



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ  
ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-*t*RNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗΣ  
ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Deinococcus radiodurans*  
&  
ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗΣ *Tu* ΑΠΟ ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ  
*Thermus thermophilus* & *Escherichia coli***



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΝΤΙΓΟΝΗ ΔΙΟΚΜΕΤΖΙΔΟΥ**

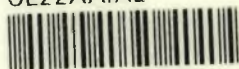
ΛΑΡΙΣΑ 2006



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

Αριθ. Εισ.: 5008/1  
Ημερ. Εισ.: 10-11-2006  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2006  
ΔΙΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087766

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Σταθόπουλου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	2
ABSTRACT.....	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	4
1.1. Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες .....	4
1.2. Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της μεθειονίνης .....	8
1.3. Ο παράγοντας επιμήκυνσης της πρωτεϊνοσύνθεσης EF-Tu .....	14
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	19
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
3.1. Αντιδραστήρια.....	20
3.2. Κύτταρα.....	21
3.2.1. DH5a .....	21
3.2.2. BL21. ....	21
3.2.3. JM103.....	21
3.2.4. <i>Deinococcus radiodurans</i> R1 .....	22
3.3. Μέθοδοι.....	23
3.3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA .....	23
3.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	23
3.3.3. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.....	24
3.3.4. Καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης .....	25
3.3.5. Σύνδεση τμημάτων DNA (Ligation).....	26
3.3.6. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων .....	31
3.3.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation).....	32
3.3.8. Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού.....	33
3.3.9. Διαδικασία υπερέκφρασης της MetRS.....	34
3.3.10. Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης MetRS .....	34
3.3.11. Διαδικασία υπερέκφρασης του παράγοντα EF-Tu.....	35
3.3.12. Απομόνωση του παράγοντα EF-Tu.....	36
3.3.13. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών .....	37
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
4.1. Κλωνοποίηση, υπερέκφραση και απομόνωση της MetRS .....	40
4.2. Υπερέκφραση και απομόνωση του παράγοντα EF-Tu .....	44
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	48
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	54

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αμινοάκυλο-συνθετάση της μεθειονίνης (MetRS) είναι μέλος της οικογένειας των 20 AARSs που είναι απαραίτητες για την πρωτεϊνοσύνθεση και τη διατήρηση της πιστότητάς της. Ανήκει στην τάξη I και αναγνωρίζει το εναρκτήριο tRNA καθώς και το tRNA<sup>Met</sup>. Η ανάλυση των κρυσταλλικών δομών από διάφορες MetRSs έχει δώσει ενδιαφέρουσες πληροφορίες για την αρχιτεκτονική του ενζύμου και την αμινοακυλίωση. Ένα από τα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά της MetRS είναι η δομική της ποικιλομορφία, καθώς πολυάριθμες βιοχημικές και γενετικές μελέτες έχουν αποκαλύψει την παρουσία επιπλέον περιοχών προσαρτημένων στον καταλυτικό πυρήνα του ενζύμου. Αυτές οι περιοχές είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση του ενζύμου με το tRNA και με άλλες πρωτεΐνες σχηματίζοντας σύμπλοκα. Η MetRS παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι εμπλέκεται και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες όπως στη διατήρηση της μεταφραστικής πιστότητας και στη βιογένεση του ριβοσώματος. Εξέχουσας σημασίας είναι και η πρόσδεση του σωστού aa-tRNA στο ριβόσωμα, μια διαδικασία που καταλύεται από τον παράγοντα επιμήκυνσης της πρωτεϊνοσύνθεσης EF-Tu. Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας κλωνοποιήθηκε το γονίδιο της MetRS (*metG*) από το βακτήριο *Deinococcus radiodurans* και ακολούθησε η υπερέκφραση και απομόνωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας κλωνοποιήθηκαν τα γονίδια *tufI* και *tufA* του παράγοντα EF-Tu από τα βακτήρια *Thermus thermophilus* και *Escherichia coli*, αντιστοίχως, και ακολούθησε έκφραση και καθαρισμός των πρωτεϊνών.

## ABSTRACT

Methionyl-tRNA synthetase (MetRS) is a member of the family of 20 enzymes essential for protein biosynthesis and maintaining its fidelity. It belongs to class I and recognizes an initiator tRNA as well as the tRNA<sup>Met</sup>. Crystal structures solved for a variety of MetRSs have given a number of interesting insights into enzyme architecture and methionylation catalysis. An interesting feature of MetRS is the structural diversity it shows. A comparison of sequences of MetRSs belonging to all kingdoms of life, as well as numerous biochemical and genetic studies have revealed the presence of various additional domains appended to the catalytic core of synthetase. They are responsible for interactions with tRNA and proteins forming complexes. Additional activities involve MetRS in the maintenance of translational fidelity and in coordination of ribosome biogenesis with protein synthesis. Of great importance is the binding of the correct aminoacyl-tRNA to the ribosome, a procedure catalysed by elongation factor Tu. During the first part of the present study the MetRS-encoding gene from the bacterium *Deinococcus radiodurans* was cloned and the enzyme was overexpressed and isolated. At the second part, the genes *tufI* and *tufA* encoding EF-Tu

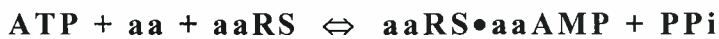
from *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli*, respectively, were cloned. Finally, the protein was over-expressed and isolated.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες

Τα νουκλεϊκά οξέα περιέχουν όλες τις πληροφορίες που είναι απαραίτητες για την λειτουργία και την επιβίωση όλων των ζωντανών οργανισμών. Η μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από τα νουκλεϊκά οξέα στις πρωτεΐνες γίνεται μέσω της μετάφρασης, μιας από τις πιο πολύπλοκες βιολογικές διαδικασίες. Ο μηχανισμός της σύνθεσης πρωτεϊνών περιλαμβάνει διάφορους πρωτεϊνικούς παράγοντες, ένζυμα, αγγελιοφόρο RNA, μεταφορικό RNA και απαιτεί υψηλή πιστότητα. Αυτή η υψηλή πιστότητα εξαρτάται κυρίως από δύο διαδικασίες, την αναγνώριση των κωδικονίων του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) από τα αντικωδικόνια του μεταφορικού RNA (tRNA) και την σύνθεση του αμινοάκυλο- tRNA (την φόρτωση του tRNA με το αντίστοιχο αμινοξύ). Η δεύτερη διαδικασία πραγματοποιείται από τις αμινοάκυλο- tRNA συνθετάσες (aaRSs), τα ένζυμα που συνδέουν τον κόσμο των νουκλεϊκών οξέων με τον κόσμο των πρωτεϊνών.

Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες καταλύουν την αντίδραση παραγωγής των αμινοάκυλο- tRNA, των ενεργοποιημένων ενδιάμεσων μορίων στη σύνθεση των πρωτεϊνών. Πρόκειται για εστέρες αμινοξέων, στους οποίους η καρβοξυλομάδα ενός αμινοξέος είναι συνδεδεμένη είτε στην 2'- είτε στην 3'-υδροξυλομάδα της ριβόζης του νουκλεοτιδίου του 3' άκρου ενός tRNA. Όλες οι συνθετάσες λειτουργούν με ένα μηχανισμό δύο σταδίων. Στο πρώτο βήμα της αντίδρασης, το αμινοξύ αντιδρά με ATP για να σχηματίσει ένα αμινοάκυλο-αδενυλικό (aa-AMP), απελευθερώνοντας μια πυροφωσφορική ομάδα. Το ενδιάμεσο μόριο αμινοάκυλο- AMP παραμένει δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Η απαιτούμενη ενέργεια για την αντίδραση παρέχεται από την διάσπαση του δεσμού υψηλής ενέργειας του ATP. Στο δεύτερο βήμα, το ενεργοποιημένο αμινοξύ μεταφέρεται στο tRNA και σχηματίζεται αμινοάκυλο- tRNA, απελευθερώνοντας AMP. Η σύνθεση του αμινοάκυλο- tRNA προάγεται με την υδρόλυση του πυροφωσφορικού.



Η ενεργοποίηση της καρβοξυλικής ομάδας των αμινοξέων είναι απαραίτητη για την δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ της αμινομάδας ενός αμινοξέος και της καρβοξυλομάδας ενός άλλου καθώς παρακάμπτει το θερμοδυναμικό εμπόδιο του δεσμού. Επίσης, η πρόσδεση του αμινοξέος στο tRNA είναι αναγκαία για την αναγνώριση των κωδικονίων του mRNA. Τα αμινοξέα δεν μπορούν να αναγνωρίσουν τα κωδικόνια του mRNA από μόνα τους και έτσι χρειάζονται ειδικά tRNA που τα μεταφέρουν στα ριβοσώματα και μπορούν να αναγνωρίσουν τα κωδικόνια του mRNA.

Κάθε aaRS αναγνωρίζει και αμινοακυλιώνει όλα τα ισοδεκτικά tRNAs που είναι ειδικά για ένα συγκεκριμένο αμινοξύ. Έτσι, κάθε κύτταρο, σύμφωνα με την Υπόθεση

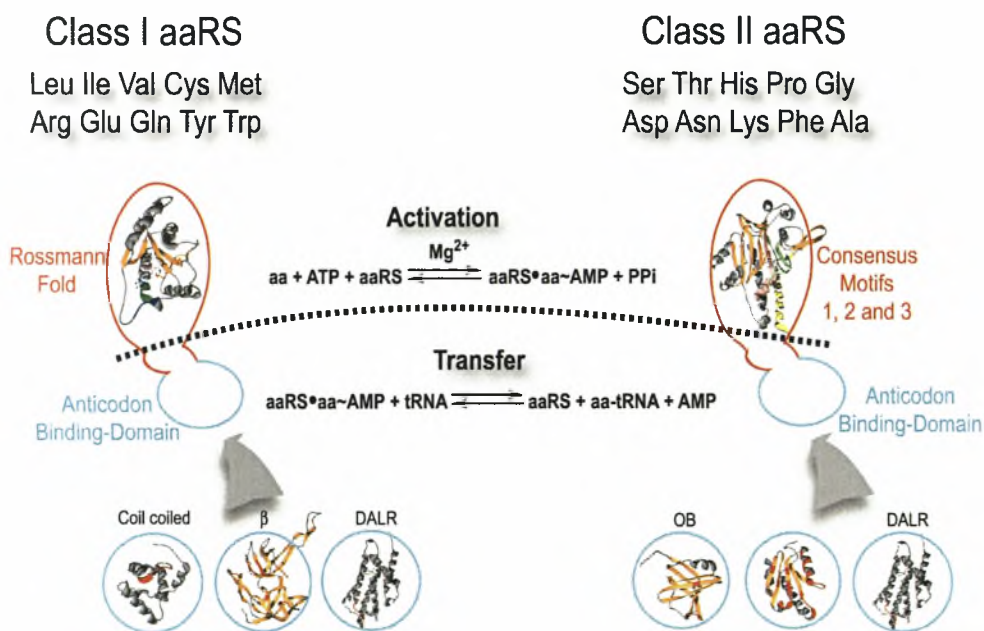
Προσαρμογής του Crick (Adaptor hypothesis, Crick 1958) αναμένεται να έχει 20 αμινοάκυλο- tRNA συνθετάσες, μια για το κάθε ένα από τα 20 αμινοξέα που χρησιμοποιούνται στην πρωτεϊνοσύνθεση. Παρόλα αυτά, έχουν βρεθεί μερικές εξαιρέσεις στον «κανόνα των 20 aaRSs» σε πολλά βακτήρια, αρχαία και ευκαρυωτικά οργανίδια. Μια από αυτές τις εξαιρέσεις είναι η έλλειψη λειτουργικής γλουταμινο- tRNA συνθετάσης (GlnRS), καθώς και ασπαραγινυλο- tRNA συνθετάσης (AsnRS), που οδήγησε στην αναγνώριση ενός δεύτερου τρόπου αμινοακυλίωσης, του έμμεσου μονοπατιού ή tRNA εξαρτώμενου. Με αυτό τον τρόπο δύο σταδίων, Gln-tRNA<sup>Gln</sup> δημιουργείται από την λανθασμένη αμινοακυλίωση του tRNA<sup>Gln</sup> με γλουταμινικό οξύ από μια αμινοάκυλο- tRNA συνθετάση του γλουταμινικού όξους με χαμηλή εξειδίκευση (ND-GluRS) παράγοντας Glu-tRNA<sup>Gln</sup>. Το λανθασμένα αμινοακυλιωμένο tRNA αναγνωρίζεται εξειδικευμένα από την γλουτάμυλο- tRNA<sup>Gln</sup> αμιδοτρανσφεράση και μετατρέπεται σε Gln-tRNA<sup>Gln</sup>.

Οι αμινοάκυλο- tRNA συνθετάσες είναι εξαιρετικά επιλεκτικά ένζυμα ως προς την αναγνώριση τόσο του αμινοξέος που πρόκειται να ενεργοποιηθεί όσο και του προσδοκώμενου δέκτη tRNA. Τα tRNA αναγνωρίζονται από την συνθετάση τους μέσω επαφών με ένα μικρό αριθμό από βάσεις. Οι πιο πιθανές θέσεις αναγνώρισης βρίσκονται στον βραχίονα δέκτη και στην θηλιά του αντικωδονίου, καθώς και η διακριτική βάση που βρίσκεται ανάμεσα στο στέλεχος δέκτη και στο άκρο CCA, η οποία είναι πάντα ίδια στα ισοδεκτικά tRNA. Επίσης, η ικανότητα να αμινοακυλιώνεται με ακρίβεια μια «μίνι έλικα» που αποτελείται μόνο από τον βραχίονα δέκτη και την θηλιά TψC, δείχνει ότι αυτή η περιοχή περιέχει την πληροφορία που χρειάζονται για ειδική πρόσδεση και κατάλυση 11 από τις 20 συνθετάσες. Επομένως, η αναγνώριση βασίζεται σε λίγα σημεία επαφής του tRNA, τα οποία βρίσκονται στα άκρα του, με μερικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Πιο δύσκολη είναι η διάκριση του σωστού αμινοξέος από τα υπόλοιπα. Η μελέτη της δέσμευσης αμινοξέων όπως η βαλίνη, η ισολευκίνη, η θρεονίνη, οδήγησε στο μοντέλο του «διπλού κόσκινου», σύμφωνα με το οποίο οι περισσότερες αμινοάκυλο- tRNA συνθετάσες περιέχουν ενεργά κέντρα υδρόλυσης επιπλέον των ενεργών κέντρων σύνθεσης. Τα μεγαλύτερα αμινοξέα από το σωστό αποβάλλονται από το κέντρο σύνθεσης, λόγω έλλειψης χώρου, ενώ τα μικρότερα ενεργοποιημένα ενδιάμεσα καταστρέφονται από το υδρολυτικό κέντρο. Παρόλα αυτά το μοντέλο του διπλού κόσκινου δεν μπορεί να ερμηνεύσει πλήρως τον διορθωτικό μηχανισμό που έχει βρεθεί σε ορισμένες άλλες συνθετάσες όπως η MetRS, PheRS και AlaRS, για τις οποίες έχουν προταθεί άλλα μονοπάτια.

Η διατήρηση του γενετικού κώδικα υποδεικνύει ότι οι aaRS εξελίχθηκαν πολύ νωρίς και βρίσκονται ανάμεσα στις πρώτες πρωτεΐνες που εμφανίστηκαν. Μελέτες προτείνουν ότι οι συνθετάσες ξεκίνησαν σαν ριβοένζυμα που εξελίχθηκαν σε σύμπλοκα πεπτιδίου-RNA, μετά σε ριβονουκλεοπρωτεΐνες και τελικά σε πρωτεΐνες. Παρά το γεγονός ότι οι αμινοάκυλο- tRNA συνθετάσες καταλύουν την ίδια βασική αντίδραση και έχουν ίδιο υπόστρωμα (ATP) και συμπάραγοντα (μαγνήσιο), αποτελούν μια ομάδα με αρκετή ποικιλομορφία όσο αφορά το μέγεθος, τις αλληλουχίες αμινοξέων και την τεταρτογενή δομή τους. Με βάση την ευθυγράμμιση αλληλουχιών και την αρχιτεκτονική της περιοχής που γίνεται η σύνθεση του αδενυλικού οι 20 αμινοάκυλο- tRNA συνθετάσες έχουν χωριστεί σε δύο τάξεις των 10 μελών, την τάξη I και την τάξη II (εικ.1).



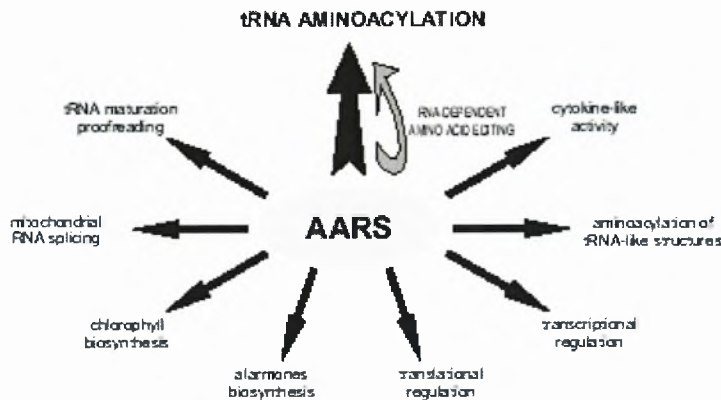
Οι συνθετάσες της τάξης I είναι γενικά μονομερείς και χαρακτηρίζονται από την πτυχή του Rossmann στο ενεργό τους κέντρο που αποτελείται από β-ελάσματα και α-έλικες. Επίσης, αμινοακυλιώνουν την 2'-υδροξυλομάδα της ριβόζης του νουκλεοτιδίου του 3' άκρου ενός tRNA και πλησιάζουν την κορυφή του βραχίονα δέκτη από την μικρή αύλακα. Από στατιστικές αναλύσεις εκατοντάδων αλληλουχιών ενζύμων της τάξης I από βακτήρια, αρχαία και ευκαρυώτες προέκυψε ότι οι aaRS μπορούν να χωριστούν σε τρεις υποομάδες, την Ia, την Ib και την Ic. Τα ένζυμα της κάθε υποομάδας έχουν την τάση να αναγνωρίζουν χημικά όμοια αμινοξέα. Για παράδειγμα, τα ένζυμα της υποομάδας Ia αναγνωρίζουν υδροφοβικά αμινοξέα όπως Ile, Leu, Val και αμινοξέα που περιέχουν σουλφιδριλικές ομάδες όπως η Met και η Cys. Η υποομάδα Ib περιλαμβάνει ένζυμα που αναγνωρίζουν αμινοξέα με φορτίο όπως το Glu και την παραγόμενη Gln και την Lys. Τα ένζυμα της υποομάδας Ic αναγνωρίζουν τα αρωματικά Thr και Tyr.



**Εικόνα 1** Οι τάξης I και II αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες διαφέρουν στην καταλυτική περιοχή και στην περιοχή πρόσδεσης του μορίου tRNA. Οι 10 συνθετάσες της τάξης I χαρακτηρίζονται από μία κοινή δομή Rossmann της καταλυτικής περιοχής, η οποία είναι τελείως διαφορετική από την δομή της καταλυτικής περιοχής της τάξης II που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη συγκεκριμένων μοτίβων (1, 2, 3). Αντίθετα, η πρόσδεση του tRNA πραγματοποιείται μέσω μιας δομής α-έλικας η οποία παρουσιάζεται συντηρημένη ανάμεσα στις συνθετάσες της τάξης I και II με διαφορετική ή ίδια οργάνωση στην κάθε τάξη.

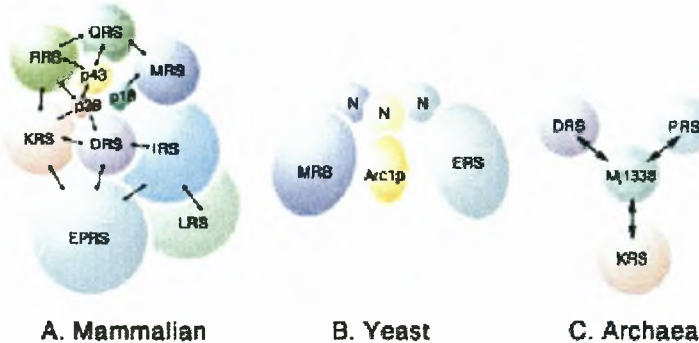
Οι συνθετάσες της τάξης II είναι γενικά διμερείς ή τετραμερείς και χαρακτηρίζονται από τρία μοτίβα γνωστά ως μοτίβα 1,2 και 3. Τα ένζυμα της τάξης II προσδέουν τα αμινοξέα στην 3'-υδροξυλομάδα της ριβόζης του νουκλεοτιδίου του 3' άκρου ενός tRNA και προσεγγίζουν το βραχίονα δέκτη από την μεγάλη αύλακα. Η τάξη II χωρίζεται και αυτή σε υποομάδες, την IIa, IIb και την IIc. Τα ένζυμα της υποομάδας Ia αναγνωρίζουν τα αλειφατικά αμινοξέα (Ala και Pro), τα πολικά (Ser, Thr, Pro και His) και την Gly. Η υποομάδα IIb περιλαμβάνει ένζυμα που αναγνωρίζουν αμινοξέα με φορτίο όπως το Asp και την παραγόμενη Asn και την Lys. Η υποομάδα IIc περιλαμβάνει την PheRS.

Επιπλέον της καταλυτικής τους ιδιότητας, η οποία είναι σημαντική για τη διατήρηση της ζωτικότητας του κυττάρου, τα ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες έχουν ένα πολύ ευρύ φάσμα λειτουργιών που ρυθμίζονται από ποικίλους μηχανισμούς. Αυτή η λειτουργική ποικιλότητα προκύπτει από φυσικές αλληλεπιδράσεις των aaRSs μεταξύ τους καθώς και με συμπράγοντες, σε τομείς που δεν σχετίζονται άμεσα με την πρωτεϊνοσύνθεση. Τέτοιοι τομείς είναι η επεξεργασία και η διακίνηση του RNA, η απόπτωση, η σύνθεση του rRNA, η αγγειογένεση και η φλεγμονή (εικ.2).



**Εικόνα 2** Οι κυτταρικές λειτουργίες των αμινοάκυλο- tRNA συνθετασών.

Ένας από τους τρόπους ελέγχου της δραστηριότητας των πρωτεϊνών είναι η δημιουργία συμπλόκων με άλλες πρωτεΐνες είτε αυτά είναι παροδικά είτε σταθερά. Οι aaRSs έχουν την ικανότητα να δημιουργούν σύμπλοκα μεταξύ τους και με μη ενζυμικούς παράγοντες. Τέτοια σύμπλοκα έχουν βρεθεί στα θηλαστικά, στα αρχαία, στην ζύμη και σε μερικά μετάζωα (εικ.3). Το πιο καλά μελετημένο σύμπλοκο είναι αυτό που σχηματίζουν τουλάχιστον εννιά aaRSs στα θηλαστικά. Η στοιχειομετρία και ο αριθμός των συστατικών δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος αλλά οι EPRS, IRS, LRS, MRS, QRS, , RRS, KRS και DRS βρίσκονται συνεχώς στο σύμπλοκο, καθώς και τρεις παράγοντες, οι p43, p38 και p18.



**Εικόνα 3** Ένα σχηματικό υποθετικό μοντέλο για την οργάνωση των συμπλόκων που σχηματίζουν οι aaRSs στα θηλαστικά, στην ζύμη και στα αρχαία. **Α)** Η διδιάστατη τοποθέτηση των συστατικών στο σύμπλοκο των θηλαστικών. Ο p38 δρα σαν πρωτεΐνη «σκαλωσιά» για την συγκρότηση του συμπλόκου. **Β)** Το σύμπλοκο των aaRSs στην ζύμη αποτελείται από δύο aaRSs (MRS και EPS) και τον Arc1p, τον ομόλογο παράγοντα του p43 στις ζύμες. Και οι δυο οι aaRSs αλληλεπιδρούν με την N-τελική περιοχή του Arc1p μέσω των N-τελικών συνημμένων περιοχών τους (Galani et al.,2001). **Γ)** Η μεταβολική πρωτεΐνη Mj1338 συνκαθαρίστηκε με την PRS από το *Methanococcus jannaschii* και σύμφωνα με μελέτες αλληλεπιδρά με την KRS. Επίσης, έχει επιβεβαιωθεί και η αλληλεπιδράσή της με την DRS (Lipman et al.,2000; Lipman et al 2003).

## 1.2 Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της μεθειονίνης

Από τις aaRSs της τάξης I, η αμινοάκυλο- tRNA συνθετάση της μεθειονίνης (MetRS) παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Αναγνωρίζει το εναρκτήριο tRNA καθώς και το tRNA που μεταφέρει την μεθειονίνη για την επιμήκυνση της πρωτεϊνικής αλυσίδας. Επιπλέον, αντίθετα με τις περισσότερες συνθετάσες, οι MetRSs που έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη παρουσιάζουν δομική ποικιλότητα, συνδεδεμένη με την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες για να σχηματίσουν λειτουργικά σύμπλοκα.

Ανάλογα με τον οργανισμό που έχει απομονωθεί, η MetRS συμπεριφέρεται είτε σαν μονομερές είτε σαν διμερές. Ο σχηματισμός διμερούς σχετίζεται πάντοτε με την παρουσία στην καρβοξυλική πλευρά μιας συμπληρωματικής περιοχής (appended domain). Η διμερής μορφή του ενζύμου δυσκόλευε αρκετά την μελέτη της δομής του, έτσι η MetRS από οργανισμούς όπως *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus*, *Thermus thermophilus*, *Pyrococcus abyssi* (17, 21-24), μετατράπηκε σε ένα μονομερή ελάχιστο πυρήνα των περίπου 550 καταλοίπων με την εκτομή της C-τελικής πλευράς. Από την μελέτη τέτοιων περικομμένων μονάδων προέκυψε η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου σε αυτούς τους οργανισμούς. Έχουν βρεθεί τέσσερις διακριτές περιοχές: η πτυχή του Rossmann (Rossmann fold), το συνδετικό πολυπεπίδιο (CP), η KMSKS περιοχή και μια δέσμη από α έλικες υπεύθυνη για την πρόσδεση του αντικωδικόνιου του tRNA<sup>Met</sup>.

Η πτυχή του Rossmann της MetRS του *T. thermophilus* σχηματίζεται από δύο

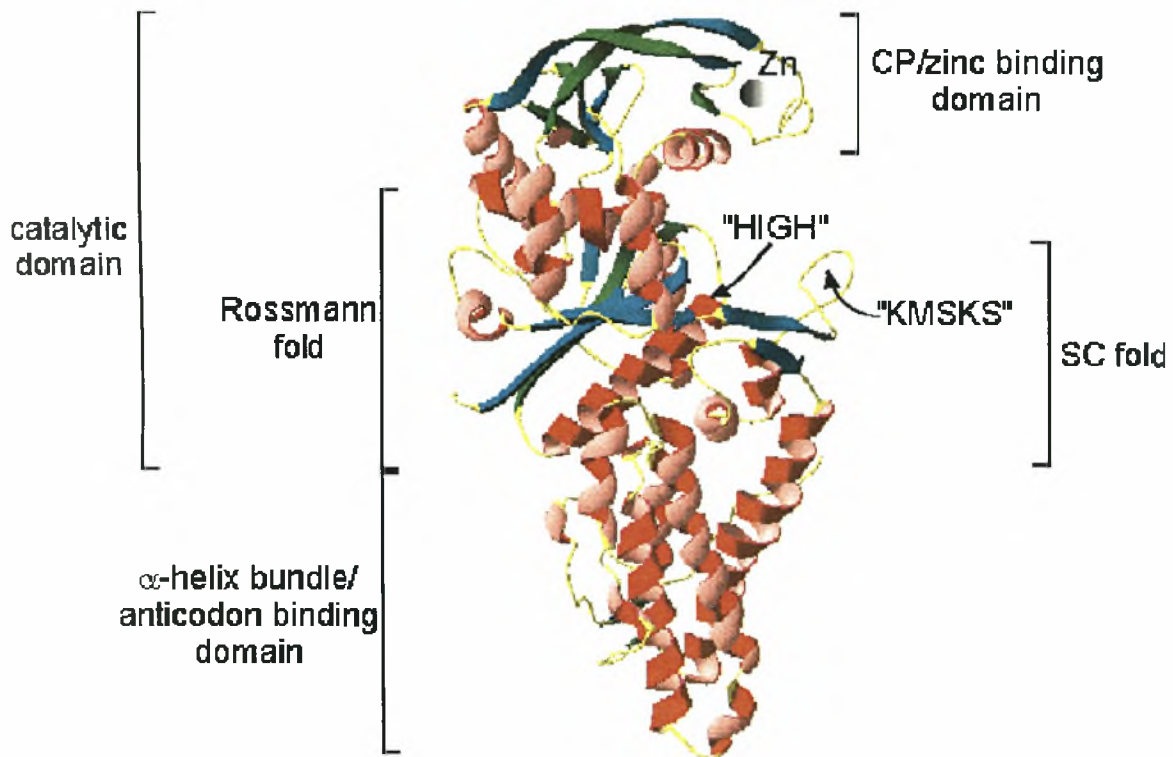


**Εικόνα 4** Η 3D δομή της μονομερούς MetRS του *E. coli* (Evans,1993). Η πτυχή του Rossmann είναι χρωματισμένη κόκκινη, το CP πράσινο, η περιοχή KMSKS κίτρινη και η C-τελική περιοχή μπλε. Οι δυο επιπλέον έλικες της πτυχής του Rossmann είναι ροζ.

πολυπεπτιδικά κομμάτια που χωρίζονται από μια παρεμβολή 117 αμινοξέων, το συνδετικό πολυπεπίδιο. Στην *E. coli* η κλασική πτυχή του Rossmann περιέχει δύο πρόσθετες έλικες, την α1 και την α5 (εικ.4). Το πεπτίδιο KMSKT βρίσκεται σε μια β-α-α-β-α δομή, την πτυχή SC (stem contact fold), ανάμεσα στην πτυχή του Rossmann και στην C-τελική δέσμη α-ελικών (εικ.5), ενώ στην *E. coli* η περιοχή KMSKS αποτελείται από δύο κοντά β-ελάσματα συνδεδεμένα με δύο α-έλικες, την α6 και την α7.

Η πτυχή SC είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση της MetRS με το αντικωδικόνιο του tRNA<sup>Met</sup>. Συντηρείται πολύ καλά και σε άλλες συνθετάσες των τάξεων I και II: IleRS, ArgRS, GlnRS και ArgRS. Το πεπτίδιο KMSKS σχηματίζει μια θηλιά η διαμόρφωση της οποίας διατηρείται στην ελεύθερη μορφή των παραπάνω ενζύμων, αλλά αλλάζει δραματικά με την πρόσδεση του υποστρώματος.

Η MetRS του *T. thermophilus* έχει την αλληλουχία HLGH στις θέσεις 19-22, η οποία είναι ακριβώς διατηρημένη και στις MetRSs του *E. coli* και της *S. cerevisiae*. Γύρω από αυτή την αλληλουχία έχουν βρεθεί υψηλές ομολογίες, έτσι αυτές οι περιοχές αποτελούν τις «αλληλουχίες υπογραφής» που έχουν βρεθεί σε πολλές aaRSs και είναι απαραίτητες για την πρόσδεση του ATP. Στην TyrRS του *B. stearothermophilus* έχει δειχθεί ότι η γλυκίνη και τα δύο κατάλοιπα ιστιδίνης της αλληλουχίας HIGH είναι απαραίτητα για τη σταθεροποίηση της διαμόρφωσης της θέσης πρόσδεσης του ATP και το κατάλοιπο ισολευκίνης στη δεύτερη θέση πιθανόν να εγκαθιστά αυτό το πεπτιδικό κομμάτι στον πυρήνα της πρωτεΐνης. Σε όλες τις MetRSs, η ισολευκίνη στην δεύτερη θέση της αλληλουχίας HIGH έχει αντικατασταθεί από λευκίνη, υποδεικνύοντας ότι η υδροφοβική αλληλεπίδραση αυτού του κομματιού με τον πυρήνα είναι διαφορετική από τις άλλες συνθετάσες. Εκτός από τις παραπάνω, έχουν παρατηρηθεί και οι αλληλουχίες YVWFDA και IGKDI στις θέσεις 225-230 και 257-261 αντίστοιχα στην MetRS του *T. thermophilus* που είναι υψηλά συντηρημένες ανάμεσα στις MetRSs. Έχει προταθεί ότι αυτές οι αλληλουχίες είναι απαραίτητες για μερικές βιολογικές λειτουργίες της MetRS (21).



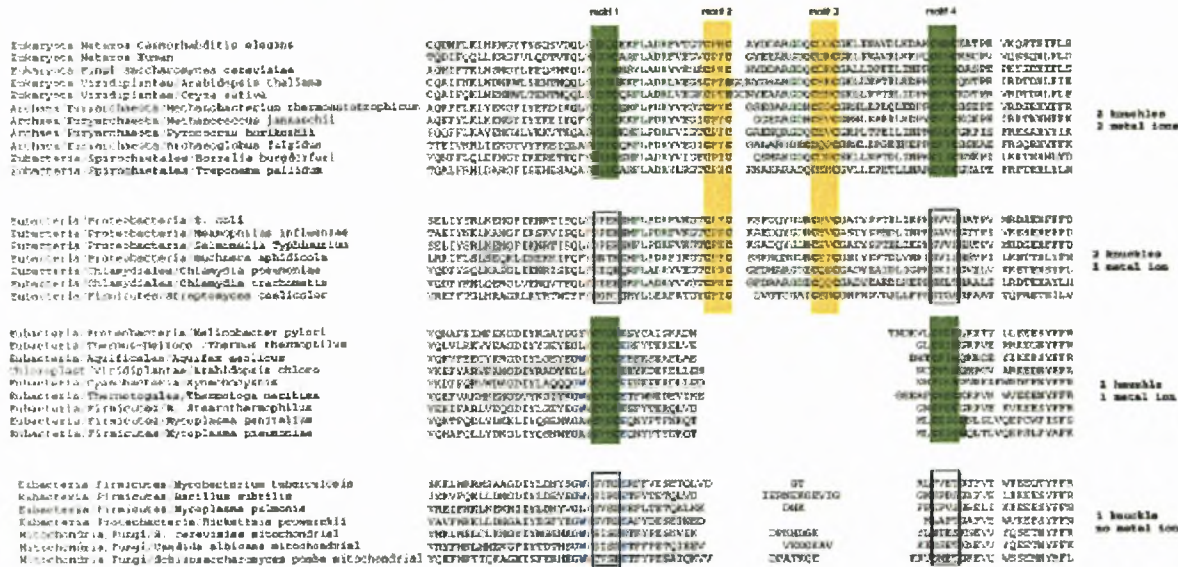
**Εικόνα 5** Τα δομικά χαρακτηριστικά της MetRS όπως παρατηρούνται στην κρυσταλλική δομή του *T. thermophilus*.

Το συνδετικό πολυπεπτιδίο του *T. thermophilus* αποτελείται από οκτώ αντιπαράλληλα β-ελάσματα. Ο πυρήνας της CP περιοχής είναι ένα φύλλο από τέσσερα β-ελάσματα, συντηρημένος σε όλες τις συνθετάσες των τάξεων I και II. Ένα άλλο φύλλο από τέσσερα β-ελάσματα έχει εισχωρήσει ανάμεσα στα β-ελάσματα του πυρήνα. Αυτή η εισχώρηση συντονίζει ένα ιόν  $Zn^{2+}$ . Η δομή “δάκτυλο ψευδαργύρου” είναι ουσιώδης για την δραστηριότητα του ενζύμου. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της μεθειονίνης,

καθώς και στην σωστή τοποθέτηση του 3' άκρου του tRNA. Μελέτες που έχουν γίνει σε MetRSs από διάφορες βακτηριακές πηγές προτείνουν ότι το ιόν ψευδαργύρου συνεισφέρει στον σωστό προσανατολισμό του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

Η περιοχή πρόσδεσης του ψευδαργύρου της MetRS από *E. coli* μοιάζει να είναι αποτέλεσμα ενός διπλασιασμού της δομής που βρέθηκε στο *T. thermophilus*. Σχηματίζεται από ένα φύλλο από αντιπαράλληλα β ελάσματα περικυκλωμένα από την περιοχή πρόσδεσης του ψευδαργύρου από την μια πλευρά και από δύο α-έλικες από την άλλη(17). Πράγματι, όπως φαίνεται στη εικόνα 6, η άρθρωση (knuckle) της MetRS του *E. coli* που συγκρατεί το ιόν  $Zn^{2+}$  έχει εισέλθει στην άρθρωση της MetRS του *T. thermophilus*. Ο  $Zn^{2+}$  συντονίζεται από τις πλευρικές αλυσίδες τεσσάρων καταλοίπων κυστεΐνης (145,148,158,161). Αυτή η οργάνωση είναι συμβατή με 1:1 στοιχειομετρία μεταξύ του  $Zn^{2+}$  και του μονομερούς της MetRS από *E. coli*. Επιπλέον, μια σύγκριση αλληλουχιών από γνωστές MetRSs έκανε δυνατή την διάκριση τεσσάρων οικογενειών με βάση τον αριθμό των αρθρώσεων και των δακτύλων ψευδαργύρου στην περιοχή CP (εικ.6)(17). Η περιοχή CP από ευκαρυώτες, αρχαία και σπιροχαΐτες αναμένεται να προσδένει δύο ιόντα  $Zn^{2+}$ . Το συνδετικό πολυπεπίδιο της MetRS από το αρχαίο *Pyrococcus abyssi* έχει την ίδια τοπολογία με την MetRS από το *E. coli* αλλά προσδένει δύο ιόντα  $Zn^{2+}$ (23). Δύο άλλες οικογένειες, με δυο αρθρώσεις και ένα ιόν  $Zn^{2+}$  ή μία άρθρωση και ένα ιόν  $Zn^{2+}$  αναπαρίστανται από την MetRS από *E. coli* και *T. Thermophilus*, αντίστοιχα. Η MetRS από τον *B. stearothermophilus* ανήκει στην οικογένεια του *T. Thermophilus* (39). Η τέταρτη οικογένεια περιέχει ένζυμα δομικά κοντά στη MetRS του *T. thermophilus* αλλά χωρίς να προσδένουν ιόν  $Zn^{2+}$ , όπως η MetRS από το *Mycobacterium tuberculosis* (24). Μέσα στην άρθρωση του  $Zn^{2+}$ , τρία κατάλοιπα που ανήκουν στην διατηρημένη αλληλουχία FLXDR είναι σημαντικά για την ενζυμική δραστηριότητα της MetRS του *E. coli*: το D138 και το R139, που οι μεταλλάξεις τους σε αλανίνη μείωσε δραστικά το βαθμό της ενεργοποίησης της μεθειονίνης, και το F135 το οποίο δρα στο επίπεδο της αμινοακυλίωσης του tRNA. Η τοποθεσία αυτών των καταλοίπων μακριά από το καταλυτικό κέντρο, υποδεικνύει την παρουσία κίνησης της περιοχής CP κατά την κατάλυση.

Η πτυχή SC της MetRS από *T. thermophilus* ακολουθείται από μια κυλινδρική περιοχή πλούσια σε α-έλικες, μοναδική στις συνθετάσες της τάξης I. Έχει δείχθει ότι τα κατάλοιπα αμινοξέων που εμπλέκονται στην αναγνώριση του αντικωδονίου του tRNA<sup>Met</sup> είναι ομαδοποιημένα στην επιφάνεια αυτής της δέσμης α-ελικών. Η επιφάνεια αναγνώρισης περιέχει τα αμετάβλητα αμινοξέα Asn355, Arg359 και Trp424. Αντίστοιχα στην MetRS από *E. coli* μελέτες μεταλαξίγνεσης έχουν δείξει ότι τα κατάλοιπα Asn391, Arg395, Trp461 και Asn452 εμπλέκονται θετικά στην αναγνώριση του αντικωδικονίου CAU καθώς και τα δύο όξινα κατάλοιπα Asp449 και Asp456, τα οποία εμπλέκονται στην απόρριψη των tRNAs με αντικωδικόνιο διάφορο του CAU. Η C-περιοχή του *E. coli* αποτελείται από μια δέσμη ελικών με έλικες από την α9 μέχρι την α14. Η C-τελική έλικα α15 διπλώνει πίσω προς την περιοχή KMSKS και πιθανόν να παίζει ρόλο στην πρόσδεση του βραχίονα δέκτη του tRNA μέσα στις περιοχές KMSKS και CP. Όλα τα παραπάνω κατάλοιπα βρίσκονται πάνω σε δύο παράλληλες α-έλικες, την α9 και την α11, μέσα στην δέσμη ελικών. Οι δύο έλικες αλληλεπιδρούν μέσω ενός δικτύου ηλεκτροστατικών δεσμών. Η έλικα α9, στην οποία βρίσκεται το κατάλοιπο Arg395, προεκτείνει μια έλικα ενώνοντας την C-τελική περιοχή με



Εικόνα 6 Πάνω: υπέρθεση των αρθρώσεων της MetRS του *T. thermophilus* (κίτρινο) και του *E. coli* (άσπρο). Τα ιόντα Zn<sup>2+</sup> φαίνονται με μπλε. Κάτω: ευθυγράμμιση αλληλουχιών της MetRS από διάφορους οργανισμούς στην περιοχή πρόσδεσης του Zn<sup>2+</sup>. Οι εγγύς προσδέτες του Zn<sup>2+</sup> φαίνονται σε πράσινα πλαίσια και οι μακρυνοί σε κίτρινα. Τα άδεια πλαίσια αναπαριστούν αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε εγγύς περιοχές χωρίς Zn<sup>2+</sup>. Το κατάλοιπο Tyr που είναι παρόν στις περισσότερες αλληλουχίες MetRS φαίνεται με κόκκινο. Τα κατάλοιπα που είναι συντηρημένα σε οικογένειες που έχουν δύο αρθρώσεις είναι πράσινα, ενώ με μία άρθρωση είναι μπλε.

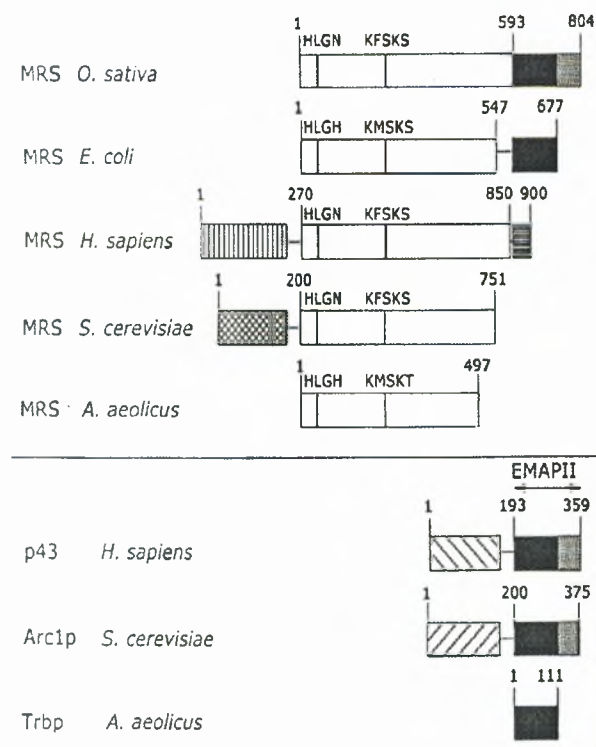
την περιοχή KMSKS. Αυτή η οργάνωση πιθανόν να αντανακλά μια σχέση μεταξύ της περιοχής πρόσδεσης του αντικωδικονίου και του ενεργού κέντρου της MetRS, όπως προτάθηκε από τους Gale et al. (1996). Η MetRS από το *P. abyssii* έχει τρεις επιπλέον έλικες, τις α16, α17, α18, που μαζί με την α15 σχηματίζουν δύο ομάδες αντιπαράλληλων ελίκων.

Έχει παρατηρηθεί ότι δύο πεπτιδικές περιοχές γύρω από τα κατάλοιπα 253 και 300 της MetRS του *E. coli* έχουν διατηρηθεί σε όλες τις γνωστές ακολουθίες των MetRSs. Αυτά τα κατάλοιπα πιθανόν να εμπλέκονται στην πρόσδεση της μεθειονίνης. Βρίσκονται στις έλικες αC και αD και αντικρίζουν η μία την άλλη σχηματίζοντας μια υδροφοβική σχισμή, όμοια με αυτή της τυροσίνης, όταν προσδέεται.

Δύο κύριες περιοχές παρούσες στη πλειοψηφία των δομών των συνθετασών, το καταλυτικό κέντρο και η περιοχή πρόσδεσης του αντικωδικονίου, αντανακλά την δομή σχήματος L του μορίου tRNA. Έχει δειχθεί στην περίπτωση της MetRS του *E. coli* ότι

μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα κατάλοιπα στην περιοχή πρόσδεσης του αντικωδικονίου και σε μια έλικα γειτονική στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου καταστρέφουν την λειτουργική επικοινωνία μεταξύ των περιοχών στο σύμπλοκο της συνθετάσης με το tRNA<sup>Met</sup>. Αυτά τα κατάλοιπα δεν έχουν καμία επαφή με το tRNA<sup>Met</sup> αλλά συνεισφέρουν στην σταθεροποίηση του συμπλόκου MetRS- tRNA<sup>Met</sup> και στην καταλυτική επάρκεια της αμινοακυλίωσης.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η MetRS ανήκει στις συνθετάσες που εμφανίζουν δομική ποικιλότητα ανάλογα με την πηγή από την οποία απομονώθηκε το ένζυμο. Σύμφωνα με αυτό MetRSs από διαφορετικές πηγές έχουν χωριστεί σε πέντε δομικές ομάδες (εικ.7). Ένας ελάχιστος πυρήνας ενζύμου έχει βρεθεί σε οργανισμούς από όλα τα βασίλεια και στα ευκαρυωτικά οργανίδια. Μια μεγάλη ομάδα βακτηριακών και μερικές MetRS αρχαίων έχουν μια πρόσθετη C-τελική περιοχή. Αυτή η περιοχή σχετίζεται με την δημιουργία της διμερούς μορφής του ενζύμου. Μερικοί οργανισμοί εκφράζουν ανάλογα αυτής της περιοχής διμερισμού. Τέτοια ανάλογα είναι, για παράδειγμα, η Trbp111 (tRNA-binding protein) του *Aquifex aeolicus*, η πρωτεΐνη CsaA από τον *B.subtilis*, η Arc1p (aminoacyl-tRNA cofactor protein) της ζύμης και το πολυπεπτίδιο EMAP II (kytokine endothelial monocyte activating polypeptide II) των θηλαστικών. Στο αρχαίο *P.abysssi* η C-τελική περιοχή της διμερούς μορφής παρέχει στο ένζυμο επιπλέον συγγένεια για την πρόσδεση του tRNA, μέσω γενικών χαρακτηριστικών για την πρόσδεση του tRNA (25). Οπότε φαίνεται ότι αυτή η περιοχή είναι στην πραγματικότητα ένα δομικό και λειτουργικό ομόλογο της πρωτεΐνης Trbp111.



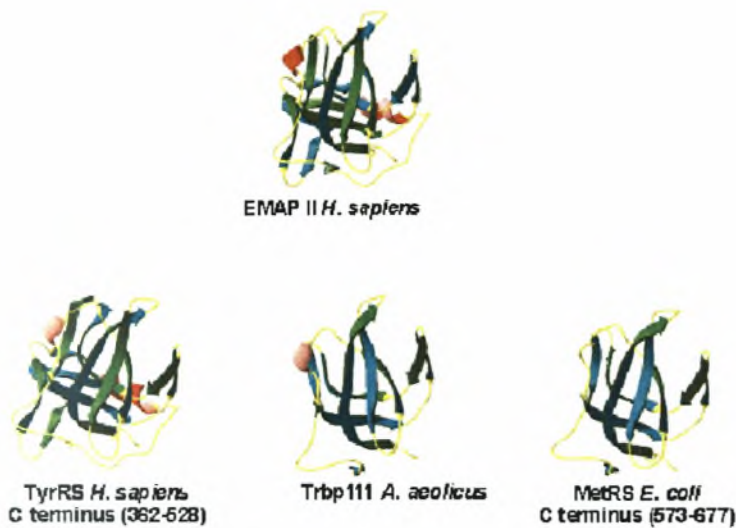
**Εικόνα 7** Οι πέντε ομάδες της MetRS και ευθυγράμμιση των περιοχών πρόσδεσης RNA που μοιάζουν με τον EMAP II.

tRNA μπορεί να καταληφθεί κάθε φορά. Αυτή η άποψη εξηγεί και την αντισυνεργιστική συμπεριφορά που παρατηρείται στην διμερή MetRS του *E. coli* όταν προσδένονται δύο μόρια tRNA. Το ένζυμο προσδένει το πρώτο μόριο με υψηλή συγγένεια και το δεύτερο

Η Trbp111 και το πεπτίδιο EMAP II έχουν όμοιες αλληλουχίες και τεταρτογενή δομή, που ονομάζεται πτυχή OB (oliginucleotide-oligosaccharide-binding folg). Αυτή η δομή β-βαρελίου έχει βρεθεί και στο N-τελικό άκρο της AspRS, της LysRS και της AsnRS, όπου είναι υπεύθυνη για την ειδική πρόσδεση του αντικωδικονίου του tRNA. Μεταλλαγμένες MetRS από *E. coli* που έχουν την περιοχή OB αλλά η ικανότητα τους να διμερίζονται έχει επηρεαστεί, υποδεικνύουν ότι η ενίσχυση της συγγένειας της πρόσδεσης του tRNA από την C-τελική περιοχή εκφράζεται μόνο όταν το ένζυμο είναι στην διμερή του μορφή. Η ανάγκη για διμερισμό έρχεται σε συμφωνία με την πρόταση ότι η σχισμή πρόσδεσης του tRNA στην Trbp111 σχηματίζεται από τις θηλιές L1-L2 και την ενδιάμεση φάση του διμερούς. Σε τέτοιο μοντέλο, μόνο ένα μέρος για

μόριο με πολύ χαμηλότερη. Μόνο το πρώτο προσδεμένο tRNA επωφελείται από την πρόσβαση στην C-τελική περιοχή.

Μια όμοια C-τελική περιοχή έχει αναγνωριστεί στην MetRS από το σκουλήκι *C.elegans*, τα φυτά *O.sativa* και *A.thaliana* και από μερικά ευβακτήρια (20). Μια λειτουργική μελέτη αυτής της περιοχής στην μονομερή MetRS από το *O.sativa* οδήγησε στο συμπέρασμα ότι παρέχει στο ένζυμο καλύτερη καταλυτική επάρκεια στην πρόσδεση του βραχίονα δέκτη του tRNA<sup>Met</sup> και διευκολύνει την αμινοακυλίωση (20). Αυτού του είδους το C-τελικό πεπτίδιο είναι όμοιο με την μονομερή κυτοκίνη EMAP II. Η EMAP II παράγεται ύστερα από πρωτεολυτική διάσπαση της p43, ενός από τα συστατικά του συμπλόκου των συνθετασών, όπου πιθανόν να διευκολύνει την πρόσδεση του tRNA. Μια κυτοκίνη που μοιάζει με την EMAP II παράγεται, επίσης, ύστερα από πρωτεολυτική διάσπαση της ανθρώπινης TyrRS(27)(εικ.8).



**Εικόνα 8** Η τεταρτοταγής δομή της ανθρώπινης EMAP II και μοντέλα φτιαγμένα με βάση αυτό: η C-τελική περιοχή της ανθρώπινης TyrRS, η Trbp111 του *A.aeolicus* και η C-τελική περιοχή από την MetRS του *E.coli*. Τα μοντέλα έγιναν με SWISS-MODEL.

Δύο τελευταίες δομικές μορφές της MetRS έχουν βρεθεί μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το ένζυμο έχει βρεθεί στο κυτταρόπλασμα ανώτερων ευκαρυωτών σε μορφή συμπλόκου πολυσυνθετασών, κατέχοντας μια μεγάλη N-τελική προέκταση και ένα μικρότερο C-τελικό πρόσθετο. Η MetRS που απομονώθηκε από κυτταρόπλασμα ζύμης κατέχει μόνο την N-τελική προέκταση. Αυτή η επιπλέον περιοχή επιτρέπει την συσχέτιση με το πεπτίδιο Arc1p. Ένα σταθερό σύμπλοκο σχηματίζεται μεταξύ δύο αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες, την MetRS και την GluRS, και τον Arc1p. Τα δύο ένζυμα αλληλεπιδρούν με άμεσα με τον Arc1p. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης γίνονται από την πρόσθετη N-τελική περιοχή των ενζύμων από την μια πλευρά και από την N-τελική περιοχή του Arc1p, που περιέχει θέσεις πρόσδεσης για τα δυο ένζυμα(28). Οι καταλυτικές περιοχές των ενζύμων είναι ελεύθερες να αλληλεπιδρούν και να αμινοακυλιώνουν τα tRNAs. Η επιλογή και η πρόσδεση των tRNAs διευκολύνεται από την περιοχή TRBD του Arc1p, η οποία αναγνωρίζει την συντηρημένη δομή των tRNAs και τα οδηγεί στο πυρήνα των ενζύμων (28,31). Επίσης, η δημιουργία του συμπλόκου παίζει ρόλο στην διαμερισματοποίηση των ενζύμων μέσα στο κύτταρο, καθώς δεν μπορούν να εισέλθουν στον πυρήνα με την μορφή συμπλόκου (28).

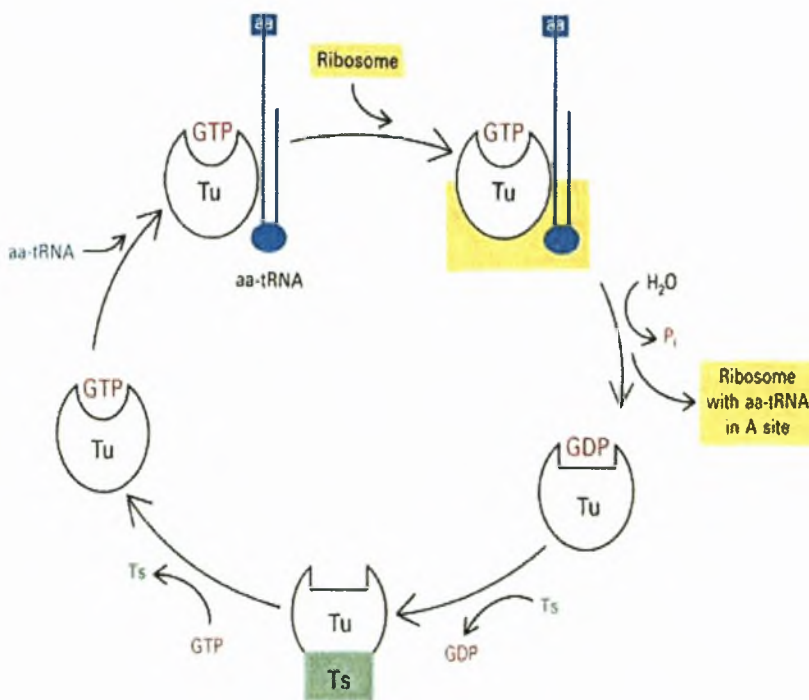


Η C-τελική περιοχή της ανθρώπινης MetRS περιέχει ένα μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα (HTH), όμοιο με την επαναλαμβανόμενη περιοχή του συνδέσμου της διλειτουγικής GluProRS, και μια ειδική C-τελική συστάδα πλούσια σε λυσίνη (LRS). Έχει δειχθεί ότι αυτές οι δυο περιοχές είναι σημαντικές για την πρόσδεση του tRNA(26). Η C-περιοχή έχει διπλή λειτουργία: εξασφαλίζει μία επαρκή πρόσδεση του tRNA<sup>Met</sup> σε συνθήκες που επικρατεί απακυλιωμένο tRNA και μπορεί να ωθήσει την άμεση μεταφορά του αμινοακυλιωμένου tRNA από την συνθετάση στον παράγοντα επιμήκυνσης EF-1α.

### 1.3 Ο παράγοντας επιμήκυνσης της πρωτεϊνοσύνθεσης EF-Tu

Η πρωτεϊνοσύνθεση αρχίζει στα βακτήρια με την μεταφορά της φορμυλομεθειονίνης στο ριβόσωμα από το εναρκτήριο tRNA. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η αμινοακυλο-tRNA συνθετάση της μεθειονίνης είναι το υπεύθυνο ένζυμο για την ενεργοποίηση του αμινοξέος και την φόρτωση του στο σωστό αμινοξύ, εξασφαλίζοντας έτσι υψηλή πιστότητα στην έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Στον κύκλο της επιμήκυνσης ένας πρωτεϊνικός παράγοντας αναλαμβάνει το καθήκον της πιστότητας.

Μετά το σχηματισμό του ριβοσώματος στο κωδικόνιο έναρξης, κάθε κύκλος σύνθεσης ξεκινά με την είσοδο ενός αμινοακυλο- tRNA στη θέση A του ριβοσώματος, ενώ η θέση P είναι κατειλημμένη από το πεπτιδυλο- tRNA. Το μόριο που θα εισέλθει εξαρτάται από το κωδικόνιο του mRNA το οποίο είναι τοποθετημένο στη θέση A. Το συμπληρωματικό αμινοακυλο- tRNA μεταφέρεται στη θέση A από τον πρωτεϊνικό παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu. Ο EF-Tu περιέχει ένα προσδεδεμένο νουκλεοτίδιο γουανίνης. Ο παράγοντας είναι μια μονομερής πρωτεΐνη G, της οποίας η ενεργότητα ελέγχεται από τη μορφή του νουκλεοτιδίου της γουανίνης. Σε σύμπλοκο με το GTP (EF-Tu•GTP), ο παράγοντας είναι



Εικόνα 9 Κύκλος αντιδράσεων του παράγοντα επιμήκυνσης

ενεργός και δεσμεύει ένα αμινοάκυλο- tRNA σχηματίζοντας το τριμερές σύμπλοκο αμινοάκυλο- tRNA•EF-Tu•GTP. Το τριμερές σύμπλοκο προσδένεται στη θέση A, το GTP υδρολύεται και η μορφή GDP του EF-Tu αποδεσμεύεται από το ριβόσωμα. Ένας άλλος παράγοντας, ο EF-Ts, μεσολαβεί για την αναγέννηση του EF-Tu•GDP στην ενεργή μορφή EF-Tu•GTP (εικ.9). Ο EF-Ts ενώνεται με τον EF-Tu και εκτοπίζει το GDP. Το GTP προσδένεται στον EF-Tu με ταυτόχρονη απελευθέρωση του EF-Ts. Έτσι, ο EF-Tu•GTP είναι εκ νέου έτοιμος να παραλάβει ένα άλλο αμινοάκυλο-tRNA και να το παραδώσει στη θέση A του ριβοσώματος.

Η αλληλεπίδραση του αμινοάκυλο-tRNA με τον EF-Tu παίζει σημαντικό ρόλο στον ποιοτικό έλεγχο. Τα αμινοάκυλο-tRNA μεταφέρονται στη θέση A χωρίς να είναι σίγουρα αν τα αντικωδικόνια τους ταιριάζουν με το κωδικόνιο του mRNA που καταλαμβάνει τη θέση A. Ένα αμινοάκυλο-tRNA το οποίο ζευγαρώνει με δύο από τις τρεις βάσεις ενός κωδικονίου μπορεί ίσως να δεσμευθεί με αυτό μεταβατικά, αλλά συνήθως θα αφήσει τη θέση A πριν προλάβει και σχηματιστεί πεπτιδικός δεσμός. Το ενεργό κέντρο GTPάσης του EF-Tu παρέχει τον χρόνο που απαιτείται για να γίνει ο έλεγχος. Ένας πεπτιδικός δεσμός δεν μπορεί να σχηματιστεί μέχρις ότου ο EF-Tu απομακρυνθεί από το αμινοάκυλο-tRNA. Η υδρόλυση του EF-Tu•GTP είναι σχετικά αργή, καθώς διαρκεί περισσότερο από το χρόνο που απαιτείται για να αποσυνδεθεί από τη θέση A ένα λάθος αμινοάκυλο-tRNA. Η αποδέσμευση του EF-Tu•GDP μετά την υδρόλυση είναι εξίσου αργή. Τα λανθασμένα αμινοάκυλο-tRNA απομακρύνονται από το ριβόσωμα κατά την διάρκεια αυτών των δύο διαστημάτων, ενώ το σωστό αμινοάκυλο-tRNA παραμένει προσδεμένο με το κωδικόνιο που βρίσκεται στη θέση A. Η στερεοδιάταξη του EF-Tu αλλάζει όταν υδρολύει GTP, με αποτέλεσμα να αλλάζει και η συνάφεια της αλληλεπίδρασης κωδικονίου-αντικωδικονίου. Το σωστό αμινοάκυλο-tRNA αλληλεπιδρά ισχυρά με το mRNA και στις δύο καταστάσεις του EF-Tu, ενώ αυτό δεν συμβαίνει με το λανθασμένο αμινοάκυλο-tRNA. Έτσι, η αλληλεπίδραση κωδικονίου-αντικωδικονίου ελέγχεται δύο φορές και με διαφορετικό τρόπο εξασφαλίζοντας υψηλότερη ακρίβεια.

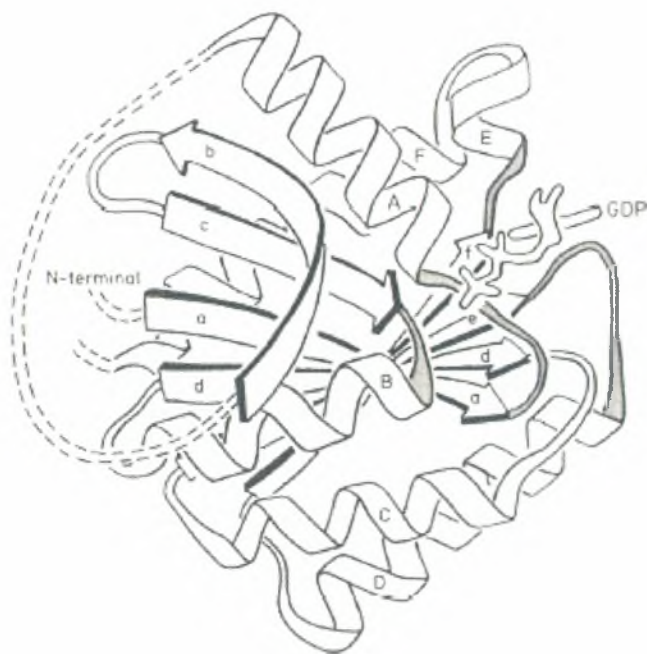
Μελέτες προτείνουν, ότι η αλλαγή στην διαμόρφωση της θηλιάς του αντικωδικονίου και πιθανόν του mRNA, που προκαλούνται από την αλληλεπίδραση κωδικονίου-αντικωδικονίου δημιουργεί ένα σήμα διαμόρφωσης που περνάει στον EF-Tu(41). Το ριβόσωμα εμπλέκεται στην σηματοδότηση της αλληλεπίδρασης του σωστού ζεύγους κωδικονίου-αντικωδικονίου στον EF-Tu και στην ενεργοποίηση της δράσης GTPάσης. Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του τριαδικού συμπλόκου αμινοάκυλο- tRNA•EF-Tu•GTP δείχνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ του βραχίονα δέκτη και της θηλιάς T του tRNA με κατάλοιπα σε περιοχές του EF-Tu(41). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να λειτουργούν σαν άμεση επικοινωνία μεταξύ των δύο μορίων, παρέχοντας ένα πιθανό σύνδεσμο στην αλληλεπίδραση κωδικονίου-αντικωδικονίου και την υδρόλυση του GTP από τον EF-Tu. Έχει δειχθεί ότι η πρόσδεση του κωδικονίου σε ένα tRNA με συμπληρωματικό αντικωδικόνιο, προκαλεί μια διαμόρφωση του tRNA στην οποία οι αλληλεπιδράσεις τεταρτοταγούς δομής στις θηλιές D και T χαλαρώνουν. Έτσι, ο βραχίονας δέκτης του tRNA κινείται ελεύθερα προς την περιοχή του αντικωδικονίου και αλλάζει τις αλληλεπιδράσεις με τον παράγοντα. Σε αυτό το μοντέλο το tRNA που αναγνωρίζει το συγγενές κωδικόνιο στη θέση A δρα σαν ενεργοποιητής του EF-Tu. Παρόλο που ο EF-Tu•GTP προσδένει με χαμηλή

συγγένεια tRNA χωρίς εστεροποιημένο αμινοξύ, η πρωτεΐνη θεωρείται ότι δεν έχει εξειδίκευση καθώς δένει όλα τα αμινοάκυλο-tRNA με την ίδια συγγένεια. Πρόσφατα πειράματα, όμως, έδειξαν ότι ο EF-Tu•GTP παρουσιάζει ουσιώδη εξειδίκευση για το εστεροποιημένο αμινοξύ και για το κορμό του tRNA, προσδένοντας τα ανεξάρτητα, με σημαντική διακύμανση στην ενέργεια πρόσδεσης μεταξύ διαφορετικών αμινοξέων και tRNA (46).

Οι αλληλουχίες των αμινοξέων καθορίστηκαν για πολλούς προκαρυωτικούς παράγοντες επιμήκυνσης όπως ο EF-Tu από *E. coli*, *T. thermophilus*, το μιτοχόνδριο της ζύμης, το χλωροπλάστη της *Euglena gracilis*, καθώς και για αρκετούς ευκαρυωτικούς παράγοντες. Ο EF-Tu του *T. thermophilus* κωδικοποιείται από δύο γονίδια, τα *tuf1* και *tuf2*, και είναι μια πρωτεΐνη 44.651 Da. Ομοίως, τα γονίδια *tufA* και *tufB* κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 43.182 Da, τον EF-Tu του *E. coli*. Η σύνθεση των κωδικονίων είναι διαφορετική στο *tuf1* του *T. thermophilus* και στο *tufA* από το *E. coli*. Το περιεχόμενο σε G+C είναι πολύ υψηλότερο στο θερμοφιλικό γονίδιο, ειδικότερα στο τρίτο γράμμα των κωδικονίων(42).

Η πρωτεΐνη από το *E. coli* αποτελείται από τρεις περιοχές. Η περιοχή 1 αποτελείται από τα κατάλοιπα 60-241, διευθετημένα σε μια συμπαγή δομή με ένα κεντρικό β-φύλλο περικυκλωμένο από α-έλικες. Η περιοχή 2 αποτελείται από τα κατάλοιπα 300-393 και σχηματίζει ένα β-βαρέλι. Η περιοχή 3 αποτελείται από τα κατάλοιπα 1-36 και 256-299 και έχει την λιγότερο καθορισμένη δομή. Τα κατάλοιπα 37-59 και 242-255 που έχουν απομείνει συνιστούν τις διασυνδέσεις μεταξύ των περιοχών. Μελέτη της κρυσταλλικής δομής του τριπλού συμπλόκου δείχνει ότι το GTP προσδένεται στην περιοχή 1, η αμινοάκυλο- ομάδα και ο βραχίονας δέκτης του αμινοάκυλο-tRNA στοιβάζονται μεταξύ των περιοχών 1 και 2 και η T θηλιά αλληλεπιδρά με την περιοχή 3.

Η μορφή της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης γύρω από το νουκλεοτίδιο είναι όμοια με αυτή που παρατηρείται σε άλλες πρωτεΐνες που προσδένουν νουκλεοτίδια και τα κατάλοιπα



**Εικόνα 10** Η δομή της περιοχής 1 του EF-Tu του *E. coli*. Τα βέλη αντιπροσωπεύουν τα β-ελάσματα και οι κορδέλες τις α-έλικες. Οι τέσσερις σκιασμένες θηλιές στα δεξιά της εικόνας είναι οι θηλιές που εμπλέκονται στην πρόσδεση του νουκλεοτιδίου.

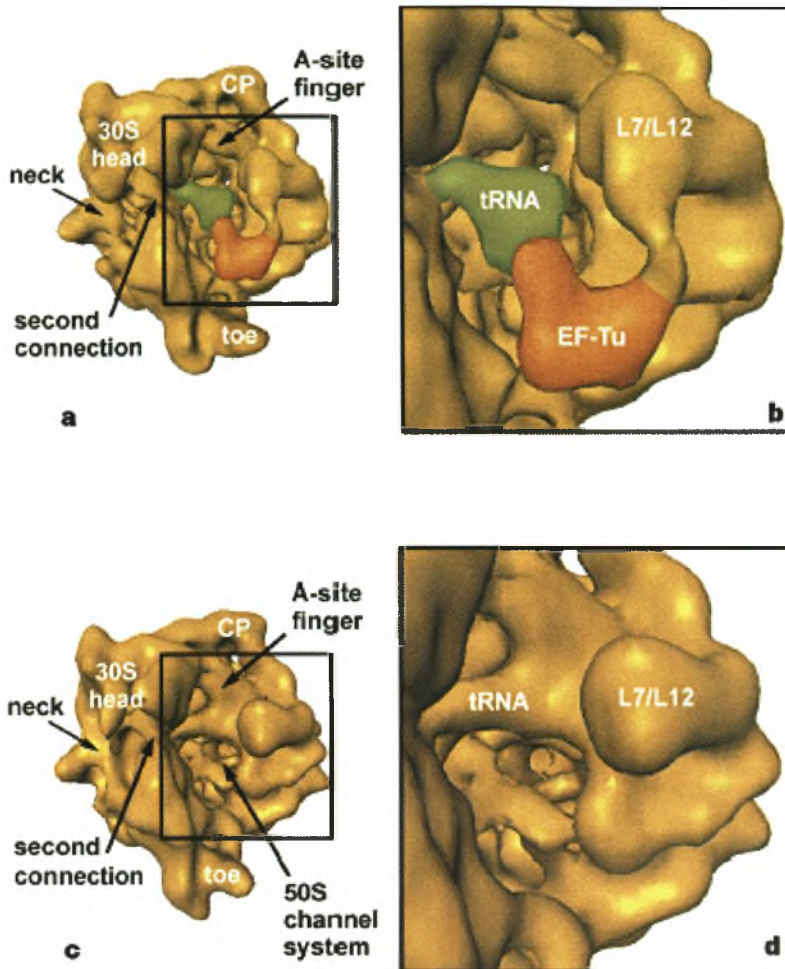
που εμπλέκονται στην πρόσδεση του GTP είναι υψηλά διατηρημένα, όχι μόνο ανάμεσα σε EF-Tus από διαφορετικά είδη αλλά επίσης ανάμεσα στον EF-Tu και τους EF-G και IF2. Το GTP προσδέεται στην επιφάνεια της περιοχής 1. Στην περίπτωση του *E. coli* EF-Tu, ο κεντρικός πυρήνας αποτελείται από ένα στριμμένο β φύλλο φτιαγμένο από πέντε παράλληλα β ελάσματα και ένα αντιπαράλληλο β έλασμα. Οι επαφές μεταξύ των παράλληλων ελασμάτων περιέχουν έξι α-έλικες (εικ10). Το μέρος πρόσδεσης του νουκλεοτιδίου βρίσκεται στο καρβοξυλο-άκρο του β φύλλου, όπως και σε άλλες πρωτεΐνες που προσδέουν νουκλεοτιδίο, και τα σημεία αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη βρίσκονται στις τέσσερις θηλιές που ενώνουν τα β-ελάσματα με τις α-έλικες.

Ο δακτύλιος της γουανίνης είναι μερικώς θαμμένος σε μια κοιλότητα καθορισμένη από τα κατάλοιπα Leu(175), Thr(26) και την πλευρική αλυσίδα της Lys(136). Η Leu(175) βρίσκεται στο N-τελικό άκρο της έλικας E και η Thr(26) στην θηλιά που συνδέει το έλασμα α με την έλικα A. Στο βάθος της κοιλότητας η Asn(135) σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το O(6) της γουανίνης, ενώ το Asp(138) σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το N(1) και/ ή με το N(2). Αυτό ίσως μπορεί να εξηγήσει την υψηλή εξειδίκευση του EF-Tu για νουκλεοτίδια γουανίνης σε σύγκριση με άλλα νουκλεοτίδια(43). Τα κατάλοιπα Asn(135) και Asp(138) βρίσκονται στην θηλιά που ενώνει το έλασμα με την έλικα D.

Η θέση πρόσδεσης του διφωσφορικού κατάλοιπου του GDP βρίσκεται στην θηλιά που συνδέει το έλασμα α με την έλικα A, ένα μοτίβο που συναντάται σε πρωτεΐνες που προσδέουν νουκλεοτίδια. Στην περίπτωση του EF-Tu, αυτή η θηλιά είναι σχετικά μακριά και ελαστική και περιέχει τα νουκλεοτίδια Gly(18)-His-Val-Asp-His-Gly(23). Η θέση της Gly(23) υπαγορεύεται από την στενή επαφή του α-φωσφορικού στην έλικα. Η πρόσδεση του β-φωσφόρου στην πρωτεΐνη είναι πολύ ισχυρότερη από αυτή του α-φωσφόρου και περιλαμβάνει ένα ιόν  $Mg^{2+}$ . Τα δύο β-οξυγόνα αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη ενώ το τρίτο β-οξυγόνο είναι προσδέτης του μεταλλικού ιόντος. Οι άλλοι προσδέτες είναι δύο ομάδες από την πρωτεΐνη και τρία μόρια νερού. Η θηλιά μεταξύ του ελάσματος c και της έλικας B είναι τοποθετημένη διαμετρικά αντίθετα από το β-φώσφορο και αποτελείται από τα κατάλοιπα Asp(80)-Cys-Pro-Gly-His(84). Η θηλιά υφίσταται αλλαγές διαμόρφωσης ανάλογα με τη πρόσδεση GTP ή GDP. Η μετάλλαξη του Asp(80) σε Asn χαρακτηρίζεται από μείωση στην συγγένεια πρόσδεσης του GTP και του  $Mg^{2+}$  αλλά η συγγένεια για GDP δεν αλλάζει(44).

Μελέτες σε τριαδικά σύμπλοκα σταματημένα με κίρρομυκίνη στην διαμόρφωση GTPάσης, αμέσως μετά την υδρόλυση του GTP, στην A θέση του ριβοσώματος επέτρεψαν οπτικοποίηση της δομής του συμπλόκου(45). Στην εικόνα 11c,d φαίνεται η δομή του συμπλόκου χωρίς κίρρομυκίνη. Το πεπτιδυλο- tRNA προσδεμένο στην θέση A, ενώνει το κενό μεταξύ της 30S και 50S υπομονάδας τοποθετημένο αριστερά του μίσχου L7/L12, αφήνοντας άδειο το διάστημα από κάτω. Στην δομή του συμπλόκου σταματημένο με κίρρομυκίνη (εικ. 11a,b), αυτό το διάστημα περιέχει επιπλέον πυκνότητα λόγω του τριαδικού συμπλόκου.

Η περιοχή 1 του EF-Tu είναι δεμένη στην 50S υπομονάδα σε μια περιοχή που εμπλέκεται στην υδρόλυση του GTP και πιθανόν περιέχει τις πρωτεΐνες L11 και L10, καθώς και την θηλιά α-σακρίνης γύρω από τη θέση 2,660 του 23S RNA, με την οποία ο EF-Tu φαίνεται ότι αλληλεπιδρά.



Εικόνα 11a,b Η 70S υπομονάδα του ριβοσώματος με το τριαδικό σύμπλοκο σταματημένο στην θέση A από την κίρρομυκίνη. c,d Η κανονική δομή του ριβοσώματος ύστερα από την υδρόλυση του GTP.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της δομής είναι η γέφυρα μεταξύ της περιοχής 1 του EF-Tu και του μίσχου L7/L12. Η διευθέτηση του τριαδικού συμπλόκου υποδεικνύει ότι η πλευρά της περιοχής 1 του EF-Tu που περιέχει τις έλικες C και D εμπλέκεται σε αυτή την επαφή. Ο EF-Tu φαίνεται ότι προσδένεται στο εξωτερικό άκρο του μίσχου, την C-τελική περιοχή των L7/L12. Υπάρχουν δεδομένα που προτείνουν ότι, σε πολλές λειτουργικές φάσεις του συμπλόκου ριβόσωμα-παράγοντας επιμήκυνσης, ο μίσχος L7/L12 παίρνει διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με το λύγισμα της ελαστικής περιοχής του διμερούς L7/L12.

Η περιοχή 2 του EF-Tu κατευθύνεται προς και ακουμπάει την 30S υπομονάδα στην περιοχή που βρίσκονται οι πρωτεΐνες S12, S5 και S4. Οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με το 16S RNA στην περιοχή 530 της θηλιάς, τοποθετώντας το σε αυτό το μέρος του 30S σωματιδίου. Λαμβάνοντας υπόψη την σημαντικότητα των πρωτεϊνών S12, S5 και S4 καθώς και την περιοχή 530 της θηλιάς για την αποκωδικοποίηση, η αλληλεπίδραση του EF-Tu με το συγκεκριμένο τμήμα της 30S υπομονάδας πρέπει να έχει ξεχωριστή λειτουργική σημασία.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός του πρώτου μέρους της παρούσας εργασίας είναι η κλωνοποίηση, υπερέκφραση και απομόνωση της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της μεθειονίνης από το βακτήριο *Deinococcus radiodurans*. Το *D. radiodurans* είναι ένα κατά Gram θετικό αερόβιο βακτήριο εδάφους που σχηματίζει τετράδα. Ανήκει στην οικογένεια *Deinococcaceae* στον κλάδο *Deinococcus-Thermus* και είναι ανάμεσα στους πιο ανθεκτικούς οργανισμούς στην ακτινοβολία, κατέχοντας ένα εύρωστο σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Το στέλεχος R1 ήταν το πρώτο από τα deinobacteria που ανακαλύφθηκε και απομονώθηκε το 1956 στην Όρεγκον από κρέας κονσέρβας που είχε χαλάσει λόγω συνεχόμενης έκθεσης σε ακτίνες X. Το γονιδίωμα του *D. radiodurans* R1 αποτελείται από δύο χρωμοσώματα (DR\_Main [2.65 Mbp] και DR412 [412 kbp]), ένα μεγαπλασμίδιο (DR177 [177 kbp]) και ένα πλασμίδιο (46 Kbp), έχοντας 3.195 γονίδια. Η πλήρης αλληλούχηση του γονιδιώματος του σε συνδυασμό με το γεγονός ότι καλλιεργείται εύκολα και είναι μη παθογόνο, καθιστούν το *D. radiodurans* ένα καλό υποψήφιο για μελέτες.

Η μελέτη της MetRS από το *D. radiodurans*, ενός ενζύμου 75.270Da, μπορεί να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση της δομής του στα βακτήρια και στη διαλεύκανση της ύπαρξης ή μη μιας επιπλέον περιοχής μέσω της οποίας η MetRS συμμετέχει σε σύμπλοκα με άλλα μόρια. Τέτοια μόρια μπορούν να είναι άλλες αμινοάκυλο-συνθετάσες ή οι παράγοντες της μετάφρασης όπως ο EF-Tu. Η συμμετοχή της MetRS σε σύμπλοκα μπορεί να οδηγήσει στη διεκπεραίωση άλλων λειτουργιών ανεξάρτητων από την αμινοακυλίωση.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, υπερεκφράστηκε και καθαρίστηκε ο παράγοντας επιμήκυνσης EF-Tu από τα βακτήρια *Thermus thermophilus* και *Escherichia coli*. Το *T. thermophilus* είναι ένα κατά Gram αρνητικό βακτήριο και ανήκει στον ίδιο κλάδο με το *D. radiodurans*. Είναι υψηλά θεμόφιλο και οι πρωτεΐνες που απομονώνονται από αυτό επιδεικνύουν υψηλή θερμοσταθερότητα. Η αλληλούχηση του γονιδιώματος του *T. thermophilus* και του *E. coli* έγινε πολύ νωρίς και επέτρεψε τη χρήση αυτών των δύο βακτηρίων σε πολλές μελέτες. Ο EF-Tu από το *T. thermophilus* είναι σταθερός σε θερμοκρασία μέχρι και 65°C, σε αντίθεση με τον EF-Tu του *E. coli*, και διαθέτει υψηλή αντίσταση σε χημικά. Η υπερέκφραση έγινε σε διαφορετικά στελέχη κυττάρων *E. coli* επιτρέποντας έτσι τη μεταξύ τους σύγκριση. Ο καθαρισμός του παράγοντα EF-Tu επιτρέπει την ακόλουθη χρήση του σε δοκιμασίες για τον έλεγχο της συμμετοχής του ή μη σε σύμπλοκα με τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες και ιδιαίτερα με τη MetRS. Επίσης, ο EF-Tu μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό αμινοάκυλο-tRNA μορίων με χρωματογραφία συγγένειας με το ακινητοποιημένο σύμπλοκο EF-Tu•GTP.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Αντιδραστήρια

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων για την παρούσα εργασία, καθώς και η εταιρία προμηθείας τους.

**Πίνακας 1. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.**

Αντιδραστήριο	Εταιρία
Acetic acid	MERCK
Acrylamide	SIGMA
Agarose	Seakem
Ammonium chloride	PANREAC
Ammonium sulfate	SERVA
Ammonium persulfate	SIGMA
Amp	PANTREXYL
ATP	FLUKA
BSA	SIGMA
Buffer 4	FINNZYMES
Buffer 3	FINNZYMES
Calcium chloride dihydrate	PANREAC
Chloramphenicol	SCHARLAU
Coomassie brilliant blue G 250	MERCK
Coomassie brilliant blue R 250	PANREAC
DEPC	SIGMA
dNTPS	FINNZYMES
Dynazine Ext	FINNZYMES
EDTA	WHATMAN
Ethanol	RESEARCH ORGANICS
Ethidium bromide	MERCK
Formaldehyde	MERCK
Glucose-D	PANREAC
Glycerol	PANREAC
Glycine	PANREAC
Isopropanol	MERCK
imidazole	MERCK
IPTG	FERMENTAS
LB agar	SIGMA
LB broth	FLUKA
Lysozyme	APPLICHEM
Magnesium	SCHARLAU
Manganese (II) chloride tetrahydrate	SCHARLAU
Methanol	FLUKA
Nde1	FERMENTAS

Phenol crystallized	PANREAC
Phusion DNA polymerase	FINNZYMES
Potassium Chloride	MERCK
Proteinase K	SIGMA
Ribonuclease A	RIEDEL DE HAEN
Sal 1	NEW ENGLAND BIOLANDS
Sap 1	FINNZYMES
Sodium chloride	MERCK
Temed	SIGMA
Tris	RIEDEL DE HAEN
Tryptone water	MERCK
Taq Polymerase	HYTEST
T4 DNA ligase	NEW ENGLAND BIOLANDS
X-gal	SIGMA
Yeast extract	SCHARLAU
Xylene cyanol	MERCK

## 3.2 Κύτταρα

### 3.2.1 DH5a

Τα κύτταρα DH5a είναι στέλεχος του *E. coli* που δεν έχουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Είναι ιδανικά για μετασηματισμό με πλασμιδιακούς και κοσμιδιακούς φορείς. Περιέχουν μια μερική έλλειψη στην αμινο-τελική περιοχή της β-D-γαλακτοσιδάσης, η οποία επιτρέπει την συμπλήρωσή της από συγκεκριμένους φορείς που κωδικοποιούν αυτή την περιοχή και έτσι μπορεί να γίνει επιλογή με βάση το χρωματισμό των αποικιών μπλε/άσπρο (blue/white screening).

### 3.2.2 BL21

Το στέλεχος BL21 του *E. coli* παρέχει υψηλού επιπέδου έκφραση πρωτεϊνών από συστήματα μετάφρασης που βασίζονται στην T7 RNA πολυμεράση. Περιέχει γονίδια για σπάνια tRNA και έτσι επιτρέπει την υψηλή έκφραση πρωτεϊνών που είναι δύσκολο ή αδύνατο να παραχθούν σε συμβατικά στελέχη *E. coli* λόγω της ύπαρξης σπανίων κωδικονίων. Επίσης, έχουν μεταλλάξεις που εμποδίζουν την έκφραση της πρωτεάσης OmpT, η οποία σε άλλα στελέχη *E. coli* επηρεάζει την απομόνωση ανέπαφων πρωτεϊνών.

### 3.2.3 JM103

Τα κύτταρα JM103 αποτελούν ένα στέλεχος του *E. coli*. Περιέχουν το επίσωμα F, που κωδικοποιεί για ένα καταστολέα της λακτόζης ο οποίος αναστέλλεται με υψηλές ποσότητες IPTG. Χρησιμοποιείται για την έκφραση πρωτεϊνών.



#### 3.2.4 Deinococcus radiodurans R1

Το στέλεχος R1 του *D. radiodurans* χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γενωμικού του DNA και κατά επέκταση την απομόνωση του γονιδίου της αμινοάκυλο-συνθετάσης της μεθειονίνης.

### 3.3 Μέθοδοι

Παρακάτω θα αναλυθούν οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεκπεραίωση των πειραματικών δοκιμών της παρούσας εργασίας καθώς και τα απαραίτητα υλικά για την κάθε μέθοδο.

#### 3.3.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από το *D.radiodurans* καλλιεργήθηκαν και συλλέχθηκαν κύτταρα του βακτηρίου. Η καλλιέργεια έγινε σε υγρό θρεπτικό μέσο με ποσότητα συστατικών ανά λίτρο: 15gr LB Broth, 5gr NaCl, 5gr γλυκόζη και απεσταγμένο νερό έως τον τελικό όγκο. Το pH ρυθμίζεται σε τιμές 7,2-7,4. Τα κύτταρα ενοφθαλμίστηκαν σε 3ml υγρού θρεπτικού και η ανάπτυξη της καλλιέργειας έγινε υπό ανάδευση σε 210rpm 12-14h στους 30° C. Κατόπιν, ανανεώθηκε το θρεπτικό και συνεχίστηκε η επώαση στις ίδιες συνθήκες έως η καλλιέργεια να φτάσει στην εκθετική φάση (απορρόφηση καλλιέργειας στα 600nm 0,4-0,5). Η συλλογή των κυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min σε θερμοκρασία 4°C. Κατόπιν, τα κύτταρα αναδιαλύθηκαν σε 10ml Tris-HCl(100mM, pH 7.5) και προστέθηκαν 15mg λυσοζύμη. Έμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 10min και ύστερα προστέθηκαν 200μl EDTA(500mM, pH 8), 20μl RNάση A (10mg/ml), 180μl πρωτεΐνάση K (10mg/ml), 100μl NaCl (5M) και 1ml SDS 10%. Ακολούθησε η εξαγωγή του DNA με τη μέθοδο φαινόλη/ χλωροφόρμιο. Στην συνέχεια, το DNA κατακρημνίστηκε με προσθήκη ενός όγκου αιθανόλης 100% σε κάθε ένα όγκο υδατικής φάσης και επώαση για 30min στους -80°C. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 20min στις 10000rpm στους 4°C. Πετάχτηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 2ml αιθανόλη 70% στο ίζημα. Έγινε vortex και φυγοκέντρηση στις 10000rpm για 5min στους 4°C. Το υπερκείμενο πετάχθηκε και το ίζημα (DNA) αφού στέγνωσε επαναδιαλύθηκε σε απεσταγμένο νερό. Το DNA αποθηκεύθηκε στους -20° C.

#### 3.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της PCR χρησιμοποιήθηκε για την εκλεκτική ενίσχυση του γονιδίου της MetRS από το γενωμικό DNA του *D.radiodurans*. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση χρειάζονται τα εξής συστατικά: DNA πολυμεράση, εκκινητές (sense, antisense), γενωμικό DNA, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> και ρυθμιστικό διάλυμα για την πολυμεράση. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια ανασυνδιασμένη μορφή του ενζύμου του θερμοφιλικού βακτηρίου *T.aquaticus*, η Taq DNA polymerase (5u/μl) της Hytest, με το δικό της ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης. Η ενίσχυση έγινε με τους προσχεδιασμένους εκκινητές *D.radiodurans* Nde1 Forward και *D.radiodurans* Sap1 Reverse (sigma). Ο Forward εκκινητής έχει στο 5' άκρο του την ακολουθία νουκλεοτιδίων της θέσης κοπής του ενζύμου Nde1 και στην συνέχεια την ακολουθία νουκλεοτιδίων του γονιδίου της MetRS από το 5' άκρο. Συνολικά έχει μήκος 22 νουκλεοτιδίων. Ο Reverse εκκινητής έχει μήκος 40 νουκλεοτιδίων και αποτελείται από την θέση κοπής του περιοριστικού ενζύμου Sap1 στο

5' άκρο του και την συμπληρωματική αλληλουχία νουκλεοτιδίων ενός μέρους του 3' άκρου του γονιδίου (πίνακας 2).

**Πίνακας 2.** Η αλληλουχία των εκκινητών και το σημείο τήξης τους ( $T_m$ ). Με κόκκινο φαίνεται η αλληλουχία αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων NdeI και SapI στους εκκινητές Forward και Reverse αντίστοιχα.

	Εκκινητές	$T_m(^{\circ}C)$
Forward	5'-GCATATGCAAAATCCCCCCCAG-3'	74.2
Reverse	5'GGTGGTTGCTCTTCCGCAACGAACTTTG GTCCCGCTCGGC-3'	90.2

Σε τελικό όγκο αντίδρασης 50μl χρησιμοποιούμε τα παρακάτω συστατικά:

**Πίνακας 3.** Τα αντιδραστήρια που χρειάζονται για 50μl αντίδρασης PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος σε μl
<i>Γεωμικό DNA</i>	2
<i>Εκκινητής Forward(100pmol/μl)</i>	0,4
<i>Εκκινητής Reverse(100pmol/μl)</i>	0,4
<i>dNTPs (10mM)</i>	1
<i>10x Reaction Buffer</i>	5
<i>MgCl<sub>2</sub> (50mM)</i>	2,5
<i>dH<sub>2</sub>O</i>	38,2
<i>Taq πολυμεράση</i>	0,5

Η συσκευή της PCR ρυθμίστηκε στις εξής συνθήκες: Ο πρώτος κύκλος της αντίδρασης ξεκινάει με ένα στάδιο μετουσίωσης στους 98°C για 3min που δεν επαναλαμβάνεται στους επόμενους κύκλους. Στο δεύτερο βήμα συμβαίνει αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 45sec. Στο τρίτο βήμα έχουμε επαναδιάταξη του DNA στους 55°C για 1,5min. Στο τέταρτο βήμα γίνεται η επέκταση του μορίου για 2min στους 72 °C. Τα βήματα 2-4 επαναλαμβάνονται για 39 κύκλους. Στον τελευταίο κύκλο της αντίδρασης υπάρχει ένα επιπλέον βήμα όπου η Taq πολυμεράση τοποθετεί πολύ-A ουρές στο 3' άκρο από τα μόρια DNA στους 72 °C για 10 min. Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει την εύκολη και αποτελεσματική σύνδεση των προϊόντων PCR σε φορείς με TA cloning. Το προϊόν της αντίδρασης PCR είναι το ενισχυμένο γονίδιο της MetRS με τις αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων NdeI και SapI στα άκρα του και πολύ-A ουρές.

### 3.3.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωριστούν μόρια DNA με κριτήριο το μοριακό τους βάρος. Τα δείγματα DNA τοποθετούνται σε μια χαραγή που έχει δημιουργηθεί στο ένα άκρο

μιας πλάκας από πήκτωμα αγαρόζης(gel) και καλύπτονται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στα άκρα της πλάκας εξασφαλίζεται η εφαρμογή τάσης μεταξύ τους. Η τάση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση των διαφόρων θραυσμάτων DNA προς το θετικό πόλο. Επειδή όμως η ταχύτητα μετακίνησης ενός θραύσματος εξαρτάται από το μέγεθός του (τα μεγάλα θραύσματα κινούνται αργότερα από τα μικρά) σε μια δεδομένη χρονική στιγμή τα μικρότερα θραύσματα «προπορεύονται» έναντι των μεγαλύτερων κατά την κίνησή τους προς το θετικό πόλο, με αποτέλεσμα να μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν gel αγαρόζης 1% και το ρυθμιστικό διάλυμα TAE(1x). Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE(1x) προκύπτει από την αραιώση του ρυθμιστικού διαλύματος TAE(50x) με απεσταγμένο νερό. Στα δείγματα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα loading buffer πριν ηλεκτροφορηθούν. Παρακάτω παρατίθενται τα συστατικά για την παρασκευή του gel αγαρόζης και των ρυθμιστικών διαλυμάτων.

#### **Gel αγαρόζης 1%**

- 1gr αγαρόζης
- 100ml TAE(1x)
- 7μl βρωμιούχο αιθίδιο

#### **TAE(50x) 1L**

- 242 gr Tris base
  - 57,1ml Οξικό οξύ
  - 100ml EDTA 0,5M, pH 8
  - απιονισμένο H<sub>2</sub>O έως τον τελικό όγκο
- Ρύθμιση του pH στο 8,6.

#### **loading buffer 6x**

- 0,09% Bromophenol Blue
- 0,09% Xylene Cyanol
- 60% Γλυκερόλη
- 60mM EDTA

Η τάση που εφαρμόζεται είναι 120V και μετά από κάποιο χρονικό διάστημα είναι δυνατή η ανίχνευση του DNA με τη μορφή ζωνών κάτω από το υπεριώδες φως εξαιτίας της ενσωμάτωσης των μορίων του βρωμιούχου αιθιδίου στις διπλές έλικες του DNA. Η σύγκριση μάλιστα της απόστασης που διένυσαν τα νουκλεϊκά οξέα του δείγματος μας, με την απόσταση που διανύουν μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους, πληροφορεί για το μέγεθος των πρώτων.

### 3.3.4 Καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.

Ο καθαρισμός των τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης έγινε με βάση το πρωτόκολλο και τα υλικά που περιέχονται στο HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction

Kit της Yeastern Labs. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα χαοτροπικό αλάτι, την guanidine thiocyanate, για να διαλύσει το gel αгарόζης και να μετουσιώσει τα ένζυμα. Τα κομμάτια DNA που βρίσκονται στο διάλυμα με το χαοτροπικό αλάτι προσδένονται στην μήτρα της υαλώδους ίνας της στήλης και κατόπιν εκλούνται. Τα βήματα του πρωτοκόλλου είναι τα εξής:

### ***I. Εξαγωγή του τμήματος DNA και διαλυτοποίησή του***

Η εξαγωγή του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει από το πήκτωμα αγαρόζης, γίνεται με την χρήση αποστειρωμένου νυστεριού. Μεταφέρονται περίπου 300mg του κομματιού σε ένα eppendorf και προστίθεται 500μl DF Buffer. Το μίγμα επωάζεται στους 55oC για 10-15min, μέχρι το κομμάτι του gel να διαλυτοποιηθεί τελείως.

### ***II. Δέσμευση του DNA***

800μl του δείγματος από το προηγούμενο βήμα φορτώνονται σε μια στήλη DF η οποία έχει τοποθετηθεί σε ένα σωλήνα συλλογής. Φυγοκεντρούμε στις 8000rpm για 30sec και αφού πετάξουμε το διάλυμα που περνάει από την στήλη την επανατοποθετούμε στο σωλήνα συλλογής.

### ***III. Πλύση της στήλης***

Προσθέτουμε 500μl του Wash Buffer( με αιθανόλη) στην στήλη DF. Φυγοκεντρούμε στις 8000rpm για 30sec και αφού πετάξουμε το διάλυμα που περνάει από την στήλη την επανατοποθετούμε στο σωλήνα συλλογής, όπως και στο προηγούμενο βήμα. Φυγοκεντρούμε ξανά για 2min στις 14000rpm για να στεγνώσουμε την μήτρα της στήλης.

### ***IV. Εκλούση του DNA***

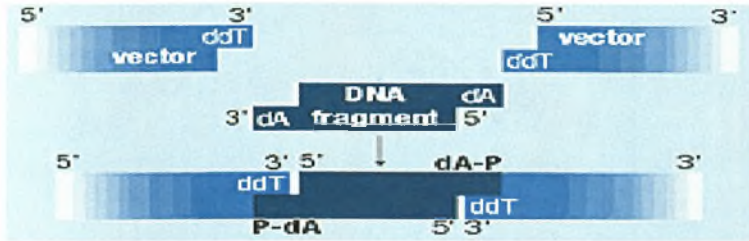
Μεταφέρουμε την στήλη σε ένα σωλήνα φυγοκέντρωσης και προσθέτουμε 15μl Elution Buffer στο κέντρο της στήλης. Επιάζουμε για 2min μέχρι να απορροφηθεί από την στήλη και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στην μέγιστη ταχύτητα για 2min για να εκλούσουμε το DNA .

### **3.3.5 Σύνδεση τμημάτων DNA (Ligation)**

Η εισαγωγή του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε ειδικό φορέα για να κλωνοποιηθεί έγινε με το pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System της εταιρίας Promega. Η διαδικασία περιλαμβάνει την επώαση των τμημάτων DNA από τον καθαρισμό του πηκτώματος αγαρόζης με τον ανοικτό πλασμιδιακό φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy και τη σύνδεση τους με την δράση της T4 DNA λιγάσης.

Ο pGEM<sup>®</sup>-T Easy είναι ένας πλασμιδιακός φορέας μεγέθους 3015bp που χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR και για εύκολη αναγνώριση των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων με μπλε /άσπρη επιλογή (Blue/white screening). Ο φορέας έχει κοπεί με το περιοριστικό ένζυμο EcoRV και έχουν προστεθεί και στα δύο άκρα του 3' τελικές θυμιδίνες. Αυτές οι μονόκλωνες προεξοχές θυμιδίνης στην περιοχή εισαγωγής του DNA, βελτιώνουν σε μεγάλο βαθμό την απόδοση της σύνδεσης του

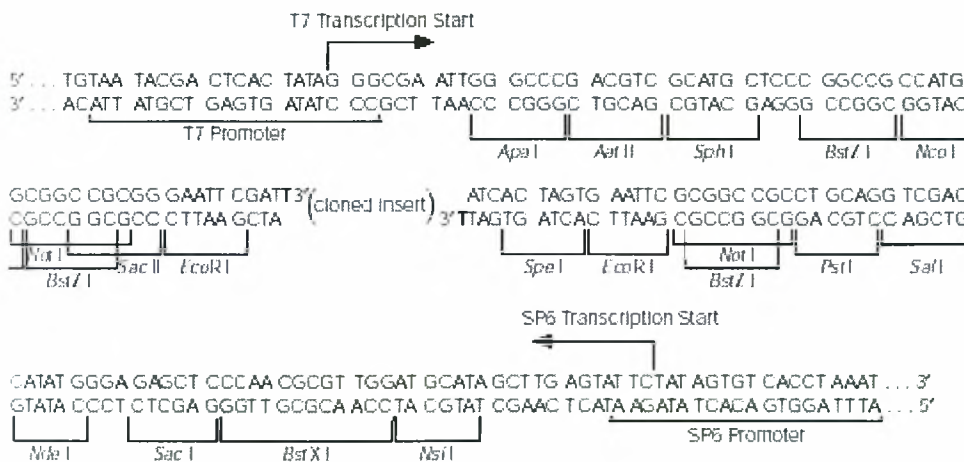
προϊόντος PCR με το πλασμίδιο. Αυτό συμβαίνει διότι αποτρέπουν την επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου και παρέχουν την συμπληρωματική προεξοχή για ένωση με τις πολύ-Α ουρές που έχει δημιουργήσει η Taq πολυμεράση, κατά την αντίδραση της PCR, στο γονίδιο που ενισχύσαμε. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται TA cloning (εικ..12).



Εικόνα 12 Η διαδικασία του TA cloning.

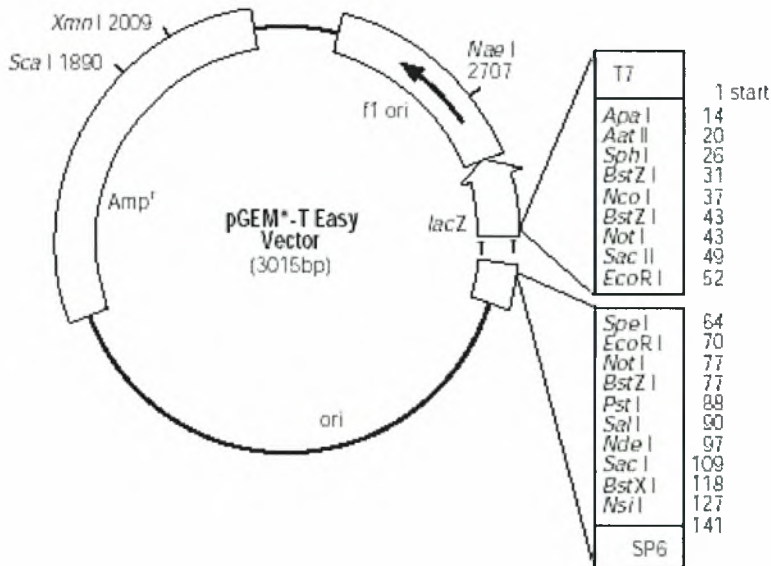
Η εύκολη μπλε /άσπρη επιλογή των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων επιτυγχάνεται μέσω των προαγωγέων των T7 και SP6 RNA πολυμερασών οι οποίοι περιστοιχίζουν τον πολυσυνδέτη που βρίσκεται μέσα στην περιοχή κωδικοποίησης του α-πεπτιδίου του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Η απενεργοποίηση του α-πεπτιδίου λόγω εισαγωγής του επιθυμητού DNA επιτρέπει την αναγνώριση των ανασυνδιασμένων κλώνων με επιλογή λόγω χρώματος.

Ο φορέας pGEM<sup>®</sup>-T Easy περιέχει πολλαπλές θέσεις κοπής περιοριστικών ενζύμων μέσα στον πολυσυνδέτη. Ο πολυσυνδέτης περιστοιχίζεται από τα περιοριστικά ένζυμα EcoR1, BstZ1 και Not1, παρέχοντας έτσι τρεις μονές αντιδράσεις πέψης για την απελευθέρωση του γονιδίου που εισάγαμε (εικ.13). Ακόμη, ο συγκεκριμένος φορέας περιέχει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη (εικ.14) και το οπερόνιο της λακτόζης (lacZ) το οποίο κωδικοποιεί τρία ένζυμα, τη β-γαλακτοσιδάση, την περμεάση και την τρανσακετυλάση.



Εικόνα 13. Οι προαγωγείς και ο πολυσυνδέτης του φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Φαίνεται ότι ο πολυσυνδέτης περιστοιχίζεται από τα περιοριστικά ένζυμα EcoR1, BstZ1 και Not1

Στην εικόνα 14 φαίνεται ο χάρτης του φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy σε κυκλική μορφή και στο πίνακα 4 παρατίθενται μερικά σημαντικά σημεία της αλληλουχίας του φορέα, όπως η θέση έναρξης της μεταγραφής από τις δυο RNA πολυμεράσες, τις θέσεις των προαγωγέων τους και τις θέσεις των γονιδίων του οπερονίου της λακτόζης.



**Εικόνα 14** Ο κυκλικός χάρτης του pGEM<sup>®</sup>-T Easy και η θέση κοπής των περιοριστικών ενζύμων.

**Πίνακας 4.** Σημαντικά σημεία της αλληλουχίας του φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy.

Σημεία αναφοράς της αλληλουχίας	Θέση
Θέση έναρξης της μεταγραφής από την T7 RNA πολυμεράση	1
Πολυσυνδέτης	10-128
Προαγωγέας της SP6 RNA πολυμεράσης	139-158
Θέση έναρξης της μεταγραφής από την SP6 RNA πολυμεράση	141
Εναρκτήριο κωδικόνιο του γονιδίου lacZ	180
Χειριστής του οπερονίου lac	200-216
Περιοχή κωδικοποίησης της β-λακταμάσης	1337-2197
Περιοχή του φάγου f1	2380-2835
Αλληλουχίες του οπερονίου της λακτόζης	2836-2996, 166-395
Προαγωγέας της T7 RNA πολυμεράσης	2999-3

Το σύστημα pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector με το οποίο έγινε η αντίδραση σύνδεσης των τμημάτων DNA περιέχει τα ακόλουθα υλικά:

- 1,2μg pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (50ng/μl)
- 12μl Control insert DNA (4ng/μl)
- 100u T4 DNA λιγάση
- 200μl 2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase

Η T4 DNA λιγάση που καταλύει την αντίδραση σύνδεσης των τμημάτων DNA του γονιδίου με το φορέα είναι ελεύθερη δραστηριοτήτων εξωνουκλεάσης και έτσι οι 3' προεξοχές θυμιδίνης δεν κινδυνεύουν να απομακρυνθούν. Η T4 DNA λιγάση λειτουργεί καλύτερα στο ρυθμιστικό διάλυμα 2x Rapid Ligation Buffer που παρέχεται με την λιγάση.

Το **2x Rapid Ligation Buffer** περιέχει:

- 60mM Tris-HCl (pH 7.8)
- 20mM MgCl<sub>2</sub>
- 20mM DDT
- 2mM ATP
- 10% polyethylene glycol

Για μια αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA με τελικό όγκο 10μl χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά στις εξής ποσότητες:

**Πίνακας 5. Οι όγκοι τω συστατικών σε μια αντίδραση σύνδεσης με τελικό όγκο 10μL.**

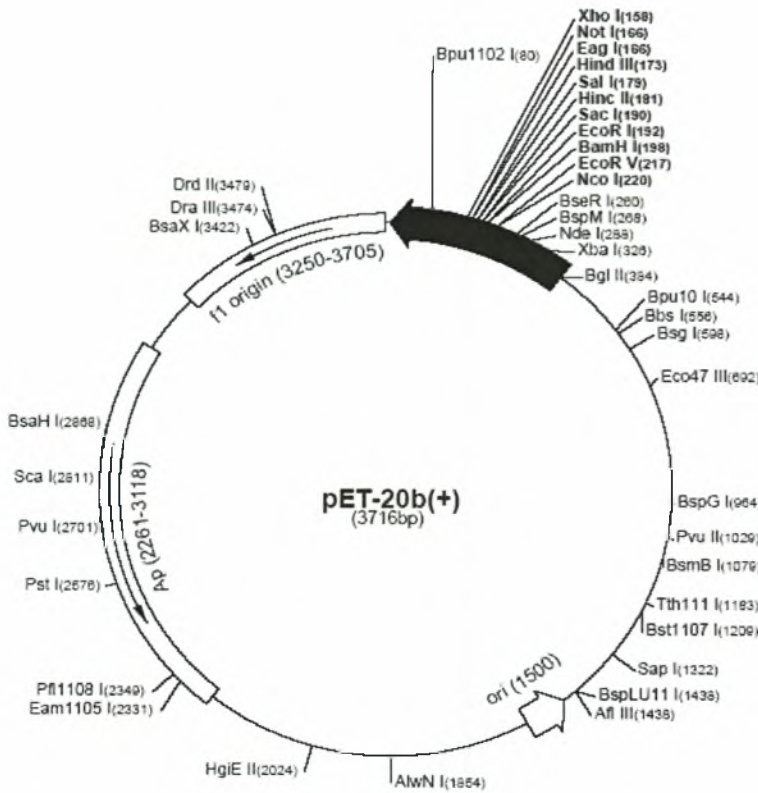
<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Όγκος σε μl</b>
2x Rapid Ligation Buffer	5
Φορέας pGEM-T Easy	0,5
Προϊόν PCR	2,5
T4 DNA λιγάση	1
Απιονισμένο H <sub>2</sub> O	1
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>10</b>

Όλα τα υλικά διατηρούνται στον πάγο κατά την διάρκεια της χρήσης τους. Το ένζυμο προστίθεται τελευταίο στο μίγμα. Η αντίδραση επωάζεται για 12-16h(overnight) στους 4°C για την επίτευξη του μέγιστου αριθμού ανασυνδιασμένων πλασμιδίων.

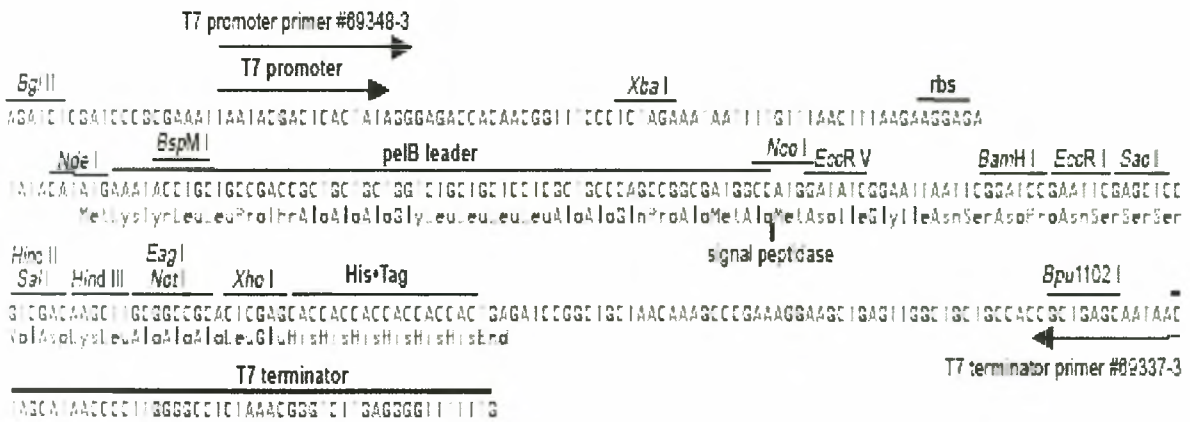
Στην διάρκεια του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας έγινε και η σύνδεση του προϊόντος της PCR στον φορέα pet20b για να γίνει η υπερέκφραση της πρωτεΐνης στα κύτταρα BL21. Ο pET20b είναι ένας πλασμιδιακός φορέας μεγέθους 3716bp (Novagen) και διαθέτει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη (εικ.15). Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση και έκφραση γονιδίων μέσω της T7 RNA πολυμεράσης. Στο πλασμίδιο pET20b μετά τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης υπάρχει ο πολυσυνδέτης (polylinker), όπου βρίσκονται όλες οι θέσεις αναγνώρισης και κοπής από τα ένζυμα περιορισμού (εικ.16). Έτσι, με τη χρήση των κατάλληλων ενζύμων είναι δυνατή η εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου, όπως είναι στη συγκεκριμένη περίπτωση το γονίδιο της MetRS στο εσωτερικό του πολυσυνδέτη και στη συνέχεια, η επαγωγή της έκφρασής του μετά από την πρόσδεση της T7 RNA πολυμεράσης στον προαγωγέα της. Το κωδικόνιο λήξης της μεταγραφής της MetRS έχει απαλειφθεί, με αποτέλεσμα να προστίθενται έξι τριάδες νουκλεοτιδίων που κωδικοποιούν έξι ιστιδίνες στο τέλος της αμινοξικής αλληλουχίας της. Η μεταγραφή σταματά από ένα κωδικόνιο λήξης αμέσως μετά τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν τις έξι ιστιδίνες. Παρ' όλα αυτά, ο pET20b δε διαθέτει



το οπερόνιο της λακτόζης (*lacZ*), με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επιλογή των αποικιών που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο, με βάση το χρώμα τους.



Εικόνα 15 Ο πλασμιδιακός φορέας pET20b.



### pET-20b(+) cloning/expression region

Εικόνα 16 Ο προαγωγέας της T7 RNA πολυμεράσης και ο πολυσυνδέτης (polylinker) του φορέα pET-20b. Στο εσωτερικό του πολυσυνδέτη διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων. Μετά τον πολυσυνδέτη διακρίνεται το His-Tag.

### 3.3.6 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Με την διαδικασία του μετασηματισμού τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια που παράγονται από την αντίδραση σύνδεσης, επανεισάγονται σε βακτήρια τα οποία έχουμε καταστήσει παροδικά διαπερατά. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν έγιναν επιδεκτικά με την μέθοδο του  $\text{CaCl}_2$ .

#### **Μέθοδος $\text{CaCl}_2$ για παραγωγή επιδεκτικών κυττάρων.**

Αρχικά, ενοφθαλμίζονται κύτταρα DH5a σε 5ml υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth. Για την παρασκευή **1 λίτρου υγρού θρεπτικού** χρησιμοποιήθηκε:

- 15gr LB Broth (10g/l Tryptone, 5g/l εκχύλισμα *S.cerevisiae*, pH 7.2)
- 10gr NaCl
- Απιονισμένο νερό έως τον τελικό όγκο

Η ανάπτυξη των καλλιιεργειών πραγματοποιείται υπό ανάδευση στις 210rpm για 12-14h στους 37°C. Στην συνέχεια, γίνεται ανανέωση του θρεπτικού μέσου και ακολουθεί επώαση στις ίδιες συνθήκες μέχρι να επανέλθουν τα κύτταρα στη εκθετική φάση ανάπτυξης. Αυτό εξακριβώνεται με την ανά τακτά διαστήματα μέτρηση της απορρόφησης της καλλιέργειας στα 600nm. Όταν η απορρόφηση φτάσει σε  $\text{OD}_{600}=0.4$ , η επώαση σταματάει και τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 4000rpm για 10min στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα  $\text{MgCl}_2\text{-CaCl}_2$  (80mM  $\text{MgCl}_2$ , 20mM  $\text{CaCl}_2$ ). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min στους 4°C, το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  ανά 50ml αρχικής καλλιέργειας. Προσθέτουμε 70μl DMSO ανά 2ml επαναδιαλυμένων κυττάρων και επωάζουμε για 15min στον πάγο. Στην συνέχεια, προσθέτουμε άλλα 70μl DMSO.

#### **Μετασηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων**

Προσθέτονται 45ng από DNA (ανασυνδιασμένο πλασμίδιο) σε 200μl κύτταρα και τα επωάζονται στον πάγο για 30min. Ακολουθεί heatshock στους 42°C για 90sec και επώαση στον πάγο για 2 λεπτά. Κατόπιν, προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 800μl SOC medium και επωάζονται για 45min στους 37°C υπό ανάδευση (170rpm) για να επανέλθουν και να εκφράσουν τον δείκτη αντίστασης στο αντιβιοτικό που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο. Τελικά, 200μl των κυττάρων επιστρώνονται σε τριβλία με στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό στο οποίο εκφράζουν αντίσταση τα μετασηματισμένα κύτταρα λόγω του πλασμιδίου που έχουν προσλάβει. Εφόσον το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε περιέχει το οπερόνιο της λακτόζης (π.χ. pGEM), τα τριβλία επιστρώνονται με 16μl X-gal/τριβλίο και 100μl IPTG (100mM)/ τριβλίο για να γίνει η μπλε/ άσπρη επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων με ανασυνδιασμένα πλασμίδια. Παρακάτω δίνεται η παρασκευή του υγρού μέσου SOC και του στερεού θρεπτικού μέσου.

#### **Υγρό μέσο SOC, pH 7, IL**

- 20gr Tryptone
- 5gr Εκχύλισμα ζύμης
- 0.5gr NaCl 1M
- 10ml KCl 250ml

- 10ml MgCl<sub>2</sub> 1M(αποστειρωμένο)
- 20ml γλυκόζη 1M(αποστειρωμένη)

Αρχικά, προσθέτουμε τα πρώτα τέσσερα συστατικά και συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό μέχρι τα 900ml. Στην συνέχεια, ρυθμίζουμε το pH στο 7 και συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τα 970ml. Αποστειρώνουμε και προσθέτουμε τα δύο τελευταία συστατικά.

#### **Στερεό θρεπτικό μέσο,1L**

- 30gr LB agar
- 10gr NaCl
- απιονισμένο νερό έως τον τελικό όγκο

Αποστειρώνουμε και προσθέτουμε το αντιβιοτικό για να επιλεγούν μόνο τα μετασχηματισμένα κύτταρα με το πλασμίδιο που παρέχει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό.

### 3.3.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα πραγματοποιήθηκε με το NucleoSpin® Plasmid QuickPure kit της εταιρίας Macherey-Nagel.

Αρχικά, μερικές από τις αποικίες των μετασχηματισμένων κυττάρων ενοφθαλμίζονται ξεχωριστά σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιέχει αμπικιλίνη(100μl/ml). Η ανάπτυξη των καλλιεργειών γίνεται στους 37°C για 12-16h υπό ανάδευση (210rpm). Στην συνέχεια, ακολουθείται το πρωτόκολλο της μεθόδου NucleoSpin® Plasmid QuickPure για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τα κύτταρα E.coli.

#### ***I. Συλλογή των βακτηριακών κυττάρων***

Φυγοκεντρώνται 1,5ml της καλλιέργειας κυττάρων για 30sec στα 11000xg και το υπερκείμενο αφαιρείται

#### ***II. Λύση των κυττάρων***

Προστίθενται 250μl buffer A1 και το ίζημα επαναδιαλύεται με έντονη ανάδευση στο vortex. Ακολουθεί προσθήκη 250μl buffer A2 και ανάμειξη με ήπια ανάδευση. Το buffer A2 ελευθερώνει το πλασμιδιακό DNA από τα κύτταρα με SDS/αλκαλική λύση. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min. Ακολούθως προστίθενται 300μl buffer A3 και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση. Το buffer A3 ουδετεροποιεί το διάλυμα που προκύπτει και δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA στην μεμβράνη της στήλης.

#### ***III. Καθαρισμός του διαλύματος***

Φυγοκέντρωση για 5 min στις 11000 x g σε θερμοκρασία δωματίου.

#### ***IV. Δέσμευση του DNA***

Το υπερκείμενο φορτώνεται στη στήλη NucleoSpin® Plasmid QuickPure που έχει τοποθετηθεί σε ένα σωλήνα συλλογής. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 1 min στις 11000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.

**V. Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης**

Επανατοποθετείται η στήλη στον σωλήνα συλλογής και προστίθενται 450μl buffer AQ (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 min στις 11000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.

**VI. Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης.**

Φυγοκέντρηση για 2min στην μέγιστη ταχύτητα.

**VII. Έκλυση του DNA**

Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωλήνα και προστίθενται 50μl buffer AE(5mM Tris-Cl, pH8.5). Στη συνέχεια, επωάζεται το δείγμα για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 11000 x g.

**3.3.8 Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού**

Η πέψη με ένζυμα περιορισμού του πλασμιδιακού DNA μας επιτρέπει να ελέγξουμε αν το υπάρχει το επιθυμητό ένθεμα στο φορέα μας και στην συνέχεια να το χρησιμοποιήσουμε. Τα ένζυμα περιορισμού υδρολύουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς σε ένα συγκεκριμένο σημείο της αλληλουχίας που αναγνωρίζουν. Για την πέψη του ανασυνδιασμένου φορέα χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού Nde1(Fermentas) και Sap1(New England Biolabs) καθώς αναγνωρίζουν τις αλληλουχίες στο 5' και στο 3' άκρο του ενθέματος που οφείλονται στους εκκινήτες. Οι ακολουθίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα φαίνονται παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 6** Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα Nde1 και Sap1. Με κόκκινο φαίνονται τα νουκλεοτίδια ανάμεσα στα οποία κόβουν τα ένζυμα.

Nde1	Sap1
5'-CATATG-3'	5'-GCTCTTCN-3'
3'-GTATAC-5'	3'-CGAGAAGNNNN-5'

Μια αντίδραση πέψης με τελικό όγκο 10μl περιλαμβάνει τα εξής:

**Πίνακας 7** Αντίδραση πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα Nde1 και Sap1.

Αντιδραστήριο	Όγκος σε μl
Πλασμιδιακό DNA	5
10x Buffer <sup>4</sup>	1
Sap1	0.5
Nde1	0.5
H <sub>2</sub> O	3
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>10</b>

Το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer 4 παρέχει τις συνθήκες στις οποίες και τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερη δραστηριότητα. Η αντίδραση επωάζεται στους 37°C για 2h.

### 3.3.9 Διαδικασία υπερέκφρασης της MetRS

Ενοφθαλμίζονται σε 5ml LB Broth με χλωραμφαινικόλη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 25mg/ml και αμικικιλίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml κύτταρα BL21 Rossetta που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο, για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Ακολουθεί μεταφορά των 5ml της καλλιέργειας σε 200ml από φρέσκο θρεπτικό μέσο LB broth με τα αντιβιοτικά και η επώαση συνεχίζεται στις ίδιες συνθήκες. Παράλληλα, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm έως ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει περίπου στην τιμή  $OD_{600}=0,4$  που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Στο στάδιο αυτό προστέθηκε στις καλλιέργειες IPTG (0,1M) σε τελική συγκέντρωση 1mM. Το IPTG δρα ως επαγωγέας της έκφρασης του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης της οποίας ο προαγωγέας στο πλασμίδιο pET-20b που χρησιμοποιείται στην συγκεκριμένη περίπτωση για την κλωνοποίηση του γονιδίου της MetRS βρίσκεται μπροστά από τον πολυσυνδέτη. Η έκφραση του γονιδίου αυτού στα κύτταρα του E. coli αναστέλλεται από τον καταστολέα LacIQ. Το IPTG δεσμεύει και απομακρύνει τον καταστολέα από το DNA επιτρέποντας έτσι την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία με τη σειρά της θα αναγνωρίσει τον προαγωγέα της στο πλασμίδιο και θα μεταγράψει το γονίδιο της MetRS. Μετά την προσθήκη του IPTG συνεχίζεται η επώαση των καλλιεργειών και η μέτρηση της απορρόφησης. Η επώαση των καλλιεργειών σταματάει όταν η οπτική πυκνότητα ξεπεράσει την τιμή  $OD_{600}$ . Τέλος, η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 4000rpm για 10min στους 4°C. Το υπερεκίμενο αφαιρείται και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C.

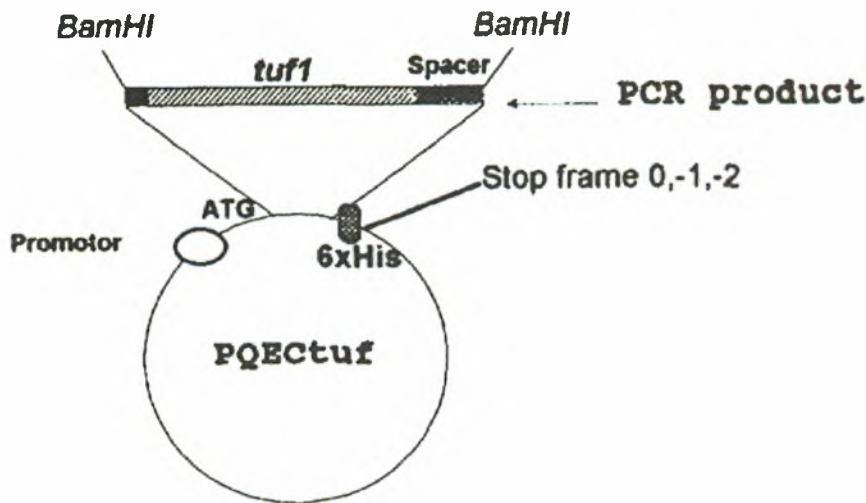
### 3.3.10 Απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης MetRS

Η απομόνωση της MetRS έγινε με Protino® Ni 1000 prepacked columns kit της εταιρίας Macherey-Nagel με τον τρόπο που περιγράφεται παρακάτω για την απομόνωση του παράγοντα EF-Tu. Η στήλη Protino® Ni 1000 είναι μια στήλη νικελίου και η MetRS μπορεί να δεσμευτεί πάνω της μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που περιέχει με τα ιόντα νικελίου της στήλης. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες διαπερνούν την στήλη και έτσι συλλέγονται κλάσματα διαφορετικής περιεκτικότητας σε κάθε στάδιο.

Τελικά, τα διαφορετικά κλάσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία SDS (SDS page) για να γίνει ο διαχωρισμός τους και κατά συνέπεια ο καθαρισμός της MetRS. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης περιγράφεται στην ενότητα 3.3.13.

### 3.3.11 Διαδικασία υπερέκφρασης του παράγοντα EF-Tu.

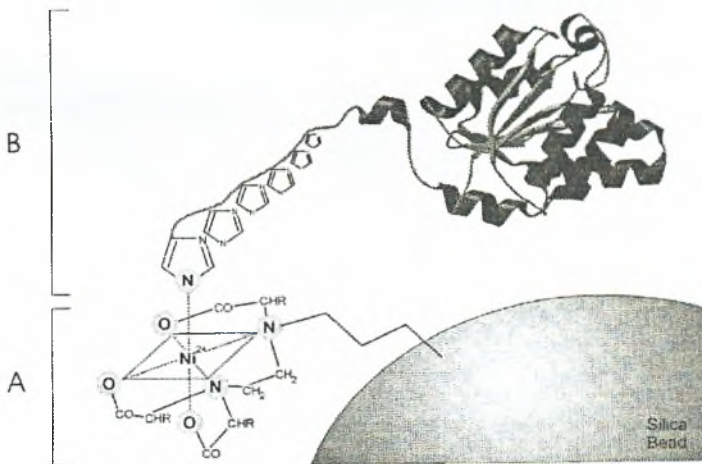
Για την διαδικασία υπερέκφρασης του παράγοντα EF-Tu έγιναν καλλιέργειες σε υγρό θρεπτικό μέσο με αμικικιλίνη (1μl/ml). Ενοφθαλμίστηκαν μετασχηματισμένα στελέχη DH5a με το γονίδιο του EF-Tu από το *T.thermophilus* και μετασχηματισμένα στελέχη JM103 και BL21 με το γονίδιο του EF-Tu από το *T.thermophilus* (*tuf 1*) και με το γονίδιο του EF-Tu από το *E.coli* (*tuf A*). Τα μετασχηματισμένα στελέχη προέκυψαν από την αντίδραση σύνδεσης του εκάστοτε γονιδίου του EF-Tu με τον πλασμιαδικό φορέα και εισαγωγή του στα επιδεκτικά κύτταρα. Ο πλασμιαδικός φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pQE12 (εικ.17) και τα γονίδια *tuf*, ύστερα από πέψη με το BamHI, εισήχθησαν στην θέση BamHI του φορέα. Τα γονίδια *tuf* ακολουθούνται από έξι κωδικόνια ιστιδίνης και αμέσως μετά από ένα κωδικόνιο λήξης. Το προϊόν της υπερέκφρασης αναμένεται να είναι ο ανασυνδιασμένος παράγοντας EF-Tu(CHis<sub>6</sub>). Η ανάπτυξη των καλλιεργειών πραγματοποιείται υπό ανάδευση στις 210rpm για 12-14h στους 37°C. Στην συνέχεια, γίνεται ανανέωση του θρεπτικού μέσου με εμβολιασμό 3ml καλλιέργειας σε 200ml υγρού θρεπτικού και ακολουθεί επώαση στις ίδιες συνθήκες μέχρι να επανέλθουν τα κύτταρα στη εκθετική φάση ανάπτυξης. Όταν η απορρόφηση φτάσει στην τιμή OD<sub>600</sub>=0,4 προσθέτουμε 1mM IPTG. Το IPTG δρα ως επαγωγέας της έκφρασης του γονιδίου του EF-Tu. Η μέτρηση της απορρόφησης συνεχίζεται κατά την διάρκεια της επώασης. Όταν η απορρόφηση φτάσει την τιμή OD<sub>600</sub>=1-1,2 σταματάμε την επώαση. Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε παγωμένα falcons και φυγοκεντρώνονται στις 4000rpm για 10min στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αποθηκεύεται.



**Εικόνα 17.** Το πλασμίδιο pQECTuf που κωδικοποιεί τον EF-Tu(CHis<sub>6</sub>). Το τροποποιημένο γονίδιο αποτελείται από την κωδικοποιούσα περιοχή του EF-Tu, εκτεινόμενη κατά εννιά αμινοξέα στην καρβοξυ-τελική περιοχή και έξι κωδικόνια ιστιδίνης ακολουθούμενα από ένα κωδικόνιο λήξης.

### 3.3.12 Απομόνωση του παράγοντα EF-Tu

Η απομόνωση του παράγοντα EF-Tu του *T.thermophilus* από το στελέχος DH5a και του EF-Tu του *E.coli* από το JM103 έγινε με το Protino® Ni 1000 prepaced columns kit της εταιρίας Macherey-Nagel και η απομόνωση του παράγοντα EF-Tu του *T.thermophilus* από το στέλεχος JM103 καθώς και από τα στελέχη BL21 από το Protino® Ni 150 prepaced columns kit της ίδιας εταιρίας. Και τα δύο επιτρέπουν την απομόνωση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών με ετικέτες πολύ-ιστιδίνης με χρωματογραφία συγγένειας με ακινητοποιημένα μεταλλικά ιόντα (IMAC). Οι στήλες έχουν πακεταριστεί με μια ρητίνη που βασίζεται στην σιλικόνη και έχει φορτωθεί με ιόντα νικελίου. Η Protino® Ni 150 μέθοδος χρησιμοποιεί μια χηλική ομάδα βασισμένη στο IDA (iminodiacetic acid), η οποία επιτρέπει την δυνατή και επαρκή πρόσδεση της πρωτεΐνης στην μήτρα IMAC, ενώ η χηλική ομάδα της Protino® Ni 1000 βασίζεται στο TED( tris-carboxymethyl ethylene diamine), ένα ισχυρό pentadenate μεταλλικό χηλωτή, ο οποίος καταλαμβάνει πέντε από τις έξι θέσεις πρόσδεσης στην σφαίρα συντονισμού του ιόντος νικελίου (εικ.18). Και στις δύο χρησιμοποιούνται τα ίδια διαλύματα : το LEW buffer που χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων, την



**Εικόνα 18** Πρόσδεση της πρωτεΐνης με ετικέτα πολύ-ιστιδίνης στην ρητίνη της Protino® Ni 1000. **A:** Η ρητίνη Protino® Ni: ένας κόκκος σιλικόνης φέρει τον μεταλλικό χηλωτή με το προσδεμένο ιόν  $Ni^{2+}$ . **B:** Ένα κατάλοιπο ιστιδίνης από την ετικέτα πολύ-ιστιδίνης της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης προσδένεται στην ρητίνη.

ισοστάθμιση και πλύση της στήλης και το Elution buffer που χρησιμοποιείται για την έκλυση της πρωτεΐνης. Παρακάτω δίνεται η σύσταση των διαλυμάτων αυτών:

#### LEW buffer

- 50mM  $NaH_2PO_4$
- 300mM NaCl
- pH 8

#### Elution buffer

- 50mM  $NaH_2PO_4$
- 300mM NaCl
- 250mM ιμιδαζόλη
- pH 8

Τα βήματα της απομόνωσης σύμφωνα και με τα δύο πρωτόκολλα είναι τα ακόλουθα:

#### ***I. Ομογενοποίηση των κυττάρων***

Το ίζημα των κυττάρων από την κάθε καλλιέργεια έκφρασης του E.coli τοποθετείται στον πάγο. Αναδιαλύεται 1gr του ιζήματος σε 2ml 1x LEW buffer και πιπετάρεται μέχρι πλήρη διάλυση των κυττάρων. Κατόπιν, προστίθεται λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml και το διάλυμα επωάζεται στον πάγο για 30min. Ακολούθως, το εναιώρημα κατεργάζεται με υπέρηχους (sonication) με αποτέλεσμα την διάρρηξη των κυττάρων. Η φυγοκέντρωση του λύματος στις 10000 x g για 30min στους 4°C απομακρύνει τα κυτταρικά υπολείμματα. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε ένα καθαρό σωλήνα και διατηρείται στον πάγο.

#### ***II. Εξισορρόπηση της στήλης***

Η εξισορρόπηση της στήλης Protino® Ni-IDA 150/1000 γίνεται με 320μl/2ml 1x LEW buffer αντίστοιχα. Η στήλη αφήνεται να στραγγίσει από την βαρύτητα.

#### ***III. Πρόσδεση της πρωτεΐνης***

Το υπερκείμενο που συλλέχθηκε από το πρώτο βήμα προστίθεται στην εξισορροπημένη στήλη και αφήνεται να στραγγίσει από την βαρύτητα.

#### ***IV. Πλύση της στήλης***

Ακολουθούν δύο πλύσεις της στήλης με 1x LEW buffer 320μl/2ml για τις στήλες Protino® Ni-IDA 150/1000 αντίστοιχα και η στήλη αφήνεται να στραγγίσει από την βαρύτητα

#### ***V. Έκλουση της πρωτεΐνης***

Ο παράγοντας EF-Tu εκλούζεται σε ένα καθαρό σωλήνα με την προσθήκη 1x Elution buffer. Η έκλουση επαναλαμβάνεται τρεις φορές και χρησιμοποιούνται 240μl/1,5ml 1x Elution buffer κάθε φορά για τις στήλες Protino® Ni-IDA 150/1000 αντίστοιχα.

### 3.3.13 Διαχωρισμός των πρωτεϊνών

Ο διαχωρισμός του παράγοντα EF-Tu έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία SDS (SDS page).

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται από το συμπολυμερισμό ακρυλαμιδίου και bis ακρυλαμιδίου σε αναλογία 30/1 w/w αντίστοιχα. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών που παράγονται από το σύστημα υπερθειικού αμμωνίου (APS) και N,N,N,N τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνης (TEMED). Στο ασυνεχές σύστημα διακρίνονται δύο πηκτές, η πηκτή επιστοιβαξής (sticking gel) και η πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Η σύσταση, το pH και το μέγεθος των πόρων των δύο πηκτών είναι τέτοια, ώστε στην πηκτή επιστοιβαξής τα δείγματα να συμπυκνώνονται και στο τέλος οι πρωτεΐνες να συσσωρεύονται σε στενές ζώνες μεγάλης συγκέντρωσης. Στην πηκτή διαχωρισμού επιτελείται ο διαχωρισμός τους, λόγω διαφορετικής κινητικότητας κάθε πρωτεΐνης. Παρουσία SDS ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους



βάρος. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό το οποίο δεσμεύεται πάνω στη ραχοκοκαλιά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με υδρόφοβους δεσμούς και έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση όλων των μη ομοιοπολικών δεσμών στο μόριο της πρωτεΐνης, την αποδιάταξη της και τη δημιουργία ενός επιμήκους συμπλόκου SDS πολυπεπτιδικής αλυσίδας με καθαρό αρνητικό φορτίο και περίπου σταθερό λόγο φορτίου ανά μονάδα μάζας πολυπεπτιδίου. Συνεπώς, το ολικό φορτίο του συμπλόκου εξαρτάται μόνο από το μέγεθος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και η ηλεκτροφορητική κινητικότητά του στην πηκτή αποκλειστικά από το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου.

Αρχικά, τοποθετείται η πηκτή διαχωρισμού στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται από πάνω της μια μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας του gel. Αφού πήξει, αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται στη συσκευή η πηκτή επιστοίβαξης, ακριβώς πάνω από την πηκτή διαχωρισμού. Τα δείγματα προετοιμάζονται πριν την εισαγωγή τους στο gel, προσθέτοντας ρυθμιστικό διάλυμα loading buffer(3x) και θερμαίνοντάς τα στους 100° C για 5min. Αφού εισαχθούν τα δείγματα και ο μάρτυρας μοριακού βάρους (rainbow marker), προστίθεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, 10x runnig buffer, ώστε να άγει το ηλεκτρικό ρεύμα. Αφού ετοιμαστεί η συσκευή, το σύστημα τροφοδοτείται με I=25 mA. Όταν τα δείγματα φτάσουν στην πηκτή διαχωρισμού, το σύστημα ρυθμίζεται στα 35 mA.

Παρακάτω παρατίθεται ο τρόπος παρασκευής των πηκτών και των ρυθμιστικών διαλυμάτων:

#### **Πηκτή διαχωρισμού 10%, τελικού όγκου 20ml**

- 6,66 ml ακρυλαμίδιο (30% ακρυλαμίδιο, 10% bis-ακρυλαμίδιο)
- 4 ml Tris-HCl 1,875M, pH 8,9
- 1ml SDS
- 40μl TEMED
- 80μl APS
- ddH<sub>2</sub>O έως τελικό όγκο

#### **Πηκτή επιστοίβαξης τελικού όγκου 10ml**

- 1,66 ml ακρυλαμίδιο (30% ακρυλαμίδιο, 10% bis-ακρυλαμίδιο)
- 2 ml Tris-HCl 0,625M, pH 6,8
- 0,5ml SDS
- 20μl TEMED
- 80μl APS
- ddH<sub>2</sub>O έως τελικό όγκο

Και στις δυο πηκτές το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος, καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.

#### **Loading buffer(3x), τελικού όγκου 8ml**

- 0,8ml Tris-Hcl 0.625M
- 1,6ml SDS 10%
- 0,8ml γλυκερόλη
- 0,4ml β-μερκαπτοαιθανόλη

- 0,4ml Coomassie brilliant blue
- ddH<sub>2</sub>O έως τελικό όγκο

**10x Running buffer, τελικού όγκου 500ml**

- 72gr γλυκίνη
- 15gr Tris
- 5gr SDS
- ddH<sub>2</sub>O έως τελικό όγκο

Μόλις τα δείγματα φτάσουν στο κάτω μέρος της συσκευής σταματά η τροφοδότηση ρεύματος και ακολουθεί αφαίρεση της πηκτής επιστοιβαξης και βάνσιμο της πηκτής διαχωρισμού με το διάλυμα χρωματισμού (staining buffer). Η διαδικασία αυτή διαρκεί 45min υπό ανάδευση και στη συνέχεια πραγματοποιείται αποχρωματισμός του gel με το διάλυμα αποχρωματισμού (destaining buffer). Τα παραπάνω διαλύματα αποτελούνται:

**Διάλυμα χρωματισμού (staining buffer), 200ml**

- 0.1gr Coomassie Brilliant Blue
- 80ml μεθανόλη
- 20ml Οξικό οξύ
- 100ml H<sub>2</sub>O

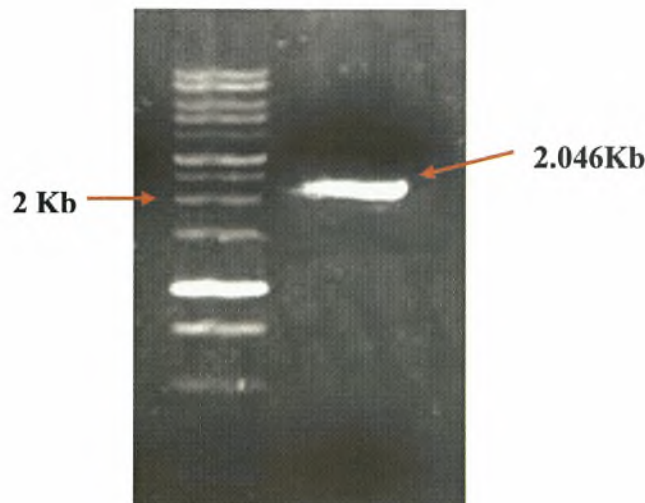
**Διάλυμα αποχρωματισμού (destaining buffer), 500ml**

- 150ml μεθανόλη
- 50ml οξικό οξύ
- 300ml H<sub>2</sub>O

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Κλωνοποίηση, υπερέκφραση και απομόνωση της MetRS

Για την ενίσχυση του γονιδίου της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της μεθειονίνης πραγματοποιήθηκε PCR με το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από το βακτήριο *Deinococcus radiodurans*. Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 50μl και σε θερμοκρασία επαναδιάταξης 55° C, στην οποία δείχθηκε ότι ο υβριδισμός των εκκινητών με τα άκρα του γονιδίου της MetRS ήταν ο πιο ικανοποιητικός. Το προϊόν της αντίδρασης είναι το ενισχυμένο γονίδιο της MetRS με τις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και SapI στα άκρα του και τις πολύ-A ουρές που έχει προσθέσει η Taq πολυμεράση. Το προϊόν της ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και έγινε ορατό με το φωτισμό του πηκτώματος με υπεριώδη ακτινοβολία. Η σύγκριση του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης με τον δείκτη μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκε επιβεβαίωσε την ενίσχυση του γονιδίου της MetRS, αφού προσδιορίστηκε μια μπάντα μεγέθους περίπου 2046bp όσο δηλαδή το μέγεθος του γονιδίου.

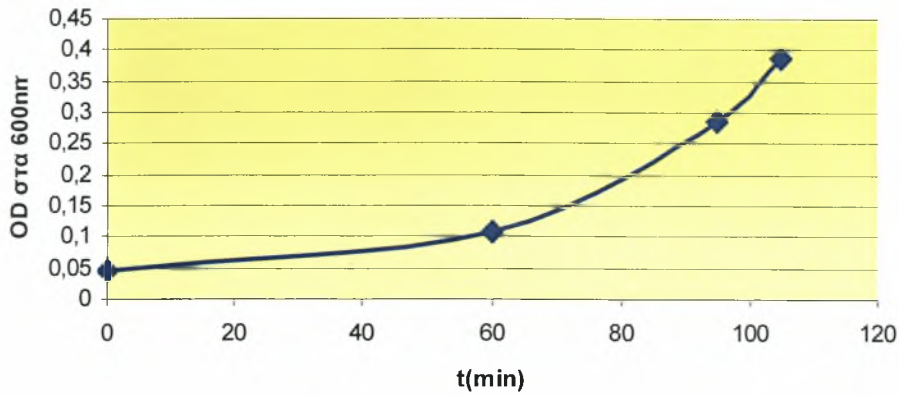


**Εικόνα 19** Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης του προϊόντος της PCR. Με τα κόκκινα βέλη σημειώνονται η ζώνη των 2Kb του μάρτυρα μοριακών βαρών και η ζώνη που αντιστοιχεί στο γονίδιο της MetRS.

Στην συνέχεια, έγινε απομόνωση της ζώνης που αντιστοιχεί στο γονίδιο της MetRS από το πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός της όπως περιγράφηκε και παραπάνω. Τα 15μl έκλουσης που προέκυψαν από αυτό το βήμα περιέχουν το ενισχυμένο γονίδιο της MetRS. Τα 2,5μl DNA χρησιμοποιούνται στην αντίδραση σύνδεσης (ligation) που ακολουθεί. Όπως έχει αναφερθεί, το γονίδιο της MetRS εισήχθηκε στον φορέα pGEM<sup>®</sup>-T Easy με την διαδικασία του TA cloning και την δράση της T4 DNA λιγάσης. Η αντίδραση επώαστηκε για 12h στους 4°C στο μηχάνημα της PCR για να εξασφαλιστεί ότι η θερμοκρασία θα παραμείνει σταθερή. Η αντίδραση μπορεί να επωαστεί και στους 23° C για 1.30h αλλά στις πρώτες συνθήκες πετυχαίνεται ο μέγιστος αριθμός μετασχηματισμένων κυττάρων.

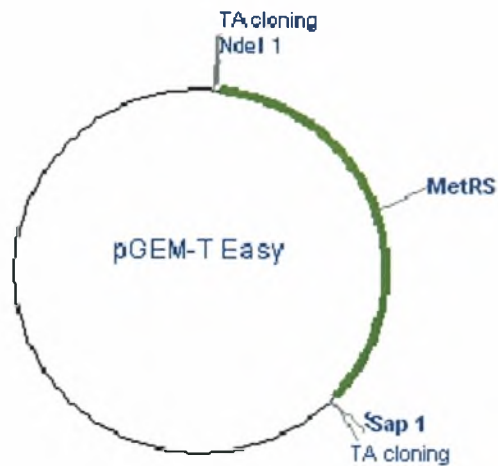
Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει τον μετασχηματισμό επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων με το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο. Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5a του βακτηρίου *E.coli* για τους λόγους που αναλύθηκαν παραπάνω. Αναπτύχθηκαν καλλιέργειες των κυττάρων με παράλληλη μέτρηση της απορρόφησης στα 600nm και οι τιμές που έδωσαν ακολουθούσαν την αναμενόμενη εκθετική καμπύλη (εικ.20).

### Απορρόφηση Καλλιέργειας DH5A *E.coli*



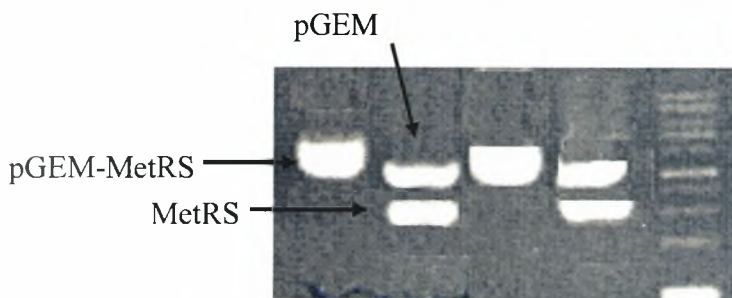
Εικόνα 20 Η καμπύλη απορρόφησης της καλλιέργειας DH5a *E.coli*.

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν στους 37°C σε τριβλία με άγαρ και το αντιβιοτικό αμικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 1μl/ml. Ο φορέας pGEM<sup>®</sup>-T Easy παρέχει ανθεκτικότητα στην αμικιλίνη και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα κύτταρα που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο. Επίσης, τα τριβλία έχουν επιστρωθεί με x-gal και IPTG και έτσι είναι δυνατή η επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών με pGEM-MetRS με βάση τον χρωματισμό τους, λόγω της παρουσίας στον pGEM του οπερονίου της λακτόζης. Αναπτύχθηκε μικρός αριθμός αποικιών και επιλέχθηκαν οι άσπρες έναντι των μπλε. Ακολούθησε ο εμβολιασμός τους σε υγρό θρεπτικό και η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα. Από αυτό το βήμα συλλέχθηκαν 50μl, από τα οποία τα 5μl χρησιμοποιήθηκαν για το έλεγχο των απομονωμένων πλασμιδίων με πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το Nde1 και το Sap1 και η αντίδραση επώαστηκε για 2 ώρες στους 37°C (εικ.21). Εφόσον οι θέσεις κοπής των ενζύμων εντοπίζονται στα άκρα του γονιδίου της MetRS αναμένεται να προκύψουν δύο τμήματα DNA μετά την πέψη, ένα τμήμα περίπου 2046 βάσεων που αντιστοιχεί στην MetRS και ένα τμήμα περίπου 3000 βάσεων που αντιστοιχεί στον pGEM. Μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης και ακτινοβολήσή της σε υπεριώδες φως εμφανίστηκαν οι αναμενόμενες ζώνες (εικ.22). Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει ότι οι αποικίες που επιλέχθηκαν ήταν θετικές, δηλαδή είχαν το επιθυμητό γονίδιο. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη του πλασμιδιακού φορέα pET20b με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, Nde1 και Sap1. Η αντίδραση επώαστηκε για τρεις ώρες στους 37°C και το αποτέλεσμα ήταν ο φορέας να κοπεί σε δύο τμήματα, ένα 2700bp που αντιστοιχεί στον



**Εικόνα 21** Οι θέσεις κοπής των ενζύμων Nde I και Sap I.

«ανοικτό» φορέα και ένα περίπου 1000bp που αντιστοιχεί στην απόσταση που χωρίζει τις δύο θέσεις κοπής. Η ηλεκτροφόρηση της πέψης επαληθεύει την ορθότητα της αντίδρασης.



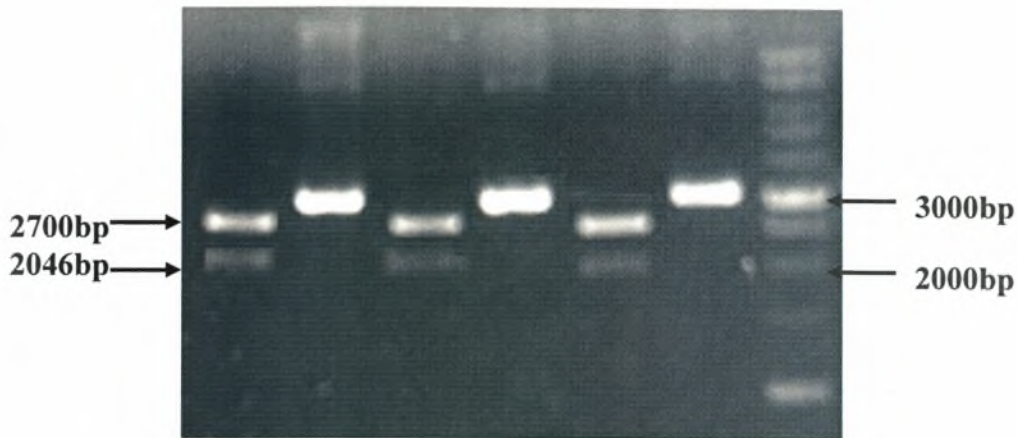
**Εικόνα 22** Απεικόνιση των τμημάτων που προκύπτουν μετά την πέψη του ανασυνδυασμένου pGEM-MeyRS με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και SapI.

Στην συνέχεια, το κομμάτι των 2682bp του γραμμοποιημένου φορέα και το κομμάτι των 2046bp του γονιδίου της MetRS εξάχθηκε από την πηκτή αγαρόζης. Ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης μεταξύ των δύο κομματιών DNA που απομονώθηκαν, δηλαδή του pET20b και της MetRS, με την δράση της T4 DNA λιγάσης. Η αντίδραση επωάστηκε στους 4° C για 14h και η λιγάση πραγματοποίησε την ένωση μεταξύ των κολλωδών άκρων που προέκυψαν από την πέψη με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα.

Το προϊόν της αντίδρασης σύνδεσης μεταφέρθηκε σε επιδεκτικά κύτταρα DH5a με την διαδικασία του μετασχηματισμού που αναλύθηκε παραπάνω. Η ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε σε τριβλία άγαρ με αμικιλίνη στους 37° C. Ο πλασμιαδικός φορέας pET20b δεν διαθέτει το οπερόνιο LacZ με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επιλογή των κλώνων που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο με το επιθυμητό ένθετο, με βάση το χρώμα τους.

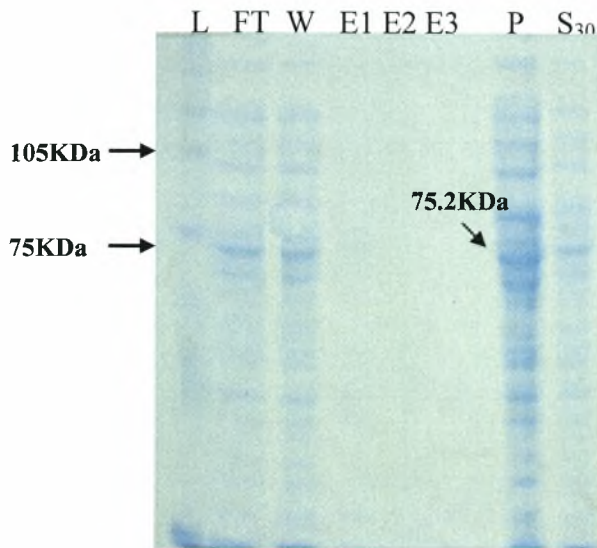
Μερικές από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν εμβολιάστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth με αμικιλίνη και επωάστηκαν για 12h στους 37° C. Κατόπιν, απομονώθηκε το πλασμιαδικό DNA σε μικρή κλίμακα και πραγματοποιήθηκε πέψη με τα ένζυμα

περιορισμού Nde1 και Sap1. Η πέψη είναι απαραίτητη για τον έλεγχο των αποικιών, δηλαδή για να εξακριβωθεί αν το επιθυμητό γονίδιο έχει ενσωματωθεί στον pET20b. Η ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της πέψης σε πηκτική αγαρόζη εμφάνισε δυο ζώνες, μια περίπου 2700bp που αντιστοιχεί στον φορέα pET20b και μία 2046bp που αντιστοιχεί στο γονίδιο της MetRS, metG (εικ.23).



**Εικόνα 23** Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της πέψης του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA για τον έλεγχο των αποικιών. Η πρώτη διαδρομή αντιστοιχεί σε πέψη και η δεύτερη σε άκοπο δείγμα.

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την εισαγωγή του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου pET20b με το γονίδιο metG σε επιδεκτικά κύτταρα BL21 με μετασχηματισμό. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τριβλία με στερεό θρεπτικό που περιέχει τα αντιβιοτικά αμικιλίνη και χλωραμφαινικόλη και επώαστηκαν στους 37°C. Ακολούθως, επιλέχθηκαν μερικές από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν και ενοφθαλμίστηκαν σε υγρό θρεπτικό που περιέχει τα δύο αντιβιοτικά για την ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών. Οι καλλιιεργειες αυτές μετά την ανάπτυξή τους εμβολιάστηκαν σε 200ml υγρού θρεπτικού για την επίτευξη καλλιιεργειών έκφρασης με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Κατόπιν, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αφού ομογενοποιήθηκαν με υπέρηχους, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση της MetRS σε στήλες νικελίου. Τέλος, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου με SDS τα κλάσματα που προέκυψαν από το καθαρισμό της MetRS με την στήλη και το κυτταρικό ίζημα από την ομογενοποίηση(εικ.24). Ωστόσο, το αποτέλεσμα δεν ήταν ικανοποιητικό. Στην θέση ηλεκτροφόρησης του ιζήματος των κυττάρων και του υπερκείμενου από την φυγοκέντρηση του κυτταρικού λύματος που προέκυψε από την ομογενοποίηση εμφανίζεται η ζώνη που αντιστοιχεί στην MetRS (75,27 KDa), γεγονός που υποδεικνύει τη υπερέκφραση της πρωτεΐνης στην καλλιιεργεια. Παρόλα αυτά εμφανίζεται μια πάρα πολύ αγνή ζώνη που να αντιστοιχεί στην MetRS στις διαδρομές των κλασμάτων που προέκυψαν από την έκλυση της πρωτεΐνης. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη εγκλωβίζεται σε σωματίδια εγκλεισμού (inclusion bodies) και κατακρημνίζεται κατά την φυγοκέντρηση είτε στην μη δέσμευση, με την μεθοδολογία που χρησιμοποιείται, της πρωτεΐνης στην στήλη. Περαιτέρω διερεύνηση του προβλήματος έδειξε ότι ισχύει η πρώτη υπόθεση.



**Εικόνα 24** Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου από την ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων από την απομόνωση της MetRS. L: πρωτεϊνικός μάρτυρας, FT: κλάσμα από την φόρτωση του δείγματος στην στήλη, W: το κλάσμα από την πλύση της στήλης, E: το κλάσμα από την έκλουση της πρωτεΐνης, P: κυτταρικό ίζημα, S30: υπερκείμενο που προκύπτει από την φυγοκέντρηση του κυτταρικού λύματος

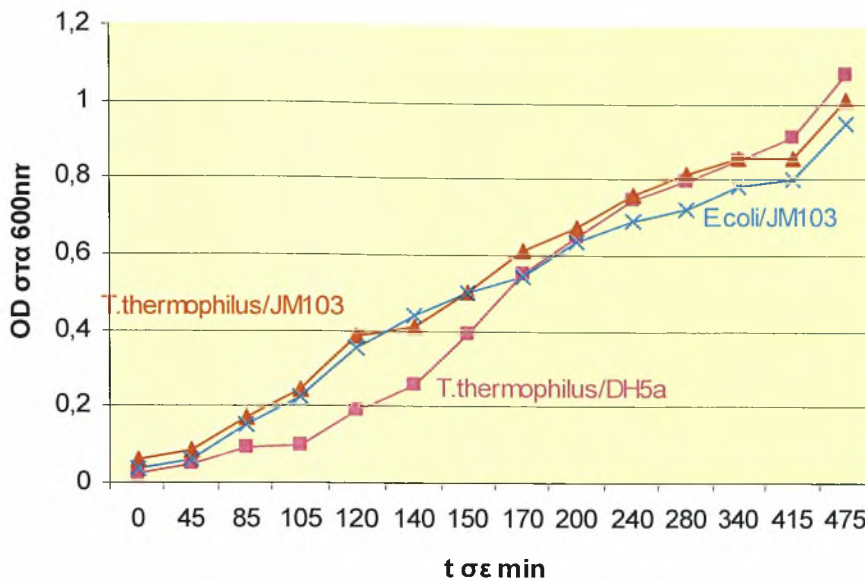
#### 4.2 Υπερέκφραση και απομόνωση του παράγοντα EF-Tu

Πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση του παράγοντα EF-Tu σε στελέχη DH5a, JM103 και BL21 του *E.coli*. Τα στελέχη DH5a και JM103 έχουν μετασχηματιστεί με το γονίδιο του EF-Tu (*tuf1*) από το θερμοφίλο βακτήριο *T.thermophilus*. Το στέλεχος JM103 έχει μετασχηματιστεί και με το γονίδιο του EF-Tu (*tufA*) από το *E.coli*. Τα παραπάνω στελέχη ενοφθαλμίστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο και αναπτύχθηκαν στους 37° C υπό ανάδευση. Από τις παραπάνω καλλιέργειες απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA το οποίο, στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων BL21. Έτσι, προέκυψαν μετασχηματισμένα στελέχη BL21 με το γονίδιο *tuf1* του *T.thermophilus* και στελέχη BL21 με το γονίδιο *tufA* του *E.coli*.

Το κάθε ένα από τα γονίδια *tuf1* και *tufA* έχουν εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα *ret20b*, ο οποίος διαθέτει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Ακολούθως, το κάθε στέλεχος ενοφθαλμίστηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο με 1μg/ml αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Όπως έχει αναφερθεί και στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» η ανάπτυξη των καλλιεργειών έγινε στους 37°C υπό ανάδευση και το θρεπτικό μέσο ανανεώθηκε με εμβολιασμό 3ml καλλιέργειας σε 200ml θρεπτικό. Η ανάπτυξη παρακολουθήθηκε με την μέτρηση της απορρόφησης στα 600nm σε τακτά χρονικά διαστήματα. Οι καμπύλες που προέκυψαν φαίνονται στις εικόνες 25 και 26. Η καλλιέργεια των κυττάρων BL21 έφθασε στην επιθυμητή τιμή οπτικής πυκνότητας 0,4 σε μικρότερο χρονικό διάστημα ( $t \approx 11\text{h}$ ) σε σύγκριση με τις καλλιέργειες των κυττάρων DH5a και JM103 ( $t \approx 14\text{h}$ ). Κατόπιν, προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM/ml για να γίνει επαγωγή της έκφρασης του παράγοντα EF-Tu και η επώαση των καλλιεργειών

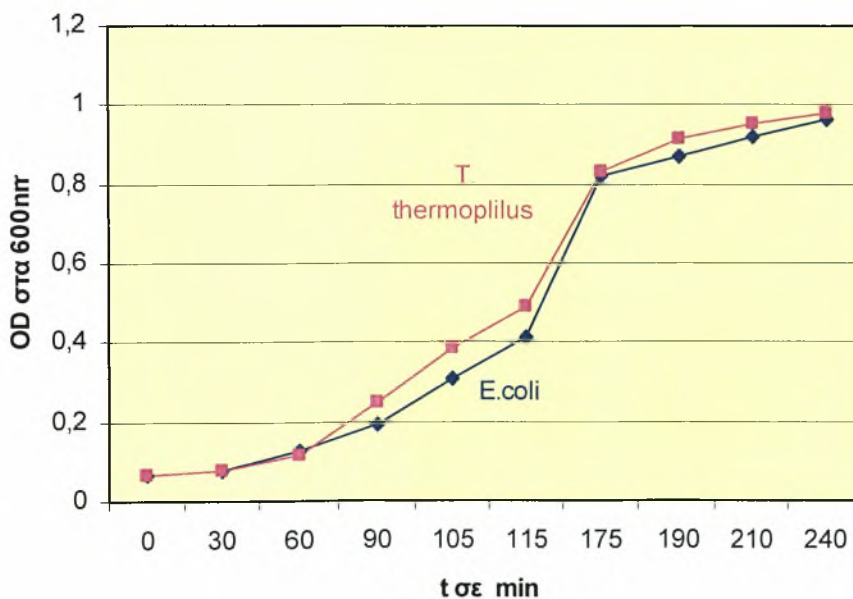
συνεχίστηκε έως την τιμή απορρόφησης  $OD_{600}=1$ . Όπως και προηγουμένως, τα κύτταρα BL21 έφτασαν πολύ πιο σύντομα ( $t \approx 240$ min) στην επιθυμητή τιμή οπτικής πυκνότητας συγκρινόμενα με τα στελέχη DH5a και JM103 ( $t \approx 475$ min).

#### Απορρόφηση Καλλιέργειας Μετασηματισμένων Κυττάρων DH5a, JM103



**Εικόνα 25** Οι καμπύλες της απορρόφησης καλλιέργειας των μετασηματισμένων κυττάρων DH5a και JM103. Οι καλλιέργειες εμφανίζουν αργή αύξηση της οπτικής πυκνότητας.

#### Απορρόφηση Καλλιέργειας Μετασηματισμένων Κυττάρων BL21

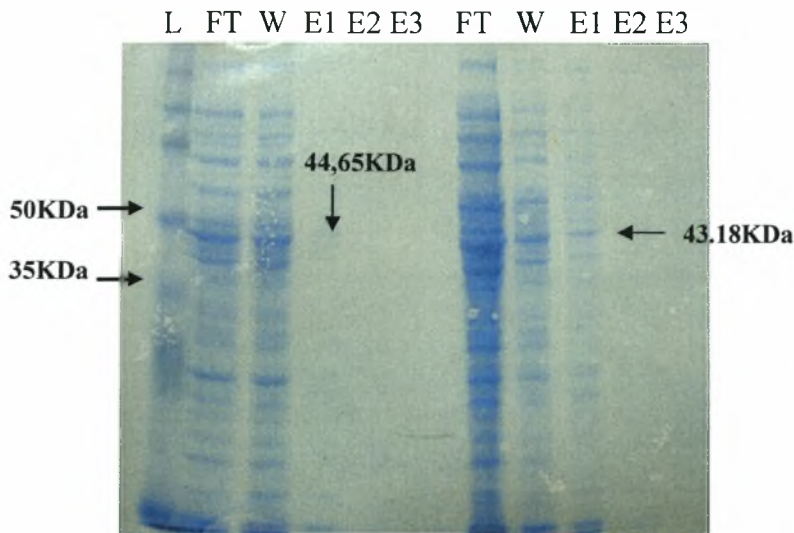


**Εικόνα 26** Οι καμπύλες της απορρόφησης καλλιέργειας των μετασηματισμένων κυττάρων BL21. Τα κύτταρα BL21 ανπτύχθηκαν με γρηγορότερους ρυθμούς από τα κύτταρα JM103 και DH5a. Ακολουθώντας, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αφού διασπάστηκαν με εφαρμογή υπερήχων η πρωτεΐνη καθαρίστηκε σε στήλες Ni-IDA με την μέθοδο που έχει περιγραφεί παραπάνω.

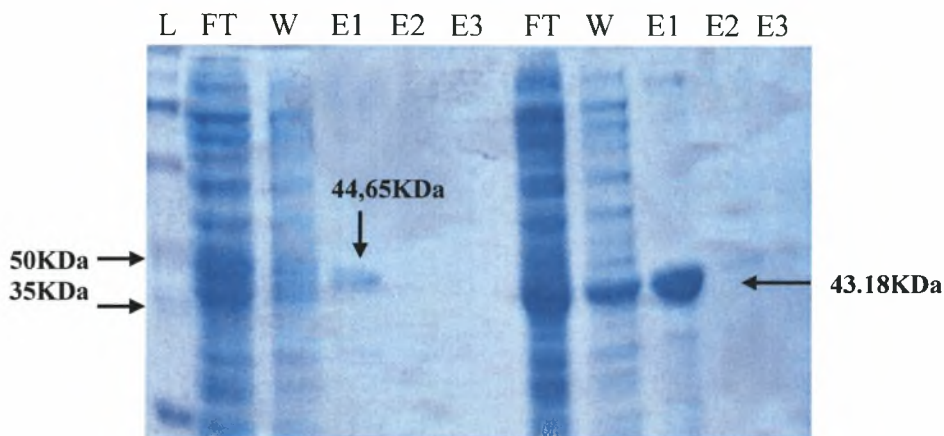


Το κωδικόνιο λήξης της μεταγραφής του EF-Tu έχει απαλειφθεί, με αποτέλεσμα να προστίθενται έξι τριάδες νουκλεοτιδίων που κωδικοποιούν έξι ιστιδίνες στο τέλος της αμινοξικής αλληλουχίας του. Η μεταγραφή σταματά από ένα κωδικόνιο λήξης αμέσως μετά τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν τις έξι ιστιδίνες. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης στις στήλες νικελίου βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ της πολύ-ιστιδινικής ουράς του EF-Tu και των ακινητοποιημένων ιόντων νικελίου. Όπως έχει αναφερθεί, η απομόνωση του παράγοντα EF-Tu του *T.thermophilus* από το στέλεχος DH5a και του EF-Tu του *E.coli* από το JM103 έγινε με το Protino<sup>®</sup> Ni 1000 prepacked columns kit ενώ η απομόνωση του παράγοντα EF-Tu του *T.thermophilus* από το στέλεχος JM103 και από τα στελέχη BL21 από το Protino<sup>®</sup> Ni 150 prepacked columns kit. Μια σύγκριση των αποτελεσμάτων (εικ.27 και 28), οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η απομόνωση της πρωτεΐνης από το Protino<sup>®</sup> Ni 150 prepacked columns kit ήταν πιο αποτελεσματική. Η αποτελεσματικότητα της απομόνωσης βασίζεται κυρίως στην αποδοτικότητα πρόσδεσης της στήλης, η οποία με την σειρά της βασίζεται στα χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης και στην συνολική ποσότητα και συγκέντρωσή της στο δείγμα. Τα χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης δεν άλλαξαν αφού και με τα δύο kit απομονώθηκε η ίδια πρωτεΐνη, ο παράγοντας EF-Tu του *E.coli* και του *T.thermophilus*. Αντίθετα, η ποσότητα και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι διαφορετική καθώς σχετίζεται άμεσα με το επίπεδο έκφρασης και την πυκνότητα των κυττάρων στην καλλιέργεια έκφρασης. Έγινε φανερό από τις παραπάνω καμπύλες απορρόφησης των καλλιεργειών έκφρασης (εικ.25 και 26), ότι τα μετασχηματισμένα κύτταρα BL21 έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα στον ίδιο όγκο καλλιέργειας σε σύγκριση με τα άλλα δύο στελέχη. Επίσης, έχει ήδη αναφερθεί ότι το στέλεχος BL21 παρέχει υψηλότερο επίπεδο έκφρασης πρωτεϊνών βασισμένο στην μεταγραφή με την T7 RNA πολυμεράση, στην ύπαρξη γονιδίων για σπάνια tRNA και στις μεταλλάξεις που εμποδίζουν την έκφραση της πρωτεΐνης OmpT, η οποία σε άλλα στελέχη *E. coli* επηρεάζει την απομόνωση ανέπαφων πρωτεϊνών. Οπότε φαίνεται ότι η έκφραση του EF-Tu σε κύτταρα BL21 πλεονεκτεί από την έκφρασή του στα κύτταρα JM103 και DH5a.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% με SDS (SDS-PAGE) των κλασμάτων που αποκτήθηκαν σε κάθε βήμα της απομόνωσης με τις στήλες. Στα πηκτώματα φαίνεται μια ζώνη 44.651Da που αντιστοιχεί στον παράγοντα EF-Tu από τον *T.thermophilus* και μια ζώνη 43.182Da που αντιστοιχεί στον παράγοντα EF-Tu του *E.coli*. Στην εικόνα 28 διακρίνεται και μία επιπλέον ζώνη που αντιστοιχεί σε μια πρωτεΐνη περίπου 20KDa από το βακτήριο *T.thermophilus*. Η ζώνη που αντιστοιχεί στον EF-Tu του *E.coli* είναι πολύ εντονότερη από την ζώνη του EF-Tu από τον *T.thermophilus* αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω της έκφρασης του EF-Tu και από το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο και από τα κύτταρα BL21.



**Εικόνα 27.** Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου από την ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων από την απομόνωση του EF-Tu, ύστερα από υπερέκφραση σε JM103. L: πρωτεϊνικός μάρτυρας, FT: κλάσμα από την φόρτωση του δείγματος στην στήλη, W: το κλάσμα από την πλύση της στήλης, E: το κλάσμα από την έκλουση της πρωτεΐνης. Οι πρώτες θέσεις είναι του EF-Tu από τον *T.thermophilus* και οι δεύτερες του EF-Tu του *E.coli*.



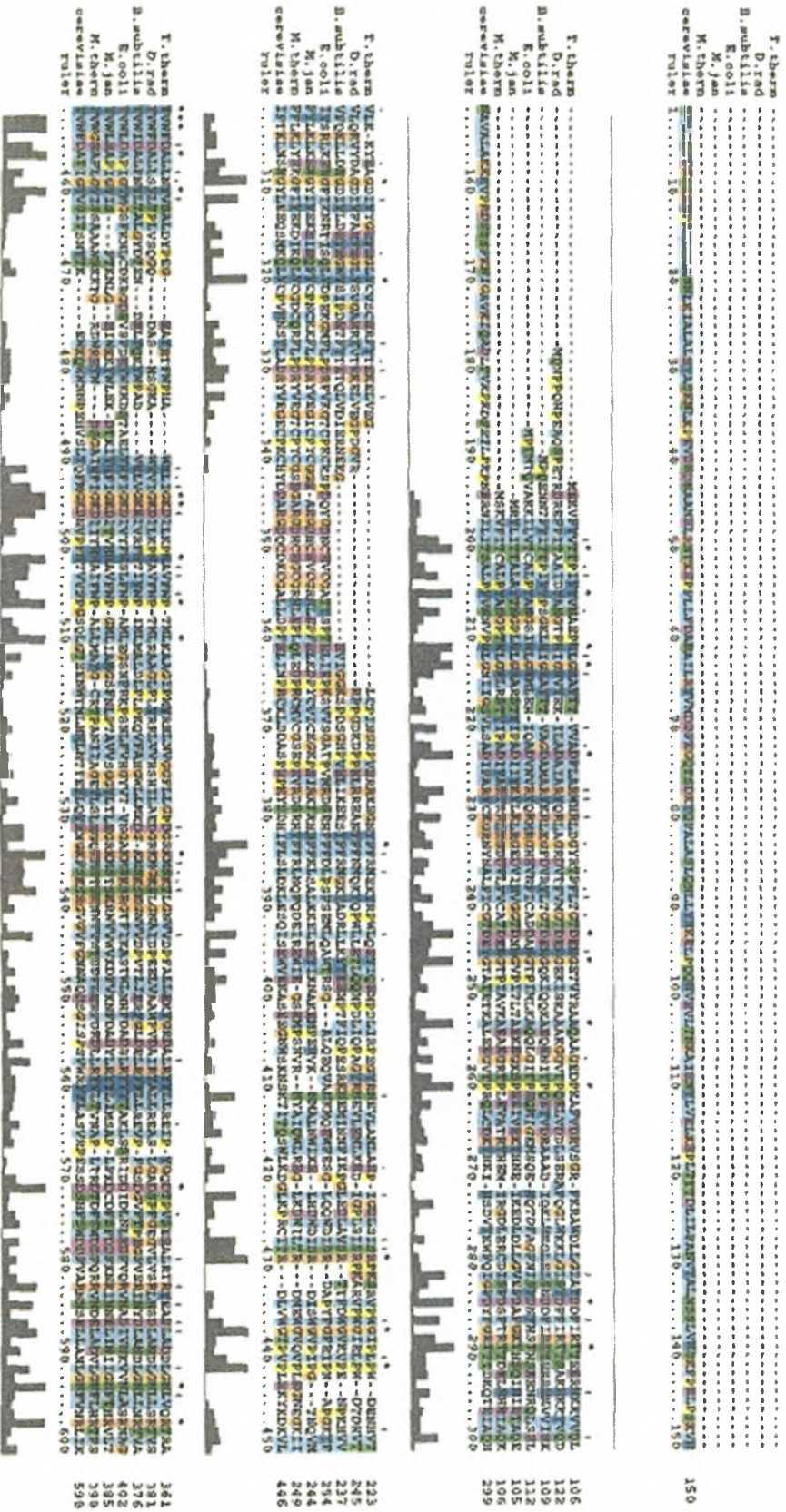
**Εικόνα 28.** Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου από την ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων από την απομόνωση του EF-Tu, ύστερα από υπερέκφραση σε BL21. L: πρωτεϊνικός μάρτυρας, FT: κλάσμα από την φόρτωση του δείγματος στην στήλη, W: το κλάσμα από την πλύση της στήλης, E: το κλάσμα από την έκλουση της πρωτεΐνης. Οι πρώτες θέσεις είναι του EF-Tu από τον *T.thermophilus* και οι δεύτερες του EF-Tu του *E.coli*.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης MetRS εμφανίζει το πρόβλημα της συσσώρευσης της πρωτεΐνης σε σωμάτια εγκλεισμού (inclusion bodies). Το πρόβλημα αυτό πρέπει να επιλυθεί και να διευκρινισθούν τα αίτια που οδηγούν στον εγκλεισμό της πρωτεΐνης σε σωμάτια. Μια υπόθεση για την δημιουργία σωματίων εγκλεισμού είναι ότι τα υψηλά επίπεδα της MetRS, που προκύπτουν από την υπερέκφρασή της, είναι τοξικά για το κύτταρο και με την συσσώρευση της πρωτεΐνης στα σωμάτια εγκλεισμού τα επίπεδα αυτά μειώνονται. Το επόμενο βήμα που θα γίνει αφορά την υπερέκφραση της MetRS και τον καθαρισμό της από το υπερκείμενο των ομογενοποιημένων κυττάρων, χωρίς να κατακρημνίζεται στο ίζημα μέσα στα σωμάτια εγκλεισμού. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την αλλαγή των συνθηκών καθαρισμού. Ενώ στην παρούσα εργασία ο καθαρισμός της πρωτεΐνης έγινε σε φυσικές συνθήκες, ο καθαρισμός της σε αποδιατακτικές συνθήκες θα εξασφαλίσει την διαλυτοποίηση των σωματίων εγκλεισμού. Στην περίπτωση μαζικού σχηματισμού σωματίων εγκλεισμού, η πρωτεΐνη εξάγεται από το ίζημα με την χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων που περιέχουν μεγάλες ποσότητες αποδιατακτικών, όπως 8M ουρία και ο περαιτέρω καθαρισμός στην στήλη γίνεται με τα πρωτόκολλα καθαρισμού κάτω από αποδιατακτατικές συνθήκες.

Η απομόνωση της MetRS από το βακτήριο *Deinococcus radiodurans* είναι ένα βήμα από μια σειρά μελετών οι οποίες διερευνούν την δομή του ενζύμου και την συμμετοχή του σε σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της MetRS και άλλων πρωτεϊνών επιτυγχάνονται από τις επιπλέον περιοχές που είναι προσαρτημένες στον καταλυτικό πυρήνα του ενζύμου. Σύμπλοκα που έχουν απομονωθεί από Μετάζωα περιέχουν οκτώ συνθετάσες, τις GluProRS, IleRS, LeuRS, MetRS, GlnRS, ArgRS, LysRS, AspRS και τρία μη ενζυμικά πεπτίδια. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του πολυενζυμικού συμπλόκου έχουν μελετηθεί εκτενώς χρησιμοποιώντας γενετικές και χημικές μεθόδους. Η γενετική προσέγγιση κατέληξε στην διευκρίνιση αρκετών επαφών που συμβαίνουν μεταξύ των αμινο- και καρβοξυ-τελικών επιπλέον περιοχών των AARSs, όπως η αμινοτελική μη καταλυτική περιοχή της MetRS δημιουργεί ομόλογες (MetRS - MetRS) και ετερόλογες (MetRS- ArgRS, MetRS- GlnRS) αλληλεπιδράσεις. Οι αμινοτελικές προσαρτημένες περιοχές των ενζύμων MetRS και GluRS είναι, επίσης, υπεύθυνες για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενζύμων και του παράγοντα Arc1p στο σύμπλοκο που απομονώθηκε από την ζύμη(28). Για την διερεύνηση της υπόθεσης ότι η MetRS από το *D.radiodurans* έχει επιπλέον καρβοξυτελικές αλληλουχίες προσαρτημένες στον καταλυτικό πυρήνα της, όπως συμβαίνει στα περισσότερα βακτήρια, έγινε πολλαπλή ομοπαράθεση των αμινοξικών ακολουθιών από διάφορους οργανισμούς με το πρόγραμμα ClustalW (εικ.29). Το αποτέλεσμα της ομοπαράθεσης υποδεικνύει ότι η MetRS από το *D.radiodurans* έχει μια μικρή προσαρτημένη περιοχή στο αμινοτελικό άκρο της. Η περιοχή αυτή εκτείνεται κατά 14 αμινοξέα σε σύγκριση με το συγγενικό του

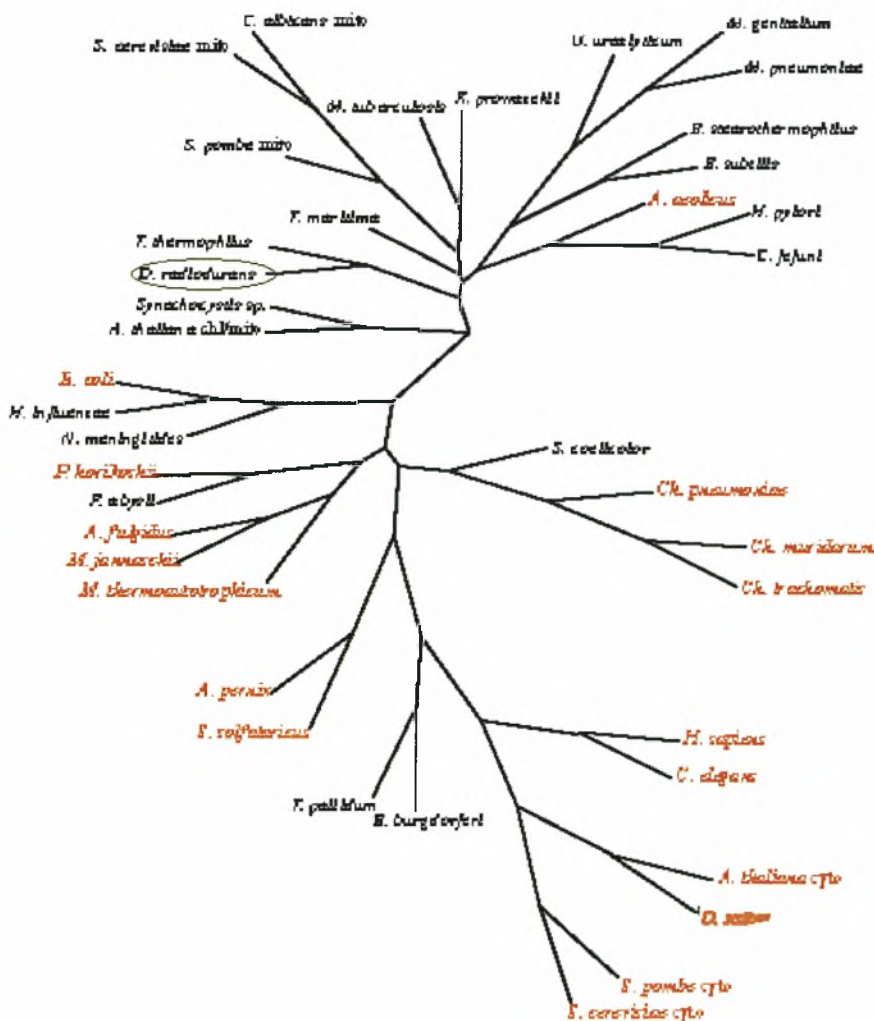
CLUSTAL X (1.81) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT



Εικόνα 29 Η ομοιοπαράθεση των αμινοξικών αλληλοαλληλουχιών της MetRS από τους οργανισμούς *T. thermophilus*, *D. radiodurans*, *B. subtilis*, *E. coli*, *M. jamaicensis*, *M. thermotrophicum*, *S. cerevisiae*

*D. radiodurans* βακτήριο, *T. thermophilus*, και είναι κατά πολύ μικρότερη από την επιπλέον αμινοτελική περιοχή που έχει βρεθεί στην ζύμη *S. cerevisiae*. Η επιπλέον αμινοτελική περιοχή της MetRS από το *D. radiodurans* μπορεί να συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες στο βακτήριο, μια υπόθεση που θα εξεταστεί στην συνέχεια των δρομολογημένων μελετών.

Μελέτες χημικής διασταύρωσης που πραγματοποιήθηκαν στα σύμπλοκα των συνθετασών που απομονώθηκαν από τα Μετάζωα, έδειξαν ότι μερικές συνθετάσες βρίσκονται σε στενή εγγύτητα στα σύμπλοκα, όπως η MetRS και η AspRS, αλλά δεν αλληλεπιδρούν μέσω του αμινο- και καρβοξυ-τελικού άκρου. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι και επιπρόσθετες επαφές, περιλαμβάνοντας τον πυρήνα του ενζύμου, είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών. Ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών που έχουν καταχωρηθεί στην EMBL/GenBank, κατέληξε στην αναγνώριση ενός τριπεπτιδίου, του Arg-Gly-Asp(RGD), στις 17 από τις 40 πρωτοταγείς δομές (εικ.30). Αυτό το μοτίβο είναι χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στα γεγονότα της κυτταρικής προσκόλλησης. Από τα παραπάνω προκύπτει η ερώτηση αν το πεπτίδιο RGD



**Εικόνα 30.** Το φυλογενετικό δένδρο των αλληλουχιών της MetRS. Τα ένζυμα που περιέχουν το τριπεπτίδιο RGD φαίνονται με κόκκινο. Με πράσινο κυκλώνεται η θέση της MetRS από το βακτήριο *Deinococcus radiodurans*.

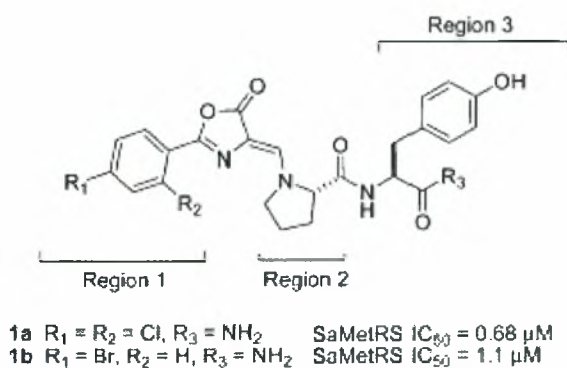
των MetRSs, κυρίως ευκαρυωτικής και αρχαιοβακτηριακής προέλευσης, μπορεί να συσχετιστεί με αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης- πρωτεΐνης, οι οποίες, για παράδειγμα θα μπορούσαν να χωροθετήσουν το ένζυμο σε κάποιο συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα ή να το συνδέσουν με ένα άλλο πεπτίδιο που θα βοηθάει την λειτουργία της MetRS ή θα είναι μέλος κάποιου πολυενζυμικού συμπλόκου. Φυσικά, τέτοιες ερωτήσεις χρειάζονται περαιτέρω έρευνα για να απαντηθούν. Στο φυλογενετικό δένδρο φαίνεται ότι η MetRS από το *Deinococcus radiodurans* δεν περιέχει το πεπτίδιο RGD και οπότε αν σχηματίζει σύμπλοκα οι αλληλεπιδράσεις θα βασίζονται κυρίως στην επιπλέον αμινοτελική περιοχή.

Η λειτουργία των πολυενζυμικών συμπλόκων δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη. Ένας πιθανός λόγος που σχηματίζονται σύμπλοκα είναι η διοχέτευση (channeling) των προϊόντων σε αντιδράσεις που ακολουθεί η μία την άλλη. Οι υπερμοριακές συγκροτήσεις των AARSs και των παραγόντων επιμήκυνσης αποτελούν μια δομική απόδειξη της υποκυττάριας οργάνωσης του μηχανισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης. Επιπλέον, η ύπαρξη ενός διοχετεύμενου κύκλου των tRNA κατά την πρωτεϊνοσύνθεση στα θηλαστικά, παρέχει τις λειτουργικές αποδείξεις για την κυτταρική διαμερισματοποίηση της μετάφρασης. Σύμφωνα με το μοντέλο διοχέτευσης, τα αμινοάκυλο-tRNA μεταφέρονται από τις AARSs στα ριβοσώματα σαν τριμερή σύμπλοκα EF-1a-GTP-aatRNA. Η μορφή του EF-1a με GDP μπορεί να εμπλέκεται στην πρόσδεση των απακυλιωμένων tRNA στην έξοδο από τα ριβοσώματα και στην μεταφορά τους στις AARSs. Παρόλα αυτά η ομαδοποίηση διαφορετικών AARSs μέσα σε ένα σύμπλοκο μπορεί να μην έχει θετικό αποτέλεσμα στην ροή των tRNAs. Η μακρομοριακή συγκρότηση μπορεί να εμποδίζει στερεοειδικά την επαρκή κίνηση των μεγάλων tRNA. Εναλλακτικές υποθέσεις του λόγου συγκρότησης συμπλόκων είναι η συμμετοχή τους στην υποκυτταρική χωροθέτηση των AARSs και ο έλεγχος του ρυθμού μετατροπής των κυτταρικών συστατικών. Τέλος, ο σχηματισμός των συμπλόκων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των μη κανονικών λειτουργιών των συστατικών τους.

Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες, όπως έχει αναφερθεί, είναι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες. Εκτός από την αμινοακυλίωση των tRNAs παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της μεταφραστικής πιστότητας, στην επεξεργασία και κυτταρική μεταφορά του RNA, στην απόπτωση, στην σύνθεση μορίων σηματοδότησης και στην μεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση. Η MetRS συμμετέχει στην διατήρηση της μεταφραστικής πιστότητας μέσω της διόρθωσης της ομοκυστεΐνης, ενός αμινοξέος που δεν συμμετέχει στην πρωτεϊνοσύνθεση, το οποίο είναι πρόδρομος της μεθειονίνης. Λόγω της δομικής της ομοιότητας με την μεθειονίνη, η ομοκυστεΐνη μπορεί να εισέλθει στο πρώτο βήμα της πρωτεϊνοσύνθεσης και να ενεργοποιηθεί σχηματίζοντας ομοκυστεΐνιλο-αδενυλικό προσδεμένο στην MetRS, το οποίο δεν μεταφέρεται στο tRNA αλλά αποβάλλεται σε μια ενδομοριακή αντίδραση μετατροπής οδηγώντας στην παραγωγή θειολακτόνης ομοκυστεΐνης. Επίσης, η MetRS έχει βρεθεί ειδικά στον πυρηνίσκο των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Η MetRS μετατοπίστηκε στον πυρηνίσκο κάτω από

μιτωτικά σήματα που επάγονται από διαφορετικούς αυξητικούς παράγοντες. Ο πυρηνίσκος είναι το μέρος του πυρήνα όπου συμβαίνει η βιογένεση των rRNA. Έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία της MetRS στον πυρηνίσκο εξαρτάται από την ακεραιότητα του rRNA και την δραστικότητα της RNA πολυμεράσης I. Ανοσολογικά τεστ έχουν επιβεβαιώσει ότι η MetRS είναι απαραίτητη για την πυρηνική σύνθεση του rRNA. Κατά επέκταση η MetRS μπορεί να είναι μέρος ενός κυτταρικού συστήματος που συντονίζει την βιογένεση του ριβοσώματος και της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Η μελέτη της δομής της MetRS σε διάφορα βακτήρια και η σύγκρισή της με την δομή της ανθρώπινης MetRS μπορεί να φέρει στην επιφάνεια διαφορές μεταξύ των δομών των ενζύμων, οι οποίες θα είναι ιδανικός στόχος για την ανάπτυξη αντιβιοτικών. Οι AARSs είναι απαραίτητα ένζυμα που είναι παρόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Η αναστολή των AARSs στους παθογόνους μικροοργανισμούς καταλήγει στην εξάντληση των φορτωμένων με αμινοξέα tRNA και οδηγεί στην διακοπή της πρωτεϊνοσύνθεσης και της κυτταρικής ανάπτυξης. Εξαιτίας του ρόλου τους στην μετάφραση, οι AARSs έχουν αναγνωριστεί σαν υποσχόμενος στόχος για την ανάπτυξη μιας νέας γενιάς αντιβιοτικών με υψηλή επιλεκτικότητα και ειδικότητα. Η μουπιροσίνη (muribacillin) είναι ένα ενθαρρυντικό παράδειγμα, καθώς αναστέλλει την βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση μέσω επιλεκτικής αναστολής της συνθετάσης της ισολευκίνης και παρουσιάζει εξαιρετική επιλεκτικότητα για την προκαρυωτική tRNA-συνθετάση της ισολευκίνης. Η μοριακή σχεδίαση με υπολογιστές είναι μια καλή βάση για την ανάπτυξη αναστολέων χρησιμοποιώντας τις διαφορές μεταξύ των ανθρώπινων και βακτηριακών συνθετασών. Μια πρόσφατη έρευνα αναγνώρισε δύο διπεπτίδια οξαζολόνης (oxazolone dipeptides) σαν μικρομοριακούς αναστολείς της MetRS από το *Staphylococcus aureus* (SaMetRS) (εικ.31)(32). Τα διπεπτίδια είναι επιλεκτικά για την SaMetRS έναντι της ανθρώπινης MetRS. Έτσι, αυτά τα καινούργια χαμηλού μοριακού βάρους ευρήματα αντιπροσωπεύουν μια υποσχόμενη αρχή για την επέκταση της έρευνας των σχέσεων μεταξύ δομής και δραστηριότητας.



**Εικόνα 31** Τα αποτελέσματα διαλογής από μια βιβλιοθήκη μικρών μορίων για την εύρεση πιθανών αναστολέων της MetRS. Στην περίπτωση του 1a η επιλεκτικότητα για την SaMetRS ξεπερνούσε τις 100 φορές.

Από το συνεχώς αναπτυσσόμενο σώμα πληροφοριών που αφορούν την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της μεθειονίνης προκύπτει μια ενδιαφέρουσα εικόνα, η οποία παρουσιάζει το γεγονός ότι το ένζυμο μπορεί να διαφέρει δομικά όχι μόνο ανάλογα με τις λειτουργίες του αλλά και με την κυτταρική του οργάνωση. Αυτό το τελευταίο σημείο χρειάζεται περαιτέρω εξερεύνηση, ειδικά στην περίπτωση των βακτηριακών ενζύμων. Λαμβάνοντας υπόψη την συμμετοχή πολλών AARSs σε διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια, πέρα της πρωτεϊνοσύνθεσης, κανείς μπορεί να περιμένει καινούργια ευρήματα που να αναδεικνύουν ένα πολύπλοκο δίκτυο σχέσεων μεταξύ των συνθετασών και άλλων συστατικών του κυττάρου.

Η απομόνωση του παράγοντα EF-Tu δίνει νέα ώθηση στην μελέτη των συστημάτων αμινοακυλίωσης. Ο βακτηριακός παράγοντας επιμήκυνσης Tu αλληλεπιδρά με μια ποικιλία από αμινοάκυλο-tRNAs. Έχει αποδειχθεί ότι ο EF-Tu του *T.thermophilus* απαιτεί μόνο 10 ζεύγη βάσεων από την θηλιά αμινοακυλίωσης και το CCA άκρο για την σταθερή πρόσδεση του αμινοάκυλο-tRNA. Με την προϋπόθεση ότι αυτή η συνθήκη εκπληρώνεται, τα αμινοάκυλο-tRNAs από διάφορες πηγές μπορούν να καθαριστούν με χρωματογραφία συγγένειας. Η στήλη συγγένειας Ni<sup>2+</sup>-EF-Tu(CHis) που μπορεί να παρασκευαστεί από τον απομονωμένο EF-Tu είναι πολύ σταθερή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολλές φορές. Αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη για την ανάλυση της κατάστασης αμινοακυλίωσης των tRNAs που απομονώθηκαν. Επιπλέον, μπορούν να παρασκευαστούν μίγματα tRNA που να στερούνται κάποια ομάδα ειδική για ένα αμινοξύ. Τέτοια παρασκευάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη του μηχανισμού μετάφρασης.



## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Croppand T. A. and Schultz P.G. (2004). An expanding genetic code. *Trends Gen.*, 20
- 2) Kim S., Lee S.W., Choi E.-C., Choi S.Y. (2003). Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61:278–288
- 3) Prætorius-Ibba M. and Ibba M. (2003). Aminoacyl-tRNA synthesis in archaea: different but not unique. *Mol. Microbiol.*, 48(3): 631–637
- 4) De Pouplana L.R and Schimmel P. (2001). Aminoacyl-tRNA synthetases: potential markers of genetic code development. *Trends Biochem. Sci.*, 26
- 5) Ibba M., Stathopoulos C. and Söll D. (2001). Protein synthesis: Twenty three amino acids and counting. *Current Biology*, 11:R563–R565
- 6) Ibba M., Becker H.D, Stathopoulos C., Tumbula D.L and Söll D. (2000). The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.*, 25: 311
- 7) Schimmel P. and de Pouplana L.R. (2000). Footprints of aminoacyl- tRNA synthetases are everywhere. *Tibs*, 25
- 8) Beuning P. J. and Musier-Forsyth K. (2000). Transfer RNA recognition by aminoacyl- tRNA synthetases. *Biopolymers (Nucleic Acid Sciences)*, 52:1–28
- 9) Ruan B., Ahel I., Ambrogelly A., Becker H.D., Bunjun S., Feng L., Tumbula-Hansen D., Ibba M., Korencic D., Kobayashi H., Jacquin-Becker C., Mejlhede N., Min B., Racznik G., Rinehart J., Stathopoulos C., Li T and Söll D. (2001). Genomics and the evolution of aminoacyl-tRNA synthesis. *Acta Biochem. Polon.*, 48:313-321
- 10) Sankaranarayanan R. and Moras D. (2001). The fidelity of the translation of the genetic code. *Acta Biochem. Polon.*, 48:323-335
- 11) Szymański M., Denziak M. and Barciszewski J. (2000). The new aspects of aminoacyl-tRNA synthetases. *Acta Biochem. Polon.*, 44: 821-834
- 12) Francklyn C., Perona J. J., Puetz J. and Hou Y.-M. (2002). Aminoacyl-tRNA synthetases: Versatile players in the changing theater of translation. *RNA Society*, 8:1363–1372
- 13) . Lee S. W, Cho B. H., Park S. G. and Kim S. (2004). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. *J. Cell Sci.*, 117:3725-3734
- 14) Woese C. R., Olsen G. J, Ibba M. and Soll D. (2000). Aminoacyl-tRNA Synthetases, the Genetic Code, and the Evolutionary Process. *Micobiol. and Mol. Biol.Reviews*, 64:202-236

- 15) P. O'Donoghue and Z. Luthey-Schulten (2003). On the Evolution of Structure in Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Micobiol. and Mol. Biol.Reviews*,67:550-573.
- 16) B. S. Laursen, H. P. Sorensen, K. K.Mortensen and H. U. Sperling-Petersen (2005). Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. *Micobiol. and Mol. Biol.Reviews*,69:101-123.
- 17) Y. Mechulam, E. Schmitt<sup>1</sup>, L. Maveyraud,C. Zelwer, O. Nureki, S. Yokoyama, M. Konno and S. Blanquet (1999). Crystal Structure of Escherichia coli Methionyl-tRNA Synthetase Highlights Species-specific Features. *J. Mol. Biol.*, 294: 1287-1297.
- 18) M. A. Denziak and J. Barciszewski (2001). Methionyl-tRNA synthetase. *Acta Biochem. Pol.*,48:337-350.
- 19) D. Datta, N. Vaidehi, D. Zhang and W.A. Goddard (2004). Selectivity and specificity of substrate binding in methionyl-tRNA synthetase. *Protein Science*, 13:2693–2705.
- 20) M. Kaminska, M. Denziak, P. Kerjan, J. Barciszowski, M. Mirande (1999). A recurrent general RNA binding domain appended to plant methionyl tRNA synthetase acts as a cis-acting cofactor for aminoacylation. *EMBO J.*,19:6908-6917.
- 21) D. Kohda, S. Yokoyama and T. Miyazawa (1987). Functions of Isolated Domains of Methionyl-tRNA Synthetase from an Extreme Thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biol. Chem.*,262:558-563.
- 22) O. Nureki, T. Muramatsu, K. Suzuki, D. Kohda, H. Matsuzawall, T. Ohtall, T. Miyazawall and S. Yokoyama (1991). *J. Biol. Chem.*,200:3268-3277.
- 23) T. Crepin, E. Schmitt, S. Blanquet and Y. Mechulam (2004). Three-Dimensional Structure of Methionyl-tRNA Synthetase from *Pyrococcus abyssi*. *Biochemistry*, 43:2635-2644.
- 24) S. Kima, Y. J. Joa, S. H. Lee, H. Motegib, K. Shibab,M. Sassanfar, S. A. Martinis (1998). Biochemical and phylogenetic analyses of methionyl-tRNA synthetase isolated from a pathogenic microorganism, *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS*, 427: 259-262.
- 25) T. Crepin, E. Schmitt, S. Blanquet and Y. Mechulam (2002). Structure and Function of the C-Terminal Domain of Methionyl-tRNA Synthetase. *Biochemistry*, 41: 13003-13011.
- 26) M. Kaminska, V. Shalak and M. Mirande (2001). The Appended C-Domain of Human Methionyl-tRNA Synthetase Has a tRNA-Sequestering Function. *Biochemistry*, 40: 14309-14316.
- 27) Wakasugi, K. & Schimmel, P. (1999) Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science*, 284:147–150.

- 28) K. Galani, H. Grosshans, K. Deinert, E. C. Hurt, E. Simos (2001). The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p. *EMBO J.*,20:6889-6898.
- 29) H. S. Kim, U. Hoja, J. Stolz, G. Sauer and E. Schweizer (2004). Identification of the tRNA-binding Protein Arc1p as a Novel Target of in Vivo Biotinylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*,279: 42445-42452.
- 30) M.-P. Golinelli-Cohen, A. Zakrzewska and M. Mirande (2004). Complementation of Yeast Arc1p by the p43 Component of the Human Multisynthetase Complex does not Require its Association with Yeast MetRS and GluRS. *J. Mol. Biol.*,340: 15–27.
- 31) G. Simos, A. Segref, F. Fasiolo, K. Hellmuth, A. Shevchenko, M. Mann and E. C. Hurt (1996). The yeast protein Arcip binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J.*,15:5437-5448.
- 32) M. Tandon, D. L. Coffen, P. Gallant, D. Keithb and M. A. Ashwella (2004). Potent and selective inhibitors of bacterial methionyl tRNA synthetase derived from an oxazolone–dipeptide scaffold. *Bioorg. & Med. Chem.*,14:1909–1911.
- 33) B. Senger, L. Despons, P. Walter H. Jakubowski and F. Fasiolo (2001). Yeast Cytoplasmic and Mitochondrial Methionyl-tRNA Synthetases: Two Structural Frameworks for Identical Functions. *J. Mol. Biol.*, 311: 205-216.
- 34) E. Schmitt, M. Panvert, S. Blanquet and Y. Mechulam (1995). Transition state stabilization by the 'high' motif of class I aminoacyl-tRNA synthetases: the case of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Research*,23: 4793-4798.
- 35) R. Aphasizhev, B. Senger, F. Fasiolo (1997). Importance of structural features for tRNA<sup>Met</sup> identity. *RNA Soc.*,3: 489-497.
- 36) O. Kellermann, H. Tonetti, A. Brevet, M. Mirande, J.-P. Pailliez and J.-P. Waller (1982). Macromolecular Complexes from Sheep and Rabbit Containing Seven Aminoacyl-tRNA Synthetases. *J. Biol. Chem.*,258: 11041-11048.
- 37) L.D. H.Schulman, H. Pelka and O. Leon (1987). Peptides at the tRNA binding site of the crystallizable monomeric form of *E.coli* methionyl-tRNA synthetase. *Nucl. Ac. Res.*,15
- 38) K. S. Makarova, L. Aravind, Y. Wolf, R. Tatusov, K. W. Minton, E. V. Koonin and M. J. Daly (2001). Genome of the Extremely Radiation-Resistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* Viewed from the Perspective of Comparative Genomics. *Micobiol. and Mol. Biol.Reviews*,65: 44-79.
- 39) Y. Mechulam, E. Schmitt, M. Panvert, J.-M. Schmitter, M. Lapadat-Tapolsky, T. Meinnel, P. Dessen, S. Blanquet and G. Fayatt (1991). Methionyl-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus*: structural and functional identities with the *Escherichia coli* enzyme. *Nucl. Ac. Res.*, 19: 3673-3681.

- 40) J. P. Abrahams, B. Kraal, B. F.C. Clark and L. Bosch (1991). Isolation and stability of ternary complexes of elongation factor Tu, GTP and aminoacyl-tRNA. Nucl. Ac. Res.,19: 553.
- 41) M. V. Rodnina, R. Fricke, L. Kuhn and W. Wintermeyer (1995). Codon-dependent conformational change of elongation factor Tu preceding GTP hydrolysis on the ribosome. EMBO J., 14: 2613-2619.
- 42) L. Seidler, M. Peter, F. Meissner and M. Sprinzl (1987). Sequence and identification of the nucleotide binding site for the elongation factor Tu from *Thermus thermophilus* HB8. Nucl. Ac. Res., 15.
- 43) T.F.M. Cour, J.Nyborg, S.Thirup and B.F.C.Clark (1985). Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography. EMBO J., 4: 2385-2388.
- 44) K. Harmark, PH. Anborgh, M. Merola, B. Clark, A. Parmeggiani (1992). Substitution of aspartic acid-80, a residue involved in coordination of magnesium, weakens the GTP binding and strongly enhances the GTPase of the G domain of elongation factor Tu. Biochemistry,31:7367-7372.
- 45) H. Stark, M. V. Rodnina, J. Rinke-Appel, R. Brimacombe, W. Wintermeyer and M. van Heel (1997). Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome. Nature,389: 403-406.
- 46) H. Asahara and O. C. Uhlenbeck (2002). The tRNA Specificity of *Thermus thermophilus* EF-Tu. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:3499-3504
- 47) S. Ribeiro, S. Nock, M. Sprinzl (1995). Purification of Amonoacyl-tRNA by affinity chromatography on immobilized *Thermys thermophilus* EF-Tu·GTP. Anal. Biochem.,228: 330-335.
- 48) J. Blank, N. W. Grillenbeck, R. Kreutzer and M. Spritzl (1995). Overexpression and purification of *Thermus thermophilus* Elongation Factors G, Tu and Ts from *Escherichia coli*. Prot. Expr. and Purif.,6: 637-645.
- 49) R. Leberman, B. Antonsson, R. Giovanelli, R. Guariguata, R.Schumann and A. Wittinghofer (1980). A simplified procedure for the isolation of bacterial polypeptide elongation factor EF-Tu. Anal. Biochem.,104: 29-36.