



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙ ΤΗΣ ΜΗ ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ – ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ
FEMΒ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟ ΤΟ
*Staphylococcus aureus***



ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΑΘ. ΠΑΣΧΑΛΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2008



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

Αριθ. Εισ.: 6594/1
Ημερ. Εισ.: 27-05-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2008
ΠΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087232

Μελέτη επί της μη ριβοσωμικής πεπτιδυλ - τρανσφεράσης FemB αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων της από το βακτήριο *Staphylococcus aureus*

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιβλέπων καθηγητής:

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος

Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- Παναγιώτης Μαρκουλάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

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, ευχαριστώ τη κυρία Σταματίνα Γιαννούλη, υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και τον κύριο Αθανάσιο Κυρίτση, μεταπτυχιακό φοιτητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για τη σημαντική συμβολή τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και όλους τους διδακτορικούς - μεταπτυχιακούς φοιτητές και συμφοιτητές μου, για την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της εργαστηριακής μας συνύπαρξης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
2.1 Σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στο <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.2 Ανθεκτικότητα στελεχών <i>Staphylococcus aureus</i> στη μεθικιλίνη.....	11
2.3 Ομόλογες πρωτεΐνες των πρωτεϊνών FemA και FemB.....	13
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	15
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	17
3.1 ΥΛΙΚΑ.....	17
3.1.1 Χημικές ουσίες.....	17
3.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα.....	18
3.1.3 Θρεπτικά μέσα.....	19
3.1.4 Κύτταρα.....	20
3.1.5 Πλασμιδιακοί φορείς.....	21
3.1.6 Εκκινητές (Primers).....	25
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
3.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	26
3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	27
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	28
3.2.4 Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction).....	28
3.2.5 Σύνδεση τμημάτων DNA (ligation).....	29
3.2.6 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> για μετασχηματισμό.....	30
3.2.7 Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. Coli</i> (transformation).....	31
3.2.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation).....	32
3.2.9. Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα (digestion).....	33
3.2.10 Υπερέκφραση πρωτεΐνης FemB.....	34
3.2.11 Απομόνωση πρωτεΐνης FemB.....	34
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο *Staphylococcus aureus* αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες υπεύθυνους για πρόκληση ενδοноσοκομειακών λοιμώξεων. Αυτό οφείλεται στην αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών. Συνεπώς, γεννάται η ανάγκη ανάπτυξης νέων, αποτελεσματικών αντιβιοτικών. Στόχος αντιβιοτικών αποτελεί το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων καθώς και η διαδικασία δημιουργίας του. Το πεπτιδογλυκανικό τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος του βακτήριου *Staphylococcus aureus* αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες εναλλασσόμενων μονάδων N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) και N-ακετυλομουραμικού οξέος (MurNAc), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με πενταπεπίδια γλυκίνης. Τα μόρια της γλυκίνης ενσωματώνονται με τη δράση μη ριβοσωμικών πεπτιδυλ-τρανσφερασών της οικογένειας FemABX, ενώ δότης των μορίων γλυκίνης είναι μόρια Gly-tRNA^{Gly}. Επομένως, η ανίχνευση και η μελέτη των παραγόντων που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία δύναται να αποκαλύψει πιθανούς στόχους αντιβιοτικών. Στη παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου της πρωτεΐνης FemB από στελέχη του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* και ακολούθησε η υπερέκφρασή της σε κύτταρα *E. coli* καθώς και η απομόνωσή της. Επίσης, διερευνήθηκε η ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο της πρωτεΐνης FemB. Σκοπός της μελέτης ήταν να αποτελέσει ένα βήμα για την διαλεύκανση των παραγόντων που εμπλέκονται στην δημιουργία του κυτταρικού τοιχώματος των Gram (+) βακτηρίων.

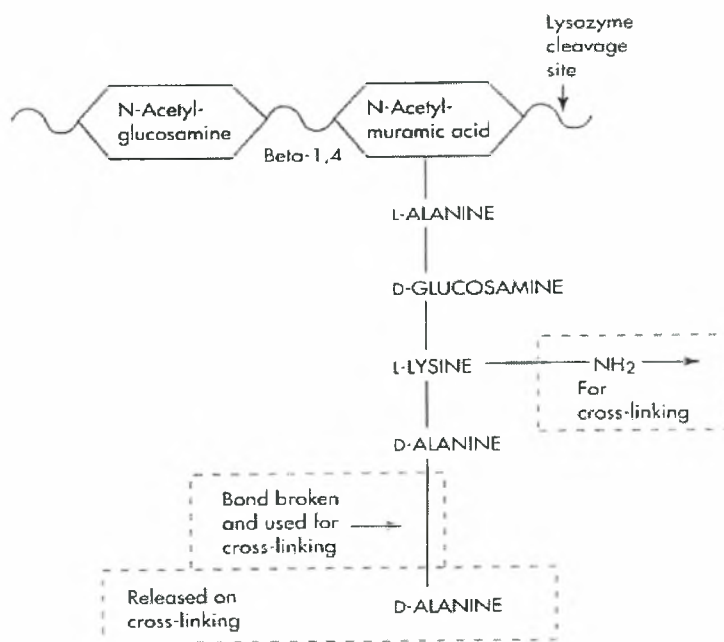
ABSTRACT

The bacterium *Staphylococcus aureus* comprises one of the major factors that provoke infections in inpatients. This is a result of illogical use of antibiotics and as a consequence the emergence of bacteria resistant to antibiotics. Thus, should be developed new, effective antibiotics. One of the antibiotic targets is the bacterial cell wall and the cell wall creation procedure. 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. The glycine molecules are incorporated by the non ribosomal peptidyl-transferases of the FemABX family, with the Gly-tRNA^{Gly} molecules serving as glycine donors. Consequently, the identification and the study of the factors that participate in this procedure, may reveal potential targets for new antibiotics. The aim of this dissertation was the cloning of the gene encoding the FemB protein from *Staphylococcus aureus* strains, the overexpression of the FemB protein in *E. coli* cells and the isolation of the enzyme. In addition, we investigated the presence of mutations in FemB gene. The purpose was to provide some information for the elucidation of the factors that participate in the formation of Gram (+) bacterial cell wall.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του *S. aureus*

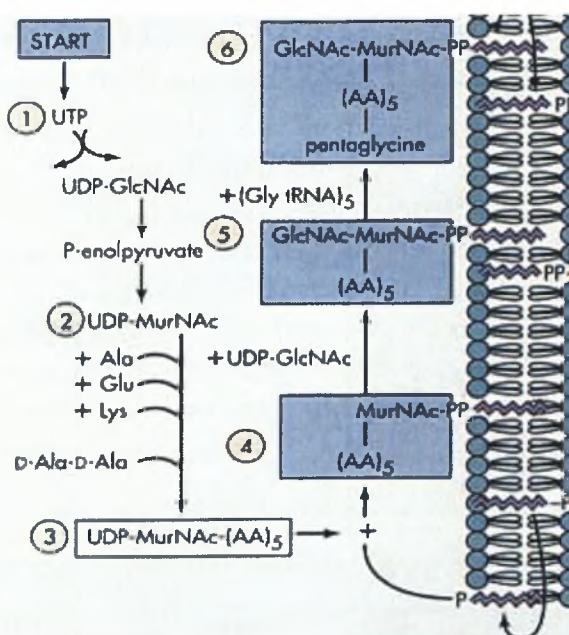
Η πεπτιδογλυκάνη του *Staphylococcus aureus* αποτελεί περίπου το 50% του κυτταρικού τοιχώματος και δημιουργεί ένα πολύστιβο κυστίδιο, το οποίο προστατεύει το βακτήριο από την οσμωτική πίεση και καθορίζει το σχήμα του (Höltje J., 1998). Αποτελείται από 20 και πλέον στιβάδες γραμμικών αλυσίδων γλυκάνης εναλλασσόμενων μονάδων N-ακετυλογλυκοσαμίνης (GlcNAc) και N-ακετυλομουραμικού οξέως (MurNAc) (Henze et al., 1993; Ghuysen J. et al., 1994; Bumsted R. et al, 1968). Το καρβοξυλικό άκρο του N-ακετυλομουραμικού οξέως είναι συνδεδεμένο με το πενταπεπτιδίο L-Ala-D-iGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (stem peptide). Ένα πενταπεπτιδίο γλυκινών συνδέει την ε-αμινομάδα της L-Lys του πενταπεπτιδίου L-Ala-D-iGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala με την D-Ala στην θέση 4 του γειτονικού πενταπεπτιδίου (van Heijenoort, J. 2001) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Μονομέρες πεπτιδογλυκάνης στο *Staphylococcus aureus* (www.digitalproteus.com)

Η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης λαμβάνει χώρα σε τρία 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

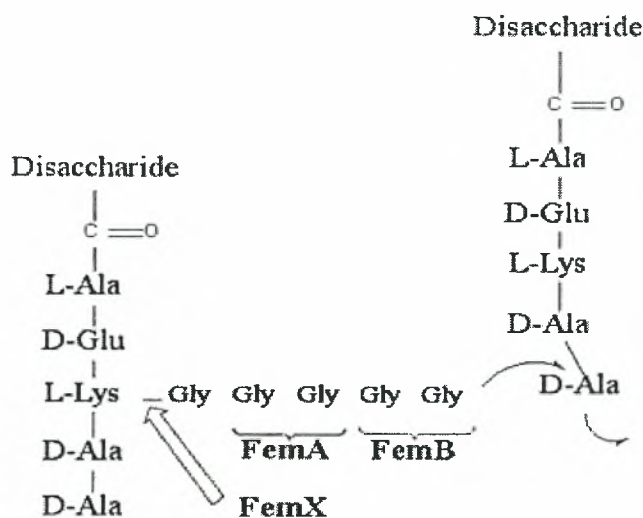
ομάδα της UDP-GlcNAc, μία αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο MurA. Στη συνέχεια, έχουμε το σχηματισμό της πρώτης ενδιάμεσης ένωσης στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, του UDP- MurNAc, με μετατροπή της ενολικής ομάδας σε γαλακτική, στα πλαίσια μιας NADPH- εξαρτώμενης αναγωγής, καταλύομενης από την ρεδοκτάση MurB. 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 ένζυμα που συμμετέχουν στην προσθήκη των αμινοξέων είναι το MurC, MurD, MurE και DdlA. 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 2**).



Εικόνα 2: Η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου πραγματοποιείται σε 6 στάδια, που καθορίζονται από τα παραγόμενα προϊόντα κάθε σταδίου (www.digitalproteus.com).

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 τρανσλοκάση 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 2**). Όπως το λιπίδιο I έτσι και το λιπίδιο II, στο στάδιο αυτό της βιοσύνθεσης τουλάχιστον, παραμένουν αγκυροβολημένα στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

Στο τελευταίο βήμα του σταδίου πραγματοποιείται η προσθήκη του πενταμερούς των αμινοξέων στην L-Lys του πενταπεπτιδίου L-Ala-D-iGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Εκτεταμένη γενετική ανάλυση και χαρακτηρισμός μεταλλαγμάτων όσον αφορά το κυτταρικό τοίχωμα, απέδειξε ότι το πενταμερές των γλυκινών στο βακτήριο *Staphylococcus aureus* συντίθεται με την διαδοχική δράση πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια των FemABX (Factors Essential for Methicillin resistance) μη ριβοσωμικών πεπτιδουλτρασφερασών (Hedge and Strader, 2001; Rohner and Berger-Bächli, 2003a). Ο FemX, που κωδικοποιείται από το γονίδιο fmhB, ενσωματώνει το πρώτο κατάλοιπο γλυκίνης στο πενταπεπίδιο (Rohrer et al., 1999; Tschierske et al., 1999). Ο FemA καταλύει την προσθήκη του δεύτερου και του τρίτου καταλοίπου γλυκίνης (Maidhof et al., 1991; Strandén et al., 1997), ενώ ο FemB προσθέτει το τέταρτο και το πέμπτο κατάλοιπο γλυκίνης (Henze et al., 1993)(Εικόνα 3). Οι παράγοντες FemA και FemB μεταφράζονται από ένα πολυκυστρονικό mRNA (Berger-Bächli et al., 1992). 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 (Arbleoa A. et al., 2004). Οι πεπτιδουλτρασφεράσες χρησιμοποιούν γλυκυλ-tRNAs ως δότες γλυκινών (Matsushashi et al., 1965).



Εικόνα 3: Η πεπτιδογλυκάνη του *Staphylococcus aureus*. Ο FemX προσθέτει το πρώτο κατάλοιπο γλυκίνης, ο FemA το δεύτερο και το τρίτο, ενώ ο FemB ενσωματώνει το τέταρτο και το πέμπτο κατάλοιπο στην γέφυρα των γλυκινών (Hegde S. And Shrader T, 2001).

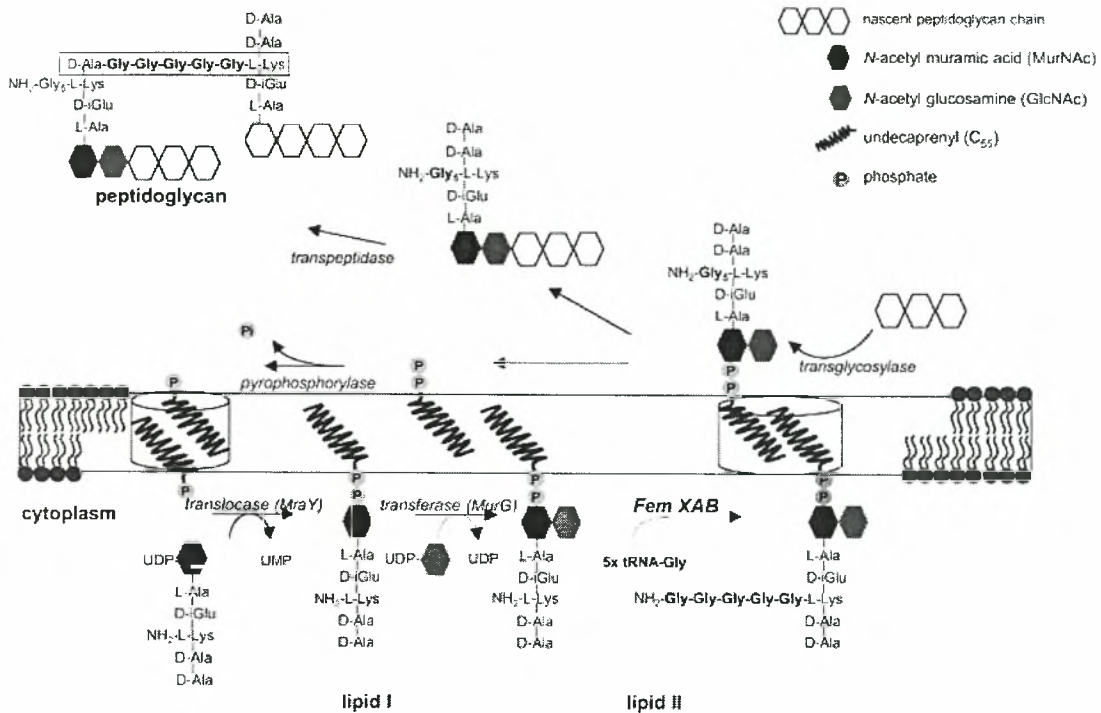
Με την ανάπτυξη του συστήματος Δύο-Υβριδίων στα βακτήρια (BTH) (Dove et al., 1997; Karimova et al., 1998) καταστήθηκε δυνατή η μελέτη αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας FemABX (Rohrer and Berger-Bächli, 2003). Αποδείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες FemA και FemB σχηματίζουν ομοδιμερή ώστε να προσθέσουν τα αμινοξικά κατάλοιπα, ενώ η πρωτεΐνη FemX κατά πάσα πιθανότητα δρα ως μονομερές. Επιπλέον, διαπιστώθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών FemA και FemB και ότι δεν εμφανίζεται καμία αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης FemX με τα

υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών FemABX. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τη βοήθεια υποβοηθητικών μορίων στο βακτήριο *Staphylococcus aureus*.

Στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις στο οπερόνιο FemAB σχηματίζουν μη ολοκληρωμένα πεπταπεπτιδία (Berger-Bachi et al., 1989; De Jonge et al., 1993; Strandén A. M. et al., 1997). Τα μεταλλαγμένα βακτήρια 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 (Maidhof et al., 1991; Strandén A. M. 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 της πρωτεΐνης FemX. 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).

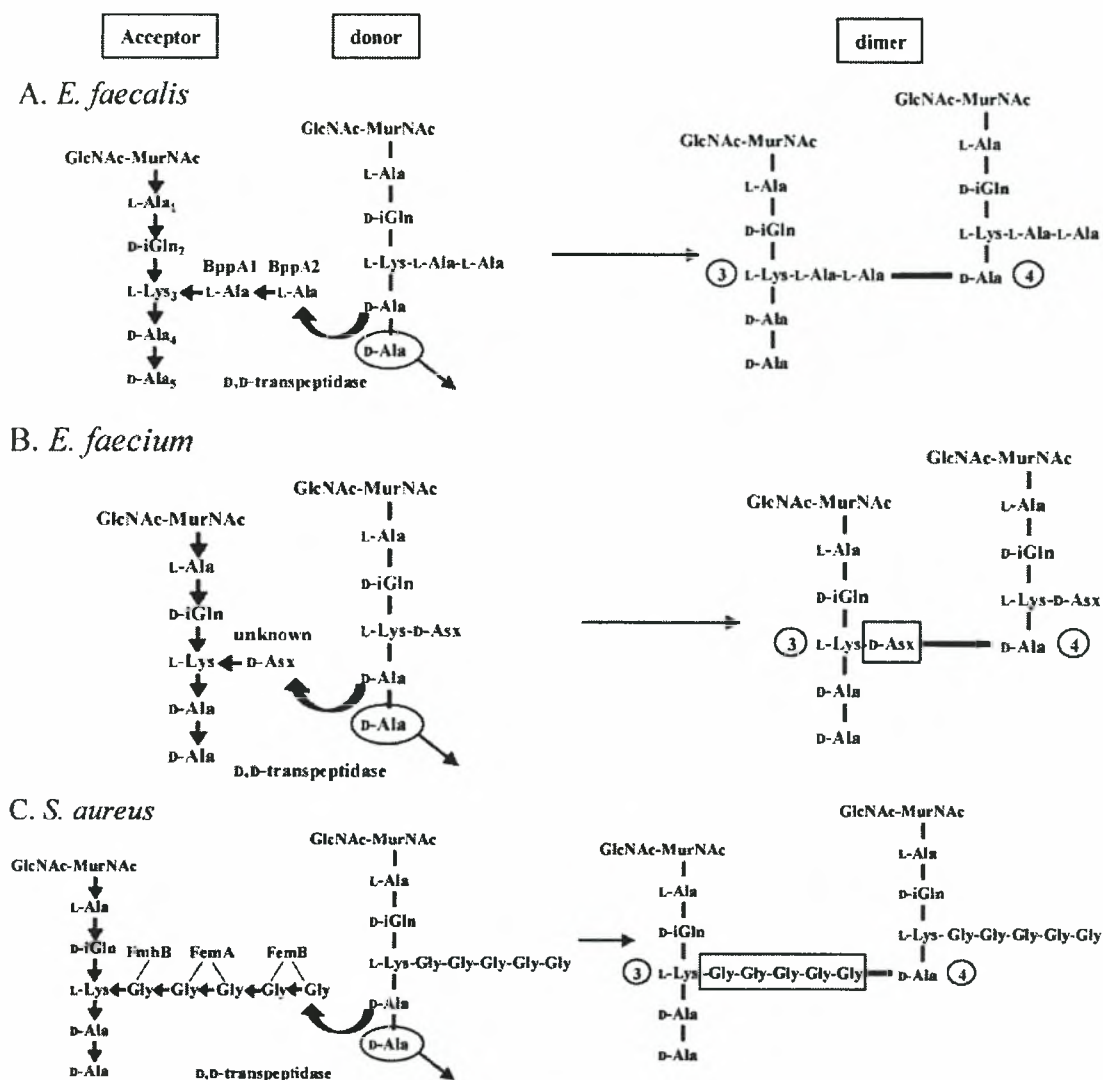
Ως δότες γλυκίνης στο σχηματισμό των αλυσίδων πενταγλυκίνης στο βακτήριο *Staphylococcus aureus*, λειτουργούν τα μόρια tRNA γλυκίνης. Οι πρώτες ενδείξεις για την εμπλοκή των tRNA^{Gly} μορίων βασίστηκαν στο εύρημα πως η ενσωμάτωση γλυκίνης στην πολυμερή πεπτιδογλυκάνη παρεμποδίζεται από ριβονουκλεάσες. Στο *S. aureus*, τουλάχιστον 4 tRNA^{Gly} μόρια έχουν ταυτοποιηθεί, με όλα να αμινοακυλώνονται 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^{Gly}, το οποίο πιθανότατα εκφράζεται. Από το σύνολο των 4 ή 5 tRNA^{Gly} 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 τρίτου και τελευταίου σταδίου στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, το λιπίδιο II, μετά το σχηματισμό της γέφυρας γλυκίνης στο *Staphylococcus aureus*, 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 διπεπτιδίο D-Ala-D-Ala (Εικόνα 4). Για την επιτυχή πραγματοποίηση της διαδικασίας τρανσπεπτιδίωσης απαιτείται η ύπαρξη ολοκληρωμένου πενταπεπτιδίου γλυκινών (Strandén A. M. et al., 1997).



Εικόνα 4: Η βιοσύνθεση του μονομερών του κυτταρικού τοιχώματος στο βακτήριο *Staphylococcus aureus*. Το λιπίδιο II μετά την μεταφορά του στην εξωτερική πλευρά του κυτταρικού τοιχώματος ενσωματώνεται στο υπάρχον πλέγμα πεπτιδογλυκάνης με τη δράση τρανσγλυκολασών και τρανσπεπτιδάσων (Schneider T. et al., 2004).

Η διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης στα βακτήρια από τις τρανσπεπτιδάσες, επιτυγχάνεται πάντα μέσω ενός διαμινοξέος του πεπτιδίου L-Ala-D-iGlu-X-D-Ala-D-Ala, με συνηθέστερα το meso-διαμινοπιμελικό (X), 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 πεπτιδίου stem. 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 5).

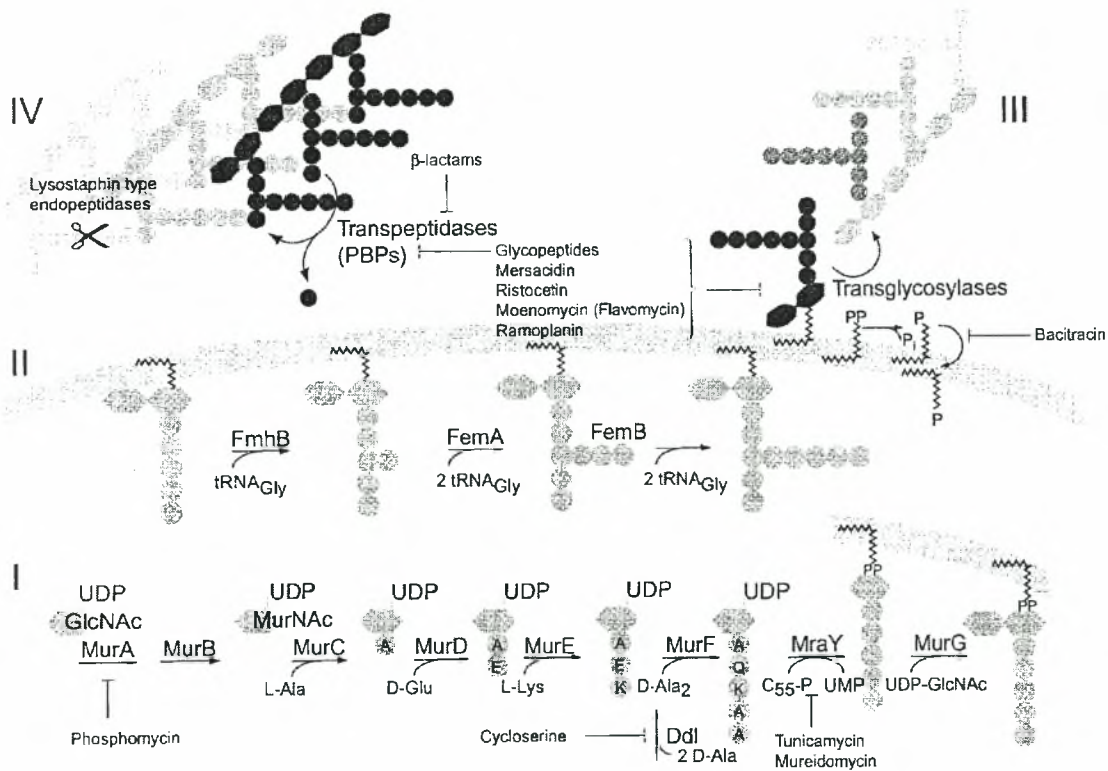


Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας των γεφυρών διασύνδεσης μεταξύ γειτονικών μορίων GlcNAc-MurNAc στους οργανισμούς *E. faecalis* (A), *E. faecium* (B), and *S. aureus* (C) (Arbeloa A. et al., 2004).

Το πλέγμα της πεπτιδογλυκάνης προστατεύει το βακτηριακό κύτταρο από την οσμωτική πίεση προσδίδοντάς του ταυτόχρονα και συγκεκριμένη δομή. Επιπλέον, οι γέφυρες γλυκίνης δρουν ως σημεία προσκόλλησης των πρωτεϊνών της επιφάνειας του βακτηρίου, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση και την παθογένεια μέσω της αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες του προσβαλλόμενου ιστού (Ton-That H. et al., 1998; Perry et al., 2002; Roche et al., 2003). Επίσης, τα πενταπεπτίδια των γλυκινών είναι απαραίτητα για την έκφραση ανθεκτικότητας στην μεθικιλίνη (Walsh et al., 1996).

1.2 Ανθεκτικότητα στελεχών *Staphylococcus aureus* στην μεθικιλίνη

Η ανθεκτικότητα παθογόνων βακτηρίων σε αντιβιοτικά έχει φτάσει σε ανησυχητικά επίπεδα καθώς εμφανίστηκαν στελέχη *Staphylococcus aureus* ανθεκτικά στην βανκομυκίνη (Neu H. C., 1992; Perl T. M., 1999). Η διαδικασία σχηματισμού της πεπτιδογλυκάνης αποτελεί έναν από τους στόχους των αντιβιοτικών φαρμάκων (Εικόνα 6). Τα Gram θετικά βακτήρια έχουν αναπτύξει δύο βασικές στρατηγικές ενάντια στη δράση των β-λακταμών, την απενεργοποίηση του αντιβιοτικού με τη δράση β-λακταμασών και την εγγενή ανθεκτικότητα που οφείλεται σε τροποποιημένα, χαμηλής συγγένειας ένζυμα, που αποτελούν τους στόχους των αντιβιοτικών και το οποία αποκαλούνται penicillin-binding-proteins (PBPs) (Rohrer and Berger-Bachi, 2003)(Πίνακας 1).



Εικόνα 6: Το μονοπάτι και οι αναστολείς σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης. I) Η συναρμολόγηση του λιπιδίου II είναι γενικό χαρακτηριστικό των ευβακτηρίων. II) Το πενταπεπίδιο των γλυκινών δημιουργείται στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. III και IV) Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στην εξωτερική πλευρά της βακτηριακής μεμβράνης καταλύονται από τρανσγλυκοσυλάσες και τρανσπεπτιδάσες (PBPs) και οδηγούν στην ώριμη πεπτιδογλυκάνη (Rohrer and Berger-Bachi, 2003).

Gene/Location	Function
<i>mec</i> determinant (chromosomal <i>Sma</i> I-G fragment)	
<i>mecA</i>	PBP2', transpeptidase, other functions?
<i>mecR1-mecI</i>	sensory-transducer, repressor: β -lactam induction, transcriptional regulation of <i>mecA</i>
penicillinase operon (plasmid or chromosome)	
<i>blaR1-blaI</i>	sensory-transducer, repressor: β -lactam induction, transcriptional regulation of <i>mecA</i>
chromosomal genes	
<i>blaR2</i>	<i>mecA</i> induction?
chromosomal genes involved in precursor formation	
<i>femX</i>	postulated, Gly1 side-chain formation
<i>femA</i>	Gly2-Gly3 side-chain formation
<i>femB</i>	Gly4-Gly5 side-chain formation
<i>femC (glnRA)</i>	glutaminesynthetase repressor, amidation of the iD-glutamate of the stem peptide
<i>femD/femR (glimM)</i>	phosphoglucosamine mutase, peptidoglycan precursor formation (N-acetyl glucosamine 1P)
<i>femF</i>	lysine adding step in stem peptide formation, gene unknown
chromosomal genes coding for membrane or cell wall associated products	
<i>fnt</i>	PBP-like protein, function unknown
<i>pbp2</i>	PBP2, transpeptidase, peptidoglycan biosynthesis
<i>llm</i>	lipophilic membrane bound protein: affects autolytic behaviour
<i>lytH</i>	autolytic activity
global regulators	
<i>sar, agr</i>	growth phase dependent regulation of cell wall associated and exoprotein biosynthesis: PBP1 and PBP3?
<i>sigB</i>	stress and stationary phase induced transcriptional factor, genes affected unknown

Πίνακας 1: Επιλογή παραγόντων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη και επηρεάζουν τα επίπεδα ανθεκτικότητας (Berger-Bachi and Tschierske, 1998).

Οι β -λακτάμες στοχεύουν στις αντιδράσεις για τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης που πραγματοποιούνται εξωκυτταρικά, αναστέλλοντας την αντίδραση τρανσπεπτιδίωσης που καταλύεται από τις PBP. Οι β -λακτάμες επιτυγχάνουν την αναστολή των PBPs, καθώς η δομή τους μοιάζει με το διπεπτίδιο D-Ala₂ που αναγνωρίζουν οι PBPs. Το ενεργό κέντρο των PBPs ακυλιώνεται από τις β -λακτάμες, αλλά η διαδικασία αποακυλίωσης γίνεται πάρα πολύ αργά με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του ενζύμου (Ghuysen, J.M., 1997). Στη συνέχεια, αυτολυτικά ένζυμα προκαλούν την θανάτωση του κυττάρου κάτω από την επίδραση των β -λακταμών (Tomasz, A., 1986).

Οι PBPs ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών των πενικιλοϋλ τρανσφερασών σερίνης, η οποία περιλαμβάνει και τις β -λακταμάσες και τους υποδοχείς των β -λακταμών. Όλα τα μέλη της πρωτεϊνικής αυτής οικογένειας φέρουν τις συντηρημένες περιοχές SXXK, (S/Y)X(N/C) και (K/H)(T/S)G, οι οποίες στο σύνολό τους σχηματίζουν το ενεργό κέντρο.

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 (Barber, M., 1961). Η ανθεκτικότητα στην μεθικιλίνη οφείλεται στη σταφυλοκοκκική χρωμοσωμική κασέτα *mec* (SCC*mec*) των 40-60 kb. Η SCC*mec* 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). Έχουν χαρακτηριστεί αρκετοί υπότυποι της κασέτας SCC*mec*, που διαφέρουν στο μέγεθος, τα γονίδια και σε ποιο ποσοστό προσφέρουν ανθεκτικότητα (Baba, T., F et al., 2002; Hiramatsu, K et al., 2001.; Ma X. X. et al., 2002). Συγκεκριμένα, το γονίδιο *mecA* του στοιχείου SCC*mec*, κωδικοποιεί για μία επιπρόσθετη PBP, την PBP2' ή αλλιώς PBP2a (Utsui et al., 1985; Reynolds et al., 1986). Η PBP2' έχει μικρότερη συγγένεια για τη μεθικιλίνη από τα άλλα παράγωγα των β-λακταμών και καταλύει τις αντιδράσεις τρανσπεπτιδύωσης ακόμη και παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων β-λακταμών.

1.3 Πρωτεΐνες ομόλογες της οικογένειας πρωτεϊνών FemAB

Πολλαπλές ομοπαράθεσεις γενωμάτων βακτηρίων οδήγησαν στην αποκάλυψη και ταυτοποίηση πρωτεϊνών ομόλογων των πρωτεϊνών της οικογένειας FemABX σε πολλά βακτηριακά είδη (Πίνακας 2). Τα είδη των βακτηρίων αυτών εμφανίζουν επίσης γέφυρες αμινοξέων για την σύνδεση των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης τους.

Οι παράγοντες που είναι όμοιοι με τους Fem μπορούν να αποτελέσουν μία νέα κατηγορία πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην σύνθεση πρωτεϊνών εκτός του ριβοσώματος (Tschierske M. et al, 1999). Μπορούν να ταξινομηθούν σε 4 κατηγορίες (berger-Bachi et al., 1998): α) πρωτεΐνες που ενσωματώνουν κατάλοιπα σερίνης (Lif, Epr, FmhA, FmhC) β) πρωτεΐνες όμοιες με τον FemB και γ) πρωτεΐνες όμοιες με τον FemA, οι οποίες ενσωματώνουν κατάλοιπα γλυκίνης σε συγκεκριμένες θέσεις και δ) πρωτεΐνες όμοιες με τις FemNew2, Zif, Borrelia FemA-like.

Οι παράγοντες FmhA και FmhC είχαν μεγαλύτερη ομολογία μεταξύ τους παρά για τους παράγοντες FemA και FemB. Επίσης ήταν όμοιοι με τους παράγοντες Epr (endopeptidase resistance) (Sugai M. et al., 1997) και Lif (lysostaphin immunity factor) (Thumm G. And Gotz F., 1997) που προέρχονται από τους οργανισμούς *S. capitis* και *S. simulans* και *S. Staphylolyticus*, αντίστοιχα και ενσωματώνουν κατάλοιπα σερίνης στις θέσεις 3' και 5' του πενταπεπτιδίου που ενώνει γειτονικά μονομερή της πεπτιδογλυκάνης. Οι FmhA και FmhC έχουν εξειδίκευση για αμινοξέα διαφορετικά από τη γλυκίνη, όπως για σερίνη ή αλανίνη, τα οποία και ενσωματώνουν σε χαμηλές συχνότητες στη γέφυρα μεταξύ των μονοερών πεπτιδογλυκάνης (Schleifer K. H., 1973).

Η οικογένεια των πρωτεϊνών που μοιάζουν με τις FemABX περιλαμβάνει παράγοντες που προστατεύουν τον βακτήριο από τις ενδοπεπτιδάσες που το ίδιο παράγει (Lif, Epr). Αυτό επιτυγχάνεται με την συσσωμάτωση καταλοίπων σερίνης σε εξειδικευμένες θέσεις του πενταπεπτιδίου που συνδέει τα μονομερή της πεπτιδογλυκάνης. Κατά συνέπεια, οι γλυκυλο-γλυκινο ενδοπεπτιδάσες λυσοσταφίνη των *S. Simulans* και *S. staphylolyticus* και ALE1 του *S. capitis* δεν μπορούν να κόψουν στο

εσωτερικό των γεφυρών του κυτταρικού τοιχώματος (Robinson J. M. et al., 1979; Thumm and Goltz, 1997; Ehlert et al., 2000). Για την ενσωμάτωση των καταλοίπων σερίνης απαιτείται η παρουσία των πρωτεϊνών FemA και FemB (Rohrer and Berger-Bachi, 2003) επειδή πιθανότατα οι τελευταίοι μόνο έχουν την ικανότητα αναγνώρισης του λιπιδίου II μέσω ειδικής θηλιάς δέσμευσης. Επίσης, αποδείχθηκε ότι ο παράγοντας Lif είναι συμπληρωματικός του FemB (Tschierske M. et al., 1997).

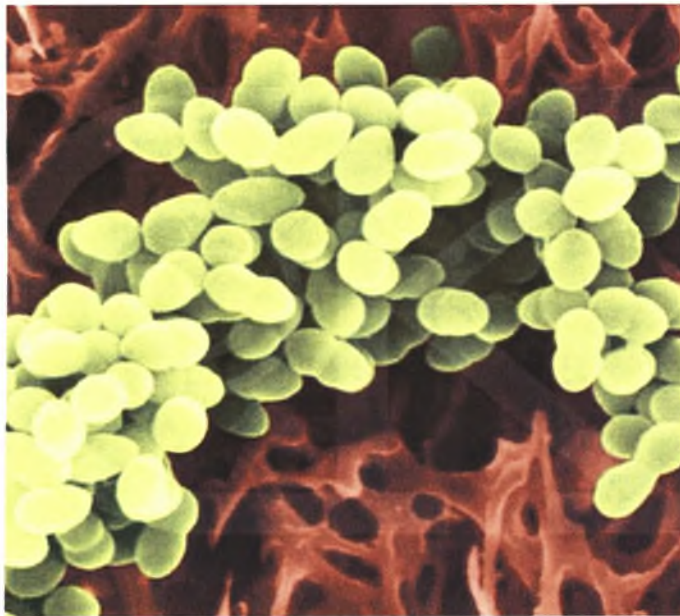
Species	Interpeptide	Peptidyl transferase (FemABX homolog), accession no.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gly ₅	FemA, P14304; FemB, P14305; FmhB, AAD23961; FmhA, AAD23960; FmhC, AAD23963
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gly _{2,3} -1-Ser _{1,2} , 1-Ala-Gly ₄	FemA, JCS325; FemB, JCS326
<i>Staphylococcus</i> spp.	Gly ₅ , Gly _{2,3} -1-Ser _{1,2} , 1-Ala-Gly ₄	<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. xylosoyus</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>	1-Ala-1-Ser, 1-Ala ₂	FibA, CAB89120; FibB, CAB89121; MurMN, AJ250764
<i>Streptococcus mutans</i>	1-Thr-1-Ala	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1-Ala _{2,3}	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1-Ala _{2,3}	AAK18829
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	1-Ala _{2,3}	Zif, AAC46073
<i>Streptococcus equi</i>	1-Ala _{2,3}	
<i>Streptococcus milleri</i>	1-Thr-Gly	MilF, AF243359
<i>Enterococcus faecalis</i>	1-Ala _{2,3}	
<i>Clostridium perfringens</i>	Gly	BAB81796
<i>Streptomyces</i> spp.	Gly	<i>S. coelicolor</i> , CAB45460; <i>S. toyocaensis</i> StaO, AAM80555
<i>Weissella viridescens</i> (<i>Lactobacillus viridescens</i>)	1-Ala-1-Ser	AAG21689
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Gly ₂	AAF10635
<i>Treponema pallidum</i>	Gly	AAC65773
<i>Borrelia</i> spp.	Gly	AAB91521

Πίνακας 2: Όλα τα είδη Gram (+) βακτηρίων που βρέθηκε πως έχουν και ένα ομόλογο των παραγόντων FemABX διαθέτουν και γέφυρες διασύνδεσης στην πεπτιδογλυκάνη τους (Rohrer and Berger-Bachi, 2003).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η περίπτωση του *Streptococcus pneumoniae*, όπου η πρωτεΐνη FibB (MurN) εσωματώνει αλανίνη ή σερίνη στο πενταπεπτιδίο stem με σκοπό, σε συνεργασία με την πρωτεΐνη FibA (MurM), να σχηματίσει αλυσίδα Ala₂ ή Ala-Ser (Filipe and Tomasz, 2000; Weber et al., 2000).

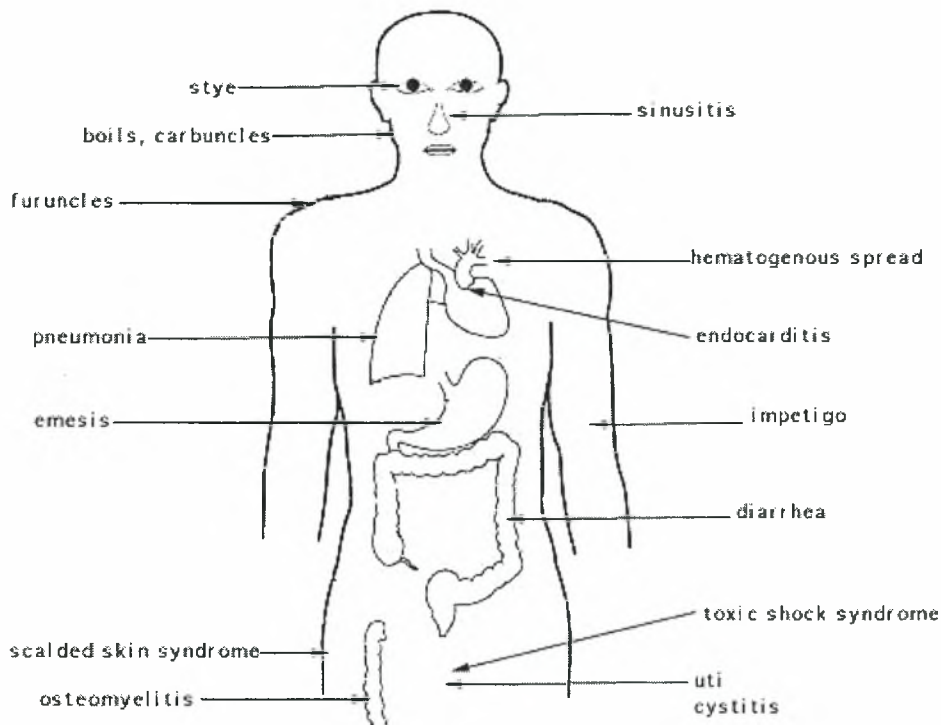
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η κλωνοποίηση και υπερέκφραση της πρωτεΐνης FemB, που προέρχεται από το Gram (+) βακτήριο *Staphylococcus aureus*. Επίσης, θα διερευνηθεί το κατά πόσον μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη FemB επηρεάζουν την ανθεκτικότητα βακτηριακών στελεχών *Staphylococcus aureus* έναντι της μεθικιλίνης. Ο *S. aureus* είναι ένα δυνητικά αναερόβιο, μη κινητικό βακτήριο, στο οποίο η διευθέτηση των κυττάρων θυμίζει τσαμπί σταφυλιού. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 15 °C έως 45 °C και συγκεντρώσεις NaCl ακόμη και 15%. Είναι οργανισμός θετικός στην δοκιμή με το ένζυμο καταλάση, αρνητικός στην δοκιμή με το ένζυμο 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 7**).



Εικόνα 7: Το θετικό κατά Gram βακτήριο *Staphylococcus aureus*, που έχει προσβάλλει έναν ιστό.

Ο *Staphylococcus aureus* μπορεί να προσβάλλει πολλά όργανα και ιστούς, ενώ συνήθως εντοπίζεται στους επιδερμικούς βλεννογόνους των ζώων συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, προκαλώντας ένα μεγάλο εύρος μολύνσεων με πύον, τροφική δηλητηρίαση και σύνδρομο τροφικού shock (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8: Ιστοί και όργανα του ανθρώπου που προσβάλλονται από το βακτήριο *Staphylococcus aureus*. (www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Staph)

Μετά την κλωνοποίηση του γονιδίου της πρωτεΐνης FemB από το βακτήριο *Staphylococcus aureus* ακολούθησε η εισαγωγή του σε στελέχη *E. coli* με σκοπό την υπερέκφραση, την απομόνωση και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης FemB. Η κλωνοποίηση, η υπερέκφραση και ο καθαρισμός του FemB από τον *S. aureus*, αποτελεί ένα μικρό μόνο τμήμα ενός γενικότερου προγράμματος που επιτελείται στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και σκοπός του οποίου είναι η ταυτοποίηση των ισοδεκτικών tRNA^{Gly} 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 (SIGMA)
- Acrylamide (SIGMA)
- Αιθανόλη (Panreac)
- Αμπικιλίνη (SIGMA)
- APS (Ammonium Persulfate) (SIGMA)
- ATP (FLUKA)
- BamH I (TAKARA)
- Bis-acrylamide (SIGMA)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (MERCK)
- Bromophenol Blue (Research Organics)
- BSA (NEW ENGLAND BIOLAB)
- Γλυκερόλη (PANREAC)
- Γλυκίνη (AppliChem)
- Γλυκόζη (PANREAC)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MERCK)
- Coomassie Brilliant Blue (FLUKA)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide) (PANREAC)
- Εκκνητέες (sense/antisense) (MACROGENE)
- EDTA (PANREAC)
- Go Taq Flexi DNA πολυμεράση (PROMEGA)
- HCl (MERCK)
- Ιμιδαζόλη (MERCK)
- Ισοπροπανόλη (SCHARLAU)
- IPTG (Isopropyl ThioGalactosyl) (FERMENTAS)
- KCl (MERCK)
- LB Broth (SCHARLAU)
- LB Agar (SCHARLAY)
- Λυσοζύμη (FLUKA)
- Μάρτυρας μοριακού βάρους (HyTest Ltd)
- Μεθανόλη (PANREAC)
- MgCl_2 για PCR (MERCK)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (PANREAC)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PANREAC)
- Νουκλεοτίδια (dNTPs) (TAKARA)
- NaCl (PANREAC)
- NaOH (MERCK)
- Οξικό οξύ (MERCK)
- Ουρία (PANREAC)
- Πρωτεΐνάση K (NEW ENGLAND BIOLABS)

- Paq5000 Ταq πολυμεράση (STRATAGENE)
- Phusion DNA πολυμεράση (FINNZYMES)
- PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride)(SIGMA)
- Ριβονουκλεάση A (NEW ENGLAND BIOLABS)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (NEW ENGLAND BIOLABS)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (FINNZYMES)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate) (SIGMA)
- Ταq πολυμεράση (HyTest Ltd)
- T4 DNA λιγάση (FERMENTAS)
- TEMED (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine) (Research Organics)
- Tris base (MERCK)
- Triton X (MERCK)
- Tryptone (MERCK)
- Φαινόλη(SIGMA)
- X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοσίδη) (SIGMA)
- XhoI (TAKARA)
- Χλωροφόρμιο(MERCK)
- Xylene Cyanol (MERCK)

3.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (50x) για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αгарόζης

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

Πίνακας 3: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος TAE (50x).

Έπεται ρύθμιση του pH στο 8,6.

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

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

Πίνακας 4: Σύσταση loading buffer 6x.

- Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (10 %)

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

Πίνακας 5: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

- Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (4x) για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
Tris-HCl, 0,5M (pH 6,8)	0,3125 M
SDS 10% (w/v)	10%
B – βρωμοφαινόλη (w/v)	0,1%
Γλυκερόλη (v/v)	50%

Πίνακας 6: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

3.1.3 Θρεπτικά μέσα

- Θρεπτικό μέσο για υγρή καλλιέργεια (LB Broth) pH 7,2

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

Πίνακας 7: Σύσταση θρεπτικού μέσου (LB Broth) pH 7,2 για υγρή καλλιέργεια.

Για την παρασκευή 1 L θρεπτικού μέσου LB Broth απαιτούνται:

- LB Broth 20 g
- NaCl 10 g
- Απιονισμένο H₂O Έως 1 L

- Θρεπτικό μέσο για στερεή καλλιέργεια (LB Agar) pH 7,2

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

Πίνακας 8: Σύσταση θρεπτικού μέσου (LB Agar) pH 7,2 για στερεή καλλιέργεια.

Για την παρασκευή 1 L θρεπτικού μέσου LB Agar απαιτούνται:

- LB Agar 30 g
- NaCl 10 g
- Απιονισμένο H₂O Έως 1 L

□ Θρεπτικό μέσο SOC για υγρή καλλιέργεια pH 7

Για την παρασκευή 100 mL του υγρού θρεπτικού μέσου SOC απαιτούνται:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Tryptone	2g
Yeast extract	0,5g
NaCl 1M	1ml
KCl 1M	0,25ml
δ/μα Mg ²⁺ 2M	1ml
Γλυκόζη 2M	1ml

Πίνακας 9: Σύσταση SOC medium pH 7 για τελικό όγκο 100ml.

Κατά την παρασκευή του διαλύματος SOC προστίθενται τα 4 πρώτα αντιδραστήρια και αφού προστεθεί απιονισμένο H₂O μέχρι τα 97 ml, γίνεται αποστείρωση. Ακολουθεί προσθήκη των άλλων δύο συστατικών και συμπλήρωση με αποστειρωμένο H₂O μέχρι τα 100ml.

Το διάλυμα Mg²⁺ 2M παρασκευάζεται με 20,33g MgCl₂·6H₂O και 24,65g MgSO₄ σε τελικό όγκο 100ml.

3.1.4 Κύτταρα

□ DH5a

Στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή και την κλωνοποίηση πλασμιδιακού DNA. Τα κύτταρα αυτά υποστηρίζουν την επιλογή βάσει των μπλε και λευκών αποικιών, χρησιμοποιώντας τη δράση της β - γαλακτοσιδάσης. Δεν φέρουν το γονίδιο *lac I*^q και επομένως δεν απαιτείται IPTG. Τα κύτταρα DH5a φέρουν τις μεταλλάξεις *recA1* και *endA1* με αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας του ενθέματος και τη βελτιστοποίηση της ποιότητας του πλασμιδιακού DNA.

□ BL21 DE3

Στέλεχος *E. coli* σχεδιασμένο για την υπερέκφραση πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας σύστημα έκφρασης βασιζόμενο σε T7 RNA πολυμεράση. Από τα στελέχη BL21 DE3 απουσιάζουν οι πρωτεάσες OmpT και Lon, οι οποίες πιθανόν να παρεμποδίζουν την

απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Τα κύτταρα BL21 DE3 χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν T7 προαγωγούς, όπως οι φορείς pET.

□ 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 τοποϊσομεράση 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.

□ Κλινικά στελέχη *Staphylococcus aureus*

Τα κλινικά στελέχη του Gram θετικού βακτηρίου *Staphylococcus aureus* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα: 1306 με MIC 32 (mg/l) , 1326 με MIC 0,5 (mg/l), 1552 με MIC 64 (mg/l), 4666 με MIC 1 (mg/l) και 6083 με MIC 64 (mg/l).

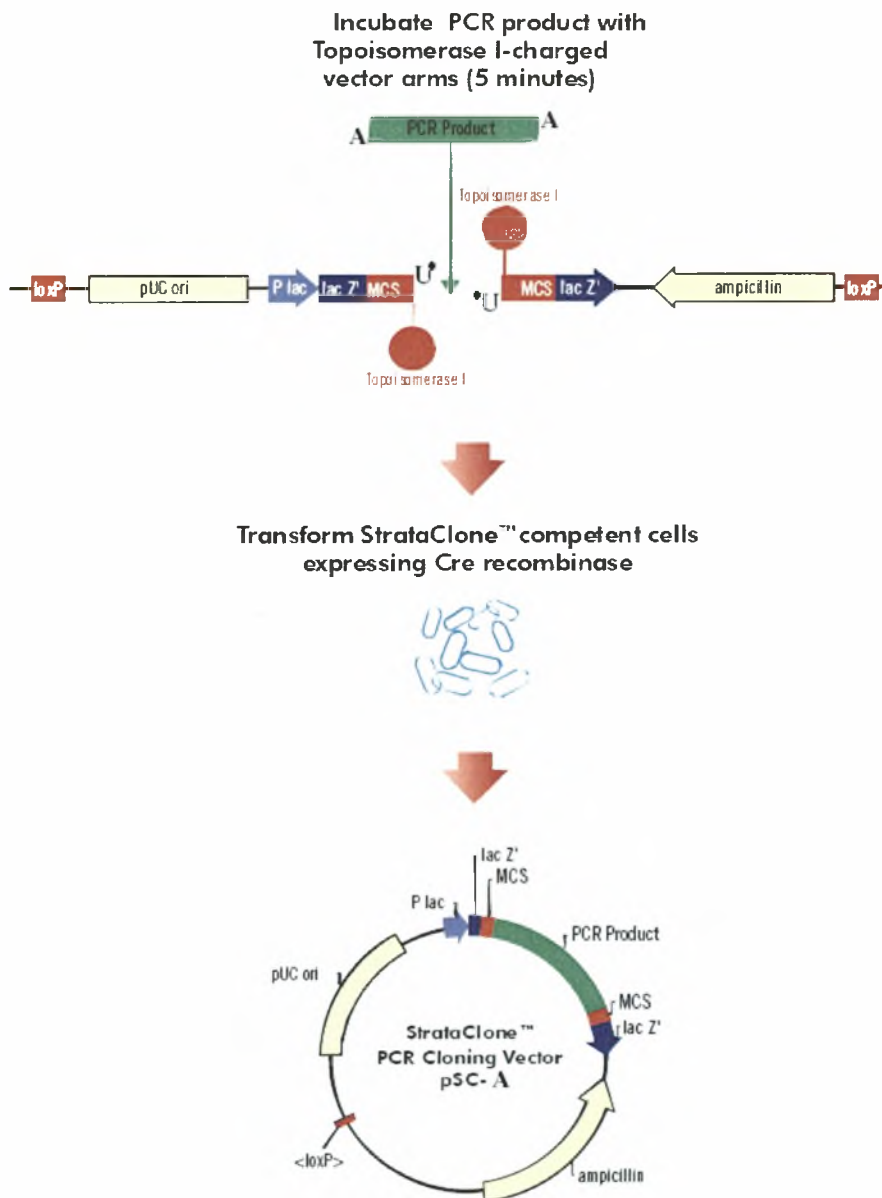
3.1.5 Πλασμιδιακοί φορείς

□ pSC-A

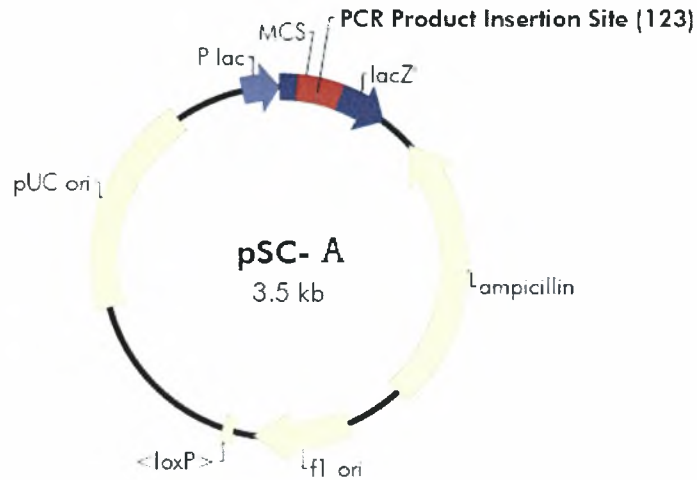
Πλασμιδιακός φορέας με μέγεθος 3.5kb που χρησιμοποιείται για τη κλωνοποίηση γονιδίων (Stratagene). Η διαδικασία της κλωνοποίησης με το συγκεκριμένο φορέα εκμεταλλεύεται τις συνδιασμένες δράσεις της τοποϊσομεράσης I από το ιό Vaccinia και της ρεκομπινάσης Cre από τον βακτηριοφάγο P1. *In vivo*, η τοποϊσομεράση I βοηθάει στην αντιγραφή του DNA χαλαρώνοντας και επανασυνδέοντας τους κλώνους του DNA. 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 επανένωση του κομμένου DNA πίσω στη σωστή έλικα. Από τη στιγμή που δημιουργηθεί το ενδιάμεσο αυτό, η αντίδραση επανένωσης μπορεί επίσης να συμβεί με ένα ετερόλογο τμήμα DNA. Η ρεκομπινάση Cre καταλύει τον ανασυνδυασμό μεταξύ δύο loxP αλληλουχιών αναγνώρισης.

Το μείγμα φορέων που παρέχεται στο StrataClone PCR cloning kit περιέχει βραχίονες DNA δύο ειδών, καθένας από τους οποίους φέρει στο ένα άκρο του 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 9). Το γραμμικό μόριο DNA που

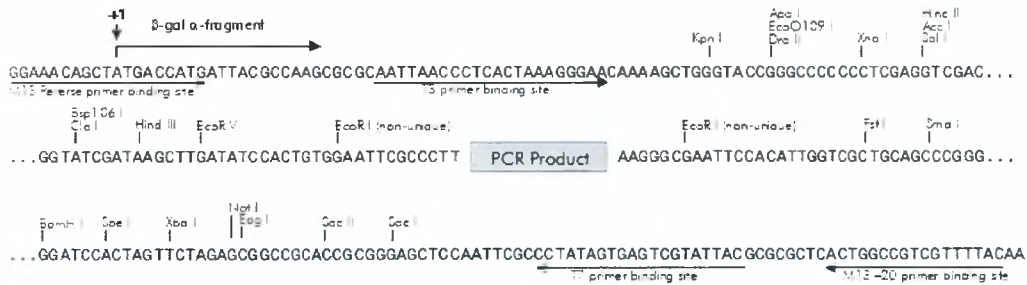
προκύπτει στη συνέχεια, μετασχηματίζει επιδεκτικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα σύνθεσης της ρεκομπινάσης Cre, η οποία με τη σειρά της ανασυνδιάζει τις περιοχές loxP στα άκρα του γραμμικού μορίου. Έτσι, σχηματίζεται ο κυκλικός φορέας pSC-A (Εικόνα 10) που έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο παρουσία αμπικιλίνης και περιέχει το σπερόνιο της λακτόζης (lacZ) προκειμένου να είναι δυνατή η επιλογή με blue/white screening.



Εικόνα 9: 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)

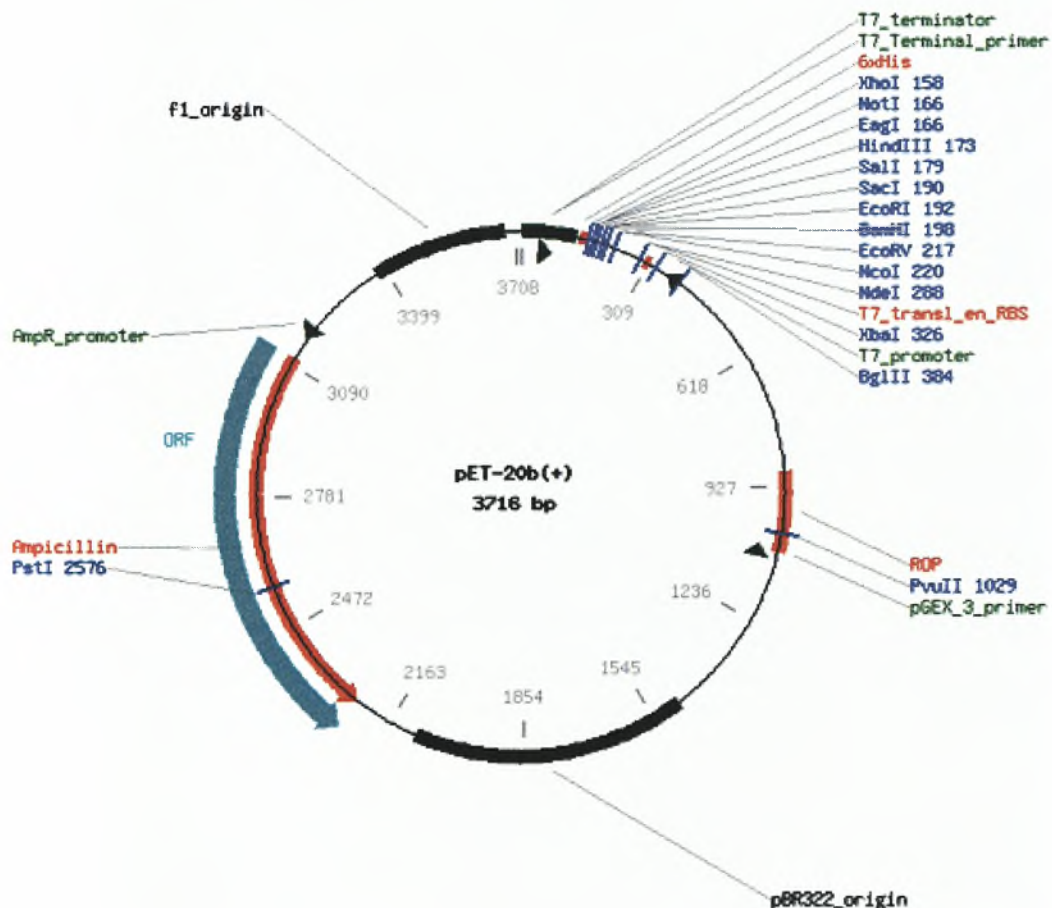


Feature	Nucleotide Position
β -galactosidase α -fragment coding sequence (<i>lacZ</i>)	1–354
Multiple cloning site (MCS)	57–197
PCR product insertion site	123
ampicillin resistance (<i>bla</i>) ORF	465–1322
f1 origin of ss-DNA replication	1514–1820
<loxP> (mutant <i>loxP</i> -derived sequence <i>lox66/71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

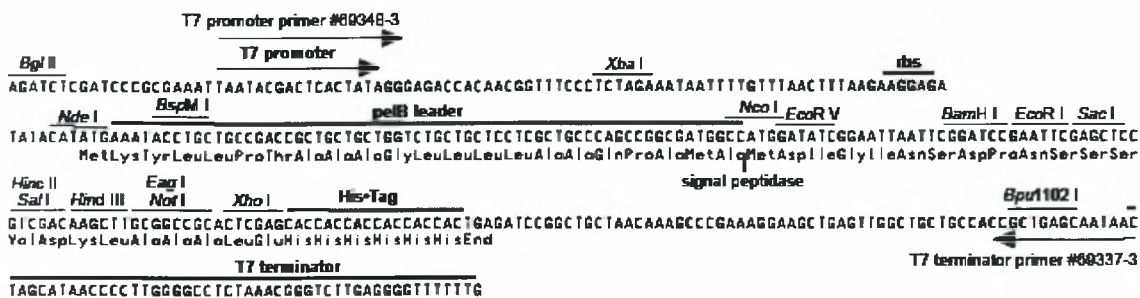
Εικόνα 10: Ο κυκλικός φορέας pSC-A. Ο χάρτης της εικόνας αναπαριστά το προϊόν της ένωσης των βραχιόνων του φορέα με το επιθυμητό προϊόν της PCR, διαδικασία που καταλύεται από την τοποϊσομεράση I και ακολουθείται από ανασυνδυασμό εξαρτώμενο από την ρεκομπινάση Cre. Επιπλέον, παρατίθενται πληροφορίες σχετικά με τις γενετικές θέσεις σημαντικών στοιχείων του φορέα, όπως η θέση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη, θέσεις κοπής περιοριστικών ενζύμων κτλ.

□ pET – 20b

Πλασμιδιακός φορέας με μέγεθος 3716bp (Novagen) που χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση και την έκφραση γονιδίων. Διαθέτει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (**Εικόνα 11**). Η κλωνοποίηση και η έκφραση γονιδίων πραγματοποιείται μέσω της T7 RNA πολυμεράσης. 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 12**). Ο φορέας pET-20b δε διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης (lacZ), με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επιλογή των αποικιών που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο με blue/white screening.



Εικόνα 11: Ο πλασμιδιακός φορέας pET-20b.



pET-20b(+) cloning/expression region

Εικόνα 12: Ο προαγωγέας της T7 RNA πολυμεράσης και ο πολυσυνδέτης (polylinker) του φορέα pET-20b. Διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων BamHI και XhoI, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας. Μετά τον πολυσυνδέτη διακρίνεται το His-Tag.

3.1.6 Εκκινητές (primers)

Για την ενίσχυση του γονιδίου FemB από το gram (+) βακτήριο *Staphylococcus aureus* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (primers) *S. aureus* BamH I Forward και *S. aureus* XhoI Reverse, οι οποίοι αποτελούν εξειδικευμένα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 32 και 34 βάσεων αντίστοιχα.

<i>S. aureus</i> BamH I Forward primer	
5' – GGA TCC ATG AAA TTT ACA GAG TTA ACT GTT AC – 3'	
Tm 57,6 °C	GC content 34,4%

<i>S. aureus</i> XhoI Reverse primer	
5' – CTC GAG TTT CTT TAA TTT TTT ACG TAA TTT ATC G- 3'	
Tm 59,1 °C	GC content 26,5 %

Εικόνα 13: Οι δύο εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου FemB από γενωμικό DNA του *Staphylococcus aureus*. Τα χρωματισμένα νουκλεοτίδια αντιστοιχούν στις επιθυμητές θέσεις κοπής από τα περιοριστικά ένζυμα BamH I (Forward primer) και Xho I (Reverse primer).

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Πραγματοποιήσαμε απομόνωση γενωμικού DNA από στελέχη του οργανισμού *Staphylococcus aureus* με τη μέθοδο φαινόλης - χλωροφορμίου. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με σκοπό την παραλαβή του γενωμικού DNA του οργανισμού για τους μετέπειτα χειρισμούς που θα απαιτηθούν.

Σε 1 g υγρής καλλιέργειας κυττάρων *Staphylococcus aureus* προσθέσαμε 7 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris – HCl 100 mM pH 7,5. Έπειτα προσθέσαμε 0,3 ml λυσοζύμης (stock λυσοζύμης 50 mg / ml) ώστε η τελική συγκέντρωση λυσοζύμης να είναι 1,5 μg / ml. Ακολουθεί ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά.

Ακολούθως, προσθέσαμε 140 μl EDTA 500 mM, στη συνέχεια 7 μl RNάση A 20 mg / ml (τελική συγκέντρωση RNάσης 10 mg / ml) και κατόπιν 63 μl πρωτεΐνάσης K 20 mg / ml (τελική συγκέντρωση πρωτεΐνάσης 10 mg / ml) και επώασαμε στους 45 °C για 45 λεπτά. Έπειτα προσθέσαμε 70 μl NaCl 5M και 0,7 ml SDS 10%.

Έπειτα ακολουθεί η απομόνωση χρησιμοποιώντας φαινόλη και χλωροφόρμιο. Προσθέτουμε 7 ml φαινόλης στο falcon με το DNA, φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά (Φυγοκέντριση 1). Μεταβιβάζουμε το υπερκείμενο σε νέο falcon. Προσθέτουμε 7 ml φαινόλης, φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 λεπτά (Φυγοκέντριση 2). Μεταβιβάζουμε το υπερκείμενο σε νέο falcon. Προσθέτουμε 6 ml φαινόλης, φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 λεπτά (Φυγοκέντριση 3). Μεταβιβάζουμε το υπερκείμενο σε νέο falcon. Προσθέτουμε 5 ml φαινόλης, φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 λεπτά (Φυγοκέντριση 4). Μεταβιβάζουμε το υπερκείμενο σε νέο falcon. Προσθέτουμε 5 ml φαινόλης, φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 λεπτά (Φυγοκέντριση 5). Μεταβιβάζουμε το υπερκείμενο σε νέο falcon. Προσθέτουμε 5 ml φαινόλης, φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 λεπτό (Φυγοκέντριση 6). Μεταβιβάζουμε το υπερκείμενο σε νέο falcon. Προσθέτουμε 4 ml φαινόλης, φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 λεπτό (Φυγοκέντριση 7). Μεταβιβάζουμε το υπερκείμενο σε νέο falcon.

Στη συνέχεια προσθέτουμε 1 όγκο ψυχρής αιθανόλης 100% και τοποθετούμε το falcon στους – 20°C overnight.

Την επόμενη μέρα φυγοκεντρίσαμε σε 13000 rpm, στους 4°C για 30 λεπτά, αποχύσαμε το υπερκείμενο, προσθέσαμε 0,7 όγκους ψυχρής αιθανόλης 70% και φυγοκεντρίσαμε εκ νέου σε 13000 rpm, στους 4°C για 5 λεπτά. Αποχύσαμε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιήσαμε το ίζημα σε 100 μl water for injection.

3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου FemB από το γενωμικό DNA που προέρχεται από τον οργανισμό *Staphylococcus aureus*. Ενισχύθηκε το γονίδιο του FemB από διάφορα στελέχη του βακτηρίου.

Αρχικά προστίθενται το γενωμικό DNA του βακτηρίου, το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης, η οποία στην προκειμένη περίπτωση είναι η Paq 5000, τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs), οι εκκινητές (primers) και H₂O for injection. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι οι *S. aureus*. BamHI 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 BamHI και XhoI. Πραγματοποιείται καλή ανάμειξη όλων των συστατικών και προστίθεται η πολυμεράση Paq 5000 . Η αντίδραση PCR ξεκινάει με ένα στάδιο μετουσίωσης σε θερμοκρασία 95°C για 4 λεπτά. Ακολουθούν 30-40 κύκλοι, καθένας από τους οποίους αποτελείται από ένα βήμα μετουσίωσης στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, ένα στάδιο υβριδισμού για την σύνδεση των εκκινητών στους 52°C για 45 δευτερόλεπτα και ένα στάδιο πολυμερισμού κατά το οποίο δρα η πολυμεράση στους 72°C για 1,5 λεπτά. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με ένα στάδιο σε θερμοκρασία υβριδισμού 72°C για 20 λεπτά όπου τοποθετείται με μεγάλη προσοχή 1 μl Hytest DNA πολυμεράση, προκειμένου να προστεθεί στα προϊόντα του πολυμερισμού μία πολύ-Α ουρά, καθώς η Paq πολυμεράση δεν έχει την ικανότητα αυτή. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μειγμάτων τελικού όγκου 50μl φαίνονται στον Πίνακα 10 .

Αντιδραστήρια	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης Paq (10 x)	5 μl
Premixed dNTPs (2,5 mM)	5 μl
Εκκινητής <i>S. aureus</i> . BamHI sense (100 pmol / μl)	1 μl
Εκκινητής <i>S. aureus</i> XhoI antisense (100 pmol / μl)	1 μl
Γενωμικό DNA	*
Paq 5000 πολυμεράση	1 μl
Water for injection	up to 50 μl

Πίνακας 10 : Τα απαιτούμενα αντιδραστήρια για την ενίσχυση του γονιδίου FemB

* Ο όγκος του γενωμικού DNA που προστέθηκε σε κάθε αντίδραση καθορίστηκε από την συγκέντρωση του γενωμικού DNA που απομονώθηκε, η οποία συγκέντρωση υπολογίστηκε βάσει της φωτομέτρησης στα 260 nm που προηγήθηκε.

3.2.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Για το διαχωρισμό των τμημάτων DNA και τον προσδιορισμό του μεγέθους τους χρησιμοποιείται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Η πυκνότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που επιθυμούμε να προσδιορίσουμε. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήσαμε πηκτή αγαρόζης 1%, η οποία παρασκευάστηκε προσθέτοντας 1 g αγαρόζης σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x. Θερμαίνουμε το διάλυμα έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη και το διάλυμα γίνει διαυγές. Στη συνέχεια ψύχουμε το διάλυμα και προσθέτουμε 7 ml βρωμιούχου αιθιδίου 1x, αναδεύουμε ελαφρά και τοποθετούμε το διάλυμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου αφήνεται να πήξει. Ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση και του μάρτυρα μοριακού βάρους που θα χρησιμοποιηθεί, με την προσθήκη loading buffer 6x. Αφού πήξει η πηκτή, η συσκευή ηλεκτροφόρησης πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x, έως ότου καλυφθούν πλήρως οι θέσεις της πηκτής για τα δείγματα. Έπειτα, συνδέονται τα ηλεκτρόδια της συσκευής ηλεκτροφόρησης με τη συσκευή τροφοδοσίας ηλεκτρικού ρεύματος με τέτοιο τρόπο ώστε το θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται στο μέρος της ηλεκτροφορητικής συσκευής που θα κατευθύνονται τα δείγματα. Εφαρμόζεται τάση 100 V και μετά την πάροδο μικρού χρονικού διαστήματος καθίσταται δυνατή η ανίχνευση των τμημάτων του DNA που επιθυμούμε, καθώς και ο προσδιορισμός του μοριακού τους βάρους, βάσει του μάρτυρα μοριακού βάρους που χρησιμοποιήσαμε. Η ανίχνευση των τμημάτων DNA είναι δυνατή στο υπεριώδες φως, λόγω της παρεμβολής των μορίων του βρωμιούχου αιθιδίου, που απορροφά στο υπεριώδες φως, στις έλικες του DNA.

3.2.4 Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction)

Ο καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction from agarose gels) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Nucleospin gel extraction.

i. Αποκοπή των τμημάτων DNA

Αρχικά πραγματοποιείται η αποκοπή των επιθυμητών τμημάτων DNA από την πηκτή της αγαρόζης με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου ξυραφιού. Κατά την εξαγωγή των επιθυμητών ζωνών DNA δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην ελαχιστοποίηση του όγκου της πηκτής.

ii. Λύση της πηκτής

Για κάθε 100 mg πηκτής, προσθέτουμε 200 μl buffer NT. Επωάζουμε τα δείγματα στους 50 °C για 5 έως 10 λεπτά μέχρι την πλήρη διάλυση της πηκτής, αναδεύοντας ανά 3 λεπτά.

iii. Δέσμευση του DNA

Το δείγμα φορτώνεται σε στήλη, η οποία τοποθετείται σε ένα σωλήνα συλλογής (collection tube) των 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000 x g, απομακρύνεται το έκλουσμα και η στήλη επανατοποθετείται στον σωλήνα συλλογής.

iv. Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης

Προστίθενται 600 µl buffer NT3 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000 x g. Απομακρύνεται το έκλουσμα και η στήλη τοποθετείται εκ νέου στον σωλήνα συλλογής.

v. Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης

Το δείγμα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στα 11.000 x g για την πλήρη απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος NT3. Τα κατάλοιπα της αιθανόλης που περιέχεται στο διάλυμα NT3, είναι πιθανόν να αναστείλουν μετέπειτα αντιδράσεις.

vi. Έκλουση του DNA

Τοποθετούμε τη στήλη σε νέο συλλεκτικό σωλήνα των 1,5 ml και προσθέτουμε 15 – 50 µl elution buffer NE. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό με σκοπό την βελτιστοποίηση της απόδοσης έκλουσης DNA και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στα 11.000 x g. Η απόδοση έκλουσης του DNA δύναται να αυξηθεί επιπλέον εάν το προστιθέμενο buffer NE είναι προθερμασμένο στους 70 °C. Το εκλούμενο DNA φυλάσσεται στους –20 °C.

3.2.5 Σύνδεση τμημάτων DNA (ligation)

Η σύνδεση τμημάτων DNA πραγματοποιείται με την επώαση του γραμμικού φορέα παρουσία των τμημάτων DNA που επιθυμούµαι να συνδέσουµε, σε αναλογία φορέα προς ένθεμα 1:3, με την προσθήκη T4 DNA λιγάσης, του ρυθμιστικού διαλύματός της και ATP. Η διάρκεια της επώασης ποικίλλει ανάλογα με το είδος του φορέα που επιλεχθεί και την χρησιμοποιούμενη λιγάση. Για την διεκπεραίωση της πτυχειακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο φορείς, ο pSC – A και ο pET – 20b.

□ Ligation με τη χρήση του PCR Cloning Kit της Strataclone (φορέας pSC –A)

Όταν επιθυμούµε να χρησιμοποιήσουµε ως φορέα τον pSC – A, προστίθενται με τη σειρά τα εξής συστατικά:

3.2.5.1 3 µl Strataclone Cloning Buffer

3.2.5.2 2 µl PCR product (5-50 ng)

3.2.5.3 1 µl Strataclone Vector Mix

Ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης μπορεί να φυλαχθεί στον πάγο.

□ Ligation σε φορέα pET – 20b

Στην περίπτωση που επιθυμούµε να χρησιμοποιήσουµε ως φορέα του ligation τον pET – 20b, προσθέτουμε τα εξής συστατικά και προσθέτοντας τελευταία την T4 DNA λιγάση.

- 10 μl ενθέματος
- 12 μl φορέα
- 3 μl ATP (50 mM)
- 3 μl T4 DNA ligase buffer 10x
- 2 μl T4 DNA λυγάση
- up to 50 μl αποστειρωμένο H₂O

Έπεται ήπια ανάδευση και επώαση overnight στους 16 °C.

3.2.6 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* για μετασηματισμό

Για την παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι, η χημική μέθοδος με CaCl₂ (CaCl₂ method) και η μέθοδος για την παρασκευή ηλεκτρο-επιδεκτικών κυττάρων (electrocompetent cells).

□ Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων με τη χημική μέθοδο

- Εμβολιάζουμε 3 ml κυττάρων σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth και επωάζουμε την καλλιέργεια στους 37 °C, στις 210 rpm, overnight.
- Εμβολιάζουμε 100 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth με 1 ml της υγρής καλλιέργειας.
- Επωάζουμε την καλλιέργεια στους 37 °C, στις 210 rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600 nm ανέλθει στο 0,4.
- Μεταφέρουμε τα βακτηριακά κύτταρα σε παγωμένα falcons των 50 ml. Τοποθετούμε τις καλλιέργειες στον πάγο για 10 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε τις καλλιέργειες στους 4 °C, στις 4000 rpm για 10 λεπτά.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τα falcons ανάποδα για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα του θρεπτικού μέσου.
- Επαναδιαλύουμε κάθε ίζημα σε 30 ml ψυχρού διαλύματος MgCl₂ – CaCl₂ (80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂).
- Φυγοκεντρούμε τα διαλύματα στους 4 °C, στις 4000 rpm για 10 λεπτά.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τα falcons ανάποδα για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα του υπερκειμένου.
- Επαναδιαλύουμε κάθε ίζημα σε 2 ml ψυχρού διαλύματος 0,1 M CaCl₂.
- Προσθέτουμε 70 μl DMSO σε κάθε falcon. Αναδεύουμε ήπια και επωάζουμε τα κύτταρα στον πάγο για 15 λεπτά.
- Προσθέτουμε επιπλέον 70 μl DMSO σε κάθε falcon. Αναδεύουμε ήπια και επανατοποθετούμε τα falcons στον πάγο.
- Δουλεύοντας γρήγορα, διανέμουμε το περιεχόμενο των falcons σε ψυχρά, αποστειρωμένα erpendorfs, τα οποία τοποθετούμε αμέσως στους –80 °C.

□ Παρασκευή ηλεκτρο – δεκτικών κυττάρων

- a. Εμβολιάζουμε 5 ml κυττάρων σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth και επωάζουμε την καλλιέργεια στους 37 °C, στις 210 rpm, overnight.
- b. Εμβολιάζουμε 100 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth με 2 ml της υγρής καλλιέργειας.
- c. Επωάζουμε την καλλιέργεια στους 37 °C, στις 210 rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600 nm ανέλθει στο 0,5 – 0,6.
- d. Μεταφέρουμε τα βακτηριακά κύτταρα σε παγωμένα falcons των 50 ml. Τοποθετούμε τις καλλιέργειες στον πάγο για 20 λεπτά.
- e. Φυγοκεντρούμε τις καλλιέργειες στους 4 °C, στις 4000 g για 15 λεπτά.
- f. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τα falcons ανάποδα για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα του θρεπτικού μέσου.
- g. Επαναδιαλύουμε κάθε ίζημα σε 50 ml ψυχρού διαλύματος γλυκερόλης 10%.
- h. Φυγοκεντρούμε τα διαλύματα στους 4 °C, στις 4000 g για 15 λεπτά.
- i. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τα falcons ανάποδα για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα του υπερκειμένου.
- j. Επαναδιαλύουμε κάθε ίζημα σε 25 ml ψυχρού διαλύματος γλυκερόλης 10%.
- k. Φυγοκεντρούμε τα διαλύματα στους 4 °C, στις 4000 g για 15 λεπτά.
- l. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τα falcons ανάποδα για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα του υπερκειμένου.
- m. Επαναδιαλύουμε κάθε ίζημα σε 2 ml ψυχρού διαλύματος γλυκερόλης 10%.
- n. Φυγοκεντρούμε τα διαλύματα στους 4 °C, στις 4000 g για 15 λεπτά.
- o. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τα falcons ανάποδα για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα του υπερκειμένου.
- p. Επαναδιαλύουμε κάθε ίζημα σε 250 μl ψυχρού διαλύματος γλυκερόλης 10%.
- q. Δουλεύοντας γρήγορα, διανέμουμε το περιεχόμενο των falcons σε ψυχρά, αποστειρωμένα erpendorfs, τα οποία τοποθετούμε αμέσως στους –80 °C.

3.2.7 Μετασηματισμός κυττάρων *E. coli* (transformation)

Η μέθοδος μετασηματισμού κυττάρων *E. coli* υπαγορεύτηκε από τα επιδεκτικά κύτταρα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Για την περαίωση της πτυχειακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι μετασηματισμού κυττάρων *E. coli*.

□ Μετασηματισμός κυττάρων *E. coli* από το PCR Cloning Kit της Strataclone (φορέας pSC –A)

- a. Σε 50 μl επιδεκτικών κυττάρων που παρέχονται από το PCR Cloning Kit της Strataclone πραγματοποιείται η προσθήκη 1 μl ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA (ligation product).
- b. Επώαση στον πάγο για 20 λεπτά.
- c. Heatshock στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα.

- d. Επώαση στον πάγο για 2 λεπτά.
- e. Προσθήκη 250 μl θρεπτικού μέσου SOC.
- f. Επώαση στους 37 °C, στις 170 rpm για 1 ώρα.
- g. Επίστρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* σε τρυβλίο LB Agar + Ampicillin και προσθήκη 40 μl X – gal 2%.
- h. Επώαση του τρυβλίου στους 37 °C για 12 - 15 ώρες.

□ Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* (chemical competent *E. coli*)

- a. Σε 200 μl επιδεκτικών κυττάρων πραγματοποιείται η προσθήκη 15 μl ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA (ligation product).
- b. Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
- c. Heatshock στους 42 °C για 1 λεπτό.
- d. Επώαση στον πάγο για 2 λεπτά.
- e. Προσθήκη 400 μl θρεπτικού μέσου SOC.
- f. Επώαση στους 37 °C, στις 170 rpm για 90 λεπτά.
- g. Επίστρωση 250 μl των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* σε τρυβλίο LB Agar + Αντιβιοτικό.
- h. Επώαση του τρυβλίου στους 37 °C για 12 - 15 ώρες.

□ Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* (electro - competent *E. coli*)

- a. Σε 50 μl επιδεκτικών κυττάρων προσθέτουμε 1 μl ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA (ligation product).
- b. Μεταφέρουμε το διάλυμα με τα κύτταρα στις κυψελίδες του electroporator.
- c. Θέτουμε σε λειτουργία τον electroporator. Σε μία επιτυχημένη ηλεκτροπώρωση η ένδειξη του electroporator κυμαίνεται στις τιμές 4-5.
- d. Προσθέτουμε 200 μl θρεπτικού μέσου SOC στην κάθε κυψελίδα.
- e. Επιστρώνουμε 100 μl από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* σε τρυβλίο LB Agar + Αντιβιοτικό.
- f. Επωάζουμε το τρυβλίο στους 37 °C για 12 - 15 ώρες.

3.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* (mini preparation) πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο “Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E. coli* Nucleosin Plasmid”.

i. Καλλιέργεια και συνκομιδή των βακτηριακών κυττάρων

Μεταφέρονται 1,5 ml από την υγρή καλλιέργεια των κυττάρων σε ένα erpendorf και φυγοκεντρώνεται στις 11000 g για 1 λεπτό. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται το βήμα.

ii. Λύση των κυττάρων

Προστίθενται 250 μl buffer A1 και επαναδιαλύεται το ίζημα. Ακολούθως, προστίθενται 250 μl buffer A2 και τα erpendorfs αναδεύονται ελαφρά και επωάζονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 λεπτά. Έπειτα προστίθενται 300 μl buffer A3 και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση.

iii. Καθαρισμός του διαλύματος

Πραγματοποιείται φυγοκέντριση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στις 11000 g για 10 λεπτά.

iv. Δέσμευση του DNA

Η στήλη Nucleospin Plasmid τοποθετείται σε ένα σωλήνα συλλογής (collection tube) των 2 ml όπου φορτώνεται το υπερκείμενο της φυγοκέντρισης που προηγήθηκε. Ακολουθεί φυγοκέντριση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στις 11000 g για 1 λεπτό. Απομακρύνεται το έκλουσμα και η στήλη επανατοποθετείται στον σωλήνα συλλογής.

v. Πλύση της μεμβράνης σιλκόνης

Προστίθενται 600 μl buffer A4 (που περιέχει αιθανόλη) και ακολουθεί φυγοκέντριση για 1 λεπτό στα 11.000 g. Απομακρύνεται το έκλουσμα και η στήλη τοποθετείται εκ νέου στον σωλήνα συλλογής.

vi. Ξήρανση της μεμβράνης σιλκόνης

Το δείγμα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στα 11.000 g για την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης του διαλύματος A4. Τα κατάλοιπα της αιθανόλης που περιέχεται στο διάλυμα A4, είναι πιθανόν να αναστείλουν μετέπειτα αντιδράσεις.

vii. Έκλυση του DNA

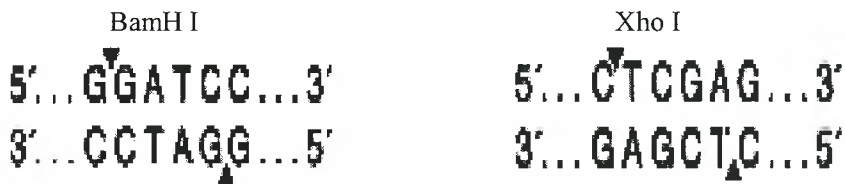
Τοποθετούμε τη στήλη σε νέο συλλεκτικό σωλήνα των 1,5 ml και προσθέτουμε 50 μl buffer AE. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό με σκοπό την βελτιστοποίηση της απόδοσης έκλυσης DNA και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στα 11.000 g. Το εκλούμενο πλασμιδιακό DNA φυλάσσεται στους -20°C .

3.2.9 Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα (digestion)

Η επώαση μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού έχει ως σκοπό την εξειδικευμένη κοπή τους σε συγκεκριμένες θέσεις λόγω της αναγνώρισης συγκεκριμένων αλληλουχιών του DNA από τα περιοριστικά ένζυμα. Πλασμιδιακό DNA επωάζεται με το ένζυμο σε αναλογία 2 Units (ενζυμικές μονάδες)/μg DNA, παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. 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 της πέψης διαρκεί περίπου 3 ώρες στους 37°C .

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 δραστηριότητας αυτών των ενζύμων.

Για την διεκπεραίωση της πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα BamH I και Xho I από την εταιρεία Takara. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης και οι αντίστοιχες θέσεις κοπής των ενζύμων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 14**.



Εικόνα 14: Οι αλληλουχίες του DNA που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα BamH I και Xho I και οι θέσεις κοπής τους.

3.2.10 Υπερέκφραση πρωτεΐνης FemB

Σε 200 ml θρεπτικού μέσου LB Broth με αμπικιλίνη εμβολιάζουμε 2 ml υγρής καλλιέργειας κυττάρων *E. coli*, που φέρουν το γονίδιο για τον FemB σε κατάλληλο πλασμίδιο για υπερέκφραση. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD₆₀₀) και επώαση της καλλιέργειας στους 37 °C υπό ανάδευση έως ότου το OD₆₀₀ φτάσει περίπου το 0,5 – 0,6 που αντιστοιχεί στην εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων. Προστίθεται IPTG (0,1M) (Isopropyl Thio Galactosyl) σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM με σκοπό την επαγωγή μεταγραφής του γονιδίου FemB. Έπειτα ακολουθεί επώαση στους 30 °C, στις 210 rpm για 7 ώρες. Κατόπιν τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στους 4 °C, στις 4000 rpm για 20 λεπτά, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα φυλάσσεται στους – 80 °C.

3.2.11 Απομόνωση πρωτεΐνης FemB

□ Ομογενοποίηση και λύση των κυττάρων

Επαναδιαλύουμε τα ιζήματα από την φυγοκέντριση της διαδικασίας υπερέκφρασης του FemB σε 1 ml sonication buffer (**Πίνακας 11**). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 20 λεπτά και στη συνέχεια σπάσιμο των κυττάρων με υπερήχους

(sonicator). Στη συνέχεια έπεται φυγοκέντριση στους 4 °C, στις 14000 rpm, για 30 λεπτά, διαχωρισμός υπερκείμενων και ιζημάτων και φύλαξη τους στους 4 °C.

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
Tris – HCl pH 8	50 mM
NaCl	500 mM
B – μερκαπτοαιθανόλη	5 mM
MgCl ₂	5 mM
PMSF	1 mM
Γλυκερόλη	10%
Triton X	0,1 %

Πίνακας 11: Σύσταση διαλύματος sonication buffer για την λύση κυττάρων *E.coli* με υπερήχους.

* Στο sonication buffer προστέθηκε και μικρή ποσότητα λυσοζύμης για την διευκόλυνση της λύσης των κυττάρων.

□ Απομόνωση της πρωτεΐνης FemB

Η πρωτεΐνη FemB μπορεί να απομονωθεί περνώντας κάθε δείγμα από στήλη Νικελίου (NTA-Ni), όπου η πρωτεΐνη FemB κατακρατάται εξαιτίας της σύνδεσης των καταλοίπων ιστιδίνης, που περιέχει, με τα μόρια του Νικελίου. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η συλλογή κλασμάτων πρωτεϊνών, αρχικά εκείνων που δεν κατακρατούνται στη στήλη, στη συνέχεια εκείνων που κατακρατούνται ασθενώς και τέλος της FemB. Η κλασμάτωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλυμάτων έκλυσης διαφορετικής συγκέντρωσης Ιμιδαζόλης. Η Ιμιδαζόλη δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου της στήλης, ανταγωνίζοντας στις θέσεις δέσμευσης για τις πρωτεΐνες που περιέχουν κατάλοιπα ιστιδίνης. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση της πρωτεΐνης FemB από τα υπερκείμενα της φυγοκέντρισης μετά τη λύση των κυττάρων καταγράφονται στον **Πίνακα 12**. Για την επεξεργασία των ιζημάτων που προέκυψαν από την φυγοκέντριση απαιτήθηκε η επαναδιάλυση τους σε ένα διάλυμα λύσης (lysis buffer) τα συστατικά του οποίου παρουσιάζονται στον **Πίνακα 13**. Μετα την επαναδιάλυση των ιζημάτων ακολούθησε φυγοκέντριση στους 4 °C, στις 14000 rpm, για 30 λεπτά και διαχωρίστηκαν τα υπερκείμενα και τα ιζήματα. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση από τα υπερκείμενα της φυγοκέντρισης των ιζημάτων αναφέρονται στον **Πίνακα 14**.

Διάλυμα	Αντιδραστήρια (τελική συγκέντρωση)		
	Tris – HCl pH 8	NaCl	Ιμιδαζόλη
Equilibration buffer	50 mM	500 mM	-
Wash buffer	50 mM	500 mM	30 mM
Elution buffer	50 mM	500 mM	250 mM

Πίνακας 12: Σύσταση διαλυμάτων για την απομόνωση της πρωτεΐνης FemB από τα υπερκείμενα μετά την λύση των κυττάρων.

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
Tris – HCl pH 8	50 mM
NaCl	0,3 M
PMSF	1 mM
B – μερκαπτοαιθανόλη	20 mM
Ουρία	8 M

Πίνακας 13: Η σύσταση του διαλύματος επαναδιάλυσης των ιζημάτων από την φυγοκέντριση που ακολούθησε την λύση των κυττάρων *E.coli* με υκερήχους.

Διάλυμα	Αντιδραστήρια (τελική συγκέντρωση)			
	Tris HCl pH 8	NaCl	Ουρία	Ιμιδαζόλη
Equilibration / Wash buffer	50 mM	0,5 M	8 M	-
Elution buffer	50 mM	0,5 M	8 M	250 mM

Πίνακας 14: Σύσταση διαλυμάτων για την απομόνωση της πρωτεΐνης FemB από τα ιζήματα μετά την λύση των κυττάρων.

□ Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης με SDS, η οποία πηκτή αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, τη πηκτή διαχωρισμού (separating gel) και τη πηκτή επιστίβαξης (stacking gel). Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την παρασκευή των δύο πηκτών καταγράφονται στον **Πίνακα 15** και στον **Πίνακα 16**, αντίστοιχα. Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Acrylamide/Bisacrylamide 30%	3,95 ml
Tris – HCl pH 8,8 1M	3,75 ml
SDS 10%	200 μl
H ₂ O	2,2 ml
TEMED	15 μl
APS 20%	45 μl

Πίνακας 15: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 12% (separating gel)

Αντιδραστήρια	Όγκος
Acrylamide/Bisacrylamide 30%	0,75 ml
Tris – HCl pH 6,8 1M	0,75 ml
SDS 10%	3,6 μl
H ₂ O	2,2 ml
TEMED	10 μl
APS 20%	30 μl

Πίνακας 16: Σύσταση πηκτής επιστίβαξης 4% (stacking gel)

Η πηκτική επιστίβαξης 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 επιστίβαξης ακριβώς πάνω από την πηκτική διαχωρισμού και αφήνεται να πήξει.

Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτική περιλαμβάνει την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού 4x (loading dye) και τη θέρμανση των δειγμάτων στους 98 °C για 5 λεπτά. Η θέρμανση έχει ως σκοπό την αποδιάταξη των πρωτεϊνών ώστε να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος στην πηκτική.

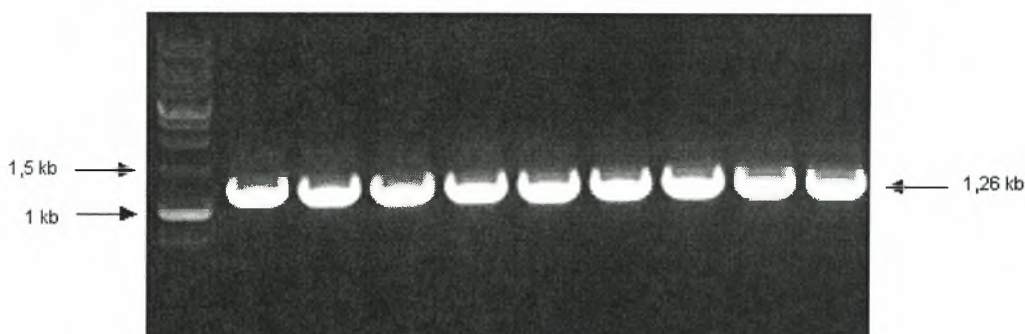
Φορτώνονται τα δείγματα στην πηκτική καθώς και οι μάρτυρες μοριακού βάρους, πληρώνεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris – Γλυκίνη – SDS) ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτική και συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδοσίας. Η τάση του ηλεκτρικού ρεύματος προσαρμόζεται στα 100 V μέχρι τα δείγματα να εισέλθουν στη πηκτική διαχωρισμού και στη συνέχεια αυξάνεται στα 200 V.

Ακολούθως, αφαιρείται η ενιαία πηκτική από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, απομακρύνεται η πηκτική επιστίβαξης και η πηκτική διαχωρισμού χρωματίζεται και αποχρωματίζεται. Η διαδικασία χρωματισμού και αποχρωματισμού της πηκτής έχει ως εξής:

- a. Προσθήκη οξικού οξέως 10% έως ότου καλυφθεί η πηκτική. Θέρμανση της πηκτής για 30 δευτερόλεπτα σε υψηλή θερμοκρασία και απομάκρυνση του οξικού οξέως.
- b. Προσθήκη Coomassie Brilliant Blue μέχρι να καλυφθεί η πηκτική. Θέρμανση της πηκτής για 30 δευτερόλεπτα σε υψηλή θερμοκρασία.
- c. Αργή ανάδευση της πηκτής για 10 λεπτά και έπειτα απομάκρυνση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue.
- d. Πλύση της πηκτής με απιονισμένο H₂O.
- e. Προσθήκη οξικού οξέως 10%. Θέρμανση της πηκτής για 30 δευτερόλεπτα σε υψηλή θερμοκρασία και απομάκρυνση του οξικού οξέως.
- f. Προσθήκη φρέσκου οξικού οξέως 10% μέχρι να καλυφθεί η πηκτική. Αργή ανάδευση της πηκτής για 30 λεπτά και απομάκρυνση του οξικού οξέως.
- g. Προσθήκη φρέσκου οξικού οξέως 10% μέχρι να καλυφθεί η πηκτική. Αργή ανάδευση της πηκτής για 10 λεπτά και απομάκρυνση του οξικού οξέως.
- h. Προσθήκη φρέσκου οξικού οξέως 10% μέχρι να καλυφθεί η πηκτική. Αργή ανάδευση της πηκτής overnight και απομάκρυνση του οξικού οξέως.

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενωμικού DNA του οργανισμού *Staphylococcus aureus* από νοσοκομειακά στελέχη με τη μέθοδο φαινόλης – χλωροφορμίου. Έπειτα ενισχύθηκε το γονίδιο της πρωτεΐνης FemB με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας ως εκκινητές *S. aureus* BamH I Forward και *S. aureus* XhoI Reverse, με σκοπό να προκύψουν προϊόντα ενίσχυσης, στα άκρα των οποίων εντοπίζονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού BamH I και Xho I. Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% και έγιναν ορατά σε υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 15). Ταυτόχρονα, προσδιορίστηκε το μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους 1 kb. Με βάση την εικόνα της πηκτής αγαρόζης στο υπεριώδες φως διαπιστώνουμε ότι ενισχύθηκε το επιθυμητό γονίδιο της πρωτεΐνης FemB, καθώς το μέγεθος της ζώνης αντιστοιχεί στις 1,262 kb.

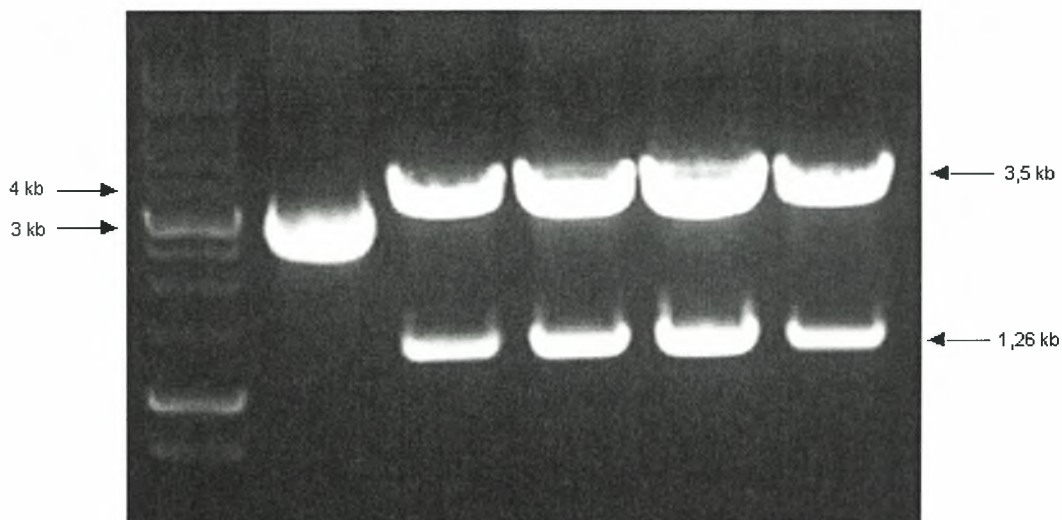


Εικόνα 15: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Οι ζώνες που αντιστοιχούν στο γονίδιο της πρωτεΐνης FemB είναι ευδιάκριτες.

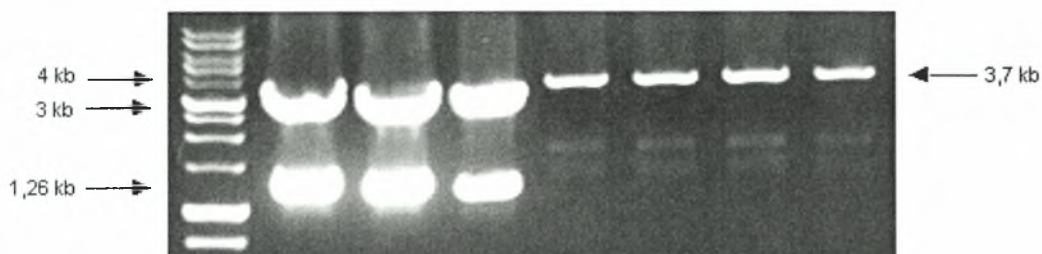
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των τμημάτων DNA που αντιστοιχούν στο γονίδιο της πρωτεΐνης FemB από την πηκτή αγαρόζης (gel extraction), διαδικασία που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Nucleospin Gel Extraction. Τα προϊόντα της διαδικασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA (ligation) μεταξύ του γονιδίου της πρωτεΐνης FemB και του πλασμιδιακού φορέα pSC – A, με τη χρήση του PCR Cloning Kit της Strataclone. Έπειτα, τα προϊόντα του ligation χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό (transformation) επιδεκτικών κυττάρων *E. coli*, που παρέχονται από το PCR Cloning Kit της Strataclone. Η ανάπτυξη αποικιών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB Agar παρουσία αμικικιλίνης σήμαινε την παρουσία μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli*, τα οποία είχαν προσλάβει τον πλασμιδιακό φορέα pSC – A. Εντούτοις, επιλέχθηκαν οι λευκές αποικίες, οι οποίες είχαν προσλάβει τον πλασμιδιακό φορέα pSC – A που περιείχε και το επιθυμητό γονίδιο του FemB (blue/white screening) και καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth με αμικικιλίνη. Ακολούθως, δημιουργήθηκε

stock γλυκερόλης (700 μl υγρής καλλιέργειας κυττάρων και 300 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 50%) και αποθηκεύτηκε στους -80°C .

Το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας περιελάμβανε την καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο LB Broth με αμικικιλίνη των μετασχηματισμένων κυττάρων (γονίδιο FemB σε πλασμιδιακό φορέα pSC – A) καθώς και κυττάρων *E. coli* που φέρουν πλασμίδια pET – 20b. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation) και για τα βακτήρια *E. coli* που φέρουν τον φορέα pSC–A και για τα βακτήρια που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα pET – 20b. Τα απομονωμένα πλασμίδια επώαστηκαν με τα ένζυμα περιορισμού BamH I και Xho I, σε μία αντίδραση διπλής πέψης, με σκοπό την εξαγωγή του επιθυμητού γονιδίου FemB από τον πλασμιδιακό φορέα pSC – A και την δημιουργία ασύζευκτων άκρων. Η αντίδραση πέψης του φορέα pET – 20b είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός γραμμικού μορίου DNA με ασύζευκτα άκρα, συμπληρωματικά με τα ασύζευκτα άκρα του γονιδίου του FemB. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% και παρατηρήθηκαν στο υπεριώδες φως. Όπως αναμενόταν, στην πέψη του πλασμιδίου pSC-A παρατηρήθηκαν 2 ζώνες, μία περίπου 3,5kb που αντιστοιχεί στον φορέα pSC – A και μία στις 1,26 kb που αντιστοιχεί στο γονίδιο της πρωτεΐνης FemB (Εικόνα 16). Η αντίδραση πέψης του φορέα pET – 20b παρουσίασε μία ζώνη στις 3,7 kb, μέγεθος που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος του γραμμοποιημένου φορέα pET – 20b (Εικόνα 17).



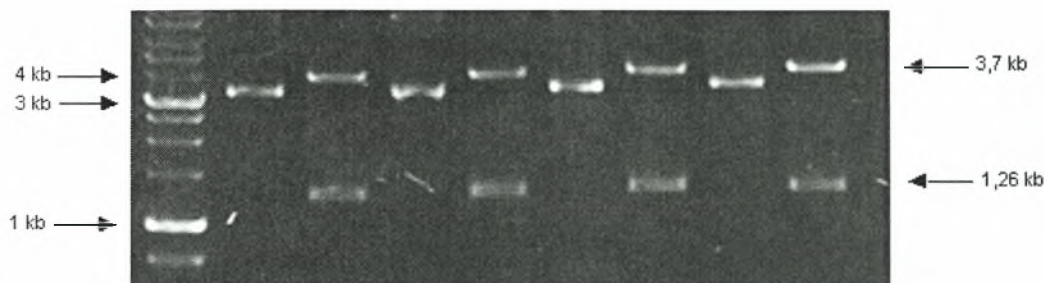
Εικόνα 16: Αλεκόνιση των τμημάτων που προκύπτουν από την πέψη του πλασμιδιακού φορέα pSC – A που φέρει το γονίδιο για την πρωτεΐνη FemB με τα ένζυμα περιορισμού BamH I και Xho I. Οι ζώνες μεγέθους 3,5 kb αντιστοιχούν στον γραμμοποιημένο φορέα pSC – A ενώ οι ζώνες μεγέθους 1,26 kb στο γονίδιο του FemB. Στην πρώτη θέση της πηκτής αгарόζης ηλεκτροφορήθηκε κυκλοποιημένος φορέας pSC–A.



Εικόνα 17: Απεικόνιση του μεγέθους του γραμμοποιημένου φορέα pET – 20b (3,7 kb) έπειτα από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamH I και Xho I. Επίσης παρατηρείται η διαφορά μεγέθους από τον γραμμοποιημένο φορέα pSC-A (3,5 kb) καθώς και η διαφορά στον αριθμό των αντιγράφων του κάθε πλασμιδίου που περιέχονται στα μετασχηματισμένα βακτήρια *E. coli*. Οι μικρές ζώνες αντιστοιχούν σε άλλα πλασμίδια των βακτηριακών στελεχών.

Οι ζώνες που αντιστοιχούν στο επιθυμητό γονίδιο της πρωτεΐνης FemB και στον γραμμοποιημένο φορέα pET – 20b, απομονώθηκαν και εξάχθηκε το DNA από την πηκτή αγαρόζης σύμφωνα με το πρωτόκολλο Nucleospin Gel Extraction. Οι αλληλουχίες DNA που απομονώθηκαν συνδέθηκαν με τη βοήθεια T4 DNA λιγάσης (ligation), διαδικασία που επιτεύχθηκε εξαιτίας της ύπαρξης των ασύζευκτων άκρων του φορέα και του γονιδίου λόγω της πέψης τους με κοινά ένζυμα περιορισμού.

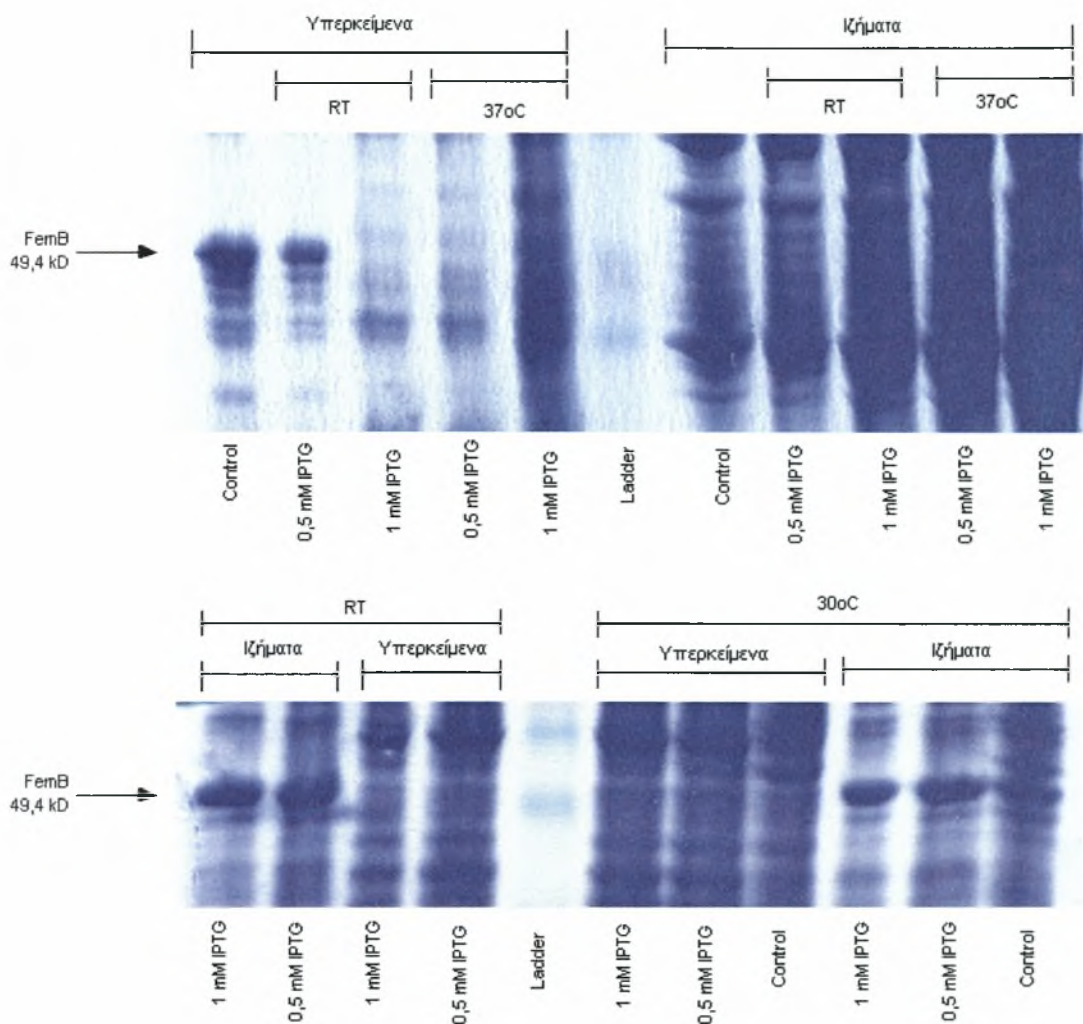
Το μετέπειτα στάδιο της πειραματικής διαδικασίας ήταν ο μετασχηματισμός (transformation) επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a με τον κυκλοποιημένο φορέα pET – 20b, ο οποίος περιέχει και το γονίδιο για την πρωτεΐνη FemB. Διαπιστώθηκε ότι ο μετασχηματισμός ηλεκτρο - επιδεκτικών κυττάρων ήταν πιο αποδοτικός από τον μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων που παράχθηκαν με τη χημική μέθοδο. Η ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB Agar παρουσία αμπικιλίνης, ώστε να αναπτυχθούν μόνο τα βακτήρια που έχουν προσλάβει τον φορέα pET –20b. Επειδή ο φορέας pET – 20b δεν διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης, ώστε να διακρίνουμε τους κλώνους που έχουν προσλάβει κυκλοποιημένο φορέα pET – 20b από τους κλώνους που έχουν προσλάβει φορέα pET – 20b που φέρει το γονίδιο του FemB, κρίθηκε απαραίτητος ο έλεγχος των κλώνων. Ο έλεγχος των μετασχηματισμένων κλώνων συμπεριλάμβανε την ανακαλλιέργεια κλώνων σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth, την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation), την πέψη των απομονωμένων πλασμιδίων με τα ένζυμα περιορισμού BamH I και Xho I και την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 1%. Οι θετικοί κλώνοι, δηλαδή εκείνοι που περιείχαν τον φορέα pET –20b μαζί με το επιθυμητό γονίδιο για την πρωτεΐνη FemB, παρουσίαζαν δύο ζώνες όταν παρατηρούσαμε την πηκτή αγαρόζης στην υπεριώδη ακτινοβολία, μία ζώνη 3,7 kb που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος του γραμμοποιημένου φορέα pET – 20b και μία ζώνη 1,26 kb που αντιστοιχεί στο επιθυμητό γονίδιο του FemB (**Εικόνα 18**). Κατόπιν, κρατήθηκαν stock γλυκερόλης από τους θετικούς κλώνους στους – 80 °C.



Εικόνα 18: Οι θετικοί κλώνοι του μετασχηματισμού παρουσίαζαν μία ζώνη 3,7 kb (γραμμοποιημένος φορέας pET – 20b) και μία ζώνη 1,26 kb (γονίδιο του FemB) μετά από την πέψη του απομονωμένου πλασμιδίου pET –20b με τα ένζυμα περιορισμού BamH I και Xho I. Στην πρώτη θέση της πηκτής αγαρόζης ηλεκτροφορήθηκε κυκλικός φορέας pET – 20b που φέρει το γονίδιο για τον FemB.

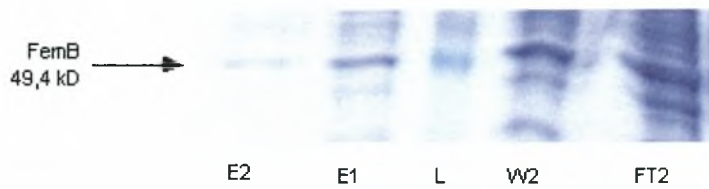
Κατόπιν πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* BL21 DE3 με τον πλασμιδιακό φορέα pET – 20b που περιέχει και το γονίδιο της πρωτεΐνης FemB, ώστε να υπερκεκφραστεί η πρωτεΐνη FemB και να καθαριστεί. Η διαδικασία αυτή περιελάμβανε ανακαλλιέργεια των κλώνων που περιέχουν τον φορέα pET – 20b μαζί με το γονίδιο του FemB σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth από το stock γλυκερόλης, απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation) και μετασχηματισμό των ηλεκτρο – δεκτικών κυττάρων *E. coli* BL21 DE3. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB Agar παρουσία αμικικιλίνης και επωάζονται στους 37 °C.

Η διαδικασία κλωνοποίησης του γονιδίου της πρωτεΐνης FemB ολοκληρώθηκε με την υπερέκφραση της πρωτεΐνης FemB σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3, την απομόνωση και την ανίχνευσή της μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης. Για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας και της βέλτιστης συγκέντρωσης IPTG που απαιτούνται για την υπερέκφραση του γονιδίου του FemB, πραγματοποιήθηκε test έκφρασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (RT), στους 30 °C και στους 37 °C σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (0,5 mM και 1 mM) για κάθε θερμοκρασία. Μετά το πέρας της διαδικασίας ακολούθησε ομογενοποίηση των κυττάρων με υπέρηχους και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12% με SDS (SDS – PAGE)(Εικόνες 19a,19b). Τα αποτελέσματα του test έκφρασης της πρωτεΐνης FemB έδειξαν ότι οι βέλτιστες συνθήκες είναι η ανάπτυξη στους 30 °C με τελική συγκέντρωση IPTG 1 mM καθώς στο συγκεκριμένο δείγμα παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης FemB.



Εικόνες 19a,19b: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12% με SDS των δειγμάτων της δοκιμής έκφρασης της πρωτεΐνης FemB σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (RT), στους 30 °C και στους 37 °C σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (0,5 mM και 1 mM) για κάθε θερμοκρασία.

Οπότε, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης FemB στις βέλτιστες συνθήκες (30 °C, συγκέντρωση IPTG 1 mM), ομογενοποίηση των κυττάρων με υπέρηχους, απομόνωση της πρωτεΐνης στόχου σε 2 ml στήλης NTA – Ni και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12% με SDS (SDS – PAGE) των κλασμάτων που συλλέχθηκαν (**Εικόνα 20**). Το αποτέλεσμα της διαδικασίας υπερέκφρασης και απομόνωσης της πρωτεΐνης FemB από κύτταρα *E. coli* δεν ήταν το αναμενόμενο καθώς η πρωτεΐνη FemB δεν εκφράστηκε σε υψηλά επίπεδα ώστε να θεωρηθεί ότι επάχθηκε η υπερέκφρασή της.

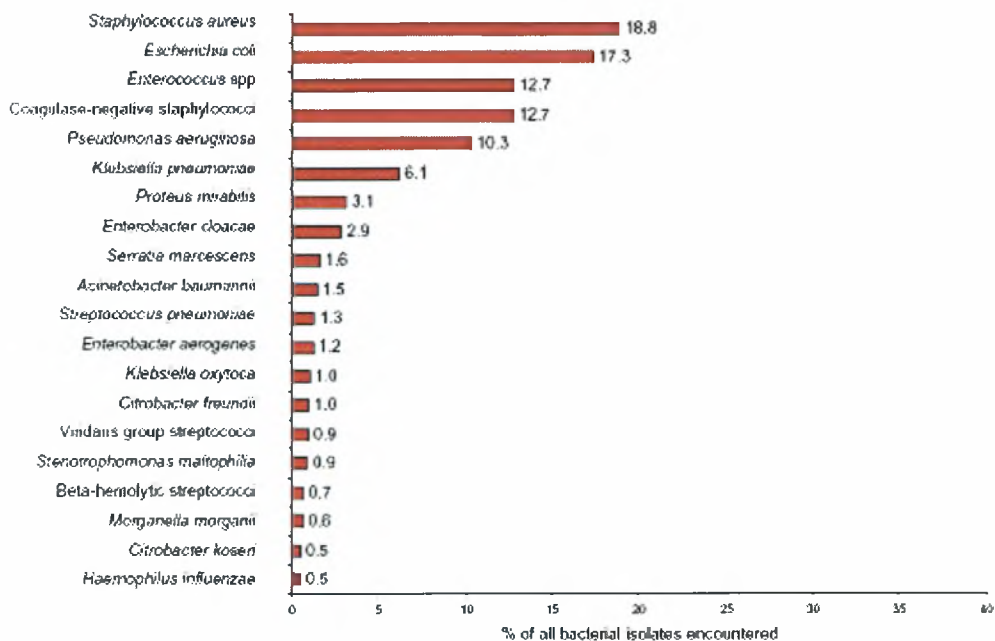


Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων που συλλέχθηκαν κατά την απομόνωση της πρωτεΐνης FemB που υπερεκφράστηκε σε θερμοκρασία 30 °C και συγκέντρωσης IPTG 1 mM (E=elution, L = Ladder, W=wash, FT= flow-through).

Η μη υπερέκφραση της πρωτεΐνης FemB στο *E. coli* πιθανόν να οφείλεται στο ενδεχόμενο η πρωτεΐνη, που προέρχεται από το αρνητικό κατά Gram βακτήριο *Staphylococcus aureus*, να προκαλεί τοξικότητα στα βακτήρια *E. coli*, τα οποία είναι Gram αρνητικά. Επιπλέον, ενδεχομένως, να απαιτείται θερμοκρασία χαμηλότερη από τους 30 °C, ώστε να υπερεκφραστεί η πρωτεΐνη.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανθεκτικότητα πολλών παθογόνων βακτηρίων στα αντιβιοτικά έχει φθάσει σήμερα σε ανησυχητικά επίπεδα παγκοσμίως (Πίνακας 17). 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 (Neu H. C., 1992) (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 (Casadevall, A., 1996). 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 (Ghuysen, J. M., 1968).



Πίνακας 17: Η σχετική συχνότητα των βακτηριακών ειδών που συναντάται σε κλινικά δείγματα ασθενών νοσοκομείου.

Τα Gram θετικά βακτήρια έχουν αναπτύξει δύο βασικές στρατηγικές ενάντια στη δράση των β-λακταμών, την απενεργοποίηση του αντιβιοτικού με τη δράση β-λακταμασών και την εγγενή ανθεκτικότητα που οφείλεται σε τροποποιημένα, χαμηλής συγγένειας ένζυμα, που αποτελούν τους στόχους των αντιβιοτικών και το οποία αποκαλούνται penicillin-binding-proteins (PBPs) (Rohrer and Berger-Bachi, 2003).

Στην κατηγορία των παραγόντων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των Gram θετικών βακτηρίων ανήκουν και οι μη ριβοσωμικές πεπτιδουλ-τρανσφεράσες της οικογένειας FemABX. Οι πεπτιδουλ-τρανσφεράσες χρησιμοποιούν ως δότες των αμινοξέων αμινοακυλιωμένα tRNAs. Στην πορεία μελέτης των παραγόντων FemABX αποκαλύφθηκε και η ύπαρξη ομόλογών τους πρωτεϊνών, που εντοπίζονται σε πολλά βακτηριακά είδη. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι πολλά είδη βακτηρίων σχηματίζουν γέφυρες για τη σύνδεση των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης τους, σε αντιστοιχία με τις γέφυρες πενταμερών καταλοίπων γλυκίνης που σχηματίζει το βακτήριο *Staphylococcus aureus* (Εικόνα 20). Οι πεπτιδικές γέφυρες είναι χαρακτηριστικές για τον κάθε μικροοργανισμό και ποικίλουν από είδος σε είδος.

Ο μικροοργανισμός *Staphylococcus aureus* σχηματίζει γέφυρες πενταμερών γλυκίνης για τη σύνδεση των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης. Η διαδικασία ενσωμάτωσης των καταλοίπων γλυκίνης λαμβάνει χώρα στην εσωτερική πλευρά της βακτηριακής μεμβράνης, ενώ η σύνδεση των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης στην εξωτερική. Οι πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την ενσωμάτωση των καταλοίπων γλυκίνης είναι ο FemX, ο FemA και ο FemB (Εικόνα 21) κατά σειρά εμφάνισής τους στην διαδικασία..



Εικόνα 20: Δενδρόγραμμα της πρωτεϊνικής οικογένειας FemABX. Τα μήκη των κλαδιών είναι ανάλογα της φυλογενετικής απόστασης των οργανισμών.



Εικόνα 21: Μοντέλο της δομής της μη ριβοσωμικής πεπτιδυλ-τρανσφεράσης FemB από τον οργανισμό *Staphylococcus aureus*.

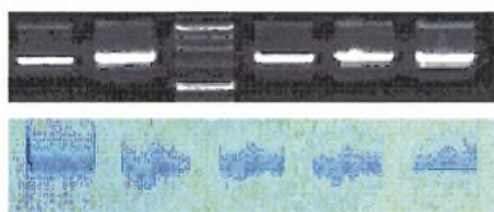
Στην παρούσα διπλωματική εργασία διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο της πρωτεΐνης FemB φέρει μεταλλάξεις με μικρή συχνότητα, οι οποίες μεταλλάξεις δεν επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την ανθεκτικότητα των βακτηριακών στελεχών *Staphylococcus aureus* στην μεθικιλίνη. Η απώλεια λειτουργίας της πρωτεΐνης FemB αντισταθμίζεται σε σημαντικό βαθμό από την ύπαρξη πρωτεϊνών ομόλογων της FemB, ενώ το γεγονός ότι knock out βακτήρια της FemB είναι βιώσιμα ενισχύει την άποψη ότι η πρωτεΐνη FemB δεν φαίνεται να διαδραματίζει βαρύνοντα ρόλο στον μηχανισμό ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη.

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 (Kopp U. et al., 1996). 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. Οι αναστολείς αυτοί αποτελούν ανάλογα αμινοακυλιωμένων tRNAs που μεταφέρουν κατάλοιπα Ser ή Ala.

Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα δεδομένα κρίθηκε απαραίτητη η κλωνοποίηση, η υπερέκφραση και ο καθαρισμός τόσο της GlyRS, των tRNA^{Gly} μορίων, όσο και του FemB από το βακτήριο *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 τις πρωτεΐνες της οικογένειας FemABX 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^{gly}.

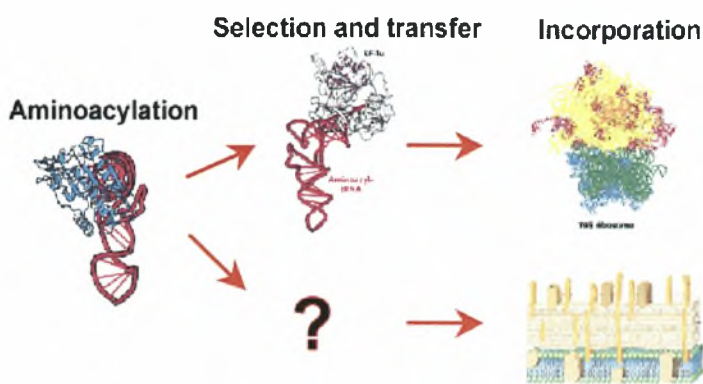
Στο *S. aureus*, ήταν γνωστά μέχρι σήμερα 4 ισοδεκτικά tRNA^{Gly} μόρια, με όλα να αμινοακυλιώνονται, όπως είδαμε, από μία μοναδική GlyRS. Λειτουργικές γονιδιωματικές αναλύσεις όμως αποκάλυψαν την ύπαρξη και ενός πέμπτου υποθετικού γονιδίου tRNA^{Gly} (αναφέρεται ως ψευδογονίδιο tRNA) που αποδείχθηκε πως εκφράζεται και μάλιστα κωδικοποιεί για ένα πλήρους μήκους, ισοδεκτικό tRNA^{Gly} 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^{Gly} γονίδια από με την μέθοδο του cassette-cloning και ακολούθησε *in vitro* μεταγραφή (με τη βοήθεια της T7 πολυμεράσης), καθαρισμός και απομόνωση των μεταγράφων (**Εικόνα 22**). Όλα τα μετάγραφα δοκιμάστηκαν για ικανότητα υποδοχής γλυκίνης και αποδείχτηκαν κατάλληλα υποστρώματα για την σταφυλοκοκκική GlyRS.



Εικόνα 22: Στην επάνω εικόνα έχουμε τα 5 ταυτοποιημένα tRNA^{Gly} 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^{Gly} που συμμετέχουν ως δότες γλυκίνης για την σύνθεση των απαραίτητων πενταπεπτιδίων γλυκίνης.
- Η ταυτοποίηση των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} 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^{Gly} σε πρωτεϊνογενετικά ή μη. Συγκεκριμένα, τα μόρια που δεσμεύονται ασθενώς με τον EF-Tu θέτουν υποψηφιότητα για αποκλειστικοί δότες γλυκίνης στο κυτταρικό τοίχωμα (**Εικόνα 23**).
- Ο έλεγχος έκφρασης του πέμπτου υποθετικού γονιδίου tRNA^{Gly} και ο πιθανός λειτουργικός του ρόλος στην σύνθεση των πενταπεπτιδίων γλυκίνης.



Εικόνα 23: Πιθανές πορείες των tRNA^{Gly} μορίων μετά την αμινοακυλίωσή τους.

- Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός του άγνωστου μέχρι σήμερα μεταφορέα των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} που συμμετέχουν ως δότες γλυκίνης για την σύνθεση των απαραίτητων πενταπεπτιδίων γλυκίνης. Μια συντηρημένη οικογένεια βακτηριακών GTPασών με άγνωστο λειτουργικό ρόλο πιθανότατα περικλείει τον άγνωστο μεταφορέα. Για το λόγο αυτό θα επικεντρωθούμε στην κλωνοποίηση, την υπερέκφραση και τις πιθανές αλληλεπιδράσεις των συγκεκριμένων GTPασών με τα tRNA^{Gly} 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^{Gly} μορίων στη σύνθεση των πενταπεπτιδίων γλυκίνης, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*.

Ο *S. aureus* είναι ένα σημαντικό παθογόνο και ευθύνεται για πολλές σοβαρές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις παγκοσμίως (**Πίνακας 17**), 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 αναπτυγμένων 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 αναδεικνύονται μέσα από γονιδιωματικές αναλύσεις, θα συμβάλλουν στην ανάδειξη νέων εν δυνάμει μοριακών στόχων για εξειδικευμένη και στοχευμένη θεραπεία.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

	1	10	20	30	40	50	60	70
SA1207	MKFTE	LTVT	EFDNF	VQNP	SLESH	YFQVK	ENIVT	RENDG
SAV1375	FEVLL	GIKDD	NNKV	IAASL	FSKIP	TMG	SYVY	
NT09SA1303	MKFTE	LTVT	EFDNF	VQNP	SLESH	YFQVK	ENIVT	RENDG
SAUSA300 1270	FEVLL	GIKDD	NNKV	IAASL	FSKIP	TMG	SYVY	
NT08SA1352	MKFTE	LTVT	EFDNF	VQNP	SLESH	YFQVK	ENIVT	RENDG
SACOL1411	FEVLL	GIKDD	NNKV	IAASL	FSKIP	TMG	SYVY	
NT11SA1252	MKFTE	LTVT	EFDNF	VQNP	SLESH	YFQVK	ENIVT	RENDG
NT05SA1229	FEVLL	GIKDD	NNKV	IAASL	FSKIP	TMG	SYVY	
MW1262	MKFTE	LTVT	EFDNF	VQNP	SLESH	YFQVK	ENIVT	RENDG

	80	90	100	110	120	130	140	
SA1207	YSNRG	PVMDF	SDLGL	VYYL	KKEL	DKYL	QQHQ	CLYV
SAV1375	KLDPY	WLYH	LYDK	DIVPF	EGRE	KNDAL	VNLF	PKSHC
NT09SA1303	YSNRG	PVMDF	SDLGL	VYYL	KKEL	DKYL	QQHQ	CLYV
SAUSA300 1270	KLDPY	WLYH	LYDK	DIVPF	EGRE	KNDAL	VNLF	PKSHC
NT08SA1352	YSNRG	PVMDF	SDLGL	VYYL	KKEL	DKYL	QQHQ	CLYV
SACOL1411	KLDPY	WLYH	LYDK	DIVPF	EGRE	KNDAL	VNLF	PKSHC
NT11SA1252	YSNRG	PVMDF	SDLGL	VYYL	KKEL	DKYL	QQHQ	CLYV
NT05SA1229	KLDPY	WLYH	LYDK	DIVPF	EGRE	KNDAL	VNLF	PKSHC
MW1262	YSNRG	PVMDF	SDLGL	VYYL	KKEL	DKYL	QQHQ	CLYV

	150	160	170	180	190	200	210	
SA1207	YEHGFT	TTEYD	TSSQ	VRWM	GVNL	LEGK	TPE	TLKKT
SAV1375	FDSQR	KRNIN	KA	INYG	VKVR	FLR	DE	FNLF
NT09SA1303	YEHGFT	TTEYD	TSSQ	VRWM	GVNL	LEGK	TPE	TLKKT
SAUSA300 1270	FDSQR	KRNIN	KA	INYG	VKVR	FLR	DE	FNLF
NT08SA1352	YEHGFT	TTEYD	TSSQ	VRWM	GVNL	LEGK	TPE	TLKKT
SACOL1411	FDSQR	KRNIN	KA	INYG	VKVR	FLR	DE	FNLF
NT11SA1252	YEHGFT	TTEYD	TSSQ	VRWM	GVNL	LEGK	TPE	TLKKT
NT05SA1229	FDSQR	KRNIN	KA	INYG	VKVR	FLR	DE	FNLF
MW1262	YEHGFT	TTEYD	TSSQ	VRWM	GVNL	LEGK	TPE	TLKKT

	220	230	240	250	260	270	280	
SA1207	ETERAG	FVSKT	DDYF	YNFID	TYGDK	VLP	LAYID	LD
SAV1375	DEYVL	KLQ	QELN	DKEN	RRD	Q	MMAK	ENK
NT09SA1303	ETERAG	FVSKT	DDYF	YNFID	TYGDK	VLP	LAYID	LD
SAUSA300 1270	DEYVL	KLQ	QELN	DKEN	RRD	Q	MMAK	ENK
NT08SA1352	ETERAG	FVSKT	DDYF	YNFID	TYGDK	VLP	LAYID	LD
SACOL1411	DEYVL	KLQ	QELN	DKEN	RRD	Q	MMAK	ENK
NT11SA1252	ETERAG	FVSKT	DDYF	YNFID	TYGDK	VLP	LAYID	LD
NT05SA1229	DEYVL	KLQ	QELN	DKEN	RRD	Q	MMAK	ENK
MW1262	ETERAG	FVSKT	DDYF	YNFID	TYGDK	VLP	LAYID	LD

	290	300	310	320	330	340	350	
SA1207	IARLDK	QIDHD	QHELL	NA	SEL	SKTDG	ILN	LAG
SAV1375	VYFAN	AYEV	NY	PSGG	SS	SEKYN	Q	FMGP
NT09SA1303	IARLDK	QIDHD	QHELL	NA	SEL	SKTDG	ILN	LAG
SAUSA300 1270	VYFAN	AYEV	NY	PSGG	SS	SEKYN	Q	FMGP
NT08SA1352	IARLDK	QIDHD	QHELL	NA	SEL	SKTDG	ILN	LAG
SACOL1411	VYFAN	AYEV	NY	PSGG	SS	SEKYN	Q	FMGP
NT11SA1252	IARLDK	QIDHD	QHELL	NA	SEL	SKTDG	ILN	LAG
NT05SA1229	VYFAN	AYEV	NY	PSGG	SS	SEKYN	Q	FMGP
MW1262	IARLDK	QIDHD	QHELL	NA	SEL	SKTDG	ILN	LAG

	360	370	380	390	400	410		
SA1207	CFDNG	YDRY	NFYGL	SGD	F	TENS	EDY	GVY
SAV1375	RFRGF	NVQ	IEEL	IGD	FYK	PIHK	VY	WLF
NT09SA1303	CFDNG	YDRY	NFYGL	SGD	F	TENS	EDY	GVY
SAUSA300 1270	RFRGF	NVQ	IEEL	IGD	FYK	PIHK	VY	WLF
NT08SA1352	CFDNG	YDRY	NFYGL	SGD	F	TENS	EDY	GVY
SACOL1411	RFRGF	NVQ	IEEL	IGD	FYK	PIHK	VY	WLF
NT11SA1252	CFDNG	YDRY	NFYGL	SGD	F	TENS	EDY	GVY
NT05SA1229	RFRGF	NVQ	IEEL	IGD	FYK	PIHK	VY	WLF
MW1262	CFDNG	YDRY	NFYGL	SGD	F	TENS	EDY	GVY

Παραπάνω παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της πολλαπλής ομοπαράθεσης της πρωτεΐνης FemB από διάφορα στελέχη του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ClustalW2 από το Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) καθώς και το πρόγραμμα ESPript (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) για την απεικόνιση της ομοπαράθεσης. Η πρωτεΐνη FemB δεν εμφανίζει μεταλλάξεις και σε γενικές γραμμές η αμινοξική της αλληλουχία είναι συντηρημένη. Εξάιρεση αποτελούν οι θέσεις 199, όπου εμφανίζεται σερίνη στη θέση αργινίνης και η θέση 307, όπου παρατηρείται η αντικατάσταση ενός καταλοίπου προλίνης με ένα κατάλοιπο σερίνης. Οι μεταλλάξεις αυτές δεν φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* στην μεθικιλίνη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arbeloa A., Hugonnet J. E., Sentilhes A. C., Josseaume N., Dubost L., Monsempes C., Blanot D., Brouard J. P., Arthur M. (2004) Synthesis of Mosaic Peptidoglycan Cross-bridges by Hybrid Peptidoglycan Assembly Pathways in Gram-positive Bacteria. *J. Biol. Chem.* 279
- Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, and K. Hiramatsu. 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359:1819–1827.
- Barber, M. 1961. Methicillin-resistant staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 14:385–393.
- Berger-Bachi, B., Barberis-Maino, B. L., Strassle, A., and Kayser, F. H. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 219, 263–269
- Berger-Bachi B., Strassle. A., Gustafson. J.E. and Kayser.F.H. (1992) Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1367-1373.
- Berger-Bachi B. and Tschierske (1998)., Role of Fem factors in methicillin resistance. *Drug Resistance Updates.*, 325-335
- 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 glycyl transfer ribonucleic acids active in peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 243: 779-782
- Casadevall, A. (1996) *Clin. Infect. Dis.* 23, 790–794
- de Jonge, B. L., Sidow, T., Chang, Y. S., Labischinski, H., Berger-Bachi, B., Gage, D. A., and Tomasz, A. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 2779–2782
- 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.
- Dove, S. L., Joung, J. K. & Hochschild, A. (1997). Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein–protein contacts. *Nature* 386, 627–630.
- Ehlert, K., Tschierske, M., Mori, C., Schroder, W. & Berger-Bachi, 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.
- Filipe, S. R. & Tomasz, A. (2000). Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4891–4896.
- Ghuysen, J.-M. 1997. Penicillin-binding proteins. Wall peptidoglycan assembly and resistance to penicillin: facts, doubts and hopes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 8:45–60
- Ghuysen, J. M., and R. Hakenbeck (ed.). 1994. *Bacterial cell wall*. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands
- 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.
- Heijenoort van, J. (2001) *Glycobiology* 11, 25R-36R

- 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.
- Hiramatsu, K., L. Cui, M. Kuroda, and T. Ito. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 9:486–493.
- Höltje, J. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 181–203
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5752–5756.
- Ling, B., and Berger-Bächi, B. (1998) Increased overall antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus* femAB null mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 936–938.
- Maidhof, H., Reinicke, B., Blumel, P., Berger-Bächi, B., and Labischinski, H. (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.
- 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.
- Matsuhashi, M., Dietrich, C.P., and Strominger, J.L. (1967) Biosynthesis of the peptidoglycan of the bacterial cell walls. III. The role of soluble ribonucleic acid and of lipid intermediates in glycine incorporation in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 243: 757–767.
- Neu, H. C. (1992) *Science* 257, 1064–1073
- Perl, T. M. (1999) *Am. J. Med.* 106, 48S–52S
- 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.
- Reynolds P.E. and Fuller C. (1986). Methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus*; presence of identical additional penicillin-binding protein in all strains examined. *FEMS Microbiol. Lett.* 33. 251-254.
- Robinson, J. M., J. K. Hardman, and G. L. Sloan. 1979. Relationship between lysostaphin endopeptidase production and cell wall composition in *Staphylococcus staphylolyticus*. *J. Bacteriol.* 137:1158–1164.
- Roche, F.M., Massey, R., Peacock, S.J., Day, N.P., Visai, L., Speziale, P., *et al.* (2003) Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology* 149: 643–654.
- Rogers, H. J.; Perkins, H. R.; Ward, J. B. *Biosynthesis of Peptidoglycan*, Chapman and Hall, Ltd.: London, 1980.
- Rohrer, S., and Berger-Bächi, B. (2003a) FemABX peptidyltransferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 837–846.

- Rohrer S. and Berger- Bächli B. (2003). Application of a bacterial two-hybrid system for the analysis of protein-protein interactions between FemABX family proteins. *Microbiology*, 149, 2733–2738
- Rohrer, S., Ehlert, K., Tschierske, M., Labischinski, H., and Berger-Bächli, B. (1999) The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9351–9356.
- Schleifer, K.H. (1973) Chemical composition of staphylococcal cell walls. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 1, 13-23.
- Schneider, T., Senn, M.M., Berger- Bächli, 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.
- Strandén, A.M., Ehlert, K., Labischinski, H., and Berger-Bächli, 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., Fujiwara, T., Ohta, K., Komatsuzawa, H., Ohara, M. and Suginaka, H. (1997) *epiA*, which encodes glycylglycine 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. & Gotz, F. (1997). Studies on prolystaphin 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.
- Ton-That, H., Labischinski, H., Berger-Bächli, B., and Schneewind, O. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 29143–29149
- Tschierske, M., K. Ehlert, A. M. Strandén, and B. Berger-Bächli. 1997. Lif, the lysostaphin immunity factor, complements FemB in staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 153:261–264.
- Tschierske, M., Mori, C., Rohrer, S., Ehlert, K., Shaw, K. J., and Berger-Bächli, B. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 97–102
- Thumm, G. and Gotz, F. (1997) Studies on prolystaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Mol. Microbiol.* 23, 1251-1265.
- Utsusi Y. and Yokota T. (1985). Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28. 397-403.
- Walsh, C. T., Fisher, S. L., Park, I. S., Prahalad, M., and Wu, Z. (1996) *Chem. Biol.* 3, 21–24
- 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 β -lactam resistance. *FEMS Microbiol Lett* 188, 81–85.

