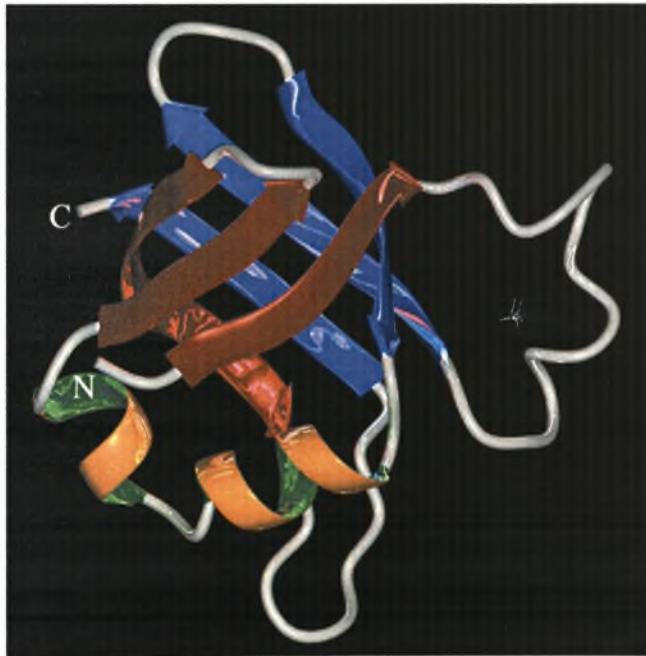


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ L25
ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΕΛΙΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟ ΤΟΥ ΠΥΛΩΡΟΥ
Helicobacter pylori



ΣΤΡΙΚΟΥΔΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2006



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

Αριθ. Εισ.: 4989/1
Ημερ. Εισ.: 14-11-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΣΤΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087754

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, με υπεύθυνη καθηγήτρια την κα. Θεοδώρα Χολή-Παπαδοπούλου, αναπληρώτρια καθηγήτρια βιοχημείας, την περίοδο 20/02/2006-17/05/2006, καθώς και στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με υπεύθυνο καθηγητή τον κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, επίκουρο καθηγητή βιοχημείας, την περίοδο 22/05/2006-29/06/2006.

Υπεύθυνη καθηγήτρια:

Θεοδώρα Χολή-Παπαδοπούλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- ❖ Θεοδώρα Χολή-Παπαδοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
- ❖ Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ❖ Γεώργιος Παπαδόπουλος, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες:

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Θεοδώρα Χολή-Παπαδοπούλου και τον κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπό μου και με δέχτηκαν στα εργαστήριά τους προκειμένου να εκπονήσω την παρούσα διπλωματική μου εργασία, καθώς και για την επιστημονική καθοδήγηση και την ηθική στήριξη που μου προσέφεραν. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Φίλιππο Κωττάκη, Αικατερίνη Τσαγκάλια και Χριστίνα Ματράγκου, PhD του Τμήματος Χημείας, όπως επίσης και την Σταματίνα Γιαννούλη του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την πολύτιμη βοήθειά τους και τις υποδείξεις τους για την εξοικείωσή μου με τις διάφορες τεχνικές προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	22
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
3.1. ΥΛΙΚΑ	23
3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	23
3.1.2. Βιολογικά υλικά	23
3.1.3. Ένζυμα και υλικά μοριακής βιολογίας	23
3.1.4. Υλικά χρωματογραφίας	24
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	24
3.2.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	24
3.2.2. Καθαρισμός τμημάτων DNA μετά από PCR	26
3.2.3. Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτική αγαρόζης	26
3.2.4. Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς	27
3.2.5. Προετοιμασία επιδεκτικών για μετασχηματισμό βακτηρίων (competent cells)	30
3.2.6. Εισαγωγή πλασμιδίου σε κύτταρα <i>E. coli</i> (μετασχηματισμός)	32
3.2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	33
3.2.8. Υπερέκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα <i>E. coli</i> BL21(DE3)-σύστημα έκφρασης ρET	34
3.2.9. Καλλιέργειες βακτηρίων <i>E. coli</i>	36
3.2.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-ηλεκτροφόρηση)	36
3.2.11. Στερέωση και βαφή πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου	37
3.2.12. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων	37
3.2.13. Λύση κυττάρων	38
3.2.14. Κλασματική κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο	39
3.2.15. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (DEAE-Sepharose, CM-Sepharose)	41
3.2.16. Καθαρισμός με την στήλη μοριακής διήθησης Sephadex G-75 Superfine	42
3.2.17. Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών-Χρωματομετρική μέθοδος κατά Bradford, τροποποιημένη από τον Bearden	44

3.2.18. Απομόνωση ολικού tRNA σε μεγάλη κλίμακα (Large scale tRNA extraction).	45
3.2.19. Δοκιμή αμινοακυλίωσης (Aminoacylation assay)	46
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
4.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου της πρωτεΐνης L25 από τον οργανισμό <i>Helicobacter pylori</i> στον πλασμιδιακό φορέα pET-11a, για την παραγωγή της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης.	48
4.2. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> BL21(DE3) με το ανασυνδυσασμένο πλασμίδιο pET-11a-L25 για την παραγωγή της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης L25	50
4.3. Κλασματική κατακρήμνιση με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50
4.4. Απομάκρυνση των νουκλεϊκών οξέων	51
4.5. Καθαρισμός με στήλες ιοντοανταλλαγής (DEAE-Sepharose, CM-Sepharose)	52
4.6. Καθαρισμός με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Sephadex G-75 Surefine)	54
4.7. Απομόνωση ολικού tRNA σε μεγάλη κλίμακα (Large scale tRNA extraction)	56
4.8. Δοκιμή αμινοακυλίωσης (Aminoacylation assay)	57
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεϊνική σύνθεση είναι ταυτόσημη με την έννοια της ζωής. Σημαντικότερο ρόλο στη διαδικασία αυτή διαδραματίζουν τα ριβοσώματα, αυτά τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια στα οποία συντίθενται οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες, καθώς επίσης και οι μηχανισμοί της αμινοακυλίωσης του tRNA. Στα ριβοσώματα, RNA και πρωτεΐνες συνεργάζονται για την κατάλυση του σχηματισμού πεπτιδικών δεσμών υπό τις οδηγίες του αγγελιοφόρου RNA. Η αμινοακυλίωση αποτελεί κεντρική κυτταρική διαδικασία κατά την οποία συντίθενται τα αμινοάκυλο-tRNAs από τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (AARSs) που αναλαμβάνουν τη διατήρηση της πιστότητας του γενετικού μηνύματος. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη μιας πιθανής εξελικτικής σχέσης μεταξύ ριβοσωμικών πρωτεϊνών και αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών, όμως οι λειτουργίες τους είναι διαφορετικές. Η ύπαρξη ωστόσο μιας ριβοσωμικής πρωτεΐνης, της L25, με υψηλή δομική ομοιότητα ως προς τη περιοχή δέσμευσης του αντικωδικονίου της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της γλουταμίνης (GlnRS), ενός εκ των νεότερων μελών αυτής της οικογένειας ενζύμων, καθώς η γλουταμίνη είναι ένα από τα τελευταία αμινοξέα που προστέθηκαν στο ρεπερτόριο των 20 γνωστών έως σήμερα αμινοξέων, η οποία μάλιστα συναντάται περισσότερο σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, εγείρει σοβαρά ερωτήματα για τη σχέση αυτή. Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση, η υπερέκφραση και ο καθαρισμός της L25 του *Helicobacter pylori*, ενός οργανισμού που στερείται την GlnRS, και ακολούθησε δοκιμή αμινοακυλίωσης για να διαπιστωθεί η λειτουργική ομοιότητα των πρωτεϊνών αυτών. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η L25 δεν έχει δράση αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της γλουταμίνης, όμως η εξελικτική σχέση των πρωτεϊνών αυτών παραμένει ένα ανοιχτό ερώτημα.

ABSTRACT

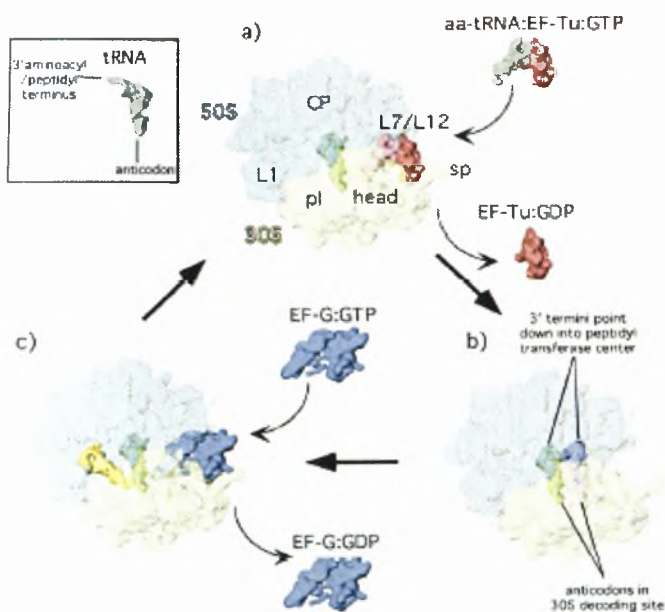
Protein synthesis is synonymous with life. The most significant role in this process is played by the ribosomes, these nucleoprotein particles where the polypeptide chains are synthesized, as well as the mechanisms of tRNA aminoacylation. In the ribosomes, RNA cooperates with proteins in order to catalyze the peptide bond formation, under the commands of messenger RNA. The tRNA aminoacylation consists a pivotal cell process during which aminoacyl-tRNAs are synthesized by aminoacyl-tRNA synthetases (AARSs) so as the fidelity of the genetic message is maintained. Many studies support the existence of a possible

evolutionary relationship between the ribosomal proteins and the aminoacyl-tRNA synthetases, nevertheless their different functions remain distinct. However, the existence of a ribosomal protein, L25, which shows high structural homology to the glutamyl-tRNA synthetase (GlnRS) anticodon binding domain, one of the latest member of this enzyme family, as glutamine has been suggested to constitute one of the last amino acids added to the known 20 amino acid repertoire, which is found mostly at higher eukaryotic organisms, raises some serious questions about this particular relationship. Goal of the present study is the cloning, the overexpression and the isolation of the L25 ribosomal protein from *Helicobacter pylori*, an organism lacking GlnRS, and the following aminoacylation assay in order to ascertain the functional homology between these two proteins. Despite the fact that no GlnRS function for L25 has been observed, the evolutionary relationship between these two proteins remains an open question.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εισαγωγή στο ριβόσωμα

Τα ριβοσώματα είναι οι μοριακές μηχανές οι οποίες συντονίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του mRNA, του tRNA, των ριβοσωμικών πρωτεϊνών και πολλών έξω-ριβοσωμικών παραγόντων κατά τη πολύπλοκη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές εγγυώνται την σωστή έναρξη, επιμήκυνση και τερματισμό της μετάφρασης. Ένα αμινοξύ εισέρχεται στην θέση A του ριβοσώματος με τη μορφή αμινοάκυλο-tRNA, συμπλεγμένο με τον παράγοντα επιμήκυνσης Tu (EF-Tu) και GTP (Εικόνα 1.α.). Η αναπτυσσόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα που βρίσκεται στην θέση P του ριβοσώματος με τη μορφή πεπτιδύλο-tRNA, μεταφέρεται στο αμινοάκυλο-tRNA (Εικόνα 1.β.). Ακολούθως το νέο πεπτιδύλο-tRNA, επαυξημένο κατά ένα αμινοξύ, μετατοπίζεται στη θέση P με τη βοήθεια παράγοντα επιμήκυνσης G (EF-G) και του GTP. Το απακυλιωμένο tRNA στη συνέχεια απελευθερώνεται από το ριβόσωμα μέσω της μιας ή των περισσότερων θέσεων εξόδου E (Εικόνα 1.γ.) (Maguire and Zimmermann 2001).



Εικόνα 1. Ο κύκλος επιμήκυνσης της πρωτεϊνικής σύνθεσης
J. Cell Biol. 150, 447–460, 2000

Το κέντρο πεπτιδύλο-τρανσφεράσης του ριβοσώματος, εκεί δηλαδή όπου καταλύεται η αντίδραση σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού, περιλαμβάνεται στη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος, ενώ η θέση αποκωδικοποίησης των συμπληρωματικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ mRNA και tRNA βρίσκεται στην μικρή υπομονάδα. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η μετατόπιση του συμπλόκου πεπτιδύλο-

tRNA και mRNA κατά μήκος του ριβοσώματος προϋποθέτει τη συνεργασία και των δύο υπομονάδων (Garrett *et al.* 2000).

Η βασική μορφή του ριβοσώματος είναι συντηρημένη εξελικτικά, αλλά υπάρχουν αρκετές παραλλαγές στο συνολικό μέγεθος και στις αναλογίες RNA και πρωτεϊνών στα ριβοσώματα των βακτηρίων, του κυτταροπλάσματος των ευκαρυωτικών οργανισμών και των οργανιδίων τους. Και τα δύο είναι ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωμάτια που περιέχουν περισσότερο RNA από πρωτεΐνη.

Τα περίπου 20.000 ριβοσώματα ενός βακτηριακού κυττάρου αποτελούν σχεδόν το ¼ της συνολικής του μάζας. Ένα τυπικό βακτηριακό ριβόσωμα με συντελεστή καταβύθισης 70S έχει μάζα περίπου 2,3MDa και περιεκτικότητα σε RNA 66%. Το σωμάτιο αυτό μπορεί να χωριστεί σε δύο υπομονάδες, την μικρή και την μεγάλη, με συντελεστές καταβύθισης 30S και 50S αντίστοιχα. Αυτές οι υπομονάδες μπορούν να χωριστούν περαιτέρω στα συστατικά τους μόρια. Η μικρή υπομονάδα περιέχει ένα μόριο RNA (16S) και κατά μέσο όρο 23 ριβοσωμικές πρωτεΐνες (S1-S23, small), ενώ η μεγάλη υπομονάδα περιέχει δύο μόρια RNA (5S και 23S) καθώς και κατά μέσο όρο 34 ριβοσωμικές πρωτεΐνες (L1-L34, large).

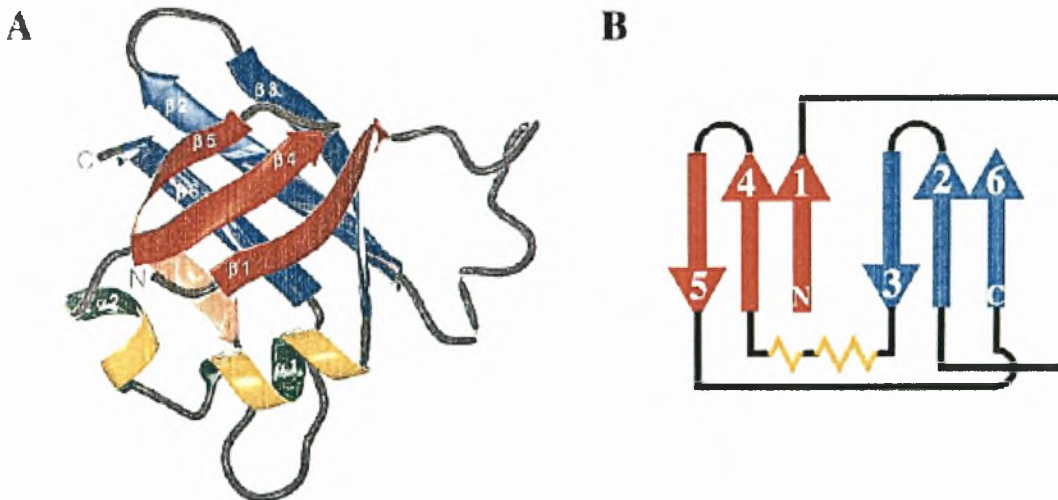
Τα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών είναι μεγαλύτερα από αυτά των βακτηρίων αφού περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα τόσο RNA όσο και πρωτεϊνών. Η μικρή υπομονάδα τους αποτελείται από το 18S RNA και κατά μέσο όρο 32 πρωτεΐνες, ενώ η μεγάλη υπομονάδα τους από τα 5S, 5,8S και 28S RNA καθώς και 46 πρωτεΐνες. Συνολικά το ευκαρυωτικό ριβόσωμα έχει μάζα 4,2MDa και το RNA εξακολουθεί να αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό όσον αφορά τη μάζα του σε ποσοστό 60%.

Κατά κύριο λόγο οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες απαντώνται στα ριβοσώματα σε ένα αντίγραφο, υπάρχουν όμως και εξαιρέσεις (Wilson and Nierhaus 2005). Οι πρωτεΐνες L7 και L12 στα περισσότερα βακτήρια συναντώνται σε δύο αντίγραφα και μαζί με την L10 σχηματίζουν το πενταμερές σύμπλοκο L10(L7/L12)₂, ενώ στα περισσότερα θερμόφιλα αρχαία σε τρία αντίγραφα σχηματίζοντας το επταμερές L10(L7/L12)₃ (Diaconu *et al.* 2005; Ilag *et al.* 2005). Γενικά, η αρίθμηση τους έγινε σύμφωνα με τις θέσεις που καταλαμβάνουν ύστερα από δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Κατά αυτόν τον τρόπο στις μεγάλες και όξινες πρωτεΐνες αντιστοιχούν μικροί αριθμοί, ενώ στις μικρές και βασικές μεγάλοι αριθμοί (Kaltschmidt and Wittmann 1970).

Η L25 ριβοσωμική πρωτεΐνη

Η L25 ριβοσωμική πρωτεΐνη των προκαρυωτικών οργανισμών, είναι συστατικό της 50S υπομονάδας αν και σε κάποιους οργανισμούς δεν έχουν βρεθεί ομόλογα γονίδια της (Nevskaya et al. 2000).

Η L25 παρουσιάζει μια συμπαγή μορφή που αποτελείται από μια δομή β-βαρελιού με έξι β-πτυχωτά φύλλα και δυο α-έλικες (Stoldt et al 1998). Τα επί μέρους στοιχεία της δευτεροταγούς δομής είναι β1-β2-β3-α1-α2-β4-β5-β6. Συγκεκριμένα το β-βαρέλι περιέχει ένα μοτίβο που επαναλαμβάνεται δύο φορές και αποτελείται από δύο παράλληλα και ένα αντιπαράλληλο πτυχωτό φύλλο. Η κάθε πλευρά του βαρελιού περιλαμβάνει τρία πτυχωτά φύλλα με την τοπολογία που περιγράφηκε παραπάνω. Τα ζεύγη των παράλληλων φύλλων β1/β4 και β2/β6, συμπληρώνονται αντίστοιχα από τα β5 και β3. Ανάμεσα στα φύλλα β3 και β4 μεσολαβούν οι δύο κάθετες μεταξύ τους α-έλικες α1 και α2. Η πρώτη περιέχει δύο στροφές ενώ η δεύτερη που είναι πιο μικρή μόνο μία και είναι προσανατολισμένες με τέτοιο τρόπο ώστε να κλείνουν τον πάτο του βαρελιού. Τα φύλλα β4/β5 και β2/β3 ενώνονται με φουρκέτες οι οποίες είναι πολύ σταθερές στο χώρο. Αντίθετα ο μεγάλος βρόγχος των 17 αμινοξέων που ενώνει τα φύλλα β1 και β2 προεξέχει από τη συμπαγή δομή της πρωτεΐνης και φαίνεται να έχει μεγαλύτερη ελευθερία κίνησης (απουσία 5S RNA).

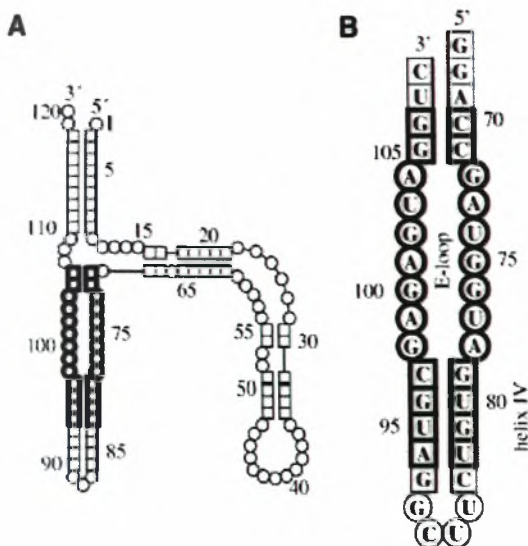


Εικόνα 2. (A) Τριτοταγής διαμόρφωση της L25 ριβοσωμικής πρωτεΐνης. Διακρίνονται το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο (N και C), τα β-πτυχωτά φύλλα (β1-β6) καθώς επίσης και οι δύο α-έλικες (α1 και α2). (B) Η τοπολογία β1-β2-β3-α1-α2-β4-β5-β6 των επιμέρους στοιχείων της δευτεροταγούς διαμόρφωσης της L25.

Συγκεκριμένα στο *E. coli* όπου και έχει μελετηθεί καλύτερα, η L25 δεσμεύεται μαζί τις L5 και L18 στο 5S RNA (που αποτελείται από 120 νουκλεοτίδια) και αποτελεί μία από τις πιο συντηρημένες (Chen-Schmeisser and Garrett 1977) αλληλουχίες

RNA και γενικά ένα από τα πιο συντηρημένα μόρια στη φύση (Specht et al. 1990). Μάλιστα είναι απαραίτητο για την επιβίωση του κυττάρου καθώς έχει αποδειχθεί πως ανασυσταμένες 50S ριβοσωμικές υπομονάδες στις οποίες λείπει το 5S RNA δεν είναι ικανές για πρωτεϊνοσύνθεση (Erdmann et al. 1971). Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός πως δεσμεύεται άμεσα στο 23S RNA και συγκεκριμένα παρακείμενα της περιοχής της πεπτιδυλοτρανσφεράσης (Dontsova et al. 1994). Η περιοχή του 5S RNA που δεσμεύεται στο 23S RNA συνορεύει με την περιοχή δέσμευσης της L25 και αυτό το γεγονός οδηγεί στην υπόθεση πως ίσως πίσω από αυτές της δεσμεύσεις να κρύβεται μία λειτουργία άγνωστη μέχρι τώρα στην διαδικασία του σχηματισμού των πεπτιδικών δεσμών.

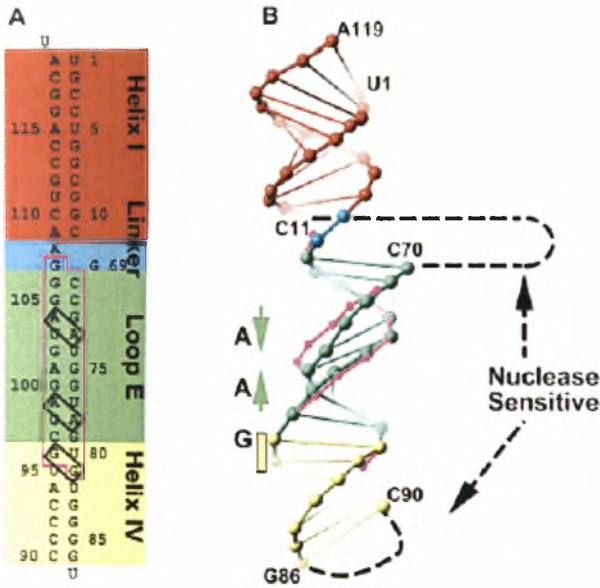
Η δευτεροταγής δομή του 5S RNA φαίνεται στην εικόνα 3. Η περιοχή στην οποία δεσμεύεται η L25 είναι ένα δίκλωνο μόριο 18 ζευγών βάσεων που ονομάζεται περιοχή E (E domain) και περιέχει την E loop καθώς και την έλικα IV (Correll et al. 1997). Η E loop δομικά σχηματίζει μια μεγάλη εσωτερική φούσκα (bulge) που έχει μια σφιχτά περιελιγμένη ελικοειδή δομή με ασυνήθιστη γεωμετρία (Leontis et al. 1998). Η τριτοταγής δομή της E domain φανερώνει συνολικά ελικοειδή διαμόρφωση σύμφωνα με την οποία η μικρή αύλακα αντιστοιχεί στην E loop, ενώ η μεγάλη αύλακα στην έλικα IV. Η E loop περιέχει 7 μη κανονικά κατά Watson-Crick ζεύγη βάσεων και η δομή της σταθεροποιείται από αρκετά ιόντα μαγνησίου.



Εικόνα 3. (A) Σχηματική παρουσίαση της δευτεροταγούς δομής του 5S RNA του *E. coli*. (B) Σχηματική παρουσίαση τμήματος των 37 νουκλεοτιδίων του 5SE. Οι βάσεις οι οποίες είναι τονισμένες, αντιστοιχούν στο τμήμα όπου η L25 δεσμεύεται.

Η συνολική μορφή του τμήματος των 18 ζευγών βάσεων διαμορφώνεται επίσης από ένα ασυνήθιστο μοτίβο από τρία ζεύγη βάσεων μεταξύ πουρινών (2 ζεύγη αδενίνης-αδενίνης στην E-loop, 1 ζεύγος γουανίνης-γουανίνης στην έλικα IV). Το μοτίβο αυτό παραμορφώνει τον σκελετό της φωσφοριβόζης του RNA στενεύοντας τον στην μικρή αύλακα και φαρδαινόντας τον στην μεγάλη (έλικα IV) (Correll et al.

1997; Lu and Steitz 2000). Αυτή ακριβώς η μη κανονική δομή της E domain 5S του RNA (5SE RNA) που όπως είπαμε σταθεροποιείται από δισθενή ιόντα μαγνησίου, αναγνωρίζεται από την L25. Οι πλευρικές αλυσίδες της αλληλεπιδρούν με τον σκελετό της φωσφοριβόζης στα σημεία που στενεύει και φαρδαίνει, ενώ αν είχε την κανονική A μορφή της αυτό δεν θα συνέβαινε.



Εικόνα 4. Δευτεροταγής και τριτοταγής δομή τμήματος του 5S RNA. Η έλικα I εμφανίζεται σε κόκκινο, η περιοχή σύνδεσης σε γαλάζιο, η loop E με πράσινο και η έλικα IV με κίτρινο χρώμα. (A) Η αλληλουχία του συγκεκριμένου τμήματος. Τονίζεται με μωβ χρώμα το τμήμα της θηλιάς E το οποίο αλλάζει διαμόρφωση λόγω των ασυνήθιστων διασταυρούμενων δεσμών πουρινών που είναι σε μαύρο περίγραμμα. (B) Η παρουσίαση του σκελετού της φωσφοριβόζης. Φαίνεται καθαρά πώς παραμορφώνεται η συγκεκριμένη περιοχή της θηλιάς E λόγω των δεσμών των πουρινών. Η μεγάλη αύλακα φαρδαίνει και η μικρή αύλακα στενεύει.

Η δέσμευση της L25 στο 5S RNA

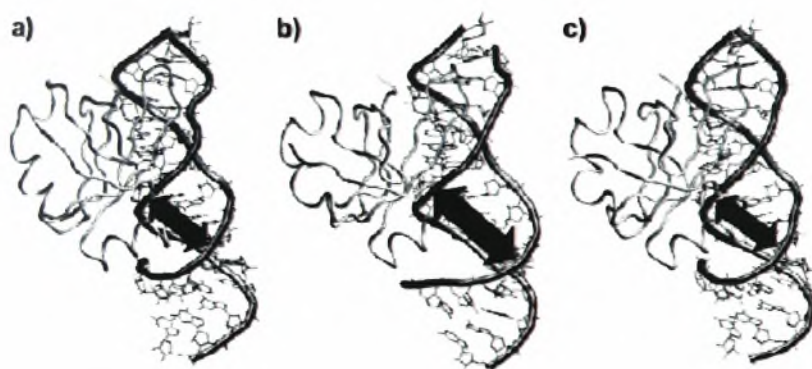
Η δομή της δεσμευμένης στο 5SE RNA L25 παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τη δομή της ελεύθερης L25 (Stoldt et al. 1999). Τα έξι β πτυχωτά φύλλα συνδέονται με τον ίδιο τρόπο και σχηματίζουν στον χώρο το ίδιο β-βαρέλι. Η δύο α-έλικες που κλείνουν τον πάτο του βαρελιού παραμένουν επίσης ανέπαφες. Η εντυπωσιακή διαφορά μεταξύ των δύο δομών εστιάζεται στον μεγάλο βρόγχο των 17 αμινοξέων που ενώνει τα φύλλα β1 και β2. Αυτός ο βρόγχος που στην ελεύθερη L25 έχει ακανόνιστη δομή, παίρνει το σχήμα α-έλικας στη δεσμευμένη L25. Έτσι λοιπόν η δέσμευση του 5SE RNA στην L25 επιφέρει στον εύκαμπτο ασχημάτιστο βρόγχο αλλαγές ώστε να πάρει τη μορφή μιας καλά σχηματισμένης α-έλικας.



Εικόνα 5. Απεικόνιση της τριτοταγούς δομής της L25 στην ελεύθερη (αριστερά) και την δεσμευμένη στο 5S RNA μορφή της (δεξιά) αντίστοιχα. Η θηλιά β1/β2 παίρνει τη μορφή α-έλικας

Μελέτες με NMR δείχνουν ότι η απουσία των ιόντων οδηγεί το 5SE RNA σε σχηματισμό της κανονικής A-μορφής του και η δομή αυτή δεν αναγνωρίζεται και δεν δεσμεύεται από την L25. Φαίνεται λοιπόν πως τα μεταλλικά ιόντα δρουν συνεργιστικά με την πρωτεΐνη στον σχηματισμό του συμπλόκου με το RNA και μάλλον είναι απαραίτητα στην οικοδόμηση ολόκληρου του ριβοσώματος *in vivo*.

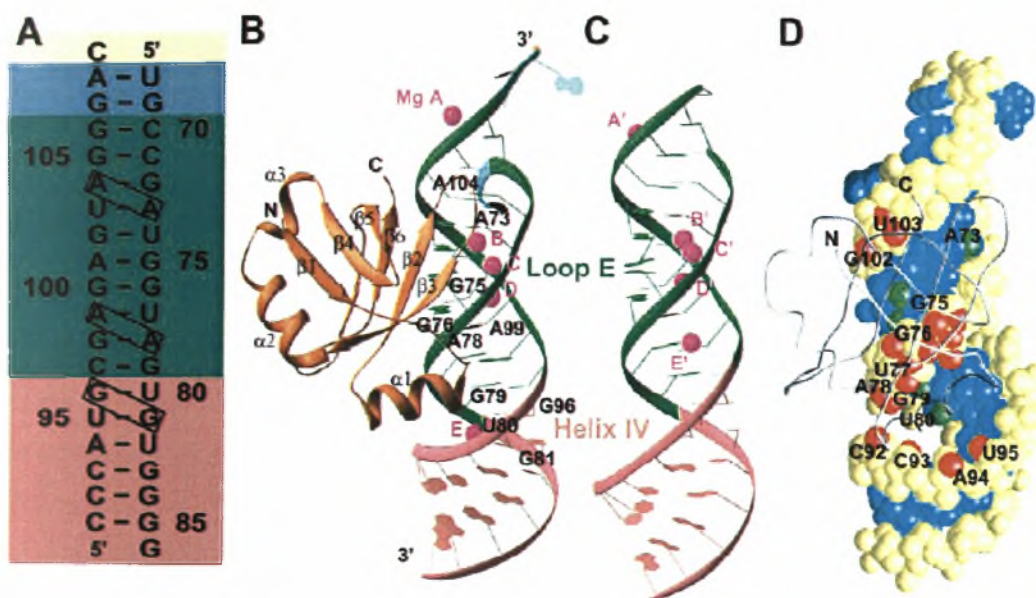
Σε αντίθεση με την L25 όπου ένα τμήμα της αλλάζει διαμόρφωση κατά τη σύνδεσή της με το RNA, το 5SE RNA δεν παρουσιάζει σχεδόν καμία μεταβολή κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου με την πρωτεΐνη. Παρατηρώντας όμως καλύτερα τη διαδικασία σχηματισμού του συμπλόκου χρησιμοποιώντας πειράματα μοριακής δυναμικής (molecular dynamics, MD), βλέπουμε πως η μεγάλη αύλακα του RNA η οποία δέχεται στην σχηματισμένη $\alpha 1$ α-έλικα φαίνεται να αλλάζει διαμόρφωση κατά τη διάρκεια του χρόνου που μετριέται σε κλίμακα της τάξης των nsec (Reblova et al. 2004). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 5 αυτή η περιοχή εμφανίζει αρχικά μία ανοιχτή και στη συνέχεια μία κλειστή γεωμετρία, προκειμένου να ολοκληρωθεί η εισαγωγή της $\alpha 1$ α-έλικας. Η διαφορά της απόστασης που παρατηρείται μεταξύ των δύο καταστάσεων είναι της τάξης των 4 Å.



Εικόνα 6. Η δομή του συμπλόκου L25-5S RNA στη διάρκεια του χρόνου σύμφωνα με πειράματα MD με τη παρουσία ιόντων μαγνησίου. (a) Στη περίοδο 0-7,5 ns το σύμπλοκο εμφανίζει κλειστή γεωμετρία. (b) Στη περίοδο 10-15 ns το σύμπλοκο εμφανίζει ανοιχτή γεωμετρία. (c) Στη περίοδο 20-24 ns το σύμπλοκο εμφανίζει κλειστή γεωμετρία.

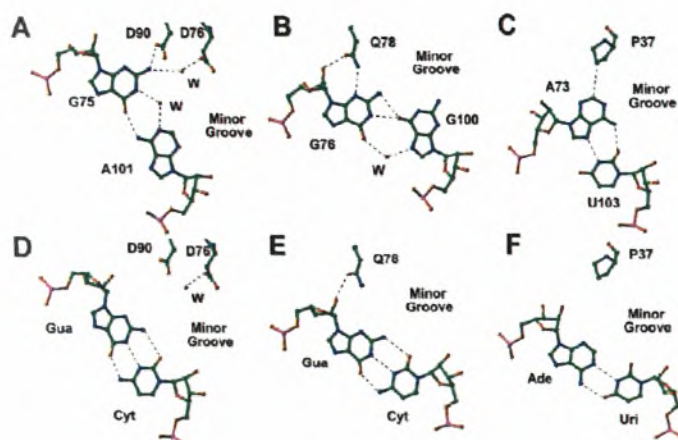
Κατά την αλληλεπίδραση RNA και πρωτεΐνης η L25 εισάγει ένα ζευγάρι από δύο αντιπαράλληλα πτυχωτά φύλλα ($\beta 2, \beta 3, \beta 5, \beta 6$) στη μικρή αύλακα της έλικας που αντιστοιχεί στην loop E, και την $\alpha 1$ α-έλικα που σχημάτισε ο βρόγχος $\beta 1/\beta 2$ στην μεγάλη αύλακα που αντιστοιχεί στην έλικα IV. Κάποια κατάλοιπα που εδράζονται σε αυτές τις περιοχές βρέθηκαν να εμπλέκονται απευθείας στις επαφές RNA-πρωτεΐνης, ενώ κάποια άλλα δεν έρχονται σε άμεση επαφή με το 5SE RNA αλλά παρόλα αυτά εντοπίζονται κυρίως σε περιοχές που η διαμόρφωση της πρωτεΐνης αλλάζει

(βρόγχος β1/β2). Η δέσμευση L25 και 5S RNA λοιπόν είναι ένας συνδυασμός preformed και induce-fit αναγνώρισης (Stoldt et al. 1999).



Εικόνα 7. (A) Τμήμα του 5S RNA που αλληλεπιδρά με την L25. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η θηλιά E (loop-E) και με μωβ χρώμα η έλικα IV. Διακρίνονται επίσης τα ζεύγη πουρινών. (B) Στεροδομή του συμπλέγματος 5S RNA-L25. Διακρίνονται τα φύλλα (β1-β6) και οι έλικες (α1-α3) της πρωτεΐνης καθώς και τα ιόντα μαγνησίου που σταθεροποιούν τη δέσμευση. (C) Στεροδομή του αδέσμευτου τμήματος του 5S RNA. (D) Van der Waals απεικόνιση του 5S RNA και της δεσμευμένης σε αυτό πρωτεΐνης. Με πράσινο εμφανίζονται οι βάσεις που αλληλεπιδρούν απευθείας με την L25, ενώ με κόκκινο τα μόρια του σκελετού της φωσφοριβόζης που κάνουν το ίδιο. Τα άτομα του σκελετού και οι βάσεις που δεν αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη, εμφανίζονται με κίτρινο και μπλε χρώμα αντίστοιχα.

Έχουν περιγραφεί 5 συγκεκριμένα κατάλοιπα που κάνουν απευθείας ή με τη μεσολάβηση νερού επαφές με το RNA και απαιτούν την ύπαρξη μη κανονικών κατά Watson-Crick ζευγών βάσεων. Αυτά φαίνονται αναλυτικά στην εικόνα 8. Χωρίς την παραμορφωμένη δομή του RNA δεν θα ήταν δυνατή η αλληλεπίδραση των στοιχείων αυτών και κατά συνέπεια η δέσμευση της L25 Στο 5S RNA.

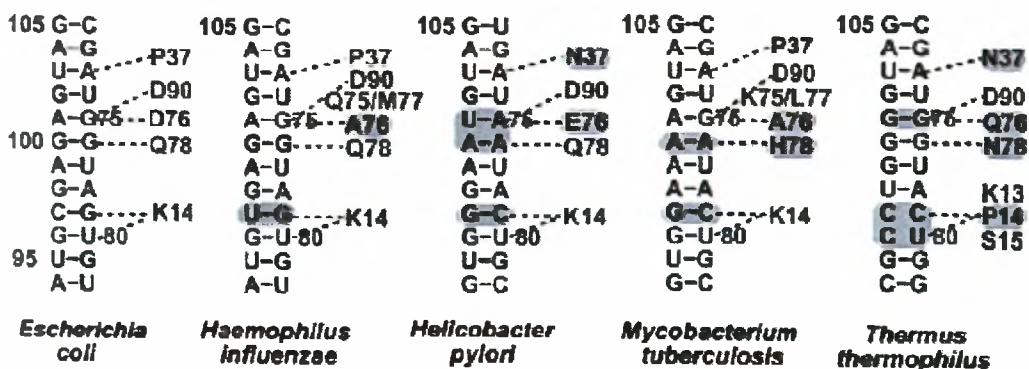


Εικόνα 8. Απευθείας ή μεσολαβούμενες από μόρια H₂O αλληλεπιδράσεις ορισμένων καταλοίπων της πρωτεΐνης με βάσεις του 5S RNA της loop-E. (A-C) Οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν πειραματικά. (D-F) Οι αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις που αναμένονται αν τα ζεύγη βάσεων ήταν κατά Watson-Crick.

Το *Helicobacter pylori*

Στην εργασία τους το 1998 ο Stoldt και οι συνεργάτες του σύγκριναν την αλληλουχία της L25 με ομόλογες ακολουθίες άλλων οργανισμών και επεσήμαναν τα συντηρημένα αμινοξέα. Ανάμεσα στις ακολουθίες που συγκρίθηκαν, βρισκόταν και αυτή της ομόλογης L25 του *Helicobacter pylori*. Το *Helicobacter pylori* είναι ένα σπειροειδές, μικροαερόφιλο, αρνητικό κατά gram βακτήριο, (Goodwin et al. 1985) που μετά από καλλιέργεια σε στερεό μέσο ανάπτυξης, οδηγεί στην εξαφάνιση των σπειροειδών μορφών και αντικατάστασή τους από ραβδοειδής βακτηριακές δομές (Goodwin and Armstrong 1990). Τα βακτήρια που προέρχονται από δείγματα βιοψίας έχουν μήκος 2.5-5μm και πάχος 0.5-1μm. Διαθέτουν 4-6 μαστίγια, απαραίτητα για την κινητικότητα του βακτηρίου (Goodwin et al. 1985; Goodwin and Armstrong 1990). Παθοφυσιολογικές μελέτες το συσχέτισαν με την ύπαρξη χρόνιας επιφανειακής (και όχι μόνο) γαστρίτιδας (Blaser 1990), καθώς και με το έλκος του δωδεκαδακτύλου (Marshall and Warren 1984) και του στομάχου (Blaser 1987). Πιο σύγχρονες έρευνες το συσχέτισαν με την εμφάνιση αδενοκαρκινώματος (Correa 1992), και της ύπαρξης (Talley et al. 1991) ή της δημιουργίας καρκίνου του στομάχου (Forman et al. 1991; Nomura et al. 1991; Parsonnet et al. 1991). Σήμερα, οι ενδείξεις που υπάρχουν λένε πως από τη στιγμή που θα υπάρξει επιτυχημένη αποίκιση ενός ατόμου από το *H. pylori*, παραμένει εφ' όρου ζωής, εκτός και αν γίνει εκρίζωση με φαρμακευτική αγωγή (Blaser 1992; Blaser 1997).

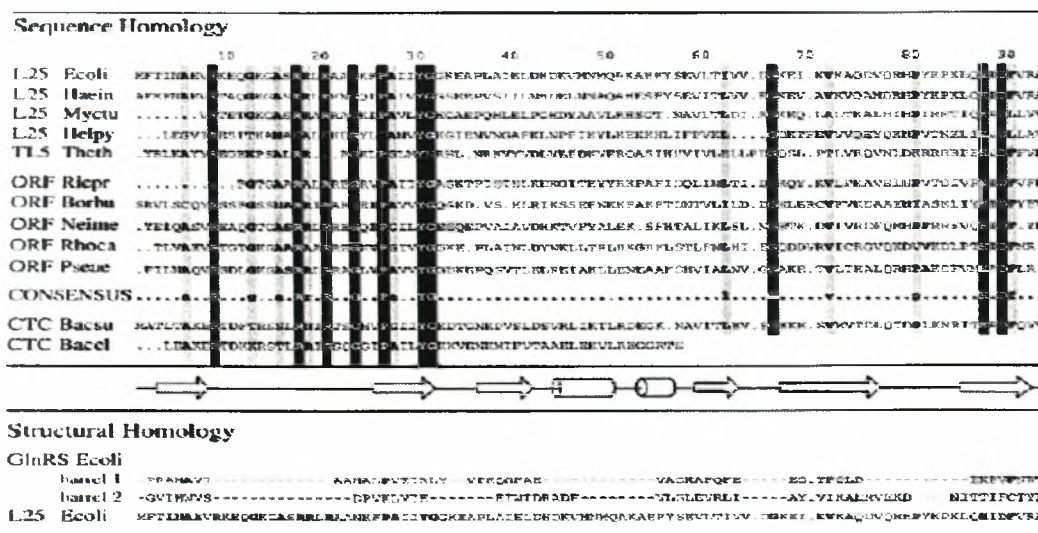
Η L25 του *Helicobacter pylori* αποτελείται από 178 αμινοξέα και η δομή του καθώς και η δέσμευσή του πάνω στο 5S RNA είναι παρόμοια με αυτήν της L25 του *E. coli*.



Εικόνα 9. Ομόλογες ακολουθίες του 5S RNA και ορισμένα από τα συντηρημένα κατάλοιπα της L25 που αλληλεπιδρούν απευθείας με βάσεις από διάφορους οργανισμούς

Η σύγκριση των ομόλογων της L25 ακολουθιών καθώς και των ομόλογων 5SE RNA σε κάποιους οργανισμούς αποκάλυψε ένα παράξενο αποτέλεσμα: Τα κατάλοιπα τα οποία αλληλεπιδρούν απευθείας με τις βάσεις του RNA καθώς και οι

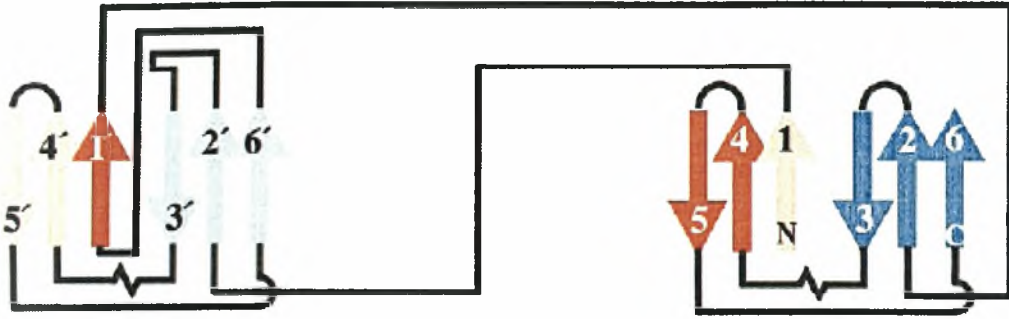
αλληλουχίες του RNA στις οποίες δεσμεύονται δεν έχουν συντηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Αντιθέτως συντηρημένα είναι τα κατάλοιπα τα οποία προσδένονται στον σκελετό της φωσφοριβόζης. Συγκεκριμένα, από τα 5 κατάλοιπα που δεσμεύονται απευθείας στις βάσεις, μόνο ένα είναι συντηρημένο, η D20, ενώ από τα 10 κατάλοιπα που δεσμεύονται στον σκελετό της φωσφοριβόζης, μόνο τα 3 (Q75, I29 και S17) δεν είναι συντηρημένα (Lu and Steitz 2000). Γιατί όμως ένα φαινομενικά σημαντικό γεγονός όπως η απευθείας αναγνώριση βάσεων δεν έχει συντηρηθεί ανάμεσα στα βακτήρια; Ίσως η L25 εμφανίστηκε αργά στην εξέλιξη του ριβοσώματος. Εάν οι αλληλουχίες του 5SE RNA είχαν ήδη διαχωριστεί στα διάφορα είδη πριν την εισαγωγή της L25 στο ριβόσωμα, τότε η πρωτεΐνη θα έπρεπε να προσαρμοστεί στις αλληλουχίες του RNA του κάθε είδους. Θα πρέπει να σημειωθεί πως ομόλογα της L25 δεν έχουν βρεθεί στο ριβόσωμα των αρχαίων καθώς και ευβακτηριακά ριβοσώματα. Τα συντηρημένα αμινοξέα της L25 είναι διασκορπισμένα στην αλληλουχία της και δεν εδράζονται σε ένα σημείο, πράγμα που υποδηλώνει πως στην αναγνώριση του 5SE RNA δεν μεσολαβεί μόνο ένα τμήμα της πρωτεΐνης.



Εικόνα 10. (Πάνω) Ευθυγράμμιση (alignment) ομόλογων ακολουθιών της L25 από διάφορους οργανισμούς: L25 των *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* και ριβοσωμική πρωτεΐνη TL5 του *Thermus thermophilus*. Ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF) των *Rickettsia prowazekii*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria meningitidis*, *Rhodobacter capsulatus* και *Pseudomonas aeruginosa*. General stress protein (CTC) των *Bacillus subtilis* και *Bacillus caldolyticus*. (Μέση) Κατούν από β-φύλλα (βέλη) και α-έλικες (κύλινδροι) της δομής της L25. (Κάτω) Δομική ομολογία της L25 του *E. coli* και των δύο β-βαρελίων της περιοχής αναγνώρισης του αντικωδικονίου της GlnRS του *E. coli*.

Οικογένειες πρωτεϊνικών διαμορφώσεων και η GlnRS

Έχει προταθεί πως οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες ως παλιές στην εξέλιξη ίσως χαρακτηρίζουν οικογένειες πρωτεϊνικών διαμορφώσεων που χρησιμοποιούνται και σε άλλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και RNA. Η οικογένεια των Asp-/Phe-/Lys- tRNA συνθετασών (Cavarelli et al. 1993; Mosyak et al. 1995; Onesti et al. 1995), οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες S1 (Bycroft et al. 1997) και S17 (Jaishree et al. 1996) όπως επίσης και η πρωτεΐνη ψυχρού σοκ CspA (Newkirk et al. 1994), αποτελούν καλά παραδείγματα μιας πιθανής εξελικτικής σχέσης μεταξύ ριβοσωμικών πρωτεϊνών, πρωτεϊνών stress και αμινοάκυλοtRNA συνθετασών. Ακολουθίες ομόλογες με την L25 περιλαμβάνουν την οικογένεια πρωτεϊνών ctc οι οποίες εμπλέκονται κατά την ύπαρξη stress στα κύτταρα (general stress proteins, ctc), ενώ η τοπολογία του β-βαρελιού της L25 έχει παρατηρηθεί ως τώρα μόνο στις GlnRSs παρόλο που η GlnRS παρουσιάζει ελάχιστη ομοιότητα στην αλληλουχία της με την L25 (Stoldt et al. 1998). Η ομολογία των ακολουθιών που παρατηρήθηκε μεταξύ της L25 (και αντίστοιχες ριβοσωμικές πρωτεΐνες από άλλους οργανισμούς) και των πρωτεϊνών ctc περιλαμβάνει πολλά συντηρημένα αμινοξέα, και η δομή του συμπλόκου L25-5SE RNA επιβεβαιώνει τώρα τη συμμετοχή τους στην αντίδραση δέσμευσης. Αυτό προϋποθέτει πως αυτές οι δύο ομάδες οικογενειών είναι συγγενικές μεταξύ τους. Αντιθέτως αν και η ίδια τοπολογία β-βαρελιού που παρατηρήθηκε στην L25 χρησιμοποιείται από την GlnRS για τη δέσμευση της θηλιάς του αντικωδικονίου του tRNA^{Gln}, αυτή η δέσμευση διαφέρει κατά πολύ από αυτήν που παρατηρείται στο σύμπλοκο L25-5S RNA. Η θηλιά αντικωδικονίου του tRNA δεσμεύεται στην διεπιφάνεια των δύο β-βαρελίων της GlnRS και οι βάσεις του αντικωδικονίου εκτίθενται στο εσωτερικό του μορίου και επιτρέπουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις έτσι ώστε να διαβαστούν. Έτσι η υψηλή δομική ομολογία των L25 και GlnRS έρχεται σε αντίθεση με τον τρόπο που αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα μόρια RNA τους καθώς και με την παντελή έλλειψη αμινοξικής ομολογίας. Κατά αυτόν τον τρόπο η GlnRS είναι απίθανο να αποτελεί μέρος της οικογένειας των πρωτεϊνών που δεσμεύουν RNA και περιλαμβάνει την L25 και τις ctc πρωτεΐνες, αν και η εξελικτική σχέση τους παραμένει ένα ανοιχτό ερώτημα.



Εικόνα 11. Η τοπολογία του διπλού β-βαρελιού της περιοχής δέσμευσης του αντικωδικονίου της GlnRS του *E. coli*.

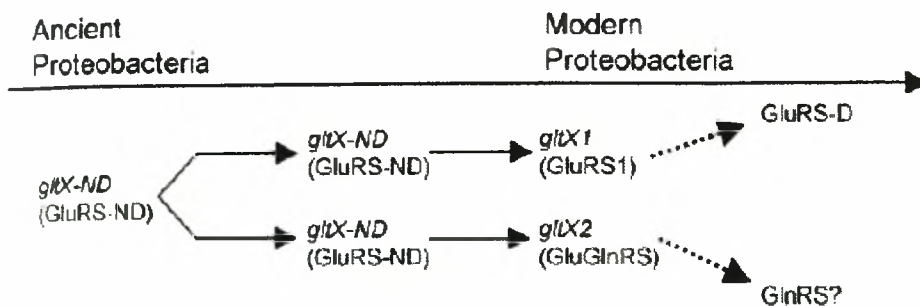
Η δομή β-βαρελιού της L25 φαίνεται να είναι απαραίτητη στην αναγνώριση irregular ds RNA μοτίβων βρόγχων (εξογκωμάτων, bulge) ενώ αυτή του διπλού β-βαρελιού της GlnRS αναγνωρίζει μονόκλωνο RNA. Η πολύ μικρή ομολογία στην ακολουθία τους μπορεί να αντιπροσωπεύει τις διαφορετικές προϋποθέσεις για την αναγνώριση των διαφορετικών δομών των RNA (Lu and Steitz 2000). Για αυτόν τον λόγο στις αρχικές υποθέσεις για την εξελικτική πορεία των γονιδίων που κωδικοποιούν τις δύο αυτές πρωτεΐνες, γινόταν αναφορά για αποκλίνουσα εξέλιξη. Ωστόσο ένα πρόσφατο μοντέλο για την εξέλιξη της οικογένειας των tRNA συνθετασών του γλουταμινικού και της γλουταμίνης προτείνει την απόκτηση της GlnRS μόνο για μια μονάδα των ευβακτηρίων μέσω οριζόντιας μεταφοράς του γονιδίου από ευκαρυωτικό οργανισμό. Έτσι παραμένει πιθανό πως οι διαμορφώσεις των β-βαρελιών της L25 και της GlnRS να αντιπροσωπεύουν περίπτωση συγκλίνουσας εξέλιξης.

Αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες

Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (AARSs) βρίσκονται στο επίκεντρο της διαδικασίας της μετάφρασης. Κάθε ένα από αυτά τα ένζυμα καταλύει το δεσμό ενός αμινοξέος με το αντίστοιχό του tRNA με μεγάλη ακρίβεια. Τα αμινοακυλιωμένα tRNA μεταφέρονται ακολούθως στο ριβόσωμα συμπλοκοποιημένα με τον EF-Tu και GTP για τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Ένα από τα χαρακτηριστικά των AARSs είναι η ικανότητά τους να διακρίνουν τα tRNA που τους αντιστοιχούν ανάμεσα σε όλα τα tRNA του κυττάρου απορρίπτοντας τα υπόλοιπα (Ibba and Soll 2000). Από τον Crick είχε προταθεί (Crick's Adaptor Hypothesis) (Crick 1966) πως κάθε αμινοξύ ενώνεται με το αντίστοιχό του tRNA μέσω της δικής του αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης και έτσι υπήρχε η πεποίθηση πως κάθε κύτταρο περιέχει 20 αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες για να παράγει τα 20 διαφορετικά είδη αμινοάκυλο-tRNA που ήταν απαραίτητα για τη μετάφραση του μηνύματος. Στα χρόνια που ακολούθησαν έχουν αναφερθεί πολλές

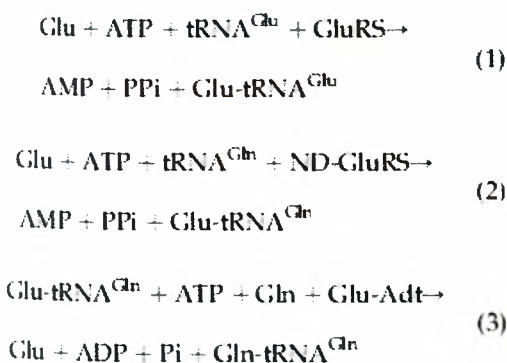
εξαιρέσεις από αυτόν τον γενικό κανόνα καθώς σε αρκετούς οργανισμούς έχουν βρεθεί όλα τα αμινοακυλιωμένα tRNA, χωρίς να έχουν βρεθεί όλες οι AARSs (Ibba et al. 2000; Ibba and Soll 2004).

Η γλουταμίνη έχει προταθεί πως είναι ένα από τα τελευταία αμινοξέα που ενσωματώθηκε στο ρεπερτόριο των 20 αμινοξέων που είναι γνωστό μέχρι σήμερα (Curnow et al. 1997). Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της γλουταμίνης (GlnRS), που καταλύει το σχηματισμό Gln-tRNA^{Gln}, έχει βρεθεί ότι λείπει από όλα τα αρχαία, από πολλά βακτήρια καθώς και εσωτερικά οργανίδια ευκαρυωτικών οργανισμών από τα οποία έχουν μελετηθεί (Ibba and Soll 2000). Η GlnRS φαίνεται να εξελίχθηκε από την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση του γλουταμινικού (GluRS) μέσω ενός παλιού γεγονότος διπλασιασμού του γονιδίου της, που ακολουθήθηκε την εξέλιξη στην εξειδίκευσή της (Brown and Doolittle 1999; Skouloubris et al. 2003). Επιπλέον, το γεγονός της εύρεσης της GlnRS σε ορισμένα είδη βακτηρίων όπως το *E. coli*, φαίνεται να οφείλεται σε οριζόντια μεταφορά του γονιδίου της από τους ευκαρυωτικούς στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι υπόλοιποι λοιπόν οργανισμοί που από το γονιδίωμα τους λείπει το γονίδιο glnS που κωδικοποιεί την GlnRS, βιοσυνθέτουν το σύμπλοκο Gln-tRNA^{Gln} με έμμεσο τρόπο, ο οποίος πρωτοανακαλύφθηκε και περιγράφηκε από τους Wilcox και Nirenberg (1968). Σε αυτούς τους οργανισμούς ο σχηματισμός του συμπλόκου αυτού απαιτεί μια GluRS με χαμηλή εξειδίκευση ή αλλιώς μη διακρίνουσα GluRS (non-discriminating, ND-GluRS), η οποία καταλύει λανθασμένα τον σχηματισμό Glu-tRNA^{Gln}. Ακολούθως η γλουταμίνη παίρνει τη θέση του γλουταμινικού σε μια αντίδραση που καταλύεται από την αμιδοτρανσφεράση του γλουταμινικού (Glu-Adt) η οποία κωδικοποιείται από το οπερόνιο gatCAB στα βακτήρια και gatDE στα αρχαία (Curnow et al. 1997). Σύγχρονες μελέτες πάνω στο θέμα αποκάλυψαν την ύπαρξη ενός ζευγαριού GluRS, τις GluRS1 και GluRS2, που η μεν GluRS1 είναι διακρίνουσα (D- GluRS) και καταλύει μόνο το σχηματισμό του Glu-tRNA^{Glu}, ενώ η δε GluRS2 είναι μη διακρίνουσα (ND- GluRS) και καταλύει τόσο τον σχηματισμό του Glu-tRNA^{Glu}, όσο και τον σχηματισμό του Glu-tRNA^{Gln} (Salazar et al. 2003; Lee and Hendrickson 2004).



Εικόνα 12. Διάγραμμα εξελικτικής πορείας των γονιδίων *gltX* που κωδικοποιούν μορφές της GluRS ανάμεσα στα πρωτεοβακτήρια. Είναι πιθανό πως ένα γεγονός διπλασιασμού του αρχέγονου γονιδίου και η επακόλουθη εξέλιξη τους αποτέλεσε την αιτία ύπαρξης δύο GluRS, της διακρίνουσας (D) και της μη διακρίνουσας (ND).

Στο *Helicobacter pylori* η GluRS2 έχει χάσει την ικανότητά της να σχηματίσει το σωστό σύμπλοκο, και κατά συνέπεια είναι ικανή για σχηματισμό μόνο του Glu-tRNA^{Gln}, είναι άρα διακρίνουσα και αυτή αλλά για το tRNA^{Gln}. Έχουν αναφερθεί και άλλες παρεκκλίσεις από το βασικό αυτό μοτίβο, όπως για παράδειγμα η περίπτωση του *Acithiobacillus ferrooxidans* όπου η GluRS2 αναγνωρίζει μόνο το tRNA^{Gln}_{UUG} ενώ η GluRS1 αναγνωρίζει και τα δύο isoacceptors του tRNA^{Glu}, αλλά και το tRNA^{Gln}_{CUG}. Στη περίπτωση του *Helicobacter pylori* που προαναφέρθηκε, βρέθηκε πως η Arg350 της διακρίνουσας GluRS1 φαίνεται να είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνη για την μη αναγνώριση του tRNA^{Glu} καθώς και η Glu417 της διακρίνουσας GluRS2 για την μη αναγνώριση του tRNA^{Glu}. Στην αναγνώριση όμως του σωστού tRNA από τις GluRS,



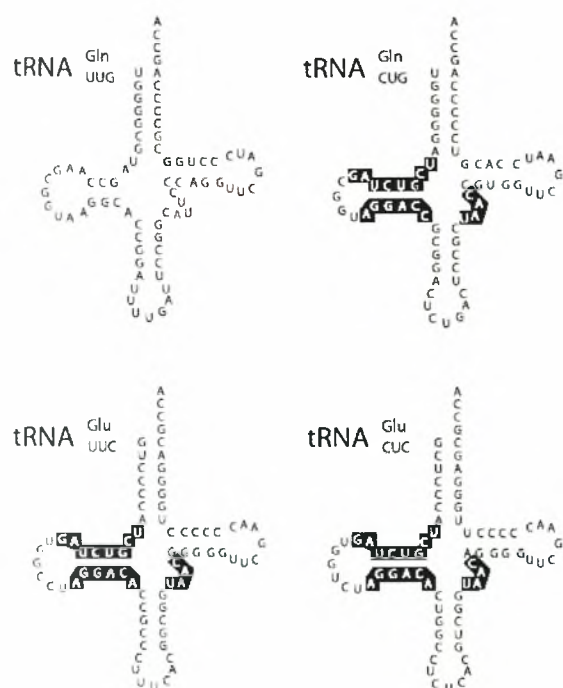
Εικόνα 13. (1) Η αντίδραση που καταλύεται από την GluRS1 του *H. pylori* και από κάθε διακρίνουσα GluRS. (2) Η αντίδραση που καταλύεται από την GluRS2 του *H. pylori* και από κάθε μη-διακρίνουσα GluRS. Η αντικατάσταση του γλουταμινικού από γλουταμίνη καταλύεται από την αμιδοτρανσφεράση του γλουταμινικού (Glu-AdT) (3) ώστε να δημιουργηθεί το σύμπλοκο Gln-tRNA^{Gln}.



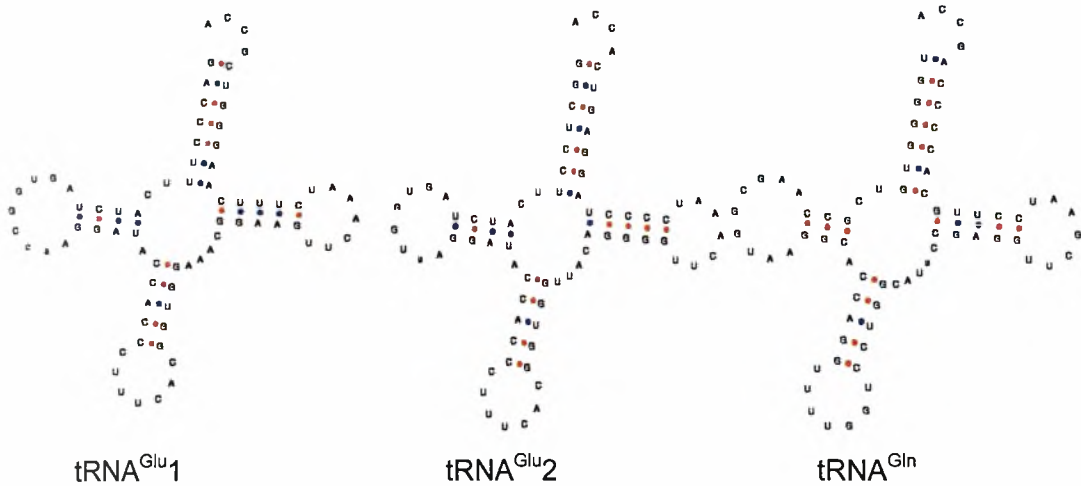
Εικόνα 14. Το οπερόνιο *gatCAB* το οποίο κωδικοποιεί τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που σχηματίζουν την αμιδοτρανσφεράση του γλουταμινικού (Glu-AdT). Η διάταξη με την οποία τα γονίδια είναι διαταγμένα, είναι πολύ σημαντική, αν υπολογίσει κανείς πως η αλυσίδα C είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό του συμπλόκου, και για αυτό τον λόγο είναι πρώτη στη σειρά.

δεν εμπλέκονται μόνο τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης, αλλά και οι βάσεις του ίδιου του tRNA (Salazar et al. 2003; Lee and Hendrickson 2004). Για να γίνει κατανοητό θα επιστρέψουμε στο παράδειγμα του *A. ferrooxidans*. Ο οργανισμός αυτός περιέχει δύο είδη tRNA^{Glu} (με αντικωδικόνια UUC και CUC) και δύο είδη tRNA^{Gln} (με αντικωδικόνια UUG και CUG) (Εικόνα 15). Η GluRS1 αναγνωρίζει και τα δύο είδη του tRNA^{Glu}, αλλά και το tRNA^{Gln}_{CUG}, ενώ η GluRS2 αναγνωρίζει μόνο το tRNA^{Gln}_{UUG}. Προτάθηκε λοιπόν πως δεν αρκούν μόνο οι τρεις βάσεις του αντικωδικονίου για την αναγνώριση από το σωστό ένζυμο, αλλά θα πρέπει να υπάρχει και η κατάλληλη δομή. Πράγματι βρέθηκε πως τα δύο είδη tRNA^{Glu} καθώς και το tRNA^{Gln}_{CUG} διαθέτουν λίγο μεγαλύτερη έλικα D καθώς και διαφορετική αλληλουχία βάσεων από το tRNA^{Gln}_{UUG}. Φαίνεται λοιπόν πως οι δύο GluRS δεσμεύουν διαφορετικά στη δομή tRNA. Οι διαφορετικές δομές αλλά και οι αλληλουχίες των tRNA του *A. ferrooxidans* φαίνεται να είναι αντίστοιχες των tRNA^{Glu} και tRNA^{Gln} του *Helicobacter pylori*, όπως αποκάλυψε η αναζήτησή τους στην Genomic tRNA Database (<http://rna.wustl.edu/tRNAdb>). Παρόλα αυτά, πειράματα αμινοακυλίωσης με την GlnRS του *E. coli* αποκάλυψαν πως το ένζυμο αυτό ξεχωρίζει τα tRNA μόνο με βάση τα διαφορετικά αντικωδικόνια τους.

Από τα παραπάνω φαίνεται πως η GluRS2 ίσως αποτελεί ένα ενδιάμεσο της εξέλιξης της διακρίνουσας GluRS σε μια μελλοντική βακτηριακή GlnRS. Πάντως όποια και αν είναι η αλήθεια, η συνύπαρξη δύο GluRS πολύ συγγενικών μεταξύ τους προσφέρει μια άνευ προηγουμένου ευκαιρία να παρατηρήσουμε το πώς μια απόκλιση στην πρωτοταγή ακολουθία, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καινούργιας εξειδίκευσης για το υπόστρωμα (tRNA) στην πορεία της εξέλιξης.



Εικόνα 15. (Αριστερά) Οι ισομορφές των tRNA^{Glu} και tRNA^{Gln} του *Acithiobacillus ferrooxidans*. Διακρίνεται η μεγαλύτερη έλικα D καθώς και η διαφορετική αλληλουχία βάσεων των δύο ειδών tRNA^{Glu} καθώς και του tRNA^{Gln}_{CUG} από τις αντίστοιχες του tRNA^{Gln}_{UUG}. Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε απόλυτη ταύτιση με τις δύο ισομορφές του tRNA^{Glu} και το tRNA^{Gln}_{UUG}, το μοναδικό μόριο tRNA^{Gln} του *H. pylori* (Κάτω) όπως αποκάλυψε η αναζήτηση στην Genomic tRNA Database (<http://rna.wustl.edu/tRNAdb>). Φαίνεται λοιπόν πως η διακρίνουσα για το αναγνωρίζει εκτός από το αντικωδικόνιο και άλλες περιοχές του μορίου tRNA προκειμένου να επιτευχθεί η δέσμευση.



Ας επανέλθουμε όμως στην L25. Αν και η δομή της παρουσιάζει μια πολύ μεγάλη ομολογία με την περιοχή δέσμευσης του αντικωδικονίου της GlnRS, αυτές οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τα αντίστοιχα RNA τους με εντελώς διαφορετικούς τρόπους χρησιμοποιώντας διαφορετικά μέρη των δομών τους. Το διπλό β-βαρέλι της GlnRS αναγνωρίζει τις αζευγάρωτες βάσεις της θηλιάς του αντικωδικονίου. Αντιθέτως, το β-βαρέλι της L25 αναγνωρίζει δίκλωνο RNA με ασυνήθιστη γεωμετρία. Παρόλα αυτά, παραμένει πιθανό πως υπό το πρίσμα του ριβοσώματος, η L25 μπορεί να συμμετέχει σε επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις με τμήματα RNA με μοτίβο δέσμευσης παρόμοιο με αυτό της GlnRS.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας εστιάζεται στη κλωνοποίηση, την υπερπαραγωγή και τον καθαρισμό της L25 ριβοσωμικής πρωτεΐνης από τον οργανισμό *Helicobacter pylori*, ένα παθογόνο του στομάχου των θηλαστικών. Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού αποτελεί ένα οξεόφιλο, αρνητικό κατά Gram βακτήριο το οποίο ζει στο μικροπεριβάλλον του επιθηλίου του στομάχου και στους ανθρώπους έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση πολλών παθολογικών καταστάσεων όπως το έλκος του στομάχου και του δωδεκαδακτύλου, και τον καρκίνο του στομάχου. Η L25 του *H. pylori*, όπως και όλες οι ομόλογές της πρωτεΐνες άλλων προκαρυωτικών οργανισμών, αποτελεί τμήμα της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος και δεσμεύεται άμεσα σε τμήμα του 5S ριβοσωμικού RNA. Ο βιολογικός της ρόλος δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί. Αν και μη συντηρημένη στη πορεία της εξέλιξης, καθώς δεν έχουν βρεθεί ομόλογά της στα αρχαία και στους ευκαρυώτες, πιστεύεται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καθώς γεινιάζει με το κέντρο πεπτιδυλοτρανσφεράσης του ριβοσώματος.

Εξέχουσας σημασίας είναι το γεγονός πως διαθέτει υψηλή δομική ομολογία με την περιοχή δέσμησης του αντικωδικονίου της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της γλουταμίνης (GlnRS), ένα ένζυμο που μάλιστα απουσιάζει από το *H. pylori* και η δραστηότητά του αντικαθίσταται από έναν μηχανισμό έμμεσης αμινοακυλίωσης του tRNA^{Gln} στον οποίο κεντρικό ρόλο παίζει η Glu-αμιδοτρανσφεράση που κωδικοποιείται από το σπερόνιο gatCAB. Αυτή λοιπόν η δομική ομοιότητα μεταξύ L25 και μέρους της GlnRS, διευρύνει τους στόχους της παρούσας εργασίας και σε αυτούς προσθέτει την εξακρίβωση της ύπαρξης ή όχι ενζυμικής δραστηότητας της L25 ως αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της γλουταμίνης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας και προμηθεύτηκαν από τους οίκους Merck (Darmstadt, Germany), Sigma-Aldrich (St.Louis, USA), Serva (Heidelberg, Germany), Riedel de Haen (Hannover, Germany) και PIERCE (Illinois, USA).

Η ραδιοσημασμένη με τρίτιο γλουταμίνη (Glutamine, L-[3,4-³H(N)]) ειδικής ραδιενέργειας 30,0mCi/mmol ήταν του οίκου Perkin Elmer (Boston, USA)

3.1.2. Βιολογικά υλικά

Το γονίδιο της L25 κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pET11a της εταιρίας Novagen.

Για την υπερέκφραση του γονιδίου της L25 μετασχηματίστηκαν τα στελέχη *E. coli*, XL1 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) και BL21 (DE3) (Invitrogen Life Technologies)

3.1.3. Ένζυμα και υλικά μοριακής βιολογίας

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού προμηθεύτηκαν από την NEBiolabs, (Beverly, USA) και της Takara Bio Inc. (Otsu, Shiga, Japan), και η Expand long polymerase και το Rapid DNA ligation kit, από την εταιρεία Roche. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε πολυμεράση FINNZYMES.

Η δεοξυριβονουκλεάση 200U/μl ήταν της εταιρίας Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), ενώ η ριβονουκλεάση A 1000U/ml ήταν της εταιρίας Sigma-Aldrich.

Οι πρωτεΐνες οβαλβουμίνη, αλβουμίνη βόειου ορού και κυτόχρωμα c ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich.

Το γονιδιακό DNA του βακτηρίου *Helicobacter pylori* ήταν ευγενική προσφορά του Dr. M. Naumann, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Max-Planck-Institute for Infection Biology, Βερολίνο.

3.1.4. Υλικά χρωματογραφίας

Για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν τα χρωματογραφικά υλικά DEAE-Sepharose CL-6B και CM-Sepharose CL-6B (ιοντοανταλλακτικές ρητίνες) και Sephadex G-200 (χρωματογραφία μοριακής διήθησης), τα οποία ήταν της εταιρείας Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden).

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA, καθώς και για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA εισάγοντας παράλληλα σε αυτό θέσεις για πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού, προκειμένου να κλωνοποιηθεί σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση μιας θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο, για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Προκειμένου να δράσει η πολυμεράση, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάζονται κατάλληλα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, (εκκινητές), τα οποία είναι συμπληρωματικά μιας περιοχής της επιθυμητής ακολουθίας.

Η τεχνική της PCR γίνεται σε τρία στάδια:

Στάδιο 1^ο: Αποδιάταξη

Το δίκλωνο μόριο του DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση σε 90°C-95°C. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργούνται δυο μονόκλωνες αλυσίδες και το τμήμα που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί για τα επόμενα στάδια. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, σταματούν όλες οι ενζυμικές δραστηριότητες, όπως για παράδειγμα, η επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας.

Στάδιο 2^ο: Υβριδισμός

Η θερμοκρασία στο στάδιο αυτό μειώνεται στους 50-75°C και τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, (εκκινητές), υβριδίζονται με το εκμαγείο συμπληρωματικά, με δεσμούς υδρογόνου. Η επιλογή της θερμοκρασίας υβριδισμού είναι πολύ σημαντική και εξαρτάται από τη σύσταση καθώς και από το μήκος των εκκινητών. Αν η επιλεγμένη θερμοκρασία δεν είναι η σωστή, είναι δυνατό να μην παραχθούν προϊόντα ή να παραχθούν παραπροϊόντα.

Στάδιο 3^ο: Πολυμερισμός

Στο στάδιο αυτό η DNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την μονόκλωνη αλυσίδα και αναγνωρίζοντας την ελεύθερη –OH ομάδα, συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα, προσθέτοντας νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του εκκινήτη. Η σύνθεση του DNA συνεχίζεται έως ότου οι δυο νεοσυντιθέμενες αλυσίδες επιμηκυνθούν τόσο ώστε να περιέχουν περισσότερα νουκλεοτίδια από το επιθυμητό τμήμα του DNA. Η διάρκεια του πολυμερισμού εξαρτάται από το μήκος της πολλαπλασιαζόμενης ακολουθίας. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι θερμοάντοχη, ώστε να είναι λειτουργική στις υψηλές θερμοκρασίες των προηγούμενων σταδίων. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 20-30 φορές και παράγονται 2ⁿ μόρια DNA, όπου n είναι ο αριθμός των διεξαγόμενων κύκλων. Στο τέλος των κύκλων, το μίγμα της αντίδρασης παραμένει στους 68°C για 5 λεπτά, ώστε να συνεχιστεί ο πολυμερισμός (Innis et al 1990).

Τα συστατικά του μίγματος της αντίδρασης φαίνονται στον πιο κάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Σύσταση μίγματος και ποσότητες για κάθε αντίδραση PCR

DNA εκμαγείο	10-20ng
Εκκινήτης νοηματικός (up)	20pmol
Εκκινήτης αντινοηματικός (low)	20pmol
Μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)	3.5mM
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης 10 x	5μl
Πολυμεράση (Taq)	1μl
H ₂ O	Έως 50μl

Στην προκείμενη εργασία πολλαπλασιάστηκε το γονίδιο της L25 ριβοσωμικής πρωτεΐνης του *Helicobacter pylori*.

Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν, τα ένζυμα περιορισμού και ο πλασμιδιακός φορέας στον οποίο έγινε η κλωνοποίηση αναφέρονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Ακολουθία εκκινήτων, γονίδιο, ένζυμα περιορισμού και πλασμιδιακός φορέας.

Εκκινήτης	Γονίδιο	Ένζυμο Περιορισμού	Πλασμίδιο
5' GCG AAT TCA TAT GTT AGA AGG CGT TAT TAG AGA 3' (up)	L25 <i>Helicobacter</i>	NdeI	pET11a
5' GCG GGA TCC ATC ACT TCG CTT TAA TCA CA 3' (low)	<i>pylori</i>	BamHI	

Στον πίνακα 3, φαίνονται αναλυτικά οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

Πίνακας 3. Συνθήκες PCR.

Θερμ. αποδιάταξης	Χρόνος Αποδιάταξης	Θερμ. Υβριδισμού	Χρόνος Υβριδισμού	Θερμ. πολυμερισμού	Χρόνος πολυμερισμού	Κύκλοι
92°C	60sec	50°C/55°C	40sec	72°C	50sec	10/10

3.2.2. Καθαρισμός τμημάτων DNA μετά από PCR

Τα τμήματα DNA που προκύπτουν από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, (PCR), ή μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε άλλες αντιδράσεις, θα πρέπει να διαχωριστούν από τους εκκινητές, το εκμαγείο, τα δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα άλατα και την πολυμεράση, ή τα αντίστοιχα ένζυμα.

Ο καθαρισμός των τμημάτων αυτών DNA γίνεται με το σύστημα Qiaquick PCR Purification Kit της εταιρείας Qiagen. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθενται 5 όγκοι διαλύματος PB, το οποίο περιέχει έναν χαστροπικό παράγοντα, ακολουθεί ανάμιξη και διαβίβαση του συνολικού όγκου στη στήλη Qiaquick. Κατόπιν, γίνεται φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για ένα λεπτό σε 13.000g. Το DNA δεσμεύεται στη στήλη, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά απομακρύνονται με τη φυγοκέντρηση. Ακολουθεί πλύσιμο της στήλης με το αιθανολικό διάλυμα PE και τελικά γίνεται έκλουση του DNA με 20-30μl αποστειρωμένου δις-απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια, ηλεκτροφορείται μια μικρή ποσότητα από το εκλουόμενο DNA, προκειμένου να ελεγχθεί για την καθαρότητά του, (Qiaquick Spin Handbook, Qiagen 1996).

3.2.3. Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτική αναρόζης

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται όπως και η προηγούμενη, (3.2.3.), για τον καθαρισμό τμημάτων DNA μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού, όταν η πέψη γίνεται διαδοχικά ή έπειτα από τον πολλαπλασιασμό τους με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, (PCR). Χρησιμοποιείται το Qiaquick Gel Extraction Kit της εταιρείας Qiagen. Η αρχή του συστήματος αυτού στηρίζεται στην ιδιότητα του DNA να προσροφάται σε μικρές στήλες που περιέχουν μεμβράνη από silica gel, παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, ενώ οι προσμίξεις διέρχονται από τις στήλες χωρίς να συγκρατηθούν.

Η διαδικασία έχει ως εξής: Το επιθυμητό τμήμα του DNA αποκόπτεται από την πηκτή και τοποθετείται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης (eppendorf). Κατόπιν, προστίθεται διάλυμα διαλυτοποίησης της αгарόζης, QG, σε αναλογία 300μl/100mg πηκτής. Ακολουθεί θέρμανση στους 50°C για 10 λεπτά με περιοδική ανάδευση, προκειμένου να διαλυτοποιηθεί η αгарόζη. Στη συνέχεια, το μίγμα αυτό διαβιβάζεται σε στήλη Qiaquick και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για ένα λεπτό σε 12.000g. Το DNA συγκρατείται στη στήλη και ξεπλένεται από τις προσμίξεις με τη διαβίβαση του αιθανολικού διαλύματος PE. Η έκλυση του DNA γίνεται με 20-30μl αποστειρωμένου δις-απεσταγμένου νερού ή TE, (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0). Κατόπιν, ηλεκτροφορεύεται μια μικρή ποσότητα από το εκλούμενο DNA, προκειμένου να ελεγχθεί για την καθαρότητά του και για να διαπιστωθεί κατ' εκτίμηση η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε, (Qiaquick Spin Handbook, Qiagen 1996).

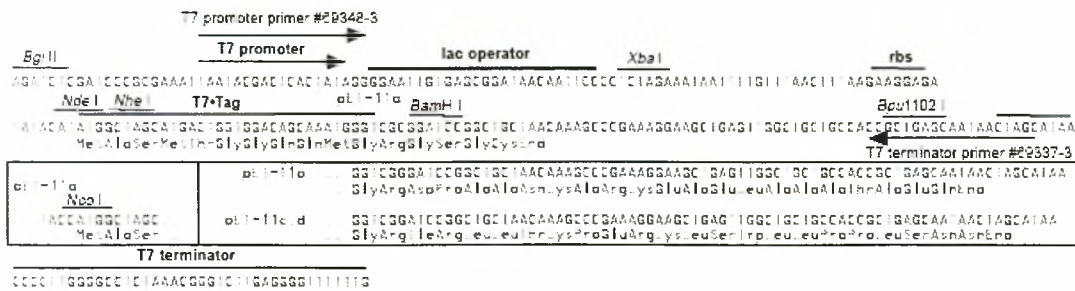
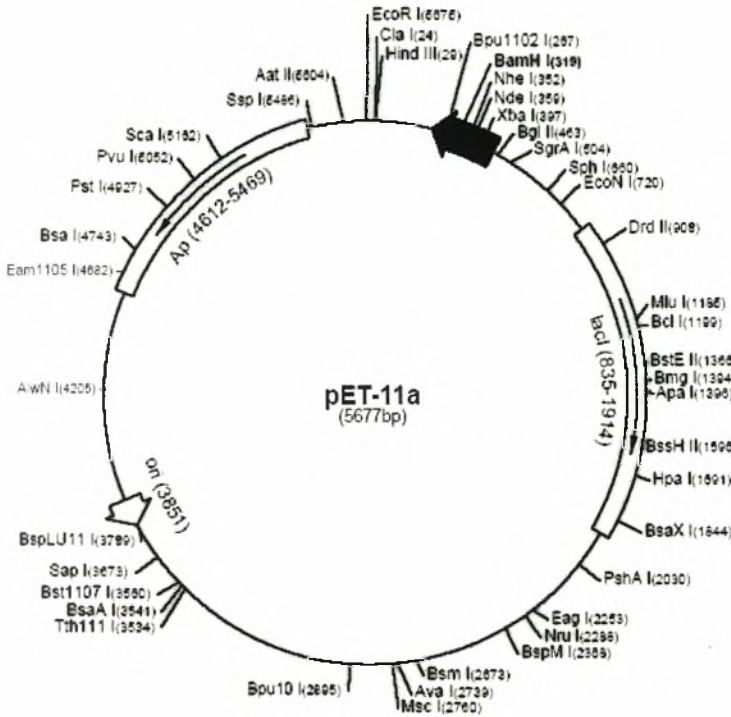
3.2.4. Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Κατά την κλωνοποίηση, γίνεται εισαγωγή ενός τμήματος DNA στο γονιδίωμα ενός αυτόνομα πολλαπλασιαζόμενου γενετικού στοιχείου, ιού ή πλασμιδίου. Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση είναι μικρά κυκλικά μόρια δίκλωνου DNA, που μπορούν να αναπτύσσονται ημι-αυτόνομα σε βακτήρια και φέρουν γονίδια που τους προσδίδουν αντίσταση σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Τόσο ο πλασμιδιακός φορέας, όσο και το ξένο τμήμα του DNA που πρόκειται να εισαχθεί σε αυτόν, επωάζονται με τις ίδιες ενδονουκλεάσες περιορισμού και στη συνέχεια, επανακυκλοποιούνται συνδεδόμενα ομοιοπολικά στα άκρα τους με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού, αντίδραση που καταλύεται από μια DNA λιγάση (Sambrook, Maniatis et al. 1989).

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι ο pET11a.

Ο πλασμιδιακός φορέας pET11a, έχει μέγεθος 5677 ζεύγη βάσεων, και περιέχει στο μόριο του έναν T7 προαγωγέα για την επαγωγή της έκφρασης του κλωνοποιημένου γονιδίου, το γονίδιο *lac I^q* που παράγει τον αναστολέα του οπερονίου της λακτόζης και το γονίδιο που του προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Προκειμένου να γίνει εισαγωγή του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει στο πλασμίδιο αυτό, γίνεται πέψη και των δυο με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI και BamHI.

Εικόνα 16. Το πλασμίδιο pET-11a.



3.2.4.1. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Προκειμένου να γίνει πέψη με ένζυμα περιορισμού, το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει: το DNA, (που μπορεί να είναι γενωμικό DNA, πλασμιδιακός φορέας, ή το τμήμα του DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί), το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο τα ένζυμα περιορισμού εμφανίζουν τη βέλτιστη δράση, τα ένζυμα περιορισμού και σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν αυτό απαιτείται, αλβουμίνη. Ο συνολικός όγκος του μίγματος κυμαίνεται από 20 έως 50μl. Η αντίδραση πραγματοποιείται συνήθως στους 37°C, εκτός από πολύ λίγες εξαιρέσεις. Η ποσότητα των ενζύμων που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να ξεπερνά το 10% v/v του συνολικού όγκου της αντίδρασης, διαφορετικά, υπάρχει περίπτωση να γίνει μη εξειδικευμένη πέψη, εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης των ενζύμων ή της υψηλής

συγκέντρωσης γλυκερόλης στο μίγμα της αντίδρασης. Ο χρόνος επώασης είναι συνήθως δυο ώρες. Μερικές φορές όμως, για τα τμήματα του DNA που προέρχονται από PCR και πρόκειται να κλωνοποιηθούν, απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος επώασης, γιατί οι θέσεις αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμού είναι πολύ κοντά στα άκρα, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η πέψη.

Στην προκειμένη εργασία κλωνοποιήθηκε το γονίδιο της L25 στο πλασμίδιο pET11a,

Οι συνθήκες της αντίδρασης για το πλασμίδιο και το τμήμα DNA που επρόκειτο να κλωνοποιηθεί φαίνονται παρακάτω:

NdeI (10U/μl)	: 20U
BamHI (20U/μl)	: 20U
pET11a/τμήμα DNA	: 10/20μg
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	: 2/5μl
BSA (10x)	: 2/5μl
H ₂ O	: μέχρι 20/50μl

Επώαση στους 37°C για 2 ώρες ή περισσότερες από δυο ώρες. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος 10x είναι: 1.5M NaCl, 100mM Tris-HCl pH 7.9, 100mM MgCl₂, 10mM DTT. Το ρυθμιστικό διάλυμα είναι εκείνο που συνοδεύει το ένζυμο περιορισμού BamHI.

Όταν πρόκειται για πέψη πλασμιδίων, γίνεται επώαση πρώτα με το ένα ένζυμο, ακολουθεί καθαρισμός από την πηκτική αгарόζης και μετά επώαση με το δεύτερο ένζυμο. Ο λόγος που γίνεται η διαδοχική πέψη, είναι προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι μετά την πέψη με το πρώτο ένζυμο, το πλασμίδιο δεν είναι πια κυκλικό, αλλά γραμμικό, κι αυτό πιστοποιείται από τη διαφορετική ηλεκτροφορητική εικόνα που παρουσιάζουν οι δυο μορφές του πλασμιδίου. Διαδοχική επώαση με τα δυο ένζυμα γίνεται, όταν αυτά δεν είναι συμβατά για να γίνει ταυτόχρονη επώαση. Οι πληροφορίες αυτές δίνονται αναλυτικά στον κατάλογο της εταιρείας NEBiolabs, στο κεφάλαιο που αφορά στις ενδονουκλεάσες περιορισμού.

3.2.4.2. Αντίδραση λιγάσης

Προκειμένου να γίνει η ενσωμάτωση του τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει στον αντίστοιχο πλασμιδιακό φορέα, χρησιμοποιείται μια DNA λιγάση. Η αναλογία των δυο αντιδρώντων είναι συνήθως 6:1. Στην προκειμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε το Rapid ligation kit, της εταιρείας Roche. Οι συνθήκες της αντίδρασης περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

DNA πλασμιδιακού φορέα	: 10ng
DNA τμήματος που θα ενσωματωθεί	: 60ng
Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης του DNA 5x(DNA Dilution buffer)	: 2μl
H ₂ O	: μέχρι τα 10μl
Ανάμιξη των συστατικών κι αμέσως μετά προσθήκη στο ίδιο μίγμα	
Ρυθμιστικό διάλυμα της T4 DNA λιγάσης 2x	: 10μl
T4 DNA λιγάση (5 units/μl)	: 1μl

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης μετά από την προσθήκη της λιγάσης είναι 21μl. Η επώαση γίνεται για 45 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.

Η πιο πάνω αντίδραση της λιγάσης γίνεται και απουσία του τμήματος DNA που πρόκειται να ενσωματωθεί στο πλασμίδιο, προκειμένου να ελεγχθεί το ποσοστό επανακυκλοποίησης του πλασμιδιακού φορέα, χωρίς την παρεμβολή του ξένου DNA. Αν παρατηρηθεί μεγάλο τέτοιο ποσοστό, κρίνεται σκόπιμο να γίνει αποφωσφορυλίωση του πλασμιδίου πριν αυτό χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση της λιγάσης. Στη συγκεκριμένη εργασία, η φωσφατάση που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας Roche. Η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης γίνεται ως εξής:

DNA πλασμιδιακού φορέα	: 100ng
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφατάσης 10x	: 2/3μl
SAP	: 1μl
H ₂ O	: μέχρι τα 20/30μl

Επώαση για 30 λεπτά στους 37°C. Μετά το τέλος της επώασης, ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου στους 65°C για 15 λεπτά. Τελικά, το πλασμίδιο καθαρίζεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο B.2.2., και μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση της λιγάσης.

3.2.5. Προετοιμασία επιδεκτικών για μετασχηματισμό βακτηρίων (competent cells)

Η τεχνική αυτή έχει ως σκοπό να καταστήσει ικανά, (επιδεκτικά), τα βακτηριακά κύτταρα, προκειμένου να γίνει εισαγωγή του πλασμιδιακού DNA σε αυτά (Sambrook, Maniatis et al. 1989).

3.2.5.1. Μέθοδος των δυο διαλυμάτων CaCl₂

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην παρατήρηση των Mandel και Higa ότι τα βακτήρια, έπειτα από κατεργασία με ψυχρά διαλύματα CaCl₂, είναι ικανά να

προσλάβουν DNA προερχόμενο από διάφορες πηγές. Η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόστηκε στα στελέχη *E. coli* XL1 και BL21(DE3) και αναλυτικά έχει ως εξής:

3ml θρεπτικού υλικού LB, (Tryptone 1% w/v, Yeast extract 0.5% w/v, NaCl 1% w/v), εμβολιάζονται με κύτταρα *E. coli*, (XL1 ή BL21), και αφήνονται να αναπτυχθούν με ανακίνηση στους 37°C για 12-16 ώρες. Στη συνέχεια, 10ml LB εμβολιάζονται με 100μl αυτής της καλλιέργειας και ακολουθεί επώαση στους 37°C, μέχρις ότου η απορρόφηση φθάσει ~0.3, (αρχή της λογαριθμικής φάσης), στα 600 nm. Αμέσως μετά η καλλιέργεια τοποθετείται στον πάγο για 10 λεπτά, προκειμένου να σταματήσει η ανάπτυξη των κυττάρων κι ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 9000g για 10 λεπτά. Κατόπιν, αφού γίνει απόχυση του υπερκείμενου, τα κύτταρα αιωρούνται σε 5ml CaCl₂ 100mM, (1/2 του αρχικού όγκου της καλλιέργειας). Τα κύτταρα παραμένουν για 20 λεπτά στον πάγο και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση σε 9000g για άλλα 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και τελικά τα κύτταρα αιωρούνται σε 1ml CaCl₂ 50mM και παραμένουν στον πάγο για 45 λεπτά, οπότε και είναι έτοιμα να δεχθούν το DNA. Για κάθε δείγμα DNA χρησιμοποιούνται 200μl επιδεκτικών κυττάρων (Hentzen, Mandel et al. 1972).

3.2.5.2. Μέθοδος CaCl₂

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται, όπως και αυτή της παραγράφου B.2.23.1, στην ιδιότητα του CaCl₂ να δημιουργεί επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα για την εισαγωγή DNA. Μπορεί να εφαρμοστεί στα στελέχη *E. coli* XL1, BL21(DE3) και TOP 10.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

Διάλυμα TFB-I pH 7.0

CH ₃ COOK	30mM
MnCl ₂	50mM
KCl	100mM
CaCl ₂	10mM
Γλυκερόλη	15% v/v

Διάλυμα TFB-II pH 7.0

MOPS	10mM
CaCl ₂	75mM
KCl	100mM
Γλυκερόλη	15% v/v

3ml θρεπτικού υλικού LB ή TYM εμβολιάζονται με βακτηριακά κύτταρα, παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού, [15μg/ml τετρακυκλίνη (XL1), 20μg/ml στρεπτομυκίνη (TOP 10)]. Η καλλιέργεια αυτή επωάζεται για 12-16 ώρες στους 37°C, υπό ανακίνηση. Ακολούθως, εμβολιάζονται 3ml θρεπτικού υλικού, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού, με 150μl από την προηγούμενη καλλιέργεια. Κατόπιν, εμβολιάζονται 50ml θρεπτικού υλικού που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό, ανάλογα με το είδος των κυττάρων που χρησιμοποιούνται, με 1ml από την καλλιέργεια αυτή. Ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας στους 37°C, μέχρις ότου η απορρόφηση στα 600nm να φθάσει το 0.35-0.4. Η καλλιέργεια στη συνέχεια ψύχεται στον πάγο για 10 λεπτά, και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 5000g για 20 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο αποχύνεται και τα κύτταρα αιωρούνται σε 25ml, (που αντιστοιχούν στο 1/2 του όγκου της καλλιέργειας), διαλύματος TFB-I και αφήνονται στον πάγο για 10 λεπτά. Κατόπιν, φυγοκεντρώνονται για 20 λεπτά σε 4000g και τα κύτταρα αιωρούνται τελικά σε 1ml διαλύματος TFB-II. Το αιώρημα που προκύπτει, χωρίζεται σε σωλήνες μικροφυγοκέντρου, (eppendorf), σε κλάσματα των 150-200μl και αυτά εμβαπτίζονται για μικρό χρονικό διάστημα σε λουτρό, στο οποίο έχει προστεθεί ξηρός πάγος/αιθανόλη. Με τη διαδικασία αυτή, επιτυγχάνεται η άμεση ψύξη των κλασμάτων, τα οποία μπορούν κατόπιν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -70°C και να χρησιμοποιούνται όταν απαιτείται.

3.2.6. Εισαγωγή πλασμιδίου σε κύτταρα *E. coli* (μετασχηματισμός)

Τα επιδεκτικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εισαγωγή σε αυτά πλασμιδιακού DNA, (καθαρού ή προϊόντος κλωνοποίησης).

Στο αιώρημα των επιδεκτικών βακτηρίων, (150-200μl), προστίθενται 40-80ng πλασμιδιακού DNA ή 7-10μl του μίγματος της αντίδρασης της λιγάσης και ακολουθεί επώαση για 45 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια, το μίγμα των κυττάρων με το DNA υπόκειται σε θερμικό σοκ στους 42°C για 2 λεπτά και αμέσως μετά ψύχεται για 1 λεπτό στον πάγο. Στο μίγμα προστίθενται 600-800μl LB και γίνεται επώαση για 30 λεπτά στους 37°C, προκειμένου να αρχίσει η ανάπτυξη των κυττάρων. Κατόπιν, το μίγμα της επώασης φυγοκεντρείται σε 6000g για 2 λεπτά και απομακρύνεται το υπερκείμενο, (600-800μl), ενώ τα κύτταρα αιωρούνται στα υπόλοιπα 150-200μl του LB. Το αιώρημα με τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα, απλώνεται στην επιφάνεια τρυβλίου με θρεπτικό υλικό LB-άγαρ και το κατάλληλο αντιβιοτικό. Κατόπιν, τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 12-16 ώρες. Τα πλασμίδια προσδίδουν στα κύτταρα ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό, με αποτέλεσμα οι αποικίες

που εμφανίζονται στα τρυβλία να αποτελούνται αποκλειστικά και μόνο από κύτταρα που περιέχουν τον πλασμιδιακό φορέα, (μόνο του ή ανασυνδυασμένο) (Sambrook, Maniatis et al. 1989).

3.2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

3.2.7.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας kit της εταιρείας Qiagen (mini prep, midi prep)

Σε 3ml θρεπτικού υλικού LB παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού, προστίθεται μια αποικία και η καλλιέργεια αναπτύσσεται με ανάδευση στους 37°C για 12-16 ώρες. 1.5ml της πλήρους ανεπτυγμένης καλλιέργειας, μεταφέρονται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρου, (eppendorf), και φυγοκεντρείται στις 13000xg για 1 λεπτό. Ακολουθεί απόχυση του υπερκείμενου και αιώρηση των κυττάρων σε 250μl διαλύματος P1. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 250μl διαλύματος P2 και ήπια ανάδευση. Έπειτα από παραμονή 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 350μl διαλύματος N3 και έπειτα από εντονότερη ανάδευση γίνεται φυγοκέντρηση σε 13000xg για 10 λεπτά, για το διαχωρισμό του χρωμοσωμικού από το πλασμιδιακό DNA των βακτηρίων. Το υπερκείμενο διαβιβάζεται στη στήλη Qiagen tip-10 και γίνεται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 13000xg. Το DNA συγκρατείται στη στήλη, ενώ οι πρωτεΐνες διέρχονται. Για την απομάκρυνση τυχόν προσμίξεων γίνεται πλύση με αιθανολικό διάλυμα PB. Το διάλυμα απομακρύνεται με διπλή φυγοκέντρηση σε 13000xg, για 1 λεπτό. Η έκλουση του πλασμιδιακού DNA από τη στήλη γίνεται με 30μl αποστειρωμένου δις-απεσταγμένου νερού.

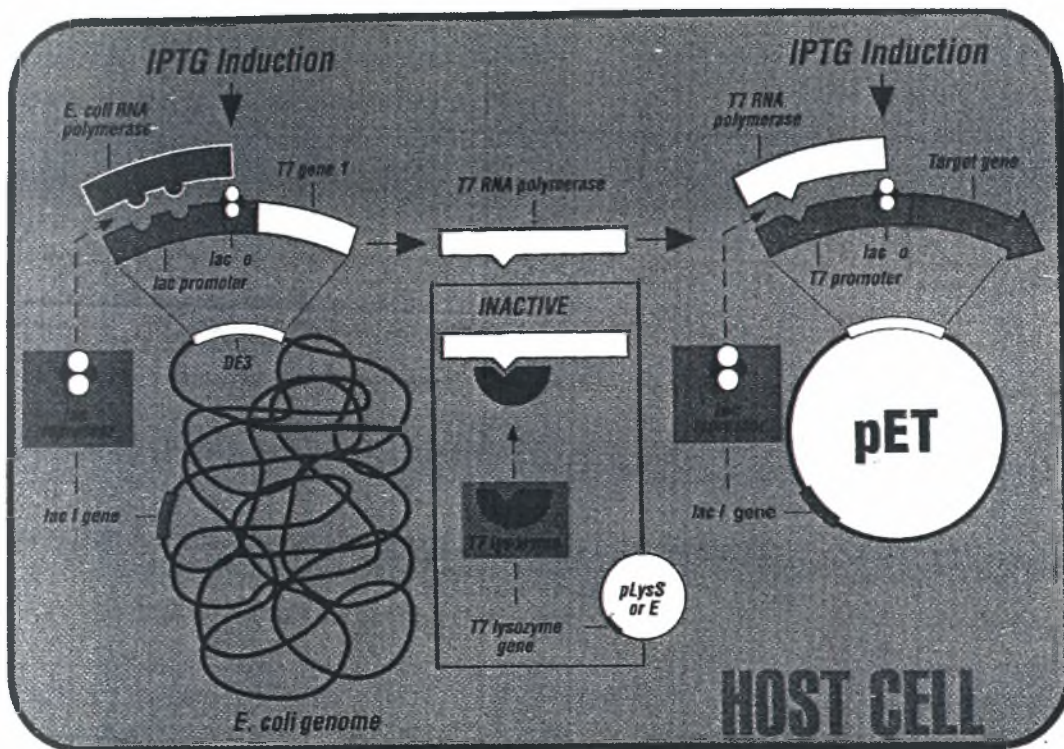
Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλες ποσότητες, χρησιμοποιούνται οι στήλες Qiagen tip-100. Στην περίπτωση αυτή, γίνεται εμβολιασμός 50 ή 100ml θρεπτικού υλικού LB, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού, από μια μικρότερη καλλιέργεια. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ανάλογη αυτής που περιγράφηκε πιο πάνω, (Qiagen Plasmid Purification Handbook, 1997).

3.2.8. Υπερέκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3)-σύστημα έκφρασης pET

Το σύστημα pET της Novagen αποτελεί ένα από τα καλύτερα συστήματα για την κλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στα κύτταρα *E. coli*, εξασφαλίζοντας υψηλά επίπεδα έκφρασης και αυστηρό έλεγχο στο βασικό επίπεδο της μετάφρασης. Το γονίδιο-στόχος κλωνοποιείται στο πλασμίδιο pET κάτω από τον έλεγχο του προαγωγού από T7 βακτηριοφάγο, ενώ η επαγωγή της έκφρασης γίνεται από την T7 RNA πολυμεράση, η οποία είναι τόσο επιλεκτική και δραστική ώστε το σύνολο σχεδόν των αποθεμάτων του κυττάρου να μετατρέπονται σε προϊόν έκφρασης του γονιδίου-στόχου.

Αρχικά τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μετασχηματίζονται σε κύτταρα ξενιστές που δεν περιέχουν το γονίδιο της T7 πολυμεράσης, (*E. coli* XL1) έτσι ώστε το γονίδιο στόχος να είναι ανενεργό και επομένως να μην προκαλέσει αστάθεια του πλασμιδίου λόγω της παραγωγής πρωτεϊνών, τοξικών για το κύτταρο. Στη συνέχεια γίνεται μεταφορά του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε βακτηριακά στελέχη τα οποία περιέχουν στο χρωμόσωμα τους ένα αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης (λDE3 λυσογόνο), (*E. coli* BL21(DE3)) το οποίο βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του lacUV5 προαγωγέα και η έκφρασή του επάγεται με την προσθήκη του ισοπροπυλ-β-D-θειογαλακτοπυρανοζιδίου (IPTG). Στην περίπτωση των λDE3 λυσογόνων, λόγω της ύπαρξης του lacUV5 προαγωγέα, μπορεί να επιτευχθεί η μεταγραφή του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης και η έκφραση γονιδίων που τα προϊόντα τους δεν είναι τοξικά για την ανάπτυξη των κυττάρων, χωρίς την προσθήκη του IPTG. Όταν όμως απαιτείται αυστηρότερος έλεγχος, τότε χρησιμοποιούνται κύτταρα ξενιστές που περιέχουν το πλασμίδιο pLysS ή pLysE. Τα πλασμίδια αυτά παράγουν σε μικρά και μεγάλα ποσά την T7 λυσοζύμη η οποία είναι φυσικός αναστολέας της T7 RNA πολυμεράσης. Ακόμη αυστηρότερος έλεγχος της μεταγραφής από την T7 RNA πολυμεράση επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση του T7 lac προαγωγέα ο οποίος περιλαμβάνει μια ακολουθία 25 bp του lac χειριστή μετά από την περιοχή των 17 bp του T7 προαγωγέα. Ο lac αναστολέας δεσμεύεται στην περιοχή του χειριστή ελαττώνοντας σημαντικά την μεταγραφή από την T7 RNA πολυμεράση. Τα πλασμίδια pET που χρησιμοποιούνται για την έκφραση των γονιδίων στόχων εκτός από τον T7 lac προαγωγέα περιέχουν και το γονίδιο του lac αναστολέα εξασφαλίζοντας έτσι ότι υπάρχει αρκετός αναστολέας για την κάλυψη όλων των θέσεων των χειριστών.

Στο σχήμα Β.1. δίνονται παραστατικά όλα τα στοιχεία ελέγχου του συστήματος υπερέκφρασης pET. Με την προσθήκη του IPTG επάγεται τόσο η έκφραση του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης, όσο και η έκφραση του κλωνοποιημένου στο pET γονιδίου.



Εικόνα 17. Στοιχεία ελέγχου του συστήματος pET στα κύτταρα BL21 (DE3).

Ένα άλλο πλεονέκτημα των φορέων έκφρασης pET είναι ότι περιέχουν διάφορες ακολουθίες που βρίσκονται δίπλα στις θέσεις κλωνοποίησης και κωδικοποιούνται προς πεπτίδια 'ουρές' που επιτρέπουν την εύκολη ανίχνευση και καθαρισμό των γονιδίων -στόχων. Τέτοια πεπτίδια 'ουρές' είναι μια ακολουθία 6 ιστιδινών (6xHis-tag) ή 10 ιστιδινών (10xHis-tag), η S-ακολουθία (S-tag), η T7-ακολουθία (T7-tag) και η HSV-ακολουθία (HSV-tag). Οι ακολουθίες αυτές μπορεί να βρίσκονται είτε στο άμινο-τελικό άκρο είτε στο κάρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Φυσικά μερικοί φορείς έκφρασης pET μπορούν να εκφράσουν πρωτεΐνες χωρίς τα πεπτίδια 'ουρές'. Ένας τέτοιος ήταν και ο pET11a που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή.

Τα κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET11a-L25 αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό LB στο οποίο έχει προστεθεί αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 50μg/mL με ανακίνηση στους 37°C έως ότου η απορρόφηση φθάσει περίπου στο 0.6, (τέλος της λογαριθμικής φάσης), στα 600 nm. Αμέσως μετά στη καλλιέργεια προστίθεται IPTG τελικής συγκέντρωσης 1mM και

αυτή αναδεύεται στους 37°C για 3 ώρες προκειμένου να γίνει η υπερέκφραση του γονιδίου της L25.

3.2.9. Καλλιέργειες βακτηρίων *E. coli*

Τα στελέχη *E. coli* XL1 και BL21(DE3), αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα LB, (Luria-Bertani) (Sambrook, Maniatis et al. 1989), του οποίου η σύσταση είναι η ακόλουθη:

Θρεπτικό υλικό LB

Εκχύλισμα ζύμης	0.5 % w/v
Τρυπτόνη	1.0 % w/v
NaCl	1.0 % w/v

Η ρύθμιση της οξύτητας γίνεται με τη χρήση NaOH. Ακολουθεί αποστείρωση του θρεπτικού υλικού στους 120°C, υπό πίεση μιας Atm, για 30 λεπτά.

Η ανάπτυξη των κυττάρων γίνεται στους 37°C, με έντονη ανάδευση, χρησιμοποιώντας κάθε φορά το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής, όταν είναι απαραίτητο.

3.2.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-ηλεκτροφόρηση)

Η αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος. Στο συγκεκριμένο είδος ηλεκτροφόρησης ως αποδιατακτικό μέσο χρησιμοποιείται το ανιονικό απορρυπαντικό SDS. Το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και τις αποδιατάσσει. Έτσι, δημιουργούνται επιμήκη μόρια, αρνητικά φορτισμένα, με σαφή και καθορισμένη δομή. Το ποσό του SDS που δεσμεύεται είναι αρκετά σταθερό, (1.4g SDS/gr πρωτ.). Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού μεγέθους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, κάτω από αυτές τις συνθήκες, εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό μέγεθος.

Το σύστημα που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των διαφόρων πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων, αποτελείται από την πηκτή διαχωρισμού και την

πηκτική επιστοιβαξης. Το διάλυμα ηλεκτροδίων (running buffer) περιέχει Tris, γλυκίνη και SDS.

Τα δείγματα πριν εισέλθουν στην πηκτική επιστοιβαξης αναμιγνύονται με διάλυμα (loading buffer) το οποίο περιέχει εκτός των άλλων β-μερκαπτοαιθανόλη 1% v/v που προκαλεί αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών και το διαχωρισμό των υπομονάδων των πρωτεϊνών, αν υπάρχουν.

3.2.11. Στερέωση και βαφή πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου

3.2.11.1. Βαφή με Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250

Η αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στη δημιουργία συμπλόκου κυανού χρώματος, μεταξύ των πρωτεϊνών και της χρωστικής CBB R-250. Προκειμένου να δημιουργηθεί το σύμπλοκο, η πηκτική εμβαπτίζεται στο διάλυμα χρώσης (χρωστική, μεθανόλη 50% v/v και οξικό οξύ 10% v/v) και αφήνεται για μια ώρα περίπου. Με το διάλυμα αυτό, γίνεται συγχρόνως και στερέωση των πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτική. Ακολούθως, η πηκτική τοποθετείται στο διάλυμα αποχρωματισμού (μεθανόλη 50% v/v και οξικό οξύ 10% v/v) και ανακινείται για αρκετές ώρες. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η ανίχνευση μέχρι και 0.1 μg πρωτεΐνης.

3.2.11.2. Βαφή με νιτρικό άργυρο (AgNO₃)

Το χαρακτηριστικό της τεχνικής αυτής είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία που παρουσιάζει στην ανίχνευση πρωτεϊνών σε σχέση με τη χρώση με CBB. Η ποσότητα της πρωτεΐνης που μπορεί να ανιχνευθεί είναι μέχρι και 0.1ng. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα των ιόντων αργύρου να αντιδρούν με πρωτεΐνες και ιδιαίτερα με τις ελεύθερες αμινοομάδες και τις θειούχες ομάδες αυτών (Helmut Blum 1987).

3.2.12. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

3.2.12.1 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτική αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης, βασίζεται στη μετακίνηση των αρνητικά φορτισμένων μορίων DNA σε ουδέτερο pH, προς την άνοδο. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από το μέγεθός τους,

(για γραμμικά δίκλινα μόρια είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους), τη διαμόρφωσή τους, (γραμμικά, κυκλικά ή υπερελικωμένα), τη συγκέντρωση της αгарόζης, το δυναμικό που εφαρμόζεται, καθώς επίσης και από τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται.

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτές αгарόζης συγκέντρωσης από 1% w/v και ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris, H₃BO₃ και EDTA pH 8.0)

Η εμφάνιση των ζωνών των μορίων του DNA στην αгарόζη, επιτυγχάνεται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα της πηκτής ή/και στο διάλυμα των ηλεκτροδίων. Πρόκειται για μια φθορίζουσα ένωση, η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και έχει την ιδιότητα να απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία στα 302 και 366 nm και να την επανεκπέμπει στην περιοχή του κόκκινου ορατού φάσματος. Η ένταση της ακτινοβολίας είναι ανάλογη της ποσότητας του DNA. Η ένταση φθορισμού του ελεύθερου EtBr είναι πολύ μικρότερη από αυτή του συμπλόκου EtBr-DNA, επομένως είναι δυνατή η ανίχνευση μικρών ποσοτήτων DNA (Sharp, Sugden et al. 1973; Sambrook, Maniatis et al. 1989).

3.2.12.2. Ηλεκτροφόρηση τμημάτων RNA σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Προκειμένου να διαχωριστούν πολύ μικρά μόρια RNA, τα ολιγονουκλεοτίδια μπορούν να αναλυθούν και σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου, έστω και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, δημιουργούν πυκνότερο πλέγμα και επιτρέπουν τον καλύτερο διαχωρισμό μικρών αυτών τμημάτων.

Η βασική αρχή είναι ίδια με αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.10. με τη διαφορά ότι στις αποδιατακτικές συνθήκες χρησιμοποιείται ουρία αντί για SDS, και το διάλυμα ηλεκτροδίων αποτελείται από TBE.

3.2.13. Λύση κυττάρων

3.2.13.1. Ήπια λύση κυττάρων με heat shock

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για την λύση μικρής ποσότητας κυττάρων των οποίων το πρωτεϊνικό προφίλ θα θέλαμε να παρατηρήσουμε. Με αυτόν τον τρόπο δεν χάνονται σχεδόν καθόλου πρωτεΐνες, γεγονός που καθιστά την συγκεκριμένη τεχνική ιδανική για παρατήρηση της υπερέκφρασης ενός γονιδίου. Η

λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με διαδοχικούς κύκλους ψύξης-απόψυξης. Το διάλυμα λύσης (lysis buffer) αποτελείται από ουρία 6M και Tris-HCl 20mM, pH 7,5. Η ουρία έχει διπλό ρόλο. Αφ' ενός ως πολικό, μη ιοντικό αποδιατακτικό διαλυτοποιεί τις μεμβρανικές πρωτεΐνες και τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, και αφ' ετέρου λόγω της μεγάλης συγκέντρωσής της στο διάλυμα, δημιουργεί οσμωτική πίεση. Τα κύτταρα αφού προηγουμένως αιωρηθούν στο διάλυμα, ψύχονται στους -80°C για 25min και στη συνέχεια στους 5°C για ίσο χρονικό διάστημα. Ο κύκλος ψύξης-απόψυξης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Όλες οι πρωτεΐνες του κυττάρου βρίσκονται στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση.

3.2.13.2. Λύση κυττάρων με υπερήχους (sonication)

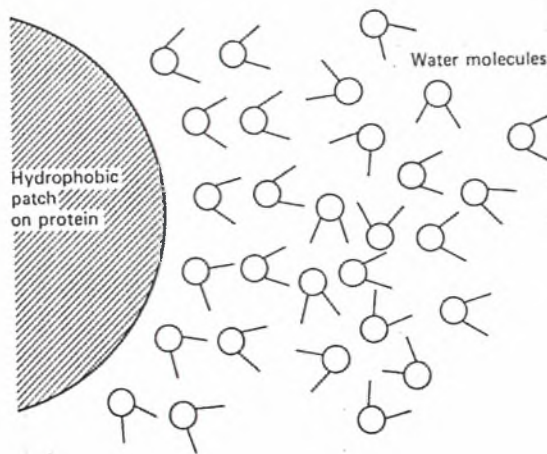
Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για την λύση μεγαλύτερης ποσότητας κυττάρων. Τα κύτταρα αιωρούνται σε διάλυμα λύσης που αποτελείται από NaCl 0,8M, Tris-HCl 20mM, pH 7,5, β-μερκαπτοαιθανόλη 0.1% και αναστολείς πρωτεασών (PMSF) 0,2mM. Το NaCl είναι υπεύθυνο για την διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών μετά τη λύση του κυττάρου, ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη και το PMSF προστατεύουν τη δομή των πρωτεϊνών η μεν β-μερκαπτοαιθανόλη προστατεύοντας τις δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, το δε PMSF είναι αναστολέας πρωτεασών οι οποίες απελευθερώνονται από τα κύτταρα μετά τη λύση τους. Ο όγκος του διαλύματος λύσης είναι το 1/50 του όγκου της υγρής καλλιέργειας των κυττάρων. Οι υπερήχοι εφαρμόζονται, για 6 χρονικά διαστήματα των 20 δευτερολέπτων και ένα χρονικό διάστημα των 40 δευτερολέπτων, ενώ ενδιάμεσα μεσολαβεί κάθε φορά μία παύση ενός λεπτού σε παγόλουτρο, ώστε να αποφεύγεται η υπερθέρμανση. Οι πρωτεΐνες του κυττάρου βρίσκονται στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση.

3.2.14. Κλασματική κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο

Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο στηρίζεται στο διαχωρισμό με προσθήκη άλατος σε υψηλές συγκεντρώσεις (salt out), ο οποίος εξαρτάται από την υδροφοβικότητα των πρωτεϊνών. Όπως είναι γνωστό ένα τυπικό μόριο πρωτεΐνης όταν βρίσκεται μέσα σε διάλυμα έχει στην επιφάνεια του υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες. Όταν αυτές έρθουν σε επαφή με ένα υδατικό διαλύτη, τα μόρια του νερού διευθετούνται γύρω από τις αλυσίδες όπου και παραμένουν (σχήμα Β.2.). Η διευθέτηση αυτή είναι μια θερμοδυναμικά ασταθής κατάσταση εφόσον η εντροπία

είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με την αδιάλυτη πρωτεΐνη και τα ελεύθερα μόρια νερού.

Με την προσθήκη άλατος στο διάλυμα, τα ιόντα του άλατος ενυδατώνονται- δηλαδή υπάρχουν πολύ λίγα ελεύθερα μόρια ύδατος- και έτσι υπάρχει μεγαλύτερη τάση απομάκρυνσης των μορίων του νερού από τις πλευρικές αλυσίδες, με αποτέλεσμα αυτές να μένουν εκτεθειμένες και να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι πρωτεΐνες που έχουν μεγαλύτερο αριθμό, ή μεγαλύτερου μεγέθους τέτοιων συσσωματωμάτων, θα κατακρημνιστούν γρηγορότερα, ενώ οι πρωτεΐνες με λιγότερες μη πολικές ομάδες στην επιφάνεια τους, θα παραμείνουν στο διάλυμα, ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις άλατος.



Εικόνα 17. Διευθέτηση των μορίων του νερού γύρω από τα υδρόφοβα συστατικά της επιφάνειας μιας πρωτεΐνης

Για να υπολογιστεί η ποσότητα του θειικού αμμωνίου που πρέπει να προστεθεί σε ένα διάλυμα πρωτεϊνών, συνήθως χρησιμοποιείται ο εκατοστιαίος κορεσμός αντί για τη συγκέντρωση, εφόσον γίνει η υπόθεση ότι το αρχικό διάλυμα είναι ισοδύναμο με το νερό όσον αφορά την ικανότητα διάλυσης του θειικού αμμωνίου. Η σχέση με την οποία υπολογίζονται τα γραμμάρια του θειικού αμμωνίου που προστίθενται σε ένα διάλυμα είναι:

$$W = \frac{0.515 \cdot V \cdot (S_2 - S_1)}{1 - 0.272 \cdot S_2}$$

Όπου: V: ο όγκος του διαλύματος.

S₂: το ποσοστό κορεσμού που θέλουμε να πετύχουμε και

S₁: το αρχικό ποσοστό κορεσμού

3.2.15. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (DEAE-Sepharose, CM-Sepharose)

Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών με την χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής στηρίζεται στην προσρόφηση φορτισμένων μορίων στις καθηλωμένες ομάδες του ιοντικού ανταλλάκτη οι οποίες φέρουν αντίθετο φορτίο. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω του ότι τα διαφορετικά μόρια έχουν διαφορετικούς βαθμούς αλληλεπίδρασης με τον ιοντικό ανταλλάκτη εξαιτίας των διαφορών στα φορτία, στις πυκνότητες φορτίου και τον διαχωρισμό των φορτίων στις επιφάνειες τους. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορούν να ελεγχθούν με μεταβολή διαφόρων συνθηκών, όπως η ιονική ισχύς και το pH.

Το ιονανταλλακτικό υλικό αποτελείται από ένα αδιάλυτο υπόστρωμα πάνω στο οποίο είναι δεσμευμένες με ομοιοπολικούς δεσμούς φορτισμένες ομάδες, οι οποίες με τη σειρά τους συνδέονται με κινούμενα ιόντα αντίθετου φορτίου. Τα ιόντα αυτά μπορούν να ανταλλαχθούν με άλλα ιόντα που φέρουν το ίδιο φορτίο, χωρίς να υποστεί καμία μεταβολή το υπόστρωμα.

Υπάρχουν δυο είδη ιοντικών ανταλλακτών, οι θετικά φορτισμένοι (ανιοντοανταλλάκτες) και οι αρνητικά φορτισμένοι (κατιοντοανταλλάκτες). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ο ανιονικός ανταλλάκτης DEAE Sepharose CL-6B, ο οποίος έχει θετικά φορτισμένο υπόστρωμα και φέρει αρνητικά ιόντα τα οποία μπορεί να ανταλλάξει, και ο κατιοντικός ανταλλάκτης CM Sepharose CL-6B. Γενικά ο τύπος των φορτισμένων ομάδων αποτελεί βασική ιδιότητα για ένα ιονικό ανταλλάκτη, γιατί καθορίζει τον τύπο και την ισχύ αυτού. Ο ανιονικός ανταλλάκτης DEAE (diethylaminoethyl) φέρει σαν λειτουργική ομάδα την $O-CH_2-CH_2-N^+H(CH_2CH_3)_2$. Οι ανιοντικοί ανταλλάκτες με τεταρτοταγής αμινομάδες θεωρούνται πολύ ισχυροί λόγω του ότι ιονίζονται πλήρως σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH. Ο κατιοντικός ανταλλάκτης CM (carboxymethyl) φέρει σαν λειτουργική ομάδα την $O-CH_2-COO^-$.

Οι στήλες DEAE Sepharose CL-6B και CM Sepharose CL-6B αποτελούνται από ένα μακροπορώδη ιοντικό ανταλλάκτη με σφαιρίδια διαμέτρου περίπου 90 nm, ο οποίος προέρχεται από πηκτή αγαρόζης Sepharose CL-6B με σταυροειδείς δεσμούς. Οι ομάδες DEAE και CM δεσμεύονται στην πηκτή με αιθερικές γέφυρες με τη μονάδα του μονοσακχαριδίου για να δώσουν την τελική πηκτή.

Οι στήλες αυτές έχουν καλή χημική και φυσική σταθερότητα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής των πρωτεϊνών, των

πολυσακχαριτών, των νουκλεϊνικών οξέων και άλλων υψηλού μοριακού βάρους μορίων.

Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν, το υλικό της στήλης πακτώνεται σε ειδικό σωλήνα, ο οποίος επιτρέπει την ροή υγρού. Πριν στοιβαχθεί το προς ανάλυση πρωτεϊνικό διάλυμα, πρέπει να εξισορροπηθεί χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 10 όγκους στήλης από το διάλυμα μέσα στο οποίο είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες. Μετά την εξισορρόπηση, το πρωτεϊνικό διάλυμα ρέει μέσα από τη στήλη και τα διάφορα μόρια κινούνται ανάλογα με τον βαθμό που δεσμεύονται στη στήλη. Μόρια με μεγαλύτερη τάση για αλληλεπίδραση καθυστερούν περισσότερο από μόρια με μικρότερη τάση για αλληλεπίδραση. Μετά τη διέλευση του δείγματος, ακολουθεί πλύσιμο της στήλης με τουλάχιστον δύο όγκους από το δείγμα εξισορρόπησης. Η έκλυση των μορίων από τη στήλη γίνεται με διαβαθμισμένη συγκέντρωση άλατος (συνήθως NaCl) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 50mM μέχρι και 1.5M.

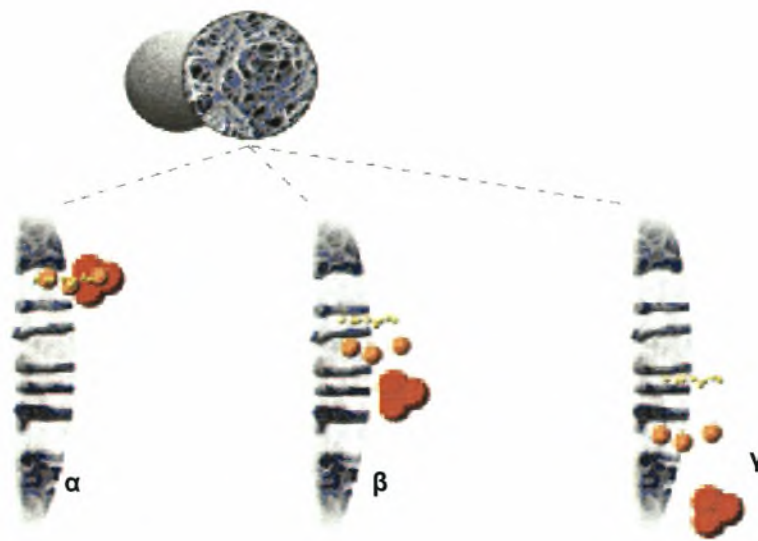
3.2.16. Καθαρισμός με την στήλη μοριακής διήθησης Sephadex G-75 Superfine

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μορίων με βάση το μέγεθος τους καθώς αυτά περνούν μέσα από τη στήλη. Σε αντίθεση με την χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής, τα μόρια δεν δεσμεύονται στο υπόστρωμα της στήλης, με αποτέλεσμα η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος να μην επηρεάζει την διαχωριστική ικανότητα της στήλης.

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βιομόρια που μπορεί να είναι ευαίσθητα στις μεταβολές του pH, της συγκέντρωσης των μεταλλικών ιόντων ή στις ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο διαχωρισμός μπορεί να γίνει παρουσία διαφόρων ιόντων, απορρυπαντικών, ουρίας, υδροχλωρικής γουανιδίνης, σε υψηλές ή χαμηλές τιμές ιονικής ισχύος, στους 37°C ή στους 4°C, ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Η συλλογή των καθαρισμένων πρωτεϊνών μπορεί να γίνει σε οποιοδήποτε ρυθμιστικό διάλυμα.

Το χρωματογραφικό υλικό είναι ένα πορώδες υπόστρωμα που έχει μορφή σφαιρικών σωματιδίων των οποίων η επιλογή έγινε με βάση τη χημική και φυσική τους σταθερότητα, καθώς και την αδράνεια τους. Η στήλη εξισορροπείται με ένα ρυθμιστικό διάλυμα που γεμίζει τους πόρους του υποστρώματος και τα κενά μεταξύ των σωματιδίων. Το διάλυμα ανάμεσα στους πόρους αναφέρεται ως στατική φάση και βρίσκεται σε ισορροπία με το διάλυμα που περιβάλλει τα σωματίδια και αναφέρεται ως κινητή φάση. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα δείγματα εκκλούνται ισοκρατικά, δηλαδή δεν χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού και η σύσταση του διαλύτη παραμένει

σταθερή κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας. Στο σχήμα Β.3. φαίνεται η διαδικασία διαχωρισμού της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.

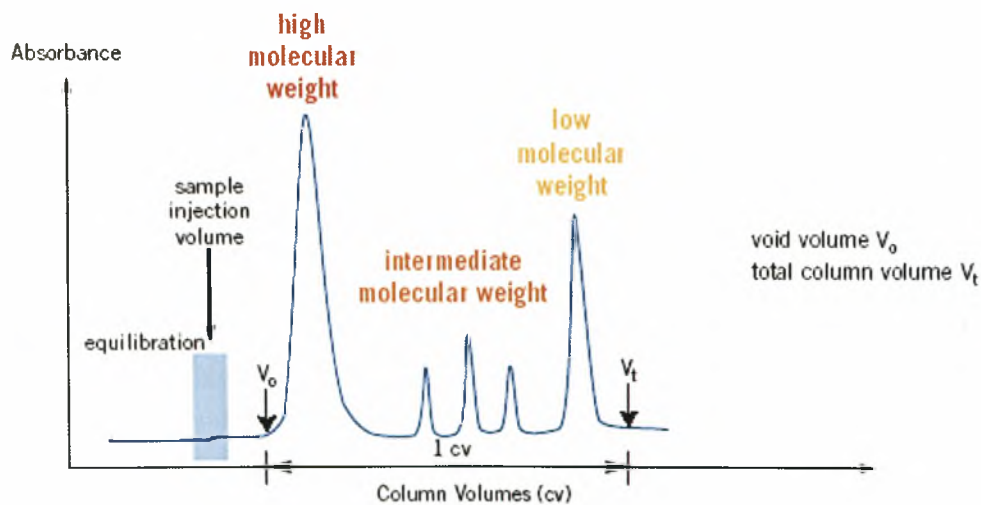


Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση της διαδρομής που ακολουθούν τα μόρια που εισέρχονται στο πλέγμα της στήλης μοριακής διήθησης.

α. το δείγμα επιστοιβάζεται στη στήλη

β. το ρυθμιστικό διάλυμα και το δείγμα κινούνται μέσα στη στήλη. Τα μόρια διαχέονται μέσα και έξω από τους πόρους του υλικού με τα μικρά μόρια να εισχωρούν περισσότερο μέσα στο υλικό από ότι τα μεγαλύτερα μόρια, με αποτέλεσμα να καθυστερούν περισσότερο να εκκλουστούν

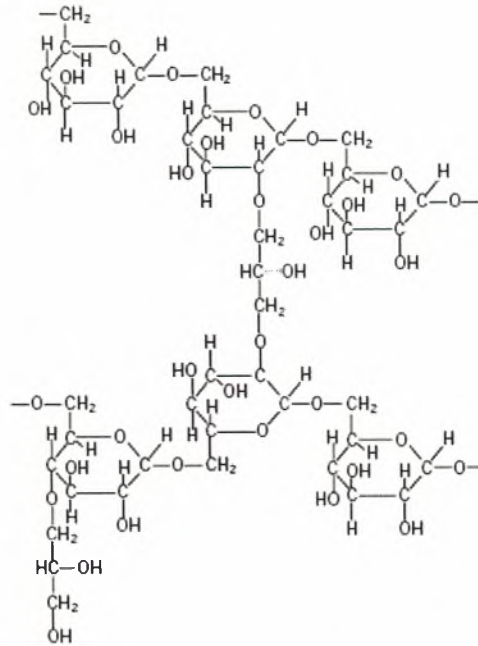
γ. Καθώς το ρυθμιστικό διάλυμα περνά διαμέσου της στήλης, τα μόρια που είναι μεγαλύτερα από τους πόρους του υλικού πλήρωσης της στήλης, δεν διαχέονται μέσα στους πόρους, με αποτέλεσμα να περνούν διαμέσου της στήλης. Τα μικρότερα μόρια διαχέονται μέσα στη στήλη και καθυστερούν να διαπεράσουν την στήλη



Εικόνα 19. Διαδικασία διαχωρισμού της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης

Η στήλη μοριακής διήθησης Sephadex G-75 Superfine χρησιμοποιήθηκε, ως μια άλλη μέθοδος διαχωρισμού της L25 από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του κυτταρικού

εκχυλίσματος. Η στήλη Sephadex G-75 Superfine αποτελείται από ένα δεξτράνιο που ενώνεται με σταυροειδείς δεσμούς με επιχλωριδρύνη (σχήμα Β.5.) και τα σφαιριδιά της έχουν πόρους μεγέθους τέτοιου, που να επιτρέπουν το διαχωρισμό πρωτεϊνών με μοριακό μέγεθος 3000-70000. Στο σύστημα εφαρμόστηκε περισταλτική αντλία που εξασφάλιζε συνεχή ροή και δεν ξεπερνούσε τα όρια ασφαλής λειτουργίας της στήλης.



Εικόνα 20. Τμήμα της δομής της Sephadex

3.2.17. Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών-Χρωματομετρική μέθοδος κατά Bradford, τροποποιημένη από τον Bearden

Η αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στην ιδιότητα που έχει η χρωστική ουσία Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 να δεσμεύεται στα μόρια των πρωτεϊνών. Η χρωστική αυτή, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη κατάσταση και σε όξινο περιβάλλον, απορροφά στα 465nm και το χρώμα της είναι καστανό. Η δημιουργία του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κυανού χρώματος και τη μεταβολή του μέγιστου απορρόφησης στα 595nm, όπου και μετράται φωτομετρικά.

Το αντιδραστήριο Bradford παρασκευάζεται ως εξής:

Αντιδραστήριο Bradford

CBB G-250	1mg/ml
H ₃ PO ₄ 85 %	200ml

Ακολουθεί ανάδευση για 16-20 ώρες. Στη συνέχεια γίνεται αραίωση του διαλύματος με απιονισμένο νερό στο 1lt. Το αντιδραστήριο είναι φωτοευαίσθητο και για το λόγο αυτό, φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα δείγματα, γίνεται ανάμιξη του κάθε δείγματος, (αραιωμένου στα 2ml με απιονισμένο νερό), με 2ml αντιδραστήριου Bradford και ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη βόειου ορού, (BSA) (Bradford 1976; Bearden 1978).

3.2.18. Απομόνωση ολικού tRNA σε μεγάλη κλίμακα (Large scale tRNA extraction).

Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο, 5g κυτάρων *E. coli* αιωρούνται σε 10ml διαλύματος 20mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM MgCl₂ (διάλυμα A). Προστίθεται ίσος όγκος Trizol (περίπου 12,5ml) και το μείγμα επωάζεται για 5min στους 65°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 8500rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδατική φάση διαχωρίζεται από τη φαινολική στην οποία προστίθενται 10ml διαλύματος A. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 8500rpm σε θερμοκρασία δωματίου κατά την οποία οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Οι δύο υδατικές φάσεις ενώνονται και προστίθεται ίσος όγκος εξισορροπημένης φαινόλης pH 5. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρείται για 10min στις 8500rpm σε θερμοκρασία δωματίου.

Η υδατική φάση μεταφέρεται και σε αυτήν προστίθενται 1/10 του όγκου 3M NaOAc pH 5,2 και ίσος όγκος ισοπροπανόλης. Σε αυτό το σημείο το διάλυμα αφήνεται over night στους 0°C. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 20min στις 8500rpm στους 4°C και στο ίζημα προστίθενται 3ml 70% ψυχρής EtOH. Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 5min στις 8500rpm στους 4°C. Το ίζημα στεγνώνεται, προστίθενται σε αυτό 4ml 0.2M TrisOAc pH 9,0 και αφήνεται για 30min στους 37°C. Ακολούθως προστίθεται 1/10 του όγκου 3M NaOAc pH 5,2 (400μl) και 2 όγκους 100% EtOH (8ml). Το διάλυμα τοποθετείται για 30min στους -70°C. Ακολούθως φυγοκεντρείται στις 8500rpm για 15min και στεγνώνεται το ίζημα. Στη συνέχεια προστίθενται 4ml 0,1M NaCl και το διάλυμα αφήνεται over night στους 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 10min στους 4°C.

Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος νέας εξισορροπημένης φαινόλης και το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 8500rpm για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην υδατική φάση που προκύπτει προστίθενται 0,4ml 3M NaOAc pH 5,2 και 8ml 100%EtOH. Κατόπιν το διάλυμα ψύχεται για 30min στους -70°C. Στη συνέχεια

φυγοκεντρείται για 15min στις 10000rpm στους 4°C και το ίζημα αφού ξεπλυθεί με 5ml 70% EtOH, φυγοκεντρείται για 5min στις 10000rpm. Το ίζημα στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε 1ml equilibrium buffer (0.01M NaOAc, 0.2M NaCl, 0.01 MgCl₂)

Η εξισορρόπηση της φαινόλης που αναφέρεται παραπάνω συμβαίνει με σκοπό να μειωθεί το pH της περίπτωση στο 5, διότι τα νουκλεϊκά οξέα που πρέπει να απομονωθούν, απαιτούν όξινες συνθήκες. Η διαδικασία έχει ως εξής: Ο όγκος της φαινόλης τοποθετείται σε σκουρόχρωμο ή καλυμμένο με αδιαφανές υλικό μπουκάλι επειδή είναι φωτοευαίσθητη. Προστίθεται ίσος όγκος NaOAc pH 5,2 και το μείγμα αναδεύεται για λίγα λεπτά σε μαγνητική πλάκα. Στη συνέχεια, αφού διαχωριστούν οι δύο φάσεις, η υδατική απορρίπτεται. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά. Το pH της φαινόλης μετρείται με πεχαμετρικό χαρτί. Αν χρειαστεί να μειωθεί το pH λίγο ακόμη, η διαδικασία επαναλαμβάνεται με ίσο όγκο 10 φορές αραιωμένου NaOAc.

3.2.19. Ενζυμική δοκιμή αμινοακυλίωσης (Aminoacylation assay)

Για να διαπιστωθεί αν η L25 έχει δράση αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της γλουταμίνης (GlnRS), έγινε δοκιμή αμινοακυλίωσης σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται σε εργασία στο περιοδικό Science (Stathopoulos et al. 2000). Κατ' αυτόν τον τρόπο ετοιμάστηκαν 3 διαλύματα (το δείγμα, ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας) για τις συνθήκες της κάθε μιας δοκιμής, ανάλογα κάθε φορά τα πειραματικά δεδομένα (συγκέντρωση ενζύμου, υποστρώματος κ.α.).

Τα δείγματα επωαζόταν στους 37°C και στα χρονικά σημεία 1,3,5,10,20,40 λεπτών, 20μL από το κάθε δείγμα εμποτίστηκαν σε χαρτί whatman διαμέτρου 3mm που περιείχαν διάλυμα τριχλωροξικού οξέος (TCA) 10%. Στο τέλος της αντίδρασης συνολικά 18 κομμάτια από χαρτί whatman διαμέτρου 3mm (3 σειρές από 6 κομμάτια) εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα TCA 10% για 30min στους 4°C για δύο φορές, σε διάλυμα TCA 5% για 15min στους 4°C και τέλος σε αιθανόλη 100% για 15min στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Μετά το τέλος της διαδικασίας αυτής, αφέθηκαν να στεγνώσουν στους 72°C για 15min.

Το κάθε κομμάτι χαρτιού τοποθετήθηκε σε δοχείο με 3mL υγρό σπινθηρισμού (quicksafe a, zinsser analytic) και η ραδιενέργεια μετρήθηκε σε αυτόματο αναλυτή (wallac 1409, liquid scintillation counter). Η ραδιενέργεια των δειγμάτων που μετρείται μετά το τέλος της αντίδρασης, προέρχεται από το σύμπλοκο tRNA-γλουταμίνης* που βρίσκεται εγκλωβισμένο στους πόρους του απορροφητικού χαρτιού. Ωστόσο είναι πιθανό μετά τις πλύσεις, να μην έχει απομακρυνθεί ολόκληρη

η ποσότητα της ελεύθερης γλουταμίνης*. Αυτή ακριβώς η τιμή του «θορύβου» μετριέται με τον αρνητικό μάρτυρα και αφαιρείται από την τιμή των δειγμάτων.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στην διάσπαση του πυρήνα του τριτίου. Το τρίτιο είναι ένα ασταθές ισότοπο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο, ένα ηλεκτρόνιο και δύο νετρόνια. Όταν ο πυρήνας του διασπάται, τότε ένα νετρόνιο μετατρέπεται σε πρωτόνιο παράγοντας ένα ισότοπο ηλίου και απελευθερώνονται ένα αρνητικά φορτισμένο σωματίδιο μικρής μάζας, που ονομάζεται β-σωματίδιο, και ένα μη φορτισμένο σωματίδιο μικρής μάζας που ονομάζεται νεutrίνο. Η κινητική ενέργεια που αποκτά κάθε β-σωματίδιο, εξαρτάται από τη μάζα του και τη ταχύτητα που αποκτά μετά τη διάσπαση. Με αυτό τον τρόπο κάθε β-σωματίδιο έχει ενέργεια η οποία είναι χαρακτηριστική για το ισότοπο από το οποίο προέρχεται.

Στην ανίχνευση με σπινθηρισμό, το ραδιοϊσότοπο διαλύεται σε οργανικό διαλύτη που περιέχει μια αρωματική ένωση (το υγρό σπινθηρισμού). Όταν συμβεί μια διάσπαση, το β-σωματίδιο που παράγεται προσκρούει σε ένα ηλεκτρόνιο του υγρού αυτού και το διεγείρει. Το ηλεκτρόνιο τότε επιστρέφει στην προηγούμενη ενεργειακή του κατάσταση παράγοντας ένα φωτόνιο ενέργειας ίσης με την κινητική ενέργεια του β-σωματιδίου. Η συνολική ενέργεια όλων των φωτονίων που παράγονται, ισοδυναμεί με το ποσό του ραδιοϊσοτόπου του δείγματος. Ο αυτόματος αναλυτής, μέσω φωτοπολλαπλασιαστών, ενισχύει το σήμα και το ανιχνεύει. Η τιμή που υπολογίζεται, ισούται με τον αριθμό των «λάμπσεων» (κρούσεων ή χτύπων) το λεπτό (counts per minute, CPM).

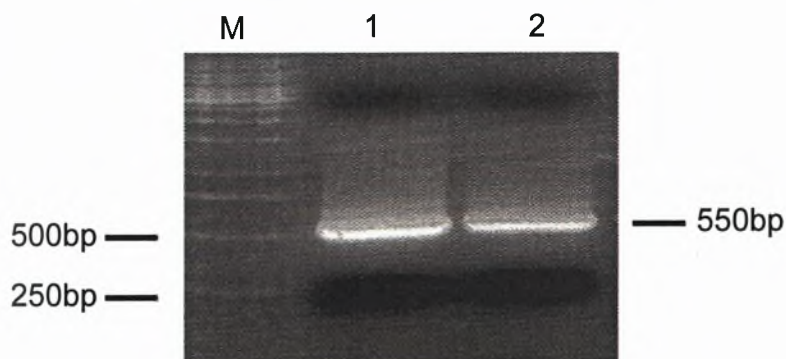
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου της πρωτεΐνης L25 από τον οργανισμό *Helicobacter pylori* στον πλασμιδιακό φορέα pET-11a, για την παραγωγή της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης.

Προκειμένου να γίνουν πειράματα που αφορούσαν στη λειτουργική ομοιότητα της πρωτεΐνης L25 με την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της γλουταμίνης, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET-11a. Η υπερπαραγόμενη πρωτεΐνη καθαρίζεται στη συνέχεια με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

Έτσι, σχεδιάστηκαν δύο ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές στην αντίδραση PCR. Ο ένας εκκινητής (5'), περιέχει την ακολουθία αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού Nde I και ο άλλος, (3'), για το ένζυμο BamH I. Η ακολουθία των εκκινητών, καθώς και οι συνθήκες της PCR, αναφέρονται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

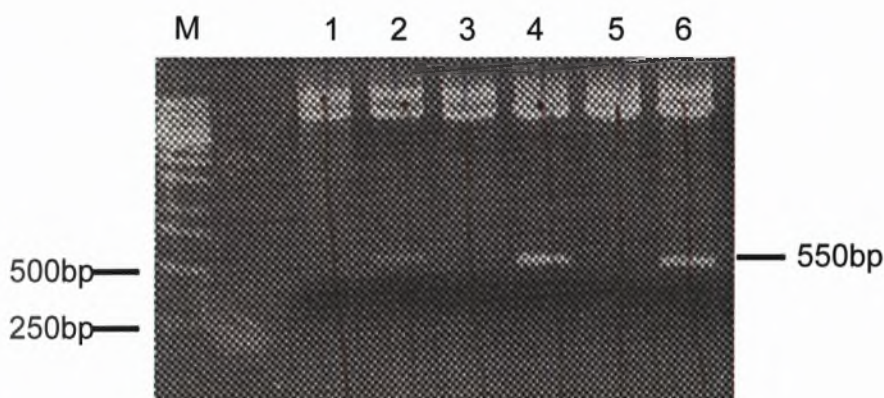
Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Στο σχήμα Γ.16 φαίνεται το προϊόν που προέκυψε στο αναμενόμενο μοριακό μέγεθος, περίπου 550bp.



Εικόνα 21. Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης των αντιδράσεων PCR για το γονίδιο L25. M: μάρτυρες μοριακού μεγέθους, Διαδρομές 1 και 2: Αντίδραση παρουσία εκμαγείου, προϊόν στα ~550 bp.

Η ζώνη του DNA στη διαδρομή 1 εκχυλίστηκε από την πηκτή αγαρόζης και στη συνέχεια ακολούθησε καθαρισμός με το σύστημα Gel Extraction Kit, (βλέπε παράγραφο 3.2.3.). Το DNA τμήμα που απομονώθηκε, επώαστηκε στη συνέχεια με τα ένζυμα περιορισμού Nde I και BamH I. Με τα ίδια ένζυμα επώαστηκε και το πλασμίδιο pET-11a. Μετά το τέλος της επώασης, τόσο το γονίδιο της L25, όσο και ο φορέας, καθαρίστηκαν με το PCR Purification Kit, (βλέπε παράγραφο 3.2.2.). Ο

φορέας επωάστηκε με το ένζυμο SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) ώστε να αποφοσφωρυλιωθεί. Ακολούθησε η αντίδραση της DNA λιγάσης, χρησιμοποιώντας το Rapid DNA Ligation Kit. Στη συνέχεια, έγινε εισαγωγή του φορέα pET-11a σε επιδεκτικά κύτταρα *E. coli* XL1, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.6. Τα μετασχηματισμένα πλέον κύτταρα, αναπτύχθηκαν στους 37°C σε στερεό υπόστρωμα LB και άγαρ, παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνης, στο οποίο παρουσιάζει ανθεκτικότητα το συγκεκριμένο πλασμίδιο, (pET-11a). Από τις αποικίες που προέκυψαν, προκειμένου να βρεθούν οι θετικές που φέρουν τον αναμενόμενο ανασυνδυασμένο φορέα, έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας kit της εταιρείας Qiagen (mini prep) (βλέπε παράγραφο 3.2.7.). Το DNA που απομονώθηκε από κάθε αποικία, επωάστηκε με τα ένζυμα περιορισμού Nde I και BamH I, προκειμένου να διαπιστωθούν οι θετικοί κλώνοι, από την ύπαρξη του αναμενόμενου τμήματος DNA στα 550bp, που αντιστοιχεί στο DNA της L25.

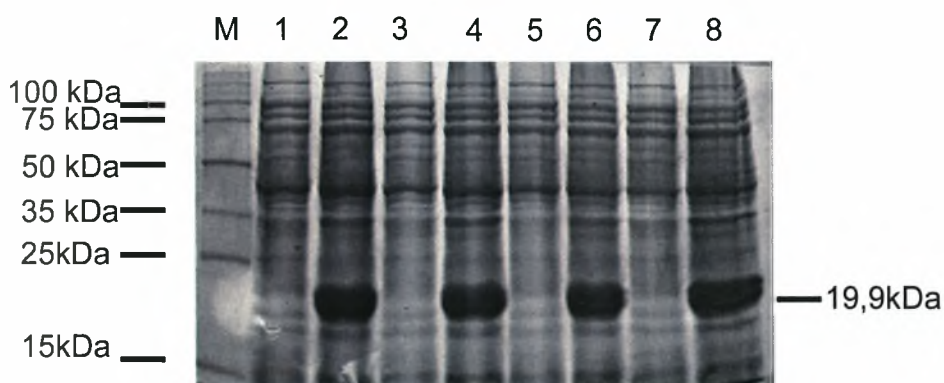


Εικόνα 22. Έλεγχος αποικιών για την ύπαρξη του ανασυνδυασμένου γονιδίου της L25. M: Μάρτυρες μοριακών βαρών. 1-6: Αποικίες βακτηρίων που σχηματίστηκαν μετά τη καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο LB και άγαρ μαζί με αμπικιλίνη. Το πλασμίδιο περιέχει γονίδιο αντίστασης στο αντιβιοτικό. Τα πλασμίδια των αποικιών 2, 4 και 6 περιέχουν το γονίδιο της L25.

4.2. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-11a-L25 για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης L25

Για την υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης L25, χρησιμοποιήθηκαν επιδεκτικά κύτταρα BL21(DE3). Ο μετασχηματισμός των κυττάρων αυτών με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET11a-L25, έγινε σύμφωνα με την τεχνική που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.6. Προηγουμένως έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας kit της εταιρείας Qiagen (mini prep) (βλέπε παράγραφο 3.2.7.).

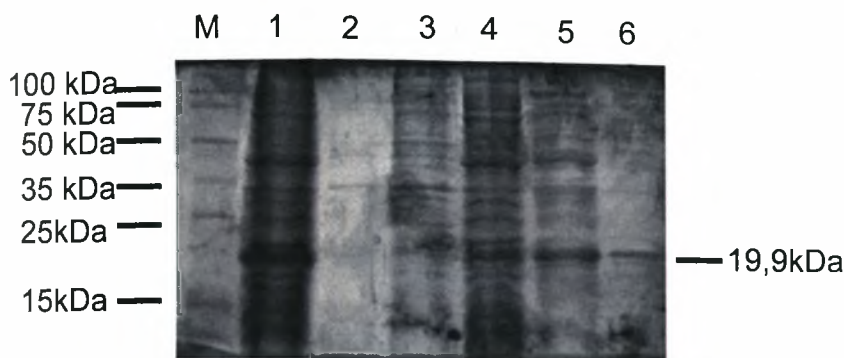
Η διαδικασία της υπερέκφρασης είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.8. Ελήφθη 1ml δείγματος πριν την επαγωγή και μετά το τέλος αυτής. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με heat shock όπως περιγράφηκε στη παράγραφο 3.2.13.1. και ακολούθησε η παραλαβή των κυτταρικών εκχυλισμάτων και η ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή SDS-PAGE 12% w/v. Στην εικόνα 23 φαίνεται η υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης L25.



Εικόνα 23. SDS-ηλεκτροφόρηση των ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) μετασχηματισμένων με pET11a-L25
Κύτταρα *E. coli* BL21(DE3), με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET11a-L25, αναπτύχθηκαν απουσία και παρουσία του IPTG. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα που προέκυψαν, ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE 12% w/v.
Διαδρομές 1,3,5 και 7: δείγμα πριν την προσθήκη IPTG σε απορρόφηση 0.6, Διαδρομές 2,4,6 και 8: δείγμα μετά την προσθήκη IPTG και επώαση για 3 ώρες στους 37°C, προϊόν L25 στα 19,9 kDa,

4.3. Κλασματική κατακρήμνιση με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Τα κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) που περιείχαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-11a-L25 συλλέχθηκαν, μετά την υπερέκφραση, με φυγοκέντρηση και όπως αναφέρεται πιο πάνω, “λύθηκαν” με υπερήχους όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.13.2 και ακολούθησε η παραλαβή του ολικού εκχυλίσματος. Η “λύση” των κυττάρων έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 20mM Tris-HCl pH 7.5, 0.8M NaCl, 0.1% β-μερκαπτοαιθανόλη και 0.2% αναστολείς πρωτεασών (PMSF). Κατόπιν, το κυτταρικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε κλασματική κατακρήμνιση με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (βλέπε παράγραφο 3.2.14.) και τα ιζήματα αιωρήθηκαν στο διάλυμα “λύσης”. Η πρωτεϊνική τους σύσταση ελέγχθηκε με SDS-ηλεκτροφόρηση 12% w/v.



Εικόνα 24. SDS-ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων από την κατακρήμνιση με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ολικό κυτταρικό εκχύλισμα από *E. coli* BL21(DE3) συνολικής καλλιέργειας 50mL, που περιείχαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET11a-L25 υποβλήθηκε σε κλασματική κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο. Τα κλάσματα που προέκυψαν ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE 12% w/v.

M: πρωτεϊνικοί μάρτυρες των οποίων το μοριακό μέγεθος φαίνεται αριστερά σε kDa, Διαδρομή 1: δείγμα μετά την προσθήκη IPTG και επώαση για 3 ώρες στους 37°C, προϊόν L25 στα 19,9 kDa, Διαδρομή 2: δείγμα από το κλάσμα 0-20% θειικό αμμώνιο, Διαδρομή 3: δείγμα από το κλάσμα 20-40% θειικό αμμώνιο, Διαδρομή 4: δείγμα από το κλάσμα 40-60% θειικό αμμώνιο, Διαδρομή 5: δείγμα από το κλάσμα 60-80% θειικό αμμώνιο, Διαδρομή 6: δείγμα από το τελικό υπερκείμενο της κατακρήμνισης,

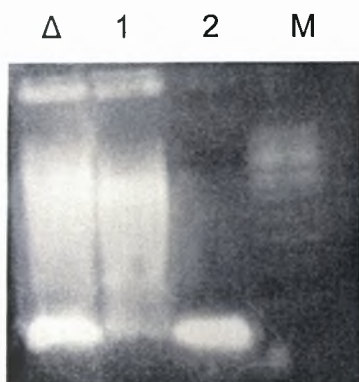
Τόσο τα αιωρημένα ιζήματα, όσο και το τελικό υπερκείμενο της κατακρήμνισης με θειικό αμμώνιο διαπιδύθηκαν, έναντι διαλύματος που περιείχε 20mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl.

Όπως φαίνεται από το παραπάνω σχήμα, η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται κυρίως στα κλάσματα 60-80% θειικό αμμώνιο καθώς και στο τελικό υπερκείμενο. Είναι εμφανές πως από όλα τα κλάσματα, αυτό με τον κορεσμό 60-80% με θειικό αμμώνιο περιέχει το μεγαλύτερο ποσό της L25, όμως το κλάσμα του τελικού υπερκειμένου περιέχει τις λιγότερες από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες από τις οποίες θέλουμε να την καθαρίσουμε. Για αυτόν το λόγο το τελευταίο κλάσμα χρησιμοποιήθηκε για τον περαιτέρω καθαρισμό.

4.4. Απομάκρυνση των νουκλεϊκών οξέων

Σε όλη τη διαδικασία μέχρι στιγμής τα νουκλεϊκά οξέα δεν έχουν απομακρυνθεί. Η απομάκρυνσή τους μπορεί να γίνει με χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής, καθώς φέρουν αρνητικό φορτίο. Η απομάκρυνση όμως του 5S rRNA μόνο με ιοντική ανταλλαγή είναι αδύνατη, καθώς η L25 ως ριβοσωμική πρωτεΐνη της μεγάλης υπομονάδας, δεσμεύεται σε αυτό πολύ ισχυρά. Προκειμένου να πάρουμε τελικά την L25 σε καθαρή μορφή και όχι σε σύμπλεγμα με το 5S rRNA, πραγματοποιήθηκε πέψη με ριβονουκλεάση A σε τελική συγκέντρωση 20μg/mL. Για

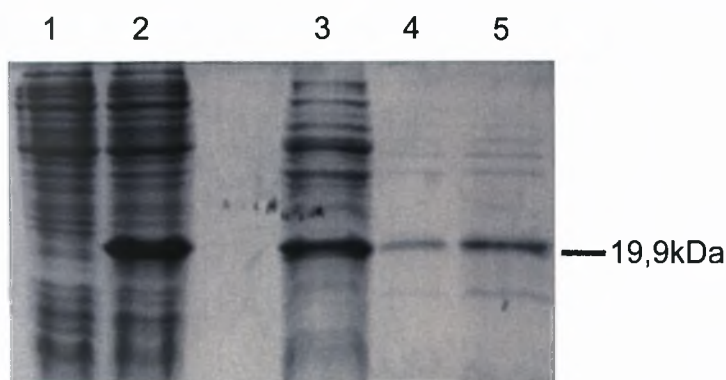
να γίνει ευκολότερη η απομάκρυνση του DNA, το δείγμα επωάζεται με δεοξυριβονουκλεάση (10U/mL).



Εικόνα 25. Απομάκρυνση νουκλεϊκών οξέων. Το δείγμα (Δ) περιέχει μεγάλη ποσότητα τόσο DNA όσο και RNA. Διαδρομές 1 και 2: Επώαση με ριβονουκλεάση A (RNase) και δεοξυριβονουκλεάση (DNase), αντίστοιχα. M: Μάρτυρες μοριακών βαρών.

4.5. Καθαρισμός με στήλες ιοντοανταλλαγής (DEAE-Sepharose, CM-Sepharose)

Κύτταρα συνολικής καλλιέργειας 10L στα οποία είχε γίνει η υπερέκφραση της πρωτεΐνης L25, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και ακολούθησε λύση, σύμφωνα με τη μέθοδο στην παράγραφο 3.2.13.2. Το διάλυμα λύσης ήταν πάλι 20mM Tris-HCl pH 7.5, 0.8M NaCl, 0.1% β-μερκαπτοαιθανόλη και 0.2mM αναστολείς πρωτεασών (PMSF). Ακολούθησε κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.14. Τα ιζήματα επαναδιαλύθηκαν στο διάλυμα λύσης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 26.



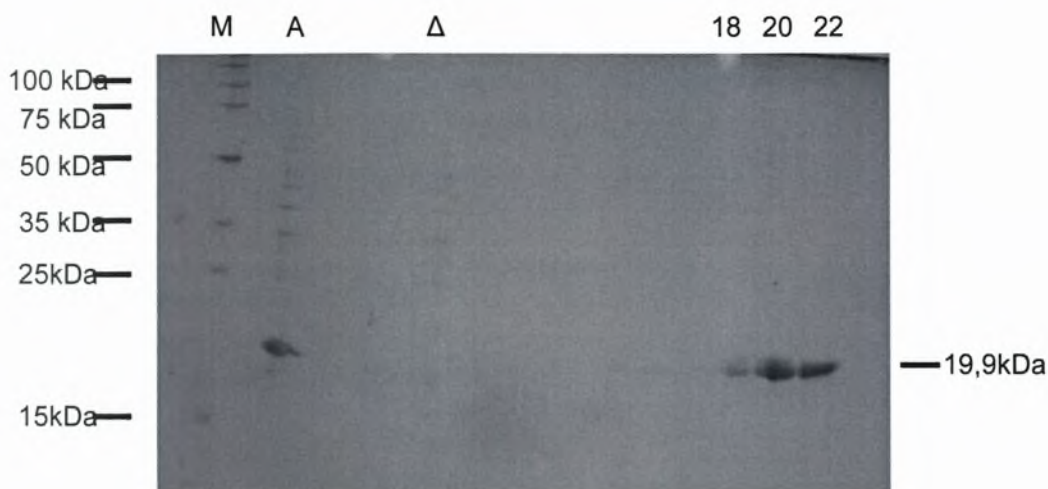
Εικόνα 26. SDS-ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων από την κατακρήμνιση με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ολικό κυτταρικό εκχύλισμα από *E. coli* BL21(DE3) συνολικής καλλιέργειας 10L, που περιείχαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET11a-L25 υποβλήθηκε σε κλασματική

κατακρήμιση με θειικό αμμώνιο. Τα κλάσματα που προέκυψαν ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE 12% w/v.

M: πρωτεϊνικοί μάρτυρες. Διαδρομή 1: δείγμα πριν την προσθήκη IPTG, Διαδρομή 2: δείγμα μετά την προσθήκη IPTG και επώαση για 3 ώρες στους 37°C, προϊόν L25 στα 19,9 kDa, Διαδρομή 3: δείγμα από το κλάσμα 60-80% θειικό αμμώνιο, Διαδρομή 4: δείγμα από το τελικό υπερκείμενο της κατακρήμισης, Διαδρομή 5: δείγμα από συμπύκνωση 9 φορές του τελικού υπερκειμένου της κατακρήμισης με 50% TCA.

Ακολουθούν δύο διαδοχικές διαπιδύσεις του τελικού υπερκειμένου, έναντι διαλύματος 20mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl ώστε να ελαχιστοποιηθεί η συγκέντρωση της θειικού αμμωνίου.

Το διαπιδυμένο δείγμα του υπερκειμένου της κατακρήμισης με θειικό αμμώνιο, που στη συνέχεια επώαστηκε με δεοξυριβονουκλεάση και ριβονουκλεάση A, επιστοιβάχθηκε σε στήλη ιοντοανταλλαγής DEAE-Sepharose, εξισοροπημένη στο ίδιο διάλυμα με το διάλυμα διαπίδυσης (20mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl). Η έκλουση έγινε με διαβαθμισμένη συγκέντρωση NaCl από 0.5M-1.5M σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.15. Η στήλη ως θετικά φορτισμένη, αναμένεται να κατακρατήσει τα ολιγονουκλεοτίδια του DNA και του RNA, καθώς επίσης και τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες σε pH 7.5. Το ισοηλεκτρικό σημείο της L25 είναι 9.41 που σημαίνει πως σε pH 7.5 (ουδέτερο pH), θα είναι θετικά φορτισμένη και άρα δεν θα κατακρατηθεί από τη στήλη αλλά θα διέλθει από αυτήν. Το διερχόμενο της στήλης DEAE-Sepharose απαλλαγμένο από νουκλεϊκά οξέα, όπως επίσης και από τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες, επιστοιβάζεται σε στήλη ιοντοανταλλαγής CM-Sepharose, η οποία έχει προηγουμένως εξισοροπηθεί επίσης σε διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl. Αναλυτικά η μέθοδος περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.15. Η έκλουση των κλασμάτων έγινε με διάλυμα NaCl διαβαθμισμένης συγκέντρωσης 50mM-1.5M. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα. Τα κλάσματα 13-28 ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη μέθοδο Bradford η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του δείγματος. Αυτή βρέθηκε να είναι 1,07mg/mL. Ο συνολικός όγκος του δείγματος μετά τη συμπύκνωση ήταν 3mL. Το δείγμα φυλάχθηκε σε 10 tubes στους -20°C.



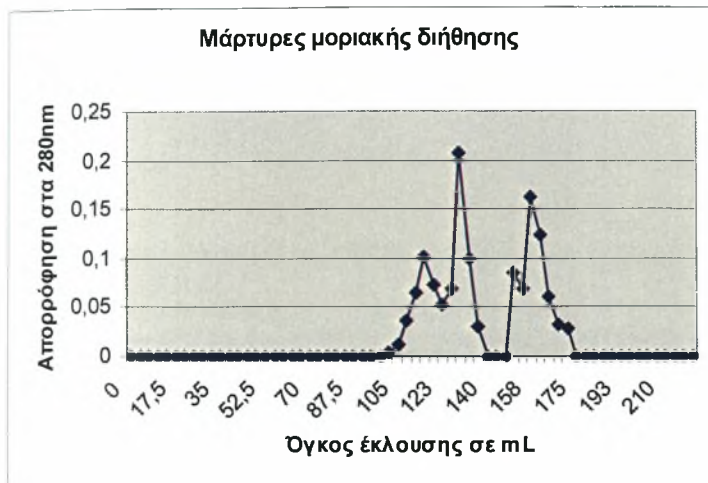
Εικόνα 27. SDS-PAGE 12% w/v κλασμάτων μετά από τη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Α: Αρχικό δείγμα. Δ: Διερχόμενο της στήλης CM-Sephagrose. Διαδρομές 18, 20 και 28: Αντίστοιχα κλάσματα που συλλέχθηκαν κατά τη διαδικασία και περιέχουν την L25 σε καθαρή μορφή.

4.6. Καθαρισμός με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Sephadex G-75 Surefine)

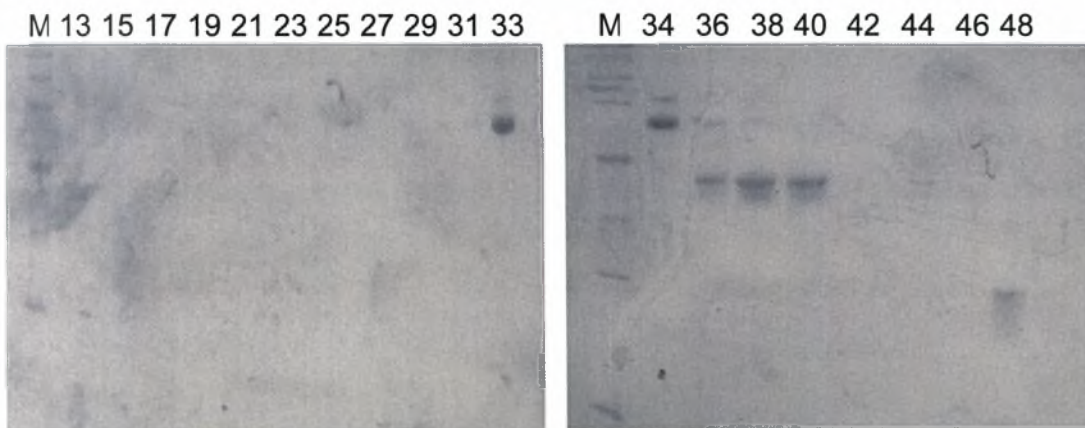
Προκειμένου να είμαστε σε θέση να καταλάβουμε τη σχέση του μεγέθους των πρωτεϊνών με τον όγκο της έκλουσης, ετοιμάζουμε διάλυμα πρωτεϊνικών μαρτύρων γνωστού μοριακού βάρους. Ως πρωτεϊνικοί μάρτυρες επελέγησαν η αλβουμίνη βόειου ορού, η οβαλβουμίνη και το κυτόχρωμα C, ενώ το πέρας της χρωματογραφίας έγινε ορατό με τη χρήση χρωμοφόρου (διχρωμικό κάλιο, $K_2Cr_{12}O_7$). Κατά αυτόν τον τρόπο, το διάλυμα των μαρτύρων που ετοιμάστηκε είχε συγκέντρωση 2mg/mL από κάθε συστατικό. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πρωτεΐνη	Μοριακό βάρος
Αλβουμίνη βόειου ορού	67000
Οβαλβουμίνη	43000
Κυτόχρωμα C	12000

Τα κλάσματα που περιέχουν τις πρωτεΐνες-μάρτυρες φωτομετρούνται στα 280nm και μετρείται ο όγκος τους. Τα δεδομένα επεξεργάζονται και σχεδιάζεται το παρακάτω διάγραμμα όγκου-απορρόφησης που θα μας βοηθήσει στον υπολογισμό του όγκου στον οποίο θα εκλουστεί η L25. Αυτός υπολογίζεται στα 148ml περίπου.

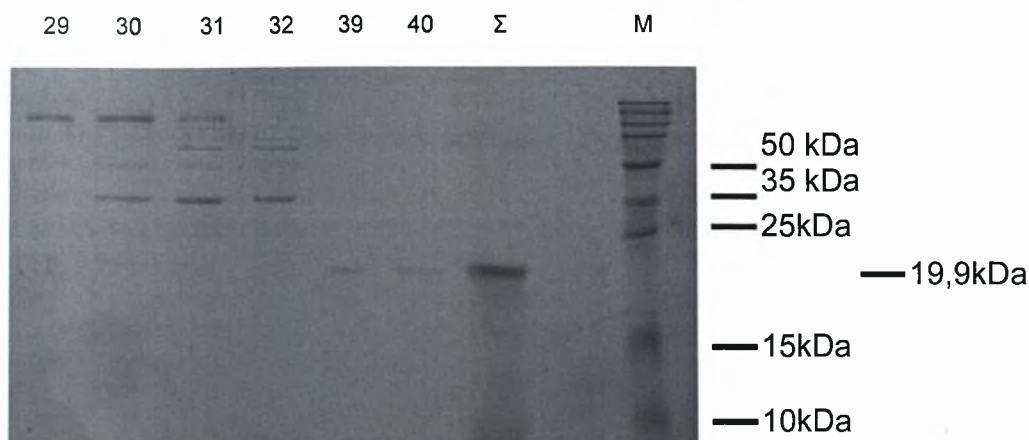


Διάγραμμα 1. Τα κλάσματα της χρωματογραφίας που περιέχουν πρωτεϊνικούς μάρτυρες φωτομετρούνται και μετράται ο όγκος τους. Οι τρεις κορυφές που διακρίνονται αντιστοιχούν κατά σειρά στις αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) με MB 67000, οβαλβουμίνη με MB 43000, κυτόχρωμα C με MB 12000. Από τα δεδομένα αυτά υπολογίζεται πως η L25 με MB 19879 θα εκλουστεί περίπου στα 148ml.



Εικόνα 28. SDS-PAGE 12% w/v των κλασμάτων της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης που περιέχουν πρωτεΐνες ως μάρτυρες. M: πρωτεϊνικοί μάρτυρες. Διαδρομές 13-48: Αντίστοιχα κλάσματα που συλλέχθηκαν από την στήλη Sephadex G-75 Superfine που περιείχε πρωτεΐνες γνωστών μοριακών βαρών που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του όγκου στον οποίο αναμένεται να εκλουστεί η L25. Κλάσματα 33 και 34: Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), MB 67000. Κλάσματα 36-40: Οβαλβουμίνη, MB 43000. Κλάσμα 48: Κυτόχρωμα c, MB 12000.

Φορτώνονται στη στήλη μοριακής διήθησης 5mL συμπυκνωμένου διαλύματος πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές προέρχονται από το διερχόμενο της ιοντοανταλλακτικής στήλης DEAE-Sepharose. Η μέθοδος περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.16.

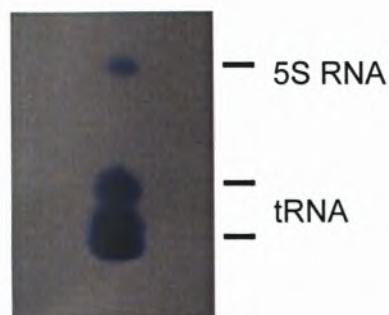


Εικόνα 29. SDS-PAGE 12%w/v κλασμάτων της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. M: Πρωτεϊνικοί μάρτυρες. Διαδρομές 29-40: Αντίστοιχα κλάσματα που συλλέχθηκαν από την στήλη Sephadex G-75 Superfine που περιείχε 5ml δείγματος. Η L25 εκλούστηκε στα κλάσματα 39 και 40. Σ: Συμπύκνωμα των κλασμάτων 39 και 40 σε τελικό όγκο 2,6ml.

Τα κλάσματα 39 και 40 ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη μέθοδο Bradford η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του δείγματος. Αυτή βρέθηκε να είναι 0.135μg/mL. Ο συνολικός όγκος του δείγματος μετά τη συμπύκνωση ήταν 2.6mL. Το δείγμα φυλάχθηκε σε 8 tubes στους -20°C.

4.7. Απομόνωση ολικού tRNA σε μεγάλη κλίμακα (Large scale tRNA extraction).

Κύτταρα *E. coli* XL1 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό LB, έως η συνολική τους μάζα να φτάσει τα 5g. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για να απομονωθεί ολικό tRNA σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.18 το οποίο θα χρειαστεί στη δοκιμή αμινοακυλίωσης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω σχήμα. Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίστηκε φωτομετρικά στο 260nm και βρέθηκε να είναι 2287g/L ή 0.09M.



Εικόνα 30. Απομόνωση ολικού tRNA από καλλιέργεια 5g κυττάρων. Το tRNA χωρίζεται χαρακτηριστικά σε δύο ζώνες. Η τεχνική δεν είναι ικανή να απομακρύνει πολύ μικρά μόρια νουκλεϊκών οξέων όπως για παράδειγμα το 5S RNA.

4.8. Ενζυμική δοκιμή αμινοακυλίωσης (Aminoacylation assay)

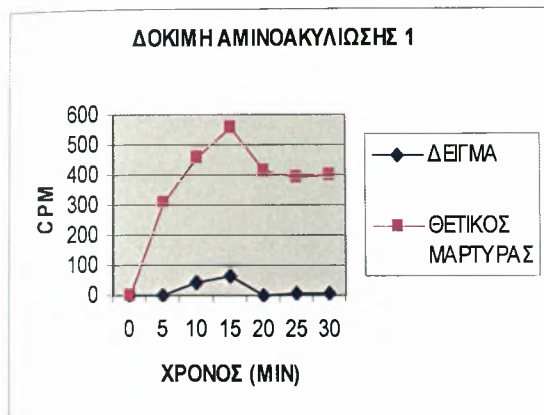
Η L25 υποβλήθηκε σε δοκιμή αμινοακυλίωσης για να διαπιστωθεί αν έχει δράση αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης σύμφωνα με τη παράγραφο 3.2.19. Σε κάθε δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε μείγμα ραδιενεργής και μη ραδιενεργής γλουταμίνης σε αναλογία 1:1 v/v, τελικής συγκέντρωσης 0.5mM. Σε απορροφητικό χαρτί whatman διαμέτρου 3mm, εμποτίζονται διαδοχικά 2,5,10 και 20μL διαλύματος Gln (mix). Χωρίς να γίνουν πλύσεις με TCA, μετρίεται η ραδιενέργειά τους έτσι ώστε να γνωρίζουμε με ακρίβεια το ποσό που προστίθεται στο μείγμα της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4. Απ'ευθείας μετρήσεις σε αναλυτή υγρού σπινθηρισμού των χτύπων ανά λεπτό που αποδίδει το μείγμα γλουταμίνης.

Gln (mix)	CPM
2μL	116.100
5μL	284.389
10μL	552.090
20μL	1.075.885

Με την ίδια διαδικασία, έγιναν αρκετές δοκιμές αμινοακυλίωσης με διαφορετικές κάθε φορά συγκεντρώσεις υποστρώματος (tRNA) και ενζύμου (L25). Τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω σχήματα. Κάθε δοκιμή αμινοακυλίωσης περιλάμβανε και έναν αρνητικό μάρτυρα από τον οποίο απουσίαζε tRNA καθώς και ένζυμο (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Η τιμή της μέτρησης που προέκυπτε κάθε φορά, αφαιρούνταν από τη τιμή του δείγματος.

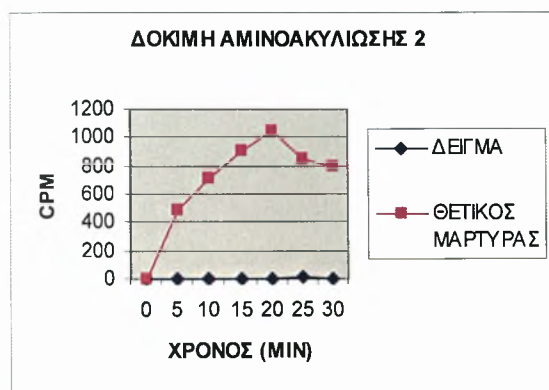
Πίνακας 5. Συνθήκες δοκιμής αμινοακυλίωσης



Διάγραμμα 1. Οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον διπλανό πίνακα

	ΔΕΙΓΜΑ	ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ
Tris-HCl pH 7,2	14 μ L	14 μ L
KCl	4,2 μ L	4,2 μ L
MgCl ₂	16,8 μ L	16,8 μ L
ATP	28 μ L	28 μ L
Gln (mix)	28 μ L	28 μ L
tRNA	4 μ L	4 μ L
L25	7 μ L	-
Crude extract	-	7 μ L
H ₂ O	38 μ L	38 μ L
Συνολικός όγκος	140 μ L	140 μ L

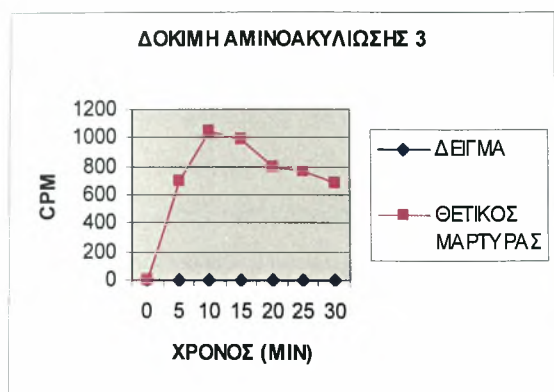
Πίνακας 6. Συνθήκες δοκιμής αμινοακυλίωσης



Διάγραμμα 2. Οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον διπλανό πίνακα

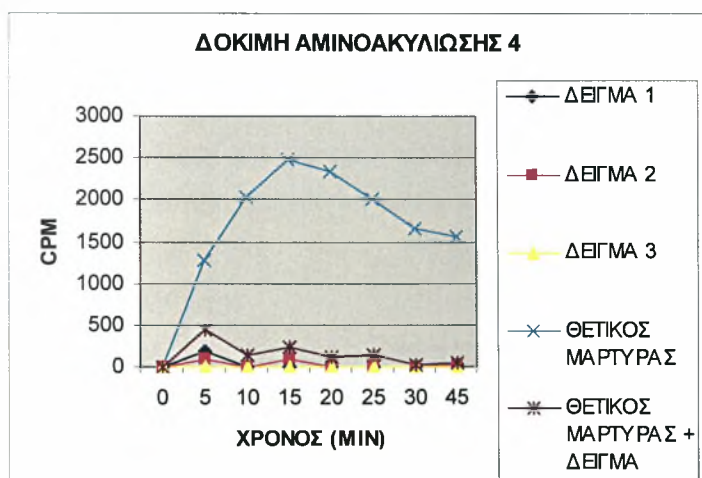
	ΔΕΙΓΜΑ	ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ
Tris-HCl pH 7,2	14 μ L	14 μ L
KCl	4,2 μ L	4,2 μ L
MgCl ₂	16,8 μ L	16,8 μ L
ATP	28 μ L	28 μ L
Gln (mix)	35 μ L	35 μ L
tRNA	8 μ L	8 μ L
L25	10 μ L	-
Crude extract	-	10 μ L
H ₂ O	24 μ L	24 μ L
Συνολικός όγκος	140 μ L	140 μ L

Πίνακας 7. Συνθήκες δοκιμής αμινοακυλίωσης 3.



Διάγραμμα 3. Οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον διπλανό πίνακα

	ΔΕΙΓΜΑ	ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ
Tris-HCl pH 7,2	14 μ L	14 μ L
KCl	4,2 μ L	4,2 μ L
MgCl ₂	16,8 μ L	16,8 μ L
ATP	28 μ L	28 μ L
Gln (mix)	35 μ L	35 μ L
tRNA	16 μ L	16 μ L
L25	10 μ L	-
Crude extract	-	10 μ L
H ₂ O	16 μ L	16 μ L
Συνολικός όγκος	140 μ L	140 μ L



Πίνακας 8. Συνθήκες δοκιμής αμινοακυλίωσης 4.

	ΔΕΙΓΜΑ 1	ΔΕΙΓΜΑ 2	ΔΕΙΓΜΑ 3	ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ + ΔΕΙΓΜΑ
Tris-HCl pH 7,2	20	20	20	20	20
KCl	6	6	6	6	6
MgCl ₂	24	24	24	24	24
ATP	40	40	40	40	40
Gln (mix)	35	35	35	35	35
tRNA	30	30	30	30	30
L25	10	20	40	-	20
Crude extract	-	-	-	10	10
H ₂ O	35	25	5	35	15
Συνολικός όγκος	200	200	200	200	200

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η κλωνοποίηση του γονιδίου της L25 ριβοσωμικής πρωτεΐνης του *Helicobacter pylori* και στη συνέχεια η υπερπαραγωγή της και ο καθαρισμός της. Τέλος η υψηλή δομική ομοιότητα που παρουσίαζε με τμήμα της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της γλουταμίνης, ήταν η αφορμή για να ερευνηθεί για το αν διαθέτει την συγκεκριμένη ενζυμική δράση.

Η πορεία για την απομόνωση της πρωτεΐνης περνάει μέσα από πολλά στάδια διαδοχικού καθαρισμού, κάθε ένα από τα οποία πρέπει να είναι προσεκτικά μελετημένα έτσι ώστε η πρωτεΐνη στο τέλος της διαδικασίας να έχει διατηρήσει τη δομική και λειτουργική της ακεραιότητα. Οι μέθοδοι που θα ακολουθηθούν λοιπόν πρέπει να είναι μη καταστρεπτικές και όλοι οι χειρισμοί και τα ρυθμιστικά διαλύματα πρέπει να επιλεγούν προσεκτικά έτσι ώστε σε κάθε βήμα να έχουμε τις ελάχιστες απώλειες.

Όσον αφορά την κλωνοποίηση, εισάχθηκε γονίδιο προκαρυωτικής ριβοσωμικής πρωτεΐνης σε άλλο προκαρυωτικό οργανισμό. Αν και πρόκειται για ετερόλογο ανασυνδυασμό (γονίδιο της L25 από το *Helicobacter pylori* στο *Escherichia coli*), το γεγονός πως η προέλευση είναι βακτηριακή, δεν αναμένεται να προκαλέσει προβλήματα επιβίωσης λόγω τοξικότητας στα κύτταρα *E. coli*.

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης περιελάμβανε την κλασματική κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο, την χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

Η κλασματική κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο διαχωρίζει τις πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας υψηλές συγκεντρώσεις ενός άλατος με υψηλή ιοντική ισχύ που ανάλογα με τον κορεσμό του διαλύματος με θειικό αμμώνιο κατακρημνίζονται και διαφορετικές πρωτεΐνες. Στην εικόνα 24 παρατηρούμε πως σε κορεσμό 80% με θειικό αμμώνιο ένα μεγάλο μέρος της L25 βρίσκεται διαλυμένη ενώ η συντριπτική πλειοψηφία των υπόλοιπων πρωτεϊνών του κυτταρικού περιεχομένου έχουν κατακρημνιστεί. Πολύ λίγες πρωτεΐνες παραμένουν διαλυτές μαζί με την L25 γεγονός που στο εξής θα διευκολύνει τον καθαρισμό της.

Μέχρι εκείνο το σημείο τα νουκλεϊκά οξέα δεν είχαν απομακρυνθεί από το δείγμα. Για να γίνει αυτό πραγματοποιείται επώαση με δεοξυριβονουκλεάση I και ριβονουκλεάση A για 30 λεπτά στους 37°C. Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως η L25 δεσμεύεται στο 5S RNA. Μετά την απομάκρυνση των νουκλεϊκών οξέων από το δείγμα γίνεται εμφανές ένα σημαντικό γεγονός που επηρεάζει την όλη διαδικασία στο εξής. Το 5S RNA κατά την δέσμευση του στην L25, την προστατεύει από υδρόλυση. Όπως φαίνεται καθαρά στην εικόνα 29 η μετά την διαδικασία αυτή αρχίζει να

υδρολύεται ταχύτατα και η συγκέντρωσή της μειώνεται δραματικά και για να κρατηθεί σε ικανοποιητικά επίπεδα πρέπει το δείγμα να συμπυκνωθεί.

Στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής η στήλη DEAE-Sepharose συγκρατεί τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες και όσα νουκλεϊκά οξέα δεν απομακρύνθηκαν προηγουμένως ενώ η CM-Sepharose συγκρατεί τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες. Κάθε φορά το διάλυμα έκλουσης που παρέχει διαβαθμισμένη συγκέντρωση NaCl έχει μεγάλη ιοντική ισχύ έτσι ώστε να αποδεσμεύσει τις πρωτεΐνες από τη στήλη αλλά όχι τόσο μεγάλη ώστε να τις κατακρημνίσει σε μορφή ιζήματος

Τέλος η χρωματογραφία μοριακής διήθησης που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες βάσει μεγέθους έχει μικρή απόδοση δηλαδή το ποσό της πρωτεΐνης που συλλέγεται στα κλάσματα είναι μικρό καθώς ένα μέρος της εγκλωβίζεται στα πορώδη σωματίδια του υλικού της στήλης. Ωστόσο, η στήλη έχει καλή διαχωριστική ικανότητα, δηλαδή κάθε κλάσμα περιέχει πρωτεΐνες πολύ στενού εύρους μοριακών βαρών. Με αυτόν τον τρόπο κάθε κλάσμα αναμένεται να περιέχει μία πρωτεΐνη. Αυτό συμβαίνει όχι μόνο λόγω καλής διαχωριστικής ικανότητας της στήλης, αλλά και επειδή έχουν προηγηθεί και άλλα στάδια καθαρισμού. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση δύο πρωτεϊνών που προσθέσαμε σε προηγούμενο σημείο και τώρα πρέπει να απομακρυνθούν. Πρόκειται για την δεοξυριβονουκλεάση I (DNase I) και την ριβονουκλεάση A (RNase A) με αντίστοιχα μοριακά βάρη 30,1kDa και 13,7kDa. Από αυτές τις δύο πρωτεΐνες, η ριβονουκλεάση A είναι αυτή που αν παραμείνει στο δείγμα θα αποτελέσει πρόβλημα, καθώς στη δοκιμή αμινοακυλίωσης θα καταστρέψει το tRNA. Από την στήλη της μοριακής διήθησης όμως, θα εκλουστεί σε διαφορετικό κλάσμα από την L25, η οποία έχει όπως έχουμε αναφέρει μοριακό βάρος 19,9kDa. Η RNase A λόγω του μικρότερου μοριακού της βάρους (13,7kDa), παραμένει περισσότερο χρόνο στη στήλη καθώς εισέρχεται μέσα στους μικρότερους πόρους του υλικού Sephadex. Το γεγονός πως η L25 είναι καθαρή φαίνεται στην εικόνα 29 όπου και μετά την συμπύκνωση, δεν εμφανίζονται άλλες ζώνες. Αντίθετα στην διαδρομή αυτή γίνεται εμφανές η μεγάλη υδρόλυση της L25 μετά από την απομάκρυνση των νουκλεϊκών οξέων που έχει προαναφερθεί.

Ερχόμαστε τώρα στη δοκιμή αμινοακυλίωσης. Ένα πρώτο σχόλιο που μπορεί να γίνει κοιτώντας τα πειραματικά δεδομένα, είναι το ότι χρησιμοποιήθηκε πολύ μεγάλη ποσότητα ραδιοσημασμένης γλουταμίνης σε κάθε δοκιμή. Αυτό το γεγονός φαίνεται με αριθμούς στον πίνακα 1 στη σελίδα ... Το ποσό της ραδιενέργειας το οποίο εισάγεται στα δείγματα είναι πάρα πολύ μεγάλο. Αυτό συμβαίνει επειδή στον θετικό μάρτυρα δεν υπάρχει καθαρή GlnRS αλλά έχει χρησιμοποιηθεί crude extract (πρωτεϊνικό εκχύλισμα) του κυττάρου *E. coli* στο οποίο η GlnRS αποτελεί ένα πολύ μικρό ποσοστό της συνολικής πρωτεΐνης. Επειδή η ραδιοσημασμένη γλουταμίνη

όπως όλα τα ραδιοσημασμένα μόρια έχει την ιδιότητα να προσδένεται μη ειδικά σε άλλα μόρια που δεν αποτελούν στόχους του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε μεγάλη ποσότητα του ραδιοσημασμένου αμινοξέος έτσι ώστε να επαρκέσει για την σύνδεση του στην GlnRS. Βλέποντας τα αποτελέσματα μόνο του θετικού μάρτυρα παρατηρούμε πως η ραδιενέργεια του tRNAGln* που ανιχνεύεται στο τέλος της διαδικασίας είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτή που εισήχθη αρχικά. Αυτό το γεγονός καταδεικνύει την πολύ μεγάλη μη ειδική σύνδεση του ραδιοσημασμένου μορίου. Αυτή ακριβώς η μη ειδική σύνδεση μπορεί να προκαλέσει σφάλματα στις μετρήσεις. Η χρήση όμως αρνητικού μάρτυρα όπως επίσης και μείγματος ραδιοσημασμένης και μη ραδιοσημασμένης γλουταμίνης, ελαχιστοποιεί τα σφάλματα αυτά.

Όπως είναι γνωστό κάθε ένζυμο χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη ικανότητα κατάλυσης. Υπό σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος και αυξανόμενη συγκέντρωση ενζύμου η συγκέντρωση του προϊόντος αυξάνεται. Στις δοκιμές αμινοακυλίωσης και περισσότερο στην τελευταία, παρατηρεί κανείς πως η συγκέντρωση της L25 αυξάνεται από τα 10μl στα 20μl και τελικά στα 40μl χωρίς να αλλάξουν οι υπόλοιπες παράμετροι, όμως δεν παρατηρείται κάποια αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος το οποίο κυμαίνεται σε πάρα πολύ χαμηλά επίπεδα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα.

Αξιοπρόσεχτα είναι τα αποτελέσματα της τελευταίας δοκιμής αμινοακυλίωσης στην οποία εκτός των δειγμάτων και του θετικού μάρτυρα, χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός και των δύο. Αν η L25 παρουσιάζει κάποια ενζυμική δράση η οποία δεν είναι δυνατόν να εκδηλωθεί στις προηγούμενες δοκιμές ίσως λόγω έλλειψης κάποιου συμπαραγόντα, με την προσθήκη ποσότητας κυτταρικού εκχυλίσματος, το πρόβλημα αυτό οφείλει να ξεπεραστεί. Σε μία τέτοια περίπτωση η τιμή του CPM (χτύποι το λεπτό) αναμένεται να είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του θετικού μάρτυρα λόγω εμφάνισης της ενζυμικής δράσης της L25. Η GlnRS του κυτταρικού εκχυλίσματος περιλαμβάνεται και στα δύο δείγματα. Όπως όμως παρατηρείται στα αποτελέσματα, όχι μόνο δεν συνέβη κάτι τέτοιο, αλλά η τιμή των CPM του δείγματος που περιλαμβάνει L25 και GlnRS, είναι μικρότερη από την αντίστοιχη του θετικού μάρτυρα που περιλαμβάνει μόνο GlnRS. Πώς όμως μπορεί η L25 να αναστέλλει τη δράση της GlnRS; Πιθανότατα η L25 ως πρωτεΐνη που δεσμεύει RNA, να μειώνει την συγκέντρωση του υποστρώματος (tRNA) που είναι διαθέσιμο για την GlnRS. Θα πρέπει να τονιστεί πως σε όλες τις δοκιμές αμινοακυλίωσης η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μεγάλη σύμφωνα με τις απαιτήσεις της κινητικής Michaelis-Menten.

Από όλα αυτά τα δεδομένα συμπεραίνεται πως η L25 δεν έχει δράση αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της γλουταμίνης. Το αποτέλεσμα είναι απολύτως λογικό καθώς η L25 εμφανίζει δομική ομοιότητα με μέρος της GlnRS που αντιστοιχεί στην περιοχή δέσμευσης του αντικωδικονίου και όχι του ενεργού κέντρου. Οι μικρές διακυμάνσεις στα διαγράμματα των δοκιμών αμινοακυλίωσης πιθανότατα οφείλονται σε σφάλματα που αποδίδονται σε μη ειδική πρόσδεση της ραδιενεργής γλουταμίνης. Η πτώση των χτύπων ανά λεπτό που παρατηρείται στα διαγράμματα με την πάροδο του χρόνου οφείλεται στον περιορισμένο χρόνο ημιζωής του αμινοακυλιωμένου tRNA. Συγκεκριμένα το tRNA^{Gln}-Gln έχει χρόνο ημιζωής περίπου 9 λεπτά (Hentzen, Mandel et al. 1972).

Εκτός από την γνωστή λειτουργία τους, οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (κυρίως οι ευκαρυωτικές) συμμετέχουν και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα τα εν λόγω ένζυμα εμπλέκονται στη μεταφορά του tRNA από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Simos and Hurt 1999), (AARSs έχουν βρεθεί και στο πυρηνόπλασμα), στη ρύθμιση της μεταγραφής και της μετάφρασης (Francklyn, Musier-Forsyth et al. 1997; Martinis, Plateau et al. 1999), στην αντιγραφή του DNA και στη ρύθμιση της έκφρασης των δικών τους γονιδίων, λειτουργία που έχει μελετηθεί λεπτομερέστατα στα βακτήρια (Putzer, Laalami et al. 1995). Η ύπαρξη λοιπόν μιας ριβοσωμικής πρωτεΐνης με υψηλή δομική ομοιότητα προς τμήμα της GlnRS ίσως να εμπλέκεται και σε άλλες άγνωστες μέχρι τώρα κυτταρικές λειτουργίες. Μάλιστα η υψηλή δομική ομοιότητα της L25 προς την περιοχή δέσμευσης του αντικωδικονίου της GlnRS, ίσως κρύβει μια εξελικτική σχέση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Σίγουρα όμως η ομοιότητα αυτή συνοδεύεται από έλλειψη του γονιδίου της GlnRS στο *H. pylori*, προκαλεί κάτι περισσότερο από απορία. Ωστόσο η λειτουργίες των δύο πρωτεϊνών είναι εντελώς διαφορετικές μεταξύ τους. Η δομή β-βαρελιού της L25 φαίνεται να αναγνωρίζει μη-κανονικά δίκλινα RNA μοτίβα βρόγχων ενώ αυτή του διπλού β-βαρελιού της GlnRS αναγνωρίζει μονόκλινο RNA. Η πολύ μικρή ομολογία στην ακολουθία τους μπορεί να αντιπροσωπεύει τις διαφορετικές προϋποθέσεις για την αναγνώριση των διαφορετικών δομών των RNA. Παρόλα αυτά, παραμένει πιθανό πως υπό το πρίσμα του ριβοσώματος, η L25 μπορεί να συμμετέχει σε επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις με τμήματα RNA με μοτίβο δέσμευσης παρόμοιο με αυτό της GlnRS.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bearden, J. C., Jr. (1978). "Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay." Biochim Biophys Acta **533**(2): 525-9.
- Blaser, M. J. (1987). "Gastric Campylobacter-like organisms, gastritis, and peptic ulcer disease." Gastroenterology **93**(2): 371-83.
- Blaser, M. J. (1990). "Helicobacter pylori and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation." J Infect Dis **161**(4): 626-33.
- Blaser, M. J. (1992). "Hypotheses on the pathogenesis and natural history of Helicobacter pylori-induced inflammation." Gastroenterology **102**(2): 720-7.
- Blaser, M. J. (1997). "Not all Helicobacter pylori strains are created equal: should all be eliminated?" Lancet **349**(9057): 1020-2.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brown, J. R. and W. F. Doolittle (1999). "Gene descent, duplication, and horizontal transfer in the evolution of glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetases." J Mol Evol **49**(4): 485-95.
- Bycroft, M., T. J. Hubbard, et al. (1997). "The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold." Cell **88**(2): 235-42.
- Cavarelli, J., B. Rees, et al. (1993). "Yeast tRNA(Asp) recognition by its cognate class II aminoacyl-tRNA synthetase." Nature **362**(6416): 181-4.
- Chen-Schmeisser, U. and R. A. Garrett (1977). "A new method for the isolation of a 5 S RNA complex with proteins L5, L18 and L25 from Escherichia coli ribosomes." FEBS Lett **74**(2): 287-91.
- Correa, P. (1992). "Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention." Cancer Res **52**(24): 6735-40.
- Correll, C. C., B. Freeborn, et al. (1997). "Metals, motifs, and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain." Cell **91**(5): 705-12.
- Crick, F. H. (1966). "Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis." J Mol Biol **19**(2): 548-55.
- Curnow, A. W., K. Hong, et al. (1997). "Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase: a novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 11819-26.
- Diaconu, M., U. Kothe, et al. (2005). "Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation." Cell **121**(7): 991-1004.
- Dontsova, O., V. Tishkov, et al. (1994). "Stem-loop IV of 5S rRNA lies close to the peptidyltransferase center." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4125-9.
- Erdmann, V. A., S. Fahnestock, et al. (1971). "Role of 5S RNA in the functions of 50S ribosomal subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(12): 2932-6.
- Forman, D., D. G. Newell, et al. (1991). "Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation." Bmj **302**(6788): 1302-5.
- Francklyn, C., K. Musier-Forsyth, et al. (1997). "Aminoacyl-tRNA synthetases in biology and disease: new evidence for structural and functional diversity in an ancient family of enzymes." Rna **3**(9): 954-60.

- Goodwin, C. S. and J. A. Armstrong (1990). "Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*)." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**(1): 1-13.
- Goodwin, C. S., R. K. McCulloch, et al. (1985). "Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa." *J Med Microbiol* **19**(2): 257-67.
- Helmut Blum, H. B. H. J. G. (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis* **8**(2): 93-99.
- Hentzen, D., P. Mandel, et al. (1972). "Relation between aminoacyl-tRNA stability and the fixed amino acid." *Biochim Biophys Acta* **281**(2): 228-32.
- Ibba, M., H. D. Becker, et al. (2000). "The adaptor hypothesis revisited." *Trends Biochem Sci* **25**(7): 311-6.
- Ibba, M. and D. Soll (2000). "Aminoacyl-tRNA synthesis." *Annu Rev Biochem* **69**: 617-50.
- Ibba, M. and D. Soll (2004). "Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code." *Genes Dev* **18**(7): 731-8.
- Ilag, L. L., H. Videler, et al. (2005). "Heptameric (L12)6/L10 rather than canonical pentameric complexes are found by tandem MS of intact ribosomes from thermophilic bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(23): 8192-7.
- Innis, M., P. Gelfand, et al. (1990). "PCR Protocols: a guide to methods and applications." Academic Press.
- Jaishree, T. N., V. Ramakrishnan, et al. (1996). "Solution structure of prokaryotic ribosomal protein S17 by high-resolution NMR spectroscopy." *Biochemistry* **35**(9): 2845-53.
- Kaltschmidt, E. and H. G. Wittmann (1970). "Ribosomal proteins. XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of *Escherichia coli* as determined by two-dimensional gel electrophoresis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**(3): 1276-82.
- Lee, J. and T. L. Hendrickson (2004). "Divergent anticodon recognition in contrasting glutamyl-tRNA synthetases." *J Mol Biol* **344**(5): 1167-74.
- Leontis, N. B. and E. Westhof (1998). "The 5S rRNA loop E: chemical probing and phylogenetic data versus crystal structure." *Rna* **4**(9): 1134-53.
- Lu, M. and T. A. Steitz (2000). "Structure of *Escherichia coli* ribosomal protein L25 complexed with a 5S rRNA fragment at 1.8-Å resolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(5): 2023-8.
- Maguire, B. A. and R. A. Zimmermann (2001). "The ribosome in focus." *Cell* **104**(6): 813-6.
- Marshall, B. J. and J. R. Warren (1984). "Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration." *Lancet* **1**(8390): 1311-5.
- Martinis, S. A., P. Plateau, et al. (1999). "Aminoacyl-tRNA synthetases: a family of expanding functions. Mittelwihr, France, October 10-15, 1999." *Embo J* **18**(17): 4591-6.
- Mosyak, L., L. Reshetnikova, et al. (1995). "Structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*." *Nat Struct Biol* **2**(7): 537-47.
- Nevskaya, N., S. Tischenko, et al. (2000). "Archaeal ribosomal protein L1: the structure provides new insights into RNA binding of the L1 protein family." *Structure* **8**(4): 363-71.
- Newkirk, K., W. Feng, et al. (1994). "Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: identification of a binding epitope for DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 5114-8.

- Nomura, A., G. N. Stemmermann, et al. (1991). "Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii." N Engl J Med **325**(16): 1132-6.
- Onesti, S., A. D. Miller, et al. (1995). "The crystal structure of the lysyl-tRNA synthetase (LysU) from Escherichia coli." Structure **3**(2): 163-76.
- Parsonnet, J., G. D. Friedman, et al. (1991). "Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma." N Engl J Med **325**(16): 1127-31.
- Putzer, H., S. Laalami, et al. (1995). "Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in Bacillus subtilis: induction, repression and growth-rate regulation." Mol Microbiol **16**(4): 709-18.
- Reblova, K., N. Spackova, et al. (2004). "Long-residency hydration, cation binding, and dynamics of loop E/helix IV rRNA-L25 protein complex." Biophys J **87**(5): 3397-412.
- Salazar, J. C., I. Ahel, et al. (2003). "Coevolution of an aminoacyl-tRNA synthetase with its tRNA substrates." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 13863-8.
- Sambrook, J., T. Maniatis, et al. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sharp, P. A., B. Sugden, et al. (1973). "Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis." Biochemistry **12**(16): 3055-63.
- Simos, G. and E. Hurt (1999). "Transfer RNA biogenesis: A visa to leave the nucleus." Curr Biol **9**(7): R238-41.
- Skouloubris, S., L. Ribas de Pouplana, et al. (2003). "A noncognate aminoacyl-tRNA synthetase that may resolve a missing link in protein evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11297-302.
- Specht, T., J. Wolters, et al. (1990). "Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences." Nucleic Acids Res **18 Suppl**: 2215-30.
- Stathopoulos, C., T. Li, et al. (2000). "One polypeptide with two aminoacyl-tRNA synthetase activities." Science **287**(5452): 479-82.
- Stoldt, M., J. Wohnert, et al. (1998). "The NMR structure of Escherichia coli ribosomal protein L25 shows homology to general stress proteins and glutamyl-tRNA synthetases." Embo J **17**(21): 6377-84.
- Stoldt, M., J. Wohnert, et al. (1999). "The NMR structure of the 5S rRNA E-domain-protein L25 complex shows preformed and induced recognition." Embo J **18**(22): 6508-21.
- Talley, N. J., A. R. Zinsmeister, et al. (1991). "Gastric adenocarcinoma and Helicobacter pylori infection." J Natl Cancer Inst **83**(23): 1734-9.
- Wilcox, M. and M. Nirenberg (1968). "Transfer RNA as a cofactor coupling amino acid synthesis with that of protein." Proc Natl Acad Sci U S A **61**(1): 229-36.
- Wilson, D. N. and K. H. Nierhaus (2005). "Ribosomal proteins in the spotlight." Crit Rev Biochem Mol Biol **40**(5): 243-67.