

Κεφάλαιο 7

Ο γενετικός κώδικας

7.1	Εισαγωγή	7.11	Τα tRNA-καταστολείς έχουν μεταλλαγμένα αντικωδικόνια που αναγνωρίζουν νέα κωδικόνια
7.2	Η ταλάντευση στην αναγνώριση κωδικονίου-αντικωδικονίου	7.12	Υπάρχουν καταστολείς ανερμηνεύσιμων μεταλλάξεων για κάθε κωδικόνιο τερματισμού
7.3	Τα tRNA προέρχονται από την επεξεργασία μεγαλύτερων πρόδρομων μορίων	7.13	Τα tRNA-καταστολείς ανταγωνίζονται τα tRNA άγριου τύπου στην ανάγνωση του κώδικα
7.4	Τα tRNA περιέχουν τροποποιημένες βάσεις	7.14	Το ριβόσωμα επηρεάζει την ακρίβεια της μετάφρασης
7.5	Οι τροποποιημένες βάσεις επηρεάζουν τη σύζευξη αντικωδικονίου-κωδικονίου	7.15	Η ανακωδικοποίηση αλλάζει το νόημα των κωδικονίων
7.6	Σποραδικά παρατηρούνται αποκλίσεις από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα	7.16	Η μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου συμβαίνει σε «ολισθηρές» αλληλουχίες
7.7	Σε ορισμένα κωδικόνια τερματισμού μπορούν να προστεθούν ασυνήθιστα αμινοξέα	7.17	Η παράκαμψη ενέχει τη μετακίνηση του ριβοσώματος
7.8	Τα tRNA φορτώνονται με αμινοξέα από τις συνδετάσες	7.18	Περίληψη
7.9	Οι συνδετάσες των αμινοακυλο-tRNA χωρίζονται σε δύο ομάδες		
7.10	Οι συνδετάσες αυξάνουν την πιστότητά τους πραγματοποιώντας διορθωτικό έλεγχο		

7.1 Εισαγωγή

Σημαντικές έννοιες

- ▶ 61 από τις 64 πιθανές τριπλέτες κωδικοποιούν 20 αμινοξέα.
- ▶ 3 κωδικόνια δεν αντιστοιχούν σε αμινοξέα και προκαλούν τερματισμό.
- ▶ Τα πιο πολλά αμινοξέα αντιπροσωπεύονται από περισσότερα από ένα κωδικόνια.
- ▶ Όταν πολλαπλά κωδικόνια κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ είναι συνήθως παρόμοια.
- ▶ Συχνά, αμινοξέα με παρόμοιες δομές κωδικοποιούνται από κωδικόνια με παρόμοιες τριπλέτες, ελαχιστοποιώντας τις επιπτώσεις των μεταλλάξεων.

Η αλληλουχία μιας κωδικής αλυσίδας DNA, όταν διαβάζεται από το 5' προς το 3' άκρο, αποτελείται από τριάδες ή τριπλέτες νουκλεοτιδίων (κωδικόνια) που αντιστοιχούν στην αλληλουχία των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης η οποία διαβάζεται από το N-τελικό προς το C-τελικό άκρο. Η ταυτοποίηση της αλληλουχίας του DNA και των πρωτεϊνών καθιστά δυνατή την άμεση σύγκριση των αντίστοιχων νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών. Υπάρχουν 64 κωδικόνια (καθένα από τα 4 πιθανά νουκλεοτίδια μπορεί να καταλάβει καθεμία από τις 3 θέσεις

Ο γενετικός κώδικας χρησιμοποιεί τριπλέτες

	Πρώτη βάση		Δεύτερη βάση	
	U	C	A	G
U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } STOP UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } STOP UGG } Trp
C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }
A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG } Met	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }
G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }

©virtualtext www.ergito.com

Εικόνα 7.1 Όλες οι τριπλέτες-κωδικόνια έχουν νόημα: 61 αντιστοιχούν σε αμινοξέα και 3 προκαλούν τερματισμό (STOP).

του κωδικονίου, δημιουργώντας $4^3 = 64$ πιθανά τρινουκλεοτίδια). Κάθε κωδικόνιο έχει ένα συγκεκριμένο νόημα στην πρωτεϊνσύνθεση: 61 κωδικόνια αντιστοιχούν σε αμινοξέα και 3 κωδικόνια προκαλούν τον τερματισμό της πρωτεϊνσύνθεσης.

Το νόημα ενός κωδικονίου που αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ καθορίζεται από το αντίστοιχο tRNA. Το νόημα των κωδικονίων τερματισμού καθορίζεται απευθείας από πρωτεϊνικούς παράγοντες.

Η αποκρυπτογράφηση του γενετικού κώδικα απέδειξε ότι οι γενετικές πληροφορίες αποθηκεύονται με τη μορφή νουκλεοτιδικών τριπλετών, αλλά δεν αποκάλυψε τον τρόπο με τον οποίο κάθε κωδικόνιο καθορίζει το αντίστοιχο αμινοξύ του. Πριν από την ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, το νόημα κάθε κωδικονίου συναγόταν έμμεσα, χρησιμοποιώντας δύο τύπους *in vitro* μελετών. Ο Nirenberg, το 1961, ανέπτυξε ένα σύστημα μετάφρασης συνθετικών πολυνουκλεοτιδίων και απέδειξε ότι το πολουριδυλικό οξύ [poly(U)] κατευθύνει τη σύνθεση πολυφαινυλαλανίνης. Επομένως, το τρινουκλεοτίδιο UUU θα πρέπει να είναι το κωδικόνιο της φαινυλαλανίνης. Αργότερα παρουσιάστηκε ένα δεύτερο σύστημα, στο οποίο χρησιμοποιούνταν ένα τρινουκλεοτίδιο στο ρόλο ενός κωδικονίου, προκαλώντας έτσι την πρόσδεση του αντίστοιχου αμινοακυλο-tRNA στο ριβόσωμα. Με τον προσδιορισμό του αμινοξέος του αμινοακυλο-tRNA ήταν δυνατόν να βρεθεί το νόημα του κωδικονίου. Οι δύο τεχνικές αποκάλυψαν από κοινού το νόημα όλων των κωδικονίων που αντιστοιχούν σε αμινοξέα.

Ο κώδικας συνοψίζεται στην **Εικόνα 7.1**. Επειδή υπάρχουν περισσότερα κωδικόνια (61) απ' ό,τι αμινοξέα (20), σχεδόν όλα τα αμινοξέα αντιστοιχούν σε περισσότερα από ένα κωδικόνια. Οι μόνες εξαιρέσεις είναι η μεθειονίνη και η τρυπτοφάνη. Τα κωδικόνια που έχουν το ίδιο νόημα ονομάζονται **συνώνυμα** (synonyms). Επειδή ο γενετικός κώδικας διαβάζεται στο mRNA, συνήθως περιγράφεται με τις 4 βάσεις που βρίσκονται στο RNA: U, C, A και G.

Τα κωδικόνια που αντιστοιχούν στα ίδια ή συγγενή αμινοξέα έχουν συνήθως παρόμοια αλληλουχία. Συχνά, η βάση στην τρίτη θέση ενός κωδικονίου δεν είναι σημαντική, αφού τα τέσσερα κωδικόνια που διαφέρουν μόνο στην τρίτη βάση αντιστοιχούν στο ίδιο αμινοξύ. Μερικές φορές, στη θέση αυτή γίνεται διάκριση μόνο ανάμεσα σε πουρίνες και πυριμιδίνες. Η μειωμένη εξειδίκευση της τελευταίας θέσης είναι γνωστή ως **εκφυλισμός της τρίτης θέσης** (third base degeneracy).

Η ερμηνεία ενός κωδικονίου απαιτεί το σχηματισμό ζευγών βάσεων με το αντικωδικόνιο του αντίστοιχου αμινοακυλο-tRNA. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα μέσα στο ριβόσωμα: τα συμπληρωματικά τρινουκλεοτίδια είναι συνήθως πολύ μικρά για να ζευγαρώσουν με σταθερότητα όταν είναι απομονωμένα, η αλληλεπίδρασή τους όμως σταθεροποιείται από το περιβάλλον της ριβοσωμικής θέσης A. Επίσης, η διαδικασία του σχηματισμού ζευγών βάσεων ανάμεσα στο κωδικόνιο και στο αντικωδικόνιο δεν εξαντλείται στο ζευγάρωμα των A-U και G-C. Το ριβόσωμα ελέγχει το περιβάλλον, έτσι ώστε στις δύο πρώτες θέσεις το ζευγάρωμα να είναι συμβατικό, αλλά να επιτρέπονται επιπλέον αντιδράσεις στην τρίτη βάση. Κατ' αυτόν τον τρόπο, ένα αμινοακυλο-tRNA είναι δυνατόν να αναγνωρίζει περισσότερα από ένα κωδικόνια, προκαλώντας τον εκφυλισμό της τρίτης θέσης. Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις ζευγαρώματος επηρεάζονται από την εισαγωγή ειδικών

βάσεων μέσα στο tRNA, και ειδικότερα από τροποποιήσεις μέσα ή κοντά στο αντικωδικόνιο.

Η τάση να αντιπροσωπεύονται τα παρόμοια αμινοξέα από συγγενικά κωδικόνια ελαχιστοποιεί τις επιπτώσεις των μεταλλάξεων. Αυξάνει την πιθανότητα η τυχαία αλλαγή μιας βάσης να μη συνοδεύεται από την αντικατάσταση του αμινοξέος ή να προκαλεί την αντικατάστασή του από ένα άλλο αμινοξύ με παρόμοια δομή. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη της τριπλέτας CUC σε CUG δεν έχει καμία συνέπεια, επειδή και τα δύο κωδικόνια αντιπροσωπεύουν τη λευκίνη, ενώ μια μετάλλαξη από CUU σε AUU έχει ως επακόλουθο την αντικατάσταση της λευκίνης από ισολευκίνη, ένα πολύ συγγενικό αμινοξύ.

Στην **Εικόνα 7.2** παριστάνεται γραφικά ο αριθμός των κωδικονίων που αντιστοιχούν σε κάθε αμινοξύ σε συνάρτηση με τη συχνότητα με την οποία χρησιμοποιείται κάθε αμινοξύ στις πρωτεΐνες (στην *E. coli*). Υπάρχει μια ελάχιστη τάση να αντιπροσωπεύονται τα πιο συνηθισμένα αμινοξέα από περισσότερα κωδικόνια. Επομένως δε φαίνεται να έχει γίνει βελτιστοποίηση του γενετικού κώδικα με βάση τη χρήση των αμινοξέων.

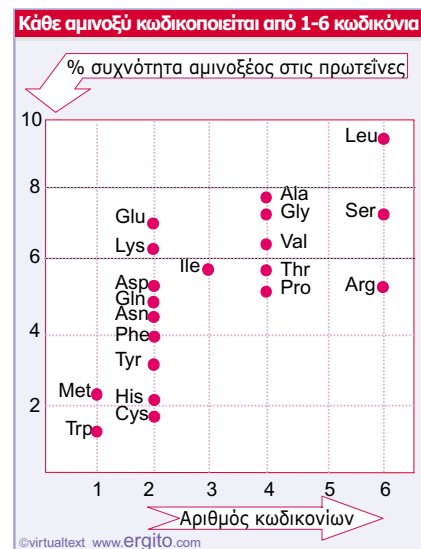
Τα τρία κωδικόνια (UAA, UAG και UGA) που δεν αντιστοιχούν σε αμινοξέα χρησιμοποιούνται ειδικά στον τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης. Ένα από αυτά τα **κωδικόνια τερματισμού** (stop codons) σηματοδοτεί το τέλος ενός γονιδίου.

Είναι ο γενετικός κώδικας ίδιος σε όλους τους έμβιους οργανισμούς;

Η σύγκριση της αλληλουχίας DNA με τις αντίστοιχες πρωτεϊνικές αλληλουχίες αποκαλύπτει ότι οι ίδιοι ακριβώς κανόνες απόδοσης των κωδικονίων χρησιμοποιούνται τόσο στα βακτήρια όσο και στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα. Κατά συνέπεια, ένα mRNA ενός είδους συνήθως μεταφράζεται σωστά *in vitro* ή *in vivo* από τη συσκευή πρωτεϊνοσύνθεσης ενός άλλου είδους. Δηλαδή τα κωδικόνια που χρησιμοποιούνται στο mRNA ενός είδους έχουν το ίδιο νόημα για τα ριβοσώματα και για τα tRNA άλλων ειδών.

Η οικουμενικότητα του γενετικού κώδικα ενισχύει την άποψη ότι πρέπει να καθιερώθηκε πολύ νωρίς στην εξέλιξη. Ίσως ο κώδικας να πρωτοεμφανίστηκε με μία πρωτόγονη μορφή, στην οποία χρησιμοποιούνταν ένας μικρός αριθμός κωδικονίων που αντιστοιχούσε σε συγκριτικά λίγα αμινοξέα. Πιθανότατα ένα κωδικόνιο να αντιστοιχούσε σε μια ομάδα αμινοξέων. Κωδικόνια με πιο ειδικό νόημα και επιπλέον αμινοξέα μπορεί να προστέθηκαν μεταγενέστερα. Ενδέχεται αρχικά να χρησιμοποιούνταν μόνο οι δύο από τις τρεις βάσεις που υπάρχουν σε κάθε κωδικόνιο. Η διάκριση στην τρίτη θέση ίσως να παρουσιάστηκε αργότερα. Αρχικά πιθανόν να υπήρχε μια στερεοχημική σχέση ανάμεσα στα κωδικόνια και στα αντίστοιχα αμινοξέα. Στη συνέχεια, εξελίχθηκε ένα πιο περίπλοκο σύστημα.

Η εξέλιξη του κώδικα μπορεί να παγιώθηκε όταν το σύστημα έγινε τόσο περίπλοκο, ώστε οποιαδήποτε αλλαγή στο νόημα των κωδικονίων θα κατέστρεφε τις υπάρχουσες πρωτεΐνες εισάγοντας μη αποδεκτά αμινοξέα. Η οικουμενικότητά του υποδεικνύει ότι αυτό θα πρέπει να συνέβη σε ένα πολύ αρχικό στάδιο, με αποτέλεσμα όλοι οι έμβιοι οργανισμοί να είναι απόγονοι ενός ενιαίου πληθυσμού αρχέγονων κυττάρων.



Εικόνα 7.2 Το πλήθος των κωδικονίων για κάθε αμινοξύ δεν αντιστοιχεί στη συχνότητα εμφάνισης του αμινοξέος στις πρωτεΐνες.

Η τρίτη βάση των κωδικονίων είναι η λιγότερο σημαντική			
UUU UUC	UCU UCC	UAU UAC	UGU UGC
UUA UUG	UCA UCG	UAA UAG	UGA UGG
CUU CUC	CCU CCC	CAU CAC	CGU CGC
CUA CUG	CCA CCG	CAA CAG	CGA CGG
AUU AUC	ACU ACC	AAU AAC	AGU AGC
AUA AUG	ACA ACG	AAA AAG	AGA AGG
GUU GUC	GCU GCC	GAU GAC	GGU GGC
GUA GUG	GCA GCG	GAA GAG	GGA GGG
Σημασία της τρίτης βάσης	Τρίτη βάση με το ίδιο νόημα	Αρ. κωδικονίων	
Η τρίτη βάση δεν παίζει ρόλο	U, C, A, G	32	
Οι πουρίνες κωδικοποιούν διαφορετικό αμινοξύ από τις πυριμιδίνες	U, C	14	
	A, G	10	
Μοναδικοί ορισμοί	U, C, A	3	
	μόνο G	2	

Εικόνα 7.3 Οι βάσεις στην τρίτη θέση έχουν τη μικρότερη επίδραση στο νόημα των κωδικονίων. Τα πλαίσια επισημαίνουν τις ομάδες κωδικονίων στις οποίες ο εκφυλισμός της τρίτης βάσης διασφαλίζει ότι όλα τα κωδικόνια έχουν το ίδιο νόημα.

Οι αποκλίσεις από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα είναι σπάνιες. Οι αλλαγές νοήματος στο γονιδίωμα ενός είδους αφορούν συνήθως τα κωδικόνια τερματισμού. Για παράδειγμα, στο μυκόπλασμα, το UGA κωδικοποιεί την τρυπτοφάνη. Σε συγκεκριμένα είδη των βλεφαριδοφόρων *Tetrahymena* και *Paramecium*, τα UAA και UAG κωδικοποιούν τη γλουταμίνη. Συστηματικές αλλαγές του κώδικα έχουν συμβεί μόνο στο μιτοχονδριακό DNA (βλ. 7.6: *Σποραδικά παρατηρούνται αποκλίσεις από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα*).

7.2 Η ταλάντευση στην αναγνώριση κωδικονίου-αντικωδικονίου

Σημαντικές έννοιες

- Τα κωδικόνια που αντιστοιχούν στο ίδιο αμινοξύ διαφέρουν συνήθως στη βάση της τρίτης θέσης τους.
- Η ταλάντευση στο ζευγάρισμα της πρώτης βάσης του αντικωδικονίου με την τρίτη βάση του κωδικονίου οφείλεται στη δομή του βρόχου του αντικωδικονίου.

Ο ρόλος του tRNA στην πρωτεϊνοσύνθεση ολοκληρώνεται όταν αναγνωρίζει το κωδικόνιο στη θέση A του ριβοσώματος. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο αντικωδικόνιο και στο κωδικόνιο ακολουθεί κανόνες διευρυμένης συμπληρωματικότητας, οι οποίοι επιτρέπουν επιπλέον αλληλεπιδράσεις, πέρα από τη δημιουργία των συνηθισμένων ζευγών G-C και A-U.

Μπορούμε να συμπεράνουμε τους κανόνες που διέπουν την αλληλεπίδραση του αντικωδικονίου με το κωδικόνιο, ταυτοποιώντας τις αλληλουχίες των αντικωδικονίων που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα κωδικόνια. Η ικανότητα ενός tRNA να αποκρίνεται σε ένα συγκεκριμένο κωδικόνιο μπορεί να εξεταστεί άμεσα, είτε μέσω της δοκιμής πρόσδεσης τρινουκλεοτιδίου είτε μέσω της χρησιμοποίησής του σε ένα *in vitro* σύστημα πρωτεϊνοσύνθεσης.

Ο ίδιος ο γενετικός κώδικας προσφέρει ορισμένες σημαντικές ενδείξεις για τη διαδικασία αναγνώρισης των κωδικονίων. Το πρότυπο εκφυλισμού της τρίτης βάσης παρουσιάζεται στην **Εικόνα 7.3**, στην οποία φαίνεται ότι σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις είτε η τρίτη βάση δε λαμβάνεται υπόψη είτε υπάρχει διάκριση μόνο ανάμεσα σε πουρίνες και πυριμιδίνες.

Υπάρχουν 8 οικογένειες που περιλαμβάνουν τέσσερα κωδικόνια η καθεμία, τα οποία μοιράζονται τις ίδιες δύο πρώτες βάσεις και έχουν το ίδιο νόημα, με συνέπεια η τρίτη βάση να μην παίζει κανέναν απολύτως ρόλο στον καθορισμό του αμινοξέος (βλ. Εικόνα 7.3, πορτοκαλί οικογένειες). Υπάρχουν 7 ζεύγη κωδικονίων τα οποία κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ, ανεξάρτητα από το ποια πυριμιδίνη υπάρχει στην τρίτη θέση (βλ. Εικόνα 7.3, μπλε οικογένειες), ενώ υπάρχουν πέντε ζεύγη κωδικονίων των οποίων η τρίτη βάση μπορεί να είναι οποιαδήποτε από τις δύο πουρίνες (βλ. Εικόνα 7.2, μοβ οικογένειες), χωρίς να αλλάζει το αμινοξύ που κωδικοποιείται.

Υπάρχουν μόνο 3 περιπτώσεις όπου η παρουσία μιας συγκεκριμένης βάσης στην τρίτη θέση αποδίδει ένα μοναδικό νόημα, οι: AUG (για μεθειονίνη), UGG (για τρυπτοφάνη) και UGA (για τερματισμό). Έτσι, οι βάσεις C και U δεν αποδίδουν ποτέ ένα μοναδικό νόημα στην τρίτη θέση, ενώ η A δεν καθορίζει ποτέ ένα μοναδικό αμινοξύ.

Επειδή το αντικωδικόνιο είναι συμπληρωματικό με το κωδικόνιο, η πρώτη βάση στην αλληλουχία του αντικωδικονίου, συμβατικά γραμμένη με κατεύθυνση 5' → 3', είναι αυτή που ζευγαρώνει με την τρίτη βάση στην αλληλουχία του κωδικονίου, γραμμένη με τον ίδιο συμβατικό τρόπο. Έτσι, ο συνδυασμός

κωδικόνιο 5' **A C G** 3'
αντικωδικόνιο 3' **U G C** 5'

συνήθως γράφεται ως κωδικόνιο ACG/αντικωδικόνιο CGU και επομένως η αλληλουχία του αντικωδικονίου θα πρέπει να διαβαστεί ανάποδα, για να φανεί η συμπληρωματικότητά της με το κωδικόνιο.

Για να αποφευχθεί η σύγχυση, από δω και στο εξής θα διατηρούμε το συνήθη συμβατικό τρόπο με τον οποίο όλες οι αλληλουχίες είναι γραμμένες με κατεύθυνση 5' → 3', αλλά θα επισημαίνουμε τις αλληλουχίες των αντικωδικονίων με ένα ανάποδο βέλος, ως υπενθύμιση για τη σχέση τους με το κωδικόνιο. Συνεπώς το ζεύγος κωδικονιο-αντικωδικόνιο που παρουσιάστηκε παραπάνω θα γράφεται ως ACG και CGU[←] αντίστοιχα.

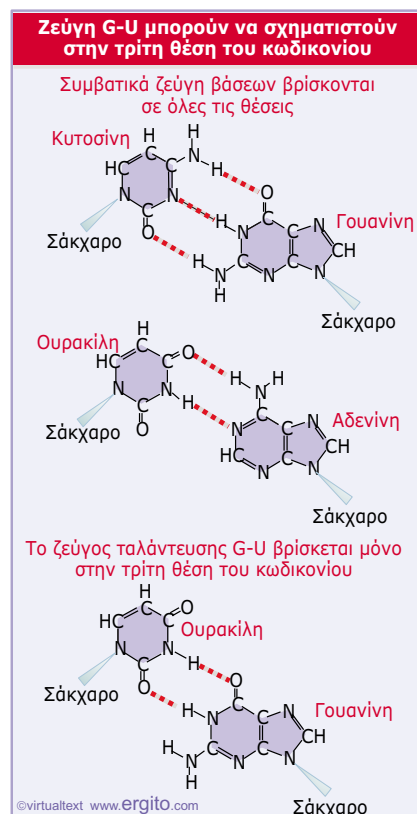
Κάθε τριπλέτα νουκλεοτιδίων απαιτεί το δικό της tRNA με συμπληρωματικό αντικωδικόνιο; Ή μπορεί ένα μόνο tRNA να ανταποκριθεί σε όλα ή έστω σε μερικά μέλη μιας οικογένειας κωδικονίων;

Συχνά, ένα tRNA αναγνωρίζει περισσότερα από ένα κωδικόνια. Αυτό σημαίνει ότι η βάση στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου θα πρέπει να είναι σε θέση να ζευγαρώνει με εναλλακτικές βάσεις στην αντίστοιχη τρίτη θέση του κωδικονίου. Το ζευγάρωμα βάσεων σε αυτή τη θέση δεν μπορεί να περιορίζεται στα συνήθη ζεύγη G-C και A-U.

Οι κανόνες που διέπουν τα πρότυπα αναγνώρισης συνοψίζονται στην **υπόθεση ταλάντευσης** (wobble hypothesis), η οποία υποστηρίζει ότι το ζευγάρωμα ανάμεσα στο κωδικόνιο και στο αντικωδικόνιο, στις δύο πρώτες θέσεις του κωδικονίου, υπακούει πάντα στον κανόνα της συμπληρωματικότητας και ότι μόνο στην τρίτη θέση μπορεί να συμβεί μη συμβατικό ζευγάρωμα (ταλάντευση) βάσεων. Η ταλάντευση συμβαίνει επειδή η διαμόρφωση του βρόχου του αντικωδικονίου του tRNA προσδίδει ευελιξία στην πρώτη βάση του αντικωδικονίου. Στην **Εικόνα 7.4** φαίνεται ότι εκτός από τα συνήθη ζεύγη μπορούν να σχηματιστούν και ζεύγη G•U.

Αυτή η ιδιαιτερότητα επιτρέπει το ζευγάρωμα των βάσεων με τέτοιο τρόπο, ώστε η βάση A να μην έχει πλέον μονοσήμαντη σχέση με το κωδικόνιο (αφού η βάση U που την αναγνωρίζει μπορεί να αναγνωρίζει και τη βάση G). Επίσης, η βάση C μπορεί να ερμηνευτεί με δύο τρόπους (επειδή η βάση G που την αναγνωρίζει μπορεί να αναγνωρίζει και τη βάση U). Στην **Εικόνα 7.5** παρουσιάζεται συνοπτικά το πρότυπο αναγνώρισης.

Η αναγνώριση μοναδικών κωδικονίων είναι επομένως δυνατή μόνο όταν η βάση στην τρίτη θέση είναι G ή U, πράγμα σπάνιο, αφού τα UGG και AUG είναι τα μόνα παραδείγματα του πρώτου τύπου, ενώ δεν υπάρχει παράδειγμα για το δεύτερο τύπο.



Εικόνα 7.4 Η ταλάντευση στο ζευγάρωμα βάσεων επιτρέπει το σχηματισμό ζευγών G-U μεταξύ της τρίτης βάσης του κωδικονίου και της πρώτης βάσης του αντικωδικονίου.

Τα ζεύγη ταλάντευσης στην τρίτη θέση του κωδικονίου	
Βάση στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου	Βάση ή βάσεις που αναγνωρίζονται στην τρίτη θέση του κωδικονίου
U	A ή G
C	μόνο G
A	μόνο U
G	C ή U

©virtualtext www.ergito.com

Εικόνα 7.5 Το ζευγάρωμα κωδικονίου-αντικωδικονίου περιλαμβάνει ταλάντευση στην τρίτη θέση.

7.3 Τα tRNA προέρχονται από την επεξεργασία μεγαλύτερων πρόδρομων μορίων

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Το ώριμο tRNA παράγεται από την επεξεργασία ενός πρόδρομου μορίου.
- ▶ Το 5' άκρο δημιουργείται με αποκοπή από την ενδονουκλεάση RNAάση P.
- ▶ Το 3' άκρο δημιουργείται με αποκοπή, η οποία ακολουθείται από τη διαδοχική απομάκρυνση των τελευταίων βάσεων και την προσθήκη της κοινής τερματικής τρινουκλεοτιδικής αλληλουχίας CCA.

Τα tRNA συνήθως συντίθενται ως πρόδρομες αλυσίδες με επιπλέον αλληλουχίες στο ένα ή και στα δύο άκρα. Στην **Εικόνα 7.6** φαίνεται ότι οι επιπλέον αλληλουχίες αφαιρούνται από το συνδυασμό ενδονουκλεολυτικών και εξωνουκλεολυτικών ενεργιοτήτων. Ένα κοινό γνώρισμα στα περισσότερα tRNA είναι ότι τα τρία νουκλεοτίδια στο 3' άκρο

τους (η τριπλέτα CCA) δεν κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα, αλλά προστίθενται κατά τη διαδικασία επεξεργασίας του tRNA. Το 5' άκρο του tRNA δημιουργείται με μια αντίδραση αποκοπής, η οποία καταλύεται από το ένζυμο ριβονουκλεάση P.

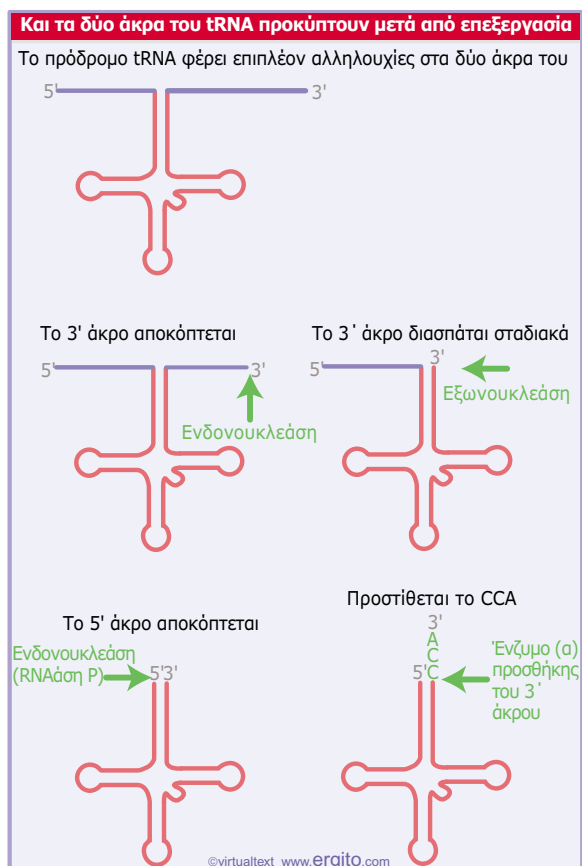
Τα ένζυμα που επεξεργάζονται το 3' άκρο έχουν μελετηθεί περισσότερο στην *E. coli*, όπου το έναυσμα δίνεται από μια ενδονουκλεάση που διασπά το πρόδρομο μόριο πριν από το 3' άκρο. Στη συνέχεια, διάφορες εξωνουκλεάσες το διασπούν σταδιακά από το νέο άκρο με κατεύθυνση 3' → 5'. Η αντίδραση στους ευκαρυώτες συμπεριλαμβάνει επίσης αρκετά ένζυμα. Το τελικό προϊόν είναι ένα tRNA που απαιτεί την προσθήκη του τρινουκλεοτιδίου CCA στο 3' άκρο του.

Η προσθήκη του CCA είναι το αποτέλεσμα μιας ενζυμικής ενεργότητας ειδικής για την αλληλουχία του τρινουκλεοτιδίου, η οποία δεν καθορίζεται από κάποια μήτρα. Υπάρχουν διάφορα μοντέλα για τη διαδικασία αυτή, η οποία μπορεί να διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό.

Σε κάποιους οργανισμούς, η διαδικασία καταλύεται από ένα μόνο ένζυμο. Ένα μοντέλο για τη δράση του υποστηρίζει ότι το ένζυμο προσδένεται στο 3' άκρο και προσθέτει διαδοχικά C, C και A, ενώ η ειδικότητά του σε κάθε στάδιο καθορίζεται από τη δομή του 3' άκρου. Άλλα μοντέλα θεωρούν ότι το ένζυμο έχει διαφορετικά ενεργά κέντρα για CTP και ATP.

Σε άλλους οργανισμούς, διαφορετικά ένζυμα ευθύνονται για την προσθήκη των καταλοίπων C και A και δρουν διαδοχικά.

Όταν ένα tRNA δεν είναι κατάλληλα επεξεργασμένο, ενεργοποιείται ένα σύστημα ποιοτικού ελέγχου που αποικοδομεί το ακατάλληλο tRNA, διασφαλίζοντας ότι η συσκευή πρωτεϊνοσύνθεσης δεν παρεμποδίζεται από μη λειτουργικά tRNA.



Εικόνα 7.6 Το 3' άκρο του tRNA δημιουργείται με αποκοπή, διαδοχική απόσπαση βάσεων και επακόλουθη προσθήκη του CCA. Το 5' άκρο δημιουργείται με αποκοπή.

7.4 Τα tRNA περιέχουν τροποποιημένες βάσεις

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Τα tRNA περιέχουν >50 τροποποιημένες βάσεις.
- ▶ Συνήθως οι βάσεις του tRNA τροποποιούνται άμεσα, αλλά σε μερικές σπάνιες περιπτώσεις μία βάση μπορεί να αφαιρεθεί και να αντικατασταθεί από μία ήδη τροποποιημένη βάση.

Ένα χαρακτηριστικό του tRNA είναι οι «ασυνήθιστες» βάσεις που περιλαμβάνει. Μια «ασυνήθιστη» βάση είναι οποιοσδήποτε πουρινικός ή πυριμιδινικός δακτύλιος, εκτός από τους συνηθισμένους A, G, C και U, που απαντώνται σε όλα τα RNA. Όλες οι υπόλοιπες βάσεις παράγονται με **τροποποίηση** (modification) μίας από τις τέσσερις βάσεις, μετά την ενσωμάτωσή τους στην πολυριβονουκλεοτιδική αλυσίδα.

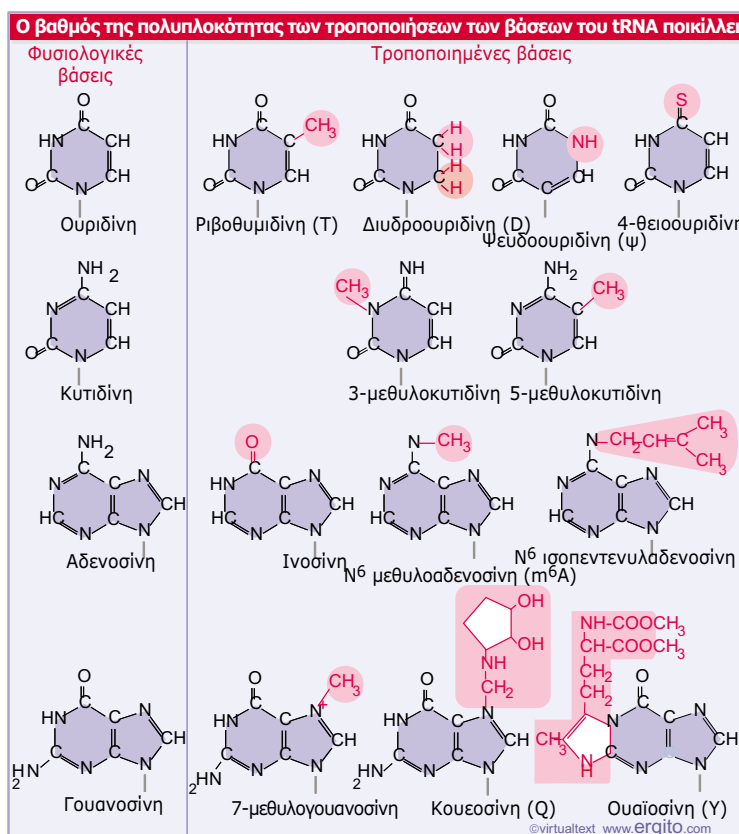
Όλες οι τάξεις RNA παρουσιάζουν τροποποιήσεις σε κάποιο βαθμό, αλλά σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός του tRNA, είναι σχετικά περιορισμένες, όπως, για παράδειγμα, απλές προσθήκες μεθυλομάδων. Στο tRNA υπάρχει μια τεράστια ποικιλία τροποποιήσεων που κυμαίνονται από την απλή μεθυλίωση μέχρι την ολοκληρωτική αναδόμηση του πουρινικού δακτυλίου. Οι τροποποιήσεις συμβαίνουν σε όλες τις επικράτειες του tRNA. Υπάρχουν πάνω από 50 διαφορετικοί τύποι τροποποιημένων βάσεων στο tRNA.

Στην **Εικόνα 7.7** παρουσιάζονται μερικές από τις πιο συνηθισμένες τροποποιημένες βάσεις. Οι τροποποιήσεις των πυριμιδινών (C και U) είναι λιγότερο πολύπλοκες από εκείνες των πουρινών (A και G). Εκτός από τις τροποποιήσεις στις ίδιες τις βάσεις, πραγματοποιείται και μεθυλίωση στη 2'-Ο θέση του δακτυλίου της ριβόζης.

Οι πιο κοινές τροποποιήσεις της ουριδίνης είναι απλές. Η μεθυλίωση στην 5 θέση δημιουργεί τη ριβοθυμιδίνη (T). Η θυμίνη είναι συχνή στο DNA, αλλά εδώ είναι συνδεδεμένη με ριβόζη και όχι με δεοξυριβόζη. Στο RNA, η θυμίνη είναι μια ασυνήθιστη βάση που προέρχεται από την τροποποίηση της ουριδίνης.

Η διυδροουριδίνη (D) δημιουργείται από τον κορεσμό ενός διπλού δεσμού, που οδηγεί σε αλλαγή της δομής του δακτυλίου. Στην ψευδοουριδίνη (ψ) υπάρχει ανταλλαγή στις θέσεις ατόμων N και C (βλ. Εικόνα 24.40). Στην 4-θειοουριδίνη ένα οξυγόνο έχει αντικατασταθεί με θείο.

Το νουκλεοτίδιο ινোসίνης (I) βρίσκεται φυσιολογικά στο κύτταρο ως ενδιάμεσο μόριο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της πουρίνης. Ωστόσο, δεν ενσωματώνεται απευθείας στο RNA, αλλά η παρουσία του εξαρτάται από την τροποποίηση της A σε I. Άλλες τροποποιήσεις της A ενέχουν την προσθήκη σύνθετων ομάδων.



Εικόνα 7.7 Και οι τέσσερις βάσεις μπορούν να τροποποιηθούν στο tRNA.

Δύο σύνθετες ομάδες νουκλεοτιδίων εξαρτώνται από την τροποποίηση της G. Οι βάσεις Q, όπως η κουεοσίνη (queuosine), έχουν έναν επιπρόσθετο πεντενυλικό δακτύλιο ο οποίος προστέθηκε στη μεθυλομάδα της 7-μεθυλογουανοσίνης μέσω μιας ομάδας NH. Ο πεντενυλικός δακτύλιος μπορεί να φέρει διάφορες επιπλέον ομάδες. Οι βάσεις Y, όπως η ουαίοσίνη (wyosine), έχουν έναν επιπρόσθετο δακτύλιο συγχωνευμένο με τον πουρινικό δακτύλιο. Ο επιπλέον δακτύλιος φέρει μια επιμήκη αλυσίδα, στην οποία προστίθενται επιπλέον ομάδες.

Η αντίδραση τροποποίησης συνήθως περιλαμβάνει τη μετατροπή ή την προσθήκη χημικών ομάδων στις υπάρχουσες βάσεις του tRNA. Μια εξαίρεση είναι η σύνθεση των βάσεων Q, όπου ένα ειδικό ένζυμο αντικαθιστά ένα κατάλοιπο γουανοσίνης του tRNA με μια ελεύθερη κουεοσίνη. Η αντίδραση ενέχει τη διάσπαση και την ανακατασκευή δεσμών και στις δύο πλευρές του νουκλεοτιδίου.

Τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια συντίθενται με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων. Το νουκλεοτίδιο που υπήρχε αρχικά σε κάθε θέση μπορεί να προσδιοριστεί είτε συγκρίνοντας την αλληλουχία του tRNA με αυτήν του αντίστοιχου γονιδίου είτε (με λιγότερη αποτελεσματικότητα) απομονώνοντας πρόδρομα μόρια που στερούνται κάποιων ή όλων των τροποποιήσεων. Οι αλληλουχίες των πρόδρομων μορίων δείχνουν ότι διάφορες τροποποιήσεις εισάγονται σε διαφορετικά στάδια κατά την ωρίμανση του tRNA.

Κάποιες τροποποιήσεις αποτελούν κοινά χαρακτηριστικά όλων των μορίων tRNA – για παράδειγμα, οι βάσεις D, από τις οποίες προήλθε το όνομα του βραχίονα D, και οι βάσεις ψ, οι οποίες βρίσκονται στην αλληλουχία TψC του ομώνυμου βραχίονα. Στην 3' πλευρά του αντικωδικονίου υπάρχει πάντα μια τροποποιημένη πουρίνη, ωστόσο το είδος της τροποποίησης ποικίλλει ευρέως.

Άλλες τροποποιήσεις είναι ειδικές για συγκεκριμένα tRNA ή ομάδες tRNA. Για παράδειγμα, οι βάσεις ουαίοσίνης είναι χαρακτηριστικές για το tRNA^{Phe} στα βακτήρια, στις ζύμες και στα θηλαστικά. Επίσης, υπάρχουν και ειδο-ειδικά πρότυπα.

Η εξειδίκευση των διαφόρων ενζύμων τροποποίησης του tRNA (~60 στο ζυμομύκητα) ποικίλλει σημαντικά. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ένα ένζυμο δημιουργεί μια συγκεκριμένη τροποποίηση σε μία μόνο θέση. Σε άλλες περιπτώσεις, ένα ένζυμο μπορεί να τροποποιήσει βάσεις σε διάφορες θέσεις-στόχους. Κάποια ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις σε συγκεκριμένα tRNA, ενώ άλλα έχουν ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Τα χαρακτηριστικά που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα τροποποίησης tRNA είναι άγνωστα, αλλά πιθανώς αφορούν δομικά χαρακτηριστικά της θέσης που τροποποιείται. Κάποιες τροποποιήσεις απαιτούν τη διαδοχική δράση περισσότερων από ένα ενζύμων.

7.5 Οι τροποποιημένες βάσεις επηρεάζουν τη σύζευξη αντικωδικονίου-κωδικονίου

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Οι τροποποιήσεις στο αντικωδικόνιο επηρεάζουν το πρότυπο της ταλάντευσης κατά το ζευγάρωμα και συνεπώς επηρεάζουν την εξειδίκευση του tRNA.

Η επίδραση μιας τροποποίησης εκδηλώνεται άμεσα όταν αυτή αφορά το αντικωδικόνιο, όπου η αλλαγή της αλληλουχίας επηρεάζει την ικανότητα ζευγαρώματος με το κωδικόνιο, καθορίζοντας έτσι το νόημα του tRNA. Τροποποιήσεις σε άλλες θέσεις κοντά στο αντικωδικόνιο επηρεάζουν όμως και το ζευγάρωμα με το κωδικόνιο.

Η τροποποίηση των βάσεων του αντικωδικονίου επιτρέπει ζευγάρωμα βάσεων κατά τρόπο πέρα από τις προβλέψεις του συμβατικού ζευγαρώματος και της ταλάντευσης που αφορούν τις κανονικές βάσεις A, C, U και G. Στην **Εικόνα 7.8** παρουσιάζεται η χρήση της ινοσίνης (I), που εμφανίζεται συχνά στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου. Η ινοσίνη μπορεί να ζευγαρώσει με οποιαδήποτε από τις τρεις βάσεις, U, C και A.

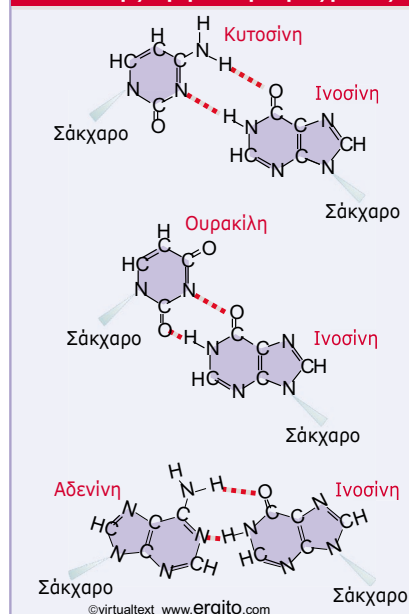
Η ικανότητα αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική στα κωδικόνια ισολευκίνης, όπου το AUA κωδικοποιεί την ισολευκίνη ενώ το AUG τη μεθειονίνη. Επειδή με τις συνηθισμένες βάσεις δεν είναι δυνατή η σαφής αναγνώριση της A στην τρίτη θέση, κάθε tRNA του οποίου το αντικωδικόνιο αρχίζει με U θα αναγνώριζε τόσο το AUG όσο και το AUA. Ωστόσο, το AUA πρέπει να διαβαστεί όπως τα AUU και AUC. Το πρόβλημα αυτό λύνεται με την ύπαρξη ενός tRNA με I στο αντικωδικόνιό του. Η ινοσίνη δεν αναγνωρίζει τη γουανίνη, διαφοροποιώντας έτσι τη μετάφραση των κωδικονίων AUA και AUG.

Στην πραγματικότητα, ορισμένοι από τους προβλεπόμενους συνδυασμούς δεν παρατηρούνται, επειδή κάποιες βάσεις είναι πάντα τροποποιημένες. Φαίνεται να μη χρησιμοποιείται ποτέ η βάση A, η οποία συνήθως μετατρέπεται σε I. Επίσης, η U στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου συνήθως τροποποιείται, ώστε να έχει αλλαγμένες ιδιότητες ζευγαρώματος.

Μερικές τροποποιήσεις δημιουργούν επιλεκτικότητα στην ανάγνωση ορισμένων κωδικονίων. Τα αντικωδικόνια με ουριδινο-5-οξυοξικό οξύ (uridine-5-oxyacetic acid) και 5-μεθοξουριδίνη (5-methoxyuridine) στην πρώτη θέση αναγνωρίζουν αποτελεσματικά τις A και G ως τρίτες βάσεις του κωδικονίου, ενώ αναγνωρίζουν λιγότερο αποτελεσματικά τη U. Μια άλλη περίπτωση στην οποία επιτρέπονται πολλαπλά ζευγάρωμα, αν και ορισμένα είναι προτιμότερα από κάποια άλλα, παρατηρείται στην κουεοσίνη και στα παράγωγά της. Αυτές οι τροποποιημένες βάσεις G εξακολουθούν να αναγνωρίζουν τις C και U, αλλά ζευγαρώνουν ευκολότερα με τη U.

Η χρησιμοποίηση της 2-θειουριδίνης στο αντικωδικόνιο περιορίζει τις δυνατότητες ζευγαρώματος, αφού, ενώ επιτρέπει το ζευγάρωμα με A, εμποδίζει τη δημιουργία ζεύγους ταλάντευσης με την G. Στην **Εικόνα 7.9** φαίνεται γιατί η 2-θειουρακίλη μπορεί να ζευγαρώσει αποκλειστικά με A.

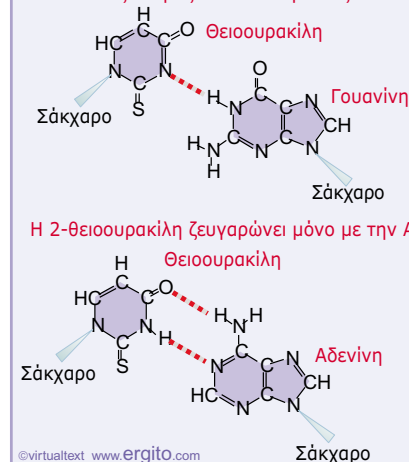
Η ινοσίνη ζευγαρώνει με τρεις βάσεις



Εικόνα 7.8 Η ινοσίνη μπορεί να σχηματίσει ζεύγη με οποιαδήποτε από τις U, C και A.

Η 2-θειουρακίλη έχει περιορισμένη δυνατότητα ζευγαρώματος

Ένας δεσμός δεν είναι αρκετός



Εικόνα 7.9 Η τροποποίηση σε 2-θειουριδίνη επιτρέπει το ζευγάρωμα μόνο με την A, επειδή μπορεί να σχηματιστεί μόνο ένας δεσμός υδρογόνου με την G.

Τέτοιες σχέσεις ζευγαρώματος φανερώνουν ότι υπάρχουν πολλοί τρόποι για τη δημιουργία ενός αριθμού tRNA ικανών να αναγνωρίζουν και τα 61 κωδικόνια που αντιστοιχούν σε αμινοξέα. Τα πρότυπα είναι κοινά στους διάφορους οργανισμούς, αν και η απουσία μιας συγκεκριμένης τροποποίησης μπορεί να εμποδίζει τη χρήση ορισμένων προτύπων αναγνώρισης σε κάποιο είδος. Έτσι, σε διαφορετικούς οργανισμούς μπορεί μια συγκεκριμένη οικογένεια κωδικονίων να διαβάζεται από tRNA που φέρουν διαφορετικά αντικωδικόνια.

Εκτός από την αναγνώριση πολλαπλών κωδικονίων από ένα tRNA, συχνά ένα συγκεκριμένο κωδικόνιο μπορεί να αναγνωρίζεται από περισσότερα από ένα tRNA. Σε τέτοιες περιπτώσεις, ίσως υπάρχουν διαφορές στην αποτελεσματικότητα των εναλλακτικών αντιδράσεων αναγνώρισης. Γενικά, αναγνωρίζονται αποτελεσματικότερα τα κωδικόνια που χρησιμοποιούνται πιο συχνά.

Οι προβλέψεις για τα ζεύγη ταλάντευσης είναι σύμφωνες με τις ιδιότητες που έχουν παρατηρηθεί σε όλα σχεδόν τα tRNA. Υπάρχουν όμως εξαιρέσεις, στις οποίες τα κωδικόνια που αναγνωρίζονται από ένα tRNA διαφέρουν από εκείνα που προβλέπονται από τους κανόνες ταλάντευσης. Τέτοια φαινόμενα πιθανώς οφείλονται στην επίδραση γειτονικών βάσεων και/ή στη στερεοδιαμόρφωση του βρόχου του αντικωδικονίου του tRNA. Πράγματι, η σημασία της δομής του βρόχου του αντικωδικονίου είναι εγγενής στην υπόθεση της ταλάντευσης. Η άποψη ότι η γενική τρισδιάστατη δομή επηρεάζει το ζευγάρωμα ενισχύεται από μεταλλάξεις σε άλλες περιοχές του μορίου οι οποίες μεταβάλλουν την ικανότητα του αντικωδικονίου να αναγνωρίζει κωδικόνια.

Ένα άλλο παράδειγμα μη συμβατικού ζευγαρώματος αφορά την ικανότητα του βακτηριακού fMet-tRNA_f έναρξης να αναγνωρίζει τόσο το κωδικόνιο AUG όσο και το GUG. Γι' αυτή την παρατυπία ευθύνεται η τρίτη βάση του αντικωδικονίου.

7.6 Σποραδικά παρατηρούνται αποκλίσεις από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Σε μερικά είδη παρατηρούνται αποκλίσεις από τον οικουμενικό γενετικό κώδικα.
- ▶ Οι αποκλίσεις του κώδικα είναι πιο συχνές στα γονιδιώματα των μιτοχονδρίων, όπου είναι δυνατή η κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου των αλλαγών που οδήγησαν στις αποκλίσεις αυτές.
- ▶ Στα πυρηνικά γονιδιώματα, οι αποκλίσεις είναι σποραδικές και συνήθως αφορούν μόνο τα κωδικόνια τερματισμού.

Η οικουμενικότητα του γενετικού κώδικα είναι εντυπωσιακή, αλλά υπάρχουν ορισμένες εξαιρέσεις, οι οποίες συνήθως επηρεάζουν τα κωδικόνια που ενέχονται στην έναρξη ή στον τερματισμό. Οι αλλαγές που απαντώνται στα κύρια γονιδιώματα (βακτηριακά ή πυρηνικά) συνοψίζονται στην **Εικόνα 7.10**.

Σχεδόν όλες οι περιπτώσεις αλλαγών του κώδικα, στις οποίες ένα κωδικόνιο αντιστοιχεί σε ένα νέο αμινοξύ, αφορούν τα κωδικόνια τερματισμού:

- ▶ Στον προκαρυωτικό οργανισμό *Mycoplasma capricolum*, το κωδικόνιο UGA δε χρησιμοποιείται για τερματισμό, αλλά κωδικοποιεί τρυπτοφάνη. Πράγματι, η τριπλέτα UGA είναι το κυρίαρχο κωδικόνιο Trp, ενώ το UGG χρησιμοποιείται σπάνια. Υπάρχουν δύο είδη tRNA^{Trp}, το ένα έχει το αντικωδικόνιο UCA[<] (αναγνωρίζει τα UGA και UGG) και το άλλο έχει το CCA[<] (αναγνωρίζει μόνο το UGG).
- ▶ Ορισμένα βλεφαριδοφόρα (μονοκύτταρα πρωτόζωα) αναγνωρίζουν τα UAA και UAG ως γλουταμίνη αντί ως κωδικόνια τερματισμού. Το *Tetrahymena thermophila*, ένα από τα βλεφαριδοφόρα, περιέχει τρία είδη tRNA^{Glu}. Το ένα είδος αναγνωρίζει τα συνηθισμένα κωδικόνια της γλουταμίνης, CAA και CAG, το άλλο είδος αναγνωρίζει και τα δύο κωδικόνια UAA και UAG (όπως προβλέπει η υπόθεση ταλάντευσης) και το τελευταίο αναγνωρίζει μόνο το UAG. Υποθέτουμε ότι ο παράγοντας αποδέσμευσης eRF έχει περιορισμένη εξειδίκευση σε σύγκριση με άλλους ευκαρυώτες.
- ▶ Σε ένα άλλο βλεφαριδοφόρο (*Euplotes octacarinatus*), το UGA κωδικοποιεί κυστεΐνη. Μόνο το UAA χρησιμοποιείται ως κωδικόνιο τερματισμού (δε χρησιμοποιείται το UAG). Η αλλαγή του νοήματος του κωδικονίου UGA ίσως επιτεύχθηκε με την τροποποίηση του αντικωδικονίου του tRNA^{Cys}, ώστε αυτό το αντικωδικόνιο, εκτός από τα κωδικόνια UGU και UGC που αναγνωρίζει κανονικά, να αναγνωρίζει και το κωδικόνιο UGA.
- ▶ Η μόνη αντικατάσταση στην κωδικοποίηση αμινοξέων συμβαίνει σε ένα μύκητα (*Candida*), όπου το κωδικόνιο CUG κωδικοποιεί τη σερίνη στη θέση της λευκίνης (και το UAG δε χρησιμοποιείται ως κωδικόνιο τερματισμού).

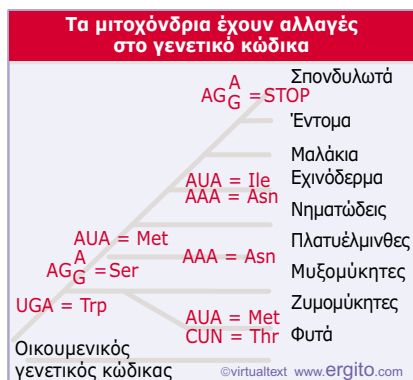
Προκειμένου ένα κωδικόνιο τερματισμού να αποκτήσει κωδική λειτουργία, απαιτούνται δύο αλλαγές: αφενός η μετάλλαξη ενός tRNA, ώστε να αναγνωρίζει το κωδικόνιο τερματισμού, και αφετέρου η μετάλλαξη του παράγοντα αποδέσμευσης τάξης I, ώστε να μην τερματίζει τη μεταγραφή σε αυτό το κωδικόνιο.

Μια άλλη συνηθισμένη αλλαγή είναι η απώλεια ενός tRNA που αντιστοιχεί σε ένα κωδικόνιο, με αποτέλεσμα το κωδικόνιο αυτό να μην μπορεί πλέον να μεταφραστεί σε αμινοξύ. Το νόημα ενός τέτοιου κωδικονίου θα εξαρτηθεί τελικά από το αν ο παράγοντας τερματισμού εξελιχθεί ώστε να το αναγνωρίζει.

Όλες αυτές οι αλλαγές είναι σποραδικές, γεγονός που σημαίνει ότι μάλλον έχουν προκύψει ανεξάρτητα, σε ορισμένους κλάδους της φυλογένεσης. Απαντώνται συχνότερα σε κωδικόνια τερματισμού, επειδή αυτές οι αλλαγές δεν προκαλούν την αντικατάσταση ενός αμινοξέος από ένα άλλο. Εφόσον ο γενετικός κώδικας καθιερώθηκε χωρίς στην εξέλιξη, οποιαδήποτε γενική αλλαγή στο νόημα ενός

Οι αλλαγές στο γενετικό κώδικα συνήθως περιλαμβάνουν κωδικόνια τερματισμού ή κωδικόνια άνευ νοήματος			
UUU Phe UUC UUA Leu UUG	UCU Ser UCC UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA STOP→Gln UAG	UGU Cys UGC UGA STOP→Trp, Cys, Sel UGG
CUU Leu CUC CUA CUG Leu→Ser	CCU Pro CCC CCA CCG	CAU His CAC CAA Gln CAG	CGU CGC Arg CGA CGG Arg→Χωρίς νόημα
AUU AUC Ile AUA Ile→Χωρίς νόημα AUG Met	ACU Thr ACC ACA ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC AGA Arg→Χωρίς νόημα AGG Arg
GUU Val GUC GUA GUG	GCU Ala GCC GCA GCG	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU GGC Gly GGA GGG ©virtualtext www.ergito.com

Εικόνα 7.10 Στα βακτηριακά και ευκαρυωτικά πυρηνικά γονιδιώματα, οι τροποποιήσεις του γενετικού κώδικα συνήθως κάνουν ένα κωδικόνιο τερματισμού να κωδικοποιεί ένα αμινοξύ ή καθιστούν ένα κωδικόνιο ανίκανο να προσδιορίζει ένα αμινοξύ. Η αλλαγή του νοήματος ενός κωδικονίου ώστε να κωδικοποιεί πλέον ένα αμινοξύ διαφορετικό από το αρχικό είναι ασυνήθιστη.



Εικόνα 7.11 Οι αλλαγές του γενετικού κώδικα των μιτοχονδρίων μπορούν να συσχετιστούν με τη φυλογένεση, θεωρώντας ότι συνέβη ο ελάχιστος δυνατός αριθμός ανεξάρτητων αλλαγών. Οι αλλαγές AUA=Met και AAA=Asn θα πρέπει να έχουν συμβεί δύο φορές με ανεξάρτητο τρόπο κατά την εξέλιξη και η πρώιμη αλλαγή AUA=Met θα πρέπει να αντιστράφηκε στα εχινόδεσμα.

κωδικονίου θα προκαλούσε αντικατάσταση σε όλες τις πρωτεΐνες που περιέχουν αυτό το αμινοξύ. Είναι πιθανόν μια τέτοια αλλαγή να είναι καταστρεπτική για τουλάχιστον μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες, γι' αυτό ασκείται αρνητική επιλογή στην τροποποίηση. Ωστόσο, παρατηρείται απόκλιση σε ορισμένα κωδικόνια τερματισμού τα οποία απέκτησαν κωδικές λειτουργίες. Αν κάποια κωδικόνια τερματισμού χρησιμοποιούνταν σπάνια, ήταν δυνατόν να αποκτήσουν κωδικές λειτουργίες μέσω αλλαγών που επέτρεψαν την αναγνώρισή τους από κάποιο tRNA.

Αποκλίσεις από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα απαντώνται και στα μιτοχόνδρια αρκετών ειδών. Στην **Εικόνα 7.11** παρουσιάζεται η φυλογένεση των αλλαγών. Θεωρείται ότι υπήρχε ένας οικουμενικός κώδικας που τροποποιήθηκε σε ποικίλα σημεία κατά την εξέλιξη του μιτοχονδρίου. Η παλαιότερη αλλαγή ήταν η χρήση του UGA για την κωδικοποίηση της τρυπτοφάνης, η οποία είναι κοινή σε όλα τα (μη φυτικά) μιτοχόνδρια.

Κάποιες από αυτές τις αλλαγές απλουστεύουν τον κώδικα, αντικαθιστώντας δύο κωδικόνια που είχαν διαφορετικό νόημα με ένα ζεύγος ίδιου νοήματος. Ζεύγη που υπέστησαν μια τέτοια αλλαγή είναι τα UGG και UGA (και τα δύο κωδικοποιούν Trp, αντί το ένα να κωδικοποιεί Trp και το άλλο να είναι κωδικόνιο τερματισμού), καθώς και τα AUG και AUA (και τα δύο κωδικοποιούν Met, αντί το ένα να κωδικοποιεί Met και το άλλο Ile).

Γιατί όμως ήταν δυνατή η εξέλιξη του γενετικού κώδικα του μιτοχονδρίου; Ίσως το κόστος των αλλαγών του κώδικα να είναι πολύ μικρότερο, επειδή το μιτοχόνδριο συνθέτει μόνο ένα μικρό αριθμό πρωτεϊνών (~10). Πιθανόν τα τροποποιημένα κωδικόνια να μην αφορούσαν αμινοξέα σε θέσεις κρίσιμες για τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών. Η ποικιλία των αποκλίσεων από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα, οι οποίες παρατηρούνται στα μιτοχόνδρια διαφορετικών ειδών, υποδηλώνει ότι οι κώδικες που απαντώνται στα μιτοχόνδρια εξελίχθηκαν ανεξάρτητα και ότι δεν ταυτίζονται με έναν κοινό προγονικό μιτοχονδριακό κώδικα.

Σύμφωνα με την υπόθεση ταλάντευσης, απαιτούνται τουλάχιστον 31 tRNA (εκτός από το tRNA έναρξης) για την αναγνώριση και των 61 κωδικονίων (τουλάχιστον δύο tRNA για κάθε οικογένεια κωδικονίων και ένα tRNA ανά ζεύγος κωδικονίων ή ανά κωδικόνιο). Ωστόσο, στα μιτοχόνδρια (τουλάχιστον) των θηλαστικών υπάρχουν μόνο 22 διαφορετικά tRNA. Πώς αυτός ο περιορισμένος αριθμός tRNA εξυπηρετεί όλα τα κωδικόνια;

Το χαρακτηριστικό του κώδικα των μιτοχονδρίων είναι η απλούστευση του τρόπου ζευγαρώματος κωδικονίου-αντικωδικονίου, οπότε ένα tRNA αναγνωρίζει και τα τέσσερα μέλη μιας οικογένειας κωδικονίων. Έτσι μειώνεται ο ελάχιστος αριθμός των tRNA που απαιτούνται για την κάλυψη όλων των κωδικονίων σε 23. Η χρήση των κωδικονίων AG^A/G για τον τερματισμό μειώνει τον παραπάνω αριθμό κατά ένα ακόμα tRNA.

Στις οχτώ οικογένειες κωδικονίων, η αλληλουχία των tRNA φέρει στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου μία μη τροποποιημένη U. Τα υπόλοιπα κωδικόνια κατατάσσονται σε ζεύγη, στα οποία όλα τα κωδικόνια που λήγουν σε πυριμιδίνη αναγνωρίζονται από αντικωδικό-

νια που αρχίζουν με G και όλα τα κωδικόνια που λήγουν σε πουρίνη αναγνωρίζονται από αντικωδικόνια που αρχίζουν με μία τροποποιημένη U, όπως δηλαδή προβλέπεται και από την υπόθεση ταλάντευσης. Το πρόβλημα με το κωδικόνιο UGG αποφεύχθηκε τροποποιώντας τον κώδικα, ώστε να αναγνωρίζει τόσο το UGG όσο και το UGA ως τρυπτοφάνη. Επιπλέον, στα θηλαστικά, το AUA δεν αντιστοιχεί στην ισολευκίνη και αναγνωρίζεται, όπως και το AUG, ως μεθειονίνη. Έτσι, όλα τα κωδικόνια που δεν ανήκουν σε κάποια οικογένεια είναι δυνατόν να καταταχθούν σε 14 ζεύγη.

Συνεπώς, τα 22 γονίδια μιτοχονδριακού tRNA που έχουν προσδιοριστεί κωδικοποιούν 14 tRNA που αντιστοιχούν σε ζεύγη κωδικονίων και 8 tRNA που αντιστοιχούν σε οικογένειες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζονται από tRNA τα δύο συνηθισμένα κωδικόνια τερματισμού, UAG και UAA, καθώς και το ζεύγος κωδικονίων AGA/G. Παρόμοιοι κανόνες ισχύουν και στα μιτοχόνδρια των μυκήτων.

7.7 Σε ορισμένα κωδικόνια τερματισμού μπορούν να προστεθούν ασυνήθιστα αμινοξέα

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Ορισμένες διαφορές στην ανάγνωση συγκεκριμένων κωδικονίων μπορεί να παρατηρηθούν σε μεμονωμένα γονίδια.
- ▶ Για την ενσωμάτωση της σεληνο-κυστεΐνης σε ορισμένα κωδικόνια UGA απαιτούνται αρκετές πρωτεΐνες που τροποποιούν το Cys-tRNA και το εισάγουν στο ριβόσωμα.
- ▶ Η πυρρολυσίνη μπορεί να εισαχθεί σε ορισμένα κωδικόνια UGA.

Σε ορισμένα γονίδια παρατηρούνται ειδικές τροποποιήσεις του τρόπου ερμηνείας του κώδικα. Η ειδικότητα αυτών των αλλαγών υποδηλώνει ότι η ανάγνωση ενός συγκεκριμένου κωδικονίου θα πρέπει να επηρεάζεται από τις γειτονικές βάσεις.

Ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα είναι η ενσωμάτωση του τροποποιημένου αμινοξέος σεληνο-κυστεΐνη σε συγκεκριμένα κωδικόνια UGA, αποκλειστικά κατά τη μετάφραση μορίων mRNA που κωδικοποιούν σεληνο-πρωτεΐνες, τόσο σε προκαρυώτες όσο και σε ευκαρυώτες. Συνήθως, αυτές οι πρωτεΐνες καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και περιέχουν ένα μόνο κατάλοιπο σεληνο-κυστεΐνης, το οποίο συμμετέχει στο ενεργό κέντρο. Οι γνώσεις μας για το φαινόμενο αυτό προέρχονται από τη χρήση των κωδικονίων UGA σε 3 γονίδια της *E. coli* που κωδικοποιούν ισοένζυμα της δεϋδρογονάσης του μυρμηκικού οξέος. Το εσωτερικό κωδικόνιο UGA διαβάζεται από ένα σεληνο-Cys-tRNA. Αυτή η ασυνήθιστη αντίδραση καθορίζεται από την τοπική δευτεροταγή δομή του mRNA και συγκεκριμένα από την παρουσία μιας δομής φουρκέτας (hairpin) μετά από το κωδικόνιο UGA.

Οι μεταλλάξεις σε 4 γονίδια *sel* προκαλούν ανεπάρκεια στη σύνθεση σεληνο-πρωτεϊνών. Το *selC* κωδικοποιεί ένα tRNA (με το αντικωδικόνιο ACU[<]) που φορτώνεται με σερίνη. Τα *selA* και *selD* απαιτούνται για την τροποποίηση της σερίνης σε σεληνο-κυστεΐνη. Η *selB*



Εικόνα 7.12 Ο SelB είναι ένας παράγοντας επιμήκυνσης που προσδένει ειδικά το σεληνο-Cys-tRNA σε ένα κωδικόνιο UGA, το οποίο ακολουθείται από μια δομή στελέχους-βρόχου στο mRNA.

είναι ένας εναλλακτικός παράγοντας επιμήκυνσης. Είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύει GTP και δρα ως ειδικός παράγοντας μετάφρασης για την είσοδο του σεληνο-Cys-tRNA στη θέση A, αντικαθιστώντας (μόνο όσον αφορά αυτό το tRNA) τον παράγοντα EF-Tu. Η αλληλουχία της SelB είναι συγγενική με τις αλληλουχίες των EF-Tu και IF-2.

Γιατί το σεληνο-Cys-tRNA προστίθεται μόνο σε ορισμένα κωδικόνια UGA; Αυτά τα κωδικόνια ακολουθούνται από μία δομή στελέχους-βρόχου στο mRNA. Στην **Εικόνα 7.12** φαίνεται ότι το στέλεχος της δομής αυτής αναγνωρίζεται από μία επικράτεια που φέρει μόνο η SelB (δεν υπάρχει στους EF-Tu και IF-2). Ένας παρόμοιος μηχανισμός μεταφράζει ορισμένα κωδικόνια UGA στα κύτταρα των θηλαστικών, με τη διαφορά ότι απαιτούνται δύο πρωτεΐνες για να αναγνωρίσουν το κατάλληλο κωδικόνιο UGA. Η μία πρωτεΐνη (η SBP2) προσδένεται σε μία δομή στελέχους-βρόχου αρκετά μακριά, καθοδικά από το κωδικόνιο UGA, ενώ η ομόλογη πρωτεΐνη της SelB (που ονομάζεται SECIS) προσδένεται στην SBP2 και ταυτόχρονα προσδένει το tRNA στο κωδικόνιο UGA.

Ένα ακόμη παράδειγμα προσθήκης ενός ειδικού αμινοξέος είναι η ενσωμάτωση πυρρολυσίνης (pyrrolysine) σε κωδικόνια UAG. Αυτή η προσθήκη παρατηρείται σε ένα αρχαιοβακτήριο και σε ένα βακτήριο. Ο μηχανισμός είναι πιθανώς ανάλογος με την προσθήκη της σεληνο-κυστεΐνης. Ένα ασυνήθιστο tRNA φορτώνεται με λυσίνη, η οποία προφανώς στη συνέχεια τροποποιείται. Το tRNA φέρει ένα αντικωδικόνιο CUA, που αποκρίνεται στο UAG. Θα πρέπει να υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που περιορίζουν την απόκρισή του μόνο στα κατάλληλα κωδικόνια UAG.

7.8 Τα tRNA φορτώνονται με αμινοξέα από τις συνθετάσες

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες είναι ένζυμα που φορτώνουν το tRNA με το αντίστοιχο αμινοξύ, δημιουργώντας αμινοακυλο-tRNA σε μια αντίδραση δύο σταδίων η οποία καταναλώνει ATP.
- ▶ Υπάρχουν 20 διαφορετικές αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες σε κάθε κύτταρο. Καθεμία φορτώνει όλα τα tRNA που αντιστοιχούν σε ένα συγκεκριμένο αμινοξύ.
- ▶ Η αναγνώριση ενός tRNA βασίζεται σε ένα μικρό αριθμό σημείων επαφής στην αλληλουχία του tRNA.

Τα tRNA είναι απαραίτητο να έχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά, αλλά και να διακρίνονται το ένα από το άλλο. Αυτό είναι επιπλέον εξαιτίας της ικανότητας του tRNA να αναδιπλώνεται σε μία κοινή τριτοταγή δομή. Οι λεπτομέρειες αυτής της δομής, όπως η γωνία των 2 βραχιόνων της δομής «L» ή η προεξοχή ορισμένων βάσεων, επιτρέπουν τη διάκριση των διαφόρων tRNA.

Όλα τα tRNA ταιριάζουν στις θέσεις P και A του ριβοσώματος, όπου το ένα άκρο τους προσδένεται στο mRNA μέσω του ζευγαρώ-

ματος κωδικονίου-αντικωδικονίου, ενώ το άλλο άκρο τους συμμετέχει στη μεταφορά του πολυπεπτιδίου. Επίσης, όλα τα tRNA αναγνωρίζονται από τους παράγοντες μετάφρασης (EF-Tu ή eEF-1), εκτός από το εναρκτήριο tRNA, που αναγνωρίζεται αντίστοιχα από τον IF-2 ή τον eIF-2. Άρα, στο σύνολό τους, τα tRNA πρέπει να διαθέτουν κοινά χαρακτηριστικά για την αλληλεπίδρασή τους με τους παράγοντες επιμήκυνσης, με εξαίρεση τη διάκριση του εναρκτήριου tRNA.

Τα αμινοξέα εισέρχονται στο μονοπάτι της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών, οι οποίες μεσολαβούν για τη σύνδεσή τους με τα νουκλεϊκά οξέα. Όλες οι συνθετάσες λειτουργούν με το μηχανισμό δύο σταδίων, που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 7.13**:

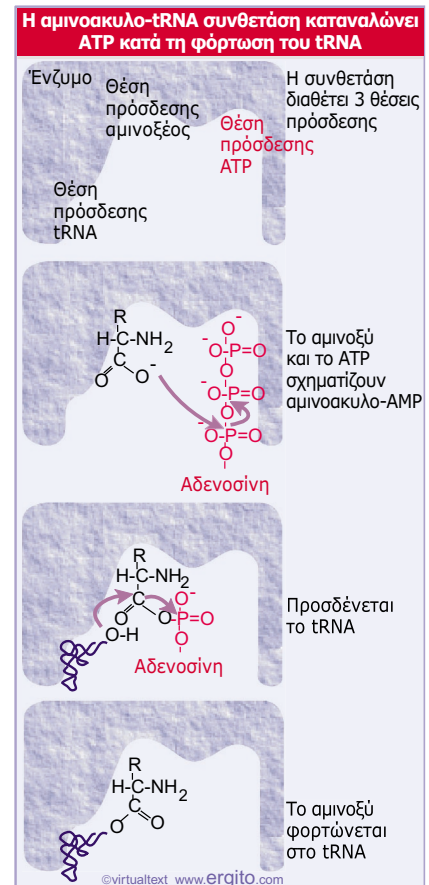
- ▶ Πρώτα, το αμινοξύ αντιδρά με ATP για να σχηματίσει ένα αμινοακυλο-αδενοσινικό οξύ (AA-AMP), απελευθερώνοντας μία πυροφωσφορική ομάδα. Η απαιτούμενη ενέργεια για την αντίδραση παρέχεται από τη διάσπαση του δεσμού υψηλής ενέργειας του ATP.
- ▶ Στη συνέχεια, το ενεργοποιημένο αμινοξύ μεταφέρεται στο tRNA, απελευθερώνοντας AMP.

Οι συνθετάσες διακρίνουν τα tRNA και τα αμινοξέα σε αντίστοιχες ομάδες. Κάθε συνθετάση αναγνωρίζει ένα μόνο αμινοξύ και όλα τα tRNA τα οποία φορτώνονται με αυτό το αμινοξύ. Συνήθως, κάθε αμινοξύ αντιστοιχεί σε περισσότερα από ένα tRNA. Αρκετά tRNA μπορεί να αποκρίνονται σε συνώνυμα κωδικόνια, ενώ μερικές φορές υπάρχουν πολλαπλά είδη tRNA που αναγνωρίζουν το ίδιο κωδικόνιο. Τα πολλαπλά tRNA που αντιστοιχούν στο ίδιο αμινοξύ ονομάζονται **ισοαποδεκτικά tRNA** (isoaccepting tRNAs). Επειδή όλα αναγνωρίζονται από την ίδια συνθετάση, αναφέρονται και ως **ομότυπα tRNA** (cognate tRNAs) της συγκεκριμένης συνθετάσης.

Οι προσπάθειες προσδιορισμού ομοιοτήτων στην αλληλουχία των ομότυπων tRNA ή η επαγωγή χημικών μετατροπών που επηρεάζουν την ικανότητα φόρτωσης αμινοξέων απέδειξαν ότι η βάση της αναγνώρισης είναι διαφορετική για διαφορετικά tRNA και δεν περιορίζεται απαραίτητα μόνο σε κάποιο γνώρισμα της πρωτοταγούς ή δευτεροταγούς δομής. Είναι γνωστό από τις κρυσταλλικές δομές ότι το στέλεχος του βραχίονα-δέκτη και το στέλεχος του αντικωδικονίου δημιουργούν ισχυρές επαφές με τη συνθετάση. Επίσης, αρκετές από τις μεταλλάξεις που αλλάζουν την αναγνώριση ενός tRNA απαντώνται στις δύο αυτές περιοχές. Δεν είναι απαραίτητο να αναγνωρίζεται το ίδιο το αντικωδικόνιο: για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις «καταστολής», που συζητούνται αργότερα σε αυτό το Κεφάλαιο, αλλάζουν μία βάση στο αντικωδικόνιο και κατά συνέπεια αλλάζουν τα κωδικόνια στα οποία αποκρίνεται ένα tRNA, χωρίς όμως να φορτώνεται διαφορετικό αμινοξύ στο μεταλλαγμένο tRNA.

Τα ισοαποδεκτικά tRNA πρέπει να φορτώνονται μόνο από τη αμινοακυλο-tRNA συνθετάση, που είναι ειδική για το αμινοξύ τους. Επομένως τα ισοαποδεκτικά tRNA θα πρέπει να έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά που επιτρέπουν στο ένζυμο να τα διακρίνει από τα υπόλοιπα tRNA. Το σύνολο των tRNA διαιρείται σε 20 ομάδες ισοαποδεκτικών μορίων. Κάθε ομάδα αναγνωρίζεται από την αντίστοιχη συνθετάση.

Τα tRNA αναγνωρίζονται από τη συνθετάση τους μέσω επαφών με ένα μικρό αριθμό από βάσεις, συνήθως 1-5. Τις περισσότερες φορές χρησιμοποιούνται τρεις τύποι επαφών:



Εικόνα 7.13 Μια αμινοακυλο-tRNA συνθετάση φορτώνει το tRNA με ένα αμινοξύ.

- ▶ Συνήθως αναγνωρίζεται τουλάχιστον μία βάση του αντικωδικονίου. Ορισμένες φορές, όλες οι θέσεις του αντικωδικονίου είναι σημαντικές.
- ▶ Συχνά αναγνωρίζεται ένα από τα τελευταία τρία ζεύγη βάσεων στο στέλεχος-δέκτη. Μια ακραία περίπτωση είναι το tRNA αλανίνης, που αναγνωρίζεται από ένα μοναδικό ζεύγος βάσεων στο στέλεχος-δέκτη.
- ▶ Η επονομαζόμενη διακριτική (discriminator) βάση, που βρίσκεται ανάμεσα στο στέλεχος-δέκτη και στο άκρο CCA, είναι πάντα ίδια στα ισοαποδεκτικά tRNA.

Κανένα από αυτά τα χαρακτηριστικά δεν αποτελεί αποκλειστικό τρόπο διάκρισης των 20 ομάδων tRNA, ούτε παρέχει ικανοποιητική εξειδίκευση. Έτσι, η αναγνώριση των tRNA φαίνεται να εξαρτάται από ειδικούς κανόνες, κατά περίπτωση, για κάθε tRNA.

Αρκετές συνθετάσες μπορούν να φορτώσουν με εξειδίκευση αμινοξύ σε μια «μίνι έλικα» που αποτελείται μόνο από το βραχίονα-δέκτη και το βραχίονα TψC (το ισοδύναμο δηλαδή του ενός μόνο βραχίονα του σχήματος L του μορίου). Σε ορισμένα tRNA, η ειδικότητα εξαρτάται αποκλειστικά από το στέλεχος-δέκτη. Αν και είναι σαφές ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη γενικότερη δομή των tRNA, σε ορισμένες περιπτώσεις η περιοχή του αντικωδικονίου είναι σημαντική. Μεταλλάξεις στο αντικωδικόνιο μπορούν να επηρεάσουν την αναγνώριση από τη Phe-tRNA συνθετάση τάξης II. Ίσως ενέχονται πολλαπλά χαρακτηριστικά: για παράδειγμα, οι μίνι έλικες από τα tRNA^{Val} και tRNA^{Met} (στα οποία το αντικωδικόνιο παίζει σημαντικό ρόλο *in vivo*) μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ειδικό τρόπο με τις συνθετάσες τους.

Επομένως η αναγνώριση βασίζεται σε λίγα σημεία επαφής του tRNA, τα οποία είναι συγκεντρωμένα στα άκρα του, με μερικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Η σημασία του ρόλου που διαδραματίζουν το στέλεχος-δέκτης και το στέλεχος του αντικωδικονίου είναι διαφορετική σε κάθε tRNA συνθετάση.

7.9 Οι συνθετάσες των αμινοακυλο-tRNA χωρίζονται σε δύο ομάδες

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες κατατάσσονται στην τάξη I ή στην τάξη II ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της αλληλουχίας και της δομής τους.

Παρά την κοινή λειτουργία τους, οι συνθετάσες συνιστούν μια μάλλον ποικιλόμορφη ομάδα πρωτεϊνών. Οι ξεχωριστές υπομονάδες ποικίλλουν από 40-110 kD και τα ένζυμα μπορεί να είναι μονομερή, διμερή ή τετραμερή. Οι ομολογίες μεταξύ τους είναι περιορισμένες. Βέβαια, το ενεργό κέντρο που αναγνωρίζει το tRNA αποτελεί ένα μικρό σχετικά τμήμα του μορίου. Είναι ενδιαφέρον να συγκρίνουμε τα ενεργά κέντρα διαφορετικών συνθετασών.

Οι συνθετάσες έχουν διαιρεθεί σε δύο γενικές ομάδες, καθεμία από τις οποίες περιλαμβάνει 10 ένζυμα, σύμφωνα με τη δομή της

επικράτειας που φέρει το ενεργό κέντρο. Η κοινή οργάνωση των δύο ομάδων περιγράφεται στην **Εικόνα 7.14**. Η καταλυτική επικράτεια περιλαμβάνει τις θέσεις πρόσδεσης του ATP και του αμινοξέος. Πρόκειται για μια μεγάλη περιοχή στην οποία παρεμβάλλεται η επικράτεια που δεσμεύει την έλικα του βραχίονα-δέκτη του tRNA. Έτσι, το άκρο του tRNA τοποθετείται κοντά στο καταλυτικό κέντρο. Μια άλλη επικράτεια δεσμεύει την περιοχή του αντικωδικονίου του tRNA. Όσες συνθετάσες αποτελούνται από πολλές υπομονάδες διαθέτουν και μία επικράτεια ολιγομερισμού.

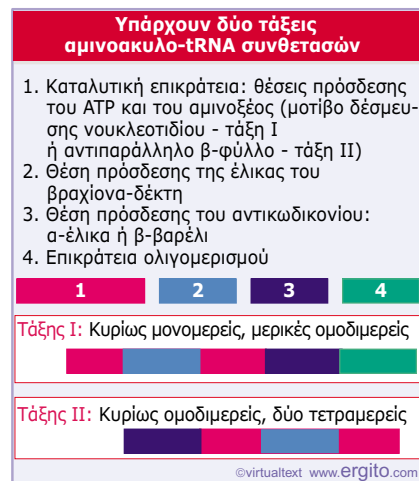
Οι συνθετάσες της τάξης I έχουν μια N-τελική καταλυτική επικράτεια η οποία αναγνωρίζεται από την παρουσία δύο βραχειών, μερικώς συντηρημένων αλληλουχιών που ονομάζονται «αλληλουχίες υπογραφής» (signature sequences). Η καταλυτική επικράτεια σχηματίζει ένα μοτίβο που ονομάζεται πτυχή δέσμευσης νουκλεοτιδίου (nucleotide-binding fold) και συναντάται και σε άλλες κατηγορίες ενζύμων που δεσμεύουν νουκλεοτίδια. Η πτυχή αυτή αποτελείται από εναλλασσόμενα παράλληλα β-ελάσματα και α-έλικες. Η αλληλουχία υπογραφής αποτελεί τμήμα της θέσης πρόσδεσης ATP. Η προσθήκη που έρχεται σε επαφή με την έλικα του βραχίονα-δέκτη του tRNA ποικίλλει σημαντικά ανάμεσα στα διαφορετικά ένζυμα της τάξης I. Οι C-τελικές περιοχές των συνθετασών της τάξης I, οι οποίες περιλαμβάνουν την επικράτεια πρόσδεσης του αντικωδικονίου του tRNA και την πιθανή επικράτεια ολιγομερισμού, είναι επίσης διαφορετικές μεταξύ τους.

Τα ένζυμα της τάξης II έχουν τρεις γενικές ομοιότητες στην αλληλουχία της καταλυτικής τους επικράτειας. Το ενεργό κέντρο περιέχει ένα μεγάλο αντιπαράλληλο β-πτυχωτό φύλλο που περιβάλλεται από α-έλικες. Και εδώ, η επικράτεια δέσμευσης της έλικας του βραχίονα-δέκτη του tRNA παρεμβάλλεται στην καταλυτική περιοχή και έχει διαφορετική δομή σε κάθε ένζυμο. Η επικράτεια πρόσδεσης του αντικωδικονίου βρίσκεται συνήθως στην N-τελική περιοχή. Η θέση της επικράτειας ολιγομερισμού ποικίλλει ευρέως.

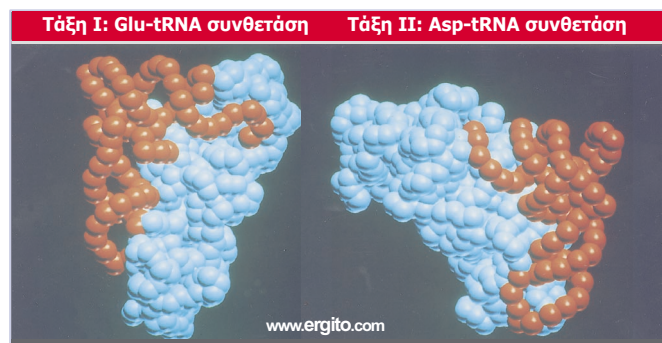
Η απουσία ξεκάθαρης σχέσης ανάμεσα στις δύο ομάδες συνθετασών είναι ένας γρίφος. Ίσως να εξελίχθηκαν ανεξάρτητα η μία από την άλλη. Είναι λοιπόν πιθανόν να υπήρχε μια πρώιμη μορφή ζωής που να περιείχε πρωτεΐνες αποτελούμενες μόνο από τα 10 αμινοξέα, τα οποία κωδικοποιούνταν από τον ένα ή τον άλλο τύπο.

Σύμφωνα με ένα μοντέλο, η συνθετάση προσδέεται πλευρικά στη δομή σχήματος L του tRNA. Η ίδια γενική αρχή ισχύει για τη σύνδεση όλων των συνδυασμών συνθετάσης με tRNA: το tRNA προσδένεται στη συνθετάση μέσω κυρίως των δύο άκρων του και το μεγαλύτερο τμήμα της αλληλουχίας του tRNA δε συμμετέχει στην αναγνώρισή του από τη συνθετάση. Ωστόσο, οι λεπτομέρειες της αλληλεπίδρασης διαφέρουν μεταξύ των ενζύμων της τάξης I και της τάξης II, όπως φαίνεται από τα μοντέλα της **Εικόνας 7.15**, τα οποία βασίζονται σε κρυσταλλικές δομές. Οι δύο τύποι ενζύμων προσεγγίζουν το tRNA από αντίθετες πλευρές, με αποτέλεσμα τα δύο μοντέλα του συμπλόκου tRNA•πρωτεΐνης να μοιάζουν όπως ένα αντικείμενο με το κατοπτρικό του είδωλο.

Ένα ένζυμο της τάξης I (η συνθετάση του Gln-tRNA) προσεγγίζει το tRNA από την πλευρά που βρίσκεται ο βρόχος D. Αναγνωρίζει

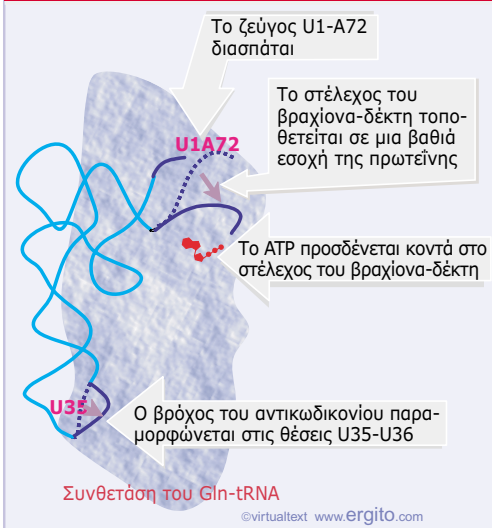


Εικόνα 7.14 Μια αμινοακυλο-tRNA συνθετάση φέρει τρεις ή τέσσερις περιοχές με διαφορετικές λειτουργίες. Μόνο οι πολυμερείς συνθετάσες διαθέτουν επικράτεια ολιγομερισμού.



Εικόνα 7.15 Οι κρυσταλλικές δομές δείχνουν ότι οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες τάξης I και τάξης II προσδένονται σε αντίθετες πλευρές του tRNA. Το tRNA φαίνεται κόκκινο και η πρωτεΐνη μπλε. Η φωτογραφία είναι ευγενική προσφορά του Dino Moras.

Η δομή του tRNA μεταβάλλεται κατά την αλληλεπίδρασή του με μια αμινοακυλο-tRNA συνθετάση τάξης I



Εικόνα 7.16 Η tRNA συνθετάση τάξης I έρχεται σε επαφή με το tRNA στη μικρή αύλακα του στελέχους-δέκτη και στο αντικωδικόνιο.

τη μικρή αύλακα του στελέχους του βραχίονα-δέκτη στο ένα άκρο της θέσης πρόσδεσης και αλληλεπιδρά με το βρόχο του αντικωδικονίου στο άλλο άκρο. Στην **Εικόνα 7.16** παρουσιάζεται μια διαγραμματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου tRNA^{Gln}-συνθετάσης. Ένα αξιοσημείωτο γνώρισμα της δομής του συμπλόκου είναι ότι η επαφή του tRNA με το ένζυμο επάγει δύο σημαντικές αλλαγές στη δομή του tRNA. Οι διαφορετικές διαμορφώσεις της δομής απεικονίζονται με τη διακεκομμένη και τη συνεχή γραμμή στο βρόχο του αντικωδικονίου και στο στέλεχος του βραχίονα-δέκτη:

- ▶ Οι βάσεις U35 και U36 στο βρόχο του αντικωδικονίου απομακρύνονται από το tRNA και κατευθύνονται προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης.
- ▶ Το άκρο του στελέχους του βραχίονα-δέκτη παραμορφώνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του ζεύγους βάσεων ανάμεσα στις U1 και A72. Το μονόκλωνο άκρο του στελέχους εισχωρεί σε ένα βαθύ θύλακα της συνθετάσης, που επίσης περιλαμβάνει τη θέση δέσμευσης του ATP.

Αυτή η δομή εξηγεί γιατί οι μεταλλάξεις στις θέσεις U35, G73 ή στο ζεύγος βάσεων U1-A72 επηρεάζουν την αναγνώριση του tRNA από τη συνθετάση του. Σε όλες αυτές τις θέσεις σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στην πρωτεΐνη και στο tRNA.

Ένα ένζυμο της τάξης II (η συνθετάση του Asp-tRNA) προσεγγίζει το tRNA από την άλλη πλευρά και αναγνωρίζει το μεταβλητό βρόχο και τη μεγάλη αύλακα του στελέχους του βραχίονα-δέκτη, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 7.17**. Το στέλεχος του βραχίονα-δέκτη διατηρεί την τυπική ελικοειδή διαμόρφωσή του. Το ATP δεσμεύεται πιθανόν κοντά στο 3' άκρο. Στο άλλο άκρο της επιφάνειας συναρμογής δημιουργείται ισχυρή επαφή με το βρόχο του αντικωδικονίου, ο οποίος αλλάζει διαμόρφωση και επιτρέπει στο αντικωδικόνιο να έρθει πολύ κοντά στην πρωτεΐνη.

Οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες τάξης II έρχονται σε επαφή με δύο περιοχές του tRNA



Εικόνα 7.17 Μια αμινοακυλο-tRNA συνθετάση τάξης II έρχεται σε επαφή με το tRNA στη μεγάλη αύλακα της έλικας-δέκτη και στο βρόχο του αντικωδικονίου.

7.10 Οι συνθετάσες αυξάνουν την πιστότητά τους πραγματοποιώντας διορθωτικό έλεγχο

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η αναγνώριση του ειδικού tRNA και του αντίστοιχου αμινοξέος ελέγχεται από τις αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες με διορθωτικό έλεγχο, που αντιστρέφει την καταλυτική αντίδραση σε περίπτωση ενσωμάτωσης λανθασμένου συστατικού.

Οι συνθετάσες των αμινοακυλο-tRNA έχουν ένα δύσκολο έργο. Κάθε συνθετάση πρέπει να διακρίνει ένα από τα 20 αμινοξέα, καθώς και τα αντίστοιχα ομότυπα tRNA (συνήθως 1-3) από ~100 διαφορετικά tRNA.

Πολλά αμινοξέα μοιάζουν μεταξύ τους. Επίσης, όλα τα αμινοξέα σχετίζονται δομικά με τα μεταβολικά ενδιάμεσα προϊόντα που παράγονται κατά τη σύνθεσή τους. Είναι ιδιαίτερα δύσκολη η διάκριση ανάμεσα σε δύο αμινοξέα που διαφέρουν μόνο στο μήκος της

ανθρακικής τους αλυσίδας (δηλαδή κατά μία ομάδα CH_2). Η ενδογενής ικανότητα διάκρισης δύο τέτοιων αμινοξέων με βάση τη σχετική ενέργεια πρόσδεσης θα ήταν μόνο $\sim 1/5$. Οι συνθετάσες βελτιώνουν αυτόν το λόγο ~ 1.000 φορές.

Η ενδογενής ικανότητα διάκρισης ανάμεσα στα tRNA είναι ευκολότερη, επειδή το tRNA προσφέρει μια μεγαλύτερη επιφάνεια για τη δημιουργία επαφών. Αν και όλα τα tRNA έχουν την ίδια γενική δομή, μάλλον υπάρχει μια περιορισμένη ομάδα γνωρισμάτων των ομότυπων tRNA που τα διακρίνει από τα μη ομότυπα.

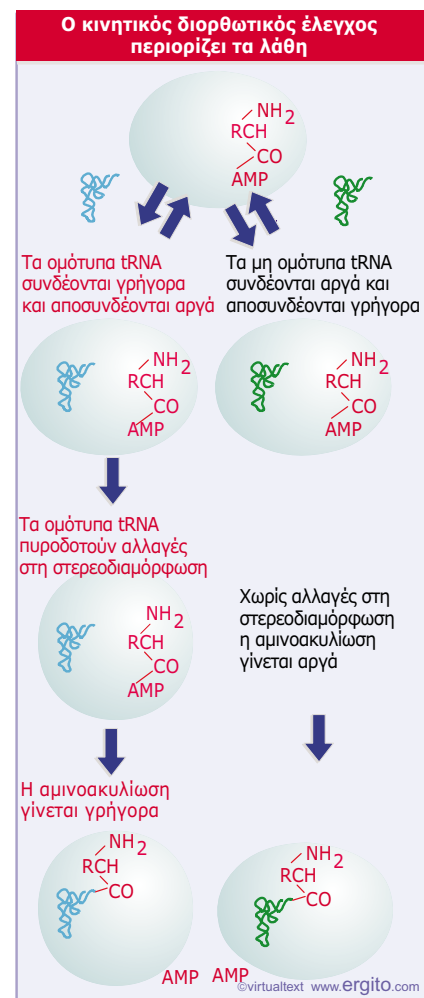
Μπορούμε να φανταστούμε δύο τρόπους με τους οποίους το ένζυμο είναι δυνατόν να επιλέξει το υπόστρωμά του:

- ▶ Ένας κύκλος εισαγωγής, εξέτασης, αποδοχής/απόρριψης θα μπορούσε να επιτελείται σε ένα μόνο βήμα, κατά την πρόσδεση. Προϋποτίθεται όμως η συγγένεια του tRNA και των αμινοξέων για τις θέσεις πρόσδεσης να είναι σχετικά υψηλή και να επαρκεί για τον έλεγχο των υποστρωμάτων. Στην περίπτωση των συνθετασών, αυτό θα σήμαινε ότι μόνο το σωστό αμινοξύ και τα ομότυπα tRNA θα μπορούσαν να συνδεθούν σταθερά στις συγκεκριμένες θέσεις.
- ▶ Εναλλακτικά, ο έλεγχος των υποστρωμάτων μπορεί να ελεγχθεί αργότερα, σε κάποιο άλλο στάδιο. Αν δεν έχουν προσδεθεί τα σωστά υποστρώματα, η αντίδραση αντιστρέφεται ή εκτρέπεται σε μια άλλη πορεία και το λάθος υπόστρωμα αποβάλλεται. Ο έλεγχος των υποστρωμάτων μετά την πρόσδεσή τους αναφέρεται γενικά ως **διορθωτικός έλεγχος** (proofreading). Στο παράδειγμα των συνθετασών, αυτό το είδος ελέγχου θα προϋπέθετε την πρόοδο της αντίδρασης μέχρι ένα συγκεκριμένο στάδιο, ακόμα και παρουσία λανθασμένων tRNA ή αμινοξέων.

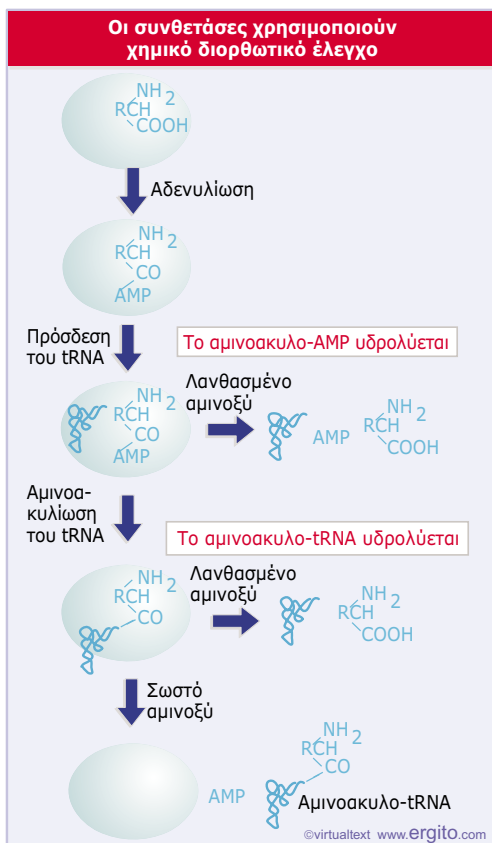
Οι συνθετάσες χρησιμοποιούν μηχανισμούς διορθωτικού ελέγχου για να επαληθεύσουν την ταυτότητα και των δύο υποστρωμάτων. Οι μηχανισμοί αυτοί βελτιώνουν την διάκριση εξαιτίας των ενδογενών διαφορών ανάμεσα στα αμινοξέα ή τα tRNA, αλλά όπως είναι αναμενόμενο από τις διαφορές ανάμεσα στα μέλη κάθε ομάδας, εξακολουθούν να γίνονται περισσότερα λάθη κατά την επιλογή των αμινοξέων (συχνότητα σφάλματος 10^{-4} - 10^{-5}) παρά κατά την επιλογή των tRNA (συχνότητα σφάλματος $\sim 10^{-6}$, βλ. Εικόνα 6.8).

Το μεταφορικό RNA προσδένεται στη συνθετάση με μια διαδικασία δύο σταδίων, που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 7.18**. Τα ομότυπα tRNA έχουν μεγαλύτερη ενδογενή συγγένεια για τη θέση πρόσδεσης, με αποτέλεσμα να συνδέονται ταχύτερα και να αποσυνδέονται πιο αργά. Μετά τη σύνδεση, το ένζυμο εξετάζει προσεκτικά το tRNA που προσδέθηκε. Αν το tRNA είναι σωστό, η σύνδεση σταθεροποιείται μέσω αλλαγής στη διαμόρφωση του ενζύμου. Το γεγονός αυτό επιτρέπει να πραγματοποιηθεί γρήγορα η αμινοακυλίωση. Αν το tRNA δεν είναι το σωστό, δεν αλλάζει η διαμόρφωση, με αποτέλεσμα η αντίδραση να προχωράει πολύ αργά. Έτσι αυξάνεται η πιθανότητα να αποσυνδεθεί το tRNA από το ένζυμο, πριν φορτωθεί με αμινοξύ. Ο συγκεκριμένος τύπος ελέγχου ονομάζεται **κινητικός διορθωτικός έλεγχος** (kinetic proofreading).

Η αποτελεσματικότητα της εξειδίκευσης των συνθετασών για τα αμινοξέα ποικίλλει. Κάποιες είναι εξαιρετικά ειδικές για την αρχική σύνδεση του αμινοξέος, ενώ κάποιες άλλες μπορούν να ενεργοποιή-



Εικόνα 7.18 Η αναγνώριση του σωστού tRNA από τις συνθετάσες ελέγχεται σε δύο στάδια. Πρώτον, το ένζυμο έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τα ομότυπα tRNA. Δεύτερον, η αμινοακυλίωση ενός λανθασμένου tRNA γίνεται με πολύ αργό ρυθμό.



Εικόνα 7.19 Ο διορθωτικός έλεγχος απαιτεί την πρόσδεση του ομότυπου tRNA στη συνθετάση που έχει δεσμεύσει λανθασμένο αμινοξύ και γίνεται είτε μέσω μιας αλλαγής στη διαμόρφωση που προκαλεί την υδρόλυση του αμινοακυλο-AMP είτε μέσω της μεταφοράς του αμινοξέος στο tRNA η οποία ακολουθείται από υδρόλυση.

Σε κάθε στάδιο ασκείται έλεγχος για την πρόληψη λαθών	
Στάδιο	Συχνότητα λάθους
Ενεργοποίηση της βαλίνης σε Val-tRNA ^{Ile}	1/225
Απελευθέρωση του Val-tRNA	1/270
Συνολική συχνότητα λάθους	$1/225 \times 1/270 = 1/60.000$

Εικόνα 7.20 Η ακρίβεια της φόρτωσης του tRNA^{Ile} από την αντίστοιχη συνθετάση βασίζεται σε έναν έλεγχο δύο σταδίων.

σουν και άλλα αμινοξέα τα οποία έχουν παρόμοια δομή με το ειδικό υπόστρωμα. Αν και μερικές φορές το λανθασμένο αυτό αμινοξύ μπορεί να αδενυλιωθεί, δε χρησιμοποιείται στο σχηματισμό ενός σταθερού αμινοακυλο-tRNA.

Η παρουσία του ομότυπου tRNA χρειάζεται συνήθως για να πυροδοτήσει το διορθωτικό έλεγχο, ακόμη και αν δεν έχει σχηματιστεί το AA-AMP. Εξαιρέση αποτελεί η συνθετάση του Met-tRNA, που μπορεί να απορρίψει μη ομότυπα AA-AMP ακόμα και απουσία tRNA.

Υπάρχουν δύο σημεία κατά το σχηματισμό του αμινοακυλο-tRNA στα οποία ένα λανθασμένο AA-AMP μπορεί να υποστεί διορθωτικό έλεγχο. Στην **Εικόνα 7.19** φαίνεται ότι και στα δύο πραγματοποιείται **χημικός διορθωτικός έλεγχος** (chemical proofreading), ο οποίος αντιστρέφει την καταλυτική αντίδραση. Ο βαθμός στον οποίο υπερσχύει το ένα ή το άλλο μονοπάτι ποικίλλει ανάλογα με τη συνθετάση:

- ▶ Το μη ομότυπο AA-AMP υδρολύεται όταν προσδεθεί το ομότυπο tRNA στη συνθετάση. Αυτός είναι ο κύριος μηχανισμός που χρησιμοποιείται από αρκετές συνθετάσες, όπως η συνθετάση της μεθειονίνης, της ισολευκίνης και της βαλίνης. Συνήθως, η αντίδραση δεν μπορεί να παρατηρηθεί *in vivo*, εκτός εάν το λανθασμένο ενεργοποιημένο αμινοξύ είναι η ομοκυστεΐνη, η οποία δε διαθέτει τη μεθυλομάδα της μεθειονίνης. Ο διορθωτικός έλεγχος σε αυτή την περίπτωση αποβάλλει το αμινοξύ με αλλαγμένη μορφή, ως θειολακτόνη της ομοκυστεΐνης. Πράγματι, η θειολακτόνη της ομοκυστεΐνης παράγεται στην *E. coli* από το ένζυμο Met-tRNA συνθετάση ως παραπροϊόν της αντίδρασης φόρτωσης. Επομένως ο διαρκής διορθωτικός έλεγχος αποτελεί τμήμα της διαδικασίας φόρτωσης ενός tRNA με το αμινοξύ του.
- ▶ Σε μερικές συνθετάσες, ο χημικός διορθωτικός έλεγχος γίνεται σε ένα μεταγενέστερο στάδιο. Το μη ομότυπο αμινοξύ μεταφέρεται στο tRNA, αλλά αναγνωρίζεται από τη δομή του στη συνέχεια ως λανθασμένο, στη θέση πρόσδεσης του tRNA, και έτσι υδρολύεται και αποβάλλεται. Η διαδικασία αυτή βασίζεται σε ένα συνεχή κύκλο δημιουργίας και υδρόλυσης του δεσμού με το tRNA, μέχρι να μεταφερθεί στο tRNA το σωστό αμινοξύ.

Ένα κλασικό παράδειγμα διάκρισης των αμινοξέων παρουσία του tRNA είναι η Ile-tRNA συνθετάση στην *E. coli*. Αν και το ένζυμο μπορεί να σχηματίσει βαλίνη-AMP, το προϊόν της αντίδρασης αυτής υδρολύεται όταν προστίθεται το tRNA^{Ile}. Η συχνότητα σφάλματος εξαρτάται από την ειδικότητα των επιμέρους βημάτων, όπως συνοψίζονται στην **Εικόνα 7.20**. Η συχνότητα σύνθεσης λανθασμένου αμινοακυλο-tRNA ($1,5 \times 10^{-5}$) είναι μικρότερη από τη συχνότητα με την οποία η βαλίνη αντικαθιστά την ισολευκίνη στην πολυπεπτιδική αλυσίδα σφαιρίνης ποντικού ($2,5 \times 10^{-4}$). Άρα η σύνθεση λανθασμένου αμινοακυλο-tRNA ευθύνεται μόνο για ένα μικρό ποσοστό από τα λάθη που συμβαίνουν κατά την πρωτεϊνοσύνθεση.

Η Ile-tRNA συνθετάση διακρίνει τα αμινοξέα βάσει του μεγέθους τους. Στην **Εικόνα 7.21** φαίνεται ότι διαθέτει δύο ενεργά κέντρα: το κέντρο σύνθεσης (ή ενεργοποίησης) και το κέντρο διόρθωσης (ή υδρόλυσης). Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου δείχνει ότι το κέντρο σύνθεσης είναι υπερβολικά μικρό για να επιτρέψει την είσοδο στη λευκίνη (μόριο στενά συγγενικό με την ισολευκίνη). Όλα τα αμινοξέα που είναι μεγαλύτερα από την ισολευκίνη εξαιρούνται από την ενεργοποι-

ηση, επειδή δεν μπορούν να εισέλθουν στο κέντρο σύνθεσης. Οποιοδήποτε αμινοξύ που μπορεί να εισέλθει στο κέντρο σύνθεσης φορτώνεται στο tRNA. Στη συνέχεια, το ένζυμο προσπαθεί να το μεταφέρει στο κέντρο διόρθωσης. Η ισολευκίνη δεν κινδυνεύει να υποστεί υδρόλυση, διότι είναι πολύ μεγάλη για να εισέλθει στο κέντρο διόρθωσης. Αντίθετα, η βαλίνη μπορεί να εισέλθει σε αυτό το κέντρο, με συνέπεια το λανθασμένο σύμπλοκο Val-tRNA^{Ile} να υδρολύεται. Στην ουσία, το ένζυμο λειτουργεί ως ένας διπλός μοριακός ηθμός, που διακρίνει πολύ συγγενικές δομές αμινοξέων βάσει του μεγέθους τους.

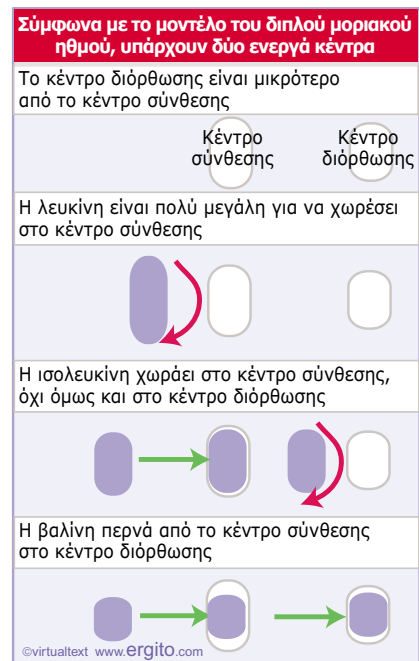
Ένα ενδιαφέρον γνώρισμα της Ile-tRNA συνθετάσης είναι ότι τα κέντρα σύνθεσης και επιδιόρθωσης βρίσκονται σε σημαντική απόσταση μεταξύ τους (~34 Å). Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου σε σύμπλοκο με ένα ανάλογο της ισολευκίνης δείχνει ότι το αμινοξύ μεταφέρεται από τη θέση σύνθεσης στη θέση διόρθωσης. Στην **Εικόνα 7.22** φαίνεται ότι η μεταφορά ενέχει μια αλλαγή της διαμόρφωσης του tRNA. Το στέλεχος-δέκτης του αμινοξέος στο tRNA^{Ile} μπορεί να έχει εναλλακτικές διαμορφώσεις. Για να αμινοακυλιωθεί από ένα αμινοξύ στη θέση σύνθεσης αποκτά μια ασυνήθιστη δομή φουρκέτας. Στη συνέχεια, αποκτά την πιο συνηθισμένη δομή έλικας, για να μετακινηθεί το αμινοξύ στο κέντρο διόρθωσης. Η μεταφορά από τη μία θέση στην άλλη είναι το πιο αργό βήμα, δηλαδή αυτό που καθορίζει την ταχύτητα του διορθωτικού ελέγχου. Η Ile-tRNA συνθετάση είναι μια συνθετάση τάξης I, αλλά ο μηχανισμός του διπλού ηθμού χρησιμοποιείται και από συνθετάσες τάξης II.

7.11 Τα tRNA-καταστολείς έχουν μεταλλαγμένα αντικωδικόνια που αναγνωρίζουν νέα κωδικόνια

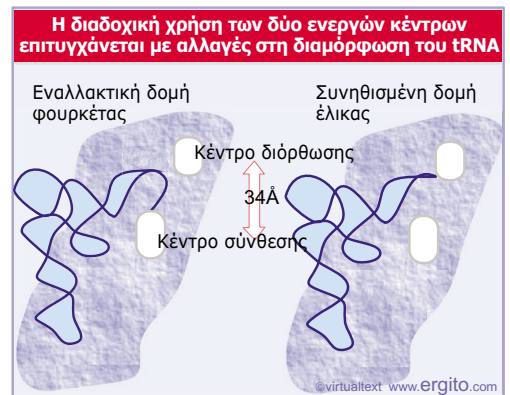
Σημαντικές έννοιες

- ▶ Ένα tRNA-καταστολέας φέρει συνήθως μία μετάλλαξη στο αντικωδικόνιο η οποία κάνει το tRNA να αποκρίνεται σε διαφορετικό κωδικόνιο.
- ▶ Όταν ένα νέο αντικωδικόνιο αναγνωρίζει ένα κωδικόνιο τερματισμού, τότε στη θέση τερματισμού εισάγεται ένα αμινοξύ και η πολυπεπτιδική αλυσίδα επεκτείνεται πέρα από αυτή. Έτσι, μπορεί αφενός να κατασταλεί μια ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη και αφετέρου να συμβεί αναγνωστική διέλευση από θέσεις φυσικών κωδικονίων τερματισμού.
- ▶ Η καταστολή μιας παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης συμβαίνει όταν ένα tRNA αναγνωρίζει διαφορετικό κωδικόνιο απ' ό,τι συνήθως, έτσι ώστε ένα αμινοξύ να αντικαθίσταται από ένα άλλο.

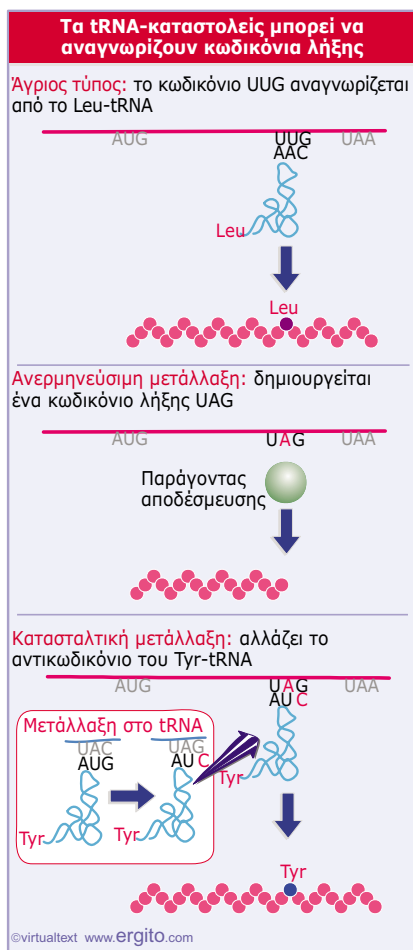
Η απομόνωση μεταλλαγμένων tRNA υπήρξε ένα από τα πιο αποτελεσματικά μέσα ανάλυσης της ικανότητας ενός tRNA να αποκρίνεται στα κωδικόνια του στο mRNA και διευκόλυνε τη μελέτη του ρόλου των περιοχών του tRNA στην αναγνώριση κωδικονίου-αντικωδικονίου.



Εικόνα 7.21 Η Ile-tRNA συνθετάση έχει δύο ενεργά κέντρα. Τα αμινοξέα που είναι μεγαλύτερα από την Ile δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν, επειδή δε χωρούν στο κέντρο σύνθεσης. Τα αμινοξέα που είναι μικρότερα από την Ile αποβάλλονται, διότι μπορούν να εισέλθουν στη θέση διόρθωσης.



Εικόνα 7.22 Ένα αμινοξύ μεταφέρεται από το κέντρο σύνθεσης στο κέντρο διόρθωσης της Ile-tRNA συνθετάσης, εξαιτίας μιας αλλαγής στη διαμόρφωση του στελέχους-δέκτη του tRNA.



Εικόνα 7.23 Οι ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις μπορούν να κατασταλούν από ένα tRNA με μεταλλαγμένο αντικωδικόνιο. Το μεταλλαγμένο tRNA αντιστοιχίζει ένα αμινοξύ στο μεταλλαγμένο κωδικόνιο. Έτσι, παράγεται μια πλήρης πρωτεΐνη, στην οποία το αρχικό κατάλοιπο Leu έχει αντικατασταθεί από Tyr.

Τα μεταλλαγμένα tRNA απομονώνονται βάσει της ικανότητάς τους να αντισταθμίζουν μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Σύμφωνα με την ορολογία της γενετικής, μια μετάλλαξη που είναι γενικά ικανή να αντισταθμίζει τις επιδράσεις μιας άλλης μετάλλαξης ονομάζεται **καταστολέας** (suppressor).

Σε συστήματα tRNA-καταστολέων, η πρωτογενής μετάλλαξη αλλάζει ένα κωδικόνιο σε ένα mRNA, ώστε το πρωτεϊνικό προϊόν να μην είναι πλέον λειτουργικό. Η δευτερογενής μετάλλαξη-καταστολέας αλλάζει το αντικωδικόνιο ενός tRNA, ώστε να αναγνωρίζει το μεταλλαγμένο κωδικόνιο αντί για το αρχικό κωδικόνιο (ή παράλληλα με το αρχικό). Το αμινοξύ που εισάγεται αποκαθιστά την πρωτεϊνική λειτουργία. Οι καταστολείς διακρίνονται σε **καταστολείς ανερμηνεύσιμων μεταλλάξεων** (nonsense suppressors) και σε **καταστολείς παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων** (missense suppressors), ανάλογα με τη φύση της αρχικής μετάλλαξης.

Μια ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη δημιουργεί ένα κωδικόνιο που αναγνωρίζεται μόνο από έναν παράγοντα αποδέσμευσης, τερματίζοντας έτσι πρόωρα την πρωτεϊνσύνθεση. Μια μετάλλαξη-καταστολέας δημιουργεί ένα αμινοακυλο-tRNA το οποίο αναγνωρίζει το κωδικόνιο τερματισμού και προσθέτει ένα αμινοξύ, επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη συνέχιση της πρωτεϊνσύνθεσης πέρα από τη θέση της ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης. Αυτή η καινούρια ιδιότητα του μεταφραστικού συστήματος επιτρέπει τη σύνθεση μιας ολοκληρωμένης πρωτεΐνης, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 7.23**. Εάν το αμινοξύ που προστίθεται μέσω της καταστολής είναι διαφορετικό από το αμινοξύ που βρισκόταν αρχικά στην ίδια θέση στην πρωτεΐνη άγριου τύπου, υπάρχει το ενδεχόμενο να αλλάξει η ενεργότητα της πρωτεΐνης.

Μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη τροποποιεί ένα κωδικόνιο ώστε να αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό αμινοξύ. Η αντικατάσταση του αρχικού αμινοξέος στη θέση του μεταλλαγμένου κωδικονίου έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Τυπικά, οποιαδήποτε αντικατάσταση αμινοξέος συνιστά μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη, αλλά στην πράξη μια τέτοια μετάλλαξη είναι δυνατόν να ανιχνευθεί μόνο εάν αλλάζει τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη μπορεί να κατασταλεί με την εισαγωγή είτε του αρχικού αμινοξέος είτε ενός αμινοξέος που είναι συμβατό με τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.

Στην **Εικόνα 7.24** φαίνεται ότι μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη μπορεί να κατασταλεί με τον ίδιο τρόπο που καταστέλλεται μια ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη, μεταλλάσσοντας το αντικωδικόνιο ενός tRNA που φέρει ένα αποδεκτό αμινοξύ, ώστε να μπορεί να αναγνωρίζει το μεταλλαγμένο κωδικόνιο. Επομένως η καταστολή μιας παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης ενέχει την αλλαγή του νοήματος του κωδικονίου από ένα αμινοξύ σε ένα άλλο.

7.12 Υπάρχουν καταστολείς ανερμηνεύσιμων μεταλλάξεων για κάθε κωδικόνιο τερματισμού

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Όλα τα ανερμηνεύσιμα κωδικόνια είναι δυνατόν να καταστολούν από tRNA με μεταλλαγμένα αντικωδικόνια.
- ▶ Κάποια σπάνια tRNA-καταστολείς φέρουν μεταλλάξεις σε θέσεις πέρα από το αντικωδικόνιό τους.

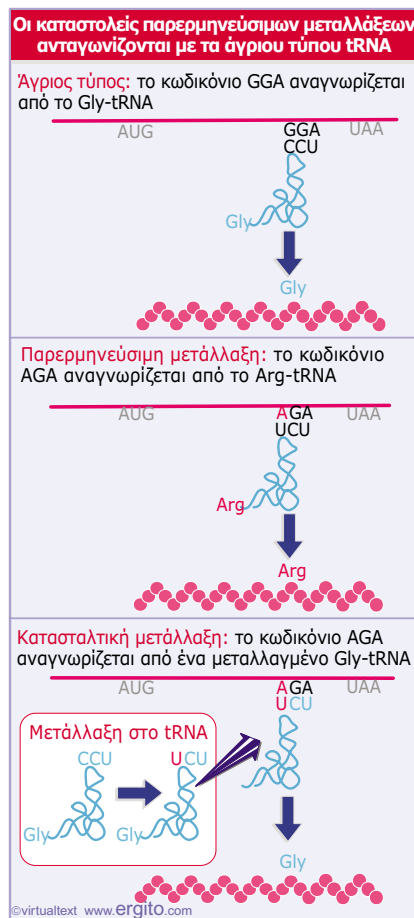
Οι καταστολείς ανερμηνεύσιμων μεταλλάξεων διαιρούνται σε τρεις τάξεις, μία για κάθε τύπο κωδικονίου τερματισμού. Στην **Εικόνα 7.25** περιγράφονται οι ιδιότητες μερικών από τους καλύτερα χαρακτηρισμένους καταστολείς.

Οι ευκολότεροι στο χαρακτηρισμό τους ήταν οι καταστολείς των μεταλλάξεων amber. Στην *E. coli* έχουν μεταλλαχθεί τουλάχιστον 6 tRNA ώστε να αναγνωρίζουν κωδικόνια UAG. Όλα τα tRNA-καταστολείς των μεταλλάξεων amber έχουν ως αντικωδικόνιο το CUA[←], το οποίο σχηματίζεται από την αλλαγή μίας βάσης στο αντικωδικόνιο του tRNA άγριου τύπου. Η θέση της μετάλλαξης μπορεί να βρίσκεται σε οποιαδήποτε από τις τρεις βάσεις του αντικωδικονίου, όπως παρατηρήθηκε στα *supD*, *supE* και *supF*. Κάθε tRNA-καταστολέας δεν αναγνωρίζει πλέον το αρχικό του κωδικόνιο αλλά μόνο το κωδικόνιο UAG. Τα αμινοξέα που προστίθενται είναι η σερίνη, η γλουταμίνη ή η τυροσίνη, τα ίδια δηλαδή με εκείνα που μεταφέρονται από τα αντίστοιχα tRNA άγριου τύπου.

Οι καταστολείς των μεταλλάξεων ochre προκύπτουν επίσης από μεταλλάξεις στο αντικωδικόνιο. Οι πιο γνωστές περιπτώσεις είναι τα *supC* και *supG*, που αφορούν μόρια tRNA τα οποία αναγνωρίζουν τόσο τα κωδικόνια ochre (UAA) όσο και τα amber (UAG) και ευθύνονται για την προσθήκη τυροσίνης ή λυσίνης στο κωδικόνιο όπου προηγουμένως τερματιζόταν η μετάφραση. Το γεγονός ότι δεν μπορεί να αναγνωριστεί μόνο το UAA συμφωνεί με την υπόθεση της ταλάντευσης.

Ένας καταστολέας του UGA έχει μια παράξενη ιδιότητα. Προέρχεται από το tRNA^{Trp}, αλλά η μοναδική του μετάλλαξη είναι η αντικατάσταση της G από την A στη θέση 24. Αυτή η αλλαγή αντικαθιστά ένα ζεύγος G•U στο στέλεχος D με ένα ζεύγος A•U, αυξάνοντας τη σταθερότητα της έλικας. Η αλληλουχία του αντικωδικονίου, CCA[←], παραμένει η ίδια με εκείνη του άγριου τύπου. Έτσι, η μετάλλαξη στο στέλεχος D θα πρέπει κατά κάποιον τρόπο να αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωση του βρόχου του αντικωδικονίου, επιτρέποντας στο CCA[←] να ζευγαρώσει με το UGA, δηλαδή προκαλώντας ένα ασυνήθιστο ζευγάρι ταλάντευσης του C με το A. Το tRNA-καταστολέας εξακολουθεί να αναγνωρίζει το συνηθισμένο του κωδικόνιο UGG.

Μια ανάλογη περίπτωση αναγνώρισης κωδικονίου-αντικωδικονίου παρατηρείται σε ένα ευκαρυωτικό tRNA. Σε ήπαρ μόσχου βρέθηκε ένα tRNA^{Ser} με αντικωδικόνιο mCCA[←]. Οι κανόνες της ταλάντευσης προβλέπουν ότι αυτό το tRNA θα πρέπει να αναγνωρίζει το κωδικόνιο τρυπτοφάνης UGG, αλλά στην πραγματικότητα αναγνωρίζει το κωδι-



Εικόνα 7.24 Μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη καταστέλλεται από μια μετάλλαξη του αντικωδικονίου ενός tRNA που καθιστά το μεταλλαγμένο tRNA ικανό να προσδένεται στο μεταλλαγμένο κωδικόνιο. Η καταστολή είναι μόνο μερική, επειδή τόσο το tRNA άγριου τύπου όσο και το tRNA-καταστολέας μπορούν να αποχριθούν στο AGA.

Τα tRNA-καταστολείς φέρουν μεταλλάξεις στα αντικωδικονιά τους					
Τόπος	tRNA	Άγριος τύπος	Καταστολέας		
<i>supD</i> (su1)	Ser	UCG	CGA	CUA	UAG
<i>supE</i> (su2)	Gln	CAG	CUG	CUA	UAG
<i>supF</i> (su3)	Tyr	UA ^C	GUA	CUA	UAG
<i>supC</i> (su4)	Tyr	UA ^C	GUA	UUA	UAG
<i>supG</i> (su5)	Lys	AA ^G	UUU	UUA	UAG
<i>supU</i> (su7)	Trp	UGG	CCA	UCA	UGG

Εικόνα 7.25 Τα tRNA-καταστολείς ανερμηνεύσιμων μεταλλάξεων δημιουργούνται από μεταλλάξεις στο αντικωδικόνιό τους. Τα αντικωδικόνια υποδεικνύονται με βέλος πάνω από τις αντίστοιχες τριπλέτες.

κόνιο τερματισμού UGA. Σ' αυτή την περίπτωση, λοιπόν, το UGA είναι πιθανόν να καταστέλλεται με φυσικό τρόπο.

Αυτές οι παρατηρήσεις αποδεικνύουν ότι η αναγνώριση κωδικονίου-αντικωδικονίου, είτε ενός άγριου τύπου είτε ενός μεταλλαγμένου tRNA, δεν είναι δυνατόν να προβλεφθεί απόλυτα από τις αντίστοιχες αλληλουχίες των τριπλετών, αλλά επηρεάζεται και από άλλα χαρακτηριστικά του μορίου του tRNA.

7.13 Τα tRNA-καταστολείς ανταγωνίζονται τα tRNA άγριου τύπου στην ανάγνωση του κώδικα

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Τα tRNA-καταστολείς ανταγωνίζονται με τα tRNA άγριου τύπου που φέρουν το ίδιο αντικωδικόνιο.
- ▶ Η απολύτως αποτελεσματική καταστολή είναι καταστροφική, διότι προκαλεί την αναγνωστική διέλευση πέρα από τα φυσιολογικά κωδικόνια τερματισμού.
- ▶ Το κωδικόνιο UGA παρουσιάζει «διαρροή» και διαβάζεται λανθασμένα, με συχνότητα 1-3%, από το Trp-tRNA.

Υπάρχει μια ενδιαφέρουσα διαφορά ανάμεσα στην αναγνώριση ενός νέου κωδικονίου από ένα μεταλλαγμένο tRNA-καταστολέα και στη φυσιολογική αναγνώριση ενός κωδικονίου από το αντίστοιχο αμινοακυλο-tRNA. Σε ένα κύτταρο άγριου τύπου, το νόημα κάθε κωδικονίου είναι μοναδικό και αντιστοιχεί είτε σε ένα συγκεκριμένο αμινοξύ είτε σε ένα σήμα τερματισμού. Αντίθετα, σε ένα κύτταρο που φέρει μια μετάλλαξη-καταστολέα, το μεταλλαγμένο κωδικόνιο μπορεί να αναγνωρίζεται εναλλακτικά είτε από το tRNA-καταστολέα είτε από το φυσιολογικό tRNA που αντιστοιχεί στο φυσιολογικό νόημα του κωδικονίου.

Ένα tRNA-καταστολέας μιας ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης ανταγωνίζεται τους παράγοντες αποδέσμευσης που αναγνωρίζουν τα κωδικόνια τερματισμού. Ένα tRNA-καταστολέας μιας παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης ανταγωνίζεται τα φυσιολογικά tRNA που αποκρίνονται στο νέο κωδικόνιο. Το αποτέλεσμα του ανταγωνισμού επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της καταστολής. Άρα η αποτελεσματικότητα ενός συγκεκριμένου καταστολέα δεν εξαρτάται μόνο από τη συγγένεια του αντικωδικονίου του με το κωδικόνιο-στόχο, αλλά επηρεάζεται και από τη συγκέντρωσή του στο κύτταρο, καθώς και από τις παραμέτρους που διέπουν τον ανταγωνισμό κατά τις αντιδράσεις τερματισμού ή προσθήκης αμινοξέος.

Η ανάγνωση ενός κωδικονίου επηρεάζεται από τη θέση του, γι' αυτό η αποτελεσματικότητα της καταστολής μιας ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης από ένα tRNA μπορεί να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό, ανάλογα με το **πλαίσιο** (context) του κωδικονίου. Δεν έχει αποκρυπτογραφηθεί πώς οι γειτονικές βάσεις του mRNA επηρεάζουν την αναγνώριση κωδικονίου-αντικωδικονίου. Πάντως, το πλαίσιο μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει τη συχνότητα με την οποία ένα συγκεκριμένο tRNA ανα-

γνωρίζει ένα κωδικόνιο κατά μία τάξη μεγέθους ή και ακόμη περισσότερο. Η βάση στην 3' πλευρά του κωδικονίου φαίνεται να έχει ιδιαίτερα ισχυρή επίδραση.

Ένας καταστολέας μιας ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης απομονώνεται βάσει της ικανότητάς του να αποκρίνεται σε ένα μεταλλαγμένο ανερμηνεύσιμο κωδικόνιο. Όμως, η ίδια τριπλέτα αποτελεί ένα από τα φυσιολογικά κωδικόνια τερματισμού του κυττάρου! Το μεταλλαγμένο tRNA που καταστέλλει την ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη είναι ουσιαστικά ικανό να καταστέλλει το φυσικό τερματισμό οποιουδήποτε γονιδίου χρησιμοποιεί το συγκεκριμένο κωδικόνιο τερματισμού. Στην **Εικόνα 7.26** φαίνεται ότι η **αναγνωστική διέλευση** (readthrough) έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μιας μεγαλύτερης σε μήκος πρωτεΐνης, με πρόσθετα αμινοξέα στο C-τελικό άκρο. Η πρωτεϊνοσύνθεση θα σταματήσει στην επόμενη τριπλέτα τερματισμού στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης. Η εκτενής καταστολή του τερματισμού ενδέχεται να είναι καταστροφική για το κύτταρο, αφού παράγονται μεγαλύτερες πρωτεΐνες των οποίων οι ιδιότητες μπορεί να μην είναι φυσιολογικές.

Οι καταστολείς amber έχουν συνήθως, ανάλογα με το σύστημα, αρκετά μεγάλη αποτελεσματικότητα (10%-50%), επειδή τα κωδικόνια amber χρησιμοποιούνται σχετικά σπάνια στον τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης της *E. coli*.

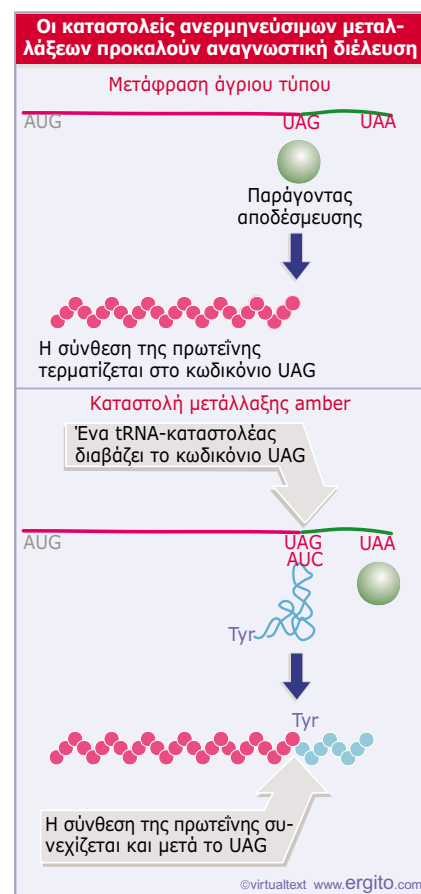
Οι καταστολείς ochre απομονώνονται δύσκολα και είναι πάντα λιγότερο αποτελεσματικοί (συνήθως <10%). Όλα τα στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις-καταστολείς ochre μεγαλώνουν σχετικά αργά, γεγονός που δείχνει ότι η καταστολή και των δύο κωδικονίων, UAA και UAG, είναι επιβλαβής για την *E. coli*, πιθανώς επειδή το κωδικόνιο ochre είναι το πιο κοινό σήμα τερματισμού.

Το UGA είναι το λιγότερο αποτελεσματικό κωδικόνιο τερματισμού όσον αφορά τη φυσιολογική του λειτουργία: σε κύτταρα άγριου τύπου αναγνωρίζεται κατά λάθος από το Trp-tRNA με συχνότητα 1-3%. Παρ' όλα αυτά, χρησιμοποιείται στον τερματισμό βακτηριακών γονιδίων συχνότερα απ' ό,τι η τριπλέτα amber.

Ο καταστολέας μιας παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης ενός γονιδίου είναι πιθανόν να είναι μεταλλάκτης (mutator) ενός άλλου γονιδίου. Ένας καταστολέας διορθώνει μια μετάλλαξη αντικαθιστώντας το αμινοξύ στη μεταλλαγμένη θέση με ένα άλλο. Ωστόσο, σε άλλες θέσεις η ίδια αντικατάσταση αλλάζει το αμινοξύ άγριου τύπου με ένα διαφορετικό αμινοξύ, πιθανώς εμποδίζοντας τη φυσιολογική πρωτεϊνική λειτουργία.

Επομένως το κύτταρο θα πρέπει να βρει την ιδανική ισορροπία, αφενός με το να καταστείλει ένα μεταλλαγμένο κωδικόνιο σε μία θέση και αφετέρου με το να μην αλλάξει δραματικά το φυσιολογικό του νόημα σε άλλες θέσεις. Έτσι εξηγείται λοιπόν γιατί δεν υπάρχουν ισχυροί καταστολείς παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων: η αποτελεσματική αντικατάσταση ενός αμινοξέος θα είχε επιβλαβή αποτελέσματα.

Μία μετάλλαξη που δημιουργεί έναν tRNA-καταστολέα μπορεί να έχει δύο συνέπειες. Πρώτον, επιτρέπει στο tRNA να αναγνωρίζει ένα νέο κωδικόνιο. Δεύτερον, μερικές φορές εμποδίζει το tRNA να αναγνωρίζει τα κωδικόνια στα οποία αποκρινόταν πριν τη μετάλλαξη. Είναι σημαντικό ότι όλοι οι υψηλής αποτελεσματικότητας καταστολείς amber προέρχονται από μετάλλαξη ενός μόνο μέλους μιας ομάδας υπεράριθμων tRNA. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το κύτταρο διαθέτει



Εικόνα 7.26 Οι καταστολείς των ανερμηνεύσιμων μεταλλάξεων αναγνωρίζουν και τα φυσικά κωδικόνια τερματισμού, προκαλώντας τη σύνθεση πρωτεϊνών που είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες του άγριου τύπου.

αρκετά tRNA τα οποία μπορούν να αποκριθούν στο κωδικόνιο που αναγνωριζόταν αρχικά από το tRNA άγριου τύπου. Έτσι, η μετάλλαξη δεν καταργεί την αναγνώριση των παλιών κωδικονίων, τα οποία συνεχίζουν να αναγνωρίζονται από τα άλλα tRNA της ομάδας. Εάν όμως υπάρχει μόνο ένα tRNA που αποκρίνεται σε ένα συγκεκριμένο κωδικόνιο, κάθε μετάλλαξη που εμποδίζει αυτή την απόκριση είναι θανατηφόρα.

Η καταστολή συνήθως αναφέρεται σε μία συγκεκριμένη μετάλλαξη που αλλάζει την ανάγνωση ενός κωδικονίου. Ωστόσο, ακόμη και σε κύτταρα άγριου τύπου, ένα κωδικόνιο τερματισμού είναι δυνατόν να αναγνωρίζεται περιστασιακά ως κωδικόνιο που κωδικοποιεί κάποιο αμινοξύ. Το πρώτο παράδειγμα που ανακαλύφθηκε ήταν το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του καψιδίου του φάγου RNA Qβ. Ο σχηματισμός μολυσματικών σωματίων Qβ απαιτεί να καταστέλλεται το κωδικόνιο τερματισμού στο τέλος του γονιδίου με μικρή συχνότητα, ώστε να συντίθεται μια μικρή ποσότητα πρωτεϊνών του καψιδίου με C-τελική προέκταση. Δηλαδή αυτό το κωδικόνιο τερματισμού παρουσιάζει «διαρροή» (leaky stop codon), επειδή αναγνωρίζεται με χαμηλή συχνότητα από το Trp-tRNA.

Η αναγνωστική διέλευση από κωδικόνια τερματισμού παρατηρείται και στους ευκαρυώτες, όπου χρησιμοποιείται κυρίως από ιούς RNA. Σ' αυτό το φαινόμενο μπορεί να ενέχεται η καταστολή του UAG/UAA από τα Tyr-tRNA, Gln-tRNA και Leu-tRNA ή η καταστολή του UGA από τα Trp-tRNA και Arg-tRNA. Η έκταση της μερικής καταστολής καθορίζεται από το γενικό πλαίσιο που περιβάλλει το κωδικόνιο.

7.14 Το ριβόσωμα επηρεάζει την ακρίβεια της μετάφρασης

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Η δομή του 16S rRNA στις θέσεις P και A του ριβοσώματος επηρεάζει την ακρίβεια της μετάφρασης.

Η απουσία ανιχνεύσιμης ποικιλομορφίας της αμινοξικής αλληλουχίας μιας πρωτεΐνης σε ένα κύτταρο αποδεικνύει ότι η πρωτεϊνοσύνθεση είναι εξαιρετικά αξιόπιστη. Εμφανίζονται ελάχιστα σφάλματα με τη μορφή αντικαταστάσεων ενός αμινοξέος από ένα άλλο. Δύο είναι τα στάδια στην πρωτεϊνοσύνθεση στα οποία μπορεί να γίνουν σφάλματα (βλ. Εικόνα 6.8, Ενότητα 6.3: *Ειδικοί μηχανισμοί ελέγχουν την ακρίβεια της πρωτεϊνοσύνθεσης*):

- ▶ Η φόρτωση ενός tRNA αποκλειστικά με το σωστό αμινοξύ είναι προφανώς πολύ σημαντική. Η λειτουργία αυτή επιτελείται από τις αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες. Πιθανόν η συχνότητα σφάλματος να ποικίλλει σε κάθε ένζυμο, αλλά γενικά είναι $<1/10^5$ αντιδράσεις αμινοακυλίωσης.
- ▶ Η ειδικότητα της αναγνώρισης κωδικονίου-αντικωδικονίου είναι καθοριστικής σημασίας, αλλά παραμένει αινιγματική. Αν και οι σταθερές πρόσδεσης είναι διαφορετικές για κάθε ζεύγος κωδικονίου-

αντικωδικονίου, η ειδικότητα ποτέ δεν είναι επαρκώς υψηλή για να διασφαλίσει συχνότητα σφάλματος $<10^{-5}$. Τα ελεύθερα σε διάλυμα tRNA δεν προσδένονται ισχυρά στις αλληλουχίες των κωδικονίων τους. Παρόμοιες αλλά λανθασμένες τριπλέτες (αν και οι δύο από τις τρεις βάσεις είναι σωστές) αναγνωρίζονται με μειωμένη αποτελεσματικότητα, κατά 10 ως 100 φορές σε σχέση με τις σωστές τριπλέτες.

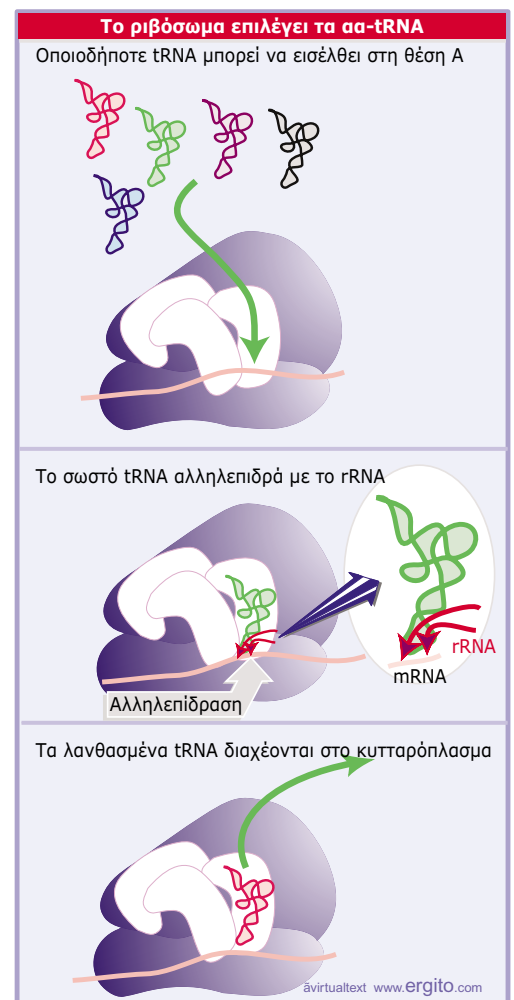
Για το λόγο αυτό, το ζευγάρι κωδικονίου-αντικωδικονίου φαίνεται να είναι ένα αδύνατο σημείο στην ακρίβεια της μετάφρασης. Το ριβόσωμα έχει ένα σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ειδικότητας αυτής της αλληλεπίδρασης, να διακρίνει άμεσα ή έμμεσα τα σωστά από τα λανθασμένα ζεύγη κωδικονίου-αντικωδικονίου, μεγεθύνοντας έτσι έως και 1.000 φορές τη μάλλον μέτρια ενδογενή διαφορά της σταθερότητας των ειδικών και μη ειδικών αλληλεπιδράσεων κωδικονίου-αντικωδικονίου. Επιπλέον, εκτός από το ρόλο που διαδραματίζει το ίδιο το ριβόσωμα, οι παράγοντες που φέρουν το εναρκτήριο tRNA και τα αμινοακυλο-tRNA στο ριβόσωμα μπορούν, επίσης, να επηρεάσουν το ζευγάρι κωδικονίου-αντικωδικονίου.

Επομένως θα πρέπει να υπάρχει κάποιος μηχανισμός σταθεροποίησης του σωστού αμινοακυλο-tRNA, ο οποίος επιτρέπει να προστεθεί το αμινοξύ του στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι επαφές με ένα λανθασμένο αμινοακυλο-tRNA θα πρέπει να διασπώνται γρήγορα, ώστε το σύμπλοκο να αποχωρεί χωρίς να έχει αντιδράσει. Ας υποθέσουμε ότι δεν υπάρχει καμία ειδικότητα στην αρχική επαφή ανάμεσα στο σύμπλοκο αμινοακυλο-tRNA•EF-Tu•GTP και στο ριβόσωμα. Εάν οποιοδήποτε σύμπλοκο, ανεξάρτητα από το tRNA που περιέχει, μπορεί να εισέλθει στη θέση A, ο αριθμός των λανθασμένων εισόδων θα πρέπει να ξεπερνά κατά πολύ τον αριθμό των σωστών εισόδων.

Υπάρχουν δύο βασικά μοντέλα για τον τρόπο με τον οποίο ένα ριβόσωμα θα μπορούσε να διακρίνει τα σωστά από τα λανθασμένα αμινοακυλο-tRNA που συνδέονται με το κωδικόνιο. Στην πράξη ισχύουν κάποια στοιχεία και των δύο μοντέλων.

- ▶ Σύμφωνα με το μοντέλο της άμεσης αναγνώρισης (direct recognition model), η δομή του ριβοσώματος είναι σχεδιασμένη ώστε να αναγνωρίζει τα αμινοακυλο-tRNA που είναι σωστά ζευγαρωμένα με το κωδικόνιο. Αυτό σημαίνει ότι το σωστό ζευγάρι προκαλεί κάποια μικρή αλλαγή στη διαμόρφωση του αμινοακυλο-tRNA, την οποία μπορεί να αναγνωρίσει το ριβόσωμα. Η διάκριση πραγματοποιείται προτού λάβουν χώρα άλλες αντιδράσεις.
- ▶ Σύμφωνα με το μοντέλο του κινητικού διορθωτικού ελέγχου (kinetic proofreading model), υπάρχουν δύο (ή περισσότερα) στάδια στη διαδικασία, ώστε το αμινοακυλο-tRNA να έχει πολλαπλές ευκαιρίες να αποσυνδεθεί. Ένα λανθασμένο αμινοακυλο-tRNA περνάει από κάποια στάδια της αντίδρασης πριν απορριφθεί. Η συνολική επιλεκτικότητα συνίσταται ουσιαστικά από το άθροισμα της επιλεκτικότητας των επιμέρους σταδίων.

Στην **Εικόνα 7.27** περιγράφεται διαγραμματικά τι συμβαίνει στα αμινοακυλο-tRNA που έχουν ζευγαρώσει σωστά ή λάθος. Ένα σωστά ζευγαρωμένο αμινοακυλο-tRNA είναι ικανό να δημιουργήσει σταθερές επαφές με το rRNA. Ένα λανθασμένο αμινοακυλο-tRNA δε δημιουργεί αυτές τις επαφές και συνεπώς είναι δυνατόν να απομακρυνθεί από τη θέση A με διάχυση.



Εικόνα 7.27 Στη θέση A μπορεί να εισαχθεί (από τον EF-Tu) οποιοδήποτε αμινοακυλο-tRNA, αλλά μόνο όποιο ζευγαρώσει με το αντικωδικόνιο δημιουργεί επαφές με το rRNA οι οποίες το σταθεροποιούν. Απουσία αυτών των επαφών, το αμινοακυλο-tRNA αποβάλλεται από τη θέση A.

Οι έρευνες των επιδράσεων του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη, τη δεκαετία του '60, άνοιξαν το δρόμο για την ανακάλυψη αυτών των αλληλεπιδράσεων. Η στρεπτομυκίνη καταστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση, επειδή προσδένεται στο 16S rRNA και εμποδίζει τον EF-G να καταλύσει τη μετατόπιση. Επίσης, αυξάνει την πιθανότητα λανθασμένης ανάγνωσης των πυριμιδινών U και C (συνήθως η μία αναγνωρίζεται εσφαλμένα στη θέση της άλλης και περιστασιακά μπορεί να διαβαστούν ως A). Η θέση όπου δρα η στρεπτομυκίνη επηρεάζεται από την πρωτεΐνη S12. Η αλληλουχία αυτής της πρωτεΐνης είναι αλλαγμένη σε ανθεκτικά στη στρεπτομυκίνη μεταλλάγματα. Τα ριβοσώματα που φέρουν πρωτεΐνη S12, η οποία προέρχεται από ανθεκτικά βακτήρια, εμφανίζουν μειωμένη συχνότητα σφαλμάτων ανάγνωσης σε σύγκριση με τα ριβοσώματα άγριου τύπου. Δηλαδή η S12 ελέγχει το επίπεδο των σφαλμάτων ανάγνωσης. Όταν μεταλλάσσεται, έτσι ώστε να μειώνει τα σφάλματα ανάγνωσης, αντισταθμίζει την επίδραση της στρεπτομυκίνης.

Η πρωτεΐνη S12 σταθεροποιεί τη δομή του 16S rRNA στην περιοχή όπου δεσμεύεται η στρεπτομυκίνη. *Τα σημαντικά σημεία είναι ότι η περιοχή των θέσεων P/A επηρεάζει την πιστότητα της μετάφρασης: η πιστότητα της μετάφρασης μειώνεται ή βελτιώνεται μεταβάλλοντας τη δομή του 16S rRNA.* Ο συνδυασμός των επιδράσεων της πρωτεΐνης S12 και της στρεπτομυκίνης στη δομή του rRNA εξηγεί τη συμπεριφορά διαφόρων μεταλλαγμάτων της S12, ορισμένα από τα οποία καθιστούν τη σωστή λειτουργία του ριβοσώματος *εξαρτώμενη* από την παρουσία στρεπτομυκίνης.

Σήμερα γνωρίζουμε, από την κρυσταλλική δομή του ριβοσώματος, ότι το 16S rRNA έχει τη δυνατότητα να δημιουργήσει επαφές με το αμινοακυλο-tRNA. Δύο βάσεις του 16S rRNA μπορεί να έρθουν σε επαφή με τη μικρή αύλακα της έλικας που σχηματίζεται από το ζευγάρωμα του αντικωδικονίου στο tRNA με τις δύο πρώτες βάσεις του κωδικονίου στο mRNA (βλ. Εικόνα 6.47). Το σωστό ζευγάρωμα των βάσεων στις δύο πρώτες θέσεις κωδικονίου-αντικωδικονίου σταθεροποιεί άμεσα τη δομή. Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός δεν ελέγχει τις επαφές στην τρίτη θέση.

Η σταθεροποίηση των σωστά ζευγαρωμένων αμινοακυλο-tRNA μπορεί να έχει δύο συνέπειες. Συγκρατώντας το αμινοακυλο-tRNA στη θέση A, το εμποδίζει να διαφύγει πριν πραγματοποιηθεί το επόμενο στάδιο της πρωτεϊνοσύνθεσης. Ταυτόχρονα, η αλλαγή στη διαμόρφωση του rRNA ίσως αποτελεί το έναυσμα για το επόμενο στάδιο της αντίδρασης, που είναι η υδρόλυση του GTP από τον EF-Tu.

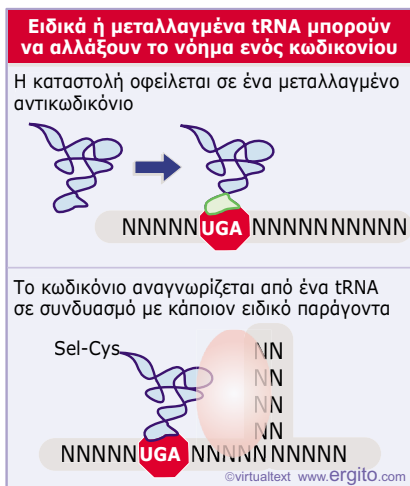
Ο διορθωτικός έλεγχος βασίζεται σε ένα ποσοστό στο συγχρονισμό των βημάτων της αντίδρασης. Ένα αμινοακυλο-tRNA στη θέση A μπορεί στην πράξη να παγιδευτεί, εάν το επόμενο στάδιο της πρωτεϊνοσύνθεσης προχωρήσει ενώ αυτό βρίσκεται ακόμα εκεί. Έτσι, μια καθυστέρηση ανάμεσα στην είσοδο στη θέση A και στην πεπτιδυλο-μεταφορά μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα αποσύνδεσης ενός λανθασμένου αμινοακυλο-tRNA. Τα λανθασμένα αμινοακυλο-tRNA αποσυνδέονται ~5 φορές γρηγορότερα απ' ό,τι το σωστά ζευγαρωμένο αμινοακυλο-tRNA. Η πιθανότητα λοιπόν να διαφύγει αυξάνεται όταν το βήμα της μεταφοράς του πεπτιδίου καθυστερεί.

Η ειδικότητα της αποκρυπτογράφησης του mRNA είχε αρχικά θεωρηθεί ότι οφείλεται στο ριβόσωμα, αλλά κάποια πρόσφατα αποτε-

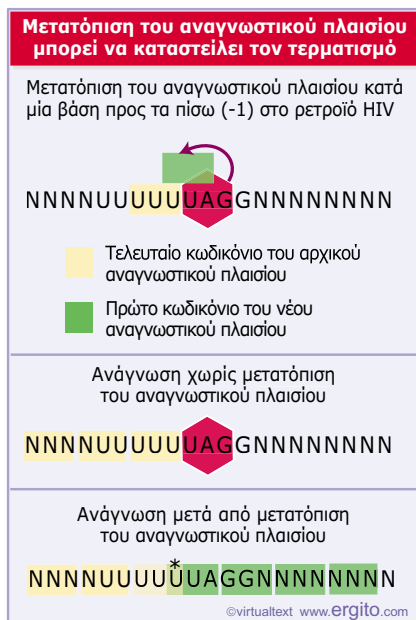
λέσματα υποδεικνύουν ότι οι παράγοντες μετάφρασης επηρεάζουν τις διαδικασίες στις θέσεις P και A. Τα μεταλλάγματα του παράγοντα EF-Tu που καταστέλλουν τη μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου αποδεικνύουν τη συμβολή του στη διαδικασία της ανάγνωσης της γενετικής πληροφορίας. Ο EF-Tu δε φέρνει απλώς το αμινοακυλο-tRNA στη θέση A, αλλά συμμετέχει και στη διάταξή του σε σχέση με το πεπτιδυλο-tRNA στη θέση P.

Μια αξιοσημείωτη περίπτωση όπου οι παράγοντες επηρεάζουν το νόημα απαντάται στην έναρξη. Η μετάλλαξη του κωδικονίου έναρξης AUG σε UUG στο γονίδιο *HIS4* της ζύμης εμποδίζει την έναρξη. Είναι δυνατόν να βρεθούν εξωγονιδιακές μεταλλάξεις-καταστολείς που επιτρέπουν την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης στο μεταλλαγμένο κωδικόνιο UUG. Δύο από αυτές τις μεταλλάξεις-καταστολείς εντοπίζονται σε γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β του eIF2, του παράγοντα που προσδένει το Met-tRNA_i στη θέση P. Η μετάλλαξη του eIFβ2 βρίσκεται σε μια περιοχή της πρωτεΐνης που συμμετέχει σχεδόν σίγουρα στην πρόσδεση νουκλεϊκών οξέων. Υπάρχει πιθανότητα ο στόχος του να είναι είτε η ίδια η αλληλουχία έναρξης του mRNA είτε τα ζεύγη βάσεων ανάμεσα στο κωδικόνιο του mRNA και στο αντικωδικόνιο του tRNA_i^{Met}. Δηλαδή, ο eIF2 συμμετέχει τόσο στη διάκριση των κωδικονίων έναρξης όσο και στη μεταφορά του tRNA έναρξης στη θέση P.

Το κόστος της πρωτεϊνοσύνθεσης, όσον αφορά τους δεσμούς υψηλής ενέργειας, μπορεί να αυξηθεί με τις διαδικασίες του διορθωτικού ελέγχου. Το κόστος της πρωτεϊνοσύνθεσης εξαρτάται από το στάδιο στο οποίο αποφασίζεται αν θα γίνει αποδεκτό ένα tRNA. Αν η αποδέσμευση του συμπλόκου αμινοακυλο-tRNA•EF-Tu•GTP γίνεται αμέσως, το κόστος της απόρριψης των (στατιστικά) πολυάριθμων λανθασμένων tRNA που είναι πιθανόν να εισέρχονται, πριν αναγνωρισθεί το σωστό tRNA, στη θέση A είναι σχετικά μικρό. Εάν όμως το GTP υδρολυθεί πριν αποσυνδεθεί το σύμπλοκο, το κόστος θα είναι μεγαλύτερο. Ένα αμινοακυλο-tRNA που έχει ζευγαρώσει λανθασμένα είναι δυνατόν να απορριφθεί είτε πριν είτε μετά τη διάσπαση του GTP, μολονότι δεν είναι γνωστή ακόμα η σχετική αναλογία. Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι η κατανάλωση του GTP κατά την πρωτεϊνοσύνθεση *in vivo* είναι μεγαλύτερη από τους 3 δεσμούς υψηλής ενέργειας που χρησιμοποιούνται στην προσθήκη κάθε (σωστού) αμινοξέος στην πολυπεπτιδική αλυσίδα.



Εικόνα 7.28 Μια μετάλλαξη ενός tRNA (συνήθως στο αντικωδικόνιο) μπορεί να αλλάξει το φυσιολογικό νόημα του αντίστοιχου κωδικονίου. Σε μια ειδική περίπτωση, ένα συγκροτημένο tRNA μπορεί να δεσμευτεί από έναν ασυνήθιστο παράγοντα επιμήκυνσης και να αναγνωρίσει ένα κωδικόνιο τερματισμού δίπλα σε μία φουρκέτα.



Εικόνα 7.29 Ένα tRNA που ολισθαίνει κατά μία βάση στο ζευγάρωμά του με το κωδικόνιο προκαλεί μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου η οποία μπορεί να καταστείλει τον τερματισμό. Η αποτελεσματικότητα συνήθως είναι ~5%. Ο αστερίσκος υποδεικνύει τη βάση η οποία διαβάζεται δύο φορές.

7.15 Η ανακωδικοποίηση αλλάζει το νόημα των κωδικονίων

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Μεταλλαγμένα tRNA ή tRNA με ειδικές ιδιότητες μπορούν να αλλάξουν το νόημα ενός κωδικονίου.
- ▶ Το αναγνωστικό πλαίσιο μπορεί να αλλάξει με μετατόπιση ή παράκαμψη, φαινόμενα που εξαρτώνται από τις ιδιότητες του mRNA.

Το αναγνωστικό πλαίσιο ενός αγγελιαφόρου RNA συνήθως είναι αμετάβλητο. Η μετάφραση ξεκινά σε ένα κωδικόνιο AUG και συνεχίζεται ανά τριπλέτες ως το κωδικόνιο τερματισμού. Η μετάφραση είναι ανεξάρτητη από το νόημα που κωδικοποιείται από το mRNA: όταν η προσθήκη ή η απάλειψη μιας βάσης μετατοπίζει το αναγνωστικό πλαίσιο πέρα από το σημείο της μετάλλας, τότε τα ριβοσώματα και τα tRNA συνεχίζουν αναπόφευκτα να διαβάζουν τριπλέτες, συνθέτοντας μια εντελώς διαφορετική πολυπεπτιδική αλυσίδα.

Σε ορισμένες ασυνήθιστες περιπτώσεις, η σύνθεση της πλήρους πρωτεΐνης από τη μετάφραση ενός αναγνωστικού πλαισίου διακόπτεται με κάποιον τρόπο –για παράδειγμα, από ένα ανερμηνεύσιμο κωδικόνιο ή μια μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου. Η απόκλιση από τους συνηθισμένους κανόνες της μετάφρασης ονομάζεται **ανακωδικοποίηση** (recoding) και μπορεί να οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς.

Η αλλαγή στο νόημα ενός συγκεκριμένου κωδικονίου επιτρέπει την αντικατάσταση ενός αμινοξέος από ένα άλλο ή επιτρέπει σε ένα αμινοξύ να προστεθεί στη θέση ενός κωδικονίου τερματισμού. Στην **Εικόνα 7.28** φαίνεται ότι αυτές οι αλλαγές βασίζονται στις ιδιότητες ενός συγκεκριμένου tRNA που αποκρίνεται στο συγκεκριμένο κωδικόνιο.

- ▶ Η καταστολή οφείλεται στην αναγνώριση ενός κωδικονίου από ένα (μεταλλαγμένο) tRNA που συνήθως θα αποκρινόταν σε κάποιο άλλο κωδικόνιο (βλ. 7.11: *Τα tRNA-καταστολείς έχουν μεταλλαγμένα αντικωδικόνια που αναγνωρίζουν νέα κωδικόνια*).
- ▶ Η τροποποίηση ενός αμινοακυλο-tRNA επαναπροσδιορίζει το νόημα ενός κωδικονίου (βλ. 7.7: *Σε ορισμένα κωδικόνια τερματισμού μπορούν να προστεθούν ασυνήθιστα αμινοξέα*).

Η μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου συμβαίνει σε δύο περιπτώσεις:

- ▶ Κατά την ολίσθηση του αναγνωστικού πλαισίου, το αμινοακυλο-tRNA ολισθαίνει κατά μία βάση (+1 προς τα εμπρός ή -1 προς τα πίσω, βλ. επόμενη Ενότητα). Στην **Εικόνα 7.29** γίνεται φανερό ότι η μετάφραση συνεχίζεται πέρα από το κωδικόνιο τερματισμού εξαιτίας της ολίσθησης.
- ▶ Η παράκαμψη (bypassing) οφείλεται στη μετακίνηση του ριβοσώματος, ώστε να αλλάξει το κωδικόνιο που ζευγαρώνει με το πεπτιδυλο-tRNA στη θέση P. Η αλληλουχία που βρίσκεται μεταξύ των δύο κωδικονίων δε θα εμφανιστεί στην πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται

στην **Εικόνα 7.30**, η παράκαμψη επιτρέπει τη συνέχιση της μετάφρασης πέρα από τα κωδικόνια τερματισμού που τυχόν βρίσκονται στην ενδιάμεση περιοχή που παρακάμπτεται.

7.16 Η μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου συμβαίνει σε «ολισθηρές» αλληλουχίες

Σημαντικές έννοιες

- ▶ Το αναγνωστικό πλαίσιο μπορεί να επηρεαστεί από την αλληλουχία του mRNA και από το ριβοσωμικό περιβάλλον.
- ▶ Οι «ολισθηρές» αλληλουχίες επιτρέπουν σε ένα tRNA να μετατοπιστεί κατά μία βάση, αφού έχει ζευγαρώσει με το αντικωδικόνιό του, αλλάζοντας έτσι το αναγνωστικό πλαίσιο.
- ▶ Η μετάφραση ορισμένων γονιδίων εξαρτάται από την προγραμματισμένη μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου.

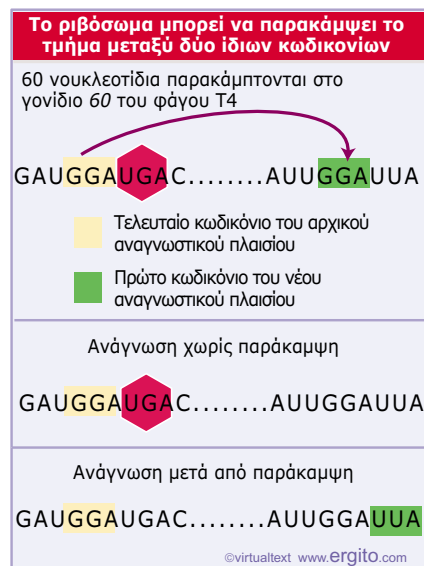
Η μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου σχετίζεται με ειδικά tRNA σε δύο περιπτώσεις:

- ▶ Κάποια μεταλλαγμένα tRNA-καταστολείς αναγνωρίζουν τέσσερις βάσεις ως ένα «κωδικόνιο» αντί για τις συνηθισμένες τρεις βάσεις.
- ▶ Ορισμένες «ολισθηρές» αλληλουχίες επιτρέπουν σε ένα tRNA να μετακινηθεί κατά μία βάση ανοδικά ή καθοδικά στο mRNA στη θέση A.

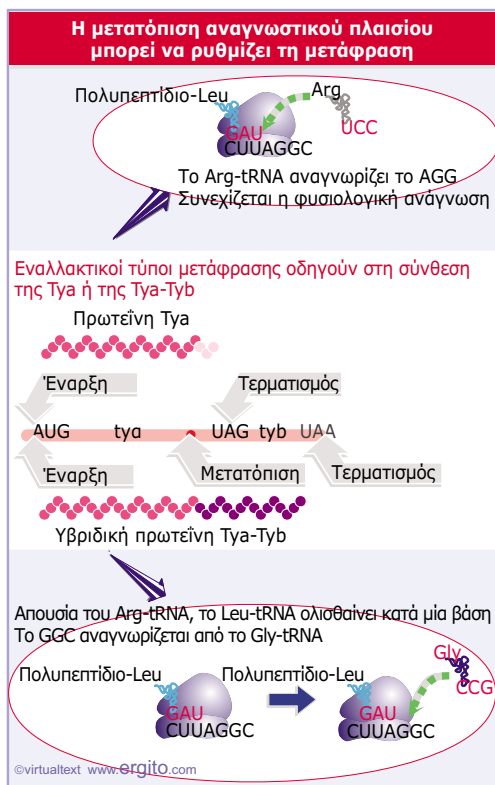
Τα μεταλλάγματα μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου προκύπτουν από την προσθήκη ή την απάλειψη μιας βάσης. Είναι δυνατόν να κατασταλούν αποκαθιστώντας το αρχικό αναγνωστικό πλαίσιο με την αντιστάθμιση των ελλειμμάτων ή των προσθηκών βάσεων μέσα σε ένα γονίδιο (βλ. 1.21: *Ο γενετικός κώδικας είναι κώδικας τριπλέτας*). Ωστόσο, υπάρχουν και εξωγονιδιακοί καταστολείς των μετατοπίσεων του αναγνωστικού πλαισίου, όπως κάποια tRNA με ασυνήθιστες ιδιότητες.

Το απλούστερο παράδειγμα εξωγονιδιακού καταστολέα μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου αφορά την αποκατάσταση του αναγνωστικού πλαισίου μετά από την προσθήκη μίας επιπλέον βάσης ανάμεσα σε όμοιες βάσεις (π.χ. προσθήκη μίας βάσης G ανάμεσα σε αρκετές συνεχόμενες βάσεις G). Ο καταστολέας της μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου είναι σε αυτή την περίπτωση ένα tRNA^{Gly} που φέρει μία επιπλέον βάση στο βρόχο του αντικωδικονίου του, μετατρέποντας τη συνηθισμένη τριπλέτα CCC[←] στην τετράδα CCCC[←]. Το tRNA-καταστολέας αναγνωρίζει λοιπόν ένα «κωδικόνιο» με τέσσερις βάσεις.

Ορισμένοι καταστολείς μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου αναγνωρίζουν περισσότερα από ένα «κωδικόνια» τεσσάρων βάσεων. Για παράδειγμα, ένα βακτηριακό tRNA^{Leu}-καταστολέας μπορεί να αναγνωρίσει είτε AAAA είτε AAAU αντί για το συνηθισμένο κωδικόνιο AAA. Ένας άλλος καταστολέας μπορεί να διαβάσει οποιοδήποτε «κωδικόνιο» τεσσάρων βάσεων με ACC στις τρεις πρώτες θέσεις. Η



Εικόνα 7.30 Παράκαμψη είναι η μετακίνηση του ριβοσώματος κατά μήκος του mRNA, έτσι ώστε το πεπτιδυλο-tRNA της θέσης P να αποδεσμεύεται από το κωδικόνιό του και στη συνέχεια να ζευγαρώνει ξανά με ένα άλλο κωδικόνιο που βρίσκεται καθοδικά στο mRNA.



Εικόνα 7.31 Για την έκφραση του γονιδίου *tyb* του στοιχείου Ty του ζυμομύκητα απαιτείται μια μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου (κατά +1). Η μετατόπιση πραγματοποιείται σε μια αλληλουχία 7 βάσεων στην οποία δύο κωδικόνια Leu συνοδεύονται από ένα σπάνιο κωδικόνιο Arg.

επόμενη βάση δεν έχει σημασία. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι εναλλακτικές βάσεις, που είναι αποδεκτές στην τέταρτη θέση του «κωδικονίου», δεν υπακούουν στους συνηθισμένους κανόνες ταλάντευσης. Ίσως το tRNA-καταστολέας να αναγνωρίζει μόνο τις τρεις βάσεις, αλλά για κάποιο λόγο –πιθανότατα εξαιτίας στερεοχημικής παρεμπόδισης– η παρακείμενη βάση μπλοκάρεται. Αυτό οδηγεί στην παράλειψη μίας βάσης, πριν το επόμενο tRNA βρει ένα κωδικόνιο.

Η μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου μπορεί να αποτελεί ένα φυσιολογικό γεγονός σε φάγους και ιούς. Στις περιπτώσεις αυτές, η μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου προκαλείται από τις ενδογενείς ιδιότητες του mRNA και μπορεί να επηρεάζει τη συνέχιση ή τον τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Στους ρετροϊούς, η μετάφραση του πρώτου γονιδίου τερματίζεται σε ένα ανερμηνεύσιμο κωδικόνιο στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο. Το δεύτερο γονίδιο βρίσκεται σε διαφορετικό αναγνωστικό πλαίσιο και (σε κάποιους ιούς) μεταφράζεται μέσω μιας μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου, η οποία παρακάμπτει το κωδικόνιο τερματισμού (βλ. Εικόνα 7.29 και Ενότητα 17.3: *Τα γονίδια των ρετροϊών κωδικοποιούν πολυπρωτεΐνες*). Η αποτελεσματικότητα της μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου είναι χαμηλή, συνήθως ~5%. Αυτό είναι σημαντικό στη βιολογία του ιού: μια αύξηση της αποτελεσματικότητας μπορεί να είναι επιβλαβής. Στην **Εικόνα 7.31** παρουσιάζεται μια παρόμοια κατάσταση που αφορά το στοιχείο Ty του ζυμομύκητα. Στην περίπτωση αυτή, το κωδικόνιο τερματισμού του γονιδίου *tya* πρέπει να παρακαμφθεί μετατοπίζοντας το αναγνωστικό πλαίσιο, ώστε να διαβαστεί το γονίδιο *tyb* που ακολουθεί.

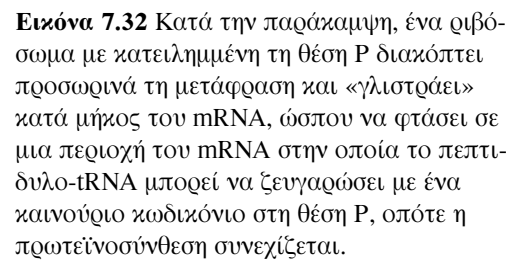
Τέτοιες καταστάσεις υποδεικνύουν ότι η σπάνια (αλλά προβλέψιμη) «λανθασμένη ανάγνωση» μπορεί να θεωρηθεί ως ένα απαραίτητο (φυσιολογικό) βήμα της μετάφρασης. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται **προγραμματισμένη μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου** (programmed frameshift) και συμβαίνει σε συγκεκριμένες θέσεις με συχνότητα 100-1.000 φορές μεγαλύτερη απ' ό,τι σε μη προγραμματισμένες θέσεις ($\sim 3 \times 10^{-5}$ ανά κωδικόνιο).

Οι μετατοπίσεις του αναγνωστικού πλαισίου αυτού του είδους έχουν 2 κοινά χαρακτηριστικά:

- ▶ Η «ολισθηρή» αλληλουχία επιτρέπει στο πεπτιδυλο-tRNA να ζευγαρώσει με το κωδικόνιό του και μετά να προχωρήσει +1 (σπάνια) ή -1 (πιο συχνά) βάση για να ζευγαρώσει με μια επικαλυπτόμενη τριπλέτα, η οποία μπορεί επίσης να συνδεθεί με το αντικωδικόνιό του.
- ▶ Το ριβόσωμα καθυστερεί στο σημείο που συμβαίνει η μετατόπιση, ώστε να επιτραπεί η αναδιάταξη του ζευγαρώματος του πεπτιδυλο-tRNA. Αιτία της καθυστέρησης μπορεί να είναι ένα παρακείμενο κωδικόνιο που απαιτεί ένα σπάνιο αμινοακυλο-tRNA, ένα κωδικόνιο τερματισμού που αναγνωρίζεται αργά από τον παράγοντα αποδέσμευσης ή ένα δομικό εμπόδιο στο mRNA, για παράδειγμα ένας «ψευδοκόμπος» (pseudoknot: ειδική διαμόρφωση του RNA) που παρεμποδίζει το ριβόσωμα.

Η ολίσθηση μπορεί να προκαλέσει τη μετακίνηση προς οποιαδήποτε από τις δύο κατευθύνσεις: μια μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου κατά -1 προκαλείται όταν το tRNA μετακινείται προς τα πίσω ενώ μια μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου κατά +1 όταν το tRNA

Η μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου σε ένα κωδικόνιο τερματισμού προκαλεί αναγνωστική διέλευση. Η βάση στην 3' πλευρά του κωδικονίου τερματισμού επηρεάζει τις σχετικές συχνότητες του τερματισμού και της μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου και κατά συνέπεια επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του σήματος τερματισμού. Έτσι εξηγείται η σημασία του αναγνωστικού πλαισίου στον τερματισμό.



Η παράκαμψη εξαρτάται από την αλληλουχία του mRNA. Τα σημαντικά χαρακτηριστικά είναι τα δύο κωδικόνια GGA για την απο-

γείωση και την προσγείωση, η μεταξύ τους απόσταση, η δομή στελέχους-βρόχου (η οποία περιλαμβάνει το κωδικόνιο απογείωσης) και το κωδικόνιο τερματισμού δίπλα στο κωδικόνιο απογείωσης. Στη διαδικασία συμμετέχει επίσης η αρτιγενής πρωτεΐνη.

Η απογείωση προϋποθέτει ότι το πεπτιδυλο-tRNA θα διαζευχθεί από το κωδικόνιό του. Η διάζευξη συνοδεύεται από μια μετακίνηση του mRNA, που εμποδίζει το ξαναζευγάρωμα. Στη συνέχεια, το ριβόσωμα σαρώνει το mRNA, μέχρι το πεπτιδυλο-tRNA να ζευγαρώσει πάλι με το κωδικόνιο στη θέση προσγείωσης. Η πρωτεϊνοσύνθεση συνεχίζεται με το συνηθισμένο τρόπο στη θέση προσγείωσης, όπου ένα αμινοακυλο-tRNA εισέρχεται στη θέση A.

Όπως και στην περίπτωση της μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου, η αντίδραση της παράκαμψης εξαρτάται από μια στάση του ριβοσώματος. Η πιθανότητα αποσύνδεσης του πεπτιδυλο-tRNA από το κωδικόνιο στη θέση P αυξάνεται όσο το αμινοακυλο-tRNA καθυστερεί να εισέλθει στη θέση A. Η έλλειψη ενός αμινοξέος μπορεί να προκαλέσει την παράκαμψη σε βακτηριακά γονίδια, εξαιτίας της προσωρινής στάσης του ριβοσώματος που δεν έχει διαθέσιμο αμινοακυλο-tRNA για να εισέλθει στη θέση A. Στο γονίδιο 60 του φάγου T4, η δομή του mRNA μειώνει την αποτελεσματικότητα του τερματισμού, προκαλώντας έτσι την απαραίτητη καθυστέρηση που απαιτείται για την αντίδραση απογείωσης.

7.18 Περίληψη

Η αλληλουχία του mRNA που διαβάζεται σε τριπλέτες με κατεύθυνση 5' → 3' συσχετίζεται, σύμφωνα με το γενετικό κώδικα, με την αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης, όταν αυτή διαβάζεται από το N-τελικό προς το C-τελικό της άκρο. Από τις 64 τριπλέτες, οι 61 κωδικοποιούν αμινοξέα και οι 3 παρέχουν τα σήματα τερματισμού. Τα συνώνυμα κωδικόνια, τα οποία αντιστοιχούν στα ίδια αμινοξέα, είναι συγγενικά και συχνά διαφέρουν μόνο στην τρίτη βάση τους. Ο εκφυλισμός της τρίτης βάσης, καθώς και η τάση τα παρόμοια κωδικόνια να κωδικοποιούν αμινοξέα με παρόμοια δομή ελαχιστοποιούν τις συνέπειες των μεταλλάξεων. Ο γενετικός κώδικας είναι οικουμενικός και πρέπει να έχει καθιερωθεί πολύ νωρίς κατά την εξέλιξη. Οι αλλαγές του κώδικα στα πυρηνικά γονιδιώματα είναι σπάνιες, αλλά ορισμένες απ' αυτές έχουν πραγματοποιηθεί κατά την εξέλιξη των μιτοχονδρίων.

Σε κάθε αμινοξύ αντιστοιχεί μια οικογένεια κωδικονίων και είναι δυνατόν να αποκρίνονται πολλαπλά tRNA σε ένα συγκεκριμένο κωδικόνιο. Τα tRNA που αποκρίνονται σε κάθε οικογένεια κωδικονίων που αντιστοιχούν σε ένα αμινοξύ είναι χαρακτηριστικά για κάθε οργανισμό. Κατά την αναγνώριση κωδικονίου-αντικωδικονίου απαιτείται ταλάντευση στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου (τρίτη θέση κωδικονίου), με αποτέλεσμα να επιτρέπεται σε κάποια tRNA να αναγνωρίζουν πολλαπλά κωδικόνια. Όλα τα tRNA φέρουν τροποποιημένες βάσεις, οι οποίες εισάγονται από ένζυμα που αναγνωρίζουν θέσεις-στόχους στη δομή του tRNA. Το ζευγάρωμα κωδικονίου-αντικωδικονίου επηρεάζεται από τροποποιήσεις του ίδιου του αντικωδικονίου, καθώς και από το πλαίσιο των γειτονικών βάσεων, ειδικά στην 3' πλευρά του αντικωδικονίου. Η ταλάντευση στο ζευγάρωμα κωδικο-

νίου-αντικωδικονίου επιτρέπει στα μιτοχόνδρια των σπονδυλωτών να χρησιμοποιούν μόνο 22 tRNA για την αναγνώριση όλων των κωδικονίων, σε σύγκριση με το συνηθισμένο κατώτατο όριο των 31 tRNA. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται και από τις αλλαγές στο μιτοχονδριακό κώδικα.

Κάθε αμινοξύ αναγνωρίζεται από μία συγκεκριμένη αμινοακυλο-tRNA συνθετάση, η οποία αναγνωρίζει όλα τα tRNA που αντιστοιχούν στα κωδικόνια αυτού του αμινοξέος. Οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες έχουν λειτουργία διορθωτικού ελέγχου, που εξετάζει προσεκτικά τα αμινοακυλο-tRNA και υδρολύει όσα αμινοακυλο-tRNA δεν έχουν φορτωθεί με το σωστό αμινοξύ.

Οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες ποικίλλουν ευρύτατα, αλλά διαιρούνται σε δύο γενικές κατηγορίες ανάλογα με τη δομή της καταλυτικής επικράτειας. Όλες οι συνθετάσες προσδένονται στην πλευρική επιφάνεια του tRNA, δημιουργώντας επαφές κυρίως με τα άκρα του βραχίονα-δέκτη και του βραχίονα του αντικωδικονίου. Οι δύο τύποι συνθετασών προσδένονται στο tRNA από αντίθετες πλευρές. Σε ορισμένα tRNA το στέλεχος-δέκτης παίζει σημαντικό ρόλο για την αναγνώριση ενώ σε άλλα tRNA είναι σημαντικότερη η περιοχή του αντικωδικονίου.

Μεταλλάξεις μπορεί να επιτρέψουν σε ένα tRNA να αναγνώσει διαφορετικά κωδικόνια. Συνήθως τέτοιες μεταλλάξεις απαντώνται στο ίδιο το αντικωδικόνιο. Η αλλαγή της ειδικότητάς του μπορεί να επιτρέψει σε ένα tRNA να καταστείλει μια μετάλλαξη ενός γονιδίου που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη. Ένα μεταλλαγμένο tRNA που αναγνωρίζει ένα κωδικόνιο τερματισμού λειτουργεί ως καταστολέας μιας ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης, ενώ ένα μεταλλαγμένο tRNA που αλλάζει το αμινοξύ το οποίο αντιστοιχεί σε ένα κωδικόνιο δρα ως καταστολέας μιας παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης. Οι καταστολείς των κωδικονίων UAG και UGA είναι πιο αποτελεσματικοί από τους καταστολείς του κωδικονίου UAA και αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι το UAA είναι το πιο συνηθισμένο φυσικό κωδικόνιο τερματισμού. Η αποτελεσματικότητα των καταστολέων εξαρτάται από το πλαίσιο του κάθε κωδικονίου-στόχου.

Οι μετατοπίσεις του αναγνωστικού πλαισίου του τύπου +1 είναι δυνατόν να προκληθούν από ανώμαλα tRNA που αναγνωρίζουν «κωδικόνια» τεσσάρων βάσεων. Οι μετατοπίσεις του αναγνωστικού πλαισίου είτε +1 είτε -1 μπορεί να προκληθούν από «ολισθηρές» αλληλουχίες στο mRNA. Οι αλληλουχίες αυτές επιτρέπουν σε ένα πεπτιδυλο-tRNA να ολισθήσει από το κωδικόνιό του σε μια επικαλυπτόμενη αλληλουχία, η οποία μπορεί επίσης να ζευγαρώσει με το αντικωδικόνιό του. Προκειμένου να συμβεί αυτή η αλλαγή του πλαισίου είναι απαραίτητη η δευτεροταγής δομή του mRNA η οποία επιβραδύνει το ριβόσωμα. Οι μετατοπίσεις του αναγνωστικού πλαισίου που καθορίζονται από την αλληλουχία του mRNA μπορεί να είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική έκφραση ορισμένων γονιδίων. Κατά την παράκαμψη, ένα ριβόσωμα σταματάει τη μετάφραση και μετακινείται κατά μήκος του mRNA με το πεπτιδυλο-tRNA του στη θέση P. Όταν το πεπτιδυλο-tRNA ζευγαρώσει με ένα κατάλληλο κωδικόνιο, το ριβόσωμα συνεχίζει τη μετάφραση.