16.5	16.4	16.3	16.2	16.1	17	1.1	1.2	1.3	1.4	
C	A	C	C	<u>G</u>	<u>U</u>	<u>C</u>	G	A	C	C	P (+) RNA
:	:	:	:	:	:		:	:	:	:	
G	U	G	G	C	A		C	U	G	G	P-Rz32 (+)
15.6	15.5	15.4	15.3	15.2	15.1		2.1	2.2	2.3	2.4	
G	U	G	G	C	A		(-)	(-)	G	G	P-Rz1 (-)
G	U	G	G	C	A		(A)	(A)	G	G	P-Rz2 (-)
G	U	G	G	C	(-)		C	U	G	G	P-Rz3 (-)
G	U	G	G	C	(G)		C	U	G	G	P-Rz4 (-)
G	U	G	G	(-)	A		C	U	G	G	P-Rz5 (-)
G	U	G	G	(U)	A		C	U	G	G	P-Rz6 (-)
G	U	G	(-)	C	A		C	U	G	G	P-Rz7 (+)

Πλασμίδιο pP-Rz32:

<i>XhoI</i>	<i>ClaI</i>
-----	-----
CCG tttcgggc ctcgag gcctcatcag	GA CCCAAGATA AATCGAT
-//-::: ::::::::::::::::::::	:: ::::::::::::::::::::-//-
GGC aaagccg gagctc cgagtagtc	CT GGGTTCTAT TAGCTA
-----	-----

καταλυτική περιοχή

(1) Επώαση με *XhoI* και *ClaI*

CCGtttcgggc	tcgag gcctcatcagga	CCCAAGATA AAT	CGAT
-//-::: ::	::	::	::-//-
GGCaaagccg	gagct	cggagtagtcct	GGGTTCTAT TAGC
			TA

(2) Αποφωσφορυλίωση των άκρων του πλασμιδίου**(3) Συγκόλληση του συμπλόκου των φωσφορυλιωμένων ολιγονουκλεοτιδίων SendP1A και SendP1B στα άκρα του πλασμιδίου**

SendP1A	5' TCGAGGCCTCATCAGCCCAAGATAAT	3'
	3' CCGGAGTAGTCGGGTTCTATTAGC	5' SendP1B

Πλασμίδιο pP-Rz1:

CCG tttcggcctcgaggcctcatcag	--CCCAAGATAATCGAT
-//-::: ::::::::::::::::::::	:: ::::::::::::::::::::-//-
GGC aaagccgagctccgagtagtc	--GGGTTCTATTAGCTA

Σχήμα 16: Δημιουργία του μεταλλαγμένου ριβοενζύμου P-Rz1, με την πραγματοποίηση συγκεκριμένων τροποποιήσεων στο P-Rz32. Δείχνονται: **(α)** με μικρά γράμματα η νουκλεοτιδική αλληλουχία που αποτελεί την καταλυτική περιοχή του ριβοενζύμου, **(β)** με έντονα γράμματα μικρά και μεγάλα οι περιοριστικές θέσεις *XhoI* και *ClaI* αντίστοιχα, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την απομάκρυνση του κομματιού μέσα στο οποίο θα δημιουργούνταν η έλλειψη των δυο νουκλεοτιδίων και **(γ)** με 5' και 3' τα αντίστοιχα άκρα των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία της τελικής κατασκευής. Τα νουκλεοτίδια που λείπουν σε σύγκριση με το P-Rz32, συμβολίζονται με δυο συνεχόμενες παύλες (--) στο μόριο του P-Rz1.

Για την δημιουργία των πλασμιδίων pP-Rz3, pP-Rz4, pP-Rz5, pP-Rz6 και pP-Rz7, χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα τα ολιγονουκλεοτίδια DNA Send3, Send4, Send5, Send6 και Send7 (**Πίνακας 2**), σε ξεχωριστή για το κάθε ένα αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, σε συνδυασμό με τον T7 εκκινητή και παρουσία pP-Rz32 DNA (**Σχήμα 17**), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφάλαιο "Υλικά και Μέθοδοι" και τον προγραμματισμό (1) που περιγράφεται στην αντίστοιχη παράγραφο. Τα προϊόντα της κάθε αντίδρασης, αφού απομονώθηκαν καθαρά, επώαστηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα *KpnI* και *XhoI* και στην συνέχεια συγκολλήθηκαν στο πλασμίδιο pP-Rz32, που είχε ήδη επωαστεί με τα παραπάνω ένζυμα.

Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν τα ζητούμενα ριβοένζυμα P-Rz3 έως P-Rz7, που φαίνονται στον **Πίνακα 4** και παρουσίαζαν τα εξής χαρακτηριστικά: το P-Rz3 είχε έλλειψη του νουκλεοτιδίου A (15.1), το P-Rz5 είχε έλλειψη του νουκλεοτιδίου C (15.2), το P-Rz7 είχε έλλειψη του νουκλεοτιδίου G (15.3), το P-Rz4 είχε αλλαγή του νουκλεοτιδίου 15.1 από A σε G, ενώ το P-Rz6 είχε αλλαγή του νουκλεοτιδίου 15.2 από C σε U.

Σε ουδεμία από τις περιπτώσεις των P-Rz3 έως και P-Rz6 παρατηρήθηκε διάσπαση του P (+) υποστρώματος-RNA (**Πίνακας 4, τελευταία στήλη**). Ενδιαφέρον παρουσιάζει εδώ το γεγονός ότι, ενεργότητα διάσπασης στα P-Rz4 και P-Rz6, δεν παρατηρήθηκε παρόλο που η αλλαγή των βάσεων είχε επιλεγεί με τέτοιο τρόπο, ώστε το δυνατό ζευγάρι βάσεων του τύπου G:U, που συναντάται σε μόρια RNA, να μπορεί να σχηματιστεί μεταξύ του υποστρώματος-RNA και του ριβοενζύμου, αφήνοντας έτσι την σφυροκέφαλη δομή μερικώς ανεπηρέαστη. Στην τελευταία περίπτωση μόνο, του ριβοενζύμου P-Rz7, όπου έλλειπε το νουκλεοτίδιο G (15.3), που μπορεί να θεωρηθεί και σαν έλλειψη του νουκλεοτιδίου 15.4, παρατηρήθηκε ικανοποιητική διάσπαση του υποστρώματος.

3) ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ-RNA ΑΠΟ ΤΟ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟ (ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟ ΑΝΤΙΚΩΔΙΚΟ RNA)

Με σκοπό τη λεπτομερέστερη κατανόηση της επίδρασης των αλλαγών εκείνων των νουκλεοτιδίων του ριβοενζυμικού μορίου, που συμμετέχουν στο σχηματισμό των ελίκων I και III με τις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές περιοχές του υποστρώματος στη συνολική καταλυτική δραστηριότητα του ριβοενζύμου, προσδιορίστηκαν και συσχετίστηκαν μεταξύ τους οι παρατηρούμενοι ρυθμοί της αντίδρασης διάσπασης του υποστρώματος-RNA από τα διάφορα ριβοένζυμα, τόσο τα κανονικά όσο και τα μεταλλαγμένα, στα οποία ανιχνεύθηκε ικανότητα διάσπασης του υποστρώματός τους.

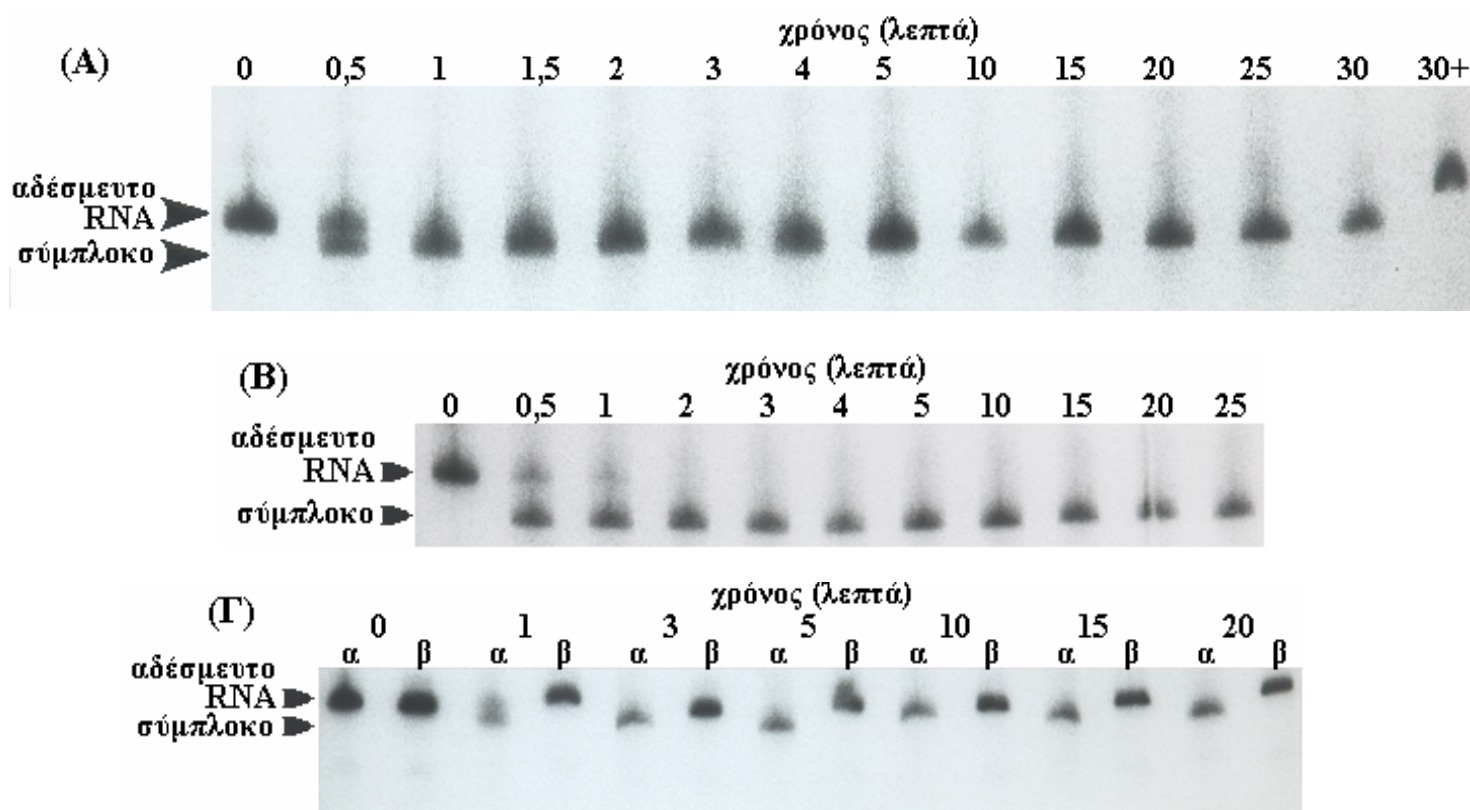
Το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε σε εκείνες τις διαφορές της διαδικασίας διάσπασης του υποστρώματος, που υπάρχουν μετά από το στάδιο σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ του υποστρώματος-RNA και του αντίστοιχου ριβοενζύμου μέσω των συμπληρωματικών νουκλεοτιδικών περιοχών τους και πιο συγκεκριμένα, στην τελική ποσοτική ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης διάσπασης. Άλλωστε για πρακτικούς σκοπούς, δηλαδή *in vivo* πειράματα, η συνολική ανιχνεύσιμη ικανότητα διάσπασης του ριβοενζύμου ενάντια στο υπόστρωμά του, είναι αυτή που ενδιαφέρει περισσότερο, παρά οποιαδήποτε άλλη διαφορά σε κάποιο ενδιάμεσο στάδιο της όλης διαδικασίας, δοθέντος φυσικά ότι τα δυο αλληλεπιδρώντα μόρια RNA μπορούν να βρεθούν μέσα στο κύτταρο και να σχηματίσουν το καταλυτικά ενεργό σύμπλοκο σφυροκέφαλης δομής.

Από την στιγμή τώρα, που τα δυο RNA είχαν αρκετά μεγάλο μήκος αντικωδικών βραχιόνων και τα προϊόντα της αντίδρασης δεν ήταν δυνατόν να αποσυνδεθούν από το ριβοένζυμο με μεγάλη ευκολία, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν κάτω από συνθήκες μονού ρυθμού μετατροπής (single-turnover), δηλαδή ένα μόριο ριβοενζύμου καταλύει την διάσπαση ενός μορίου υποστρώματος. Ο τρόπος με τον οποίο μπορεί να επιτευχθεί κάτι τέτοιο είναι όταν, το ένα από τα δυο αντιδρώντα, π.χ. το ριβοένζυμο, βρίσκεται σε πολύ υψηλή μοριακή περίσσεια από το άλλο, δηλαδή το υπόστρωμα. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η συγκέντρωση του ριβοενζύμου θεωρείται ότι δεν μεταβάλλεται και επομένως η αντίδραση ακολουθεί κινητική ψευδο-πρώτης τάξεως. Αντίθετα, όπως στην περίπτωση των ριβοενζύμων με 8 νουκλεοτίδια σε κάθε αντικωδικό βραχίονα, όπου υπάρχει μεγαλύτερη ευκολία αποδέσμευσης του ριβοενζύμου από τα προϊόντα της αντίδρασης διάσπασης και που χρησιμοποιήθηκαν από άλλους ερευνητές, οι συνθήκες κάτω από τις οποίες μπορούν να γίνουν τα πειράματα, είναι αυτές της πολλαπλής μετατροπής (multiple turnover).

Αρχικά, επειδή για μερικά από τα μεταλλαγμένα ριβοένζυμα ανιχνεύθηκε αρκετά χαμηλή καταλυτική ενεργότητα, επιλέχθηκε σαν θερμοκρασία πραγματοποίησης της αντίδρασης αυτή των 60°C, με στόχο να αποφευχθούν υψηλής διάρκειας χρόνοι επώασης. Για να αποκλειστούν οι οποιεσδήποτε διαφορές, όσον αφορά την κινητική σχηματισμού συμπλόκου (association kinetics), ήταν αναγκαίο να καθοριστεί ο χρόνος που απαιτείται για τον σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ των δυο RNA, υποστρώματος και ριβοενζύμου, απουσία ιόντων Mg²⁺, καθώς και να εξεταστεί αν κάποια από τις μεταλλαγές είχε επίπτωση σ' αυτό το στάδιο της διαδικασίας διάσπασης. Χρησιμοποιώντας παρόμοιες συνθήκες με αυτές, που περιγράφονται από τους **Persson κ.α. (1988)**, ραδιενεργά σημασμένο L₁ (+) πολικότητας υπόστρωμα-RNA επώαστηκε με υψηλή μοριακή περίσσεια (90 nM) ριβοενζύμου L₁-Rz122 στους 60°C, απουσία ιόντων Mg²⁺, αλλά παρουσία 20 mM Tris/acetate pH 7,5 και 500 mM NaCl. Στην **Εικόνα 2A**, φαίνεται καθαρά ότι το σύμπλοκο σχηματίστηκε 1 λεπτό μετά την χρονική στιγμή, που τα δυο RNA βρέθηκαν μαζί στο μίγμα επώασης. Στην τελευταία στήλη, με ένδειξη 30+, δείχνεται η αποδιάταξη του συμπλόκου, που είχε σχηματιστεί 30 λεπτά μετά την επώαση των δυο RNA, αφού το δείγμα βράστηκε για 1 λεπτό πριν την εφαρμογή του στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Επίσης, με στόχο τον αποκλεισμό της περίπτωσης, οι μεταλλαγές στο μόριο του ριβοενζύμου να αποτελούν τον περιοριστικό παράγοντα και συνεπώς να επηρεάζουν την κινητική σχηματισμού συμπλόκου, πραγματοποιήθηκε ένα παρόμοιο πείραμα, όπου το κατάλληλο υπόστρωμα-RNA βρισκόταν σε υψηλή μοριακή περίσσεια (80 nM) και αναμιγνύονταν κάθε φορά με το αντίστοιχο υπό εξέταση ραδιενεργά σημασμένο διαφορετικό ριβοένζυμο. Όπως αποδεικνύεται, στην **Εικόνα 2B**, για το μεταλλαγμένο ριβοένζυμο L₁-Rz182 και το L₁ (+) υπόστρωμα-RNA, το σύμπλοκο σχηματίστηκε μεταξύ 1 και 2 λεπτών. Το ίδιο συνέβη και για τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα ριβοένζυμα, με χρόνους σχηματισμού συμπλόκου που κυμαίνονταν από 30 δευτερόλεπτα μέχρι 1,5 λεπτό.

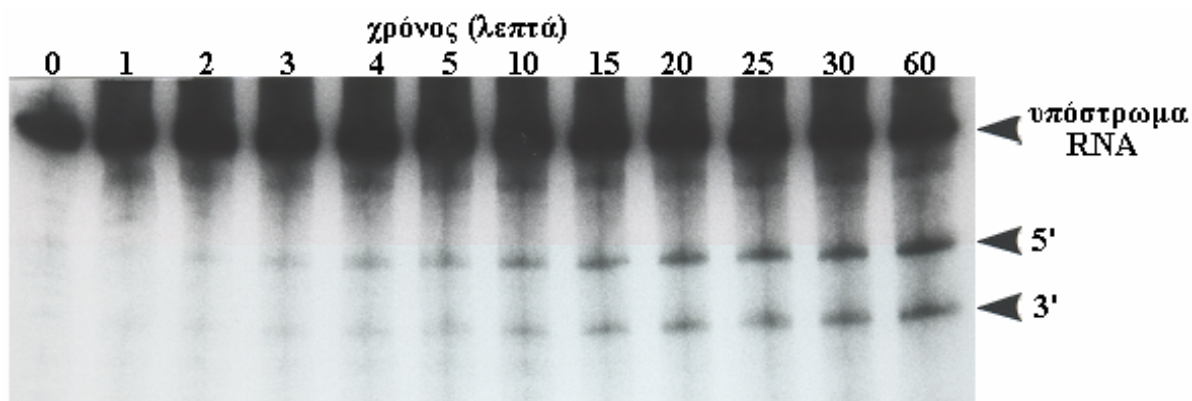
Ενας άλλος παράγοντας, που θα μπορούσε να παίζει ρόλο, είναι αυτός της διάστασης ή αποσύνδεσης (dissociation) του ριβοενζύμου από τα προϊόντα διάσπασης του υποστρώματος. Για να αποκλεισθεί η περίπτωση να έχει συμβεί κάτι τέτοιο και να δημιουργήσει πρόβλημα, όταν αργότερα μια τέτοια μεθοδολογία θα χρησιμοποιούνταν για τον προσδιορισμό του ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα κινητικής, όπου πάλι υψηλή μοριακή περίσσεια (80 nM) του L₁ (+) υποστρώματος-RNA αναμίχθηκε και επώαστηκε στους 60°C, με ραδιενεργά σημασμένο ριβοένζυμο L₁-Rz122, παρουσία ιόντων Mg²⁺.



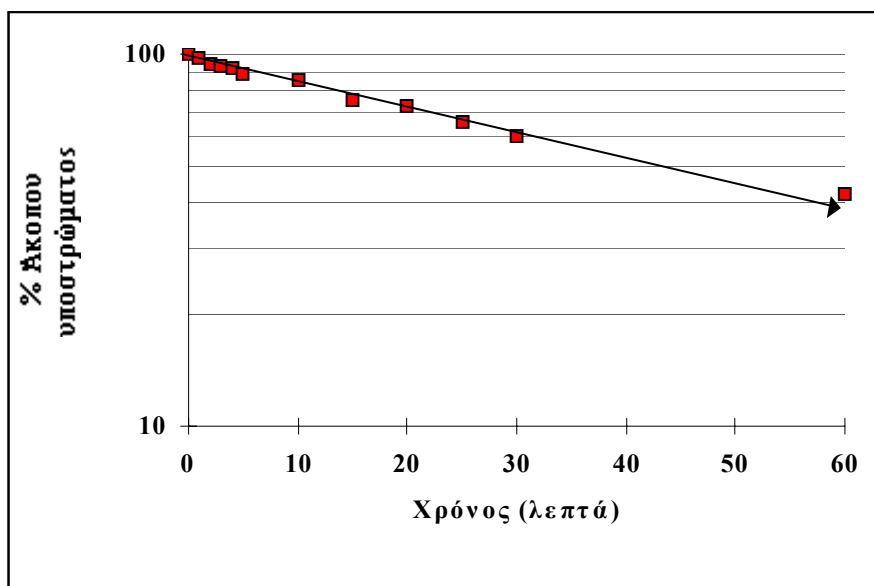
Εικόνα 2: Ανάλυση του σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ του υποστρώματος-RNA και του αντίστοιχου ριβοενζύμου. **(Α)** Σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ ραδιενεργά σημασμένου L_1 (+) RNA και μη σημασμένου L_1 -Rz122. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 60°C , απουσία ιόντων Mg^{2+} και για τον χρόνο που δείχνεται στην κορυφή κάθε λωρίδας. Το δείγμα (30+) βράστηκε πριν εφαρμοσθεί στο μερικώς αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με ουρία, έτσι ώστε να δειχθεί η θέση του αδέσμευτου υποστρώματος-RNA, καθώς και του συμπλόκου στα υπόλοιπα δείγματα. Το σύμπλοκο όπως δείχνεται έχει κιάλας σχηματιστεί μετά από 1 λεπτό επώασης των δυο μορίων RNA. **(Β)** Αντίδραση κινητικής για την μελέτη του σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ του μεταλλαγμένου ριβοενζύμου L_1 -Rz182 και του ραδιενεργά σημασμένου υποστρώματός του L_1 (+) RNA. Το σύμπλοκο έχει σχηματιστεί μετά από 2 λεπτά επώασης των δυο μορίων RNA. **(Γ)** Αντίδραση κινητικής για την μελέτη του σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ ραδιενεργά σημασμένου L_1 -Rz122 και μη σημασμένου L_1 (+) RNA, παρουσία ιόντων Mg^{2+} . Τα δείγματα επώαστηκαν στους 60°C για τον χρόνο που δείχνεται στην κορυφή της κάθε λωρίδας και στην περίπτωση **(α)** χωρίς βράσιμο, ενώ στην περίπτωση **(β)** με βράσιμο, πριν την εφαρμογή τους στο μερικώς αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Σε καμία χρονική στιγμή και ειδικότερα στην **(α)** περίπτωση, δεν παρατηρήθηκε οποιαδήποτε άλλη μορφή ραδιενεργά σημασμένου ριβοενζύμου, εκτός από αυτήν του συμπλόκου με τα δυο προϊόντα της αντίδρασης διάσπασης.

Η αντίδραση διάσπασης θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί κάτω από αυτές τις συνθήκες. Το μισό δείγμα από κάθε συγκεκριμένη χρονική στιγμή χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω τροποποίηση (**στήλη α**), ενώ το άλλο μισό (**στήλη β**) βράστηκε για 1 λεπτό πριν εφαρμοστεί σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για περαιτέρω διαχωρισμό των μορίων RNA. Στην **Εικόνα 2Γ** φαίνεται το αποτέλεσμα του πειράματος, όπου το ριβοένζυμο παραμένει ενωμένο και με τα δυο προϊόντα διάσπασης του υποστρώματός του, χωρίς να εμφανίζονται οποιαδήποτε άλλα μόρια RNA με διαφορετική κινητική ικανότητα, π.χ. σύμπλοκο ριβοενζύμου με ένα από τα δυο προϊόντα της αντίδρασης διάσπασης, ή αδέσμευτο ριβοένζυμο.

Μετά από τα παραπάνω πειράματα ελέγχου των συνθηκών πραγματοποίησης της αντίδρασης, ακολούθησε ο καθορισμός του ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης κάτω από συνθήκες μονού ρυθμού μετατροπής, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Δηλαδή, το κατάλληλο ραδιενεργά σημασμένο υπόστρωμα-RNA σχημάτισε προηγουμένως σύμπλοκο με το αντίστοιχο ριβοένζυμο, που βρισκόταν σε υψηλή μοριακή συγκέντρωση (50-100 nM) και η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη ιόντων Mg^{2+} στο μίγμα. Μια τέτοιου τύπου αντίδραση κινητικής φαίνεται στην **Εικόνα 3**. Παρακολουθώντας την εξέλιξη της αντίδρασης σε σχέση με το χρόνο, μπορούμε να σχεδιάσουμε την γραφική παράσταση του ποσοστού του άκοπου υποστρώματος-RNA σε σχέση με τον χρόνο που διήρκεσε η αντίδραση. Από την κλίση της ευθείας που προκύπτει και φαίνεται στο **Σχήμα 18**, μπορούμε να υπολογίσουμε τον χρόνο ημιζωής του συμπλόκου μεταξύ του υποστρώματος-RNA και του ριβοενζύμου, δηλαδή τον χρόνο που χρειάζεται ώστε το μισό από το υπόστρωμα να παραμένει αδιάσπαστο. Από αυτόν υπολογίστηκε η σταθερά της αντίδρασης διάσπασης K_{cat} για τα διάφορα ριβοένζυμα, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 5**. Σε κάθε περίπτωση, όπου χρησιμοποιούνταν διαφορετικό υπόστρωμα-RNA, το αντίστοιχο ριβοένζυμο με τις τέλεια σχηματισμένες έλικες I και III, ήταν δραστικότερο από εκείνα που είχαν ελλείψεις στις περιοχές των παραπάνω ελίκων. Εν τούτοις η διαφορά ήταν λιγότερο δραματική από την αναμενόμενη. Για παράδειγμα, το ριβοένζυμο L-Rz12 που είχε έλλειψη των νουκλεοτιδίων 2.2 έως 2.4, παρουσίασε 65 % της δραστικότητας του κανονικού ριβοενζύμου L-Rz21. Τα νουκλεοτίδια όμως 2.5 και 2.6 ήταν όμοια με τα 2.2 και 2.3 αντίστοιχα, έτσι ώστε θα μπορούσαν να τα αντικαταστήσουν. Αυτού του τύπου το ριβοένζυμο μπορούσε επομένως να σχηματίσει μια έλικα I με 3 μόνο ζευγάρια βάσεων, γεγονός που θεωρείται αρκετό για την ύπαρξη καταλυτικής ενεργότητας (Tablet κ.α., 1994).



Εικόνα 3: Παράδειγμα εξέλιξης της αντίδρασης διάσπασης σε συνάρτηση με τον χρόνο, για το L₁ (+) υπόστρωμα-RNA από το αντίστοιχο ριβοένζυμο L₁-Rz122. Δείχνονται οι θέσεις του άκοπου υποστρώματος-RNA, καθώς και των 5' και 3' προϊόντων διάσπασης του υποστρώματος.



Σχήμα 18: Γραφική παράσταση της διάσπασης του υποστρώματος L (-) RNA από το αντίστοιχο κανονικό ριβοένζυμο L-Rz21, ως προς τον χρόνο, σε ημιλογαριθμικό χαρτί. Από την κλίση της ευθείας υπολογίστηκαν οι τιμές $t_{1/2}$, έτσι ώστε να γίνει στη συνέχεια δυνατός ο καθορισμός της σταθεράς του ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης.

Πίνακας 5: Χρόνοι ημιζωής και σταθερές του ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης για τα διαφορετικά ενεργά ριβοένζυμα, κανονικά (έντονα γράμματα) ή μεταλλαγμένα, όπως μετρήθηκαν μετά από επώασή τους με το αντίστοιχο υποστρώμα-RNA, στους 60°C.

Ριβοένζυμο	Υπόστρωμα	$t_{1/2}^{\alpha}$ (λεπτά)	$K_{\delta\lambda\sigma\pi}^{\beta}$ ($10^{-2}/\lambda\epsilon\pi\tau\acute{o}$)	$K_{\delta\lambda\sigma\pi\mu\epsilon\tau\alpha\lambda\lambda.}/$ $K_{\delta\lambda\sigma\pi\kappa\alpha\nu\omicron\nu.}^{\gamma}$
P-Rz32	P (+) RNA	31,5	2,20	1,00
P-Rz7	-//-	65,6	1,00	0,45
P-Rz82	P (-) RNA	11,6	6,00	1,00
P-Rz92	-//-	49,5	1,40	0,23
P-Rz62	-//-	106,3	0,65	0,11
P-Rz41	-//-	176,4	0,40	0,07
L-Rz21	L (-) RNA	45,8	1,50	1,00
L-Rz12	-//-	71,7	0,97	0,65
L-Rz40	-//-	78,1	0,90	0,60
L₁-Rz122	L₁ (+) RNA	55,7	1,25	1,00
L ₁ -Rz182	-//-	194,7	0,36	0,29
L₁-Rz72	L₁ (-) RNA	153,1	0,45	1,00
L ₁ -Rz162	-//-	311,7	0,22	0,49
L_I-Rz142	L_I (+) RNA	0,75	92,00	1,00
L _I -Rz19	-//-	363,5	0,20	0,002

α . Οι τιμές αποτελούν τον μέσο όρο δυο πειραμάτων και η σταθερά απόκλιση ήταν 10 % ή λιγότερο.

β . Η μετρούμενη σταθερά του ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης αντιστοιχεί στην ανιχνεύσιμη απόδοση της συνολικής διαδικασίας διάσπασης, μετά τον σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ του υποστρώματος-RNA και του ριβοενζύμου. Δεν αντιπροσωπεύει αναγκαστικά τον ρυθμό του πραγματικού χημικού σταδίου, δηλαδή της αντίδρασης τρανσεστεροποίησης.

γ . Οι σχετικοί ρυθμοί της αντίδρασης διάσπασης για τα κανονικά και τα μεταλλαγμένα ριβοένζυμα. Στα κανονικά και για κάθε ξεχωριστή κατηγορία ενάντια σε διαφορετικό υπόστρωμα, ο λόγος αυτός είναι ίσος με 1,00, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των μεταλλαγμένων ριβοενζύμων με αυτά.

Έλλειψη των νουκλεοτιδίων 2.2 και 2.3 είχε επίσης το αποτέλεσμα, της μόλις 4 φορές ελάττωση της ριβοενζυμικής δραστηριότητας, αν συγκριθεί το μεταλλαγμένο ριβοένζυμο P-Rz92 με το κανονικό P-Rz82, καθώς και το μεταλλαγμένο L₁-Rz182 με το κανονικό L₁-Rz122. Επίσης έλλειψη των 5 νουκλεοτιδίων, από 2.2 έως 2.6 στο μεταλλαγμένο L₁-Rz162 συνέβαλε σε πτώση της ριβοενζυμικής δραστηριότητας μόλις στο 50% του κανονικού L₁-Rz72. Αντιθέτως, έλλειψη μόνο του νουκλεοτιδίου 2.2 στο μεταλλαγμένο P-Rz62, ελάττωσε την ενεργότητα 10 φορές του κανονικού P-Rz82. Δραματική ελάττωση, σε σχέση με το κανονικό ριβοένζυμο L₁-Rz142, βρέθηκε όταν έλλειπε το νουκλεοτίδιο 2.1 στο μεταλλαγμένο L₁-Rz19, ενώ η έλλειψη του νουκλεοτιδίου 15.3, που όμως είναι το ίδιο με το 15.4, στο μεταλλαγμένο P-Rz7, ελάττωσε την ενεργότητα μόνο κατά δυο φορές σε σχέση με το κανονικό P-Rz32.

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός, ότι ο ρυθμός της αντίδρασης διάσπασης παρουσίαζε αισθητή ποικιλομορφία μεταξύ των κανονικών ριβοενζύμων, που στόχευαν όμως διαφορετικό υπόστρωμα-RNA, κάτω από τις ίδιες συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης (**Πίνακας 5**). Το γεγονός αυτό δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στην διαφορετική φύση της τριπλέτας νουκλεοτιδίων, που καθορίζουν την συγκεκριμένη θέση διάσπασης του υποστρώματος από το αντίστοιχο ριβοένζυμο. Για παράδειγμα, όλα τα ριβοένζυμα P-Rz32, P-Rz82 και L₁-Rz142, πραγματοποιούν την διάσπαση μετά από GUC στο υπόστρωμα-RNA τους, που στην κάθε περίπτωση όμως, αυτή η τριπλέτα περιβάλλεται από διαφορετική νουκλεοτιδική αλληλουχία (sequence context), με αποτέλεσμα την κατά 50 φορές υψηλότερη δραστηριότητα του ριβοενζύμου L₁-Rz142 συγκρινόμενο με το P-Rz32.

(B) ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ N ΚΑΙ X ΤΗΣ ΤΡΙΠΛΕΤΑΣ NUX, ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΕΙ ΤΗΝ ΘΕΣΗ - ΣΤΟΧΟ.

Στόχος των πειραμάτων αυτής της ενότητας, ήταν η συστηματική μελέτη της επίδρασης της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων NUX στην θέση-στόχο του υποστρώματος, στην συνολική αποτελεσματικότητα της αντίδρασης διάσπασης, όταν οι υπόλοιπες αλληλουχίες της έλικας I και III παραμένουν όμοιες. Το κίνητρο για μια τέτοια μελέτη δόθηκε από τα δεδομένα προηγούμενων μελετών, που ήταν αντιφατικά (**Ruffner κ.α., 1990, Perriman κ.α., 1992**), αφού παρουσίαζαν σημαντικές διακυμάνσεις στην αποδοτικότητα της αντίδρασης. Παρουσία AUC στη θέση-στόχο στην πρώτη δημοσίευση, έδειχνε να ευνοεί την διάσπαση του υποστρώματος από το αντίστοιχο ριβοένζυμο, ενώ στην δεύτερη δημοσίευση συνέβαινε το αντίθετο. Η μόνη διαφορά μεταξύ των δυο αυτών εργασιών, ήταν η νουκλεοτιδική αλληλουχία εκατέρωθεν του AUC. Συγχρόνως όμως, καμμία από αυτές δεν πραγματοποίησε συστηματική ανάλυση όλων των πιθανών συνδυασμών στην θέση-στόχο. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκε μια συστηματικότερη ανάλυση, με σύγκριση των σχετικών ρυθμών των αντιδράσεων διάσπασης, όταν στη θέση-στόχο υπήρχε κάθε ένας από τους 12 δυνατούς συνδυασμούς νουκλεοτιδίων που προκύπτουν από τον τύπο NUX, όπου N= A, C, G, U και X= A, C ή U, αλλά στο ίδιο μόριο υποστρώματος-RNA. Για κάθε τρεις τέτοιους συνδυασμούς νουκλεοτιδίων, όπως AUC, AUA και AUU, αντιστοιχεί ένα μόνο ριβοένζυμο, αφού τα νουκλεοτίδια 16.1 και 16.2 παραμένουν σταθερά και συγχρόνως το τελευταίο νουκλεοτίδιο της τριπλέτας, αμέσως μετά από το οποίο θα πραγματοποιηθεί η διάσπαση του υποστρώματος, που μπορεί να είναι C ή A ή U και αντιστοιχεί στην θέση 17 της σφυροκέφαλης δομής, παραμένει ελεύθερο κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ του υποστρώματος και του ριβοενζύμου (**Σχήμα 9**). Τα 4 ριβοένζυμα, που κατασκευάστηκαν, ήταν της μορφής των "ασύμμετρων σφυροκέφαλων καταλυτικών RNA", δηλαδή οι αντικωδικοί βραχίονες που σχημάτιζαν τις έλικες I και III, είχαν μήκος 3 και 154 νουκλεοτιδίων, αντίστοιχα ο καθένας. Αυτό το είδος του ριβοενζύμου περιγράφεται εκτενέστερα από τους **Tabler κ.α. (1994)** και εκτός του ότι η αντίδραση διάσπασης παρουσίαζε αυξημένη απόδοση, επιλέχθηκε για την κατασκευή των ριβοενζύμων της συγκεκριμένης μελέτης, επειδή ένας τέτοιος σχεδιασμός απλοποιούσε τις απαιτούμενες τροποποιήσεις στο DNA, ώστε να δημιουργηθούν οι διάφορες κατασκευές.

1) ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ 12 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ RNA ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΩΝ 4 ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ

Για την κατασκευή των πλασμιδίων, που κωδικοποιούν τα 12 διαφορετικά RNA υποστρώματα, χρησιμοποιήθηκε ως μεταλλάξιμη μήτρα το πλασμίδιο pBS29-CX (**Σχήμα 19**). Αυτό περιέχει ένα κομμάτι cDNA μήκους 413 bp, μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *SacI* και *HindIII* του κλώνου BH10, που αντιστοιχούν στις νουκλεοτιδικές θέσεις 222 έως 634 του HIV-1 RNA (**Homann κ.α., 1993**). Τα νουκλεοτίδια στις θέσεις 374, 375 και 376 είναι αντίστοιχα τα ATC και αποτελούν μέρος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας AT/CGAT που αναγνωρίζεται από το περιοριστικό ένζυμο *ClaI*. Τα νουκλεοτίδια A(374) και C(376) αντικαταστάθηκαν με συστηματικό τρόπο από G, ή T, ή C και T, ή A αντίστοιχα, σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς, με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με τον προγραμματισμό (2), όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη ενότητα του κεφαλαίου "Υλικά και Μέθοδοι". Εκτός από τον T7 εκκινήτη (primer), χρησιμοποιήθηκε για τον σκοπό αυτό και ένα εκφυλισμένο ολιγονουκλεοτίδιο DNA (**Πίνακας 2**), το οποίο εισήγαγε επίσης μια περιοριστική θέση *BamHI* στο παραγόμενο με PCR κομμάτι DNA, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίησή του. Τα προϊόντα της αντίδρασης επώαστηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα *SacI* και *BamHI* και συγκολλήθηκαν στο πλασμίδιο-φορέα κλωνοποίησης pT3T7*lac*, το οποίο είχε προηγουμένως επωαστεί με τα ίδια ένζυμα. Με την μέθοδο προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής ακολουθίας (sequencing) περίπου 50 διαφορετικοί κλώνοι αναλύθηκαν και αναγνωρίστηκαν τα πλασμίδια με τους 12 δυνατούς συνδυασμούς, δηλαδή όλοι οι συνδυασμοί μεταξύ των νουκλεοτιδίων A, G, C, T στη θέση 374 και ενός κάθε φορά από τα νουκλεοτίδια A, C, T στη θέση 376, εκατέρωθεν της θέσεως 375 που ήταν αμετάλλακτη και κατεχόμενη από T. Αυτά τα πλασμίδια έδιναν την δυνατότητα της *in vitro* σύνθεσης του υποστρώματος-RNA, που φαίνονται στο **Σχήμα 20** και διαφέρουν μόνο στα νουκλεοτίδια των θέσεων 16.2 και 17, σύμφωνα με το διεθνώς εφαρμοζόμενο σύστημα αρίθμησης των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων **Hertel κ.α. (1992)**. Η υπόλοιπη νουκλεοτιδική ακολουθία παρέμεινε αναλλοίωτη και ίδια μεταξύ των διαφορετικών πλασμιδίων.

Σχήμα 20: Απεικόνιση των 12 διαφορετικών υποστρωμάτων-RNA καθώς και των 4 αντίστοιχων ριβοενζύμων. Πιο συγκεκριμένα δείχνονται: **(α)** η περιοχή σχηματισμού της έλικας I, από τρία μόνο ζεύγη βάσεων, καθώς και η περιοχή σχηματισμού της έλικας III, από 154 ζεύγη βάσεων, **(β)** με πλάγιους αριθμούς οι νουκλεοτιδικές θέσεις του γενωμικού HIV-1 RNA, ενώ οι κανονικοί αριθμοί δείχνουν την αρίθμηση των νουκλεοτιδίων σύμφωνα με το διεθνές σύστημα αρίθμησης των **Hertel κ.α. (1992)**, **(γ)** με έντονα γράμματα, στο μεν υπόστρωμα η θέση-στόχος, το νουκλεοτίδιο 17 (376) της οποίας μπορεί να είναι ή A, ή C, ή U κάθε φορά, στο δε ριβοένζυμο το νουκλεοτίδιο 15.2, το οποίο είναι διαφορετικό μεταξύ των 4 ριβοενζύμων Rz-U, Rz-G, Rz-C και Rz-A, **(δ)** το 5' και 3' άκρο του κάθε μορίου RNA, που συμμετέχει στον σχηματισμό του συμπλόκου και **(ε)** οι τιμές της σταθεράς του ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης $K_{\text{διασπ}}$ (10^{-4} /λεπτό) για τα 12 διαφορετικά υποστρώματα. Οπως φαίνεται την μεγαλύτερη απόδοση έχουμε όταν στη θέση-στόχο υπάρχει η τριπλέτα AUC ή GUC, ενώ την μικρότερη όταν υπάρχει UUU ή CUU.

Υπόστρωμα RNA με θέση-στόχο: AUX

<u>Ελικά III</u>	376	<u>Ελικά I</u>	
222	374	17	
16.154	16.216.1	A	GGGAUC-3'
5'-G---UUAG	A U C	G A U	
:	:::: :	U : : :	
3'-C---AATC	U A	C U A	
15.154	15.2	A	C AUUCGA-5'
	A	U	
	G	A G	
<u>Rz-U</u>	C--G	G A	
	C--G	U	
	G--C		AUA: 8,7
	G--C		AUC: 24,0
	A U		AUU: 5,5
	G C		

Υπόστρωμα RNA με θέση-στόχο: CUX

<u>Ελικά III</u>	376	<u>Ελικά I</u>	
222	374	17	
16.154	16.216.1	A	GGGAUC-3'
5'-G---UUAG	C U C	G A U	
:	:::: :	U : : :	
3'-C---AATC	G A	C U A	
15.154	15.2	A	C AUUCGA-5'
	A	U	
	G	A G	
<u>Rz-G</u>	C--G	G A	
	C--G	U	
	G--C		CUA: 2,0
	G--C		CUC: 4,7
	A U		CUU: 1,1
	G C		

Υπόστρωμα RNA με θέση-στόχο: GUX

<u>Ελικά III</u>	376	<u>Ελικά I</u>	
222	374	17	
16.154	16.216.1	A	GGGAUC-3'
5'-G---UUAG	G U C	G A U	
:	:::: :	U : : :	
3'-C---AATC	C A	C U A	
15.154	15.2	A	C AUUCGA-5'
	A	U	
	G	A G	
<u>Rz-C</u>	C--G	G A	
	C--G	U	
	G--C		GUA: 6,0
	G--C		GUC: 20,0
	A U		GUU: 3,0
	G C		

Υπόστρωμα RNA με θέση-στόχο: UUX

<u>Ελικά III</u>	376	<u>Ελικά I</u>	
222	374	17	
16.154	16.216.1	A	GGGAUC-3'
5'-G---UUAG	U U C	G A U	
:	:::: :	U : : :	
3'-C---AATC	A A	C U A	
15.154	15.2	A	C AUUCGA-5'
	A	U	
	G	A G	
<u>Rz-A</u>	C--G	G A	
	C--G	U	
	G--C		UUA: 4,6
	G--C		UUC: 14,0
	A U		UUU: 0,6
	G C		

Για την κατασκευή των πλασμιδίων, που κωδικοποιούν τα τέσσερα διαφορετικά ριβοένζυμα, εναντίον των 12 δυνατών συνδυασμών στη θέση-στόχο του υποστρώματος, χρησιμοποιήθηκε η *ClaI* περιοριστική θέση του πλασμιδίου pBS29-CX, όπου και εισήχθη μια *ClaI*-ειδική DNA "κασσέτα", με σκοπό να κατασκευαστεί ένα ριβοένζυμο ή αλλιώς καταλυτικό αντικωδικό RNA, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο "Υλικά και Μέθοδοι" και δείχνεται ειδικότερα για την συγκεκριμένη περίπτωση στο **Σχήμα 21**. Το πλασμίδιο p2as-RzC7 που προέκυψε, κωδικοποιούσε ένα "σφυροκέφαλο" ριβοένζυμο ειδικό για την AUC τριπλέτα-στόχο στις θέσεις 374-376. Αυτό με τη σειρά του μετατράπηκε σε 4 διαφορετικά πλασμίδια που κωδικοποιούσαν ασύμμετρα "σφυροκέφαλα" ριβοένζυμα, που διέφεραν στο νουκλεοτίδιο της θέσης 374. Τέσσερις διαφορετικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιήθηκαν με βάση τον προγραμματισμό (2), αλλά χρησιμοποιώντας πλασμιδιακό DNA p2as-RzC7 και κάθε φορά ένα από τα DNA ολιγονουκλεοτίδια, A-Rz3H1, C-Rz3H1, G-Rz3H1 και U-Rz3H1 (**Πίνακας 2**), σε συνδυασμό με τον T7 εκκινητή. Τα προϊόντα της αντίδρασης επώαστηκαν με *SacI* και *XhoI* και συγκολλήθηκαν στις ίδιες θέσεις του p2as-Rz12/2, όμοιο με αυτό της έρευνας των **Tablet κ.α. (1994)**, το οποίο είχε τα 3 νουκλεοτίδια (5' AUC 3') για τον σχηματισμό της έλικας I με το υπόστρωμα-RNA, προσδίδοντας με αυτό τον τρόπο τον ασύμμετρο χαρακτήρα στο ριβοένζυμο ή αλλιώς καταλυτικό αντικωδικό RNA. Τελικώς, τα πλασμίδια pRz-A, pRz-C, pRz-G και pRz-U δημιουργήθηκαν, τα οποία επέτρεπαν την *in vitro* σύνθεση των ριβοενζύμων Rz-A, Rz-C, Rz-G και Rz-U αντίστοιχα, που σαν στόχο τους είχαν το καθένα, τρία διαφορετικά υποστρώματα-RNA όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 20**.

Σχήμα 21: Μεθοδολογία για την κατασκευή του πλασμιδίου pRz-A, ενός από τα 4 διαφορετικά ασύμμετρα καταλυτικά αντικωδικά RNA, με την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με την βοήθεια των εκκινητών T7 και A-Rz3H1. Με αντικατάσταση μόνο του εκκινητή A-Rz3H1, από τους G-Rz3H1 ή C-Rz3H1 ή U-Rz3H1 (**Πίνακας 2**), κατασκευάστηκαν τα πλασμίδια pRz-G, pRz-C και pRz-U. Στο σχήμα δείχνονται: **(α)** οι περιοριστικές θέσεις *SacI* και *HindIII* του πλασμιδίου pBS29-CX, μεταξύ των οποίων βρίσκεται κλωνοποιημένο το cDNA τμήμα του γενωμικού HIV-1 RNA, στο οποίο αντιστοιχούν και οι αριθμοί 222 και 634, καθώς και η περιοριστική θέση *ClaI*, στην οποία έγινε ένθεση της *ClaI* ειδικής δίκλωνης DNA "κασσέτας", που περιέχει όμως μια *AflII* περιοριστική θέση, για την κατασκευή του πλασμιδίου p2as-RzC7, **(β)** η θέση του εκκινητή T7, καθώς και η νουκλεοτιδική αλληλουχία του εκκινητή A-Rz3H1, όπου φαίνονται με έντονα και υπογραμμισμένα γράμματα, η περιοριστική θέση *XhoI* που θα δημιουργηθεί και το νουκλεοτίδιο που πρέπει να αλλαχθεί κάθε φορά, για την δημιουργία του κατάλληλου ριβοενζύμου π.χ. Rz-A, όταν από το πλασμίδιο p2as-Rz12/2 αφαιρεθεί η αντίστοιχη περιοχή, **(γ)** με μικρά γράμματα η καταλυτική περιοχή του ριβοενζύμου και **(δ)** το 5' και 3' άκρο της κάθε νουκλεοτιδικής αλυσίδας.

Πλασμίδιο pBS29-CX

```

5'      GGGGAGAATTAG ATCGAT GGGAAAAAATTC 3'
SacI-//-:~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~-//-HindIII
!      CCCCTCTTAATC TAGCTA CCCTTTTTTAAG      !
222                      ClaI                      634

```

(1) Επώαση με το περιοριστικό ένζυμο *ClaI*

```

5'      GGGGAGAATTAG AT      CGAT GGGAAAAAATTC 3'
SacI-//-:~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~-//-HindIII
          CCCCTCTTAATC TAGC      TA CCCTTTTTTAAG

```

(2) Περικοπή προεξεχόντων νουκλεοτιδίων με νουκλεάση *S₁*

```

5'      GGGGAGAATTAG AT      AT GGGAAAAAATTC 3'
SacI-//-:~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~-//-HindIII
          CCCCTCTTAATC TA      TA CCCTTTTTTAAG

```

(3) Ενθεση της *ClaI* ειδικής δίκλωνης DNA "κασσέτας"Πλασμίδιο p2as-RzC7:

```

T7                                AflIII
5'      GGGGAGAATTAGATttcgggccttaaggcctcatcaggATGGGAAAAAATTC 3'
SacI-//-:~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~-//-
          CCCCTCTTAATCTAaagccggaattccggagtagtcctACCCTTTTTTAAG
3'      CTCTTAATCAAAAGCCGGAGCTCCGC 5'      A-Rz3H1 εκκινητής
                                     XhoI

```

(4) Πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

(5) Επώαση των προϊόντων της αντίδρασης με *SacI* και *XhoI*(6) Επώαση του πλασμιδίου p2as-Rz12/2 με *SacI* και *XhoI*Πλασμίδιο p2as-Rz12/2:

```

                                     XhoI
          AGGCTGTttcgggcctcgaggcctcatcagGATTAAGCTTTTGTGCC
SacI-//-:~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~-
          TCCGACAaagccggagctccggagtagtcCTAATTCGAAAACAAGGG

```

(7) Συγκόλληση των προϊόντων από τα στάδια (5) και (6) για την κατασκευή του πλασμιδίου pRz-A

Πλασμίδιο pRz-A

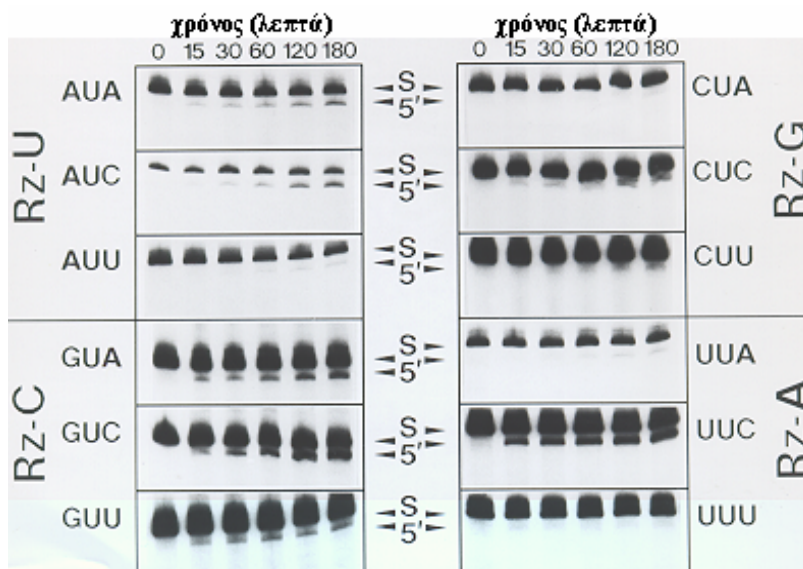
```

5'      G      TTAGTTttcgggcctcgaggcctcatcagGATTAAGCTTTTGTGCC 3'
:-//-:~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~-
C      AATCAAaagccggagctccggagtagtcCTAATTCGAAAACAAGGG

```

2) ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ-RNA

Ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιήθηκε ο καθορισμός του ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης του υποστρώματος είναι ο ίδιος με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της προηγούμενης ενότητας. Δηλαδή, ραδιενεργά σημασμένα μετάγραφα RNA από τα 12 διαφορετικά υποστρώματα-RNA στόχους και υψηλή μοριακή περίσσεια από μη σημασμένα μετάγραφα RNA από τα αντίστοιχα 4 ριβοένζυμα, προετοιμάστηκαν για την ανάλυση της αντίδρασης διάσπασης του υποστρώματος. Οι συνθήκες ήταν οι ίδιες με αυτές που περιγράφονται και προηγούμενα, δηλαδή της μη αποσύνδεσης του ριβοενζύμου από τα προϊόντα της αντίδρασης μετά την διάσπαση του υποστρώματος, κάτι που εξασφαλίζεται από την μακριά έλικα III. Για να αποκλειστούν τώρα οι οποιεσδήποτε διαφορές στην κινητική δέσμευσης του υποστρώματος με το αντίστοιχο ριβοένζυμο και τον σχηματισμό συμπλόκου, μια δεκαπλάσια μοριακή περίσσεια του ριβοενζύμου προεπώαστηκε για 10-15 λεπτά στους 37°C, με το αντίστοιχο ραδιενεργά σημασμένο υποστρώμα-RNA. Μετά την επιβεβαίωση του επιτυχούς σχηματισμού δίκλωνου συμπλόκου κάτω από αυτές τις συνθήκες, η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη ιόντων Mg^{2+} στο μίγμα. Στα δείγματα της κάθε χρονικής στιγμής, για την οποία διήρκεσε η αντίδραση, μετρήθηκε η ραδιενέργεια του άκοπου υποστρώματος-RNA, όπως επίσης και του προϊόντος-RNA προς το 5' άκρο, ως προς την θέση διάσπασης του υποστρώματος. Τα αποτελέσματα τέτοιων αντιδράσεων κινητικής για τα 12 διαφορετικά υποστρώματα-RNA, φαίνονται στην **Εικόνα 4**. Το προς το 3' άκρο προϊόν-RNA μήκους μόλις 5 νουκλεοτιδίων, δεν αναλύθηκε. Όπως περιγράφεται και από τους **Homann κ.α. (1993, 1994)** και **Tablet κ.α. (1994)**, κάτω από αυτές τις συνθήκες, η καταλυόμενη από το ριβοένζυμο αντίδραση ακολουθεί κινητική ψευδο-πρώτης τάξεως, η οποία επέτρεψε τον καθορισμό της σταθεράς του παρατηρούμενου ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης. Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 20**, βρέθηκε ότι οι υψηλότερες τιμές παρουσιάζονταν, εάν το νουκλεοτίδιο στη θέση 17 ήταν C, γεγονός που είχε σαν αποτέλεσμα την κατά 2-3 φορές αποτελεσματικότερη ανιχνεύσιμη διάσπαση, συγκρινόμενη με το αν υπήρχε A στην ίδια θέση. Η παρουσία U στην θέση αυτή, συνέβαλλε στην περαιτέρω ελάττωση του ρυθμού της αντίδρασης στο μισό του παρατηρούμενου, όταν υπήρχε A στη θέση 17. Αξιοσημείωτη εξαίρεση ήταν αυτή της τριπλέτας UUU, που είχε την χαμηλότερη τιμή από όλες όσες υπολογίστηκαν. Λαμβάνοντας υπόψη το νουκλεοτίδιο 16.2, η αποτελεσματικότερη διάσπαση παρατηρήθηκε από το ριβοένζυμο Rz-U, όταν δηλαδή η θέση αυτή κατέχονταν από το νουκλεοτίδιο A στο υποστρώμα-RNA. Επίσης, το ριβοένζυμο Rz-C παρουσίασε σχετικά υψηλές τιμές, ενώ το ριβοένζυμο Rz-A είχε το 70% της ενεργότητας του ριβοενζύμου Rz-C, χωρίς να λάβουμε υπόψη μας την περίπτωση της τριπλέτας UUU. Τέλος, η διάσπαση του υποστρώματος από το ριβοένζυμο Rz-G, ήταν γενικά πολύ φτωχή.



Εικόνα 4: Εξέλιξη της αντίδρασης διάσπασης για τις 12 διαφορετικές θέσεις-στόχους του υποστρώματος-RNA, σε συνάρτηση με τον χρόνο. Ο χρόνος επώασης στους 37⁰C δείχνεται στην κορυφή, ενώ στα πλάγια φαίνονται επίσης το είδος της τριπλέτας στην θέση-στόχο, το αντίστοιχο ριβοένζυμο, καθώς και η θέση του άκοπου υποστρώματος και του 5' παραγόμενου προϊόντος της αντίδρασης διάσπασης. Μετρήθηκε η ραδιενέργεια, τόσο του άκοπου υποστρώματος, όσο και του 5' παραγόμενου προϊόντος, ώστε να υπολογιστεί η σταθερά του ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης, όπως περιγράφεται λεπτομερέστερα στο κεφάλαιο "Υλικά και Μέθοδοι".

(Γ) IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΟΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ (*Saccharomyces cerevisiae*).

Ο μηχανισμός με τον οποίο ρυθμίζεται η έκφραση των διαφόρων γονιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ένα ερώτημα πολύ ενδιαφέρον και αντικείμενο εντατικής μελέτης, αφού αποτελεί τον πυρήνα της ανταπόκρισης των κυττάρων στα ποικίλα εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα, είτε αυτά προέρχονται από μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, είτε από την ανάγκη ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και εν γένει επιβαλλόμενες αναπτυξιακές μεταβολές. Η εναρμόνιση της έκφρασης των γονιδίων με τα εκάστοτε ερεθίσματα ή τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, εξασφαλίζει τόσο την βιωσιμότητα του κυττάρου όσο και την οντογένεσή του και την ικανότητα αναπαραγωγής του, με σκοπό την διαίωσή του.

Στα πειράματα αυτής της ενότητας περιγράφεται η κατασκευή και χρησιμοποίηση καταλυτικών αντικωδικών RNA σφυροκέφαλου τύπου, με σκοπό την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε κύτταρα του οργανισμού *Saccharomyces cerevisiae*.

1) ΓΙΑΤΙ ΕΠΙΛΕΧΘΗΚΕ Ο SACCHAROMYCES CEREVISIAE ΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η επιλογή του συγκεκριμένου βιολογικού συστήματος έγινε με βάση το γεγονός, ότι ο σακχαρομύκητας είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός, ο οποίος είναι αρκετά ελκυστικός από ερευνητικής άποψης, λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρει στην μελέτη και απάντηση συγκεκριμένων βιολογικών ερωτημάτων, που μπορεί να αφορούν το σύνολο των ευκαρυωτικών οργανισμών. Έχει σύντομο κυτταρικό κύκλο, αναπαράγεται σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα και αναπτύσσεται χωρίς ιδιαίτερες τροφικές απαιτήσεις και προφυλάξεις. Αποτελεί επομένως έναν ευκολομεταχειρίσιμο πειραματικά οργανισμό, έστω και για κάποιον που δεν τον χρησιμοποιεί συστηματικά και αποκλειστικά για τις μελέτες του. Έχει επίσης την δυνατότητα να υπάρχει σε δυο διαφορετικές μορφές, τόσο την απλοειδή όσο και τη διπλοειδή, που σε συνδυασμό με το πλήθος των διαθέσιμων μεταλλαγών σε διάφορους γενετικούς τόπους, επιτρέπει την εφαρμογή κλασσικής γενετικής ανάλυσης. Η ύπαρξη μεγάλης ποικιλίας πλασμιδιακών φορέων, καθώς και τεχνικών μετασχηματισμού του, σε συνδυασμό με την εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων μοριακής βιολογίας, δίνουν επίσης την δυνατότητα μοριακής ανάλυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών.

2) ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ RNA-ΣΤΟΧΟΥ ΓΙΑ ΤΑ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΑ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΑ

Σαν στόχος του ριβοενζύμου χρησιμοποιήθηκε το mRNA του γονιδίου *GCN4*, που κωδικοποιεί έναν καλά μελετημένο μεταγραφικό ενεργοποιητή των γονιδίων βιοσύνθεσης των αμινοξέων, αποτελεί δηλαδή μέρος του "γενικού συστήματος ελέγχου βιοσύνθεσης των αμινοξέων". Το σύστημα αυτό είναι υπεύθυνο για το κοινό φαινόμενο που παρατηρείται στους μύκητες *Neurospora crassa* (Carsiotis και Jones, 1974), *Aspergillus nidulans* (Piotrowska M., 1980) και *Saccharomyces cerevisiae* (Jones και Fink, 1985), να έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσονται σε περιβάλλον, που παρατηρείται έλλειψη αμινοξέων. Αυτό συμβαίνει λόγω της ιδιαιτερότητας, που έχουν οι οργανισμοί αυτοί, να μπορούν να βιοσυνθέτουν τα δικά τους αμινοξέα. Ειδικότερα στον σακχαρομύκητα, όταν αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο στο οποίο δεν υπάρχει ένα αμινοξύ, παρατηρείται ενεργοποίηση σε επίπεδο μεταγραφής, περισσότερων από τριάντα γονιδίων (Hinnebusch, 1988), τα οποία κωδικοποιούν τα ένζυμα εκείνα που είναι υπεύθυνα για την βιοσύνθεση των περισσότερων αμινοξέων. Η μεταγραφή των γονιδίων βιοσύνθεσης αμινοξέων ελέγχεται από τα μεν γονίδια *GCN1*, *GCN2*, *GCN3*, *GCN4* και *GCN5* θετικά, από τα δε *GCD1* έως *GCD7* και *GCD9* έως *GCD13* αρνητικά (Hinnebusch, 1985). Μεταλλαγές στα πρώτα υποχρεώνουν τα κύτταρα που τις φέρουν να μην μπορούν να μεγαλώσουν σε φτωχό θρεπτικό μέσο, ενώ μεταλλαγές σε οποιοδήποτε γονίδιο από τα δεύτερα, έχουν σαν αποτέλεσμα υψηλό επίπεδο μεταγραφής των γονιδίων βιοσύνθεσης των αμινοξέων ανεξάρτητα από τις συνθήκες καλλιέργειας.

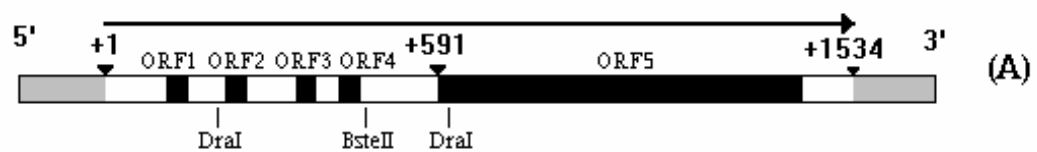
Κεντρικό ρόλο στο γενικό σύστημα ελέγχου κατέχει το προϊόν του γονιδίου *GCN4*, το οποίο είναι ένας από τους καλύτερα χαρακτηρισμένους ενεργοποιητές της μεταγραφής των ευκαρυωτικών κυττάρων (Hope and Struhl, 1986). Η πρωτεΐνη αυτή δεσμεύεται ως διμερές (Hope και Struhl, 1987) στην παλίνδρομη αλληλουχία 5'-TGA(C/G)TCA -3', που βρίσκεται μια ή και περισσότερες φορές στον υποκινητή των γονιδίων βιοσύνθεσης των αμινοξέων και επάγει τη μεταγραφή τους (Hill κ.α., 1986). Μεταλλαγές που καταστρέφουν την αλληλουχία αυτή καθιστούν τα κύτταρα ανίκανα να μεγαλώσουν σε φτωχό θρεπτικό μέσο, αφού τα αντίστοιχα γονίδια δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν μεταγραφικά (Hill κ.α., 1986). Ενθεση της αλληλουχίας στην περιοχή του υποκινητή γονιδίων, που δεν υπόκεινται στον έλεγχο ενός τέτοιου συστήματος, τα θέτει υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του *GCN4*.

Η έκφραση της πρωτεΐνης *gen4* ρυθμίζεται ποσοτικά στο επίπεδο της μετάφρασης, ανάλογα με την ανάγκη για αμινοξέα. Το mRNA του συγκεκριμένου γονιδίου παρουσιάζει μια ασυνήθιστη δομή, όπως φαίνεται στο Σχήμα 22 (A), καθώς στην 5' μη μεταφραζόμενη

περιοχή του, περιέχει τέσσερα ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος (Open Reading Frames, ORFs) με αρνητική επίδραση στην μετάφρασή του (Mueller και Hinnebusch, 1986). Το mRNA αυτό εκφράζεται συνεχώς και σε υψηλά επίπεδα, αλλά μεταφράζεται πολύ περισσότερο μόνο κάτω από συνθήκες έλλειψης αμινοξέων (Thireos κ.α., 1984). Τότε η πρωτεϊνική κινάση που κωδικοποιείται από το γονίδιο *GCN2* ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει την α -υπομονάδα του παράγοντα έναρξης της μεταγραφής eIF2 (Roussou κ.α., 1988, Dever κ.α., 1992). Η τροποποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του ρυθμού σχηματισμού του συμπλόκου του μηχανισμού μετάφρασης, 40S met-tRNA, γεγονός που συμβάλλει στο να ξεπεραστούν τα εμπόδια από την παρουσία των τεσσάρων AUG, στα αντίστοιχα ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής (Abastado κ.α., 1991). Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η δραματική αύξηση της πρωτεΐνης *gcn4*, που μπορεί να ρυθμίσει την μεταγραφή όλων εκείνων των γονιδίων, που φέρουν την κατάλληλη γι' αυτήν θέση πρόσδεσης.

Άμεση απόδειξη ότι τα AUG κωδικόνια των τεσσάρων ανοιχτών πλαισίων διαβάσματος της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του *GCN4* mRNA ή ολόκληρα τα ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος, απαιτούνται για την μεταφραστική ρύθμιση του *GCN4* mRNA, δόθηκε **α)** από τα πειράματα όπου είχε γίνει σταδιακά σημειακή μετάλλαξη στο ένα ή τα δύο ή τα τρία ή και τα τέσσερα AUG, καθώς και **β)** από την σταδιακή απομάκρυνση ενός ή δύο ή τριών ή τελικά όλων των ανοιχτών πλαισίων διαβάσματος της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής (Hinnebusch, 1988). Για την εκτίμηση του αποτελέσματος και των δύο τύπων πειραμάτων, μετρήθηκε η ενζυμική ενεργότητα της β -γαλακτοσιδάσης, το γονίδιο της οποίας (*lacZ*) ήταν ενωμένο αμέσως μετά από το πέμπτο ανοιχτό πλαίσιο διαβάσματος, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη *gcn4*. Η μεγαλύτερη τιμή της παρατηρήθηκε όταν είχαν μεταλλαχθεί και τα τέσσερα AUG ή είχαν απομακρυνθεί και τα τέσσερα ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος. Τότε, η έκφραση της *gcn4* πρωτεΐνης ήταν σταθερή, συνεχής και σε πολύ υψηλά επίπεδα, ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία οποιουδήποτε άλλου ρυθμιστικού παράγοντα της έκφρασής της. Χρησιμοποιώντας αρχικά παρόμοια κατασκευή, δηλαδή το γονίδιο *lacZ* ενωμένο αμέσως μετά από ένα τμήμα του πέμπτου ανοιχτού πλαισίου διαβάσματος (Σχήμα 22 Β, Γ), τα πειράματα που έγιναν είχαν τον ίδιο σκοπό με τα παραπάνω. Να πραγματοποιηθεί δηλαδή, με την βοήθεια ενός σφυροκέφαλου τύπου καταλυτικού αντικωδικού RNA, ενάντια σε θέση-στόχο λίγο πριν το AUG του πέμπτου ανοιχτού πλαισίου διαβάσματος, απομάκρυνση των τεσσάρων ανοιχτών πλαισίων διαβάσματος της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής. Έτσι θα επαληθευόταν η δραματική αύξηση της μετρούμενης φωτομετρικά ενζυμικής ενεργότητας της β -γαλακτοσιδάσης, συγκρινόμενη με τις τιμές της στα αντίστοιχα κύτταρα, όπου δεν εκφραζόταν το ριβοένζυμο.

Σχήμα 22: (A) Δομή του γονιδίου *GCN4*, έτσι όπως αυτό εκφράζεται από το χρωμόσωμα ή από το πλασμίδιο pGCN4 όπου είχε υποκλωνοποιηθεί. Διακρίνονται: (α) με γκρι χρώμα οι γειτονικές προς το γονίδιο αυτό περιοχές του DNA του σακχαρομύκητα, (β) το βέλος που υποδηλώνει το συνολικό μετάγραφο του RNA που παράγεται, (γ) το 5' και 3' άκρο του μορίου, ενώ οι αριθμοί δείχνουν την απόσταση από το 5' άκρο, (δ) με μαύρο χρώμα φαίνονται τα διάφορα ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος (ORF) που απαρτίζουν το συνολικό γονίδιο, με κύριο το ORF5 που κωδικοποιεί την GCN4 πρωτεΐνη, (ε) οι περιοριστικές θέσεις *DraI* που χρησιμοποιήθηκαν: **1**) για την υποκλωνοποίηση του μεταξύ τους αντίστοιχου κομματιού στο πλασμίδιο φορέα κλωνοποίησης pT3T7, για τον σχηματισμό του πλασμιδίου pS9, που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα *in vitro*, για την παραγωγή αντικωδικού RNA, ή **2**) για την υποκλωνοποίηση του μεταξύ τους αντίστοιχου κομματιού, στο ειδικό για τον σακχαρομύκητα πλασμίδιο φορέα κλωνοποίησης και έκφρασης pAAR-6, δημιουργώντας έτσι το πλασμίδιο pAs7, που παρήγαγε αντικωδικό RNA μέσα στα κύτταρα, (στ) η περιοριστική θέση *BsteII*, στην οποία περιέχεται η αλληλουχία GUU, που αποτελεί την θέση-στόχο στο υπόστρωμα και στην οποία εισήχθη το δίκλωνο σύμπλοκο μεταξύ των ολιγονουκλεοτιδίων GCN4S και GCN4A (**Πίνακας 2**), για τον σχηματισμό της καταλυτικής περιοχής στο παραγόμενο RNA, δηλαδή το ριβοένζυμο. **1**) Όταν η τροποποίηση αυτή έγινε στο τμήμα μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *DraI* που βρισκόταν στο πλασμίδιο pT3T7, τότε δημιουργήθηκε το πλασμίδιο pRz32, από το οποίο παραγόταν το ριβοένζυμο για τα *in vitro* πειράματα. **2**) Όταν η τροποποίηση αυτή έγινε στο τμήμα μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *DraI* που βρισκόταν στο πλασμίδιο pAAR-6, τότε δημιουργήθηκε το πλασμίδιο pRz8, που παρήγαγε ριβοένζυμο μέσα στα κύτταρα. (B) Η συγκεκριμένη κατασκευή χρησιμοποιήθηκε όταν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων της δράσης των ριβοενζύμων, μετρήθηκε η ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Αποτελούσε δηλαδή το υπόστρωμα του ριβοενζύμου και σε μια περίπτωση βρισκόταν κλωνοποιημένη και εκφραζόταν από το πλασμίδιο pGCN4/*lacZ*, ενώ σε μια άλλη περίπτωση είχε τοποθετηθεί στο χρωμόσωμα και συγκεκριμένα στον γενετικό τόπο *URA3-52*. Το γονίδιο *lacZ* βρισκόταν ενωμένο αμέσως μετά από την περιοχή του ORF5 που κωδικοποιεί για τα 50 πρώτα αμινοξέα της GCN4 πρωτεΐνης. (Γ) Η συγκεκριμένη κατασκευή ήταν κλωνοποιημένη και εκφραζόταν μόνο από το πλασμίδιο pGCN4-1/*lacZ*. Χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο σκοπό όπως η κατασκευή (B) και ήταν ίδια με αυτήν, μόνο που πριν το γονίδιο *lacZ* βρισκόταν ένα μεγαλύτερο τμήμα του ORF5, που κωδικοποιεί για τα 150 πρώτα αμινοξέα της GCN4 πρωτεΐνης.



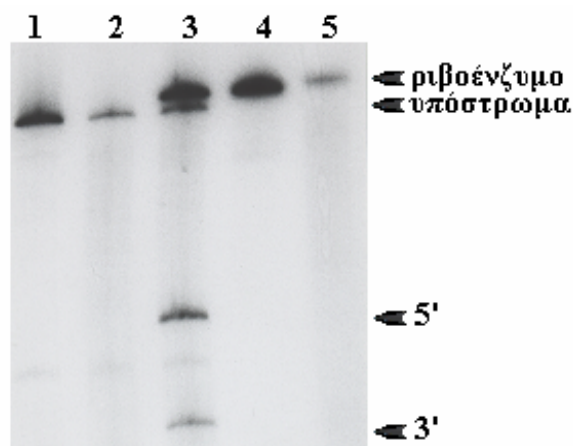
1) IN VITRO ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ

Κατασκευάστηκαν δύο πλασμίδια για να αποδειχθεί, τουλάχιστον *in vitro*, η ικανότητα του ριβοενζύμου που θα δοκιμαζόταν στη συνέχεια σε κύτταρα ζύμης (*in vivo*), να διασπά το υπόστρωμά του.

Το πρώτο ήταν το πλασμίδιο pS9, που κωδικοποιούσε το υπόστρωμα-RNA και περιείχε στη θέση *HincII* του φορέα κλωνοποίησης pT3T7*lac* ένα κομμάτι cDNA 360 bp. Το κομμάτι αυτό ήταν υποκλωνοποιημένο από το πλασμίδιο pGCN4 και βρίσκονταν μεταξύ των θέσεων 259 και 619, που αναγνωρίζονται από το περιοριστικό ένζυμο *DraI* (**Σχήμα 22 Α**). Ξεκινάει δε 35 bp πριν από το AUG του δεύτερου ανοιχτού πλαισίου διαβάσματος (ORF2) και σταματάει 30 bp μετά το AUG του ORF5. Στη θέση 450 υπάρχει μια *BstEII* περιοριστική θέση, μέρος της οποίας είναι η αλληλουχία GUU, η οποία ήταν τελικά και η θέση-στόχος του ριβοενζύμου στο υπόστρωμα.

Το δεύτερο ήταν το πλασμίδιο pRz32, που κωδικοποιούσε το ριβοένζυμο και ήταν το ίδιο με το pS9, μόνο που στη θέση *BstEII* είχε εισαχθεί η καταλυτική περιοχή του ριβοενζύμου, σύμφωνα με την μέθοδο των **Tabler και Tsagris (1991)**. Για τον σκοπό αυτό δύο συνθετικά DNA ολιγονουκλεοτίδια, τα GCN4S και GCN4A (**Πίνακας 2**), φωσφορυλιώθηκαν στο 5' άκρο τους με τη βοήθεια της T₄ πολυνουκλεοτιδικής κινάσης, βράστηκαν μαζί για 1 λεπτό και το μίγμα τους αφέθηκε να επανέλθει αργά στους 25⁰C. Παράλληλα, το πλασμίδιο pS9 επώαστηκε με το περιοριστικό ένζυμο *BstEII* και ακολούθησε αποκοπή των προεξεχόντων νουκλεοτιδίων, με την χρήση της νουκλεάσης mung bean. Τελικά, το δίκλωνο σύμπλοκο των δύο ολιγονουκλεοτιδίων συγκολλήθηκε στην παραπάνω θέση, με τη βοήθεια της T₄ DNA λιγάσης.

Για να ελεγχθεί αν το ριβοένζυμο ήταν σε θέση να διασπά το υπόστρωμα-RNA τουλάχιστον *in vitro*, πραγματοποιήθηκε η ανάλογη αντίδραση, όπου επώαστηκαν ραδιενεργά σημασμένα μόρια από τα δύο είδη RNA, παρουσία ιόντων Mg²⁺. Το αποτέλεσμα φαίνεται στη **λωρίδα 3** της **Εικόνας 5**, όπου το παραγόμενο από το πλασμίδιο pS9 υπόστρωμα-RNA διασπάστηκε επιτυχώς, όταν επώαστηκε με το ριβοένζυμο, που εκφραζόταν από το πλασμίδιο pRz32. Τα προϊόντα της αντίδρασης, που παρατηρήθηκαν κάτω από αυτές τις συνθήκες, δεν παρουσιάστηκαν όταν το υπόστρωμα-RNA ή το ριβοένζυμο επώαστηκαν μόνα τους, στο ίδιο μίγμα της αντίδρασης και για τον ίδιο χρόνο, στους 0⁰C ή στους 60⁰C, όπως φαίνεται στις **λωρίδες 1, 2 και 4, 5** αντίστοιχα.

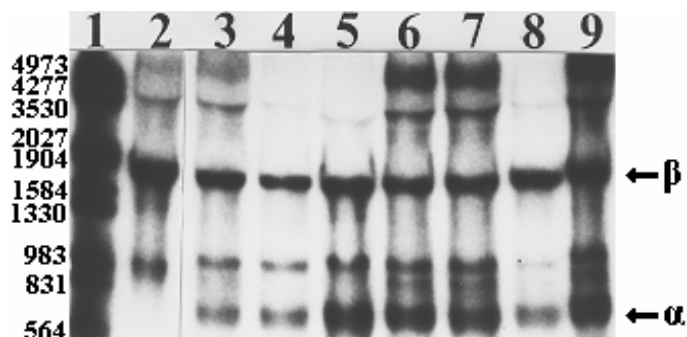


Εικόνα 5: *In vitro* δοκιμή της ενεργότητας του ριβοενζύμου, χρησιμοποιώντας ραδιενεργά σημασμένο, τόσο υπόστρωμα-RNA μεταγραμμένο από το πλασμίδιο pS9, όσο και ριβοένζυμο μεταγραμμένο από το πλασμίδιο pRz32. **Λωρίδα 1:** υπόστρωμα-RNA στους 0⁰C, **λωρίδα 2:** υπόστρωμα-RNA στους 60⁰C, **λωρίδα 3:** υπόστρωμα-RNA μαζί με ριβοένζυμο στους 60⁰C, **λωρίδα 4:** ριβοένζυμο στους 0⁰C και **λωρίδα 5:** ριβοένζυμο στους 60⁰C. Με τα βέλη δείχνονται οι θέσεις του ριβοενζύμου, του άκοπου υποστρώματος και των 5' και 3' προϊόντων της αντίδρασης διάσπασης.

2) IN VIVO ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ

Για τη μελέτη της δράσης των ριβοενζύμων στα κύτταρα του σακχαρομύκητα, κατασκευάστηκαν τα πλασμίδια pAs7 και pRz8. Το πλασμίδιο pAs7 κατασκευάστηκε μετά από την υποκλωνοποίηση του *DraI-DraI* κομματιού DNA από το πλασμίδιο pGCN4, στην *EcoRI* θέση του pAAR-6 και με την κατάλληλη κατεύθυνση (orientation), έτσι ώστε να παράγεται αντικωδικό RNA μέσα στα μετασχηματισμένα κύτταρα της ζύμης. Το πλασμίδιο pRz8 κατασκευάστηκε μετά από την υποκλωνοποίηση του *DraI-DraI* κομματιού DNA από το πλασμίδιο pGCN4, στην *EcoRI* θέση του pAAR-6, με την ένθεση όμως στην περιοριστική θέση *BstEII*, σύμφωνα με την μέθοδο των **Tabler και Tsagris (1991)**, του δίκλωνου συμπλόκου των ολιγονουκλεοτιδίων GCN4S και GCN4A, από την μεταγραφή του οποίου θα αποκτούσε καταλυτικές ιδιότητες το παραγόμενο RNA. Από το πλασμίδιο pRz8 δηλαδή, θα παραγόταν ριβοένζυμο μέσα στα μετασχηματισμένα κύτταρα του σακχαρομύκητα. Το πλασμίδιο για την έκφραση του αντικωδικού RNA ήταν απαραίτητο να συμπεριληφθεί σαν πείραμα ελέγχου, αφού αρχικά τουλάχιστον έπρεπε να δειχθεί, ότι η ύπαρξη της καταλυτικής περιοχής στο μόριο του ριβοενζύμου που συνέβαλε στην διάσπαση στόχου-RNA, ήταν υπεύθυνη για οποιαδήποτε πιθανή παρατηρούμενη αλλαγή στην έκφραση του υποστρώματος-RNA και όχι οι αντικωδικοί του βραχίονες από μόνοι τους.

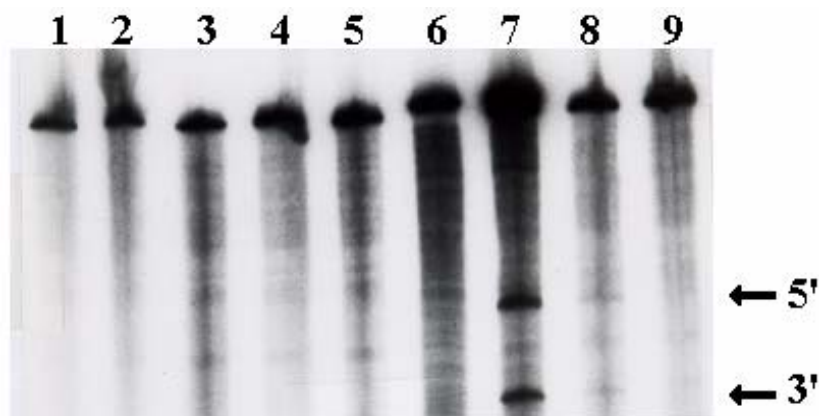
Αρχικά, ελέγχθηκε η έκφραση του αντικωδικού RNA και του ριβοενζύμου, όπως αυτά εκφραζόταν από τα πλασμίδια pAs7 και pRz8 αντίστοιχα, μέσα στα μετασχηματισμένα κύτταρα του σακχαρομύκητα. Χρησιμοποιήθηκε η Northern μέθοδος ανάλυσης του RNA με ανιχνευτή (probe) το κοινό μεταξύ όλων των παραπάνω RNA, αντίστοιχο κομμάτι DNA του πλασμιδίου pRz32, μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *XbaI* και *PstI*. Όπως δείχνεται στην **θέση (α) της Εικόνας 6**, τόσο το αντικωδικό RNA όσο και το ριβοένζυμο, εκφράζονται κανονικά στα αντίστοιχα μετασχηματισμένα κύτταρα του σακχαρομύκητα, που εξετάστηκαν.



Εικόνα 6: Ανάλυση Northern του mRNA, όπως αυτό εκφράζεται από το πλασμίδιο φορέα κλωνοποίησης pAAR-6 (**λωρίδα 2**), ή με το πλασμίδιο pAs7 (**λωρίδες 3-5**) που εκφράζει αντικωδικό RNA, ή το πλασμίδιο pRz8 (**λωρίδες 6-9**) που εκφράζει ριβοένζυμο, μέσα στα μετασχηματισμένα, με τα αντίστοιχα πλασμίδια, κύτταρα του σακχαρομύκητα. Στη **λωρίδα 1** φαίνεται το ραδιενεργά σημασμένο DNA του φάγου λ, που είχε προηγουμένως επωαστεί με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *HindIII*. Το αποτέλεσμα της υβριδοποίησης του ανιχνευτή με το συνολικό RNA του κυττάρου δείχνει, στην θέση (**α**) να εντοπίζεται το αντικωδικό RNA και το ριβοένζυμο, όπως αυτά εκφράζονται από τα αντίστοιχα πλασμίδια, ενώ στην θέση (**β**) εντοπίζεται το ενδογενές *GCN4* mRNA, όπως αυτό παράγεται από το χρωμόσωμα του σακχαρομύκητα.

Σε μια προσπάθεια να αποδειχθεί ότι το ριβοένζυμο ήταν ενεργό, όπως αυτό θα εκφραζόταν από το πλασμίδιο pRz8 μέσα στα κύτταρα και μπορούσε θεωρητικά να διασπά το υπόστρωμα-RNA στόχο του, πραγματοποιήθηκε μια ακόμα *in vitro* δοκιμή ενεργότητας του ριβοενζύμου. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το ριβοένζυμο που βρισκόταν στο εκχύλισμα συνολικού RNA, από μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pRz8 κύτταρα σακχαρομύκητα, ενώ ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το *in vitro* μεταγραμμένο και ραδιενεργά σημασμένο RNA, όπως αυτό παραγόταν από το πλασμίδιο pS9. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 30°C για 6 ώρες, η οποία είναι και η πραγματική θερμοκρασία που αναπτύσσονται συνήθως τα κύτταρα του σακχαρομύκητα. Στην **Εικόνα 7** φαίνονται τα αποτελέσματα. Τα προϊόντα της αντίδρασης διάσπασης που ανιχνεύθηκαν στις **λωρίδες 8 και 9**, όπου το συνολικό RNA που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από κύτταρα σακχαρομύκητα μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pRz8, ήταν του ίδιου μεγέθους όπως εκείνα που παρατηρούνται όταν επώαστηκαν στο ίδιο μίγμα και κάτω από τις ίδιες συνθήκες, ραδιενεργά σημασμένα μόρια τόσο υποστρώματος-RNA όσο και ριβοενζύμου, τα οποία είχαν παραχθεί με τη βοήθεια *in vitro* συστήματος μεταγραφής από τα πλασμίδια pS9 και pRz32 αντίστοιχα (**λωρίδα 7**). Τέτοια προϊόντα δεν διακρίνονται: **α)** όταν χρησιμοποιήθηκε συνολικό RNA από κύτταρα σακχαρομύκητα που μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο φορέα κλωνοποίησης pAAR-6 (**λωρίδα 1**), ή **β)** με το πλασμίδιο pAs7 που παράγει αντικωδικό RNA μέσα στα κύτταρα του σακχαρομύκητα (**λωρίδες 2, 3 και 4**), ή **γ)** όταν τόσο το *in vitro* μεταγραμμένο ραδιενεργά σημασμένο υπόστρωμα-RNA (**λωρίδα 5**) ή ριβοένζυμο (**λωρίδα 6**), επώαστηκαν μόνα τους κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Μετά από τα παραπάνω πειράματα ελέγχου έγινε προσπάθεια να εξακριβωθεί με την βοήθεια του ριβοενζύμου, η ήδη γνωστή προαναφερθείσα θεωρία που πρέσβευε ότι μετά την απομάκρυνση της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του *GCN4* mRNA και η οποία περιλάμβανε τα ORF1, ORF2, ORF3 και ORF4, οι τιμές της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*), το γονίδιο της οποίας ήταν ενωμένο αμέσως μετά το γονίδιο *GCN4*, θα έπρεπε να αυξηθούν σημαντικά, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας που θα παρατηρούνταν σε κύτταρα που δεν έκφραζαν το ριβοένζυμο. Για τον σκοπό αυτό, το κατάλληλο στέλεχος σακχαρομύκητα, μετασχηματίστηκε συγχρόνως με τα πλασμίδια: **1)** pGCN4/*lacZ* που θα έκφραζε το υπόστρωμα-RNA (**Σχήμα 22B**) και τον φορέα κλωνοποίησης pAAR-6, ή **2)** το pGCN4/*lacZ* και το pAs7 που θα έκφραζε το αντικωδικό RNA, ή **3)** το pGCN4/*lacZ* και το pRz8, που θα έκφραζε το ριβοένζυμο μέσα στα κύτταρα.



Εικόνα 7: Δοκιμή δραστηριότητας ριβοενζύμου στους 30⁰C για 6 ώρες, χρησιμοποιώντας *in vitro* μεταγραμμένο ραδιενεργά σημασμένο υποστρώμα-RNA από το πλασμίδιο pS9 (**λωρίδα 5**) το οποίο επάζεται μαζί με συνολικό RNA κυττάρων σακχαρομύκητα μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο φορέα κλωνοποίησης pAAR-6 (**λωρίδα 1**), ή με το πλασμίδιο pAs7 (**λωρίδες 2-4**) που παράγει αντικωδικό RNA, ή με το πλασμίδιο pRz8 (**λωρίδες 8,9**) που παράγει ριβοένζυμο μέσα στα κύτταρα του σακχαρομύκητα. Στην **λωρίδα 6**, δείχνεται το *in vitro* μεταγραμμένο ραδιενεργά σημασμένο ριβοένζυμο, όπως αυτό παράγεται από το πλασμίδιο pRz32, ενώ στην **λωρίδα 7**, φαίνεται το αποτέλεσμα της επώασης στο ίδιο μίγμα, του *in vitro* μεταγραμμένου υποστρώματος-RNA και ριβοενζύμου. Τα βέλη δείχνουν την θέση του 5' και 3' παραγόμενου προϊόντος της αντίδρασης διάσπασης του υποστρώματος-RNA.

Στις καλλιέργειες αυτών των μετασχηματισμένων κυττάρων, μετρήθηκε στη συνέχεια φωτομετρικά η ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Οι τιμές της αναφέρονται στον **Πίνακα 6** και το αποτέλεσμα ήταν προφανώς το αντίθετο από το αναμενόμενο. Οι τιμές της ενζυμικής ενεργότητας, αντί να αυξάνονται στα κύτταρα που εκφραζόταν το ριβοένζυμο, ελαττωνόταν σημαντικά συγκρινόμενες με αυτές των κυττάρων που είχαν μετασχηματιστεί με τον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pAAR-6, ή εκφραζόταν το αντικωδικό RNA από το πλασμίδιο pAs7. Όπως παρατηρούμε μάλιστα, οι δύο τελευταίες κατηγορίες μετασχηματισμένων κυττάρων είχαν παρόμοια επίπεδα τιμών, άρα η έκφραση του αντικωδικού RNA δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης. Αυτό που πολύ πιθανόν συμβαίνει, στην προκειμένη περίπτωση, είναι ότι στο 5' άκρο του 3' παραγόμενου προϊόντος της αντίδρασης διάσπασης του *GCN4/lacZ* mRNA δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί η σχετική τοποθέτηση καλύμματος (capping), επομένως το mRNA ήταν μειωμένης σταθερότητας και χαμηλότερης ικανότητας να μεταφραστεί. Έτσι, η ελάττωση της ενεργότητας, δεν ήταν δυνατόν να συνοδευτεί και από την σαφή και ξεκάθαρη παρατήρηση της αντίστοιχης ελάττωσης των επιπέδων του *GCN4/lacZ* mRNA, αφού η συγκεκριμένη πλασμιδιακή κατασκευή, που χρησιμοποιήθηκε, παρήγαγε αρκετά μετάγραφα ποικίλου μήκους (aberrant transcripts). Επιπλέον, λόγω της χαμηλής σταθερότητας του mRNA, ούτε με την βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης στάθηκε δυνατό να ανιχνευθεί ή να προσδιοριστεί το μήκος κάποιου από τα πιθανά προϊόντα της αντίδρασης διάσπασης, γεγονός πολύ κοινό στις μέχρι σήμερα *in vivo* μελέτες της δράσης των ριβοενζύμων.

Από την στιγμή λοιπόν που αντί για αύξηση παρατηρήθηκε ελάττωση των τιμών της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης, χρησιμοποιήθηκε μια άλλη πειραματική προσέγγιση διαφορετικής ευαισθησίας, για να επιβεβαιώσει ένα τέτοιο αποτέλεσμα. Ελέγχθηκε λοιπόν η δυνατότητα δημιουργίας ενός διαφορετικού φαινοτύπου στα κύτταρα εκείνα που έκφραζαν το ριβοένζυμο. Τα κύτταρα αυτά δηλαδή, παρουσία ριβοενζύμου και αν υποθέσουμε ότι διασπάται το ενδογενές χρωμοσωμικό *GCN4* mRNA, θα ήταν αδύνατο να μεγαλώσουν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 3-αμινοτριαζόλη (AT), μια χημική ουσία που αναστέλλει την δράση του *HIS3* γονιδιακού προϊόντος, δημιουργώντας έτσι τεχνητές συνθήκες πείνας λόγω έλλειψης ιστιδίνης. Για τον σκοπό αυτό, (**α**) ένα κατάλληλο στέλεχος σακχαρομύκητα μετασχηματίστηκε με τα πλασμίδια pAAR-6, ή pAs7, ή pRz8, όπου σαν στόχος επομένως ήταν το ενδογενές χρωμοσωμικό *GCN4* mRNA και (**β**) ένα άλλο κατάλληλο στέλεχος μετασχηματίστηκε με τα πλασμίδια **1**) pGCN4 (**Σχήμα 22A**) και pAAR-6, ή **2**) pGCN4 και pAs7, ή **3**) pGCN4 και pRz8, όπου στόχος δηλαδή του ριβοενζύμου ήταν το *GCN4* mRNA όπως αυτό μεταγραφόταν από πλασμίδιο.

	<u>Τύπος</u> <u>μετασχηματισμένων</u> <u>κυττάρων</u>	<u>Ενζυμικές μονάδες lacZ</u>
1)	pAAR-6 / 1	23,8
	pAAR-6 / 2	30,0
	pAAR-6 / 3	37,0
2)	pAs7 / 1	23,0
	pAs7 / 2	23,8
	pAs7 / 3	31,2
3)	pRz8 / 1	13,9
	pRz8 / 2	14,8
	pRz8 / 3	16,0

Πίνακας 6: Ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης σε κύτταρα σακχαρομύκητα από τρεις διαφορετικές αποικίες (1, 2, 3) που είχαν μετασχηματιστεί, ή **1**) με το πλασμίδιο pGCN4/lacZ και τον φορέα κλωνοποίησης pAAR-6 (pAAR-6/1, pAAR-6/2, pAAR-6/3), ή **2**) με το πλασμίδιο pGCN4/lacZ και το πλασμίδιο pAs7 (pAs7/1, pAs7/2, pAs7/3) που παράγει αντικωδικό RNA, ή **3**) με το πλασμίδιο pGCN4/lacZ και το πλασμίδιο pRz8 (pRz8/1, pRz8/2, pRz8/3) που παράγει ριβοένζυμο μέσα στα κύτταρα του σακχαρομύκητα. Οι τιμές είναι η μέση τιμή δυο ανεξάρτητων πειραμάτων και η σταθερά απόκλιση ήταν 10% ή λιγότερο.

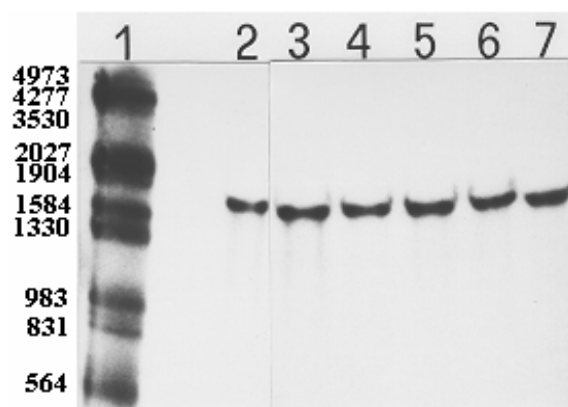
Εάν σε μια από τις δύο ή και στις δύο περιπτώσεις, ένα ικανοποιητικό ποσοστό του υποστρώματος διασπώνταν από το ριβοένζυμο μέσα στο κύτταρο, τότε θα έπρεπε να συμβεί η μετατροπή του στελέχους του σακχαρομύκητα από AT^r (aminotriazol resistant) σε AT^s (aminotriazol sensitive). Δυστυχώς δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο, ακόμα και όταν ελέγχθηκε πολύ μεγάλος αριθμός αποικιών μετασχηματισμένων κυττάρων, καλλιεργούμενες σε στερεό ελάχιστο θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 5 mM αντί με 10 mM AT, που χρησιμοποιείται συνήθως. Όπως επιβεβαιώνεται και από την ανάλυση Northern στην **Εικόνα 8**, τα επίπεδα του ενδογενούς χρωμοσωμικού *GCN4* mRNA παρέμειναν τα ίδια σε όλες τις κατηγορίες των μετασχηματισμένων κυττάρων, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα να μην συνέβη καθόλου σχηματισμός καταλυτικά ενεργού συμπλόκου μεταξύ του υποστρώματος *GCN4* mRNA και του ριβοενζύμου Rz8.

Τέλος, το γεγονός της ελάττωσης της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης, δεν παρατηρήθηκε σε δυο ακόμα περιπτώσεις.

Στην πρώτη όταν το υπόστρωμα-RNA, δηλαδή το *GCN4/lacZ* mRNA, εκφραζόταν από το χρωμόσωμα, αφού είχε τοποθετηθεί στον γενετικό τόπο *URA3-52*. Εγινε δηλαδή προσπάθεια, να ελεγχθεί πόσο αποτελεσματικά το ριβοένζυμο μπορεί να δράσει τώρα ενάντια σε υπόστρωμα-RNA, που εκφράζεται όμως από το χρωμόσωμα και να επαληθευτεί στην χειρότερη περίπτωση το αρχικό αποτέλεσμα, όπου τότε όμως το ίδιου τύπου υπόστρωμα-RNA εκφραζόταν από πλασμίδιο.

Η δεύτερη ήταν όταν το υπόστρωμα εκφραζόταν από το πλασμίδιο pGCN4-1/lacZ, που διέφερε από το pGCN4/lacZ, στο ότι είχε την κωδικοποιούσα περιοχή των 150 αντί των 50 πρώτων αμινοξέων του ORF5 (**Σχήμα 22Γ**). Παραγόταν επομένως, ένα αρκετά μακρύτερο μετάγραφο υποστρώματος-RNA, το *GCN4-1/lacZ* mRNA. Το ερώτημα δηλαδή σ' αυτή την περίπτωση ήταν, αν το ριβοένζυμο μπορούσε να δράσει στον ίδιο βαθμό όπως στο *GCN4/lacZ* mRNA, αλλά σε ένα μεγαλύτερου μήκους και επομένως αυξημένης λόγω δευτεροταγών δομών πολυπλοκότητας RNA, όπως το *GCN4-1/lacZ* mRNA.

Όπως φαίνεται στους **Πίνακες 7** και **8** αντίστοιχα, ότι μετρήθηκαν παρόμοια επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης, μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών μετασχηματισμένων κυττάρων σακχαρομύκητα. Δεν παρατηρήθηκε επομένως η ελάττωση που θα περίμενε κανείς, όπως συνέβη αρχικά με την χρήση του πλασμιδιακού *GCN4/lacZ* mRNA σαν στόχο και του ριβοενζύμου Rz8.



Εικόνα 8: Ανάλυση Northern του *GCN4* mRNA, από κύτταρα σακχαρομύκητα μετασχηματισμένα με τον φορέα κλωνοποίησης pAAR-6 (**λωρίδα 2**) ή με το πλασμίδιο pAs7 (**λωρίδα 3**) που παράγει αντικωδικό RNA, ή το πλασμίδιο pRz8 (**λωρίδες 4-7**) που παράγει ριβοένζυμο μέσα στα κύτταρα του σακχαρομύκητα. Στην **λωρίδα 1** φαίνεται το ραδιενεργά σημασμένο DNA του λ φάγου που είχε προηγουμένως επωαστεί με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *HindIII*.

	<u>Τύπος</u> <u>μετασχηματισμένων</u> <u>κυττάρων</u>	<u>Ενζυμικές μονάδες lacZ</u>
1)	pAAR-6 / 1	26,8
	pAAR-6 / 2	27,3
	pAAR-6 / 3	25,2
2)	pAs7 / 1	27,4
	pAs7 / 2	25,8
	pAs7 / 3	23,9
3)	pRz8 / 1	22,5
	pRz8 / 2	25,8
	pRz8 / 3	23,6

Πίνακας 7: Ενζυμική δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης σε κύτταρα σακχαρομύκητα από τρεις διαφορετικές αποικίες (1, 2, 3) που είχαν μετασχηματιστεί μόνο με τον φορέα κλωνοποίησης pAAR-6 (pAAR-6/1, pAAR-6/2, pAAR-6/3), ή μόνο με το πλασμίδιο pAs7 (pAs7/1, pAs7/2, pAs7/3) που παράγει αντικωδικό RNA, ή μόνο με το πλασμίδιο pRz8 (pRz8/1, pRz8/2, pRz8/3) που παράγει ριβοένζυμο μέσα στα κύτταρα του σακχαρομύκητα, ενώ το υπόστρωμα *GCN4/lacZ* mRNA εκφραζόταν από το χρωμόσωμα, αφού είχε τοποθετηθεί προηγουμένως στον *URA3-52* γενετικό τόπο του χρωμοσώματος. Οι τιμές είναι η μέση τιμή δυο ανεξάρτητων πειραμάτων και η σταθερά απόκλιση ήταν 10% ή λιγότερο.

<u>Τύπος</u> <u>μετασχηματισμένων</u> <u>κυττάρων</u>	<u>Ενζυμικές μονάδες lacZ</u>
1) pAAR-6 / 1	27,7
pAAR-6 / 2	22,9
pAAR-6 / 3	28,7
2) pAs7 / 1	22,6
pAs7 / 2	23,9
pAs7 / 3	26,5
3) pRz8 / 1	28,0
pRz8 / 2	24,6
pRz8 / 3	23,4

Πίνακας 8: Ενζυμική δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης σε κύτταρα σακχαρομύκητα από τρεις διαφορετικές αποικίες (1, 2, 3) που είχαν μετασχηματιστεί, **1)** με το πλασμίδιο pGCN4-1/lacZ και με τον φορέα κλωνοποίησης pAAR-6 (pAAR-6/1, pAAR-6/2, pAAR-6/3), ή **2)** με το πλασμίδιο pGCN4-1/lacZ και με το πλασμίδιο pAs7 (pAs7/1, pAs7/2, pAs7/3) που παράγει αντικωδικό RNA, ή **3)** με το πλασμίδιο pGCN4-1/lacZ και με το πλασμίδιο pRz8 (pRz8/1, pRz8/2, pRz8/3) που παράγει ριβοένζυμο μέσα στα κύτταρα του σακχαρομύκητα. Οι τιμές είναι η μέση τιμή δυο ανεξάρτητων πειραμάτων και η σταθερά απόκλιση ήταν 10% ή λιγότερο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

(Α) Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΑΠΟ ΤΑ ΑΝΤΙΚΩΔΙΚΑ ΝΟΥΚΛΕΙΚΑ ΟΞΕΑ ΣΤΑ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΑ

Η δυνατότητα να ρυθμίζεται ανασταλτικά η έκφραση ορισμένων γονιδίων, τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα, αποτελεί ίσως το καλύτερο εργαλείο για την μελέτη του ρόλου και τον καθορισμό της συγκεκριμένης λειτουργίας τους, ή για τον έλεγχο της έκφρασης παθογενών γονιδίων, ή για την καταστολή της έκφρασης ανεπιθύμητων γενετικών ιδιοτήτων.

Ενας από τους τρόπους, που χρησιμοποιούνταν με αρκετή επιτυχία την δεκαετία του 1980 για την επίτευξη των παραπάνω, ήταν η τεχνολογία των αντικωδικών νουκλεϊκών οξέων. Η αρχή πάνω στην οποία βασίσθηκε είναι αυτή του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων μονόκλωνων μορίων τόσο DNA όσο και RNA, με ταυτόχρονο σχηματισμό δίκλωνων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων. Το DNA όμως είναι από την φύση του δίκλωνο μόριο και μόνο κατά το στάδιο της αντιγραφής στην μεσόφαση μπορεί να βρεθεί σε μονόκλωνη μορφή. Αντίθετα, το RNA είναι πάντοτε σε μονόκλωνη μορφή, άσχετα με την ύπαρξη δίκλωνων περιοχών στο μόριό του λόγω ενδομοριακών δευτεροταγών δομών. Η μονόκλωνη φύση του RNA το κατέστησε προτιμητέο στόχο, αφού η δέσμευση του αντικωδικού νουκλεϊκού οξέος με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας, θα είχε ως αποτέλεσμα την ουσιαστική παρεμβολή του στην φυσιολογική λειτουργία του κωδικού RNA.

Ενας σημαντικός αριθμός εργασιών, όπου γίνεται χρήση της παραπάνω μεθοδολογίας με επιτυχή αποτελέσματα, έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα, τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά ζωικά ή φυτικά κύτταρα [Inouye (1988), Simons (1988), van der Krol (1988), Toulme και Helene (1988), Helene και Toulme (1990), Tabler (1993)]. Στις παραπάνω μελέτες μπορούμε να διακρίνουμε την χρήση δυο κατηγοριών αντικωδικών νουκλεϊκών οξέων. Στην πρώτη περιλαμβάνονται βραχέα μόρια, συνολικού μήκους συνήθως 8-30 νουκλεοτιδίων. Πρόκειται για ειδικά, για κάθε περίπτωση, συνθετικά αντικωδικά δεσοξυριβο- ή ριβο-ολιγονουκλεοτίδια, με ή χωρίς χημικές τροποποιήσεις στο μόριό τους. Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα μεγαλύτερου μήκους αντικωδικά RNA, τα οποία μπορούν είτε να μεταγραφούν *in vitro* και να εισαχθούν με την κατάλληλη μέθοδο στα κύτταρα, είτε να εκφραστούν κατ' ευθείαν μέσα στα κύτταρα από το αντίστοιχο τμήμα DNA,

το οποίο έχει προηγουμένως κλωνοποιηθεί σε ένα κατάλληλο για τα κύτταρα αυτά φορέα κλωνοποίησης και έκφρασης ή να έχει ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό του κυττάρου.

Σύντομα όμως έγινε αντιληπτό, ότι η αποτελεσματικότητα της τεχνολογίας των αντικωδικών νουκλεϊκών οξέων θα μπορούσε να βελτιωθεί ακόμα περισσότερο, αν αυτά εφοδιαζόταν με τα κατάλληλα χαρακτηριστικά δομικά και λειτουργικά στοιχεία έτσι, ώστε να μπορούν να επάγουν μη αντιστρέψιμες αντιδράσεις στην αλληλουχία-στόχο τους. Ένας από τους μηχανισμούς για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο είναι και η χρήση της τεχνολογίας των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων ή καταλυτικών αντικωδικών RNA.

Όπως αναφέρθηκε στην "Εισαγωγή", ανακαλύφθηκε ότι ορισμένα RNA που συναντώνται στη φύση κατέχουν στο μόριό τους μια συγκεκριμένη νουκλεοτιδική ακολουθία, στην οποία οφείλεται η ικανότητά τους να καταλύουν την διάσπαση του εαυτού τους σε συγκεκριμένη θέση. Από τα πειράματα των **Haseloff και Gerlach (1988)** και **Tabler και Tsagris (1991)**, δείχθηκε ότι σε οποιοδήποτε μόριο RNA είναι δυνατόν να τοποθετηθεί σε συγκεκριμένη θέση του η παραπάνω νουκλεοτιδική περιοχή, που θα του προσδίδει καταλυτικές ιδιότητες, έτσι ώστε να δύναται να διασπά *in trans* το κατάλληλο συμπληρωματικό RNA στόχο του. Οι εργασίες αυτές, στις οποίες ουσιαστικά ξεπεράστηκαν κατασκευαστικά προβλήματα των ριβοενζύμων, αποτέλεσαν και το έναυσμα για μια πληθώρα *in vitro* και *in vivo* μελετών, οι οποίες αναφέρονται αναλυτικότερα στην "Εισαγωγή", όπου το ριβοένζυμο και το υπόστρωμα-RNA συνυπήρχαν ή συνεκφράζονταν, τόσο σε προκαρυωτικά όσο και ευκαρυωτικά ζωικά και φυτικά κύτταρα. Από τις δημοσιεύσεις αυτές επιβεβαιώνεται η άποψη, ότι η ύπαρξη της καταλυτικής περιοχής στο αντίστοιχο RNA αποτελεί μια σημαντική βελτίωση της τεχνολογίας των αντικωδικών RNA για την αναστολή της γονιδιακής έκφρασης, αφού ο σχηματισμός του δίκλωνου συμπλόκου μεταξύ του RNA στόχου και του αντικωδικού RNA είναι θεωρητικά αντιστρέψιμος, ενώ στην περίπτωση των ριβοενζύμων, λόγω ακριβώς των ενδονουκλεολυτικών ιδιοτήτων τους το υπόστρωμα RNA επηρεάζεται κατά τρόπο μη αντιστρέψιμο.

Ποιοί είναι όμως οι παράγοντες εκείνοι που μπορούν να επηρεάσουν τόσο την αποτελεσματικότητα όσο και την εξειδίκευση των ριβοενζύμων; Την απάντηση στο ερώτημα αυτό μπορούμε να την αναζητήσουμε, τόσο στην ποιότητα ή ποικιλομορφία των νουκλεοτιδίων, που συμμετέχουν στον σχηματισμό των ελίκων I και III, όσο και στο συνολικό μήκος των περιοχών αυτών. Παρακάτω, γίνεται μια προσπάθεια ανάλυσης των παραγόντων αυτών, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, αλλά και τα δεδομένα από προηγούμενες μελέτες.

(B) Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΤΕΛΩΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΕΛΙΚΩΝ I ΚΑΙ III ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ.

1) Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑΣ ΓΥΡΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΘΕΣΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ-RNA

Η καθοριστική τριπλέτα νουκλεοτιδίων στην θέση διάσπασης του υποστρώματος, έχει δειχθεί ότι είναι του τύπου NUX, όπου N μπορεί να αντικατασταθεί από οποιοδήποτε από τα ριβονουκλεοτίδια A, G, C ή U και X οποιοδήποτε από τα A, C ή U αλλά ποτέ G (Symons, 1992, Koizumi κ.α., 1988, Ruffner κ.α., 1990, Sheldon και Symons, 1989, Perriman κ.α., 1992). Ομως, οι διαφορετικοί συνδυασμοί που προκύπτουν μ' αυτό τον τρόπο, διασπώνται από το αντίστοιχο ριβοένζυμο με διαφορετικό βαθμό αποτελεσματικότητας. Για παράδειγμα, η ακολουθία GUC η οποία επικρατεί στα περισσότερα συναντώμενα στη φύση σφυροκέφαλα ριβοένζυμα (Bruening, 1989), πιστεύεται ότι διασπάται αρκετά αποτελεσματικά. Αντιθέτως, η τριπλέτα AUC έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα ως ελάχιστα αποτελεσματική, σαν θέση στόχος (Ruffner κ.α., 1990) ή ακόμα και μη ικανή να διασπαστεί από το αντίστοιχο ριβοένζυμο (Perriman κ.α., 1992). Αυτές οι ιδιαιτερότητες που έχουν παρατηρηθεί με διαφορετικά ζευγάρια υποστρώματος-RNA και ριβοενζύμου, πρέπει να αντανakλούν διαφορετικές ικανότητες στον σχηματισμό της απαιτούμενης καταλυτικά ενεργής διαμόρφωσης μεταξύ των δυο αντιδρώντων μορίων ή/και διαφορές στον ρυθμό της χημικής αντίδρασης στο στάδιο της διάσπασης. Ανεξάρτητα από το ποιά από τις δυο παραμέτρους επηρεάζεται από την νουκλεοτιδική σύνθεση της τριπλέτας στην θέση-στόχο, για πρακτικές εφαρμογές θεωρείται σπουδαιότερη η συνολική αποτελεσματικότητα της διαδικασίας διάσπασης.

Για την παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν ήδη σχηματισμένα σύμπλοκα μεταξύ υποστρώματος-RNA και ριβοενζύμου, πριν την έναρξη της αντίδρασης, έτσι ώστε η κινητική σχηματισμού του συμπλόκου αυτού κατά την διάρκεια της αντίδρασης, να μην έπαιζε κανένα ρόλο στην συνολική ικανότητα διάσπασης του υποστρώματος από το αντίστοιχο ριβοένζυμο. Επίσης, τα καταλυτικά αντικωδικά RNA, δηλαδή τα σφυροκέφαλου τύπου ριβοένζυμα με μακριές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες εκατέρωθεν της τριπλέτας-στόχου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, έχουν γενικά χαμηλές τιμές του ρυθμού της αντίδρασης, σε σύγκριση με αυτές που παρατηρήθηκαν για μικρότερα σε συνολικό μέγεθος

ριβοένζυμα (**Homann κ.α., 1994, Tabler κ.α., 1994**). Μια σύγκριση τώρα των διαφορετικών ζευγαριών υποστρώματος-ριβοενζύμου, δείχνει ότι ο ρυθμός της αντίδρασης υπό τις παραπάνω συνθήκες, δεν επηρεάζεται μόνο από την φύση των νουκλεοτιδίων στην τριπλέτα-στόχο, αλλά επίσης και από την νουκλεοτιδική σύνθεση των εκατέρωθεν αλυσίδων ή αλλοιώς αντικωδικών βραχιόνων. Για παράδειγμα όταν στην θέση διάσπασης έχουμε GUC, όπως στην περίπτωση του (+) πολικότητας L₁-RNA, η διάσπαση είναι 50 φορές αποτελεσματικότερη από όταν είναι GUC αλλά στο (+) πολικότητας P-RNA, δηλαδή η τριπλέτα αυτή βρίσκεται μεταξύ διαφορετικής σύνθεσης νουκλεοτιδίων εκατέρωθεν της. Πιθανόν, η ύπαρξη συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων, που γειτονεύουν άμεσα με την θέση-στόχο του υποστρώματος, να επηρεάζουν την τριτοταγή δομή αυτής της περιοχής, όταν συνδεθεί και το αντίστοιχο ριβοένζυμο, επιδρώντας έτσι σημαντικά στην χημική διαδικασία της αντίδρασης διάσπασης.

Συστηματικότερη μελέτη απαιτείται για τον σκοπό αυτό, δηλαδή για την ανάλυση του ρόλου και της επίδρασης της φύσης και ποικιλομορφίας των άμεσα γειτονικών προς την θέση-στόχο νουκλεοτιδίων.

2) ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΖΕΥΓΑΡΙΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ-RNA ΚΑΙ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ.

Από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, όπως περιγράφονται στους **Πίνακες 3, 4 και 5**, γίνεται φανερό ότι οι τροποποιήσεις μέσα στην περιοχή σχηματισμού της έλικας I των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων, έχουν σαν αποτέλεσμα την δραματική μείωση ή έλλειψη ενεργότητας του ριβοενζύμου. Ειδικότερα αυτό συνέβη όταν έλλειπαν τα νουκλεοτίδια 2.1 ή/και 2.2, δηλαδή αφορά τα ριβοένζυμα L₁-Rz19, P-Rz62, P-Rz1 και P-Rz2. Απ' την άλλη μεριά, αποσταθεροποίηση της έλικας I με έλλειψη ενός ή αρκετών νουκλεοτιδίων μεταξύ των θέσεων 2.2 έως 2.6, είχε μόνο οριακές επιδράσεις στον παρατηρούμενο ρυθμό της αντίδρασης διάσπασης, δείχνοντας έτσι ότι το συνεχές ζευγάρωμα βάσεων μέσα στην περιοχή σχηματισμού της έλικας I είναι μεν ευεργετικό, αλλά όχι απολύτως αναγκαίο για την δραστηριότητα του ριβοενζύμου, όπως αυτό συνέβη με τα P-Rz92, L₁-Rz182 και L₁-Rz162. Αξιοσημείωτο είναι εδώ το γεγονός, ότι έλλειψη μόνο του νουκλεοτιδίου 2.2 στο P-Rz62,

ελάττωσε την ενεργότητα του ριβοενζύμου περισσότερο από όταν υπήρξε ταυτόχρονη έλλειψη και του νουκλεοτιδίου 2.3, στην περίπτωση του P-Rz92.

Αντιθέτως, ελλείψεις στην περιοχή σχηματισμού της έλικας III, είχαν σημαντική επίδραση στην αποτελεσματικότητα του αντίστοιχου ριβοενζύμου, όπως στα P-Rz3 και P-Rz5, πράγμα που αναμενόταν, αφού τα νουκλεοτίδια 15.1 και 15.2 όχι μόνο εμπλέκονται στον σχηματισμό της έλικας III, αλλά θεωρούνται απαραίτητα για την καταλυτική ικανότητα και ενεργότητα των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων. Όταν στις θέσεις αυτές γίνονταν αλλαγές, ώστε να σχηματίζονται ζευγάρια μεταξύ των ριβονουκλεοτιδίων G και U, όπως στα ριβοένζυμα P-Rz4 και P-Rz6, γεγονός που δεν θα έπρεπε να επηρεάζει σημαντικά ή να καταστρέφει την σφυροκέφαλη δομή, η καταλυτική ικανότητα χανόταν εντελώς. Παρόμοιες παρατηρήσεις είχαν γίνει για κοντύτερο υπόστρωμα-RNA (Sheldon και Symons, 1989), ενώ ένα άλλο υπόστρωμα-RNA μπορούσε να διασπαστεί από το αντίστοιχο ριβοένζυμο, παρουσία ζευγαριών G:U (Perriman κ.α., 1992). Το γεγονός της έλλειψης ενός νουκλεοτιδίου στην περιοχή της έλικας III και πέρα από την κρίσιμη αυτή περιοχή, όπως στην περίπτωση του P-Rz7, δεν κατέστρεφε την ικανότητα του ριβοενζύμου να διασπά το υπόστρωμά του, όπως συνέβη με το L_I-Rz151, που παρουσίαζε παρατεταμένη έλλειψη νουκλεοτιδίων στην περιοχή της έλικας III.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι στην περιοχή της έλικας I υπάρχει μεγαλύτερη "ελαστικότητα" και δεν απαιτείται η ύπαρξη συνεχόμενων ζευγαριών βάσεων μεταξύ υποστρώματος-RNA και ριβοενζύμου για την ύπαρξη καταλυτικής ενεργότητας. Ένα τέτοιο συμπέρασμα ενισχύθηκε και από την ανακάλυψη ότι, η τυχαία ταυτόχρονη έλλειψη νουκλεοτιδίων στις περιοχές των ελίκων I και III, δημιούργησε σε δυο περιπτώσεις ένα ριβοένζυμο ικανό να διασπά το υπόστρωμά του σε μια νέα θέση, προς το 5' άκρο του μορίου RNA, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 15** για τα ριβοένζυμα L-Rz40 και P-Rz41.

3) ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ (SPECIFICITY) ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ.

Η εξειδίκευση των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων βασίζεται στους αντικωδικούς βραχίονες, δηλαδή τις νουκλεοτιδικές περιοχές, που συμμετέχουν στον σχηματισμό των ελίκων I και III. Αυτές οι περιοχές από μόνες τους δεν έχουν καταλυτικές ιδιότητες, αλλά παίρνουν μέρος μόνο στην δέσμευση του ριβοενζύμου στο RNA-στόχο του και παρέχουν την δυνατότητα του σωστού προσανατολισμού της καταλυτικής περιοχής γύρω από την θέση

διάσπασης, έτσι ώστε να σχηματισθεί η συνολική σφυροκέφαλη δομή και να καταστεί τελικά δυνατή η διάσπαση του υποστρώματος-RNA. Το μήκος αυτών των αντικωδικών βραχιόνων πρέπει να έχει πολύ μεγάλη σημασία, αφού τα τμήματα αυτά ενός ριβοενζύμου είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση της αντίστοιχης συμπληρωματικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σ' ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα, με αποτέλεσμα την δέσμευση των δυο μορίων και τον σχηματισμό ενός σταθερού συμπλόκου.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι ουσιαστικό και σημαντικό για την επιτυχή διάσπαση ενός μορίου RNA, τα νουκλεοτίδια στις θέσεις 1.1, 16.1, 16.2 και πιθανόν 16.3 του υποστρώματος-RNA, να ταιριάζουν απόλυτα με αυτά του αντίστοιχου ριβοενζύμου. Ζευγάριμα βάσεων στα γειτονικά από αυτές τις περιοχές νουκλεοτίδια, να μην είναι ευεργετικό για την καταλυτική ενεργότητα αλλά όχι επιτακτικό, εφ' όσον οι εκατέρωθεν προς την θέση διάσπασης αντικωδικοί βραχίονες είναι μεγάλοι σε μήκος, ώστε να εξασφαλίζεται η δημιουργία ενός ισχυρού συμπλόκου μεταξύ των δυο αντιδρώντων μορίων RNA. Αυτό φαίνεται και από την πρόσφατη παρατήρηση, ότι η ύπαρξη τριών μόνο νουκλεοτιδίων στην περιοχή της έλικας I σε συνδυασμό με μια μακριά έλικα III, είναι αρκετά για την ύπαρξη πλήρους καταλυτικής ενεργότητας ενός σφυροκέφαλου ριβοενζύμου (**Tabler κ.α., 1994**). Από την αναγκαιότητα μόλις τριών ή τεσσάρων νουκλεοτιδίων όμως, προκύπτει το ερώτημα, αν ένα σφυροκέφαλο ριβοένζυμο μπορεί να είναι επαρκώς εξειδικευμένο για ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα-RNA, όταν αυτή η μέθοδος εφαρμοσθεί κάποια στιγμή *in vivo* ή αν άσχετα μόρια RNA σε σχέση με το κανονικό υπόστρωμα θα μπορούσαν επίσης να διασπαστούν. Βασισμένος σε θεωρητικές προσεγγίσεις ο **Herschlag (1991)** κατέληξε στο συμπέρασμα ότι, η εξειδίκευση ενός ριβοενζύμου ελαττώνεται με το μήκος του RNA και ότι είναι λογικά δυνατόν ένα σφυροκέφαλο ριβοένζυμο να μπορεί να διασπά πιθανόν και άλλα μόρια RNA, άσχετα προς το αρχικό υπόστρωμά του, από το σύνολο των κυτταρικών RNA κατά την διάρκεια *in vivo* εφαρμογών της τεχνολογίας των ριβοενζύμων. Εν τούτοις, αν ένα μόριο RNA διασπώνταν μη σκόπιμα από ένα ριβοένζυμο, τότε θα έπρεπε να ταιριάζει επαρκώς στα νουκλεοτίδια γύρω από την καταλυτική περιοχή του ριβοενζύμου και επίσης να συνδεθεί αποτελεσματικά και γρήγορα με το ριβοένζυμο και να σχηματίσει ένα σταθερό σύμπλοκο. Ο σχηματισμός του δίκλωνου συμπλόκου είναι κινητικά ελεγχόμενος, απαιτώντας την υπερπήδηση του εμποδίου των δευτεροταγών δομών, που πιθανόν να υπάρχουν στο υπόστρωμα-RNA και το ριβοένζυμο, ειδικά όταν αυτά ή ένα από αυτά είναι αρκετά μακριά. Από τις μέχρι σήμερα πληροφορίες, δεν έχει δειχθεί ότι η έκφραση ενός αντικωδικού RNA

έχει προκαλέσει την μη ειδική καταστολή έκφρασης ενός άσχετου προς το στοχευόμενο είδους μορίων RNA.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και άλλων εργασιών, οι συμπληρωματικές περιοχές που απαιτούνται για τον αποτελεσματικό σχηματισμό του δίκλωνου συμπλόκου, θα πρέπει να είναι πολύ μακρύτερες από εκείνες που απαιτούνται για την πραγματοποίηση της αντίδρασης διάσπασης και μόνο.

Για παράδειγμα, ένα σφυροκέφαλο ριβοένζυμο με αντικωδικούς βραχίονες των 8 νουκλεοτιδίων σε κάθε πλευρά της καταλυτικής περιοχής, δεν μπορούσε να συνδεθεί *in vitro* με το μεγάλο σε μήκος υπόστρωμα-RNA εκτός αν τα δυο RNA είχαν αποδιαταχθεί νωρίτερα, με τη βοήθεια θερμότητας (Tablet κ.α., 1994). Φαίνεται λοιπόν, ότι τα σφυροκέφαλα ριβοένζυμα με πολύ μικρό μήκος αντικωδικών βραχιόνων, εμφανίζουν το μειονέκτημα να μην μπορούν να ανταγωνιστούν επιτυχώς τις δευτεροταγείς δομές που υπάρχουν στο πολύ μακρύ υπόστρωμα και να δεσμευθούν επιτυχώς σ' αυτό. Τέτοιου είδους "κοντά" ριβοένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε πολλές *in vitro* μελέτες κινητικής της αντίδρασης διάσπασης, όπου δείχνεται ότι μπορούν να δρουν καταλυτικά, δηλαδή να δεσμεύονται σε ένα αντίστοιχα "κοντό" μόριο υποστρώματος, να το διασπούν και να αποδεσμεύονται από τα προϊόντα διάσπασης, καταλύοντας έτσι την διάσπαση περισσοτέρων του ενός μορίων υποστρώματος. Το μειονέκτημα τους όμως φαίνεται από μια σειρά *in vivo* εφαρμογών. Για παράδειγμα, οι Cotten κ.α. (1989), ανέφεραν ότι ένα τέτοιο μικρό σε μήκος σφυροκέφαλο ριβοένζυμο ενάντια στο U7 RNA, ήταν αναγκαίο να βρίσκεται σε 1000 φορές μεγαλύτερη μοριακή περίσσεια σε σχέση με το υπόστρωμά του, έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης αναστολή της U7-εξαρτώμενης διαδικασίας ωρίμανσης *in vivo*, ενώ ένα αρκετά μακρύτερο αντικωδικό RNA ήταν αποτελεσματικό, όταν βρισκόταν σε έξι φορές μόνο μεγαλύτερη μοριακή περίσσεια σε σχέση με το ίδιο υπόστρωμα. Το πείραμα αυτό δείχνει ότι η δέσμευση και όχι η διάσπαση του υποστρώματος, ήταν ο περιοριστικός παράγοντας μέσα στα κύτταρα. Ομοίως, οι Cameron και Jennings (1989), περιγράφουν την αναγκαιότητα για 1000 φορές μεγαλύτερη μοριακή περίσσεια του "κοντού" σφυροκέφαλου ριβοενζύμου, για την αναστολή της έκφρασης της ακέτυλο τρασνφεράσης της χλωραμφενικόλης σε κύτταρα πιθήκου, ενώ η ίδια ακριβώς απαίτηση υπήρχε και στα πειράματα των L'Hullier κ.α. (1992), για την αναστολή της έκφρασης της α-γαλακτοσφαιρίνης σε κύτταρα ποντικού. Σε όλες τα παραπάνω πειράματα, η συγκέντρωση που απαιτείται είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από την απαιτούμενη για καταστολή με την χρήση των συνηθισμένων αντικωδικών RNA.

Το εμπόδιο όμως της επιτυχούς δέσμευσης του ριβοενζύμου στο υπόστρωμά του μπορεί να ξεπεραστεί αν αυξηθεί το μήκος των αντικωδικών βραχιόνων εκατέρωθεν της καταλυτικής περιοχής, πάνω από 50 έως μερικές εκατοντάδες νουκλεοτίδια. Τέτοιας κατασκευής σφυροκέφαλα ριβοένζυμα μπορούν να ανταγωνιστούν επιτυχώς τις δευτεροταγείς δομές του υποστρώματος και όπως έχει αποδειχθεί, είναι ικανά να καταστέλλουν την έκφραση του RNA-στόχου τους. Βέβαια, τα "μακριά" αυτά σφυροκέφαλα ριβοένζυμα δεν αναμένεται να μπορούν να δρουν καταλυτικά όπως τα "κοντά", τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, αλλά μάλλον πρέπει να δρουν στοιχειομετρικά, δηλαδή ένα μόριο ριβοενζύμου είναι σε θέση να καταλύει την διάσπαση ενός μόνο μορίου υποστρώματος, αφού μετά την δέσμευσή του σ' αυτό και την πραγματοποίηση της αντίδρασης διάσπασης, δεν θα είναι σε θέση να αποδεσμευθεί από τα προϊόντα της αντίδρασης διάσπασης.

Από τα παραπάνω, θα πρέπει να θεωρείται μάλλον απίθανο ότι, ένα καταλυτικό αντικωδικό RNA με μακρείς συμπληρωματικούς αντικωδικούς βραχίονες, θα μπορεί να συνδεθεί και να σχηματίσει ένα σταθερό δίκλωνο σύμπλοκο με ένα άσχετο προς το αρχικό του υπόστρωμα μόριο κυτταρικού RNA, ακόμα και αν η πραγματοποίηση της αντίδρασης διάσπασης και μόνο ήταν δυνατή λόγω τυχαίων νουκλεοτιδικών ομοιοτήτων γύρω από την θέση-στόχο του υποστρώματος.

Μια προσέγγιση σ' ένα τέτοιο πρόβλημα, δηλαδή κατά πόσο ένα αρκετά μεγάλο σε μήκος σφυροκέφαλο ριβοένζυμο θα μπορούσε να δεσμευθεί εκτός από το κανονικό του υπόστρωμα και με ορισμένα άλλα άσχετα μόρια RNA, λόγω κάποιων μερικών ομοιοτήτων στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, έγινε με την σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των αντικωδικών βραχιόνων του καταλυτικού αντικωδικού RNA που κατασκευάστηκε για τα πειράματα της παρούσας μελέτης, για την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *GCN4* στον σακχαρομύκητα και του συνόλου των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδιώματος του ίδιου οργανισμού. Το ζητούμενο δηλαδή ήταν η ανεύρεση ακολουθιών, που παρουσίαζαν υψηλό ή τουλάχιστον ικανοποιητικό βαθμό ομοιότητας με τις αλληλουχίες των αντικωδικών βραχιόνων, έτσι ώστε θεωρητικά τουλάχιστον, να υπάρχει η δυνατότητα σχηματισμού ενός συμπλόκου μεταξύ του άσχετου μορίου RNA και του χρησιμοποιούμενου μεγάλου σε μήκος καταλυτικού αντικωδικού RNA. Από την έρευνα αυτή βρέθηκαν μερικές ομοιότητες υποπεριοχών των αντικωδικών βραχιόνων με άσχετα προς το στοχευόμενο RNA μόρια, σε καμία περίπτωση όμως δεν βρέθηκαν ταυτόχρονα κάποιου βαθμού ομοιότητες και στις δυο περιοχές των αντικωδικών βραχιόνων του καταλυτικού RNA εκατέρωθεν της καταλυτικής περιοχής, οι οποίες εμπλέκονται άμεσα στον σχηματισμό των ελίκων I και III με

το υπόστρωμα-RNA. Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας, μπορεί να λεχθεί ότι είναι μάλλον δύσκολο να πραγματοποιηθεί η αντίδραση διάσπασης ενός άσχετου προς τον συγκεκριμένο στόχο-RNA που έχουμε επιλέξει και σχεδιάσει εναντίον του το αντίστοιχο καταλυτικό αντικωδικό RNA, χωρίς βέβαια να μπορεί να αποκλεισθεί η δημιουργία εναλλακτικών δομών, όπως αυτές που παρατηρούνται στο **Σχήμα 15**, όπου η θέση-στόχος μετατοπίστηκε μερικά νουκλεοτίδια μακρύτερα από την ήδη επιλεγμένη.

Δεν μπορούμε όμως να καταλήξουμε σε σαφές συμπέρασμα ως προς την σχέση μήκους και εξειδίκευσης, αφού το ιδανικότερο μήκος κατά πάσα πιθανότητα θα διαφέρει ανάλογα με το RNA-στόχο που επιλέγεται καθώς και το χρησιμοποιούμενο βιολογικό σύστημα. Πρέπει όμως να έχουμε υπόψη μας, ότι η παρατηρούμενη δομική ελαστικότητα στην περιοχή της έλικας I αλλά και στην περιοχή της έλικας III, με ορισμένους περιορισμούς, θα μπορούσε να είναι χρήσιμη, αν ο ιός με γονιδίωμα RNA ήταν ο ζητούμενος στόχος. Τούτο γιατί λόγω της έλλειψης ικανότητας διόρθωσης των λαθών τους από τα ιικά ένζυμα, που αντιγράφουν το ιικό RNA, πιστεύεται ότι αυτοί οι ιοί έχουν υψηλό βαθμό μεταλλακτικότητας (**Domingo και Holland, 1988**). Εκτός και αν μεταλλαχθούν τα νουκλεοτίδια των θέσεων 1.1, 16.1, 16.2 ή 16.3 του υποστρώματος-RNA ή το νουκλεοτίδιο στη θέση 17 μετατραπεί σε G, το ιικό RNA θα μπορούσε ακόμα να διασπάται από το ριβοένζυμο. Αυτό επομένως ελαχιστοποιεί τις πιθανότητες ένα ιικό RNA να δραπετεύσει από το ριβοένζυμο, προκαλώντας έτσι μια παθολογική κατάσταση στο προσβαλλόμενο κύτταρο.

(Γ) ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ Ν ΚΑΙ Χ ΤΗΣ ΤΡΙΠΛΕΤΑΣ ΝUX, ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΕΙ ΤΗΝ ΘΕΣΗ-ΣΤΟΧΟ ΤΟΥ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΟΥ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟΥ ΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ-RNA.

Παρά τις αρκετές επιτυχείς εφαρμογές των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης (Marschall κ.α., 1994), συμπεριλαμβανομένων και αυτών σε διαγενωμικά (transgenic) ζώα (Heinrich κ.α., 1993, Zhao και Pick, 1993, Efrat κ.α., 1994, Larsson κ.α., 1994), προς το παρόν αυτή η τεχνολογία ελάχιστα χρησιμοποιείται παρά τη δυνατότητά της. Εκτός από τον γενικό σχεδιασμό των αντικωδικών βραχιόνων, που μπορεί να ποικίλλουν σε μήκος (Tablet κ.α., 1994, Crisell κ.α., 1993), η επιλογή της θέσης-στόχου είναι ένα από τα κρισιμότερα στάδια στην όλη κατασκευή ενός σφυροκέφαλου ριβοενζύμου. Στην επιλογή της πρέπει να ληφθούν υπόψη, δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος-RNA, όπως επίσης και η φύση της τριπλέτας νουκλεοτιδίων, που σύμφωνα με τον τύπο NUX, καθορίζουν την θέση-στόχο, όπου θα συμβεί η διάσπαση του μορίου. Ανάμεσα στα σφυροκέφαλα ριβοένζυμα, που συναντώνται στην φύση, επικρατεί η αλληλουχία GUC στην θέση διάσπασης (Bruening, 1989), αλλά στο δορυφορικό RNA του LTSV RNA (Lucerne Transient Streak Virus) και του BYDV RNA (Barley Yellow Dwarf Virus), συναντάται GUA (Forster και Symons, 1987) ή AUA (Miller κ.α., 1991), αντίστοιχα. Ακολουθώντας το παράδειγμα της φύσης, οι περισσότεροι ερευνητές έχουν επιλέξει την τριπλέτα GUC ή τουλάχιστον μια του τύπου GUX, όπου X μπορεί να είναι A, C ή U, στις μελέτες τους όπου γίνεται χρήση σφυροκέφαλων ριβοενζύμων. Υπάρχουν επίσης παραδείγματα με CUC (Perriman κ.α., 1992, Cotten κ.α., 1989, Saxena και Ackerman, 1990, Perreault κ.α., 1990), όπως επίσης UUA (He κ.α., 1993), UUC (Perriman κ.α., 1992), CUA (Koizumi κ.α., 1988), CUU (Pachuk κ.α., 1994) και AUU (Xing και Whitton, 1992) στη θέση-στόχο του υποστρώματος-RNA, ενώ η παρουσία CAC, UAC και AAC συνέβαλε λιγότερο στην διάσπαση του υποστρώματος (Perriman κ.α., 1992).

Από την στιγμή που τα σφυροκέφαλα ριβοένζυμα κατασκευάζονται όχι μόνο ενάντια σε διαφορετικές θέσεις διάσπασης, αλλά επίσης και με ποικίλο μήκος των αντικωδικών τους βραχιόνων, μια γενική σύγκριση των καταλυτικών τους ιδιοτήτων είναι μάλλον δύσκολη. Οι περισσότεροι ερευνητές βασίζονται στον λόγο K_{cat}/K_m ως σταθεράς σύγκρισης, υιοθετώντας έτσι μια παράμετρο από τις αντιδράσεις κινητικής των ενζύμων, η οποία μετράται κάτω από συνθήκες πολλαπλής μετατροπής του υποστρώματος (multiple substrate turnover), καθώς

επίσης και σε κατάσταση ισορροπίας, π.χ. σταθερή συγκέντρωση του ελεύθερου και του δεσμευμένου στο υπόστρωμα σφυροκέφαλου ριβοενζύμου. Ικανοποιητικές τιμές αυτού του λόγου μπορούν να προκύψουν, αν χρησιμοποιούνται κοντά μόρια RNA τόσο σαν υποστρώματα όσο και σαν ριβοένζυμα, έτσι ώστε να μπορεί το μόριο του ριβοενζύμου να αποδεσμευθεί από τα προϊόντα της διάσπασης και να καταλύσει την διάσπαση ενός άλλου μορίου υποστρώματος. Μια γενική σύγκριση διαφορετικών ριβοενζύμων, βασισμένη αποκλειστικά στην παράμετρο K_{cat}/K_m είναι μάλλον προβληματική, καθώς υπάρχουν αρκετά παραδείγματα όπου η χρησιμοποίηση μακρύτερων υποστρωμάτων-RNA, τα οποία ομοιάζουν περισσότερο στα αυθεντικά ενδογενή RNA-στόχους του κυττάρου, είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της τιμής του λόγου K_{cat}/K_m (Heidenreich και Eckstein, 1992, Denman, 1993, Ellis και Rogers, 1993, Bertrand κ.α., 1994). Αυτό σήμαινε ελάττωση της καταλυτικής ενεργότητας του ριβοενζύμου, όπως επίσης και λιγότερο αποτελεσματικό σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ του υποστρώματος-RNA και του ριβοενζύμου, παρόλο που μερικά από τα κατασκευασθέντα για τις μελέτες αυτές ριβοένζυμα ήταν αποτελεσματικά κατά την εφαρμογή τους σε ζωντανά κύτταρα.

Σε όλα τα πειράματα της παρούσας μελέτης, ο υπολογισμός των ρυθμών της αντίδρασης διάσπασης πραγματοποιήθηκε στην ουσία με τον ίδιο τρόπο όπως σε τρεις προηγούμενες μελέτες [Homann κ.α. (1993), (1994) και Tablet κ.α. (1994)], με την εξαίρεση ότι χρησιμοποιήθηκαν προσχηματισμένα σύμπλοκα μεταξύ υποστρώματος-RNA και ριβοενζύμου, έτσι ώστε να αποφευχθούν τυχόν διαφορές στην όλη κινητική της αντίδρασης δέσμευσης των δύο μορίων. Στην πραγματικότητα μια τέτοια προφύλαξη δεν ήταν άκρως αναγκαία, αφού κάτω από τις συνθήκες, που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα, η δέσμευση των δυο αντιδρώντων μορίων και ο σχηματισμός του αντίστοιχου συμπλόκου έγινε σε πάρα πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Ο καθορισμός της σταθεράς του ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης περιγράφει την συνολική διαδικασία διάσπασης, η οποία περιλαμβάνει τόσο μια πιθανή αλλαγή της συνολικής διαμόρφωσης στο χώρο του συμπλόκου μεταξύ του υποστρώματος-RNA και του ριβοενζύμου, όσο και τη χημική αντίδραση τρανσεστεροποίησης στην συγκεκριμένη θέση που στοχεύεται. Αν χρησιμοποιούνταν κοντά σε μήκος σφυροκέφαλα ριβοένζυμα τότε οι τιμές της σταθεράς είναι της τάξεως περίπου: 1 (min^{-1}). Τα σφυροκέφαλα όμως ριβοένζυμα με τουλάχιστον ένα μακρύ αντικωδικό βραχίονα, τα οποία επίσης ονομάζονται καταλυτικά αντικωδικά RNA, είναι διαφορετικά από τα πολύ κοντότερα ριβοένζυμα, καθώς δεν αποχωρίζονται από το συνδεδεμένο σε αυτά υπόστρωμά τους, τουλάχιστον *in vitro*. Η συμπεριφορά αυτού του είδους ριβοενζύμων καθορίζεται

αρχικά από τον ρυθμό με τον οποίο δεσμεύονται στο υπόστρωμά τους και δεύτερον από την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας διάσπασης. Γενικώς, ο ρυθμός της αντίδρασης διάσπασης ελαττώνεται περίπου 100 έως 500 φορές σε σύγκριση με τα πολύ μικρότερα σε μέγεθος σφυροκέφαλα ριβοένζυμα (Symons, 1992) και είναι της τάξεως περίπου: $10^{-2}(\text{min}^{-1})$, ίσως επειδή απαιτείται επιπλέον αλλαγή της όλης διαμόρφωσης του συμπλόκου, ώστε να συμβεί η αντίδραση διάσπασης (Homann κ.α., 1994). Παρά τις χαμηλές τιμές όμως, έχει δειχθεί ότι η επίδραση και το αποτέλεσμα, που έχει η εφαρμογή της τεχνολογίας των αντικωδικών RNA, ενισχύεται από την παρουσία της καταλυτικής ενεργότητας στο ίδιο μόριο (Homann κ.α., 1993, Tabler κ.α., 1994). Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει και ο Crissel κ.α. (1993), υποστηρίζοντας ότι τα σφυροκέφαλα ριβοένζυμα με μακρείς αντικωδικούς βραχίονες είναι πολύ δυναμικότεροι αναστολείς *in vivo*, συγκρινόμενοι με τα πολύ κοντότερου τύπου ριβοένζυμα, παρόλο που τα τελευταία παρουσίαζαν πολύ μεγαλύτερη καταλυτική ενεργότητα *in vitro*.

Για αποτελεσματικότερη εφαρμογή, τα καταλυτικά αντικωδικά RNA, θα έπρεπε να επιλέγονται με βάση, **α)** την γρήγορη υβριδοποίησή τους με το υπόστρωμα-RNA στόχο τους, καθώς και **β)** την γρήγορη επαγωγή της αντίδρασης διάσπασης. Στην πρώτη περίπτωση, η ταχύτητα σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ των δυο αλληλεπιδρώντων μορίων RNA, επηρεάζεται σημαντικά από το σύνολο των δευτεροταγών δομών, που συναντώνται σε αυτά. Όταν κατασκευάζεται ένα αντικωδικό RNA, υπάρχει η δυνατότητα επιλογής είτε μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας συμπληρωματικής προς όλη την περιοχή στόχο, είτε απλώς προς μια υποπεριοχή της. Μια τέτοια επιλογή θα επηρεάσει την δευτεροταγή δομή του αντικωδικού RNA και συνεπώς την δέσμευσή του με το RNA-στόχο του. Με αφορμή ένα τέτοιο προβληματισμό, αναπτύχθηκε μια μέθοδος επιλογής *in vitro*, των ταχύτατα υβριδοποιούμενων μορίων RNA, από ένα σύνολο που έχουν το ίδιο 5' άκρο, όπου βρέθηκε ότι ο ρυθμός σχηματισμού συμπλόκου εξαρτάται σημαντικά από το μήκος του αντικωδικού RNA (Rittner κ.α., 1993). Μια τέτοια τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην περίπτωση των ασύμμετρων σφυροκέφαλων ριβοενζύμων. Εδώ, η επιτυχία της δέσμευσης με το υπόστρωμα ελέγχεται αποκλειστικά από τον αντικωδικό βραχίονα, που συμμετέχει στον σχηματισμό της έλικας III, γιατί η έλικα I συνολικού μήκους μόνο τριών νουκλεοτιδίων είναι πολύ κοντή για να προάγει από μόνη της το στάδιο της υβριδοποίησης με το υπόστρωμα. Ποικιλομορφία του μήκους της έλικας III, θα είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία ασύμμετρων σφυροκέφαλων ριβοενζυμικών μορίων, με διαφορές στις ικανότητες

σηματισμού συμπλόκου με το υπόστρωμά τους, από τα οποία θα μπορούσαν εύκολα να αναγνωρισθούν εκείνα με τη μεγαλύτερη ταχύτητα υβριδοποίησης.

Από την στιγμή που η μεθοδολογία για την καλύτερη δυνατή υβριδοποίηση έχει ήδη αναπτυχθεί, ο ρυθμός της αντίδρασης διάσπασης εξαρτάται σε ένα μεγάλο βαθμό από την επιλογή της κατάλληλης θέσης-στόχου. Με σκοπό την δημιουργία καθοδηγητικών κανόνων για την επιλογή της θέσης αυτής, η παρούσα μελέτη ασχολήθηκε με την σύγκριση των 12 δυνατών συνδυασμών-στόχων που μπορεί να υπάρξουν σε μια τέτοια θέση και προκύπτουν από τον τύπο NUX, όπου N=A, G, C, U και X=A, C, U, στο ίδιο όμως μόριο υποστρώματος-RNA ενός ασύμμετρου σφυροκέφαλου ριβοενζύμου. Η ανάλυση της αντίδρασης διάσπασης επιβεβαίωσε ότι όλοι οι συνδυασμοί μπορούν να διασπαστούν, αλλά με υψηλή ποικιλότητα στο ρυθμό διάσπασης. Η χαμηλότερη τιμή ήταν αυτή της τριπλέτας UUU, για την οποία από τις μέχρι σήμερα πληροφορίες και δημοσιεύσεις δεν έχει αναφερθεί ότι μπορεί να αποτελέσει μια ικανή θέση-στόχο. Την υψηλότερη τιμή παρουσίασε η τριπλέτα AUC, $K_{\text{διασπ.}} = 2.4 \times 10^{-3} / \text{λεπτό} = 4 \times 10^{-5} / \text{δευτερόλεπτο}$, η οποία ήταν περίπου 4 φορές μικρότερη από αυτήν ενός άλλου ασύμμετρου σφυροκέφαλου ριβοενζύμου (Tablet *κ.α.*, 1994). Αυτό αντικατοπτρίζει το διαφορετικό νουκλεοτιδικό περιβάλλον, στο οποίο βρίσκονται οι τριπλέτες AUC, το οποίο δείχθηκε από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ότι έχει υψηλή επίδραση στην παρατηρούμενη καταλυτική ενεργότητα διάσπασης, ακόμα και για την ίδια θέση-στόχο.

1) ΜΠΟΡΟΥΝ ΟΙ ΣΧΕΤΙΚΟΙ ΡΥΘΜΟΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΝΑ ΓΕΝΙΚΕΥΘΟΥΝ;

Παρόλο που η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που συγκρίνει και τους 12 δυνατούς συνδυασμούς, που προκύπτουν από τον τύπο NUX, υπάρχουν τρεις προηγούμενες δημοσιεύσεις στις οποίες συγκρίθηκαν τριπλέτες του τύπου NUC και GUX στο ίδιο πάντα υπόστρωμα-RNA (Koizumi *κ.α.*, 1988, Ruffner *κ.α.*, 1990, Perriman *κ.α.*, 1992). Σε κάθε μια από αυτές χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στην καταλυτική περιοχή του ριβοενζύμου, που σχηματίζουν την έλικα II. Εν τούτοις, αρκετές άλλες μελέτες έχουν δείξει, ότι νουκλεοτιδικές αλλαγές στην έλικα II έχουν σε γενικές γραμμές ελάχιστη σημασία, εφ' όσον δεν αλλάζουν τα συντηρημένα νουκλεοτίδια, που είναι άκρως απαραίτητα για την καταλυτική ενεργότητα του ριβοενζύμου (McCall *κ.α.*, 1992, Tuschl και Eckstein, 1993). Ειδικά οι σχετικοί ρυθμοί των αντιδράσεων διάσπασης για μια συγκεκριμένη ομάδα υποστρωμάτων-RNA, δεν θα έπρεπε να επηρεάζονται από τις διαφορές στην περιοχή της

έλικας II. Μόνο η μελέτη των **Koizumi κ.α. (1988)** ίσως αποτελεί εξαίρεση, από την στιγμή που ο σχεδιασμός των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων βασίστηκε στο μετάγραφο RNA του δορυφορικού DNA-2 της σαύρας (newt). Όπως βρέθηκε αργότερα, τούτο ήταν σε θέση να διασπά μέσω διαφορετικών μηχανισμών, περιλαμβάνοντας τον σχηματισμό ενός διπλού ριβοενζύμου (**Epstein και Pabon-Pena, 1991**), έτσι ώστε η σύγκριση ίσως να είναι δύσκολη σ' αυτή την περίπτωση. Στις άλλες δυο μελέτες των **Ruffner κ.α. (1990)** και **Perriman κ.α. (1992)**, χρησιμοποιήθηκαν ήδη σχηματισμένα σύμπλοκα υποστρώματος-RNA και ριβοενζύμου, στα οποία η αντίδραση διάσπασης ακολουθούσε κινητική ψευδοπρώτης τάξεως, έτσι ώστε διαφορές στην υβριδοποίηση ή στις τιμές της σταθεράς K_m , να μην ευθύνονται για την ποικιλομορφία στην παρατηρούμενη αποτελεσματικότητα διάσπασης. Οι σχετικοί ρυθμοί της αντίδρασης διάσπασης από τις 4 διαφορετικές μελέτες συνοψίζονται στον **Πίνακα 9**, όπου μέτρο σύγκρισης θεωρήθηκε ο ρυθμός διάσπασης ίσος με 100%, όταν στην θέση-στόχο υπήρχε η τριπλέτα GUC, ενώ δείχνονται και τα αμέσως γειτονικά προς την θέση-στόχο νουκλεοτίδια 16.3 και 1.1. Παρατηρούμε ότι υπάρχουν αισθητές διαφορές, άσχετα με το αν χρησιμοποιήθηκαν κοντά συνθετικά RNA (**Koizumi κ.α., 1988, Ruffner κ.α., 1990**) ή ριβοένζυμα με τουλάχιστον ένα μακρύ αντικωδικό βραχίονα, όπως στην παρούσα μελέτη και αυτή των **Perriman κ.α. (1992)**. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι οι θέσεις-στόχοι δεν μπορούν να καταταχθούν σε κατηγορίες ισχυρών και αδύναμων. Παρόλα αυτά, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι, μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων-RNA, η τριπλέτα GUC που συναντάται και στην φύση, διασπώνταν πάντοτε με σχετικά υψηλή αποτελεσματικότητα. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι ότι, η τριπλέτα AUC διασπώνταν καλύτερα απ' όλες τις άλλες στην παρούσα μελέτη, ενώ δεν ήταν σε θέση να διασπαστεί καθόλου στην εργασία των **Perriman κ.α. (1992)**, μαρτυρώντας έτσι την σημασία των γύρω από την θέση διάσπασης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και η οποία ήταν διαφορετική μεταξύ των δυο αυτών μελετών. Επίσης, οι **Nakamaye και Eckstein (1994)**, ανέφεραν τα αποτελέσματα των προσπαθειών τους να επιλέξουν ένα αποτελεσματικό σφυροκέφαλο ριβοένζυμο, που να μπορεί να διασπά μετά από την αλληλουχία AUA, βασισμένοι στην καταλυτική περιοχή του sBYDV. Η τριπλέτα AUA παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον, αφού αποτελεί μέρος της αλληλουχίας αναγνώρισης AAUAAA, που θεωρείται υπεύθυνη για την πολυαδενυλίωση του mRNA. Στην μελέτη τους σύγκριναν τους σχετικούς ρυθμούς των αντιδράσεων διάσπασης για διαφορετικές θέσεις του τύπου AUX στο ίδιο υπόστρωμα-RNA.

Πίνακας 9: Σχετικοί ρυθμοί της αντίδρασης διάσπασης μετά από τριπλέτες του τύπου NUC και GUX, καθώς και σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με εκείνα που έχουν μέχρι σήμερα δημοσιευθεί. Για διευκόλυνση της σύγκρισης η τιμή του ρυθμού διάσπασης όταν στην θέση-στόχο υπήρχε η τριπλέτα GUC, θεωρήθηκε ίση με 100% και οι τιμές των υπολοίπων τριπλετών συγκρίθηκαν προς αυτή.

ΜΕΛΕΤΗ	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟ ¹ 16.3	ΤΡΙΠΛΕΤΑ-ΣΤΟΧΟΣ						ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟ ¹ 1.1
		GUC	AUC	CUC	UUC	GUA	GUU	
Koizumi κ.α. (1988)²	G	100	10	100	41	104	104	C
Ruffner κ.α. (1990)	U	100	57	8	25	70	5	U
Perriman κ.α. (1992)	C	100	0	95	120	93	68	U
Παρούσα Διατριβή	G	100	120	10	70	30	15	U

1. Το νουκλεοτίδιο 16.3 μαζί με το 1.1 γειτονεύουν άμεσα με κάθε τριπλέτα του τύπου NUX στην θέση-στόχο, στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα.

2. Τα δεδομένα αυτής της μελέτης αποκτήθηκαν με βάση το σφυροκέφαλο ριβοένζυμο που παρατηρείται στο μετάγραφο RNA του δορυφορικού 2 DNA της σαύρας, το οποίο παρουσιάζει διαφορετικό μηχανισμό αυτο-διάσπασης, απ' ότι τα υπόλοιπα RNA που συναντώνται στην φύση και έχουν την ικανότητα να καταλύουν την διάσπαση του εαυτού τους.

Ακόμα και σ' αυτά τα πειράματα, στην περίπτωση που στην θέση-στόχο υπήρχε η τριπλέτα AUC, η διάσπαση ήταν η αποτελεσματικότερο των υπολοίπων, αλλά σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη, η τριπλέτα AUU διασπóνταν με σχεδόν ίδιο ρυθμό όπως η AUC. Η τριπλέτα AUA η οποία συναντάται στο sBYDV, διασπóνταν με αποτελεσματικότητα μόνο 3.5% περίπου, συγκρινόμενη με την AUC, σε αντίθεση με το αποτέλεσμα τούτης της εργασίας, όπου για την τριπλέτα AUA το ποσοστό ανερχόταν στο 36%.

Οι παρατηρούμενες διαφορές στην σχετική ικανότητα διάσπασης μετά από μια συγκεκριμένη τριπλέτα-στόχο του τύπου NUX, αντανakλούν μάλλον μια πολύπλοκη σχέση μεταξύ αυτής της θέσης και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας γύρω της. Γι' αυτό θα ήταν ίσως σκόπιμο, να αναλυθεί επίσης η επίδραση των νουκλεοτιδίων που γειτονεύουν άμεσα με την θέση-στόχο του υποστρώματος-RNA. Από την στιγμή που ο ρυθμός της αντίδρασης διάσπασης επηρεάζεται περισσότερο από ελλείψεις στην περιοχή της έλικας III, σε σύγκριση με την έλικα I, θα μπορούσαμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα, ότι τα νουκλεοτίδια 16.3 ή 16.4 κατά πάσα πιθανότητα, επηρεάζουν το γεγονός της αντίδρασης διάσπασης. Αλλωστε, είναι ενδιαφέρον ότι στους αντιπροσώπους που συναντώνται στην φύση και το RNA τους διασπάται μέσω ενός μονού σφυροκέφαλου μηχανισμού, στην θέση 16.3 υπάρχει μια πυριμιδίνη, με εξαίρεση του sLTSV, που υπάρχει επίσης και στην θέση 16.4 (**Bruening, 1989**). Μελλοντικές μελέτες ελπίζεται ότι θα αποκαλύψουν την σημασία των παραπάνω παρατηρήσεων.

(Δ) ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΤΗΣ ΚΑΛΥΤΕΡΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΚΑΙ ΘΕΣΗΣ-ΣΤΟΧΟΥ ΣΤΟ RNA ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΔΙΑΣΠΑΣΤΕΙ.

Συνοψίζοντας, τις μέχρι σήμερα γνώσεις μας σχετικά με τον σχεδιασμό αποδοτικότερων καταλυτικών αντικωδικών RNA σφυροκέφαλου τύπου, μπορεί να προταθεί μια γενική στρατηγική η οποία δύναται να ακολουθηθεί από οποιαδήποτε ερευνητική ομάδα, προκειμένου να εξευρεθεί η καλύτερη θέση-στόχος σε ένα συγκεκριμένο είδος RNA, η έκφραση του οποίου πρέπει να ανασταλλεί. Τα βασικά της σημεία είναι τα εξής:

1) Η επιλογή μιας περιοχής στο παραγόμενο υπόστρωμα-RNA, η οποία εμφανίζει την χαμηλότερη δυνατή πιθανότητα σχηματισμού δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση του υπολογιστικού προγράμματος που αναπτύχθηκε, εφαρμόστηκε και δημοσιεύθηκε από τους **Sczakiel κ.α. (1993)**. Συγκεκριμένα, σ' αυτήν την μελέτη περιγράφεται ένας τρόπος ανάλυσης της δυνατότητας αναδίπλωσης ενός μορίου RNA σε μια συγκεκριμένη περιοχή του, υπολογίζοντας την χαμηλότερη ενέργεια αναδίπλωσης (lowest folding energy). Αυτή η τεχνική βέβαια δεν θα πρέπει να υπερεκτιμηθεί, αλλά πολύ πιθανόν να συμβάλλει στην παραγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων σχετικά με το ποιά είναι η καταλληλότερη περιοχή, ενάντια της οποίας πρέπει να κατευθυνθεί το καταλυτικό αντικωδικό RNA. Στην περίπτωση αυτή, το κρίσιμότερο στάδιο για την πραγματοποίηση της αντίδρασης διάσπασης, είναι αυτό της δέσμευσης του ριβοενζύμου με το υπόστρωμά του, γεγονός που εξαρτάται άμεσα από την διαθεσιμότητα των κατάλληλων ακολουθιών του υποστρώματος στις συμπληρωματικές τους στους αντικωδικούς βραχίονες του ριβοενζύμου, έτσι ώστε να σχηματιστεί το σταθερότερο δυνατό σύμπλοκο μεταξύ τους. Τα θετικά αποτελέσματα από τα πειράματα, που έγιναν με HIV-1 RNA, μαρτυρούν ίσως τις δυνατότητες ενός τέτοιου τύπου ανάλυσης.

2) Η επιλογή της καλύτερης δυνατής τριπλέτας νουκλεοτιδίων του τύπου NUX, όπου N= A, G, C ή U και X= A, C ή U, που θα αποτελέσει την θέση-στόχο του ριβοενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, μια τέτοια τριπλέτα θα μπορούσε να είναι του τύπου NUC, όπως π.χ. GUC ή AUC, η οποία μάλιστα θα ήταν προτιμότερο να είναι μέρος μιας αλληλουχίας αναγνώρισης ενός περιοριστικού ενζύμου, έτσι ώστε να είναι ευκολότερη η κατασκευή του αντίστοιχου σφυροκέφαλου ριβοενζύμου με την μέθοδο των **Tabler και Tsagris (1991)**. Βέβαια, από την στιγμή που δεν υπάρχει άλλη δυνατότητα, οποιαδήποτε άλλη τριπλέτα θα 'πρεπε να επιλεγεί σαν υποψήφια θέση-στόχος.

3) Κατασκευή του κατάλληλου ασύμμετρου καταλυτικού αντικωδικού RNA με την μέθοδο των **Tabler κ.α. (1994)**, η οποία εφαρμόστηκε με επιτυχία στην παρούσα μελέτη. Δηλαδή, το σφυροκέφαλου τύπου καταλυτικό αντικωδικό RNA που θα προκύπτει από την μεταγραφή του αντίστοιχου τμήματος DNA, θα έχει ένα πολύ μικρό αντικωδικό βραχίονα μήκους 3 νουκλεοτιδίων, που θα συμμετέχει στον σχηματισμό της έλικας I, ενώ από την άλλη θα έχει έναν αρκετά μακρύτερο αντικωδικό βραχίονα μήκους μερικών δεκάδων έως εκατοντάδων νουκλεοτιδίων, που θα συμμετέχει στον σχηματισμό της έλικας III, μαζί με τα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια των αντίστοιχων περιοχών του υποστρώματος.

4) Βελτιστοποίηση του μήκους του αντικωδικού βραχίονα του ριβοενζύμου, που θα συμμετέχει στον σχηματισμό της έλικας III με την αντίστοιχη περιοχή του υποστρώματός του, χρησιμοποιώντας την τεχνική των **Rittner κ.α. (1993)**. Με τον τρόπο αυτό δηλαδή, θα γίνει επιλογή *in vitro* των ταχύτερα υβριδοποιούμενων μορίων RNA, από ένα σύνολο μορίων που έχουν το ίδιο 5' σημασμένο άκρο, αλλά διαφέρουν στο μήκος της περιοχής σχηματισμού της έλικας III.

5) *In vitro* δοκιμή της καταλυτικής ενεργότητας του/των σφυροκέφαλου/ων ριβοενζύμου/ων που κατασκευάστηκε/αν και μέτρηση του σχετικού ρυθμού της αντίδρασης διάσπασης, όπως ακριβώς περιγράφεται στην παρούσα μελέτη.

6) *In vivo* δοκιμή της δυνατότητας αναστολής της έκφρασης του ζητούμενου γονιδίου, παρουσία του ή των επιλεγμένων ριβοενζυμικών κατασκευών, φροντίζοντας πάντα για την πραγματοποίηση των κατάλληλων πειραμάτων ελέγχου. Δηλαδή, για την ανάδειξη της σημασίας και του ρόλου του ή των συγκεκριμένων ριβοενζύμων, θα πρέπει να εξετάζονται τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης του υποστρώματος στα κύτταρα εκείνα όπου εκφράζεται μόνο αυτό, ή που εκφράζεται παράλληλα και το αντικωδικό RNA, ή μια ανενεργή μορφή του ριβοενζύμου. Εφόσον υπάρχει ένα αρχικό θετικό αποτέλεσμα, τότε θα πρέπει να αναζητηθεί, έστω και με την εφαρμογή πολύπλοκων τεχνικών, κάποιο ή και τα δυο προϊόντα της αντίδρασης διάσπασης, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η δράση του ριβοενζύμου. Οι πιθανές βελτιώσεις που θα μπορούσαν να γίνουν στον τρόπο έκφρασης και αλληλεπίδρασης του ριβοενζύμου με το υπόστρωμά του αναλύονται και συζητούνται παρακάτω, όπου περιγράφεται μια ανάλογη *in vivo* εφαρμογή σε κύτταρα του σακχαρομήκητα.

(E) IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΟΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ (*Saccharomyces cerevisiae*).

Ενας μάλλον περιορισμένος αριθμός μελετών, που αφορούσαν την δράση των αντικωδικών RNA και των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων στον σακχαρομύκητα, έχουν δημοσιευθεί έως σήμερα. Έτσι οι ερευνητές **Law και Devenish (1988)**, δημοσίευσαν πρώτοι τα αποτελέσματα των προσπαθειών τους για να ρυθμίσουν την έκφραση του γονιδίου *ADE1* σε κύτταρα ζύμης με την χρήση αντικωδικού RNA. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την σύνθεση του ενζύμου φωσφο-ριβόσουλ-άμινο-ιμιδαζολ-ηλεκτρικο-καρβοξαμιδικής συνθετάσης (E.C.6.3.26), η απουσία του οποίου προκαλεί τον κόκκινο χρωματισμό, αντί για τον φυσιολογικό άσπρο, στα κύτταρα του σακχαρομύκητα. Παρά την τοποθέτηση του τμήματος του DNA που θα παρήγαγε το αντικωδικό RNA, σε φορέα κλωνοποίησης με υψηλό αριθμό αντιπροσώπευσης στα κύτταρα (high copy number yeast expression vector), εντούτοις δεν παρατηρήθηκε η αναμενόμενη αλλαγή του φαινότυπου, δηλαδή η δημιουργία *ADE1* μεταλλαγμένων στελεχών. Την ίδια εποχή δημοσίευσαν τα αποτελέσματα των εργασιών τους και οι **Xiao και Rank (1988)**, οι οποίοι μελετούσαν την επίδραση του κατάλληλου αντικωδικού RNA εκφραζόμενου πάλι από φορέα κλωνοποίησης υψηλής αντιπροσώπευσης στο κύτταρο, ενάντια σε τμήμα του γονιδίου *ILV2* το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο ακετο-γαλακτική συνθάση (E.C.4.1.3.18). Το ένζυμο αυτό είναι το πρώτο κοινό ένζυμο που χρησιμοποιείται για την βιοσύνθεση της ισολευκίνης και της βαλίνης. Οποιαδήποτε μεταλλαγή στο γονίδιο *ILV2* ή καταστολή της έκφρασής του από την δράση του αντικωδικού RNA, θα δημιουργούσε αυξότροφα στελέχη για την ισολευκίνη, την λευκίνη και την βαλίνη, γεγονός που αρχικά επαληθεύτηκε αλλά στη συνέχεια διορθώθηκε σαν μια λάθος παρατήρηση όπως προέκυψε από την δημοσίευση των αποτελεσμάτων, από τους **Arndt κ.α. (1994)**.

Μια από τις πρώτες δημοσιεύσεις που αφορούσε την μελέτη της δράσης των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων ενάντια ενός υποστρώματος, ήταν αυτή των **Parker κ.α. (1992)**. Συγκεκριμένα, τμήμα του γονιδίου *gag* του HIV-1 που θα αποτελούσε το υπόστρωμα, τοποθετήθηκε σε ορισμένη θέση στο 3' άκρο του γονιδίου *PGK1*, το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο φωσφογλυκερική κινάση, το mRNA του οποίου είναι υψηλής σταθερότητας μέσα στο κύτταρο ($t_{1/2} > 45$ λεπτά). Στην ίδια θέση του *PGK1* mRNA τοποθετήθηκε και το ολιγονουκλεοτίδιο που θα κωδικοποιούσε το αντίστοιχο σφυροκέφαλο ριβοένζυμο. Όταν το υπόστρωμα και το ριβοένζυμο επωάζονταν *in vitro*, τότε παρατηρούνταν τα αναμενόμενα

προϊόντα της αντίδρασης διάσπασης. Όταν όμως τα δυο RNA εκφράζονταν *in vivo* με την βοήθεια δυο διαφορετικών πλασμιδίων, τότε δεν ήταν δυνατόν να παρατηρηθεί ελάττωση των επιπέδων του PGK1 / HIV-1 gag mRNA, αλλά ούτε και να ανιχνευθεί κάποιο από τα προϊόντα της αντίδρασης διάσπασης, που πιθανόν να συνέβαινε σε πολύ χαμηλό ποσοστό, έτσι ώστε να μην μπορεί να δικαιολογηθεί ικανοποιητική ελάττωση των επιπέδων του mRNA. Το παραπάνω αποτέλεσμα μπορεί να εξηγηθεί με βάση το γεγονός, ότι το συνολικό μήκος του παραγόμενου RNA τόσο για το υπόστρωμα όσο και για το ριβοένζυμο ήταν για το καθένα από αυτά ίσο με 1.400 βάσεις. Πολύ πιθανόν λοιπόν, τα δύο RNA να μην μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν και να σχηματίσουν το κατάλληλο σύμπλοκο, λόγω πολύπλοκων δευτεροταγών δομών που υπήρχαν στο καθένα και έτσι να μην ήταν δυνατή η εκδήλωση της δράσης του σφυροκέφαλου ριβοενζύμου.

Μια πρώτη ένδειξη για την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης στον σακχαρομύκητα ήρθε από τα πειράματα των **Atkins και Gerlach (1994)**. Στόχος του αντικωδικού RNA και του ριβοενζύμου, που σε όλες τις περιπτώσεις εκφράζονταν από κατάλληλο ζυμοειδικό πλασμίδιο, ήταν το mRNA του γονιδίου της ακετυλο-τρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης (CAT), το οποίο ή βρισκόταν στο ίδιο μετάγραφο RNA με το αντικωδικό RNA ή το ριβοένζυμο (*in cis* αλληλεπίδραση), ή εκφραζόταν είτε από διαφορετικό πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης είτε από το χρωμόσωμα, βρισκόταν δηλαδή σε διαφορετικό μετάγραφο από το αντικωδικό RNA ή το ριβοένζυμο (*in trans* αλληλεπίδραση). Σημειωτέον επίσης, ότι το μόριο του ριβοενζύμου περιείχε εννέα συνεχόμενες καταλυτικές περιοχές η απόσταση μεταξύ των οποίων ήταν 15-20 νουκλεοτίδια, στόχευε δηλαδή ταυτόχρονα εννέα διαφορετικές θέσεις του υποστρώματος. Τα αποτελέσματα από τα *in vitro* πειράματα, έδειξαν ότι και στις δυο περιπτώσεις έκφρασης τόσο *in cis* όσο και *in trans*, το ριβοένζυμο είχε την ικανότητα να διασπά το υπόστρωμά του, αλλά *in vivo* υπήρχε 90% μείωση της ενεργότητας του ενζύμου CAT, μόνο στην περίπτωση που το υπόστρωμα και το αντικωδικό RNA ή το ριβοένζυμο βρίσκονταν στο ίδιο μετάγραφο. Τα αντίστοιχα επίπεδα όμως του mRNA όχι μόνο δεν παρουσίασαν μείωση, αλλά αυξήθηκαν κατά 7 φορές σε σχέση με εκείνα των κυττάρων, όπου δεν εκφραζόταν ούτε το αντικωδικό RNA ούτε το ριβοένζυμο. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι στην προκειμένη περίπτωση πρέπει να υπάρχει κάποιος άλλος μηχανισμός καταστολής έκφρασης του CAT γονιδίου, από την αποικοδόμηση δηλαδή ενός σχηματισμένου δίκλωνου συμπλόκου όπου μάλιστα η αποτελεσματικότητα του ριβοενζύμου δεν διαφέρει σε τίποτα από αυτήν του αντικωδικού RNA.

Η μόνη επιτυχημένη προσπάθεια που έχει δημοσιευθεί μέχρι σήμερα ήταν αυτή των **Ferbeyre κ.α. (1995)**, οι οποίοι μελέτησαν την αναστολή της έκφρασης του γονιδίου *ADE1*, το οποίο περιγράφηκε και παραπάνω, με την χρήση ενός σφυροκέφαλου ριβοενζύμου, το οποίο είτε βρίσκονταν στο ίδιο μετάγραφο είτε σε διαφορετικό σε σχέση με το υπόστρωμά του. Η αναστολή της γονιδιακής έκφρασης επιτεύχθηκε μόνο λόγω της παρουσίας του ριβοενζύμου στο ίδιο μετάγραφο RNA και έγινε αντιληπτή τόσο από τον χαρακτηριστικό κόκκινο φαινότυπο, κόκκινο χρωματισμό δηλαδή της αποικίας των κυττάρων σε αντίθεση με τον φυσιολογικό άσπρο, όσο και από την ανίχνευση του 3' προϊόντος της *in vivo* αντίδρασης διάσπασης, με την βοήθεια μιας τεχνικής που περιλάμβανε συνδυασμό συγκόλλησης μορίων RNA καθώς και PCR.

Από τα παραπάνω πειράματα εξάγεται το συμπέρασμα, ότι αποτελεσματική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στον σακχαρομύκητα μπορεί να προκύψει με την μεσολάβηση αντικωδικών RNA ή ριβοενζύμων, που αντιδρούν όχι *in trans* με το RNA-στόχο τους, αλλά μόνο όταν βρίσκονται στο ίδιο μόριο RNA, δηλαδή αντιδρούν *in cis*, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί με βάση το ότι μια τέτοια διάταξη ευνοεί την αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο αλληλουχιών RNA, εξασφαλίζοντας την σύμπτωσή τους τόσο χρονικά όσο και τοπικά.

Από τις μέχρι σήμερα πληροφορίες και δημοσιεύσεις, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη όπου περιγράφεται η δράση ενός σφυροκέφαλου ριβοενζύμου, όταν το ίδιο και το αντίστοιχο υπόστρωμα-RNA του, βρίσκονται σε διαφορετικά μετάγραφα RNA, αντιδρούν *in trans* στα κύτταρα του σακχαρομύκητα. Τα αποτελέσματα όμως που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο "Αποτελέσματα", είναι εντελώς αντίθετα από τα αναμενόμενα με βάση τον αρχικό σχεδιασμό. Δηλαδή, αν τα ORF 1, 2, 3 και 4 πριν το 5 απομακρύνονταν από την δράση του ριβοενζύμου, μετά την διαδικασία της μεταγραφής στον πυρήνα, τότε τα επίπεδα ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης, το γονίδιο της οποίας ήταν συνδεδεμένο αμέσως μετά το κομμάτι του ORF 5 (*GCN4/lacZ*), θα έπρεπε να αυξάνονται. Αυτή άλλωστε ήταν και η προηγούμενη παρατήρηση, όταν χρησιμοποιήθηκαν οι ανάλογες πλασμιδιακές κατασκευές, που διερευνούσαν ένα τέτοιο ερώτημα (**Hinnebusch, 1988**). Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στα πειράματα αυτής της μελέτης, όπου αντί για αύξηση οι τιμές ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης ελαττώνονταν κατά 50%, παρουσία ριβοενζύμου στα κύτταρα του σακχαρομύκητα. Βέβαια, ίσως αυτό να είναι και λογικότερο, αφού για να παρατηρηθεί η αύξηση θα έπρεπε, αμέσως μετά την πραγματοποίηση της αντίδρασης διάσπασης, το μόριο του 3' παραγόμενου προϊόντος RNA να επανακαλυφθεί στο 5' άκρο του, ώστε να μπορεί να μεταφραστεί. Η ελάττωση τώρα, θα μπορούσε να ήταν και μεγαλύτερη του 50%, αν υπήρχαν

στον σακχαρομύκητα πρωτείνες που θα διευκόλυναν τον σχηματισμό δίκλωνων συμπλόκων μεταξύ μορίων RNA. Όπως έχει αναφερθεί, η πρωτεΐνη hnRNP A1 που βρέθηκε στα πυρηνικά εκχυλίσματα σε κύτταρα θηλαστικών, έχει την ικανότητα να αυξάνει την υβριδοποίηση μεταξύ νουκλεϊνικών οξέων (**Pontius και Berg, 1990**), ενώ ο ρόλος της στην αύξηση της δραστηριότητας των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων *in vitro*, έχει ήδη δειχθεί (**Tsuchihashi κ.α., 1993**). Παρόμοια όμως πρωτεϊνική ενεργότητα στον σακχαρομύκητα δεν έχει αναφερθεί έως σήμερα. Το γεγονός τώρα, ότι παρά την ελάττωση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης, τα αντίστοιχα επίπεδα του GCN4/lacZ mRNA δεν ελαττώνονται, φανερώνει ένα διαφορετικό μηχανισμό μέσω του οποίου συμβαίνει μια τέτοια καταστολή *in vivo*. Πιθανόν, το σύμπλοκο μεταξύ προϊόντων της αντίδρασης διάσπασης του υποστρώματος-RNA και του ριβοενζύμου να διατηρείται και μετά την πραγματοποίηση της αντίδρασης, αφού οι μεγάλοι σε μήκος αντικωδικοί βραχίονες που χρησιμοποιήθηκαν στον συγκεκριμένο σχεδιασμό του σφυροκέφαλου ριβοενζύμου ευνοούν κάτι τέτοιο. Η απουσία μάλιστα από τον σακχαρομύκητα, ενζύμων ικανών να αποδιατάσσουν τέτοια δίκλινα σύμπλοκα RNA, όπως έχει αναφερθεί ότι υπάρχει στους πυρήνες κυττάρων θηλαστικών ζώων και ωοκυττάρων του βατράχου (**Hough και Bass, 1994**), ενισχύει μια τέτοια άποψη. Αυτό το δίκλινο σύμπλοκο τώρα ίσως να μην μπορούσε να εξέλθει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, προστατευόμενο έτσι από τις νουκλεάσες που θα μπορούσαν να το αποικοδομήσουν, ενώ συγχρόνως δεν θα ήταν προσιτό για μετάφραση από τα πολυσώματα. Η παρατήρηση, ότι το ριβοένζυμο είχε κάποια επίδραση όταν το υπόστρωμα-RNA εκφραζόταν από το πλασμίδιο pGCN4/lacZ (GCN4/lacZ mRNA) και όχι από τα πλασμίδια pGCN4-1/lacZ (GCN4-1/lacZ mRNA) ή pGCN4 (GCN4 mRNA) ή το χρωμόσωμα (GCN4 mRNA), μπορεί να αποδοθεί στο ότι, αυξανόμενου του μήκους του μετάγραφου, αυξάνεται και η πολυπλοκότητα του στόχου, λόγω της ύπαρξης πληθώρας δευτεροταγών δομών σ' αυτά τα πολύ μακρύτερα μόρια RNA. Στην περίπτωση που το υπόστρωμα-RNA εκφράζεται κατευθείαν από το χρωμόσωμα, ενώ το ριβοένζυμο από πλασμίδιο, τότε η έλλειψη επίδρασης παρουσία του ριβοενζύμου να μπορεί να αποδοθεί και σε μια άλλη παράμετρο. Αυτή θα ήταν, ή έλλειψη συνεντοπισμού τους στον κυτταρικό πυρήνα σε μια δεδομένη χρονική στιγμή, αφού το κάθε ένα από τα δυο RNA πιθανόν να ακολουθούσε ξεχωριστά μονοπάτια εξόδου του από τον πυρήνα, όπως έχει δειχθεί σε ορισμένες περιπτώσεις [**Lawrence κ.α. (1989)**, **Spector (1990)**, **Xing κ.α. (1993)**]. Μ' αυτό τον τρόπο, θα παρεμποδίζονταν η γρήγορη και επιτυχής αλληλεπίδρασή τους για τον σχηματισμό του κατάλληλου δίκλωνου συμπλόκου. Ένα τέτοιο εμπόδιο πιθανόν να ξεπερνιόταν, αν τα δυο RNA εκφραζόταν πολύ κοντά στο ίδιο

χρωμόσωμα. Η σημασία άλλωστε του συνεντοπισμού υποστρώματος και ριβοενζύμου, έχει φανεί από τα πειράματα των **Sullenger και Cech (1993)**, όπου η χρησιμοποίηση ρετροϊκών φορέων έκφρασης για την παραγωγή ριβοενζύμου και RNA-στόχου, έδειξε ότι ο συνεντοπισμός των δυο RNA, αύξανε σημαντικά την καταστολή του γονιδιακού προϊόντος λόγω της παρουσίας του ριβοενζύμου.

Τα δεδομένα τόσο αυτής της μελέτης όσο και προηγούμενων, δείχνουν ότι στο μέλλον ίσως θα 'πρεπε να δοθεί μεγαλύτερη προσοχή στο αν μπορεί να συμβεί ή/και πως να αυξηθεί η ικανότητα αλληλεπίδρασης και στόχευσης των ριβοενζύμων με το χρωμοσωμικά πλέον και όχι πλασμιδιακά εκφραζόμενο υπόστρωμά τους, αν η ρύθμιση ή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης μέσω της τεχνολογίας των ριβοενζύμων επρόκειτο να εκμεταλλευθεί στον *S. cerevisiae*. Ενας τρόπος θα ήταν η πολύ υψηλή έκφραση του ριβοενζύμου, είτε από πλασμίδιο είτε από το χρωμόσωμα, ή με την τοποθέτηση του υποστρώματος και του ριβοενζύμου στις αντίστοιχες θέσεις δυο αλληλομόρφων γονιδίων σε απλοειδή στελέχη, ώστε μετά την παραγωγή του διπλοειδούς στελέχους τα δυο διαφορετικά αλληλεπιδρώντα μόρια RNA να αποτελούν "αλληλόμορφα γονίδια" αφού θα βρίσκονται στην ίδια θέση του χρωμοσώματος. Επιπλέον, θα μπορούσε να εκφραστεί και το γονίδιο της πρωτεΐνης hnRNP A1 σε στελέχη του σακχαρομύκητα, έτσι ώστε να δειχθεί η πιθανή συμβολή της στην αύξηση της δράσης των αντικωδικών RNA ή των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων, ή ακόμα θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί έκφραση μιας γονιδιακής βιβλιοθήκης ενός ανώτερου ευκαρυωτικού οργανισμού σε κάποιο στέλεχος σακχαρομύκητα, με επιλογή και απομόνωση των γονιδίων εκείνων τα οποία συμβάλλουν στην ενίσχυση της δράσης αντικωδικών και καταλυτικών RNA.

(ΣΤ) ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΣΦΥΡΟΚΕΦΑΛΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ.

Η υψηλή εξειδίκευση με την οποία τα ριβοένζυμα δεσμεύονται και διασπούν το υπόστρωμά τους, τους προσδίδει την δυνατότητα να δράσουν ως θεραπευτικοί παράγοντες διαφόρων ασθενειών και ειδικότερα εκείνων που σχετίζονται με την παρουσία ενός ιού με γονιδίωμα RNA. Ένα σημαντικό πρόβλημα όμως των εφαρμογών του αντικωδικού RNA και των ριβοενζύμων, είναι η χαμηλή αποδοτικότητα και υψηλή τοξικότητα των παραγόντων εξωγενούς παράδοσης των μορίων αυτών, στα κύτταρα που επιθυμείται. Έτσι, παράλληλα με τις προοπτικές βελτίωσης της τεχνολογίας των σφυροκέφαλων ριβοενζύμων που αναφέρονται παραπάνω στις ενότητες (Γ) και (Δ), χρειάζεται να γίνει οπωσδήποτε βελτίωση των μεθόδων παράδοσης (delivery), όπως π.χ. της τεχνικής των κατιονικών λιποσωμάτων η οποία έχει χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες των περιπτώσεων που έχουν δημοσιευθεί (**Zabner κ.α., 1995**).

Σημαντικό όμως είναι και το ζήτημα της καλύτερης των μεθόδων ενδογενούς έκφρασης των ριβοενζύμων από τους ανάλογους φορείς, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται το δυνατόν περισσότερο ο επιτυχής σχηματισμός του δίκλωνου συμπλόκου μεταξύ του υποστρώματος και του ριβοενζύμου. Για τον σκοπό αυτό προτείνεται η χρησιμοποίηση υποκινητών ειδικών για την DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση III, γεγονός που οδηγεί σε πολύ αυξημένα επίπεδα έκφρασης των ζητούμενων ακολουθιών DNA. Κάτι τέτοιο θα επιτρέψει την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ριβοενζύμου στα κύτταρα και θα διευκολύνει τον σχηματισμό του ζητούμενου συμπλόκου με το αντίστοιχο υπόστρωμα, όπως επίσης, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται ασύμμετρα καταλυτικά αντικωδικά RNA, ο μεγάλος σε μήκος αντικωδικός βραχίονας να μην επιτρέπει την αποδέσμευση του ριβοενζύμου από το προϊόν της αντίδρασης διάσπασης, με αποτέλεσμα την στοιχειομετρική, αντί της καταλυτικής, δράση του ριβοενζύμου.

Τέλος, άλλο ένα σημαντικό πρόβλημα σχετικό με την εφαρμογή της τεχνολογίας των καταλυτικών αντικωδικών RNA, είναι αυτό της σταθερότητάς τους στο κύτταρο. Προς αυτή την κατεύθυνση έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες, οι οποίες έχουν αναφερθεί στην "Εισαγωγή" και συνίστανται στην τροποποίηση ορισμένων μη σημαντικών για την καταλυτική ενεργότητα νουκλεοτιδίων του ριβοενζύμου, έτσι ώστε να αυξάνεται η ανθεκτικότητα και συνεπώς η σταθερότητα του μορίου στις νουκλεάσες. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να γίνει ευρύτερη διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης των κατασκευών εκείνων,

που εκμεταλλεύονται την ένθεση της κωδικοποιούσας για το ριβοένζυμο περιοχής στο μόριο κάποιου tRNA. Με τον τρόπο αυτό το παραγόμενο RNA θα είναι όχι μόνο σε μοριακή περίσσεια σε σχέση με την συγκέντρωση του υποστρώματός του, αφού θα μεταγράφεται σε υψηλό βαθμό από τον κατάλληλο υποκινητή με την βοήθεια της RNA πολυμεράσης III, αλλά θα είναι και λιγότερο προσιτό σε νουκλεάσες, γεγονός που θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημιζωής του και κατ' επέκταση της πιθανότητάς να δεσμευθεί με το υπόστρωμά του. Σε μία μόνο μελέτη μέχρι σήμερα, η οποία πραγματοποιήθηκε σε φυτικά κύτταρα (**Perriman κ.α., 1995**), δείχθηκε η επιτυχής καταστολή της έκφρασης του γονιδίου στόχου, εξαιτίας όμως της περίσσειας του ριβοενζύμου, χωρίς να μελετηθεί η σχετική σταθερότητα του παραγόμενου RNA. Άλλη μια λύση στο πρόβλημα της αύξησης του χρόνου ημιζωής του παραγόμενου ριβοενζύμου θα μπορούσε να είναι η τοποθέτηση των χαρακτηριστικών stem-loop δομών στο 5' και 3' άκρο του μορίου, όπως ακριβώς πιστεύεται ότι συνέβη σε παρόμοια περίπτωση, χωρίς όμως να διερευνηθεί αναλυτικότερα, όταν το καταλυτικό αντικωδικό RNA στόχευε τμήμα του RNA του γονιδίου *white* της μύγας *Drosophila melanogaster* (**Heinrich κ.α., 1993**).

Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας των ριβοενζύμων, δηλαδή των μορίων εκείνων του RNA, που έχουν την ικανότητα να διασπών κάποιο άλλο συγκεκριμένο μόριο RNA, εμπλουτίστηκε το οπλοστάσιό μας, στην προσπάθεια να ρυθμίσουμε την γονιδιακή έκφραση ανακαλύπτοντας έτσι μέρος της αλήθειας ή θεραπεύοντας σημαντικές ασθένειες-μάστιγες της εποχής μας, ενώ η πραγματοποίηση αρκετών από τα όσα προτείνονται παραπάνω, πιστεύεται ότι θα συμβάλλει αισθητά στην καλύτερευση της απόδοσής τους για τον σκοπό αυτό.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abastatado J.P., Miller P.F. and Hinnebusch A. (1991) Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames, in amino acid-starved cells, forms the basis for *GCN4* translational control. *Mol. Gen. Biol.* 11: 486-496.

Altman S., Baer M.F., Bartkiewicz M., Gold H., Guerrier-Takada C., Kirsebom L.A., Lumelsky N. and Peck K. (1989) Catalysis by the RNA subunit of RNase P - a minireview. *Gene* 82: 63-64.

Altman S., Kirsebom L. and Talbot S. (1993) Recent studies of ribonuclease P. *FASEB J.* 7:7-14.

Arndt G.M., Xiao W. and Rank G.H. (1994) Antisense RNA regulation of *ILV2* gene in yeast: a correction. *Curr. Genetics* 25: 289.

Atkins D. and Gerlach W.L. (1994) Artificial ribozyme and antisense gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antisense Res Dev.* 4: 109-117.

Bender M.L., Bergeron R.J., Komiyama M. (1984) The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis, New York, Wiley.

Bertrand E., Pictet R. and Grange T. (1994) Can hammerhead ribozymes be efficient tools to inactivate gene function? *Nucleic Acids Res.* 22: 293-300.

Bruening G. (1989) Compilation of self-cleaving sequences from plant virus satellite RNAs and other sources. *Methods Enzymol.* 180: 546-558.

Buzayan J.M., Gerlach W.L. and Bruening G. (1986) Non-enzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA. *Nature* 323: 349-353.

Cameron F.H. and Jennings P.A. (1989) Specific gene suppression by engineered ribozymes in monkey cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9139-9143.

Cameron F.H. and Jennings P.A. (1994) Multiple domains in a ribozyme construct confer increased suppressive activity in monkey cells. *Antisense Res. Dev.* 4: 87-94.

Cantor G.H., McElwain T.F., Birkebak T.A. and Palmer G.H. (1993) Ribozyme cleaves rex/tax mRNA and inhibits bovine leukemia virus expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10932-10936.

Carsiotis M. and Jones R.F. (1974) Cross-pathway regulation: Tryptophan - mediated control of histidine and arginine biosynthetic enzymes in *N. crassa*. *J. Bacteriol.* 119: 889-892.

Cech T.R. (1990) Self-splicing of group I introns. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 543-568.

Cech T.R. and Bass B.L. (1986) Biological catalysis by RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 599-629.

Chen C.-J., Banerjea A.C., Harmison G.G., Haglund K. and Schubert M. (1992) Multitarget-ribozyme directed to cleave at up to nine highly conserved HIV-1 env RNA regions inhibits HIV-1 replication - potential effectiveness against most presently sequenced HIV-1 isolates. *Nucleic Acids Res.* 20: 4581-4589.

Chen P.J., Kalpana G., Goldberg J., Mason W., Werner B., Gerin J. and Taylor J. (1986) Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8774-8778.

Chowrira B.M., Berzal-Herranz A. and Burke J.M. (1991) Novel guanosine requirement for catalysis by the hairpin ribozyme. *Nature* 354: 320-322.

Cotten M. and Birnstiel M.L. (1989) Ribozyme mediated destruction of RNA *in vivo*. *EMBO J.* 8: 3861-3866.

Cotten M., Schaffner G. and Birnstiel M.L. (1989) Ribozyme, antisense RNA and antisense DNA inhibition of U7 small nuclear ribonucleoprotein-mediated histone pre-mRNA processing *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 9: 4479-4487.

Crisell P., Thompson S. and James W. (1993) Inhibition of HIV-1 replication by ribozymes that show poor activity *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 21: 5251-5255.

Dahm S.C. and Uhlenbeck O.C. (1991) Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry* 30: 9464-9469.

Denman R.B. (1993) Cleavage of full-length β APP mRNA by hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.* 21: 4119-4125.

Denman R.B., Smedman M., Ju W., Rubenstein R., Potempska A. and Miller D.L. (1994) Ribozyme mediated degradation of β -amyloid peptide precursor mRNA in COS-7 cells. *Nucleic Acids Res.* 22: 2375-2382.

Dever T.E., Feng G., Wek R.C., Cigan A.M., Donahue T.F. and Hinnebusch A.G. (1992) Phosphorylation of initiation factor 2 α by protein kinase GCN2 mediates gene - specific translational control of *GCN4* in yeast. *Cell* 68: 585-596.

Domingo E. and Holland J.J. (1988) in Domingo E., Holland J.J. and Ahlquist P. (eds) RNA Genetics, Vol. III, Variability of RNA Genomes, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, pp 3-36.

Dropulic B., Lin N.H., Martin M.A. and Jeang K.-T. (1992) Functional characterization of a U5 ribozyme: intracellular suppression of human immunodeficiency virus type 1 expression. *J. Virol.* 66: 1432-1441.

Ellis J. and Rogers J. (1993) Design and specificity of hammerhead ribozymes against calretinin mRNA. *Nucleic Acids Res.* 21: 5171-5178.

Epstein L.M. and Gall J.G. (1987) Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the newt. *Cell* 48: 535-543.

Epstein L.M. and Pabon-Pena L.M. (1991) Alternative modes of self-cleavage by newt satellite 2 transcripts. *Nucleic Acids Res.* 19: 1699-1705.

Fabrizio P. and Abelson J. (1990) Two domains of yeast U6 small nuclear RNA required for both steps of nuclear precursor messenger RNA splicing. *Science* 250: 404-409.

Fedor M.J. and Uhlenbeck O.C. (1990) Substrate sequence effects on "hammerhead" RNA catalytic efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1668-1672.

Fedor M.J. and Uhlenbeck O.C. (1992) Kinetics of intermolecular cleavage by hammerhead ribozymes. *Biochemistry* 31: 12042-12054.

Ferbeyre G., Bratty J., Chen H. and Cedergren R. (1995) A hammerhead ribozyme inhibits *ADE1* gene expression in yeast. *Gene* 155: 45-50.

Forster A.C. and Symons R.H. (1987) Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* 49: 211-220.

Forster A.C. and Symons R.H. (1987) Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell* 50: 9-16.

Fu D., Benseler F. and McLaughlin L.W. (1994) Hammerhead ribozymes containing non-nucleoside linkers are active RNA catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 4591-4598.

Goldschmidt-Clermont M., Choquet Y., Girard-Bascou J., Nichel F., Schirmer-Rahire M. and Rochaix J.D. (1991) A small chloroplast RNA may be required for trans-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell* 65: 135-143.

Goodchild J. and Kohli V. (1991) Ribozymes that cleave an RNA sequence from Human Immunodeficiency Virus: the effect of flanking sequence on rate. *Arch. Biochem. Biophys.* 284: 386-391.

Guthrie C. (1991) Messenger RNA splicing in yeast: clues to why the spliceosome is a ribonucleoprotein. *Science* 253: 157-163.

Hampel A. and Tritz R. (1989) RNA catalytic properties of the minimum (-) sTRSV sequence. *Biochemistry* 28: 4929-4933.

Hampel A., Tritz R. Hicks M. and Cruz P. (1990) "Hairpin" catalytic RNA model: Evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA. *Nucleic Acids Res.* 18: 2299-304.

Haseloff J. and Gerlach W.L. (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 334: 585-591.

He Y.-K., Lu C.-D. and Qi G.-R. (1993) In vitro cleavage of HPV16 E6 and E7 RNA fragments by synthetic ribozymes and transcribed ribozymes from RNA-trimming plasmids. *FEBS Lett.* 322: 21-24.

Heidenreich O., Benseler F., Fahrenholz A. and Eckstein F. (1994) High activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'-modified pyrimidine nucleosides and phosphorothioates. *J. Biol. Chem.* 269: 2131-2138.

Heidenreich O. and Eckstein F. (1992) Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* 267: 1904-1909.

Heinrich J.-C., Tabler M. and Louis C. (1993) Attenuation of white gene expression in transgenic *Drosophila melanogaster*: possible role of a catalytic antisense RNA. *Developmental Genet.* 14: 258-265.

Helene C. and Toulme J.-J. (1990) Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1049: 99-125.

Herschlag D. (1991) Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules *in vivo*: More isn't always better. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6921-6925.

Hertel K.J., Herschlag D. and Uhlenbeck O.C. (1994) A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction. *Biochemistry* 33: 3374-3385.

Hertel K.J., Pardi A., Uhlenbeck O.C., Koizumi M., Uesugi S., Cedergren R., Eckstein F., Gerlach W.L., Hodgson R. and Symons R.H. (1992) Numbering system for the hammerhead. *Nucleic Acids Res.* 20: 3252.

Heus H.A., Uhlenbeck O.C. and Pardi A. (1990) Sequence-dependent structural variations of hammerhead RNA enzymes. *Nucleic Acids Res.* 18: 1103-1108.

Hill D.E., Hope I.A., Macke J.P. and Struhl K. (1986) Saturation mutagenesis of the yeast HIS3 regulatory site: requirements for transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein. *Science* 234: 451-457.

Hinnebusch A.G. (1985) A hierarchy of trans acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *S. cerevisiae*. *Mol. Cel. Biol.* 5: 2349-2360.

Hinnebusch A.G. (1988) Mechanisms of gene regulation in the general control of aminoacid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52: 248-273.

Homann H.E., Hofschneider P.H. and Neubert W.J. (1990) Sendai virus gene expression in lytically and persistently infected cells. *Virology* 177: 131-140.

Homann M., Tabler M., Tzortzakaki S. and Sczakiel G. (1994) Extension of helix II of an HIV-1-directed hammerhead ribozyme with long antisense flanks does not alter

kinetic parameters in vitro but causes loss of the inhibitory potential in living cells. *Nucleic Acids Res.* 22: 3951-3957.

Homann M., Tzortzakaki S., Rittner K., Sczakiel G. and Tabler M. (1993) Incorporation of the catalytic domain of a hammerhead ribozyme into antisense RNA enhances its inhibitory effect on the replication of human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res.* 21: 2809-2814.

Hope I.A. and Struhl K. (1986) Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein GCN4 of yeast. *Cell* 46: 885-894.

Hope I.A. and Struhl K. (1987) GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. *EMBO J.* 6: 2781-2784.

Hough R.F. and Bass B.L. (1994) Purification of the *Xenopus laevis* double-stranded RNA adenosine deaminase. *J. Biol. Chem.* 269: 9933-9939.

Inouye M. (1988) Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation - a review. *Gene* 72: 25-34.

Jacquier A. (1990) Self-splicing group II and nuclear pre-mRNA introns: how similar are they? *Trends Biochem. Sci.* 15: 351-354.

Jeffries A.C. and Symons R.H. (1989) A catalytic 13-mer ribozyme. *Nucleic Acids Res.* 17: 1371-1377.

Jones E.W. and Fink G.R. (1985) Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. *Microbiol. Rev.* 5: 181-293.

Kashani-Sabet M., Funato T., Tone T., Jiao L., Wang W., Yoshida E., Kashfinn B.I., Shitara T., Wu A.M., Moreno J.G., Traweek S.T., Ahlering T.E. and Scanlon K.J. (1992) Reversal of the malignant phenotype by an anti-ras ribozyme. *Antisense Res. Dev.* 2: 3-15.

Kashani-Sabet M., Funato T., Florenes V.A., Fodstad O. and Scanlon K.J. (1994) Suppression of the neoplastic phenotype in vivo by an anti-ras ribozyme. *Cancer Res.* 54: 900-902.

Koizumi M., Iwai S. and Ohtsuka E. (1988a) Construction of a series of several self-cleaving RNA duplexes using synthetic 21-mers. *FEBS Lett.* 228: 228-230.

Koizumi M., Iwai S. and Ohtsuka E. (1988b) Cleavage of specific sites of RNA by designed ribozymes. *FEBS Lett.* 239: 285-288.

Koizumi M., Hayase Y., Iwai S., Kamiya H., Inoue H. and Ohtsuka E. (1989) Design of RNA enzymes distinguishing a single base mutation in RNA. *Nucleic Acids Res.* 17: 7059-7071.

Koizumi M. and Ohtsuka E. (1991) Effects of phosphorothioate and 2-amino groups in hammerhead ribozymes on cleavage rates and Mg^{2+} binding. *Biochemistry* 30: 5145-5150.

Krinke L. and Wulff D.L. (1990) The cleavage specificity of RNase III. *Nucleic Acids Res.* 18: 4809-4815.

van de Krol A.R., Mol J.N.M. and Stuitje A.R. (1988) Antisense genes in plants: an overview. *Gene* 72: 45-50.

Kuo M., Sharmeen L., Dinter-Gottlieb G. and Taylor J. (1988) Characterization of self-cleaving RNA sequence on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J. Virol.* 62: 4439-4444.

L'Huillier P.J., Davis S.R. and Bellamy A.R. (1992) Cytoplasmic delivery of ribozymes leads to efficient reduction in α -lactalbumin mRNA levels in C127I mouse cells. *EMBO J.* 11: 4411-4418.

Lange W., Daskalakis M., Finke J. and Dolken G. (1994) Comparison of different ribozymes for efficient and specific cleavage of BCR/ABL related mRNAs. *FEBS Lett.* 338: 175-178.

Larsson S., Hotchkiss G., Andang M., Nyholm T., Inzunza J., Jansson I. and Ahrlund-Richter L. (1994) Reduced β 2-microglobulin mRNA levels in transgenic mice expressing a designed hammerhead ribozyme. *Nucleic Acids Res.* 22: 2242-2248.

Law R.H.P. and Devenish R.J. (1988) Expression in yeast of antisense RNA to ADE1 mRNA. *Biochem Interntl.* 17: 673-679.

Lawrence J.B., Singer R.H. and Marselle L.M. (1989) Highly localised tracks of specific transcripts within interphase nuclei visualised by in situ hybridisation. *Cell* 57: 493-502.

Lo K.M.S., Biasolo M.A., Dehni G., Palu G. and Haseltine W.A. (1992) Inhibition of replication of HIV-1 by retroviral vectors expressing tat-antisense and anti-tat ribozyme RNA. *Virology* 190: 176-183.

Long D.M. and Uhlenbeck O.C. (1994) Kinetic characterization of intramolecular and intermolecular hammerhead RNAs with stem II deletions. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6977-6981.

Marschall P., Thomson J.B. and Eckstein F. (1994) Inhibition of gene expression with ribozymes. *Cell. Mol. Neurobiol.* 14: 523-538.

Mazzolini L., Axelos M., Lescure N. and Yot P. (1992) Assaying synthetic ribozymes in plants: high-level expression of a functional hammerhead structure fails to inhibit target gene activity in transiently transformed protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 20: 715-731.

McCall M.J., Hendry P. and Jennings P.A. (1992) Minimal sequence requirements for ribozyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5710-5714.

Michel F., Umesono K. and Ozeki H. (1989) Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns - a review. *Gene* 82: 5-30.

Michel F. and Westhof E. (1990) Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* 216: 585-610.

Miller W.A., Hercus T., Waterhouse P.M. and Gerlach W.L. (1991) A satellite RNA of barley yellow dwarf virus contains a novel hammerhead structure in the self-cleavage domain. *Virology* 183: 711-720.

Mueller P.P. and Hinnebusch A.G. (1986) Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GCN4. *Cell* 45: 201-207.

Murhy F.L. and Cech T.R. (1989) Alteration of substrate specificity for the endoribonucleolytic cleavage of RNA by the Tetrahymena ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9218-9222.

Nakamaye K.L. and Eckstein F. (1994) AUA-cleaving hammerhead ribozymes: attempted selection for improved cleavage. *Biochemistry* 33: 1271-1277.

Ng M.M.P., Benseler F., Tuschl T. and Eckstein F. (1994) Isoguanosine substitution of conserved adenosines in the hammerhead ribozymes. *Biochemistry* 33: 12119-12126.

Noller H.F., Hoffarth V. and Zimniak I. (1992) Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256: 1416-1419.

Odai O., Hiroaki H., Sakata T., Tanaka T. and Uesugi S. (1990) The role of a conserved guanosine residue in the hammerhead-type RNA. *FEBS Lett.* 267: 150-152.

Pachuk C.J., Yoon K., Moelling K. and Coney L.R. (1994) Selective cleavage of bcr-abl chimeric RNAs by a ribozyme targeted to non-contiguous sequences. *Nucleic Acids Res.* 22: 301-307.

Paoella G., Sproat B.S. and Lamond A.I. (1992) Nuclease resistant ribozymes with high catalytic activity. *EMBO J.* 11: 1913-1919.

Parker R., Muhlrads D., Deshler J.O., Taylor N. and Rossi J.J. (1992) Ribozymes: principles and designs for their use as antisense and therapeutic agents. In: Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA. R.P. Erickson and J.G. Izant, eds. New York, Raven Press, pp. 55-70.

Perreault J.-P., Wu T., Cousineau B., Ogilvie K.K. and Cedergren R. (1990) Mixed deoxyribo- and ribo-oligonucleotides with catalytic activity. *Nature* 344: 565-567.

Perreault J.-P., Labuda D., Usman N., Yang J.-H. and Cedergren R. (1991) Relationship between 2'-hydroxyls and magnesium binding in the hammerhead RNA domain: a model for ribozyme catalysis. *Biochemistry* 30: 4020-4025.

Perriman R., Delves A. and Gerlach W.L. (1992) Extended target-site specificity for a hammerhead ribozyme. *Gene* 113: 157-163.

Perriman R., Graf L. and Gerlach W.L. (1993) A ribozyme that enhances gene suppression in tobacco protoplasts. *Antisense Res. Dev.* 3: 253-263.

Perriman R., Bruening G., Dennis E.S. and Gerlach W.L. (1995) Effective ribozyme delivery in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6175-6179.

Perrotta A.T. and Been M.D. (1991) A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of Hepatitis Delta Virus RNA. *Nature* 350: 434-436.

Persson C., Gerhart E., Wagner H. and Nordstrom K. (1988) Control of replication of plasmid R1: kinetics of in vitro interaction between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT. *EMBO J.* 7: 3279-3288.

Pieken W.A., Olsen D.B., Benseler F, Aurup H. and Eckstein F. (1991) Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science* 253: 314-317.

Piotrowska M. (1980) Cross pathway regulation of ornithin carbamyl-transferase synthesis in *A. nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 116: 335-339.

Pley H.W., Flaherty K.M. and McKay D.B. (1994) Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* 372: 68-74.

Pontius B.W. and Berg P. (1990) Renaturation of complementary DNA strands mediated by purified mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 protein: implications for a mechanism for rapid molecular assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8403-8407.

Rittner K., Burmester C and Sczakiel G. (1993) In vitro selection of fast-hybridizing and effective antisense RNAs directed against the human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res.* 21: 1381-1387.

Roussou I., Thireos G. and Hauge B.M. (1988) Transcriptional - translational regulatory circuit in *S. cerevisiae* which involves the GCN4 transcriptional activator and the GCN2 protein kinase. *Mol. Cel. Biol.* 8: 2132-2139.

Ruffner D.E. and Uhlenbeck O.C. (1990) Thiophosphate interference experiments locate phosphates important for the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Nucleic Acids Res.* 18: 6025-6029.

Ruffner D.E., Dahm S.C. and Uhlenbeck O.C. (1989) Studies on the hammerhead RNA self-cleaving domain. *Gene* 82: 31-41.

Ruffner D.E., Stormo G.D. and Uhlenbeck O.C. (1990) Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry* 29: 10695-10702.

Saldanha R., Mohr G., Belfort M. and Lambowitz A.M. (1993) Group I and group II introns. *FASEB J.* 7: 15-24.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning - a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Sanger F. and Coulson A.R. (1975) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *J. Mol. Biol.* 94: 441-449.

Sarver N., Cantin E.M., Chang P.S., Zaia J.A., Ladne P.A., Stephens D.A. and Rossi J.J. (1990) Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science* 247: 1222-1225.

Scanlon K.J., Jiao L., Funato T., Wang W., Tone T., Rossi J.J. and Kashani-Sabet M. (1991) Ribozyme-mediated cleavage of c-fos mRNA reduces gene expression of DNA synthesis enzymes and metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10591-10595.

Scanlon K.J., Ishida H. and Kashani-Sabet M. (1994) Ribozyme mediated reversal of the multidrug-resistant phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11123-11127.

Sczakiel G., Homann M. and Rittner K. (1993) Computer-aided search for effective antisense RNA target sequences of the Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Antisense Res Develop.* 3: 45-52.

Sheldon C.C. and Symons R.H. (1989) Mutagenesis analysis of a self-cleaving RNA. *Nucleic Acids Res.* 17: 5679-5685.

Shimayama T., Nishikawa F., Nishikawa S. and Taira K. (1993) Nuclease-resistant chimeric ribozymes containing deoxyribonucleotides and phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.* 21: 2605-2611.

Shioda T., Iwasaki K. and Shibuta H. (1986) Determination of the complete nucleotide sequence of the Sendai virus genome RNA and the predicted amino acid sequence of the F, HN and L proteins. *Nucleic Acids Res.* 14: 1545-1563.

Simons R.W. (1988) Naturally occurring antisense RNA control - a brief review. *Gene* 72: 35-44.

Sioud M. and Drlica K. (1991) Prevention of human immunodeficiency virus type 1 integrase expression in *Escherichia coli* by a ribozyme. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7303-7307.

Sioud M., Natvig J.B. and Forre O. (1992) Preformed ribozyme destroys tumour necrosis factor mRNA in human cells. *J. Mol. Biol.* 223: 831-835.

Spector D.L. (1990) Higher order nuclear organisation: Three dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 147-151.

Steinecke P., Herget T. and Schreier P.H. (1992) Expression of a chimeric ribozyme gene results in endonucleolytic cleavage of target mRNA and a concomitant reduction of gene expression *in vivo*. *EMBO J.* 11: 1525-1530.

Sullenger B.A. and Cech T.R. (1993) Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science* 262: 1566-1569.

Symons R.H. (1992) Small catalytic RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 641-671.

Tabler M. (1993) Antisense RNA in plants: a tool for analysis and suppression of gene function, in *Morphogenesis in Plants*, edited by K.A. Roubelakis-Angelakis and K. Tran Thanh Van, Plenum Press, New York, pp 237-258.

Tabler M. and Tsagris M. (1991) Catalytic antisense RNAs produced by incorporating ribozyme cassettes into cDNA. *Gene* 108: 175-183.

Tabler M., Homann M., Tzortzakaki S. and Sczakiel G. (1994) A three-nucleotide helix I is sufficient for full activity of a hammerhead ribozyme: advantages of an asymmetric design. *Nucleic Acids Res.* 22: 3958-3965.

Thireos G., Driscoll - Penn M. and Greer H. (1984) 5' untranslated sequences are required for the translational control of a yeast regulatory gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5096-5101.

Thomson J.B., Tuschl T. and Eckstein F. (1993) Activity of hammerhead ribozymes containing non-nucleotidic linkers. *Nucleic Acids Res.* 21: 5600-5603.

Toulme J.J. and Helene C. (1988) Antimessenger oligodeoxyribonucleotides: an alternative to antisense RNA for artificial regulation of gene expression - a review. *Gene* 72: 51-58.

Tsuchihashi Z., Khosla M. and Herschlag D. (1993) Protein enhancement of hammerhead ribozyme catalysis. *Science* 262: 99-102.

Tuschl T. and Eckstein F. (1993) Hammerhead ribozymes: importance of stem-loop II for activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6991-6994.

Tuschl T., Gohlke C., Jovin T.M., Westhof E. and Eckstein F. (1994) A three-dimensional model for the hammerhead ribozyme based on fluorescence measurements. *Science* 266: 785-789.

Uhlenbeck O.C. (1987) A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* 328: 596-600.

Wang K.S., Choo Q.L., Weiner A.J., Ou J.H., Najarian R.C., Thayer R.M., Mullenbach G.T., Denniston K.J., Gerin J.L. and Houghton M. (1986) Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (δ) viral genome. *Nature* 323: 508-513.

Weerasinghe M., Liem S.E., Asad S., Read S.E. and Joshi S. (1991) Resistance to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in human CD4⁺ lymphocyte-derived cell lines conferred by using retroviral vectors expressing an HIV-1 RNA-specific ribozyme. *J. Virol.* 65: 5531-5534.

Williams D.M., Pieken W.A. and Eckstein F. (1992) Function of specific 2'-hydroxyl groups of guanosines in a hammerhead ribozyme probed by 2' modifications. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89: 918-921.

Xiao W. and Rank G.H. (1988) Generation of an *ilv* bradytrophic phenocopy in yeast by antisense RNA. *Curr. Genet.* 13: 283-289.

Xing Y, Johnson C.V., Dobner P.R. and Lawrence J.B. (1993) Higher level organisation of individual gene transcription and RNA splicing. *Science* 259: 1326-1330.

Xing Z. and Whitton J.L. (1992) Ribozymes which cleave arenavirus RNAs: identification of susceptible target sites and inhibition by target site secondary structure. *J. Virol.* 66: 1361-1369.

Yang J., Usman N., Chartrand P. and Cedergren R. (1992) Minimum ribonucleotide requirement for catalysis by the RNA hammerhead domain. *Biochemistry* 31: 5005-5009.

Zhao J.J. and Pick L. (1993) Generating loss-of-function phenotypes of the *fushi tarazu* gene with targeted ribozyme in *Drosophila*. *Nature* 365: 448-451.

Zabner J., Fasbender A.J., Moninger T., Poellinger K.A. and Welsh M.J. (1995) Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* 270: 18997-19007.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

(Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής)

1. Zoumadakis M., Neubert W.J. and Tabler M. (1994) The influence of imperfectly paired helices I and III on the catalytic activity of hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.* 22 (24) 5271-5278.

2. Zoumadakis M. and Tabler M. (1995) Comparative analysis of cleavage rates after systematic permutation of the NUX consensus target motif for hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.* 23 (7) 1192-1196.