

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Δραΐνας
(Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου
Πατρών)

Επίδραση αντιβιοτικών στη δραστικότητα της ριβονουκλεάσης P



Διπλωματική Εργασία
Φώτης Κακατσιδης
Λάρισα 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

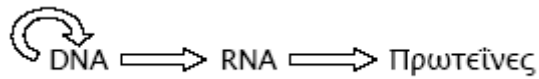
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1 ΘΕΩΡΙΑ ΤΟΥ RNA ΚΟΣΜΟΥ	5
2 .ΜΕΤΑΦΟΡΙΚΟ RNA.....	6
2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ tRNA	6
2.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΟΥ tRNA	7
3. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟ RNA.....	9
4. RNA ΚΟΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΟΣ RNA ΚΟΣΜΟΣ.	9
4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ.....	10
4.2 ΤΟ ΡΙΒΟΣΩΜΑ ΕΙΝΑΙ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΟ	11
5. RNASE P.....	12
5.1 ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ RNA ΤΗΣ RNASE P.....	14
5.1.1 ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ.....	14
5.1.2 ΤΡΙΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ.....	16
5.1.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΔΙΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΙΟΝΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ.....	18
5.1.5. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΩΜΑΤΟΣ – ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΘΡΑΥΣΗΣ.....	18
6. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	20
6.1 ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ	21
6.2 ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ	22
7. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ RNASE P	23
8. ΣΚΟΠΟΣ:	24
9.ΥΛΙΚΑ	26
9.1. ΓΕΝΙΚΑ	26
9.2 ΕΝΖΥΜΑ.....	27
9.3 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ:	28
9.4 ΚΙΤ:	28
10. ΜΕΘΟΔΟΙ:	29
10.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ M1 RNA <i>IN VITRO</i>	29
10.1.1 ΓΡΑΜΜΟΠΟΙΗΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ.	29
10.1.2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ M1 RNA <i>IN VITRO</i>	30
10.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ C5.....	31
10.2.1 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ XL-1BLUE ΜΕ ΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ <i>pQE30</i>	31
10.2.2 ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ C5 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.....	32
10.2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ C5 ΜΕ ΗΛΕΚΤΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ SDS-ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (SDS-PAGE)	32
10.2.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ C5 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΕ ΣΤΗΛΗ Ni-NTA.....	33
10.2.5 ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ-ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΡΩΤΡΙΝΩΝ.....	34
10.2.6 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	35
11. ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΕΝΕΡΓΟΥ ΟΛΟΕΝΖΥΜΟΥ RNASE P.....	36
12. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ RNASE P	36
12.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ RNASE P	36
12.2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΡtRNA ^{TYR}	37

12.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ «ΘΕΡΜΟΥ» ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ.....	37
12.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΝΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΟΥ ΟΛΟΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ RNASE P	38
12.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ M1 RNA.....	39
13.ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	39
14. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΟΛΟΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ RNASE P ΚΑΙ ΤΟΥ M1 RNA.	39
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
15. ΠΑΡΑΓΩΓΗ M1 RNA ΜΟΡΙΩΝ ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.	41
16.ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ C5 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.	41
17. ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΕΝΕΡΓΟΥ ΟΛΟΕΝΖΥΜΟΥ RNASE P..... ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.	42
18. ΔΟΣΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ TRNA ΑΠΟ ΤΟ M1 RNA ΚΑΙ ΤΟ ΑΝΑΣΥΣΤΑΜΕΝΟ ΟΛΟΕΝΖΥΜΟ ΤΗΣ RNASE P, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΛΙΝΔΑΜΥΚΙΝΗΣ. ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.	43
19. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ TRNA ΑΠΟ ΤΟ M1 RNA ΚΑΙ ΤΟ ΑΝΑΣΥΣΤΑΜΕΝΟ ΟΛΟΕΝΖΥΜΟ ΤΗΣ RNASE P, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΛΙΝΔΑΜΥΚΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΠΙΡΑΜΥΚΙΝΗΣ..... ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.	47
20. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.	48
21.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

Εισαγωγή

1. Εισαγωγή

Η πληροφορία που βρίσκεται αποθηκευμένη στο γενετικό υλικό, προκειμένου να εκφραστεί, ακολουθεί την εξής πορεία:



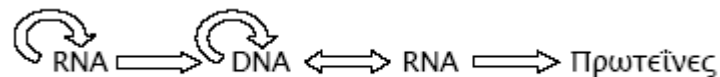
Η παραπάνω πρόταση αποτελεί την κλασική διατύπωση του κεντρικού δόγματος της Βιολογίας και σύμφωνα με αυτό, η γενετική πληροφορία που βρίσκεται αποθηκευμένη στο DNA αρχικά μεταγράφεται σε RNA το οποίο στη συνέχεια αποκωδικοποιείται ώστε να συντεθούν οι πρωτεΐνες, που αποτελούν τα δομικά και λειτουργικά μόρια του κυττάρου. Η πρόταση αυτή εισήχθη από τον Francis Crick το 1968. Η γενική ιδέα ότι η εξέλιξη της ζωής πάνω στη γη βασίστηκε στην αντιγραφή του DNA αναφέρθηκε για πρώτη φορά πριν από 40 χρόνια (Crick 1968, Orgel 1968).

Το παραπάνω δόγμα δείχνει ότι η ροή της γενετικής πληροφορίας ακολουθεί μονόδρομη πορεία, όπως υποδεικνύεται από τα μονά βέλη, και το οποίο σημαίνει ότι στην περίπτωση παραγωγής ενζύμων, μόνο το DNA εμφανίζει ικανότητα διπλασιασμού ενώ το RNA είναι το μόριο που μεταφράζεται σε πρωτεΐνες. Έτσι, για πολλά χρόνια μετά την ταυτοποίηση του DNA ως γενετικού υλικού των κυττάρων, στην επιστημονική κοινότητα επικρατούσε η λανθασμένη άποψη ότι μόνο τα μόρια του DNA μπορούν να διπλασιάζονται και επομένως ότι όλοι οι οργανισμοί φέρουν DNA ως γενετικό υλικό, καθώς και ότι η ροή της γενετικής πληροφορίας δεν ήταν δυνατό να ακολουθήσει την αμφίδρομη πορεία σε κανένα από τα δύο βήματα του παραπάνω δόγματος.

Η ανακάλυψη των ρετροϊών απέδειξε ότι το RNA μπορεί όπως και το DNA να χρησιμοποιηθεί ως το πρωτογενές αποθηκευτικό μόριο για τις γενετικές πληροφορίες. Έτσι η ροή της γενετικής πληροφορίας μπορεί να είναι αμφίδρομη μεταξύ του DNA και του RNA. Ακόμα, σε μερικούς ιούς των φυτών και των ζώων, όπως ο ιός της πολιομυελίτιδας, το RNA έχει την ικανότητα να δρα ως εκμαγείο για την αντιγραφή του. Επίσης, στις αρχές της δεκαετίας του '80, ο Thomas Cech και η ερευνητική του ομάδα, διαπίστωσαν ότι το ίδιο το πρόδρομο μετάγραφο του ριβοσωμικού RNA από το πρωτόζωο *Tetrahymena thermophila* είναι υπεύθυνο για την αποκοπή του ιντρονίου και την ωρίμανσή του (Kruger et al. 1982). Ταυτόχρονα και ανεξάρτητα με τον Cech, ανακαλύφθηκε ένα καταλυτικό μόριο RNA, η RNA υπομονάδα της RNase P, από το βακτήριο *Escherichia coli* από τον Sidney Altman και την ομάδα του, το οποίο ήταν υπεύθυνο για μια από τις διαδικασίες ωρίμανσης των πρόδρομων μορίων tRNA. Το ένζυμο αυτό διαπιστώθηκε ότι είναι ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, δηλαδή αποτελείται από μια ριβονουκλεϊκή υπομονάδα και από μια πρωτεϊνική υπομονάδα και ότι η καταλυτική δραστηριότητά του αποδίδεται αποκλειστικά στο ριβονουκλεϊκό τμήμα του συμπλόκου (Guerrier -Takada et al. 1983). Οι Cech και Altman έλαβαν από κοινού το Nobel Χημείας το 1989 για την ανακάλυψη των καταλυτικών ιδιοτήτων του RNA.

Η ανακάλυψη καταλυτικών μορίων RNA ή ριβοενζύμων όπως ονομάστηκαν, είχε ως αποτέλεσμα, την αναθεώρηση μιας από τις μέχρι τότε παγιωμένες αντιλήψεις της Βιοχημείας, ότι όλα τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες. Επίσης επανέφεραν στο επιστημονικό προσκήνιο τη θεωρία του κόσμου του RNA (Gilbert 1986).

Η ικανότητα του RNA να κωδικοποιεί τη γενετική πληροφορία, να δρα ως εκμαγείο κατά την αντιγραφή και να καταλύει χημικές αντιδράσεις οδήγησε στην επαναδιατύπωση του κεντρικού δόγματος της Μοριακής Βιολογίας, το οποίο πλέον περιγράφεται με την παρακάτω πρόταση:



Ενδιάμεσα μόρια που λειτουργούν κατά την πορεία έκφρασης της γενετικής πληροφορίας ώστε να μεταφερθούν και μεταφραστούν οι πληροφορίες, αποτελούν διάφορα μόρια RNA, όπως το αγγελιοφόρο RNA (mRNA), το μεταφορικό RNA (tRNA) και το ριβοσωμικό RNA (rRNA). Τα μόρια αυτά μεταγράφονται αρχικά σε πρόδρομα μετάγραφα τα οποία μετατρέπονται σε λειτουργικά μόρια με κάποιες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, οι οποίες συνθέτουν μια διαδικασία γνωστή ως ωρίμανση του RNA. Η ριβονουκλεάση P είναι ένα μόριο που συμμετέχει στην ωρίμανση του tRNA και παρουσιάζει ενδονουκλεολυτική δράση. Η δράση της ριβονουκλεάσης P έχει ως αποτέλεσμα την ωρίμανση του 5' άκρου του πρόδρομου μορίου των tRNA μέσω αφαίρεσης μιας αλληλουχίας στο άκρο αυτό (επιπρόσθετη οδηγός αλληλουχία). Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της κλινδαμυκίνης στη δραστηριότητα της RNase P από το βακτήριο *E. coli*.

1.1 Θεωρία του RNA κόσμου

Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, το RNA αποτελεί το πρωτογενές αποθηκευτικό μόριο της γενετικής πληροφορίας και παράλληλα καταλύει χημικές αντιδράσεις. Οι ιδιότητες αυτές, το καθιστούν ικανό να αποτελεί το πρώτο βιολογικό μόριο που εμφανίστηκε στο πρώτο οργανωμένο βιολογικό σύστημα πριν το DNA και τις πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται και με τη μελέτη του ενδιάμεσου μεταβολισμού, όπως αυτός είναι γνωστός σήμερα. Βάσει της βιοχημείας, λοιπόν, σε κάθε κύτταρο η σύνθεση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων ακολουθεί τη σύνθεση των ριβονουκλεοτιδίων, όπως επίσης πρώτα πραγματοποιείται η σύνθεση της ουρακίλης και έπεται η μεθυλίωσή της για την παραγωγή της θυμίνης. Εξάλλου, είναι γνωστό πως η έναρξη της αντιγραφής του DNA προαπαιτεί την σύνθεση RNA εκκινητών, που βέβαια στη συνέχεια αποσυντίθενται και αντικαθίστανται από DNA.

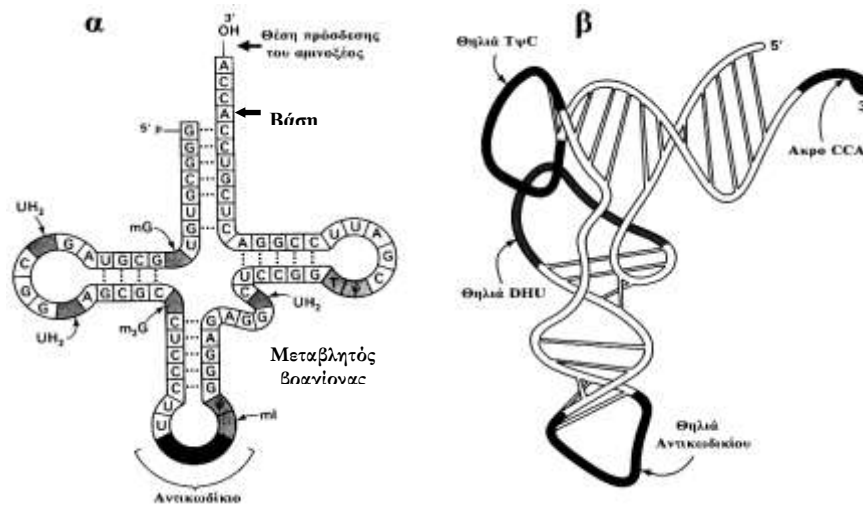
2 .Μεταφορικό RNA

Τα μόρια tRNA, που αρχικά ονομάστηκαν «μόρια προσαρμοστές» από τον Francis Crick, είναι μόρια μικρού μεγέθους που αποτελούνται από 74 έως 95 νουκλεοτίδια. Τα tRNA μόρια παίζουν το ρόλο του μεταφραστή από τη γλώσσα των τεσσάρων βάσεων των νουκλεϊκών οξέων στη γλώσσα των είκοσι αμινοξέων των πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό, τα μόρια του tRNA φέρουν μια θέση αλληλεπίδρασης με το mRNA, που ονομάζεται αντικωδικίο, και μια θέση πρόσδεσης του αμινοξέος, που ονομάζεται βραχίονας υποδοχής.

Τα μόρια tRNA βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα και σε όλους τους οργανισμούς που πραγματοποιούν πρωτεϊνοσύνθεση.

2.1 Δομή του tRNA

Το πρώτο μόριο tRNA του οποίου προσδιορίστηκε η αλληλουχία ήταν το tRNA^{Ala} από ζυμομύκητες και πραγματοποιήθηκε από τον Robert Holley το 1965. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί οι αλληλουχίες πάνω από 2000 μόριων tRNA καθώς και των αντίστοιχων γονιδίων τους σε περισσότερους από 200 οργανισμούς και οργανίδια. Το μεγαλύτερο μέρος αυτών των αλληλουχιών παρουσιάζουν κοινή δευτεροταγή δομή, η οποία μοιάζει με σχήμα τριφυλλιού (cloverleaf structure), όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.α.



Εικόνα 1. Κοινές δομές των μορίων tRNA. α) Δευτεροταγής. β) Τριτοταγής

Έτσι, στην δευτεροταγή δομή τους τα tRNAs έχουν τέσσερις σταθερές δίκλωνες περιοχές (βραχίονες), ένα μεταβλητό βραχίονα (variant loop) με αριθμό βάσεων που ποικίλει και τρεις σταθερές μονόκλωνες περιοχές (θηλιές). Το 3' άκρο των μορίων tRNA καταλήγει σε μονόκλωνη αλυσίδα με συντηρημένη την αλληλουχία CCA, η οποία αποτελεί θέση πρόσδεσης

των αμινοξέων. Κάθε αμινοξύ προσδένεται στο αντίστοιχο tRNA μέσω ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ της καρβοξυλομάδας του αμινοξέως και του νουκλεοτιδίου της αδενίνης, σχηματίζοντας έτσι το αμινοακυλο-tRNA (aa~tRNA). Το 5' άκρο είναι φωσφορυλιωμένο και συνήθως pG. Στη δεύτερη θηλιά από το 5' άκρο υπάρχουν τρία νουκλεοτίδια συμπληρωματικά του κωδικίου (αντικωδίκιο), ώστε η θηλιά αυτή να είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του aa~tRNA στο mRNA. Τέλος, σημαντικός είναι ο ρόλος των πέντε ομάδων αζευγάρωτων βάσεων (-CCA περιοχή, θηλιά (loop) TΨC, μεταβλητός βραχίονας, θηλιά DHU και θηλιά του αντικωδικίου) στην ενδομοριακή αλληλεπίδραση και τη διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής του μορίου (εικόνα 1).

Λόγω των κοινών αυτών χαρακτηριστικών, τα μόρια tRNA έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν κατά τον ίδιο τρόπο με τα μόρια mRNA και με τα ριβοσώματα. Στις αλληλεπιδράσεις αυτές, το 50% περίπου των βάσεων βρίσκεται σε ζεύγη κατά Watson-Crick, ενώ δημιουργούνται και μη-συμβατικά ζεύγη βάσεων, στα οποία συμμετέχουν ασυνήθιστες βάσεις (συνήθως μεθυλιωμένα παράγωγα των βάσεων A, U, C και G). Στην παρουσία των μη-συμβατών ζευγαριών βάσεων βασίζεται η υπόθεση της αστάθειας (wobble), σύμφωνα με την οποία το ίδιο αντικωδίκιο tRNA μπορεί να ζευγαρώνει με περισσότερα από ένα κωδικία.

Μελέτες που έγιναν από τον Alexander Rich και Aaron Klug το 1974 σε μόρια tRNA^{Phe} ζυμομυκήτων, οι οποίες στηρίχτηκαν σε κρυσταλλογραφικές αναλύσεις με ακτίνες X, έδειξαν ότι η τριτοταγής δομή των tRNAs είναι συμπαγής και μοιάζει με ανάποδο L ή Γ (εικόνα 1.β) (Rich και Kim 1978).

Κάθε μόριο tRNA μεταφέρει ένα είδος αμινοξέος στην κατάλληλη θέση κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης, με τη μορφή του aa~tRNA. Η πρόσδεση ενός αμινοξέος στο αντίστοιχο tRNA καταλύεται από ειδικά ένζυμα που λέγονται αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες.

2.2 Βιοσύνθεση και ωρίμανση του tRNA

Τα μόρια tRNA σε όλους τους οργανισμούς προέρχονται από πρόδρομα μετάγραφα, τα οποία υφίστανται στη συνέχεια μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις ώστε τα λειτουργικά πλέον μόρια να συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση. Τα στάδια που ακολουθούνται στη βιοσύνθεση των μορίων tRNA τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι τα εξής: μεταγραφή, ωρίμανση του 5' άκρου, ωρίμανση του 3' άκρου, τροποποίηση ορισμένων βάσεων και μάτισμα (splicing).

Οι διαδικασίες αυτές πραγματοποιούνται στον πυρήνα, εκτός της μετατροπής των βάσεων που παρατηρείται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυταρόπλασμα (Schimmel και de Poupiana 1995). Αφού εξέλθουν στο κυταρόπλασμα τα tRNAs, θα προσδεθούν με το κατάλληλο αμινοξύ για να πάρουν μέρος στην πρωτεϊνοσύνθεση.

- **Μεταγραφή**

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως ήδη αναφέρθηκε, τα γονίδια tRNA μεταγράφονται ως πολυκιστρονικά μηνύματα που περιέχουν και πρόδρομα μόρια rRNA. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τα γονίδια των tRNA μεταγράφονται ως μονομερή πρόδρομα μόρια ή μερικές φορές ως διμερή (Mao et al. 1980).

- **Ωρίμανση του 5' άκρου**

Η ωρίμανση του 5' άκρου των πρόδρομων μορίων tRNA καταλύεται σε όλους τους οργανισμούς από τη ριβονουκλεάση P (Ribonuclease P, RNase P), η οποία απομακρύνει την 5' επιπρόσθετη οδηγό αλληλουχία (leader sequence) των πρόδρομων μορίων tRNA (Altman 1981).

- **Ωρίμανση του 3' άκρου**

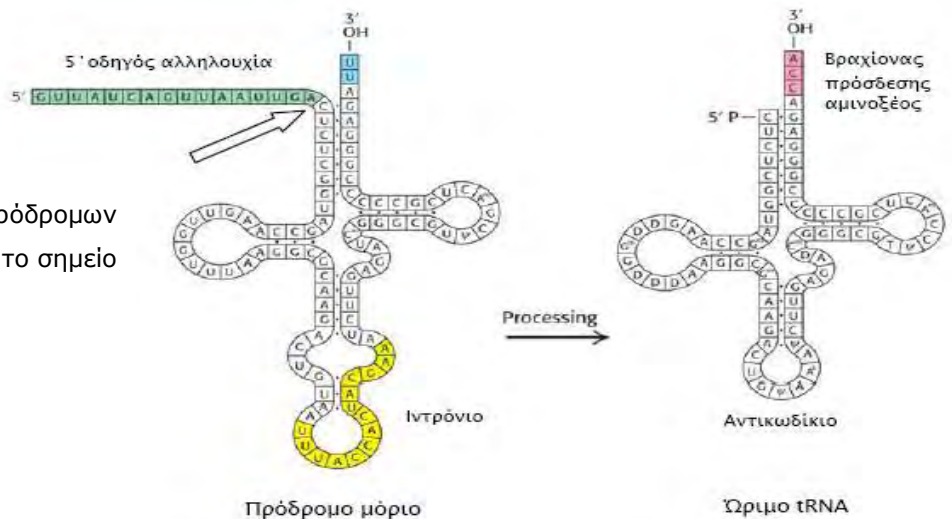
Στα βακτήρια, χωρίς να είναι πλήρως διευκρινισμένο, πιστεύεται ότι μια εξωνουκλεάση απομακρύνει την 3' μετα-τερματική αλληλουχία, αφού πρώτα δημιουργηθεί μια ενδονουκλεολυτική θραύση μερικά νουκλεοτίδια καθοδικά από του 3' -CCA άκρου (Nomura και Ishihama 1988). Στο βακτήριο *E. coli* έχουν βρεθεί αρκετές εξωνουκλεάσες που δρουν στο 3' άκρο, με επικρατέστερη την RNase D ως υπεύθυνη για την ωρίμανση του 3' άκρου (Deutscher et al. 1980).

- **Τροποποίηση βάσεων**

Οι περισσότερες τροποποιήσεις αφορούν συνήθως μεθυλώσεις, οι οποίες μπορούν να πραγματοποιηθούν είτε στη βάση είτε στη 2' υδροξυλομάδα της ριβόζης. Εκτεταμένη τροποποίηση βάσεων παρατηρείται καθώς προχωρούμε από τα προκαρυωτικά στα ευκαρυωτικά μόρια tRNA.

- **Μάτισμα**

Περίπου το 10 έως 20% των ευκαρυωτικών tRNA γονιδίων περιέχουν μια μεγάλη μήκους παρεμβαλλόμενη αλληλουχία (ιντρόνιο) τα όρια της οποίας εντοπίζονται ένα νουκλεοτίδιο προς το 3' άκρο του αντικωδικίου (εικόνα 2). Στα βακτήρια τα ιντρόνια απομακρύνονται με αυτομάτισμα. Η απομάκρυνση όμως των ιντρονίων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και τα αρχαιοβακτήρια γίνεται ενζυμικά με τη συμμετοχή ενζύμων: μιας ενδονουκλεάσης, μιας κυκλικής φωσφοδιεστεράσης, μιας κινάσης, μιας λινάσης, και μιας φωσφατάσης.



Εικόνα 2. Ωρίμανση των πρόδρομων μορίων tRNA. Με βέλος δείχνεται το σημείο όπου δρά η RNase P.

3. Καταλυτικό RNA

Το μόριο RNA με καταλυτική δραστηριότητα που ανακαλύφθηκε πρώτο ήταν το πρόδρομο ριβοσωμικό RNA από το βλεφαριδωτό πρωτόζωο *Tetrahymena thermophila*. Το μόριο αυτό, που ανακαλύφθηκε στο εργαστήριο του Tom Cech στο πανεπιστήμιο του Colorado το 1982, περιέχει ένα ιντρόνιο το οποίο έχει την ικανότητα να αποκόπτεται από μόνο του *in vitro*, χωρίς την παρουσία πρωτεϊνικού παράγοντα ή άλλης πηγής εξωτερικής ενέργειας. Οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητες *in vivo* για τη σταθεροποίηση της σωστής δευτεροταγούς δομής των ιντρονίων αυτών, αλλά όχι για τις ενζυμικές αντιδράσεις του μορίου. Το ιντρόνιο συνεχίζει να έχει ενζυμική δράση και μετά την εκτομή του, επομένως το ιντρόνιο αποτελεί ένα πραγματικό ένζυμο (Kruger et al. 1982).

Λίγο αργότερα από την ανακάλυψη των αυτοκαταλυόμενων ιντρονίων, βρέθηκε, από την ερευνητική ομάδα του Sidney Altman στο πανεπιστήμιο του Yale, ότι η καταλυτική δραστηριότητα της RNase P από το βακτήριο *Escherichia coli* εντοπίζεται στην RNA υπομονάδα του μορίου, η οποία είναι ικανή να ωριμάζει το 5' άκρο των πρόδρομων μορίων tRNA *in vitro*, χωρίς την παρουσία πρωτεϊνικών παραγόντων (Guerrier-Takada et al. 1983). Έτσι, τα μόρια RNA με καταλυτικές ιδιότητες ονομάστηκαν ριβοένζυμα και οι Cech και Altman τιμήθηκαν, για τις ανακαλύψεις τους αυτές, με το Βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1989.

Οι ανακαλύψεις αυτές δημιούργησαν ένα καινούριο ερευνητικό πεδίο στη Βιοχημεία και σύντομα διαπιστώθηκε ότι τα ριβοένζυμα είναι διάσπαρτα στη φύση. Τα μόρια αυτά έχουν βρεθεί σε φυτά, βακτήρια, ιούς και μύκητες.

Οι υπομονάδες RNA ορισμένων ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων είναι πιθανό ότι είναι υπεύθυνες για την ενζυμική δραστηριότητα, με πιο χαρακτηριστικά τα παραδείγματα του ριβοσώματος (Steitz και Moore 2003) και της αυτοκαταλυόμενης εκτομής των ιντρονίων των πρόδρομων μορίων mRNA. Επίσης, καινούρια ριβοένζυμα συντίθενται *de novo* στο εργαστήριο, μέσω συνδυαστικής σάρωσης τυχαίων αλληλουχιών RNA.

4. RNA κόσμος και σύγχρονος RNA κόσμος.

Είναι πλέον γενικώς αποδεκτό ότι το RNA έχει την ικανότητα να αποθηκεύει γενετικές πληροφορίες αλλά και να καταλύει βιοχημικές αντιδράσεις. Τα νέα αυτά δεδομένα αναπόφευκτα έφεραν και πάλι στο επιστημονικό προσκήνιο την θεωρία του «RNA κόσμου», σύμφωνα με την οποία το αρχέγονο βιολογικό μόριο ήταν RNA και η οποία αρχικά διατυπώθηκε από τον Walter Gilbert το 1986. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, οι πρωτόγονες λειτουργίες της ζωής θα μπορούσαν να διεκπεραιώνονται από ένα και μόνο μόριο, το οποίο θα είναι ικανό να αποθηκεύει τις πληροφορίες, να τις μεταφέρει και παράλληλα να εμφανίζει και ενζυμική δραστηριότητα, ιδιότητες τις οποίες διαθέτει το μόριο του RNA. Στην πορεία της εξέλιξης και μέσω αντίστροφης μεταγραφής δημιουργήθηκε το DNA, το οποίο ως σταθερότερο και λιγότερο επιρρεπές στις μεταλλάξεις μόριο σε σχέση με το RNA, επιλέχτηκε ως το γενετικό υλικό των

οργανισμών. Επίσης, καθώς αυξήθηκε η ποικιλότητα σε διαειδικό αλλά και ενδοειδικό επίπεδο, οι πρωτεΐνες ανέλαβαν τις περισσότερες από τις ενζυμικές λειτουργίες των αρχέγονων μορίων, λόγω της μεγάλης ποικιλίας πλευρικών ομάδων που διαθέτουν και επομένως ο ρόλος τους ως βιοκαταλύτες μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικός. Από τη χρονιά που διατυπώθηκε η θεωρία του «RNA κόσμου» μέχρι σήμερα, έχουν γραφτεί πολλά υπέρ και κατά, τα οποία συχνά βασίζονται στα ίδια πειραματικά δεδομένα. Η επιλογή καταλυτικών μορίων RNA *in vitro* (*in vitro* selection) καθώς και η ανακάλυψη ότι τα μόρια RNA μπορούν να καταλύουν αντιδράσεις πολυμερισμού (μια ιδιότητα απαραίτητη για τη δημιουργία των πρώτων βιομορίων), έδωσαν βάση στους υποστηρικτές της θεωρίας (Jaeger 1997). Τα επιχειρήματα που αντιτίθενται στη θεωρία αυτή είναι η δυσκολία σύνθεσης διακριτών νουκλεοτιδικών τμημάτων κάτω από τις θεωρητικές προβιοτικές συνθήκες, αλλά κυρίως η δυσκολία σύνθεσης συγκεκριμένων πολυμερών από αυτά (Joyce και Orgel 1999).

Ο RNA κόσμος, όπως τον γνωρίζουμε σήμερα, διαφέρει από τον αρχέγονο, που περιγράφηκε προηγουμένως. Τα RNA μόρια εξακολουθούν και έχουν σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές διαδικασίες και εμφανίζονται είτε με νέες προσαρμογές και εξελιγμένα από τα αντίστοιχα αρχέγονα, είτε ως μοριακά «απολιθώματα» αυτών.

4.1 Γενικά χαρακτηριστικά των ριβοενζύμων

Οι επτά κύριες ομάδες ριβοενζύμων κατατάσσονται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες, με βάση το μέγεθός τους και το μηχανισμό της αντίδρασής τους: στα μεγάλα ριβοένζυμα και στα μικρά ριβοένζυμα (Πίνακας 1) (Tanner 1999).

Μεγάλα ριβοένζυμα	Μικρά ριβοένζυμα
Ιντρόνια της ομάδας I	Ριβοένζυμο του ιού της ηπατίτιδας δ
Ιντρόνια της ομάδας II	Ριβοένζυμο φουρκέτα
RNA υπομονάδα της RNase P	Σφυροκέφαλο ριβοένζυμο
	Ριβοένζυμο της <i>Neurospora crassa</i>

Πίνακας 1. Κατηγορίες ριβοενζύμων με βάση το μέγεθός τους.

Τα μεγάλα ριβοένζυμα αποτελούνται από τα ιντρόνια της ομάδας I (group I introns), τα ιντρόνια της ομάδας II (group II introns) και τη ριβονουκλεάση P (RNase P). Το μέγεθος των μορίων αυτών ποικίλει από μερικές εκατοντάδες έως 3000 νουκλεοτίδια. Τα μεγάλα ριβοένζυμα καταλύουν αντιδράσεις που παράγουν προϊόντα με 3' υδροξυλικά και 5' φωσφορικά άκρα (εικόνα 2.α).

Η κατηγορία των μικρών ριβοενζύμων περιέχει το σφυροκέφαλο ριβοένζυμο (hammerhead ribozyme), το ριβοένζυμο φουρκέτα (hairpin ribozyme), το ριβοένζυμο του ιού της ηπατίτιδας δ (HDV ribozyme) και το ριβοένζυμο της *Neurospora crassa* (VS RNA) (Πίνακας 1). Τα μόρια αυτά έχουν μέγεθος από ~35 έως ~155 νουκλεοτίδια και χρησιμοποιούν την 2'

υδροξυλομάδα της ριβόζης ως νουκλεόφιλο για την προσβολή και τη θραύση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, παράγοντας έτσι προϊόντα με 2' -3' κυκλικό φωσφορικό και 5' υδροξύλιο.

Όλα σχεδόν τα παραπάνω ριβοένζυμα καταλύουν αντιδράσεις που τροποποιούν το ίδιο το μόριο, δρουν δηλαδή ενδομοριακά (*in cis*) και για το λόγο αυτό δεν μπορούν να θεωρηθούν σαν πραγματικά ένζυμα. Μοναδική εξαίρεση στον τρόπο αυτό δράσης αποτελεί η RNA υπομονάδα της RNase P από βακτήρια και ορισμένα αρχαία, η οποία δρα διαμοριακά (*in trans*) σε πολλαπλά εξωτερικά υποστρώματα. Επίσης, πρόσφατα έχει βρεθεί ότι και η RNA υπομονάδα από την ανθρώπινη RNase P εμφανίζει καταλυτική δραστηριότητα απουσία των πρωτεϊνικών της υπομονάδων (Kikovska et al. 2007). Παρά όμως την δράση *in cis* των μορίων που δρουν με τον τρόπο αυτό *in vivo*, τα μόρια αυτά μπορούν να μετατραπούν *in vitro* σε πραγματικά ριβοένζυμα που δρουν *in trans* θραύοντας άλλα μόρια RNA, τα οποία φέρουν αλληλουχία που είναι συμπληρωματική με την ενζυμική αλυσίδα των ριβοενζύμων (Hartmann et al. 1995). Τα ριβοένζυμα αποτελούν επομένως μόρια τα οποία μπορούν να χρησιμοποιήσουν διαφορετικά μόρια RNA σαν υπόστρωμα και να ανακυκλωθούν ή να χρησιμοποιήσουν τον εαυτό τους ως υπόστρωμα οπότε χρησιμοποιούνται μόνο μία φορά.

Όλα τα γνωστά ριβοένζυμα έχουν απαίτηση σε δισθενή κατιόντα ώστε να εμφανίσουν δραστηριότητα και κυρίως σε κατιόντα Mg^{2+} , ενώ για το λόγο αυτό θεωρούνται σαν μια καινούρια κατηγορία μεταλλοενζύμων (Pyle 1993). Έτσι, έχει προταθεί ένα γενικό μοντέλο μηχανισμού αντίδρασης στον οποίο συμμετέχουν δύο κατιόντα μετάλλου (two metal ion reaction mechanism). Το μοντέλο αυτό βασίζεται στο μηχανισμό αντίδρασης των πρωτεϊνικών μεταλλοενζύμων (Steitz και Steitz 1993). Ο ρόλος των δισθενών κατιόντων για τα μικρά ριβοένζυμα δεν είναι απόλυτα σαφής αλλά θεωρείται ότι είναι απαραίτητα για την κατάλυση.

4.2 Το ριβόσωμα είναι ριβοένζυμο

Όπως ήδη αναφέρθηκε, το καταλυτικό κέντρο της δραστηριότητας πεπτιδυλο-τρανσφεράσης, η οποία είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού κατά την βιοσύνθεση των πρωτεϊνών, σχηματίζεται από RNA που ανήκει στην μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα, και έτσι πλέον το ριβόσωμα θεωρείται ριβοένζυμο (Steitz και Moore 2003). Το ριβόσωμα θεωρείται ότι σχηματίστηκε την εποχή που επικρατούσαν τα RNA μόρια και αποτελούνταν αποκλειστικά από RNA, ενώ στη συνέχεια συνέβαλλε καθοριστικά στην εγκαθίδρυση των πρωτεϊνών στους μοριακούς μηχανισμούς των πρωτοκυττάρων. Η διαλεύκανση των λειτουργικών χαρακτηριστικών αυτού του σχηματισμού θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για την μοριακή φυλογένεση των συστατικών του κυττάρου.

5. RNase P

Η RNase P είναι μια πανταχού παρούσα ενδονουκλεάση, και σε πολλές περιπτώσεις αποτελεί ένα ριβοένζυμο, η οποία συμμετέχει στον μηχανισμό ωρίμανσης των πρόδρομων tRNAs. Η ριβονουκλεάση αυτή, είναι υπεύθυνη για την ωρίμανση του 5' άκρου των πρόδρομων μορίων tRNA. Η ωρίμανση αυτή επιτυγχάνεται με ενδονουκλεολυτική θραύση ενός μόνο φωσφοδιεστερικού δεσμού και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων με 3' υδροξυλικά και 5' φωσφορικά άκρα με την ταυτόχρονη απομάκρυνση της 5' επιπρόσθετης οδηγού αλληλουχίας, την οποία φέρουν τα πρόδρομα μόρια tRNA. Δραστικότητα RNase P, έχει παρατηρηθεί σε όλους τους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, με μοναδική εξαίρεση το αρχαίο *Nanoarchaeum equitans* (Randau et al 2008). Το ένζυμο αυτό έχει απομονωθεί από μια ευρεία κλίμακα οργανισμών, στους οποίους περιλαμβάνονται εκπρόσωποι και από τις τρεις φυλογενετικές περιοχές, δηλαδή βακτήρια, αρχαιοβακτήρια και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Έτσι, όλα τα κύτταρα και τα υποκυτταρικά οργανίδια στα οποία γίνεται σύνθεση πρόδρομων μορίων tRNA, αναμένεται να διαθέτουν δραστικότητα RNase P (Frank και Pace 1998).

Η μελέτη της RNase P παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον λόγω της σύστασής της. Η RNase P είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, αποτελείται από μια ριβονουκλεϊκή υπομονάδα και ποικίλο αριθμό πρωτεϊνικών υπομονάδων. Εξαίρεση στον κανόνα αυτό, αποτελεί η RNase P που προέρχεται από χλωροπλάστες σπανακιού, για την οποία δεν έχει ανιχνευθεί πρωτεϊνική υπομονάδα (Thomas et al. 2000), αλλά και η ανθρώπινη μιτοχονδριακή RNase P, που διαθέτει 3 πρωτεϊνικές υπομονάδες χωρίς ριβονουκλεϊκή υπομονάδα. (Holzmann et al. 2008), καθώς το ίδιο ισχύει και για τους χλωροπλάστες και τα πλαστίδια του φυτού *Arabidopsis thaliana* όπου έχει βρεθεί ότι η δραστικότητα της RNase P οφείλεται σε μία πρωτεϊνική υπομονάδα (Gobert 2010). Επιπροσθέτως, βρέθηκε ότι η RNA υπομονάδα του βακτηριακού ενζύμου παρουσιάζει καταλυτική δραστικότητα *in vitro*, απουσία της πρωτεϊνικής υπομονάδας, πρόκειται δηλαδή για ένα RNA ένζυμο ή ριβοένζυμο (Gurrier-Takada et al. 1983). Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι και η αντίστοιχη υπομονάδα από ορισμένα αρχαία εμφανίζει ενζυμική δραστικότητα *in vitro*, απουσία της πρωτεϊνικής υπομονάδας (Pannucci et al. 1999). Επίσης, παλαιότερη δημοσίευση από το εργαστήριο του Καθηγητή Δ. Δραΐνα αναφέρει ότι η RNase P από ευκαρυωτικό οργανισμό (*Dictyostelium discoideum*) διατηρεί την καταλυτική της δραστικότητα ύστερα από εξαντλητική αποπρωτεΐνωση του συμπλόκου της ριβονουκλεοπρωτεΐνης (Stathopoulos et al. 2001), παρέχοντας για πρώτη φορά ισχυρές ενδείξεις για ένα ευκαρυωτικό ριβοένζυμο. Η απόδειξη ήρθε πρόσφατα, με δημοσίευση, ότι η RNA υπομονάδα από την ανθρώπινη RNase P εμφανίζει καταλυτική δραστικότητα απουσία των πρωτεϊνικών της υπομονάδων (Kikowska et al. 2007).

Παρά όμως την ευρεία εξάπλωση του ενζύμου και το γεγονός ότι είναι απαραίτητο για τη βιωσιμότητα του κυττάρου, η RNase P εμφανίζει μεγάλες διαφορές στη σύσταση, τη δομή και τη λειτουργία ανάμεσα στους οργανισμούς διαφορετικής φυλογενετικής προέλευσης. Η

αναλογία πρωτεΐνης/RNA του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου, που εκφράζεται με την πυκνότητα επιπολής του ολοενζύμου, διαφέρει μεταξύ των εκπροσώπων των διαφορετικών φυλογενετικών περιοχών, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2. Η ποικιλομορφία αυτή ίσως είναι και η αιτία που ακόμα δεν έχει προσδιοριστεί ούτε η ακριβής δομή των υπομονάδων του ενζύμου αλλά ούτε και ο τρόπος αναγνώρισης του υποστρώματος καθώς επίσης και ο ακριβής μηχανισμός κατάλυσης του ενζύμου.

Τα ένζυμα RNase P από αρχαία και ευκαρυωτικούς οργανισμούς περιέχουν μεγαλύτερα ποσά πρωτεΐνης σε σχέση με το βακτηριακό ένζυμο, γεγονός που υποδεικνύει ότι η πρωτεϊνική υπομονάδα (ή υπομονάδες) αναλαμβάνει πιο περίπλοκες λειτουργίες σε σχέση με τα αντίστοιχα βακτηριακά μόρια. Εν τούτοις, πρόσφατες συγκριτικές μελέτες των RNA υπομονάδων από την RNase P έχουν δείξει ότι όλες οι RNA υπομονάδες περιέχουν έναν παρόμοιο δομικά πυρήνα, ο οποίος στα βακτήρια φιλοξενεί το κέντρο της καταλυτικής δραστηριότητας. Είναι λοιπόν πολύ πιθανό, ότι και στα ολοένζυμα στα οποία δεν έχει προσδιοριστεί η καταλυτική υπομονάδα, θα πρέπει ο μηχανισμός κατάλυσης να είναι παρόμοιος με αυτόν των βακτηρίων, να στηρίζεται δηλαδή στην υπομονάδα RNA (Frank και Pace 1998). Επομένως, η αποσαφήνιση του ακριβούς μηχανισμού δράσης των βακτηριακών RNA υπομονάδων θα δώσει, έμμεσα, πολύτιμες πληροφορίες και για το μηχανισμό δράσης των ολοενζύμων από τους άλλους οργανισμούς.

Οργανισμός	Πυκνότητα επιπολής	Ευαισθησία σε MN	Πρωτεϊνικές υπομονάδες	υπομονάδες RNA	Ενεργό ριβοένζυμο	Επιπλέον υποστρώματα
Βακτήρια						
<i>E. coli</i>	1.71 g/ml	+	14 kD	377 nt	+	4.5S, 10Sa RNA
<i>B. subtilis</i>	1.7	+	14 kD	401	+	Άγνωστο
Αρχαία						
<i>S. acidocaldarius</i>	1.27	-	+	315	-	Άγνωστο
<i>H. volcanii</i>	1.61	+	+	435	+	Άγνωστο
Ευκαρυωτικοί						
<i>S. pombe</i>	1.40	+	Τουλάχιστον (1)	285	-	Άγνωστο
<i>S. cerevisiae</i>	-	+	(9)	369	-	Άγνωστο
<i>X. laevis</i>	1.34	+	+	320	-	Άγνωστο
<i>H. sapiens</i>	1.28	+	(10)	340	+	Άγνωστο
<i>R. rattus</i>	1.36	-	+	+	-	Άγνωστο
<i>D. discoideum</i>	1.23	+	Τουλάχιστον (8)	+	(?)	Άγνωστο
Μιτοχόνδρια						
<i>S. cerevisiae</i>	1.28	+	105 kD	490	-	Άγνωστο
<i>H. sapiens</i> (HeLa)	-	+	+	+	-	Άγνωστο
Χλωροπλάστες						
Σπανάκι	1.28	-	+	-	-	Άγνωστο

Πίνακας 2. Βιοχημικά χαρακτηριστικά ενζύμων RNase P.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η RNase P είναι το μόνο γνωστό ριβοένζυμο στη φύση που δρα διαμοριακά (*in trans*), όπως οι κλασσικοί πρωτεϊνικοί καταλύτες, σε αντίθεση με

τα άλλα ριβοένζυμα τα οποία καταλύουν ενδομοριακές αντιδράσεις (*in cis*) (Hodgson et al. 1994). Τέλος, όπως και τα άλλα ριβοένζυμα έτσι και η RNase P απαιτεί την παρουσία δισθενών κατιόντων μετάλλων (κατά προτίμηση Mg^{2+}), τα οποία παίζουν τόσο δομικό όσο και λειτουργικό ρόλο.

5.1 Δομή της υπομονάδας RNA της RNase P

Η σύγκριση των πρωτοταγών δομών του RNA της RNase P από διαφορετικούς οργανισμούς, δίνει πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή του μορίου. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις RNA υπομονάδες έχουν προσδιοριστεί με τη χρήση δύο μεθόδων:

- 1) Σαρώσεις γονιδιωμάτων για παράγοντες που απαιτούνται στην ωρίμανση του pre-tRNA.
- 2) Υβριδοποίηση των μορίων RNA που απομονώνονται από υψηλής καθαρότητας δείγμα RNase P με DNA βιβλιοθήκες.

Εφόσον αναγνωριστούν οι αλληλουχίες των RNA υπομονάδων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση ομόλογων μορίων RNA από άλλους οργανισμούς, με μεθόδους υβριδοποίησης ή με εκλεκτική επέκταση χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR).

Η ταυτοποίηση μιας πιθανής RNA υπομονάδας πρέπει να επαληθευθεί με διάφορους τρόπους. Όσον αφορά στα βακτήρια, η επαλήθευση αυτή είναι εύκολη γιατί οι RNA υπομονάδες είναι καταλυτικά ενεργές απουσία πρωτεΐνης κι έτσι αρκεί η απλή δοκιμασία του μεταγράφου *in vitro* του υπό εξέταση κλώνου για ενζυμική δραστηριότητα. Απουσία όμως ενζυμικής δραστηριότητας από την RNA υπομονάδα, η ταυτοποίησή της αποτελεί πολύπλοκη διαδικασία. Η πρώτη ένδειξη ότι ένα μόριο RNA μπορεί να αποτελεί την RNA υπομονάδα της RNase P δίνεται με το αν το μόριο συνεκλύεται με την ενζυμική δραστηριότητα RNase P. Από μόνο του το στοιχείο αυτό, παρότι είναι ενθαρρυντικό, δεν αποτελεί την τελική απόδειξη ταυτοποίησης. Η ταυτοποίηση αυτού του μορίου RNA με την RNA υπομονάδα της RNase P βασίζεται σε ομοιότητες που παρουσιάζει η αλληλουχία του με αυτή άλλων απομονωμένων RNA υπομονάδων, διαδικασία η οποία μπορεί επίσης να αποδειχτεί δύσκολη, δεδομένης της μικρής ομολογίας αλληλουχιών που εμφανίζουν οι RNA υπομονάδες από τους διάφορους οργανισμούς που έχουν απομονωθεί (Frank και Pace 1998).

5.1.1 Δευτεροταγής δομή

Οι αλληλουχίες του RNA σχηματίζουν στη δευτεροταγή δομή τους έλικες μέσω ζευγαρώματος συμπληρωματικών βάσεων κατά Watson-Crick και επιπλέον αναπτύσσουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ελίκων για τον σχηματισμό της τριτοταγούς δομής τους. Τα λειτουργικά μόρια RNA σχηματίζουν συμπαγείς τρισδιάστατες δομές καθορισμένου σχήματος. Ως βασική μονάδα της αναδίπλωσης του RNA, δηλαδή της δευτεροταγούς δομής, μπορούν να οριστούν δύο ή περισσότερα ζευγάρια βάσεων κατά Watson-Crick ευθυγραμμισμένα σε αντιπαράλληλη έλικα. Η εξακρίβωση της δευτεροταγούς δομής της RNA υπομονάδας έχει

βασιστεί κυρίως σε συγκριτικές φυλογενετικές μελέτες, μέθοδος η οποία παραμένει η πιο αξιόπιστη για τον προσδιορισμό των μεγάλων μορίων RNA. Με αυτή τη μέθοδο η δομή εξάγεται ταυτοποιώντας συνδιαφοροποιήσεις ή συνεξαρτημένες αλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία ομόλογων μορίων RNA, μορίων δηλαδή με κοινή προέλευση και λειτουργία. Η αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στο γεγονός ότι εξελικτική αλλαγή σε μία βάση θα προκαλέσει μία ανάλογη αλλαγή σε άλλο τμήμα του μορίου έτσι ώστε να διατηρείται η λειτουργικώς ανώτερη δομή (Pace και Brown 1995). Έτσι, για παράδειγμα, ζεύγη βάσεων που υπάρχουν στη δευτεροταγή δομή ενός μορίου RNA διατηρούνται εξελικτικά με συνδυαστική αλλαγή στην πρωτοταγή του δομή. Επομένως, ευθυγραμμίζοντας (aligning) και συγκρίνοντας ομόλογες αλληλουχίες μορίων RNA είναι δυνατόν να εξαχθεί η δευτεροταγής δομή ενός μορίου RNA (Frank και Pace 1998).

Οι βακτηριακές υπομονάδες RNA είναι οι περισσότερο μελετημένες και αποτελούν το σύστημα από το οποίο έχουν προέλθει τα περισσότερα δεδομένα. Η δευτεροταγής δομή των βακτηριακών υπομονάδων RNA είναι καλά καθορισμένη και από τη σύγκριση των δομών των διαφόρων βακτηρίων έχουν προκύψει δύο κατηγορίες δομών: τη δομή τύπου A που βασίζεται στο M1 RNA από το *Escherichia coli* και αντιπροσωπεύει τις δομές από την πλειοψηφία των βακτηρίων, και τη δομή τύπου B που βασίζεται στην υπομονάδα από το *Bacillus subtilis* και αντιπροσωπεύει τις δευτεροταγείς δομές των RNA υπομονάδων από τα κατά Gram θετικά βακτήρια, χαμηλά σε ζεύγη G+C (εικόνα 3).

Επίσης, από τη σύγκριση των δευτεροταγών δομών των βακτηριακών υπομονάδων RNA προέκυψε μια φυλογενετικά ελάχιστη συντηρημένη δευτεροταγής δομή (minimal consensus), η οποία θεωρείται ότι διαθέτει τις ελάχιστες δομές που είναι απαραίτητες για την λειτουργικότητα του μορίου της RNA υπομονάδας της RNase P και επομένως αποτελεί τον δομικό πυρήνα του μορίου, ο οποίος είναι κοινός σε όλες τις βακτηριακές υπομονάδες RNA. Η δομή αυτή απεικονίζεται στην εικόνα 3 και έχει το μισό περίπου μέγεθος σε σχέση με το μέγεθος της τυπικής φυσικής υπομονάδας RNA του βακτηριακού ενζύμου (Frank και Pace 1998).

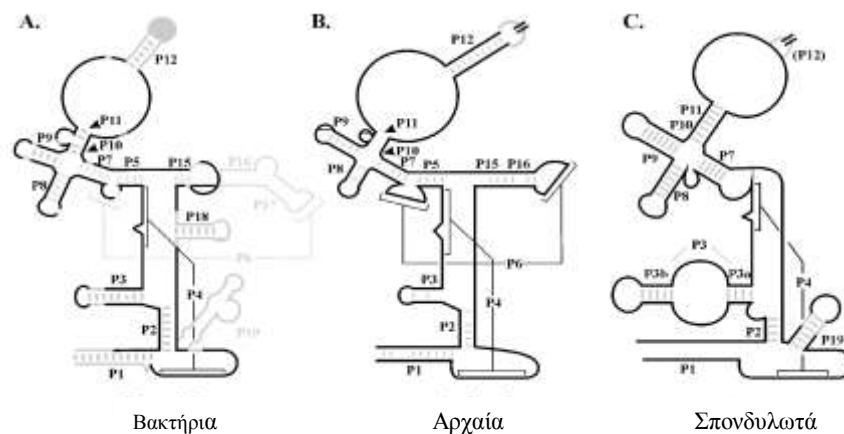


A Ελάχιστη συντηρημένη δομή **B**

Εικόνα 3. Δευτεροταγής δομή της βακτηριακής υπομονάδας RNA. A: Τύπος A, B: Τύπος B. Η ελάχιστη συντηρημένη δομή παρουσιάζεται στο κέντρο. Με κεφαλαία γράμματα αντιπροσωπεύονται τα απόλυτα συντηρημένα κατάλοιπα στα διάφορα είδη.

Οι υπομονάδες RNA από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη ποικιλομορφία, όσον αφορά την αλληλουχία, σε σχέση με την αντίστοιχη υπομονάδα από τα αρχαία και τα βακτήρια. Σύγκριση των αντίστοιχων δευτεροταγών δομών των υπομονάδων RNA της RNase P από τους οργανισμούς αυτούς, φανερώνει την ύπαρξη ενός δομικού πυρήνα που είναι συντηρημένος και στις τρεις φυλογενετικές περιοχές (εικόνα 4).

Παρόλα αυτά όμως, η δευτεροταγής δομή της υπομονάδας RNA από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς δεν έχει μέχρι σήμερα πλήρως διαλευκανθεί, ώστε να μπορούμε να εξάγουμε πιο ασφαλή συμπεράσματα για αυτόν τον φυλογενετικά συντηρημένο δομικό πυρήνα.



Εικόνα 4. Συντηρημένες δευτεροταγείς δομές RNA υπομονάδων της RNase P από τις τρεις φυλογενετικές περιοχές. Οι ευκαρυωτικοί εδώ, αντιπροσωπεύονται από τα σπονδυλωτά. Παρατηρούμε την έντονη ομοιότητα αλλά και τις διαφορές που είναι παρούσες.

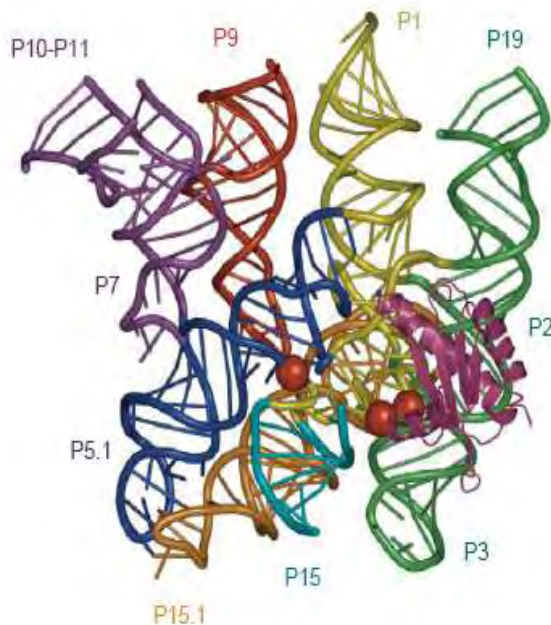
Το βασικό συμπέρασμα που εξάγεται όσον αφορά την ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της υπομονάδας RNA της RNase P από τους διάφορους οργανισμούς, είναι ότι όλες οι δομές συμπεριλαμβάνουν ένα κεντρικό συντηρημένο πυρήνα ο οποίος εμπλουτίζεται με συγκεκριμένα δομικά στοιχεία. Τέτοια είναι οι αποκλίσεις όσον αφορά το μήκος συγκεκριμένων αλληλουχιών, οι οποίες εκφράζονται στη δομή του μορίου με δύο κυρίως τρόπους: (α) με προεκτάσεις των ελίκων ή (β) με προσθήκη ή αφαίρεση ολόκληρων ελίκων. Τα μεταβλητά αυτά δομικά στοιχεία, ενώ δεν είναι απαραίτητα για την ενζυμική δραστηριότητα, είναι σημαντικά για την διατήρηση της ανώτερης δομής της υπομονάδας RNA, δομή η οποία είναι και η υπεύθυνη για την ενζυμική δραστηριότητα.

5.1.2 Τριτοταγής δομή

Το συμπέρασμα από τη μελέτη της πρωτοταγούς και της δευτεροταγούς δομής της υπομονάδας RNA της RNase P από τους διάφορους οργανισμούς είναι ότι παρουσιάζουν

ομολογία στις ανώτερες δομές, δευτεροταγείς και τριτοταγείς, και όχι στην πρωτοταγή. Η καταλυτική ικανότητα της RNA υπομονάδας αποδίδεται σε συγκεκριμένες διαμορφώσεις και προσανατολισμούς που υιοθετεί στο χώρο. Αποσαφήνιση, συνεπώς, της τριτοταγούς της δομής, θα δώσει πολλές πληροφορίες όσον αφορά τον τρόπο αναγνώρισης των υποστρωμάτων, καθώς και το μηχανισμό της αντίδρασης.

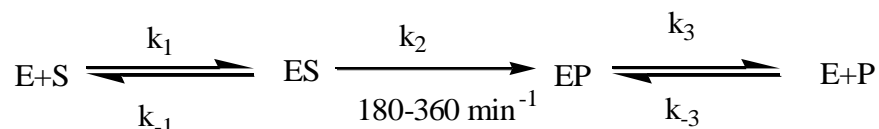
Η αποκάλυψη της τριτοταγούς δομής του RNA των RNase P βασίστηκε αρχικά σε φυλογενετικές συγκρίσεις και σε πειράματα αποτύπωσης (footprinting) (Tsai 2003 και Brown 1996). Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφικές μεθόδους η περιοχή εξειδίκευσης της δομής της RNA υπομονάδας τύπου B (Krasilnikov 2003). Μόλις το 2006 προσδιορίστηκαν με κρυσταλλογραφία RNA υπομονάδες και από άλλα βακτήρια (εικόνα 5) (Torres-Larios 2006).



Εικόνα 5: Τριτοταγής δομή ενός υβριδικού βακτηριακού ολοενζύμου. Η RNA υπομονάδα προέρχεται από την RNase P του *Bacillus stearotherophilus* και η πρωτεϊνική από αυτή του *B. subtilis*. Οι κόκκινες σφαίρες δείχνουν τα σημεία πρόσδεσης του tRNA.

5.1.3 Μηχανισμός της αντίδρασης

Η αντίδραση που καταλύεται από την βακτηριακή RNase P, αποτελείται από τρία βασικά στάδια: (α) πρόσδεση του υποστρώματος, (β) θραύση του φωσφοδιεστερικού δεσμού και (γ) απελευθέρωση των προϊόντων (εξίσωση 1).



(1)

Οι σταθερές ταχύτητας των επιμέρους βημάτων της αντίδρασης έχουν υπολογιστεί για τα ριβοένζυμα από την *E. coli*, *B. subtilis*, και *Thermus thermophilus* (Frank και Pace 1998). Η ταχύτητα της αντίδρασης καθορίζεται από την ταχύτητα απελευθέρωσης του προϊόντος ($k_{cat}=k_3$). Κινητικές μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν ξεχωριστές θέσεις δέσμευσης του υποστρώματος και του προϊόντος πάνω στο M1 RNA (Altman et al. 1993).

5.1.4 Ο ρόλος των δισθενών κατιόντων μετάλλων

Έχει αναφερθεί παραπάνω ότι η RNase P έχει απόλυτη εξάρτηση σε παρουσία δισθενών κατιόντων μετάλλων (κατά προτίμηση Mg^{2+}) για δραστικότητα. Ο ρόλος των κατιόντων είναι τόσο δομικός, όσο και λειτουργικός (Vourekas et al. 2008).

Τα δισθενή κατιόντα μετάλλων παίζουν ρόλο στην αναδίπλωση της υπομονάδας RNA στο χώρο και στη διατήρηση της ενεργούς διαμόρφωσης της. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι τουλάχιστον τρία ιόντα Mg^{2+} συμμετέχουν στη διαμόρφωση της υπομονάδας RNA από το *B. subtilis* (Pan et al. 1995).

Εκτός από το δομικό τους ρόλο, τα δισθενή κατιόντα μετάλλων, είναι απολύτως απαραίτητα και για την ενζυμική δραστικότητα. Η απαίτηση αυτή είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό όλων των ριβοενζύμων και για το λόγο αυτό έχουν χαρακτηριστεί ως μια ξεχωριστή ομάδα μεταλλοενζύμων. Τα δισθενή κατιόντα και κατά προτίμηση τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}), βοηθούν στην αποτελεσματική πρόσδεση του υποστρώματος με την υπομονάδα RNA (Smith 1993) και συμβάλλουν καθοριστικά στη σωστή διαμόρφωση του ριβοενζύμου για την καταλυτική του δράση (Frank και Pace 1998). Τα κατιόντα Mg^{2+} μπορούν όμως να αντικατασταθούν και από άλλα δισθενή κατιόντα, όπως τα κατιόντα Mn^{2+} , με μικρή ελάττωση της απόδοσης της ενζυμικής δραστικότητας και τα κατιόντα Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} (Smith και Pace 1993, Tekos et al. 1998).

5.1.5. Αναγνώριση του υποστρώματος–επιλογή της θέσης θραύσης

Η RNase P δεν αναγνωρίζει συγκεκριμένες αλληλουχίες στα υποστρώματά της. Από μελέτες της RNase P από *E. coli* συμπεραίνεται εντούτοις ότι το ένζυμο διατηρεί γενικές προτιμήσεις για κάποια νουκλεοτίδια στην ελάχιστη περιοχή αναγνώρισης. Αναμενόμενο είναι ότι οι προτιμήσεις αυτές αντανakλούν την σύνθεση των μορίων tRNA που συναντάται στην φύση. Για παράδειγμα, η μεγάλη πλειοψηφία των ώριμων μορίων tRNA έχει μια γουανίνη (G) στο 5' άκρο, υψηλή περιεκτικότητα σε G-C στον βραχίονα υποδοχής, μια ουρακίλη (U) στην θέση 8 και μια 3' τερματική -CCA αλληλουχία. Υπάρχουν επίσης δεδομένα που υποδηλώνουν ότι η γουανίνη στη θέση -2 της 5' επιπρόσθετης οδηγού αλληλουχίας επηρεάζει τόσο την απόδοση της αντίδρασης, όσο και την επιλογή της θέσης θραύσης (Kirsebom και Svard 1993). Η απόδοση της αντίδρασης της RNase P συχνά ελαττώνεται δραματικά αν αλλάξει κάποιο από

τα συντηρημένα αυτά στοιχεία των υποστρώματων. Άλλωστε λανθασμένη θέση θραύσης εμφανίζεται με την αλλαγή της γουανινης στη θέση 1 ή με καταστροφή των ζευγών βάσεων κοντά στον βραχίονα υποδοχής.

Ιδιαίτερη σημασία στην δημιουργία του συμπλόκου ενζύμου υποστρώματος έχει δειχθεί ότι έχει η αλληλουχία 3'-CCA. Αφαίρεση ή μετάλλαξη της αλληλουχίας αυτής οδηγεί σε αύξηση της τιμής της σταθεράς K_m . Η ελάττωση όμως αυτής της συγγένειας ως προς το υπόστρωμα, που προκαλείται από την απουσία της 3' CCA αλληλουχίας, αναστρέφεται παρουσία της πρωτεϊνικής υπομονάδας του ενζύμου (Hardt et al. 1995).

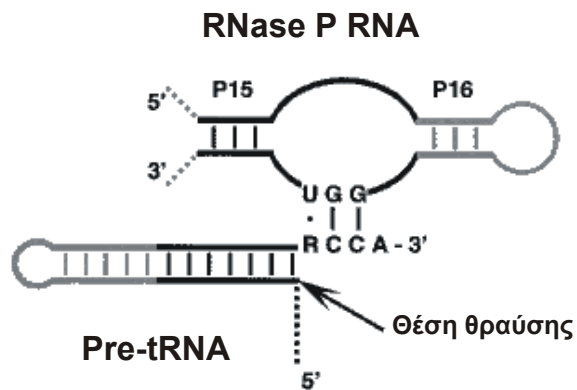
Η αλληλεπίδραση του ριβοενζύμου με το υπόστρωμα θεωρείται ότι γίνεται μέσω σχηματισμού τριών ζευγών βάσεων Watson-Crick, μεταξύ των βάσεων CC του 3' άκρου καθώς και της βάσης διαλογέα (discriminator base) που είναι συνήθως πουρίνη και βρίσκεται ακριβώς πριν το 3' CCA άκρο των πρόδρομων μορίων tRNA και της αλληλουχίας 5'-GGU-3' της υπομονάδας RNA της RNase P της περιοχής J16/15 (εικόνα 6) (Easterwood και Harvey 1997).

Το ερώτημα αν η δραστηριότητα των μη βακτηριακών RNase P επηρεάζεται από την 3'-CCA δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί. Εντούτοις, η RNA υπομονάδα των ευκαρυωτικών RNase P δεν διαθέτει την περιοχή που είναι ομόλογη με την περιοχή της βακτηριακής RNase P στην οποία προσδένεται το 3'-CCA άκρο. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η ευκαρυωτική RNase P δεν αναγνωρίζει το 3'-CCA άκρο, είτε ότι άλλες περιοχές του RNA έχουν αναλάβει το ρόλο αυτό.

Αρκετά αποτελέσματα δείχνουν επίσης ότι η 5' οδηγός αλληλουχία δεν παίζει σημαντικό ρόλο της διαδικασίας αναγνώρισης υποστρώματος. Υποστρώματα με τεχνητά 5' άκρα που ποικίλουν σε μέγεθος από ένα έως πολλά νουκλεοτίδια έχουν δοκιμαστεί και το ένζυμο τα επεξεργάζεται επαρκώς. Άλλωστε το ώριμο μόριο tRNA είναι ένας ικανός ανταγωνιστικός αναστολέας της αντίδρασης κάτι που σημαίνει ότι το 5' άκρο δεν συνεισφέρει ουσιαστικά στην πρόσδεση υποστρώματος.

Το αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων αυτών μεταξύ του ριβοενζύμου και του υποστρώματος είναι η έκθεση της θέσης θραύσης και σωστή τοποθέτηση του φωσφοδιεστερικού δεσμού που πρόκειται να διασπαστεί, στο ενεργό κέντρο του ριβοενζύμου. Η υπομονάδα RNA της RNase P θα πρέπει να αναδιπλώνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε να δημιουργεί μια κοιλότητα μέσα στην οποία εναποτίθενται τα στοιχεία αυτά του υποστρώματος, δηλαδή ο βραχίονας υποδοχής, η θηλιά και ο βραχίονας T.

Όσον αφορά την επιλογή της σωστής θέσης θραύσης, έχει προταθεί ένας μηχανισμός αρίθμησης (measuring device) με βάση τον οποίο η RNase P επιλέγει το σημείο θραύσης το οποίο βρίσκεται σε συγκεκριμένη απόσταση σε σχέση με ορισμένες δομικές περιοχές πάνω στο μόριο του tRNA (εικόνα 6). Οι περιοχές αυτές είναι το μήκος του βραχίονα υποδοχής (συνήθως 7 ζεύγη βάσεων), ο βραχίονας και η θηλιά T. Το ένζυμο φαίνεται ότι μετράει την απόσταση μεταξύ του βραχίονα T και της θέσης θραύσης, η οποία έχει σχεδόν πάντοτε απόσταση 12 ζευγών βάσεων (Svard και Kirsebom 1993).

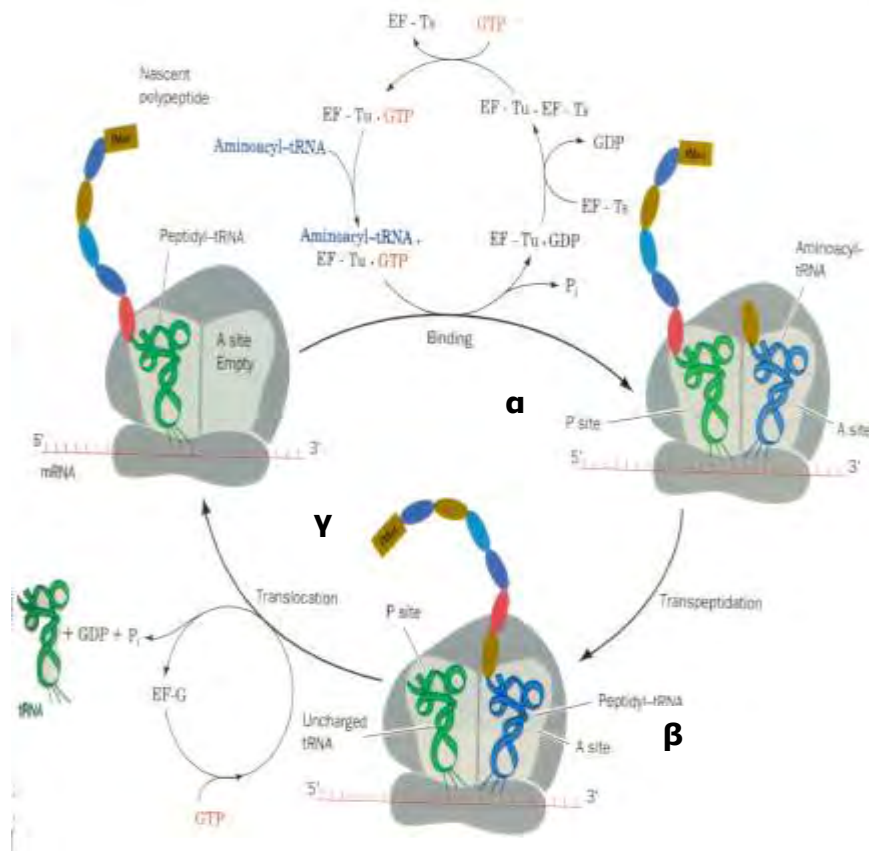


Εικόνα 6. Πρόσδεση του 3' RCCA άκρου του υποστρώματος πάνω στην RNA υπομονάδα της RNase P.

6. Αντιβιοτικά

Ως αντιβιοτικά ορίζονται τα χαμηλού μοριακού βάρους προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού μικροοργανισμών, τα οποία σε μικρές συγκεντρώσεις (<200μg/ml), αναστέλλουν την ανάπτυξη ή εξοντώνουν άλλους μικροοργανισμούς. Τα διάφορα αντιβιοτικά διαφέρουν σημαντικά στις φυσικές, χημικές και φαρμακολογικές τους ιδιότητες, στο αντιμικροβιακό φάσμα και στους μηχανισμούς δράσης. Με την παραγωγή ημισυνθετικών παραγώγων, ο όρος "αντιβιοτικό" έχει σήμερα αντικατασταθεί από τον περιεκτικότερο όρο "αντιμικροβιακό" που περιλαμβάνει φυσικές, ημισυνθετικές ή συνθετικές ουσίες, ικανές να αναστέλλουν το πολλαπλασιασμό των μικροβίων και να τα καταστρέφουν. Τα περισσότερα από αυτά έχουν σαν στόχο το προκαρυωτικό ριβόσωμα και αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση σε διάφορα στάδια (Sprahn και Prescott 1996). Έχει βρεθεί ότι τα αντιβιοτικά δρουν με τους εξής τρόπους: (α) εμποδίζοντας την πρόσδεση του τριμερούς συμπλόκου (ternary complex) στην A θέση του ριβοσώματος (Gale et al 1981, Hausner et al 1988), (β) αλληλεπιδρώντας με την πεπτιδυλοτρανσφεράση αναστέλλοντας την ενζυμική της δραστηριότητα (Gale et al. 1981, Vazquez 1979) και (γ) αναστέλλοντας την μετατόπιση (translocation) (Hausner et al. 1988) (εικόνα 7). Τα περισσότερα αντιβιοτικά που έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο RNA έχουν σαν στόχο το ριβοσωμικό RNA (Sprahn και Prescott 1996, Moazed και Noller 1987). Κινητικές μελέτες, καθώς και μελέτες δέσμευσης των αντιβιοτικών με τα ριβοσώματα, επέτρεψαν τον προσδιορισμό σπουδαίων λειτουργικών θέσεων πάνω στο ριβοσωμικό RNA. Για παράδειγμα, πολλά αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πεπτιδυλοτρανσφεράση αποδείχθηκαν πολύ χρήσιμα εργαλεία για το χαρακτηρισμό νουκλεοτιδίων που εντοπίζονται στο καταλυτικό κέντρο του ριβοσώματος (Gale et al. 1981, Vazquez 1979). Ενώ θεωρούνταν ότι οι ενώσεις αυτές δρουν αποκλειστικά στο ριβόσωμα, πρόσφατα βρέθηκε ότι μερικά από αυτά, επηρεάζουν τη δράση και άλλων μορίων RNA, όπως τα αυτοματιζόμενα ιντρόνια της ομάδας I (von Ahlsen

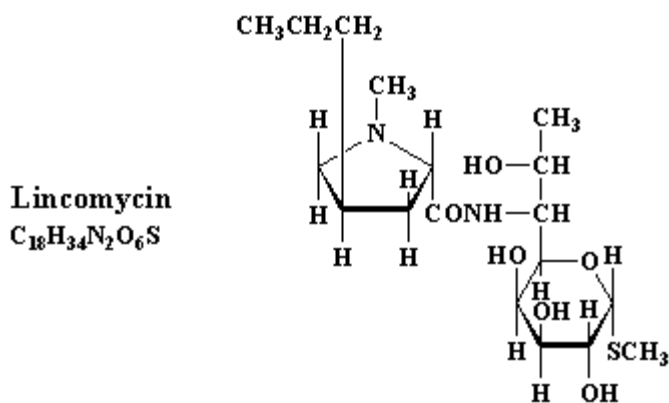
et al. 1991), το σφυροκέφαλο ριβοένζυμο (Stage et al. 1995), το ριβοένζυμο του ιού της ηπατίτιδας δ (Rogers et al. 1996), το RNA του ιού HIV (Zapp et al. 1993) αλλά και του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου της RNase P (Tekos et al. 2004).



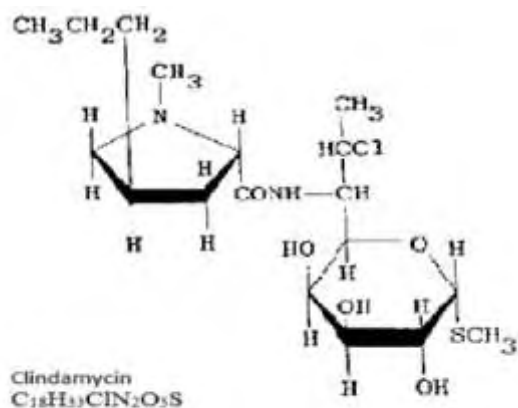
Εικόνα 7. Τα σημεία στο στάδιο της επιμήκυνσης όπου μπορούν να δράσουν τα αντιβιοτικά.

6.1 Λινκοσαμίδες

Οι λινκοσαμίδες αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση στο βακτηριακό κύτταρο μέσω πρόσδεσής τους στο 23S rRNA της 50S υπομονάδας του βακτηριακού ριβοσώματος (Tenson et al. 2003). Πρώτη ανακαλύφθηκε η λινκομυκίνη (εικόνα 8), που απομονώθηκε το 1962 από τον στρεπτομύκητα *Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis*. Η κλινδαμυκίνη (εικόνα 9) αναπτύχθηκε αργότερα ύστερα από τροποποίηση του μορίου της λινκομυκίνης. Χημικώς οι λινκοσαμίδες είναι παράγωγα ενός αμινοξέος και ενός μονοσακχαρίτου (οκτόζης) που περιέχει θείο. Για τη σταθεροποίησή τους χρησιμοποιούνται συνήθως υπό μορφή υδροχλωρικού άλατος.



Εικόνα 8. Δομή της λινκοσαμίδης λινκομυκίνη.



Εικόνα 9. Δομή της λινκοσαμίδης κλινδαμυκίνη.

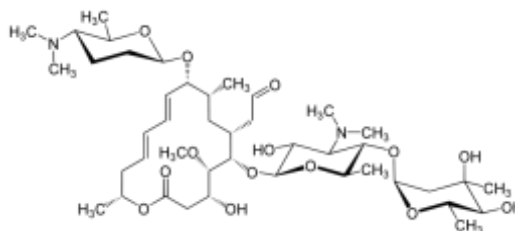
Η μελέτη της επίδρασης των αναστολέων της πεπτιδυλοτρανσφεράσης στη δραστικότητα της RNase P έχει προσφέρει πολύτιμα στοιχεία για τη δομή και τη λειτουργία του ενζύμου αυτού. Στα πλαίσια της μελέτης αυτής εκπονήθηκε η παρούσα εργασία με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της λινκοσαμίδης κλινδαμυκίνη στη δραστηρότητα της βακτηριακής RNase P αλλά και της RNA υπομονάδας της βακτηριακής RNase P (M1 RNA). Επίσης δοκιμάζεται πιθανή προσθετική δράση της κλινδαμυκίνης με το μακρολίδιο σπιραμυκίνη με δεδομένο πως η σπιραμυκίνη ενεργοποιεί την βακτηριακή RNase P (Toumpeki et al. 2008).

6.2 Μακρολίδια

Τα μακρολίδια αναστέλλουν τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση μέσω πρόσδεσης στην 50S ριβοσωμική υπομονάδα, και συγκεκριμένα στην περιοχή V του 23S rRNA, προκαλώντας πρόωρη αποσύνδεση του πεπτιδίου κατά τη διάρκεια της μετάφρασης. Τα μακρολίδια αναστέλλουν επιλεκτικά τη βακτηριακή πεπτιδυλοτρανσφεράση ενώ δεν επηρεάζουν την πρωτεϊνοσύνθεση των ευκαρυωτικών οργανισμών. Η δράση είναι κυρίως βακτηριοστατική αλλά μπορεί να είναι και βακτηριοκτόνος σε υψηλές συγκεντρώσεις. Τα μακρολίδια τείνουν να συσσωρεύονται στο εσωτερικό των λευκοκυττάρων, και γι' αυτό μεταφέρονται στο σημείο της λοίμωξης. Έχουν εισαχθεί στην κλινική εφαρμογή εδώ και περίπου 50 χρόνια.

Η σπιραμυκίνη (εικόνα 10) είναι ένα μακρολίδιο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της τοξοπλάσμωσης. Η σπιραμυκίνη προσδένεται σε ένα στενό σημείο (narrow part) του καναλιού εξόδου του πεπτιδίου σε μια περιοχή που εκτείνεται μεταξύ του κέντρου της πεπτιδυλοτρανσφεράσης και της περίσφιξης του καναλιού κοντά στις πρωτεΐνες L4 και L22 και με αυτόν τον τρόπο κλείνει τον αυλό του καναλιού (Hansen et al. 2002).

Εικόνα 10. Δομή σπιραμυκίνης.



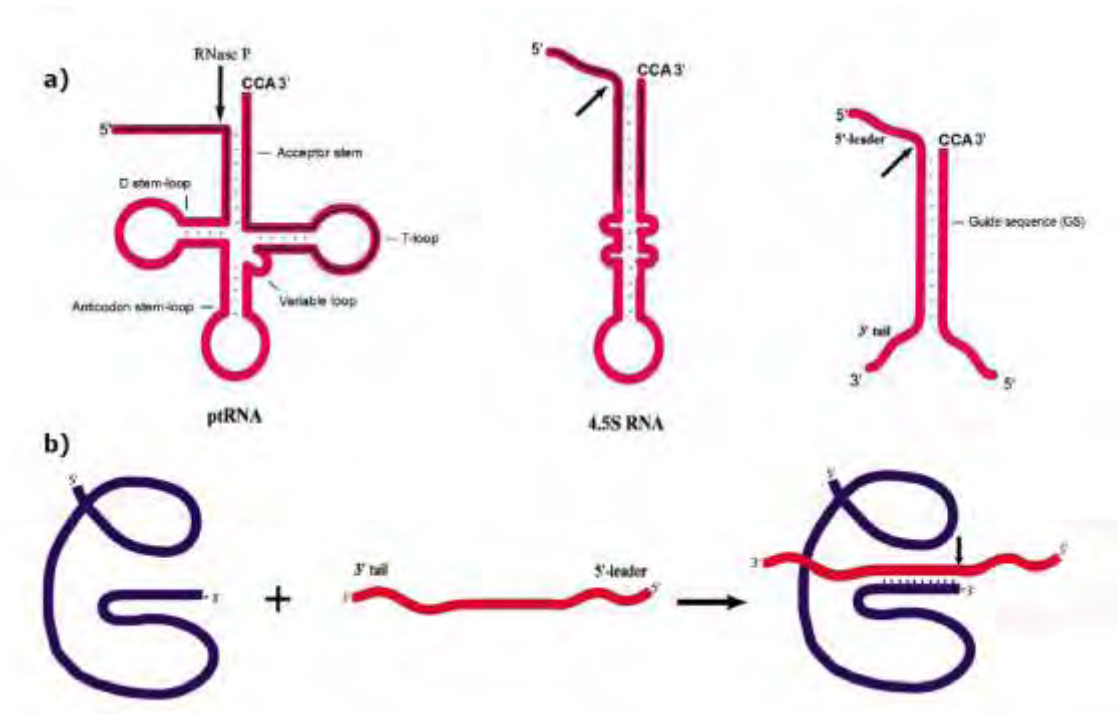
7. Θεραπευτικές εφαρμογές της RNase P

Τα χαρακτηριστικά της RNase P σχετικά με την αναγνώριση και την θραύση ποικίλων υποστρωμάτων, έδωσε την ιδέα να χρησιμοποιηθεί η ενδονουκλεοτική δραστηριότητα του ριβοενζύμου σε θεραπευτικές προσεγγίσεις *in vivo*, δηλαδή να στοχεύει και να θραύει παθολόνα RNA μόρια. Αποδείχθηκε ότι η σχεδίαση ριβοενζύμων βασισμένων στο RNA της RNase P που έχουν κάποιον στόχο, μπορεί να οδηγήσει στη σύνθεση ενεργών θεραπευτικών εργαλείων. Τα σχεδιασμένα μόρια μπορούν να αναγνωρίζουν παθολόνα mRNA και ιϊκά RNA, δρώντας πριν το σχηματισμό των λειτουργικών πρωτεϊνών. Με τον τρόπο αυτόν δημιουργήθηκε ένα νέο είδος γονιδιακής θεραπείας.

Η κεντρική ιδέα είναι η χρήση μιας οδηγού αλληλουχίας συμπληρωματική προς το μόριο στόχο. Η υβριδοποίηση των δύο μορίων έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας δομής που διαθέτει δομικές ομοιότητες με τα φυσικά υποστρώματα της RNase P (εικόνα 11.α), με αποτέλεσμα η δομή να αναγνωρίζεται από το ένζυμο και να θραύεται η αλληλουχία στόχος. Έτσι, ακολουθούνται δύο στρατηγικές:

α. Χορηγείται μια εξωτερική οδηγός αλληλουχία (external guide sequence, EGS) συμπληρωματική προς το μόριο στόχο, και η δομή που σχηματίζεται, θραύεται από την ενδογενή δραστηριότητα RNase P (Yuan και Altman 1994) (εικόνα 11.α).

β. Χρησιμοποιείται η καταλυτική υπομονάδα της RNase P από το *E. coli* (M1 RNA) σε συνδυασμό με την οδηγό αλληλουχία σε ένα χιμαιρικό μόριο. Η εσωτερική πλέον οδηγός αλληλουχία (internal guide sequence, IGS) συμπληρωματική προς τον RNA-στόχο, συνδέεται ομοιοπολικά στο M1 RNA (M1-GS) (εικόνα 11.β).



Εικόνα 11. Σχεδιασμός θεραπευτικών προσεγγίσεων με βάση την RNase P.

A) Αναπαράσταση των φυσικών υποστρωμάτων (pre-tRNA και 4.5s RNA, με μαύρο επισημαίνονται οι ελάχιστες δομικές για την αναγνώριση και κατάλυση) και ενός ελαχιστοποιημένου τεχνητού υποστρώματος (EGS: mRNA) της RNase P και του M1 RNA. Το σημείο θραύσης υποδεικνύεται με βέλος.

B) Αναπαράσταση του χιμαιρικού M1GS RNA (μπλέ χρώμα) και της πρόσδεσής του στην αλληλουχία στόχο (κόκκινο χρώμα).

8. ΣΚΟΠΟΣ:

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εκτιμηθεί η επίδραση της κλινδαμυκίνης στην ενζυμική δραστηριότητα του ολοενζύμου της βακτηριακής RNase P αλλά και της RNA υπομονάδας της βακτηριακής RNase P (M1 RNA). Επίσης δοκιμάστηκε πιθανή προσθετική δράση της κλινδαμυκίνης με το μακρολίδιο σπιραμυκίνη.

Υλικά και Μέθοδοι

9.Υλικά:

9.1. Γενικά

- Αγαρόζη από SERVA
- Αμπικιλίνη από SERVA
- Αιθανόλη από MERCK
- Αιθυλένοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) από SERVA
- Ακρυλαμίδιο από SERVA
- [α -³²P] GTP από NEN και RURKIN-ELMER
- β -μερκαπτοαιθανόλη από SERVA
- Βενζαμιδίνη από SERVA
- Βορικό οξύ από MERCK
- Βρωμιούχο αιθίδιο από SIGMA
- Bacto peptone από DIFCO
- Bradford Reagent από BIORAD
- Bromophenol Blue από SERVA
- Coomassie Brilliant Blue R250 από SIGMA
- Γλυκερόλη από SDS
- Γλυκίνη από SERVA
- Γλυκόζη από SDS
- Διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης από SERVA
- Δις-ακρυλαμίδιο από SERVA
- Διθειοθρεϊτόλη (DTT) από SERVA
- Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) από SERVA
- EDTA από SERVA
- EGTA από SERVA
- HCl από SDS
- Ιμιδαζόλιο από ALDRICH
- Ισοπροπανόλη από SERVA
- Ισοπροπυλ-1-θειο- β -D-γαλακτοπυρανοσίσιο (IPTG) από SERVA
- $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ από MERCK
- KH_2PO_4 από MERCK
- KOH από MERCK
- KCl από MERCK
- Κλινδομυκίνη από MERK

- Κυανούν του ξυλενίου από SERVA
- Μάρτυρας πρότυπων μοριακών βαρών πρωτεϊνών SeeBlue Pre-Stained Standard από INVITROGEN
- Μεμβράνες διαπίδυσης από SERVA
- MgCl₂ από SIGMA
- Na₂HPO₄ × 2H₂O από MERCK
- NaCl από MERCK
- NaOH από MERCK
- NH₄Cl από MERCK
- NH₄OAc από MERCK
- Νουκλεοτίδια (NTPs) από PROMEGA
- N-N'τετραμεθύλενο διαμίνη (TEMED) από SERVA
- Νικελίου νιτριλοτριοξικού οξέος αγαρόζη (Ni nitrilotriacetic acid [Ni-NTA] Agarose) από QIAGEN
- Οξικό οξύ από SDS
- Ουρία από SERVA
- Πολυαιθυλένο-γλυκόλη (PEG-20000) από SERVA
- Πουρομυκίνη από SIGMA
- Σπιραμυκίνη από MERK
- Pepstatin από SERVA
- Peptone from meat από SERVA
- PMSF (Φθοριούχο φαίνυλ-μέθυλ-σουλφονικό οξύ) από SIGMA
- Sephadex G-50, Mini Quick Spin RNA columns από Roche
- SDS από SIGMA
- Τετρακυκλίνη από SIGMA
- Τρις-υδροξυ-μεθυλ-άμινο-μεθάνιο (Tris) από MERCK
- Tween 20 από SERVA
- Υπερθειικό αμμώνιο (APS) από SERVA
- Φαινόλη από SERVA
- Φιλμ αυτοραδιογραφίας από KODAK και FUJI
- Φορμαμίδιο από SDS
- Φίλτρα αποστείρωσης από MILLIPORE

9.2 Ένζυμα:

- BamHI ενδονουκλεάση περιορισμού από PROMEGA

- BsaAI ενδονουκλεάση περιορισμού από PROMEGA
- Fok I ενδονουκλεάση περιορισμού από PROMEGA
- Λυσοζύμη από QIAGEN
- RQI DNase από TAKARA
- RNasin από PROMEGA
- T7 RNA πολυμεράση από TAKARA

9.3 Βακτηριακά στελέχη:

XL1-Blue MRF^r [γονότυπος: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44$
thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F^r *proAB lac1qZΔM15 Tn10* (Tet^r)]

9.4 Κιτ:

Nucleospin Plasmid DNA Mini Prep από Macherey Nagel

10. Μέθοδοι:

10.1 Σύνθεση του M1 RNA *in vitro*

10.1.1 Γραμμοποίηση πλασμιδίου.

Το πλασμίδιο pDW98 περιέχει το γονίδιο *mpB* που κωδικοποιεί το M1 RNA και φέρει ανοδικά του γονιδίου την αλληλουχία του προαγωγέα (promoter) της T7 RNA πολυμεράσης. Η γραμμοποίηση του πλασμιδίου επιτυγχάνεται με το ένζυμο περιορισμού BsaA I. Η θέση περιορισμού του παραπάνω ενζύμου βρίσκεται στο 3' άκρο του γονιδίου του M1 RNA. Έτσι, η μεταγραφή του γραμμοποιημένου πλασμιδίου τερματίζεται στη θέση αυτή αφού η T7 πολυμεράση συναντά το φυσικό τέλος του γονιδίου (run off transcription).

Το μίγμα της **αντίδρασης γραμμοποίησης** περιλαμβάνει:

Ρυθμιστικό διάλυμα NEBuffer 3 (10x)	10 μ L
Πλασμίδιο pDW98	30 μ L
Ενδονουκλεάση περιορισμού BsaA I	5 μ L
dd H ₂ O	55 μ L

Το μίγμα επωάζεται για 120 min στους 37°C. Ακολουθεί εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλης και κατακρήμνιση με 2,5 όγκους αιθανόλη (610 μ L) παρουσία 1/10 του όγκου NaOAc 3 M, pH=5,2 (27 μ L) για 15-20 min στους 0-4 °C. Το γραμμοποιημένο πλασμίδιο επανακτάται σε ίζημα μετά από φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο για 30 min στους 4 °C. Τα ίχνη αιθανόλης απομακρύνονται με φυγοκέντρηση υπό κενό (speed vacuum dryer) και το ίζημα αφού επαναδιαλυθεί σε 25 μ L αποστειρωμένο ddH₂O, φυλάσσεται στους -20 °C. 1 μ L του γραμμοποιημένου πλασμιδίου αναμειγνύεται με 4 μ L διαλύματος χρωστικών (6x) και ηλεκτροφορεύεται σε πήγμα αγαρόζης 1 %, που περιέχει 0,5 μ g/mL βρωμιούχο αιθίδιο. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (1x). Οι ζώνες που πιστοποιούν τη γραμμοποίηση του πλασμιδίου γίνονται ορατές σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Αντιδραστήρια: BsaA I (5 u/ μ L), Πλασμίδιο pDW98 (0,5 mg/mL), 3 M NaOAc (pH=5,2), Διάλυμα φαινόλης (pH=8,0)

Ρυθμιστικό διάλυμα NEBuffer 3 (New England Biolabs): 50 mM Tris-HCl, (pH=7,9), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT.

Διάλυμα χρωστικών (6x): 30% v/v γλυκερόλη, 0,25% w/v κυανούν του ξυλενίου, 0,25% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 5 mM EDTA.

Πήγμα αγαρόζης: Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10x), 1% αγαρόζη.

Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10x): 1 M Tris-HCl, 0,5 M Βορικό οξύ, 25 mM EDTA.

10.1.2 Μεταγραφή του γονιδίου του M1 RNA *in vitro*.

Η μεταγραφή του γονιδίου του M1 RNA *in vitro* πραγματοποιείται σύμφωνα με τη μέθοδο που έχει περιγραφεί από τον Milligan et al. (1987).

Προκειμένου να συνθέσουμε το M1 RNA η προσθήκη των αντιδραστηρίων στο μίγμα της αντίδρασης (100 μ l) γίνεται στους 25 °C με την εξής σειρά:

Ρυθμιστικό διάλυμα T7 RNA πολυμεράσης (10x) (TAKARA)	10 μ L
50 mM DTT	20 μ L
RNasin (40 u/ μ L)	2 μ L
Μίγμα rATP, rCTP, rUTP, rGTP (10 mM each)	15 μ L
Γραμμικό πλασμίδιο pDW98 (200 ng/ μ L)	5 μ L
T7 RNA πολυμεράση (20 u/ μ L)	3 μ L

Το μίγμα επωάζεται όλη νύχτα στους 37 °C. Ακολούθως προστίθενται 5 μ L DNase I και το μίγμα επωάζεται για ακόμη 20 min. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 10 μ L EDTA 200 mM και στη συνέχεια πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη (phenol extraction), ώστε να απομακρυνθούν τα πρωτεϊνικά μόρια της παραπάνω αντίδρασης. Προστίθεται ίσος όγκος (115 μ L) διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1 v/v/v) και ακολουθεί έντονη ανάδευση για 30 sec και φυγοκέντρηση για 5 min. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε ένα νέο σωλήνα και ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1 v/v) και ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση όπως παραπάνω. Στο στάδιο αυτό απομακρύνονται σταγονίδια φαινόλης που ίσως μεταφέρθηκαν με την υδατική φάση κατά το προηγούμενο βήμα. Η υδατική φάση στη συνέχεια υπόκειται σε κατακρήμνιση με αιθανόλη, για να κατακρημνιστούν τα μόρια νουκλεϊκού οξέος, άρα και το M1 RNA. Έτσι, στην υδατική φάση προστίθενται 2,5 όγκοι απόλυτης αιθανόλης παρουσία 1/10 του όγκου 3 M NaOAc (pH=5,2) και το δείγμα τοποθετείται στους -70°C για 45 min, οπότε και πραγματοποιείται η κατακρήμνιση. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται για 30 min στους 4°C. Το ίζημα ξεπλένεται με 1 mL EtOH 70% και φυγοκεντρείται πάλι για 15 min στους 4 °C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιαλύεται σε 100 μ L H₂O.

Ο καθαρισμός του M1 RNA γίνεται με στήλη G-50 Sephadex (Roche) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του M1 RNA γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm (1 OD αντιστοιχεί σε 2688 nmoles/mL, ή 40 μ g RNA). Ο ακριβής υπολογισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων μπορεί επίσης να επιτευχθεί με χρήση του προγράμματος «Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator» στην ιστοσελίδα: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>, όπου εισάγεται η OD₂₆₀ καθώς και η νουκλεοτιδική αλληλουχία του μορίου. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο δεύτερος τρόπος υπολογισμού της συγκέντρωσης του M1 RNA.

Ρυθμιστικό διάλυμα T7 πολυμεράσης (10x): 400 mM Tris-HCl (pH=8,0), 80 mM MgCl₂, 20 mM σπερμιδίνη.

10.2. Παραγωγή και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης C5.

Η διαδικασία παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης αλλά και ο καθαρισμός της, πραγματοποιήθηκαν με βάση την πειραματική πορεία που θα περιγραφεί (Rivera-Leon et al., 1995).

10.2.1 Μετασχηματισμός κυττάρων XL1-blue με το πλασμίδιο pQE-30.

Το πλασμίδιο pQE-30 περιέχει την αλληλουχία του γονιδίου *mpA* που κωδικοποιεί την ανασυνδυασμένη C5 πρωτεΐνη της RNase P από το *E. coli*, η οποία φέρει 6 κατάλοιπα ιστιδίνης στο αμινοτελικό της άκρο. Το πλασμίδιο αυτό, το οποίο ήταν μια ευγενική προσφορά του καθηγητή Roland Hartmann (Philipps-Universität Marburg, Germany), εισήχθη σε κύτταρα *E. coli* XL1-blue με τη μέθοδο του μετασχηματισμού.

Ποσότητα 400 μ L από εναιώρημα των παραπάνω δεκτικών κυττάρων αναμιγνύεται με 4 μ L pQE-30 (10 ng/ μ L) (ο όγκος του διαλύματος που περιέχει το πλασμίδιο δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από το 5% του όγκου του εναιωρήματος των κυττάρων) και το μίγμα επωάζεται στους 4 °C για 30 min. Στο στάδιο αυτό το πλασμίδιο γειτνιάζει με το εξωτερικό περίβλημα των βακτηριακών κυττάρων. Στη συνέχεια, το εναιώρημα υπόκειται σε θερμικό σοκ (heat shock) για 45 min στους 42°C. Στη φάση αυτή η απότομη μεταβολή της θερμοκρασίας δημιουργεί οπές στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων, με αποτέλεσμα να εισάγονται εύκολα τα πλασμίδια στο εσωτερικό των κυττάρων. Έπειτα, το εναιώρημα μεταφέρεται στους 4 °C για 2 min, οπότε και κλείνουν οι οπές στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα τα πλασμίδια να εγκλωβίζονται στο εσωτερικό των κυττάρων. Ακολούθως, στο εναιώρημα προστίθεται 1 mL θρεπτικού μέσου SOC και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37 °C για 1 ώρα. Το εναιώρημα κατόπιν φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 11000 rpm για 1 min, αφαιρείται το υπερκείμενο και εφόσον τα κύτταρα επαναδιαλυθούν σε μικρή ποσότητα θρεπτικού (~50 μ L) στρώνονται σε τρυβλία LB/αμπικιλίνη/τετρακυκλίνη. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για 16 ώρες.

Θρεπτικό μέσο SOC: 2% tryptone, 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 0,05% NaCl, 20 mM γλυκόζη, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂.

Θρεπτικό μέσο LB/αμπικιλίνη/τετρακυκλίνη: 1% tryptone, 1% NaCl, 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 50 μ g/mL αμπικιλίνη και 30 μ g/mL τετρακυκλίνη.

Τρυβλία LB άγαρ/αμπικιλίνη/τετρακυκλίνη: 1% tryptone, 1% NaCl, 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 12g/L άγαρ, 50 μ g/mL αμπικιλίνη και 30 μ g/mL τετρακυκλίνη.

10.2.2 Επαγωγή της έκφρασης της C5 πρωτεΐνης.

Μετά το πέρας της επώασης, στα τρυβλία παρατηρούμε την ανάπτυξη αποικιών που προέρχονται μόνο από τα μετασχηματισμένα βακτήρια, μιας για το γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη βρίσκεται στο πλασμίδιο. Από δύο αποικίες εμβολιάζουμε δύο καλλιέργειες των 10 mL θρεπτικού μέσου LB/αμπικιλίνη/ τετρακυκλίνη οι οποίες επωάζονται στους 37 °C για 16 ώρες σε ανακινούμενη τράπεζα. Μετά το πέρας της επώασης, 4 mL από την καλλιέργεια των μετασχηματισμένων κυττάρων απομονώνονται τα πλασμίδια με το kit Nucleospin Plasmid DNA και τα απομονωμένα πλασμίδια pQE-30 τοποθετούνται στους -70 °C για μελλοντική χρήση.

Η υπόλοιπη ποσότητα της καλλιέργειας (12 mL) μεταγγίζεται σε 100 mL όμοιου θρεπτικού μέσου και ακολουθεί πάλι επώαση υπό ανάδευση στους 37 °C για 16 ώρες. Τέλος, η καλλιέργεια αυτή μεταγγίζεται σε δύο κωνικές με 1 L θρεπτικό μέσο η καθεμία και οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37 °C μέχρι η οπτική απορρόφηση του εναιωρήματος στα 600 nm να φτάσει ~0,5, οπότε και επάγεται η υπερέκφραση της C5 πρωτεΐνης. Στις δύο καλλιέργειες του 1 L προστίθεται IPTG τελικής συγκέντρωσης 2 mM και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 25 °C για 2 ώρες (Rivera-Leon *et al.*, 1995).

Στο πλασμίδιο pQE-30, το γονίδιο *rnpA* που κωδικοποιεί τη C5 πρωτεΐνη, βρίσκεται υπό τον έλεγχο του προαγωγέα της T5 πολυμεράσης, η οποία παράγεται μέσα στα κύτταρα της καλλιέργειας. Με την προσθήκη, του IPTG, η T5 πολυμεράση αναγνωρίζει τον προαγωγέα της και έτσι αρχίζει η μεταγραφή του *rnpA* γονιδίου.

Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 8000 g για 15 min στους 4 °C, επαναδιαλύονται σε 40 mL PBS (pH=7,4) και φυγοκεντρώνονται πάλι στις ίδιες συνθήκες προκειμένου να συλλεχθούν. Συνολικά από 2 L καλλιέργειας συλλέχθηκαν περίπου 2,6 g κυττάρων, και το ίζημα των κυττάρων αποθηκεύτηκε στους -20 °C μέχρι να ομογενοποιηθεί.

Διάλυμα IPTG: 2,38 g/100mL (100 mM).

Διάλυμα PBS: 0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,12% Na₂HPO₄, 0,02 % NaH₂PO₄.

10.2.3 Ανίχνευση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης C5 με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS- πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Σε μικρή ποσότητα ιζήματος κυττάρων από το προηγούμενο βήμα (παράγραφος 10.2.2), προστίθενται 100 μL 2x Laemmli Buffer. Τα δείγματα βράζουν στους 100 °C για 10 min. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται και σε μικρή ποσότητα ιζήματος κυττάρων πριν την επαγωγή της υπερέκφρασης της C5 πρωτεΐνης. Με τη διαδικασία αυτή δημιουργείται δείγμα εκχυλίσματος ολικής πρωτεΐνης των κυττάρων πριν και μετά την υπερέκφραση της πρωτεΐνης μας. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 18%, εφόσον επιθυμούμε το βέλτιστο διαχωρισμό πρωτεϊνών με μοριακά βάρη από 50 έως 4 kDa. Σημειωτέον ότι για το βέλτιστο διαχωρισμό πρωτεϊνών με μοριακά βάρη από

90 έως 20 kDa το πήκτωμα διαχωρισμού πρέπει να είναι περιεκτικότητας σε ακριλαμίδιο 10%, για εύρος 50 έως 10 kDa η περιεκτικότητα πρέπει να είναι 16%, ενώ όταν επιθυμούμε το διαχωρισμό πρωτεϊνών με μικρότερα μοριακά βάρη η περιεκτικότητα σε ακριλαμίδιο πρέπει να αυξάνεται.

Οι διαστάσεις του πήκτωματος είναι: 7 cm ύψος, 9 cm πλάτος και 1 mm πάχος. Το πήκτωμα χωρίζεται σε δύο μέρη: το πήκτωμα πακεταρίσματος που είναι το ανώτερο μέρος (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού που είναι το κατώτερο μέρος (separating gel). Στο πρώτο μέρος το δείγμα πακετάρεται ενώ στο δεύτερο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των μορίων. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στα 80 V ενώ βρίσκονται στο stacking gel και στα 120 V όταν βρίσκονται στο separating gel, ενώ η συνολική διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι περίπου 3 ώρες.

Εκτός από τα δείγματα, στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται και μάρτυρας με πρότυπα μοριακά βάρη πρωτεϊνών (SeeBlue INVITROGEN).

Η χρώση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με Coomassie Brilliant Blue. Η συγκεκριμένη χρώση είναι χαμηλής ευαισθησίας (ανιχνεύει ποσότητα πρωτεΐνης μέχρι 50 ng), όμως στην παρούσα φάση μπορούμε να τη χρησιμοποιήσουμε εφόσον θέλουμε να εκτιμήσουμε ποιοτικά αν πραγματοποιήθηκε η υπερέκφραση της C5 πρωτεΐνης.

2x Laemmli buffer: 120 mM Tris-HCl (pH=6,8), 20% γλυκερόλη, 4% SDS, 0,1% bromophenol blue, 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη.

Ρυθμιστικό διάλυμα SDS ηλεκτροφόρησης: 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris, 0,1% SDS.

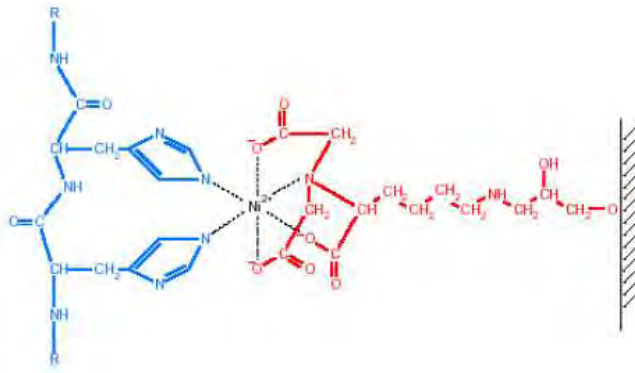
Stacking gel: 0,5 mL running upper buffer (0,5 M Tris-HCl [pH=6,8], 0,4% SDS), 0,3 mL acrylamide 30%, 1,2 mL H₂O.

Separating gel: 1,25 mL running lower buffer (1,5 M Tris-HCl [pH=8,8], 0,4% SDS), 3 mL acrylamide 30%, 0,7 mL H₂O.

10.2.4 Καθαρισμός της C5 πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγενείας σε στήλη Ni-NTA

Αφού επιβεβαιωθεί η υπερέκφραση της C5 πρωτεΐνης, ακολουθεί ο καθαρισμός της με χρωματογραφία συγγενείας σε στήλη νικελίου (Ni-NTA).

Τα εξαπεπίδιο των ιστιδινών, που φέρει η πρωτεΐνη στο αμινοτελικό της άκρο, αλληλεπιδρά μέσω των ιμιδαζολικών δακτυλίων με το νικέλιο του χρωματογραφικού υλικού με εξαιρετικά μεγάλη συγγένεια που φτάνει αυτή του ενζύμου-υποστρώματος ή τη συγγένεια αντιγόνου-αντισώματος (εικόνα 12).



Εικόνα 12. Αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών κατάλοιπων ιστιδίνης με άτομα νικελίου της Ni-NTA. Με μπλε χρώμα αναπαρίσταται η πεπτιδική αλυσίδα που διακρίνονται οι δακτύλιοι ιμιδαζολίου των ιστιδινών, και με κόκκινο χρώμα ο χηλικός προσροφητής του νικελίου, το νιτριλο-οξικό οξύ.

Η αλληλεπίδραση παραμένει ισχυρή στα διάφορα στάδια εκπλύματος της στήλης και παύει σε χαμηλό pH (5,9-4,5) ή σε υψηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (250-1000 mM), το οποίο ανταγωνίζεται με τα αμινοξέα ιστιδίνης για την πρόσδεση στη στήλη. Με την εξασθένηση της αλληλεπίδρασης των ιστιδινών με το νικέλιο, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκλύεται μέχρι και 95% καθαρισμένη από τις άλλες πρωτεΐνες του εκχυλίσματος.

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παράγεται σε διαλυτή μορφή, με τον παραπάνω τρόπο και μπορεί να διατηρηθεί στους 4 °C για αρκετούς μήνες.

Η κατεργασία των κυττάρων που συλλέχτηκαν μετά την επαγωγή με IPTG (παράγραφος 1.2) γίνεται με τρόπο τέτοιο ώστε να παραλαμβάνουμε ξεχωριστά το κλάσμα των διαλυτών πρωτεϊνών από εκείνο των αδιάλυτων όπου βρίσκονται και τα έγκλειστα σωματίδια. Στο κλάσμα των διαλυτών πρωτεϊνών γνωρίζουμε ότι υπάρχει η ανασυνδυασμένη C5 πρωτεΐνη (Rivera-Leon R et al., 1995). Το κλάσμα αυτό λοιπόν καθαρίζεται με χρωματογραφία συγγενείας σε στήλη Ni-NTA Agarose, όπως θα περιγραφεί παρακάτω.

10.2.5 Ομογενοποίηση κυττάρων – Παραλαβή διαλυτού κλάσματος πρωτεϊνών

Στο ίζημα των κυττάρων, εφαρμόζονται διαδοχικοί κύκλοι «παγώματος-ξεπαγώματος» (από τους -20 °C στους 25 °C για 30 min, στους -20 °C για άλλα 30 min και τέλος στους 25 °C για 30 min τουλάχιστον). Με τη διαδικασία αυτή, τα κυτταρικά τοιχώματα γίνονται ευαίσθητα, ώστε να σπάσουν στη συνέχεια με την εφαρμογή υπερήχων στο ίζημα των κυττάρων. Ακολούθως, το ίζημα αναδιαλύεται σε 5,2 mL διαλύματος λύσης (2x όγκος κυττάρων) και στο εναιώρημα προστίθεται λυοφιλοποιημένη λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1 mg/mL, ώστε να διευκολυνθεί η λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων και ακολουθεί επώαση στους 25 °C για 15 min. Η ομογενοποίηση των κυττάρων γίνεται σε συσκευή υπερήχων με 12 «χτυπήματα»

(bursts) σε ισχύ 25 W, διάρκειας 20 sec το καθένα. Το ομογενοποίηση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας διατηρείται στους 4 °C. Στη συνέχεια, στο ομογενοποίηση προστίθενται 15 µL RQI DNase και γίνεται επώαση για 20 min 4 °C. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση σε 100000 g για 1 ώρα και 10 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο αποτελεί το S100 κλάσμα των διαλυτών πρωτεϊνών του κυττάρου σε διάλυμα λύσης.

Διάλυμα λύσης: 50 mM Tris-HCl (pH=8), 10 mM MgOAc, 1 M NH₄Cl, 0,12% Tween 20, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, αναστολείς πρωτεασών (pepstatin 1µg/mL, 1 mM PMSF).

10.2.6 Καθαρισμός εκχυλίσματος διαλυτών πρωτεϊνών

Στο εκχύλισμα (κλάσμα S100) προστίθεται 8 mL εναιωρήματος χρωματογραφικού υλικού (περιέχει υλικό για 4 mL πακεταρισμένης στήλης) και το μίγμα τίθεται υπό ελαφρά ανακίνηση στους 4 °C για 1,5 ώρες. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η πρόσδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο χρωματογραφικό υλικό, μέσω αλληλεπίδρασης του εξαπεπτιδίου ιστιδινών με το νικέλιο. Ακολούθως, το εναιώρημα πακετάρεται σε στήλη με τη ροή που προκαλείται από τη δύναμη της βαρύτητας και το διάλυμα που διέρχεται από τη στήλη συλλέγεται (flow-through). Η στήλη εκπλένεται με 50 όγκους (200 mL) διάλυμα λύσης (παράγραφος 1.4) και συλλέγονται κλάσματα των 50 mL. Η στήλη εξισορροπείται με διάλυμα έκλουσης που δεν περιέχει ιμιδαζόλιο και το διάλυμα συλλέγεται. Στη συνέχεια, στη στήλη εφαρμόζεται διάλυμα έκλουσης με βαθμιδωση συγκέντρωσης ιμιδαζολίου 0-500 mM συνολικού όγκου 30 mL και συλλέγονται δείγματα των 2 mL. Η C5 πρωτεΐνη εκλύεται στα 300 mM ιμιδαζόλιο περίπου. Ακολουθεί SDS ηλεκτροφόρηση των διαφόρων κλασμάτων της στήλης, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 10.2.3. Προκειμένου να ελεγχθεί το περιεχόμενο των κλασμάτων σε πρωτεΐνες, τα πηκτώματα υποβλήθηκαν σε χρώση με άργυρο (silver staining), η οποία διαθέτει 20 έως 50 φορές καλύτερη διακριτική ικανότητα από τη χρώση με Coomassie (ανίχνευση μέχρι λίγα ng πρωτεΐνης).

Τα κλάσματα της στήλης που περιείχαν τη C5 πρωτεΐνη συγκεντρώθηκαν και διαπιδύθηκαν σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα P του ολοενζύμου της RNase P και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους 4 °C. Η συγκέντρωση της C5 πρωτεΐνης υπολογίστηκε με τη μέθοδο Braddford.

Διάλυμα έκλουσης: 10 mM HEPES, 300 mM NaCl (pH=7,5).

Διάλυμα έκλουσης με βαθμιδωση συγκέντρωσης ιμιδαζολίου: Κατασκευάστηκε με τη χρήση συσκευής βαθμιδωσης, αναμιγνύοντας διάλυμα έκλουσης χωρίς ιμιδαζόλιο και διάλυμα έκλουσης με 500 mM ιμιδαζόλιο.

Ρυθμιστικό διάλυμα P (1x): 50 mM Tris-HCl (pH=7,6), 100 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 0,06 mM EDTA.

11. Ανασύσταση ενζυμικά ενεργού ολοενζύμου RNase P

Προκειμένου να ελέγξουμε αν τα μόρια της πρωτεΐνης που απομονώσαμε είναι λειτουργικά, αρκεί να διαπιστώσουμε αν παρατηρείται δραστικότητα RNase P όταν αναμιγνύονται μόρια M1 RNA με μόρια C5 πρωτεΐνης. Είναι γνωστό ότι το M1 RNA, απουσία της C5 πρωτεΐνης, έχει απαίτηση σε υψηλή ιοντική ισχύ, προκειμένου να εμφανίσει δραστικότητα, ενώ παρουσία της πρωτεΐνης η απαίτηση του ολοενζύμου για ιοντική ισχύ είναι 5 φορές μικρότερη. Για το λόγο αυτό, αναμίχθηκαν διάφορες αναλογίες του M1 RNA με την πρωτεΐνη στο ρυθμιστικό διάλυμα P του ολοενζύμου της RNase P και ελέγχθηκε αν τα μίγματα παρουσιάζουν δραστικότητα RNase P, διαδικασία η οποία θα περιγραφεί στην επόμενη παράγραφο. Οι αναλογίες M1 RNA προς C5 πρωτεΐνης που δοκιμάστηκαν ήταν 1:1, 1:2, 1:3 και 1:5 αντίστοιχα.

Έτσι, για την ανασύσταση ενζυμικά ενεργού ολοενζύμου της RNase P, δημιουργείται διάλυμα του ολοενζύμου με ανάμιξη μορίων M1 RNA και C5 πρωτεΐνης σε αναλογία 1:5 αντίστοιχα (0,105 pmoles M1 RNA/μL: 0,525 pmoles C5 πρωτεΐνης/μL), σε ρυθμιστικό διάλυμα του ολοενζύμου της RNase P (1x), παρουσία γλυκερόλης 50% v/v. Το μίγμα προεπωάζεται για 10 min στους 37°C, στη συνέχεια το μίγμα αφήνεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να μειωθεί σταδιακά η θερμοκρασία του και τέλος τοποθετείται στους 4 °C.

12. Ανίχνευση ενδονουκλεοτιδικής δραστικότητας RNase P

Η ανίχνευση της ενζυμικής δραστικότητας του M1 RNA και του ανασχηματισμένου ολοενζύμου της RNase P από το *E. coli* γίνεται, μέσω της ανίχνευσης των προϊόντων της αντίδρασης του ενζύμου με το πρόδρομο tRNA της τυροσίνης από το *E. coli*. Για το σκοπό αυτό παρασκευάζουμε ραδιενεργά σημασμένα πρόδρομο tRNA, με μεταγραφή του γονιδίου του *in vitro*.

12.1 Σύνθεση υποστρώματος για τον προσδιορισμό της δραστικότητας RNase P

Γραμμοποίηση του πλασμιδίου pTyr.

Το πλασμίδιο pTyr φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA^{Tyr} από το *E. coli*. Το πλασμίδιο κόβεται με το ένζυμο περιορισμού Fok I προκειμένου να γραμμοποιηθεί. Η μεταγραφή του γονιδίου του ptRNA από το γραμμοποιημένο πλασμίδιο τερματίζεται στη θέση περιορισμού του Fok I καθώς η RNA πολυμεράση συναντά το φυσικό τέλος του γονιδίου (run off transcription).

Το μίγμα της **αντίδρασης γραμμοποίησης** περιλαμβάνει:

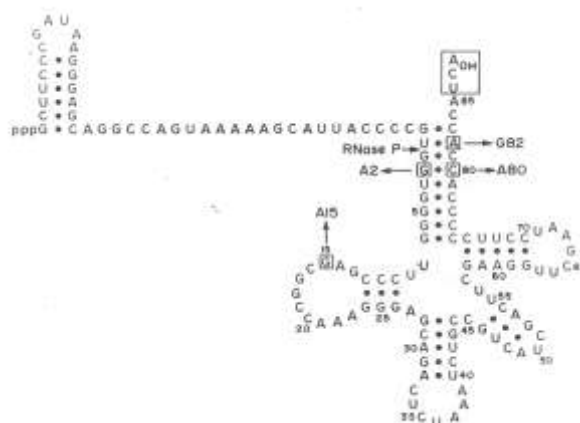
Ρυθμιστικό διάλυμα FM (10x)

10 μl

Πλασμίδιο Tyr	30 μ l
Ενδονουκλεάση περιορισμού Fok I	5 μ l
dd H ₂ O	55 μ l

12.2 Μεταγραφή του γονιδίου ptRNA^{Tyr}

Η μεταγραφή του γονιδίου ptRNA^{Tyr} (εικόνα 13) *in vitro* πραγματοποιείται σύμφωνα με τη μέθοδο που έχει περιγραφεί από τους Krupp et al. (1986) και Nichols et al. (1988).



Εικόνα 13. Δευτεροταγής δομή του πρόδρομου tRNA^{Tyr}. Διακρίνεται το σημείο θραύσης του μορίου από την RNase P του *E. coli*.

12.3 Παρασκευή «θερμού» υποστρώματος

Προκειμένου να παρασκευάσουμε «θερμό» υπόστρωμα, δηλαδή ραδιενεργά σημασμένο, η προσθήκη των αντιδραστηρίων στο μίγμα της αντίδρασης (20 μ L) γίνεται στους 25 °C με την εξής σειρά:

Ρυθμιστικό διάλυμα T7 RNA πολυμεράσης (10x)	2 μ L
50 mM DTT	2 μ L
rRNasin	0,5 μ L
Μίγμα ATP, CTP, UTP (10 mM each)	1,5 μ L
GTP (0,1 mM)	2,5 μ L
Γραμμικό πλασμίδιο Tyr (80 ng/ μ L)	3 μ L
[α - ³² P] GTP (10 μ Ci/ μ L)	2 μ L
T7 RNA πολυμεράση (20 μ / μ L)	1 μ L

Το μίγμα επωάζεται για 2 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, γίνεται πέψη του πλασμιδίου με 5u DNase I. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 1 μ L EDTA 200 mM και τέλος προστίθενται 5 μ L διαλύματος χρωστικών. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε αποδιατακτικό

πήγμα πολυακρυλαμιδίου 10% / 8 M ουρίας (19x21 cm). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (1x) και σε 30 mA.

Η ζώνη που αντιστοιχεί στο πρόδρομο μόριο tRNA γίνεται ορατή με αυτοραδιογραφία, απομονώνεται και εκλούεται σε ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (300 µL) για 16 ώρες (ο/ν) στους 25 °C. Το έκλουμα μεταγγίζεται σε νέο σωληνάκι (ependorf) και η έκλουση επαναλαμβάνεται με 100 µL ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης για 1 ώρα στους 25 °C. Συγκεντρώνεται ο συνολικός όγκος του εκλούματος (400 µL) και ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη, όπως έχει περιγραφεί πιο πάνω. Αφού απομακρυνθεί η αιθανόλη, το ίζημα αναδιαλύεται σε 100 µL αποστειρωμένο ddH₂O και φυλάσσεται στους -20°C.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του υποστρώματος γίνεται με μέτρηση των cpm σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού που μετρά β ακτινοβολία.

Ρυθμιστικό διάλυμα T7 πολυμεράσης (10x): 400 mM Tris-HCl (pH=8,0), 80 mM MgCl₂, 20 mM σπερμιδίνη.

Διάλυμα χρωστικών: 0,05% w/v xylene cyanol, 0,05% w/v bromophenol blue, 90% v/v φορμαμίδιο.

Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10x): 1 M Tris-HCl, 0,5 M Βορικό οξύ, 25 mM EDTA.

Αποδιατακτικό πήγμα πολυακρυλαμιδίου 10% / 8 M ουρία: 10 g ουρία, 5 ml από διάλυμα 40% w/v ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου (19:1), 2 ml TBE (10x), 5 ml H₂O απιονισμένο.

Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης: 10 mM Tris-HCl (pH=7,5), 300 mM KCl, 1 mM EDTA.

12.4 Προσδιορισμός δραστικότητας του ανασχηματισμένου ολοενζύμου της RNase P

Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας του ανασχηματισμένου ολοενζύμου πραγματοποιείται αντίδραση με 1 µL από το διάλυμα του ολοενζύμου (0,105 pmoles M1 RNA : 0,525 pmoles C5 πρωτεΐνης) σε 20 µL ρυθμιστικού διαλύματος P της RNase P (1x), το οποίο περιέχει ~2 fmoles ραδιενεργά σημασμένου υποστρώματος (πρόδρομο ³²P-tRNA^{Tyr}). Μετά την προσθήκη του υποστρώματος, το μίγμα επωάζεται για 10 min στους 37 °C, ενώ η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 5 µL διαλύματος χρωστικών f-EDTA. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% / 8 M ουρία, γίνονται ορατά με αυτοραδιογραφία μέσω Phosphorimager FLA 3000 (FUJIFILM) και ποσοτικοποιούνται με το πρόγραμμα PCBAS/AIDA (Raytest).

Ρυθμιστικό διάλυμα P (5x): 250 mM Tris-HCl (pH=7,6), 50 mM MgCl₂, 500 mM NH₄Cl, 0,3 mM EDTA.

Διάλυμα χρωστικών f-EDTA: 80% v/v φορμαμίδιο, 50 mM EDTA, 0,1% w/v xylene cyanol, 0,1% w/v bromophenol blue.

Αποδιατακτικό πήγμα πολυακρυλαμιδίου 10% / 8 M ουρία: 10 g ουρία, 5 ml από διάλυμα 40% w/v ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου (19:1), 2 ml TBE (10x), 5 ml H₂O απιονισμένο.

Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10x): 1 M Tris-HCl, 0,5 M Βορικό οξύ , 25 mM EDTA.

12.5 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του M1 RNA

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του M1 RNA ακολουθείται η ίδια ακριβώς πειραματική πορεία που περιγράφηκε παραπάνω με τη διαφορά ότι η αντίδραση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα M του M1 RNA. Επίσης, το μίγμα προεπωάζεται (πριν την προσθήκη του υποστρώματος) για 30 min στους 37°C, προκειμένου το M1 RNA να πάρει τη σωστή διαμόρφωση και να αλληλεπιδράσει με τα μόρια του υποστρώματος. Τέλος, πραγματοποιείται επώαση για 30 min στους 37°C. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% / 8 M ουρία. Τέλος, το αποτέλεσμα της αντίδρασης γίνεται ορατό με αυτοραδιογραφία με τη χρήση Phosphorimager FLA 3000 (FUJIFILM) και ποσοτικοποιείται με το πρόγραμμα PCBAS/AIDA (Raytest).

Ρυθμιστικό διάλυμα M (5x): 250 mM Tris-HCl (pH=7,6), 250 mM MgCl₂, 500 mM NH₄Cl, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη.

13. Παρασκευή διαλυμάτων αντιβιοτικών

Για την παρασκευή των διαλυμάτων λινκοσαμιδών, ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού σε ζυγό ακριβείας και διαλύεται σε αποστειρωμένο ddH₂O. Τα διαλύματα αποστειρώνονται με διήθηση μέσω φίλτρων Millipore με διάμετρο πόρων 0,22 μm, και στη συνέχεια φυλάσσονται στους -20°C.

14. Πειράματα επίδρασης των αντιβιοτικών στη δραστηριότητα του ολοενζύμου της RNase P και του M1 RNA.

Για τη μελέτη της επίδρασης της κλινδαμυκίνης στην αντίδραση ωρίμανσης του πρόδρομου tRNA^{Tyr} από το ανασχηματισμένο ολοένζυμο της RNase P ή του M1 RNA, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με συγκεντρώσεις κλινδαμυκίνης από 0,5 έως 1000 μM. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε 20 μL ρυθμιστικού διαλύματος P ή M, ανάλογα με το πιο μόριο δοκιμάζεται και πριν την προσθήκη του υποστρώματος (pre-tRNA) τα μίγματα προεπωάζονται για 30 min στους 37 °C. Ακολουθεί η προσθήκη του πρόδρομου tRNA (ptRNA)

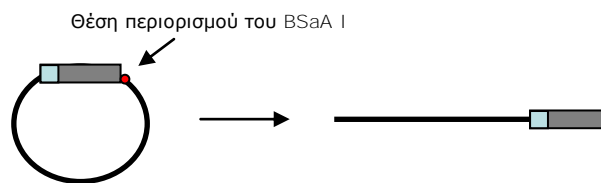
και πραγματοποιείται η αντίδραση για 10 min για το M1 RNA και 3 min για το ανασυσταμένο ολοένζυμο στους 37 °C. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 5 μ L διαλύματος χρωστικών f-EDTA. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% / 8 M ουρίας. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων γίνονται ορατά με αυτοραδιογραφία με τη χρήση Phosphorimager FLA 3000 (FUJIFILM) και ποσοτικοποιούνται με το πρόγραμμα PCBAS/AIDA (Raytest).

Οι χρόνοι προεπάσης και αντίδρασης που χρησιμοποιούνται επιλέχθηκαν έπειτα από την κατασκευή της καμπύλης του ποσοστού της αντίδρασης σε συνάρτηση με το χρόνο, για την προεπάση του ολοενζύμου και του M1 RNA, καθώς και της αντίστοιχης καμπύλης για την αντίδραση ωρίμανσης του πρόδρομου tRNA^{Tyr}, απουσία και παρουσία των διαφόρων συγκεντρώσεων αντιβιοτικών.

Αποτελέσματα

15. Παραγωγή μορίων M1 RNA

Κατά τη μεταγραφή του γονιδίου *rnpB in vitro*, το οποίο βρίσκεται κλωνοποιημένο στο φορέα pDW98, παράγονται μόρια του M1 RNA που αποτελούνται από 377 νουκλεοτίδια και έχουν μοριακό βάρος 116,8 KDa, όσο δηλαδή και το φυσικό μόριο. Η παραγωγή μορίων M1 RNA φυσικού μεγέθους είναι δυνατή με την ύπαρξη της θέσης περιορισμού για το ένζυμο BSaA I στο φυσικό τέλος του γονιδίου (εικόνα 14). Το γονίδιο βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία μεταγράφει το γραμμοποιημένο πλασμίδιο, παράγοντας λειτουργικά μόρια M1 RNA.



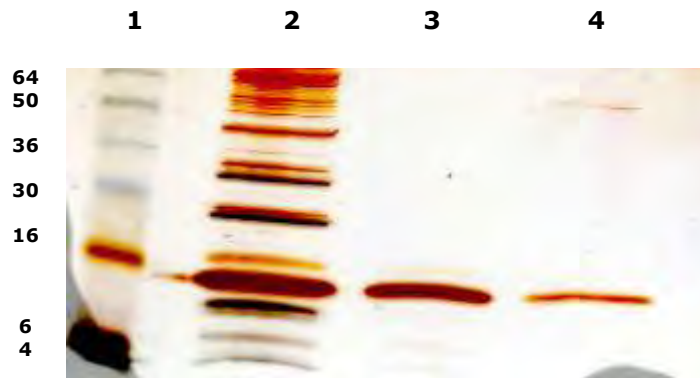
Εικόνα 14. Σχήμα της γραμμοποίησης του pDW98. Η θέση περιορισμού για το ένζυμο BSaA I βρίσκεται στο φυσικό τέλος του γονιδίου του M1 RNA, και εδώ απεικονίζεται με κόκκινο κύκλο. Το γονίδιο του M1 RNA απεικονίζεται με γκρι ορθογώνιο, ενώ το γαλάζιο τμήμα αντιπροσωπεύει τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης.

Με τη μεταγραφή του γονιδίου *rnpB in vitro* σε μεγάλη κλίμακα παράγονται μόρια του M1 RNA σε μεγάλη ποσότητα, ενώ είναι απαλλαγμένα από κάθε μικρότερο μόριο που τυχόν δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, εφόσον ο καθαρισμός του μορίου πραγματοποιείται με στήλη Sephadex G-50, και τα μόρια αυτά κρατούνται στη στήλη. Έτσι, παρήχθησαν λειτουργικά μόρια M1 RNA σε υδατικό διάλυμα, η συγκέντρωση των οποίων προσδιορίστηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως, οπότε προέκυψε ότι παρήχθησαν 534,6 μg/mL ή 4,577 pmoles/μL.

16. Υπερέκφραση και απομόνωση της ανασυνδυασμένης C5 πρωτεΐνης

Με την πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο (Υλικά και Μέθοδοι, ενότητα 10.2), πραγματοποιήθηκε η παραγωγή της C5 πρωτεΐνης της RNase P από το *E. coli* σε διαλυτή μορφή και απαλλαγμένη από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του διαλυτού κλάσματος, κατά 95% τουλάχιστον (εικόνα 15). Η ανασυνδυασμένη C5 πρωτεΐνη αποτελείται από 119 αμινοξέα (φέρει 6 κατάλοιπα ιστιδίνης στο αμινοτελικό της άκρο) και έχει μοριακό βάρος 15,189 KDa. Στην εικόνα που προέκυψε μετά τη χρώση των πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE) με Coomassie Brilliant Blue, εμφανίζεται μία πολύ έντονη ζώνη στο επιθυμητό μοριακό βάρος και η οποία υπάρχει μόνο στο ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων (XL1-blue) μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης. Εφόσον πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του εκχυλίσματος των διαλυτών πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγενείας σε στήλη Ni-NTA και διαπίδωση των δειγμάτων της στήλης σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα P, πήραμε 2,5 mL διαλύματος C5 πρωτεΐνης, η οποία είχε καθαριστεί κατά τουλάχιστον 95% (εικόνα 15)

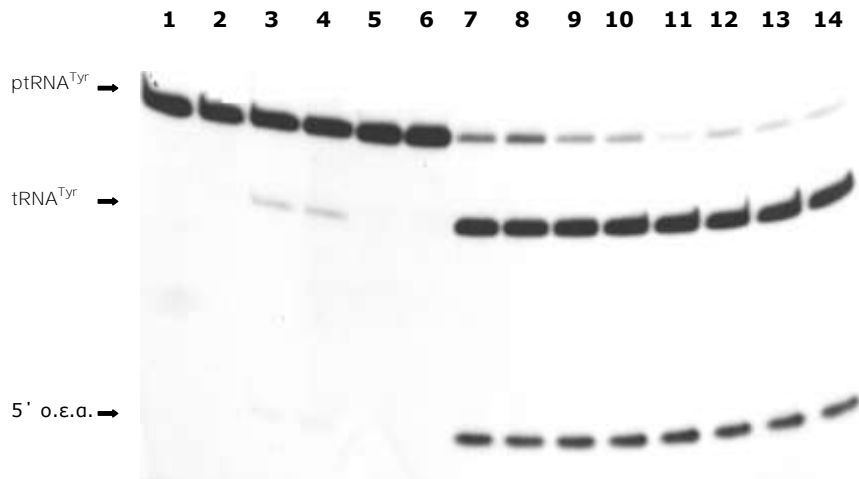
και η συγκέντρωσή της, στο δείγμα που παρουσίαζε υψηλή συγκέντρωση και υψηλού βαθμού καθαρότητα, υπολογίστηκε στα 39,5 pmol/μL με τη μέθοδο Braddford.



Εικόνα 15: Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE) μετά από χρώση με άργυρο. Στήλη 1: Μάρτυρας πρότυπων πρωτεϊνών με μοριακά βάρη από 4 έως 64 kDa. Στήλη 2: δείγματα 1-9 της στήλης Ni-NTA που είχαν υψηλή συγκέντρωση της C5 πρωτεΐνης αλλά χαμηλή καθαρότητα. Στήλη 3: δείγματα 10-12 της στήλης Ni-NTA που είχαν υψηλή συγκέντρωση της C5 πρωτεΐνης και υψηλή καθαρότητα. Στήλη 4: δείγματα 13-15 της στήλης Ni-NTA που έφεραν τη C5 πρωτεΐνη σε υψηλή καθαρότητα αλλά σε χαμηλή συγκέντρωση.

17. Ανασύσταση ενζυμικά ενεργού ολοενζύμου RNase P

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του ανασυσταμένου ολοενζύμου, με προσθήκη tRNA στο ρυθμιστικό διάλυμα P, εξασφαλίζουν ότι το αποτέλεσμα της αντίδρασης οφείλεται μόνο στα μόρια του ανασυσταμένου ολοενζύμου, εφόσον η πρωτεϊνική υπομονάδα μόνη της δεν εμφανίζει καταλυτική δραστηριότητα και επίσης το M1 RNA απουσία της πρωτεϊνικής υπομονάδας δεν είναι ενζυμικά ενεργό σε αυτές τις συνθήκες. (εικόνα 16). Για την ανασύσταση λειτουργικών μορίων του ολοενζύμου της RNase P, δοκιμάστηκαν αναλογίες M1 RNA προς C5 πρωτεΐνη από 1:1 έως 1:5, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 16, μεγαλύτερη ποσότητα C5 πρωτεΐνης σε σχέση με εκείνη του M1 RNA, είχε σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερο ποσοστό αντίδρασης, ενώ το ποσοστό της αντίδρασης δε μεταβάλλεται σημαντικά όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι τουλάχιστον 4 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του M1 RNA. Έτσι, επιλέχτηκε η αναλογία αυτών των μορίων να είναι 1:5 στα υπόλοιπα πειράματα.

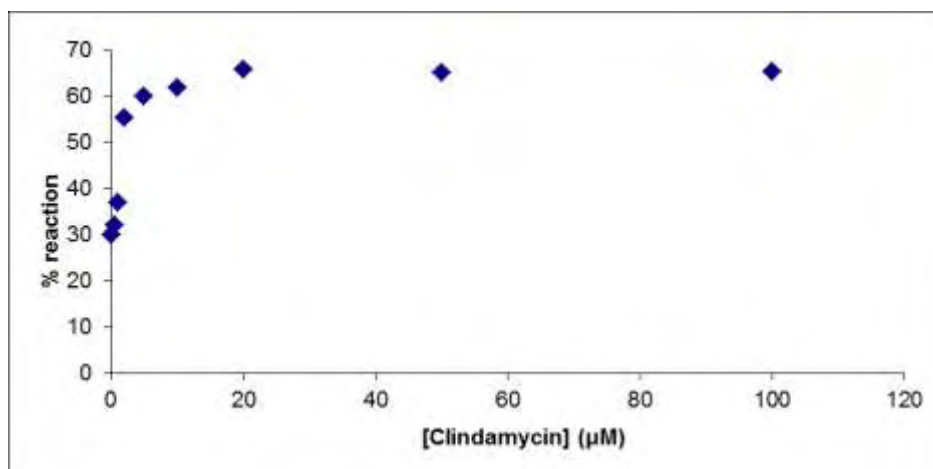


Εικόνα 16. Αυτοραδιογραφία της αντίδρασης του ανασυσταμένου ολοενζύμου της RNase P, σε διαφορετικές αναλογίες M1 RNA : C5 πρωτεΐνη. Στήλη 1: υπόστρωμα. Στήλη 2: υπόστρωμα παρουσία 0,525 pmoles C5 πρωτεΐνης. Στήλες 3,4: M1 RNA (0,105 pmoles) σε ρυθμιστικό διάλυμα M (χρόνος αντίδρασης 10 min). Στήλες 5,6: M1 RNA (0,42 pmoles) σε ρυθμιστικό διάλυμα P (χρόνος αντίδρασης 10 min). Στήλες 7,8: αναλογία μορίων M1 RNA προς μόρια C5 πρωτεΐνης ίση με 1:1. Στήλες 9,10: αναλογία μορίων M1 RNA προς μόρια C5 πρωτεΐνης ίση με 1:2. Στήλες 11,12: αναλογία μορίων M1 RNA προς μόρια C5 πρωτεΐνης ίση με 1:4. Στήλες 13,14: αναλογία μορίων M1 RNA προς μόρια C5 πρωτεΐνης ίση με 1:5. Χρόνος αντίδρασης του ανασυσταμένου ολοενζύμου 3 min.

18. Δοσοεξαρτώμενη ενεργοποίηση της αντίδρασης ωρίμανσης του πρόδρομου tRNA από το M1 RNA και το ανασυσταμένο ολοένζυμο της RNase P, παρουσία κλινδαμυκίνης.

Η αντίδραση ωρίμανσης του πρόδρομου tRNA από το **M1 RNA** παρουσιάζει ενεργοποίηση παρουσία κλινδαμυκίνης, κατά ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο (εικόνες 17 και 18).

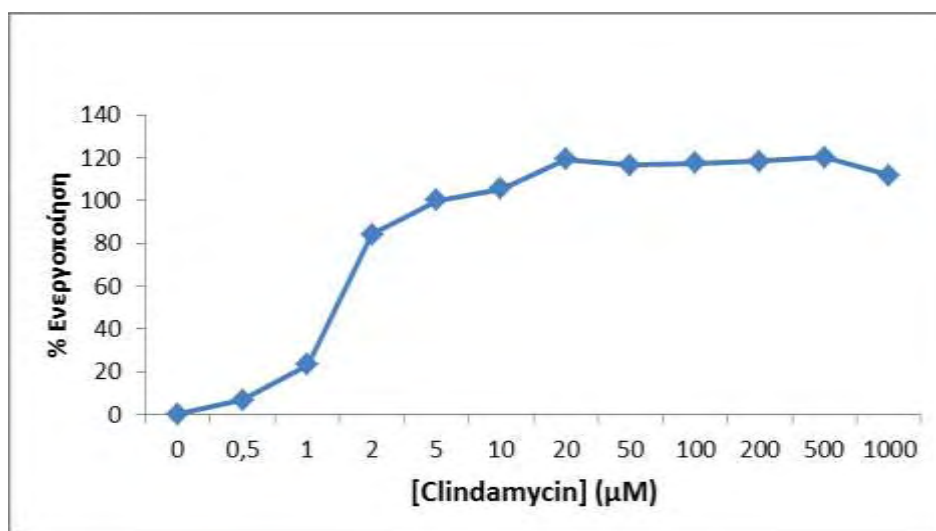
Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα στην ενζυμική δραστηριότητα του **ανασχηματισμένου ολοένζυμου της RNase P** παρουσία της κλινδαμυκίνης, η οποία ενεργοποιείται κατά ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο (εικόνες 19 και 20).



Εικόνα 17. Δοσοεξαρτώμενη ενεργοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας του M1 παρουσία κλινδαμυκίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Στο διάγραμμα φαίνεται η % αντίδραση της ενζυμικής δραστηριότητας έναντι των αυξανόμενων συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού.

Στην εικόνα 17 φαίνεται η **% αντίδραση** του **M1 RNA**, παρουσία κλινδαμυκίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Η ενεργοποίηση είναι δοσοεξαρτώμενη μέχρι συγκέντρωσης 20 μM κλινδαμυκίνης, εφόσον σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η ενεργοποίηση παραμένει σταθερή. Η ενεργοποίηση ξεκινάει από 0,5 μM κλινδαμυκίνης (32% αντίδραση) και φτάνει στο μέγιστο σε 20 μM κλινδαμυκίνης (65,89% αντίδραση).

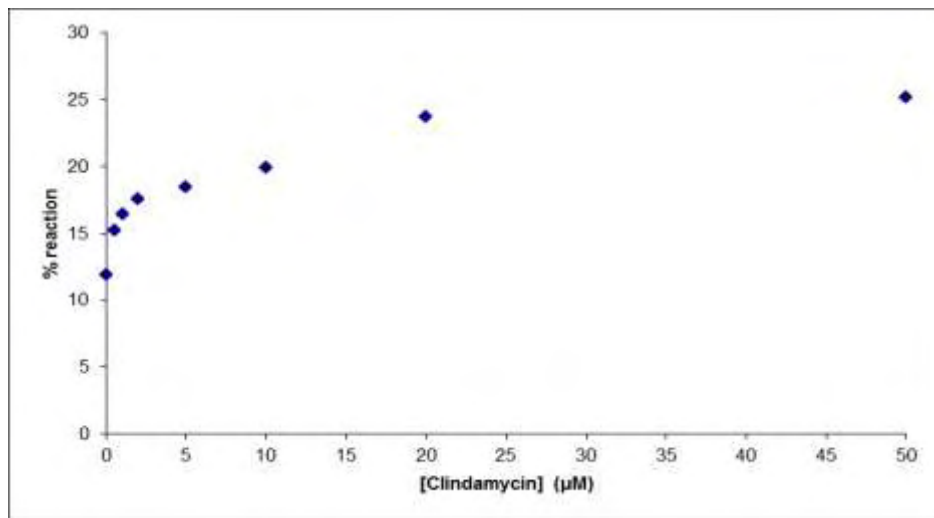
Στην εικόνα 18 φαίνεται η **% ενεργοποίηση** του **M1 RNA**, παρουσία κλινδαμυκίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Η ενεργοποίηση είναι δοσοεξαρτώμενη μέχρι συγκέντρωσης 20 μM κλινδαμυκίνης. Η ενεργοποίηση ξεκινάει από 0,5 μM κλινδαμυκίνης (6,6% ενεργοποίηση) και φτάνει στο μέγιστο σε 20 μM κλινδαμυκίνης (119,41% ενεργοποίηση).



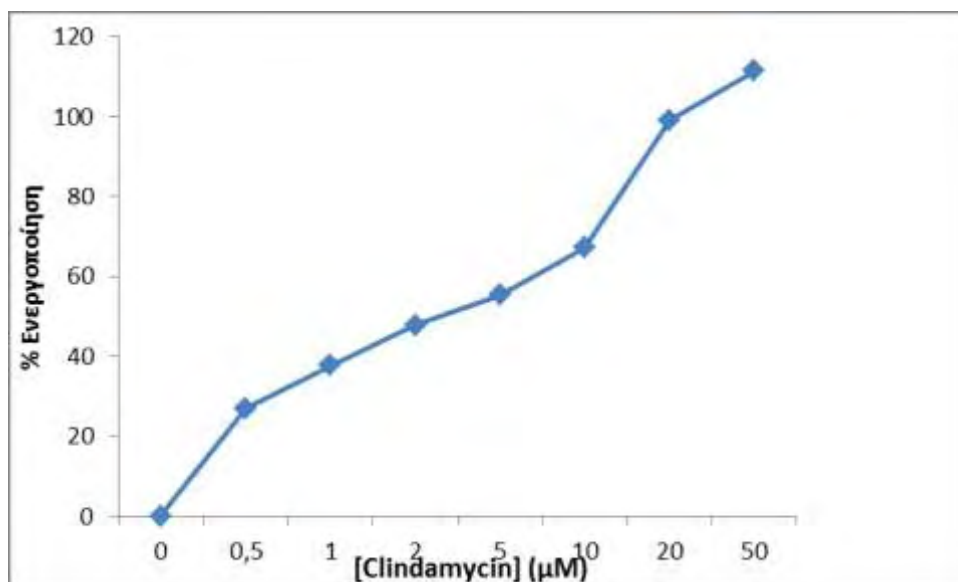
Εικόνα 18. Δοσοεξαρτώμενη ενεργοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας του M1 παρουσία κλινδαμυκίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Στο διάγραμμα φαίνεται η % ενεργοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας έναντι των αυξανόμενων συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού

Στην εικόνα 19 φαίνεται η **% αντίδραση** του **ολοενζύμου**, παρουσία κλινδαμυκίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, όπου φαίνεται η δοσοεξαρτώμενη ενεργοποίηση μέχρι συγκέντρωσης 20 μM της κλινδαμυκίνης, εφόσον σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η ενεργοποίηση παραμένει σταθερή. Η ενεργοποίηση ξεκινάει από 0,5 μM κλινδαμυκίνης (15,2% αντίδραση) και φτάνει στο μέγιστο σε 20 μM κλινδαμυκίνης (23,7% αντίδραση).

Στην εικόνα 20 φαίνεται η **% ενεργοποίηση** του **ολοενζύμου**, παρουσία κλινδαμυκίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Η ενεργοποίηση είναι δοσοεξαρτώμενη μέχρι 20 μM κλινδαμυκίνης. Η ενεργοποίηση ξεκινάει από 0,5 μM κλινδαμυκίνης (27% ενεργοποίηση) και φτάνει στο μέγιστο σε 20 μM κλινδαμυκίνης (111,43% ενεργοποίηση).



Εικόνα 19. Δοσοεξαρτώμενη ενεργοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας του ολοενζύμου της RNase P, παρουσία κλινδαμυκίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Στο διάγραμμα φαίνεται η % αντίδραση της ενζυμικής δραστηριότητας έναντι των αυξανόμενων συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού.



Εικόνα 20. Δοσοεξαρτώμενη ενεργοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας του ολοενζύμου της RNase P, παρουσία κλινδαμυκίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Στο διάγραμμα φαίνεται η % ενεργοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας έναντι των αυξανόμενων συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού.

19. Ενεργοποίηση της αντίδρασης ωρίμανσης του πρόδρομου tRNA από το M1 RNA και το ανασυσταμένο ολοένζυμο της RNase P, παρουσία κλινδαμυκίνης και σπιραμυκίνης.

Η αντίδραση ωρίμανσης του πρόδρομου tRNA από το M1 RNA και το ανασυσταμένο ολοένζυμο της RNase P εμφανίζει ενεργοποίηση παρουσία κλινδαμυκίνης όπως φάνηκε παραπάνω. Γνωρίζοντας πως το μακρολίδιο σπιραμυκίνη ενεργοποιεί τη βακτηριακή RNase P (Τουμπρεκί et al. 2008), εξετάστηκε το ενδεχόμενο προσθετικό αποτέλεσμα της ταυτόχρονης παρουσίας των δυο αντιβιοτικών στην αντίδραση ωρίμανσης του tRNA από το M1 RNA και το ολοένζυμο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

	M1	RNase P
Control (χωρίς αντιβιοτικό)	30%	12%
Σπιραμυκίνη 20μM	63%	21%
Κλινδαμυκίνη 50μM	65%	25%
Σπιραμυκίνη 20μM Κλινδαμυκίνη 50μM	72%	31%

Πίνακας 3. Ενεργοποίηση M1 και του ολοενζύμου της RNase P απουσία και παρουσία κλινδαμυκίνης και σπιραμυκίνης. Στον πίνακα αναγράφονται τα ποσοστά της % αντίδρασης.

Από τον παραπάνω πίνακα, προκύπτει η ταυτόχρονη παρουσία των δύο αντιβιοτικών προκαλεί μία μικρή αύξηση στην ενεργοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας τόσο του M1 RNA όσο και του ολοενζύμου, χωρίς όμως αυτή η ενεργοποίηση να είναι προσθετική.

Συζήτηση

20. Συζήτηση

Η RNase P είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο συμμετέχει στην ωρίμανση των 5' άκρων των πρόδρομων tRNA μορίων μέσω ενδονουκλεολυτικής θραύσης (Altman και Kirsebom 1989). Δραστηκότητα RNase P έχει απομονωθεί από οργανισμούς και των τριών φυλογενετικών περιοχών (βακτήρια, αρχαία, ευκαρυώτες), καθώς και από μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες (Frank και Pace 1998, Schön 1999). Η RNase P, στους περισσότερους οργανισμούς από τους οποίους έχει απομονωθεί, αποτελείται από μια RNA υπομονάδα και από μία ή περισσότερες πρωτεϊνικές υπομονάδες. Η βακτηριακή RNase P αναγνωρίζει το βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος και τον T βραχίονα των πρόδρομων tRNA μορίων (Harris et al. 2003), ενώ έχει αποδειχτεί ότι η RNA υπομονάδα της RNase P είναι καταλυτικά ενεργή *in vitro*, απουσία της πρωτεϊνικής υπομονάδας και παρουσία υψηλής ιοντικής ισχύος σε αντιπροσώπους και των τριών φυλογενετικών περιοχών (Guerrier-Takara et al. 1983, Panucci et al 1999, Hole και Brown 2002, Kikovska et al 2007).

Πολλά αντιβιοτικά, τα οποία είναι αναστολείς της πεπτιδυλοτρανσφεράσης, αλληλεπιδρούν με ριβοένζυμα, μεταξύ των οποίων και με την RNase P, επηρεάζοντας τη δραστηκότητα του ενζύμου, σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό μας (Vourekas et al 2006, Toumpeki et al 2008). Εκτός από τους αμονιγλυκοζίτες, πολλά άλλα μικρά μόρια, όπως η πουρομυκίνη, η αμισετίνη, η βλαστισιδίνη S, οι πορφυρίνες, οι πορφύνες, τα ρετινοϊδή, η καλσιποτριόλη και η ανθραλίνη, φαίνεται να επηρεάζουν τη δραστηκότητα της ευκαρυωτικής RNase P (Vourekas et al. 2006). Η πουρομυκίνη, η αμισετίνη και η βλαστισιδίνη S, αναστέλλουν την ωρίμανση των tRNA μορίων από την ευκαρυωτική RNase P, κατά ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Επιπροσθέτως, τα ρετινοϊδή και τα αροτινοϊδή έχει δείχθει ότι προκαλούν απευθείας αναστολή της δραστηκότητας της ευκαρυωτικής RNase P *in vitro* (Papadimou et al. 1998, Papadimou et al. 2000, Papadimou et al. 2003). Επίσης, η καλσιποτριόλη εμφανίζει μια διπλή δοσοεξαρτώμενη δράση επί της δραστηκότητας της ευκαρυωτικής RNase P *in vitro*. Η δραστηκότητα της RNase P ενεργοποιείται σε συγκεντρώσεις της καλσιποτριόλης μέχρι 50 μM , ενώ αναστέλλεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του μορίου (Papadimou et al. 2000). Τέλος, η ανθραλίνη μπορεί επίσης να αναστείλει την ωρίμανση του πρόδρομου tRNA από την ευκαρυωτική RNase P κατά ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Drainas et al. 2000). Πάντως, άγνωστο παραμένει το γεγονός αν η καλσιποτριόλη, η ανθραλίνη, τα ρετινοϊδή και τα αροτινοϊδή στοχεύουν το RNA μόριο, τις πρωτεϊνικές υπομονάδες ή κάποιο άλλο άγνωστο συστατικό της ευκαρυωτικής RNase P (Vourekas et al. 2006).

Οι λινκοσαμίδες αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση στο βακτηριακό κύτταρο μέσω πρόσδεσής τους στο 23S rRNA της 50S υπομονάδας του ριβοσώματος. Η σπιραμυκίνη, από μελέτες που έχουν γίνει στο εργαστήριό μας, έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί την ενζυμική δραστηκότητα του ολοενζύμου της βακτηριακής RNase P και της RNA υπομονάδας της, δηλαδή του M1 RNA, μέσω αλλαγής διαμόρφωσης που προκαλείται από το αντιβιοτικό στην περιοχή P10/11 του M1 RNA.

Στα πειράματα που έγιναν, χρησιμοποιήθηκε η λινκοσαμίδα κλινδαμυκίνη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η κλινδαμυκίνη ενεργοποιεί τη δραστικότητα του βακτηριακού ολοενζύμου αλλά και της RNA υπομονάδας της (M1 RNA) κατά ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι η δοσοεξαρτώμενη ενεργοποίηση της RNA υπομονάδας (M1 RNA) ξεκινάει από 0,5 μM κλινδαμυκίνης (6,6% ενεργοποίηση) και παρουσιάζει μέγιστο στα 20 μM κλινδαμυκίνης (119,41% ενεργοποίηση), ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού η ενεργοποίηση παραμένει σταθερή στο μέγιστο ποσοστό. Όσον αφορά στο ολοένζυμο της RNase P, επίσης, η δοσοεξαρτώμενη ενεργοποίηση ξεκινάει από 0,5 μM κλινδαμυκίνης (27% ενεργοποίηση) και παρουσιάζει μέγιστο στα 20 μM κλινδαμυκίνης (111,43% ενεργοποίηση).

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να μελετηθεί η τυχόν συνδυαστική και προσθετική επίδραση της κλινδαμυκίνης και της σπιραμυκίνης στην ενζυμική δραστικότητα του M1 RNA και του ανασυσταμένου ολοενζύμου της RNase P. Έτσι, φάνηκε ότι η ταυτόχρονη παρουσία 20 μM σπιραμυκίνης και 50 μM κλινδαμυκίνης κατά την ενζυμική αντίδραση, προκαλεί μία μικρή αύξηση στην ενεργοποίηση της δραστικότητας τόσο του M1 RNA όσο και του ολοενζύμου, αλλά χωρίς να είναι προσθετική. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται στο ότι τα δύο αντιβιοτικά προσδένονται στην ίδια θέση πάνω στο M1 RNA, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ταυτόχρονη δράση τους, εφόσον συναγωνίζονται για την ίδια θέση πρόσδεσης πάνω στο ριβοένζυμο. Επίσης, είναι πιθανό μετά την πρόσδεση του ενός αντιβιοτικού στο M1 RNA, να αλλάζει η δομή του μορίου, όπως έχει ήδη αποδειχτεί ότι συμβαίνει παρουσία σπιραμυκίνης, με αποτέλεσμα να μην μπορεί πλέον το δεύτερο αντιβιοτικό να προσδεθεί πάνω στο M1 RNA και επομένως να επηρεάσει τη δραστικότητά του. Προκειμένου να εξακριβωθούν οι παραπάνω υποθέσεις, πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειράματα.

Το M1 RNA αποτελεί ένα μόριο ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, γιατί τα τελευταία χρόνια έχει εισαχθεί σαν ένα νέο εργαλείο στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης και στη γονιδιακή θεραπεία. Σημαντικό χαρακτηριστικό του ριβοενζύμου, είναι η μεγάλη εξειδίκευση που παρουσιάζει, αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες δομές και όχι αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η στόχευση οποιασδήποτε αλληλουχίας RNA.

Η επίδραση των λινκοσαμίδων και συγκεκριμένα της κλινδαμυκίνης στο M1 RNA δείχνει ότι αυτή η κατηγορία αντιβιοτικών, θα μπορούσε να διαδραματίσει διπλό ρόλο στη θεραπεία. Εκτός από το ρόλο τους στην καταπολέμηση των παθογόνων μικροοργανισμών, το σύμπλοκο M1 RNA-λινκοσαμίδιο θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης και στη γονιδιακή θεραπεία, μιας και βρέθηκε ότι η συγκεκριμένη κατηγορία αντιβιοτικών φαίνεται να ενεργοποιεί το M1 RNA.

21.Βιβλιογραφία

- Altman S. (1993) RNA enzyme-directed gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10898-10900
- Altman S., Baer M.F., Bartkiewicz M., Gold H., Guerrier-Takada C., Kirsebom L.A., Lumelsky N., Peck K. (1989) Catalysis by the RNA subunit of RNase P-a minireview. *Gene* 82: 63-64
- Crick F. (1968). The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.* 38: 367-379
- Deutscher M.P., Cundy H. (1980) Apparent involvement of ribonuclease D in the 3' processing of tRNA precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 77: 837-841
- Drainas D., Papadimou E., Monastirli A., Tsambaos D., Merk H.F. (2000) Dose-dependent inhibition of ribonuclease P activity by anthralin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin. Physiol.* 13: 128-132
- Easterwood T.R., Harvey S.C. (1997) Ribonuclease P RNA: models of the 15/16 bulge from *Escherichia coli* and the P15 stem loop of Bacillus subtilis. *RNA* 3: 577-585
- Frank D.N., Pace N.R. (1998) Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Ann. Rev. Biochem.* 67:153-180
- Gale E.F., Cundliffe E., Richmond M.H., Waring M.J. (1981) The molecular basis of antibiotic action. Wiley, London.
- Gilbert, W. (1986). The RNA world. *Nature* 319: 618
- Gobert A., Gutmann B., Taschner A., Gössringer M., Holzmann J., Hartmann R.K., Rossmann W. and Giegé P. (2010) A single Arabidopsis organellar protein has RNase P activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 740-744
- Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace S., Altman. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35: 849-857
- Hansen J.L, Ippolito J.A., Ban N., Nissen P., Moore P.B., Steitz T.A. (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell* 10: 117-128
- Hardt W.D., Schlegl J., Erdmann V.A., Hartmann R.K. (1995) Kinetics and thermodynamics of the RNase P RNA cleavage reaction: analysis of tRNA 3'-end variants. *J. Mol. Biol.* 247: 161-172
- Harris M.E., Zahler N.H., and Christian E.L. (2003) Recognition of the 5' leader of pre-tRNA substrates by the active site of ribonuclease P. *RNA*, 9: 734-745
- Hartmann R.K., Krupp G., Hardt W.D. (1995) Towards a new concept of gene inactivation: specific RNA cleavage by endogenous ribonuclease P. *Ann. Rev. Biotech.* 1: 215-265

- Hausner T.P., Geigenmüller U., Nierhaus K.H. (1988) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. New insights into the inhibition mechanisms of aminoglycosides, thiostrepton, and viomycin. *J. Biol. Chem.* 263: 13103-13111
- Hodgson R.A., Shirley N.J., and Symons R.H. (1994) Probing the hammerhead ribozyme structure with ribonucleases. *Nucleic Acids Res.* 22: 1620-1625
- Holzmann J., Frank P., Löffler E., Bennett K.L., Gerner C., Rossmann W. (2008) RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* 135: 462-474
- Jaeger L. (1997). The New World of ribozymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 324-335
- Joyce G.F., Orgel L.E., Arrhenius G., Bada J.L., Lazcano A., Miller S. (1999) Origin and ancestor: separate environments. *Science* 283: 792
- Kikovska E., Svärd S.G., Kirsebom L.A. (2007) Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104: 2062-2067
- Kirsebom L.A., Svärd S.G. (1993) Identification of a region within M1 RNA of *Escherichia coli* RNase P important for the location of the cleavage site on a wild-type tRNA precursor. *J. Mol. Biol.* 231: 594-604
- Krasilnikov A.S., Yang X., Pan T. and Mondragon A. (2003) Crystal structure of the specificity domain of ribonuclease P. *Nature* 421: 760-764
- Kruger K., Grabowski P., Zaug A., Sands J., Gottschling D., Cech T. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31: 147-157
- Krupp G., Cheravil B., Frendewey D., Nishikawa S., and Soll D. (1986) Two RNA species co-purify with RNase P from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 5: 1696-1703
- Mao J., Schmidt O., Soll D. (1980) Dimeric transfer RNA precursors in *S. pombe* *Cell* 21: 509-516
- Milligan J.F., Groebe D.R., Witherell G.W., Uhlenbeck O.C. (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* 15: 8783-8798
- Moazed D., Noller H.F. (1987) Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 327: 389-394
- Nichols R.A., Spandidos D.A., Wilkie N.M., and Pintzas A. (1988) Phorbol ester-responsive H-ras1 gene promoter contains multiple TPA-inducible/AP-1-binding consensus sequence elements. *FEBS Lett.* 240: 191-195
- Nomura T., Ishihama A. (1988) A novel function of RNase P from *Escherichia coli*: processing of a suppressor tRNA precursor. *EMBO J.* 7: 3539-3545
- Orgel L.E. (1968) Evolution of the genetic apparatus. *J. Mol. Biol.* 38: 381-393

- Pace N.R., Brown J.W. (1995) Evolutionary perspective on the structure and function of ribonuclease P, a ribozyme. *J. Bacteriol.* 177: 1919-1928
- Pan T., Loria A., Zhong K. (1995) Probing of tertiary interactions in RNA: 2'-hydroxyl-base contacts between the RNase P RNA and pre-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92: 12510-12514
- Pannucci J.A., Haas E.S, Hall T.A, Harris J.K, Brown J.W. (1999) RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7803-7808
- Papadimou E., Georgiou S., Tsambaos D., Drainas D. (1998) Inhibition of ribonuclease P activity by retinoids. *J. Biol. Chem.* 273: 24375-24378
- Papadimou E., Monastirli A., Tsambaos D., Merk H.F., Drainas D. (2000) Inhibitory effects of arotinoids of tRNA biogenesis. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 13: 345-351
- Papadimou E., Pavlidou D., Seraphin B., Tsambaos D., Drainas D. (2003) Retinoids inhibit human epidermal keratinocyte RNase P activity. *Biol. Chem.* 384: 457-462
- Pyle A.M. (1993). Ribozymes: a distinct class of metalloenzymes. *Science* 261: 709-714
- Randau L., Schroder I. and Soll D. (2008) Life without RNase P. *Nature* 453: 120-123
- Rich A., Kim S.H. (1978) The three-dimensional structure of transfer RNA. *Sci. Am.* 238: 52-62
- Rivera-Leon R., Green C.J., Vold B.S. (1995) High-level expression of soluble recombinant RNase P protein from Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 177: 2564-2566
- Rogers J., Chang H.A., von Ahsen U., Schroeder R., Davies J. (1996) Inhibition of the self-cleavage reaction of the human hepatitis delta virus ribozyme by antibiotics. *J. Mol. Biol.* 259: 916-925
- Schimmel P., de Pouplana L.R. (1995) Transfer RNA: from minihelix to genetic code. *Cell* 81: 983-986
- Smith D., Pace N.R. (1993). Multiple magnesium ions in the ribonuclease P reaction mechanism. *Biochemistry* 32: 5273-5281
- Spahn C.M.T., Prescott C.D. (1996) Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus. *J. Mol. Med.* 74: 423-439
- Stage T.K., Hertel K.J., Uhlenbeck O.C. (1995) Inhibition of the hammerhead ribozyme by neomycin. *RNA* 1: 95-101
- Stathopoulos C., Tekos A., Zarkadis I.K., Drainas D. (2001) Extensive deproteinization of Dictyostelium discoideum RNase P reveals a new catalytic activity. *Eur. J. Biochem.* 268: 2134-2140
- Steitz T.A., Moore P.B. (2003) RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends Biochem. Sci.* 28: 411-418

- Steitz T.A., Steitz J.A. (1993) A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6498-6502
- Svård S.G., Kirsebom L.A. (1993) Determinants of *Escherichia coli* RNase P cleavage site selection: a detailed *in vitro* and *in vivo* analysis. *Nucleic Acids Res.* 21: 427-434
- Tanner N.K. (1999) Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 257-275
- Tekos A., Stathopoulos C., Tsambaos D., Drainas D. (2004) RNase P: A Promising Molecular Target for the Development of New Drugs. *Curr. Med. Chem.* 11: 2979-2989
- Tekos A., Stathopoulos C., Drainas D., (1998) Bimodal Action of Alkaline Earth Cations on *Dictyostelium discoideum* Ribonuclease P Activity. *Biochemistry* 37: 15474-15480
- Tenson T., Lovmar M., Ehrenberg M., (2003) The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J. Mol. Biol.* 330: 1005-1014
- Thomas C.B., Li X., Gegenheimer P. (2000) Chloroplast ribonuclease P does not utilize the ribozyme-type pre-tRNA cleavage mechanism. *RNA* 6: 545-555
- Toumpeki C., Vourekas A., Kalavrizioti D., Stamatopoulou V., Drainas D. (2008) Activation of bacterial ribonuclease P by macrolides. *Biochemistry* 47:4112-4118
- Torres-Larios A., Swinger K.K., Pan T., Mondragón A. (2006) Structure of ribonuclease P-a universal ribozyme. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 327-335
- Tsai H.S., Masquida B., Biswas R., Westhof E., Gopalan V., (2003) Molecular modeling of the three-dimensional structure of the bacterial RNase P holoenzyme *J. Mol. Biol.* 325: 661-675
- Vázquez D. (1979) Inhibitors of protein biosynthesis. Springer-Verlag, Heidelberg, New York.
- Yuan Y., Altman S. (1994) Selection of guide sequences that direct efficient cleavage of mRNA by human ribonuclease P. *Science* 263:1269-1273
- von Ahsen U., Davies J., Schroeder R. (1991) Antibiotic inhibition of group I ribozyme function. *Nature* 353: 368-370
- Vourekas A., Stamatopoulou V., Toumpeki C., Tsitlaidou M., Drainas D. (2008) Insights into functional modulation of catalytic RNA activity. *IUBMB Life.* 60: 669-683
- Vourekas A., Kalavrizioti D., Stathopoulos C., Drainas D. (2006) Modulation of catalytic RNA biological activity by small molecule effectors. *Mini Rev. Med. Chem.* 6: 971-978
- Yuan Y, Altman S. (1994) Selection of guide sequences that direct efficient cleavage of mRNA by human ribonuclease P. *Science* 263: 1269-1273

Zapp M.L., Stern S., Green M.R. (1993) Small molecules that selectively block RNA binding of HIV-1 Rev protein inhibit Rev function and viral production. *Cell* 74: 969-978