



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Κλωνοποίηση και έκφραση της αμινοάκυλο-tRNA
συνθετάσης του ασπαραγινικού οξέος
και των ομόλογων υποστρωμάτων της από το βακτήριο
*Neisseria Meningitidis**



ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΖΑΤΤΑΣ

Λάρισα 2006



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

Αριθ. Εισ.: 5013/1
Ημερ. Εισ.: 10-11-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΖΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087765

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Σταθόπουλου, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπο μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Σταματίνα Γιαννούλη για την πολύτιμη βοήθεια της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και τους συναδέλφους Αθανάσιο Κυρίτση και Αντιγόνη Διοκμετζίδου για την άψογη συνεργασία που είχαμε στο εργαστήριο.

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

- Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
- Παναγιώτης Μαρκουλάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
- Μαρία Κοντού, Λέκτορας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>Περίληψη</u>	<u>5</u>
<u>Εισαγωγή</u>	<u>8</u>
<u>Υλικά & Μέθοδοι</u>	<u>21</u>
1) Υλικά	22
i) Κατάλογος Αντιδραστηρίων & Χημικών Ουσιών	22
ii) Primers – Εκκινητές	23
iii) Κυτταρικές Σειρές	25
iv) Θρεπτικά Υλικά	26
v) Ρυθμιστικά Διαλύματα	28
vi) Πλασμιδιακοί Φορείς	29
2) Μέθοδοι	34
A) <u>Κλωνοποίηση Και Έκφραση Του Γονιδίου Που Κωδικοποιεί Την AspRS</u>	34
Ai) Ενίσχυση Του Γονιδίου Μέσω PCR	34
Aii) Ηλεκτροφόρηση	35
Aiii) Καθαρισμός DNA Από Πηκτή Αγαρόζης	36
Aiv) Σύνδεση Τμημάτων DNA	38
Av) Μετασηματισμός Κυττάρων Με Πλασμιδιακούς DNA	39
Avi) Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA Σε Μικρή Κλίμακα	43
Avii) Πέψη Μορίων DNA	44
Aviii) Υπερέκφραση Της Πρωτεΐνης AspRS	46
Aix) Απομόνωση Της Πρωτεΐνης AspRS	47
Ax) Διαχωρισμός Των Πρωτεϊνών	49
B) <u>Κλωνοποίηση Των γονιδίων Που Κωδικοποιούν Τα Μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn}</u>	51
Bi) Φωσφορυλίωση Των Ολιγονουκλεοτιδίων	51
Bii) Υβριδοποίηση	52
Biii) Σύνδεση Με Πλασμιδιακό DNA	53
Biv) <i>In vitro</i> Μεταγραφή	54

<u>Αποτελέσματα</u>	<u>55</u>
1) Κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την AspRS	56
2) Κλωνοποίηση και in vitro μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA ^{Asp} και tRNA ^{Asn}	66
<u>Συζήτηση</u>	<u>70</u>
<u>Βιβλιογραφία</u>	<u>77</u>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Περίληψη:

Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (aaRS) αποτελούν πολύτιμα καταλυτικά μόρια που απαντώνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Συνιστούν μια πολύπλοκη ομάδα ενζύμων που εγγυώνται την πιστότητα της μεταφοράς της γενετικής πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες. Σύμφωνα με τον Crick (Adaptor Hypothesis, 1958) για κάθε αμινοξύ υπάρχει μία αντίστοιχη αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση. Ωστόσο σε ορισμένους οργανισμούς, κυρίως στα αρχαία, σε μερικά βακτήρια και στα περισσότερα παθογόνα για τον άνθρωπο βακτήρια, υπάρχουν λιγότερα από τα αναμενόμενα 20 είδη αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών. Στους οργανισμούς αυτούς εκφράζεται μια χαμηλής εξειδίκευσης αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση του ασπαραγινικού οξέος (ND-AspRS) η οποία συνθέτει κακοφορτισμένα Asp-tRNA^{Asn}, τα οποία ακολούθως αμιδώνονται σε Asn-tRNA^{Asn} με τη δράση μιας AdT αμιδοτρανσφεράσης, μέσω του έμμεσου μονοπατιού της αμινοακυλίωσης.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η κλωνοποίηση του γονιδίου *aspS* από το βακτήριο *N. Meningitidis* και στη συνέχεια η έκφραση και απομόνωση της εκφραζόμενης αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης του ασπαραγινικού οξέος, που σύμφωνα με γενωμικές αναλύσεις, πιστεύεται ότι είναι χαμηλής εξειδίκευσης. Δεύτερος στόχος είναι η κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} μέσω της μεθόδου του cassette-cloning.

Abstract:

Aminoacyl-tRNA synthetases (AARS) are essential catalyzing molecules found in all living organisms. They form a diverse group of enzymes that ensure the fidelity of transfer of genetic information from DNA to proteins. According to Crick's Adaptor Hypothesis (1958) for each amino acid, there is a corresponding aminoacyl-tRNA synthetase. However certain organisms, including many human pathogens, do not possess the full set of the 20 aminoacyl-tRNA synthetases. In organisms lacking the aminoacyl-tRNA synthetase of asparagine (AsnRS) the formation of Asn-tRNA^{Asn}

is taking place via the indirect aminoacylation pathway. In these organisms a non-discriminating AspRS (ND-AspRS) formates Asp-tRNA^{Asn} which is then amidated to Asn-tRNA^{Asn} by an AdT amidotransferase. The first goal of this study is the cloning of the *aspS* gene from the *N. meningitidis* and the subsequent overexpression and purification of the encoded aspartyl-tRNA synthetase, which is believed to be non-discriminating. The second goal, is the cloning of tRNA^{ASP} and tRNA^{Asn} encoding genes via the method of cassette-cloning.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (aaRS) αποτελούν σημαντικά ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης και είναι υπεύθυνα για την αμινοακυλίωση των μορίων tRNA. Συγκεκριμένα, καταλύουν τη δημιουργία ενός εστερικού δεσμού μεταξύ της καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος και της ριβόζης της αδενοσίνης που βρίσκεται στο 3' άκρο του συγγενούς μορίου tRNA. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε δύο βήματα. Το πρώτο βήμα είναι ο σχηματισμός ενός αμινοάκυλο-AMP μορίου από ένα αμινοξύ και ένα μόριο ATP. Στο δεύτερο βήμα η αμινοακυλομάδα του αμινοάκυλο-AMP μεταφέρεται σε ένα μόριο tRNA ώστε να σχηματιστεί το αμινοάκυλο-tRNA, ενώ απελευθερώνεται AMP (εικόνα 1). Το αμινοακυλωμένο tRNA στη συνέχεια μεταφέρεται μέσω ενός παράγοντα επιμήκυνσης στο σύμπλεγμα ριβοσώματος-mRNA όπου τα αντικωδικόνια των tRNA μορίων αλληλεπιδρούν με τα αντίστοιχα κωδικόνια του mRNA (εικόνα 2). Εκεί το αμινοξύ αποδεσμεύεται από το μόριο tRNA και ενσωματώνεται στη νεοσυντιθέμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα.

Ενεργοποίηση



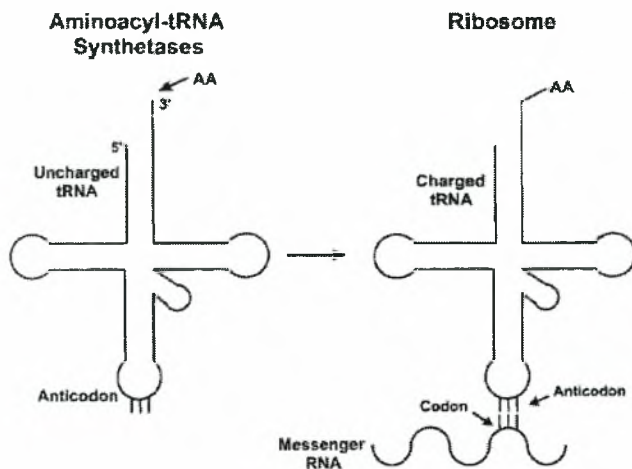
Μεταφορά



Εικόνα 1: Τα στάδια της αμινοακυλίωσης του tRNA από την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση

Η πιστότητα της μετάφρασης εξαρτάται κυρίως από δύο βασικές ιδιότητες που εξασφαλίζουν οι aaRSs: τη σωστή εστεροποίηση του συγγενούς αμινοξέος στο συγγενές του μόριο tRNA και την απομάκρυνση μη συγγενών αμινοξέων τα οποία δεσμεύονται σε μη συγγενή μόρια tRNA (1).

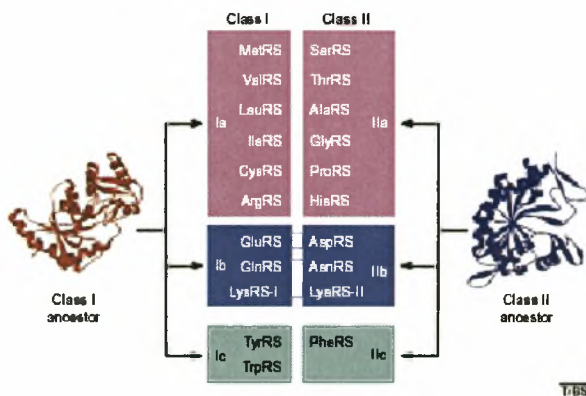
Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες διαχωρίζονται σε δύο κλάσεις ανάλογα με την τοπολογία των ενεργών τους κέντρων και τα δομικά τους μοτίβα. Αυτές είναι οι κλάσεις I και II (2).



Εικόνα 2: Αλληλεπίδραση του αντικωδικονίου του μορίου tRNA με το αντίστοιχο κωδικόνιο του mRNA

Κάθε κλάση περιλαμβάνει δέκα ένζυμα στην πλειονότητα των οργανισμών που έχουν έως τώρα μελετηθεί (εικόνα 3). Συγκεκριμένα, οι aaRSs της κλάσης I έχουν δύο ομόλογες περιοχές, που δεν απαντώνται σε άλλες πρωτεΐνες και οι οποίες έχουν τις συντηρημένες αλληλουχίες His-Ile-Gly-His (HIGH) και Lys-Met-Ser-Lys-Ser (KMSKS). Τα δύο αυτά τμήματα αποτελούν μέρη μιας διαμόρφωσης που δεσμεύει διουκλεοτιδία (Rossmann διαμόρφωση), συμμετέχουν στη δέσμευση του ATP και εμπλέκονται στην κατάλυση. Οι συνθετάσες της κλάσης II έχουν τρεις κοινές αλληλουχίες, οι οποίες απαρτίζουν ένα μοναδικό δομικό μοτίβο. Το μοτίβο αυτό αποτελείται από επτά αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα με τρεις πλευρικές α-έλικες, που διαμορφώνουν τον πυρήνα των καταλυτικών τους περιοχών. Μια επιπλέον διαφορά μεταξύ των ενζύμων των δύο κλάσεων είναι ότι οι συνθετάσες κλάσης I μέσω του ενεργού τους κέντρου δεσμεύουν το βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος (acceptor stem) του μορίου tRNA από την πλευρά της μικρής αύλακας, σε αντίθεση με τα ενεργά κέντρα των ενζύμων της κλάσης II που προσεγγίζουν το βραχίονα αυτό στη μεγάλη αύλακα. Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι πολλές συνθετάσες της κλάσης I απαιτούν την αναγνώριση του αντικωδικονίου για να

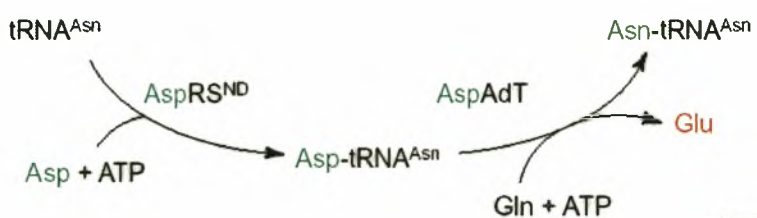
αμινοακυλιώσουν τα συγγενή μόρια tRNA, ενώ τα περισσότερα ένζυμα της κλάσης II δεν αλληλεπιδρούν με το αντικωδικόνιο του μορίου tRNA που δεσμεύουν. Επιπλέον, οι συνθετάσες κλάσης I αμινοακυλιώνουν τα 3' άκρα των μορίων tRNA στη θέση 2'-OH της τελικής αδενοσίνης, ενώ οι συνθετάσες κλάσης II, εκτός από τη PheRS, επιτελούν την ίδια διεργασία στη θέση 3'-OH (3). Επίσης το ένζυμο της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της λυσίνης αποτελεί μία ιδιαίτερη περίπτωση καθώς ενώ στους περισσότερους οργανισμούς ανήκει στην κλάση II σε ορισμένα αρχαία (όπως το *Methanococcus jannaschi*) ανήκει στην κλάση I (εικόνα 3) (4).



Εικόνα 3: Διαχωρισμός των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών στις κλάσεις I και II. Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της λυσίνης υπάρχει σε δύο υπότυπους I και II, κάθε ένας αντιστοιχεί σε μια κλάση.

Σύμφωνα με την Υπόθεση Προσαρμογής του Crick (Adaptor hypothesis, 1958) σε κάθε αμινοξύ αντιστοιχεί μία aaRS, επομένως είναι αναμενόμενο κάθε κύτταρο να περιλαμβάνει 20 από αυτές τις πρωτεΐνες. Ωστόσο, από διάφορες μελέτες λειτουργικής γενωμικής που έγιναν πάνω σε συστήματα βακτηρίων και αρχαίων, προέκυψε ότι υπάρχουν πολυάριθμοι οργανισμοί που δεν χρησιμοποιούν ολόκληρο το "σετ" των 20 aaRSs για τη σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNA μορίων. Οι οργανισμοί αυτοί στερούνται την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της ασπαραγίνης (AsnRS) ή/και την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της γλουταμίνης (GlnRS) (1). Αντί αυτών περιέχουν δύο αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες που αμινοακυλιώνουν λανθασμένα τα μόρια tRNA, την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση του ασπαραγινικού (AspRS) και του γλουταμικού οξέος (GluRS). Συγκεκριμένα, αντί να πραγματοποιείται απευθείας σχηματισμός Asp-

tRNA^{Asn} μέσω της AsnRS, μία χαμηλής εξειδίκευσης (Non-Discriminating) AspRS αμινοακυλιώνει λανθασμένα ένα μόριο tRNA^{Asn} με ασπαραγινικό οξύ. Στη συνέχεια ένα δεύτερο ένζυμο, η tRNA αμιδοτρανσφεράση GatCAB μετατρέπει το Asp-tRNA^{Asn} μέσω αμιδίωσης σε Asn-tRNA^{Asn} (εικόνα 4). Το ετεροτριμέρες αυτό ένζυμο GatCAB αποτελείται από τρεις υπομονάδες, τις GatA, GatB και GatC, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gatA*, *gatB* και *gatC*, αντίστοιχα. Το ένζυμο αυτό έχει διττή δράση καθώς μπορεί να καταλύσει και το σχηματισμό του Gln-tRNA^{Gln} από το Glu-tRNA^{Gln}. Η απουσία των γονιδίων που κωδικοποιούν τις AsnRS (*asnS*) και GlnRS (*glnS*) από τα γονιδιώματα πολλών παθογόνων και μη μικροοργανισμών αποτελεί ένδειξη ότι το μονοπάτι της τρανσαμίδωσης είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση (5).

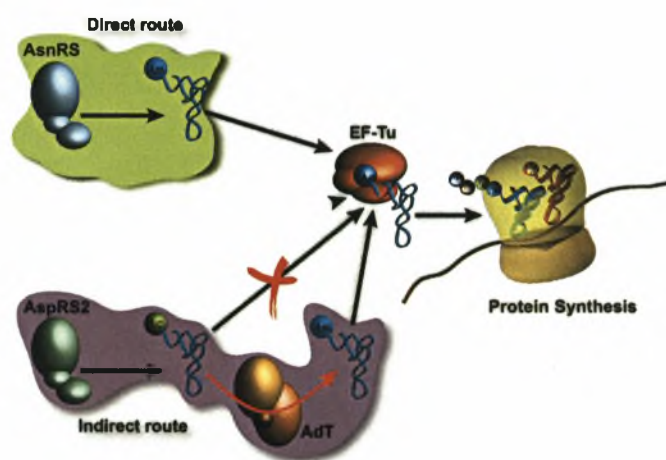


Εικόνα 4: Σύνθεση του Asn-tRNA μέσω του έμμεσου μονοπατιού (τρανσαμίδωση).

Γονιδιωματικές αναλύσεις έδειξαν ότι η AspRS των αρχαίων διαφέρει σε σχέση με αυτή των βακτηρίων. Συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων του ενζύμου που είναι σημαντικά για τη δέσμευση του Asp-AMP είναι μοναδικά στους ευκαρυώτες και στα αρχαία ενώ διαφέρουν από τα αντίστοιχα του βακτηριακού τύπου ενζύμου (6). Επίσης, συγκρίσεις μεταξύ των αλληλουχιών έδειξαν ότι η AspRS που κωδικοποιείται στα βακτήρια φέρει περισσότερα κατάλοιπα αμινοξέων (~570) σε σχέση με αυτή των αρχαίων (~430) (7). Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η πλειονότητα των βακτηριακών γονιδιωμάτων περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την AsnRS, είχε αρχικά προταθεί ότι η AspRS των βακτηρίων είναι καθαρά υψηλής εξειδίκευσης, δηλαδή μπορεί και αμινοακυλιώνει μόνο τα μόρια tRNA^{Asp}, ενώ των αρχαίων ήταν χαμηλής εξειδίκευσης, δηλαδή αμινοακυλιώνει με ασπαραγινικό οξύ τόσο το tRNA^{Asp} όσο και το tRNA^{Asn}. Ωστόσο, βρέθηκε ότι τα βακτήρια *Thermus thermophilus* και *Deinococcus*

radiodurans περιέχουν εκτός από μία υψηλής εξειδίκευσης AspRS που αμινοακυλιώνει μόνο tRNA^{Asp} και μία χαμηλής εξειδίκευσης AspRS που αμινοακυλιώνει και tRNA^{Asn} όπως στην περίπτωση των αρχαίων. Τα βακτήρια αυτά αποτελούν το καλύτερο παράδειγμα μικροοργανισμών που φέρουν και τα δύο μονοπάτια αμινοακυλίωσης του tRNA^{Asn}.

Από τις μελέτες που έγιναν πάνω στα αρχαία διαπιστώθηκε ότι αυτά μπορούν, με βάση το μονοπάτι σχηματισμού του Asn-tRNA^{Asn}, να υποδιαιρεθούν σε δύο ομάδες: η μία ομάδα αρχαίων μπορεί να σχηματίσει απευθείας Asn-tRNA^{Asn} χρησιμοποιώντας την AsnRS (άμεσο μονοπάτι), ενώ η άλλη ομάδα χρησιμοποιεί την χαμηλής εξειδίκευσης ND-AspRS (ή AspRS2). Στη δεύτερη περίπτωση απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη της Asp-AdT, που κωδικοποιείται από τα γονίδια *gatCAB* (έμμεσο μονοπάτι) (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Άμεσο και έμμεσο μονοπάτι σχηματισμού του Asn-tRNA^{Asn}

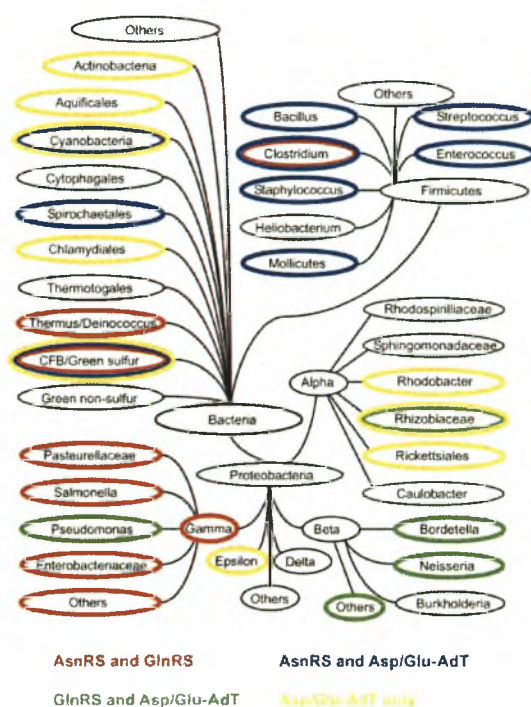
Αξίζει να επισημανθεί ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την GlnRS δεν απαντάται σε κανένα αρχαίο (8,9) και επομένως είναι αναμενόμενο ο σχηματισμός του Gln-tRNA^{Gln} να πραγματοποιείται από μία Glu-tRNA^{Gln} αμιδοτρανσφεράση. Υπάρχουν δύο ένζυμα που εμφανίζουν τέτοια δραστηριότητα, η GatCAB αμιδοτρανσφεράση που αναφέρθηκε προηγουμένως και μία GatDE αμιδοτρανσφεράση που κωδικοποιείται από τα γονίδια *gatD* και *gatE*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν υπομονάδες που είναι ομόλογες με τις GatA και GatC, αντίστοιχα, και ουσιαστικά τα δύο ένζυμα διαφέρουν μόνο ως προς την B

υπομονάδα, που πιθανότατα αναγνωρίζει το tRNA. Το ένζυμο GatDE εκφράζεται σε όλα τα αρχαία εξαιτίας της παντελούς έλλειψης GlnRS. Αντίθετα, η GatCAB εντοπίζεται μόνο στα αρχαία από τα οποία απουσιάζει η AsnRS. Η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο ενζύμων είναι ότι η GatCAB μπορεί και καταλύει το σχηματισμό του Asn-tRNA^{Asn} και του Gln-tRNA^{Gln}, ενώ η GatDE συνθέτει μόνο Gln-tRNA^{Gln}. Λόγω της ικανότητας της GatCAB να καταλύει την τρανσαμιδωση δύο διαφορετικών υποστρωμάτων, του Asp-tRNA^{Asn} και του Glu-tRNA^{Gln}, το ένζυμο είναι γνωστό και ως Asp/Glu-αμιδοτρανσφεράση (Asp/Glu-AdT). Στην περίπτωση των βακτηρίων, ωστόσο, δεν έχει παρατηρηθεί έκφραση της GatDE παρόλο που υπάρχουν περιπτώσεις, στις οποίες το γονίδιο που κωδικοποιεί την GlnRS (*glnS*) απουσιάζει από το γονιδίωμα (10). Η παρουσία των γονιδίων *gatC*, *gatB* και *gatA* στα βακτηριακά γονιδιώματα υποδεικνύει την ύπαρξη του μονοπατιού τρανσαμιδωσης (έμμεσο μονοπάτι) για το σχηματισμό του Asn-tRNA^{Asn} ή/και για το σχηματισμό του Gln-tRNA^{Gln}. Επόμενως, σε κάθε βακτηριακό οργανισμό που κωδικοποιείται η Asp/Glu-αμιδοτρανσφεράση υπάρχει η πιθανότητα να εκφράζεται η χαμηλής εξειδίκευσης AspRS ή/και η χαμηλής εξειδίκευσης GlnRS.

Γονιδιωματικές και βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι τα βακτήρια, βάσει των διαφορετικών μονοπατιών που ακολουθούνται για το σχηματισμό του Gln-tRNA^{Gln} και/ή του Asn-tRNA^{Asn} μπορούν να χωριστούν σε 4 ομάδες (εικόνα 6):

- 1) Οργανισμοί που φέρουν τα γονίδια *asnS* και *glnS* και επομένως συνθέτουν Gln-tRNA^{Gln} και Asn-tRNA^{Asn} με απευθείας αμινοακυλίωση (άμεσο μονοπάτι) (11).
- 2) Σε οργανισμούς που στερούνται τις συνθετάσες AsnRS και GlnRS και χρησιμοποιούν την Asp/Glu-AdT (12), ακολουθείται το έμμεσο μονοπάτι (τρανσαμιδωση) και απαιτείται η παρουσία της ND-AspRS και της ND-GluRS.
- 3) Οργανισμοί που έχουν GlnRS αλλά όχι AsnRS (απαιτείται η παρουσία της ND-AspRS)
- 4) Οργανισμοί που έχουν AsnRS αλλά όχι GlnRS (απαιτείται η παρουσία της ND-GluRS)

Ωστόσο, υπάρχουν και εξαιρέσεις καθώς συγκεκριμένα βακτήρια, όπως είναι τα *Thermus thermophilus* και *Deinococcus radiodurans*, εκφράζουν την AsnRS και την GlnRS αλλά εκφράζουν επίσης και την χαμηλής εξειδίκευσης AspRS. Στην περίπτωση του *Neisseria meningitidis* έχει βρεθεί ότι κωδικοποιείται η GatCAB αμιδοτρανσφεράση ενώ η AsnRS δεν εκφράζεται. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η εκφραζόμενη AspRS είναι πιθανότατα ένζυμο χαμηλής εξειδίκευσης (non-discriminating).



Εικόνα 6: Κατανομή των άμεσων και έμμεσων μονοπατιών σχηματισμού των *Asn-tRNA^{Asn}* και *Gln-tRNA^{Gln}* στις διάφορες βακτηριακές σειρές. Κάθε χρώμα υποδεικνύει ποια ένζυμο εκφράζονται στην αντίστοιχη οικογένεια οργανισμών (13).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, σε οργανισμούς όπου το γονίδιο *asnS* απουσιάζει, απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός του *Asn-tRNA^{Asn}* είναι η ύπαρξη της αμιδοτρανσφεράσης GatCAB. Από συγκρίσεις των γονιδιωμάτων που έγιναν μεταξύ διάφορων αρχαίων αποκαλύφθηκε μία

εντυπωσιακή συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του *asnS* και της απουσίας του GatCAB (Πίνακας 1) (14).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Discriminatory nature of AspRS predicted from genome content

Species (reference)	Predicted nature ^a	<i>asnS</i> homologs ^b	<i>gatC</i> homologs ^b	<i>gatA</i> homologs ^b	<i>gatB</i> homologs ^b	<i>aspS</i> homologs ^b
<i>Ferroplasma acidarmanus</i> ^c	D ^d	Contig 157, gene 190/ Contig 151, gene 6	None	None	None	Contig 143, gene 58
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> (30)	D	PAE2973	None	None	None	PAE0703
<i>Pyrococcus abyssi</i> ^e	D	PAB2203	None	None	None	PAB0646
<i>Pyrococcus furiosus</i> ^f	D	PF0155	None	None	None	PF0869
<i>Pyrococcus horikoshii</i> (21)	D	PHO241	None	None	None	PH1020
<i>Thermoplasma acidophilum</i> (31)	D	TA0519	None	None	None	TA0946
<i>Thermoplasma volcanium</i> (32)	D	TVG1050051	None	None	None	TVN1090
<i>Acropyrum pernix</i> (33)	ND	None	APE1716	APE1717	APE1718	APE2192
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> (34)	ND	None	AF2328	AF2329/1954	AF2116	AF0920
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1 (35)	ND	None	VNG0870G	VNG0872G	VNG0345G	VNG0461G
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> (36)	ND	None	MJ0243	MJ1160	MJ0160	MJ1555
<i>Methanopyrus kandleri</i> (37)	ND	None	MK0359	MK0238	MK0960	MK0710
<i>Methanosarcina acetivorans</i> (38)	ND	None	MA4522	MA4523	MA4524	MA1684
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> (20)	ND ^d	None	MTH415	MTH1496	MTH1280	MTH226
<i>Sulfolobus solfataricus</i> (39)	ND	None	SSO6855	SSO0957	SSO0232	SSO0173
<i>Sulfolobus tokodaii</i> (40)	ND	None	STS140	ST1283	ST0282	ST0205

Συσχέτιση της AspRS με την παρουσία ή απουσία της GatCAB αμιδοτρανοσφάρασης σε συγκεκριμένα αρχαία (D= discriminating AspRS, ND=non-discriminating AspRS)
 {D. Tumbula, L. Feng, H. Toogood, K.O. Stetter and D. Soll
 (2002) J. Biol. Chem. 277, 37184-37190}

Σύγκριση μεταξύ των ακολουθιών της χαμηλής εξειδίκευσης AspRS (ND-AspRS) και της υψηλής εξειδίκευσης AspRS (D-AspRS) στα αρχαία έδειξαν ένα υψηλό ποσοστό ομολογίας, έως και 60%. Η ομοιότητα αυτή ίσως υποδεικνύει ότι μόνο ένας μικρός αριθμός μεταλλάξεων είναι αρκετός για την μετατροπή της tRNA-εξαρτώμενης εξειδίκευσης των συνθετασών αυτών (15). Σε μία ομοπαράθεση 26 πρωτεϊνών AspRS από διάφορα βακτήρια και αρχαία η μεγαλύτερη ομοιότητα (~60 %) εντοπίστηκε μεταξύ της D-AspRS της ομάδας *Pyrococcus/Thermococcus* και της ND-AspRS από το *Archaeoglobus fulgidus* ή το *Methanopyrus kandleri*. Ωστόσο, η ομοπαράθεση αποκάλυψε ότι τα αμινοξέα δύο διαφορετικών θέσεων στην αμινο-τελική περιοχή διέφεραν συστηματικά μεταξύ της D-AspRS και της ND-AspRS (εικόνα 7). Το πρώτο αμινοξύ βρίσκεται στη θέση 26 της AspRS του *T. Kodakaraensis* (αρχαίο, βάσει του οποίου έγινε η ομοπαράθεση) και γενικά στην υψηλής εξειδίκευσης AspRS είναι μία τρυπτοφάνη (W) ή γλουταμίνη (Q), ενώ στην ίδια θέση της χαμηλής εξειδίκευσης AspRS υπάρχει ιστιδίνη (H). Το δεύτερο αμινοξύ (θέση 85 στην AspRS του *T.*

Kodakaraensis) είναι μία λυσίνη (K) στα ένζυμα D-AspRS, ενώ αντίστοιχα είναι προλίνη (P) στα ένζυμα ND-AspRS.

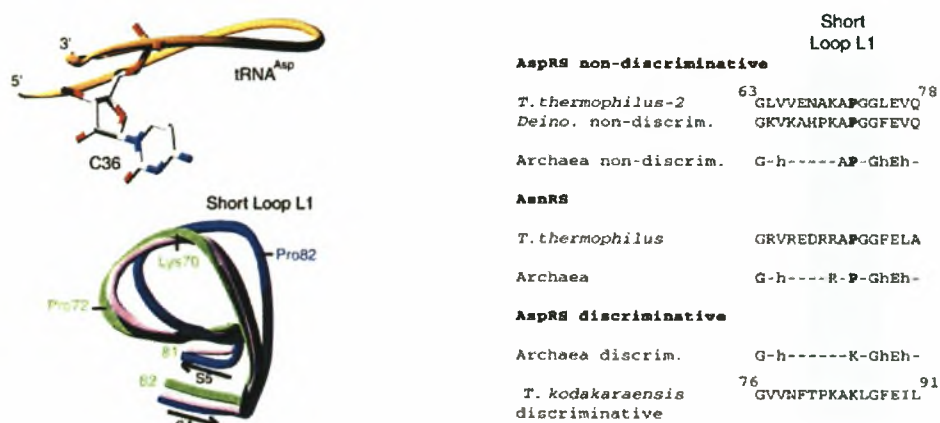
Dradi	20	TWKIQGFT ^{β1} EAR ^{β4} DL	68	GK ^{L1} KAHPKAF ^{β5} G--GFE
Tther	15	EVELLGFT ^{β1} WR ^{β4} DL	63	GLVVENAKAF ^{β5} G--GLE
Nther	23	EVTVMGK ^{β1} VEI ^{β4} DL	81	GT ^{L1} QESGKAF ^{β5} G--GFE
Macet	24	KITLAGW ^{β1} VEV ^{β4} DL	82	GSVKFEEKAF ^{β5} N--GYE
Mbark	24	KITLAGW ^{β1} VEV ^{β4} DL	82	GSVKFEEKAF ^{β5} N--GYE
Mhurt	23	KVTVC ^{β1} GW ^{β4} VEV ^{β5} DL	81	GTAKAEGKAF ^{β5} N--GYE
Mjann	24	EVIIMGW ^{β1} ESIP ^{β4} AL	82	GK ^{L1} IANEKAF ^{β5} N--GFE
Mkand	18	EVRLAGW ^{β1} VEV ^{β4} DL	76	GT ^{L1} QANEKAF ^{β5} G--GVE
Mmari	24	EVTIMGW ^{β1} ESIP ^{β4} AL	82	GK ^{L1} VANEKAF ^{β5} K--GFE
Mmaze	24	KVTLAGW ^{β1} VEV ^{β4} DL	82	GSVKFEEKAF ^{β5} N--GYE
Afulg	16	KVTLYGW ^{β1} VEV ^{β4} DL	74	GE ^{L1} VRREEKAF ^{β5} G--GVE
Hnrcl	18	DTTLAGH ^{β1} VEL ^{β4} DL	75	GTLEASDQAF ^{β5} G--GVE
Hvolc	15	TVTVAGW ^{β1} VEV ^{β4} DL	73	GE ^{L1} WDEEPRAP ^{β5} T--GVE
Ssolf	18	EVKVAGW ^{β1} ENV ^{β4} NL	73	GV ^{L1} VKADARAF ^{β5} N--GVE
Stoko	18	EVIWAGW ^{β1} ELL ^{β4} DL	73	GI ^{L1} VKADKRAF ^{β5} R--GIE
Csymb	25	DVTVMG ^{β1} W ^{β4} AV ^{β5} WGH	83	GT ^{L1} VRASEKAF ^{β5} S--GFE
Mfrig	14	RAVVICW ^{β1} VEV ^{β4} DL	72	GT ^{L1} IKATEKAF ^{β5} G--GRE
Aprn	21	RVRVCGW ^{β1} RI ^{β4} DL	79	GE ^{L1} R---QAF ^{β5} TREGVE
Facid	16	DVTIKGW ^{β1} QET ^{β4} KI	72	GT ^{L1} LKKKSI ^{β5} ES--GME
Tacid	17	KVVVYGW ^{β1} QEAR ^{β4} IM	72	GS ^{L1} VKKKSI ^{β5} EA--GIE
Tvole	17	NVEIYGN ^{β1} LDL ^{β4} LL	72	GK ^{L1} INKKSV ^{β5} ES--GLE
Pabys	18	KVKVAGW ^{β1} QEV ^{β4} DL	76	GI ^{L1} VNFTP ^{β5} KAKL--GFE
Phori	18	RVKVAGW ^{β1} QEV ^{β4} DL	76	GI ^{L1} VNFTP ^{β5} KAKL--GFE
Pfuri	18	RVKVAGW ^{β1} QEV ^{β4} DL	76	GI ^{L1} VNFTP ^{β5} KAKL--GFE
Paero	20	EVVVAGW ^{β1} VEL ^{β4} DL	78	GI ^{L1} VEASKI ^{β5} AS--GVE
Tkoda	18	KVKVAGW ^{β1} QEV ^{β4} DL	76	GI ^{L1} VNFTP ^{β5} KAKL--GFE

Εικόνα 7: Ομοπαράθεση τμήματος της N-τελικής περιοχής των πρωτεϊνών AspRS. (άνω τμήμα) ND-AspRS. (κάτω τμήμα) D-AspRS. Οι θέσεις με >90% ταυτοποίηση είναι σημειωμένες με κόκκινο χρώμα και αυτές με ομοιότητα >90% είναι σημειωμένες με γαλάζιο χρώμα. Τα αμινοξέα που διαφέρουν ως προς τις δύο θέσεις μεταξύ των δύο ομάδων είναι τονισμένες με γκρι χρώμα. Στα ένζυμα D-AspRS τα αμινοξέα είναι σημειωμένα με κίτρινο χρώμα, ενώ στα ένζυμα ND-AspRS είναι σημειωμένα με άσπρο χρώμα.

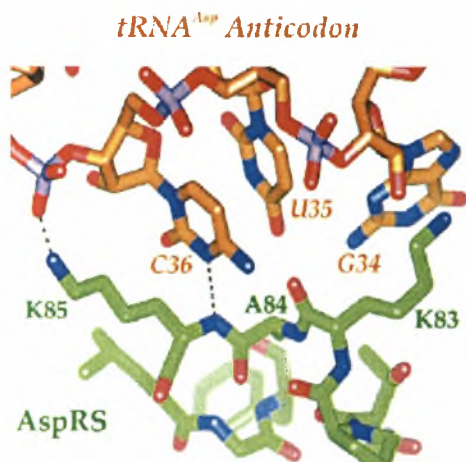
Η K85 εντοπίζεται στη θηλιά L1 και συγκεκριμένα στα τελευταία β-πτυχωτά φύλλα της περιοχής δέσμευσης του αντικωδικονίου στην AspRS (*T. Kodakaraensis*) (εικόνα 8). Η αντίστοιχη θηλιά στις βακτηριακές και ευκαρυωτικές AspRS αλληλεπιδρά επίσης με το αντικωδικόνιο του tRNA^{Asp}.

Από μελέτες που έχουν γίνει πάνω στην δομή των μορίων tRNA έχει γίνει ξεκάθαρο ότι η περιοχή του αντικωδικονίου (θέση 34-36), η βάση διαλογέας (θέση 73) και τα ζεύγη βάσεων του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του μορίου tRNA από την αμινοάκυλο-tRNA συνθεάση.

Έτσι, η πραγματοποίηση σημειακών μεταλλάξεων στην D-AspRS του *T. kodakaraensis* δηλ. προλίνη αντί για λυσίνη στη θέση 85 (K85P) και ιστιδίνη αντί για τρυπτοφάνη στη θέση 26 (W26H) είχε σαν αποτέλεσμα το ένζυμο να εμφανίσει μεγάλη εξειδίκευση για την αμινοακυλίωση του $tRNA^{Asn}$ (15). Επομένως, οι αλλαγές των αμινοξέων σε αυτές τις θέσεις συνέβαλλαν αποφασιστικά στο να αποκτήσει το ένζυμο δραστηριότητα χαμηλής εξειδίκευσης (non-discriminating nature). Και αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει καθώς το αμινοξύ στη θέση 85 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της συνθετάσης με το αντικωδικόνιο του μορίου $tRNA$ (εικόνα 9).



Εικόνα 8: (Αριστερά) Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής αλληλεπίδρασης της συνθετάσης (Θηλιά L1) με την περιοχή του αντικωδικονίου στο μόριο $tRNA^{Asp}$. (Δεξιά) Μερική ομοπαράθεση της ακολουθίας στη Θηλιά L1 μεταξύ των συνθετασών D-AspRS, ND-AspRS και AsnRS διάφορων οργανισμών.



Εικόνα 9: Μοντέλο αναγνώρισης του αντικωδικονίου του $tRNA^{Asp}$ από την AspRS του *T. kodakaraensis*. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στους δεσμούς υδρογόνου. Μέσω αυτού του δεσμού γίνεται η αλληλεπίδραση της K85 με την περιοχή του αντικωδικονίου.

Έχει προταθεί ότι η προγονική AspRS ήταν πιθανότατα ένζυμο χαμηλής εξειδίκευσης (16) και από αυτήν προήλθε, μέσω μεταλλάξεων, η AsnRS και η D-AspRS (17). Ωστόσο, μία εξελικτική αλλαγή από την D-AspRS στην ND-AspRS θα μπορούσε να είναι επίσης λογική καθώς ο σχηματισμός του Asp-tRNA^{Asn} σε ορισμένους οργανισμούς φαίνεται να μην προκαλεί τα τοξικά αποτελέσματα που αναμενόταν (15). Επίσης, η παρουσία της ND-AspRS μπορεί να εμπλέκεται και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες, εκτός από την πρωτεϊνοσύνθεση, όπως π.χ. στη βιοσύνθεση ασπαραγίνης (18). Έτσι, η διατήρηση αυτής της “ευελιξίας” από πλευράς του οργανισμού όσον αφορά την αναγνώριση ορισμένων μορίων tRNA, μπορεί να είναι ένα πλεονέκτημα σε περιπτώσεις αλλαγών που επηρεάζουν τη δραστηριότητα του κυττάρου. Για να υπάρχει ωστόσο μια πληρέστερη εικόνα γύρω από τις διαδικασίες σχηματισμού των Asp-tRNA^{Asp} και Asn-tRNA^{Asn} και για το πως αυτές εξελίχθηκαν, απαιτούνται πολλές ακόμα μέletes πάνω στην εξειδίκευση της AspRS σε διάφορους οργανισμούς.

Σκοπός της Εργασίας

Γονιδιωματικές μελέτες δείχνουν ότι η πλειονότητα των παθογόνων βακτηρίων έχουν AspRS ή GluRS χαμηλής εξειδίκευσης. Επομένως, ένα από αυτά τα βακτήρια όπως είναι το *Neisseria meningitidis* είναι πιθανόν να φέρει ένα ένζυμο χαμηλής εξειδίκευσης όπως είναι η AspRS. Το βακτήριο *Neisseria meningitidis* (εικόνα 10) είναι ο αιτιογόνος παράγοντας μηνιγγίτιδας στις αναπτυσσόμενες χώρες (*serogroup A*) ενώ στις αναπτυγμένες χώρες είναι υπεύθυνο για επιδημικές εξάρσεις που παρατηρούνται ανά τακτά χρονικά διαστήματα (*serogroup B,C*).



Εικόνα 10: Το παθογόνο βακτήριο *Neisseria meningitidis*.

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι δύο: Πρώτος στόχος είναι η κλωνοποίηση του γονιδίου της AspRS (*aspS*) από το βακτήριο *Neisseria meningitidis* και στη συνέχεια ο μετασχηματισμός συγκεκριμένων βακτηριακών στελεχών *E. coli* των οποίων η χρήση ενδείκνυται για την υπερέκφραση υπό μελέτη γονιδίων. Στο τέλος πραγματοποιείται απομόνωση της παραγώμενης πρωτεΐνης. Δεύτερος στόχος είναι η κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA^{ASP} και tRNA^{ASN} μέσω της μεθόδου του cassette-cloning για *in vivo* και *in vitro* μεταγραφή. Απώτερος στόχος της εργασίας είναι η μελέτη της πιθανής διπλής δραστηριότητας του ενζύμου της AspRS να αμινοακυλιώνει με ασπαραγινικό οξύ τόσο τα μόρια του tRNA^{ASP} όσο και τα μόρια tRNA^{ASN} αλλά και η συμβολή στην κατανόηση της συνολικής λειτουργικότητας των ενζύμων αυτού του τύπου.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

1) Υλικά

ι) Κατάλογος Αντιδραστηρίων & Χημικών Ουσιών

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και οι αντίστοιχοι προμηθευτές.

Αντιδραστήρια/Χημικές Ουσίες	Εταιρεία
Αγαρόζη	SeaKem
Αιθανόλη	Panreac
Αμπικιλίνη	Sigma
ATP	Fluka
BamHI (ένζυμο περιορισμού)	New England Biolabs
BSA 100x διάλυμα	New England Biolabs
Bromophenol Blue	Research Organics
Βρωμιούχο Αιθίδιο	Merck
Buffer BamHI	New England Biolabs
Buffer 2	New England Biolabs
Buffer T4 DNA λιγάση	New England Biolabs
Buffer T4 DNA λιγάση	Takara
CaCl ₂ 2H ₂ O	Merck
Γλυκερόλη	Panreac
Γλυκόζη	Panreac
DEPC	Research Organics
DMSO	Panreac
dNTPs (10mM) (νουκλεοτίδια)	Stratagene
DyNAzyme Πολυμεράση	Finnzymes
Δείκτης Μοριακού Βάρους 1Kb	HyTest Ltd
EDTA	Panreac
Εκκινητές	HHMI / Keck Biotech
HCl	Merck
HindIII (ένζυμο περιορισμού)	New England Biolabs
IPTG	Fermentas
KCl	Merck
LB Broth	Scharlau
LB Agar	Scharlau

Loading Buffer 6x	Takara
Μεθανόλη	Panreac
MgCl ₂ 50 mM για PCR	Finnzymes
MgCl ₂ 6H ₂ O	Panreac
NaCl	Panreac
NaOH	Merck
NdeI (ένζυμο περιορισμού)	New England Biolabs
<i>N.meningitidis</i> serA genomic DNA	-
Οξικό Οξύ	Merck
Ρυθμιστικό Δ/μα (10x) Πολυμεράσης	HyTest Ltd
Ρυθμιστικό Δ/μα (10x) Πολυμεράσης	Finnzymes
T4 DNA Λιγάση	New England Biolabs
T4 DNA Λιγάση	Takara
Τριγλωρο-οξικό Οξύ	Fluka
Tris	Merck
Ταq Πολυμεράση	HyTest Ltd
Χλωροαμφαινικόλη	Sigma
X-Gal	Sigma
Xylene Cyanol	Merck

ii) Primers-Εκκινητές

Για τη διαδικασία ενίσχυσης του γονιδίου της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης του ασπαραγινικού οξέος (AspRS) από το *Neisseria meningitidis* serotype A χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές: *A. N. men NdeI Primer sense* και *A. N. men BamHI Primer anti-sense*. Οι εκκινητές αυτοί φέρουν θέσεις κοπής για τα ένζυμα περιορισμού NdeI και BamHI, αντίστοιχα. Αναλυτικά:

➤ NdeI primer Sense (ANDESENSE)

Αλληλουχία: 5'-CATATGCGTACCAACTATTGCGGTCTG- 3'

Αριθμός Βάσεων: 27

Ποσοστό GC: 48.1%

➤ BamHI primer Antisense (ABAMANTI)

Αλληλουχία: 5' -CGATCCTTATGCTTCTTTGGTTTCAGCCGCC- 3'

Αριθμός Βάσεων: 31

Ποσοστό GC: 51.6%

Για τη διαδικασία κλωνοποίησης των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} μέσω της μεθόδου του cassette-cloning χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

➤ Για το tRNA^{Asp}

- ASP 1.1:

5'- GATCCTAATACGACTCACTATAGCGGTGGTAGCTCAGTTG
GTTAGAGTACCGGCCTGTCACGCCGGGGTTCGCGGGTTCGAGC
CCCGTCCGCCGCGCCAGGA - 3'

Αριθμός Βάσεων: 102

- ASP 1.2:

5'- AGCTTCCTGGCGCGGCGGACGGGGCTCGAACCCGCGACCC
CCGGCGTGACAGGCCGGTACTCTAACCAACTGAGCTACCACCGC
TATAGTGAGTCGTATTAG - 3'

Αριθμός Βάσεων: 102

➤ Για το tRNA^{Asn}

- **ASN 1.1:**

5' - GATCCTAATACGACTCACTATATCCCCGATAGCTCAGTCG
GTAGAGCGACGGACTGTTAATCCGCAGGTCCCTGGTTCGAGCCC
AGGTCGGGGAGCCATGCATA-3'

Αριθμός Βάσεων: 104

- **ASN 1.2:**

5' - AGCTTATGCATGGCTCCCCGACCTGGGCTCGAACCAGGGAC
CTGCGGATTAACAGTCCGTCGCTCTACCGACTGAGCTATCGGGG
ATATAGTGAGTCGTATTAG - 3'

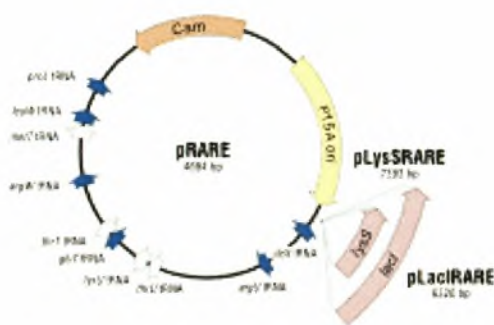
Αριθμός Βάσεων: 104

Οι primers 1.1 φέρουν στο 5' άκρο τους θέση κοπής για το ένζυμο περιορισμού BamHI, ενώ αντίστοιχα οι primers 1.2 στο 5' άκρο τους φέρουν θέση κοπής για το HindIII. Επίσης, οι εκκινητές ASN φέρουν και μία θέση κοπής για το ένζυμο NsiI, ενώ αντίστοιχα οι εκκινητές ASP φέρουν μία θέση κοπής για το BstNI.

iii) Κυτταρικές Σειρές

- **DH5α:** Αποτελεί στέλεχος *E. coli* το οποίο χρησιμοποιείται σε συνήθεις διαδικασίες εισαγωγής πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα.

• **BL21 Rosetta:** Αποτελεί στέλεχος *E. coli* που φέρει πλασμίδια (pRare) με γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό χλωροαμφαινικόλη. Εκτός αυτού, το πλασμίδιο περιέχει και κωδικόνια που χρησιμοποιούνται σπάνια στο *E.coli* και τα οποία αντιστοιχούν σε 6 σπάνια μόρια tRNA (τα κωδικόνια AUA, AGG, AGA, CUA, CCC και GGA). Τα κύτταρα αυτά έχουν σχεδιαστεί με αυτόν τρόπο που τα καθιστά ιδανικά για την υπερέκφραση πρωτεϊνών που προέρχονται από ευρύ φάσμα οργανισμών (από αρχαία έως ευκαρυώτες). Στη συγκεκριμένη περίπτωση η επίθυμητη πρωτεΐνη για υπερέκφραση είναι η AspRS από το *Neisseria Meningitidis*.



Χάρτης του πλασμιδίου pRare: Η περιοχή Cam περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό χλωροαμφαινικόλη. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA τα οποία φέρουν σπάνια κωδικόνια είναι σημειωμένα με μπλέ χρώμα.

iv) Θρεπτικά Υλικά

➤ LB Agar – Στερεό Θρεπτικό Υλικό

Για τελικό όγκο στερεού θρεπτικού υλικού 1L απαιτείται:

- LB Agar → 30 gr
- NaCl → 10 gr
- H₂O απιονισμένο → έως το 1 λίτρο
- Ακολουθεί αποστείρωση του θρεπτικού μέσου

- Όταν η θερμοκρασία του θρεπτικού υλικού είναι γύρω στους 37⁰C-40⁰C και πριν αρχίσει να πήζει προστίθεται, εάν είναι επιθυμητό, το κατάλληλο αντιβιοτικό και έπειτα η ποσότητα του θρεπτικού διανέμεται σε τρυβλία.

Το *LB Agar* περιέχει καζεΐνη και εκχύλισμα *S.cerevisiae* (yeast extract) σε τυπική αναλογία 10 gr/l και 5 gr/l αντίστοιχα, όπως επίσης και άγαρ σε αναλογία 15 gr/l.

➤ LB Broth – Υγρο Θρεπτικό Υλικό

Για τελικό όγκο υγρού θρεπτικού υλικού 1L απαιτείται:

- LB Broth → 15 gr
- NaCl → 10 gr
- H₂O απιονισμένο → έως το 1 λίτρο
- Ακολουθεί αποστείρωση του θρεπτικού μέσου

Το *LB Broth* περιέχει καζεΐνη και εκχύλισμα *S.cerevisiae* (yeast extract) σε τυπική αναλογία 10 gr/l και 5 gr/l αντίστοιχα.

➤ SOC θρεπτικό μέσο

Για τελικό όγκο SOC medium 100 ml ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Αρχικά, προστίθενται 2 gr tryptone
- 0.5 gr εκχυλίσματος *S.cerevisiae*
- 0.05 gr NaCl
- KCl 250 mM προστίθεται 1 ml
- Απιονισμένο H₂O έως τα 90 ml
- Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 7 και προστίθεται απιονισμένο H₂O ως τα 97 ml
- Αποστείρωση του διαλύματος

- Αφού κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται 1 ml αποστειρωμένου $MgCl_2$ 1M
- Τέλος, προστίθενται 2 ml Γλυκόζης 1M που έχει αποστειρωθεί με φίλτρο

➤ Διάλυμα SOB (για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων μέσω της μεθόδου FSB)

Για τελικό όγκο δ/τος SOB 100 ml απαιτούνται:

- 1.5 gr LB Broth
- 0.05 gr NaCl
- 2.5 ml KCl 1M και συμπλήρωση με απιονισμένο H_2O ως τα 90 ml
- Ρύθμιση του pH στο 7 με τη χρήση NaOH 10M και συμπλήρωση με απιονισμένο H_2O ως τα 98 ml
- Αποστείρωση του διαλύματος
- Αφού κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου προστίθενται 2 ml 0.5M $MgCl_2$

v) Ρυθμιστικά Διαλύματα

➤ Loading Buffer 6x

Το loading buffer 6x προστίθεται στα δείγματα νουκλεϊκών οξέων κατά την ηλεκτροφόρηση. Περιέχει:

Χημική Ουσία	Περιεκτικότητα	Ρόλος
EDTA	60 mM	Εμποδίζει τυχόν αντιδράσεις (δεσμεύει δισθενή κατιόντα)
Γλυκερόλη	60 %	Βοηθά στην καθίζηση των μορίων DNA
Bromophenol blue	0.09 %	Χρωστική
Xylene cyanol	0.09 %	Χρωστική

➤ Διάλυμα TAE 50x

Το διάλυμα TAE 50x χρησιμοποιείται ως stock για τη δημιουργία διαλύματος TAE 1x (μέσω αραιώσης). Το TAE 1x χρησιμοποιείται στην παρασκευή πηκτών αγαρόζης αλλά και ως buffer στη διαδικασία ηλεκτροφόρησης των νουκλεϊκών οξέων.

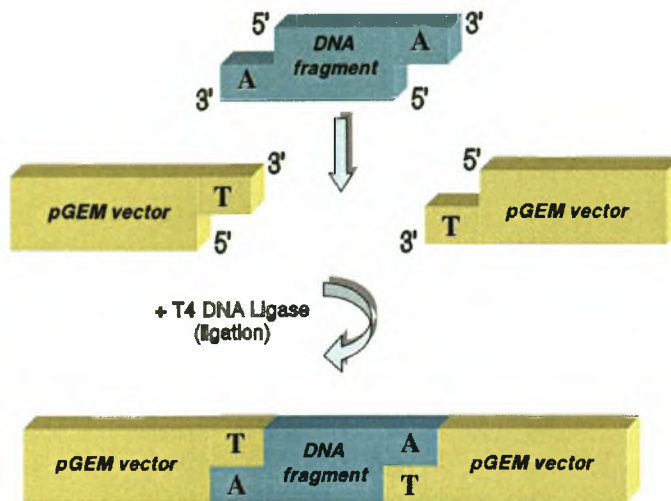
Για τη δημιουργία 1L TAE 50x απαιτείται:

- Διάλυση 242 gr σε 500 ml απιονισμένου H₂O
- Προσθήκη 100 ml EDTA 0.5M
- Προσθήκη 57.1 ml (glacial) οξικό οξύ και έπειτα απιονισμένο H₂O ως το 1L

vi) *Πλασμιδιακοί Φορείς*

➤ pGEM-T Easy vector

Για την αποτελεσματική κλωνοποίηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (Promega). Το πλασμίδιο αυτό έχει προκύψει από πέψη με το ένζυμο περιορισμού *EcoRV* και με την επιπλέον προσθήκη μίας βάσης δεοθυμιδίνης στα 3' άκρα. Οι προεξοχές αυτές, των βάσεων θυμίνης, αυξάνουν την αποτελεσματικότητα σύνδεσης ενός PCR προϊόντος στο πλασμίδιο εμποδίζοντας ταυτοχρόνα την επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου. Έτσι, ουσιαστικά, οι προεξοχές παρέχουν το κατάλληλο υπόστρωμα για τη σύνδεση προϊόντων PCR, που έχουν προκύψει από θερμοανθεκτικές πολυμεράσες, καθώς αυτά φέρουν πολυ-A (δεοξυαδενίνη) ουρές στα 3' άκρα τους. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση σύνδεσης του PCR προϊόντος με τον φορέα pGEM-T Easy είναι η T4 DNA λιγάση.



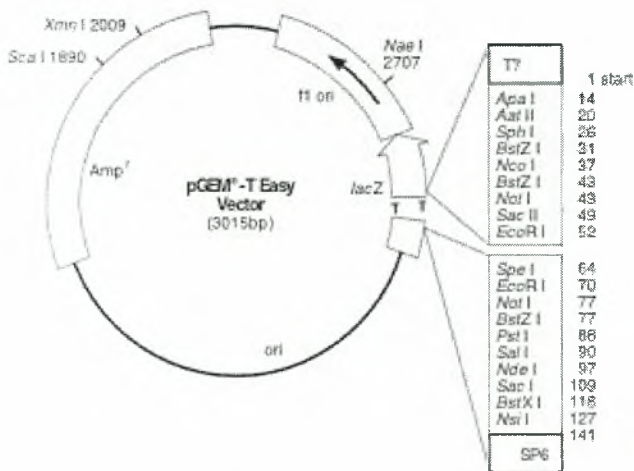
Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας σύνδεσης ενός τμήματος DNA με το πλασμίδιο pGEM-T Easy (TA Cloning).

Τα πλασμίδια pGEM-T Easy περιέχουν τους υποκινητές T7 και SP6 της RNA πολυμεράσης, από τους οποίους ο T7 υποκινητής συνδέεται με το οπερόνιο της λακτόζης (lacZ) και είναι υπεύθυνος για τη σύνθεση των τριών ενζύμων που φέρει το οπερόνιο. Τα ένζυμα που κωδικοποιούνται είναι:

- η β-γαλακτοσιδάση → καταλύει τη μετατροπή της λακτόζης σε γλυκόζη
- η περμεάση → καταλύει τη μεταφορά γλυκόζης στο κύτταρο
- η τρανσακετυλάση → ο ρόλος της είναι άγνωστος

Εντός της περιοχής που κωδικοποιείται το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση βρίσκεται ο πολυσυνδέτης (polylinker) μια αλληλουχία που περιλαμβάνει πολλαπλές θέσεις κοπής για ένζυμα περιορισμού και ουσιαστικά αποτελεί το σημείο ενσωμάτωσης του επιθυμητού τμήματος DNA. Επομένως, η εισαγωγή του ενθέματος στον πολυσυνδέτη οδηγεί στη μη έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης καθώς η αλληλουχία που κωδικοποιεί το ένζυμο διακόπτεται. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης μπορεί να γίνει φανερό με την ενσωμάτωση του πλασμιδίου σε κύτταρα και παρουσία του X-gal το οποίο είναι ανάλογο της λακτόζης. Αν η ενσωμάτωση του ενθέματος δεν πραγματοποιηθεί τότε η β-γαλακτοσιδάση θα

παράγεται κανονικά και θα καταλύει τη διάσπαση του X-gal οπότε θα έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μπλέ χρωστικής. Έτσι οι αποικίες κυττάρων που θα αναπτυχθούν έχοντας το πλασμίδιο θα έχουν μπλέ χρώμα. Σε περίπτωση που ενσωματωθεί το επιθυμητό DNA, η β-γαλακτοσιδάση δεν θα παράγεται και έτσι δεν θα παραχθεί η μπλέ χρωστική από τη διάσπαση του X-gal. Όποτε τα κύτταρα που θα φέρουν το πλασμίδιο μαζί με το ένθεμα θα αναπτύχθουν έχοντας λευκό χρώμα (διαδικασία blue/white screening). Απαραίτητο συστατικό κατά τη διαδικασία αυτή είναι ένας ισοπροπυλο-θειογαλακτοζιτης (IPTG) που δεσμεύεται στον καταστολέα και τον παρεμποδίζει να προσδεθεί στον χειριστή (operator) του οπερονίου. Έτσι, εξασφαλίζεται η συνεχής έκφραση των γονιδίων. Επίσης το πλασμίδιο pGEM-T Easy φέρει και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.



Εικόνα 12:

Χάρτης του πλασμιδίου pGEM-T Easy (μεγέθους 3.015 bp) και κατάλογος των σημείων αναφοράς επί της αλληλουχίας του

pGEM[®]-T Easy Vector sequence reference points:

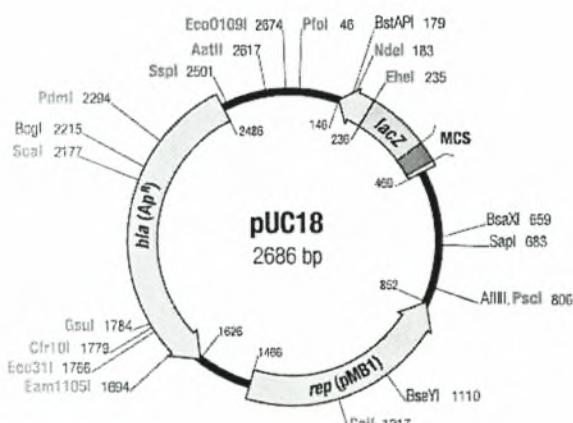
T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
lacZ start codon	180
lac operator	200–216
β-lactamase coding region	1337–2197
phage f1 region	2380–2835
lac operator sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	2999–3

➤ pUC18

Ο φορέας pUC18 είναι ένα μικρό *E.coli* πλασμίδιο, με υψηλό ρυθμό αντιγραφής και μέγεθος 2.686 bp. Ο πλασμιδιακός αυτός φορέας περιέχει:

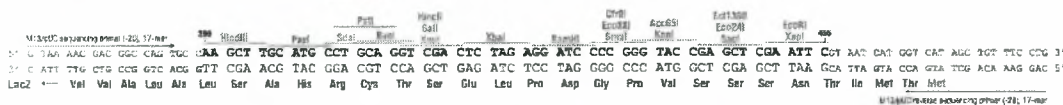
- Μια περιοχή πολυσυνδέτη (polylinker).
- Μια περιοχή pMB1 (*rep*) υπεύθυνη για την αντιγραφή του πλασμιδίου.
- Ένα γονίδιο *bla* που κωδικοποιεί τη β-λακταμάση, προσδίδοντας έτσι ανθεκτικότητα στη αμπικιλίνη.
- Το οπερόνιο *lac*, στο οποίο εκφράζεται η β-γαλακτοσιδάση.

Όπως και στην περίπτωση του pGEM, παρουσία του επαγωγέα IPTG και του X-gal, μπορεί να ελεγχθεί μέσω του χρώματος των κυτταρικών αποικιών αν το επιθυμητό τμήμα DNA έχει ενσωματώθει στο πλασμίδιο. Είναι η λέγομενη μέθοδος του blue/white screening στην οποία αναφερθήκαμε παραπάνω. Όπως και στην περίπτωση του pET15b έτσι και εδώ υπεύθυνος για την έκφραση του γονιδίου είναι ο υποκινητής στον οποίο προσδένεται η T7 RNA πολυμεράση.



Εικόνα 14:

Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pUC18 (αριστερά) και η περιοχή εισαγωγής και κλωνοποίησης του ενθέματος (multiple cloning site - κάτω)



2) Μέθοδοι Επεξεργασίας, Απομόνωσης και Μεταφοράς Νουκλεϊκών Οξέων.

- Κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την AspRS-

ι) Ενίσχυση του γονιδίου μέσω PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης):

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ενίσχυση του γονιδίου της AspRS από το γονιδίωμα του βακτηρίου *N. meningitidis* (serotype A) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για τη διαδικασία αυτή απαιτείται γενωμικό DNA από το *N. meningitidis*, εκκινητές (primers) που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι οι: NdeI Primer sense (*N. men.*) και BamHI Primer antisense (*N. men.*). Η αλληλουχία που θα ενισχυθεί θα φέρει θέσεις κοπής στα άκρα της για τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού (BamHI και NdeI). Επίσης προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 10x ειδικό για την πολυμεράση (συγκεκριμένα για την DyNAzyme Polymerase της Finnzymes), διάλυμα MgCl₂ 50mM, αποστειρωμένο νερό (H₂O) και τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs). Αναλυτικά οι ποσότητες των αντιδραστηρίων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (σε τελικό όγκο 50 μl):

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
dNTPs (10 mM)	1 μl
NdeI sense εκκινητής (<i>N. men.</i>)	0.4 μl
BamHI antisense εκκινητής (<i>N. men.</i>)	0.4 μl
Γενωμικό DNA (<i>N. men.</i>)	1 μl
MgCl ₂ 50mM	2.5 μl
Ρυθμιστικό Διάλυμα 10x	5 μl
H ₂ O (sterile)	38.3 μl
DyNAzyme Polymerase	0.5 μl

Στάδια της PCR

Βήμα 1): Πραγματοποιείται αποδιάταξη του DNA στους **98 °C** για **3 min**. Στο τέλος αυτού του σταδίου προστίθεται γρήγορα αλλά και με προσοχή η πολυμεράση που αναφέρεται στον πίνακα (0.5 μl).

Τα επόμενα βήματα (2 έως 4) πραγματοποιούνται διαδοχικά για 40 κύκλους.

Βήμα 2): Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται αποδιάταξη του DNA στους **95 °C** για **45 sec**.

Βήμα 3): Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται υβριδισμός των εκκινητών με το DNA. Η διαδικασία γίνεται στους **55 °C** για **1.5 min**.

Βήμα 4): Η πολυμεράση λαμβάνει δράση και πραγματοποιείται ο πολυμερισμός. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα στους **72 °C** για **2 min**.

Βήμα 5): Τέλος, στους **72 °C** και για **10 min**, η πολυμεράση τοποθετεί πολυ-A ουρές στα άκρα των μορίων DNA.

ii) Ηλεκτροφόρηση- Διαχωρισμός Μορίων DNA

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης είναι απαραίτητη προκειμένου να γίνει ο διαχωρισμός των μορίων DNA σε ένα δείγμα βάσει μεγέθους (σε ζεύγη βάσεων) και να προσδιοριστεί ποιο είναι το επιθυμητό τμήμα. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται η πηκτή αγαρόζης της οποίας η περιεκτικότητα (σε αγαρόζη) ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος των μορίων DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε (όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των μορίων τόσο πιο υψηλής περιεκτικότητας είναι η πηκτή). Συνήθως χρησιμοποιείται πηκτή αγαρόζης 0.8% με 1%. Αν είναι 1% τότε προστίθεται 1 gr αγαρόζης σε 100 ml διαλύματος TAE 1x. Το διάλυμα έπειτα

θερμαίνεται έως ότου η αгарόζη διαλυθεί πλήρως. Αφού κρυώσει το διάλυμα-όχι όμως αρκετά ώστε να πήξει- προστίθενται 7 μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr 1%) και έπειτα από καλή ανάδευση τοποθετείται στο καλούπι της πηκτής. Τα μόρια του βρωμιούχου αιθιδίου ενσωματώνονται μεταξύ των διπλών ελικών των μορίων DNA και έτσι γίνεται δυνατή η ανίχνευση τους στο τέλος της διαδικασίας με τη χρήση υπεριώδους φωτός. Αφού πήξει η πηκτή αφαιρείται το «χτενάκι», το οποίο χρησιμεύει για το σχηματισμό των θέσεων φόρτωσης των δειγμάτων και έπειτα η συσκευή ηλεκτροφόρησης πληρώνεται με διάλυμα TAE 1x έως ότου οι θέσεις αυτές καλυφθούν πλήρως. Στο επόμενο βήμα γίνεται η τοποθέτηση των δειγμάτων και του DNA Ladder (μάρτυρας μεγέθους DNA τμημάτων) στις θέσεις φόρτωσης. Σε κάθε δείγμα προηγουμένως έχει προστεθεί και η κατάλληλη ποσότητα loading buffer 6x, που περιέχει τις απαραίτητες χρωστικές και γλυκερόλη για να 'κατακαθίσει' το DNA.

Λόγω του αρνητικού φορτίου των μορίων DNA τα ηλεκτρόδια τοποθετούνται κατάλληλα στη συσκευή έτσι ώστε το θετικά φορτισμένο να βρίσκεται προς την πλευρά που θέλουμε να κατευθυνθούν τα μόρια DNA (δηλ. στο κάτω τμήμα της πηκτής) και το αρνητικά φορτισμένο στην αντίθετη πλευρά. Εφαρμόζεται τάση (συνήθως στα 120 V) για περίπου 20 min ώστε να διαχωριστούν καλά οι ζώνες του DNA και έπειτα γίνεται η ανίχνευση τους υπό υπεριώδες φως. Βάσει του μάρτυρα μεγέθους των τμημάτων DNA (ladder) μπορεί να γίνει ο προσδιορισμός των ζώνων DNA σε κάθε δείγμα.

iii) Gel Extraction-Καθαρισμός DNA από πηκτή αгарόζης

Για τον καθαρισμό των επιθυμητών τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης χρησιμοποιήθηκε το HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit και το αντίστοιχο πρωτόκολλο της Real Genomics.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένα άλας (guanidine thiocyanate) το οποίο είναι υπεύθυνο για τη διάλυση της πηκτής αгарόζης και την αποδιάταξη των ενζύμων. Τα τμήματα DNA σε διάλυμα αυτού του άλατος δεσμεύονται σε μία μεμβράνη υαλοβάμβακα που βρίσκεται εντός μιας μικρής στήλης. Αφού πρώτα

γίνει "ξέπλυμα" της στήλης, ώστε να απομακρυνθούν τα ανεπιθύμητα συστατικά, έπειτα προστίθεται διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης άλατος ή απιονισμένο νερό (αποστειρωμένο) ώστε να γίνει η έκλουση του DNA. Έτσι άλατα, ένζυμα και μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια απομακρύνονται αποτελεσματικά χωρίς τη διαδικασία καθαρισμού με φαινόλη ή κατακρήμνιση με αλκοόλη. Με τη μέθοδο αυτή η απόδοση από τον καθαρισμό είναι της τάξεως του 60% με 80%.

Αναλυτικά, το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

- *Διάλυση της πηκτής*

1. Με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, κόβεται το τμήμα της πηκτής αγαρόζης που περιέχει το επιθυμητό DNA. Η πλεονάζουσα αγαρόζη πρέπει να απομακρύνεται.
2. Μεταφέρονται έως 300 mg του κομμένου τμήματος της πηκτής σε ένα σωλήνα χωρητικότητας 1.5 ml.
3. Προστίθενται 500 μl DF Buffer στο δείγμα και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση με vortex.
4. Επώαση στους 55 °C για 10-15 min (υδατόλουτρο) έως ότου τα τμήματα της πηκτής να διαλυθούν πλήρως.

- *Δέσμευση του DNA*

5. Τοποθετείται μια DF στήλη (column) σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collection tube)
6. Προστίθενται 800 μl από το διάλυμα του δείγματος που προέκυψε στο βήμα 4, στη στήλη DF.
7. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 30 sec.
8. Απομακρύνεται το έκλουσμα και τοποθετείται ξανά η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα.
9. (Αν το διάλυμα είναι περισσότερο από 800 μl επαναλαμβάνονται τα βήματα 5-8)

- *Πλύση της στήλης*

10. Προστίθενται 500 μl Διαλύματος Πλύσης-Wash Buffer (το οποίο περιέχει και αιθανόλη ώστε να κατακρημνιστεί το DNA) στην DF στήλη.

11. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 30 sec.
12. Απομακρύνεται το έκλουσμα και τοποθετείται ξανά η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα.
13. Πραγματοποιείται εκ νέου φυγοκέντρηση για 2 min στις 12.000 rpm, ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη της στήλης.

- *Έκλουση του DNA*

14. Μεταφέρεται η στήλη σε ένα νέο σωλήνα (1.5 ml).
15. Προστίθενται 15 μ l Διάλυμα Έκλουσης (Elution Buffer) ή απιονισμένο νερό (αποστειρωμένο).
16. Η στήλη αφήνεται για 2 min ώστε να απορροφηθεί το διάλυμα έκλουσης ή το νερό από τη μεμβράνη.
17. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 2 min στις 12.000 rpm και το έκλουσμα που προκύπτει περιέχει το καθαρισμένο DNA. (Το DNA θα βρίσκεται σε διάλυμα όγκου 15 μ l).

iv) Ligation - Σύνδεση Τμημάτων DNA

Σε περίπτωση που επιθυμείται σύνδεση του επιθυμητού τμήματος DNA με το πλασμίδιο *pGEM-T Easy*, χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνονται μαζί με το πλασμίδιο, δηλαδή: 2x Rapid Ligation buffer για την T4 DNA λιγάση, το πλασμίδιο *pGEM-T Easy* (50 ng/ μ l) και η T4 DNA λιγάση (3 weiss units/ μ l). Παρόλο που το διάλυμα-buffer της T4 DNA λιγάσης περιέχει ATP σε ορισμένες αντιδράσεις χρησιμοποιηθήκε και επιπρόσθετη ποσότητα ATP (50 mM).

Σε περιπτώσεις που οι αντιδράσεις απαιτούσαν διαφορετικό πλασμίδιο, όπως το *pET15b*, χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA λιγάση (350 units/ μ l) της Takara και το αντίστοιχο buffer της (10x T4 DNA Ligase Buffer που περιέχει: 660 mM Tris-HCl (pH 7.6), 66 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 1 mM ATP). Η συνήθης αναλογία ενθέματος/πλασμιδίου που απαιτείται για αποτελεσματική σύνδεση είναι 3:1. Και

στις δύο περιπτώσεις για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση το δείγμα επωάζεται για 12-16 ώρες στους 4⁰C και 16⁰C, αντίστοιχα.

υ) Μετασχηματισμός κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

A) Δημιουργία Επιλεκτικών Κυττάρων (DH5α – Rosseta – BL21 codon plus)

Για τη δημιουργία επιλεκτικών κυττάρων εφαρμόζεται η μέθοδος που κάνει χρήση του CaCl₂.

Βήμα 1

Σε 3 ml θρεπτικού υλικού LB Broth ενοφθαλμίζονται τα κύτταρα που επιθυμούμε. Στην περίπτωση που ενοφθαλμίζονται κύτταρα DH5α τότε στο θρεπτικό υλικό προστίθεται και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100 mg/ml). Αν ενοφθαλμίζονται κύτταρα Rosseta και BL21 codon plus, προστίθεται στο θρεπτικό υλικό και χλωροαμφαινικόλη (30 mg/ml). Οι τελικές συγκεντρώσεις και στις δύο περιπτώσεις πρέπει να είναι 100 mg/ml. Οι υγρές καλλιέργειες έπειτα επωάζονται στους 37 °C και στις 210 rpm για 12-16 ώρες.

Βήμα 2

Λαμβάνεται 1 ml από την overnight καλλιέργεια και τοποθετείται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100 ml θρεπτικό LB Broth. Έπειτα απο ελαφρά ανάδευση, φωτομετρείται 1 ml απο την καλλιέργεια στα 600 nm με μάρτυρα LB Broth. Η οπτική απορρόφηση (OD₆₀₀) πρέπει να είναι γύρω στο 0,04. Μετά από αυτό η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C και στις 210 rpm. Πραγματοποιούνται φωτομετρήσεις ανά τακτικά χρονικά διαστήματα έως ότου η οπτική απορρόφηση είναι OD₆₀₀=0,4 καθώς τα κύτταρα στο σημείο εκείνο βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους.

Βήμα 3

Τα 100 ml της καλλιέργειας των κυττάρων μοιράζονται σε δύο αποστειρωμένους και παγωμένους πλαστικούς σωλήνες των 50 ml σε ασηπτικές συνθήκες και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά.

Βήμα 4

Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min και στους 4 °C.

Βήμα 5

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και οι πλαστικοί σωλήνες τοποθετούνται ανάποδα ώστε να φύγουν και τα τελευταία ίχνη (τα κύτταρα βρίσκονται υπό τη μορφή ιζήματος).

Βήμα 6

Σε κάθε πλαστικό σωλήνα προστίθενται 30 ml διάλυμα $MgCl_2-CaCl_2$ (80 mM/20 mM) και πραγματοποιείται ελαφρά ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.

Βήμα 7

Φυγοκεντρούνται εκ νέου οι πλαστικοί σωλήνες στις 4.000 rpm για 10 min και στους 4°C

Βήμα 8

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και οι σωλήνες τοποθετούνται ανάποδα.

Βήμα 9

Σε κάθε σωλήνα προστίθεται 2 ml παγωμένου διαλύματος $CaCl_2$ 0.1 M, αναδιαλύεται το ίζημα και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο.

Βήμα 10

Εισάγονται 70 μl DMSO σε κάθε σωλήνα και αναδεύονται (το DMSO διατηρεί τα κύτταρα δεκτικά για περισσότερο διάστημα και εμποδίζει τυχόν διαφυγή των τμημάτων τους). Έπειτα επωάζονται στους 0-4°C για 15 min.

Βήμα 11

Προστίθενται άλλα 70 μl DMSO στους σωλήνες και αφού αναδευτούν, τοποθετούνται στον πάγο.

Βήμα 12

Πολύ γρήγορα, μοιράζεται η ποσότητα των επιδεκτικών κυττάρων ανά 200 μl σε κάθε σωλήνα (1.5 ml) και τοποθετούνται στους -80°C .

B) Μετασχηματισμός κυττάρων (DH5α – Rosseta – BL21 codon plus)

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν δύο μέθοδοι μετασχηματισμού κυττάρων με πλασμιδιακό DNA.

Με την πρώτη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν επιδεκτικά κύτταρα που αναπτύχθηκαν με τη διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως. Αναλυτικά:

Βήμα 1

- Σε 200 μl επιδεκτικά κύτταρα (DH5α – Rosseta – BL21 codon plus) προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA (περίπου 25 ng DNA ανά 50 μl κυττάρων).
- Το δείγμα επωάζεται στους $0-4^{\circ}\text{C}$ για 30 min.

Βήμα 2

- Πραγματοποιείται heat shock στους 42°C για 90 sec (στο υδατόλουτρο ή σε dry heat block)

Βήμα 3

- Γρήγορη μεταφορά στον πάγο και αφήνεται για 1-2 min.

Βήμα 4

- Προστίθεται 800 μl διαλύματος SOC.
- Επώαση για 10 min στους 37°C .
- Ανάδευση στις 160 rpm και στους 37°C για περίπου 1.5 ώρα.

Βήμα 5

- Σε τρυβλίο, που περιέχει θρεπτικό υλικό LB agar και το αντίστοιχο αντιβιοτικό για τα κύτταρα και το πλασμίδιο του μετασχηματισμού, προστίθεται και στρώνεται X-gal 50 mg/ml (στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται κύτταρα DH5a διότι υπάρχει blue/white screening).
- Προστίθεται και στρώνεται IPTG 100 mM (ισοπροπυλο-θειογαλακτοζιτης).
- Προστίθενται και στρώνονται στο τρυβλίο 200 μl κυττάρων.
- Επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 12-16 ώρες.

Με τη δεύτερη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν τα Subcloning Efficiency DH5a κύτταρα (Invitrogen) στα οποία κατά το μετασχηματισμό ακολουθείται διαφορετικό πρωτόκολλο. **Αναλυτικά:**

- > Τοποθετούνται τα κύτταρα στο πάγο.
- > Μόλις ξεπαγώσουν, τοποθετούνται 50 μl από τα κύτταρα σε σωλήνα χωρητικότητας 1.5 ml.
- > Τα κύτταρα ψύχονται ξανά, σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει αιθανόλη και ξηρό πάγο, για 5 min. Τοποθετούνται άμεσα στους -80 °C.
- > Στο σωλήνα με τα κύτταρα προστίθενται 25 ng ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA.
- > Ο σωλήνας αφήνεται στον πάγο για 30 min.
- > Για την πραγματοποίηση του heat shock ο σωλήνας τοποθετείται στο υδατόλουτρο για 20 sec στους 37 °C.
- > Γρήγορη μεταφορά στον πάγο, όπου και ο σωλήνας αφήνεται για 2 min.
- > Προστίθενται 950 μl διαλύματος SOC.
- > Τα κύτταρα τοποθετούνται σε αναδευτήρα-επωαστήρα για 1 ώρα στους 37 °C και στις 225 rpm (στροφές/λεπτό).
- > Σε τρυβλία με LB agar και αμικιλίνη προστίθεται και στρώνεται X-gal 50 mg/ml.
- > Προστίθενται και στρώνονται 200 μl κυττάρων στο τρυβλίο.
- > Επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 12-16 ώρες.

vi) Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα-Miniprep

Αρχικά, για κάθε λευκή αποικία που αναπτύχθηκε στο τρυβλίο, προετοιμάζεται υγρή καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό LB Broth. Τα κύτταρα κάθε αποικίας ενοφθαλμίζονται σε 5 ml LB Broth που περιέχει το αντίστοιχο αντιβιοτικό και έπειτα οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37 °C υπό ανάδευση στις 210 rpm για 12-16 ώρες. Για κάθε καλλιέργεια που αναπτύχθηκε ετοιμάζεται stock κυττάρων με γλυκερόλη. Σε σωλήνα χωρητικότητας 1.5 ml προστίθενται 700 μl κύτταρα από την καλλιέργεια και 300 μl αποστειρωμένη γλυκερόλη 50% (η γλυκερόλη δρά σαν κρυοπροστατευτικό - προστατεύει τα κύτταρα από τυχόν διαρρήξεις των μεμβρανών τους). Έπειτα από καλή ανάδευση του σωλήνα, τα κύτταρα αποθηκεύονται στους -80 °C. Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E.coli* χρησιμοποιείται το kit και το πρωτόκολλο *Nucleospin Plasmid Quickpure* της Macherey-Nagel.

Αναλυτικά η διαδικασία:

1) Καλλιέργεια και Συλλογή Κυττάρων

Από κάθε καλλιέργεια λαμβάνεται ποσότητα 1.5 ml κυττάρων και τοποθετούνται σε σωλήνα χωρητικότητας 1.5 ml. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11.000 xg για 30 sec και έπειτα το υπερκείμενο που προκύπτει, απομακρύνεται.

2) Λύση των Κυττάρων

Προστίθενται 250 μl διαλύματος-buffer A1 και το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται πρώτα με πιετάρισμα και έπειτα με vortex. Έπειτα προστίθενται 250 μl buffer A2. Ακολουθεί επώαση, για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου, κατά τη διάρκεια της οποίας πραγματοποιείται ελαφρά ανάδευση του σωλήνα και οπωσδήποτε όχι με vortex. Αν το διάλυμα κατά το διάστημα εκείνο δεν έχει διαυγάσει, επωάζεται για ακόμη 1 min. Στη συνέχεια προστίθενται 300 μl buffer A3 που ακολουθείται από ελαφρά ανάδευση.

3) Καθαρισμός του Προϊόντος Λύσης των Κυττάρων

Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5 min στις 11.000 xg.

4) Δέσμευση του DNA

Το υπερκείμενο υλικό του σωλήνα μεταφέρεται στη στήλη *Nucleospin Plasmid Quickpure column* που παρέχεται μαζί με το kit. Η στήλη έπειτα φυγοκεντρείται για 1 min στις 11.000 xg και το έκλουσμα που προκύπτει απομακρύνεται.

5) Πλύση της Μειβοράνης Σιλικόνης

Προστίθενται στη στήλη 450 μl διαλύματος πλύσης-buffer AQ (+αιθανόλη) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 min στις 11.000 xg.

6) Ξήρανση της Μειβοράνης Σιλικόνης

Αφού απομακρυνθεί το έκλουσμα από τη στήλη πραγματοποιείται εκ νέου φυγοκέντρηση για 2 min στις 16.000 xg.

7) Έκλουση Υψηλής Καθαρότητας DNA

Μεταφέρεται η στήλη σε ένα νέο σωλήνα χωρητικότητας 1.5 ml και στη συνέχεια προστίθενται 50 μl διαλύματος-buffer AE. Έπειτα η στήλη επωάζεται για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για άλλο 1 min στις 11.000 xg. Το έκλουσμα που προκύπτει (50 μl) περιέχει σε υψηλή καθαρότητα το πλασμιδιακό DNA.

vii) Πέψη μορίων DNA με τη χρήση ενζύμων περιορισμού

Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης του ασπαραγινικού οξέος φέρουν θέσεις κοπής για τα ένζυμα περιορισμού BamHI και NdeI. Τα ένζυμα περιορισμού, που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο-ένθεμα, είναι της εταιρείας New England Biolabs.

Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού και οι θέσεις κοπής τους είναι οι εξής:



Και τα δύο ένζυμα περιορισμού έχουν δραστηριότητα 20 units/ml. Η New England Biolabs διαθέτει και 4 ρυθμιστικά διαλύματα NEB Buffers στα οποία κάθε ένζυμο παρουσιάζει διαφορετική δραστηριότητα. Επίσης παρέχεται και διάλυμα BSA 100x (Bovine Serum Albumine) το οποίο κατά τη πέψη προσδένεται στα τοιχώματα του σωλήνα, εμποδίζοντας έτσι να προσδεθούν τα ένζυμα και κατ' επέκταση εμποδίζοντας μείωση της δραστηριότητας τους.

Η δραστηριότητα των ενζύμων σε κάθε ρυθμιστικό διάλυμα είναι η εξής:

Είδος Buffer	Δραστηριότητα BamHI	Δραστηριότητα NdeI
NEB Buffer 1	75 %	75 %
NEB Buffer 2	100 %	100 %
NEB Buffer 3	50 %	75 %
NEB Buffer 4	75 %	100 %

Επειδή οι πέψεις που πραγματοποιούνται είναι διπλές (δηλ. χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα και τα δύο ένζυμα περιορισμού) χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο είναι κατάλληλο και για τα δύο ένζυμα. Για τη διπλή πέψη BamHI/NdeI καταλληλότερο είναι το διάλυμα που παρέχεται με το BamHI δηλαδή το NEB Buffer BamHI (10x).

1x NEB Buffer BamHI περιέχει:

- 10 mM Tris-HCl
- 150 mM NaCl
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM Dithiothreitol
- pH 7.9 στους 25 °C

Ανάλογα με την ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται για την πέψη, προστίθεται και η κατάλληλη ποσότητα ενζύμου. Αποτελεσματική αναλογία είναι τα 2 units ανά μg DNA. Ως unit ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πέψη ενός μg DNA σε 1 ώρα και στους 37°C (σε συνολικό όγκο αντίδρασης 50 μl). Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C για 3 ώρες.

viii) Υπερέκφραση της πρωτεΐνης *AspRS*

Ενοφθαλμίζονται σε 5 ml LB Broth με χλωραμφαινικόλη (100 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 25 mg/ml και αμπικιλίνη (100 mg/ml), κύτταρα BL21 codon plus που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο, για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Ακολουθεί μεταφορά των 5 ml της καλλιέργειας σε 200 ml από φρέσκο θρεπτικό μέσο LB broth με τα αντιβιοτικά και η επώαση συνεχίζεται στις ίδιες συνθήκες. Παράλληλα, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm έως ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει περίπου στην τιμή $OD_{600}=0,4$ που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Στο στάδιο αυτό προστέθηκε στις καλλιέργειες IPTG (0,1M) σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Το IPTG δρα ως επαγωγέας της έκφρασης του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης της οποίας ο υποκινητής βρίσκεται στο πλασμίδιο pET-15b που χρησιμοποιείται στην συγκεκριμένη περίπτωση για την κλωνοποίηση του γονιδίου της *AspRS*. Η έκφραση του γονιδίου αυτού στα κύτταρα του *E. coli* αναστέλλεται από τον καταστολέα LacIQ. Το IPTG δεσμεύει και απομακρύνει τον καταστολέα από το DNA επιτρέποντας έτσι την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία με τη

σειρά της θα αναγνωρίσει τον υποκινητή της στο πλασμίδιο και θα μεταγράψει το γονίδιο της AspRS. Μετά την προσθήκη του IPTG συνεχίζεται η επώαση των καλλιιεργειών και η μέτρηση της απορρόφησης. Η επώαση των καλλιιεργειών σταματάει όταν η οπτική πυκνότητα ξεπεράσει την τιμή OD₆₀₀. Τέλος, η καλλιιεργεια φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm για 10 min στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C.

ix) Απομόνωση της πρωτεΐνης AspRS

Η απομόνωση της AspRS έγινε με Protino® Ni 1000 prepacked columns kit της εταιρίας Macherey-Nagel. Η στήλη Protino® Ni 1000 είναι μια στήλη νικελίου και η AspRS μπορεί να δεσμευτεί πάνω της μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που περιέχει με τα ιόντα νικελίου της στήλης. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες διαπερνούν την στήλη και έτσι συλλέγονται κλάσματα διαφορετικής περιεκτικότητας σε κάθε στάδιο. Οι στήλες έχουν πακεταριστεί με μια ρητίνη που βασίζεται στην σιλικόνη και έχει προφορτωθεί με ιόντα νικελίου. Η χηλική ομάδα της Protino® Ni 1000 βασίζεται στο TED (tris-carboxymethyl ethylene diamine), ένα ισχυρό pentadenate μεταλλικό χηλωτή, ο οποίος καταλαμβάνει πέντε από τις έξι θέσεις πρόσδεσης στην σφαίρα συντονισμού του ιόντος νικελίου. Χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα : το LEW buffer που χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων, την ισοστάθμιση και πλύση της στήλης και το Elution buffer που χρησιμοποιείται για την έκλυση της πρωτεΐνης. Παρακάτω δίνεται η σύσταση των διαλυμάτων αυτών:

LEW buffer

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- pH 8

Elution buffer

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 250 mM ιμιδαζόλη
- pH 8

Τα βήματα της απομόνωσης σύμφωνα και με το πρωτόκολλο είναι τα ακόλουθα:

1) Ομογενοποίηση των κυττάρων

Το ίζημα των κυττάρων από την κάθε καλλιέργεια έκφρασης του *E.coli* τοποθετείται στον πάγο. Αναδιαλύεται 1 gr του ιζήματος σε 2 ml 1x LEW buffer και πιετάρεται μέχρι πλήρη διάλυση των κυττάρων. Κατόπιν, προστίθεται λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml και το διάλυμα επωάζεται στον πάγο για 30 min. Ακολούθως, το εναιώρημα κατεργάζεται με υπέρηχους (sonication) με αποτέλεσμα την διάρρηξη των κυττάρων. Η φυγοκέντρωση του λύματος στις 10000 x g για 30 min στους 4°C απομακρύνει τα κυτταρικά υπολείματα. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε ένα καθαρό σωλήνα και διατηρείται στον πάγο. Το ίζημα που προέκυψε φυλάσσεται στους -80°C.

2) Εξισορρόπηση της στήλης

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

3) Πρόσδεση της πρωτεΐνης

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

4) Πλύση της στήλης

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

5) Έκλουση της πρωτεΐνης

Η AspRS εκλούεται σε ένα καθαρό σωλήνα με την προσθήκη 1x Elution buffer. Η έκλουση επαναλαμβάνεται τρεις φορές και χρησιμοποιούνται 1,5 ml 1x Elution buffer κάθε φορά.

χ) Διαχωρισμός των πρωτεϊνών

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, την πηκτή διαχωρισμού (separating gel) (**Πίνακας 2**) και την πηκτή επιστοιβαξης (stacking gel) (**Πίνακας 3**). Η πηκτή επιστοιβαξης έχει μικρότερη πυκνότητα από το πήκτωμα διαχωρισμού και συγκεντρώνει την ποσότητα των δειγμάτων που ηλεκτροφορούνται, τα οποία όταν εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Αρχικά η πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται από πάνω της μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας της πηκτής. Αφού πήξει, αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται στη συσκευή η πηκτή επιστοιβαξης ακριβώς πάνω από την πηκτή διαχωρισμού, η οποία αφήνεται να πήξει. Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν ηλεκτροφορηθούν περιλαμβάνει την προσθήκη του διαλύματος πλήρωσης (loading buffer 3x) και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών.

Το διάλυμα πλήρωσης περιέχει χρωστική, ώστε να παρακολουθείται το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης και η μετουσίωση επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C, για 5 λεπτά, ούτως ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση το φορτίο τους, το οποίο είναι ενιαίο αρνητικό, εξαιτίας του SDS. Ακολουθώντας, αφού εξασφαλιστεί ότι η πηκτή είναι έτοιμη, ηλεκτροφορούνται τα δείγματα, καθώς και οι μάρτυρες μοριακού βάρους, στις ειδικές υποδοχές της πηκτής και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris, γλυκίνη, SDS), έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή.

Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση 100V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτή επιστοιβαξης, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 200V.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Ακρυλαμίδιο 30%	2,0 ml
Tris-HCl 0,5M (pH 6,8)	1,5 ml
SDS 10%	60 μl
TEMED	6,0 μl
APS 10%	30 μl
ddH ₂ O	2,5 ml

Πίνακας 2: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 10%.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Ακρυλαμίδιο 30%	0,5 ml
Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	0,75 ml
SDS 10%	30 μl
TEMED	6,0 μl
APS 10%	30 μl
ddH ₂ O	1,75 ml

Πίνακας 3: Σύσταση πηκτής επιστοιβαξης 4%.

Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος, καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης αφαιρείται η πηκτική επιστοιβαξης και ακολουθεί χρώση της πηκτής διαχωρισμού με το διάλυμα χρωματισμού (staining solution).

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

Πίνακας 4: Σύσταση διαλύματος χρωματισμού.

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

πρωτεϊνικών τμημάτων μέσω της σύγκρισης των ζωνών με τους μάρτυρες μοριακού βάρους.

- *Κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn}.*

i) Φωσφορυλίωση των Ολιγονουκλεοτιδίων

Η διαδικασία αυτή αποτελεί το πρώτο βήμα για την κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} μέσω της μεθόδου του cassette-cloning. Για κάθε tRNA διατίθενται δύο εκκινητές-ολιγονουκλεοτίδια (ASP 1.1, ASP 1.2 και ASN 1.1, ASN 1.2) τα οποία είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους και μόνο στα 5' άκρα τους είναι μονόκλωνα. Η φωσφορυλίωση των ολιγονουκλεοτιδίων είναι απαραίτητη για την έπειτα ενσωμάτωση τους σε πλασμίδιο, καθώς για να δράσει η DNA λιγάση πρέπει να αναγνωρίσει τα 5'-φωσφορυλιωμένα άκρα. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση των ολιγονουκλεοτιδίων είναι η T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση (T4 PNK). Η κινάση ουσιαστικά καταλύει τη μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας από το ATP στην 5'-OH υδροξυλομάδα των ολιγονουκλεοτιδίων. Επίσης το ένζυμο δρά και ως 3'-φωσφατάση.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η T4 PNK (Fermentas) μαζί με το αντίστοιχο ρυθμιστικό της διάλυμα, T4 PNK buffer A 10x. Το buffer περιέχει:

- 500 mM Tris-HCl (pH 6.4 στους 25 °C)
- 100 mM MgCl₂
- 50 mM DDT
- 1 mM spermidine
- 1 mM EDTA
- 1 mM ADP

Οι ποσότητες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον επόμενο πίνακα:

Εκκινητές	Όγκος Εκκινητών	ATP 50 mM	10x Buffer T4 PNK	T4 PNK	H ₂ O έως τα 50 μl
ASP 1.1	4 μl	1 μl	5 μl	1 μl	39 μl
ASP 1.2	4 μl	1 μl	5 μl	1 μl	39 μl
ASN 1.1	4 μl	1 μl	5 μl	1 μl	39 μl
ASN 1.2	4 μl	1 μl	5 μl	1 μl	39 μl

Πραγματοποιείται επώαση στους 37 °C για 20 min κατά τη διάρκεια της οποίας λαμβάνει χώρα η φωσφορυλίωση. Έπειτα ακολουθεί επώαση στους 65 °C για 10 min και επέρχεται η απενεργοποίηση της πολυνουκλεοτιδικής κινάσης. Τέλος, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο ή στους -20 °C.

ii) Υβριδοποίηση

Με τη διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων των εκκινητών. Συγκεκριμένα, στις ποσότητες των φωσφορυλιωμένων εκκινητών προστίθεται το 10x buffer της T4 DNA λιγάσης (Takara) και H₂O μέχρι τα 30 μl.

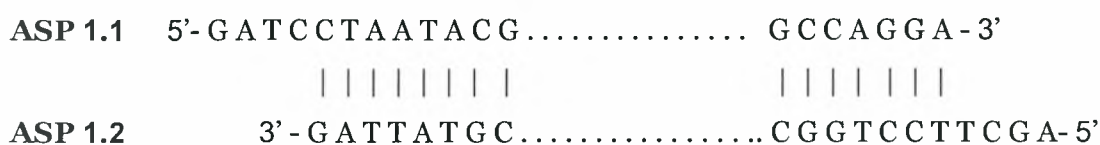
Αναλυτικά:

Εκκινητές	ASP	ASN
ASP 1.1	2 μl	-
ASP 1.2	2 μl	-
ASN 1.1	-	2 μl
ASN 1.2	-	2 μl
Buffer T4 DNA λιγάση	15 μl	15 μl
H ₂ O	11 μl	11 μl

Η αντίδραση της υβριδοποίησης πραγματοποιείται με επώαση στους 85°C για 10 min και έπειτα τα δείγματα αφήνονται να κρυώσουν στο πάγκο ώσπου να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου (περίπου 3 ώρες).

Το αποτέλεσμα της υβριδοποίησης θα είναι το εξής:

➤ Για το ASP:



➤ Για το ASN:



iii) *Σύνδεση των υβριδοποιημένων εκκινητών με πλασμιδιακό DNA*

Η διαδικασία αυτή είναι όμοια με αυτήν της σύνδεσης τμημάτων DNA που περιγράφηκε προηγουμένως. Αυτή τη φορά όμως πραγματοποιείται σύνδεση των υβριδοποιημένων εκκινητών με το πλασμίδιο pUC18. Το πλασμίδιο pUC18 έχει κοπεί με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και HindIII, ώστε τα μονόκλωνα άκρα που θα προκύψουν να είναι συμπληρωματικά με τα μονόκλωνα άκρα του ενθέματος.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- 5 μl προϊόν υβριδοποίησης
- 3 μl pUC18 BamHI/HindIII (1μg/μl)
- 1 μl ATP 50 mM
- 1 μl T4 DNA λιγάση (Takara)

Η αντίδραση πραγματοποιείται με επώαση στους 16 °C για 12-16 ώρες.

*iv) In vitro μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια
tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn}*

Αφού πραγματοποιηθούν υγρές καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό LB Broth από τις αποικίες των κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο pUC18 με ενσωματωμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA^{Asp} ή το tRNA^{Asn}, ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (minipreps). Για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα της σύνδεσης του γονιδίου που κωδικοποιεί το tRNA, με το πλασμίδιο pUC18 πραγματοποιήθηκε πέψη με τα ένζυμα BamHI και HindIII σε 10 μl πλασμιδιακού DNA. Στη συνέχεια τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%. Για τη διαδικασία της *in vitro* μεταγραφής, αρχικά, τα υπόλοιπα 40 μl πλασμιδιακού DNA επωάζονται με 0.6 μl ενζύμου (NsiI, εάν πρόκειται για το γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA^{Asn} ή BstNI, εάν πρόκειται για το γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA^{Asp}) και 6 μl ρυθμιστικού διαλύματος 1 σε θερμοκρασία 65°C. Ακόμη 1.5 μl του αντίστοιχου ενζύμου προστίθενται μετά από 2 ώρες. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για τη γραμμοποίηση του DNA. Στη συνέχεια από το προϊόν της πέψης λαμβάνονται 45 μl DNA τα οποία επωάζονται για 3 ώρες και στους 37°C με 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος, 10 μl DTT, 1.85 μl αδενίνης (324mM), 1.09 μl γουανίνης (550mM) 1.69 μl ουρακίλης (354mM), 1.2 μl κυτοσίνης 500mM), 1 μl T7 πολυμεράσης, 1 μl RNasin και 28.2 μl H₂O. Για το διαχωρισμό του RNA πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Για να γίνει η πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα:

- Διάλυμα πολυακρυλαμιδίου 40% το οποίο αποτελείται από 7.6 g ακρυλαμιδίου και 0.4 g δισ-ακρυλαμιδίου.
- Διάλυμα ακρυλαμιδίου και ουρίας 10% το οποίο αποτελείται από 5 ml του παραπάνω διαλύματος, 2 ml 10x TBE και 10 g ουρία.
- Διάλυμα APS 20%.

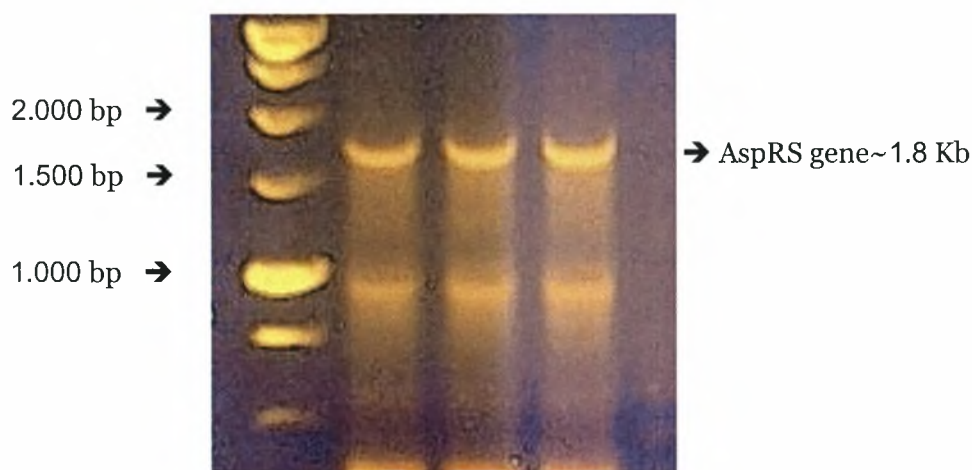
Για την πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται 10 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου ουρίας, 8 μl TEMED, που είναι υπεύθυνο για τον πολυμερισμό και

60 μl APS, που βοηθά στην πήξη. Προστίθεται το διάλυμα στην κατάλληλη ηλεκτροφορητική συσκευή μέχρι να πήξει. Παράλληλα, τα δείγματα που θα ηλεκτροφορηθούν προετοιμάζονται με την προσθήκη του διαλύματος πλήρωσης. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί φορτώνονται τα δείγματα στις θέσεις υποδοχείς και εφαρμόζεται τάση 225V. Για να ανιχνευθεί η ύπαρξη RNA μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης βάφεται η πηκτή με την προσθήκη μπλέ της βρωμοφαινόλης και αναδεύεται για 20 min. Στη συνέχεια για να γίνουν ορατές οι μπάντες πραγματοποιείται σταδιακά αποχρωματισμός της πηκτής με νερό.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Κλωνοποίηση και έκφραση
του γονιδίου που κωδικοποιεί την AspRS-

Στο πρώτο στάδιο, χρησιμοποιώντας γενωμικό DNA από το *Neisseria meningitidis* serotype A, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του γονιδίου της AspRS με τη μέθοδο της PCR. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές A NdeI primer Sense και A BamHI primer Antisense. Οι συνθήκες της PCR και ο όγκος των συστατικών της αντίδρασης περιγράφηκαν αναλυτικά στην ενότητα των μεθόδων. Έπειτα, στο προϊόν της PCR (50 μ l) προστέθηκαν 10 μ l loading buffer 6x και το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1 % μαζί με μοριακό δείκτη 1 Kb (ladder). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120V και υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας παρατηρήθηκε ο διαχωρισμός των ζωνών. Το αποτέλεσμα αντικατροπτίζεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 15: Αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης του PCR προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης 1% υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας.

Το μέγεθος του γονιδίου της AspRS από τη βάση δεδομένων της TIGR (www.tigr.org) βρέθηκε ότι είναι 1809 bp. Όπως φαίνεται και στην εικόνα υπάρχει μια ζώνη που αντιστοιχεί στο μέγεθος του γονιδίου, επομένως η PCR φαίνεται να πραγματοποιήθηκε με επιτυχία.

Επόμενο βήμα ήταν η απομόνωση της επιθυμητής ζώνης και η τοποθέτηση των τμημάτων της πηκτής σε ένα σωλήνα 1.5 ml. Μέσω της διαδικασίας καθαρισμού, χρησιμοποιώντας το kit της Real Genomics, εκλύεται το επιθυμητό τμήμα DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 8.0 όγκου 30 μ l. Αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε σύνδεση (ligation) του γονιδίου της AspRS με το πλασμίδιο pGEM-T Easy με τη διαδικασία που είναι γνωστή ως TA cloning.

Η αντίδραση σύνδεσης περιείχε:

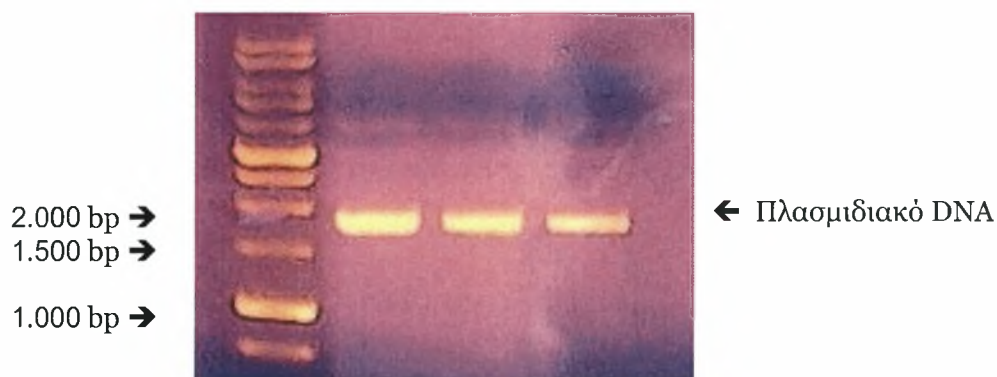
- 5 μ l Rapid Ligation buffer 2x
- 0.5 μ l vector pGEM (50ng/ μ l)
- 2.5 προϊόν PCR
- 1 μ l ATP 50mM
- 1 μ l T4 DNA λιγάση

Η αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιήθηκε με επώαση του δείγματος στους 23 $^{\circ}$ C για 1 ώρα και 15 λεπτά (για μεγαλύτερη απόδοση όμως είναι προτιμότερο η επώαση να πραγματοποιείται για 12-16 ώρες στους 4 $^{\circ}$ C).

Επόμενο στάδιο ήταν αυτό του μετασχηματισμού των επιδεικτικών κυττάρων του στελέχους *E. coli* DH5a (Subcloning Efficiency της εταιρείας Invitrogen) με το προϊόν σύνδεσης, ακολουθώντας το αντίστοιχο πρωτόκολλο που περιγράφεται αναλυτικά στις μεθόδους. Αφού πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός, ακολούθησε επίστρωση 200 μ l από τα κύτταρα σε τρυβλία που περιέχουν στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ και αμπικιλίνη, καθώς το πλασμίδιο pGEM φέρει το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας και θέλουμε να αναπτυχθούν μόνο τα κύτταρα που φέρουν το πλασμίδιο. Ωστόσο, προστέθηκε IPTG και X-gal στο τρυβλίο καθώς η επιλογή των κυττάρων που φέρουν το πλασμίδιο μαζί με το γονίδιο της AspRS θα γίνει βάσει του blue/white screening. Οι λευκές αποικίες θα είναι αυτές στις οποίες το πλασμίδιο έχει ενσωματωμένο το γονίδιο. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 $^{\circ}$ C για 12-16 ώρες προκειμένου να αναπτυχθούν τα κύτταρα.

Από τις λευκές αποικίες που αναπτύχθηκαν, επιλέχθηκαν τέσσερις για τη δημιουργία υγρών καλλιεργειών. Κύτταρα από κάθε αποικία ενοφθαλμίστηκαν σε 5 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB Broth που περιείχε αμπικιλίνη και οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C και στις 210 rpm για 12-16 ώρες. Στο τέλος της επώασης αναπτύχθηκαν οι τρεις καλλιέργειες, από τις οποίες αποθηκεύτηκε δείγμα στους -80 °C μετά την προσθήκη γλυκερόλης (glycerol stocks). Από κάθε καλλιέργεια τοποθετήθηκαν 700 μl κυττάρων σε 300 μl γλυκερόλη 50%.

Επόμενο βήμα ήταν η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις καλλιέργειες με χρήση του *Nucleospin Plasmid Quickpure* kit για minipreps (απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα) της εταιρείας Macherey-Nagel. Ο τελικός όγκος έκλουσης που περιέχει το πλασμιδιακό DNA είναι 50 μl. Από αυτά ελήφθησαν 5 μl ώστε να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.



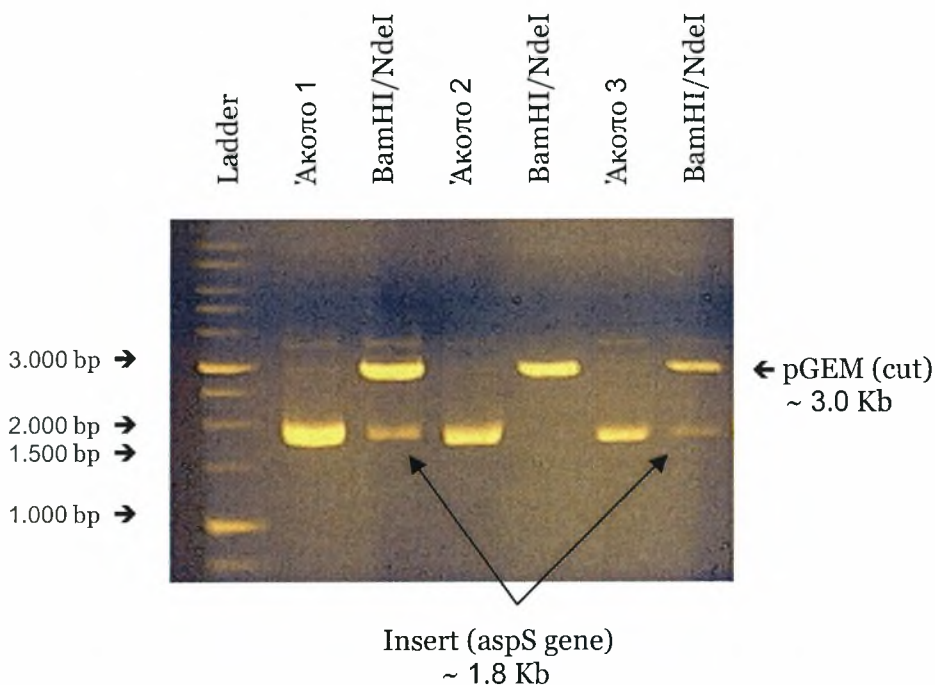
Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA (*pGEM-aspS*).

Το μέγεθος του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA είναι περίπου 4.8 kb (3.0 kb *pGEM* + 1.8 kb *aspS*). Ωστόσο, όπως φαίνεται και από την παραπάνω εικόνα, η ζώνη εμφανίζεται σε χαμηλότερο σημείο από ότι αναμενόταν και αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA είναι υπερελικωμένο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη των τριών δειγμάτων με τα ένζυμα περιορισμού *Bam*HI και *Nde*I προκειμένου να διαπιστωθεί αν έχει ενσωματωθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την *AspRS* στο πλασμίδιο *pGEM*.

Η αντίδραση πέψης περιείχε:

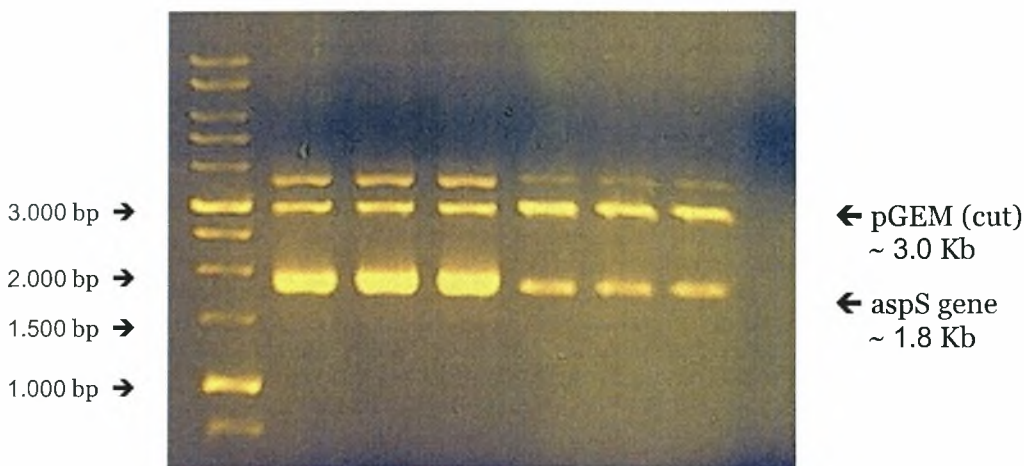
- 5 μ l πλασμιδιακό DNA
- 1 μ l buffer BamHI
- 2.9 μ l H₂O (αποστειρωμένο)
- 0.1 μ l BSA
- 0.3 μ l BamHI
- 0.3 μ l NdeI

Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 2 ώρες. Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της πέψης μαζί με άκοπο πλασμιδιακό DNA σε πηκτή αγαρόζης 1%. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των επιθυμητών κλώνων στις αντίστοιχες αποικίες (θετικός (+) έλεγχος). Στην πηκτή ηλεκτροφορήθηκε ολόκληρη η ποσότητα από κάθε προϊόν πέψης (10 μ l), ενώ από το άκοπο πλασμιδιακό DNA ηλεκτροφορήθηκαν 5 μ l.



Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, όπου φαίνεται το αποτέλεσμα της πέψης του πλασμιδίου pGEM-T που περιέχει το γονίδιο της *AspRS* με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού BamHI και NdeI.

Από την παραπάνω εικόνα διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα 1 και 3 ήταν αυτά στα οποία επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του γονιδίου *aspS*. Ωστόσο, λόγω της μικρής ποσότητας DNA που είχε η επιθυμητή ζώνη, η πέψη πραγματοποιήθηκε εκ νέου σε 20 μ l πλασμιδιακού DNA έτσι ώστε μετά τον καθαρισμό της ζώνης να ληφθεί επαρκής ποσότητα DNA για ακόλουθα πειράματα.

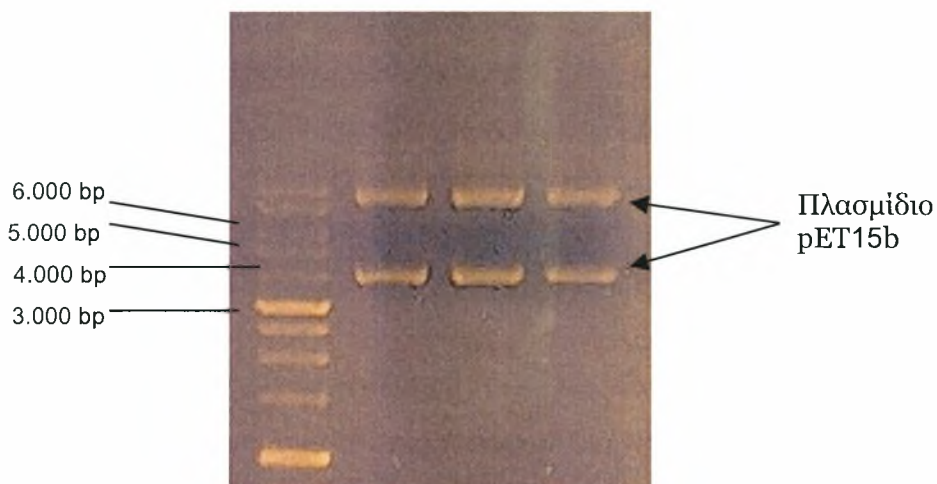


Εικόνα 18: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της δεύτερης πέψης.
Σειρά δεινιάτων: Ladder/Δείγμα 1/Δείγμα 1/Δείγμα 3/Δείγμα 3/Δείγμα 3

Η ζώνη που αντιστοιχεί στο γονίδιο *aspS* απομονώθηκε και το τμήμα της πηκτής τοποθετήθηκε σε ένα σωλήνα 1.5 ml. Μέσω της διαδικασίας καθαρισμού, όπως και προηγουμένως, χρησιμοποιήθηκε το kit της Real Genomics και το επιθυμητό τμήμα DNA εκλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 8.0 όγκου 30 μ l.

Παράλληλα, ενοφθαλμίστηκαν σε 5 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB Broth που περιείχε και αμπικιλίνη, κύτταρα DH5α τα οποία έφεραν και το πλασμίδιο pET15b. Συνολικά προετοιμάστηκαν 3 καλλιέργειες, κάθε μία από διαφορετικό stock κυττάρων. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C υπό ανάδευση στις 210 rpm για 12-16 ώρες. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (pET15b) από τα κύτταρα *E. Coli* χρησιμοποιώντας το kit και το πρωτόκολλο *Nucleospin Plasmid Quickpure* της Macherey-Nagel. Στη συνέχεια από τον

τελικό όγκο έκλουσης (50 μ l) κάθε δείγματος ελήφθησαν 5 μ l τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%.



Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA (pET15b).
Σειρά Δειγμάτων: Ladder/Δείγμα P1/Δείγμα P2/Δείγμα P3

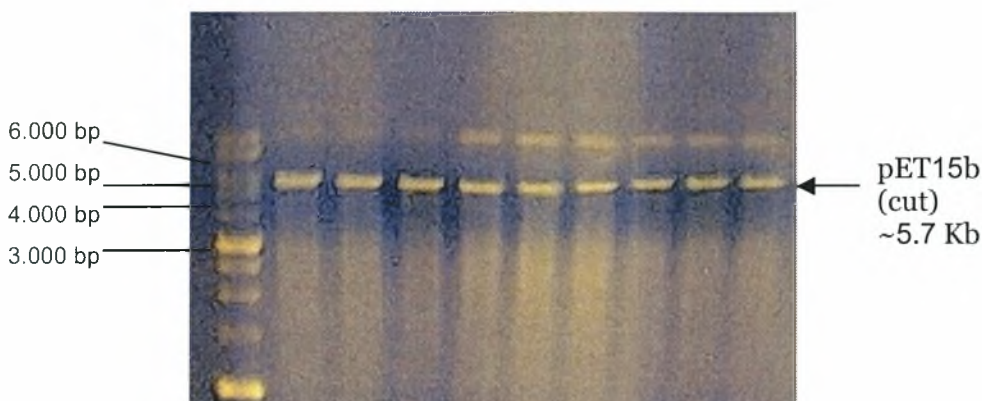
Το μέγεθος του πλασμιδίου pET15b είναι 5.708 bp. Ωστόσο, λόγω των υπερελικωμένων μορφών του πλασμιδιακού DNA, στην πηκτή εμφανίστηκαν ζώνες που αντιστοιχούν σε διάφορα μεγέθη. Επόμενο βήμα ήταν η πέψη των τριών δειγμάτων με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και NdeI. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη προκειμένου να γραμμοποιηθούν τα πλασμίδια και να προκύψουν μονόκλωνα άκρα τα οποία θα είναι συμπληρωματικά με τα αντιστοίχα του γονιδίου *aspS* για να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η αντίδραση σύνδεσης.

Η αντίδραση πέψης περιείχε:

- 40 μ l πλασμιδιακό DNA
- 5 μ l buffer BamHI
- 2.5 μ l H₂O (αποστειρωμένο)
- 0.5 μ l BSA
- 1 μ l BamHI
- 1 μ l NdeI

Ακολούθησε επώαση για 3 ώρες στους 37⁰C.

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία, τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζης 1%.



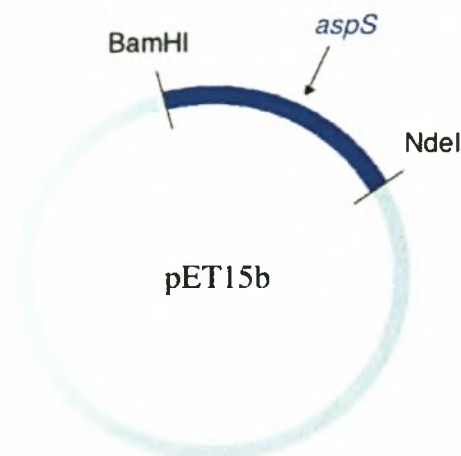
Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA pET15b σε πηκτική αγαρόζης 1% ύστερα από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και NdeI.
Σειρά δεινυμάτων: Ladder/P1/P1/P1/P2/P2/P2/P3/P3/P3

Από τα παραπάνω αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, η πέψη φαίνεται να πραγματοποιήθηκε με επιτυχία, καθώς σε κάθε δείγμα εμφανίζεται μια ζώνη μεταξύ των 5 και 6 Kb, μέγεθος που αντιστοιχεί σ' αυτό του γραμμοποιημένου πλασμιδίου pET15b. Τα τμήματα της πηκτής που περιείχαν την επιθυμητή ζώνη αποκόπηκαν και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σωλήνα 1.5 ml (συνολικά 3 σωλήνες, ένα για κάθε δείγμα). Επόμενο βήμα ήταν ο καθαρισμός του DNA με τη χρήση του kit και του πρωτοκόλλου της Real Genomics. Με την απομόνωση του κομμένου pET15b είναι δυνατή η αντίδραση σύνδεσης (ligation) με το γονίδιο *aspS* χάρη στη συμπληρωματικότητα των άκρων του γονιδίου μ' αυτά του πλασμιδίου (εικόνα 21).

Η αντίδραση σύνδεσης περιείχε:

- 1 μl Buffer T4 λιγάσης
- 3 μl vector pET15b
- 4 μl insert (*aspS gene*)
- 1 μl ATP 50mM
- 1 μl T4 DNA λιγάση

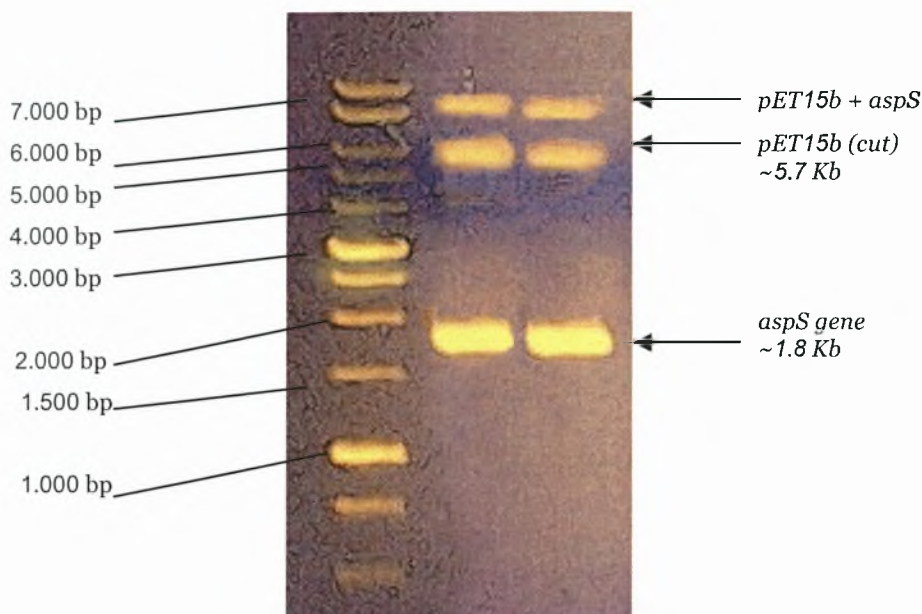
Ακολούθησε επώαση στους 16°C για 12-16 ώρες.



Εικόνα 21: Αποτέλεσμα της αντίδρασης σύνδεσης μεταξύ του πλασμιδίου pET15b και του γονιδίου *aspS*.

Με το προϊόν της αντίδρασης σύνδεσης πραγματοποιήθηκε, στο επόμενο στάδιο, μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων DH5α. Ακολουθείται το πρωτόκολλο όπως αυτό περιγράφεται στην ενότητα των μεθόδων. Πραγματοποιήθηκε επίστρωση 200 μl μετασχηματισμένων κυττάρων σε στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ το οποίο περιείχε και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, ενώ προστίθεται και IPTG 100 mM. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 37°C. Ωστόσο, στα τρυβλία δεν προστέθηκε X-gal καθώς το πλασμίδιο pET15b στερείται του οπερονίου *lacZ* και έτσι η επιλογή των αποικιών που θα αναπτυχθούν δεν μπορεί να γίνει βάσει του blue/white screening.

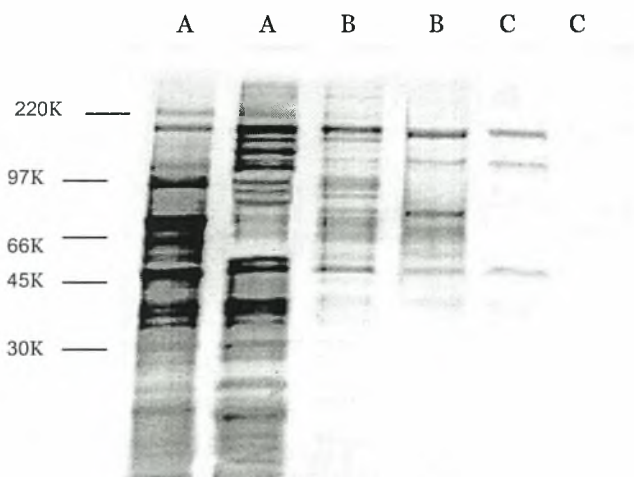
Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν, επιλέχθηκαν δύο των οποίων τα κύτταρα στη συνέχεια ενοφθαλμίστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth που περιείχε και αμπικιλίνη. Από τις υγρές αυτές καλλιέργειες (έπειτα από επώαση στους 37°C και ανάδευση στις 210 rpm) απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA σε μικρή κλίμακα (τελικός όγκος έκλουσης=50 μl) σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στις μεθόδους. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των επιθυμητών κλώνων, πραγματοποιήθηκε πέψη σε 10 μl πλασμιδιακού DNA με τη χρήση των ενζύμων BamHI και NdeI. Στη συνέχεια το προϊόν της πέψης (από δύο δείγματα) ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1%. Από την πέψη αυτή αναμένεται να εμφανιστούν δύο ζώνες, μία που να αντιστοιχεί σε μέγεθος ~6Kb (όπως είναι αυτό του pET15b) και μία που να αντιστοιχεί σε μέγεθος ~1.8 Kb (γονίδιο *aspS*).



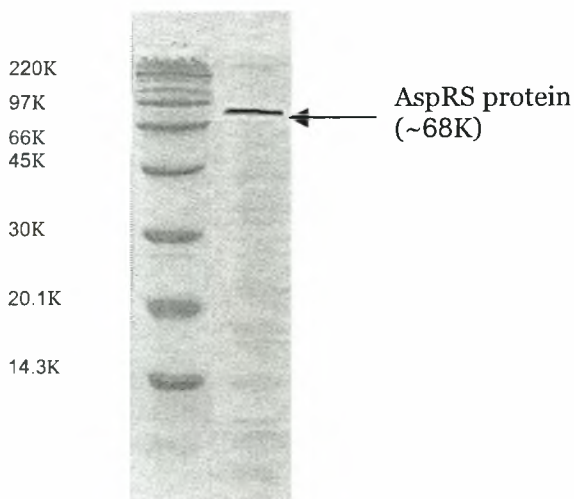
Εικόνα 22: Αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων πέψης. Κάθε διαδρομή αντιστοιχεί στο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από κάθε αποικία.

Από την παραπάνω εικόνα η πέψη φαίνεται να πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Με την υπόλοιπη ποσότητα του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των κυττάρων BL21 codon plus. Η διαδικασία μετασχηματισμού είναι όμοια μ' αυτές που περιγράφηκαν προηγουμένως. Στο τέλος της διαδικασίας γίνεται επιστροφή με 200 μl από τα μετασχηματισμένα κύτταρα σε στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ που περιέχει και χλωραμφαινικόλη καθώς τα BL21 codon plus κύτταρα περιέχουν το πλασμίδιο pRare που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο προαναφερθέν αντιβιοτικό. Τα τρυβλία ελωάστηκαν στους 37°C. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν επιλέχτηκαν οι τρεις. Κύτταρα από κάθε αποικία ενοφθαλμίστηκαν σε 200 ml υγρού θρεπτικού LB Broth που περιείχε και χλωραμφαινικόλη και ακολούθησε η διαδικασία υπερέκφρασης της AspRS από τις καλλιέργειες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αφού ομογενοποιήθηκαν με υπέρηχους, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση της AspRS σε στήλης νικελίου (οι παραπάνω διαδικασίες περιγράφονται αναλυτικά στις μεθόδους). Επόμενο βήμα ήταν η ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων από την εισαγωγή του δείγματος, την πλύση και τη έκλυση της στήλης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS (εικόνα 23). Ωστόσο, μετά τη χρώση της πηκτής δεν εμφανίστηκε κάποια ζώνη που να αντιστοιχούσε στο μέγεθος της πρωτεΐνης της

AspRS (~68 KDa). Αυτό όμως ήταν κάτι αναμενόμενο, καθώς η παραγόμενη πρωτεΐνη βρίσκεται, πιθανότατα, μέσα σε *έγκλειστα σωματίδια* (inclusion bodies). Η δράση της ND-AspRS θεωρείται τοξική για τα κύτταρα *E.coli* εξαιτίας της λανθασμένης αμινοακυλίωσης που προκαλεί, γεγονός που κατ' επέκταση οδηγεί σε λάθη κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Επόμενως, η διαδικασία που ακολούθησε ήταν η ομογενοποίηση με SDS του ιζήματος που είχαμε πάρει από την πρώτη ομογενοποίηση και στη συνέχεια η φυγοκέντρηση του ώστε η πρωτεΐνη να βρεθεί σε διαλυτή μορφή. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου όπου έπειτα από χρώση της πηκτής ανιχνεύθηκε η AspRS (εικόνα 24)



Εικόνα 23: Αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου-SDS, έπειτα από χρώση με Coomassie Brilliant Blue. (A) Κλάσμα πρωτεϊνών πριν την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, (B) Κλάσμα πρωτεϊνών που προκύπτει μετά από πλύση της στήλης, (C) Κλάσμα πρωτεϊνών μετά από την έκλουση της στήλης.



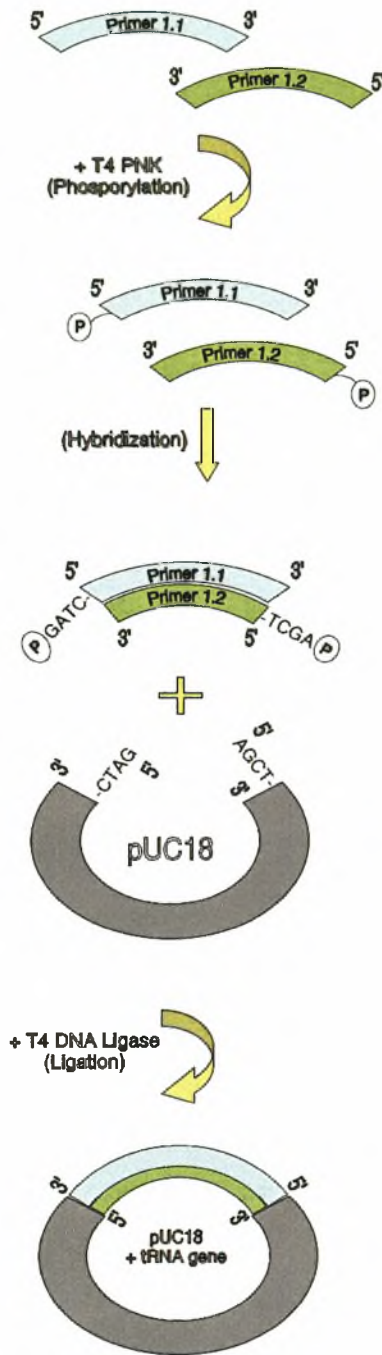
Εικόνα 24: Αποτέλεσμα της δεύτερης ηλεκτροφόρησης σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου, έπειτα από ομογενοποίηση του ιζήματος με SDS και στη συνέχεια φυγοκέντρηση. (Πρώτη Διαδρομή) μάρτυρας πρωτεϊνών, (Δεύτερη Διαδρομή) δείγμα.

- Κλωνοποίηση και *in vitro* μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} -

Το πρώτο βήμα που απαιτείται για την κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} μέσω της μεθόδου του cassette-cloning από το *Neisseria meningitidis*, είναι η φωσφορυλίωση των εκκινητών-ολιγονουκλεοτιδίων. Για κάθε tRNA υπάρχουν δύο συμπληρωματικοί εκκινητές (ASP 1.1, ASP 1.2 για το tRNA^{Asp} και ASN 1.1, ASN 1.2 για το tRNA^{Asn}) που στο μεγαλύτερο τμήμα υβριδίζονται μεταξύ τους, ενώ τα 5' άκρα τους είναι μονόκλωνα. Οι εκκινητές 1.1 φέρουν στο 5' άκρο τους θέση κοπής για το ένζυμο περιορισμού BamHI, ενώ αντίστοιχα οι primers 1.2 στο 5' άκρο τους φέρουν θέση κοπής για το HindIII. Η φωσφορυλίωση των εκκινητών απαιτείται για να δράσει η DNA λιγάση (αναγνωρίζει τα φωσφορυλιωμένα 5' άκρα) και να πραγματοποιήσει την αντίδραση σύνδεσης με το πλασμίδιο pUC18. *Το πρωτόκολλο και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στην ενότητα των μεθόδων.*

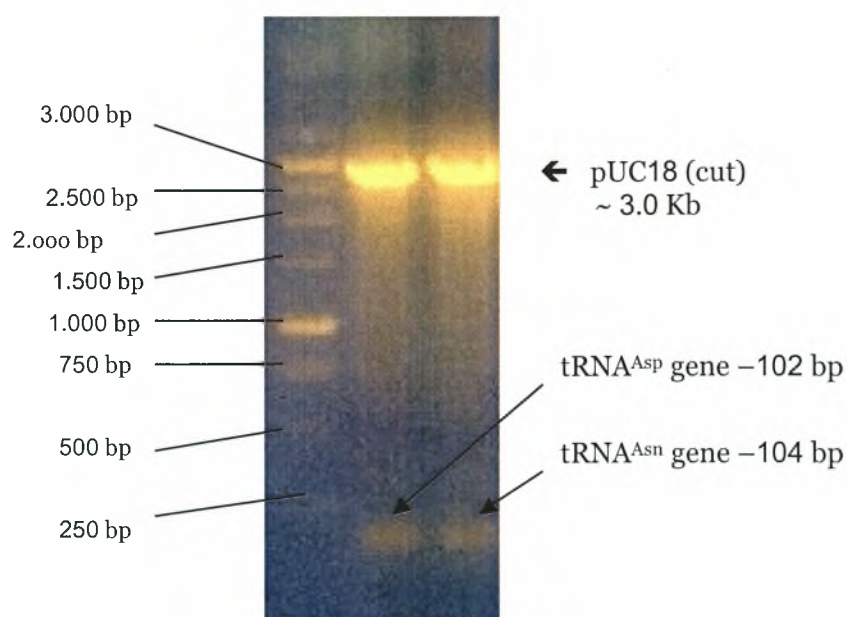
Το δεύτερο βήμα που πραγματοποιήθηκε ήταν η υβριδοποίηση των εκκινητών. Με τη διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων των εκκινητών. *Αναλυτικά η διαδικασία υβριδοποίησης περιγράφεται στις μεθόδους.*

Στο τρίτο βήμα, πραγματοποιήθηκε σύνδεση των υβριδοποιημένων εκκινητών με το πλασμίδιο pUC18. Το πλασμίδιο pUC18 έχει κοπεί με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και HindIII, ώστε τα μονόκλωνα άκρα που θα προκύψουν να είναι συμπληρωματικά με τα μονόκλωνα άκρα του ενθέματος. Με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης (Takara) και επώαση στους 16 °C για 12-16 ώρες πραγματοποιήθηκαν δύο ξεχωριστές αντιδράσεις σύνδεσης (ligation). Η μία γίνεται μεταξύ του pUC18 και των υβριδοποιημένων εκκινητών ASN και η άλλη με τους υβριδοποιημένους εκκινητές ASP. *Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την αντίδραση σύνδεσης περιγράφηκαν στις μεθόδους.*



Εικόνα 25: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας κλωνοποίησης των γονιδίων των tRNAs.

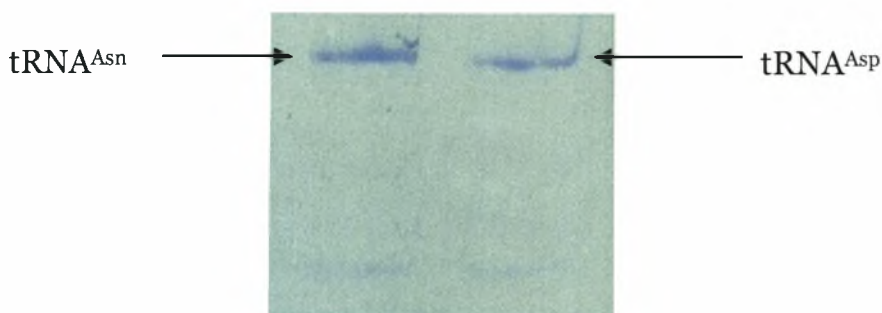
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των επιλεκτικών DH5α *E.coli* κυττάρων, ξεχωριστά, με κάθε προϊόν σύνδεσης. Από τα μετασχηματισμένα κυττάρα επιστρώθηκαν 200 μl σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ που περιέχει και αμπικιλίνη. Επίσης, σε κάθε τρυβλίο επιστρώθηκε IPTG και X-gal καθώς η επιλογή των επιθυμητών αποικιών θα γίνει βάσει του χρώματος τους (οι λευκές αποικίες περιέχουν το πλασμίδιο). Τα τρυβλία στη συνέχεια επώαστηκαν στους 37°C για 12-16 ώρες. Από τις λευκές αποικίες που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν δύο για την δημιουργία υγρών καλλιιεργειών σε θρεπτικό υλικό LB Broth (επώαση στους 37°C και υπό ανάδευση στις 210 rpm). Στη συνέχεια από τα κύτταρα κάθε καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα. Για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα της σύνδεσης του γονιδίου, που κωδικοποιεί το tRNA, με το πλασμίδιο pUC18 πραγματοποιήθηκε πέψη με τα ένζυμα BamHI και HindIII σε 10 μl πλασμιδιακού DNA. Στη συνέχεια τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (εικόνα 26)



Εικόνα 26: Αποτέλεσμα πέψης του πλασμιδιακού DNA (*pUC18 - tRNA gene*)
 Σειρά Δειγμάτων: *Ladder/pUC18-tRNA^{Asp}/pUC18-tRNA^{Asn}*

Οι ζώνες που διαχωρίστηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης αντιστοιχούν στα μεγέθη που αναμενόταν. Το μέγεθος του πλασμιδίου pUC18 είναι 2.686 bp, ενώ τα γονίδια που κωδικοποιούν τα tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} έχουν μέγεθος 102 bp και 104 bp, αντίστοιχα.

Έπειτα, με την υπόλοιπη ποσότητα του άκοπου πλασμιδιακού DNA (40 μl) πραγματοποιήθηκε πέψη με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού για κάθε περίπτωση, ώστε να επιτευχθεί γραμμοποίηση του μορίου DNA. Η γραμμοποίηση επιτρέπει την μεταγραφή μορίων tRNA με ώριμο CCA άκρο, γεγονός που είναι απαραίτητο για την ακυλίωση της τελευταίας αδενοσίνης με το αμινοξύ. Εάν το πλασμίδιο φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA^{Asn} η πέψη πραγματοποιείται με το ένζυμο NsiI, ενώ αν φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA^{Asp} χρησιμοποιείται το ένζυμο BstNI. *Οι προηγούμενες διαδικασίες περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα των μεθόδων.* Ο διαχωρισμός του RNA μετά το τέλος της διαδικασίας έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% (εικόνα 27). *Η διαδικασία προετοιμασίας της πηκτής και της ηλεκτροφόρησης περιγράφεται στις μεθόδους.*



Εικόνα 27: Ηλεκτροφόρηση των μορίων tRNA σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10 % ύστερα από την *in vitro* μεταγραφή τους.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι διαθέσιμες γενωμικές και βιοχημικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι η πλειονότητα των αρχαίων και βακτηριακών οργανισμών στερούνται γονιδίων που κωδικοποιούν αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες. Επομένως, η ικανότητα των οργανισμών αυτών να επιτυγχάνουν την αμινοακυλίωση των αντίστοιχων μορίων tRNA μέσω εναλλακτικών μονοπατιών αποτελεί ένδειξη ότι η ικανότητα αυτή δεν διατηρήθηκε τυχαία κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Η απουσία των συγκεκριμένων γονιδίων μπορεί να επηρεάζει και άλλες κυτταρικές λειτουργίες των οργανισμών και έτσι να λειτουργεί ως απάντηση σε διάφορες περιβαλλοντικές πιέσεις που δρουν πάνω σε διαδικασίες όπως είναι ο μεταβολισμός του κύτταρου ή να αποτελεί πλεονέκτημα έναντι συγκριμένων μεταλλάξεων (15).

Ένα από τα γονίδια που απουσιάζουν σε ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών (αρχαίων και βακτηρίων) είναι και αυτό που κωδικοποιεί την αμινοάκυλο-tRNA της ασπαραγίνης (AsnRS). Παρά την απουσία αυτής της συνθετάσης η αμινοακυλίωση του tRNA^{Asn} με ασπαραγίνη πραγματοποιείται χάρη σε μία χαμηλής εξειδίκευσης αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση του ασπαραγινικού οξέος (ND-AspRS) και σε μία GatCAB αμιδοτρανσφεράση. Η AspRS φέρεται να έχει αυτό το διττό ρόλο, δηλαδή την ικανότητα αμινοακυλίωσης τόσο του tRNA^{Asp}, όσο και του tRNA^{Asn} σε μία πληθώρα μικροοργανισμών και ιδιαίτερα στους παθογόνους οργανισμούς (19).

Το γεγονός ότι η AsnRS απουσιάζει από το γονιδίωμα δύο στελεχών του *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis* Z2491 Serogroup A και *N. meningitidis* MC58 Serogroup B) (20,21) σε συνδυασμό με την ύπαρξη των γονιδίων *gata*, *gatB* και *gatC* που κωδικοποιούν τις υπομονάδες της ετεροτριμερούς αμιδοτρανσφεράσης, καθιστά εξαιρετικά πιθανό η AspRS των οργανισμών αυτών να εμφανίζει διπλή δραστηριότητα. Με την κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την AspRS αλλά και των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} από το *Neisseria meningitidis* serotype A σκοπός είναι η μελέτη της λειτουργικής ιδιομορφίας της συνθετάσης και βάσει των αλληλεπιδράσεων αυτής με τα μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} να επιβεβαιωθεί αν όντως το ένζυμο αυτό εμφανίζει διπλή εξειδίκευση.

Όσον αφορά την κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του cassette-cloning και της *in vitro* μεταγραφής, έναντι της μεθόδου PCR. Με τη μέθοδο του cassette-cloning αποφεύγεται η περίπτωση πρόκλησης τυχαίων μεταλλάξεων και αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς ένα τέτοιο γεγονός θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα κατά την αλληλεπίδραση της AspRS με τα μόρια tRNA και σε παρερμηνευση των αποτελεσμάτων. Επίσης, ένα πλεονέκτημα που παρέχει αυτός ο τρόπος κλωνοποίησης είναι η δυνατότητα αντικαταστάσης συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδικών τμημάτων που φέρουν ελεγχόμενες σημειακές μεταλλάξεις. Αυτό είναι ιδιαίτερο χρήσιμο σε περιπτώσεις όπου επιθυμείται η μελέτη της επίδρασης συγκεκριμένων μεταλλάξεων στη λειτουργικότητα των μορίων tRNA όπως είναι π.χ η αλληλεπίδραση τους με τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες ή με κάποιον άλλο παράγοντα όπως ο Ef-Tu.

Παρακάτω παρατίθεται μια συγκριτική μελέτη μεταξύ αλληλουχιών που κωδικοποιούν ένζυμα AspRS στα δύο στελέχη (A, B) του βακτηρίου *Neisseria meningitidis*, καθώς και σε άλλα παθογόνα βακτήρια. Οι συντηρημένες περιοχές είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό του ενεργού κέντρου στο οποίο ενεργοποιείται το αμινοξύ, καθώς επίσης και για την αναγνώριση του αντικωδικίου (22).

ΟΜΟΠΑΡΑΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΣΕΙΚΗΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑΣ ΤΗΣ ASPRS

ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

```

1N.men      1  IVQVVID--PDTPEAAADSSRNEIVSITGRVRRNPEGTTNDKVISGKIE LAKELVINAATPFQDD-EN
2N.men      1  IVQVVID--PDTPEAAADSSRNEIVSITGRVRRNPEGTTNDKVISGKIE LAKELVINAATPFQDD-EN
E.coli      1  IVQVFFD--PDRADALKLASEIRNEFCIQVCTVRRADKKNINRDMATGEIEVLASSETIINRA---VPLDGNHV
Sal.Enter   1  IVQVFFD--PDRADALKLASEIRNEFCIQVCTVRRADKKNINRDMATGEIEVLASSETIINRA---SPLDGNHV
H.inf       1  IVQVCFD--EKYQDALTAAAGRNFFCQKSEVIARPNQINKMATGEIE LAKELRIYNAS---VPLDFNQN
Vi.cho      1  IVQVVVD--PDMADVAVANQIRSEFCIKTGEVRRARPE SQVAKEMATGEIEVLARSLEITNRS---VPLDFNQK
Ps.aer      1  IVQVFFD--PDRATTEAKADRVREEVVKITCKVRRPEGARNPNMATGSIIELVLEVINQAITPPEPLDYSD
H.pyl       1  IVQVCFD--ES-SKAEKALERSEEVVAKCKVRRERGAGLENPKKTKKIEVLEELIENKAITPEEIGN-KH
C.ace       1  IVQVVFQ--EEINKDAEMKADLVSEYCSVYGTILVRESPE--NPNMETGMIEKSEPKKISESETTPPEYKENLD
Str.Pyo     1  IVQVVIPEEVSSDVMATAERIRSEVIEEYEFVVEARQA--NDKMATGMIEKVSALTIINTEKTPPEKDDVE
consensus  1  ivqv d pd daf a lr ef i itg vr r e n matG iEila el iin adtppl id

```

```

1N.men      74  ISENVRLTNEVLDLRRPVMQRNLLRYQVAMGVRRLLDAQSFDIEPMLTSTPEGARDYLVP SRVHGKFFALP
2N.men      74  ISENVRLTNEVLDLRRPVMQRNLLRYQVAMGVRRLLDAQSFDIEPMLTSTPEGARDYLVP SRVHGKFFALP
E.coli      73  NSEARLRYRYLDRRPEMAQRLLTRAKTSLVRRPMDHGFLDIEETPMLTKATPEGARDYLVP SRVHGKFFYALP
Sal.Enter   73  NSEARLRYRYLDRRPEMAQRLLTRAKTSLVRRPMDHGFLDIEETPMLTKATPEGARDYLVP SRVHGKFFYALP
H.inf       73  NSEARLRYRYLDRRPEMAQRLLTRAKTSLVRRPMDHGFLDIEETPMLTKATPEGARDYLVP SRVHGKFFYALP
Vi.cho      73  NSEARLRYRYLDRRPEMAQRLLTRAKTSLVRRPMDHGFLDIEETPMLTKATPEGARDYLVP SRVHGKFFYALP
Ps.aer      75  VGEITRLRYRYLDRRPEMAAKLKLRAFTSSRRLLDNGFLDIEETPMLTKATPEGARDYLVP SRVHGKFFYALP
H.pyl       73  VNEELRLRYRYLDRRPEMAQRLLTRAKTSLVRRPMDHGFLDIEETPMLTKATPEGARDYLVP SRVHGKFFYALP
C.ace       74  AAENIRLRYRYLDRRPEMAQRLLTRAKTSLVRRPMDHGFLDIEETPMLTKATPEGARDYLVP SRVHGKFFYALP
Str.Pyo     75  VSDITRLRYRYLDRRPEMLNFKLRKVTSHSRNLLDLEFDIEETPMLTKATPEGARDYLVP SRVHGKFFYALP
consensus  81  see rikyryldiRrpm lklrkvtrvRryldd gfidietpmittpegardylvpsrvh gkfyalp

```


1N.men 150 QSEDLFRKIMMAGSFDRYYQITKCFRDEDIRADRFEFTQIDMETSFLNEDEIMDIETEMAKQVFKADGVLDLQ-E
 2N.men 150 QSEDLFRKIMMAGSFDRYYQITKCFRDEDIRADRFEFTQIDMETSFLNEDEIMDIETEMAKQVFKADNVLDLQ-D
 E.coli 149 QSEDLFRKIMMAGSFDRYYQIVKCFRDEDIRADRFEFTQIDMETSFLTAPOVREYMERLVRHLWLEKGVLDLQ-D
 Sal.Enter 149 QSEDLFRKIMMAGSFDRYYQIVKCFRDEDIRADRFEFTQIDMETSFLTAPOVREYMERLVRHLWLEKGVLDLQ-D
 H.inf 149 QSEDLFRKIMMAGSFDRYYQIVKCFRDEDIRADRFEFTQIDMETSFLTAPEVREYMERLVRHLWLEKGVLDLQ-K
 Vi.cho 149 QSEDLFRKIMMAGSFDRYYQIVKCFRDEDIRADRFEFTQIDMETSFLTAEOVRAVTEKMPREYMERLVRHLWLEKGVLDLQ-D
 Ps.aer 151 QSEDLFRKIMMAGSFDRYYQIVKCFRDEDIRADRFEFTQIDMETSFLDESDIETGTERKVVQLEKELVDVDFD-E
 H.pyl 149 QSEDLFRKIMMAGSFDRYYQIVKCFRDEDIRADRFEFTQIDMETSFLDESDIETGTERKVVQLEKELVDVDFD-E
 C.ace 150 QSEDLFRKIMMAGSFDRYYQIVKCFRDEDIRADRFEFTQIDMETSFLDESDIETGTERKVVQLEKELVDVDFD-E
 Str.Pyo 151 QSEDLFRKIMMAGSFDRYYQIVKCFRDEDIRADRFEFTQIDMETSFLDESDIETGTERKVVQLEKELVDVDFD-E
 consensus 161 qspqlfkqllmw gfdryyqi kcfirdediradrqpeftqidletsfl e evmdi egmvk vfkevl vdlg d

1N.men 225 FPEEPESEAMFYVGSQKPDRLINIKFTETDLMKTEEFKVRGCAADMKGGRVVALRVVNGAEFSSRKEIDE 337
 2N.men 225 FPEEPESEAMFYVGSQKPDRLINIKFTETDLMKTEEFKVRGCAADMKGGRVVALRVVNGAEFSSRKEIDE 337
 E.coli 224 FPEEPESEAMFYVGSQKPDRLINIKFTETDLMKTEEFKVRGCAADMKGGRVVALRVVNGAEFSSRKEIDE 336
 Sal.Enter 224 FPEEPESEAMFYVGSQKPDRLINIKFTETDLMKTEEFKVRGCAADMKGGRVVALRVVNGAEFSSRKEIDE 336
 H.inf 224 FPEEPESEAMFYVGSQKPDRLINIKFTETDLMKTEEFKVRGCAADMKGGRVVALRVVNGAEFSSRKEIDE 337
 Vi.cho 224 FPEEPESEAMFYVGSQKPDRLINIKFTETDLMKTEEFKVRGCAADMKGGRVVALRVVNGAEFSSRKEIDE 336
 Ps.aer 226 FPEEPESEAMFYVGSQKPDRLINIKFTETDLMKTEEFKVRGCAADMKGGRVVALRVVNGAEFSSRKEIDE 339
 H.pyl 224 FPEEPESEAMFYVGSQKPDRLINIKFTETDLMKTEEFKVRGCAADMKGGRVVALRVVNGAEFSSRKEIDE 338
 C.ace 226 FPEEPESEAMFYVGSQKPDRLINIKFTETDLMKTEEFKVRGCAADMKGGRVVALRVVNGAEFSSRKEIDE 354
 Str.Pyo 227 FPEEPESEAMFYVGSQKPDRLINIKFTETDLMKTEEFKVRGCAADMKGGRVVALRVVNGAEFSSRKEIDE 336
 consensus 241 fprmsy eam rygsdkpdir lelldvadlmk efkvf g a dp g rv alrvpvgg a lsrk ide

1N.men 295 YTKFVGIYGAGGLAYIKVNERNLSNGEDSGDQSPVKFLIENAKETARTGAQNGDIFFGADKKVNVNBAIGA
 2N.men 295 YTKFVGIYGAGGLAYIKVNERNLSNGEDSGDQSPVKFLIENAKETARTGAQNGDIFFGADKKVNVNBAIGA
 E.coli 294 YGNFVKIYGAGGLAYIKVNERKGLG-----INSPAKFLNAEIEDIERTAQDGDGDIFFGADNKKVVAIAGA
 Sal.Enter 294 YGNFVKIYGAGGLAYIKVNERKGLG-----INSPAKFLNAEIEDIERTAQDGDGDIFFGADNKKVVAIAGA
 H.inf 294 YTCFVGIYGAGGLAYIKVNERNAGL-----WSPAKFLNEDVWKGAEVNAQTDGDIFFGADKQWTTTBAIGA
 Vi.cho 294 YTAFAVGIYGAGGLAYIKVNERNAGL-----WSPAKFLNEDVWKGAEVNAQTDGDIFFGADKQWTTTBAIGA
 Ps.aer 296 YTKFVGIYGAGGLAYIKVNERKGVG-----LQSPVKFLIENAKETARTGAQNGDIFFGADKRAKIVCBAIGA
 H.pyl 296 LEEFVQIYGAGGLAYIKVNERKGVG-----LQSPVKFLIENAKETARTGAQNGDIFFGADKRAKIVCBAIGA
 C.ace 295 LGEFVKIYGAGGLAYIKVNERKGVG-----LQSPVKFLIENAKETARTGAQNGDIFFGADKRAKIVCBAIGA
 Str.Pyo 293 LTFEAKIYGAGGLAYIKVNERKGVG-----LQSPVKFLIENAKETARTGAQNGDIFFGADKRAKIVCBAIGA
 consensus 321 yt fv iygakglayikvnd g eg lqspiakflse l iidrt aq gdiiffgakd kvv eaiga

1N.men 371 LRLKVGHELGHGKDNQYFTDEWKPLWVDFPMFEFDEEEDRYVAHHHPFTAPKEGHEGLVSDPANCARAFDMVNLG
 2N.men 371 LRLKVGHELGHGKDNQYFTDEWKPLWVDFPMFEFDEEEDRYVAHHHPFTAPKEGHEGLVSDPANCARAFDMVNLG
 E.coli 366 LRLKVGHELGHGKDNQYFTDEWKPLWVDFPMFEFDEEEDRYVAHHHPFTAPKEGHEGLVSDPANCARAFDMVNLG
 Sal.Enter 366 LRLKVGHELGHGKDNQYFTDEWKPLWVDFPMFEFDEEEDRYVAHHHPFTAPKEGHEGLVSDPANCARAFDMVNLG
 H.inf 366 LRLKVGHELGHGKDNQYFTDEWKPLWVDFPMFEFDEEEDRYVAHHHPFTAPKEGHEGLVSDPANCARAFDMVNLG
 Vi.cho 366 LRLKVGHELGHGKDNQYFTDEWKPLWVDFPMFEFDEEEDRYVAHHHPFTAPKEGHEGLVSDPANCARAFDMVNLG
 Ps.aer 368 LRLKVGHELGHGKDNQYFTDEWKPLWVDFPMFEFDEEEDRYVAHHHPFTAPKEGHEGLVSDPANCARAFDMVNLG
 H.pyl 363 LRLKVGHELGHGKDNQYFTDEWKPLWVDFPMFEFDEEEDRYVAHHHPFTAPKEGHEGLVSDPANCARAFDMVNLG
 C.ace 362 LRLKVGHELGHGKDNQYFTDEWKPLWVDFPMFEFDEEEDRYVAHHHPFTAPKEGHEGLVSDPANCARAFDMVNLG
 Str.Pyo 359 LRLKVGHELGHGKDNQYFTDEWKPLWVDFPMFEFDEEEDRYVAHHHPFTAPKEGHEGLVSDPANCARAFDMVNLG
 consensus 401 lrlkvghel l w plwvdfp mfe deeg avhhpft pke t d ld p ala aydmvnlg

1N.men 447 WEIGGGSRIHRAVQEKVFAALKSPDEQERFGFLLDNKFGAPPFHGLFGLDRLVMLTGCASSIWIIFPK
 2N.men 447 WEIGGGSRIHRAVQEKVFAALKSPDEQERFGFLLDNKFGAPPFHGLFGLDRLVMLTGCASSIWIIFPK
 E.coli 438 WEIGGGSRIHNGEMQQTIVFGLGINEEERERFGFLLDALKFGAPPFHGLFGLDRLVMLTGCASSIWIIFPK
 Sal.Enter 438 WEIGGGSRIHNGEMQQTIVFGLGINEEERERFGFLLDALKFGAPPFHGLFGLDRLVMLTGCASSIWIIFPK
 H.inf 438 WEIGGGSRIHNGEMQQTIVFGLGINEEERERFGFLLDALKFGAPPFHGLFGLDRLVMLTGCASSIWIIFPK
 Vi.cho 438 WEIGGGSRIHNGEMQQTIVFGLGINEEERERFGFLLDALKFGAPPFHGLFGLDRLVMLTGCASSIWIIFPK
 Ps.aer 438 WEIGGGSRIHNGEMQQTIVFGLGINEEERERFGFLLDALKFGAPPFHGLFGLDRLVMLTGCASSIWIIFPK
 H.pyl 430 WEIGGGSRIHNGEMQQTIVFGLGINEEERERFGFLLDALKFGAPPFHGLFGLDRLVMLTGCASSIWIIFPK
 C.ace 436 WEIGGGSRIHNGEMQQTIVFGLGINEEERERFGFLLDALKFGAPPFHGLFGLDRLVMLTGCASSIWIIFPK
 Str.Pyo 432 WEIGGGSRIHNGEMQQTIVFGLGINEEERERFGFLLDALKFGAPPFHGLFGLDRLVMLTGCASSIWIIFPK
 consensus 481 weiGggsrih dmq vf ilgi eeq ekFgflldalkfg pphglafgl d rlvmltgcassirndvvaifpk

```

1N.men 523 FRRFCIENNAENSDDKQRFSTKRNQAAETKEA 602
2N.men 523 FRRFCIENNAENSDDKQRFSTKRNQAAETKEV 602
E.coli 514 TAAACIMTEAPSFANPTALAEISSQVKAENN--- 590
Sal.Enter 514 TAAACIMTEAPSFANOAALEFGQVKAENN--- 590
H.inf 514 TAAACIMTEAPSFANPQALEEIASVKAE----- 588
Vi.cho 514 TAAACIMTDAPSLANPAALREIATAVSLATKDKA-- 591
Ps.aer 514 TCAAGDMTQFQPSDGKALREHHRREQPKAE--- 591
H.pyl 506 NKAQSEFNAPSPNEEQREHHRISK----- 577
C.ace 512 NNAACPEEAPNVVDENQEEELGLAESSEEE----- 604
Str.Pyo 508 NKAQDPMTQAPSLRESENQLEESQSESD----- 582
consensus 561 tq a clmt aps v l eL irlr k

```

```

1N.men Neisseria meningitidis Z2491 (serogroup A)
2N.men Neisseria meningitidis MC58 (serogroup B)
E.coli Escherichia coli
Sal.Enter Salmonella enterica
H.inf Haemophilus influenza
Vi.cho Vibrio cholerae
Ps.aer Pseudomonas aerinosa
H.pyl Helicobacter pylori
C.ace Clostridium acetobutylicum
Str.Pyo Streptococcus pyogenes

```

Δομικά, τα ένζυμα AspRS, είτε αυτά είναι υψηλής εξειδίκευσης (discriminating) είτε χαμηλής εξειδίκευσης (non-discriminating) εμφανίζουν τις εξής διακριτές περιοχές:

- A) Τη N-τελική περιοχή (1-200 αμινοξέα περίπου) η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του αντικωδικίου του μορίου tRNA^{Asp}.
- B) Την αμέσως γειτονική περιοχή που περιλαμβάνει τα μοτίβα I και II και αποτελεί τον καταλυτικό πυρήνα των ενζύμων.
- Γ) Μια περιοχή ανάμεσα στα μοτίβα II και III η οποία παρεμβάλλεται και είναι χαρακτηριστική των ενζύμων AspRS με υψηλή εξειδίκευση
- Δ) Την περιοχή που καλύπτει το μοτίβο III και μερικές C-τελικές προεκτάσεις της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, χαρακτηριστικές σε ένζυμα από βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων και των ενζύμων των δύο στελεχών του βακτηρίου *Neisseria meningitidis*.

Οι δομικές αυτές περιοχές των βακτηριακών ενζύμων διαφέρουν σε σχέση με αυτές των ευκαρυωτικών (23,24). Οι διαφορές αυτές είναι πιθανόν να έχουν

και αντίκτυπο στη λειτουργικότητα των ομόλογων ενζύμων από διάφορους οργανισμούς.

Γενικά, η ποικιλομορφία των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών που αναδείχθηκε μέσω των μελετών της λειτουργικής γενωμικής, ανάμεσα στους οργανισμούς και κυρίως ανάμεσα σε παθογόνους οργανισμούς (όπως είναι το βακτήριο *Neisseria meningitidis*) και τον άνθρωπο, καθιστά τα ένζυμα αυτά ελκυστικούς μοριακούς στόχους έρευνας και θεραπείας. Για τον λόγο αυτό και λόγω της κεντρικής λειτουργίας των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών στην πρωτεϊνοσύνθεση, ένας αρκετά μεγάλος αριθμός αναστολέων που κυρίως προσομοιάζουν με το αμινοάκυλο-αδενυλικό, έχουν σχεδιασθεί για εξειδικευμένη αναστολή της δράσης συγκεκριμένων ενζύμων όπως π.χ. Pro-AMS, 5'-O-[N-(L-propyl)-sulfamoyl]-adenosine για την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της προλίνης (25,26). Έτσι, με την ανίχνευση των αμινοξέων που είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση του ασπαραγίνυλο-AMP (Asp-AMP) στο ενεργό κέντρο της AspRS μπορούν σχεδιασθούν κατάλληλοι χημικοί παράγοντες που να προσομοιάζουν το Asp-AMP μόνο που αυτοί θα έχουν ανασταλτική δράση για το ένζυμο. Ένας τέτοιος αναστολέας θα μπορούσε να έχει θανατηφόρο δράση για το *N. meningitidis* εξαιτίας της παρεμπόδισης της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Από τη μελέτη της AspRS θα μπορούσε να αποσαφηνιστεί ο λειτουργικός ρόλος ορισμένων καταλοίπων αμινοξέων και η συμβολή τους στον καθορισμό της δραστηριότητας υψηλής και χαμηλής εξειδίκευσης του ενζύμου. Είναι ήδη γνωστό από διάφορες έρευνες ότι ακόμα και η μεταλλαγή δύο καταλοίπων του ενζύμου μπορεί να οδηγήσει σε μετατροπή της εξειδίκευσης (15).

Επίσης, θα μπορούσε να μελετηθεί η έκφραση της AspRS αλλά και των μεταλλαγμένων μορφών της *in vivo* σε ετερόλογα συστήματα όπως π.χ στο *S. cerevisiae*. Ένας τρόπος για να γίνει αυτό είναι μέσω απαλοιφής του γονιδίου που κωδικοποιεί την ενδογενή AspRS του οργανισμού και αντικατάστασης του από το αντίστοιχο γονίδιο του *N. meningitidis* που είναι ενσωματωμένο σε κάποιο πλασμιδιακό φορέα. Ένας δεύτερος τρόπος είναι να μελετηθεί η έκφραση της AspRS του *N. meningitidis* παρουσία του αντίστοιχου γονιδίου του *S. cerevisiae*. Η διαδικασία αυτή θα μπορούσε να αποδειχθεί πολύ χρήσιμη σε

μελέτες επίδρασης των αναστολέων της AspRS του *N. meningitidis* σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Αντίστοιχα, οι *in vivo* μελέτες των μορίων tRNA μπορούν να συνεισφέρουν στον εντοπισμό και την αποσαφήνιση συγκεκριμένων λειτουργικών περιοχών (tRNA identity elements) που είναι αναγνωρίσιμες από τις συνθετάσες και συνεισφέρουν στην συνολική υψηλή πιστότητα της πρωτεϊνοσύνθεσης (27).

Γενικότερα, με τη μελέτη της AspRS από το *Neisseria meningitidis* θα μπορούμε να πάρουμε απάντηση σε σημαντικά ερωτήματα όπως:

1. Είναι η *N. meningitidis* AspRS σε θέση να αμινοακυλιώνει εκτός από το tRNA^{Asp} και το tRNA^{Asn} και αν ναι σε ποιο βαθμό;
2. Ποιες είναι οι δομικές αλλαγές που απαιτούνται για να μετατρέψουν την *N. meningitidis* AspRS από ένζυμο με περιορισμένη εξειδίκευση (non-discriminating) σε ένζυμο απόλυτης εξειδίκευσης (discriminating);
3. Εάν η AspRS του *N. meningitidis* είναι χαμηλής εξειδίκευσης, μπορούν να σχεδιαστούν αναστολείς έναντι αυτού του ενζύμου με αποτελεσματική δράση;

Από τις απαντήσεις που θα προκύψουν από τα παράπανω ερωτήματα μπορούν να εξαχθούν πολύτιμα συμπεράσματα για μία από τις σημαντικότερες βιοχημικές διεργασίες του παθογόνου αυτού οργανισμού που αφορά άμεσα τον άνθρωπο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ibba M. and Söll D. Aminoacyl-tRNA synthesis. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 617-650.
2. Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., and Moras D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. (1990) *Nature* **347 (6289)**, 203-206.
3. Cusack S. Aminoacyl-tRNA synthetases. (1997) *Current Opinion in Structural Biology* **7**, 881-889.
4. Ibba M., Morgan S., Curnow A.W., Pridmore D.R., Vothknecht U.C., Gardner W., Lin W., Woese C.R. and Söll D. A euryarcheal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases. (1997) *Science* **278**, 1119-1122.
5. Wolf Y.I., Aravind L., Grishin N.V. and Koonin E.V. (1999) *Genome Res.* **9**, 689-710.
6. Schmitt E., Moulinier L., Fujiwara S., Imanaka T., Thierry J.C. and Moras D. (1998) *EMBO J.* **17**, 5227-5237.
7. Becker H.D. and Kern D. *Thermus Thermophilus*: a link in evolution of tRNA-dependent amino acid amidation pathways. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12832-12837.
8. Ibba M., Becker H.D., Stathopoulos C., Tumbula D.L. and Söll D. The Adaptor Hypothesis revisited. (2000) *Trends In Biochem. Sci.* **25**, 311-316.
9. Gupta R., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 9461-9471.
10. Tumbula D.L., Becker H.D., Chang W.Z. and Söll D. Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. (2000) *Nature* **407**, 106-110.
11. Lamout V., Quevillon S., Diriong S., N'Guyen V.C., Lipinski M. and Mirande M. Evolution of the Glx-tRNA synthetase family: The glutaminyl enzyme as a case of horizontal gene transfer. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8670-8674.
12. Raczniak G., Becker H.D., Min B. and Söll D. A single amidotransferase forms asparaginyl-tRNA and glutaminyl-tRNA in *Clamydomona trachomatis*. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 45862-45867.
13. Ibba M. and Söll D. ~~Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code.~~ (2004) *Genes & Dev.* **18**: 734-738.

14. Tumbula-Hansen D., Feng L., Toogood H., Stetter K.O. and Söll D. Evolutionary Divergence of the archaeal aspartyl-tRNA synthetases into discriminating and nondiscriminating forms. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 37184-37190.
15. Feng L., Tumbula D., Toogood H. and Söll D. Expanding tRNA recognition of a tRNA synthetase by a single amino acid change. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5676-5681.
16. Di Giulio M. (2002) *J. Mol. Evol.* **55**, 616-622.
17. Shiba K., Motegi H., Yoshida M. and Noda T. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 5045-5051.
18. Min B., Pelaschier J.T., Graham D., Tumbula-Hansen D. and Söll D. Transfer RNA-dependent amino acid biosynthesis: An essential route to asparagine formation (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2678-2683.
19. Raczniak G., Ibba M. and Söll, D. Genomics-based identification of targets in pathogenic bacteria for potential therapeutic and diagnostic use. (2001) *Toxicology* **160**, 181-189.
20. Parkhill J., Achtman M., James K.D., Bentley S.D., Churcher C., Klee S.R., Morelli G., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Davies R.M., Davis P., Devlin K., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Leather S., Moule S., Mungall K., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., Simmonds M., Skelton J., Whitehead S., Spratt B.G. and Barrell B.G. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. (2000) *Nature* **404** (6777), 502-506.
21. Tettelin H., Saunders N.J., Heidelberg J., Jeffries A.C., Nelson K.E., Eisen J.A., Ketchum K.A., Hood D.W., Peden J.F., Dodson R.J., Nelson W.C., Gwinn M.L., DeBoy R., Peterson J.D., Hickey E.K., Haft D.H., Salzberg S.L., White O., Fleischmann R.D., Dougherty B.A., Mason T., Ciecko A., Parksey D.S., Blair E., Citti H., Clark E.B., Cotton M.D., Utterback T.R., Khouri H., Qin H., Vamathevan J., Gill J., Scarlato V., Masignani V., Pizza M., Grandi G., Sun L., Smith H.O., Fraser C.M., Moxon E.R., Rappuoli R. and Venter J.C. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. (2000) *Science* **287** (5459), 1809-15.
22. Rees B., Webster G., Delarue M., Boeglin M. and Moras D. Aspartyl tRNA-synthetase from *Escherichia coli*: flexibility and adaptability to the substrates. (2000) *J. Mol. Biol.* **299** (5), 1157-1164.

23. Ador L., Camasses A., Erbs P., Cavarelli J., Moras D., Gangloff J. and Eriani G. Active site mapping of yeast aspartyl-tRNA synthetase by in vivo selection of enzyme mutations lethal for cell growth. (1999) *J. Mol. Biol.* **288** (2), 231-242.
24. Becker H.D., Roy H., Moulinier L., Mazauric M.H., Keith G. and Kern D. *Thermus thermophilus* contains an eubacterial and an archaeobacterial aspartyl-tRNA synthetase (2000) *Biochemistry* **39** (12), 3216-30.
25. Bunjun S., Stathopoulos C., Graham D., Min B., Kitabatake M., Wang A.L., Wang C.C., Vivares C.P., Weiss L.M. and Söll D. A dual-specificity aminoacyl-tRNA synthetase in the deep-rooted eukaryote *Giardia lamblia*. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12997-13002.
26. Kamtekar S., Kennedy D.W., Wang J., Stathopoulos C., Söll D. and Steitz T.A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 1673-1678.
27. Briand C., Poterszman A., Eiler S., Webster G., Thierry J. and Moras D. An intermediate step in the recognition of tRNA(Asp) by aspartyl-tRNA synthetase. (2000) *J. Mol. Biol.* **299** (4), 1051-1060.
28. Curnow A.W., Tumbula D.L., Pelaschier J.T., Min.B. and Söll D. Glutamyl-tRNA^{Gln} amidotransferase in *Deinococcus radiodurans* may be confined to asparagine synthesis (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12838-12843.
29. Ribas L. and Schimmel P. Aminoacyl-tRNA synthetases: potential markers of genetic code development (2001) *Trends In Biochemical Sciences* **26**, 591-596.
30. Kim S., Lee S.W., Choi E.C. and Choi S.Y. Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 278-288.