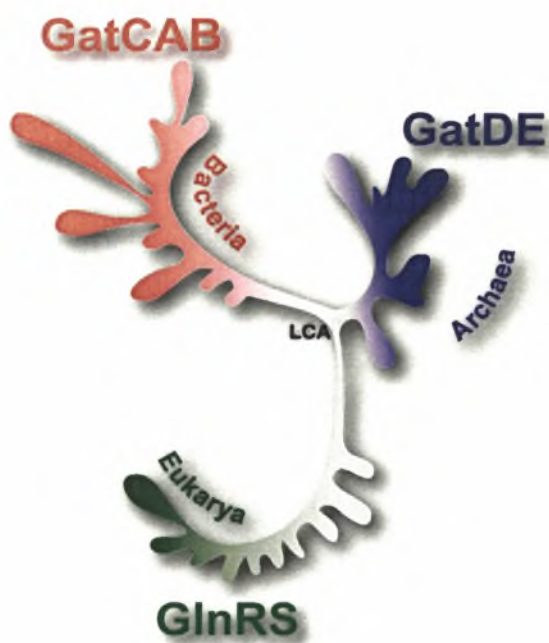




FGG.
7-10-05

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ
Glu-ΑΜΙΔΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ GATDE ΑΠΟ ΤΟ ΑΡΧΑΙΟ
Pyrococcus abyssi



ΜΑΡΙΑ ΘΑΝΑΣΟΥΛΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4666/1
Ημερ. Εισ.: 3-11-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΘΑΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087865

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Παναγιώτης Μαρκουλάτος Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Δρ. Νικόλαος Μπαλατσός

Ευχαριστίες:

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	23
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
3.1 ΥΛΙΚΑ	25
3.1.1. Χημικές ουσίες	25
3.1.2. Κύτταρα	26
3.1.3. Θρεπτικά μέσα	26
3.1.4. Ρυθμιστικά διαλύματα	27
3.1.5. Πλασμιδιακοί φορείς	28
3.1.6. Εκκινητές (primers)	33
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	34
3.2.1. Μεταφορά των πλασμιδιακών φορέων σε κύτταρα <i>E.coli</i>	34
3.2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)	35
3.2.3. Διαχωρισμός και ανίχνευση του DNA	36
3.2.4. Καθαρισμός τμημάτων DNA από gel αгарόζης	36
3.3. ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	37
3.3.1. Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού	37
3.3.2. Σύνδεση τμημάτων DNA	38
3.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	39
3.4. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GATDE	39
3.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GATDE	40
3.5.1. Ομογενοποίηση των κυττάρων	40
3.5.2. Επεξεργασία του κυτταρικού εκχυλίσματος με θέρμανση - Απομόνωση της πρωτεΐνης GatDE	40
3.5.3. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα πεδίο στο οποίο η σύγκριση μεταξύ των τριών βασιλείων των οργανισμών, αρχαία, βακτήρια και ευκαρυώτες, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι οι μηχανισμοί της αμινοακυλίωσης των tRNAs. Η αμινοακυλίωση αποτελεί μια σημαντική κυτταρική διαδικασία κατά την οποία, φυσιολογικά, πραγματοποιείται η σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNAs από τα ένζυμα αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (AARSs). Ωστόσο, πολυάριθμες μελέτες έχουν αποκαλύψει μεγάλη διαφοροποίηση και ποικιλομορφία όσον αφορά τους μηχανισμούς αμινοακυλίωσης ανάμεσα στους διαφορετικούς οργανισμούς. Παράδειγμα αποτελεί η ύπαρξη έμμεσων μονοπατιών αμινοακυλίωσης σε ορισμένους οργανισμούς, τα οποία διεξάγονται με τη βοήθεια των ενζύμων tRNA-εξαρτώμενων αμιδοτρανσφερασών (AdTs). Η αμιδοτρανσφεράση που συναντάται σε αρκετά βακτήρια και αρχαία, είναι η GatCAB, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln}. Επίσης, έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη μιας δεύτερης αμιδοτρανσφεράσης η οποία εντοπίζεται αποκλειστικά στα αρχαία και εμπλέκεται στη σύνθεση Gln-tRNA^{Gln}, η λεγόμενη GatDE. Έχει παρατηρηθεί μεγάλο ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας και της λειτουργίας ανάμεσα στις υπομονάδες των δύο αμιδοτρανσφερασών. Επομένως, είναι εύλογη η υπόθεση ότι η μελέτη του ενός ενζύμου μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες και για το άλλο. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση των δύο γονιδίων της GatDE και η δημιουργία ενός οπερονίου, το οποίο αποτελείται από τα δύο επιμέρους γονίδια. Ακολούθησε η μεταφορά του οπερονίου σε στελέχη *E. coli*, ενώ επιπλέον, διεξήχθη υπερέκφραση και απομόνωση ολόκληρου του ενζύμου GatDE.

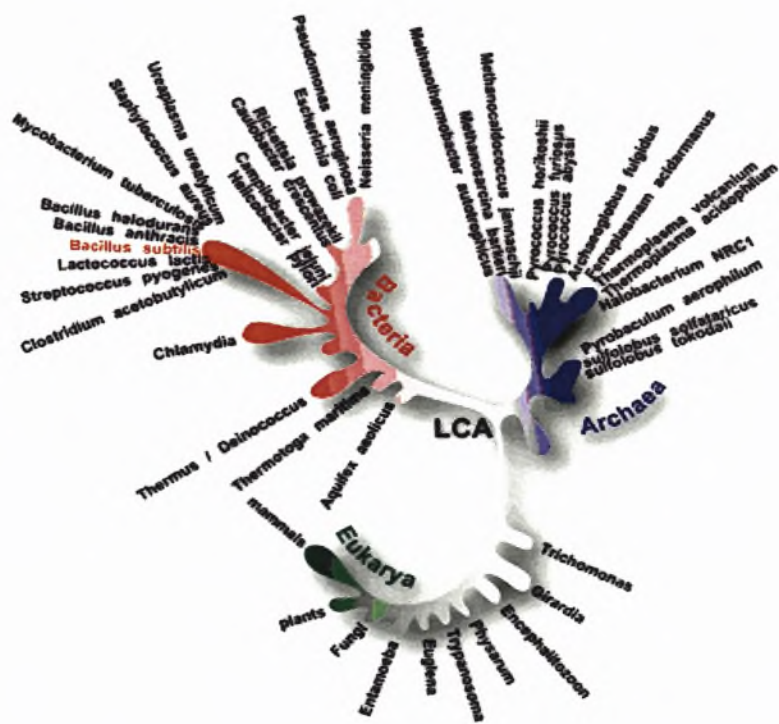
ABSTRACT

A field in which the comparison between the three kingdoms of organisms, archaea, bacteria and eukaryotes, is especially interesting is the mechanism of tRNA aminoacylation. Aminoacylation is an important cellular process during which the synthesis of aminoacyl-tRNA molecules is performed by the enzymes, aminoacyl-tRNA synthetases. However, several studies have revealed a great amount of variety between the mechanisms of aminoacylation taking place in the different organisms. Such an example is the existence of indirect routes of aminoacylation in some organisms, which depend on the activity of the enzymes tRNA-dependent amidotransferases (AdTs). The amidotransferase found in many bacteria and archaea, is GatCAB, which is responsible for the synthesis of Asn-tRNA^{Asn} και Gln-

tRNA^{Gln}. Moreover, the existence of a second amidotranferase exclusively in archaea, has been confirmed. It is called GatDE and it takes part in the synthesis of Gln-tRNA^{Gln}. It has been found that there is a great percentage of similarity between the sequence and the function of the subunits consisting the two amidotransferases. Therefore, it is possible that the study of one of the two enzymes will offer a great deal of information concerning the other. Goal of the present study is the cloning of the two genes encoding GatDE from the archeon *Pyrococcus abyssi*, the production of an operon consisted of these two genes and its subsequent transfer to *E. coli* strains. Finnally, the over-expression and the isolation of the complete protein GatDE was also performed.

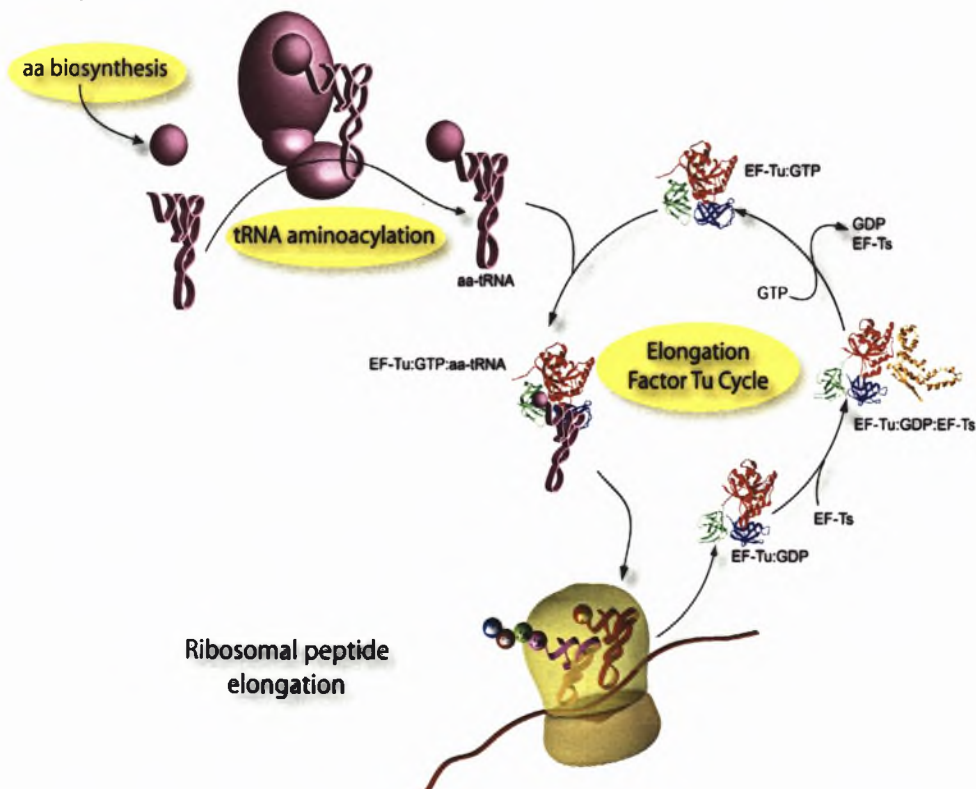
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι έμβιοι οργανισμοί έχουν διαχωριστεί σε τρία βασίλεια, αρχαία, βακτήρια και ευκαρυώτες. Αυτή η ταξινόμηση έχει επιτευχθεί με βάση τη φυλογενετική ανάλυση των συντηρημένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών των οργανισμών, με αποτέλεσμα τα μέλη του κάθε βασιλείου να εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά και λειτουργίες. Η μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των τριών βασιλείων των οργανισμών, αποκαλύπτει ότι τα αρχαία βρίσκονται εξελικτικά εγγύτερα στους ευκαρυώτες από ότι στα βακτήρια (Εικόνα 1). Ένα παράδειγμα το οποίο υποστηρίζει αυτή τη διαπίστωση αποτελεί το γεγονός ότι στα αρχαία και στους ευκαρυώτες κατά την πρωτεϊνοσύνθεση η μετάφραση των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων ξεκινά με το αμινοξύ μεθειονίνη, σε αντίθεση με τα βακτήρια που ως αμινοξύ έναρξης χρησιμοποιούν τη φόρμυλ-μεθειονίνη. Παρ’ όλα αυτά, πολυάριθμες μελέτες έχουν αποκαλύψει ένα μεγάλο ποσοστό ποικιλομορφίας όσον αφορά διάφορους μηχανισμούς και λειτουργίες που επιτελούνται στα μέλη και των τριών βασιλείων. Αυτή η ποικιλομορφία, η οποία αποτελεί ένα εξελικτικό προϊόν, εξασφαλίζει την εξειδίκευση διαφόρων μηχανισμών ως προς το είδος του οργανισμού και ενισχύει την πιστότητα κάθε κυτταρικής διαδικασίας.



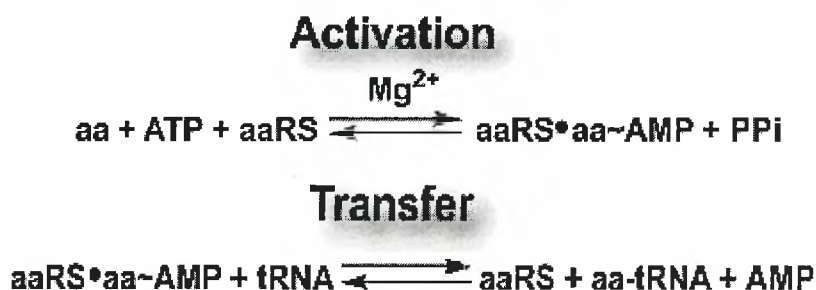
Εικόνα 1: Το φυλογενετικό δέντρο των τριών μεγάλων βασιλείων των οργανισμών. Οι τρεις μορφές ζωής είναι τα αρχαία, τα βακτήρια και οι ευκαρυώτες. Το μήκος των κλαδιών αντιστοιχεί στη γενετική απόσταση μεταξύ αυτών των οργανισμών. Έτσι παρατηρείται πως τα αρχαία απέχουν φυλογενετικά περισσότερο από τα βακτήρια, ενώ βρίσκονται εγγύτερα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Ένα πεδίο στο οποίο η σύγκριση μεταξύ των τριών βασιλείων των οργανισμών είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα, είναι οι μηχανισμοί της αμινοακυλίωσης του tRNA. Ο όρος αμινοακυλίωση περιλαμβάνει την κυτταρική διαδικασία κατά την οποία παράγονται αμινοάκυλο-tRNAs, τα οποία στη συνέχεια θα αποτελέσουν τα κατάλληλα μόρια για τη μεταφορά των αμινοξέων στο ριβόσωμα κατά τη μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνες. Η σύνθεση, λοιπόν, λειτουργικών πρωτεϊνών σχετίζεται άμεσα με την πιστότητα της διαδικασίας σύνθεσης των αμινοάκυλο-tRNAs, η οποία επιτελείται από την οικογένεια των ενζύμων αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (AARSs) (Ibba M. & Söll D. 2001). Η δράση των ενζύμων αυτών έγκειται στην κατάλυση της εστεροποίησης ενός μόνο συγκεκριμένου αμινοξέος με τη βάση της αδερίνης στο 3' άκρο του αντίστοιχου tRNA (Rould et al. 1989). Το αμινοακυλιωμένο tRNA (AA-tRNA), στη συνέχεια, δεσμεύεται από τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu μαζί με ένα μόριο GTP. Ακολουθώς το σύμπλοκο AA-tRNA:EF-Tu:GTP μεταφέρεται και δεσμεύεται στο ριβόσωμα για να γίνει εντέλει η αναγνώριση και σύνδεση της τριπλέτας του κωδικονίου του mRNA με τη συμπληρωματική τριπλέτα του αντικωδικονίου που υπάρχει στο tRNA (Sprinzl M. et al. 1994). Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η ενσωμάτωση του σωστού αμινοξέος στη νεοσυντιθέμενη πεπτιδική αλυσίδα (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Διαδικασία του μηχανισμού της μετάφρασης. Απεικονίζεται η σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNAs (AA-tRNAs) και η δέσμευσή τους από τον παράγοντα επιμήκυνσης (EF-Tu) για τη δημιουργία του συμπλόκου AA-tRNA:EF-Tu:GTP. Μέσω αυτού του συμπλόκου, στη συνέχεια, πραγματοποιείται η μεταφορά των AA-tRNAs στο ριβόσωμα όπου και συμμετέχουν στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης, μέσω της ενσωμάτωσης των αμινοξέων που φέρουν, στη νεοσυντιθέμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα.

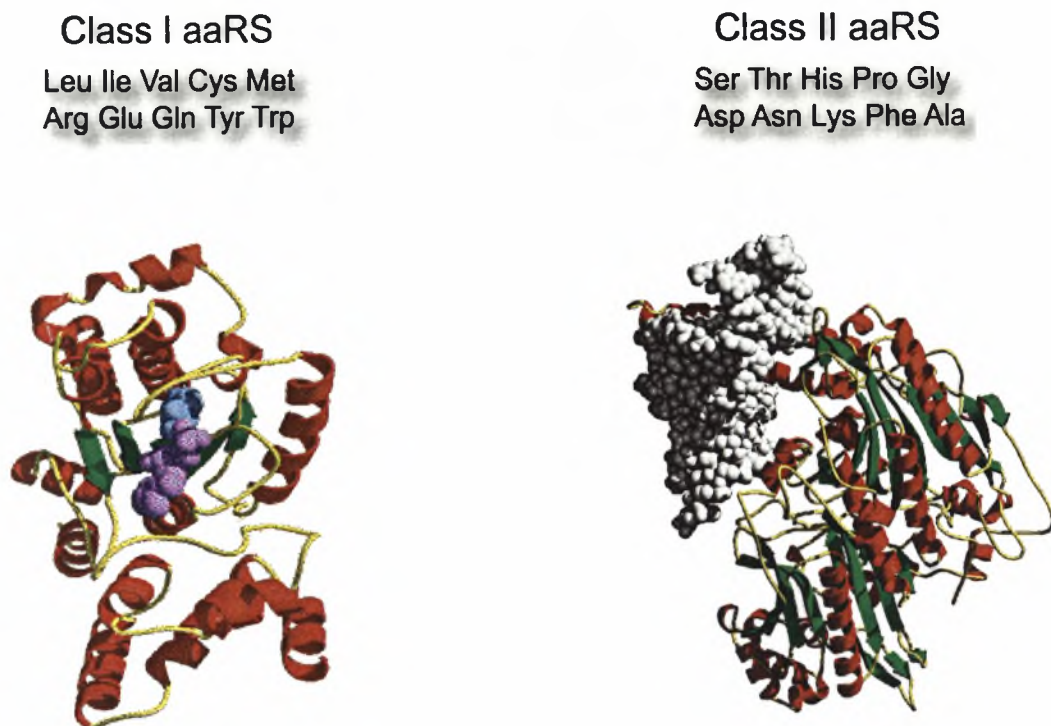
Η λειτουργία των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών σε αυτή τη διαδικασία περιλαμβάνει δύο στάδια: α) ενεργοποίηση του αμινοξέος με την κατανάλωση δύο μορίων ATP και β) μεταφορά του ενεργοποιημένου αμινοξέος στο αντίστοιχο tRNA (Βίου et al. 1994) (Εικόνα 3). Για τη διεξαγωγή της λειτουργίας των AARSs είναι απαραίτητη, αρχικά, η αναγνώριση του σωστού tRNA για να ακολουθήσει στη συνέχεια η ενεργοποίησή του. Στο μηχανισμό αναγνώρισης του tRNA από την αντίστοιχη αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση, συμμετέχει ένας μικρός αριθμός νουκλεοτιδίων, που κατά κύριο λόγο εντοπίζονται στη θηλιά του αντικωδικονίου και στο βραχίονα υποδοχής αμινοξέων (acceptor stem) των tRNA και είναι μοναδικά σε κάθε περίπτωση (Sissler M. et al. 1997).



Εικόνα 3: Αντιδράσεις των δύο σταδίων του μηχανισμού αμινοακυλίωσης των tRNA που καταλύεται από τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες. Κατά την πρώτη αντίδραση πραγματοποιείται η ενεργοποίηση του αμινοξέος με την κατανάλωση δυο μορίων ATP παρουσία Mg^{2+} , ενώ κατά τη δεύτερη πραγματοποιείται μεταφορά του ενεργοποιημένου αμινοξέος στο αντίστοιχο tRNA.

Έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη δύο δομικά διακριτών και εξελικτικά συντηρημένων τάξεων AARSs, η τάξη I και η τάξη II (Eriani G. et al. 1990). Οι AARSs της τάξης I διαθέτουν μια δομή που περιλαμβάνει μια χαρακτηριστική Rossman περιοχή στο καταλυτικό τους κέντρο και κατά την πλειοψηφία τους είναι μονομερείς (Sugiura I. et al. 2000), σε αντίθεση με αυτές της τάξης II, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μια διαμόρφωση αντιπαράλληλου β-πτυχωτού φύλλου περιβαλλόμενου από α-έλικες (Perona J. J. et al. 1993), ενώ κατά το μεγαλύτερο ποσοστό τους είναι διμερείς ή πολυμερείς (Εικόνα 4). Στις αντιδράσεις που καταλύουν οι τάξης I AARSs, η αμινομάδα συνδέεται με το 2'-OH του tRNA, ενώ αντίθετα στις αντιδράσεις που καταλύονται από τις τάξης II AARSs προτιμάται η θέση του 3'-OH. Στην τάξη I ανήκουν οι συνθετάσες των γλουταμινικού οξέος, γλουταμίνης, τρυπτοφάνης, τυροσίνης, βαλίνης, λευκίνης, ισολευκίνης, μεθειονίνης, κυστεΐνης και αργινίνης, ενώ στην τάξη II ανήκουν οι συνθετάσες των αλανίνης, ασπαραγίνης, ασπαρτικού οξέος, γλυκίνης, ιστιδίνης, λυσίνης, φαινυλαλανίνης, προλίνης, σερίνης και θρεονίνης (Εικόνα 4). Οι 10 συνθετάσες της τάξης I χαρακτηρίζονται από κοινή δομή Rossmann της καταλυτικής περιοχής, η οποία είναι τελείως διαφορετική από τη δομή της

καταλυτικής περοχής της τάξης II. Αντίθετα, η πρόσδεση του tRNA πραγματοποιείται μέσω μιας δομής α-έλικας η οποία παρουσιάζεται συντηρημένη ανάμεσα στις συνθετάσες της τάξης I και II.



Εικόνα 4: Δομή των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών τάξης I και τάξης II. Στο πάνω μέρος της εικόνας αναγράφονται οι AARSs που ανήκουν σε κάθε τάξη, ενώ από κάτω απεικονίζεται η δομή της AARS της τυροσίνης που ανήκει στην τάξη I (αριστερά) και της AARS της σερίνης που ανήκει στην τάξη II (δεξιά). Στην πρώτη περίπτωση μπορούμε να διακρίνουμε τη χαρακτηριστική δομή Rossman του καταλυτικού κέντρου με μια κεντρική δομή που περιλαμβάνει 5 παράλληλα β-πτυχωτά φύλλα (πράσινα βέλη), στην άκρη της οποίας είναι προσδεμένη η αδενυλιωμένη τυροσίνη (μωβ) με τη φωσφορική ομάδα (γαλάζιο) στην επιφάνεια. Στη δεύτερη περίπτωση διακρίνεται μια κεντρική δομή αντιπαράλληλου β-πτυχωτού φύλλου αντί για τη δομή Rossman περιβαλλόμενη από α-έλικες (κόκκινες έλικες), ενώ η πρόσδεση του tRNA (άσπρο) γίνεται μέσω μιας προεξέχουσας περιοχής.

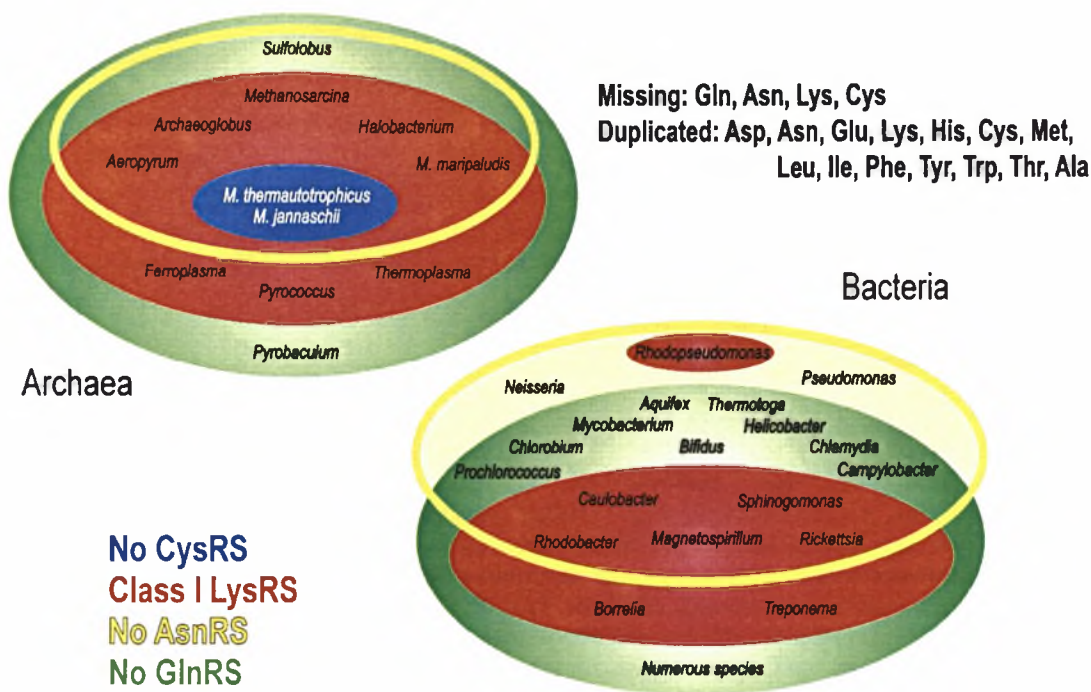
Το γεγονός ότι η σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNAs αποτελεί μια μη αναστρέψιμη διαδικασία, εξαιτίας της δέσμευσης των φορτισμένων tRNA μορίων από τον παράγοντα επιμήκυνσης (EF-Tu), καθιστά επιτακτική ανάγκη την πλήρη πιστότητα της συγκεκριμένης διαδικασίας (Pingould et al. 1990, Clark et al. 1995). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της υψηλής λειτουργικής εξειδίκευσης των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών η οποία έγκειται στην ικανότητα των ενζύμων αυτών να διακρίνουν μεταξύ πολλαπλών υποστρώματων και να συνδέουν με ακρίβεια ένα συγκεκριμένο αμινοξύ στο αντίστοιχο μόριο tRNA (Becker et al. 1997). Οι AARSs επιτυγχάνουν αυτή την εξειδικευμένη επιλογή του υποστρώματος, και συνεπώς το περιορισμένο ποσοστό λαθών σε αυτή τη

διαδικασία, με δύο τρόπους: είτε με την επιλεκτική πρόσδεση του σωστού tRNA, είτε με την επιλεκτική διόρθωση των λανθασμένων tRNA μορίων, η οποία πραγματοποιείται συνήθως με υδρόλυση του λανθασμένα ενεργοποιημένου tRNA. Με αυτό τον τρόπο ασκείται ένα είδος ποιοτικού ελέγχου στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Αυτή η ιδέα της απόλυτης εξειδίκευσης των AARSs επικρατούσε σε προηγούμενες δεκαετίες. Συγκεκριμένα, κατά την προγενωμική περίοδο είχε δημιουργηθεί μια κοινή πεποίθηση που βασιζόταν στην υπόθεση του Crick (Adaptor hypothesis) (Crick 1958), σύμφωνα με την οποία κάθε κύτταρο και οργανίδιο διαθέτει 20 αμινοξέα και 20 αντίστοιχες αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες, καθεμία από τις οποίες είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση καθενός εκ των 20 διαφορετικών AA-tRNAs που είναι απαραίτητα για την μετάφραση του mRNA. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε στις επόμενες δεκαετίες με την απομόνωση και το χαρακτηρισμό όλων των 20 AARSs. Πρωταρχικό παράδειγμα αποτελεί το *Escherichia coli* στο οποίο πραγματοποιήθηκε αναγνώριση δύο υψηλά συντηρημένων, δομικά διακριτών τάξεων AARSs, καθεμία από τις οποίες περιλάμβανε 10 μέλη, γεγονός που επιβεβαίωσε φαινομενικά αναμφισβήτητα την Adaptor hypothesis. Οι περισσότερες μελέτες στις επόμενες δεκαετίες διέπονταν από την ιδέα μιας αρκετά συντηρημένης εξελικτικής πορείας των μηχανισμών της αμινοακυλίωσης. Παρ' όλα αυτά, η ανάπτυξη νέων τεχνολογικών και πειραματικών μεθόδων για την αποκωδικοποίηση του γενώματος όλο και περισσότερων οργανισμών και την ενδελεχή μελέτη των μηχανισμών της αμινοακυλίωσης, οδήγησε στην ανακάλυψη αρκετών αποκλίσεων ανάμεσα στους διαφορετικούς οργανισμούς όσον αφορά την εν λόγω υπόθεση, η οποία σταμάτησε να αποτελεί δόγμα. Η αλματώδης αύξηση της γνώσης στον τομέα της αμινοακυλίωσης δεν περιορίστηκε μόνο στη μελέτη συντηρημένων χαρακτηριστικών, αλλά αποκάλυψε και μια τεράστια πολυπλοκότητα και ποικιλομορφία των μηχανισμών αυτής της τόσο σημαντικής διαδικασίας. Η αμφισβήτηση της καθολικότητας της Adaptor hypothesis ξεκίνησε με την πραγματοποίηση της αλληλούχισης του γενώματος δύο μεθανογενετικών αρχαίων, του *Methanococcus jannaschii* και του *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Bult et al. 1996, Smith et al. 1997). Εν συνεχεία, γενωμικές και βιοχημικές αναλύσεις στα εν λόγω αρχαία, οδήγησαν στην αναγνώριση γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν μόνο 16 AARSs, γεγονός που κατέστησε εύλογο το ερώτημα για το πώς πραγματοποιείται σε αυτούς τους οργανισμούς η σύνθεση ασπαραγινύλ-tRNA (Asn-tRNA), κυστεινύλ-tRNA (Cys-tRNA), γλουταμινύλ-tRNA (Gln-tRNA) και λυσύλ-tRNA (Lys-tRNA). Η αναγνώριση και μελέτη των εναλλακτικών μονοπατιών μέσω των οποίων πραγματοποιείται η σύνθεση αυτών των 4 AA-tRNAs αποτέλεσε μια απρόσμενα μεγάλη πηγή πληροφοριών για τη δομική και λειτουργική ποικιλία των μηχανισμών που περιλαμβάνονται στη σύνθεση των AA-tRNAs. Επιπλέον,

διάφορες φυλογενετικές μελέτες έδειξαν ότι τα εναλλακτικά μονοπάτια σύνθεσης των AA-tRNAs δεν εντοπίζονται αποκλειστικά στα δύο αυτά αρχαία, αλλά αποτελούν ένα ευρύτερο φαινόμενο που εκτείνεται σε όλο το έμβιο βασίλειο. Έτσι άρχισαν να αναδύονται οι απαντήσεις σε όλο και περισσότερα ερωτήματα τα οποία είχαν δημιουργηθεί αρκετά παλαιότερα, όπως το εναλλακτικό μονοπάτι σύνθεσης του Asn-tRNA, του οποίου η ύπαρξη είχε εικαστεί από το 1972 (White and Bayley, 1972).

Στο γένωμα των βακτηρίων και των αρχαίων με τη βοήθεια της γενωμικής, εντοπίστηκαν διπλασιασμοί και ελλείψεις ολόκληρων γονιδίων ή τμημάτων των γονιδίων των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών (Εικόνα 5). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γεγονός ότι κάποιοι οργανισμοί χαρακτηρίζονται από την πλήρη έλλειψη της λειτουργίας δύο AARSs, της AsnRS και της GlnRS, όπως συμβαίνει στο *Neisseria meningitides* που στερείται της AsnRS (Bunjun S. et al. 2000) ή στο *Pyrococcus horikoshii* του οποίου η γενωμική αλληλουχία δε μπορούσε να εξηγήσει πως πραγματοποιείται η σύνθεση Asn-tRNA και Gln-tRNA σε αυτόν τον οργανισμό (Tumbula D. L. et al. 2000). Η έλλειψη αυτή μπορεί να παρακαμφθεί μέσω της χρήσης μίας ή δύο άλλων AARSs με χαλαρή εξειδίκευση (nondiscriminating) από τους οργανισμούς αυτούς. Τέτοιου είδους συνθετάσες χαρακτηρίζονται από χαλαρή εξειδίκευση στο καταλυτικό τους κέντρο ως προς την αναγνώριση του tRNA υποστρώματος και γι' αυτό μπορούν να ακυλιώσουν δύο διαφορετικά tRNAs. Για παράδειγμα, έχει δείχθει ότι στα *Bacillus subtilis* και *M. thermoautotrophicum*, μια GluRS με χαλαρή εξειδίκευση ακυλιώνει αποτελεσματικά με γλουταμινικό, όχι μόνο το tRNA^{Glu} αλλά και το tRNA^{Gln} οδηγώντας στο σχηματισμό Glu-tRNA^{Gln} (Lapointe et al. 1986, Tumbula et. al. 2000). Αντίστοιχα, μια AspRS με χαλαρή εξειδίκευση, η οποία εντοπίζεται κυρίως στα αρχαία, καθώς και στα *D. radiodurans* and *Thermus thermophilus* είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό Asp-tRNA^{Asn}. Παρ' όλο που φυλογενετικές μελέτες βασισμένες στη γενωμική αλληλουχία απέτυχαν στο να αναγνωρίσουν δομικές διαφορές ανάμεσα στην εξειδικευμένη και μη εξειδικευμένη GluRS, η δομική ανομοιογένεια μεταξύ των AspRSs, όπως αναφέρεται παρακάτω, σχετίστηκε άμεσα με διάφορες λειτουργικές ποικιλομορφίες (Becker et al. 2000). Επίσης, μπορεί να αναφερθεί ότι σε ορισμένους οργανισμούς απουσιάζει η συνήθης LysRS, ενώ εντοπίζεται μια LysRS με διαφορετική ενζυμική δράση, η οποία δε διαθέτει την κλασσική δομή της τάξης II, στην οποία φυσιολογικά ανήκει, αλλά παρουσιάζει δομή AARS τάξης I. Τέτοιοι οργανισμοί είναι τα *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rickettsia*, *Pyrococcus* και αρκετά άλλα βακτήρια και αρχαία (Εικόνα 5) (Ibba M. & Söll D. 2001, Ibba et al. 1997b).



Εικόνα 5: Παραδείγματα βακτηρίων και αρχαίων που εμφανίζουν φυλογενετική ποικιλομορφία όσον αφορά τη σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNAs, η οποία δεν πραγματοποιείται μέσω των φυσιολογικών μονοπατιών εξαιτίας της έλλειψης ή της ασυνήθιστης δομής κάποιων αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών. Οι οργανισμοί μέσα στον μπλε κύκλο δεν κωδικοποιούν την CysRS, ενώ αυτοί μέσα στον κόκκινο κύκλο κωδικοποιούν LysRS τάξης I. Αντίστοιχα, οι οργανισμοί μέσα στον πράσινο κύκλο στερούνται της GlnRS, ενώ τέλος αυτοί μέσα στον κίτρινο κύκλο στερούνται της AsnRS. Έτσι, για παράδειγμα, τα *Rhodobacter* στερούνται των AsnRS και GlnRS και εκφράζουν μια LysRS τάξης I, ενώ τα *Chlamydia* στερούνται μεν των AsnRS και GlnRS, αλλά δε διαθέτουν LysRS τάξης I. Τέλος, επάνω δεξιά στην εικόνα αναγράφονται και οι AARSs των οποίων τα γονίδια παρουσιάζουν διπλασιασμό.

Σε αντίθεση με το άμεσο μονοπάτι σύνθεσης των αμινοάκυλο-tRNAs το οποίο όπως αναφέρθηκε αποτελείται από δύο στάδια, σε πολλά βακτήρια και αρχαία τα Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln} συντίθενται με ένα έμμεσο μονοπάτι δύο σταδίων το οποίο περιλαμβάνει αρχικά την δράση μιας AspRS ή GluRS με χαλαρή εξειδίκευση και εν συνεχεία μιας tRNA-εξαρτώμενης αμιδοτρανσφεράσης (AdT) (Wilcox and Nirenberg 1968, Curnow et al. 1996). Στο πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται η σύνθεση των λανθασμένα φορτισμένων Asp-tRNA^{Asn} και Glu-tRNA^{Gln} από τα ένζυμα με τη χαλαρή εξειδίκευση, που προαναφέραμε. Αυτά τα tRNAs στη συνέχεια θα αποτελέσουν υποστρώματα των ενζύμων tRNA-εξαρτώμενες αμιδοτρανσφεράσες (AdTs), τα οποία παρουσία κάποιου δότη αμιδίων (π.χ. γλουταμίνη) μετατρέπουν τα λανθασμένα ακυλιωμένα tRNAs σε Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln}, αντίστοιχα (Εικόνα 6).

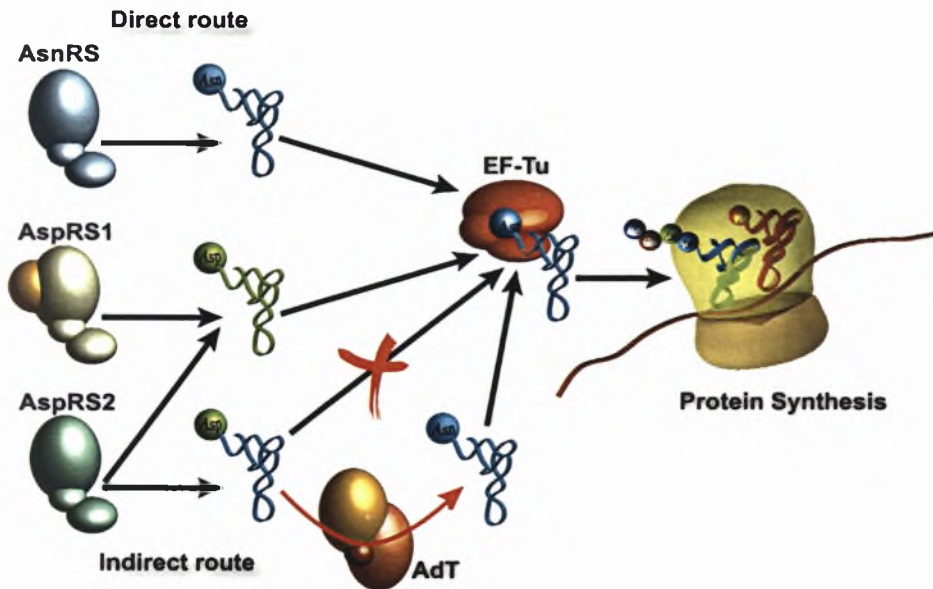


Εικόνα 6: Στάδια του μηχανισμού σύνθεσης των $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$ και $\text{Asn-tRNA}^{\text{Asn}}$ μέσω του έμμεσου μονοπατιού αμινοακυλίωσης με τη βοήθεια των tRNA -εξαρτώμενων αμιδοτρανσφερασών (AdTs). Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση των λανθασμένα φορτισμένων $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$ και $\text{Asp-tRNA}^{\text{Asn}}$ από την GluRS και την AspRS που χαρακτηρίζονται από χαλαρή εξειδίκευση (nondiscriminating, ND) αντίστοιχα, με την ταυτόχρονη διάσπαση ενός μορίου ATP σε AMP και PPi . Στο δεύτερο στάδιο διεξάγεται η μετατροπή των λανθασμένα αμινοακυλιωμένων tRNAs σε $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$ και $\text{Asn-tRNA}^{\text{Asn}}$ μέσω της Glu -αμιδοτρανσφεράσης και της Asp -αμιδοτρανσφεράσης αντίστοιχα, με την ταυτόχρονη διάσπαση ενός μορίου ATP σε ADP και Pi .

Τα δύο μονοπάτια αμινοακυλίωσης που αναφέρθηκαν (άμεσο και έμμεσο) συνεντοπίζονται σε ορισμένους οργανισμούς, ενώ σε άλλους πραγματοποιείται μόνο το ένα από τα δύο, ανάλογα με τα ένζυμα αμινοακυλίωσης που διαθέτει ο καθένας. Στην πρώτη περίπτωση ανήκει το θερμοφίλο ευβακτήριο *Thermus thermophilus* στο οποίο πρόσφατα αναφέρθηκε η ύπαρξη δύο γενετικά διακριτών AspRSs (AspRS1 και AspRS2) (Εικόνα7) (Becker et al. 1997) και οι δύο από τις οποίες ενεργοποιούν Asp και αμινοακυλιώνουν tRNA^{Asp} , αλλά παρουσιάζουν δομικές διαφορές μεταξύ τους (M_r 68 και 51 για την AspRS1 και την AspRS2 , αντίστοιχα). Μελέτη αυτών των δύο ενζύμων έδειξε ότι η AspRS2 αμινοακυλιώνει επιπλέον και tRNA^{Asn} και ότι το *T. thermophilus* προάγει τη σύνθεση $\text{Asn-tRNA}^{\text{Asn}}$ μέσω του έμμεσου μονοπατιού με τη βοήθεια της AdT . Εξαιτίας, όμως, της ταυτόχρονης ύπαρξης στον οργανισμό αυτό AsnRS ικανής να καταλύσει το άμεσο μονοπάτι, αυτό το ευβακτήριο διαθέτει τη δυνατότητα αμινοακυλίωσης ενός tRNA μέσω και των δύο μονοπατιών. Αντίθετα, η σύνθεση Gln-tRNA προωθείται μέσω ενός μοναδικού μονοπατιού που καταλύεται από την GlnRS (Becker et al. 1997).

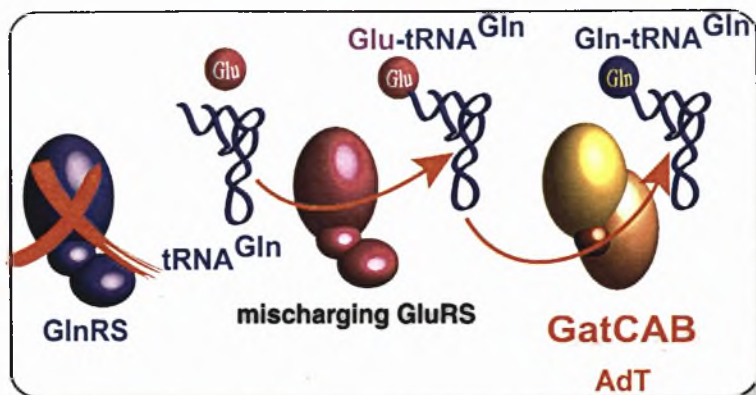
Από την άλλη μεριά, στους οργανισμούς οι οποίοι δε διαθέτουν τις AsnRS και GlnRS , το έμμεσο μονοπάτι είναι και το μοναδικό που χρησιμοποιούν οι συγκεκριμένοι οργανισμοί για τη σύνθεση των Asn-tRNA και Gln-tRNA . Παραδείγματα αποτελούν τα Gram+ βακτήρια, το Gram- βακτήριο *Rhizobium meliloti*, τα ριζοβακτήρια και τα αρχαιοβακτήρια, καθώς και ευκαρυωτικά οργανίδια όπως μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες, τα οποία

στερούνται της αμινοκύκλο-tRNA συνθετάσης της γλουταμίνης (Lapointe J. et al. 1986, Schön et al. 1988, Gagnon Y. et al 1996).



Εικόνα 7: Σύνθεση του Asn-tRNA^{Asn} μέσω των δύο μονοπατιών αμινοακυλίωσης και δέσμευση των αμινοακυλιωμένων tRNAs από τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu, ο οποίος τα μεταφέρει στο ριβόσωμα για να συμμετάσχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση. Το ένα μονοπάτι αποτελεί τον άμεσο μηχανισμό σύνθεσης του Asn-tRNA^{Asn} μέσω της AsnRS και πραγματοποιείται στους οργανισμούς που διαθέτουν αυτό το ένζυμο. Ορισμένοι οργανισμοί, όμως, είτε στερούνται της AsnRS, είτε εκτός από αυτό το ένζυμο διαθέτουν και δύο AspRSs (AspRS1 και AspRS2), όπως συμβαίνει στον *Thermus thermophilus*. Η AspRS1 συνθέτει κανονικά Asp-tRNA^{Asp}, ενώ η AspRS2 χαρακτηρίζεται από χαλαρή εξειδίκευση και συνθέτει είτε Asp-tRNA^{Asp}, είτε Asp-tRNA^{Asn}. Το Asp-tRNA^{Asn} δε δεσμεύεται από τον EF-Tu παρά μόνο μετά τη μετατροπή του σε Asn-tRNA^{Asn} μέσω της αμιδοτρανσφεράσης (AdT) (έμμεσο μονοπάτι).

Έχουν περιγραφεί δύο είδη tRNA-εξαρτώμενων αμιδοτρανσφερασών. Η μία από αυτές, η GatCAB (κωδικοποιείται από τα γονίδια *gatA*, *gatB*, *gatC*), είναι μια ετεροτριμερής αμιδοτρανσφεράση η οποία συναντάται σε πολλά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων πολλών παθογόνων βακτηρίων, καθώς και σε αρχαία. Η λειτουργία της έγκειται στη σύνθεση Asn-tRNA^{Asn} ή Gln-tRNA^{Gln} in vitro, παρουσία λανθασμένα αμινοακυλιωμένου υποστρώματος (Curnow et al. 1998, Becker et al. 2000b, Tumbula et al. 2000) (Εικόνα 8). Γι' αυτό το λόγο, ο ρόλος αυτού του ενζύμου in vivo πιστεύεται ότι εξαρτάται άμεσα από την παρουσία μη εξειδικευμένων AspRS και GluRS στο κύτταρο, τουλάχιστον όσον αφορά τα βακτήρια.



Εικόνα 8: Σύνθεση του $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$ μέσω του έμμεσου μονοπατιού αμινοακυλίωσης που συνάτταται σε ορισμένα βακτήρια και αρχαία που δεν διαθέτουν GlnRS . Αρχικά συντίθεται $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$ μέσω της GluRS που εμφανίζει χαλαρή εξειδίκευση στην αναγνώριση του υποστρώματος (mischarging) και ακολουθεί η μετατροπή του σε $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$ μέσω της αμιδοτρανσφεράσης GatCAB .

Η δεύτερη τάξη αμιδοτρανσφερασών περιλαμβάνει την GatDE (κωδικοποιείται από τα γονίδια *gatD* και *gatE*), ένα ετεροδιμερές ένζυμο, το οποίο μέχρι τώρα έχει βρεθεί μόνο στα αρχαία (Tumbula et al. 2000). Τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν το ένζυμο αυτό είναι παρόντα σε όλα τα 13 αρχαία με γνωστή γενωμική αλληλουχία (Πίνακας 1), ενώ δεν εντοπίζονται σε κανένα από τα άλλα δύο βασίλεια μικροοργανισμών. Σε αντίθεση με την GatCAB , η GatDE έχει την ικανότητα να συνθέτει μόνο $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$. Η κατανομή των δύο αυτών AdTs στα αρχαία οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος της GatCAB στα αρχαία είναι να συνθέτει $\text{Asn-tRNA}^{\text{Asn}}$, εφόσον παρατηρήθηκε ότι το συγκεκριμένο ένζυμο εντοπίζεται μόνο στα 8 από τα αρχαία με γνωστή γενωμική αλληλουχία (*A. pernix*, *A. fulgidus*, *H. salinarum*, *M. thermoautotrophicum*, *M. jannaschii*, *M. mazei* και τα δύο είδη *Sulfolobus*) τα οποία δε διαθέτουν γονίδια *asnS* που κωδικοποιούν την AsnRS (Πίνακας 1). Αντίθετα τα *P. aerophilum*, *T. acidophilum*, *P. abyssi*, *P. horikoshii* και *P. furiosus* χρησιμοποιούν την AsnRS , εφόσον διαθέτουν το γονίδιο *asnS* και στερούνται των γονιδίων *gatCAB* (Tumbula et al. 2000). Σε αυτά τα αρχαία, επομένως, η GatDE αποτελεί την μοναδική πηγή δράσης Glu-AdT . Παρ' όλα αυτά, η παρουσία και των δύο αμιδοτρανσφερασών σε έναν μεγάλο αριθμό αρχαίων δημιουργεί το ερώτημα αν η GatDE σε ορισμένα από αυτά, είναι πλεονάζον στοιχείο (Stathopoulos et al. 2001). Τόσο η GatCAB , όσο και η GatDE αναγνωρίζουν το ίδιο tRNA^{Gln} υπόστρωμα, ενώ ο *in vivo* δότης του αμιδιού δεν είναι γνωστός. Η εξέταση όλων των ικανών υποστρωμάτων έδειξε ότι η GatDE δεν παρουσιάζει πλεονέκτημα ως προς την κατανάλωση του υποστρώματος έναντι της GatCAB των αρχαίων. Επιπλέον, η GatCAB έχει τη δυνατότητα χρήσης γλουταμίνης, ασπαραγίνης ή κλωριούχου αμμωνίου ως

δότη του αμιδίου, ενώ η GatDE δε μπορεί να χρησιμοποιήσει ιόντα αμμωνίου. Είναι, λοιπόν, πιθανόν τα δύο αυτά ένζυμα να συμμετέχουν σε διαφορετικές μεταβολικές λειτουργίες (Tumbula et al. 2000). Μελλοντικές *in vivo* μελέτες πάνω στις AdTs των αρχαίων θα μπορούν, πιθανόν, να παρέχουν επιπλέον πληροφορίες για τη βάση του διαχωρισμού των μονοπατιών σύνθεσης Asn-tRNA και Gln-tRNA.

Είναι, λοιπόν, εμφανές ότι κάθε είδος μικροοργανισμού χρησιμοποιεί διαφορετικούς μηχανισμούς σύνθεσης κάποιων AA-tRNAs οι οποίοι εξαρτώνται από τις εκάστοτε συνθήκες, όπως για παράδειγμα από τον δότη των αμιδίων που είναι διαθέσιμος σε έναν ορισμένο τόπο και χρόνο, ενώ παράγοντας κλειδί για τη διατήρηση του έμμεσου μονοπατιού, είναι η παρουσία μιας λειτουργικής AARS με χαλαρή εξειδίκευση στον εκάστοτε οργανισμό. Έτσι, η σύνθεση του Gln-tRNA στα αρχαία και σε μικρότερο βαθμό στα βακτήρια γίνεται κυρίως μέσω της τρανσαμιδίωσης, ενώ στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα κυριαρχεί η διεξαγωγή της μέσω του ενζύμου GlnRS. Η σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNAs είναι το μόνο βήμα της πρωτεϊνοσύνθεσης του οποίου οι μηχανισμοί παρουσιάζουν διαφορές και στα τρία βασίλεια οργανισμών (Tumbula et al. 2000).

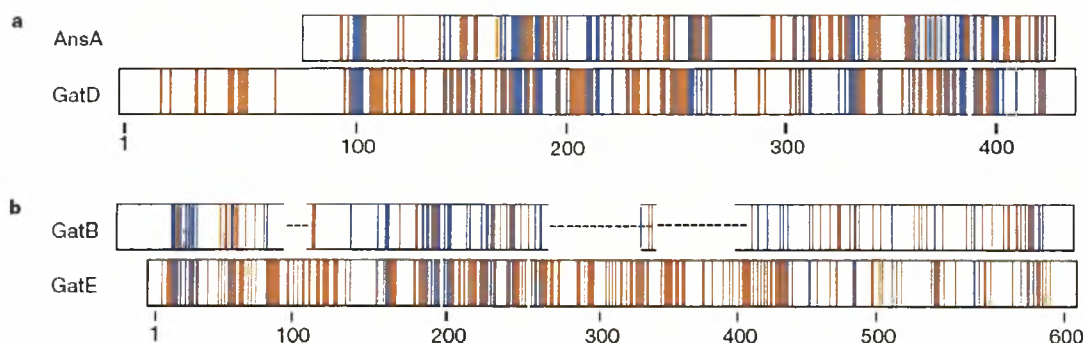
Παραθέσεις αλληλουχιών έδειξαν ότι η υπομονάδα GatA είναι ομόλογη με τις αμιδάσες και αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα η οποία προσδένει την ATP αμιδοϋδρολάση, ενώ η υπομονάδα GatD είναι παράλογο του *ansA*, ενός γονιδίου που κωδικοποιεί μια τύπου I L-ασπαραγινάση με άγνωστη λειτουργία, η οποία εντοπίζεται σε πολλά βακτήρια και αρχαία (Spring et al. 1986). Τόσο οι αμιδάσες, όσο και οι ασπαραγινάσες ανήκουν στην υπεροικογένεια των αμιδοτρασφερασών γλουταμίνης οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση της γλουταμίνης και την ακόλουθη μεταφορά της αμμωνίας σε έναν μεγάλο αριθμό δεκτών (Zalkin and Smith 1998). Οι δύο αμιδοτρασφεράσες, λοιπόν, έχουν στρατολογήσει μία ξεχωριστή γλουταμινάση για την ενεργοποίηση της αμμωνίας που είναι απαραίτητη για την αντίδραση της τρανσαμιδίωσης. Παρ' όλα αυτά, κρυσταλλογραφικές μελέτες και μελέτες μεταλλαξιγένεσης έδειξαν ότι καμία από τις δύο υπομονάδες, GatA και GatD, δε φέρει τις αλληλουχίες που είναι υπεύθυνες για την καταλυτική δράση γλουταμινάσης, όπως η αμινοτελική κυστεΐνη που αποτελεί χαρακτηριστικό των τύπου Ntn γλουταμινασών, ή η καταλυτική τριάδα Cys-His-Glu, χαρακτηριστικό μιας άλλης τάξης γλουταμινασών. Αντίθετα, δείχθηκε ότι τα κατάλοιπα σερίνης και ασπαρτικού που εντοπίζονται στο εσωτερικό του signature motif (DTGGS) της αμιδάσης του *Rhodococcus* έχουν ιδιαίτερη σημασία για την εκδήλωση της καταλυτικής δράσης (Kobayashi et al. 1997). Μελλοντικές αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης των ομόλογων καταλοίπων των GatA και GatD ίσως αποκαλύψουν αν τελικά οι δύο αυτές υπομονάδες διαδραματίζουν κοινό ρόλο στις AdTs.

Organism	Taxonomic group	asnS	glnS	gatCAB		
				Asp-AdT ^a	Glu-AdT ^a	gatDE
<i>Aeropyrum pernix</i>	Crenarchaeota	-	-	+	+	+
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Crenarchaeota	-	-	+	+	+
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	Crenarchaeota	-	-	-	+	+
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Euryarchaeota	-	-	+	+	+
<i>Halobacterium salinarum</i>	Euryarchaeota	-	-	+	+	+
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> ^a	Euryarchaeota	-	-	+	+	+
<i>Methanococcus jannaschii</i>	Euryarchaeota	-	-	+	+	+
<i>Methanosarcina mazei</i>	Euryarchaeota	-	-	+	+	+
<i>Aquifex aeolicus</i>	Aquificales	-	-	+	+	-
<i>Thermotoga maritima</i>	Thermotogales	-	-	+	+	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Firmicutes	-	-	+	+	-
<i>Chlamydia muridarum</i>	Chlamydiales	-	-	+	+	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> ^b	Chlamydiales	-	-	+	+	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Chlamydiales	-	-	+	+	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlamydomonadales	-	-	+	+	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ε-Proteobacteria	-	-	+	+	-
<i>Helicobacter pylori</i> ^b	ε-Proteobacteria	-	-	+	+	-
<i>Rickettsia prowazekii</i>	α-Proteobacteria	-	-	+	+	-
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	Crenarchaeota	+	-	-	-	+
<i>Pyrococcus abyssi</i>	Euryarchaeota	+	-	-	-	+
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Euryarchaeota	+	-	-	-	+
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	Euryarchaeota	+	-	-	-	+
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Crenarchaeota	+	-	-	-	+
<i>Bacillus halodurans</i>	Firmicutes	+	-	-	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> ^a	Firmicutes	+	-	-	+	-
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Firmicutes	+	-	-	+	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Firmicutes	+	-	-	+	-
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Firmicutes	+	-	-	+	-
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Firmicutes	+	-	-	+	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Firmicutes	+	-	-	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	Firmicutes	+	-	-	+	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> ^a	Firmicutes	+	-	-	+	-
<i>Synechocystis</i> sp.	Cyanobacteria	+	-	-	+	-
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Spirochaetales	+	-	-	-	-
<i>Treponema pallidum</i>	Spirochaetales	+	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	β-Proteobacteria	-	+	+	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	β-Proteobacteria	-	+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	γ-Proteobacteria	-	+	+	-	-
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Cytophagales	+	+	-	-	+
<i>Bacteroides</i> sp.	γ-Proteobacteria	+	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	γ-Proteobacteria	+	+	-	-	-
<i>Haemophilus influenza</i>	γ-Proteobacteria	+	+	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i>	γ-Proteobacteria	+	+	-	-	-
<i>Xylella fastidiosa</i>	γ-Proteobacteria	+	+	-	-	-
<i>Yersinia pestis</i>	γ-Proteobacteria	+	+	-	-	-
<i>Deinococcus radiodurans</i> ^a	Thermus/Deinococcus	+	+	+	-	-
<i>Thermus thermophilus</i> ^b	Thermus/Deinococcus	+	+	+	-	-

Πίνακας 1: Η κατανομή του άμεσου και έμμεσου μονοπατιού σύνθεσης των Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln} σε διάφορους προκαρυώτες με γνωστή γενωμική αλληλουχία. Ο πίνακας καταγράφει την παρουσία ή απουσία των γονιδίων των AsnRS (asnS), GlnRS (glnS), gatCAB και gatDE από τα γονιδιώματα προκαρυωτών των οποίων έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχηση. Όταν είναι παρόντα τα γονίδια που κωδικοποιούν την GatCAB, η in vivo λειτουργία της ως Asp-AdT ή Glu-AdT υποδεικνύεται με ^a. Εκτός των λίγων ειδών στα οποία έχει αναγνωριστεί βιοχημικά η εξειδίκευση του ενζύμου GatCAB (υποδεικνύονται με ^b), η εξειδίκευση της AdT βασίζεται στην παρουσία ή έλλειψη των AsnRS και GlnRS. Όταν λείπουν και οι δύο εκ των AsnRS και GlnRS η AdT λειτουργεί σαν Glu/Asp-AdT. Όταν είναι απύσχα μόνο η GlnRS, η AdT λειτουργεί ως Glu-AdT, ενώ όταν είναι απύσχα η AsnRS, η AdT λειτουργεί ως Asp-AdT. Αυτές οι διαφορετικές κατηγορίες προκαρυωτών διαχωρίζονται με μια κενή σειρά στον πίνακα. Στις δύο τελευταίες γραμμές του πίνακα αναγράφονται βακτήρια στα οποία εντοπίζονται αμφότερες εκ των GlnRS και AsnRS. Σε κάθε τμήμα του πίνακα τα είδη έχουν ομαδοποιηθεί ανάλογα με την ταξινόμική τους φύση.

Οι υπομονάδες GatB και GatE παρουσιάζουν περίπου 30% ομοιότητα στην αλληλουχία τους και διαθέτουν σε γενικές γραμμές τα ίδια χαρακτηριστικά (Tumbula et al. 2000). Οι λειτουργίες τους δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητές, αλλά είναι γεγονός ότι και οι δύο είναι απαραίτητες για την διεξαγωγή της αντίδρασης τρανσαμιδίου, εφόσον παρατηρήθηκε ότι η GatCA στο *B. subtilis* και η GatD στο *M. thermautotrophicum* από μόνες τους, δεν είναι ικανές να μετατρέψουν Glu-tRNA^{Gln} σε Gln-tRNA^{Gln} (Curnow et al. 1997). Αντίστοιχα, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι υπομονάδες GatB και GatE είναι σημαντικές για την αναγνώριση του tRNA (Curnow et al. 1997), αλλά αυτή η υπόθεση δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί πειραματικά. Τέλος, η GatC παρατηρήθηκε ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την έκφραση της GatA στο *B. subtilis* (Curnow et al. 1997), ενώ στο *Thermus thermophilus* η παρουσία της για τη διεξαγωγή της λειτουργίας ολόκληρης της GatCAB αποδείχθηκε περιττή (Becker and Kern 1998). Το ίδιο διαπιστώθηκε και κατά την πειραματική διαδικασία όπου κατά τον καθαρισμό του ενζύμου GatCAB η απώλεια της υπομονάδας GatC δεν εμπόδισε τη σωστή λειτουργία της AdT in vitro. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η έλλειψη της GatC στο *Helicobacter pylori* μπορεί να επιφέρει το θάνατο (Chalker et al. 2001). Όλα αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα μπορεί να εξηγηθούν από το γεγονός ότι η λειτουργία της υπομονάδας GatC in vitro, ίσως διαφέρει από τη λειτουργία της in vivo.

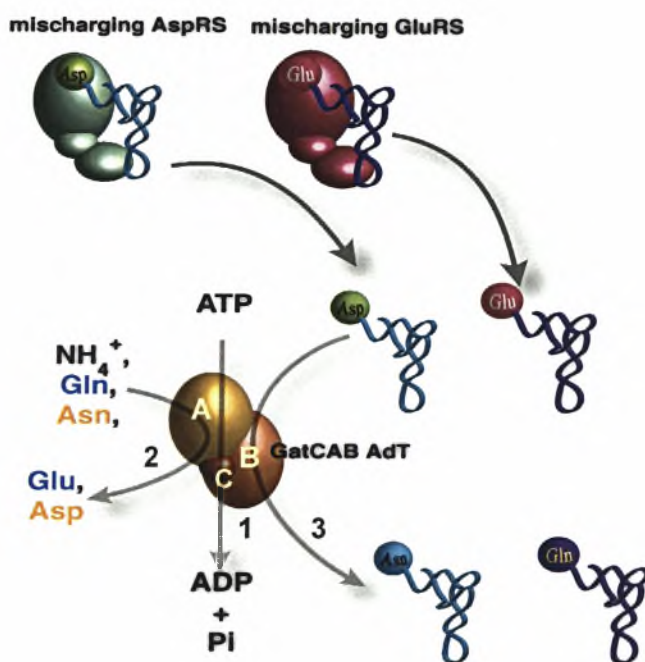
Έχει διαπιστωθεί ότι τόσο οι αλληλουχίες της GatD όσο και της GatE, είναι μεγαλύτερες από αυτές των παραλόγων τους (Εικόνα 9). Οι επιπλέον αλληλουχίες είναι αποκλειστικό χαρακτηριστικό των αρχαίων και δεν εμφανίζουν ομολογία με καμιά γνωστή πρωτεϊνική αλληλουχία (Εικόνα 9) (Tumbula et al. 2000). Τα γονίδια *gatD* και *gatE* ανέρχονται στις 1317 bp και 1902 bp αντίστοιχα, ενώ το μέγεθος των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν είναι 48777 Da για την GatD και 70444 Da για την GatE. Επιπλέον, τα γονίδια *gatD* και *gatE* στα περισσότερα αρχαία εμφανίζονται άμεσα συνδεδεμένα μεταξύ τους στο γονιδίωμα και πιθανόν μεταγράφονται μαζί, ενώ παράλληλα υπάρχουν και περιπτώσεις εντοπισμού των γονιδίων των δύο υπομονάδων σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος (Πίνακας 2) (Tumbula et al. 2000). Ένα παράδειγμα οργανισμού στον οποίο εντοπίζονται των γονίδια *gatDE* σε μορφή σπερονίου είναι το *Pyrococcus abyssi*.



Εικόνα 9: Συντηρημένες περιοχές που προέκυψαν από τις ομοπαράθεσεις των αμινοξικών αλληλουχιών των συστατικών των αμιδοτρανσφερασών: α) των AnsA και GatD και β) των GatB και GatE. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες που αναγράφονται παρακάτω παρατέθηκαν με CLUSTAL_X (V1.84). Οι μπλε γραμμές αντιπροσωπεύουν τις περιοχές με τουλάχιστον 75% ομοιότητα ανάμεσα στις AnsA και GatD, ή ανάμεσα στις GatB και GatE. Οι πορτοκαλί γραμμές αντιπροσωπεύουν τις υπόλοιπες περιοχές οι οποίες παρουσιάζουν τουλάχιστον 75% ομολογία σε κάθε γονίδιο ξεχωριστά, AnsA, GatD, GatB ή GatE, των οργανισμών που εξετάστηκαν. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τις θέσεις των αμινοξέων των αλληλουχιών της GatD και της GatE του *M. thermoautotrophicum*. Τα κενά που είναι μεγαλύτερα των 12 αμινοξέων υποδεικνύονται με διακεκομμένες γραμμές. Οι αλληλουχίες των AnsA και GatB προέρχονται από αρχαία και βακτήρια, ενώ των GatD και GatE προέρχονται μόνο από αρχαία. Ομοπαράτεθηκαν αλληλουχίες από τους ακόλουθους οργανισμούς: *Aeropyrum pernix*, *Archaeoglobus fulgidus*, *M. thermoautotrophicum*, *Methanococcus jannaschii* (GatB, GatE και GatD), *Halobacterium salinarum*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Sulfolobus solfataricus*, *Thermoplasma acidophilum* (GatE και GatD), *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus*, *P. horikoshii* (GatE, AnsA, GatD), *Aquifex aeolicus*, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Thermotoga maritima* (GatB), *B. subtilis* (GatB, AnsA) και *E. coli* (AnsA).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των αντιδράσεων τρανσαμιδώσης μέσω των AdTs, η οποία μπορεί να προσφέρει σημαντικά στοιχεία για τη λειτουργία και τις σχέσεις των υπομονάδων των AdTs που συμμετέχουν άμεσα στην καταλυτική δράση των ενζύμων αυτών (GatA και GatD). Έχουν προταθεί 3 διακριτά βήματα για τη μετατροπή του Asp-tRNA^{Asn} ή Glu-tRNA^{Gln} σε ορθά αμινοακυλιωμένα tRNAs μέσω των AdTs (Wilcox et al. 1969): α) υδρόλυση της γλουταμίνης για την παραγωγή ενεργής αμμωνίας, β) φωσφορυλίωση του Glu-tRNA^{Gln} και γ) αμιδίωση του ενεργοποιημένου tRNA ενδιαμέσου (Εικόνα 10). Πρόσφατη ανάλυση της κινητικής της GatCAB του *Streptococcus pyogenes*, αποκάλυψε κάποια χρήσιμα στοιχεία για την κατανόηση του μηχανισμού τρανσαμιδώσης (Horiuchi et al. 2001). Δείχθηκε ότι τόσο η δράση γλουταμινάσης, όσο και η δράση ATPάσης της GatCAB είναι στενά συνδεδεμένες με την αντίδραση αυτή. Απουσία λανθασμένα αμινοακυλιωμένου tRNA, οι δραστηριότητες γλουταμινάσης και ATPάσης εμφανίστηκαν ιδιαίτερα χαμηλές. Κατά την προσθήκη, όμως, Glu-tRNA^{Gln} η k_{cat} της αντίδρασης γλουταμινάσης αυξήθηκε σημαντικά, ενώ η συγγένεια (K_m) του ενζύμου για τη γλουταμίνη παρέμεινε σταθερή. Αντίστοιχα, αυξήθηκε και το

ποσοστό υδρόλυσης του ATP παρουσία Glu-tRNA^{Gln} και γλουταμίνης. Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πρόσδεση του λανθασμένα αμινοακυλιωμένου tRNA στην αμιδοτρασφεράση, πιθανόν προκαλεί αλλαγή της διαμόρφωσης του ενζύμου, η οποία επιτρέπει στα κατάλοιπα των ενεργών περιοχών της γλουταμινάσης και της ATPάσης να ενεργοποιηθούν για την εκδήλωση της καταλυτικής δράσης (Horiuchi et al. 2001). Από τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων διάφορων παρόμοιων πειραμάτων προέκυψε ότι η πρόσδεση του ATP και του Glu-tRNA^{Gln} είναι μεν, ικανή συνθήκη για την επαγωγή της δράσης γλουταμινάσης, αλλά η υδρόλυση του ATP είναι απαραίτητη για την διεξαγωγή και συνέχιση της αντίδρασης τρανσαμιδίου.



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της καταλυόμενης από AdT τρανσαμιδίου. Οι υπομονάδες της AdT (GatA, GatB και GatC) υποδηλώνονται με έντονα κίτρινα γράμματα. Οι αριθμοί δίπλα στα τόξα υποδεικνύουν τη σειρά των ενδιάμεσων βημάτων της αντίδρασης. Το ATP προσδένεται στην A υπομονάδα στην περιοχή με δράση ATPάσης και ο δότης της αμιδομάδας, γλουταμίνη ή ασπαράγινη, προσδένεται στην περιοχή με δράση γλουταμινάσης η οποία, ομοίως, εντοπίζεται στην A υπομονάδα. **Βήμα 1:** Κατά την πρόσδεση του Glu-tRNA^{Gln} ή Asp-tRNA^{Asn} στο ενεργό κέντρο, επάγεται η δράση ATPάσης γεγονός που οδηγεί στη μετατροπή του ATP σε ADP το οποίο απελευθερώνεται, και σε ανόργανο φωσφορικό (Pi), το οποίο μεταφέρεται στην γ-καρβοξυλική ομάδα του γλουταμινικού (Glu) ή του ασπαργινικού (Asp) εστεροποιώντας το tRNA^{Gln} ή tRNA^{Asp}, αντίστοιχα. **Βήμα 2:** Ταυτόχρονα, επάγεται και η δράση γλουταμινάσης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό Glu ή Asp το οποίο απελευθερώνεται, και το σχηματισμό αμμωνίας η οποία ακολούθως θα μεταφερθεί στο ενεργοποιημένο ενδιάμεσο P-γ-Glu-tRNA^{Gln} ή P-γ-Asp-tRNA^{Asn}. **Βήμα 3:** Ο σχηματισμός Gln-tRNA^{Gln} ή Asn-tRNA^{Asn}, προκαλεί την απελευθέρωση του Pi οδηγώντας στην αποσύνδεση του Gln-tRNA^{Gln} ή Asn-tRNA^{Asn} από την AdT.

Η μελέτη των εξελικτικών σχέσεων των διαφόρων ειδών των οργανισμών είναι επιτακτική για τη συλλογή στοιχείων που αφορούν την ποικιλομορφία των μηχανισμών αμινοακυλίωσης. Το γεγονός ότι τα περισσότερα αρχαιοβακτήρια δεν περιέχουν AsnRS και GlnRS, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των ευβακτηρίων, τα οποία διαθέτουν AsnRS, με εξαίρεση τα Gram- ευβακτήρια που διαθέτουν και GlnRS, μαρτυρά ότι η εμφάνιση των σύγχρονων μονοπατιών ασπαραγινυλίωσης και γλουταμινυλίωσης στους προκαρυώτες καθυστέρησε χρονικά. Τα ευβακτήρια απέκτησαν AsnRS και GlnRS μετά το διαχωρισμό των προγονικών τους μορφών που συνέβει στα αρχαιοβακτήρια, τα οποία διατήρησαν τις AspRS και GluRS με τη διπλή εξειδίκευση (Becker and Kern 1998). Φυλογενετικές αναλύσεις προτείνουν την προέλευση της σημερινής μορφής των GluRS και GlnRS από μια κοινή προγονική μορφή GluRS (GlxRS) η οποία συμμετείχε στη διαδικασία σύνθεσης Gln-tRNA^{Gln} σε συνδυασμό με μια αμιδοτρανσφεράση, γεγονός που υποστηρίζει και ενδυναμώνει την ιδέα της προγονικής ιδιότητας του μονοπατιού της τρανσαμιδίωνης (Cagnon et al. 1996). Αυτή η προγονική GluRS (GlxRS) εξελίχθηκε έτσι ώστε να δώσει μετά από διπλασιασμό, μια GlnRS-like GluRS στην ευκαρυωτική σειρά και μια GluRS-like GluRS στη βακτηριακή σειρά, αμφότερες συστατικά του μονοπατιού τρανσαμιδίωνης. Αυτό το εξελικτικό σενάριο υποστηρίζει την υπόθεση ότι η δράση της GlnRS εμφανίστηκε αρχικά στην ευκαρυωτική σειρά και μεταφέρθηκε αργότερα σε μερικά βακτήρια. Παρ' όλα αυτά, έρχεται σε αντίθεση με τη γενικά αποδεκτή υπόθεση σύμφωνα με την οποία οι AARSs εξελίχθηκαν έτσι ώστε να παρουσιάζουν εξειδίκευση για καθένα από τα 20 αμινοξέα, πριν εκδηλωθεί η ποικιλομορφία που είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση προκαρυωτών και ευκαρυωτών (Cagnon et al. 1996). Η ιδέα της εμφάνισης της GlnRS στους ευκαρυώτες από την προγονική GlxRS πριν πραγματοποιηθεί η μεταφορά της στα ευβακτήρια, ενισχύεται από την αισθητά μεγαλύτερη ομοιότητα της δομής της βακτηριακής GlnRS με την ευκαρυωτική GluRS, παρά με τη βακτηριακή GluRS (Lamour et al. 1994). Παράλληλα, η αδυναμία εύρεσης στοιχείων που να συνδέουν δομικά τη βακτηριακή AsnRS με την ευκαρυωτική και τη βακτηριακή AspRS, μαρτυρά ότι η AsnRS εμφανίστηκε στους ευκαρυώτες μετά από διπλασιασμό του γονιδίου μιας προγονικής AsxRS και ακολούθως μεταφέρθηκε στα βακτήρια, πιθανότατα, πριν τη GlnRS. Συνεπώς, η πλειοψηφία των βακτηρίων έχασε το αρχικό μονοπάτι ασπαραγινυλίωσης, ενώ η GlnRS εμφανίστηκε αργότερα, στον πρόγονο των Gram- βακτηρίων.

Η κατανομή των έμμεσων μονοπατιών αμινοακυλίωσης των tRNAs στα διάφορα είδη των οργανισμών γεννά ποικίλα εξελικτικά ερωτήματα, όπως για παράδειγμα, αν τα μονοπάτια τρανσαμιδίωνης συνιστούν απομεινάρια των μηχανισμών που οδήγησαν στην επέκταση του γενετικού κώδικα. Επίσης, άλλα ερωτήματα πηγάζουν από τον τρόπο μεταφοράς των γονιδίων των αμινοακυλο-

tRNA συνθετασών. Φυλογενετικές αναλύσεις και αναλύσεις αλληλουχίας των γενωμικών δεδομένων υποδεικνύουν μια εκτεταμένη οριζόντια μεταφορά των γονιδίων των AARSs ανάμεσα στα διαφορετικά είδη του έμβιου κόσμου (Woese et al. 2000, Wolf et al. 1999). Επομένως, αποτέλεσε έκπληξη το γεγονός ότι το γονίδιο της GlnRS (*glnS*) δε μεταφέρθηκε στα αρχαία από τους ευκαρυώτες (Curnow et al. 1996, Gupta 1984). Έτσι, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η αναστολή της σταθερής μεταφοράς της GlnRS στα αρχαία και η κυριαρχία των έμμεσων μονοπατιών σύνθεσης του Gln-tRNA στους οργανισμούς αυτούς ίσως να οφείλεται, κατά κύριο λόγο, σε διαφορές των στοιχείων ταυτότητας των tRNA μορίων (tRNA^{Gln}) των συγκεκριμένων οργανισμών σε σχέση με τους υπόλοιπους (Tumbula et al. 2000).

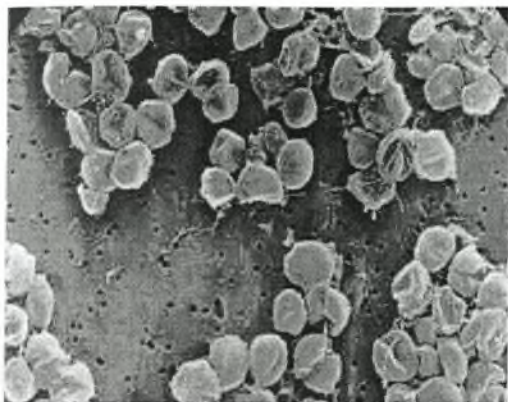
Λαμβάνοντας υπόψιν αυτή την ποικιλομορφία που ήδη διαπιστώθηκε, γεννιέται το ερώτημα αν ο μηχανισμός σύνθεσης των Asn-tRNA και Gln-tRNA είναι ακόμα σε εξέλιξη και αν τα δύο αμινοξέα Gln και Asn είναι από τα τελευταία που προστέθηκαν στο ρεπερτόριο των αμινοξέων των πρωτεϊνών. Από τα μέχρι τώρα ευρήματα μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα ποικίλα αυτά μονοπάτια αμινοακυλίωσης των tRNAs εξελίχθηκαν ξεχωριστά, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί μεγαλύτερο ποσοστό ακρίβειας και πιστότητας κατά την διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Από όλα τα παραπάνω, λοιπόν, είναι εμφανές ότι η μελέτη και η διεξαγωγή συμπερασμάτων για τους μηχανισμούς αμινοακυλίωσης των διαφορετικών οργανισμών απαιτεί των συνδυασμό αποτελεσμάτων από πολλαπλές έρευνες καθεμία από τις οποίες θα εστιάζεται σε διαφορετικό σημείο των αντιδράσεων που συνιστούν αυτούς τους μηχανισμούς. Όσον αφορά την παρούσα εργασία η οποία πραγματεύεται κυρίως τους μηχανισμούς σύνθεσης των Gln-tRNA και Asn-tRNA, τα σημαίνοντα σημεία που χρήζουν μελέτης μπορούν να συνοψιστούν στα εξής: συστατικά του άμεσου μονοπατιού αμινοακυλίωσης με έμφαση στις AARSs, συστατικά του έμμεσου μονοπατιού αμινοακυλίωσης και ενδελεχής μελέτη των αμιδοτρασφερασών και των αντιδράσεων που καταλύουν, καθώς και κάθε υπομονάδας τους ξεχωριστά, και τέλος εξελικτικές και φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα στους οργανισμούς στους οποίους εντοπίζεται η ποικιλομορφία των μηχανισμών αμινοακυλίωσης.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας εστιάζεται στη δημιουργία ενός οπερονίου που θα αποτελείται από τα γονίδια *gatD* και *gatE* της GatDE αμιδοτρανσφεράσης η οποία συναντάται στα αρχαία. Χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια που προέρχονται από τον οργανισμό *Pyrococcus abyssi*, ο οποίος αποτελεί ένα υπερθερμόφιλο αρχαιοβακτήριο, σε σχήμα κόκκου, που πρωτοανακαλύφθηκε και απομονώθηκε από τον πυθμένα του Ειρηνικού ωκεανού σε βάθος 3.500 μέτρα, όπου αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 100°C (Εικόνα 11). Στον οργανισμό αυτό τα γονίδια *gatDE* εντοπίζονται συνδεδεμένα μεταξύ τους στο γονιδίωμα, σε μορφή οπερονίου. Ο συγκεκριμένος οργανισμός χρησιμοποιεί το άμεσο βιοχημικό μονοπάτι για την παραγωγή Asn-tRNA^{Asn}, αφού στο γονιδίωμά του εντοπίζεται το γονίδιο *asnS*, που κωδικοποιεί για τη συνθετάση της ασπαραγίνης (Roy H. et al. 2003), ενώ ταυτόχρονα δε διαθέτει τα γονίδια *gatCAB*. Επιπλέον, ο οργανισμός αυτός δε διαθέτει GlnRS, αλλά μια GluRS με χαλαρή εξειδίκευση (nondiscriminating), η οποία μαζί με την αμιδοτρανσφεράση GatDE αποτελούν τα κύρια συστατικά του έμμεσου μονοπατιού σύνθεσης του Gln-tRNA^{Gln}. Είναι εμφανές, λοιπόν, ότι στο *Pyrococcus abyssi* ο μοναδικός τρόπος σχηματισμού Gln-tRNA^{Gln} είναι μέσω του έμμεσου μονοπατιού αμινοακυλίωσης.

Εξέχουσας σημασίας είναι το γεγονός ότι έχει παρατηρηθεί μεγάλο ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας και της λειτουργίας μεταξύ των υπομονάδων των δύο αμιδοτρανσφερασών, GatCAB και GatDE. Λαμβάνοντας υπόψιν αυτό το γεγονός, είναι εύλογη η υπόθεση ότι η μελέτη της GatDE ίσως προσφέρει σημαντικές πληροφορίες και για τη δομή και λειτουργία της GatCAB, η οποία εντοπίζεται σε μεγάλο αριθμό παθογόνων βακτηρίων. Σε πολλούς οργανισμούς, όπως προαναφέρθηκε, η GatDE εντοπίζεται σε μορφή οπερονίου, ενώ σε άλλους τα δύο επιμέρους γονίδια εντοπίζονται σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος. Έχουν, ήδη, διεξαχθεί έρευνες οι οποίες βασίζονται στη μελέτη του κάθε γονιδίου ξεχωριστά και έχουν αποφέρει καρπούς. Υπάρχουν, όμως, ακόμα αρκετά ερωτήματα τα οποία χρήζουν απάντησης και είναι πιθανόν αυτές οι απαντήσεις να προκύψουν από την μελέτη ολόκληρου του οπερονίου *in vitro*. Ένα από αυτά τα ερωτήματα αναζητά την αιτία που οδήγησε σε αναστολή της σταθερής μεταφοράς του γονιδίου της GlnRS από τους άλλους οργανισμούς στα αρχαία, κατά την διάρκεια της εξέλιξης. Στην παρούσα εργασία, τη δημιουργία του οπερονίου ακολούθησε η μεταφορά του σε στελέχη *E. coli*, η υπερέκφρασή του και η απομόνωσή του.



Εικόνα 11: Το υπερθερμόφιλο αρχαιοβακτήριο *Pyrococcus abyssi*, σε σχήμα κόκκου, που πρωτοανακαλύφθηκε και απομονώθηκε από τον πυθμένα του Ειρηνικού ωκεανού σε βάθος 3.500 μέτρα, όπου αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 100°C.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. Χημικές ουσίες:

- Αγαρόζη (SeaKem)
- Acrylamide (SIGMA)
- Αμπικιλλίνη (SIGMA)
- APS (Ammonium Persulfate) (SIGMA)
- BamH1 (New England Biolabs)
- Bis-acrylamide (SIGMA)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Merck)
- Bromophenol Blue (Research Organics)
- BSA (New England Biolabs)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- Γλυκίνη (AppliChem)
- Γλυκόζη (Panreac)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Coomassie Brilliant Blue (Fluka)
- Εκκινητές (sense/antisense) (Bio-Rad)
- Εκχύλισμα ζύμης (Scharlau)
- EDTA (Panreac)
- HCl (Merck)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- IPTG (Isopropyl ThioGalactosyl) (Fermentas)
- KCl (Merck)
- Μάρτυρας μοριακού βάρους (HyTest Ltd)
- Μεθανόλη (Panreac)
- MgCl_2 για PCR (Finnzymes)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Panreac)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac)
- Νουκλεοτίδια (dNTPs) (Stratagene)
- NaCl (Panreac)
- NaOH (Merck)
- Nde1 (New England Biolabs)
- Οξικό οξύ (Merck)
- Ριβονουκλεάση (New England Biolabs)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (New England Biolabs)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (Finnzymes)
- Pac1 (New England Biolabs)

- SDS (Sodium dodecyl sulfate) (SIGMA)
- Taq πολυμεράση (New England Biolabs)
- Taq πολυμεράση (Finnzymes)
- T4 λιγάση (New England Biolabs)
- TEMED (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine) (Research Organics)
- Τετρακυκλίνη (SIGMA)
- Tris base (Merck)
- Tryptone (Merck)
- Χλωραμφαινικόλη (SIGMA)
- X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοσίδη) (SIGMA)
- Xylene Cyanol (Merck)

3.1.2. Κύτταρα

XL 1 blue : Στέλεχος *E. coli* που στερείται του μηχανισμού αναγνώρισης και καταστροφής ξένων τμημάτων DNA (Novagen), γι' αυτό και χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA. Επιπλέον, διαθέτει γονίδια που του προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη.

DH5α: Στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA.

BL 21 Rosetta : Στέλεχος *E. coli* που περιέχει πλασμίδια που του προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη. Επιπλέον, το γονιδίωμά του περιλαμβάνει τις πληροφορίες για τη σύνθεση έξι tRNAs που μπορούν και αναγνωρίζουν τέσσερα σπάνια κωδικόνια (rare codons). Αυτά τα κωδικόνια χρησιμοποιούνται ευρέως από τα αρχαία και τα tRNAs που τα αναγνωρίζουν ονομάζονται minor tRNAs. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τα κύτταρα BL 21 Rosetta ιδανικά για την πραγματοποίηση της έκφρασης της εκάστοτε πρωτεΐνης-στόχου, όπως είναι στη συγκεκριμένη περίπτωση η αμιδοτρανσφεράση GatDE η οποία αποτελεί αποκλειστικά πρωτεΐνη των αρχαίων.

3.1.3. Θρεπτικά μέσα

LB Broth υγρό μέσο, pH7,2 (Scharlau με τυπική αναλογία g/L):

- Tryptone (10,0)
- Εκχύλισμα ζύμης (5,0)

Για τελικό όγκο 1L χρησιμοποιούνται:

- LB Broth 15g
- NaCl 10g
- Απιονισμένο H₂O

LB Agar στερεό μέσο, pH7,2 (Scharlau με τυπική αναλογία g/L):

- Tryptone (10,0)
- Εκχύλισμα ζύμης (5,0)
- Άγαρ (15,0)

Για τελικό όγκο 1L χρησιμοποιούνται:

- LB Agar 30g
- NaCl 10g
- Απιονισμένο H₂O

SOC medium υγρό μέσο, pH7 για τελικό όγκο 100ml:

- Tryptone 2g
- Εκχύλισμα ζύμης 0,5g
- NaCl 1M 1ml
- KCl 1M 0,25ml
- δ/μα Mg²⁺ 2M 1ml
- Γλυκόζη 2M 1ml

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

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

3.1.4. Ρυθμιστικά διαλύματα

Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE (50x) χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης και περιέχει για τελικό όγκο 1L:

- Tris base 242g
- Οξικό οξύ 57,1ml
- EDTA 0,5M pH 8 100ml
- απιονισμένο H₂O

Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 8,6.

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε gel πολυακρυλαμίδιου (10 %) για 1L τελικό όγκο περιέχει:

- Tris (pH 8,3) 15 g
- Γλυκίνη 72 g
- SDS 5 g
- απιονισμένο H₂O

Το ρυθμιστικό διάλυμα (loading buffer 6x) που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση του DNA αποτελείται από:

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

Το ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (3x) που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε τελικό όγκο 10ml αποτελείται από:

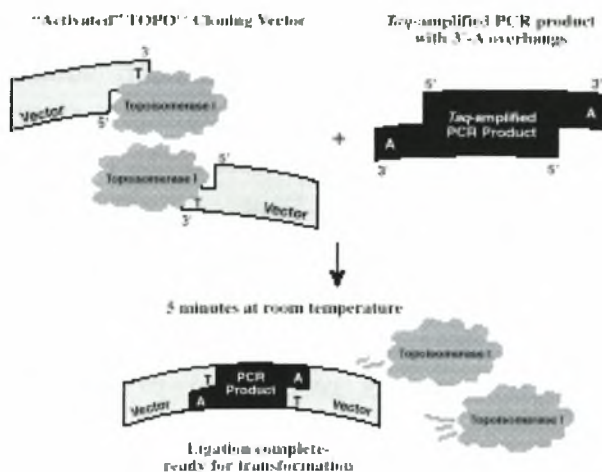
- Tris-HCl, 0,5M (pH 6,8) 2,0ml
- SDS 10 % (w/w) 1,0ml
- Γλυκερόλη 2,4ml
- β-μερκαπτοαιθανόλη 0,2ml
- 0,5% Coomassie brilliant blue G250 0,4ml
- απιονισμένο H₂O 4,0ml

3.1.5. Πλασμιδιακοί φορείς

pCR2.1-Toro :

Είναι πλασμιδιακός φορέας μεγέθους 3,9 kb και χρησιμοποιείται για τη κλωνοποίηση γονιδίων (Invitrogen). Η διαδικασία της κλωνοποίησης με το συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα περιλαμβάνει τη σύνδεση του προϊόντος της ενίσχυσης με PCR του γονιδίου που επιθυμούμε να εισαχθεί στο φορέα, με το φορέα pCR2.1-Toro μέσω της τοποϊσομεράσης I (Εικόνα 12). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται TA cloning και βασίζεται στην ικανότητα της Taq πολυμεράσης να προσθέτει μία δεοξυαδενοσίνη (A) στο 3' άκρο των προϊόντων της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτουν πολλά αντίγραφα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας, στην προκειμένη περίπτωση του γονιδίου-στόχου, με 3' A προεξοχές (overhangs). Αντίστοιχα, ο φορέας είναι κατάλληλα σχεδιασμένος, ώστε να μετατρέπεται σε γραμμικοποιημένο πλασμίδιο με 3' προεξοχές δεοξυθυμιδίνης (T) οι οποίες ενεργοποιούνται μετά από την ομοιοπολική τους

σύνδεση με την τοποϊσομεράση I. Τα 3' A άκρα του προϊόντος της PCR είναι συμπληρωματικά με τα 3' T άκρα του φορέα, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η εύκολη και γρήγορη σύνδεσή τους παρουσία της τοποϊσομεράσης I ή μιας λιγάσης, όπως της T4 DNA λιγάσης.



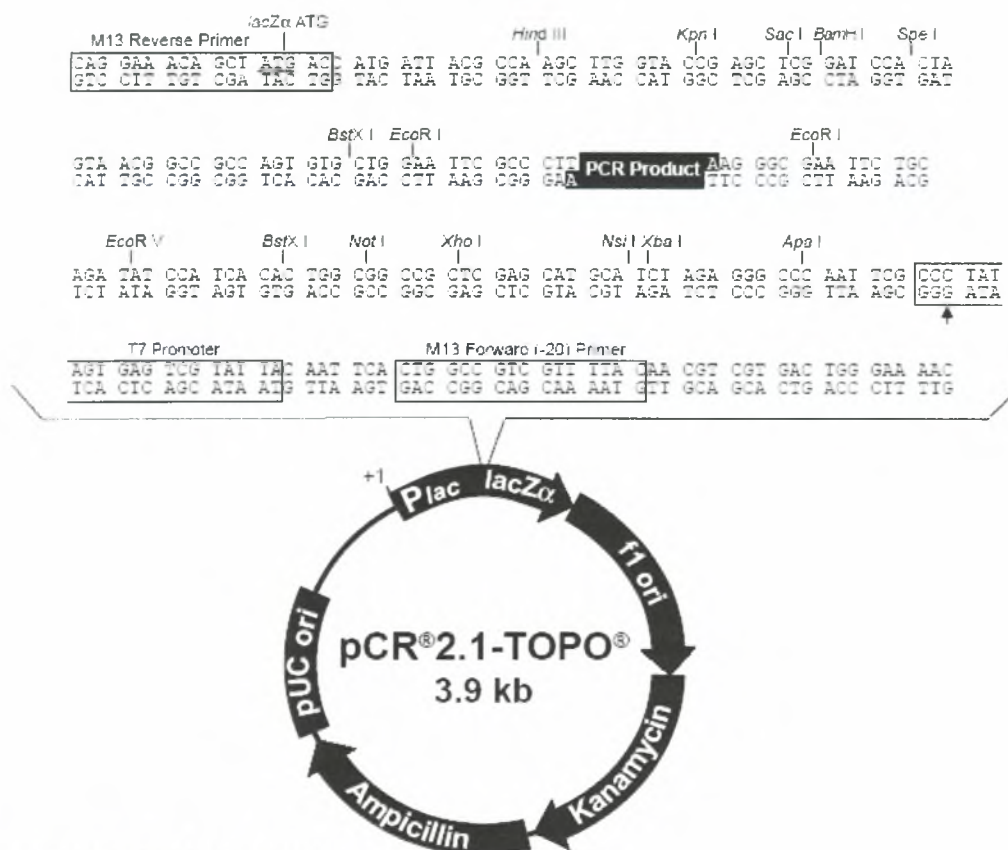
Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της κλωνοποίησης με τη μέθοδο TA cloning. Ο φορέας έχει γραμμοποιηθεί έτσι ώστε να διαθέτει 3' προεξοχές (overhangs) δεοξυθυμιδίνης (T) οι οποίες ενεργοποιούνται μετά από την ομοιοπολική τους σύνδεση με την τοποϊσομεράση I. Ακολουθεί η προσθήκη του προϊόντος PCR που αντιστοιχεί στο προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου που πρόκειται να κλωνοποιηθεί, το οποίο διαθέτει 3' προεξοχές δεοξαδενοσίνης (A) εξαιτίας της δράσης της Taq πολυμεράσης. Τέλος, πραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσης για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, όπου ενώνονται τα συμπληρωματικά άκρα του προϊόντος της PCR (3' A) και του φορέα (3' T), παρουσία της τοποϊσομεράσης I ή μιας λιγάσης, με αποτέλεσμα το ανασυνδυασμένο, πλέον, πλασμίδιο να είναι έτοιμο για μετασχηματισμό.

Άλλα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φορέα που είναι ιδιαίτερα χρήσιμα, είναι ότι περιέχει τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη (Εικόνα 13). Επίσης, διαθέτει το οπερόνιο της λακτόξης (lacZ) το οποίο κωδικοποιεί τρία ένζυμα, τη β-γαλακτοσιδάση που διασπά τη λακτόζη σε D-γλυκόζη και D-γαλακτόζη, τη περμεάση που καταλύει τη μεταφορά της λακτόξης μέσα στο κύτταρο και τη τρανσακετυλάση που δεν είναι απαραίτητη για το μεταβολισμό της λακτόξης και ο φυσιολογικός της ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί μέχρι τώρα. Η μεταγραφή αυτού του οπερονίου επάγεται από την ύπαρξη της λακτόξης στο περιβάλλον. Το χαρακτηριστικό της αντίδρασης διάσπασης της λακτόξης είναι η παραγωγή μπλέ χρωστικών.

Στα πλασμίδια, λοιπόν, που διαθέτουν το οπερόνιο της lacZ, ο πολυσυνδέτης (polylinker) βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία αυτού του οπερονίου (Εικόνα 13). Επομένως, αν επιτευχθεί η εισαγωγή ενός γονιδίου στον πολυσυνδέτη μετά από επεξεργασία με περιοριστικά ένζυμα, το τελικό αποτέλεσμα θα είναι να διακοπεί η αλληλουχία του lacZ και έτσι να μην είναι

δυνατή η έκφρασή του. Έτσι, αν πραγματοποιηθεί μεταφορά του πλασμιδιακού φορέα με το κλωνοποιημένο γονίδιο σε κύτταρα, κατά την ανάπτυξη των κυττάρων παρουσία του επαγωγέα λακτόζη (X-gal), δε θα είναι δυνατή η έκφραση του οπερονίου οπότε και η επακόλουθη διάσπαση της λακτόζης. Αυτό το γεγονός έχει ιδιαίτερη σημασία, εφόσον αν δεν πραγματοποιηθεί διάσπαση της λακτόζης δεν παράγεται μπλέ χρωστική, με αποτέλεσμα οι αποικίες των κυττάρων που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο να παρουσιάζουν λευκό χρώμα. Αντίθετα οι αποικίες που δεν έχουν προσλάβει το πλασμίδιο ή το πλασμίδιο δεν έχει ενσωματώσει το επιθυμητό γονίδιο παρουσιάζουν μπλε χρώμα, εφόσον εκφράζεται το lacZ και επομένως διασπάται η λακτόζη. Ο μηχανισμός αυτός, λοιπόν, είναι ιδιαίτερα χρήσιμος για την κλωνοποίηση γονιδίων σε βακτηριακούς φορείς και μάλιστα σε συνδυασμό με την ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο με το κατάλληλο αντιβιοτικό, καθιστά αρκετά αξιόπιστη και ακριβή τη διαδικασία επιλογής των αποικιών που έχουν προσλάβει το φορέα με το επιθυμητό ένθετο.

Επιπλέον, ο συγκεκριμένος φορέας διαθέτει τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης που είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφή του lacZ οπερονίου (Εικόνα 13). Το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης προέρχεται από βακτηριοφάγο, μέσω του οποίου μεταφέρθηκε και ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα των κυττάρων που χρησιμοποιούμε. Στα κύτταρα του *E. coli*, όμως, αναστέλλεται η έκφραση του γονιδίου αυτού παρουσία του καταστολέα LacIQ. Γι' αυτό είναι απαραίτητη η προσθήκη του επαγωγέα IPTG (Isopropyl Thio Galactosyl), ο οποίος δεσμεύει και απομακρύνει τον καταστολέα από το DNA επιτρέποντας έτσι την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης. Αυτή με τη σειρά της θα αναγνωρίσει τον προαγωγέα της στο πλασμίδιο και θα μεταγράψει τα γονίδια που βρίσκονται μετά από αυτόν. Αυτό σημαίνει ότι αν πραγματοποιηθεί εισαγωγή των επιθυμητών γονιδίων στη θέση μετά τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης, η προσθήκη του επαγωγέα IPTG θα οδηγήσει στην έκφραση των εισαχθέντων γονιδίων.



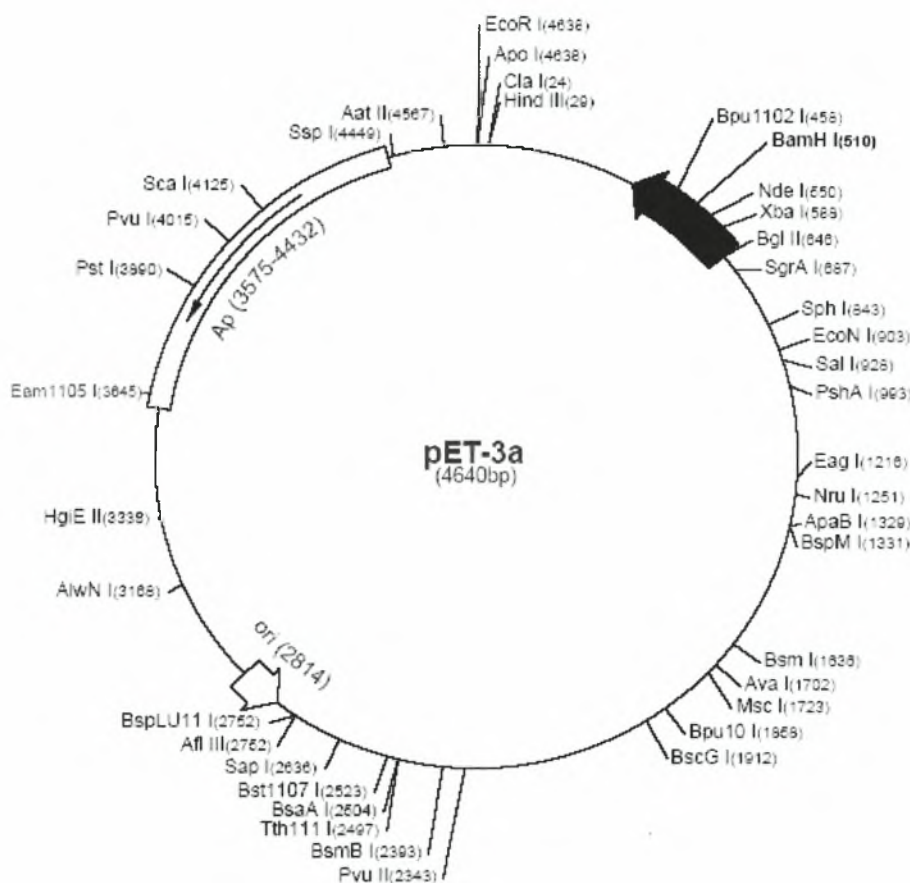
Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®] 3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547
M13 reverse priming site: bases 205-221
Multiple cloning site: bases 234-357
T7 promoter/priming site: bases 364-383
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
f1 origin: bases 548-985
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
pUC origin: bases 3136-3809

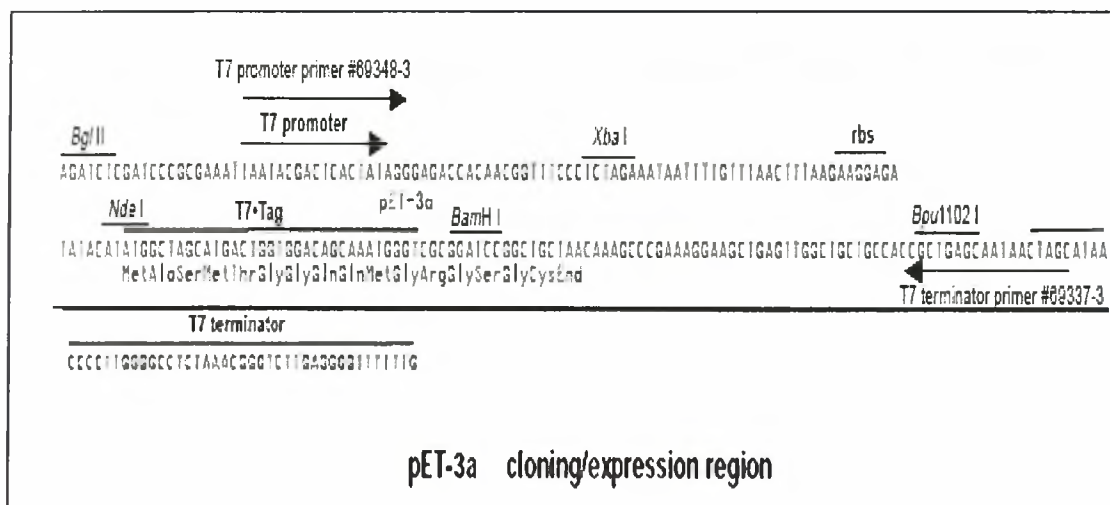
Εικόνα 13: Ο πλασμιδιακός φορέας pCR2.1-Topo. Αναγράφονται τα γονίδια του φορέα που του προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη, καθώς και το οπερόνιο της λακτόζης lacZ. Επιπλέον, δίνεται αναλυτικά η αλληλουχία του πολυσυνδέτη (multiple cloning site) που εντοπίζεται στο εσωτερικό της αλληλουχίας του lacZ και οι θέσεις που αναγνωρίζουν διάφορα περιοριστικά ένζυμα στο εσωτερικό του. Τέλος, στο εσωτερικό του πολυσυνδέτη διακρίνεται η θέση εισαγωγής του προϊόντος ενίσχυσης του προς κλωνοποίηση γονιδίου, καθώς και οι αλληλουχίες των M13 reverse και forward primers και του προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης. Κάτω από το σχήμα αναγράφεται ο αριθμός των βάσεων που αποτελούν κάθε προαναφερθής αλληλουχία.

pET-3a:

Είναι πλασμιδιακός φορέας μεγέθους 4640bp (Novagen) και διαθέτει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη (Εικόνα 14). Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση και έκφραση γονιδίων μέσω της T7 RNA πολυμεράσης με τον ίδιο μηχανισμό που προαναφέρθηκε. Στο πλασμίδιο pET-3a μετά τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης υπάρχει ο πολυσυνδέτης (polylinker), όπου βρίσκονται όλες οι θέσεις αναγνώρισης και κοπής από τα ένζυμα περιορισμού (Εικόνα 15). Έτσι, με τη χρήση των κατάλληλων ενζύμων είναι δυνατή η εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου στο εσωτερικό του polylinker και στη συνέχεια η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου αυτού μετά από την πρόσδεση της T7 RNA πολυμεράσης στον προαγωγέα της. Παρ' όλα αυτά, το pET-3a δε διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης (lacZ), με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επιλογή των αποικιών που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο, με βάση το χρώμα τους.



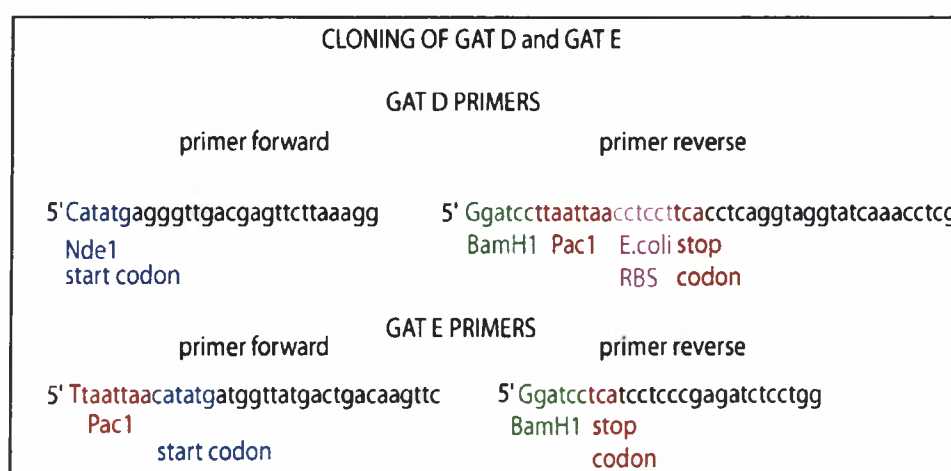
Εικόνα 14: Ο χάρτης περιορισμού του πλασμιδίου pET-3a. Φαίνονται όλες οι θέσεις που αναγνωρίζονται από ένζυμα περιορισμού, καθώς και η θέση έναρξης της αντιγραφής ori (άσπρο τόξο). Τέλος, αναγράφονται τα ένζυμα που αναγνωρίζουν τις θέσεις κοπής στο εσωτερικό του πολυσυνδέτη (μάυρο τόξο), όπως το BamH1 και το NdeI, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.



Εικόνα 15: Περιοχή κλωνοποίησης και έκφρασης του πλασμιδιακού φορέα pET-3a. Διακρίνεται ο προαγωγέας της T7 RNA πολυμεράσης και τα περιοριστικά ένζυμα που αναγνωρίζουν θέσεις κοπής στο εσωτερικό της αλληλουχίας του πολυσυνδέτη, ο οποίος εντοπίζεται μετά τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης.

3.1.6. Εκκινητές (primers)

Για την ενίσχυση των *gatD* και *gatE* γονιδίων, καθώς και ολόκληρου του οπερονίου *gatDE* χρησιμοποιούνται ως εκκινητές (primers), εξειδικευμένα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 28-46 βάσεων (Εικόνα 16), τα οποία περιλαμβάνουν και τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις θέσεις δράσης των ενζύμων περιορισμού που θα χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω επεξεργασία των γονιδίων και τη δημιουργία του οπερονίου.



Εικόνα 16: Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των γονιδίων *gatD* και *gatE* με τη χρήση της PCR. Φαίνονται οι forward και reverse εκκινητές που αντιστοιχούν σε κάθε γονίδιο, τα κωδικόνια έναρξης και λήξης της μεταγραφής, καθώς και οι θέσεις αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα NdeI, BamHI και PacI, σε κάθε εκκινητή.

ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

3.2.1. Μεταφορά των πλασμιδίων σε κύτταρα *E. coli*

Προηγείται η δημιουργία υγρών καλλιιεργειών XL 1 Blue ή DH5a (για κλωνοποίηση των πλασμιδίων) ή BL 21 Rossetta (για υπερέκφραση της πρωτεΐνης) με τον ενοφθαλμισμό 5ml LB broth που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Συγκεκριμένα, για την ανάπτυξη των XL 1 Blue χρησιμοποιείται τετρακυκλίνη (5mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,02mg/ml και χλωραμφαινικόλη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 25mg/ml για την ανάπτυξη των BL 21 Rossetta. Η ανάπτυξη των καλλιιεργειών πραγματοποιείται 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm). Όταν τα κύτταρα έχουν περιέλθει στη στατική φάση, διακόπτεται η ανάπτυξη και γίνεται ανανέωση του θρεπτικού μέσου με μεταφορά 200 μl κυττάρων σε 5ml LB με το αντίστοιχο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση για 3 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) για να επανέλθουν τα κύτταρα στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 4000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο, επαναδιαλύεται το ίζημα σε 2,5 ml CaCl₂ (0,1M) και επωάζεται για 45 λεπτά στους 0-4°C. Φυγοκεντρείται στα 4000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και στη συνέχεια μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου το ίζημα επαναδιαλύεται σε 500μl CaCl₂ (0,1M). Ακολουθεί επώαση στους 0-4°C για 60 min και προσθήκη 2μl pCR2.1-Toro και 2μl pET-3a σε 200μl επιδεκτικών κυττάρων. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 35 min και heatshock στους 42°C για 1 min. Επωάζεται στον πάγο για 2 min και εν συνεχεία προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 800 μl διαλύματος SOC. Ακολουθεί επώαση για 1,5 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (170 rpm). Τέλος, επιστρώνονται 100μl-200μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας σε τριβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό, ανάλογα με τα γονίδια ανθεκτικότητας που διαθέτει το εκάστοτε πλασμίδιο που χρησιμοποιείται (π.χ. αμπικιλίνη και καναμυκίνη για το pCR2.1-Toro και αμπικιλίνη για το pET-3a). Επίσης, σε περίπτωση που το πλασμίδιο που χρησιμοποιείται διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης (π.χ. pCR2.1-Toro), είναι απαραίτητη η προσθήκη 32μl X-gal (50mg/ml) και 100μl IPTG (0,1M) στα τριβλία άγαρ πριν την επίστρωση των κυττάρων, για να είναι δυνατή, στη συνέχεια, η επιλογή των αποικιών με το επιθυμητό πλασμίδιο. Τέλος, πραγματοποιείται επώαση των τριβλίων στους 37°C για 12-14h.

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

Προηγείται η δημιουργία υγρών καλλιιεργειών με ενοφθαλισμό των μετασχηματισμένων αποικιών (τόσο για το pCR2.1-Topo όσο και για το pET-3a) που διαθέτουν ικανοποιητικό μέγεθος, σε 3ml LB broth που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση των καλλιιεργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (205 rpm). Η ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli* με το NucleoSpin® Plasmid QuickPure:

Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:

Τοποθετούνται 1,5ml από την καλλιέργεια *E. coli* που αναπτύχθηκε σε ένα σωλήνα και φυγοκεντρώνονται για 30s στις 11000 x g. Αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η διαδικασία.

Λύση των κυττάρων:

Προστίθενται 250μl buffer A1 και επαναδιαλύεται το ίζημα με έντονη ανάδευση στο vortex. Ακολουθεί προσθήκη 250μl buffer A2 και ανάμειξη με ήπια ανάδευση χωρίς τη χρήση του vortex. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min το μέγιστο. Ακολούθως προστίθενται 300μl buffer A3 και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση αποφεύγοντας τη χρήση του vortex. Φυγοκέντρηση για 5 min στις 11000 x g σε θερμοκρασία δωματίου.

Δέσμευση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη NucleoSpin® Plasmid QuickPure σε έναν collecting tube 2ml στην οποία φορτώνεται το υπερκείμενο που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρηση του προηγούμενου βήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 min στις 11000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.

Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

Επανατοποθετείται η στήλη στον collecting tube και προστίθενται 450μl buffer AQ (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 4 min στις 11000 x g όπου και επιτυγχάνεται ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του εκλούσματος.

Έκλυση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωλήνα και προστίθενται 25μl buffer AE. Στη συνέχεια, επωάζεται το δείγμα για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 11000 x g και επαναλαμβάνεται το βήμα της έκλυσης του DNA με αποτέλεσμα ο τελικός όγκος έκλυσης να είναι 50μl.

3.2.3 Διαχωρισμός και ανίχνευση του DNA

Για το διαχωρισμό του DNA και τον προσδιορισμό του μεγέθους των διαφόρων DNA τμημάτων χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης. Χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης 0,8% ή 1%, ανάλογα με το μέγεθος του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε και να ανιχνεύσουμε, το οποίο παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,96gr αγαρόζης ή 1,2gr αγαρόζης, αντίστοιχα, σε 120ml TAE buffer 1x. Στη συνέχεια, θερμαίνεται το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί όλη η ποσότητα της αγαρόζης και να γίνει διαυγές. Αφού κρυώσει λίγο ακολουθεί προσθήκη 8ml βρωμιούχου αιθιδίου 1% και το διάλυμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου και αφήνεται να πήξει. Προετοιμάζονται τα δείγματα και οι μάρτυρες του μοριακού βάρους που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν με την προσθήκη σε αυτά loading buffer 6x. Όταν το πήκτωμα είναι έτοιμο, προστίθεται TAE buffer 1x μέχρι να καλυφθεί η επιφάνειά του και φορτώνονται τα δείγματα στις ειδικές υποδοχές του πηκτώματος. Ακολουθώντας, συνδέονται τα ηλεκτρόδια της ηλεκτροφορητικής συσκευής με τη συσκευή τροφοδότησης έτσι ώστε το θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής όπου κατευθύνονται τα δείγματα τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα. Τέλος, εφαρμόζεται τάση 120 V και μετά από 30 περίπου λεπτά είναι δυνατή η ανίχνευση του DNA με τη μορφή ζωνών κάτω από το υπεριώδες φως, γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω της ενσωμάτωσης των μορίων του βρωμιούχου αιθιδίου, μιας ουσίας που απορροφά στο υπεριώδες, στο DNA, ενώ ταυτόχρονα είναι δυνατός ο προσδιορισμός του μεγέθους των ζωνών μέσω της σύγκρισής τους με τους μάρτυρες του μοριακού βάρους.

3.2.4. Καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η απομόνωση και ο καθαρισμός τμημάτων DNA από gel αγαρόζης (DNA extraction from agarose gels) πραγματοποιείται με βάση το αντίστοιχο πρωτόκολλο του NucleoSpin® Extract II:

Εξαγωγή του τμήματος DNA:

Αρχικά εξάγεται από το gel αγαρόζης η ζώνη με το τμήμα του DNA που επιθυμούμε να απομονώσουμε με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου ξυραφιού. Η εξαγωγή πραγματοποιείται με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο περιττός όγκος του gel.

Διάλυση του gel:

Το κομμάτι αυτό διαλύεται σε buffer NT σε αναλογία 200μl buffer για κάθε 100mg gel αγαρόζης (για gel αγαρόζης μέχρι και 2%). Η διάλυση επιτυγχάνεται με θέρμανση του gel στους 50°C για 5-10 min με ταυτόχρονη ανάδευση στο vortex κατά τακτά χρονικά διαστήματα.

Δέσμευση του DNA:

Το δείγμα φορτώνεται σε μια στήλη NucleoSpin® Extact II η οποία τοποθετείται σε έναν collecting tube 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 11000 x g. Τέλος, απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στον collecting tube.

Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

Προστίθενται 600μl buffer NT3 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 11000 x g. Απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στον collecting tube.

Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης:

Τα δείγμα φυγοκεντρείται για 2 min στις 11000 x g με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του buffer NT3. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο γιατί έτσι επιτυγχάνεται η απομάκρυνση της αιθανόλης που περιέχει το buffer NT3, η οποία είναι πιθανόν να αναστείλει ακόλουθες αντιδράσεις.

Έκλωση του DNA:

Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προστίθενται 15μl elution buffer NE. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της έκλωσης του DNA. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 min στις 11000 x g. Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται, με αποτέλεσμα ο τελικός όγκος έκλωσης να είναι 30μl.

3.3. ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

3.3.1. Ανάλυση με ένζυμο περιορισμού

Η ενζυμική πέψη με τη χρήση ενζύμων περιορισμού έχει σκοπό την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA. Πλασμιδιακό DNA επωάζεται με το ένζυμο σε αναλογία 2 Units (ενζυμικές μονάδες)/μg DNA, παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο προτείνεται από την κατασκευαστική εταιρεία. Η ενζυμική μονάδα ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει 1 μg DNA από βακτηριοφάγο σε μια ώρα, στους 37°C. Η αντίδραση διαρκεί περίπου 3 ώρες στους 37°C. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά είναι τα BamH1 (20u/ml), PacI (10u/ml) και NdeI (20u/ml) της εταιρείας New England Biolabs και στην εικόνα 17 φαίνονται οι αλληλουχίες του DNA που αναγνωρίζουν και οι αντίστοιχες θέσεις κοπής τους. Στην ίδια εταιρεία ανήκουν και τα ρυθμιστικά διαλύματα 10x των ενζύμων (NEBuffer 1-4), σε καθένα από τα οποία το εκάστοτε ένζυμο παρουσιάζει διαφορετική δραστητικότητα (Εικόνα 17).

BamH1:

5'...GGATCC...3'
3'...CCTAGG...5'

NdeI:

5'...CATATG...3'
3'...GTATAC...5'

PacI:

5'...TTAATTAA...3'
3'...AATTAATT...5'

	BamH1	NdeI	PacI
NEBuffer 1:	75%	75%	100%
NEBuffer 2:	100%	100%	75%
NEBuffer 3:	50%	75%	10%
NEBuffer 4:	75%	100%	100%

Εικόνα 17: Αριστερά φαίνονται οι αλληλουχίες του DNA που αναγνωρίζουν οι τρεις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamH1, PacI και NdeI και οι ακριβείς θέσεις κοπής. Στον πίνακα δεξιά, αναγράφονται οι δραστικότητες καθενός εκ των τριών περιοριστικών ενζύμων σε καθένα από τα 4 ρυθμιστικά διαλύματα της εταιρείας New England Biolabs. Ο πίνακας αυτός είναι απαραίτητος για την επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις πέψης, τόσο με ένα μόνο περιοριστικό ένζυμο, όσο και με την ταυτόχρονη δράση δύο ή και περισσότερων περιοριστικών ενζύμων. Το τελευταίο απαιτεί τη σύγκριση των δραστικοτήτων των ενζύμων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν και την επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη δραστικότητα. Για παράδειγμα, για μια αντίδραση πέψης με τα ένζυμα BamH1 και NdeI το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα είναι το NEBuffer 2, στο οποίο και τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν 100% δραστικότητα.

Κατά τη διαδικασία της ενζυμικής πέψης προστίθεται επιπλέον και BSA (100x), μια ουσία η οποία δεσμεύεται στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωλήνων, εμποδίζοντας έτσι τη δέσμευση των περιοριστικών ενδονουκλεασών σε αυτά, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η επακόλουθη μείωση της δραστικότητας των ενζύμων αυτών. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η διάρκεια της πέψης με το BamH1 είναι προτιμότερο να μην υπερβαίνει τις 3 ώρες γιατί υπάρχει κίνδυνος να εκδηλωθεί star activity του ενζύμου (η πέψη αλληλουχιών παρόμοιων με τη φυσιολογικά αναγνωριζόμενη αλληλουχία από ορισμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες) και να υπάρχουν επιπλοκές στα διεξαγόμενα αποτελέσματα. Οι συνθήκες συνθήκες που μπορούν να οδηγήσουν στην εκδήλωση star activity είναι η χαμηλή ιονική ισχύς, η υψηλή συγκέντρωση ενζύμου, συγκέντρωση γλυκερόλης που ξεπερνά το 5%, καθώς και pH μεγαλύτερο του 8.0.

3.3.2. Σύνδεση τμημάτων DNA

Επωάζεται γραμμικός φορέας παρουσία των τμημάτων, που επιθυμούμε να συνδέσουμε, σε αναλογία φορέα προς τμήμα DNA 1:3, με την προσθήκη 1 Unit T4 DNA λιγάσης (400u/μl). Επιπλέον, είναι απαραίτητη η προσθήκη στο διάλυμα του ειδικού buffer της λιγάσης το οποίο κατασκευάζεται από την ίδια εταιρεία, καθώς επίσης και ATP (10mM) τελικής συγκέντρωσης 0,25 Mm. Το ένζυμο αφήνεται να δράσει για 12-14h στους 16°C.

3.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των γονιδίων *gatD* και *gatE*, καθώς και ολόκληρου του οπερονίου *gatDE*. Αρχικά προστίθενται το DNA προς ενίσχυση, το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται η οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η Taq πολυμεράση (New England Biolabs) από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs), οι εκκινητές και το H₂O και όλα τα συστατικά αναμειγνύονται όσο το δυνατόν καλύτερα. Ακολούθως, τοποθετείται το μείγμα στη συσκευή PCR. Η PCR ξεκινάει με ένα στάδιο μετουσίωσης σε θερμοκρασία 95°C για 3 min. Μετά την πάροδο αυτού του χρονικού διαστήματος προστίθεται με προσοχή η πολυμεράση και το πρόγραμμα συνεχίζεται. Ακολουθούν 30-40 κύκλοι καθένας από τους οποίους αποτελείται από ένα βήμα μετουσίωσης στους 95°C για 45 sec, ένα στάδιο υβριδισμού για τη σύνδεση των εκκινητών στους 45-60°C για 1 min και 30 sec και ένα στάδιο πολυμερισμού κατά το οποίο δρα η πολυμεράση στους 72 °C για 2 min. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με ένα στάδιο σε θερμοκρασία υβριδισμού 72°C για 10 min. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μείγματος τελικού όγκου 50μl είναι τα ακόλουθα:

➤ Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (10x)	5 μL
➤ Premixed dNTPs (10 mM)	1,5 μL
➤ MgCl ₂ (50mM)	2,5μl
➤ Εκκινητές sense (100 μM)	1 μL
➤ Εκκινητές antisense (100 μM)	1 μL
➤ Πλασμιδιακό DNA	1 μL
➤ Taq πολυμεράση (5u/μl)	1μL

3.4. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ *GatDE*

Αναπτύσσονται καλλιέργειες 5ml με τα αντιβιοτικά χλωραμφαινικόλη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 25mg/ml και αμπικιλίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml με τα κύτταρα BL 21 Rossetta που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο, για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Ακολουθεί μεταφορά των 5ml της καλλιέργειας σε 100ml από φρέσκο θρεπτικό μέσο LB broth με χλωραμφαινικόλη και αμπικιλίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD₆₀₀) και επώαση των καλλιεργειών στους 37°C υπό ανάδευση έως ότου το OD₆₀₀ φτάσει περίπου το 0,5 που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Προσθέτουμε IPTG (0,1M) (Isopropyl Thio Galactosyl) σε τελική συγκέντρωση 0,5Mm και 1Mm, καθώς και αμπικιλίνη. Το IPTG δρα ως επαγωγέας της

έκφρασης του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης της οποίας ο προαγωγέας στο πλασμίδιο pET-3a βρίσκεται μπροστά από τον πολυσυνδέτη. Η έκφραση του γονιδίου αυτού στα κύτταρα του *E. coli* αναστέλλεται από τον καταστολέα LacIQ. Το IPTG, λοιπόν, 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. Μετά την προσθήκη του IPTG συνεχίζεται η επώαση των καλλιιεργειών στους 37°C και σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι το OD₆₀₀ να φτάσει το 0,8-0,9. Τέλος, φυγοκεντρούνται οι καλλιέργειες στις 12000 rpm για 30 min στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C. Πρέπει να αναφέρουμε ότι η επώαση σε θερμοκρασία δωματίου αποσκοπεί στην επίτευξη της αναστολής της δράσης πρωτεασών και της επακόλουθης αποικοδόμησης της πρωτεΐνης-στόχου, σε περίπτωση που αυτή εγκλωβίζεται σε σωμάτια εγκλεισμού (inclusion bodies) με πρωτεολυτικά ένζυμα και κατακρημνίζεται κατά τη φυγοκέντρηση μαζί με αυτά.

3.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GatDE

3.5.1. Ομογενοποίηση των κυττάρων

Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα ομογενοποίησης για τη διαδικασία σπασίματος των κυττάρων BL 21 Rossetta στα οποία έχει προηγηθεί υπερέκφραση της πρωτεΐνης GatDE. Το διάλυμα ομογενοποίησης περιέχει σε τελικό όγκο 40ml:

- 50mM Tris-HCl pH 7,5 (1M)
- 50mM KCl (1M)
- 10mM MgCl₂ (1M)
- 5mM β-μερκαπτοαιθανόλη (14,3M)

Ακολουθεί διάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 2ml του παραπάνω διαλύματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία του σπασίματος των κυττάρων με υπέρηκους και φυγοκέντρηση στα 15000 rpm, για 10 min στους 4°C. Διαχωρίζεται το υπερκείμενο από το ίζημα και ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης-στόχου.

3.5.2. Επεξεργασία του κυτταρικού εκχυλίσματος με θέρμανση - Απομόνωση της πρωτεΐνης GatDE

Εξαιτίας της μεγάλης θερμοανθεκτικότητας που εμφανίζει η προς απομόνωση πρωτεΐνη, GatDE, είναι δυνατή η απομόνωσή της μέσω της θέρμανσης του κυτταρικού εκχυλίσματος που προέκυψε από τη διαδικασία ομογενοποίησης των κυττάρων στα οποία είχε προηγηθεί η υπερέκφρασή της. Το ίζημα το οποίο προέκυψε μετά τη φυγοκέντρηση του κυτταρικού

εκχυλίσματος επαναδιαλύεται σε Tris-HCl pH6,8 και η μισή ποσότητα, μαζί με τη μισή ποσότητα του υπερκείμενου, που επίσης προέρχεται από το κυτταρικό εκχύλισμα, φυλάσσεται στους -20°C. Η άλλη μισή ποσότητα του ιζήματος, καθώς το υπόλοιπο μισό του υπερκείμενου θερμαίνεται στους 70°C για 20 min. Ακολουθεί φυγοκέντρωση των δειγμάτων που θερμάνθηκαν, στα 14000 rpm για 30 min και διαχωρισμός του υπερκείμενου από το ίζημα, και τα δύο από τα οποία φυλάσσονται στους -20°C.

3.5.3 Διαχωρισμός των πρωτεϊνών

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου, η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, τη πηκτική διαχωρισμού (separating gel) και τη πηκτική συγκέντρωσης (stacking gel). Το πήκτωμα συγκέντρωσης έχει μικρότερη πυκνότητα από το πήκτωμα διαχωρισμού και, όπως φαίνεται και από την ονομασία του, συγκεντρώνει την ποσότητα των δειγμάτων που έχουμε φορτώσει, τα οποία όταν εισέλθουν στην πηκτική διαχωρισμού, διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Αρχικά τοποθετείται το πήκτωμα διαχωρισμού στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται από πάνω του μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας του gel. Αφού πήξει, αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται στη συσκευή το πήκτωμα συγκέντρωσης ακριβώς από πάνω από το gel διαχωρισμού, το οποίο αφήνεται να πήξει. Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτική περιλαμβάνει την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού (3x) και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η μετουσίωση επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C, για 5 min, ούτως ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση το φορτίο τους, το οποίο είναι ενιαίο αρνητικό, εξαιτίας του SDS. Ακολούθως, αφού εξασφαλιστεί ότι το πήκτωμα είναι έτοιμο, φορτώνονται τα δείγματα, καθώς και οι μάρτυρες μοριακού βάρους, στις ειδικές υποδοχές της πηκτικής και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris, γλυκίνη, SDS) στη συσκευή, έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με το gel. Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με τη συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση 100V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτική συγκέντρωσης, ενώ μόλις φτάσουν στην πηκτική διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 200V.

Πηκτική διαχωρισμού 10%:

➤ Ακρυλαμίδιο 30%	2,0 ml
➤ Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	1,5 ml
➤ SDS 10%	60 μl
➤ TEMED	6,0 μl
➤ APS 20%	15 μl
➤ ddH ₂ O	2,5 ml

Πηκτή συγκέντρωσης 4%:

➤ Ακρυλαμίδιο 30%	0,5 ml
➤ Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	0,75 ml
➤ SDS 10%	30 μ l
➤ TEMED	6,0 μ l
➤ APS 20%	15 μ l
➤ ddH ₂ O	1,75 ml

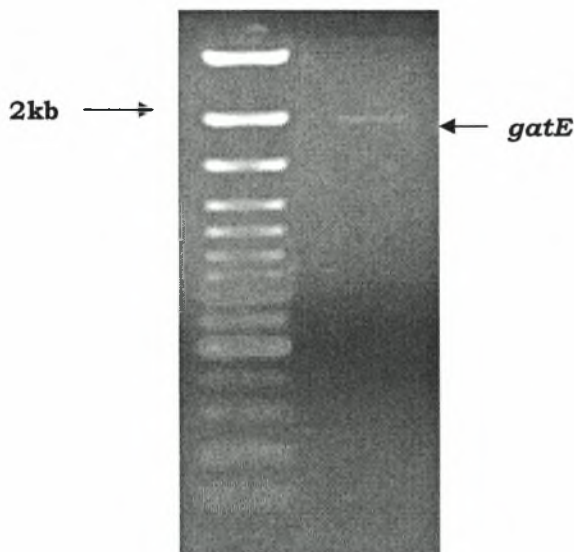
Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος, καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Ακολουθεί, αφαίρεση της πηκτής συγκέντρωσης και βάψιμο του gel διαχωρισμού με το διάλυμα χρωματισμού (stain solution) το οποίο περιέχει για τελικό όγκο 100ml τα εξής:

➤ Coomassie Brilliant Blue	0,25g
➤ Ισοπροπανόλη	25ml
➤ Οξικό οξύ	10ml
➤ H ₂ O	65ml

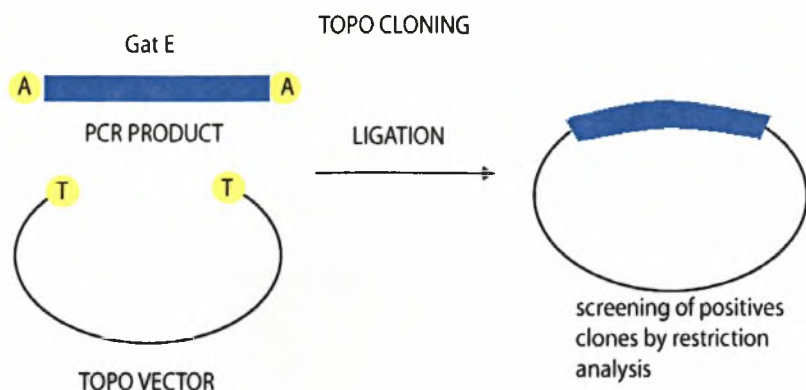
Η διαδικασία αυτή διαρκεί 45 min υπό ανάδευση και στη συνέχεια πραγματοποιείται αποχρωματισμός του gel με το διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution), το οποίο αποτελείται από 10% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ. Η διαδικασία αποχρωματισμού διαρκεί για περίπου 50 min, αλλά κάθε 10 min είναι απαραίτητη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

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pCR2.1-Topo και pET-3a για την κλωνοποίηση των γονιδίων *gatE* και *gatD*, αντίστοιχα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση του γονιδίου *gatE* με PCR, αφού πρώτα προετοιμάστηκε ένα δείγμα τελικού όγκου 50μl. Αφού ολοκληρώθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης κατά την οποία εφαρμόστηκε θερμοκρασία υβριδισμού 60°C, έγινε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος ενίσχυσης σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έγιναν ορατά σε υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 18) και η εικόνα που προέκυψε επιβεβαίωσε την ορθότητα της ενίσχυσης εφόσον μπορούμε να διακρίνουμε μια ζώνη που αντιστοιχεί στις 1,9kb, όσο δηλαδή είναι και το μέγεθος του *gatE*. Ακολούθως, έγινε απομόνωση αυτής της ζώνης από την πηκτή και καθαρισμός της σε τελικό όγκο έκλουσης του DNA 30μl, με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Το δείγμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της αντίδρασης σύνδεσης μετά από την προσθήκη του πλασμιδίου pCR2.1-Topo και του ενζύμου T4 DNA λιγάση που είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση των δύο τμημάτων. Η διαδικασία της εισαγωγής του γονιδίου *gatE* στο φορέα pCR2.1-Topo έγινε με τη μέθοδο του TA cloning όπως περιγράφηκε παραπάνω (Εικόνα 19). Παράλληλα, εισήχθει και το γονίδιο *gatD* στο φορέα pET-3a μετά από πέψη και των δύο με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και BamHI. Ακολούθησε η διαδικασία σύνδεσης των δύο τμημάτων μέσω των κολλωδών τους άκρων με τη βοήθεια της T4 DNA λιγάσης στους 16°C για 12-14h.



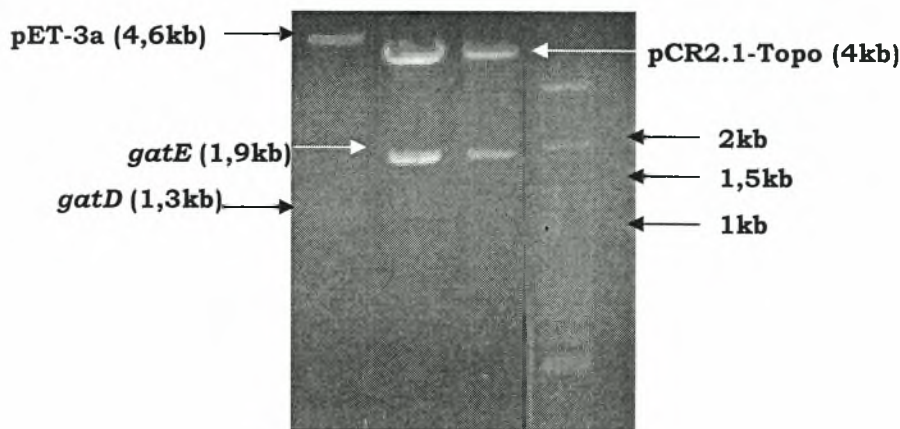
Εικόνα 18: Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης ενίσχυσης με PCR του γονιδίου *gatE*, το οποίο πρόκειται να εισαχθεί στο φορέα pCR2.1-Topo με τη μέθοδο του TA cloning. Είναι ευδιάκριτη μια ζώνη περίπου 2kb η οποία αντιστοιχεί στο προϊόν ενίσχυσης του *gatE*.



Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας κλωνοποίησης με τη μέθοδο του TA cloning, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή του γονιδίου *gatE* στον πλασμιδιακό φορέα pCR2.1-Topo. Ο φορέας έχει γραμμοποιηθεί έτσι ώστε να διαθέτει 3' προεξοχές (overhangs) δεοξυθυμιδίνης (T), ενώ το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *gatE* που πρόκειται να κλωνοποιηθεί διαθέτει 3' προεξοχές δεοξυαδενοσίνης (A) εξαιτίας της δράσης της Taq πολυμεράσης. Ακολούθως, πραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσης μέσω των συμπληρωματικών άκρων του προϊόντος της PCR (3' A) και του φορέα (3' T), παρουσία της T4 DNA λιγάσης. Το ανασυνδυασμένο, πλέον, πλασμίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μετασχηματισμό και ακόλουθο έλεγχο των θετικών κλώνων που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο με τη μέθοδο της ανάλυσης με ένζυμα περιορισμού.

Αναπτύχθηκαν καλλιέργειες κύτταρων XL 1 Blue σε υγρό θρεπτικό μέσο με τετρακυκλίνη (5mg/ml) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός, για τη μεταφορά των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε κύτταρα XL 1 Blue. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε στους 37°C σε τριβλία άγαρ με το αντιβιοτικό αμικικλίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml για το pCR2.1-Topo και το pET-3a και επιπλέον καναμυκίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml για το pCR2.1-Topo. Εφόσον το κάθε πλασμίδιο προσδίδει ανθεκτικότητα στα αντίστοιχα αντιβιοτικά, οι αποικίες που θα αναπτυχθούν παρουσία αυτών των αντιβιοτικών θα είναι αποκλειστικά εκείνες που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο και μάλιστα όσον αφορά το pCR2.1-Topo το οποίο διαθέτει το *lacZ* με την προσθήκη X-gal και IPTG στα τριβλία άγαρ, είναι δυνατή η επιλογή των λευκών αποικιών έναντι των μπλε. Ακολούθησε δημιουργία stock των μετασχηματισμένων κυττάρων σε 50% γλυκερόλη (με αναλογία 700μl κύτταρα και 300μl γλυκερόλη) και αποθήκευση στους -80°C. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις επιλεγμένες αποικίες σε μικρή κλίμακα σε τελικό όγκο 50μl και έλεγχος των απομονωμένων πλασμιδίων με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και BamHI. Οι θέσεις κοπής των ενζύμων NdeI και BamHI εντοπίζονται στα άκρα τόσο του *gatD* όσο και του *gatE*. Επομένως, αναμένεται να προκύψουν δύο ζώνες για το pET-3a, η μια από τις οποίες θα αντιστοιχεί στο *gatD* (1,3kb) και η άλλη στο φορέα (4,6kb), και δύο ζώνες για το pCR2.1-Topo, η μια από τις

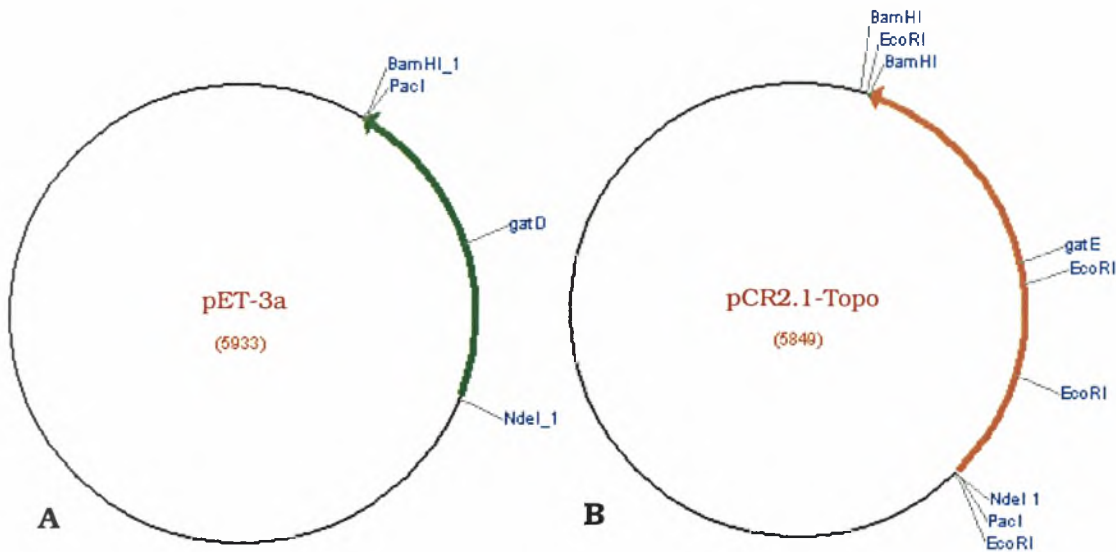
οποίες θα αντιστοιχεί στο *gatE* (1,9kb) και η άλλη στο φορέα (4kb). Μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel αγαρόζης έγινε ανίχνευση των τμημάτων DNA με υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 20) και προσδιορισμός του μεγέθους τους με βάση το μάρτυρα μοριακού βάρους. Η εικόνα που προέκυψε επιβεβαίωσε ότι έγινε μεταφορά και απομόνωση των σωστών πλασμιδίων με τα επιθυμητά γονίδια.



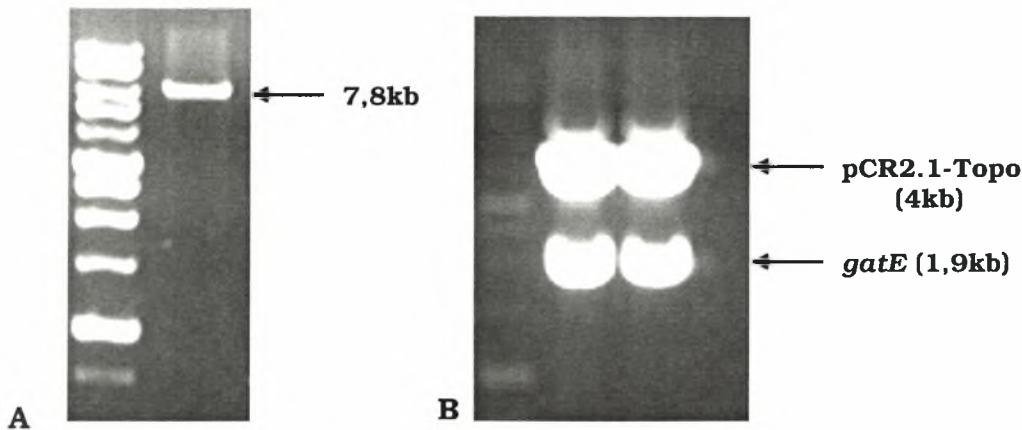
Εικόνα 20: Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης πέψης των φορέων pET-3a με το *gatD* και pCR2.1-Topo με το *gatE* που απομονώθηκαν από κύτταρα XL 1 Blue, με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *NdeI* και *BamH1*. Τα δείγματα είναι από αριστερά προς τα δεξιά, τα εξής: πέψη με *NdeI* και *BamH1* του pET-3a, πέψη με *NdeI* και *BamH1* του pCR2.1-Topo, Ladder.

Στη συνέχεια, αναπύχθηκαν καλλιέργειες από το stock γλυκερόλης που προέρχεται από τον προηγούμενο μετασχηματισμό σε LB broth με αμπικιλίνη και καναμυκίνη για το pCR2.1-Topo και αμπικιλίνη για το pET-3a στις συγκεντρώσεις που ήδη αναφέρθηκαν, και ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα. Αμέσως μετά έγινε πέψη του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *BamH1* και *PacI*. Συγκεκριμένα για το pCR2.1-Topo το οποίο περιέχει το γονίδιο *gatE*, έγινε πέψη 3 ωρών με την ταυτόχρονη δράση και των δύο ενζύμων για την εξαγωγή του γονιδίου, εφόσον στα άκρα του υπάρχουν οι θέσεις κοπής που αναγνωρίζουν τα συγκεκριμένα ένζυμα (Εικόνα 21B). Αντίθετα, όσον αφορά το πλασμίδιο pET-3a πραγματοποιήθηκε πρώτα πέψη με το ένζυμο *BamH1* για 3 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε το ένζυμο *PacI* το οποίο αφέθηκε να δράσει για επιπλέον 3 ώρες. Αυτό γίνεται για να εξαλειφθούν οι επιπλοκές που μπορεί να προκληθούν από την ταυτόχρονη δράση των δύο ενζύμων εξαιτίας της πολύ μικρής απόστασης που μεσολαβεί ανάμεσα στις δύο θέσεις κοπής (Εικόνα 21A). Η εικόνα, λοιπόν, που αναμένεται από την ανάλυση με αυτές τις ενδονουκλεάσες θα περιλαμβάνει μία ζώνη για το pET-3a, η οποία θα αντιστοιχεί στο γονίδιο μαζί με το φορέα γραμμοποιημένο (5,9kb) και δύο ζώνες για το pCR2.1-Topo, η μία από τις οποίες θα αντιστοιχεί στο *gatE* (1,9kb) και η

άλλη στο φορέα (3,9kb) ξεχωριστά. Από την ακόλουθη ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel αγαρόζης προκύπτει μια τέτοια εικόνα (Εικόνα 22), επιβεβαιώνοντας την ορθότητα της διαδικασίας.

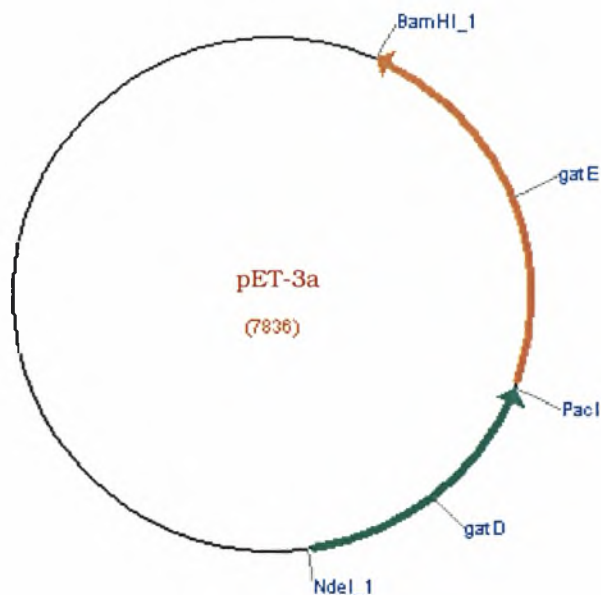


Εικόνα 21: A) Χάρτης περιορισμού του πλασμιδιακού φορέα pET-3a. Φαίνονται οι θέσεις που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού BamH1, PacI και NdeI, καθώς και η θέση εισαγωγής του γονιδίου gatD. Για τη γραμμοποίηση του φορέα πραγματοποιήθηκε πέψη με τα ένζυμα BamH1 και PacI τα οποία, όπως φαίνεται στο σχήμα, αναγνωρίζουν γειτονικές αλληλουχίες στο συγκεκριμένο φορέα.
 B) Χάρτης περιορισμού του πλασμιδιακού φορέα pCR2.1-Topo. Φαίνονται οι θέσεις που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού BamH1, PacI, NdeI και EcoRI καθώς και η θέση εισαγωγής του γονιδίου gatE. Για την εξαγωγή του γονιδίου gatE από το φορέα πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης με την ταυτόχρονη δράση των ενζύμων BamH1 και PacI, τα οποία όπως φαίνεται αναγνωρίζουν θέσεις κοπής στα άκρα του γονιδίου.

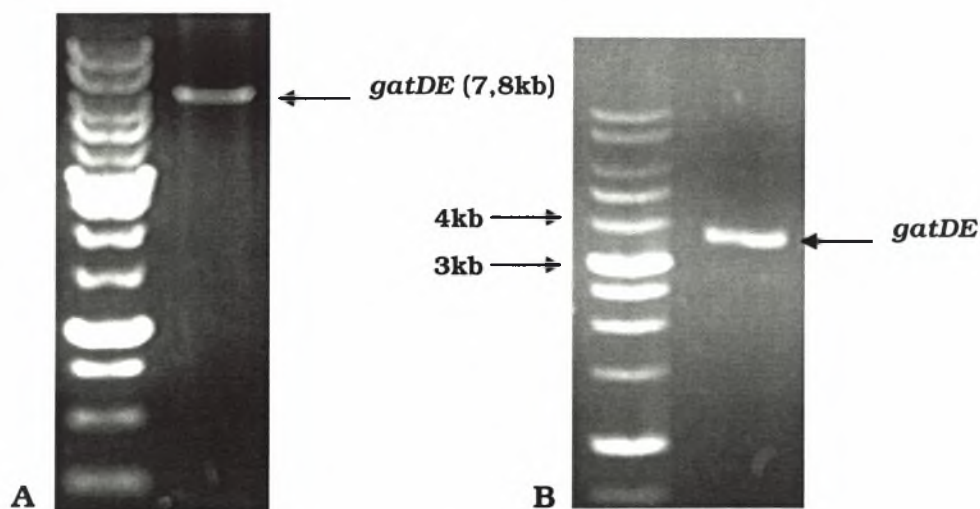


Εικόνα 22: A) Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης πέψης του ανασυνδυασμένου φορέα pET-3a που απομονώθηκε από κύτταρα XL 1 Blue, με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων PacI και BamH1. Διακρίνεται μια ζώνη στις 7,8kb η οποία αντιστοιχεί στο γραμμοποιημένο φορέα pET-3a που περιέχει το γονίδιο gatD.
 B) Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης πέψης του ανασυνδυασμένου φορέα pCR2.1-Topo (που περιέχει το gatE) που απομονώθηκε από κύτταρα XL 1 Blue, με την ταυτόχρονη δράση των περιοριστικών ενζύμων PacI και BamH1. Διακρίνονται δύο ζώνες, η μία από τις οποίες αντιστοιχεί σε μέγεθος 4kb (pCR2.1-Topo) και η άλλη σε μέγεθος, περίπου, 2kb (gatE).

Ακολουθεί η απομόνωση και ο καθαρισμός του τμήματος που αντιστοιχεί στο γονίδιο *gatE* (1,9kb) από το gel αγαρόζης σε τελικό όγκο 30μl. Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει τη σύνδεση των δύο τμημάτων, του απομονωμένου γονιδίου *gatE* με το γραμμοποιημένο φορέα pET-3a που περιέχει το γονίδιο *gatD*. Το *gatE* πρόκειται να ενσωματωθεί στο pET-3a, στη θέση αμέσως μετά το *gatD* (Εικόνα 23) μέσω των κολλωδών άκρων των δύο τμημάτων τα οποία προέκυψαν από την πέψη τους με κοινά περιοριστικά ένζυμα (BamH1 και PacI). Η σύνδεση αυτή διεξάγεται στους 16°C για 12-14h από το ένζυμο T4 DNA λιγάση. Στην αντίδραση σύνδεσης που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκε σχεδόν η μισή ποσότητα του γονιδίου *gatE* σε σχέση με το φορέα που περιέχει το γονίδιο *gatD*, εξαιτίας της πολύ μεγαλύτερης συγκέντρωσης του πρώτου όπως προέκυψε από τη σύγκριση της έντασης των ζωνών που αντιστοιχούν στο καθένα στο gel αγαρόζης (Εικόνα 22). Ακολούθως ηλεκτροφορήθηκε το δείγμα και η εικόνα που προέκυψε έδειξε ότι έχει πραγματοποιηθεί η αντίδραση σύνδεσης, εφόσον διακρίνεται μια ζώνη που αντιστοιχεί στις 7,8kb όσο δηλαδή είναι και το μέγεθος του οπερονίου (Εικόνα 24A). Η εικόνα αυτή αντιστοιχεί στο φορέα με το επιθυμητό ένθετο σε γραμμική μορφή. Αντίθετα, στην εικόνα 24B φαίνεται μια ζώνη στις 4kb περίπου, η οποία αντιστοιχεί στο φορέα με το οπερόνιο σε κυκλική, όμως, μορφή. Η διαφορά στο μέγεθος της ζώνης που ανιχνεύεται, οφείλεται στο γεγονός ότι ο μάρτυρας μοριακού βάρους αποτελείται από τμήματα γραμμικού DNA, σε αντίθεση με τον πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος είναι κυκλικός. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη διαφορετική ηλεκτοφορητική ικανότητα του φορέα, γεγονός που οδήγησε στην εμφάνιση μιας ζώνης αρκετά χαμηλότερου μεγέθους από το αναμενόμενο. Αυτή η σημαντική διαφορά του μεγέθους των ζωνών που διακρίνονται στις εικόνες 24A και 24B, είναι πιθανόν να οφείλεται σε υπερελίκωση του κυκλικού φορέα.



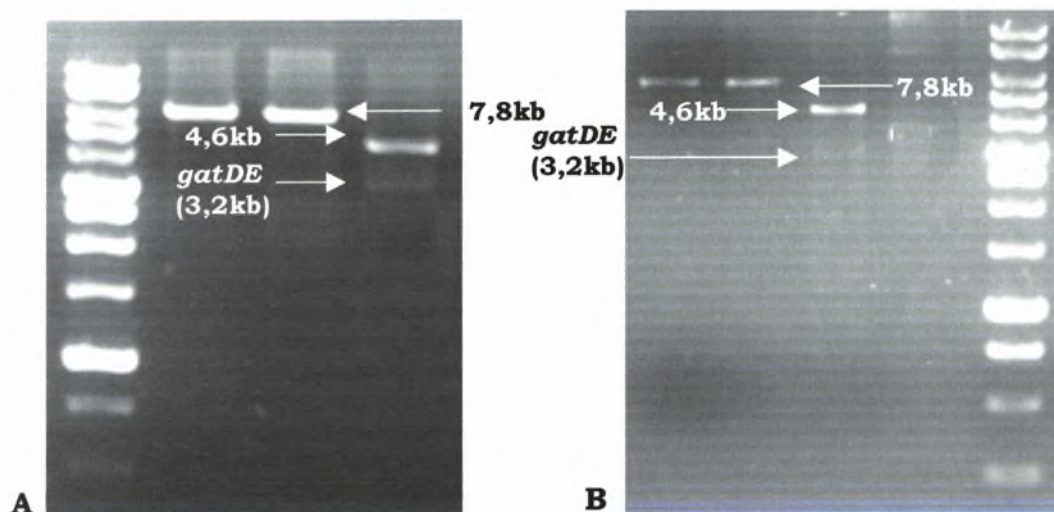
Εικόνα 23: Χάρτης περιορισμού του πλασμιδιακού φορέα pET-3a στον οποίο έχουν εισαχθεί τα γονίδια *gatD* και *gatE* μετά από την αντίδραση σύνδεσης μέσω της δράσης της T4 DNA λιγάσης. Φαίνονται οι θέσεις που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού BamHI, PacI και NdeI, καθώς και η θέση εισαγωγής των δύο γονιδίων.



Εικόνα 24: Α) Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης του φορέα pET-3.1 που περιέχει το *gatD*, με το γονίδιο *gatE* για την δημιουργία του οπερονίου, με την βοήθεια της T4 DNA λιγάσης. Παρατηρείται μια ζώνη στις 8kb περίπου η οποία αντιστοιχεί στον φορέα με το επιθυμητό ένθετο, αλλά σε γραμμική και όχι κυκλική μορφή.

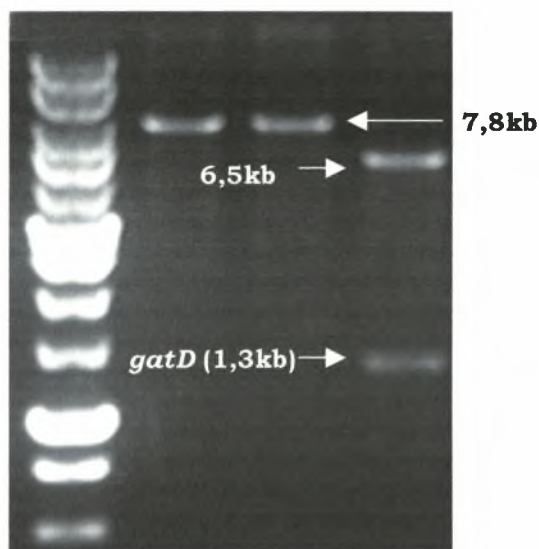
Β) Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης για την παραγωγή του οπερονίου *gatDE*. Παρατηρείται μια ζώνη στις 4kb περίπου η οποία αντιστοιχεί στο φορέα με το οπερόνιο. Η διαφορά στο μέγεθος της ζώνης σε σχέση με την εικόνα 24Α, οφείλεται στο γεγονός ότι το προϊόν σύνδεσης είναι κυκλικό σε αντίθεση με το μάρτυρα μοριακού βάρους ο οποίος είναι γραμμικός. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το τμήμα να ανιχνεύεται αρκετά χαμηλότερα από το αναμενόμενο. Η μεγάλη διαφορά στην ηλεκτροφορητική ικανότητα, πιθανότατα οφείλεται σε υπερελίκωση του κυκλικού πλασμιδιακού φορέα.

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει τη μεταφορά του προϊόντος σύνδεσης σε κύτταρα XL 1 Blue και DH5a με τη διαδικασία του μετασχηματισμού. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν 20 αποικίες από αυτές που αναπτύχθηκαν σε τριβλία άγαρ με αμπικιλίνη, οι οποίες, ακολούθως, καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB broth με αμπικιλίνη, εφόσον το pET-3a διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας σε αυτό το αντιβιοτικό. Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα μετασχηματισμένα κύτταρα και ανάλυση με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και BamHI. Πραγματοποιήθηκαν 3 αντιδράσεις πέψης, μία με το NdeI, μία με το BamHI και μια τρίτη με τα δύο ένζυμα ταυτόχρονα. Τα προϊόντα που αναμένεται να προκύψει από τις δύο πρώτες πέψεις είναι μία ζώνη που αντιστοιχεί στις 7,8kb, εφόσον αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζουν ένα μοναδικό σημείο κοπής στο πλασμίδιο, με αποτέλεσμα να το μετατρέπουν σε γραμμικό, ενώ τα αναμενόμενα προϊόντα της τρίτης πέψης είναι ένα τμήμα 3,2kb που αντιστοιχεί σε ολόκληρο το οπερόνιο *gatDE* και ένα τμήμα 4,6kb που αντιστοιχεί στο φορέα. Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε gel αгарόζης (Εικόνα 25Α και 25Β) περιλαμβάνει τα αναμενόμενα αποτελέσματα για 6 από τις 12 αποικίες XL 1 Blue και 4 από τις 8 αποικίες DH5a οι οποίες αναλύθηκαν με τα προαναφερθέντα περιοριστικά ένζυμα, υποδεικνύοντας ότι, πιθανόν, έχει παραχθεί το επιθυμητό οπερόνιο.



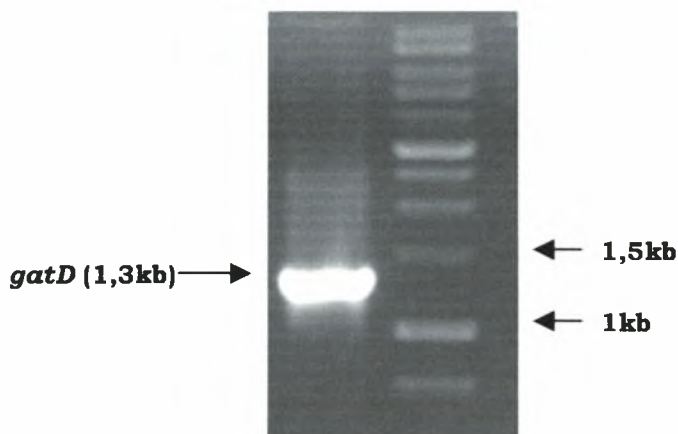
Εικόνα 25: Εικόνες από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης πέψης του πλασμιδιακού DNA (pET-3a) που απομονώθηκε: Α) από αποικία κυττάρων XL 1 Blue, με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων NdeI και BamHI. Τα δείγματα είναι από αριστερά προς τα δεξιά, τα εξής: Ladder, πέψη με NdeI, πέψη με BamHI, πέψη με BamHI και NdeI. Β) από αποικία κυττάρων DH5a, με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων NdeI και BamHI. Τα δείγματα είναι από αριστερά προς τα δεξιά, τα εξής: πέψη με NdeI, πέψη με BamHI, πέψη με BamHI και NdeI, Ladder.

Στη συνέχεια επιλέχθηκε μία από τις αποικίες με το επιθυμητό πρότυπο, η οποία παρουσίασε την πιο καθαρή εικόνα και χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω ανάλυση με επιπλέον ένζυμα περιορισμού. Εκτός από τις δύο αντιδράσεις πέψης με τα ένζυμα *NdeI* και *BamHI* που περιγράφηκαν προηγουμένως, πραγματοποιήθηκε και μία επιπλέον αντίδραση με τα ένζυμα *NdeI* και *PacI*. Το αποτέλεσμα της ταυτόχρονης δράσης των ενζύμων *NdeI* και *PacI* αναμένεται να είναι δύο προϊόντα, ένα στις 6,5kb που αντιστοιχεί στο φορέα με το γονίδιο *gatE* και ένα στις 1,3kb που αντιστοιχεί στο γονίδιο *gatD*. Η εικόνα που προέκυψε από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel αгарόζης είναι αρκετά ικανοποιητική και επιβεβαιώνει την παραγωγή του επιθυμητού οπερονίου *gatDE* (Εικόνα 26).



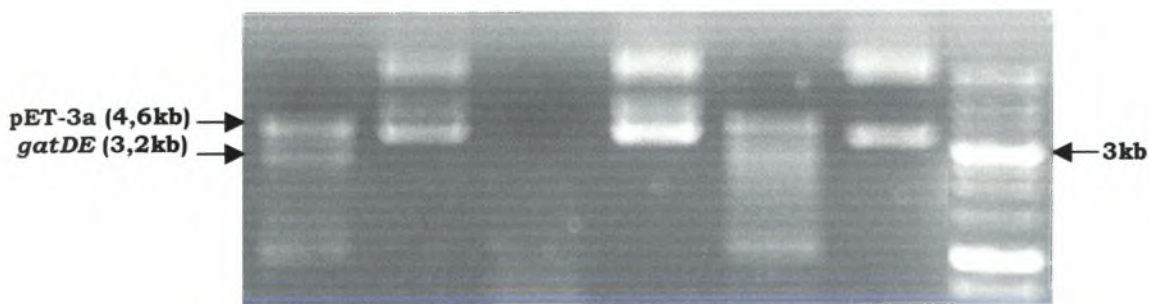
Εικόνα 26: Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης πέψης του πλασμιδιακού DNA (*pET-3a*) που απομονώθηκε από την αποικία *XL 1 Blue* με το επιθυμητό ένθετο, με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *NdeI*, *PacI* και *BamHI*. Τα δείγματα είναι από αριστερά προς τα δεξιά, τα εξής: *Ladder*, πέψη με *NdeI*, πέψη με *BamHI*, πέψη με *NdeI* και *PacI*.

Το επόμενο βήμα για την επιβεβαίωση των έως τώρα αποτελεσμάτων είναι η διεξαγωγή PCR με σκοπό την ενίσχυση αρχικά του γονιδίου *gatD*. Χρησιμοποιούνται, λοιπόν, οι εκκινητές *sense* και *antisense* του γονιδίου *gatD* για τη διεξαγωγή της αντίδρασης PCR. Στην αντίδραση ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε 1μl πλασμιδιακού DNA το οποίο είχε απομονωθεί από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *XL 1 Blue* και *DH5a* στο προηγούμενο βήμα και εφαρμόστηκε θερμοκρασία υβριδισμού 55°C. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης και από την παρατήρηση της εικόνας που προέκυψε, συμπεραίνουμε ότι πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση του *gatD*, εφόσον διακρίνεται μια έντονη ζώνη 1,3kb (Εικόνα 27).



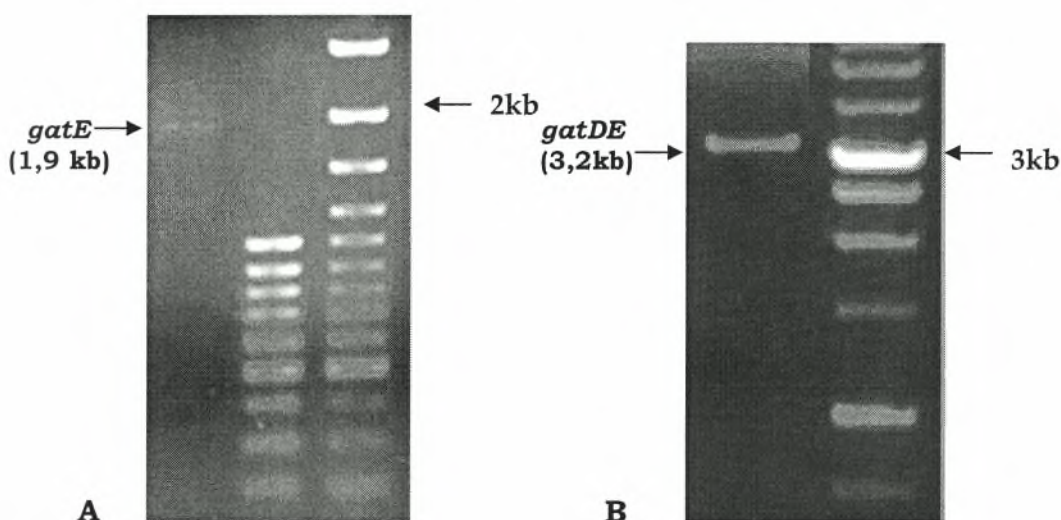
Εικόνα 27: Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης ενίσχυσης με PCR του γονιδίου *gatD* που έχει κλωνοποιηθεί στο φορέα pET-3a ο οποίος απομονώθηκε από τα μετασχηματισμένα κύτταρα XL 1 Blue. Όπως φαίνεται, παράχθηκε προϊόν ενίσχυσης 1,3kb που αντιστοιχεί στο *gatD*.

Το επόμενο πειραματικό στάδιο περιλαμβάνει τη μεταφορά του pET-3a με το οπερόνιο σε κύτταρα BL 21 Rossetta, τα οποία αναπτύσσονται παρουσία του αντιβιοτικού χλωραμφαινικόλη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 25mg/ml. Μετά το πέρας του μετασχηματισμού επιστρώθηκαν τα κύτταρα σε τριβλία άγαρ με αμικικιλίνη και χλωραμφαινικόλη και στη συνέχεια, αφού επιλέχθηκαν κάποιες από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν, δημιουργήθηκαν 14 υγρές καλλιέργειες με τα ίδια αντιβιοτικά. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα και πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες με σκοπό τον έλεγχο του DNA που απομονώθηκε. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα BamH1 και NdeI. Έγινε ταυτόχρονη πέψη και με τα δύο ένζυμα και τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης αναμένεται να είναι μια ζώνη στις 4,6kb που αντιστοιχεί στο φορέα και μια ζώνη 3,2kb που αντιστοιχεί στο *gatDE*. Από τις 7 αποικίες που αναλύθηκαν, οι 4 παρουσίασαν το επιθυμητό πρότυπο στο gel αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης πέψης 3 δειγμάτων πλασμιδιακού DNA (pET-3a) που απομονώθηκε από κύτταρα BL 21 Rossetta, με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων NdeI και BamH1. Τα δείγματα είναι από αριστερά προς τα δεξιά, τα εξής: πέψη με NdeI και BamH1, Άκοπο, Ladder. Είναι εμφανές ότι στο πρώτο και το τρίτο δείγμα παρατηρείται μια ζώνη στις 3kb περίπου, η οποία πιθανόν αντιστοιχεί στο *gatDE*.

Από τις 3 αποικίες των κυττάρων Rossetta που περιείχαν το πλασμίδιο με το οπερόνιο, επιλέχθηκε μία η οποία παρουσίασε το πιο καθαρό πρότυπο και χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή PCR με σκοπό την ενίσχυση του *gatE* και ολόκληρου του *gatDE*, εφόσον το *gatD* έχει ήδη ενισχυθεί με προηγούμενη αντίδραση PCR. Πραγματοποιήθηκαν, λοιπόν, δύο αντιδράσεις ενίσχυσης με θερμοκρασία υβριδισμού 55°C: μία με τους εκκινητές sense και antisense για το *gatE* και μία με τον sense εκκινητή του *gatD* και τον antisense εκκινητή του *gatE*. Μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel αгарόζης, παρατηρείται ένα προϊόν που αντιστοιχεί στις 1,9kb, το οποίο αντιστοιχεί στο προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *gatE* (Εικόνα 29Α), καθώς και μία ζώνη στις 3,2kb η οποία αντιστοιχεί στο προϊόν ενίσχυσης ολόκληρου του οπερονίου *gatDE* (Εικόνα 29Β).

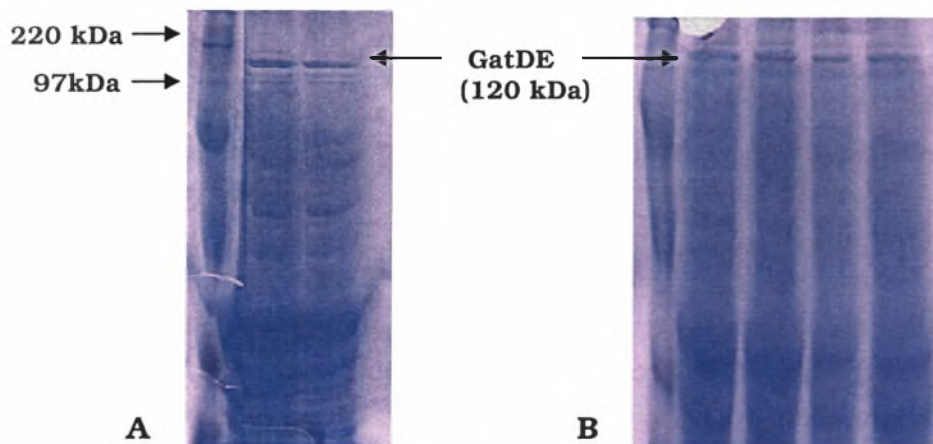


Εικόνα 29: Α) Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης ενίσχυσης με PCR του *gatE* κλωνοποιημένου στο φορέα pET-3a που απομονώθηκε από τα κύτταρα BL 21 Rossetta. Όπως φαίνεται, παράχθηκε προϊόν ενίσχυσης μεγέθους 1,9kb, το οποίο προφανώς αντιστοιχεί στο γονίδιο *gatE*.

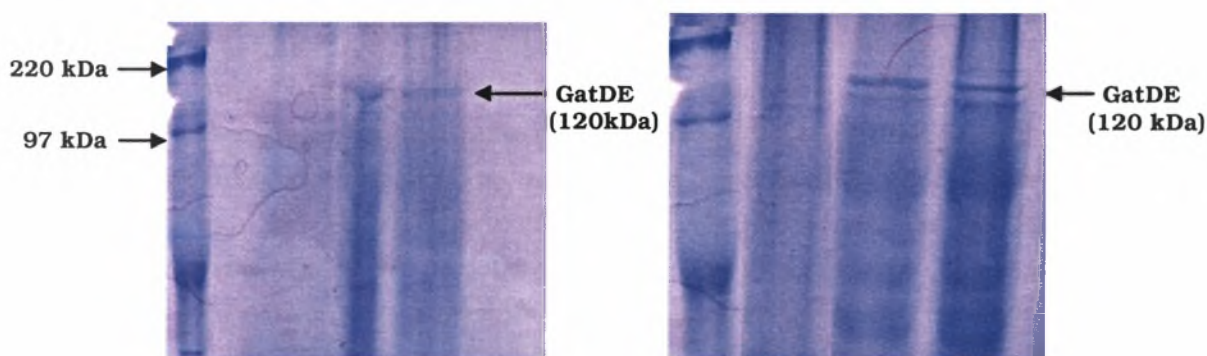
Β) Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης ενίσχυσης με PCR του οπερονίου *gatDE* στο φορέα pET-3a που απομονώθηκε από τα κύτταρα BL 21 Rossetta. Όπως φαίνεται, παράχθηκε προϊόν ενίσχυσης μεγέθους 3,2kb, το οποίο προφανώς αντιστοιχεί στο οπερόνιο *gatDE*.

Αυτό, λοιπόν, που απομένει είναι η ανίχνευση του οπερονίου σε επίπεδο πρωτεΐνης. Για να επιτευχθεί αυτό είναι απαραίτητη η επαγωγή της υπερέκφρασης του *gatDE*, έτσι ώστε να είναι δυνατή, στη συνέχεια, η απομόνωσή του και η ανίχνευσή του αν ηλεκτροφορηθεί σε gel πολυακρυλαμιδίου. Έτσι, αρχικά πραγματοποιείται η διαδικασία της υπερέκφρασης όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω. Για τη δημιουργία καλλιέργειών μεγαλύτερου όγκου, χρησιμοποιήθηκε η αποικία των Rossetta η οποία είχε επιλεγεί προηγουμένως και για την ενίσχυση του οπερονίου. Για

την επαγωγή της έκφρασης του *gatDE* χρησιμοποιήθηκε το IPTG το οποίο δρα με τον τρόπο που ήδη περιγράφηκε. Μετά την προσθήκη του IPTG, μερικές από τις αποικίες επωάστηκαν στους 37°C, ενώ άλλες σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την αναστολή της δράσης πρωτεασών σε περίπτωση που η αμιδοτρανσφεράση εγκλωβίζεται σε σωμάτια εγκλεισμού (inclusion bodies) και κατακρυμνίζεται με τα κυτταρικά υπολείμματα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και αποθήκευση των ιζημάτων στους -80°C. Μετά το πέρας της διαδικασίας τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 2ml από το διάλυμα λύσης του οποίου η σύσταση αναφέρεται παραπάνω και ακολουθεί η διαδικασία της ομογενοποίησης των κυττάρων με υπέρηχους. Αφού, ακολούθως, φυγοκεντρηθεί το κυτταρικό εκχυλίσμα, πραγματοποιείται η διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης-στόχου με θέρμανση τόσο του υπερκείμενου, όσο και του ιζήματος, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Η πρωτεΐνη GatDE αποτελεί μια ιδιαίτερα θερμοανθεκτική πρωτεΐνη, γεγονός που είναι εύλογο, εφόσον προέρχεται από έναν οργανισμό ο οποίος αναπτύσσεται σε περιβάλλον με θερμοκρασία που φτάνει τους 100°C. Επομένως, η απομόνωσή της με θέρμανση του εκχυλίσματος των κυττάρων που την εκφράζουν (Rossetta BL 21) στους 70°C θα είναι αρκετά αποτελεσματική, εφόσον οι υπόλοιπες πρωτεΐνες των κυττάρων αυτών μετουσιώνονται σε μια τόσο υψηλή θερμοκρασία. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που προέκυψαν από τη διαδικασία απομόνωσης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε gel πολυακρυλαμιδίου 10% με SDS (SDS-PAGE). Τα δείγματα αντιστοιχούν στα ιζήματα και τα υπερκείμενα που παράχθηκαν πριν τη θέρμανση του κυτταρικού εκχυλίσματος, καθώς και τα αντίστοιχα μετά τη θέρμανση του κυτταρικού εκχυλίσματος, ενώ όλα τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 100°C πριν την ηλεκτροφόρησή τους. Η πρωτεΐνη GatDE έχει μέγεθος 119,221 kDa, οπότε αναμένεται να εμφανιστεί μια ζώνη που θα αντιστοιχεί περίπου στα 120 kDa, μετά από βάψιμο του gel πολυακρυλαμιδίου με το διάλυμα χρωματισμού που περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue. Παρ' όλα αυτά, δεν αποκλείεται η περίπτωση του διαχωρισμού της πρωτεΐνης στις επιμέρους υπομονάδες της κατά την επεξεργασία της, με αποτέλεσμα να είναι πιθανή η εμφάνιση δύο πρωτεϊνικών τμημάτων που θα αντιστοιχούν σε κάθε υπομονάδα της GatDE, μία στα 48,777 kDa (GatD) και μία στα 70,444 kDa (GatE). Στις εικόνες που προέκυψαν μπορούμε να διακρίνουμε μια ζώνη γύρω στα 120 kDa, η οποία πιθανώς αντιστοιχεί σε ολόκληρη την πρωτεΐνη GatDE (Εικόνα 30 και 31), ενώ παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη ανιχνεύεται τόσο στο ίζημα, όσο και στο υπερκείμενο που προέκυψε μετά την διαδικασία ομογενοποίησης των κυττάρων. Η ανίχνευση της αμιδοτρανσφεράσης στο ίζημα, σημαίνει ότι, πιθανότατα, εγκλωβίζεται σε σωμάτια εγκλεισμού.



Εικόνα 30: Α) Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel πολυακρυλαμιδίου για την ανίχνευση της έκφρασης της GatDE. Τα δείγματα προέρχονται από τα κύτταρα Rossetta BL 21 που έχουν υποστεί ομογενοποίηση και έχει απομονωθεί η επιθυμητή πρωτεΐνη. Τα δείγματα από αριστερά προς τα δεξιά είναι τα εξής: Ladder, ίζημα μετά τη θέρμανση :α) χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5M και η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε στους 37°C, β) χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση IPTG σε τελική συγκέντρωση 1M και η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε στους 37°C. Β) Εικόνα από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel πολυακρυλαμιδίου για την ανίχνευση της έκφρασης της GatDE. Τα δείγματα είναι από αριστερά προς τα δεξιά, τα εξής: Ladder, ίζημα πριν τη θέρμανση: α) χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5M και η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε θερμοκρασία δωματίου, β) χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση IPTG σε τελική συγκέντρωση 1M και η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε θερμοκρασία δωματίου, γ) χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5M και η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε θερμοκρασία 37°C, δ) χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση IPTG σε τελική συγκέντρωση 1M και η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε θερμοκρασία 37°C.



Εικόνα 31: Εικόνες από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel πολυακρυλαμιδίου για την ανίχνευση της έκφρασης της GatDE. Τα δείγματα προέρχονται από το κυτταρικό εκχύλισμα που προέκυψε από την ομογενοποίηση των κυττάρων Rossetta BL 21 στα οποία έχει υπερεκφραστεί η επιθυμητή πρωτεΐνη. Τα δείγματα και στις δύο εικόνες είναι από αριστερά προς τα δεξιά, τα εξής: Ladder, ίζημα πριν τη θέρμανση, υπερκείμενο πριν τη θέρμανση, ίζημα μετά τη θέρμανση.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μηχανισμοί της αμινοακυλίωσης των tRNAs είναι ένα πεδίο το οποίο παρουσιάζει ιδιαίτερα μεγάλο ενδιαφέρον και χρήζει εκτεταμένης μελέτης εφόσον από την πιστότητα αυτής της διαδικασίας εξαρτάται άμεσα η ορθότητα ολόκληρης της διαδικασίας της πρωτεϊνοσύνθεσης. Τα ένζυμα που κατέχουν ιδιαίτερα σημαντική θέση στη διαδικασία τη αμινοακυλίωσης είναι οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (AARSs). Για την εξασφάλιση της σωστής λειτουργίας αυτών των ενζύμων και κατ' επέκταση της πιστότητας των μηχανισμών αμινοακυλίωσης, έχουν στρατολογηθεί πολυάριθμοι μηχανισμοί ποιοτικού ελέγχου οι οποίοι στοχεύουν στην επιδιόρθωση τυχόν λαθών που διαπιστώνονται κατά τη διάρκεια της εν λόγω διαδικασίας. Στην αποφυγή λαθών συμβάλλουν και οι AARSs εξαιτίας του υψηλού βαθμού εξειδίκευσης που παρουσιάζουν και της ικανότητάς τους να διακρίνουν το κατάλληλο μεταξύ πολλαπλών υποστρωμάτων. Αυτά τα στοιχεία περί πλήρους εξειδίκευσης των AARSs, υποστηρίζουν την άποψη που επικρατούσε κατά την προγενωμική περίοδο η οποία βασιζόταν στην υπόθεση του Crick (Adaptor hypothesis). Η ανάπτυξη, όμως, νέων τεχνολογικών και πειραματικών μεθόδων και η αποκωδικοποίηση του γενώματος όλο και περισσότερων οργανισμών, αποκάλυψε στις επόμενες δεκαετίες ένα ιδιαίτερα μεγάλο ποσοστό ποικιλομορφίας των μηχανισμών αμινοακυλίωσης που επεκτείνονταν σε όλο το έμβιο βασίλειο, καταρρίπτοντας έτσι την καθολικότητα της Adaptor hypothesis. Συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε, η μελέτη του γενώματος αρκετών οργανισμών, κυρίως αρχαίων και βακτηρίων, αποκάλυψε σε αρκετές περιπτώσεις διπλασιασμούς και ελλείψεις ολόκληρων γονιδίων ή τμημάτων των γονιδίων που κωδικοποιούν ορισμένες αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γεγονός ότι σε κάποιους οργανισμούς εντοπίζεται πλήρης έλλειψη της λειτουργίας των AsnRS και GlnRS, όπως συμβαίνει στο *Pyrococcus horikoshii* (Tumbula D. L. et al. 2000) ή στο *Neisseria meningitides* το οποίο στερείται της AsnRS (Bunjun S. et al. 2000).

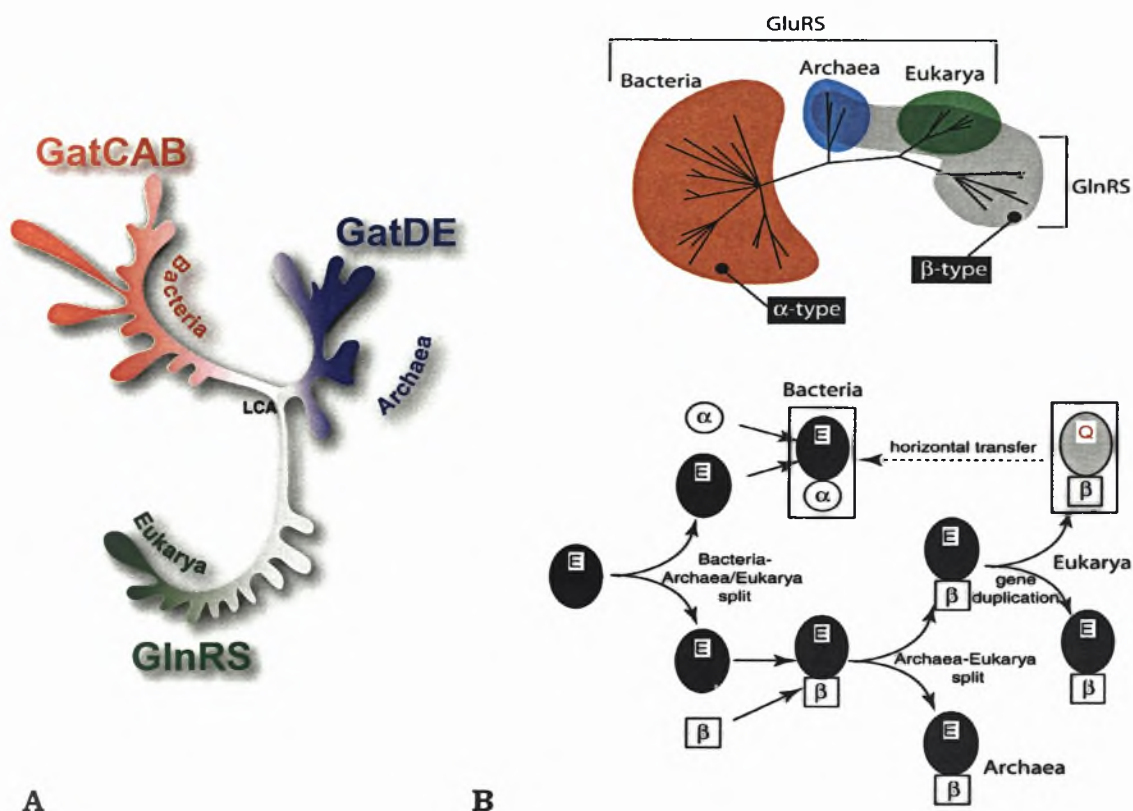
Τα ένζυμα που συμμετέχουν στο έμμεσο μονοπάτι σύνθεσης Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln} στα βακτήρια και στα αρχαία που παρουσιάζουν τις προαναφερθείσες ελλείψεις, έχουν τεθεί υπό το πρίσμα εκτεταμένης μελέτης. Η πρώτη αμιδοτρανσφεράση, η ετεροτριμερής GatCAB, συναντάται σε πολλά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων πολλών παθογόνων βακτηρίων, γεγονός που καθιστά τη μελέτη του συγκεκριμένου ενζύμου επιτακτική. Η δεύτερη αμιδοτρανσφεράση, η ετεροδιμερής GatDE, εντοπίζεται αποκλειστικά στα αρχαία και είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση αποκλειστικά Gln-tRNA^{Gln}. Τα γονίδια *gatD* και *gatE* που την κωδικοποιούν εντοπίζονται σε όλα τα 13 αρχαία

με γνωστή γενωμική αλληλουχία και εμφανίζονται είτε συνδεδεμένα μεταξύ τους, είτε ξεχωριστά, σε διαφορετικές περιοχές του γενώματος (Πίνακας 2).

Organism	GatD*	GatE*	Adjacency (gatD and gatE)	AsnRS†	Asp/Glu-AdT‡
<i>Aeropyrum pernix</i>	427	642	Yes	-	+
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	408	613	No‡	-	+
<i>Halobacterium salinarum</i>	427	622	No	-	+
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	435	619	Yes	-	+
<i>Methanococcus jannaschii</i>	417	630	Yes	-	+
<i>Methanospirillum haderi</i>	421	632	No	-	+
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	444	633	Yes	-	+
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	448	628	Yes	-	+
<i>Pyrococcus aerophilum</i>	417	608	No	+	-
<i>Pyrococcus abyssi</i>	438	633	Yes	+	-
<i>Pyrococcus furiosus</i>	438	628	Yes	+§	-
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	438	632	Yes	+	-
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	409	603	Yes	+	-

Πίνακας 2: Η παρουσία των γονιδίων των αμιδοτρανσφερασών και της AsnRS στα αρχαία. * Οι αριθμοί των στηλών 2 και 3 αναπαριστούν τον αριθμό των αμινοξέων που συνιστούν κάθε υπομονάδα αυτών των ενζύμων. Σε αντίθεση με τη GatE, το μέσο μέγεθος των αλληλουχιών της GatB που προέκυψε από την ομοπαράθεση της εικόνας 9, είναι 482 αμινοξέα. Στην στήλη 4 αναγράφεται αν τα δύο γονίδια gatD και gatE εντοπίζονται συνδεδεμένα ή όχι στο γένωμα του εκάστοτε οργανισμού. ‡ Ένα ημιτελές γονίδιο gatD (AF1441) είναι συνδεδεμένο με το gatE (AF1440), αλλά εντοπίζεται και ένα ανέπαφο γονίδιο gatD (AF0882) σε άλλη θέση του γενώματος. † Οι στήλες 5 και 6 υποδεικνύουν την παρουσία (+) ή την απουσία (-) του γονιδίου της AsnRS και των Asp/Glu-AdT, αντίστοιχα, στο γονιδίωμα του εκάστοτε οργανισμού.

Το καθένα από τα δύο μονοπάτια αμινοακυλίωσης που περιγράφηκαν εντοπίζεται, συνήθως, σε διαφορετικούς οργανισμούς, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις συνεντοπισμού και των δύο στον ίδιο οργανισμό. Το είδος του μονοπατιού σύνθεσης των αμινοάκυλο-tRNA μορίων που συναντάται σε κάθε οργανισμό είναι φυσικό να εξαρτάται, κυρίως, από τα ένζυμα που εντοπίζονται σε αυτόν και τα οποία διαφέρουν από είδος σε είδος ως προϊόν της εξέλιξης. Έτσι, σε γενικές γραμμές στα βακτήρια έχει επικρατήσει εξελικτικά το μονοπάτι που βασίζεται στη δράση της GatCAB, στα αρχαία αυτό που απαιτεί την ύπαρξη της αμιδοτρανσφεράσης GatDE, ενώ τέλος στους ευκαρυώτες έχει επικρατήσει το άμεσο μονοπάτι αμινοακυλίωσης εξαιτίας της ύπαρξης της συνθετάσης GlnRS σε αυτούς τους οργανισμούς (Εικόνα 32Α). Παράδειγμα συνεντοπισμού των δύο μονοπατιών αποτελεί το βακτήριο *Thermus thermophilus* (Becker et. al. 1997) στο οποίο η σύνθεση του Asn-tRNA^{Asn} πραγματοποιείται τόσο μέσω του άμεσου μονοπατιού με την βοήθεια της GlnRS που διαθέτει, όσο και μέσω του έμμεσου μονοπατιού με τη βοήθεια της GatCAB και μιας AspRS με χαλαρή εξειδίκευση. Είναι αξιοσημείωτη η διαπίστωση ότι η σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNA μορίων είναι το μόνο βήμα της πρωτεϊνοσύνθεσης του οποίου οι μηχανισμοί παρουσιάζουν διαφορές και στα τρία βασίλεια των οργανισμών (Tumbula et al. 2000).



Εικόνα 32: Α) Φυλογενετικό δέντρο των τριών ομάδων οργανισμών. Στα βακτήρια έχει επικρατήσει εξελικτικά το μονοπάτι που βασίζεται στη δράση της αμιδοτρανσφεράσης GatCAB, στα αρχαία αυτό που απαιτεί τη δράση της αμιδοτρανσφεράσης GatDE, ενώ στους ευκαρυώτες το άμεσο μονοπάτι αμινοακυλίωσης εξαιτίας της παρουσίας της συνθετάσης GlnRS σε αυτούς τους οργανισμούς.

Β) Σχηματική αναπαράσταση της εξελικτικής πορείας που ακολούθησαν τα γονίδια των GluRS και GlnRS. Αρχικά εμφανίστηκε μια προγονική GluRS (GlxRS), η οποία διατηρήθηκε και μετά το διαχωρισμό των βακτηρίων από τα αρχαία και τους ευκαρυώτες. Στα βακτήρια μετά την προσάρτηση νέων τμημάτων στην αλληλουχία του γονιδίου της GlxRS (πιθανώς με ομόλογο ανασυνδυασμό) η GlxRS τροποποιήθηκε δίνοντας έναν νέο τύπο GluRS (α-type) με χαλαρή εξειδίκευση και την ικανότητα αμινοακυλίωσης τόσο του tRNA^{Glu}, όσο και του tRNA^{Gln}, η οποία ακολούθως εξειδικεύτηκε μερικώς ως προς τη σύνθεση Glu-tRNA^{Glu}. Παράλληλα, στα αρχαία και στους ευκαρυώτες η GlxRS εξελίχθηκε έτσι ώστε να δώσει μια GluRS (β-type) η οποία διέθετε επίσης χαλαρή εξειδίκευση. Αυτός ο τύπος διατηρήθηκε στα αρχαία, ενώ στους ευκαρυώτες μετά από διπλασιασμό του γονιδίου της, προέκυψε μια GlnRS και μια νέα GluRS η οποία, όμως, παρουσίαζε εξειδίκευση ως προς την αναγνώριση του υποστρώματος με αποτέλεσμα να συνθέτει μόνο Glu-tRNA^{Glu}. Η GlnRS, ακολούθως, μεταφέρθηκε με οριζόντια μεταφορά αποκλειστικά στα βακτήρια, με αποτέλεσμα την απουσία της από το βασίλειο των αρχαίων.

Αποτελέσματα φυλογενετικών αναλύσεων υποδεικνύουν ότι τα ευβακτήρια απόκτησαν AsnRS και GlnRS, μετά το διαχωρισμό των προγονικών τους μορφών που συνέβει στα αρχαιοβακτήρια, τα οποία διατήρησαν τις AspRS και GluRS με την ικανότητα αμινοακυλίωσης δύο διαφορετικών tRNAs (Becker and Kern 1998). Η σημερινή μορφή των GluRS και GlnRS προέρχεται από μια κοινή προγονική μορφή GluRS (GlxRS) η οποία συμμετείχε στη διαδικασία σύνθεσης Gln-tRNA^{Gln} σε συνδυασμό με μια αμιδοτρανσφεράση (Cagnon et al. 1996). Κατά το διαχωρισμό των βακτηρίων από τα αρχαία και τους ευκαρυώτες,

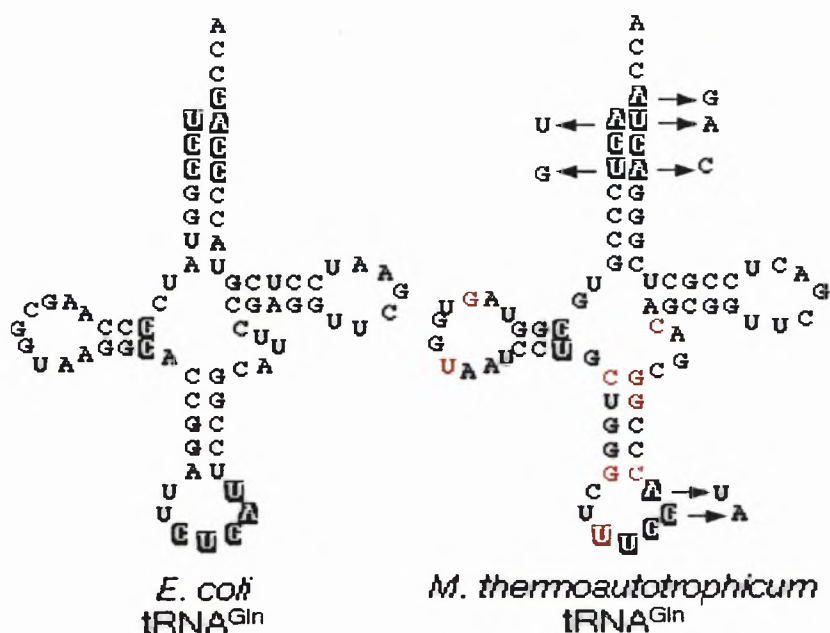
προέκυψαν δύο νέοι τύποι GluRS. Τα βακτήρια απέκτησαν μια GluRS με χαλαρή εξειδίκευση και την ικανότητα αμινοακυλίωσης τόσο του tRNA^{Gln}, όσο και του tRNA^{Glu}, η οποία ακολούθως εξειδικεύτηκε μερικώς ως προς τη σύνθεση Glu-tRNA^{Glu}. Παράλληλα, τα αρχαία και οι ευκαρυώτες απέκτησαν έναν δεύτερο τύπο GluRS επίσης με χαλαρή εξειδίκευση. Τα αρχαία διατήρησαν αυτόν τον τύπο GluRS, ενώ από την άλλη μεριά η προγονική GluRS των ευκαρυωτών εξελίχθηκε έτσι ώστε να δώσει μετά από διπλασιασμό μια νέα GluRS και μια GlnRS (Εικόνα 32B). Αυτός ο νέος τύπος GluRS εξελίχθηκε έτσι ώστε να περιοριστεί η εξειδίκευσή της αποκλειστικά ως προς τη φόρτιση του tRNA^{Glu} με Glu, ενώ η GlnRS μεταφέρθηκε μόνο στα βακτήρια μέσω της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς, και όχι στα αρχαία, με αποτέλεσμα να διαθέτουν GlnRS μόνο οι ευκαρυώτες και τα βακτήρια (Εικόνα 32B).

Το γονίδιο της AsnRS ακολούθησε μια εξελικτική πορεία αντίστοιχη με αυτή που περιγράφηκε για τη GlnRS. Συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι η ασπαργίνη είναι από τα τελευταία αμινοξέα που προστέθηκαν στο κυτταρικό ρεπερτόριο και ότι τα κωδινόνια AAU και AAC αρχικά ήταν και τα δύο εξειδικευμένα ως προς το ασπαργινικό (Wong J. T. 1975). Επομένως, ο πρόγονος τόσο του tRNA^{Asp} όσο και του tRNA^{Asn} φορτιζόταν με Asp μέσω της προγονικής AsxRS πριν την εμφάνιση του Asn. Η ικανότητα ασπαργινυλίωσης του tRNA εμφανίστηκε ταυτόχρονα με την ικανότητα της μετατροπής του Asp το οποίο ήταν συνδεδεμένο στο tRNA^{GUU} μέσω της Asp-AdT. Αν υποθέσουμε ότι η AsnRS εμφανίστηκε σύμφωνα με το πρότυπο που προτείνεται για τη GlnRS (Lamour et al. 1994, Rogers and Söll 1993), τότε πιθανότατα εμφανίστηκε στους ευκαρυώτες μετά από διπλασιασμό του γονιδίου της AsxRS (Becker and Kern 1998) και απέκτησε εξειδίκευση για το Asn και το tRNA^{GUU}. Η απόκτηση της AsnRS από τα βακτήρια μέσω της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς συσχετίζεται με τον επαναπροσδιορισμό της εξειδίκευσης της AsxRS ώστε να φορτίζει αποκλειστικά το tRNA^{GUC} με Asp. Επιπλέον, η προγονική AsnRS δεν είχε επαρκή εξειδίκευση ως προς τη διάκριση του tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} ώστε να εξασφαλίζει την επιβίωση του οργανισμού. Το ποσοστό εξειδίκευσης αυξήθηκε αισθητά με την απόκτηση της σύγχρονης AspRS, η οποία μειώνει το ποσοστό των ελεύθερων tRNA^{Asp} με αποτέλεσμα να μειώνεται ταυτόχρονα και ο κίνδυνος χρήσης τους από την AsnRS. Άρα, οι AspRS1 (με μονή εξειδίκευση) και AsnRS διατηρήθηκαν εξαιτίας της αποτελεσματικότητας και της αυξημένης ακρίβειας που παρουσίαζαν όταν ήταν παρούσες και οι δύο. Αντίθετα, ο διαχωρισμός των εξειδικευμένων χαρακτηριστικών καθενός εκ των μηχανισμών σύνθεσης του Gln-tRNA και Glu-tRNA οφείλεται στη GlnRS. Η GlnRS αποκτήθηκε πιθανόν ευκολότερα από την AsnRS, εφόσον ο μεγάλος βαθμός συμμετοχής του Gln σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες (Taylor B. 1978) προώθησε την εμφάνιση του άμεσου μονοπατιού γλουταμινυλίωσης μετά από την απόκτηση της GlnRS, ενώ

επέτρεψε και στην προγονική GlxRS να περιορίσει την εξειδίκευσή της αποκλειστικά ως προς το tRNA^{Glu}.

Το γεγονός ότι η παρουσία της αμιδοτρανσφεράσης GatDE έχει περιοριστεί στα αρχαία έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πρόσφατων ερευνών και φαίνεται ότι προκύπτουν ποικίλα εξελικτικά ερωτήματα. Η GatDE εντοπίζεται στα αρχαία τα οποία στερούνται της GlnRS με αποτέλεσμα η σύνθεση του Gln-tRNA^{Gln} σε αυτούς του οργανισμούς να πραγματοποιείται αποκλειστικά μέσω του έμμεσου μονοπατιού. Ένα ερώτημα που προκύπτει, λοιπόν, αναζητά την αιτία που οδήγησε στην αναστολή της μεταφοράς της GlnRS στα αρχαία κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Μια εξήγηση που έχει δοθεί καθιστά το tRNA^{Gln} των αρχαίων υπεύθυνο για την απουσία της συγκεκριμένης συνθετάσης από αυτούς τους οργανισμούς και ειδικότερα τις διαφορές που παρουσιάζει η αλληλουχία των βασικών στοιχείων ταυτότητας του μορίου αυτού σε σχέση με τα tRNA^{Gln} των βακτηρίων και των ευκαρυωτών. Τα στοιχεία αυτά είναι, κυρίως, υπεύθυνα για την αναγνώριση του tRNA^{Gln} από τη GlnRS και εντοπίζονται στη θηλιά του αντικωδικωνίου, στο βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος, καθώς και στην θηλιά DHU (D loop) του tRNA μορίου.

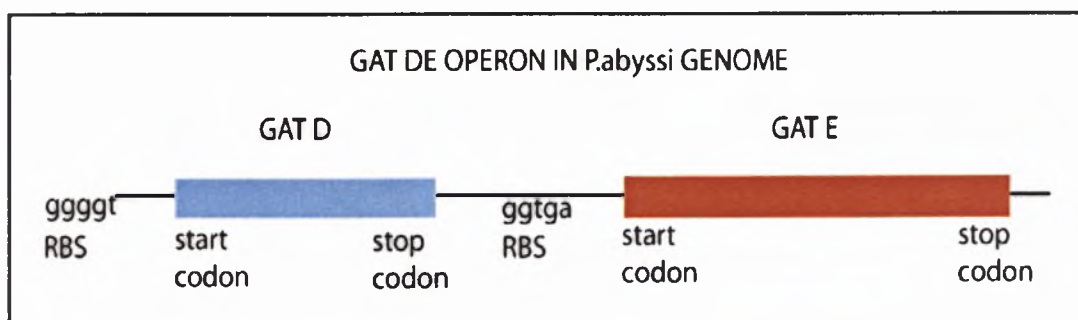
Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται ήδη από ορισμένα πειραματικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι η GlnRS του *E. coli* δε διαθέτει την ικανότητα αμινοακυλίωσης μορίων tRNA που προέρχονται από το αρχαίο *M. thermoautotrophicum* (Tumbula et al. 2000). Τα βασικά στοιχεία της αλληλουχίας του tRNA^{Gln} του *E. coli* που είναι υπεύθυνα για την αναγνώρισή του από τη GlnRS του ίδιου οργανισμού είναι ευρέως γνωστά τόσο σε βιοχημικό όσο και σε δομικό επίπεδο (Εικόνα 33) (Ibba et al. 1996, Hayase et al. 1992). Αποδείχθηκε, λοιπόν, ότι το *M. thermoautotrophicum* διαθέτει δύο είδη μορίων tRNA^{Gln} (tRNA₁^{Gln} και tRNA₂^{Gln}) με διαφορετικές βάσεις σε περισσότερες από τις μισές θέσεις των βασικών στοιχείων ταυτότητας, συγκρινόμενα με το βακτηριακό tRNA^{Gln}. Παρ' όλα αυτά, προέκυψε ότι η μεταφορά των βασικών στοιχείων ταυτότητας του tRNA^{Gln} του *E. coli* στο μετάγραφο που προέρχεται από το *M. thermoautotrophicum* (Εικόνα 33) επιτρέπει την αποτελεσματική σύνθεση του Gln-tRNA (Tumbula et al. 2000). Επομένως, όπως υποδεικνύουν αυτά τα πειραματικά αποτελέσματα, είναι πιθανόν η αλληλουχία του tRNA^{Gln} των αρχαίων να εμπόδιζε από μόνη της τη σταθερή μεταφορά της GlnRS από τα άλλα είδη οργανισμών στα αρχαία. Εναλλακτικά, δεν αποκλείεται αυτή η αλληλουχία του γενώματος των αρχαίων να εξελίχθηκε αργότερα σαν συνέπεια της απαίτησης διαφορετικών αλληλεπιδράσεων RNA-πρωτεΐνης από το διαφορετικό (έμμεσο) μονοπάτι σύνθεσης του Gln-tRNA^{Gln} που είχε ήδη επικρατήσει σε αυτούς τους οργανισμούς (Tumbula et al. 2000).



Εικόνα 33: Δομή των μορίων tRNA^{Gln} που προέρχονται από τους οργανισμούς *E. coli* και *M. thermoautotrophicum*. Τα τόξα υποδεικνύουν τις αλλαγές των νουκλεοτιδίων που έγιναν στο μεταγράφο του tRNA^{Gln} του *M. thermoautotrophicum*. Τα σκιασμένα νουκλεοτίδια αποτελούν τα βασικά στοιχεία ταυτότητας του tRNA^{Gln} του *E. coli* που αναγνωρίζονται από τη GlnRS. Τα νουκλεοτίδια που εμφανίζουν κόκκινο χρώμα διαφέρουν ανάμεσα στο tRNA^{Gln}₁ και tRNA^{Gln}₂ του *M. thermoautotrophicum*.

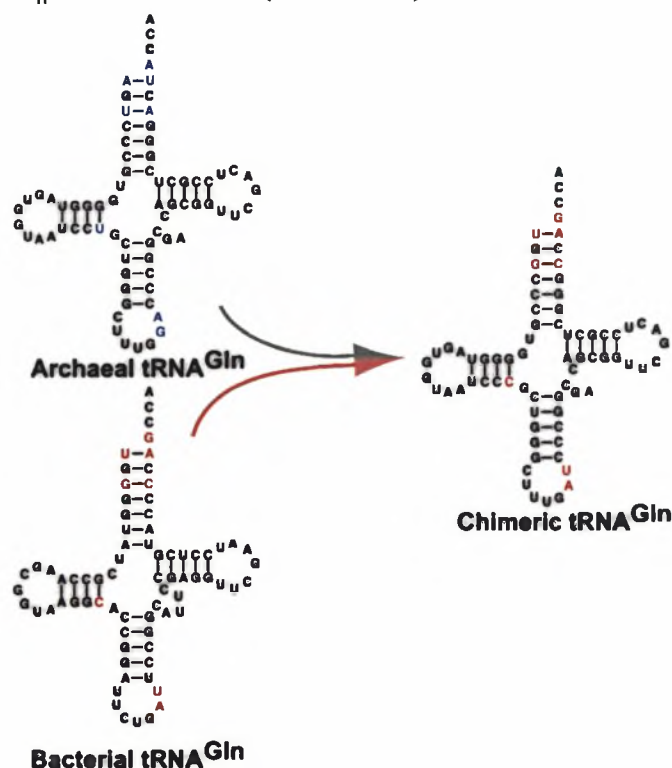
Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η μελέτη των αμιδοτρανσφερασών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εφόσον μπορεί να δώσει απαντήσεις σε φλέγοντα ερωτήματα, γεγονός που συνέβαλε στο να αποτελέσει η αμιδοτρανσφεράση GatDE αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Κατ' αρχήν, η μελέτη των ενζύμων αυτών μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά των υπομονάδων τους, ορισμένες από τις οποίες, όπως αναφέρθηκε, παρουσιάζουν σημαντικό ποσοστό ομοιότητας μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία της υπομονάδας GatA της GatCAB παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό ομολογίας με αυτή της υπομονάδας GatD της GatDE, ενώ υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι αμφότερες διαθέτουν δράση γλουταμινάσης (Spring et al. 1986). Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν αρκετά δεδομένα τα οποία δεν επιτρέπουν την καθιέρωση αυτής της άποψης. Μελλοντικές αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης των ομόλογων καταλοίπων των GatA και GatD ίσως αποκαλύψουν αν τελικά οι δύο αυτές υπομονάδες διαδραματίζουν κοινό ρόλο στις AdTs. Επιπλέον, εικάζεται πως οι υπομονάδες GatB και GatE των οποίων οι αλληλουχίες παρουσιάζουν 30% ομοιότητα και διαθέτουν σε γενικές γραμμές τα ίδια δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά (Tumbula et al. 2000), συμμετέχουν άμεσα στην αναγνώριση του tRNA από τις AdTs (Curnow et al. 1997). Απομένει η πειραματική επιβεβαίωση και

Η δημιουργία ενός οπερονίου *in vitro*, αποτελεί το πρώτο βήμα για τη μελέτη της λειτουργίας του ενζύμου GatDE η οποία μέχρι τώρα είχε περιοριστεί σε επίπεδο της κάθε υπομονάδας ξεχωριστά. Χρησιμοποιήθηκαν, λοιπόν, τα γονίδια του οργανισμού *Pyrococcus abyssi*, ο οποίος αποτελεί ένα ιδιαίτερα θερμοανθεκτικό αρχαίο που χαρακτηρίζεται από την έλλειψη της GlnRS. Αντίθετα διαθέτει μια GluRS με χαλαρή εξειδίκευση (nondiscriminating), η οποία μαζί με την αμιδοτρανσφεράση GatDE αποτελούν τα κύρια συστατικά του έμμεσου μονοπατιού σύνθεσης του Gln-tRNA^{Gln}. Το *Pyrococcus abyssi*, λοιπόν, αποτελεί έναν ιδανικό δότη των προς κλωνοποίηση γονιδίων, εφόσον ο μοναδικός τρόπος σχηματισμού Gln-tRNA^{Gln} στο αρχαίο αυτό είναι μέσω του έμμεσου μονοπατιού αμινοακυλίωσης. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι στο γονιδίωμα του συγκεκριμένου οργανισμού, τα γονίδια *gatD* και *gatE* εντοπίζονται σε μορφή οπερονίου (Εικόνα 34), γεγονός που επιτρέπει τη σύγκριση της συμπεριφοράς του ενζύμου *in vivo* και *in vitro*, καθώς είναι πιθανόν να παρουσιάζει διαφορές. Αυτό το γεγονός μπορεί να φανεί χρήσιμο και κατά τη διεξαγωγή μελετών μεταλλαξιγένεσης με σκοπό τη συλλογή πληροφοριών, τόσο για κάθε υπομονάδα της αμιδοτρανσφεράσης ξεχωριστά, όσο και για ολόκληρο το ένζυμο.



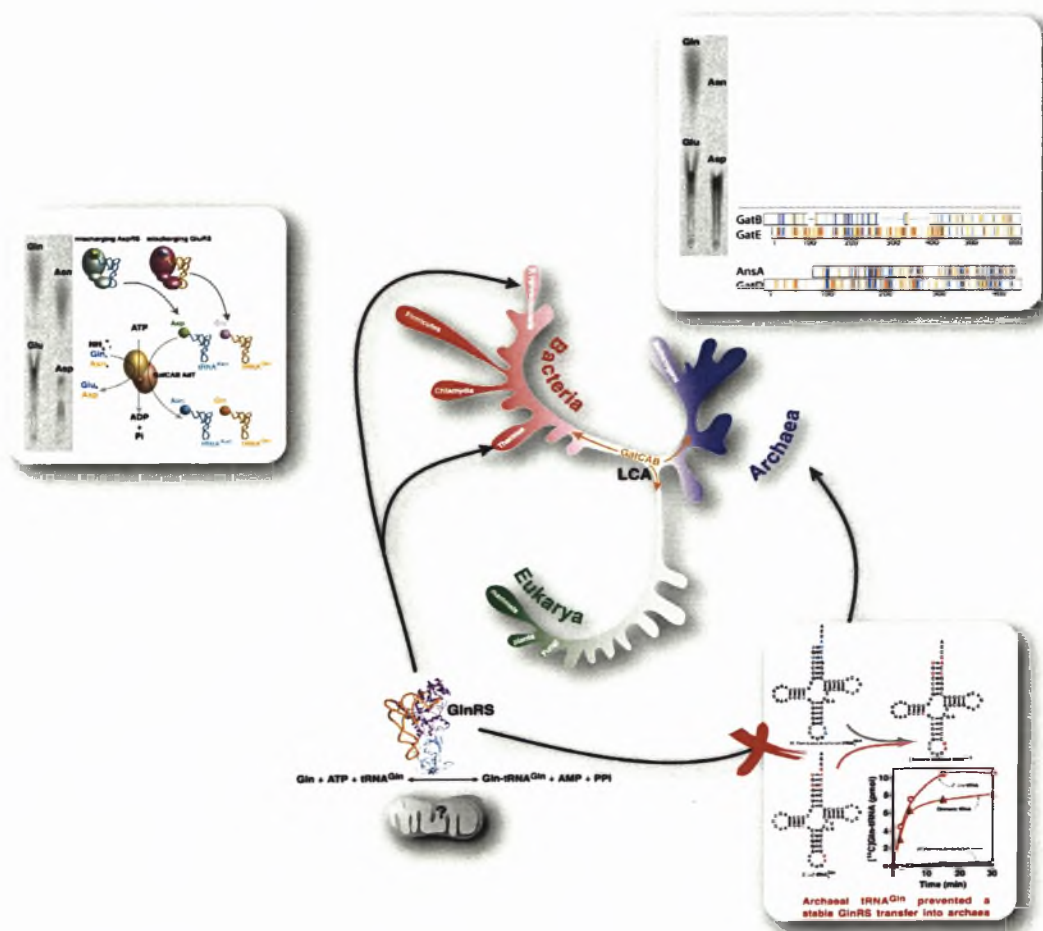
Ένας άλλος τομέας στον οποίο η δημιουργία του οπερονίου GatDE είναι απαραίτητη, είναι η μελέτη των χαρακτηριστικών του μορίου tRNA^{Gln} των αρχαίων, τα οποία οδήγησαν στην αναστολή της μεταφοράς της συνθετάσης

GlnRS στα αρχαία από τους άλλους οργανισμούς κατά την πορεία της εξέλιξης. Πολλά από αυτά τα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν στοιχεία ταυτότητας και αλληλουχίες του μορίου που συμμετέχουν στην αναγνώρισή του από την αμιδοτρανσφεράση. Αντίστοιχα, είναι γνωστές οι αλληλουχίες του βακτηριακού tRNA^{Gln} που είναι υπεύθυνες για την αναγνώρισή του από τη βακτηριακή GlnRS. Είναι εύκολος, λοιπόν, ο προσδιορισμός των διαφορών του tRNA^{Gln} των αρχαίων σε σχέση με το αντίστοιχο μόριο των βακτηρίων ή των ευκαρυωτών, μέσω της σύγκρισης των αλληλουχιών τους. Η ταυτοποίηση όμως των διαφορετικών στοιχείων που είναι υπεύθυνα για την επικράτηση του έμμεσου μονοπατιού σύνθεσης του Gln-tRNA^{Gln} στα αρχαία μέσω της αμιδοτρανσφεράσης GatDE, ίσως είναι δυνατή μέσω της δημιουργίας μορίων tRNA^{Gln} των αρχαίων που φέρουν μεταλλάξεις σε διάφορα σημεία της αλληλουχίας τους και της αλληλεπίδρασής τους με ολόκληρο το ένζυμο GatDE το οποίο έχει παραχθεί *in vitro*. Για παράδειγμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόρια tRNA τα οποία θα αποτελούν χιμαιρικά μόρια tRNA^{Gln} που θα συνιστώνται από την αλληλουχία του κανονικού tRNA^{Gln} των αρχαίων η οποία όμως θα φέρει τα βασικά στοιχεία ταυτότητας του βακτηριακού tRNA^{Gln} (Εικόνα 35).



Εικόνα 35: Δομές των μορίων tRNA^{Gln} που προέρχονται από αρχαία και βακτήρια, καθώς και δομή του χιμαιρικού tRNA^{Gln} που προκύπτει από τον συνδυασμό της αλληλουχίας των δύο πρώτων. Επισημαίνονται με μπλε χρώμα τα νουκλεοτιδία που συνιστούν τα στοιχεία ταυτότητας του tRNA^{Gln} των αρχαίων που διαφέρουν από τα αντίστοιχα του βακτηριακού tRNA^{Gln} τα οποία επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα. Δεξιά φαίνεται η δομή του χιμαιρικού tRNA^{Gln} το οποίο προέρχεται από το tRNA^{Gln} των αρχαίων στο οποίο, όμως, έχει πραγματοποιηθεί αντικατάσταση των νουκλεοτιδίων των στοιχείων ταυτότητας από τα αντίστοιχα του βακτηριακού tRNA^{Gln}, ενώ η υπόλοιπη αλληλουχία παραμένει η ίδια.

Είναι εμφανές, λοιπόν, ότι παρ' όλες τις ανακαλύψεις που έχουν επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια, παραμένουν ακόμα άγνωστες πολλές πτυχές αυτής της τόσο σημαντικής διαδικασίας που λέγεται σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNA μορίων. Η ανακάλυψη της αμιδοτρανσφεράσης GatDE στα αρχαία και της GatCAB τόσο στα βακτήρια όσο και στα αρχαία, καθώς και το πολύ σημαντικό ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας και λειτουργίας που παρουσιάζουν οι υπομονάδες των δύο ενζύμων, μπορούν να αποτελέσουν το εφαλτήριο για περαιτέρω μελέτες με σκοπό να δωθούν απαντήσεις στα αναπάντητα ερωτήματα που συνεχώς αναδύονται. Τέλος, η υπόθεση ότι η αναστολή της μεταφοράς της συνθετάσης GlnRS στα αρχαία κατά την εξέλιξη, οφείλεται στα διαφορετικά στοιχεία ταυτότητας που διαθέτει το tRNA^{Gln} των αρχαίων, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα ορισμένων πρόσφατων ερευνών, χρήζει περαιτέρω πειραματικής επιβεβαίωσης, ενώ μελλοντικές μελέτες μεταλλαξιγένεσης είναι πιθανόν να οδηγήσουν στον ακριβή προσδιορισμό αυτών των στοιχείων (Εικόνα 36).



Εικόνα 36: Συνοπτική παρουσίαση των ανακαλύψεων που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι τώρα, όσον αφορά το έμμεσο μονοπάτι σύνθεσης των αμινοάκυλο-tRNAs που έχει εντοπιστεί σε πολλά βακτήρια και αρχαία.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akochy P.-M., Bernard D., Roy P.H., and Lapointe J. 2004. Direct glutaminyI-tRNA biosynthesis and indirect asparaginyI-tRNA biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **186**(3): 767-776.
- Becker H.D., Roy H., Moulinier L., Mazauric M.H., Keith G., and Kern D. 2000a. *Thermus thermophilus* contains an eubacterial and an archaeobacterial aspartyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **39**: 3216.
- Becker H.D., Min B., Jacobi C., Racznia G., Pelaschier J., Roy H., Klein S., Kern D., and Söll D. 2000b. The heterotrimeric *Thermus thermophilus* Asp-tRNA^{Asn} amidotransferase can also generate Gln-tRNA^{Gln}. *FEBS Lett.* **476**: 140.
- Becker H.D. and Kern D. 1998. *Thermus thermophilus*: A link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 12832.
- Becker H.D., Reinbolt J., Kreutzer R., Giegé R., and Kern D. 1997. Existence of two distinct aspartyl-tRNA synthetases in *Thermus thermophilus*. Structural and biochemical properties of the two enzymes. *Biochemistry*, Vol. **36**: 8785-8797
- Becker H.D., Giegé R., and Kern D. 1996. Identity of prokaryotic and eukaryotic tRNA^{Asp} for aminoacylation by aspartyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*, Vol. 35, 7447-7458.
- Bult C.J., White O., Olsen G.J., Zhou L., Fleischmann R.D., Sutton G.G., Blake J.A., FitzGerald L.M., Clayton R.A., Gocayne J.D., Kerlavage A.R., Dougherty B.A., Tomb J.-F., Adams M.D., Reich C.I., Overbeek R., Kirkness E.F., Weinstock K.G., Merrick J.M., Glodek A., Scott J.L., Geoghagen N.S., Weidman J.F., Fuhmann J.L., Nguyen D., Utterback T.R., Kelley J.M., Peterson J.D., Sadow P.W., Hanna M.C., Cotton M.D., Roberts K.M., Hurst M.A., Kaine B.P., Borodovsky M., Klenk H.-P., Fraser C.M., Smith H.O., Woese C.R., and Venter J.C. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science.* **273**: 1058.
- Bunjun S., Stathopoulos C., Graham D., Min B., Kitabatake M., Wang A.L. Wang C.C., Vivarés C.P., Weiss L.M., and Söll D. 2000. A dual-specificity aminoacyl-tRNA synthetase in the deep-rooted eukaryote *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 12997.
- Chalker A.F., Minehart H.W., Hughes N.J., Koretke K.K., Lonetto M.A., Brinkman K.K., Warren P.V., Lupas A., Stanhope M.J., Brown J.R., and Hoffman P.S. 2001. Systematic identification of selective essential genes in *Helicobacter pylori* by genome prioritization and allelic replacement mutagenesis. *J. Bacteriol.* **183**: 1259.
- Clark R.L. & Neidhardt F.C. 1990. Roles of the two lysyl-tRNA synthetases of *Escherichia coli*: analysis of nucleotide sequences and mutant behavior. *J. Bacteriol.* **172**: 3237-3243.

- Crick F.H.C. 1958. On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12**: 138.
- Curnow A.W., Tumbula D.L., Pelaschier J.T., Min B., and Söll D. 1998. Glutamyl- tRNA^{Gln} amidotransferase in *Deinococcus radiodurans* may be confined to asparagine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 12838.
- Curnow A.W., Hong K.-W., Yuan R., Kim S.-I., Martins O., Winkler W., Henkin T.M., and Söll D. 1997. Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase: A novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 11819.
- Curnow A.W., Ibba M., and Söll D. 1996. tRNA-dependent asparagine formation. *Nature.* **382**: 589.
- Delarue M. 1995. Aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**:48-55.
- Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., Moras D. 1990. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature.* **347**: 203-206.
- Feng L., Sheppard K., Tumbula-Hansen D., and Söll D. 2005. Gln-tRNA^{Gln} formation from Glu-tRNA^{Gln} requires cooperation of an asparaginase and a Glu-tRNA^{Gln} kinase. *J. Biol. Chem.* Vol. 280, Issue 9, 8150-8155.
- Feng L., Tumbula H.D., Toogood H., and Söll D. 2003. Expanding tRNA recognition of a tRNA synthetase by a single amino acid change. *Eurekah bioscience Journal.* 086-091.
- Feng L., Stathopoulos C., Ahel I., Mitra A., Tumbula-Hansen D., Hartsch T., and Söll D. 2002. Aminoacyl-tRNA formation in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Extremophiles.* **6**: 167-174.
- Freist W., Gauss D.H., Söll D., Lapointe J. 1997. Glutamyl-tRNA synthetase. *Biol. Chem.* **378**: 1313-1329.
- Gagnon Y., Lacoste L., Champagne N., and Lapointe J. 1996. Widespread use of the Glu-tRNA^{Gln} transamidation pathway among bacteria. *J. Biol. Chem.* **271**:14856-14863.
- Gupta R. 1984. *Halobacterium volcanii* tRNAs. *J. Biol. Chem.* **259**:9461-9471.
- Hamann C.S., Sowers K.R., Lipman R.S. and Hou Y.M. 1999. An archeal aminoacyl-tRNA synthetase missing from genomic analysis. *J. Bacteriol.* **181**: 5880.
- Handy J., and Doolittle R.F. 1999. An attempt to pinpoint the phylogenetic introduction of glutamyl-tRNA synthetase among bacteria. *J. Mol. Evol.* **49**: 709.

Horiuchi K.Y., Harpel M.R., Shen L., Luo Y., Rogers K.C., and Copeland R.A. 2001. Mechanistic studies of reaction coupling in Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase. *Biochemistry*. **40**: 6450.

Ibba-Prætorius M. and Ibba M. 2003. Aminoacyl-tRNA synthesis in archaea: different but not unique. *Molecular Microbiology*. Vol. 48, Issue 3, Page 631.

Ibba M. & Söll D. 2001. The renaissance of aminoacyl-tRNA synthesis. *EMBO Reports* 2, 5, 382-387.

Ibba M, Becker H.D., Stathopoulos C., Tumbula D.L., and Söll D. 2000. The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 311.

Ibba M., Morgan S., Curnow A.W., Pridmore D.R., Vothknecht U.C., Gardner W., Lin W., Woese C.R. and Söll D. 1997b. A euryarchaeal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases. *Science*. **278**: 1119-1122.

Kobayashi M., Fujiwara Y., Goda M., Komeda H., and Shimizu S. 1997. Identification of active sites in amidase: Evolutionary relationship between amide bond- and peptide bond-cleaving enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 11986.

Lamour V., Quevillon S., Diriong S., N'guyen V.C., Lipinski M., and Mirande M. 1994. Evolution of the Glx-tRNA synthetase family: The glutaminyl enzyme as a case of horizontal gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 8670.

Lapointe J., Duplain L., and Proulx M. 1986. A single glutamyl-tRNA synthetase aminoacylates tRNA^{Glu} and tRNA^{Gln} in *Bacillus subtilis* and efficiently misacylates *Escherichia coli* tRNA^{Gln1} in vitro. *J. Bacteriol.* **165**: 88.

Min B., Pelaschier J.T., Graham D.E., Tumbula-Hansen D., and Söll D. 2002. Transfer RNA-dependent amino acid biosynthesis: An essential route to asparagine formation. *PNAS*. Vol. 99, No. 5, 2678-2683.

Perona J.J., Rould M., Steitz T.A. 1993. Structural basis for transfer RNA aminoacylation by *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*. **32**: 8758-8771.

Racznik G., Becker H.D., Min B. and Söll D. 2001. A single amidotransferase forms asparaginyl-tRNA and glutaminyl-tRNA in *Chlamydia trachomatis*. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, Issue 49, 45862-45867.

Rogers K.C. and Söll D. 1993. Discrimination among tRNAs intermediate in glutamate and glutamine acceptor identities. *Biochemistry*. **32**: 14210-14219.

Rould M.A., Perona J.J., Söll D. and Steitz T.A. 1989. Structure of Gln-tRNA synthetase - tRNA complex. *Science*. **246**: 1135-1142.

Roy H., Becker H.D., Reinbolt J., and Kern D. 2003. When contemporary aminoacyl-tRNA synthetases invent their cognate amino acid metabolism. *PNAS Early Edition*. **10**: 1073.

Schön A., Kannangara C.G., Gough S., and Söll D. 1988. Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. *Nature*. **331**: 187.

Sissler M., Eriani G., Martin F., Giegé R. and Florentz C. 1997. Mirror image alternative interaction patterns of the same tRNA with either class I arginyl-tRNA synthetase or class II aspartyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No. 24, 4899–4906.

Smith D.R., Doucette-Stamm L.A., Deloughery C., Lee H., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lumm W., Pothier B., Qiu D., Spadafora R., Vicaire R., Wang Y., Wierzbowski J., Gibson R., Jiwani N., Caruso A., Bush D., Safer H., Patwell D., Prabhakar S., McDougall S., Shimer G., Goyal A., Pietrokovsky S., Church G.M., Daniels C.J., Mao J.-I., Rice P., Nölling J., and Reeve J.N. 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*: Functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**: 7135.

Spring K.J., Jerlstrom P.G., Burns D.M., Beacham I.R. 1986. L-asparaginase genes in *Escherichia coli* : isolation of mutants and characterization of the *ansA* gene and its protein product. *J. Bacteriol.*, **166**: 135-142.

Sprinzi M. 1994. Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector. *Trends Biochem. Sci.*, **19**: 245-250.

Stathopoulos C., Ahel I., Ali K., Ambrogelly A., Becker D., Bunjun S., Feng L., Herring S., Jacquín-Becker C., Kobayashi H., Korencic D., Krett B., Mejlhede N., Min B., Nakano H., Namgoong S., Polycarpo C., Raczniak G., Rinehart J., Rosas-Sandoval G., Ruan B., Sabina J., Sauerwald A., Toogood H., Tumbula-Hansen D., Ibba M., and Söll D. 2001. Aminoacyl-tRNA synthesis: A postgenomic perspective. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 0-87969-619-2/01.

Stathopoulos C., Li T., Longman R., Vothknecht U.C., Becker H.D., Ibba M., and Söll D. 2000. One polypeptide with two aminoacyl-tRNA synthetase activities. *Science*. **287**: 479.

Sugiura I., Nureki O., Ugaji-Yoshikawa Y., Kuwabara S., Shimada A., Tateno M., Lorber B., Giegé R., Moras D., Yokoyama S., Konno M. 2000. A crystal structure of *Thermus thermophilus* methionyl-tRNA synthetase reveals two RNA-binding modules. *Structure*. **8**: 197-208.

Tumbula D.L., Becker H.D., Chang W. & Söll D. 2000. Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature*, Vol. **407**: 106-110.

Tumbula D.L., Vothknecht U.C., Kim H.-S., Ibba M., Min B., Li T., Pelaschier J., Stathopoulos C., Becker H., and Söll D. 1999. Archeal aminoacyl-tRNA synthesis: Diversity replaces dogma. *Genetics*. **152**: 1269.

Tyler B. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Annu Rev Biochem.* **47**: 1127–1162.

White B.N. and Bayley S.T. 1972. Further codon assignments in an extremely halophilic bacterium using a cell-free protein-synthesizing system and a ribosomal binding assay. *Can. J. Biochem.* **50**: 600–609.

Wilcox M. 1969. Gamma-glutamyl phosphate attached to glutamine-specific tRNA: A precursor of glutaminyl-tRNA in *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **11**: 405.

Wilcox M. and Nirenberg M. 1968. Transfer RNA as a cofactor coupling amino acids synthesis with that of protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **61**: 229.

Woese C.R., Olsen G.J., Ibba M., and Söll D. 2000. Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. **64**: 202.

Wolf Y.I., Aravind L., Grishin N.V., and Koonin E.V. 1999. Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases: Analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genomic Research*. Vol. 9, Issue 8, 689-710.

Wong J. T. 1975. A co-evolution theory of the genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 1909–1912.

Zalkin H. and Smith J.L. 1998. Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **72**:87-144.