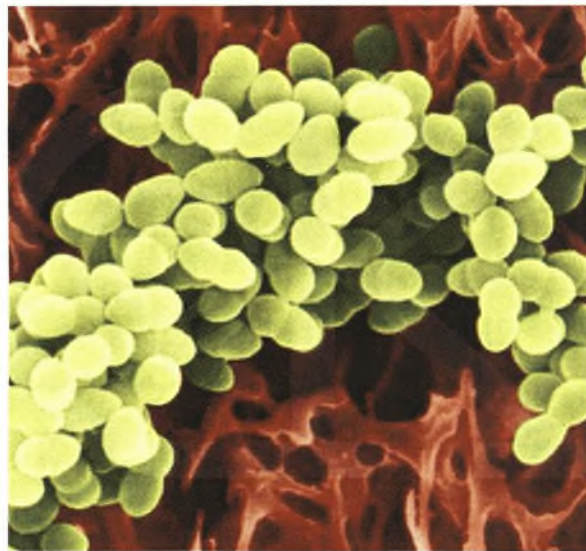




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

***IN VITRO* ΚΑΙ *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΠΙ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ
ΤΩΝ ΜΗ ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΥΛ - ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΩΝ
FEMA ΚΑΙ FEMX ΑΠΟ ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *Staphylococcus
aureus* ΜΕ ΧΑΜΗΛΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΑΡΙΑ Ι. ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ

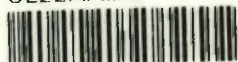
ΛΑΡΙΣΑ 2009



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

Αριθ. Εισ.: 6954/1
Ημερ. Εισ.: 02-06-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΠΑΠ

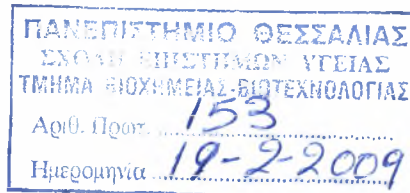
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087225

***In vitro* και *in vivo* μελέτες επί μεταλλαγμάτων των μη ριβοσωμικών πεπτιδυλ - τρανσφερασών FemA και FemX από κλινικά στελέχη *Staphylococcus aureus* με χαμηλή ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη**

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2007-2008.



Επιβλέπων καθηγητής:

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος
Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

- Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Μόσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με την καθοδήγηση, τις υποδείξεις και την υποστήριξη τους, συντέλεσαν στην επιτυχή αποπεράτωση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκ. Καθ. του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κο Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η εργασία, για τις αδιάλειπτες επιστημονικές υποδείξεις και ηθική στήριξη που μου προσέφερε κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, αλλά και για την τιμή που μου έκανε με την ανάθεση της εργασίας αυτής. Επιπλέον, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ, στη κυρία Σταματίνα Γιαννούλη, υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και στον κύριο Αθανάσιο Κυρίτση, μεταπτυχιακό φοιτητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για τις πολύτιμες συμβουλές, υποδείξεις και ηθική υποστήριξη, καθώς και όλους τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς, και προπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Λειτουργικής Βιοχημείας, για την άσπογη και ομαλή συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της εργαστηριακής μας συνύπαρξης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1 Οι AARSs και οι εναλλακτικοί τους ρόλοι.....	5
1.2 Η βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στο <i>Staphylococcus aureus</i> ...7	
1.3 Ανθεκτικότητα στελεχών <i>Staphylococcus aureus</i> στη μεθικιλίνη.....12	
1.4 Πρωτεΐνες ομόλογες των FemXAB παραγόντων.....15	
1.5 Κρυσταλλικές δομές των FemA και FemX.....17	
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	20
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
3.1 ΥΛΙΚΑ.....	22
3.1.1 Χημικές ουσίες-αντιδραστήρια.....	22
3.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα.....	23
3.1.3 Θρεπτικά μέσα.....	23
3.1.4 Κύτταρα.....	25
3.1.5 Πλασμιδιακοί φορείς.....	26
3.1.6 Εκκινητές (Primers).....	29
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
3.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA	30
3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	30
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτη αγαρόζη.....	31
3.2.4 Καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτη αγαρόζη (gel extraction).....	32
3.2.5 Σύνδεση τμημάτων DNA (ligation).....	32
3.2.6 Παρασκευή ηλεκτρο-επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> για μετασχηματισμό.....	33
3.2.7 Παρασκευή ηλεκτρο-επιδεκτικών κυττάρων <i>S. aureus</i> για μετασχηματισμό.....	33
3.2.8 Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. Coli</i> (transformation).....	34
3.2.9 Μετασχηματισμός ηλεκτρο-επιδεκτικών κυττάρων <i>S. aureus</i>	35
3.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα.....	35
3.2.11 Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα (digestion).....	36
3.2.12 Υπερέκφραση του παράγοντα FemA.....	37
3.2.13 Απομόνωση του παράγοντα FemA.....	38
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Staphylococcus aureus* είναι μια από τις κύριες αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων παγκοσμίως. Το φαινόμενο αυτό έχει επιταχυνθεί λόγω της ασύνετης χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων, που έδωσε ώθηση στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών. Έτσι, είναι επιτακτική η ανάγκη ανακάλυψης νέων, αποτελεσματικών θεραπευτικών παραγόντων. Το κυτταρικό τοίχωμα, που αποτελεί στόχο των αντιβιοτικών, αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες εναλλασσόμενων μονάδων N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) και N-ακετυλομουραμικού οξέος (MurNAc), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με γέφυρες πενταγλυκίνης. Η διαδοχική ενσωμάτωση των καταλοίπων γλυκίνης καταλύεται από την δράση μιας οικογένειας μη ριβοσωμικών πεπτιδουλ-τρανσφερασών, τους παράγοντες FemXAB. Δότες των γλυκινών είναι τα μόρια Gly-tRNA^{Gly}, ενώ προσφάτως αποδείχθηκε πως είναι τρία τα ισοδεκτικά μόρια tRNA^{Gly}, που συμμετέχουν αποκλειστικά στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Στη παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των γονιδίων των FemA και FemX παραγόντων, από κλινικά στελέχη *S. aureus* με χαμηλή ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη και διερευνήθηκε η ύπαρξη μεταλλάξεων στα γονίδια αυτά. Ακολούθησε υπερέκφραση και απομόνωση του FemA παράγοντα από κύτταρα *E. coli* και μετασχηματισμός MRSA στελεχών, με μεταλλάγματα των FemA και FemB παραγόντων. Σκοπός της μελέτης είναι να αποδειχθεί η σημασία των Fem παραγόντων στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στον *S. aureus*, στα πλαίσια ανακάλυψης νέων στόχων αντιβιοτικών.

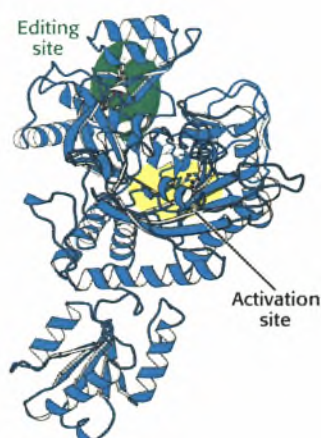
ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the most common causes of hospital-acquired infections worldwide. This phenomenon is accelerated by the extensive use of antimicrobial agents, that became the major reason for the appearance of resistant strains in a broad-spectrum of antibiotics. In view, of these threatening developments, it becomes urgent to search for new, efficient therapeutic agents. The bacterial cell wall, a suitable target of antibiotics, contains linear chains of alternating N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylmuramic acid (MurNAc) cross-linked by pentaglycine bridges. The subsequent incorporation of glycine residues is catalyzed by a family of non-ribosomal peptidyltransferases, the FemXAB factors. The Gly-tRNA^{Gly} molecules serving as glycine donors, while, recently, it has been demonstrated that three isoacceptor tRNA^{Gly} molecules participate, exclusively, in cell wall synthesis. Cloning of the genes encoding FemA and FemX factors from low-level resistance *S. aureus* strains and the inspection of mutations of these genes took place in the present study. Additionally, we accomplished the over-expression and isolation of FemA factor from *E. coli* strains, while FemA and FemX mutants were used to transformed MRSA strains. Our goal was to provide evidence that mutations in Fem factors play a critical role correct cell wall synthesis in *S. aureus*, as a part of a general project for the investigation of new molecular targets for antibiotics.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

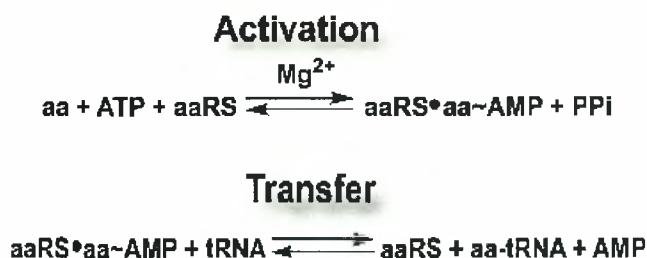
1.1 Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες και οι εναλλακτικοί τους ρόλοι

Η πρωτεϊνοσύνθεση είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία, που επιβάλλεται να διεξάγεται τόσο με υψηλή πιστότητα, όσο και με μεγάλη ταχύτητα, ώστε να ανταποκρίνεται στις ανάγκες του κυττάρου. Η πιστότητα διασφαλίζεται μέσω της συμμετοχής πολυάριθμων παραγόντων, οι οποίοι παρέχουν έτσι ένα μεγάλο αριθμό σημείων ελέγχου, που λειτουργούν ως δικλείδες ασφαλείας. Τέτοιοι παράγοντες είναι και οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες (aaRS), που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση, καταλύοντας την αντίδραση της αμινοακυλίωσης, δηλαδή τη σύνδεση του αμινοξέος στο αντίστοιχο tRNA. Κάθε συνθετάση είναι εξαιρετικά ειδική για ένα συγκεκριμένο αμινοξύ και θα συνδέσει ένα λανθασμένο αμινοξύ μόνο μία φορά κάθε 10^4 ή 10^5 καταλυτικές αντιδράσεις. Τα αποτελέσματα μελετών μεταλλαξιγένεσης αποκάλυψαν τη δομή των ενζύμων αυτών, σημειώνοντας τη θέση του κέντρου ενεργοποίησης, όσο και του κέντρου διόρθωσης (**Εικόνα 1**).



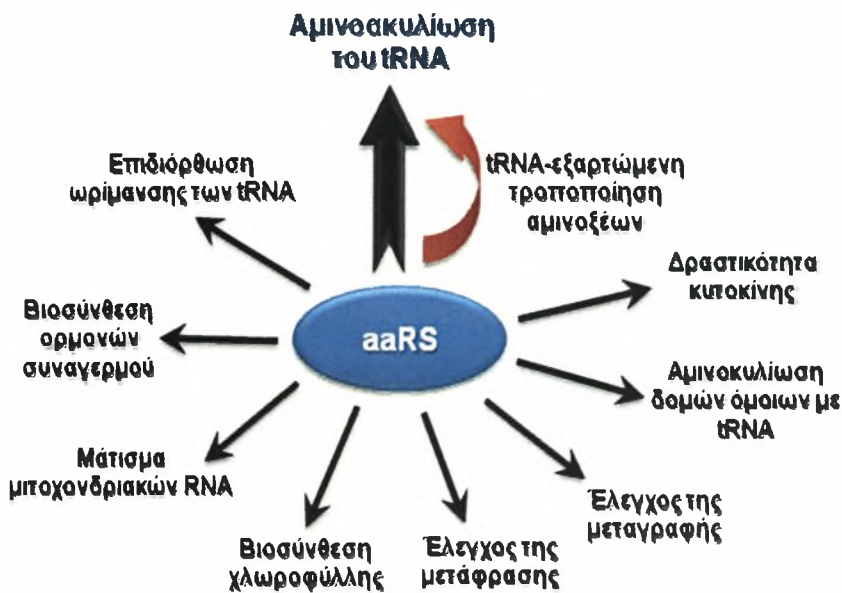
Εικόνα 1: Κρυσταλλική δομή αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών.

Μέσω της αμινοακυλίωσης, όπου η καρβοξυλική ομάδα ενός αμινοξέος συνδέεται με τη 2'- ή την 3'- υδροξυλομάδα της αδενίνης στο 3'-CCA άκρο του αντίστοιχου μορίου tRNA, ξεπερνιέται ο φραγμός σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού μεταξύ ελεύθερων αμινοξέων, που είναι θερμοδυναμικά ανεπίτευκτο. Προκύπτουν εστέρες αμινοξέων, τα φορτισμένα-ενεργοποιημένα tRNA, ή αλλιώς τα αμινοακυλο-tRNA. Επειδή η αμινοακυλίωση είναι μια διαδικασία ενεργοποίησης και μεταφοράς των αμινοξέων (**Εικόνα 2**), οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες είναι γνωστές και ως *ενεργοποιητικά ένζυμα* (Paul Zamecknic, 1966).



Εικόνα 2: Ενεργοποίηση και μεταφορά του αμινοξέος από την αμινοακυλο-tRNA συνθετάση.

Πέραν όμως της συμμετοχής των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών στην πρωτεϊνοσύνθεση, έχει αποδειχθεί πως τα ένζυμα αυτά έχουν εναλλακτικούς ρόλους σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες. Χαρακτηριστική είναι η εμπλοκή τους στο μάτισμα του μιτοχονδριακού RNA, στη σύνθεση της χλωροφύλλης (Ibba et al., 1997), στην αμινοακυλίωση δομών που μοιάζουν με tRNA (Goodwin et al., 1997; Himeno et al., 1998; Felden et al., 1997), στον έλεγχο της ωρίμανσης του tRNA, στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση, στη βιοσύνθεση σηματοδοτικών μορίων και αμινοξέων, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει και εκδήλωση δράσης κυτοκίνης, καθώς και η άσκηση μεταγραφικής και μεταφραστικής ρύθμισης (**Εικόνα 3**), (Martinis et al., 1999; Sissler et al., 1999; Fan et al., 1999).



Εικόνα 3: Κάποιοι από τους εναλλακτικούς ρόλους των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών.

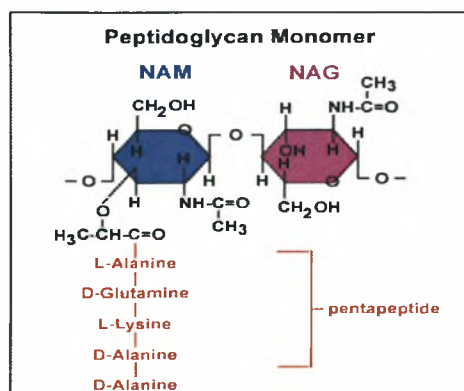
Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι κάποιες αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες συμμετέχουν σε διεργασίες που αφορούν τη βακτηριακή κυτταρική ανάπτυξη, επηρεάζοντας τον τρόπο με τον οποίο το κύτταρο αλληλεπιδρά με διάφορα αντιβιοτικά και αντιμικροβιακούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, στον *Staphylococcus aureus* και το *Listeria monocytogenes*, η αμινοακυλο-tRNA συνθετάση της λυσίνης (LysRS), εναλλακτικά, παρέχει Lys-tRNA^{Lys}, τα οποία λειτουργούν ως δότες κατάλοιπων λυσίνης, στην ελεύθερη υδροξυλομάδα της γλυκερόλης, στην φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηριών. Η παρουσία των κατάλοιπων αυτών αυξάνει το θετικό φορτίο της κυτταρικής μεμβράνης, μειώνοντας σε ένα βαθμό την διαπερατότητα σε κατιονικά μόρια, όπως θετικά φορτισμένα αντιβιοτικά πχ αμινογλυκοσιδία, γλυκοπεπτίδια, β-λακτάμες (Weidenmaier C et al., 2005; Friedman L et al., 2006). Στο *Clostridium perfringens*, αποκαλύφθηκε ότι όχι μόνο η αμινοακυλο-tRNA συνθετάση της λυσίνης (LysRS), αλλά και η αμινοακυλο-tRNA συνθετάση της αλανίνης (AlaRS), παρέχει ένα βαθμό αντίστασης σε θετικώς φορτισμένα αντιβιοτικά, με την παροχή Ala-tRNA^{Ala}, και την περαιτέρω προσθήκη κατάλοιπων αλανίνης στην κυτταρική μεμβράνη (Roy and Ibba, 2008;).

Μια ακόμα αμινοακυλο-tRNA συνθετάση που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω του εναλλακτικού της ρόλου στην σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, είναι η αμινοακυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης (GlyRS), όπως αποδείχθηκε στο *Staphylococcus aureus* και το *Staphylococcus epidermidis* (Schneider et al., 2004). Αυτή η συνθετάση παρέχει Gly-tRNA^{Gly}, τα οποία, αποκλειστικά, λειτουργούν ως δότες γλυκινών, στην σύνθεση της γέφυρας αμινοξέων της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος, προσδίδοντας χαρακτηριστική αντοχή σε αντιβιοτικά όπως οι β-λακτάμες.

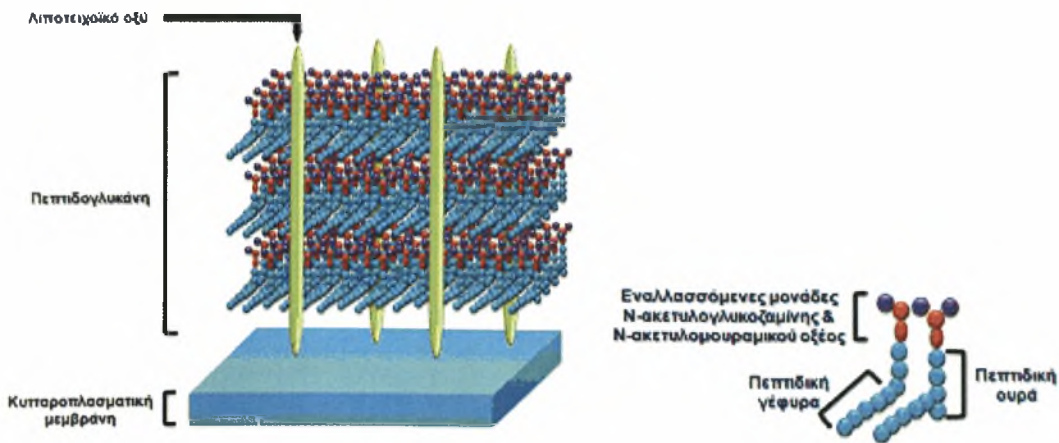
1.2 Η βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στο *S. aureus*

Το *S. aureus*, όπως και τα άλλα Gram-θετικά βακτήρια, χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη κυτταρικού τοιχώματος, εξωτερικά της κυτταρικής τους μεμβράνης. Η κυτταρική μεμβράνη, που αποτελείται από μια διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, λειτουργεί ως φραγμός διαπερατότητας, εμποδίζοντας την παθητική ροή μορίων από ή προς το εσωτερικό του κυττάρου. Από την άλλη, το κυτταρικό τοίχωμα, ένας άκαμπος εξωσκελετός, παρέχει στήριξη και συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στη διατήρηση της δομής του κυττάρου, ενώ ταυτόχρονα προστατεύει το κύτταρο από οσμωτική λύση (Salton MRJ, 1994) Επίσης, έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις εμπλοκής του στην κυτταρική αύξηση και διαίρεση. Η βιοσύνθεσή του, έτσι, έχει μελετηθεί ενδελεχώς και ιδίως στο *S. aureus*, καταλήγοντας στο ότι η αναστολή της διαδικασίας αυτής, μπορεί να αποτελέσει έναν σημαντικό στόχο αντιβιοτικών.

Το κυτταρικό τοίχωμα του *S. aureus* είναι αρκετά πυκνό και απαρτίζεται από πεπτιδογλυκάνη, λιποτειχοϊκό οξύ και πρωτεΐνες (Εικόνα 5). Η πεπτιδογλυκάνη, που είναι υπεύθυνη για τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά του κυτταρικού τοιχώματος, καταλαμβάνει σχεδόν το 50% του κυτταρικού τοιχώματος και αποτελείται από τουλάχιστον 20 στρώματα γραμμικών αλυσίδων γλυκάνης. Οι αλυσίδες γλυκάνης αποτελούνται από μονομερή πεπτιδογλυκάνης (Εικόνα 4). Κάθε μονομερές συνίσταται από εναλλασσόμενες μονάδες N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) και N-ακετυλομουραμικού οξέως (MurNAc), τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς (Henze et al., 1993; Ghuysen J et al., 1994; Bumsted R et al., 1968). Η D-γαλακτική ομάδα του MurNAc είναι υποκατεστημένη από ένα πενταπεπτίδιο (stem peptide) ενώ μια γέφυρα, που ξεκινά από το πενταπεπτίδιο λειτουργεί σαν διαμεσολαβητής για την σύνδεση των μονομερών πεπτιδογλυκάνης.



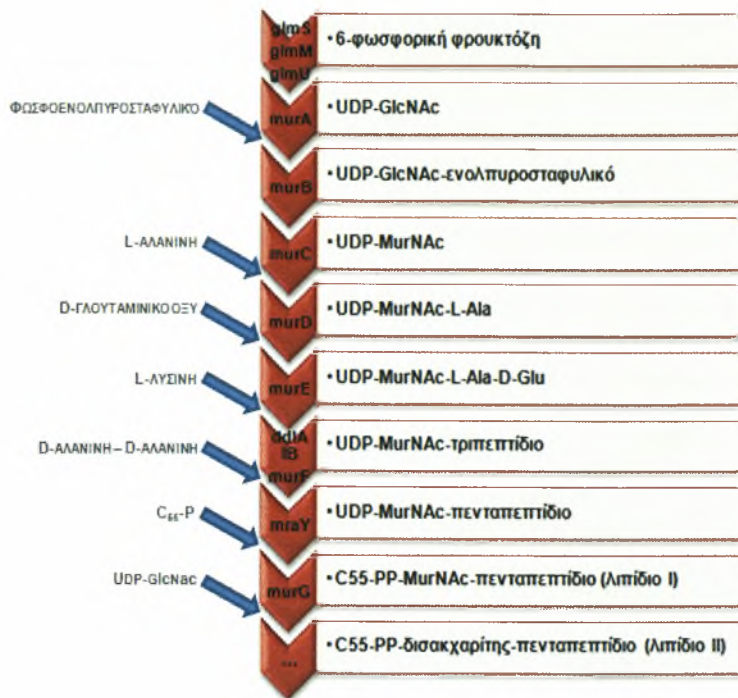
Εικόνα 4: Μονομερές πεπτιδογλυκάνης στο *Staphylococcus aureus*.



Εικόνα 5: Δομή κυτταρικού τοιχώματος στο *Staphylococcus aureus*.

Η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης λαμβάνει χώρα σε τρία διακριτά στάδια, στο κυτταρόπλασμα, στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και εξωτερικά της κυτταρικής μεμβράνης, κατά σειρά. Το πρώτο στάδιο, που λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, αφορά τη μετατροπή της UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης (UDP-GlcNAc) σε UDP-N-ακετυλομουραμικό οξύ (UDP-MurNAc). Συγκεκριμένα, η 6-φωσφορική φρουκτόζη μετατρέπεται, αρχικά, σε UDP-GlcNAc μετά την διαδοχική δράση αρκετών ενζύμων όπως η GtaB, η GlmS, η GlmU. Για την μετατροπή της UDP-GlcNAc σε UDP-MurNAc, πρωτίστως, μια ενολοπυροσταφυλική ομάδα μεταφέρεται στην 3' υδροξυλική ομάδα της UDP-GlcNAc, καταλύομενη από το ένζυμο MurA. Σχηματίζεται, έτσι, η πρώτη ενδιάμεση ένωση στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, το UDP-MurNAc, με την μετατροπή της ενολικής ομάδας σε γαλακτική, στα πλαίσια μιας NADPH- εξαρτώμενης αναγωγής, που καταλύεται από την ρεδουκτάση MurB. Έπειτα, το πενταπεπτίδιο του UDP-MurNAc σχηματίζεται με τη διαδοχική προσθήκη L-αλανίνης, D-γλουταμινικού οξέος, L-λυσίνης, D-αλανυλο-D-αλανίνης στη D-γαλακτική ομάδα του UDP-MurNAc. Καθένα από αυτά τα βήματα προσθήκης αμινοξέων καταλύεται από μία ειδική συνθετάση που χρησιμοποιεί ATP. Τα ένζυμα που εμπλέκονται κατά σειρά είναι τα εξής: MurC, MurD, MurE και DdIA (Εικόνα 6). Από τις ανωτέρω αντιδράσεις προκύπτει τελικά το UDP-MurNAc-πενταπεπτίδιο ή αλλιώς “νουκλεοτίδιο του Park”.

Το δεύτερο στάδιο στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, μια αντίδραση ανταλλαγής πυροφωσφορικού, λαμβάνει χώρα στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Η αντίδραση αυτή ξεκινά με τη μεταφορά του διαλυτού UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίου, από το ένζυμο MraY, στο λιπιδιακό φορέα φωσφοβακτοπρενόλη (C55-P), που βρίσκεται προσκολλημένος στη μεμβράνη. Προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι το λιπίδιο I (C55-PP-MurNAc-πενταπεπτίδιο), ταυτόχρονα με την απελευθέρωση UMP. Εν συνέχεια, η τρανλοκάση MurG καταλύει τη μεταφορά της GlcNAc από την ενεργοποιημένη UDP-GlcNAc στην υδροξυλομάδα του C(4) του μουραμικού τμήματος του λιπιδίου I, προκειμένου να παραχθεί ο ενδιάμεσος δισακχαρίτης, C55-PP-MurNAc-πενταπεπτίδιο-β1-4-GlcNAc, γνωστός ως λιπίδιο II, που αποτελεί και τον τελικό μονομερικό μεσολαβητή στην σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Εικόνα 6) (VanNieuwenhze MS et al., 2002).

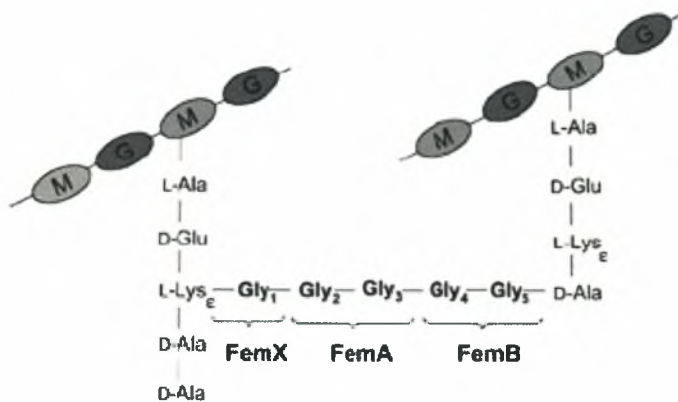


Εικόνα 6: Ανακεφαλαιωτικό σχήμα ενζύμων και προϊόντων στις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα για την παραγωγή του λιπιδίου II.

Το τελευταίο στάδιο στη βιοσύνθεση, εσωτερικά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, είναι η σύνθεση της γέφυρας διασύνδεσης, αν απαιτείται, ανάλογα με τον οργανισμό, μια αντίδραση που καταλύεται από εξειδικευμένα ένζυμα, που χρησιμοποιούν ως δότες των αμινοξέων, αμινοακυλιωμένα μόρια tRNA. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η γέφυρα αυτή δεν είναι ίδια για όλα τα βακτήρια και δεν είναι πάντα απαραίτητο να κατασκευαστεί. Από ένα διαμινοξύ του πενταπεπτιδίου, συνήθως την L-λυσίνη, αφού έχουν βρεθεί και περιπτώσεις που το ρόλο του διαμινοξέος διαδραματίζει η L-ορνιθίνη και το meso-διαμινοπιμελικό (X) (Rogers H et al., 1980), ξεκινά η κατασκευή της γέφυρας. Είναι ιδιαίτερες οι διαφορές μεταξύ των γεφυρών διασύνδεσης στα *S. aureus*, *E. faecalis* και *E. faecium*. Συγκεκριμένα, στο *E. Faecalis* η γέφυρα απαρτίζεται από δυο κατάλοιπα L-Ala, που προστίθενται από τα ένζυμα BppA1 και BppA2, στο *E. faecium* η διασύνδεση λαμβάνει χώρα μέσω μόνο ενός κατάλοιπου D-Asp από μια λιγάση ανεξάρτητης του ATP, ενώ στο *S. aureus* η γέφυρα αποτελείται από πέντε κατάλοιπα γλυκινών, τα οποία προστίθενται διαδοχικά μετά την δράση των ειδικών Fem παραγόντων (Arbeloa A. et al., 2004).

Μετά από μακροχρόνιες γενετικές αναλύσεις και μελέτες πάνω στην σύνθεση της πενταγλυκινικής γέφυρας διασύνδεσης στο *S. aureus*, αποκαλύφθηκε ότι η κατασκευή της πραγματοποιείται σε τρία διαδοχικά στάδια από μια οικογένεια μη ριβοσομικών πεπτιδυλ-τρανσφερασών, τους FemXAB (Factors Essential for Methicillin resistance) παράγοντες (Hedge and Strader, 2001; Rohner and Berger-Bächi, 2003a). Συγκεκριμένα, ο FemX, που κωδικοποιείται από το γονίδιο fmhB, καταλύει την προσθήκη του πρώτου κατάλοιπου γλυκίνης, Gly₁, στην ε-αμινομάδα του διαμινοξέος L-Lys του stem πεπτιδίου αναγνωρίζοντας ως υπόστρωμα το λιπίδιοII (Rohrer et al., 1999; Tschierske et al., 1999). Στην συνέχεια, δρα ο FemA, ο οποίος καταλύει την προσθήκη του δεύτερου και τρίτου κατάλοιπου γλυκίνης, Gly₂

και Gly₃, αναγνωρίζοντας ως υπόστρωμα το λιπίδιο II- Gly₁ (Maidhof et al., 1991; Strandén et al., 1997), ενώ ο FemB προσθέτει το τέταρτο και πέμπτο κατάλοιπο γλυκίνης, Gly₄ και Gly₅, αναγνωρίζοντας ως υπόστρωμα του το λιπίδιο II- Gly_{1,2,3} (Εικόνα 7) (Henze et al., 1993). Οι FemAB κωδικοποιούνται από γονίδια που είναι οργανωμένα υπό τη μορφή οπερονίου (οπερον *femAB*). Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιμήκυνση της γέφυρας πενταγλυκίνης πραγματοποιείται με κατεύθυνση από το καρβοξύ- προς το αμινο-τελικό άκρο, σε αντίθεση με τη σύνθεση πεπτιδίων μέσω της πρωτεΐνο-συνθετικής μηχανής. Επίσης, μελέτες επί της σύνθεσης της γέφυρας πενταγλυκίνης έχουν δείξει ότι δεν αναστέλλεται από τα αντιβιοτικά που στοχεύουν στα ριβοσώματα. Οπότε ο μηχανισμός προσθήκης των καταλοίπων γλυκίνης είναι ανεξάρτητος της πρωτεΐνοσύνθεσης που λαμβάνει χώρα στα ριβοσώματα.



Εικόνα 7: Οι παράγοντες FemXAB στη σύνθεση γέφυρας διασύνδεσης στο *S. aureus*.

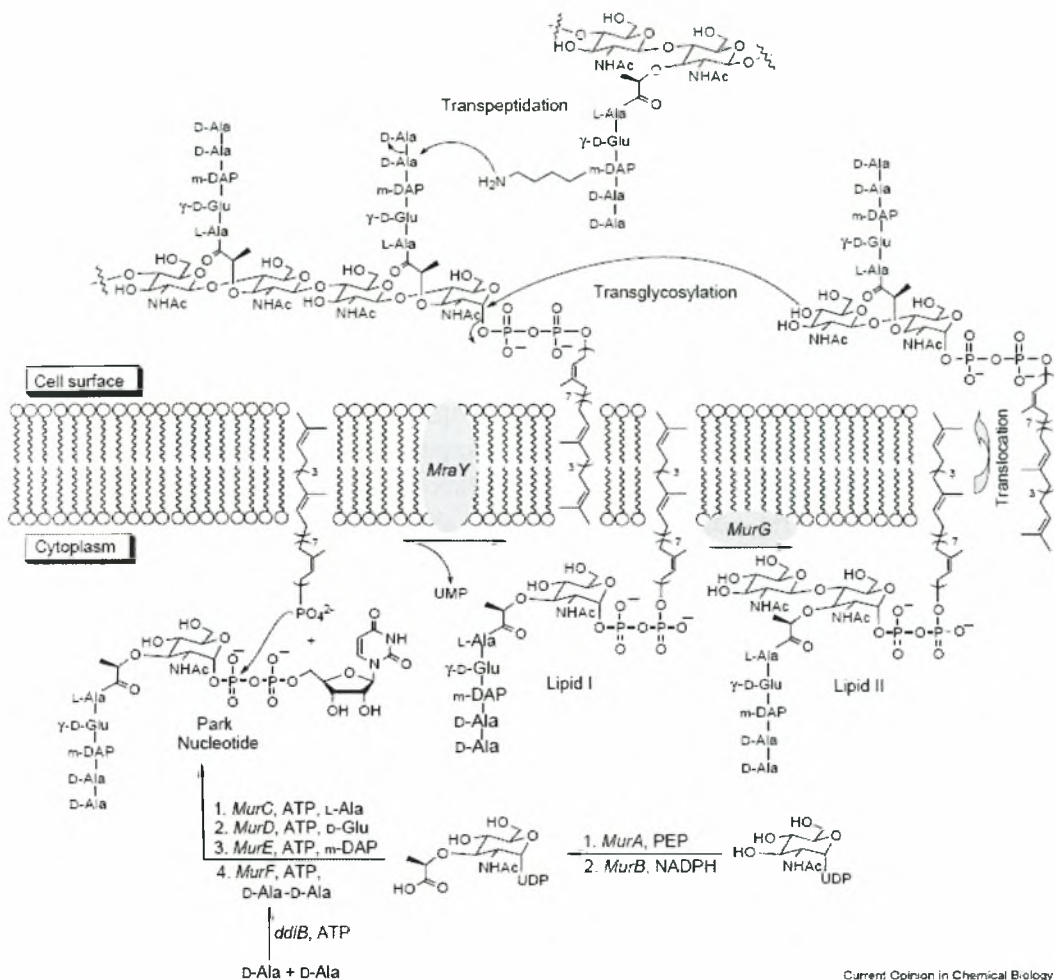
Από *in vitro* μελέτες αποδείχθηκε πως ο FemX, που το υπόστρωμα του είναι το λιπίδιο II, παρουσιάζει μέγιστη καταλυτική δραστηριότητα απουσία των FemA και FemB, αφού έχουν και αυτοί την ικανότητα να αναγνωρίζουν την διασκαρχική μονάδα GlcNAc-MurNAc (Schneider T et al., 2004). Από την άλλη, όσον αφορά τον FemA, δεν φαίνεται να επηρεάζεται η δραστηριότητα του παρουσία του FemX. Η διαθεσιμότητα, ακόμα, σε Gly-tRNA^{Gly}, επηρεάζει το ρυθμό σύνθεσης της γέφυρας πενταγλυκίνης, όπου αυξανόμενης της διαθεσιμότητας τους, αυξάνεται και ρυθμός σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (Strandén et al., 1997; Tschierske et al., 1997; Roos et al., 1998; Ehlert et al., 2000a).

Ο παράγοντας FemA, αποκαλύφθηκε πως περιέχει μόνο μια θέση δέσμευσης tRNA, οπότε γίνεται η υπόθεση πως μετά την προσθήκη της πρώτης γλυκίνης ακολουθεί ένας δεύτερος γύρος δέσμευσης Gly-tRNA^{Gly} και μεταφοράς της δεύτερης γλυκίνης. Ο τρόπος αυτός δράσης, όμως, φαίνεται να στοιχίζει αρκετά στο κύτταρο. Με το σύστημα του διπλού υβριδίου (BTH) (Dove et al., 1997; Karimova et al., 1998), δόθηκε η δυνατότητα να ανιχνευθούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ FemA-FemA, FemB-FemB και FemA-FemB (Rohrer and Berger-Bächi, 2003). Ο FemX δεν φάνηκε να αλληλεπιδρά με τους άλλους δύο παράγοντες. Αυτό υποδεικνύει ότι ο FemX δρα ως μονομερές, ενώ οι FemA και FemB μπορεί να δρουν ως ομοδιμερή, με τέτοιο τρόπο ώστε και οι δύο υπομονάδες να δεσμεύουν tRNA για να εξασφαλιστεί έτσι η διαδοχική προσθήκη και των δύο καταλοίπων γλυκίνης στο συντιθέμενο πεπτίδιο – γέφυρα.

Ως δότες γλυκίνης στο σχηματισμό των αλυσίδων πενταγλυκίνης στο βακτήριο *Staphylococcus aureus*, λειτουργούν τα μόρια tRNA^{Gly}. Οι πρώτες ενδείξεις για την εμπλοκή των tRNA^{Gly} στη σύνθεση της πενταγλυκινικής γέφυρας προέκυψαν από το γεγονός, ότι η ενσωμάτωση γλυκίνης στην πεπτιδογλυκάνη παρεμποδίζεται παρουσία ριβονουκλεασών. Στο *S. aureus*, είχαν ταυτοποιηθεί 4 τουλάχιστον ισοδεκτικά tRNA^{Gly} μόρια, τα οποία αμινοακυλιώνονται από μία και μόνο αμινοακυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης (GlyRS) (Schneider T et al., 2004). Επιπλέον, αναλύσεις με εργαλεία της Βιοπληροφορικής, αποκάλυψαν την ύπαρξη και ενός πέμπτου γονιδίου tRNA^{Gly}, το οποίο είναι κατατεθειμένο στις βάσεις δεδομένων ως ψευδογονίδιο. Ωστόσο, το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε ποσοστά ανάλογα των υπολοίπων τεσσάρων και αποτελεί υπόστρωμα για την GlyRS του *S. aureus*. Από αυτά τα 5 ισοδεκτικά tRNA^{Gly}, μόνο τα 2 είναι πρωτεϊνογενετικά (όρος που συναντάται στην βιβλιογραφία), ενώ τα υπόλοιπα 3 συμμετέχουν αποκλειστικά στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης.

Έχει διαπιστωθεί, πως στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις στο οπερόνιο FemAB δεν είναι δυνατόν να σχηματίζουν γέφυρες διασύνδεσης πλήρους αριθμού κατάλοιπων γλυκίνης (Berger-Bächli et al., 1989; De Jonge et al., 1993; Strandén AM et al., 1997). Είναι ψευδοπολυκυτταρικά, με παχιά κυτταρικά τοιχώματα, χαμηλά ποσοστά γλυκίνης στο τοίχωμα τους, με μειωμένη ικανότητα ανακύκλωσης του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ χαρακτηριστική είναι η μείωση της δυνατότητας τους στη διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης, καθώς και η υπερευαισθησία τους στη μεθικιλίνη και σε άλλα αντιβιοτικά. Αυτά τα μεταλλαγμένα στελέχη, που στερούνται των παραγόντων FemA και FemB, υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να επιβιώσουν, ενώ πολλές φορές η βιωσιμότητά τους εξαρτάται από αντισταθμιστικές μεταλλάξεις (Maidhof et al., 1991; Strandén AM et al., 1997; Ling B et al., 1998). Στις περιπτώσεις όμως εκείνων των στελεχών, που έχει ανασταλεί το *fmhB* γονίδιο, που κωδικοποιεί τον FemX, παρατηρείται υπερσυσσώρευση μονομερών μονάδων πεπτιδογλυκάνης που δεν περιέχουν καθόλου γλυκίνη, μηδαμινή διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης με αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια της ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα πως η παρουσία ή μη του FemX επηρεάζει σημαντικά την βιωσιμότητα του κύτταρου, με την απουσία του να έχει χαρακτηριστεί θανατηφόρος για το κύτταρο (de Lencastre et al., 1994, Strandén AM et al., 1997).

Στο τελευταίο στάδιο βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης, το λιπίδιο II, μετά το σχηματισμό της γέφυρας διασύνδεσης, μεταφέρεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, όπου και λαμβάνει χώρα ο πολυμερισμός σε ίνες γλυκάνης με τη δράση τρανσγλυκολασών. Μετά τον πολυμερισμό και το σχηματισμό της υδατανθρακικής ραχοκοκαλιάς της πεπτιδογλυκάνης, ο βακτοπρενολικός λιπιδιακός φορέας μεταφέρεται μέσω της μεμβράνης στην εσωκυτταρική πλευρά προκειμένου να ανακυκλωθεί. Τέλος, τα πολυμερή γλυκάνης, διασυνδέονται με την ανάπτυξη πεπτιδικών δεσμών μεταξύ της ε-αμινομάδας της L-Lys μιας μονάδας N-ακετυλομουραμικού με την D-Ala στη θέση 4 μιας γειτονικής μονάδας N-ακετυλομουραμικού, μέσω της πενταγλυκινικής γέφυρας διασύνδεσης, ενώ παράλληλα η D-Ala στη θέση 5 απομακρύνεται. Αυτή η αντίδραση διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης καταλύεται από τρανσπεπτιδάσες, τις PBPs (penicillin binding proteins), οι οποίες αναγνωρίζουν ειδικά το διπεπτίδιο D-Ala-D-Ala, και καταλύουν το σχηματισμό του δεσμού μεταξύ του τελευταίου κατάλοιπου γλυκίνης (Gly₅) της γέφυρας και της D-Ala στη θέση 4 του πενταπεπτιδίου του άλλου μονομερούς πεπτιδογλυκάνης (**Εικόνα 8**).



Current Opinion in Chemical Biology

Εικόνα 8: Βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στο *S. aureus* (Kristi Lazar and Suzanne Walker, 2002).

Αξίζει να σημειωθεί πως για να γίνει η διασύνδεση μεταξύ των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης, δεν είναι σε όλους του οργανισμούς απαραίτητη η γέφυρα-διαμεσολαβητής, η οποία αποτελείται από 1-5 αμινοξέα, στην L ή D διαμόρφωσή τους και ξεκινά από το διαμινοξύ του πεπτιδίου stem.. Η διασύνδεση μπορεί έτσι να πραγματοποιηθεί και άμεσα με απ' ευθείας ένωση δύο γειτονικών διαμινοξέων, όπως συμβαίνει στον *L. Monocytogenes*. Ανεξαρτήτως όμως του τρόπου διασύνδεσης των μονομερών πεπτιδογλυκάνης, το αποτέλεσμα είναι το ίδιο: η κατασκευή ενός πλέγματος πεπτιδογλυκάνης, που συμβάλει στην στήριξη και τη δομική ακεραιότητα του βακτηριακού κυττάρου, προσδίδοντας ταυτόχρονα ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως οι β-λακτάμες.

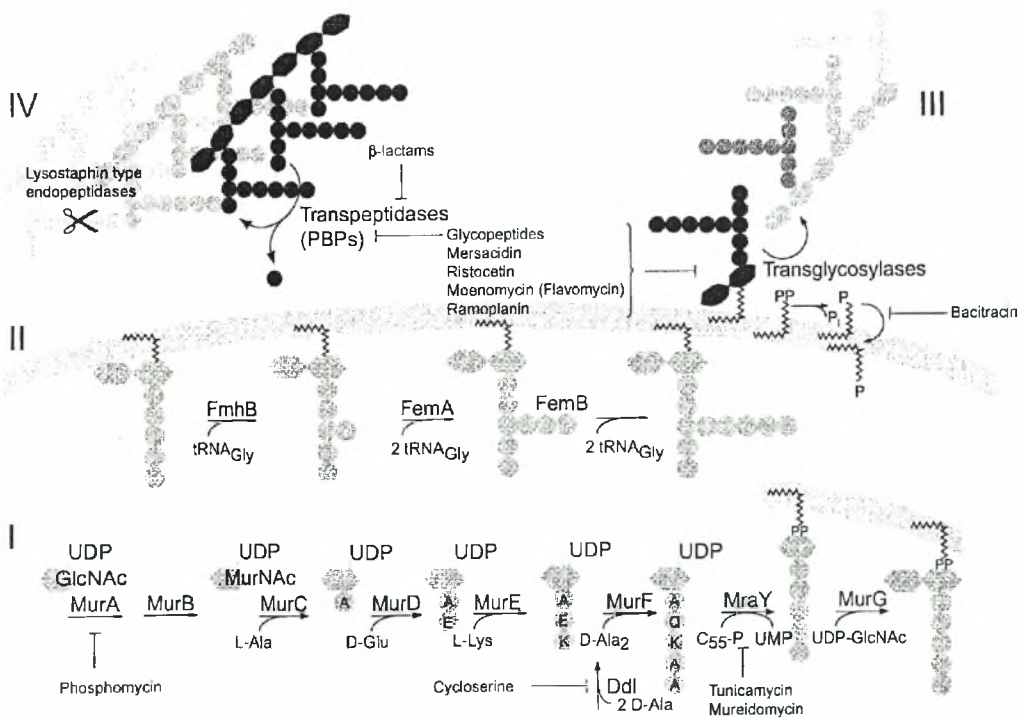
1.3 Ανθεκτικότητα στελεχών *Staphylococcus aureus* στη μεθικιλίνη

Η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών *S. aureus* σε αντιβιοτικά, και ιδίως τις β-λακτάμες απασχολούν ιδιαίτερα την νοσοκομειακή κοινότητα και χρόνο με το χρόνο γίνεται ακόμα πιο επιτακτική η ανάγκη αντιμετώπισης των στελεχών αυτών. Οι β-λακτάμες, στις οποίες ανήκει και η μεθικιλίνη, έχουν σαν στόχο τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Εικόνα 9). Σύμφωνα με μελέτες, τα Gram θετικά βακτήρια έχουν αναπτύξει δύο βασικές στρατηγικές ενάντια στη δράση των β-λακταμών, την

απενεργοποίηση του αντιβιοτικού με τη δράση β-λακταμασών και την εγγενή ανθεκτικότητα που οφείλεται σε τροποποιημένα, χαμηλής συγγένειας ένζυμα, που αποτελούν τους στόχους των αντιβιοτικών, τις PBPs (penicillin-binding-proteins) (Rohrer and Berger-Bächi, 2003).

Πιο συγκεκριμένα, οι PBPs, ανήκουν στην πρωτεϊνική υπερκογένεια των πενικιλανο-τρανσφερασών σερίνης, στην οποία συμπεριλαμβάνονται και οι β-λακταμάσες, καθώς και οι υποδοχείς των β-λακταμών, όπως ο BlaR1. Τα βακτήρια ανάλογα με το είδος, μπορεί να περιέχουν από 4 έως και 8 PBPs. Ταξινομούνται σε διάφορες ομάδες, με τις μεγάλου μοριακού βάρους PBPs να καταλύουν τόσο την τρανσγλυκοσυλίωση όσο και την τρανσπεπτιδίωση, αντιδράσεις απαραίτητες για την ενσωμάτωση των πρόδρομων και συνδεδεμένων με το λιπίδιο II μορίων πεπτιδογλυκάνης, στο αναπτυσσόμενο κυτταρικό τοίχωμα. Όλα τα μέλη της πρωτεϊνικής αυτής οικογένειας φέρουν τρεις συντηρημένες περιοχές, τις SXXK, (S/Y)X(N/C) και (K/H)(T/S)G, οι οποίες συνολικά απαρτίζουν το ενεργό κέντρο των ενζύμων. Παρολ' αυτά, η αρχική αλληλουχία φαίνεται να έχει διαφοροποιηθεί αρκετά, και θεωρείται πως οι υποδοχείς των β-λακταμών και οι β-λακταμάσες σερίνης, αποτελούν μια εξέλιξη της αλληλουχίας των PBPs (Ghuysen JM et al., 1997).

Όσον αφορά τις β-λακτάμες, αυτές όπως προαναφέρθηκε στοχεύουν στις αντιδράσεις σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης που πραγματοποιούνται εξωκυτταρικά, αναστέλλοντας την αντίδραση τρανσπεπτιδίωσης που καταλύεται από τις PBP. Η αναστολή των PBPs αποδίδεται στο γεγονός ότι η δομή των β-λακταμών μοιάζει με το διπεπτίδιο D-Ala₂ που αναγνωρίζουν οι PBPs. Με τη δέσμευση, λοιπόν, των PBPs στις β-λακτάμες, το ενεργό κέντρο τους ακυλώνεται από τις β-λακτάμες. Επειδή, όμως, η διαδικασία της αποακυλίωσης είναι πολύ αργή, το αποτέλεσμα είναι η απενεργοποίηση του ενζύμου (Ghuysen JM, 1997). Τελικά, το κύτταρο θανατώνεται από αυτολυτικά ένζυμα υπό την επίδραση των β-λακταμών (Tomasz A, 1986).



Εικόνα 9: Το μονοπάτι και οι αναστολείς στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος (Rohrer and Berger-Bächi, 2003).

Ήταν το 1961, λίγο μετά την εισαγωγή του αντιβιοτικού μεθικιλίνη στην κλινική πράξη, όταν έκανε την εμφάνιση του το πρώτο στέλεχος *S. aureus*, με ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό μεθικιλίνη, γνωστό και ως MRSA (Methicillin-resistant strains of *S. aureus*). Έκτοτε, έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών στελεχών MRSA, που εξαπλώνονται σε όλο τον κόσμο. Μετά από ενδελεχείς μελέτες, αποκαλύφθηκε πως τα στελέχη αυτά φέρουν μια μη σταφυλοκοκκικής προέλευσης χρωμοσωμική κασέτα *mec* (SCC*mec*) μεταξύ των 21-67 kb, στην οποία οφείλεται και η εν λόγω αυξημένη ανθεκτικότητα τους στην μεθικιλίνη. Η SCC*mec* αποτελεί ένα καινοτόμο μεταθετό στοιχείο και χαρακτηρίζεται ως «νήσος ανθεκτικότητας». Θεωρείται πως η κασέτα αυτή δεν έχει σταφυλοκοκκική προέλευση καθώς έχει διαφορετική περιεκτικότητα σε G+C από τα υπόλοιπα χρωμοσώματα του σταφυλόκοκκου (Berger-Bächi, 1989). Έχουν χαρακτηριστεί αρκετοί υπότυποι της κασέτας SCC*mec*, που διαφέρουν στο μέγεθος, τα γονίδια και στο ποσοστό ανθεκτικότητας που προσφέρουν (Baba T et al., 2002; Hiramatsu K et al., 2001; Ma XX et al., 2002). Συγκεκριμένα, το γονίδιο *mecA* του στοιχείου SCC*mec*, κωδικοποιεί μία επιπρόσθετη PBP, την PBP2' ή αλλιώς PBP2a (Utsui et al., 1985; Reynolds et al., 1986). Αναλύσεις στην αλληλουχία της κασέτας αυτής για την προέλευση του γονιδίου *mecA*, έδειξαν πως πιθανόν να προέκυψε από ανασυνδυασμό ενός δομικού γονιδίου μιας PBP με την ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου μιας β-λακταμάσης (Song et al., 1987). Η PBP2' έχει μικρότερη συγγένεια για τη μεθικιλίνη από τις ενδογενείς PBPs, διότι περιέχει μια δομή μη-δέσμευσης πενικιλινών (n-PB), άγνωστης ακόμα λειτουργίας (Goffin and Ghuysen, 1998). Η PBP2', όμως, λόγω της ύπαρξης περιοχής τρανσπεπτιδίωσης, έχει την ικανότητα να καταλύει τις αντιδράσεις τρανσπεπτιδίωσης ακόμη και παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων β-λακταμών, αφού οι ενδογενείς PBPs έχουν απενεργοποιηθεί. Αποδείχθηκε όμως, ότι για την πλήρη έκφραση της ανθεκτικότητας σε υψηλές συγκεντρώσεις μεθικιλίνης, είναι απαραίτητη η συνεργασία της PBP2' με την ενδογενή PBP2. Η PBP2' αναλαμβάνει την τρανσπεπτιδίωση της πεπτιδογλυκάνης και η PBP2 ευθύνεται για την τρανσγλυκοσυλίωση της (Pinho et al., 2001). Υπάρχουν υποψίες, πως τόσο η PBP1, όσο και η PBP3 πιθανόν να συνεισφέρουν και αυτές στην εκδήλωση αντίστασης στη μεθικιλίνη (Duran SP et al., 1996).

Ο φαινότυπος αντίστασης στην μεθικιλίνη ποικίλλει μεταξύ στελεχών. Μπορούν να διακριθούν σε εκείνα τα στελέχη που εκφράζουν ομοιογενή, υψηλού επιπέδου αντίσταση και σε εκείνα που εκφράζουν ετερογενή, ποικίλων επιπέδων αντίσταση. Για την έκφραση ομοιογενούς, υψηλών επιπέδων αντίστασης, απαιτείται επαρκή έκφραση PBP2', υψηλός ρυθμός και με μεγάλη ακρίβεια σύνθεση μονομερών πεπτιδογλυκάνης. Τα στελέχη αυτά είναι πολύ σπάνια, και χαρακτηρίζονται από συνεχή έκφραση της PBP2', ανεξαρτήτως της παρουσίας μεθικιλίνης και πιθανόν αυτό να οφείλεται σε μεταλλάξεις εκτός SCC*mec* (Ryffel et al. 1994, de Lencastre et al., 1993) Η ετερογενής αντίσταση, στην πλειοψηφία, είναι συνήθως χαμηλών επιπέδων αντίσταση, επαγόμενη από την παρουσία μεθικιλίνης. Τα επίπεδα της ετερογενούς αντίστασης, όπως αποκαλύφθηκε από επιπρόσθετες μελέτες δεν εξαρτώνται αποκλειστικά από τη δράση της PBP2', αλλά και από άλλους παράγοντες χρωμοσωμικής προέλευσης. Μια ομάδα τέτοιων παραγόντων, είναι οι Fem παράγοντες, που συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στην σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης και παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση της ανθεκτικότητας αυτής και κανένας από αυτούς μέχρι στιγμής δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του PBP2' (Berger-Bächi et al., 1992; de Lencastre et al., 1999). Μεταλλάξεις στα γονίδια των FemXAB,

οδήγησαν σε αλλοίωση του κυτταρικού τοιχώματος και θάνατο του βακτηρίου παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων μεθικιλίνης παρά τη φυσιολογική έκφραση του PBP2'. Ακόμα, τα επίπεδα της αντίστασης μπορεί να επηρεαστούν από το pH, το μέσο ανάπτυξης των βακτηρίων, την θερμοκρασία, το φως (Matthews PR et al., 1984). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι χρωμοσωμικοί παράγοντες που συνεισφέρουν στην έκφραση ανθεκτικότητας.

Gene (alternate names)	Function or effects on methicillin resistance levels	References
<i>fmhB</i> (<i>femX</i>)	Interpeptide formation; addition of the first glycine to the stem peptide; inactivation lethal	(Rohrer et al. 1999)
<i>femA</i>	Interpeptide formation; addition of the 2nd and 3rd glycine to the stem peptide; inactivation abolishes methicillin resistance	(Strandén et al. 1997)
<i>femB</i>	Interpeptide formation addition of the 4th and 5th glycine to the stem peptide; inactivation reduces methicillin resistance	(Henze et al. 1993)
<i>femC</i> (<i>glnR</i>)	Glutamine synthetase repressor; inactivation reduces amidation of the iD-glutamate of the stempeptide; inactivation reduces methicillin resistance	(Gustafson et al. 1994)
<i>femD</i> (<i>femR315</i>) (<i>glmM</i>)	Phosphoglucosamine mutase; catalyzes the interconversion of glucosamine-6-phosphate to glucosamine-1-phosphate; a cytoplasmic peptidoglycan precursor; inactivation reduces methicillin resistance	(Jolly et al. 1997)
<i>femE</i>	Function unknown; inactivation slightly reduces methicillin resistance	(de Lencastre et al. 1994)
<i>femF</i> (<i>murE</i>)	Catalyzes incorporation of lysine into peptidoglycan stem peptide; inactivation reduces methicillin resistance	(Ornelas-Soares et al. 1994)
<i>fmlA</i>	Membrane protein; inactivation decreases cross-linking and amidation of peptidoglycan, and reduces methicillin resistance	(Komatsuzawa et al. 1999)
<i>fmlB</i> (<i>mnp</i>)	Cell surface protein; function unknown; inactivation reduces pentaglycyl-substituted monomer of the cell wall fraction while increasing the amount of unsubstituted pentapeptide and reduces methicillin resistance	(Wu and De Lencastre 1999 Komatsuzawa et al. 2000)
<i>fmlC</i> (<i>mprF</i>)	Membrane-associated protein; inactivation reduces modification of phosphatidyl-glycerol with L-lysine, and reduces methicillin resistance	(Komatsuzawa et al. 2001; Peschel et al. 2001)
<i>llm</i>	Function unknown; inactivation increases Triton-X-100-induced autolysis and reduces resistance	(Maki et al. 1994)
<i>lytH</i>	Homologous to lytic enzymes; inactivation increases methicillin resistance	(Fujimura and Murakami 1997)
<i>pbp2</i>	Penicillin-binding protein 2; functional transglycosylase domain of PBP2 is needed for methicillin resistance	(Pinho et al. 2001a)
<i>sigB</i>	Alternate transcription factor; inactivation reduces methicillin resistance	(Wu et al. 1996)
<i>hmrA</i>	Putative aminohydrolase; overexpression increases methicillin resistance	(Kondo et al. 2001)
<i>hmrB</i>	Homologue of acyl carrier protein; overexpression increases methicillin resistance	(Kondo et al. 2001)
<i>dlt</i> operon	Transfer of D-alanine into teichoic acids; inactivation increases methicillin resistance	(Nakao et al. 2000)

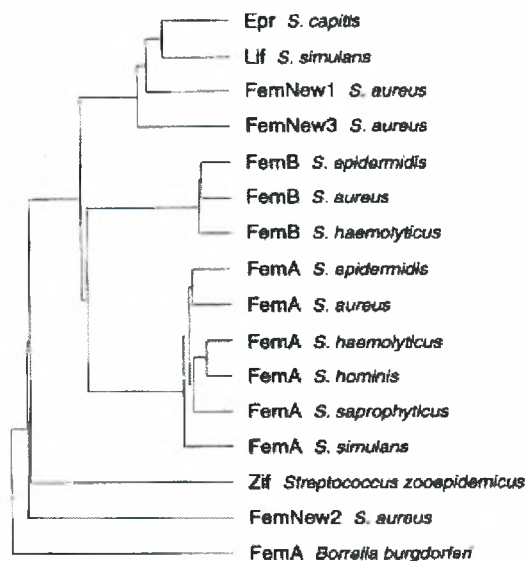
Πίνακας 1: Γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης και συνεισφέρουν στην έκφραση της ανθεκτικότητας στο *S. aureus* (Berger-Bächli and Tschierske, 1998).

1.4 Πρωτεΐνες ομόλογες των FemXAB παραγόντων

Μετά από πολυάριθμες αναζητήσεις και τη διεξαγωγή πολλαπλών ομοπαράθεσεων, στην βάση δεδομένων, για την εύρεση αλληλουχιών ομόλογων του FmhB σε ένα μεγάλο εύρος βακτηριακών γενωμάτων, ήρθαν στο φως πρωτεΐνες ομόλογες των FemXAB. Δεν προκάλεσε έκπληξη το ότι όλα τα είδη που περιέχουν ομόλογα των FemXAB παραγόντων, εμφανίζουν γέφυρες διασύνδεσης για την σύνδεση των μονομερών πεπτιδογλυκάνης, γεγονός που πιστοποιεί πως τα ομόλογα αυτά είναι λειτουργικά. Κάποιοι από τους οργανισμούς στους οποίους ανακαλύφθηκαν ομόλογα των FemXAB, όχι αποκλειστικά σταφυλοκοκκικοί, είναι οι *Borrelia burgdorferi*, *Sterptomyces coelicolor*, *Clostridium perfringens*.

Οι παράγοντες που είναι ομόλογοι των Fem μπορούν να αποτελέσουν μια νέα ομάδα πρωτεϊνών που λαμβάνουν μέρος στη μη ριβοσωμική πρωτεϊνοσύνθεση (Tschierske M et al., 1999). Μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες

(Berger-Bächli et al., 1998): i) τις πρωτεΐνες εκείνες που προσθέτουν κατάλοιπα σερίνης συμπεριλαμβανομένων των Lif, Epr καθώς και τους FmhA ή FemNew1, FmhC ή FemNew3 ii) τις πρωτεΐνες που είναι ομόλογες του FemB και iii) τις πρωτεΐνες που είναι ομόλογες του FemA, που και οι δυο προσθέτουν κατάλοιπα γλυκινών σε συγκεκριμένες θέσεις κατά μήκος της γέφυρας διασύνδεσης και iv) τις πρωτεΐνες τις λιγότερο συγγενικές με τον FmhB, οι FemNew2, Zif και οι FemA-like παράγοντες στο *Borrelia*. Η ομαδοποίηση αυτή φαίνεται χαρακτηριστικά στο δενδρόγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης των FemAB-like παραγόντων κατασκευασμένο με το πρόγραμμα PileUp (Berger-Bächli and Tschierske, 1998).

Όσον αφορά την πρώτη κατηγορία πρωτεϊνών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι παράγοντες Lif (lysostaphin immunity factor) και Epr (endopeptidase resistance), στους οργανισμούς *Staphylococcus simulans* και *Staphylococcus capitis*, αντίστοιχα. Οι παράγοντες αυτοί προστατεύουν το βακτήριο από τις δικές του γλυκίλ-γλυκίνης ενδοπεπτιδάσες, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να καταστρέφουν την πενταγλυκινική γέφυρα διασύνδεσης της σταφυλοκοκκικής πεπτιδογλυκάνης. Συγκεκριμένα, ο παράγοντας Lif προστατεύει το βακτήριο από την ενδοπεπτιδάση λυσοσταφίνη, ενώ ο παράγοντας Epr προστατεύει από την ενδοπεπτιδάση Ale-1. Οι δυο αυτοί παράγοντες παρέχουν προστασία μέσω της προσθήκης κατάλοιπων σερίνης έναντι γλυκινών στις θέσεις 3 και 5 της γέφυρας διασύνδεσης, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να αναγνωριστούν και να καταστραφούν από τις ενδοπεπτιδάσες (Robinson JM et al., 1979; Thumm and Goltz, 1997; Ehlert et al., 2000). Παρουσιάζουν ομοιότητα γύρω στο 41% (Πίνακας 2) με τους FemA και FemB, καταδεικνύοντας έτσι πως αυτοί οι Fem μπορεί να έχουν την ικανότητα ενσωμάτωσης κατάλοιπων σερίνης. Παρ' αυτά επιπρόσθετες μελέτες, απέδειξαν πως οι Lif και Epr δεν μπορούν από μόνοι τους να καταλύσουν την ενσωμάτωση των κατάλοιπων σερίνης, αλλά είναι απαραίτητη και η παρουσία των FemA και FemB, επειδή πιθανόν μόνο οι τελευταίοι έχουν την ικανότητα αναγνώρισης του λιπιδίου II (Rohrer and Berger-Bächli, 2003). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την αυτόνομη επιμήκυνση της γέφυρας διασύνδεσης από τους FemAB, παρά την υψηλή ομοιότητα των FemAB με τους Lif-Epr.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν και οι παράγοντες FmhA και FmhC ή αλλιώς οι FemNew1 και FemNew3 αντίστοιχα, οι οποίοι όπως έχει αποδειχθεί είναι ομόλογοι των Lif και Epr αντίστοιχα, παρά των FemAB, στο *Staphylococcus aureus* (Πίνακας 2). Πιθανόν, αποτελούν ``κατάλοιπα`` των FemAB-like γονιδίων, και η απενεργοποίηση τους δεν φάνηκε να επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες μάλλον είναι σχεδόν ανενεργά. Σε περιπτώσεις, όμως, αποσιώπησης των γονιδίων των FemAB παρατηρούνται σε σχετικά χαμηλές συχνότητες κατάλοιπα σερίνης και αλανίνης στις γέφυρες του κυτταρικού τοιχώματος, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στη δράση των παραγόντων αυτών (Schleifer KH, 1973).

	FemA (Sa)	FemA (Se)	FemB (Sa)	FemB (Se)	Epr	Lif	FmhA	FmhC	FmhB
FemA (Sa)	100								
FemA (Se)	81	100							
FemB (Sa)	40	39	100						
FemB (Se)	40	39	87	100					
Epr	40	41	38	38	100				
Lif	41	43	39	39	70	100			
FmhA	43	41	40	41	62	64	100		
FmhC	37	38	37	37	58	57	59	100	
FmhB	27	26	26	25	23	23	25	21	100

Πίνακας 2: Αμινοξική ομολογία μεταξύ των FemAB παραγόντων και των FemAB-like παραγόντων. (Sa) *S. aureus*; (Se) *S. epidermidis* (Tschierske M et al., 1999).

1.5 Κρυσταλλικές δομές των FemA και FemX

Ο παράγοντας **FemA** είναι η πρώτη μη ριβοσωμική πεπτιδυλ-τρανσφεράση του *Staphylococcus aureus*, της οποίας η δομή αποκαλύφθηκε μέσω X-ray κρυσταλλογραφίας (Benson et al., 2002). Η αποκάλυψη της δομής (Εικόνα 11) έδωσε πληροφορίες που αφορούν τον τρόπο δράσης του ενζύμου αυτού. Συγκεκριμένα, από την μελέτη της κρυσταλλικής δομής του FemA, φαίνεται ότι ο παράγοντας αυτός αποτελείται από μια σφαιρική (globular) περιοχή (*domain 1*) και από μια ελικοειδή περιοχή (*domain 2*) που προεξέχει από τη μεγαλύτερη και σφαιρική.

Δέσμευση λιπιδιακού εξαπεπτιδικού δισακχαρίτη

Η σφαιρική περιοχή υποδιαιρείται σε δυο υποπεριοχές (domain 1A και domain 1B). Ταυτοποιήθηκε πως μόνο η υποπεριοχή 1B, που προσομοιάζεται σαν ένα βαθύ κανάλι διαμόρφωσης L και διασχίζει την επιφάνεια της πρωτεΐνης, έχει την ικανότητα πρόσδεσης του λιπιδιακού εξαπεπτιδικού δισακχαρίτη (λιπίδιο Π-Gly₁), ενώ η υποπεριοχή 1A αδυνατεί της πρόσδεσης του υποστρώματος αυτού. Από τη στιγμή που το υπόστρωμα θα δεσμευτεί, τα 12 αμινοξικά κατάλοιπα των ελίκων α7 και α8, κλείνουν γύρω από το υπόστρωμα και ανοίγουν μόνο όταν τα δύο κατάλοιπα Gly (Gly₂ και Gly₃) προστεθούν στο υπόστρωμα, και το προϊόν απελευθερώνεται.

Δέσμευση Gly- tRNA^{Gly}

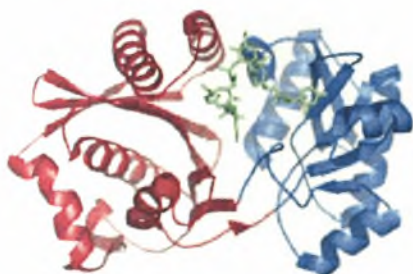
Η περιοχή 2 (domain 2 ή coiled-coil domain), αποδείχθηκε πως αποτελεί μια εύκαμπτη πλατφόρμα για την αλληλεπίδραση με το tRNA, γι' αυτό καθιστά και την περιοχή δέσμευσης του Gly-tRNA^{Gly} και εξυπηρετεί στο να συγκρατεί το tRNA κατά τη διάρκεια της προσθήκης των κατάλοιπων γλυκίνης, στην αυξανόμενη γέφυρα πενταγλυκινών.

A.**B.**

Εικόνα 11: Στερεοδιαμόρφωση (A) και κρυσταλλική δομή (B) του FemA παράγοντα. Η περιοχή με κίτρινο χρώμα είναι ο domain 1A, η περιοχή με το μωβ είναι ο domain 1B και αυτές με το πράσινο επιπρόσθετες περιοχές του domain 1, η περιοχή με το μπλε χρώμα είναι ο domain 2 και η περιοχή άσπρου χρώματος (B) είναι το κανάλι διαμόρφωσης L (Benson et al., 2002).

Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του παράγοντα FemA και σύγκριση της δομής του με άλλες συγγενικές δομές καταχωρημένες στην PDB (Protein Data Base), έδειξαν ότι το ένζυμο αυτό μπορεί να δεσμεύει ταυτόχρονα και τα δυο υποστρώματα του, δηλαδή το λιπιδιακό εξαπεπτιδικό δισακχαρίτη και το Gly-tRNA^{Gly}. Παρατηρήθηκε απ' ευθείας μεταφορά του κατάλοιπου γλυκίνης στο εξαπεπτιδικό υπόστρωμα, με αποτέλεσμα την αύξηση της γέφυρας κατά ένα αμινοξύ. Η δέσμευση όμως και η αποδέσμευση του tRNA^{Gly} πριν και μετά την προσθήκη, και η αμέσως επόμενη δέσμευση ενός άλλου, φαίνεται πως είναι μεγάλου κόστους για το κύτταρο, γι' αυτό και υποθέτουν πως ο παράγοντας αυτός δρα ως ομοδιμερές.

Η αποκάλυψη της κρυσταλλικής δομής του παράγοντα **FemX** έγινε μετά από απομόνωση του από τον οργανισμό *Weissella viridescens* (Biarrotte-Sorin S et al., 2004). Η διαφοροποίηση αυτού του FemX από αυτόν στο *S. aureus*, είναι ότι προσθέτει την πρώτη L-Ala, στο υπόστρωμα του, το οποίο είναι το UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίου, εν αντιθέσει με αυτόν από το *S. aureus*, που προσθέτει το πρώτο κατάλοιπο γλυκίνης στην γέφυρα πενταγλυκινών, αναγνωρίζοντας ως υπόστρωμα το λιπίδιο II (C55PP-UDP-GlcNAc-UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίου) (Plapp and Strominger, 1970). Η δομή του FemX αποκάλυψε, ότι αποτελείται από δυο βασικές δομικές περιοχές, γνωστές ως domain 1 και domain 2 (**Εικόνα 12**). Οι δυο αυτές βασικές περιοχές διαχωρίζονται μεταξύ τους από μια αύλακα-σχισμή, η οποία εκτείνεται και στις δυο περιοχές και περιλαμβάνει μια θέση πρόσδεσης του UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίου, που εντοπίζεται πιο κοντά στο domain 1 και ένα μακρύ κανάλι που διασχίζει το domain 2. Παρατήρησαν ότι ο FemX δεν συμπεριλαμβάνει στην δομή του κανάλι διαμόρφωσης L, όπως στον FemA.



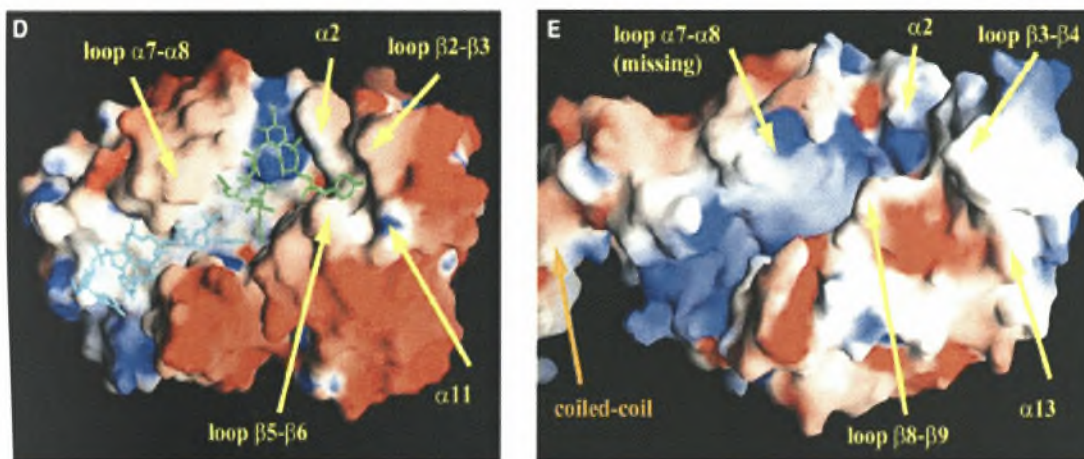
Εικόνα 12: Στερεοδιαμόρφωση του FemX στο *W. viridescens*. Η περιοχή με μπλε χρώμα είναι ο domain 1 και η περιοχή με μωβ χρώμα είναι ο domain 2. Με πράσινο χρώμα αναπαρίσταται το υπόστρωμα UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίου (Biarrotte-Sorin S et al., 2004).

Δέσμευση UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίου

Η θέση δέσμευσης του UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίου στην αύλακα, είναι σε πολύ άμεση επαφή με το domain 1 και οριοθετείται από τέσσερις δομές του domain αυτού (**Εικόνα 13**).

Δέσμευση Ala-tRNA^{Ala}

Το μακρύ κανάλι διασχίζει το domain 2 και είναι πλάτους $\sim 8\text{\AA}$ και μήκους $\sim 25\text{\AA}$. Το ηλεκτροστατικό, επιφανειακό δυναμικό, θετικής φόρτισης του καναλιού αυτού, καθώς και το μέγεθος του αποτελεί μια πολύ προσφυή θέση δέσμευσης για τον αρνητικής φόρτισης φωσφορικό σκελετό του tRNA (**Εικόνα 13**). Αξίζει να σημειωθεί, πως μετά και την δέσμευση του Ala-tRNA^{Ala} στον FemX, που ήδη έχει προσδέσει και το άλλο υπόστρωμα του, παρατηρείται μια ολική αναδιάταξη της δομής του ενζύμου, με σκοπό να φέρει κοντά τις χημικές ομάδες των δυο υποστρωμάτων του.

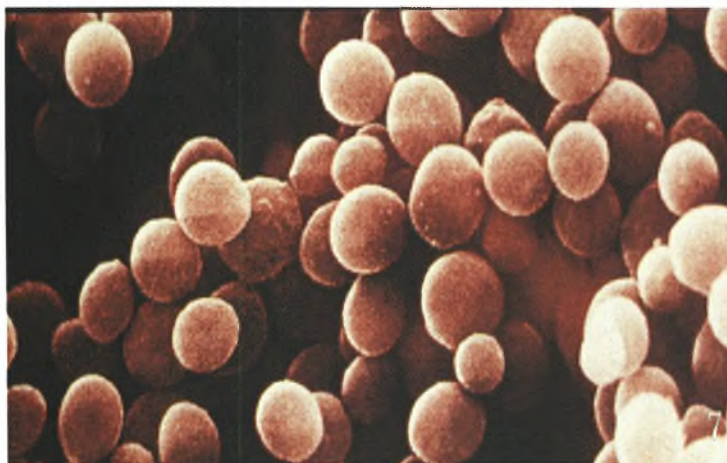


Εικόνα 13: Κρυσταλλική δομή FemX στο *W. viridescens* (D) και FemA στο *S. aureus* (E). Οι περιοχές ηλεκτροστατικού δυναμικού είναι χρωματισμένες με μπλε και κόκκινο. Το ένα υπόστρωμα του FemX, το UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίο είναι χρωματισμένο πράσινο, ενώ το άλλο υπόστρωμα, το Ala-tRNA^{Ala}, είναι χρωματισμένο κυανό. Από τις δυο αυτές κρυσταλλικές δομές μπορούμε εύκολα να αποφανθούμε για τις δομικές διαφορές και ομοιότητες των δυο ενζύμων (Biartotte-Sorin S et al., 2004).

Εν κατακλείδι, από την αποκάλυψη και τη μελέτη των κρυσταλλικών δομών των FemA και FemX, διαπιστώθηκαν τα εξής: i) η θέση δέσμευσης του πρόδρομο μορίου της πεπτιδογλυκάνης είναι ειδική είτε αφορά λιπιδιακό πρόδρομο μόριο (λιπίδιοII-Gly₁ του FemA στο *S. aureus*), είτε διαλυτά νουκλεοτιδικά πρόδρομα υποστρώματα πεπτιδογλυκάνης (UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίο του FemX στο *W. Viridescens*) ii) η δομική οργάνωση της θέσης πρόσδεσης του tRNA, είναι σχεδόν όμοια τόσο στον FemA όσο και τον FemX, αφού αφορά μια εύκαμπτη, μακριά πλατφόρμα iii) η δομή του FemX αλλάζει από τη στιγμή δέσμευσης και των δυο υποστρωμάτων, έτσι ώστε να λάβει χώρα η απαιτούμενη αντίδραση. Υποπτευόμαστε παρόλ' αυτά πως η κρυσταλλική δομή του FemX και στο *S. aureus* έχει παρόμοια οργάνωση με αυτή που έχει ήδη αποκαλυφθεί για το *W. Viridescens*.

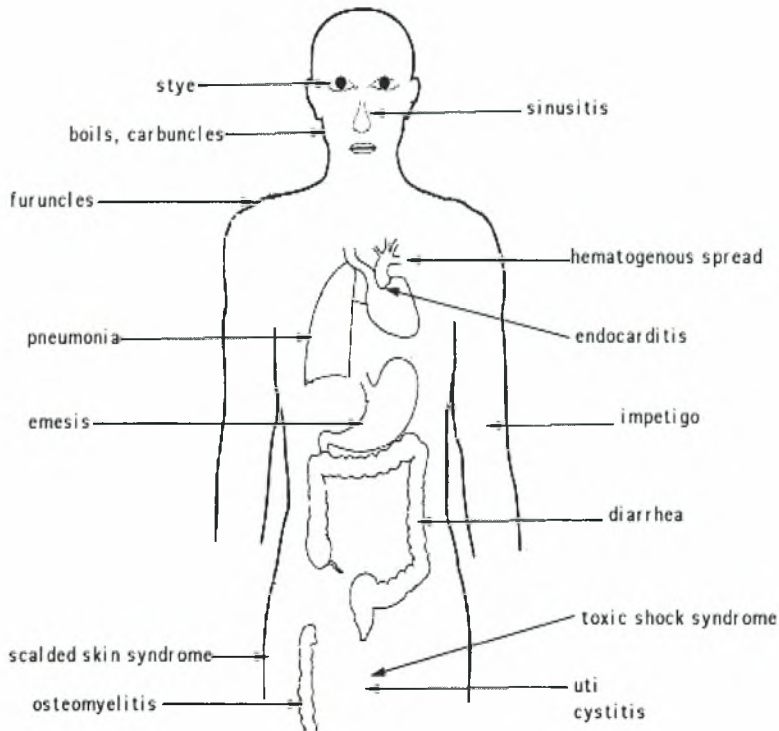
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η κλωνοποίηση των FemA και FemX παραγόντων από το Gram (+) βακτήριο *Staphylococcus aureus*, καθώς και μεταλλαγμάτων τους από κλινικά στελέχη με ευαισθησία στη μεθικιλίνη και η ακόλουθη υπερέκφραση, απομόνωση και καθαρισμός του FemA παράγοντα. Ακόμα, θα μελετηθεί το κατά πόσο οι μεταλλάξεις στους FemA και FemB θα επηρεάσουν την ανθεκτικότητα και κατ' επέκταση τη βιωσιμότητα ανθεκτικών στη μεθικιλίνη στελεχών *Staphylococcus aureus* (MRSA), μετά την εισαγωγή των γονιδίων των εν λόγω παραγόντων στα στελέχη αυτά και τη μετέπειτα έκθεσή τους στο αντιβιοτικό. Το *S. aureus* είναι ένα δυνητικά αναερόβιο, μη κινητικό βακτήριο, στο οποίο η διευθέτηση των κυττάρων είναι τέτοια, που θυμίζει τσαμπί σταφυλιού. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 15 °C έως 45 °C και σε συγκεντρώσεις NaCl ακόμη και 15%. Είναι οργανισμός θετικός στην δοκιμή με το ένζυμο καταλάση, αρνητικός στην δοκιμή με το ένζυμο οξειδάση, ενώ το κύριο προϊόν του μεταβολισμού του είναι το γαλακτικό οξύ. Έχει τειχικά οξέα, σχετικά χαμηλό περιεχόμενο G+C (33.96%) και σχηματίζει τεράστιες κίτρινες αποικίες (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14 : Το Gram (+) βακτήριο *Staphylococcus aureus*.

Το *Staphylococcus aureus* μπορεί να εντοπισθεί στο δέρμα και στη μύτη μερικών ανθρώπων χωρίς να προκαλεί μόλυνση. Στις περιπτώσεις αυτές μιλάμε για εποικισμό. Γενικά, όμως, μπορεί να προσβάλλει πολλά όργανα και ιστούς, προκαλώντας πολύ σοβαρές μολύνσεις, μερικές από τις οποίες απειλούν και την ίδια τη ζωή. Χαρακτηριστικές είναι οι μολύνσεις του δέρματος, των οστών (οστεομυελίτιδα), η πνευμονία, η σηψαιμία καθώς και οι νεκρωτικές μολύνσεις των μαλακών μορίων (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 15: Σχηματική παρουσίαση των ιστών και των οργάνων του ανθρώπου που αποτελούν στόχους προσβολής από το *Staphylococcus aureus*, καθώς και οι ασθένειες που προκαλούνται από την προσβολή αυτή (www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Staph).

Όταν ολοκληρώθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου *femA* που κωδικοποιεί τον FemA παράγοντα, και του γονιδίου *fmhB* του FemX παράγοντα από πέντε κλινικά στελέχη *S. aureus*, χαμηλής ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη, ακολούθησε μετασχηματισμός των γονιδίων αυτών σε κυτταρικά στελέχη *E. coli*. Πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση και απομόνωση του FemA παράγοντα. Η κλωνοποίηση των FemA και FemX, καθώς και η υπερέκφραση και απομόνωση του FemA από το *S. aureus*, αποτελεί ένα μικρό μόνο μέρος ενός γενικότερου project που επιτελείται στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, σκοπός του οποίου είναι η ταυτοποίηση των ισοδεκτικών tRNA^{Gly} μορίων, τα οποία λειτουργούν ως υποστρώματα στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του *S. aureus*, η ταυτοποίηση παραγόντων-διαμεσολαβητών (π.χ. παράγοντες που μοιάζουν με τον EF-Tu) που ενδέχεται να εμπλέκονται στην tRNA-εξαρτώμενη μεταφορά και ενσωμάτωση καταλοίπων γλυκίνης στο τοίχωμα και γενικότερα η διαλεύκανση του συγκεκριμένου μηχανισμού. Ένα επιπρόσθετο πειραματικό μέρος, που εκπονήθηκε στη διπλωματική αυτή εργασία, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, ήταν ο μετασχηματισμός στελεχών *S. aureus*, υψηλής ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη, με μεταλλαγμένους FemA και FemB παράγοντες, στα πλαίσια ανακάλυψης νέων στόχων αντιβιοτικών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Χημικές Ουσίες – Αντιδραστήρια

Αγαρόζη (SIGMA)	MgCl ₂ ·6H ₂ O (PANREAC)
Acrylamide (SIGMA)	Νουκλεοτίδια (dNTPs) (TAKARA)
Αιθανόλη (Panreac)	NaCl (PANREAC)
Αμπικιλίνη (SIGMA)	NaOH (MERCK)
APS (Ammonium Persulfate) (SIGMA)	Ni – NTA agarose (QIAGEN)
ATP (FLUKA)	Οξικό οξύ (MERCK)
BamHI (TAKARA)	Ουρία (PANREAC)
Bis-acrylamide (SIGMA)	Πρωτεΐνάση K (NEW ENGLAND BIOLABS)
β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)	Phusion DNA πολυμεράση (FINNZYMES)
Βρωμιούχο αιθίδιο (MERCK)	PMSF (phenylmethanesulphonyl fluoride)(SIGMA)
Bradford reagent (MERCK)	Ριβονουκλεάση A (NEW ENGLAND BIOLABS)
Bromophenol Blue (Research Organics)	Polyethelene Glycol 40000 (PEG 40000) (SERVA)
BSA (NEW ENGLAND BIOLABS)	Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμων περιορισμού (NEW ENGLAND BIOLABS)
Γλυκερόλη (PANREAC)	Ρυθμιστικό διάλυμα Taq πολυμεράσης Paq5000 (STRATAGENE)
Γλυκόζη (PANREAC)	Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης (FERMENTAS)
Casein hydrosylate (FLUKA)	Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης (TAKARA)
Coomasie Brilliant Blue (FLUKA)	Sall (NEW ENGLAND BIOLABS)
DMSO (Dimethyl sulfoxide) (PANREAC)	Taq πολυμεράση (HyTest Ltd)
Εκκινητές (sense/antisense) (MACROGENE)	Taq πολυμεράση Paq5000 (STRATAGENE)
EDTA (PANREAC)	Taq πολυμεράση Phusion (FINNZYMES)
HCl (MERCK)	T4 DNA λιγάση (FERMENTAS)
Ιμιδαζόλη (MERCK)	T4 DNA λιγάση (TAKARA)
Ισοπροπανόλη (SCHARLAU)	TEMED (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine) (Research Organics)
IPTG(IsopropylThioGalactosyl)(FERMENTAS)	Tris base (MERCK)
KCl (MERCK)	Trypticase soy Agar (BIOLIFE)
LB Agar (SCHARLAU)	Tryptone (MERCK)
LB Broth (SCHARLAU)	Φαινόλη (SIGMA)
Λυσοζύμη (FLUKA)	X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοσίδη) (SIGMA)
Maleic acid (FLUKA)	XhoI (TAKARA)
Μάρτυρας μοριακού βάρους (HyTest Ltd)	Χλωροφόρμιο(MERCK)
Μεθανόλη (PANREAC)	Xylene Cyanol (MERCK)
MgCl ₂ για PCR (MERCK)	Yeast extract (SCHARLAU)

3.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα

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

Για την παρασκευή 1L του διαλύματος αυτού χρησιμοποιούνται 242gr Tris base, 57,1ml οξικό οξύ, 100ml EDTA συγκέντρωσης 0.5M σε pH=8. Ακολούθως, πραγματοποιείται ρύθμιση του pH στο 8,6.

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

Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού χρησιμοποιείται Bromophenol Blue σε τελική περιεκτικότητα 0,09%, Xylene Cyanol σε τελική περιεκτικότητα 0,09%, γλυκερόλη σε τελική περιεκτικότητα 60% και EDTA σε τελική συγκέντρωση 60 mM.

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

Για την παρασκευή 1L του διαλύματος αυτού χρησιμοποιούνται 15gr Tris base pH=8.3, 72gr γλυκίνη και 5gr SDS.

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

Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού χρησιμοποιείται Tris-HCl, 0,5M σε pH=6.8, τελικής συγκέντρωσης 0,3125 M, SDS 10% (w/v) σε τελική περιεκτικότητα 10%, Β-βρωμοφαινόλη σε τελική περιεκτικότητα 0,1% και γλυκερόλη σε τελική περιεκτικότητα 50%.

- Ρυθμιστικό διάλυμα Sodium hydrogen maleate 0,2M.

Για την παρασκευή 500 ml του διαλύματος αυτού απαιτούνται 11,6gr Maleic acid και 4gr NaOH. Ακολουθεί πλήρωση με απιονισμένο H₂O και αποστείρωση.

3.1.3 Θρεπτικά μέσα

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

Για την παρασκευή 1L αυτού του θρεπτικού μέσου απαιτούνται 20gr LB Broth, 10gr NaCl και πλήρωση έως 1L με απιονισμένο H₂O.

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

Για την παρασκευή 1L αυτού του θρεπτικού μέσου απαιτούνται 30gr LB Agar, 10gr NaCl και πλήρωση έως 1L με απιονισμένο H₂O.

➤ Υγρό θρεπτικό μέσο SOC pH=7.

Για την παρασκευή 100 mL του υγρού θρεπτικού μέσου SOC είναι απαραίτητα:

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

Πίνακας 3: Σύσταση SOC medium pH=7 για τελικό όγκο 100ml.

Κατά την παρασκευή του υγρού θρεπτικού μέσου SOC προστίθενται τα 4 πρώτα αντιδραστήρια, που αναγράφονται παραπάνω, ακολουθεί προσθήκη 97 ml απιονισμένου H₂O και αποστείρωση. Έπειτα, προστίθενται και τα άλλα δύο συστατικά και πλήρωση με απιονισμένο H₂O μέχρι τα 100ml. Το διάλυμα Mg²⁺ 2M παρασκευάζεται με 20,33g MgCl₂·6H₂O και 24,65g MgSO₄ σε τελικό όγκο 100ml.

➤ Υγρό θρεπτικό μέσο B2 pH=7,5 για καλλιέργεια *S. aureus*.

Για την παρασκευή 1L του υγρού θρεπτικού μέσου B2, pH=7.5 είναι απαραίτητα:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Casein hydrosylate	10 g
Yeast extract	25 g
NaCl 1M	25 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Glucose 2M	5 g

Πίνακας 4: Σύσταση B2 medium, pH=7.5 για τελικό όγκο 1L.

Κατά την παρασκευή του υγρού θρεπτικού μέσου B2, προστίθενται τα 4 πρώτα αντιδραστήρια, που αναγράφονται παραπάνω, ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 7.5, προσθήκη 900 ml απιονισμένου H₂O και αποστείρωση. Έπειτα, προστίθεται η γλυκόζη και γίνεται πλήρωση με απιονισμένου H₂O μέχρι το 1L.

➤ Υγρό θρεπτικό μέσο trypticase soy broth.

Για την παρασκευή 1L αυτού του θρεπτικού μέσου, προστίθενται 40g trypticase soy agar, σε 1L απιονισμένου H₂O και ακολουθεί αποστείρωση του.

➤ Υγρό θρεπτικό μέσο 2X SMM pH=6,5.

Για την παρασκευή 125 mL του υγρού θρεπτικού μέσου 2X SMM είναι απαραίτητα:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Sodium hydrogen maleate 0.2M	25 ml
NaOH 0.1M	40 ml
MgCl ₂ 1M	5 ml
Sucrose	42,7 g

Πίνακας 5: Σύσταση 2X SMM medium, pH=6.5 για τελικό όγκο 125 ml.

Κατά την παρασκευή του υγρού θρεπτικού μέσου 2X SMM, προστίθενται τα 2 πρώτα αντιδραστήρια, που αναγράφονται παραπάνω, ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.5 και η προσθήκη των επόμενων 2 αντιδραστηρίων. Έπεται πλήρωση με απιονισμένο H₂O μέχρι τα 125 ml και αποστείρωση με φίλτρο.

➤ Υγρό θρεπτικό μέσο SMMP pH=7.

Για την παρασκευή 100 mL του υγρού θρεπτικού μέσου SMMP είναι απαραίτητα:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
2X SMM	55 ml
Trypticase soy broth	40 ml
10% (w/v) bovine albumin	5 ml

Πίνακας 6: Σύσταση SMMP medium, pH=7 για τελικό όγκο 100 ml.

Κατά την παρασκευή του υγρού θρεπτικού μέσου SMMP, προστίθενται όλα τα αντιδραστήρια, που αναγράφονται παραπάνω, ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 7, και αποστείρωση του με φίλτρο.

3.1.4 Κύτταρα

□ Strataclone™ Solopack Competent Cells

Τα συγκεκριμένα κύτταρα παρέχονται από το Strataclone PCR Cloning Kit της Stratagene και έχουν την ικανότητα έκφρασης της ρεκομπινάσης Cre, η οποία είναι απαραίτητη για την κυκλοποίηση των γραμμικών μορίων DNA που παράγονται κατά τη διάρκεια, του καταλυόμενου από την τοποϊσομεράση I, ligation. Επίσης, τα κύτταρα αυτά δίνουν την δυνατότητα επιλογής βάσει των μπλε και άσπρων αποικιών (*blue/white screening*), όταν μετασχηματισθούν με το πλασμίδιο pSC-A, το οποίο παρέχεται από το ίδιο kit και εξασφαλίζουν μετασχηματισμό υψηλής απόδοσης.

□ DH5a

Στέλεχος *E.coli* που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή (transformation) πλασμιδιακού φορέα στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το επιθυμητό γονίδιο. Τα κύτταρα αυτά υποστηρίζουν την επιλογή βάσει των μπλε και άσπρων αποικιών (*blue/white screening*), μέσω της δράση της β-γαλακτοσιδάσης, στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί πλασμιδιακός φορέας που φέρει το γονίδιο της, όπως ο pSC-A. Δεν έχουν το γονίδιο *lac I^q* και επομένως δεν απαιτείται IPTG. Τα κύτταρα DH5a φέρουν τις μεταλλάξεις *recA1* και *endA1* με αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας του ενθέματος και τη βελτιστοποίηση της ποιότητας του πλασμιδιακού DNA. Τα κυτταρικά αυτά στελέχη δεν επιτρέπουν την υπερέκφραση των πρωτεϊνών.

□ BL21 DE3

Στέλεχος *E.coli* σχεδιασμένο ώστε να επιτρέπει την υπερέκφραση πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας σύστημα έκφρασης βασισμένο σε T7 RNA πολυμεράση. Από τα στελέχη BL21 DE3 απουσιάζουν οι πρωτεάσες OmpT και Lon, οι οποίες πιθανόν να παρεμποδίζουν την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Τα κύτταρα BL21 DE3 χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν T7 προαγωγούς, όπως οι φορείς pET.

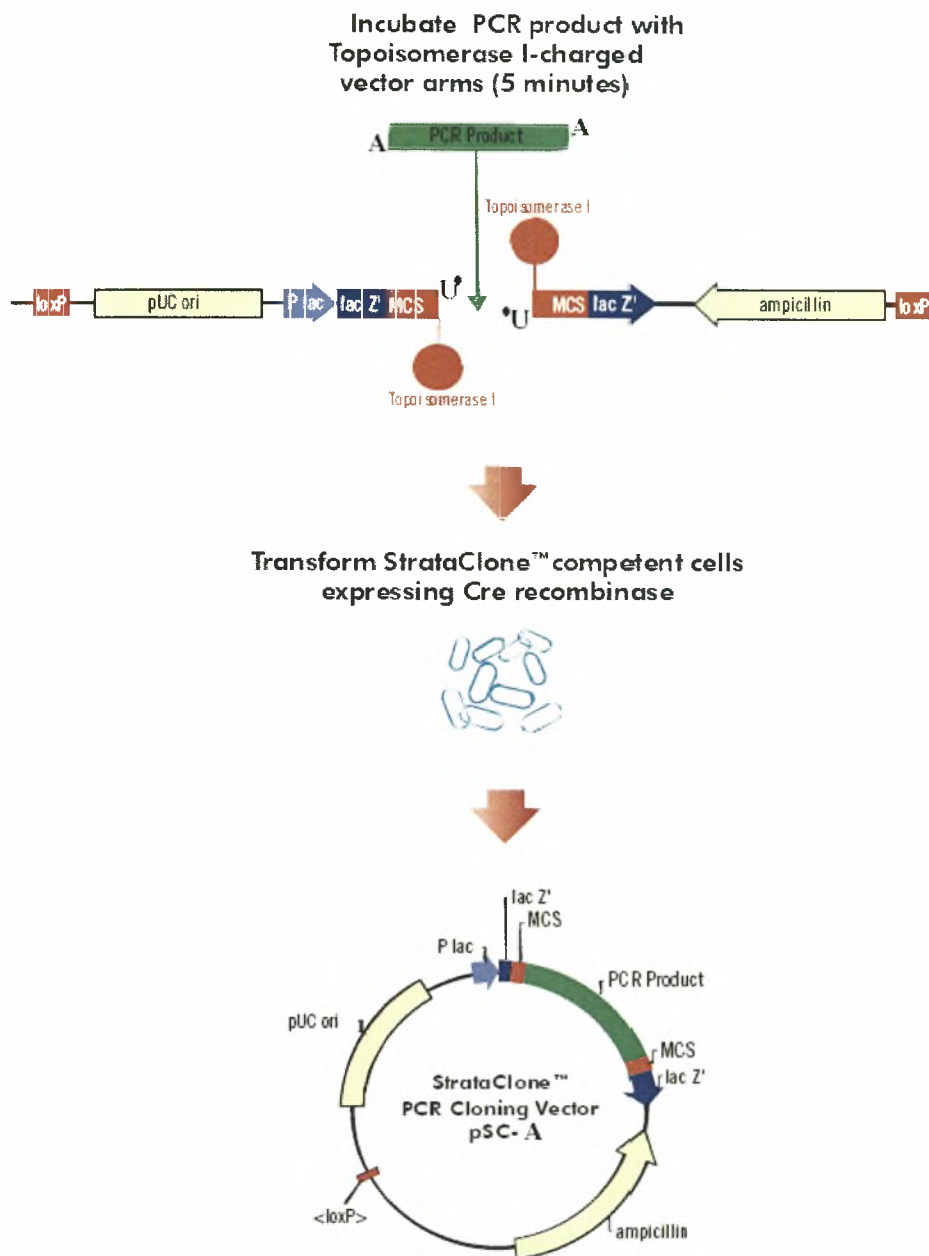
□ Κλινικά στελέχη *Staphylococcus aureus*

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

3.1.5 Πλασμιδιακοί φορείς

□ pSC-A

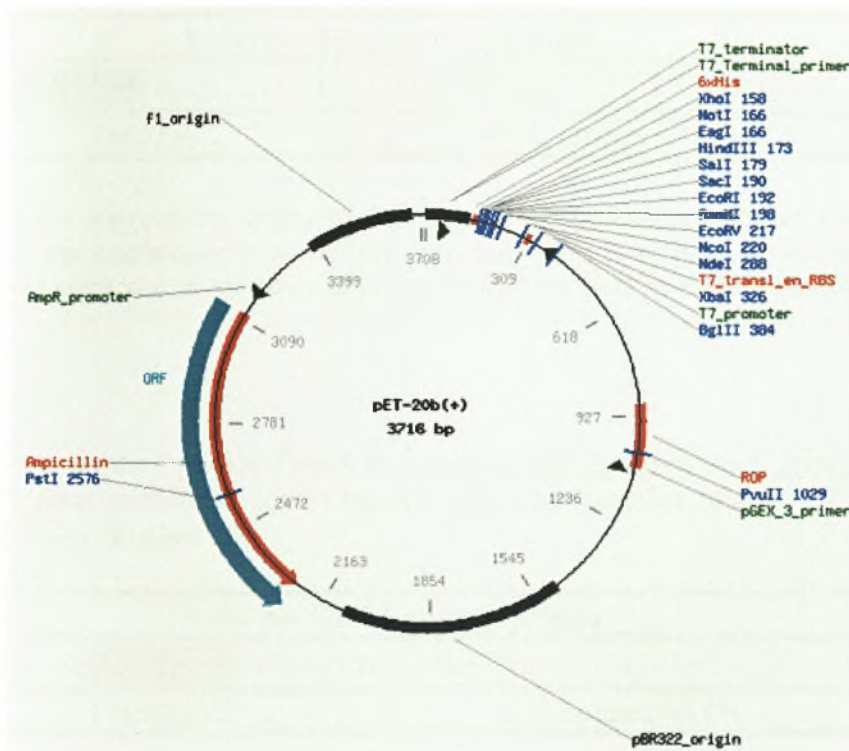
Πλασμιδιακός φορέας με μέγεθος 3.5kb που χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση γονιδίων (Stratagene). Η διαδικασία της κλωνοποίησης με το συγκεκριμένο φορέα εκμεταλλεύεται τις συνδυασμένες δράσεις της τοποϊσομεράσης I από το ιό Vaccinia και της ρεκομπινάσης Cre από τον βακτηριοφάγο P1 (Εικόνα 16). Αυτός ο κυκλικός φορέας έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο παρουσία αμικικιλίνης και παρέχει την δυνατότητα επιλογής με blue/white screening, εφόσον περιέχει το οπερόνιο της λακτόζης (*lacZ*).



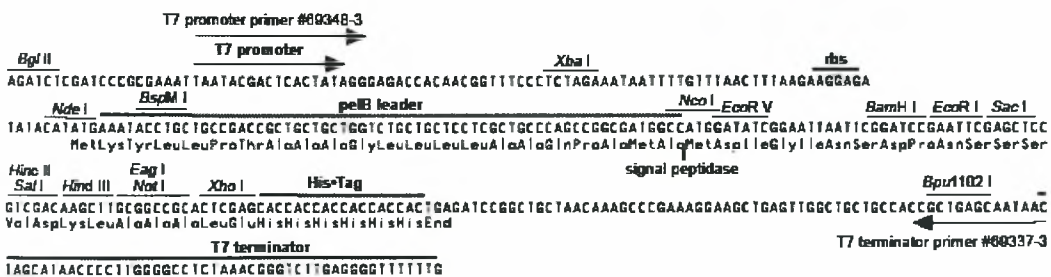
Εικόνα 16: Σύνοψη της μεθόδου στην οποία στηρίζεται ο μετασχηματισμός με τη βοήθεια του Strataclone PCR cloning kit.

□ **pET – 20b**

Πλασμιδιακός φορέας με μέγεθος 3.716kb (Novagen) ο οποίος χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση και την έκφραση γονιδίων, γνωστός και ως «φορέας υπερέκφρασης». Διαθέτει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη (Εικόνα 17). Η κλωνοποίηση και η έκφραση γονιδίων πραγματοποιείται μέσω της T7 RNA πολυμεράσης. Στο πλασμίδιο pET-20b μετά τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης υπάρχει ο πολυσυνδέτης (polylinker), όπου βρίσκονται όλες οι θέσεις αναγνώρισης και κοπής από τα ένζυμα περιορισμού (Εικόνα 18). Ο φορέας pET-20b δε διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης (lacZ), με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επιλογή των αποικιών που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο με το επιθυμητό γονίδιο μέσω blue/white screening.



Εικόνα 17: Ο πλασμιδιακός φορέας pET-20b.



pET-20b(+) cloning/expression region

Εικόνα 18: Ο προαγωγέας της T7 RNA πολυμεράσης και ο πολυσυνδέτης (polylinker) του φορέα pET-20b. Διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων BamHI και XhoI, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας. Μετά τον πολυσυνδέτη διακρίνεται το His-Tag.

3.1.6 Εκκινητές (primers)

Για την ενίσχυση των γονιδίων FemA και FemX από το Gram (+) βακτήριο *Staphylococcus aureus* χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές (primers):

i) για την ενίσχυση του γονιδίου **FemA** οι *S. aureus* BamHI Forward και *S. aureus* XhoI Reverse, οι οποίοι αποτελούν εξειδικευμένα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 29 και 33 βάσεων αντίστοιχα (Εικόνα 19).

<i>S. aureus</i> BamHI Forward primer	
5' – GGA TCC ATG AAG TTT ACA AAT TTA ACA GC – 3'	
Tm 57,9 °C	GC content 34,5%

<i>S. aureus</i> XhoI Reverse primer	
5' – CTC GAG AAA AAT TCT GTC TTT AAG TTT TTT AAG - 3'	
Tm 57,9 °C	GC content 27,3 %

Εικόνα 19: Οι δύο εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου FemA από γενωμικό DNA του *Staphylococcus aureus*. Τα χρωματισμένα νουκλεοτίδια αντιστοιχούν στις επιθυμητές θέσεις κοπής από τα περιοριστικά ένζυμα BamHI (Forward primer) και XhoI (Reverse primer).

ii) για την ενίσχυση του γονιδίου **FemX** οι *S. aureus* SalI Forward και *S. aureus* XhoI Reverse, οι οποίοι αποτελούν εξειδικευμένα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 27 και 26 βάσεων αντίστοιχα (Εικόνα 20).

<i>S. aureus</i> Sal I Forward primer	
5' – GGT CGA CAT GGA AAA GAT GCA TAT CAC – 3'	
Tm 60,6 °C	GC content 44,4%

<i>S. aureus</i> XhoI Reverse primer	
5' – CTC GAG TTT TCG TTT TAA TTT ACG AG - 3'	
Tm 54,4 °C	GC content 34,6 %

Εικόνα 20: Οι δύο εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου FemX από γενωμικό DNA του *Staphylococcus aureus*. Τα χρωματισμένα νουκλεοτίδια αντιστοιχούν στις επιθυμητές θέσεις κοπής από τα περιοριστικά ένζυμα SalI (Forward primer) και XhoI (Reverse primer).

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε από στελέχη του οργανισμού *Staphylococcus aureus* με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου. Η διαδικασία αυτή έγινε με σκοπό την παραλαβή του γενωμικού DNA του οργανισμού για τους μετέπειτα απαιτούμενους χειρισμούς.

Σε 1 g υγρής καλλιέργειας κυττάρων *Staphylococcus aureus* προστίθενται 7 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 100 mM pH=7,5 και έπειτα 0,3 ml λυσοζύμης. Ακολουθεί ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά. Στην συνέχεια, γίνεται προσθήκη 140 μl EDTA 500 mM, 7μl RNάσηA 20 mg/ml και κατόπιν 63 μl πρωτεΐνάσης K 20 mg/ml. Ακολουθεί επώαση στους 45 °C για 45 λεπτά και προσθήκη 70 μl NaCl 5M και 0,7 ml SDS 10%.

Η απομόνωση μετ' έπειτα πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας φαινόλη και χλωροφόρμιο. Συγκεκριμένα, γίνεται προσθήκη 7 ml φαινόλης στο falcon με το DNA, το οποίο φυγοκεντρείται στις 13000 rpm, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά (Φυγοκέντριση 1). Το υπερκείμενο μεταβιβάζεται σε νέο falcon. Προστίθενται 7 ml φαινόλης, και φυγοκέντριση στις 13000 rpm, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 λεπτά (Φυγοκέντριση 2). Ακολουθούν άλλες πέντε φυγοκεντρίσεις με μικρές αλλαγές στην ποσότητα φαινόλης που προστίθεται και τον χρόνο φυγοκέντρισης. Το υπερκείμενο τελικά μεταβιβάζεται σε νέο falcon και γίνεται προσθήκη 1 όγκου ψυχρής αιθανόλης 100% και το falcon τοποθετείται στους -20°C overnight.

Την επόμενη μέρα φυγοκεντρείται στις 13000 rpm, στους 4°C για 30 λεπτά, το υπερκείμενο αποχύνεται, προστίθενται 0,7 όγκοι ψυχρής αιθανόλης 70% και ακολουθεί φυγοκέντριση εκ νέου στις 13000 rpm, στους 4°C για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο αποχύνεται ξανά και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 100 μl water for injection.

3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των γονιδίων FemA και FemX από το γενωμικό DNA που προέρχεται από τον οργανισμό *Staphylococcus aureus*. Συγκεκριμένα, ενισχύθηκαν τα γονίδια των FemA και FemX από πέντε κλινικά στελέχη του βακτηρίου που παρουσιάζουν ευαισθησία στο αντιβιοτικό μεθικιλίνη.

Αρχικά προστίθενται το γενωμικό DNA του βακτηρίου, το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης, η οποία στην προκειμένη περίπτωση είναι η Paq 5000 (Stratagene), τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs), οι εκκινητές (primers) και H₂O for injection. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι οι *S. aureus* BamHI sense και *S. aureus* XhoI antisense, για την ενίσχυση του γονιδίου FemA, και οι *S. aureus* SalI sense και *S. aureus* XhoI antisense, για την ενίσχυση του γονιδίου FemX. Έτσι, μετά το πέρας της αντίδρασης ενίσχυσης των επιθυμητών γονιδίων, προκύπτουν προϊόντα που στα άκρα τους φέρουν θέσεις κοπής για τα περιοριστικά ένζυμα BamHI-XhoI και για τα SalI-XhoI, αντιστοίχως. Πραγματοποιείται καλή ανάμειξη όλων των συστατικών και προστίθεται η πολυμεράση Paq 5000. Η αντίδραση PCR ξεκινάει με ένα στάδιο μετουσίωσης σε θερμοκρασία 95°C για 4 λεπτά. Ακολουθούν 40 κύκλοι, καθένας από τους οποίους αποτελείται από ένα βήμα μετουσίωσης στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, ένα στάδιο υβριδισμού για την

σύνδεση των εκκινητών στους 50°C για 45 δευτερόλεπτα και ένα στάδιο πολυμερισμού κατά το οποίο δρα η πολυμεράση στους 72°C για 1,5 λεπτά. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με ένα στάδιο σε θερμοκρασία υβριδισμού 72°C για 20 λεπτά όπου τοποθετείται με μεγάλη προσοχή 1 μl Hytest DNA πολυμεράση, προκειμένου να προστεθεί στα προϊόντα του πολυμερισμού μία πολύ-A ουρά, εφόσον η DNA πολυμεράση Paq5000 δεν έχει την ικανότητα αυτή. Τα υλικά και οι ποσότητες που απαιτούνται για την παρασκευή μειγμάτων PCR τελικού όγκου 50μl φαίνονται στον **Πίνακα 7**, και ισχύουν τόσο για την ενίσχυση των FemA όσο και των FemX γονιδίων.

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

Πίνακας 7 : Τα απαιτούμενα αντιδραστήρια για την ενίσχυση των γονιδίων FemA και FemX.

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

3.2.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Με σκοπό τον διαχωρισμό των τμημάτων DNA και τον προσδιορισμό του μεγέθους τους χρησιμοποιείται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Η πυκνότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που επιθυμούμε να προσδιορίσουμε. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 1%. Τα δείγματα αλλά και ο μάρτυρας μοριακού βάρους, πριν ηλεκτροφορηθούν, προετοιμάζονται με την προσθήκη loading buffer 6x. Η τάση που εφαρμόζεται είναι 110 V και μετά την πάροδο μικρού χρονικού διαστήματος καθίσταται δυνατή η ανίχνευση των επιθυμητών τμημάτων DNA, καθώς και ο προσδιορισμός του μοριακού τους βάρους, βάσει του μάρτυρα μοριακού βάρους που ηλεκτροφορήθηκε ταυτοχρόνως. Η ανίχνευση των τμημάτων DNA είναι δυνατή στο υπεριώδες φως, λόγω της ιδιότητας του βρωμιούχου αιθιδίου, που έχει προστεθεί κατά την παρασκευή της πηκτής, να παρεμβάλλεται στις διπλές έλικες του DNA και να απορροφά στο υπεριώδες.

3.2.4 Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction)

Η απομόνωση και ο καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Nucleospin gel extraction, της Macherey - Nagel. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Αποκοπή των τμημάτων DNA

Αρχικά πραγματοποιείται η αποκοπή των επιθυμητών τμημάτων DNA από την πηκτή της αγαρόζης.

2. Λύση της πηκτής

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

3. Δέσμευση του DNA

Το δείγμα φορτώνεται σε στήλη, η οποία τοποθετείται σε ένα σωλήνα συλλογής (collection tube) των 1,5 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 x g, απομακρύνεται το έκλουσμα και η στήλη επανατοποθετείται στον σωλήνα συλλογής.

4. Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης

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

5. Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης

Το δείγμα επαναφυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 11.000 x g για την πλήρη απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος NT3, διότι τα κατάλοιπα της αιθανόλης που περιέχεται στο διάλυμα NT3, είναι πιθανόν να αναστείλουν τις μετέπειτα αντιδράσεις.

6. Έκλυση του DNA

Η στήλη τοποθετείται σε νέο συλλεκτικό σωλήνα των 1,5 ml και προστίθενται 30 μl elution buffer NE. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και έπειτα φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 x g. Το εκλούμενο DNA φυλάσσεται στους -20 °C.

3.2.5 Σύνδεση τμημάτων DNA (ligation)

Η σύνδεση τμήματος DNA σε φορέα πραγματοποιείται μετά από επώαση του επιθυμητού φορέα, ο οποίος είναι γραμμοποιημένος, και του τμήματος DNA που επιθυμούμε να ενθέσουμε σε αυτόν, σε αναλογία φορέα προς ένθεμα 1:3, παρουσία T4 DNA λιγάσης και του ρυθμιστικού της διαλύματος.

Η διάρκεια της επώασης εξαρτάται από το είδος του φορέα στον οποίο θα γίνει η κλωνοποίηση. Οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο pSC-A και ο pET-20b.

- *Σύνδεση στον πλασμιακό φορέα pSC -A με τη χρήση του PCR Cloning Kit της Strataclone*

Στην περίπτωση αυτή, τα συστατικά προστίθενται με την εξής σειρά:

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

Ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

- **Σύνδεση στον πλασμιδιακό φορέα pET – 20b**

Για τη σύνδεση των ένθετων γονιδίων με τον πλασμιδιακό φορέα χρησιμοποιούνται 150ng γραμμοποιημένου φορέα και 450 ng ένθετου γονιδίου. Η αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιείται σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα για την T4 DNA λιγάση παρουσία 2mM ATP και 20 U της T4 DNA λιγάσης. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση overnight στους 16 °C.

3.2.6 Παρασκευή ηλεκτρο-επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* για μετασχηματισμό

Για την παρασκευή ηλεκτρο-επιδεκτικών κυττάρων (electrocompetent cells) *E. coli* ακολούθησε η εξής διαδικασία:

- Αρχικά, γίνεται εμβολιασμός κυττάρων από glycerol stock σε 5 ml υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth και ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας στους 37°C, στις 210 rpm, για 12-14 ώρες.
- Από την καλλιέργεια αυτή, εμβολιάζεται 2 ml σε 100 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth.
- Η καλλιέργεια επώαζεται στους 37 °C, στις 210 rpm, και ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνται φωτομετρήσεις στα 600 nm μέχρι η οπτική πυκνότητα της (OD) ανέλθει στο 0.5 – 0.6.
- Η καλλιέργεια επώαζεται στους 0-4 °C για 20 λεπτά.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4.000 g, στους 4°C για 15 λεπτά.
- Κάθε ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 ml ψυχρού διαλύματος γλυκερόλης 10%.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4.000g, στους 4°C για 15 min.
- Τα εναπομείναντα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 25 ml ψυχρού διαλύματος γλυκερόλης 10%.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4.000g, στους 4°C για 15 min.
- Τα εναπομείναντα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 2 ml ψυχρού διαλύματος γλυκερόλης 10%.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4.000g, στους 4°C για 15 min.
- Τα εναπομείναντα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 250 μl ψυχρού διαλύματος γλυκερόλης 10%.
- Πολύ γρήγορα, το περιεχόμενο των falcons σε επιλεκτικά κύτταρα διανέμεται ισόποσα σε ψυχρά, αποστειρωμένα eppendorfs των 1.5 ml, τα οποία και τοποθετούνται αμέσως, προς φύλαξη μέχρι χρησιμοποίησής τους, στους –80 °C.

3.2.7 Παρασκευή ηλεκτρο-επιδεκτικών κυττάρων *S. aureus* για μετασχηματισμό

- Αρχικά, γίνεται εμβολιασμός αποικίας κυττάρων *S. aureus* σε 3 ml B2 υγρού θρεπτικού μέσου και ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας στους 37°C, στις 210 rpm, για 12-14 ώρες.
- 500μl από την καλλιέργεια αυτή, εμβολιάζονται σε 50 ml φρέσκου υγρού θρεπτικού μέσου B2.
- Η καλλιέργεια επώαζεται στους 37 °C, στις 210 rpm, και ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνται φωτομετρήσεις στα 600nm, σε 1ml της καλλιέργειας, μέχρι η οπτική πυκνότητα της (OD) ανέλθει στο 0,5 – 0,6.

- Η καλλιέργεια των 50 ml μοιράζεται, υπό φλόγα, σε δυο αποστειρωμένα και παγωμένα falcons των 50 ml και στην συνέχεια τοποθετούνται σε παγολούτρο για 15 λεπτά, ώστε να σταματήσει η ανάπτυξη των κυττάρων.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4.000 g, στους 4°C για 15 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα του θρεπτικού μέσου.
- Κάθε ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 ml ψυχρού αποστειρωμένου H₂O.
- Τα falcons φυγοκεντρούνται εκ νέου στις 4.000g, στους 4°C για 15 min.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα του υπερκείμενου.
- Η επαναδιάλυση των ιζημάτων με την προσθήκη ψυχρού αποστειρωμένου H₂O, η φυγοκέντρηση και η απομάκρυνση των υπερκειμένων, πραγματοποιείται τοιο-
τοτρόπως για άλλες δυο φορές
- Κάθε ίζημα επαναδιαλύεται σε 8 ml ψυχρού διαλύματος γλυκερόλης 10%.
- Τα falcons φυγοκεντρούνται εκ νέου στις 4.000g, στους 4°C για 15 min.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα του υπερκείμενου.
- Κάθε ίζημα επαναδιαλύεται σε 0,7 ml ψυχρού διαλύματος γλυκερόλης 10%.
- Πολύ γρήγορα, το περιεχόμενο των falcons σε επιλεκτικά κύτταρα διανέμεται ισόποσα (50 μl) σε ψυχρά, αποστειρωμένα erpendorfs των 1.5 ml, τα οποία και τοποθετούνται αμέσως, προς φύλαξη μέχρι χρησιμοποίησης τους, στους -80 °C.

3.2.8 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* (transformation)

A) Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με το PCR Cloning Kit της Strataclone

- Σε 50 μl επιλεκτικά κύτταρα που παρέχονται από το PCR Cloning Kit της Strataclone προστίθεται 1μl ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA (ligation product), υπό φλόγα.
- Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 20 λεπτά.
- Τοποθέτηση στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα, ώστε να επέλθει heatshock.
- Επώαση στον πάγο για 2 λεπτά.
- Προστίθενται 250 μl θρεπτικού μέσου SOC.
- Επώαση στους 37 °C, στις 170 rpm για 1 ώρα.
- 100 μl μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* επιστρώνονται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης LB Agar παρουσία του αντιβιοτικού Ampicillin και 40μl X-gal 2%.
- Επώαση του τρυβλίου στους 37 °C για 12-14 ώρες (overnight).

Εφόσον, η κλωνοποίηση του υπό μελέτη γονιδίου έχει γίνει σε πλασμιδιακό φορέα pSC-A , ο οποίος φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, είναι εύκολο να διακρίνουμε τα κύτταρα εκείνα τα οποία και μετασχηματίστηκαν, μέσω του blue-white screening. Αυτός είναι και ο λόγος που στα υπό επίστρωση τρυβλία προστίθεται X-gal. Οι προκύπτουσες λευκές αποικίες κυττάρων, σημαίνει ότι φέρουν το ανασυνδυασμένο, με το επιθυμητό γονίδιο, πλασμίδιο, ενώ οι μπλε αντιστοιχούν σε κύτταρα που δεν φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

B) Μετασχηματισμός *electro-competent* κυττάρων *E. coli*

- Σε 50 μl επιδεκτικών κυττάρων προστίθενται 1μl ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA (ligation product), υπό φλόγα.
- Το διάλυμα με τα κύτταρα, στο οποίο έχει προστεθεί το ligation product, μεταφέρεται στις ειδικές κυβέτες του electroporator, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να κατανεμηθεί ομοιόμορφα στο εσωτερικό της.
- Τα κύτταρα στην κυβέτα υπόκεινται σε μετασχηματισμό με ηλεκτροπόρωση.
- Ακολούθως, προστίθενται 200 μl θρεπτικού μέσου SOC στην κάθε κυβέτα. Αξίζει να σημειωθεί, ότι όσο πιο γρήγορα προστεθεί το SOC μετά την ηλεκτροπόρωση τόσο πιο αποτελεσματικός θα είναι ο μετασχηματισμός.
- 100 μl του ανωτέρω διαλύματος (κύτταρα *E.coli* + ligation product + SOC) επιστρώνονται σε τρυβλίο LB Agar παρουσία αντιβιοτικού.
- Το τρυβλίο επωάζεται στους 37 °C για 12 - 15 ώρες (overnight).

3.2.9 Μετασχηματισμός ηλεκτρο-επιδεκτικών κυττάρων *S. aureus*

- Σε 50 μl ηλεκτρο-επιδεκτικών κυττάρων, τα οποία έχουν ξεπαγώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται, υπό φλόγα, 1μl ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA, που έχει απομονωθεί σε μικρή κλίμακα.
- Τα κύτταρα με το πλασμιδιακό DNA, επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το μείγμα κυττάρων-DNA μεταφέρεται σε ειδικές κυβέτες των 0,2cm, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να κατανεμηθούν ομοιόμορφα στο εσωτερικό της.
- Αφού, η ένδειξη στη συσκευή ηλεκτροπόρωσης έχει ρυθμιστεί `` StA``, η κυβέτα τοποθετείται σε μια ειδική θέση, όπου με το πάτημα ενός κουμπιού επέρχεται η ηλεκτροπόρωση. Η ηλεκτροπόρωση θεωρείται επιτυχής, όταν η ένδειξη του electroporator είναι 2,5.
- Αμέσως, προστίθεται 1 ml θρεπτικού μέσου SMMP και τα κύτταρα στη συνέχεια μεταφέρονται σε αποστειρωμένα tubes των 1,5 ml.
- Επωάζονται για 1 ώρα, στις 170 rpm.
- 300 μl των κυττάρων, επιστρώνονται σε τρυβλίο στερεού θρεπτικού υποστρώματος Müller-Hinton agar, στο οποίο όμως τρυβλίο έχουμε προηγουμένως επιστρώσει και 100 μl IPTG 0,1M, για να επαχθεί η έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων.
- Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 36-48 ώρες.

3.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Το πλασμιδιακό DNA απομονώνεται από καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* σε μικρή κλίμακα (mini preparation) βάσει του πρωτοκόλλου “Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E. coli* Nucleospin Plasmid”, της Macherey-Nagel. Η διαδικασία έχει ως εξής:

i. Καλλιέργεια και συγκομιδή των βακτηριακών κυττάρων

1,5 ml overnight υγρής καλλιέργειας κυττάρων, μεταφέρεται σε ένα eppendorf και φυγοκεντρείται στις 11000 g για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα, έτσι ώστε να έχει ανακτηθεί ίζημα από 3ml καλλιέργειας.

ii. Λύση των κυττάρων

Το ίζημα επαναδιαλύεται με την προσθήκη 250 μl buffer A1 και προσεκτικό πιπετάρισμα. Ακολούθως, προστίθενται 250 μl buffer A2, τα eppendorfs

αναδεύονται ελαφριά και επωάζονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για περίπου 2 λεπτά. Έπειτα, προστίθενται 300 μl buffer **A3** και ακολουθεί έντονη ανάδευση.

iii. Καθαρισμός του διαλύματος

Τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στις 11000 g για 10 λεπτά.

iv. Δέσμευση του DNA

Το υπερκείμενο, από την προηγηθείσα φυγοκέντριση, μεταφέρεται στη στήλη “Nucleospin Plasmid”, η οποία είναι τοποθετημένη σε ένα σωλήνα συλλογής (collection tube) των 2 ml του kit και ακολουθεί φυγοκέντριση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στις 11000 g για 1 λεπτό. Το έκλουσμα απομακρύνεται και η στήλη επανατοποθετείται στον σωλήνα συλλογής.

v. Καταστροφή νουκλεασών

Στη στήλη προστίθενται 500 μl buffer **AW**, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 50°C, και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 11000 g για 1 λεπτό. Το έκλουσμα απομακρύνεται και η στήλη επανατοποθετείται στον σωλήνα συλλογής.

vi. Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης

Στη στήλη προστίθενται 600 μl buffer **A4** (που περιέχει αιθανόλη) και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 11.000 g για 1 λεπτό. Το έκλουσμα απομακρύνεται και η στήλη τοποθετείται εκ νέου στον σωλήνα συλλογής.

vii. Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης

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

viii. Έκλυση του DNA

Η στήλη τοποθετείται σε ένα eppendorf των 1.5 ml, προστίθενται 50 μl buffer **AE** και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό, με σκοπό να βελτιστοποιηθεί η απόδοση έκλυσης DNA. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 11.000 g για 1 λεπτό. Το εκλούμενο πλασμιδιακό DNA φυλάσσεται στους -20 °C μέχρι χρήσης του.

3.2.11 Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα (digestion)

Τα ένζυμα περιορισμού έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Λόγω αυτής τους της ικανότητας, πέπτουν το DNA σε εξειδικευμένες θέσεις, μέσω υδρόλυσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών, προκύπτοντας χαρακτηριστικού μεγέθους τμήματα (digestion products). Η ενζυμική μονάδα Unit, ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει 1 μg DNA από βακτηριοφάγο σε μια ώρα, στους 37 °C.

Πλασμιδιακό DNA επωάζεται με το ένζυμο σε αναλογία 2 Units (ενζυμικές μονάδες) / μg DNA, παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για την δράση του ενζύμου, καθώς και *BSA* (100x), μιας ουσίας η οποία δεσμεύεται στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωλήνων, εμποδίζοντας τη δέσμευση των περιοριστικών ενζύμων σε αυτά και την μείωση της δραστηριότητάς τους. Η αντίδραση της πέψης διαρκεί περίπου 3 ώρες στους 37 °C.

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν, κατά την πειραματική διαδικασία, είναι τα *BamHI* και *XhoI* από την εταιρεία Takara, για το γονίδιο του *FemA* παράγοντα και τα *SalI* και *XhoI*, των εταιριών New England Biolabs και Takara, αντίστοιχα, για το γονίδιο του *FemX* παράγοντα. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης και οι αντίστοιχες θέσεις κοπής των ενζύμων παρουσιάζονται στην εικόνα **21** και εικόνα **22**.

❖ Στο γονίδιο του FemA παράγοντα:



Εικόνα 21: Οι αλληλουχίες αναγνώρισης και οι θέσεις κοπής του DNA από τα ένζυμα περιορισμού BamHI και XhoI.

❖ Στο γονίδιο του FemX παράγοντα:



Εικόνα 22: Οι αλληλουχίες αναγνώρισης και οι θέσεις κοπής του DNA από τα ένζυμα περιορισμού SalI και XhoI.

3.2.12 Υπερέκφραση του παράγοντα FemA

Σε 5ml LB Broth με αμπικιλίνη (100mg/ml), τελικής συγκέντρωσης 100μg/ml, εμβολιάζονται, από glycerol stock, BL21-DE3 κύτταρα, τα οποία φέρουν το επιθυμητό γονίδιο σε ειδικό φορέα υπερέκφρασης, τον pET-20b και επωάζονται για 12-14h (overnight) στους 37°C, υπό ανάδευση στις 210 rpm. Την επομένη, σε 200 ml φρέσκου θρεπτικού μέσου LB Broth με αμπικιλίνη ενοφθαλμίζονται 2ml της υγρής O/N καλλιέργειας κυττάρων. Πραγματοποιείται μια αρχική μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των κυττάρων της καλλιέργειας στα 600nm (OD₆₀₀) και ακολουθεί επώαση της στους 37 °C υπό ανάδευση έως ότου το OD₆₀₀ φτάσει περίπου το 0.5 – 0.6, που αντιστοιχεί στην εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων. Όταν η οπτική απορρόφηση φτάσει του επιθυμητού ορίου τις τιμές, προστίθεται 2ml IPTG (0,1M) (Isopropyl Thio Galactosyl) σε τελική συγκέντρωση **1 mM** με σκοπό την επαγωγή έκφρασης του γονιδίου του FemA παράγοντα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το IPTG δρα ως επαγωγέας της έκφρασης του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης, της οποίας ο προαγωγέας στο πλασμίδιο pET-20b βρίσκεται μπροστά από τον polylinker. Η έκφραση του γονιδίου αυτού στα *E. coli* κύτταρα αναστέλλεται από τον καταστολέα LacIQ. Το IPTG δεσμεύει και απομακρύνει τον καταστολέα από το DNA επιτρέποντας έτσι την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία με τη σειρά της θα αναγνωρίσει τον προαγωγέα της στο πλασμίδιο και θα μεταγράψει τα γονίδια που βρίσκονται μετά από αυτόν, όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το γονίδιο του FemA. Έπειτα ακολουθεί επώαση σε **θερμοκρασία δωματίου (RT)**,

overnight, υπό ανάδευση. Την επομένη, η O/N καλλιέργεια μοιράζεται σε αποστειρωμένα και παγωμένα falcons, τα οποία φυγοκεντρώνονται στους 4 °C, στις 4000 rpm για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα φυλάσσεται στους - 80 °C.

3.2.13 Απομόνωση του παράγοντα FemA

- Ομογενοποίηση και λύση των κυττάρων

Τα ιζήματα από την φυγοκέντριση της διαδικασίας υπερέκφρασης του FemA επαναδιαλύονται σε 1 ml sonication buffer (Πίνακας 8). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 20 λεπτά και στη συνέχεια σπάσιμο των κυττάρων με υπερήχους (sonicator). Έπεται φυγοκέντριση στους 4 °C, στις 14000 rpm, για 30 λεπτά. Τα υπερκείμενα διαχωρίζονται από τα ιζήματα και φυλάσσονται στους 4 °C.

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

Πίνακας 8: Σύσταση διαλύματος sonication buffer για την λύση κυττάρων *E.coli* με υπερήχους.

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

- Απομόνωση της πρωτεΐνης FemA

Η πρωτεΐνη FemA είναι δυνατό να απομονωθεί, περνώντας τόσο τα υπερκείμενα, όσο και τα ιζήματα που φυλάχθηκαν μετά το sonication στους 4°C, από στήλη Νικελίου (*NTA-Ni*). Η ικανότητα της να κατακρατάται στη στήλη αυτή οφείλεται στη σύνδεση των καταλοίπων ιστοδίνης (His-Tag), που περιέχει στο C-τελικό της άκρο μετά από ενίσχυση με τους κατάλληλους εκκινητές, με τα μόρια του Νικελίου. Με αυτό τον τρόπο γίνεται συλλογή κλασμάτων πρωτεϊνών και πέραν της επιθυμητής. Αρχικά, συλλέγονται εκείνες οι πρωτεΐνες που δεν κατακρατώνται καθόλου στη στήλη, ακολουθεί η συλλογή εκείνων που κατακρατώνται ασθενώς (έκλουση με wash buffer) και τέλος εκείνων που διαθέτουν His-Tag, στην προκειμένη περίπτωση η πρωτεΐνη FemA. Η έκλουση και έτσι η ανάκτηση των πρωτεϊνών από την στήλη, επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλυμάτων έκλουσης διαφορετικής συγκέντρωσης Ιμιδαζόλης. Αξίζει να αναφερθεί, πως η Ιμιδαζόλη δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου της στήλης, ανταγωνιζόμενη στις θέσεις δέσμευσης τις his-tagged πρωτεΐνες. Το διάλυμα έκλουσης με την μεγαλύτερη συγκέντρωση

Ιμιδαζολης (elution buffer), είναι εκείνο που χρησιμοποιείται για την αποδέσμευση από την στήλη της πρωτεΐνης FemA. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν μετά την έκλουση της στήλης με elution buffer ελέγχονται ενδελεχώς για την ύπαρξη αυτής της πρωτεΐνης.

Όπως προαναφέρθηκε, από την στήλη πέρασαν τόσο τα υπερκείμενα όσο και τα ιζήματα, που προέκυψαν μετά τη λύση των κυττάρων. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση της πρωτεΐνης FemA από τα υπερκείμενα, αναγράφονται στον **Πίνακα 9**. Τα ιζήματα, από την άλλη, αρχικά επαναδιαλύθηκαν σε ένα διάλυμα λύσης (lysis buffer) τα συστατικά του οποίου παρουσιάζονται στον **Πίνακα 10** και ακολούθησε φυγοκέντριση στους 4 °C, στις 14000 rpm, για 30 λεπτά. Τα υπερκείμενα και τα ιζήματα διαχωρίστηκαν. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση της πρωτεΐνης FemA από τα υπερκείμενα της φυγοκέντρησης των ιζημάτων αναγράφονται στον **Πίνακα 11**.

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

Πίνακας 9: Σύσταση διαλυμάτων για την απομόνωση της πρωτεΐνης FemA από τα υπερκείμενα μετά την λύση των κυττάρων.

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

Πίνακας 10: Η σύσταση του διαλύματος επαναδιάλυσης των ιζημάτων από την φυγοκέντριση που ακολούθησε την λύση των κυττάρων *E.coli* με υπερήχους.

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

Πίνακας 11: Σύσταση διαλυμάτων για την απομόνωση της πρωτεΐνης FemA από τα ιζήματα μετά την λύση των κυττάρων.

- Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με SDS υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η πηκτή αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, τη *πηκτή επιστίβαξης* (stacking gel) και τη *πηκτή διαχωρισμού* (separating gel). Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την παρασκευή των δύο πηκτών καταγράφονται στον **Πίνακα 12** και στον **Πίνακα 13**, αντίστοιχα. Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου.

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

Πίνακας 12: Σύσταση πηκτής επιστίβαξης 4% (stacking gel).

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

Πίνακας 13: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 12% (separating gel).

Η πηκτή επιστίβαξης έχει μικρότερη πυκνότητα από το πήκτωμα διαχωρισμού και συγκεντρώνει τη ποσότητα των δειγμάτων που έχουμε φορτώσει στα πηγάδια, 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 επιστίβαξης, ακριβώς πάνω από την πηκτή διαχωρισμού και αφήνεται να πήξει.

Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού 4x (loading dye) και τη θέρμανση των δειγμάτων στους 98 °C για 5 λεπτά, όσον αφορά τα υπερκείμενα και στους 98 °C για 30 λεπτά, όσον αφορά τα ιζήματα. Η θέρμανση έχει ως σκοπό την αποδιάταξη των πρωτεϊνών ώστε να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος στην πηκτή.

Τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή καθώς και οι μάρτυρες μοριακού βάρους, πληρώνεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, Running buffer 10x (Tris – Γλυκίνη – SDS), ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή και συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδοσίας. Η τάση του ηλεκτρικού ρεύματος προσαρμόζεται στα 100 V μέχρι τα δείγματα να εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού και στη συνέχεια αυξάνεται στα 200 V. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία διαχωρισμού των πρωτεϊνών, αφαιρείται η ενιαία πηκτή από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, απομακρύνεται η πηκτή επιστίβαξης και ακολουθεί ο χρωματισμός της πηκτής διαχωρισμού με staining buffer (0.05M Coomassie Brilliant Blue, 10% acetic acid, 40% methanol) για περίπου 45 min και αποχρωματισμός της με destaining buffer (10% acetic acid, 30% methanol).

- Καθαρισμός της πρωτεΐνης FemA και συμύκνωση της

Μετά την ηλεκτροφορηση, των ανακτηθέντων από την στήλη Νικελίου πρωτεϊνικών κλασμάτων, είναι δυνατό να αποφανθούμε σε ποιο από αυτά υπάρχει η επιθυμητή πρωτεΐνη. Τα κλάσματα αυτά μεταφέρονται σε μεμβράνη διαπίδυσης. Η **διαπίδυση** είναι μια διαδικασία που γίνεται με σκοπό τον καθαρισμό της πρωτεΐνης από το ιμιδαζόλιο, που περιείχαν τα διαλύματα εκλουσης κατά την απομόνωση της από τη στήλη. Αφού, λοιπόν, τα κλάσματα τοποθετηθούν στη ειδικά επεξεργασμένη μεμβράνη, τα άκρα της δένονται προσεκτικά και έπειτα τοποθετείται στο dialysis buffer (Tris-HCl pH=8, KCl, Β-μερκαπτοαιθανόλη, MgCl₂ και PMSF) στους 4 °C, O/N, υπό ελαφριά ανάδευση.

Την επομένη, η μεμβράνη διαπίδυσης απομακρύνεται από το dialysis buffer και ακολουθεί η διαδικασία **συμύκνωσης** της πρωτεΐνης, με σκοπό την αύξηση της συγκέντρωσης της. Έτσι, η μεμβράνη επικαλύπτεται με πολυ-αιθυλική γλυκόλη (*Polyethelene Glycol-PEG*), που βοηθά στην απομάκρυνση του νερού από το εσωτερικό της μεμβράνης, και αφήνεται στους 4°C, για περίπου 30 λεπτά.

- Μέτρηση συγκέντρωσης της πρωτεΐνης FemA και φύλαξη της

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία συμύκνωσης, μετράμε την συγκέντρωση της απομονωθείσας πρωτεΐνης με την μέθοδο **Bradford**. Η μέθοδος αυτή, στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595 nm. Έτσι, σε 20μl συμπυκνωμένου πρωτεϊνικού δείγματος, προστίθενται 800 μl Bradford reagent και 180 μl water for injection, και έπεται φωτομετρηση στα 595 nm. Η οπτική απορρόφηση (OD) του δείγματος ανάγεται σε συγκέντρωση της πρωτεΐνης (mg/ml) μέσω της εξίσωσης της καμπύλης: $y = 4.2609 x + 0.024$, όπου $y = OD_{595}$

Η πρωτεΐνη, αφού απομακρυνθεί από τη μεμβράνη διαπίδυσης, μοιράζεται σε εppendorfs των 1.5ml, παρουσία γλυκερόλης, σε τελική συγκέντρωση 30%, και φύλαξη της στους -20 °C.

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

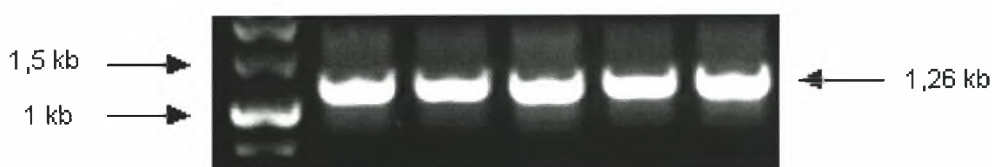
Κλωνοποίηση των femA και fmhB γονιδίων-υπερέκφραση και απομόνωση του FemA παράγοντα

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA από κλινικά στελέχη *Staphylococcus aureus* με χαμηλή ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη, με τη μέθοδο φαινόλης – χλωροφορμίου. Ακολούθησε ενίσχυση των γονιδίων femA και fmhB, των παραγόντων FemA και FemX, αντίστοιχα, με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας, όπως προαναφέρθηκε, τα εξής ζεύγη εκκινητών: *S. aureus* BamHI Forward - *S. aureus* XhoI Reverse, για την ενίσχυση του γονιδίου femA, και *S. aureus* SalI Forward - *S. aureus* XhoI Reverse, για την ενίσχυση του γονιδίου fmhB. Χρησιμοποιήθηκαν αυτά τα ζεύγη εκκινητών, με σκοπό τα προϊόντα ενίσχυσης που θα προκύψουν, να φέρουν στα άκρα τους αλληλουχίες που θα αναγνωρίζονται ειδικά από τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού. Μετά το πέρας της PCR, τα προϊόντα ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαροζής 1% και τα αποτελέσματα έγιναν ορατά μετά από έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνες 23A-B). Το μέγεθος των ενισχυθέντων τμημάτων DNA προσδιορίστηκε βάσει ενός μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder 1kb). Η εικόνα της πηκτής που προέκυψε επιβεβαίωσε την ορθότητα της ενίσχυσης, και των δυο γονιδίων, καθώς το μέγεθος των ζωνών είναι 1,263 και 1,266 kb, που αντιστοιχούν στα μεγέθη των γονιδίων femA και fmhB, αντίστοιχα.

A.



B.



Εικόνα 23: **A)** Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης του ενισχυθέντος με PCR γονιδίου του FemA παράγοντα (1,263 kb). **B)** Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης του ενισχυθέντος με PCR γονιδίου του FemX παράγοντα (1,266 kb).

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός (gel extraction), των ζωνών εκείνων στην πηκτή αγαροζής, που αντιστοιχούν στα ενισχυθέντα γονίδια των παραγόντων, FemA και FemX, σύμφωνα με το πρωτόκολλο Nucleospin Gel Extraction της Macherey-Nagel.

Τα προϊόντα από την παραπάνω διαδικασία, δηλαδή τα γονίδια των παραγόντων FemA και FemX, χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τη σύνδεση τους (ligation) στον πλασμιδιακό φορέα pSC-A, με τη χρήση του PCR Cloning Kit της Strataclone. Η σύνδεση αυτή βασίστηκε στο σχηματισμό δεσμών τύπου A-U*, μεταξύ φορέα και γονιδίων, αφού ο pSC-A είναι κατασκευασμένος με τέτοιο τρόπο

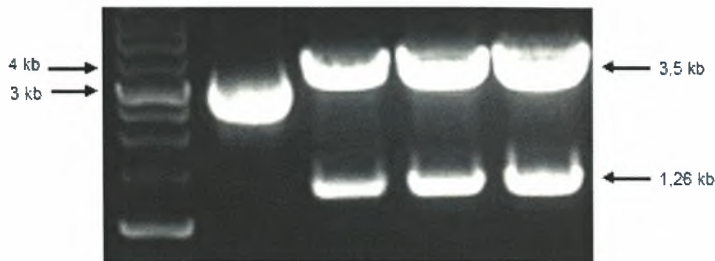
ώστε να διαθέτει προεξοχές τροποποιημένης ουριδίνης (U*), ενώ τα γονίδια διέθεταν, μετά το τέλος της PCR, 3'-δεοξυαδενοσίνης (A) προεξοχές, χάρη στη δράση της Hystest DNA πολυμεράσης που προστέθηκε κατά το τελευταίο βήμα υβριδισμού στην PCR .

Τα προϊόντα σύνδεσης, εισήχθησαν μέσω της διαδικασίας του μετασηματισμού (transformation) σε επιδεκτικά κύτταρα *E. coli*, που παρέχονται από το PCR Cloning Kit της Strataclone. Μετά το πέρας της διαδικασίας για να πραγματοποιηθεί ο μετασηματισμός, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB Agar, παρουσία αμπικιλίνης (100mg/ml) τελικής συγκέντρωσης 0,1mg/ml, μιας και ο πλασμιδιακός φορέας pSC-A προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα κύτταρα εκείνα που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο. Επίσης, στο στερεό μέσο ανάπτυξης των κυττάρων, προστέθηκε και X-gal, αφού ο συγκεκριμένος φορέας φέρει το οπερόνιο LacZ, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η επιλογή των αποικιών που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο που περιέχει και το επιθυμητό γονίδιο (blue/white screening). Έτσι, από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν, επιλέχθηκαν οι λευκές έναντι των μπλε, δηλαδή αυτές που είχαν προσλάβει τον πλασμιδιακό φορέα pSC-A με το επιθυμητό γονίδιο (τόσο για το femA, όσο και για το fmhB).

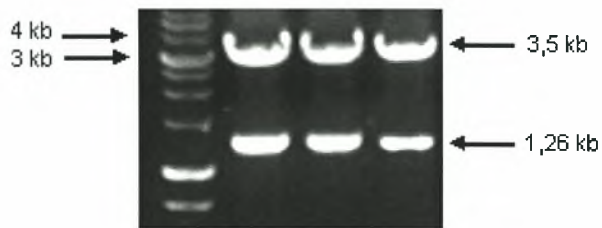
Οι λευκές αποικίες καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth με αμπικιλίνη και στη συνέχεια δημιουργήθηκαν stock γλυκερόλης femA σε pSC-A και fmhB σε pSC-A (700 μl υγρής καλλιέργειας κυττάρων και 300 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 50%), τα οποία αποθηκεύτηκαν προς φύλαξη στους - 80 °C.

Σε ένα επόμενο στάδιο, έλαβε χώρα η καλλιέργεια, σε υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth παρουσία αμπικιλίνης, των ανωτέρω μετασηματισμένων κυττάρων (γονίδιο FemA και FemX σε πλασμιδιακούς φορείς pSC-A) καθώς και κυττάρων *E. coli* που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pET-20b. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation). Τα απομονωθέντα πλασμίδια, επώαστηκαν με ειδικά ένζυμα περιορισμού (με BamHI-XhoI αυτά που έφεραν το femA γονίδιο και με SalI-XhoI αυτά που έφεραν το γονίδιο fmhB). Και οι πλασμιδιακοί φορείς pET-20b, επώαστηκαν τόσο με BamHI-XhoI, όσο και με SalI-XhoI. Η επώαση των πλασμιδίων με τα ένζυμα περιορισμού, έλαβε χώρα στους 37°C για 3ωρες. Το αποτέλεσμα των αντιδράσεων διπλής πέψης, ήταν να προκύψουν γραμμικά τμήματα DNA, που φέρουν ασύζευκτα άκρα. Έτσι, τόσο το γονίδιο femA, όσο και το fmhB, εξήχθησαν από τους pSC-A φορείς τους, μετά από την πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα. Η αντίδραση πέψης του φορέα pET-20b, με τα δυο διαφορετικά ζεύγη περιοριστικών ενζύμων, είχε σαν αποτέλεσμα να προκύψουν γραμμικά τμήματα DNA με ασύζευκτα άκρα, συμπληρωματικά με τα ασύζευκτα άκρα του γονιδίου femA, και γραμμικά τμήματα DNA με ασύζευκτα άκρα, συμπληρωματικά με εκείνα του fmhB. Τη διαδικασία της πέψης διαδέχθηκε η ηλεκτροφορηση των προϊόντων της σε πηκτή αгарόζης 1%. Μετά από έκθεση της πηκτής στο υπεριώδες φως, από την πέψη των pSC-A πλασμιδίων, παρατηρήθηκαν 2 ζώνες, όπως ήταν αναμενόμενο. Εμφανίστηκε μία ζώνη περίπου 3,5kb, η οποία αντιστοιχεί στο μέγεθος του φορέα pSC-A και μία των 1,26 kb που αντιστοιχεί στα υπό μελέτη γονίδια, femA και fmhB (**Εικόνες 24A-B**). Η αντίδραση πέψης του φορέα pET-20b παρουσίασε μία ζώνη στις 3,7 kb, το μέγεθος του γραμμοποιημένου αυτού φορέα (**Εικόνα 25**).

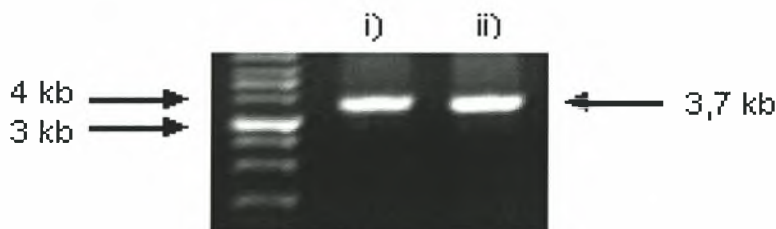
A.



B.



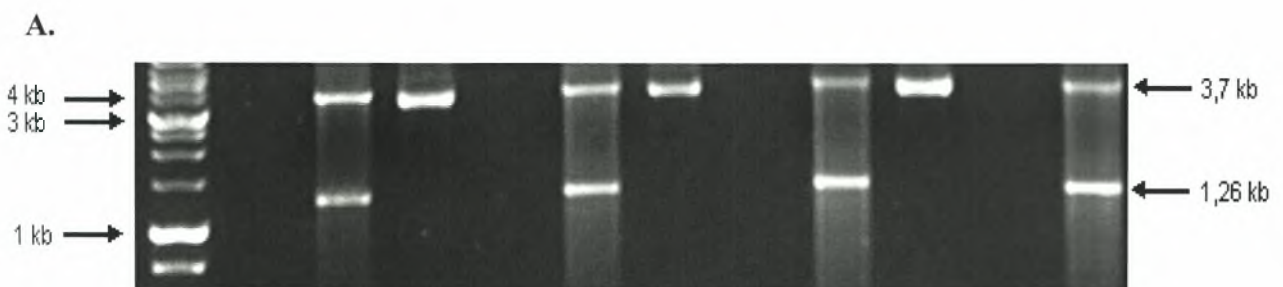
Εικόνα 24: A) Απεικόνιση των τμημάτων που προκύπτουν μετά από την πέψη του πλασμιδιακού φορέα pSC-A που φέρει το γονίδιο για την πρωτεΐνη FemA με τα ένζυμα περιορισμού BamHI-XhoI Στην πρώτη θέση της πηκτής αγαρόζης ηλεκτροφορήθηκε κυκλοποιημένος φορέας pSC-A. B) Απεικόνιση των τμημάτων που προκύπτουν μετά από την πέψη του πλασμιδιακού φορέα pSC-A που φέρει το γονίδιο για την πρωτεΐνη FemX με τα ένζυμα περιορισμού Sall-XhoI. Οι ζώνες μεγέθους 3,5 kb αντιστοιχούν στον γραμμοποιημένο φορέα pSC-A ενώ οι ζώνες μεγέθους 1,26 kb στα γονίδια των FemA και FemX.

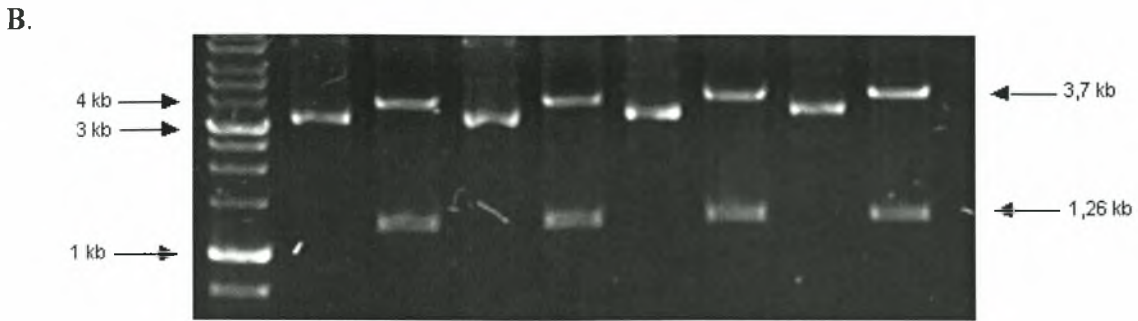


Εικόνα 25: Εικόνα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων του γραμμοποιημένου πλασμιδιακού φορέα pET-20b (3,7 kb), μετά από πέψη του με τα εξής ένζυμα περιορισμού i) BamHI-XhoI ii) Sall-XhoI.

Στην συνέχεια, απομονώθηκαν από το πήκτωμα, τόσο οι ζώνες που αντιστοιχούν στα γονίδια των FemA και FemX, όσο και η ζώνη των 3,7 kb που αντιστοιχεί στο γραμμοποιημένο φορέα pET-20b, σύμφωνα με το πρωτόκολλο Nucleospin Gel Extraction της Macherey-Nagel. Καθένα από τα γονίδια που απομονώθηκαν, συνδέθηκε στο φορέα υπερέκφρασης pET-20b, που είχε υποστεί πέψη με εκείνα τα ένζυμα περιορισμού, ειδικά για το κάθε γονίδιο (BamHI-XhoI για το femA γονίδιο και Sall-XhoI για το fmhB γονίδιο). Η αντίδραση της σύνδεσης (ligation), που πραγματοποιήθηκε O/N στους 16°C με τη βοήθεια της T4 DNA λιγάσης, επετεύχθη εξαιτίας των συμπληρωματικών ασύζευκτων άκρων του φορέα και του γονιδίου λόγω της πέψης τους με κοινά ένζυμα περιορισμού.

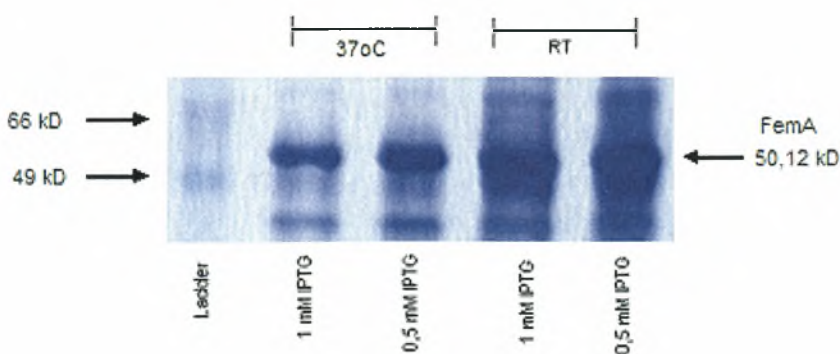
Ακολούθησε, μετασχηματισμός (transformation) των προϊόντων σύνδεσης, δηλαδή του κυκλοποιημένου φορέα pET-20b με το επιθυμητό γονίδιο, σε επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21-DE3, που είχαν παραχθεί με χημική μέθοδο. Αποδείχθηκε όμως πως ο μετασχηματισμός ηλεκτρο-επιδεκτικών BL21-DE3 κυττάρων έδωσε μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας μετασχηματισμού, από αυτών με χημικά- επιδεκτικά κύτταρα. Εκείνα τα μετασχηματισμένα κύτταρα με pET-20b που φέρει το γονίδιο του FemA παράγοντα, και εκείνα με pET-20b που φέρει το γονίδιο του FemX παράγοντα επιστρώθηκαν μετά την ηλεκτροπόρωση, σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB Agar παρουσία αμπικιλίνης, ώστε να αναπτυχθούν μόνο τα κύτταρα εκείνα που έχουν προσλάβει τον φορέα pET-20b. Ο φορέας pET-20b όμως, δεν διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατόν να γνωρίζουμε αν οι αποικίες, που προέκυψαν στα τρυβλία μετά από O/N επώαση τους στους 37°C, φέρουν pET-20b που έχει ενσωματώσει το γονίδιο, ή αν φέρουν pET-20b που έχει κυκλοποιηθεί χωρίς να ενσωματώσει γονίδιο. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις στις αποικίες αυτές. Συγκεκριμένα, έλαβε χώρα η ανακαλλιέργεια των κλώνων αυτών σε υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth παρουσία αμπικιλίνης (100mg/ml) τελικής συγκέντρωσης 0,1mg/ml. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation) και τα απομονωθέντα πλασμίδια υπέστησαν πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού: BamHI -XhoI για τον έλεγχο αποικιών κυττάρων που μετασχηματίστηκαν με ligation pET-20b/femA και Sall-XhoI για τον έλεγχο αποικιών κυττάρων που μετασχηματίστηκαν με ligation pET-20b/ fmhB. Τα προϊόντα πέψης, ως πάντα, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1%. Η κλωνοποίηση των δυο γονιδίων σε φορέα υπερεκφρασης pET-20b αποδείχθηκε επιτυχής, μιας και τόσο οι κλώνοι που έφεραν τον φορέα pET-20b με το γονίδιο του FemA, όσο και οι κλώνοι που έφεραν τον φορέα pET-20b με το γονίδιο του παράγοντα FemX, εμφάνισαν δύο ζώνες στο πήκτωμα μετά την έκθεσή τους σε υπεριώδες φως, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο. Συγκεκριμένα, η μία ζώνη των 1,26 kb αντιστοιχούσε στα υπό μελέτη γονίδια, femA και fmhB και η ζώνη των 3,7kb στο γραμμοποιημένο φορέα pET-20b (Εικόνες 26A-B). Από τις ανακαλλιέργειες των κλώνων, στους οποίους επιβεβαιώθηκε ο επιθυμητός μετασχηματισμός (θετικοί κλώνοι), δημιουργήθηκαν stock γλυκερόλης, με τον τρόπο που ήδη αναφέρθηκε και φυλάχτηκαν στους - 80 °C.





Εικόνα 26: Ηλεκτροφορητικές εικόνες προϊόντων διαγνωστικών πέψεων σε θετικούς κλώνους: **A)** pET-20b/*femA*, πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI-XhoI **B)** pET-20b/*fimhB*, πέψη με τα ένζυμα περιορισμού Sall-XhoI. Η ζώνη των 3,7 kb αντιστοιχεί στο γραμμοποιημένο φορέα pET-20b, ενώ οι ζώνες των 1,26 kb στα γονίδια των FemA (**A**) και FemX (**B**) παραγόντων.

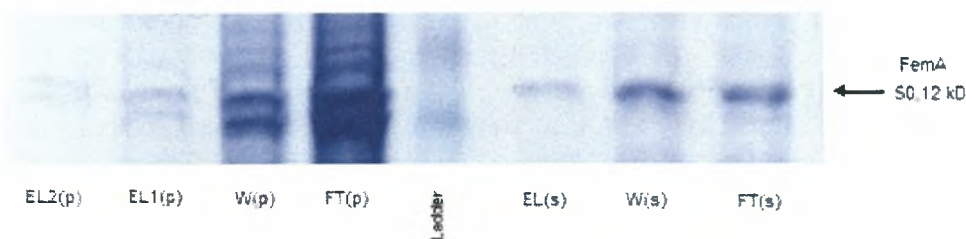
Η υπερέκφραση σε *E. coli* BL21-DE3 κύτταρα και η ανίχνευση της πρωτεΐνης FemA, αποτελεί το τελευταίο και ταυτόχρονα επιβεβαιωτικό πειραματικό μέρος της όλης διαδικασίας κλωνοποίησης του γονιδίου *femA*. Αξίζει να σημειωθεί, πως η υπερέκφραση, η απομόνωση και ο καθαρισμός, πραγματοποιήθηκε μόνο για τον FemA παράγοντα, όχι και για τον FemX. Πριν διεξαχθεί η διαδικασία της υπερέκφρασης, πραγματοποιήθηκε test έκφρασης (expression test), σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (RT) και στους 37 °C, σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (0,5 mM και 1 mM) για κάθε θερμοκρασία, με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας και συγκέντρωσης IPTG για την υπερέκφραση του γονιδίου *femA*. Ακολούθησε ομογενοποίηση των κυττάρων με υπερήχους και διαχωρισμός των πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12% με SDS υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Η εικόνα της πηκτής (**Εικόνα 27**) αποκάλυψε πως οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης του γονιδίου του FemA παράγοντα είναι η θερμοκρασία δωματίου (RT) σε συγκέντρωση IPTG 1 mM.



Εικόνα 27: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12% με SDS των δειγμάτων της δοκιμής έκφρασης της πρωτεΐνης FemA, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (RT), και στους 37 °C σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (0,5 mM και 1 mM) για κάθε θερμοκρασία.

Εφόσον, πραγματοποιήθηκε το expression test και βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για την έκφρασης του *femA* γονιδίου, ακολούθησε η υπερέκφραση του γονιδίου σε αυτές τις συνθήκες, η απομόνωση της πρωτεΐνης στόχου σε στήλη Νικελίου (NTA-Ni) και η ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων που συλλέχθηκαν από τη

στήλη, σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12% με SDS υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Η εικόνα της πηκτής επιβεβαίωσε την επιτυχή υπερέκφραση και απομόνωση της πρωτεΐνης FemA (Εικόνα 28). Η ζώνη των 50,12 kDa αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη FemA (49,124 kDa το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και 1 kDa η His-Tag στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης που προστέθηκε για την απομόνωση της σε στήλη Νικελίου). Το πειραματικό αυτό μέρος ολοκληρώθηκε με τον καθαρισμό, τη συμπύκνωση και την αποθήκευση της πρωτεΐνης στους -20°C παρουσία γλυκερόλης.



Εικόνα 28: Ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων που συλλέχθηκαν κατά την απομόνωση της πρωτεΐνης FemA που υπερέκφράστηκε σε θερμοκρασία δωματίου, και συγκέντρωση IPTG 1mM (EL=elution, W=wash, FT= flow-through, (s)=supernatant, (p)=pellet).

In vivo δοκιμές επί των μεταλλαγμάτων FemA και FemB στον *S. aureus*

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, έγιναν προσπάθειες για *in vivo* μελέτες επί των μεταλλαγμάτων των μη ριβοσωμικών πεπτιδυλ-τρανσφερασών FemA και FemB, σε κυτταρική σειρά *S.aureus* με αυξημένη ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό μεθικιλίνη.

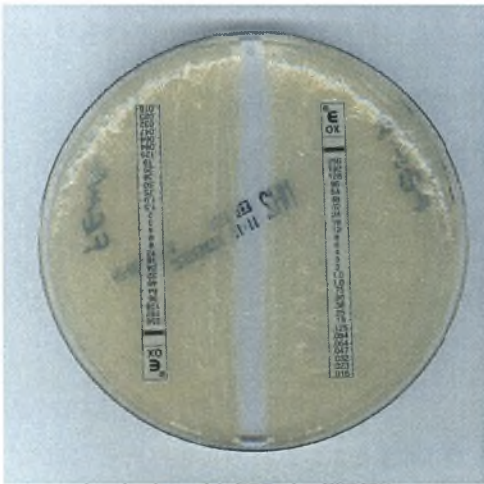
Αρχικά, έλαβε χώρα η καλλιέργεια, σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης LB Broth, παρουσία αμικιλίνης (100mg/ml) τελικής συγκέντρωσης 0,1mg/ml, των στελεχών femA-1326 σε φορέα υπερέκφρασης pET-20b, femB-1326 σε φορέα υπερέκφρασης pET-20b, fmhB-αγρίου τύπου σε φορέα υπερέκφρασης pET-20b, και glyRS-αγρίου τύπου επίσης σε φορέα υπερέκφρασης pET-20b. Τα παραπάνω γονίδια, ενσωματωμένα στο φορέα αυτό, υπήρχαν σε stock γλυκερόλης από προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες. Να σημειωθεί πως τα παραπάνω ανασυνδυασμένα πλασμίδια βρίσκονται σε *E. coli* BL21-DE3 κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκαν τα κλινικά μεταλλαγμένα στελέχη FemAB-1326, μιας και μετά από αλληλούχισή τους εμφάνισαν τις πιο ενδιαφέρουσες μεταλλάξεις. Ο αγρίου τύπου FemX παράγοντας, χρησιμοποιήθηκε σαν control ως προς τους άλλους δυο μεταλλαγμένους FemAB, και η αγρίου τύπου GlyRS, σαν control ως προς τους FemXAB.

Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (*mini preparation*), και περαιτέρω καθαρισμός των πλασμιδίων από ενδεχόμενα υπολείμματα αλάτων, που επηρεάζουν την επιτυχία του μετασχηματισμού με ηλεκτροπόρωση. Ο καθαρισμός έλαβε χώρα με τη χρήση 100% και 70% αιθανόλης.

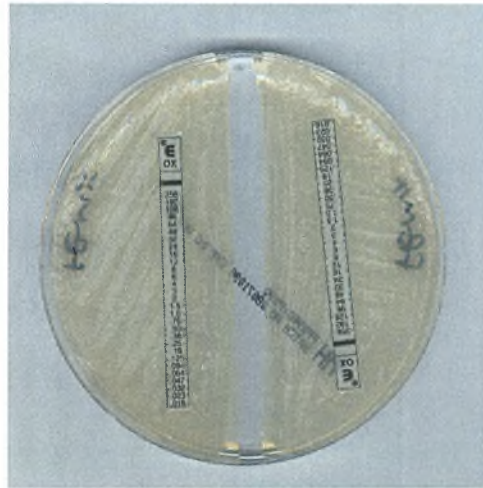
Αφού απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν τα πλασμιδιακά DNA, το επόμενο βήμα ήταν μετασχηματισμός ηλεκτρο-επιδεκτικών κυττάρων *S. aureus* με αυξημένη ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη, με την μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης. 300 μl από τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν επιστρώθηκαν σε τρυβλία στερεού θρεπτικού υποστρώματος Müller-Hinton, παρουσία 100 μl IPTG 0,1M, για να επαχθεί η έκφραση των γονιδίων στα *S. aureus* κύτταρα που μετασχηματίστηκαν. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους 37°C, για 2 ημέρες.

Όταν η ανάπτυξη των κυττάρων στα τρυβλία κρίθηκε επαρκής, διεξήχθη E-test στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Συγκεκριμένα, τα μετασχηματισμένα στελέχη *S. aureus*, υψηλής ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη, αναπτύχθηκαν παρουσία μεθικιλίνης, με σκοπό να αποφανθούμε κατά πόσο οι μεταλλάξεις στους FemA και FemB παράγοντες θα επηρεάσουν την ανθεκτικότητα των στελεχών αυτών παρουσία μεθικιλίνης. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην αναστολή ανάπτυξης των στελεχών που έφεραν τους μεταλλαγμένους παράγοντες FemA και FemB, σε σύγκριση με τα στελέχη που έφεραν τον αγρίου τύπου FemX και την αγρίου τύπου GlyRS, παρουσία αντιβιοτικού (**Εικόνες 29A-B**). Σκοπός ήταν να αποδειχθεί πως στελέχη με φυσιολογική έκφραση του *mecA*, δηλαδή ανθεκτικά στη μεθικιλίνη, που έφεραν όμως μεταλλαγμένο FemA και άλλα το μεταλλαγμένο FemB παράγοντα, θα λύονταν παρουσία μεθικιλίνης. Έτσι, ήταν δυνατόν να αποδειχθεί πως οι Fem παράγοντες επηρεάζουν τα επίπεδα αντίστασης του *S. aureus* στη μεθικιλίνη και μπορούν να αποτελέσουν νέο στόχο αντιβιοτικών. Η μη αναμενόμενη έκβαση του πειράματος, οφείλεται στο φορέα (pET-20b), ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα και κατά πάσα πιθανότητα δεν επιτρέπει την έκφραση των γονιδίων σε κύτταρα *S. aureus*.

A.



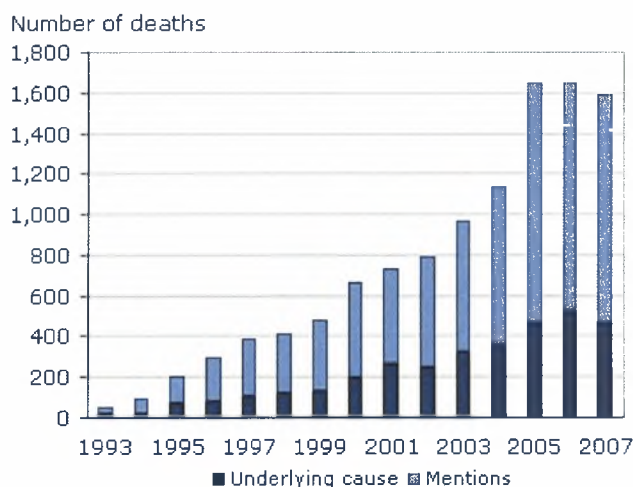
B.



Εικόνα 29: Τρυβλία μετά την διεξαγωγή του E-test. Δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στην αναστολή ανάπτυξης μεταξύ του στελέχους *S. aureus* που έφερε το μεταλλαγμένο παράγοντα FemA (**A**) και εκείνου με τον αγρίου τύπου παράγοντα FemX (**B**), παρουσία μεθικιλίνης.

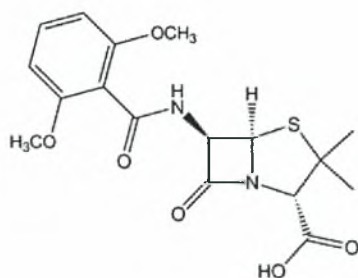
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα επίπεδα ανθεκτικότητας πολλών παθογόνων βακτηρίων στα αντιβιοτικά, σήμερα, είναι ιδιαίτερα ανησυχητικά παγκοσμίως και χρόνο με το χρόνο τα κρούσματα θανάτων από βακτηριακές μολύνσεις αυξάνονται όλο και περισσότερο (Πίνακας 14). Το φαινόμενο αυτό είναι το αποτέλεσμα της εκτεταμένης και πολλές φορές αλόγιστης χρήσης αντιβιοτικών ευρέως φάσματος, τα οποία δεν έχουν την ικανότητα διάκρισης μεταξύ των παθογόνων-στόχων και της μη στοχευόμενης φυσιολογικής χλωρίδας (Neu HC, 1992). Έτσι, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη αναζήτησης και ταυτοποίησης νέων στόχων για την ανάπτυξη αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά θα πρέπει να εμφανίζουν εξειδίκευση για συγκεκριμένους παθογόνους οργανισμούς, ενώ παράλληλα, θα πρέπει να παρουσιάζουν ικανοποιητικούς χρόνους κλινικής δράσης και υψηλό λόγο οφέλους/ρίσκου (Casadevall A, 1996). Τα ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση των γεφυρών διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης αρκετών παθογόνων, αποτελούν, χωρίς αμφιβολία, στόχους για την ανάπτυξη αντιβιοτικών, καθώς οι γέφυρες αυτές : (α) αποτελούν απαραίτητο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος, (β) για τη σύνθεση τους απαιτούνται πολλαπλά ενζυμικά βήματα που μπορούν να δώσουν ισάριθμους εν δυνάμει στόχους αντιβιοτικών, (γ) απαντώνται μόνο σε ένα μικρό ποσοστό των Gram (+) βακτηρίων και ποικίλλουν σε μήκος και σύσταση μεταξύ των ειδών (δ) συντίθενται σε λίγα μόνο Gram (-) βακτήρια συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων σπειροχαιτών, αποκλειόμενων των μη παθογόνων εντεροβακτηρίων της φυσιολογικής μικροχλωρίδας (Ghuysen JM, 1968).



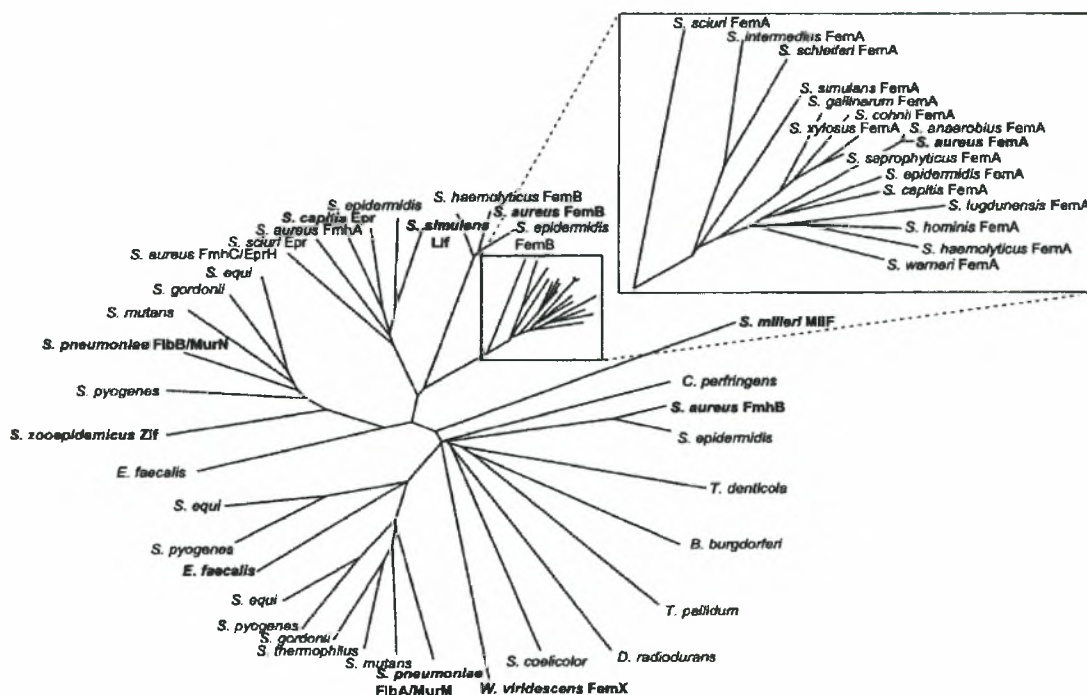
Πίνακας 14: Αριθμός θανάτων που προκλήθηκαν από στελέχη *S. aureus* ανθεκτικά στη μεθικιλίνη την περίοδο 1993-2007.

Μια κατηγορία αντιβιοτικών, που στοχεύουν το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων, είναι οι β-λακτάμες, που διακρίνονται στις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες. Στην τάξη των παραγώγων της πενικιλίνης ανήκει η μεθικιλίνη (Εικόνα 30), ένα αντιβιοτικό που αναπτύχθηκε το 1959 από την φαρμακοβιομηχανία Beecham και έχει απασχολήσει ιδιαίτερα λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών *S. aureus* έναντι αυτού (MRSA). Τα Gram (+) βακτήρια έχουν αναπτύξει δύο βασικές στρατηγικές ενάντια στη δράση των β-λακταμών: i) απενεργοποίηση του αντιβιοτικού με τη δράση β-λακταμασών και ii) εγγενή ανθεκτικότητα που οφείλεται σε τροποποιημένα, χαμηλής συγγένειας ένζυμα, τις PBP's (penicillin-binding-proteins), που αποτελούν τους στόχους των β-λακταμών (Rohrer and Berger-Bächi, 2003).



Εικόνα 30: Χημικός τύπος του αντιβιοτικού μεθικιλίνη, παραγώγου της πενικιλίνης.

Στους νέους στόχους για την ανάπτυξη αντιβιοτικών κατά των παθογόνων Gram (+) βακτηρίων, όπως προαναφέρθηκε, ανήκουν και τα ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Τέτοια ένζυμα είναι και οι FemXAB μη ριβοσωμικές, αμινοάκυλο-tRNA εξαρτώμενες, πεπτιδυλ-τρανσφεράσες, που ήρθαν στο φως στις αρχές της δεκαετίας του 70'. Τα τρία αυτά ένζυμα συμμετέχουν στη δημιουργία των γεφυρών διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης στο *Staphylococcus aureus*. Στη μελέτη των FemXAB παραγόντων, συμπεριλήφθηκαν και πολλαπλές ομοπαράθεσεις μεταξύ των γενωμάτων διαφόρων παθογόνων βακτηρίων, που αποκάλυψαν την ύπαρξη ομόλογων των Fem πρωτεϊνών, ενώ διαπιστώθηκε ότι οι οργανισμοί αυτοί σχηματίζουν γέφυρες διασύνδεσης μεταξύ των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης (Εικόνα 31). Αξίζει να σημειωθεί πως δεν σχηματίζουν όλα τα βακτήρια γέφυρες διασύνδεσης, πέραν από μια υποομάδα Gram(+) βακτηρίων και κάποιων παθογόνων σπειροχαιτών, και οι γέφυρες είναι χαρακτηριστικές για τον κάθε μικροοργανισμό.

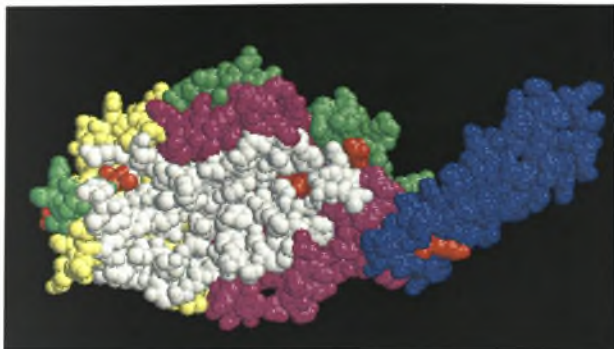


Εικόνα 31: Δενδρόγραμμα της πρωτεϊνικής οικογένειας FemABX. Τα μήκη των κλαδιών είναι ανάλογα της φυλογενετικής απόστασης των οργανισμών.

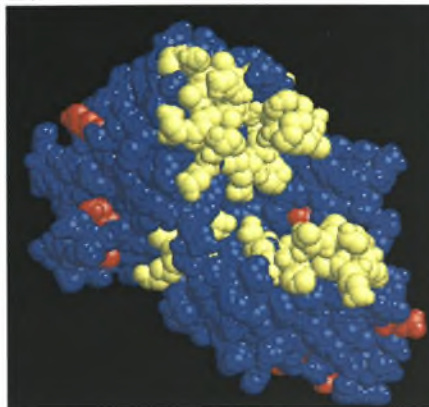
Στον *S. aureus* η γέφυρα διασύνδεσης αποτελείται από πέντε κατάλοιπα γλυκινών, τα οποία προστίθενται διαδοχικά από την κατά σειρά δράση των παραγόντων FemX, FemA και FemB, στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Γενετικές αναλύσεις των γονιδίων των παραγόντων αυτών αποκάλυψαν πως η παρουσία των FemX και FemA είναι ζωτικής σημασίας για το βακτήριο, εν αντιθέσει με αυτή του FemB, ο οποίος παρουσιάζει 40% ταυτότητα και 60% ομοιότητα όσον αφορά την αμινοξική αλληλουχία με τον FemA (Ling B et al., 1998; Henze U et al., 1993).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία κλωνοποιήθηκαν οι FemA και FemX παράγοντες από πέντε νοσοκομειακά στελέχη *S. aureus* χαμηλής ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη. Από την αλληλούχιση των γονιδίων τους και από πολλαπλές ομοπαραθέσεις αποκαλύφθηκε πως οι FemXA παράγοντες από τα στελέχη αυτά φέρουν μεταλλάξεις σε αμινοξέα, που υποπευόμαστε ότι επηρεάζουν τη δραστηριότητα των εν λόγω ενζύμων και κατ' επέκταση το βαθμό ανθεκτικότητας του βακτηρίου. Όσον αφορά τον FemA, τα μεταλλαγμένα στελέχη, χαμηλής ευαισθησίας στη μεθικιλίνη, παρουσίασαν κάποιες αμινοξικές αντικαταστάσεις σε σύγκριση με τον αγρίου τύπου FemA παράγοντα από στέλεχος *S. aureus* ανθεκτικό στην μεθικιλίνη (**Εικόνα 32A**): στην θέση 210 η ασπαραγίνη αντικαθιστά το ασπαραγινικό, στην θέση 216 η θρεονίνη αντικαθιστά την αλανίνη, στην θέση 234 το ασπαραγινικό αντικαθιστά το γλουταμινικό, στην θέση 346 η προλίνη την γλουταμίνη, στην θέση 361 η φαινυλαλανίνη την τυροσίνη, στην θέση 398 η φαινυλαλανίνη και η γλυκίνη σε διαφορετικά στελέχη αντικαθιστούν την ισολευκίνη. Οι παραπάνω αντικαταστάσεις αναφέρονται ως οι πιο σημαντικές αφού εντοπίζονται στο domain 1B, δηλαδή την περιοχή δέσμευσης του λιπιδιακού εξαπεπτιδικού δισακχαρίτη (λιπίδιο II-Gly₁). Υπάρχει περίπτωση οι μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή να δυσχεραίνουν την δέσμευση του υποστρώματος αυτού, γεγονός που μπορεί να επηρεάζει τελικά την ενεργότητα του ενζύμου και κατ' επέκταση την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος και την βιωσιμότητα του βακτηρίου. Στην περίπτωση του FemX, μετά από αλληλουχίσεις και ομοπαραθέσεις μεταξύ μεταλλαγμάτων του FemX παράγοντα από στελέχη *S. aureus* χαμηλής ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη και αγρίου τύπου FemX από στέλεχος *S. aureus* ανθεκτικό στην μεθικιλίνη, (**Εικόνα 32B**) εντοπίστηκαν οι εξής σημαντικές μεταλλάξεις: στην θέση 11 η ασπαραγίνη αντικαθιστά την ιστιδίνη, στην θέση 18 η ιστιδίνη αντικαθιστά την ασπαραγίνη, στην θέση 51 η βαλίνη την ισολευκίνη και στην θέση 184 η φαινυλαλανίνη την σερίνη. Θεωρούνται ως οι πιο σημαντικές μιας και οι τρεις πρώτες που προαναφέρθηκαν (11, 18 και 51) εντοπίζονται στο domain 1 (σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του FemX που αποκαλύφθηκε στο *W. viridescens*), δηλαδή στην περιοχή δέσμευσης του λιπιδίου II, του ενός υποστρώματος του FemX. Η μετάλλαξη στη θέση 184 εντοπίζεται στο domain 2, δηλαδή στην περιοχή δέσμευσης των αμινοακυλιωμένων tRNA^{Ala} (στο *W. Viridescens*). Οι μεταλλάξεις αυτές είναι πολύ πιθανό να επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου και την αλληλεπίδραση του κάθε παράγοντα με τους άλλους Fem. και από τη στιγμή που η αντίδραση που καταλύει ο FemX θεωρείται το βήμα ζωτικής σημασίας στη δημιουργία της πενταγλυκινικής γέφυρας, πολύ πιθανό να ευθύνονται και για την αυξημένη ευαισθησία των εν λόγω στελεχών στη μεθικιλίνη.

A.



B.



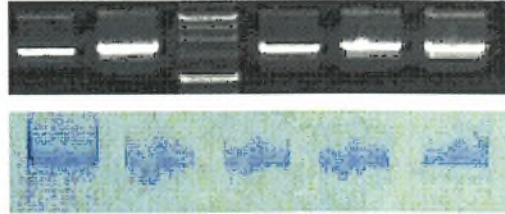
Εικόνα 32: Κρυσταλλικές δομές μεταλλαγμάτων των FemA (A) και FemX (B) παραγόντων, που κατασκευάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος RASMOL. Οι μεταλλάξεις είναι χρωματισμένες με κόκκινο και εντοπίζονται κυρίως στις περιοχές δέσμευσης των υποστρωμάτων λιπίδιοII-Gly₁ και λιπίδιο II, αντίστοιχα. (Giannouli, Labrou, Kyritsis, Ikonomidis, Maniatis, Stathopoulos, Pournaras (2008) Antimicrob. Agents Chem. Submitted)

Στα πλαίσια της διπλωματικής αυτής εργασίας, πραγματοποιήθηκε επιπλέον υπερέκφραση, απομόνωση και καθαρισμός της FemA μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, με σκοπό την *in vivo* ταυτοποίηση της συνεισφοράς των μεταλλάξεων στον φαινότυπο ευαισθησίας στη μεθικιλίνη, μετά από τη χρήση της για μετασχηματισμό στελεχών *S. aureus* ανθεκτικά στη μεθικιλίνη. Παρά την μη αναμενόμενη έκβαση του πειραματικού αυτού μέρους, είναι σίγουρο πως οι FemXAB μπορούν να αποτελέσουν κατάλληλους στόχους για την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων. Ένας πιθανός αναστολέας των FemXAB θα αποτελούσε έναν υψηλής εξειδίκευσης και αποτελεσματικότητας αντιμικροβιακό παράγοντα, για τους οργανισμούς στους οποίους οι γέφυρες διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τους τοίχωμα είναι ζωτικής σημασίας (Kopp U et al., 1996).

Σήμερα, το γεγονός ότι είναι διαθέσιμα τόσο οι FemA και FemX, όσο και η GlyRS και μόρια tRNA^{Gly} από το βακτήριο *S. aureus*, έχει γίνει ένα βήμα προκειμένου να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις αυτών των μορίων με άλλους πιθανούς παράγοντες στα πλαίσια της μεταφοράς της γλυκίνης στο κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου. Η GlyRS, ένα κλασσικό παράδειγμα του εναλλακτικού ρόλου των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών στα βιολογικά συστήματα με μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των οργανισμών, ανήκει στην τάξη II των συνθετασών και πέραν του ρόλου της στην πρωτεϊνοσύνθεση συμμετέχει και στην σύνθεση των γεφυρών πενταγλυκίνης του *S. aureus*. Συγκεκριμένα, παράγει τα απαραίτητα υποστρώματα για τις δύο αυτές διεργασίες, δηλαδή τα μόρια tRNA^{Gly}.

Στο *S. aureus*, ήταν γνωστά μέχρι σήμερα 4 ισοδεκτικά tRNA^{Gly} μόρια, με όλα να αμινοακυλιώνονται, όπως είδαμε, από μία μοναδική GlyRS. Λειτουργικές γονιδιωματικές αναλύσεις όμως αποκάλυψαν την ύπαρξη και ενός πέμπτου υποθετικού γονιδίου tRNA^{Gly} (αναφέρεται ως ψευδογονίδιο tRNA) που αποδείχθηκε πως εκφράζεται και μάλιστα κωδικοποιεί για ένα πλήρους μήκους, ισοδεκτικό tRNA^{Gly} μόριο με αντικωδικόνιο TCC (Kuroda et al, 2001). Στα πλαίσια της προσπάθειας για αποσαφήνιση του μηχανισμού της tRNA-εξαρτώμενης σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος στον *S. aureus*, κλωνοποιήθηκαν στο εργαστήριο και τα

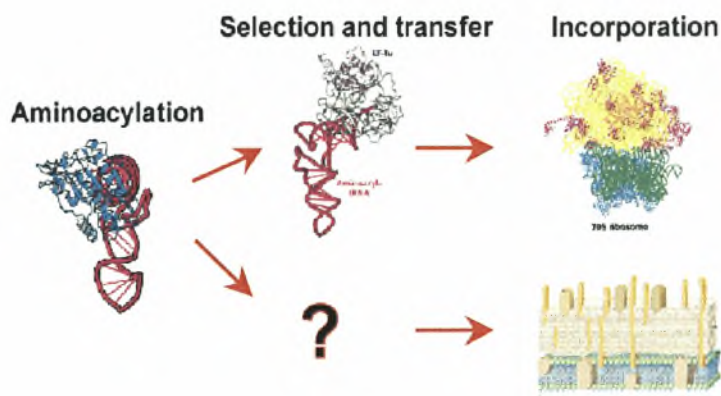
5 tRNA^{Gly} γονίδια με την μέθοδο του cassette-cloning και ακολούθησε *in vitro* μεταγραφή (με τη βοήθεια της T7 πολυμεράσης), καθαρισμός και απομόνωση των μεταγράφων (Εικόνα 33). Όλα τα μετάγραφα δοκιμάστηκαν για ικανότητα υποδοχής γλυκίνης και αποδείχτηκαν κατάλληλα υποστρώματα για την σταφυλοκοκκική GlyRS.



Εικόνα 33: Στην επάνω εικόνα έχουμε τα 5 ταυτοποιημένα tRNA^{Gly} γονίδια του *S. aureus* μετά την ενίσχυσή τους με PCR και στην κάτω το αποτέλεσμα της *in vitro* μεταγραφής τους.

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

- Η ταυτοποίηση των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} που συμμετέχουν ως δότες γλυκίνης για την σύνθεση των απαραίτητων πενταπεπτιδίων γλυκίνης.
- Η ταυτοποίηση των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} που συμμετέχουν ως δότες γλυκίνης για την ριβοσωμική πρωτεϊνοσύνθεση.
- Ο προσδιορισμός των δομικών στοιχείων που επιτρέπουν την διάκριση από τον παράγοντα EF-Tu (ευθύνεται για την μεταφορά αμινοακυλιωμένων μορίων tRNA ως υποστρώματα της πρωτεϊνοσύνθεσης στο ριβόσωμα) των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} σε πρωτεϊνογενετικά ή μη. Συγκεκριμένα, τα μόρια που δεσμεύονται ασθενώς με τον EF-Tu θέτουν υποψηφιότητα για αποκλειστικοί δότες γλυκίνης στο κυτταρικό τοίχωμα (Εικόνα 34).
- Ο έλεγχος έκφρασης του πέμπτου υποθετικού γονιδίου tRNA^{Gly} και ο πιθανός λειτουργικός του ρόλος στην σύνθεση των πενταπεπτιδίων γλυκίνης.



Εικόνα 34: Πιθανές πορείες των tRNA^{gly} μορίων μετά την αμινοακυλίωσή τους.

- Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός του άγνωστου μέχρι σήμερα μεταφορέα των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} που συμμετέχουν ως δότες γλυκίνης για την σύνθεση των απαραίτητων πενταπεπτιδίων γλυκίνης. Μια συντηρημένη οικογένεια βακτηριακών GTPασών με άγνωστο λειτουργικό ρόλο πιθανότατα περικλείει τον άγνωστο μεταφορέα. Για το λόγο αυτό θα επικεντρωθούμε στην κλωνοποίηση, την υπερέκφραση και τις πιθανές αλληλεπιδράσεις των συγκεκριμένων GTPασών με τα tRNA^{Gly} μόρια του *S. aureus* και κυρίως θα εστιάσουμε σε ένα μέλος αυτής της ομάδας που παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τον EF-Tu. Πρόσφατα μάλιστα αποκαλύφθηκε πως ένα μέλος της οικογένειας αυτής συμμετέχει στη συγκρότηση της 50S υπομονάδας στο *S. subtilis*. Η ταυτοποίηση του άγνωστου μεταφορέα tRNA θα αποκαλύψει ένα ακόμη σημαντικό στόχο για μελλοντικά καινοτόμα και εξειδικευμένα αντιβιοτικά φάρμακα.
- Η μελέτη αναστολής όλων των παραπάνω παραγόντων που εμπλέκονται στην αμινοακυλίωση, μεταφορά και χρήση των Gly-tRNA^{Gly} μορίων στη σύνθεση των πενταπεπτιδίων γλυκίνης, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πολλαπλή ομοπαράθεση του παράγοντα FemA από κλινικά στελέχη S. aureus.

#FemA_S_aureus_MRSA252	MKFTNLTAKE	FGAFTDSMPY	SHFTQTVGHY	ELKLAEGYET	HLVGIKNNNN	[50]
#FemA_1326	[50]
#FemA_4666	[50]
#FemA_1306	[50]
#FemA_1552	[50]
#FemA_6083	[50]
#FemA_S_aureus_MRSA252	EVIAACLLTA	VFVMKVKFYF	YSNRGPVIDY	ENQELVHFFF	NELSKYVKKH	[100]
#FemA_1326	[100]
#FemA_4666	[100]
#FemA_1306	[100]
#FemA_1552	[100]
#FemA_6083	[100]
#FemA_S_aureus_MRSA252	RCLYLHIDPY	LPYQYLNHDG	EITGNAGNDW	FFDKMSNLGF	EHTGFHKGFD	[150]
#FemA_1326	[150]
#FemA_4666	[150]
#FemA_1306	[150]
#FemA_1552	[150]
#FemA_6083	[150]
#FemA_S_aureus_MRSA252	FVLQIRYHSV	LDLKDKTADD	IIKNMDGLRK	RNTKKVKKNG	VKVRYLSEEE	[200]
#FemA_1326	[200]
#FemA_4666	[200]
#FemA_1306	[200]
#FemA_1552T.....	[200]
#FemA_6083	[200]
#FemA_S_aureus_MRSA252	LPFRSFMED	TSESKAFADR	DDKIFYNRLK	YYKERVIVPL	AYINFDEYIK	[250]
#FemA_1326N.....T.....D.....V...	[250]
#FemA_4666	[250]
#FemA_1306D.....	[250]
#FemA_1552D.....	[250]
#FemA_6083D.....	[250]
#FemA_S_aureus_MRSA252	ELNBERDILN	KDLNKALKDI	EKRPEKKAH	NKRDNLQQQL	DANSQKIEEG	[300]
#FemA_1326	[300]
#FemA_4666	[300]
#FemA_1306	[300]
#FemA_1552	[300]
#FemA_6083	[300]
#FemA_S_aureus_MRSA252	KRLQBEHGNE	LPISAGFFFI	NPFEVVYYAG	GTSNAFRHFA	GSYAVQWEMI	[350]
#FemA_1326	R.....	[350]
#FemA_4666P...	[350]
#FemA_1306	[350]
#FemA_1552	[350]
#FemA_6083	[350]
#FemA_S_aureus_MRSA252	NYALNHGIDR	YNFYGVSGKF	TEDAEDAGVV	KFKKGYNAEI	IEYVGDFIKP	[400]
#FemA_1326	[400]
#FemA_4666	F.....F..	[400]
#FemA_1306	[400]
#FemA_1552	[400]
#FemA_6083G..	[400]
#FemA_S_aureus_MRSA252	INKPVYAAAYT	ALKKVKDRIF	-----	--	[432]	
#FemA_1326L.....	-----	--	[432]	
#FemA_4666	.K.....	-----	--	[432]	
#FemA_1306	-----	--	[432]	
#FemA_1552L.....	-----	--	[432]	
#FemA_6083	-----	--	[432]	

Πολλαπλή ομοπαράθεση του παράγοντα *FemX* από κλινικά στελέχη *S. aureus*.

#FEMX_MRSA	MEKMHITNQE	HDAFVKSNNP	GDLLQLTKWA	ETKKLTGWYA	RRIAVGRDGE	[50]
#FEMX_1326	N.....H..	[50]
#FEMX_4666	N.....H..	[50]
#FEMX_1306	..R.....	N.....H..	[50]
#FEMX_1552	N.....H..	[50]
#FEMX_6083	[50]
#FEMX_MRSA	IQGVAQLLFK	KVPKLPYTLG	YISRGFVVVDY	SNKEALNALL	DSAKEIAKAE	[100]
#FEMX_1326	V.....	[100]
#FEMX_4666	V.....	[100]
#FEMX_1306	V.....	[100]
#FEMX_1552	V.....	[100]
#FEMX_6083	V.....	[100]
#FEMX_MRSA	KAYAIIKIDPD	VEVDKGTDAL	QNLKALGFKH	KGFKEGLSKD	YIQPRMTMIT	[150]
#FEMX_1326	[150]
#FEMX_4666	[150]
#FEMX_1306	[150]
#FEMX_1552	[150]
#FEMX_6083	[150]
#FEMX_MRSA	PIDKNDDELL	NSFERRNRSK	VRLALKRGTT	VERSDREGLK	TFAELMKITG	[200]
#FEMX_1326F.....	[200]
#FEMX_4666F.....	[200]
#FEMX_1306	[200]
#FEMX_1552F.....	[200]
#FEMX_6083	[200]
#FEMX_MRSA	ERDGFLLTRDI	SYFENIYDAL	HEDGDAELFL	VKLDPKENIA	KVNQELNELH	[250]
#FEMX_1326	[250]
#FEMX_4666	[250]
#FEMX_1306	[250]
#FEMX_1552	[250]
#FEMX_6083	[250]
#FEMX_MRSA	AEIAKWQQKM	ETSEKQAKKA	QNMINDAQNK	IAKNEDLKRK	LEALEKEHFE	[300]
#FEMX_1326F.....	[300]
#FEMX_4666F.....	[300]
#FEMX_1306	[300]
#FEMX_1552	[300]
#FEMX_6083	[300]
#FEMX_MRSA	GIYLSGALLM	FAGSKSYLY	GASSNEFRDF	LPNHHMQYTM	MKYAREHGAT	[350]
#FEMX_1326F.....	[350]
#FEMX_4666F.....	[350]
#FEMX_1306	[350]
#FEMX_1552	[350]
#FEMX_6083	[350]
#FEMX_MRSA	TYDFGGTDND	PKDSEHYGL	WAFKKVWGTY	LSEKIGFDY	VLNQPLYQLI	[400]
#FEMX_1326	[400]
#FEMX_4666	[400]
#FEMX_1306	[400]
#FEMX_1552	[400]
#FEMX_6083	[400]
#FEMX_MRSA	EQVKPRLTKA	KIKISEKLRK	K			[421]
#FEMX_1326			[421]
#FEMX_4666			[421]
#FEMX_1306			[421]
#FEMX_1552			[421]
#FEMX_6083			[421]

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arbeloa A, Hugonnet JE, Sentilhes AC, Josseaume N, Dubost L, Monsempes C, Blanot D, Brouard JP, Arthur M (2004) Synthesis of Mosaic Peptidoglycan Cross-bridges by Hybrid Peptidoglycan Assembly Pathways in Gram-positive Bacteria. *J. Biol. Chem.* **279**.
- Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K and Hiramatsu K (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* **359**:1819–1827.
- Benson TE, Prince DB, Mutchler VT, Curry KA, Ho AM, Sarver RW, Hadagon JC, Choi GH and Garlick RL (2002) *Structure* **10**: 1107-1115.
- Berger-Bächli B, Barberis-Maino BL, Strassle A and Kayser FH (1989) *Mol. Gen. Genet.* **219**: 263–269.
- Berger-Bächli B, Strassle A, Gustafson JE and Kayser FH (1992) Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36** : 1367-1373.
- Berger-Bächli B and Tschierske M (1998) Role of Fem factors in methicillin resistance. *Drug Resistance Updates* **1**: 325-335.
- Biarrotte-Sorin S, Maillard AP, Delettre J, Sougakoff W, Arthur M and Mayer C (2004) Crystal structures of *Weissella viridescens* FemX and its complex with UDP-MurNAc-pentapeptide: insights into FemABX family substrates recognition. *Structure* **12**: 257-267.
- Bumsted RM, Dahl JL, Soll D and Strominger JL (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. X. Further study of the glycyl transfer ribonucleic acids active in peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **243**: 779-782.
- de Lencastre H, Figueredo AMS, Tomasz A (1993) Genetic control of population structure in heterogeneous strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **12**: 13-18.
- de Lencastre H and Tomasz A (1994) Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* **38**:2590–2598.
- de Lencastre H, Wu SW, Pinho MG, Ludovice AM, Filipe S, Gardete S, Sobral R, Gill S, Chung M, Tomasz A (1999) Antibiotic resistance as a stress response: Complete sequencing of a large number of chromosomal loci in *Staphylococcus aureus* strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin. *Microb Drug Res* **5**: 163-175.
- Dove SL, Joung JK & Hochschild A (1997) Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein–protein contacts. *Nature* **386**: 627–630.
- Duran SP, Kayser FH, Berger-Bächli B (1996) Impact of *sar* and *agr* on methicillin resistant in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **141**: 255-260.
- Ehlert K, Tschierske M, Mori C, Schroder W & Berger-Bächli B (2000) Site-specific serine incorporation by Lif and Epr into positions 3 and 5 of the staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge. *J Bacteriol* **182**: 2635–2638.
- Friedman L, Alder JD, Silverman JA (2006) Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2137-2145.

- Ghuysen JM, and Hakenbeck R (ed.) (1994) Bacterial cell wall. *Elsevier Science BV*, Amsterdam, The Netherlands.
- Ghuysen JM (1997) Penicillin-binding proteins. Wall peptidoglycan assembly and resistance to penicillin: facts, doubts and hopes *Int. J. Antimicrob. Agents* **8**:45–60.
- Goffin C, Ghuysen JM (1998) Multimodular penicillin binding proteins: An enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Molec Biol.* **62**: 1079-1093.
- Hegde SS and Shrader TE (2001) FemABX family members are novel nonribosomal peptidyltransferases and important pathogen-specific drug targets. *J Biol Chem* **276**: 6998–7003.
- Henze U, Sidow T, Wecke J, Labischinski H and Berger-Bächi B (1993) Influence of femB on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **175**: 1612_1620.
- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M and Ito T (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **9**:486–493.
- Ibba M, Curnow AW & Soell D (1997) Aminoacyl-tRNA synthetases: Different routes to a common goal. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 39-42.
- Karimova G, Pidoux J, Ullmann A & Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5752–5756.
- Kuroda M, et al. (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**: 1218-1219.
- Lazar K and Walker S (2002) Substrate analogues to study cell-wall biosynthesis and its inhibition. *J Biol Chem* **6**: 786-793.
- Ling B and Berger-Bächi B (1998) Increased overall antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus* femAB null mutants. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 936–938.
- Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS and Hiramatsu K (2002) Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1147–1152.
- Martinis SA, Plateau P, Cavarelli J & Florentz C (1999) Aminoacyl-tRNA synthetases: A family of expanding functions. *EMBO J.* **18**: 4591-4596.
- Matthews PR, Stewart PR (1984) Resistance heterogeneity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **22**: 161-166.
- Midhof H, Reinicke B, Blumel P, Berger-Bächi, B and Labischinski H (1991) femA, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* **173**: 3507–3513.
- Pinho MG, Filipe SR, de Lencastre H, and Tomasz A (2001) Complementation of the essential peptidoglycan transeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**: 6525-6531.
- Plapp R, and Strominger JL (1970) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XVII. Biosynthesis of peptidoglycan and of interpeptide bridges in *Lactobacillus viridescens*. *J. Biol. Chem.* **245**: 3667-3674.
- Reynolds PE and Fuller C (1986) Methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus*; presence of identical additional penicillin-binding protein in all strains examined. *FEMS Microbiol. Lett.* **33**: 251-254.

- Robinson JM, Hardman JK and Sloan GL (1979) Relationship between lysostaphin endopeptidase production and cell wall composition in *Staphylococcus staphylolyticus*. *J. Bacteriol.* **137**:1158–1164.
- Rogers HJ, Perkins HR, Ward JB (1980) *Biosynthesis of Peptidoglycan*, Chapman and Hall, Ltd: London.
- Rohrer S, Ehlert K, Tschierske M, Labischinski H and Berger-Bächi, B (1999) The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9351–9356.
- Rohrer S and Berger-Bächi B (2003). Application of a bacterial two-hybrid system for the analysis of protein-protein interactions between FemABX family proteins. *Microbiology* **149**: 2733–2738.
- Rohrer S, and Berger-Bächi B (2003a) FemABX peptidyltransferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 837–846.
- Roos M, Pittenauer E, Schmid E, Beyer M, Reinike B, Allmaier G and Labischinski H (1998) Improved high-performance liquid chromatographic separation of peptidoglycan isolated from various *Staphylococcus aureus* strains for mass spectrometric characterization. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **705**: 183-192.
- Roy H, Ibba M (2008) RNA-dependent lipid remodeling by bacterial multiple peptide resistance factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 215-218.
- Ryffel C, Strassle A, Kayser FH, and Berger-Bächi B (1994) Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38(4)**: 724-728.
- Schleifer KH (1973) Chemical composition of staphylococcal cell walls. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **1**: 13-23.
- Schneider T, Senn MM, Berger- Bächi B, Tossi A, Sahl HG & Wiedemann I (2004) In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* **53(2)**: 675-85.
- Sissler M, Delorme C, Bond J, Ehrlich D, Renault P & Franclyn C (1999) An aminoacyl-tRNA synthetase paralog with a catalytic core in histidine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 8995-8990.
- Somner EA and Reynolds PE (1990) Inhibition of peptidoglycan biosynthesis by ramnoplanin. *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 413-419.
- Song MD, Wachi M, Doi M, Ishino F and Matsuhashi M (1987) Evolution of an inducible penicillin-target protein of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett.* **221**, 167-171.
- Stranden AM, Ehlert K, Labischinski H and Berger-Bächi B (1997) Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a *femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **179**: 9–16.
- Thumm G and Goëtz F (1997) Studies on prolystaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Mol. Microbiol.* **23**: 1251-1265.
- Tomasz A (1986) Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of beta-lactam antibiotics. *Rev. Infect. Dis.* **8** (Suppl. 3):S260–S278.
- Tschierske M, Ehlert K, Stranden AM and Berger-Bächi B (1997) Lif, the lysostaphin immunity factor, complements FemB in staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge formation. *FEMS Microbiol Lett* **153**:261–264.

- Tschierske M, Mori C, Rohrer S, Ehlert K, Shaw KJ and Berger-Bächi B (1999) Identification of three additional femAB-like open reading frames in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **171**: 97–102.
- Utsusi Y and Yokota T (1985) Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**: 397-403.
- VanNieuwenhze MS, Mauldin SC, Zia-Ebrahimi M, Winger BE, Hornback WJ, Saha SL, Aikins JA, Blaszcak LC (2002) The first total synthesis of lipid II: the final monomeric intermediate in bacterial cell wall biosynthesis. *J Am Chem Soc* **124**: 3656-3660.
- Weidenmaier C, et al. (2005) DltABCD- and Mprf-mediated cell envelope modifications of *Staphylococcus aureus* confer resistance to platelet microbicidal proteins and contribute to virulence in a rabbit endocarditis model. *Infect Immun* **73**:8033-8038.

