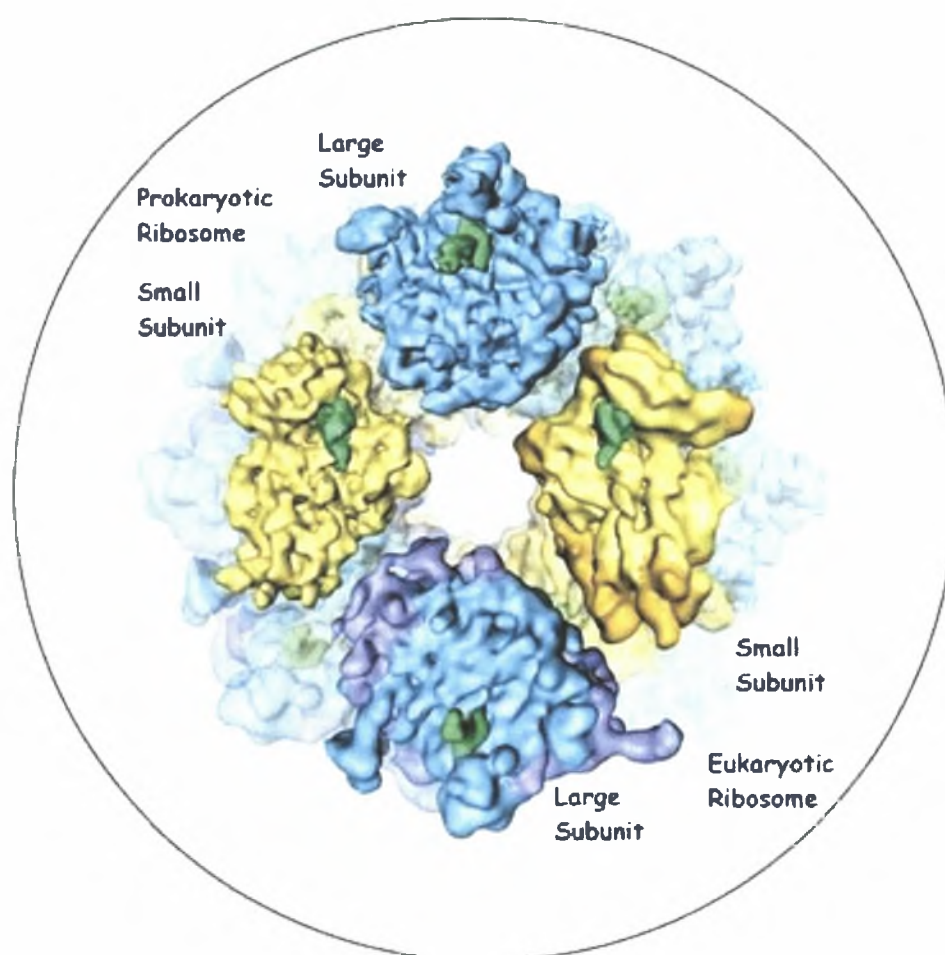


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η επίδραση των μη συμβατικών μεθυλιώσεων και της διαγραφής συμβατικών ψευδοουριδινών του rRNA στην ακρίβεια αποκωδικοποίησης του mRNA



ΣΤΕΦΑΝΟΣ Α. ΛΗΜΝΑΙΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2006



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4843/1

Ημερ. Εισ.: 04/10/2006

Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006

ΛΗΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087769

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον τομέα Génétique Moléculaire de la Traduction του Institut de Génétique et Microbiologie του Πανεπιστημίου PARIS SUD XI του Παρισιού της Γαλλίας κατά τη διάρκεια των μηνών Μαρτίου έως Ιουνίου του 2005.

Επικεφαλής του εργαστηρίου και της παρούσας έρευνας ήταν ο Καθηγητής κ. Jean-Pierre Rousset και επιβλέποντες οι κα. Agnes Baudin-Baillieu και κα. Marta Kwapisz τους οποίους και ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθειά τους. Υπεύθυνος καθηγητής της εργασίας στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας στη Λάρισα είναι ο Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση κ. Κωνσταντίνος Σταθόπουλος τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την υπομονή και τη στήριξη του μέχρι το πέρας της εργασίας.

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή απαρτίζεται από τους:

- **κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο**, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Λάρισα)
- **κ. Ζήση Μαμούρη**, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Λάρισα)
- **κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο**, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Λάρισα)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
2. ABSTRACT	5
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
3.1 ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ	6
3.2 ΟΙ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΣΤΟ Rrna ΚΑΙ ΤΑ snoRNAs	10
3.2.1 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ rRNA ΣΤΟΥΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ	12
3.2.2 ΨΕΥΔΟΟΥΡΙΔΙΝΕΣ ΚΑΙ rRNA ΣΤΟΥΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΕΣ	13
3.3 ΜΕΛΕΤΩΜΕΝΑ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΛΑΘΩΝ	16
3.3.1 ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΛΗΞΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ (READ-THROUGH)	16
3.3.2 ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΠΛΑΙΣΙΟΥ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ -1 (FRAME-SHIFTING)	17
3.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	18
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
4.1 ΥΛΙΚΑ	19
4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	20
4.2.1 ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	20
4.2.2 ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΚΑΙ snoRNAs	23
4.2.3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	25
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΕΩΝ	29
5.1.1 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΟΙΠΟΥ A2967 ΣΤΟΝ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΒΡΟΓΧΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ pBL233 ΣΤΟΝ <i>S. cerevisiae</i>	30
5.1.2 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΟΙΠΟΥ U1257 ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΓΤΡάσης ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ pBL162 ΣΤΟΝ <i>S. cerevisiae</i>	31
5.1.3 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΟΙΠΟΥ C2817 ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ pBL226 ΣΤΟΝ <i>S. cerevisiae</i>	32
5.1.4 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΟΙΠΟΥ U2950 ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ pBL232 ΣΤΟΝ <i>S. cerevisiae</i>	33
5.1.5 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΟΙΠΟΥ A2816 ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ pBL163 ΣΤΟΝ <i>S. cerevisiae</i>	34

5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΨΕΥΔΟΟΥΡΙΔΙΝΩΝ	35
5.2.1 ΔΙΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ snR42, snR34 ΚΑΙ snR37 ΣΤΟΝ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΒΡΟΓΧΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΟΥ <i>S. cerevisiae</i> YTK132	35
5.2.2 ΔΙΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ snR42, snR34, snR37 ΚΑΙ snR46 ΣΤΟΝ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΒΡΟΓΧΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΟΥ <i>S. cerevisiae</i> YTK136	36
5.2.3 ΔΙΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ snR42, snR34, snR37, snR46 ΚΑΙ snR10 ΣΤΟΝ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΒΡΟΓΧΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΟΥ <i>S. cerevisiae</i> YTK143	36
5.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	37
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
6.1 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ U2950 (pBL232) ΚΑΙ A2816 (pBL163)	39
6.2 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ A2967 (pBL233) ΚΑΙ U1257 (pBL162)	40
6.3 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΟΙΠΟΥ C2817 (pBL226)	41
6.4 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΔΙΑΓΡΑΦΩΝ snRs ΣΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ <i>S. cerevisiae</i> YTK132 ΚΑΙ YTK136	42
6.5 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΔΙΑΓΡΑΦΩΝ snRs ΣΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΤΟΥ <i>S. cerevisiae</i> YTK143	43
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε τόσο η επίδραση των μη συμβατικών μεθυλίσεων του rRNA στην ακρίβεια αποκωδικοποίησης του mRNA όσο και η επίδραση της διαγραφής των συμβατικών ψευδοουριδινών με στόχο τον έλεγχο στην ακρίβεια αποκωδικοποίησης του mRNA στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Η ακρίβεια της μεταγραφής μετρήθηκε βάσει του επιπέδου στο οποίο το ριβόσωμα μεταβάλλει το πλαίσιο ανάγνωσης και δεν αναγνωρίζει το σήμα τερματισμού που τα κωδικόνια λήξης συνθέτουν στο μεταφραζόμενο mRNA. Για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιήθηκαν 2 τύποι πλασμιδίων, η οικογένεια πλασμιδίων pBL (φορείς μεθυλίσεων) και η οικογένεια πλασμιδίων pAC (πλασμίδια αναφοράς).

Έτσι, με την βοήθεια των παραπάνω οικογενειών πλασμιδίων, ερευνήθηκε η ακρίβεια αποκωδικοποίησης του mRNA υπό τις προηγούμενες συνθήκες. Για τις μεθυλίσεις, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι πιθανόν οι μεταβολές οι οποίες παρατηρούνται για τα κατάλοιπα U2950 και A2816, είτε μειώνουν το ρυθμό σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού είτε επιδρούν στην τοποθέτηση μη νοηματικών αμινοακυλιωμένων tRNA έναντι κωδικονίων. Ακόμη, πιθανολογείται πως οι μεθυλίσεις των καταλοίπων A2967 και U1257 μειώνουν την ικανότητα των eRF1 και eRF3 να αναγνωρίζουν το UGA ως σήμα λήξης. Τέλος, η μεθυλίωση του καταλοίπου C2817 αυξάνει την ικανότητα των eRF1 και eRF3 να αναγνωρίζουν το UAA ως σήμα λήξης. Όσον αφορά τη διαγραφή των snRs (συνεπώς και των ψευδοουριδινών), για τα snR42, snR34, snR37 και snR46 πιστεύεται ότι είτε μειώνουν το ρυθμό σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού είτε επιδρούν στην τοποθέτηση μη νοηματικών αμινοακυλιωμένων tRNA έναντι κωδικονίων. Ολοκληρώνοντας, η ταυτόχρονη διαγραφή των παραπάνω snRs μαζί με το snR10 δείχνουν πως οι προηγούμενες διαγραφές, οι οποίες δεν επηρέαζαν τους ρυθμούς ανάπτυξης, αποτύγχαναν στην σωστή μετάφραση μόνο όσο οι απαιτήσεις του κυττάρου για αυξημένους ρυθμούς μετάφρασης ήταν υψηλές, ενώ όταν “έπεσαν” οι ρυθμοί λόγω της διαγραφής του snR10, άρα και οι απαιτήσεις, έπαψε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

ABSTRACT

During this diploma project were studied the influence of non-conventional methylations and the influence of the deletion of conventional pseudouridines of rRNA at the fidelity of mRNA decoding in *Saccharomyces cerevisiae*. The fidelity of translation was counted by the level of frame-shifting and read-through phenomena. For this reason were used 2 types of plasmids, the pBL family and the pAC family.

Assisted by the previous plasmid families, it was studied the fidelity of mRNA decoding. For the methylations, the results indicate that probably the changes shown for the U2950 and A2816, either decrease the rate of creation of the peptide bond or they influence the settlement of non-sense aminoacyl tRNAs. Additionally, the methylations of A2967 and U1257 reduce the ability of eRF1 and eRF3 to recognize the UGA codon stop. Finally, the methylation of the C2817 residue increases the ability of eRF1 and eRF3 to recognize the UAA codon stop. As far as it concerns the deletion of snRs (consequently and of the pseudouridines), for snR42, snR34, snR37 and snR46 it is believed that they decrease the rate of creation of the peptide bond or they influence the settlement of non-sense aminoacyl tRNAs. Closing, the simultaneous deletion of the previous snRs in addition with the deletion of snR10 show that the previous deletions, that are not influencing the development rate, fail to do a proper translation while the requirements of the cell are high, but when they decrease, because of the deletion of snR10, the statistical deference is eliminated.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ

Κατά τη μεταφορά του γενετικού σήματος από το DNA στις πρωτεΐνες διαμεσολαβούν ποικίλες διαδικασίες επεξεργασίας της γενετικής πληροφορίας. Έτσι, μέσω της μεταγραφής οι πληροφορίες περνούν στο RNA και από εκεί, με τη διαδικασία της μετάφρασης, στις πρωτεΐνες. Όμως, για να επιτευχθεί η παραγωγή πρωτεϊνών απαιτούνται κάποιες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις στο RNA προτού περάσουν στο στάδιο της μετάφρασης.

Αυτές στο *E. coli* καταλύονται από ένζυμα, αντίθετα στους ευκαρυώτες καταλύονται από διάφορα snoRNAs (small nucleolar RNAs) και τέλος στα αρχαία καταλύονται από sRNPs (Decatur W., Fournier M., 2002). Ιδιαίτερη σημασία έχει να αναφέρουμε πως αυτές οι τροποποιήσεις στο rRNA – που θα είναι και το μόριο στο οποίο θα επικεντρωθεί η προσοχή μας – βρίσκονται σε περιοχές του ριβοσωμικού rRNA που έχουν ρόλους με μεγάλη λειτουργική σημασία, πράγμα που δείχνει πως οι τροποποιήσεις αυτές συμμετέχουν σε σημαντικές λειτουργίες του ριβοσώματος και άρα της μετάφρασης.

Η κατανομή των τροποποιήσεων του rRNA στη δευτεροταγή δομή του ριβοσώματος του *S. cerevisiae* και του *E. coli*, φαίνεται στις εικόνες 1 και 2 όπου υπάρχουν 109 και 35 τροποποιημένα νουκλεοτίδια αντίστοιχα. Αυτές οι τροποποιήσεις χωρίζονται σε 3 ομάδες, τις ψευδοουριδίνες (Ψ), τις 2'-Ο-μεθυλιώσεις (Nm) και άλλες μεθυλιώσεις βάσεων (mN). Τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια του rRNA και οι πιθανές επιδράσεις τους στο ριβόσωμα παρατίθενται συνοπτικά στους πίνακες 1 και 2.

Γενικά πάντως, οι κυριότερες τροποποιήσεις συνεισφέρουν στη σταθεροποίηση της δομής του RNA, στην αποφυγή της αποικοδόμησής του από τις διάφορες ενδονουκλεάσες καθώς και στην ακρίβεια αποκωδικοποίησης του RNA σε πρωτεΐνες.

Ως προς την ακρίβεια αποκωδικοποίησης του RNA υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι κανόνες της μετάφρασης παρακάμπτονται και εμπίπτουν σε ποικίλα λάθη. Αυτά χωρίζονται σε τυχαία και προγραμματισμένα.

Στα τυχαία λάθη συγκαταλέγονται η τοποθέτηση μη συγγενούς ή σχεδόν συγγενούς αμινοακυλιωμένου tRNA (aa-tRNA) έναντι ενός κωδικονίου, η πρόωρη διακοπή της μετάφρασης (φαινόμενο “drop-off”) καθώς και η ατελής συγκρότηση του συμπλόκου έναρξης. Από την άλλη, στα προγραμματισμένα λάθη ανήκουν τα φαινόμενα όπου το ριβόσωμα παραλείπει την αποκωδικοποίηση κάποιων κωδικονίων προχωρώντας παρακάτω (φαινόμενο “hopping”), αδυνατεί να τερματίσει τη μετάφραση (φαινόμενο “read-through”) και τέλος μεταβάλλει το πλαίσιο ανάγνωσης (φαινόμενο “frame-shifting ±1”).

Πίνακας 1

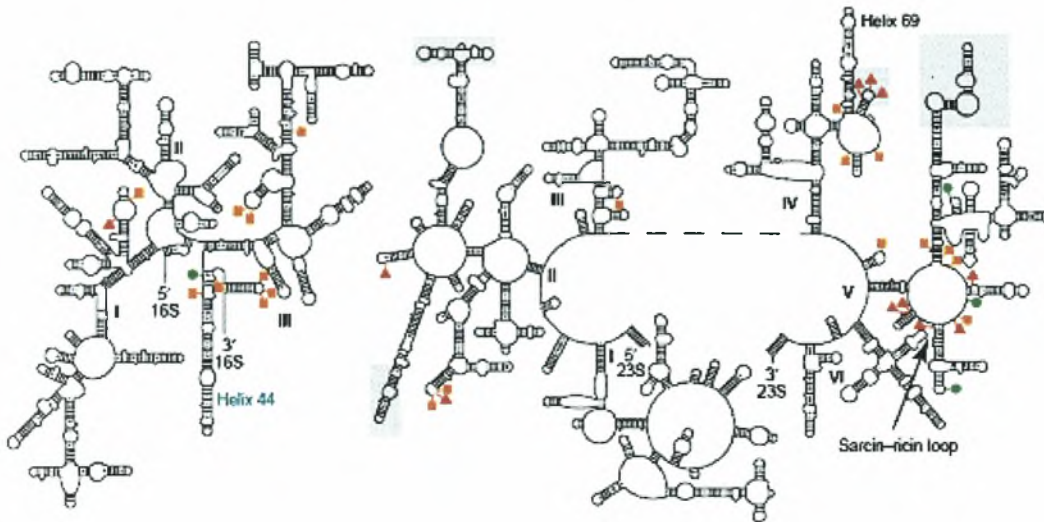
Τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια του rRNA και οι πιθανές επιδράσεις τους στο ριβόσωμα (SSU = small subunit = μικρή υπομονάδα) – (από Decatur W., Fournier M., 2002)

Περιοχές rRNA	Τροποποιημένα νουκλεοτίδια		Πιθανές επιδράσεις
	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
A site	1	4	Επιλογή aa-tRNA Διατήρηση πλαisiού ανάγνωσης Μετατόπιση Τερματισμός
P site	3	3	Έναρξη Διατήρηση πλαisiού ανάγνωσης Μετατόπιση
E site	0	2	Μετατόπιση
Έλικα 44	3	1	Επιλογή aa-tRNA Επικοινωνία υπομονάδων
mRNA latch	2	4	Έναρξη Μετατόπιση Δέσμευση mRNA
Γέφυρες σύνδεσης μεταξύ των υπομονάδων	6	8	Σχηματισμός συμπλόκου Επιλογή aa-tRNA Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού Μετατόπιση
Σύνολο	11	34	

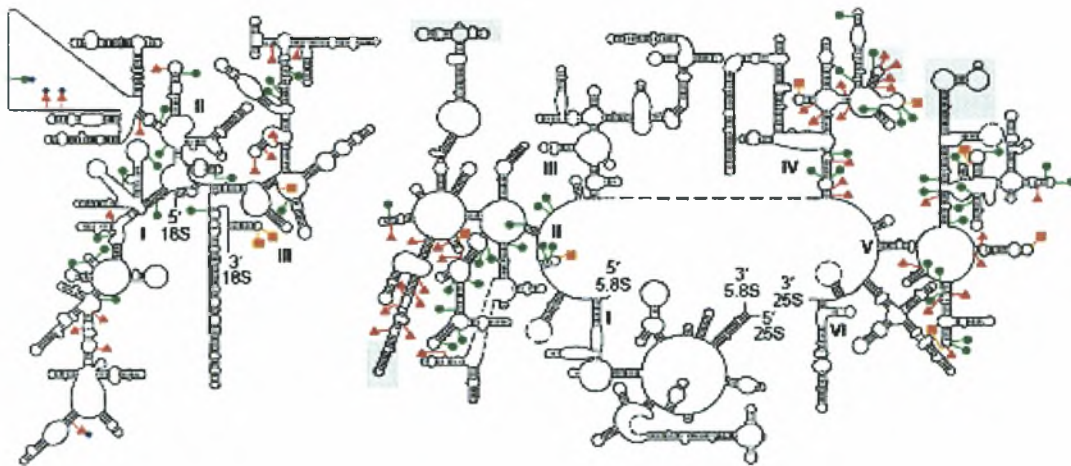
Πίνακας 2

Τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια του rRNA και οι πιθανές επιδράσεις τους στο ριβόσωμα (LSU = large subunit = μεγάλη υπομονάδα) – (από Decatur W., Fournier M., 2002)

Περιοχές rRNA	Τροποποιημένα νουκλεοτίδια		Πιθανές επιδράσεις
	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
A site	5	10	Επιλογή aa-tRNA Τοποθέτηση του 3'- άκρου του aa-tRNA Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού Διατήρηση πλασίου ανάγνωσης Μετατόπιση Τερματισμός
P site	4	3	Έναρξη Τοποθέτηση του 3'- άκρου του aa-tRNA Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού Διατήρηση πλασίου ανάγνωσης Μετατόπιση Τερματισμός
E site	0	3	Μετατόπιση
Κέντρο πεπτιδυλ- τρασφεράσης	11	14	Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού Τοποθέτηση του 3'- άκρου του aa-tRNA Μετατόπιση
Τούνελ εξόδου	18	37	Μετακίνηση της νέας αλυσίδας Τροποποίηση πεπτιδίου
Γέφυρες σύνδεσης μεταξύ των υπομονάδων	5	14	Σχηματισμός συμπλόκου Επιλογή aa-tRNA Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού Μετατόπιση
Σύνολο	24	74	



Εικόνα 1 Κατανομή των τροποποιήσεων του rRNA στη δευτεροταγή δομή του ριβοσώματος του *E. coli*. Τα νουκλεοτίδια που είναι γνωστό πως τροποποιούνται στο *E. coli* επισημαίνονται με χρωματισμούς. Γενικά υπάρχουν 35 τροποποιημένα νουκλεοτίδια που εδώ χωρίζονται σε 3 ομάδες οι οποίες δεικνύονται με διαφορετικούς χρωματισμούς. Σε κάθε ομάδα συγκαταλέγονται: α) 11 ψευδοουριδίνες και τροποποιημένες ψευδοουριδίνες (Ψ) με κόκκινο χρώμα, β) 4 2'-Ο-μεθυλιώσεις (Nm) με πράσινο χρώμα και γ) άλλες τροποποιήσεις που αποτελούνται από 19 μεθυλιώσεις βάσεων (mN) καθώς και από 1 δι-υδρο-ουριδίνη της LSU, όλα επισημασμένα με πορτοκαλί χρώμα. Η κατανομή τους μεταξύ της SSU και της LSU έχει ως εξής: Ψ → 1/10, Nm → 1/3, άλλες → 9/11 (βάση εικόνας από Decatur W., Fournier M., 2002).

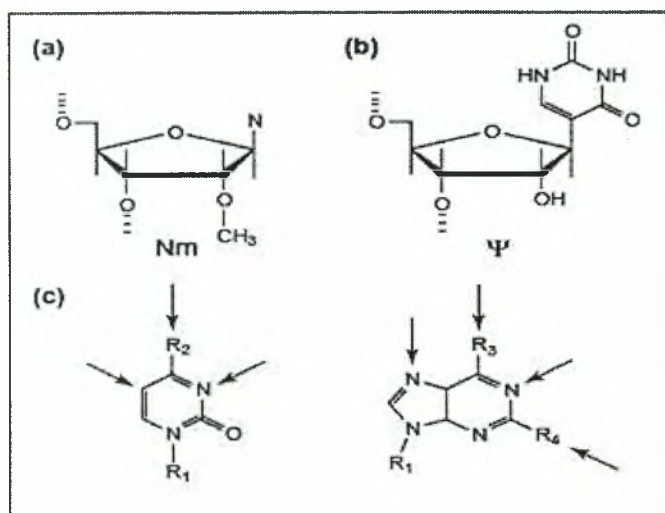


Εικόνα 2 Κατανομή των τροποποιήσεων του rRNA στη δευτεροταγή δομή του ριβοσώματος της *S. cerevisiae* (αριστερά 18S, δεξιά 25S - 5,8S rRNAs). Γενικά υπάρχουν 109 τροποποιημένα νουκλεοτίδια εκ των οποίων εδώ δείχνονται τα 108. Αυτά είναι 44 ψευδοουριδίνες (Ψ), 54 (από τις 55) 2'-Ο-μεθυλιώσεις (Nm) και 10 άλλες μεθυλιώσεις βάσεων (mN) που εδώ χωρίζονται σε 3 ομάδες οι οποίες δεικνύονται με διαφορετικούς χρωματισμούς. Η κατανομή τους μεταξύ της SSU και της LSU έχει ως εξής: Ψ → 14/30 με κόκκινο, Nm → 17/37 με πράσινο, άλλες → 3/7 με πορτοκαλί. Οι ποικίλες περιοχές του RNA σημειώνονται με λατινικούς αριθμούς (βάση εικόνας από Decatur W., Fournier M., 2002).

ΟΙ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΣΤΟ rRNA ΚΑΙ ΤΑ snoRNAs

Τα ερωτήματα που τίθενται για τις τροποποιήσεις στο rRNA και θα αναλυθούν είναι ποιες είναι αυτές, πως επιτυγχάνονται, ποιοι οι λόγοι που αυτές υπάρχουν και ποια η πρακτική τους εφαρμογή.

Τα διάφορα νουκλεοτίδια του rRNA υπόκεινται 3 τύπους τροποποιήσεων: α) η 2'-Ο-μεθυλίωση (Nm), β) η μετατροπή της ουριδίνης σε ψευδοουριδίνη (Ψ) και γ) διάφορες άλλες τροποποιήσεις των αζωτούχων βάσεων, με κυριότερες τις μεθυλίωσεις σε διάφορες θέσεις (mN). Στην εργασία αυτή αναλύονται οι 2 πρώτες κατηγορίες δηλαδή, οι μεθυλίωσεις των 2' υδροξυλίων και η μετατροπή των ουριδινών σε ψευδοουριδίνες (εικόνα 3).

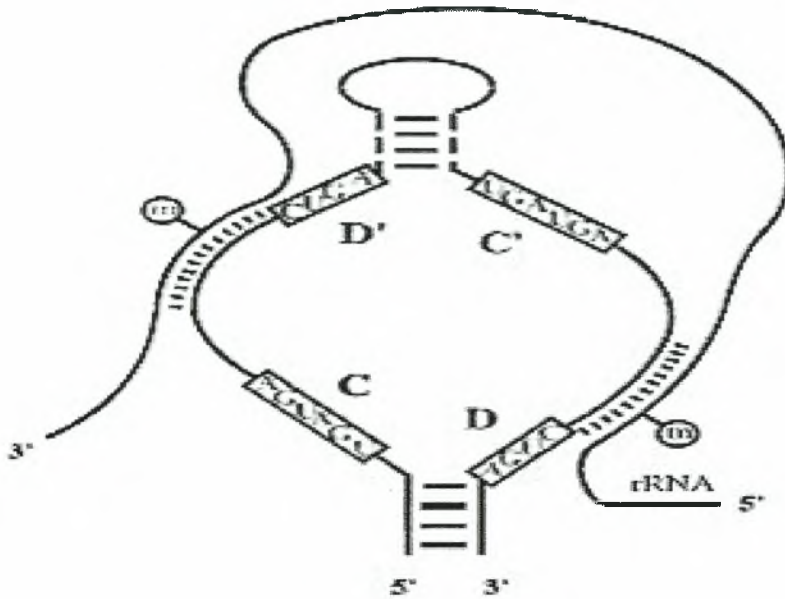


Εικόνα 3 Οι κυριότεροι τύποι rRNA τροποποιήσεων. α) 2'-Ο-μεθυλίωση (Nm), β) ισομερισμός της ουριδίνης σε ψευδοουριδίνη (Ψ), το "πέμπτο νουκλεοτίδιο" και γ) οι υπόλοιπες τροποποιήσεις που συμπεριλαμβάνουν κυρίως μεθυλίωσεις (mN) σε ποικίλες θέσεις των "5 νουκλεοτιδίων" (βέλη) – (από Decatur W., Fournier M., 2002).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι τροποποιήσεις που μας ενδιαφέρουν καταλύονται στο *E. coli* από ένζυμα ενώ, στους ευκαρυώτες (*S. cerevisiae*) καταλύονται από διάφορα snoRNAs (small nucleolar RNAs), τα οποία βρίσκονται στα ευκαρυωτικά κύτταρα ως συμπλέγματα snoRNA:πρωτεϊνών (snoRNPs) και δρουν μετα-μεταγραφικά για την ωρίμανση διαφόρων τύπων RNA στους πυρηνίσκους (Liu B., Ni J., Fournier M., 2001).

Και στις 2 περιπτώσεις snoRNA οι τροποποιήσεις πραγματοποιούνται με παρόμοιο τρόπο. Το επιλεγθέν νουκλεοτίδιο στοχεύεται μέσω ειδικών συμπληρωματικών τμημάτων μεταξύ των snoRNAs και του εκάστοτε υποστρώματος και βρίσκεται σε συγκεκριμένη απόσταση από μια εκ των περιοχών συμπληρωματικότητας (C+D ή H+ACA boxes που αναλύονται αμέσως μετά – Εικόνα 4 και Εικόνα 8). Η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται με την δράση των διαφόρων εμπλεκόμενων πρωτεϊνών (Liu B., Ni J., Fournier M., 2001).

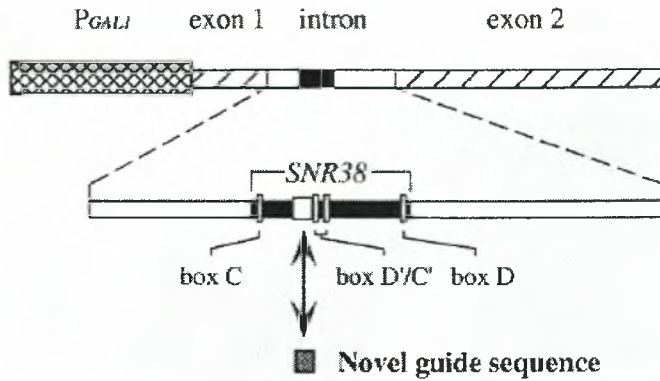
Τα snoRNAs τελικά είναι αυτά τα οποία προκαλούν τις διάφορες τροποποιήσεις του rRNA στον *S. cerevisiae*. Η μεγάλη πρόοδος όμως επήλθε με την εύρεση πως τα περισσότερα snoRNAs έχουν περιοχές συμπληρωματικές με το rRNA και μπορούν να χωριστούν σε 2 τύπων: α) στα "C+D box snoRNAs" που είναι υπεύθυνα για την κατεύθυνση των 2'-Ο-μεθυλίωσεων και β) στα "H+ACA box snoRNAs" που είναι υπεύθυνα για την κατεύθυνση του σχηματισμού των ψευδοουριδινών σε 45 σημεία στον *S. cerevisiae*. Κάθε ομάδα από snoRNAs έχει και μια γκάμα πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στην όλη διαδικασία. Διακρίνονται η Nor1p για τις μεθυλίωσεις και η Cbf5p για ψευδοουριδιλάση (Warner J.R., 2001).



Εικόνα 4. Απλουστευμένη μορφή ενός *C+D box snoRNA*. Η μεθυλίωση λαμβάνει χώρα στην περιοχή της συμπληρωματικότητας, σε μια θέση του υποστρώματος 5 νοκλεοτίδια άνωθεν (*upstream*) της *D* ή *D'* αλληλουχίας (από Liu B., Ni J., Fournier M., 2001).

Στην προσπάθειά να κατανοήσουμε τους λόγους αυτών των τροποποιήσεων η έρευνα καταλήγει πως η υδρόφοβη φύση των 2'-O-μεθυλίων και η αντίστοιχη δυναμική δεσμού υδρογόνου των ψευδοουριδινών πιθανώς συνεισφέρουν στην αναδίπλωση (*folding*) του tRNA ή/και μπορεί να διευκολύνουν τις αλληλεπιδράσεις RNA-πρωτεϊνών ή RNA-RNA και έτσι να ρυθμίζουν και να φροντίζουν για την καλή λειτουργία του ριβοσώματος (Gannot P., Bortolin M.-L., Kiss T., 1997).

Τέλος, στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα snoRNAs για να επιτευχθούν καθορισμένες τροποποιήσεις (κυρίως μεθυλιώσεις μιας και για τις ψευδοουριδίνες ακολουθήθηκε παρόμοια αλλά λίγο διαφοροποιημένη μεθοδολογία). Τα μόρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από ένα φυσικό snoRNA γνωστό και ως snR38 που κανονικά στοχεύει στη μεθυλίωση της G2811 στο 25S rRNA στον *S. cerevisiae*. Η κωδική αλληλουχία για το snR38 είναι μέσα σε ένα εσώνιο του γονιδίου της πρωτεΐνης TEF4 που αντιστοιχεί στον παράγοντα επιμήκυνσης της μετάφρασης 4. Όλες οι παραλλαγές του snR38 με νέες οδηγούσες αλληλουχίες εκφράζονται από μια ειδική έκδοση του γονιδίου *TEF4*, από το οποίο λείπουν μόνο 36bp από το εξώνιο 2, απλά και μόνο για την αποφυγή της δράσης της πρωτεΐνης Tef4p. Το κωδικέον DNA έχει συντηχθεί στο σύστημα επαγωγής του υποκινητή GAL1. Η γενική δομή του πειραματικού γονιδίου δίδεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5 Η δομή του πειραματικού γονιδίου *snoRNA* που χρησιμοποιείται. *SnoRNAs* με νέες ακολουθίες οδηγούς φτιάχνονται με αντικατάσταση στο φυσικό *snR38* της ακολουθίας με μια επιλεγείσα. Η χρησιμοποιούμενη κασέτα περιέχει το εξώνιο 1, το εσώνιο και ένα μικρό τμήμα του εξωνίου 2. Η μεταγραφή ελέγχεται από τον υποκινητή *GAL1* γαλακτόζης (από Liu B., Ni J., Fournier M., 2001).

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ rRNA ΣΤΟΥΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

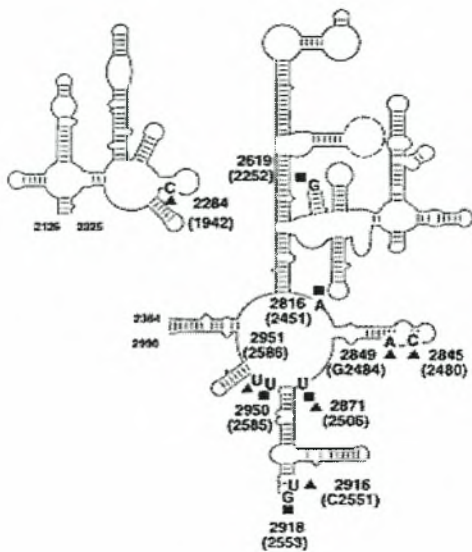
Οι μεθυλίωσεις του ριβοσωμικού RNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς καταλύονται από ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα γνωστά και ως snoRNPs που ειδικά ονομάζονται C+D box snoRNPs. Όπως σχολιάστηκε παραπάνω και όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, το RNA του όλου συμπλόκου είναι αυτό που δρα ως οδηγός για τον εντοπισμό του προς τροποποίηση νουκλεοτιδίου ενώ, οι συστατικές πρωτεΐνες καταλύουν την μεθυλίωση.

Στο θέμα της αλληλουχίας οδηγού, τα σημεία που είναι να τροποποιηθούν επιλέγονται από μια μεγάλη (>10-nt) αντικωδική αλληλουχία οδηγό του snoRNA και από την απόσταση τους από ένα καθορισμένο σημείο του D ή D' box (Εικόνα 4.) (Liu B., Ni J., Fournier M., 2001).

Σημαντική δράση επίσης έχουν τα snoRNAs στην ωρίμανση του rRNA αλλά και άλλων RNAs του πυρηνίσκου αλλά και κατά τη διάσπαση του pre-rRNA όπου θεωρείται πως δρουν ως σαπερόνες.

Από την άλλη, τα ειδικά αυτά snoRNPs για τις μεθυλίωσεις που καλούνται C+D box snoRNPs έχουν μια γκάμα πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στην όλη διαδικασία με τη Nop1p να φαίνεται πως είναι υπεύθυνη για τις μεθυλίωσεις (Warner J.R., 2001). Μία άλλη πολύ σημαντική πρωτεΐνη είναι και η φιμπριλλαρίνη, που βρίσκεται στους πυρηνίσκους, και όπως δείχθηκε η σύνδεσή της με τα snoRNAs είναι απαραίτητη για την λειτουργικότητα των τελευταίων στο έργο τους για την καθοδήγηση των τροποποιήσεων στα νουκλεοτίδια στόχους (Gannot P., Bortolin M.-L., Kiss T., 1997).

Τέλος, αξίζει να αναφερθούν και οι λόγοι των μεθυλίωσεων μιας και υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν πως αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν και αλλάζουν τις χημικές και δομικές ιδιότητες του RNA. Πιο συγκεκριμένα η προσθήκη μιας μεθυλομάδας στο 2'OH της ριβόζης προστατεύει το RNA από το να αποικοδομηθεί από ένζυμα ή χημικές ουσίες, αλλά και πιο άμεσα επηρεάζει τη δομή του εκάστοτε νουκλεοτιδίου επηρεάζοντας και τις αλληλεπιδράσεις του με άλλα νουκλεοτίδια (Lapeyre Br., 2004).

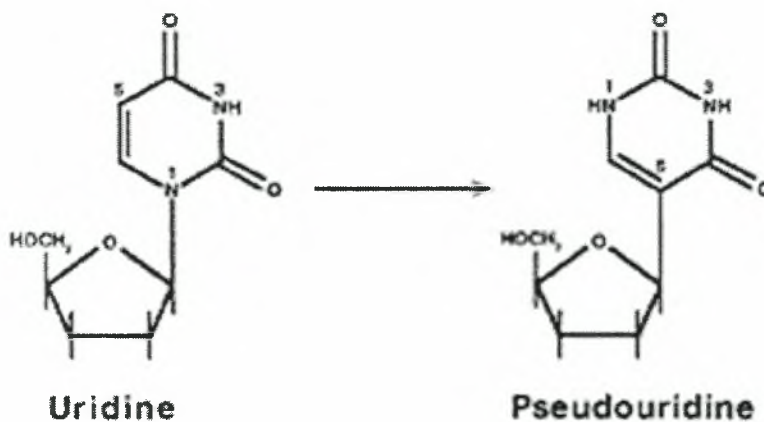


Εικόνα 6 Μερικά τροποποιημένα νουκλεοτίδια στο ριβόσωμα του *S.cerevisiae*. Στην παρένθεση φαίνονται τα νουκλεοτίδια για το *E. coli* (από Liu B., Ni J., Fournier M., 2001).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν αυτά τα snoRNAs με χρήση νέων ακολουθιών οδηγών με στόχο συγκεκριμένα νουκλεοτίδια προς μεθυλίωση. Στην Εικόνα 6 φαίνονται η U2950 (U2585) και η A2816 (A2451). Τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια στόχοι είναι τα A2967 (A2602), C2817 (C2455) και U1257 (U1083). Όλα αυτά τα νουκλεοτίδια βρίσκονται σε καίρια σημεία του ριβοσώματος, όπως το κέντρο της πεπτιδυλ-τρανσφεράσης και της GTPάσης. Παρακάτω γίνεται εκτενέστερη αναφορά.

ΨΕΥΔΟΥΡΙΔΙΝΕΣ ΚΑΙ rRNA ΣΤΟΥΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΕΣ

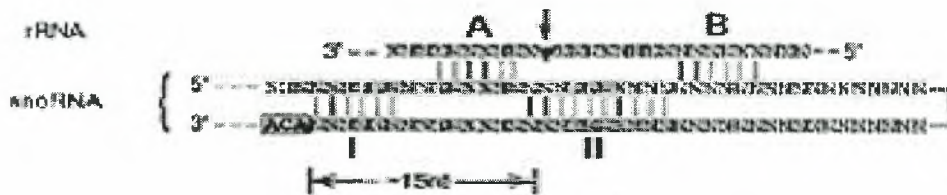
Η μετατροπή των ουριδινών σε ψευδοουριδίνες αποτελεί μια ιδιαίτερα διαδεδομένη τροποποίηση στο rRNA (Εικόνα 7). Αυτές οι τροποποιήσεις, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, καταλύονται από ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα γνωστά και ως snoRNPs που ειδικά ονομάζονται H+ACA box snoRNPs. Το μοντέλο που παρουσιάζεται κι εδώ είναι αυτό της Εικόνας 5.



Εικόνα 7 Μετα-μεταγραφική σύνθεση της ψευδοουριδίνης. Η ψευδοουριδίνη σχηματίζεται από την ουριδίνη με: α) κοπή του N_1-C_1 γλυκοζυλικού δεσμού, β) περιστροφή της βάσης και γ) επανασύνδεση της μέσω των C_5 και C_1 ανθράκων (από Ni J., Tien L., Fournier M.J., 1997).

Μέχρι τώρα έχουν ταυτοποιηθεί 20 H+ACA box snoRNAs. Από αυτά τα 17 έχουν χαρακτηριστεί και γενετικά. Ξεχωριστής μνείας χαίρουν το snR30, το οποίο είναι απαραίτητο για την παραγωγή του 18s RNA, και η απουσία του δεν είναι συμβατή με τη ζωή, και το snR10 που συμμετέχει στην τροποποίηση του pre-rRNA και η απουσία του μειώνει τους ρυθμούς ανάπτυξης. Τα υπόλοιπα δεν είναι απαραίτητα για κάποια ζωτική διαδικασία (Πίνακας 3.) – (Gannot P., Bortolin M.-L., Kiss T., 1997). Ακόμη, αναφέρεται πως το πλήρως τροποποιημένο rRNA του *S. cerevisiae* έχει 43 ψευδοουριδίνες, 13 στην μικρή υπομονάδα και 30 στη μεγάλη (Ni J., Tien L., Fournier M.J., 1997).

Όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης, απαιτούνται για την επιτυχή διαδικασία: α) η ζεύξη των αζωτούχων βάσεων στα σημεία συμπληρωματικότητας μεταξύ του snoRNA και του rRNA υποδεικνύοντας έτσι την περιοχή στόχο και β) η αναγνώριση της ουριδίνης στόχου που βρίσκεται σε κοντινή σταθερή απόσταση από το ACA box του snoRNA (Εικόνα 8) – (Ni J., Tien L., Fournier M.J., 1997).



Εικόνα 8 Ένα H+ACA box snoRNA. Η ψευδοουριδιλίωση λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένη απόσταση από την περιοχή συμπληρωματικότητας, σε μια θέση του υποστρώματος λίγα νουκλεοτίδια από το ACA box (βάση εικόνας από Ni J., Tien L., Fournier M.J., 1997).

Πίνακας 3

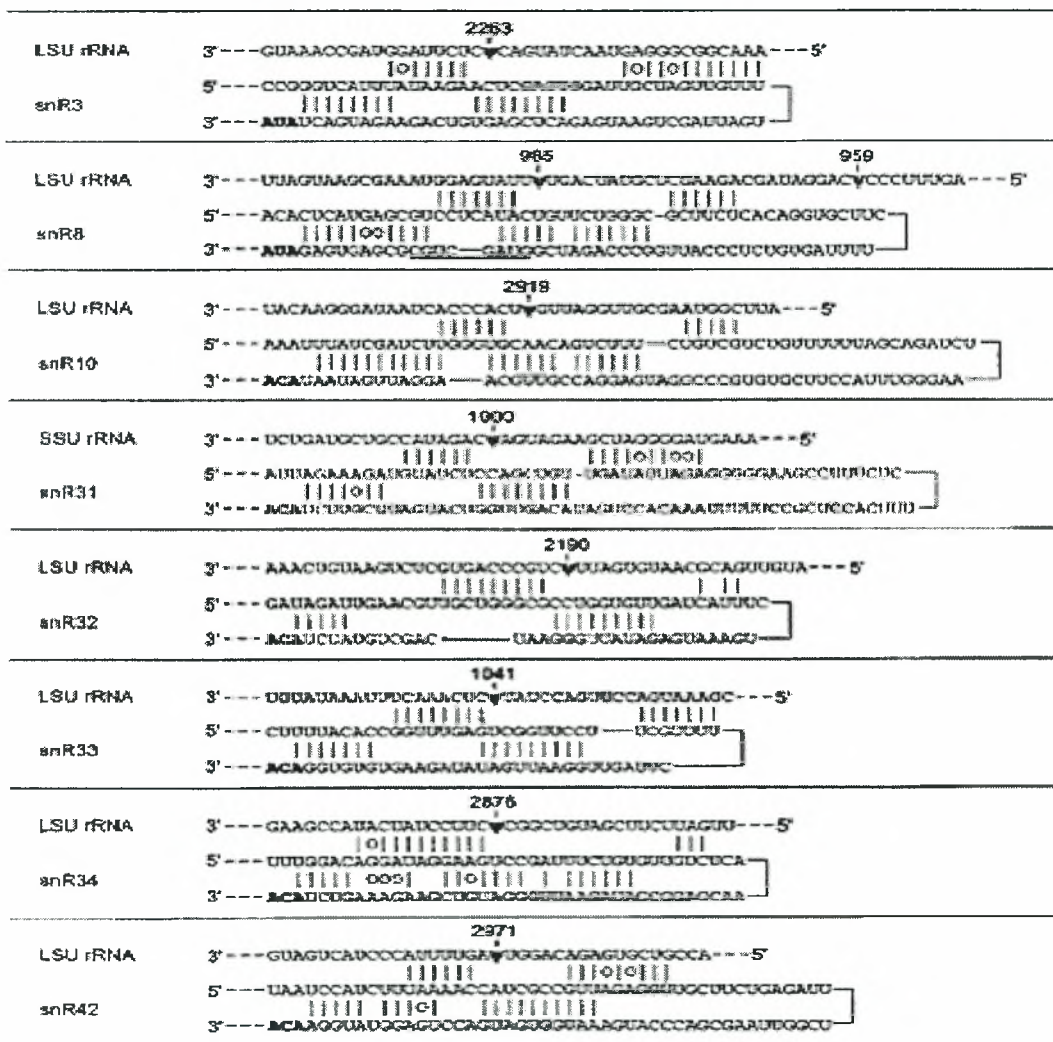
Τα απαραίτητα snoRNAs για τη σύνθεση των ψευδοουριδινών στο rRNA του *S. cerevisiae*. Οχτώ από τα έντεκα σημεία ψευδοουριδιλίωσης συμφωνούν με το γενικό μοντέλο, αυτά που δε συμφωνούν βρίσκονται σε παρένθεση (από Ni J., Tien L., Fournier M.J., 1997)

	snR3	snR8	snR10	snR31	snR32	snR33	snR34	snR37	snR42	snR46
rRNA	LSU	LSU	LSU	SSU	LSU	LSU	LSU	LSU	LSU	LSU
ψ position	2263	985	2919	1000	2190	1041	2876	(2940)	2971	(2861)
		(959)								

Από την άλλη, τα ειδικά αυτά snoRNPs για να δράσουν διασυνδέονται με μια ομάδα πρωτεϊνών. Από αυτές διακρίνονται η Cbf5p που φαίνεται πως έχει ρόλο ψευδοουριδιλίωσης και μια πυρηνισκική πρωτεΐνη πλούσια σε γλυκίνη και αργινίνη, ονόματι Gar1p, της οποίας η σύνδεση με το H+ACA box RNA είναι πολύ σημαντική για την όλη λειτουργία (Gannot P., Bortolin M.-L., Kiss T., 1997).

Τέλος, αναφέρονται οι λόγοι δημιουργίας ψευδοουριδινών οι οποίοι διασαφηνίστηκαν προσφάτως. Προτείνεται πως ο κύριος ρόλος για τη μετατροπή μιας ουριδίνης σε ψευδοουριδίνη είναι πιθανόν για να παρέχει στο νουκλεοτίδιο έναν επιπλέον δότη δεσμού υδρογόνου και έτσι, να μας δώσει ένα πιο σταθερό μόριο (Lapeyre Br., 2004).

Στην παρούσα εργασία με η χρήση κάποιων σειρών του *S. cerevisiae* που έχουν γενετικά τροποποιηθεί μέσω διαγραφής συγκεκριμένων γονιδίων snR, πετυχαίνει τη μη δημιουργία συγκεκριμένων ψευδοουριδινών που κανονικά θα έπρεπε να υπήρχαν. Εξ αυτών τα μοτίβα των snR10, snR34 και snR42 με το συμπληρωματικό τμήμα του αντίστοιχου rRNA φαίνονται στην Εικόνα 9. Τα υπόλοιπα χρησιμοποιούμενα snRs είναι το snR37 και το snR46. Όλα τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια βρίσκονται σε καίρια σημεία του ριβοσώματος. Παρακάτω γίνεται εκτενέστερη αναφορά.



Εικόνα 9 Ποικίλα δομικά μοτίβα από ζεύγη snR-rRNA. Η θέση των ψευδοουριδινών που τροποποιήθηκαν από τα snoRNAs δείχνονται για κάθε ένα ζεύγος. Να σημειωθεί πως η απόσταση μεταξύ του ACA box και της ψευδοουριδίνης είναι σχεδόν σταθερή και ίση με 15-nt με εξαίρεση το snR8 (από Ni J., Tien L., Fournier M.J., 1997).

ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΛΑΘΩΝ

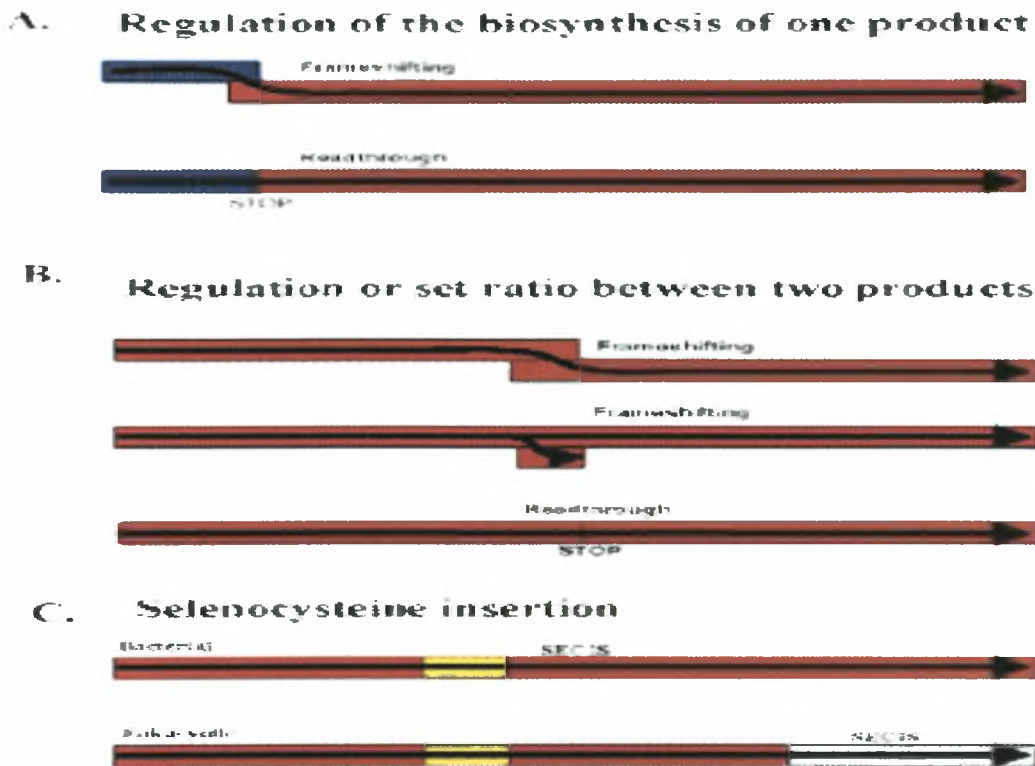
ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΛΗΞΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ (READ-THROUGH)

Σε θεωρητικό επίπεδο ο τερματισμός της μετάφρασης λαμβάνει χώρα όταν αναγνωριστεί από το ριβόσωμα ένα κωδικόνιο λήξης. Όμως, στην πράξη, αυτό δε συμβαίνει πάντα. Πολλές φορές αντί να επέλθει η λήξη της μετάφρασης με την αναγνώριση ενός κωδικονίου λήξης, τοποθετείται ένα tRNA που καταστέλλει τον τερματισμό με αποτέλεσμα τη συνέχιση της μετάφρασης από το ριβόσωμα. Το φαινόμενο αυτό καλείται φαινόμενο αδυναμίας τερματισμού της μετάφρασης (read-through).

Ως “φαινόμενο read-through” ορίζεται η περίπτωση όπου σε ένα κωδικόνιο λήξης δίδεται ένα νέο νόημα προσωρινά με σκοπό να δώσει τη δυνατότητα σε έναν αριθμό ριβοσωμάτων να συνεχίσουν την διαδικασία επιμήκυνσης με τελικό στόχο την παραγωγή ενός επιμηκυμένου προϊόντος (Baranov P., Gestelant R., Atkins J., 2002). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να διαχωριστεί σε πολλών τύπων ανάλογα με το αμινοξύ που ενσωματώνεται κατά την αποκωδικοποίηση του κωδικονίου λήξης, με κυριότερους: α) την περίπτωση ενσωμάτωσης της σελινοκυστεΐνης, του αποκαλούμενου και 21^{ου} αμινοξέος, που κωδικοποιείται από την τριπλέτα UGA στα βακτήρια και τους ευκαρυώτες (Baranov P., Gestelant R., Atkins J., 2002), β) την περίπτωση ενσωμάτωσης μιας τροποποιημένης σερίνης που έχει παρατηρηθεί σε πολλά κυτταρικά γονίδια, αλλά απαιτεί την παρουσία ενός συγκεκριμένου παράγοντα επιμήκυνσης και ενός ειδικού μορίου tRNA (Driscoll M.D., Copeland R.P., 2003) και γ) την περίπτωση ενσωμάτωσης ποικίλων αμινοξέων όπως η σερίνη, η τρυπτοφάνη, η γλουταμίνη ή ακόμα και η τυροσίνη, εμπλέκοντας έτσι τη φυσική μηχανή πρωτεϊνοσύνθεσης που όμως έχει παρατηρηθεί σε πλήθος ιών των φυτών και θηλαστικών, αλλά σε κανένα κυτταρικό γονίδιο ευκαρυωτών ή προκαρυωτών (Weiss R.B., Dunn D.M., Atkins J.F., Gestelant R.F., 1987).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο τρόπος εμφάνισης του φαινομένου και οι παράγοντες που το επηρεάζουν. Κανονικά η μετάφραση τελειώνει όταν ένα κωδικόνιο λήξης μπει στη θέση A του ριβοσώματος. Το εάν θα επέλθει όμως ο τερματισμός της μετάφρασης ή εάν θα εμφανιστεί το “φαινόμενο read-through” επηρεάζεται από τα νουκλεοτίδια άνωθεν και κάτωθεν του κωδικονίου λήξης. Μέχρι και 6 νουκλεοτίδια άνωθεν του κωδικονίου λήξης έχει δειχθεί πως εμπλέκονται στην αποτελεσματικότητα του “φαινόμενο read-through”. Το μέγιστο όμως αποτέλεσμα δίδεται από το πρώτο κωδικόνιο άνωθεν του κωδικονίου λήξης και πιο συγκεκριμένα από τα 2 πρώτα νουκλεοτίδια άνωθεν αυτού (Tork S., Hatin I., Rousset J.-P., Fabret C., 2004).

Το κυριότερο όμως σημείο αυτού του φαινομένου είναι η κατανόηση του εξής, πως οι παράγοντες τερματισμού βρίσκονται σε διαρκή δυναμική ισορροπία με μόρια tRNA ικανά να αναγνωρίσουν τα κωδικόνια λήξης. επειδή μάλιστα δεν έχει βρεθεί και κάποιος μηχανισμός επιδιόρθωσης των λαθών του τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης, το μόνο που επηρεάζει την ακρίβεια της μετάφρασης είναι οι ικανότητες (ταχύτητα και εξειδίκευση) των παραγόντων λήξης για την αναγνώριση αυτών των κωδικονίων. Έτσι, αν το κωδικόνιο λήξης δεν είναι σε σημείο εύκολα προσβάσιμο από τους παράγοντες λήξης τότε η ισορροπία κλείνει προς τα tRNAs και η μετάφραση θα συνεχιστεί.



Εικόνα 10 Τρεις μεγάλες κατηγορίες από λειτουργικά σημαντικά φαινόμενα. Τα σιστρόνια, των οποίων η μετάφραση καταλήγει σε **λειτουργικά προϊόντα** φαίνονται με **κόκκινο**, σε **μη λειτουργικά** με **μπλε** και η **σελινοκυστεΐνη** με **κίτρινο**. **A)** Η ρύθμιση της σύνθεσης ενός προϊόντος συντονίζεται από κυτταρικούς παράγοντες, 1) μέσω της μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης (“φαινόμενο *frame-shifting*”) και 2) μέσω της αδυναμίας λήξης (“φαινόμενο *read-through*”). **B)** Η αναλογία παραγωγής μεταξύ 2 προϊόντων, 1) το “φαινόμενο *frame-shifting*” δίδει επιμηκυνόμενα προϊόντα και 2) το “φαινόμενο *frame-shifting*” δίδει βραχύτερα προϊόντα. **C)** Η εισαγωγή της σελινοκυστεΐνης, 1) στα ευβακτήρια και 2) στους ευκαρυώτες (από Baranov P., Gestelant R., Atkins J., 2002).

ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΠΛΑΙΣΙΟΥ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ -1 (FRAME-SHIFTING -1)

Η μεταβολή του πλαισίου ανάγνωσης σε ένα άλλο μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε κατά τη φάση της επιμήκυνσης είτε κατά τον τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης. Κατά γενικό κανόνα τυχαία λάθη που να προκαλούν την μεταβολή του πλαισίου ανάγνωσης (“φαινόμενο *frame-shifting*”) δεν είναι συχνά σε σχέση με τα προγραμματισμένα. Όλες οι μορφές του φαινομένου εμπλέκουν την ολίσθηση μορίων tRNA και είναι εκτενώς μελετημένες σε ιούς, ρετρομεταθετόνια της *Drosophila* και μεταθετά στοιχεία των βακτηρίων. Στο προγραμματισμένο “φαινόμενο *frame-shifting*” τελικώς, το ριβόσωμα αλλάζει σε ένα εναλλακτικό πλαίσιο ανάγνωσης σε ένα πολύ συγκεκριμένο σημείο αλλαγής. Διεγερτικά σήματα στο mRNA, μακριά από το σημείο αλλαγής, τυπικά προκαλούν αύξηση του αριθμού των ριβοσωμάτων που πραγματοποιούν το φαινόμενο. Αφού πραγματοποιηθεί η αλλαγή η αποκωδικοποίηση των τριπλετών συνεχίζεται (Baranov P., Gestelant R., Atkins J., 2002).

Για την πραγμάτωση του όλου φαινομένου απαιτούνται 2 σήματα. Το πρώτο και πιο καθοριστικό είναι μια ειδική-διεγερτική ακολουθία νουκλεοτιδίων (slippery sequence) στο μηνυματοφόρο mRNA. Αυτή επάγει την λανθασμένη αλληλεπίδραση και ολίσθηση των μορίων tRNA στα κωδικόνια. Το δεύτερο σήμα αποτελούν παράγοντες που προκαλούν ριβοσωμικές παύσεις, όπως παραδείγματος χάριν είναι μια αργά αποκωδικοποιούσα ακολουθία στο mRNA ή ένα κωδικόνιο λήξης. Εναλλακτικά συναντιόνται διάφορες δευτεροταγείς δομές φουρκέτας ή ψευδοκόμβων που δρουν ως προαγωγείς του φαινομένου.

Πιο ειδικές αναλύσεις στον *S. cerevisiae* έδειξαν ότι η παρουσία της τροποποίησης Ψ39 στο tRNA που βρίσκεται στη θέση E του ριβοσώματος κατά τη μετάφραση αυξάνει τους ρυθμούς εμφάνισης του φαινομένου. Βρέθηκε μάλιστα πως και οι 3 ριβοσωμικές θέσεις (A, P, E) συμμετέχουν στο φαινόμενο. Έτσι, 2 είναι οι υποθέσεις που προτείνονται για τον ρόλο του tRNA της θέσης E όσον αφορά το “φαινόμενο frame-shifting”: α) πιθανόν το “φαινόμενο frame-shifting” ενισχύεται από την απουσία tRNA στη θέση E, σε αυτήν την περίπτωση η τροποποίηση Ψ39 πιθανόν αποσταθεροποιεί την αλληλεπίδραση tRNA:θέσης E, β) η Ψ39 μπορεί να εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα με την αλληλεπίδραση του tRNA της θέσης P με το mRNA, μειώνοντας έτσι τη σταθερότητα του ζεύγους (Bekaert M., Rousset J.-P., 2005).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της εργασίας αυτής είναι η ανακάλυψη μιας πιθανής σύνδεσης μεταξύ των τροποποιήσεων που υπόκειται το rRNA και της ακρίβειας με την οποία το ριβόσωμα αποκωδικοποιεί το μήνυμα του mRNA σε πρωτεΐνες. Πιο ειδικά, θα ελεγχθεί η επίδραση των μη συμβατικών μεθυλιώσεων και της διαγραφής συμβατικών ψευδοουριδινών του rRNA στην ακρίβεια αποκωδικοποίησης του mRNA.

Έναυσμα για την έρευνα αυτή αποτέλεσε η έλλειψη γνώσεων για τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις του rRNA μιας και αυτές ίσως μπορέσουν να βοηθήσουν την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα για την καταπολέμηση ποικίλων προβλημάτων (π.χ. της μάστιγας του HIV) σε μοριακό επίπεδο. Έτσι προέκυψε και η όλη πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής εργασίας (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως οι περιοχές αυτές επιλέχθηκαν γιατί διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης και τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί ότι η λειτουργία τους καταλύεται κατά κύριο λόγο από το rRNA συστατικό τους. Οπότε η τροποποίηση των καταλυτικών αυτών κέντρων θεωρήθηκε ότι δεν είναι απίθανο να επηρεάζει την ακρίβεια αποκωδικοποίησης του mRNA από το ριβόσωμα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

Μετασχηματισμοί	Ομογενοποίηση κυττάρων / Εκχύλιση πρωτεϊνών
PEG4000 (Polyethelene glucol)	PSMF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)
LiAC	Tris PPI (pH 7,8)
ss-Carrier DNA	MgCL ₂
Καλλιέργειες	DTT
LB (NaCl, Tryptone, Yeast Extract)	EDTA
Raffinose	Triton x 100
Galactose	Glycerol
Adenine	BSA
Uracile	Benzamidine
Leucine	Pepstatine A
Histidine	Leupeptine
Ampicillin	Antipaine
Ammonium Sulfate	Chymostatine
CSM	Test δραστηκότητας β-γαλακτοσιδάσης
YNB (Yeast Nitrogen Base)	Na ₂ HPO ₄
Εξαγωγή πλασμιδιακού DNA	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O
D-glucose	KCl
Tris Cl (pH 8,0)	MgSO ₄ 7H ₂ O
EDTA (pH 8,0)	β-mercaptoethanol
NaOH	ONPG
SDS	Na ₂ CO ₃
Potassium Acetate	Test δραστηκότητας λουσιφεράσης
Acetic acid	ATP
Ethanol	Luciferin
TE (pH 8,0)	BSA
DNAase-free pancreatic RNAase	Παραγωγή πλασμιδίων
NaCl	pFLK7c
Phenol	pFLK7w
Buffer P1 + P2 + P3	BglII
Buffer QBT + QC + QF	Buffer 3
Isopropanol	Buffer QG
Ηλεκτροφόρηση	Isopropanol
TBE	Buffer PE
Agarose	Ethanol
BrEt	Επικύρωση πλασμιδίων (Αλληλούχιση + Πέψη)
Bromophenol Blue	Big Dye
PCR	luc1
dNTPs	Formamide
Buffer 10x	Ethanol
R-Taq	

ΜΕΘΟΔΟΙ

ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Πρόσφατα βρέθηκε ότι φαινόμενα όπως το “frame-shifting -1” και το “read-through” αρκετά συχνά λαμβάνουν χώρα σε διάφορους ιούς, μικροοργανισμούς και άλλα, όπως ο HIV, τα μεταθετόνια και κάποιες φορές και σε κυτταρικά γονίδια. Αυτό προκάλεσε και το έντονο ενδιαφέρον για την κατανόηση αυτών των μηχανισμών.

Το πρώτο σκέλος αυτών των πειραμάτων είναι η ολοκλήρωση μιας προηγούμενης εργασίας όπου οι μεθυλίώσεις έγιναν σε συγκεκριμένα σημεία στόχους του rRNA, όπου κανονικά δεν θα έπρεπε να υπάρχουν, με στόχο την παρακολούθηση της μεταβολής της ακρίβειας αποκωδικοποίησης του mRNA μέσω των “φαινόμενων frame shifting και read-through”.

Από την άλλη, στο δεύτερο σκέλος, ελέγχοντας και πάλι την ακρίβεια αποκωδικοποίησης του mRNA μέσω των “φαινόμενων frame shifting και read-through”, διαγράφηκαν ποικίλες ψευδοουριδίνες που κανονικά θα έπρεπε να είναι παρούσες στο rRNA. Για το σκέλος αυτό όμως αρχικά χρειάστηκε η παραγωγή κάποιων σειρών πλασμιδίων τα οποία τα χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα μας στο κομμάτι αυτό.

Συνοπτικά για το τμήμα των μεθυλίσεων:

- i) Μετασηματίστηκαν βακτήρια *E. coli* DH5α με πλασμίδια pBL τα οποία αποτέλεσαν τους φορείς μεθυλίωσης.
- ii) Καλλιεργήθηκαν σε μέσο επιλογής (LB + αμπικιλίνη) για την επιλογή των μετασηματισμένων κλώνων *E. coli*.
- iii) Απομονώθηκε το πλασμιδιακό τους DNA.
- iv) Επικυρώθηκε με ηλεκτροφόρηση.
- v) Εν συνεχεία, μετασηματίστηκε το στέλεχος YS602 του *S. cerevisiae* με ένα πλασμίδιο pBL (φορέας μεθυλίωσης) και ένα πλασμίδιο pAC/Leu2⁺ (πλασμίδιο αναφοράς) τη φορά, πραγματοποιώντας όλους τους δυνατούς συνδυασμούς πλασμιδίων (Πίνακας 4). Επώστηκαν σε τριβλία με τα κατάλληλα αμινοξέα για επιλογή των μετασηματισμένων ζυμών.
- vi) Από τις αποικίες των μετασηματισμένων ζυμών, επιλέχθηκαν κλώνοι που καλλιεργήθηκαν σε μέσο που περιείχε ραφινόζη με στόχο την ανάπτυξή τους μέχρι την στατική φάση ($OD_{600nm} = 7-8$).
- vii) Από τις καλλιέργειες αυτές προετοιμάστηκαν νέες με θρεπτικό υλικό αυτή τη φορά που περιείχε γαλακτόζη, με στόχο την ανάπτυξή τους μέχρι τη λογαριθμική-εκθετική φάση ($OD_{600nm} = 2-3$).
- viii) Αμέσως μετά τα κύτταρα ομογενοποιούνται και εκχυλίζεται το DNA τους.
- ix) Από το εκχύλισμα αυτό, μέσω των test β-γαλακτοσιδάσης και λουσιφερίνης, ένζυμα τα οποία κωδικοποιούνται από τον φορέα αναφοράς pAC/Leu2⁺, και με τη μεσολάβηση των κατάλληλων υπολογισμών εκτιμάται η ακρίβεια αποκωδικοποίησης του mRNA.

Συνοπτικά για την παραγωγή των νέων pAC που έχουν τον κατάλληλο δείκτη επιλογής (Ade2) για το δεύτερο σκέλος των πειραμάτων:

- i) Παράγωγή του δείκτη επιλογής (δηλαδή ένα τμήμα DNA που κωδικοποιεί το γονίδιο Ade2) μέσω PCR από το πλασμίδιο pASZ11(pFL/Ade2⁺). Πραγματοποιείτε ηλεκτροφόρηση και απομόνωση του δείκτη επιλογής και με νέα ηλεκτροφόρηση επιβεβαίωση του αποτελέσματός.
- ii) Παραγωγή του πλασμιδιακού φορέα (δηλαδή ένα ανοιχτό πλασμίδιο pAC) με πέψη. Πολλαπλασιασμός του φορέα με PCR και ηλεκτροφόρηση. Απομόνωση και έπειτα, πάλι με ηλεκτροφόρηση επιβεβαίωση του αποτελέσματός μας.
- iii) Ακολούθως μετασχηματισμός του *S. cerevisiae* με τον πλασμιδιακό φορέα pAC/ΔLeu2 και τον δείκτη επιλογής Ade2. Επίστρωση σε τριβλία με το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Οι μετασχηματισμένες ζύμες θα δημιουργήσουν το νέο πλασμίδιο pAC/ Ade2⁺.
- iv) Απομόνωση με εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA από τον *S. cerevisiae*.
- v) Εισαγωγή στο *E. coli* του εκχυλίσματος και επώαση των βακτηριδίων μας, με στόχο την δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων του πλασμιδίου.
- vi) Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.
- vii) Επιβεβαίωση της φύσης του πλασμιδίου με αλληλούχιση (επιβεβαίωση για το τμήμα pAC) και πέψη (επιβεβαίωση για το τμήμα Ade2).

Συνοπτικά για το τμήμα των ψευδοουριδινών:

- i) Παραγωγή των pAC/Ade2⁺.
- ii) Εν συνεχεία, μετασχηματισμός διαφόρων σειρών του *S. cerevisiae*, τα οποία έχουν ορισμένες επιλεκτικές διαγραφές γονιδίων που κωδικοποιούν κάποια snoRNAs τα οποία κανονικά συμβάλουν στη δημιουργία συγκεκριμένων ψευδοουριδινών στο rRNA, με ένα πλασμίδιο pAC/Ade2⁺ (πλασμίδιο αναφοράς) τη φορά, πραγματοποιώντας όλους τους δυνατούς συνδυασμούς πλασμιδίων και κυτταρικών σειρών (Πίνακας 5). Επώαση σε τριβλία με τα κατάλληλα αμινοξέα για επιλογή των μετασχηματισμένων ζυμών.
- iii) Από τις αποικίες των μετασχηματισμένων ζυμών, επιλέγονται κλώνοι που καλλιεργούνται σε μέσο που περιέχει ραφινόζη με στόχο την ανάπτυξή τους μέχρι την στατική φάση (OD_{600nm} = 7-8).
- iv) Από τις καλλιέργειες αυτές ετοιμάζονται νέες με θρεπτικό υλικό αυτή τη φορά που περιέχει γαλακτόζη, με στόχο την ανάπτυξή τους μέχρι τη λογαριθμική-εκθετική φάση (OD_{600nm} = 2-3).
- v) Αμέσως μετά τα κύτταρα ομογενοποιούνται και εκχυλίζεται το DNA τους.
- vi) Από το εκχύλισμα αυτό, μέσω των test β-γαλακτοσιδάσης και λουσιφερίνης, ένζυμα τα οποία κωδικοποιούνται από τον φορέα αναφοράς pAC/Ade2⁺, και με τη μεσολάβηση των κατάλληλων υπολογισμών εκτιμάται η ακρίβεια αποκωδικοποίησης του mRNA.

Για την απόκτηση στατιστικής σημαντικότητας στα ερευνητικά μας αποτελέσματα, από κάθε μετασχηματισμένο στέλεχος πραγματοποιούνταν 2 καλλιέργειες από 2 διαφορετικούς μετασχηματισμένους κλώνους τη φορά και η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε 4 φορές για τις μεθυλιώσεις και 3 φορές για τις ψευδοουριδίνες. Εν συνεχεία, οι λόγοι δραστηριότητας Luc/ β -Gal συγκρίνονταν με αυτούς των μαρτύρων βάση του Mann-Whitney-Wilcoxon test (u-test). Το test αυτό αποτελεί μια μη παραμετρική δοκιμασία ομογένειας δύο ανεξάρτητων δειγμάτων ιδιαίτερα όταν ο αριθμός των παρατηρήσεων είναι μικρός. Στηρίζεται στο διατάξιμο του χαρακτηριστικού που εξετάζεται και ελέγχεται αν τα 2 δείγματα παρουσιάζουν την ίδια κατανομή (Kounias S., Koliva-Maxaira F., Bagiatis K., Mpora-Senta E., 2001, Trixopoulos D., Tzonou A., Katsougianni K., 2001).

Πίνακας 4

Όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί πλασμιδίων pBL (φορείς μεθυλίωσης) και pAC/Leu2⁺ (πλασμίδια αναφοράς) με τα οποία μετασχηματίσαμε τον *S. cerevisiae* YS602. Τα πλασμίδια pRS314 και pAC/TQ αποτελούν τα πλασμίδια control για τα pBLs και pACs αντίστοιχα.

pACs pBLs	pAC/TQ	pAC/HIV-1	pAC/TAG	pAC/TGA	pAC/TAA
pRS314	pRS314 + pAC/TQ	pRS314 + pAC/HIV-1	pRS314 + pAC/TAG	pRS314 + pAC/TGA	pRS314 + pAC/TAA
pBL233	pBL233 + pAC/TQ	pBL233 + pAC/HIV-1	pBL233 + pAC/TAG	pBL233 + pAC/TGA	pBL233 + pAC/TAA
pBL162	pBL162 + pAC/TQ	pBL162 + pAC/HIV-1	pBL162 + pAC/TAG	pBL162 + pAC/TGA	pBL162 + pAC/TAA
pBL232	pBL232 + pAC/TQ	pBL232 + pAC/HIV-1	pBL232 + pAC/TAG	pBL232 + pAC/TGA	pBL232 + pAC/TAA
pBL226	pBL226 + pAC/TQ	pBL226 + pAC/HIV-1	pBL226 + pAC/TAG	pBL226 + pAC/TGA	pBL226 + pAC/TAA
pBL162	pBL162 + pAC/TQ	pBL162 + pAC/HIV-1	pBL162 + pAC/TAG	pBL162 + pAC/TGA	pBL162 + pAC/TAA

Πίνακας 5

Όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί μεταξύ των πλασμιδίων pAC/Ade2⁺ (πλασμίδια αναφοράς) με τα οποία μετασχηματίσαμε τον *S. cerevisiae* και οι διάφορες κυτταρικές σειρές του τελευταίου τις οποίες και μετασχηματίσαμε με τα pACs/Ade2⁺. Το πλασμίδιο pAC/TQ αποτελεί το πλασμίδιο control για τα pACs, ενώ η σειρά YS602 είναι η σειρά control (η οποία δεν έχει καμία διαγραφή snoRNA) για τις ζύμες.

pACs/Ade2 ⁺	pAC/TQ	pAC/TGA
Σειρές <i>S. cerevisiae</i>		
YS602	YS602 + pAC/TQ	YS602 + pAC/TGA
YTK132	YTK132 + pAC/TQ	YTK132 + pAC/TGA
YTK136	YTK136 + pAC/TQ	YTK136 + pAC/TGA
YTK143	YTK143 + pAC/TQ	YTK143 + pAC/TGA

ΣΤΕΛΕΧΗ, ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΚΑΙ snoRNAs

Αναφέραμε πριν διάφορα στελέχη *S. cerevisiae* και *E. coli*. Τα βακτήριά μας ανήκουν στο στέλεχος DH5α, ενώ οι ζύμες μας ποικίλουν. Για τις μεθυλιώσεις χρησιμοποιήθηκε η ζύμη YS602, ενώ για τις ψευδοουριδίνες χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα στελέχη YTK132, YTK136 και YTK143.

Αναλυτικότερα:

- *E. coli* DH5α → *F*, *endA1*, *hsdR17*, *supE44*, *thi-1*, λ , *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*argF-lacZya*)U169, ϕ 80, *dLLacZ* Δ M15
- *S. cerevisiae* YS602 → *MATa*, *ade2-101*, *trp1- Δ 101*, *ura3-52*, *leu2,3-112*, *his3- Δ 200*
- *S. cerevisiae* YTK132 → *MATa*, *ade2-101*, *trp1- Δ 101*, *ura3-52*, *leu2,3-112*, *his3- Δ 200* *HIS::snr42*, *LEU2::snr34*, *URA3::snr37*
- *S. cerevisiae* YTK136 → *MATa*, *ade2-101*, *trp1- Δ 101*, *ura3-52*, *leu2,3-112*, *his3- Δ 200* *HIS::snr42*, *LEU2::snr34*, *URA3::snr37*, *TRP1::snr46*
- *S. cerevisiae* YTK143 → *MATa*, *ade2-101*, *trp1- Δ 101*, *ura3-52*, *leu2,3-112*, *his3- Δ 200* *HIS::snr42*, *LEU2::snr34*, *URA3::snr37*, *TRP1::snr46*, *LYS2::snr10*

Εκτός όμως από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα, θα πρέπει να γίνει πιο αναλυτική αναφορά και στα πλασμίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις διάφορες διαδικασίες που ακολουθήθηκαν. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα pBL και pAC.

Πλασμίδια μεθυλίωσης του rRNA (pBLs): αυτή η οικογένεια πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκε μόνο για την περίπτωση μελέτης της επίδρασης των μη συμβατικών μεθυλιώσεων στην αποκωδικοποίηση του mRNA για να προκαλέσει τις μεθυλιώσεις στο rRNA στα σημεία που επιλέγονταν από εμάς να γίνουν. Τα πλασμίδια αυτά περιέχουν το **γονίδιο snR38** το οποίο φυσιολογικά εντοπίζεται σε ένα εσώνιο του γονιδίου που κωδικοποιεί τον παράγοντα επιμήκυνσης 4 (TEF4). Η χρησιμοποιούμενη κασέτα εμπεριέχει το εξώνιο 1, το εσώνιο και ένα μικρό τμήμα του εξωνίου 2. Η μεταγραφή ελέγχεται από τον **υποκινητή GAL1 γαλακτόζης** (Εικόνα 5). Για τις μεθυλιώσεις μας χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο αυτό αντικαθιστώντας την ακολουθία οδηγό με διάφορες επιλεγείσες, αφαιρώντας όμως 36bp από το εξώνιο 2, απλά και μόνο για αποφυγή της δράσης της πρωτεΐνης Tef4p. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά των pBLs είναι: το **γονίδιο της β-λακταμάσης**, το οποίο χρησιμοποιείται για να προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη στα εκάστοτε μετασχηματισμένα κύτταρα, και το γονίδιο **TRP1**, που συμμετέχει στην παραγωγή της τρυπτοφάνης, και αποτελεί δείκτη επιλογής των εκάστοτε μετασχηματισμένων κυττάρων.

Ακολούθως παρατίθεται ο Πίνακας 6 ο οποίος εμπεριέχει όλα τα pBLs, τα σημεία στόχους και τις λειτουργικές περιοχές όπου εντοπίζονται.

Πίνακας 6

Τα *pBLs*, τα σημεία στόχοι και οι λειτουργικές περιοχές όπου αυτά εντοπίζονται.

Πλασμίδια	Σημεία στόχοι στο rRNA <i>S. cerevisiae/E. coli</i>	Λειτουργικές περιοχές
pRS314	-	-
pBL233	A2967/A2602	Περιοχή V της LSU Κεντρικός βρόχος ΡΤάσης
pBL163	A2816/A2451	Περιοχή V της LSU Κεντρικός βρόχος ΡΤάσης
pBL232	U2950/U2585	Περιοχή V της LSU Κεντρικός βρόχος ΡΤάσης
pBL226	C2817/C2455	Περιοχή V της LSU Κεντρικός βρόχος ΡΤάσης
pBL162	U1257/U1083	Περιοχή II της LSU Κέντρο GTPάσης

Πλασμίδια αναφοράς (pACs): χρησιμοποιήθηκε η οικογένεια των pACs με δύο διαφορετικούς δείκτες (markers). Για τις μεθυλιώσεις χρησιμοποιήθηκε η σειρά πλασμιδίων pACs/Leu2⁺ και για τις ψευδοουριδινιώσεις η σειρά πλασμιδίων pACs/Ade2⁺. Ασχέτως με τον δείκτη τα πλασμίδια περιέχουν μια θέση έναρξης της αντιγραφής για το *E. coli* (OriC) και μια για τον *S. cerevisiae* (2μ). Αλλά και 2 γονίδια επιλογής, το γονίδιο της β-λακταμάσης, το οποίο χρησιμοποιείται για να προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη στα εκάστοτε μετασηματισμένα κύτταρα, και το γονίδιο LEU2, που συμμετέχει στην παραγωγή της λευκίνης. Το κυριότερο όμως δομικό στοιχείο των pACs είναι μια σειρά γονιδίων και εμβόλιμων αλληλουχιών της μορφής “lacZ – αλληλουχία – luc”. Το γονίδιο lacZ κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση και το luc τη λουσιφεράση. Στην περιοχή ‘αλληλουχία’ υπάρχει μια αλληλουχία που περιέχει ένα εν δυνάμει κωδικόνιο λήξης ή μια αλληλουχία μεταβολής πλαισίου ανάγνωσης.

Ολοκληρώνοντας, παρατίθεται ο Πίνακας 7 ο οποίος εμπεριέχει όλα τα pACs καθώς και τις περιεχόμενες αλληλουχίες.

Πίνακας 7

Πλασμίδια αναφοράς και οι περιεχόμενες αλληλουχίες τους. Με σκούρο μαύρο δεικνύονται τα κωδικόνια λήξης, ενώ για τον HIV, με σκούρο μαύρο φαίνεται η αλληλουχία σήμα για frame-shifting -1. Με κόκκινο φαίνεται η βάση όπου γίνεται η μεταβολή του πλαισίου ανάγνωσης.

Πλασμίδια αναφοράς (pAC)	Περιεχόμενες αλληλουχίες
pAC/TQ	GGA ACA CAA CAG CAA TTA CAG
pAC/TAA	GGA ACA CAA TAA CAA TTA CAG
pAC/TGA	GGA ACA CAA TGA CAA TTA CAG
pAC/TAG	GGA ACA CAA TAG CAA TTA CAG
pAC/HIV-1	CAG,GCT,AAT,TTT,TT,A,GG,GAA,GAT,

snRNAs και ζύμες: για το τμήμα των ψευδοουριδινών χρησιμοποιήθηκαν διάφορες κυτταρικές σειρές οι οποίες αναφέρθηκαν παραπάνω. Σε κάθε μια από αυτές είχαν διαγραφεί κάποια γονίδια που κωδικοποιούν συγκεκριμένα snoRNAs, με αποτέλεσμα τον μη σχηματισμό των συνήθων ψευδοουριδινών στο rRNA. Λοιπά στοιχεία αναφέρονται παραπάνω. Εδώ, παρατίθεται ο Πίνακας 8, όπου φαίνονται τα snRs τα οποία διαγράφηκαν, τα σημεία στόχοι των snoRNAs που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα snRs και οι λειτουργικές περιοχές όπου αυτά εντοπίζονται.

Πίνακας 8

Τα snRs, τα σημεία στόχοι και οι λειτουργικές περιοχές όπου αυτά εντοπίζονται.

Γονίδια	Σημεία στόχοι στο rRNA	Λειτουργικές περιοχές
snR42	U→Ψ2971	Περιοχή V της LSU Κεντρικός βρόχος PTάσης
snR34	U→Ψ2876	Περιοχή V της LSU Κεντρικός βρόχος PTάσης
snR37	U→Ψ2940	Περιοχή V της LSU Κεντρικός βρόχος PTάσης
snR46	U→Ψ2861	Περιοχή V της LSU Κεντρικός βρόχος PTάσης
snR10	U→Ψ2919	Περιοχή V της LSU Κεντρικός βρόχος PTάσης

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* DH5α: Αναμειγνύονται 100μl επιλεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5α με 10μl πλασμιδίου και αφήνονται για 30 λεπτά σε πάγο. Κατόπιν πραγματοποιείτε θερμικό σοκ για 40sec στους 42°C. Αμέσως μετά τοποθετούνται πάλι στον πάγο. Καθ' όσο αυτά βρίσκονται στον πάγο προστίθενται 750μl LB (NaCl 5g/l, tryptone 10g/l, yeast extract 5g/l) και τα επωάζονται για 45min στους 37 °C. Τέλος, επιστρώνονται σε τριβλία LB με αμπικιλίνη (50μg/ml) και επώαση στους 37 °C για 18 ώρες.

Απομόνωση/εξαγωγή πλασμιδιακού DNA από *E. coli*: Από τα μετασχηματισμένα *E. coli* λαμβάνεται 1 απομονωμένη αποικία και τοποθετείτε σε 5ml LB με αμπικιλίνη για 18 ώρες στους 37 °C υπό ανάδευση. Έπειτα, λαμβάνονται 2ml από αυτήν την καλλιέργεια και φυγοκεντρώνται στα 13000rpm για 30min στους 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και στεγνώνει το ίζημα.

Ακολουθως, επαναδιαλυτοποιείται το ίζημα που περιέχει τα βακτήρια με 100μl παγωμένου Δ1 (4°C: 50mM γλυκόζη, 25mM Tris-Cl pH=8, 10mM EDTA pH=8) με έντονη ανάδευση. Προστίθενται 200μl Δ2 (0,2N NaOH, 1% SDS) και γίνεται ανάμειξη. Τοποθετούνται τα δείγματα μας στον πάγο. Προστίθενται 150μl παγωμένου Δ3 (60ml 5M Οξικό κάλιο, 11,5ml κρυσταλλικό οξικό οξύ, 28,5ml H₂O). Τοποθετούνται, τα βακτήρια μας, για 5min στον πάγο. Φυγοκεντρώνονται για 5min στα 12000rpm στους 4°C. Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε ένα καινούργιο σωλήνα erpendorf. Κατακρημνίζεται το δίκλωνο DNA με 2 όγκους αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου. Αναμειγνύεται το διάλυμα με έντονη ανάδευση. Το μείγμα ηρεμεί για 2min σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκεντρείται για 5min στα 12000rpm στους 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο επιμελώς. Ξεπλένεται το δίκλωνο DNA μας με 1ml αιθανόλη 70% στους 4°C. Απομακρύνεται και πάλι το υπερκείμενο. Αφήνεται το ίζημα του DNA να στεγνώσει καλά στον αέρα για 10min. Επαναδιαλυτοποιείται το DNA σε 100μl TE pH=8,0 που περιέχει καθαρή παγκρεατική RNAάση (20μg/ml χωρίς ίχνη DNAάσης). Επιβεβαίωση του αποτελέσματός μας με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% (100ml TBE1x, 0,8g αγαρόζη, 10μl BrEt).

Μετασχηματισμός κυττάρων *S. cerevisiae*: Λαμβάνεται καλλιέργεια που έχει επωαστεί για 24 ώρες στους 30°C και μετράται η οπτική πυκνότητα στα 600nm. Φυγοκεντρώνονται 50ml αυτής για 5min στα 3000rpm. Απορρίπτεται το υπερκείμενο. Επαναδιαλυτοποιείται σε 1ml απεσταγμένου H₂O. Φυγοκεντρείται 30sec στα 13000rpm και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Επαναδιαλυτοποιείται σε 1ml απεσταγμένου H₂O. Τοποθετούνται 100μl διαλύματος ζύμης σε κάθε erpendorf.

Από εδώ και πέρα η πορεία διαφοροποιείται από το εάν ο μετασχηματισμός γίνεται με pACs/Leu2⁺ και pBLs (A) ή pACs/ΔLeu2 και τμήματα Ade2 (B).

(A) Σε κάθε erpendorf προστίθενται: 240μl PEG 50%, 36μl LiAC 1M, 10μl carrier DNA (10mg/ml), 1μl pBL, 1μl pAC και 72μl H₂O.

(B) Σε κάθε erpendorf προστίθενται: 240μl PEG 50%, 36μl LiAC 1M, 10μl carrier DNA (10mg/ml), 10μl pAC/ΔLeu2, 10μl Ade2 και 54μl H₂O.

Σε κάθε περίπτωση τοποθετούνται τα προς μετασχηματισμό κύτταρα για 30 με 40min στους 42°C. Φυγοκεντρώνονται για 30sec στα 13000rpm και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Επαναδιαλυτοποιείται σε 50μl απεσταγμένου H₂O. Τέλος, τα δείγματα επιστρώνονται σε τριβλία που περιέχουν μέσο επιλογής και τοποθετούνται για επώαση στους 30°C (περίπου για 3 ημέρες).

Ομογενοποίηση κυττάρων *S. cerevisiae*: Μετά από κατάλληλες καλλιέργειες των μετασχηματισμένων ζυμών μας, αρχικά σε ραφινόζη και έπειτα σε γαλακτόζη και όταν επιτυγχάνεται το απαιτούμενο OD_{600nm}=1-2, 2x2ml καλλιέργειας φυγοκεντρώνονται για 3min στα 13000rpm. Απομακρύνεται το υπερκείμενο. Προστίθενται 100μl ρυθμιστικού διαλύματος Luc+BSA 0,1% μαζί με ένα μείγμα αναστολέων πρωτεασών, μερικά γυάλινα σφαιρίδια και PMSF. Αφήνονται υπό έντονη ανάδευση για 30min στους 4°C. Έπειτα τοποθετούνται σε πάγο και προστίθενται 150μl ρυθμιστικού διαλύματος Luc+BSA 0,1% μαζί με ένα μείγμα αναστολέων πρωτεασών και PMSF. Φυγοκεντρώνονται για 15min στα 13000rpm στους 4°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα Luc+BSA 0.1%: Tris PPI pH=7,8 25mM, MgCl₂ 8mM, DTT 1mM, EDTA 1mM, Triton X-100 1%, γλυκερόλη 15%, BSA 0,1%.

Μείγμα αναστολέων πρωτεασών: Βενζαμιδίνη 31μg/ml, Πεψατίνη A 136μg/ml, Λευκοπεπτίνη 26μg/ml, Αντιπαΐνη 200μg/ml, Χυμοστατίνη 200μg/ml.

Testi δραστηριότητας β-γαλακτοσιδάσης: Τοποθετούνται 400μl ρυθμιστικού διαλύματος Z σε ένα erppendorf μαζί με 100μl κυτταρικού εκχυλίσματος και 100μl ONPG (4mg/ml). Αφήνονται στους 30°C για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Αναστέλλεται η αντίδραση με την προσθήκη 250μl Na₂CO₃ 1M όταν το χρώμα γίνει σχεδόν κίτρινο. Από την τοποθέτηση στους 30°C μέχρι την διακοπή της αντίδρασης σημειώνεται η ώρα. Φυγοκεντρώνονται για 3min στα 13000rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Φωτομετρώνονται στα 420nm. Η δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\Delta. \beta\text{-gal} = \text{OD}_{420\text{nm}} / \text{Vol}(\text{ml}) \cdot t(\text{min})$$

Ρυθμιστικό διάλυμα Z: Na₂HPO₄ 0,06M, NaH₂PO₄ H₂O 0,04M, KCl 0,01M, MgSO₄ 7H₂O 0,001M, β-μερκαπταιθανόλη 0,05M

Testi δραστηριότητας λουσιφεράσης: Η λουσιφεράση καταλύει την παραγωγή φωτονίων παρουσία λουσιφερίνης και ATP. Οι μετρήσεις γίνονται σε 20μl εκχυλίσματος κυττάρων παρουσία 110μl ρυθμιστικού διαλύματος A και 150μl ρυθμιστικού διαλύματος Luc+BSA 0,1% σε κάθε σωλήνα. Η κορυφή της εκπομπής φωτονίων μετρείται στη διάρκεια των πρώτων 10sec σε ειδικό φωτόμετρο (illuminometer).

Η δραστηριότητα της λουσιφεράσης υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\Delta. \text{luci} = \text{OD} / \text{Vol}(\mu\text{l})$$

Ρυθμιστικό διάλυμα A: ρυθμιστικό διάλυμα Luci, ATP 2×10^{-3} M, λουσιφερίνη 2×10^{-4} M.

Παραγωγή δείκτη Ade2 με PCR: για το σκοπό αυτό πραγματοποιείτε μια PCR με τα εξής:

20μl Buffer 10x

4μl dNTPs 10mM

8μl pFLK7c (oligo1)

8μl pFLK7w (oligo2)

1μl pASZ11

157μl H₂O

2μl R-Taq.

Έπειτα ηλεκτροφορούνται τα προϊόντα και από την πηκτή μας απομονώνεται ο δείκτης Ade2. Αυτό πράττεται ως εξής: κόβεται το τμήμα της πηκτής όπου περιέχεται το υλικό μας με όσο το δυνατό μεγαλύτερη ακρίβεια. Ζυγίζεται και προστίθενται 3 όγκοι Buffer QG ανά όγκο gel. Επωάζεται στους 50°C μέχρι να λιώσει το gel και μετά, ελέγχεται να είναι το χρώμα του διαλύματος κίτρινο. Προστίθεται 1 όγκος gel ισοπροπανόλης και αναδεύεται (προαιρετικά). Τοποθετούνται σε ειδική στήλη η οποία κατακρατεί το DNA μας (QIAquick spin column). Απορρίπτεται ότι δεν κατακρατήθηκε και ξεπλένεται το DNA με 0,75ml Buffer PE. Για να ληφθεί το υλικό μας από τη στήλη, προστίθενται 50μl H₂O και φυγοκεντρώνονται για 1min εις διπλούν.

Επιβεβαιώνεται το αποτέλεσμα με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,8%.

Πέψη πλασμιδίων pAC: για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται πέψη του εκάστοτε pAC με το ένζυμο BglII. Έτσι, τοποθετείται 1μl πλασμιδιακού DNA, 1μl BglII, 2μl Buffer3 και 16μl H₂O σε ένα erppendorf και αφήνονται στους 37°C για 1 ώρα. Πολλαπλασιάζεται το υλικό μας με PCR και το ηλεκτροφορείται για να απομονωθεί από την πηκτή όπως πριν. Επιβεβαιώνεται το αποτέλεσμα με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,8%.

Αλληλούχιση πλασμιδίων pAC: Τοποθετούνται σε ένα μικρό erppendorf για PCR → 4μl Big Dye

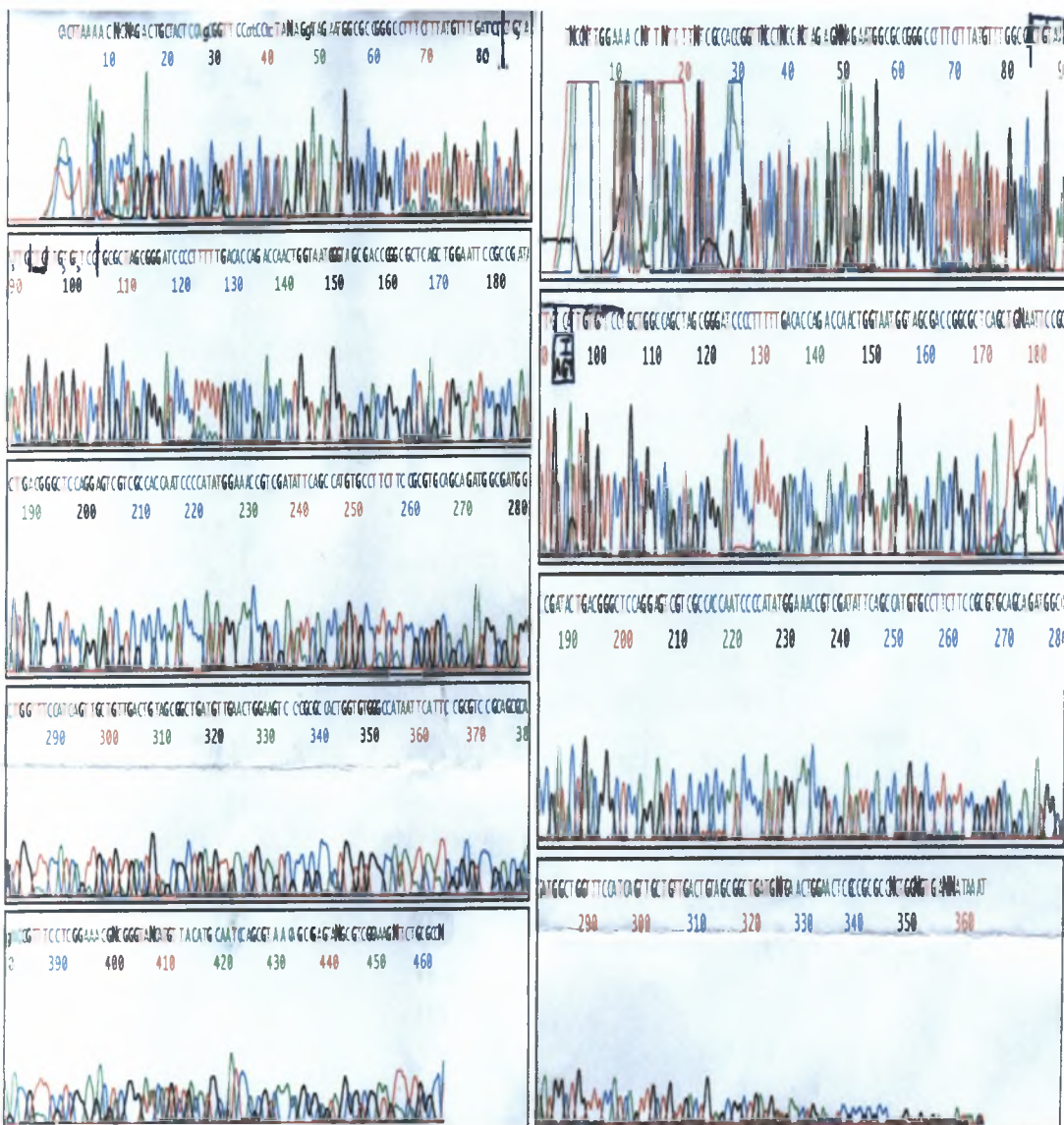
1μl Luc1 (oligo 10pmol/μl)

1μg πλασμιδιακού DNA

14μl H₂O

Το πρόγραμμα της PCR: στους 95°C για 30sec και έπειτα 30 φορές 95°C για 30sec, 50°C για 15sec και 60°C για 4min.

Εν συνεχεία, μεταφέρονται τα προϊόντα σε ένα άλλο erppendorf και προστίθενται 16μl H₂O και 64μl αιθανόλης 95°. Αφήνονται 15min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά φυγοκεντρούνται για 30min. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και στεγνώνεται το ίζημα. Επαναδιαλυτοποιείται σε 20μl φορμαμίδης. Τέλος, απόδιατάσσεται το DNA για 2min στους 94°C και αμέσως τοποθετείται στον πάγο. Το παραγόμενο πηγαίνει σε συσκευή αλληλούχισης. Δίδονται ως παράδειγμα τα μοτίβα αλληλούχισης για τα 2 επιτυχώς παραγμένα pAC-TQ/Ade2⁺ και pAC-TGA/Ade2⁺ (Εικόνα 11 α και β).



Εικόνα 11 Α) Βλέπουμε το μοτίβο αλληλούχισης για το pAC-TQ/Ade2⁺ και β) για το pAC-TGA/Ade2⁺. Για την καλύτερη κατανόηση των 2 αυτών αλληλουχιών προτείνεται η παράλληλη παρακολούθηση και του πίνακα 7.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΕΩΝ

Για την ερμηνεία των επιδράσεων της κάθε μεθυλίωσης στην ακρίβεια αποκωδικοποίησης υπολογίζονται οι λόγοι δραστηριότητας λουσιφεράσης/ β -γαλακτοσιδάσης και γίνεται σύγκριση αυτών παρουσία και απουσία μεθυλίωσης. Εδώ δίδεται πίνακας που αντιπροσωπεύει τις τιμές των λόγων σε στελέχη που μετασηματίστηκαν με τον φορέα pRS314 και δε φέρουν μεθυλίωση στο rRNA (Πίνακας 9 – με κόκκινο οι τιμές που δε θα συμπεριληφθούν στους μέσους όρους λόγω σημαντικών αποκλίσεων). Αυτός ο πίνακας θα αποτελέσει τον πίνακα αναφοράς βάση του οποίου εκτιμώνται οι τιμές του λόγου δραστηριότητας παρακάτω.

Πίνακας 9

Αποτελέσματα αναφοράς – Καμία μεθυλίωση

pRS314	Λόγος δραστηριοτήτων luc/ β -gal					Μέσος Δ.Δρ. luc / β -gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	1,6E+09	2,3E+09	2,0E+09	1,9E+09	1,1E+09	1,8E+09	100,0%
	1,8E+09	1,8E+09	1,8E+09	1,8E+09	1,8E+09		
pAC-HIV-1	1,1E+08	1,2E+08	0,7E+08	0,5E+08	0,7E+08	0,8E+08	4,4%
	1,3E+08	0,9E+08	0,8E+08	0,7E+08	0,6E+08		
pAC-TAG	5,8E+08	4,6E+08	3,2E+08	5,0E+08	4,0E+08	4,5E+08	25,0%
	5,5E+08	4,2E+08	4,5E+08	2,0E+08	3,8E+08		
pAC-TGA	1,3E+08	1,7E+08	1,2E+08	1,3E+08	1,6E+08	1,4E+0,8	7,8%
	1,5E+08	1,4E+08	1,1E+08	1,5E+08	1,5E+08		
pAC-TAA	1,9E+08	1,2E+08	2,1E+08	1,5E+08	1,2E+08	1,6E+08	8,9%
	2,0E+08	1,6E+08	1,6E+08	1,4E+08	1,6E+08		

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΟΪΠΟΥ A2967 ΣΤΟΝ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΒΡΟΓΧΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ pBL233 ΣΤΟΝ *S. cerevisiae*

Παρατίθεται πίνακας ο οποίος αντιπροσωπεύει τις τιμές των λόγων σε στελέχη που μετασχηματίστηκαν με τον φορέα pBL233 και φέρουν μεθυλίωση του καταλοίπου A2967 στο rRNA (Πίνακας 10 – με κόκκινο οι τιμές που δε θα συμπεριληφθούν στους μέσους όρους λόγω σημαντικών αποκλίσεων).

Πίνακας 10

Αποτελέσματα μεθυλίωσης του καταλοίπου A2967 με χρήση του πλασμιδίου pBL233 στον S. cerevisiae

pBL233	Λόγος δραστηριοτήτων luc/β-gal					Μέσος Λ.Δρ. luc / β-gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	0,6E+09	1,4E+09	2,5E+09	1,1E+09	1,6E+09	1,5E+09	100,0%
	0,6E+09	0,9E+09	2,0E+09	1,7E+09	2,2E+09		
pAC-HIV-1	0,3E+08	0,5E+08	1,0E+08	0,5E+08	0,7E+08	0,6E+08	4,0%
	0,3E+08	0,4E+08	1,0E+08	0,7E+08	0,7E+08		
pAC-TAG	1,5E+08	4,4E+08	5,3E+08	4,6E+08	4,6E+08	4,8E+08	32,0%
	1,2E+08	6,2E+08	1,6E+08	3,8E+08	1,6E+08		
pAC-TGA	2,3E+08	2,3E+08	1,2E+08	1,9E+08	1,4E+08	1,9E+0,8	12,7%
	2,5E+08	2,4E+08	1,4E+08	1,8E+08	1,5E+08		
pAC-TAA	0,9E+08	1,4E+08	1,8E+08	1,6E+08	1,7E+08	1,4E+08	9,3%
	1,0E+08	2,0E+08	1,6E+08	1,4E+08	0,9E+08		

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΟΪΠΟΥ U1257 ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΓΤΡάσης ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ pBL162 ΣΤΟΝ *S. cerevisiae*

Παρατίθεται πίνακας ο οποίος αντιπροσωπεύει τις τιμές των λόγων σε στελέχη που μετασηματίστηκαν με τον φορέα pBL162 και φέρουν μεθυλίωση του καταλοίπου U1257 στο rRNA (Πίνακας 11 – με κόκκινο οι τιμές που δε θα συμπεριληφθούν στους μέσους όρους λόγω σημαντικών αποκλίσεων).

Πίνακας 11

Αποτελέσματα μεθυλίωσης του καταλοίπου U1257 με χρήση του πλασμιδίου pBL162 στον S. cerevisiae

pBL162	Λόγος δραστηριοτήτων luc/β-gal					Μέσος Λ.Δρ. luc / β-gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	1,7E+09	1,0E+09	1,9E+09	0,9E+09		1,7E+09	100,0%
	1,9E+09	2,6E+09	2,0E+09	1,9E+09			
pAC-HIV-1	0,7E+08	1,1E+08	0,8E+08	0,8E+08		0,9E+08	5,3%
	0,9E+08	1,2E+08	1,0E+08	0,6E+08			
pAC-TAG	4,4E+08	4,3E+08	4,0E+08	4,8E+08		4,1E+08	24,1%
	2,2E+08	4,3E+08	3,2E+08	5,2E+08			
pAC-TGA	3,1E+08	1,5E+08	2,1E+08	1,8E+08		2,1E+0,8	12,4%
	3,0E+08	1,9E+08	2,1E+08	1,2E+08			
pAC-TAA	2,4E+08	1,8E+08	2,1E+08	1,8E+08		1,9E+08	11,2%
	2,0E+08	1,5E+08	2,1E+08	1,3E+08			

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΟΪΠΟΥ C2817 ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ pBL226 ΣΤΟΝ *S. cerevisiae*

Παρατίθεται πίνακας ο οποίος αντιπροσωπεύει τις τιμές των λόγων σε στελέχη που μετασηματίστηκαν με τον φορέα pBL226 και φέρουν μεθυλίωση του καταλοΐπου C2817 στο rRNA (Πίνακας 12 και 13). Ο Πίνακας 12 περιέχει τις τιμές για τον φορέα pBL226 με τα pAC-TQ, pAC-HIV-1 και pAC-TAG. Ο Πίνακας 13 περιέχει τις τιμές για τον φορέα pBL226 με τα pAC-TQ, pAC-TGA και pAC-TAA από το παρόν πείραμα.

Πίνακας 12

Αποτελέσματα μεθυλίωσης του καταλοΐπου C2817 με χρήση του πλασμιδίου pBL226 στον *S. cerevisiae*

pBL226	Λόγος δραστηριοτήτων luc/β-gal					Μέσος Λ.Δρ. luc / β-gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	1,7E+09	1,7E+09	2,4E+09	1,3E+09	1,7E+09	1,7E+09	100,0%
	2,0E+09	2,0E+09	1,3E+09	1,5E+09	1,4E+09		
pAC-HIV-1	0,7E+08	0,7E+08	1,0E+08	0,8E+08	0,9E+08	0,8E+08	4,7%
	0,8E+08	0,8E+08	0,6E+08	0,7E+08	1,0E+08		
pAC-TAG	2,9E+08	2,9E+08	4,7E+08	3,6E+08	3,1E+08	3,1E+08	18,2%
	2,0E+08	2,0E+08	4,5E+08	3,4E+08	2,1E+08		

Πίνακας 13

Αποτελέσματα μεθυλίωσης του καταλοΐπου C2817 με χρήση του πλασμιδίου pBL226 στον *S. cerevisiae*

pBL226	Λόγος δραστηριοτήτων luc/β-gal					Μέσος Λ.Δρ. luc / β-gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	0,8E+09	1,0E+09	1,2E+09	1,4E+09		1,1E+09	100,0%
	1,2E+09	0,9E+09	0,9E+09	1,5E+09			
pAC-TGA	1,3E+08	1,1E+08	1,1E+08	1,2E+08		1,2E+08	10,9%
	1,3E+08	1,0E+08	0,9E+08	1,3E+08			
pAC-TAA	1,4E+08	0,7E+08	0,9E+08	1,2E+08		1,1E+08	10,0%
	1,1E+08	1,0E+08	0,9E+08	1,4E+08			

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΟΪΠΟΥ U2950 ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ pBL232 ΣΤΟΝ *S. cerevisiae*

Παρατίθεται πίνακας ο οποίος αντιπροσωπεύει τις τιμές των λόγων σε στελέχη που μετασηματίστηκαν με τον φορέα pBL232 και φέρουν μεθυλίωση του καταλοΐπου U2950 στο rRNA (Πίνακας 14 και 15 – με **κόκκινο** οι τιμές που δε θα συμπεριληφθούν στους μέσους όρους λόγω σημαντικών αποκλίσεων). Ο Πίνακας 14 περιέχει τις τιμές για τον φορέα pBL232 με τα pAC-TQ, pAC-HIV-1 και pAC-TAG. Ο Πίνακας 15 περιέχει τις τιμές για τον φορέα pBL232 με τα pAC-TQ, pAC-TGA και pAC-TAA από το παρόν πείραμα.

Πίνακας 14

Αποτελέσματα μεθυλίωσης του καταλοΐπου U2950 με χρήση του πλασμιδίου pBL232 στον *S. cerevisiae*

pBL232	Λόγος δραστηριοτήτων luc/β-gal					Μέσος Λ.Δρ. luc / β-gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	1,7E+09	1,7E+09	0,9E+09	0,8E+09	1,6E+09	1,4E+09	100,0%
	1,8E+09	1,3E+09	1,3E+09	1,2E+09	1,4E+09		
pAC-HIV-1	0,7E+08	0,8E+08	0,3E+08	0,6E+08	0,8E+08	0,8E+08	5,7%
	1,1E+08	0,8E+08	0,5E+08	0,6E+08	0,7E+08		
pAC-TAG	5,5E+08	4,2E+08	2,8E+08	3,6E+08	2,9E+08	3,5E+08	25,0%
	2,7E+08	3,7E+08	3,5E+08	3,4E+08	2,2E+08		

Πίνακας 15

Αποτελέσματα μεθυλίωσης του καταλοΐπου U2950 με χρήση του πλασμιδίου pBL232 στον *S. cerevisiae*

pBL232	Λόγος δραστηριοτήτων luc/β-gal					Μέσος Λ.Δρ. luc / β-gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	0,6E+09	0,8E+09	0,4E+09	1,0E+09		0,8E+09	100,0%
	1,0E+09	0,7E+09	0,7E+09	1,1E+09			
pAC-TGA	0,7E+08	0,9E+08	0,4E+08	1,4E+08		0,9E+08	11,3%
	1,3E+08	0,6E+08	0,5E+08	1,3E+08			
pAC-TAA	0,8E+08	0,7E+08	0,5E+08	1,5E+08		0,9E+08	11,3%
	0,9E+08	0,6E+08	0,7E+08	1,6E+08			

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΟΪΠΟΥ A2816 ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ pBL163 ΣΤΟΝ *S. cerevisiae*

Παρατίθεται πίνακας ο οποίος αντιπροσωπεύει τις τιμές των λόγων σε στελέχη που μετασηματίστηκαν με τον φορέα pBL163 και φέρουν μεθυλίωση του καταλοΐπου A2816 στο rRNA (Πίνακας 16 και 17). Ο Πίνακας 16 περιέχει τις τιμές για τον φορέα pBL163 με τα pAC-TQ, pAC-HIV-1 και pAC-TAG. Ο Πίνακας 17 περιέχει τις τιμές για τον φορέα pBL163 με τα pAC-TQ, pAC-TGA και pAC-TAA από το παρόν πείραμα.

Πίνακας 16

Αποτελέσματα μεθυλίωσης του καταλοΐπου A2816 με χρήση του πλασμιδίου pBL163 στον *S. cerevisiae*

pBL163	Λόγος δραστηριοτήτων luc/β-gal					Μέσος Λ.Δρ. luc / β-gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	1,0E+09	2,1E+09	1,4E+09	0,9E+09	1,4E+09	1,4E+09	100,0%
	1,1E+09	1,4E+09	1,4E+09	1,5E+09	1,4E+09		
pAC-HIV-1	0,4E+08	0,4E+08	0,7E+08	0,6E+08	0,2E+08	0,5E+08	3,6%
	0,6E+08	0,4E+08	0,6E+08	0,5E+08	0,5E+08		
pAC-TAG	1,8E+08	3,1E+08	2,8E+08	3,3E+08	2,4E+08	2,9E+08	20,7%
	3,5E+08	3,1E+08	3,1E+08	3,3E+08	2,6E+08		

Πίνακας 17

Αποτελέσματα μεθυλίωσης του καταλοΐπου A2816 με χρήση του πλασμιδίου pBL163 στον *S. cerevisiae*

pBL163	Λόγος δραστηριοτήτων luc/β-gal					Μέσος Λ.Δρ. luc / β-gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	0,9E+09	0,9E+09	0,8E+09	0,6E+09		0,8E+09	100,0%
	1,0E+09	1,0E+09	0,7E+09	0,2E+09			
pAC-TGA	0,6E+08	0,9E+08	0,4E+08	0,3E+08		0,7E+08	8,8%
	0,8E+08	1,0E+08	0,7E+08	0,5E+08			
pAC-TAA	1,4E+08	1,1E+08	0,8E+08	0,4E+08		0,8E+08	10,0%
	0,6E+08	1,0E+08	0,9E+08	0,4E+08			

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΨΕΥΔΟΥΡΙΔΙΝΩΝ

Για την ερμηνεία των επιδράσεων της διαγραφής συμβατικής ψευδοουριδίνης στην ακρίβεια αποκωδικοποίησης υπολογίζονται οι λόγοι δραστηριότητας λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης και γίνεται σύγκριση αυτών παρουσία και απουσία της διαγραφής. Εδώ δίδεται πίνακας που αντιπροσωπεύει τις τιμές των λόγων του στελέχους YS602 το οποίο δεν έχει υποστεί καμία διαγραφή γονιδίου snR. (Πίνακας 18). Αυτός ο πίνακας θα αποτελέσει τον πίνακα αναφοράς βάση του οποίου εκτιμώνται οι τιμές του λόγου δραστηριότητας παρακάτω.

Πίνακας 18

Αποτελέσματα αναφοράς – Καμία διαγραφή

YS602	Λόγος δραστηριοτήτων luc/β-gal			Μέσος Λ.Δρ. luc / β-gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	0,7E+09	1,4E+09	1,8E+09	1,4E+09	100,0%
	1,3E+09	1,6E+09	1,5E+09		
pAC-TGA	0,6E+08	1,5E+08	1,5E+08	1,3E+08	9,3%
	0,6E+08	1,8E+08	1,6E+08		

ΔΙΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ snR42, snR34 ΚΑΙ snR37 ΣΤΟΝ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΒΡΟΓΧΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΟΥ *S. cerevisiae* YTK132

Δίδεται πίνακας που αντιπροσωπεύει τις τιμές των λόγων του στελέχους YTK132 το οποίο έχει υποστεί 3 διαγραφές γονιδίων snR. (Πίνακας 19).

Πίνακας 19

Αποτελέσματα διαγραφής των snR42, snR34, snR37 με χρήση του στελέχους YTK132

YTK132	Λόγος δραστηριοτήτων luc/β-gal			Μέσος Λ.Δρ. luc / β-gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	1,1E+09	0,9E+09	1,0E+09	0,9E+09	100,0%
	0,6E+09	0,9E+09	1,1E+09		
pAC-TGA	0,7E+08	0,5E+08	0,5E+08	0,6E+08	6,7%
	0,7E+08	0,6E+08	0,5E+08		

ΔΙΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ snR42, snR34, snR37 ΚΑΙ snR46 ΣΤΟΝ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΒΡΟΓΧΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΟΥ *S. cerevisiae* YTK136

Δίδεται πίνακας που αντιπροσωπεύει τις τιμές των λόγων του στελέχους YTK136 το οποίο έχει υποστεί 4 διαγραφές γονιδίων snR. (Πίνακας 20).

Πίνακας 20

Αποτελέσματα διαγραφής των snR42, snR34, snR37, snR46 με χρήση του στελέχους YTK136

YTK136	Λόγος δραστηριοτήτων luc/β-gal			Μέσος Λ.Δρ. luc / β-gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	1,0E+09	1,1E+09	1,0E+09	0,9E+09	100,0%
	0,5E+09	1,0E+09	0,9E+09		
pAC-TGA	0,5E+08	0,5E+08	0,4E+08	0,5E+08	5,5%
	0,5E+08	0,5E+08	0,6E+08		

ΔΙΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ snR42, snR34, snR37, snR46 ΚΑΙ snR10 ΣΤΟΝ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΒΡΟΓΧΟ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΟΥ *S. cerevisiae* YTK143

Δίδεται πίνακας που αντιπροσωπεύει τις τιμές των λόγων του στελέχους YTK143 το οποίο έχει υποστεί 5 διαγραφές γονιδίων snR. (Πίνακας 21).

Πίνακας 21

Αποτελέσματα διαγραφής των snR42, snR34, snR37, snR46, snR10 με χρήση του στελέχους YTK143

YTK143	Λόγος δραστηριοτήτων luc/β-gal			Μέσος Λ.Δρ. luc / β-gal	Ποσοστό επί του control (pAC-TQ)
pAC-TQ	1,2E+09	1,4E+09	1,2E+09	1,2E+09	100,0%
	0,7E+09	1,5E+09	1,2E+09		
pAC-TGA	1,0E+08	1,7E+08	1,5E+08	1,4E+08	11,7%
	1,0E+08	1,7E+08	1,6E+08		

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Σε όλους τους παραπάνω πίνακες, στα άκρα δεξιά δίδονται συγκεκριμένα ποσοστά επί τις 100. Αυτά μας δείχνουν το ποσοστό στο οποίο αντιστοιχεί η πλήρης αλληλουχία (β-γαλακτοσιδάση και εν συνεχεία η λουσιφεράση στη σειρά) που παράγεται από κάθε pAC, με το εκάστοτε ριβόσωμα, ως προς τη πλήρη αλληλουχία που παράγεται από το όμοια τροποποιημένο ριβόσωμα αποκωδικοποιώντας την αλληλουχία που παρεμβάλλεται στο pAC-TQ. Με πιο θεωρητική διατύπωση, τα ποσοστά αυτά μας δείχνουν το εάν κοινά τροποποιημένο ριβόσωμα ωθείται συχνότερα ή όχι σε “λάθος” αποκωδικοποίηση λόγω του διαφορετικού υποστρώματος το οποίο και αποκωδικοποιεί (pAC-TQ, HIV-1, TAG, TGA, TAA). Παρατηρείται συνεπώς πως γενικά, η παρουσία αλληλουχιών του HIV ή των κωδικονίων λήξης προκαλεί μεταβολή στην ακρίβεια αποκωδικοποίησης του mRNA όπως και αναμενόταν.

Από την άλλη πλευρά το κυρίως τμήμα του ενδιαφέροντος μας στρέφεται στο ποιες από τις ποικίλες τροποποιήσεις του ριβοσώματος προκαλούν μεγαλύτερη μεταβολή στην ακρίβεια αποκωδικοποίησης του mRNA. Αυτό εξετάζεται με το test Mann-Whitney-Wilcoxon. Στο test αυτό, συγκρίνεται πως για κοινό pAC (άρα κοινό υπόστρωμα-αλληλουχία), τα ποικίλα τροποποιημένα ριβοσώματα αποκωδικοποιούν με διαφορετική συχνότητα “λάθους” την κοινή αλληλουχία κάθε φορά. Εάν υπάρχει απόκλιση, γίνεται φανερό πως η μεταβολή αυτή οφείλεται στην αντίστοιχη τροποποίηση. Στο κομμάτι αυτό δίδεται ο Πίνακας 22 όπου, παρουσιάζονται οι μέσοι λόγοι δραστηριοτήτων luc/β-gal κάθε μεθυλίωσης και υποδεικνύονται με πράσινο χρώμα οι λόγοι που είναι στατιστικά διαφορετικοί έναντι των αντίστοιχων λόγων αναφοράς.

Πίνακας 22

Μέσοι λόγοι δραστηριοτήτων luc/β-gal κάθε μεθυλίωσης. Υποδεικνύουμε με πράσινο χρώμα τους λόγους που είναι στατιστικά διαφορετικοί έναντι των αντίστοιχων λόγων αναφοράς με κατώτατο επίπεδο το 5% ($\alpha=0,05$) που φτάνει για αρκετούς και το 0,1% ($\alpha=0,001$).

Μεταφραζόμενες αλληλουχίες Θέσεις μεθυλίωσης <i>S.cerevisiae</i>	Κοινό πλαίσιο ανάγνωσης (pAC-TQ)	Frame-shifting (pAC-HIV-1)	Read-through TAG (pAC-TAG)	Read-through TGA (pAC-TGA)	Read-through TAA (pAC-TAA)
Όχι μεθυλίωση (pRS314)	1,8E+09	0,8E+08	4,5E+08	1,4E+08	1,6E+08
A2967 (pBL233)	1,5E+09	0,6E+08	4,8E+08	1,9E+08	1,4E+08
U2950 (pBL232)	1,1E+09	0,8E+08	3,5E+08	0,9E+08	0,9E+08
C2817 (pBL226)	1,4E+09	0,8E+08	3,1E+08	1,2E+08	1,1E+08
A2816 (pBL163)	1,1E+09	0,5E+08	2,9E+08	0,7E+08	0,8E+08
U1257 (pBL162)	1,7E+09	0,9E+08	4,1E+08	2,1E+08	1,9E+08

Ακολούθως παρατίθεται και ο Πίνακας 23 όπου, με τη χρήση των μέσων λόγων δραστηριοτήτων *luc/β-gal* για κάθε τροποποιημένο στέλεχος, παρουσιάζονται τα αποτελέσματά συνοπτικά, δείχνοντας με πράσινο χρώμα τους λόγους που είναι στατιστικά διαφορετικοί έναντι των αντίστοιχων λόγων αναφοράς.

Όλα τα αποτελέσματα συζητούνται αμέσως μετά στο τμήμα Συζήτηση.

Πίνακας 23

Μέσοι λόγοι δραστηριοτήτων luc/β-gal για κάθε στέλεχος που έχει υποστεί διαγραφές των snR του. Υποδεικνύουμε με πράσινο χρώμα τους λόγους που είναι στατιστικά διαφορετικοί έναντι των αντίστοιχων λόγων αναφοράς με κατώτατο επίπεδο το 5% ($\alpha=0,05$) που φτάνει για αρκετούς και το 1% ($\alpha=0,01$).

Μεταφραζόμενες αλληλουχίες Διαγραμμένες ψευδοουριδίνες	Κοινό πλαίσιο ανάγνωσης (pAC-TQ)	Read-through TGA (pAC-TGA)
Όχι διαγραφές (YS602)	1,4E+09	1,3E+08
Ψ2971, Ψ2876, Ψ2940 (YTK132)	0,9E+09	0,6E+08
Ψ2971, Ψ2876, Ψ2940, Ψ2861 (YTK136)	0,9E+09	0,5E+08
Ψ2971, Ψ2876, Ψ2940, Ψ2861, Ψ2919 (YTK143)	1,2E+09	1,4E+08

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ U2950 (pBL232) ΚΑΙ A2816 (pBL163)

Κατά την προσπάθεια για μελέτη και εξήγηση των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των λόγων δραστηριότητας μεταξύ του control μας (καμία μεθυλίωση) και των ριβοσωμάτων με μεθυλίωσεις στα κατάλοιπα U2950 και A2816 ως προς τον φορέα μάρτυρα pAC-TQ (Mann-Whitney-Wilcoxon test). Πράγμα παράδοξο μιας και αναμενόταν να είναι στατιστικά αναλλοίωτος. Δυστυχώς όμως αφού η στατιστική διαφορά/μεταβολή αυτή υφίσταται δεν μας επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά την αποκωδικοποίηση του mRNA. Αυτό βεβαίως γίνεται κατανοητό αφού οποιαδήποτε εκτίμηση σε ένα πείραμα όπου το πρότυπο μεταβάλλεται, μόνο σοβαρά δε μπορεί να ληφθεί.

Το ερώτημα που τίθεται είναι πώς οι μεθυλίωσεις αυτές περιορίζουν την ορθή μετάφραση. Έτσι, από μελέτες είναι γνωστό πως τα κατάλοιπα U2950 και A2816 είναι τα εγγύτερα στο σημείο σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού. Αυτό κάνει πιθανό αυτή τους η θέση να παρέχει έναν καταλυτικό ρόλο στη σύνθεση του πεπτιδικού δεσμού, πράγμα το οποίο έχει ήδη επιβεβαιωθεί στην περίπτωση του καταλοίπου A2816 στο *E. coli*.

Ως προς το κατάλοιπο A2816, πιστεύεται πως ο ρόλος του αυτός οφείλεται στο N3 της αδενίνης. Αυτό υποβοηθά την απόσπαση ενός πρωτονίου από την α-αμινομάδα του αμινοακυλωμένου tRNA προάγοντας το σχηματισμό του δεσμού με το καρβονύλιο του νέοσυντιθέμενου πεπτιδίου του πεπτιδυλ-tRNA. Από την άλλη, σημαντικό στην κατάλυση του πεπτιδικού δεσμού θεωρείται και το 2'-OH της ριβόζης το οποίο είναι και ο στόχος της μεθυλίωσης στην εργασία αυτή.

Εάν τελικά ισχύει η υπόθεσή μας πως **οι μεθυλίωσεις U2950 και A2816 μειώνουν το ρυθμό σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού**, τότε είναι πιθανό να αυξάνεται και το “φαινόμενο drop-off”. “Drop-off” είναι το φαινόμενο κατά το οποίο εμφανίζεται πρόωρος τερματισμός της μετάφρασης από την αναγνώριση ενός νοηματικού κωδικονίου. Ένα σπάνιο φαινόμενο που όμως για τα UGG (τρυπτοφάνη) και UAU (τυροσίνη) δεν είναι αμελητέο.

Λόγω της σημαντικότητας των αλληλεπιδράσεων στο σημείο αυτό, ο μη σύντομος σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού μπορεί να επιτρέπει στους παράγοντες λήξης να δεσμεύονται σε νοηματικά κωδικόνια και να προκαλούν πρόωμη λήξη και αποσύνθεση του ριβοσώματος. Πάντως για την άρση του φαινομένου οι οργανισμοί διαθέτουν μια πεπτιδυλ-tRNA υδρολάση η οποία ελευθερώνει τα ριβοσώματα και τα θέτει ξανά στη λειτουργία του κυττάρου.

Σύμφωνα με την παραπάνω υπόθεση, δικαιολογούνται οι μικρότερες δραστηριότητες. Όμως η παραπάνω υπόθεση δεν είναι και η μοναδική. Εναλλακτικά οι μειωμένοι ρυθμοί ίσως οφείλονται στην **επίδραση της μεθυλίωσης των καταλοίπων U2950 και A2816 στην τοποθέτηση μη νοηματικών αμινοακυλωμένων tRNA έναντι κωδικονίων**, μιας και η τοποθέτηση τέτοιων κωδικονίων θα είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή αλλοιωμένων σε σύσταση πολυπεπτιδίων που δεν αποκλείεται να διαθέτουν μειωμένη δραστηριότητα.

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ A2967 (pBL233) ΚΑΙ U1257 (pBL162)

Στη περίπτωση των καταλοίπων A2967 (pBL233) και U1257 (pBL162) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των λόγων δραστηριότητας ως προς το control μας (καμία μεθυλίωση) όσον αφορά τον φορέα pAC-TGA (Mann-Whitney-Wilcoxon test). Έτσι οι μεθυλίωσεις αυτές μείωσαν την αποτελεσματικότητα τερματισμού της μετάφρασης (αύξηση του “φαινομένου read-through” – Ραβδόγραμμα 1) με κωδικόνιο λήξης το UGA όχι όμως και τα UAG ή UAA. Το ερώτημα που τίθεται είναι γιατί επηρεάζεται η ακρίβεια της μετάφρασης μόνο όταν σήμα λήξης είναι το UGA; Στην πραγματικότητα ξεκάθαρη απάντηση δεν υπάρχει, αλλά θα γίνει προσπάθεια για προσέγγιση του θέματος όσο το δυνατόν πιο εποικοδομητικά.

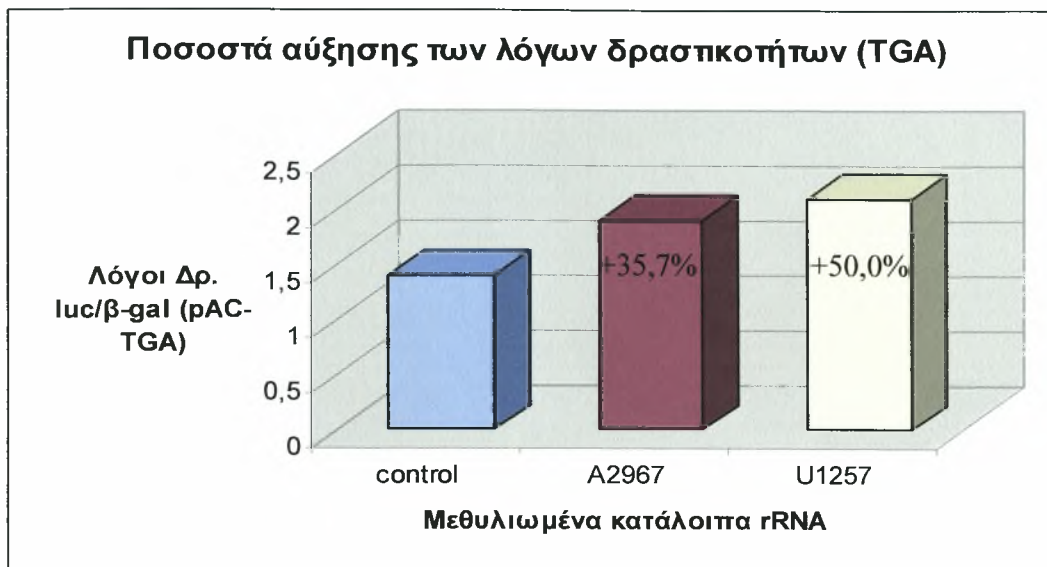
Σε ορισμένους οργανισμούς έχει αποδειχθεί πως τα κωδικόνια λήξης δε χρησιμοποιούνται εξίσου συχνά (Πίνακας 24). Στους *E. coli*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis* και *D. melanogaster* το κωδικόνιο UAA είναι το συχνότερο ενώ, στον άνθρωπο, τα ποντίκια και το *M. tuberculosis* είναι το UGA. Ποικίλες πρόσφατες δημοσιεύσεις δείχνουν πως υπάρχει σημαντική συσχέτιση της συχνότητας ενός κωδικονίου λήξης στο γονιδίωμα και της αποτελεσματικότητας του για επαγωγή της λήξης της μετάφρασης. Δείχθηκε τελικά πως το πιο αποτελεσματικό κωδικόνιο λήξης στον *S. cerevisiae* είναι το UAA που είναι και το πιο σύννηθες σε αυτόν ενώ αντίθετα, στον ποντικό το πλέον σύννηθες UGA είναι το λιγότερο ικανό για τερματισμό της μετάφρασης (Πίνακας 24).

Με τις γνώσεις που έχουμε για το γενικό μοντέλο λήξης της μετάφρασης πιθανολογούμε πως **οι μεθυλίωσεις των καταλοίπων A2967 (pBL233) και U1257 (pBL162) μειώνουν την ικανότητα των eRF1 και eRF3 να αναγνωρίζουν το UGA ως σήμα λήξης** (ο eRF1 δρα μαζί με τον eRF3 δρουν ως απελευθερωτικοί παράγοντες *in vivo*, και ειδικότερα αναγνωρίζουν τα 3 κωδικόνια λήξης και επάγουν την υδρόλυση του πεπτιδυλ-tRNA από το ριβόσωμα, προάγοντας την απελευθέρωση του νέου πεπτιδίου). Η μείωση αυτή της ικανότητας του συμπλόκου eRF1-eRF3 να αναγνωρίσει το UGA ως σήμα λήξης επιτρέπει σε κατασταλτικά μόρια tRNA να αλληλεπιδράσουν με το κωδικόνιο λήξης και να δώσουν συνέχεια στη φάση επιμήκυνσης της μετάφρασης. Πάντως η όλη υπόθεση αν και φαινομενικά σωστή, έρχεται σε αντίθεση με το γεγονός ότι η μεθυλίωση δεν έχει καμία επίδραση στο λιγότερο ικανό κωδικόνιο λήξης UAG του *S. cerevisiae*.

Πίνακας 24

Χρήση και εμφάνιση των κωδικονίων λήξης στον *S. cerevisiae* και η ικανότητα αποτελεσματικού τερματισμού της μετάφρασης.

<i>S. cerevisiae</i>	UAA	UAG	UGA	Αποτελεσματικότητα τερματισμού
Ποσοστό εύρεσης σε κωδικοποιούσες περιοχές	47%	23%	30%	UAA>UGA>UAG
Ποσοστό εύρεσης σε μη κωδικοποιούσες περιοχές	52%	23%	24%	



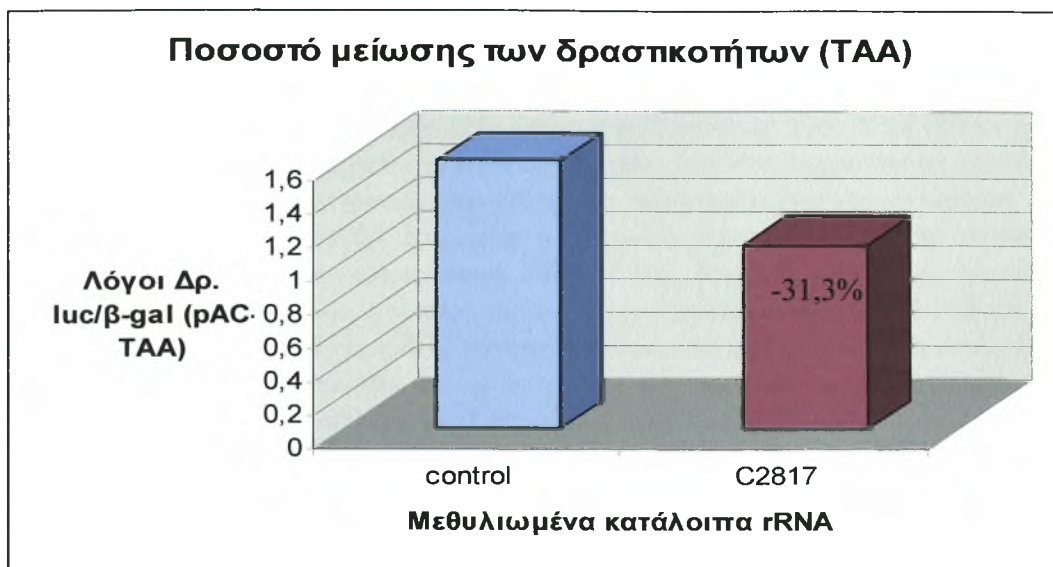
Ραβδόγραμμα 1 Παρουσιάζονται τα ποσοστά αύξησης των λόγων δραστηριοτήτων των ενζύμων λουσιφεράση/β-γαλακτοσιδάση, όταν παρεμβάλλεται το UGA, μεταξύ των U1257 και A2967 ως προς το control μας (λόγος δραστηριοτήτων pBL+TGA/λόγος δραστηριοτήτων pRS314+TGA).

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΤΑΛΟΙΠΟΥ C2817 (pBL226)

Στη περίπτωση του κατάλοιπου C2817 (pBL226) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των λόγων δραστηριότητας ως προς το control μας (καμία μεθυλίωση) όσον αφορά τον φορέα pAC-TAA (Mann-Whitney-Wilcoxon test). Έτσι οι μεθυλίωσεις μας αυτές αύξησαν την αποτελεσματικότητα τερματισμού της μετάφρασης (μείωση του “φαινομένου read-through” – Ραβδόγραμμα 2) με κωδικόνιο λήξης το UAA όχι όμως και τα UAG ή UGA. Το ερώτημα που τίθεται, όπως και προηγουμένως, είναι γιατί δεν επηρεάζεται η ακρίβεια της μετάφρασης για όλα τα σήματα λήξης παρά μόνο για ένα, το UAA;

Η πιθανότερη θεωρία αναφέρθηκε στο προηγούμενο τμήμα της Συζήτησης (Πίνακας 24). Με τις γνώσεις που έχουμε για το γενικό μοντέλο λήξης της μετάφρασης πιθανολογείται πως η μεθυλίωση του κατάλοιπου C2817 (pBL226) αυξάνει την ικανότητα των eRF1 και eRF3 να αναγνωρίζουν το UAA ως σήμα λήξης. Η αύξηση αυτή της ικανότητας του συμπλόκου eRF1-eRF3 να αναγνωρίσει το UAA ως σήμα λήξης δεν επιτρέπει στα κατασταλτικά μόρια tRNA να αλληλεπιδράσουν με το κωδικόνιο λήξης και να δώσουν συνέχεια στη φάση επιμήκυνσης της μετάφρασης τόσο εύκολα όσο πριν τη μεθυλίωση. Πάντως η όλη υπόθεση αν και φαινομενικά σωστή, έρχεται σε αντίθεση με το γεγονός ότι η μεθυλίωση δεν έχει καμία επίδραση στο λιγότερο ικανό κωδικόνιο λήξης UAG του *S. cerevisiae* το οποίο και είχε πολύ περισσότερα περιθώρια βελτίωσης σε σχέση με τα άλλα 2 κωδικόνια.

Κλείνοντας το τμήμα των μεθυλίωσεων θα πρέπει να τονιστεί πως μιας και οι θεωρίες που αναπτύχθηκαν περί μεταβολών των λόγων δραστηριότητας παραμένουν στον χώρο των υποθέσεων και όχι των τεκμηριωμένων αποτελεσμάτων και πως η περαιτέρω έρευνα για πιο ασφαλή και σίγουρα συμπεράσματα.



Ραβδόγραμμα 2 Παρουσιάζονται τα ποσοστά μείωσης των λόγων δραστηριοτήτων των ενζύμων λουσιφεράση/β-γαλακτοσιδάση, όταν παρεμβάλλεται το UAA, μεταξύ του C2817 (pBL226) ως προς το control μας (λόγος δραστηριοτήτων pBL+TAA/λόγος δραστηριοτήτων pRS314+TAA).

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΔΙΑΓΡΑΦΩΝ snRs ΣΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ *S. cerevisiae* YTK132 ΚΑΙ YTK136

Κατά την προσπάθεια για μελέτη και εξήγηση των αποτελεσμάτων μας, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των λόγων δραστηριότητας μεταξύ του control μας (καμία διαγραφή) και των ριβοσωμάτων με διαγραφές ψευδοουριδινών για τα στελέχη YTK132 και YTK136 ως προς τον φορέα μάρτυρα pAC-TQ (Mann-Whitney-Wilcoxon test). Πράγμα παράδοξο μιας και αναμέναμε να είναι στατιστικά αναλλοίωτος. Δυστυχώς όμως αφού η στατιστική διαφορά/μεταβολή αυτή υφίσταται δεν μας επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά την αποκωδικοποίηση του mRNA. Αυτό βεβαίως γίνεται κατανοητό αφού οποιαδήποτε εκτίμηση σε ένα πείραμα όπου το πρότυπο μεταβάλλεται, μόνο σοβαρά δε μπορεί να ληφθεί.

Το ερώτημα που τίθεται τώρα είναι πως οι διαγραφές αυτές περιορίζουν την ορθή μετάφραση. Πιθανόν οι διαγραμμένες ψευδοουριδίνες, οι οποίες βρίσκονται όλες στον κεντρικό βρόγχο της πεπτιδυλ-τρανσφεράσης, λόγω της θέσης τους να αποκτούν έναν καταλυτικό ρόλο στην αποκωδικοποίηση του mRNA.

Εάν τελικά ισχύει η υπόθεσή μας πως **οι διαγραφές των snR42, snR34, snR37 και snR46 μειώνουν το ρυθμό σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού**, τότε είναι πιθανό να αυξάνεται και το “φαινόμενο drop-off” το οποίο είχε αναλυθεί παρακάτω. Σύμφωνα με την παραπάνω υπόθεση, δικαιολογούνται οι μικρότερες δραστηριότητες. Όμως η παραπάνω υπόθεση δεν είναι και η μοναδική. Εναλλακτικά οι μειωμένοι ρυθμοί ίσως οφείλονται στην **επίδραση των διαγραφών των snR42, snR34, snR37 και snR46 στην τοποθέτηση μη νοηματικών αμινοακυλιωμένων tRNA έναντι κωδικονίων**, μιας και η τοποθέτηση τέτοιων κωδικονίων θα είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή αλλοιωμένων σε σύσταση πολυπεπτιδίων που δεν αποκλείεται να διαθέτουν μειωμένη δραστηριότητα.

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΔΙΑΓΡΑΦΩΝ snRs ΣΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ *S. cerevisiae* YTK143

Κατόπιν σύγκρισης των λόγων δραστηριοτήτων στο στέλεχος YTK143 με τους λόγους αναφοράς, αυτοί θεωρούνται στατιστικά ίσοι. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι οι διαγραφές στο ριβόσωμα του συγκεκριμένου στελέχους δεν επιδρούν καθόλου στο επίπεδο στο οποίο η αναποτελεσματικότητα λήξης λαμβάνει χώρα κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Ίσως μάλιστα πως δεν τροποποιεί την ακρίβεια μετάφρασης γενικότερα. Όμως η περαιτέρω γνώση μας, μας θυμίζει πως ενώ για τις διαγραφές των snR42, snR34, snR37 και snR46 παρουσιάζεται σημαντική στατιστική διαφορά με το που προστίθεται και η διαγραφή του snR10 όλα επιστρέφουν στο κανονικό. Άρα η αρχική υπόθεση είναι φανερό πως είναι λανθασμένη.

Ο λόγος που πιθανόν οδηγεί σε αυτό το φαινόμενο είναι η φύση του snR10 για το οποίο έχει δειχθεί πως συμμετέχει στην τροποποίηση του pre-RNA και η απουσία του μειώνει τους ρυθμούς ανάπτυξης. Αυτό το γεγονός μας κάνει να σκεφτούμε πως λόγω της απότομης μείωσης των ρυθμών ανάπτυξης ο ρυθμός μετάφρασης μειώνεται μιας και οι απαιτήσεις μειώνονται επίσης. Αυτό πιθανόν υποδεικνύει πως οι προηγούμενες διαγραφές, οι οποίες δεν επηρέαζαν τους ρυθμούς ανάπτυξης, αποτύγχαναν στην σωστή μετάφραση μόνο όσο οι απαιτήσεις του κυττάρου ήταν αυξημένες, ενώ όταν “έπεσαν” οι ρυθμοί λόγω της διαγραφής του snR10, άρα και οι απαιτήσεις, έπαψε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Η υπόθεση αυτή το κατά πόσο έχει επιστημονική βάση θα αποδειχθεί με την εφαρμογή ποικίλων ακόμα πειραμάτων τα οποία θα εξιχνιάσουν το όλο φαινόμενο και θα δώσουν σαφέστερα αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baranov V. Pavel, Gesteland F. Raymond, Atkins F. John (2002), Recoding: Translational Bifurcations in Gene Expression, *Gene* 286, 187–201.
- Bekaert Michael, Rousset Jean-Pierre (2005), An Extended Signal Involved in Eukaryotic -1 Frame-shifting Operates through Modification of the E Site tRNA, *Molecular Cell* 17, 61-68.
- Decatur A. Wayne, Fournier J. Maurile (2002), rRNA Modifications and Ribosome Function, *TRENDS in Biochemical Sciences* 27 No.7.
- Driscoll M. D., Copeland R. P. (2003), Mechanism and Regulation of Selenoprotein Synthesis, *Annu. Rev. Nutr.* 23, 17-40.
- Ganot Philippe, Bortolin Marie-Line, Kiss Tamas (1997), Site-Specific Pseudouridine Formation in Preribosomal RNA Is Guided by Small Nucleolar RNAs, *Cell* 89, 799–809.
- Georgia D. Tsagogeorga's Diploma Project (2004)
- Hernas K. Anthony, Dez Christophe, Henry Yves (2004), RNA Structure and Function in C/D and H/ACA snoRNPs, *Current Opinion in Structural Biology* 14, 335-343.
- Kounias S., Koliva-Maxaira F., Bagiatis K., Mpora-Senta E. (2001), Εισαγωγή στην Στατιστική, *Εκδόσεις Χριστοδουλίδη*.
- Lapeyre Br. (2004), Conserved Ribosomal RNA Modification and their Putative Roles in Ribosome Biogenesis and Translation.
- Lecointe Francois, Namy Olivier, Hatin Isabelle, Simos George, Rousset Jean-Pierre, Grosjean Henri (2002), Lack of Pseudouridine 38/39 in the Anticodon Arm of Yeast Cytoplasmic tRNA Decreases *in vivo* Recoding Efficiency, *The Journal of Biological Chemistry* 277, No 34, 30445-30453.
- Liu Ben, Fournier J. Maurile (2004), Interference Probing of rRNA with snoRNPs: A Novel Approach for Functional Mapping of RNA *in vivo*, *RNA* 10, 1130-1141.
- Liu Ben, Ni Jingwei, Fournier J. Maurille (2001), Probing RNA in Vivo with Methylation Guide Small Nucleolar RNAs, *Methods* 23, 276–286.
- Ni Jingwei, Tien L. Amy, Fournier J. Maurille (1997), *Cell* 89, 565–573.
- Tork Sanaa, Hatin Isabelle, Rousset Jean-Pierre, Fabret Celine (2004), The Major 5' Determinant in Stop Codon Read-through Involves Two Adjacent Adenines, *Nucleic Acids Research* 32, No. 2, 415-421.
- Trixopoulos D., Tzonou A., Katsougianni K. (2001), Βιοστατιστική, *Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.*
- Venema Jaap, Tollervey David (1995), Processing of Pre-Ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 11, 1629-1650.
- Warner R. Jonathan (2001), Nascent Ribosomes, *Cell* 107, 133-136.
- Weiss R.B., Dunn D.M., Atkins J.F., Gestelant R.F. (1987), Slippery Runs, Shifty Stops, Backward Steps, Forward Hops: -2, -1, +1, +2, +5 and +6 Ribosomal Frame-shifting, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52, 687-693.
- Wilson N. Daniel, Nierhaus H. Knud (2003), The Ribosome through the Looking Glass, *Angewandte Chemie Int. Ed.* 2003, 42, 3464 – 3486.