

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**« ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΕΚΦΡΑΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ  
ΤΗΣ 5-ΜΕΘΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ tRNA ΤΟΥ ΑΡΧΑΙΟΥ *PYROCOCCUS*  
*ABYSSI* - ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ  
5-ΜΕΘΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ tRNA ΣΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *BACILLUS*  
*SUBTILIS*»**

**ΚΑΛΛΙΟΠΗ Μ. ΤΡΑΧΑΝΑ**  
**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΛΑΡΙΣΑ 2004**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**« ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΕΚΦΡΑΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ  
ΤΗΣ 5-ΜΕΘΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ tRNA ΤΟΥ ΑΡΧΑΙΟΥ *PYROCOCCUS*  
*ABYSSI* - ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ  
5-ΜΕΘΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ tRNA ΣΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *BACILLUS*  
*SUBTILIS*»**

**ΚΑΛΛΙΟΠΗ Μ. ΤΡΑΧΑΝΑ**  
**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΛΑΡΙΣΑ 2004**



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

Αριθ. Εισ.: 4063/1

Ημερ. Εισ.: 05-11-2004

Δωρεά: \_\_\_\_\_

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΤΡΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075127

### **Ευχαριστίες:**

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας έλαβε χώρα στο εργαστήριο του Dr. Henri Grosjean στο Εθνικό Κέντρο Ερευνών (Centre National Recherche Scientifique) στο Gif- sur- Yvette, της Γαλλίας υπό την επίβλεψη της κ. Sylvie Auxellien και του κ. Jiaunius Urbonavičius.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σταθόπουλο που με επέλεξε ως υπότροφο Erasmus για την συγκεκριμένη θέση και τον Dr. Grosjean που με δέχθηκε στο εργαστήριο του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Dr. Grosjean για την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια των τριών μηνών και τους επιβλέποντες μου κ. Sylvie Auxellien και κ. Jiaunius Urbonavičius για τις συμβουλές και την υπομονή τους.

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος - Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μαμούρης Ζήσης - Αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Σίμος Γεώργιος - Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

*«Modified nucleotides in RNA are always “pejoratively” called  
“minor nucleotides”  
“odd nucleotides”  
“rare nucleotides”  
“unusual nucleotides”  
“secondary nucleotides”  
“nucleotides in trace amount”  
Only few people (including me and hopefully you?) called them  
important nucleotides  
essential nucleotides  
nucleotides that may play a major role in RNA function  
and thereby in gene expression and regulation.»*

**Henri Grosjean**

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	22
I. ΥΛΙΚΑ .....	23
II. ΜΕΘΟΔΟΙ .....	23
<i>Κλωνοποίηση, έκφραση, καθαρισμός και βιοχημικός έλεγχος της (tRNA) m<sup>5</sup>U54 μεθυλτρανσφεράσης του αρχαίου P. abyssi</i> .....	23
1. Προετοιμασία της αλληλουχίας- στόχου .....	24
2. Προετοιμασία του φορέα κλωνοποίησης .....	27
3. Ένωση του φορέα κλωνοποίησης και της αλληλουχίας- στόχου (Ligation) .....	29
4. Μετασχηματισμός των <i>E. coli</i> XL1 blue με τα προϊόντα συνένωσης (Transformation).....	30
5. Έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	32
6. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος σε πήκτωμα 12% πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (SDS- polyacrilamide electrophoresis) .....	33
7. Καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών .....	34
8. Βιοχημικός έλεγχος των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για την δραστηκότητα τους ως(tRNA) m <sup>5</sup> U54 ΜΤασης .....	35
<i>Ταυτοποίηση της (tRNA) m<sup>5</sup>U54 μεθυλτρανσφεράσης στο βακτήριο Bacillus subtilis</i> .....	36
1. Έλεγχος της τροποποίησης στα στελέχη W168, BFS2838 του <i>B. subtilis</i> και MRE600 του <i>E.coli</i> .....	36
2. Απομόνωση του συνολικού tRNA από τα στελέχη W168 και BFS2838 του <i>B. subtilis</i> .....	38
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	40
<i>Κλωνοποίηση, έκφραση, καθαρισμός και βιοχημικός έλεγχος της (tRNA) m<sup>5</sup>U54 μεθυλτρανσφεράσης του αρχαίου P. abyssi</i> .....	41
<i>Αποτελέσματα των δοκιμών για την ενζυμική δραστηκότητα</i> .....	46
<i>Αποτελέσματα από την HPLC</i> .....	52
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	59

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

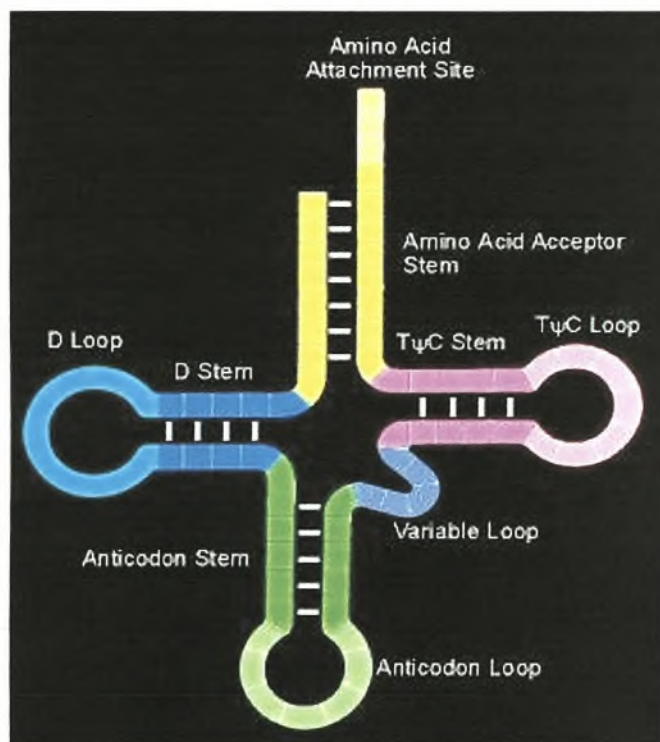
Η μετα-μεταγραφική τροποποίηση 5-μεθυλ-ουρακίλη ( $m^5U$ ) εντοπίζεται στη βρόγχο T (θέση 54) των περισσότερων μορίων tRNA σε οργανισμούς των τριών Βασιλείων (Βακτήρια, Ευκαρύωτες και Αρχαία). Στο γονιδίωμα του αρχαίου *Pyrococcus abyssi* εντοπίζεται ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (PAB0719, Genebank) που κωδικοποιεί την  $m^5U$  μεθυλ-τρανσφεράση των μορίων tRNA. Το συγκεκριμένο πλαίσιο ανάγνωσης εντοπίστηκε λόγω της ομολογίας του με ανάλογα γονίδια στο βακτήριο *Escherichia coli* (*trmA*) και στον ευκαρυώτη *Saccharomyces cerevisiae* (*trm2*). Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας ζεύγος εκκνητών με υψηλή ομολογία προς το 5' και το 3' άκρο της αλληλουχίας-στόχου και συνδέοντας το γονίδιο με ένα φορέα έκφρασης, ο οποίος σε κύτταρα *E.coli* επιτρέπει την έκφραση μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με μοριακό βάρος 49 kDa. Ο καθαρισμός της τελευταίας επιτυγχάνεται με χρωματογραφία συγγένειας. Η δραστηριότητα του ενζύμου ως  $m^5U$  μεθυλ-τρανσφεράση ελέγχεται *in vitro*. Ως συνένζυμο της συγκεκριμένης *in vitro* δοκιμής χρησιμοποιείται η S-αδένινο-L μεθειονίνη (S-adenosyl-L-methionine). Η τροποποίηση  $m^5U$  δεν ανιχνεύεται στα μόρια tRNA του στέλεχους BFS2838 του βακτηρίου *Bacillus subtilis*. Το συγκεκριμένο στέλεχος φέρει μετάλλαξη στο γονίδιο *gid*. Η έλλειψη δραστηριότητας του ενζύμου ανιχνεύεται με δοκιμή *in vitro* χρησιμοποιώντας ως πηγή του ενζύμου κυτταρικό εκχύλισμα από το μεταλλαγμένο στέλεχος BFS2838, ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται κυτταρικό εκχύλισμα από το αγρίου τύπου στέλεχος W168 του *B.subtilis*. Η σύσταση της αντίδρασης περιλαμβάνει μια σειρά από συνένζυμα: τετραφολικό οξύ (THF), ανηγμένη μορφή του φλάβινο-αδένινο-δινουκλεοτιδίου (FADH<sub>2</sub>) και ανηγμένη μορφή φωσφορικού νικοτινάμινο-αδένινο-δινουκλεοτιδίου (NADPH).

## ABSTRACT:

The posttranscriptional enzymatic modification 5-methyluracil ( $m^5U$ ) is found in the T-loop (position 54) of many tRNAs from all the three kingdoms (Bacteria, Eukaryotes and Archaea). The Open Reading Frame (ORF) PAB0719 encoding the (tRNA)  $m^5U54$  methyl-transferase of the strictly anaerobic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi* has been identified by sequence similarity with *trmA* gene of *Escherichia coli* and *trm2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. The gene was cloned by PCR using 5'- and 3'- part probes of the corresponding ORF and the recombinant protein with an apparent molecular mass of 49kDa was expressed into an *E.coli* expression vector. The recombinant enzyme was tested *in vitro* with supplement S-adenosyl-L-methionine for its activity as (tRNA)  $m^5U54$  methyl-transferase uses unmodified yeast tRNA transcript. Moreover, in protein extract of strain BFS2838 of *Bacillus subtilis* (Gram positive bacterium) is not detected  $m^5U$ . Strain BFS2838 has a mutation in the *gid* gene due to insertional mutagenesis. The reaction takes place using tetrahydrofolate and reduced Flavino-Adenino Dinucleotide (FADH<sub>2</sub>) and Nicotinamino-Adenino Dinucleotide Phosphate (NADPH). A folate-dependent presentation of (tRNA) $m^5U54$  modification is detected in wild type (W168) *Bacillus subtilis* cells, in contrast with the absence of the particular modification in mutant (BFS2838) cells establishing the *gid* gene as essential gene in  $m^5U54$  biosynthesis of *Bacillus subtilis*.

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

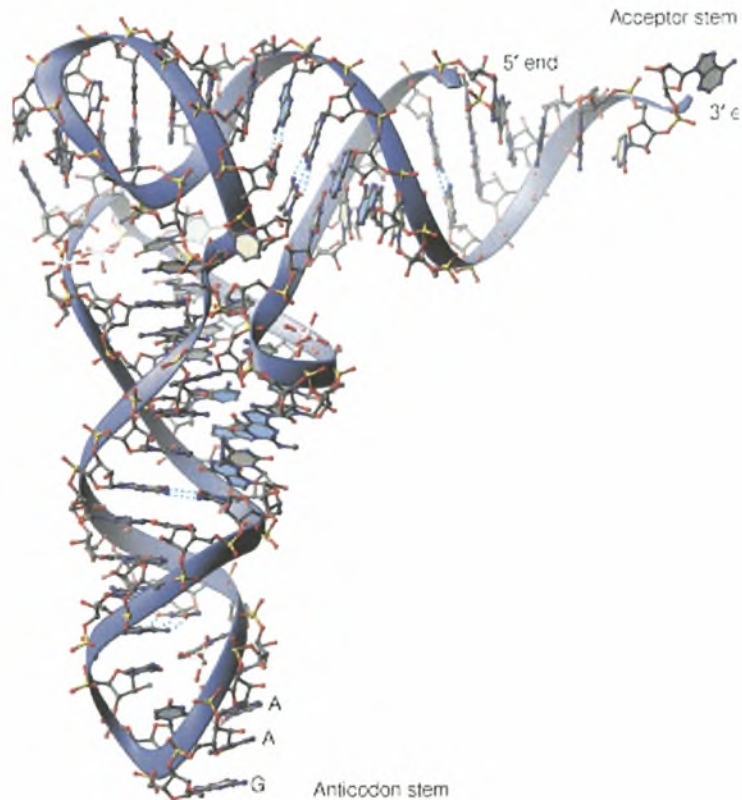
Το Κεντρικό Δόγμα της Βιολογίας προτείνει ότι η γενετική πληροφορία, που αποθηκεύεται στο μόριο του DNA, μεταγράφεται σε ένα μόριο RNA (μηνυματοφόρο RNA/ messenger RNA/ mRNA) και στη συνέχεια μέσω της διαδικασίας της μετάφρασης γίνεται η αποκωδικοποίηση της πληροφορίας από το mRNA σε πεπτιδική αλληλουχία. Σύμφωνα με την «Υπόθεση προσαρμογής», που πρότεινε ο Francis Crick το 1958, ένα προσαρμοστικό μόριο (adaptor molecule) εμπλέκεται στη διαδικασία της μετάφρασης. Αυτό το προσαρμοστικό μόριο ονομάζεται σήμερα μεταφορικό RNA (transfer RNA/ tRNA) και συμμετέχει στη μετάφραση της γενετικής πληροφορίας μεταφέροντας τα αμινοξέα στο ριβόσωμα για τη σύνθεση των πεπτιδίων. Η βασική αλληλουχία ενός μορίου tRNA προσδιορίστηκε αρχικά από τον Robert Holley το 1965. Η δευτερογενής διάταξη του μορίου απεικονίζεται με την μορφή τριφυλλιού (εικόνα 1), και η τριτοταγής δομή του, που προσδιορίστηκε πρώτη φορά το 1974, αντανακλά το ρόλο του ως προσαρμοστικό μόριο.



Εικόνα 1: Τα μόρια tRNA έχουν πολλά κοινά δομικά χαρακτηριστικά, ώστε κάθε ένα από αυτά να μπορεί να διεκπεραιώσει το ρόλο του στη διαδικασία της μετάφρασης. Σε αυτή την εικόνα παρουσιάζεται η δευτεροταγής δομή του tRNA μορίου, η γνωστή δομή του τριφυλλιού. Κάθε διακριτό τμήμα του μορίου χρωματίζεται διαφορετικά και διακρίνονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζουν τους βραχίονες του μορίου.

Το ζευγάρι των βάσεων στο πρότυπο δομής τριφυλλιού, το οποίο έχει συνταχθεί με βάση την αλληλουχία, επιβεβαιώνεται ότι είναι σωστό μετά την ανάλυση της τρισδιάστατης δομής του μορίου.

Από την ανάλυση της τρισδιάστατης δομής, με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας, το μόριο του tRNA εμφανίζεται με δομή σχήματος L (εικόνα 2). Υπάρχουν δυο τμήματα του μορίου που έχουν δομή διπλής έλικας και είναι κάθετα μεταξύ τους. Οι περισσότερες από τις βάσεις εντός των μη ελικοειδών περιοχών συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου· οι τελευταίοι συχνά αναπτύσσονται και μεταξύ μη συμπληρωματικών βάσεων. Δύο περιοχές αζευγάρωτων νουκλεοτιδίων εντοπίζονται στα δύο άκρα της δομής του σχήματος L: το άκρο CCA που περιέχει την θέση δέσμευσης του αμινοξέος και ο βρόχος του αντικωδικίου. Οι βρόχοι DHU και TψC σχηματίζουν την γωνία του σχήματος L.

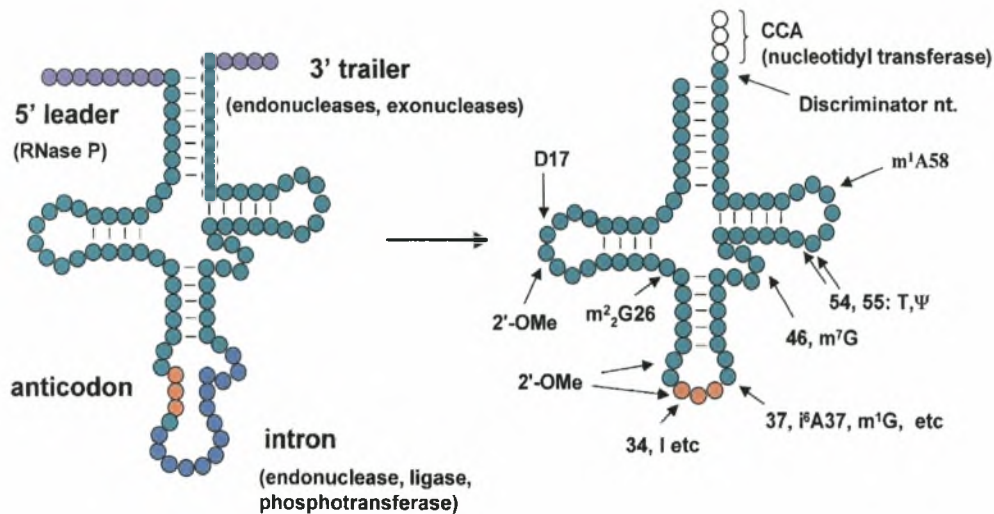


Εικόνα 2: Η τριτοταγής δομή του μορίου, διαμόρφωση σχήματος L, αντικατοπτρίζει την ιδιότητα του μορίου tRNA ως μόριο-προσαρμοστή. Στο πάνω τμήμα του μορίου, στο 3' άκρο, διακρίνεται η θέση δέσμευσης του αμινοξέος, ενώ στη βάση του μορίου σχηματίζεται ο βρόχος του αντικωδικονίου. Οι δύο αυτές περιοχές δεν σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με άλλες βάσεις του μορίου.

Τα πρωτογενή μετάγραφα των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA για να εκπληρώσουν τον βιολογικό τους ρόλο θα πρέπει να ωριμάσουν. Η διαδικασία αυτών των διαδοχικών αλλαγών περιγράφεται περιληπτικά ως:

- Απομάκρυνση του 5' άκρου μέσω της δράσης του ενζύμου RNase P
- Απομάκρυνση του 3' άκρου με συνδυασμένη δράση ένδο- και εξωνουκλεασών.
- Προσθήκη της ακολουθίας CCA στο 3' άκρο στους ευκαρυώτες, σε πολλά βακτήρια και σε κάποια αρχαία.

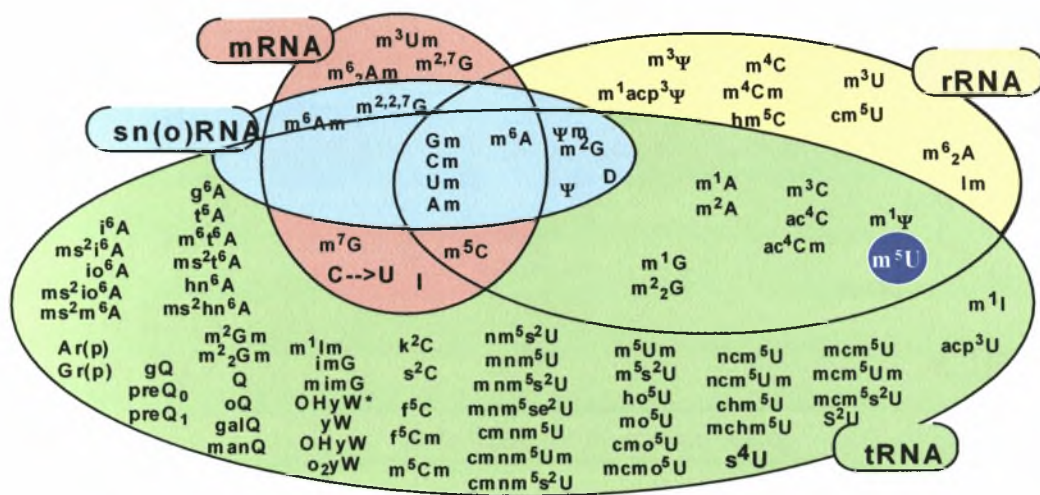
- Μάτισμα των ιντρονίων από τα tRNA μετάγραφα σε πολλούς (αν όχι σε όλους) ευκαρυώτες και σε κάποια αρχαία και
- Πολυάριθμες τροποποιήσεις σε νουκλεοτίδια του μορίου. (εικόνα 3)



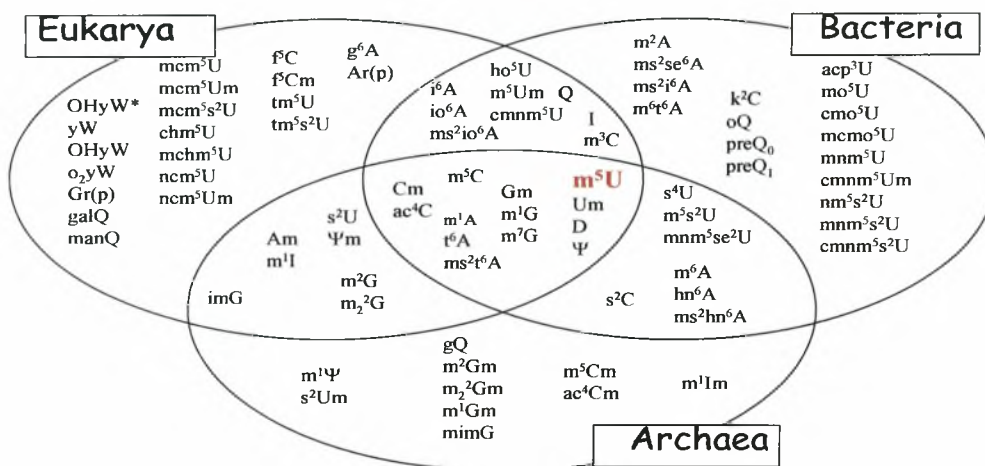
Εικόνα 3: Η σύνοψη των μεταβολών που γίνονται στο πρωτογενές μετάγραφο των μορίων tRNA (αριστερά) σε ένα ευκαρυωτικό οργανισμό, ενδεχομένως και ένα αρχαίο. Κάθε νουκλεοτίδιο παρουσιάζεται σαν κύκλος: το τμήμα του ώριμου tRNA χρωματίζεται πράσινο, το 3' και 5' άκρο που αποκόπτεται: μοβ, τα ιντρόνια: μπλε και το αντικωδικόνιο: κόκκινο. Οι πιο συνηθισμένες τροποποιήσεις υποδεικνύονται στο ώριμο πλέον μόριο tRNA.

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το βήμα της μετά-μεταγραφικής ενζυμικής τροποποίησης των μορίων tRNA, δεδομένου της πληθώρας των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων που ανιχνεύονται στα φυσικά μόρια tRNA. Όλα τα είδη RNA μορίων περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό τροποποιημένων νουκλεοτιδίων (εικόνα 4), αλλά η μεγαλύτερη ποικιλία ανιχνεύεται στο μόριο tRNA. Ο συνολικός αριθμός των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων στα μόρια tRNA είναι 80, εκ των οποίων 43 εντοπίζονται στο βασίλειο των Βακτηρίων (16 από αυτά είναι μοναδικά σε αυτό το βασίλειο), 47 στο βασίλειο των Ευκαρυωτών (21 μοναδικά) και 36 στο βασίλειο των Αρχαίων (9 μοναδικά) (εικόνα 5).

Οι τροποποιήσεις κατατάσσονται σε απλές, όπως είναι η μεθυλίωση της αζωτούχου βάσης ή της ριβόζης, η ισομερίωση, η απαμίνωση και η αναγωγή της αζωτούχου βάσης, και σε σύνθετες, όπως η προσθήκη ομάδων στη βάση ή/και στη ριβόζη (εικόνα 6). Ο αριθμός μετά το όνομα της τροποποίησης δηλώνει το νουκλεοτίδιο του μορίου tRNA που τροποποιήθηκε. Οι σύνθετες τροποποιήσεις όπως φαίνεται παρακάτω λαμβάνουν χώρα συνήθως στη τριπλέτα του αντικωδικονίου (θέση 34) ή δίπλα σε αυτή (θέση 37).

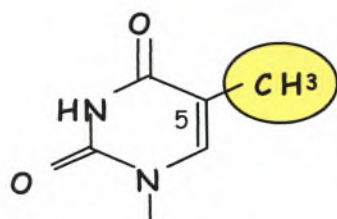


Εικόνα 4: Όλα τα μόρια RNA φέρουν τροποποιήσεις στο μόριο τους, εντούτοις η μεγαλύτερη ποικιλία και ο αριθμός τροποποιήσεων ανιχνεύεται στα μόρια tRNA. Υπάρχουν τροποποιήσεις που εμφανίζονται σε πάνω από ένα είδος RNA, όπως η μεθυλίωση του άνθρακα 5 στο μόριο της ουρακίλης (τροποποίηση m<sup>5</sup>U). Η συγκεκριμένη τροποποίηση εμφανίζεται και στο μόριο του tRNA (θέση 54) στους περισσότερους οργανισμούς και στο μόριο 16S rRNA (θέση 747 και θέση 1939) του βακτηρίου *E.coli*.

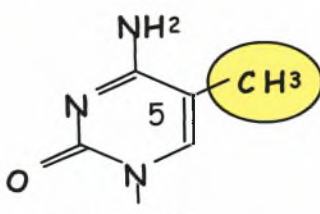


Εικόνα 5: Το σύνολο των τροποποιήσεων του μορίου tRNA για τα τρία φυλογενετικά βασίλεια. Κάποιες τροποποιήσεις παρουσιάζονται και στα τρία βασίλεια, όπως η τροποποίηση m<sup>5</sup>U, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ως σταθερές.

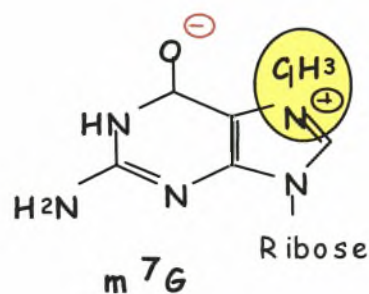
ΑΠΛΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ



Ribose  
m<sup>5</sup>U = T



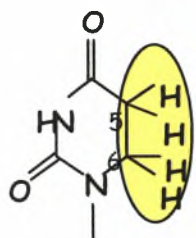
Ribose  
m<sup>5</sup>C



Ribose

m<sup>7</sup>G

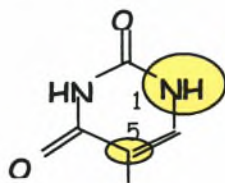
Μεθυλίωση της αζωτούχου βάσης



Ribose

D

Αναγωγή της  
αζωτούχου βάσης

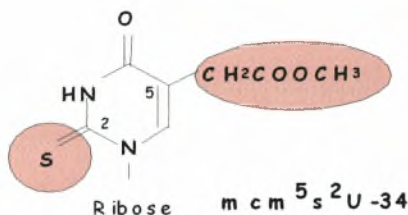


Ribose

Y

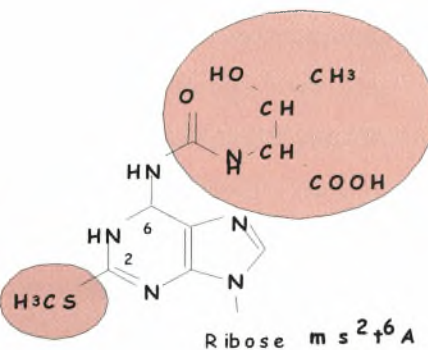
Ισομερίωση της  
αζωτούχου βάσης

ΣΥΝΘΕΤΕΣ  
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

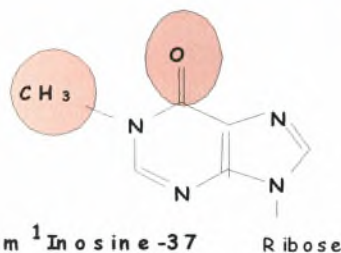


Ribose

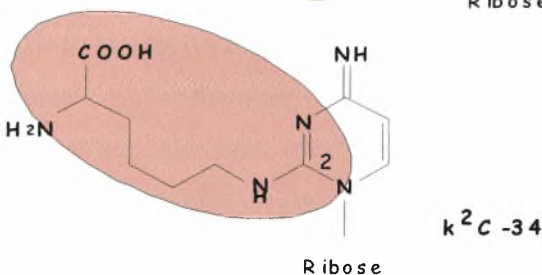
m<sup>cm</sup>5<sub>s</sub><sup>2</sup>U -34



Ribose m<sup>s</sup>2<sup>t</sup>6A



m<sup>1</sup>Inosine-37  
Ribose



Ribose

k<sup>2</sup>C -34

Εικόνα 6: Οι παραπάνω τροποποιήσεις χαρακτηρίζονται ως κοινές λόγω της παρουσίας τους σε όλα τα βακτήρια. Είναι τα πιο τυπικά παραδείγματα μετά-μεταγραφικών τροποποιήσεων. Με κίτρινο και κόκκινο κύκλο σημαίνονται οι αλλαγές στο μόριο του νεοκλεοτιδίου κατά τις απλές και σύνθετες τροποποιήσεις, αντίστοιχα.

Κάθε μετα-μεταφραστική τροποποίηση έχει τον δικό της ρόλο στην λειτουργικότητα του tRNA, λόγω της διαφοράς μεταξύ των χημικών δομών τους, της παρουσίας τους σε διαφορετικούς τύπους μορίων tRNA και σε διαφορετικές θέσεις στο μόριο του και της επίδρασής τους στις ποικίλες αντιδράσεις που λαμβάνει μέρος το tRNA. Γενικά, τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια σταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων των μορίων tRNA. Εντούτοις πειράματα *in vitro* έχουν αποδείξει ότι ένα μη τροποποιημένο μόριο tRNA είναι εξίσου λειτουργικό. Η ενίσχυση των δεσμών υδρογόνου, η βελτιστοποίηση της επιστοιβάξης των βάσεων (base stacking) και η δημιουργία επιπρόσθετων θέσεων δέσμευσης των μετάλλων (π.χ.  $Mg^{+2}$ ) είναι ιδιότητες που προσδίδουν τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια στα μόρια tRNA, με τελικό αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα των μορίων στη θερμική μετουσίωση.

Βασικά, τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια έχουν επιλεχθεί κατά την εξέλιξη για την ακριβή διεξαγωγή της μετάφρασης. Οι τροποποιήσεις του μορίου tRNA βοηθούν στην αναγνώρισή του από τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες για την προσθήκη του αμινοξέος στο 3' άκρο, από τον EF1a για το σχηματισμό του τριαδικού συμπλέγματος με το αμινοακυλιωμένο tRNA μόριο και το GTP, από στοιχεία του ριβοσώματος και άλλους βοηθητικούς παράγοντες της μετάφρασης. Τέλος, είναι εξίσου σημαντικές για την ακρίβεια της μετάφρασης καθορίζοντας την επιλογή του κωδικονίου και ελέγχοντας το πλαίσιο ανάγνωσης (reading frame). Πιο συγκεκριμένα, έχουν εξετασθεί πολλά παραδείγματα που η παρουσία ενός τροποποιημένου νουκλεοτιδίου επηρεάζει θετικά ή αρνητικά την αλληλεπίδραση μιας αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης με το μόριο tRNA. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της λυσιδίνης (Lysidine,  $k^2C$ ) στο βακτήριο *E.coli*: η παρουσία αυτής στη θέση 34 του μορίου tRNA για το αμινοξύ ισολευκίνης (Ile) επηρεάζει θετικά την αλληλεπίδραση του μορίου tRNA με την αντίστοιχη συνθετάση, ενώ αλληλεπιδρά αρνητικά με τη συνθετάση του Met (μεθειονίνη)- tRNA. Στην πρώτη περίπτωση δρα ως θετικός καθοριστής (determinant), ενώ στη δεύτερη ως αρνητικός (anti-determinant). Γενικά, οι τροποποιήσεις που επηρεάζουν την αμινοακυλίωση είναι εκείνες που εντοπίζονται στο βρόγχο του αντικωδικονίου. Σχετικά με την αλληλεπίδραση των τροποποιημένων μορίων tRNA με παράγοντες επιμήκυνσης της μετάφρασης (EFs) υπάρχουν αποτελέσματα μετά από μελέτες σε μύκητες και φυτά. Οι τροποποιήσεις που επηρεάζουν αυτή την αλληλεπίδραση εντοπίζονται κυρίως στον βρόγχο *TψC* και συγκεκριμένα παρεμποδίζουν την αλληλεπίδραση των παραγόντων επιμήκυνσης με τα εναρκτήρια μόρια tRNA της μεθειονίνης· πρόκειται ουσιαστικά για έναν αρνητικό καθορισμό. Τέλος, τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια καθορίζουν τη σωστή αλληλεπίδραση μεταξύ κωδικονίου-αντικωδικονίου και σε αυτή την περίπτωση οι κρίσιμες τροποποιήσεις βρίσκονται στις θέσεις 34 και 37 (βρόγχος αντικωδικονίου). Έχουν μελετηθεί αρκετές περιπτώσεις «παραβίασης» του γενετικού κώδικα λόγω απουσίας ή/και παρουσίας τροποποιήσεων σε αυτές τις θέσεις (Urbonavičius, 2001).

Το πρότυπο (τύπος και θέση) της εμφάνισης των νουκλεοτιδικών τροποποιήσεων εξαρτάται από το μετάγραφο του μορίου tRNA (το tRNA<sup>asp</sup> εμφανίζει διαφορετικές τροποποιήσεις από το tRNA<sup>phe</sup>), από το είδος από το οποίο προέρχεται το μόριο tRNA και εάν πρόκειται για tRNA που δρα στο κυτταρόπλασμα ή σε κάποιο οργανίδιο. Κάποιες από τις τροποποιήσεις αναφέρονται ως σταθερές,



λόγω της παρουσίας τους σε όλα τα φυλογενετικά βασίλεια καθώς και σε συγκεκριμένες θέσεις στο μόριο tRNA. Σίγουρα, μια διατηρημένη τροποποίηση θα έχει κάποιο ιδιαίτερο ρόλο στη λειτουργία του μορίου. Μία από αυτές τις σταθερές τροποποιήσεις είναι η μεθυλίωση του άνθρακα 5 της ουρακίλης στη θέση 54 (βρόχος TψC) του μορίου tRNA (συντομογραφικά (tRNA) m<sup>5</sup>U54), που εμπειρικά ονομάζεται και ριβοθυμίνη (rT) (εικόνα 5). Η παρουσία της τροποποίησης m<sup>5</sup>U54 σταθεροποιεί το μόριο του tRNA, όπως προκύπτει από αναλύσεις NMR (Davanloo et al. 1979). Πιο συγκεκριμένα, το τροποποιημένο νουκλεοτίδιο m<sup>5</sup>U54 εμπλέκεται στην τριτοταγή διαμόρφωση του μορίου tRNA μέσω αλληλεπίδρασης ζεύγους Hoogsteen με την αδενίνη στη θέση 58 (A58) (Kim et al., 1972). Αντικατάσταση του τροποποιημένου νουκλεοτιδίου με αδενίνη (A54) επιτρέπει το σχηματισμό ζεύγους Watson-Crick με την ουρακίλη στη θέση 60 (U60) αλλάζοντας πλήρως την τριτοταγή δομή του μορίου tRNA.

Η τροποποίηση m<sup>5</sup>U54 παρουσιάζεται σε όλα τα είδη tRNA του *E.coli*, όπως και στα περισσότερα βακτήρια. Φυσικά, υπάρχουν και εξαιρέσεις, όπως κάποια στελέχη *Mycoplasma*, τα οποία στερούνται ολοκληρωτικά αυτήν την τροποποίηση. Υπάρχουν συγκεκριμένα μόρια tRNA βακτηρίων που αντί για m<sup>5</sup>U54 περιέχουν μη τροποποιημένη U, π.χ. το tRNA<sup>gly</sup> από τον *Staphylococcus epidermis* και το εναρκτήριο tRNA<sup>met</sup> από τους *Streptomyces griseus* and *Mycoplasma smegmatis*. Επιπλέον στα ακραία θερμοφιλά, όπως το βακτήριο *Thermus thermophilus*, ανιχνεύεται μια επιπλέον θειϊκή ομάδα στην ήδη υπάρχουσα m<sup>5</sup>U, δηλαδή τελικά m<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U, στα tRNA<sup>le</sup> και εναρκτήριο tRNA<sup>met</sup>.

Όσον αφορά το βασίλειο των αρχαίων παρουσιάζονται διάφορες τροποποιήσεις στη θέση 54 του μορίου tRNA. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι σήμερα μόνο στα *Pyrococcales* αρχαία, π.χ. *Pyrococcus furiosus*, έχει ανιχνευτεί m<sup>5</sup>U54 (Constantinesco, 1999), σε αντίθεση με τα περισσότερα αρχαία στα οποία εντοπίζεται η τροποποίηση m<sup>1</sup>Ψ σε αυτή τη θέση. Εξαιρέση αποτελούν τα μόρια tRNA<sup>gly</sup> και tRNA<sup>asn</sup> του *Methanobacterium thermophilus*, tRNA<sup>his</sup> και tRNA<sup>gln</sup> του *Halobacterium volcanii* που περιέχουν Ψ, ενώ στο εναρκτήριο tRNA<sup>met</sup> του *Sulfolobus acidocaldarius* εντοπίζεται U<sub>m</sub>. Μια ιδιαίτερα σημαντική παρατήρηση σχετίζεται με την διάταξη στο χώρο της μεθυλικής ομάδας που προστίθεται κατά τις τροποποιήσεις m<sup>1</sup>Ψ54 και m<sup>5</sup>U54. Η μεθυλομάδα αυτή έχει την ίδια σχετική θέση με τον φωσφοσακχαρικό σκελετό του μορίου · μια μαρτυρία ενδεχομένως ότι πρόκειται για μια κρίσιμη τροποποίηση του μορίου tRNA. Τέλος, η m<sup>5</sup>U54 ανιχνεύεται και στα ευκαρυωτικά μόρια tRNA. Έχει αποδειχθεί ότι όλα τα είδη tRNA του *Saccharomyces cerevisiae* φέρουν την τροποποίηση m<sup>5</sup>U54, με εξαίρεση το κυτοπλασματικό εναρκτήριο tRNA<sup>met</sup>.

Το πρώτο γονίδιο, που κλωνοποιήθηκε, υπεύθυνο για παραγωγή μίας (tRNA) m<sup>5</sup>U54 μεθυλτρανσφεράση (συν/κά ΜΤαση) είναι το trmA που τοποθετείται στο 89 λεπτό του χρωμοσωμικού χάρτη του *E.coli* (Ny and Björk, 1980). Το πολυπεπτιδικό προϊόν του γονιδίου έχει μοριακό βάρος 42kDa (Gu and Santi, 1991). Οι τελευταίοι εφαρμόζοντας χρωματογραφία σε στήλη κυταρίνης-DEAE για την απομάκρυνση των νουκλεϊκών οξέων και στη συνέχεια χρωματογραφία σε στήλη φωσφορικής κυταρίνης (phosphocellulose chromatography) κατάφεραν την απομόνωση ενεργού ενζύμου με το παραπάνω μοριακό βάρος. Μια σημαντική πληροφορία είναι ότι μετά την κλωνοποίηση του γονιδίου

trmA και την επαγωγή της έκφρασης του μόνο το 50% της εκφραζόμενης πρωτεΐνης υπήρχε σε διαλυτή μορφή. Η εξήγηση της παραπάνω παρατήρησης ήρθε μέσα από τα πειράματα των Gustafsson και Björk (1993). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ερευνών τους, το ένζυμο εμφανίζεται *in vivo* είτε ως απλό πολυπεπτιδίο των 42kDa, είτε ως σύμπλοκο με το rRNA ομοιοπολικά (54kDa). Η ανακάλυψη αυτή πραγματοποιήθηκε λόγω του διαφορετικού πειραματικού πρωτοκόλλου καθαρισμού που χρησιμοποίησαν. Μετά την αλληλούχηση και την ανάλυση με Southern blot το rRNA ταυτοποιήθηκε με μια υποομάδα υπο-τροποποιημένων μορίων tRNA και το 3' άκρο της 16s rRNA. Ο ομοιοπολικός δεσμός δεν επιδρά στη δραστικότητα του ενζύμου.

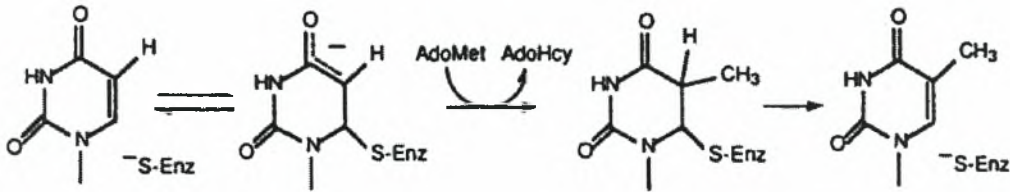
Πέρα από την μεθυλτρανσφεράση που κωδικοποιείται από το γονίδιο trmA στο βακτήριο *E.coli*, έχουν κλωνοποιηθεί δύο επιπλέον μεθυλτρανσφεράσες από το ίδιο βακτήριο, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την τροποποίηση m<sup>5</sup>U στο μόριο του rRNA. Τα υπεύθυνα γονίδια ονομάζονται ybiF και ygcA και τα πολυπεπτιδικά προϊόντα τροποποιούν την ουρακίλη στη θέση 747(περιοχή II) και την ουρακίλη στη θέση 1939 (περιοχή IV) στο 16 rRNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας.

Από την άλλη, η τροποποίηση αυτή δεν εμφανίζεται στο μόριο του rRNA σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, π.χ. στον *Saccharomyces cerevisiae*. Στον τελευταίο, το υπεύθυνο γονίδιο για την κωδικοποίηση της (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάσης είναι το trm2. Το εν λόγω γονίδιο αποτέλεσε μια εξαιρετικά δύσκολη περίπτωση ταυτοποίησης, αφού το αναγνωστικό πλαίσιο στο οποίο αντιστοιχεί είχε ταυτοποιηθεί ως γονίδιο ενδονουκλεάσης (yNucR endo-exonuclease). Η αλληλούχηση του γονιδίου έδειξε ομοιότητα της ακολουθίας με το ομόλογο γονίδιο του *E.coli* που περιορίζεται στο καρβόξυ- τελικό άκρο των δύο πρωτεϊνών. Η κλωνοποιημένη ακολουθία που προφανώς κωδικοποιούσε την (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάση του *Saccharomyces cerevisiae* εμφάνιζε τέσσερα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames:ORFs) δυσκολεύοντας την εύρεση του μοριακού βάρους και των ιδιοτήτων του ενζύμου. Μετά από έλεγχο όλων των προϊόντων που κωδικοποιούνται από τα ORFs κατέληξαν στο ότι το μοριακό βάρος της (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάσης στη ζύμη είναι 64,2kDa και η κωδικοποίηση του ενζύμου ξεκινά από το τρίτο κωδικόνιο έναρξης που εντοπίζεται στην ακολουθία. (Nordlund, 2000)

Ως υπόστρωμα τόσο του ευκαρυωτικού (Knapp et al., 1978), όσο και του προκαρυωτικού ενζύμου (Schaefer, 1973) είναι πρωτογενή μετάγραφα των γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια tRNA στο πρώιμο στάδιο της ωρίμανσης τους. Χαρακτηριστικά ο Knapp ανιχνεύει την τροποποίηση m<sup>5</sup>U54 ενώ δεν έχει ολοκληρωθεί το μάτισμα του ευκαρυωτικού μορίου tRNA και υποστηρίζει ότι η δράση του ενζύμου εντοπίζεται στον πυρήνα.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης διευκρινίστηκε από τον Kealey (1991). Βάση του μηχανισμού που πρότεινε η (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάση καταλύει τη μεταφορά μίας μεθυλικής ομάδας από το συνένζυμο S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη (S-adenosyl- L- methionine; AdoMet) στον άνθρακα 5 της ουρακίλης στη θέση 54 του μορίου tRNA. Μελετήθηκε η στερεοχημεία της αντίδρασης χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικά στερεομερή του συνενζύμου AdoMet και μόρια tRNA που απουσίαζε η τροποποίηση m<sup>5</sup>U στη θέση 54. Μετά από ανάλυση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων m<sup>5</sup>U54 βρέθηκε ότι η αντίδραση πραγματοποιείται σε δύο βήματα.

Αρχικά η θειική ομάδα από το αμινοξύ κυστεΐνη, κατάλοιπο 324 του ενζύμου, αντιδρά με τον άνθρακα 6 της ουρακίλης στη θέση 54 του μορίου tRNA δημιουργώντας ένα πυρηνόφιλο κέντρο (εικόνα 7). Έπειτα, η μεθυλική ομάδα από το συνένζυμο AdoMet μεταφέρεται στον άνθρακα 5 της ουρακίλης 54 και μέσω β-απόσπασης (β-elimination) παράγεται το μεθυλιωμένο νουκλεοτίδιο m<sup>5</sup>U και απελευθερώνεται το ένζυμο.



Εικόνα 7: Ο μηχανισμός κατάλυσης του ένζυμου (tRNA) m<sup>5</sup>U54 Μτάση με τη βοήθεια του συνενζύμου AdoMet .

Η τροποποίηση m<sup>5</sup>U54, όπως προαναφέρθηκε, είναι σχεδόν πάντοτε παρούσα στο βρόγχο *TψC* στη θέση 54, πράγμα που υποδηλώνει ότι έχει κρίσιμο ρόλο. Η παρουσία της m<sup>5</sup>U54 επηρεάζει *in vitro* την πιστότητα και το ρυθμό της πρωτεϊνοσύνθεσης, όπως και την σταθερότητα της δομής του μορίου tRNA στο *E.coli* (Davanloo et al., 1979; Kersten et al, 1981). Η ομάδα του Kersten μελέτησε την επιρροή της τροποποίησης m<sup>5</sup>U54 στα μόρια tRNA<sup>Phe</sup> και tRNA<sup>Lys</sup> που απομόνωσε από στελέχη K12 του βακτηρίου *E.coli* και από τον άγριο τύπο του βακτηρίου.

Από την άλλη πλευρά, ήταν αρκετά δύσκολο να διευκρινιστεί ο *in vivo* ρόλος αυτής της τροποποίησης. Ένα μεταλλαγμένο στέλεχος του *E.coli* (*ttnA5*), από το οποίο απουσιάζει εντελώς η τροποποίηση m<sup>5</sup>U54, έχει απομονωθεί και ο μόνος ανιχνεύσιμος φαινότυπος *in vivo* ήταν μια ελάττωση του ρυθμού αύξησης, περίπου 4%. Επιπλέον, η ύπαρξη μικροοργανισμών (π.χ. *Mycoplasma*) που δεν φέρουν αυτή την τροποποίηση, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος της περιορίζεται στην σταθεροποίηση των μετάγραφων tRNA και στην ακρίβεια της μετάφρασης. Η υπόθεση αυτή ανατρέπεται όταν έγινε η προσπάθεια δημιουργίας στελεχών *E.coli* με παρένθεση στο αρχικό τμήμα του γονιδίου. Τα τελευταία δεν είναι βιώσιμα. Αυτό υποδηλώνει ότι η τροποποίηση m<sup>5</sup>U54 δεν είναι αναγκαία για την βιωσιμότητα του κυτάρου, σε αντίθεση με το γονίδιο *ttnA*. Είναι πιθανόν το μετάγραφο ή η πρωτεΐνη έχει διπλή λειτουργία στα κύτταρα του *E.coli* (Persson et al, 1992).

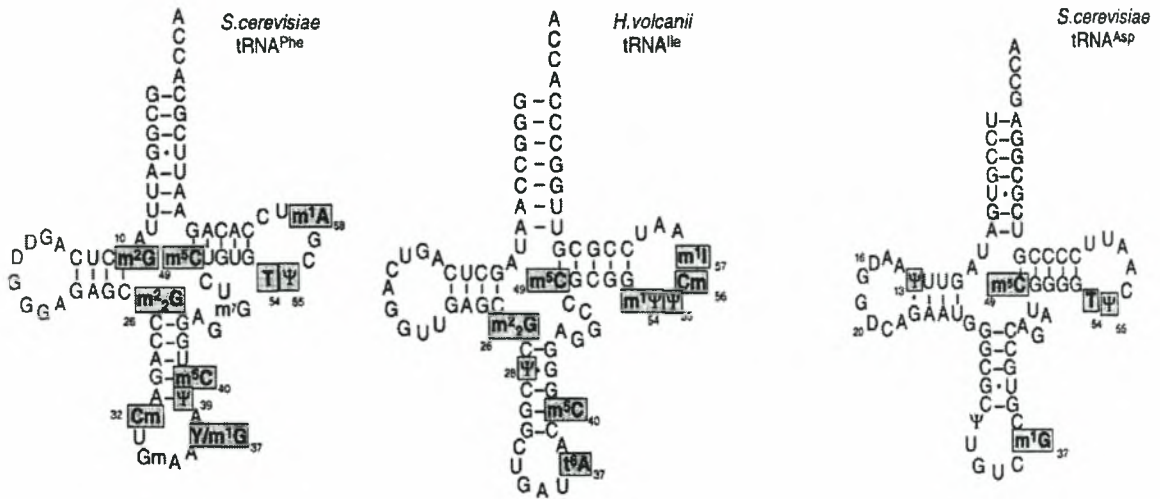
Πιο δύσκολα πιστοποιήθηκε η *in vivo* λειτουργία του γονιδίου και της πρωτεΐνης *ttn2* στον ευκαρυώτη *Saccharomyces cerevisiae*, λόγω της δυσκολίας της κλωνοποίησης του γονιδίου. Στελέχη του *S.cerevisiae* στα οποία απουσίαζε η τροποποίηση (tRNA) m<sup>5</sup>U54, που είχαν ανιχνευτεί από την Hopper (1982), ήταν βιώσιμα χωρίς καμία αλλαγή στο φαινότυπο. Η ανακάλυψη όμως του Persson για το γονίδιο *ttnA* δημιουργούσε ερωτηματικά για την αναγκαιότητα του ίδιου του γονιδίου (*ttn2*) και όχι της τροποποίησης στα κύτταρα της ζύμης. Απαλοιφή λοιπόν του γονιδίου *ttn2* έδειξε ότι το γονίδιο που

κωδικοποιεί την (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάση του *S. cerevisiae* δεν είναι αναγκαίο για την ανάπτυξη του οργανισμού. Στελέχη που δε φέρουν το γονίδιο είναι βιώσιμα χωρίς προβλήματα ανάπτυξης (Johansson et Bystrom, 2002). Παρ' όλα αυτά η πρωτεΐνη trm2 (ptrm2) είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη μεταλλαγμένων στελεχών της ζύμης για το γονίδιο sup61, το οποίο είναι υπεύθυνο για την μεταγραφή του tRNA<sup>Ser</sup> για το κωδικόνιο CGA και έχει χαρακτηριστεί ως αναγκαίο (essential) για την ανάπτυξη της ζύμης. Τέσσερα λοιπόν στελέχη, που φέρουν μια σημειακή μετάλλαξη στο συγκεκριμένο γονίδιο, παρουσιάζουν μειωμένο ρυθμό ωρίμανσης του μορίου tRNA<sup>Ser</sup> απουσία της ptrm2.

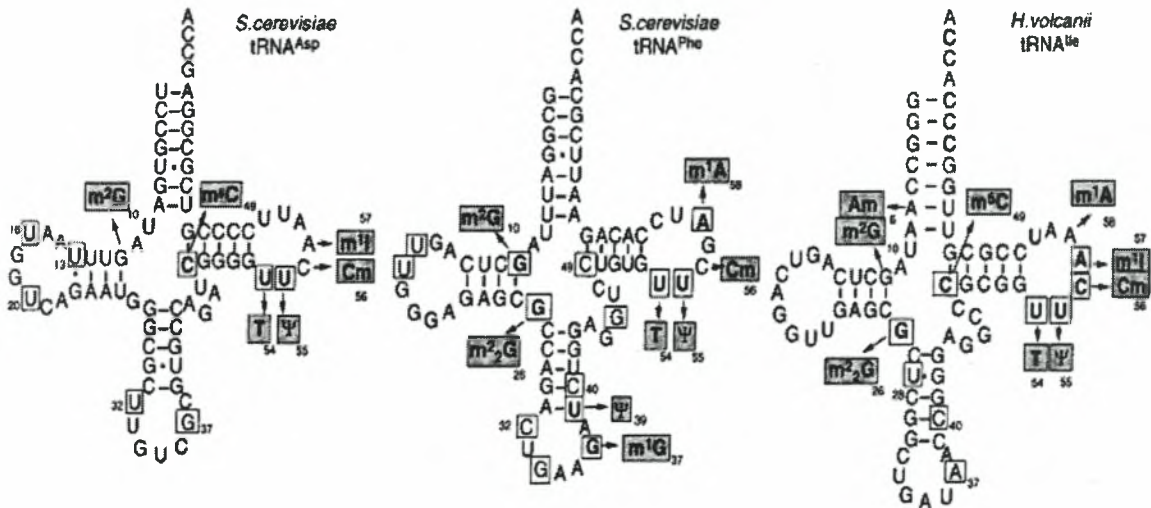
Παρά τις εκτεταμένες έρευνες για την (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάση των Gram αρνητικών βακτηρίων (π.χ. *E. coli*) και των ευκαρυωτών (π.χ. *S. cerevisiae*) τα τροποποιητικά ένζυμα με την ίδια λειτουργία για τους οργανισμούς όπως τα Gram θετικά βακτήρια (π.χ. *Bacillus subtilis*) ή τα αρχαία δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Σκοπός λοιπόν αυτής της μελέτης είναι η ταυτοποίηση των (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤασιών στα Gram θετικά βακτήρια και στην οικογένεια των αρχαίων *Pyrococcales*.

Η πληροφορία για την παρουσία της (tRNA) m<sup>5</sup>U54 τροποποίησης στο αρχαίο *Pyrococcus furiosus* είναι σχετικά πρόσφατη (Constantinesco, 1999). Η οικογένεια των *Pyrococcales* αρχαίων, μέλος της οποίας είναι ο οργανισμός *P. furiosus*, αποτελεί την εξαίρεση σε αυτό το βασίλειο (τουλάχιστον μέχρι σήμερα) που φέρει την τροποποίηση m<sup>5</sup>U στη θέση 54 του μορίου tRNA. Για την ανίχνευση της συγκεκριμένης τροποποίησης χρησιμοποιήθηκε ένα ετερόλογο σύστημα δοκιμασίας *in vitro*. Μετάγραφα από συνθετικά γονίδια των tRNA<sup>Phe</sup> και tRNA<sup>Asp</sup> του *Saccharomyces cerevisiae* και tRNA<sup>Ile</sup> του αρχαίου *Haloferox volcanii* (εικόνα 8) επωάζονται με κυτταρικό εκχύλισμα από τον οργανισμό *Pyrococcus furiosus* παρουσία του συνενζύμου AdoMet. (περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την μέθοδο ακολουθούν στο μέρος *Υλικά και Μέθοδοι*). Τα παραπάνω μόρια tRNA δεν φέρουν καμία τροποποίηση πριν την επώαση με το κυτταρικό εκχύλισμα.

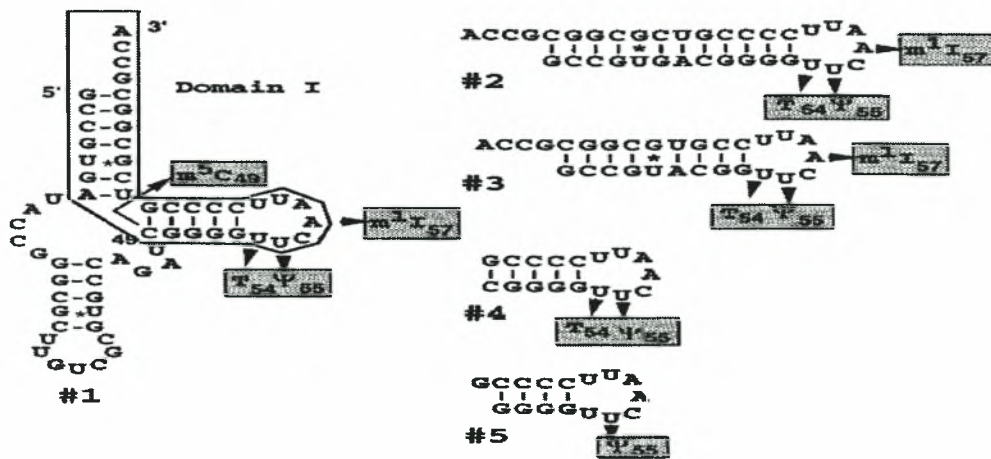
Τελικά, η τροποποίηση m<sup>5</sup>U54 ανιχνεύτηκε σε όλα τα υποστρώματα (εικόνα 9), με εξαίρεση το mini- υπόστρωμα #5 (εικόνα 10). Επομένως, το αρχαίο *P. furiosus* διαθέτει το γονίδιο που κωδικοποιεί την (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάση. Το ένζυμο αυτό μάλιστα χρειάζεται το συνένζυμο AdoMet για να δράσει, όπως η πλειονότητα αυτών των ενζύμων. Μετά από επαλήθευση της αντίδρασης χρησιμοποιώντας κυτταρικό εκχύλισμα από το αρχαίο *Pyrococcus abyssi*, ακολούθησε η κλωνοποίηση του γονιδίου της (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάσης από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό.



Εικόνα 8: Τα πρότυπα τροποποιήσεων στα τρία μόρια tRNA που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την ανίχνευση της τροποποίησης m<sup>5</sup>U. Με γκρι κουτιά προσδιορίζονται οι τροποποιήσεις που ανιχνεύονται στα ομόλογα συστήματα.



Εικόνα 9: Τα νουκλεοτίδια που αναγράφονται στο γκρι κουτί τροποποιούνται μετά την επώαση με το κυτταρικό εκχύλισμα του *Pyrococcus furiosus* και στο άσπρο κουτί εκείνα που έχουν το δυναμικό τροποποίησης. Η τροποποίηση m<sup>5</sup>U54 ανιχνεύεται και στα τρία μόρια tRNA.



Εικόνα 10: Τα ένζυμα που κωδικοποιούνται από τα *trm2* και *trmA* γονίδια έχει βρεθεί ότι αναγνωρίζουν συγκεκριμένη αλληλουχία του βρόχου *TΨC* και όχι όλο το μόριο του tRNA. Βασισμένοι σε αυτή την πληροφορία, οι ερευνητές εξέτασαν την εξειδίκευση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα. Η σήμανση των νουκλεοτιδίων είναι όπως την εικόνα 8.

Η πρώτη παρατήρηση για την (tRNA)  $m^5U54$  ΜΤαση για τα Gram θετικά βακτήρια ήταν από τον Samuel (1973). Χαρακτηριστικά αναφέρει «δεν ανιχνεύεται ριβοθυμιδικό οξύ μετά από ενζυμική υδρόλυση των νουκλεοτιδίων στα κύτταρα του βακτηρίου *Streptococcus faecalis* που έχουν αναπτυχθεί απουσία φολικού οξέος, αν και το συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο ανιχνεύεται στο μόριο του εναρκτήριου tRNA<sup>Met</sup> των κυτάρων *E.coli* και *Streptococcus faecalis* που έχουν αναπτυχθεί παρουσία φολικού οξέος.» Η παρατήρηση αυτή θέτει την παρουσία φολικού οξέος στο καλλιεργητικό μέσο απαραίτητη για την κατάλυση της τροποποίησης  $m^5U54$  στα κύτταρα του *Streptococcus faecalis*, ενώ η ίδια τροποποίηση φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από το φολικό οξύ για το *E.coli*. Σημαντική πληροφορία για την κατανόηση του πειράματος είναι ότι το βακτήριο *Streptococcus faecalis* δεν συνθέτει *de novo* φολικό οξύ. Το 1974, ο Delk επιβεβαιώνει ότι η (tRNA)  $m^5U54$  ΜΤαση του *Streptococcus faecalis* δεν χρησιμοποιεί ως δότη της μεθυλομάδας το συνένζυμο Ado-Met και το 1976 παρατηρεί το ίδιο και για το βακτήριο *Bacillus subtilis*. Έναντι του συνενζύμου Ado-Met, αυτά τα ένζυμα απαιτούν ένα παράγωγο φολικού οξέος ως δότης της μεθυλικής ομάδας για την αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα έχει ταυτοποιηθεί ο παράγοντας 5,10 μεθυλτετραφολικό οξύ. Επιπλέον για την τέλεση της αντίδρασης είναι απαραίτητο το συνένζυμο FADH<sub>2</sub> ή κάποιος άλλος αναγωγικός παράγοντας για την αναγωγή της μεθυλικής ομάδας. Η αντίδραση που προτάθηκε από τις μελέτες αυτές είναι:



Μια συγκριτική μελέτη πραγματοποιήθηκε από τον Schmidt (1977) προκειμένου να ταυτοποιηθεί το βιοσυνθετικό μονοπάτι της τροποποίησης  $m^5U$  στα Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια. Διάφορα είδη βακτηρίων αναπτύχθηκαν παρουσία τριμεθοπρίνης, ενός παρεμποδιστή της

τρανσ-μεθυλίωσης εξαρτώμενης από το τετραφολικό οξύ. Η παρουσία της τριμεθοπρίμης αναμενόταν να αναστείλει την βιοσύνθεση της 5-μεθύλ-ουρακίλης στα βακτήρια που χρησιμοποιούν τα παράγωγα του φολικού οξέος σε αυτό το βιοσυνθετικό μονοπάτι. Μετά την απομόνωση των μορίων tRNA από κάθε είδος βακτηρίου, αυτά δοκιμάστηκαν *in vitro* για την παρουσία της τροποποίησης m<sup>5</sup>U54. Μετά την ανίχνευση των μορίων tRNA, που απουσίαζε η τροποποίηση, τα τελευταία επωάζονταν με κυτταρικό εκχύλισμα κυτάρων *E.coli* με προσθήκη AdoMet - το τελευταίο ήταν ραδιοσημανσμένο με <sup>3</sup>H. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ανιχνεύονταν το 90% της μεθυλικής ομάδας του συνενζύμου. Τα μόρια tRNA που απουσίαζε η τροποποίηση και επομένως τροποποιήθηκαν από το κυτταρικό εκχύλισμα του *E.coli* προερχόταν κατά πλειοψηφία από Gram θετικά βακτήρια: *Streptococcus faecium*; *Staphylococcus aureus*; *Corynebacterium bovis*; *Arthrobacter albidus*, και όλα τα εξετασθέντα *Bacillaceae* με εξαίρεση του *Bacillus stearothermophilus*. Αντιθέτως, η παρουσία τριμεθοπρίμης δεν επηρέασε τη βιοσύνθεση της τροποποίησης στα Gram αρνητικά βακτήρια: *Enterobacteriaceae*, *Rhizobium lupini* και *Pseudomonadaceae*.

Βέβαια, η περίπτωση του *B.subtilis* είναι μια από τις πολλές περιπτώσεις μίας γνωστής βιοχημικής λειτουργίας, για την οποία δεν έχει ταυτοποιηθεί το γονίδιο. Μέσα από μελέτη των μέχρι σήμερα γνωστών στοιχείων για το συγκεκριμένο ένζυμο, όπως το μοριακό του βάρος και το μοτίβο δέσμευσης του συνενζύμου FADH<sub>2</sub>, εντοπίστηκαν κάποια υποψήφια γονίδια στο γένωμα του βακτηρίου *B.subtilis*. Η διαδικασία διαλογής του υποψήφιου γονιδίου αναφέρεται παρακάτω:

1. απορρίφθηκαν γονίδια των Gram θετικών βακτηρίων, που υπήρχαν στα Gram αρνητικά βακτήρια
2. απορρίφθηκαν γονίδια Gram θετικών βακτηρίων, που ανιχνεύονταν στο Gram θετικό βακτήριο *Bacillus stearothermophilus*
3. το μοριακό βάρος του φυσικού ενζύμου είναι 115,000 σύμφωνα με χρωματογραφία στήλης Sephadex G150, ενώ σε πήκτωμα SDS υπό συνθήκες μετουσίωσης εμφανίζεται μια ζώνη μοριακού βάρους 58,000. Επομένως πρόκειται για ένα διμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο.
4. περιέχει στην αλληλουχία του αναγνωριστική ακολουθία για την πρόσδεση του αναγωγικού παράγοντα FADH<sub>2</sub>.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**



## I. Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή όλων των πειραμάτων μέτρησης ενζυμικής δραστηριότητας *in vitro* αναφέρονται παρακάτω: το [α]-<sup>32</sup>P-ραδιοσημασμένο τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο (UTP) (400 Ci/mmol) είναι από την εταιρεία Amersham Biosciences. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται, δηλαδή η T7 πολυμεράση και η νουκλεάση P1 από τον μικροοργανισμό *Penicillium citrinum* προμηθεύονται από τις εταιρείες Promega και Roche Applied Sciences, αντίστοιχα. Το συνένζυμο είναι της εταιρείας Sigma με εξαίρεση το συνένζυμο THF (Merck). Οι πλάκες με διαστάσεις 10 x 10-cm που χρησιμοποιούνται για την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας Thin layer cellulose plates (TLC plates) είναι από την εταιρεία Macherey- Nagel. Όλα τα λοιπά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι από την εταιρεία Merck Biochemicals.

Τα ένζυμα περιορισμού παράγονται από την BioLabs (UK) και τα λοιπά ένζυμα είναι από την Promega. Οι εκκινητές παρασκευάστηκαν από την MWG biotech και τα kit που χρησιμοποιούνται είναι όλα από την Qiagquick.

## II. Μέθοδοι

### Κλωνοποίηση, έκφραση, καθαρισμός και βιοχημικός έλεγχος της (tRNA) m<sup>5</sup>U54 μεθυλτρανσφεράσης του αρχαίου *P.abyssii*.

Για την ταυτοποίηση του υπεύθυνου γονιδίου της (tRNA) m<sup>5</sup>U54 μεθυλτρανσφεράσης του αρχαίου *P.abyssii* χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων *Clusters of Orthologous Groups* (COG) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) Η τελευταία επιτρέπει τη φυλογενετική ομαδοποίηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας πληροφορίες από πλήρη γονιδιώματα. Αναλύοντας το πλήρες γονιδίωμα του αρχαίου *Pyrococcus abyssi* στη βάση δεδομένων ανιχνεύονται δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frame, ORF) που παρουσιάζουν ομολογία με το γονίδιο *tmA* του βακτηρίου *E.coli*. Τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης έχουν τους κωδικούς PAB0760 και PAB0719.

Τα δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης PAB0760 και PAB0719 κλωνοποιήθηκαν σε ένα φορέα έκφρασης στο *E.coli* (pET28b) της Novagen. Το σύστημα έκφρασης pET επιτρέπει την καταστολή της βασικής έκφρασης της T7 RNA πολυμεράσης. Η έκφραση της πολυμεράσης επάγεται με την προσθήκη ισο-προπυλ-θειο-γλυκοζιτη (IPTG) και έχει ως άμεσο αποτέλεσμα τον έλεγχο της μεταγραφής του κλωνοποιημένου γονιδίου. Ως στοιχείο διαλογής του φορέα αναφέρεται η ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Ο φορέας pET28b είχε την δυνατότητα προσθήκης έξι κατάλοιπων ιστιδίνης (6His-tag) είτε στο άμινο-τελικό άκρο, είτε στο καρβόξυ- τελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που προκύπτει από

τη μετάφραση της κλωνοποιημένης αλληλουχίας. Συνδυάζοντας τον αριθμό των γονιδίων με τις πιθανές θέσεις της ουράς ιστιδίνης δημιουργούνται ουσιαστικά τέσσερις πολυνουκλεοτιδικές αλληλουχίες: PAB0760Nter, PAB0760Cter, PAB0760Nter και PAB0760Cter (Nter συμβολίζει την προσθήκη της αλληλουχίας για τα έξι κατάλοιπα ιστιδίνης στο άμινο- τελικό άκρο και Cter αντίστοιχα στο καρβόξυ- τελικό άκρο).

## 1. Προετοιμασία της αλληλουχίας- στόχου

### ➤ Ενίσχυση της αλληλουχίας- στόχου:

Δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR (Polymerase Chain Reaction) έγιναν για την ενίσχυση των παραπάνω αλληλουχιών με συμπληρωματικούς εκκινητές (primers) για τα 5' και 3' άκρα τους που περιγράφονται παρακάτω:

PAB0760; N-termini 6His-taq (προϊόν PCR /πρωτεΐνη A)/ ένζυμο περιορισμού:NdeI

5'-AAA **ACA TAT GAG** GGG AAT CAT AAA GGG AG-3' (T<sub>m</sub>= 53°C)

PAB0760; N-termini 6His-taq (προϊόν PCR /πρωτεΐνη A)/ ένζυμο περιορισμού:EcoRI

5'-AAA **AGA ATT CAC** CTT CTC CTG AGC TTA ACG-3'(T<sub>m</sub>= 53°C)

PAB0760; C-termini 6His-taq (προϊόν PCR /πρωτεΐνη B) / ένζυμο περιορισμού:NcoI

5'- AAA **ACC ATG GGG** AGG GGA ATC ATA AAG GGA GTA TC -3'(T<sub>m</sub>= 51,5°C)

PAB0760; C-termini 6His-taq (προϊόν PCR /πρωτεΐνη B) / ένζυμο περιορισμού:EcoRI

5'- AAA **AGA ATT CCT** TCT CCT GAG CTT AAC GAC- 3'(T<sub>m</sub>= 50°C)

PAB0719; N-termini 6His-taq (προϊόν PCR /πρωτεΐνη C)/ ένζυμο περιορισμού:NdeI

5'- AAA **ACA TAT GAG** GGG AGT CAT AAG AAA- 3'(T<sub>m</sub>= 51°C)

PAB0719; N-termini 6His-taq (προϊόν PCR /πρωτεΐνη C)/ ένζυμο περιορισμού: EcoRI

5'- AAA **AGA ATT CAG** ACT AGC TTC GCA ACG AGC TC- 3'(T<sub>m</sub>= 53,5°C)

PAB0719; C-termini 6His-taq (προϊόν PCR /πρωτεΐνη D)/ ένζυμο περιορισμού:NcoI

5'- AAA **ACC ATG GGG** AGG GGA GTC ATA AGA- 3'(T<sub>m</sub>= 45°C)

PAB0719; C-termini 6His-taq (προϊόν PCR /πρωτεΐνη D)/ ένζυμο περιορισμού:EcoRI

5'- AAA **AGA ATT CGC** GAC TAG CTT CGC AAC GAG CTC- 3'(T<sub>m</sub>= 53,5°C)

Πάντοτε το πρώτο ολιγονουκλεοτίδιο από κάθε ζευγάρι είναι ο πρόσθιος (forward) εκκινητής και το δεύτερο ο αντίστροφος (reverse) εκκινητής. Πάνω από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο αναφέρεται για ποια αλληλουχία-στόχο έχει σχεδιαστεί και από ποιο ένζυμο περιορισμού αναγνωρίζεται. Με έντονα μαύρα γράμματα δείχνεται η αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου, τα πλάγια

γράμματα είναι συμπληρωματικά με την αλληλουχία-στόχο, ενώ τα υπογραμμισμένα δείχνουν νουκλεοτίδια που προστέθηκαν για τη διατήρηση του πλαισίου ανάγνωσης. Η πρώτη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιείται σύμφωνα με τα στοιχεία του πίνακα 1.

Πίνακας 1: Σύσταση του μίγματος της πρώτης PCR αντίδρασης (PCR1).

10x ThermoPol ρυθμιστικό διάλυμα (200mM Tris-HCl (pH 8,8); 100mM KCl; 100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 20mM MgSO <sub>4</sub> ; 1% Triton X-100)	5μl
10mM dNTPs	1μl
10 pmol/μl εκκινητής 1	10μl
10 pmol/μl εκκινητής 2	10μl
<i>Pyrococcus abyssi</i> γενωμικό DNA (3mg/ml)	0,5μl
Vent DNA πολυμεράση (2u/μl) (Promega)	1μl
H <sub>2</sub> O	22,5μL

Αρχικά πραγματοποιείται αποδιάταξη στους 94°C για 2 λεπτά και ακολουθούν:

94°C (μετουσίωση); 30 sec  
 45°C (υβριδισμός); 30 sec  
 72°C (πολυμερισμός); 90 sec  
 και τελικά για 5 λεπτά στους 72°C.

} 30 κύκλοι

Η δεύτερη αντίδραση της PCR πραγματοποιείται με χρήση του ενζύμου Vent πολυμεράσης και ως εκμαγείο χρησιμοποιούνται τα προϊόντα της πρώτης PCR αντίδρασης. Η σύνθεση του μίγματος της αντίδρασης περιγράφεται στον πίνακα 2. Οι συνθήκες της αντίδρασης αλλάζουν για τις αλληλουχίες A και D, πιο συγκεκριμένα:

94°C; 2 λεπτά  
 94°C (μετουσίωση); 30 sec  
 45°C (υβριδισμός); 30 sec  
 72°C (πολυμερισμός); 90 sec  
 και τελικά 5 λεπτά στους 72°C.

} 30 κύκλοι

**Πίνακας 2: Σύσταση του μίγματος της δεύτερης PCR αντίδρασης (PCR2).**

10x ThermoPol ρυθμιστικό διάλυμα (200mM Tris-HCl (pH 8,8); 100mM KCl; 100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 20mM MgSO <sub>4</sub> ; 1% Triton X-100)	5μl
10mM dNTPs	1μl
10 pmol/μl εκκινητής 1	10μl
10 pmol/μl εκκινητής 2	10μl
PCR1 προϊόν	1μl
Vent DNA πολυμεράση (2u/μl)	1μl
H <sub>2</sub> O	22μL

➤ **Απομόνωση της αλληλουχίας- στόχου με αποκοπή από πήκτωμα αγαρόζης:**

Αρχικά, το DNA από το προηγούμενο βήμα ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Το ηλεκτρικό πεδίο που χρησιμοποιείται είναι 80V για 20-30min. Η απομόνωση της επιθυμητής ζώνης (1.2kDa) από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται με αποκοπή της από πήκτωμα 1% αγαρόζης με τη βοήθεια του "Gel Extraction" kit (Qiaquick). 3 όγκοι διαλύματος QG προστίθενται στο πήκτωμα (ο «όγκος», που χρησιμοποιείται ως μονάδα μέτρησης εδώ, ισοδυναμεί με τη μάζα του τμήματος ηηκτώματος που αποκόπηκε). Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 5-10min, ώσπου το πήκτωμα να ρευστοποιηθεί. Το μίγμα εφαρμόζεται σε μια στήλη δέσμευσης του DNA (QIAquick spin column) και φυγοκεντρείται στις 5000rpm σε 20-22°C για 1min. Στη συνέχεια, τοποθετείται 0,5ml διαλύματος QG στη στήλη δέσμευσης και επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 1min (σε αυτό το βήμα απομακρύνονται όλα τα ίχνη αγαρόζης). 0,75ml διαλύματος PE προστίθενται στη στήλη και φυγοκεντρείται εις διπλούν στις 5000rpm για 1min. Τελικά, το DNA εκλύεται με την προσθήκη 30μl H<sub>2</sub>O, επώαση για 1min και φυγοκέντρηση στις 5000rpm σε 20-22°C για 1min.

Διάλυμα QBT: 750 mM NaCl ; 50mM MOPS pH 7.0 ; 15% ισοπροπανόλη ; 0,15% Triton X-100

Διάλυμα QC: 1.0M NaCl ; 50mM MOPS pH 7.0 ; 15% ισοπροπανόλη

Διάλυμα QF: 1.25 M NaCl ; 50 mM Tris- Cl, pH 8.5; 15% ισοπροπανόλη

➤ **Διπλή πέψη των PCR προϊόντων:**

Κάθε PCR προϊόν πέπτεται με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, ώστε να αποκτήσει συμπληρωματικά άκρα με το φορέα κλωνοποίησης. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται παρουσιάζεται στον πίνακα 3. Η πέψη διαρκεί 3,5h.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο, για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, 50μl (1 όγκος) από την προηγούμενη αντίδραση αναμιγνύονται με 50μl (1 όγκος) διαλύματος φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης και το νεοσύστατο μίγμα φυγοκεντρείται στις 10.000rpm για 5min στους 20-25°C. Σε αυτό το βήμα απομακρύνονται οι πρωτεΐνες, που βρίσκονται στην υποκείμενη και στη μεσαία στιβάδα μετά τη φυγοκέντρωση. Το υπερκείμενο αναμιγνύεται με 50μl (1 όγκος) χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης, αναδεύεται και φυγοκεντρείται στις 10.000rpm για 1min, 20-25°C. Στην υπερκείμενη στιβάδα που προκύπτει από την τελευταία φυγοκέντρωση προστίθενται 150μl (3 όγκοι) 100% αιθανόλης και 5 μL (0,1 όγκος) οξικού νατρίου (pH 5,2). Το μίγμα επώαζεται στους -20 °C για 12h. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10000rpm για 30-60min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το κατακρημνισμένο DNA πλένεται με 50μl (1 όγκο) 70% αιθανόλης. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση στις 10000rpm για 15min στους 4°C και απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο. Τελικά, το DNA επαναδιαλυτοποιείται σε 30μl νερού και είναι έτοιμο για την συνένωση του με το φορέα κλωνοποίησης.

**Πίνακας 3: Σύσταση των δειγμάτων της αντίδρασης πέψης των προϊόντων A, B, C και D.**

Όνομα του προϊόντος PCR.	A	B	C	D
Όγκος μίγματος	37μl	35μL	28μL	41μl
10xR <sup>+</sup> /10xY <sup>+</sup> incubation buffer (Fermentas)	5μl (1xR <sup>+</sup> )	10μL (2xY <sup>+</sup> )	5μL (1xR <sup>+</sup> )	10μL (2xY <sup>+</sup> )
Περιοριστικά ένζυμα (10u/μL) (BioLabs)	1μl NdeI 1μl EcoRI	1μl NcoI 1μl EcoRI	1μl NdeI 1μl EcoRI	1μl NcoI 1μl EcoRI
H <sub>2</sub> O	6μL	3μL	15μl	5μl

10xR<sup>+</sup> ρυθμιστικό διάλυμα: 10mM Tris-HCl (pH 7,5); 50mM KCl; 1mM DTT; 0,1mM EDTA; 0,2 mg/ ml BSA; 50% γλυκερόλη  
10xY<sup>+</sup> ρυθμιστικό διάλυμα: 10mM Tris-HCl (pH 7,4); 100mM KCl; 1mM DTT; 1mM EDTA; 0,2 mg/ ml BSA; 50% γλυκερόλη

## 2. Προετοιμασία του φορέα κλωνοποίησης

### ➤ Απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα pET28b

Αρχικά απομονώνεται μεγάλη ποσότητα (maxi-prep) του φορέα pET28b από μετασχηματισμένα κύτταρα με τη βοήθεια ειδικού kit της Qiaquick. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην αλκαλική λύση των βακτηρίων και κατακρήμνιση του DNA του φορέα με ισοπροπανόλη.

Πρωτόκολλο: Αποικία των μετασχηματισμένων κυττάρων (competence host-cells, Novagen) για το φορέα pET28b επιλέγεται από τρυβλία με LB άγαρ (1% bacto- tryptone, 0,5% bacto- yeast extract, 1%

NaCl, 0,7% bacto- agar). Ετοιμάζεται καλλιέργεια σε 5ml καλλιεργητικού μέσου LB (1% bacto- tryptone, 0,5% bacto- yeast extract, 1% NaCl) παρουσία 25μg/ml καναμυκίνης και επωάζεται στους 37°C για 5-6h. Η καλλιέργεια αραιώνεται σε 500ml LB. Η νέα καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση. Μετά από 12h επώασης, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 5000rpm για 15min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα βακτηριακά κύτταρα (ίζημα) επαναδιαλύονται σε 10ml διαλύματος T1 με ανάδευση. Προστίθενται 10 ml του διαλύματος T2 και το μίγμα αναδεύεται και επωάζεται για 5min σε 20-25°C. Ακολουθεί προσθήκη 10ml διαλύματος T3 με ανάδευση και επώαση για 15min στους 4°C (σε αυτό το βήμα γίνεται κατακρήμνιση του γενωμικού DNA, πρωτεϊνών, κυτταρικού σκελετού και SDS). Το τελικό μίγμα φυγοκεντρείται υπό συνθήκες: 12000rpm; 30min; 4°C. Το υπερκείμενο εφαρμόζεται σε μικροστήλη ρητίνης (QIAGEN tip), η οποία έχει εξισορροπηθεί προηγουμένως με το διάλυμα QBT. Το υγρό μετακινείται λόγω της βαρύτητας και το DNA κατακρατείται από την στήλη. Η στήλη πλένεται με 30ml διαλύματος QC εις διπλούν, ενώ το DNA εκλύεται με την εφαρμογή του διαλύματος QF. Τελικά, στο μίγμα που εκλούεται από τη στήλη προστίθενται 15ml ισοπροπανόλης και φυγοκεντρείται. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα ξεπλένεται με 5ml 70% αιθανόλης. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση στις 6.500rpm για 20min στους 4°C και επαναδιαλυτοποίηση του DNA σε 30μl νερό.

Διάλυμα T1: 50 mM Tris- Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 μg/ ml RNάση A;

Διάλυμα T2: 200 mM NaOH; 1% SDS

Διάλυμα T3: 3.0 M οξικό κάλιο; pH 5,5

#### ➤ Πέψη του φορέα κλωνοποίησης:

Ο φορέας pET28b πέπτεται με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI/EcoRI, σχηματίζοντας το φορέα 1(V1), που φέρει την αλληλουχία για την ουρά ιστιδίνης (6His-tag) στο αμινο- τελικό άκρο. Αντιθέτως, ο φορέας 2 (V2), που φέρει την αλληλουχία για την 6His-tag στο καρβόξυ-τελικό άκρο, πέπτεται με τα περιοριστικά ένζυμα NcoI/EcoRI. Η πέψη ολοκληρώνεται με δύο διαδοχικές αντιδράσεις, η πρώτη περιγράφεται στον πίνακα 4. Η αντίδραση διαρκεί 3h στους 37°C. Στο τέλος της επώασης, τα μίγματα από τους δοκιμαστικούς σωλήνες Ψ και Φ, καθώς και εκείνα των Χ και Ζ αναμιγνύονται, ενώ μετά την μίξη προστίθενται 2μL από το ένζυμο EcoRI σε όλους τους σωλήνες, 2μL του ενζύμου NcoI στο σωλήνα ΨΦ και 2μL του ενζύμου NdeI στο σωλήνα ΧΖ. Ακολουθεί νέα επώαση για 3h στους 37°C υπό ανάδευση. Το DNA των δειγμάτων ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και ακολουθεί απομόνωση από το πήκτωμα όπως περιγράφηκε παραπάνω.

**Πίνακας 4: Σύσταση των μιγμάτων της πέψης.**

Όνομα δοκιμαστικού σωλήνα.	Ψ.(NcoI)	Φ (EcoRI)	Όνομα δοκιμαστικού σωλήνα.	X (NdeI)	Z (EcoRI)
10xY <sup>+</sup> ρυθμιστικό διάλυμα	6μl	6μl	10xR <sup>+</sup> ρυθμιστικό διάλυμα	3μl	3μL
10u/μl NcoI	2μl	-	10u/μl NdeI	3μL	-
10u/μl EcoRI	-	2μl	10u/μl EcoRI	-	2μl
pET28b (0,53mg/ml)	20μL	20μL	pET28b (0,53mg/ml)	20μl	20μl
H <sub>2</sub> O	2μl	2μL	H <sub>2</sub> O	4μl	5μl

➤ **Αποφωσφορυλίωση του φορέα:**

Οι φορείς κλωνοποίησης επεξεργάζονται με το ένζυμο Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) της Promega, το ένζυμο απομακρύνει την φωσφορική ομάδα από το 5' άκρο, ώστε να αποφευχθεί η επανακυκλοποίηση του φορέα. Η σύνθεση της αντίδρασης δείχνεται στο πίνακα 5. Η θερμοκρασία επώασης είναι 37°C και η διάρκεια της αντίδρασης είναι 30min. Μετά το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιείται εκχύλιση των πρωτεϊνών με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με αιθανόλη. (Το πρωτόκολλο έχει ήδη περιγραφεί στην διαδικασία καθαρισμού της αλληλουχίας- στόχου)

**Πίνακας 5: Σύσταση μίγματος αποφωσφορυλίωσης**

Φορέας V1/ V2	26μL
10x CIAP ρυθμιστικό διάλυμα	5μl
CIAPase (1.3 u/μl)	1μl
H <sub>2</sub> O	18μL

10 x CIAP ρυθμιστικό διάλυμα: 500mM Tris-HCl (pH 9,0); 10mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM ZnCl<sub>2</sub> 10mM σπερμιδίνη

**3. Ένωση του φορέα κλωνοποίησης και της αλληλουχίας- στόχου (Ligation)**

Το υπεύθυνο ένζυμο για την αντίδραση είναι η T4 DNA λιγάση (Promega), το οποίο καταλύει το σχηματισμό του φωσφο-διεστερικού δεσμού μεταξύ των 5'-φωσφορικού και 3'-υδρόξυ γειτονικών

άκρων δίκλωνου DNA. Σημαντικός συμπαράγοντας για την αντίδραση είναι το μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), το οποίο εμπεριέχεται στο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου.

Για τη μεγαλύτερη απόδοση της αντίδρασης επιλέγεται ως λόγος μόρια DNA φορέα κλωνοποίησης προς μόρια DNA αλληλουχίας- στόχου το 1:3. Γνωρίζοντας τη συγκέντρωση του DNA για τα προϊόντα της PCR (A, B, C και D) και των φορέων V1 και V2 (έχει προηγηθεί μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 280nm) λαμβάνει χώρα η αντίδραση όπως περιγράφεται στον πίνακα 6. Τα μίγματα στους σωλήνες 1, 2 και 3 είναι οι μάρτυρες της αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, τα νούμερα 1 και 2 είναι αρνητικοί μάρτυρες και το νούμερο 3 θετικός. Τα μίγματα επωάζονται αρχικά στους 22°C για 1h και στη συνέχεια στους 65°C για 10min (το τελευταίο βήμα σταματάει την αντίδραση, αφού το ένζυμο μετουσιώνεται).

Πίνακας 6: Σύσταση μιγμάτων για την αντίδραση λιγάσης

Μετασχηματισμένο προϊόν	A	B	C	D	1	2	3
V1(0,2mg/ml)	0,5μl	-	0,5 μl		0,5 μl	-	-
V2(0,17mg/ml)	-	0,6 μl	-	0,6 μl	-	0,6 μl	-
pET28b(0,53mg/ml)	-	-	-	-	-	-	0,2 μl
Αλληλουχία- στόχος	0,6 μl	12 μl	2,4 μl	6 μl	-	-	-
10x ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
T4 DNA λιγάση (2u/μL)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
H <sub>2</sub> O	15,9 μl	4,4 μl	14,1 μl	10,4 μl	16,5 μl	16,4 μl	16,8 μl

10x ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης: 300mM Tris-HCl (pH 7,8); 100mM MgCl<sub>2</sub> ; 100mM DTT; 10mM ATP

#### **4. Μετασχηματισμός των *E. coli* XL1 blue με τα προϊόντα συνένωσης (Transformation)**

Τελικό βήμα στη διαδικασία της κλωνοποίησης είναι ο μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* του στελέχους XL1 blue (Novagen) με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

Το πρωτόκολλο περιγράφεται παρακάτω:

20μL από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο αναμιγνύονται με 200μL επιδεκτικών κυττάρων XL1 blue *E. coli*. Το μίγμα επωάζεται στον πάγο για 20min. Τα κύτταρα ακολούθως υφίστανται θερμικό σοκ: 90sec στους 42°C και 5min στους 4°C. 800μL από το καλλιεργητικό μέσο LB προστίθενται και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 1h υπό ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5.000rpm για 2min στους 20-25°C. Το κυτταρικό ίζημα, μετά τη φυγοκέντρηση, επαναδιαλύεται με τα 200μL του



υπερκείμενου και επιστρώνεται σε τρυβλία με καλλιεργητικό μέσο LB παρουσία 25μg/ml καναμυκίνης. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 20h.

Η ανίχνευση των θετικών (δηλαδή κυτάρων που έχουν μετασχηματισθεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο) μετασχηματισμένων κλώνων του *E.coli* γίνεται με την εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA από μικρή ποσότητα κυτάρων και την πέψη του με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Η διαδικασία περιγράφεται πιο αναλυτικά ως εξής:

-Επιλέγεται μία αποικία και χρησιμοποιείται για εμβολιασμό 2ml LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Ακολουθεί επώαση στους 37°C υπό ανάδευση.

-Φυγοκεντρείται στις 5000rpm για 5min στους 20-25°C.

-Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα αραιώνεται σε 200μl διαλύματος E1.

-Το μίγμα αναδεύεται και προστίθενται 200μl διαλύματος E2. Μετά την ανάδευση προστίθενται επιπλέον 200μl διαλύματος E3 και η ανάδευση συνεχίζει.

-Το μίγμα του προηγούμενου βήματος φυγοκεντρείται στις 3000rpm για 10min στους 20-25°C.

-600μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, προστίθενται 400μl ισοπροπανόλης και φυγοκεντρείται στις 13000rpm για 20min στους 4°C.

-Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα πλένεται με 500μl 70% αιθανόλης.

-Τέλος, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13000rpm για 5min στους 4°C και το ίζημα, που είναι το πλασμιδιακό DNA διαλύεται με 30μl διαλύματος TE.

Διάλυμα E1: 50 mM Tris- Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 μg/ ml RNάση A;

Διάλυμα E2: 200 mM NaOH; 1% SDS

Διάλυμα E3: 3.0 M οξικό κάλιο; pH 5,5

Το πρωτόκολλο της αντίδρασης πέψης φαίνεται στο πίνακα 7.

**Πίνακας 7: Πρωτόκολλο πέψης για την ανίχνευση θετικά μετασχηματισμένων κυτάρων *E.coli***

Όνομα δοκιμαστικού σωλήνα.	A	B	C	D
10xY <sup>+</sup> ρυθμιστικό διάλυμα	-	2 μL	-	2 μL
10xR <sup>+</sup> ρυθμιστικό διάλυμα	1μL	-	1μL	-
10u/μl EcoRI	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl
10u/μl NcoI	-	0,2 μl	-	0,2 μl
10u/μl NdeI	0,2 μL	-	0,2 μL	-
Μετασχηματισμένο πλασμίδιο (0,15mg/ml)	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl
H <sub>2</sub> O	4,6 μl	3,6 μL	4,6 μl	3,6 μL

Τα αποτελέσματα της πέψης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Τα θετικά μετασχηματισμένα κύτταρα XL1 blue *E.coli* χρησιμοποιούνται για εμβολιασμό μεγάλης ποσότητας (100mL) μέσου LB. Τα κύτταρα συλλέγονται και εξάγεται το πλασμιδιακό DNA, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Μέρος της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιείται σε ακόλουθα πειράματα, ενώ κάποια ποσότητα υφίσταται πέψη και το ένθετο DNA (δηλ. το DNA της αλληλουχίας- στόχου με μέγεθος 1.2 kDa) στέλνεται για αλληλούχηση (sequencing) στην εταιρεία MWG biotech.

## 5. Έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Αρχικά σταθμίζονται οι παράμετροι για την καλύτερη έκφραση των πρωτεϊνών. Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης χρησιμοποιούνται καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Δοκιμάζονται διαφορετικοί τύποι κυττάρων-ξενιστών (expression host cells) και θερμοκρασίες, οι συνδυασμοί που επιλέχθηκαν αναφέρονται στον πίνακα 8.

Τα στελέχη του βακτηρίου *E.coli* (Novagen) που παρουσιάζονται παρακάτω καταστέλλουν την βασική έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης πριν από την επαγωγή της από το IPTG και επομένως την αποκωδικοποίηση των πρωτεϊνών στόχων.

Στέλεχος BL21 είναι ένα από τους πιο συνηθισμένους ξενιστές φορέων pET και είναι ανεπαρκές στις πρωτεάσες *lon* και *ompT*.

Στέλεχος Rosetta: ενισχύει την έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών (ενδεχομένως και των πρωτεϊνών από τα αρχαία, αφού οι τελευταίες είναι πιο συγγενείς σε εκείνες των ευκαρυώτων από των βακτηρίων) οι οποίες περιέχουν κωδικόνια που εμφανίζονται σπάνια στο *E.coli*. Αυτό το στέλεχος αποθέτει τα μόρια tRNA<sup>Leu</sup> tRNA<sup>Arg</sup> tRNA<sup>Arg</sup> tRNA<sup>Leu</sup> και tRNA<sup>Pro</sup> υπό τον έλεγχο του φυσικού τους προαγωγέα, ο οποίος βρίσκεται σε ένα συμβατό, ανθεκτικό στην χλωραμφενικόλη πλασμίδιο.

Στέλεχος BL21 Plus codon: είναι ανεπαρκές στις πρωτεάσες *lon* και *ompT* και αποθέτει τα μόρια tRNA<sup>Leu</sup>, tRNA<sup>Arg</sup> and tRNA<sup>Leu</sup> υπό τον έλεγχο του φυσικού τους προαγωγέα. Στην ουσία πρόκειται για ένα μεικτό στέλεχος BL21 και Rosetta.

Η διαδικασία μετασχηματισμού έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω.

Η πειραματική διαδικασία για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης συνοψίζεται στα παρακάτω βήματα. 200μl από τα μετασχηματισμένα κύτταρα επωάζονται με 5ml από το καλλιεργητικό μέσο παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών (εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου- ξενιστή) στους 37°C. Όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας έχει την τιμή 0,6- 0,8 στα 595nm, τότε προστίθεται 1mM IPTG σε τελική συγκέντρωση. Ως μάρτυρας του πειράματος χρησιμοποιείται μια καλλιέργεια κυττάρων υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες χωρίς την προσθήκη IPTG. Οι καλλιέργειες επωάζονται για 3h επιπλέον στην επιθυμητή θερμοκρασία. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6000rpm για 3min και διαλύονται σε 600μl διάλυμα λύσης (50mM NaHPO<sub>4</sub> (pH 8.0); 0,3M NaCl).

Στη συνέχεια διαρρηγνύονται με υπέρηχους. Τα διερρηγμένα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 10000g στους 4°C για 30 min. Το υπερκείμενο (supernatant S/ δείγμα S) διαχωρίζεται από το κυτταρικό ίζημα (cell pellet P) και το τελευταίο διαλύεται σε 600μL διάλυμα λύσης (δείγμα P).

Πίνακας 8: Οι συνδυασμοί συνθηκών έκφρασης. Η σύσταση του καλλιεργητικού μέσου LB έχει περιγραφεί παραπάνω και η σύσταση του μέσου M9 είναι: 20% γλυκόζη, 1M MgSO<sub>4</sub>, 50mM CaCl<sub>2</sub>

Νο δοκιμής	κύτταρα- ξενιστές	Θερμοκρασία	Καλλιεργητικό μέσο	Αντιβιοτικά
1	BL21 Plus codon	20	LB	Καναμυκίνη και χλωραμφενικόλη
2	BL21 Plus codon	28	LB	Καναμυκίνη και χλωραμφενικόλη
3	BL21 Plus codon	16	LB	Καναμυκίνη και χλωραμφενικόλη
4	BL21 Plus codon	20	M9	Καναμυκίνη και χλωραμφενικόλη
5	BL21 Plus codon	28	M9	Καναμυκίνη και χλωραμφενικόλη
6	BL21	20	LB	Καναμυκίνη
7	BL21 strain	28	LB	Καναμυκίνη
8	Rosetta strain	20	LB	Καναμυκίνη και χλωραμφενικόλη
9	Rosetta strain	28	LB	Καναμυκίνη και χλωραμφενικόλη

#### **6. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος σε πήκτωμα 12% πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες μετουσίωσης (SDS- polyacrilamide electrophoresis)**

Οι πρωτεΐνες που εκφράζονται σε ένα κύτταρο, όπως τα κύτταρα- ξενιστές *E.coli* μπορούν να προσδιοριστούν ποιοτικά με διαχωρισμό σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12% υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η σύσταση του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης περιγράφεται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 9: Σύσταση του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου.

Πήκτωμα διαχωρισμού	12% (2 gels)
40% Acryl- Bis 29:1	3 ml
1M Tris- Cl pH8,8	3,75 ml
H <sub>2</sub> O	3 ml
10% SDS	100 μl
10% PSA	100 μl
TEMED	5 μl

Πήκτωμα επιστοιβαξης	5% (2 gel)
40% Acryl- Bis 29:1	0,5 ml
1M Tris- Cl pH6,8	0,5 ml
H <sub>2</sub> O	2,9 ml
10% SDS	40 μl
10% PSA	40 μl
TEMED	5 μl

10 μL από το δείγμα αναμιγνύονται με 3,3ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (190mM γλυκίνη, 25 mM Tris- Cl, pH 8.3, 0,05 mM EDTA, 5 mM β- μερκαπτοαιθανόλη) και υφίστανται θερμική μετουσίωση για 2 min; στους 95°C. Μετά την ηλεκτροφόρηση, που διαρκεί 3h σε πεδίο 100V πραγματοποιείται χρώση του πηκτώματος με Coomassie Brilliant Blue (ανιχνεύεται ποσότητα πρωτεΐνης μέχρι 50ng).

#### 7. Καθαρισμός των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών

Αρχικά προετοιμάζεται κυτταρικό εκχύλισμα με:

- φυγοκέντρηση ενός λίτρου καλλιέργειας μετασχηματισμένων επιδεικτικών κυττάρων στα 6000g για 10min

- προσθήκη 5 όγκων ( 5 όγκοι ισοδυναμούν με 5 φορές τη μάζα του κυτταρικού ιζήματος) ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (50mM NaHPO<sub>4</sub> (pH 8.8); 300mM NaCl; 10mM ιμιδαζόλη; 10% γλυκερόλη; 5mM β-μερκαπτοαιθανόλη) και 0.01 όγκο κοκτέιλ παρεμποδιστών των πρωτεασών (Protease Inhibitors Cocktail-PIC (Sigma) 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonul fluoride(AEBSF),bestatin,pepstatinA,trans-epoxysuccinyl-L-leucyl-amido(4guanidino)butane (E-64) and N-(α-Rhamnopyranosyloxyhydroxyphosphinyl)-Leu-Trp.) στο κυτταρικό ίζημα που προκύπτει από το πρώτο βήμα.

- διάσπαση των κυτάρων με υπέρηχους και φυγοκέντρηση υπό τις συνθήκες 10.000g; 30 min; 4°C  
- Συλλογή του υπερκείμενου για τον καθαρισμό του διαλυτού τμήματος της πρωτεΐνης με τη βοήθεια χρωματογραφίας συγγένειας.

Η διαδικασία καθαρισμού πραγματοποιείται με τη βοήθεια της στήλης χρωματογραφίας Chelating Sepharose Fast Flow (1x 30 Amersham Biosciences) υπό φυσιολογικές συνθήκες (native conditions).

Αρχικά η στήλη πλένεται με δύο όγκους ρυθμιστικού διαλύματος αναγέννησης (6M GuHCl, 0,2M acetic acid) και ξεπλένεται με πέντε όγκους νερού. Έπειτα η στήλη φορτίζεται με την εφαρμογή εις διπλούν διαλύματος 100mM NiSO<sub>4</sub>. Εφαρμόζονται 2 όγκοι νερού και η στήλη εξισορροπείται με δύο όγκους ρυθμιστικού διαλύματος σύστασης: 50mM NaHPO<sub>4</sub> (pH 8.8); 300mM NaCl; 20mM ιμιδαζόλη; 10% γλυκερόλη; 5mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα συστατικά της στήλης αναμιγνύονται με το εκχύλισμα των ανασυνδυσασμένων κυτάρων για 30min στους 4°C. Το σύμπλοκο ρητίνης- κυτταρικού εκχυλίσματος (batch) πλένεται με 2 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος του προηγούμενου βήματος. Τελικά, οι πρωτεΐνες αποδεσμεύονται από την στήλη με εφαρμογή ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (50mM NaHPO<sub>4</sub> (pH 8.8); 300mM NaCl; 250mM ιμιδαζόλης; 10% γλυκερόλη; 5mM β-μερκαπτοαιθανόλη).

Βοηθητικό βήμα για τον καθαρισμό των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών είναι η διαπίδυση στους 4°C για 12-14h. Το ρυθμιστικό διάλυμα της διαπίδυσης αποτελείται από 20 mM Tris-HCl; 100mM NaCl; 50% γλυκερόλη and 2 mM DTT. Σε αυτό το βήμα αποβάλλονται μόρια μικρού μεγέθους, όπως τα ιόντα νικελίου.

## **8. Βιοχημικός έλεγχος των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών για την δραστικότητα τους ως(tRNA m<sup>5</sup>U54 ΜΤασης**

Για τη μέτρηση της δραστικότητας των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το μετάγραφο του γονιδίου tRNA<sup>asp</sup> του ευκαρυωτικού οργανισμού *Saccharomyces cerevisiae*. Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο pUC18. Ο πλασμιδιακός φορέας γραμμοποιείται και ακολουθεί μεταγραφή του ένθετου γονιδίου tRNA με τη χρήση T7 πολυμεράσης και τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (ATP, CTP, GTP και [α]- <sup>32</sup>P-UTP). Το μετάγραφο που προκύπτει δεν φέρει καμία μετάλλαξη και τροποποίηση.

Το διάλυμα της αντίδρασης περιέχει σε τελικές συγκεντρώσεις 25mM Tris-HCl, pH 7.5, 25mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 75μM AdoMet, 20U RNasin, 1mg/ml BSA και 40 fmol <sup>32</sup>P-ραδιοσημασμένο μεταγράφο του tRNA<sup>asp</sup>. Ο τελικός όγκος (50 μL) συμπληρώνεται με H<sub>2</sub>O (DECP). Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση δεν είναι μολυσμένα από RNάσες (RNase-free).

Τη χρονική στιγμή (t<sub>0</sub>=0) γίνεται προσθήκη του ενζύμου ώστε η συγκέντρωση του στο διάλυμα να είναι 1mg/ml. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 4 διαφορετικές συνθήκες: 37°C, 50°C με ή χωρίς προηγούμενη επώαση στους 80°C για 10min, στους 80°C. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 200μl οξικού νατρίου συγκέντρωσης 0,5M. Το μίγμα φυγοκεντρείται και το RNA συλλέγεται μετά από επεξεργασία με αιθανόλη (το πρωτόκολλο έχει ήδη περιγραφεί).

Τα τροποποιημένα, πλέον, μεταγράφα επεξεργάζονται με νουκλεάση P1 για 12h σε 50mM οξικού αμμωνίου (pH 5,3). Η ταυτοποίηση των ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων επιτυγχάνεται με δύο διαστάσεων χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (2D)TLC. Το μίγμα των ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων εφαρμόζεται σε TLC πλάκα (περίπου 50-100 [α]- <sup>32</sup>P cps) και στη συνέχεια αυτή τοποθετείται διαδοχικά σε δυο διαλύτες ανάπτυξης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η TLC πλάκα τοποθετείται για 2-3 ώρες στο διαλύτη Nishimura N1 και στη συνέχεια για άλλες 2-3h στον Rajbhanary RII, η σύσταση των οποίων είναι αντίστοιχα:

330ml ισοβουτυρικού οξέος

5ml υδροξείδιο του αμμωνίου (25%)

1ml EDTA (0,5M; pH8, 0) και H<sub>2</sub>O μέχρι 500ml(τελικός όγκος)

και

500ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1M; pH6,8)

Τα ραδιενεργά στίγματα οπτικοποιούνται και αναλύονται ποσοτικά με τη βοήθεια του PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) με λογισμικό ImageQuant, ενώ για την ποιοτική ανάλυση των σιγμάτων χρησιμοποιούνται (reference maps) χάρτες (Keith 1995).

### Ταυτοποίηση της (tRNA) m<sup>5</sup>U54 μεθυλτρανσφεράσης στο βακτήριο *Bacillus subtilis*

#### 1. Έλεγχος της τροποποίησης στα στελέχη W168, BFS2838 του *B. subtilis* και MRE600 του *E.coli*

Μετά από γενωμική ανάλυση του γονιδιώματος του *B.subtilis* εντοπίστηκε ένα υποψήφιο γονίδιο για την κωδικοποίηση της (tRNA) m<sup>5</sup>U54 μεθυλτρανσφεράσης, το γονίδιο ονομάζεται *gid*. Στα

παρακάτω πειράματα εξετάστηκαν δύο στελέχη του βακτηρίου *B.subtilis*: το στέλεχος W168 (άγριος τύπος) και το στέλεχος BFS2838 (μεταλλαγμένο στο γονίδιο *gid*). Το μεταλλαγμένο στέλεχος προκύπτει από ενσωμάτωση του πλασμιδίου ρMUTIN στο γονίδιο *gid* του *B.subtilis*. Στο πλασμιδίο ρMUTIN έχει κλωνοποιηθεί μέρος της αλληλουχίας του γονιδίου-στόχου, έτσι ώστε εισαγωγή του πλασμιδίου στα κύτταρα του βακτηρίου να επιτρέπουν ομόλογο ανασυνδυασμό με το γονίδιο-στόχο και διακοπή του πλαισίου ανάγνωσης μετά από αυτόν. Επιπλέον σημαντικά χαρακτηριστικά του ρMUTIN είναι το γονίδιο-αναφοράς της γαλακτοσιδάσης (*lacZ*) και ο προαγωγέας  $P_{\sigma 34}$  που επάγει την έκφραση των γονιδίων του οπερονίου κάτωθεν του γονιδίου-στόχου και ενεργοποιείται με την προσθήκη IPTG. (Vagner et al, 1998)

Αποικίες από πρόσφατη καλλιέργεια των στελεχών W168, BFS2838 του *B. subtilis* και MRE600 του *E.coli* σε LB άγαρ επιλέγονται και καλλιεργούνται χωριστά σε 5ml μέσου LB στους 37°C για 12h. Στη συνέχεια διαλύονται σε 100 ml καλλιεργητικού μέσου LB και επωάζονται ξανά στους 37°C με δυνατή ταλάντευση έως η οπτική πυκνότητα στα 600nm(OD<sub>600</sub>) έχει την τιμή 1.2. Τα κύτταρα της καλλιέργειας συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 8000g στους 4°C για 15min. Το κυτταρικό ίζημα πλένεται με 10ml διαλύματος λύσης (25mM Tris -HCl pH7.5; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 25 mM KCl; 2mM DDT). Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση στα 10.000g στους 4°C για 10min. Το κυτταρικό ίζημα διαλύεται σε 1.5 όγκους διαλύματος λύσης και 0.01 όγκο PIC. Τα κύτταρα διαρρηγνύονται με υπέρηχους και φυγοκεντρώνονται στα 10.000g στους 4°C για 15min. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης περιέχει τις πρωτεΐνες του κυτάρου και το ριβοσωμικό RNA και ονομάζεται κυτταρικό εκχύλισμα S10.

Το κυτταρικό εκχύλισμα S10 υπερ-φυγοκεντρείται στις 42.000gpm στους 4°C για 1h και προκύπτει το κυτταρικό εκχύλισμα S100. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών για κάθε S100 μετράται με τη μέθοδο Bradford. Πιο συγκεκριμένα, 1 μl από το κυτταρικό εκχύλισμα S100 διαλύεται σε 799 μl νερού και αναμιγνύονται με 200 μl διαλύματος Bradford (BioRad). Το μίγμα φωτομετρείται στα 595 nm και οι τιμές που λαμβάνονται συγκρίνονται με την καμπύλη Bradford. Τελικά, οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών από τα τρία κυτταρικά εκχυλίσματα υπολογίζονται:

[S100] *B.subtilis* W168=6.55mg/ml

[S100] *B.subtilis* BF2838=6.8mg/ml

[S100] *E.coli* MRE600=7.8mg/ml

Για την καλύτερη διατήρηση των δειγμάτων προστίθεται 50% γλυκερόλη, επομένως οι τελικές τους συγκεντρώσεις υποδιπλασιάζονται.

Επόμενο βήμα είναι ο έλεγχος της δραστικότητας των κυτταρικών εκχυλισμάτων για την τροποποίηση m<sup>5</sup>U54 στο μόριο του tRNA που επιτυγχάνεται με προσομοίωση της αντίδρασης *in vitro* και TLC, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Ως υποστρώματα για την αντίδραση χρησιμοποιούνται τα μετάγραφα τριών μεταλλαγμένων tRNA γονιδίων: 1) tRNA<sup>s</sup> με διαγραφή του βραχίονα-βρόγχου D (το γονίδιο έχει κλωνοποιηθεί στο πλασμιδίο *rug9*) 2) tRNA<sup>Gln</sup> με διπλή μετάλλαξη G34A και U35G (πλασμιδίο ρHG41) και 3) tRNA<sup>phe</sup> που φέρει τη μετάλλαξη C25U (πλασμιδίο ρHG61). Οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών του ρυθμιστικού διαλύματος στην *in vitro* δοκιμή είναι: 40 mM HEPES

(pH 7,0), 10 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA. Τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης είναι: 2.5 mM FAD, 5 mM NADH, 10 mM NADPH, 0,5 mM τετραβολικού οξέος (TetraHydroFolate THF), 2 mM DTT, 20 U RNAsin, 40 fmol <sup>32</sup>P ραδιοσημασμένο μετάγραφο tRNA. Τέλος, προστίθεται το κυτταρικό εκχύλισμα ώστε η τελική συγκέντρωση των πρωτεϊνών να είναι 1mg/ml. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C. Η συνέχεια για την ανίχνευση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων έχει περιγραφεί ήδη.

Πιο συγκεκριμένα, τελούνται 7 διαφορετικές αντιδράσεις (πίνακας 10)

**Πίνακας 10: Αντιστοιχία κυτταρικών εκχυλισμάτων και υποστρωμάτων tRNA.**

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ
W168 <i>B.subtilis</i>	tRNA <sup>phe</sup>
W168 <i>B.subtilis</i>	tRNA <sup>ala</sup>
W168 <i>B.subtilis</i>	minitRNA <sup>asp</sup>
BFS2838 <i>B.subtilis</i>	tRNA <sup>phe</sup>
BFS2838 <i>B.subtilis</i>	tRNA <sup>ala</sup>
BFS2838 <i>B.subtilis</i>	minitRNA <sup>asp</sup>
MRE600 <i>E.coli</i>	tRNA <sup>asp</sup>

## 2. Απομόνωση του συνολικού tRNA από τα στελέχη W168 και BFS2838 του *B. subtilis*

Καλλιέργειες των στελεχών W168 και BFS2838 του βακτηρίου *B.subtilis* επωάζονται σε καλλιεργητικό μέσο LB (500 ml) για 12h στους 37°C. Η καλλιέργεια του στελέχους BFS2838 μοιράζεται εξίσου σε δύο κωνικές φιάλες όταν η οπτική πυκνότητα στα 600nm (OD<sub>600</sub>) έχει την τιμή 0.2. Σε μία από τις δύο κωνικές φιάλες προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών συνεχίζεται μέχρι η OD<sub>600</sub> να έχει την τιμή περίπου 1.0. Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στα 8000g στους 4°C για 15min. Το κυτταρικό ίζημα ξεπλένεται με 6ml παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος TM (10mM Tris-HCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>). Στο νέο μίγμα προστίθενται 12 ml 90% κορεσμένης φαινόλης και το μίγμα ανακατεύεται για 30min σε 20-25°C. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 10000g στους 4°C για 20min. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης τοποθετείται σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται 120μL οξικού νατρίου (pH 5,0) και 2ml 100% αιθανόλης, για την κατακρήμιση του RNA. Οι τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες φυλάσσονται στους -20°C. Μετά από 12h, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 6.500g για 1h. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης απομακρύνεται και τα κατακρημνισμένα νουκλεϊκά οξέα ξεπλένονται με 70% αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 6500g για 20 min, το ίζημα στεγνώνει και προστίθεται νερό κατεργασμένο με DEPC.



Στο τελικό στάδιο για τον καθαρισμό του tRNA εφαρμόζεται χρωματογραφία ανιοανταλλαγής (anion- exchange chromatography). Τρία διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιούνται για την πλύση της στήλης, των οποίων η σύσταση περιγράφεται παρακάτω:

Ρυθμιστικό διάλυμα 1: 10mM Tris-HCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1M NaCl

Ρυθμιστικό διάλυμα 2: 10mM Tris-HCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 0,3M NaCl και

Ρυθμιστικό διάλυμα 3: 10mM Tris-HCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 0,6M NaCl.

Με την εφαρμογή ρυθμιστικών διαλυμάτων χαμηλής περιεκτικότητας σε άλατα (π.χ. 0,3M NaCl) εκλύονται πρωτεΐνες που ενδεχομένως υπήρχαν στα δείγματα, ενώ με την εφαρμογή διαλύματος που περιέχει 0,6M NaCl εξέρχεται από την στήλη το tRNA και 5s rRNA. Το tRNA που εκλύεται θα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

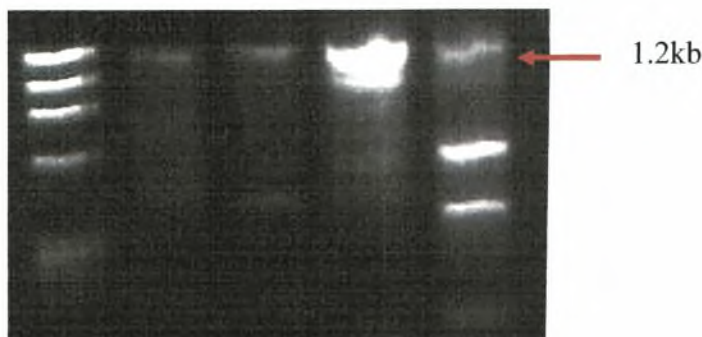
Κλωνοποίηση, έκφραση, καθαρισμός και βιοχημικός έλεγχος της (tRNA)<sup>m<sup>5</sup></sup>U54 μεθυλτρανσφεράσης του αρχαίου *P.abysssi*.

➤ Αναζήτηση σε ψηφιακές τράπεζες δεδομένων:

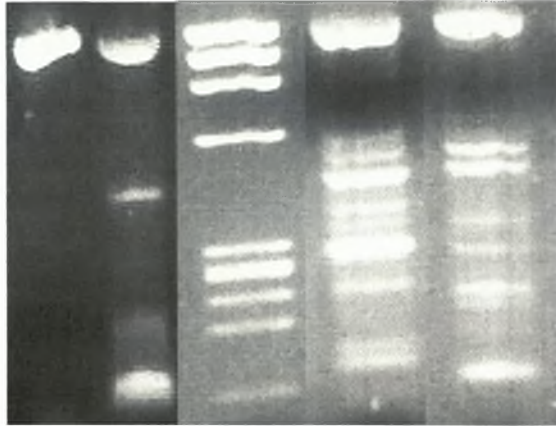
Στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας έγινε χρήση των πολύτιμων εργαλείων της βιοπληροφορικής. Ο δικτυακός τόπος του National Center for Biotechnology Information (NCBI) και πιο συγκεκριμένα το πρόγραμμα Clusters of Orthologous Groups (COG) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). Η ιστοσελίδα δίνει τη δυνατότητα για αναζήτηση και σύγκριση των αποθηκευμένων αλληλουχιών με αλληλουχίες της επιλογής μας. Χρησιμοποιώντας την αλληλουχία του γονιδίου *trnA* από το βακτήριο *E.coli* αναζητούνται ομόλογες ακολουθίες στο αρχαίο *P.abysssi*. Μετά την αναζήτηση εμφανίζονται δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης στο γένωμα του συγκεκριμένου αρχαίου που παρουσιάζουν ομολογία με το γονίδιο *trnA* και ανήκουν στο COG2265: κατηγορία μεθυλτρανσφερασών εξαρτώμενες από το συνένζυμο AdoMet.

➤ Αποτελέσματα κλωνοποίησης

Δύο διαδοχικές PCR πραγματοποιήθηκαν ώστε να αυξηθεί η απόδοση της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα των δύο αντιδράσεων παρουσιάζονται παρακάτω. Οι αντιδράσεις για την ενίσχυση των αλληλουχιών- στόχων PAB0760Cter (B) και PAB0719Nter (C) αποδίδουν πολλά παραπροϊόντα. Βεβαίως, ο καθαρισμός των προϊόντων PCR (ζώνη με μέγεθος 1.2kb) με αποκοπή τους από το πήκτωμα αγαρόζης επιλύει το πρόβλημα των παραπροϊόντων και επιτρέπει την εφαρμογή των επόμενων βημάτων μόνο στο επιθυμητό προϊόν της αντίδρασης.

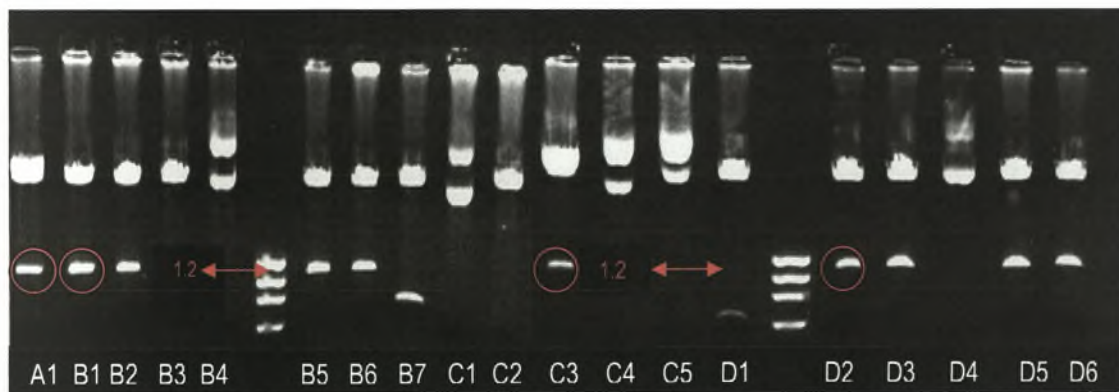


Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση των PCR1 προϊόντων σε 1% πήκτωμα αγαρόζης. Από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται ο μάρτυρας, PCR1A, PCR1B, PCR1C και PCR1D. Η ενίσχυση της αλληλουχίας PAB0760 (προϊόντα A και B) δεν είναι σημαντική, ενώ κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας D εμφανίζονται παραπροϊόντα.



Εικόνα 12: Έλεγχος των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η πρώτη και η δεύτερη στήλη αναφέρονται στην ενίσχυση των αλληλουχιών A και D αντίστοιχα. Η τρίτη στήλη είναι ο μάρτυρας. Οι δύο τελευταίες στήλες αποτυπώνουν τα PCR2 προϊόντα κατά την ενίσχυση των αλληλουχιών B και C αντίστοιχα.

Μετά τη συνένωση της αλληλουχίας-στόχου και του φορέα κλωνοποίησης ακολουθεί μετασχηματισμός κυττάρων XL1 blue *E.coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Για την ανίχνευση των θετικών κλώνων έγινε εξαγωγή του πλασμιδίου από τα βακτηριακά κύτταρα και πέψη του με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Τα αποτελέσματα της πέψης ελέγχονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (εικόνα 13)



Εικόνα 13: Μετά την πέψη του πλασμιδιακού DNA, ο έλεγχος για την παρουσία της αλληλουχίας-στόχου έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Το όνομα κάθε πλασμιδίου, επομένως και της αλληλουχίας-στόχου, αναγράφεται στο κάτω μέρος κάθε στήλης. Τα πλασμίδια A1 (pA1), ομοίως pB1, pC3 και pD2 είναι εκείνα που επιλέγονται να αποσταλούν για αλληλούχηση και να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα έκφρασης.

Τέσσερις διαφορετικές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες αναμένεται να εκφραστούν μετά από επαγωγή του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης από IPTG. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών, που αναμένονται, υπολογίζονται ως:

- 48,6 kDa για την A (431aa,  $pI=9,97$ )
- 48,6 kDa για την B (431aa,  $pI=9,77$ )
- 49 kDa για την C (426aa,  $pI=9,23$ )
- 49,1 kDa για την D (427aa,  $pI=8,98$ )

Από τα πειράματα έκφρασης, στα οποία δοκιμάστηκαν αρκετές διαφορετικές συνθήκες έκφρασης, επιλέχθηκε ο συνδυασμός των συνθηκών που απέδιδε καλύτερο κλάσμα διαλυτής προς αδιάλυτης μορφής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Υπάρχουν τα δείγματα S και P (όπως περιγράφηκε στο μέρος *Υλικά και Μέθοδοι*), τα πρώτα αντιστοιχούν στην ποσότητα της διαλυτής πρωτεΐνης, που υπάρχει ελεύθερη στο κύτταρο και επομένως διατηρεί στην δραστικότητα της, ενώ τα δείγματα P στην ποσότητα του ενζύμου που είναι δεσμευμένη στη κυτταρική μεμβράνη.

Μετά την βελτιστοποίηση των συνθηκών επιχειρείται καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας (metal affinity chromatography). Ο καθαρισμός πραγματοποιείται μόνο για τις πρωτεΐνες B και D για τους παρακάτω λόγους:

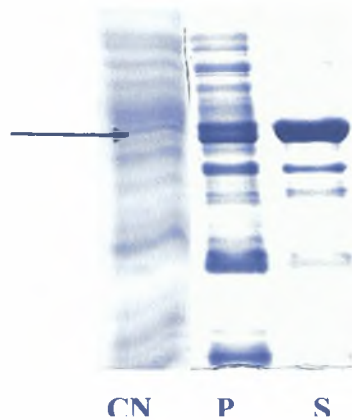
A) έχει παρατηρηθεί γενικά ότι η ουρά ιστιδίνης στο καρβόξυ-τελικό άκρο δεν επηρεάζει την δραστικότητα της πρωτεΐνης.

B) η έκφραση της ουράς ιστιδίνης στο καρβόξυ-τελικό άκρο προϋποθέτει την ολοκληρωμένη μεταγραφή και μετάφραση της αλληλουχίας-στόχου.

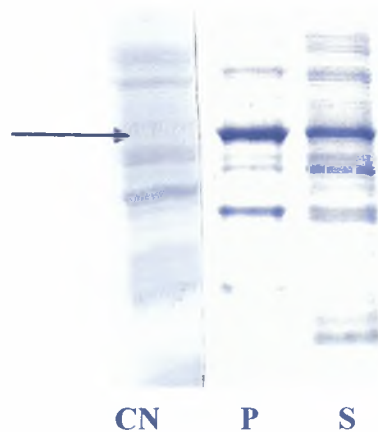
Γ) σε αυτές τις πρωτεΐνες παρατηρήθηκε ο υψηλότερος ρυθμός διαλυτής προς αδιάλυτης μορφής της πρωτεΐνης (βλ. εικόνες 14,15).

Μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών επιχειρείται καθαρισμός των πρωτεϊνών υπό τις βέλτιστες συνθήκες με χρωματογραφία συγγένειας. Η επιλογή της μεθόδου οφείλεται στην αλληλεπίδραση της ουράς ιστιδίνης (6 διαδοχικά κατάλοιπα ιστιδίνης) με ιόντα νικελίου. Η ουρά ιστιδίνης είναι μικρή και αφόρτιστη σε pH 8.0 και γενικά δεν επηρεάζει την έκκριση ή την αναδίπλωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο. Μετά από σειρά πειραμάτων σε διάφορους τύπους πρωτεϊνών έχει τεκμηριωθεί ότι η ουρά ιστιδίνης δεν επεμβαίνει στη δομή και στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που προκύπτουν από τη διαδικασία καθαρισμού αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%.

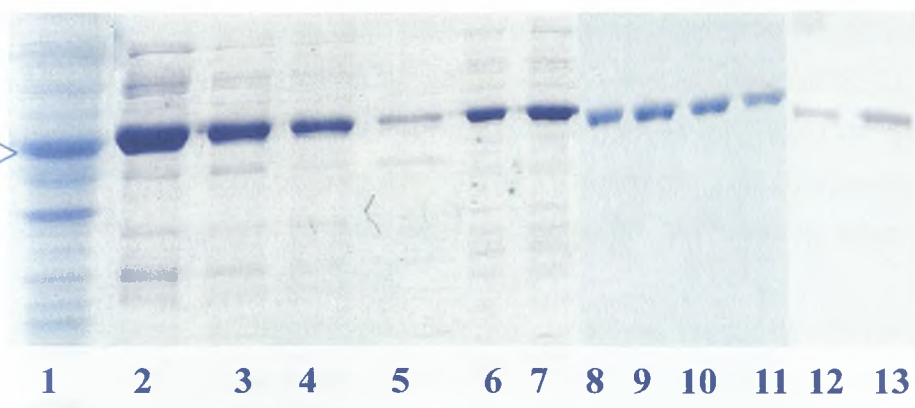
Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ώστε να δοκιμαστεί στη συνέχεια η δραστικότητα της ως  $m^5U$  μεθυλτρανσφεράση. Είναι πολύ σημαντικό ο καθαρισμός να διεξαχθεί με επιτυχία αφού υπάρχει συγγενές ομόλογο ένζυμο στο μικροοργανισμό *E.coli* (προϊόν *trmA*). Εάν ο καθαρισμός δεν είναι επιτυχής μπορεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης *in vitro* να οφείλεται στην  $m^5U$  μεθυλτρανσφεράση του επιδεκτικού κυττάρου.



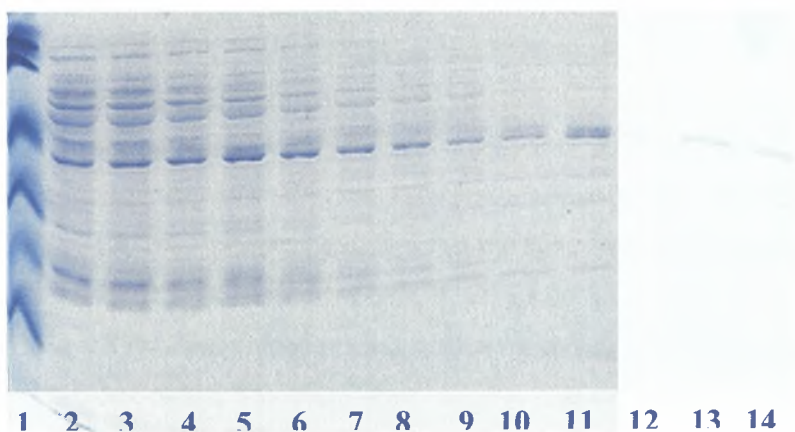
Εικόνα 14: Η βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης των πρωτεϊνών απαιτεί τη δοκιμασία αρκετών συνδυασμών των διαφορετικών παραμέτρων της διαδικασίας. Σκοπός είναι ο προσδιορισμός της καλύτερης αναλογίας μεταξύ της διαλυτής (S) και αδιάλυτης (P) μορφής της πρωτεΐνης. Για την έκφραση της πρωτεΐνης D αποφασίστηκαν οι παρακάτω συνθήκες: βακτηριακό στέλεχος: BL21 Plus codon *E.coli*, θερμοκρασία: 20°C, καλλιεργητικό μέσο: LB. Η ποσότητα της αδιάλυτης και της διαλυτής μορφής φαίνονται στην εικόνα (CN: αρνητικός μάρτυρας έκφρασης της πρωτεΐνης D, P: αδιάλυτη μορφή και S: διαλυτή πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα). Ο έλεγχος των πρωτεϊνικών κλασμάτων έγινε σε πήκτωμα 12% πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.



Εικόνα 15: Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες για τον έλεγχο της έκφρασης της πρωτεΐνης B υπό συνθήκες: βακτηριακό στέλεχος: BL21 *E.coli*, θερμοκρασία: 20°C, καλλιεργητικό μέσο: LB. Η ποσότητα της αδιάλυτης και της διαλυτής μορφής φαίνονται στην εικόνα (CN: αρνητικός μάρτυρας έκφρασης της πρωτεΐνης B, P: αδιάλυτη μορφή και S: διαλυτή πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα). Η ελεύθερη (διαλυτή) και αδιάλυτη πρωτεΐνη εκφράζονται σχεδόν ισοδύναμα.



Εικόνα 16: Ανάλυση των πρωτεϊνικών κλασμάτων κατά τον καθαρισμό της ανασυνδρασμένης πρωτεΐνης PAB0719-Cter σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%. Μετά το μάρτυρα, ακολουθούν τα πρωτεϊνικά κλάσματα 1-7 που εξέρχονται μετά την εφαρμογή του διαλύματος έκλουσης, ενώ τα κλάσματα 8-11 προέρχονται από επαναληπτική χρωματογραφία λόγω της χαμηλής ποιότητας καθαρισμού από την πρώτη. Τέλος, τα κλάσματα 12 και 13 είναι μετά τη διαπίδυση των κλασμάτων 8-11.



Εικόνα 17: Ανάλυση των πρωτεϊνικών κλασμάτων κατά τον καθαρισμό της ανασυνδρασμένης πρωτεΐνης PAB0760-Cter σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%. Στην πρώτη στήλη είναι ο μάρτυρας, από τη στήλη 2-11 είναι τα πρωτεϊνικά κλάσματα που εξέρχονται μετά την εφαρμογή διαλύματος έκλουσης και από την στήλη 12-14 είναι τα πρωτεϊνικά κλάσματα μετά την διαπίδυση των 7-11 κλασμάτων.

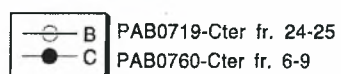
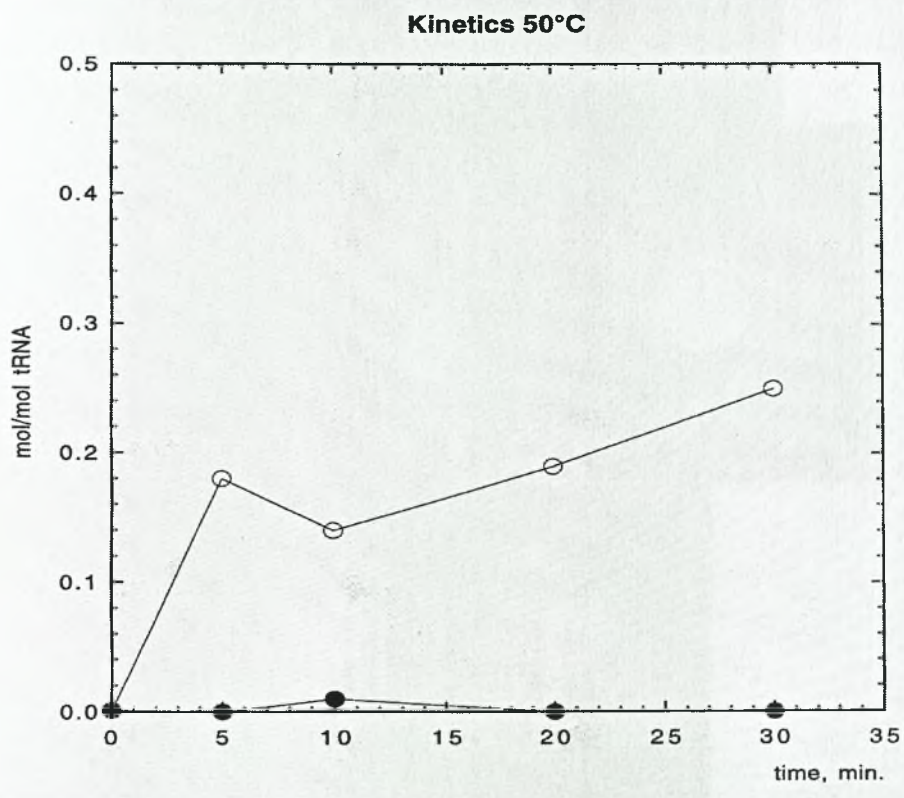
### Αποτελέσματα των δοκιμών για την ενζυμική δραστικότητα

Η δραστικότητα των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών ως (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤαση ελέγχεται βιοχημικά. Γενικά, η δραστικότητα των τροποποιητικών ενζύμων του μορίου tRNA δοκιμάζεται *in vitro*. Ως υπόστρωμα για τη δοκιμασία της δραστικότητας χρησιμοποιούνται ραδιοσημασμένα ([<sup>32</sup>P], [<sup>14</sup>C] ή [<sup>3</sup>H]) μετάγραφα από συνθετικά γονίδια tRNA που κωδικοποιούν, τα οποία έχουν την πρωτοταγή δομή των μορίων tRNA, αλλά δεν έχουν υποστεί καμία τροποποίηση. Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ραδιοσημασμένη ουρακίλη (πιο συγκεκριμένα <sup>32</sup>P- UTP) κατά την μεταγραφή του συνθετικού γονιδίου από την T7 πολυμεράση.

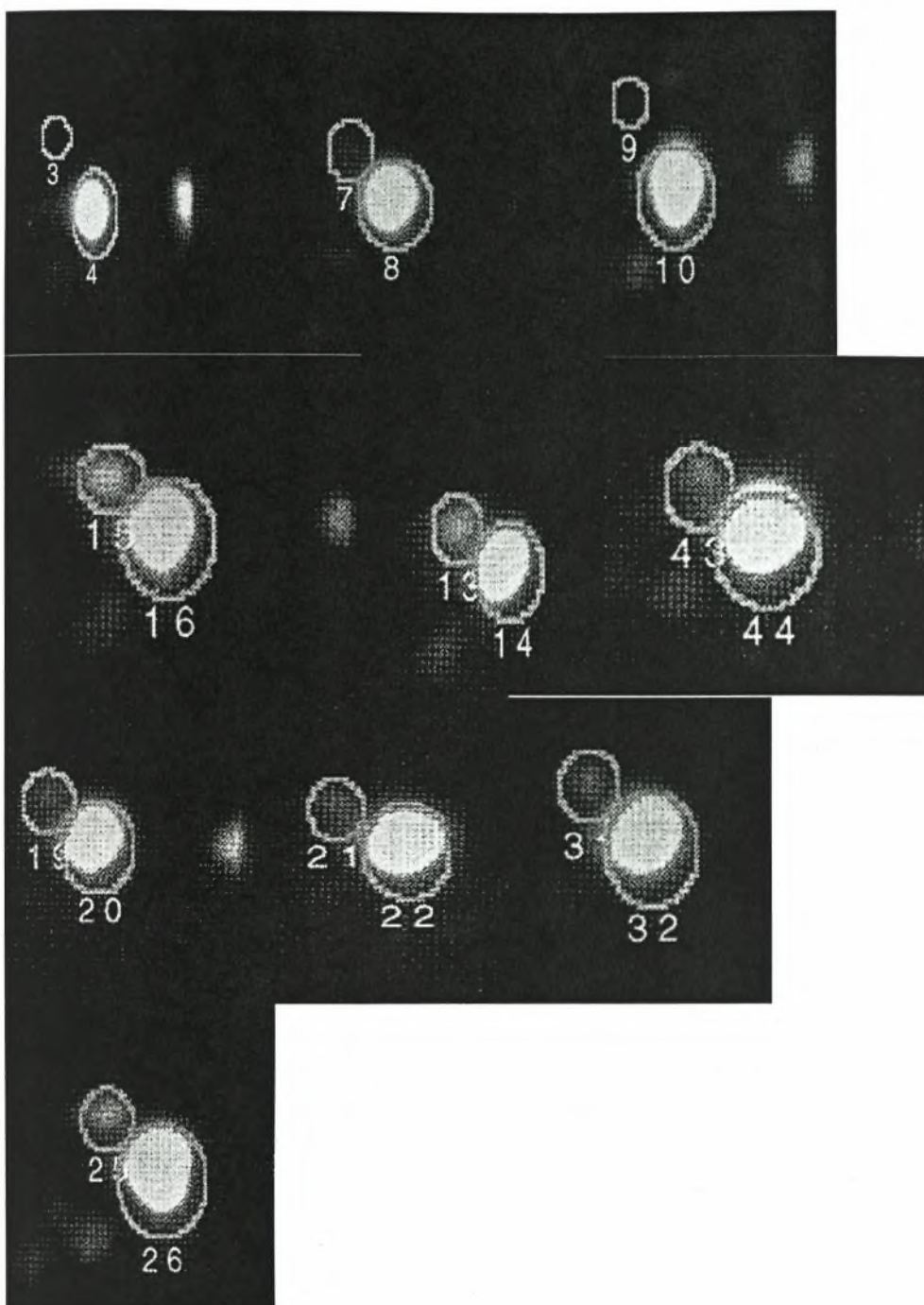
Η αναμενόμενη αντίδραση πραγματοποιείται με ανάμειξη του παραπάνω υποστρώματος με το προς εξέταση ένζυμο. Ως πηγή ενζύμου χρησιμοποιείται είτε κυτταρικό εκχύλισμα του υπό μελέτη οργανισμού (περίπτωση *B.subtilis*), είτε καθαρό ένζυμο (περίπτωση *P. abyssi*). Μετά το πέρας της αντίδρασης τα τροποποιημένα μόρια tRNA επεξεργάζονται με νουκλεάση (είτε την P1, είτε την T2 νουκλεάση) και τα νουκλεοτίδια που παράγονται ταυτοποιούνται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography). Στη εικόνα 18 φαίνονται τα αποτελέσματα από την αντίδραση των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών B και D με το μόριο tRNA<sup>asp</sup> σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στα *Υλικά και Μέθοδοι*.

Ποσοτικοποιώντας τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας TLC συμπεραίνεται ότι η πρωτεΐνη που έχει δραστικότητα (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάσης είναι εκείνη που κωδικοποιείται από την αλληλουχία PAB0719Cter (πρωτεΐνη D). Η δραστικότητα της τελευταίας ανέρχεται περίπου στα 0,3mole ενζύμου/ 1 mole tRNA (η βέλτιστη τιμή που μπορεί να λάβει μια αντίδραση τροποποίησης είναι 1mole ενζύμου/ 1 mole tRNA) σε αντίθεση με τη δραστικότητα της πρωτεΐνης B, για την οποία δεν ανιχνεύτηκε η τροποποίηση m<sup>5</sup>U54 στο υπόστρωμα (εικόνα 19). Προφανές είναι ότι η βέλτιστη τιμή της δραστικότητας της πρωτεΐνης D μετράται στη θερμοκρασία 80°C, που προσομοιάζει εκείνη της φυσιολογικής θερμοκρασίας ανάπτυξης του *Pyrococcus abyssi*, η τιμή της είναι 0.88 mole ενζύμου/ 1 mole tRNA, ενώ στην ίδια θερμοκρασία η τιμή της δραστικότητας της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης B υπολογίζεται 0,02mole ενζύμου/ 1 mole tRNA. Επώαση του μίγματος της αντίδρασης στους 80°C για 10 λεπτά πριν την αντίδραση επιβεβαιώνει ότι πιθανή μόλυνση του ενζύμου με το ομόλογο ένζυμο trmA δεν επιδρά στο αποτέλεσμα. Σύμφωνα με τα τελικά πειράματα για την ταυτοποίηση της m<sup>5</sup>U54 μεθυλτρανσφεράσης του αρχαίου *Pyrococcus abyssi* είναι δυνατό να πούμε ότι το υπεύθυνο γονίδιο για την κωδικοποίηση της αναγράφεται ως PAB0719.

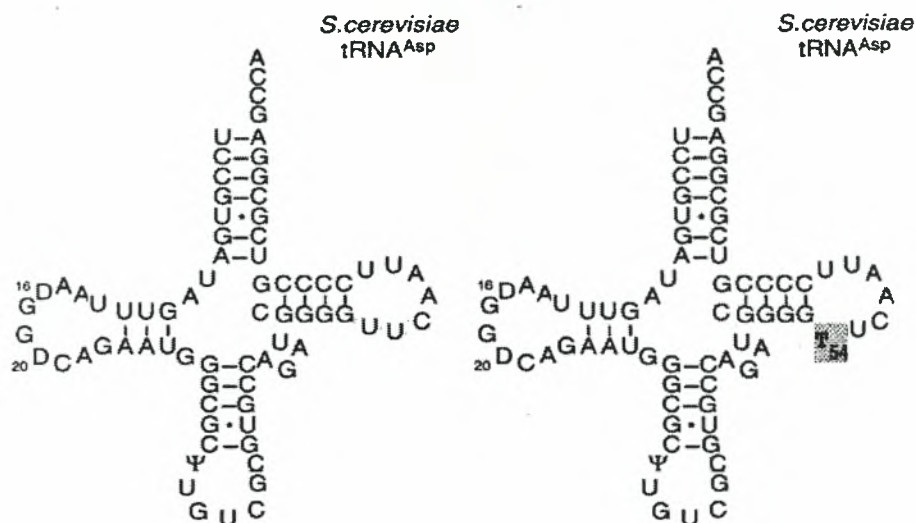




Εικόνα 18: Μετά την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων από την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιούνται οι τιμές τους από την αντίδραση στους 50°C για να βρεθεί η κινητική της αντίδρασης.

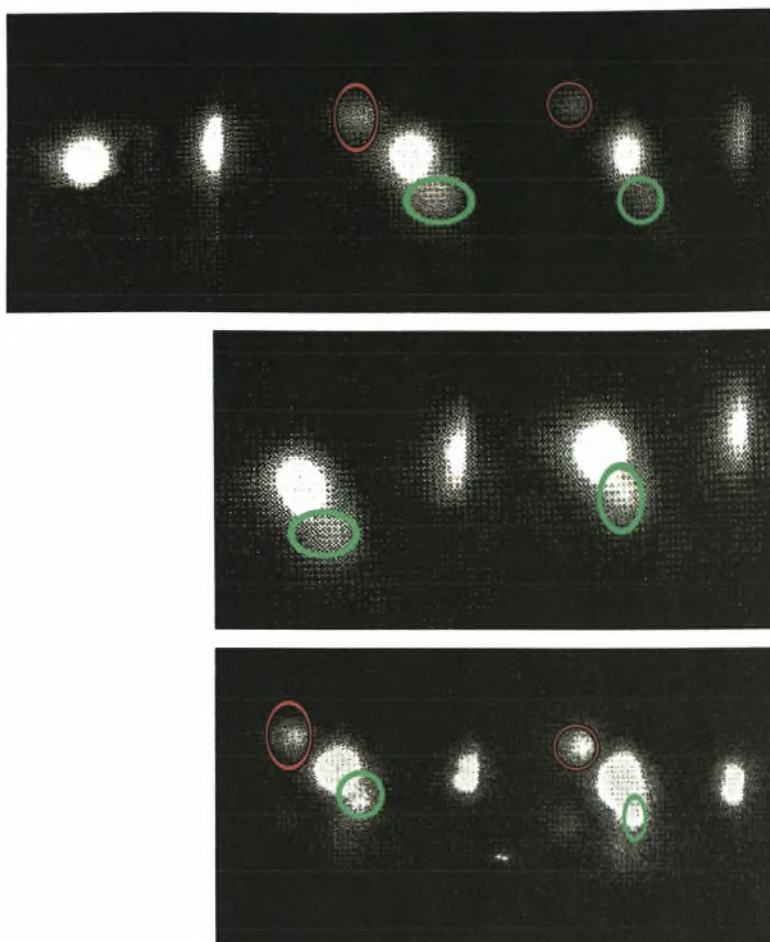


Εικόνα 19: Κάθε κύκλος στην παραπάνω εικόνα ταυτίζεται με ένα ραδιοσημασμένο νουκλεοτίδιο. Συγκρίνοντας τους κύκλους της εικόνας με χάρτες τροποποιημένων και μη ραδιενεργών κύκλων συμπεραίνουμε ότι ο μεγάλος κύκλος ταυτίζεται με την ουρακίλη (U), ενώ ο μικρός κύκλος πάνω από την ουρακίλη είναι το τροποποιημένο νουκλεοτίδιο  $m^5U54$ . Η σειρά που παρουσιάζονται οι αντιδράσεις είναι: (1) μάρτυρας- δεν υπάρχει πρωτεΐνη στο μίγμα της αντίδρασης, (2) 37°C; χρόνος επώασης 30min, (3) 37°C; χρόνος επώασης 60min, (4) 80°C χωρίς προηγούμενη επώαση στους 50°C ; χρόνος επώασης 30min (5) 80°C χωρίς προηγούμενη επώαση στους 50°C ;χρόνος επώασης 60min (6) 50°C με προ-επώαση στους 80°C για 10min: χρόνος επώασης 30min, (7), (8), (9) και (10) 50°C για χρόνους επώασης 5, 10, 20 και 30 min αντίστοιχα. Ανάλογα παίρνουμε και το αποτύπωμα για την πρωτεΐνη B.

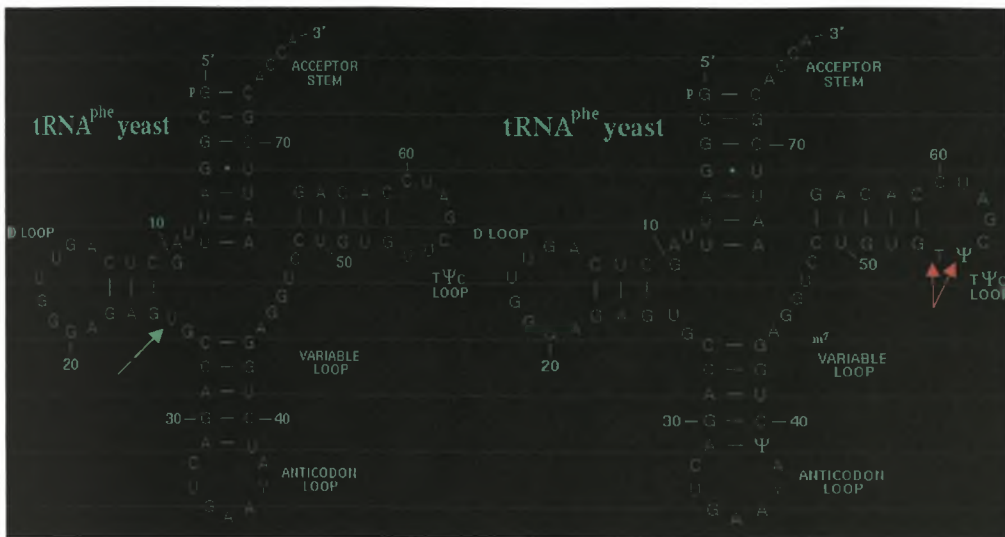


Εικόνα 20: Το μόριο tRNA της ασπαραγίνης χωρίς καμία μετά-μεταγραφική τροποποίηση (20α). Το παραπάνω μόριο προκύπτει από μεταγραφή του γονιδίου της ασπαραγίνης από την T7 πολυμεράση. Η μοναδική τροποποίηση που αναμένεται να παρατηρηθεί μετά την αντίδραση σημειώνεται στο σχήμα 20β.

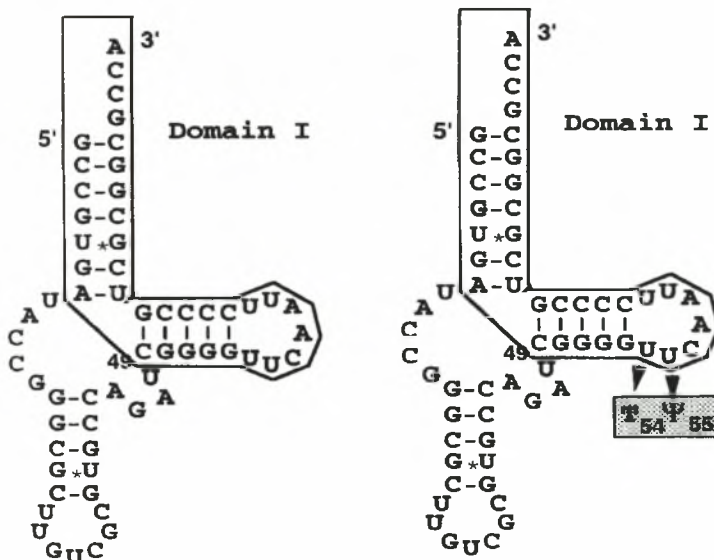
Στη συνέχεια αξιολογούνται τα αποτελέσματα της δοκιμασίας *in vitro* για την ταυτοποίηση του γονιδίου *gid* ως υποψήφιο γονίδιο (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤασης για το βακτήριο *B.subtilis*. Όπως αναφέρεται και στο πειραματικό μέρος δοκιμάστηκαν 3 διαφορετικά υποστρώματα ώστε να προσδιοριστεί η εξειδίκευση του ενζύμου. Το ραδιενεργό αποτύπωμα που προκύπτει από τη χρωματογραφία TLC εμφανίζεται στην εικόνα 21. Είναι ευδιάκριτη η διαφορά μεταξύ του *E.coli* και των στελεχών του *B.subtilis*, καθώς και η απουσία της τροποποίησης από το μεταλλαγμένο στέλεχος BFS2838. Από την ποσοτικοποίηση των ραδιενεργών σημάτων, φαίνεται ότι η καλύτερη δραστηριότητα ανιχνεύθηκε στην αντίδραση με το mini-υπόστρωμα του tRNA<sup>asp</sup> ( 0,76 mole ενζύμου/ 1 mole tRNA) ενώ κατά την διάρκεια των αντιδράσεων η δραστηριότητα μειωνόταν, γεγονός που ενδεχομένως οφείλεται στη μείωση της δραστηριότητας των συνενζύμων στο διάλυμα, τα φλάβινο-αδένινο συνένζυμα είναι συνήθως ευαίσθητα στην οξειδωση και το φως.



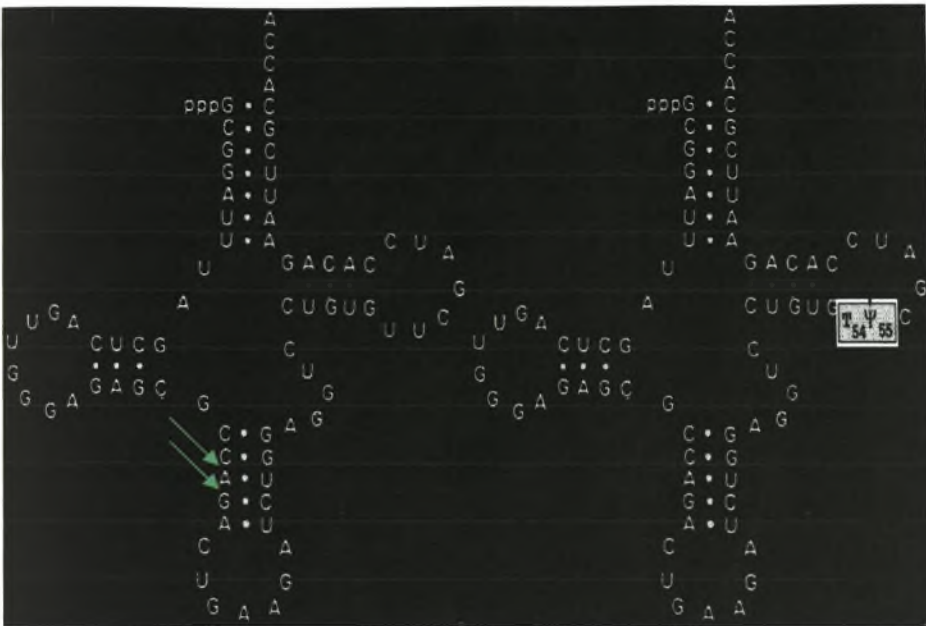
Εικόνα 21: Η ανάλυση της χρωματογραφίας TLC. Η αντίδραση είναι μεταξύ του mini-υποστρώματος του tRNA<sup>asp</sup> και των τριών κυτταρικών εκχυλισμάτων: 168 *B.subtilis*, BFS2838 *B.subtilis* και MRE600 *E.coli* αντίστοιχα με την σειρά εμφάνισης. Η πρώτη πλάκα είναι ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης (δεν προστίθεται κυτταρικό εκχύλισμα). Ο κόκκινος κύκλος περικλείει την τροποποίηση m<sup>5</sup>U54 και ο πράσινος κύκλος την ψευδοουριδίνη (Ψ).



Εικόνα 22: Στην εικόνα 22α παρουσιάζεται το μεταλλαγμένο μόριο tRNA της φαινυλαανίνης. Η μετάλλαξη δείχνεται με ένα πράσινο βέλος, ενώ στην εικόνα 22β με κόκκινο βέλος δείχνονται οι τροποποιήσεις του μορίου μετά από την επώασή του με κυτταρικό εκχύλισμα από τον *B.subtilis*.



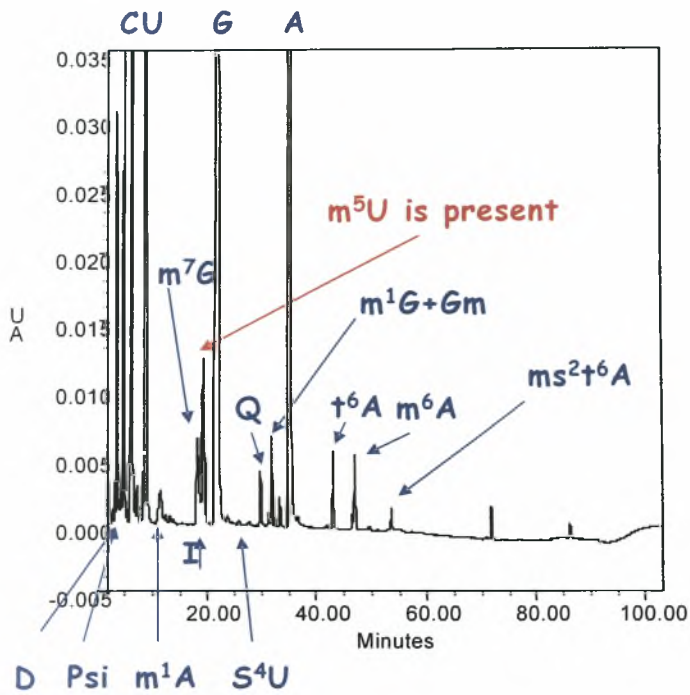
Εικόνα 23: Το μόριο του tRNA της ασπαραγίνης με διαγραφή του βραχίονα- βρόγχου D χωρίς καμία μεταγραφική τροποποίηση όπως προκύπτει από μεταγραφή του πλασμιδίου pHG9 από την T7 πολυμεράση. Στο σχήμα αριστερά στην εικόνα είναι το μετάγραφο πριν την επώαση με το κυτταρικό εκχύλισμα του *B.subtilis*, ενώ στα δεξιά με γκρι φόντο εμφανίζονται οι τροποποιήσεις που υφίστανται στο βρόγχο TΨC.



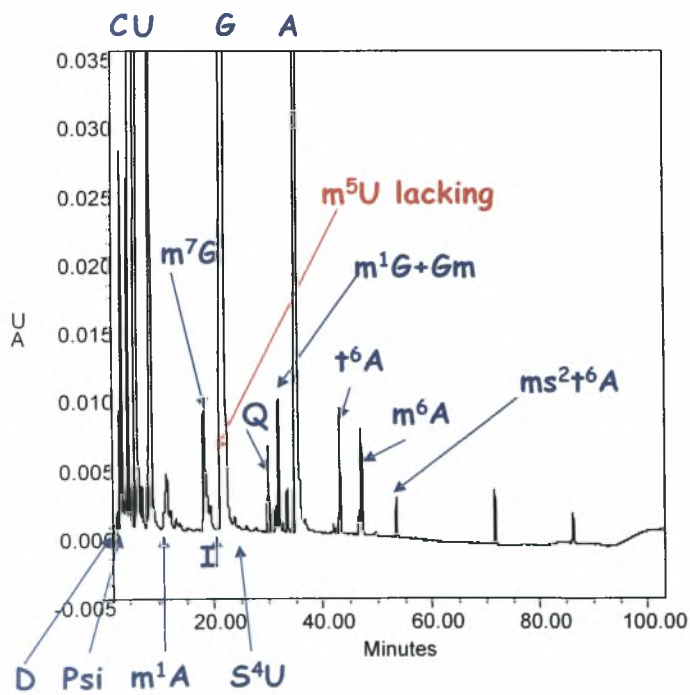
Εικόνα 24: Στην εικόνα 24α παρουσιάζεται το μεταλλαγμένο μόριο (διπλή μετάλλαξη) του tRNA της φαινυλαλανίνης. Οι μεταλλάξεις δείχνονται με ένα πράσινο βέλος, ενώ στην εικόνα 24β οι τροποποιήσεις του μορίου μετά από την επώασή του με κυτταρικό εκχύλισμα από τον *B.subtilis* δείχνονται με γκρι φόντο.

### Αποτελέσματα από την HPLC

Η απουσία του τροποποιημένου νουκλεοτιδίου  $m^5U54$  από τα μόρια του tRNA του μεταλλαγμένου στελέχους BFS2838 πιστοποιείται επιπλέον με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Στις εικόνες 25 και 26 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας. Πρόκειται για μια ανάλυση των φυσικών νουκλεοτιδίων που ανιχνεύονται στα μόρια tRNA από τα στελέχη W168 και BFS2838 του βακτηρίου *B. subtilis*. Η απουσία του γονιδίου *gid* είναι η ουσιαστική γενετική διαφορά μεταξύ των δύο στελεχών του *B.subtilis* και η οποία ταυτίζεται με την απουσία ενός βιοχημικού μονοπατίου, όπως ανιχνεύεται και με αυτή τη μέθοδο.



Εικόνα 25: Η ανάλυση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων που ανιχνεύονται στα μόρια tRNA του στελέχους W168 του *B.subtilis*. Η κορυφή που δείχνει το κόκκινο βέλος δηλώνει την παρουσία της  $m^5U$  στο άγριο τύπο του βακτηρίου.



Εικόνα 26: Η ανάλυση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων που ανιχνεύονται στα μόρια tRNA του στελέχους BFS2838 του *B.subtilis*. Συγκρίνοντας τις κορυφές από τα δύο χρωματογραφήματα διαπιστώνεται ότι απουσιάζει η κορυφή της τροποποίησης  $m^5U$ , ενώ ταυτίζονται όλες οι υπόλοιπες τροποποιήσεις.

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



Τα μόρια tRNA υπόκεινται σε ένα μεγάλο αριθμό μετά-μεταγραφικών τροποποιήσεων. Η πιο κοινή τροποποίηση των μορίων tRNA σε όλα τα φυλογενετικά βασίλεια είναι η μεθυλίωση. Η μεθυλίωση αποτελεί μια απλή τροποποίηση του tRNA δίνοντας όμως μια τεράστια ποικιλία τροποποιημένων νουκλεοτιδίων, αφού μπορούν να μεθυλωθούν άτομα N, C ή O, τόσο της αζωτούχου βάσης, όσο και της ριβόζης. Ο συνδυασμός της απλής δράσης του ενζύμου, όσο και της ποικιλίας προϊόντων που προκύπτουν, κάνουν την οικογένεια των tRNA-μεθυλτρανσφερασών ελκυστική για τους εξελικτικούς βιολόγους. Ένα μεθυλιωμένο νουκλεοτίδιο, αποτέλεσμα μετα-μεταγραφικής τροποποίησης, είναι το νουκλεοτίδιο της 5-μεθύλ-ουρακίλης στη θέση 54 ( $m^5U54$ ) του μορίου tRNA. Η τροποποίηση αυτή είναι παρούσα και στα τρία βασίλεια. Η ταυτοποίηση του γονιδίου έχει επιτευχθεί για τα Gram-αρνητικά βακτήρια και τους ευκαρυώτες, όχι όμως για τα Gram-θετικά βακτήρια και τα αρχαία. Η προσέγγιση των δύο γονιδίων ήταν τελείως διαφορετική. Στην περίπτωση της ταυτοποίησης του γονιδίου από το αρχαίο *Pyrococcus abyssi* είναι ήδη αναγνωρισμένα δύο ομόλογα γονίδια, που κωδικοποιούν δύο καλά μελετημένες μεθυλτρανσφεράσες (pTRM2 και pTRMA). Στην άλλη περίπτωση, εκείνη του *Bacillus subtilis*, γίνεται προσπάθεια ανίχνευσης του υπεύθυνου γονιδίου από μια γνωστή βιοχημική λειτουργία. Παρ' όλα αυτά το ζητούμενο είναι η ταυτοποίηση δύο γονιδίων που συμπληρώνουν το παζλ για την ανίχνευση των (tRNA)  $m^5U54$  ΜΤάσων που εκφράζονται στα τρία βασίλεια της ζωής (Ευκαρυώτες, Βακτήρια και Αρχαία). Η τροποποίηση  $m^5U54$  στο βρόγχο TΨC του tRNA είναι παρούσα και στα τρία βασίλεια.

Το υπεύθυνο γονίδιο για την κωδικοποίηση της (tRNA)  $m^5U54$  ΜΤάσης από το αρχαίο *P.abyssi* έχει κλωνοποιηθεί και το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου έχει ελεγχθεί βιοχημικά για την δραστικότητα του. Το γονίδιο PAB0719 του *P. abyssi* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με δραστικότητα (tRNA)  $m^5U54$  ΜΤάσης. Η τιμή της τελευταίας, όπως προκύπτει από την δοκιμή in vitro, δεν είναι υψηλή, αλλά είναι δικαιολογημένη. Η δραστικότητα των προς εξέταση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιείται in vitro σχεδιάζοντας ένα ετερόλογο σύστημα: πηγή ενζύμου αρχαίο *P. abyssi*-υπόστρωμα tRNA<sup>ASP</sup> από τον ευκαρυωτικό οργανισμό *S.cerevisiae*. Δυστυχώς η ελλιπής γνώση του πρότυπου τροποποιήσεων των μορίων tRNA και η υψηλή περιεκτικότητα σε GC βάσεις (που εμποδίζουν την μεταγραφή από την T7 πολυμεράση) των γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια tRNA του οργανισμού *Pyrococcus abyssi* δεν επιτρέπει το σχεδιασμό ενός ομόλογου συστήματος. Το αρχαίο *Pyrococcus abyssi* είναι ένας υπέρ-θερμόφιλος οργανισμός, της τάξης των *Thermococcales*, που ο μεταβολισμός του τελείται παρουσία θείου. Αναπτύσσεται κάτω από αυστηρά αναερόβιες συνθήκες κοντά σε θερμικές πηγές και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι 100°C. Επομένως, βέλτιστη θερμοκρασία για τη δραστικότητα των ενζύμων αυτού είναι εκείνη των 100°C. Αντιθέτως, τα μη τροποποιημένα μετάγραφα από την T7 πολυμεράση των γονιδίων tRNA από τον ευκαρυώτη *S.cerevisiae* μετουσιώνονται περίπου στους 55°C. Επομένως, για το καλύτερο αποτέλεσμα επιλέγεται η μέτρηση της δραστικότητας να πραγματοποιηθεί στους 50°C. Λογικά, ακόμα και σε αυτή τη

θερμοκρασία, το ομόλογο ένζυμο του *E.coli* μετουσιώνεται και χάνει τη δραστικότητά του, επομένως ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες για ψευδώς θετική αντίδραση.

Από την άλλη πλευρά, τα πειράματα *in vitro* για την ταυτοποίηση του γονιδίου της (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάσης του *B.subtilis* σπηρίζονται στο διαφορετικό γενετικό προφίλ δυο στελεχών του βακτηρίου που ανακλάται στο κυτταρικό πρωτεϊνικό εκχύλισμά τους. Η παρουσία ή απουσία του τροποποιημένου νουκλεοτιδίου m<sup>5</sup>U σχετίζεται με την έκφραση ή όχι αντίστοιχα του γονιδίου *gid*. Εντούτοις, οι συγκεκριμένες βιοχημικές δοκιμές δεν είναι παρά μόνο ενδείξεις για την συμβολή αυτού του γονιδίου στο μονοπάτι σύνθεσης του τροποποιητικού ενζύμου: m<sup>5</sup>U54 Μτάση. Είναι σαφές ότι θα πρέπει το γονίδιο να κλωνοποιηθεί και το πρωτεϊνικό προϊόν του να δοκιμασθεί *in vitro*.

Τα πειράματα όμως αυτά έδωσαν και άλλα στοιχεία για τη φύση αυτού του εξαρτώμενου από φολικό οξύ ενζύμου. Κατ' αρχήν βρέθηκε η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος και των συνενζύμων που απαιτούνται για τη μέγιστη απόδοση της αντίδρασης, δεδομένα που προήλθαν από βιβλιογραφική μελέτη και πειραματισμό (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται εδώ). Επίσης, η πραγματοποίηση της αντίδρασης με τρία διαφορετικά υποστρώματα φανέρωσε την εξειδίκευση του ενζύμου. Διαπιστώθηκε ότι η (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάση του *B.subtilis* αναγνωρίζει τμήμα του μορίου tRNA (site- specific) και δε χρειάζεται ολόκληρη την τρισδιάστατη διαμόρφωση του μορίου για να δράσει. Αυτή η πληροφορία συμφωνεί με τα ως τώρα γνωστά χαρακτηριστικά των (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤασών. Όλα αυτά τα ένζυμα τροποποιούν ακόμα και τμήματα του βραχίονα T, παρατήρηση που προκύπτει και από τα πειράματα της Constantinesco. Μάλιστα είναι εκπληκτικό το γεγονός ότι δύο διαφορετικές ομάδες ενζύμων όπως : φολικού οξέος- και AdoMet- εξαρτώμενες (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάσεις έχουν προσαρμόσει την τρισδιάστατη μορφή τους ώστε να συνδέονται και να αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα παρόμοια.

Επιπλέον, τα πειράματα *in vitro* με το σχεδιασμό ενός ετερόλογου συστήματος (cross-reactions) επιτρέπουν την ταυτοποίηση καθοριστών, δηλαδή στοιχείων/χαρακτηριστικών στη δομή των μορίων tRNA που επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά την ενζυμική αντίδραση. Οι απαντήσεις που δίνονται από αυτή τη διαδικασία επιτρέπουν: 1) την αναγνώριση αλληλουχιών και δομικών στοιχείων σε ομάδες μορίων tRNA, των οποίων η αλληλουχία είναι άγνωστη (π.χ. το βασιλείο των αρχαίων) και 2) την τοποθέτηση των εξεταζόμενων οργανισμών σε ένα φυλογενετικό δέντρο. Άλλωστε αυτός είναι και ένας από τους λόγους που η υπερ-οικογένεια των (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤασών αποτελεί ένα σημαντικό εξελικτικό μοντέλο.

Η μεθυλίωση των νουκλεϊκών οξέων καταλύεται από μια μεγάλη και διαφοροποιημένη κλάση AdoMet-εξαρτώμενων μεθυλτρανσφερασών. Υπάρχουν δύο διαφορετικές υπέρ-οικογένειες, της μίας εκ των οποίων τα μέλη παρουσιάζουν τη δομή Rossmann-like-fold, μέλος της οποίας είναι και οι (tRNA) m<sup>5</sup>U ΜΤάσεις. Τα ένζυμα αυτής της υπέρ-οικογένειας στην καταλυτική περιοχή έχουν κοινό δομικό πυρήνα και κοινή περιοχή δέσμευσης του συνενζύμου AdoMet. Γνωρίζοντας ότι στην ομοπαράθεση μεταξύ της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του TRMA του βακτηρίου *E.coli* και του TRM2 του *S.cerevisiae* εντοπίζονται δύο αλληλουχίες μοτίβων, πιο συγκεκριμένα το μοτίβο (motif) I και την ακολουθία μετά το

μοτίβο I (post-motif I, P-I), αναζητούμε αυτά τα μοτίβα στην αλληλουχία του γονιδίου PAB0719. Η αλληλουχία του μοτίβου I προτάθηκε από τους Kagan and Clarke (1994) και τοποθετείται στη θέση δέσμευσης του συνενζύμου AdoMet. Μέρος της θέσης δέσμευσης του συνενζύμου αποτελεί και μια δεύτερη αμινοξική αλληλουχία (post-motif I), που τοποθετείται περίπου 13 αμινοξέα κάτωθεν του μοτίβου I και έχει ταυτοποιηθεί από τους Niewmierzycka και Clarke (1999). Οι εν λόγω ακολουθίες είναι αντίστοιχα: L/I/V-V/L-E/D-V/I-G-C/G-G-P/T-G και h-h-X-h-D/E, όπου το h αντιπροσωπεύει ένα υδρόφοβο αμινοξύ και το X ένα οποιοδήποτε αμινοξύ. Επιπλέον, στην εικόνα 27 σημαίνεται το κατάλοιπο της κυστεΐνης που έχει την καταλυτική ιδιότητα, βάση του μηχανισμού που έχει προταθεί από τον Kealey.

Μέλη της ίδιας υπέρ-οικογένειας με τις μεθυλτρανσφεράσες της m<sup>5</sup>U είναι οι m<sup>5</sup>C Μτάσες των RNA και DNA μορίων. Θεωρείται λοιπόν ενδιαφέρουσα η δομική μελέτη αυτών των τριών οικογενειών με τη βοήθεια των εργαλείων της βιοπληροφορικής και της κρυσταλλογραφίας για την τοποθέτηση αυτών μέσα στο εξελικτικό χρονοδιάγραμμα της ζωής. Βασιζόμενοι στα δέκα διαφορετικά μοτίβα που εμφανίζονται στην αλληλουχία αυτών των ενζύμων επιτυγχάνεται μια πρώτη ομαδοποίηση. Η αρχική έρευνα της ομάδας του Bunjicki (2004) με την παραπάνω λογική αποδεικνύει ότι η οικογένεια των (RNA) m<sup>5</sup>U ΜΤασών φαίνεται να είναι η πιο αρχέγονη, ενώ ταυτόχρονα δίνει μια επιπλέον ένδειξη για την θεωρία "RNA World". Μελετώντας την αλληλουχία του νέου μέλους της οικογένειας των (tRNA) m<sup>5</sup>U ΜΤασών εμφανίζονται τα κοινά χαρακτηριστικά μοτίβα που μοιράζονται τα μέλη της οικογένειας και επομένως αποκρυπτογραφούνται ευκολότερα τα χαρακτηριστικά που την διακρίνουν από τις άλλες συγγενείς οικογένειες.



Εικόνα 27: Πολλαπλή ομαπαράθεση των C-τελικών άκρων των τριών πρωτεϊνικών αλληλουχιών (PAB0719, TRM2 και TRMA). Το μοτίβο I και η ακολουθία P-I βρίσκονται σε καφέ φόντο, ενώ το κατάλοιπο της Cys εμφανίζεται σε μαύρο φόντο.

Λεπτομερής ανάλυση του μεταβολισμού των αρχαίων αποδεικνύει την παρουσία γνωρισμάτων τόσο των ευκαρυωτικών, όσο και των βακτηριακών κυττάρων. Η πληροφορία αυτή μπορεί να εξηγήσει την παρουσία δύο υποψήφιων αλληλουχιών με υψηλή ομολογία προς το αντίστοιχο γονίδιο του *E.coli* (*trnA*). Ενδεχομένως, η τροποποίηση m<sup>5</sup>U να εμφανίζεται και στο μόριο rRNA, εκτός από το μόριο tRNA στην οικογένεια των *Pyrococcales*, δηλαδή το δεύτερο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης να κωδικοποιεί μια rRNA: m<sup>5</sup>U ΜΤάση. Μια παραπάνω ένδειξη για τη θεωρία προέλευσης των τριών βασιλείων. Τα βακτήρια εμφανίζουν την τροποποίηση m<sup>5</sup>U και στα δύο μόρια RNA, έχοντας δύο υπεύθυνα γονίδια για την κωδικοποίηση (rRNA) m<sup>5</sup>U ΜΤασών, σε αντίθεση με τους ευκαρυώτες, που η τροποποίηση ανιχνεύεται μόνο στο μόριο tRNA.

Συνοψίζοντας, η εξέλιξη έχει εγκαθιδρύσει στις κύριες διαδικασίες του κυττάρου, δηλαδή διπλασιασμός, μεταγραφή και μετάφραση, μια κληρονομήσιμη σταθερότητα, που επιτρέπει την διατήρηση της ζωής από γενιά σε γενιά σε όλους τους οργανισμούς. Εντούτοις, υπάρχουν στοιχεία σε αυτές τις διαδικασίες που ομολογούν ότι η εξέλιξη έλαβε και λαμβάνει μέρος από το τελευταίο κοινό παγκόσμιο μονοκύτταρο οργανισμό ( Last Universal Common Ancestor: LUCA). Ένα από αυτά τα στοιχεία είναι οι τροποποιήσεις των μορίων tRNA, που όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, αποτελεί την πολυπληθέστερη ομάδα μεταξύ των νουκλεϊκών οξέων. Οι μετά-μεταγραφικές τροποποιήσεις των μορίων tRNA επιδρούν στη δομή και τη λειτουργία του μορίου, με άμεση επιρροή στη διαδικασία της μετάφρασης. Η ταυτοποίηση και η σύγκριση των τροποποιητικών ενζύμων του tRNA ίσως φωτίσει την εξελικτική πορεία αυτής της διαδικασίας. Συγχρόνως, η συνεχής συσσώρευση πληροφοριών σε ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων που σχετίζονται με την αλληλούχηση και ανάλυση (εύρεση μοτίβων και πρόβλεψη της δομής) ολόκληρων γονιδιωμάτων των οργανισμών δύναται να ταυτοποιήσουν τα γονίδια ήδη γνωστών βιοχημικών λειτουργιών.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Anantharaman V., Koonin E. and Aravind L.; Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism; 2002; *Nucleic Acids Research*; **30**; 1427-1464

Armengaud J., Urbonavičius J., Fernandez B., Chaussinand G., Bujnicki J. and Grosjean H.; N<sup>2</sup>-Methylation of Guanosine at position 10 in tRNA is catalysed by a THUMP domain- containing, S-Adenosylmethionine- dependent methyltransferase, conserved in Archaea and Eukaryota; 2004; *J. Biol Chem*; **279**; 37142- 37152.

Arnold H.H., Schmidt W., Reattig L., Sandig H., Domdey H. and Kersten H.; S-Adenomethionine and tetrahydrofolate- dependent methylation of tRNA in *Bacillus subtilis*.; 1976; *Archives of Biochemistry and Biophysics*; **176**; 12-20

Bujnicki J., Feder M., Ayres C. and Redman K.; Sequence- structure- function studies of tRNA: m<sup>5</sup>C methyltransferase Trm4p and its relationship to DNA: m<sup>5</sup>C and RNA: m<sup>5</sup>U methyltransferases; 2004; *Nucleic Acids Research*; **32**; 2453-2463

Constantinesco F., Motorin Y. and Grosjean H.; Transfer RNA modification enzymes from *Pyrococcus furiosus*: detection of the enzymatic activities *in vitro*. 1999; *Nucleic Acids Research*; **27**, 1308-1315

Constantinesco F., Benachenhou N., Motorin Y. and Grosjean H.; The tRNA (guanine- 26, N<sup>2</sup>- N<sup>2</sup>) methyltransferase (Trm1) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: cloning, sequencing of the gene and its expression in *Escherichia coli*.; 1998; *Nucleic Acids Research*; **26**; 3753-3761

Crick, F.H.C. The biological replication of macromolecules. 1958; *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12**;138-163

Davanloo P., Sprinzl M., Watanabe K., Albani M. and Kersten H.; Role of ribothymidine in the thermal stability of transfer RNA as monitored by proton magnetic resonance; 1979; *Nucleic Acids Research*; **6**; 1571- 1581

Delk A.S. and Rabinowitz J.C.; Biosynthesis of ribothymidine in the transfer RNA of *Streptococcus faecalis*: a folate- dependent methylation, not involving S- Adenosymethionine.; 1975; *PNAS*; **72**; 528-530

Delk A.S., Romeo J.M., Nagle D.P. Jr. and Rabinowitz J.C; Biosynthesis of ribothymidine in the transfer RNA of *Streptococcus faecalis* and *Bacillus subtilis*.; 1976; *J Biol Chem*; **251**; 7649-7656

Delk A.S., Nagle D.P. Jr., Rabinowitz J.C.; Methylenetetrahydrofolate- dependent biosynthesis of Ribothymidine in transfer RNA of *Streptococcus faecalis*.; 1980; *J Biol Chem*; **4387**-4390

Greenberg R, Dudock B.; Isolation and characterization of m<sup>5</sup>U-methyltransferase from *Escherichia coli*; 1980; *J Biol Chem*; **255**(17):8296-302

Grosjean H, Keith G, Droogmans L; Detection and quantification of modified nucleotides in RNA using thin-layer chromatography; 2004; *Methods Mol Biol.*; **265**:357-91

Gu and Santi; High- level expression of *E.coli* tRNA- (m<sup>5</sup>U)- methyltransferase; 1990; *DNA and Cell Biol.*; **9**; 273-278

Gustafsson C. and Björk G.; The tRNA- (m<sup>5</sup>U)- methyltransferase of *Escherichia coli* is present in two forms in vivo, one of which is present as bound to tRNA and to a 3'- end fragment of 16s rRNA.; 1993; *Journal of Biological Chemistry*; **268**; 1326-1331

Hopper A. K. and Phizicky Eric M.; tRNA transfers to the limelight; January 2003; *Genes Dev*; Vol. **17**, No. 2, pp. 162-180

Hopper A. K., Furukawa A.H., Pham H.D. and Martin N.C.; Defects in modifications of cytoplasmic and mitochondrial transfers RNAs are caused by single nuclear mutations; 1982; *Cell*; **28**; 543-550

Johansson MJ, Bystrom AS; Dual function of the tRNA (m<sup>5</sup>U<sup>54</sup>) methyltransferase in tRNA maturation; 2002 Mar; *RNA*; **8**(3):324-35

Kagan R. and Clarke S.; Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-Adenosylmethionine- dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes; 1994; *Archives of Biochemistry and Biophysics*; **310**; 417- 427

Kealy J.T., Lee S., Floss H.G. and Santi D.V.; Stereochemistry of methyl transfer catalyzed by tRNA (m<sup>5</sup>U<sup>54</sup>) methyltransferase; 1991; *Nucleic Acids Research*; **19**; 6465- 6468

Keith G.; Mobilities of modified ribonucleotides on two- dimensional cellulose thin layer chromatography; 1995; *Biochimie*; **77**; 142-144

Kim S.H., Sussman J.L., Suddath F.L., Quigley G.J., McPherson A., Wang H.J., Seeman N.C. and Rich A.; Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. 1972; *Science*; **185**; 435-440

Motorin, Y. and Grosjean, H. Appendix 1: Chemical structures and classification of posttranslationally modified nucleosides in RNA. In Grosjean, H. and Benne, R. (eds), *Modification and Editing of RNA* (1998) ASM Press, Washington, DC, pp. 543–549.

Niewmierzycka A. and Clarke S.; S-Adenomethionine- dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*; 1999; *Journal of Biological Chemistry*; **274**; 814-824

Nordlund ME, Johansson JO, von Pawel-Rammingen U, Bystrom AS; Identification of the TRM2 gene encoding the tRNA (m<sup>5</sup>U54) methyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*; 2000 Jun; *RNA*; **6**(6):844-60.

Ny T. and Björk G.R.; Cloning and restriction mapping of the *trmA* gene coding for the transfer ribonucleic acid (5-methyluridine) methyltransferase in *Escherichia coli* K-12; 1980; *Journal Bacteriol.*; **142**; 371-379

Persson B.C., Gustafsson C., Berg D.E. and Björk G.; The gene for a tRNA modifying enzyme, m<sup>5</sup>U54-methyltransferase, is essential for viability in *Escherichia coli*; May 1992; *PNAS*; **89**; 3995-3998

Urbonavičius J.; Qian Q.; Durand J.; Hagervall T.G. and Björk G.; Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications; 2001; *EMBO Journal*; **20**; 4863-4873

Samuel C.E. and Rabinowitz J.C; Initiation of protein synthesis by folate- sufficient and folate- deficient *Streptococcus faecalis* R.; 1974; *J Biol Chem*; **249**; 1198-1206

Schaefer K.P., Altman S. and Soll D.; Nucleotide modification *in vitro* of the precursor of tRNA<sup>Tyr</sup> of *E.coli*; 1973; *PNAS*; **70**; 3626- 3630

Schmidt W., Arnold H.H and Kersten H.; Tetrahydrofolate- dependent biosynthesis of ribothymidine in transfer ribonucleic acids of Gram- positive bacteria.; 1977; *J. of Bacteriology*; **129**; 15-21



Tatusov R.L., Darren A., Garkavtsev I.V., Tatusova T.A. et al.; The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. 2001; *Nucleic Acids Research*; **29**, No. 1, 22-28

Vagner et al.; A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*; 1998; *Microbiology* **144**, 3097- 3104