

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Σταματίνα Ε. Γιαννούλη
Βιοχημικός & Βιοτεχνολόγος

ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΑΣΥΝΗΘΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΙΚΟΥ RNA ΣΕ
ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2008

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Σταματίνα Ε. Γιαννούλη
Βιοχημικός & Βιοτεχνολόγος

ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΑΣΥΝΗΘΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΙΚΟΥ RNA ΣΕ
ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2008

Συνολικός αριθμός σελίδων: 176

Αριθμός πινάκων: 18

Αριθμός σχημάτων: 79

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 231

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος (Επιβλέπων Καθηγητής)

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη Μεταβολική Ρύθμιση, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παναγιώτης Μαρκουλάτος

Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γεώργιος Σίμος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Διονύσιος Δραΐνας

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Δημήτριος Καλπαξής

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ζήσης Μαμούρης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παναγιώτης Μαρκουλάτος

Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γεώργιος Σίμος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη Μεταβολική Ρύθμιση, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Διονύσιος Συνετός

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ως ελάχιστη ένδειξη ευγνωμοσύνης για τη βοήθεια και τη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή Κωνσταντίνο Σταθόπουλο. Η εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου και η παρότρυνση να προχωρώ μπροστά ακόμα και τις πιο δύσκολες στιγμές ήταν ιδιαίτερα σημαντική για μένα. Τον ευχαριστώ ακόμα για τις ατέλειωτες συζητήσεις. Εκτός από δάσκαλος και καθοδηγητής ήταν για μένα αυτά τα χρόνια και ένας πολύτιμος φίλος.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παναγιώτη Μαρκουλάτο και τον αναπληρωτή Καθηγητή Γεώργιο Σίμο, για τη συνεργασία κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, για τη στήριξη που μου παρείχαν με την παροχή υλικοτεχνικής υποδομής και τις επισημάνσεις τους επί της διατριβής μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα 4 μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τους Καθηγητές Διονύσιο Δραΐνα, Δημήτριο Καλπαξή, Ζήση Μαμούρη και Διονύσιο Συνετό, που ήταν πρόθυμοι και δέχτηκαν να αξιολογήσουν το έργο μου.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας που ήταν οι πρώτοι μου δάσκαλοι στο Πανεπιστήμιο και συνέβαλαν ουσιαστικά στην πρόοδο μου. Η συνεργασία μαζί τους ήταν ιδιαίτερα παραγωγική και οι δεσμοί που έχουν αναπτυχθεί μεταξύ μας πιστεύω ότι είναι ιδιαίτερα ισχυροί και ευελπιστώ να διατηρηθούν με την πάροδο του χρόνου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ζήση Μαμούρη για τη συνεργασία μας τα χρόνια αυτά και για την εκτίμηση που έδειξε στο πρόσωπο μου.

Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής φιλοξενήθηκα για έξι μήνες συνολικά στο εργαστήριο του Καθηγητή Daniel Kern, στο IBMC, CNRS του Στρασβούργου. Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους Καθηγητές Daniel Kern και Hubert Becker για την άφογη συνεργασία μας και τη φιλοξενία που μου παρείχαν. Με δέχτηκαν ως ισότιμο μέλος της ερευνητικής τους ομάδας και μου παρείχαν οτιδήποτε απαιτούνταν για την πραγματοποίηση της ερευνητικής μου εργασίας. Επίσης, οι μεταπτυχιακοί φοιτητές Michael Blaise και Mark Bailly με βοήθησαν ιδιαίτερα στον εγκλιματισμό μου στο νέο εργασιακό χώρο και παραμένουν δυο πολύ καλοί μου φίλοι. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω γιατί πάντα με φρόντιζαν και με καθοδηγούσαν και γιατί ήμουν για αυτούς η αγαπημένη "La Grecque".

Η βοήθεια των συνεργατών μου στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας τα τέσσερα αυτά χρόνια ήταν ανεκτίμητη. Θα ήθελα ιδιαίτερα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στο μεταπτυχιακό φοιτητή Αθανάσιο Κυρίτση που στάθηκε δίπλα μου ως συνεργάτης και ως φίλος. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την τεχνικό Κατερίνα Γραφανάκη για την τεχνική βοήθεια και την ηθική υποστήριξη, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές που εκπαιδεύτηκαν στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας τα χρόνια αυτά και με βοήθησαν να μάθω μέσα από τις απορίες τους και από τα λάθη μας.

Βέβαια, στην πορεία μου αυτή σημαντικό ρόλο έπαιξαν και οι φίλοι μου που ήταν πάντα δίπλα μου για να με εμπυχώσουν αλλά και να συζητήσουν μαζί μου για τις

τεχνικές δυσκολίες. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τις Υποψήφιες Διδάκτορες του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Ευδοξία Κακάνη, Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου και Κωνσταντίνα Τσουμάνη αλλά και όλους τους συναδέλφους μεταπτυχιακούς φοιτητές για τη στήριξη αλλά και τα εποικοδομητικά διαλείμματα.

Τέλος και κυρίως θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Μαρούλα και Ελευθέριο Γιαννούλη, γιατί ήταν σύμμαχοι στον αγώνα αυτό, με στηρίζανε τις δύσκολες ώρες και για όλες τις θυσίες που έχουν κάνει για να μπορώ αυτή τη στιγμή να γράφω αυτά τα λίγα λόγια ευγνωμοσύνης. Ευχαριστώ πολύ και τον αδερφό μου Θεμιστοκλή και χαίρομαι πολύ που ήταν δίπλα μου αυτά τα χρόνια ως αδερφός και συγκάτοικος.

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Η ροή των γενετικών πληροφοριών	4
1.2 Το μεταφορικό RNA (tRNA) ως προσαρμοστικό μόριο κατά τη ροή της γενετικής πληροφορίας.	4
1.2.1 Βιογένεση του tRNA και χαρακτηριστικά του	6
1.2.2 Ταυτότητα των μορίων tRNA	8
1.3 tRNA και αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες: Ο ρόλος τους στην πρωτεϊνοσύνθεση. 15	
1.3.1 Εξειδίκευση και επιδιορθωτική δράση των aaRSs	18
1.4 Ρόλος των μορίων tRNA σε κυτταρικές διεργασίες πέραν της πρωτεϊνοσύνθεσης	22
1.5 Ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης: Ο ρόλος των μορίων tRNA.....	24
1.5.1 tRNA εξαρτώμενα συστήματα αλληλομετατροπής αμινοξέων	24
1.5.2 tRNA και σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος	35
1.6 Συμβατικά και ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης - Νέοι μοριακοί στόχοι για απενεργοποίηση	44
1.6.1 Αναστολείς των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών	44
1.6.2 Στόχευση παραγόντων που εμπλέκονται σε ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης.	46
Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής.....	48
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	50
2.1 ΥΛΙΚΑ	51
2.1.2 Αντιδραστήρια	51
2.1.3 Βακτηριακά στελέχη	53
2.1.4 Πλασμιδιακοί φορείς.....	53
2.2 Μέθοδοι	56
2.2.1 Ηλεκτροφορήσεις.....	56
2.2.2 Γονιδωματική ανάλυση.....	57
2.2.3 Απομόνωση γενωμικού DNA	58
2.2.4 Ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	58
2.2.5 Κλωνοποίηση των γονιδίων – μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων	60
2.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα	62
2.2.7 Έλεγχος ανασυνδυασμού των πλασμιδίων.....	63
2.2.8 Προετοιμασία ανασυνδυασμένων γονιδίων και φορέων έκφρασης	64

2.2.9 Κλωνοποίηση των απομονωμένων γονιδίων σε φορέα έκφρασης.....	64
2.2.10 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων	65
2.2.11 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> BL21 (DE3) με ανασυνδυασμένους φορείς έκφρασης	65
2.2.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα – επιλογή θετικών αποικιών	65
2.2.13 Έλεγχος έκφρασης γονιδίων.....	66
2.2.14 Έκφραση γονιδίων	66
2.2.15 Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	67
2.2.16 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών	69
2.2.17 Cassette cloning των γονιδίων tRNA.....	71
2.2.18 Έλεγχος ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.....	74
2.2.19 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxipreps).....	75
2.2.20 <i>In vitro</i> μεταγραφή	76
2.2.21 Αντίδραση αμινοακυλίωσης μορίων tRNA (tRNA aminoacylation assays)	77
2.2.22 Αντιδράσεις τρανσαμιδωσης (tRNA-dependent transamidation assays)	79
2.2.23 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) για το διαχωρισμό αμινοξέων	80
2.2.24 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα <i>S. aureus</i>	80
2.2.25 Έλεγχος έκφρασης των μορίων tRNA του <i>S. aureus</i> με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)	81
2.2.26 Χρωματογραφία συγγένειας με κατηλωμένο EF-Tu του <i>Staphylococcus aureus</i>	82
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	83
3.1 Ασύνηθες σύστημα αλληλομετατροπής αμινοξέων – tRNA εξαρτώμενη σύνθεση της ασπαργίνης.....	84
3.1.1. Καθαρισμός ενζύμων και tRNA υποστρωμάτων για τη μελέτη της tRNA- εξαρτώμενης τρανσαμιδωσης	84
3.1.2 Κινητική μελέτη της βακτηριακής GatCAB αμιδοτρανσφεράσης του <i>Neisseria meningitidis</i>	89
3.1.3 Προσδιορισμός των στοιχείων ταυτότητας του Asp-tRNA ^{Asn} για την τρανσαμιδωση από τη βακτηριακή AdT	91
3.1.4 Ειδικά ως προς την οργανισμική προέλευση (species-specific) στοιχεία ταυτότητας των μορίων tRNA για την tRNA εξαρτώμενη σύνθεση ασπαργίνης	102

3.1.5 Στοιχεία ταυτότητας για την τρoνσαμίδωση του Glu-tRNA ^{Gln} από τη βακτηριακή GatCAB.....	106
3.2 Διερεύνηση της tRNA-εξαρτώμενης σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος στο <i>Staphylococcus aureus</i>	112
3.2.1 Ταυτοποίηση ενός πιθανού ψευδογονιδίου που κωδικοποιεί ένα ασύνηθες μόριο tRNA ^{Gly(UCC)}	113
3.2.2 Προετοιμασία παραγόντων για το χαρακτηρισμό των ισοδεκτικών μορίων tRNA ^{Gly} του <i>Staphylococcus aureus</i>	118
3.2.3 Το ασύνηθες NEWtRNA ^{Gly(UCC)} αποτελεί υπόστρωμα για την GlyRS του <i>Staphylococcus aureus</i>	123
3.2.4 Διαφορική δέσμευση των ισοδεκτικών tRNA ^{Gly} στον παράγοντα επιμήκυνσης Tu του <i>Staphylococcus aureus</i>	124
3.2.5 Ανίχνευση του πιθανού μεταφορέα των μη-πρωτεϊνογενετικών μορίων tRNA ^{Gly} στο κυτταρικό τοίχωμα	128
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	131
ABSTRACT	155
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	157
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	177

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ως ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης ορίζονται βιοσυνθετικά μονοπάτια τα οποία εμπλέκουν μόρια tRNA ως κεντρικούς παράγοντες, τόσο κατά τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης όσο και εκτός αυτής. Τα τελευταία χρόνια, λειτουργικές και γονιδιωματικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι αμινοακυλιωμένα μόρια tRNA συμμετέχουν σε μία ποικιλία σημαντικών κυτταρικών διεργασιών πέραν της πρωτεϊνοσύνθεσης. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη παραγόντων που εμπλέκονται σε δύο ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης.

Στο πρώτο σκέλος της διατριβής μελετήθηκε και χαρακτηρίστηκε βιοχημικά ο ρόλος των μορίων tRNA κατά την tRNA-εξαρτώμενη μετατροπή του ασπαραγινικού οξέος σε ασπαραγίνη στο παθογόνο βακτήριο *Neisseria meningitidis*, μία αντίδραση η οποία καταλύεται από την tRNA-εξαρτώμενη αμιδοτρανσφεράση (AdT). Η βιοσυνθετική αυτή πορεία, η οποία είναι παρούσα σε όλα τα παθογόνα βακτήρια των οποίων το γονιδίωμα είναι γνωστό, έχει διπλό ρόλο. Παρέχει τα Asn-tRNA^{Asn} υποστρώματα για την ενσωμάτωση ασπαραγίνης στις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες των οργανισμών, ενώ παράλληλα παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη βιοσύνθεση της ασπαραγίνης, όταν από τους οργανισμούς απουσιάζουν τα ένζυμα που ευθύνονται για τη βιοσύνθεση του συγκεκριμένου αμινοξέος. Βρέθηκε ότι το καθοριστικό στοιχείο αναγνώρισης του tRNA^{Asn} από τις βακτηριακές αμιδοτρανσφεράσες είναι το πρώτο ζεύγος βάσεων U1-A72, ενώ για τα αντίστοιχα ένζυμα των αρχαίων είναι το μέγεθος και η αλληλουχία της μεταβλητής θηλιάς. Αντίστοιχα, το αντικαθοριστικό στοιχείο που παρεμποδίζει την αναγνώριση του tRNA^{Asp} είναι το μέγεθος της θηλιάς D.

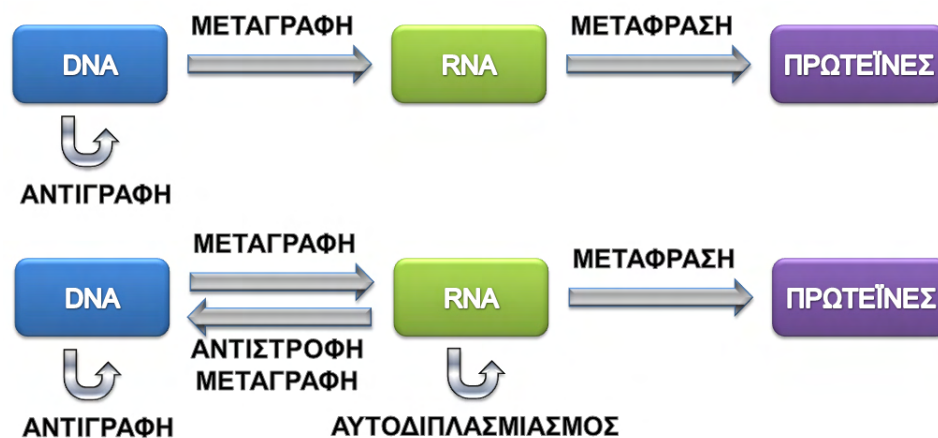
Το δεύτερο ασυνήθες σύστημα αμινοακυλίωσης που μελετήθηκε ήταν η tRNA-εξαρτώμενη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του παθογόνου *Staphylococcus aureus*. Η πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος στο συγκεκριμένο παθογόνο σταθεροποιείται από χαρακτηριστικές γέφυρες πενταγλυκίνης οι οποίες συντίθενται εξω-ριβωσωμικά. Ως δότες γλυκίνης διαμεσολαβούν Gly-tRNA^{Gly} μόρια ο αριθμός και η ταυτότητα των οποίων ήταν μέχρι σήμερα άγνωστα. Στην παρούσα διατριβή διευκρινίστηκε ο αριθμός και ο ρόλος των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} του *S. aureus* που υπάρχουν και εκφράζονται στο συγκεκριμένο παθογόνο. Βρέθηκε ότι 5 ισοδεκτικά μόρια κωδικοποιούνται και εκφράζονται στο συγκεκριμένο οργανισμό. Επιπρόσθετα, με βιοχημικές προσεγγίσεις έγινε εφικτός ο διαχωρισμός τους σε εκείνα που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή (πρωτεϊνογενετικά, 2 μόρια P1 και P2) και σε εκείνα που εμπλέκονται στη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (μη-πρωτεϊνογενετικά, 3 μόρια NP1, NP2 και NEW).

Η παρούσα διατριβή εστίασθηκε στο σημαντικό ρόλο των μορίων tRNA, όχι ως απλών προσαρμοστικών μορίων, αλλά ως σημαντικών παραγόντων σε βιοχημικές διεργασίες, οι οποίες σήμερα αναγνωρίζονται στην πλειοψηφία των παθογόνων, ως νέοι μοριακοί στόχοι για εξειδικευμένη απενεργοποίηση.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ροή των γενετικών πληροφοριών

Η μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες είναι μια θεμελιώδης διαδικασία για τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Το κεντρικό δόγμα της Βιολογίας, όπως αυτό διατυπώθηκε το 1958 από τον Crick, αποτελεί ουσιαστικά μια αναπαράσταση της ροής της γενετικής πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες (Crick, 1958). Αρχικά, η πορεία που περιγραφόταν από το δόγμα αυτό αποτελούνταν από τρία διακριτά βήματα: την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τη μετάφραση. Η αντιγραφή του DNA αποτελεί μία από τις βασικές διαδικασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η μεταγραφή τμημάτων του DNA σε μόρια αγγελιοφόρου RNA (mRNA) και η ακόλουθη μετάφραση αυτών συνολικά επιτελούν τη μετατροπή της πληροφορίας από τη γλώσσα των νουκλεοτιδίων στη γλώσσα των αμινοξέων με βάση το γενετικό κώδικα (Crick, 1970). Σήμερα, μετά από εκτεταμένες μελέτες στο πεδίο της ροής της γενετικής πληροφορίας και το χαρακτηρισμό μεγάλου αριθμού οργανισμών, το απλό αυτό σχήμα έχει εμπλουτιστεί με επιπλέον διεργασίες, όπως είναι η αντίστροφη μεταγραφή και ο αυτοδιπλασιασμός του RNA (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1: Κεντρικό δόγμα της Βιολογίας. Η μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες. (Α) Αρχική διατύπωση από τον Crick που περιλαμβάνει μόνο τις διαδικασίες αντιγραφής του DNA, μεταγραφής και μετάφρασης, (Β) Μεταγενέστερη διατύπωση μετά την αποκάλυψη επιπρόσθετων βιοχημικών διεργασιών, όπως η αντίστροφη μεταγραφή και ο αυτοδιπλασιασμός του RNA.

1.2 Το μεταφορικό RNA (tRNA) ως προσαρμοστικό μόριο κατά τη ροή της γενετικής πληροφορίας

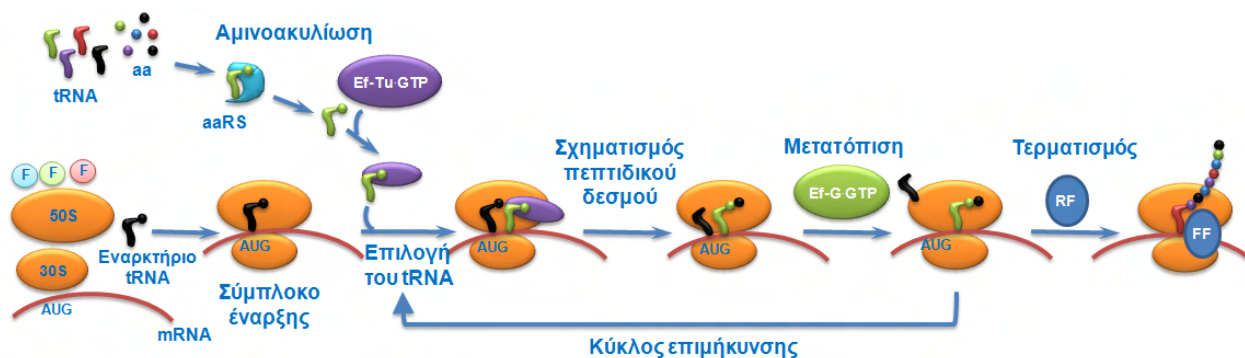
Το ρεπερτόριο της σύνθεσης των πρωτεϊνών βασίζεται στο ότι κάθε τριπλέτα βάσεων (κωδικόνιο) αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ (**Εικόνα 2**). Παρόλη την απλότητα της

αντιστοίχησης, η εξασφάλιση της πιστότητας της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι μείζονος σημασίας για τις κυτταρικές λειτουργίες. Το 1958, ο Crick διατύπωσε την “Υπόθεση του Προσαρμοστή” (“Adaptor Hypothesis”), σύμφωνα με την οποία η μετάφραση λαμβάνει χώρα με τη μεσολάβηση “προσαρμοστικών μορίων” (Crick, 1958). Κάθε ένα από τα μόρια αυτά θα μπορούσε να μεταφέρει ένα συγκεκριμένο αμινοξύ και θα έπρεπε να περιέχει ριβονουκλεοτίδια, ώστε η αναγνώριση των κωδικονίων να πραγματοποιείται μέσω συμπληρωματικότητας ζευγών βάσεων.

		Δεύτερη βάση									
		U		C		A		G			
Πρώτη βάση	U	Phe UUU	Phe UUC	Ser UCU	Ser UCC	Tyr UAU	Tyr UAC	Cys UGU	Cys UGC	UC	Τρίτη βάση
		Leu UUA	Leu UUG	Ser UCA	Ser UCG	Stop UAA	Stop UAG	Stop UGA	Trp UGG	AG	
	C	Leu CUU	Leu CUC	Pro CCU	Pro CCC	His CAU	His CAC	Arg CGU	Arg CGC	UC	Τρίτη βάση
		Leu CUA	Leu CUG	Pro CCA	Pro CCG	Gln CAA	Gln CAG	Arg CGA	Arg CGG	AG	
A	Ile AUU	Ile AUC	Thr ACU	Thr ACC	Asn AAU	Asn AAC	Ser AGU	Ser AGC	UC	Τρίτη βάση	
	Ile AUA	Met AUG	Thr ACA	Thr ACG	Lys AAA	Lys AAG	Arg AGA	Arg AGG	AG		
G	Val GUU	Val GUC	Ala GCU	Ala GCC	Asp GAU	Asp GAC	Gly GGU	Gly GGC	UC	Τρίτη βάση	
	Val GUA	Val GUG	Ala GCA	Ala GCG	Glu GAA	Glu GAG	Gly GGA	Gly GGG	AG		

Εικόνα 2: Ο γενετικός κώδικας με βάση τον οποίο γίνεται η αντιστοίχηση μεταξύ κωδικονίων και αμινοξέων. Κάθε αμινοξύ αντιστοιχεί σε περισσότερα του ενός κωδικόνια (εκφυλισμός του γενετικού κώδικα).

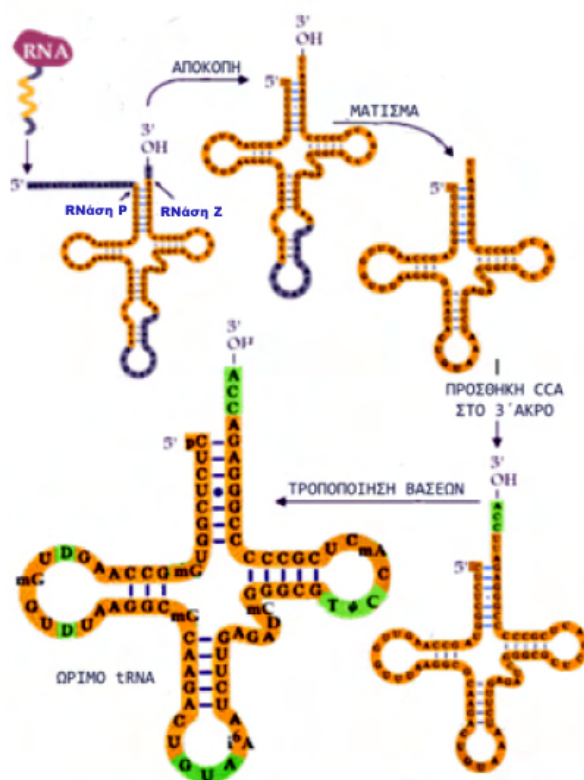
Η θεωρία αυτή αποδείχθηκε προφητική, καθώς τα αμινοξέα που απαιτούνται για τη σύνθεση των πεπτιδίων μεταφέρονται εστεροποιημένα στο άκρο των μεταφορικών μορίων RNA (tRNA). Η σύνθεση των πρωτεϊνών είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων και η πιστότητα σε κάθε ένα από αυτά επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα. Η συμμετοχή πολυάριθμων παραγόντων διασφαλίζει την ορθή μετάφραση, καθώς είναι πολλά τα σημεία ελέγχου που λειτουργούν σαν δικλίδες ασφαλείας. Στην πορεία της μετάφρασης τα μόρια tRNA και τα ένζυμα που καταλύουν την αμινοακυλίωσή τους, γνωστά ως **αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (aminoacyl-tRNA synthetases, aaRS)**, διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην παροχή των σωστών υποστρωμάτων (Ibba & Soll, 2001), τα οποία μεταφέρονται στο ριβόσωμα μέσω του παράγοντα επιμήκυνσης Tu (EF-Tu) (**Εικόνα 3**) (Sprinzl, 1994).



Εικόνα 3: Η εμπλοκή των μορίων tRNA στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Αρχικά το εναρκτήριο aa-tRNA συμμετέχει στο σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης με τις δύο υπομονάδες του ριβοσώματος και το mRNA. Τα μόρια tRNA αμινοακυλιώνονται με το συγγενές αμινοξύ από τις συγγενείς αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες και μετά από έλεγχο μεταφέρονται μέσω του παράγοντα EF-Tu στο ριβόσωμα, όπου μεταφέρουν τα εστεροποιημένα αμινοξέα στις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες.

1.2.1 Βιογένεση του tRNA και χαρακτηριστικά του

Η βιογένεση των μορίων tRNA είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που διαμεσολαβείται από διάφορα στάδια σύνθεσης και τροποποίησης. Τα μόρια tRNA μεταγράφονται από τα αντίστοιχα γονίδια από την RNA πολυμεράση III. Τα πρόδρομα μετάγραφα που προκύπτουν (αναφέρονται ως pre-tRNA, precursor tRNA), περιέχουν επιπλέον αλληλουχίες τόσο στο 5' όσο και στο 3' άκρο τους και πολλές φορές και στη θηλιά του αντικωδικονίου. Τα επιπλέον νουκλεοτίδια του 5' άκρου απομακρύνονται μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από την ριβονουκλεάση P (RNase P), ένα από τα πρώτα ριβοένζυμα που ανακαλύφθηκαν, ενώ αυτά του 3' άκρου από τη ριβονουκλεάση Z (RNase Z) (De La Sierra-Gallay et al., 2005). Η RNase P είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο του οποίου η σύσταση σε πρωτεΐνες και μόρια RNA ποικίλλει μεταξύ των οργανισμών των διαφόρων βασιλείων (Frank & Pace, 1998, Altman, 2007). Στα πλαίσια της ωρίμανσης των μορίων tRNA, ματίζονται τα ιντρόνια που εμπεριέχονται σε κάποιες περιπτώσεις στο βραχίονα του αντικωδικονίου. Επιπλέον, στις περιπτώσεις που δεν κωδικοποιείται από τα γονίδια των μορίων tRNA το συντηρημένο 3'- CCA άκρο, αυτό προστίθεται μετα-μεταγραφικά από το ένζυμο CCA-νουκλεοτιδυλτρανσφεράση (Xiong & Steitz, 2006, Tomita et al., 2004). Τελικό στάδιο της ωρίμανσης των μορίων tRNA είναι η τροποποίηση ορισμένων βάσεων σε θέσεις κλειδιά του μορίου (Bjork, 1995, Sprinzl et al., 1998). Χαρακτηριστικό παράδειγμα η σύνθεση της ψευδοουριδίνης στη θηλιά ΤψC του μορίου, λόγω της οποίας αποδίδεται και η συγκεκριμένη ονομασία στη θηλιά και εμπλέκεται στην αναγνώριση των μορίων από παράγοντες της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής (**Εικόνα 4**).

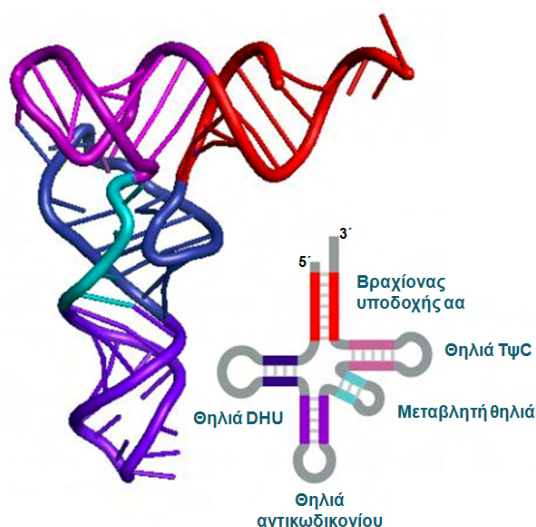


Εικόνα 4: Τα στάδια ωρίμανσης των μορίων tRNA. Από το πρόδρομο μόριο tRNA αποκόπτονται οι επιπρόσθετες αλληλουχίες από το 3' και 5' άκρο με τη δράση RNασών. Ακολουθεί μάτισμα, προσθήκη της ακολουθίας CCA στο 3' άκρο και τροποποίηση βάσεων σε συγκεκριμένες θέσεις.

Τα μόρια του μεταφορικού RNA (tRNA) είναι ένα από τα είδη του RNA που συμμετέχουν ενεργά στη γονιδιακή έκφραση. Το πρώτο μόριο tRNA που αλληλουχήθηκε πλήρως ήταν αυτό που δεσμεύει αλανίνη (tRNA^{Ala}). Αυτή η καινοτόμος μελέτη πραγματοποιήθηκε από τον R. Holley και τους συνεργάτες του, πριν την ανακάλυψη των σύγχρονων τεχνικών αλληλούχησης (Holley *et al.*, 1965). Σήμερα είναι γνωστό ότι τα μόρια tRNA είναι μονές αλυσίδες που περιέχουν από 73-93 ριβονουκλεοτίδια, με εξαίρεση τα μιτοχονδριακά μόρια tRNA, τα οποία έχουν συνήθως μικρότερο μέγεθος. Το 5' άκρο των μορίων tRNA είναι φωσφορυλιωμένο και συνήθως το κατάλοιπο είναι pG, ενώ στο 3' άκρο απαντάται η συντηρημένη αλληλουχία CCA, η τελική αδενοσίνη της οποίας αποτελεί και τη θέση πρόσδεσης του ενεργοποιημένου αμινοξέος. Στην αλληλουχία των μορίων tRNA εκτός από τις συνήθεις βάσεις A, U, G και C απαντώνται τροποποιημένα νουκλεοτίδια, όπως ινοσίνη, ψευδοουριδίνη, διϋδροουριδίνη, ριβοθυμιδίνη και μεθυλιωμένα παράγωγα της γουανοσίνης και της ινοσίνης (Bjork *et al.*, 1987).

Παρά τις διαφοροποιήσεις των αλληλουχιών των μορίων tRNA, η δευτεροταγής τους δομή μπορεί να παρασταθεί γραφικά με το σχήμα ενός τριφυλλιού, στο οποίο τα μισά περίπου κατάλοιπα συμμετέχουν σε ζεύγη βάσεων (**Εικόνα 5**). Οι βάσεις που δε ζευγαρώνουν σχηματίζουν τις θηλιές TψC και DHU, τη θηλιά του αντικωδικονίου και τη μεταβλητή θηλιά, καθώς και το 3'-CCA άκρο. Στις αρχές της δεκαετίας του 1970, η

τρισεδιάστατη δομή του μορίου tRNA προσδιορίστηκε με την ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων (*Brown et al., 1972, Jack et al., 1976*). Σύμφωνα με τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, προέκυψε ότι η “δομή τριφυλλιού” λαμβάνει στο χώρο μια διαμόρφωση που προσομοιάζει με το λατινικό γράμμα L (**Εικόνα 5**). Στο ένα άκρο της δομής αυτής βρίσκεται η θηλιά του αντικωδικονίου, ενώ στο άλλο άκρο η περιοχική δέσμευση του αμινοξέος. Αντίστοιχα, οι θηλιές DHU και ΤψC βρίσκονται αντιδιαμετρικά του κάθετου άξονα του μορίου.



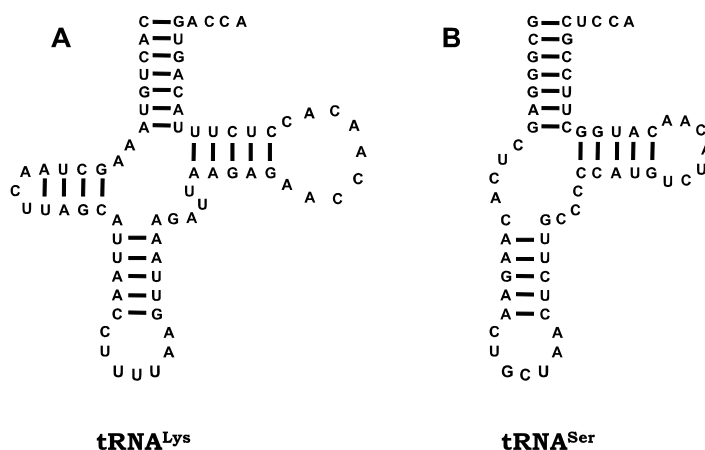
Εικόνα 5: Η δομή των μορίων tRNA. Δεξιά απεικονίζεται η δευτεροταγής δομή του μορίου (“σχήμα τριφυλλιού”) και αριστερά η τριτοταγής δομή (L μορφή). Το μόριο tRNA αποτελείται από το βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος, το βραχίονα και τη θηλιά DHU, το βραχίονα και τη θηλιά ΤψC, τη μεταβλητή θηλιά και το βραχίονα και τη θηλιά του αντικωδικονίου.

1.2.2 Ταυτότητα των μορίων tRNA

Τα μόρια tRNA παίζουν σημαντικότατο ρόλο, αντιστοιχώντας τα σωστά αμινοξέα στα κωδικόνια του mRNA, διαμορφώνοντας έτσι την ορθή αμινοξική αλληλουχία των πρωτεϊνών, όπως αυτή καθορίζεται από την αλληλουχία του γονιδίου. Για να επιτευχθεί αυτό, το μόριο tRNA πρέπει να παρουσιάζει εξειδίκευση όχι μόνο στο στάδιο της μετάφρασης αλλά και της αμινοακυλίωσης. Η εξειδίκευση των μορίων tRNA στη μετάφραση έγκειται στην αλληλεπίδραση κωδικονίου-αντικωδικονίου, ενώ στην αμινοακυλίωση στην αλληλεπίδραση με τη συγγενή τους αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση. Σε αντίθεση με τις αλληλεπιδράσεις tRNA-συνθετάσης, η αλληλεπίδραση κωδικονίου-αντικωδικονίου είναι πιο αυστηρή καθώς διέπεται από ακριβείς κανόνες συμπληρωματικότητας, οι οποίοι υπαγορεύονται από το γενετικό κώδικα.

Η αναγνώριση των μορίων tRNA από τις συνθετάσες πρέπει να διέπεται από μια σειρά κανόνων, διότι είναι μόρια που παρουσιάζουν μεγάλη νουκλεοτιδική και δομική ομοιότητα μεταξύ τους. Ο αριθμός των βάσεων στις περιοχές των θηλιών και των βραχιόνων είναι συντηρημένος σε τέτοιο βαθμό που μπορούν να αναφερθούν με

συγκεκριμένο σύστημα αρίθμησης (Sprinzl and Vassilenko, 2005). Αυξομειώσεις παρατηρούνται στη θηλιά D και στη μεταβλητή θηλιά. Κατ' εξαίρεση, κάποια μιτοχονδριακά μόρια tRNA δε φέρουν το βραχίονα και τη θηλιά D ή / και το βραχίονα και τη θηλιά T, αλλά και αυτά τα ασυνήθη μόρια λαμβάνουν την L διαμόρφωση στο χώρο (**Εικόνα 6**) (de Bruijn & Klug, 1983, Helm et al., 2000).



Εικόνα 6: Παραδείγματα μιτοχονδριακών μορίων tRNA του *H. sapiens* που στερούνται (A) τη θηλιά D (tRNA^{Lys}) και (B) το βραχίονα και τη θηλιά D (tRNA^{Ser}).

Οι περιοχές των μορίων tRNA που καθορίζουν την εξειδικευμένη αμινοακυλίωσή τους έχουν μελετηθεί συστηματικά και σε μεγάλη έκταση. Αρχικά υπήρχε η πεποίθηση ότι οι συνθετάσες αναγνωρίζουν κατά βάση την περιοχή του αντικωδικονίου. Έχει αναφερθεί χαρακτηριστικά ότι η δέσμευση συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων στα αντικωδικόνια ή η χημική τροποποίησή τους οδηγεί σε μείωση της συγγένειας των aaRSs με το υπόστρωμα (Bruton & Clark, 1974). Επίσης, μετάλλαξη του αντικωδικονίου μπορεί να αποτελέσει σήμα αναγνώρισης από μη συγγενή συνθετάση, όπως στην περίπτωση του tRNA^{Trp} του *Escherichia coli* που η μετατροπή του αντικωδικονίου από CCA σε CUA το κατέστησε υπόστρωμα για την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της γλουταμίνης (GlnRS) (Rogers et al., 1992).

Ωστόσο, η αναγνώριση μόνο του αντικωδικονίου δημιουργεί το ερώτημα, πώς οι συνθετάσες αναγνωρίζουν τα ισοδεκτικά μόρια tRNA (isoacceptor tRNAs), καθώς ο γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος και αντιστοιχούν πάνω από ένα κωδικόνιο ανά αμινοξύ. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι η αλλαγή κάποιων αντικωδικονίων δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση με τη συνθετάση. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη των αντικωδικονίων των μορίων tRNA^{Gln}, tRNA^{Ser} και tRNA^{Tyr} του *Escherichia coli* σε CUA, από την οποία προκύπτουν amber κατασταλτικά μόρια, φάνηκε να μην επηρεάζει την πιστότητα της αμινοακυλίωσης (Smith, 1972).

Ποιά είναι τα στοιχεία που αποκλειστικά ή συνεργατικά με το αντικωδικόνιο καθορίζουν την αναγνώριση των μορίων tRNA; Ο ρόλος αυτός έχει αποδοθεί κυρίως στο βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος. Μόρια tRNA^{Ala} με χημικές τροποποιήσεις στην περιοχή αυτή έχει δείχθει ότι δεν αμινοακυλώνονται, ενώ μεταλλαγμένα κατασταλτικά

μόρια tRNA που αναγνωρίζονται από μη συγγενείς aaRSs φέρουν νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις στο βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος (Schulman & Chambers, 1968). Εκτός όμως από το βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος και άλλες περιοχές του μορίου tRNA φάνηκε να καθορίζουν την ταυτότητά του.

Το πρόβλημα που αναδύθηκε από τις αρχικές μελέτες ήταν ότι υπέδειξαν σχεδόν όλα τα επιμέρους τμήματα των μορίων tRNA ως σημαντικά για την εξειδικευμένη αμινοακυλίωσή τους. Η λανθασμένη αυτή θεώρηση προέκυψε καθώς χημικές τροποποιήσεις ακόμα και ενός νουκλεοτιδίου μπορούσαν να προκαλέσουν αλλαγές στη διαμόρφωση του μορίου που απέτρεπαν την αμινοακυλίωσή του. Καθώς στις περισσότερες των περιπτώσεων αυτές οι αλλαγές δεν ήταν ανιχνεύσιμες, προέκυψε το λανθασμένο συμπέρασμα ότι κάθε τμήμα του μορίου tRNA είναι σημαντικό για την αναγνώρισή του από τις συνθετάσες. Σε αυτό συνέβαλε και το γεγονός ότι οι αρχικές μελέτες βασίστηκαν στα αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα μόρια tRNA που συναντώνται φυσιολογικά στους οργανισμούς, λόγω έλλειψης τεκνογνωσίας. Τα αποτελέσματα των αρχικών μελετών δεν επηρεάστηκαν μόνο από την έλλειψη τεχνικών, αλλά και από το γεγονός ότι τα μεταλλαγμένα μόρια έφεραν υποκαταστάσεις μόνο μιας βάσης.

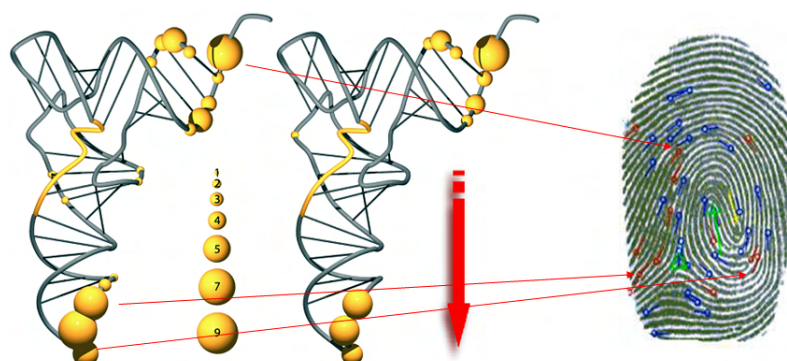
Τις τελευταίες δεκαετίες, η ανάπτυξη των μεθοδολογιών έδωσε τη δυνατότητα σύνθεσης δίκλωνων μορίων DNA που κωδικοποιούν μόρια tRNA με οποιοδήποτε αριθμό νουκλεοτιδικών αλλαγών. Η ενσωμάτωση των συνθετικών γονιδίων σε πλασμίδια και η επακόλουθη μεταγραφή τους παρέχει νέα μεταλλαγμένα μόρια tRNA που μπορούν να αναλυθούν λειτουργικά τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Στο σχεδιασμό των γονιδίων αυτών συνέβαλε και η ανάπτυξη τεχνικών για τη σύγκριση των μορίων tRNA μέσω εργαλείων της Βιοπληροφορικής. Τα προγράμματα αυτά έχουν τη δυνατότητα να προσδιορίζουν τις καθοριστικές περιοχές αναγνώρισης των μορίων tRNA, αλλά και το γενικό χαρακτήρα της εξειδίκευσης της αμινοακυλίωσης, γνωστό και ως *cove score*. Η διαδικασία αυτή ομοιάζει με τον τρόπο που οι συνθετάσες ξεχωρίζουν το υπόστρωμα τους μέσα στο πλήθος των παρόμοιων μορίων.

Η ουσιαστική πρόοδος στο συγκεκριμένο τομέα προήλθε από την επίλυση της κρυσταλλικής δομής συμπλόκων μεταξύ μορίων tRNA και συνθετασών, η οποία αποσαφήνισε τη σχέση δομής – λειτουργίας λεπτομερώς (Steitz *et al.*, 1990). Τυπικά, 20% από την προσβάσιμη επιφάνεια του μορίου tRNA αλληλεπιδρά με τη συνθετάση και κάποιες αλληλεπιδράσεις συνοδεύονται από μεγάλες αλλαγές στη διαμόρφωση των μορίων tRNA. Στις περιοχές αυτές ένας μικρός αριθμός νουκλεοτιδίων συνήθως προσδιορίζει την ταυτότητα των μορίων tRNA. Τα νουκλεοτίδια αυτά στις περισσότερες των περιπτώσεων εντοπίζονται στις ίδιες περιοχές, και συγκεκριμένα στο βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος, στο αντικωδικόνιο και λιγότερο συχνά στη μεταβλητή θηλιά, σε διαφορετικά μόρια RNA. Για το λόγο αυτό διατυπώθηκε ο όρος **“ταυτότητα των μορίων tRNA” (tRNA identity)** για να περιγράψει όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά στην αλληλουχία και στη δομή των μορίων αυτών που είναι μοναδικά για κάθε ένα τύπο μορίων tRNA, αποτελούν δηλαδή ένα είδος δακτυλικού αποτυπώματος (**Εικόνα 7**). Τα καθοριστικά νουκλεοτίδια ενός συγκεκριμένου μορίου tRNA προσδιορίζουν ταυτόχρονα τόσο παραγωγικές, όσο και μη παραγωγικές αλληλεπιδράσεις με τις

συνθετάσες. Συνεπώς, οι όροι **“ταυτότητα των μορίων tRNA”** και **“αναγνώριση των μορίων tRNA”** είναι έννοιες ταυτόσημες. Όπως προκύπτει από τις δομές των συμπλόκων μεταξύ των συνθετασών και των συγγενών μορίων tRNA υπάρχουν αλληλεπιδράσεις τόσο με τις βάσεις όσο και με το σκελετό σακχάρου-φωσφορικών. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του σκελετού των μορίων tRNA με τις συνθετάσες είναι επικρατείς αλλά δεν είναι γνωστό πως επηρεάζουν την αναγνώριση από τις aaRS. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις αυτές εξαρτώνται άμεσα από τις αλλαγές στη διαμόρφωση των μορίων tRNA, οι οποίες σχετίζονται με την αλληλουχία τους. Τέλος, τα νουκλεοτίδια που καθορίζουν την ταυτότητα του tRNA δεν είναι πάντα συντηρημένα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Αυτό εξαρτάται από τις αλλαγές των αμινοξέων των συνθετασών και την εξελικτική συμπροσαρμογή τους.

Τα στοιχεία ταυτότητας των μορίων tRNA διακρίνονται σε **Θετικά (καθοριστικά, determinants)** και **αρνητικά (αντι-καθοριστικά, anti-determinants)**, τα οποία αντίστοιχα επάγουν την εξειδικευμένη αμινοακυλίωση και αποτρέπουν την εστεροποίηση μη συγγενών αμινοξέων (Giege *et al.*, 1998). Τα στοιχεία αυτά δεν καθορίζονται μόνο από τις στενές φυσικοχημικές ιδιότητες, αλλά κυρίως από λειτουργικά κριτήρια, δηλαδή από την ισορροπία μεταξύ της αναγνώρισης από μια συνθετάση και της μη αναγνώρισης από τις υπόλοιπες.

Σε κάθε μόριο tRNA, τα θετικά στοιχεία είναι περιορισμένα στον αριθμό. Συμπεριλαμβάνουν μεμονωμένα νουκλεοτίδια σε μονόκλωνες περιοχές, ζεύγη βάσεων και μπορεί ακόμα να είναι και δομικά μοτίβα. Τα **συντηρημένα (conserved)** και **ημι-συντηρημένα (semi-conserved)** νουκλεοτίδια που είναι υπεύθυνα για την αρχιτεκτονική των μορίων tRNA δε συμπεριλαμβάνονται στα στοιχεία ταυτότητας. Η δομή των μορίων tRNA μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα ικρίωμα που επιτρέπει την κατάλληλη παρουσίαση σημάτων ταυτότητας στις συνθετάσες. Μετά την ενεργοποίηση του αμινοξέος από τη συνθετάση, το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου ενεργοποιείται πλήρως από τη σωστή αλληλεπίδραση με το μόριο tRNA, οπότε και ακολουθεί η αμινοακυλίωσή του.



Εικόνα 7: Η ταυτότητα των μορίων tRNA, που αποτελεί το “δακτυλικό αποτύπωμά” τους, καθορίζεται από νουκλεοτίδια σε συγκεκριμένα τμήματα του μορίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα καθοριστικά στοιχεία εντοπίζονται στο βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος και στη θηλιά του αντικωδικονίου.

Μεγάλος αριθμός μελετών έχει πραγματοποιηθεί στα πλαίσια της διευκρίνισης της ταυτότητας πολλών μορίων tRNA. Συγκεκριμένα, έχουν προσδιοριστεί τα στοιχεία αναγνώρισής τους και για τα 20 συστήματα αμινοακυλίωσης του *Escherichia coli*, 14 του *Saccharomyces cerevisiae*, 4 του *Thermus thermophilus* και κάποια από άλλους οργανισμούς, ακόμα και ανώτερους ευκαρυωτικούς, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου (**Πίνακες 1, 2**) (Giege et al., 1998, Mallick et al., 2005). Στις περισσότερες των περιπτώσεων είναι συγκεκριμένα νουκλεοτίδια, όπως για παράδειγμα η βάση διαλογέας (discriminator base) ή τα πρώτα ζεύγη βάσεων του βραχίονα υποδοχής τους αμινοξέος. Τροποποιημένα νουκλεοτίδια έχουν επίσης αναφερθεί ως στοιχεία ταυτότητας για τα tRNA μόρια της ισολευκίνης (Muramatsu et al., 1988, Nureki et al., 1994), του γλουταμινικού οξέος (Sylvers et al., 1993) και της λυσίνης του *Escherichia coli* και της ισολευκίνης του *Saccharomyces cerevisiae* (Perret et al., 1990). Αυτές οι τροποποιήσεις εντοπίζονται στη θηλιά του αντικωδικονίου. Εντούτοις, τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια που προκύπτουν μετα-μεταγραφικά συνεισφέρουν κυρίως στη σωστή τριτοταγή διαμόρφωση των μορίων tRNA, αλλά δεν είναι κατά κανόνα κύριοι ρυθμιστές της εξειδίκευσης στη διαδικασία της αμινοακυλίωσης.

Πίνακας 1: Στοιχεία ταυτότητας των μορίων tRNA που αμινοακυλιώνονται από aaRS κλάσης I. (α) βραχίονας υποδοχής αμινοξέος, (β) θηλιά αντικωδικονίου, (γ) υπόλοιπα τμήματα του μορίου tRNA.

Κλάση I	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. thermophilus</i>	Άλλοι οργανισμοί (*)	Αρχαία	Σχόλια	
Val	(a) A73,G3:C70,U4:A69	A73	—	—	A73		
	(b) A35,C36	A35			A35,C36		
	(c) —	—			—		
Ile	(a) A73,C4:G69	—	—	—	A73		
	(b) L/G34,A35,U36,t ⁶ A37,A38	I34,A35,U36			G34,A35,U36		
	(c) U12:A23,C29:G41	—			C27:G43		
Leu	(a) A73	A73	—	A73,C3:G70,A4:U69,G5:C68	A73	* <i>Homo sapiens</i>	
	(b) —	A35, G37		—	—		
	(c) U8-A14	—		C20a	G26-U44		
Met (fMet)	(a) A73,U4:A69,A5:U68 (G2:C71,C3:G70)	A73	—	—	A73	Τα νουκλεοτίδια σε παρένθεση είναι στοιχεία ταυτότητας των εναρκτήριων μορίων tRNA	
	(b) C34,A35,U36 (C32,U33,A37)	C34,A35,U36 & 4 nt θηλιάς αντικωδικονίου			—		(A1:U72) C34,A35,U36
	(c) —	Βραχίονας D			—		(3 ζεύγη GC - βραχίονας αντικωδικονίου)
Cys	(a) U73,G2:C71,C3:G70	U73	—	—	U73	Το G15-G48 χαρακτηριστικό του tRNA ^{Cys}	
	(b) G34,C35,A36	—			G34,C35,A36		
	(c) G15-G48,A13-A22	—			—		
Tyr	(a) A73	A73,C1:G72	—	C1:G72	C1:G72	* <i>Pneumocystis carinii</i>	
	(b) U35	G34,Ψ35			G34,U35,A36		
	(c) —	—			—		
Trp	(a) G73,A1:U72,G2:C71,G3:C70	—	—	G73,A1:U72,G5:C68,A9	A73	* <i>Bacillus subtilis</i>	
	(b) C34,C35,A36	C34,C35		C34,C35,A36			
	(c) —	—		—			
Glu	(a) G1:C72,U2:A71	—	—	—	C5:G68		
	(b) s ⁴ U34,U35,A37				U34,U35,C36		
	(c) U11:A24,U13:G22-A46,Δ47				—		
Gln	(a) G73,U1:A72,G2:C71,G3:C70	—	—	—	A73		
	(b) Y34,U35,G36,A37,U38				Αντικωδικόνιο		
	(c) G10				—		
Arg	(a) A/G73	—	—	—	A/G73		
	(b) C35,U/G36	C35,U/G36			C35,U/G36		
	(c) A20	—			A20		

Πίνακας 2: Στοιχεία ταυτότητας των μορίων tRNA που αμινοακυλιώνονται από aaRS κλάσης II. (α) βραχίονας υποδοχής αμινοξέος, (β) θηλιά αντικωδικονίου, (γ) υπόλοιπα τμήματα του μορίου tRNA.

Κλάση II	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. thermophilus</i>	Άλλοι οργανισμοί (*)	Αρχαία	Σχόλια
Ser	(a) G73,C72,G2:C71,A3:U70,R4:Y69	—	—	G73	G73	* <i>Homo sapiens</i>
	(b) —	—	—	—	—	
	(c) C11:G24, Μεταβλητή θηλιά	Μεταβλητή θηλιά	—	Μεταβλητή θηλιά	G26·U44	
Thr	(a) G1:C72,C2:G71	G1:C72	U73,G1:C72,U3:A70	—	U73	
	(b) G34,G35,U36	G35,U36	G35,U36		G35,U36	
	(c) —	—	—		—	
Pro	(a) A73,G72	—	—	—	A73	* <i>Homo sapiens</i>
	(b) G35,G36			G35,G36	G36	
	(c) G15.C48			—	—	
Gly	(a) U73,G1:C72,C2:G71,G3:C70	A73,C2:G71,G3:C70	U73,G1:C72,C2:G71	A73,C2:G71	A73	* Θηλασικά
	(b) C35,C36	C35,C36	C35,C36	—	C35,C36	
	(c) —	—	(G10:C25)	—	—	
His	(a) C73,G-1	A73,G-1	—	—	C73	
	(b) Αντικωδικόνιο	G34,U35			—	
	(c) —	—			C50:G64,G29:C41	
Asp	(a) G73,G2:C71	G73	G73	—	G73,G6:C67	
	(b) G34,U35,C36,C38	G34,U35,C36,C38	G34,U35,C36,C38		G34,U35,C36	
	(c) G10	G10·U25	G10		—	
Lys	(a) A73	—	—	—	G73	
	(b) U34,U35,U36,(mnm ^s s ² U)34				U35	
	(c) —				—	
Asn	(a) G73	—	—	—	G73,C3:G70	
	(b) G34,U35,U36				G34,U35,U36	
	(c) —				—	
Phe	(a) A73	A73	A73	A73	A73	* <i>Homo sapiens</i>
	(b) G34, A35, A36	G34,A35,A36,i ⁶ A37	G34,A35,A36	G34,A35,A36	G34, A35, A36	
	(c) G27:C43,G28:C42,U20, G44,U45,U59,U60	G20	—	C30:C40,A31:U39,G20	C13:G22	
Ala	(a) A73,G2:C71,G3·U70,G4:C69	G3·U70	—	G3·U70	A73,G3·U70	* <i>Bacillus mori</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> .
	(b) —	—		—	—	
	(c) G20	—		—	—	

Σε όλα τα συστήματα που έχουν αναλυθεί, τα στοιχεία ταυτότητας εντοπίζονται κυρίως στα δύο απομακρυσμένα άκρα των μορίων tRNA, όπως αυτά παρουσιάζονται στην τριτοταγή δομή του. Το σημαντικότερο ρόλο παίζουν τα νουκλεοτίδια του αντικωδικονίου, η βάση διαλογέας N73 και κάποια ζεύγη βάσεων του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος. Το νουκλεοτίδιο στη θέση 37 της θηλιάς του αντικωδικονίου συμπεριλαμβάνεται στα στοιχεία ταυτότητας μόνο των μορίων tRNA που αμινοακυλιώνονται από συνθετάσες κλάσης I (Nureki *et al.* 1994, Soma *et al.* 1996). Τα καθοριστικά στοιχεία αναγνώρισης στον πυρήνα των μορίων tRNA (nt 8-31 και 39-65) εντοπίζονται ανάλογα με το σύστημα αμινοακυλίωσης και είναι διασκορπισμένα σε 21 θέσεις. Κυρίως συμμετέχουν σε επτά περιπτώσεις συνθετασών κλάσης I (Ile, Leu, Cys, Glu, Gln, Arg, Met) (Nureki *et al.*, 1994, Normanly *et al.*, 1992, Hou *et al.*, 1993) και σε έξι περιπτώσεις συνθετασών κλάσης II (Ser, Pro, Phe, Gly, Asp, Ala) (Himeno *et al.*, 1997, Himeno *et al.*, 1990). Σε ελάχιστες περιπτώσεις στην αναγνώριση συμβάλλουν κάποιες ιδιαιτερότητας στην αλληλουχία των μορίων tRNA. Χαρακτηριστικά παραδείγματα, η μεγάλη μεταβλητή θηλιά του tRNA^{Ser} (Asahara *et al.*, 1994), το νουκλεοτίδιο N-1 του tRNA^{His} (Connolly *et al.*, 2004) και το ασύνηθες ζεύγος βάσεων G15-G48 του tRNA^{Cys} στο *Escherichia coli* (Hou *et al.* 1993).

Η αναγνώριση, λοιπόν, και η ορθή αμινοακυλίωση των μορίων tRNA φαίνεται να είναι μια διαδικασία που χρήζει ιδιαίτερης μελέτης, καθώς γίνεται αντιληπτό ότι τα κύτταρα έχουν αναπτύξει σημαντικούς μηχανισμούς για τη διασφάλιση της πιστότητας της αμινοακυλίωσής τους.

1.3 tRNA και αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες: Ο ρόλος τους στην πρωτεϊνοσύνθεση

Η μετάφραση των αγγελιοφόρων RNA κατά την πρωτεϊνοσύνθεση περιλαμβάνει την αμινοακυλίωση των μορίων tRNA, τη μεταφορά τους στο ριβόσωμα, με τη βοήθεια του παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu, και τη δημιουργία πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των αμινοξέων. Η ενσωμάτωση ενός αμινοξέος σε μια συγκεκριμένη θέση ενός νεοσυντιθέμενου πεπτιδίου καθορίζεται κυρίως από το σωστό συνδυασμό αμινοξέος – μορίου tRNA και την αλληλεπίδραση του αντικωδικονίου του αμινοακυλιωμένου tRNA με το κατάλληλο κωδικόνιο του mRNA. Επομένως, η πιστότητα της σύνθεσης των αμινοάκυλο-tRNA μορίων εξασφαλίζει την απρόσκοπτη ροή κατάλληλων υποστρωμάτων προς το ριβόσωμα, αλλά και από τη δομική ακεραιότητα του ριβοσώματος. Η διεργασία αυτή περιλαμβάνει την εστεροποίηση της καρβοξυλομάδας ενός και μόνο συγκεκριμένου αμινοξέος στην υδροξυλομάδα της αδενίνης στο 3'-CCA άκρο του μορίου tRNA (Rould *et al.*, 1989). Η αντίδραση καταλύεται από μια οικογένεια εξελικτικά συντηρημένων ενζύμων, τα οποία ονομάζονται αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (Schimmel & Soll, 1979, Schimmel, 1987). Η πιστότητα της μετάφρασης εξαρτάται κυρίως από δύο βασικές ιδιότητες που εξασφαλίζουν τα ένζυμα αυτά: τη σωστή εστεροποίηση του **συγγενούς αμινοξέος (cognate amino acid)** στο **συγγενές του μόριο tRNA (cognate tRNA)** και την απομάκρυνση μη συγγενών αμινοξέων, τα

οποία δεσμεύονται σε μη συγγενή μόρια tRNA (Ibba & Soll, 2000). Υπάρχουν βέβαια και άλλα σημεία ελέγχου των αμινοακυλιωμένων tRNA καθώς αυτά μεταφέρονται στο ριβόσωμα σε σύμπλοκο με τον παράγοντα επιμήκυνσης Tu. Ο παραγόντας EF-Tu χρησιμοποιεί ως δότη ενέργειας την υδρόλυση GTP για τη μεταφορά των αμινοακυλιωμένων tRNA στο ριβόσωμα. Στα πλαίσια της επιδιόρθωσης, τα λανθασμένα μόρια tRNA αποδεσμεύονται πριν ή μετά την απελευθέρωση του EF-Tu. Ο παράγοντας EF-Tu συνεισφέρει στην πιστότητα της μετάφρασης με τρεις κυρίως τρόπους (Thompson et al., 1986, Ibba & Soll, 1999). Σε περίπτωση που το μόριο tRNA στη θέση A του ριβοσώματος δεν είναι συμπληρωματικό με το κωδικόνιο του mRNA, ο EF-Tu καθυστερεί την υδρόλυση του GTP, με αποτέλεσμα το κακοφορτισμένο tRNA να απομακρύνεται από το ριβόσωμα. Επιπρόσθετα, υπάρχει ένας ακόμα έλεγχος μετά την απελευθέρωση του EF-Tu και πριν το μόριο tRNA εισέλθει πλήρως στη θέση A. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα τα λανθασμένα μόρια tRNA να απομακρυνθούν από τη θέση A, πριν ενσωματώσουν το λανθασμένο αμινοξύ στην πρωτεΐνη. Έχει περιγραφεί και ένας τρίτος μηχανισμός, ο οποίος όμως δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό ο παράγοντας EF-Tu ελέγχει αδρά τη σύνδεση αμινοξέος - μορίου tRNA και αποβάλλει τα σύμπλοκα στα οποία το αμινοξύ δεν είναι δεσμευμένο με το συγγενές μόριο tRNA. Η πλήρης αξιολόγηση λοιπόν των αμινοακυλιωμένων tRNA ξεκινά από τις συνθετάσες και συνεχίζεται μέχρι και το τελευταίο τμήμα της πρωτεΐνοσυνθετικής μηχανής.

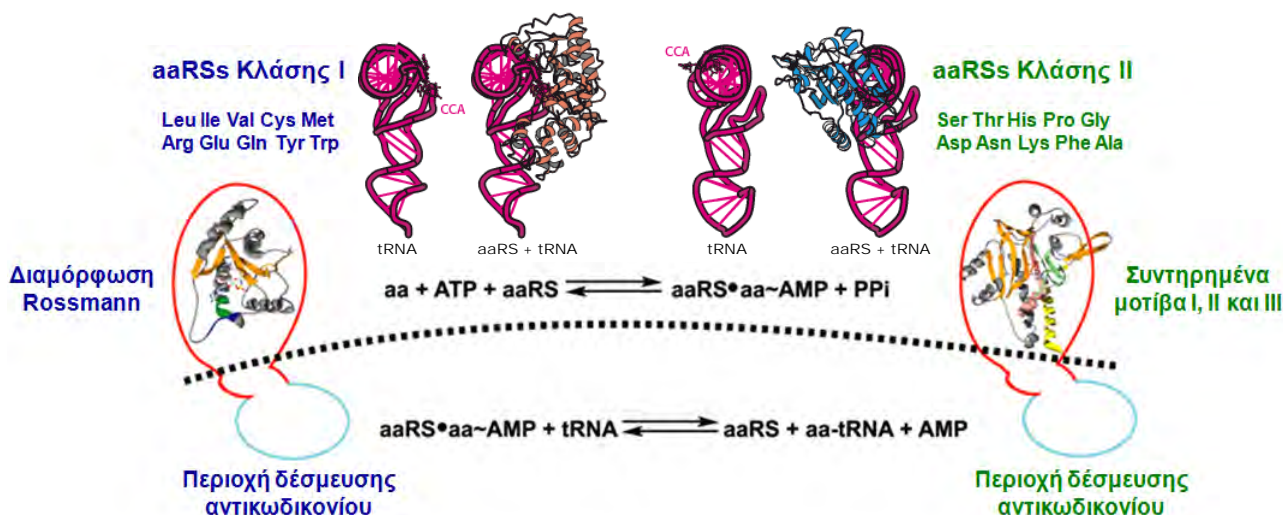
Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες διαχωρίζονται σε δύο κλάσεις, I και II, ανάλογα με την τοπολογία των ενεργών τους κέντρων και τα δομικά τους μοτίβα (Eriani et al., 1990). Κάθε κλάση περιλαμβάνει δέκα ένζυμα στην πλειονότητα των οργανισμών, που έχουν μελετηθεί ως τώρα (**Πίνακας 3**).

Πίνακας 3: Αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες κλάσης I και II. Οι δύο κλάσεις των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών περιλαμβάνουν δέκα ένζυμα η κάθε μια στην πλειονότητα των οργανισμών. Το όνομα κάθε συνθετάσες αποτελείται από τα τρία πρώτα γράμματα του συγγενούς αμινοξέος και την κατάληξη RS.

Αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες			
Κλάση I		Κλάση II	
Αργινίνη	ArgRS	Αλανίνη	AlaRS
Βαλίνη	ValRS	Ασπαραγίνη	AsnRS
Γλουταμίνη	GlnRS	Ασπαραγινικό οξύ	AspRS
Γλουταμινικό οξύ	GluRS	Γλυκίνη	GlyRS
Ισολευκίνη	IleRS	Θρεονίνη	ThrRS
Κυστεΐνη	CysRS	Ιστιδίνη	HisRS
Λευκίνη	LeuRS	Λυσίνη	LysRS
Μεθειονίνη	MetRS	Προλίνη	ProRS
Τρυπτοφάνη	TrpRS	Σερίνη	SerRS
Τυροσίνη	TyrRS	Φαινυλαλανίνη	PheRS

Οι aaRSs κλάσης I έχουν δύο ομόλογες περιοχές, που δεν απαντώνται σε άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν τις συντηρημένες αλληλουχίες His-Ile-Gly-His (HIGH) και

Lys-Met-Ser-Lys-Ser (KMSKS) (**Εικόνα 8**) (Burbaum & Schimmel, 1991). Τα δύο αυτά τμήματα αποτελούν μέρη μιας διαμόρφωσης που δεσμεύει δινουκλεοτίδια (Rossmann διαμόρφωση), συμμετέχουν στη δέσμευση του ATP και εμπλέκονται στην κατάλυση (Sugiura *et al.*, 2000). Οι συνθετάσες κλάσης II είναι γενικά διμερή ή τετραμερή και χαρακτηρίζονται από τρία υδρόφοβα μοτίβα που δεν έχουν ιδιαίτερα συντηρημένες αλληλουχίες, γνωστά ως μοτίβα 1, 2 και 3 (Perona *et al.*, 1993). Το μοτίβο 1 περιέχει ένα συντηρημένο κατάλοιπο προλίνης και εμπλέκεται στο διμερισμό. Οι συνθετάσες κλάσης II δεν εμπεριέχουν τη διαμόρφωση Rossmann, αλλά το καταλυτικό τους κέντρο αποτελείται από μια δομή αντιπαράλληλων β-πτυχωτών φύλλων. Τα μοτίβα 2 και 3 περιέχουν από μια συντηρημένη αργινίνη και σχηματίζουν το ενεργό κέντρο που εμπλέκεται στη σύνθεση του αμινοαδενυλικού ενδιάμεσου και στη δέσμευση του 3' άκρου του μορίου tRNA. Μια επιπλέον διαφορά μεταξύ των ενζύμων των δύο κλάσεων είναι ότι οι συνθετάσες κλάσης I μέσω του ενεργού τους κέντρου δεσμεύουν το βραχίονα αποδοχής του αμινοξέος του μορίου tRNA από την πλευρά της μικρής αύλακας, σε αντίθεση με τα ενεργά κέντρα των ενζύμων της κλάσης II που προσεγγίζουν το βραχίονα αυτό στη μεγάλη αύλακα (**Εικόνα 8**). Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι πολλές συνθετάσες της κλάσης I απαιτούν την αναγνώριση του αντικωδικονίου για να αμινοακυλιώσουν τα συγγενή μόρια tRNA, ενώ τα περισσότερα ένζυμα της κλάσης II δεν αλληλεπιδρούν με το αντικωδικόνιο του μορίου tRNA που δεσμεύουν. Επιπλέον, οι συνθετάσες κλάσης I αμινοακυλιώνουν τα 3' άκρα των μορίων tRNA στη θέση 2'-OH της τελικής αδενοσίνης, ενώ οι συνθετάσες κλάσης II, εκτός από τη PheRS, επιτελούν την ίδια διεργασία στη θέση 3'-OH (Cusack, 1997).



Εικόνα 8: Αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες κλάσης I και II. Οι συνθετάσες των δύο κλάσεων διαφέρουν στην τοπολογία των ενεργών τους κέντρων, καθώς φέρουν διαφορετικά δομικά μοτίβα. Διαφέρουν επίσης και στον τρόπο προσέγγισης του μορίου tRNA.

1.3.1 Εξειδίκευση και επιδιορθωτική δράση των aaRSs

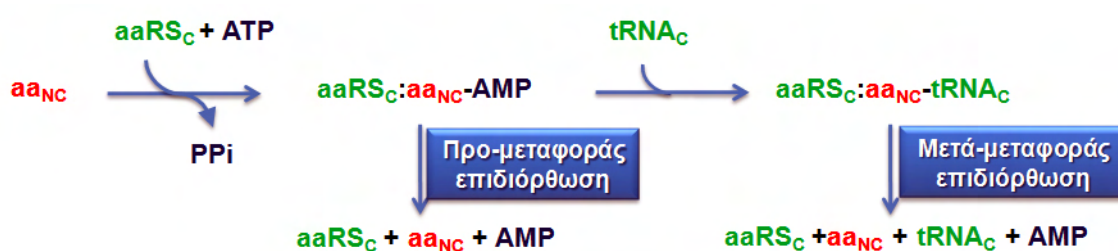
Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών είναι η υψηλή τους εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Κάθε ένα από τα ένζυμα της οικογένειας αυτής ακυλιώνει ένα μόνο είδος συγγενών μορίων tRNA με το συγγενές του αμινοξύ. Η αντίδραση που καταλύουν λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο ενεργοποιείται το αμινοξύ καθώς ένα μόριο ATP και το αμινοξύ δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης και δημιουργείται ένα σύμπλοκο αμινοακυλο-αδενυλικού, από ένα αμινοξύ και ένα μόριο AMP, που είναι δεσμευμένο στο ένζυμο, ενώ μια ανόργανη πυροφωσφορική ομάδα αποχωρεί. Στο δεύτερο στάδιο ένα μόριο tRNA δεσμεύεται στο σύμπλοκο aaRS•aa-AMP και ακολουθεί εστεροποίηση του μορίου tRNA στο 3' άκρο με το κατάλοιπο του αμινοξέος και απελευθέρωση ενός μορίου AMP (*Ibba & Soll, 2000*). Συνολικά, κατά την αντίδραση αυτή το αμινοξύ συνδέεται με το 3' άκρο του tRNA, ενώ παράλληλα υδρολύεται ATP και απελευθερώνεται ενέργεια με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός δεσμού υψηλής ενέργειας ανάμεσα στο μόριο tRNA και το αμινοξύ. Τα αμινοακυλιωμένα πλέον μόρια tRNA μεταφέρονται μέσω του παράγοντα επιμήκυνσης στο ριβόσωμα. Εκεί τα αντικωδικόνια των μορίων αυτών αλληλεπιδρούν με τα αντίστοιχα κωδικόνια του mRNA και το αμινοξύ, μετά την ενσωμάτωση του στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, απελευθερώνεται από το μόριο του tRNA.

Για να εξασφαλιστεί η ορθότητα της μετάφρασης, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μια σειρά μηχανισμών “ελέγχου ποιότητας” (quality control) (*Ibba & Soll, 1999*). Στους μηχανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται, η αποδοχή ή απόρριψη του αμινοάκυλο-tRNA από το ριβόσωμα, η εξειδικευμένη επιλογή υποστρωμάτων από τις aaRS και οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης. Η υψηλή αυτή εξειδίκευση επιτυγχάνεται μέσω περίπλοκων αλληλεπιδράσεων τόσο με τα αμινοξέα όσο κυρίως με τα μόρια tRNA, ώστε να εξασφαλιστεί ότι μόνο τα συγγενή υποστρώματα έχουν επιλεγεί από ένα πλήθος δομικά παρόμοιων υποστρωμάτων. Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η υδρόλυση των εσφαλμένα ενεργοποιημένων αμινοξέων ή των λανθασμένα φορτισμένων μορίων tRNA.

Η αναγνώριση του σωστού μορίου tRNA από την αντίστοιχη aaRS εξαρτάται από την ύπαρξη συγκεκριμένων στοιχείων ταυτότητας στα μόρια tRNA που δεν επιτρέπουν την αλληλεπίδραση με μη συγγενείς aaRSs (*McClain, 1993*). Οι περισσότερες συνθετάσες αλληλεπιδρούν μέσω δύο περιοχών με τα συγγενή μόρια tRNA. Η καταλυτική τους περιοχή δεσμεύει τη θηλιά TψC και το βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος του μορίου tRNA, ενώ άλλες περιοχές των συνθετασών, λιγότερο συντηρημένες σε σχέση με το ενεργό κέντρο, αλληλεπιδρούν κατά περίπτωση με την περιοχή του αντικωδικονίου (*Charles & Carter, 1993*). Συνήθως, οι περιοχές αυτές είναι προεκτάσεις του N- ή C- τελικού άκρου των συνθετασών. Η αναγνώριση του αντικωδικονίου είναι δευτερεύουσας σημασίας για την εξειδικευμένη επιλογή του μορίου tRNA. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες περιπτώσεις που η αναγνώριση κυρίως του ενδιάμεσου νουκλεοτιδίου του αντικωδικονίου είναι κρίσιμη για τη δέσμευση του συγγενούς μορίου tRNA. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η C- τελική προέκταση της

TyrRS του *Methanococcus jannaschii* που παίζει σημαντικό ρόλο στην εξειδικευμένη αλληλεπίδραση του ενζύμου με το tRNA^{Tyr} (Steer & Schimmel, 1999). Οι υπόλοιπες περιοχές του μορίου tRNA δεν αλληλεπιδρούν με το μόριο της συνθετάσης αν και έχει αναφερθεί ότι σε κάποιες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα αυτή της ArgRS του *Thermus thermophilus*, η συνθετάση αναγνωρίζει και κάποια στοιχεία του βρόχου D στα πλαίσια της αλληλεπίδρασης με το μόριο tRNA (Hendricson, 2001).

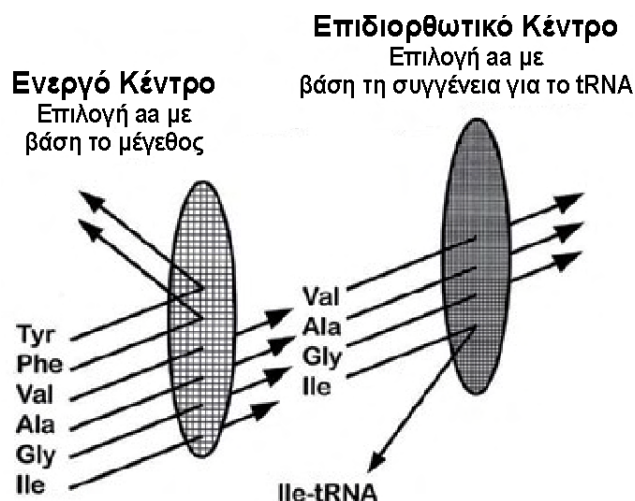
Η διαλογή των συγγενών αμινοξέων από τις συνθετάσες είναι μια διαδικασία περισσότερο πολύπλοκη, διότι τα μόρια αυτά είναι λιγότερο σύνθετα στη δομή τους σε σχέση με τα μόρια tRNA. Κάποια αμινοξέα, όπως η τρυπτοφάνη, φέρουν χαρακτηριστικές πλευρικές αλυσίδες και είναι εύκολη η αναγνώρισή τους. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αμινοξέα που παρουσιάζουν μικρές διαφορές μεταξύ τους και δε μπορούν να διακριθούν σαφώς, ώστε να αποφευχθούν τυχόν λάθη κατά τη μετάφραση. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των αμινοξέων βαλίνη και ισολευκίνη, που διαφέρουν μόνο κατά μια μεθυλομάδα. Η χαμηλή συχνότητα ενσωμάτωσης λανθασμένων αμινοξέων οφείλεται στην υψηλή εξειδίκευση και στην επιδιορθωτική δράση των aaRSs. Για παράδειγμα, ενώ η IleRS δεσμεύει βαλίνη σε μια συχνότητα 1:150 σε σύγκριση με την ισολευκίνη, η επιδιορθωτική δράση του εν λόγω ενζύμου εξασφαλίζει ότι ο ρυθμός με τον οποίο τα κωδικόνια της ισολευκίνης παρερμηνεύονται σε βαλίνη είναι περίπου 1:3000 (Loftfield & Vanderjagt, 1972). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω δύο μηχανισμών επιδιόρθωσης. Η **προ-μεταφοράς επιδιόρθωση (pre-transfer proofreading)** λαμβάνει χώρα, όταν το μη συγγενές αμινοξύ βρίσκεται ακόμα στη μορφή του αμινοακυλο-αδενυλικού συμπλόκου. Αντίθετα, η **μετα-μεταφοράς επιδιόρθωση (post-transfer proofreading)** επιδρά στο ήδη αμινοακυλωμένο μόριο tRNA (**Εικόνα 9**) (Ibba & Soll, 1999).



Εικόνα 9: Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί των aaRSs. Κάποιες συνθετάσες έχουν τη δυνατότητα να υδρολύσουν το ενεργοποιημένο μη συγγενές αμινοαξύ στο στάδιο του αμινοαδενυλικού ενδιάμεσου (προ-μεταφοράς επιδιόρθωση) ή μετά την εστεροποίησή του στο μόριο tRNA (μετα-μεταφοράς επιδιόρθωση).

Τα μόρια tRNA^{Ile} επηρεάζουν έμμεσα και τους δυο επιδιορθωτικούς μηχανισμούς. Γενικά, η επιδιορθωτική δράση βασίζεται στην ύπαρξη δύο διακριτών καταλυτικών περιοχών της IleRS, που διαμορφώνουν ένα **διπλό μηχανισμό διαλογής ("διπλό κόσκινο", double sieve)** κατά τη διαδικασία επιλογής των υποστρωμάτων (**Εικόνα 10**) (Nureki et al., 1998, Silivian et al., 1999). Στο ενεργό κέντρο της

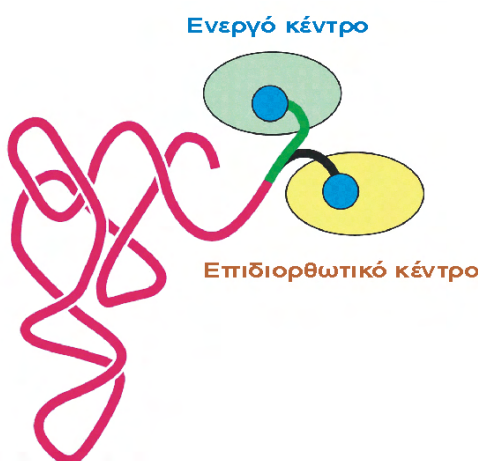
αμινοακυλίωσης πραγματοποιείται αποκλεισμός των αμινοξέων που είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από την ισολευκίνη. Η βαλίνη όμως, λόγω μικρού μεγέθους, προσλαμβάνεται ως υπόστρωμα με αποτέλεσμα να συνθέτονται σύμπλοκα Val-AMP. Στη **θέση επιδιόρθωσης (editing site)** πραγματοποιείται η δεύτερη επιλογή, μέσω υδρόλυσης των αμινοακυλο-αδενυλικών αυτών συμπλόκων.



Εικόνα 10: Η επιλογή των υποστρωμάτων από την IleRS με βάση ένα διπλό μηχανισμό διαλογής (“διπλό κόσκινο”, *double sieve*). Στην πρώτη διαλογή απομακρύνονται τα μεγαλύτερα σε μέγεθος αμινοξέα ενώ στη δεύτερη υδρολύονται τα αμινοαδενυλικά σύμπλοκα των μη συγγενών αμινοξέων.

Πολύ πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η εξειδίκευση της αμινοακυλο-tRNA συνθετάσης της θρεονίνης (ThrRS) βασίζεται στο διαχωρισμό των αμινοξέων μέσω ενός μηχανισμού, στον οποίο κρίσιμο ρόλο παίζει η ύπαρξη ιόντων ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο (*Sankaranarayanan et al., 2000*). Η ThrRS αναγνωρίζει και ενεργοποιεί εξειδικευμένα τη θρεονίνη, γιατί μέσω της αμινομάδας και της υδροξυλομάδας της πλευρικής της αλυσίδας συνδέεται ετεροπολικά με το ιόν του ψευδαργύρου του ενεργού κέντρου το ενζύμου. Αντίθετα, η βαλίνη, αν και ομοιάζει δομικά με τη θρεονίνη, στη θέση της υδροξυλομάδας φέρει μια μεθυλομάδα που δεν επιτρέπει την αλληλεπίδραση με το ιόν αυτό. Οπότε η βαλίνη απορρίπτεται άμεσα και δεν συντίθενται λανθασμένα φορτισμένα μόρια Val-tRNA^{Thr}. Στο ίδιο ένζυμο υπάρχει και μετα-μεταφοράς επιδιόρθωση, διότι ενεργοποιεί κατάλοιπα σερίνης, των οποίων δεν είναι δυνατή η απόρριψη πριν την εστεροποίησή τους στο tRNA^{Thr}. Το μόριο του tRNA καθοδηγεί ουσιαστικά την επιδιόρθωση του σφάλματος αυτού. Η δομική ανάλυση του συμπλόκου της ThrRS και των υποστρωμάτων της έδειξε ότι το αμινοακυλιωμένο-CCA άκρο μετακινείται από το καταλυτικό κέντρο στην περιοχή επιδιόρθωσης, που απέχει περί τα 20Å. Έτσι, χωρίς να αποδεσμεύεται το μόριο tRNA από τη συνθετάση, υδρολύεται η λανθασμένα ενεργοποιημένη σερίνη.

Η επιδιόρθωση μπορεί να λάβει χώρα και μετά τη δέσμευση με το μόριο tRNA. Η επιδιορθωτική δράση της IleRS εξαρτάται από συγκεκριμένες αλληλουχίες των tRNA^{Ile}, ενισχύοντας έτσι την ακρίβεια της σύνθεσης Ile-tRNA^{Ile} (Dock-Bregeon *et al.*, 2000). Τα μόρια tRNA^{Ile} ειδικά επάγουν τη μετατόπιση της εσφαλμένα ενεργοποιημένης βαλίνης, μέσω μακρομοριακών συγκρούσεων, από το καταλυτικό κέντρο στη θέση τροποποίησης και έτσι εξηγείται η χρησιμότητα των μορίων αυτών και για τις δύο αντιδράσεις επιλογής (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11: tRNA-εξαρτώμενη επιδιορθωτική δράση των συνθετασών. Το μόριο tRNA είναι υπεύθυνο για τη μετατόπιση του κακοφορητισμένου 3' άκρου του από το ενεργό στο επιδιορθωτικό κέντρο για την απομάκρυνση του εστεροποιημένου μη συγγενούς αμινοξέος.

Εκτός από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης που περιγράφηκαν παραπάνω έχει περιγραφεί και μη εξαρτώμενη από tRNA υδρόλυση των μη συγγενών αμινοαδενυλικών συμπλόκων που είναι δεσμευμένα με το ένζυμο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η MetRS, η επιδιορθωτική δράση της οποίας κατευθύνεται πρωταρχικά προς την ομοκυστεΐνη (homocysteine), ένα ενδιάμεσο προϊόν του μεταβολισμού της μεθειονίνης. Ο μηχανισμός της απόρριψης περιλαμβάνει την κυκλοποίηση της ομοκυστεΐνης προς παραγωγή θειολακτόνης (Jakubowski, 1995). Εκτός από τη MetRS, παρόμοια δράση έχει περιγραφεί και για τις IleRS, LeuRS και LysRS και υποδεικνύει ότι περιοχές δέσμευσης θειόλης υπάρχουν σε κάποιες aaRSs και των δύο κλάσεων. Εκτός από το ρόλο τους στην τροποποίηση της ομοκυστεΐνης, τα ένζυμα αυτά καταλύουν τη θειόλο-εξαρτώμενη απακυλίωση του μορίου tRNA με συνακόλουθη σύνθεση διπεπτιδίων που φέρουν κυστεΐνη, αν και ο φυσιολογικός ρόλος της διεργασίας αυτής δεν έχει προσδιοριστεί. Παρόλα τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα, η επιδιορθωτική ικανότητα των aaRSs δεν είναι πλήρως προσδιορισμένη για όλα τα μέλη των ενζύμων αυτής της οικογένειας. Επιπρόσθετα, φαίνεται από συγκριτικές εξελικτικές μελέτες ότι η ιδιότητα αυτή απουσιάζει από νεώτερα μέλη της οικογένειας, τα οποία εισήλθαν στο ρεπερτόριο της πρωτεϊνοσύνθεσης εξελικτικά αργότερα από κάποια άλλα. Η CysRS του *Escherichia coli* που θεωρείται η εξελικτικά νεώτερη συνθετάση έχει δείξει ότι δεν

περιέχει κανένα επιδιορθωτικό κέντρο παρόμοιο με αυτά που έχουν προσδιοριστεί για άλλες aaRSs (Newberry et al., 2002).

1.4 Ρόλος των μορίων tRNA σε κυτταρικές διεργασίες πέραν της πρωτεϊνοσύνθεσης

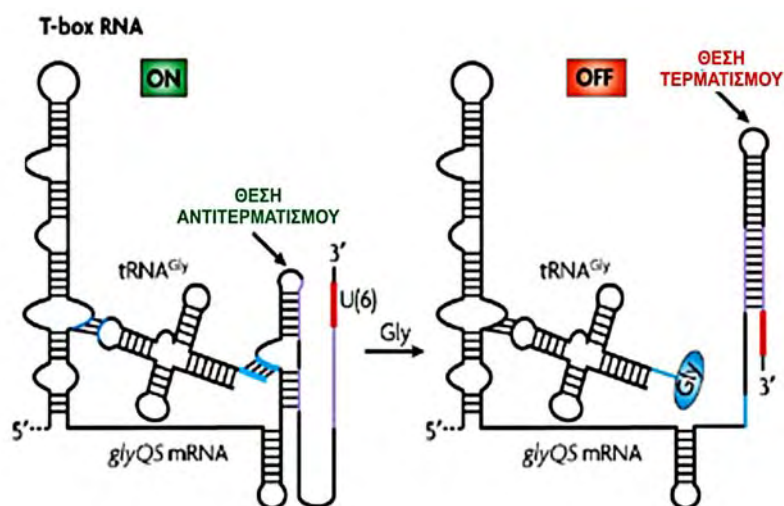
Ο ρόλος των μορίων tRNA στο κύτταρο δεν είναι μονοδιάστατος. Πέραν της συμμετοχής τους στην ενσωμάτωση αμινοξέων στα πεπτίδια, εμπλέκονται ακόμα και σε διεργασίες που προηγούνται της πρωτεϊνοσύνθεσης. Σε πολλές περιπτώσεις η σύνθεση συγκεκριμένων aa-tRNA μορίων εξαρτάται από τα μόρια tRNA καθώς επηρεάζουν τη δράση συγκεκριμένων ενζύμων τροποποίησης αμινοξέων για τη σύνθεση άλλων. Παράλληλα, αποτελούν και ρυθμιστές της σύνθεσης συγκεκριμένων αμινοξέων μέσω ασύνηθων συστημάτων αμινοακυλίωσης, σε περιπτώσεις που απουσιάζουν τα κατάλληλα βιοσυνθετικά ένζυμα. Για παράδειγμα, η βιοσύνθεση της ασπαραγίνης πραγματοποιείται μέσω ενός tRNA-εξαρτώμενου μηχανισμού στους οργανισμούς που απουσιάζει η συγγενής συνθετάση και το αντίστοιχο βιοσυνθετικό ένζυμο (Min et al., 2002). Τις τελευταίες δεκαετίες, οι μελέτες υποδεικνύουν το tRNA ως μόριο κλειδί και άλλων κυτταρικών διεργασιών, εξίσου σημαντικών για τη βιωσιμότητα των κυττάρων (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 12: Συμμετοχή των αμινοακυλιωμένων μορίων tRNA σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες. Πέραν της πρωτεϊνοσύνθεσης, τα aa-tRNA μόρια συμμετέχουν σε σημαντικά μονοπάτια βιοσύνθεσης ή τροποποίησης κυτταρικών συστατικών.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των μορίων tRNA έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνων. Για παράδειγμα, η αυξημένη σύνθεση του tRNA^{iMet} μπορεί να συσχετισθεί με την ογκογόνο ικανότητα κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια (Marshall et al., 2008). Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, τα μόρια tRNA εμπλέκονται σε ποικιλία διεργασιών. Ένα πρόσφατα προσδιορισμένο ισοδεκτικό tRNA^{Glu} (αναφέρεται ως tRNA₃^{Glu}) του *Acidithiobacillus ferrooxidans* αποσυνδέει την πρωτεϊνοσύνθεση από τη σύνθεση της τετραπυρόλης (Levicán et al., 2005). Επίσης, τα αμινοακυλιωμένα μόρια tRNA χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για τη μεταφορά μεμονωμένων αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο πρωτεϊνών (Leibowitz & Soffer, 1970, Watanabe et al., 2007). Η προσθήκη αυτή αποτελεί σήμα για την αποικοδόμηση των “σημασμένων” πλέον πρωτεϊνών (Varshavsky, 1996).

Τα aa-tRNA μόρια μπορεί να αποτελέσουν τη βάση και για τη σύνθεση άλλων μορίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η μετατροπή του εστεροποιημένου γλουταμινικού οξέος στο μόριο tRNA^{Glu} σε γλουταμινική 1-ημιαδελδεΐδη, ένα πρόδρομο μόριο της βιοσύνθεσης πορφυρίνης (Jahn et al., 1992). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μόρια tRNA εμπλέκονται και στο μετα-μεταγραφικό έλεγχο, καθώς στο κατά Gram θετικό βακτήριο *Bacillus subtilis*, η μετάφραση του mRNA της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της γλυκίνης (GlyRS) ρυθμίζεται μέσω της δέσμευσης μη φορτισμένων μορίων tRNA^{Gly} σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες της 5' αμετάφραστης περιοχής του mRNA γνωστές ως **ριβοδιακόπτες (T-boxes, riboswitches, Εικόνα 13)** (Yousef et al., 2005).



Εικόνα 13: Ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *glyQS* που κωδικοποιεί την GlyRS του *B. subtilis* μέσω ριβοδιακόπτη (riboswitch). Τα μόρια tRNA ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου μέσω αλληλεπίδρασης με την περιοχή T-box του mRNA.

Πέραν όμως των διαδικασιών που περιγράφηκαν παραπάνω τα αμινοακυλιωμένα μόρια tRNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε δύο μηχανισμούς που σχετίζονται με τις ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος (RajBhandary & Söll, 2008). Στο *Clostridium perfringens* έχει

μελετηθεί η συμμετοχή aa-tRNA μορίων και ειδικότερα του Lys-tRNA^{Lys} στην αμινοακυλίωση των φωσφολιπιδίων (Roy & Ibbra, 2008). Η διαδικασία αυτή σχετίζεται με τη μείωση της διαπερατότητας των μεμβρανών σε παράγοντες, όπως είναι βακτηριολυτικά ένζυμα και αντιμικροβιακά πεπτιδία, που έχουν κατιονικό χαρακτήρα. Επιπρόσθετα, τα aa-tRNA μόρια εμπλέκονται και στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος κατά Gram θετικών βακτηρίων. Στην περίπτωση αυτή τα μόρια tRNA δρουν ως δότες αμινοξέων για τη σύνθεση πεπτιδίων απαραίτητων για την ακεραιότητα του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Συγκεκριμένα, το tRNA^{Ala} συμμετέχει στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του *Weissella viridescens* (Plapp & Strominger, 1970) και του *Streptococcus pneumoniae* (Lloyd et al., 2008). Αντίστοιχα, τα tRNA^{Gly} και tRNA^{Ser} εμπλέκονται στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των *Staphylococcus aureus* (Matsushashi et al., 1965) και *Staphylococcus epidermidis* (Petit et al., 1968). Τα συγκεκριμένα παραδείγματα εναλλακτικών ρόλων των αμινοακυλιωμένων μορίων tRNA υποδεικνύουν την σημαντικότητα τους σε ασυνήθεις μεταβολικές οδούς, πέραν της πρωτεϊνοσύνθεσης.

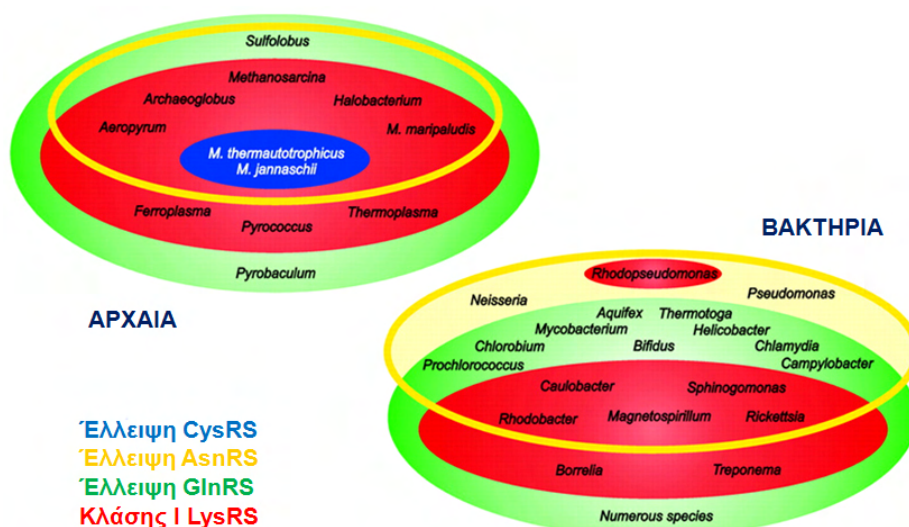
Ο πολυδιάστατος ρόλος των μορίων tRNA στις κυτταρικές λειτουργίες υποδεικνύει το λόγο για τον οποίο παραμένουν ιδιαίτερα συντηρημένα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Χαρακτηριστική συνέπεια τυχαίων μεταλλάξεων των μορίων tRNA αποτελούν οι ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών ομολόγων τους στον άνθρωπο (Zifa et al., 2007). Τα μόρια tRNA που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα έχουν αναλυθεί σε μεγάλο βαθμό. Οι σημειακές μεταλλάξεις που φέρουν διακρίνονται σε πολυμορφισμούς και παθογόνες μεταλλάξεις, οι οποίες σχετίζονται με την εμφάνιση νευρομυϊκών και νευροεκφυλιστικών παθήσεων. Λόγω του αυξημένου βαθμού συντήρησης της αλληλουχίας τους, τα μιτοχονδριακά γονίδια των μορίων tRNA χρησιμεύουν και σαν βοηθητικοί δείκτες φυλογενετικών αναλύσεων σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Stamatis et al., 2008). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις αναλύσεις αυτές είναι συγκρίσιμα με εκείνα των μελετών που βασίζονται στο κυτόχρωμα C και τη θηλιά D του μιτοχονδριακού γενόματος.

1.5 Ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης: Ο ρόλος των μορίων tRNA

1.5.1 tRNA εξαρτώμενα συστήματα αλληλομετατροπής αμινοξέων

Σύμφωνα με την υπόθεση του Crick, κάθε κύτταρο και οργανίδιο θα έπρεπε να διαθέτει 20 αμινοξέα και 20 αντίστοιχες αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες, κάθε μια από τις οποίες είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση καθενός από τα 20 διαφορετικά aa-tRNA μόρια που είναι απαραίτητα για τη μετάφραση των mRNA (Crick, 1958). Ωστόσο, οι πληροφορίες που προκύπτουν από τις γονιδιωματικές αναλύσεις των τελευταίων δεκαετιών υποδεικνύουν ότι η υπόθεση αυτή δεν αποτελεί δόγμα. Σε πολλούς οργανισμούς δεν εντοπίζονται και τα 20 γονίδια που κωδικοποιούν τις aaRSs. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη εναλλακτικών οδών σύνθεσης των αντίστοιχων aa-tRNA μορίων, στους οργανισμούς που οι συγγενείς τους συνθετάσες απουσιάζουν. Η

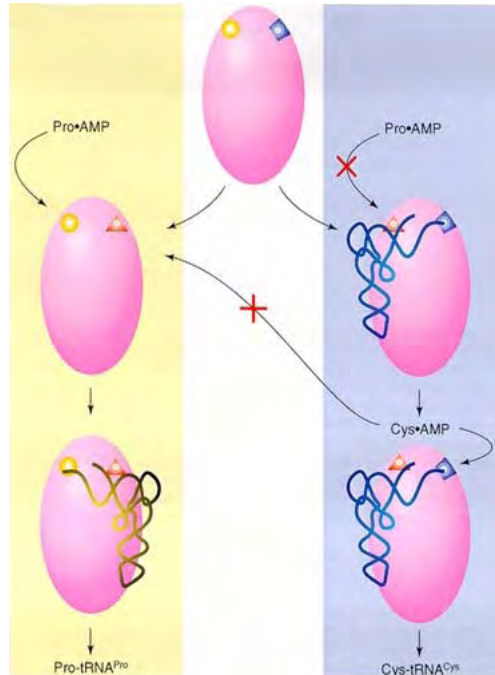
αμφισβήτηση της καθολικότητας της υπόθεσης του προσαρμοστή βασίστηκε στη δημοσίευση του πλήρους γονιδιώματος μεθανιογόνων αρχαίων, του *Methanococcus jannaschii* και του *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Bult et al., 1996, Smith et al., 1997). Εν συνεχεία, λειτουργικές και γονιδιωματικές αναλύσεις στα εν λόγω αρχαία αλλά και σε άλλους οργανισμούς οδήγησαν στην αναγνώριση γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν μόνο 16 aaRSs. Ειδικότερα, στους οργανισμούς αυτούς η tRNA συνθετάση της λυσίνης (LysRS) είναι κλάσης I και όχι II (Ibba et al., 1997) και απουσιάζουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες της κυστεΐνης (CysRS) (Ibba et al., 2000), της γλουταμίνης (GlnRS) και της ασπαραγίνης (AsnRS) (**Εικόνα 14**) (Bunjun et al., 2000, Tumbula et al., 2000).



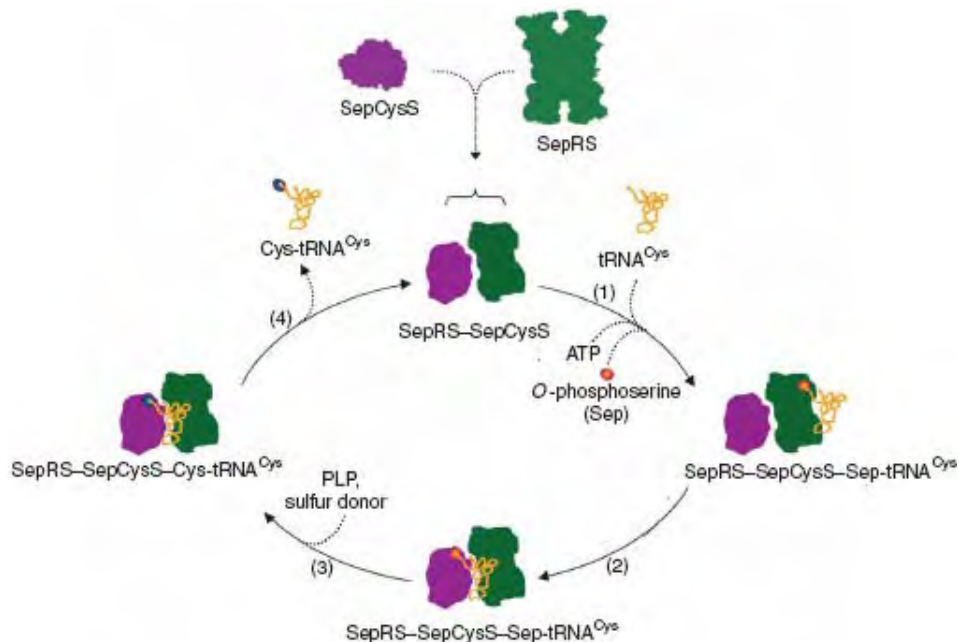
Εικόνα 14: Παραδείγματα βακτηρίων και αρχαίων που εμφανίζουν φυλογενετική ποικιλομορφία όσον αφορά τη σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNA μορίων. Οι οργανισμοί μέσα στο μπλε κύκλο δεν κωδικοποιούν τη CysRS, αυτοί μέσα στον κόκκινο κύκλο κωδικοποιούν LysRS τάξης I. Αντίστοιχα, οι οργανισμοί μέσα στον πράσινο κύκλο στερούνται της GlnRS, και τέλος αυτοί μέσα στον κίτρινο κύκλο στερούνται της AsnRS.

Οι περισσότεροι οργανισμοί φέρουν ένα λειτουργικό αντίγραφο του γονιδίου *cysS* και βιοσυνθέτουν Cys-tRNA άμεσα μέσω της CysRS. Ωστόσο, στα δύο αρχαία που δεν απαντάται το συγκεκριμένο ένζυμο, ακολουθείται μια εναλλακτική πορεία αμινοακυλίωσης των tRNA^{Cys}. Δύο είναι τα πιθανά μονοπάτια που έχουν μελετηθεί σε διαφορετικές συνθήκες. Σε αερόβιες συνθήκες, η σύνθεση Cys-tRNA^{Cys} πραγματοποιείται μέσω της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της προλίνης (ProRS) που παρουσιάζει διπλή εξειδίκευση (**Εικόνα 15**) (Li et al., 1999, Stathopoulos et al., 2000). Το μόριο tRNA^{Cys} σε αυτή την περίπτωση κατευθύνει την ορθή αμινοακυλίωσή του, καθώς αποτρέπει τη δέσμευση ενεργοποιημένης προλίνης (Stathopoulos et al., 2001). Σε αναερόβιες συνθήκες μια O-φωσφοσερυλ-tRNA συνθετάση (SepRS) καταλύει την εξειδικευμένη δέσμευση φωσφοσερίνης στο tRNA^{Cys} (Sauerwald et al., 2005). Ακολουθώντας, μια Sep-tRNA:Cys-tRNA συνθάση (SepCysS) καταλύει τη μετατροπή του

Sep-tRNA^{Cys} σε Cys-tRNA^{Cys}, χρησιμοποιώντας φωσφορική πυριδοξάλη ως συμπράγοντα (**Εικόνα 16**). Στο *Methanococcus maripaludis* η πορεία αυτή πέρα από την πρωτεϊνοσύνθεση είναι υπεύθυνη και για τη βιοσύνθεση του αμινοξέος κυστεΐνη.



Εικόνα 15: Σύνθεση των Cys-tRNA^{Cys} σε αερόβιες συνθήκες στα αρχαία που απουσιάζει η CysRS. Μια ProRS με διπλή δραστικότητα συνθέτει Pro-tRNA^{Pro} και Cys-tRNA^{Cys} μέσω μια διαδικασίας που εξαρτάται από τα μόρια tRNA.



Εικόνα 16: Σύνθεση Cys-tRNA^{Cys} σε αναερόβιες συνθήκες στα αρχαία που απουσιάζει η CysRS. Στο μονοπάτι σύνθεσης συμμετέχουν δύο ένζυμα: μια O-φωσφοσερυλ-tRNA συνθετάση (SepRS)

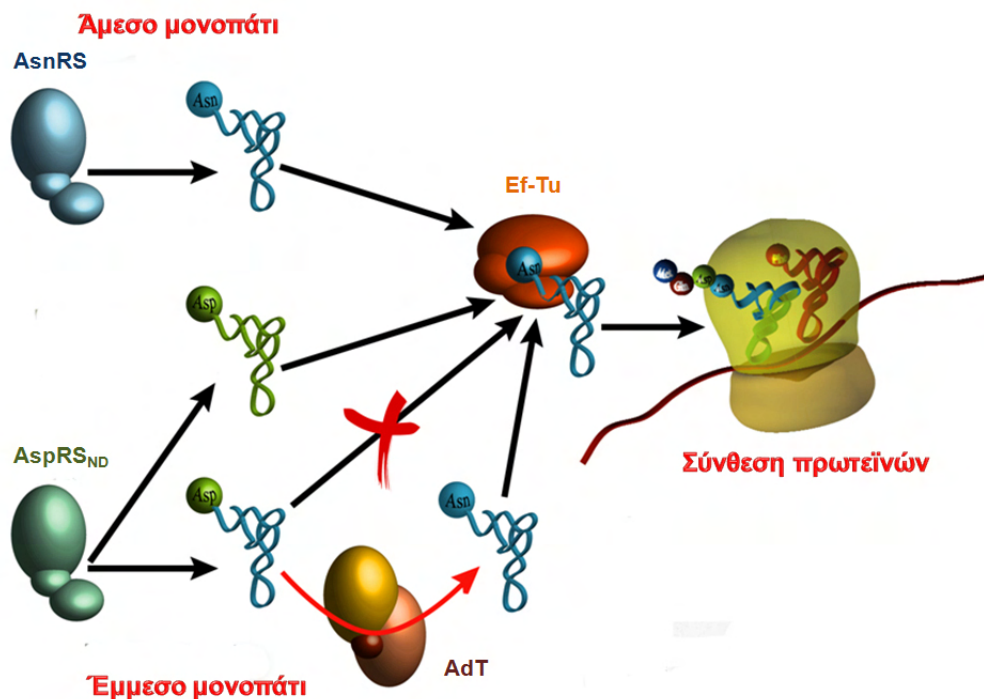
που καταλύει τη δέσμευση φωσφοσερίνης στο $tRNA^{Cys}$ και μια $Sep-tRNA:Cys-tRNA$ συνθάση ($SepCysS$) που καταλύει τη μετατροπή του $Sep-tRNA^{Cys}$ σε $Cys-tRNA^{Cys}$.

Η έλλειψη των συνθετασών της ασπαραγίνης ($AsnRS$) και της γλουταμίνης ($GlnRS$) παρακάμπτεται μέσω ενός μηχανισμού δύο διαφορετικών ενζυμικών αντιδράσεων, του οποίου η ύπαρξη είχε εικαστεί πριν από τέσσερις δεκαετίες (*Wilcox & Nirenberg, 1968, White & Bayley, 1972*). Στους οργανισμούς που απουσιάζουν οι $AsnRS$ και $GlnRS$, η αμινοακυλίωση των αντίστοιχων $tRNA^{Asn}$ και $tRNA^{Gln}$ λαμβάνει χώρα ως εξής: ασπαραγινικό και γλουταμινικό οξύ εστεροποιούνται αντίστοιχα στα $tRNA^{Asn}$ και $tRNA^{Gln}$. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από μη εξειδικευμένες $AspRS$ και $GluRS$ που παρουσιάζουν **χαμηλή εξειδίκευση** στο καταλυτικό τους κέντρο όσον αφορά την αναγνώριση του μορίου $tRNA$ (**nondiscriminating, ND**) (*Lapointe et al., 1986, Tumbula et al. 2000*). Έχουν, δηλαδή, την ικανότητα να αναγνωρίζουν ως υποστρώματα τόσο το συγγενές ($tRNA^{Asp}$, $tRNA^{Glu}$) όσο και το μη συγγενές $tRNA$ μόριο ($tRNA^{Asn}$, $tRNA^{Gln}$).

Αντί να χρησιμοποιούν μόνο μια μη εξειδικευμένη $AspRS$, κάποια βακτήρια, όπως ο *Thermus thermophilus*, χρησιμοποιούν δύο $AspRS$ s (**AspRS1** με υψηλή εξειδίκευση και **AspRS2** με χαμηλή εξειδίκευση) για την αμινοακυλίωση όλων των ισοδεκτικών $tRNA^{Asp}$ και $tRNA^{Asn}$ (*Becker & Kern, 1998*). Στο *Thermus thermophilus* η $AspRS1$ είναι εξειδικευμένη και αμινοακυλιώνει μόνο τα δύο ισοδεκτικά μόρια $tRNA^{Asp}$ και όχι τα $tRNA^{Asn}$. Η αμινοακυλίωση των $tRNA^{Asn}$ καταλύεται αποκλειστικά από την $AspRS2$. Η χαμηλή εξειδίκευση της $AspRS2$, η αναγνώριση δηλαδή τόσο των $tRNA^{Asn}$ όσο και των $tRNA^{Asp}$, θεωρείται ότι οφείλεται στις διαφορές που παρουσιάζει στην περιοχή δέσμευσης του αντικωδικονίου σε σχέση με την $AspRS1$ (*Charron et al., 2003*). Κάτι αντίστοιχο έχει παρατηρηθεί και σε οργανισμούς οι οποίοι εκφράζουν δύο $GluRS$ s. Συνήθως στους οργανισμούς αυτούς, όπως ο *Acidithiobacillus ferrooxidans*, η δράση των δύο συνθετασών είναι συμπληρωματική, καθώς η μία συνθέτει $Glu-tRNA^{Glu}$, ενώ η δεύτερη $Gln-tRNA^{Gln}$ (*Salazar et al., 2003*).

Μέσω της δράσης των μη εξειδικευμένων συνθετασών προκύπτουν **κακοφορτισμένα μόρια tRNA (mischarged tRNAs)**, τα οποία όμως δε θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν στην πρωτεϊνοσύνθεση, προκειμένου να αποφευχθεί η ενσωμάτωση ασπαραγινικού οξέος στη θέση της ασπαραγίνης και γλουταμινικού οξέος έναντι της γλουταμίνης. Ο παράγοντας επιμήκυνσης EF-Tu δεν αναγνωρίζει τα κακοφορτισμένα μόρια οπότε δε μεταφέρονται στο ριβόσωμα για να συμμετέχουν στη σύνθεση πρωτεϊνών (*Stanzel et al., 1994, Becker & Kern, 1998*). Ακολούθως, τα $Asp-tRNA^{Asn}$ και $Glu-tRNA^{Gln}$ που προκύπτουν δεσμεύονται σε ένα δεύτερο βήμα από εξειδικευμένα ένζυμα, τις **tRNA-εξαρτώμενες αμιδοτρανσφεράσες (tRNA-dependent amidotransferase, AdTs)**, των οποίων η δραστηριότητα εξαρτάται από την παρουσία κακοφορτισμένων μορίων $tRNA$, ATP και ιόντων αμμωνίας (*Curnow et al., 1997, Curnow et al., 1998*). Σε γενικές γραμμές η αντίδραση που καταλύουν είναι η μεταφορά μιας αμιδομάδας στην πλευρική ομάδα ασπαραγινικού ή γλουταμινικού οξέος που είναι εστεροποιημένο στο μόριο $tRNA$ και ταυτόχρονη κατανάλωση ATP

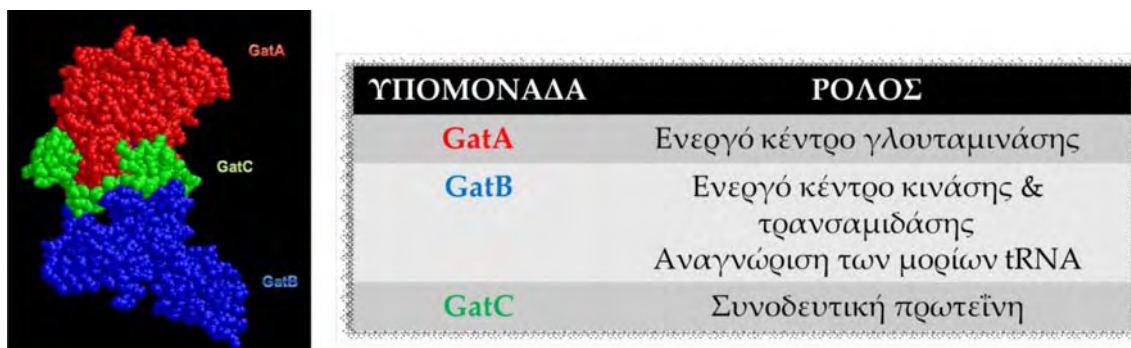
(**Εικόνα 17**). Οι tRNA-εξαρτώμενες αμιδοτρανσφεράσες (tRNA-dependent amidotransferases, AdTs) είναι ένζυμα, των οποίων η δραστηριότητα εξαρτάται από τα tRNA μόρια και διακρίνονται σε δύο είδη, την **ετεροτριμερή GatCAB** (υπομονάδες GatA, GatB και GatC) (Tumbula et al., 2000, Curnow et al., 1998) και την **ετεροδιμερή GatDE** (υπομονάδες GatD και GatE) (Tumbula et al., 2000).



Εικόνα 17: Άμεσο και έμμεσο μονοπάτι σύνθεσης των Asn-tRNA^{Asn}. Στο άμεσο μονοπάτι συμμετέχει μια εξειδικευμένη AsnRS που εστεροποιεί Asn στο συγγενές μόριο tRNA. Στο έμμεσο μονοπάτι μια μη εξειδικευμένη AspRS (AspRS_{ND} ή AspRS2) εστεροποιεί Asp τόσο στο συγγενές tRNA^{Asp} όσο και στο μη συγγενές tRNA^{Asn}. Το κακοφορισμένο Asp-tRNA^{Asn} δε δεσμεύεται από τον EF-Tu αλλά αποτελεί υπόστρωμα για την tRNA-εξαρτώμενη αμιδοτρανσφεράση (AdT) που μετατρέπει το εστεροποιημένο Asp σε Asn χρησιμοποιώντας κάποιο δότη αμιδίου.

Η GatCAB είναι ένα ετεροτριμερές ένζυμο που κωδικοποιείται από τα γονίδια *gatC*, *gatA* και *gatB*. Σε κάποια βακτήρια, όπως ο *Bacillus subtilis*, τα γονίδια αυτά είναι οργανωμένα σε οπερόνιο (Curnow et al., 1997), ενώ σε άλλα, όπως ο *Deinococcus radiodurans*, οι υπομονάδες κωδικοποιούνται από μεμονωμένα γονίδια (Curnow et al., 1998). Η υπομονάδα GatA φαίνεται να καταλύει την υδρόλυση της γλουταμίνης, που πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας ενός ενδιάμεσου ακυλ-ενζύμου στη γ-καρβοξυλομάδα της γλουταμίνης με τη Ser178 (σύμφωνα με την αρίθμηση του ενζύμου του *Staphylococcus aureus*) (Nakamura et al., 2006). Η υπομονάδα GatB περιέχει τα ενεργά κέντρα κινάσης και αμιδοτρανσφεράσης καθώς και τη θέση αναγνώρισης των μορίων tRNA (Oshikane et al., 2006). Ένα υδρόφιλο κανάλι μήκους 30 Å συνδέει τα ενεργά κέντρα των δύο υπομονάδων (Nakamura et al., 2006). Ο ρόλος της υπομονάδας GatC δεν έχει προσδιοριστεί επακριβώς λόγω αντικρουόμενων

παρατηρήσεων. Στην κρυσταλλική δομή της GatCAB του *Staphylococcus aureus*, η υπομονάδα GatC περιτυλίσσεται γύρω από τη διεπιφάνεια των GatA και GatB και ίσως να παίζει κάποιο ρόλο στη σταθεροποίηση του συμπλόκου (Nakamura *et al.*, 2006) (**Εικόνα 18**). Στο *Bacillus subtilis*, η GatC πιθανότατα εμπλέκεται στη σωστή έκφραση της GatA (Curnow *et al.*, 1997) και στο *Helicobacter pylori* φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα του κυττάρου (Chalker *et al.*, 2001). Αντίθετα, στο *Thermus thermophilus* η παρουσία της δεν είναι αναγκαία για την καταλυτική δραστηριότητα της αμιδοτρανσφεράσης, ενώ παράλληλα έχει παρατηρηθεί ότι κατά τον καθαρισμό του ενζύμου δεν ανακτάται η υπομονάδα GatC, χωρίς αυτό να επηρεάζει τη δραστηριότητά του *in vitro* (Becker & Kern, 1998). Η μόνη πιθανή εξήγηση των αποτελεσμάτων αυτών είναι η διαφορετική λειτουργία της υπομονάδας τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*.



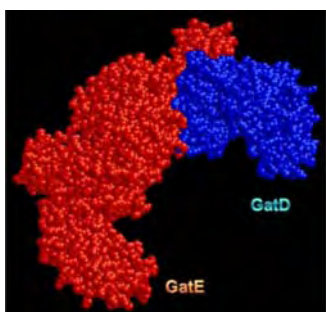
Εικόνα 18: Η κρυσταλλική δομή της GatCAB αμιδοτρανσφεράσης (Asp- / Glu- AdT) και ο ρόλος των υπομονάδων GatA, GatB και GatC.

Ο μηχανισμός της τρανσαμιδωσης αναλύθηκε με βάση την κινητική της GatCAB του *Streptococcus pyogenes* (Horiuchi *et al.*, 2001). Σύμφωνα με την εν λόγω μελέτη, η δράση γλουταμινάσης και ATPάσης της GatCAB συνδέονται άμεσα με τη δράση τρανσαμιδάσης. Απουσία κακοφορτισμένων μορίων tRNA, οι δραστηριότητες γλουταμινάσης και ATPάσης εμφανίζονται ιδιαίτερα χαμηλές. Αντιθέτως, κατά την προσθήκη Glu-tRNA^{Gln} η δραστηριότητα γλουταμινάσης αυξάνεται σημαντικά, ενώ η συγγένεια του ενζύμου για τη γλουταμίνη παραμένει σταθερή. Αντίστοιχα, αυξάνεται και το ποσοστό υδρόλυσης του ATP παρουσία γλουταμίνης και Glu-tRNA^{Gln}. Η πρόσδεση λοιπόν των κακοφορτισμένων μορίων tRNA στην αμιδοτρανσφεράση φαίνεται να προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωσή της, η οποία επιτρέπει στα κατάλοιπα των ενεργών κέντρων της γλουταμινάσης και της ATPάσης να συμμετέχουν στην κατάλυση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελετών για τη δράση των AdTs έχει προταθεί ότι η πρόσδεση του ATP και του κακοφορτισμένου μορίου tRNA είναι ικανή συνθήκη για την επαγωγή της δράσης γλουταμινάσης. Ωστόσο η υδρόλυση του ATP είναι το καθοριστικό βήμα για τη συνέχιση της αντίδρασης τρανσαμιδωσης.

Η GatCAB αμιδοτρανσφεράση συναντάται τόσο στα βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων όλων των παθογόνων με γνωστό γονιδίωμα, όσο και στα αρχαία.

Σύμφωνα με *in vitro* πειράματα παρουσιάζει διπλή εξειδίκευση, έχει δηλαδή τη δυνατότητα να αναγνωρίσει και να τροποποιήσει τόσο το Asp-tRNA^{Asn} όσο και το Glu-tRNA^{Gln} (Asp-/Glu-AdT) (Curnow *et al.*, 1998, Becker *et al.*, 2000b, Tumbula *et al.*, 2000, Cathopoulos *et al.*, 2007a). Ωστόσο, το ένζυμο *in vivo* συμπεριφέρεται κάτω από προϋποθέσεις είτε ως αμιδοτρανσφεράση του γλουταμινικού είτε του ασπαραγινικού οξέος. Η ακριβής εξειδίκευση της GatCAB *in vivo* εξαρτάται από την απουσία των συγγενών συνθετασών (Becker *et al.*, 2000, Bailly *et al.*, 2007). Στα βακτήρια, όπως είναι το *Bacillus subtilis*, από τα οποία απουσιάζει η GlnRS (Lapointe *et al.*, 1986), η GatCAB παρουσιάζει δραστηριότητα Glu-AdT (Curnow *et al.*, 1997). Στα βακτήρια που δεν κωδικοποιούν AsnRS, όπως για παράδειγμα τα *Neisseria meningitidis*, *Thermus thermophilus*, *Deinococcus radiodurans* κ.ά., παρουσιάζει εξειδικευμένη δράση ως Asp-AdT (Curnow *et al.*, 1998, Akochy *et al.*, 2004). Σε δύο περιπτώσεις, έχει αναφερθεί ότι το ένζυμο παρουσιάζει διπλή εξειδίκευση *in vivo* στα βακτήρια *Chlamydia trachomatis* (Raczniak *et al.*, 2001) και *Helicobacter pylori* (Sheppard *et al.*, 2007), από τα οποία απουσιάζουν και οι δύο συγγενείς συνθετάσες, AsnRS και GlnRS.

Η GatDE αμιδοτρανσφεράση είναι ένα ένζυμο που απαντάται μόνο στα αρχαία και είναι ετεροδιμερές (Tumbula *et al.*, 2000). Οι δύο υπομονάδες του κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gatD* και *gatE*. Κατ' αντιστοιχία με τις υπομονάδες GatA και GatB της GatCAB, η υπομονάδα GatD φέρει το ενεργό κέντρο γλουταμινάσης, ενώ η GatE περιέχει τα ενεργά κέντρα κινάσης και τρανσαμιδάσης και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση των μορίων tRNA (**Εικόνα 19**) (Oshikane *et al.*, 2006). Η δράση γλουταμινάσης συνδέεται άμεσα με τη δέσμευση του Glu-tRNA^{Gln} και την ακεραιότητα του GatDE ετεροδιμερούς. Τέσσερα συντηρημένα αμινοξέα (Thr101, Thr177, Asp178, και Lys254) είναι σημαντικά για τη δραστηριότητα γλουταμινάσης, με τη μια από τις δύο θρεονίνες να αποτελεί το νουκλεόφιλο του ενεργού κέντρου σε συνδυασμό με την καταλυτική τριάδα Thr-Lys-Asp (Feng *et al.*, 2005, Schmitt *et al.*, 2005), η οποία συναντάται και στις L-ασπαραγινάσες (Swain *et al.*, 1993, Palm *et al.*, 1996). Πολλά συντηρημένα κατάλοιπα της υπομονάδας GatE (π.χ. His15, Glu157, Glu184) επηρεάζουν τη δράση κινάσης και τρανσαμιδάσης, αλλά όχι αυτή της γλουταμινάσης (Oshikane *et al.*, 2006). Αντίθετα, μερικές μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευθεί, όπως η Arg221Ala, αναστέλλουν και τις τρεις ενζυμικές δραστηριότητες (Oshikane *et al.*, 2006).



ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ	ΡΟΛΟΣ
GatD	Ενεργό κέντρο γλουταμινάσης
GatE	Ενεργό κέντρο κινάσης & τρανσαμιδάσης Αναγνώριση των μορίων tRNA

Εικόνα 19: Η κρυσταλλική δομή της GatDE αμιδοτρανοσφοράσης (Glu – AdT) και ο ρόλος των υπομονάδων GatD και GatE.

Από τα παραπάνω έχει προταθεί ότι υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ της δράσης γλουταμινάσης της υπομονάδας GatD και του ενεργού κέντρου της GatE. Τα ενεργά κέντρα των δύο υπομονάδων συνδέονται μέσω ενός καναλιού μήκους 40 Å, στο οποίο επικρατούν υδρόφιλα αμινοξέα, και είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά της αμμωνίας από την GatD στην GatE υπομονάδα (Oshikane et al., 2006, Nakamura et al., 2006). Τέλος, η GatE περιέχει μια επιπρόσθετη περιοχή που ομοιάζει με την AspRS, η οποία έχει προταθεί ότι αποτρέπει τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ AspRS, Asp-tRNA^{Asn}, και GatDE, αποκλείοντας έτσι τη χρήση του Asp-tRNA^{Asn} από την τρανσαμιδάση (Oshikane et al., 2006).

Τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν την τρανσαμιδάση GatDE είναι παρόντα σε όλα τα 13 αρχαία με γνωστή γονιδιωματική αλληλουχία, ενώ δεν εντοπίζονται σε κανένα από τα άλλα δύο βασίλεια οργανισμών. Σε αντίθεση με την GatCAB, η GatDE έχει την ικανότητα να συνθέτει μόνο Gln-tRNA^{Gln}. Η κατανομή των δύο αυτών AdTs στα αρχαία οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος της GatCAB στα αρχαία είναι να συνθέτει αποκλειστικά Asn-tRNA^{Asn}, εφόσον παρατηρήθηκε ότι το συγκεκριμένο ένζυμο εντοπίζεται μόνο στα 8 από τα αρχαία με γνωστή γονιδιωματική αλληλουχία (*Aeropyrum pernix*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Halobacterium salinarum*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanosarcina mazei* και τα δύο είδη *Sulfolobus*), τα οποία δε διαθέτουν γονίδια *asnS* που κωδικοποιούν την AsnRS (Tumbula et al., 2000). Αντίθετα, τα *Pyrobaculum aerophilum*, *Thermoplasma acidophilum*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus horikoshii* και *Pyrococcus furiosus*, που διαθέτουν το συγκεκριμένο γονίδιο, χρησιμοποιούν μια εξειδικευμένη AsnRS και στερούνται των γονιδίων *gatCAB*. Σε αυτά τα αρχαία, επομένως, η GatDE αποτελεί την μοναδική πηγή δράσης Glu-AdT. Παρ' όλα αυτά, η παρουσία και των δύο αμιδοτρανοσφερασών σε έναν μεγάλο αριθμό αρχαίων δημιουργεί το ερώτημα αν η GatDE σε ορισμένα από αυτά, είναι πλεονάζον στοιχείο (Stathopoulos et al., 2001).

Τόσο η GatCAB, όσο και η GatDE αναγνωρίζουν το ίδιο tRNA^{Gln} υπόστρωμα, ενώ ο *in vivo* δότης του αμιδίου δεν είναι γνωστός. Η εξέταση όλων των ικανών υποστρωμάτων έδειξε ότι η GatDE δεν παρουσιάζει πλεονέκτημα ως προς την κατανάλωση του υποστρώματος έναντι της GatCAB των αρχαίων. Επιπλέον, η GatCAB έχει τη δυνατότητα χρήσης γλουταμίνης, ασπαραγίνης ή ιόντων αμμωνίου ως δότη του αμιδίου, ενώ η GatDE δε μπορεί να χρησιμοποιήσει ιόντα αμμωνίου. Για αυτό το λόγο έχει προταθεί ότι τα δύο αυτά ένζυμα να συμμετέχουν σε διαφορετικές μεταβολικές λειτουργίες.

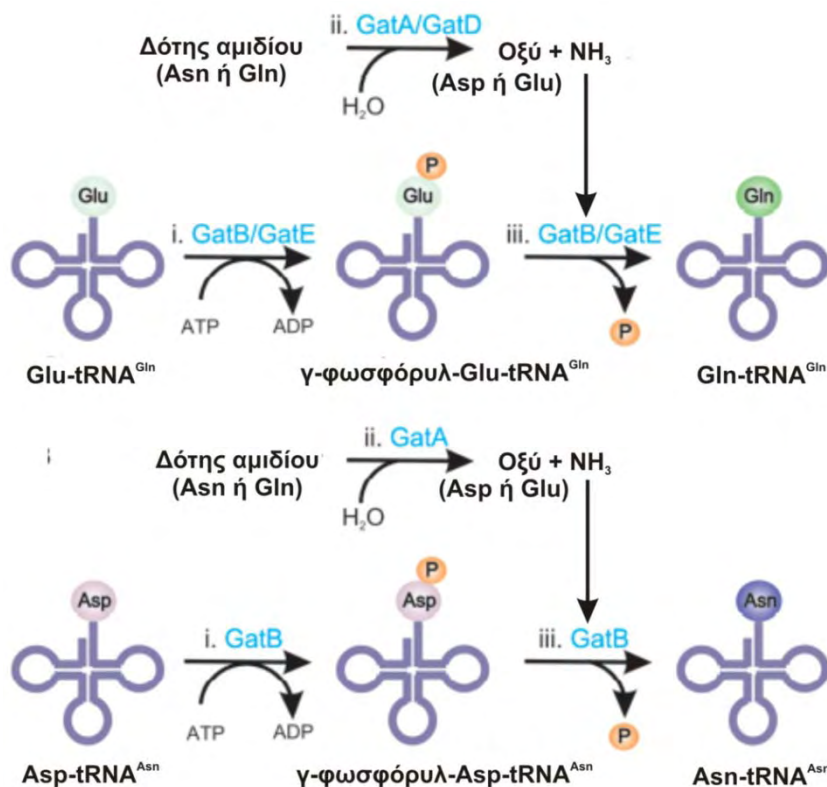
Ομοπαράθεσις αλληλουχιών έδειξαν ότι η υπομονάδα GatA είναι ομόλογη με τις αμιδάσες (Curnow et al., 1997), ενώ το γονίδιο της υπομονάδας GatD είναι παράλογο (paralog) του γονιδίου *asnA* (Spring et al., 1986), ενός γονιδίου που κωδικοποιεί μια τύπου I L-ασπαραγινάση με άγνωστη λειτουργία, η οποία εντοπίζεται

σε πολλά βακτήρια και αρχαία. Τόσο οι αμιδάσες, όσο και οι ασπαραγινάσες ανήκουν στην υπεροικογένεια των αμιδοτρασφερασών γλουταμίνης, οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση της γλουταμίνης και την ακόλουθη μεταφορά της αμμωνίας σε έναν μεγάλο αριθμό δεκτών (Zalkin & Smith, 1998). Οι δύο αμιδοτρασφεράσες, λοιπόν, έχουν στρατολογήσει μία ξεχωριστή γλουταμινάση για την ενεργοποίηση της αμμωνίας που είναι απαραίτητη για την αντίδραση της τρανσαμιδωσης. Παρ' όλα αυτά, κρυσταλλογραφικές μελέτες και μελέτες μεταλλαξιγένεσης έδειξαν ότι καμία από τις δύο υπομονάδες, GatA και GatD, δε φέρει τις αλληλουχίες που είναι χαρακτηριστικές των γλουταμινασών. Αντίθετα, δείχθηκε ότι τα κατάλοιπα σερίνης και ασπαραγινικού που εντοπίζονται στο εσωτερικό του χαρακτηριστικού μοτίβου (DTGGS) της αμιδάσης του *Rhodococcus* έχουν ιδιαίτερη σημασία για την εκδήλωση της καταλυτικής δράσης (Kobayashi et al., 1997).

Οι υπομονάδες GatB και GatE παρουσιάζουν περίπου 30% ομοιότητα στην αλληλουχία τους και διαθέτουν σε γενικές γραμμές τα ίδια χαρακτηριστικά (Tumbula et al., 2000). Οι λειτουργίες τους δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητές, αλλά είναι γεγονός ότι και οι δύο είναι απαραίτητες για την διεξαγωγή της αντίδρασης τρανσαμιδωσης, εφόσον παρατηρήθηκε ότι η GatCA στο *Bacillus subtilis* και η GatD στο *Methanobacterium thermautotrophicum* από μόνες τους, δεν είναι ικανές να μετατρέψουν Glu-tRNA^{Gln} σε Gln-tRNA^{Gln} (Curnow et al., 1997). Ωστόσο, πιθανολογείται η συμμετοχή των υπομονάδων αυτών στην αναγνώριση των μορίων tRNA. Η θεώρηση αυτή βασίζεται στην ύπαρξη μιας επιπλέον περιοχής στο καρβοξυτελικό άκρο των υπομονάδων GatB και GatE, η οποία παρουσιάζει ομολογία με την οικογένεια των πρωτεϊνών YqeY (Sheppard & Söll, 2008). Η YqeY καρβοξυτελική προέκταση της GlnRS του *Deinococcus radiodurans* είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση των tRNA υποστρωμάτων (Deniziak et al., 2007). Αντίστοιχα, λοιπόν, οι περιοχές των AdTs που ομοιάζουν με YqeY φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τη θηλιά D των μορίων tRNA.

Ο μηχανισμός δράσης των AdTs, στο βαθμό που αυτός έχει αποσαφηνιστεί, φαίνεται να αποτελείται από τρία διακριτά στάδια (**Εικόνα 20**) (Cathopoulos et al., 2007b). Αρχικά, η υπομονάδα με δράση κινάσης του εκάστοτε ενζύμου (GatB ή GatE) φωσφορυλιώνει το Glu ή Asp που είναι εστεροποιημένο στο μόριο tRNA, σχηματίζοντας ένα ενεργοποιημένο ενδιάμεσο, γ-φωσφορυλ-Glu-tRNA^{Gln} ή γ-φωσφορυλ-Asp-tRNA^{Asn}, αντίστοιχα. Ο σχηματισμός του γ-φωσφορυλ-Glu-tRNA^{Gln} υποστηρίζεται από βιοχημικά δεδομένα (Wilcox, 1969), σε αντίθεση με την πιθανή σύνθεση του γ-φωσφορυλ-Asp-tRNA^{Asn}, πιθανώς λόγω της αστάθειας του ενδιάμεσου. Στο δεύτερο στάδιο, η υπομονάδα με δράση γλουταμινάσης (GatA ή GatD) απελευθερώνει αμμωνία από δότες αμιδίου όπως είναι η ασπαραγίνη και η γλουταμίνη (Feng et al., 2005, Harpel et al., 2002). Τα ιόντα αμμωνίας μεταφέρονται από το ενεργό κέντρο γλουταμινάσης στο ενεργό κέντρο τρανσαμιδάσης μέσω ενός υδρόφιλου καναλιού (Nakamura et al., 2006). Στο τρίτο στάδιο πραγματοποιείται η αντίδραση τρανσαμιδωσης από τις αντίστοιχες υπομονάδες των AdTs (GatB ή GatE) με τελικό

αποτέλεσμα τη σύνθεση των ορθώς αμινοακυλιωμένων $\text{Asn-tRNA}^{\text{Asn}}$ και $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$ από τα κακοφορτισμένα $\text{Asp-tRNA}^{\text{Asn}}$ και $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$.

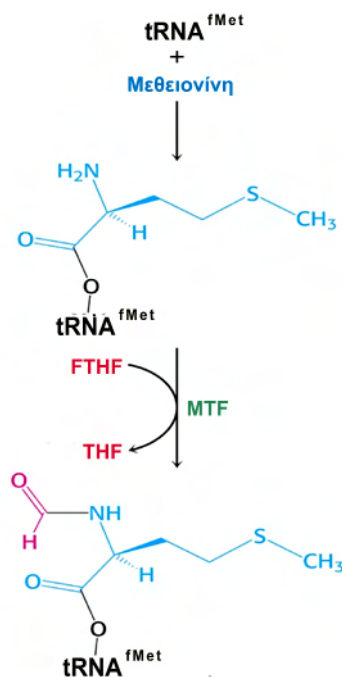


Εικόνα 20: Μηχανισμός δράσης των AdTs. Πρώτο στάδιο (i): φωσφορυλίωση του κατάλοιπου Asp / Glu που είναι εστεροποιημένο στο μόριο tRNA από την υπομονάδα με δράση κινάσης (GatB / GatE). Δεύτερο στάδιο (ii): απελευθέρωση αμμωνίας από το δότη αμιδίου που καταλύεται από την υπομονάδα με δράση γλουταμινάσης (GatA / GatD). Τρίτο στάδιο (iii): Τρανσαμιδάση των κατάλοιπων Asp / Glu από την υπομονάδα με δράση τρανσαμιδάσης (GatB / GatE) και σύνθεση του τελικού προϊόντος $\text{Asn-tRNA}^{\text{Asn}}$ και $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$.

Η σύνθεση του $\text{Asn-tRNA}^{\text{Asn}}$ διαφέρει από αυτή του $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$ σε τρία κυρίως σημεία. Πρώτον, η AsnRS υπάρχει σε περισσότερους οργανισμούς σε σχέση με την GlnRS, οπότε αυτό το έμμεσο μονοπάτι είναι λιγότερο σύνθετο στα βακτήρια, αλλά παρόλα αυτά είναι επικρατές στα αρχαία. Δεύτερον, η μετατροπή ασπαραγινικού οξέος σε ασπαραγίνη καταλύεται μόνο από την διπλής εξειδίκευσης Asp/Glu-AdT (GatCAB), καθώς το $\text{Asp-tRNA}^{\text{Asn}}$ δεν αποτελεί υπόστρωμα για την Glu-AdT (GatDE). Τρίτον, κάποιοι οργανισμοί δε φέρουν τη συνθάση της ασπαραγίνης με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούν το μονοπάτι αυτό ως το μόνο τρόπο βιοσύνθεσης της ασπαραγίνης, κάτι που δεν φαίνεται να ισχύει για τη γλουταμίνη (Ibba et al., 2000).

Εκτός από τα συστήματα που περιγράφηκαν παραπάνω, έχουν ταυτοποιηθεί και άλλοι tRNA-εξαρτώμενοι μηχανισμοί. Η σύνθεση της φορμυλ-μεθειονίνης είναι ο πιο κοινός από τους μηχανισμούς αυτούς. Όλοι οι οργανισμοί χρησιμοποιούν ένα ειδικό μόριο tRNA^{Met} για την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Τα βακτήρια και τα

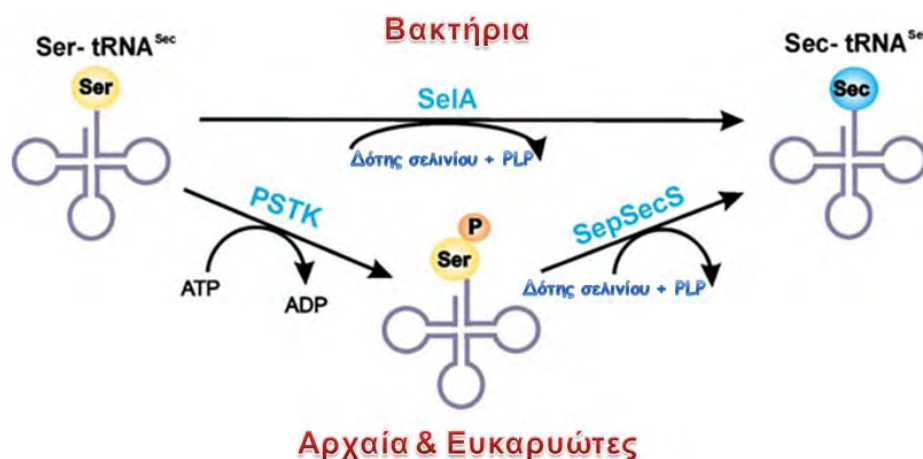
οργανίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών (μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες) απαιτούν φορμυλ-μεθειονυλ- $tRNA^{fMet}$ σαν αναρκτήριο μόριο. Η αμινοάκυλο- $tRNA$ συνθετάση της μεθειονίνης (MetRS) εστεροποιεί μεθειονίνη στο $tRNA^{fMet}$, η οποία φορμυλιώνεται από την μεθειονυλ- $tRNA$ φορμυλτρανσφεράση (methionyl- $tRNA$ formyltransferase, MTF) παρουσία ενός δότη φορμυλίου, του N10-φορμυλτετραϋδροφολικού (FTHF) (**Εικόνα 21**) (Dickerman et al., 1967, Gite et al., 2000). Η αντίδραση φορμυλίωσης περιλαμβάνει μια ιδιαίτερα εξειδικευμένη διαδικασία αναγνώρισης του μορίου $tRNA$, καθώς φορμυλιώνεται μόνο το $Met-tRNA^{fMet}$.



Εικόνα 21: $tRNA$ εξαρτώμενη σύνθεση των $fMet-tRNA^{fMet}$. Η MetRS εστεροποιεί Met στο $tRNA^{fMet}$. Ακολουθεί φορμυλίωση του αμινοξέος από την μεθειονυλ- $tRNA$ φορμυλτρανσφεράση (MTF) παρουσία ενός δότη φορμυλίου, του FTHF.

Το 1976 αναφέρθηκε για πρώτη φορά ότι μια υπομονάδα της αναγωγάσης της γλυκίνης του *Copsychus stricklandii* περιέχει ένα κατάλοιπο σεληνιοκυστεΐνης (Cone et al., 1976). Δέκα χρόνια αργότερα, αποδείχθηκε ότι η σεληνιοκυστεΐνη ενσωματώνεται σε κάποιες πρωτεΐνες άμεσα λόγω υπερανάγνωσης ενός κωδικονίου τερματισμού UGA που εμπεριέχεται στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης. Τα παραπάνω στοιχεία οδήγησαν στο χαρακτηρισμό της σεληνιοκυστεΐνης ως το 21^ο αμινοξύ. Σήμερα είναι γνωστό ότι η σεληνιοκυστεΐνη ενσωματώνεται στις πρωτεΐνες μέσω του σεληνιοκυστεΐνυλ- $tRNA^{Sec}$ ($Sec-tRNA^{Sec}$) και ότι η χρήση της απαντάται σε όλα τα ζωικά βασίλεια. Σε όλους τους οργανισμούς, το πρώτο στάδιο του βιοσυνθετικού μονοπατιού της σεληνιοκυστεΐνης είναι η εστεροποίηση σερίνης στο $tRNA^{Sec}$ μέσω της SerRS (Bilokapic et al., 2004, Leinfelder et al., 1988). Στα βακτήρια η συνθάση της σεληνιοκυστεΐνης (SelA) μετατρέπει το $Ser-tRNA^{Sec}$ σε $Sec-tRNA^{Sec}$, το οποίο ακολούθως ενσωματώνεται στις πρωτεΐνες με τη βοήθεια του εξειδικευμένου παράγοντα

επιμήκυνσης SelB (Bock *et al.*, 2005). Στα αρχαία και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το Ser-tRNA^{Sec} δεν μετατρέπεται άμεσα σε Sec-tRNA^{Sec}. Αντιθέτως, πρώτα μετατρέπεται σε Sep-tRNA^{Sec} από μια O-φωσφοσερυλ-tRNA κινάση (PSTK) (Carlson *et al.*, 2004) και έπειτα το Sep-tRNA μετατρέπεται σε Sec-tRNA μέσω της δράσης της συνθάσης Sep-tRNA:Sec-tRNA (SepSecS) (Yuan *et al.*, 2006, Xu *et al.*, 2007) παρουσία σεληνιοφωσφορικού (Leinfelder *et al.*, 1988) (**Εικόνα 22**). Τα δύο ένζυμα, SelA και SepSecS, χρησιμοποιούν ως συμπαραγόντα τη φωσφορική πυριδοξάλη.



Εικόνα 22: tRNA-εξαρτώμενη σύνθεση Sec-tRNA^{Sec} στα βακτήρια, τα αρχαία και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τα δύο μονοπάτια ξεκινούν με υπόσφρωμα το κακοφορισμένο Ser-tRNA^{Sec}. Στα βακτήρια η μετατροπή σε Sec-tRNA^{Sec} καταλύεται από ένα μόνο ένζυμο (SelA), ενώ στα αρχαία και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς πραγματοποιούνται δύο αντιδράσεις από τα ένζυμα PSTK και SepSecS για τη σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος.

Στα ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης συμπεριλαμβάνεται και η σύνθεση ή τροποποίηση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Το κυτταρικό τοίχωμα των οργανισμών αυτών περιέχει κάποια πεπτιδία που παίζουν το ρόλο γεφυρών μεταξύ των μονομερών του κυτταρικού τοιχώματος και η σύνθεση τους είναι εξαρτώμενη από μόρια tRNA, χωρίς όμως τη συμμετοχή της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής.

1.5.2 tRNA και σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος

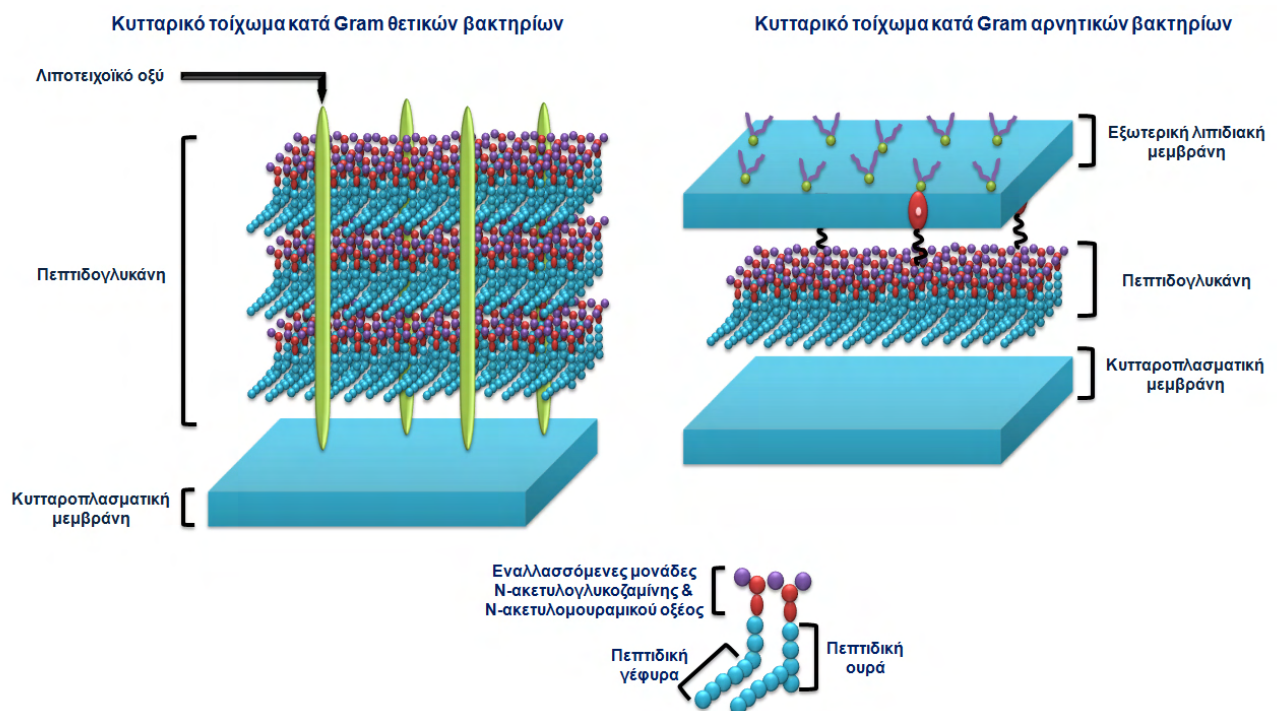
1.5.2.1 Κυτταρικό τοίχωμα κατά Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων

Το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων βρίσκεται εξωτερικά της πλασματικής μεμβράνης και παρέχει στο κύτταρο κυρίως δομική στήριξη και προστασία. Η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος διαφέρει μεταξύ των κατά Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων (**Εικόνα 23**). Τα κατά Gram θετικά βακτήρια φέρουν ένα πυκνό κυτταρικό τοίχωμα που εμπεριέχει πολλά στρώματα πεπτιδογλυκάνης και τειχοϊκό οξύ. Αντίθετα, τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια φέρουν ένα σχετικά λεπτό κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από ελάχιστα στρώματα πεπτιδογλυκάνης που περιβάλλονται από μια

δεύτερη λιπιδιακή μεμβράνη αποτελούμενη από λιποπολυσακχαρίτες και λιποπρωτεΐνες.

Η ανθεκτικότητα του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος οφείλεται στα μακρομόρια της πεπτιδογλυκάνης. Η κύρια λειτουργία της είναι να διατηρεί την ακεραιότητα του κυττάρου καθώς ανθίσταται στην εσωτερική οσμωτική πίεση. Η πεπτιδογλυκάνη είναι επίσης υπεύθυνη για τη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος και εμπλέκεται στην κυτταρική αύξηση και διαίρεση.

Η πεπτιδογλυκάνη είναι ένα ετεροπολυμερές που αποτελείται από αλυσίδες γλυκάνης συνδεδεμένες μέσω μικρών πεπτιδίων (Osborn, 1969). Το τμήμα γλυκάνης της πεπτιδογλυκάνης είναι ιδιαίτερα ομοιόμορφο. Αποτελείται συνήθως από εναλλασσόμενα κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) και N-ακετυλομουραμικού οξέος (MurNAc) συνδεδεμένα μεταξύ του με δεσμό β1,4 (Bumsted *et al.*, 1968). Η γλυκάνη παρουσιάζει ελάχιστες διαφοροποιήσεις, όπως ακετυλίωση ή φωσφορυλίωση της υδροξυλομάδας στη θέση 6 του μουραμικού οξέος (Araki *et al.*, 1971, Ghuysen, 1968, Liu & Gotschlich, 1967) και κατά περίπτωση απουσία ενός πεπτιδίου ή N-ακέτυλο συστατικού (Ghuysen, 1968, Araki *et al.*, 1971b). Σε διαφορετικούς οργανισμούς, ο μέσος όρος του μήκους της αλυσίδας είναι από 10 έως 65 μονάδες δισακχαριτών (Ghuysen, 1968, Hughes, 1970).



Εικόνα 23: Κυτταρικό τοίχωμα κατά Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων. Η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος διαφέρει στον αριθμό των στρωμάτων πεπτιδογλυκάνης και στην ύπαρξη της εξωτερικής λιπιδιακής μεμβράνης στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια. Σε κάθε περίπτωση, η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από εναλλασσόμενες μονάδες N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος που φέρει μια πλευρική πεπτιδική αλυσίδα. Το πεπτιδικό τμήμα της

πεπτιδογλυκάνης είναι υπεύθυνο για τη διασύνδεση μεταξύ των μονομερών απευθείας ή μέσω πεπτιδικών γεφυρών.

Το πεπτιδικό τμήμα της πεπτιδογλυκάνης εξυπηρετεί τη σύνδεση μεταξύ των μονομερών (**Εικόνα 24**) (Rogers *et al.*, 1980). Η σύγκριση της διαφορετικής αλληλουχίας αμινοξέων των πεπτιδογλυκανών υπέδειξε τους ακόλουθους κανόνες, όσον αφορά τη χημική κατασκευή του πεπτιδικού τμήματος (Schleifer & Kandler, 1972):

(i) Ο αριθμός των αμινοξέων στις διάφορες πεπτιδογλυκάνες είναι μάλλον περιορισμένος. 3 έως 6 διαφορετικά αμινοξέα απαντώνται σε μια συγκεκριμένη πεπτιδογλυκάνη. Διακλαδισμένα (βαλίνη, λευκίνη κ.τ.λ.), αρωματικά (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη), αμινοξέα που περιέχουν θείο (κυστεΐνη, μεθειονίνη), ισιδίνη, αργινίνη και προλίνη δεν έχουν ανιχνευθεί σε πεπτιδογλυκάνες.

(ii) Οι πεπτιδικές αλυσίδες αποτελούνται από εναλλασσόμενα L- και D-αμινοξέα. Το D-γλουταμινικό οξύ στη θέση 2 και η D-αλανίνη στις θέσεις 4 και 5 της πεπτιδικής υπομονάδας δεν αντικαθιστώνται συνήθως από άλλα αμινοξέα. Στις θέσεις 1 και 3 μπορεί να βρεθούν διάφορα αμινοξέα σε διαφορετικές πεπτιδογλυκάνες. Στη θέση 1 συναντάμε συνήθως L-αλανίνη, L-σερίνη ή γλυκίνη. Η θέση 3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία, καθώς 9 διαφορετικά αμινοξέα έχουν βρεθεί στη θέση αυτή.

(iii) Τα περισσότερα από τα αμινοξέα της πεπτιδικής υπομονάδας μπορεί να χρησιμοποιηθούν και στη σύνθεση της γέφυρας διασύνδεσης. Τα περισσότερα μονοκαρβοξυλικά αμινοξέα των γεφυρών απαντώνται στην διαμόρφωση L. Εξαιρεση αποτελεί η D-σερίνη της ενδιάμεσης γέφυρας της πεπτιδογλυκάνης του *Bifidobacterium bifidum*. Τα δικαρβοξυλικά αμινοξέα και τα διαμινοξέα αντιθέτως συναντώνται και στις δύο διαμορφώσεις.

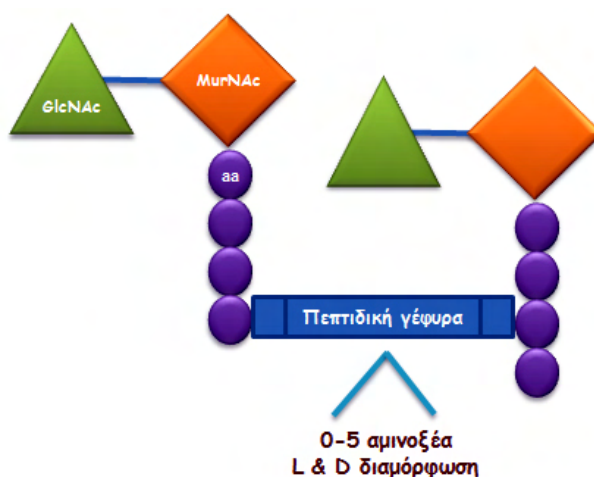
(iv) Τα μονοκαρβοξυλικά L-αμινοξέα και η γλυκίνη ενεργοποιούνται από τις συγγενείς τους συνθετάσες και μεταφέρονται εστεροποιημένα από τα συγγενή τους μόρια tRNA για την ενσωμάτωση τους στην ενδιάμεση γέφυρα (Bumsted *et al.*, 1968, Roberts *et al.*, 1968a & b), κάτι που δεν είναι εφικτό για τα δικαρβοξυλικά αμινοξέα.

(v) Οι μεταξύ των πεπτιδίων γέφυρες που εμπεριέχουν διαμινοξέα παρουσιάζουν μια ενδιαφέρουσα συσχέτιση μεταξύ του τρόπου σύνδεσης και της διαμόρφωσης των διαμινοξέων.

(vi) Είναι πιθανό σε μια συγκεκριμένη πεπτιδογλυκάνη να απαντώνται διαφορετικά αμινοξέα. Βρέθηκε σε πολλούς οργανισμούς ότι η L-λυσίνη και η L-ορνιθίνη βρίσκονται στην ίδια πεπτιδογλυκάνη στη θέση 3 του πεπτιδικού τμήματος. Στις ενδιάμεσες γέφυρες η γλυκίνη, η L-αλανίνη και η L-σερίνη μπορούν να αντικαθιστούν μερικώς η μια την άλλη.

Η σύνδεση μεταξύ των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης ευθύνεται για τη δομική ακεραιότητα του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και μπορεί επίσης να επηρεάζει τη διαπερατότητά του. Επειδή τα κύτταρα μπορεί να αλλάξουν όγκο ακόμα και κατά 200% λόγω των ιοντικών συνθηκών, το κυτταρικό τοίχωμα πρέπει να είναι

ευέλικτο. Ένα μοντέλο του κυτταρικού τοιχώματος προτείνει ότι οι αλυσίδες γλυκάνης συνεισφέρουν στη δομική σταθερότητα, ενώ οι γέφυρες διασύνδεσης παρέχουν ευελιξία καθώς επεκτείνονται σε καταστάσεις στρες. Πολλοί αντιβακτηριακοί αναστολείς εμπλέκονται στην αναστολή των διαφόρων βημάτων κατά τη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, τη διασύνδεση και τη μεταφορά ουσιών μέσω του κυτταρικού τοιχώματος. Έχει προταθεί ότι ο σχεδιασμός και ο έλεγχος τέτοιων φαρμάκων μπορεί να ενισχυθεί από έναν ενδελεχή βιοχημικό χαρακτηρισμό της διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης, της κινητικότητας και των πιθανών θέσεων αλληλεπίδρασης με τα φάρμακα.



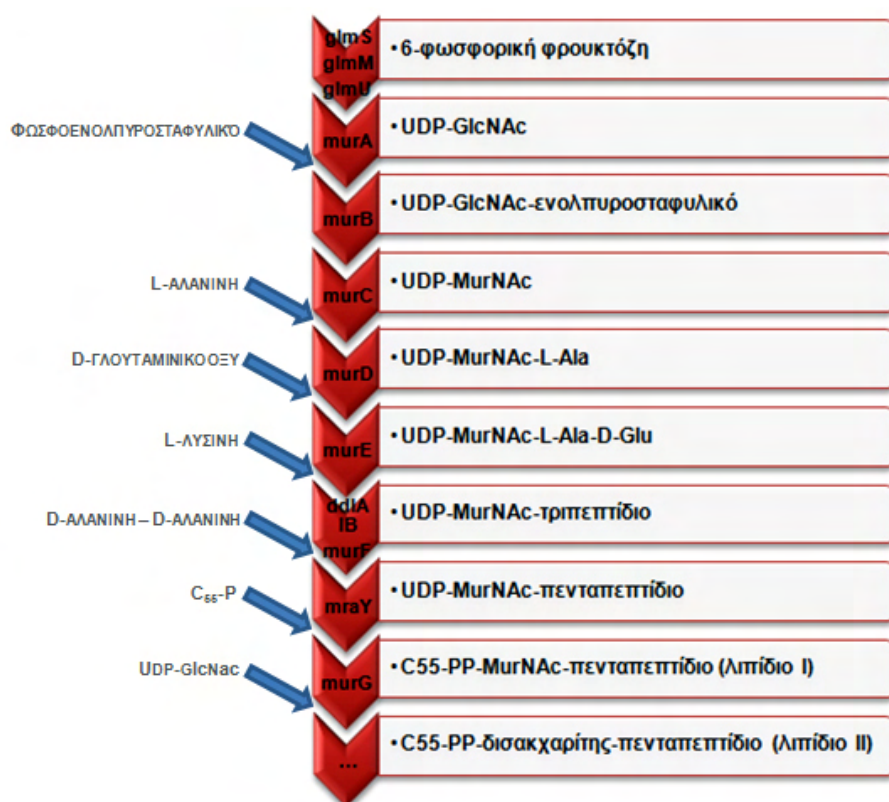
Εικόνα 24: Τα μονομερή της πεπτιδογλυκάνης συνδέονται άμεσα ή μέσω πεπτιδικών γεφυρών μεταξύ δύο γειτονικών πεπτιδικών αλυσίδων. Οι γέφυρες διασύνδεσης αποτελούνται από αμινοξέα τόσο L όσο και D διαμόρφωσης.

1.5.2.2 Κυτταρικό τοίχωμα του *Staphylococcus aureus*

Το *Staphylococcus aureus* είναι ένα από τα πρώτα βακτήρια στα οποία μελετήθηκε η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, η οποία πραγματοποιείται σε τρία διακριτά στάδια (*van Heijenoort, 2001*). Το πρώτο από αυτά, που λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, είναι ένας καταράκτης ενζυμικών αντιδράσεων με τελικό προϊόν το UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίο. Στο δεύτερο στάδιο της βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης, πραγματοποιείται αρχικά σύνδεση του προϊόντος του πρώτου σταδίου με ένα λιπιδικό φορέα (φωσφοβακτοπρενόλη, C55-P) με αποτέλεσμα το σχηματισμό του λιπιδίου I (C55-PP-MurNAc-πενταπεπτιδίο). Έπειτα, στο μουραμικό τμήμα μεταφέρεται UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη προκειμένου να παραχθεί ο ενδιάμεσος δισακχαρίτης, γνωστός ως λιπίδιο II (C55-PP-MurNAc πενταπεπτιδίο-β1-4-GlcNAc) (**Εικόνα 25**) (*van Heijenoort & Gutmann, 2000*). Όπως το λιπίδιο I έτσι και το λιπίδιο II, στο στάδιο αυτό της βιοσύνθεσης, παραμένουν αγκυροβολημένα στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Ακολουθεί η σύνθεση των

γεφυρών σύνδεσης των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης, εάν απαιτούνται, ανάλογα με τον οργανισμό.

Κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, το λιπίδιο II, μετά το σχηματισμό της πεπτιδικής γέφυρας, μεταφέρεται διαμέσου της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης στην εξωκυτταρική πλευρά, όπου και ακολουθεί πολυμερισμός σε ίνες γλυκάνης με τη δράση τρανογλυκολασών. Μετά τον πολυμερισμό και το σχηματισμό του υδατανθρακικού σκελετού της πεπτιδογλυκάνης, ο λιπιδιακός φορέας μεταφέρεται και πάλι μέσω της μεμβράνης στην εσωκυτταρική πλευρά προκειμένου να ανακυκλωθεί. Τα πολυμερή γλυκάνης από την άλλη, διασυνδέονται με το σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών μεταξύ του αμινοξέος στη θέση 3 του πεπτιδικού τμήματος μιας μονάδας N-ακετυλομουραμικού με την D-Ala στη θέση 4 ενός γειτονικού πεπτιδίου, ενώ παράλληλα η D-Ala στη θέση 5 απομακρύνεται. Η αντίδραση αυτή της διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης καταλύεται από τρανοπεπτιδάσες, τις **PBPs (Penicillin Binding Proteins)**, οι οποίες αναγνωρίζουν ειδικά το διπεπτιδίο D-Ala-D-Ala (Chambers, 1999).



Εικόνα 25: Καταρράκτης αντιδράσεων για τη σύνθεση των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης του *S. aureus*. Αρχικό υπόστρωμα αποτελεί η 6-φωσφορική φρουκτόζη και τελικό προϊόν το λιπίδιο II, το οποίο ακολούθως μεταφέρεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και συνδέεται με τα πολυμερή της πεπτιδογλυκάνης.

Στο *Staphylococcus aureus* η σύνθεση των αλυσίδων πενταγλυκίνης πραγματοποιείται σε τρία διαδοχικά στάδια στην κυτταροπλασματική πλευρά της

μεμβράνης, με το λιπίδιο II ως υπόστρωμα και το πρώτο κατάλοιπο γλυκίνης να προστίθεται στην ε-αμινομάδα της L-λυσίνης της πεπτιδικής ουράς (Strominger & Ghuysen, 1967, Hegde & Shrader, 2001, Rohrer & Berger-Bächi, 2003a). Ακολουθεί διαδοχική προσθήκη και των υπολοίπων τεσσάρων καταλοίπων γλυκίνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιμήκυνση της γέφυρας πενταγλυκίνης πραγματοποιείται με κατεύθυνση από το καρβοξυ- προς το αμινο-τελικό άκρο, σε αντίθεση με τη σύνθεση πεπτιδίων μέσω της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής (Kamiryo & Matsushashi, 1972). Επίσης, μελέτες επί της σύνθεσης της γέφυρας πενταγλυκίνης έχουν δείξει ότι δεν αναστέλλεται από τα αντιβιοτικά που στοχεύουν στα ριβοσώματα (Matsushashi et al., 1967). Οπότε, ο μηχανισμός προσθήκης των καταλοίπων γλυκίνης θεωρείται ότι είναι ανεξάρτητος της ριβοσωμικής πρωτεϊνοσύνθεσης.

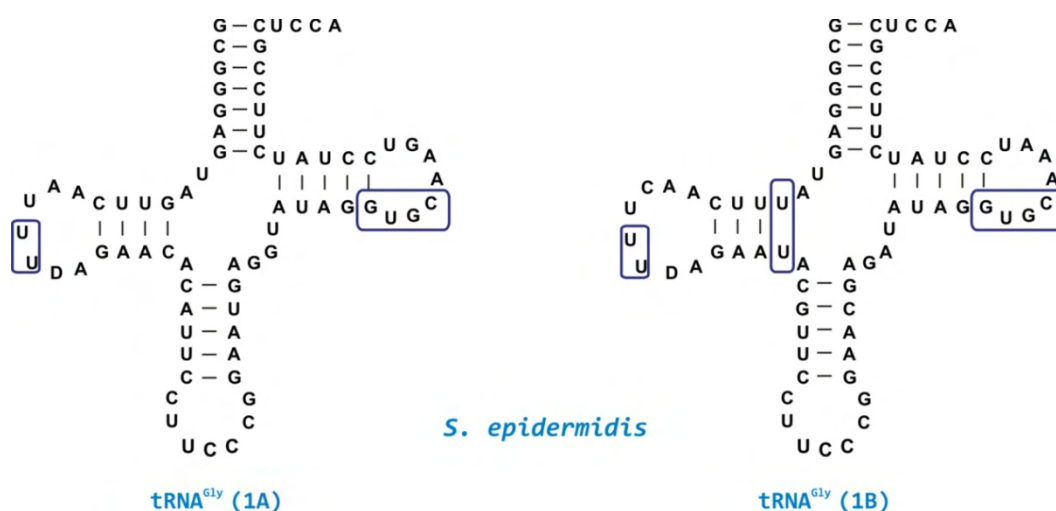
Τα ένζυμα που ευθύνονται για τη σύνθεση των ενδιάμεσων γεφυρών της πεπτιδογλυκάνης είναι οι **παράγοντες Fem (Factors Essential for Methicillin resistance)**, που ανήκουν σε μια σημαντική οικογένεια μη-ριβοσωμικών πεπτιδυλ-τρανσφερασών (Berger-Bächi & Tschierske, 1998). Σχεδόν όλοι οι παράγοντες Fem εμπλέκονται στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης. Η ακεραιότητα των διασυνδέσεων της πεπτιδογλυκάνης σχετίζεται άμεσα με την ανθεκτικότητα του οργανισμού στη μεθικιλίνη και σε άλλες β-λακτάμες. Οι παράγοντες FemXAB, εμπλέκονται αποκλειστικά στη σύνθεση της γέφυρας πενταγλυκίνης. Ως δότη καταλοίπων γλυκίνης και οι τρεις παράγοντες χρησιμοποιούν αμινοακυλιωμένα μόρια tRNA (Gly-tRNA^{Gly}) (Kamiryo & Matsushashi, 1972).

Ένα ασύνηθες μονοπάτι αμινοακυλίωσης Gly-tRNA^{Gly} εμπλέκεται στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του *Staphylococcus aureus*. Οι πρώτες ενδείξεις για τη συμμετοχή του στη σύνθεση της γέφυρας πενταγλυκίνης βασίστηκαν στο γεγονός ότι η ενσωμάτωση γλυκίνης στην πεπτιδογλυκάνη παρεμποδίζεται από ριβονουκλεάσες (Matsushashi et al., 1967). Επιπρόσθετα στοιχεία ανλήθηκαν από το μερικό χαρακτηρισμό του συγκεκριμένου συστήματος σε ένα συγγενή οργανισμό, το *Staphylococcus epidermidis*. Στο βακτήριο αυτό οι γέφυρες διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης αποτελούνται από κατάλοιπα γλυκίνης και σερίνης (Petit et al., 1968). Όσον αφορά την ενσωμάτωση της γλυκίνης, έχουν ταυτοποιηθεί τα μόρια tRNA^{Gly} που ευθύνονται για τη μεταφορά των αμινοξέων στο κυτταρικό τοίχωμα, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός κατάλυσης της προσθήκης των καταλοίπων στη γέφυρα.

Τα μόρια tRNA που φαίνεται να εμπλέκονται αποκλειστικά στη διεργασία αυτή, και όχι στην πρωτεϊνοσύνθεση, φέρουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που οδήγησαν στο χαρακτηρισμό τους ως μη πρωτεϊνογενετικά (Roberts, 1972 & 1974). Συγκεκριμένα, παρουσιάζουν ιδιαιτερότητες στις θηλιές DHU και στο βραχίονα και τη θηλιά TψC. Η απουσία των νουκλεοτιδίων GG από τη θηλιά DHU δεν ευνοεί την αλληλεπίδραση των μορίων tRNA με τον παράγοντα EF-Tu. Επιπρόσθετα, η αντικατάσταση της χαρακτηριστικής αλληλουχίας GUψC της θηλιάς TψC με την αλληλουχία GUGC αλλοιώνει τη θέση αναγνώρισης των μορίων από το ριβόσωμα

(Ofengand & Henes, 1969, Stewart et al., 1971), αποτρέποντας έτσι και μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (**Εικόνα 26**).

Στο *Staphylococcus aureus* τουλάχιστον 4 tRNA^{Gly} μόρια έχουν ταυτοποιηθεί. Τα μόρια αυτά αμινοακυλιώνονται από τη μοναδική αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης (GlyRS) που κωδικοποιείται στο γονιδίωμα του (Niyomporn et al., 1968). Τα μόρια tRNA^{Gly} που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του *Staphylococcus aureus* παρουσιάζουν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές στη δομή και την αλληλουχία, αν και φέρουν την πλειοψηφία των στοιχείων ταυτότητας, όπως αυτά έχουν προσδιοριστεί για το tRNA της γλυκίνης (Nameki et al., 1997).



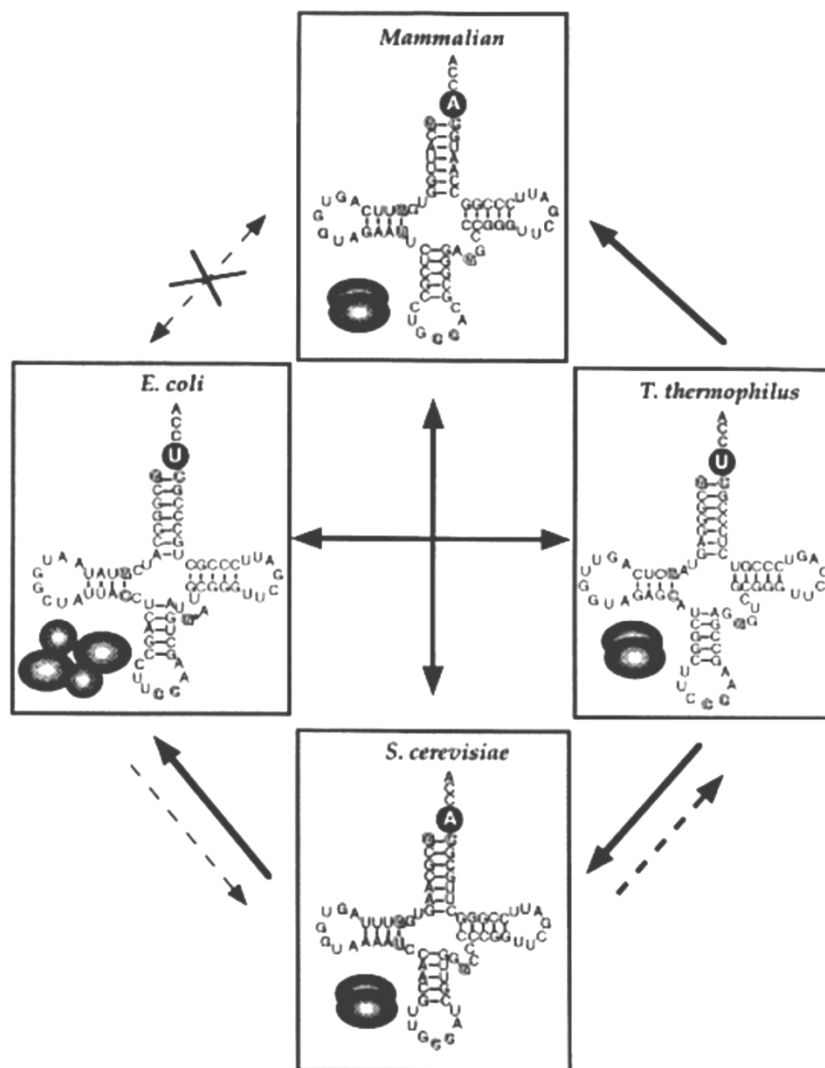
Εικόνα 26: Ασύνηθη μόρια tRNA^{Gly} του *S. epidermidis* που συμμετέχουν αποκλειστικά στη σύνθεση των γεφυρών διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος. Τα ανοικτά πλαίσια υποδεικνύουν τις ιδιαιτερότητες των συγκεκριμένων μορίων, οι οποίες σχετίζονται με μειωμένη δεσμευτική ικανότητα για τον παράγοντα EF-Tu και το ριβόσωμα.

1.5.2.2.1 Αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης (GlyRS)

Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης (GlyRS) είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση Gly-tRNA^{Gly} μορίων. Το ένζυμο αυτό ανήκει στην κλάση II των συνθετασών. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της GlyRS είναι ότι απαντάται σε δύο μορφές. Η μια από αυτές, που έχει εντοπιστεί μέχρι τώρα μόνο σε βακτήρια, είναι η ετεροτετραμερής α₂β₂, που αποτελείται από δύο α και δύο β αλυσίδες (Mazauric et al., 1996). Η α υπομονάδα είναι ιδιαίτερα συντηρημένη στα βακτήρια σε σύγκριση με την υπομονάδα β αλλά και άλλες συνθετάσες. Συνήθως, οι δύο υπομονάδες είναι οργανωμένες σε οπερόνιο (Keng et al., 1982). Η δεύτερη μορφή είναι η ομοδιμερής α₂, η οποία είναι χαρακτηριστική των ευκαρυωτικών οργανισμών και των αρχαίων αλλά απαντάται και σε κάποια βακτήρια (Mazauric et al., 1996). Οι τετραμερείς και οι ομοδιμερείς GlyRSs έχουν κοινό καταλυτικό πυρήνα (catalytic central domain, CCD), αλλά οι περιοχές δέσμευσης του αντικωδικονίου (anticodon binding domain, ABD) διαφέρουν τόσο στην αλληλουχία όσο και στη δομή (Shiba et al., 1994). Η σύνθεση μορίων Gly-tRNA^{Gly} θεωρείται από τα πιο σύνθετα συστήματα αμινοακυλίωσης διότι η δομή των GlyRS

αλλά και τα στοιχεία ταυτότητας των μορίων tRNA^{Gly} διαφέρουν μεταξύ των τριών βασιλείων (Mazauric *et al.*, 1998).

Η ανάλυση των συστημάτων αμινοακυλίωσης αλλά και συνδυασμοί των GlyRS και tRNA^{Gly} από διαφορετικούς οργανισμούς έχουν δείξει την ύπαρξη ενός συντηρημένου συστήματος αναγνώρισης των tRNA^{Gly} στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, παρά την ύπαρξη δομικά διαφορετικών συνθετασών (Mazauric *et al.*, 1998). Ωστόσο, η GlyRS του *Thermus thermophilus* αναγνωρίζει και αμινοακυλιώνει τα ευκαρυωτικά μόρια tRNA^{Gly}, ενώ η συνθετάση του *Escherichia coli* αναγνωρίζει μόνο τα προκαρυωτικά υποστρώματα. Αντίστοιχα, η GlyRS είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη ως προς τα ευκαρυωτικά υποστρώματα, σε αντίθεση με τη χαμηλή εξειδίκευση της συνθετάσης του *Saccharomyces cerevisiae* (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών σχέσεων μεταξύ συστημάτων αμινοακυλίωσης προκαρυωτικών (*E. coli* και *T. thermophilus*) και ευκαρυωτικών οργανισμών (*S. cerevisiae* και θηλαστικών). Φαίνονται οι ομοδιμερείς και τετραμερείς μορφές των GlyRSs για κάθε οργανισμό. Με μαύρο κύκλο επισημαίνεται η βάση διαλογέας (discriminator base). Οι έντονες γραμμές αναπαριστούν υψηλό ποσοστό αμινοακυλίωσης, η έντονη διακεκομμένη γραμμή

αναπαριστά μειωμένο ποσοστό αμινοακυλίωσης, η ακνή διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά χαμηλό ποσοστό αμινοακυλίωσης και η διαγραμμένη διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά απουσία αμινοακυλίωσης.

Πέραν της ιδιαιτερότητας της σύνθεσης Gly-tRNA^{Gly} στους διάφορους οργανισμούς, η GlyRS παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της συσχέτισής της με ασθένειες του ανθρώπου. Μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στην GlyRS σχετίζονται με νευροπάθειες και μυοπάθειες, όπως είναι η ασθένεια Charcot-Marie-Tooth και η Μυϊκή Ατροφία τύπου V (Seburn *et al.*, 2006, Dubourg *et al.*, 2006).

1.5.2.3 Παράγοντες Fem και αλληλεπίδρασή τους με μόρια tRNA^{Gly}

Η δράση των μη ριβοσωμικών πεπτιδυλο-τρανοφερασών FemXAB είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη και κάθε μια από αυτές είναι υπεύθυνη για την ενσωμάτωση καταλοίπων γλυκίνης σε συγκεκριμένες θέσεις της πεπτιδικής γέφυρας. Πρόσφατα αποκαλύφθηκε πως ο FemX καταλύει την προσθήκη του πρώτου καταλοίπου γλυκίνης στην ε-αμινομάδα της L-λυσίνης (Rohrer *et al.*, 1999). Ο FemA ενσωματώνει το δεύτερο και τρίτο κατάλοιπο γλυκίνης (Maidhof *et al.*, 1991, Stranden *et al.*, 1997), ενώ ο FemB, που παρουσιάζει 40% ταυτότητα και 60% ομοιότητα όσον αφορά την αμινοξική αλληλουχία με τον FemA, προσθέτει τα κατάλοιπα γλυκίνης 4 και 5 (Henze *et al.*, 1993). Ο FemX χρησιμοποιεί αποκλειστικά ως αποδέκτη για την πρώτη γλυκίνη, το λιπίδιο II (Hegde & Shrader, 2001). Τα υποστρώματα των FemA και FemB είναι το λιπίδιο II-Gly1 και το λιπίδιο II-Gly3 αντίστοιχα, ενώ κανένα από τα ένζυμα FemXAB δεν απαιτεί την παρουσία κάποιου ή και των δύο άλλων Fem για να δράσει (Schneider *et al.*, 2004). Αν και τα υποστρώματα των τριών παραγόντων διαφέρουν ως προς τον αριθμό των καταλοίπων γλυκίνης που εμπεριέχουν, και οι τρεις παράγοντες αναγνωρίζουν το λιπίδιο II μέσω του σακχάρου. Αυτό μπορεί να αποτελεί και εξήγηση της μειωμένης δραστηριότητας του FemX παρουσία FemA, που έχει παρατηρηθεί *in vitro*.

Δεδομένου ότι η πεπτιδυλο-τρανοφεράση FemA περιέχει μόνο μια θέση δέσμευσης tRNA, είχε προταθεί ότι μετά την προσθήκη της πρώτης γλυκίνης ακολουθεί ένας δεύτερος γύρος δέσμευσης Gly-tRNA και μεταφοράς της δεύτερης γλυκίνης. Ωστόσο, με το σύστημα του διπλού υβριδίου έχουν ανιχνευθεί αλληλεπιδράσεις FemA-FemA, FemB-FemB και FemA-FemB. Ο FemX δεν φάνηκε να αλληλεπιδρά με τους άλλους δύο παράγοντες (Rohrer & Berger-Bächi, 2003b). Αυτό υποδεικνύει ότι ο FemX δρα ως μονομερές ενώ οι FemA και FemB μπορεί να δρουν ως ομοδιμερή.

Τα γονίδια των παραγόντων FemAB είναι οργανωμένα υπό τη μορφή οπερονίου στο χρωμόσωμα του *Staphylococcus aureus*. Στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις στο οπερόνιο *femAB* είναι ψευδοπολυκυτταρικά με παχιά κυτταρικά τοιχώματα, σημαντική μείωση στη διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης, χαμηλά ποσοστά γλυκίνης στο τοίχωμα, υπερευαίσθητα στη μεθικιλίνη και άλλα αντιβιοτικά και πολλές φορές η

βιωσιμότητά τους εξαρτάται από αντισταθμιστικές μεταλλάξεις (*Ling & Berger-Bächi, 1998, Stranden et al., 1997*). Ωστόσο, κάποια μεταλλαγμένα στελέχη που στερούνται των παραγόντων FemA και FemB μπορούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να επιβιώσουν. Αντιθέτως, σε περίπτωση αναστολής του γονιδίου *fmbB*, που κωδικοποιεί τον παράγοντα FemX, προκαλείται κυτταρικός θάνατος (*De Lencastre & Tomasz, 1994*). Σε τέτοια στελέχη παρατηρείται υπερσυσσώρευση μονομερών μονάδων πεπτιδογλυκάνης που δεν περιέχουν καθόλου γλυκίνη, πλήρης απώλεια της ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη και μηδαμινή διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης.

Οι παράγοντες Fem είναι ένζυμα υψηλής σημασίας για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Εξασφαλίζοντας την ακεραιότητα των γεφυρών διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης, εμπλέκονται έμμεσα και στην ανθεκτικότητα των κυττάρων στα αντιβιοτικά που στοχεύουν το κυτταρικό τοίχωμα.

1.6 Συμβατικά και ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης - Νέοι μοριακοί στόχοι για απενεργοποίηση

1.6.1 Αναστολείς των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών

Οι aaRSs αποτελούν μια οικογένεια ενζύμων ιδιαίτερα σημαντικών για όλα τα ζωικά βασίλεια. Είναι ένζυμα συντηρημένα εξελικτικά, αλλά έχουν ταυτοποιηθεί κάποιες διαφορές μεταξύ των προκαρυωτικών και των ευκαρυωτικών ενζύμων που μπορεί να βοηθήσουν στο σχεδιασμό εξειδικευμένων αναστολέων. Ήδη αναφέρεται στη βιβλιογραφία η ύπαρξη φυσικών προϊόντων που αναστέλλουν τη δράση των aaRSs. Το ψευδομονικό οξύ (μουπιροσίνη, pseudomonic acid, murpirocin) συντίθεται από τον *Pseudomonas fluorescens* (*Fuller et al., 1971*) και αναστέλλει τη δράση της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της ισολευκίνης (IleRS) των κατά Gram θετικών παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus saprophyticus*, και κάποιων κατά Gram αρνητικών, όπως των *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae* και *Neisseria meningitidis* (*Hughes & Mellows, 1980*). Είναι ενεργό έναντι κλινικών στελεχών *Staphylococcus aureus* που είναι ανθεκτικά στην πενικιλίνη (penicillin), τη στρεπτομυκίνη (streptomycin), τη μεθικιλίνη (methicillin) και άλλα αντιβιοτικά (*Casewell & Hill, 1985*). Το ψευδομονικό οξύ έχει 8000 φορές μεγαλύτερη επιλεκτικότητα για την IleRS των παθογόνων έναντι αυτής των θηλαστικών (*Hughes & Mellows, 1980*). Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι υδρολύεται ταχύτατα στους ιστούς και το αίμα προς παραγωγή του ανενεργού μονικού οξέος. Οπότε, το φάρμακο αυτό χορηγείται μόνο για εξωτερική χρήση, όπως π.χ. για θεραπεία μολύνσεων του δέρματος (*Baines et al., 1984*). Άλλα γνωστά φυσικά προϊόντα που στοχεύουν τις aaRS περιλαμβάνουν τη μπορελλιδίνη (borrelidin, ThrRS) (*Nass et al., 1969, Paetz & Nass, 1973*), τη φουρανομυκίνη (furanomycin, IleRS) (*Tanaka et al., 1969*), τη γραναισίνη (granaticin, LeuRS) (*Ogilvie et al., 1975*), την ινδολμυκίνη (indolmycin, TrpRS) (*Werner et al., 1976*), την

οχρατοξίνη A (ochratoxin A, PheRS) (Konrad & Roschenthaler, 1977) και τη cis-πεντασίνη (cispentacin, ProRS) (Konishi et al., 1989).

Η αποκάλυψη όλων αυτών των φυσικών αναστολέων των συνθετασών προκάλεσε το ερώτημα, αν εξειδικευμένοι ως προς το παθογόνο αναστολεις θα μπορούσαν να αναπτυχθούν έναντι των 20 aaRSs. Τα ένζυμα αυτά συγκεντρώνουν πολλά θετικά στοιχεία ως πιθανοί στόχοι φαρμάκων διότι είναι διαλυτά, σχετικά σταθερά, εκφράζονται εύκολα από ανασυνδυασμένα γονίδια, απομονώνονται και καθαρίζονται σε μεγάλες ποσότητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε δοκιμές με διάφορες μεθόδους. Επιπλέον, έχουν αναλυθεί οι κρυσταλλικές δομές για περισσότερες από τις μισές συνθετάσες και είναι γνωστός ο μηχανισμός και η χημεία της αντίδρασης αμινοακυλίωσης (Moras, 1992, Cusack, 1993, Carter, 1993). Βασίζομενος σε αυτές τις πληροφορίες, ο ορθολογικός σχεδιασμός αναστολέων είναι πραγματοποιήσιμος και μπορεί να επιτευχθεί με χημική σύνθεση απλούστερη από αυτή που απαιτείται για τις σύνθετες δομές πολλών φυσικών προϊόντων.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα φαρμάκου που ομοιάζει με ενδιάμεσο προϊόν της αμινοακυλίωσης και έχει αναπτυχθεί για τη στόχευση μιας συνθετάσης είναι η μικροσίνη C (microcin C). Αποτελεί ένα επταπεπτιδίο που συντίθεται μέσω του ριβοσώματος και περιέχει μια τροποποιημένη μονοφωσφορική αδενοσίνη ομοιοπολικά δεσμευμένη με το κατάλοιπο ασπαραγινικού οξέος του καρβοξυτελικού άκρου (Metlitskaya et al., 2006). Το πεπτιδίο αυτό αποικοδομείται στο εσωτερικό των κυττάρων και παράγεται έτσι ένα τροποποιημένο ασπαρτυλ-αδενυλικό, το οποίο αναστέλλει τη δράση της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης τους ασπαραγινικού οξέος (AspRS). Γενικά, τα αντιβακτηριακά φάρμακα που έχουν αναπτυχθεί και ομοιάζουν με αμινοαδενυλικό ενδιάμεσο παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς το είδος.

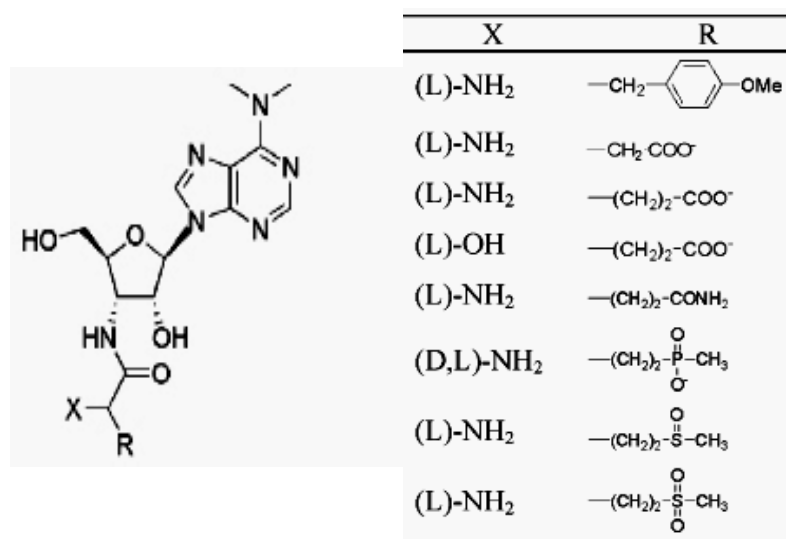
Η ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών φαρμάκων μπορεί να βασιστεί και σε δεδομένα που προκύπτουν από μυκητοκτόνα φάρμακα με γνωστό μηχανισμό αναστολής των aaRSs. Το μυκητοκτόνο ευρέως φάσματος 5-φλουορο-1,3-διϋδρο-1-υδροξυλ-2,1-βενζοξαμφορόλη (AN2690), το οποίο αναπτύχθηκε για τη θεραπεία της ονυχομυκητίασης, είναι ένα φάρμακο που μπορεί να αποτελέσει πρότυπο. Η ουσία αυτή αναστέλλει την κυτταροπλασματική αμινοακυλο-tRNA συνθετάση της λευκίνης (LeuRS) των μυκήτων σχηματίζοντας ένα σταθερό σύμπλοκο με το μόριο tRNA^{Leu} (Rock et al., 2007). Το σύμπλοκο αυτό παραμένει δεσμευμένο στο επιδιορθωτικό κέντρο της συνθετάσης παγιδεύοντας έτσι το ένζυμο σε μια ανενεργή κατάσταση. Αντίστοιχα, η αμινοακυλίωση των μορίων tRNA του *Saccharomyces cerevisiae* έχει βρεθεί ότι αναστέλλεται από την πενταμιδίνη (pentamidin). Το μόριο αυτό δεσμεύει τα μόρια tRNA αλλάζοντας τη δευτεροταγή τους διαμόρφωση και αποκρύπτοντας τη θηλιά του αντικωδικονίου μέσα στην τριτοταγή δομή (Sun & Zhang, 2008).

Τέλος, ένα ακόμα φυσικό προϊόν, η πουργουρομυκίνη (purpurosomycin), που παράγεται από τον *A. ianthinogenes*, έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση. Όπως αποκαλύφθηκε αργότερα ο μηχανισμός δράσης του αντιβιοτικού παρουσιάζει ιδιαιτερότητες, καθώς δεσμεύει με σχετικά υψηλή συγγένεια όλα τα μόρια tRNA, αναστέλλοντας τη δεσμευτική τους ικανότητα (Kirillov et al., 1997).

Η πουργουρομυκίνη βρέθηκε ότι αναστέλλει μόνο την αμινοακυλίωση των μορίων tRNA και καμία άλλη κυτταρική λειτουργία πέραν αυτής, όπως για παράδειγμα την αλληλεπίδραση του μορίου με τους παράγοντες της μετάφρασης και το ριβόσωμα. Καθώς το αντιβιοτικό αυτό δεν επηρεάζει την αντίδραση ανταλλαγής ATP-PPi της συνθετάσης ή την αρχική αλληλεπίδρασή της με το μόριο tRNA, πιθανολογείται ότι η αναστολή της αμινοακυλίωσης προκύπτει από τη δημιουργία μη παραγωγικών συμπλόκων tRNA-συνθετασών παρουσία πουργουρομυκίνης, κατά την οποία το μόριο tRNA δε μπορεί να αμινοακυλωθεί με το συγγενές του αμινοξύ.

1.6.2 Στόχευση παραγόντων που εμπλέκονται σε ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης.

Το tRNA-εξαρτώμενο μονοπάτι τρανσαμιδίωσης, που χρησιμοποιείται ευρέως από τα παθογόνα για τον άνθρωπο βακτήρια, αλλά απουσιάζει από το κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων, έχει μελετηθεί σε κάποιο βαθμό ως στόχος αναστολέων. Οι AdTs, τα κύρια ένζυμα του μονοπατιού αυτού, αποτελούν έναν ενδιαφέροντα στόχο έναντι του οποίου μπορούν να σχεδιαστούν νέοι και ιδιαίτερα εξειδικευμένοι αντιμικροβιακοί παράγοντες. Ήδη έχουν συντεθεί και αξιολογηθεί κάποια ανάλογα της πουργουρομυκίνης ως αναστολείς του μηχανισμού δράσης των βακτηριακών αμιδοτρανσφερασών με ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα (**Εικόνα 28**) (Balg et al., 2008). Η ανάλυση των συγκεκριμένων μορίων αποτελεί μια διεξοδική πορεία προς την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών φαρμάκων με καινοτόμο μηχανισμό δράσης.



Εικόνα 28: Γενική δομή των εν δυνάμει αναστολέων των βακτηριακών AdTs και συνδυασμοί υποκαταστατών που έχουν μελετηθεί ως προς την ανασταλτική τους δραστηριότητα.

Μια ακόμα ώθηση προς τη στόχευση των ασυνήθων συστημάτων αμινοακυλίωσης από αντιβιοτικά φάρμακα έδωσε η μελέτη της αλληλεπίδρασης των μορίων tRNA με τον παράγοντα FemX του *Weissella viridescens* (Hegde & Blanchard,

2003). Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μεταφορά L-Ala στο πρόδρομο μόριο UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίο χρησιμοποιώντας ως δότη του αμινοξέος το Ala-tRNA^{Ala}. Σύμφωνα με αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν με μόρια tRNA αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα πρόκυψε ότι τα δύο πρώτα ζεύγη βάσεων του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος και η αλληλουχία ACCA του 3' άκρου αναγνωρίζονται από τον παράγοντα FemX (Villet *et al.*, 2007). Η αποκάλυψη αυτών των στοιχείων ταυτότητας οδήγησε στη σύνθεση μορίων ανάλογων με τα Ala-tRNA^{Ala} μόρια. Τα ανάλογα αυτά φέρουν ένα 1,2,4-οξαδιοζολικό δακτύλιο στο 3' άκρο του μορίου tRNA και αναστέλλουν τη δράση του παράγοντα FemX (Chemama *et al.*, 2007), αποκαλύπτοντας μια χημική πλατφόρμα στην οποία μπορεί να βασιστεί ο σχεδιασμός αναστολέων των παραγόντων Fem που συμμετέχουν στη σύνθεση των γεφυρών διασύνδεσης των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης.

Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Τα ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης των μορίων tRNA εμπλέκονται σε πληθώρα σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών. Η μελέτη των συστημάτων αυτών ξεκίνησε τη δεκαετία του '70 αλλά συνεχώς αποκαλύπτονται νέοι ασυνήθεις ρόλοι των aa-tRNA μορίων, λόγω της αλματώδους εξέλιξης της μεθοδολογίας, η οποία επιτρέπει πιο λεπτομερείς πειραματικές προσεγγίσεις. Επιπλέον, ο μηχανισμός πολλών ασυνήθων συστημάτων παραμένει ακόμα άγνωστος ή έχει πρόσφατα αποσαφηνιστεί. Το μόριο tRNA εμπλέκεται σε διεργασίες πέραν της πρωτεϊνοσύνθεσης, όπως είναι η αλληλομετατροπή και βιοσύνθεση αμινοξέων, η σύνθεση και τροποποίηση συστατικών των κυττάρων και η σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη παραγόντων που εμπλέκονται σε δύο ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης.

Στο πρώτο στάδιο αναλύθηκε το σύστημα της tRNA-εξαρτώμενης τρανσαμίδωσης από την αμιδοτρανσφεράση GatCAB. Η αμιδοτρανσφεράση GatCAB απαντάται σε βακτήρια και αρχαία και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι έχει τη δυνατότητα να συνθέτει δύο διαφορετικά αμινοακυλιωμένα tRNA μόρια, τα Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln}. Για να το επιτύχει αυτό, το ένζυμο πρέπει να είναι αρκετά εξειδικευμένο ώστε να διαχωρίζει τα κακοφορισμένα Asp-tRNA^{Asn} και Glu-tRNA^{Gln} από τα συγγενή Asp-tRNA^{Asp} και Glu-tRNA^{Glu}. Παράλληλα, όμως, η εξειδίκευση της GatCAB πρέπει να είναι αρκετά χαλαρή ώστε να επιτρέπει τη σύνθεση τόσο Asn-tRNA^{Asn} όσο και Gln-tRNA^{Gln}. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη των στοιχείων ταυτότητας των υποστρωμάτων της GatCAB και η αποσαφήνιση του κατά πόσο τα δύο tRNA αναγνωρίζονται μέσω των ίδιων ή διαφορετικών στοιχείων ταυτότητας. Ως οργανισμός μοντέλο για τη μελέτη της tRNA-εξαρτώμενης τρανσαμίδωσης επιλέχθηκε το παθογόνο για τον άνθρωπο *Neisseria meningitidis*. Στο σύνολο των πρωτεϊνών του βακτηρίου αυτού δεν περιέχεται η AsnRS, οπότε και ακολουθεί το μονοπάτι των αμιδοτρανσφερασών για να συνθέσει Asn-tRNA^{Asn}. Η παρουσία της GatCAB αμιδοτρανσφεράσης τόσο στα βακτήρια όσο και στα αρχαία προκάλεσε το ερώτημα αν τα δύο ένζυμα, που παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία τους, διαφέρουν στον τρόπο αναγνώρισης του tRNA. Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε το κατά πόσο οι αμιδοτρανσφεράσες, όπως και οι συνθετάσες, χρησιμοποιούν διαφορετικά προφίλ αναγνώρισης των μορίων tRNA σε κάθε βασιλείο.

Το δεύτερο ασυνήθες σύστημα αμινοακυλίωσης που μελετήθηκε είναι η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του *Staphylococcus aureus*. Η πεπτιδογλυκάνη του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από μονομερή τα οποία συνδέονται μεταξύ τους είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω πεπτιδικών γεφυρών. Η ενσωμάτωση των L-αμινοξέων στις πεπτιδικές γέφυρες διασύνδεσης διαμεσολαβείται από ένα ασυνήθες σύστημα αμινοακυλίωσης. Στο *Staphylococcus epidermidis*, έναν οργανισμό συγγενή του *Staphylococcus aureus*, η πεπτιδική γέφυρα αποτελείται από κατάλοιπα γλυκίνης και σερίνης. Τα ασυνήθη μόρια tRNA^{Gly} που εξυπηρετούν ως

δότες γλυκίνης για την ενσωμάτωσή της στις γέφυρες της πεπτιδογλυκάνης παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στην αλληλουχία τους, που αποτρέπουν την αλληλεπίδραση τους με παράγοντες της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής. Τα μόρια αυτά χαρακτηρίζονται ως μη-πρωτεϊνογενετικά και φαίνεται ότι συμμετέχουν αποκλειστικά στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Ωστόσο, δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός σύνθεσης των γεφυρών της πεπτιδογλυκάνης του *Staphylococcus epidermidis* και δεν έχουν χαρακτηριστεί οι παράγοντες που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή. Στο *Staphylococcus aureus* είναι γνωστό ότι η ενσωμάτωση των καταλοίπων γλυκίνης στις γέφυρες πενταγλυκίνης της πεπτιδογλυκάνης καταλύεται από τις μη ριβοσωμικές πεπτιδυλ-τρανσφεράσες FemXAB. Οι παράγοντες αυτοί χρησιμοποιούν ως δότες γλυκίνης μόρια Gly-tRNA^{Gly}. Ωστόσο, ο αριθμός και τα χαρακτηριστικά των ισοδεκτικών μορίων του *Staphylococcus aureus* παρέμεινε αδιευκρίνιστος. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διευκρίνιση του αριθμού των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} του *Staphylococcus aureus* με μελέτες έκφρασης των γονιδίων. Επιπρόσθετα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η μελέτη των λειτουργικών χαρακτηριστικών των μορίων αυτών όσον αφορά την αμινοακυλίωσή τους από τη συγγενή GlyRS αλλά και τη δεσμευτική τους ικανότητα για τον παράγοντα EF-Tu με απώτερο στόχο το διαχωρισμό των μορίων tRNA^{Gly} σε εκείνα που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή (πρωτεϊνογενετικά) και σε εκείνα που εμπλέκονται στη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (μη-πρωτεϊνογενετικά).

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.2 Αντιδραστήρια

- ¹⁴C-Γλυκίνη (Amersham)
- ¹⁴C-Ασπαραγινικό οξύ (Amersham)
- Ammonium persulfate (Sigma)
- ATP (Fluka)
- BamHI (New England Biolabs)
- Bis - ακρυλαμίδη (Merck)
- Bromophenol Blue (Research Organics)
- BSA (New England Biolabs)
- BstNI (New England Biolabs)
- CaCl₂·2H₂O (Merck)
- Coomassie Brilliant Blue (Fluka)
- DEPC (Merck)
- DMSO (Sigma)
- DNase I (New England Biolabs)
- dNTPs (Stratagene)
- DTT (Fluka)
- DynaZyme EXT DNA πολυμεράση (Finzymes)
- EcoRI (New England Biolabs)
- EDTA (Panreac)
- ExtractII (Macherey-Nagel)
- HCl (Merck)
- HindIII (New England Biolabs)
- IPTG (Fermentas)
- KCl (Merck)
- LB agar (Scharlau)
- LB Broth (Scharlau)
- MgCl₂·6H₂O (Panreac)
- MgSO₄·7H₂O (Panreac)
- NaOH (Merck)
- NcoI (New England Biolabs)
- Ni-NTA αφαρόζη (Qiagen)
- Pfu Ultra DNA πολυμεράση (Stratagene)
- PMSF (Merck)
- Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel)
- RNase A (New England Biolabs)
- RNasin (New England Biolabs)
- SalI (New England Biolabs)
- SDS (Sigma)
- T4 Πολυνουκλεοτιδική κινάση (Takara)

- T7 RNA πολυμεράση (Takara)
- TEMED (Research Organics)
- Tris Base (Merck)
- Tryptone (Merck)
- X-gal (Sigma)
- XhoI (New England Biolabs)
- Xylene cyanol (Merck)
- Άγαρ (Sigma)
- Αγαρόζη (Biorad)
- Αιθανόλη (Merck)
- Ακρυλαμίδιο (Sigma)
- MMuLV (Finzymes)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-De Haen)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Merck)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- Γλυκίνη (Applichem)
- Γλυκόζη (Panreac)
- Εκκινητές (VBC-Genomics, Austria)
- Εκχύλισμα ζύμης (Scharlau)
- Ιμιδαζόλιο (Merck)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- Καναμυκίνη (Sigma)
- Λυσοζύμη (Sigma)
- Μάρτυρας μοριακού βάρους DNA (Hytest LTD)
- Μάρτυρας μοριακού βάρους πρωτεϊνών (Biorad)
- Μεθανόλη (Panreac)
- Μεμβράνες διαπίδυσης (Sigma)
- Οξικό οξύ (Merck)
- Σπερμιδίνη (Merck)
- Σπερμίνη (Sigma)
- T4 DNA λιγάση (Fermentas)
- Taq DNA πολυμεράση (Hytest LTD)
- Φαινόλη (Merck)
- Χλωριούχο νάτριο (Panreac)
- Χλωροφόρμιο (Merck)

2.1.3 Βακτήρια στελέχη

Escherichia coli DH5a: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ⁻

Escherichia coli BL21 DE3: F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

Escherichia coli Rosetta: F⁻ ompT hsdS_B(R_B⁻ m_B⁻) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam^R)

2.1.4 Πλασμιδιακοί φορείς

Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pET (Novagen)

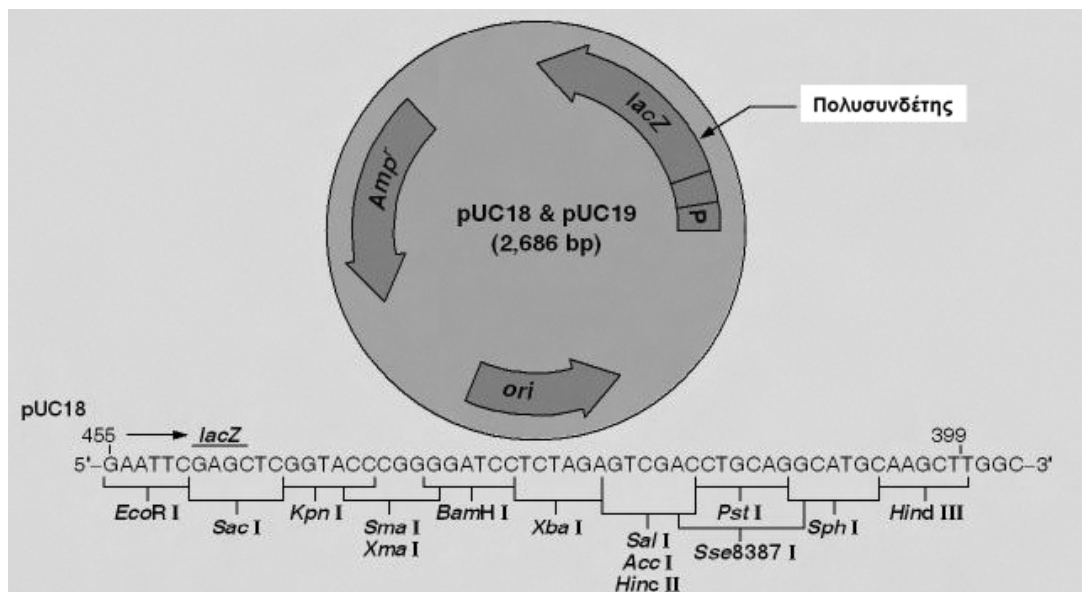
Το σύστημα pET αναπτύχθηκε για την υποκλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων σε κύτταρα του στελέχους *E. coli*. Οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pET φέρουν σημαντικά στοιχεία: ένα γονίδιο *lacI* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του καταστολέα *lac*, ένα T7 προαγωγέα που είναι εξειδικευμένος μόνο για την T7 πολυμεράση, έναν ρυθμιστή *lac* που μπορεί να σταματήσει τη μεταγραφή, έναν πολυσυνδέτη, μια f1 θέση έναρξης της αντιγραφής, ένα γονίδιο για ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη ή στην καναμυκίνη και μια θέση έναρξης της αντιγραφής *ColE1*. Σε κάθε περίπτωση το υπό μελέτη γονίδιο κλωνοποιείται στο πλασμίδιο pET στον πολυσυνδέτη. Ο προαγωγέας T7 και ο ρυθμιστής *lac* βρίσκονται στο 5' άκρο του κλωνοποιημένου γονιδίου. Παρουσία της T7 RNA πολυμεράσης ο ρυθμιστής *lac* δεν καταστέλλεται και το γονίδιο μεταγράφεται κανονικά. Συνήθως, τα κύτταρα ξενιστές που χρησιμοποιούνται ανήκουν στο στέλεχος *E. coli* BL21(DE3). Ο έλεγχος του συστήματος έκφρασης pET επιτυγχάνεται μέσω του προαγωγέα και του ρυθμιστή *lac*. Το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή έχει συνήθως ένα επαγωγίμο προαγωγέα που ενεργοποιείται από το IPTG. Το IPTG είναι ένα ανάλογο της λακτόζης που δεσμεύει τον καταστολέα του ρυθμιστή *lac*.

Ο φορέας έκφρασης pET-20b(+) έχει μήκος 3716bp. Φέρει μια σηματοδοτική αλληλουχία *pelB* στο N-τελικό άκρο, για πιθανή περιπλασμική τοποθέτηση, και μια αλληλουχία έξι ιστιδινών (His•Tag) στο C-τελικό άκρο. Η επιπλέον αλληλουχία των έξι ιστιδινών που προστίθεται στο καρβοξυτελικό άκρο της επιθυμητής πρωτεΐνης εξυπηρετεί την απομόνωσή της με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με ιόντα νικελίου (Ni-NTA). Επίσης, φέρει το γονίδιο *bla* που κωδικοποιεί τη β-λακταμάση, η οποία προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη (**Εικόνα 29**).

Ο φορέας pET-24b(+) έχει μήκος 5309bp και φέρει μια αλληλουχία έξι ιστιδινών (His•Tag) στο C-τελικό άκρο και το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη (www.novagen.com) (**Εικόνα 30**).

Πλασμίδιο pUC18

Ο φορέας pUC18 είναι ένα πλασμίδιο του *E. coli* με μέγεθος 2686 bp. Το πλασμίδιο φέρει το ρεπλικόνιο *rep* που ευθύνεται για την αντιγραφή του πλασμιδίου, το γονίδιο *bla*, που κωδικοποιεί τη β-λακταμάση παρέχοντας ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, μια περιοχή του οπερονίου *lac* του *E. coli*, τον προαγωγέα P_{lac}, τη θέση δέσμευσης του καταστολέα *lac* και ένα τμήμα του 5'-άκρου του γονιδίου *lacZ* που κωδικοποιεί την N-τελική περιοχή της β-γαλακτοσιδάσης. Ο πολυσυνδέτης εντοπίζεται μέσα στο τμήμα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (**Εικόνα 31**). Η επιλογή των κλώνων που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο βασίζεται στη θέση του πολυσυνδέτη. Η ένθεση του γονιδίου στον πολυσυνδέτη διακόπτει την αλληλουχία του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, οπότε και δεν παράγεται η λειτουργική μορφή του ενζύμου. Παρουσία του X-gal, που είναι ένα ανάλογο της λακτόζης, τα κύτταρα ξενιστές που έχουν προσλάβει μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρωματίζονται γαλάζια, λόγω του χρώματος του μεταβολίτη του X-gal. Αντίθετα, τα κύτταρα ξενιστές που προσλαμβάνουν ανασυνδυασμένα με το ένθετο γονίδιο πλασμίδια παρουσία X-gal χρωματίζονται λευκά, διότι δεν έχουν την ικανότητα να μεταβολίσουν την ουσία αυτή (Blue-White Screening).



Εικόνα 31: Πλασμιδιακός φορέας pUC18. Ο πολυσυνδέτης βρίσκεται στο άκρο του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, οπότε η ενσωμάτωση του ένθετου γονιδίου επηρεάζει το ένζυμο και παρουσία υποστρώματος παρατηρείται διαφορετικός χρωματισμός των μετασχηματισμένων κυττάρων.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Ηλεκτροφορήσεις

A. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Οι ηλεκτροφορήσεις των τμημάτων DNA πραγματοποιούνται σε πήκτωμα αγαρόζης. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται διάλυμα TAE 1X, το οποίο παρασκευάζεται μετά από αραιώση διαλύματος TAE 50X. Η επί της εκατό περιεκτικότητα σε αγαρόζη διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός προστίθεται στο διάλυμα της αγαρόζης βρωμιούχο αιθίδιο (5 mg/ml). Επίσης, στα δείγματα που ηλεκτροφορούνται εισάγεται η ανάλογη ποσότητα διαλύματος πλήρωσης (Loading Buffer 6X). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε 1X TAE. Παράλληλα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μεγέθους DNA (ladder), ώστε να υπολογίζεται το μέγεθος των τμημάτων DNA.

B. Ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Η ηλεκτροφόρηση των τμημάτων RNA υπό αποδιατακτικές συνθήκες πραγματοποιείται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία ουρίας. Η πηκτή περιέχει 12% πολυακρυλαμίδιο και 8M ουρία πολυμερισμένο με TEMED 0.025% v/v και υπερθειικό αμμώνιο 0.0025% w/v. Στα δείγματα προστίθεται διάλυμα πλήρωσης (Loading Buffer 2X). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα 1X TBE. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται χρώση με Μπλε του Μεθυλίου (Methylene Blue 2%) και αποχρωματισμός με απιονισμένο νερό.

Γ. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων και των πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες πραγματοποιείται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS. Η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα: την πηκτή διαχωρισμού και την πηκτή επιστοιβαξης. Η πηκτή διαχωρισμού περιέχει 10-12% w/v ακρυλαμίδιο, πολυμερισμένο χημικά με 0.025% v/v TEMED και 0.0025% w/v υπερθειικό αμμώνιο, σε διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 375 mM Tris-HCl pH 8.8 και 0.1% SDS. Η πηκτή επιστοιβαξης περιέχει 3% w/v ακρυλαμίδιο πολυμερισμένο με TEMED και υπερθειικό αμμώνιο σε διάλυμα 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, και 0.1% SDS. Στα δείγματα προστίθεται το διάλυμα πλήρωσης (Loading Buffer 4X). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με διάλυμα 1X Tris-Glycine-SDS. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται χρώση της πηκτής με διάλυμα χρώσης (Protein

stain) και ακολουθούν επανειλημμένες πλύσεις με διάλυμα αποχρωματισμού (Protein destain).

TAE 50X: 24.2% w/v Tris, 5.71% Glacial acetic acid, 1.86% w/v EDTA

TBE10X: 10.8% w/v Tris base, 5.5% w/v Boric acid, 0.02 M EDTA (pH 8.0)

Tris – Glycine – SDS 10X: 3.03% w/v Tris, 14.4% w/v glycine, 1% w/v SDS

Loading Buffer 6X (DNA): 0.09% Bromophenol Blue, 0.09% Xylene Cyanol, 60% γλυκερόλη, 60 mM EDTA

Loading buffer 2X (RNA): 90% formamide, 0.05% Bromophenol Blue, 0.05% Xylene Cyanol

Loabing Buffer 4X (Πρωτεΐνες): 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% γλυκερόλη, 5% 2-μερκαπταιθανόλη, 0.001% Bromophenol Blue.

Διάλυμα Χρώσης: 0.2% Coomassie Blue, 10% οξικό οξύ.

Διάλυμα Αποχρωματισμού: 10% οξικό οξύ

2.2.2 Γονιδωματική ανάλυση

Οι αλληλουχίες των υπό μελέτη γονιδίων του *S. aureus* MRSA, του *T. thermophilus* και του *N. meningitides* αντλήθηκαν από ψηφιακές βάσεις δεδομένων. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν την AspRS2 (*aspS2*) του *T. thermophilus*, την GlyRS (*glyS*) και τον παράγοντα επιμήκυνσης Tu (*tuf*) του *S. aureus*. Με βάση τις αλληλουχίες των υπό μελέτη γονιδίων σχεδιάζονται οι εκκινητές (primers) έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικοί ο ένας προς το 3' άκρο της μη κωδικοποιούσας αλυσίδας (πρόσθιος εκκινητής, forward primer) και ο δεύτερος προς το 5' άκρο της κωδικοποιούσας αλυσίδας (αντίστροφος εκκινητής, reverse primer). Στα άκρα των εκκινητών προσθέτονται νουκλεοτίδια, ώστε να δημιουργηθούν θέσεις αναγνώρισης για τα περιοριστικά ένζυμα που επιλέγονται ανάλογα με την αλληλουχία του γονιδίου και του πλασμιδίου στο οποίο θα γίνει η υποκλωνοποίηση.

Αναλύσεις με εργαλεία της βιοπληροφορικής πραγματοποιήθηκαν για:

1. Την πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} των βακτηρίων και των αρχαίων που χρησιμοποιούν το ασύνηθες σύστημα αμινοακυλίωσης με τη συμμετοχή της tRNA-εξαρτώμενης αμιδοτρανσφεράσης GatCAB. Η ομοπαράθεση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw). Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή ομοπαράθεση των βακτηριακών tRNA^{Gln} και tRNA^{Glu}.
2. Την άντληση όλων των αλληλουχιών των μορίων tRNA^{Gly} διαφόρων στελεχών *S. aureus* και *S. epidermidis* από ψηφιακές βάσεις δεδομένων (T.I.G.R., www.tigr.org, Genomic tRNA Database, <http://gtrnadb.ucsc.edu>).
3. Την πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών των μορίων tRNA^{Gly} των *S. aureus* και *S. epidermidis*, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Mega3.1.
4. Την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} των *S. aureus* και *S. epidermidis* με το πρόγραμμα tRNAScan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE>) και τον υπολογισμό του cove score των μορίων αυτών.

5. Την αναζήτηση πρωτεϊνών που να κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του *S. aureus* και να παρουσιάζουν ομοιότητα με GTPάσες ή / και τον EF-Tu (T.I.G.R., www.tigr.org, Swiss-Prot/TrEMBL, <http://ca.expasy.org>).
6. Την πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης EF-Tu-like που κωδικοποιείται από το γονίδιο SAR0294 του *S. aureus* με τα προγράμματα πρόβλεψης δομής SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>), LOOPP (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>) και HMMSTR/Rosetta (<http://www.bioinfo.rpi.edu/~bystrc/hmmstr/server.php>).

2.2.3 Απομόνωση γενωμικού DNA

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από τα στελέχη των *N. meningitides*, *T. thermophilus* και *S. aureus*, 500 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB εμβολιάζονται με μικρό αριθμό κυττάρων και η καλλιέργεια επωάζεται για 14-16 h στους 37° C υπό ανάδευση στις 210 rpm. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 20 min στους 4° C και επαναδιαλύονται σε 10 ml διαλύματος Tris – HCl 100 mM, pH 7.5, που περιέχει 15 μg λυσοζύμης. Το εναιώρημα επωάζεται για 10 min στους 20-22° C και έπειτα προστίθενται 200 μl διαλύματος EDTA 500 mM, 20 μl RNase A (10 mg/ml), 180 μl πρεωτεΐνης K (10 mg/ml), 100 μl διαλύματος 5 M NaCl και 1 ml 10% SDS. Τα δείγματα επωάζονται για 45 min στους 45° C και ακολουθούν πλύσεις με φαινόλη/χλωροφόρμιο (τουλάχιστον 5 φορές). Το DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη 100%, πραγματοποιείται πλύση με αιθανόλη 70% και μετά την απομάκρυνση κάθε υπολείμματος αιθανόλης επαναδιαλύεται σε 100 μl αποστειρωμένου νερού.

2.2.4 Ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Τα υπό μελέτη γονίδια των *T. thermophilus*, *N. meningitides* και *S. aureus*, ενισχύονται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται γενωμικό DNA των βακτηρίων και ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές. Για τα γονίδια *aspS2* που κωδικοποιεί την AspRS2 του *T. thermophilus* οι εκκινητές σχεδιάστηκαν ώστε να φέρουν συμβατά άκρα για υποκλωνοποίηση στο φορέα pET24b (EcoRV/Sall). Το ζεύγος των εκκινητών για το γονίδιο *glyS* σχεδιάστηκε έτσι ώστε τα άκρα του προϊόντος της PCR να είναι συμβατά για υποκλωνοποίηση σε pET24b (BamHI/XhoI) ενώ για το γονίδιο *tuf* ώστε να είναι συμβατά για υποκλωνοποίηση στο φορέα pET20b (BamHI/XhoI). Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων *aspS2* του *T. thermophilus*, *glyS* και *tuf* του *S. aureus*. Με πράσινο σημαίνονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες ενώ με μπλε οι αλληλουχίες που είναι συμπληρωματικές με τα άκρα του γονιδίου.

Εκκινητής	Αλληλουχία
<i>aspS2</i> <i>T. therm.</i> FW (EcoRV)	5'-GATATCATGCGGGTACTGGTACG-3'
<i>aspS2</i> <i>T. therm.</i> RV (Sall)	5'-GTCGACGGGCGTGAGCCGGTG-3'
<i>glyS</i> <i>S. aureus</i> FW (BamHI)	5'-GGATCCATGGC AAAA GATATGG-3'
<i>glyS</i> <i>S. aureus</i> RV (XhoI)	5'-CTCGAGGAATTTTGT TTTTTT CAGTTAAGA-3'
<i>tuf</i> <i>S. aureus</i> FW (BamHI)	5'-GGATCCATGGC AAAA G AAAA ATTCG-3'
<i>tuf</i> <i>S. aureus</i> RV (XhoI)	5'-CTCGAGTTTAAATGATTTTCAGTAA CA ACG-3'

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται με DNA πολυμεράση υψηλής πισότητας, ώστε να αποφευχθεί η εισαγωγή τυχαίων μεταλλάξεων κατά την ενίσχυση του γονιδίου. Η PCR πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το γενωμικό DNA των βακτηρίων. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για τη δράση της Pfu Ultra DNA πολυμεράσης, στο οποίο προστίθενται ~100 ng γενωμικού DNA, 0.2 mM από κάθε dNTP, 1.6 mM από κάθε εκκινητή, 2 U Pfu Ultra DNA πολυμεράσης. Το ένζυμο προστίθεται μετά το αρχικό στάδιο αποδιάταξης και ακολουθεί η αντίδραση στις συνθήκες που αναφέρονται στον **Πίνακα 5**. Για την προσθήκη της πολυ-A ουράς στο 3' άκρο του προϊόντος της PCR (για τη χρήση του σε αντίδραση κλωνοποίησης TA) προστίθεται στο τελευταίο στάδιο επέκτασης της αντίδρασης ποσότητα Taq DNA πολυμεράσης που δεν έχει επιδιορθωτική δράση.

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Η ανάκτηση του μορίου DNA που η ζώνη του αντιστοιχεί στο συνολικό μέγεθος του ενισχυμένου τμήματος πραγματοποιείται με εκτομή της από την πήκτη και καθαρισμό με τη βοήθεια του συστήματος Extract II (Macherey-nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

10X ρυθμιστικό διάλυμα για την Pfu Ultra DNA πολυμεράση: 20 mM Tris-HCl (pH 8.8 στους 25°C), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1 mg/mL nuclease-free BSA.

10X ρυθμιστικό διάλυμα για την Taq DNA πολυμεράση: 670 mM Tris-HCl, pH 8.8, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 % Tween 20

Πίνακας 5: Συνθήκες των αντιδράσεων PCR για την ενίσχυση των γονιδίων *aspS2* του *T. thermophilus*, *glyS* και *tuf* του *S. aureus*.

	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός επαναλήψεων	
<i>aspS2</i>	Αρχική αποδιάταξη	95° C	4 min	1
	Αποδιάταξη	95° C	30 sec	
	Υβριδοποίηση εκκινητών	60° C	40 sec	30
	Επιμήκυνση	72° C	1.5 min	
	Προσθήκη 2 U Taq DNA Πολυμεράσης (Hyttest)			
	Τελική επιμήκυνση	72° C	20 min	1
<i>glyS</i>	Αρχική αποδιάταξη	95° C	4 min	1
	Αποδιάταξη	95° C	30 sec	
	Υβριδοποίηση εκκινητών	53° C	40 sec	35
	Επιμήκυνση	72° C	1.5 min	
	Προσθήκη 2 U Taq DNA Πολυμεράσης (Hyttest)			
	Τελική επιμήκυνση	72° C	20 min	1
<i>tuf</i>	Αρχική αποδιάταξη	95° C	4 min	1
	Αποδιάταξη	95° C	30 sec	
	Υβριδοποίηση εκκινητών	58° C	40 sec	30
	Επιμήκυνση	72° C	1.5 min	
	Προσθήκη 2 U Taq DNA Πολυμεράσης (Hyttest)			
	Τελική επιμήκυνση	72° C	20 min	1

2.2.5 Κλωνοποίηση των γονιδίων – μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων

Η κλωνοποίηση προϊόντων PCR γίνεται με ενσωμάτωσή τους σε γραμμοποιημένο (linearized) πλασμίδιο το οποίο φέρει στα δύο 3' άκρα του δύο προεξέχουσες θυμίνες (TA cloning). Η DNA πολυμεράση προσθέτει στην αλυσίδα που επιμηκώνει, αμέσως μετά το τέλος της δίκλωνης περιοχής, 2-3 αδενίνες, με αποτέλεσμα τα προϊόντα της PCR να διαθέτουν 3' προεξέχουσες αδενίνες. Οι αδενίνες αυτές υβριδοποιούνται με τις 3' προεξέχουσες θυμίνες του πλασμδιακού φορέα με αντίδραση λιγάσης και έτσι σχηματίζονται ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

Τα ενισχυμένα γονίδια κλωνοποιούνται στο φορέα pSC-A (Stratagene). Η τεχνική αυτή της κλωνοποίησης εκμεταλλεύεται τη συνδυασμένη δράση της τοποϊσομεράσης I από τον ιό *Vaccinia* και της ρεκομπινάσης Cre του βακτηριοφάγου P1. *In vivo*, η DNA τοποϊσομεράση I συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA

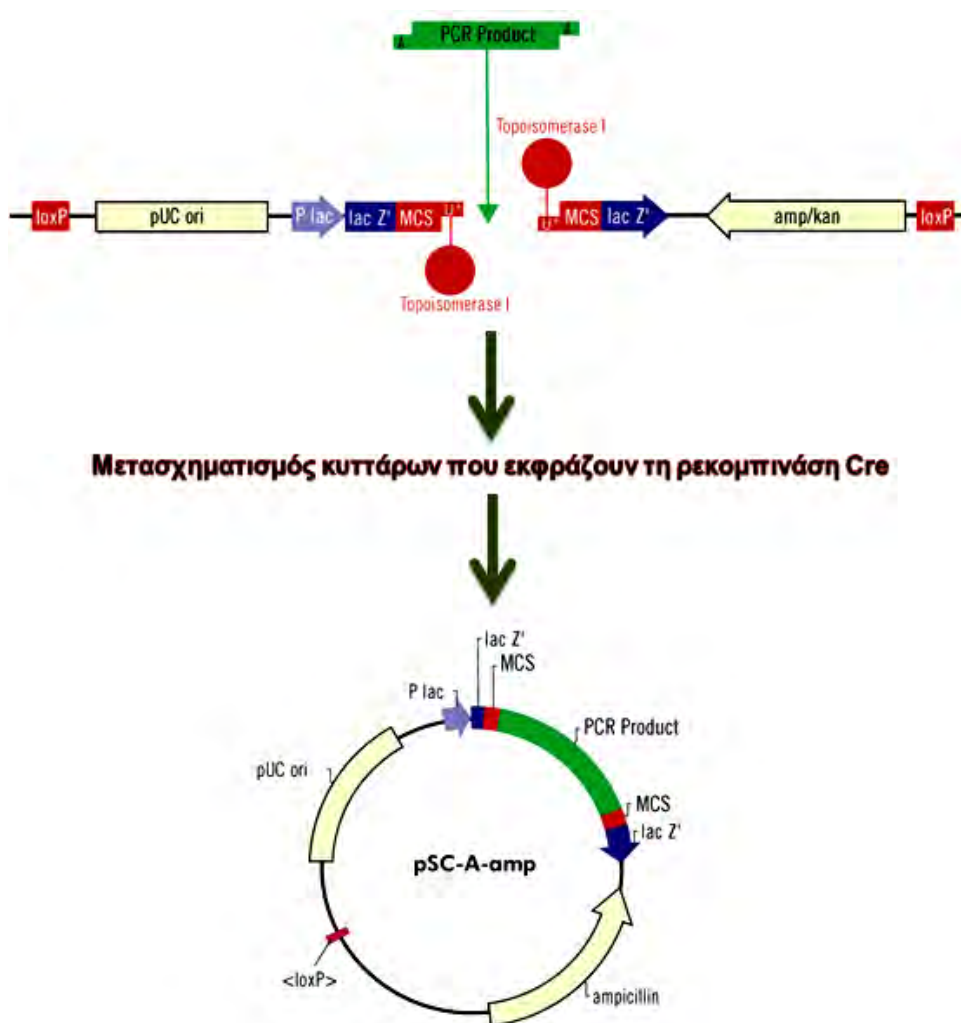
καλαρώνοντας και επανενώνοντας τις αλυσίδες του DNA. Η τοποϊσομεράση I διασπά το φωσφοδιεστερικό σκελετό μιας αλυσίδας DNA μετά την αλληλουχία 5'-CCCTT, σχηματίζοντας ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο DNA-ενζύμου το οποίο διατηρεί την ενέργεια του δεσμού για να χρησιμοποιηθεί στην επανασύνδεση του διασπασμένου DNA και το σχηματισμό του αρχικού κλώνου. Μετά το σχηματισμό του ομοιοπολικού ενδιάμεσου DNA-ενζύμου, η αντίδραση επανασύνδεσης μπορεί να πραγματοποιηθεί και με ετερόλογο τμήμα DNA. Η ρεκομπινάση Cre καταλύει τον ανασυνδυασμό μεταξύ δύο αλληλουχιών αναγνώρισης *loxP*.

Το μίγμα πλασμιδίων pSC-A (Stratagene) περιέχει δύο τμήματα DNA, που το καθένα φέρει μια τοποϊσομεράση I στο ένα άκρο και μια αλληλουχία αναγνώρισης *loxP* στο άλλο άκρο. Τα προϊόντα της PCR φέρουν επεκτάσεις αδενίνης οι οποίες υβριδίζονται με τις προεξέχουσες θυμίνες του πλασμιδίου και ακολουθεί σύνδεση των τμημάτων διαμεσολαβούμενη από την τοποϊσομεράση I. Το γραμμοποιημένο τμήμα DNA που προκύπτει (τμήμα πλασμιδίου - προϊόν PCR - τμήμα πλασμιδίου) χρησιμοποιείται άμεσα για το μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων που εκφράζουν τη ρεκομπινάση Cre. Ο διαμεσολαβούμενος από την Cre ανασυνδυασμός μεταξύ των περιοχών *loxP* του πλασμιδίου σχηματίζει ένα κυκλικό μόριο DNA που δύναται να αντιγραφεί σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αμπικιλίνη (**Εικόνα 32**).

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων προστίθενται 2 μL από το απομονωμένο DNA σε 1 μL πλασμιδίου pSC-A και 3 μL ρυθμιστικού διαλύματος. Το διάλυμα επώαζεται για 5 min στους 20-22° C. Ακολουθεί μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων που παρέχονται μαζί με τον πλασμιδιακό φορέα. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τη ρεκομπινάση Cre ώστε να κυκλοποιήσουν το ευθύγραμμο μόριο DNA που σχηματίζεται από την τοποϊσομεράση I. Για το μετασχηματισμό των κυττάρων μεταφέρονται 2-3 μl από την αντίδραση σύνδεσης σε 50 μl επιδεκτικών κυττάρων. Ακολουθεί επώαση για 20 min στους 0° C και θερμικό σοκ για 45 sec στους 42° C. Τα κύτταρα μεταφέρονται εκ νέου στις 0° C για 2-3 min. Προστίθενται 300 μl διαλύματος SOC και ακολουθεί επώαση για 1 h στους 37° C υπό ανάδευση στις 170 rpm. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρέφονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (LB/άγαρ) που περιέχει αμπικιλίνη (100 μg/mL) και X-gal (30 μg/ml) και επώαζονται για 14 h στους 37° C.

Στερεό θρεπτικό υλικό LB/άγαρ: 1% Tryptone, 1% NaCl, 0.5% Yeast extract, 12 gr/Lt άγαρ








SOC: 0.5% Yeast extract, 2% Tryptone, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, απιονισμένο νερό μέχρι το 98% του τελικού όγκου, αποστείρωση με θέρμανση, προσθήκη 20 mM MgSO₄, 20 mM γλυκόζη.



Εικόνα 32: Κλωνοποίηση προϊόντων PCR στο φορέα pSC-A με τη μέθοδο του TA cloning. Το πλασμίδιο αρχικά είναι χωρισμένο σε δύο τμήματα που φέρουν μια τοποϊσομεράση I στο ένα άκρο. Η κλωνοποίηση βασίζεται στη δράση της τοποϊσομεράσης ενώ η κυκλοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα στη ρεκομπινάση των κυττάρων ξενιστών.

2.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

Η επιβεβαίωση του μετασχηματισμού των κυττάρων με πλασμίδια στα οποία ενσωματώθηκαν τα υπό μελέτη γονίδια πραγματοποιείται με απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini-prep). Αναλυτικότερα, επιλέγονται κάποιες λευκές αποικίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 5 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB με αμπικιλίνη (100 μg/mL). Η μεταφορά των κυττάρων στο μέσο πραγματοποιείται σε ασηπτικές συνθήκες. Οι καλλιέργειες επωάζονται για 14 h στους 37° C υπό ανάδευση. Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, από 3 ml κάθε υγρής καλλιέργειας μετασχηματισμένων κλώνων συλλέγονται τα κύτταρα με φυγοκέντρηση για 1 min στα 13000 rpm. Ακολουθεί λύση των κυττάρων και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (**Εικόνα 33**).

Συλλογή κυττάρων		30 sec 11,000 x g
Λύση κυττάρων		Buffer A1 250 µl Buffer A2 250 µl Buffer A3 300 µl
Απομάκρυνση πρωτεϊνών		5 - 10 min 11,000 x g
Δέσμευση DNA		1 min 11,000 x g
Πλύση		Buffer A4 600 µl 1 min 11,000 x g
Στέγνωμα		2 min 11,000 x g
Έκλυση πλασμιδιακού DNA		50 µl Buffer AE RT 1 min 1 min 11,000 x g

Εικόνα 33: Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (*mini-prep*) με το σύστημα *Nucleospin plasmid* της *Macherey-Nagel*.

2.2.7 Έλεγχος ανασυνδυασμού των πλασμιδίων

Για να ελεγχθεί αν τα κύτταρα έχουν μετασηματιστεί με ανασυνδυασμένα πλασμίδια πραγματοποιείται πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες που επιλέγονται ανάλογα με τις αλληλουχίες των άκρων των γονιδίων. Το διάλυμα της πέψης περιέχει 1X ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για τη δράση των ενζύμων, περίπου 400 ng πλασμιδιακού DNA, 2 U από το κάθε περιοριστικό ένζυμο και 1X BSA (όταν απαιτείται για τη δράση του περιοριστικού ενζύμου). Τα δείγματα επωάζονται για 3 h στους 37° C

και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης επιλέγονται οι κλώνοι που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμιδίο. Το πλασμιδιακό DNA των κλώνων αυτών αποστέλλεται για αλληλούχηση.

2.2.8 Προετοιμασία των ανασυνδυασμένων γονιδίων και των φορέων έκφρασης για κλωνοποίηση

Προκειμένου να κλωνοποιηθούν τα γονίδια σε φορείς έκφρασης πραγματοποιείται ενζυμική πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και των φορέων έκφρασης με τα κατάλληλα ένζυμα, ώστε τελικά να έχουν συμβατά άκρα τα ένθετα γονίδια με τους φορείς έκφρασης. Η πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *aspS2-pSC-A* (4 µg) και του πλασμιδιακού φορέα *pET-24b* (4 µg) πραγματοποιείται σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα για τα ένζυμα περιορισμού *EcoRV/SalI* με 2 U από το κάθε ένζυμο. Η πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων *glyS-pSC-A* (4 µg) και *tuf-pSC-A* (4 µg) καθώς και των πλασμιδιακών φορέων *pET24b* (4 µg) και *pET20b* (4 µg) πραγματοποιείται σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για τα ένζυμα *BamHI/XhoI*, με 2 U από το κάθε ένζυμο. Μετά από επώαση για 3-4 h στους 37° C ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής απομονώνονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στο συνολικό μέγεθος των γονιδίων και των γραμμοποιημένων φορέων έκφρασης και το DNA απομονώνεται από το πήκτωμα με τη βοήθεια του συστήματος Extract II (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ρυθμιστικό διάλυμα για τα ένζυμα περιορισμού *EcoRV* και *SalI*: 50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0,025% Triton-X 100, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,5 @ 25° C.

Ρυθμιστικό διάλυμα για τα ένζυμα περιορισμού *BamHI* και *XhoI*: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,9 @ 25° C.

2.2.9 Κλωνοποίηση των απομονωμένων γονιδίων σε φορέα έκφρασης

Το προϊόν της πέψης χρησιμοποιείται για την ενσωμάτωση των γονιδίων στα πλασμιδία *pET20b* και *pET24b*. Για την κλωνοποίηση των γονιδίων περίπου 2 µg από το απομονωμένο DNA του ένθετου γονιδίου αναμιγνύεται με 0.7 µg του φορέα έκφρασης, 1X ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την T4 DNA λιγάση, 20 U T4 DNA λιγάσης και 1 mM ATP. Παράλληλα παρασκευάζονται αρνητικοί μάρτυρες που περιέχουν όλα τα προαναφερθέντα συστατικά, εκτός από το DNA του γονιδίου. Μετά από επώαση 14 h στους 16° C ακολουθεί μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3).

Ρυθμιστικό διάλυμα για την T4 DNA λιγάση: 660 mM Tris-HCl (pH7.6), 66 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 1 mM ATP.

2.2.10 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων

Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται κύτταρα των στελεχών *E.coli* DH5a και BL21 (DE3). Αρχικά, 5 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB εμβολιάζονται με μικρή ποσότητα κυττάρων από stock γλυκερόλης και επωάζονται υπό ανάδευση για 16 h στους 37° C, 210 rpm. Η καλλιέργεια αυτή στη συνέχεια μεταγγίζεται σε κωνική φιάλη με 100 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB και επωάζεται στους 37° C υπό ανάδευση στις 210 rpm μέχρι η οπτική απορρόφηση του εναιωρήματος στα 600 nm να είναι περίπου 0.4, τιμή που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων. Τα κύτταρα επωάζονται για 10 min στους 4° C και συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min, στους 4° C. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 60 ml διαλύματος MgCl₂ – CaCl₂ (80 mM MgCl₂ και 20 mM CaCl₂, 4° C). Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 min στις 4000 rpm στους 4° C και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 4 ml διαλύματος CaCl₂ 0.1M (4° C) που περιέχει 140 μl DMSO. Ακολουθεί επώαση για 15 min στους 0-4° C και μετά την προσθήκη 140 μl DMSO το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται σε πλαστικούς σωλήνες (200 μl/σωλήνα) και ψύχεται άμεσα στους -80° C.

Υγρό θρεπτικό υλικό LB: 1% Tryptone, 1% NaCl, 0.5% Yeast extract

2.2.11 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3) με ανασυνδυασμένους φορείς έκφρασης

Για το μετασχηματισμό των επιδεκτικών κυττάρων, 5 μl της αντίδρασης κλωνοποίησης μεταφέρονται σε 100 μl επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* BL21 (DE3) και ακολουθεί επώαση για 30 min στους 0-4° C. Τα κύτταρα υποβάλλονται σε θερμικό σοκ στους 42° C για 1 min και μεταφέρονται άμεσα στους 0° C για 2-3 min. Τέλος, μετά την προσθήκη 400 μl διαλύματος SOC, επωάζονται για 1 h και 30 min στους 37° C, υπό ανάδευση (170 rpm). Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (LB/άγαρ) που περιέχει αμπικιλίνη (100 μg/ml, για τον ανασυνδυασμένο pET20b) ή καναμυκίνη (50 μg/mL, για τον ανασυνδυασμένο pET24b) και επωάζονται για 14 h στους 37° C.

2.2.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα – επιλογή θετικών αποικιών

Από τις αποικίες που αναπτύσσονται στα τρυβλία ελέγχονται κάποιες για το αν τα κύτταρα έχουν μετασχηματιστεί με τους ανασυνδυασμένους φορείς έκφρασης. Πραγματοποιείται απομόνωση πλασμιδιακού DNA και πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω (§ 2.2.6).

2.2.13 Έλεγχος έκφρασης γονιδίων

Για να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης των κλωνοποιημένων γονιδίων πραγματοποιούνται δοκιμές έκφρασης. Συγκεκριμένα, 3 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB με αμπικιλίνη (100 µg/ml, για τον ανασυνδυασμένο pET20b) ή καναμυκίνη (50 µg/ml, για τον ανασυνδυασμένο pET24b) εμβολιάζονται με κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) μετασχηματισμένα με τους ανασυνδυασμένους φορείς έκφρασης. Οι καλλιέργειες επωάζονται για 14 h στους 37° C υπό ανάδευση στις 210 rpm. Από την καλλιέργεια αυτή 2 ml χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 140 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37° C υπό ανάδευση στις 210 rpm μέχρι η οπτική απορρόφηση του εναιωρήματος στα 600 nm να έχει τιμή περίπου 0.6. Η καλλιέργεια μοιράζεται σε επτά αποστειρωμένες κωνικές φιάλες (20 ml στην κάθε μια). Στις τρεις καλλιέργειες προστίθεται IPTG 0.5 mM και η μια επωάζεται στους 37° C για 5 h, η δεύτερη στους 30° C για το ίδιο χρονικό διάστημα και η τρίτη στους 20-22° C για 14-16 h, υπό ανάδευση στις 210rpm. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τις υπόλοιπες τρεις καλλιέργειες με τη διαφορά ότι προστίθεται 1 mM IPTG. Η πέμπτη καλλιέργεια επωάζεται στους 37° C για 5 h χωρίς την προσθήκη IPTG και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Μετά το πέρας της επώασης τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm, για 30 min στους 4° C. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 1 ml διαλύματος λύσης και ομογενοποιούνται με υπερήχους για 2 min με παύσεις των 10 sec ανά 10 sec. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 14000 rpm για 30 min στους 4° C για την απομάκρυνση των μεμβρανών και των κυτταρικών οργανιδίων. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέους πλαστικούς σωλήνες. Ακολουθεί προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτική ακρυλαμιδίου παρουσία SDS. Συγκεκριμένα, 9 µl από το κάθε υπερκείμενο αναμιγνύονται με 3 µl 4X διαλύματος πλήρωσης, επωάζονται για 5 min στους 98° C και μεταφέρονται άμεσα στον πάγο. Τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 100 µl 4X διαλύματος πλήρωσης και επωάζονται για 30 min στους 98° C με έντονη ανάδευση ανά 5 min. Έπειτα, 3 µl από το κάθε αναδιαλυμένο ίζημα αραιώνονται με 9 µl νερού. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου 12% και μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται χρώση και πλύση της πηκτής όπως περιγράφηκε παραπάνω (§ 2.2.1. Γ).

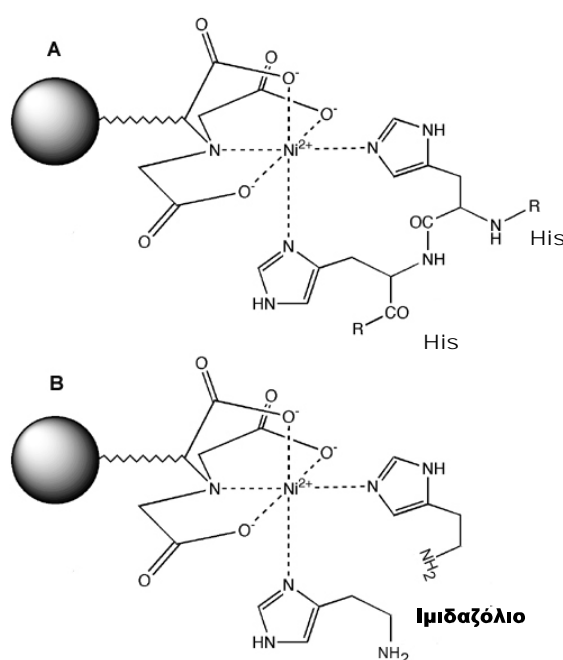
2.2.14 Έκφραση γονιδίων

Μετά τον προσδιορισμό των κατάλληλων συνθηκών για την έκφραση κάθε γονιδίου, εφαρμόζονται οι συνθήκες αυτές σε καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου για την έκφραση των γονιδίων και την ακόλουθη απομόνωση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιμολύνονται με κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) που έχουν μετασχηματιστεί με τους ανασυνδυασμένους φορείς έκφρασης. Οι καλλιέργειες επωάζονται για 14-16 h στους 37° C υπό ανάδευση στις 210 rpm. Από την καλλιέργεια αυτή, 5 ml χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 3 Lt

υγρού θρεπτικού μέσου LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Οι καλλιέργειες αυτές επωάζονται στους 37° C στις 210 rpm, έως ότου η οπτική απορρόφηση στα 600 nm είναι περίπου 0,6. Στο σημείο αυτό προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα IPTG ανάλογα με τα αποτελέσματα του ελέγχου υπερέκφρασης και οι καλλιέργειες επωάζονται στη βέλτιστη θερμοκρασία για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα. Μετά το πέρας της επώασης τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 30 min στους 4° C και το κυτταρικό ίζημα αποθηκεύεται στους -80° C.

2.2.15 Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών που φέρουν έξι κατάλοιπα ιστιδίνης στο αμινοτελικό ή στο καρβοξυτελικό τους άκρο (N-terminal και C-terminal His-tag) χρησιμοποιείται στήλη συγγένειας Ni-NTA. Τα κατάλοιπα των έξι εν σειρά ιστιδινών αλληλεπιδρούν μέσω των ιμιδαζολικών δακτυλίων με τα ιόντα νικελίου της ρητίνης. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι αρκετά ισχυρή και για την απομόνωση των πρωτεϊνών, μετά την απομάκρυνση των μη επιθυμητών πεπτιδίων με το διάλυμα πλύσης, χρησιμοποιείται διάλυμα έκλουσης που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου. Το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται την ουρά ιστιδινών για την πρόσδεση στη στήλη (**Εικόνα 34**).



Εικόνα 34: (A) Αλληλεπίδραση δύο γειτονικών κατάλοιπων ιστιδίνης με τα ιόντα νικελίου της στήλης χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA. (B) Αλληλεπίδραση του ιμιδαζολίου με τα ιόντα νικελίου. Το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται τα κατάλοιπα ιστιδίνης για τη δέσμευση στα ιόντα νικελίου.

Αρχικά, τα κυτταρικά ιζήματα επαναδιαλύονται στον αντίστοιχο όγκο διαλύματος λύσης (3 ml/gr κυττάρων) και επωάζονται για 20 min στους 0-4° C.

Ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπερήχους για 2 min, με παύσεις των 10sec ανά 10sec. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 min στις 14000 rpm στους 4° C και τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέους πλαστικούς σωλήνες. Ακολουθεί η προετοιμασία της στήλης συγγένειας Ni-NTA. Σε σύριγγα των 5ml τοποθετείται υαλοβάμβακας και έπειτα προστίθεται 2 ml Ni-NTA αγαρόζης. Η στήλη πακετάρεται και μετά πραγματοποιείται εξισορρόπηση με 10 όγκους διαλύματος εξισορρόπησης. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μεταφέρονται στη στήλη και τα δείγματα συλλέγονται σε πλαστικούς σωλήνες με τις χαρακτηριστικές ονομασίες FT (flow – through). Στα κλάσματα αυτά περιέχεται η πλειονότητα των πρωτεϊνών που δε δεσμεύονται στη στήλη. Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που έχουν δεσμευτεί στη στήλη μη ειδικά πραγματοποιείται πλύση με διάλυμα πλύσης που περιέχει μικρή συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Τα δείγματα αυτά συλλέγονται σε πλαστικούς σωλήνες με τις χαρακτηριστικές ονομασίες W (wash). Συνήθως, οι πρωτεΐνες που συλλέγονται σε αυτό το στάδιο της απομόνωσης περιέχουν κάποια κατάλοιπα ιστιδίνης που δεσμεύονται στα ιόντα νικελίου. Τέλος, η υπό μελέτη πρωτεΐνη εκκλύεται από τη στήλη με διάλυμα έκλυσης που περιέχει ιμιδαζόλιο σε συγκέντρωση 250 mM-1M. Τα δείγματα συλλέγονται σε πλαστικούς σωλήνες με τις χαρακτηριστικές ονομασίες EL (elution). Τα κλάσματα αποθηκεύονται στους 4° C. Κάποια αντιπροσωπευτικά δείγματα από τα FT, W και EL ηλεκτροφορούνται σε SDS-PAGE 10% για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της απομόνωσης. Οι πρωτεΐνες που περιέχονται στα δείγματα της έκλυσης συλλέγονται σε μια μεμβράνη διαπίδυσης, η οποία τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 100 όγκους διαλύματος διαπίδυσης. Η διαπίδυση λαμβάνει χώρα στους 4° C για 3 h υπό ελαφρά ανάδευση και μετά την αντικατάσταση του διαλύματος διαπίδυσης με ίσο όγκο νέου διαλύματος συνεχίζεται για 14-16 h. Σε περίπτωση που απαιτείται συμπύκνωση των πρωτεϊνών συλλέγεται το δείγμα σε μεμβράνη διαπίδυσης, η οποία τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει PEG40000 για 1-2 h στους 4° C. Τελικά, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε πλαστικούς σωλήνες και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 40%.

Διάλυμα λύσης: 50 mM Tris-HCl pH 8, 500mM NaCl, 0.1% Triton-X, 5 mM β-mercaptoethanol, 5 mM MgCl₂, 15 μg/ml lysozyme, 1 mM PMSF, 10% glycerol.

Διάλυμα εξισορρόπησης: 50 mM Tris-HCl pH 8, 500mM NaCl

Διάλυμα πλύσης: 50 mM Tris-HCl pH 8, 500mM NaCl, 30 mM imidazol

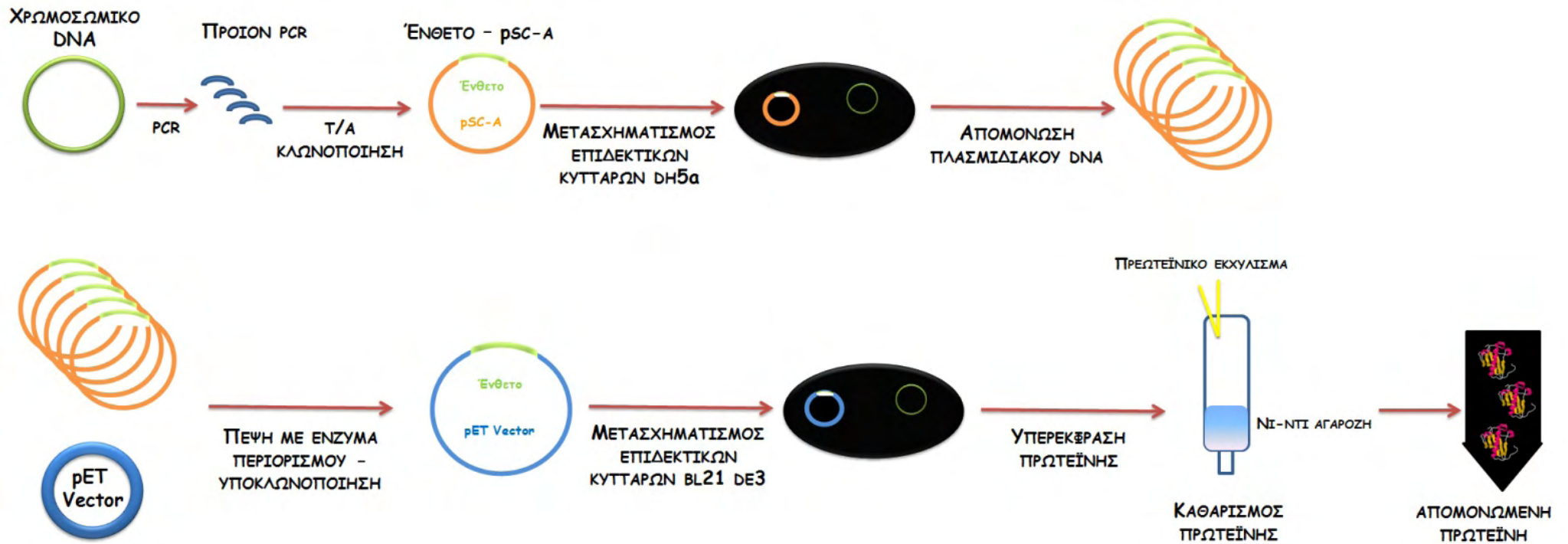
Διάλυμα έκλυσης: 50 mM Tris-HCl pH 8, 500mM NaCl, 250mM-1M imidazol

Διάλυμα διαπίδυσης (AspRS2, GlyRS): 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 2 mM β-mercaptoethanol

Διάλυμα διαπίδυσης (EF-Tu): 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NH₄Cl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoethanol

2.2.16 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα. Η τεχνική βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες (*Bradford, 1976*) και ο προσδιορισμός πραγματοποιείται με φωτομέτρηση στα 595 nm.



Εικόνα 35: Σύνοψη της πειραματικής διαδικασίας για την ενίσχυση και κλωνοποίηση των γονιδίων και την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

2.2.17 Cassette cloning των γονιδίων tRNA

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων των δύο αγρίου τύπου και δώδεκα μεταλλαγμένων μορίων tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} του *N. meningitidis* και των πέντε μορίων tRNA^{Gly} του *S. aureus* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του cassette cloning, όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία (Fechter et al., 1998). Αρχικά, σχεδιάζονται επικαλυπτόμενα ολιγονουκλεοτίδια και για τους δυο κλώνους του κάθε γονιδίου. Στο 5' άκρο κάθε γονιδίου προστίθεται ένα ολιγονουκλεοτίδιο με την αλληλουχία του T7 προαγωγέα και η αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο HindIII. Αντίστοιχα, στο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στο 3' άκρο της αλληλουχίας κάθε γονιδίου προστίθεται η αλληλουχία αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων BamHI και BstNI. Οι θέσεις αναγνώρισης από τα ένζυμα HindIII και BamHI εξυπηρετούν την υποκλωνοποίηση του γονιδίου στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, ενώ η θέση αναγνώρισης του BstNI τη γραμμοποίηση του πλασμιδίου για την *in vitro* μεταγραφή. Στις περιπτώσεις που το πρώτο ζεύγος βάσεων του μορίου tRNA είναι UA, στο 5' άκρο του γονιδίου προστίθεται και η αλληλουχία ενός αυτοκαταλυόμενου ριβοενζύμου (Curnow et al., 1998). Για το κάθε γονίδιο που κωδικοποιεί μόριο tRNA αγρίου τύπου σχεδιάζονται 8-10 ολιγονουκλεοτίδια, ενώ για την ενσωμάτωση συγκεκριμένων μεταλλάξεων στα μόρια tRNA σχεδιάζονται επιπλέον ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων (Πίνακες 6, 7 και 8).

Πίνακας 6: Αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των γονιδίων των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορίων tRNA^{Asn} του *N. meningitidis*.

tNNme1	5'-AGCTTAATACGACTCAC-3'
tNNme2	5'-TATAGGGAGATATCGGGGA-3'
tNNme3	5'-CTGATGAGTCCCTGAGGACGAAACGGTACCCGGTACCCGTC-3'
tNNme4	5'-TCCCCGATAGCTCAGTCGG-3'
tNNme5	5'-TAGAGCGGCGGACTGTAAAT-3'
tNNme6	5'-CCGTAGGTCGCTGGTTCG-3'
tNNme7	5'-AGCCCAGCTCGGGGAGCCAG-3'
tNNme8	5'-CGGACTCATCAGTCCCGATATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
tNNme9	5'-TCGGGGAGACGGGTACCGGGTACCGTTCGTCCTCA-3'
tNNme10	5'-CCGCTCTACCGACTGAGCTA-3'
tNNme11	5'-CTACGGATTAACAGTCCG-3'
tNNme12	5'-GCTGGGCTCGAACCAGCGAC-3'
tNNme13	5'-GATCCTGGCTCCCCGA-3'
tNNme5U20A	5'-TTAGAGCGGCGGACTGTAAAT-3'
tNNme10U20A	5'-CCGCTCTAACCGACTGAGCTA-3'
tNNme5C36	5'-TAGAGCGGCGGACTGTCAAT-3'
tNNme11C36	5'-CTACGGATTGACAGTCCG-3'
T7tata	5'-AGCTTAATACGACTCAClata-3'
tNNmeT7tataG1	5'-TCGGGGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
tNNme4G1	5'-GCCCCGATAGCTCAGTCGG-3'
tNNme7C72	5'-AGCCCAGCTCGGGGCGCCAG-3'
tNNme13C72	5'-GATCCTGGCGCCCCGA-3'
tNNme5U20AC36	5'-TTAGAGCGGCGGACTGTCAAT-3'
tNNme7G72	5'-AGCCCAGCTCGGGGCGCCAG-3'
tNNme13C72	5'-GATCCTGGCCCCCGA-3'

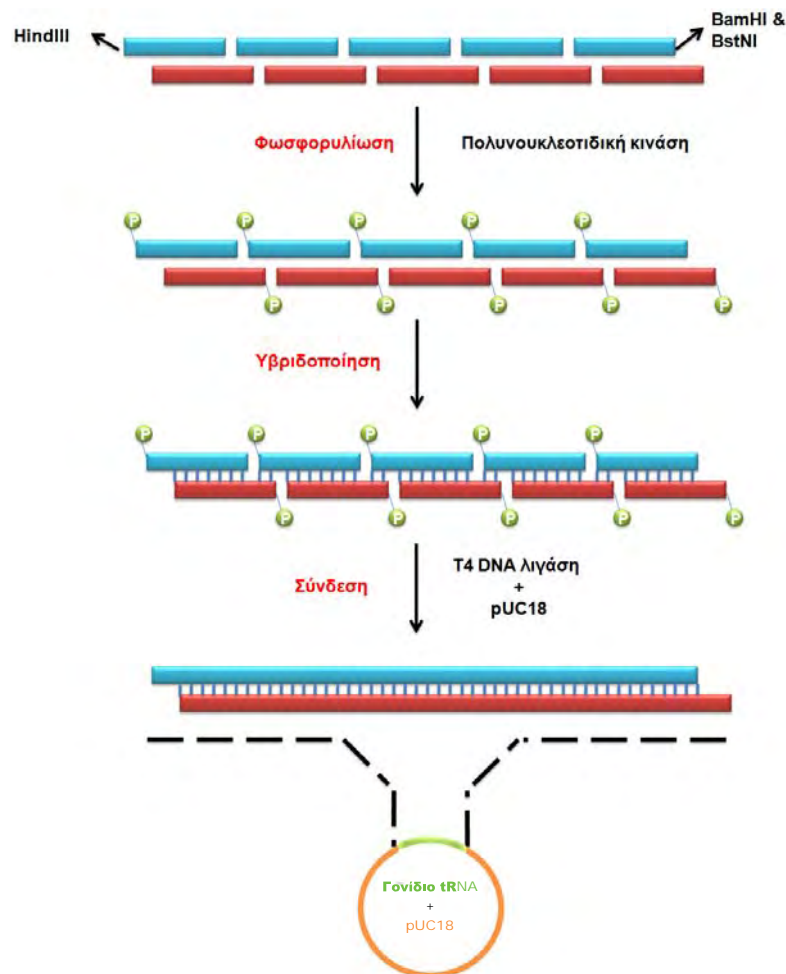
Πίνακας 7: Αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των γονιδίων των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορίων *tRNA^{Asp}* του *N. meningitidis*.

<i>tDNme2</i>	5'-TATAGGGAGATACCGCCGA-3'
<i>tDNme4U1</i>	5'-TCGGTGGTAGCTCAGTTGG-3'
<i>tDNme5U20AU36</i>	5'-TAGAGTACCGGCCTGTTACG-3'
<i>tDNme6</i>	5'-CCGGGGTCCGCGGTTCCG-3'
<i>tDNme7A72</i>	5'-AGCCCCGTCCGCCGAGCCAG-3'
<i>tDNme8</i>	5'-CGGACTCATCAGTCGGCGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
<i>tDNme9U1</i>	5'-CCACCGAGACGGTACCGGGTACCGTTTCGTCCCTCA-3'
<i>tDNme10-U20A</i>	5'-GTACTCTACCAACTGAGCTA-3'
<i>tDNme11U36</i>	5'-CCCCGGCGTAACAGGCCG-3'
<i>tDNme12</i>	5'-ACGGGGCTCGAACCCGCGAC-3'
<i>tDNme13A72</i>	5'-GATCCTGGCTCGGCGG-3'
<i>tDNme5</i>	5'-TTAGAGTACCGGCCTGTCACG-3'
<i>tDNme10</i>	5'-GTACTCTAACCAACTGAGCTA-3'
<i>tDNme11</i>	5'-CCCCGGCGTGACAGGCCG-3'
<i>tDNmeT7TATA</i>	5'-CCACCGCTATAGTGAAGTCGTATTA-3'
<i>tTDNme4</i>	5'-GCGGTGGTAGCTCAGTTGG-3'
<i>tTDNme7</i>	5'-AGCCCCGTCCGCCGCGCCAG-3'
<i>tTDNme13</i>	5'-GATCCTGGCGCGGCGG-3'

Πίνακας 8: Αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των γονιδίων των μορίων *tRNA^{Gly}* του *S. aureus*.

<i>tGSauT7TATA</i>	5'-AGCTTAATACGACTCACTATA-3'
<i>tGSauP12</i>	5'-GCAGAAGTAGTTCAGCGGTAG-3'
<i>tGSauP13</i>	5'-AATACAACCTTGCCAAAGG-3'
<i>tGSauP14</i>	5'-TTGGGGTCCGCGGTTCCGAATC-3'
<i>tGSauP15</i>	5'-CCGTCTTCTGCTCCAG-3'
<i>tGSauP16</i>	5'-CTTCTGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
<i>tGSauP17</i>	5'-GGTTGTATTCTACCGCTGAACTA-3'
<i>tGSauP18</i>	5'-CCC CGACCCCAACCTTGGCAA-3'
<i>tGSauP19</i>	5'-GATCCTGGAGCAGAAGACCGGATTCGAA-3'
<i>tGSauP22</i>	5'-GCGGGTGTAGTTTAATGGC-3'
<i>tGSauP23</i>	5'-AAAACCTCAGCCTTCCAAGC-3'
<i>tGSauP24</i>	5'-TGATGTTGTGGGTTCCGATTC-3'
<i>tGSauP25</i>	5'-CCATCACCCGCTCCAG-3'
<i>tGSauP26</i>	5'-CACCCGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
<i>tGSauP27</i>	5'-GAGGTTTGGCCATTAACCTA-3'
<i>tGSauP28</i>	5'-CAACATCAGCTTGGAAAGGCT-3'
<i>tGSauP29</i>	5'-GATGGGAATCGAACCCA-3'
<i>tGSauP210</i>	5'-GATCCTGGAGCGGT-3'
<i>tGSauNP12</i>	5'-GCGGGAGTAGTTCAACTTTTAG
<i>tGSauNP13</i>	5'-AACACGTTCCCTCCCGGAAC-3'
<i>tGSauNP14</i>	5'-GAGGTATAGGTGCAAATCC-3'
<i>tGSauNP15</i>	5'-TATCTTCCGCTCCAG-3'
<i>tGSauNP16</i>	5'-CTCCCGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
<i>tGSauNP17</i>	5'-CGTGTCTAAAAGTTGAACTA-3'
<i>tGSauNP18</i>	5'-CCTCGTCCCGGAAGGAA-3'
<i>tGSauNP19</i>	5'-GATAGGATTTGCACCTATA-3'
<i>tGSauNP110</i>	5'-GATCCTGGAGCGGA-3'
<i>tGSauNP24</i>	5'-GAGGTATAGGTGTAATCC-3'
<i>tGSauNP29</i>	5'-GATAGGATTTACACCTATA-3'
<i>tGSauNEW2</i>	5'-GCGGGAGTATTTCAACTCTTAGAAT-3'
<i>tGSauNEW3</i>	5'-ACATTCCTTCCGGAATGAGG-3'
<i>tGSauNEW4</i>	5'-TATAGGTGTAATCCTATCTCCGCTCCAG-3'
<i>tGSauNEW5</i>	5'-AAATACTCCCGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
<i>tGSauNEW6</i>	5'-AAGGAATGTATTCTAAGAGTTG-3'
<i>tGSauNEW7</i>	5'-ATTTACACCTATACCTCATTCCAGG-3'
<i>tGSauNEW8</i>	5'-GATCCTGGAGCGGAAGATAGG-3'

Για τη σύνθεση των γονιδίων πραγματοποιείται φωσφορυλίωση και υβριδοποίηση των εκκινητών και σύνδεσή τους με τον πλασμιδιακό φορέα pUC18 (**Εικόνα 36**).



Εικόνα 36: Κλωνοποίηση των γονιδίων των μορίων tRNA με τη μέθοδο του Cassette cloning. Τα oligονουκλεοτίδια φωσφορυλιώνονται, υβριδίζονται και συνδέονται μεταξύ τους και με τον πλασμιδιακό φορέα pUC18.

Αναλυτικότερα, φωσφορυλιώνονται 100 pmol από τον κάθε εκκινητή σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα για την T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση που περιέχει 1 mM ATP και 10 U T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση. Πραγματοποιείται επώαση για 30 min στους 37° C. Το ένζυμο απενεργοποιείται με θέρμανση στους 65° C για 20 min. Για την αντίδραση υβριδοποίησης αναμιγνύονται 20 pmol από κάθε έναν από τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν για ένα γονίδιο tRNA με 3X ρυθμιστικό διάλυμα για την T4 DNA λιγάση. Τα δείγματα επωάζονται για 10 min στους 85° C και ακολουθεί σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας για 3h ώστε η τελική θερμοκρασία να είναι 20-22° C. Το 1/3 του προϊόντος της αντίδρασης υβριδοποίησης χρησιμοποιείται για την αντίδραση σύνδεσης με 1 μg πλασμιδιακού φορέα pUC18 που είχε υποστεί πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και BamHI. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 16 h

στους 16° C σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την T4 DNA λιγάση που περιέχει 2,5 mM ATP και 40 U T4 DNA λιγάση. Ο ανασυνδυασμένος φορέας χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων του στελέχους *E. coli* DH5a, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η επιλογή των κλώνων γίνεται με βάση το χρώμα των αποικιών (Blue-White screening).

Ρυθμιστικό διάλυμα για τα ένζυμα περιορισμού BamHI και HindIII : 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,9 @ 25° C

2.2.18 Έλεγχος ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

Για να ελεγχθεί αν ο φορέας pUC18 ανασυνδυάστηκε με τα γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA πραγματοποιείται αντίδραση PCR. Ως εκμαγείο χρησιμοποιούνται ελάχιστα κύτταρα από την κάθε αποικία. Τα κύτταρα μεταφέρονται αρχικά με ένα ρύγχος σε πλαστικό σωλήνα στον οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση PCR και έπειτα επιστρώνονται σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB/agar που περιέχει αμπικιλίνη (100 µg/ml). Το τρυβλίο είναι χωρισμένο σε διακριτές θέσεις ώστε να επιστρωθούν κύτταρα από όλες τις αποικίες που ελέγχονται και για την ανάπτυξη των κυττάρων επωάζεται για 14-16 h στους 37° C. Για το κάθε γονίδιο η αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για τη δράση της Taq DNA πολυμεράσης (Hyttest), στο οποίο προστίθενται 0.2 mM από κάθε dNTP, 1.6 mM από τους δύο ακραίους εκκινητές, 2.5 mM MgCl₂ και 2.5 U Taq DNA πολυμεράσης. Οι αντιδράσεις για όλα τα γονίδια πραγματοποιούνται στις συνθήκες που αναγράφονται στον **Πίνακα 9**. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2.5%. Το πλασμιδιακό DNA από τις αποικίες που είναι θετικές απομονώνεται όπως περιγράφηκε παραπάνω και αλληλουχείται με τον εκκινητή M13F. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αξιολογούνται με ομοπαράθεση με τις αλληλουχίες των γονιδίων που αντλούνται από ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων.

Πίνακας 9: Συνθήκες της αντίδρασης PCR για έλεγχο των ανασυνδυασμένων με τα γονίδια tRNA πλασμιδίων.

	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός επαναλήψεων
Αρχική αποδιάταξη	95° C	4 min	1
Αποδιάταξη	95° C	1 min	
Υβριδοποίηση εκκινητών	45° C +0.5° C/κύκλο	1 min	30
Επιμήκυνση	72° C	0.5 min	
Τελική επιμήκυνση	72° C	10 min	1

2.2.19 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxipreps)

Για την *in vitro* μεταγραφή των γονιδίων των μορίων tRNA απαιτούνται μεγάλες ποσότητες πλασμιδιακού DNA. Για το λόγο αυτό απομονώνεται πλασμιδιακό DNA από τις θετικές αποικίες σε μεγάλη κλίμακα (maxi-prep). Αρχικά, 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB με αμπικιλίνη (100 µg/ml) εμβολιάζονται με μικρό αριθμό κυττάρων. Η καλλιέργεια επωάζεται για 5 h στους 37° C, υπό ανάδευση στις 210 rpm, και έπειτα 2 ml αυτής χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 1 lt υγρού θρεπτικού μέσου LB. Τα κύτταρα αναπτύσσονται για 14-16 h στους 37° C υπό ανάδευση στις 210 rpm και φυγοκεντρώνονται για 15 min στις 4200 rpm στους 4° C. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 7.5 ml διαλύματος I και τα κύτταρα λύνονται με προσθήκη 15 ml διαλύματος II. Το εναιώρημα των κυττάρων αναδεύεται για 5 min και επωάζεται για 30 min στους 37° C. Η λύση σταματά με την προσθήκη 10 ml διαλύματος III. Μετά από έντονη ανάδευση τα δείγματα επωάζονται στους 0° C για 10 min και φυγοκεντρώνονται για 30 min στις 4200 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο πλαστικό σωλήνα και αναμιγνύεται με 0.6 όγκους ισοπροπανόλης και επωάζεται στους 20-22° C για 20 min. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση για 20 min στις 4200 rpm. Το ίζημα επαναδιαλύεται με έντονη ανάδευση σε 5 ml CsCl₂ πυκνότητας 1.58 και προστίθενται 200 µl βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min στους 4° C και φυγοκεντρώνονται για 10 min στις 3000 rpm ώστε να απομακρυνθούν τα μόρια RNA μεγάλου μεγέθους. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε πλαστικούς σωλήνες διαβάθμισης Quick-seal (13 X 51 mm Beckman) και γίνεται πλήρωση των σωλήνων με CsCl₂. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 8000 rpm σε κεφαλή Beckman Vti90 για 2.5 h (εναλλακτικά: 55000 rpm, 14 h). Με τη φυγοκέντρηση δημιουργείται μια διαβάθμιση πυκνότητας από 1.50 έως 1.65. Τα διάφορα τμήματα DNA διαχωρίζονται ανάλογα με την πυκνότητά τους. Το υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA ενσωματώνει λιγότερο βρωμιούχο αιθίδιο σε σχέση με το κατεστραμμένο πλασμιδιακό DNA, του οποίου ο ένας κλώνος έχει κοπεί ή με το γραμμοποιημένο γενωμικό DNA. Συνεπώς, το υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA είναι πιο πυκνό από το κατεστραμμένο πλασμιδιακό ή το γενωμικό DNA. Στο σωλήνα εμφανίζονται δύο ζώνες. Το υπερελικωμένο, κυκλικό, πλασμιδιακό DNA, που εντοπίζεται στην κατώτερη ζώνη, συλλέγεται με μια σύριγγα και μεταφέρεται σε σωλήνα με αιμολυσίνη. Για να απομακρυνθεί το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται 1 όγκος διαλύματος ισοπροπανόλης 80% σε ρυθμιστικό διάλυμα TE. Μετά από 1-2 min απορρίπτεται το υπερκείμενο (περιέχει ισοπροπανόλη και βρωμιούχο αιθίδιο) και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να αποχρωματιστεί το διάλυμα. Το δείγμα αραιώνεται σε αναλογία 1:3 με νερό και προστίθεται διάλυμα NaCl τελικής συγκέντρωσης 0.25 M. Για την κατακρήμνιση του DNA προστίθενται 3 όγκοι αιθανόλης 100%, τα δείγματα επωάζονται στους -20° C για 1 h και φυγοκεντρώνονται για 20 min στις 4000 rpm στους 4° C. Ακολουθεί πλύση με αιθανόλη 80% και φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm στους 4° C. Μετά την απομάκρυνση κάθε υπολείμματος αιθανόλης, το ίζημα του DNA επαναδιαλύεται σε 400 µl

αποστειρωμένου νερού και πραγματοποιείται πλύση με φαινόλη και χλωροφόρμιο για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του βρωμιούχου αιθιδίου. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA όπως περιγράφηκε παραπάνω και τελικά το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλύεται σε 200 μ l αποστειρωμένου νερού και αποθηκεύεται στους -20° C.

2.2.20 *In vitro* μεταγραφή

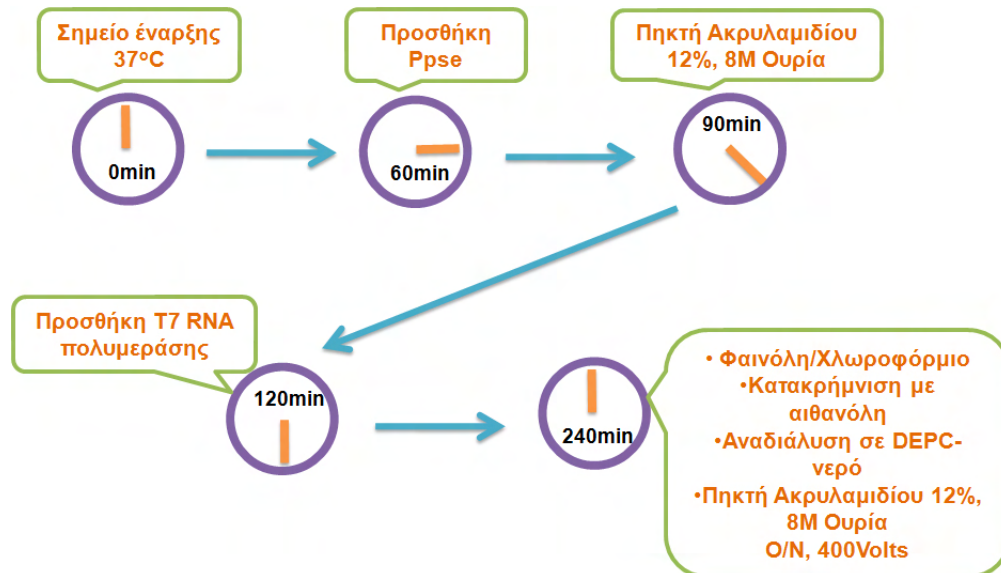
Για την *in vitro* μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια tRNA απαιτείται το πλασμίδιο να είναι γραμμικό. Πραγματοποιείται αρχικά πέψη του ανασυνδυασμένου pUC18 με το ένζυμο περιορισμού BstNI. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για το BstNI με 1X BSA, 100 μ g πλασμιδιακό DNA και 50 U BstNI. Τα δείγματα επωάζονται για 2 h στους 60° C και μετά την πάροδο 1.5 h προστίθενται επιπλέον 6 U ενζύμου. Ακολουθεί πλύση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη και τελικά το προϊόν της πέψης επαναδιαλύεται σε 50 μ l αποστειρωμένου νερού. Από το προϊόν της πέψης 1 μ l ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%. Ακολουθεί η *in vitro* μεταγραφή των γονιδίων των μορίων tRNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης, της οποίας η σύσταση φαίνεται στον **Πίνακα 10**, είναι 500 μ l.

Πίνακας 10: Σύσταση των αντιδράσεων της *in vitro* μεταγραφής των γονιδίων των μορίων tRNA.

	Τελική Συγκέντρωση
ΓΡΑΜΜΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA	25 μ L
Tris HCl pH 8.1	40 mM
DTT	5 mM
MgCl₂	22 mM
Spermidine	1 mM
Triton X100	0.01%
ATP	4 mM
CTP	4 mM
GTP	4 mM
UTP	4 mM
GMP	16 mM
T7 RNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ	20 U

Τα δείγματα επωάζονται για 2 h στους 37° C. Μετά την πρώτη ώρα παρατηρείται κατακρήμνιση πυροφωσφορικού μαγνησίου και προστίθενται 2 μ l πυροφωσφατάση (Ppse, 20 U/ μ l). Μετά από 30 min, 5 μ l από την αντίδραση ηλεκτροφορούνται σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου 12% με 8M ουρία για να ελεγχθεί αν έχει παραχθεί tRNA. Την ίδια χρονική στιγμή προστίθενται 5 U T7 RNA πολυμεράσης σε κάθε αντίδραση και ακολουθεί επώαση για επιπλέον 2 h. Πραγματοποιείται πλύση με

φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Τελικά, το RNA επαναδιαλύεται σε 150 μl αποστειρωμένου DEPC-νερού. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% με 8 M ουρία στα 400 Volts για 14-16 h. Η πορεία της *in vitro* μεταγραφής παρουσιάζεται συνοπτικά στην **Εικόνα 37**.



Εικόνα 37: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας που ακολουθείται κατά την *in vitro* μεταγραφή των γονιδίων των μορίων tRNA.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται ηλεκτροέκλυση των μορίων tRNA. Αρχικά τοποθετούνται τρεις μεμβράνες στη συσκευή. Οι δύο ακραίες μεμβράνες, της ανόδου και της καθόδου, είναι μη διαπερατές ενώ η τρίτη μεμβράνη, που τοποθετείται μεταξύ των δύο και πιο κοντά στη μεμβράνη της καθόδου, είναι διαπερατή. Μετά την εκτομή των ζωνών που αντιστοιχούν στα μόρια tRNA, τα κομμάτια τεμαχίζονται και τοποθετούνται μεταξύ των δύο μεμβρανών στη συσκευή της ηλεκτροέκλυσης. Στο τμήμα της συσκευής που τοποθετείται το κομμάτι της πηκτής προστίθενται 10 ml αποστειρωμένου διαλύματος 1X TBE και μεταξύ των δύο μεμβρανών της καθόδου 800 μl του ίδιου διαλύματος. Η έκλυση πραγματοποιείται για 2 h στα 250 Volts και έπειτα γίνεται αλλαγή των πόλων για 15 sec. Το διάλυμα μεταξύ των μεμβρανών της καθόδου μεταφέρεται σε νέο πλαστικό σωλήνα και το RNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη. Τελικά, το tRNA επαναδιαλύεται σε 100 μl αποστειρωμένου νερού και αποθηκεύεται στους -20° C.

Ρυθμιστικό διάλυμα για το ένζυμο περιορισμού BstNI: 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,9 @ 25° C

2.2.21 Αντίδραση αμινοακυλίωσης μορίων tRNA (tRNA aminoacylation assays)

Αντιδράσεις αμινοακυλίωσης πραγματοποιούνται για την αμινοακυλίωση των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορίων tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} από την AspRS2 του *T. thermophilus* και για την αμινοακυλίωση των μορίων tRNA^{Gly} από την GlyRS του *S. aureus*. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιείται σημασμένο [¹⁴C]ασπαραγινικό οξύ ενώ στη δεύτερη [¹⁴C]γλυκίνη.

Για την αμινοακυλίωση των μορίων tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} χρησιμοποιούνται 30pmol από το κάθε μετάγραφο. Στο θετικό μάρτυρα προστίθεται tRNA^{Asp} του *T. thermophilus*. Ο αρνητικός μάρτυρας δεν περιέχει μετάγραφο tRNA. Η σύσταση του διαλύματος της αντίδρασης αμινοακυλίωσης αναγράφεται στον **Πίνακα 11** και ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 50μL.

Πίνακας 11: Σύσταση των αντιδράσεων αμινοακυλίωσης των tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} μεταγραφών του *N. meningitidis* από την AspRS2 του *T. thermophilus*.

	Τελική Συγκέντρωση
Hepes-NaOH pH 7.2	100 mM
KCl	30 mM
MgCl₂	12 mM
ATP	10 mM
[¹⁴C]Asp (200 cpm/pmol)	5 μM
AspRS2	2.3 μM

Τα δείγματα επωάζονται στους 50° C. Μετά από 30 min απομακρύνονται 20 μl από κάθε δείγμα τα οποία μεταφέρονται σε ένα κομμάτι χαρτιού whatman. Τα εμποτισμένα χαρτιά μεταφέρονται κατευθείαν σε 5% TCA, για να σταματήσει η αντίδραση. Ακολουθεί εκ νέου προσθήκη ενζύμου (5 μM) σε κάθε αντίδραση και μετά την πάροδο 15 min συλλέγονται δείγματα όπως περιγράφηκε παραπάνω. Πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις των εμποτισμένων τμημάτων χαρτιού με 5% TCA για 15 min και δύο με αιθανόλη 96% για 5 min. Ακολουθεί στέγνωμα, τοποθέτηση των τμημάτων χαρτιού σε ειδικά φιαλίδια, προσθήκη 3 ml υγρού σπινθηρισμού στο κάθε ένα από αυτά και μέτρηση της β-ακτινοβολίας με μετρητή σπινθηρισμού (Liquid Scintillation Counter, TriCARB 2800, Perkin Elmer).

Αντίστοιχα, για την αμινοακυλίωση των μορίων tRNA^{Gly} χρησιμοποιούνται 300-600pmol από τα μετάγραφα των μορίων του *S. aureus*. Στο θετικό μάρτυρα προστίθεται ολικό tRNA του *S. aureus* (20μM) ενώ ο αρνητικός μάρτυρας δεν εμπεριέχει μετάγραφο μορίου tRNA. Η σύσταση του διαλύματος της αντίδρασης αμινοακυλίωσης αναγράφεται στον **Πίνακα 12** και ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 300μl. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37° C και λαμβάνονται δείγματα των 20μl ανά τακτά χρονικά διαστήματα και για συνολικό χρόνο των 30 min. Ακολουθεί

επεξεργασία των δειγμάτων όπως περιγράφηκε παραπάνω και μέτρηση της β-ακτινοβολίας με μετρητή σπινθηρισμού (Liquid Scintillation Counter, TriCARB 2800, Perkin Elmer).

Πίνακας 12: Σύσταση των αντιδράσεων αμινοακυλίωσης των $tRNA^{Gly}$ μετάγραφων του *S. aureus* από τη *GlyRS*.

	Τελική Συγκέντρωση
Hepes-NaOH pH 7.2	100 mM
KCl	30 mM
MgCl₂	10 mM
ATP	2 mM
[¹⁴C]Gly (270 cpm/pmol)	20 μM
GlyRS	0.1 μM

2.2.22 Αντιδράσεις τρανσαμίδωσης (tRNA-dependent transamidation assays)

Η δοκιμή τρανσαμίδωσης πραγματοποιείται για την κινητική ανάλυση της βακτηριακής GatCAB αμιδοτρανσφεράσης και τον έλεγχο των στοιχείων ταυτότητας των μορίων $tRNA^{Asn}$ για την τρανσαμίδωση του εστεροποιημένου Asp. Για την αντίδραση τρανσαμίδωσης απαιτείται αρχικά η αμινοακυλίωση των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορίων $tRNA^{Asn}$ και $tRNA^{Asp}$, η οποία πραγματοποιείται όπως περιγράφηκε παραπάνω, αλλά με 4.6 μM AspRS2, 75pmol μετάγραφο του μορίου $tRNA$ και την προσθήκη 0,1 mg/ml BSA. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 50° C. Μετά από 30 min λαμβάνεται δείγμα 2μl για το έλεγχο της απόδοσης της αντίδρασης. Παράλληλα προστίθενται στην αντίδραση 5μl οξικό κάλιο (pH 4.5, 3 M, 4° C) και 50μl όξινη φαινόλη (pH 5, κορεσμένη σε οξικό νάτριο). Τα δείγματα αναδεύονται έντονα για 30 sec και φυγοκεντρώνονται για 30 sec στις 12000rpm. Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο πλαστικό σωλήνα και προστίθενται 50μl κλωροφόρμιο (4° C). Τα δείγματα αναδεύονται έντονα για 30 sec και φυγοκεντρώνονται για 30 sec στις 12000 rpm και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο πλαστικό σωλήνα. Τα αμινοακυλιωμένα μόρια $tRNA$ κατακρυμνίζονται με 5μl οξικού καλίου (pH 4.5, 3 M, 4° C) και 3 όγκους αιθανόλης 100% (-20° C). Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 20 min στις 12000 rpm στους 4° C και πλύση των ιζημάτων με 80% αιθανόλη. Πριν την αντίδραση τρανσαμίδωσης τα ιζήματα αναδιαλύονται σε 25 μl αποστειρωμένου νερού. Για να ελεγχθεί η πιθανή απακυλίωση των μορίων $tRNA$ λαμβάνεται δείγμα 1 μl από κάθε αντίδραση. Για την αντίδραση τρανσαμίδωσης χρησιμοποιούνται τα αμινοακυλιωμένα πλέον μετάγραφα $tRNA$. Για το θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα χρησιμοποιείται Asp- $tRNA^{Asn}$ του *T. thermophilus*, αλλά στον αρνητικό μάρτυρα δεν προστίθεται ένζυμο. Η σύσταση της αντίδρασης τρανσαμίδωσης που έχει τελικό όγκο 50μl φαίνεται στον **Πίνακα 13**.

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37° C και λαμβάνονται δείγματα των 15 μl στα 5, 10 και 20 min. Από κάθε αντίδραση 1μl χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί η

πιθανή απαकुλίωση των μορίων tRNA. Στα δείγματα προστίθενται 50μl φαινόλης/χλωροφόρμιου, αναδεύονται ισχυρά και φυγοκεντρώνται για 30 sec στις 12000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προστίθενται 50 μl χλωροφόρμιο, αναδεύονται ισχυρά και φυγοκεντρώνται για 30 sec στις 12000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο πλαστικό σωλήνα και προστίθενται 2.5 μl KOH 1N και τα δείγματα επωάζονται στους 90° C για 2 h, ώστε να απαकुλιωθούν τα μόρια tRNA. Μετά την πάροδο των δύο ωρών προστίθενται 3μl HCl 1N και τα δείγματα επωάζονται στους 100° C για την ξήρανσή τους. Αναδιάλυση πραγματοποιείται σε 5 μl αποστειρωμένου νερού.

Πίνακας 13: Σύσταση των αντιδράσεων τρανσαμίδωσης των αμινοακυλιωμένων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μεταγραφών *Asp-tRNA^{Asp}* και *Asp-tRNA^{Asn}* από την *GatCAB* αμιδοτρανοσφεράση του *N. meningitidis*.

	Τελική Συγκέντρωση
Hepes pH 7.2	100mM
KCl	30mM
MgCl₂	12mM
ATP	10mM
BSA	0,1mg/ml
GatCAB <i>N.men</i>	50nM
L-Gln (δότης αμιδίου)	2mM
Asp-tRNA	70pmol

2.2.23 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) για το διαχωρισμό αμινοξέων

Για να ελεγχθεί η απόδοση και η πορεία της αντίδρασης τρανσαμίδωσης πραγματοποιείται χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο διαχωρισμός των αμινοξέων που ήταν εστεροποιημένα στο μόριο tRNA, καθώς το ασπαραγινικό οξύ παρουσιάζει διαφορετική κινητικότητα από την ασπαραγίνη. Αρχικά σημειώνονται στο φύλλο κυτταρίνης τα σημεία εφαρμογής των δειγμάτων. Από κάθε δείγμα μεταφέρονται 3 μL στο αντίστοιχο σημείο. Το διάλυμα της χρωματογραφίας αποτελείται από 10 ml οξικό οξύ, 80 ml ισοπροπυλική αλκοόλη, 10 ml φορμικό οξύ και 4 ml νερό.

2.2.24 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα *S. aureus*

Για την απομόνωση ολικού RNA από το *S. aureus*, αρχικά συλλέγονται κύτταρα από καλλιέργεια των 30 ml που επωάστηκε για 14-16 h στους 37° C στις 210 rpm. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 μl διαλύματος TE που περιέχει 2 mg/ml λυσοζύμη με έντονη ανάδευση. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 10 min. Για τη

λύση των κυττάρων προστίθενται 350 µl διαλύματος RA1 και 3.5 µl β-mercaptoethanol και αναδεύεται το δείγμα ισχυρά. Το προϊόν της λύσης μεταφέρεται σε στήλη φιλτραρίσματος NucleoSpin και φυγοκεντρείται για 1 min στις 11000 rpm. Ακολουθεί προσθήκη 350 µl αιθανόλης 70% και μεταφορά σε στήλη NucleoSpin RNA II. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 sec στις 11000 rpm. Για την αφαλάτωση της στήλης προστίθενται 350 µl διαλύματος MDB (Membrane Desalting Buffer) και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 min για την ξήρανση της στήλης. Η απομάκρυνση των αλάτων αυξάνει την αποτελεσματικότητα της κατεργασίας με την DNάση. Για την απομάκρυνση του DNA παρασκευάζεται ένα διάλυμα με 10 µl DNάση και 90 µl ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης για την DNάση. Από το διάλυμα αυτό μεταφέρονται 95 µl DNάσης στο κέντρο της στήλης. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα για 15 min στους 20-22° C. Για την απενεργοποίηση της DNάσης προστίθενται 200 µl διαλύματος RA2 και τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 sec στις 11000 rpm. Έπειτα πραγματοποιείται μια δεύτερη πλύση με 600 µl διαλύματος RA3 και φυγοκέντρηση για 30 sec στις 11000 rpm. Η στήλη ξεπλένεται εκ νέου με 250 µl διαλύματος RA3 και φυγοκέντρηση για 2 min στις 11000 rpm για να ξηρανθεί πλήρως. Η έκλουση του ολικού RNA πραγματοποιείται με 60 µl νερού απαλλαγμένου από RNάσες και φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 min.

TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8

2.2.25 Έλεγχος έκφρασης των μορίων tRNA του *S. aureus* με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

Για να ελεγχθεί αν εκφράζονται όλα τα γονίδια του tRNA και το ψευδογονίδιο του γονιδιώματος του *S. aureus* πραγματοποιείται RT-PCR με εκμαγείο το ολικό RNA που απομονώνεται από κύτταρα του βακτηρίου. Για την αντίδραση με την αντίστροφη μεταγραφή (RT) και τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιούνται 100 pmoles τυχαία εξαμερή ως εκκινητές, 1 µg ολικό RNA, 1X ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την MMuIV, 0.25 mM dNTPs, 6 mM DTT, 2 U αναστολέα της RNάσης (RNasin) και 100 U MMuIV. Οι συνθήκες της αρχικής αντίδρασης σύνθεσης cDNA είναι: 25° C για 30 min, 37° C για 120 min και 65° C για 15 min.

Στη συνέχεια το cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο σε αντιδράσεις PCR για τον έλεγχο της έκφρασης κάθε γονιδίου tRNA και του ψευδογονιδίου. Για τον έλεγχο της έκφρασης του ψευδογονιδίου πραγματοποιούνται δύο επιπλέον αντιδράσεις παρουσία DNάσης και RNάσης για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα της έκφρασης και να αποκλειστεί η πιθανότητα επιμόλυνσης από DNA. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιούνται σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την Dynazyme EXT DNA πολυμεράση με 0.5 µg cDNA, 100 pmoles από τον κάθε εκκινητή, 0.25 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂ και 2.5 U Dynazyme EXT DNA πολυμεράση. Οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον **Πίνακα 14**. Ακολουθώντας τα τελικά προϊόντα αναλύονται σε πηκτική αгарόζης 2.5%.

5X Ρυθμιστικό διάλυμα για την MMuIV αντίστροφη μεταγραφή: 250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT.

1X Ρυθμιστικό διάλυμα για την Dynazyme EXT DNA πολυμεράση: 50 mM Tris-HCl (pH 9.0, 25 °C), 15 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 % Triton X-100.

Πίνακας 14: Συνθήκες της αντίδρασης PCR μετά την αντίστροφη μεταγραφή για την ενίσχυση των μεταγράφων των μορίων tRNA^{Gly} του *S. aureus*.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός επαναλήψεων
Αποδιάταξη	94° C	30 sec	
Υβριδοποίηση εκκινητών	60° C	45 sec	30
Επιμήκυνση	72° C	20 sec	
Τελική επιμήκυνση	72° C	7 min	1

2.2.26 Χρωματογραφία συγγένειας με καθηλωμένο EF-Tu του *S. aureus*

Για να ελεγχθεί η δεσμευτική ικανότητα των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} με τον EF-Tu αρχικά αμινοακυλιώνονται τα μεταγραφα των μορίων tRNA με σημασμένη [¹⁴C]Gly. Η αντίδραση αμινοακυλίωσης πραγματοποιείται όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω αλλά με διπλάσια ποσότητα ενζύμου και υποστρώματος.

Παράλληλα, πραγματοποιείται ενεργοποίηση του EF-Tu (*Ribeiro et al., 1995, Becker & Kern, 1998*). Ο EF-Tu που φέρει έξι κατάλοιπα ιστιδίνης στο καρβοξυτελικό του άκρο επώαζεται για 10 min στους 20-22° C με 2 ml εξισορροπημένης Ni-NTA αγαρόζης. Η στήλη εξισορροπείται με διάλυμα A χωρίς την προσθήκη GTP. Ο EF-Tu ενεργοποιείται με επώαση για 30 min στους 37° C με 3 ml διαλύματος A. Μετά την καθήλωση του EF-Tu μεταφέρονται στη στήλη τα αμινοακυλιωμένα μόρια tRNA. Τα απακυλιωμένα μόρια tRNA και εκείνα που δε δεσμεύτηκαν με τον EF-Tu εκλούνται αρχικά με το διάλυμα B. Τα ασθενώς δεσμευμένα μόρια aa-tRNA εκλούνται με το διάλυμα C σε ήπιες ιοντικές συνθήκες. Ακολούθως, τα ισχυρά δεσμευμένα aa-tRNA εκλούνται με το διάλυμα D σε υψηλές ιοντικές συνθήκες. Σε κάθε στάδιο έκλυσης συλλέγονται από 8-15 δείγματα. Έπειτα από κατεργασία με TCA, όπως περιγράφηκε παραπάνω, ακολουθεί μέτρηση της β-ακτινοβολίας με μετρητή σπινθηρισμού (Liquid Scintillation Counter, TriCARB 2800, Perkin Elmer).

Διάλυμα A: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM phosphoenolpyruvate, 5 mM GTP, 50 mM KCl, 50 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoethanol, 100 μg/ml pyruvate kinase.

Διάλυμα B: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM GTP, 50 mM KCl, 50 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoethanol.

Διάλυμα C: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 50 μM GTP, 50 mM KCl, 50 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoethanol.

Διάλυμα D: 100 mM Isoborate-Na pH 7.5, 1 M NaCl, 50 μ M GTP, 10 mM MgCl₂, 10 mM β -mercaptoethanol.

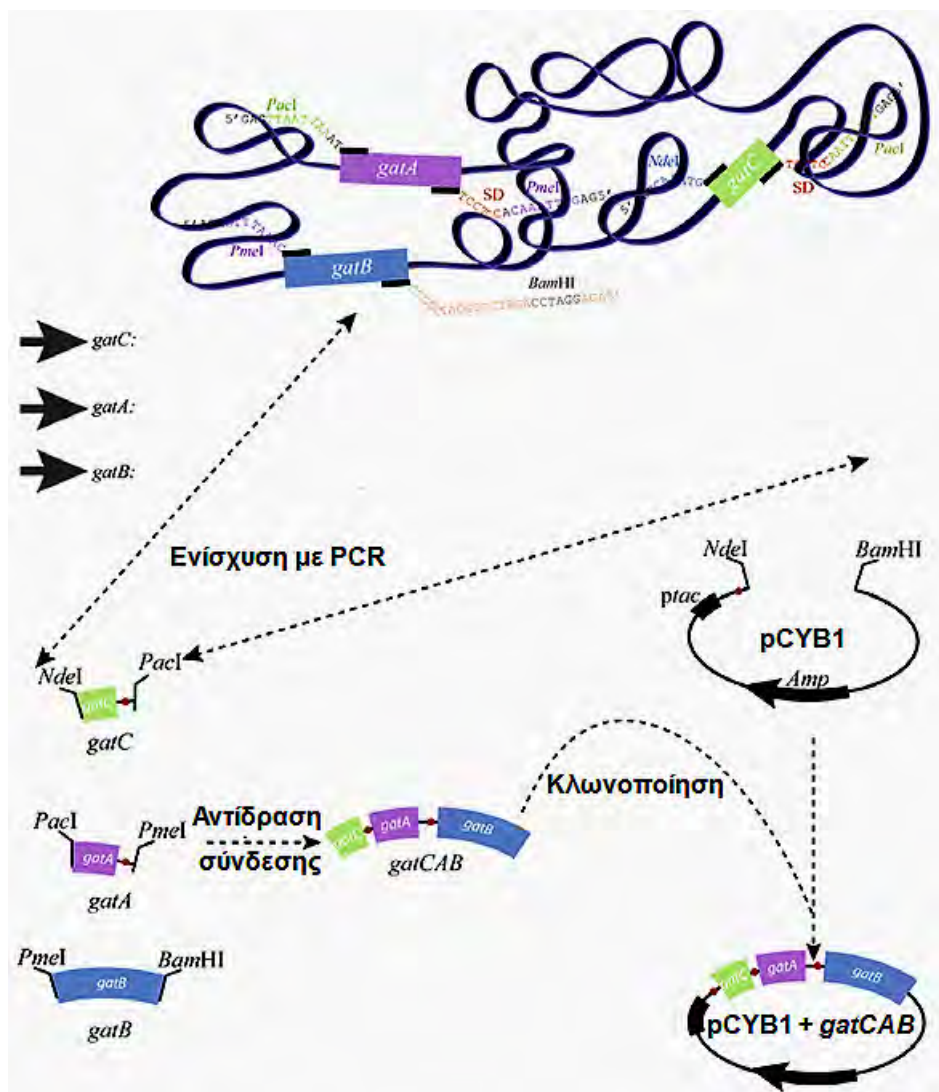
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ασύνηθες σύστημα αλληλομετατροπής αμινοξέων – tRNA-εξαρτώμενη σύνθεση της ασπαραγίνης

3.1.1. Καθαρισμός ενζύμων και tRNA υποστρωμάτων για τη μελέτη της tRNA-εξαρτώμενης τρoσαμίδωσης

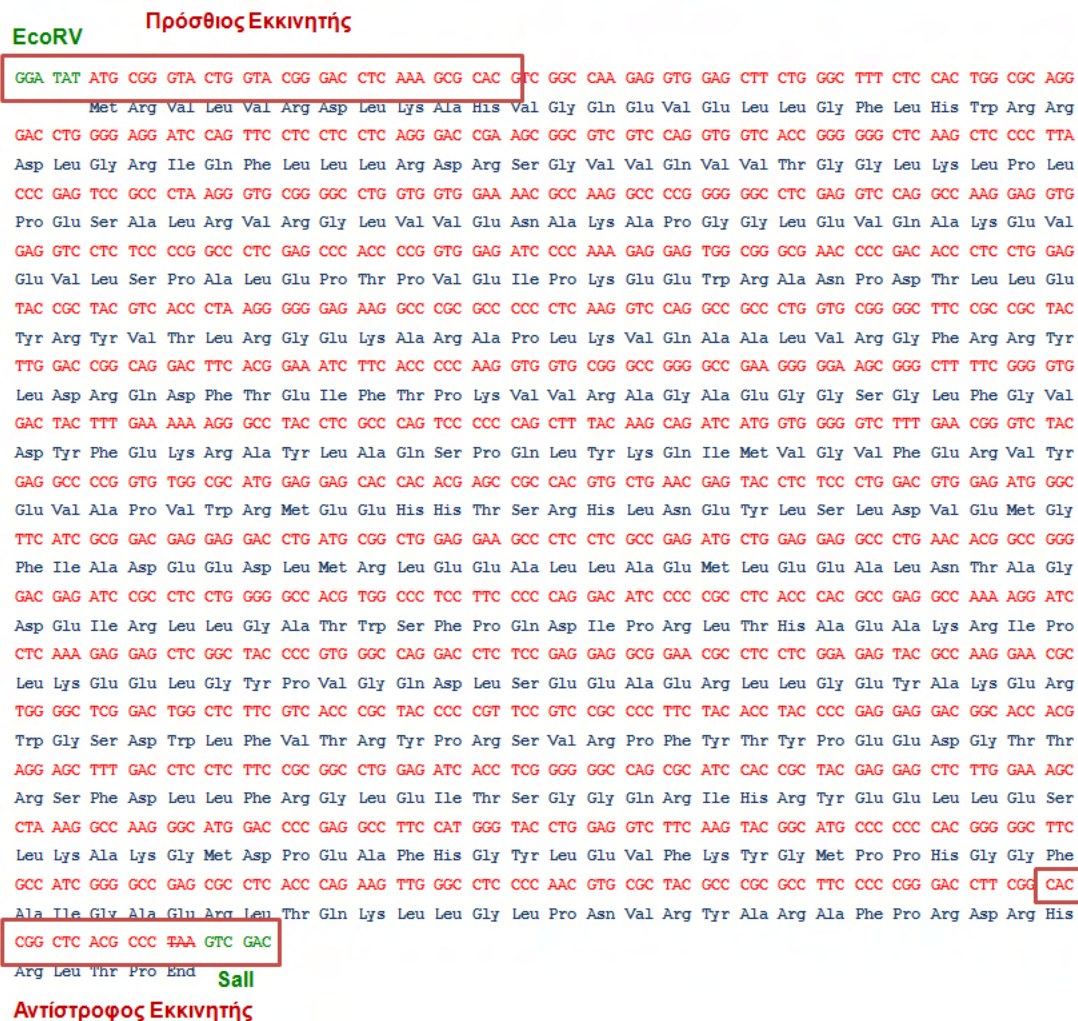
Η tRNA-εξαρτώμενη σύνθεση των μορίων Asn-tRNA^{Asn} στα βακτήρια και στα αρχαία που δεν εκφράζουν την AsnRS πραγματοποιείται σε δύο διαδοχικά στάδια. Αρχικά, το μόριο tRNA^{Asn} κακοφορτίζεται με Asp από μια AspRS με χαμηλή εξειδίκευση και ακολούθως το Asp-tRNA^{Asn} μετατρέπεται σε Asn-tRNA^{Asn} από την tRNA-εξαρτώμενη GatCAB αμιδοτρoσφεράση (ανασκόπηση: *Sheppard et al., 2008*). Για την κινητική μελέτη της βακτηριακής GatCAB αμιδοτρoσφεράσης και των στοιχείων ταυτότητας των υποστρωμάτων της επιλέχθηκε ως οργανισμός μοντέλο το *Neisseria meningitidis*, ένα παθογόνο για τον άνθρωπο βακτήριο. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις τρεις υπομονάδες, *gatA*, *gatB* και *gatC*, από το *Neisseria meningitidis* ενισχύθηκαν και κλωνοποιήθηκαν υπό μορφή οπερονίου σε πλασμιδικό φορέα pCYB1. Οι τρεις πρωτεϊνικές υπομονάδες απομονώθηκαν από ετερόλογο σύστημα μετασχηματισμένων κυττάρων *Escherichia coli* με χρωματογραφία συγγένειας. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου του καθ. Daniel Kern στο IBMC, CNRS του Στρασβούργου. Η πορεία που ακολουθήθηκε είναι παρόμοια με αυτή που περιγράφεται για τη σύνθεση του οπερονίου με τα γονίδια *gatCAB* της AdT του *T. thermophilus* (*Bailly et al., 2008*) (**Εικόνα 38**). Η διαφορά που παρουσιάζουν τα δύο συστήματα είναι ότι τα τρία γονίδια της GatCAB του *Neisseria meningitidis* είναι οργανωμένα σε οπερόνιο στο χρωμόσωμα ενώ αντίθετα στο *Thermus thermophilus* απαντώνται διαχωρισμένα στο γονιδίωμα.

Για την *in vitro* αμινοακυλίωση των μορίων tRNA, κλωνοποιήθηκε το γονίδιο *aspS2* που κωδικοποιεί την AspRS2 του *T. thermophilus*. Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει χαμηλή εξειδίκευση και αμινοακυλιώνει τόσο το συγγενές μόριο tRNA^{Asp} όσο και το μη συγγενές tRNA^{Asn} με ασπαραγινικό οξύ (*Becker et al., 2000*). Επίσης, θα πρέπει να αναφερθεί ότι είναι η μόνη λειτουργική AspRS με χαμηλή εξειδίκευση που έχει απομονωθεί ανασυνδυαμένη, χωρίς να είναι ιδιαίτερα τοξική για το κύτταρο ξενιστή, και έχει εξαιρετική δραστηριότητα στην παραγωγή κακοφορτισμένων Asp-tRNA^{Asn}.



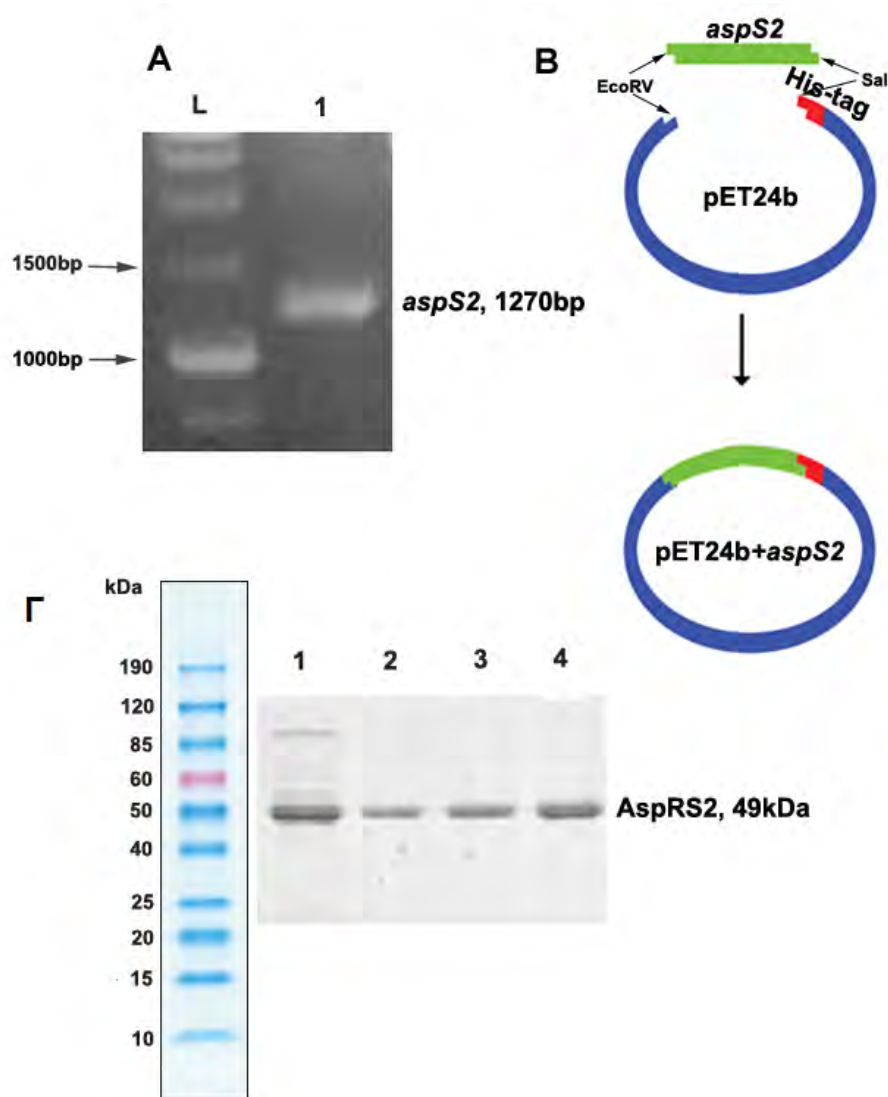
Εικόνα 38: Κλωνοποίηση των γονιδίων *gatCAB* της AdT του *T. thermophilus* υπό μορφή οπερονίου. Αρχικά, τα γονίδια ενισχύονται με PCR χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα γενωμικό DNA του οργανισμού. Έπειτα, συνδέονται μεταξύ τους με μια αντίδραση σύνδεσης και το οπερόνιο κλωνοποιείται στον πλασμιδιακό φορέα pCYB1.

Το γονίδιο *aspS2* (1270bp) ενισχύθηκε με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα γενωμικό DNA του *Thermus thermophilus* και ειδικούς εκκινητές που έφεραν στα 5' άκρα τους αλληλουχίες αναγνώρισης για τα ένζυμα περιορισμού EcoRV και SalI και ο αντίστροφος εκκινητής (reverse primer) δεν περιείχε κωδικόνιο τερματισμού (**Εικόνα 39, 40A**).



Εικόνα 39: Αλληλουχία του γονιδίου *aspS2* του *T. thermophilus* (κόκκινοι χαρακτήρες) και της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης *AspRS2* με χαμηλή εξειδίκευση (μπλε χαρακτήρες). Στα πλαίσια περιέχονται οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου με PCR καθώς και οι αλληλουχίες που προστέθηκαν για αναγνώριση από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (πράσινοι χαρακτήρες).

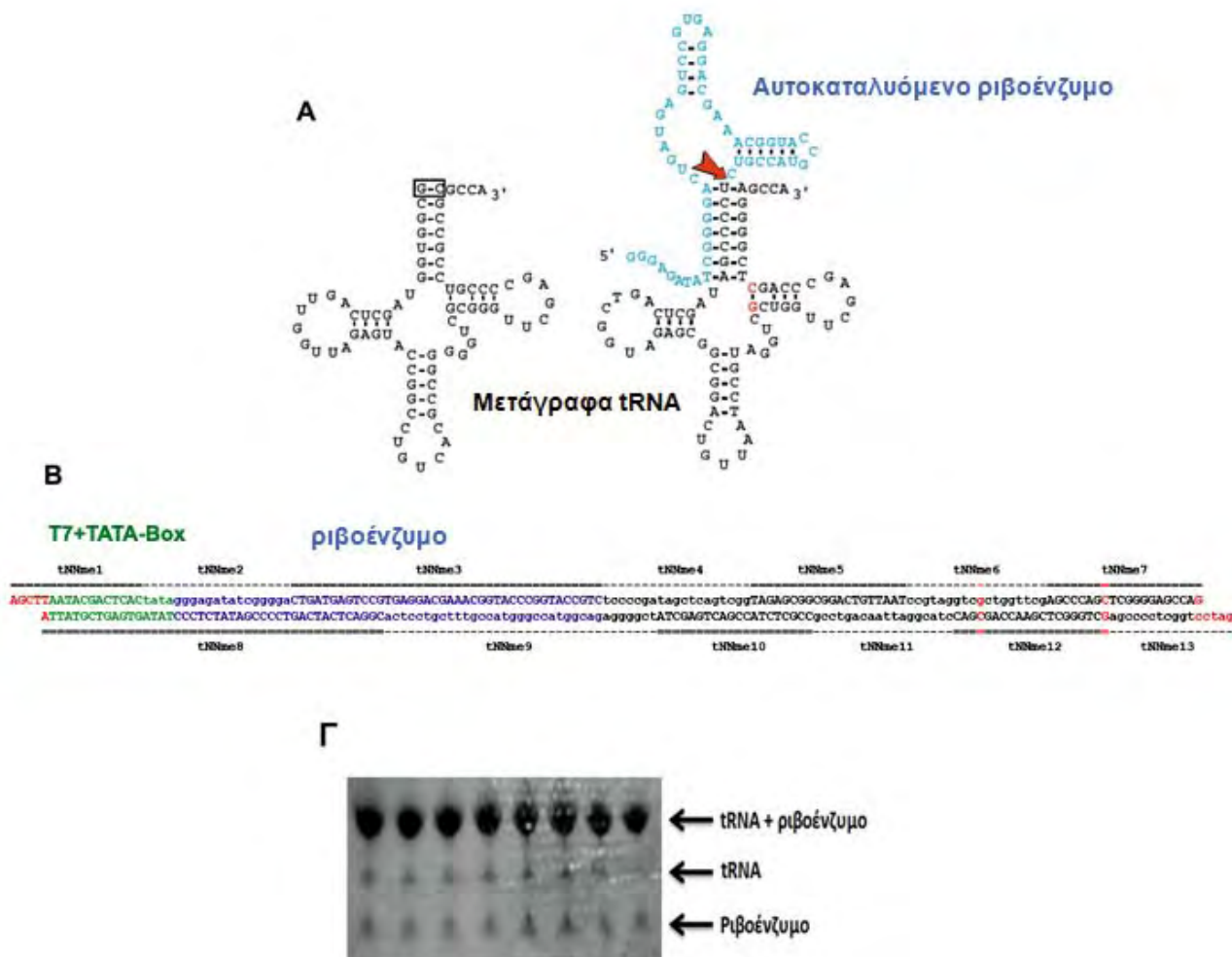
Μετά την επιβεβαίωση της ορθής αλληλουχίας του ενισχυμένου γονιδίου, υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης pET24b (**Εικόνα 40B**). Στο 3' άκρο του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου αυτού περιέχονται 6 κωδικόνια που μεταφράζονται σε μια ουρά ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, η οποία εξυπηρετεί την απομόνωσή τους με χρωματογραφία συγγένειας. Το γονίδιο *aspS2* υπερεκφράστηκε σε ετερόλογο σύστημα μετασχηματισμένων κυττάρων του στελέχους *Escherichia coli* BL21 (DE3) παρουσία 1mM IPTG στους 30° C. Για την απομόνωσή της *AspRS2* (49kDa) αρχικά το πρωτεϊνικό εκκύλισμα θερμάνθηκε για την αποδιάταξη και ακόλουθη απομάκρυνση των πρωτεϊνών του *Escherichia coli*. Η ανασυνδυασμένη *AspRS2*-C-terminal-His₆-tag που παρέμεινε στο υπερκείμενο απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας με στήλη Ni-NTA με τελικό ποσοστό καθαρότητας 95% (**Εικόνα 40Γ**).



Εικόνα 40: Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου *aspS2* του *T. thermophilus* και απομόνωση της *AspRS2*. (A) Προϊόν της ενίσχυσης του γονιδίου *aspS2* του *T. thermophilus* με PCR. Το μέγεθος και η αλληλουχία του ενισχυμένου προϊόντος αντιστοιχεί σε αυτά του υπό μελέτη γονιδίου. L: Μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA, 1: Προϊόν PCR (B) Υποκλωνοποίηση του *aspS2* στον πλασμιδιακό φορέα *pET24b*. Το ένθετο γονίδιο και το πλασμίδιο υπέστησαν πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (*EcoRV/SalI*) και τα συμπληρωματικά άκρα τους συνδέθηκαν προς σχηματισμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *pET24b-aspS2*. (Γ) Απομόνωση της *AspRS2* με χρωματογραφία συγγένειας (*Ni-NTA*). Η τελική καθαρότητα της πρωτεΐνης είναι 95%. Έκλυση της πρωτεΐνης με 1: 20 mM, 2: 50 mM, 3: 250 mM και 4: 500 mM ιμιδαζολίου.

Για την προετοιμασία των υποστρωμάτων tRNA ακολουθήθηκε η τεχνική του cassette cloning (Fechter, 1998). Σχεδιάστηκαν επικαλυπτόμενα ολιγονουκλεοτίδια για τα αγρίου τύπου μόρια tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp}, καθώς και ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων για την εισαγωγή συγκεκριμένων μεταλλάξεων. Στο 5' άκρο κάθε γονιδίου προστέθηκε η αλληλουχία του προαγωγέα T7. Στις περιπτώσεις που το πρώτο ζεύγος βάσεων των μορίων tRNA ήταν U1-A72 προστέθηκε μετά τον προαγωγέα στο 5' άκρο ένα επιπλέον

ολιγονουκλεοτίδιο με την αλληλουχία ενός αυτοκαταλυόμενου σφυροκέφαλου ριβοενζύμου (hammerhead ribozyme) (Curnow *et al.*, 1998) (**Εικόνα 41A,B**). Τα γονίδια των μορίων tRNA κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pUC18, ελέγχθηκε η ορθότητα της αλληλουχίας τους και ακολούθησε η *in vitro* μεταγραφή τους. Τα μετάγραφα απομονώθηκαν με ηλεκτροέκλυση μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική ακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (**Εικόνα 41Γ**).



Εικόνα 41: (A) Δευτεροταγής δομή των tRNA μετάγραφων. Αριστερά απεικονίζεται η δευτεροταγής δομή ενός απλού μετάγραφου, ενώ δεξιά ένα tRNA μετάγραφο συνδεδεμένο στο 5' άκρο με ένα αυτοκαταλυόμενο ριβοένζυμο. (B) Παράδειγμα σύνθεσης γονιδίου ενός μορίου tRNA με επικαλυπτόμενα ολιγονουκλεοτίδια. Στο 5' άκρο βρίσκεται η αλληλουχία του προαγωγέα T7 (πράσινο) και ακολούθως η αλληλουχία του αυτοκαταλυόμενου ριβοενζύμου (μπλε). (Γ) Ηλεκτροφορητικό προφίλ των μετάγραφων tRNA σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες πριν και μετά τη δράση του αυτοκαταλυόμενου ριβοενζύμου.

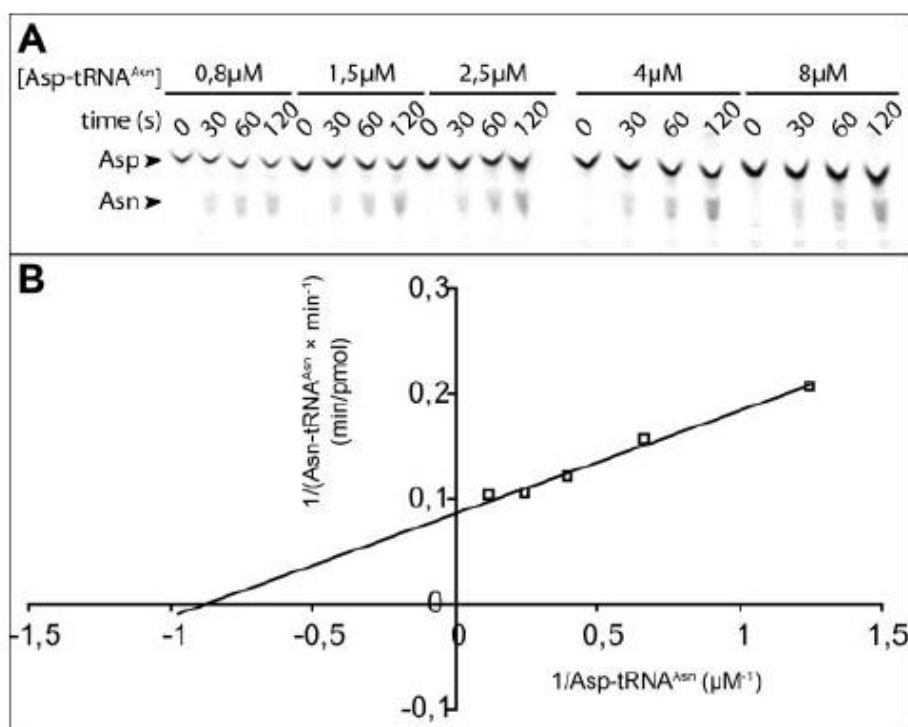
3.1.2 Κινητική μελέτη της βακτηριακής GatCAB αμιδοτρανσφεράσης του *Neisseria meningitidis*

Μέχρι πρόσφατα παρέμενε αναπάντητο το ερώτημα κατά πόσο οι AdTs συμπεριφέρονται ως ένζυμα που ακολουθούν κλασική κινητική συμπεριφορά κατά Michaelis-Menten. Η απουσία κινητικής μελέτης για την GatCAB AdT οφείλεται κυρίως στην έλλειψη σταθερότητας του εστερικού δεσμού μεταξύ του αμινοξέος και του μορίου tRNA του aa-tRNA υποστρώματος που μπορεί να μην επιτρέπει ακριβείς κινητικές μετρήσεις. Ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών για τα διάφορα Asp-tRNA μόρια απαιτεί καθαρά aa-tRNA μόρια, οπότε είναι αναγκαία η χρήση *in vitro* μετάγραφων των μορίων tRNA. Ωστόσο, η δραστηριότητα των GatCAB AdTs που έχουν μελετηθεί ως τώρα προσδιοριζόταν με τη χρήση αμινοακυλιωμένων, μετα-μεταγραφικά τροποποιημένων tRNA^{Asn} ή tRNA^{Gln} μορίων που εκφράζονταν *in vivo*. Οπότε, η επίδραση των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων των μορίων tRNA στην αναγνώριση τους από την GatCAB AdT παραμένει άγνωστη. Στην παρούσα μελέτη οι αντιδράσεις τρανσαμιδωσης χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της δραστηριότητας της AdT, για την οποία δεν είχαν προσδιοριστεί οι κινητικές σταθερές.

Το πρώτο τμήμα της μελέτης περιελάμβανε την κινητική μελέτη της tRNA-εξαρτώμενης σύνθεσης ασπαραγίνης από την AdT του *Neisseria meningitidis*. Ως υποστρώματα για την αντίδραση τρανσαμιδωσης χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* μετάγραφα του tRNA^{Asn} του *N. meningitidis*. Το μετάγραφο αμινοακυλιώθηκε από τη μη εξειδικευμένη AspRS2 του *Thermus thermophilus* σε ποσοστό περίπου 100%. Η σταθερότητα του εστερικού δεσμού των Asp-tRNA^{Asn} μορίων ελέγχθηκε με επώασή τους με το μίγμα της τρανσαμιδωσης. Σε αυτές τις συνθήκες ο χρόνος ημιζώης των aa-tRNA μορίων ήταν 45 min στους 37° C. Έπειτα, ελέγχθηκε η ικανότητα του [¹⁴C]Asp-tRNA^{Asn} να τρανσαμιδώνεται. Επώαση 100pmol του [¹⁴C]Asp-tRNA^{Asn} με 10pmol AdT του *Neisseria meningitidis* για 30 min στους 37° C είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη μετατροπή του σε [¹⁴C]Asn-tRNA^{Asn}, επιβεβαιώνοντας ότι το αμινοακυλιωμένο μετάγραφο του μορίου tRNA που δε φέρει μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις είναι κατάλληλο υπόστρωμα για την AdT του *Neisseria meningitidis*.

Για την κινητική μελέτη της αντίδρασης τρανσαμιδωσης λαμβάνονται δείγματα για το σχεδιασμό καμπύλης χρόνου μεταξύ των 30 sec έως 2 min. Με κατακρήμνιση των δειγμάτων με TCA επιβεβαιώθηκε ότι η απακυλίωση των aa-tRNA μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα είναι αμελητέα (~3%). Ο έλεγχος του ποσοστού απακυλίωσης στο συγκεκριμένο στάδιο είναι ιδιαίτερα σημαντικός, διότι θα πρέπει να είναι ακριβής ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων για την κινητική μελέτη. Η μετατροπή του [¹⁴C]Asp-tRNA^{Asn} σε [¹⁴C]Asn-tRNA^{Asn} για ένα εύρος συγκεντρώσεων των μορίων aa-tRNA από 0.8 - 8 μM αναλύθηκε με TLC (**Εικόνα 42A**). Με βάση τα δεδομένα της ανάλυσης σχεδιάστηκαν οι αρχικές χρονοκαμπύλες και τα αρχικά ποσοστά χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της καμπύλης του διπλού αντιστρόφου. Η γραμμικότητα της καμπύλης υποδεικνύει ότι η AdT του *Neisseria meningitidis* παρουσιάζει κινητική κατά Michaelis-Menten. Οι τιμές σταθερών K_M (1.2 μM) και κ_{cat}

(0.64 sec^{-1}) της AdT του *Neisseria meningitidis* για το συγγενές αμινοακυλιωμένο μετάγραφο του μορίου tRNA^{Asn} προσδιορίστηκαν από τρεις ανεξάρτητες σειρές (Bailly et al., 2006) (**Εικόνα 42B**). Η επίδραση των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων του μορίου tRNA στην αποτελεσματικότητα της καταλυόμενης από την AdT αντίδρασης αναλύθηκε συγκρίνοντας τις κινητικές σταθερές της τρανσαμιδωσης του Asp που ήταν εστεροποιημένο είτε στο tRNA^{Asn} του *Thermus thermophilus* που είχε απομονωθεί από ένα στέλεχος *Escherichia coli* μετά από υπερέκφραση, είτε στο T7 μετάγραφο του tRNA^{Asn} του *Neisseria meningitidis*. Καθώς η AdT του *Neisseria meningitidis* τρανσαμιδώνει το Asp-tRNA^{Asn} του *Thermus thermophilus* ($K_M = 0.6 \mu\text{M}$, $\kappa_{\text{cat}} = 0.34 \text{ sec}^{-1}$) και του *N. meningitidis* με συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα, οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις των μορίων tRNA^{Asn} φαίνεται να μην επηρεάζουν σε σημαντικό ποσοστό την τρανσαμιδωση, αιτιολογώντας τη χρήση των μετάγραφων των μορίων tRNA για το χαρακτηρισμό των στοιχείων ταυτότητας των μορίων tRNA για την τρανσαμιδωση.



Εικόνα 42: Προσδιορισμός των κινητικών σταθερών της τρανσαμιδωσης του Asp-tRNA^{Asn} μετάγραφου από την AdT του *N. meningitidis*. (A) Ανάλυση με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των εστεροποιημένων αμινοξέων στο μόριο tRNA^{Asn} μετά από αντίδραση τρανσαμιδωσης με διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος ($0,8\mu\text{M}$ - $8\mu\text{M}$) σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0 - 120 sec). (B) Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών.

3.1.3 Προσδιορισμός των στοιχείων ταυτότητας του Asp-tRNA^{Asn} για την τρανσαμιδωση από τη βακτηριακή AdT

Για τον εντοπισμό των στοιχείων ταυτότητας των μορίων tRNA^{Asn} που καθορίζουν την εξειδικευμένη αναγνώρισή τους από την GatCAB έναντι του tRNA^{Asp} πραγματοποιήθηκε πολλαπλή ομοπαράθεση 49 αλληλουχιών γονιδίων βακτηριακών μορίων tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} (**Εικόνα 43**). Οι αλληλουχίες των γονιδίων αντλήθηκαν από βάσεις δεδομένων αποκλειστικά από γονιδιώματα οργανισμών που χρησιμοποιούν την tRNA-εξαρτώμενη τρανσαμιδωση για τη σύνθεση Asn-tRNA^{Asn}. Ο εντοπισμός των καθοριστικών στοιχείων κατευθύνθηκε από δύο ικανές και αναγκαίες συνθήκες. Η αρχική υπόθεση βασίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεοτίδια αυτά θα πρέπει να είναι συντηρημένα στα μόρια tRNA^{Asn} όλων των οργανισμών που χρησιμοποιούν την Asp-AdT για να συνθέσουν Asn-tRNA^{Asn} και ότι τα καθοριστικά στοιχεία του μορίου tRNA που επάγουν την σύνθεση της ασπαραγίνης από την AdT δεν είναι ειδικά ως προς το βακτηριακό στέλεχος. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα που έδειξαν ότι οι βακτηριακές AdTs μπορούν να τρανσαμιδώσουν αποτελεσματικά το Asp-tRNA^{Asn} από άλλα βακτήρια (ετερόλογη τρανσαμιδωση) (Becker *et al.*, 1996 & 2000). Η δεύτερη συνθήκη βασίστηκε στο γεγονός ότι όλες οι AdTs που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα δεν μπορούν να τρανσαμιδώσουν το Asp-tRNA^{Asp} που συντίθεται στα κύτταρα. Ως εκ τούτου, τα νουκλεοτίδια που είναι συντηρημένα στο μόριο tRNA^{Asn} αλλά απαντώνται και στο tRNA^{Asp} θα έπρεπε να εξαιρεθούν από τα δομικά στοιχεία που είναι εν δυνάμει υπεύθυνα για την tRNA εξαρτώμενη σύνθεση της ασπαραγίνης. Τα εν δυνάμει λοιπόν στοιχεία ταυτότητας των μορίων tRNA^{Asn} για την αναγνώρισή τους από τη βακτηριακή GatCAB θα έπρεπε να είναι συντηρημένα στα μόρια αυτά αλλά να παρουσιάζουν διαφορές συγκρινόμενα με τα νουκλεοτίδια στις αντίστοιχες θέσεις των μορίων tRNA^{Asp}. Τα αποτελέσματα της πολλαπλής ομοπαράθεσης των γονιδίων των μορίων tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} έδειξαν ότι 8 ζεύγη βάσεων και 9 νουκλεοτίδια είναι συντηρημένα στα μόρια tRNA^{Asn}. Από τα συντηρημένα αυτά στοιχεία ενδιαφέρον παρουσιάζουν μόνο ένα ζεύγος βάσεων, το U1-A72 του tRNA^{Asn} και G1-C72 του tRNA^{Asp}, και ένα νουκλεοτίδιο, U36 στο tRNA^{Asn} και C36 στο tRNA^{Asp}, διότι αποτελούν συντηρημένες διαφορές μεταξύ των δύο μορίων. Επιπρόσθετα, τα μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} διαφέρουν στο μέγεθος της θηλιάς D. Στο tRNA^{Asn}, η θηλιά D είναι πάντα κατά ένα νουκλεοτίδιο μικρότερη σε σχέση με το tRNA^{Asp} λόγω της απουσίας της βάσης στη θέση 20A, που στο tRNA^{Asp} είναι κυρίως U.

Εικόνα 43: Πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asp} από βακτήρια που χρησιμοποιούν την tRNA-εξαρτώμενη τρανσαμιδωση για τη σύνθεση Asn-tRNA^{Asn}. Οι συντηρημένες διαφορές μεταξύ των μορίων (κόκκινες στήλες) εντοπίζονται στο πρώτο ζεύγος βάσεων (U1-A72 - tRNA^{Asn}, G1-C72 - tRNA^{Asp}), στο αντικωδικόνιο (GUU - tRNA^{Asn}, GUC - tRNA^{Asp}) και στο μέγεθος της θηλιάς D (+U20A - tRNA^{Asp}).

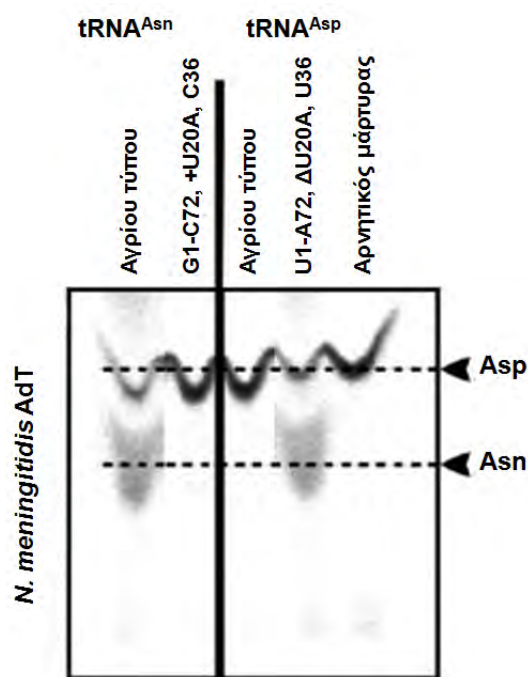
Μεταξύ αυτών των υποψήφιων στοιχείων, ως στοιχεία ταυτότητας της τρoνoαμίδωσης μπορούν να θεωρηθούν τα νουκλεοτίδια του tRNA^{Asn} που μετά από εναλλαγή τους με τα αντίστοιχα νουκλεοτίδια του μορίου tRNA^{Asp} θα μειώσουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα της τρoνoαμίδωσης του Asp-tRNA^{Asn}, ενώ η μεταμόσχευση των στοιχείων αυτών από το tRNA^{Asn} στο tRNA^{Asp} θα προκαλέσει επαγωγή της τρoνoαμίδωσης του Asp-tRNA^{Asp}. Για να προσδιοριστεί η συμμετοχή των συντηρημένων αυτών διαφορών στην εξειδικευμένη αναγνώριση μόνο των κακοφορισμένων Asp-tRNA^{Asn} και όχι των Asp-tRNA^{Asp} από τη βακτηριακή GatCAB ακολούθησαν μελέτες μεταλλαξιγένεσης των μορίων των δύο τύπων. Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκαν ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων για τη μεταμόσχευση των συντηρημένων στοιχείων της αλληλουχίας του μορίου tRNA^{Asp} στο μόριο tRNA^{Asn} και αντιστρόφως. Συνολικά συντέθηκαν τα γονίδια των αγρίου τύπου tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} και τα μεταλλαγμένα γονίδια του tRNA^{Asn} που έφεραν ως πρώτο ζεύγος βάσεων G1-C72, ένα νουκλεοτίδιο λιγότερο στη θηλιά D και C στην τρίτη θέση του αντικωδικονίου, αλλά και γονίδια με συνδυασμούς των τροποποιήσεων αυτών. Αντίστοιχα, συντέθηκαν τα μεταλλαγμένα γονίδια του tRNA^{Asp} που έφεραν ως πρώτο ζεύγος βάσεων U1-A72, ένα επιπλέον νουκλεοτίδιο U στη θέση 20A της θηλιάς D και U στην τρίτη θέση του αντικωδικονίου, καθώς και γονίδια με συνδυασμούς των τροποποιήσεων αυτών. Συνολικά, λοιπόν, συντέθηκαν 14 γονίδια που κωδικοποιούν αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} (**Πίνακας 15**).

Πίνακας 15: Αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα μετάγραφα tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn}. Στον πίνακα αναγράφονται τα στοιχεία της αλληλουχίας κάθε μορίου tRNA που συντέθηκε με *in vitro* μεταγραφή, στο πρώτο ζεύγος βάσεων, στη θηλιά D και στο αντικωδικόνιο.

Μόριο tRNA ^x	Ζεύγος 1-72	Θηλιά D	Αντικωδικόνιο
Asn αγρίου τύπου	U-A	ΔU20A	GUU
Asn U1-G72	U-G	ΔU20A	GUU
Asn C36	U-A	ΔU20A	GUC
Asn +U20A	U-A	+U20A	GUU
Asn G1-C72	G-C	ΔU20A	GUU
Asn G1-C72, +U20A	G-C	+U20A	GUU
Asn G1-C72, +U20A, C36	G-C	+U20A	GUC
Asp αγρίου τύπου	G-C	+U20A	GUC
Asp U1-G72	U-G	+U20A	GUC
Asp ΔU20A	G-C	ΔU20A	GUC
Asp U1-G72, ΔU20A	U-G	ΔU20A	GUC
Asp U1-A72	U-A	+U20A	GUC
Asp U1-A72, ΔU20A	U-A	ΔU20A	GUC
Asp U1-A72, ΔU20A, U36	U-A	ΔU20A	GUU

Για να αξιολογηθεί η προσέγγιση που ακολουθήθηκε για τον εντοπισμό των στοιχείων ταυτότητας αρχικά συντέθηκαν δύο μόρια tRNA στα οποία όλα τα εν δυνάμει καθοριστικά στοιχεία εναλλάχτηκαν μεταξύ των tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn}. Για το λόγο αυτό, συντέθηκαν το μεταλλαγμένο tRNA^{Asn}(G1-C72, +U20A, C36), στο οποίο το πρώτο ζεύγος

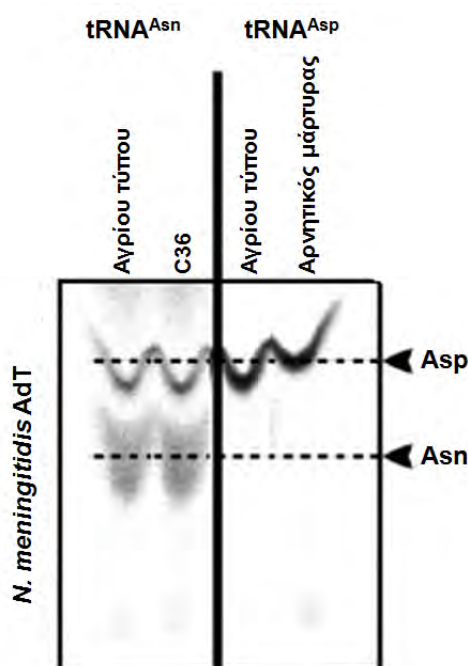
βάσεων U1-A72 μεταλλάχτηκε σε G1-C72, το U36 αντικαταστάθηκε από το C36 και η θηλιά D επεκτάθηκε με την ενσωμάτωση ενός επιπλέον νουκλεοτιδίου U στη θέση 20A. Στο μεταλλαγμένο $tRNA^{Asp(U1-A72, \Delta U20A, U36)}$, το πρώτο ζεύγος βάσεων G1-C72 μεταλλάχτηκε στο U1-A72, το C36 αντικαταστάθηκε από το U36 και μειώθηκε το μέγεθος της θηλιάς D με την απαλοιφή του U20A. Τα δύο μετάγραφα αμινοακυλιώθηκαν με $[^{14}C]Asp$ από την AspRS2 και έπειτα χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις τρανσαμίδωσης σε συνθήκες που επέτρεπαν τη μέτρηση των K_M και k_{cat} . Η κινητική ανάλυση έδειξε ότι το $Asp-tRNA^{Asn(G1-C72, +U20A, C36)}$ χάνει πλήρως την ικανότητα του να τρανσαμιδώνεται από την AdT του *Neisseria meningitidis*. Αντίθετα, το $Asp-tRNA^{Asp(U1-A72, \Delta U20A, U36)}$ αποκτά την ικανότητα να τρανσαμιδώνεται τόσο αποτελεσματικά όσο το αγρίου τύπου $Asp-tRNA^{Asn}$ (**Εικόνα 44**). Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση που προέκυψε ως αποτέλεσμα της στρατηγικής της πολλαπλής ομοπαράθεσης που χρησιμοποιήθηκε για να ταυτοποιηθεί το πλήρες σετ των εν δυνάμει στοιχείων ταυτότητας του μορίου tRNA για την τρανσαμίδωση.



Εικόνα 44: Ανάλυση των εστεροποιημένων αμινοξέων σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) μετά από τρανσαμίδωση των αμινοακυλιωμένων tRNA μετάγραφων για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της πολλαπλής ομοπαράθεσης. Τα επίπεδα της τρανσαμίδωσης με υπόστρωμα το αμινοακυλιωμένο $tRNA^{Asp(U1-A72, \Delta U20A, U36)}$ στο οποίο έχουν ενσωματωθεί όλα τα εν δυνάμει στοιχεία ταυτότητας του $tRNA^{Asn}$ είναι συγκρίσιμα με εκείνα του αγρίου τύπου $tRNA^{Asn}$. Αντίθετα, το $Asp-tRNA^{Asn(G1-C72, +U20A, C36)}$, στο οποίο εναλλάχτηκαν τα εν δυνάμει στοιχεία ταυτότητας με εκείνα που απαντώνται στο $tRNA^{Asp}$, δεν αποτελεί υπόστρωμα για την AdT του *N. meningitidis* όπως και το αγρίου τύπου αμινοακυλιωμένο $tRNA^{Asp}$. Η μετατροπή αυτή της αναγνώρισης των υποστρωμάτων με την εισαγωγή των συγκεκριμένων μεταλλάξεων υποδεικνύει ότι τα στοιχεία ταυτότητας εμπεριέχονται σε αυτές τις συντηρημένες διαφορές.

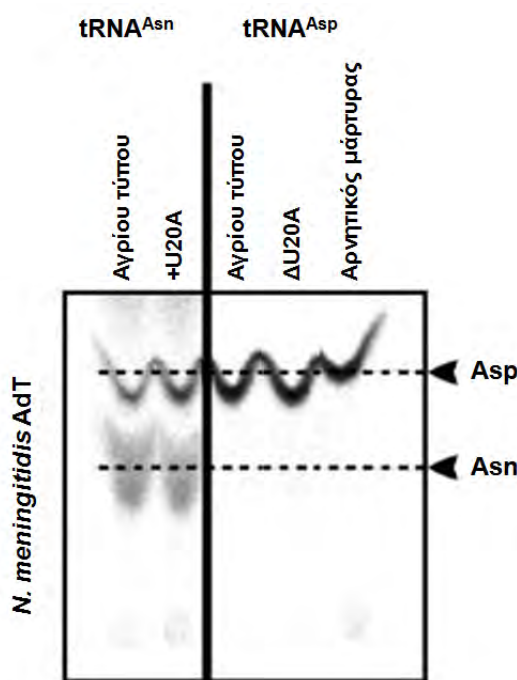
Για να αναλυθεί η μεμονωμένη συνεισφορά κάθε στοιχείου και να εντοπιστεί ο ελάχιστος αριθμός των στοιχείων που προάγουν την τρoσαμίδωση, συντέθηκαν μετάγραφα του tRNA^{Asn} του *Neisseria meningitidis*, στα οποία το πρώτο ζεύγος βάσεων U1-A72 και το U36 εναλλάχτηκαν μεμονωμένα με τα νουκλεοτίδια στις αντίστοιχες θέσεις του tRNA^{Asp} (tRNA^{Asn(G1-C72)} και tRNA^{Asn(C36)}). Αντίστοιχα, συντέθηκαν μετάγραφα του tRNA^{Asp} του *Neisseria meningitidis*, στα οποία το πρώτο ζεύγος βάσεων G1-C72 και το C36 εναλλάχτηκαν μεμονωμένα με τα νουκλεοτίδια στις αντίστοιχες θέσεις του tRNA^{Asn} (tRNA^{Asp(U1-A72)} και tRNA^{Asp(U36)}). Για να ελεγχθεί η επίδραση του μεγέθους της θηλιάς D στην τρoσαμίδωση του Asp-tRNA^{Asn} συντέθηκε ένα μεταλλαγμένο μόριο tRNA^{Asn} στο οποίο το U20A ενσωματώθηκε στη θηλιά D (tRNA^{Asn(+U20A)}) και ένα μεταλλαγμένο tRNA^{Asp} στο οποίο έγινε απαλοιφή του U20A (tRNA^{Asp(ΔU20A)}).

Όσον αφορά την εναλλαγή του αντικωδικονίου, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αντίδρασης τρoσαμίδωσης, το μεταλλαγμένο tRNA^{Asn(C36)}, που φέρει το αντικωδικόνιο του tRNA^{Asp}, προάγει την τρoσαμίδωση του εστεροποιημένου Asp, αλλά κατά δύο φορές λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με το αγρίου τύπου tRNA^{Asn} (**Εικόνα 45**). Το αντικωδικόνιο, λοιπόν, των μορίων tRNA που ελέγχθηκαν δε βρέθηκε να συνεισφέρει στην τρoσαμίδωση που καταλύεται από τη βακτηριακή GatCAB AdT.



Εικόνα 45: Ανάλυση των εστεροποιημένων αμινοξέων σε TLC μετά από τρoσαμίδωση των αμινοακυλιωμένων tRNA μεταγραφών για την εκτίμηση της συνεισφοράς του αντικωδικονίου στην αναγνώριση του tRNA^{Asn}. Η μετατροπή του εστεροποιημένου Asp σε Asn από την AdT του *N. meningitidis* δεν επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από την εναλλαγή του αντικωδικονίου του tRNA^{Asn} (GUU) με εκείνο του tRNA^{Asp} (GUC), γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανώς το αντικωδικόνιο δεν αποτελεί στοιχείο ταυτότητας για την τρoσαμίδωση.

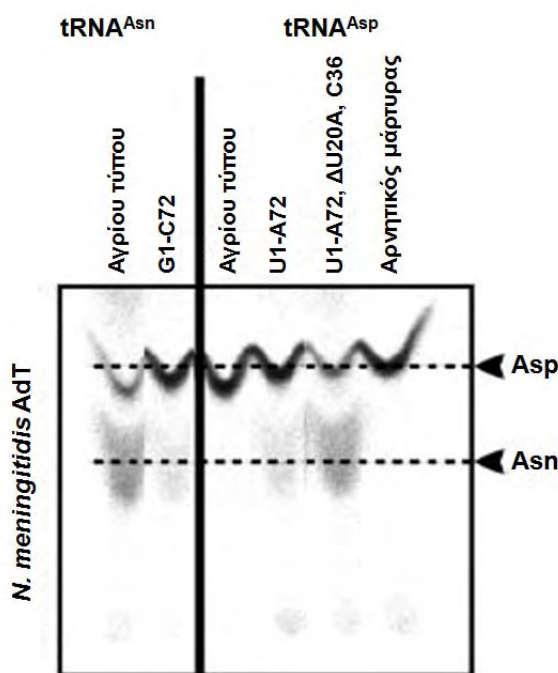
Για να ελεγχθεί η επίδραση του μεγέθους της θηλιάς D στην αναγνώριση του υποστρώματος από την AdT πραγματοποιήθηκε ενσωμάτωση του U20A στη θηλιά D του $tRNA^{Asn}$. Αυτή η προσθήκη είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της αποτελεσματικότητας της τρανσαμίδωσης κατά σχεδόν μια τάξη μεγέθους ως αποτέλεσμα της μείωσης της συγγένειας του Asp- $tRNA^{Asn(+U20A)}$ για την AdT (**Εικόνα 46**). Η απαλοιφή του νουκλεοτιδίου αυτού από τη θηλιά D του $tRNA^{Asp}$ ωστόσο δεν επαρκεί για να καταστήσει το $tRNA^{Asp}$ υπόστρωμα της AdT.



Εικόνα 46: Ανάλυση των εστεροποιημένων αμινοξέων σε TLC μετά από τρανσαμίδωση των αμινοακυλιωμένων $tRNA$ μεταγράφων για την εκτίμηση της συνεισφοράς του μεγέθους της θηλιάς D στην αναγνώριση του $tRNA^{Asn}$. Η ενσωμάτωση ενός επιπλέον νουκλεοτιδίου στη θέση 20A της θηλιάς D του μορίου $tRNA^{Asn}$ μείωσε την τρανσαμίδωση του εστεροποιημένου Asp κατά μια τάξη μεγέθους, πιθανώς μειώνοντας τη συγγένεια του υποστρώματος για την AdT του *N. meningitidis*. Το μέγεθος της θηλιάς D δεν φαίνεται να είναι ένα στοιχείο ταυτότητας του $tRNA^{Asn}$, καθώς η απαλοιφή του επιπλέον νουκλεοτιδίου από τη θηλιά D του $tRNA^{Asp}$ δε το κατέστησε υπόστρωμα για την αμιδοτρανσφεράση.

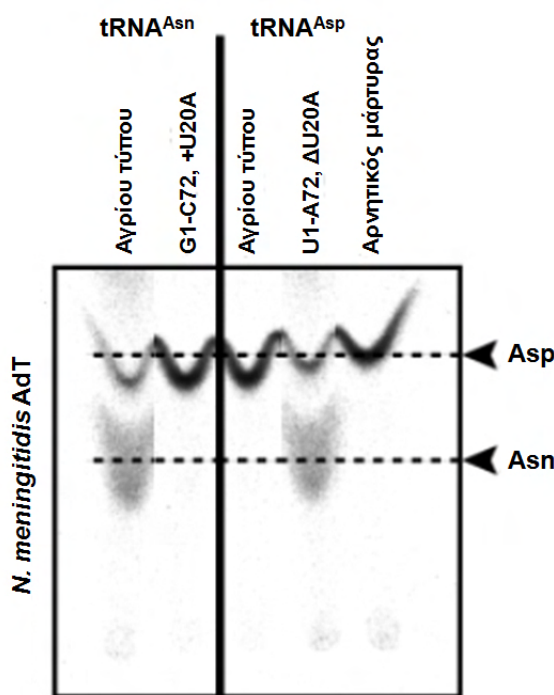
Ο έλεγχος του πρώτου ζεύγους βάσεων του βραχίονα υποδοχής τους αμινοξέος ως εν δυνάμει στοιχείου ταυτότητας πραγματοποιήθηκε με μετάλλαξη του μορίου $tRNA^{Asn}$ προς δημιουργία του μορίου $tRNA^{Asn(G1-C72)}$. Η αμινοακυλιωμένη μορφή του μεταλλαγμένου $tRNA^{Asn(G1-C72)}$ τρανσαμίδωνεται σε ελάχιστα ποσοστά, σχεδόν 100 φορές λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με το Asp- $tRNA^{Asn}$. Αυτή η διαφορά πιθανώς να οφείλεται στη μείωση της συγγένειας του Asp- $tRNA^{Asn}$ για την AdT. Ως αποτέλεσμα, μεμονωμένες κινητικές σταθερές δε μπορούσαν να υπολογιστούν για το συγκεκριμένο μεταλλαγμένο μετάγραφο, οπότε προσδιορίστηκε μόνο η απόδοση της καταλυτικής δραστηριότητας. Η μετάλλαξη του πρώτου ζεύγους βάσεων στο μόριο $tRNA^{Asp}$

δημιουργεί το μεταλλαγμένο μόριο $tRNA^{Asp(U1-A72)}$ του οποίου η αμινοακυλιωμένη μορφή τρανσαμιδώνεται. Ωστόσο, το μόριο $Asp-tRNA^{Asp(U1-A72)}$ παρουσιάζει μειωμένη τρανσαμιδωση κατά δύο τάξεις μεγέθους σε σύγκριση με το αγρίου τύπου $Asp-tRNA^{Asn}$ και το $Asp-tRNA^{Asp(U1-A72, \Delta U20A, U36)}$ (**Εικόνα 47**). Η διαφορά στην απόδοση της καταλυτικής δραστηριότητας της AdT έναντι των $Asp-tRNA^{Asp(U1-A72)}$ και $Asp-tRNA^{Asp(U1-A72, \Delta U20A, U36)}$ μπορεί να αποδοθεί στα διαφορετικά νουκλεοτίδια στη θέση 36 ή στα συγκεκριμένα μεγέθη της θηλιάς D στα δύο μόρια tRNA. Ωστόσο, η θέση 36 του αντικωδικονίου δεν ανήκει στα στοιχεία ταυτότητας. Επιπλέον, το νουκλεοτίδιο U20A που απουσιάζει από τη θηλιά D του $tRNA^{Asn}$ δε μπορεί να θεωρηθεί αυθεντικό στοιχείο ταυτότητας, και θα μπορούσε πιθανότατα να δρα ως αντι-καθοριστικό στοιχείο που μειώνει την αναγνώριση του $Asp-tRNA^{Asp}$. Η συνολική παρατήρηση λοιπόν των αποτελεσμάτων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το πρώτο ζεύγος βάσεων του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος του μορίου $tRNA^{Asn}$ είναι το κύριο στοιχείο που καθορίζει την ταυτότητα του μορίου tRNA για την τρανσαμιδωση από την AdT.



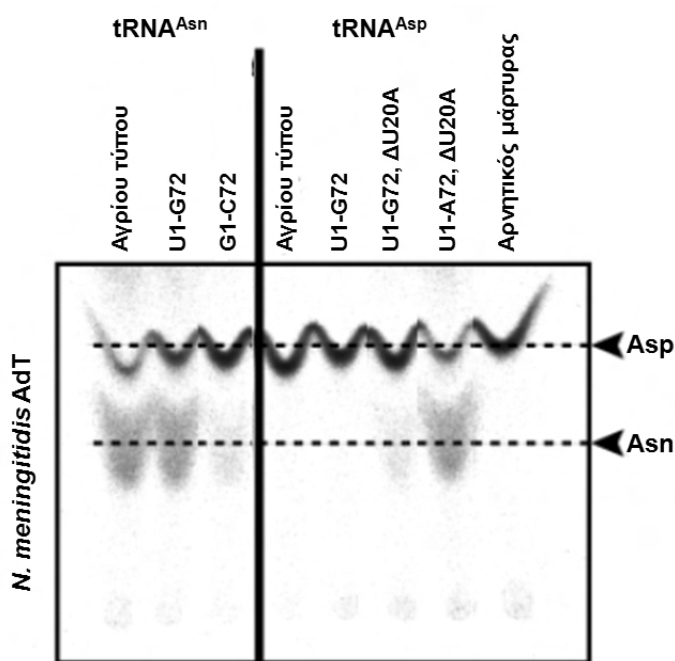
Εικόνα 47: Ανάλυση των εστεροποιημένων αμινοξέων σε TLC μετά από τρανσαμιδωση των αμινοακυλιωμένων tRNA μεταγραφών για την εκτίμηση της εμπλοκής του πρώτου ζεύγους βάσεων στην αναγνώριση του $tRNA^{Asn}$. Η μετατροπή του πρώτου ζεύγους βάσεων του μορίου $tRNA^{Asn}$ σε G1-C72 (πρώτο ζεύγος βάσεων του $tRNA^{Asp}$) προκαλεί δραματική μείωση της τρανσαμιδωσης. Η αντίστροφη μετατροπή του πρώτου ζεύγους βάσεων του $tRNA^{Asp}$ σε U1-A72 (πρώτο ζεύγος βάσεων του $tRNA^{Asn}$) καθιστά το μεταλλαγμένο $tRNA^{Asp(U1-A72)}$ υπόστρωμα για την AdT του *N. meningitidis*, αλλά η απόδοση της καταλυτικής δραστηριότητας είναι περιορισμένη (10% σε σχέση με το αγρίου τύπου $Asp-tRNA^{Asn}$). Η τρανσαμιδωση ενισχύεται όταν παράλληλα απαλείφεται το επιπλέον νουκλεοτίδιο U20A της θηλιάς D του $tRNA^{Asp}$ προς σχηματισμό του μορίου $tRNA^{Asp(U1-A72, \Delta U20A)}$. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι το πρώτο ζεύγος βάσεων είναι το κύριο στοιχείο ταυτότητας για την τρανσαμιδωση του κακοφορισμένου $Asp-tRNA^{Asn}$, ενώ το μέγεθος της θηλιάς D δρα ως αντι-καθοριστικό στοιχείο που περιορίζει την αλληλεπίδραση του $tRNA^{Asp}$ με την AdT.

Για να προσδιοριστεί ο ακριβής ρόλος του μεγέθους της θηλιάς D στην αναγνώριση των υποστρωμάτων της AdT, πραγματοποιήθηκε απαλοιφή του νουκλεοτιδίου U20A από το $tRNA^{Asp(U1-A72)}$ και προσθήκη ενός U20A στο $tRNA^{Asn(G1-C72)}$. Όπως αναμενόταν, το μόριο $Asp-tRNA^{Asp(U1-A72, \Delta U20A)}$ τρανσαμιδώνεται σχεδόν τόσο αποτελεσματικά όσο το αγρίου τύπου μόριο $Asp-tRNA^{Asn}$ από την AdT του *Neisseria meningitidis*, ενώ το μόριο $Asp-tRNA^{Asn(G1-C72, +U20A)}$ χάνει πλήρως την ικανότητα του να τρανσαμιδώνεται (**Εικόνα 48**). Η αποδοτική τρανσαμιδωση, λοιπόν, των μορίων $Asp-tRNA$ του *Neisseria meningitidis* από την ομόλογη AdT προάγεται από ένα μοναδικό στοιχείο ταυτότητας που είναι το πρώτο ζεύγος βάσεων του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος του $tRNA^{Asn}$. Παράλληλα, η πιθανή εμπλοκή του $Asp-tRNA^{Asp}$ ως υπόστρωμα για τρανσαμιδωση αποτρέπεται από την παρουσία του επιπλέον νουκλεοτιδίου U20A στη θηλιά D του μορίου $tRNA^{Asp}$, το οποίο δρα ως αντικαθοριστικό στοιχείο.



Εικόνα 48: Ανάλυση των εστεροποιημένων αμινοξέων σε TLC μετά από τρανσαμιδωση των αμινοακυλιωμένων $tRNA$ μεταγραφών για την εκτίμηση της συνεισφοράς του μεγέθους της θηλιάς D στην αναγνώριση του $tRNA^{Asn}$. Η ενσωμάτωση ενός επιπλέον νουκλεοτιδίου στη θέση 20A της θηλιάς D του μορίου $tRNA^{Asn(G1-C72)}$ προς σχηματισμό του μορίου $tRNA^{Asn(G1-C72, +U20A)}$ απέτρεψε την αναγνώριση και ακόλουθη τρανσαμιδωση του αμινοακυλιωμένου μορίου από την AdT του *N. meningitidis*. Η απαλοιφή του επιπλέον νουκλεοτιδίου από το μόριο $tRNA^{Asp}$ στο οποίο είχε ενσωματωθεί το κύριο στοιχείο ταυτότητας για την τρανσαμιδωση (U1-A72) οδήγησε στη σύνθεση του $tRNA^{Asp(U1-A72, \Delta U20A)}$. Το αμινοακυλιωμένο μεταλλαγμένο αυτό μόριο τρανσαμιδώνεται σε ποσοστά συγκρίσιμα με το αγρίου τύπου $Asp-tRNA^{Asn}$, ενισχύοντας την υπόθεση ότι το μέγεθος της θηλιάς D αποτελεί ένα αντι-καθοριστικό στοιχείο για την αναγνώριση του $tRNA^{Asp}$ από την AdT του *N. meningitidis*.

Τέλος, προέκυψε το ερώτημα αν τα στοιχεία του μορίου $tRNA^{Asn}$ που προσδιορίστηκαν ως υπεύθυνα για την τρoσαμίδωση του εστεροποιημένου Asp, μπορούσαν να περιοριστούν μόνο στη βάση U1. Για το σκοπό αυτό, συντέθηκαν τα μόρια $tRNA^{Asn(U1-G72)}$ και $tRNA^{Asp(U1-G72, \Delta U20A)}$ και αναλύθηκε η ικανότητά τους να προάγουν την τρoσαμίδωση του εστεροποιημένου σε αυτά Asp από την AdT. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των δοκιμών τρoσαμίδωσης, το μόριο $Asp-tRNA^{Asn(U1-G72)}$ τρoσαμιδώνεται μόνο κατά 6.4 φορές λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με το αγρίου τύπου $Asp-tRNA^{Asn}$, αλλά 16 φορές πιο αποτελεσματικά από ότι το $Asp-tRNA^{Asn(G1-C72)}$. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι το νουκλεοτίδιο U1 του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος είναι το κύριο καθοριστικό στοιχείο για την τρoσαμίδωση και ότι το A72 μπορεί να είναι λιγότερο απαραίτητο. Παρομοίως, η ενσωμάτωση του U1-G72 στο μόριο $tRNA^{Asp(\Delta U20A)}$ το μετατρέπει σε υπόστρωμα για την AdT, αλλά τρoσαμιδώνεται κατά 120 φορές λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με το μόριο $tRNA^{Asp(U1-A72, \Delta U20A)}$ (**Εικόνα 49**). Αυτό υποδεικνύει ότι το νουκλεοτίδιο A72 συνεισφέρει πιο αποτελεσματικά στην τρoσαμίδωση του Asp από την AdT όταν είναι εστεροποιημένο στο μόριο $tRNA^{Asp}$ παρά στο μόριο $tRNA^{Asn}$.



Εικόνα 49: Ανάλυση των εστεροποιημένων αμινοξέων σε TLC μετά από τρoσαμίδωση των αμινοακυλιωμένων $tRNA$ μεταγράφων για την εκτίμηση της συνεισφοράς της βάσης U1 στην αναγνώριση του $tRNA^{Asn}$. Η μετατροπή του πρώτου ζεύγους βάσεων του μορίου $tRNA^{Asn}$ από U1-A72 σε U1-G72, προκαλεί μείωση της απόδοσης της καταλυτικής δραστηριότητας αλλά σε μικρό ποσοστό σε σχέση με τη μετάλλαξη του σε G1-C72. Το νουκλεοτίδιο U1 φαίνεται να καθορίζει την αναγνώριση του μορίου $tRNA^{Asn}$ από την AdT σε μεγαλύτερο βαθμό από το A72. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από το γεγονός ότι η μετατροπή του πρώτου ζεύγους βάσεων του $tRNA^{Asp}$ σε U1-G72, με ταυτόχρονη απαλοιφή του νουκλεοτιδίου U20A της θηλιάς D καθιστά το μεταλλαγμένο $tRNA^{Asp(U1-G72, \Delta U20A)}$ υπόστρωμα για την AdT του *N. meningitidis*, αν και η απόδοση της καταλυτικής δραστηριότητας είναι περιορισμένη.

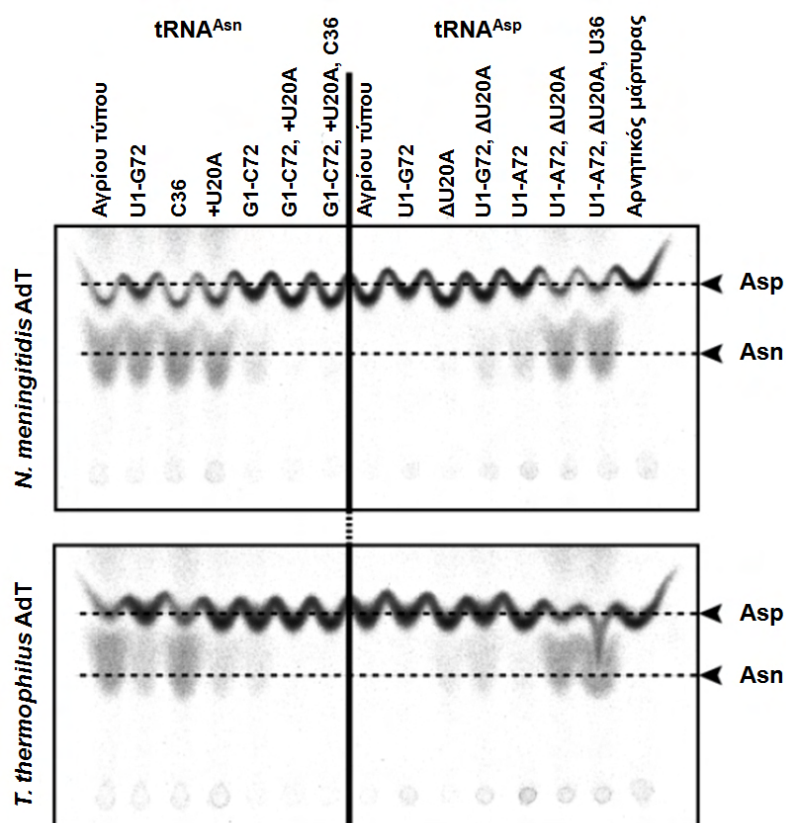
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων τρανσαμίδωσης έδειξε ότι το πρώτο ζεύγος βάσεων είναι αυτό που καθορίζει την εξειδικευμένη αναγνώριση των υποστρώματων από την GatCAB του *Neisseria meningitidis* (Bailly *et al.*, 2006). Οι κινητικές σταθερές που υπολογίστηκαν για τα αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα υποστρώματα που ελέχθησαν υποδεικνύουν ότι η συγγένεια του ενζύμου για το αγρίου τύπου tRNA^{Asn} είναι συγκρίσιμη με εκείνη για το μεταλλαγμένο μόριο tRNA^{Asp(U1-A72, ΔU20A, U36)}. Αντίθετα, όπως αναμενόταν το αγρίου τύπου tRNA^{Asp} και το μεταλλαγμένο tRNA^{Asn(G1-C72, +U20A, C36)} δεν τρανσαμίδωνονται. Το σημαντικότερο ρόλο στην αναγνώριση του tRNA^{Asn} φαίνεται να παίζει η βάση U1, καθώς η μετατροπή του πρώτου ζεύγους βάσεων από U1-A72 σε U1-G72 μείωσε μεν τη συγγένεια της AdT για το υπόστρωμα αλλά όχι σε σημαντικό ποσοστό, όπως για παράδειγμα η μετάλλαξη σε G1-C72. Οι κινητικές σταθερές της GatCAB αμιδοτρανοσφοράσης του *Neisseria meningitidis* για όλα τα αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα υποστρώματα tRNA που αναλύθηκαν φαίνονται στον **Πίνακα 16**.

Πίνακας 16: Κινητικές σταθερές της αντίδρασης τρανσαμίδωσης των αμινοακυλιωμένων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μεταγράφων tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} από την AdT του *N. meningitidis*.

Asp-tRNA μετάγραφα	Κινητικές σταθερές		
	K_M (μM)	k_{cat} (sec^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} sec^{-1}$)
Asp-tRNA ^x			
Asn αγρίου τύπου	1.2	0.64	0.53
Asn U1-G72	5.6	0.46	0.082
Asn C36	0.48	0.65	1.35
Asn +U20A	11.39	0.91	0.076
Asn G1-C72	n.d.	n.d.	0.0052
Asn G1-C72, +U20A	-	-	-
Asn G1-C72, +U20A, C36	-	-	-
Asp αγρίου τύπου	-	-	-
Asp U1-G72	-	-	-
Asp ΔU20A	-	-	-
Asp U1-G72, ΔU20A	n.d.	n.d.	0.0022
Asp U1-A72	n.d.	n.d.	0.0044
Asp U1-A72, ΔU20A	2.7	0.68	0.25
Asp U1-A72, ΔU20A, U36	0.6	0.46	0.77

Είναι όμως τα στοιχεία ταυτότητας του tRNA^{Asn} που καθορίζουν την τρανσαμίδωση του εστεροποιημένου Asp στο *Neisseria meningitidis* συντηρημένα σε άλλα βακτηριακά είδη που συνθέτουν ασπαραγίνη μέσω του tRNA-εξαρτώμενου μονοπατιού; Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό αναλύθηκε το προφίλ τρανσαμίδωσης των Asp-tRNA^{Asp} και Asp-tRNA^{Asn} του *Neisseria meningitidis* από την AdT ενός είδους που φυλογενετικά διαφέρει από το *Neisseria meningitidis*, όπως είναι το *Thermus thermophilus*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των δοκιμών τρανσαμίδωσης, η AdT του

Thermus thermophilus αναγνωρίζει τα ίδια στοιχεία του μορίου tRNA^{Asn} όπως και το ένζυμο του *Neisseria meningitidis*. Οι μικρές διαφορές που παρατηρούνται αφορούν τη σχετική συνεισφορά κάθε στοιχείου στην αποτελεσματικότητα της τρoσαμιδωσης. Για την AdT του *Thermus thermophilus* η σημασία της A72 φαίνεται αυξημένη καθώς το Asp-tRNA^{Asn(U1-G72)} είναι λιγότερο κατάλληλο υπόστρωμα για το ένζυμο του *Thermus thermophilus* σε σχέση με αυτό του *Neisseria meningitidis* (**Εικόνα 50**). Επιπρόσθετα, το επιπλέον νουκλεοτίδιο U20A του μορίου tRNA^{Asp} είναι ισχυρότερο αντικαθοριστικό στοιχείο όταν η τρoσαμιδωση καταλύεται από την AdT του *Thermus thermophilus* σε σχέση με το ένζυμο του *Neisseria meningitidis*.



Εικόνα 50: Ανάλυση των εστεροποιημένων αμινοξέων σε TLC μετά από τρoσαμιδωση των αμινοακυλιωμένων tRNA μετάγραφων για την εκτίμηση της ομοιότητας των στοιχείων ταυτότητας του μορίου tRNA^{Asn} για δύο βακτηριακές AdTs, του *N. meningitidis* και του *T. thermophilus*. Το προφίλ της τρoσαμιδωσης των αμινοακυλιωμένων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορίων tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο αμιδοτρoσαφερασών. Ωστόσο, παρατηρούνται μικρές διαφορές στη συνεισφορά κάθε στοιχείου στην αναγνώριση του υποστρώματος μεταξύ των δύο ενζύμων. Η βάση A72 είναι περισσότερο σημαντική για την αναγνώριση από την AdT του *T. thermophilus*, καθώς το tRNA^{Asn(U1-G72)} τρoσαμιδώνεται σε μικρότερο βαθμό από το ένζυμο αυτό σε σχέση με την AdT του *N. meningitidis*. Επιπρόσθετα, το μέγεθος της θηλιάς D είναι ισχυρότερο αντικαθοριστικό στοιχείο για την AdT του *T. thermophilus*, όπως υποδεικνύεται από το γεγονός ότι το tRNA^{Asp(U1-A72)} αποτελεί καταλληλότερο υπόστρωμα για την AdT του *N. meningitidis*. Γενικά, όμως η αναγνώριση των υποστρωμάτων φαίνεται να καθορίζεται από τα ίδια στοιχεία.

Από τη συγκριτική ανάλυση της τρoσaμίδωσης με τις AdTs από τα δύο βακτήρια προκύπτει ότι το μόριο Asp-tRNA^{Asn(+U20A)} τρoσaμίδωνεται κατά 60% λιγότερο αποτελεσματικά από την AdT του *Thermus thermophilus* σε σχέση με το ένζυμο από το *Neisseria meningitidis*. Επιπλέον, το μόριο Asp-tRNA^{Asn(ΔU20A)} τρoσaμίδωνεται ελάχιστα από την AdT του *Thermus thermophilus* αλλά όχι από εκείνη του *Neisseria meningitidis*. Τέλος, όταν απαλείφεται το U20A, η αποτελεσματικότητα της τρoσaμίδωσης του μορίου Asp-tRNA^{Asp(U1-A72)} αυξάνεται περισσότερο με την AdT του *Thermus thermophilus* σε σχέση με το ένζυμο του *Neisseria meningitidis*. Ωστόσο, εφόσον τα ίδια στοιχεία των μορίων tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} προάγουν και αποτρέπουν, αντίστοιχα, την τρoσaμίδωση από τις AdTs των *Thermus thermophilus* και *Neisseria meningitidis*, και τα δύο ένζυμα διακρίνουν το Asp-tRNA^{Asn} από το Asp-tRNA^{Asp} μέσω παρόμοιων μηχανισμών (Bailly et al., 2006).

3.1.4 Ειδικά ως προς την οργανισμική προέλευση (species-specific) στοιχεία ταυτότητας των μορίων tRNA για την tRNA εξαρτώμενη σύνθεση ασπαραγίνης

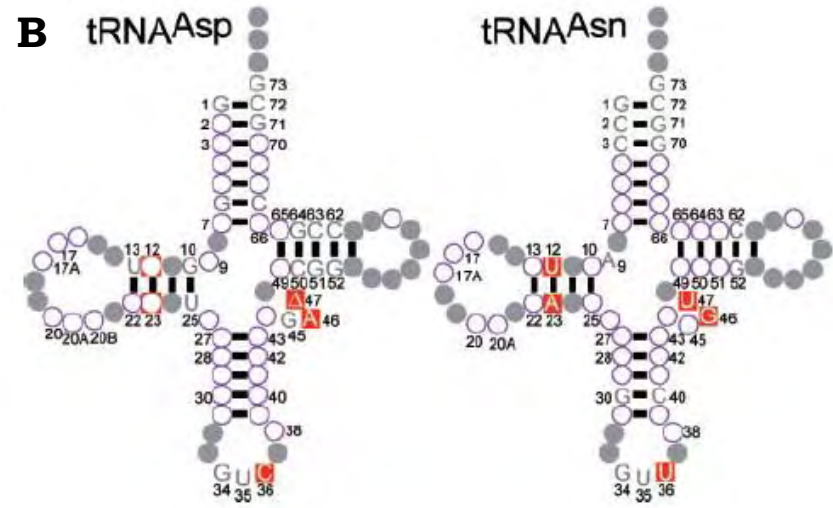
Το tRNA εξαρτώμενο ασύνηθες μονοπάτι σύνθεσης Asn-tRNA^{Asn}, με τη μεσολάβηση της GatCAB απαντάται όχι μόνο στα βακτήρια αλλά και σε αρκετά αρχαία (Roy et al., 2003, Tumbula et al., 2000). Οι υπομονάδες GatC, GatA και GatB της AdT των αρχαίων παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με τις υπομονάδες του βακτηριακού ενζύμου. Τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν τα ίδια λειτουργικά χαρακτηριστικά καθώς *in vitro* έχουν διπλή εξειδίκευση, συνθέτουν δηλαδή τόσο Asn-tRNA^{Asn} όσο και Gln-tRNA^{Gln} (Tumbula et al., 2000). Ωστόσο, τα στοιχεία του μορίου tRNA που επάγουν την τρoσaμίδωση πιθανόν να διαφέρουν στα δύο βασίλεια. Η υπόθεση αυτή πηγάζει από την παρατήρηση ότι στα αρχαία, το πρώτο ζεύγος βάσεων G1-C72 του μορίου tRNA^{Asn} απαντάται και στο tRNA^{Asp}, υποδεικνύοντας ότι σε αντίθεση με τα βακτήρια, αυτό το ζεύγος βάσεων δε μπορεί να επάγει εξειδικευμένα την τρoσaμίδωση του Asp-tRNA^{Asn}.

Εφαρμόζοντας την ίδια στρατηγική των συγκριτικών πολλαπλών ομοπαράθεσεων των αλληλουχιών των μορίων tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} από αρχαία, προσδιορίστηκαν οι συντηρημένες διαφορές μεταξύ των δύο μορίων (**Εικόνα 51A**). Αναλυτικότερα, το ζεύγος βάσεων U12-A23 του βραχίονα D, το νουκλεοτίδιο U36 του αντικωδικονίου και τα νουκλεοτίδια G46 και U47 της μεταβλητής θηλιάς του μορίου tRNA^{Asn} είναι τα πιθανά στοιχεία ταυτότητας που επάγουν την tRNA-εξαρτώμενη τρoσaμίδωση από την AdT των αρχαίων (**Εικόνα 51B**). Τα νουκλεοτίδια αυτά διαφέρουν στα μόρια tRNA^{Asp} των αρχαίων όπου το ζεύγος 12-23 είναι κυρίως G-C, στη θέση 36 απαντάται C, και η μεταβλητή θηλιά είναι μικρότερη κατά ένα νουκλεοτίδιο σε σχέση με το μόριο tRNA^{Asn} διότι απουσιάζει το νουκλεοτίδιο στη θέση 47 ενώ στη θέση 46 βρίσκεται μια A. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα στοιχεία αυτά που πιθανώς καθορίζουν την τρoσaμίδωση του Asp-tRNA^{Asn} των αρχαίων είναι συντηρημένα στα βακτηριακά μόρια tRNA^{Asn}. Επιπρόσθετα, τα νουκλεοτίδια G46 και U47 της μεταβλητής θηλιάς είναι επίσης συντηρημένα και σε

όλα τα βακτηριακά μόρια tRNA^{Asp}, τα οποία στις περισσότερες των περιπτώσεων, όπως στο *Neisseria meningitidis*, φέρουν και το ζεύγος U12–A23.

A

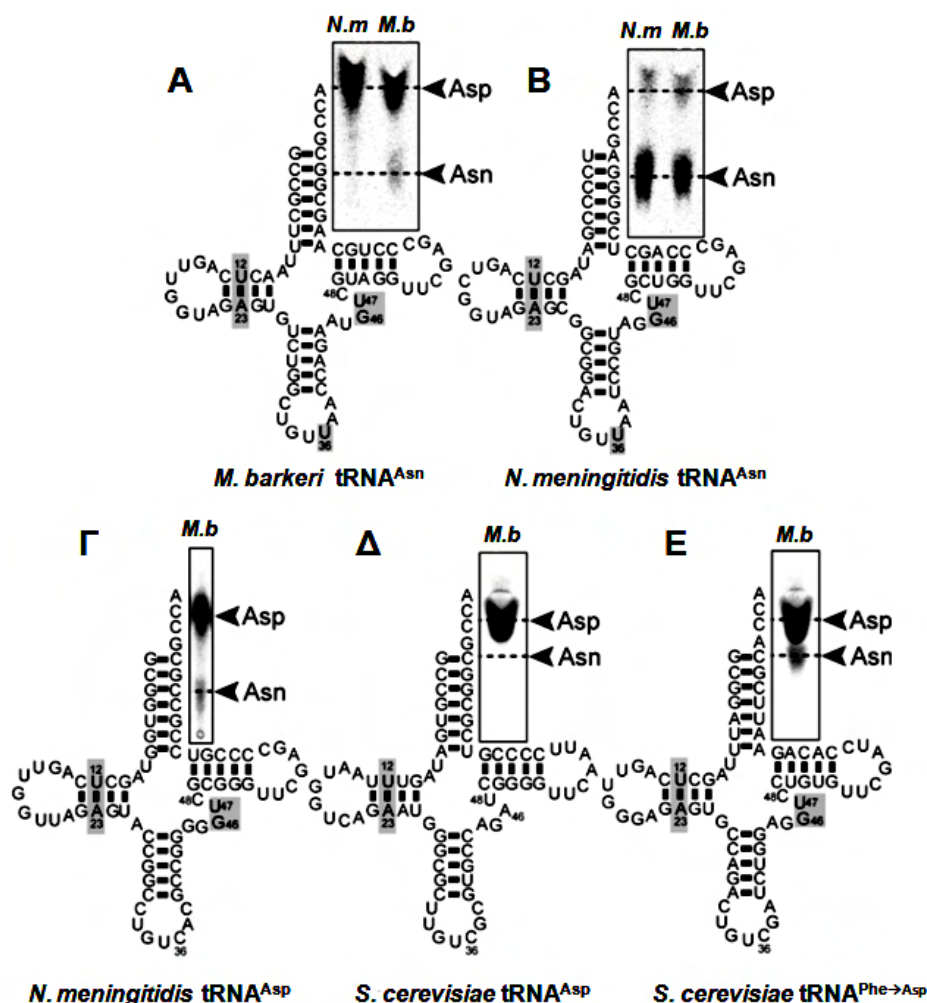
aa	Οργανισμός	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	17A	18	19	20	20A	20B	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76						
D	GUC <i>Haloferax volcanii</i>	G	C	C	C	G	G	G	T	G	R	T	G	T	A	G	T	-	-	G	G	C	C	C	A	T	C	A	T	A	C	G	A	C	C	C	T	G	T	C	A	C	G	G	T	C	G	T	G	A	-	C	G	C	G	G	G	T	T	C	A	A	A	T	C	C	C	G	C	C	T	C	G	G	C	G	C	A	G	G	G	C	G	C	C	A
D	GTC <i>Methanococcus vannielii</i>	G	C	C	C	T	G	G	T	G	T	G	T	A	G	T	C	-	-	G	G	C	C	T	A	T	C	A	T	A	C	A	G	G	A	C	T	G	T	C	A	C	T	C	C	T	G	T	G	A	-	C	T	C	G	G	G	T	T	C	A	A	A	T	C	C	C	G	C	C	A	G	G	G	C	G	C	C	A							
D	GTC <i>Methanothermus fervidus</i>	G	C	C	C	T	G	G	T	G	T	A	G	T	-	-	-	-	-	G	G	C	T	-	A	T	C	A	T	G	C	G	G	C	C	T	G	T	C	A	G	C	C	C	G	C	G	A	-	C	T	C	G	G	G	T	T	C	A	A	T	C	C	C	G	C	C	A	G	G	C	G	C	C	A											
D	GTC <i>Methanococcus voltae</i>	G	C	C	C	T	G	G	T	G	T	A	G	T	C	-	-	-	-	G	G	C	T	-	A	T	C	A	T	A	C	A	G	G	A	C	T	G	T	C	A	G	C	C	C	T	G	A	-	C	T	C	G	G	G	T	T	C	A	A	A	T	C	C	C	G	C	C	A	G	G	C	G	C	C	A										
D	GTC <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	G	C	C	C	T	G	G	T	G	T	A	G	T	-	-	-	-	-	G	G	C	T	-	A	T	C	A	T	G	C	G	G	C	C	T	G	T	C	A	G	C	C	C	G	C	G	A	-	C	T	C	G	G	G	T	T	C	A	A	T	T	C	C	G	G	C	C	A	G	G	C	G	C	C	A										
D	GTC <i>Aeropyrum pernix</i>	G	C	C	C	G	T	A	G	T	A	T	A	G	C	C	T	-	-	G	G	C	T	-	A	G	T	A	T	G	C	G	G	C	C	T	G	T	C	A	A	G	C	C	C	G	T	G	A	-	C	C	C	G	G	G	T	T	C	A	A	A	T	C	C	C	G	C	C	A	G	G	C	G	C	C	A									
D	GTC <i>Methanococcus janaschii</i>	G	C	C	C	T	G	G	T	G	T	A	G	C	C	C	-	-	-	-	G	G	C	T	-	A	T	C	A	T	A	C	A	G	G	A	C	T	G	T	C	A	A	G	C	C	C	T	G	T	G	A	-	C	T	C	G	G	G	T	T	C	A	A	A	T	C	C	C	G	C	C	A	G	G	C	G	C	C	A						
D	GTC <i>Thermoplasma acidophilum</i>	G	C	C	C	G	T	A	G	T	G	T	A	G	T	-	-	-	-	G	G	C	T	-	A	T	C	A	T	A	C	A	G	G	C	C	T	G	T	C	A	A	G	C	C	C	T	G	T	G	A	-	C	A	T	G	G	G	T	T	C	A	A	A	T	C	C	C	G	C	C	A	G	G	C	G	C	C	A							
D	GTC <i>Sulfolobus solfataricus</i>	G	C	C	C	G	T	A	G	T	C	T	A	G	T	-	-	-	-	G	G	T	C	-	A	G	G	A	T	G	G	G	G	C	C	T	G	T	C	A	A	A	G	C	C	C	T	G	A	-	C	C	C	G	G	G	T	T	C	A	A	A	T	C	C	C	G	C	C	C	G	C	G	C	G	C	C	A								
D	GTC <i>Halobacterium sp.</i>	G	C	C	C	G	A	T	G	T	G	T	A	G	T	-	-	-	-	G	G	C	C	-	A	T	C	A	T	A	C	A	A	C	C	C	T	G	T	C	A	A	A	G	C	C	G	T	G	A	-	C	G	C	G	G	G	T	T	C	A	A	A	T	C	C	C	G	T	C	C	G	G	C	G	C	C	A								
N	GUU <i>Halobacterium cutirubrum</i>	G	C	C	C	C	A	T	A	G	C	T	C	A	G	T	T	-	-	G	G	T	-	-	A	G	A	G	C	A	C	G	T	G	G	T	T	G	T	T	G	C	C	A	C	G	T	G	T	G	T	C	C	A	G	G	T	T	C	G	A	C	C	T	G	G	T	G	G	C	G	C	C	A												
N	GUU <i>Haloferax volcanii</i>	G	C	C	C	C	G	T	A	G	C	T	C	A	G	T	T	-	-	G	G	T	-	-	A	G	A	G	C	A	C	C	T	C	G	C	T	G	T	T	G	A	C	G	A	G	G	T	G	T	C	C	C	A	G	G	T	T	C	G	A	G	T	C	C	T	G	G	C	G	T	G	G	C	C	A										
N	GTT <i>Methanococcus vannielii</i>	G	C	C	T	C	C	T	A	G	C	T	C	A	G	T	A	-	-	G	G	T	A	-	-	G	C	A	G	C	A	T	G	A	C	T	G	T	C	A	A	T	A	T	C	C	A	T	A	G	G	T	C	G	C	A	G	T	T	C	G	A	G	C	C	T	G	C	A	G	A	G	G	C	C	A										
N	GTT <i>Methanothermus fervidus</i>	G	C	C	C	C	G	T	A	G	C	T	C	A	G	T	A	-	-	G	G	T	A	-	-	G	C	A	G	C	G	C	T	C	G	C	T	G	T	C	A	A	A	G	C	C	C	G	A	T	G	A	-	C	T	C	G	C	A	G	T	T	C	G	A	G	T	C	C	T	G	C	C	G	C	G	C	C	A							
N	GTT <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	G	C	C	C	C	G	T	A	G	C	T	C	A	G	T	A	-	-	G	G	T	-	-	A	G	A	G	C	G	T	T	C	G	G	C	T	G	T	T	A	A	C	C	G	A	T	T	G	G	T	C	A	A	G	G	T	T	C	G	A	G	C	C	T	G	T	C	G	C	G	C	C	A												
N	GTT <i>Aeropyrum pernix</i>	G	C	C	C	C	G	T	A	G	C	T	C	A	G	T	A	-	-	G	G	T	-	-	A	G	A	G	C	G	C	C	G	G	C	T	G	T	T	G	A	C	G	A	G	G	T	G	T	C	C	C	A	G	G	T	T	C	A	A	G	T	C	C	C	C	G	G	C	G	C	C	A													
N	GTT <i>Methanococcus janaschii</i>	G	C	C	C	C	A	T	A	G	C	T	C	A	G	T	-	-	-	G	G	T	-	-	A	G	A	G	C	A	C	G	G	A	C	T	G	T	C	A	A	A	T	A	T	C	C	G	T	A	G	G	T	C	G	A	G	G	T	T	C	G	A	G	T	C	C	T	G	C	T	G	G	C	G	C	C	A								
N	GTT <i>Thermoplasma acidophilum</i>	G	C	C	C	C	T	A	G	C	T	C	A	G	T	-	-	-	-	G	G	T	-	-	A	G	A	G	C	A	C	T	C	G	C	T	G	T	T	A	A	C	C	G	A	G	C	G	T	G	A	-	C	A	T	C	G	A	G	A	C	C	A	T	C	C	A	G	G	C	C	C	A													
N	GTT <i>Sulfolobus solfataricus</i>	G	C	C	G	A	G	T	A	G	C	T	C	A	G	T	T	-	-	-	G	G	T	-	-	A	G	A	G	C	C	C	C	G	C	T	G	T	C	A	A	A	T	C	C	G	G	G	T	G	A	-	C	A	T	C	G	A	G	T	T	C	G	A	G	T	C	C	T	C	C	C	G	C	C	A										
N	GTT <i>Halobacterium sp.</i>	G	C	C	G	C	A	T	A	G	C	T	C	A	G	T	T	-	-	-	G	G	T	-	-	A	G	A	G	C	A	C	G	T	G	T	T	G	T	T	A	A	C	C	A	C	A	G	T	G	T	C	C	A	G	G	T	T	C	G	A	G	C	C	T	G	T	G	G	C	G	C	C	A												



Εικόνα 51: (Α) Συγκριτική ομοπαράθεση αλληλουχιών των γονιδίων των μορίων $tRNA^{Asn}$ και $tRNA^{Asp}$ από αρχαία που χρησιμοποιούν την $tRNA$ -εξαρτώμενη τρανσαμιδωση για τη σύνθεση Asn - $tRNA^{Asn}$. Οι συντηρημένες διαφορές μεταξύ των δύο μορίων (πράσινες-κόκκινες στήλες) εντοπίζονται στο ζεύγος βάσεων 12-23 του βραχίονα D (U12-A23 στο $tRNA^{Asn}$, G12-C23 στο $tRNA^{Asp}$), στο μέγεθος και την αλληλουχία της μεταβλητής θηλιάς (G46, U47 στο $tRNA^{Asn}$, A46, Δ47 στο $tRNA^{Asp}$) και στο αντικωδικόνιο (GUU στο $tRNA^{Asn}$, GUC στο $tRNA^{Asp}$). (Β) Η δευτεροταγής δομή της συναινετικής (consensus) αλληλουχίας από δέκα μόρια $tRNA^{Asp}$ και $tRNA^{Asn}$ από αρχαία. Οι γκρι κύκλοι αντιστοιχούν σε νουκλεοτίδια συντηρημένα σε όλα τα μόρια $tRNA$. Τα νουκλεοτίδια με γκρι χαρακτήρες είναι συντηρημένα και στα δύο μόρια $tRNA^{Asp}$ και $tRNA^{Asn}$. Τα νουκλεοτίδια στα κόκκινα πλαίσια αντιστοιχούν στις συντηρημένες διαφορές μεταξύ των δύο μορίων.

Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η AdT των αρχαίων μπορεί να αναγνωρίσει τόσο το βακτηριακό αμινοακυλιωμένο $tRNA^{Asn}$ όσο και το $tRNA^{Asp}$. Ωστόσο, καθώς όλα τα μόρια $tRNA^{Asn}$ των αρχαίων φέρουν το ζεύγος βάσεων G1-C72 που έχει δείχθει ότι αποτρέπει την τρανσαμιδωση από τη βακτηριακή AdT, μπορεί να υποθεθεί ότι τα αμινοακυλιωμένα $tRNA^{Asn}$ των αρχαίων δεν αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα για τη βακτηριακή AdT.

Για να επιβεβαιωθεί η αρχική υπόθεση, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές τρανσαμιδωσης με ετερόλογα ένζυμα και υποστρώματα από διαφορετικούς οργανισμούς. Το μόριο $tRNA^{Asn}$ του αρχαίου *Methanosarcina barkeri* κακοφορτίστηκε από την AspRS2 με χαμηλή εξειδίκευση του *Thermus thermophilus* και το εστεροποιημένο Asp τρανσαμιδώθηκε από την AdT του *Methanosarcina barkeri* (**Εικόνα 52A**). Ωστόσο, όπως αναμενόταν, η AdT του *Neisseria meningitidis* δεν μπορεί να τρανσαμιδώσει το Asp που είναι εστεροποιημένο στο $tRNA^{Asn}$ των αρχαίων (**Εικόνα 52A**), ενώ η AdT από το *Methanosarcina barkeri* τρανσαμιδώνει τόσο το Asp- $tRNA^{Asn}$ όσο και το Asp- $tRNA^{Asp}$ του *Neisseria meningitidis* (**Εικόνα 52B, Γ**). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η AdT των αρχαίων δε μπορεί να διακρίνει το βακτηριακό υπόστρωμα καθώς τρανσαμιδώνει και το ορθώς αμινοακυλιωμένο Asp- $tRNA^{Asp}$, ενώ η AdT των βακτηρίων δεν αλληλεπιδρά καθόλου με το υπόστρωμα των αρχαίων. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι τα στοιχεία του μορίου $tRNA$ που καθορίζουν τη μετατροπή του εστεροποιημένου Asp σε Asn διαφέρουν μεταξύ των συστημάτων των βακτηρίων και των αρχαίων. Επίσης, από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι το νουκλεοτίδιο στη θέση 36, C στο μόριο $tRNA^{Asp}$ και U στο μόριο $tRNA^{Asn}$, δεν αποτελούν στοιχείο ταυτότητας της τρανσαμιδωσης στο σύστημα των αρχαίων.



Εικόνα 52: Προσδιορισμός των στοιχείων ταυτότητας του $tRNA^{Asn}$ για την τρανσαμιδωση από την AdT των αρχαίων με ετερόλογα ένζυμα και υποστρώματα από βακτήρια, αρχαία και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. (A) Το αμινοακυλιωμένο μόριο $tRNA^{Asn}$ του *M. barkeri* τρανσαμιδώνεται μόνο από την ομόλογη αμιδοτρανσφεράση και όχι από τη βακτηριακή AdT καθώς δε φέρει το κύριο στοιχείο ταυτότητας U1-A72. (B) Το μόριο Asp- $tRNA^{Asn}$ του *N. meningitidis* τρανσαμιδώνεται τόσο από την ομόλογη AdT όσο και από την AdT των αρχαίων καθώς φέρει όλα τα εν δυνάμει στοιχεία ταυτότητας για την τρανσαμιδωση από το ένζυμο αυτό (U12-A23, U36, G46, U47). (Γ) Το αμινοακυλιωμένο μόριο $tRNA^{Asp}$ του *N. meningitidis* αποτελεί υπόστρωμα για την AdT των αρχαίων και φέρει τα εν δυνάμει στοιχεία αναγνώρισης για το ένζυμο αυτό, εκτός από το αντικωδικόνιο. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι το αντικωδικόνιο δεν εμπλέκεται στην αναγνώριση των υποστρωμάτων από την αμιδοτρανσφεράση των αρχαίων, όπως ισχύει και για τη βακτηριακή AdT. (Δ) Το μόριο $tRNA^{Asp}$ του *S. cerevisiae* που φέρει μόνο το στοιχείο U12-A23, δεν αποτελεί υπόστρωμα για την AdT των αρχαίων, γεγονός που υποδεικνύει ότι το ζεύγος αυτό του βραχίονα D δεν εμπλέκεται στην αναγνώριση του μορίου $tRNA$ από την AdT. (E) Το μόριο $tRNA^{Phe \rightarrow Asp}$, στο οποίο έχουν ενσωματωθεί τα στοιχεία ταυτότητας για την αμινοακυλίωση από την AspRS, φέρει τα δύο εν δυνάμει στοιχεία ταυτότητας για τρανσαμιδωση από την AdT των αρχαίων. Δεδομένου ότι το ζεύγος 12-23 του βραχίονα D δε φαίνεται να καθορίζει την αναγνώριση του μορίου και ότι το αμινοακυλιωμένο $tRNA^{Phe \rightarrow Asp}$ τρανσαμιδώνεται προκύπτει ότι το μέγεθος ή / και η αλληλουχία της μεταβλητής θηλιάς φαίνεται να αποτελεί στοιχείο ταυτότητας για την αναγνώριση του υποστρώματος από την AdT των αρχαίων.

Για να επιβεβαιωθεί ότι τα νουκλεοτίδια G46 και U47 της μεταβλητής θηλιάς του μορίου tRNA^{Asn} εμπλέκονται στην τρoσαμίδωση στα αρχαία, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές τρoσαμίδωσης με διασταύρωση της AdT των αρχαίων και των μετάγραφων των μορίων tRNA^{Asp} και tRNA^{Phe} (tRNA^{Phe→Asp}) του *Saccharomyces cerevisiae*, που εμπεριέχουν τα στοιχεία ταυτότητας για την αμινοακυλίωσή τους από την AspRS του οργανισμού αυτού. Και τα δύο αυτά μόρια tRNA περιέχουν το ζεύγος βάσεων U12–A23 στο βραχίονα D, αλλά ενώ το μόριο tRNA^{Asp} φέρει τη μεταβλητή θηλιά του μορίου tRNA^{Asp} των αρχαίων (απουσία της θέσης 47 και A στη θέση 46), η μεταβλητή θηλιά του μορίου tRNA^{Phe→Asp} προσομοιάζει με αυτή του μορίου tRNA^{Asn} των αρχαίων (G46, U47). Επομένως, τα μόρια αυτά tRNA είναι κατάλληλα υποστρώματα για την ανάλυση του ρόλου της μεταβλητής θηλιάς στην τρoσαμίδωση από την AdT των αρχαίων. Σύμφωνα με την ανάλυση των εστεροποιημένων αμινοξέων μετά την αντίδραση τρoσαμίδωσης, η AdT των αρχαίων τρoσαμίδώνει το Asp-tRNA^{Phe→Asp} (**Εικόνα 52E**) αλλά όχι το Asp-tRNA^{Asp} του *Saccharomyces cerevisiae* (**Εικόνα 52Δ**), επιβεβαιώνοντας ότι η τρoσαμίδωση από την AdT των αρχαίων προάγεται από τα νουκλεοτίδια G46 και U47 της μεταβλητής θηλιάς. Αυτό είναι σύμφωνο με την ανεπάρκεια της AdT των αρχαίων να τρoσαμίδώσει το Asp-tRNA^{Asp} του *Saccharomyces cerevisiae* που φέρει το ζεύγος βάσεων U12–A23. Για το λόγο αυτό, αυτό το ζεύγος βάσεων, όπως και το U36, δεν μπορούν να θεωρηθούν και δεν αποτελούν καθοριστικά στοιχεία της τρoσαμίδωσης από τις αμιδοτρoσφεράσες των αρχαίων. Ωστόσο, δεν είναι βέβαιο αν η ταυτότητα καθορίζεται αποκλειστικά από το μήκος της μεταβλητής θηλιάς ή από τη φύση των νουκλεοτιδίων στις θέσεις 46 και 47. Τα νουκλεοτίδια στις συγκεκριμένες θέσεις του μορίου tRNA παίζουν σημαντικό ρόλο στην τριτοταγή διαμόρφωση και στη σταθερότητα του μορίου (Rogers & Soll, 1993). Ως εκ τούτου, η διάκριση από την AdT των αρχαίων μεταξύ των Asp-tRNA^{Asn} και Asp-tRNA^{Asp} θα μπορούσε να βασίζεται σε συγκεκριμένη τριτοταγή διαμόρφωση των μορίων αυτών.

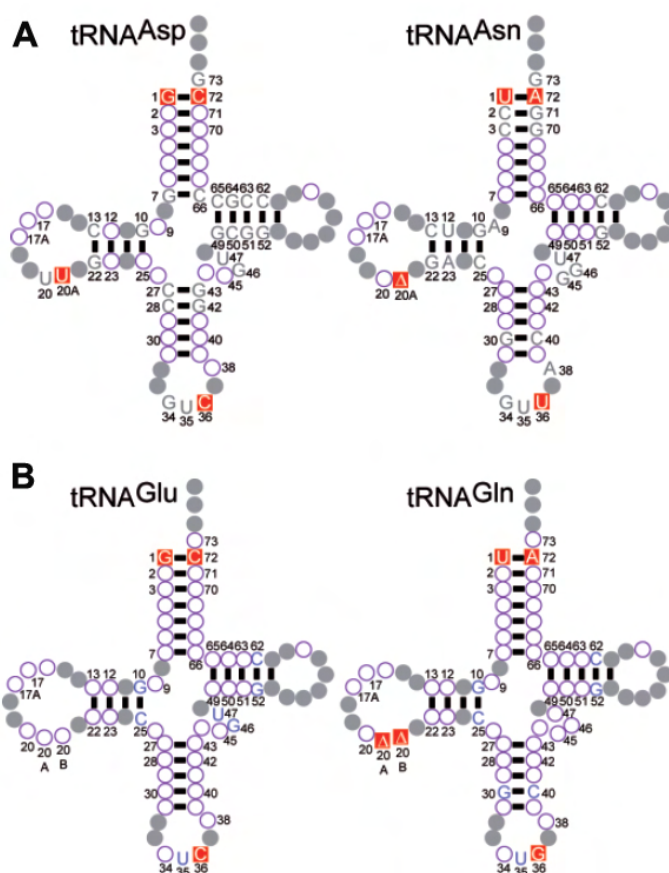
3.1.5 Στοιχεία ταυτότητας για την τρoσαμίδωση του Glu-tRNA^{Gln} από τη βακτηριακή GatCAB

Ανεξάρτητα από τη δραστικότητα που παρουσιάζουν *in vivo* (Asp- ή/και Glu-AdT), όλες οι βακτηριακές AdTs που έχουν μελετηθεί έως σήμερα παρουσιάζουν διπλή εξειδίκευση *in vitro* και συνθέτουν τόσο Asn-tRNA^{Asn} όσο και Gln-tRNA^{Gln}. Ένα από τα ερωτήματα που προέκυψαν από τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της AdT είναι αν τα μόρια tRNA^{Asn} και tRNA^{Gln} φέρουν τα ίδια ή παρόμοια στοιχεία αναγνώρισης ή αν οι AdTs αναγνωρίζουν διαφορετικά στοιχεία στα δύο είδη μορίων tRNA. Για τον εντοπισμό των στοιχείων εκείνων του μορίου tRNA^{Gln} που επάγουν την τρoσαμίδωση του εστεροποιημένου Glu και των στοιχείων του μορίου tRNA^{Glu} που αποτρέπουν την τρoσαμίδωση, ακολουθήθηκε παρόμοια προσέγγιση. Ομοπαράτέθηκαν οι αλληλουχίες των μορίων tRNA^{Gln} και tRNA^{Glu} από βακτήρια που χρησιμοποιούν το

μονοπάτι της τρανσαμίδωσης για να συνθέσουν Gln-tRNA^{Gln} για να εντοπιστούν οι συντηρημένες διαφορές μεταξύ των δύο μορίων (**Εικόνα 53**).

Η συγκριτική ομοπαράθεση δείχνει ότι τα στοιχεία που είναι συντηρημένα στο tRNA^{Gln} αλλά διαφέρουν στο tRNA^{Glu} είναι το πρώτο ζεύγος βάσεων του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος, ένα U1–A72 απαντάται στο tRNA^{Gln}, το οποίο αντικαθίσταται στο tRNA^{Glu} από το G1–C72. Επιπρόσθετα, το tRNA^{Glu} φέρει ένα επιπλέον νουκλεοτίδιο στη θέση 20A ή 20B της θηλιάς D σε σχέση με το tRNA^{Gln}. Τέλος, τα μόρια tRNA^{Gln} και tRNA^{Glu} διαφέρουν στο τρίτο νουκλεοτίδιο του αντικωδικονίου, που είναι G36 στο tRNA^{Gln} και C36 στο tRNA^{Glu}.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκριτικής ομοπαράθεσης τα στοιχεία που είναι συντηρημένα στο tRNA^{Gln}, αλλά διαφέρουν στο tRNA^{Glu}, είναι εκείνα που στο tRNA^{Asn} επάγουν τη μετατροπή του Asp σε Asn (πρώτο ζεύγος βάσεων του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος U1-A72) (**Εικόνα 54**). Αντίστοιχα, το μόριο tRNA^{Glu} φέρει συντηρημένα τα στοιχεία εκείνα που απαντώνται και στο tRNA^{Asp} και αποτρέπουν την αλληλεπίδρασή του με την αμιδοτρανσφεράση (επιπλέον νουκλεοτίδιο στη θέση 20A ή B της θηλιάς D). Παρόμοια με τα tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp}, τα tRNA^{Gln} και tRNA^{Glu} διαφέρουν στο τρίτο νουκλεοτίδιο του αντικωδικονίου. Ωστόσο, καθώς το νουκλεοτίδιο αυτό δεν συνεισφέρει σημαντικά στην τρoσαμίδωση του Asp-tRNA^{Asn}, θεωρείται ότι οι AdTs δε διαχωρίζουν το tRNA^{Gln} από το tRNA^{Glu} βασιζόμενες στο αντικωδικόνιο.



Εικόνα 54: Δευτεροταγής δομή της συναινετικής αλληλουχίας που προκύπτει από την ομοπαράθεση (A) 49 αλληλουχιών γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} από βακτήρια που χρησιμοποιούν τη δραστικότητα Asp-AdT της GatCAB και (B) 26 αλληλουχιών γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια tRNA^{Glu} και tRNA^{Gln} από βακτήρια που χρησιμοποιούν τη δραστικότητα Glu-AdT της GatCAB. Τα δύο μόρια παρουσιάζουν τις ίδιες συντηρημένες διαφορές με αυτές των μορίων tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn}. Το tRNA^{Gln} φέρει το στοιχείο ταυτότητας U1-A72 για την τρoσαμίδωση από τη βακτηριακή AdT, ενώ το tRNA^{Glu} έχει επιπρόσθετα νουκλεοτίδια στις θέσεις 20A και B της θηλιάς D, το οποίο δρα ως αντι-καθοριστικό στοιχείο. Οι γκρι κύκλοι αντιστοιχούν σε νουκλεοτίδια συντηρημένα σε όλα τα μόρια tRNA. Τα νουκλεοτίδια με γκρι χαρακτήρες είναι συντηρημένα και στα δύο μόρια (tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} ή tRNA^{Glu} και tRNA^{Gln}). Τα νουκλεοτίδια στα κόκκινα πλαίσια αντιστοιχούν στις συντηρημένες διαφορές μεταξύ των δύο μορίων.

Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι τα ίδια δομικά στοιχεία εμπλέκονται στην αναγνώριση των Asp-tRNA^{Asn} και Glu-tRNA^{Gln} από τις βακτηριακές AdTs (Bailly *et al.*, 2006). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι στα βακτήρια που χρησιμοποιούν και τις δύο δραστηριότητες των AdTs, τα tRNA^{Asn} και tRNA^{Gln} φέρουν ένα U1–A72 ζεύγος βάσεων ενώ τα tRNA^{Asp} και tRNA^{Glu} ένα G1–C72 και μια επέκταση κατά ένα νουκλεοτίδιο στη θηλιά D (**Πίνακας 17**). Επιπρόσθετα, στα βακτήρια που *in vivo* μόνο η μια από τις δύο δραστηριότητες της αμιδοτρανσφεράσης είναι παρούσα (Asp- ή Glu-AdT), το μόριο tRNA που επάγει κάθε φορά την τρανσαμίδωση πάντα φέρει τα στοιχεία ταυτότητας για την αναγνώριση από το ένζυμο. Τέλος, στα βακτήρια που στερούνται της AdT, τα tRNA^{Asn} και tRNA^{Gln} αμινοακυλιώνονται άμεσα από τη συγγενή aaRS και δε φέρουν τα συγκεκριμένα στοιχεία ταυτότητας.

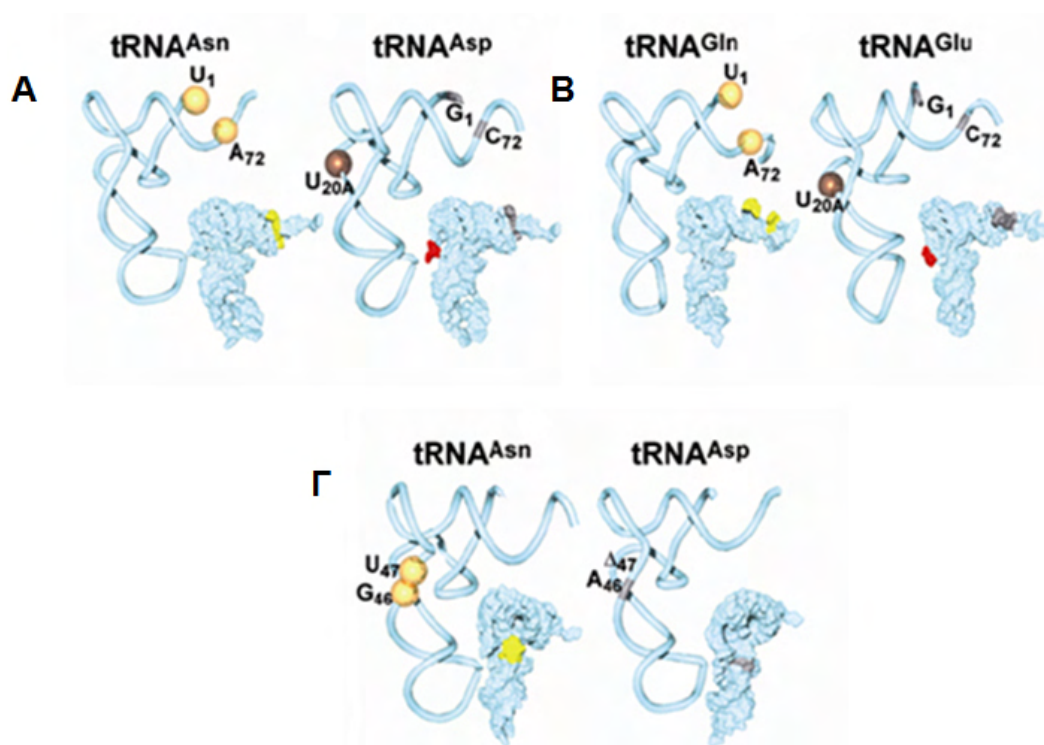
Η πειραματική επιβεβαίωση της πρόβλεψης για τα στοιχεία ταυτότητας των βακτηριακών tRNA^{Gln} που σχετίζονται με την αναγνώρισή τους από την AdT είναι δύσκολο να επιτευχθεί. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα μη τροποποιημένα tRNA^{Glu}, που προκύπτουν από *in vitro* μεταγραφή, έχει δειχθεί ότι δεν είναι κατάλληλα υποστρώματα για τις βακτηριακές GluRSs που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα είτε παρουσιάζουν υψηλή είτε χαμηλή εξειδίκευση. Στην περίπτωση της GluRS του *Escherichia coli*, έχει δειχθεί ότι το ένζυμο παρουσιάζει κατά 100 φορές μειωμένη καταλυτική δραστηριότητα για το μετάγραφο του συγγενούς tRNA^{Glu} σε σχέση με το tRNA^{Glu} που υπερεκφράζεται *in vivo* (Kern & Lapointe, 1979, Sylvers *et al.*, 1993). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι τα tRNA μετάγραφα δεν αποτελούν κατάλληλα υποστρώματα για τη GluRS, καθώς φαίνεται να απαιτούνται μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις για την αναγνώριση των υποστρωμάτων tRNA από τη συγκεκριμένη συνθετάση.

Πίνακας 17: Αλληλουχία του πρώτου ζεύγους βάσεων και της θηλιάς D των μορίων tRNA^{Asp}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Glu} και tRNA^{Gln} από βακτήρια που χρησιμοποιούν το tRNA-εξαρτώμενο μονοπάτι τρανσαμίδωσης. Το κύριο στοιχείο ταυτότητας U1-A72 είναι συντηρημένο στα μόρια tRNA^{Asn} και tRNA^{Gln} στα βακτήρια που χρησιμοποιούν την αντίστοιχη δραστηριότητα Asp-AdT ή Glu-AdT της GatCAB. Η θηλιά D των tRNA^{Asp} και tRNA^{Glu} φέρει στις περισσότερες περιπτώσεις επιπλέον νουκλεοτίδια στις θέσεις 20A και B.

Οργανισμός	tRNA ^{Asn}		tRNA ^{Asp}		tRNA ^{Gln}		tRNA ^{Glu}		AdT	
	1-72	Θηλιά D	1-72	Θηλιά D	1-72	Θηλιά D	1-72	Θηλιά D	Asp	Glu
<i>C. trachomatis</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	11(CC20AB)	+	+
<i>M. tuberculosis</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	8	G-C	9(CC20AB)	+	+
<i>H. pylori</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CC20AB)	+	+
<i>C. jejuni</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>C. crescentus</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>T. maritima</i>	U-A	8	G-C	10(U20A)	U-A	7	G-C	8(C20A)	+	+
<i>A. aeolicus</i>	U-A	8	G-C	10(C20A)	U-A	8	G-C	11(CU20AB)	+	+
<i>C. acetobutylicum</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>R. prowazekii</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>R. melittensis</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>M. loti</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>A. tumefaciens</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>S. melibioti</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>C. tepidum</i>	U-A	7	G-C	10(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>C. glutamicum</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	8	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>T. tenacoenzensis</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>B. longum</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>B. suis</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>T. whippelii</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>C. burnetti</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>S. coelicolor</i>	U-A	8	G-C	10(G20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>M. meningitidis</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	8	G-C	8(U20A)	+	+
<i>D. radiodurans</i>	U-A	7	G-C	8(U20A)	A-U	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	A-U	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>C. perfringens</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>R. solanacearum</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	A-U	9	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>B. japonicum</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>Pirellula sp.</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	8	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>N. europaea</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>P. syringae</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	A-U	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>B. subtilis</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>S. aureus</i>	U-A	7	G-C	8(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>U. urealyticum</i>	G-C	7	G-C	8(U20A)	U-A	7	G-C	9(UG20AB)	+	+
<i>B. burgdorferi</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>M. genitalium</i>	G-C	7	G-C	8(U20A)	U-A	7	G-C	9(UU20AB)	+	+
<i>T. pallidum</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>Synechocystis sp.</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	U-A	8	G-C	8(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>S. pyogenes</i>	U-A	9	G-C	8(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>Nostoc sp.</i>	C-U	7	G-C	9(U20A)	U-A	10	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>M. pulmonis</i>	G-C	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>F. nucleatum</i>	G-C	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>S. agalactiae</i>	U-A	9	G-C	8(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>T. elongates</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>L. interrogans</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>O. ihayensis</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>S. mutans</i>	U-A	9	G-C	8(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>B. halodurans</i>	U-A	7	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>C. tetani</i>	U-A	7	G-C	10(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>E. faecalis</i>	U-A	9	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>L. plantarum</i>	G-C	8	G-C	10(U20A)	U-A	7	G-C	9(UU20AB)	+	+
<i>B. anthracis</i>	U-A	7	G-C	8(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+
<i>B. aphidicola</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	8	G-C	8(U20A)	+	+
<i>V. cholerae</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	A-U	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>E. coli</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>H. influenza</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>P. multocida</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>Y. pestis</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>S. typhimurium</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CC20AB)	+	+
<i>X. campestris</i>	G-C	9	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>X. axonopodis</i>	G-C	9	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>S. oneidensis</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>S. flexneri</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CC20AB)	+	+
<i>X. fastidiosa</i>	G-C	9	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CU20AB)	+	+
<i>S. enterica</i>	U-A	8	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	9(CC20AB)	+	+
<i>B. thetaiotaomicron</i>	U-A	9	G-C	9(U20A)	U-A	7	G-C	8(U20A)	+	+

Από τον προσδιορισμό των στοιχείων ταυτότητας που καθορίζουν την εξειδικευμένη αναγνώριση των κακοφορισμένων μορίων tRNA από τις GatCAB αμιδοτρανοφεράσες των βακτηρίων και των αρχαίων προκύπτει ότι τα μόρια tRNA αναγνωρίζονται με τρόπο διαφορετικό στα δύο βασίλεια. Στα βακτήρια το πρώτο ζεύγος βάσεων και το μέγεθος της θηλιάς D καθορίζουν ουσιαστικά την αναγνώριση τόσο του tRNA^{Asn} όσο και του tRNA^{Gln} ενώ στα αρχαία σημαντικό ρόλο παίζει το μέγεθος και η αλληλουχία της μεταβλητής θηλιάς. Ο εντοπισμός των στοιχείων ταυτότητας στην

τριτοταγή διαμόρφωση των αντίστοιχων μορίων tRNA οδηγεί στη παρατήρηση ότι πέραν των συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων, διαφέρει και ο τρόπος προσέγγισης των υποστρωμάτων μεταξύ των δύο GatCAB αμιδοτρανσφερασών των βακτηρίων και των αρχαίων. Οι θέσεις κλειδιά για την αναγνώριση των βακτηριακών υποστρωμάτων εντοπίζονται στη μικρή αύλακα του μορίου tRNA οπότε η βακτηριακή GatCAB φαίνεται να προσεγγίζει το υπόστρωμά της με τρόπο παρόμοιο με αυτό των aaRSs κλάσης I (**Εικόνα 55**). Αντίθετα η GatCAB των αρχαίων αναγνωρίζει στοιχεία του μορίου tRNA που εντοπίζονται στη μεγάλη αύλακα του μορίου, ένας τρόπος προσέγγισης που παραπέμπει στις συνθετάσες κλάσης II.



Εικόνα 55: Τριτοταγής δομή των μορίων (A) tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp}, (B) tRNA^{Gln} και tRNA^{Glu} από βακτήρια που χρησιμοποιούν τη δραστικότητα Asp- ή/και Glu-AdT της GatCAB και (Γ) tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} από αρχαία που χρησιμοποιούν τη δραστικότητα Asp-AdT της GatCAB. Με κίτρινο χρώμα σημαίνονται τα κύρια στοιχεία ταυτότητας των μορίων tRNA^{Asn} και tRNA^{Gln} για την τρoνσαμίδωση, ενώ με καφέ τα αντι-καθοριστικά στοιχεία των μορίων tRNA^{Asp} και tRNA^{Glu}. Ο εντοπισμός των στοιχείων στην τριτοταγή δομή των μορίων tRNA υποδεικνύει τη διαφορετική προσέγγιση των υποστρωμάτων από τις GatCAB των βακτηρίων και των αρχαίων.

3.2 Διερεύνηση της tRNA-εξαρτώμενης σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος στο *Staphylococcus aureus*

Τα ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες πέραν της πρωτεϊνοσύνθεσης. Ένα τέτοιο σύστημα αποτελεί και η tRNA εξαρτώμενη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Αναλυτικότερα, σε ορισμένα κυρίως κατά Gram θετικά βακτήρια η σύνδεση μεταξύ των μονομερών της

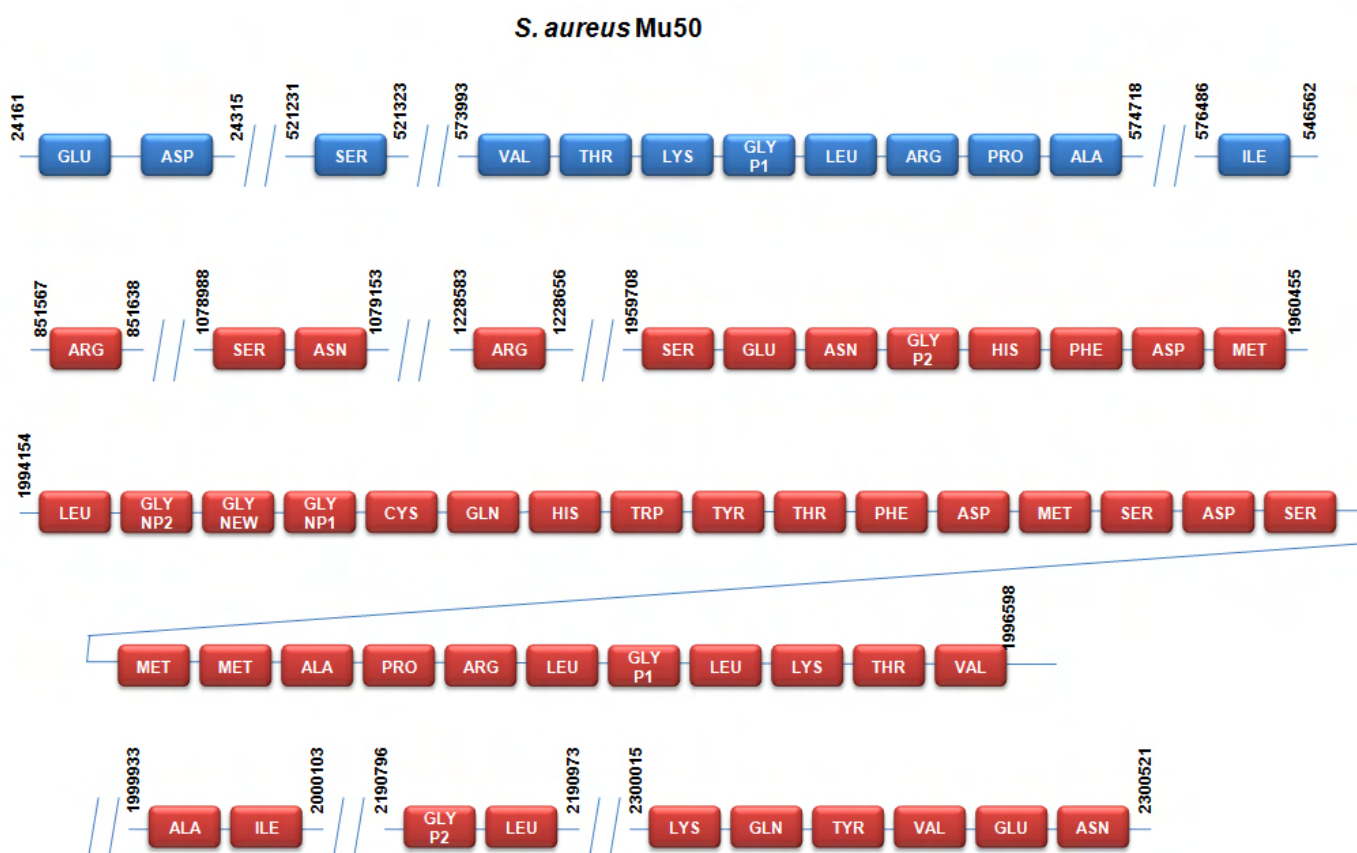
πεπτιδογλυκάνης πραγματοποιείται μέσω πεπτιδικών γεφυρών. Η σύνθεση των γεφυρών διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης συντίθεται μέσω ενός ασύνηθους συστήματος αμινοακυλίωσης μορίων tRNA. Στο *Staphylococcus aureus* η γέφυρα διασύνδεσης είναι ένα πεπτίδιο που αποτελείται από πέντε κατάλοιπα γλυκίνης. Η ενσωμάτωση των κατάλοιπων γλυκίνης είναι γνωστό ότι καταλύεται από τους παράγοντες FemXAB, που χρησιμοποιούν ως δότες γλυκίνης αμινοακυλιωμένα μόρια tRNA (Schneider et al., 2004). Ωστόσο, μέχρι πρόσφατα τίποτα δεν ήταν γνωστό για τον αριθμό και τα χαρακτηριστικά των μορίων tRNA^{Gly} που εμπλέκονται στην κυτταρική αυτή διεργασία.

3.2.1 Ταυτοποίηση ενός πιθανού ψευδογονιδίου που κωδικοποιεί ένα ασύνηθες μόριο tRNA^{Gly(UCC)}

Σε μια προσπάθεια να ανιχνευτούν γονίδια που κωδικοποιούν μόρια tRNA^{Gly} και δεν έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, ελέχθησαν όλες οι διαθέσιμες γονιδιωματικές βάσεις δεδομένων που περιλαμβάνουν πλήρεις γονιδιωματικές αλληλουχίες από 8 διαφορετικά στελέχη του *Staphylococcus aureus*. Η ανάλυση με το πρόγραμμα tRNAScan-SE ταυτοποίησε τέσσερα γονίδια που ήταν κατατεθειμένα ως γονίδια που κωδικοποιούν μόρια tRNA^{Gly} και τα προϊόντα τους φέρουν τα απαραίτητα στοιχεία ταυτότητας για την αναγνώριση τους από τη GlyRS. Επιπρόσθετα ταυτοποιήθηκε και ένα πέμπτο γονίδιο που κωδικοποιεί tRNA^{Gly}, το οποίο σε κάποιες βάσεις δεδομένων ήταν κατατεθειμένο ως ψευδογονίδιο. Μόνο δύο από τα γονίδια αυτά (με τις κωδικές ονομασίες P1/GCC και P2/UCC) φαίνεται να κωδικοποιούν ισοδεκτικά μόρια tRNA^{Gly} με υψηλό cove score (86.82 και 75.68, αντίστοιχα), αρκετά υψηλό ώστε να θεωρηθούν μόρια tRNA. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα γονίδια αυτά βρίσκονται σε δύο αντίγραφα το καθένα. Τα υπόλοιπα τρία γονίδια (με τις κωδικές ονομασίες NP1/UCC, NP2/UCC και NEW/UCC) κωδικοποιούν μόρια tRNA^{Gly} με σημαντικά χαμηλότερο cove score (41.66, 33.70 και 27.77, αντίστοιχα). Το πιθανό ψευδογονίδιο, όταν αναλύθηκε με το πρόγραμμα tRNAScan-SE με τις προεπιλεγμένους περιορισμούς, παρουσίασε μηδενικό ή πολύ χαμηλό cove score (NEW/UCC), ανάλογα με τις παραμέτρους.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ισοδεκτικά tRNA^{Gly} μόρια εντοπίζονται σε τμήματα του χρωμοσώματος, όπου είναι οργανωμένα γονίδια που κωδικοποιούν μόρια tRNA (tRNA gene clusters). Παραδείγματος χάριν, στο γονιδίωμα του στελέχους *Staphylococcus aureus* Mu50 τα γονίδια αυτά εντοπίζονται στις εξής θέσεις: P1/GCC (αντίγραφο 1) σε μια ομάδα 8 γονιδίων tRNA (θετικός κλώνος, θέσεις 573993-574718), P1/GCC (αντίγραφο 2) και NP1/UCC – NP2/UCC σε μια ομάδα 27 γονιδίων tRNA (αρνητικός κλώνος, θέσεις 1994154-1996598), P2/UCC (αντίγραφο 1) σε μια ομάδα 8 γονιδίων tRNA (αρνητικός κλώνος, θέσεις 1959708-1960455), P2/UCC (αντίγραφο 2) βρίσκεται μαζί με το γονίδιο ενός tRNA^{Leu} (αρνητικός κλώνος, θέσεις 2190796-2190973). Το ψευδογονίδιο (NEW/UCC) σε αυτό το στέλεχος εντοπίζεται μεταξύ των γονιδίων των NP1/UCC και NP2/UCC (θέσεις 1994364-1994438) (**Εικόνα 56**). Αυτή η οργάνωση των γονιδίων των μορίων tRNA στο *Staphylococcus aureus* έχει περιγραφεί

στη βιβλιογραφία και αξίζει να σημειωθεί ότι το πιθανό ψευδογονίδιο είχε βρεθεί ανάμεσα σε γονίδια γνωστών μορίων tRNA, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Green & Vold, 1993).

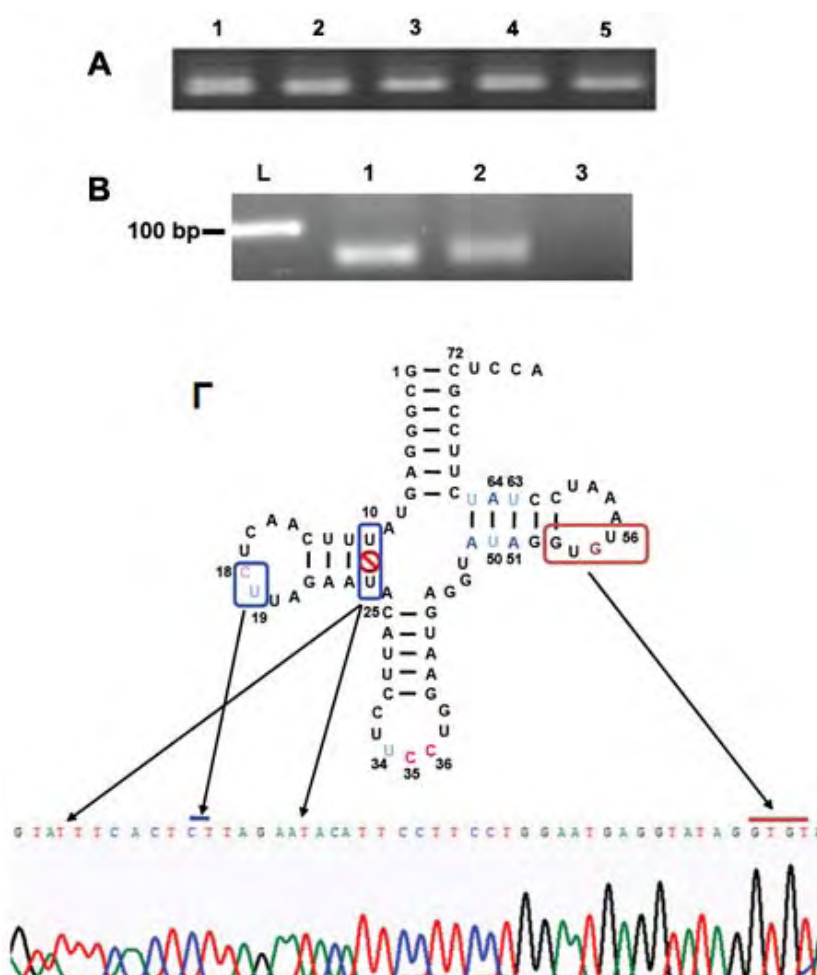


Εικόνα 56: Οργάνωση των γονιδίων των μορίων tRNA του *S. aureus* Mu50. Τα περισσότερα γονίδια των μορίων tRNA οργανώνονται σε ομάδες (gene clusters) στο γονιδίωμα του *S. aureus*. Τα γονίδια των ισοδεκτικών $tRNA^{Gly}$ P1/GCC και P2/UCC απαντώνται σε δύο αντίγραφα σε διαφορετικές ομάδες γονιδίων. Τα γονίδια των NP1/UCC, NP2/UCC και NEW/UCC είναι ομαδοποιημένα μαζί με άλλα 24 γονίδια μορίων tRNA με το γονίδιο του NEW/UCC $tRNA^{Gly}$ να εντοπίζεται μεταξύ των άλλων δύο. Τα μπλε πλαίσια αντιστοιχούν στα γονίδια που εντοπίζονται στο θετικό κλώνο του χρωμοσώματος του *S. aureus* και τα κόκκινα πλαίσια στα γονίδια του αρνητικού κλώνου.

Η πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών των ισοδεκτικών μορίων $tRNA^{Gly}$ από τον *Staphylococcus aureus* με τα ισοδεκτικά μόρια $tRNA^{Gly}$ του *Staphylococcus epidermidis*, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως μη πρωτεϊνογενετικά, υποδεικνύει ότι τα NP1 $tRNA^{Gly(UCC)}$, NP2 $tRNA^{Gly(UCC)}$ και NEW $tRNA^{Gly(UCC)}$ είναι πολύ πιθανό να μη συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση (**Εικόνα 57B**). Τα τρία ασυνήθη δομικά χαρακτηριστικά του NEW $tRNA^{Gly(UCC)}$ εντοπίζονται στην αρχή του βραχίονα D (τρία ζεύγη βάσεων αντί για 4 και παρουσία των μη ζευγαρωμένων U10 και U25), στη θηλιά D (UUU ή UCU αντί για CGG ή GGG) και στη θηλιά T (GUGU αντί του GTψC) (**Εικόνα 57A**). Ωστόσο, η σύγκριση των δευτεροταγών δομών των πέντε ισοδεκτικών

μορίων tRNA^{Gly} υποδεικνύει ότι τα μόρια αυτά φέρουν τα απαραίτητα στοιχεία ταυτότητας για την αναγνώριση τους από της GlyRS, τα οποία είναι κυρίως τα ζεύγη βάσεων G1-C72 και C2-G71 του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος, τα νουκλεοτίδια C35 και C36 του αντικωδικονίου και η βάση διαλογέας U73 (Nameki et al., 1997). Συγκρίνοντας το ασύνηθες μόριο tRNA με τα μη πρωτεϊνογενετικά ισοδεκτικά tRNA^{Gly} του *Staphylococcus epidermidis* προκύπτει ότι οι αλληλουχίες τους παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα. Οι ελάχιστες διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των δύο ειδών δεν είναι συντηρημένες και εντοπίζονται σε θέσεις που δεν επηρεάζουν την αναγνώριση από τη GlyRS ούτε προκαλούν διαφορετική δεσμευτική ικανότητα για τον παράγοντα EF-Tu. Ωστόσο, τα μόρια tRNA που συμμετέχουν στη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να φέρουν διαφορετικά ιδιαίτερα χαρακτηριστικά όπως έχει αναφερθεί πρόσφατα για το tRNA^{Ala} του *Weissella viridescens* (Villet et al., 2007).

Η έκφραση όλων των γονιδίων των tRNA μελετήθηκε μετά από απομόνωση ολικού RNA από καλλιέργειες του *Staphylococcus aureus* που είχαν αναπτυχθεί μέχρι το μέσο της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, για να διασφαλιστεί ο μέγιστος ρυθμός πρωτεϊνοσύνθεσης και ακολούθησε ανάλυση με RT-PCR. Όλα τα γνωστά ισοδεκτικά μόρια tRNA^{Gly} ανιχνεύθηκαν με αλληλούχηση μετά την ενίσχυση με PCR των αντίστοιχων γονιδίων. Η ίδια προσέγγιση ακολουθήθηκε και για τη διερεύνηση της έκφρασης του NEWtRNA^{Gly(UCC)} και τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν ότι το μόριο αυτό εκφράζεται σε καλλιέργειες του *Staphylococcus aureus* (**Εικόνα 58A, Γ**). Για να επιβεβαιωθεί η εξειδίκευση του προϊόντος μετά την αντίστροφη μεταγραφή και την ενίσχυση με PCR και να ελεγχθεί το ενδεχόμενο επιμόλυνσης από γενωμικό DNA στα δείγματα, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία με DNάση I και RNάση A πριν την ενίσχυση με την PCR. Στο δείγμα που είχε υποστεί επεξεργασία με την DNάση I, ανιχνεύθηκε με RT-PCR η έκφραση του πιθανού ψευδογονιδίου. Αντίθετα, όταν το ίδιο υπόστρωμα υπέστη κατεργασία με RNάση A και αναλύθηκε με RT-PCR δεν ανιχνεύθηκε η αντίστοιχη ζώνη (**Εικόνα 58B**).



Εικόνα 58: (A) Έλεγχος έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τα 5 ισοδεκτικά μόρια tRNA^{Gly} του *S. aureus* με RT-PCR. 1: P1/GCC, 2:P2/UCC, 3: NP1/UCC, 4: NP2/UCC, 5:NEW/UCC. (B) Έλεγχος έκφρασης του ψευδογονιδίου. L: Μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA (100bp), 1: Προϊόν

της RT-PCR από την ενίσχυση του NEW/UCC χωρίς επιπλέον επεξεργασία, 2: μετά από επεξεργασία με DNάση I, 3: μετά από επεξεργασία με RNάση A. (Γ) Χρωματογράφημα αλληλούχησης του προϊόντος της RT-PCR για τον έλεγχο της έκφρασης του ψευδογονιδίου. Τα βέλη και τα πλαίσια υποδεικνύουν τα δομικά χαρακτηριστικά που απαντώνται στο NEWtRNA^{Gly(UCC)}.

Από τα δεδομένα των αναλύσεων της έκφρασης των γονιδίων των μορίων tRNA^{Gly} του *Staphylococcus aureus*, προκύπτει ότι εκτός από τα τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν μόρια tRNA^{Gly}, τα οποία είχαν περιγραφεί και είχαν κατατεθεί, ένα επιπλέον γονίδιο που κωδικοποιεί και εκφράζει ένα νέο ασύνηθες ισοδεκτικό tRNA^{Gly} υπάρχει σε όλα τα στελέχη του *Staphylococcus aureus* (Giannouli et al., 2008). Αυτή η παρατήρηση ξεκαθαρίζει το θέμα του πόσα ισοδεκτικά μόρια tRNA^{Gly} πραγματικά υπάρχουν στον οργανισμό αυτό και προτείνει ότι το ασύνηθες NEWtRNA^{Gly(UCC)} αντιπροσωπεύει ένα μη χαρακτηρισμένο έως τώρα πέμπτο ισοδεκτικό μόριο.

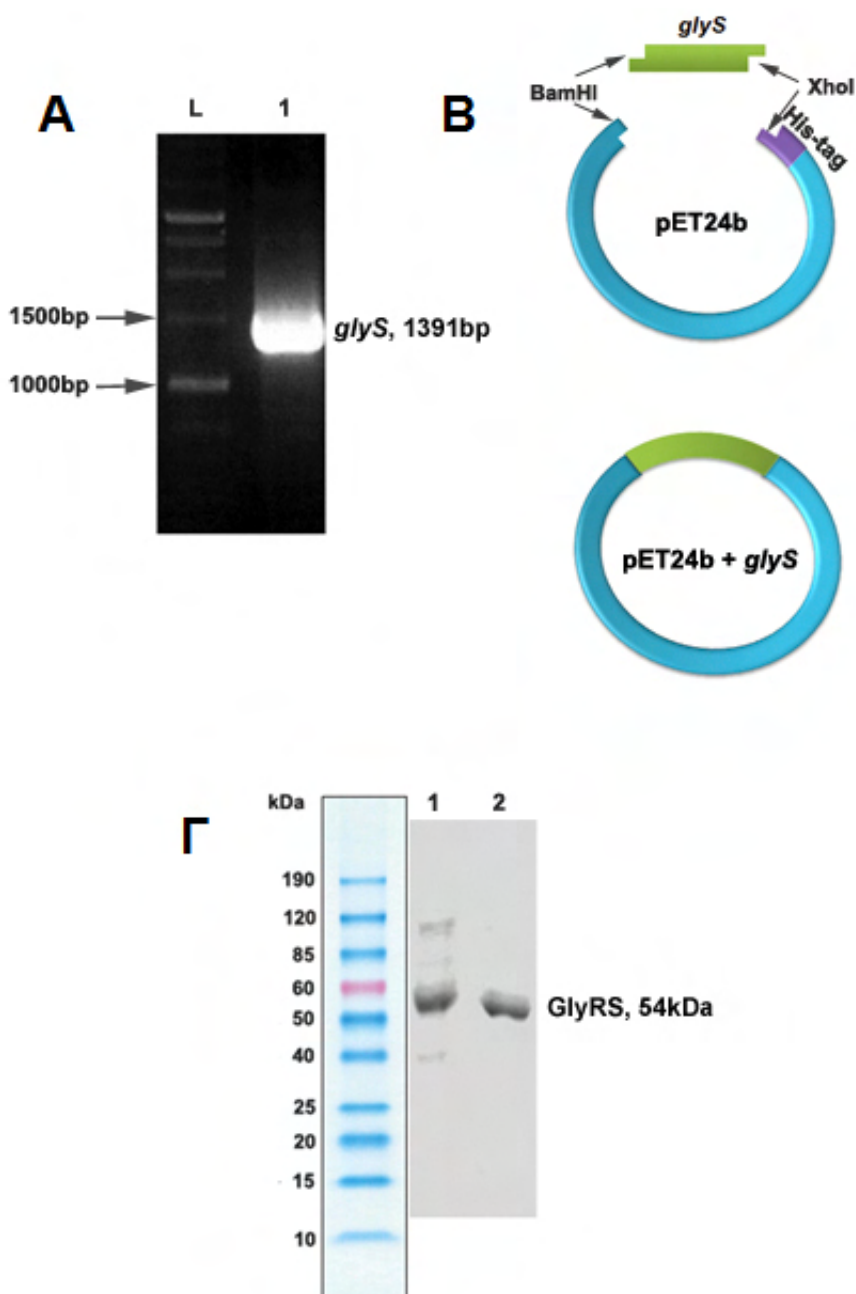
3.2.2 Προετοιμασία παραγόντων για το χαρακτηρισμό των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} του *Staphylococcus aureus*

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που παρουσιάζει το NEWtRNA^{Gly(UCC)} προκάλεσαν το ερώτημα κατά πόσο το μόριο αυτό αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα για αμινοακυλίωση από τη GlyRS. Για το σκοπό αυτό ενισχύθηκε το γονίδιο *glyS* (1391bp) που κωδικοποιεί την GlyRS του *Staphylococcus aureus* (**Εικόνα 60Α**). Για την ενίσχυση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα γενωμικό DNA του *Staphylococcus aureus* και ειδικοί εκκινητές που περιείχαν τις αλληλουχίες αναγνώρισης για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI και XhoI. Ο αντίστροφος εκκινητής δεν περιείχε το κωδικόνιο τερματισμού (**Εικόνα 59**).



Εικόνα 59: Αλληλουχία του γονιδίου *glyS* του *S. aureus* (κόκκινοι χαρακτήρες) και της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης GlyRS (μπλε χαρακτήρες). Στα πλαίσια περιέχονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου με PCR καθώς και οι αλληλουχίες που προστέθηκαν για αναγνώριση από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (πράσινοι χαρακτήρες).

Το ενισχυμένο γονίδιο μετά από έλεγχο της αλληλουχίας του κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης pET24b (**Εικόνα 60B**). Ο φορέας αυτός φέρει στο 3' άκρο του πολυσυνδέτη έξι κωδικόνια, που κωδικοποιούν μια ουρά ιστιδινών τα οποία ενσωματώνεται στο καρβοξυτελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Το γονίδιο υπερεκφράστηκε σε κύτταρα του στελέχους *Escherichia coli* BL21 (DE3) παρουσία 1 mM IPTG στους 30° C. Η ανασυνδυασμένη GlyRS-C-terminal-His₆-tag (54kDa) του *Staphylococcus aureus* που έφερε έξι ιστιδίνες στο καρβοξυτελικό της άκρο απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη Ni-NTA (**Εικόνα 60Γ**). Το τελικό ποσοστό καθαρότητας του ενζύμου ήταν 95%.

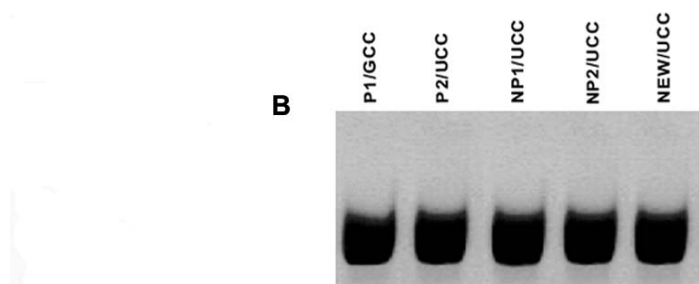


Εικόνα 60: Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου *glyS* του *S. aureus* και απομόνωση της GlyRS. (A) Προϊόν της ενίσχυσης του γονιδίου *glyS* του *S. aureus* με PCR. Το μέγεθος και η αλληλουχία του ενισχυμένου προϊόντος αντιστοιχεί σε αυτά του υπό μελέτη γονιδίου. L: Μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA, 1: Προϊόν PCR (B) Υποκλωνοποίηση του *glyS* στον πλασμιδιακό φορέα pET24b. Το ένθετο γονίδιο και το πλασμίδιο υπέστησαν πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (BamHI/XhoI) και τα συμπληρωματικά άκρα τους συνδέθηκαν προς σχηματισμό του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET24b-*glyS*. (Γ) Απομόνωση της GlyRS με χρωματογραφία συγγένειας (Ni-NTA). Η τελική καθαρότητα της πρωτεΐνης είναι 95%. Έκλουση της πρωτεΐνης με 1: 250 mM και 2: 500 mM ιμιδαζολίου.

Επιπρόσθετα, κλωνοποιήθηκαν και μεταγράφηκαν *in vitro* και τα πέντε γονίδια των μορίων tRNA^{Gly}. Για την κλωνοποίηση των γονιδίων των μορίων tRNA σχεδιάστηκαν

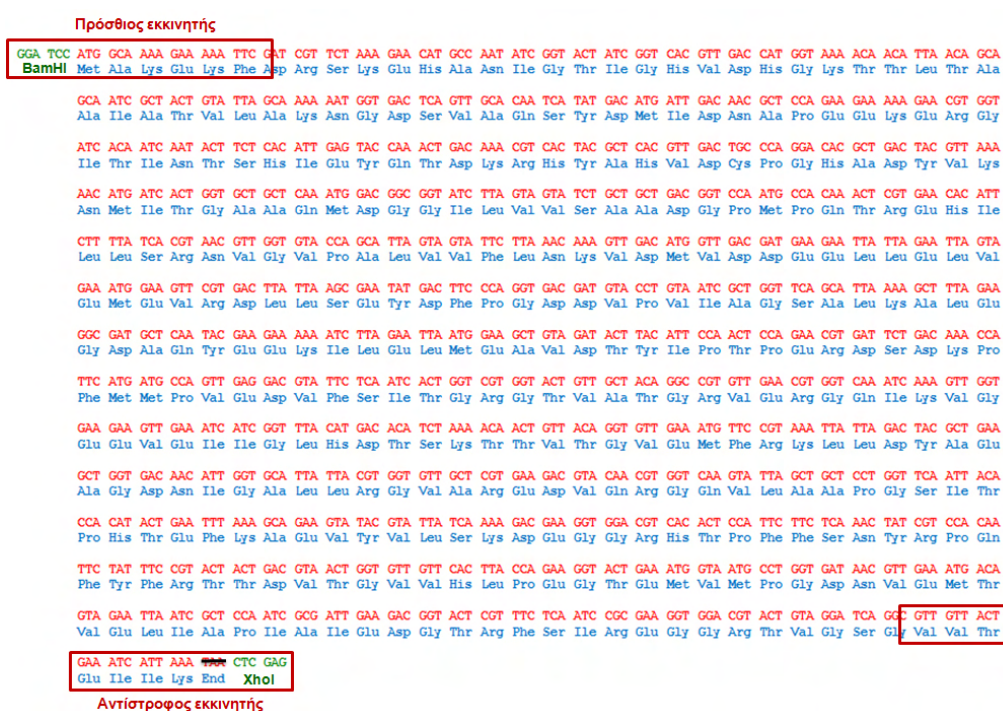
επικαλυπτόμενα ολιγονουκλεοτίδια για όλο το μήκος του γονιδίου και στο 5' άκρο κάθε γονιδίου προστέθηκε ένα ολιγονουκλεοτίδιο με την αλληλουχία του T7 προαγωγέα (**Εικόνα 61A**). Για τα γονίδια των μορίων NP1tRNA^{Gly(UCC)} και NP2tRNA^{Gly(UCC)} χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια ολιγονουκλεοτίδια εκτός από ένα ζεύγος που περιείχε τη σημειακή μετάλλαξη C56T, η οποία αποτελεί τη μοναδική διαφορά μεταξύ των δύο μορίων. Στο γονίδιο που κωδικοποιεί το NEWtRNA^{Gly(UCC)} τροποποιήθηκε το νουκλεοτίδιο στη θέση 37 από T σε C, για να απαλειφθεί η θέση αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο BstNI, το οποίο χρησιμοποιείται για τη γραμμοποίηση του πλασμιδίου πριν την *in vitro* μεταγραφή. Η εναλλαγή αυτή δεν φαίνεται να επηρεάζει τη λειτουργικότητα του μορίου tRNA, διότι το νουκλεοτίδιο αυτό δεν εμπεριέχεται στα στοιχεία ταυτότητας για την αμινοακυλίωση του μορίου από τη GlyRS και σε όλα τα υπόλοιπα ισοδεκτικά tRNA^{Gly} είναι συντηρημένο. Ακολούθησε η *in vitro* μεταγραφή των πέντε γονιδίων των ισοδεκτικών tRNA^{Gly} του *Staphylococcus aureus* και τα μόρια tRNA απομονώθηκαν με ηλεκτροέκλυση μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (**Εικόνα 61B**).





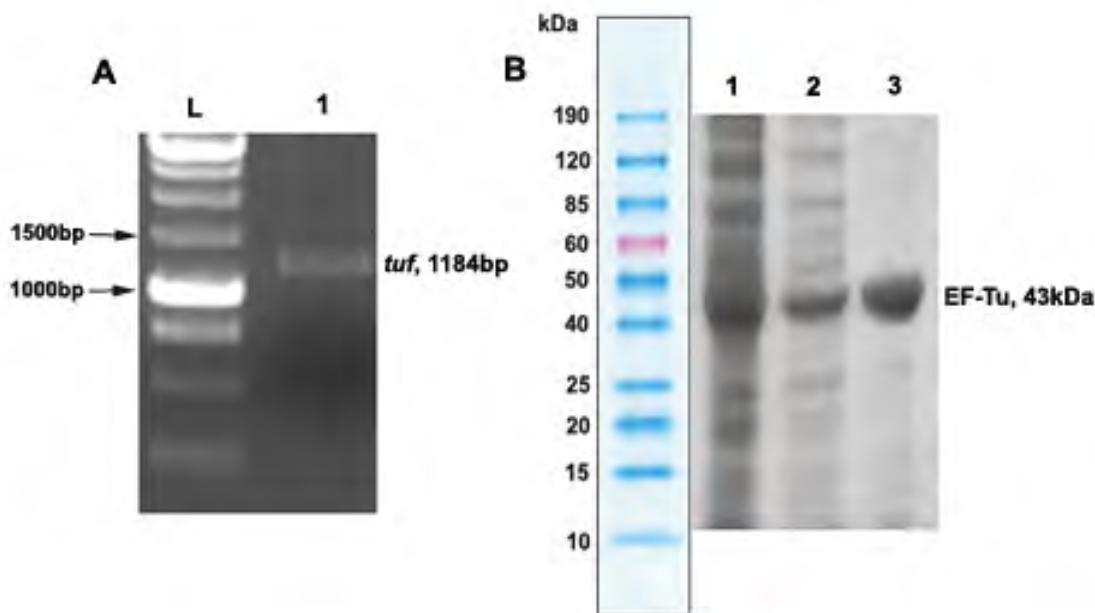
Εικόνα 61: (Α) Σύνθεση των γονιδίων των 5 ισοδεκτικών $tRNA^{Gly}$ του *S. aureus* με επικαλυπτόμενα ολιγονουκλεοτίδια. Στο 5' άκρο κάθε γονιδίου βρίσκεται η αλληλουχία του προαγωγέα T7 (ολιγονουκλεοτίδιο tGSauT7TATA). (Β) Ηλεκτροφορητικό προφίλ των *in vitro* μεταγραφών των μορίων $tRNA^{Gly}$ σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

Για τη βιοχημική ανάλυση της ισχύος των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων tRNA και του EF-Tu, ενισχύθηκε το γονίδιο *tuf* (1184bp) που κωδικοποιεί τον EF-Tu του *Staphylococcus aureus* (**Εικόνα 63A**). Για την ενίσχυση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα γενωμικό DNA του *Staphylococcus aureus* και ειδικοί εκκινητές που έφεραν αλληλουχίες για αναγνώριση από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI και XhoI. Ο αντίστροφος εκκινητής δεν περιείχε το κωδικόνιο τερματισμού (**Εικόνα 62**).



Εικόνα 62: Αλληλουχία του γονιδίου *tuf* του *S. aureus* (κόκκινοι χαρακτήρες) και της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης EF-Tu (μπλε χαρακτήρες). Στα πλαίσια περιέχονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου με PCR καθώς και οι αλληλουχίες που προστέθηκαν για αναγνώριση από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (πράσινοι χαρακτήρες).

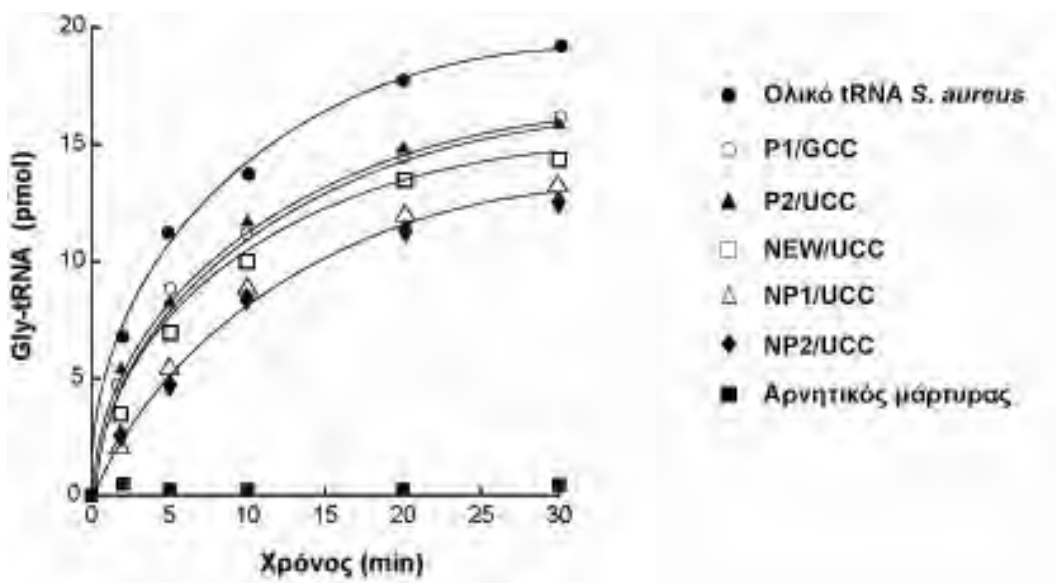
Το ενισχυμένο γονίδιο μετά τον έλεγχο της αλληλουχίας του κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης pET20b με σκοπό την ενσωμάτωση μιας ουράς έξι ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Το κλωνοποιημένο γονίδιο υπερεκφράστηκε σε κύτταρα του στελέχους *Escherichia coli* BL21 (DE3) παρουσία 0.5 mM IPTG στους 37° C. Ο ανασυνδυασμένος EF-Tu-C-terminal-His₆-tag απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας (Ni-NTA) (**Εικόνα 63B**). Το τελικό ποσοστό καθαρότητας του ενζύμου ήταν 90%.



Εικόνα 63: Ενίσχυση του γονιδίου *tuf* του *S. aureus* και απομόνωση του EF-Tu. (A) Προϊόν της ενίσχυσης του γονιδίου *tuf* του *S. aureus* με PCR. Το μέγεθος και η αλληλουχία του ενισχυμένου προϊόντος αντιστοιχεί σε αυτά του υπό μελέτη γονιδίου. L: Μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA, 1: Προϊόν PCR (B) Απομόνωση του EF-Tu με χρωματογραφία συγγένειας (Ni-NTA). Η τελική καθαρότητα της πρωτεΐνης είναι 90%. Έκλουση της πρωτεΐνης με 1: 20 mM, 2: 250 mM και 3: 500 mM ιμιδαζολίου.

3.2.3. Το ασύνηθες NEWtRNA^{Gly(UCC)} αποτελεί υπόστρωμα για την GlyRS του *Staphylococcus aureus*

Για τη μελέτη της καταλληλότητας των tRNA υποστρωμάτων ελέγχθηκαν τα επίπεδα της αμινοακυλίωσης των μετάγραφων των μορίων tRNA^{Gly} του *Staphylococcus aureus*. Όλα τα μετάγραφα μπορούσαν να αμινοακυλιωθούν από τη GlyRS του *Staphylococcus aureus* με ελάχιστες διαφορές στη δεσμευτική τους ικανότητα (**Εικόνα 64**). Αν και τα *in vitro* μετάγραφα δε φέρουν μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, που σε κάποιες περιπτώσεις είναι απαραίτητες για την αποτελεσματική αμινοακυλίωση, το NEWtRNA^{Gly(UCC)} διατηρεί όλα τα σημαντικά στοιχεία ταυτότητας για την αναγνώρισή του από τη συγγενή συνθετάση του *Staphylococcus aureus*. Σύμφωνα, λοιπόν, με τα αποτελέσματα των δοκιμών αμινοακυλίωσης, και τα πέντε ισοδεκτικά tRNA είναι εν δυνάμει μεταφορείς γλυκίνης (Giannouli *et al.*, 2008).



Εικόνα 64: Αμινοακυλίωση των μετάγραφων των 5 ισοδεκτικών μορίων $tRNA^{Gly}$ του *S. aureus* από τη GlyRS. Όλα τα ισοδεκτικά $tRNA^{Gly}$ αμινοακυλιώνονται εξίσου αποτελεσματικά από τη συγγενή συνθετάση. Ολικό tRNA του *S. aureus* χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Η απόδοση της αντίδρασης αμινοακυλίωσης των μετάγραφων κυμαίνεται μεταξύ 40-60 %.

Τα μόρια $tRNA^{Gly}$ του *Staphylococcus aureus* ομαδοποιήθηκαν σε εκείνα που είναι πιθανά πρωτεϊνογενετικά (εκείνα δηλαδή που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά στη ριβοσωμική πρωτεϊνοσύνθεση, P1/GCC και P2/UCC) και στα πιθανά μη-πρωτεϊνογενετικά (εκείνα που πιθανώς εμπλέκονται ως δότες γλυκίνης στη σύνθεση της γέφυρας πενταγλυκίνης του κυτταρικού τοιχώματος του *Staphylococcus aureus*). Η διάκριση αυτή βασίστηκε σε προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τα δομικά στοιχεία του μορίου tRNA που είναι κυρίως υπεύθυνα για την ισχύ της αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα επιμήκυνσης Tu (EF-Tu). Τα στοιχεία αυτά σχετίζονται άμεσα με ισχυρή και ασθενή αλληλεπίδραση μεταξύ του EF-Tu και των Gly-tRNA^{Gly}. Για την επιβεβαίωση της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε με εργαλεία της Βιοπληροφορικής και λαμβάνοντας υπόψη προηγούμενα βιοχημικά δεδομένα, διερευνήθηκε η πιθανή διαφορική ικανότητα των ισοδεκτικών Gly-tRNA^{Gly} να σχηματίζουν σύμπλοκο με τον ενεργοποιημένο EF-Tu του *Staphylococcus aureus*.

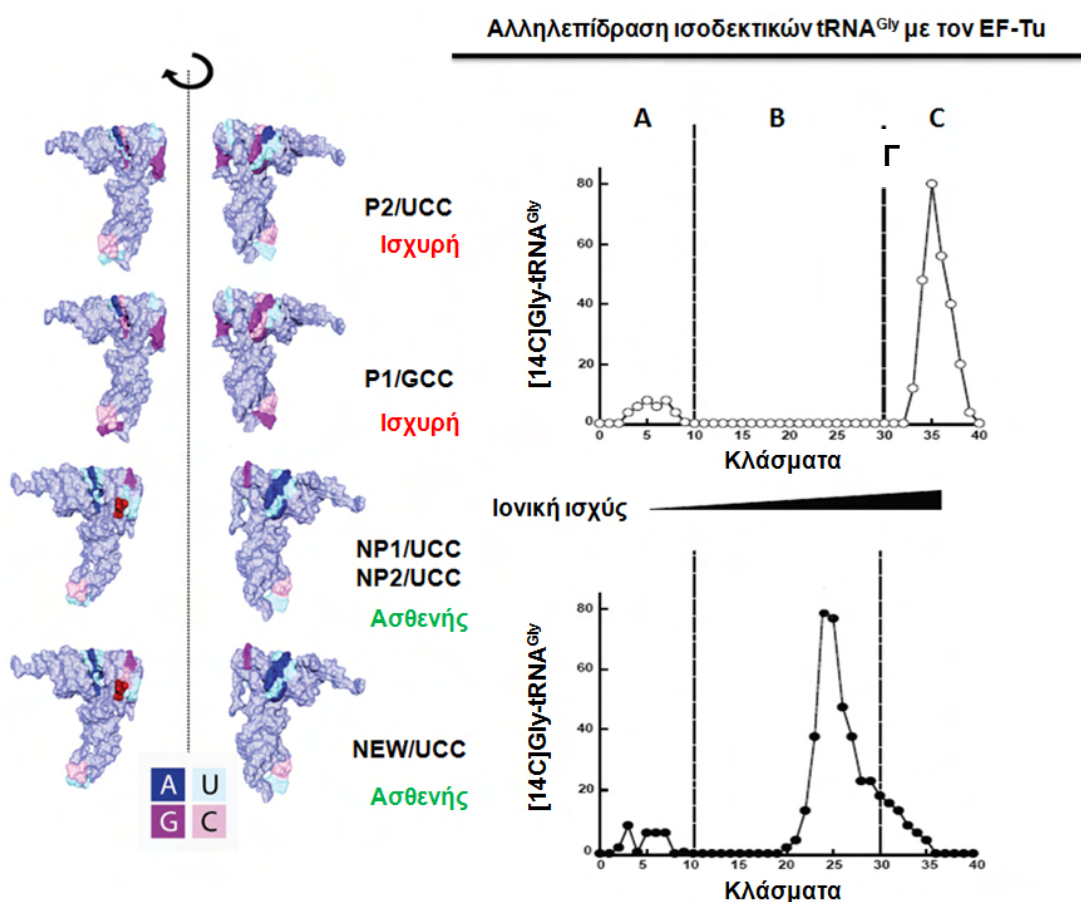
3.2.4 Διαφορική δέσμευση των ισοδεκτικών $tRNA^{Gly}$ στον παράγοντα επιμήκυνσης Tu του *Staphylococcus aureus*

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι στο *Staphylococcus epidermidis*, έναν οργανισμό συγγενή με το *Staphylococcus aureus*, ειδικά ισοδεκτικά μόρια $tRNA^{Gly}$ χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Roberts, 1972). Αυτά τα μόρια tRNA βρέθηκε ότι παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια για τον EF-Tu, μια παρατήρηση που αποδόθηκε στην ασυνήθη αλληλουχία των μορίων αυτών σε

σχέση με εκείνα που συμμετέχουν ως υποστρώματα για την πρωτεϊνοσύνθεση (Kawakami *et al.*, 1975). Από την πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών των tRNA^{Gly} του *Staphylococcus aureus* και του *Staphylococcus epidermidis*, που παρουσιάζουν χαμηλές τιμές του cove score, προέκυψε ότι τα μόρια αυτά παρουσιάζουν συντηρημένες διαφορές σε σύγκριση με τα πρωτεϊνογενετικά μόρια tRNA^{Gly} (**Εικόνα 65B**). Είναι εμφανές από τη σύγκριση αυτή ότι όλα τα πιθανά μη πρωτεϊνογενετικά μόρια tRNA^{Gly} δεν διατηρούν το εξειδικευμένα ζεύγη βάσεων G49-U65 και G51-C63 που έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικά στοιχεία για ισχυρή αλληλεπίδραση με τον EF-Tu (Asahara & Uhlenbeck, 2002, Sanderson & Uhlenbeck, 2007, Roy *et al.*, 2007) (**Εικόνα 65A**). Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει την ύπαρξη ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του κατάλοιπου Glu390 του EF-Tu του *Thermus thermophilus* και της αμινομάδας της γουανίνης του ζεύγους 51-63 στο βραχίονα T, ο οποίος σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση με το μόριο tRNA (Sanderson & Uhlenbeck, 2007). Αντιθέτως, τα εν δυνάμει μη πρωτεϊνογενετικά tRNA^{Gly} περιέχουν τα ζεύγη βάσεων A49-U65 και A51-U63, που αντιστοιχούν σε δομικές διαφορές που σχετίζονται με πιο ασθενή αλληλεπίδραση με τον EF-Tu.

Αυτή η θεώρηση έχει υποστηριχτεί και από *in vivo* πειράματα που δείχνουν ότι στο *Escherichia coli*, η τροποποίηση των ζευγών βάσεων G49-U65 και G51-C63 μειώνει σημαντικά τη συμμετοχή των μορίων tRNA^{Gly} στην πρωτεϊνοσύνθεση. Η ανάλυση λοιπόν των ισοδεκτικών tRNA^{Gly} του *Staphylococcus aureus* με εργαλεία της Βιοπληροφορικής οδήγησε σε ένα θεωρητικό διαχωρισμό τους ανάλογα με την ισχύ της αλληλεπίδρασης τους με τον EF-Tu.

Για να ελεγχθεί η δεσμευτική ικανότητα των ισοδεκτικών tRNA^{Gly} με τον παράγοντα επιμήκυνσης, ο EF-Tu ενεργοποιήθηκε και ακινητοποιήθηκε σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA. Μετά την *in vitro* μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων, όλα τα ισοδεκτικά μόρια tRNA^{Gly} αμινοακυλιώθηκαν με σημασμένη [¹⁴C]Gly από την ανασυνδυασμένη GlyRS του *Staphylococcus aureus*. Τα αμινοακυλιωμένα πλέον μόρια [¹⁴C]Gly-tRNA ελέγχθηκαν για τη δεσμευτική τους ικανότητα με τον ακινητοποιημένο ενεργοποιημένο EF-Tu του *Staphylococcus aureus*. Όπως αναμενόταν από την αρχική πρόβλεψη παρατηρήθηκε ότι τα P1tRNA^{Gly(GCC)} και P2tRNA^{Gly(UCC)}, που περιέχουν τα ζεύγη βάσεων G49-U65 και G51-C63, δεσμεύονται ισχυρά στον EF-Tu (**Εικόνα 66**). Αντίθετα, το NEWtRNA^{Gly(UCC)} καθώς και τα NP1tRNA^{Gly(UCC)} και NP2tRNA^{Gly(UCC)} που περιέχουν τα ζεύγη βάσεων A49-U65 και A51-U63, δεν δεσμεύονται αποτελεσματικά στον EF-Tu. Η διαφορική αυτή δεσμευτική ικανότητα υποδεικνύει ότι το NEWtRNA^{Gly(UCC)} που ανιχνεύθηκε, καθώς και τα NP1tRNA^{Gly(UCC)} και NP2tRNA^{Gly(UCC)}, είναι πολύ πιθανόν μη-πρωτεϊνογενετικά, σε συμφωνία με ότι έχει προηγουμένως προταθεί για τα ορθόλογα μόρια του *Staphylococcus epidermidis* (Kawakami et al. 1975).



Εικόνα 66: (Αριστερά) Η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνογενετικών και μη πρωτεϊνογενετικών μορίων tRNA^{Gly} του *S. aureus*. Τα διαφορετικά δομικά στοιχεία μεταξύ των πρωτεϊνογενετικών και μη πρωτεϊνογενετικών μορίων αντιπροσωπεύονται με τα ίδια χρώματα όπως και στην πολλαπλή ομοπαράθεση της εικόνας 57. (Δεξιά) Προφίλ έκλουσης των μορίων Gly-tRNA^{Gly} μετά από

αλληλεπίδραση με τον καθλωμένο σε στήλη συγγένειας Ni-NTA, ενεργοποιημένο παράγοντα EF-Tu. Τα πιθανά μη-πρωτεϊνογενετικά μόρια Gly-tRNA^{Gly} δε δεσμεύονται ισχυρά στον EF-Tu και εκκλούνται σε ηπιότερες ιοντικές συνθήκες (150mM NaCl), σε αντίθεση με τα πιθανά πρωτεϊνογενετικά που εκκλούνται παρουσία 1 M NaCl.

3.2.5 Ανίχνευση του πιθανού μεταφορέα των μη-πρωτεϊνογενετικών μορίων tRNA^{Gly} στο κυτταρικό τοίχωμα

Ο χαρακτηρισμός των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} του *Staphylococcus aureus* οδήγησε στο διαχωρισμό τους σε πρωτεϊνογενετικά και μη πρωτεϊνογενετικά. Το νέο ασύνηθες μόριο που ανιχνεύθηκε, μαζί με τα NP1tRNA^{Gly(UCC)} και NP2tRNA^{Gly(UCC)}, πιθανώς δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή. Αντιθέτως, παρουσιάζει υψηλή ομοιότητα με τα μη-πρωτεϊνογενετικά tRNA^{Gly} του *Staphylococcus epidermidis* που έχουν ήδη χαρακτηριστεί. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στο *Staphylococcus epidermidis* οι γέφυρες πενταπεπτιδίων, εκτός από γλυκίνη, εμπεριέχουν και σερίνη. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα λεπτομερή ενζυμικά στάδια που εμπλέκονται στη σύνθεση και η ακριβής εξειδίκευση για την ενσωμάτωση γλυκίνης και σερίνης δεν έχει χαρακτηριστεί στο *Staphylococcus epidermidis*, αν και ο οργανισμός αυτός περιέχει ομόλογα γονίδια που κωδικοποιούν μη ριβοσωμικές πεπτιδυλο-τρανσφεράσες. Στο *Staphylococcus aureus* είναι γνωστό ότι η ενσωμάτωση των καταλοίπων γλυκίνης καταλύεται από τους FemXAB. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία αναφέρεται το ενδεχόμενο κάθε ένας από τους παράγοντες αυτούς να αναγνωρίζει και να αλληλεπιδρά με ένα ισοδεκτικό μόριο tRNA^{Gly} (Schneider et al., 2004), το οποίο είναι σύμφωνο και με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καθώς τρία μη πρωτεϊνογενετικά μόρια tRNA^{Gly} φαίνεται να εκφράζονται στον *Staphylococcus aureus*. Ωστόσο η εξειδίκευση του κάθε παράγοντα Fem για τα τρία μόρια tRNA και επιπρόσθετα δομικά στοιχεία που διαμεσολαβούν τις αλληλεπιδράσεις RNA-πρωτεΐνης δεν έχουν διερευνηθεί ακόμα.

Το γεγονός ότι τα αμινοακυλιωμένα μόρια tRNA που εξυπηρετούν ως δότες γλυκίνης για τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του *Staphylococcus aureus* δεν αλληλεπιδρούν ισχυρά με τον παράγοντα EF-Tu προκαλεί το ερώτημα, πώς τα μόρια αυτά μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη. Με βάση μια πρόσφατη αναφορά για την ύπαρξη GTPασών στους οργανισμούς, των οποίων δεν έχει διευκρινιστεί ο ρόλος (Brown, 2005), πραγματοποιήθηκε μια αναζήτηση με τα εργαλεία της βιοπληροφορικής για τον εντοπισμό ενός ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) που έπρεπε να πληροί συγκεκριμένα κριτήρια. Το ORF θα έπρεπε να απαντάται σε όλα τα σελέχη του *Staphylococcus aureus* και να παρουσιάζει ομοιότητα με κάποια GTPάση ή με το ενεργό κέντρο GTPάσης του EF-Tu. Η αναζήτηση αυτή βασίστηκε στην περιγραφή μιας ολόκληρης οικογένειας GTPασών του *Bacillus subtilis*, οι οποίες πιθανόν να εμπλέκονται σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις μορίων tRNA. Από την αναζήτηση στις ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων εντοπίστηκε ένα γονίδιο που πληροί τα παραπάνω κριτήρια και του οποίου ο ρόλος είναι αδιευκρίνιστος (SAR0294, T.I.G.R.).

Η ομοπαράθεση της αλληλουχίας της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης με τον EF-Tu έδειξε ότι οι δύο πρωτεΐνες παρουσιάζουν ομοιότητα στην αμινοξική τους αλληλουχία, η οποία εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή του ενεργού κέντρου GTPάσης του EF-Tu (**Εικόνα 67A**).

Πέραν της ομοιότητας της αμινοξικής αλληλουχίας μελετήθηκε και η πιθανή δομική ομοιότητα των πρωτεϊνών αυτών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Swiss-Model, LOOPP και HMMSTR-Rosetta. Γενικά, υπάρχουν τρεις προσεγγίσεις για την πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης, η συγκριτική μοντελοποίηση (comparative modeling, Swiss-Model), η νηματοιδή (threading, LOOP) και η εξ' αρχής πρόβλεψη (ab initio prediction, HMMSTR-Rosetta). Η συγκριτική μοντελοποίηση βασίζεται στο γεγονός ότι εξελικτικά σχετιζόμενες πρωτεΐνες με παρόμοιες αλληλουχίες συχνά έχουν την ίδια δομή. Για παράδειγμα, δύο αλληλουχίες που έχουν έστω και 25% ομοιότητα συνήθως έχουν την ίδια γενική τριτοταγή διαμόρφωση. Η νηματοιδής μέθοδος συγκρίνει την αλληλουχία στόχο με μια βιβλιοθήκη γνωστών κρυσταλλικών δομών, παράγοντας μια λίστα με βαθμολογίες. Η δομή που έχει τη μεγαλύτερη βαθμολογία θεωρείται ότι είναι αυτή που αντιστοιχεί στην υπό ανάλυση πρωτεΐνη. Τέλος, η εξ' αρχής πρόβλεψη συνίσταται στη μοντελοποίηση όλων των θερμοδυναμικών παραμέτρων που εμπλέκονται στη διαδικασία της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και έπειτα βρίσκει τη δομή με τη χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια. Αυτή η προσέγγιση βασίζεται στους νόμους της θερμοδυναμικής, σύμφωνα με τους οποίους η φυσική δομή μιας πρωτεΐνης είναι εκείνη για την οποία η ελεύθερη ενέργεια είναι συνολικά ελάχιστη. Ως υπόστρωμα για την πρόβλεψη της δομής της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το SAR0294 από το πρόγραμμα Swiss-Model χρησιμοποιήθηκε αυτόματα από το σύστημα η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης BH3703 του *Bacillus halodurans*. Ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι άγνωστος και η κύρια ομοιότητα που παρουσιάζει με την υπό μελέτη πρωτεΐνη είναι ότι φέρουν και οι δύο το μοτίβο Duf600, του οποίου ο ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί αλλά απαντάται σε πολλές πρωτεΐνες των κατά Gram θετικών βακτηρίων.

Οι δομές που προέκυψαν από τα προγράμματα πρόβλεψης της τριτοταγούς δομής παρουσιάζουν κάποιες διαφορές μεταξύ τους (**Εικόνα 67B**). Η οργάνωση των δομών διαφέρει ακόμα και στην αναλογία των α-ελικών προς τα β-πτυχωτά φύλλα. Μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ τους παρουσιάζουν οι διαμορφώσεις που προκύπτουν από την πρόβλεψη με τη συγκριτική μοντελοποίηση και τη νηματοιδή μέθοδο. Εντούτοις, η δομή που προσομοιάζει περισσότερο με την περιοχή που περιέχει το ενεργό κέντρο GTPάσης του EF-Tu είναι αυτή που προέκυψε από τον υπολογισμό της ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας (HMMSTR-Rosetta). Η πρωτεΐνη λοιπόν που κωδικοποιείται από το γονίδιο SAR0294 πιθανόν να αντιπροσωπεύει μια GTPάση που ίσως εξυπηρετεί την εξειδικευμένη μεταφορά των Gly-tRNA^{Gly} για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Ωστόσο μέχρι τώρα υπάρχουν μόνο ενδείξεις του πιθανού της ρόλου και θα πρέπει να πραγματοποιηθούν βιοχημικές αναλύσεις για την εξακρίβωση του ρόλου της πρωτεΐνης αυτής. Παρόλα αυτά, αποτελεί ένα καλό υπόστρωμα για την

έναρξη της διερεύνησης σχετικά με τους παράγοντες που εμπλέκονται στο ασύνηθες αυτό μονοπάτι αμινοακυλίωσης, που δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως μέχρι σήμερα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αμινοακυλιωμένα μόρια tRNA εμπλέκονται σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες πέραν της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η tRNA-εξαρτώμενη σύνθεση αμινοξέων και άλλων κυτταρικών συστατικών, ο μεταγραφικός έλεγχος, η σύνθεση και η τροποποίηση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης αποτελούν μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα (ανασκόπηση: *RajBhandary & Söll, 2008*). Η συμμετοχή των aa-tRNA στα ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης υποδεικνύει ότι το μόριο tRNA δεν είναι απλά ένα προσαρμοστικό μόριο για τη μεταφορά των αμινοξέων στο ριβόσωμα, αλλά έχει ένα πολυδιάστατο ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό.

Η ορθή αμινοακυλίωση των μορίων tRNA είναι μια διαδικασία ιδιαίτερα σημαντική για τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από μια οικογένεια είκοσι εξελικτικά συντηρημένων ενζύμων, των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών (*Schimmel & Soll, 1979, Schimmel, 1987*). Οι aaRS παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση και κάποια μέλη της οικογένειας παρουσιάζουν επιδιορθωτική δράση για την αποτροπή της σύνθεσης κακοφορισμένων μορίων tRNA (*Ibba & Soll, 1999*). Ο έλεγχος όμως των aa-tRNA μορίων δεν περιορίζεται στο στάδιο της αμινοακυλίωσης, καθώς η καταλληλότητα των μορίων αυτών για τη συμμετοχή τους στη σύνθεση των πρωτεϊνών ελέγχεται και σε μετέπειτα στάδια της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής. Ο παράγοντας EF-Tu και ειδικότερα ο ρυθμός με τον οποίο υδρολύει GTP λειτουργεί ως ένας ελεγκτικός μηχανισμός των aa-tRNA μορίων (*Thompson et al., 1986*). Επιπρόσθετα, το ριβόσωμα ελέγχει την καταλληλότητα των υποστρωμάτων που δεσμεύει πριν την ενσωμάτωση των αμινοξέων στις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες (*Stahl et al., 2002, Ogle et al., 2003*).

Η σύνθεση των αμινοακυλιωμένων μορίων tRNA είναι πρωτεύουσα διαδικασία, η οποία παρέχει τα ορθά υποστρώματα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή δεν είναι άμεση σε κάποιες περιπτώσεις. Η εισαγωγή νέων αμινοξέων στο ρεπερτόριο της πρωτεϊνοσύνθεσης κατά τη διάρκεια της εξέλιξης και η απουσία συγκεκριμένων συνθετασών από το γονιδίωμα πολλών οργανισμών συντήρησε εξελικτικά την παρουσία ασυνήθων συστημάτων αμινοακυλίωσης. Το πρώτο ασυνήθες μονοπάτι που μελετήθηκε ήταν αυτό της tRNA-εξαρτώμενης σύνθεσης του εναρκτήριου fMet-tRNA^{fMet} στα βακτήρια (*Dickerman et al., 1967, Gite et al., 2000*). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί και η σύνθεση του 21^{ου} αμινοξέος, της σεληνιοκυστεΐνης, μέσω ενός ασυνήθους μονοπατιού αμινοακυλίωσης, το οποίο χαρακτηρίστηκε βιοχημικά πολύ πρόσφατα. Στο σύστημα αυτό το πρώτο στάδιο καταλύεται από τη μη συγγενή συνθετάση SerRS και η ακόλουθη μετατροπή των κακοφορισμένων Ser-tRNA^{Sec} πραγματοποιείται μέσω μηχανισμών που διαφέρουν μεταξύ βακτηρίων και ευκαρυωτικών οργανισμών (*Bock et al., 2005, Carlson et al., 2004, Yuan et al., 2006*).

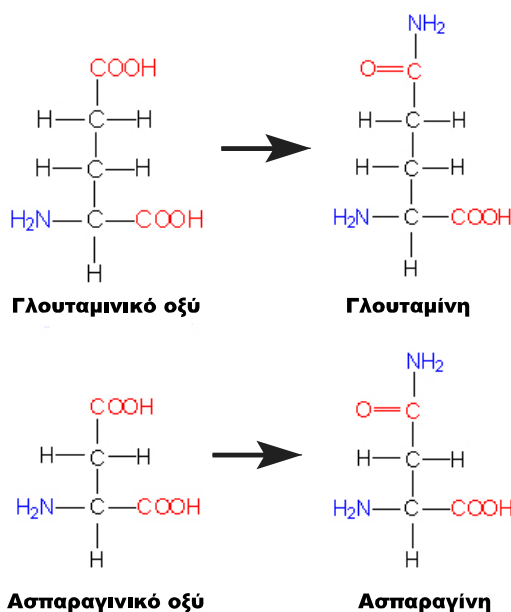
Τα ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης εμπλέκονται και σε περιπτώσεις που απουσιάζει κάποια από τις συνθετάσες των είκοσι βασικών αμινοξέων που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση. Πέραν της LysRS, η οποία σε κάποια αρχαία παραβιάζει τον

κανόνα των κλάσεων και παρουσιάζει ομοιότητα στην τοπολογία του ενεργού κέντρου με τις συνθετάσες κλάσης II, ενώ το σύνθηδες ένζυμο ανήκει στην κλάση I (Ibba et al., 1997), υπάρχουν περιπτώσεις πλήρους απουσίας κάποιων aaRS. Ειδικότερα, τα αρχαία *Methanobacterium thermoautotrophicus* και *Methanococcus janaschii* δεν εκφράζουν τη CysRS και έχουν μελετηθεί δύο πιθανά μονοπάτια σε διαφορετικές συνθήκες, αερόβιες και αναερόβιες, για τη σύνθεση των Cys-tRNA^{Cys} μορίων (Stathopoulos et al., 2000, Sauerwald et al., 2005).

Το πιο ευρέως διαδεδομένο ασύνθηδες σύστημα αμινοακυλίωσης που απαντάται σε βακτήρια, αρχαία αλλά και στα οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων, είναι η tRNA-εξαρτώμενη τρανσαμίδωση (Curnow et al., 1997 & 1998). Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται για τη σύνθεση Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln} στους οργανισμούς που στερούνται των συγγενών συνθετάσων AsnRS και GlnRS, αντίστοιχα. Η τρανσαμίδωση αποτελεί το δεύτερο στάδιο της σύνθεσης των μορίων αυτών, καθώς στο πρώτο στάδιο τα μόρια tRNA κακοφορτίζονται από μια συνθετάση με χαμηλή εξειδίκευση (AspRS και GluRS, αντίστοιχα) προς σχηματισμό των Asp-tRNA^{Asn} και Glu-tRNA^{Gln} (Lapointe et al., 1986, Tumbula et al., 2000). Τα κακοφορτισμένα αυτά μόρια αποτελούν ακατάλληλα υποστρώματα για την πρωτεϊνοσύνθεση και η δέσμευσή τους από τον EF-Tu παρεμποδίζεται, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η λανθασμένη ενσωμάτωση ασπαραγινικού και γλουταμινικού οξέος στη θέση της ασπαραγίνης και της γλουταμίνης στις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες (Stanzel et al., 1994, Becker & Kern, 1998). Αντίθετα, τα κακοφορτισμένα μόρια tRNA αποτελούν υπόστρωμα για τις tRNA-εξαρτώμενες αμιδοτρανσφεράσες, που καταλύουν τη μετατροπή του εστεροποιημένου αμινοξέος, Asp ή Glu, στο αντίστοιχο συγγενές προς το tRNA αμινοξύ, Asn ή Gln, χρησιμοποιώντας ένα δότη αμιδομάδας. Στα βακτήρια απαντάται αποκλειστικά η ετεροτριμερής GatCAB αμιδοτρανσφεράση, η οποία παρουσιάζει διπλή δραστικότητα. Ανάλογα με το ποια συνθετάση απουσιάζει από τον κάθε οργανισμό, AsnRS ή / και GlnRS, η GatCAB μπορεί να παρουσιάζει δραστικότητα Asp-AdT ή / και Glu-AdT (Becker et al., 2000). Στα αρχαία, πέραν της GatCAB, απαντάται και η ετεροδιμερής GatDE που δρα μόνο ως Glu-AdT (Tumbula et al., 2000).

Η αμιδοτρανσφεράση GatCAB παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της διπλής της εξειδίκευσης. Έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει δύο διαφορετικά αμινοξέα (**Εικόνα 68**) και να συνθέτει έτσι δύο διαφορετικά αμινοακυλιωμένα tRNA μόρια. Για να το επιτύχει αυτό, το ένζυμο πρέπει να είναι αρκετά εξειδικευμένο, ώστε να διαχωρίζει τα κακοφορτισμένα Asp-tRNA^{Asn} και Glu-tRNA^{Gln} από τα συγγενή Asp-tRNA^{Asp} και Glu-tRNA^{Glu}. Αυτός ο διαχωρισμός είναι ιδιαίτερα σημαντικός, ώστε να αποφευχθεί ή σύνθεση Asn-tRNA^{Asp} και Gln-tRNA^{Glu}. Σε αντίθεση με τα Asp-tRNA^{Asn} και Glu-tRNA^{Gln}, τα Asn-tRNA^{Asp} και Gln-tRNA^{Glu} μπορούν να δεσμευτούν από τον EF-Tu και να προκαλέσουν έτσι λανθασμένη ενσωμάτωση αμινοξέων στις πρωτεΐνες (LaRiviere et al., 2001, Asahara & Uhlenbeck, 2002) Παράλληλα, όμως, η εξειδίκευση της GatCAB πρέπει να είναι αρκετά χαλαρή ώστε να επιτρέπει τη σύνθεση τόσο Asn-tRNA^{Asn} όσο και Gln-tRNA^{Gln}. Ο μηχανισμός αναγνώρισης δεν είχε ταυτοποιηθεί και

δεν ήταν γνωστό αν τα δύο μόρια tRNA που αποτελούν υποστρώματα της GatCAB αναγνωρίζονται μέσω των ίδιων ή διαφορετικών στοιχείων ταυτότητας.

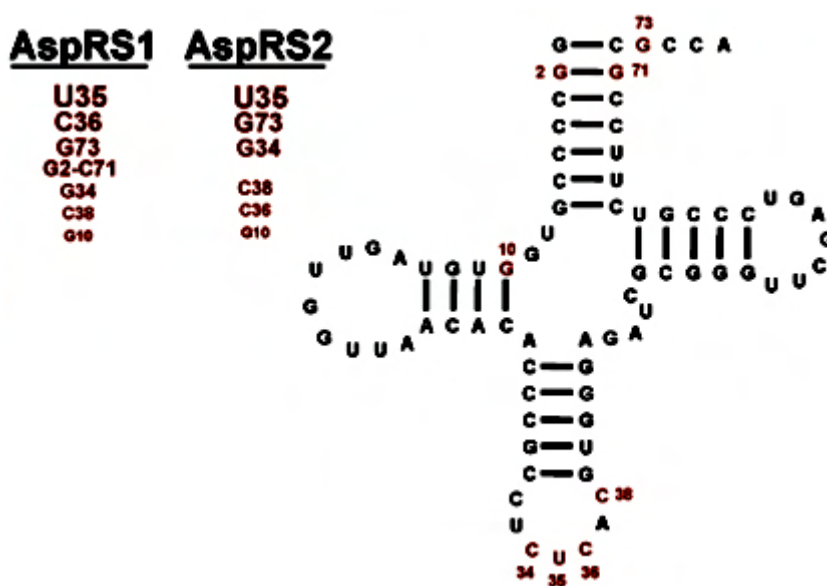


Εικόνα 68: Τα αμινοξέα γλουταμίνη και ασπαραγίνη που προστέθηκαν εξελικτικά πρόσφατα στο ρεπερτόριο της πρωτεϊνοσύνθεσης συντίθενται με βάση το γλουταμινικό και το ασπαραγινικό οξύ, αντίστοιχα.

Ωστόσο, πριν τον χαρακτηρισμό των στοιχείων που καθορίζουν την αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος, κρίθηκε αναγκαία η κινητική μελέτη της βακτηριακής GatCAB AdT. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κινητικής ανάλυσης η βακτηριακή GatCAB του *Neisseria meningitidis* ακολουθεί κλασική κινητική συμπεριφορά κατά Michaelis-Menten με K_M ίση με 1.2 μM . Η έλλειψη σταθερότητας του εστερικού δεσμού μεταξύ του αμινοξέος και του μορίου tRNA του aa-tRNA υποστρώματος ήταν ένα αποτρεπτικό στοιχείο για τη μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς της GatCAB. Για το λόγο αυτό και επειδή απαιτούνται καθαρά aa-tRNA μόρια για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών, χρησιμοποιήθηκαν αμινοακυλιωμένα *in vitro* μετάγραφα των μορίων tRNA. Το γεγονός ότι τα μόρια αυτά κακοφορτίστηκαν αποτελεσματικά από την AspRS2 του *Thermus thermophilus* και το εστεροποιημένο Asp τρανσαμιδώθηκε σε Asn από τη GatCAB του *Neisseria meningitidis* υποδεικνύει ότι η αναγνώριση των tRNA υποστρωμάτων από τα δύο αυτά ένζυμα δε φαίνεται να επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τροποποιημένες βάσεις.

Η χαμηλή εξειδίκευση της AspRS2 σε αντίθεση με την AspRS1 του *Thermus thermophilus*, που αναγνωρίζει και αμινοακυλιώνει μόνο τα συγγενή μόρια tRNA^{Asp}, οδήγησε στην αρχική υπόθεση ότι η AspRS1 αναγνωρίζει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά στα συγγενή μόρια tRNA, ενώ η AspRS2 αναγνωρίζει στοιχεία που είναι κοινά στα μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn}. Με μια μόνο εξαίρεση, τα ίδια νουκλεοτίδια καθορίζουν την αμινοακυλίωση από τις AspRS1 και AspRS2, αλλά η

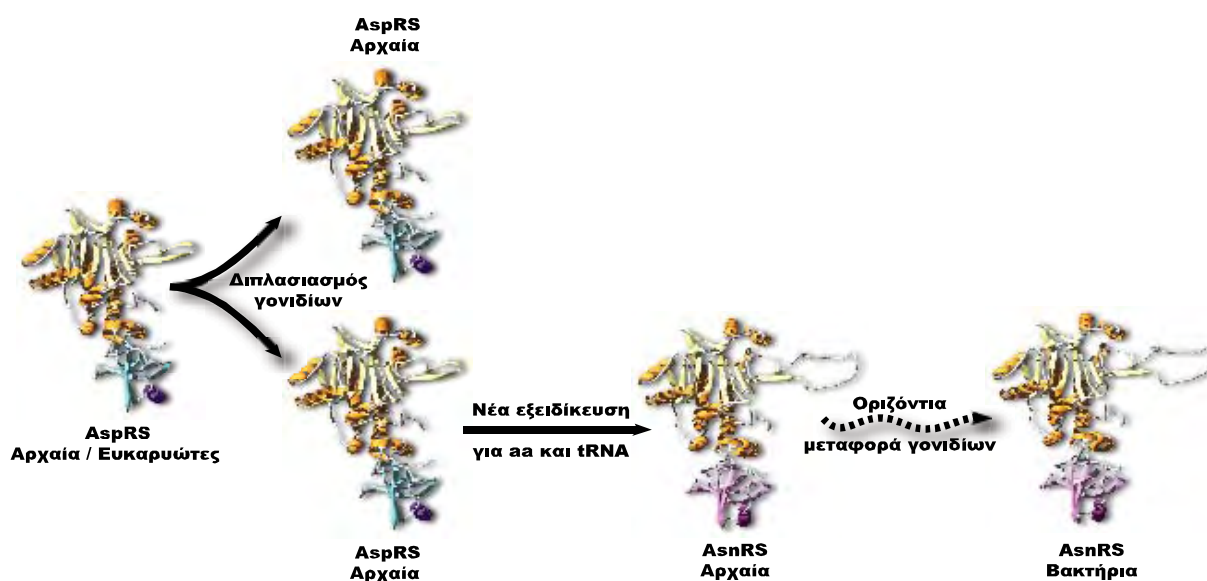
συνεισφορά τους στην αναγνώριση των υποστρωμάτων διαφέρει μεταξύ των δύο ενζύμων (*Becker et al., 1997*) (**Εικόνα 69**). Τα 3 κύρια στοιχεία ταυτότητας για την κατάλυση από την AspRS1 είναι τα νουκλεοτίδια U₃₅ και C₃₆ του αντικωδικονίου και η βάση διαλογέας G₇₃. Λιγότερο σημαντικά φαίνεται να είναι το ζεύγος βάσεων G₂-C₇₁ του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος, η βάση G₃₄ του αντικωδικονίου και τέλος τα νουκλεοτίδια C₃₈ και G₁₀. Η ιεραρχία της συνεισφοράς των στοιχείων αυτών διαφέρει στην περίπτωση της AspRS2, με τη βάση C₃₆ να εμπλέκεται στην αναγνώριση στο μικρότερο ποσοστό. Οπότε, ενώ η AspRS1 αναγνωρίζει το tRNA υπόστρωμα βασιζόμενη κυρίως στο νουκλεοτίδιο στη θέση 36 του αντικωδικονίου, η βάση αυτή δε φαίνεται να συνεισφέρει σημαντικά στην αναγνώριση του υποστρώματος από την AspRS2, με αποτέλεσμα τη χαμηλή εξειδίκευση του ενζύμου.



Εικόνα 69: Τα στοιχεία ταυτότητας του μορίου tRNA^{Asn} για την αναγνώρισή του από τις AspRS1 και AspRS2 του *T. thermophilus*. Τα στοιχεία ταυτότητας είναι κοινά για τις δύο συνθετάσες, αλλά διαφέρει η συνεισφορά τους στην αναγνώριση. Η AspRS1 βασίζεται κυρίως στο νουκλεοτίδιο στη θέση 36 του αντικωδικονίου, το οποίο δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του υποστρώματος από την AspRS2.

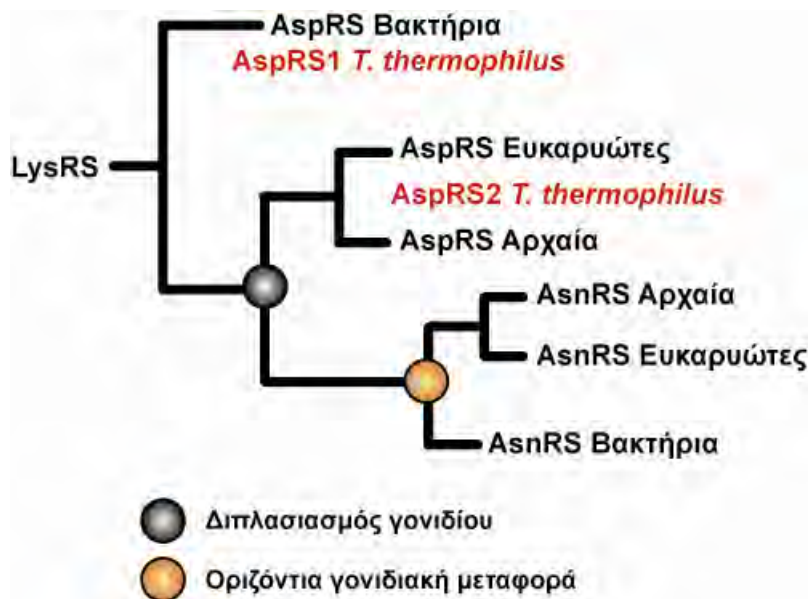
Η χαμηλή εξειδίκευση της AspRS2 φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της εξελικτικής της προέλευσης καθώς θεωρείται ένα κατάλοιπο της αρχέγονης AspRS (*Becker et al., 2000, Tumbula-Hansen et al., 2002*). Το σενάριο αυτό είναι συμβατό με τη θεώρηση ότι η ασπαραγίνη ήταν ένα από τα τελευταία αμινοξέα που προστέθηκαν στο ρεπερτόριο των πρωτεϊνών, και κατά συνέπεια η AsnRS είναι μια από τις πρόσφατες εξελικτικά συνθετάσες (*Woese et al., 2000, O'Donoghue & Luthey-Schulten, 2003*). Η αρχέγονη AspRS είχε τη δυνατότητα να αναγνωρίζει και να αμινοακυλιώνει τόσο το tRNA^{Asp} όσο και το tRNA^{Asn}, ένα λειτουργικό χαρακτηριστικό που διατηρεί η AspRS2 του *Thermus thermophilus*. Σύμφωνα με το εξελικτικό μοντέλο της προέλευσης των συνθετασών AspRS και AsnRS, το αρχέγονο μόριο είναι η AspRS των

αρχαίων και των ευκαρυωτικών οργανισμών (Woese *et al.*, 2000, Becker *et al.*, 2000) (**Εικόνα 70**). Ο διπλασιασμός του γονιδίου αυτού οδήγησε σε δύο AspRS, μια εκ των οποίων απέκτησε διαφορετική εξειδίκευση για τα δύο υποστρώματα, το αμινοξύ και το μόριο tRNA, με αποτέλεσμα την εμφάνιση της AsnRS. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται και από την παρούσα διατριβή και είναι μια ακόμα ένδειξη ότι τα μόρια tRNA^{Asp} και tRNA^{Asn} εξελίχθηκαν πριν από τις αντίστοιχες συνθετάσες τους. Συνεπακόλουθα, η εμφάνιση της AsnRS ήταν προσαρμοσμένη στην αναγνώριση ήδη υπαρχόντων στοιχείων ταυτότητας που έφερε το συγγενές της μόριο tRNA. Η παρουσία της AsnRS στα βακτήρια θεωρείται αποτέλεσμα οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων.



Εικόνα 70: Εξελικτικό μοντέλο για την εμφάνιση της AsnRS στα αρχαία και τα βακτήρια. Η AsnRS των αρχαίων θεωρείται ότι προήλθε από την AspRS μετά από διπλασιασμό του γονιδίου και απόκτηση νέας εξειδίκευσης για το αμινοξύ και το μόριο tRNA. Η AsnRS των βακτηρίων ήταν αποτέλεσμα οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων από τα αρχαία.

Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση των συνθετασών AspRS και AsnRS από τα τρία βασίλεια, η AspRS2 του *Thermus thermophilus* ομαδοποιείται με την AspRS των αρχαίων και παρουσιάζει μεγάλη απόσταση από τη βακτηριακή AspRS (Woese *et al.*, 2000, Charon *et al.*, 2003) (**Εικόνα 71**). Η AspRS2, λοιπόν, διαχωρίζεται από την AspRS1 του *Thermus thermophilus* όχι μόνο βάσει της διαφορετικής εξειδίκευσης, αλλά και λόγω της ομοιότητας που παρουσιάζει το ένζυμο με την AspRS των αρχαίων.



Εικόνα 71: Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση των AspRS και AsnRS, η AspRS1 του *T. thermophilus* ομαδοποιείται με τις βακτηριακές AspRSs, ενώ η AspRS2 ανήκει στην ομάδα των AspRS των αρχαίων και των ευκαρυωτικών οργανισμών.

Ποια είναι όμως τα στοιχεία του μορίου tRNA^{Asn} που καθορίζουν την αναγνώριση από τη βακτηριακή GatCAB; Η πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} από βακτήρια που χρησιμοποιούν την tRNA-εξαρτώμενη τρoσoαμίδωση υπέδειξε την ύπαρξη διαφορών μεταξύ των δύο μορίων. Με βάση την υπόθεση ότι τα στοιχεία ταυτότητας tRNA^{Asn} θα πρέπει να είναι συντηρημένα στα βακτήρια που χρησιμοποιούν τη δραστικότητα Asp-AdT και να διαφέρουν από τα νουκλεοτίδια στις αντίστοιχες θέσεις του tRNA^{Asp} δόθηκε έμφαση στη μελέτη των συντηρημένων διαφορών μεταξύ των δύο μορίων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η συνεισφορά του πρώτου ζεύγους βάσεων, του μεγέθους της θηλιάς D και του αντικωδικονίου στην αναγνώριση των υποστρωμάτων από τη βακτηριακή GatCAB. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν μελέτες μεταλλαξιγένεσης των μορίων tRNA στα τμήματα αυτά του μορίου, ώστε να αναλυθούν συνολικά αλλά και μεμονωμένα τα εν δυνάμει στοιχεία ταυτότητας για την τρoσoαμίδωση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των δοκιμών τρoσoαμίδωσης που πραγματοποιήθηκαν, το μοναδικό στοιχείο ταυτότητας του μορίου tRNA^{Asn} που καθορίζει την εξειδικευμένη αναγνώρισή τους από τη βακτηριακή GatCAB είναι το πρώτο ζεύγος βάσεων του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος, U1-A72. Ειδικότερα, για τη GatCAB του *Neisseria meningitidis*, σε αντίθεση με το ένζυμο του *Thermus thermophilus*, μεγαλύτερη βαρύτητα φαίνεται να έχει το νουκλεοτίδιο U1. Μέχρι τώρα, μεταξύ των ενζύμων που συνθέτουν aa-tRNA, μόνο η AlaRS έχει δείξει να αναγνωρίζει το συγγενές μόριο tRNA μόνο μέσω ενός ζεύγους βάσεων (Hou & Schimmel, 1988).

Η σημασία του ζεύγους βάσεων U1-A72 για την καταλυτική δραστικότητα της GatCAB πιθανώς να έγκειται στην ενεργειακή κατάσταση του συμπλόκου ενζύμου-

υποστρώματος. Σε ένα σύστημα που φαίνεται να λειτουργεί με τον ίδιο μηχανισμό, η αποδιάταξη του ζεύγους U1-A72 του tRNA^{Gln} του *Escherichia coli* μετά την αλληλεπίδραση του με τη GlnRS επιτρέπει το διαχωρισμό των συγγενών από τα μη συγγενή υποστρώματα (Rould *et al.*, 1989, Sherman & Soll, 1996). Υποθέτοντας ότι η διάσπαση του ζεύγους βάσεων U1-A72 του tRNA^{Asn} είναι το κύριο στάδιο που οδηγεί στην παρουσίαση του εστεροποιημένου Asp στο καταλυτικό κέντρο της GatCAB, η σημαντικότητα του συγκεκριμένου ζεύγους μπορεί να συσχετιστεί με την ασθενέστερη σύνδεση μέσω δεσμών υδρογόνου του ζεύγους αυτού. Η παρουσία του ζεύγους G1-C72 στο tRNA υπόστρωμα θα οδηγούσε σε μεγαλύτερη δαπάνη ελεύθερης ενέργειας για την αποδιάταξη του ζεύγους βάσεων. Στη GlnRS του *Escherichia coli*, ένα κατάλοιπο λευκίνης (Leu136) στην περιοχή δέσμευσης του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος του μορίου tRNA (acceptor-binding domain) ευνοεί αυτή τη διάσπαση μέσω υδροφοβικής παγίδευσης της πλευρικής αλυσίδας μεταξύ των A72 και G2 του tRNA^{Gln} (Sherman & Soll, 1996). Η τεταρτοταγής δομή της GatCAB υποδεικνύει την ύπαρξη στοιχείων συμβατών με την αναγνώριση του ζεύγους βάσεων U1-A72 του μορίου tRNA μέσω ενός μηχανισμού που προσομοιάζει με αυτόν της GlnRS (Nakamura *et al.*, 2006). Πράγματι, η καρβοξυτελική περιοχή της υπομονάδας GatB, που αποτελεί το ενεργό κέντρο τρανσαμιδάσης εμπεριέχει δύο θηλιές και ένα συντηρημένο κατάλοιπο λευκίνης (L472), η απαλοιφή του οποίου προκαλεί μειωμένη δεσμευτική ικανότητα για τα μόρια tRNA.

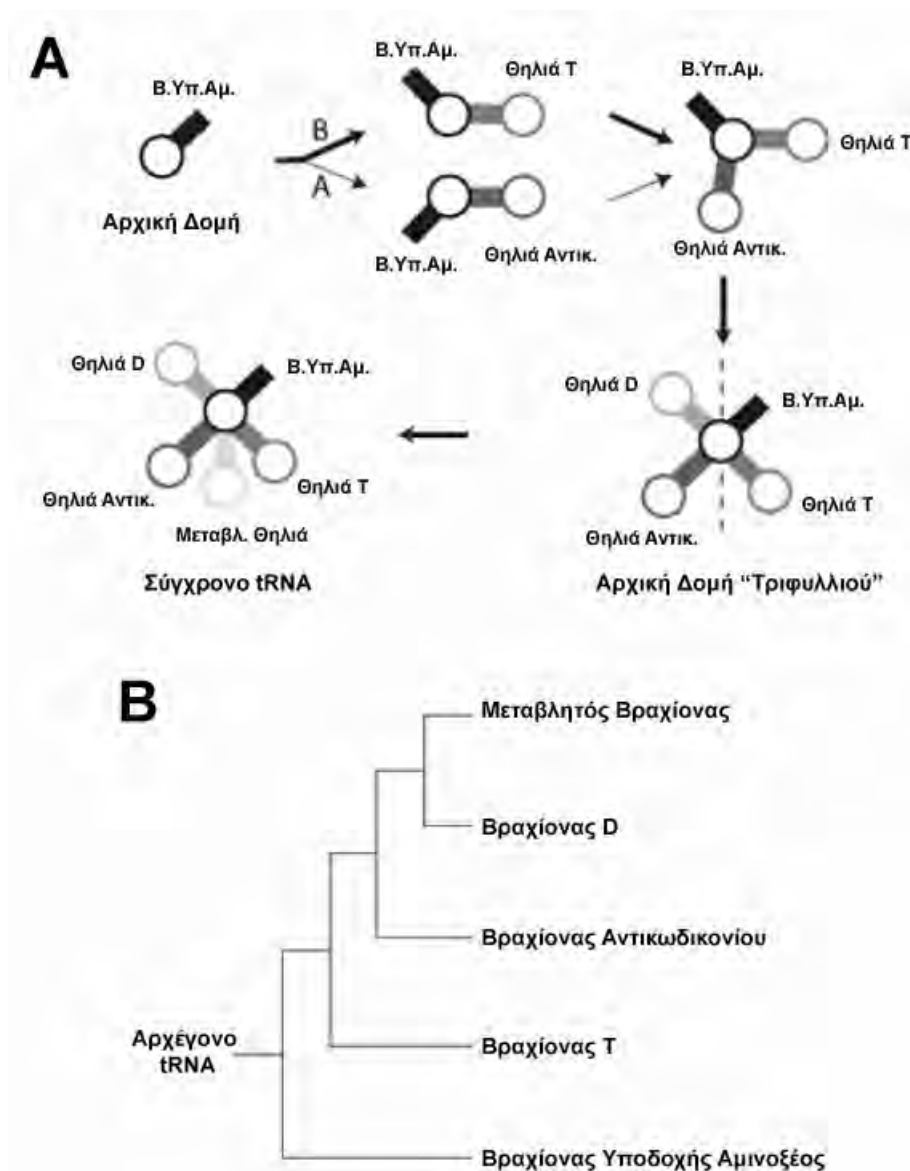
Η διάκριση μεταξύ των συγγενών και μη συγγενών υποστρωμάτων Asp-tRNA^{Asn} και Asp-tRNA^{Asp}, αντίστοιχα, από τις βακτηριακές AdTs δεν βασίζεται μόνο στη φύση του πρώτου ζεύγους βάσεων των δύο μορίων tRNA, αλλά και στο μέγεθος της θηλιάς D. Η GatCAB φαίνεται να έχει τη δυνατότητα να αντιλαμβάνεται τη μεγαλύτερη σε μέγεθος θηλιά D του tRNA^{Asp} και να αποκλείει το μόριο αυτό από τα πιθανά υποστρώματα. Ως εκ τούτου, τα επιπλέον νουκλεοτίδια που απαντώνται στη θηλιά D του tRNA^{Asp} θεωρούνται αντι-καθοριστικά στοιχεία της τρανσαμιδάσης. Ωστόσο δεν είναι γνωστό αν αυτό πραγματοποιείται από το ενεργό κέντρο του ενζύμου ή από κάποια άλλη περιοχή που αποκλειστικά αντιλαμβάνεται το μέγεθος της θηλιάς D του μορίου tRNA.

Η διπλή εξειδίκευση της GatCAB ως Asp- και Glu-AdT προκάλεσε το ερώτημα αν το ένζυμο αναγνωρίζει τα δύο υποστρώματα, Asp-tRNA^{Asn} και Glu-tRNA^{Gln}, μέσω των ίδιων στοιχείων ταυτότητας. Η ανάλυση των αλληλουχιών γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια tRNA^{Gln} και tRNA^{Glu} από βακτήρια που χρησιμοποιούν την Glu-AdT δραστηριότητα της GatCAB υπέδειξε την ύπαρξη συντηρημένων διαφορών μεταξύ των δύο μορίων. Παρόμοια με τα tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp}, διαφέρουν στο πρώτο ζεύγος βάσεων, στο μέγεθος της θηλιάς D και στο αντικωδικόνιο, το οποίο όμως δε φαίνεται να σχετίζεται με την αναγνώριση των υποστρωμάτων για την ακόλουθη τρανσαμιδάση. Προκύπτει λοιπόν ότι το tRNA^{Gln} διατηρεί τα ίδια στοιχεία ταυτότητας με το tRNA^{Asn} για την τρανσαμιδάση από την GatCAB, ενώ αντίστοιχα το tRNA^{Glu} φέρει τα ίδια αντι-καθοριστικά στοιχεία με το tRNA^{Asp} για τη δραστηριότητα αυτή. Η παρατήρηση αυτή είναι συμβατή με βιοχημικά και κρυσταλλογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι το

tRNA^{Gln} δεσμεύεται στην υπομονάδα GatB και ότι η αναγνώριση περιλαμβάνει το U1-A72 ζεύγος βάσεων και τη θηλιά D του μορίου tRNA (Nakamura *et al.*, 2006). Επιπρόσθετα, η ανάλυση της τεταρτοταγούς δομής της GatCAB του *Staphylococcus aureus* υπέδειξε την ύπαρξη ενός ενεργού κέντρου που σχηματίζεται από τις καταλυτικές περιοχές γλουταμινάσης και τρανσαμιδάσης των υπομονάδων GatA και GatB, αντίστοιχα, και μιας θέσης δέσμευσης για το tRNA υπόστρωμα, γεγονός που μπορεί να επεξηγήσει την ύπαρξη των κοινών στοιχείων ταυτότητας των μορίων tRNA^{Asn} και tRNA^{Gln} για την τρανσαμιδώσή τους (Nakamura *et al.*, 2006).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα αρχαία και τα βακτήρια χρησιμοποιούν ειδικά ως προς το βασίλειο στοιχεία ταυτότητας για την αποτελεσματική και εξειδικευμένη τρανσαμιδωση των Asp-tRNA^{Asn} από τις GatCAB AdTs. Οι δύο AdTs, παρότι παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους και καταλύουν την ίδια αντίδραση, δεν αναγνωρίζουν την ίδια περιοχή του μορίου tRNA. Οι AdTs των αρχαίων φαίνεται να αναγνωρίζουν τη μεταβλητή θηλιά του μορίου tRNA, που αποτελεί ένα συνδέτη μεταξύ του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος και του βραχίονα του αντικωδικονίου. Η μεταβλητή θηλιά δεν αποτελεί μόνο μια δομική αλλά και μια εξελικτική σύνδεση μεταξύ των τμημάτων του μορίου tRNA.

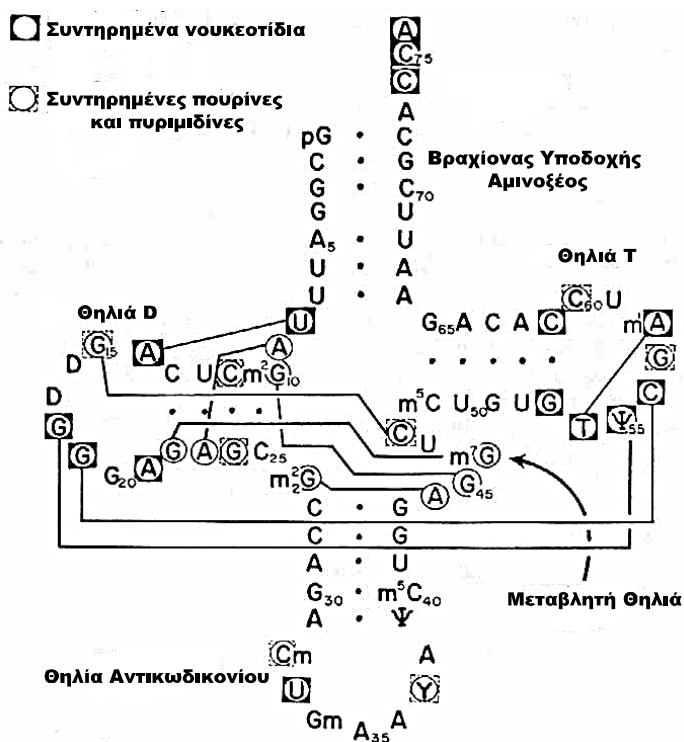
Ο βραχίονας υποδοχής του αμινοξέος θεωρείται το αρχέγονο μόριο tRNA, ενώ η θηλιά του αντικωδικονίου προστέθηκε στο μόριο αργότερα στην εξέλιξη και οδήγησε στην παρουσία της τριτοταγούς L-διαμόρφωσης (Schimmel & Ribas De Pouplana, 1995). Γενικότερα, σύμφωνα με το εξελικτικό μοντέλο που επεξηγεί την προέλευση και την εξέλιξη του μορίου tRNA, η σύγχρονη δευτεροταγής δομή του μορίου είναι αποτέλεσμα σταδιακής προσθήκης ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων ή διπλασιασμών τμημάτων του μορίου (Sun & Caetano-Anollés, 2008, Harris *et al.*, 2003) (**Εικόνα 72**). Το μόριο tRNA θεωρείται ότι προήλθε από ένα μικρό μόριο RNA με δομή φουρκέτας που εμπεριείχε μια απλή δομή βραχίονα-θηλιάς και ήταν ομόλογο με το σύγχρονο βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος. Στα βακτήρια και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το αρχέγονο αυτό μόριο επεκτάθηκε με την προσθήκη μιας περιοχής ομόλογης του σύγχρονου βραχίονα και της θηλιάς ΤΨC. Στα αρχέγονα μόρια των αρχαίων θεωρείται ότι αρχικά προστέθηκε μια περιοχική ομόλογη με το σύγχρονο βραχίονα και τη θηλιά του αντικωδικονίου. Η δομή των αρχέγονων μορίων επεκτάθηκε με την ενσωμάτωση περιοχών ομόλογων με το βραχίονα και τη θηλιά του αντικωδικονίου ή T, αντίστοιχα. Η προσθήκη της θηλιάς και του βραχίονα D οδήγησε σε ένα πιο σύνθετο μόριο tRNA και έπειτα αναπτύχθηκε η μεταβλητή θηλιά μεταξύ του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος και του βραχίονα T.



Εικόνα 72: Εξελικτικό μοντέλο για την προέλευση και την εξέλιξη των μορίων tRNA. (A) Το αρχέγονο μόριο αποτελούνταν μόνο από το βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος, ο οποίος στα βακτήρια και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς επεκτάθηκε με την προσθήκη του βραχίονα και της θηλιάς T (B), ενώ στα αρχαία με την προσθήκη του βραχίονα και της θηλιάς του αντικωδικονίου. Ακολούθως προστέθηκαν τα αντίστοιχα τμήματα στα μόρια tRNA. Τέλος, ενσωματώθηκε η θηλιά D και το μόριο tRNA πήρε την τελική μορφή με την προσθήκη της μεταβλητής θηλιάς. (B) Φυλογενετική ανάλυση των περιοχών των μορίων tRNA με βάση τις αλληλουχίες αλλά και τα λειτουργικά τους στοιχεία (B.Υπ.Αμ : Βραχίονας Υποδοχής του Αμινοξέος).

Το πρώτο ζεύγος βάσεων του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος αποτελεί ένα ισχυρό καθοριστικό στοιχείο της τρανσαμίδωσης στα βακτήρια διότι είναι συντηρημένο σε όλα τα μόρια tRNA^{Asn} αλλά απουσιάζει από τα μόρια tRNA^{Asp}. Αντίθετα στα αρχαία το πρώτο ζεύγος των μορίων tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} είναι κοινό. Ως εκ τούτου η διάκριση μεταξύ των tRNA^{Asn} και tRNA^{Asp} πρέπει να βασίζεται σε κάποιο άλλο τμήμα του μορίου

tRNA. Η αναγνώριση των υποστρωμάτων από τη GatCAB των αρχαίων δεν είναι ξεκάθαρο, αν καθορίζεται από το μήκος της μεταβλητής θηλιάς ή τη φύση των νουκλεοτιδίων στις θέσεις 46 και 47. Τα νουκλεοτίδια στις συγκεκριμένες θέσεις της μεταβλητής θηλιάς παίζουν σημαντικό ρόλο στην τριτοταγή διαμόρφωση των μορίων tRNA. Το νουκλεοτίδιο στη θέση 46 αλληλεπιδρά με το ζεύγος 13-22 του βραχίονα D μέσω τριών δεσμών υδρογόνου (**Εικόνα 73**), ενώ έχει δειχθεί ότι η απουσία του νουκλεοτιδίου στη θέση 47 αλλοιώνει τη σταθερότητα του μορίου tRNA (Rogers & Soll, 1993). Ως εκ τούτου, η διάκριση από την AdT των αρχαίων μεταξύ των Asp-tRNA^{Asn} και Asp-tRNA^{Asp} θα μπορούσε να βασίζεται σε συγκεκριμένη τριτοταγή διαμόρφωση των μορίων αυτών.



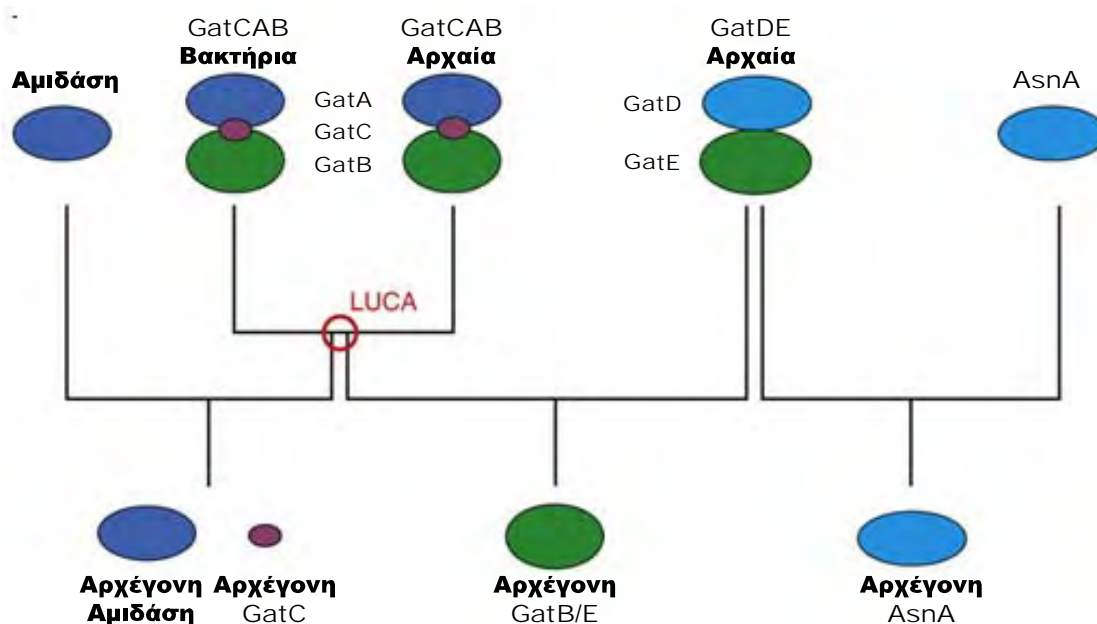
Εικόνα 73: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νουκλεοτιδίων σε συγκεκριμένες θέσεις του μορίου tRNA καθορίζουν την τριτοταγή διαμόρφωση του μορίου.

Μελέτες μεταλλαξιγένεσης που πραγματοποιήθηκαν με υποστρώματα tRNA και τη GatCAB του *Methanobacterium thermoautotrophicus* έδειξαν ότι πέραν της μεταβλητής θηλιάς, η θηλιά D, ο βραχίονας και η θηλιά T είναι σημαντικά για την αναγνώριση του tRNA^{Asn} από την AdT (Namgoong *et al.*, 2007). Όσον αφορά τη θηλιά D, δεν είναι ξεκάθαρο αν το μέγεθος αυτής ή νουκλεοτίδια σε συγκεκριμένες θέσεις επηρεάζουν την αναγνώριση. Αντίθετα, ο βραχίονας T, και ειδικότερα το νουκλεοτίδιο U49 του tRNA^{Asp} του *Methanobacterium thermoautotrophicus* αποτελεί ένα αντικαθοριστικό στοιχείο της τρσαναμιδωσης. Το νουκλεοτίδιο στη θέση 49 πιθανώς χρησιμοποιείται ως αντι-καθοριστικό στοιχείο από πολλές GatCAB αρχαίων, όπως φαίνεται από τις αλληλουχίες των μορίων tRNA^{Asp} από αρχαία.

Οι διαφορές που παρουσιάζουν οι GatCAB των βακτηρίων και των αρχαίων στην αναγνώριση των υποστρώματων, σε συνδυασμό με τα δεδομένα που προκύπτουν από τη μελέτη των στοιχείων ταυτότητας των υποστρώματων της GatDE των αρχαίων, μπορούν να ερμηνευτούν με βάση την εξελικτική προέλευση των ενζύμων. Η εξελικτική συσχέτιση των υπομονάδων GatB και GatE και το γεγονός ότι η GatDE και η βακτηριακή GatCAB αναγνωρίζουν το πρώτο ζεύγος βάσεων του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος υποδεικνύει ότι η αρχέγονη AdT θα μπορούσε να αναγνωρίζει το στοιχείο αυτό στα aa-tRNA υποστρώματά του. Η εξελικτική πίεση που οδήγησε στο διαχωρισμό της δραστικότητας Glu-AdT από την Asp-AdT στα αρχαία πιθανώς να είχε ως αποτέλεσμα η GatCAB των αρχαίων να μην αναγνωρίζει πλέον το πρώτο ζεύγος βάσεων του Asp-tRNA^{Asn} ώστε να διατηρήσει μόνο τη δραστικότητα Asp-AdT. Η ίδια πίεση προφανώς ευνόησε την ταυτόχρονη εξέλιξη της GatDE και του μορίου tRNA^{Gln}, ώστε το ένζυμο να αναγνωρίζει συγκεκριμένες βάσεις στο Glu-tRNA^{Gln}. Αντίθετα, η GatCAB των αρχαίων εξελίχτηκε ως Asp-AdT κυρίως απορρίπτοντας το συγγενές Glu-tRNA^{Gln} και όχι αναγνωρίζοντας συγκεκριμένα στοιχεία στο Asp-tRNA^{Asn} (Namgoong *et al.*, 2007). Η διαφορά στην ταυτόχρονη εξέλιξη των δύο AdTS των αρχαίων με τα tRNA υποστρώματά τους ίσως να είναι ένας λόγος που η AsnRS απαντάται σε όλα τα βασίλεια ενώ η GlnRS απουσιάζει πλήρως από τα αρχαία.

Η φυλογενετική ανάλυση των μορίων tRNA^{Gln} υποδεικνύει το διαχωρισμό των tRNA^{Gln} των αρχαίων, ενώ στην περίπτωση του tRNA^{Asn} παρατηρείται σύγκληση μεταξύ των αλληλουχιών από αρχαία, βακτήρια και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Έχει δειχθεί ότι η GlnRS του *Escherichia coli* και του *Saccharomyces cerevisiae* δεν αμινοακυλιώνουν το tRNA^{Gln} του *Methanobacterium thermoautotrophicus* (Tumbula *et al.*, 2000). Το μοναδικό tRNA^{Gln} των αρχαίων που προτιμάται από την GatDE μπορεί να απέτρεψε τα αρχαία από το να αποκτήσουν τη GlnRS μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Αντίθετα, η GatCAB των αρχαίων δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με κάποιο υπόστρωμα tRNA^{Asn} των αρχαίων που να μην αναγνωρίζεται από την AsnRS.

Πριν από τον πρώτο κοινό πρόγονο (LUCA, Last Universal Communal Ancestor) πιθανολογείται ότι υπήρχε ένας διπλασιασμός της υπομονάδας GatB/GatE (Sheppard & Söll, 2008). Είναι πιθανό ότι η αρχέγονη GatB/GatE δεν απαιτούσε τη δραστικότητα γλουταμινάσης, οπότε λειτουργούσε ως μονομερές. Μετά το διπλασιασμό, η μια GatB/GatE συνδέθηκε με μια αμιδάση (αρχέγονη GatA), πιθανώς με τη βοήθεια μιας βοηθητικής πρωτεΐνης GatC, προκαλώντας τη γένεση της GatCAB. Η άλλη GatB/GatE συνδέθηκε με μια αρχέγονη AnsA (GatD) σχηματίζοντας την πρώιμη ετεροδιμερή AdT (**Εικόνα 74**).



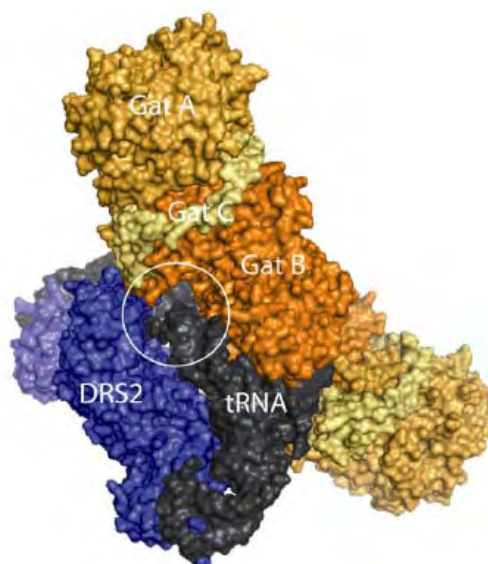
Εικόνα 14: Εξελικτικό μοντέλο για την προέλευση των AdTs. Τα δύο είδη αμιδοτρανοσφεράσης, GatCAB και GatDE, προήλθαν από τη σύζευξη της υπομονάδας GatB/E με μια αμιδάση και μια συνοδευτική πρωτεΐνη (GatCAB) ή με μια αρχέγονη AsnA (GatDE).

Τα αρχαία αναδυθήκαν από το LUCA φέροντας τόσο τη GatDE όσο και τη GatCAB, ενώ τα βακτήρια μόνο τη GatCAB. Η παρουσία και των δύο AdTs στο LUCA δεν μπορεί να θεωρηθεί ασύνηθες φαινόμενο (Roy *et al.*, 2003). Έχει αναφερθεί, για παράδειγμα, ότι το άμεσο και το έμμεσο μονοπάτι σύνθεσης Cys-tRNA^{Cys} ήταν παρόντα στο LUCA (O'Donoghue *et al.*, 2005), όπως επίσης και οι διαφορετικές μορφές των GlyRS, SerRS και LysRS (Woese *et al.*, 2000, O'Donoghue & Luthey-Schulten, 2003). Πιθανώς, ο LUCA να αποτελούσε μια ποικιλόμορφη ομάδα οργανισμών, στην οποία η οριζόντια μεταφορά γονιδίων να ήταν ένα κοινό φαινόμενο (Vetsigian *et al.*, 2006). Σε αυτή την ομάδα, κάποιος οργανισμός μπορεί να κωδικοποιούσαν μόνο τη GatCAB, ενώ άλλοι τη GatCAB και τη GatDE. Δε μπορεί όμως να απορριφθεί το ενδεχόμενο ότι ένας υποπληθυσμός του LUCA θα μπορούσε να κωδικοποιεί μόνο την αρχέγονη GatDE με διπλή δραστικότητα, ως Glu-AdT και Asp-AdT. Αν οι πρόγονοι των βακτηρίων στο LUCA έφεραν μόνο τη GatCAB ενώ οι πρόγονοι των αρχαίων κωδικοποιούσαν και τις δύο AdTs, θα μπορούσε να δικαιολογηθεί η σύγχρονη διανομή των GatCAB και GatDE.

Η χρήση ασύνηθων μονοπατιών αμινοακυλίωσης, που δεν είναι ένα πρόσφατο εξελικτικά χαρακτηριστικό των οργανισμών, συνεπάγεται τη σύνθεση λανθασμένα φορτισμένων μορίων tRNA όχι ως σφάλμα, αλλά ως απαίτηση. Αυτό συνεπάγεται την προσαρμογή όλης της μεταφραστικής μηχανής, με τελικό σκοπό την αποφυγή της ενσωμάτωσης αμινοξέων σε λάθος θέσεις στις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες. Η πιστότητα της πρωτεϊνοσύνθεσης επιτυγχάνεται, μεταξύ άλλων, μέσω της επιλογής από τον EF-Tu, ο οποίος έχει χαμηλή συγγένεια για τα

κακοφορισμένα μόρια tRNA. Έτσι, αποτρέπεται η μεταφορά τους στο ριβόσωμα. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι δε δεσμεύονται από τον παράγοντα επιμήκυνσης καθιστά τα μόρια aa-tRNA ευαίσθητα, διότι δεν προστατεύεται ο εστερικός δεσμός και υπάρχει πιθανότητα άμεσης υδρόλυσής του.

Ο μηχανισμός που θα μπορούσε να αποτρέψει την απελευθέρωση των κακοφορισμένων μορίων tRNA από τις συνθετάσες με χαμηλή εξειδίκευση, αλλά παράλληλα να τα προστατέψει από την υδρόλυση είναι η άμεση μεταφορά (channeling) των aa-tRNA από το ενεργό κέντρο της συνθετάσης στο ενεργό κέντρο της αμιδοτρανοφεράσης. Πρόσφατα μελετήθηκε ένα τριαδικό σύμπλοκο, που αναφέρεται ως **τρανσαμιδόσωμα (transamidosome)**, μεταξύ της μη εξειδικευμένης συνθετάσης AspRS2, της βακτηριακής αμιδοτρανοφεράσης GatCAB και του tRNA^{Asn} (Bailly *et al.*, 2007) (**Εικόνα 75**). Στο σύστημα αυτό, ο αμινοακυλιωμένος βραχίονας υποδοχής του αμινοξέος του μορίου tRNA μπορεί να καθοδηγείται από το ενεργό κέντρο της συνθετάσης σε αυτό της αμιδοτρανοφεράσης. Το τρανσαμιδόσωμα θεωρείται ένα νέο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (RNP), διότι το μόριο tRNA ευθύνεται για τη συναρμολόγηση του συμπλόκου στο οποίο δύο πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια μεταξύ τους στρατολογούνται από το tRNA και αλληλεπιδρούν μόνο παρουσία αυτού. Ωστόσο, το τρανσαμιδόσωμα είναι ένα ασύνηθες RNP, διότι ο ρόλος του μορίου tRNA δεν περιορίζεται μόνο στην αρχιτεκτονική του συμπλόκου. Στην πραγματικότητα, το tRNA^{Asn} είναι υπόστρωμα για την AspRS2 και συμπαράγοντας για το δεύτερο παράγοντα του συμπλόκου. Λόγω των πολλών ρόλων του μορίου RNA το τρανσαμιδόσωμα μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα δυναμικό RNP που απαιτεί το tRNA για να δομηθεί και αποσυναρμολογείται όταν το αμινοακυλιωμένο tRNA απελευθερώνεται.



Εικόνα 75: Το τρανσαμιδόσωμα αποτελεί ένα νέο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο μεταξύ της AspRS με χαμηλή εξειδίκευση, της βακτηριακής GatCAB και του tRNA^{Asn} που εξυπηρετεί την

άμεση μεταφορά του κακοφορισμένου Asp από το ενεργό κέντρο της συνθετάσης στο ενεργό κέντρο της αμιδοτρανσφοράσης.

Τα ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης εμπλέκονται και σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες πέραν της πρωτεϊνοσύνθεσης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η σύνθεση και η τροποποίηση συστατικών των κυττάρων, όπως είναι η βιοσύνθεση της αα-φωσφατιδυλογλυκερόλης, που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά (Roy & Ibb, 2008). Επιπρόσθετα, κάποια στάδια της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος διαμεσολαβούνται από ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης.

Η πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από μονομερή, που συνδέονται μεταξύ τους είτε άμεσα είτε έμμεσα, μέσω πεπτιδικών γεφυρών, των οποίων η σύσταση ποικίλει (**Πίνακας 18**). Στο *Staphylococcus aureus* ειδικότερα η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από 20 ή περισσότερα στρώματα γραμμικών αλυσίδων γλυκάνης. Η καρβοξυλομάδα του N-ακετυλομουραμικού οξέος είναι υποκατεστημένη από το πενταπεπτιδιο L-Ala-D-iGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Η σύνδεση μεταξύ των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης πραγματοποιείται με χαρακτηριστικές για τον οργανισμό γέφυρες πενταγλυκίνης, οι οποίες ενώνουν την ε-αμινομάδα της L-Lys ενός πεπτιδικού τμήματος με την D-Ala στη θέση 4 μιας γειτονικής πεπτιδικής αλυσίδας (Strominger & Ghuyssen, 1967, Hegde & Shrader, 2001, Rohrer & Berger-Bächi, 2003a). Το ευέλικτο πεπτιδιο πενταγλυκίνης επιτρέπει τη διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης, συνεισφέροντας έτσι στη σταθερότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Παράλληλα, η γέφυρα διασύνδεσης δρα ως αποδέκτης των πρωτεϊνών επιφανείας του *Staphylococcus aureus* που αγκυροβολούν ομοιοπολικά σε αυτή. Οι πρωτεΐνες επιφανείας είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την παθογονικότητα του οργανισμού αυτού (Perry et al., 2002, Roche et al., 2003).

Πίνακας 18: Παραδείγματα σύστασης των γεφυρών διασύνδεσης των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης σε διάφορα βακτηριακά στελέχη.

Βακτηριακό Είδος	Γέφυρα Διασύνδεσης Πεπτιδογλυκάνης
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gly ₅
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gly ₂₋₄ -L-Ser ₁₋₂ -Gly
<i>Streptococcus pneumonia</i>	L-Ala ₂ ή L-Ser-L-Ala
<i>Weissella viridescens</i>	L-Ala-L-Ser
<i>Enterococcus faecalis</i>	L-Ala ₂
<i>Enterococcus faecium</i>	D-Asx
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Gly

Η ενσωμάτωση των L-αμινοξέων στις πεπτιδικές γέφυρες διασύνδεσης διαμεσολαβείται από ένα ασυνήθες σύστημα αμινοακυλίωσης. Στο *Staphylococcus*

epidermidis, έναν οργανισμό του ίδιου γένους με το *Staphylococcus aureus*, η πεπτιδική γέφυρα αποτελείται από κατάλοιπα γλυκίνης και σερίνης. Ως δότες γλυκίνης για την ενσωμάτωση του αμινοξέος στις γέφυρες διασύνδεσης έχουν χαρακτηριστεί δύο ασυνήθη μόρια tRNA^{Gly} του οργανισμού αυτού (Roberts, 1972). Τα μόρια αυτά χαρακτηρίζονται ως μη-πρωτεϊνογενετικά (non-proteinogenic, NP), καθώς παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στην αλληλουχία τους που αποτρέπουν την αλληλεπίδραση τους με παράγοντες της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής και φαίνεται ότι συμμετέχουν αποκλειστικά στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Roberts, 1972). Ωστόσο, δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός σύνθεσης των γεφυρών της πεπτιδογλυκάνης του *Staphylococcus epidermidis* και δεν έχουν χαρακτηριστεί οι παράγοντες που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή.

Στο *Staphylococcus aureus*, αντίθετα, η ενσωμάτωση των καταλοίπων γλυκίνης στις γέφυρες πενταγλυκίνης της πεπτιδογλυκάνης είναι γνωστό ότι καταλύεται από τις μη ριβοσωμικές πεπτιδυλο-τρανσφεράσες Fem (Berger-Bächi & Tschierske, 1998). Οι παράγοντες αυτοί χρησιμοποιούν ως δότες γλυκίνης μόρια Gly-tRNA^{Gly} (Kamiryo & Matsushashi, 1972). Μέχρι σήμερα, ο αριθμός και τα χαρακτηριστικά των μορίων αυτών αλλά και γενικότερα των ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} του *Staphylococcus aureus* παρέμενε αδιευκρίνιστος. Οι μελέτες σχετικά με τον αριθμό των μορίων tRNA^{Gly} του οργανισμού αυτού ανέφεραν την ύπαρξη τριών ή τεσσάρων ισοδεκτικών μορίων βασιζόμενες σε χρωματογραφικές αναλύσεις και αναφέροντας την πιθανότητα σφάλματος λόγω αδυναμίας διαχωρισμού των κορυφών με τις υπάρχουσες τότε τεχνικές (Bumsted et al., 1968). Λόγω της συγγένειας των *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus aureus* και του γεγονότος ότι και οι δύο οργανισμοί φέρουν κατάλοιπα γλυκίνης στις γέφυρες διασύνδεσης των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης, υπήρχε η πιθανότητα να εκφράζονται και στο *Staphylococcus aureus* κάποια ασυνήθη μόρια tRNA^{Gly} που να συμμετέχουν αποκλειστικά στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και να μην έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσουν με παράγοντες της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Η αποκάλυψη της οργάνωσης του γονιδιώματος και ειδικότερα το ότι τα γονίδια των μορίων tRNA απαντώνται σε ομάδες στο χρωμόσωμα του *Staphylococcus aureus* υπέδειξε την ύπαρξη τουλάχιστον τεσσάρων γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια tRNA^{Gly} (Green & Vold, 1993). Η ανάλυση με τα εργαλεία της Βιοπληροφορικής αποκάλυψε την ύπαρξη 5 γονιδίων που κωδικοποιούν ισοδεκτικά μόρια tRNA^{Gly} στο *Staphylococcus aureus*. Ωστόσο, σύμφωνα με τις ψηφιακές βάσεις δεδομένων, ένα από τα ισοδεκτικά tRNA^{Gly} (NEWtRNA^{Gly(UCC)}) κωδικοποιούνταν από ένα ψευδογονίδιο. Το ψευδογονίδιο αυτό εντοπίζεται στο γονιδίωμα του *Staphylococcus aureus* μεταξύ δύο γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια tRNA^{Gly} σε μια ομάδα 27 γονιδίων tRNA. Η ανάλυση της έκφρασής του σε καλλιέργειες του *Staphylococcus aureus* έδειξε ότι το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε ποσοστά συγκρίσιμα με αυτά των υπολοίπων γονιδίων tRNA^{Gly}. Επιπρόσθετα, το ισοδεκτικό NEWtRNA^{Gly(UCC)} αποτελεί υπόστρωμα για την GlyRS του *Staphylococcus aureus* καθώς διατηρεί όλα τα στοιχεία ταυτότητας και αμινοακυλιώνεται εξίσου αποτελεσματικά με τα υπόλοιπα τέσσερα ισοδεκτικά tRNA^{Gly}.

Ποια είναι όμως τα χαρακτηριστικά του μορίου tRNA που μεταγράφεται από το ψευδογονίδιο;

Ο χαρακτηρισμός του NEWtRNA^{Gly(UCC)} ως “ψευδο”-tRNA πιθανότατα να οφείλεται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της αλληλουχίας του, που οδηγούν στον υπολογισμό ενός χαμηλού cove score, όσον αφορά την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής του μορίου. Παρόμοιες χαμηλές τιμές στο cove score παρουσιάζουν δύο ακόμα μόρια tRNA^{Gly} του *Staphylococcus aureus*, τα NP1tRNA^{Gly(UCC)} και NP2tRNA^{Gly(UCC)} και έχουν αναφερθεί και για άλλα μόρια tRNA που εμπλέκονται σε ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης (Levicán *et al.*, 2005). Τα κοινά στοιχεία των τριών αυτών μορίων είναι ότι από τις αλληλουχίες τους απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές αλληλουχίες GTψC της θηλιάς T και G18, G19 της θηλιάς D. Οι συγκεκριμένες θέσεις είναι ιδιαίτερα σημαντικές, διότι η αλληλεπίδραση μεταξύ τους επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την τριτοταγή δομή των μορίων tRNA, ενώ παράλληλα αποτελούν και θέσεις αναγνώρισης από το ριβόσωμα. Η έλλειψη αυτών των στοιχείων αποτέλεσε μια πρώτη ένδειξη ότι τα τρία αυτά μόρια πιθανότατα δε συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση. Αντίθετα, τα άλλα δύο ισοδεκτικά P1tRNA^{Gly(GCC)} και P2tRNA^{Gly(UCC)}, παρουσιάζουν υψηλές τιμές cove score και φέρουν όλες τις χαρακτηριστικές αλληλουχίες των πρωτεϊνογενετικών μορίων tRNA, όπως αυτά προσδιορίζονται μέσω συμβατικών εργαλείων της Βιοπληροφορικής. Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε απαραίτητη η περαιτέρω βιοχημική διερεύνηση του ρόλου αυτών των μορίων tRNA.

Η ανάλυση των δευτεροταγών δομών των NP1, NP2 και NEWtRNA^{Gly(UCC)} υπέδειξε ότι τα μόρια αυτά φέρουν στοιχεία στην αλληλουχία τους που δεν ευνοούν την αλληλεπίδραση με το ριβόσωμα και άλλους παράγοντες της πρωτεϊνοσύνθεσης. Συγκεκριμένα, τα ζεύγη βάσεων A49-U65 και A51-U63 που είναι κοινά και στα τρία μόρια σχετίζονται με ασθενή αλληλεπίδραση με τον παράγοντα EF-Tu (Roy *et al.*, 2007, Asahara & Uhlenbeck, 2002). Αντίθετα, στα μόρια P1tRNA^{Gly(GCC)} και P2tRNA^{Gly(UCC)} απαντώνται τα ζεύγη G49-U65 και G51-C63, αντίστοιχα. Το ζεύγος 51-63 παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των μορίων tRNA με τον EF-Tu, καθώς έχει δείξει ότι το κατάλοιπο Glu390 του EF-Tu αλληλεπιδρά ισχυρά με τη γουανίνη στη θέση 51 (Sanderson & Uhlenbeck, 2007). Καθώς, όμως η ισχύς της αλληλεπίδρασης tRNA - EF-Tu καθορίζεται και από το εστεροποιημένο αμινοξύ, κρίθηκε αναγκαία η βιοχημική ανάλυση της αλληλεπίδρασης των αμινοακυλιωμένων ισοδεκτικών μορίων tRNA^{Gly} του *Staphylococcus aureus* με τον EF-Tu. Η πρόβλεψη που βασίστηκε σε γονιδιωματικές αναλύσεις επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της βιοχημικής ανάλυσης της παρούσας διατριβής, δείχνοντας ότι τα τρία μόρια tRNA^{Gly} με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά δεσμεύονται ασθενώς με τον παράγοντα, σε αντίθεση με τα μόρια P1tRNA^{Gly(GCC)} και P2tRNA^{Gly(UCC)} (Giannouli *et al.*, 2008).

Η διαφορετική δεσμευτική ικανότητα των ισοδεκτικών tRNA^{Gly} με τους παράγοντες της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής επιτρέπει το διαχωρισμό τους σε πρωτεϊνογενετικά (P1tRNA^{Gly(GCC)} και P2tRNA^{Gly(UCC)}), τα οποία συμμετέχουν στη σύνθεση πρωτεϊνών, και μη-πρωτεϊνογενετικά (NEWtRNA^{Gly(UCC)}, NP1tRNA^{Gly(UCC)} και NP2tRNA^{Gly(UCC)}), που δεν εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή. Τα μη-πρωτεϊνογενετικά

tRNA^{Gly} του *Staphylococcus aureus* παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα με τα ασυνήθη μόρια tRNA^{Gly} του *Staphylococcus epidermidis* που συμμετέχουν αποκλειστικά στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Παραμένει, όμως, αδιευκρίνιστο ποιοι παράγοντες εμπλέκονται στην ενσωμάτωση των αμινοξέων στις γέφυρες της πεπτιδογλυκάνης του *Staphylococcus epidermidis* αν και στο γονιδίωμα του οργανισμού υπάρχουν ομόλογα γονίδια που κωδικοποιούν μη ριβοσωμικές πεπτιδυλο-τρανοφεράσες (Rohrer & Berger-Bächi, 2003b). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής είναι ένα ακόμα παράδειγμα της εμπλοκής μορίων tRNA σε βιοχημικές διεργασίες πέραν της πρωτεϊνοσύνθεσης και του ενεργού τους ρόλου ως καταγραφών γενετικών πληροφοριών.

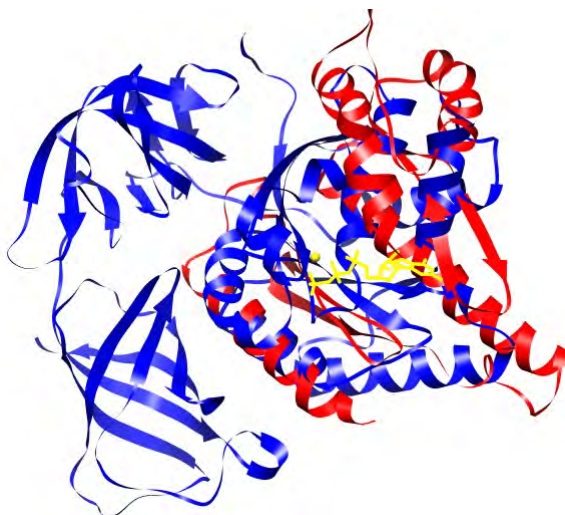
Δεδομένου ότι τα αμινοακυλιωμένα μη-πρωτεϊνογενετικά tRNA^{Gly} δεν αλληλεπιδρούν ισχυρά με τον EF-Tu, κάποιος άλλος παράγοντας θα πρέπει να έχει αναλάβει τη δέσμευση και μεταφορά τους στην πλασματική μεμβράνη παράλληλα να προστατέψει τον εστερικό δεσμό από την υδρόλυση. Ο ρόλος αυτός θα μπορούσε να αποδοθεί σε μια πρωτεΐνη που να ομοιάζει με τον EF-Tu ή να έχει δράση GTPάσης, αν και μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί το σύστημα αυτό της μεταφοράς των aa-tRNA για τη σύνθεση των γεφυρών διασύνδεσης.

Στα βακτήρια το ένα τρίτο των γονιδίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δεν έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα (Tatusov et al., 2000). Ένα μεγάλο ποσοστό των γονιδίων αυτών φαίνεται να κωδικοποιούν GTPάσες και ATPάσες. Η πλειονότητα των GTPασών ανήκει στην οικογένεια των NTPασών με θηλιά P (P-loop NTPases) που φέρουν μια διαμόρφωση δέσμευσης μονονουκλεοτιδίων και καταλύουν την υδρόλυση του β-γ φωσφοδιεστερικού δεσμού του νουκλεοτιδίου (Leipe et al., 2002, Saraste et al., 1990). Οι P-loop NTPάσες φέρουν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο που αποτελείται από μια μεταβλητή θηλιά μεταξύ ενός β πτυχωτού φύλλου και μιας α έλικας με τη χαρακτηριστική αλληλουχία GxxxxGK. Η θηλιά αυτή είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση των φωσφορικών ομάδων του νουκλεοτιδίου (Walker et al. 1982).

Η ανάλυση των γνωστών γονιδιωμάτων στελεχών του *Staphylococcus aureus* με εργαλεία της Βιοπληροφορικής υπέδειξε την ύπαρξη μιας πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο SAR0294 (*Staphylococcus aureus* MRSA252) και παρουσιάζει ομοιότητα στην αλληλουχία της με την περιοχική δέσμευσης GTP του EF-Tu (**Εικόνα 76**). Από την παράθεση της προβλεπόμενης δομής της πρωτεΐνης αυτής με τη δομή του EF-Tu προκύπτει ότι η πρωτεΐνη παρουσιάζει κάποια δομική ομοιότητα με την περιοχική αυτή του EF-Tu. Στην αλληλουχία της πρωτεΐνης αυτής εμπεριέχεται η χαρακτηριστική αλληλουχία GxxxxGK σε μια θηλιά μεταξύ μιας α έλικας και ενός β πτυχωτού φύλλου, αλλά περισσότερα από τέσσερα αμινοξέα παρεμβάλλονται μεταξύ των G-GK (αμινοξέα 93-109).

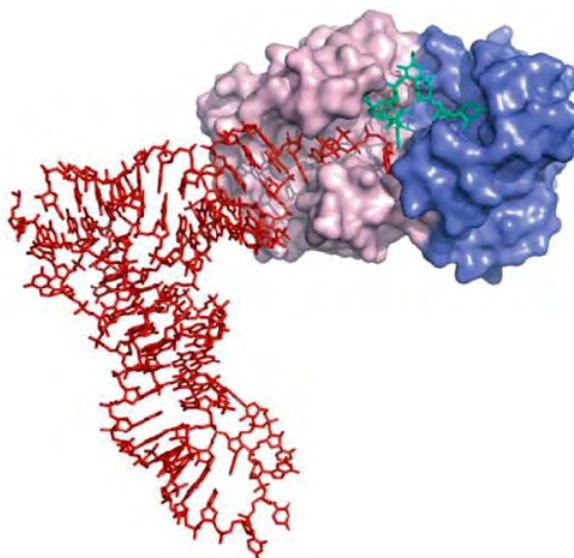
Στο *Staphylococcus aureus*, η ενσωμάτωση των καταλοίπων γλυκίνης στη γέφυρα διασύνδεσης πραγματοποιείται σταδιακά από τους παράγοντες FemXAB (Berger-Bächi & Tschierske, 1998). Στη διαδικασία αυτή δεν εμπλέκονται ριβοσώματα και η σύνθεση του πεπτιδίου πραγματοποιείται με φορά αντίθετη από αυτή της πρωτεϊνοσύνθεσης, από το καρβοξυτελικό προς το αμινοτελικό άκρο (Kamiryo &

Matsushashi, 1972). Έχει προταθεί πρόσφατα, ότι κάθε μια από τις τρεις μη ριβοσωμικές πεπτιδυλο-τρανσφεράσες χρησιμοποιεί ως δότη γλυκίνης ένα συγκεκριμένο μόριο tRNA^{Gly} (*Schneider et al., 2004*). Η υπόθεση αυτή είναι συμβατή με την ταυτοποίηση τριών μη πρωτεϊνογενετικών tRNA^{Gly} στο *Staphylococcus aureus*. Η εξειδικευμένη αλληλεπίδραση των παραγόντων Fem με τα τρία ισοδεκτικά tRNA^{Gly} καθώς και τα δομικά στοιχεία που καθορίζουν την αλληλεπίδραση αυτή δεν έχουν διερευνηθεί περαιτέρω.



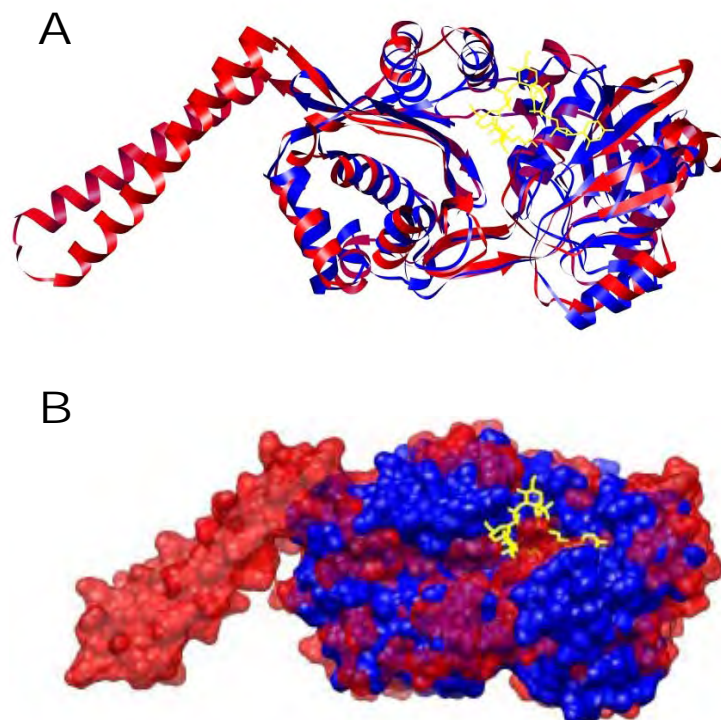
Εικόνα 76: Παράθεση της δομής της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο SAR0294 (πρόβλεψη με HMMSTR-Rosetta, κόκκινο) με την κρυσταλλική δομή του EF-Tu του *T. thermophilus* (μπλε) σε σύμπλοκο με ένα ανάλογο του GTP, το GDPNHP (κίτρινο).

Ο μηχανισμός ενσωμάτωσης των αμινοξέων στις γέφυρες διασύνδεσης έχει μελετηθεί μερικώς στο *Weissella viridescens* (*Hegde & Blanchard, 2003*). Στον οργανισμό αυτό οι γέφυρες αποτελούνται από ένα κατάλοιπο σερίνης και ένα αλανίνης. Η ενσωμάτωση της αλανίνης καταλύεται από τον παράγοντα FemX, του οποίου είναι γνωστή η κρυσταλλική δομή (*Biarrotte-Sorin et al., 2004*). Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων του FemX με το Ala-tRNA^{Ala} και το UDP-MurNAc-πενταπεπτίδιο υπέδειξε την πιθανή ύπαρξη ενός συμπλόκου μεταξύ τους που εξυπηρετεί την ταυτόχρονη δέσμευση και μεταφορά του αμινοξέος στο πενταπεπτίδιο. Στην τριτοταγή διαμόρφωση του FemX διακρίνεται η ύπαρξη μιας αύλακας που πιθανώς εξυπηρετεί την ταυτόχρονη δέσμευση των δύο υποστρωμάτων και η οποία πιθανώς είναι συντηρημένη και στους FemXAB του *Staphylococcus aureus* (*Biarrotte-Sorin et al., 2004, Benson et al., 2002*) (**Εικόνα 77**). Η περιοχή του tRNA^{Ala} που αλληλεπιδρά με τον παράγοντα FemX είναι τα δύο πρώτα ζεύγη βάσεων του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος και το ACCA-3' άκρο του μορίου.



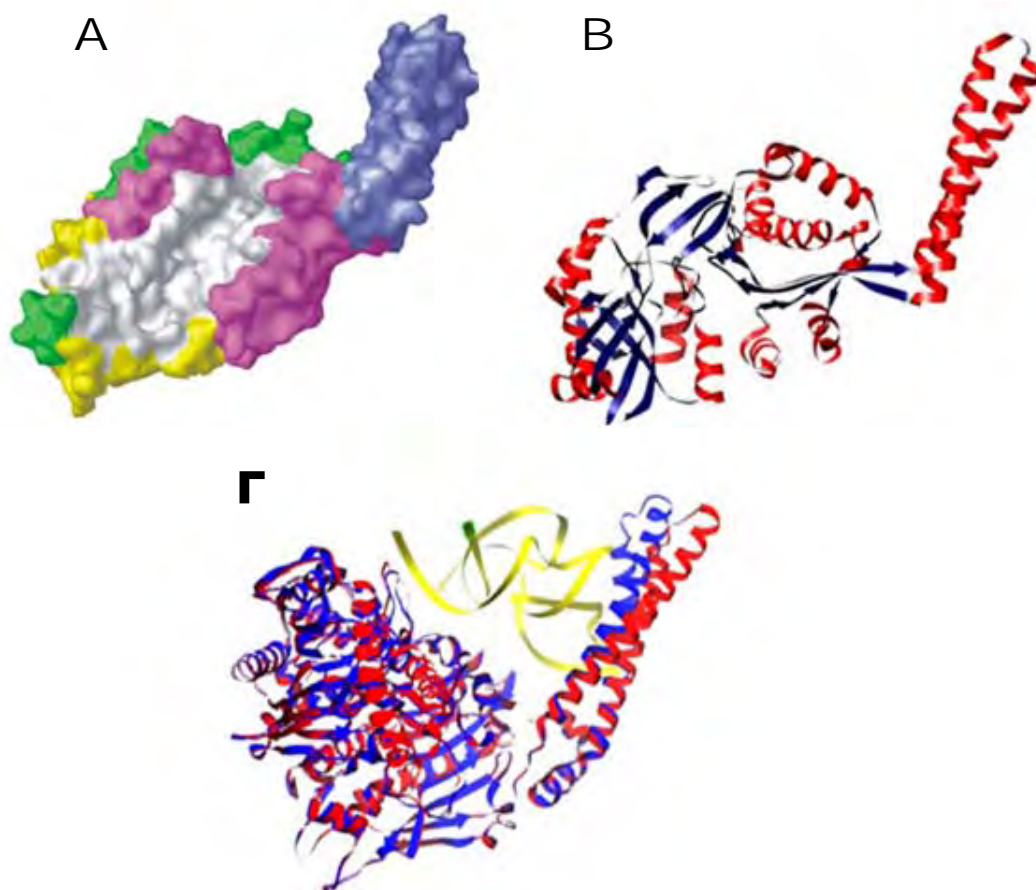
Εικόνα 77: Πρόβλεψη της περιοχής αλληλεπίδρασης του FemX του *W. viridescens* με το UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίο και το μόριο tRNA^{Ala}. Η αύλακα που παρατηρείται στην τριτοταγή διαμόρφωση του ευζύμου θεωρείται ότι είναι η περιοχή δέσμευσης των δύο υποστρωμάτων.

Ο FemX του *Weissella viridescens* διαφέρει από τον ομόλογο παράγοντα του *Staphylococcus aureus*, διότι είναι διαλυτή πρωτεΐνη και αναγνωρίζει το UDP-MurNAc-πενταπεπτιδίο (Hegde & Shrader, 2001). Αντίθετα, ο FemX του *Staphylococcus aureus* είναι πρωτεΐνη συνδεόμενη με την κυτταρική μεμβράνη και υπόστρωμα της είναι το λιπίδιο II. Οι δύο παράγοντες παρουσιάζουν μεταξύ τους μικρότερη αμινοξική ομοιότητα, σε σχέση με αυτή που παρουσιάζει ο FemX του *Staphylococcus aureus* με τον FemA. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής του FemX του *Staphylococcus aureus* δε μπορεί να βασιστεί στη δομή του FemX του *Weissella viridescens* και επιλέγεται αυτόματα από το σύστημα η δομή του FemA ως πρότυπο. Ωστόσο, όταν συγκρίνονται οι δομές των δύο παραγόντων FemX φαίνεται ότι ομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό στο κεντρικό σώμα των πρωτεϊνών (**Εικόνα 78**).



Εικόνα 78: Παράθεση της κρυσταλλικής δομής του FemX του *W. viridescens* (μπλε) και της προβλεπόμενης δομής του FemX του *S. aureus* (SwissModel, κόκκινο). Στο (A) απεικονίζονται οι α έλικες και τα β πτυχωτά φύλλα ενώ στο (B) η επιφάνεια των ενζύμων. Ο FemX του *S. aureus* φέρει μια επιπλέον περιοχή σπειρωμένου σπειράματος, της οποίας ο ρόλος δεν έχει προσδιοριστεί, αλλά παρουσιάζει δομική ομοιότητα με τον FemX του *W. viridescens* στο κύριο σώμα του ενζύμου.

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της τριτοταγούς δομής του FemA του *Staphylococcus aureus*, που πιθανώς να διατηρείται και από τους παράγοντες FemXB του οργανισμού αυτού, είναι ένα σπειρωμένο σπείραμα (coiled-coil) (Benson *et al.*, 2002) (**Εικόνα 79A, B**). Δύο ερμηνείες έχουν αποδοθεί για το ρόλο του σπειράματος, οι οποίες δεν έχουν επιβεβαιωθεί. Το γεγονός ότι το σπείραμα απουσιάζει από τη δομή FemX του *Weissella viridescens* που είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, οδήγησε στην υπόθεση ότι μπορεί να εμπλέκεται στη δέσμευση με την πλασματική μεμβράνη (Biarrotte-Sorin *et al.*, 2004). Σύμφωνα με τη δεύτερη υπόθεση, το σπειρώδες σπείραμα είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με το μόριο tRNA (Benson *et al.*, 2002). Η θεώρηση αυτή πηγάζει από την ύπαρξη ενός παρόμοιου σπειράματος στη βακτηριακή SerRS (Fujinaga *et al.*, 1993) το οποίο αλληλεπιδρά με το tRNA υπόστρωμα (Cusack *et al.*, 1996) (**Εικόνα 79Γ**).



Εικόνα 79: (Α) Κρυσταλλική δομή του παράγοντα FemA του *S. aureus*. Με λευκό απεικονίζεται η αύλακα που θεωρείται ότι αποτελεί την περιοχή αλληλεπίδρασης με τα υποστρώματα, το λιπίδιο II και το μόριο $tRNA^{Gly}$. (Β) Δομή του παράγοντα FemA του *S. aureus*, στην οποία απεικονίζονται οι α έλικες και τα β πτυχωτά φύλλα. Η περιοχή του σπειρωμένου σπειρώματος θεωρείται συντηρημένη στους παράγοντες FemXAB του *S. aureus*. (Γ) Παράθεση της κρυσταλλικής δομής της SerRS του *P. horikoshii* σε ελεύθερη κατάσταση (κόκκινο) και σε σύμπλοκο (μπλε) με το $tRNA^{Ser}$ (κίτρινο). Η δέσμευση του υποστρώματος φαίνεται να προκαλεί μια μετατόπιση στην περιοχή του σπειρωμένου σπειρώματος, που ευθύνεται για τη δέσμευση του μορίου tRNA.

Η μελέτη των παραγόντων FemXAB του *Staphylococcus aureus* ως συνάρτηση των αλληλεπιδράσεων τους με τα $tRNA^{Gly}$ υποστρώματα είναι ιδιαίτερα σημαντική. Ο προσδιορισμός των στοιχείων ταυτότητας των μορίων tRNA για τη συμμετοχή τους στο ασύνηθες αυτό σύστημα αμινοακυλίωσης θα μπορούσε να παρέχει μια χημική πλατφόρμα για το σχεδιασμό εν δυνάμει αναστολέων των μορίων αυτών και ιδιαίτερα του FemX, που η δραστικότητα του είναι κρίσιμη για τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Γενικότερα, η στόχευση των παραγόντων των ασύνηθων συστημάτων αμινοακυλίωσης είναι πολλά υποσχόμενη για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών φαρμάκων.

Η εύρεση νέων μοριακών στόχων για απενεργοποίηση αποτελεί πλέον επιτακτική ανάγκη, διότι η ευρεία χρήση των αντιβιοτικών φαρμάκων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα βακτήρια. Τα πρώτα χρόνια η πενικιλίνη αποτέλεσε το “φάρμακο-θαύμα”, μέχρι που αποκαλύφθηκε ότι οι μικροοργανισμοί

έχουν ισχυρούς προσαρμοστικούς μηχανισμούς για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Το παράδειγμα της πενικιλίνης έχει επαναληφθεί και με άλλα αντιβιοτικά φάρμακα. Το γεγονός αυτό έχει κινητοποιήσει έντονες προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών φαρμάκων. Οι κυτταρικοί στόχοι για τα ήδη υπάρχοντα αλλά και τα νέα αντιβιοτικά φάρμακα είναι ποικίλοι και όλοι σημαντικοί για την κυτταρική ανάπτυξη. Γενικά μπορούν να διαχωριστούν σε δύο ομάδες: σε αυτούς που είναι μοναδικοί για τους παθογόνους μικροοργανισμούς και δεν έχουν ομόλογα στα κύτταρα των θηλαστικών και σε εκείνους που έχουν ομόλογους στα θηλαστικά.

Η πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή και ειδικότερα οι παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτή αποτελούν έναν από τους κύριους στόχους για τα αντιβιοτικά φάρμακα που έχουν αναπτυχθεί μέχρι τώρα. Τα αντιβιοτικά αυτά είναι φυσικά προϊόντα που περιλαμβάνουν τις αμινογλυκοσίδες, τα μακρολίδια και τις τετρακυκλίνες μεταξύ άλλων. Τα περισσότερα όμως έχουν κάποιους περιορισμούς όπως είναι η ενδοκυττάρωση ή η εμφάνιση ανθεκτικότητας από τα παθογόνα. Η ανάπτυξη λοιπόν νέων αντιβιοτικών φαρμάκων έχει στραφεί προς τον εντοπισμό και το χαρακτηρισμό νέων μοριακών στόχων στα αρχικά στάδια της πρωτεϊνοσύνθεσης και συγκεκριμένα στους παράγοντες που συμμετέχουν στην αμινοακυλίωση των μορίων tRNA.

Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες αποτελούν έναν εν δυνάμει στόχο ιδιαίτερα εξειδικευμένων αντιβιοτικών φαρμάκων. Ωστόσο, ο σχεδιασμός αναστολέων για τα ένζυμα αυτά είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος λόγω της υψηλής ομολογίας μεταξύ των προκαρυωτικών και των ευκαρυωτικών συνθετασών. Βέβαια, οι aaRSs ως στόχοι φαρμάκων είναι πολλά υποσχόμενα ένζυμα, διότι υπάρχουν πολλά παραδείγματα τέτοιων ενζύμων που απαντώνται μόνο σε προκαρυωτικούς οργανισμούς και συμμετέχουν σε ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης τα οποία περιγράφηκαν παραπάνω.

Μία άλλη κύρια τάξη αντιβιοτικών αναστέλλει τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος μέσω ποικίλων μηχανισμών. Η σύνθεση και η μεταφορά του λιπιδίου II αποτελούν από τους κύριους στόχους των φαρμάκων αυτών (*De Kruijff et al., 2008*). Επιπρόσθετα, το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης αναστέλλεται από ποικιλία αντιβιοτικών φαρμάκων που προσομοιάζουν δομικά με το πεπτιδικό τμήμα των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης και αναστέλλουν την αντίδραση τρανσπεπτιδίωσης (π.χ. β-λακτάμες).

Τα ασυνήθη συστήματα αμινοακυλίωσης αποτελούν έναν ελκυστικό στόχο για απενεργοποίηση. Τα θετικά στοιχεία που παρουσιάζουν είναι η εξειδίκευση ως προς το είδος και η απουσία κάποιων από αυτά στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Ακόμα και στις περιπτώσεις που τα μονοπάτια αυτά απαντώνται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως για παράδειγμα η σύνθεση της σεληνιοκυστεΐνης, έχει αποδειχθεί ότι η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων και οι παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτή διαφέρουν μεταξύ των δύο βασιλείων. Μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί η αναστολή των ασυνήθων συστημάτων αμινοακυλίωσης σε μεγάλο βαθμό. Ελάχιστες είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές που σχετίζονται με το σχεδιασμό και τον έλεγχο αναστολέων για παράγοντες των ασυνήθων συστημάτων. Ο πλήρης χαρακτηρισμός των παραγόντων αυτών και των

αντιδράσεων που καταλύουν θα παρείχε απαραίτητες πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση ενζύμου υποστρώματος που θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη χημική βάση για τη σύνθεση νέων πιθανών αναστολέων.

Τέλος, η παρούσα διατριβή συνεισφέρει στην κατανόηση του κεντρικού ρόλου των μορίων tRNA όχι απλώς ως παθητικών μεταφορέων αμινοξέων αλλά ως σημαντικών ρυθμιστικών μορίων, τα οποία κατά τη διάρκεια της εξέλιξης έχουν συντηρήσει τον προσαρμοστικό τους ρόλο σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, η μελέτη και αποσαφήνιση των οποίων μόλις πρόσφατα αρχίζει να εξερευνάται.

ABSTRACT

The term “unconventional (or unusual) aminoacylation systems” describes biosynthetic pathways that involve aminoacyl-tRNAs as essential factors, not only during protein synthesis but also in alternative processes (tRNA-dependent). During recent years, many functional genomic studies have demonstrated the unconventional role of aminoacyl-tRNAs outside protein synthesis and their participation in many different but equally essential biochemical pathways.

In the first part, the present dissertation deals with the study and biochemical characterization of the role of tRNA molecules during the tRNA-dependent conversion of aspartate to asparagine in the pathogen *Neisseria meningitidis*. This pathway is catalyzed by the tRNA-dependent amidotransferase (AdT). This biosynthetic pathway is present in all pathogens with known genome and plays a dual role. It supplies the necessary Asn-tRNA^{Asn} substrates for the incorporation of asparagine into nascent polypeptides, but it also plays critical role on the biosynthesis of asparagine, in the organisms that lack the appropriate biosynthetic enzymes for this specific amino acid. It was found that the crucial determinant elements for recognition by bacterial amidotransferases constitute by the first base-pair U1-A72 of tRNA^{Asn} and the length and the sequence of the variable loop for the archaeal enzymes. In addition, an extra nucleotide in the D-loop of tRNA^{Asp} is the anti-determinant element that prevents the interaction with the amidotransferases.

In the second part, the present dissertation deals with the study and elucidation of the tRNA-dependent synthesis of the cell wall in the pathogen *Staphylococcus aureus*. The peptidoglycan moiety in this specific pathogen is stabilized through characteristic pentaglycine interpeptide bridges, which are synthesized independent of ribosomal activity. As donors of glycine this pathway utilizes Gly-tRNA^{Gly} molecules. However, until today it was not known, how many and which tRNA^{Gly} molecules are actually encoded, expressed and involved in this exo-ribosomal pathway of peptide synthesis. In the present dissertation was determined the exact number of genes encoding for tRNA^{Gly} isoacceptors that are expressed. In addition, biochemical studies lead to the characterization of specific tRNA^{Gly} isoacceptors as proteinogenic (those participating solely into ribosomal protein synthesis, 2 molecules P1 and P2) and as non-proteinogenic (those devoted to exo-ribosomal bacterial cell wall synthesis, 3 molecules NP1, NP2 and NEW).

The study of both unconventional aminoacylation systems focuses on the essential role of tRNA molecules not only as passive adaptors during the flow of the genetic information but as key-players in essential biochemical pathways that are now considered as novel molecular targets for specific inactivation for the majority of pathogens.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akochy, P.M., Bernard, D., Roy, P.H. and Lapointe, J. (2004) Direct glutaminyl-tRNA biosynthesis and indirect asparaginyl-tRNA biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 186: 767–776
- Altman, S. (2007) A view of RNase P. *Mol. Biosyst.* 3: 604–607
- Araki, Y., Nakatani, T., Hayashi, H. and Ito, E. (1971b) Occurrence of non-N-substituted glucosamine residues in lysozyme-resistant peptidoglycan from *Bacillus cereus* cell walls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42: 691–697
- Araki, Y., Nakatani, T., Makino, R., Hayashi, H. and Ito, E. (1971a) Isolation of glucosaminyl β (1-4)-muramic acid and phosphoric acid ester of this disaccharide from acid hydrolysates of peptidoglycan of *Bacillus cereus* AHU 1356 cell walls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42: 684–690
- Asahara, H. and Uhlenbeck, O.C. (2002) The tRNA specificity of *Thermus thermophilus* EFTu, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 3499–3504
- Asahara, H., Himeno, H., Tamura, K., Nameki, N., Hasegawa, T. and Shimizu, M. (1994) *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase recognizes tRNA(Ser) by its characteristic tertiary structure. *J. Mol. Biol.* 236: 738–748
- Bailly, M., Blaise, M., Lorber, B., Becker, H.D. and Kern, D. (2007) The transamidosome: a dynamic ribonucleoprotein particle dedicated to prokaryotic tRNA-dependent asparagine biosynthesis. *Mol. Cell.* 28: 228–239
- Bailly, M., Blaise, M., Roy, H., Deniziak, M., Lorber, B., Birck, C., Becker, H.D. and Kern, D. (2008) tRNA-dependent asparagine formation in prokaryotes: characterization, isolation and structural and functional analysis of a ribonucleoprotein particle generating Asn-tRNA(Asn). *Methods* 44: 146–163
- Bailly, M., Giannouli, S., Blaise, M., Stathopoulos, C., Kern, D. and Becker, H.D. (2006) A single tRNA base pair mediates bacterial tRNA-dependent biosynthesis of asparagine. *Nucleic Acids Res.* 34: 6083–6094
- Baines, P.J., Jackson, D., Mellows, G., Swaisland, A.J. and Tasker, T.C.G. (1984) Mupirocin: its chemistry and metabolism. In: Mupirocin—A Novel Topical Antibiotic (Wilkinson, D. S., and Price, J. D., eds) pp. 13–22, Royal Society of Medicine International Congress and Symposium Series Number 80
- Balg, C., Huot, J.L., Lapointe, J., Chênevert, R. (2008) Inhibition of *Helicobacter pylori* aminoacyl-tRNA amidotransferase by puromycin analogues. *J. Am. Chem. Soc.* 130: 3264–3265

- Becker, H.D. and Kern, D. (1998) *Thermus thermophilus*: A link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 12832-12837
- Becker, H.D., Giege, R. and Kern, D. (1996) Identity of prokaryotic and eukaryotic tRNA^{Asp} for aminoacylation by aspartyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry* 35: 7447-7458
- Becker, H.D., Min, B., Jacobi, C., Raczniak, G., Pelaschier, J., Roy, H., Klein, S., Kern, D. and Söll, D. (2000b). The heterotrimeric *Thermus thermophilus* Asp-tRNA^{Asn} amidotransferase can also generate Gln-tRNA^{Gln}. *FEBS Lett.* 476: 140-144
- Becker, H.D., Reinbolt, J., Kreutzer, R., Giegé, R. and Kern, D. (1997) Existence of two distinct aspartyl-tRNA synthetases in *Thermus thermophilus*. Structural and biochemical properties of the two enzymes. *Biochemistry* 36: 8785-8797
- Becker, H.D., Roy, H., Moulinier, L., Mazauric, M.H., Keith, G. and Kern, D. (2000) *Thermus thermophilus* contains an eubacterial and an archaeobacterial aspartyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 39: 3216-3230
- Benson, T.E., Prince, D.B., Mutchler, V.T., Curry, K.A., Ho, A.M., Sarver, R.W., Hagadorn, J.C., Choi, G.H. and Garlick, R.L. (2002) X-ray crystal structure of *Staphylococcus aureus* FemA. *Structure* 10: 1107-1115
- Berger-Bächi, B. and Tschierske, M. (1998) Role of fem factors in methicillin resistance. *Drug Resist. Updat.* 1: 325-335
- Biarrotte-Sorin, S., Maillard, A.P., Delettré, J., Sougakoff, W., Arthur, M. and Mayer, C. (2004) Crystal structures of *Weissella viridescens* FemX and its complex with UDP-MurNAc-pentapeptide: insights into FemABX family substrates recognition. *Structure* 12: 257-267
- Bilokapic, S., Korencic, D., Söll, D. and Weygand-Durasevic, I. (2004) The unusual methanogenic seryl-tRNA synthetase recognizes tRNA^{Ser} species from all three kingdoms of life. *Eur. J. Biochem.* 271: 694-70
- Bjork, G.R. (1995) Genetic dissection of synthesis and function of modified nucleosides in bacterial transfer RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 50: 263-33
- Bjork, G.R., Ericson, J.U., Gustafsson, C.E.D., Hagervall, T.G., Jonsson, H. and Wikstrom, P.M. (1987) Transfer RNA modification. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 263-287
- Bock, A., Thanbichler, M., Rother, M. and Resch, A. (2005) Selenocysteine. In Ibba, M., Francklyn, C. and Cusak, S. (eds), *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*. Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA, pp. 320-327

- Bradford, 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: 248-254
- Brown, E.D. (2005) Conserved P-loop GTPases of unknown function in bacteria: an emerging and vital ensemble in bacterial physiology. *Biochem. Cell Biol.* 83: 738-746
- Brown, R.S., Clark, B.F., Coulson, R.R., Finch, J.T., Klug, A. and Rhodes, D. (1972) Crystallization of pure species of bacterial tRNA for X-ray diffraction studies. *Eur J Biochem* 31: 130-134
- Bruton, C.J. and Clark, B.F. (1974) The role of the anticodon in the interaction between methionyl-tRNA synthetase and bacterial initiator tRNA. *Nucleic Acids Res.* 1: 217-221
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S. and Venter, J.C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273: 1058-1073
- Bumsted, R.M., Dahl, J.L., Söll, D. and Strominger J.L. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. X. Further study of the glycyl transfer ribonucleic acids active in peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 243: 779-783
- Bunjun, S., Stathopoulos, C., Graham, D., Min, B., Kitabatake, M., Wang, A.L., Wang, C.C., Vivarés, C.P., Weiss, L.M. and Söll, D. (2000) A dual-specificity aminoacyl-tRNA synthetase in the deep-rooted eukaryote *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 12997-13002
- Burbaum, J.J. and Schimmel, P. (1991) Structural relationships and the classification of aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* 266: 16965-16968
- Carlson, B.A., Xu, X.M., Kryukov, G.V., Rao, M., Berry, M.J., Gladyshev, V.N. and Hatfield, D.L. (2004) Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 12848-12853
- Carter, C.W. Jr. (1993) Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 715-748
- Casewell, M.W. and Hill, R.L. (1985) In vitro activity of mupirocin ('pseudomonic acid') against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 15: 523-531

- Cathopoulos, T., Chuawong, P. and Hendrickson, T.L. (2007b) Novel tRNA aminoacylation mechanisms. *Mol. Biosyst.* 3: 408–418
- Cathopoulos, T.J., Chuawong, P. and Hendrickson, T.L. (2007a) A thin-layer electrophoretic assay for Asp^tRNA(Asn)/Glu-tRNA(Gln) amidotransferase. *Anal. Biochem.* 360: 151–153
- Chalker, A.F., Minehart, H.W., Hughes, N.J., Koretke, K.K., Lonetto, M.A., Brinkman, K.K., Warren, P.V., Lupas, A., Stanhope, M.J., Brown, J.R. and Hoffman, P.S. (2001) Systematic identification of selective essential genes in *Helicobacter pylori* by genome prioritization and allelic replacement mutagenesis. *J. Bacteriol.* 183: 1259-1268
- Chambers, H. F. (1999) Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *The Journal of Infectious Diseases.* 179: 353–359
- Charles, W. and Carter, J.R. (1993) Cognition, mechanism and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 715-748
- Charron, C., Roy, H., Blaise, M., Giegé, R. and Kern, D. (2003) Non-discriminating and discriminating aspartyl-tRNA synthetases differ in the anticodon-binding domain. *EMBO J.* 22: 1632-1643
- Chemama, M., Fonvielle, M., Villet, R., Arthur, M., Valéry, J.M. and Etheve-Quellejeu, M. (2007) Stable analogues of aminoacyl-tRNA for inhibition of an essential step of bacterial cell-wall synthesis. *J Am Chem Soc.* 129: 12642-12643
- Cone, J.E., Del Río, R.M., Davis, J.N. and Stadtman, T.C. (1976) Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 2659-2663
- Connolly, S.A., Rosen, A.E., Musier-Forsyth, K. and Francklyn, C.S. (2004) G-1:C73 recognition by an arginine cluster in the active site of *Escherichia coli* histidyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 43: 962-969
- Crick, F.H.C. (1958) On Protein Synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* XII: 139-163
- Crick, F.H.C. (1970) Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227: 561-563
- Curnow, A.W., Hong, K., Yuan, R., Kim, S., Martins, O., Winkler, W., Henkin, T.M. and Söll, D. (1997) Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase: a novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 11819-26
- Curnow, A.W., Tumbula, D.L., Pelaschier, J.T., Min, B. and Söll, D. (1998) Glutamyl-tRNA^{Gln} amidotransferase in *Deinococcus radiodurans* may be confined to asparagine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 12838-12843

- Cusack, S. (1993) Sequence, structure and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-tRNA synthetases: an update. *Biochimie* 75: 1077–1081
- Cusack, S. (1997) Aminoacyl-tRNA synthetases. *Current Opinion in Structural Biology* 7: 881-889
- Cusack, S., Yaremchuk, A. and Tukalo, M. (1996) The crystal structure of the ternary complex of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase with tRNA(Ser) and a seryl-adenylate analogue reveals a conformational switch in the active site. *EMBO J.* 15: 2834-2842
- De Bruijn, M.H. and Klug, A. (1983) A model for the tertiary structure of mammalian mitochondrial transfer RNAs lacking the entire 'dihydrouridine' loop and stem. *EMBO J.* 2: 1309–1321
- de Kruijff, B., van Dam, V. and Breukink, E. (2008) Lipid II: A central component in bacterial cell wall synthesis and a target for antibiotics. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids In Press*
- De La Sierra-Gallay, I.L., Pellegrini, O. and Condon, C. (2005) structural basis for substrate binding, cleavage and allostey in the tRNA maturase RNase Z. *Nature* 433: 657-661
- De Lencastre, H. and Tomasz, A. (1994) Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2590–2598
- Denziak, M., Sauter, C., Becker, H.D., Paulus, C.A., Giege, R. and Kern, D. (2007) *Deinococcus* glutaminyl-tRNA synthetase is a chimer between proteins from an ancient and the modern pathways of aminoacyl-tRNA formation. *Nucleic Acids Res.* 35: 1421–1431
- Dickerman, H.W., Steers, E. Jr., Redfield, B.G. and Weissbach, H. (1967) Methionyl soluble ribonucleic acid transformylase. I. Purification and partial characterization. *J. Biol. Chem.* 242: 1522–1525
- Dock-Bregeon, A., Sankaranarayanan, R., Romby, P., Caillet, J., Springer, M., Rees, B., Francklyn, C.S., Ehresmann, C. and Moras, D. (2000) Transfer RNA-mediated editing in threonyl-tRNA synthetase: The class II solution to the double discrimination problem. *Cell* 103: 877-884
- Dubourg. O., Azzedine, H., Yaou, R.B., Pouget, J., Barois, A., Meininger, V., Bouteiller, D., Ruberg, M., Brice, A. and LeGuern, E. (2006) The G526R glycyl-tRNA synthetase gene mutation in distal hereditary motor neuropathy type V. *Neurology* 66: 1721-1726

- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. and Moras, D. (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* 347: 203-206
- Fechter, P., Rudinger, J., Giege, R. and Theobald-Dietrich, A. (1998) Ribozyme processed tRNA transcripts with unfriendly internal promoter for T7 RNA polymerase: production and activity. *FEBS Lett.* 436: 99-103
- Feng, L., Sheppard, K., Tumbula-Hansen, D. and Söll, D. (2005) Gln-tRNA^{Gln} formation from Glu-tRNA^{Gln} requires cooperation of an asparaginase and a Glu-tRNA^{Gln} kinase. *J. Biol. Chem.* 280: 8150-8155
- Frank, D.N. and Pace N.R. (1998) Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Annual Rev Biochemistry* 67: 153-180
- Fujinaga, M., Berthet-Colominas, C., Yaremchuk, A.D., Tukalo, M.A. and Cusack, S. (1993) Refined crystal structure of the seryl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* at 2.5Å resolution. *J. Mol. Biol.* 234: 222-233
- Fuller, A.T., Mellows, G., Woolford, M., Banks, G.T., Barrow, K.D. and Chain, E.B. (1971) Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature* 234: 416-417
- Ghuysen, J.M. (1968) Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* 32: 425-464
- Giannouli, S., Kyritsis, A., Malissovas, N., Becker, H.D. and Stathopoulos, C. (2008) On the role of an unusual tRNA^{Gly} isoacceptor in *Staphylococcus aureus*. *Biochimie* In Press
- Giege, R., Sissler, M. and Florentz, C. (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res.* 26(22): 5017-5035
- Gite, S., Li, Y., Ramesh, V. and RajBhandary, U.L. (2000) *Escherichia coli* methionyl-tRNA formyltransferase: role of amino acids conserved in the linker region and in the C-terminal domain on the specific recognition of the initiator tRNA. *Biochemistry* 39: 2218-2226
- Green, C.J. and Vold, B.S. (1993) *Staphylococcus aureus* has clustered tRNA genes. *J. Bacteriol.* 175: 5091-5096
- Harpel, M.R., Horiuchi, K.Y., Luo, Y., Shen, L., Jiang, W., Nelson, D.J. Rogers, K.C., Decicco, C.P. and Copeland, R.A. (2002) Mutagenesis and mechanism-based inhibition of *Streptococcus pyogenes* Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase implicate a serine based glutaminase site. *Biochemistry* 41: 6398-6407.
- Harris, J.K., Kelley, S.T., Spiegelman, G.B. and Pace, N.R. (2003) The genetic core of the universal ancestor. *Genome Res.* 13: 407-412

- Hegde, S.S. and Blanchard, J.S. (2003) Kinetic and mechanistic characterization of recombinant *Lactobacillus viridescens* FemX (UDP-N-acetylmuramoyl pentapeptide-lysine N6-alanyltransferase). *J. Biol. Chem.* 278: 22861-22867
- Hegde, S.S. and Shrader, T.E. (2001) FemABX family members are novel nonribosomal peptidyltransferases and important pathogen-specific drug targets. *J. Biol. Chem.* 276: 6998-7003
- Helm, M., Brule, H, Friede D., Giege R., Putz, D. and Florentz C. (2000) Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA* 6: 1356-1379
- Hendricson, T.L. (2001) Recognizing the D-loop of transfer RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci* 98: 13473-13475
- Henze, U., Sidow, T., Wecke, J., Labischinski, H. and Berger-Bächi, B. (1993) Influence of femB on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 175: 1612-1620
- Himeno, H., Hasegawa, T., Ueda, T., Watanabe, K. and Shimizu, M. (1990) Conversion of aminoacylation specificity from tRNA(Tyr) to tRNA(Ser) *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 18: 6815-6819
- Himeno, H., Yoshida, S., Soma, A. and Nishikawa, K. (1997) Only one nucleotide insertion to the long variable arm confers an efficient serine acceptor activity upon *Saccharomyces cerevisiae* tRNA(Leu) *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 268: 704-711
- Holley, R.W., Everett, G.A., Madison, J.T. and Zamir, A. (1965) Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 240: 2122-2128
- Horiuchi, K.Y., Harpel, M.R., Shen, L., Luo, Y., Rogers, K.C., and Copeland, R.A. (2001) Mechanistic studies of reaction coupling in Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase. *Biochemistry* 40: 6450-6457
- Hou, Y.M. and Schimmel, P. (1988) A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA. *Nature* 333: 140-145
- Hughes, J. and Mellows, G. (1980) Interaction of pseudomonic acid A with *Escherichia coli* B isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochem. J.* 191: 209-219
- Hughes, R. C. (1970) Autolysis of isolated cell walls of *Bacillus licheniformis* N.C.T.C. 6346 and *Bacillus subtilis* Marburg strain 168. Separation of the products and characterization of the mucopeptide fragments. *Biochem. J.* 119: 849-860
- Ibba, M. and Söll, D. (1999) Quality control mechanisms during translation. *Science* 286: 1893-1897

- Ibba, M. and Söll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 617-650
- Ibba, M. and Söll, D. (2001) The renaissance of aminoacyl-tRNA synthesis. *EMBO Reports* 2: 382-387
- Ibba, M., Becker, H.D., Stathopoulos, C., Tumbula, D.L. and Söll, D. (2000) The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.* 25: 311-316
- Ibba, M., Morgan, S., Curnow, A.W., Pridmore, D.R., Vothknecht, U.C., Gardner, W., Lin, W., Woese, C.R. and Söll, D. (1997) A euryarchaeal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases. *Science* 278: 1119-1122
- Jack, A., Ladner, J.E. and Klug, A. (1976) Crystallographic refinement of yeast phenylalanine transfer RNA at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 108: 619-649
- Jahn, D., Verkamp, E. and Söll, D. (1992) Glutamyl-transfer RNA: A precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17: 215-218
- Jakubowvski, H. (1995) Proofreading in vivo. Editing of homocysteine by aminoacyl-tRNA synthetases in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270: 17672-17673
- Kamiryo, T. and Matsushashi, M. (1972) The biosynthesis of the cross-linking peptides in the cell wall peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 247: 6306-6311
- Kawakami, M., Tanada, S. and Takemura, S. (1975) Properties of alanyl-oligonucleotide, puromycin and *Staphylococcus epidermidis* glycyl-tRNA in interaction with elongation factor Tu:GTP complex, *FEBS Lett.* 51: 321-324
- Keng, T., Webster, T.A., Sauer, R.T. and Schimmel, P. (1982). Gene for *Escherichia coli* Glycyl-tRNA synthetase has tandem subunit coding regions in the same reading frame. *J. Biol. Chem.* 257: 12503-12508
- Kern, D. and Lapointe, J. (1979) Glutamyl transfer ribonucleic acid synthetase of *Escherichia coli*. Effect of alteration of the 5-methylaminomethyl-2-thiouridine in the anticodon of glutamic acid transfer ribonucleic acid on the catalytic mechanism. *Biochemistry* 18: 5819-5826
- Kirillov, S., Vitali, L.A., Goldstein, B.P., Monti, F., Semenov, Y., Makhno, V., Ripa, S., Pon, C.L. and Gualerzi, C.O. (1997) Purpuromycin: an antibiotic inhibiting tRNA aminoacylation. *RNA* 3: 905-913
- Kobayashi, M., Fujiwara, Y., Goda, M., Komeda, H. and Shimizu, S. (1997) Identification of active sites in amidase: Evolutionary relationship between amide bond- and peptide bond-cleaving enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 11986-11991

- Konishi, M., Nishio, M., Saitoh, K., Miyaki, T., Oki, T. and Kawaguchi, H. (1989) Cispentacin, a new antifungal antibiotic. I. Production, isolation, physico-chemical properties and structure. *J. Antibiot.* 42: 1749–1755
- Konrad, I. and Roschenthaler, R. (1977) Inhibition of phenylalanine tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A. *FEBS Lett.* 83: 341–347
- Lapointe, J., Duplain, L. and Proulx, M. (1986) A single glutamyl-tRNA synthetase aminoacylates tRNA^{Glu} and tRNA^{Gln} in *Bacillus subtilis* and efficiently misacylates *Escherichia coli* tRNA^{Gln1} *in vitro*. *J. Bacteriol.* 165: 88–93.
- LaRiviere, F.J., Wolfson, A.D. and Uhlenbeck, O.C. (2001) Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science* 294: 165–168
- Leibowitz, M.J. and Soffer, R.L. (1970) Enzymatic modification of proteins. 3. Purification and properties of a leucyl, phenylalanyl transfer ribonucleic acid protein transferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 245: 2066–2073
- Leinfelder, W., Forchhammer, K., Zinoni, F., Sawers, G., Mandrand-Berthelot, M.A. and Bock, A. (1988) *Escherichia coli* genes whose products are involved in selenium metabolism. *J. Bacteriol.* 170: 540–546
- Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M.A. and Bock, A. (1988) Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature* 331: 723–725
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. and Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.* 317: 41–72
- Levicán, G., Katz, A., Valenzuela, A., Söll, D. and Orellana, O. (2005) A tRNA(Glu) that uncouples protein and tetrapyrrole biosynthesis, *FEBS Lett.* 579: 6383–6387
- Li, T., Graham, D., Stathopoulos, C., Haney, P., Kim, H.S., Vothknecht, U., Kitabatake, M., Hong, K.W., Eggertsson, G., Curnow, A.W., Lin, W., Celic, I., Whitman, W. and Söll, D. (1999). CysteinyI-tRNA formation: the last puzzle of aminoacyl-tRNA synthesis. *FEBS Lett.* 462: 302–306
- Ling, B. and Berger-Bächi, B. (1998) Increased overall antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus* femAB null mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 936–938
- Liu, T.Y. and Gotschlich, E.C. (1967) Muramic acid phosphate as a component of the mucopeptide of gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* 242: 471–476
- Lloyd, A.J., Gilbey, A.M., Blewett, A.M., De Pascale, G., Zoeiby, A.E., Levesque, R.C., Catherwood, A.C., Tomasz, A., Bugg, T.D.H., Roper, D.I. and Dowson, C.G. (2008) Characterization of tRNA-dependent peptide bond formation by MurM in

- the synthesis of *Streptococcus pneumoniae* peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 283: 6402–6417
- Loftfield, R.B. and Vanderjagt, D. (1972) The frequency of errors in protein biosynthesis. *Biochem. J.* 128: 1353-1356
- Maidhof, H., Reinicke, B., Blumel, P., Berger-Bächli, B. and Labischinski, H. (1991) femA, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.* 173: 3507–3513
- Mallick, B., Chakrabarti, J., Sahoo, S., Ghosh, Z. and Das, S. (2005) Identity Elements of Archaeal tRNA. *DNA Res.* 12: 235–246
- Marshall, L., Kenneth, N.S. and White, R.J. (2008) Elevated tRNA(iMet) synthesis can drive cell proliferation and oncogenic transformation, *Cell* 133: 78-89
- Matsushashi, M., Dietrich C.P. and Strominger, J.L. (1965) Incorporation of glycine into the cell wall glycopeptides in *Staphylococcus aureus*: role of sRNA and lipid intermediates. *Biochemistry* 54: 587-594
- Matsushashi, M., Dietrich, C.P. and Strominger, J.L. (1967) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls III. The role of soluble ribonucleic acid and of lipid intermediates in glycine incorporation in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 242: 3191-3206
- Mazauric, M.H., Keith, G., Logan, D., Kreutzer, R., Giege, R. and Kern, D. (1998) Glycyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. Wide structural divergence with other prokaryotic glycyl-tRNA synthetases and functional inter-relation with prokaryotic and eukaryotic glycylation systems. *Eur. J. Biochem.* 251: 744-757
- Mazauric, M.H., Reinbolt, J., Lorber, B., Ebel, C., Keith, G., Giege, R. and Kern, D. (1996) An example of nonconservation of oligomeric structure in prokaryotic aminoacyl-tRNA synthetases. *Eur. J. Biochem.* 241: 814–826
- McClain, W.H. (1993) Transfer RNA identity. *The FASEB Journal* 7: 72-78
- McClain, W.H. (2006) Surprising contribution to aminoacylation and translation of non-Watson-Crick pairs in tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 4570-4575
- Metlitskaya, A., Kazakov, T., Kommer, A., Pavlova, O., Praetorius-Ibba, M., Ibba, M., Krashennnikov, I., Kolb, V., Khmel, I. and Severinov, K. (2006) Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic Microcin. C. *Biol. Chem.* 281: 18033-18042
- Min, B., Pelaschier, J.T., Graham, D.E., Tumbula-Hansen, D. and Söll, D. (2002) Transfer RNA-dependent amino acid biosynthesis: an essential route to asparagine formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 2678-2683

- Moras, D. (1992) Structural and functional relationships between aminoacyl-tRNA synthetases. *Trends Biochem. Sci.* 17: 159–164
- Muramatsu, T., Nishikawa, K., Nemoto, F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Miyazawa, T. and Yokoyama, S. (1988) Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification. *Nature* 336: 179–181
- Nakamura, A., Yao, M., Chimnaronk, S., Sakai, N. and Tanaka, I. (2006) Ammonia channel couples glutaminase with transamidase reactions in GatCAB. *Science* 312: 1954–1958
- Nameki, N., Tamura, K., Asahara, H. and Hasegawa, T. (1997) Recognition of tRNA(Gly) by three widely diverged glycyl-tRNA synthetases. *J. Mol. Biol.* 268: 640–647
- Namgoong, S., Sheppard, K., Sherrer, R.L. and Söll, D. (2007) Co-evolution of the archaeal tRNA-dependent amidotransferase GatCAB with tRNA(Asn). *FEBS Lett.* 581: 309–314
- Nass, G., Poralla, K. and Zahner, H. (1969) Effect of the antibiotic Borrelidin on the regulation of threonine biosynthetic enzymes in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Acta* 34: 84–91
- Newberry, K.J., Hou, Y.M. and Perona, J.J. (2002) Structural origins of amino acid selection without editing by cysteinyl-tRNA synthetase. *EMBO J.* 21: 2778–2787
- Niyomporn, B., Dahl, J.L. and Strominger, J.L. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. IX. Purification and properties of glycyl transfer ribonucleic acid synthetase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 243: 773–778
- Normanly, J., Ollick, T. and Abelson, J. (1992) Eight base changes are sufficient to convert a leucine-inserting tRNA into a serine-inserting tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 5680–5684
- Nureki, O., Niimi, T., Muramatsu, T., Kanno, H., Kohno, T., Florentz, C., Giegé, R. and Yokoyama, S. (1994) Molecular recognition of the identity determinants set of isoleucine transfer RNA from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 236: 710–724
- Nureki, O., Vassylyev, D.G., Tateno, M., Shimada, A., Nakama, T., Fukai, S., Konno, M., Hendrickson, T.L., Schimmel, P. and Yokoyama, S. (1998) Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* 280: 578–582
- O'Donoghue, P. and Luthey-Schulten, Z. (2003) On the evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 550–573

- O'Donoghue, P., Sethi, A., Woese, C.R. and Luthey-Schulten, Z.A. (2005) The evolutionary history of Cys-tRNA^{Cys} formation. *Proc. Natl Acad. Sci.* 102: 19003–19008
- Ofengand, J. and Henes, C. (1969) The function of pseudouridylic acid in transfer ribonucleic acid. II. Inhibition of amino acyl transfer ribonucleic acid-ribosome complex formation by ribothymidylyl-pseudouridylyl-cytidylyl-guanosine 3'-phosphate. *J. Biol. Chem.* 244(22): 6241-53
- Ogilvie, A., Wiebauer, K. and Kersten, W. (1975) Inhibition of leucyl-transfer ribonucleic acid synthetase in *Bacillus subtilis* by granaticin. *Biochem. J.* 152: 511–515
- Ogle, J.M., Carter, A.P. and Ramakrishnan, V. (2003) Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem. Sci.* 28(5): 259-266
- Osborn, M.J. (1969) Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Annual Review of Biochemistry* 38: 501-538
- Oshikane, H., Sheppard, K., Fukai, S., Nakamura, Y., Ishitani, R., Numata, T., Sherrer, R.L., Feng, L., Schmitt, E., Panvert, M., Blanquet, S., Mechulam, Y., Söll, D. and Nureki, O. (2006) Structural basis of RNA-dependent recruitment of glutamine to the genetic code. *Science* 312: 1950–1954
- Paetz, W. and Nass, G. (1973) Biochemical and immunological characterization of threonyl-tRNA synthetase of two borrelidin resistant mutants of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* 35: 331– 337
- Palm, G.J., Lubkowski, J., Derst, C., Schleper, S., Rohm, K.H. and Wlodawer, A. (1996) A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase: crystal structure of a Thr-89-Val mutant. *FEBS Lett.* 390: 211–216
- Perona, J.J., Rould, M. and Steitz, T.A. (1993) Structural basis for transfer RNA aminoacylation by *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 32: 8758-8771
- Perret, V., Garcia, A., Grosjean, H., Ebel, J.P., Florentz, C. and Giege, R. (1990) Relaxation of a transfer RNA specificity by removal of modified nucleotides. *Nature* 344: 787-789
- Perry, A.M., Ton-That, H., Mazmanian, S.K. and Schneewind, O. (2002) Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. III. Lipid II is an *in vivo* peptidoglycan substrate for sortase-catalyzed surface protein anchoring. *J. Biol. Chem.* 277: 16241–16248
- Petit, J.F., Strominger, J.L. and Söll, D. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VII. Incorporation of serine and glycine into interpeptide bridges in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Biol. Chem.* 243: 757-767

- Plapp, R. and Strominger, J.L. (1970) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XVIII. Purification and properties of L-alanyl transfer ribonucleic acid-uridine diphosphate-N-acetylmuramyl-pentapeptide transferase from *Lactobacillus viridescens*. *J. Biol. Chem.* 245: 3675-3682
- Raczniak, G., Becker, H.D., Min, B. and Söll, D. (2001) A single amidotransferase forms asparaginylyl-tRNA and glutaminylyl-tRNA in *Chlamydia trachomatis*. *J. Biol. Chem.* 276: 45862-45867
- RajBhandary, U.L. and Söll, D. (2008) Aminoacyl-tRNAs, the bacterial cell envelope, and antibiotics, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 5285-5286
- Ribeiro, S., Nock, S. and Sprinzl, M. (1995) Purification of aminoacyl-tRNA by affinity chromatography on immobilized *Thermus thermophilus* EF-Tu-GTP. *Anal Biochem* 228: 330-335
- Roberts, R.J. (1972) Structures of two glycyl-tRNAs from *Staphylococcus epidermidis*. *Nature New Biol.* 237: 44-45
- Roberts, R.J. (1974) Staphylococcal transfer ribonucleic acids. II. Sequence analysis of isoaccepting glycine transfer ribonucleic acids IA and IB from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Biol. Chem.* 249: 4787-4796.
- Roberts, W.S.L., Petit, J.F. and Strominger, J.L. (1968a) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VIII. Specificity in the utilization of L-alanyl transfer ribonucleic acid for interpeptide bridge synthesis in *Arthrobacter crystallopietes*. *J. Biol. Chem.* 243: 768-773
- Roberts, W.S.L., Strominger, J.S. and Söll, D. (1968b). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VI. Incorporation of L-threonine into interpeptide bridges in *Micrococcus roseus*. *J. Biol. Chem.* 243: 749-757.
- Roche, F.M., Massey, R., Peacock, S.J., Day, N.P., Visai, L., Speziale, P., Lam, A., Pallen, M. and Foster, T.J. (2003) Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology* 149: 643-654
- Rock F.L., Mao, W., Yaremchuk, A., Tukalo, M., Crépin, T., Zhou, H., Zhang, Y.K., Hernandez, V., Akama, T., Baker, S.J., Plattner, J.J., Shapiro, L., Martinis, S.A., Benkovic, S.J., Cusack, S. and Alley, M.R. (2007) An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site. *Science* 316: 1759-1761
- Rogers, H.J., Perkins, H.R. and Ward, J.B. (1980) Biosynthesis of Peptidoglycan; Chapman and Hall, Ltd.: London.
- Rogers, K.C. and Söll, D. (1993) Discrimination among tRNAs intermediate in glutamate and glutamine acceptor identity. *Biochemistry* 32: 14210-14219

- Rogers, M.J., Adachi, T., Inokuchi, H. and Söll, D. (1992) Switching tRNA(Gln) identity from glutamine to tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 3463-3467
- Rohrer, S. and Berger-Bächi, B. (2003a) FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 837-846
- Rohrer, S. and Berger-Bächi, B. (2003b) Application of a bacterial two-hybrid system for the analysis of protein-protein interactions between FemABX family proteins. *Microbiology* 149: 2733-2738
- Rohrer, S., Ehlert, K., Tschierske, M., Labischinski, H. and Berger-Bächi, B. (1999) The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 9351-9356
- Rould, M.A., Perona, J.J., Söll, D. and Steitz, T.A. (1989) Structure of *E.coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Gln} and ATP at 2.8 Å resolution. *Science* 246: 1135-1142
- Roy, H. and Ibba, M. (2008) RNA-dependent lipid remodeling by bacterial multiplepeptide resistance factors, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 4667-4672
- Roy, H., Becker, H.D., Mazauric, M.H. and Kern, D. (2007) Structural elements defining elongation factor Tu mediated suppression of codon ambiguity, *Nucleic Acids Res.* 35: 3420-3430
- Roy, H., Becker, H.D., Reinbolt, J. and Kern, D. (2003) When contemporary aminoacyl-tRNA synthetases invent their cognate amino acid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 9837-9842
- Salazar, J.C., Ahel, I., Orellana, O., Tumbula-Hansen, D., Krieger, R., Daniels, L. and Söll, D. (2003) Coevolution of an aminoacyl-tRNA synthetase with its tRNA substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 13863-13868
- Sanderson, L.E. and Uhlenbeck, O.C. (2007) The 51-63 base pair of tRNA confers specificity for binding by EF-Tu. *RNA* 13: 835-840
- Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A.C., Rees, B., Bovee, M., Caillet, J., Romby, P., Francklyn, C.S. and Moras, D. (2000) Zinc ion mediated amino acid discrimination by threonyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Biol.* 7: 461-465
- Saraste, M., Sibbald, P.R. and Wittinghofer, A. (1990) The P-loop – a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15: 430-434
- Sauerwald, A., Zhu, W., Major, T.A., Roy H., Palioura, S., Jahn, D., Whitman, W.B., Yates, R.J., Ibba, M. and Söll, D. (2005) RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Science* 307: 1969-1972

- Schimmel, P. (1987) Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 125-158
- Schimmel, P. and Ribas De Pouplana, L. (1995) Transfer RNA: from minihelix to genetic code. *Cell* 81: 983-986
- Schimmel, P.R. and Söll, D., (1979) Amino acyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 601-648
- Schleifer, K.H. and Kandler O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews* 36: 407-477
- Schmitt, E., Panvert, M., Blanquet, S. and Mechulam, Y. (2005) Structural basis for tRNA-dependent amidotransferase function. *Structure* 13: 1421-1433.
- Schneider, T., Senn, M.M., Berger-Bächli, B., Tossi, A., Sahl, H.G. and Wiedemann, I. (2004) *In vitro* assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 53: 675-685
- Schulman, L.H. and Chambers, R.W. (1968) Transfer RNA, II. A structural basis for alanine acceptor activity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 61: 308-315
- Seburn, K.L., Nangle, L.A., Cox, G.A., Schimmel, P. and Burgess, R.W. (2006) An active dominant mutation of glycyl-tRNA synthetase causes neuropathy in a Charcot-Marie-Tooth 2D mouse model. *Neuron* 51: 715-726
- Sheppard, K. and Söll, D. (2008) On the evolution of the tRNA-dependent amidotransferases, GatCAB and GatDE. *J. Mol. Biol.* 377: 831-844
- Sheppard, K., Akochy, P.M., Salazar, J.C. and Söll, D. (2007) The *Helicobacter pylori* amidotransferase Gat-CAB is equally efficient in glutamine-dependent transamidation of Asp-tRNA^{Asn} and Glu-tRNA^{Gln}. *J. Biol. Chem.* 282: 11866-11873
- Sheppard, K., Yuan, J., Hohn, M.J., Jester, B., Devine, K.M. and Söll, D. (2008) From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* 36: 1813-1822
- Sherman, J.M. and Soll, D. (1996) Aminoacyl-tRNA synthetases optimize both cognate tRNA recognition and discrimination against noncognate tRNAs. *Biochemistry* 35: 601-607
- Shiba, K., Schimmel, P., Motegi, H. and Noda, T. (1994) Human glycyl-tRNA synthetase. Wide divergence of primary structure from bacterial counterpart and species-specific aminoacylation. *J. Biol. Chem.* 269: 30049-30055
- Silvian, L.F., Wang, J. and Steitz, T.A. (1999) Insights into editing from an ile-tRNA synthetase structure with tRNA^{ile} and mupirocin. *Science* 285: 1074-1077

- Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Reeve, J.N., et al. (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* 179: 7135-55
- Smith, J.D. (1972) Genetics of transfer RNA. *Annu. Rev. Genet.* 6: 235-256
- Soma, A., Kumagai, R., Nishikawa, K. and Himeno, H. (1996) The anticodon loop is a major identity determinant of *Saccharomyces cerevisiae* tRNA(Leu). *J. Mol. Biol.* 263: 707-714
- Spring, K.J., Jerlstrom, P.G., Burns, D.M. and Beacham, I.R. (1986) L-asparaginase genes in *Escherichia coli*: isolation of mutants and characterization of the ansA gene and its protein product. *J. Bacteriol.* 166: 135-142
- Sprinzi, M. (1994) Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector. *Trends Biochem. Sci.* 19: 245-250
- Sprinzi, M. and Vassilenko, K.S. (2005) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 33: 139-140
- Sprinzi, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A. and Steinberg, S. (1998) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res* 26: 148-153
- Stahl, G., McCarty, G.P. and Farabaugh, P.J. (2002) Ribosome structure: revisiting the connection between translational accuracy and unconventional decoding. *Trends Biochem. Sci.* 27: 178-183
- Stamatis, C., Giannouli, S., Suchentrunk, F., Sert, H., Stathopoulos, C. and Mamuris, Z. (2008) Recruitment of mitochondrial tRNA genes as auxiliary variability markers for both intra- and inter-species analysis: The paradigm of brown hare (*Lepus europaeus*). *Gene* 410: 154-164
- Stanzel, M., Schon, A. and Sprinzi, L. (1994) Discrimination against misacylated tRNA by chloroplast elongation factor Tu. *Eur. J. Biochem.* 219: 435-439.
- Stathopoulos, C., Jacquin-Becker, C., Becker, H.D., Li, T., Ambrogelly, A., Longman, R. and Söll, D. (2001) *Methanococcus jannaschii* prolyl-cysteinyl-tRNA synthetase possesses overlapping amino acid binding sites. *Biochemistry* 40: 46-52
- Stathopoulos, C., Li, T., Longman, R., Vothknecht, U.C., Becker, H., Ibba, M. and Söll, D. (2000) One polypeptide with two aminoacyl-tRNA synthetase activities. *Science* 287: 479-482

- Steer, B.A. and Schimmel, P. (1999) Domain-domain communication in a miniature archaeobacterial tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(24): 13644-13649
- Steitz, T.A., Rould, M.A. and Perona, J.J. (1990) Structural basis of tRNA discrimination as derived from the high resolution crystal structure of glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA (Gln) and ATP. *Mol. Biol. Rep.* 14(2-3): 213-214
- Stewart, T.S., Roberts, R.J. and Strominger, J.L. (1971) Novel species of tRNA. *Nature* 230: 36-38
- Stranden, A.M., Ehlert, K., Labischinski, H. and Berger-Bächi, B. (1997) Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a femAB null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179: 9-16
- Strominger, J.L. and Ghuysen, J.M. (1967) Mechanisms of enzymatic bacteriaolysis. Cell walls of bacteria are solubilized by action of either specific carbohydrases or specific peptidases. *Science* 156: 213-221
- Sugiura, I., Nureki, O., Ugaji-Yoshikawa, Y., Kuwabara, S., Shimada, A., Tateno, M., Lorber, B., Giege, R., Moras, D., Yokoyama, S. and Konno, M. (2000) A crystal structure of *Thermus thermophilus* methionyl-tRNA synthetase reveals two RNA-binding modules. *Structure* 8: 197-208
- Sun, F.J. and Caetano-Anollés, G. (2008) The origin and evolution of tRNA inferred from phylogenetic analysis of structure. *J. Mol. Evol.* 66: 21-35
- Sun, T. and Zhang, Y. (2008) Pentamidine binds to tRNA through non-specific hydrophobic interactions and inhibits aminoacylation and translation. *Nucleic Acids Res.* 36: 1654-1664
- Swain, A.L., Jaskolski, M., Housset, D., Rao, J.K. and Wlodawer, A. (1993) Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proc. Natl Acad. Sci.* 90: 1474-1478
- Sylvers, L.A., Rogers, K.C., Shimizu, M., Ohtsuka, E. and Söll, D. (1993) A 2-thiouridine derivative in tRNA^{Glu} is a positive determinant for aminoacylation by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 32: 3836-3841
- Tanaka, K., Tamoki, M. and Watanabe, S. (1969) Effect of furanomycin on the synthesis of isoleucyl-tRNA. *Biochem. Biophys. Acta* 195: 244-245
- Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A. and Koonin, E.V. (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* 28: 33-36

- Thompson, R.C., Dix, D.B. and Karim, A.M. (1986) The reaction of ribosomes with elongation factor Tu-GTP complexes. Aminoacyl-tRNA-independent reactions in the elongation cycle determine the accuracy of protein synthesis. *J Biol Chem.* 261: 4868-4874
- Tomita, K., Fukai S., Ishitani R., Ueda, T., Takeuchi, N., Vassylyev, D.G. and Nureki, O. (2004) Structural basis for template-independent RNA polymerization. *Nature* 430: 700-704
- Tumbula, D.L., Becker, H.D., Chang, W. and Söll, D. (2000) Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature* 407: 106-110
- Tumbula-Hansen, D., Feng, L., Toogood, H., Stetter, K.O. and Söll, D. (2002) Evolutionary divergence of the archaeal aspartyl-tRNA synthetases into discriminating and nondiscriminating forms. *J. Biol. Chem.* 277: 37184–37190
- van Heijenoort, J. (2001) Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat. Prod. Rep.* 18: 503-519
- van Heijenoort, J. and Gutmann, L. (2000) Correlation between the structure of the bacterial peptidoglycan monomer unit, the specificity of transpeptidation, and susceptibility to beta-lactams. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 5028–5030
- Varshavsky, A. (1996) The N-end rule: Functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 12142–12149
- Vetsigian, K., Woese, C. and Goldenfeld, N. (2006) Collective evolution and the genetic code. *Proc. Natl Acad. Sci.* 103: 10696–10701
- Villet, R., Fonvielle, M., Busca, P., Chemama, M., Maillard, A.P., Hugonnet, J.E., Dubost, L., Marie, A., Josseume, N., Mesnage, S., Mayer, C., Valéry, J.M., Ethève-Quellejeu, M. and Arthur, M. (2007) Idiosyncratic features in tRNAs participating in bacterial cell wall synthesis. *Nucleic Acids Res.* 35: 6870-6883
- Walker, J.E., Saraste, M. and Runswick, M.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945–951
- Watanabe, K., Toh, Y., Suto, K., Shimizu, Y., Oka, N., Wada, T., Tomita, K. (2007) Protein-based peptide-bond formation by aminoacyl-tRNA protein transferase. *Nature* 449: 867–871
- Werner, R.G., Thorpe, L.F., Reuter, W. and Nierhaus, K.H. (1976) Indolmycin inhibits prokaryotic tryptophanyl-tRNA ligase. *Eur. J. Biochem.* 68: 1–3
- White, B.N. and Bayley, S.T. (1972) Further codon assignments in an extremely halophilic bacterium using a cell-free protein-synthesizing system and a ribosomal binding assay. *Can. J. Biochem.* 50: 600–609

- Wilcox, M. (1969) Gamma-phosphoryl ester of Glu-tRNA^{Gln} as an intermediate in *Bacillus subtilis* glutaminyl- tRNA synthesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 34: 521–528
- Wilcox, M. and Nirenberg, M. (1968) Transfer RNA as a cofactor coupling amino acids synthesis with that of protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 61: 229-236
- Woese, C.R., Olsen, G.J., Ibba, M. and Söll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 202-236
- Xiong, Y. and Steitz, T.A. (2006) a story with a good ending: tRNA 3'-end maturation by CCA-adding enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 12-17
- Xu, X.M., Carlson, B.A., Mix, H., Zhang, Y., Kazima, S., Glass, R.S., Berry, M.J., Gladyshev, V.N. and Hatfield, D.L. (2007) Biosynthesis of Selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS Biol.* 5: 96–105
- Yousef, M.R., Grundy, F.J. and Henkin, T.M. (2005) Structural transitions induced by the interaction between tRNA^{Gly} and the *Bacillus subtilis* *glyQS* T Box leader RNA. *J. Mol. Biol.* 349: 273–287
- Yuan, J., Palioura, S., Salazar, J.C., Su, D., O'Donoghue, P., Hohn, M.J., Cardoso, A.M., Whitman, W.B. and Soll, D. (2006) RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. *Proc. Natl Acad. Sci.* 103: 18923–18927
- Zalkin, H. and Smith, J.L. (1998) Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 72: 87-144
- Zifa, E., Giannouli, S., Theotokis, P., Stamatis, C., Mamuris, Z. and Stathopoulos, C. (2007) Mitochondrial tRNA mutations: clinical and functional perturbations. *RNA Biol.* 4: 38-66

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ ΓΙΑΝΝΟΥΛΗ

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2005-Σήμερα: Υποψήφια διδάκτορας Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Θέμα: “Γονιδιωματική ανάλυση και λειτουργικός χαρακτηρισμός ασύνηθων συστημάτων αμινοακυλίωσης του μεταφορικού RNA σε παθογόνους μικροοργανισμούς”. Επιβλέπων Καθηγητής: Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2004: Πτυχιούχος Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Βαθμός πτυχίου: Λίαν καλώς, 7,69)

2003-2004: Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με θέμα: “Προκαταρκτικές μελέτες επί της επιδιορθωτικής δραστικότητας της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της φαινυλαλανίνης”. Υπεύθυνος Καθηγητής: Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2000: Απολυτήριο λυκείου. 4^ο Ενιαίο Λύκειο Κατερίνης. Βαθμός απολυτηρίου 19,2 (Άριστα)

Ξένες Γλώσσες : Αγγλικά (άριστα, Κάτοχος του Certificate of Proficiency in English, University of Michigan), Γαλλικά (αρχάριος).

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

9/2007 – 6/2008: Εντεταλμένη διδασκαλίας ΑΤΕΙ Λάρισας, Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, (Βιοχημεία II, Κλινική Χημεία III)

4/2007 – 8/2007: IBMC, CNRS, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France. Συμμετοχή σε ερευνητικό πρόγραμμα στο εργαστήριο του Dr. Daniel Kern. Εκπόνηση ερευνητικής εργασίας με θέμα: “tRNA-dependent cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*”

11/2004 - 1/2005: IBMC, CNRS, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France. Συμμετοχή σε ερευνητικό πρόγραμμα στο εργαστήριο του Dr. Daniel Kern. Εκπόνηση ερευνητικής εργασίας με θέμα: “A single tRNA base mediates tRNA-dependent biosynthesis of asparagine”

7-8/2003: Department of Microbiology, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA. Συμμετοχή σε ερευνητικό πρόγραμμα στο εργαστήριο του Αναπληρωτή

Καθηγητή Michael Ibba. Εκπόνηση ερευνητικής εργασίας με θέμα : "Ενίσχυση και κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α & β της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της φαινυλαλανίνης από *E. coli* και *M. thermoautotrophicum*"

7-8/2002: Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Πρακτική άσκηση στο βιοχημικό εργαστήριο

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

Υπουργείο Ανάπτυξης
Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας
Ελλάδα-Γαλλία: Κοινά ερευνητικά και τεχνολογικά προγράμματα 2003-2005.
Υπότροφος

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιτροπή Ερευνών
2005. Χρηματοδότηση ερευνητικών ομάδων του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ελληνική Εταιρεία Χειρουργικής Ορθοπαιδικής και Τραυματολογίας 2006-2008.

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ – ΒΡΑΒΕΙΑ

- Υπότροφος ERASMUS-SOCRATES – ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΑΤΙΚΩΝ ΥΠΟΤΡΟΦΙΩΝ ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2007 – ΙΟΥΛΙΟΣ 2007
- 58^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Πάτρα 9-11 Δεκεμβρίου 2006. Έπαινος καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης συνοδευόμενος από χρηματικό βραβείο.
- 33th FEBS – 11th IUBMB Congress, Athens, Greece 28 June - 3 July 2008. Βραβείο Ιδρύματος Μποδοσάκη για Ελληνικές ερευνητικές ομάδες συνοδευόμενο από χρηματική ενίσχυση.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ

Αρωγό μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά με κριτές

1. Kalavrizioti D. Vourekas A., Stamatopoulou, V., Toumpeki C., **Giannouli S.**, Stathopoulos C., and Drainas D. **(2006)** RNA-mediated therapeutics: from gene inactivation to clinical application ***Curr. Top. Med. Chem.*** 6: 1737-1758
2. Bailly M., **Giannouli S.**, Blaise M., Stathopoulos C., Kern D and Becker H. D. **(2006)** A single tRNA base-pair mediates bacterial tRNA-dependent biosynthesis of asparagine. ***Nucleic Acids Res.*** 34: 6083-6094
3. Zifa E., **Giannouli S.**, Theotokis P., Stamatis K., Mamuris Z. and Stathopoulos C. **(2007)** Mitochondrial tRNA mutations: functional and clinical perturbations. ***RNAbiology*** 4: 38-66
4. Stamatis C*, **Giannouli, S***, Suchentrunk F., Sert H., Stathopoulos C. and Mamuris Z. **(2008)** Recruitment of mitochondrial tRNA genes as auxiliary molecular markers for linked functional genomic and genetic analyses: the paradigm of brown hare (*Lepus europaeus*) ***Gene*** 410(1):154-164 ***co-first authors**
5. Papatheodorou L. K., Malizos K. N., Poultsidis L. A., Hantes M. E., **Giannouli S.**, Grafanaki K., Ioannou M. G., Koukoulis G. K., Protopappas V. C., Fotiadis D. I. and Stathopoulos C. and **(2008)** Effect of transosseus application of low-intensity ultrasound at the tendon graft-bone interface healing: Gene expression and histological analysis in rabbits. ***Ultrasound Med. Biol. In Press***
6. **Giannouli S.**, Kyritsis A., Malissovass N., Becker H. D. and Stathopoulos C. **(2008)** On the role of an unusual tRNA^{Gly} isoacceptor in *Staphylococcus aureus*. ***Biochimie In Press***
7. **Giannouli S.**, Labrou M., Kyritsis A., Ikonomidis A., Maniatis A., Stathopoulos C. and Pournaras S. **(2008)** Detection of mutations in FemABX protein family in oxacillin-susceptible, *mecA* positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates ***Antimicrob. Agents Chem. Submitted***

Δημοσιεύσεις σε πρακτικά εθνικών συνεδρίων

1. **Giannouli S.**, Roy H., Ibba M. and Stathopoulos C. **(2004)** Mutational analysis of the active site of tyrosyl-tRNA synthetase Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology NEWSLETTER, 51: 51-55.

2. **Giannouli S.**, Becker H.D., Kern D., Ibba M., Söll D. and Stathopoulos C. **(2004)** Aminoacyl-tRNA synthesis: Genomic analysis reveals new pathways. Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology NEWSLETTER, 51: 49.
3. **Giannouli S.**, Bailly M., Blaise M., Kern D., Becker H. D. and Stathopoulos C. **(2005)** Mode of tRNA recognition by a bacterial tRNA-dependent amidotransferase. Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology NEWSLETTER, 52: 80.
4. **Giannouli S.**, Bailly M., Blaise M., Kern D., Becker H. D. and Stathopoulos C. **(2006)** tRNA identity elements recognized by an Asp-AdT. “Biosciences in the 21st century” Hellenic Union of Bioscientists, Athens 13-15 April 2006.
5. **Giannouli S.**, Kiritsis A., Diokmetzidou A., Zattas D. and Stathopoulos C. **(2006)** tRNA-dependent cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*: preliminary studies. Hellenic Society of Biological Sciences. Proceedings of the 28th Conference, Ioannina 18-20 May 2006.
6. Stamatis C., **Giannouli S.**, Stathopoulos C. and Mamuris Z. **(2006)** Molecular investigations on mitochondrial tRNA genes as markers for comparative functional genomic and phylogenetic analyses. Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology NEWSLETTER, 53: 204.
7. **Giannouli S.**, Bailly M., Blaise M., Kern D., Becker H. D. and Stathopoulos C. **(2006)** A single tRNA base-pair mediates bacterial tRNA-dependent biosynthesis of asparagine. Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology NEWSLETTER, 53: 81.
8. Kottakis P., **Giannouli S.**, Papazachariou L., Strigoudis A., Kyritsis A., Stathopoulos C., Papadopoulos G., and Choli-Papadopoulou T. **(2007)** The *Helicobacter pylori* L25 ribosomal protein exhibits functional similarities with its counter part from *Bacillus subtilis*. Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology NEWSLETTER, 54: 159

- 9. Giannouli S.**, Kyritsis A., Kern D., Becker H. D. and Stathopoulos C. **(2007)** Identification of a pseudogene that encodes a genuine substrate for *Staphylococcus aureus* glycyl-tRNA synthetase. Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology NEWSLETTER, 54: 106
- 10.** Stathopoulos C., **Giannouli S.**, Labrou M., Kyritsis A., Grafanaki K., Maniatis A and Pournaras, S. **(2008)** Mechanisms of cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*. Correlation with oxacillin resistance. 5th National Conference of Medical Biopathology, Thessaloniki 9-12 April 2008.
- 11.** Apostolodi M., **Giannouli S.**, Stathopoulos C. and Karpouzas D. G. **(2008)** Molecular cloning and preliminary characterization of the gene-enzyme system responsible for cadusafos hydrolysis in a *Sphigomonas paucimobilis* strain. Hellenic National Initiative Mikrobiokosmos 1st Conference, Athens 12-14 December 2008.

Δημοσιεύσεις σε πρακτικά διεθνών συνεδρίων

- 1. Giannouli S.**, Bailly M., Blaise M., Stathopoulos C., Kern D. and Becker H. D. **(2007)** Bacterial tRNA-dependent biosynthesis of asparagine is mediated by a single tRNA base-pair. 22nd tRNA Workshop, November 1-6 2007, Uppsala, Sweden.
- 2. Giannouli S.**, Kyritsis A. and Stathopoulos C. **(2008)** Studies on the role of a pseudogene encoding an atypical tRNA^{Gly} in *Staphylococcus aureus*. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference. June 28th – July 3rd Athens, Greece.
- 3.** Apostolidi M., **Giannouli S.**, Stathopoulos C. and Karpouzas D. G. **(2008)** Studies on the isolation of the gene-enzyme system responsible for cadusafos hydrolysis in two bacterial strains. 5th International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology. September 28th – October 1st Thessaloniki, Greece.
- 4.** Papatheodorou L. K., Grafanaki K., **Giannouli S.**, Fotiadis D. I., Stathopoulos C. and Malizos K. N. **(2008)** Transosseus application of low-intensity ultrasound at the tendon graft-bone interface affects the healing rate and up-regulates simultaneously the expression of collagen type I and tRNA^{Gly}. 8th IEEE International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE 2008). October 8-10 Athens, GREECE.

