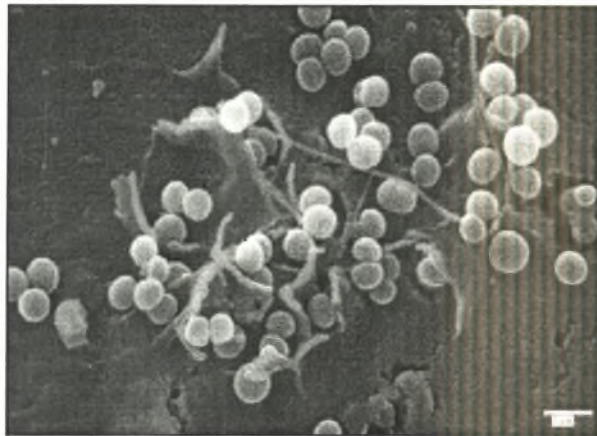




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ  
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ FEMΧ ΑΠΟ ΤΟ GRAM (+) ΒΑΚΤΗΡΙΟ  
*Staphylococcus aureus*



ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΚΥΡΙΤΣΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2007



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

Αριθ. Εισ.: 5425/1

Ημερ. Εισ.: 31-03-2009

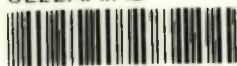
Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2007

ΚΥΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087322

## Κλωνοποίηση, Υπερέκφραση και Απομόνωση του παράγοντα FemX από το Gram (+) βακτήριο *Staphylococcus aureus*

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### Υπεύθυνος Καθηγητής:

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

### Μέλη τριμελής επιτροπής:

- Παναγιώτης Μαρκουλάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.
- Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.
- Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Ευχαριστίες: Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την ομαλή και επιτυχή διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επικ. Καθ. του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την επιστημονική καθοδήγηση και την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε. Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω τη Σταματίνα Γιαννούλη, υποψήφια διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για τη σημαντική συμβολή της στη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και όλους τους διδακτορικούς φοιτητές και συμφοιτητές μου, για την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1. Εναλλακτικοί ρόλοι των AARSs.	5
1.2. Βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στο <i>Staphylococcus aureus</i> – Ρόλος της πρωτεϊνικής οικογένειας FemABX.	7
1.3. Ανθεκτικότητα στελεχών <i>S. aureus</i> στη μεθικιλίνη-Ρόλος των PBP's και της χρωμοσωμικής κασέτας SCCmec.	14
1.4. Πρωτεΐνες ομόλογες ή παρόμοιες των FemABX.	15
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	18
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
3.1. ΥΛΙΚΑ	20
3.1.1. Χημικές ουσίες	20
3.1.2. Κύτταρα	21
3.1.3. Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων	21
3.1.4. Θρεπτικά μέσα	23
3.1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα	25
3.1.6. Πλασμιδιακοί φορείς	26
3.1.7. Εκκινητές (Primers)	32
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	32
3.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR	32
3.2.2 Διαχωρισμός τμημάτων DNA	33
3.2.3 Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης	34
3.2.4 Σύνδεση τμημάτων DNA	35
3.2.5 Μεταφορά πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα <i>E. coli</i>	35
3.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep)	36
3.2.7 Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού	37
3.2.8. Διαδικασία υπερέκφρασης του παράγοντα FemX.	38
3.2.9. Διαδικασία απομόνωσης του FemX.	38
3.2.10 Gel Retardation Assay	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πεπτιδογλυκανικό τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος στο βακτήριο *Staphylococcus aureus* αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες εναλλασσόμενων μονάδων N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με πενταπεπτίδια γλυκίνης. Η γλυκίνη ενσωματώνεται μέσω της δράσης των μη ριβοσωμικών πεπτιδυλο-τρανσφερασών FemA, FemB και FemX και με δότη γλυκίνης τα Gly-tRNA<sup>Gly</sup> μόρια. Έχουν ανιχνευτεί τουλάχιστον 4 ισοδεκτικά μόρια tRNA<sup>Gly</sup> που εκτός από την πρωτεϊνοσύνθεση, εμπλέκονται και στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Τα tRNAs αυτά αμινοακυλιώνονται από την ίδια αμινοακυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης, αλλά ακολουθούν διαφορετικές πορείες ανάλογα με τις κυτταρικές ανάγκες. Δεδομένης της μολυσματικότητας του *S. aureus* καθώς και του γεγονότος ότι η ανθεκτικότητα του σε αντιβιοτικά εξαρτάται άμεσα από την ακεραιότητα των γεφυρών γλυκίνης, η ανίχνευση των παραγόντων που εμπλέκονται στη μεταφορά και ενσωμάτωση της γλυκίνης, θα αποκαλύψει σημαντικούς στόχους νέων αντιβιοτικών φαρμάκων. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου του FemX από MR (multi-resistant) όσο και από MS (methicillin-susceptible) στελέχη του βακτηρίου *S. aureus*, και ακολούθησε η υπερέκφραση και απομόνωση της εν λόγω πρωτεΐνης, προκειμένου να αποτελέσει κατάλληλο υπόστρωμα για την περαιτέρω διαλεύκανση αλληλεπιδράσεων με άλλους παράγοντες που πιθανώς να συμμετέχουν στη μεταφορά της γλυκίνης στο κυτταρικό τοίχωμα.

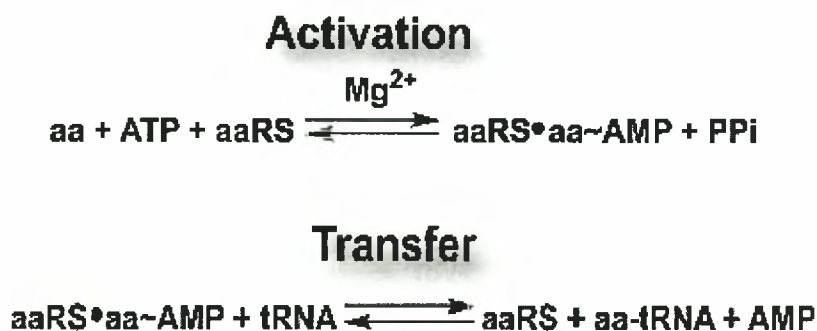
## ABSTRACT

The peptidoglycan fraction of the *Staphylococcus aureus* cell wall contains linear chains of alternating N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylmuramic acid (MurNAc) cross-linked by pentaglycine bridges. Glycine is incorporated by the non-ribosomal peptidyltransferases FemA, FemB and FemX, with the Gly-tRNA<sup>Gly</sup> molecules serving as glycine donors. At least four isoacceptor tRNA<sup>Gly</sup> molecules have been identified and besides protein synthesis, they also participate in cell wall synthesis. All tRNA<sup>Gly</sup> molecules are aminoacylated by a single glycyl-tRNA synthetase (GlyRS), following different pathways depending on cell necessities. Given the pathogenicity of *S. aureus* and its resistance to several antibiotics, which relies on the pentaglycine bridges integrity, the identification of factors participating in glycine transfer and incorporation will reveal significant molecular targets for new antibiotics. Aim of the present study is the cloning of the gene encoding FemX from both multi-sensitive and multi-resistant *S. aureus* strains and the over-expression and isolation of the enzyme, providing a suitable substrate for the elucidation of possible interactions with other potential factors involved in the glycine transfer to the cell wall.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Εναλλακτικοί ρόλοι των AARSs.

Οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες (AARSs) αποτελούν ένζυμα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς καταλύουν την αμινοακυλίωση (εικόνα 1), μια κυτταρική διαδικασία με άμεσο αντίκτυπο στην πιστότητα της πρωτεϊνοσύνθεσης. Συγκεκριμένα, οι συνθετάσες καταλύουν τη σύνδεση της καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος με την 2'- ή την 3'-υδροξυλομάδα του αδενοσινο-3' -τελικού άκρου του αντίστοιχου tRNA. Αυτό το ενεργοποιημένο ενδιάμεσο μόριο που προκύπτει καλείται αμινοακυλο-tRNA. Η πρόσδεση ενός αμινοξέος σε ένα μόριο tRNA είναι σημαντική από την άποψη ότι ο σχηματισμός ενός πεπτιδικού δεσμού μεταξύ της αμινομάδας του και της καρβοξυλομάδας ενός άλλου tRNA είναι θερμοδυναμικά ανέφικτη. Το εμπόδιο αυτό παρακάμπτεται ενεργοποιώντας την καρβοξυλομάδα των προδρόμων αμινοξέων και σχηματίζοντας εστέρες αμινοξέων, τα αμινοακυλο-tRNAs. Γι' αυτό το λόγο οι συνθετάσες καλούνται και ενεργοποιητικά ένζυμα (Paul Zamecknic, 1966).

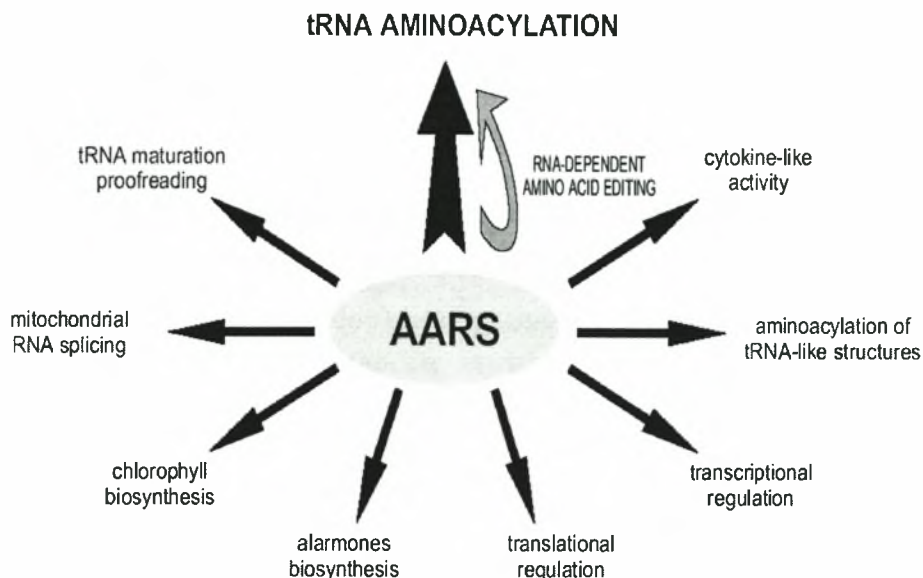


Εικόνα 1: Ενεργοποίηση και μεταφορά του αμινοξέος από την αμινοακυλο-tRNA συνθετάση.

Κατά τη διάρκεια διάφορων μελετών, γεννήθηκε το ερώτημα αν η απουσία των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών επηρεάζει πέραν της διαδικασίας της πρωτεϊνοσύνθεσης και άλλες κυτταρικές διεργασίες και όντως διαρκώς έρχονται στην επιφάνεια περιπτώσεις AARSs οι οποίες δεν συμμετέχουν μόνο στην αμινοακυλίωση.

Τέτοιες κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται διάφορες AARSs είναι ο έλεγχος της ωρίμανσης του tRNA, το μάτισμα του μιτοχονδριακού RNA, η σύνθεση χλωροφύλλης (Ibba et al., 1997), η βιοσύνθεση σηματοδοτικών μορίων (π.χ. οι ολιγοφωσφορικές διαδενοσίνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίδραση των βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων σε σειρά στρεσογόνων καταστάσεων), ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου και η απόπτωση, η βιοσύνθεση των αμινοξέων, η εκδήλωση δράσης κυτοκίνης, η αμινοακυλίωση δομών που μοιάζουν με tRNA (Goodwin et al., 1997; Himeno et al., 1998; Felden et al., 1997), καθώς και η άσκηση μεταγραφικής και

μεταφραστικής ρύθμισης (Martinis et al., 1999; Sissler et al., 1999; Fan et al., 1999),(εικόνα 2).



Εικόνα 2: Κάποιες από τις κυτταρικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες.

Εξαιρετικό παράδειγμα συνθετάσης που έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες εκτός της αμινοακυλίωσης, αποτελεί η αμινοακυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης (GlyRS). Η GlyRS έχει βρεθεί πως συμμετέχει εκτός των άλλων και στον τερματισμό της μεταγραφής, μια διαδικασία απαραίτητη για την έκφραση των γονιδίων. Στο *Sacharomyces cerevisiae*, αναλύσεις αποκάλυψαν την ύπαρξη μιας μετάλλαξης ενός θερμοανθεκτικού παράγοντα, η οποία επηρεάζει τον τερματισμό της μεταγραφής. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα αυτό είναι ένα μετάλλαγμα του αντίστοιχου της αμινοακυλο-tRNA συνθετάσης της γλυκίνης (GRS1). Επίσης, η GlyRS μας παρέχει και το πρώτο παράδειγμα εμπλοκής αμινοακυλο-tRNA συνθετάσης σε ανθρώπινες γενετικές ασθένειες. Ειδικότερα, στην ασθένεια των δοντιών Charcot-Marie τύπου 2D (CMT2D) και την περιφερειακή ραχιαία μυϊκή ατροφία τύπου V (dSMA-V), δύο αξονικές περιφερειακές νευροπάθειες που κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, το υπεύθυνο γονίδιο για τις ασθένειες αυτές είναι αυτό της GlyRS (GARS) που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7(p).

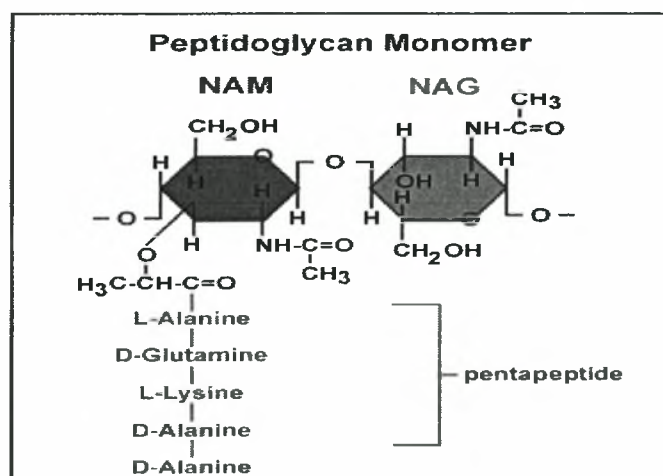
Στους *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus aureus*, η GlyRS συμμετέχει στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Schneider et al., 2004). Στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων αυτών εντοπίζονται γέφυρες αμινοξέων που απαρτίζονται αποκλειστικά από γλυκίνη στον *S.aureus* και από γλυκίνη και σερίνη στον *S. epidermidis* και ο ρόλος τους είναι πολύ σημαντικός στη σταθεροποίηση των πεπτιδογλυκανών και κατ'επέκταση του κυτταρικού τοιχώματος. Στους οργανισμούς αυτούς έχει δειχθεί ότι η GlyRS αμινοακυλώνει

κάποιες ισομορφές tRNA<sup>Gly</sup> μορίων, τα οποία δε συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση αλλά αποκλειστικά στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Η GlyRS τόσο του *S. aureus* όσο και του *S. epidermidis* είναι της μορφής α<sub>2</sub>. Παρόλα αυτά σύμφωνα με γενωμικές αναλύσεις υπάρχουν ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης στο γένωμα των βακτηρίων αυτών που μοιάζουν με τις αλληλουχίες β υπομονάδων των αντίστοιχων ενζύμων άλλων βακτηρίων.

## 1.2. Βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στο *Staphylococcus aureus* – Ρόλος της πρωτεϊνικής οικογένειας FemABX.

Η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης συνιστά έναν από τους πιο κοινούς στόχους των αντιβιοτικών, καθώς η πεπτιδογλυκάνη είναι μοναδική για τα ευβακτήρια και αναστολή της παραγωγής της είναι σε γενικές γραμμές βακτηριοκτόνος. Ο *S. aureus* ήταν ένας από τους πρώτους βακτηριακούς οργανισμούς στους οποίους μελετήθηκε η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, με πρωτοποριακά αποτελέσματα να προκύπτουν από τη μελέτη αυτή.

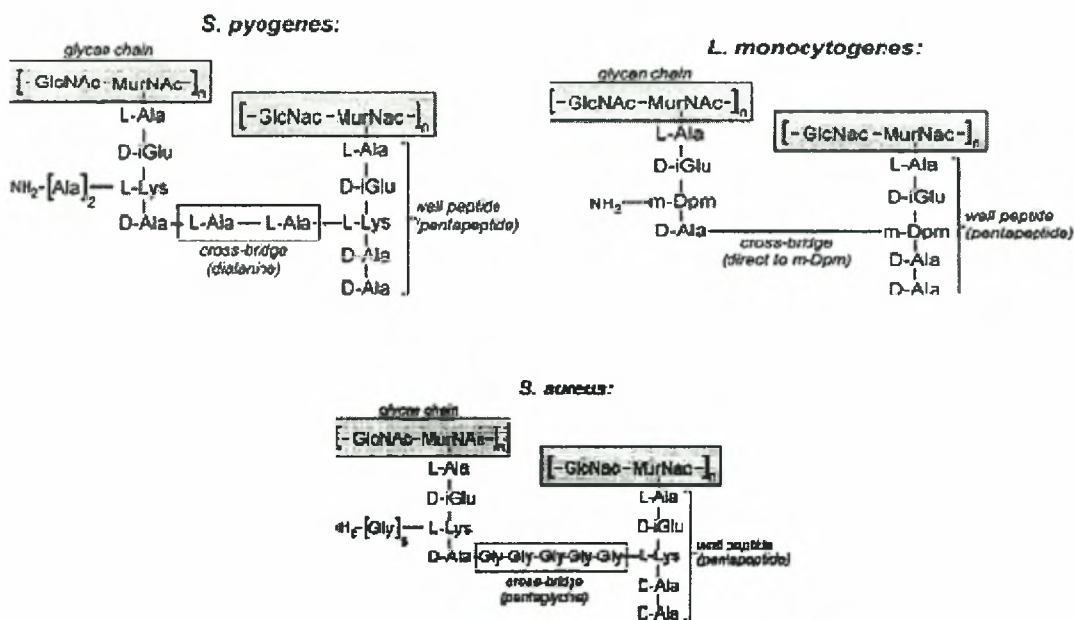
Η πεπτιδογλυκάνη του *S. aureus* αποτελείται από 20 ή και περισσότερα στρώματα γραμμικών αλυσίδων γλυκάνης αποτελούμενων από εναλλασσόμενες μονομερείς μονάδες πεπτιδογλυκάνης. Ένα μονομερές πεπτιδογλυκάνης αποτελείται από δύο ενωμένα αμινοσάκχαρα, την N-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNAc) και το N-ακετυλομουραμικό οξύ (MurNAc) (Henze et al., 1993; Ghuysen J. et al., 1994; Bumsted R. et al, 1968). Η καρβοξυλομάδα του N-ακετυλομουραμικού οξέος φέρει το πενταπεπτίδιο L-Ala-D-iGlu- L-Lys -D-Ala-D-Ala (stem peptide) (εικόνα 3). Τρανσγλυκοσυλάσεις συνδέουν τα συγκεκριμένα μονομερή προκειμένου να σχηματισθούν οι αλυσίδες πεπτιδογλυκάνης, ενώ τρανσπεπτιδάσεις διασυνδέουν αυτές τις αλυσίδες παρέχοντας δύναμη στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα (Barber M., 1961).



Εικόνα 3: Μονομερές πεπτιδογλυκάνης στο *Staphylococcus aureus*.



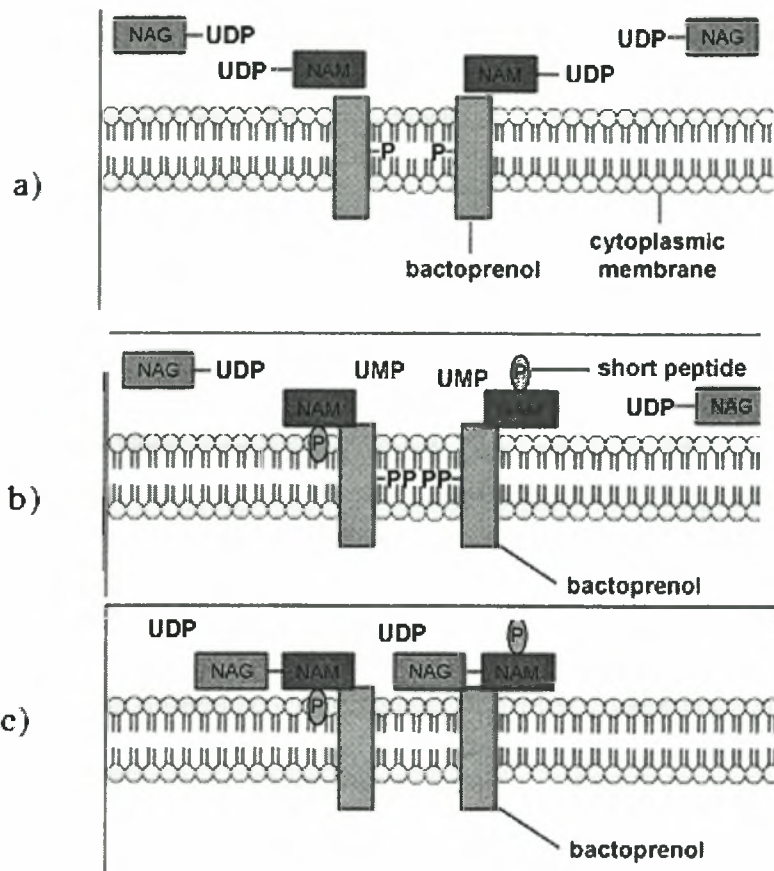
Η διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης στα βακτήρια από τις τρανσπεπτιδάσες, επιτυγχάνεται πάντα μέσω ενός διαμινοξέος του stem πεπτιδίου, με συνηθέστερα το meso-διαμινοπιμελικό, την L-λυσίνη και την L-ορνιθίνη (Rogers H. et al., 1980). Η διασύνδεση πραγματοποιείται είτε άμεσα με απ'ευθείας ένωση δύο γειτονικών διαμινοξέων είτε μέσω μιας γέφυρας-διαμεσολαβητή, η οποία αποτελείται από 1-5 αμινοξέα και ξεκινά από το διαμινοξύ του stem πεπτιδίου. Το διαπεπτίδιο αυτό μπορεί να περιλαμβάνει αμινοξέα που βρίσκονται είτε στην L είτε στη D διαμόρφωσή τους. Στον *L. monocytogenes*, για παράδειγμα, έχουμε άμεση διασύνδεση ενώ στο *S. pyogenes* έχουμε γέφυρες L-Ala- L-Ala. Στον *S. aureus* απαντώνται γέφυρες πενταγλυκίνης, οι οποίες ενώνουν την ε-αμινομάδα της L-Λυσίνης (L-Lys) μιας μονάδας N-ακετυλομουραμικού με την D-Αλανίνη (D-Ala) στη θέση 4 μιας γειτονικής μονάδας N-ακετυλομουραμικού, ενώ παράλληλα η D-Ala στη θέση 5 απομακρύνεται ως αποτέλεσμα μιας αντίδρασης τρανσπεπτιδίωσης (εικόνα 4). Ο μηχανισμός αυτός διασύνδεσης θα μπορούσε να ειπωθεί πως έρχεται σε άμεση αντίθεση με το μηχανισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης ο οποίος πραγματοποιείται με προσθήκη στο καρβοξυτελικό άκρο.



Εικόνα 4: Διάγραμμα πεπτιδογλυκανικών δομών στους οργανισμούς *S. aureus*, *S. pyogenes* και *L. monocytogenes*. Σε ορισμένες περιπτώσεις, δεν έχουμε διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης με τη βοήθεια αμινοξικών γεφυρών, αλλά άμεση σύνδεση του meso-διαπιμελικού του πενταπεπτιδίου ενός δισακχαρίτη GlcNAc-MurNAc με την D-Ala στη θέση 4 του πενταπεπτιδίου ενός γειτονικού δισακχαρίτη GlcNAc-MurNAc, όπως π.χ. συμβαίνει στον *L. monocytogenes*.

Η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης λαμβάνει χώρα σε τρία διακριτά στάδια. Το πρώτο από αυτά, συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα και ξεκινά με τη μετατροπή της UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης σε UDP-N-ακετυλομουραμικό οξύ. Η σύνθεση της UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης ξεκινά από την 6-φωσφορική φρουκτόζη και περιλαμβάνει την διαδοχική δράση αρκετών ενζύμων όπως η GtaB, η GlmS και ο FemD. Το αρχικό βήμα για τη μετατροπή της UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης σε UDP-N-ακετυλομουραμικό οξύ περιλαμβάνει την μεταφορά μιας ενολοπυροσταφυλικής ομάδας στην 3' υδροξυλική ομάδα της UDP-GlcNAc, μία αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο MurA. Στη συνέχεια, έχουμε το σχηματισμό της πρώτης ενδιάμεσης ένωσης στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, του UDP- MurNAc, με μετατροπή της ενολικής ομάδας σε γαλακτική, στα πλαίσια μιας NADPH- εξαρτώμενης αναγωγής, καταλυόμενης από την ρεδουκτάση MurB (εικόνα 5a). Το πενταπεπτίδιο του UDP-MurNAc σχηματίζεται με τη διαδοχική προσθήκη L-αλανίνης, D-γλουταμινικού οξέος, L-λυσίνης, D-αλανυλο-D-αλανίνης στη D-γαλακτική ομάδα του UDP- MurNAc. Καθένα από αυτά τα βήματα προσθήκης αμινοξέων καταλύεται από μία ειδική συνθετάση που χρησιμοποιεί ATP. Τα εμπλεκόμενα ένζυμα είναι τα εξής: MurC, MurD, MurE και DdIA (εικόνα 7- πίνακας 1). Το τελικό προϊόν των παραπάνω αντιδράσεων είναι το UDP- MurNAc- L-Ala-D-iGlu- L-Lys -D-Ala-D-Ala (επίσης καλείται "UDP- MurNAc-πενταπεπτίδιο" και "νουκλεοτίδιο του Park") (εικόνα 5b).

Το δεύτερο στάδιο της βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης πραγματοποιείται στην κυτταροπλασματική πλευρά της βακτηριακής μεμβράνης. Αρχικά, το ένζυμο MraY καταλύει τη μεταφορά του διαλυτού UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίου στο λιπιδιακό φορέα φωσφοβακτοπρενόλη (C55-P), η οποία βρίσκεται προσκολλημένη στη μεμβράνη. Προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι το λιπίδιο I (C55-PP-MurNAc-πενταπεπτίδιο), ενώ παράλληλα απελευθερώνεται UMP. Ακολούθως, η τρανλοκάση MurG μεταφέρει την ενεργοποιημένη με UDP N-ακετυλογλυκοζαμίνη στο μουραμικό τμήμα προκειμένου να παραχθεί ο ενδιάμεσος δισακχαρίτης, γνωστός ως λιπίδιο II (C55- PP-MurNAc πενταπεπτίδιο-β1-4- GlcNAc) (εικόνα 5c). Όπως το λιπίδιο I έτσι και το λιπίδιο II, στο στάδιο αυτό της βιοσύνθεσης τουλάχιστον, παραμένουν αγκυροβολημένα στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.



Εικόνα 5: Απλή σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης.

Στο *S. aureus*, η σύνθεση των αλυσίδων πενταγλυκίνης πραγματοποιείται σε τρία διαδοχικά βήματα στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, με το λιπίδιο II ως υπόστρωμα και το πρώτο κατάλοιπο γλυκίνης να προστίθεται στην ε-αμινομάδα της L-λυσίνης. Οι αντιδράσεις προσθήκης καταλύονται από μία ομάδα μη ριβοσωμικών πεπτιδυλο-τρανσφερασών, τους παράγοντες FemA, FemB και FemX. Η έκφραση της ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη εξαρτάται από αρκετά γονίδια που καλούνται fem (factors essential for methicillin resistance; Berger-Bachi, 1994). Έχει δειχθεί ότι όλοι οι παράγοντες fem είναι προϊόντα απαραίτητων για το βακτήριο γονιδίων και τους περισσότερους από αυτούς να παίζουν κάποιο ρόλο στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

Πρόσφατα αποκαλύφθηκε πως ο fmhB (FemX) καταλύει την προσθήκη του πρώτου καταλοίπου γλυκίνης στην ε-αμινομάδα της L-λυσίνης. Ο FemA ενσωματώνει το δεύτερο και τρίτο κατάλοιπο γλυκίνης (Maidhof H. et al., 1991), ενώ ο FemB που παρουσιάζει 39% ταυτότητα και 59% ομοιότητα όσον αφορά το αμινοξικό επίπεδο με τον FemA, προσθέτει τα κατάλοιπα γλυκίνης 4 και 5. Ο FemX χρησιμοποιεί αποκλειστικά ως αποδέκτη για την πρώτη γλυκίνη, το λιπίδιο II. Τα υποστρώματα των FemA και FemB είναι το λιπίδιο II-Gly1 και το λιπίδιο II-Gly3 αντίστοιχα, ενώ κανένα από τα ένζυμα FemABX δεν απαιτεί την παρουσία κάποιου ή και των δύο άλλων Fem για να δράσει. Αντιθέτως, παρατηρείται καθυστέρηση στη σύνθεση των γεφυρών όταν σε *in vitro* σύστημα

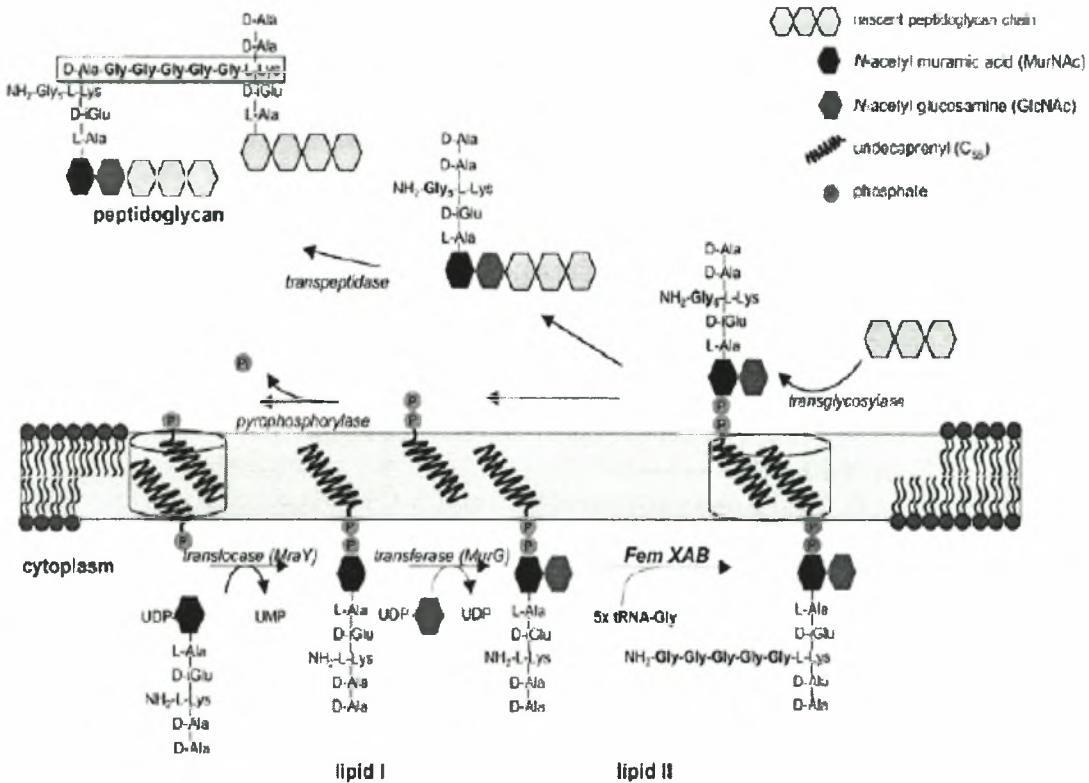
είναι παρόντες και οι τρεις παράγοντες, καθώς και οι τρεις φαίνεται να περιέχουν θέση δέσμευσης του σακχαρικού τμήματος (MurNAc) του λιπιδίου II και δρουν ανταγωνιστικά για τη δέσμευσή του. Οι FemA και FemB κωδικοποιούνται από το οπερόνιο femAB. Ο FemA πιθανότατα περιέχει μόνο μία θέση δέσμευσης tRNA<sup>Gly</sup> μορίου, γεγονός που οδήγησε το 2002 το Ledson και τους συνεργάτες του στην υπόθεση ότι μετά την προσθήκη της δεύτερης γλυκίνης, ακολουθεί ένας ακόμη κύκλος δέσμευσης και μεταφοράς ενός Gly-tRNA<sup>Gly</sup> μορίου για την ενσωμάτωση και της τρίτης γλυκίνης. Πρόσφατα όμως με τη βοήθεια της δοκιμής του διπλού υβριδισμού, ανιχνεύθηκαν άμεσες αλληλεπιδράσεις FemA-FemA, FemB-FemB και FemA-FemB. Ανάλογη συμπεριφορά αλληλεπιδράσης του FemX με τους FemA και FemB δεν παρατηρήθηκε. Συμπερασματικά, θα μπορούσε να ειπωθεί πως ο FemX δρά ως μονομερές, ενώ οι FemA και FemB πιθανώς ως ομοδιμερή (Rohrer and Berger-Bachi, 2003b).

Στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις στο οπερόνιο femAB είναι ψευδοπολυκυτταρικά με παχιά κυτταρικά τοιχώματα, σημαντική μείωση στη διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης, χαμηλά ποσοστά γλυκίνης στο τοίχωμα, υπερευαίσθητα στη μεθικιλίνη και άλλα αντιβιοτικά και πολλές φορές η βιωσιμότητά τους εξαρτάται από αντισταθμιστικές μεταλλάξεις (Stranden A. et al., 1997; Ling B. et al, 1998). Και ενώ μεταλλαγμένα στελέχη που στερούνται των υπηρεσιών των παραγόντων FemA και FemB μπορούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να επιβιώσουν, το ίδιο δεν μπορεί να ειπωθεί και για περιπτώσεις όπου έχουμε αναστολή του γονιδίου fmhB. Σε τέτοια στελέχη παρατηρείται υπερσυσσώρευση μονομερών μονάδων πεπτιδογλυκάνης που δεν περιέχουν καθόλου γλυκίνη, πλήρης απώλεια της ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη και μηδαμινή διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης. Για τα στελέχη αυτά η απουσία του FemX είναι θανατηφόρος (de Lencastre et al., 1994).

Ως δότες γλυκίνης στο σχηματισμό των αλυσίδων πενταγλυκίνης, λειτουργούν τα μόρια tRNA γλυκίνης. Οι πρώτες ενδείξεις για την εμπλοκή των tRNA<sup>Gly</sup> μορίων βασίστηκαν στο εύρημα πως η ενσωμάτωση γλυκίνης στην πολυμερή πεπτιδογλυκάνη παρεμποδίζεται από ριβονουκλεάσες. Στο *S. aureus*, τουλάχιστον 4 tRNA<sup>Gly</sup> μόρια έχουν ταυτοποιηθεί, με όλα να αμινοακυλιώνονται από μία και μόνο αμινοακυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης (Schneider, T. et al, 2004). Επιπλέον, αναλύσεις με εργαλεία της Βιοπληροφορικής, αποκάλυψαν την ύπαρξη και ενός πέμπτου γονιδίου tRNA<sup>Gly</sup>, το οποίο πιθανότατα εκφράζεται. Από το σύνολο των 4 ή 5 tRNA<sup>Gly</sup> μορίων που αλληλεπιδρούν με την μοναδική GlyRS, μόνο τα 2 είναι πρωτεϊνογενετικά, ενώ τα υπόλοιπα 2 ή 3 συμμετέχουν αποκλειστικά στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης.

Κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, το λιπίδιο II, μετά το σχηματισμό της γέφυρας γλυκίνης, μεταφέρεται διαμέσω της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης στην εξωκυτταρική πλευρά όπου και ακολουθεί πολυμερισμός σε ίνες γλυκάνης με τη δράση τρανσγλυκολασών. Μετά τον πολυμερισμό και το σχηματισμό της υδατανθρακικής ραχοκοκαλιάς της πεπτιδογλυκάνης, ο βακτοπρενολικός

λιπιδιακός φορέας μεταφέρεται και πάλι μέσω της μεμβράνης στην εσωκυτταρική πλευρά προκειμένου να ανακυκλωθεί. Τα πολυμερή γλυκάνης από την άλλη, διασυνδέονται με το σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών μεταξύ της ε-αμινομάδας της L-Lys μιας μονάδας N-ακετυλομουραμικού με την D-Ala στη θέση 4 μιας γειτονικής μονάδας N-ακετυλομουραμικού, ενώ παράλληλα η D-Ala στη θέση 5 απομακρύνεται. Η αντίδραση αυτή της διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης καταλύεται από τρανσπεπτιδάσες, τις PBPs (penicillin binding proteins), οι οποίες αναγνωρίζουν ειδικά το διπεπτίδιο D-Ala-D-Ala (εικόνα 6).

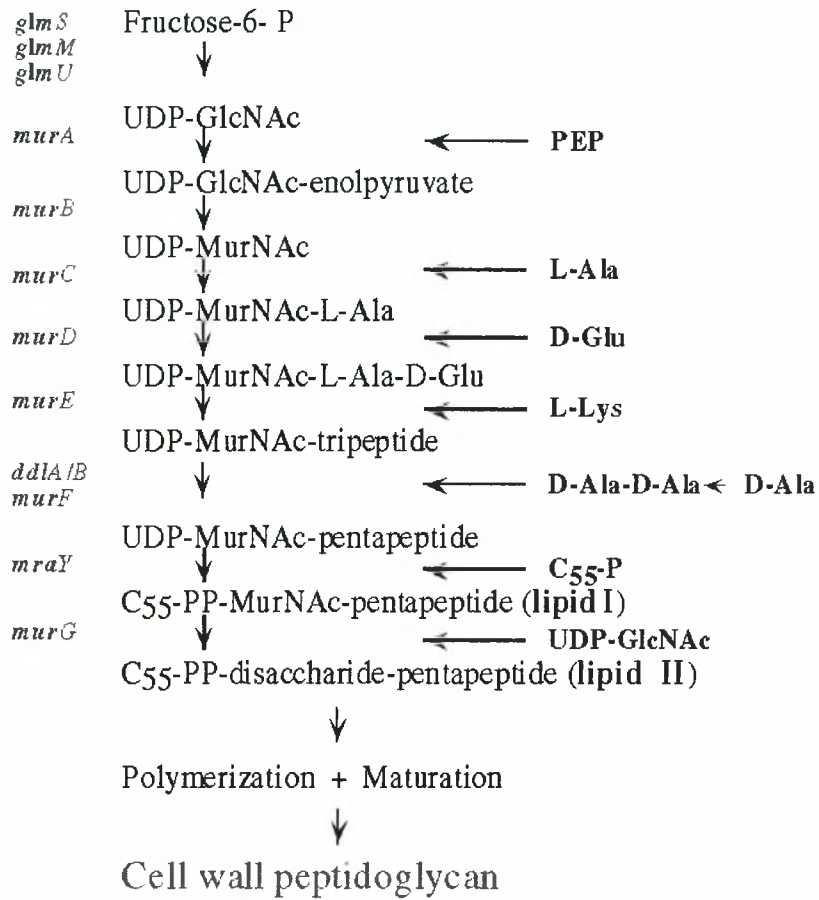


Εικόνα 6: Βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στο *S. aureus*. Ο σχηματισμός των γεφυρών πενταγλυκίνης δε πραγματοποιείται προτού ολοκληρωθεί η σύνθεση του λιπιδίου II. Μόλις σχηματιστούν οι γέφυρες, οι μονομερείς μονάδες πεπτιδογλυκάνης μεταφέρονται διαμέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στο εξωτερικό τμήμα και ενσωματώνονται στο κυτταρικό τοίχωμα.

Αυτές οι εύκαμπτες γέφυρες πενταγλυκίνης επιτρέπουν το σχηματισμό ενός τρισδιάστατου, υψηλής διασύνδεσης δικτύου πεπτιδογλυκάνης, χαρακτηριστικού του κυτταρικού τοιχώματος των σταφυλοκόκκων. Η ώριμη πεπτιδογλυκάνη του *S. aureus* αποτελεί περίπου το 50% του συνόλου του κυτταρικού τοιχώματος του οργανισμού που προστατεύει το βακτήριο από την οσμωτική πίεση ενώ ταυτόχρονα καθορίζει και το σχήμα του. Επίσης, οι γέφυρες γλυκίνης λειτουργούν ως πεδία προσκόλλησης μεμβρανικών πρωτεϊνών, απαραίτητων για τη μολυσματικότητα αυτού του παθογόνου (Foster T. et al., 1994; Perry et al., 2002). Εκτός των άλλων, οι συγκεκριμένες γέφυρες είναι

απαραίτητες για την πλήρη έκφραση της ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη στα MRSA στελέχη του *S. aureus* (methicillin resistant *S. aureus*).

### BIOSYNTHESIS OF PEPTIDOGLYCAN



Εικόνα 7. Συνοπτικός καταρράκτης αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης.

Gene designation	Encoded enzyme
<i>glmS</i>	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase
<i>glmM (femD)</i>	Phosphoglucosamine-mutase
<i>gtaB</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
<i>murA</i>	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyl transferase 1
<i>murZ</i>	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyl transferase 2
<i>murC</i>	UDP-N-acetylmuramate-alanine ligase
<i>ddlA</i>	D-Alanine-D-alanine ligase
<i>murF</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2, 6-diaminopimelate-D-alanyl-D-alanyl ligase
<i>murI</i>	Glutamate racemase
<i>murD</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate ligase
<i>mraY</i>	Phospho-N-muramic acid-pentapeptide translocase
<i>murG</i>	Undecaprenyl-PP-MurNAc-pentapeptide-UDPGlcNAc GlcNAc transferase
<i>murE</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase
<i>sgtA</i>	Probable transglycosylase
<i>sgtB</i>	Hypothetical protein, similar to penicillin-binding protein 1A/1B
<i>uppS</i>	Undecaprenyl pyrophosphatase synthetase
<i>pbp4</i>	Penicillin binding protein 4
<i>bacA</i>	Bacitracin resistance protein (putative undecaprenol kinase) homologue
<i>femA</i>	Factor essential for expression of methicillin resistance
<i>femB</i>	FemB protein
<i>uppS</i>	Undecaprenyl pyrophosphatase synthetase
<i>pbpA</i>	Penicillin-binding protein 1
<i>pbp2</i>	Penicillin-binding protein 2
<i>pbp3</i>	Penicillin-binding protein 3
<i>sgtB</i>	Hypothetical protein, similar to penicillin-binding protein 1A/1B
<i>NN</i>	Similar to UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase
<i>mraY</i>	Phospho-N-muramic acid-pentapeptide translocase
<i>fmhA</i>	FmhA protein
<i>fmhB</i>	FmhB protein
<i>fmhC (eprh)</i>	FmhC protein
<i>srtA</i>	Sortase
<i>drp35</i>	Drp35
<i>ebsB</i>	Cell wall enzyme

From Kuroda et al. (2001).

Πίνακας 1. Γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης στο *S. aureus* N315

### 1.3. Ανθεκτικότητα στελεχών *S. aureus* στη μεθικιλίνη-Ρόλος των PBPs και της χρωμοσωμικής κασέτας SCCmec.

Οι PBPs, όπως ήδη έχει αναφερθεί, είναι ένζυμα που εμπλέκονται στα τελευταία στάδια συναρμολόγησης της πεπτιδογλυκάνης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Οι PBPs ανήκουν στην υπεροικογένεια των πενικιλυνο-τρανσφερασών σερίνης, μαζί με τις β-λακταμάσες και τους υποδοχείς των β-λακταμών, όπως π.χ. είναι ο BlaR1. Όλα τα μέλη της πρωτεϊνικής αυτής οικογένειας φέρουν τις συντηρημένες περιοχές SXXX, (S/Y)X(N/C) και (K/H)(T/S)G, οι οποίες στο σύνολό τους σχηματίζουν το ενεργό κέντρο (Van Heijenoort et al, 2000).

Ανάλογα και με το είδος τα βακτήρια περιέχουν από 4 έως και 8 PBPs, οι οποίες ταξινομούνται σε διάφορες ομάδες. Οι μεγάλου μοριακού βάρους PBPs καταλύουν τόσο την γλυκοσυλίωση όσο και την τρανσπεπτιδίωση, αντιδράσεις απαραίτητες για την ενσωμάτωση των πρόδρομων και συνδεδεμένων με το λιπίδιο II μορίων πεπτιδογλυκάνης, στο αναπτυσσόμενο κυτταρικό τοίχωμα. Ο μεγάλος αριθμός ερευνών που επικεντρώνονται στις PBPs, κυρίως τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, οφείλεται στο ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες σχετίζονται με την

έκφραση ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, καθώς αποτελούν στόχο των β-λακταμών (Rohrer S. et al., 2003) Οι τελευταίες χάρη στην μεγάλη δομική ομοιότητα τους με το διπεπτίδιο D-Ala-D-Ala, αναστέλλουν τη δράση των PBP's, ακυλιώνοντας το ενεργό τους κέντρο. Το στάδιο της απακυλίωσης είναι τόσο αργό που καθιστά τις πρωτεΐνες ουσιαστικά ανενεργές. Ακολούθως, αυτολυτικά ένζυμα, κάτω από την επίδραση των β-λακταμών, προκαλούν το θάνατο του βακτηριακού κυττάρου. Με άλλα λόγια, οι β-λακτάμες δεσμεύουν την περιοχή με δραστηριότητα τρανσπεπτιδάσης των PBP's.

Τα πρώτα στελέχη του *S. aureus* με ανθεκτικότητα στην μεθικιλίνη (MRSA) έκαναν την εμφάνισή τους λίγο μετά την εισαγωγή της πενικιλινασο-ανθεκτικής μεθικιλίνης (παράγωγο της πενικιλίνης) στην κλινική πράξη το 1960. Η ανθεκτικότητα στην μεθικιλίνη οφείλεται στη σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα *mec* (*SCC<sub>mec</sub>*) των 40-60 kb. Η *SCC<sub>mec</sub>* αποτελεί ένα καινοτόμο μεταθετό στοιχείο και χαρακτηρίζεται ως «νήσος ανθεκτικότητας», ενώ πιστεύεται πως δεν έχει σταφυλοκοκκική προέλευση καθώς έχει διαφορετική περιεκτικότητα σε G+C από τα υπόλοιπα χρωμοσώματα του σταφυλόκοκου (Berger-Bächli, 1989). Συγκεκριμένα, το γονίδιο *mecA* του στοιχείου *SCC<sub>mec</sub>*, κωδικοποιεί για μία επιπρόσθετη PBP, την PBP2' ή αλλιώς PBP2a. Η PBP2' έχει μικρότερη συγγένεια για τη μεθικιλίνη και άλλα παράγωγα των β-λακταμών και καταλύει τις αντιδράσεις τρανσπεπτιδίωσης ακόμη και παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων β-λακταμών (Hartman and Tomasz, 1984). Για την πλήρη όμως έκφραση της ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη, απαιτείται και η παρουσία μιας ενδογενούς PBP, της PBP2 μίας μεγάλου μοριακού βάρους PBP. Σε υψηλές συγκεντρώσεις μεθικιλίνης, οι PBP2 και PBP2' συνεργάζονται, με την PBP2' να αναλαμβάνει την τρανσπεπτιδίωση της πεπτιδογλυκάνης και την PBP2 να ευθύνεται για την τρανσγλυκοσυλίωση της (Pinho et al., 2001).

#### 1.4. Πρωτεΐνες ομόλογες ή παρόμοιες των FemABX.

Πολλαπλές ομοπαράθεσεις για την αποκάλυψη ομόλογων του γονιδίου *fimH*, έφεραν στο φως την ύπαρξη πολλών παρόμοιων ακολουθιών μέσα από ένα μεγάλο εύρος βακτηριακών γενωμάτων. Είδη τόσο σχετικά μεταξύ τους όσο τα *Borrelia burgdorferi*, *Sterptomyces coelicolor* και *Clostridium perfringens*, περιέχουν και ένα FemABX ομόλογο (πίνακας 2). Επίσης, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι όλα αυτά τα είδη φέρουν πεπτιδικές γέφυρες διασύνδεσης στην πεπτιδογλυκάνη τους, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση πως όλα εκφράζουν λειτουργικά μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας των FemABX. Παρόλαυτα, η λειτουργία των ομόλογων αυτών πρέπει να αποδειχθεί και πειραματικά. Ενδιαφέρουσες είναι οι περιπτώσεις του *Lactococcus lactis* ή του *E. faecium*, οι οποίοι περιέχουν D-αμινοξέα στις γέφυρες της πεπτιδογλυκάνης χωρίς όμως να έχει βρεθεί κάποιος παράγοντας ομόλογος των FemABX. Ο μηχανισμός ενσωμάτωσης αυτών των αμινοξέων παραμένει για την ώρα άγνωστος.



Ομόλογα των παραγόντων FemA, FemB και FemX, έχουν ταυτοποιηθεί σε όλα τα Gram(+) βακτήρια που παράγουν γέφυρες διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης, οι οποίες περιέχουν γλυκίνη ή και άλλα L-αμινοξέα (Rohrer and Berger-Bachi, 2003b) (πίνακας 2).

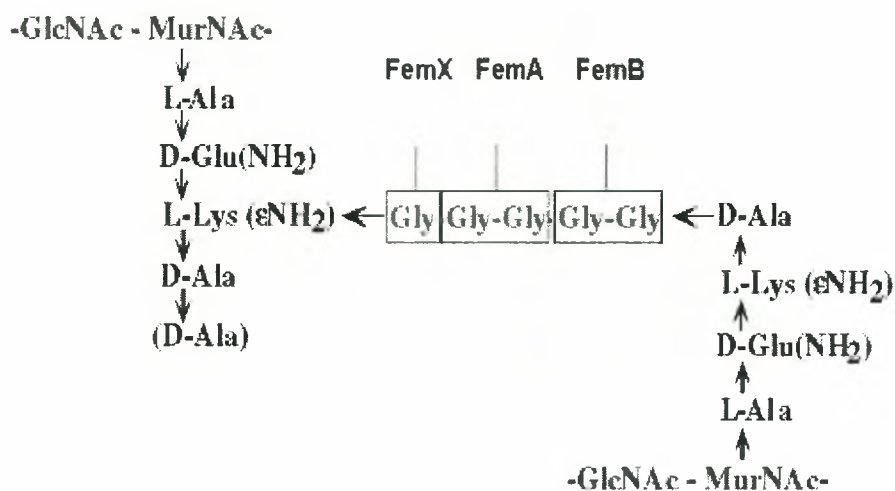
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ταυτοποίηση δύο πνευμονοκοκκικών τρανσφερασών αλανίνης ή και σερίνης που ονομάζονται MurMN ή FibAB, καθώς ανακαλύφθηκαν ταυτόχρονα από δύο ανεξάρτητες επιστημονικές ομάδες (Filipe et al., 2000; Weber et al., 2000). Απενεργοποίηση των γονιδίων τους στα ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη, τα καθιστά ευαίσθητα στις β-λακτάμες. Η καταλυτική δραστηριότητα των FemABX του *Enterococcus faecalis* αναλύθηκε πρόσφατα, ενώ τελευταία ταυτοποιήθηκε και κρυσταλλογραφήθηκε από τους Hegde και Shrader ο FemX του *W. viridescens*.

Species	Interpeptide	Peptidyl transferase (FemABX homolog), accession no.	Refer
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gly <sub>5</sub>	FemA, P14304; FemB, P14305; FmhB, AAD23961; FmhA, AAD23960; FmhC, AAD23963	10, 49, 8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gly <sub>2,3</sub> -L-Ser <sub>1,2</sub> , L-Ala-Gly <sub>4</sub>	FemA, JC5325; FemB, JC5326	1, 52, 8*
<i>Staphylococcus</i> spp.	Gly <sub>5</sub> , Gly <sub>2,3</sub> -L-Ser <sub>1,2</sub> , L-Ala-Gly <sub>4</sub>	<i>S. anaerobius</i> FemA, AAD33940; <i>S. capitis</i> FemA, AAC69633; <i>S. cohnii</i> FemA, AAD45259; <i>S. gallinarum</i> FemA, AAD45258; <i>S. haemolyticus</i> FemA, AAC69631; <i>S. hominis</i> FemA, CAA73372; <i>S. intermedius</i> FemA, AAD33941; <i>S. lugdunensis</i> FemA, AAC69632; <i>S. saprophyticus</i> FemA, CAA73373; <i>S. schleiferi</i> FemA, AAC69636; <i>S. sciuri</i> FemA, AAC69635; <i>S. xyloso</i> FemA, AAC69634; <i>S. warneri</i> FemA, AAD33942; <i>S. haemolyticus</i> FemB, AAD22133; <i>S. simulans</i> Lif, AAB53784; <i>S. capitis</i> Epr, BAA21486; <i>S. sciuri</i> Epr, AAG16879;	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	L-Ala-L-Ser, L-Ala <sub>2</sub>	FibA, CAB89120; FibB, CAB89121; MurMN, AJ250764	33, 88, 1
<i>Streptococcus mitis</i>	L-Thr-L-Ala		88
<i>Streptococcus pyogenes</i>	L-Ala <sub>2,3</sub>		88
<i>Streptococcus thermophilus</i>	L-Ala <sub>2,3</sub>	AAK18829	88
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	L-Ala <sub>2,3</sub>	Zif, AAC46073	7, 88
<i>Streptococcus equi</i>	L-Ala <sub>2,3</sub>		
<i>Streptococcus milleri</i>	L-Thr-Gly	MilF, AF243359	13, 88
<i>Enterococcus faecalis</i>	L-Ala <sub>2,3</sub>		16, 88
<i>Clostridium perfringens</i>	Gly	BAB81796	88
<i>Streptomyces</i> spp.	Gly	<i>S. coelicolor</i> , CAB45460; <i>S. toyocaensis</i> StaO, AAM80555	81, 88
<i>Weissella viridescens</i> ( <i>Lactobacillus viridescens</i> )	L-Ala-L-Ser	AAG21689	48, 88
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Gly <sub>2</sub>	AAF10635	88
<i>Treponema pallidum</i>	Gly	AAC65773	110
<i>Borrelia</i> spp.	Gly	AAB91521	115

**Πίνακας 2.** Όλα τα είδη Gram (+) βακτηρίων που βρέθηκε πως έχουν και ένα ομόλογο των παραγόντων FemABX διαθέτουν και γέφυρες διασύνδεσης στην πεπτιδογλυκάνη τους.

Έχουν όμως ταυτοποιηθεί και άλλοι παράγοντες παρόμοιοι με τους παράγοντες FemABX, όπως ο Lif (lysostaphin immunity factor) στα βακτήρια *S. simulans* και *S. staphylolyticus* (Thumm and Gotz, 1997) και ο Epr (endopeptidase resistance) στον *S. capitis* (Sugai M. Et al., 1998), οι οποίοι στην ουσία

προστατεύουν τα στελέχη αυτά από τις δικές τους γλυκυλο-γλυκίνο ενδοπεπτιδάσες (Thumm and Gotz, 1997). Συγκεκριμένα, εισάγουν κατάλοιπα σερίνης αντί γλυκίνης στις θέσεις 3 και 5 της πενταμερούς γέφυρας (εικόνα 8). Έτσι, οι γλυκυλο-γλυκίνο ενδοπεπτιδάσες λυσοσταφίνη των *S. Simulans* και *S. staphylolyticus* και ALE1 του *S. capitis* δεν μπορούν να κόψουν στο εσωτερικό των γεφυρών του κυτταρικού τοιχώματος (Ehlert et al., 2000). Οι παράγοντες Lif και Epr για να επιτελέσουν τη λειτουργία τους αυτή απαιτούν και την παρουσία των παραγόντων FemA και FemB, επειδή πιθανότατα οι τελευταίοι μόνο έχουν την ικανότητα αναγνώρισης του λιπιδίου II μέσω ειδικής θηλιάς δέσμησης. Επιπλέον, το γεγονός αυτό της απαραίτητης παρουσίας των FemA και FemB (Tschierske M. et al. 1997), ενισχύει την υπόθεση πως λειτουργούν ως ομοδιμερή με τέτοιο τρόπο ώστε και οι δύο να «φορτώνονται» με Gly-tRNA<sup>Gly</sup> μόρια, εξασφαλίζοντας τη διαδοχική προσθήκη και των δύο καταλοίπων γλυκίνης στην αναπτυσσόμενη γέφυρα διασύνδεσης.

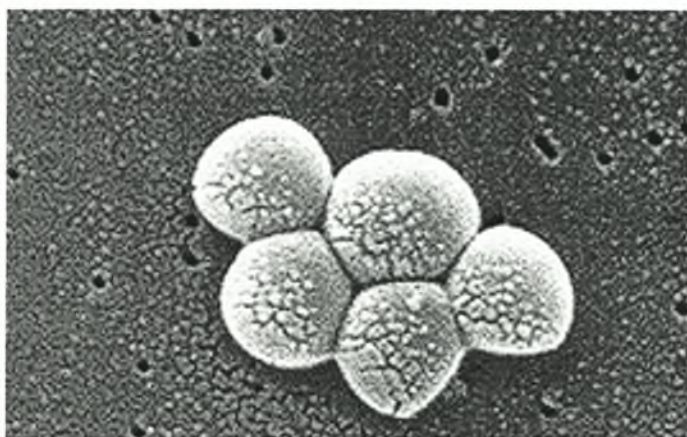


Εικόνα 8 : Ο Lif (lysostaphin immunity factor) ταυτοποιήθηκε στον *S. simulans* και είναι υπεύθυνος για την ενσωμάτωση καταλοίπων σερίνης αντί γλυκίνης στις θέσεις 3 και 5 της πενταμερούς γέφυρας

Στον *S. aureus*, τα γονίδια *fmhA* και *fmhC* φαίνεται πως κωδικοποιούν παράγοντες ανάλογους με τους Lif και Epr αντίστοιχα. Όμως στο βακτήριο αυτό τα γονίδια αυτά μάλλον είναι σχεδόν ανενεργά, αν και έχουν γίνει υποθέσεις πως σε αυτά οφείλεται το υψηλό σχετικά ποσοστό σερίνης στο κυτταρικό τοίχωμα στελεχών στα οποία έχουν αποσιωπηθεί τα γονίδια των FemA και FemB.

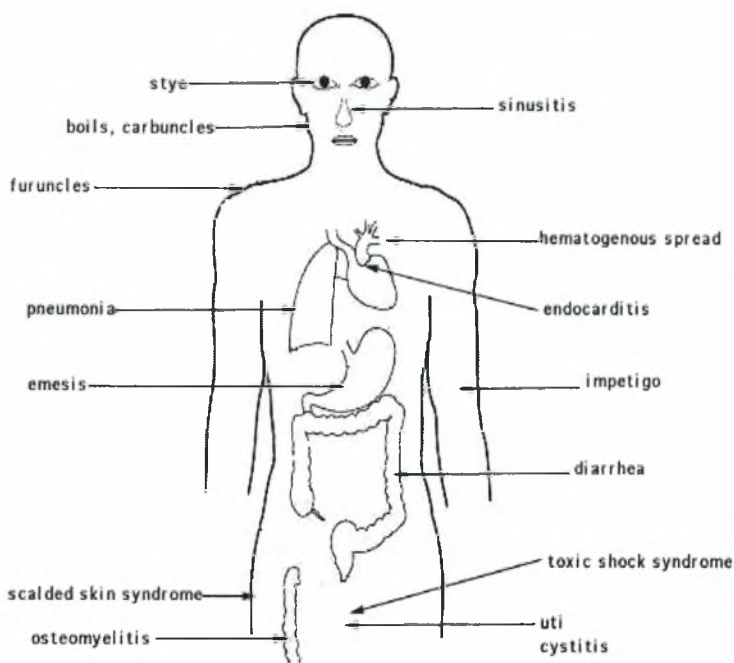
## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η κλωνοποίηση, η υπερέκφραση και η κλωνοποίηση του FemX από το Gram(+) βακτήριο *Staphylococcus aureus*. Ο *S. aureus* είναι ένα δυνητικά αναερόβιο, μη κινητό Gram(+) βακτήριο, στο οποίο η διευθέτηση των κυττάρων θυμίζει τσαμπί σταφυλιού. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 15 έως 45° C και συγκεντρώσεις NaCl ακόμη και 15%. Είναι οργανισμός θετικός στην δοκιμή με το ένζυμο καταλάση, αρνητικός στην οξειδάση και παράγει γαλακτικό οξύ ως κύριο προϊόν του μεταβολισμού του. Επίσης, έχει τειχικά οξέα, σχετικά χαμηλό περιεχόμενο G+C (33.96%) και σχηματίζει τεράστιες κίτρινες αποικίες (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Το Gram+ βακτήριο *Staphylococcus aureus*.

Ο *S. aureus* απαντάται συνήθως επί των επιδερμικών βλεννογόννων μεμβρανών των θερμόαιμων ζώων και αποτελεί το σημαντικότερο παθογόνο του ανθρώπου καθώς προκαλεί πληγές, αποστήματα, πνευμονία, σύνδρομο τοξικού σοκ, τροφικές δηλητηριάσεις κ.λ.π. (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Στόχοι μολύνσεων και ασθενειών προκαλούμενων από το *S. aureus* στον άνθρωπο.

Την κλωνοποίηση του γονιδίου *fmhB* που κωδικοποιεί τον FemX στον *S. aureus*, ακολούθησε η μεταφορά του, με μετασχηματισμό, σε ειδικά στελέχη *E. coli* που είναι ικανά να υπερεκφράσουν το εν λόγω ένζυμο και τέλος η απομόνωσή του. Η κλωνοποίηση, η υπερέκφραση και ο καθαρισμός του FemX από τον *S. aureus*, αποτελεί ένα μικρό μόνο τμήμα ενός γενικότερου project που επιτελείται στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και σκοπός του οποίου είναι η ταυτοποίηση των ισοδεκτικών tRNA<sup>Gly</sup> μορίων, τα οποία λειτουργούν ως υποστρώματα στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του *S. aureus*, η ταυτοποίηση παραγόντων-διαμεσολαβητών (π.χ. παράγοντες που μοιάζουν με τον EF-Tu) που ενδέχεται να εμπλέκονται στην tRNA-εξαρτώμενη μεταφορά και ενσωμάτωση καταλοίπων γλυκίνης στο τοίχωμα και γενικότερα η διαλεύκανση του συγκεκριμένου μηχανισμού.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. ΥΛΙΚΑ

##### 3.1.1. Χημικές ουσίες

- Αγαρόζη (SeaKem)
- Acrylamide (SIGMA)
- Αμπικιλίνη (SIGMA)
- APS (Ammonium Persulfate) (SIGMA)
- ATP (Fluka)
- Bis-acrylamide (SIGMA)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Merck)
- Bromophenol Blue (Research Organics)
- BSA (New England Biolabs)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- Γλυκίνη (AppliChem)
- Γλυκόζη (Panreac)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck)
- Coomassie Brilliant Blue (Fluka)
- Εκκινητές (sense/antisense) (Bio-Rad)
- Εκχύλισμα *S. cerevisiae* (Scharlau)
- EDTA (Panreac)
- Go Taq Flexi DNA πολυμεράση (Promega)
- HCl (Merck)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- IPTG (Isopropyl ThioGalactosyl) (Fermentas)
- KCl (Merck)
- LB Broth (Scharlau)
- LB Agar (Scharlau)
- Μάρτυρας μοριακού βάρους (HyTest Ltd)
- Μεθανόλη (Panreac)
- $\text{MgCl}_2$  για PCR (Finnzymes)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Panreac)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Panreac)
- Νουκλεοτίδια (dNTPs) (Stratagene)
- NaCl (Panreac)
- NaOH (Merck)
- Nco1 (New England Biolabs)
- Οξικό οξύ (Merck)
- Paq5000 Ταq πολυμεράση (Stratagene)
- Phusion DNA πολυμεράση (Finnzymes)
- Ριβονουκλεάση (New England Biolabs)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (New England Biolabs)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (Finnzymes)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate) (SIGMA)
- Ταq πολυμεράση (HyTest Ltd)
- T4 λιγάση (New England Biolabs)
- T4 λιγάση (Takara)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (Research Organics)
- Τετρακυκλίνη (SIGMA)
- Tris base (Merck)
- Tryptone (Merck)
- Χλωραμφαινικόλη (SIGMA)
- X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοσίδη) (SIGMA)
- Xho1 (Takara)
- Xylene Cyanol (Merck)

### 3.1.2. Κύτταρα

- **XL 1 blue**: Στέλεχος *E. coli* που στερείται του μηχανισμού αναγνώρισης και καταστροφής ξένων τμημάτων DNA (Novagen), γι' αυτό και χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA. Επιπλέον, διαθέτει γονίδια που του προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη και χρησιμοποιείται για κλωνοποίηση πλασμιδίων, εισαγόμενων σε αυτό με μετασχηματισμό.
- **DH5a**: Στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή και κλωνοποίηση πλασμιδιακού DNA.
- **BL 21 Rosetta** : Στέλεχος *E. coli* που περιέχει πλασμίδια που του προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη. Επιπλέον, το γονιδίωμα του περιλαμβάνει τις πληροφορίες για τη σύνθεση έξι μορίων tRNA που μπορούν και αναγνωρίζουν τέσσερα σπάνια κωδικόνια (rare codons). Αυτά τα κωδικόνια χρησιμοποιούνται ευρέως από τα αρχαία και τα μόρια tRNA που τα αναγνωρίζουν ονομάζονται minor tRNAs. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τα κύτταρα BL 21 Rosetta ιδανικά για την πραγματοποίηση της έκφρασης της εκάστοτε πρωτεΐνης-στόχου.
- **Strataclone™ Solopack Competent Cells**  
Τα συγκεκριμένα κύτταρα παρέχονται από το Strataclone PCR Cloning Kit της Stratagene και διαθέτουν την ικανότητα έκφρασης της ρεκομπινάσης Cre, η οποία απαιτείται για την κυκλοποίηση των γραμμικών μορίων DNA που παράγονται κατά τη διάρκεια του καταλυόμενου από την τοποισομεράση I ligation. Επίσης, τα κύτταρα αυτά υποστηρίζουν την επιλογή βάσει των μπλε και άσπρων αποικιών (blue/white screening) όταν μετασχηματισθούν με το πλασμίδιο pSC-A, το οποίο παρέχεται από το ίδιο kit και εξασφαλίζουν μετασχηματισμό υψηλής απόδοσης.

### 3.1.3. Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων (competent cells).

Για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CaCl<sub>2</sub>.

- Αρχικά σε 3 ml θρεπτικού υλικού LB Broth ενοφθαλμίζονται τα κύτταρα που επιθυμούμε να καταστήσουμε επιδεκτικά. Στην περίπτωση των κυττάρων DH5a προστίθεται στο θρεπτικό υλικό και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 100 mg/ml, ενώ στην περίπτωση ενοφθαλμισμού κυττάρων Rosseta και BL21 codon plus προστίθεται χλωραμφαινικόλη (34 mg/ml), επίσης σε τελική συγκέντρωση 100 mg/ml. Οι υγρές καλλιέργειες έπειτα τοποθετούνται στους 37 °C και στις 210 rpm για 12-16 ώρες (overnight).
- Από την overnight καλλιέργεια λαμβάνεται 1 ml και τοποθετείται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100 ml θρεπτικό LB Broth. Έπειτα από ήπια ανάδευση,

φωτομετρείται 1 ml απο την καλλιέργεια στα 600 nm. Η οπτική απορρόφηση (OD<sub>600</sub>) πρέπει να είναι γύρω στο 0,04. Ακολούθως η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C και στις 210 rpm. Πραγματοποιούνται φωτομετρήσεις άνα τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου η οπτική απορρόφηση είναι OD<sub>600</sub>=0,4, καθώς τα κύτταρα στο σημείο εκείνο βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους.

- Τα 100 ml της καλλιέργειας των κυττάρων μοιράζονται σε δύο αποστειρωμένα και παγωμένα falcons των 50 ml (υπό φλόγα) και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα ώστε να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίζηνα.
- Σε κάθε falcon προστίθεται 30 ml διάλυμα MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> (80 mM/20 mM) και πραγματοποιείται ελαφρά ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
- Τα falcons φυγοκεντρούνται εκ νέου στις 4.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα.
- Σε κάθε falcon προστίθεται 2 ml παγωμένου διαλύματος CaCl<sub>2</sub> 0.1 M, αναδιαλύεται το ίζημα και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο.
- Εισάγονται 70 μl DMSO σε κάθε falcon και ακολουθεί ανάδευση (το DMSO διατηρεί τα κύτταρα δεκτικά για περισσότερο διάστημα και εμποδίζει τυχόν διαφυγή των τμημάτων τους). Έπειτα αφήνονται στον πάγο για 15 λεπτά.
- Προστίθενται άλλα 70 μl DMSO στα falcons και αφού αναδευτούν, τοποθετούνται στον πάγο.
- Πολύ γρήγορα μοιράζεται η ποσότητα των επιδεκτικών κυττάρων (200 μl ανά σωλήνα των 1.5 ml) και τοποθετούνται προς φύλαξη στους -80 °C.

### 3.1.4. Θρεπτικά μέσα

- ❖ *Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth) pH 7,2*

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τυπική αναλογία (g/l)</i>
Tryptone	10,0
Yeast extract	5,0

Πίνακας 3: Σύσταση υγρού θρεπτικού μέσου (LB Broth) pH 7,2.

Για τελικό όγκο υγρού θρεπτικού μέσου 1L χρησιμοποιούνται:

- LB Broth                    15g
- NaCl                        10g
- Απιονισμένο H<sub>2</sub>O

❖ Στερεό θρεπτικό μέσο (*LB Agar*) pH 7,2

Αντιδραστήριο	Τυπική αναλογία (g/l)
Tryptone	10,0
Yeast extract	5,0
Άγαρ	15,0

Πίνακας 4: Σύσταση στερεού θρεπτικού μέσου (*LB Agar*) pH 7,2.

Για τελικό όγκο στερεού θρεπτικού μέσου 1L χρησιμοποιούνται:

- *LB Agar* 30g
- *NaCl* 10g
- Απιονισμένο  $H_2O$

❖ *SOC medium* (υγρό θρεπτικό μέσο) pH 7 για τελικό όγκο 100ml

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Tryptone	2g
Yeast extract	0,5g
<i>NaCl</i> 1M	1ml
<i>KCl</i> 1M	0,25ml
δ/μα $Mg^{2+}$ 2M	1ml
Γλυκόζη 2M	1ml

Πίνακας 5: Σύσταση *SOC medium* pH 7 για τελικό όγκο 100ml.

Κατά την παρασκευή του διαλύματος *SOC* προστίθενται τα 4 πρώτα αντιδραστήρια και αφού προστεθεί απιονισμένο  $H_2O$  μέχρι τα 97 ml, γίνεται αποστείρωση. Ακολουθεί προσθήκη των άλλων δύο συστατικών και συμπλήρωση με αποστειρωμένο  $H_2O$  μέχρι τα 100ml.

Το διάλυμα  $Mg^{2+}$  2M παρασκευάζεται με 20,33g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  και 24,65g  $MgSO_4$  σε τελικό όγκο 100ml.



### 3.1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (50x) για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Tris base	242g
Οξικό οξύ	57,1ml
EDTA 0,5M pH 8	100ml
Απιονισμένο H <sub>2</sub> O	Έως 1L

Πίνακας 6: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος TAE (50x).

Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 8,6.

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (10 %).

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Tris base (pH 8,3)	15g
Γλυκίνη	72g
SDS	5g
Απιονισμένο H <sub>2</sub> O	Έως 1L

Πίνακας 7: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα loading buffer (6x) για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Περιεκτικότητα</i>
Bromophenol Blue	0,09%
Xylene Cyanol	0,09%
Γλυκερόλη	60%
EDTA	60mM

Πίνακας 8: Σύσταση loading buffer.

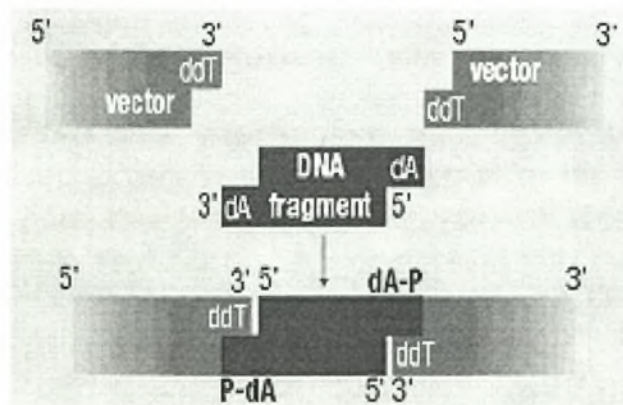
❖ Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (3x) για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών:

Αντιδραστήριο	Περιεκτικότητα/Συγκέντρωση
Tris-HCl, 0,5M (pH 6,8)	62,5mM
SDS 10% (w/w)	2%
Γλυκερόλη	25%
Απιονισμένο H <sub>2</sub> O	0.01%

Πίνακας 9: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

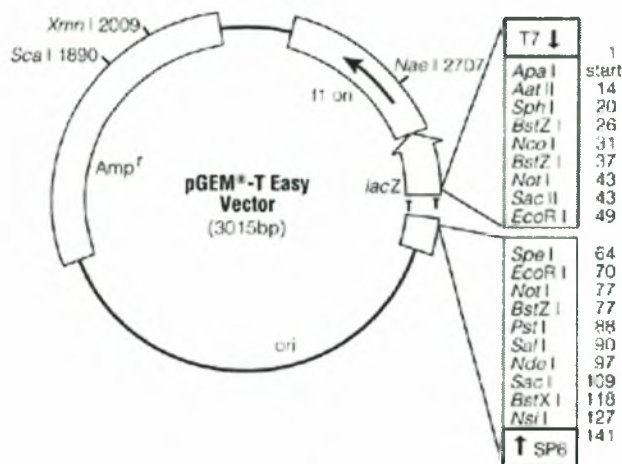
### 3.1.6. Πλασμιδιακοί φορείς

**pGEM-T Easy:** Πρόκειται για εύχρηστο πλασμιδιακό φορέα μεγέθους 3015bp που χρησιμοποιείται για τη κλωνοποίηση γονιδίων (Promega). Η διαδικασία της κλωνοποίησης με το συγκεκριμένο φορέα στηρίζεται στην διαδικασία του TA cloning, όπου έχουμε τη σύνδεση του γονιδίου της επιλογής μας (το οποίο και έχουμε ενισχύσει PCR) με το φορέα pGEM-T Easy με τη βοήθεια της T4 DNA λιγάσης (εικόνα 11). Ειδικότερα, η διαδικασία αυτή βασίζεται στην ικανότητα της Taq πολυμεράσης να προσθέτει μία δεοξυαδενοσίνη (A) στο 3' άκρο των προϊόντων της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτουν πολλά αντίγραφα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας, στην προκειμένη περίπτωση του γονιδίου-στόχου, με 3' A προεξοχές (overhangs). Αντίστοιχα, ο φορέας είναι κατάλληλα σχεδιασμένος, ώστε να μετατρέπεται σε γραμμοποιημένο πλασμίδιο με 3' προεξοχές δεοξυθυμιδίνης (T). Με αυτόν τον τρόπο τα 3' A άκρα του προϊόντος της PCR καθίστανται συμπληρωματικά των 3' T άκρων του φορέα, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η εύκολη και γρήγορη σύνδεσή τους παρουσία της T4 DNA λιγάσης.



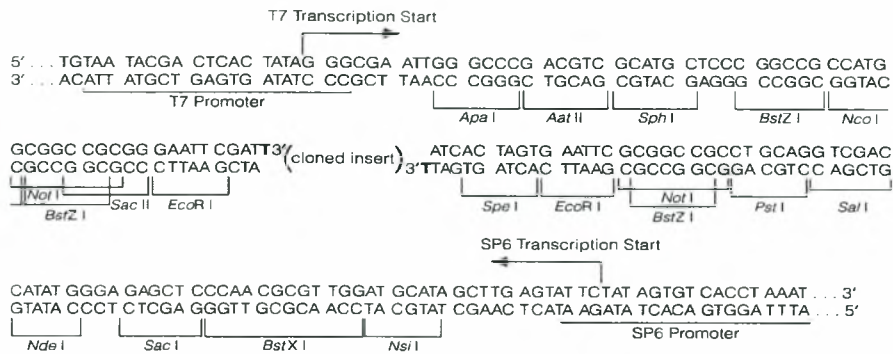
Εικόνα 11: Σύνδεση του προϊόντος της PCR (DNA fragment) με τον φορέα pGEM-T Easy (vector) παρουσία της T4 DNA λιγάσης (TA cloning).

Άλλα χαρακτηριστικά του pGEM-T Easy που είναι ιδιαίτερα χρήσιμα, είναι ότι περιέχει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (εικόνα 12). Επίσης, ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας διαθέτει τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης που είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή του lacZ οπερονίου (εικόνα 13). Επιπλέον, περιέχει το οπερόνιο της λακτόζης (lacZ), γεγονός που έχει ιδιαίτερη σημασία, στον έλεγχο της επιτυχίας της κλωνοποίησης με βάση την εμφάνιση μπλε ή/και άσπρων αποικιών (blue/white screening). Ο φορέας έχει επεξεργαστεί κατάλληλα έτσι ώστε να είναι κομμένος εντός του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης. Οι αποικίες που δεν έχουν προσλάβει το πλασμίδιο ή το πλασμίδιο δεν έχει ενσωματώσει το επιθυμητό γονίδιο, παρουσιάζουν μπλε χρώμα, καθώς ο φορέας επανακυκλοποιείται, εκφράζεται το lacZ και επομένως διασπάται η λακτόζη. Ο μηχανισμός αυτός, λοιπόν, είναι ιδιαίτερα χρήσιμος για την κλωνοποίηση γονιδίων σε βακτηριακούς φορείς και μάλιστα σε συνδυασμό με την ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο με το κατάλληλο αντιβιοτικό, καθιστά αρκετά αξιόπιστη και ακριβή την διαδικασία επιλογής των αποικιών που έχουν προσλάβει τον φορέα με το επιθυμητό ένθετο (insert).



Εικόνα 12: Ο φορέας pGEM-T Easy. Περιλαμβάνει τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, τα δομικά γονίδια της β-γαλακτοσιδάσης, της περιελάσης και της τρανσακετυλάσης, καθώς και τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης.

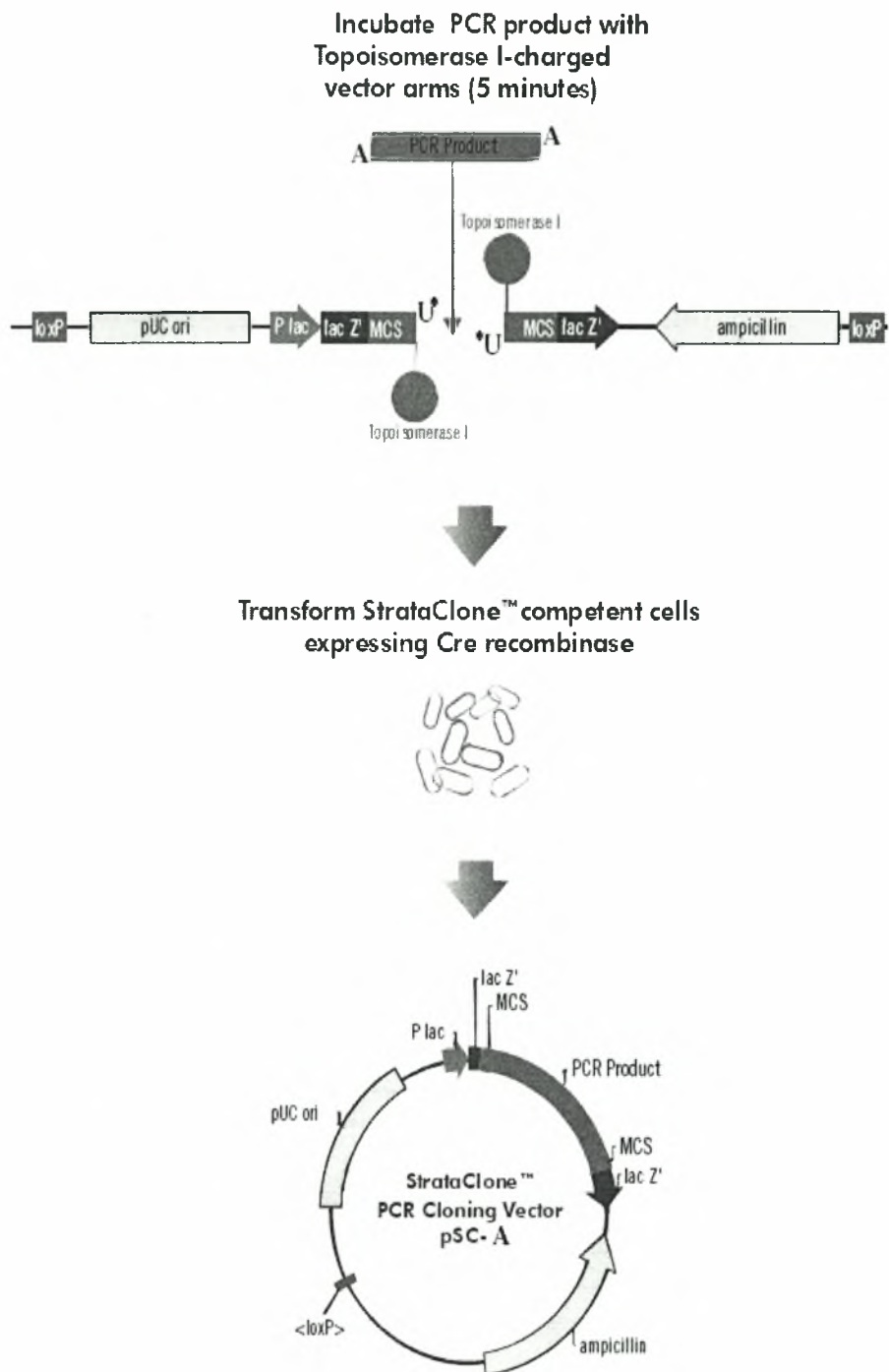
Τέλος, ο pGEM-T Easy φέρει και έναν πολυσυνδέτη (polylinker), δηλαδή μία περιοχή πολλαπλών θέσεων περιορισμού, επίσης εντός του οπερονίου της λακτόζης (lacZ). Χάρη στην περιοχή αυτή επιτυγχάνεται εύκολη απελευθέρωση του ενθέτου από τον φορέα μετά την κλωνοποίηση και παρουσία ενός ή και περισσότερων περιοριστικών ενδονουκλεασών (εικόνες 12, 13).



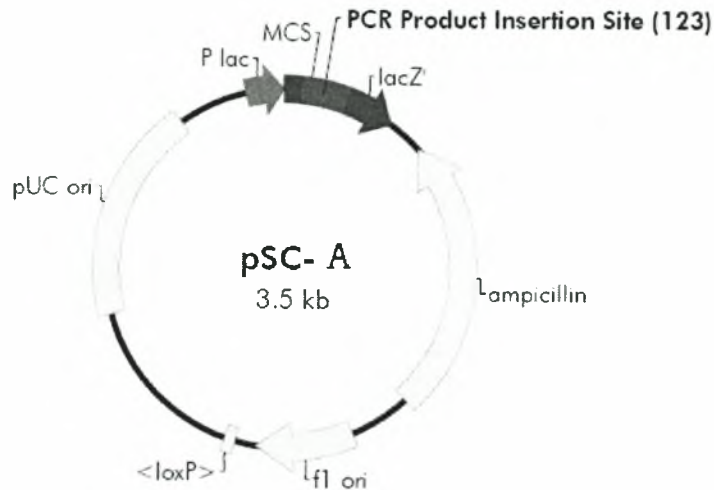
Εικόνα 13: Ο πολυσυνδέτης (polylinker) του φορέα pGEM-T Easy όπου εντοπίζονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών καθώς και η θέση εισαγωγής του προϊόντος ενίσχυσης του προς κλωνοποίηση γονιδίου. Ο προαγωγέας της T7 RNA πολυμεράσης είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή του lacZ οπερονίου.

pSC-A: Πρόκειται για πλασμιδιακό φορέα μεγέθους 3.5kb που χρησιμοποιείται για τη κλωνοποίηση γονιδίων (Stratagene). Η διαδικασία της κλωνοποίησης με το συγκεκριμένο φορέα εκμεταλλεύεται τις συνδιασμένες δράσεις της τοποϊσομεράσης I από το ιό Vaccinia και της ρεκομπινάσης Cre από τον βακτηριοφάγο P1. *In vivo*, η τοποϊσομεράση I συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA χαλαρώνοντας και επανασυνδέοντας τις έλικες του DNA. Ειδικότερα, η τοποϊσομεράση I κόβει τη φωσφοδιεστερική ραχοκοκαλιά μιας αλυσίδας DNA ακριβώς μετά την αλληλουχία '5-CCCTT δημιουργώντας μια ενδιάμεση ένωση DNA-ενζύμου, η οποία συντηρεί την ενέργεια δεσμού που πρόκειται να χρειαστεί για την επανελίκωση του κομμένου DNA πίσω στη σωστή έλικα. Από τη στιγμή που δημιουργηθεί το ενδιάμεσο αυτό, η αντίδραση επανελίκωσης μπορεί επίσης να συμβεί με ένα ετερόλογο τμήμα DNA. Η ρεκομπινάση Cre καταλύει τον ανασυνδιασμό μεταξύ δύο loxP αλληλουχιών αναγνώρισης.

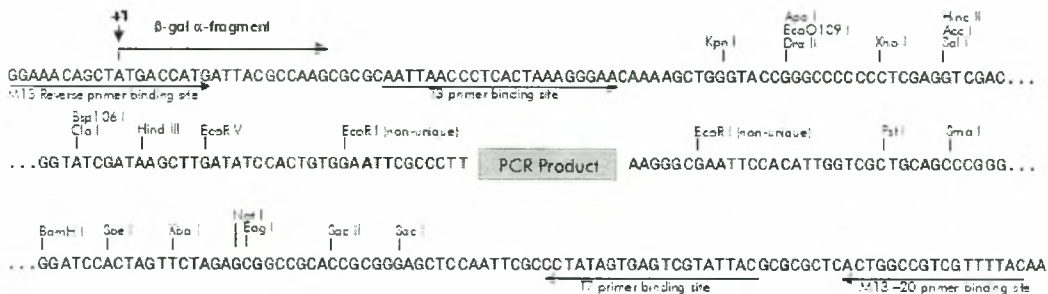
Το μείγμα φορέων που παρέχεται με το PCR cloning kit της Stratagene περιέχει βραχίονες DNA δύο ειδών, καθένας από τους οποίους στο ένα άκρο του φέρει μια τοποϊσομεράση I και στο άλλο μια περιοχή αναγνώρισης loxP. Τα φορτισμένα με την τοποϊσομεράση άκρα διαθέτουν μια προεξοχή τροποποιημένης ουριδίνης ( U\* ). Με αυτόν τον τρόπο τα ενισχυμένα με Taq πολυμεράση προϊόντα της PCR, τα οποία φέρουν '3-A προεξοχές μπορούν να ενωθούν αποτελεσματικά με τους παραπάνω βραχίονες μέσω του σχηματισμού δεσμών A- U\* , ακολουθούμενου από την σύνδεση των αλυσίδων DNA με τη βοήθεια της τοποϊσομεράσης I (εικόνα 14). Το γραμμικό μόριο DNA που προκύπτει στη συνέχεια, μετασχηματίζει επιλεκτικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα σύνθεσης της ρεκομπινάσης Cre, η οποία με τη σειρά της ανασυνδιάζει τις περιοχές loxP στα άκρα του γραμμικού μορίου. Έτσι, σχηματίζεται ο κυκλικός φορέας pSC-A (εικόνα 15) που έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο παρουσία αμπικιλίνης και περιέχει το οπερόνιο της λακτόζης (lacZ) προκειμένου να είναι δυνατή η επιλογή με white/blue screening, όπως ακριβώς συμβαίνει και στην περίπτωση του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy.



Εικόνα 14: Σύνοψη της μεθόδου στην οποία στηρίζεται ο μετασχηματισμός με τη βοήθεια του Strataclone PCR cloning kit.



**pSC-A PCR Cloning Vector PCR Product Insertion Site Region**  
(sequence shown 3460-3469, 1-252)

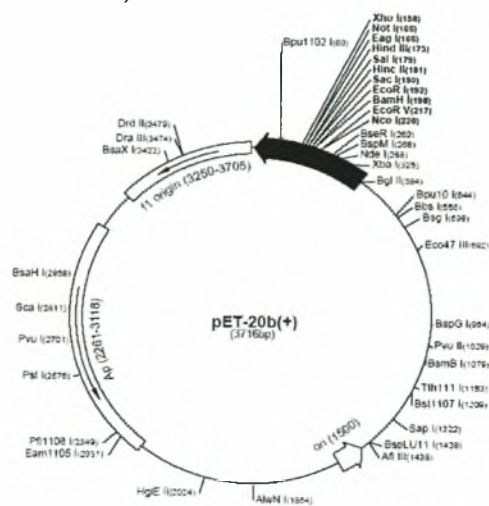


Feature	Nucleotide Position
$\beta$ -galactosidase $\alpha$ -fragment coding sequence ( <i>lacZ'</i> )	1-354
Multiple cloning site (MCS)	57-197
PCR product insertion site	123
ampicillin resistance ( <i>bla</i> ) ORF	465-1322
f1 origin of ss-DNA replication	1514-1820
<loxP> (mutant loxP-derived sequence lox66/71; nonfunctional in Cre-mediated recombination)	1887-1920
pUC origin of replication	2461-3128
<i>lac</i> promoter	3350-3469

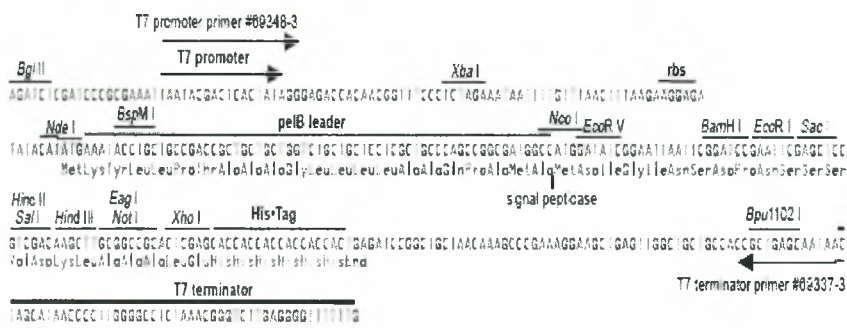
Εικόνα 15: Ο κυκλικός φορέας pSC-A. Ο χάρτης της εικόνας αντιπροσωπεύει το προϊόν της ένωσης των βραχιόνων του φορέα με το επιθυμητό προϊόν της PCR στα πλαίσια μιας αντίδρασης που καταλύεται από την τοποϊσομεράση I και ακολουθείται από Cre-εξαρτώμενο ανασυνδιασμό. Επίσης, παραχωρείται και μια λίστα από σημαντικές αλληλουχίες του φορέα, όπως οι θέσεις κοπής των περιοριστικών ενζύμων, η περιοχή στην οποία οφείλεται η ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη κτλ.

pET-20b: Πρόκειται για πλασμιαδικό φορέα μεγέθους 3716bp (Novagen), ο οποίος διαθέτει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη (εικόνα 16). Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση και έκφραση γονιδίων μέσω της T7 RNA πολυμεράσης με τον ίδιο μηχανισμό που

περιγράφηκε και στην περίπτωση του pGEM-T Easy. Στο πλασμίδιο pET-20b μετά τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης υπάρχει ο πολυσυνδέτης (polylinker), όπου βρίσκονται όλες οι θέσεις αναγνώρισης και κοπής από τα ένζυμα περιορισμού (εικόνα 17).



Εικόνα 16: Ο πλασμιδιακός φορέας pET-20b.



pET-20b(+) cloning/expression region

Εικόνα 17: Ο προαγωγέας της T7 RNA πολυμεράσης και ο πολυσυνδέτης (polylinker) του φορέα pET-20b. Στο εσωτερικό του πολυσυνδέτη διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων NcoI και XhoI, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας. Μετά τον πολυσυνδέτη διακρίνεται το His-Tag.

Έτσι, με τη χρήση των κατάλληλων ενζύμων είναι δυνατή η εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου, όπως είναι στη συγκεκριμένη περίπτωση το γονίδιο του FemX στο εσωτερικό του polylinker και στη συνέχεια, η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου αυτού μετά από την πρόσδεση της T7 RNA πολυμεράσης στον προαγωγέα της. Το κωδικόνιο λήξης της μεταγραφής του FemX έχει απαλειφθεί, με αποτέλεσμα να προστίθενται έξι τριάδες νουκλεοτιδίων που κωδικοποιούν έξι ιστιδίνες στο τέλος της αμινοξικής αλληλουχίας του FemX. Η μεταγραφή σταματά από ένα κωδικόνιο λήξης αμέσως μετά τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν τις έξι ιστιδίνες. Παρ' όλα αυτά, ο pET-20b δε διαθέτει το σπερόνιο

της λακτόζης (lacZ), με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επιλογή των αποικιών που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο με blue/white screening.

### 3.1.7. Εκκινητές (primers)

Για την ενίσχυση του γονιδίου του FemX από το βακτήριο *Staphylococcus aureus*, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (primers) *S. aureus* NcoI Forward primer και *S. aureus* XhoI Reverse primer αντίστοιχα, οι οποίοι αποτελούν εξειδικευμένα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 23 και 26 βάσεων(εικόνα 18).

<i>S. aureus</i> NcoI Forward primer
5' -GCCATGGAAAAGATGCATATCAG - 3'
GC Content 43.4%, Tm=55.1 °C

<i>S. aureus</i> XhoI Reverse primer
5' -CTCGAGTTTTCGTTTAAATTTACGAG - 3'
GC Content 34.6% , Tm=54.4 °C

Εικόνα 18: Οι δύο εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *femB* του FemX, από γενωμικό DNA του *Staphylococcus aureus* Mu50 . Τα χρωματισμένα νουκλεοτίδια αντιστοιχούν στις επιθυμητές θέσεις κοπής από τα περιοριστικά ένζυμα NcoI (Forward primer) και XhoI (Reverse primer).

Οι δύο εκκινητές περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις θέσεις δράσης των ενζύμων περιορισμού NcoI και XhoI, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία για την κλωνοποίηση του γονιδίου του FemX.

## 3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου του FemX (*femB*) από γενωμικό DNA που προέρχεται από τον οργανισμό *Staphylococcus aureus*. Συγκεκριμένα, ενισχύθηκε το γονίδιο του FemX, τόσο από ένα στέλεχος ανθεκτικό στη μεθικιλίνη (methicillin resistant, MR) , όσο και από ένα στέλεχος που προσβάλλεται από το αντιβιοτικό αυτό (methicillin susceptible, MS). Αρχικά προστίθενται το γενωμικό DNA του βακτηρίου, το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης, η οποία στην προκειμένη περίπτωση είναι η Phusion πολυμεράση (High-Fidelity)( Finnzymes), τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs), οι εκκινητές (primers) και H<sub>2</sub>O. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην



παρούσα εργασία είναι οι *S. aureus*. NcoI sense και *S. aureus* XhoI antisense. Έτσι, μετά το πέρας της αντίδρασης ενίσχυσης των επιθυμητών γονιδίων, προκύπτουν προϊόντα που στα άκρα τους φέρουν θέσεις κοπής για τα περιοριστικά ένζυμα NcoI και XhoI. Πριν τοποθετηθούν τα μείγματα στη συσκευή PCR πραγματοποιείται καλή ανάμιξη όλων των συστατικών. Η αντίδραση PCR ξεκινάει με ένα στάδιο μετουσίωσης σε θερμοκρασία 98°C για 3 λεπτά. Μετά την πάροδο αυτού του χρονικού διαστήματος προστίθεται με προσοχή η πολυμεράση και το πρόγραμμα συνεχίζεται. Ακολουθούν 30-40 κύκλοι, καθένας από τους οποίους αποτελείται από ένα βήμα μετουσίωσης στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα, ένα στάδιο υβριδισμού για την σύνδεση των εκκινητών στους 53°C για 1,5 λεπτά και ένα στάδιο πολυμερισμού κατά το οποίο δρα η πολυμεράση στους 72°C για 2 λεπτά. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με ένα στάδιο σε θερμοκρασία υβριδισμού 72°C για 10 λεπτά όπου τοποθετείται επίσης με μεγάλη προσοχή 0,5 μl Taq πολυμεράση (New England Biolabs) από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* προκειμένου να προστεθεί στα προϊόντα του πολυμερισμού μία πολύ-A ουρά, καθώς η Phusion πολυμεράση δεν έχει την ικανότητα αυτή. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μειγμάτων τελικού όγκου 50μl φαίνονται στον Πίνακα 10.

Αντιδραστήρια	Όγκος (methicillin resistant, MR)	Όγκος (methicillin susceptible, MS)
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (5x)	10 μl	10 μl
Premixed dNTPs (10 mM)	1 μl	1 μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1 μl	1 μl
Εκκινητές <i>S. aureus</i> NcoI sense	0,6 μl	0,6 μl
Εκκινητές <i>S. aureus</i> XhoI antisense	0,6 μl	0,6 μl
Γενωμικό DNA	2 μl	3 μl
Phusion πολυμεράση	0,5 μl	0,5 μl
Sterile H <sub>2</sub> O	34.3 μl	33.3 μl
Συνολικός όγκος	50 μl	50 μl

Πίνακας 10. Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την παρασκευή μείγματος για PCR.

### 3.2.2. Διαχωρισμός τμημάτων DNA

Για το διαχωρισμό τμημάτων DNA και τον προσδιορισμό του μεγέθους του καθενός χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης. Χρησιμοποιείται πηκτή αγαρόζης 0,8% ή 1%, ανάλογα με το μέγεθος του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε και να ανιχνεύσουμε, το οποίο παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,32gr αγαρόζης ή 0,40gr αγαρόζης, αντίστοιχα, σε 40ml TAE buffer 1x. Στη

συνέχεια, θερμαίνεται το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί όλη η ποσότητα της αγαρόζης και να γίνει διαυγές. Αφού κρυώσει ακολουθεί προσθήκη 3μl βρωμιούχου αιθιδίου 1% , ήπια ανάδευση και στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου και αφήνεται να πήξει. Προετοιμάζονται τα δείγματα και οι μάρτυρες του μοριακού βάρους που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν με την προσθήκη σε αυτά loading buffer 6x. Όταν η πηκτή πήξει, πληρώνεται με TAE buffer 1x μέχρι να καλυφθεί και φορτώνονται τα δείγματα στις ειδικές υποδοχές (πηγαδάκια) της πηκτής. Ακολούθως, συνδέονται τα ηλεκτρόδια της ηλεκτροφορητικής συσκευής με τη συσκευή τροφοδότησης έτσι ώστε το θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής όπου κατευθύνονται τα δείγματα τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα. Τέλος, εφαρμόζεται τάση 120 V και μετά από 30 περίπου λεπτά είναι δυνατή η ανίχνευση του DNA με τη μορφή ζωνών κάτω από το υπεριώδες φως, γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω της ενσωμάτωσης των μορίων του βρωμιούχου αιθιδίου, μιας ουσίας που απορροφά στο υπεριώδες, στις διπλές έλικες του DNA. Ταυτόχρονα, είναι δυνατός ο προσδιορισμός του μεγέθους των ζωνών μέσω της σύγκρισής τους με τους μάρτυρες του μοριακού βάρους.

### **3.2.3. Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction)**

Η απομόνωση και ο καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (DNA extraction from agarose gels) έγινε με βάση το πρωτόκολλο Invitrogen PureLink Quick Gel Extraction.

#### *1) Εξαγωγή του τμήματος DNA- Διάλυση της πηκτής:*

Αρχικά εξάγεται από την πηκτή αγαρόζης η ζώνη με το τμήμα του DNA που επιθυμούμε να απομονώσουμε με την βοήθεια ενός αποστειρωμένου ξυραφιού. Η εξαγωγή πραγματοποιείται με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν ο περιττός όγκος της πηκτής. Το κομμάτι αυτό διαλύεται σε buffer GS1 σε αναλογία 30μl buffer για κάθε 10mg πηκτής αγαρόζης (για πηκτή αγαρόζης μέχρι και 2%). Η διάλυση επιτυγχάνεται με θέρμανση της πηκτής στους 50°C για 15 λεπτά με ανάδευση κάθε 3 λεπτά. Αφού λιώσει η πηκτή, αφήνω στους 50°C για 5 λεπτά ακόμη. Παράλληλα προθερμαίνω το TE buffer στους 65-70°C.

#### *2) Δέσμευση του DNA- Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης*

Το δείγμα φορτώνεται σε στήλη, η οποία τοποθετείται σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 x g, απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα. Ακολούθως, προστίθενται ακόμη 500μl GS1 buffer, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 x g και απομακρύνεται το έκλουσμα. Η στήλη επανατοποθετείται στο συλλεκτικό σωλήνα. Στη συνέχεια, προστίθενται 700μl buffer W9 (περιέχει αιθανόλη) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση για 1 λεπτό

στις 12000 x g. απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα.

### 3) Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης- Έκλουση του DNA

Τα δείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 12000 x g με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του οποιουδήποτε buffer. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο γιατί έτσι επιτυγχάνεται η απομάκρυνση της αιθανόλης που περιέχει το buffer W9, η οποία είναι πιθανόν να αναστείλει ακόλουθες αντιδράσεις. Ακολούθως, η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα (Recovery Tube) και προστίθενται 50μl του TE buffer που είχε προθερμανθεί. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της έκλουσης του DNA. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 12000 x g. Το εκλούμενο DNA φυλάσσεται στους -20°C.

### 3.2.4. Σύνδεση τμημάτων DNA (ligation)

Επωάζεται γραμμικός φορέας παρουσία των τμημάτων, που επιθυμούμε να συνδέσουμε, σε αναλογία φορέα προς τμήμα DNA 1:3, με την προσθήκη 1 Unit T4 DNA λιγάσης (400u/μl) (Takara). Επιπλέον, είναι απαραίτητη η προσθήκη στο διάλυμα του ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος της λιγάσης το οποίο κατασκευάζεται από την ίδια εταιρεία, καθώς επίσης και ATP (50mM) τελικής συγκέντρωσης 5mM. Το διάλυμα επωάζεται για 12-14h στους 4°C στην περίπτωση που το ένθεμα ενώνεται με το φορέα pGEM-T Easy, ενώ στους 16 °C και για το ίδιο χρονικό διάστημα στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ο φορέας pET-20b.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί ο πλασμιδιακός φορέας pSC-A, προστίθενται με την ακόλουθη σειρά τα εξής συστατικά:

- 3 μl Strataclone Cloning Buffer
- 2 μl PCR product (5-50ng)
- 1 μl Strataclone Vector Mix

Ακολούθως, πραγματοποιείται επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

### 3.2.5. Μεταφορά πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα *E. coli* (transformation)

Σε 200μl επιδεκτικών κυττάρων γίνεται προσθήκη 5μl του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 30 λεπτά και ακολούθως heatshock στους 42°C για 1,5 λεπτά. Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 1-2 λεπτά και εν συνεχεία προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 800μl SOC medium. Ακολουθεί επώαση για 1,5 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (160 rpm). Τέλος, επιστρώνονται 300μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας σε τριβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό, ανάλογα με τα γονίδια ανθεκτικότητας που διαθέτει το εκάστοτε πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό (π.χ. αμπικιλίνη). Επίσης, σε περίπτωση που το πλασμίδιο που χρησιμοποιείται διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης (π.χ. pGEM-Teasy), είναι απαραίτητη η

προσθήκη 16μl X-gal (50mg/ml) και 100μl IPTG 0,1M (Isopropyl Thio Galactosyl) στα τριβλία άγαρ πριν την επίστρωση των κυττάρων, για να είναι δυνατή, στη συνέχεια, η επιλογή των λευκών αποικιών που θα περιέχουν το επιθυμητό πλασμιδίο (blue/white screening). Το IPTG δεσμεύει και απομακρύνει τον καταστολέα LacIQ, από το DNA επιτρέποντας έτσι την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης. Με αυτόν τον τρόπο, το γονίδιο του FemX που έχει εισαχθεί μετά το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης στον πλασμιδιακό φορέα, εκφράζεται. Τέλος, πραγματοποιείται επώαση των τριβλίων στους 37°C για 12-14h.

### **3.2.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)**

Οι λευκές αποικίες ενοφθαλμίζονται σε 3ml LB broth που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση των καλλιέργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Η ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα E. coli NucleoSpin( Plasmid QuickPure).

1) Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:

Μεταφέρονται 1,5ml από την καλλιέργεια E. coli που αναπτύχθηκε σε ένα σωλήνα και φυγοκεντρώνται για 30s στις 11000 x g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται αυτό το βήμα.

2) Λύση των κυττάρων:

Προστίθενται 250μl buffer A1 και επαναδιαλύεται το ίζημα με τη βοήθεια πιπέτας και έντονη ανάδευση στο vortex. Ακολουθεί προσθήκη 250μl buffer A2 και ανάμειξη αναποδογυρίζοντας ήπια μερικές φορές χωρίς τη χρήση του vortex. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Ακολούθως προστίθενται 300μl buffer A3 και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας μερικές φορές (6-8) αποφεύγοντας τη χρήση του vortex. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 11000 x g σε θερμοκρασία δωματίου.

3) Δέσμευση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη NucleoSpin (Plasmid QuickPure σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml στην οποία φορτώνεται το υπερκείμενο που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρηση του προηγούμενου βήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.

4) Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

Επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα και προστίθενται 450μl buffer AQ (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 11000 x g όπου και επιτυγχάνεται ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του εκλούσματος και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα.

### 5) Έκλυση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωλήνα και προστίθενται 50μl buffer AE. Στη συνέχεια, επωάζεται το δείγμα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g.

### 3.2.7. Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού (digestion)

Η ενζυμική πέψη με τη χρήση ενζύμων περιορισμού έχει σκοπό την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA. Πλασμιδιακό DNA επωάζεται με το ένζυμο σε αναλογία 2 Units (ενζυμικές μονάδες)/μg DNA, παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο προτείνεται από την κατασκευαστική εταιρεία. Η ενζυμική μονάδα (Unit) ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει 1 μg DNA από βακτηριοφάγο σε μια ώρα, στους 37°C. Η αντίδραση διαρκεί περίπου 2 ώρες στους 37°C. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία είναι τα NcoI (10000u/ml) και XhoI (10u/μl) των εταιριών New England Biolabs και Takara αντίστοιχα. Στην εικόνα 19 φαίνονται οι αλληλουχίες του DNA που αναγνωρίζουν τα συγκεκριμένα περιοριστικά ένζυμα και οι αντίστοιχες θέσεις κοπής τους.



Εικόνα 19: Οι αλληλουχίες του DNA που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα NcoI και XhoI και οι θέσεις κοπής τους.

Στην εταιρεία New England Biolabs ανήκουν και τα ρυθμιστικά διαλύματα (10x) των ενζύμων (NEBuffer 1-4) σε καθένα από τα οποία το εκάστοτε ένζυμο παρουσιάζει διαφορετική δραστικότητα (πίνακας 11).

	NcoI	XhoI
NEBuffer 1	75%	100%
NEBuffer 2	100%	100%
NEBuffer 3	100%	100%
NEBuffer 4	100%	100%

Πίνακας 11: Οι δραστικότητες των περιοριστικών ενζύμων NcoI και XhoI στο εκάστοτε buffer.

Κατά την διαδικασία της ενζυμικής πέψης προστίθεται επιπλέον και BSA (100x), μια ουσία η οποία δεσμεύεται στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωλήνων, εμποδίζοντας έτσι την δέσμευση των περιοριστικών ενδονουκλεασών σε αυτά, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η μείωση της δραστικότητας αυτών των ενζύμων.

### 3.2.8. Διαδικασία υπερέκφρασης του παράγοντα FemX.

Σε 5ml LB Broth με χλωραμφαινικόλη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 25mg/ml και αμπικιλίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml, ενοφθαλμίζονται κύτταρα BL 21 Rossetta που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο και επωάζονται για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Ακολουθεί μεταφορά των 5ml της O/N καλλιέργειας σε 100ml από φρέσκο θρεπτικό μέσο LB broth με χλωραμφαινικόλη και αμπικιλίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD<sub>600</sub>) και επώαση των καλλιεργειών στους 37°C υπό ανάδευση έως ότου το OD<sub>600</sub> φτάσει περίπου το 0,5 που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Προσθέτουμε IPTG (0,1M) (Isopropyl Thio Galactosyl) σε τελική συγκέντρωση 0,5mM και 1 mM, καθώς και αμπικιλίνη. Το IPTG δρα ως επαγωγέας της έκφρασης του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης της οποίας ο προαγωγέας στο πλασμίδιο pET-20b που χρησιμοποιείται στην συγκεκριμένη περίπτωση για την κλωνοποίηση του γονιδίου του FemX βρίσκεται μπροστά από τον polylinker. Η έκφραση του γονιδίου αυτού στα κύτταρα του *E. coli* αναστέλλεται από τον καταστολέα LacIQ. Το IPTG δεσμεύει και απομακρύνει τον καταστολέα από το DNA επιτρέποντας έτσι την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία με τη σειρά της θα αναγνωρίσει τον προαγωγέα της στο πλασμίδιο και θα μεταγράψει τα γονίδια που βρίσκονται μετά από αυτόν, που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το γονίδιο του FemX. Μετά την προσθήκη του IPTG συνεχίζεται η επώαση των καλλιεργειών στους 37°C και σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι το OD<sub>600</sub> να φτάσει το 1-1,1. Η επώαση σε θερμοκρασία δωματίου αποσκοπεί στην επίτευξη της αναστολής της δράσης πρωτεασών και της επακόλουθης αποικοδόμησης του πρωτεϊνικού παράγοντα FemX, σε περίπτωση που αυτός εγκλωβίζεται σε σωματίδια εγκλεισμού (inclusion bodies) με πρωτεολυτικά ένζυμα και κατακρυμνίζεται κατά την φυγοκέντρωση μαζί με αυτά. Τέλος, φυγοκεντρώνονται οι καλλιέργειες στις 12000 rpm για 30 min στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C.

### 3.2.9. Διαδικασία απομόνωσης του FemX.

#### Ομογενοποίηση των κυττάρων

Η ομογενοποίηση των κυττάρων BL 21 Rossetta, στα οποία έχει προηγηθεί υπερέκφραση του FemX, πραγματοποιείται στο διάλυμα ομογενοποίησης (Διάλυμα 1) (Πίνακας 12). Ακολουθεί διάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml του παραπάνω διαλύματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία του σπασίματος των κυττάρων με υπέρηχους (sonicator) και φυγοκέντρωση στις 14000 rpm, για 30 λεπτά στους 4°C. Διαχωρίζεται το υπερκείμενο από το ίζημα και ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης FemX.

### Απομόνωση της πρωτεΐνης FemX.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 14000 rpm για 30 λεπτά και διαχωρισμός του υπερκείμενου από το ίζημα, και τα δύο από τα οποία φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Το υπερκείμενο μπορεί να κλασματοποιηθεί, περνώντας κάθε δείγμα από στήλη νικελίου (NTA-Ni), η οποία κατακρατά τον FemX μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που περιέχει με τα άτομα του νικελίου και αφήνει τις υπόλοιπες πρωτεΐνες να τη διαπεράσουν. Έτσι, είναι δυνατόν να συλλεχθούν κλάσματα τα οποία περιέχουν πρωτεΐνες διαφορετικές του FemX. Στη συνέχεια, και όταν στο ρυθμιστικό διάλυμα προστεθεί ιμιδαζόλη σε τελική συγκέντρωση 20 mM (Διάλυμα 2), πρωτεΐνες που κατακρατούνται ασθενώς εκλούνται. Για την ανάκτηση του FemX το ρυθμιστικό διάλυμα πρέπει να περιέχει ιμιδαζόλη σε μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση (300 mM) (Διάλυμα 3), ώστε ο παράγοντας αυτός να μπορέσει να αποδεσμευτεί από τη στήλη. Αυτό που κάνει στην ουσία η ιμιδαζόλη είναι να δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου και να ανταγωνίζεται τις his-tagged πρωτεΐνες στη δέσμευση. Κυρίως στα κλάσματα που συλλέχθηκαν μετά τα την εφαρμογή του διαλύματος 3 θα αναζητηθεί στη συνέχεια η ύπαρξη FemX.

Αντιδραστήρια	Διάλυμα 1	Διάλυμα 2	Διάλυμα 3
	Τελική συγκέντρωση		
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH = 7.8	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM
PMSF	0.1 mM	-	-
Lysozyme (from hen egg)	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	-
Ιμιδαζόλη	-	20 mM	300 mM

Πίνακας 12: Σύσταση των διαλυμάτων ομογενοποίησης (Διάλυμα 1) και έκλουσης (Διαλύματα 2 και 3) διαφορετικών τελικών συγκεντρώσεων ιμιδαζόλης.

### Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, τη πηκτή διαχωρισμού (separating gel) (πίνακας 13) και τη πηκτή συγκέντρωσης (stacking gel) (πίνακας 14).

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>
Ακρυλαμίδιο 30%	2,7 ml
Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	2,5 ml
SDS 10%	100 $\mu$ l
TEMED	6,0 $\mu$ l
APS 10%	100 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	Up to 10 ml

Πίνακας 13: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 8%.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>
Ακρυλαμίδιο 30%	0,83 ml
Tris-HCl 0,5M (pH 6,8)	1,26 ml
SDS 10%	50 $\mu$ l
TEMED	5,0 $\mu$ l
APS 10%	50 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	Up to 5 ml

Πίνακας 14: Σύσταση πηκτής συγκέντρωσης 5%.

Η πηκτική συγκέντρωσης έχει μικρότερη πυκνότητα από το πήκτωμα διαχωρισμού και συγκεντρώνει τη ποσότητα των δειγμάτων που έχουμε φορτώσει στα πηγάδια, τα οποία όταν εισέλθουν στην πηκτική διαχωρισμού, διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Αρχικά η πηκτική διαχωρισμού τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται από πάνω της μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας της πηκτής. Αφού πήξει, αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται στη συσκευή η πηκτική συγκέντρωσης ακριβώς πάνω από την πηκτική διαχωρισμού, η οποία αφήνεται να πήξει. Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτική περιλαμβάνει την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού (3x) και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η μετουσίωση επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C, για 4 λεπτά, ούτως ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση το φορτίο τους, το οποίο είναι ενιαίο αρνητικό, εξαιτίας του SDS. Ακολούθως, αφού εξασφαλιστεί ότι η πηκτική είναι έτοιμη, φορτώνονται τα δείγματα, καθώς και οι μάρτυρες μοριακού βάρους, στις ειδικές υποδοχές της πηκτής και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris, γλυκίνη, SDS), έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτική. Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση 100V, μέχρι τα



δείγματα να διανύσουν την πηκτική συγκέντρωση, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτική διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 200V.

Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος, καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Ακολουθεί, αφαίρεση της πηκτικής συγκέντρωσης και βάψιμο της πηκτικής διαχωρισμού με το διάλυμα χρωματισμού (stain solution)(πίνακας 15).

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητα-Όγκος</i>
Coomasie Brilliant Blue	0,25g
Ισοπροπανόλη	25ml
Οξικό οξύ	10ml
ddH <sub>2</sub> O	65ml

Πίνακας 15: Σύσταση διαλύματος χρωματισμού.

Η διαδικασία αυτή διαρκεί 45 λεπτά υπό ανάδευση και στη συνέχεια πραγματοποιείται αποχρωματισμός της πηκτικής με το διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution), το οποίο αποτελείται από 10% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ. Η διαδικασία αποχρωματισμού διαρκεί για περίπου 50 λεπτά, αλλά κάθε 10 λεπτά είναι απαραίτητη η ανανέωση του διαλύματος. Στο τέλος της διαδικασίας είναι ευδιάκριτες οι ζώνες των πρωτεϊνών, εξαιτίας της μπλε χρωστικής Coomasie Brilliant Blue, ενώ είναι δυνατός και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνικών τμημάτων μέσω της σύγκρισης των ζωνών με τους μάρτυρες μοριακού βάρους.

### 3.2.10 Gel Retardation Assay

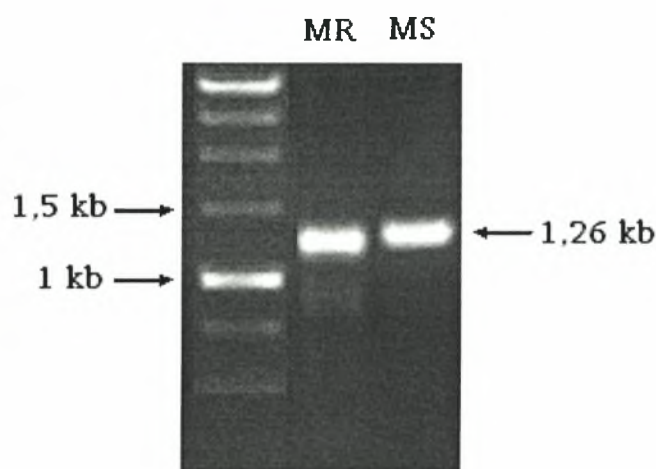
Η δοκιμή καθυστέρησης σε πηκτική είναι μια κοινή τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA). Με τον τρόπο αυτό διευκρινίζεται αν μια πρωτεΐνη ή ένα μείγμα πρωτεϊνών έχει την ικανότητα δέσμευσης μιας δεδομένης αλληλουχίας DNA ή RNA και κάποιες φορές προσδιορίζεται αν στο σύμπλεγμα δέσμευσης συμμετέχει μία ή περισσότερες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή περιλαμβάνει τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό ενός μείγματος πρωτεΐνης-νουκλεϊκού οξέος σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου ή αγαρόζης για ένα μικρό χρονικό διάστημα. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα διάφορα μόρια (ή οι συνδιασμοί τους) καθορίζεται από το μέγεθος, το φορτίο και κατά ένα μικρότερο βαθμό από το σχήμα τους. Έτσι, όταν ένα νουκλεϊκό οξύ αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη δημιουργείται ένα βαρύτερο σύμπλοκο με μικρότερη κινητικότητα που γίνεται εμφανές ως μία μπάντα που βρίσκεται πιο ψηλά στην πηκτική από ότι η μπάντα του νουκλεϊκού οξέος που δεν αλληλεπιδράσε με την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει (gel shift). Στην περίπτωσή μας, η συγκεκριμένη δοκιμή πραγματοποιήθηκε προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ικανότητα του FemX

να δεσμεύει μόρια tRNA. Συγκεκριμένα, η πηκτή και το buffer της ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν τα εξής:

- Gel : 6% acrylamide/bisacrylamide 40:1 , 5% glycerol , 1x TBE (electrophoresis buffer)
- Electrophoresis buffer: 1x TBE pH 8.3 ; 0.05 M Tris; 0.025M boric acid; 1 mM EDTA pH 8.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

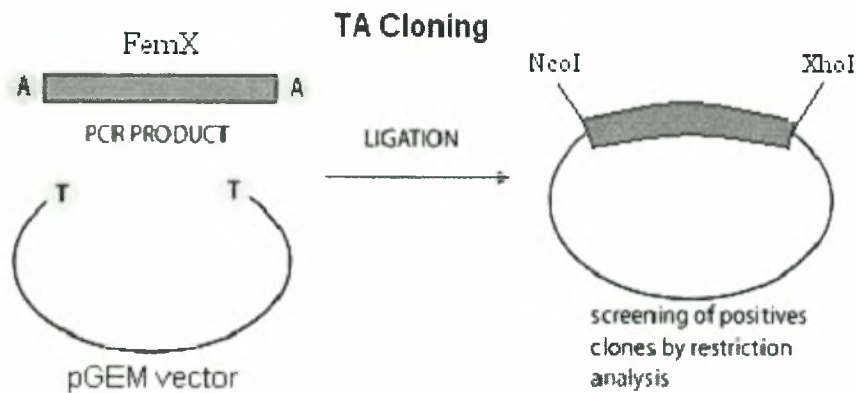
Αρχικά πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου *fmhB* του παράγοντα FemX από το βακτήριο *Staphylococcus aureus*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA τόσο από ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη *S. aureus* (MR, multi-resistant strains), όσο και από στελέχη ευαίσθητα σ' αυτή και αρκετά ακόμη αντιβιοτικά (MS, multi-sensitive strains). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl και εφαρμόστηκε θερμοκρασία υβριδισμού 53°C. Χρησιμοποιήθηκαν, όπως προαναφέρθηκε, οι εκκινητές *S. aureus* NcoI sense και *S. aureus* XhoI antisense, με αποτέλεσμα να προκύψουν προϊόντα ενίσχυσης τα οποία θα διαθέτουν στα άκρα τους τις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα NcoI και XhoI. Μετά την ολοκλήρωση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης σε πήκτωμα αγαρόζης (1%). Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έγιναν ορατά σε υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 20), ενώ πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του μεγέθους των τμημάτων DNA με βάση τον μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder 1kb). Η εικόνα που προέκυψε επιβεβαίωσε την ορθότητα της ενίσχυσης εφόσον είναι ευδιάκριτες ζώνες που αντιστοιχούν στις 1,26 kb, όσο, δηλαδή, είναι και το μέγεθος του γονιδίου του FemX τόσο στα MR όσο και στα MS στελέχη του *S. aureus* (εικόνα 21).



Εικόνα 20: Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης του προϊόντων της PCR . Είναι ευδιάκριτες οι ζώνες μεγέθους 1,26 kb που αντιστοιχούν στο ενισχυμένο γονίδιο του FemX τόσο από MR όσο και από MS στελέχη *S. aureus*.

Ακολούθησε καθαρισμός και απομόνωση από το πήκτωμα αγαρόζης των ενισχυμένων τμημάτων DNA που αντιστοιχούν στις επιθυμητές ζώνες με τη βοήθεια του πρωτοκόλλου PureLink Quick Gel Extraction της Invitrogen, ακριβώς όπως έχει ήδη περιγραφεί. Ο τελικός όγκος έκλουσης ήταν τα 50μl. Στη συνέχεια τα προϊόντα που εξήχθησαν από την πηκτή, χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της ένωσης με τον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy. Η

σύνδεση των ενισχυμένων γονιδίων του FemX με τον φορέα, βασίστηκε στη μέθοδο του TA cloning, καθώς τα γονίδια διέθεταν μετά το τέλος της PCR 3' προεξοχές δεοξυαδενοσίνης (A) (χάρη στη δράση της Taq πολυμεράσης που προστέθηκε κατά το τελευταίο βήμα υβριδισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης) και ο pGEM είναι κατασκευασμένος με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να διαθέτει προεξοχές δεοξυθυμιδίνης (T). Η αντίδραση σύνδεσης των συμπληρωματικών αυτών άκρων πραγματοποιήθηκε για 12-14h στους 4°C (εικόνα 21).



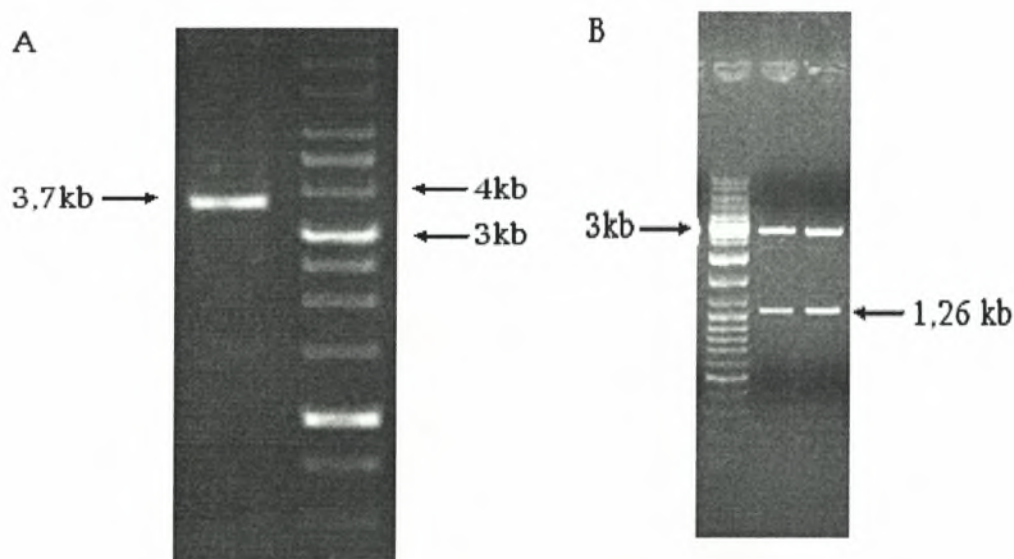
Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας κλωνοποίησης με τη μέθοδο του TA cloning, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή του γονιδίου του FemX στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy. Ο φορέας έχει γραμμοποιηθεί έτσι ώστε να διαθέτει 3' προεξοχές (overhangs) δεοξυθυμιδίνης (T), ενώ το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου FemX που πρόκειται να κλωνοποιηθεί διαθέτει 3' προεξοχές δεοξυαδενοσίνης (A) εξαιτίας της δράσης της Taq πολυμεράσης. Ακολούθως, πραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσης μέσω των συμπληρωματικών άκρων του προϊόντος της PCR (3' A) και του φορέα (3' T), παρουσία μιας λιγάσης (T4 DNA λιγάση). Το ανασυνδυασμένο, πλέον, πλασμίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μετασχηματισμό και ακόλουθο έλεγχο των θετικών κλώνων που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο με τη μέθοδο της ανάλυσης με ένζυμα περιορισμού (στην προκειμένη περίπτωση τα περιοριστικά ένζυμα NcoI και XhoI).

Το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας περιελάμβανε τη μεταφορά των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης σε στελέχη *E. coli* και συγκεκριμένα σε κύτταρα DH5a, τα οποία προηγουμένως είχαν καταστεί επιδεκτικά. Αρχικά, αναπτύχθηκαν καλλιέργειες κύτταρων DH5a και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός, για τη μεταφορά των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στα κύτταρα. Για την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C σε τριβλία άγαρ με το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml. Εφόσον το πλασμίδιο pGEM-T Easy προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, οι αποικίες που θα αναπτυχθούν παρουσία αυτού του αντιβιοτικού θα είναι αποκλειστικά εκείνες που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο. Επίσης, είναι απαραίτητη η προσθήκη X-gal και IPTG στα τριβλία άγαρ, καθώς ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας διαθέτει το οπερόνιο LacZ

με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η επιλογή των λευκών αποικιών που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο, έναντι των μπλε (blue/white screening). Ακολούθησε δημιουργία stock των μετασχηματισμένων κυττάρων σε 50% γλυκερόλη (με αναλογία 700μl κύτταρα και 300μl γλυκερόλη) και αποθήκευση στους -80°C.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις επιλεγμένες λευκές αποικίες σε μικρή κλίμακα (mini-preps) και έλεγχος του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA με χρήση των περιοριστικών ενζύμων NcoI και XhoI. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε διπλή αντίδραση πέψης (δηλαδή με ταυτόχρονη παρουσία και δράση των περιοριστικών ενζύμων NcoI και XhoI) διάρκειας 2 ωρών στους 37°C. Όπως αναμενόταν μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης και έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία, προέκυψαν δύο ζώνες μεγέθους περίπου 3kb που αντιστοιχούν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM και δύο ζώνες μεγέθους περίπου 1,3 kb που αντιστοιχούν στα γονίδια του FemX, προερχόμενα τόσο από MR όσο και από MS στελέχη *S. aureus* (εικόνα 22B).

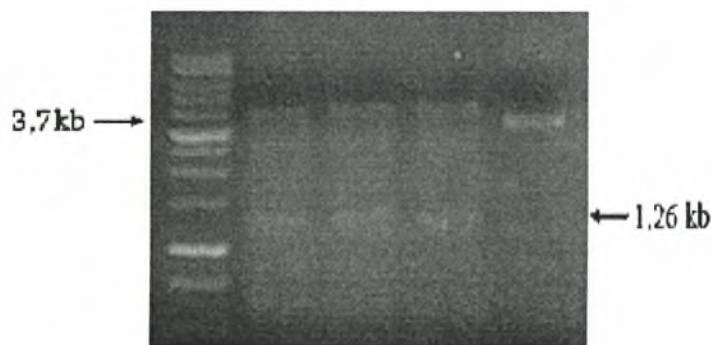
Παράλληλα, έγινε πέψη του πλασμιδιακού φορέα pET-20b, με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, NcoI και XhoI. Η αντίδραση διήρκεσε 2 ώρες στους 37°C. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων επιβεβαιώνει την ορθότητα της αντίδρασης πέψης, εφόσον παρατηρείται η ζώνη μεγέθους περίπου 3,7kb, η οποία αντιστοιχεί στον φορέα pET-20b γραμμοποιημένο (εικόνα 22A).



Εικόνα 22: Α) Αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της πέψης του πλασμιδιακού φορέα pET-20b, με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NcoI και XhoI ώστε να γραμμοποιηθεί πριν την απομόνωση. Β) Απεικόνιση των τμημάτων που προκύπτουν μετά την πέψη του ανασυνδυασμένου pGEM-FemX με τα ένζυμα περιορισμού NcoI και XhoI. Οι δύο μπάντες στις 1,26 kb αντιστοιχούν στα γονίδια του FemX από MR και MS στελέχη *S. aureus*, ενώ οι ζώνες αντιστοιχούν στον pGEM.

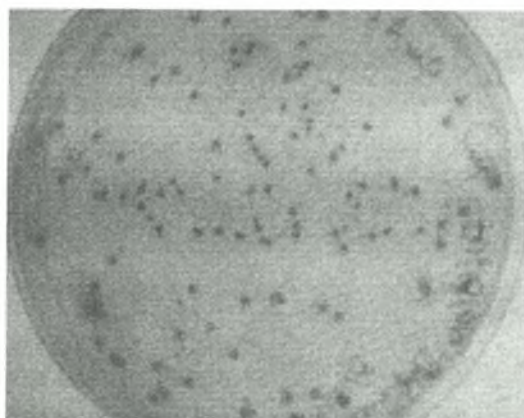
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή των ζωνών μεγέθους 1,26kb που αντιστοιχούν στο γονίδιο του FemX του *S. aureus* από το πήκτωμα αγαρόζης της εικόνας 22B, καθώς και εξαγωγή της ζώνης μεγέθους 3,7kb που αντιστοιχεί στον γραμμοποιημένο πλασμιδιακό φορέα pET-20b από το πήκτωμα αγαρόζης της εικόνας 22A. Ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης (ligation) ανάμεσα στα δύο τμήματα που απομονώθηκαν από τα πηκτώματα αγαρόζης, μέσω της δράσης της T4 DNA λιγάσης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 16°C O/N, ενώ η σύνδεση των δύο τμημάτων επιτεύχθη μέσω των κολλωδών άκρων τους που προέκυψαν από την πέψη με κοινά περιοριστικά ένζυμα (NcoI και XhoI).

Έπειτα, ακολούθησε η μεταφορά του προϊόντος της αντίδρασης σύνδεσης σε επιδεικτικά κύτταρα DH5a, με τη διαδικασία του μετασχηματισμού. Η ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε στους 37°C σε τριβλία άγαρ με το αντιβιοτικό αμπικιλίνη στη συγκέντρωση που ήδη αναφέρθηκε. Ο πλασμιδιακός φορέας pET-20b δεν διαθέτει το οπερόνιο LacZ με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επιλογή των κλώνων που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο με το επιθυμητό ένθετο, με βάση το χρώμα τους. Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκε μία από τις αναπτυχθείσες αποικίες για την δημιουργία υγρής καλλιέργειας σε LB broth με αμπικιλίνη, για να γίνει στην συνέχεια απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με mini preparation σε τελικό όγκο 50μl. Αυτό είναι απαραίτητο για έλεγχο του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA ο οποίος θα επιτευχθεί μέσω της πέψης του με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI. Αυτά τα ένζυμα, όπως αναφέρθηκε, αναγνωρίζουν θέσεις κοπής που εντοπίζονται στα άκρα του γονιδίου του FemX, το οποίο έχει εισαχθεί στον φορέα pET-20b, με αποτέλεσμα να αναμένεται η ανίχνευση δύο ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης. Η μία ζώνη θα έχει μέγεθος 1,3kb περίπου και θα αντιστοιχεί στο γονίδιο του FemX και η δεύτερη θα έχει μέγεθος 3,7kb και θα αντιστοιχεί στον pET-20b. Στην εικόνα που προέκυψε παρατηρείται η αποικία που ελέγχθηκε παρουσιάζει το αναμενόμενο πρότυπο (εικόνα 23).



Εικόνα 23: Η έλεγχος της μοναδικής αποικίας που αναπτύχθηκε, έγινε με πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NcoI και XhoI και στη συνέχεια τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 10%. Οι μπάντες στις 1,26 kb αντιστοιχούν στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον FemX, ενώ οι μπάντες των 3,7 kb αντιστοιχούν στον κομμένο-γραμμοποιημένο pET-20b, επιβεβαιώνοντας έτσι την επιτυχία της εισαγωγής του FemX στον πλασμιδιακό φορέα.

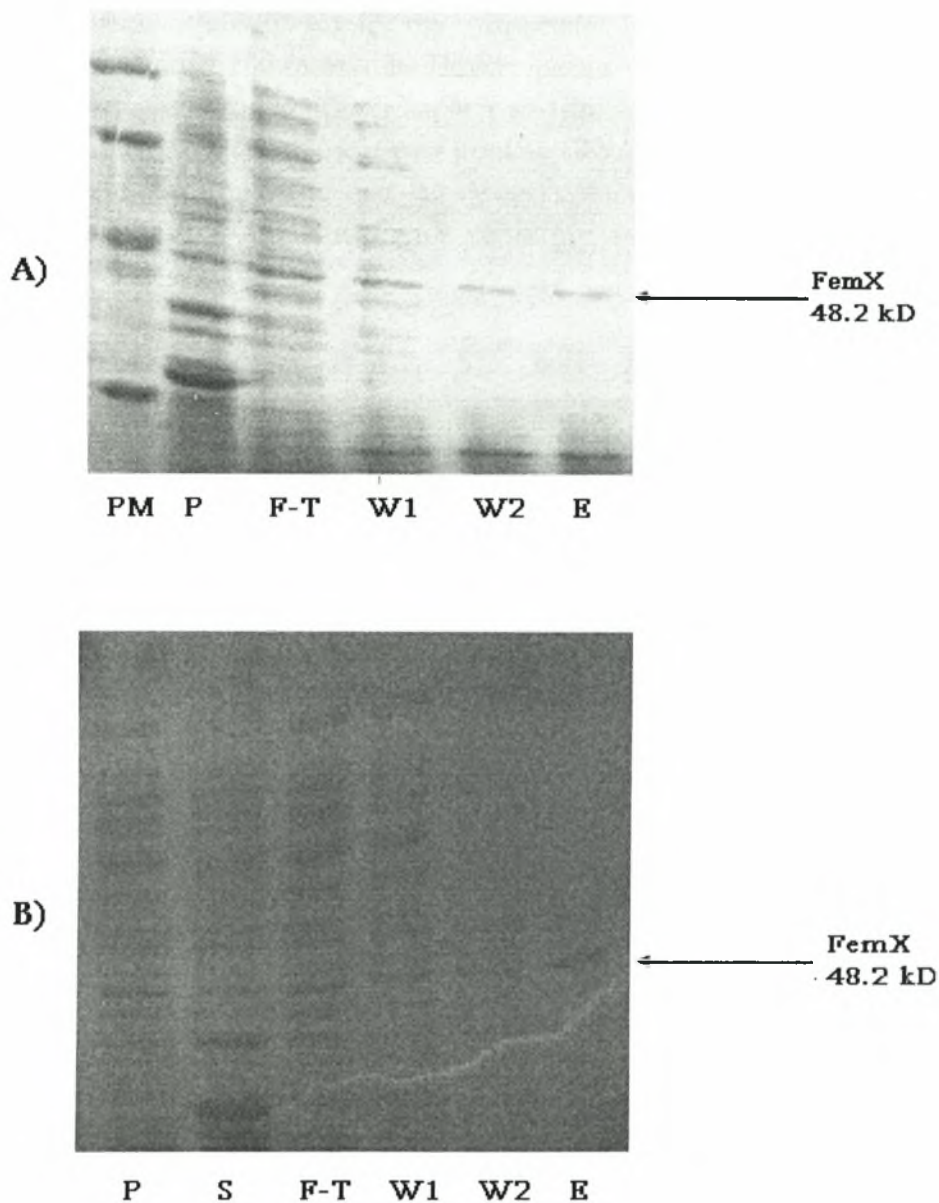
Το επόμενο πειραματικό στάδιο περιλαμβάνει την μεταφορά του pET-20b με το εισαχθέν γονίδιο σε επιδεκτικά κύτταρα BL 21 codon+, τα οποία αναπτύσσονται παρουσία του αντιβιοτικού χλωραμφαινικόλη (34mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 100mg/ml, με την διαδικασία του μετασχηματισμού. Μετά το πέρας του μετασχηματισμού επιστρώθηκαν τα κύτταρα σε τριβλία άγαρ με αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη και η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37°C (εικόνα 24).



Εικόνα 24: Αναπτυχθείσες αποικίες μετά το μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων BL21 με το φορέα pET-20b που φέρει το γονίδιο του FemX.

Η επιβεβαίωση ολόκληρης της διαδικασίας κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε με το τελευταίο πειραματικό στάδιο το οποίο περιλαμβάνει την ανίχνευση του γονιδίου του FemX σε επίπεδο πρωτεΐνης. Για να επιτευχθεί αυτό, είναι απαραίτητη η επαγωγή της υπερέκφρασης του γονιδίου του FemX, έτσι ώστε να είναι δυνατή, στη συνέχεια, η απομόνωσή του και η ανίχνευσή του αν ηλεκτροφορηθεί σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Έτσι, αρχικά πραγματοποιείται η διαδικασία της υπερέκφρασης του FemX του *S. aureus*, ακριβώς όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν 2 καλλιέργειες των 200 ml από την αποικία των BL 21 που είχε αναλυθεί και ελεγχθεί προηγουμένως με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG για την επαγωγή της έκφρασης (0.1mM και 1mM) σε θερμοκρασία δωματίου και βέλτιστη αποδείχθηκε η συγκέντρωση των 0.1mM καθώς στα συγκεκριμένα δείγματα παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ποσότητα απομονωμένης πρωτεΐνης. Μετά το πέρας της διαδικασίας ακολούθησε ομογενοποίηση των κυττάρων με υπέρηχους (15 κύκλους σπασίματος) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση της πρωτεΐνης-στόχου με 2 ml στήλης NTA-Ni. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 10% με SDS (SDS-PAGE) των κλασμάτων που συλλέξαμε (εικόνα 25). Αξίζει εδώ να σημειωθεί πως αρχικά επιχειρήθηκε επαγωγή της υπερέκφρασης με IPTG σε θερμοκρασία 37°C χωρίς όμως να έχουμε ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων ενώ και η εικόνα που πήραμε σε πηκτή ακρυλαμίδης

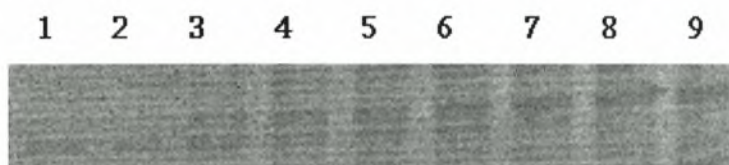
μετά το σπάσιμο των κυττάρων και το πέρασμα του εκχυλίσματος από στήλη νικελίου απέδειξε την αποτυχία απομόνωσης του FemX. Βιβλιογραφικά, θεωρείται σύνηθες το γεγονός πως μια πρωτεΐνη προερχόμενη από ένα Gram(+) βακτήριο, όπως ο *S. aureus*, δρα τοξικά σε ένα Gram(-) βακτήριο όπως το *E. coli*, και μάλιστα στους 37°C.



Εικόνα 25: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8%. Ηλεκτροφορήθηκαν τα ιζήματα των κυττάρων μετά την ομογενοποίηση (pellets), το υπερκείμενο (supernatants), τα flow-throughs καθώς και αντιπροσωπευτικά κλάσματα που προέκυψαν κατά το ξέπλυμα (washing) της στήλης και την έκλυση (elution) του FemX. Όπου PM: protein markers. Στην εικόνα 26A έχουμε επαγωγή έκφρασης με IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.1mM και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ στην εικόνα 26B έχουμε επαγωγή με με IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM και επώαση επίσης σε θερμοκρασία δωματίου.



Τέλος, η ικανότητα του εκλουόμενου FemX να δεσμεύει μόρια tRNA επιβεβαιώθηκε με την εκτέλεση μιας δοκιμής επιβράδυνσης λόγω σχηματισμού συμπλόκου σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (gel retardation assay). Και αυτό το πετύχαμε επωάζοντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκλουόμενου FemX (0, 5, 10, 13, 15, 18, 20  $\mu$ l) με σταθερή συγκέντρωση ολικού RNA (1  $\mu$ l) σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά στους 4° C και ακολούθως ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου χωρίς την παρουσία ουρίας (μη αποδιατακτικές συνθήκες) και πήραμε την εικόνα 26. Παρατηρούμε πως παρουσία RNA υπάρχει και μια μπάντα που εμφανίζει μειωμένη κινητικότητα λόγω της δημιουργίας συμπλόκου μεταξύ του FemX και των μορίων tRNA που περιέχονται στο ολικό RNA που χρησιμοποιήσαμε για τη συγκεκριμένη δοκιμή. Μάλιστα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του FemX τόσο πιο έντονη παρουσιάζεται και η μπάντα αυτή.



Εικόνα 26 Στην γραμμή 1 έχουμε ένα αρνητικό control που περιέχει μόνο ολικό RNA και κατά συνέπεια παρατηρείται μία και μοναδική μπάντα. Στις θέσεις 2-9 σταδιακά αυξάνουμε τη συγκέντρωση του FemX και έτσι κάνει την εμφάνισή της και μια δεύτερη μπάντα που βρίσκεται πιο ψηλά στην πηκτή, η οποία και αυτή με τη σειρά της ενισχύεται. Αντίθετα, η μπάντα που αντιστοιχεί στο ολικό RNA εξασθενεί σταδιακά καθώς ένα σημαντικό ποσοστό του tRNA έχει δεσμευτεί από τον FemX.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

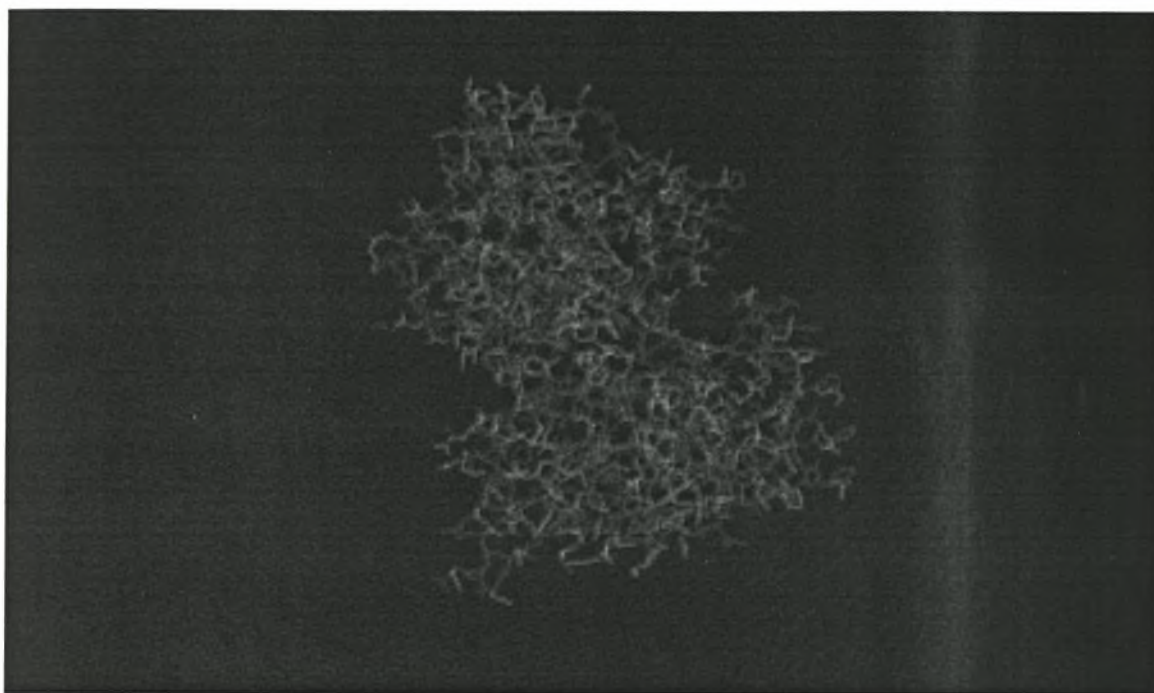
Η ανθεκτικότητα πολλών παθογόνων βακτηρίων στα αντιβιοτικά έχει φθάσει σήμερα σε ανησυχητικά επίπεδα παγκοσμίως. Αυτό το φαινόμενο επιταχύνεται από την εκτεταμένη και πολλές φορές αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος, τα οποία δεν έχουν την ικανότητα διάκρισης μεταξύ των παθογόνων-στόχων και της μη στοχευόμενης φυσιολογικής χλωρίδας (πολλές φορές αποδεικνύονται και τοξικά για τα μιτοχόνδρια). Το γεγονός αυτό καθιστά επιτακτική την ανάγκη για αναζήτηση και ταυτοποίηση νέων στόχων για την ανάπτυξη αντιβιοτικών ειδικών για συγκεκριμένους παθογόνους οργανισμούς, τα οποία παράλληλα να παρουσιάζουν ικανοποιητικούς χρόνους κλινικής δράσης και υψηλό λόγο οφέλους/ρίσκου. Τέτοιους στόχους αποτελούν, χωρίς αμφιβολία, τα ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση των γεφυρών διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης αρκετών παθογόνων, καθώς οι γέφυρες αυτές : (α) αποτελούν απαραίτητο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος, (β) για τη σύνθεση τους απαιτούνται πολλαπλά ενζυμικά βήματα που μπορούν να δώσουν ισάριθμους εν δυνάμει στόχους αντιβιοτικών, (γ) απαντώνται μόνο σε ένα μικρό ποσοστό των Gram(+) βακτηρίων και ποικίλλουν σε μήκος και σύσταση μεταξύ των ειδών (δ) συντίθενται σε λίγα μόνο Gram(-) βακτήρια συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων σπειροχαιτών και αποκλειόμενων των μη παθογόνων εντεροβακτηρίων της φυσιολογικής μικροχλωρίδας.

Η κλάση αντιβιοτικών με στόχο το κυτταρικό τοίχωμα που χρησιμοποιείται κυρίως, είναι οι β-λακτάμες και τα παράγωγά τους. Τα Gram(+) βακτήρια έχουν αναπτύξει δύο κύριες στρατηγικές κατά των β-λακταμών (Fontana et al., 1990):

- Απενεργοποίηση των φαρμάκων με τη βοήθεια των β-λακταμασών
- Έμφυτη ανθεκτικότητα που οφείλεται σε τροποποιημένες, χαμηλής συγγένειας PBP's που αποτελούν και τα ένζυμα-στόχους των β-λακταμών. Για παράδειγμα, στον *S. aureus*, η ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη οφείλεται στο προϊόν της χρωμοσωμικής κασέτας SCCmec (πρόκειται πιθανώς για μεταθετό στοιχείο μη-σταφυλοκοκκικής προέλευσης).

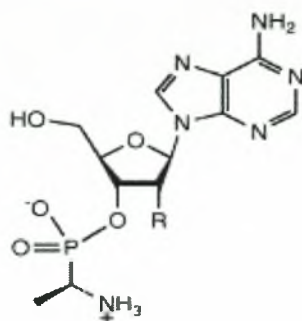
Σε αυτή την κατηγορία παραγόντων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος Gram(+) βακτηρίων, ανήκουν τα ένζυμα της οικογένειας FemABX, η οποία ταυτοποιήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του '60 και αρχές της δεκαετίας του '70 και περιλαμβάνει μη ριβοσωμικές, αμινοάκυλο-tRNA εξαρτώμενες πεπτιδυλο-τρανσφεράσες. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν στη δημιουργία πεπτιδικών γεφυρών απαραίτητων κυρίως για τη διασύνδεση του κυτταρικού τοιχώματος ορισμένων βακτηρίων. Πολλαπλές ομοπαράθεσεις μεταξύ διαφόρων μικροβιακών γενωμάτων αποκάλυψε την ύπαρξη πολλών ακολουθιών ομόλογων του γονιδίου *fmbB* και μάλιστα διαπιστώθηκε πως όλοι





Εικόνα 28: Εικόνα που λάβαμε πραγματοποιώντας το modeling του FemX από τον *S. aureus*, Mu50 με τη βοήθεια του προγράμματος RASMOL.

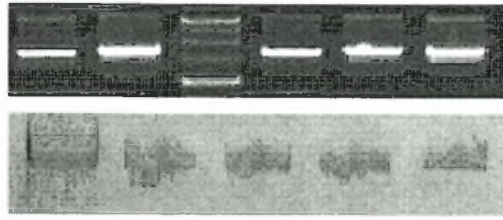
Η γνώση που έχει αποκτηθεί σήμερα για τις πεπτιδυλο-τρανσφεράσες της πρωτεϊνικής οικογένειας FemABX, αναδεικνύει κατάλληλους στόχους για την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων. Ένας πιθανός αναστολέας των FemABX θα αποτελούσε έναν υψηλής εξειδίκευσης αντιμικροβιακό παράγοντα για τους οργανισμούς στους οποίους η διασύνδεση του κυτταρικού τοιχώματος με πεπτιδικές γέφυρες θεωρείται ζωτικής σημασίας. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, προκειμένου να επιτευχθεί υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες, οι PBP's των σταφυλόκοκκων και των πνευμονόκοκκων απαιτούν την ύπαρξη πλήρως σχηματισμένων διαπεπτιδικών γεφυρών (Weber B., et al., 2000). Επιπρόσθετα, η απουσία των συγκεκριμένων γεφυρών θα περιορίζε αισθητά την μολυσματικότητα παθογόνων βακτηρίων καθώς οι συγκεκριμένες γέφυρες αποτελούν τόπο πρόσδεσης πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ικανότητα αυτή των μικροοργανισμών. Τελευταία γίνεται προσπάθεια ανάπτυξης αναστολέων για την tRNA-εξαρτώμενη MurM του *Streptococcus pneumoniae* που καταλύει την ενσωμάτωση καταλοίπων Ser ή Ala στο λιπίδιο II για το σχηματισμό διασυνδέσεων Ser- Ala ή Ala- Ala στο κυτταρικό τοίχωμα του οργανισμού (Cressina E. et al., 2007). Συγκεκριμένα, ως αναστολείς δοκιμάζονται φωσφορικά ανάλογα αδενοσίνης που προσομοιάζουν αμινοακυλιωμένα tRNAs που μεταφέρουν τη σερίνη ή την αλανίνη στην πεπτιδογλυκάνη (εικόνα 29).



Εικόνα 29: Συνθετικά ανάλογα της αμινοακυλιωμένης 3' τελικής αδενοσίνης των μορίων tRNA.

Από αυτή τη σκοπιά, κρίθηκε απαραίτητη η κλωνοποίηση, η υπερέκφραση και ο καθαρισμός τόσο της GlyRS, των tRNA<sup>Gly</sup> μορίων, όσο και του FemX από τον *S. aureus*, προκειμένου να γίνουν διαθέσιμα τα υποστρώματα για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων αυτών των μορίων με άλλους πιθανούς παράγοντες στα πλαίσια της μεταφοράς της γλυκίνης στο κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου. Έτσι, σήμερα έχουμε στη διάθεσή μας εκτός από τον FemX και την GlyRS του *S. aureus*. Η GlyRS, ένα κλασσικό παράδειγμα του εναλλακτικού ρόλου των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών στα βιολογικά συστήματα με μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των οργανισμών, ανήκει στην τάξη II των συνθετασών και πέραν του ρόλου της στην πρωτεϊνοσύνθεση συμμετέχει και στην σύνθεση των γεφυρών πενταγλυκίνης του *S. aureus*. Συγκεκριμένα, παράγει τα απαραίτητα υποστρώματα για τις δύο αυτές διεργασίες, δηλαδή τα μόρια tRNA<sup>Gly</sup>.

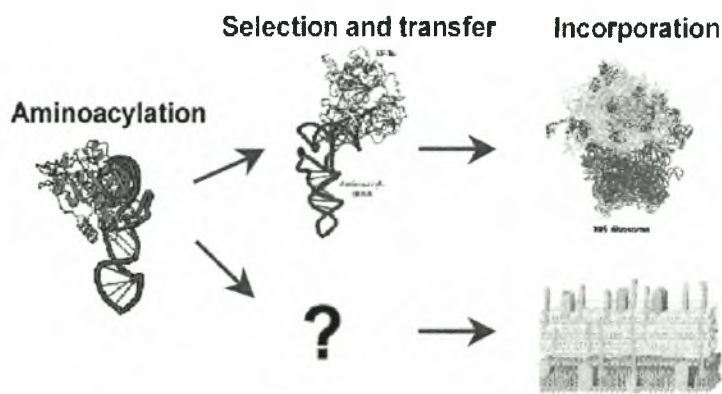
Στο *S. aureus*, ήταν γνωστά μέχρι σήμερα 4 ισοδεκτικά tRNA<sup>Gly</sup> μόρια, με όλα να αμινοακυλιώνονται, όπως είδαμε, από μία μοναδική GlyRS. Λειτουργικές γονιδιωματικές αναλύσεις όμως αποκάλυψαν την ύπαρξη και ενός πέμπτου υποθετικού γονιδίου tRNA<sup>Gly</sup> (αναφέρεται ως ψευδογονίδιο tRNA) που αποδείχθηκε πως εκφράζεται και μάλιστα κωδικοποιεί για ένα πλήρους μήκους, ισοδεκτικό tRNA<sup>Gly</sup> μόριο με αντικωδικόνιο TCC (Kuroda et al, 2001). Στα πλαίσια της προσπάθειας για αποσαφήνιση του μηχανισμού της tRNA-εξαρτώμενης σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος στον *S. aureus*, κλωνοποιήθηκαν στο εργαστήριο και τα 5 tRNA<sup>Gly</sup> γονίδια από με την μέθοδο του cassette-cloning (Becker et al., 1996) και ακολούθησε *in vitro* μεταγραφή (με τη βοήθεια της T7 πολυμεράσης), καθαρισμός και απομόνωση των μεταγράφων (εικόνα 30). Όλα τα μετάγραφα δοκιμάστηκαν για ικανότητα υποδοχής γλυκίνης και αποδείχτηκαν κατάλληλα υποστρώματα για την σταφυλοκοκκική GlyRS.



Εικόνα 30: Στην επάνω εικόνα έχουμε τα 5 ταυτοποιημένα tRNA<sup>Gly</sup> γονίδια του *S. aureus* μετά την ενίσχυσή τους με PCR και στην κάτω το αποτέλεσμα της *in vitro* μεταγραφής τους.

Συνοψίζοντας, τα ερευνητικά ερωτήματα τα οποία παραμένουν προς διερεύνηση για την πλήρη αποσαφήνιση της tRNA-εξαρτώμενης σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος του *S. aureus*, είναι τα εξής:

- Η ταυτοποίηση των ισοδεκτικών μορίων tRNA<sup>Gly</sup> που συμμετέχουν ως δότες γλυκίνης για την σύνθεση των απαραίτητων πενταπεπτιδίων γλυκίνης.
- Η ταυτοποίηση των ισοδεκτικών μορίων tRNA<sup>Gly</sup> που συμμετέχουν ως δότες γλυκίνης για την ριβοσωμική πρωτεϊνοσύνθεση.
- Ο προσδιορισμός των δομικών στοιχείων που επιτρέπουν την διάκριση από τον παράγοντα EF-Tu (ευθύνεται για την μεταφορά αμινοακυλιωμένων μορίων tRNA ως υποστρώματα της πρωτεϊνοσύνθεσης στο ριβόσωμα) των ισοδεκτικών μορίων tRNA<sup>Gly</sup> σε πρωτεϊνογενετικά ή μη. Συγκεκριμένα, τα μόρια που δεσμεύονται ασθενώς με τον EF-Tu θέτουν υποψηφιότητα για αποκλειστικοί δότες γλυκίνης στο κυτταρικό τοίχωμα (εικόνα 31).



Εικόνα 31: Πιθανές πορείες των tRNA<sup>Gly</sup> μορίων μετά την αμινοακυλίωσή τους.

- Ο έλεγχος έκφρασης του πέμπτου υποθετικού γονιδίου tRNA<sup>Gly</sup> και ο πιθανός λειτουργικός του ρόλος στην σύνθεση των πενταπεπτιδίων γλυκίνης.
- Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός του άγνωστου μέχρι σήμερα μεταφορέα των ισοδεκτικών μορίων tRNA<sup>Gly</sup> που συμμετέχουν ως δότες γλυκίνης για την σύνθεση των απαραίτητων πενταπεπτιδίων

γλυκίνης Μια συντηρημένη οικογένεια βακτηριακών GTPασών με άγνωστο λειτουργικό ρόλο (πίνακας 16) πιθανότατα περικλείει τον άγνωστο μεταφορέα (Brown et al., 2005). Για το λόγο αυτό θα επικεντρωθούμε στην κλωνοποίηση, την υπερέκφραση και τις πιθανές αλληλεπιδράσεις των συγκεκριμένων GTPασών με τα tRNA<sup>Gly</sup> μόρια του *S. aureus* και κυρίως θα εστιάσουμε σε ένα μέλος αυτής της ομάδας που παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τον EF-Tu. Πρόσφατα μάλιστα αποκαλύφθηκε πως ένα μέλος της οικογένειας αυτής συμμετέχει στη συγκρότηση της 50S υπομονάδας στο *S. subtilis*. Η ταυτοποίηση του άγνωστου μεταφορέα tRNA θα αποκαλύψει ένα ακόμη σημαντικό στόχο για μελλοντικά καινοτόμα και εξειδικευμένα αντιβιοτικά φάρμακα.

- Η μελέτη αναστολής όλων των παραπάνω παραγόντων που εμπλέκονται στην αμινοακυλίωση, μεταφορά και χρήση των Gly-tRNA<sup>Gly</sup> μορίων στη σύνθεση των πενταπεπτιδίων γλυκίνης, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*.

Gene <sup>a</sup>	Conservation <sup>b</sup>	Phenotype	Biochemistry	Proposed role <sup>c</sup>
<i>era, bex</i>	-----QVDRLB CEFGHSNUJX-TW	Essential in <i>E. coli</i> ; cell division defect; chromosome segregation defect; energy metabolism; altered ribosome profile; genetic interactions with <i>ksgA</i> , <i>dnaG</i> , and <i>rbfA</i> ; slow growth and sporulation defect in <i>B. subtilis</i>	Slow GTPase; binds 16S rRNA; KH domain-mediated RNA binding; GTPase stimulated by RNA; X-ray structure; cryo-em costructure with 30S	Ribosome biogenesis
<i>obg, yhbZ, obgE, cgtA</i>	-----YQVDRLB CEFGHSNUJXITW	Essential; chromosome segregation defect; genetic interactions with <i>rrmJ</i> , <i>recA</i> , and <i>recB</i> ; chemical-genetic interactions with replication inhibitors	Slow GTPase; binds 50S and 30S ribosome; cofractionation with ribosomal proteins and RNA; X-ray structure; novel N-terminal Obg-fold	Ribosome biogenesis
<i>trmE, mnmE, thdF</i>	-----YQVD-LB CEFGHSNUJXITW	Deficiency in 5-methylaminomethyl-2-uridine (U34) of tRNAs; synthetic lethality with unknown mutation(s)	Fast GTPase; tRNA modification; X-ray structure; N-terminal formyl-tetrahydrofolate binding, C-terminal G domain	tRNA modification
<i>yjeQ, rsgA, yloQ</i>	-----QV-RLB CEFGHSN-J--TW	Slow growth; filamentous; chemical-genetic interactions with translation inhibitors; altered ribosome profile	Slow GTPase; binds 30S ribosome; GTPase stimulated by 30S; X-ray structure; central circularly permuted G domain; N-terminal OB-fold; C-terminal Zn finger	Ribosome biogenesis
<i>engA, der, yfgK, yphC</i>	-----QVDRLB CEFGHSNUJXITW	Essential; filamentous; chromosome segregation defect; genetic interaction with <i>rrmJ</i>	Slow GTPase; X-ray structure; 2 adjacent G domains; C-terminal KH-like domain	Ribosome biogenesis
<i>yihA, ysxC</i>	AOM-K-YQV--LB -EFGHSNUJX--W	Essential; filamentous; septation defect	Binds GTP and GDP	—
<i>hflX, ynbA</i>	-OM-KZ-QVDRLB CEFGHSN-J-I--	High frequency of lysogenization ( <i>hfl</i> ) locus	—	—
<i>yhcF, yyaF</i>	AOMPZYQVDRLB CEFGHSNUJXITW	Slow growth and temperature-sensitive in <i>E. coli</i>	Binds GTP and nucleic acid; X-ray structure	—
<i>yjeE, ydiB</i>	-----QVDRLB CEFGHSNUJXIT-	Essential	Slow ATPase; binds ADP and YjeF; X-ray structure	—

Πίνακας 16: Συντηρημένες βακτηριακές P-loop GTPάσες με άγνωστη λειτουργία (και μία ATPάση).

Ο *S. aureus* είναι ένα σημαντικό παθογόνο και ευθύνεται για πολλές σοβαρές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις παγκοσμίως, ενώ ιδιαίτερα αυξανόμενα παρουσιάζονται τα κρούσματα τέτοιων λοιμώξεων στη χώρα μας τα τελευταία χρόνια. Παρουσιάζει αυξανόμενη αντοχή στα αντιβιοτικά και τα στελέχη με

αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν την δυνατότητα ταχείας εξάπλωσης και αποικισμού, γεγονός που έχει θέσει σε εγρήγορση τις υγειονομικές υπηρεσίες των αναπτυσσόμενων χωρών, σε μία προσπάθεια περιορισμού των λοιμώξεων αυτών, μέσω στοχευμένης απενεργοποίησης νέων αλλά απολύτως σημαντικών βιοχημικών μονοπατιών, όπως αυτό που αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Για τον λόγο αυτό θεωρείται ότι η σε βάθος μελέτη νέων παραγόντων, που αναδυσκνούνται μέσα από γονιδιωματικές αναλύσεις, θα συμβάλλουν στην ανάδειξη νέων εν δυνάμει μοριακών στόχων για εξειδικευμένη και στοχευμένη θεραπεία.





Παραπάνω παρατίθεται το αποτέλεσμα της πολλαπλής ομοπαράθεσης της πρωτεΐνης FemX από διάφορα στελέχη του Gram(+) βακτηρίου *Staphylococcus aureus* χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST. Σε γενικές γραμμές οι περισσότερες περιοχές του FemX είναι συντηρημένες. Εντούτοις, παρατηρούνται και περιοχές με αρκετές διαφορές, όπως π.χ. τα αμινοξέα 253, 254 που δεν είναι συντηρημένα ακόμη και μεταξύ των στελεχών του ίδιου είδους, γεγονός που οφείλεται στην ενσωμάτωση μεταλλάξεων στο γονίδιο του FemX, προκειμένου τα διάφορα στελέχη του *S. aureus* να αποκτήσουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά στα οποία εκτίθενται.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Barber, M. 1961. Methicillin-resistant staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 14: 385–393.
- Berger-Bächi, B. 1989. Genetics of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 23:671–673.
- Bumsted, R. M., Dahl, J. L., Soll, D and Strominger, J. L. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. X. Further study of the glycylyl transfer ribonucleic acids active in peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 243: 779-782.
- Berger-Bächi, B. 1983. Insertional inactivation of staphylococcal methicillinresistance by Tn551. *J. Bacteriol.* 154:479–487.
- De Lencastre, H., and A. Tomasz. 1994. Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2590–2598.
- Ehlert, K., Tschierske, M., Mori, C., Schroder, W., and Berger-Bächi, B. (2000) Site-specific serine incorporation by Lif and Epr into positions 3 and 5 of the staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge. *J Bacteriol* 182: 2635-2638.
- Felden, B., Hanawa, K., Atkins, J.F., Himeno, H., Muto, A., Gesteland, R.F., McCloskey, J.A. & Crain, P.F. (1998) Presence and location of modified nucleotides in *Escherichia coli* tmRNA: Structural mimicry with tRNA acceptor branches. *EMBO J.* 17, 3188-3196.
- Filipe, S. R., Pinho, M. G. and Thomasz, A. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 27768 - 27774
- Fontana, R., P. Canepari, M. M. Lleo, and G. Satta. 1990. Mechanisms of resistance of enterococci to beta-lactam antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9:103–105.
- Foster, T. J., and D. McDevitt. 1994. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* 118:199–205.
- Ghuysen, J. M., and R. Hakenbeck (ed.). 1994. Bacterial cell wall. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands.
- Goodwin, J.B. & Dreher, T.W. (1998) Transfer RNA mimicry in a new group of positive- strand RNA plant viruses, the furoviruses: Differential aminoacylation between the RNA components of one genome. *Virology* 246: 170-178.
- Hegde, S.S., and Shrader, T.E. (2001) FemABX family members are novel nonribosomal peptidyltransferases and important pathogen-specific drug targets. *J Biol Chem* 276: 6998–7003.
- Henze, U., Sidow, T., Wecke, J., Labischinski, H., and Berger-Bächi, B. (1993) Influence of femB on methicillin resistance and peptidoglycan

- metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 175: 1612\_1620.
- Ibba, M., Curnow, A.W. & Soell, D. (1997) Aminoacyl-tRNA synthetases: Different routes to a common goal. *Trends Biochem. Sci.* 22: 39-42.
  - Ichetovkin, I. E., Abramochkin, G., and Shrader, T. E. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 33009–33014.
  - Kuroda, M, et al. (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357: 1218-1219.
  - Ling, B., and Berger-Bächi, B. (1998) Increased overall antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus* femAB null mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 936–938.
  - Ma, X. X., T. Ito, C. Tiensasitorn, M. Jamklang, P. Chongtrakool, S. Boyle-Vavra, R. S. Daum, and K. Hiramatsu. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1147–1152.
  - Maidhof, H., B. Reinicke, P. Blumel, B. Berger-Bächi, and H. Labischinski. 1991. *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.* 173: 3507–3513.
  - Martinis, S.A., Plateau, P., Cavarelli, J. & Florentz, C. (1999) Aminoacyl-tRNA synthetases: A family of expanding functions. *EMBO J.* 18: 4591-4596.
  - Matsushashi, M., Dietrich, C. P. and Strominger, J. L. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3191-3206
  - McClain, W. H., Foss, K., Jenkins, R. A. & Schneider, J. (1991) Rapid determination of nucleotides that define tRNA<sup>Gly</sup> identity, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 6147-6151.
  - Perry, A.M., Ton-That, H., Mazmanian, S.K., and Schneewind, O. (2002) Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. III. Lipid II is an *in vivo* peptidoglycan substrate for sortase-catalyzed surface protein anchoring. *J Biol Chem* 277: 16241–16248.
  - Rogers, H. J.; Perkins, H. R.; Ward, J. B. *Biosynthesis of Peptidoglycan*; Chapman and Hall, Ltd.: London, 1980.
  - Rohrer, S., Ehlert, K., Labischinski, H. and Berger- Bächi, B. (1999). The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9351-9356
  - Schneider, T., Senn, M.M., Berger- Bächi, B., Tossi, A., Sahl, H.G. & Wiedemann, I. (2004) In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 53(2), 675-85.

- Shiba, K., Schimmel, P., Motegi, H. & Noda, T. (1994). Human glycyl-tRNA synthetase. Wide divergence of primary structure from bacterial counterpart and species-specific aminoacylation. *J. Biol. Chem.* 269: 30049-30055.
- Sissler, M., Delorme, C., Bond, J., Ehrlich, D., Renault, P. & Franclyn, C. (1999) An aminoacyl-tRNA synthetase paralog with a catalytic core in histidine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 8995-8990.
- Stranden, A.M., Ehlert, K., Labischinski, H., and Berger-Bächi, B. (1997) Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a femAB null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol* 179: 9-16
- Sugai, M., T. Fujiwara, H. Komatsuzawa, and H. Suginaka. 1998. Identification and molecular characterization of a gene homologous to *epr* (endopeptidase resistance gene) in *Staphylococcus aureus*. *Gene* 224:67-75.
- Sugai, M., T. Fujiwara, K. Ohta, H. Komatsuzawa, M. Ohara, and H. Suginaka. 1997. *epr*, which encodes glycyglycine endopeptidase resistance, is homologous to *femAB* and affects serine content of peptidoglycan cross bridges in *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179:4311-4318.
- Thumm, G., and F. Götz. 1997. Studies on prollystaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar staphylolyticus. *Mol. Microbiol.* 23:1251-1265.
- Tomasz, A. 1986. Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of beta-lactam antibiotics. *Rev. Infect. Dis.* 8 (Suppl. 3): S260-S278.
- Tschierske, M., Ehlert, K., Stranden, A.M., and Berger-Bächi, B. (1997) Lif, the lysostaphin immunity factor, complements FemB in staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge formation. *FEMS Microbiol Lett* 153: 261-264.
- Van Heijenoort, J., and Gutmann, L. (2000) Correlation between the structure of the bacterial peptidoglycan monomer unit, the specificity of transpeptidation, and susceptibility to beta-lactams. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5028-5030.
- Weber B, Ehlert K, Diehl A, Reichmann P, Labischinski H, Hakenbeck R (2000) The *fib* locus in *Streptococcus pneumoniae* is required for peptidoglycan crosslinking and PBP-mediated betalactam resistance. *FEMS Microbiol Lett* 188:81-85

