



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΝΕΣΗΣ ΕΠΙ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΤΟ ΜΕΤΑΦΟΡΙΚΟ RNA ΤΗΣ
ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΗΣ (tRNA^{Gln}) ΑΠΟ ΤΟ ΑΡΧΑΙΟ *Pyrococcus abyssi***

ΔΗΜΗΤΡΑ ΓΙΑΤΣΙΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4646/1
Ημερ. Εισ.: 1-11-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΓΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087870

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.

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

Μαρία Κοντού, Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ζήσης Μαμούρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	6
<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	8
1.1 Προσδιορισμός των στοιχείων ταυτότητας του μορίου tRNA	11
1.2 Ο ρόλος του αντικωδικονίου στην ταυτότητα του μορίου tRNA	12
1.3 Διαφορικά βασικά στοιχεία αναγνώρισης των μορίων tRNA	14
1.4 Στοιχεία ταυτότητας του tRNA ^{Gln}	16
1.5 Στοιχεία ταυτότητας του tRNA ^{Glu}	17
1.6 Αμινοακυλίωση του tRNA: δύο βιοχημικά μονοπάτια	18
1.7 Μηχανισμοί επιλογής υποστρωμάτων και μηχανισμοί επιδιόρθωσης	21
1.8 Το εναλλακτικό μονοπάτι αμινοακυλίωσης	24
1.9 Αμιδοτρανσφεράσες	25
1.10 Glu-tRNA ^{Gln} αμιδοτρανσφεράσες (GluAdTs)	27
<u>Σκοπός της εργασίας</u>	30
<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	31
2.1 Χημικά	32
2.2 Ένζυμα	32
2.3 Στελέχη κυττάρων <i>E.coli</i>	33
2.4 Θρεπτικά μέσα	33
2.5 Πλασμιακοί φορείς	34
2.6 Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers)	35
2.7 Εκκινητές (primers) ή Προμοδότες	36
<u>2.8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ</u>	37
2.8.1 Προετοιμασία εκκινητών	37
2.8.2 Φωσφορυλίωση και υβριδοποίηση εκκινητών	37
<u>2.9 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ</u>	38
<u>ΟΞΕΩΝ</u>	
2.9.1 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων	38
2.9.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο	38
2.9.3 Απομόνωση πλασμιατικού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)	39
2.9.4 Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού	39
2.9.5 Ηλεκτροφόρηση	40
2.9.6 Ανίχνευση και ταυτοποίηση κλωνοποιημένων γονιδίων στους πλασμιατικούς φορείς	40
2.9.7 Αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του DNA και σύνδεση τμημάτων DNA	41
2.9.8 <i>In vitro</i> μεταγραφή	41

<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	43
3.1 Κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν το tRNA της γλουταμίνης (αγρίου τύπου & μεταλλαγμένων)	44
3.2 Μεταγραφή των κλωνοποιημένων γονιδίων	49
<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	51
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

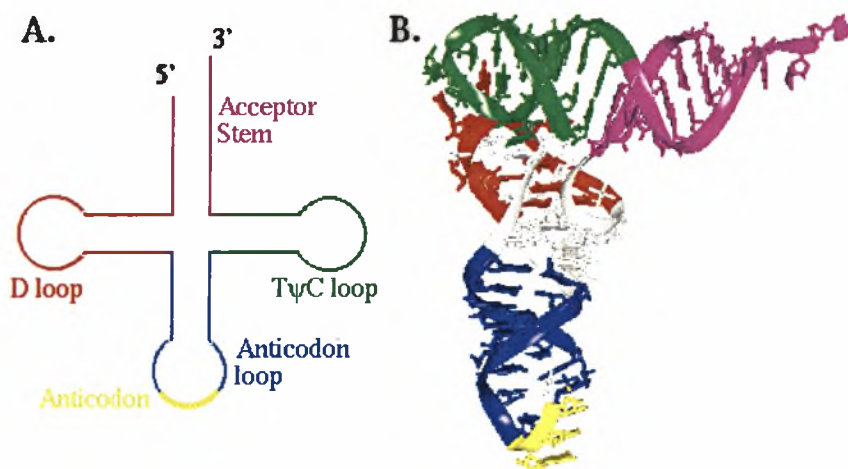
Το μεταφορικό RNA (tRNA) είναι το μόριο το οποίο παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο κατά της μετάφραση της γενετικής πληροφορίας. Το γεγονός ότι όλα τα μόρια tRNA έχουν παρόμοια δευτεροταγή και τριτοταγή δομή εξυπηρετεί την διαδικασία εναλλαγής τους κατά την πρωτεϊνική σύνθεση στο ριβόσωμα. Η παρόμοια δομή των μορίων tRNA, έδωσε το έναυσμα για την ανίχνευση συγκεκριμένων στοιχείων για το καθένα από αυτά, τα οποία διευκολύνουν την αναγνώρισή του από την αντίστοιχη αμινοακυλο-tRNA συνθετάση, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η ακρίβεια με την οποία γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Αυτά τα στοιχεία αποτελούν την ταυτότητα του tRNA. Στην παρούσα μελέτη κλωνοποιήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί το μεταφορικό RNA της γλουταμίνης (tRNA^{Gln}) από το αρχαίο *Pyrococcus abyssi*. Παράλληλα και μετά από γονιδιωματική ανάλυση δημιουργήθηκαν μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου οι οποίες επηρεάζουν την ταυτότητα του tRNA^{Gln}. Τα μόρια tRNA που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια αποτελούν υποστρώματα για τις tRNA-εξαρτώμενες αμιδοτρανσφεράσες. Τα ένζυμα αυτά απαντώνται κυρίως σε βακτήρια και αρχαία και είναι υπεύθυνα για το εναλλακτικό μονοπάτι αμινοακυλίωσης των αμινοξέων γλουταμίνη και ασπαραγίνη και την τελική ενσωμάτωσή τους στις πρωτεΐνες των οργανισμών αυτών. Τέλος έγινε *in vitro* μεταγραφή των υπό μελέτη γονιδίων με αποτέλεσμα την παραγωγή κατάλληλων υποστρωμάτων για βιοχημικές μελέτες.

ABSTRACT

Transfer RNA (tRNA) plays a crucial role in the translation of genetic information. The fact that all tRNAs have similar secondary and tertiary structures helps them to function interchangeably on the ribosome during protein synthesis. The same structure of tRNAs gave the spark off finding distinct elements for its of these molecules that mediate correct recognition by the aminoacyl-tRNA synthases (AARs) and ensure the fidelity of protein synthesis. These elements comprise the identity of a tRNA. In this study, we subcloned the genes that encode the tRNA^{Gln} of *Pyrococcus abyssi*. Simultaneously and after genes analysis, we created mutations in distinct areas of the gene that affect the identity of tRNA^{Gln}. The molecules that are encoded by these genes are the substrates for the tRNA-dependent amidotransferases. These enzymes are founded in bacteria and archea and are responsible for the alternative pathway of aminoacylation of the aminoacids glutamine and asparagine and their embodiment in the proteins of these organisms. Finally, we accomplished *in vitro* transcription of these genes and thus production of appropriate substrates for biochemical studies.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

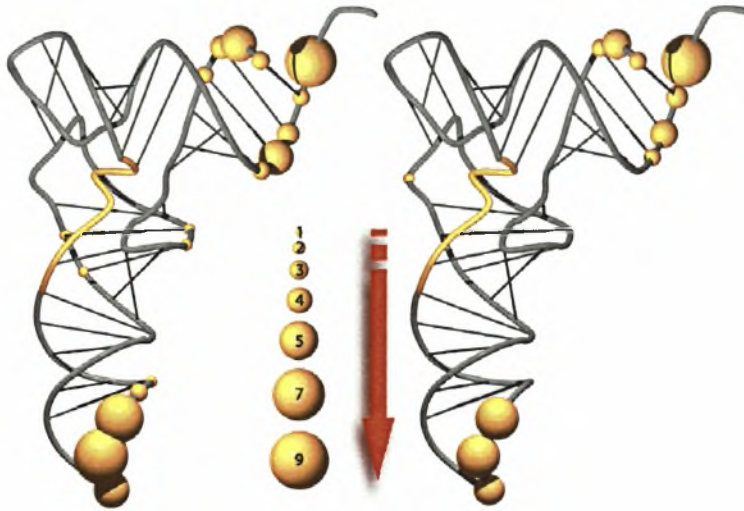
Το μεταφορικό RNA (tRNA) είναι το μόριο το οποίο παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο κατά της μετάφραση της γενετικής πληροφορίας^{1,2}. Κάθε κωδικόνιο αναγνωρίζεται από ένα μοναδικό μόριο tRNA το οποίο έχει προηγουμένως φορτιστεί με το κατάλληλο αμινοξύ. Η σωστή πρόσδεση κάθε αμινοξέος στο αντίστοιχο μόριο tRNA καταλύεται από τις αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες (AARSs) και αποτελεί μία πολύ εξειδικευμένη διαδικασία κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνσύνθεσης^{3,4,5}. Η σωστή αμινοακυλίωση καθορίζεται από το είδος των στοιχείων αναγνώρισης του μορίου tRNA και από τον ανταγωνισμό μεταξύ των διαφορετικών συνθετασών⁶. Εξαιτίας του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα, υπάρχουν περισσότερα από ένα μόρια tRNA για κάθε αμινοξύ. Αντίθετα κάθε αμινοξύ αναγνωρίζεται από μία μόνο αμινοακυλο-tRNA συνθετάση. Μία αμινοακυλο-tRNA συνθετάση πρέπει να αναγνωρίζει και να ενεργοποιεί το συγγενές αμινοξύ της και στη συνέχεια να το συνδέει με το κατάλληλο μόριο tRNA. Το γεγονός ότι όλα τα μόρια tRNA έχουν παρόμοια δευτεροταγή και τριτοταγή δομή εξυπηρετεί την διαδικασία εναλλαγής τους κατά την πρωτεϊνική σύνθεση στο ριβόσωμα⁷ (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Δευτεροταγής (A) και τριτοταγής (B) δομή του tRNA.

Η παρόμοια δομή των μορίων tRNA, έδωσε το έναυσμα για την ανίχνευση συγκεκριμένων στοιχείων για το καθένα από αυτά, τα οποία διευκολύνουν την αναγνώρισή του από την αντίστοιχη αμινοακυλο-tRNA συνθετάση, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η ακρίβεια με την οποία γίνεται η πρωτεϊνσύνθεση (Εικόνα 2). Αυτά τα στοιχεία αποτελούν την ταυτότητα του tRNA και διακρίνονται σε προσδιοριστικά (**determinants**) και αντι-προσδιοριστικά (**anti-determinants**)^{8,9}. Τα προσδιοριστικά στοιχεία είναι αυτά που επιτρέπουν την αναγνώριση του

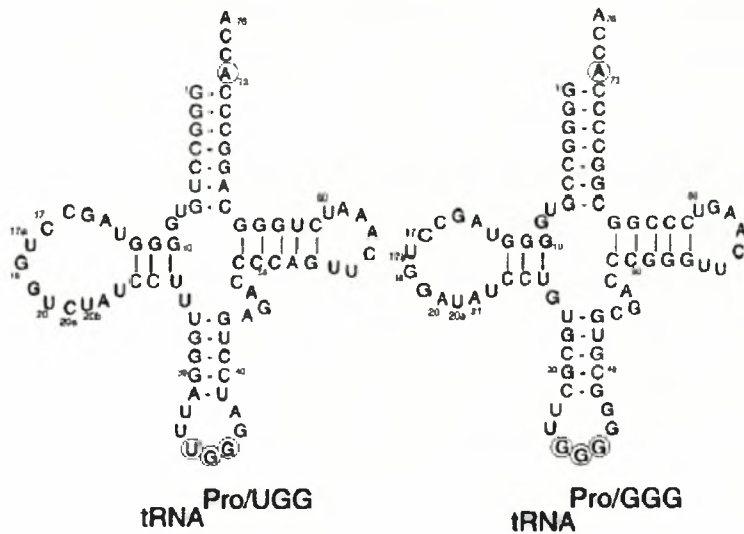
tRNA από την αντίστοιχη αμινοακυλο-tRNA συνθετάση, ενώ τα αντι-προσδιοριστικά είναι αυτά που παρεμποδίζουν την αναγνώριση από μία μη ειδική αμινοακυλο-tRNA συνθετάση.



Εικόνα 2: Στοιχεία της ταυτότητας του μορίου tRNA. Η ισχύς των στοιχείων αυξάνεται όσο αυξάνεται το μέγεθος της σφαίρας.

Εκτός από τα προσδιοριστικά και αντι-προσδιοριστικά στοιχεία έχει αναφερθεί και διαφορετική κατηγοριοποίηση η οποία συμπληρώνει την ταυτότητα του κάθε μορίου tRNA και περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

- **Ισχυρά στοιχεία (Major elements):** πρόκειται για στοιχεία τα οποία μετά από μετάλλαξη επιφέρουν ισχυρά λειτουργικά αποτελέσματα.
- **Ασθενή στοιχεία (Minor elements):** πρόκειται για στοιχεία τα οποία μετά από μετάλλαξη οδηγούν σε τροποποιητικά αποτελέσματα και σε ρυθμιζόμενη εξειδίκευση.
- **Επιτρεπτά στοιχεία (Permissive elements):** πρόκειται για μη τυχαίους συνδυασμούς αλληλουχιών οπουδήποτε μέσα στο μόριο του tRNA, οι οποίες δεν παρεμποδίζουν την αμινοακυλίωση. Συνήθως αναφέρονται σε αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν την τρισδιάστατη δομή.
- **Εναλλακτικά στοιχεία ταυτότητας:** ο όρος αναφέρεται στα καθοριστικά στοιχεία τα οποία εντοπίζονται σε όλα τα ισοδεκτικά μόρια tRNA (tRNA isoacceptors). Πρόκειται για μόρια tRNA διαφορετικής αλληλουχίας τα οποία μπορούν να εισάγουν το ίδιο αμινοξύ κατά την πρωτεϊνοσύνθεση (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Εναλλακτικά στοιχεία αναγνώρισης των ισοδεκτικών μορίων του tRNA^{Pro}.

1.1 Προσδιορισμός των στοιχείων ταυτότητας του μορίου tRNA

Στο παρελθόν έγιναν πολλές προσπάθειες από ερευνητές για να μελετηθεί η ταυτότητα των μορίων του tRNA. Οι προσπάθειες αυτές στηρίζονται σε δύο νέες τεχνικές οι οποίες θεωρούνται πιο αξιόπιστες εξαιτίας των εξελίξεων στην τεχνολογία της γονιδιακής σύνθεσης. Στην πρώτη τεχνική πραγματοποιούνται οι λιγότερες αλλαγές με σκοπό να τροποποιηθεί η ταυτότητα του μορίου tRNA, διατηρώντας όμως την πλήρη βιολογική του λειτουργία. Αυτές οι αλλαγές, που είναι υπεύθυνες για την αναθεώρηση της αναγνώρισης από τις αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες *in vivo*, συνιστούν τα στοιχεία της ταυτότητας του μορίου tRNA. Στη δεύτερη τεχνική γίνονται αλλαγές στην αλληλουχία ενός μορίου tRNA με αποτέλεσμα να προκύπτουν από αυτό διαφορετικά μόρια και μελετώνται *in vitro* οι ιδιότητες τους ως υποστρώματα για τις αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες. Αυτή η προσέγγιση διευκολύνεται από το γεγονός ότι είναι εύκολη η σύνθεση *in vitro* μορίων tRNA από την T7 RNA πολυμεράση.

Η πρώτη τεχνική στηρίζεται κυρίως στη μελέτη ενός "amber" κατασταλτικού μορίου tRNA. Πρόκειται για ένα μεταλλαγμένο μόριο tRNA το οποίο μπορεί και αναγνωρίζει και καταστέλλει τα κωδικόνια λήξης (UAG) της πρωτεϊνοσύνθεσης, ενσωματώνοντας κάποιο αμινοξύ στη θέση αυτή^{10,11}. Οι καταστολείς αυτοί διευκόλυναν τη μελέτη του μορίου tRNA, ενώ χρησιμοποιούνται ευρέως σε βακτήρια, βακτηριοφάγους και ζύμες. Η όλη τεχνική οδήγησε στην αποσαφήνιση της δευτεροταγής δομής του μορίου tRNA καθώς και σε πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό δράσης του¹².

Με τη δεύτερη τεχνική, πραγματοποιείται σύνθεση γονιδίων που κωδικοποιούν φυσιολογικά μόρια tRNA, καθώς και μεταλλάξεών τους. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές νουκλεοτιδίων στη θηλιά του αντικωδικίου του μορίου tRNA, στη θηλιά DHU ή ακόμη στα ζεύγη βάσεων κοντά στην περιοχή πρόσδεσης του αμινοξέος. Ακολούθως τα γονίδια τίθενται κάτω από τον έλεγχο του προαγωγέα της T7 πολυμεράσης έτσι ώστε το πρώτο νουκλεοτίδιο του *in vitro* μεταγράφου να είναι το 5' άκρο του ώριμου μορίου tRNA. Η μέθοδος της *in vitro* μεταγραφής των μορίων tRNA έδωσε μία διέξοδο στη μελέτη των στοιχείων ταυτότητας του μορίου tRNA καθώς βασίζεται σε *in vitro* δοκιμές και επιτρέπει τον εύκολο καθαρισμό των μεταγράφων. Μελέτη κάποιων μεταλλαγμένων μεταγράφων απέδειξε ότι δεν διαθέτουν τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά του αρχικού μορίου tRNA και γι' αυτό αποτελούν κατάλληλα υποστρώματα για τη μελέτη κάθε τροποποιητικού ενζύμου. Παράλληλα αποτελούν υποστρώματα για τη μελέτη των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών¹³.

1.2 Ο ρόλος του αντικωδικονίου στην ταυτότητα του μορίου tRNA

Το αντικωδικόνιο σχετίζεται άμεσα με την ταυτότητα του μορίου tRNA και γι' αυτό το λόγο παίζει έναν σημαντικό και καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του με τις συνθετάσες. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται σε πρόσφατες μελέτες που βασίζονται στο συνδυασμό χημικών τροποποιήσεων και αναλύσεων μεταλλαγμένων μορίων tRNA. Υπάρχουν διάφορα μόρια tRNA στα οποία το αντικωδικόνιο συμμετέχει στην αναγνώριση από τη συνθετάση, μεταξύ των οποίων είναι το tRNA^{Gly}, το tRNA^{Lys}, το tRNA^{Arg}, το tRNA^{Glu} και το tRNA^{Trp} του βακτηρίου *E. coli*¹⁴.

Ωστόσο υπάρχει και η αντίθετη άποψη που υποστηρίζει ότι το αντικωδικόνιο δεν αποτελεί σημαντικό στοιχείο αναγνώρισης και προέρχεται από παρατηρήσεις στις οποίες πραγματοποιούνται αλλαγές στο αντικωδικόνιο με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός "amber" κατασταλτικού μορίου, χωρίς όμως καμία επίδραση στην εξειδίκευση σχετικά με τα αμινοξέα σε τουλάχιστον 4 μόρια tRNA. Επιπλέον, μετάφραση των κωδικονίων της σερίνης, λευκίνης και της αργινίνης απαιτεί μία ομάδα μορίων tRNA με διαφορετικά νουκλεοτίδια στις 2 από τις 3 θέσεις για τη λευκίνη και την αργινίνη και στις 3 θέσεις για την σερίνη. Η πληροφορία αυτή επιβεβαιώνει το γεγονός ότι διαφορετικά αντικωδικόνια κωδικοποιούν για το ίδιο αμινοξύ, ανεξάρτητα από τη διαφορά που παρουσιάζουν στην τριπλέτα των βάσεων.

Παρόλα αυτά είναι προφανές ότι το αντικωδικόνιο αποτελεί στοιχείο αναγνώρισης για την πλειοψηφία των μορίων tRNA. Η πιο ισχυρή απόδειξη για τον ισχυρισμό αυτό προήλθε από πειράματα στο *E. coli* σχετικά με το tRNA^{Met}. Τα πειράματα αυτά κατέληξαν στη διαπίστωση ότι το αντικωδικόνιο CAU είναι σημαντικό για την αναγνώριση του tRNA^{Met} από τη MetRS.

Χημικές τροποποιήσεις που έγιναν στα νουκλεοτίδια C₃₄ και A₃₅ οδηγούν σε απώλεια της ικανότητας πρόσδεσης της μεθειονίνης στο συγγενές μόριο tRNA¹⁵. Επίσης πειράματα στα οποία το νουκλεοτίδιο C₃₄ αντικαταστάθηκε από U, A ή G οδήγησαν σε μείωση του ρυθμού αμινοακυλίωσης. Μείωση παρατηρείται επίσης και από αλλαγές του αντικωδικονίου στις θέσεις A₃₅ και U₃₆. Αντικαταστάσεις σε οποιαδήποτε θέση του αντικωδικονίου με νουκλεοτίδια που διαθέτουν παρόμοιες λειτουργικές ομάδες με τα νουκλεοτίδια στα μόρια αγρίου τύπου είναι πιο ανεκτές σε σχέση με νουκλεοτίδια που δεν φέρουν αυτές τις ομάδες. Το συμπέρασμα που προκύπτει αναφέρεται στο γεγονός ότι η συνθετάση πρέπει να αλληλεπιδρά με εξειδικευμένες λειτουργικές ομάδες στο μόριο του tRNA.

Πρόσφατα πραγματοποιήθηκαν και άλλες μελέτες με τις οποίες προτείνεται ότι το αντικωδικόνιο αποτελεί μέγιστο στοιχείο αναγνώρισης. Πιο συγκεκριμένα συντέθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν το tRNA^{Trp} και το tRNA^{Val} στο βακτήριο *E. coli*, τα οποία διαθέτουν όμως το αντικωδικόνιο CAU της μεθειονίνης. Τα γονίδια αυτά στη συνέχεια μεταγράφηκαν *in vitro* και μελετήθηκε η κινητική αμινοακυλίωσής τους από την MetRS και την ValRS. Παρατηρήθηκε ότι το tRNA^{Val} αμινοακυλιώνεται από την MetRS με μία τιμή V_{max}/K_m παρόμοια με αυτή του φυσιολογικού tRNA^{Met}, ενώ το tRNA^{Trp} με μία τιμή μικρότερη κατά 10 φορές. Αντίστροφα, το tRNA^{Met} με το αντικωδικόνιο της βαλίνης (UAC) αμινοακυλιώνεται από την ValRS με μία τιμή V_{max}/K_m που αντιστοιχεί στο 1/10 αυτής του φυσιολογικού tRNA^{Val}. Επίσης η τιμή αμινοακυλίωσης του tRNA^{Met} από την ValRS είναι 4 φορές μικρότερη από αυτήν του tRNA^{Val}. Από τα αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι το αντικωδικόνιο είναι το κυριότερο, εάν όχι το μοναδικό στοιχείο αναγνώρισης για το tRNA^{Met}, ενώ είναι εξίσου σημαντικό και για την ταυτότητα του tRNA^{Val}.

Ανάλογη περίπτωση με το tRNA^{Met} στο *E. coli* όπου το αντικωδικόνιο θεωρείται το βασικό στοιχείο της ταυτότητάς του, αποτελεί και το tRNA^{Phe} στο μύκητα *S. cerevisiae*. Από πειράματα διαπιστώθηκε ότι απομάκρυνση του αντικωδικονίου οδήγησε σε ένα μόριο tRNA το οποίο αμινοακυλιώνεται από την PheRS σε ποσοστό 20% σε σχέση με το tRNA αγρίου τύπου. Μέσα από τεχνικές ανασυνδυασμού διαπιστώθηκε ότι οποιαδήποτε αντικατάσταση στο αντικωδικόνιο του tRNA^{Phe} παρεμποδίζει την αμινοακυλίωσή του, καθώς παρατηρήθηκε μείωση της τιμής k_{cat}/k_m κατά 3 έως 10 φορές. Επιπλέον, κατά τη μεταφορά του αντικωδικονίου της φαινυλαλανίνης στο tRNA^{Tyr}, η αμινοακυλίωση πραγματοποιήθηκε από την PheRS, αλλά σε μικρό βαθμό γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία αναγνώρισης του tRNA^{Phe} και εκτός του αντικωδικονίου. Για να διαπιστωθεί ποια είναι αυτά τα επιπλέον στοιχεία που αναφέρθηκαν, συντέθηκαν κάποια γονίδια με την εισαγωγή μεταλλάξεων σε συγκεκριμένη θέση και ακολούθησε η μεταγραφή τους με τη βοήθεια της T7 πολυμεράσης.

Τελικά προέκυψε μία ποικιλία μορίων με διάφορες αλλαγές στην αλληλουχία, οι οποίες ελέγχθηκαν για να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στην αναγνώριση του tRNA^{Phe} από την PheRS. Από τις μελέτες αυτές διαπιστώθηκε ότι αλλαγή στο ζεύγος των βάσεων στις θέσεις 19-56 από G-C σε C-G δεν επηρεάζει καθόλου της αμινοακυλίωση του tRNA^{Phe}. Επίσης αλλαγή στο ζευγάρι G₁-C₇₂ σε G-U ή A-U οδηγεί σε μείωση της τιμής k_{cat}/k_m κατά 4 ή 7 φορές αντίστοιχα, χωρίς αυτό όμως να ξεκαθαρίζει εάν το ζεύγος αυτό αποτελεί προσδιοριστικό στοιχείο του tRNA^{Phe} ή δομικό χαρακτηριστικό. Από την όλη μελέτη διαπιστώθηκε ότι 5 νουκλεοτίδια σε μονόκλωνες περιοχές αποτελούν τα στοιχεία αναγνώρισης από την PheRS. Πρόκειται για τις τρεις βάσεις, G₃₄, A₃₅ και A₃₆ του αντικωδικονίου, το νουκλεοτίδιο G₂₀ στη θηλιά D και το νουκλεοτίδιο A₇₃, που αποτελεί τη βάση διαλογέα. Καθένα από αυτά τα στοιχεία συμμετέχει ανεξάρτητα στην εξειδικευμένη αναγνώριση του tRNA^{Phe}, ενώ τα στοιχεία εντοπίζονται απομακρυσμένα το ένα από το άλλο στην τριτοταγή δομή του μορίου, υποδεικνύοντας ότι η PheRS έρχεται σε επαφή με όλη την επιφάνεια του μορίου tRNA. Γι' αυτό το λόγο ένα μόριο tRNA που διαθέτει 4 από τα 5 στοιχεία έχει μία τιμή k_{cat}/k_m κατά 1 φορά μικρότερη σε σχέση με αυτή του μορίου αγρίου τύπου, ενώ ένα μόριο που διαθέτει 3 στοιχεία έχει μία τιμή μικρότερη κατά 2 φορές.

1.3 Διαφορικά βασικά στοιχεία αναγνώρισης των μορίων tRNA

Η θηλιά του αντικωδικονίου αποτελεί σημαντικό στοιχείο της ταυτότητας των μορίων tRNA, αφού όπως αναφέρθηκε είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση και την αναγνώριση από την αντίστοιχη αμινοακυλο-tRNA συνθετάση. Υπάρχουν όμως και άλλα στοιχεία στο μόριο tRNA τα οποία θεωρούνται εξίσου σημαντικά και τα οποία μπορεί να είναι ζευγάρια βάσεων σε έλικες ή μη τροποποιημένα ζεύγη σε δομικές περιοχές του μορίου tRNA. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το tRNA^{Ala} στο οποίο ένα μοναδικό ζευγάρι βάσεων G₃-U₇₀ αποτελεί το κυριότερο προσδιοριστικό στοιχείο της ταυτότητάς του. Η ικανότητα του συγκεκριμένου ζεύγους βάσεων να κατευθύνει την αναγνώριση του tRNA^{Ala} από την AlaRS απεδείχθη μέσα από πειράματα στα οποία απομονώθηκαν μεταλλαγμένα μόρια του "amber" κατασταλακτικού μορίου του tRNA^{Ala} τα οποία δεν μπορούσαν να αναγνωριστούν από την AlaRS. Συγκεντρώθηκε μία σειρά από μεταλλαγμένα μόρια από τα οποία μόνο αυτά που είχαν υποστεί αλλαγές στο ζεύγος G₃-U₇₀ δεν μπορούσαν να δεσμεύσουν αλανίνη¹⁶. Επιπλέον για να ελεγχθεί η εξειδίκευση του ζεύγους G₃-U₇₀ συνθέσαν μεταλλαγμένα μόρια tRNA^{Cys} και tRNA^{Phe} τα οποία διέθεταν το συγκεκριμένο ζεύγος βάσεων. Το μόριο tRNA^{Cys} μπορούσε να προσδέσει εξολοκλήρου αλανίνη, ενώ το μόριο tRNA^{Phe} μπορούσε να δεσμεύσει αλανίνη κατά 63% και

φαινυλαλανίνη κατά 37%. Επιπλέον μέσα από περαιτέρω πειράματα διαπιστώθηκε ότι εκτός από το αντικωδικόνιο και το ζεύγος G₃-U₇₀ και άλλα δύο μονά νουκλεοτίδια, το G₂₀ και C₆₀, θεωρήθηκε αρχικά ότι αποτελούσαν σημαντικά μόρια της ταυτότητας του tRNA^{Ala}. Μετά από μελέτες όμως διαπιστώθηκε ότι αυτά τα νουκλεοτίδια αν τροποποιηθούν δεν μπορούν να παρεμποδίσουν τη σύνδεση της αλανίνης στο συγγενές tRNA, αλλά ούτε μπορούν να διευκολύνουν την αμινοακυλίωση του tRNA^{Phe} από την AlaRS, όταν ενσωματωθούν στο συγκεκριμένο μόριο tRNA.

Ανάλογα πειράματα, με τη χρήση κατασταλτικών μορίων, έγιναν και για να μελετηθούν τα στοιχεία αναγνώρισης του tRNA^{Ser}. Υπάρχουν 6 κωδικόνια για τη σερίνη, AGU/C και UCN, όπου N οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, τα οποία αναγνωρίζονται τουλάχιστον από 4 διαφορετικά μόρια tRNA. Θεωρήθηκε απίθανο να υπάρχει κάποιο στοιχείο αναγνώρισης του μορίου tRNA^{Ser} στο αντικωδικόνιο, χωρίς αυτό όμως να έχει ελεγχθεί *in vitro*. Για το λόγο αυτό έγινε προσπάθεια αλλαγής της ταυτότητας του κατασταλτικού μορίου του tRNA^{Leu} σε tRNA^{Ser}. Μετά από εξέταση στο βακτήριο *E. coli* των αλληλουχιών 6 μορίων tRNA^{Ser} διαπιστώθηκε ότι 14 νουκλεοτίδια είναι καλά συντηρημένα, αλλά δεν υπάρχουν στο tRNA^{Leu}. Επίσης βρέθηκε ότι το ζευγάρι στις θέσεις 3-70 (A-U ή U-A) σχετίζεται αποκλειστικά με το μόριο tRNA^{Ser17}. Αυτό το ζεύγος βάσεων θεωρείται πιθανό στοιχείο υπεύθυνο για την αναγνώριση από την SerRS, καθώς και τα συντηρημένα νουκλεοτίδια που εντοπίζονται στην περιοχή πρόσδεσης του αμινοξέος και στη θηλιά DHU. Με την πραγματοποίηση 12 μεταλλάξεων στις περιοχές αυτές του tRNA^{Leu} προέκυψε ένα κατασταλτικό μόριο tRNA^{Leu-Ser} με απόλυτη εξειδίκευση προς τη σερίνη. Επιπλέον με την πραγματοποίηση 8 μεταλλάξεων στα ζευγάρια βάσεων 2-71, 3-70, στα νουκλεοτίδια 72 και 73 στην περιοχή πρόσδεσης του αμινοξέος και στο ζευγάρι στη θέση 11-24 της θηλιάς D παρατηρήθηκε μείωση της εξειδίκευσης του συγκεκριμένου κατασταλτικού μορίου κατά 40%. Η αποτελεσματικότητα αυτή μπορούσε να ανακτηθεί με αποκατάσταση των μεταλλάξεων της θηλιάς D, γεγονός που υποδηλώνει πόσο σημαντικά είναι αυτά τα νουκλεοτίδια στην εξειδικευμένη αναγνώριση από τη SerRS.

1.4 Στοιχεία ταυτότητας του tRNA^{Gln}

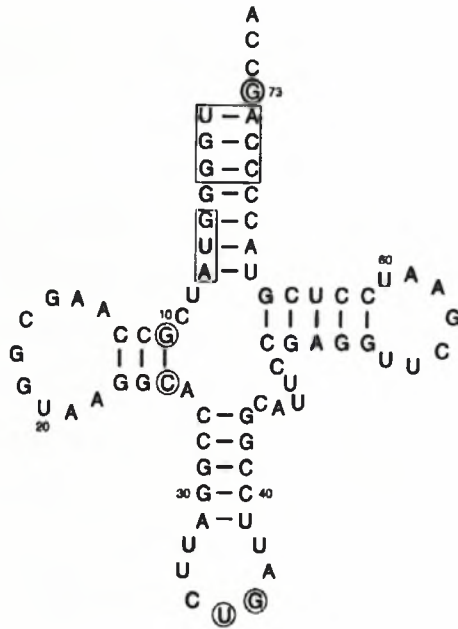
Τα προσδιοριστικά στοιχεία της ταυτότητας του tRNA^{Gln} εντοπίζονται στη θηλιά του αντικωδικιού και στην περιοχή πρόσδεσης του αμινοξέος^{18,19} (Εικόνα 4). Μετάλλαξη του αντικωδικιού του tRNA^{Met} από CAU σε CUA, καθώς και του αντικωδικιού του tRNA^{Trp}

από CCA σε CUA, οδήγησε σε υποστρώματα που αμινοακυλιώνονται από την GlnRS σε μεγάλο βαθμό. Η U στη δεύτερη θέση του αντικωδικονίου πρέπει να παίζει τον καθοριστικό ρόλο στην αναγνώριση από τη συνθετάση. Επίσης η G στη θέση 73 αποτελεί σημαντικό προσδιοριστικό στοιχείο του μορίου, όπως αποδεικνύεται μετά από μετάλλαξη στο μόριο tRNA^{Tyr} της A₇₃ σε G με αποτέλεσμα το μόριο να αναγνωρίζεται από την GlnRS. Σημαντικά προσδιοριστικά στοιχεία αποτελούν και τα νουκλεοτίδια G₂, G₃ και G₁₀, όπως προκύπτει από μελέτη μορίων tRNA^{Gln} που φέρουν μεταλλάξεις στις συγκεκριμένες βάσεις με αποτέλεσμα πτώση της τιμής k_{cat}/k_m 300 φορές. Επιπλέον από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο *E. coli* διαπιστώθηκε ότι η αναγνώριση του tRNA^{Gln} από την GlnRS εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις RNA και πρωτεϊνών και από διαμορφωτικές αλλαγές του tRNA^{Gln} κατά την αλληλεπίδραση με την GlnRS.

Αφού προσδιορίστηκε η ομάδα των στοιχείων που είναι απαραίτητη για την αναγνώριση του tRNA^{Gln} από την GlnRS έγινε προσπάθεια να καθοριστεί εάν τα στοιχεία αυτά είναι επαρκή για να αναγνωριστεί ένα μη κατάλληλο μόριο tRNA από την GlnRS. Για το σκοπό αυτό συντέθηκαν μεταλλαγμένα μόρια tRNA^{Glu} που φέρουν τα στοιχεία αναγνώρισης του tRNA^{Gln} και ελέγχθηκε αν αμινοακυλιώνονται από την GlnRS και από την GluRS²⁰. Παρατηρήθηκε ότι προσθήκη των στοιχείων αναγνώρισης του tRNA^{Gln} στο του tRNA^{Glu} στην περιοχή πρόσδεσης του αμινοξέος ή στη θηλιά του αντικωδικίου αύξησε την πιθανότητα αμινοακυλίωσης από την GlnRS.

Γενικά διαπιστώθηκε ότι οι μεταλλάξεις που έγιναν διευκόλυναν την εστεροποίηση γλουταμίνης (Gln) και όχι γλουταμινικού (Glu) στο tRNA^{Gln}, γεγονός που υποδηλώνει ότι και τα στοιχεία αναγνώρισης του tRNA^{Glu} από την GluRS εντοπίζονται στην περιοχή πρόσδεσης του αμινοξέος ή στη θηλιά του αντικωδικίου²¹.

Η ανικανότητα όμως να μετατραπούν τα στοιχεία του tRNA^{Glu} σε στοιχεία που αποκλειστικά ευνοούν την πρόσδεση της γλουταμίνης υποδηλώνει ότι το tRNA^{Glu} διαθέτει ένα αντιπροσδιοριστικό στοιχείο για την αναγνώριση της γλουταμίνης. Πράγματι η διαφορά μεταξύ των μορίων tRNA^{Gln} και tRNA^{Glu} εντοπίζεται στην τρίτη θέση της θηλιάς του αντικωδικίου, όπου υπάρχουν οι βάσεις G₃₆ και C₃₆ σε κάθε μόριο αντίστοιχα²².



Εικόνα 4: Δευτεροταγής δομή του tRNA^{Glu}. Τα νουκλεοτίδια που δρουν ως εξειδικευμένα προσδιοριστικά στοιχεία εντοπίζονται στο κουτί, ενώ τα υπόλοιπα που δρουν ως στοιχεία δέσμωσης για άλλα μόρια είναι σε κύκλο.

1.5 Στοιχεία ταυτότητας του tRNA^{Glu}

Τα κυριότερα στοιχεία αναγνώρισης του tRNA^{Glu} από την GluRS αποτελούνται από τις βάσεις U34, U35, C36, A37 στη θηλιά του αντικωδικίου, τα ζεύγη βάσεων G1-C72, U2-A71 στην περιοχή πρόσδεσης του αμινοξέος και τα ζεύγη U11-A24, U13-G22-A46 στη θηλιά D (Εικόνα 5). Από τις βάσεις αυτές τα προσδιοριστικά στοιχεία αποτελούν οι U34, C36, A37 και τα ζεύγη G1-C72 και U11-A24. Ο ρόλος της GluRS είναι να φέρνει σε άμεση επαφή την μικρή αύλακα των 2 βασιικών ζευγών βάσεων, U11-A24 και U13-G22.



Εικόνα 5: Τα κυριότερα στοιχεία της ταυτότητας του μορίου tRNA^{Glu} από την GluRS αποτελούνται από τις βάσεις U34, U35, C36, A37 στη θηλιά του αντικωδικίου, τα ζεύγη βάσεων G1-C72, U2-A71 στην περιοχή πρόσδεσης του αμινοξέος και τα ζεύγη U11-A24, U13-G22-A46 στη θηλιά D.

1.6 Αμινοακυλίωση του tRNA: δύο βιοχημικά μονοπάτια

Η ενεργοποίηση των αμινοξέων και η επακόλουθη σύνδεσή τους με τα tRNA καταλύεται από τις ειδικές συνθετάσες των αμινοακυλο- tRNA (aa-tRNA).

Η αμινοακυλίωση του tRNA πραγματοποιείται σε δύο στάδια:

- Το πρώτο βήμα αποτελεί ο σχηματισμός ενός αμινοακυλο-αδενυλικού από ένα αμινοξύ και ένα μόριο ATP. Αυτό το ενεργοποιημένο μόριο είναι ένας μεικτός ανυδρίτης, στον οποίο η καρβοξυλομάδα του αμινοξέος είναι συνδεδεμένη με τη φωσφορική ομάδα του AMP. Γι' αυτό το λόγο το ενδιάμεσο μόριο είναι γνωστό και ως αμινοακυλο-AMP.
- Το επόμενο βήμα είναι η μεταφορά της αμινοακυλομάδας του αμινοακυλο-AMP σε ένα μόριο tRNA και ο σχηματισμός ενός αμινοακυλο-tRNA (Εικόνα 6).

Τα αμινοξέα ενεργοποιούνται και ενώνονται με το tRNA με τη βοήθεια μιας οικογένειας 20 ενζύμων, των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών(aaRSs), οι οποίες χαρακτηρίζονται από δομική και λειτουργική ποικιλότητα²³. Πρόκειται για ένζυμα που καταλύουν το σχηματισμό ενός αμινοακυλο-tRNA. Συγκεκριμένα η συνθετάση υδρολύει το ATP για να δεσμεύσει το κατάλληλο αμινοξύ στο 3'-OH άκρο του μορίου tRNA²⁴. Η συνθετάση αναγνωρίζει το tRNA από την τριτοταγή του δομή και κατευθύνει το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ της τριπλέτας CCA του tRNA και του αμινοξέος. Η συγκεκριμένη αντίδραση γίνεται με μεγάλη αξιοπιστία.

Πρωταρχικός ρόλος των aaRSs είναι να παρέχουν στο κύτταρο τα κατάλληλα μόρια aa-tRNA για τη σωστή μετάφραση του mRNA. Η πρωταρχική σημασία της λειτουργίας αυτών των ενζύμων στην ακριβή ροή της γενετικής πληροφορίας φαίνεται από την εξειδίκευση και την πολύχρονη ύπαρξη αυτής της ομάδας ενζύμων²⁵. Η εξειδίκευση των aaRSs επιτυγχάνεται μέσω της διάκρισης μεταξύ των συγγενών και μη αμινοξέων και μορίων tRNA. Η επιλογή των μορίων tRNA στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των στοιχείων αναγνώρισης της ταυτότητας του μορίου tRNA και των θέσεων αναγνώρισης της αντίστοιχης aaRS, ενώ τα αμινοξέα μπορούν να διαχωριστούν από διαφορές στις φυσικοχημικές του ιδιότητες.

Η σωστή επιλογή του αμινοακυλο-tRNA πραγματοποιείται με το μηχανισμό της μετάφρασης και στηρίζεται στη μελέτη της κινητικής, η οποία διευκολύνεται από τον παράγοντα EF-Tu και το σύμπλοκο που σχηματίζει με το aa-tRNA και το GTP. Η ικανότητα υδρόλυσης του GTP που έχει αυτό το σύμπλοκο παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου του επιλεγμένου aa-tRNA. Η σωστή επιλογή προκύπτει από τις αλληλεπιδράσεις κωδικονίου-αντικωδικονίου, οι οποίες δημιουργούν τις απαραίτητες διαμορφωτικές αλλαγές για την υδρόλυση του GTP²⁶.

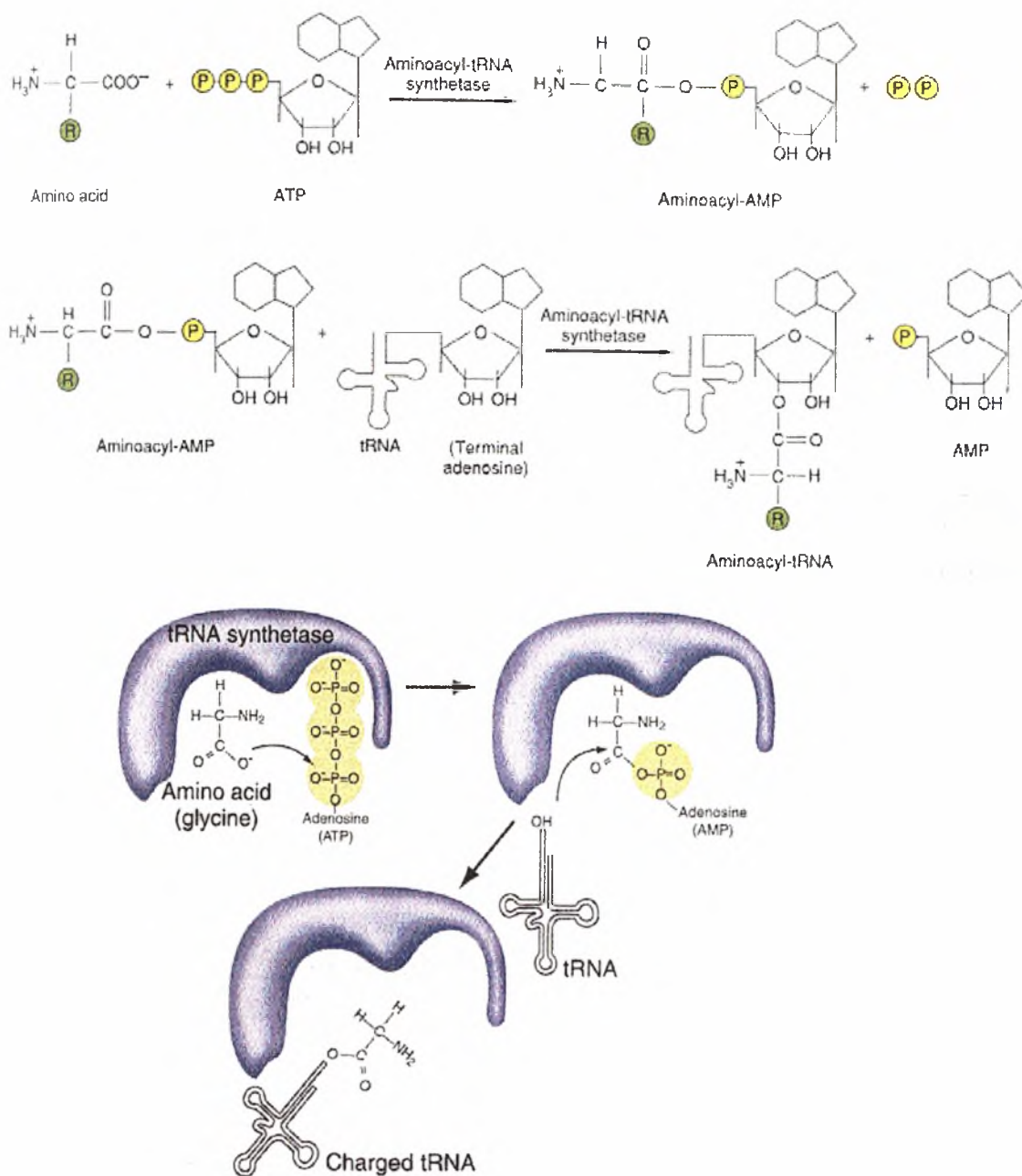
Οι aaRSs διαθέτουν 2 έως 4 υπομονάδες, ενώ το μέγεθός τους ποικίλλει από 334 κατάλοιπα για TrpRS έως 1112 κατάλοιπα για την PheRS. Παρόλο που οι περισσότερες aaRSs είναι ομοδιμερείς, κάποιες από αυτές είναι ετεροδιμερείς ή και τετραμερείς. Υπάρχουν 2 κλάσεις aaRSs κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από 10 μέλη (Πίνακες I και II). Στις aaRSs κλάσης I απαντώνται 2 κοινά, ομόλογα μοτίβα και οι συνθετάσες αυτές αμινοακυλιώνουν το μόριο tRNA στο 2'-OH άκρο. Οι aaRSs κλάσης II διαθέτουν 3 κοινά, ομόλογα μοτίβα και αμινοακυλιώνουν το μόριο tRNA στο 3'-OH άκρο²⁷. Κάθε τάξη διαθέτει αποκλειστικά μοτίβα στη θέση δέσμευσης του ATP και επειδή τα μοτίβα αυτά δεν μοιράζονται υψηλή ομολογία, παρατηρείται αυστηρή συντήρηση στα κατάλοιπα που είναι σημαντικά για τη λειτουργία και ρύθμιση των ενζύμων. Κάθε aaRS έχει το δικό της σύστημα αναγνώρισης των μορίων tRNA και τα συστήματα αυτά ποικίλουν για την ίδια aaRS ανάλογα με το είδος του οργανισμού. Με αυτόν τον τρόπο η εξέλιξη προστατεύει την εξειδικευμένη αναγνώριση μεταξύ aaRS και tRNA.

Πίνακας I: AARSs τάξης I

Ia	Ib	Ic
Leu (alpha)	Tyr (alpha 2)	Arg (alpha)
Ile (alpha)	Trp (alpha 2)	Gln (alpha)
Val (alpha)		Glu (alpha)
Cys (alpha 2)		
Met (alpha 2)		

Πίνακας II: AARSs τάξης II

IIa	IIb	IIc
His (alpha2)	Asp(alpha2)	Gly (alpha2/beta2))
Pro (alpha2)	Asn (alpha2)	Ala (alpha4)
Ser (alpha2)	Lys (alpha2)	Phe (alpha2/beta2)
Thr (alpha2)		

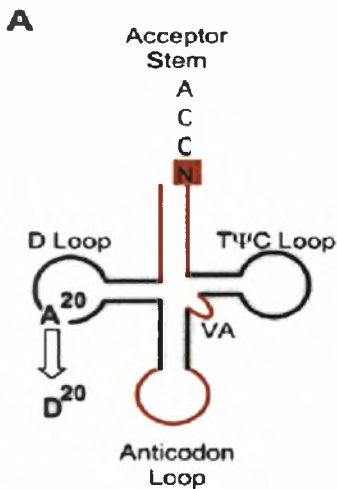


Εικόνα 6: Αμινοακυλίωση του tRNA από τις συνθετάσες των αμινοακυλο- tRNA.

1.7 Μηχανισμοί επιλογής υποστρωμάτων και μηχανισμοί επιδιόρθωσης

Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μια σειρά μηχανισμών ελέγχου ποιότητας, ώστε να εξασφαλιστεί η όσο το δυνατόν ορθότερη μετάφραση των κωδικονίων. Εκτός από το ζευγάρισμα του κωδικονίου με το αντικωδικόνιο, οι μηχανισμοί ελέγχου της πιστότητας της μετάφρασης είναι η εξειδικευμένη επιλογή υποστρωμάτων από τις AARSs, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης και η απόρριψη από το ριβόσωμα²⁸.

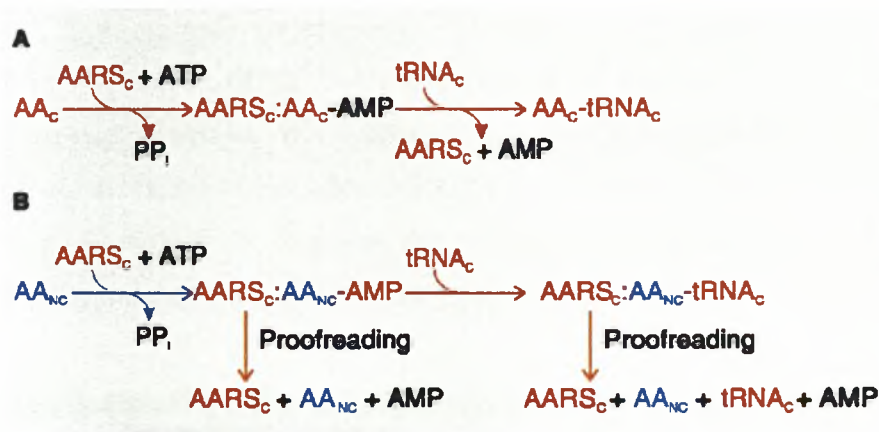
Όσον αφορά την επιλογή του σωστού μορίου tRNA, η ορθότητα της διαδικασίας αυτής εξαρτάται από την αναγνώρισή του από την αντίστοιχη AARS και ενισχύεται από την ύπαρξη καθοριστικών περιοχών στα μόρια tRNA που δεν επιτρέπουν την αλληλεπίδραση με μη συγγενείς AARSs. Τα μόρια tRNA κατέχουν ρόλο κλειδί όχι μόνο για τη σωστή διαμόρφωση των ενεργών κέντρων των συνθετασών, αλλά κυρίως για τις πληροφορίες που περιέχονται στην αλληλουχία τους. Η αναγνώριση των τριών βάσεων του αντικωδικονίου, η τελευταία βάση πριν το 3' CCA άκρο (βάση διαλογέας, discriminator base) και τροποποιημένες ή ασυνήθεις βάσεις, αποτελούν το σύνολο των στοιχείων που συνθέτουν την ταυτότητα των προσαρμοστικών αυτών μορίων. Οι περισσότερες συνθετάσες αλληλεπιδρούν μέσω δύο περιοχών με τα συγγενή μόρια tRNA. Η καταλυτική τους περιοχή δεσμεύει την ΤΨC μικροέλικα και το βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος του μορίου tRNA, ενώ άλλες περιοχές των συνθετασών, λιγότερο συντηρημένες σε σχέση με το ενεργό κέντρο αλληλεπιδρούν με την περιοχή του αντικωδικονίου (Εικόνα 7). Συνήθως οι περιοχές αυτές είναι προεκτάσεις του N- ή C- τελικού άκρου των συνθετασών. Η αναγνώριση του αντικωδικονίου είναι δευτερεύουσας σημασίας για την εξειδικευμένη επιλογή του μορίου tRNA. Ωστόσο υπάρχουν κάποιες περιπτώσεις που η αναγνώριση κυρίως του ενδιάμεσου νουκλεοτιδίου του αντικωδικονίου είναι κρίσιμη για τη δέσμευση του συγγενούς μορίου tRNA.



Εικόνα 7: Οι περιοχές του μορίου tRNA που εμπλέκονται στην αναγνώριση του από τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες. Εκτός από το βραχίονα δέσμευσης του αμινοξέος και την περιοχή του αντικωδικονίου κάποιες συνθετάσες αναγνωρίζουν το μεταβλητό βραχίονα (VA) και το βρόγχο D.

Η διάκριση μεταξύ των αμινοξέων από τις AARSs είναι μια διαδικασία πολύπλοκη, διότι τα μόρια αυτά είναι λιγότερο σύνθετα στη δομή τους σε σχέση με τα μόρια tRNA, οπότε και δυσκολότερο να διαχωριστούν. Υπάρχουν αμινοξέα, όπως η κυστεΐνη, που φέρουν χαρακτηριστικές πλευρικές αλυσίδες. Παρόλα αυτά, κάποια αμινοξέα δε μπορούν να διαχωριστούν σαφώς ώστε να αποφευχθούν τυχόν λάθη κατά τη μετάφραση. Χαρακτηριστικό

είναι το παράδειγμα των αμινοξέων βαλίνη και ισολευκίνη, που διαφέρουν μόνο κατά μια μεθυλομάδα. Το γεγονός ότι τέτοια λάθη συμβαίνουν σε πολύ χαμηλή συχνότητα οφείλεται στην επιδιορθωτική δράση των AARSs, οι οποίες επιτυγχάνουν την εξειδίκευσή τους με δύο τρόπους: ευνοώντας τη δέσμευση του συγγενούς αμινοξέος και επιδιορθώνοντας επιλεκτικά τα μη συγγενή αμινοξέα. Για παράδειγμα, ενώ η IleRS δεσμεύει βαλίνη σε μια συχνότητα 1:150 σε σύγκριση με την ισολευκίνη, η επιδιορθωτική δράση του εν λόγω ενζύμου εξασφαλίζει ότι ο ρυθμός με τον οποίο τα κωδικόνια της ισολευκίνης παρερμηνεύονται σε βαλίνη είναι ένα περίπου στις 3000. Η IleRS έχει την ικανότητα να επιδιορθώνει τη λανθασμένα ενεργοποίηση βαλίνης σε δύο σημεία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αμινοακυλίωσης: το ένζυμο αυτό, όπως και άλλες συνθετάσες, μπορεί να επιδιορθώσει το σφάλμα όταν είναι δεσμευμένο με το αμινοακυλο-αδενυλικό σύμπλοκο (προ-μεταφοράς επιδιόρθωση, pre-transfer proofreading) ή όταν είναι δεσμευμένο με το αμινοακυλωμένο tRNA (μετα-μεταφοράς επιδιόρθωση, post-transfer proofreading) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: (A) Η αντίδραση αμινοακυλίωσης των μορίων tRNA από τις AARSs. (B) Επιδιόρθωση του μη συγγενούς αμινοξέος από τις AARSs. Το μη συγγενές αμινοξύ (AA_{nc}) πρώτα ενεργοποιείται, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία ενός συμπλόκου μεταξύ μιας συγγενούς AARS με ένα μη συγγενές αμινοάκυλο-αδενυλικό. Αυτό το σύμπλοκο μπορεί είτε να επιδιορθωθεί άμεσα (προ-μεταφοράς επιδιόρθωση, pre-transfer proofreading), απελευθερώνοντας το μη συγγενές αμινοξύ, είτε να μεταφερθεί το μη συγγενές αμινοξύ στο 3' άκρο ενός συγγενούς μορίου tRNA. Όταν συντεθεί το κακοφορητισμένο tRNA δεν απελευθερώνεται, αλλά επιδιορθώνεται από την AARS (μετα-μεταφοράς επιδιόρθωση, post-transfer proofreading).

Ένας τρίτος μηχανισμός επιδιόρθωσης είναι η μη εξαρτώμενη από tRNA υδρόλυση των μη συγγενών αμινοαδενυλικών συμπλόκων που είναι δεσμευμένα με το ένζυμο. Ο μηχανισμός αυτός είναι υψίστης σημασίας για κάποιες AARS, όπως η MetRS, η επιδιορθωτική δράση της οποίας κατευθύνεται πρωταρχικά προς την ομοκυστεΐνη, ένα ενδιάμεσο προϊόν του

μεταβολισμού της μεθειονίνης Αυτό το παράδειγμα επιδιόρθωσης είναι ασυνήθιστο, διότι ο μηχανισμός της απόρριψης περιλαμβάνει την κυκλοποίηση της ομοκυστεΐνης προς παραγωγή θειολακτόνης. Αυτή η δράση δεν περιορίζεται στη MetRS, αλλά έχει βρεθεί και για τις IleRS, LeuRS και LysRS και υποδεικνύει ότι περιοχές δέσμησης θειόλης υπάρχουν σε κάποιες AARSs και των δύο κλάσεων. Εκτός από το ρόλο τους στην τροποποίηση της ομοκυστεΐνης, οι AARSs αυτές καταλύουν την θειόλο-εξαρτώμενη απακυλίωση του μορίου tRNA με την ακόλουθη σύνθεση διπεπτιδίων που φέρουν κυστεΐνη, αν και ο φυσιολογικός ρόλος της διεργασίας αυτής δεν έχει προσδιοριστεί.

1.8 Το εναλλακτικό μονοπάτι αμινοακυλίωσης

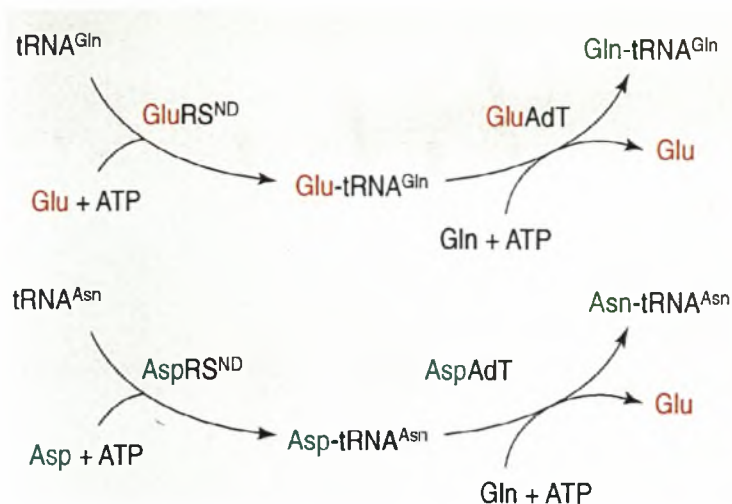
Η απουσία της GlnRS από τα Gram θετικά βακτήρια, από κάποια Gram αρνητικά, από αρχαία, χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια κατέστησε απαραίτητη την ύπαρξη ενός εναλλακτικού μονοπατιού αμινοακυλίωσης^{29,30,31} (Εικόνα 9). Το πρώτο βήμα σε αυτό το μονοπάτι περιλαμβάνει φόρτιση του tRNA^{Gln} με Glu από την GluRS και μετατροπή του Glu-tRNA^{Gln} σε Gln-tRNA^{Gln} από τις αμιδοτρανσφεράσες^{32,33,34,35} (Εικόνα 10). Η μετατροπή αυτή πρέπει να γίνει πριν το υπόστρωμα Glu-tRNA^{Gln} αλληλεπιδράσει με τον παράγοντα EF-Tu. Σε περίπτωση που το υπόστρωμα μεταφερθεί στο ριβόσωμα πριν την μετατροπή του, τότε θα εισάγει γλουταμινικό οξύ ως απάντηση στα κωδικόνια CAA και CAG της γλουταμίνης με αποτέλεσμα λάθη στην πρωτεϊνοσύνθεση. Η δέσμηση του υποστρώματος Glu-tRNA^{Gln}, η υδρόλυση της γλουταμίνης και η τρανσαμίδωση είναι συντονισμένα γεγονότα.

Distribution of Synthetases Among the Organismal Domains

	Bacteria	Archaea	Eukarya
	<i>Mycoplasm</i>	<i>Thermophilus</i>	<i>Methanococcus</i>
			<i>Yeast</i>
# Synthetases	19	20	17
	lacks GlnRS		lacks GlnRS AsnRS CysRS



Εικόνα 9: Κατανομή των συνθετασών μεταξύ των οργανισμών και αναφορά εκείνων που απουσιάζουν από κάθε κατηγορία οργανισμών.



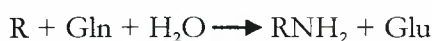
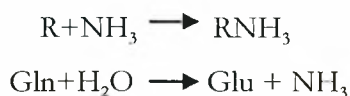
Εικόνα 10: Το tRNA^{Gln} στην αρχή κακοφορτίζεται με το γλουταμινικό από μία μη ειδική GluRS, η οποία μπορεί να συνθέσει και Glu-tRNA^{Glu} και Glu-tRNA^{Gln}. Στο τέλος το Glu-tRNA^{Gln} μετατρέπεται από μία αμιδοτρανσφεράση, την Glu-AdT, σε Gln-tRNA^{Gln}.

1.9 Αμιδοτρανσφεράσες

Οι αμιδοτρανσφεράσες αποτελούν μία οικογένεια ενζύμων που χρησιμοποιούν την αμινομάδα της γλουταμίνης για τη βιοσύνθεση αμινοξέων, πουρινών, πυριμιδινών, συνενζύμων και αντιβιοτικών³⁶. Υπάρχουν 16 κατηγορίες αμιδοτρανσφερασών (πίνακας III) και οι περισσότερες διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες:

- Μπορούν να χρησιμοποιούν NH₃ στη θέση της γλουταμίνης
- Αναστέλλεται η δραστηριότητά τους μέσω αλκυλίωσης ενός καταλοίπου κυστεΐνης που υπάρχει στο ενεργό τους κέντρο και
- Μπορούν να υδρολύουν την γλουταμίνη³⁷

Οι 3 αυτές δυνατότητες των αμιδοτρανσφερασών πραγματοποιούνται σε 2 περιοχές του ενζύμου, μία που καταλύει την αντίδραση με την NH₃ (περιοχή σύνθεσης) και μία άλλη που συμμετέχει στο να παρέχει την αμινομάδα της γλουταμίνης για σύνθεση (περιοχή GAT). Η περιοχή GAT απαντά σε 2 είδη με αποτέλεσμα οι αμιδοτρανσφεράσες να χωρίζονται σε 2 τάξεις. Στις αμιδοτρανσφεράσες τάξης I καθοριστικό ρόλο κατέχει μία ιστιδίνη, ενώ στις τάξης II καθοριστικό ρόλο κατέχει η παρουσία μίας Cys στο αμινοτελικό άκρο³⁸.



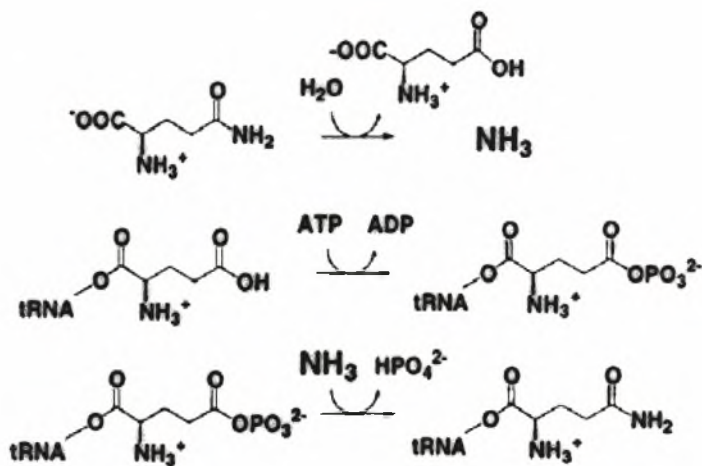
Πίνακας III

Ένζυμο	Γονίδιο	Μονοπάτι
Anthranilate synthase	<i>trpEg</i>	trp
Carbamoyl-P synthase	<i>carba</i>	arg,utp,CTP
CTP synthase	<i>pyrg</i>	CTP
FGAM synthase	<i>purl</i>	AMP,GMP
GMP synthase	<i>guaa</i>	GMP
Asparagine synthase	<i>asnb</i>	asn
Glutamate synthase	<i>gltdb</i>	glu
Glutamine PRPP amidotransferases	<i>purf</i>	AMP,GMP
Arylamine synthase	4	chloramphenicol
tRNA dependent amidotransferases	4	Glu-tRNA ^{Gln} Asp-tRNA ^{Asn}
NAD synthase	5	NAD

Η γενική λειτουργία των αμιδοτρανσφερασών συνοψίζεται σε έναν μηχανισμό που περιλαμβάνει συνολικά 4 βήματα. Στο πρώτο βήμα, παρατηρείται στην περιοχή GAT δέσμευση της αμινομάδας της γλουταμίνης από ένα κατάλοιπο κυστεΐνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου μορίου. Επίσης στην περιοχή σύνθεσης, το ATP βοηθά στην ενεργοποίηση του υποστρώματος για να δεχθεί την αμινομάδα. Στο δεύτερο βήμα, καταστρέφεται το ενδιάμεσο μόριο που είχε δημιουργηθεί και παράγεται NH₃ μετά την απομάκρυνση ενός πρωτονίου. Στο τρίτο βήμα, ένα μόριο H₂O καταστρέφει το θειοεστέρα που έχει δημιουργηθεί, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία ενός δεύτερου τετραεδρικού ενδιάμεσου. Επιπλέον, η NH₃ δεσμεύεται στην περιοχή σύνθεσης και δημιουργείται ένα δεύτερο ενδιάμεσο μόριο. Τέλος, στο τέταρτο βήμα έχει καταστραφεί το δεύτερο ενδιάμεσο μόριο στην περιοχή GAT, με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται γλουταμίνη, ενώ στην περιοχή πρόσδεσης έχει σχηματιστεί το προϊόν που διαθέτει την αμινομάδα.

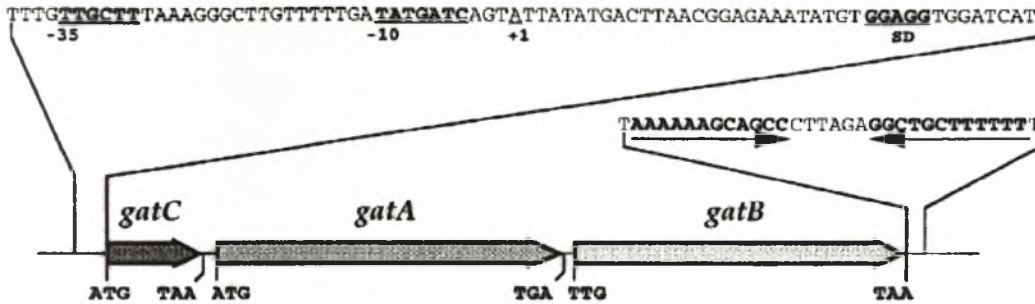
1.10 Glu-tRNA^{Gln} αμιδοτρανσφεράσες (GluAdTs)

Οι Glu-tRNA^{Gln} αμιδοτρανσφεράσες, οι οποίες είναι απαραίτητες για το εναλλακτικό μονοπάτι αμινοακυλίωσης εντοπίζονται σε αρχαία, βακτήρια και ευκαρυωτικά οργανίδια³⁹. Τα γονίδια για την Glu-AdT σχηματίζουν ένα οπερόνιο που αποτελείται από τρία πλαίσια ανάγνωσης⁴⁰. Σε αντίθεση με τις άλλες αμιδοτρανσφεράσες που διαθέτουν ως καταλυτικό κέντρο Cys/His/Glu, η Glu-AdT διαθέτει μία καλά συντηρημένη σερίνη στη θέση 176 η οποία είναι απαραίτητη για την υδρόλυση της γλουταμίνης⁴¹. Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει μία ομοιότητα μεταξύ της καταλυτικής περιοχής της Glu-AdT και της καρβοξυτελικής περιοχής της GlnRS, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αντίδραση τρανσαμίδωσης του συμπλέγματος Glu-tRNA^{Gln} αποτελεί πιθανόν εξελικτικό πρόδρομο του άμεσου μονοπατιού αμινοακυλίωσης του tRNA^{Gln}⁴². Τρεις ξεχωριστές αντιδράσεις καταλύονται από την Glu-AdT και οι οποίες είναι υδρόλυση της γλουταμίνης, ενεργοποίηση του μορίου Glu-tRNA^{Gln} η οποία εξαρτάται από το ATP και τρανσαμίδωση του ενεργοποιημένου υποστρώματος με τη χρήση της NH₃ που παράγεται από την υδρόλυση της γλουταμίνης (Εικόνα 11)



Εικόνα 11: Τρεις αντιδράσεις πραγματοποιούνται από την Glu-AdT: υδρόλυση γλουταμίνης, ενεργοποίηση του μορίου Glu-tRNA^{Gln} και τρανσαμίδωση.

Έχουν αναγνωρισθεί 2 τύποι AdTs, ένα ετεροτριμερές ένζυμο το *gatCAB*, που εντοπίζεται σε βακτήρια, αρχαία και ευκαρυωτικά οργανίδια και το ετεροδιμερές *gatDE* που εντοπίζεται αποκλειστικά σε αρχαία.



Εικόνα 12: Οργάνωση του οπερονίου *gatCAB*. Διαθέτει τις περιοχές -35 και -10 του προαγωγέα, την αλληλουχία Shine Dalgarno (SD) και την περιοχή έναρξης της μεταγραφής +1.

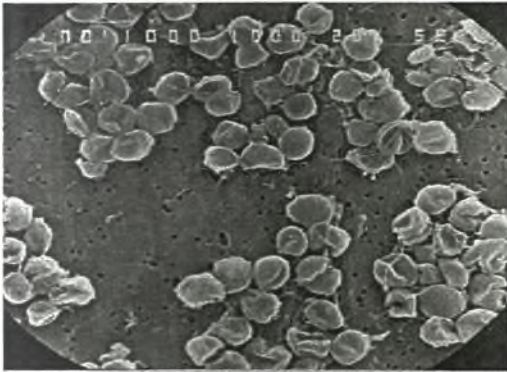
Το οπερόνιο *gatCAB* κωδικοποιεί για μία αμιδοτρανσφεράση η οποία μπορεί να αναγνωρίζει και το Asp-tRNA^{Asn} και το Glu-tRNA^{Gln} και χρησιμοποιεί τα αμινοξέα ασπαραγίνη και γλουταμίνη καθώς και το χλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl) ως δότες αμινομάδων⁴³. Η υπομονάδα *gatA* διαθέτει την καταλυτική δραστηριότητα, μετατρέπει δηλαδή το γλουταμινικό σε γλουταμίνη^{44,45}. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιεί ως δότη αμινομάδας την NH₃ που προέρχεται από την υδρόλυση της γλουταμίνης⁴⁶. Η υπομονάδα *gatB* παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της δομής και στη διατήρηση της δραστηριότητας της αμιδοτρανσφεράσης σε υψηλά επίπεδα και τέλος η υπομονάδα *gatC* συμμετέχει στη σωστή αναδίπλωση του ενζύμου και τη σταθεροποίηση της *gatA* υπομονάδας (Εικόνα 12). Επίσης η *gatB* υπομονάδα παρουσιάζει μία εξειδικευμένη ομολογία με το γονίδιο *pet112* στο *Saccharomyces cerevisiae* το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μιτοχονδριακή πρωτεϊνική σύνθεση.

Υπάρχουν βακτήρια, όπως το *Bacillus subtilis*, στα οποία το ολοένζυμο *gatCAB* είναι πλήρως ενεργό, ενώ συνδυασμοί των *gatCA* με το *gatB* αποφέρουν μόνο το 50% της πλήρους δραστηριότητας του ενζύμου. Αντίθετα, σε άλλα βακτήρια, όπως το *Thermus thermophilus*, το ένζυμο μπορεί να είναι δραστικό σαν ετεροδιμερές *gatAB*. Επειδή τα γονίδια *gatCAB* είναι διασκορπισμένα σε όλο το γονιδίωμα ίσως η *gatC* υπομονάδα να έχει έναν διαφορετικό ρόλο στην αναδίπλωση της *gatA* από ότι συνήθως, εξηγώντας με αυτόν τον τρόπο γιατί το διμερές *gatAB* είναι πλήρως ενεργό⁴⁷. Επίσης στο ίδιο βακτήριο η συγκεκριμένη αμιδοτρανσφεράση χάνει την ικανότητα της Asp-AdT, ενώ διατηρεί αυτή της Glu-AdT, εάν απομακρύνουμε 44 αμινοξέα από το καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου, γεγονός που σημαίνει ότι οι δύο ιδιότητες είναι διαχωρισμένες. Αυτό εξηγείται είτε από την ύπαρξη 2 διαφορετικών ενεργών κέντρων στην

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη συγκεκριμένων μεταλλάξεων στο μόριο tRNA^{Gln} οι οποίες θα βοηθήσουν στην ανίχνευση των στοιχείων της ταυτότητάς του που είναι απαραίτητα για την αναγνώριση από την GluRS. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση, σε στελέχη *E.coli*, του γονιδίου που κωδικοποιεί το tRNA της γλουταμίνης, καθώς και άλλων γονιδίων, που προκύπτουν από την προσθήκη μεταλλάξεων στο γονίδιο άγριου τύπου. Επίσης έγινε προσπάθεια μεταγραφής των συγκεκριμένων γονιδίων. Τα μόρια που προκύπτουν αναγνωρίζονται από τις αμιδοτρανσφεράσες.

Το αρχαίο το οποίο χρησιμοποιήθηκε είναι το *Pyrococcus abyssi* (Εικόνα 14). Πρόκειται για έναν υπερθερμόφιλο οργανισμό που απομονώθηκε από τον πυθμένα του Ειρηνικού ωκεανού, όπου ζούσε σε θερμοκρασία 100°C. Στο αρχαίο αυτό, από το οποίο απουσιάζει η GlnRS, μοναδικό τρόπο σχηματισμού του Gln-tRNA^{Gln} αποτελεί η χρήση της αμιδοτρανσφεράσης του γλουταμινικού οξέος. Με τη δημιουργία μεταλλαγμένων γονιδίων που κωδικοποιούν το tRNA της γλουταμίνης και συνεπώς την αλλαγή συγκεκριμένων βάσεων στο μόριο γίνεται προσπάθεια μελέτης των στοιχείων που συμμετέχουν στην αναγνώριση του μορίου από τις αμιδοτρανσφεράσες, όταν αυτό κακοφορτίζεται από τη μη ειδική GluRS.



Εικόνα 14 : Το υπερθερμόφιλο αρχαίο *Pyrococcus abyssi* ανακαλύφθηκε στον πυθμένα του Ειρηνικού ωκεανού όπου η θερμοκρασία αγγίζει τους 100°C.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.ΥΛΙΚΑ

2.1 Χημικά

- Άγαρ
- Αγαρόζη
- Ακρυλαμίδιο
- Δις- ακρυλαμίδιο
- Αμπικιλίνη
- APS (Θειϊκό αμμώνιο)
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- BSA (Ορός αλβουμίνης)
- IPTG (Ισοπροπυλική θειογαλακτόζη)
- X-gal (5-βρωμο-4-χλώρο-3-ινδοϋλ-β-D-γαλακτοπυρανόζη)
- Μπλε της βρωμοφαινόλης
- MgCl₂
- Νουκλεοτίδια (dNTPs)
- Ουρία
- TBE (Tris-Βορικό-EDTA)
- TEMED
- DEPC

2.2 Ένζυμα

- Αλκαλική φωσφατάση
- BamH I
- BstN I
- Hind III
- T4 κινάση
- T4 λιγάση
- Taq DNA πολυμεράση
- T7 RNA πολυμεράση

2.3 Στελέχη κυττάρων *E. coli*

XL1 blue

Πρόκειται για στελέχη *E. coli* τα οποία διαθέτουν τα ακόλουθα γονίδια: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *lac*, F' *proAB*, *lacI^{qZ}* M15, Tn10(Tet^r). Χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση του γονιδίου αγριίου τύπου, καθώς και άλλων μεταλλαγμένων που κωδικοποιούν το tRNA^{Gln}.

2.4. Θρεπτικά μέσα

LB (Luriat Broth) υγρό μέσο:

- Casein peptone (10g)
- Εκχύλισμα ζύμης (5g)
- NaCl (10g)
- Απιονισμένο H₂O

LB (Luriat Broth) στερεό μέσο:

- Casein peptone (10g)
- Εκχύλισμα ζύμης (5g)
- NaCl (10g)
- Απιονισμένο H₂O
- Άγαρ (15g)

Το θρεπτικό μέσο SOC αποτελείται από:

- Tryptone 20g
- Εκχύλισμα ζύμης 5g
- NaCl 0,5g
- KCl 1M 2,5ml

Το θρεπτικό μέσο TSB αποτελείται από:

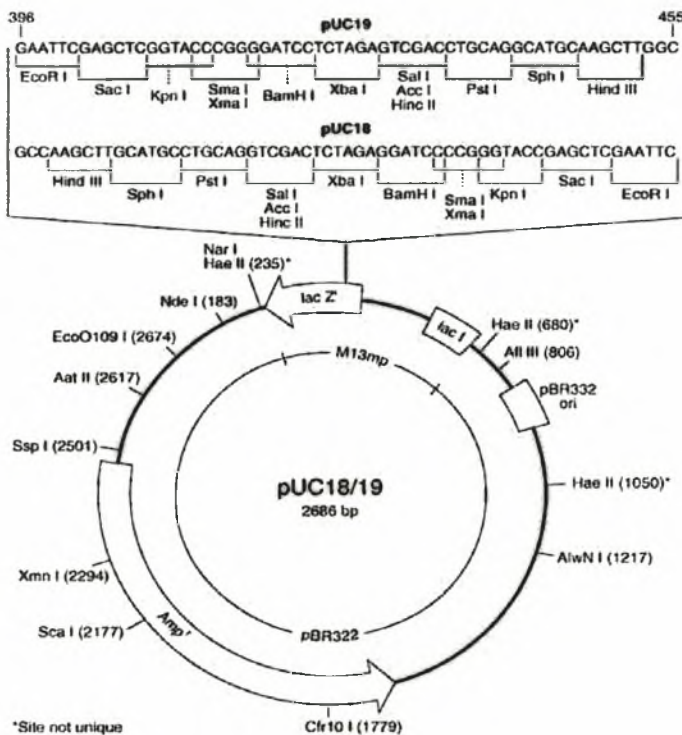
- Tryptone 1%
- NaCl 1%
- Εκχύλισμα ζύμης 0,5%
- PEG 10%

2.5 Πλασμιδιακοί φορείς

ρUC 18

Έχει μέγεθος 2,7 kb και περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες που προσδίδουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Διαθέτει επίσης το οπερόνιο της λακτόζης (*lacZ*) (Εικόνα 15). Η μεταγραφή αυτού του οπερονίου επάγεται από την ύπαρξη της λακτόζης στο περιβάλλον. Το χαρακτηριστικό της αντίδρασης διάσπασης της λακτόζης είναι η παραγωγή μπλε χρωστικών.

Στα πλασμίδια που διαθέτουν το οπερόνιο της λακτόζης, ο πολυσυνδέτης (polylinker) βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία του οπερονίου αυτού και επομένως το γονίδιο που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε θα διακόπτει τη συγκεκριμένη αλληλουχία, γεγονός που οδηγεί στη δομική και λειτουργική απενεργοποίηση του οπερονίου. Η μεταφορά του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου σε συγκεκριμένους φορείς επιβεβαιώνεται με τη χρήση του αναλόγου της λακτόζης, X-gal. Όσες από τις αναπτυσσόμενες αποικίες παρουσιάζονται λευκές σημαίνει ότι έχουν ενσωματώσει το πλασμίδιο με το κλωνοποιημένο γονίδιο, ενώ όσες χρωματίζονται μπλε σημαίνει πως τα κύτταρα τους δεν έχουν προσλάβει το πλασμίδιο ή το πλασμίδιο δεν έχει ενσωματώσει το επιθυμητό γονίδιο.



Εικόνα 15: Ο φορέας ρUC 18 που χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση των γονιδίων.

2.6 Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers)

Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και περιέχει:

- Tris base 400 mM
- Οξικό νάτριο 50mM
- Na₂EDTA 10mM
- Οξικό οξύ pH 7,9

Το ρυθμιστικό διάλυμα TBE χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και περιέχει:

- Tris base 400mM
- H₃BO₃
- Na₂EDTA2H₂O 10mM

Τα ακόλουθα ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιούνται για την αντίδραση με τα ένζυμα περιορισμού:

Ρυθμιστικό διάλυμα 1 (NE buffer 1)

- 10mM Tris-HCl
- 10mM MgCl₂
- 50mM NaCl
- 1mM dithiothreitol

Ρυθμιστικό διάλυμα 2 (NE buffer 2)

- 50mM Tris-HCl
- 10mM MgCl₂
- 100mM NaCl
- 1mM dithiothreitol

Το ρυθμιστικό διάλυμα A που χρησιμοποιείται για τη δράση της T4 κινάσης περιέχει:

- 0,5 M imidazole-HCl
- 0,18M MgCl₂
- 50mM DTT
- 1mM spermidine
- 1mM EDTA
- 1mM ADP

Το ρυθμιστικό διάλυμα Β που χρησιμοποιείται για τη δράση της T4 DNA λιγάσης περιέχει:

- 50mM Tris-HCl
- 10mM MgCl₂
- 10mM DTT
- 1mM ATP
- 2,5μg/ml BSA

2.7 Εκκινητές (primers) ή Προμοδότες

Για την σύνθεση των γονιδίων (άγριου τύπου και μεταλλαγμένων) που κωδικοποιούν για το tRNA της γλουταμίνης χρησιμοποιούνται εξειδικευμένα ολιγονουκλεοτίδια, ως εκκινητές (Πίνακας IV).

Πίνακας IV

```
TQPABY1: 5'AGCTTAATACGACTCAC 3'  
TQPABY2: 5' tatagggagatacggggct 3'  
TQPABY3:5'CTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGGTACCCGGTACCGTC3'  
TQPABY4: 5' agccccgtggtgtagcggc 3'  
TQPABY5: 5' CAAGCATGCGGGACTTTGGA 3'  
TQPABY6: 5' tccccgacccgggttcg 3'  
TQPABY7 5' AATCCCGGCGGGGCTACCAG 3'  
TQPABY8: 5'cggactcatcagagccccgtatctccctatagtgagtcgtatta 3'  
TQPABY9: 5' cggggctgacggtaccgggtaccggttctcctca 3'  
TQPABY10: 5' catgcttgcccgctacacca 3'  
TQPABY11: 5'gccccgatccaaagtcccc 3'  
TQPABY12: 5'cggggattcgaacccgggtc 3'  
TQPABY13: 5'gatcctgtagccccg 3'  
T7tata: 5'AGCTTAATACGACTCACtata 3'  
TQPABY4G1: 5'ggccccgtggtgtagcggc 3'  
TQPABY7C72: 5'AATCCCGGCGGGGCCACCAG3'  
QT7tataG1: 5'cggggcctatagtgagtcgtatta 3'  
TQPABY13C72: 5' gatcctggtggccccg 3'  
TQPABY4C2: 5' acccccgtggtgtagcggc 3'  
TQPABY7G71: 5' AATCCCGGCGGGGGTACCAG 3'  
TQPABY9C2: 5' cgggggtgacggtaccgggtaccggttctcctca 3'  
TQPABY13G71: 5' gatcctggtacccccg 3'  
TQPABY4+C17: 5' agccccgtggtgtagcggc 3'  
TQPABY10+C17: 5' catgcttgcccgctacacca 3'  
TQPABY4+C17C17A: 5'agccccgtggtgtagccccg 3'  
TQPABY10+C17C17A: 5' catgcttgccgggctacacca 3'  
TQPABY5C36: 5' CAAGCATGCGGGACTTTCTGA 3'  
TQPABY11C36: 5' gccccgatcgaagtcccc 3'  
TQPABY4G1C2C1717A: 5' gccccgtggtgtagccccg 3'  
TQPABY7G71C72: 5' AATCCCGGCGGGGGCACCAG 3'
```

QT7tataG1C2: 5' cgggggctatagtgagtcgtatta 3'
TQPABY10+C17C17A: 5' catgcttggccgggctacacca 3'
TQPABY13G71C72: 5' gatcctggtgcccccg 3'

2.8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

2.8.1 Προετοιμασία εκκινητών

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των γονιδίων που κωδικοποιούν για το tRNA^{Gln} αναδιαλύονται σε ddH₂O παρουσία DEPC (0,05%). Το DEPC παρεμποδίζει τη δράση των νουκλεασών.

2.8.2 Φωσφορυλίωση και υβριδοποίηση εκκινητών

Το πρώτο βήμα για τη σύνθεση του κάθε γονιδίου αποτελεί η φωσφορυλίωση των εκκινητών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται 0,5μl από κάθε εκκινητή ξεχωριστά στον οποίο προσθέτουμε 5μl ATP (10mM), 5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος A, 0,5μl T4 κινάσης και 39μl H₂O. Ακολουθεί επώαση στους 37⁰C για 30min και μετά στους 65⁰C για 10min.

Για τη σύνθεση του κάθε γονιδίου πραγματοποιείται υβριδοποίηση συγκεκριμένων εκκινητών. Η ποσότητα που χρησιμοποιείται από κάθε εκκινητή είναι 50pmol, ενώ προστίθεται και 40μl ρυθμιστικού διαλύματος B. Ακολουθεί επώαση στους 85⁰ C για 10min και τέλος σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας σε θερμοκρασία δωματίου για 3h.

2.9 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.9.1 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων

Η παρασκευη δεκτικών κυττάρων πραγματοποιείται με 2 μεθόδους:

- Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιούνται 5ml LB υγρού μέσου στα οποία προστίθεται 20 μl τετρακυκλίνης (5mg/ml) και εμβολιάζονται με κύτταρα στελέχους XL1 Blue. Η καλλιέργεια των κυττάρων επωάζεται για 10-14 ώρες στους 37°C και στις 210rpm. Ακολούθως 200 μl από την καλλιέργεια μεταφέρονται σε 5ml LB υγρού μέσου και επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση ώσπου η απορρόφηση OD₆₀₀ να φτάσει στην τιμή 0,4-0,5 που αντιστοιχεί στην εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων. Έπειτα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10min, στους 4°C και στις 4000 rpm. Αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθενται 2,5ml CaCl₂ (1M) και τοποθετούνται τα κύτταρα στους 0-4°C για 45min. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, αφαίρεση υπερκείμενου, προσθήκη 500μl CaCl₂(1M) και παραμονή των κυττάρων στους 0-4°C για 60min.
- Στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιούνται 5ml LB υγρού μέσου στα οποία προστίθεται 20 μl τετρακυκλίνης (5mg/ml) και εμβολιάζονται με κύτταρα στελέχους XL1 Blue. Η καλλιέργεια των κυττάρων επωάζεται για 10-14 ώρες στους 37°C και στις 210rpm. Ακολούθως η καλλιέργεια προστίθεται σε 200ml LB υγρού μέσου που περιέχει επίσης τετρακυκλίνη και αφήνονται τα κύτταρα να αναπτυχθούν στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600nm να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,4 και 0,5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στους 4°C και στις 4000rpm. Αφαιρείται το υπερκείμενο, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 5ml TSB και επωάζονται στους 0-4°C για 10min. Τέλος διαχωρίζονται σε ποσότητες των 100μl και αποθηκεύονται στους -80°C.

2.9.2 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Για το μετασηματισμό χρησιμοποιούνται 100μl δεκτικών κυττάρων τα οποία μεταφέρονται σε σωλήνες των 15ml. Στη συνέχεια προστίθενται 5μl από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και αφήνονται οι σωλήνες στους 0-4°C για 30min. Οι σωλήνες μεταφέρονται στο

υδατόλουτρο στους 42°C για 1min και μετά στους 0-4°C για 2min. Ακολούθως προστίθενται 500μl διαλύματος SOC και ακολουθεί επώαση για 1,5h στους 37°C και στις 180rpm. Τέλος 200μl μετασχηματισμένων κυττάρων επιστρώνονται σε τριβλία με LB στερεό μέσο και αμπικιλίνη.

2.9.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Λαμβάνονται 3mL καλλιέργειας μετασχηματισμένων κυττάρων και φυγοκεντρώνονται στις 11.000 rpm για 30sec. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 250μl από το διάλυμα A1. Το διάλυμα A1 περιέχει Rnase A η οποία πέπτει το βακτηριακό RNA που θα απελευθερωθεί με τη λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια προστίθενται 250 μl από το διάλυμα A2, το οποίο λύνει τα κύτταρα με το SDS που περιέχει και τη δημιουργία αλκαλικού περιβάλλοντος. Το μίγμα αναδεύεται ήπια για να μην θρυμματιστεί το χρωμοσωμικό DNA και προοδευτικά διαυγάξει καθώς η λύση των κυττάρων γίνεται πλήρως. Στο επόμενο βήμα προστίθενται 300μl από το διάλυμα A3, το οποίο εξουδετερώνει το ισχυρό αλκαλικό περιβάλλον που είχε δημιουργηθεί προηγουμένως. Οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA σε αυτό το βήμα μετουσιώνονται και πέφτουν σαν ίζημα με φυγοκέντρηση στις 11.000g για 5min. Το υπερκείμενο, στο οποίο παραμένει διαλυμένο το πλασμιδιακό DNA, μεταφέρεται σε ειδική στήλη που εφαρμόζεται σε eppendorf των 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1min στις 11000g. Το πλασμιδιακό DNA δεσμεύεται στη στήλη και ακολουθεί έκπλυσή του 450μl διαλύματος AQ και φυγοκέντρηση στις 11.000g για 4min, ώστε να αφαιρεθεί ποσοτικά η αλκοόλη από τη στήλη. Το πλασμιδιακό DNA εκλύεται κάτω από χαμηλής ισχύος ιονικές συνθήκες και ελαφρώς αλκαλικό pH με την προσθήκη στη στήλη 25μl διαλύματος AE, παραμονή για 1min και φυγοκέντρηση για 1min στους 20-22°C και στις 11000g.

Το διάλυμα AE περιέχει:

- 5mM Tris-HCl, pH 8,5.

2.9.4 Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού

Η διεργασία αυτή αναφέρεται στην υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA με ένζυμα περιορισμού. Πλασμιδιακό DNA επάζεται με το ένζυμο, παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος που προτείνεται από το κατασκευαστή και αφήνεται για 3 ώρες στους 37°C. Τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιούνται και δρουν σε αυτές τις συνθήκες είναι τα BamHI(10u/μl), HindIII(5u/μl). Αντίθετα το BstNI(2u/μl) δρα σε θερμοκρασία 65°C. Η

ενζυμική μονάδα ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει 1μg από βακτηριοφάγο σε μία ώρα. Κατά την επεξεργασία του πλασμιδίου με τα ένζυμα προστίθεται και BSA, το οποίο δεσμεύεται στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωλήνων, εμποδίζοντας έτσι τη δέσμευση ενδονουκλεασών σε αυτά και την επακόλουθη μείωση της δραστικότητάς των.

2.9.5 Ηλεκτροφόρηση

Ηλεκτροφορείται το διάλυμα του DNA σε πηκτή(gel) αγαρόζης, συγκέντρωσης 0,8% και 2%. Για τη δημιουργία του gel χρησιμοποιούμε αγαρόζη και ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1x). Το διάλυμα που περιέχει αυτά τα δύο συστατικά θερμαίνεται μέχρι να λιώσει η αγαρόζη και να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο και το διάλυμα τοποθετείται στην ηλεκτροφοριτική συσκευή όπου και αφήνεται να πήξει. Εν τω μεταξύ τα δείγματα που θα ηλεκτροφορηθούν προετοιμάζονται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος πλήρωσης (loading buffer). Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί φορτώνονται τα δείγματα στις θέσεις υποδοχείς και εφαρμόζεται τάση 120V. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, ανιχνεύεται η ύπαρξη DNA στην υπεριώδη ακτινοβολία, που επιτυγχάνεται με την προσθήκη του βρωμιούχου αιθιδίου που έχει προηγηθεί.

2.9.6 Ανίχνευση και ταυτοποίηση κλωνοποιημένων γονιδίων στους πλασμιδιακούς φορείς

Αρχικά προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα, το $MgCl_2$, τα νουκλεοτίδια, οι εκκινητές και το H_2O και φυγοκεντρείται το διάλυμα. Στη συνέχεια προστίθεται το DNA και αναμιγνύεται το μίγμα. Στο τέλος προστίθεται το ένζυμο, ενώ ακολουθεί και ανάδευση για ομοιόμορφη κατανομή του ενζύμου στο διάλυμα. Η PCR ξεκινά με ένα στάδιο μετουσίωσης σε θερμοκρασία $95^{\circ}C$ για 4min και ακολουθούν 30 κύκλοι καθένας από τους οποίους αποτελείται από ένα βήμα μετουσίωσης στους $95^{\circ}C$ για 1min, ένα στάδιο υβριδισμού στους $45^{\circ}C$ για 1,5min και ένα στάδιο πολυμερισμού στους $72^{\circ}C$ για 30sec. Κατόπιν διατηρείται η θερμοκρασία υβριδισμού για 10min. Τα υλικά που προστίθενται είναι τα ακόλουθα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer Taq) 10μl
- Νουκλεοτίδια (dNTPs) 1,3μl
- Εκκινητές sense 1μl
- Εκκινητές antisense 1μl
- DNA 2μl
- Taq(200u/μl) πολυμεράση 0,5μl

2.9.7 Αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του DNA και σύνδεση τμημάτων DNA

Σε 0,04g γραμμικού DNA προστίθεται 1μl αλκαλικής φωσφατάσης. Το διάλυμα επωάζεται στους 37°C για 45min και έπειτα στους 65°C για 10min.

Για τη σύνδεση των τμημάτων του DNA, 1μl γραμμικού και αποφωσφορυλιωμένου φορέα παρουσία των γονιδίων που θέλουμε να συνδέσουμε και σε αναλογία φορέα προς γονίδιο 1:10, επωάζονται με 5μl ATP 50mM και 1μl T4 λιγάσης στους 16°C όλη νύχτα.

2.9.8 *In vitro* μεταγραφή

Για την *in vitro* μεταγραφή επωάζονται 50μl πλασμιδιακού DNA με 0,6μl του ενζύμου BstN1, 6μl ρυθμιστικού διαλύματος 1 και σε θερμοκρασία 65°C. Ακόμη 1,5μl του ενζύμου προστίθενται μετά από 2 ώρες. Για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα της πέψης ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόχης 0,8%. Για τη μεταγραφή χρησιμοποιούνται 45μl DNA μετά από την πέψη τα οποία επωάζονται για 3 ώρες και στους 37°C με 10μl ρυθμιστικού διαλύματος, 10μl DTT, 1,85μl αδερίνης (324mM), 1,09μl γουανίνης (550Mm) 1,69μl ουρακίλης (354mM), 1,2μl κυτοσίνης 500mM), 1μl T7 πολυμεράσης, 1μl RNasin και 28,2μl H₂O. Για το διαχωρισμό του RNA πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου. Για να γίνει η πηκτική πολυακρυλαμιδίου, παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα:

- Διάλυμα πολυακρυλαμιδίου 40% το οποίο αποτελείται από 7,6g ακρυλαμιδίου και 0,4g δισ-ακρυλαμιδίου.
- Διάλυμα ακρυλαμιδίου και ουρίας 10% το οποίο αποτελείται από 5mL του παραπάνω διαλύματος, 2mL 10x TBE και 10g ουρία.
- Διάλυμα APS 20%.

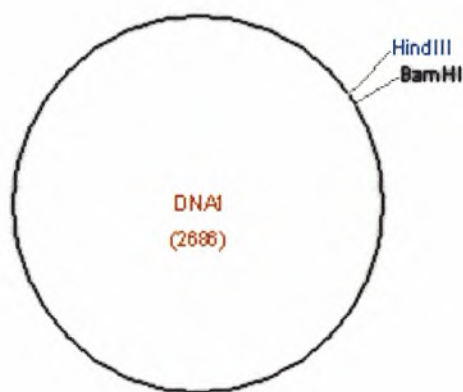
Για την πηκτική πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται 10mL διαλύματος ακρυλαμιδίου ουρίας, 8μl TEMED, που είναι υπεύθυνο για τον πολυμερισμό και 60μl APS, που βοηθά στην πήξη. Προστίθεται το διάλυμα στην κατάλληλη ηλεκτροφοριστική συσκευή μέχρι να πήξει. . Εν τω μεταξύ τα δείγματα που θα ηλεκτροφορηθούν προετοιμάζονται με την προσθήκη του διαλύματος πλήρωσης. Όταν η πηκτική στερεοποιηθεί φορτώνονται τα δείγματα στις θέσεις υποδοχείς και εφαρμόζεται τάση 225V. Για να ανιχνευθεί η ύπαρξη RNA μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης βάφεται η πηκτική με την προσθήκη μπλε της βρωμοφαινόλης και αναδεύεται για 20min. Στη συνέχεια για να γίνουν ορατές οι μπάντες πραγματοποιείται σταδιακά αποχρωματισμός της πηκτικής με νερό.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν το tRNA της γλουταμίνης (αγρίου τύπου & μεταλλαγμένων)

Αρχικός στόχος ήταν η κλωνοποίηση του αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων γονιδίων, που κωδικοποιούν για το tRNA της γλουταμίνης στο πλασμίδιο pUC 18 (Πίνακας V). Η όλη διαδικασία ξεκίνησε με την προσπάθεια μετασχηματισμού κυττάρων XL1 blue με το πλασμίδιο pUC 18. Αρχικά προετοιμάστηκαν δεκτικά κύτταρα, προστέθηκε το πλασμίδιο και έγινε επίστρωση συγκεκριμένης ποσότητας κυττάρων σε τριβλία που περιείχαν LB στερεό μέσο και λακτόζη (X-gal). Τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν και όσες λευκές αποικίες προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία 24 υγρών καλλιέργειών, κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Για κάθε τέτοια καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε LB υγρό θρεπτικό μέσο και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν υπό ανάδευση σε επωαστήρα για 14 ώρες στους 37°C.

Για την εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA από τα κύτταρα ακολουθήθηκε η διεργασία απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδιακού DNA με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και HindIII στους 37°C για 3 ώρες. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 0,8% από την οποία διαπιστώθηκε ότι η πέψη ήταν επιτυχής. (Εικόνα 17).



Εικόνα 16: Το πλασμίδιο pUC 18 και οι θέσεις κοπής των ενζύμων BamHI και HindIII (Genamics software).

Πίνακας V: Το γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA^{Gln} καθώς και μεταλλάξεις αυτού.

Αγρίου τύπου (wt)

ndII	pT7+TATA-Box	ribozyme	1	Pyrococcus abyssi tRNA ^{Gln}			76BamHI								
TQPABY1		TQPABY2		TQPABY3		TQPABY4		TQPABY5		TQPABY6		TQPABY7			
<p>ACTTAATACGACTCACtatagggagatacggggcctCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACCGTACCCCGTACCGTCagcccggtggtgtagcggcCAAGCATCCGGACTTTGGAtcccgcgaccgggttcgAATCCCGCGGGCTACCAg ATTAATGCTGAGTGATATCCCTCTATGCCCGGAGACTACTCAGGCactcctgctttgccatgggcatggcagtcggggcACCACATCCGGCTTCGTACgcccctgaaacctagggcgCTGGCCCAAGCTTAGGGCCgccccgtaggtcctag</p>															
TQPABY8				TQPABY9				TQPABY10		TQPABY11		TQPABY12		TQPABY13	

1 (C1G72→G1C72)

tRNA ^{Gln} mutant G1C72		T7tata		TQPABI4G1		TQPABY5		TQPABY6		TQPABY7C72		
<p>AAGCTTAATACGACTCACtatagggcgggtggtgtagcggcCAAACATCCGGACTTTGGAtcccgcgaccgggttcgAATCCCGCGGGJCCACCAg ATTAATGCTGAGTGATATccggggcACCACATCCCGCTTCGTACgcccctgaaacctagggcgCTGGCCCAAGCTTAGGGCCgccccgtaggtcctag</p>												
QT7tataG1			TQPABY10			TQPABI11		TQPABI12		TQPABY13C72		

2 (G2C71→C2G71)

tRNA ^{Gln} mutant C2G71		TQPABY1		TQPABY2		TQPABY3		TQPABY4C2		TQPABY5		TQPABY6		TQPABI7G71			
<p>ACTTAATACGACTCACtatagggagatacggggcctCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACCGTACCCCGTACCGTCagcccggtggtgtagcggcCAAGCATCCGGACTTTGGAtcccgcgaccgggttcgAATCCCGCGGGTACCAg ATTAATGCTGAGTGATATCCCTCTATGCCCGGAGACTACTCAGGCactcctgctttgccatgggcatggcagtcggggcACCACATCCGGCTTCGTACgcccctgaaacctagggcgCTGGCCCAAGCTTAGGGCCgccccgtaggtcctag</p>																	
TQPABY8				TQPABI9C2				TQPABY10		TQPABI11		TQPABI12		TQPABY13G71			

3 (+C17)

tRNA ^{Gln} mutant +C17		TQPABY1		TQPABY2		TQPABY3		TQPABY4+C17		TQPABY5		TQPABI6		TQPABY7					
<p>ACTTAATACGACTCACtatagggagatacggggcctCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACCGTACCCCGTACCGTCagcccggtggtgtagcggcCAAGCATCCGGACTTTGGAtcccgcgaccgggttcgAATCCCGCGGGTACCAg ATTAATGCTGAGTGATATCCCTCTATGCCCGGAGACTACTCAGGCactcctgctttgccatgggcatggcagtcggggcACCACATCCGGCTTCGTACgcccctgaaacctagggcgCTGGCCCAAGCTTAGGGCCgccccgtaggtcctag</p>																			
TQPABY8				TQPABY9				TQPABY10+C17				TQPABI11		TQPABI12		TQPABY13			

4 (+C17+C17A)

tRNA ^{Gln} mutant +C17+C17A		TQPABY1		TQPABY2		TQPABY3		TQPABY4+C17C17A		TQPABY5		TQPABY6		TQPABI7					
<p>ACTTAATACGACTCACtatagggagatacggggcctCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACCGTACCCCGTACCGTCagcccggtggtgtagcggcCAAGCATCCGGACTTTGGAtcccgcgaccgggttcgAATCCCGCGGGTACCAg ATTAATGCTGAGTGATATCCCTCTATGCCCGGAGACTACTCAGGCactcctgctttgccatgggcatggcagtcggggcACCACATCCGGCTTCGTACgcccctgaaacctagggcgCTGGCCCAAGCTTAGGGCCgccccgtaggtcctag</p>																			
TQPABY8				TQPABY9				TQPABI10+C17C17A				TQPABI11		TQPABI12		TQPABI13			

5 (G36→C36)

tRNA^{Gln} mutant C36

```

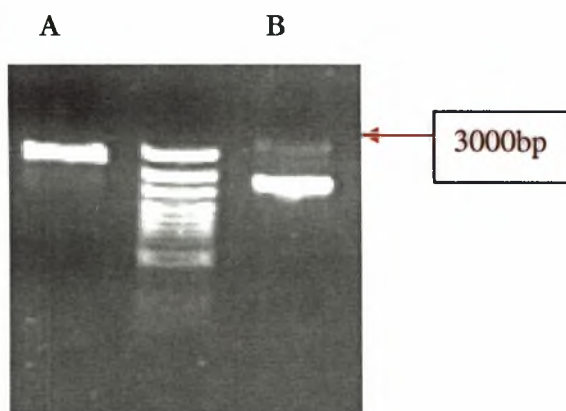
TQPABY1      TQPABY2      TQPABY3      TQPABY4      TQPABY5C36      TQPABY6      TQPABY7
-----
AGCTTAATACGACTCActataggggagatacggggctCTGATGAGTCGGTGAAGACAAACGGTACCCGGTACCGTCAgccccgtgggtgtagcgggcCAAGCATGCCGGACTTTGGAtccccggaacccgggttcgAAATCCCGGGGGGCTACCAG
ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTATGCCCGAGACTACTCAGGCac:tcctgetttgccatggggccatgggcagtcggggcACCCATCGCCGGTTCGTACgcccctgaaagctagggcgCTGGGCCAAGCTTAGGGCCgccccgtaggtcctag
-----
TQPABY8      TQPABY9      TQPABY10      TQPABY11C36      TQPABY12      TQPABY13
  
```

6 (all mutated)

tRNA^{Gln} mutant all

```

T7tata      TQPABY4G1C2C1717A      TQPABY5C36      TQPABY6      TQPABY7G71C72
-----
AGCTTAAATACGACTCActatagccccgggtgggtgtagcgggcCAAGCATGCCGGACTTTGGAtccccggaacccgggttcgAAATCCCGGGGGGGCAACAG
ATTATGCTGAGTGATATcgggggcACCCATCGGGCCGGTTCGTACgcccctgaaagctagggcgCTGGGCCAAGCTTAGGGCCgccccgtaggtcctag
-----
QT7tataG1C2      TQPABY10+C17C17A      TQPABY11C36      TQPABY12      TQPABY13G71C72
  
```



Εικόνα 17: Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μετά από απομόνωση και πέψη με τα ένζυμα BamHI και HindIII του φορέα pUC 18. Η επιθυμητή ζώνη εντοπίζεται στις 3000bp. (A:pUC 18 μετά από πέψη, B:pUC 18)

Από την πηκτική απομονώθηκαν οι ζώνες που αντιστοιχούν στον φορέα pUC 18 με σκοπό να καθαριστεί το πλασμίδιο. Η τελική επεξεργασία που υπέστη το πλασμίδιο ήταν η αποφωσφορυλίωση με επώαση παρουσία της αλκαλικής φωσφατάσης.

Επόμενο βήμα στην όλη διαδικασία αποτέλεσε η σύνθεση των γονιδίων. Για το σκοπό αυτό αρχικά φωσφορυλιώθηκε ο κάθε εκκινητής ξεχωριστά με τη δράση της T4 κινάσης. Έπειτα χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένοι εκκινητές για κάθε γονίδιο, οι οποίοι και υβριδοποιήθηκαν. Τελικά πραγματοποιήθηκε η σύνδεση φορέα και γονιδίου με επώαση παρουσία λιγάσης στους 16°C για 12-14 ώρες.

Επόμενο βήμα στην όλη διαδικασία αποτέλεσε η σύνθεση των γονιδίων. Για το σκοπό αυτό αρχικά φωσφορυλιώθηκε ο κάθε εκκινητής ξεχωριστά με τη δράση της T4 κινάσης. Έπειτα χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένοι εκκινητές για κάθε γονίδιο, οι οποίοι και υβριδοποιήθηκαν. Τελικά πραγματοποιήθηκε η σύνδεση φορέα και γονιδίου με επώαση παρουσία λιγάσης στους 16°C για 12-14 ώρες.

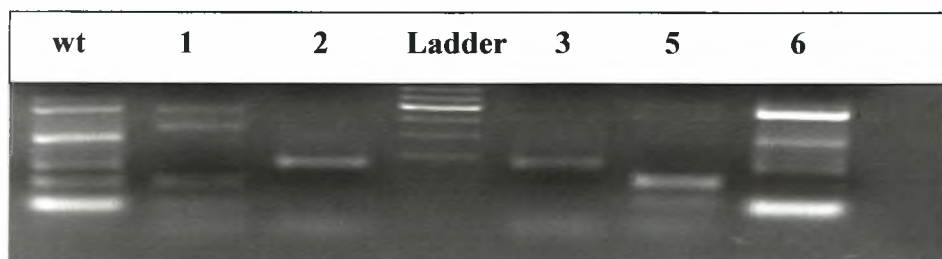
Η επιτυχία της κλωνοποίησης των γονιδίων επιβεβαιώθηκε με το μετασχηματισμό κυττάρων XL1 blue με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε προσθήκη του πλασμιδίου και επιστρώθηκαν τριβλία με LB στερεό μέσο. Στη συνέχεια όσες άσπρες καλλιέργειες προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία 24 υγρών καλλιεργειών, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA (ανασυνδυασμένο puc 18) (Εικόνα 18).

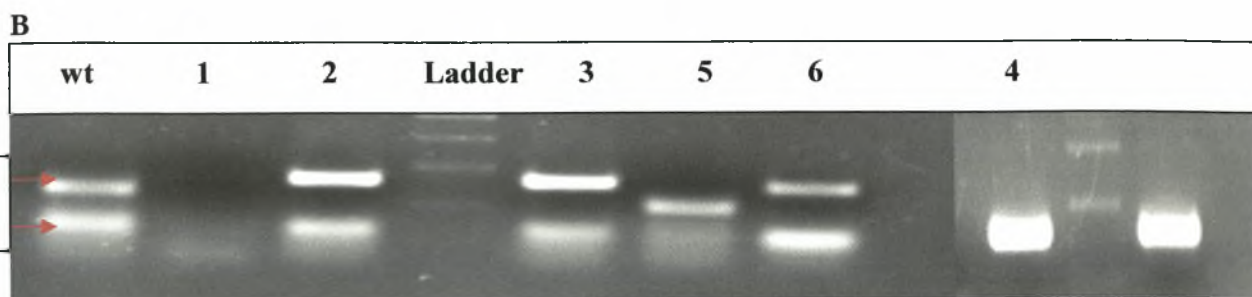


Εικόνα 18: Οι λευκές αποικίες που αναπτύσσονται στο εσωτερικό του τρυβλίου είναι κλώνοι που πιθανώς έχουν μετασχηματιστεί με το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Στο τελικό στάδιο του πειράματος πραγματοποιήθηκε PCR, τα προϊόντα της οποίας ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 2%. Έγιναν δύο PCR, η πρώτη στους 45°C και με ποσότητα εκκινητών 2μl συνολικά της οποίας τα προϊόντα δεν ήταν τόσο εξειδικευμένα διότι οι εκκινητές παρουσίαζαν συμπληρωματικότητα και σε άλλα σημεία του πλασμιδίου, εκτός του επιθυμητού γονιδίου(Εικόνα 19A). Στη δεύτερη PCR αυξήθηκε η ποσότητα των εκκινητών σε 4μl συνολικά και η θερμοκρασία στους 60°C, με αποτέλεσμα να αυξηθεί η εξειδίκευση και προκύψουν τα επιθυμητά προϊόντα (Εικόνα 19B).

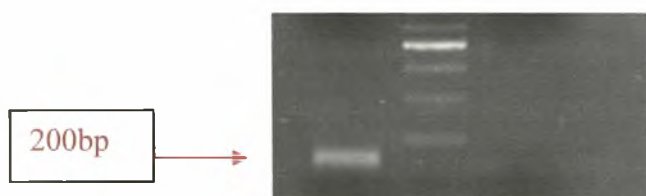
A





Εικόνα 19: Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR των κλωνοποιημένων γονιδίων. Στην εικόνα 19A παρουσιάζεται η PCR στους 45°C, ενώ η εικόνα 19B στους 60°C. Τα γονίδια που κλωνοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα: το γονίδιο άγριου τύπου που κωδικοποιεί το tRNA^{Gln}, το γονίδιο 1 που φέρει τη μετάλλαξη G1C72, το γονίδιο 2 με τη μετάλλαξη C2G71, το γονίδιο 3 με τη μετάλλαξη +C17, το γονίδιο 4 που φέρει τη μετάλλαξη +C17+C17A, το 5 με τη μετάλλαξη C36 και το γονίδιο 6 που φέρει όλες τις παραπάνω μεταλλάξεις. Η επιθυμητή ζώνη εντοπίζεται στις 200bp.

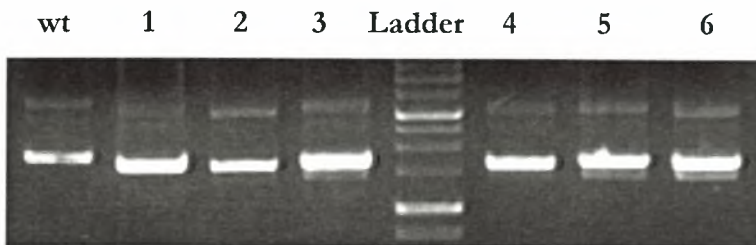
Από τη εικόνα 19B διαπιστώθηκε ότι έπρεπε να επαναληφθεί η διαδικασία κλωνοποίησης για το γονίδιο 1 που φέρει τη μετάλλαξη G1C72. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε PCR και ηλεκτροφόρηση για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία των αποτελεσμάτων (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης του προϊόντος PCR του κλωνοποιημένου γονιδίου 1.

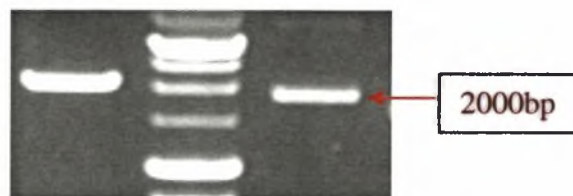
3.2 Μεταγραφή των κλωνοποιημένων γονιδίων

Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση των γονιδίων εξετάστηκε η δυνατότητα μεταγραφής τους. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν οι σωστοί κλώνοι από κάθε γονίδιο και μία ποσότητά τους ηλεκτροφορήθηκε για να υπολογιστεί η ποσότητα που απαιτείται για τη μεταγραφή (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση μιας ποσότητας ανασυνδιασμένου πλασμιδίου με το κάθε γονίδιο.

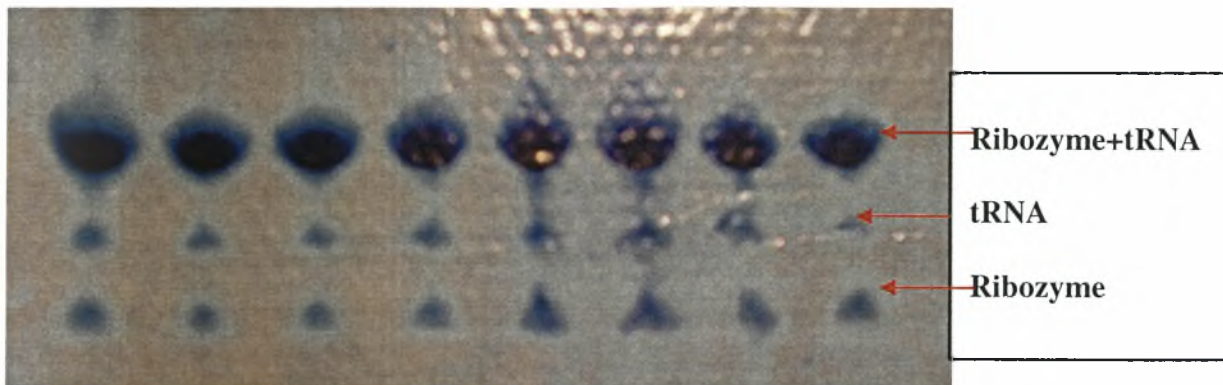
Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι χρειαζόνταν 50μl πλασμιδιακού DNA τα οποία επώαστηκαν με το ένζυμο BstN1 και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Μία ποσότητα του ενζύμου προστίθεται στην αρχή της αντίδρασης, ενώ μία άλλη προστίθεται αφού περάσουν 2 ώρες. Τα αποτελέσματα της πέψης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 0,8% (Εικόνα 22).



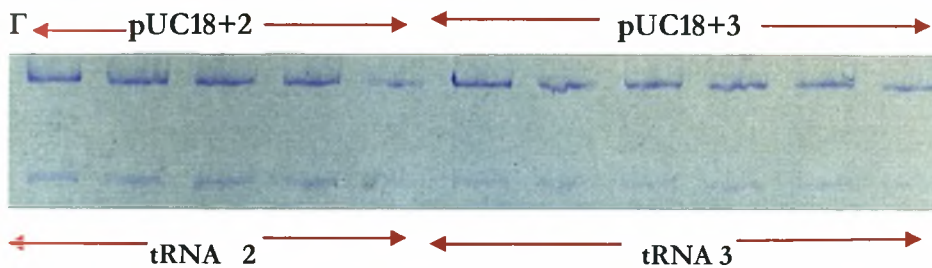
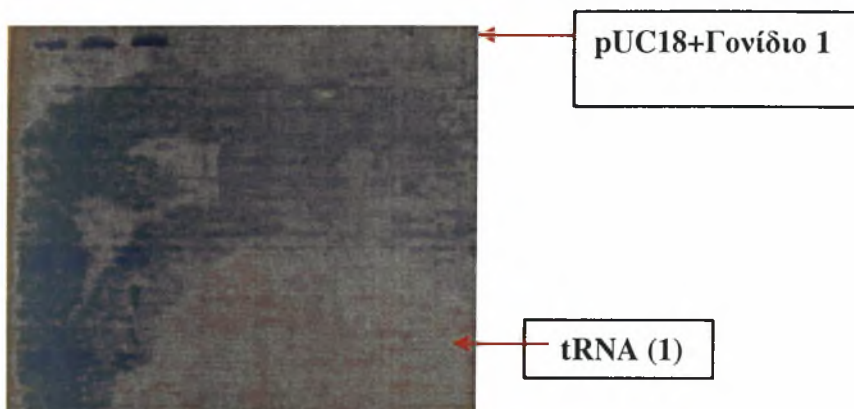
Εικόνα 22: Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μετά από πέψη του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου με το ένζυμο BstN1. Η επιθυμητή ζώνη εντοπίζεται στις 2000bp.

Ακολουθεί η μεταγραφή. Αρχικά προστίθεται μέσα στο σωλήνα με το γραμμικό DNA το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, DTT, τα ριβονουκλεοτίδια και ο αναστολέας της ριβονουκλεάσης (RNasin). Τέλος προστίθεται το ένζυμο T7 πολυμεράση και ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 37°C για 4 ώρες. Σε αυτό το διάστημα προετοιμάστηκε η πηκτική πολυακρυλαμίδου στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της μεταγραφής. Μετά τη ηλεκτροφόρηση η πηκτική βάρθηκε με μπλε της βρωμοφαινόλης και αφέθηκε όλη νύχτα υπό ανάδευση για να αποχρωματιστεί με νερό. Η τελική παρατήρηση της πηκτικής επιβεβαίωσε την ορθότητα των αποτελεσμάτων της μεταγραφής. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε για ένα γονίδιο μικρού και για δύο γονίδια μεγάλου μεγέθους (Εικόνα 23).

A



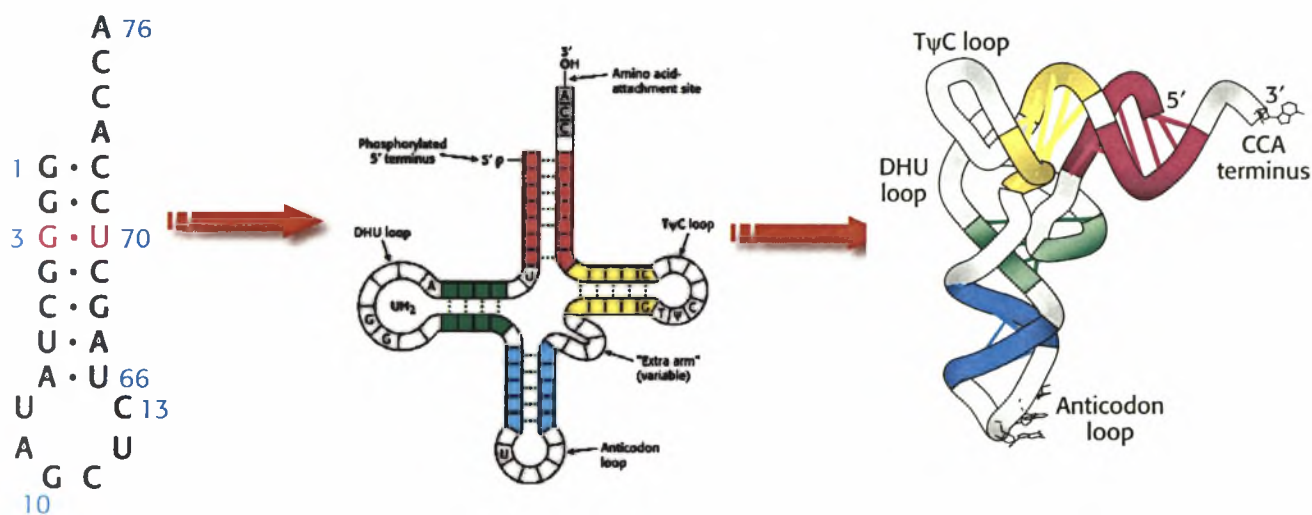
B



Εικόνα 23: Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου των προϊόντων έκφρασης του γονιδίου αγρίου τύπου που φέρει το ριβοένζυμο, καθώς και των γονιδίων 1: C1G72→C2G71 (B) 2: G2C71→C2G71 και 3: +C17 (Γ).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το tRNA είναι ένα προσαρμοστικό μόριο υπεύθυνο για την αναγνώριση των κωδικονίων του mRNA και την μετατροπή τους στο αντίστοιχο αμινοξύ⁴⁸. Η ταυτότητα του tRNA θεωρείται σημαντική για τη σωστή αμινοακυλίωση του μορίου και συνεπώς τη σωστή έκφραση του γενετικού κώδικα και την παραγωγή πρωτεϊνών⁴⁹. Κατά μήκος του μορίου υπάρχουν βάσεις, γνωστές ως στοιχεία αναγνώρισης, οι οποίες συμμετέχουν στην εξειδικευμένη αναγνώριση του tRNA από την ειδική αμινοακυλο-tRNA συνθετάση (aaRS). Τυπικά μόνο το 20% της προσβάσιμης επιφάνειας του μορίου tRNA συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με την αμινοακυλο-tRNA συνθετάση, ενώ κάποιες από αυτές τις αλλαγές μπορεί να οδηγήσουν σε κρίσιμες μεταβολές της διαμόρφωσης του μορίου. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι η τροποποίηση συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων σε πολλά μόρια tRNA είναι σημαντική για τη μετάφραση του mRNA στο ριβόσωμα⁵⁰. Για παράδειγμα, το tRNA^{Lys} (UUU) απαιτεί την τροποποίηση N6-θρεόνυλοκαρβαμυλοαδενοσίνη στη θέση 37 κοντά στο 3' άκρο του αντικωδικονίου για να δεσμεύσει AAA στη θέση A της 30S υπομονάδας. Επίσης το μόριο tRNA κατά τη διάρκεια της εξέλιξης απέκτησε διαφορετική δομή με την εμφάνιση επιπλέον βάσεων, οι οποίες διευκολύνουν την αναγνώριση από τις συνθετάσες (Εικόνα 24).

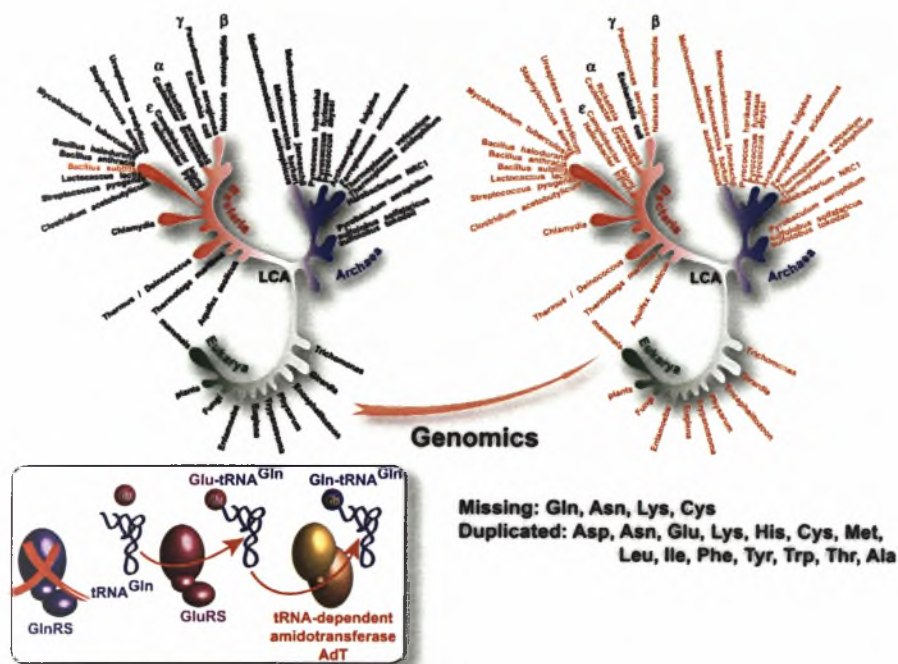


Εικόνα 24: Εξέλιξη του μορίου tRNA από ένα πιο απλό μόριο σε ένα πιο πολύπλοκο μόριο.

Μελέτες έδειξαν ότι η σωστή αναγνώριση του tRNA από την αμινοακυλο-tRNA συνθετάση στηρίζεται στη μελέτη της κινητικής Michaelis Menten. Στις περισσότερες περιπτώσεις η χρήση μεταλλαγμένων ή μη ειδικών μορίων tRNA επηρεάζει την k_{cat} , ενώ έχει μικρότερη επίδραση στη σταθερά k_m .

Η αμινοακυλίωση γίνεται μέσω δύο βιοχημικών μονοπατιών. Το πρώτο στηρίζεται στην αλληλεπίδραση του tRNA με μία ειδική αμινοακυλο-tRNA συνθετάση, ενώ στο δεύτερο

μονοπάτι συμμετέχει μία μη ειδική αμινοακυλο-tRNA συνθετάση και μία αμιδοτρανσφεράση (AdT). Υπάρχουν δύο αμιδοτρανσφεράσες, μία που εντοπίζεται στα βακτήρια και στα ευκαρυωτικά οργανίδια, κωδικοποιείται από το οπερόνιο *gatCAB* και λειτουργεί και ως Asp/Glu-AdT και μία που εντοπίζεται αποκλειστικά στα αρχαία, κωδικοποιείται από το οπερόνιο *gatDE* και λειτουργεί μόνο ως Glu-AdT (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Κατανομή των συνθετασών μεταξύ των οργανισμών και το εναλλακτικό μονοπάτι αμινοακυλίωσης.

Στη συγκεκριμένη εργασία κλωνοποιήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA^{Gln}, καθώς και γονίδια που προέκυψαν από αυτό του αγρίου τύπου με την εισαγωγή μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις αυτές θα οδηγήσουν σε αλλαγές των βάσεων στο μόριο tRNA^{Gln} και συγκεκριμένα στην θηλιά του αντικωδικίου, στην περιοχή πρόσδεσης του αμινοξέος και στη θηλιά DHU. Η κλωνοποίηση αυτών των γονιδίων ήταν επιτυχής, όπως φαίνεται και από τις ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων PCR των συγκεκριμένων γονιδίων. Με την ίδια επιτυχία πραγματοποιήθηκε και μεταγραφή μερικών από αυτά τα γονίδια, όπως φαίνεται από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου.

Το ενδιαφέρον όλων των ερευνητών στρέφεται στην ταυτότητα του tRNA και στην εξειδικευμένη αμινοακυλίωσή του. Η σωστή επιλογή και ενεργοποίηση του αμινοξέος είναι απαραίτητα για τη σωστή έκφραση και τη σύνθεση της κατάλληλης πρωτεΐνης. Η όλη διαδικασία θεωρείται θεμελιώδης διότι οι οργανισμοί καταφέρνουν να συνθέσουν τις πρωτεΐνες που χρειάζονται και οι οποίες τους δίνουν την δυνατότητα να συνεχίσουν να επιβιώνουν. Σε αυτή

την κατάσταση συμβάλλει και η ύπαρξη του έμμεσου μονοπατιού αμινοακυλίωσης με τις αμιδοτρανσφεράσες που βοηθά τους οργανισμούς, από του οποίους απουσιάζει η AsnRS και η GluRS να συνθέτουν Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln}. Σε περιπτώσεις που επιλέγεται το λάθος αμινοξύ, πραγματοποιείται η σύνθεση μίας διαφορετικής πρωτεΐνης από την επιθυμητή, η οποία μπορεί να είναι ελαττωματική και να οδηγήσει σε απορρύθμιση της λειτουργίας του οργανισμού και τελικά στο θάνατο.

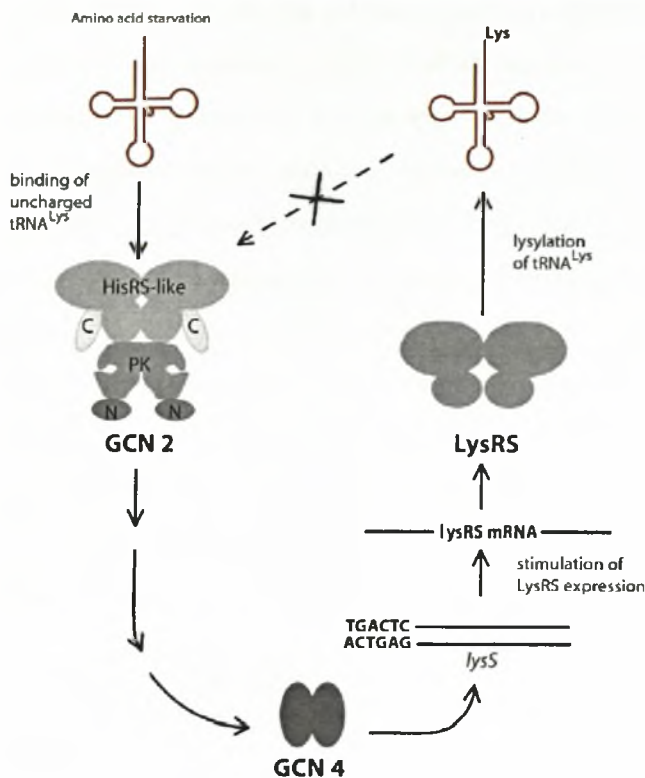
Επειδή το μονοπάτι της Glu-AdT είναι κρίσιμο για την πρωτεϊνοσύνθεση στα Gram θετικά βακτήρια, η Glu-AdT μπορεί να αποτελέσει στόχο για αντιβακτηριακά φάρμακα. Ένα πολύ καλό παράδειγμα αποτελεί η *Chlamydia* της οποίας οι φυσιολογία εξαρτάται άμεσα από τις AdTs⁵¹. Παρατηρήθηκε ότι μετά από επώαση ενός ιστού με την *Chlamydia trachomatis* το περιβάλλον αλλάζει και γίνεται εχθρικό για τα εισβάλλοντα παράσιτα. Η βακτηριακή μόλυνση πυροδοτεί ένα μονοπάτι από γεγονότα στο σώμα που οδηγεί σε ερεθισμό και ανοσολογική απόκριση που συντονίζεται από τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Το εσωκυτταρικό περιβάλλον που περικλείει το βασικό σώμα του παρασίτου είναι φτωχό σε γλουταμίνη και πλούσιο σε γλουταμινικό και δεν επηρεάζει την είσοδο των παρασίτων στα ξένα κύτταρα, διότι η είσοδος των παρασίτων εξαρτάται από πρωτεΐνες στη μεμβράνη τους και όχι από την πρωτεϊνοσύνθεση στα ξένα κύτταρα. Ωστόσο μετά την είσοδο, το παράσιτο πρέπει να εκφράσει συγκεκριμένα γονίδια για να πυροδοτήσει ένα εξωκυτταρικό μονοπάτι, αποφεύγοντας καταστροφή από τα λυσοσώματα, και για να μετατραπεί από τη μη μεταβολική μορφή του σε μία ενεργή μορφή. Φαίνεται ότι το ελλειπές σε γλουταμίνη παράσιτο ίσως χρειάζεται Asp/Glu-AdT για να παράγει σωστά φορτισμένα tRNA, να εκφράσει τις κατάλληλες πρωτεΐνες και να μολύνει τα ξένα κύτταρα.

Η ανάλυση της αλληλουχίας των μιτοχονδριακών μορίων tRNA (mtRNA) απέδειξε ότι μία σειρά από μεταλλάξεις στα μόρια αυτά προκαλούν αρκετές ασθένειες στον άνθρωπο, οι οποίες μπορεί να είναι θανατηφόρες ή όχι⁵². Έχει παρατηρηθεί όμως ότι τα δυσάρεστα αποτελέσματα αυτών των μεταλλάξεων μπορούν να αποκατασταθούν με την πραγματοποίηση νέων μεταλλάξεων που επαναφέρουν την δομική σταθερότητα των μορίων tRNA. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων μεθόδων θεραπείας των διαφόρων ασθενειών.

Υπάρχει μία ποικιλία ασθενειών που σχετίζεται με μεταλλάξεις των μορίων tRNA. Για παράδειγμα, σημειακή η μετάλλαξη A>G στη θέση 3243 του m-tRNA^{Leu} (UUR) σχετίζεται με αρκετές κλινικές καταστάσεις, όπως εγκεφαλοπάθεια, διαβήτη και κώφωση⁵³. Επιπλέον η ίδια μετάλλαξη μειώνει τη δυνατότητα αμινοακυλίωσης του tRNA^{Leu54}. Επίσης ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA έδειξε ότι μετάλλαξη που είναι υπεύθυνη για την προσθήκη κυτιδίνης και όχι ουριδίνης στο 5' άκρο του αντικωδικονίου του tRNA^{Ile} μπορεί να οδηγήσει σε

υπερχοληστερολαιμία και υπομαγνησισαιμία⁵⁵. Αξίζει να αναφερθεί ότι η μετάλλαξη A7445G στο πρόδρομο m-tRNA^{Ser} μπορεί να προκαλέσει κώφωση⁵⁶. Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι η μετάλλαξη A58U στο tRNA^{Lys} μπορεί να παρεμποδίσει την αντιγραφή του HIV 1 και συνεπώς να επηρεάσει τον κύκλο ζωής του ιού⁵⁷.

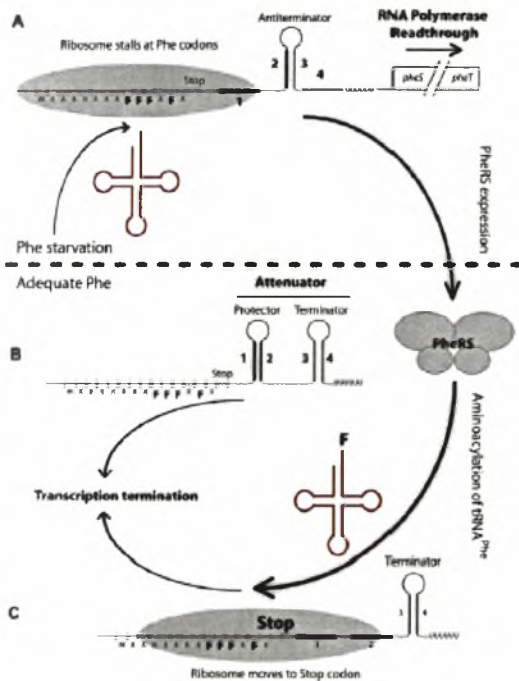
Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε πόσο σημαντική είναι η διατήρηση της δομικής σταθερότητας και της ταυτότητας του tRNA, καθώς και η σωστή αμινοακυλίωση του στην παρεμπόδιση της εμφάνισης διαφόρων ασθενειών. Τα μόρια tRNA όμως εκτός από τη μετάφραση θεωρούνται εξίσου σημαντικά για διάφορους ρυθμιστικούς μηχανισμούς και γι' αυτό το λόγο κατά τη διάρκεια της εξέλιξης έχουν επιλεγεί διάφορα δομικά χαρακτηριστικά τους ως στοιχεία κλειδιά για αρκετά βιολογικά μονοπάτια⁵⁸. Τα αφόρτιστα tRNAs αποτελούν τους αισθητήρες για την έλλειψη των αμινοξέων η οποία ρυθμίζεται από τις aaRSs. Ένας μηχανισμός που συμμετέχει στη γενική απάντηση για την έλλειψη των αμινοξέων είναι αυτός που διαμεσολαβεί από το GCN2/GCN4. Ένα καλό παράδειγμα για αυτό το μηχανισμό αποτελεί η έλλειψη λυσίνης (Lys). Από τη στιγμή που η συγκέντρωση της Lys ελαττώνεται, παρατηρείται αύξηση του mRNA της LysRS ως απάντηση προς ένα συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα που ονομάζεται GCN4. Αυτός ο ενεργοποιητής αναγνωρίζει μία συγκεκριμένη αλληλουχία (5'-TGACTC-3') στον επαγωγέα του γονιδίου της LysRS. Αυτός ο παράγοντας συμμετέχει σε πολλές διαδικασίες, μία από τις οποίες είναι η ενεργοποίηση, μέσω των αφόρτιστων tRNAs, της πρωτεΐνης GCN2. Η πρωτεΐνη αυτή διαθέτει 4 λειτουργικές περιοχές: 1) μία αμινοτελική στην οποία δεσμεύονται και άλλοι ενεργοποιητές 2) μία περιοχή πρωτεϊνικής κινάσης. (PK) 3) μία ομόλογη με την HisRS (HisRS-like) και 4) μία καρβοξυτελική περιοχή. Η GCN2 μπορεί να δεσμεύει διαφορετικά αμινοξέα και να διακρίνει μεταξύ αφόρτιστων και φορτισμένων αμινοξέων. Σε χαμηλή συγκέντρωση Lys ένα αφόρτιστο tRNA^{Lys} δεσμεύεται στην περιοχή HisRS-like και στην καρβοξυτελική περιοχή. Η δέσμευση αυτή ενεργοποιεί την περιοχή PK και οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής του παράγοντα GCN4, οποίος δεσμεύεται στον επαγωγέα της LysRS γεγονός που οδηγεί σε μεταγραφή του mRNA της. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η συγκέντρωση της LysRS με αποτέλεσμα να ευνοείται η αμινοακυλίωση του tRNA^{Lys}. Από τη στιγμή που το tRNA φορτίζεται δεν μπορεί να δεσμευθεί στην πρωτεΐνη GCN2 με αποτέλεσμα το μονοπάτι GCN2/GCN4 να παρεμποδίζεται (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Το μονοπάτι GCN2/GCN4 ως απάντηση στην έλλειψη Lys στο *S. cerevisiae*. Σε χαμηλή συγκέντρωση Lys ένα αφορτιστο tRNA^{Lys} δεσμεύεται στην περιοχή HisRS-like και στην καρβοξυτελική περιοχή. Η δέσμευση αυτή ενεργοποιεί την περιοχή PK και οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής του παράγοντα GCN4, οποίος δεσμεύεται στον επαγωγέα της LysRS γεγονός που οδηγεί σε μεταγραφή του mRNA της. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η συγκέντρωση της LysRS με αποτέλεσμα να ευνοείται η αμινοακυλίωση του tRNA^{Lys}. Από τη στιγμή που το tRNA φορτίζεται δεν μπορεί να δεσμευθεί στην πρωτεΐνη GCN2 με αποτέλεσμα το μονοπάτι GCN2/GCN4 να παρεμποδίζεται.

Ένας άλλος μηχανισμός στον οποίο σημαντικό ρόλο κατέχουν τα αμινοξέα είναι γνωστός ως «transcriptional attenuation». Στη συγκεκριμένη διαδικασία παρατηρείται άμεση σχέση μεταξύ της μεταγραφής και της μετάφρασης, καθώς μετάφραση μιας μικρής περιοχής-οδηγού αποτελεί το περιοριστικό βήμα στην μεταγραφή του mRNA μιας συνθετάσης. Το ακόλουθο παράδειγμα αναφέρεται στο tRNA^{Phe} και στην PheRS. Υπάρχουν 2 γονίδια, τα *pheS* και *pheT* τα οποία είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο, μεταγράφονται από ένα μοναδικό επαγωγέα και κωδικοποιούν μία ετεροτριμερή PheRS. Στην πραγματικότητα παράγονται 2 mRNA. Το πρώτο είναι ένα μετάγραφο μεγάλου μήκους που περιλαμβάνει τα 150 νουκλεοτιδία της περιοχής-οδηγού που ακολουθείται από τα γονίδια *pheS* και *pheT*. Το δεύτερο μετάγραφο είναι πιο μικρό και περιλαμβάνει μόνο την περιοχή-οδηγό προτείνοντας τη λήξη της μεταγραφής πριν τα γονίδια *pheS* και *pheT*. Στην πραγματικότητα, το RNA της περιοχής-

οδηγού όχι μόνο κωδικοποιεί μια ομάδα 14 αμινοξέων των οποίων το πλαίσιο ανάγνωσης περιέχει πολλά κωδικόνια φαινυλαλανίνης, αλλά διαθέτει και μία μοναδική περιοχή πριν το γονίδιο *pheS* που ονομάζεται «attenuator». Αυτή η περιοχή διαθέτει 2 άλλες λειτουργικές δομές γνωστές ως «rho-independent terminator» και «protector element». Στην περίπτωση που παρατηρηθεί έλλειψη Phe, η χαμηλή συγκέντρωση Phe-tRNA^{Phe} παρεμποδίζει τη σύνθεση πεπτιδίου. Σε αυτή την περίπτωση ευνοείται ο σχηματισμός της περιοχής που παρεμποδίζει τη λήξη της μεταγραφής (υβριδοποίηση των περιοχών 2 και 3) με αποτέλεσμα η RNA πολυμεράση να συνεχίζει τη μεταγραφή των γονιδίων *pheS* και *pheT*. Η ενεργοποίηση της έκφρασης της PheRS ευνοεί την αμινοακυλίωση του tRNA^{Phe} και επιτρέπει την κωδικοποίηση της περιοχής-οδηγού. Η τοποθέτηση του ριβοσώματος στο κωδικόνιο λήξης του mRNA παρεμποδίζει την περιοχή «protector element», ενώ οδηγεί στο σχηματισμό της περιοχής «rho-independent terminator» με αποτέλεσμα τη λήξη της μεταγραφής και της παραγωγής PheRS.



Εικόνα 27: Ο μηχανισμός «transcriptional attenuation» όπως παρουσιάζεται για τη ρύθμιση της PheRS στο *E. coli*. A,B) Στην περίπτωση που παρατηρηθεί έλλειψη Phe, η χαμηλή συγκέντρωση Phe-tRNA^{Phe} παρεμποδίζει τη σύνθεση πεπτιδίου. Σε αυτή την περίπτωση ευνοείται ο σχηματισμός της περιοχής που παρεμποδίζει τη λήξη της μεταγραφής (υβριδοποίηση των περιοχών 2 και 3) με αποτέλεσμα η RNA πολυμεράση να συνεχίζει τη μεταγραφή των γονιδίων *pheS* και *pheT*. Γ) Η ενεργοποίηση της έκφρασης της PheRS ευνοεί την αμινοακυλίωση του tRNA^{Phe} και επιτρέπει την κωδικοποίηση της

περιοχής-οδηγού. Η τοποθέτηση του ριβοσώματος στο κωδικόνιο λήξης του mRNA παρεμποδίζει την περιοχή «protector element» (1 και 2), ενώ οδηγεί στο σχηματισμό της περιοχής «rho-independent terminator» (3 και 4) με αποτέλεσμα τη λήξη της μεταγραφής και της παραγωγής PheRS.

Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε πόσο σημαντική είναι η μελέτη των στοιχείων της ταυτότητας του μορίου tRNA, όχι μόνο για την πρωτεϊνοσύνθεση, αλλά και για άλλα μονοπάτια και βιοχημικές διαδικασίες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Nakanishi K and Nureki O. (2005) Recent progress of structural biology of tRNA processing and modification. *J.Mol Cells.* 19(2):157-66
2. William H. McClain. (1993) Rules that Govern tRNA Identity in Protein Synthesis. *J.Mol Cells.* 7:53706-1567
3. William H. McClain. (1993) Transfer RNA identity. *J.Mol Cells* 234(2):53706-1567
4. Jahn M, Rogers MJ, Soll D. (1991) Anticodon and acceptor stem nucleotides in tRNA(Gln) are major recognition elements for E. coli glutamyl-tRNA synthetase. *Nature.* 352(6332):258-60.
5. Zhao MW, Zhu B, Hao R, Xu MG, Eriani G, Wang ED. (2005) Leucyl-tRNA synthetase from the ancestral bacterium *Aquifex aeolicus* contains relics of synthetase evolution. *EMBO J.* 24(7):1430-9
6. Rogers MJ, Weygand-Durasevic I, Schwob E, Sherman JM, Rogers KC, Adachi T, Inokuchi H, Soll D. (1993) Selectivity and specificity in the recognition of tRNA by E coli glutamyl-tRNA synthetase. *Biochimie.* 75(12):1083-90
7. Normanly Jennifer and Abelson John. (1989) tRNA IDENTITY. *Annual Rev.Biochemistry.* 58: 1029-49.
8. Fender Aurélie , Sissler Marie, Florentz Catherine and Giegé Richard. (2004) Functional idiosyncrasies of tRNA isoacceptors in cognate and noncognate aminoacylation systems. *Biochimie.* 86(1):21-29
9. Giege Richard, Sissler Marie and Florentz Catherine. (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic acids Res.* 5017-5035.
10. Fersht R, Shi P, Lowe Knill-Jones and Wilkinson J. (1985) Hydrogen bonding and biological specificity analysed by protein engineering. *Nature.* 314(6008):235-38
11. Zelwer C, Risler J and Brunie S. (1982) Crystal structure of Escherichia coli methionyl-tRNA synthetase at 2.5 Å resolution. *J.Mol Biol.* 155(1):63-81
12. Willis I, Hottinger H, Pearson D and Chisholm V. (1984) Mutations affecting excision of the intron from a eukaryotic dimeric tRNA precursor. *EMBO J.* 3(7):1573-80
13. Schimmel P and Soll D. (1978) Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs. *Annual Rev Biochemistry* (48):601-48
14. Kisselev L. (1985) The role of the anticodon in recognition of tRNA by aminoacyl-tRNA synthetases. *J.Mol Biol.* 32:236-66
15. Schulman L. (1979) In Transfer RNA: Structure, Properties and Recognition. *Methods Enzymol.* (59):311-24
16. McClain W, Foss K, Chen Y and Schneider J. (1988) Association of transfer RNA acceptor identity with a helical irregularity. *Science.* 242(4886):1681-84
17. Atilgan T, Nicholas H and McClain W. (1986) A statistical method for correlating tRNA sequence with amino acid specificity. *Nucleic acids Res.* 14(1):375-80

18. Hayase Y, Jahn M, Rogers MJ, Sylvers LA, Koizumi M, Inoue H, Ohtsuka E and Soll D(1992). Recognition of bases in Escherichia coli tRNA(Gln) by glutaminyl-tRNA synthetase: a complete identity set. *EMBO J.* 11:4159-65.
19. Rogers MJ, Weygand-Durasevic I, Schwob E, Sherman JM, Rogers KC, Thomann HU, Sylvers LA, Ohtsuka E, Inokuchi H and Soll D. (1993) The recognition of E. coli glutamine tRNA by glutaminyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Symp Ser.* 29:211-3.
20. Frugier M, Soll D, Giege R and Florentz C. (1994) Identity switches between tRNAs aminoacylated by class I glutaminyl- and class II aspartyl-tRNA synthetases. *Biochemistry.* 33(33):9912-21.
21. Rogers KC and Soll D. (1993) Discrimination among tRNAs intermediate in glutamate and glutamine acceptor identity. *Biochemistry.* 32(51):14210-9.
22. Lee Joohee and Hendrickson Tamara. (2004) Divergent Anticodon Recognition in Contrasting Glutamyl-tRNA Synthetases. *J.Mol Biol.* 344(5):1167-1174
23. Charron Christophe, HerveÂ Roy, Blaise Mickael, GiegeÂ Richard and Kern Daniel. (2003) Non-discriminating and discriminating aspartyl-tRNA synthetases differ in the anticodon-binding domain. *EMBO J.* 22(7):1632-1643
24. Zhang Chun-Mei and Hou Ya-Ming. (2005) Domain-Domain Communication for tRNA Aminoacylation: The Importance of Covalent Connectivity. *Biochemistry.* 44(19):7240-7249
25. Ibba Michael, Hong Kwang-Won, Sherman Joyce M., Sever Sanja and Soll Dieter. (1996) Interactions between tRNA identity nucleotides and their recognition sites in glutaminyl-tRNA synthetase determine the cognate amino acid affinity of the enzyme. *Biochemistry.* 6953-6958
26. Ibba M. and Söll D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annual. Rev. Biochemistry.* 617-650
27. Cochella Luisa and Green Rachel. (2005) An Active Role for tRNA in Decoding Beyond Codon:Anticodon Pairing. *Science.* 308(5725):1178-1180
28. Shitivelband S and Hou YM. (2005) Breaking the stereo barrier of amino acid attachment to tRNA by a single nucleotide. *J.Mol Biol.* 348(3):513-21
29. Harpel Mark., Horiuchi Kurumi, Luo Ying, Shen Li, Jiang Wenjun, Nelson David, Rogers Kelley, Decicco Carl and Copeland Robert. (2002) Mutagenesis and Mechanism-Based Inhibition of *Streptococcus pyogenes* Glu-tRNA Gln Amidotransferase Implicate a Serine-Based Glutaminase Site. *Biochemistry.* 41:6398-6407
30. Akochy Pierr-Marie, Bernard Dominic, Roy Paul and Lapointe Jacques. (2004) Direct Glutaminyl-tRNA Biosynthesis and Indirect Aspartaginyll- Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J.Bacteriology.* 767-776

31. Rinehart J, Krett B, Rubio MA, Alfonzo JD and Soll D. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev.* 19(5):583-92
32. Jahn D, Kim YC, Ishino Y, Chen MW and Soll D. (1990) Purification and functional characterization of the Glu-tRNA(Gln) amidotransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J.Biol Chem.* 265(14):8059-64.
33. Howard Zalkin. (1993) The Amidotransferases. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology.* 66:203-309
34. Howard Zalkin. (1985) Glutamine Amidotransferases. *Methods Enzymol.* 113:263-265
35. Strauch Mark, Howard Zalkin and Aronson Arthur . Characterization of the Glutamyl-tRNA^{Gln} – to Glutamyl-tRNA^{Gln} Amidotransferase Reaction of *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriology.* 4:916-920
36. Núñez Harold, Lefimil Claudia, Min Bokkee, Söll Dieter and Orellana Omar. (2004) In vivo formation of glutamyl-tRNA^{Gln} in *Escherichia coli* by heterologous glutamyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* 557(1-3):133-135
37. Curnow Alan, Hong Kwang-Won, Yuan Robert, Sung-Il Kim, Martins Orlando, Wade Winkler, Henkin Tina and Soll Dieter. (1997) Glu-tRNA Gln amidotransferase: A novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. *Science.* 94(22):11819-11826
38. Feng Lian, Tumbula-Hansen Debra, Min Bokkee, Nangoong Suk, Salazar Juan, Orellana Omar and Soll Dieter. (2002) Transfer RNA- Dependent Amidotransferases: Key Enzymes for Asn-tRNA and Glu-tRNA. *Nature.* 10-16
39. Schnizer HG, Boehlein SK, Stewart JD, Richards NG and Schuster SM. (1999) Formation and isolation of a covalent intermediate during the glutaminase reaction of a class II amidotransferase. *Biochemistry.* 38(12):3677-82
40. Horiuchi Kurumi, Harpel Mark, Shen Li, Luo Ying, Rogers Kelley and Copeland Robert. (2001) Mechanistic Studies of Reaction Coupling in Glu-tRNA Gln Amidotransferase. *Biochemistry.* 40(2):6450-6457
41. Zalkin H and Smith JL. (1998) Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Biochemistry.* 315(4):87-144
42. Salazar Juan Carlos, Zuniga Roberto , Raczniak Gregory , Becker Hubert , Soll Dieter and Orellana Omar. (2001) A dual-specific Glu-tRNA Gln and Asp-tRNA Asn amidotransferase is involved in decoding glutamine and asparagine codons in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEBS Lett.* 500(3):129-131
43. RajBhandary Uttam. (1997) Once there were twenty. *Physiology.* 11761-11763

44. Becker H, Bokke M, Jacobi C, Raczniak G, Pelaschier J, Herve, Klein S, Kern and Soll D. (2000) The heterotrimeric *Thermus thermophilus* Asp-tRNA Asn amidotransferase can also generate Gln-tRNA Gln. *FEBS Lett.* 476(3):140-144
45. Hyeok Kwak Joon, Kunyoo Shin, Woo Ji-Su, Mun Kyung Kim, Kim Sung Il, Soo Hyun Eom and Hong Kwang-Won. (2002) Expression, Purification, and Crystallization of Glutamyl-tRNA Gln Specific Amidotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *J.Mol Cells.* 374-381
46. Massiere F and Badet-Denisot MA. (1998) The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases. *J.Mol Biol.* 14(3):205-22
47. Di Giulio M. (1993) Origin of glutamyl-tRNA synthetase: an example of palimpsest?. *J.Mol Biol.* 37(1):5-10
48. Lavrov Dennis and Franz Lang B. (2005) Transfer RNA gene recruitment in mitochondrial DNA. *Trends Genet.* 3:129-133
49. Murphy FV 4th, Ramakrishnan V and Malkiewicz A. (2004) The role of modifications in codon discrimination by tRNA(Lys)UUU. *J.Mol Biol.* 12:1186-91
50. Raczniak Gregory, Becker Hubert, Bokke Min and Soll Dieter. (2001) A Single Amidotransferase Forms Asparaginyl-tRNA and Glutamyl-tRNA in *Chlamydia trachomatis*. *Biochemistry.* 1276(49):45862-45867
51. McFarland R, Elson JL, Taylor RW, Howell N and Turnbull DM. (2004) Assigning pathogenicity to mitochondrial tRNA mutations: when "definitely maybe" is not good enough. *Trends Genet.* 20(12):591-6
52. Dinour D, Mini S, Polak-Charcon S, Lotan D and Holtzman EJ. (2004) Progressive nephropathy associated with mitochondrial tRNA gene mutation. *Clinical Nephrology.* 62(2):149-54
53. Munakata K, Iwamoto K, Bundo M and Kato T. (2005) Mitochondrial DNA 3243A>G mutation and increased expression of LARS2 gene in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 57(5):525-32
54. Wilson FH, Hariri A, Farhi A, Zhao H, Petersen KF, Toka HR, Nelson-Williams C, Raja KM, Kashgarian M, Shulman GI, Scheinman SJ and Lifton RP. (2004) A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. *Science.* 306(5699):1190-4
55. Li X, Zhang LS, Fischel-Ghodsian N and Guan MX. (2005) Biochemical characterization of the deafness-associated mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) A7445G mutation in osteosarcoma cell cybrids. *Biochemistry.* 382(2):491-8
56. Renda MJ, Bradel-Tretheway B, Planelles V, Bambara RA and Dewhurst S. (2004) Inhibition of HIV type 1 replication using lentiviral-mediated delivery of mutant tRNA(Lys3)A58U. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 20(12): 1324-34

57. Ryckelynck Michael, Giege Richard and Frugier Magali. (2005) tRNAs and tRNA mimics as cornerstones of aminoacyl-tRNA synthetase regulations. *Biochimie*.
58. Ibba M, Hong KW and Soll D. (1996) Glutaminyl-tRNA synthetase: from genetics to molecular recognition. *Genes Cells*. 1(5):421-7