



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΠΙ ΤΗΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΤΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΦΑΙΝΥΛΑΛΑΝΙΝΗΣ



ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ ΓΙΑΝΝΟΥΛΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2004



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

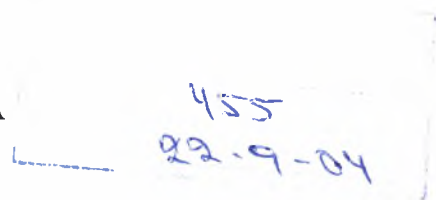
**ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΠΙ ΤΗΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΤΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΦΑΙΝΥΛΑΛΑΝΙΝΗΣ**



ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ ΓΙΑΝΝΟΥΛΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2004





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΠΙ ΤΗΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΤΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΦΑΙΝΥΛΑΛΑΝΙΝΗΣ**



ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ ΓΙΑΝΝΟΥΛΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2004



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

Αριθ. Εισ.: 3981/1

Ημερ. Εισ.: 19-10-2004

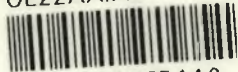
Δωρεά:

Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΓΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075142

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε
στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του
Επίκουρου Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Σταθόπουλου.

Τμήμα του έργου πραγματοποιήθηκε στο Department of Microbiology,
The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA,
υπό την επίβλεψη του Prof. Michael Ibba.

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Αικατερίνη Μούτου, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ζήσης Μαμούρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 ΟΙ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΕΣ: ΜΙΑ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΕΝΖΥΜΩΝ ΜΕ ΥΨΗΛΗ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ	9
1.2 ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΕΣ: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ	15
1.3 Η ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΗ ΤΗΣ ΦΑΙΝΥΛΑΛΑΝΙΝΗΣ (PheRS).	18
1.5 Η ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΗ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ (TyrRS)	20
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
I. ΥΛΙΚΑ	25
II . ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΤΙΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ α ΚΑΙ β ΤΗΣ PheRS ΤΟΥ <i>E.coli</i>	27
2.1.1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	27
2.1.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	27
2.1.3 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	28
2.1.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	28
2.1.5 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ XL-1 BLUE ΜΕ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ	29
2.1.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ	29
2.1.7 ΠΕΨΗ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ	30
2.1.8 ΔΙΠΛΗ ΠΕΨΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ	30
2.1.9 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΕ ΦΟΡΕΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	30
2.1.10 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>S.cerevisiae</i>	31
2.1.11 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>S.cerevisiae</i> ΜΕ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ	31
2.1.12 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>S.cerevisiae</i> ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ.	32
2.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΤΗΝ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ α ΚΑΙ ΕΝΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΟΜΟΛΟΓΟΥ ΜΕ ΑΥΤΟ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΤΗ β ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ ΤΗΣ PheRS ΤΟΥ <i>M.thermoautotrophicum</i>	32
2.2.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΓΟΝΙΔΙΩΝ, ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΛΩΝΩΝ.	32
2.2.2 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΦΟΡΕΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	33
2.3 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΤΗΝ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΗ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ ΤΟΥ <i>G. stearothermophilus</i>	34

2.3.1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.	34
2.3.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR	34
2.3.3 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΤΗΝ TyrRS ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ	35
2.3.4 ΘΕΣΗ-ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ ΕΠΙΚΑΛΥΠΤΟΜΕΝΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
3.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΤΙΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ α ΚΑΙ β ΤΗΣ PheFS ΤΟΥ <i>E.coli</i> .	38
3.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΤΙΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ α ΚΑΙ β_{cons} ΤΗΣ PheRS ΤΟΥ <i>M.thermoautotrophicum</i>	41
3.3 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΤΗΝ TyrRS ΤΟΥ <i>G. stearothermophilus</i>	48
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεϊνοσύνθεση είναι μια θεμελιώδης διεργασία που εξασφαλίζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η ορθότητα της επιτυγχάνεται με τη σωστή αμινοακυλίωση των μορίων tRNA και την αλληλεπίδραση κωδικονίου-αντικωδικονίου. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των σωστών αμινοάκυλο-tRNA μορίων είναι οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες. Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση και έχουν αναπτύξει επιδιορθωτικούς μηχανισμούς κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της φαινυλαλανίνης (PheRS) ανήκει στην κλάση II και είναι ένα τετραμερές ένζυμο με δομή $(\alpha\beta)_2$. Η PheRS ενεργοποιεί σε κάποιες περιπτώσεις το αμινοξύ τυροσίνη, αλλά έχει τη δυνατότητα να επιδιορθώσει το σφάλμα αυτό. Ο ακριβής μηχανισμός επιδιορθωσης δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η προετοιμασία των κατάλληλων παραγόντων για τη μελέτη και αποκάλυψη του μηχανισμού αυτού. Για τη μελέτη αυτή ενισχύθηκε και κλωνοποιήθηκε το τμήμα του γενωμικού DNA του *E.coli* το οποίο εμπεριέχει τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS και φέρει τη μετάλλαξη A294G στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα. Η μετάλλαξη αυτή είναι κρίσιμη για την εξειδικευμένη επιλογή αμινοξέων από τη συνθετάση. Ακολούθως, επιχειρήθηκε η έκφραση των γονιδίων αυτών. Επιπλέον ενισχύθηκαν και κλωνοποιήθηκαν το γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα της PheRS του *M.thermoautotrophicum* και ένα γονίδιο που παρουσιάζει υψηλή ομολογία με εκείνο που κωδικοποιεί τη β υπομονάδα της PheRS και έγινε προσπάθεια να τεθούν υπό την επίδραση του ίδιου προαγωγέα. Τέλος, ενισχύθηκε και κλωνοποιήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί την TyrRS του *G.stearothermophilus* και επιχειρήθηκε η εισαγωγή θέση-κατευθυνόμενων μεταλλάξεων στο κατάλοιπο 152 από γλουταμινικό οξύ σε αλανίνη και αργινίνη. Η μεταλλαγμένη συνθετάση εστεροποιεί τυροσίνη στο tRNA της φαινυλαλανίνης και είναι κατάλληλη για να παρέχει τα απαραίτητα υποστρώματα για *in vitro* μελέτες της επιδιορθωτικής δράσης της PheRS.

ABSTRACT

Protein synthesis is a fundamental process that ensures the viability of cells. The accuracy of this process is the result of both the cognate aminoacylation of tRNAs and the correct codon-anticodon interaction. The enzymes that are responsible for the synthesis of the cognate aminoacyl-tRNAs are named aminoacyl-tRNA synthetases. These enzymes have high specificity and have developed proofreading mechanisms during the evolution. Phenylalanyl-tRNA synthetase (PheRS) is a class II enzyme and has an $(\alpha\beta)_2$ tertiary structure. PheRS, although in certain cases misactivates the amino acid tyrosine, has the ability to proofread this mistake. The exact mechanism of proofreading has not been characterized, yet. Aim of the present study is the preparation of the necessary components for elucidation of this mechanism. For the present study the part of the genomic DNA from *E. coli*, that includes the genes encoding the α and β subunits of PheRS and bear the mutation A294G in the gene of α subunit, was amplified by PCR and cloned. This mutation is critical for the specific binding of cognate amino acids. Moreover, the expression of these genes was attempted. In addition, the gene that codes the α subunit of PheRS from *M.thermoautotrophicum* and a gene exhibiting high homology to the PheRS β subunit, were amplified and cloned, in an effort to place both genes under the control of the same promoter. Finally, the gene that encodes TyrRS from *G.stearothermophilus* was amplified, cloned and used to introduce point mutations in position 152 (E152). The mutations E152A and E152R attach tyrosine on tRNA^{Phe} and they are appropriate to provide mischarged tRNA species for *in vitro* studies of PheRS's editing mechanism.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η βιωσιμότητα των κυττάρων εξασφαλίζεται από την απρόσκοπτη μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες. Η γενετική πληροφορία μεταφέρεται υπό τη μορφή mRNA μορίων, τα οποία μεταφράζονται σε πολυπεπίδια. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στο ότι κάθε τριπλέτα βάσεων (κωδικόνιο) αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο αμινοξύ. Έτσι, η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων αποτελεί το υπόστρωμα για τη σύνθεση της αντίστοιχης αλληλουχίας αμινοξέων που τελικά απαρτίζουν το συντιθέμενο πολυπεπίδιο. Το 1958, ο Crick στη θεωρία του, που αργότερα έγινε γνωστή ως “Υπόθεση Προσαρμογής” [“The Adaptor Hypothesis”] πρότεινε ότι η μετάφραση λαμβάνει χώρα με τη μεσολάβηση «προσαρμοστικών» μορίων. Κάθε τέτοιο μόριο θα μπορούσε να μεταφέρει ένα συγκεκριμένο αμινοξύ προσδεμένο σε ένζυμο, ώστε να αναγνωρίζει το αντίστοιχο κωδικόνιο. Ο Crick πρότεινε ότι τα προσαρμοστικά μόρια περιείχαν ριβονουκλεοτίδια, διότι έτσι θα μπορούσε να δοθεί η εξήγηση ότι η αναγνώριση των κωδικονίων συμβαίνει λόγω συμπληρωματικότητας ζευγών βάσεων¹. Πράγματι, τα αμινοξέα που απαιτούνται για τη σύνθεση των πεπτιδίων μεταφέρονται με τη βοήθεια αμινοακυλιωμένων-tRNA μορίων.

1.1 Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες: μια απαραίτητη οικογένεια ενζύμων με υψηλή εξειδίκευση

Η ταυτότητα ενός αμινοξέος που ενσωματώνεται σε μια συγκεκριμένη θέση ενός νεοσυντιθέμενου πολυπεπτιδίου καθορίζεται κυρίως από δύο παράγοντες: το σωστό συνδυασμό των αμινοξέων με τα αντίστοιχα μόρια tRNA και την αλληλεπίδραση του αντικωδικονίου του αμινοακυλιωμένου-tRNA με το κατάλληλο κωδικόνιο του mRNA. Επομένως, η σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNA μορίων είναι μια κεντρική διαδικασία, η οποία εξασφαλίζει την απρόσκοπτη ροή υποστρωμάτων προς το ριβόσωμα με σκοπό τη σύνθεση των πρωτεϊνών². Η αντίδραση της δημιουργίας των σωστών ζευγών αμινοξέος και μορίου tRNA καταλύεται από τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (AARSs). Η πιστότητα της μετάφρασης εξαρτάται κυρίως από δύο βασικές ιδιότητες που εξασφαλίζουν τα ένζυμα αυτά: τη σωστή εστεροποίηση του συγγενούς αμινοξέος στο συγγενές του μόριο tRNA και την απομάκρυνση μη συγγενών αμινοξέων τα οποία δεσμεύονται σε μη συγγενή μόρια tRNA³.

Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (AARSs) είναι μια οικογένεια ενζύμων που καταλύουν την άμεση δέσμευση των αμινοξέων στα μόρια tRNA⁴. Διαχωρίζονται σε δύο κλάσεις, τις I και II, ανάλογα με την τοπολογία των ενεργών τους κέντρων και τα δομικά τους μοτίβα, και κάθε κλάση περιλαμβάνει δέκα ένζυμα στην πλειονότητα των οργανισμών, που έχουν μελετηθεί ως τώρα⁵(πίνακας 1). Συγκεκριμένα, 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). Τα δύο αυτά τμήματα αποτελούν μέρη μιας διαμόρφωσης που δεσμεύει δινουκλεοτίδια (Rossmann διαμόρφωση), συμμετέχουν στη δέσμευση του ATP και εμπλέκονται στην κατάλυση. Οι συνθετάσες της κλάσης II έχουν τρεις κοινές αλληλουχίες, οι οποίες απαρτίζουν ένα μοναδικό δομικό μοτίβο. Το μοτίβο αυτό αποτελείται από επτά αντιπαράλληλα β πτυχωτά φύλλα με τρεις πλευρικές α έλικες, που διαμορφώνουν τον πυρήνα των καταλυτικών τους περιοχών³. 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 (acceptor stem) του μορίου tRNA από την

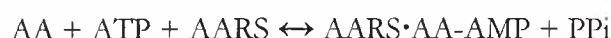
πλευρά της μικρής αύλακας, σε αντίθεση με τα ενεργά κέντρα των ενζύμων της κλάσης II που προσεγγίζουν το βραχίονα αυτό στη μεγάλη αύλακα. Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι πολλές συνθετάσες της κλάσης I απαιτούν την αναγνώριση του αντικωδικονίου για να αμινοακυλιώσουν τα συγγενή μόρια tRNA, ενώ τα περισσότερα ένζυμα της κλάσης II δεν αλληλεπιδρούν με το αντικωδικόνιο του μορίου tRNA που δεσμεύουν. Επιπλέον, οι συνθετάσες κλάσης I αμινοακυλιώνουν τα 3' άκρα των μορίων tRNA στη θέση 2'-OH της τελικής αδενοσίνης, ενώ οι συνθετάσες κλάσης II, εκτός από τη PheRS, επιτελούν την ίδια διεργασία στη θέση 3'-OH⁶. Ένα από τα παράδοξα του διαχωρισμού των συνθετασών στις δύο κλάσεις αποτελεί η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της λυσίνης. Στους περισσότερους οργανισμούς η LysRS ανήκει στην κλάση II. Σύμφωνα όμως με γενωμικές μελέτες, τα αρχαία *Methanococcus jannaschi* και *Methanobacterium thermoautotrophicum* εκκωδάζουν LysRS που ανήκει στην κλάση I⁷.

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών σε δύο κλάσεις

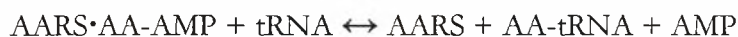
AMINOΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΕΣ(AARSs)

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

Οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, δηλαδή κάθε ένα ένζυμο της οικογένειας αυτής ακυλιώνει ένα μόνο είδος μορίων tRNA (cognate tRNA) με το συγγενές του αμινοξύ (cognate amino acid). Αναφέρεται ότι οι AARSs επιτρέπουν μόνο ένα λάθος σε κάθε 10,000 μόρια tRNA που αμινοακυλιώνουν⁸. Η σύνθεση αμινοάκυλο-tRNA μορίων είναι το στάδιο κατά το οποίο τα μόρια tRNA εστεροποιούνται στο 3' άκρο τους με το αντίστοιχο συγγενές αμινοξύ για να το μεταφέρουν στο ριβόσωμα, όπου και θα αποτελέσει υπόστρωμα για την επιμήκυνση του πολυπεπτιδίου. Η διαδικασία αμινοακυλίωσης των μορίων tRNA με τα αντίστοιχα αμινοξέα επιτελείται μέσω μιας αντίδρασης δύο σταδίων⁹. 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. Κατά το πρώτο στάδιο ένα μόριο ATP και το αμινοξύ δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης και δημιουργείται ένα σύμπλοκο αμινοάκυλο-αδενυλικού, από ένα αμινοξύ και ένα μόριο AMP, που είναι δεσμευμένο στο ένζυμο, ενώ μια ανόργανη πυροφωσφορική ομάδα αποχωρεί.

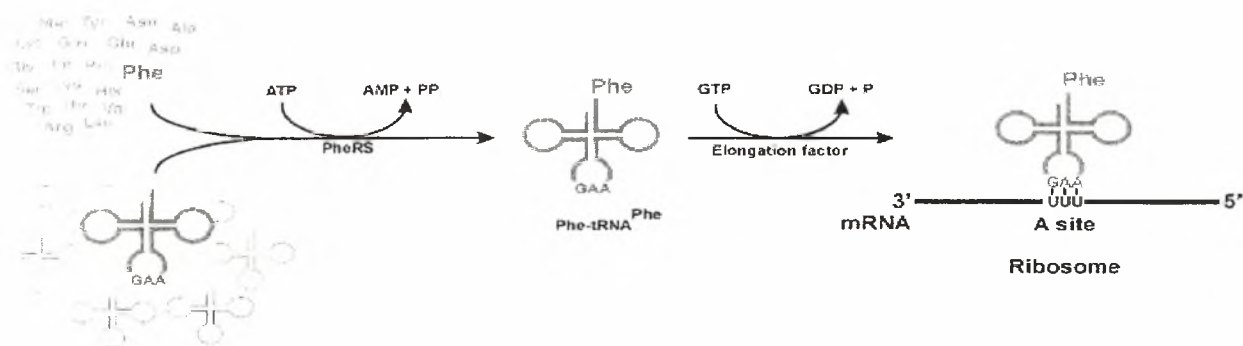


Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης ένα μόριο tRNA δεσμεύεται στο σύμπλοκο AARS·AA-AMP και ακολουθεί εστεροποίηση του μορίου tRNA στο 3' άκρο με το κατάλοιπο του αμινοξέος και απελευθέρωση ενός μορίου AMP.



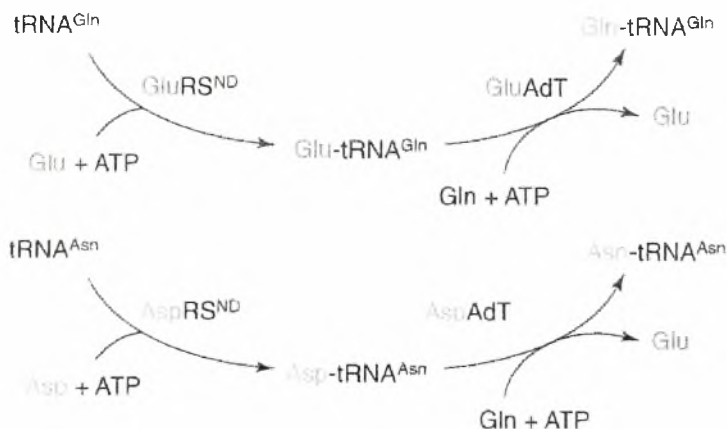
(AA: αμινοξύ, AARS: αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση)

Τα αμινοακυλωμένα 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(εικόνα 1).



Εικόνα 1: Μετάφραση του κωδικονίου UUU σε φαινυλαλανίνη κατά στο στάδιο επιμήκυνσης της πρωτεϊνσύνθεσης. Μη φορτισμένα tRNA^{Phe} και κατάλοιπα φαινυλαλανίνης επιλέγονται από τη PheRS ανάμεσα στο πλήθος των παρόμοιων δομικά υποστρωμάτων. Μετά τη σύνθεση και την απελευθέρωση από τη PheRS, τα μόρια Phe-tRNA^{Phe} μεταφέρονται στο ριβόσωμα, όπου το αντικωδικόνιο μπορεί να αλληλεπιδράσει με το αντίστοιχο κωδικόνιο του mRNA.

Οι πληροφορίες από τα γονιδιώματα και οι γενωμικές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα έχουν υποδείξει ότι η μειοψηφία των οργανισμών εκκράζει και τα είκοσι ένζυμα των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών. Στην πλειοψηφία των οργανισμών κάποιες συνθετάσες απουσιάζουν και αντικαθιστάται η δράση τους μέσω άλλων ενζύμων και μονοπατιών του κυττάρου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η απουσία της GlnRS από τα κατά Gram θετικά βακτήρια, τα αρχαία, τα κυανοβακτήρια, τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες των περισσότερων κυττάρων. Τι γίνεται στην περίπτωση αυτή; Το γλουταμινικό οξύ συνδέεται στο tRNA^{Gln} μέσω της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση του γλουταμινικού οξέος. Ουσιαστικά λοιπόν προκύπτει ένα «κακοφορισμένο» Glu-tRNA^{Gln} μόριο, το οποίο τρανσαμινώνεται σε Gln-tRNA^{Gln} από το ένζυμο αμιδινοτρανσφεράση του Glu-tRNA^{Gln} (Glu-AdT) μέσω μιας αντίδραση που απαιτεί κατανάλωση ATP και χρησιμοποιεί ως δότη αμινομάδων τη γλουταμίνη¹⁰. Η αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο Glu-AdT πραγματοποιείται σε τρία στάδια. Αρχικά, υδρολύεται η γλουταμίνη σε γλουταμινικό οξύ και προκύπτει μια ομάδα NH₃. Έπειτα, το ATP αντιδρά με την πλευρική αλυσίδα της γλουταμίνης του Glu-tRNA^{Gln} και αποδίδει ένα ακυλοφωσφορικό ενδιάμεσο και ADP. Τέλος, το ακυλοφωσφορικό ενδιάμεσο αντιδρά με την ομάδα NH₃, οπότε και σχηματίζεται Gln-tRNA^{Gln} και P_i. Κάποιοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν ένα παρόμοιο μονοπάτι τρανσαμίδωσης για τη σύνθεση Asn-tRNA^{Asn} από Asp-tRNA^{Asn}, όταν απουσιάζει από τα ένζυμα τους η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της ασπαραγίνης¹¹(εικόνα 2).



Εικόνα 2: tRNA-εξαρτώμενη σύνθεση Gln-tRNA^{Gln} και Asn-tRNA^{Asn} με τη μεσολάβηση AdTs.

Η παρατήρηση ότι η δράση κάποιων συνθετασών είναι εξαρτώμενη από την ταυτότητα των μορίων tRNA δεν είναι πρόσφατη. Παλαιότερες μελέτες έχουν υποδείξει δύο τέτοιες χαρακτηριστικές περιπτώσεις, αυτές της φορμυλμεθειονίνης και της σεληνοκυστεΐνης. Είναι γνωστό ότι όλοι οι οργανισμοί χρησιμοποιούν ένα ειδικό εναρκτήριο μόριο tRNA της μεθειονίνης για να αρχίσει η πρωτεϊνοσύνθεση. Ωστόσο, τα βακτήρια και τα οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων (μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες) απαιτούν φορμυλμεθειονίνη δεσμευμένη στο συγγενές της tRNA^{fmet} ως αρχικό μόριο¹². Το ένζυμο MetRS καταλύει τη δέσμευση μεθειονίνης στο tRNA της φορμυλμεθειονίνης και έπειτα το κατάλοιπο μεθειονίνης φορμυλιώνεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται φορμυλτρανσφεράση του μεθειονύλ-tRNA (MTF) που χρησιμοποιεί ως δότη φορμυλομάδων την ουσία N¹⁰-formyltetrahydrofolate (FTHF). Η διεργασία της φορμυλίωσης είναι άκρως εξειδικευμένη διότι από την πληθώρα των αμινοακυλιωμένων tRNA μορίων αναγνωρίζεται και τροποποιείται μόνο το μεθειονύλ-tRNA^{fmet}. Η διεργασία σύνθεσης της σεληνοκυστεΐνης προσομοιάζει σε γενικές γραμμές με αυτή της φορμυλμεθειονίνης, με τη διαφορά ότι η πρώτη είναι τελικό παράγωγο μιας σερίνης που δεσμεύεται στο tRNA^{sec}¹³.

Μια ακόμα περίπτωση εναλλακτικής αμινοακυλίωσης των μορίων tRNA είναι αυτή που έχει παρατηρηθεί σε κάποια αρχαία, όπως το *Methanococcus jannaschii*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί στο γονιδίωμα τους δεν έχουν γονίδιο που να κωδικοποιεί μία κανονική CysRS. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση τόσο Cys-tRNA μορίων όσο και Pro-tRNA μορίων στον οργανισμό αυτό είναι η ProRS και λόγω της διπλής εξειδίκευσης την οποία έχει καλείται ProCysRS. Επιπλέον είναι χαρακτηριστικό ότι η ProCysRS καταλύει τη σύνθεση κυστεΐνυλο-αδενυλικών συμπλόκων μόνο παρουσία του συγγενούς μορίου tRNA^{Cys}. Είναι λοιπόν εμφανές ότι η διττή δράση του ενζύμου ProCysRS είναι άμεσα εξαρτώμενη από την δέσμευση στο ένζυμο των συγκεκριμένων μορίων tRNA¹⁴.

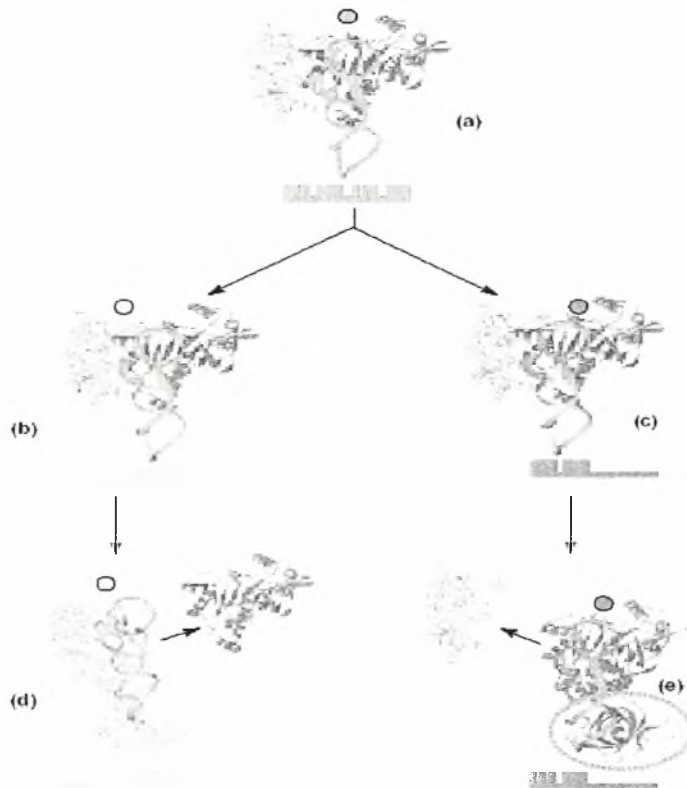
Αξιοσημείωτες είναι οι παρατηρήσεις που προέρχονται από γενωμικές μελέτες και αναφέρουν ότι σε κάποιους οργανισμούς έχουν ανιχνευτεί γονίδια που παρουσιάζουν ομοιότητα είτε με τμήματα είτε με ολόκληρα τα γονίδια που κωδικοποιούν τις AARSs (διπλασιασμός γονιδίων). Παρά την εκτεταμένη μελέτη των “σύγχρονων” ενζύμων και την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης τους, ο ρόλος των γονιδίων αυτών παραμένει μέχρι σήμερα ένα ανοιχτό ερευνητικό ερώτημα. Ταυτόχρονα, η αρχική

υπόθεση ότι οι σύγχρονες συνθετάσες συναρμολογήθηκαν από διάφορα τέτοια πολυπεπτιδικά τμήματα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης φαίνεται να ενισχύεται με την ολοένα αυξανόμενη ανίχνευση γονιδίων με μεγάλη ομολογία προς τις AARSs¹⁵. Πρόσφατα, αποσαφηνίστηκε ο ρόλος ενός τέτοιου γονιδίου (*hisZ*) το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ομόλογη προς την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της ιστιδίνης. Η πρωτεΐνη αυτή από τον *Lactococcus lactis* συμπίπτει με την καταλυτική περιοχή της κανονικής HisRS. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν μπορεί να διεκπεραιώσει τη δραστηριότητα της κανονικής HisRS. Αντίθετα δείχθηκε ότι είχε σημαντική ενζυμική δράση στη βιοσύνθεση της ιστιδίνης στο συγκεκριμένο οργανισμό¹⁶. Άλλα πεπτίδια με ομοιότητα προς την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της μεθειονίνης φαίνεται ότι ενισχύουν τη δέσμευση του μορίου tRNA στη συγκεκριμένη συνθετάση. Τα πεπτίδια αυτά δεν μπορούν να δεσμεύσουν κανένα άλλο είδος RNA^{17,18}. Πρωτεΐνες οι οποίες προσομοιάζουν με την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης από θηλαστικά δείχθηκε ότι δεν έχουν καμία εμφανή εμπλοκή ούτε στη βιοσύνθεση του συγκεκριμένου αμινοξέος ούτε στη δέσμευση tRNA. Αντίθετα αποτελούν βοηθητικό παράγοντα της μιτοχονδριακής DNA πολυμεράσης γ και ο κύριος ρόλος τους είναι η διέγερση της σύνθεσης DNA. Σύμφωνα με πρόσφατη αναφορά που μελετά πρωτεΐνη του *E.coli* (YadB), η οποία προσομοιάζει με την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της γλουταμίνης, φαίνεται η πρωτεΐνη αυτή να παίζει σημαντικό ρόλο στη μετα-μεταγραφής τροποποίηση βάσεων του tRNA^{19,20}. Στο *Clostridium sticklandii* έχει ταυτοποιηθεί μια πρωτεΐνη ομόλογη προς την ProRS, η PrdX, η οποία εξειδικευμένα υδρολύει τα κακοφορισμένα Ala-tRNA^{Pro}. Παρόμοια επιδιορθωτική δράση παρουσιάζει και μια πρωτεΐνη, η AlaX, που απαντάται στους οργανισμούς *Methanosarcina barkeri* και *Sulfolobus solfataricus*. Η AlaX υδρολύει τα κακοφορισμένα Ser-tRNA^{Ala} και Gly-tRNA^{Ala}²¹. Τέλος, έχει πρόσφατα αναφερθεί ότι σε κάποια αρχαία υπάρχει μια επέκταση στη N-τελική περιοχή της ThrRS η οποία δεν προσομοιάζει με την αντίστοιχη περιοχή του ενζύμου των βακτηρίων και των ευκαρυωτών. Η περιοχή αυτή συμμετέχει στη διαδικασία ελέγχου της συνθετάσης έναντι των κακοφορισμένων Ser-tRNA^{Thr} μέσω ενός μηχανισμού που θεωρείται ότι είναι παρόμοιος με αυτόν της περιοχής ελέγχου της ThrRS των βακτηρίων^{22,23}.

Τα γονίδια που είναι ομόλογα με αυτά που κωδικοποιούν τις AARS προέρχονται από διπλασιασμούς γονιδίων και ίσως σε κάποιες περιπτώσεις από οριζόντια μεταφορά τμημάτων γενωμικού υλικού. Τα γεγονότα αυτά συνέβησαν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ενώ παράλληλα οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες αποκτούσαν υψηλή εξειδίκευση και τη δυνατότητα επιδιόρθωσης των σφαλμάτων κατά την αμινοακυλίωση. Όπως προαναφέρθηκε, στα μόρια tRNA υπάρχουν περιοχές κλειδιά που συμβάλλουν στην εξειδίκευση της αμινοακυλίωσής τους. Μεταβολές στον τρόπο αναγνώρισης του tRNA είναι γενικά σχετιζόμενες με διαφορές των AARSs μεταξύ των ειδών, γεγονός που υποδεικνύει ότι από ένα χρονικό σημείο και έπειτα, υπήρξε παράλληλη διαφοροποίηση τόσο των συνθετασών, όσο και των συγγενών τους μορίων tRNA κατά την εξέλιξη²⁴.

Η καθολική εξάπλωση των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών σε όλα τα εξελικτικά στάδια της ζωής, καταμαρτυρεί ότι τα ένζυμα αυτά ανήκουν στις παλαιότερες οικογένειες ενζύμων. Αρχικά, η διαδικασία της αμινοακυλίωσης καταλυόταν από ριβοένζυμα, τα οποία είχαν μικρή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και κατά τη διάρκεια της εξέλιξης συνδέθηκαν με κάποιες βοηθητικές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούσαν να καλύψουν και να προστατεύουν το βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος

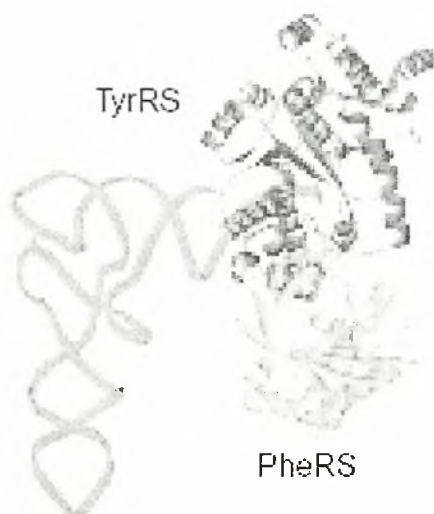
των μορίων tRNA και συμμετείχαν έτσι έμμεσα στην ακρίβεια της αμινοακυλίωσης²⁵. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τα δομικά απλά και πρώιμα αυτά ένζυμα, κάτω από ισχυρή επιλεκτική πίεση, απέκτησαν περιοχές με ισχυρή συνάφεια προς τα συγγενή τους αμινοξέα και το ATP με αποτέλεσμα τη δημιουργία των πρωτων εξειδικευμένων ενεργών κέντρων. Οι περιοχές των ενεργών κέντρων των συνθετασών είναι προγονικές περιοχές δέσμευσης του ATP που πιθανώς προσαρμόστηκαν στο να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές των μορίων tRNA. Η εξέλιξη των AARSs ολοκληρώθηκε με την απώλεια των περιοχών που αλληλεπιδρούσαν με ριβοένζυμα και την αντικατάστασή τους με επιπρόσθετες συνοδευτικές πρωτεΐνες, οι οποίες τελικά ενσωματώθηκαν στην κύρια δομή των αρχέγονων ενζύμων. Ταυτόχρονα ο διπλασιασμός των γονιδίων των AARSs και η διαφοροποίηση των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (AARS-tRNA) και καθώς ο γενετικός κώδικας γινόταν όλο και πιο πολύπλοκος οδήγησε στη δημιουργία δύο δομικά διακριτών και εξελικτικά συντηρημένων ενζυμικών ομάδων (class I και class II) οι οποίες περιλαμβάνουν μέχρι σήμερα δέκα μέλη έκαστη²⁶ (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Εξελικτική προέλευση των δύο κλάσεων των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών. Από το προγονικό μόριο προέκυψαν δύο ομάδες συνθετασών μετά από διάσπαση. Οι συνθετάσες των δύο κλάσεων προσαρμόσαν στα μόρια τους και κάποιες επιπλέον πρωτεϊνικές αλυσίδες (που περιβάλλονται από τους κύκλους) οι οποίες ενίσχυσαν την εξειδίκευσή τους.

Δομικές αναλύσεις των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών έδειξαν ότι οι περιοχές των ενεργών κέντρων κάποιων ζευγών ενζύμων είναι συμπληρωματικές²⁷. Σε κάθε ζεύγος το ένα ένζυμο ανήκει στην κλάση I και το άλλο στην κλάση II. Το γεγονός ότι η περιοχή της συμπληρωματικότητας κάθε ζεύγους συνθετασών διαφέρει ως προς τον άξονα του βραχίονα υποδοχής των αμινοξέων των μορίων tRNA οδηγεί στην υπόθεση ότι οι συμβατοί συνδυασμοί αντιστοιχούν σε προγονικά ζευγαρώματα των περιοχών των συνθετασών, στα αρχέγονα δηλαδή ενεργά κέντρα τους. Πιο επεξηγηματικά, κάθε ζεύγος

συμπληρωματικών συνθετασών προήλθε από τη διάσπαση ενός προγονικού μορίου και έτσι οι δομές τους παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο χώρο. Ένα από τα ζεύγη αυτά είναι η TyrRS της κλάσης I με τη PheRS της κλάσης II (εικόνα 4). Η σύνδεση μεταξύ της TyrRS και της PheRS, που κάθε μια δεσμεύει το βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος του tRNA με προσανατολισμό διαφορετικό από αυτό των ενζύμων της κλάσης στην οποία ανήκουν, είναι ένα στοιχείο εξαιρετικά σημαντικό, καθώς, όπως θα αναφερθεί παρακάτω, οι δύο συνθετάσες δεσμεύουν σε κάποιες περιπτώσεις υποστρώματα η μια της άλλης.

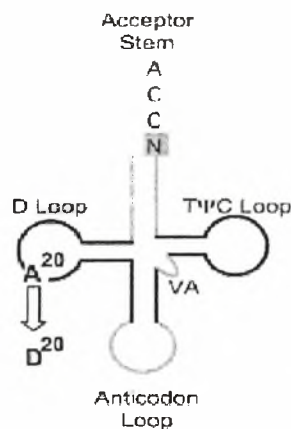


Εικόνα 4: Οι δομές της PheRS και της TyrRS παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο χώρο. Θεωρείται ότι τα δύο ένζυμα προέρχονται από τη διάσπαση ενός αρχέγονου μορίου συνθετάσης.

1.2 Αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες: μηχανισμοί επιλογής υποστρωμάτων και μηχανισμοί επιδιόρθωσης

Τα παραδείγματα των εναλλακτικών μονοπατιών αμινοακυλίωσης των μορίων tRNA υποδεικνύουν ότι η μετάφραση κάποιων κωδικονίων βασίζεται στην αμινοακυλίωση μορίων tRNA με μη συγγενή αμινοξέα. Ωστόσο, τις περισσότερες φορές η σύνθεση των μορίων αυτών αποτελεί απειλή για την ορθότητα της μετάφρασης. Κατά συνέπεια, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μια σειρά μηχανισμών ελέγχου ποιότητας, ώστε να εξασφαλιστεί η όσο το δυνατόν ορθότερη μετάφραση των κωδικονίων. Εκτός από το ζευγάρι του κωδικονίου με το αντικωδικόνιο, οι μηχανισμοί ελέγχου της πιστότητας της μετάφρασης είναι η εξειδικευμένη επιλογή υποστρωμάτων από τις AARSs, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης και η απόρριψη από το ριβόσωμα³. Οι μηχανισμοί που επιτρέπουν στις AARSs να επιλέγουν τα ορθά υποστρώματα για τις αντιδράσεις αμινοακυλίωσης είναι ποικίλοι και περιλαμβάνουν μηχανισμούς τροποποίησης, που εξασφαλίζουν ότι τα εσφαλμένα ενεργοποιημένα αμινοξέα ή τα κακοφορισμένα μόρια tRNA θα υδρολυθούν. Η εξειδίκευση των AARSs επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους. Οι συνθετάσες πραγματοποιούν μια σειρά περίπλοκων αλληλεπιδράσεων/επαφών τόσο με τα αμινοξέα όσο και με τα μόρια tRNA, οπότε έχουν το περιθώριο να εξασφαλίσουν ότι μόνο τα συγγενή υποστρώματα έχουν επιλεγεί από ένα πλήθος δομικά παρόμοιων υποστρωμάτων.

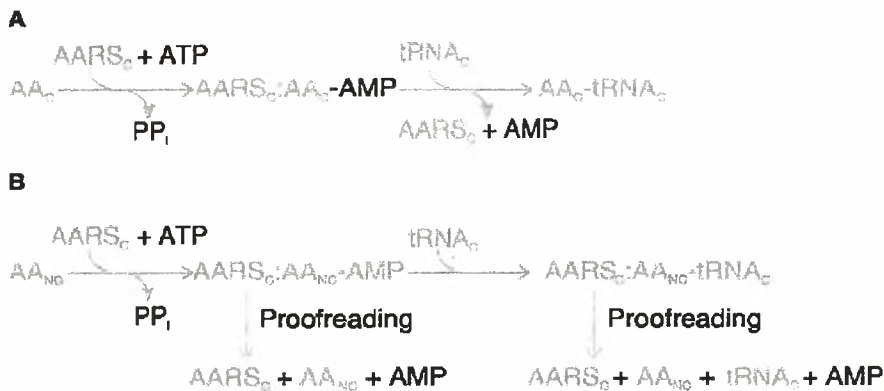
Όσον αφορά την επιλογή του σωστού μορίου tRNA, η ορθότητα της διαδικασίας αυτής εξαρτάται από την αναγνώρισή του από την αντίστοιχη AARS και ενισχύεται από την ύπαρξη καθοριστικών περιοχών στα μόρια tRNA που δεν επιτρέπουν την αλληλεπίδραση με μη συγγενείς AARSs. Τα μόρια tRNA κατέχουν ρόλο κλειδί όχι μόνο για τη σωστή διαμόρφωση των ενεργών κέντρων των συνθετασών, αλλά κυρίως για τις πληροφορίες που περιέχονται στην αλληλουχία τους. Η αναγνώριση των τριών βάσεων του αντικωδικονίου, η τελευταία βάση πριν το 3' CCA άκρο (βάση διαλογέας, discriminator base) και τροποποιημένες ή ασυνήθεις βάσεις, αποτελούν το σύνολο των στοιχείων που συνθέτουν την ταυτότητα των προσαρμοστικών αυτών μορίων (tRNA identity)²⁸. Οι περισσότερες συνθετάσες αλληλεπιδρούν μέσω δύο περιοχών με τα συγγενή μόρια tRNA. Η καταλυτική τους περιοχή δεσμεύει την ΤΨC μικροέλικα και το βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος του μορίου tRNA, ενώ άλλες περιοχές των συνθετασών, λιγότερο συντηρημένες σε σχέση με το ενεργό κέντρο αλληλεπιδρούν με την περιοχή του αντικωδικονίου²⁹ (εικόνα 5). 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 *M. jannaschii* που παίζει σημαντικό ρόλο στην εξειδικευμένη αλληλεπίδραση του ενζύμου με το tRNA^{Tyr}³⁰. Οι AARSs σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τη μια ή και τις δύο περιοχές αναγνώρισης του μορίου tRNA και κάποιες φορές με το μεταβλητό βραχίονα. 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 βρόγχου D στα πλαίσια της αλληλεπίδρασης με το μόριο tRNA³¹.



Εικόνα 5: Οι περιοχές του μορίου tRNA που εμπλέκονται στην αναγνώριση του από τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες. Εκτός από το βραχίονα δέσμευσης του αμινοξέος και την περιοχή του αντικωδικονίου κάποιες συνθετάσες αναγνωρίζουν το μεταβλητό βραχίονα (VA) και το βρόγχο D.

Η διάκριση μεταξύ των αμινοξέων από τις AARSs είναι μια διαδικασία πολύπλοκη, διότι τα μόρια αυτά είναι λιγότερο σύνθετα στη δομή τους σε σχέση με τα μόρια tRNA, οπότε και δυσκολότερο να διαχωριστούν. Υπάρχουν αμινοξέα, όπως η κυστεΐνη, που φέρουν χαρακτηριστικές πλευρικές αλυσίδες. Παρόλα αυτά, κάποια αμινοξέα δε μπορούν να διαχωριστούν σαφώς ώστε να αποφευχθούν τυχόν λάθη

κατά τη μετάφραση. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των αμινοξέων βαλίνη και ισολευκίνη, που διαφέρουν μόνο κατά μια μεθυλομάδα. Το γεγονός ότι τέτοια λάθη συμβαίνουν σε πολύ χαμηλή συχνότητα οφείλεται στην επιδιορθωτική δράση των AARSs, οι οποίες επιτυγχάνουν την εξειδίκευσή τους με δύο τρόπους: ευνοώντας τη δέσμευση του συγγενούς αμινοξέος και επιδιορθώνοντας επιλεκτικά τα μη συγγενή αμινοξέα. 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 ένα περίπου στις 3000³². Η IleRS έχει την ικανότητα να επιδιορθώνει τη λανθασμένα ενεργοποίηση βαλίνης σε δύο σημεία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αμινοακυλίωσης: το ένζυμο αυτό, όπως και άλλες συνθετάσες, μπορεί να επιδιορθώσει το σφάλμα όταν είναι δεσμευμένο με το αμινοακυλο-αδενυλικό σύμπλοκο (προ-μεταφοράς επιδιόρθωση, pre-transfer proofreading) ή όταν είναι δεσμευμένο με το αμινοακυλωμένο tRNA (μετα-μεταφοράς επιδιόρθωση, post-transfer proofreading)³³ (εικόνα 6).



Εικόνα 6: (A) Η αντίδραση αμινοακυλίωσης των μορίων tRNA από τις AARSs. (B) Επιδιόρθωση του μη συγγενούς αμινοξέος από τις AARSs. Το μη συγγενές αμινοξύ (AA_{nc}) πρώτα ενεργοποιείται, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία ενός συμπλόκου μεταξύ μιας συγγενούς AARS με ένα μη συγγενές αμινοακυλο-αδενυλικό. Αυτό το σύμπλοκο μπορεί είτε να επιδιορθωθεί άμεσα (προ-μεταφοράς επιδιόρθωση, pre-transfer proofreading), απελευθερώνοντας το μη συγγενές αμινοξύ, είτε να μεταφερθεί το μη συγγενές αμινοξύ στο 3' άκρο ενός συγγενούς μορίου tRNA. Όταν συντεθεί το κακοφορητισμένο tRNA δεν απελευθερώνεται, αλλά επιδιορθώνεται από την AARS (μετα-μεταφοράς επιδιόρθωση, post-transfer proofreading).

Οι δύο μηχανισμοί αποκατάστασης του σφάλματος από την IleRS εξαρτώνται έμμεσα από την παρουσία μορίων tRNA^{Ile}. Ποιος είναι όμως ο ακριβής μηχανισμός; Η IleRS έχει δύο διακριτές καταλυτικές περιοχές, που διαμορφώνουν ένα διπλό επιλογέα/κόσκινο (double sieve) κατά τη διαδικασία επιλογής των υποστρωμάτων^{34,35}. Η πρώτη επιλογή εξυπηρετεί τον αποκλεισμό των αμινοξέων που είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από την ισολευκίνη, αλλά δε δύναται να κάνει το ίδιο και για τη βαλίνη, λόγω μικρού μεγέθους, με αποτέλεσμα να συνθέτονται σύμπλοκα βαλινυλ-AMP. Η δεύτερη επιλογή δρα υδρολύοντας τα αμινοακυλο-αδενυλικά αυτά σύμπλοκα σε μια δομικά διακριτή θέση ελέγχου (editing site). Η IleRS επιδιορθώνει την εσφαλμένα ενεργοποιημένη βαλίνη είτε στο στάδιο του αμινοακυλο-αδενυλικού συμπλόκου είτε όταν είναι συνδεδεμένη 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}. 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.

Ένας εναλλακτικός μηχανισμός επιδιόρθωσης έχει περιγραφεί για την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της θρεονίνης. Η συνθετάση αυτή πρέπει να αναγνωρίζει και να ενεργοποιεί εξειδικευμένα τη θρεονίνη, έναντι των παρόμοιων δομικά αμινοξέων βαλίνη και σερίνη. Ο διαχωρισμός μεταξύ της θρεονίνης και της βαλίνης επιτυγχάνεται με ένα μηχανισμό που εμπλέκει το ιόν ψευδαργύρου, το οποίο βρίσκεται στο ενεργό κέντρο της ThrRS³⁶. Η θρεονίνη μέσω της αμινομάδας και της υδροξυλομάδας της πλευρικής της αλυσίδας συνδέεται ετεροπολικά με το ιόν του ψευδαργύρου. Η βαλίνη στη θέση της υδροξυλομάδας φέρει μια μεθυλομάδα που δεν επιτρέπει την αλληλεπίδραση με το ιόν αυτό. Οπότε η βαλίνη απορρίπτεται άμεσα και δεν δημιουργούνται κακοφορισμένα μόρια Val-tRNA^{Thr}. Αντιθέτως, στην περίπτωση της σερίνης δεν είναι δυνατή η απόρριψη του αμινοξέος πριν την εστεροποίησή του στο tRNA^{Thr}. Για την επιδιόρθωση του σφάλματος αυτού πολύ σημαντικό ρόλο παίζει το μόριο του tRNA³⁷. Η δομική ανάλυση του συμπλόκου της ThrRS και των υποστρωμάτων της έδειξε ότι το αμινοακυλιωμένο-CCA άκρο μετακινείται από το καταλυτικό κέντρο στην περιοχή ελέγχου, που απέχει περί τα 20Å. Έτσι, χωρίς να αποδεσμεύεται το μόριο tRNA από τη συνθετάση υδρολύεται η λανθασμένα ενεργοποιημένη σερίνη. Ουσιαστικά, λοιπόν, το μόριο tRNA είναι αυτό που ρυθμίζει την επιδιόρθωσή του καθώς με τη μετακίνηση του αμινοακυλιωμένου του άκρου το θέτει υπό τον έλεγχο της αντίστοιχης περιοχής.

Ένας τρίτος μηχανισμός επιδιόρθωσης είναι η μη εξαρτώμενη από tRNA υδρόλυση των μη συγγενών αμινοαδενυλικών συμπλόκων που είναι δεσμευμένα με το ένζυμο. Ο μηχανισμός αυτός είναι υψίστης σημασίας για κάποιες AARS, όπως η MetRS, η επιδιορθωτική δράση της οποίας κατευθύνεται πρωταρχικά προς την ομοκυστεΐνη, ένα ενδιάμεσο προϊόν του μεταβολισμού της μεθειονίνης³⁸. Αυτό το παράδειγμα επιδιόρθωσης είναι ασυνήθιστο, διότι ο μηχανισμός της απόρριψης περιλαμβάνει την κυκλοποίηση της ομοκυστεΐνης προς παραγωγή θειολακτόνης. Αυτή η δράση δεν περιορίζεται στη MetRS, αλλά έχει βρεθεί 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, οι AARSs αυτές καταλύουν την θειόλο-εξαρτώμενη απακυλίωση του μορίου tRNA με την ακόλουθη σύνθεση διπεπτιδίων που φέρουν κυστεΐνη, αν και ο φυσιολογικός ρόλος της διεργασίας αυτής δεν έχει προσδιοριστεί.

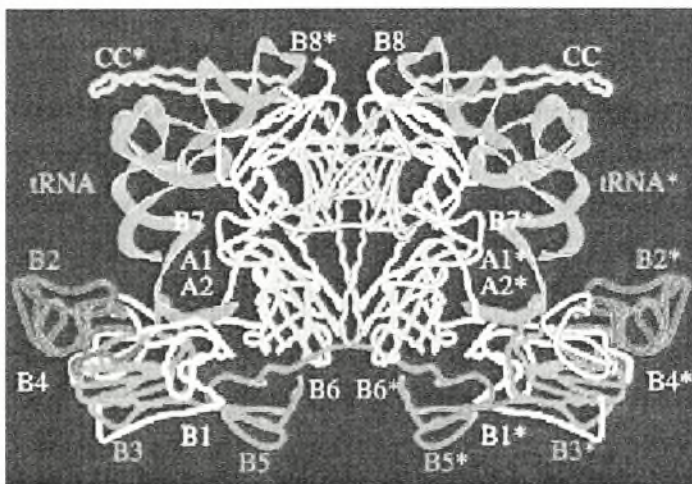
1.3 Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της φαινυλαλανίνης (PheRS).

Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της φαινυλαλανίνης, είναι το μεγαλύτερο και πιο σύνθετο δομικά μέλος της οικογένειας των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών. Το ένζυμο αυτό ανήκει στην κλάση II των συνθετασών, σύμφωνα με τα δομικά του χαρακτηριστικά, αλλά λειτουργικά προσομοιάζει με τις συνθετάσες κλάσης I, καθώς αμινοακυλιώνει τη 2'-OH ομάδα της τελικής αδενοσίνης του μορίου tRNA³⁹. Σχεδόν όλες οι PheRS είναι ετεροτετραμερή με δομή (αβ)₂, με μόνη εξαίρεση το μονομερές μιτοχονδριακό ένζυμο του *S.cerevisiae*⁴⁰. Το ετεροδιμερές αβ αποτελείται από 11 δομικές περιοχές· οι

τρεις από αυτές [ένα ελικοειδή βραχίονα με δομή υπερσπειρωμένου σπειράματος (coiled-coil) στο N-τελικό άκρο, A1 και A2] ανήκουν στην υπομονάδα α και οι υπόλοιπες οχτώ (B1-B8) στην υπομονάδα β ⁴¹. Οι περιοχές A1 και A2 διαμορφώνουν την καταλυτική δομική περιοχή που είναι συντηρημένη στα ένζυμα κλάσης II. Το CCA άκρο και ο βραχίονας υποδοχής του αμινοξέος του tRNA^{Phe} αλληλεπιδρούν με το καταλυτική δομική περιοχή και τις περιοχές B1, B3 και B7 του ίδιου ετεροδιμερούς. Η περιοχή του αντικωδικονίου και η γενική διαμόρφωση του tRNA^{Phe} αναγνωρίζονται από τη B8 περιοχή και τον ελικοειδή βραχίονα με δομή σπειρωμένου σπειράματος του δεύτερου ετεροδιμερούς (εικόνα 7). Η αλληλεπίδραση ενός tRNA^{Phe} και με τις τέσσερις υπομονάδες της συνθετάσης εξηγεί την αναγκαιότητα της τετραμερούς δομής για την ενζυμική δραστηριότητα της PheRS.

Ο βραχίονας υποδοχής του αμινοξέος και η περιοχή του αντικωδικονίου είναι εξίσου σημαντικά για την εξειδικευμένη αναγνώριση του tRNA^{Phe}. Μελέτες μεταλλαξιγένεσης των καταλοίπων στις δύο αυτές περιοχές του συγκεκριμένου μορίου tRNA έδειξαν ότι το αντικωδικόνιο συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην αναγνώριση από τη συνθετάση του μορίου tRNA και ότι η περιοχή αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο μορίων είναι εκτενής⁴². Επιπλέον, αναφέρεται ότι η PheRS του *Thermus thermophilus* παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση στην επιλογή μορίου tRNA στο στάδιο δέσμευσης αυτού παρά στο καταλυτικό στάδιο⁴³. Στην αναγνώριση του μορίου tRNA στη συγκεκριμένη περίπτωση, εκτός από την περιοχή του αντικωδικονίου, εμπλέκεται και η δομή του tRNA.

Βιοχημικές μελέτες και αναλύσεις της δομής του ενζύμου έχουν υποδείξει κάποια κατάλοιπα αμινοξέων στην περιοχή του ενεργού κέντρου που συμμετέχουν στην αναγνώριση του αμινοξέος, αλλά ο ακριβής μηχανισμός και η περιοχή που εμπλέκεται στην επιδιόρθωση των μη συγγενών υποστρωμάτων παραμένει άγνωστη.



Εικόνα 7: Η δομή του συμπλόκου PheRS-tRNA^{Phe}. Οι περιοχές των υπομονάδων α και β του δεύτερου ετεροδιμερούς διαχωρίζονται με έναν αστερίσκο. Το σύμβολο CC αντιστοιχεί στον ελικοειδή βραχίονα με δομή σπειρωμένου σπειράματος της α υπομονάδας.

Η PheRS του *E.coli* είναι ο στόχος της τοξικότητας που προκαλεί η p-φλουοροφαινυλαλάνη (p-F-phe), της οποίας η δέσμευση στο μόριο tRNA έχει ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωσή της στις πρωτεΐνες του κυττάρου⁴⁴. Αλληλούχιση του γονιδίου που κωδικοποιεί τη PheRS από άγριου τύπου στελέχη και στελέχη με ανθεκτικότητα στην p-F-phe υπέδειξε ότι το κατάλοιπο στη θέση 294 της α υπομονάδας της PheRS ευθύνεται για την ανθεκτικότητα αυτή. Το κατάλοιπο αυτό βρίσκεται στην περιοχή A5, η οποία

εμπλέκεται στην εξειδικευμένη δέσμευση αμινοξέων από τη συνθετάση. Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι όταν το κατάλοιπο στη θέση 294 είναι γλυκίνη αντί για αλανίνη τότε η PheRS ενεργοποιεί τυροσίνη. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται διότι με την υποκατάσταση του συγκεκριμένου καταλοίπου αλλάζει η διαμόρφωση του ενεργού κέντρου. Η διαφορά μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων της αλανίνης και της γλυκίνης προκαλεί την μεγέθυνση της δομής που διαμορφώνεται στο ενεργό κέντρο. Η αλλοίωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα η συνθετάση να χάνει την εξειδίκευσή της.

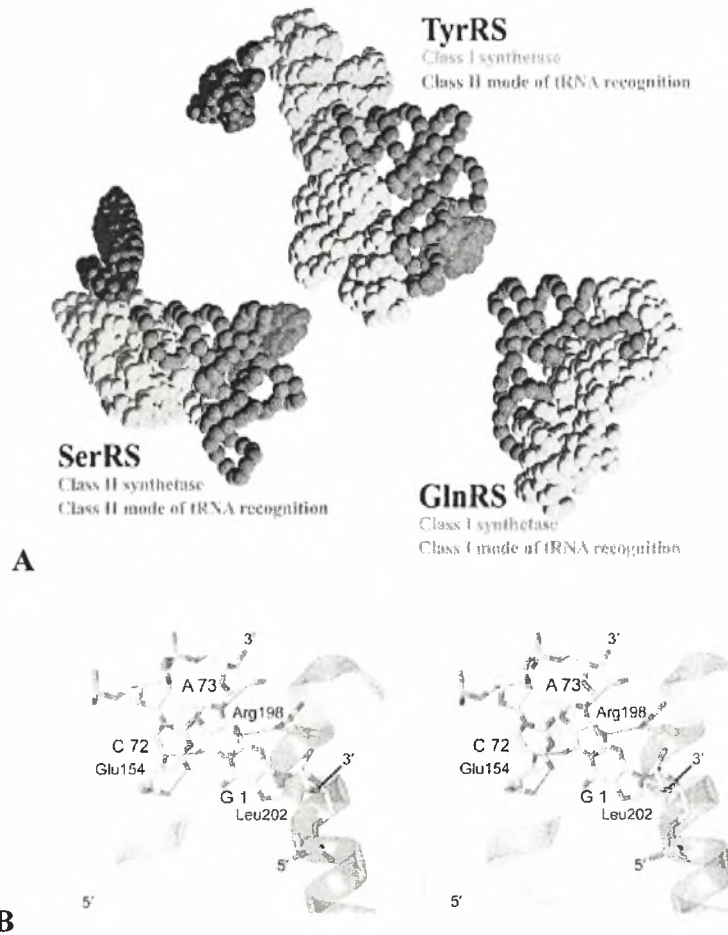
Το σύμπλοκο ενζύμου-Tyr-AMP που προκύπτει υδrolύεται άμεσα μετά το σχηματισμό του, υποδεικνύοντας την ύπαρξη επιδιορθωτικού μηχανισμού έναντι του μη συγγενούς αμινοξέος. Με βάση τη διαπίστωση αυτή μπορεί να υποτεθεί ότι και το ένζυμο άγριου τύπου ενεργοποιεί τυροσίνη, αλλά ο ρυθμός της επιδιορθωτικής υδρόλυσης είναι τόσο υψηλός που το σύμπλοκο δεν είναι άμεσα ανιχνεύσιμο. Οι μελέτες δεν έχουν ταυτοποιήσει ακόμα την ύπαρξη μετα-μεταφοράς τροποποίησης. Ωστόσο, η PheRS του *S.cerevisiae*, που φυσιολογικά φέρει την προαναφερθείσα μετάλλαξη A294G, φαίνεται να επιδιορθώνει την εσφαλμένα ενεργοποιημένη τυροσίνη με μετα-μεταφοράς τροποποίηση⁴⁵. Ο ακριβής μηχανισμός της επιδιορθωσης της PheRS και ο ρόλος των περιοχών της συνθετάσης που εμπλέκονται στο μηχανισμό αυτό δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί πλήρως. Ωστόσο αναφέρεται ότι το μόριο tRNA^{Phe} εμπλέκεται σε κάποιο βαθμό στον επιδιορθωτικό μηχανισμό, καθώς η ακεραιότητα του 3' άκρου του προκαλεί την προ-μεταφοράς υδρόλυση των μη συγγενών αμινοακυλο-αδενυλικών συμπλόκων⁴⁶.

Σε πολλούς μικροοργανισμούς έχουν ανιχνευτεί γονίδια που παρουσιάζουν ομοιότητα είτε με τμήματα είτε με ολόκληρα τα γονίδια των AARSs, όπως έχει αναφερθεί. Στο γονιδίωμα του αρχαίου *Methanobacterium thermoautotrophicum* έχει ανιχνευτεί ένα γονίδιο μήκους 741bp, το οποίο έχει ομολογία με το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β υπομονάδα της PheRS του μικροοργανισμού αυτού. Ο ακριβής ρόλος του προϊόντος του γονιδίου αυτού δεν είναι γνωστός. Υπάρχει ωστόσο η πιθανότητα να εμπλέκεται στην αμινοακυλίωση του tRNA^{Phe} ή στην εξειδικευμένη επιλογή υποστρωμάτων και το μηχανισμό επιδιορθωσης της PheRS. Μελέτες της δραστηριότητας του πολυπεπτιδίου που κωδικοποιεί το γονίδιο αυτό θα μπορούσαν να δώσουν την απάντηση ως προς τη λειτουργικότητά του.

1.5 Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της τυροσίνης (TyrRS)

Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της τυροσίνης (TyrRS) είναι ένα ένζυμο κλάσης I. Είναι η πρώτη συνθετάση για την οποία αποκαλύφθηκε η κρυσταλλική της δομή καθώς επίσης και των συμπλόκων της με τα υποστρώματα τυροσίνη και τυροσυλ-αδενυλικό⁴⁷. Επίσης, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες επί της ενεργειακής κατάστασης των διαμορφώσεων του ενζύμου στα διάφορα στάδια της αντίδρασης αμινοακυλίωσης. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ενζύμου αυτού είναι ότι στους προκαρυώτες, αλλά όχι στους ευκαρυώτες και τα αρχαία, αναγνωρίζει τα συγγενή μόρια tRNA με τρόπο όμοιο με αυτό των συνθετασών κλάσης II⁴⁸. Η TyrRS αλληλεπιδρά με το tRNA^{Tyr} μέσω της μικρής αύλακας του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος χωρίς να απαιτεί ειδική διαμόρφωση του 3' άκρου του μορίου tRNA για να προσεγγίσει το ενεργό κέντρο. Αντίθετα, τα υπόλοιπα ένζυμα κλάσης I προσεγγίζουν τα συγγενή μόρια tRNA μέσω της μικρής αύλακας του βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος και απαιτούν μια διαμόρφωση

φουρκέτας του 3' άκρου του μορίου tRNA ώστε αυτό να εισβάλλει στο ενεργό τους κέντρο. Παρά τον ασυνήθη τρόπο προσέγγισης του μορίου tRNA, η TyrRS αμινοακυλιώνει τη 2'-OH ομάδα όπως οι συνθετάσες κλάσης I.



Εικόνα 8: (A) Σχηματικό διάγραμμα των διαφορετικών τρόπων προσέγγισης των μορίων tRNA από τις συνθετάσες. Η TyrRS (κλάση I) και η SerRS (κλάση II) προσεγγίζουν το βραχίονα υποδοχής του αμινοξέος του μορίου tRNA μέσω της μεγάλης αύλακας. Η GlnRS (κλάση I) αντιθέτως προσεγγίζει τη μικρή αύλακα του ίδιου βραχίονα. (B) Η αναγνώριση του μορίου tRNA από την TyrRS του *T. thermophilus*. Το κατάλοιπο γλουταμινικού οξέος στη θέση 154 διαδραματίζει τον κύριο ρόλο στην αναγνώριση του CCA άκρου του μορίου tRNA. Το κατάλοιπο αυτό αντιστοιχεί στο γλουταμινικό οξύ της θέσης 152 της TyrRS του *B. stearothermophilus*.

Η TyrRS του *G. stearothermophilus* είναι ένα ομοδιμερές που παρουσιάζει ενεργότητα των μισών καταλυτικών κέντρων⁴⁹. Η N-τελική περιοχή του ενός πολυπεπτιδίου είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση των αμινοάκυλο-αδενυλικών συμπλόκων, ενώ η C-τελική περιοχή είναι απαραίτητη για την αναγνώριση και δέσμευση του συγγενούς μορίου tRNA. Ο βραχίονας υποδοχής του tRNA^{Tyr} αλληλεπιδρά με τη N-τελική περιοχή της μιας υπομονάδας και η περιοχή του αντικωδικονίου με την C-τελική περιοχή της δεύτερης υπομονάδας.

Για τη μελέτη του ρόλου των καταλοίπων διαφόρων θέσεων στην επιφάνεια της TyrRS πραγματοποιήθηκε μια σειρά μεταλλάξεων σε αυτά. Ιδιαίτερα ενδιαφέρονσα για τη συγκεκριμένη

εργασία είναι η μετάλλαξη που πραγματοποιήθηκε στη θέση 152 υποκαθιστώντας ένα κατάλοιπο γλουταμινικού οξέος με αλανίνη (E152A) και αργινίνη (E152R). Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι οι μεταλλαγμένες συνθετάσες αμινοακυλίωσαν τα μόρια tRNA^{Phe} και tRNA^{Val} με τυροσίνη⁵⁰. Η TyrRS με την υποκατάσταση E152R προκαλεί μεγαλύτερα ποσοστά κακοφορισμένων μορίων tRNA σε σχέση με αυτή που φέρει τη μετάλλαξη E152A. Το φαινόμενο αυτό επεξηγήθηκε με βάση το φορτίο των αμινοξέων στη θέση της μετάλλαξης. Συγκεκριμένα, καθώς το φορτίο γίνεται θετικό αυξάνεται το ποσοστό των κακοφορισμένων μορίων. Πιθανολογείται, λοιπόν, ότι η πλευρική αλυσίδα του γλουταμινικού οξέος της θέσης 152 της TyrRS απωθεί μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων τα μη συγγενή μόρια tRNA⁵¹. Καθώς, λοιπόν, το φορτίο μεταβάλλεται η απώθηση των μη συγγενών μορίων tRNA δεν επιτυγχάνεται και μειώνεται η εξειδίκευση της TyrRS ως προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε *in vitro* μελέτες.

Η προσπάθεια διερεύνησης της εξειδίκευσης των μεταλλαγμένων συνθετασών *in vivo* δεν ήταν επιτυχής, καθώς η έκφραση των TyrRS που έφεραν τις μεταλλάξεις οδήγησε σε μηδαμινή ανάπτυξη των κυττάρων⁵². Θεωρήθηκε λοιπόν ότι οι μεταλλαγμένες στη θέση 152 συνθετάσες όταν παράγονται προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο. Με βάση τα *in vitro* πειράματα το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί καθώς οι μεταλλαγμένες TyrRS μέσα στα κύτταρα πιθανώς προκαλούν την εσφαλμένη ενσωμάτωση καταλοίπου τυροσίνης έναντι βαλίνης ή/και φαινυλαλανίνης. Η λανθασμένη αυτή μετάφραση των κωδικονίων ίσως είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η προετοιμασία των απαραίτητων παραγόντων για τη μελέτη της επιδιορθωτικής δράσης της PheRS. Αρχικά, ενισχύθηκε ένα τμήμα του γενωμικού DNA του *E.coli* που περιλαμβάνει τα γονίδια που κωδικοποιούν τις α και β υπομονάδες της PheRS και φέρει τη μετάλλαξη A294G στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα. Σε επόμενο στάδιο το τμήμα αυτό κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης και επιχειρήθηκε η έκφραση της συνθετάσης σε κύτταρα *S.cerevisiae*. Επιπλέον, ενισχύθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα της PheRS του αρχαίου *Methanobacterium thermoautotrophicum* και ένα γονίδιο που παρουσιάζει ομολογία με το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β υπομονάδα. Τα δύο γονίδια κλωνοποιήθηκαν το κάθε ένα χωριστά σε πλασμίδιο και έπειτα έγινε μια προσπάθεια οι δύο υπομονάδες να τεθούν υπό τον έλεγχο του ίδιου προαγωγέα, να αποτελέσουν δηλαδή τμήματα ενός οπερονίου, ώστε να επιτυγχάνεται ταυτόχρονη έκφραση τους. Για τις *in vitro* μελέτες της επιδιορθωτικής δράσης της PheRS απαιτείται η ύπαρξη κακοφορτισμένων μορίων tRNA^{Phe}. Για το σκοπό αυτό ενισχύθηκε και κλωνοποιήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί την TyrRS του *G.stearothermophilus*. Επιπλέον, έγινε μια προσπάθεια να υποκατασταθεί το κατάλοιπο του γλουταμινικού οξέος στη θέση 152 με αλανίνη ή αργινίνη. Η έκφραση των μεταλλαγμένων TyrRS και ακόλουθη χρήση τους για σύνθεση κακοφορτισμένων μορίων Phe-tRNA^{Phe} παρέχει τα απαιτούμενα υποστρώματα. Μελλοντικός σκοπός των πειραμάτων αυτών είναι η μελέτη της δράσης των ενζύμων, ο προσδιορισμός της επιδιορθωτικής του ικανότητας και η σύγκριση των δύο αυτών παραμέτρων σε αντιπροσώπους και από τα τρία φυλογενετικά βασίλεια.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ι. ΥΛΙΚΑ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Acetic Acid [**MERCK**]
Acrylamide [**SIGMA**]
Agarose [**SEAKEM**]
Ampicillin [**SIGMA**]
Ammonium persulfate [**SIGMA**]
Bacto Tryptone [**MERCK**]
Bromophenol Blue [**MERCK**]
Bovine Serum Albumin (BSA) [**SIGMA**]
Chloramphenicol [**SIGMA**]
Chloroform [**MERCK**]
CaCl₂ [**MERCK**]
DMSO [**FINNZYMES**]
dNTPs [**FINNZYMES**]
EDTA [**PANREAC**]
Ethidium bromide [**MERCK**]
EtOH [**PANREAC**]
Glucose [**PANREAC**]
Glycerol [**PANREAC**]
HCl 37% [**MERCK**]
IPTG [**FERMENTAS**]
Kanamycin [**SIGMA**]
KCl [**PANREAC**]
LB Agar [**SCHARLAU**]
LB Broth [**SCHARLAU**]
2-mercaptoethanol [**RIEDEL de HAEN**]
MgCl₂ x 6H₂O [**PANREAC**]
MgSO₄ x 7H₂O [**PANREAC**]
NaCl [**PANREAC**]
Phenol [**PANREAC**]
Polyethylene glycol (PEG) [**MERCK**]
Potassium Acetate [**RIEDEL de HAEN**]
SDS 10% (Sodium docecyl sulfate) [**SIGMA**]
TEMED [**RESEARCH ORGANICS**]
Tris [**MERCK**]
X-Gal [**APPLICHEM**]
Xylene Cyanol [**MERCK**]
Yeast extract [**SCHARLAU**]
100bp Ladder [**FERMENTAS**]
100bp Ladder plus [**FERMENTAS**]
High DNA Mass Ladder [**INVITROGEN**]

DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΕΣ

Phusion [**FINNZYMES**]
Taq [**HYTEST**]
Pfu [**STRATAGENE**]
Pfu Turbo [**STRATAGENE**]

ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

EcoRI [**NEW ENGLAND BIOLABS**]
BamHI [**NEW ENGLAND BIOLABS**]
NdeI [**NEW ENGLAND BIOLABS**]
SpeI [**NEW ENGLAND BIOLABS**]
XbaI [**NEW ENGLAND BIOLABS**]
SmaI [**NEW ENGLAND BIOLABS**]

ΛΙΓΑΣΕΣ

T4 DNA λιγάση [**NEW ENGLAND BIOLABS**]

KIT

QIAEX II [**QIAGEN**]
TOPO [**INVITROGEN**]

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

E.coli XL-1 Blue [recA1 endA1 gyrA96 thi-1
hsdR17 supE44 relA1 lac {F'proAB
lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)}]

ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΗΣ

S.cerevisiae L40 [MATa his3-Δ200 trp1-901 leu2-
3,112 ade2 LYS::(LexAop)4-HIS3
URA3::(LexAop)8-LacZ]

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Mastercycler Gradient [**EPPENDORF**]

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΕΙΣ: 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 ποσότητα της αγαρόζης που διαλύεται κάθε φορά 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 (5mg/mL). Επίσης στα δείγματα που ηλεκτροφορούνται εισάγεται η ανάλογη ποσότητα διαλύματος πλήρωσης (loading buffer 6X). Παράλληλα ηλεκτροφορούνται και ένας ή δύο μάρτυρες μεγέθους DNA (ladders), ανάλογα με την περίπτωση, ώστε να υπολογίζεται το μέγεθος των τμημάτων DNA.

Η ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιείται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS. Η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα: την πηκτή διαχωρισμού και την πηκτή επιστοιβαξής. Η πηκτή διαχωρισμού περιέχει 7.5w/v ακρυλαμίδιο, πολυμερισμένο χημικά με TEMED 0.025% v/v και υπερθειικό αμμώνιο 0.0025%w/v, σε διάλυμα τελικής συγκέντρωσης Tris-HCl 375mM pH8.8 και SDS 0.1%. Η πηκτή επιστοιβαξής περιέχει 3% w/v ακρυλαμίδιο πολυμερισμένο με TEMED και υπερθειικό αμμώνιο σε διάλυμα Tris-HCl 125mM, pH 6.8, και 0.1% SDS. Στα δείγματα προσθέεται το διάλυμα πλήρωσης που περιέχει, σε τελική συγκέντρωση, Tris-HCl 62.5mM pH6.8, SDS 2%, γλυκερόλη 10%, 2-μερκαπταιθανόλη 5% και κυανού της βρωμοφαινόλης 0.001%, ως δείκτη. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες βάφονται με διάλυμα 0.2% Coomassie Blue σε 10% οξικό οξύ (Protein stain). Οι πηκτή τελικά ξεβάφεται με επανειλημμένες πλύσεις με 10% οξικού οξέος (Protein destain).

TAE 50X: 242gr Tris, 57.1mL Glacial acetic acid, 18.6gr EDTA, απιονισμένο νερό ως τον όγκο του 1L.

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

Protein stain: 1gr Coomassie Blue, 250mL μεθανόλη, 50mL οξικό οξύ και απιονισμένο νερό ως τον όγκο των 500mL

Protein destain: 250mL μεθανόλη, 50mL οξικό οξύ και απιονισμένο νερό ως τον όγκο των 500mL

ii. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ενίσχυση και κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS του *E.coli*.

2.1.1 Γενωμική ανάλυση

Η αλληλουχία του γονιδιώματος του *E.coli* βρέθηκε μετά από αναζήτηση στην ψηφιακή βάση δεδομένων T.I.G.R. (The Institute for Genomic Research, www.tigr.com). Βάσει αυτής προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS. Στο στέλεχος *E.coli* (Yale *E.coli* Genetic Stock) που χρησιμοποιείται υπάρχει μια διαφοροποίηση ως προς την αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την α υπομονάδα, καθώς φέρει τη μετάλλαξη A294G. Με βάση την αλληλουχία του τμήματος που περιλαμβάνει τα δύο γονίδια σχεδιάζονται οι εκκινητές (primers) έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικοί ο ένας προς το 3' άκρο της μη κωδικοποιούσας αλυσίδας (forward ή νοηματικός <sense> εκκινητής) και ο δεύτερος προς το 5' άκρο της κωδικοποιούσας αλυσίδας (reverse ή αντινοηματικός <antisense> εκκινητής). Στα άκρα των εκκινητών προσθέτονται νουκλεοτίδια ώστε να δημιουργηθούν θέσεις αναγνώρισης για τα περιοριστικά ένζυμα SpeI στο νοηματικό εκκινητή και EcoRI στον αντινοηματικό εκκινητή (πίνακας 2).

Πίνακας 2: Νοηματικός και αντινοηματικός εκκινητής για την ενίσχυση του τμήματος που περιλαμβάνει τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS του *E.coli*

SpeI sense PheRS <i>E.coli</i>	5'- ACT AGT ATG AGA GGA TCT CAC CAT CAC CAT CA - 3'
EcoRI antisense PheRS <i>E.coli</i>	5'- GAA TTC TCA ATC CCT CAA TGA TGC CTG G - 3'

2.1.2 Ενίσχυση των γονιδίων με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Για την ενίσχυση των γονιδίων πραγματοποιείται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) με εκμαγείο το γενωμικό DNA του *E.coli*. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για τη δράση της Pfu DNA πολυμεράσης, στο οποίο προστίθενται ~100ng γενωμικού DNA από *E.coli*, 0.2 mM από κάθε dNTP, 1.6mM από κάθε εκκινητή, 1U Pfu DNA πολυμεράσης. Το ένζυμο προστίθεται μετά το αρχικό στάδιο αποδιάταξης και ακολουθεί η αντίδραση (πίνακας 3).

Πίνακας 3: Συνθήκες της PCR για την ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS του *E.coli*

	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός επαναλήψεων
Αρχική αποδιάταξη	94°C	3 min	1
Αποδιάταξη	94°C	1 min	
Υβριδοποίηση εκκινητή	65°C~55°C (0.3°C/κύκλο)	1 min	30
Επιμήκυνση	72°C	4 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	1

Η υβριδοποίηση των εκκινητών γίνεται σε θερμοκρασία περίπου 2.5°C πιο χαμηλά από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών στον πρώτο κύκλο ενώ μειώνεται σταδιακά με την πάροδο των κύκλων. Μετά το στάδιο των 30 κύκλων ακολουθούν 10min επώασης στους 72°C για την τελική επιμήκυνση των μορίων DNA. Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 0.8%. Η ανάκτηση του μορίου DNA που η ζώνη του αντιστοιχεί στο συνολικό μέγεθος του ενισχυμένου τμήματος πραγματοποιείται με εκτομή της από την πηκτή και καθαρισμό με τη βοήθεια του συστήματος QIAEX II (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

10X ρυθμιστικό διάλυμα για την Pfu DNA πολυμεράση: 20mM Tris-HCl (pH 8.8 στους 25°C), 10mM KCl, 10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100, 0.1mg/mL nuclease-free BSA.

2.1.3 Κλωνοποίηση των γονιδίων

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 επιμηκύνει, 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 πλασμιδιακού φορέα με αντίδραση λιγάσης και έτσι σχηματίζονται ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

Το ενισχυμένο γονίδιο κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο TOPO. Η κλωνοποίηση γονιδίων στο συγκεκριμένο πλασμίδιο βασίζεται στο ένζυμο DNA τοποϊσομεράση I, το οποίο δρα ως ένζυμο περιορισμού και ταυτόχρονα ως λιγάση. Ο φυσιολογικός ρόλος του ενζύμου αυτού είναι η διάσπαση και η επανασύνδεση των μορίων DNA κατά την αντιγραφή. Για να εκμεταλλευτεί την επανασυνδυετική δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης, τα πλασμίδια TOPO παρέχονται σε γραμμοποιημένη μορφή με την τοποϊσομεράση I ομοιοπολικά δεσμευμένη σε κάθε 3' φωσφορική ομάδα. Αυτό επιτρέπει στο πλασμίδιο να επιδέσει εύκολα τις ακολουθίες DNA που φέρουν συμβατά άκρα.

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων προστίθενται αρχικά 4μL από το απομονωμένο DNA σε 1μL πλασμιδίου TOPO και 1μL διαλύματος αλάτων. Το διάλυμα επωάζεται για 1h στους 20-22°C.

Διάλυμα αλάτων: 1.2M NaCl, 0.06M MgCl_2

2.1.4 Προετοιμασία επιδεικτικών κυττάρων

Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται στελέχη *E.coli* XL-1 blue. Αρχικά, σε 5mL υγρού θρεπτικού μέσου LB που περιέχει τετρακυκλίνη (50μg/μL) εισάγεται μικρή ποσότητα κυττάρων από stock γλυκερόλης και επωάζονται υπό ανάδευση για 16h στους 37°C. Η καλλιέργεια αυτή στη συνέχεια μεταγγίζεται σε κωνική φιάλη με 200mL υγρού θρεπτικού μέσου LB με τετρακυκλίνη (50μg/μL) και επωάζεται στους 37°C μέχρι η οπτική απορρόφηση του εναιωρήματος στα 600nm να έχει τιμή O.A. 0.4~0.5, τιμές που αντιστοιχούν στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 1000g για 10min. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 5mL διαλύματος TSB. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10min και το εναιώρημα των κυττάρων στη

συνέχεια διαιρείται σε ποσότητες των 100μL και αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

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

Διάλυμα TSB: 4.1mL LB (pH 6.5, 2x), 2.0mL 50% PEG (MW 3350), 0.5mL DMSO (100%), 0.1mL MgCl₂ (1M), 0.1mL MgSO₄ (1M), αποστειρωμένο νερό ως τον όγκο των 10mL. Αποστείρωση με φιλτράρισμα.

2.1.5 Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων XL-1 blue με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Για το μετασχηματισμό των επιδεικτικών κυττάρων, σε 1μL του μίγματος κλωνοποίησης προσθέτονται 100μL επιδεικτικών κυττάρων *E. coli* XL-1 Blue, 20μL διαλύματος 5x KCM και 79μL αποστειρωμένου νερού. Ακολουθούν επωάσεις των 20min αρχικά στους 0-4°C και έπειτα στους 20-22°C. Τέλος, μετά την προσθήκη 500μL διαλύματος SOC, επωάζεται για 1h στους 37°C, υπό ανάδευση. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (LB/άγαρ) που περιέχει καναμυκίνη (50μg/mL) και επωάζονται για 14h στους 37°C. Επιλέγονται οι πιο ευμεγέθεις αποικίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 5mL υγρού θρεπτικού υλικού LB με καναμυκίνη (50μg/mL). Η μεταφορά των κυττάρων στο μέσο πραγματοποιείται σε ασηπτικές συνθήκες. Οι καλλιέργειες επωάζονται για 14h στους 37°C υπό ανάδευση.

5X KCM: 0.5M KCl, 0.15M CaCl₂, 0.25M MgCl₂, αποστειρωμένο νερό ως τον όγκο των 30mL, αποστείρωση με φιλτράρισμα και αποθήκευση στους 4°C.

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

SOC: 0.5% Yeast extract, 2% Tryptone, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 20mM MgSO₄, 20mM γλυκόζη, απιονισμένο νερό μέχρι τον όγκο των 100mL, αποστείρωση με θέρμανση.

2.1.6 Απομόνωση πλασμιδίου 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, από 1mL κάθε υγρής καλλιέργειας μετασχηματισμένων κλώνων συλλέγονται τα κύτταρα με φυγοκέντρηση για 3min στα 13000rpm. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100μL διαλύματος I με ισχυρή ανάδευση. Μετά από 5min στους 20-22°C προσθέτονται 200μL διαλύματος II, το οποίο λύει τα κύτταρα με το SDS που περιέχει και προσδίδει αλκαλικό περιβάλλον. Τα μίγματα αναδεύονται για 10sec ήπια για να μην θρυμματιστεί το χρωμοσωμικό DNA και προσδευτικά διαυγάζουν καθώς η λύση των κυττάρων γίνεται πλήρης. Μετά από 5min στους 0-4°C προσθέτονται 150μL διαλύματος III, το οποίο εξουδετερώνει το ισχυρά αλκαλικό περιβάλλον, τα δείγματα ανακινούνται ελαφρά και επανατοποθετούνται στους 0-4°C για 5min. Στο βήμα αυτό οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA μετουσιώνονται και στη φυγοκέντρηση που ακολουθεί (3min, 12000rpm) κατακρημνίζονται. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο πλαστικό σωλήνα και πραγματοποιείται κατακρήμνιση με αιθανόλη και έπειτα φυγοκέντρηση για 3min στα 12.000 rpm. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50μL αποστειρωμένο νερό που περιέχει RNase A (0.1mg/mL) και επωάζεται για 30min στους 37°C.

Διάλυμα I για mini-prep: 0.9mL γλυκόζη (50%), 1.25mL Tris-HCl (1M, pH 8.0), 1mL EDTA (0.5M, pH 8.0), απιονισμένο νερό ως τον όγκο των 50mL, αποστείρωση με θέρμανση, αποθήκευση στους 4°C

Διάλυμα II για mini-prep: 0.1mL NaOH (10M), 0.5mL SDS (10%), 4.4mL αποστειρωμένο νερό.

Διάλυμα III για mini-prep: 30mL Potassium acetate (5M), 5.75mL Glacial acetic acid, αποστειρωμένο νερό ως τον όγκο των 50mL, αποθήκευση στους 4°C.

2.1.7 Πέψη για έλεγχο ανασυνδυασμού των πλασμιδίων.

Για να ελεγχθεί κατά πόσο έχουν εισαχθεί στα κύτταρα πλασμίδια που φέρουν τα υπό μελέτη γονίδια πραγματοποιείται πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και SmaI. Για την τέλεση της πέψης σε 1μL ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλου για τη δράση των ενζύμων προσθέτονται 7μL πλασμιδιακού DNA από τα 11 δείγματα, 2U περιοριστικού ενζύμου EcoRI, 2U ενζύμου SmaI και 1μL αποστειρωμένου νερού. Το κάθε δείγμα επωάζεται για 2h στους 37°C και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%. Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης επιλέγονται οι κλώνοι που φέρουν το πλασμίδιο του ενδιαφέροντος μας. Το πλασμιδιακό DNA των κλώνων αυτών αποστέλλεται για αλληλούχηση.

Ρυθμιστικό διάλυμα για τα ένζυμα EcoRI και SmaI: 100mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 0.025% Triton X-100 (pH 7.5 στους 25°C)

2.1.8 Διπλή πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

Προκειμένου να κλωνοποιηθούν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS σε φορείς έκφρασης πραγματοποιείται ενζυμική πέψη του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA από τους επιλεγμένους κλώνους με τα ένζυμα περιορισμού SpeI και EcoRI. Αναλυτικότερα, σε 21μL πλασμιδιακού DNA από τους δύο κλώνους χωριστά προσθέτονται 6μL κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για τη δράση των περιοριστικών ενζύμων, 3U από κάθε ένζυμο και 29μL αποστειρωμένου νερού. Μετά από επώαση 14h στους 37°C ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο και έπειτα με αιθανόλη. Στο ίζημα κάθε δείγματος προσθέτονται 3U SmaI, 6μL ρυθμιστικού διαλύματος και 52μL αποστειρωμένου νερού. Η πέψη αυτή σκοπό έχει να διαχωριστούν ως προς το μέγεθος το πλασμίδιο και το τμήμα των γονιδίων για να απομονωθεί μόνο το επιθυμητό τμήμα DNA. Η πέψη διαρκεί 1h στους 37°C και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής απομονώνονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στο συνολικό μέγεθος των γονιδίων και το DNA καθαρίζεται από το πήκτωμα όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Ρυθμιστικό διάλυμα για τα ένζυμα EcoRI και SpeI: 10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol [pH 7.9 στους 25°C]

Ρυθμιστικό διάλυμα για το περιοριστικό ένζυμο SmaI: 20mM Tris-acetate, 50mM potassium acetate, 10mM magnesium acetate, 1mM dithiothreitol [pH 7.9 στους 25°C]

2.1.9 Κλωνοποίηση του απομονωμένου γονιδίου σε φορέα έκφρασης

Το προϊόν της πέψης χρησιμοποιείται για την ενσωμάτωση των γονιδίων στα πλασμίδια p414 και p424, ειδικά για έκφραση γονιδίων τόσο σε βακτήρια όσο και σε κύτταρα ζυμομύκητα. Για την κλωνοποίηση του τμήματος που περιλαμβάνει τα γονίδια, 8μL από το απομονωμένο DNA αναμιγνύεται με 2μL του πλασμιδίου (δύο δείγματα – ένα για κάθε πλασμίδιο), 4μL ρυθμιστικού

διαλύματος κατάλληλου για την T4 DNA λιγάση, 1μL ενζύμου και 5μL αποστειρωμένου νερού. Παράλληλα παρασκευάζονται μάρτυρες που περιέχουν όλα τα προαναφερθέντα συστατικά εκτός από το DNA του γονιδίου. Μετά από επώαση 14h στους 16°C τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιούνται για μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων. Ακολουθεί επιλογή και έλεγχος των μετασχηματισμένων κλώνων.

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

2.1.10 Προετοιμασία επιδεικτικών κυττάρων *S.cerevisiae*

Τα κύτταρα του *S.cerevisiae* μετατρέπονται σε επιδεικτικά. Αναλυτικότερα, 5mL υγρού θρεπτικού μέσου YPG, που περιέχει 3% γλυκερόλη, εμβολιάζεται με κύτταρα και επωάζεται για 20h στους 30°C. Η καλλιέργεια αυτή στη συνέχεια μεταγγίζεται σε κωνική φιάλη με 200mL του ίδιου υγρού θρεπτικού μέσου και επωάζεται στους 30°C μέχρι η οπτική απορρόφηση του εναιωρήματος στα 600nm να έχει τιμή O.A. 0.4~0.5. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 800g για 10min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και ακολουθεί επώαση στους 23°C για 1.5h υπό ανάδευση. Η ποσότητα αυτή των κυττάρων διαιρείται σε πλαστικούς σωλήνες ανά 100μL και οι σωλήνες περιτυλίγονται με χαρτί, ώστε να ψυχθούν σταδιακά τα κύτταρα, και φυλάγονται έπειτα στους -80°C.

Διάλυμα 1x TE-LiAc: 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 0.1M Lithium Acetate
YPG: 20gr/Lt peptone και 20g/Lt yeast extract.

2.1.11 Μετασχηματισμός κυττάρων *S.cerevisiae* με ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA των επιλεγμένων αποικιών χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό κυττάρων *S.cerevisiae*. Η διαδικασία του μετασχηματισμού των επιδεικτικών κυττάρων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια p414 και p424 πραγματοποιείται με χρήση μονόκλωνου DNA από σπέρμα ρέγκας που είχε το ρόλο του μεταφορέα. Συγκεκριμένα, 20μL DNA σπέρματος ρέγκας (8mg/mL) θερμαίνονται στους 100°C για 15min και έπειτα μεταφέρονται για 5min στους 0-4°C. Σε 700μL διαλύματος PEG-TE-LiAc προσθέτονται 25μL ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και 100μL επιδεικτικών κυττάρων *S.cerevisiae*. Τα μίγματα επωάζονται για 30min στους 30°C υπό ανάδευση και έπειτα για 15min στους 42°C. Τέλος, 150μL από τα μίγματα επώασης επιστρώνονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει το αμινοξύ τρυπτοφάνη.

Διάλυμα PEG-TE-LiAc: 40% PEG-4000, 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 0.1M Lithium Acetate
Θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής για το ζυμομόκητα: 890mg URA-mix, 6gr NaOH, 10gr Succinic Acid, 20gr άγαρ, 905mL απιονισμένο νερό, ρύθμιση του pH στο 6.8, αποστείρωση με θέρμανση, προσθήκη 45mL YNB (150mg/mL), 40mL Γλυκόζη (50%), 10mL Ουρακίλη (50mg/mL), 10mL Λευκίνη (50mg/mL), 20mL Ασπαρτικό οξύ (50mg/mL), 5mL Θρεονίνη (50mg/mL).

2.1.12 Λύση κυττάρων *S.cerevisiae* και απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος.

Μετά από εμβολιασμό 30mL θρεπτικού υλικού συλλέγονται 1-1.5gr μετασχηματισμένων κυττάρων *S.cerevisiae*. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 30μL Tris-HCl 50mM (pH 7.5) και θερμαίνονται στους 100°C για 3min. Προσθέτονται γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 0.2mm και το μίγμα αναδεύεται έντονα για 2min. Ακολούθως, προσθέτονται 70μL PSB, τα δείγματα ανακινούνται έντονα και θερμαίνονται για 1min στους 100°C. Έπεται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS. Στο ίδιο πήκτωμα ηλεκτροφορείται ένα δείγμα ελέγχου που περιλάμβανε δύο ζώνες στα μεγέθη των πρωτεϊνών των υπομονάδων α και β της PheRS καθώς και ένας μάρτυρας (protein marker).

PSB: σε 800ml νερού προσθέτονται 8gr NaCl, 0.2gr KCl, 1.44gr Na₂HPO₄, 0.24gr KH₂PO₄, ρύθμιση του pH στο 7.4 με 1M HCl, προσθήκη νερού ως τον όγκο των 1000mL.

Tris-HCl 50mM (pH=7.5): 1.21gr Tris σε 170ml νερού, ρύθμιση του pH στο 7.5 με HCl 1M, προσθήκη νερού ως τον όγκο των 200mL.

2.2 Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την υπομονάδα α και ενός γονιδίου ομόλογου με αυτό που κωδικοποιεί τη β υπομονάδα της PheRS του *M.thermoautotrophicum*

2.2.1 Ενίσχυση και κλωνοποίηση των δύο γονιδίων, μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων και επιλογή κλώνων.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της φαινυλαλανίνης (PheRS) του *M.thermoautotrophicum* και κι ένα γονίδιο συντηρημένο που παρουσιάζει ομολογία με το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β υπομονάδα (θα αναφέρεται ως β_{cons}) ενισχύθηκαν και κλωνοποιήθηκαν. Η ενίσχυση τους πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο γενωμικό DNA του αρχαίου. Για την ενίσχυση και κλωνοποίηση των γονιδίων σε πλασμίδιο, το μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και την επιλογή των θετικών κλώνων ακολουθείται η ίδια σειρά πειραμάτων, όπως αυτά περιγράφονται για τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS του *E.coli*. Οι διαφοροποιημένες παράμετροι σε σχέση με τα προαναφερθέντα πειράματα είναι:

1. Οι αλληλουχίες των άκρων των δύο εκκινητών σχεδιάζονται έτσι ώστε να αποτελούν θέσεις αναγνώρισης για τα περιοριστικά ένζυμα NdeI στο νοηματικό εκκινητή και XbaI στον αντινοηματικό εκκινητή, για το γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα, και για τα περιοριστικά ένζυμα XbaI στο νοηματικό εκκινητή και BamHI στον αντινοηματικό εκκινητή, για το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β_{cons} υπομονάδα (πίνακας 4).

Πίνακας 4: Νοηματικοί και αντινοηματικοί εκκινητές για την ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS του *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

NdeI sense α subunit PheRS <i>M.th.</i>	5' - CAT ATG TTG AAA AGA AAG GAT AT - 3'
XbaI antisense α subunit PheRS <i>M.th.</i>	5' - TCT AGA GGC AGG AAT AGA TTA TGT GGA TGG TGA TT - 3'
XbaI sense β_{cons} subunit PheRS <i>M.th.</i>	5' - TCT AGA TCA CCC CCT TAA CCT G - 3'
BamHI antisense β_{cons} subunit PheRS <i>M.th.</i>	5' - GGA TCC TTA ACT CTT CAG GAA CTC CT - 3'

2. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών παραμένει σταθερή στους 55°C σε όλους τους κύκλους της PCR. Επιπλέον, ο χρόνος της επιμήκυνσης στους 72°C μειώνεται στα 2min.

3. Η πέψη του πλασμιδιακού DNA για τον έλεγχο του ανασυνδυασμού πραγματοποιείται με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και XbaI για το γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα και EcoRI για το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β_{cons} υπομονάδα.

Ρυθμιστικό διάλυμα για τα ένζυμα NdeI και XbaI: 10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol (pH 7.9 στους 25°C).

Ρυθμιστικό διάλυμα για το ένζυμο EcoRI: 10mM Tris-HCl, 5mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.0025% Triton X-100 (pH 7.5 στους 25°C).

2.2.2 Κλωνοποίηση των γονιδίων σε φορέα έκφρασης

Για την κλωνοποίηση των δύο γονιδίων σε μορφή οπερονίου το ένα γονίδιο πέπτεται με τα ένζυμα NdeI και XbaI και το άλλο με τα BamHI και XbaI, ώστε να αποκτήσουν συμπληρωματικά άκρα και να συνδεθούν μεταξύ τους σε μια αντίδραση λιγάσης. Για την αντίδραση αυτή παρασκευάζονται δύο μίγματα (πίνακας 5). Το μίγμα Β έχει το ρόλο του μάρτυρα. Τα μίγματα επωάζονται για 6h στους 16°C και ακολουθεί η δεύτερη αντίδραση λιγάσης.

Πίνακας 5: Σύσταση μιγμάτων για την πρώτη αντίδραση λιγάσης

Αντιδραστήρια	Μίγμα Α	Μίγμα Β
Πλασμιδιακό DNA με γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα α	8μL	0μL
Πλασμιδιακό DNA με γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα β _{cons}	8μL	0μL
Ρυθμιστικό διάλυμα	2μL	2μL
T4 DNA λιγάση	1μL	1μL
Αποστειρωμένο νερό	1μL	17μL

Ακολουθεί πέψη του πλασμιδιακού φορέα pET11b με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και BamHI και με μια νέα αντίδραση λιγάσης ο φορέας pET11b συνενώνεται με τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δύο υπομονάδες. Για τη δεύτερη αντίδραση λιγάσης προσθέτονται στα προϊόντα της πρώτης όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια (πίνακας 6). Τα διαλύματα επωάζονται για 16h στους 16°C και τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιούνται για μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων

Πίνακας 6: Σύσταση μιγμάτων για τη δεύτερη αντίδραση λιγάσης

Αντιδραστήρια	Μίγμα Α	Μίγμα Β
Πλασμιδιακός φορέας pET11b	3μL	3μL
Ρυθμιστικό διάλυμα	1μL	1μL
T4 DNA λιγάση	1μL	1μL
Αποστειρωμένο νερό	5μL	5μL

Ο μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και ο έλεγχος των κλώνων πραγματοποιείται όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι τα NdeI και BamHI.

Ρυθμιστικό διάλυμα για τα ένζυμα NdeI και BamHI: 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol (pH 7.9 στους 25°C)

2.3 Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την αμινοάκυλο-tRNA συνθεάση της τυροσίνης του *Geobacillus stearothermophilus*

2.3.1 Γενωμική ανάλυση.

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS του *G.stearothermophilus* βρέθηκε στην ψηφιακή βάση δεδομένων T.I.G.R. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία χρησιμεύει στο σχεδιασμό των εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου. Στα άκρα των εκκινητών προσθέτονται νουκλεοτιδία ώστε να δημιουργηθούν θέσεις αναγνώρισης για τα περιοριστικά ένζυμα NdeI στο νοηματικό εκκινητή και BamHI στον αντινοηματικό εκκινητή (πίνακας 7).

Πίνακας 7: Νοηματικός και αντινοηματικός εκκινητής για την ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS του *G.stearothermophilus*

NdeI sense TyrRS <i>B.st</i>	5'- GCA TAT GGA TTT GCT TGC GGA ATT G-GCA TAT GGA TTT GCT TGC GGA ATT G -3'
BamHI antisense TyrRS <i>B.st</i>	5' -GGA TCC TTA GGC GTA GCG ATT CAA ATA ATA C-3'

2.3.2 Ενίσχυση του γονιδίου με αντίδραση PCR

Η ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS του *G.stearothermophilus* τελείται με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο γενωμικό DNA του μικροοργανισμού αυτού. Συγκεκριμένα παρασκευάζονται τρία μίγματα ώστε να ενισχυθεί το γονίδιο με τη χρήση τριών διαφορετικών DNA πολυμερασών (πίνακας 8). Σε κάθε μίγμα προσθέτονται από 2U του αντίστοιχου ενζύμου μετά την αρχική αποδιάταξη και ακολουθεί η αντίδραση PCR (πίνακας 9).

Πίνακας 8: Σύσταση των διαλυμάτων των PCR αντιδράσεων για την ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS του *G.stearothermophilus*

Αντιδραστήρια	Μίγμα Α	Μίγμα Β	Μίγμα Γ
dNTPs (10mM)	3μL	3 μL	3 μL
Εκκινητές (100pmol/μL)	2x2 μL	2x2 μL	2x2 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα 5X (phusion)	20 μL	-	-
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X (taq)	-	10 μL	-
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X (pfu turbo)	-	-	10 μL
MgCl ₂ (1M)	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL
Γενωμικό DNA του <i>G.stearothermophilus</i> (200ng/μL)	1μL	1 μL	1 μL
Αποστειρωμένο νερό	71.5 μL	80.5μL	80.5μL

Πίνακας 9: Συνθήκες της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS του *G.stearothermophilus*

	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός επαναλήψεων
Αρχική αποδιάταξη	97°C	5min	1
Αποδιάταξη	95°C	2min	
Υβριδοποίηση εκκινητή	58°C	1min	30
Επιμήκυνση	72°C	2min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10min	1

Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών είναι 5°C μικρότερη από τη θερμοκρασία τήξης τους (T_m). Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η ζώνη που αντιστοιχεί στο μέγεθος του γονιδίου απομονώνεται και το DNA καθαρίζεται από το πήκτωμα όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Ρυθμιστικό διάλυμα 5X (phusion): δεν είναι γνωστή η σύνθεση του.

Ρυθμιστικό διάλυμα 10X (taq): 670mM Tris-HCl (pH8.8), 166mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Tween 20

Ρυθμιστικό διάλυμα 10X (pfu turbo): 200 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM $MgSO_4$, 100 mM KCl, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1% Triton® X-100, 1 mg/mL nuclease-free BSA.

2.3.3 Κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS και μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Το ενισχυμένο γονίδιο κλωνοποιείται σε πλασμιδιακό φορέα p-GEM T Easy. Η κλωνοποίηση βασίζεται στις ίδιες αρχές με την κλωνοποίηση σε πλασμίδιο TOPO (παράγραφος 2.1.3). Για την αντίδραση αυτή, σε 5μL κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για την T4 DNA λιγάση προσθέτονται 1μL T4 DNA λιγάσης (3Weiss units/μl), 1μL πλασμιδίου p-GEM και 3μL του προϊόντος της αντίδρασης PCR αντίδρασης. Το μίγμα επωάζεται για 14h στους 4°C.

Ακολουθεί μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων με το μίγμα επώασης. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία LB/άγαρ με αμπικιλίνη(100mg/mL) που περιέχουν Xgal(80μg/mL)/IPTG(0.5mM) και επωάζονται για 16h στους 37°C. Στα τρυβλία παρατηρείται ανάπτυξη μπλε και λευκών αποικιών. Επιλέγονται δώδεκα αποικίες λευκού χρώματος και μερικά κύτταρα αυτών χρησιμοποιούνται ως εμβόλιο σε 3mL υγρού θρεπτικού υλικού LB με αμπικιλίνη (100mg/mL). Οι καλλιέργειες επωάζονται για 14h στους 37°C, υπό ανάδευση. Ο έλεγχος του ανασυνδυασμού του πλασμιδίου πραγματοποιείται με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και BamHI.

2.3.4 Θέση-εξειδικευμένη μεταλλαξιγένεση με τη χρήση επέκτασης επικαλυπτόμενων εκκινητών

Η εισαγωγή μιας μετάλλαξης αμινοξέος σε συγκεκριμένη θέση μπορεί να επιτευχθεί με την τεχνική της PCR και βασίζεται στην επέκταση επικαλυπτόμενων εκκινητών⁵³. Για τη μεταλλαξιγένεση σχεδιάζονται δύο εκκινητές που φέρουν τη μετάλλαξη, ένας νοηματικός και ένας αντινοηματικός, οι οποίοι δεσμεύονται στην περιοχή που εισάγεται η επιθυμητή υποκατάσταση. Οι δύο εκκινητές και το ενισχυμένο γονίδιο χρησιμοποιούνται σε δύο παράλληλες αντιδράσεις PCR. Στην πρώτη χρησιμοποιείται ο νοηματικός ακραίος εκκινητής και ο μεταλλαγμένος αντινοηματικός και στη δεύτερη ο αντινοηματικός ακραίος εκκινητής και ο μεταλλαγμένος νοηματικός. Για την μετάλλαξη του καταλοίπου στη θέση 152 του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS του *G.stearothermophilus* σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη μεταλλαγμένων εκκινητών, ένα για την υποκατάσταση σε αλανίνη και ένα για την αργινίνη(πίνακας 10).

Πίνακας 10: Νοηματικοί και αντινοηματικοί εκκινητές για την εισαγωγή των μεταλλάξεων του γλουταμινικού οξέος σε αλανίνη και αργινίνη στη θέση 152 του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS.

Ala sense TyrRS <i>B.st</i>	5'- GAT GGC GAA AGC GTC GGT TCA ATC - 3'
Ala antisense TyrRS <i>B.st</i>	5'- GAT TGA ACC GAC GCT TTC GCC ATC - 3'
Arg sense TyrRS <i>B.st</i>	5'- GAT GGC GAA ACG TTC GGT TCA ATC - 3'
Arg antisense TyrRS <i>B.st</i>	5'- GAT TGA ACC GAA CGT TTC GCC ATC - 3'

Για την αντίδραση PCR παρασκευάζονται τέσσερα μίγματα, δύο για τη μετάλλαξη του γλουταμινικού οξέος σε αλανίνη και δύο για την αντίστοιχη μετάλλαξη σε αργινίνη. Για κάθε δείγμα, σε 20μL ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλου για τη phusion DNA πολυμεράση προσθέτονται 0.3mM dNTPs, 5mM MgCl₂, ~30ng προϊόντος από την αντίδραση PCR ενίσχυσης του γονιδίου, 2mM από κάθε εκκινητή, σε συγκεκριμένους συνδυασμούς (πίνακας 11), και αποστειρωμένο νερό ως τον όγκο των 100μL. Σε όλα τα δείγματα χρησιμοποιείται Phusion DNA πολυμεράση.

Πίνακας 11: Συνδυασμοί εκκινητών της αντίδρασης PCR για την εισαγωγή των μεταλλάξεων

Εκκινητές	Μίγμα Α	Μίγμα Β	Μίγμα Γ	Μίγμα Δ
NdeI sense	*	-	*	-
BamHI antisense	-	*	-	*
Ala sense	-	*	-	-
Ala antisense	*	-	-	-
Arg sense	-	-	-	*
Arg antisense	-	-	*	-

Μετά την αρχική αποδιάταξη προσθέτονται 2U ενζύμου phusion σε κάθε δείγμα και ακολουθεί η αντίδραση PCR (πίνακας 12). Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και οι ζώνες που αντιστοιχούν στα αναμενόμενα τμήματα απομονώνονται και το DNA καθαρίζεται από το πήκτωμα όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Πίνακας 12: Συνθήκες της αντίδρασης PCR για την εισαγωγή των μεταλλάξεων

	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός επαναλήψεων
Αρχική αποδιάταξη	98°C	5min	1
Αποδιάταξη	95°C	0.5min	
Υβριδοποίηση εκκινητή	58°C	1.5min	50
Επιμήκυνση	72°C	2min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10min	1

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο, τα προϊόντα των δύο αντιδράσεων PCR που αντιστοιχούν σε κάθε μετάλλαξη χρησιμοποιούνται από κοινού ως εικμαγείο σε μια αντίδραση PCR, για την ενίσχυση του μεταλλαγμένου γονιδίου.

Για την τελευταία PCR αντίδραση παρασκευάζονται δείγματα σε ρυθμιστικό διάλυμα 5x για την πολυμεράση phusion που περιέχουν 0.3mM dNTPs, 2mM εκκινητή NdeI sense, 2mM εκκινητή BamHI antisense και 2.5mM MgCl₂. Σε κάθε δείγμα, ανάλογα με το αν προορίζεται για τη μετάλλαξη σε αλανίνη ή αργινίνη, προσθέτονται από περίπου 10ng των αντίστοιχων προϊόντων της προηγούμενης αντίδρασης PCR. Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι ίδιες με αυτές που εφαρμόζονται για την ενίσχυση του γονιδίου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ενίσχυση και κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS του *E.coli*.

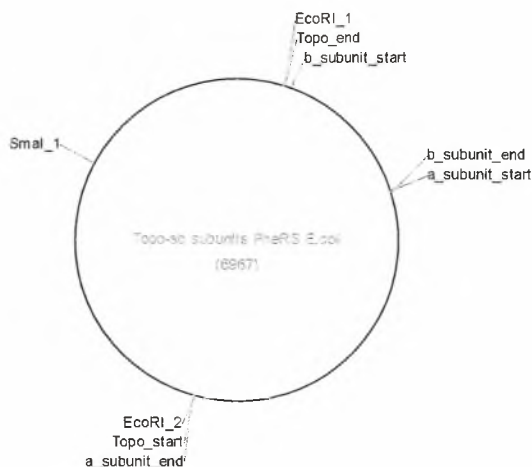
Στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας έγινε εκτενής χρήση των εργαλείων της βιοπληροφορικής. Αρχικά, προσδιορίστηκε η αλληλουχία του τμήματος του γενωμικού DNA του *E.coli* που περιλαμβάνει τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS (εικόνα 9). Με βάση την αλληλουχία αυτή σχεδιάστηκαν οι εκκινητές έτσι ώστε τα άκρα τους να είναι θέσεις κοπής για τα ένζυμα περιορισμού SreI και EcoRI.



Εικόνα 9: Η αλληλουχία του τμήματος που περιέχει τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS του *E.coli*. Οι περιοχές εντός των περιγραμμάτων είναι οι θέσεις δέσμευσης των εκκινητών. Οι κόκκινες τριπλέτες οριοθετούν το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β υπομονάδα και οι μπλε το γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα α.

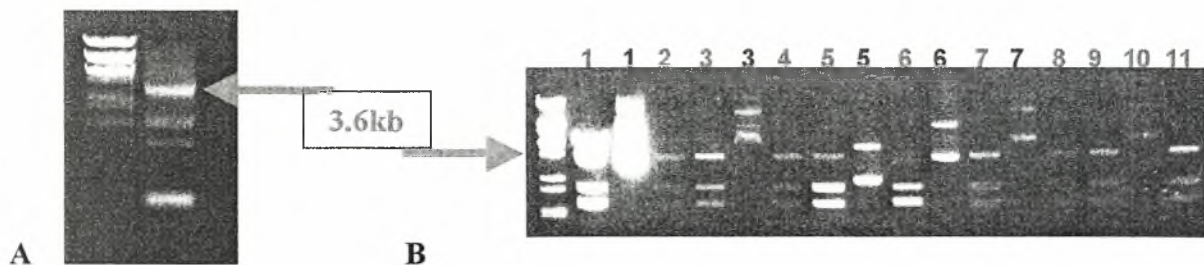
Το τμήμα που περιλαμβάνει τα δύο γονίδια ενισχύθηκε με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας γενωμικό DNA του *E.coli*. Στο στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητών η θερμοκρασία μειωνόταν με την πάροδο των κύκλων. Με την σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται μεν βελτιωμένη ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων, αλλά παράλληλα ενισχύονται και τμήματα που αποτελούν παραπροϊόντα της PCR. Πράγματι, εμφανίστηκαν περισσότερες από μια ζώνες στο ηλεκτρογράφημα, μια εκ των οποίων αντιστοιχούσε στις 3.6κβ, όπως αναμενόταν (εικόνα 11A). Το τμήμα DNA που ανακτήθηκε από τη ζώνη αυτή κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο TOPO και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων. Η ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο που περιείχε καναμυκίνη, διότι το πλασμίδιο TOPO φέρει γονίδιο για ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό. Από τους μετασχηματισμένους κλώνους επιλέχτηκαν οι έντεκα πιο ευμεγέθεις αποικίες (που σημαίνει καλή ανάπτυξη παρούσα αντιβιοτικού άρα σταθερό πλασμίδιο και σε αρκετά αντίγραφα ανά κύτταρο), από τις οποίες απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA και ελέγχθηκε ο ανασυνδυασμός του πλασμίδιο μέσω πέψης με τα ένζυμα EcoRI και SmaI. Τα ένζυμα αυτά επιλέχτηκαν διότι το EcoRI κόβει περίπου στα άκρα του γονιδίου οπότε θα ήταν εμφανές αν είχε εισαχθεί το τμήμα DNA του επιθυμητού μεγέθους. Καθώς όμως το τμήμα αυτό είναι ίσου μεγέθους με το πλασμίδιο, η πέψη με το EcoRI δε θα έδινε ανιχνεύσιμα αποτελέσματα, γιατί

οι ζώνες θα επικαλύπτονταν. Για το λόγο αυτό έγινε παράλληλη πέψη με SmaI, το οποίο έχει μόνο μια θέση κοπής μέσα στο πλασμίδιο (εικόνα 10). Έτσι, αναμενόταν μια ζώνη στις 3.6kb και κάποιες μικρότερες λόγω της πέψης του πλασμιδίου.



Εικόνα 10: Το τμήμα που περιλαμβάνει τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS του *E.coli* κλωνοποιημένο σε πλασμίδιο TOPO. Το τμήμα είναι ισομεγέθες με το πλασμίδιο και για αυτό επιλέχθηκαν τα ένζυμα EcoRI και SmaI ώστε να διαχωρίζονται οι ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση.

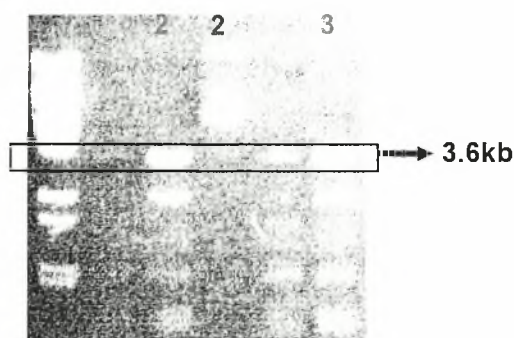
Από τα προϊόντα της πέψης προσδιορίστηκαν οι κλώνοι που έφεραν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (εικόνα 11B). Παράλληλα ηλεκτροφορήθηκαν και ποσότητες πλασμιδιακού DNA των κλώνων που δεν είχε υποστεί πέψη ώστε να αποτελέσουν μάρτυρες και να βοηθήσουν στην επιλογή των κλώνων. Τα περισσότερα δείγματα έφεραν τη ζώνη στις 3.6kb, που αντιστοιχεί στο συνολικό μέγεθος των δύο γονιδίων. Επιλέχθηκαν οι κλώνοι που το άπεπτο πλασμιδιακό τους DNA έδωσε τη ζώνη στις 7.2kb περίπου. Για παράδειγμα το δείγμα 5 δεν επιλέχτηκε διότι το προφίλ του άπεπτου πλασμιδιακού DNA του κλώνου αυτού δεν είναι το αναμενόμενο. Επιλέγησαν οι κλώνοι 2 και 3 και το πλασμιδιακό τους DNA στάλθηκε για αλληλούχιση, τα αποτελέσματα της οποίας επιβεβαίωσαν την ορθή επιλογή των συγκεκριμένων κλώνων.



Εικόνα 11: (A) Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της α υπομονάδας της PheRS του *E.coli*. Εκτός από τα παραπροϊόντα, ενισχύθηκε και το αναμενόμενο τμήμα στις 3.6kb. (B) Τα προϊόντα της πέψης του πλασμιδιακού DNA των έντεκα μετασχηματισμένων επιλεγμένων κλώνων. Οι κλώνοι 2 και 3 επιλέχθηκαν για τη συνέχιση των πειραμάτων. Οι κόκκινοι αριθμοί αντιστοιχούν στα προϊόντα της πέψης και οι μπλε στο πλασμιδιακό DNA που δεν υπέστη πέψη.

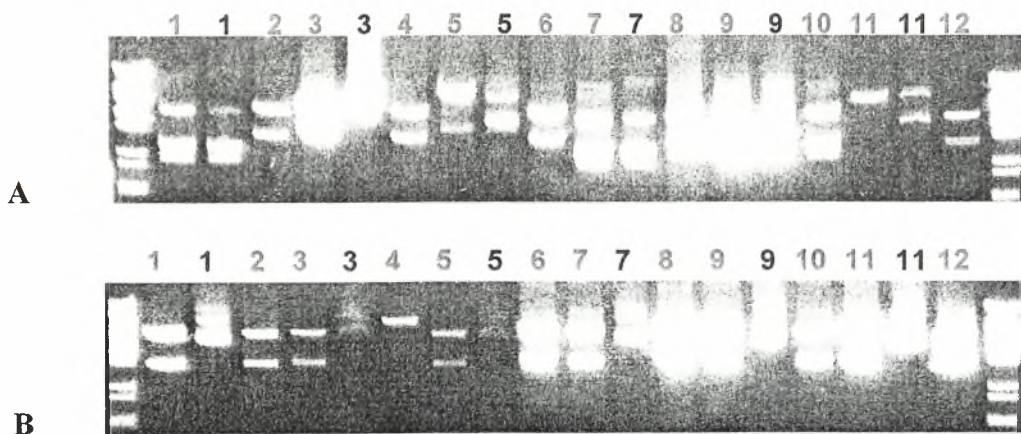
Εφόσον επιβεβαιώθηκε ότι οι δύο μετασχηματισμένοι κλώνοι έφεραν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, επόμενος στόχος ήταν η κλωνοποίηση των γονιδίων σε φορείς έκφρασης.

Τα γονίδια διαχωρίστηκαν με πέψη από τον πλασμιδιακό φορέα TOPO χρησιμοποιώντας τα περιοριστικά ένζυμα SpeI, EcoRI και SmaI (εικόνα 12). Το τμήμα που περιλαμβάνει τα δύο γονίδια συνενώθηκε έπειτα με τους πλασμιδιακούς φορείς p414 και p424 σε μια αντίδραση λιγάσης.



Εικόνα 12: Τα προϊόντα της πέψης του πλασμιδιακού DNA των κλώνων 2 και 3 με EcoRI, SpeI και SmaI. Το τμήμα που εμπεριέχει τα δύο αυτά γονίδια είναι μεγέθους 3.6kb. Οι αριθμοί κόκκινου χρώματος αντιστοιχούν στα προϊόντα της πέψης και οι μπλε χρώματος στο πλασμιδιακό DNA που δεν υπέστη πέψη.

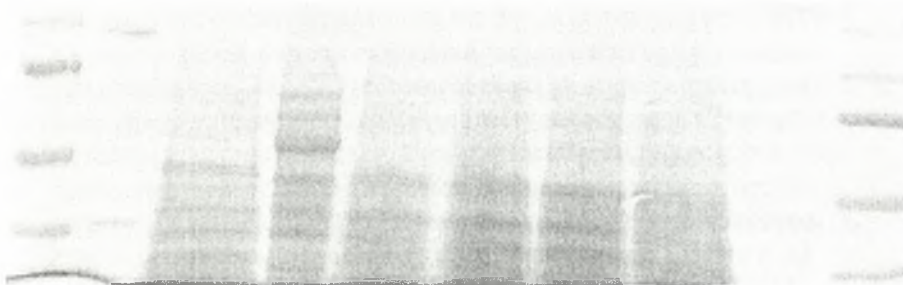
Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό κυττάρων, τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε αμπικιλίνη, διότι οι δύο πλασμιδιακοί φορείς έχουν γονίδια για την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό. Επιλέχθηκαν 12 ευμεγέθεις αποικίες από κάθε μετασχηματισμό και απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA. Με χρήση των περιοριστικών ενζύμων EcoRI και SpeI πραγματοποιήθηκε πέψη ώστε να προσδιοριστούν οι κλώνοι που είχαν μετασχηματιστεί με πλασμίδιο p414 και p424 που έφερε τα υπό μελέτη γονίδια. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πέψης οι κλώνοι 2, 3 και 12 από το μετασχηματισμό με το ανασυνδυασμένο p414 (εικόνα 13A) και οι κλώνοι 2, 3 και 8 από το μετασχηματισμό με ανασυνδυασμένο p424 έφεραν το επιθυμητό τμήμα με τα δύο γονίδια (εικόνα 13B). Σε μερικά δείγματα η συγκέντρωση του DNA ήταν ιδιαίτερα αυξημένη και αυτό δεν επέτρεψε τη διάκριση των ζωνών, ώστε να κριθεί αν οι κλώνοι είναι θετικοί ή όχι ως προς τον ανασυνδυασμό. Το προφίλ του άπεπτου πλασμιδιακού DNA αποτέλεσε μάρτυρα για την ορθή επιλογή των κλώνων.



Εικόνα 13: Τα προϊόντα της πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και SpeI για έλεγχο του ανασυνδυασμού των πλασμιδίων p414 και p424. (A) Η πέψη του πλασμιδιακού DNA των 12 μετασχηματισμένων κλώνων με πλασμίδιο p414 έδειξε ότι οι μισοί περίπου κλώνοι εμπεριείχαν το επιθυμητό τμήμα των 3.6kb. Από τους κλώνους αυτούς επιλέχθηκαν ως καλύτεροι οι 2,3 και 12. (B) Η αντίστοιχη διαδικασία για τους μετασχηματισμένους κλώνους με πλασμίδιο p424 έδειξε ότι οι κλώνοι που εμπεριείχαν το επιθυμητό τμήμα ήταν οι 2,3 και 8. Με κόκκινους αριθμούς συμβολίζονται τα δείγματα του πλασμιδιακού DNA που υπέστησαν πέψη ενώ με μπλε το πλασμιδιακό DNA των κλώνων που ηλεκτροφορήθηκε αυτούσιο ως μάρτυρας για την ορθότερη επιλογή των κλώνων.

Το πλασμιδιακό DNA από τους επιλεγμένους κλώνους χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων *S.cerevisiae*. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε τρυπτοφάνη. Τα στελέχη του ζυμομύκητα που χρησιμοποιήθηκαν για το στάδιο αυτό είναι αυξότροφα ως προς το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Επιπλέον, τα δύο πλασμίδια φέρουν τα γονίδια για το βιοσυνθετικό μονοπάτι της τρυπτοφάνης. Επομένως, στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα των τρυβλίων που χρησιμοποιούνται για την επιλογή των κλώνων του ζυμομύκητα και στο αντίστοιχο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα επιβιώνουν και αναπτύσσονται μόνο οι κλώνοι στους οποίους έχει εισέλθει το πλασμίδιο και έχουν με τον τρόπο αυτό επανακτήσει την ιδιότητα της σύνθεσης του συγκεκριμένου αμινοξέος. Οι υπόλοιποι κλώνοι δε αναπτύσσονται διότι από το θρεπτικό τους υπόστρωμα λείπει το αμινοξύ για το οποίο είναι αυξότροφοι, οπότε και δε δύνανται να συνθέσουν βασικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν στην αλληλουχία τους το αμινοξύ τρυπτοφάνη.

Παρατηρήθηκε ότι τα μετασχηματισμένα κύτταρα *S.cerevisiae* κατά την ανάπτυξή τους χρωματίζονταν ροζ. Από τους μετασχηματισμένους κλώνους απομονώθηκε το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο και ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με SDS. Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκε και ένα δείγμα που περιείχε την πρωτεΐνη της α και της β_{cons} υπομονάδας για να ελεγχθεί η σύσταση των πρωτεϊνικών περιεχομένων ως προς τις υπομονάδες αυτές. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης δεν υπάρχει ζώνη σε καμία στήλη που να αντιστοιχεί στο μέγεθος της μιας ή της άλλης υπομονάδας. Επίσης, παρατηρείται ότι τα πρωτεϊνικά περιεχόμενα δεν φέρουν όλο το εύρος των αναμενόμενων πολυπεπτιδίων (εικόνα 14).



Εικόνα 14: SDS ηλεκτροφόρηση κυτταρικών εκχυλισμάτων των μετασχηματισμένων κλώνων *S.cerevisiae*. Στη δεύτερη στήλη ηλεκτροφορήθηκε το δείγμα που περιείχε την α (πάνω) και β_{cons} υπομονάδα (κάτω) της PheRS του *E.coli*. Στις υπόλοιπες έξι στήλες ηλεκτροφορήθηκαν τα πρωτεϊνικά περιεχόμενα των 6 επιλεγμένων κλώνων *S.cerevisiae*. Σε κανένα από τα δείγματα δε φαίνεται να υπάρχουν ζώνες αντίστοιχες των δύο υπομονάδων της PheRS.

3.2 Ενίσχυση και κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β_{cons} της PheRS του *M.thermoautotrophicum*

Οι αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α , β και β_{cons} της PheRS του *Methanobacterium thermoautotrophicum* προσδιορίστηκαν με αναζήτηση στην ψηφιακή βάση δεδομένων T.I.G.R. (εικόνες 15.16). Με βάση τις αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β_{cons} σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για την ενίσχυση τους και προστέθηκαν τα νουκλεοτίδια για τη δημιουργία των θέσεων κοπής των περιοριστικών ενζύμων (ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ).

```
ttgaaaagaagatattgtaagcttcaaggaaggacttgaagaggcatggctgaaaagtggaaagagtct  
aaggaaacccaccatgacatgcatgacacgcctcgaattcgaaacggaaatcgcactactctatgatac  
catctgagataaagggaagcctacctgcccctgattcagtaaatggaaccctctcatagacgaggga  
cacatataccgccagttggcccaggcccctgagtcctgacaggtgcttctactcgggggtctcccaaga  
cccgatatcggactgggaccgggagatcagatgatagaggataggccatagatgtcttgatgagaaagcta  
gaaaacctgaaaggaggcttcagctacacaagaaggggatcttcaggggagcactctctcaggatrc  
aatgcccctgaaagtgagagccacgagcgtctgagggtccttgagagggcttccctgagataaaggacctaaac  
cagctcagggagaaaccaccctcaggtccacatgacatcaggatgggtcctatcactcagaacatccacgacg  
gtacagagtgccactaaagctttctcactgaccgctgctccggaggagcagaaaggagactccagtcacctg  
atgacctatcctccctctgctggtggtgaccatgaggtcccttgatgtgggaaaggccgttcagaggg  
gctcctcagcacctgggatttcaagggttcaggctccagatgagaaaggtccaaagctactacatcccggca  
cccagacagaggctcagccctaccctctcctaaaggagtgggtgaggtggcaacattcggcctctattcaccg  
ataggcccttccatgacgggataaccaggaggtcatgaaacctgggggtgggggtgaaagggttgcctgacatcct  
caaccaggcaagcagctgctgtaaatgggtctaccccaagatatacgggtaagctgactgctgacaggacat  
cgccgagagctcaaggataaacctccaccctgtaacctcagatggcctgctcctgagaaagatagtcaaaacct  
ggaggggccatgacagaccctccctcctgagcttggagctacagtgagggaattcctgggggagggatag  
aggtaggtgcccgtgaggtggaggagaaacacggctgctgggaccgagatgaaacaccgttacatacatga  
tgggaaatcctggtgaccacctggaaaccgagctcagacggaaactcatcaccaggggcagaaaggaggcc  
tgaacaccggatatacctacatggaggccctgcaagcagggcctaccgataaggagagtggtgaaagtg  
cgccgaggagggtgaggtaggacacaatagcaagatccctctgacctgaaacctaccctgaggacaccggcc  
atgaggatcataaccggtaaaaccgggagatgacctgaggggaccgctgctaatcacatccacataatctattc  
ctgcc
```

Εικόνα 15: Η αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την υπομονάδα α της PheRS του *M.thermoautotrophicum*. Οι περιοχές εντός των πλαισίων αντιστοιχούν στις θέσεις δέσμευσης των εκκινητών.

```
tcaccccctaacctggaaatgtaggataccagtaaggattacagactcatgggtgacagtt  
aaaggcagttgactcttcaaggaggaccctgaatcaggggggcttcaggggggcaggtggaa  
aaagaagcccgcccttcaaggctgcccgtgaaattgagaggatacttcaggggcctcacatac  
tgttacatggaaacagaaagatcttccctcaagcccagggtcatggagatcaaggaggaaag  
gltgaggagagataaggcccttggtggtgaggactgaggccggagggttccttgaggagg  
gcccggcctgaggagaggagaaaggttgaaggagaaacattgcaagggtgagggttctcctg  
aacacccttggaaaccttgcagaggaggtcctgctggaaaagatctgaccctggtgac  
ggagttgataaattacaggtgaggtcagaaagcggggaaaccatcccgtggcagataag  
ctgcatgtgcaaacgtgaatgctggtggagggtcaataaagggtgctcaccaatgacctc  
gatgctcctgagaaatgaccatggtgctgtggcactcctccccacagaatttcaggggc  
gtgaccagtgagggaatgttcctgggtgtaaagggtgctcaggagatggtgatggtgaa  
cccgtgaaatcccagggggataccctcggggccctcaaccgaaacccggaaacctggtt  
aggagttcctgaaagggttaa
```

Εικόνα 16: Η αλληλουχία του συντηρημένου γονιδίου που κωδικοποιεί την υπομονάδα β_{cons}. Οι περιοχές εντός των πλαισίων αντιστοιχούν στις θέσεις δέσμευσης των εκκινητών.

Για να προσδιοριστεί ο βαθμός ομοιότητας των υπομονάδων β_{cons} και β πραγματοποιήθηκε μια ομοπαράθεση των αλληλουχιών των πολυπεπτιδικών τους αλυσίδων. Για την ομοπαράθεση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ClustalX και επιλέχθηκε ο πίνακας βαθμολόγησης BLOSUM62, ενώ η ποινή για τα κοινά ορίστηκε στις 11 μονάδες. Με βάση της παραμέτρους αυτές προσδιορίστηκαν οι περιοχές ομοιότητας των δύο αλληλουχιών (εικόνα 17).

```

phers  LYFDAYITGCVPEEWKNQPLKILKIIYLPVDSLMOPTPTDSLAVVNYLFDTMITFKHHIY
cons  -----L

phers  WRITMPVITFDYDDLKELGIDIDREKLLDVLPMGSDIEDFDDESIVKVEFFPNRPDLLSV
cons  W---M-VIGM-WD-TSK---DY-R--LM-V---A---VKAVD-----LFR-RT-LES-
*   * ** : :*  .:  * * *: *           :: .*           :* * . * *

phers  EGVARS LRGLGIEKGMPSYDVHDSGVEVTVDSEVLDVRPYLGMVAVIEDVQFTDKKLVQV
cons  -G-----GFRGQWKKKPAL--QAAG-EI---ERILQGLTYCYME-PEDLASS----PEV
*           ** * * *:           : :* *:           * :*: . * * ** : :           :*

phers  MEFQEDLHWVIGRDRRKVAIGIHDLDRVEPPFLYSGVEPEGVTFPLDSVCEMTPHEILE
cons  MEIKGKVEEIV-----E-ALGGEDWSR---RFL-----E-E-----APREER-EKVE-ENIA
**:: .:. : :           : :* * . * *           ** * *           :* :. * . * :

phers  EHPKGVSYAHLRLDHDRLITDKNGDVLSPPIINGELTKLTVNTRRILVDVTGTDDRA
cons  RV-R-FFLN-TLGNLDRR-LML---GKI-S-DPVI-G--VDI-I-TGEVM-SV-G--NHP
.   : .           * : ** * :           * : * * : * * . . : : * . : . * * : .

phers  VRQTLNIICTSF AEAGGRIGSVRVKRPDGLHLPDLTPREMRVSVSEASRITGLELSADE
cons  VADKLH-VCN--VNAGGR--SIKVV TND----L-DV--REND-HV--A--VA-L-LPP-Q
* :.*: :*. .:***** *::* * * * * : * * * * * * * * : : * * . . :

phers  VMDLLMKARMDARRTSDDEVVAVIPAYRVDILHEVDLVENIAVQHCIGRIEP-ELPDIAT
cons  --N-FMGV-----TSEG MFLGVEGVLR-D----VD-----G--EPGEMPRGIP
: :* .           **:. .:.* . * * * *           * * * * * * *

phers  IAEEDTWSRADASIREVMVGLGFQEVMSLMLTSEESHYRRMRLEEDERVEVAQPI SQDRT
cons  L-EALNETR-NL-VEE-----F--LKS-----
: * . : * : :.*           * : *

phers  MIRKSLNGLLEFFEDNKHEDLPQKIFEVGDVVYINPESETRSRVVTKLACAVTHSSAGF
cons  -----

phers  TEIKSLAAAVVENLGYEFRIEPLHPSFIEGRCAAI ESEGKSSAIGGFFGEVHPEVVTNF
cons  -----

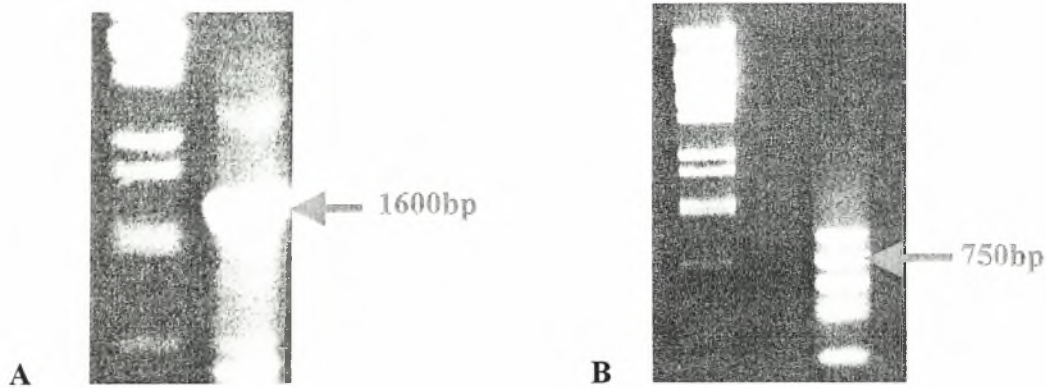
phers  NLEYPVIALEIEFK
cons  -----

```

Εικόνα 17: Η ομοπαράθεση των αλληλουχιών των υπομονάδων β και β_{cons} . Η βαθμός ομοιότητας είναι ιδιαίτερα αυξημένος σε κάποιες περιοχές. Η ομοπαράθεση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalX.

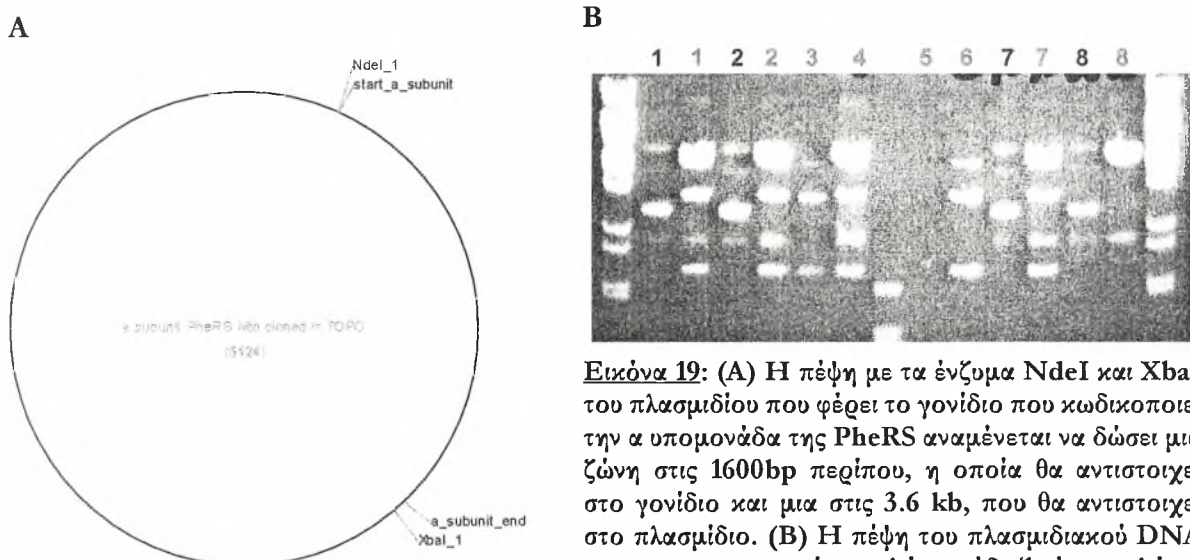
Το γενωμικό DNA του στελέχους Delta H του *M.thermoautrophicum* χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ενίσχυση των δύο γονιδίων. Τα προϊόντα των δύο αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%. Τα δύο τμήματα ενισχύθηκαν και προέκυψαν οι ζώνες στις 1.6kb και 750bp, που αντιστοιχούν στο μέγεθος των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β_{cons} , αντίστοιχα. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις η ενίσχυση δεν ήταν άκρως εξειδικευμένη, καθώς εμφανίστηκαν ζώνες που αντιστοιχούσαν σε παραπροϊόντα των αντιδράσεων (εικόνα 18).

Ακολούθως τα γονίδια κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα TOPO, το καθένα χωριστά, και τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων. Οι μετασχηματισμένοι κλώνοι αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε καναμυκίνη, καθώς το πλασμίδιο TOPOφέρει γονίδιο για ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό.



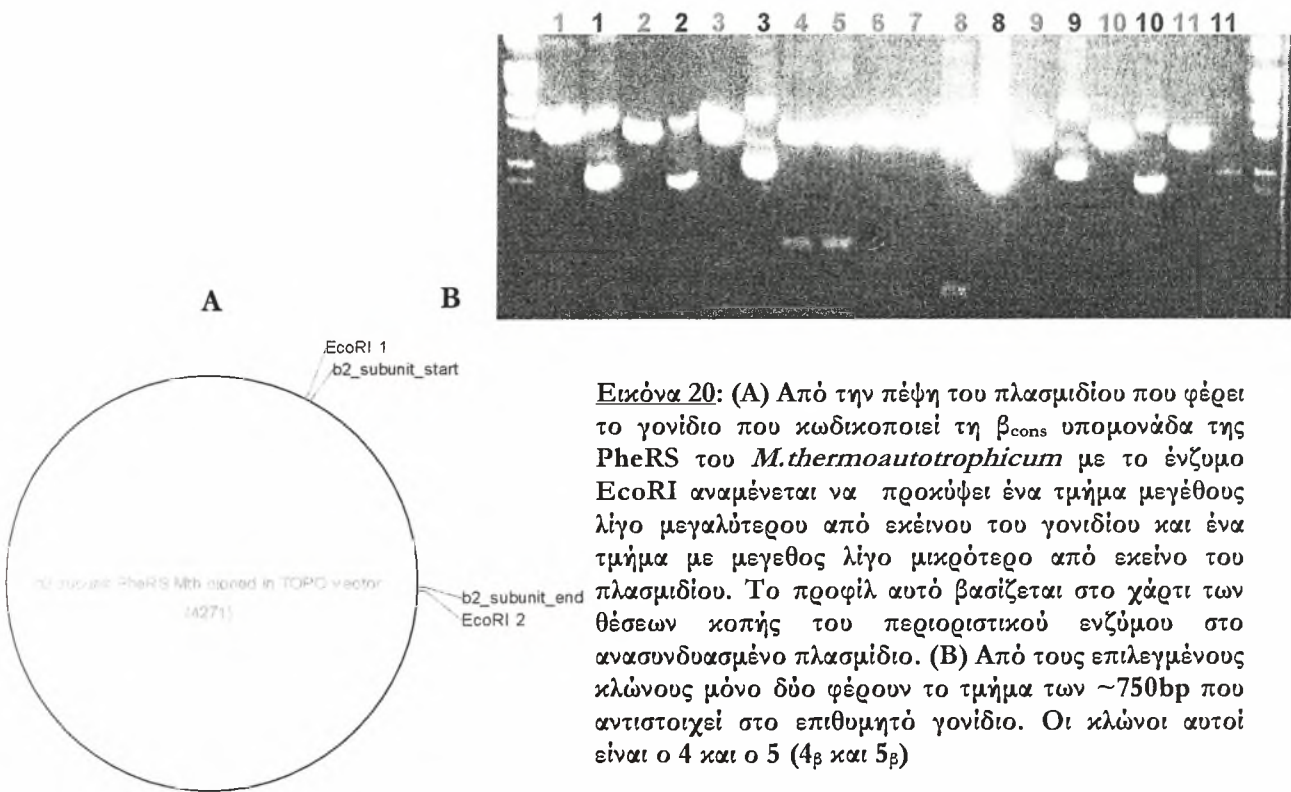
Εικόνα 18: (A) Η ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την α υπομονάδα της PheRS του *M.thermoautrophilicum* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έδωσε μια ζώνη στις 1600bp και κάποια παραπροϊόντα. (B) Η αντίστοιχη ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί τη β_{cons} υπομονάδα έδωσε μια ζώνη στις 750bp περίπου και παραπροϊόντα τόσο μικρότερου όσο και μεγαλύτερου μεγέθους.

Από τα τρυβλία των μετασηματισμένων κλώνων (TOPO-γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα και TOPO-γονίδιο που κωδικοποιεί τη β_{cons} υπομονάδα) επιλέχτηκαν οι 8 και 11 πιο ευμεγέθεις αποικίες μετασηματισμένων κλώνων, αντίστοιχα, και από αυτές απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA και ελέγχθηκε ο ανασυνδυασμός του πλασμιδίου με το ελάχιστο γονίδιο μέσω πέψης. Η διεργασία τη πέψης για το ανασυνδυασμένο με την α υπομονάδα πλασμιδιακό DNA πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα NdeI και XbaI. Αναμενόταν από την πέψη αυτή να προκύψει ένα τμήμα περί τις 1600bp που αντιστοιχεί στο μέγεθος του γονιδίου που κωδικοποιεί την α υπομονάδα καθώς επίσης και ένα τμήμα στα 3.6kb που αντιστοιχεί στο μέγεθος του πλασμιδίου. Τελικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πέψης οι κλώνοι που έφεραν πλασμίδιο ανασυνδυασμένο με το επιθυμητό γονίδιο ήταν οι 4 και 6 κατά σειρά αριθμησης(εικόνα 19).



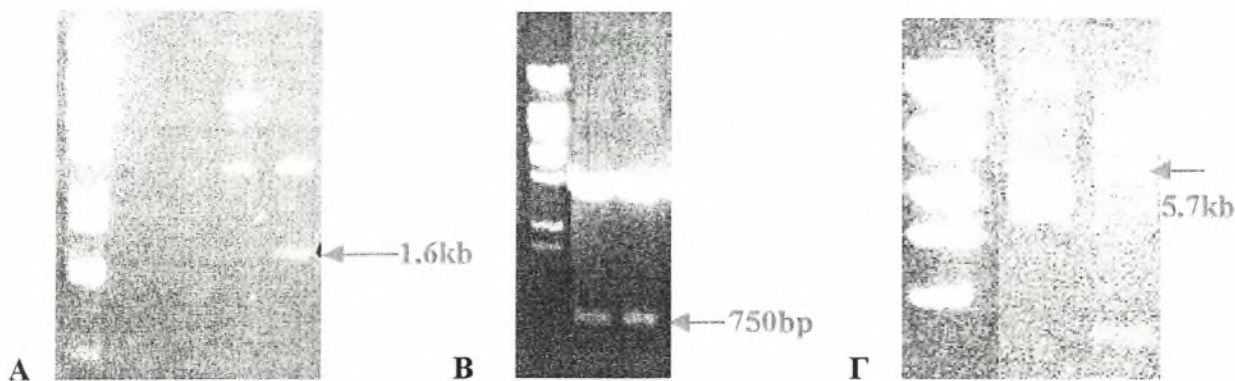
Εικόνα 19: (A) Η πέψη με τα ένζυμα NdeI και XbaI του πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα της PheRS αναμένεται να δώσει μια ζώνη στις 1600bp περίπου, η οποία θα αντιστοιχεί στο γονίδιο και μια στις 3.6 kb, που θα αντιστοιχεί στο πλασμίδιο. (B) Η πέψη του πλασμιδιακού DNA των μετασηματισμένων κλώνων έδειξε ότι οι κλώνοι που εμπειρεύσαν πλασμίδιο με το επιθυμητό γονίδιο ήταν οι 4 και 6 (4_α και 6_α). Στους κόκκινους αριθμούς αντιστοιχούν τα δείγματα που υπέστησαν πέψη και στους μπλε τα δείγματα μάρτυρες.

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για τους κλώνους που είχαν μετασχηματιστεί με πλασμίδια που έφεραν το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β_{cons} υπομονάδα της PheRS του *M.thermoautotrophicum*. Η πέψη στην προκειμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο EcoRI. Το ένζυμο αυτό πέπτει σε δύο σημεία το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, οπότε προκύπτουν στα δείγματα των ορθώς μετασχηματισμένων κλώνων δύο ζώνες. Η μια αντιστοιχεί σε μέγεθος λίγο μεγαλύτερο από αυτό του γονιδίου καθώς οι θέσεις κοπής που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού βρίσκονται μερικές βάσεις εκατέρωθεν των νουκλεοτιδίων έναρξης και λήξης της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί τη β_{cons} υπομονάδα. Η δεύτερη ζώνη αντιστοιχεί σε μέγεθος λίγο μικρότερο από αυτό του πλασμιδιακού φορέα για τον ίδιο λόγο που αναφέρθηκε παραπάνω. Πράγματι, η εικόνα αυτή προέκυψε για κάποιους από τους μετασχηματισμένους κλώνους και τελικά τα πειράματα συνεχίστηκαν με το πλασμιδιακό DNA των κλώνων 4 και 5 (εικόνα 20).



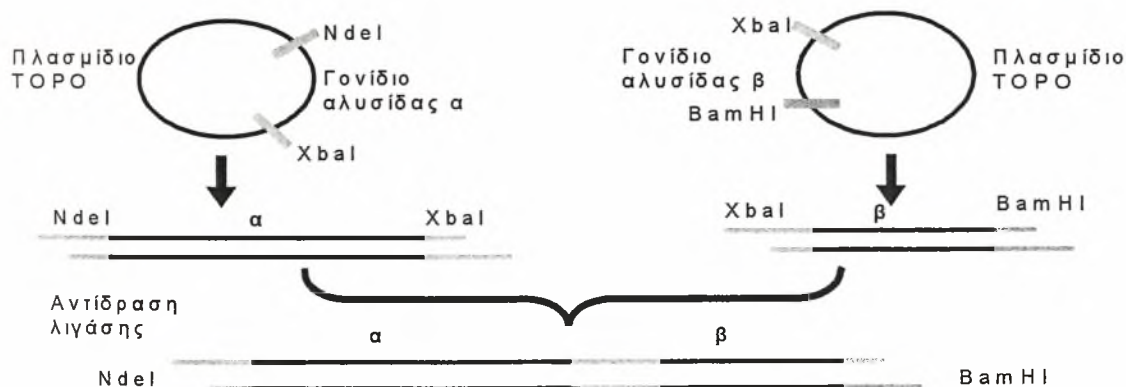
Εικόνα 20: (A) Από την πέψη του πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β_{cons} υπομονάδα της PheRS του *M.thermoautotrophicum* με το ένζυμο EcoRI αναμένεται να προκύψει ένα τμήμα μεγέθους λίγο μεγαλύτερου από εκείνου του γονιδίου και ένα τμήμα με μεγεθος λίγο μικρότερο από εκείνο του πλασμιδίου. Το προφίλ αυτό βασίζεται στο χάρτι των θέσεων κοπής του περιοριστικού ενζύμου στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. (B) Από τους επιλεγμένους κλώνους μόνο δύο φέρουν το τμήμα των ~750bp που αντιστοιχεί στο επιθυμητό γονίδιο. Οι κλώνοι αυτοί είναι ο 4 και ο 5 (4_{β} και 5_{β})

Τελικός σκοπός ήταν η κλωνοποίηση των δύο γονιδίων σε φορέα έκφρασης με τρόπο τέτοιο ώστε να τεθούν υπό τον έλεγχο ενός προαγωγέα, να αποτελούν δηλαδή μέρη ενός οπερονίου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδιακού DNA των κλώνων 4_{α} , 6_{α} , $4_{\beta_{\text{cons}}}$ και $5_{\beta_{\text{cons}}}$ και του πλασμιδιακού φορέα pET11b με τα κατάλληλα ένζυμα για να επιτευχθεί ακολούθως η συνένωσή τους (εικόνα 21). Αναλυτικότερα, το πλασμιδιακό DNA των κλώνων 4_{α} και 6_{α} υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XbaI και εκείνο των κλώνων $4_{\beta_{\text{cons}}}$ και $5_{\beta_{\text{cons}}}$ με τα ένζυμα περιορισμού XbaI και BamHI. Επιπλέον, η πέψη του pET11b πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα NdeI και BamHI.



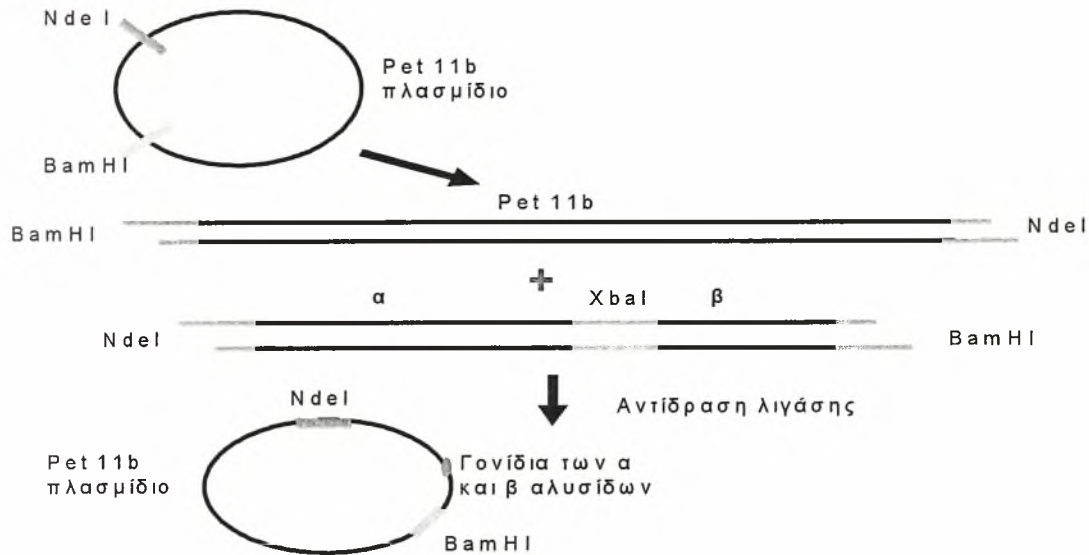
Εικόνα 21: (Α) Τα προϊόντα της πέψης του πλασμιδιακού DNA των κλώνων 4_{α} και 6_{α} με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XbaI. Το πλασμιδιακό DNA του κλώνου 6_{α} πριν και μετά την πέψη απεικονίζεται στις πρώτες δύο στήλες ενώ το αντίστοιχο του κλώνου 4_{α} στις δύο τελευταίες στήλες. Στις δύο πρώτες στήλες δεν παρατηρείται καμία ζώνη πιθανώς λόγω λανθασμένης μεταχείρισης των δειγμάτων. Στις στήλη του πλασμιδιακού DNA του κλώνου 4_{α} που υπέστη πέψη παρατηρείται η ζώνη στις 1.6kb που αντιστοιχεί στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα. (Β) Τα προϊόντα της πέψης του πλασμιδιακού DNA των κλώνων $4_{\beta\text{cons}}$ (στήλη 1) και $5_{\beta\text{cons}}$ (στήλη 2) με τα ένζυμα περιορισμού XbaI και BamHI. Η πέψη και των δύο δειγμάτων έδωσε μια ζώνη στο μέγεθος του πλασμιδίου (3.6kb) και μια στο μέγεθος του γονιδίου που κωδικοποιεί τη βcons υπομονάδα (750bp). (Γ) Τα προϊόντα της πέψης του πλασμιδιακού φορέα pET11b με τα ένζυμα NdeI και BamHI. Στην πρώτη στήλη απεικονίζεται το πλασμίδιο πριν την πέψη ενώ στη δεύτερη τα προϊόντα της πέψης. Είναι εμφανής η ζώνη στις 5.7kb που αντιστοιχεί στο πλασμίδιο pET11b, καθώς άλλες δύο (βλέπε κείμενο).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης οι κλώνοι 4_{α} και $5_{\beta\text{cons}}$ ήταν αυτοί που έφεραν τα επιθυμητά ανασυνδυασμένα πλασμίδια με τα αντίστοιχα γονίδια. Ο ανασυνδυασμός του πλασμιδίου με τα δύο γονίδια πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις λιγάσης. Με μια πρώτη αντίδραση λιγάσης έγινε μια προσπάθεια σύνδεσης των δύο απομονωμένων γονιδίων. Η αντίδραση αυτή βασίζεται στο ότι τα δύο γονίδια έχουν συμπληρωματικά άκρα μεταξύ τους, που προκύπτουν από τη δράση του περιοριστικού ενζύμου XbaI και έτσι υπάρχει η δυνατότητα να συνδεθούν μεταξύ τους.(εικόνα 22).



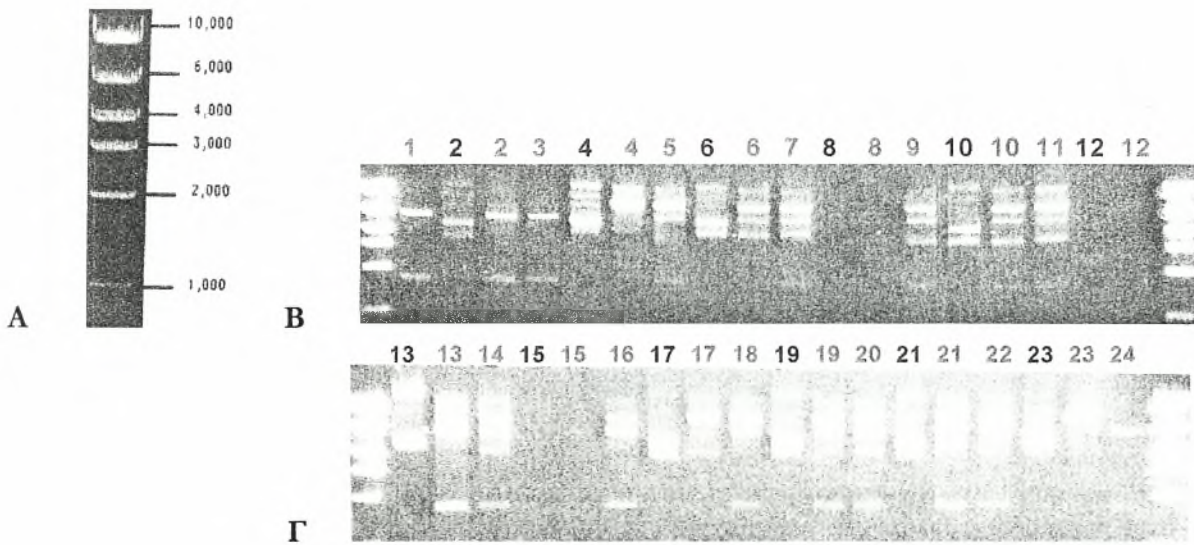
Εικόνα 22: Αντίδραση λιγάσης για τη σύνδεση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS του *M.thermoautotrophicum*

Έπειτα, το προϊόν της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιείται για τον ανασυνδυασμό του πλασμιδιακού φορέα pET11b, σε μια δεύτερη αντίδραση λιγάσης. Ο πλασμιδιακός φορέας pET11b φέρει συμπληρωματικά άκρα με το τμήμα DNA που προκύπτει από την πρώτη αντίδραση. Τα άκρα αυτά προέκυψαν από τη δράση των περιοριστικών ενζύμων NdeI και BamHI (εικόνα 23).



Εικόνα 23: Αντίδραση λιγάσης για τη σύνδεση του προϊόντος της προηγούμενης αντίδρασης με τον πλασμιδιακό φορέα pET11b

Επιδεικτικά κύτταρα μετασχηματίστηκαν με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που είχε αμπικιλίνη, διότι ο pET11b φέρει γονίδιο για ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό. Από τους μετασχηματισμένους κλώνους επιλέχτηκαν οι 24 πιο ευμεγέθεις και απομονώθηκε το πλασμιδιακό τους DNA. Για τον προσδιορισμό των αποικιών που είχαν μετασχηματιστεί με πλασμίδιο που έφερε τα δύο γονίδια συνδεδεμένα μεταξύ τους ακολούθησε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και BamHI του πλασμιδιακού DNA των επιλεγμένων κλώνων. Σύμφωνα με την χάρτη των θέσεων αναγνώρισης των δύο περιοριστικών ενζύμων πάνω στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, αναμενόταν μετά την πέψη του πλασμιδιακού DNA να προκύψει μια ζώνη περί τις 2.0kb. Ωστόσο, σε κανένα από τα δείγματα δεν παρατηρήθηκε ζώνη αντίστοιχου μεγέθους. Υπήρχαν κάποιοι κλώνοι που είχαν μετασχηματιστεί με πλασμίδιο που έφερε πιθανώς μόνο το γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα, καθώς εμφανίζεται μια ζώνη περί τις 1600 με 1700bp (εικόνα 24 Β.Γ). Υπάρχει βέβαια το ενδεχόμενο το τμήμα αυτό να μην είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα, αλλά βάσει του χάρτη των θέσεων κοπής των περιοριστικών ενζύμων δεν μπορεί να δοθεί άλλη προφανής εξήγηση.



Εικόνα 24: (Α) Ο μάρτυρας μεγέθους που ηλεκτροφορήθηκε μαζί με τα δείγματα. (Β) Τα προϊόντα της πέψης του πλασμιδιακού DNA των 12 από τους επιλεγμένους κλώνους με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και BamHI. Κανένα δείγμα δε φέρει το επιθυμητό τμήμα των 2.0kb που αντιστοιχεί στα συνδεδεμένα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β_{cons} . (Γ) Τα προϊόντα της πέψης του πλασμιδιακού DNA των υπολοίπων 12 από τους επιλεγμένους κλώνους. Και στην περίπτωση αυτή κανένα δείγμα δε φέρει το επιθυμητό τμήμα των 2.0kb. Οι κόκκινοι αριθμοί αντιστοιχούν στα δείγματα που υπέστησαν πέψη. Οι μπλε αντιστοιχούν στα δείγματα πλασμιδιακού DNA που δεν υπέστησαν πέψη.

3.3 Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS του *Geobacillus stearothermophilus*

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS του *G.stearothermophilus* αντλήθηκε από την ψηφιακή βάση δεδομένων T.I.G.R. (εικόνα 25). Με βάση την αλληλουχία αυτή σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου. Στα άκρα τους προστέθηκαν τα κατάλληλα νουκλεοτίδια ώστε να προκύψουν θέσεις αναγνώρισης για τα περιοριστικά ένζυμα NdeI στο νοσηματικό εκκινητή και BamHI στον αντινοσηματικό.

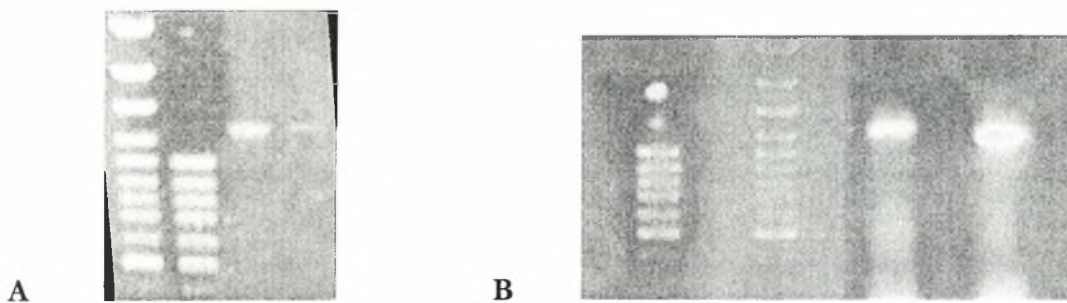
```

|atggattgcttgccggaattgccaatggccggggdctgtcaaccaaacgacggatgagaagccgggtgcgcaactgttaaataggagcgggtgacgctctactg
cgggtttgacccgacggccgggacagactttgcatacggccaactggccaccatttgacgatgcgcgctccagcaggccggcaccggccgatcgctdtagtcgg
cggagcgcacgggggttgcacggcgaaccggagcgggaaaagaagcagcgcacgctcaetgccaagaacaacggctcgagcgcattggagcgcgctatgaaag
aacgctcgcccgttttagatttgaagcggagcggcaatccggcgaaaatacaaaaaacacacgactgacgcccggcggctggaatgctatttcttggcggcga
cgctcggcaagcaatccaactcaactcagatggcggaaagagtcgtcaactgcgcatcgagagccggcattcaatcaacggctcagctatgatgctcagcag
gcatacgaatttcccgctgtacgagcgggaagcggcgcctgcacaatgcccggagccgacaaatggggcaacatcacggcaggcggctgagcttattcgcga
aaacgaaaaggcagggcgcgggcttggcctgaagatcccgctgtgacgaaagcggagggcaccgaatcgggaaaacggaaaagcggcaccgatttggctc
gacaagagaaaacgctcgcctgaagcggtttaccagtttggatcaacaccgatgaccgcatgtgatacgttactgaagcggcctcctgcgaaagagga
aatcgaagcgttgaaacaaagatcgtgagccccagagaaagggggcgcccaaaagacgttgctgaggaagtgaacaagcgtgcacggcggaaaga
ggcgtcagcgaagcgaatcgcattctgaagcgtatgacggcgacatggccaatggacagcggcgaaatgagcaagggttcaaaagatgaccgctacc
gttcatgaaaggaagcggcgccttccgctgtagctgctcgttcgcggcatttcgccatcgaaagcagcaagcggcagcaaacgacatcccaaaacggcaccattac
gtcaaacggcggagccttcaagcgcctggaacatattaacggcctgaacaccgctgaggggcgggttaccggctacggcgggaagaaaaagttattattt
gattcgtcaccgctaaa|

```

Εικόνα 25: Η αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS του *G.stearothermophilus*. Εντός των πλαισίων βρίσκονται οι περιοχές δέσμευσης των εκκινητών.

Για την ενίσχυση του γονιδίου πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο γενωμικό DNA του *G.stearothermophilus*. Παρασκευάζοντας διαφορετικά μίγματα ελέγχθηκε η δράση τριών πολυμερασών, Phusion, Taq και Pfu turbo. Οι δύο πρώτες πολυμεράσες έδωσαν το αναμενόμενο προϊόν στις 1.3 kb και η Phusion είχε την καλύτερη απόδοση (εικόνα 26A).



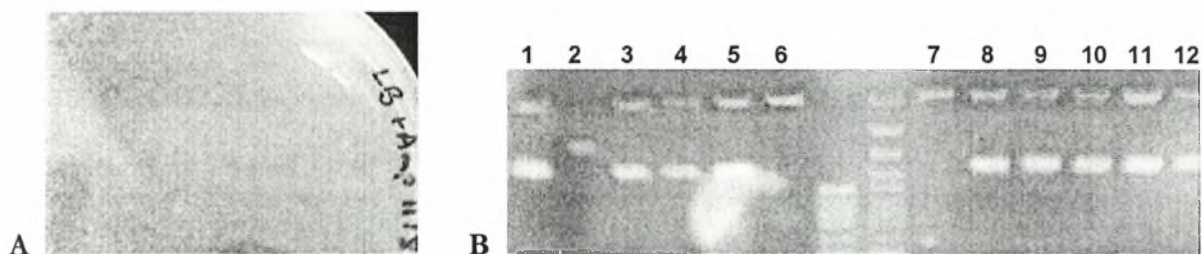
Εικόνα 26: (A) Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS του *B.stearothermophilus*. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA του μικροοργανισμού. Στην πρώτη στήλη απεικονίζεται το προϊόν του δείγματος στο οποίο χρησιμοποιήθηκε Phusion DNA πολυμεράση και στη δεύτερη το προϊόν του δείγματος που περιείχε Taq. Η Phusion είχε καλύτερη επίδοση από την Taq σύμφωνα με τη φωτεινότητα των ζωνών. Η Pfu Turbo δεν έδωσε το επιθυμητό αποτέλεσμα. (B) Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την TyrRS. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του μικροοργανισμού. Στην πρώτη στήλη είναι το προϊόν της αντίδρασης χωρίς DMSO και στη δεύτερη στήλη με DMSO. Το DMSO ενίσχυσε τα αποτελέσματα της αντίδρασης.

Για βελτιστοποίηση της ενίσχυσης του γονιδίου πραγματοποιήθηκε μια εναλλακτική αντίδραση PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο κύτταρα του μικροοργανισμού. Τα κύτταρα υπέστησαν λύση σε μια επώαση σε υψηλή θερμοκρασία πριν από την αντίδραση PCR. Έτσι, το χρωμοσωμικό τους DNA απογυμνώθηκε και ήταν άμεσα προσβάσιμο από την πολυμεράση και τους υπόλοιπους παράγοντες της RCR. Ο πολυμερισμός πραγματοποιήθηκε με την Taq DNA πολυμεράση και σε ένα δείγμα προστέθηκε DMSO για να ελεγχθεί η επίδραση του στην απόδοση της αντίδρασης. Το δείγμα που περιείχε το DMSO είχε καλύτερη απόδοση από το άλλο (εικόνα 26B). Σύμφωνα με την ποσοτικοποίηση των απομονωμένων DNA τμημάτων μετά τον καθαρισμό τους από το πήκτωμα αραρόζης, η εναλλακτική αντίδραση έδωσε προϊόντα μεγαλύτερης συγκέντρωσης αν και οι αρχικές παράμετροι δε διέφεραν από την αντίδραση PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA.

Το ενισχυμένο γονίδιο κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα p-GEM και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων. Το πλασμίδιο p-GEM T Easy φέρει ως μάρτυρα επιλογής το γονίδιο της β λακταμάσης που προσδίδει στο βακτήριο που το διαθέτει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Επιπλέον φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης σε τέτοια θέση ώστε το γονίδιο να απενεργοποιείται όταν η ένθεση γίνεται με το σωστό τρόπο. Τα βακτήρια που αναπτύσσονται παρουσία αμπικιλίνης φέρουν το πλασμίδιο pGEM-T. Μεταξύ των προϊόντων της αντίδρασης λιγάσης υπάρχουν και επανακυκλοποιημένα μόρια πλασμιδίου χωρίς ένθετο. Τα βακτήρια που φέρουν τέτοιο πλασμίδιο διαθέτουν ενεργό το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης και έτσι μπορούν να μεταβολίσουν το ανάλογο της λακτόζης, X-Gal, που υπάρχει στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, και να δώσουν μπλε ουσία ως παραπροϊόν (5-bromo-4-chloro-indigo) χρωματίζοντας τις βακτηριακές αποικίες. Οι λευκές αποικίες ανήκουν στα βακτήρια που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (εικόνα 27A).

Η επιλογή των λευκών αποικιών, η ακόλουθη ανάπτυξη των κλώνων αυτών και η απομόνωση και πέψη του πλασμιδιακού του DNA έδωσε τη δυνατότητα ελέγχου της ύπαρξης ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με το επιθυμητό γονίδιο. Συγκεκριμένα, μετά την πέψη του πλασμιδιακού DNA των

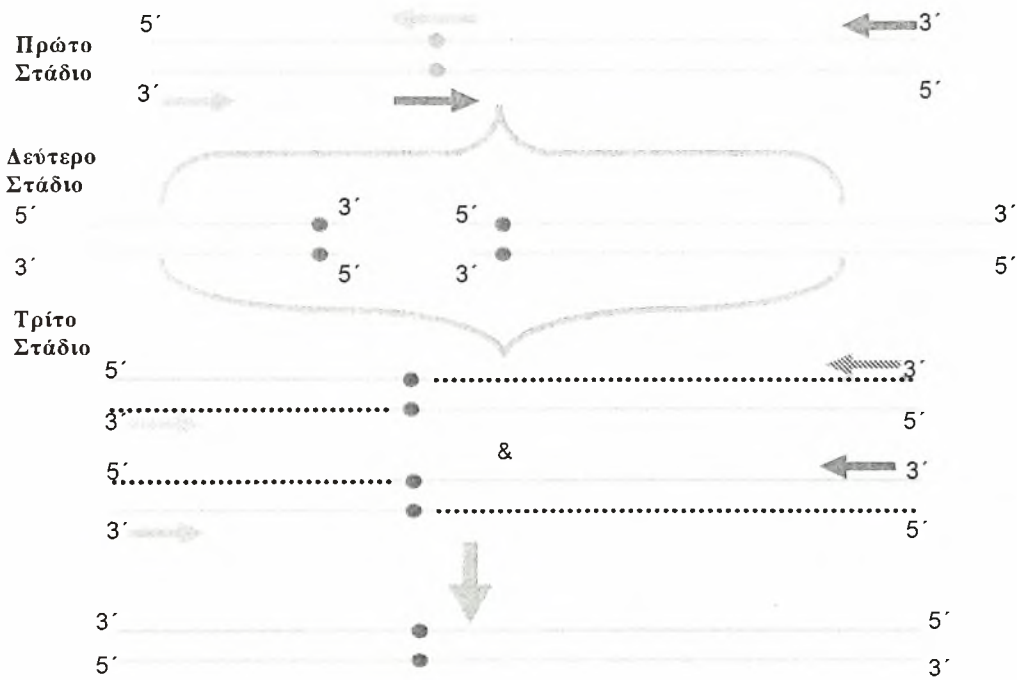
δώδεκα επιλεγμένων κλώνων με τα ένζυμα NdeI και BamHI ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και βρέθηκε ότι το 75% των κλώνων (9 στους 12 κλώνους) έφεραν πλασμίδιο ανασυνδυασμένο με το υπό μελέτη γονίδιο (εικόνα 27B). Στις στήλες που ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της πέψης του πλασμιδιακού DNA των θετικών κλώνων εμφανίστηκε μια ζώνη στις 1.3kb που αντιστοιχεί στο ενισχυμένο γονίδιο που κωδικοποιεί την TyrRS. Η ύπαρξη ψευδολευκών αποικιών πιθανότατα οφείλεται στην ενσωμάτωση παραπροϊόντων στο πλασμίδιο ή σε αλλοίωση του Xgal λόγω μερικής έκθεσης στο φως, καθώς η ουσία αυτή είναι φωτοευαίσθητη.



Εικόνα 27: (A) Οι λευκές αποικίες που απεικονίζονται στο εσωτερικό του τρυβλίου είναι κλώνοι που πιθανώς έχουν μετασχηματιστεί με το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. (B) Η πέψη του πλασμιδιακού DNA των 12 επιλεγμένων κλώνων με τα ένζυμα περιορισμού NdeI, BamHI έδειξε ότι το 75% αυτών έχει μετασχηματιστεί με πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί την TyrRS.

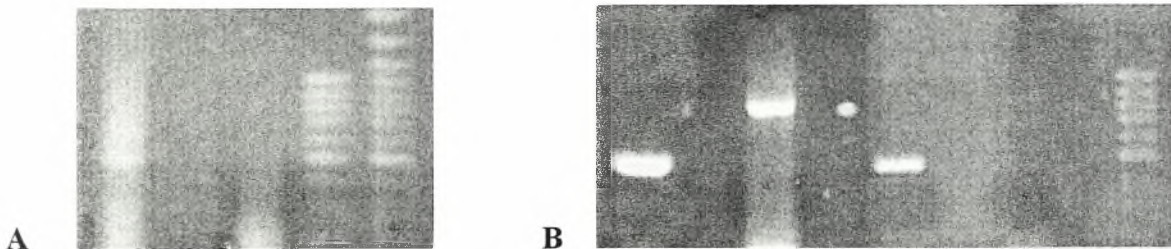
Για την εισαγωγή των επιθυμητών μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί την TyrRS σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών. Η ζητούμενη μετάλλαξη είναι στη θέση 152, ένα γλουταμινικό οξύ να αντικατασταθεί με αλανίνη ή αργινίνη. Για το σκοπό αυτό σχεδιάζονται εκκινητές οι οποίοι φέρουν την τριπλέτα της μετάλλαξης για την κωδικοποιούσα και τη μη κωδικοποιούσα αλυσίδα και έχουν επιπλέον από τις δύο μεριές της τριπλέτας αυτής από 10 τουλάχιστον νουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς την αντίστοιχη περιοχή που περιβάλλει τη θέση της μετάλλαξης. Έτσι, αρχικά σχεδιάζεται το ένα ζεύγος των εκκινητών εκ των οποίων ο ένας είναι συμπληρωματικός με την αλληλουχία γύρω από τη θέση της επιθυμητής μετάλλαξης της μη κωδικοποιούσας αλυσίδας και φέρει την τριπλέτα για την εισαγωγή της μετάλλαξης σε αλανίνη (νοσηματικός εκκινητής, Ala sense) και ο δεύτερος είναι συμπληρωματικός με την αντίστοιχη περιοχή της κωδικοποιούσας αλυσίδας και φέρει την τριπλέτα της μετάλλαξης (αντινοσηματικός εκκινητής, Ala antisense). Με το ίδιο ακριβώς σκεπτικό σχεδιάζονται και οι εκκινητές για την εισαγωγή της μετάλλαξης της αργινίνης.

Η μεταλλαξιγένεση πραγματοποιήθηκε μέσω επέκτασης των επικαλυπτόμενων εκκινητών με αντίδραση PCR (εικόνα 28). Η μέθοδος αυτή στοχεύει αρχικά στην ενίσχυση με αντίδραση PCR δύο τμημάτων που φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη. Αθροιστικά το μέγεθος των τμημάτων αυτών είναι λίγο μεγαλύτερο από το συνολικό μέγεθος του γονιδίου, διότι επικαλύπτονται στην περιοχή της μετάλλαξης. Τα τμήματα αυτά χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο σε μια δεύτερη αντίδραση PCR. Κατά την αντίδραση αυτή οι αντιπαράλληλοι κλώνοι, ένας από κάθε τμήμα, υβριδοποιούνται στην περιοχή της επικάλυψης και ακολουθεί ενίσχυση του γονιδίου που φέρει πλέον τη μετάλλαξη.



Εικόνα 28: Θέση-κατευθυνόμενη μετάλλαξη με επέκταση επικαλυπτόμενων εκκινητών.

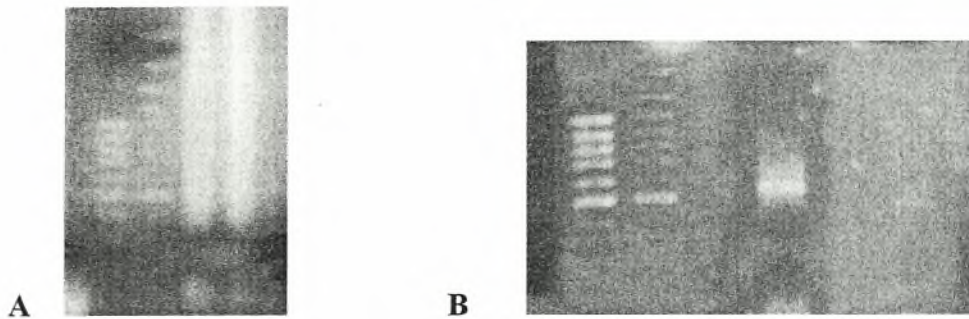
Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το ενισχυμένο γονίδιο και οι εκκινητές για την εισαγωγή της μετάλλαξης. Για την αντίδραση παρασκευάστηκαν τέσσερα μίγματα με σκοπό ανά δύο να δώσουν τα επικαλυπτόμενα τμήματα για την κάθε μετάλλαξη. Πράγματι, το πρώτο, με τη σειρά που περιγράφονται στην παράγραφο 2.3.4, έδωσε την ζώνη των ~500bp για τη μετάλλαξη της αλανίνης και το δεύτερο τη ζώνη των ~800bp για την ίδια μετάλλαξη. Αντίστοιχα τα μίγματα τρία και τέσσερα έδωσαν τα τμήματα των ~500bp και ~800bp για τη μετάλλαξη της αργινίνης (εικόνα 29Α).



Εικόνα 29: Προϊόντα της PCR δευτέρου σταδίου. Σε όλες τις περιπτώσεις οι δύο πρώτες στήλες αντιστοιχούν στη μετάλλαξη της αλανίνης, στα τμήματα των ~500bp και ~800bp, αντίστοιχα, ενώ οι δύο τελευταίες στήλες στα αντίστοιχα τμήματα για τη μετάλλαξη της αργινίνης. (Α) Από την πρώτη αντίδραση για την εισαγωγή της μετάλλαξης προέκυψαν τα μεταλλαγμένα τμήματα για την υποκατάσταση σε αλανίνη και αργινίνη αλλά σε μικρή συγκέντρωση (Β) Μια νέα αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε για την εισαγωγή της μετάλλαξης. Για τις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε ενισχυμένο γονίδιο από την PCR στην οποία είχαν χρησιμοποιηθεί κύτταρα. Το τμήμα των 800bp για τη μετάλλαξη της αργινίνης δεν είναι εμφανές στην εικόνα αλλά ήταν αμυδρά ορατό με γυμνό οφθαλμό.

Οι ζώνες που αντιστοιχούν στα επικαλυπτόμενα τμήματα που φέρουν τη μετάλλαξη δεν ήταν αρκετά έντονες. Έτσι, πραγματοποιήθηκε εκ νέου μια αντίδραση PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το ενισχυμένο γονίδιο από την εναλλακτική αντίδραση, στην οποία είχαν χρησιμοποιηθεί κύτταρα. Η αντίδραση αυτή έδωσε τα αναμενόμενα προϊόντα σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (εικόνα 29B).

Σε τελικό στάδιο τα τμήματα DNA που έφεραν τη μετάλλαξη χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για την ενίσχυση του γονιδίου με την επιθυμητή μετάλλαξη. Στο πήκτωμα που ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της PCR δεν εμφανίζονταν ζώνες συγκεκριμένου μεγέθους, αλλά σε όλες τις στήλες υπήρχαν παραπροϊόντα από το πηγαδάκι ως το σημείο που διακόπηκε η ηλεκτροφόρηση (εικόνα 30A). Μια δεύτερη προσπάθεια ενίσχυσης του μεταλλαγμένου γονιδίου είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση ενός τμήματος περίπου 600bp, αλλά όχι του επιθυμητού γονιδίου (εικόνα 30B).



Εικόνα 30: Τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του μεταλλαγμένου γονιδίου. (A) Η πρώτη προσπάθεια είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση παραπροϊόντων σε όλο το μήκος της στήλης στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα. (B) Η δεύτερη αντίδραση είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση ενός τμήματος περίπου 600bp, αλλά όχι του επιθυμητού γονιδίου στις 1.3kb.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι αντιδράσεις των δύο πρώτων σταδίων επαναλήφθηκαν πολλές φορές αλλά μετά από κάποιο διάστημα τα αποτελέσματα τους δεν ήταν επαναλήψιμα. Με βάση τα αποτελέσματα των αντιδράσεων- μαρτύρων, που είχαν ελεγχθεί παλαιότερα και είχαν σταθερά αποτελέσματα, βρέθηκε ότι στις περισσότερες των περιπτώσεων ευθύνονταν τα ένζυμα πολυμερισμού ή τα dNTPs. Προς το τέλος των επαναληπτικών αντιδράσεων υπήρχε η υποψία ότι είχαν υδρολυθεί οι εκκινητές και συντέθηκαν νέοι με την ίδια αλληλουχία.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών διασφαλίζουν την ακρίβεια και την πιστότητα της μετάφρασης των κωδικονίων. Οι AARSs επιδιορθώνουν τα σφάλματα που οι ίδιες προκαλούν μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Μέχρι σήμερα έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο μηχανισμός του διπλού κόσκινου/επιλογέα (double sieve) της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της ισολευκίνης (PheRS)^{34,35}, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός της ενζυμικής αυτής οικογένειας. Κατά την πρώτη επιλεκτική διαδικασία η PheRS αποκλείει τα αμινοξέα μεγαλύτερου μεγέθους από την ισολευκίνη. Η βαλίνη που είναι μικρότερου μεγέθους όμως ενεργοποιείται. Η PheRS με προ-μεταφοράς τροποποίηση υδρολύει την εσφαλμένα ενεργοποιημένη βαλίνη στο στάδιο του αμινοάκυλο-αδενυλικού συμπλόκου. Εναλλακτικά, επιδιορθώνει το σφάλμα με μετα-μεταφοράς τροποποίηση όταν η βαλίνη έχει ήδη εστεροποιηθεί στο μόριο tRNA και το κακοφορητισμένο Val-tRNA^{le} είναι προσδεδεμένο με τη συνθετάση. Εξίσου μελετημένος είναι και ο μηχανισμός επιδιόρθωσης της ThrRS, που έχει και αυτός διττή φύση. Η ThrRS φέρει στο ενεργό της κέντρο ένα ιόν ψευδαργύρου. Το ιόν αυτό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον αποκλεισμό της βαλίνης λόγω της διαφορετικότητας της πλευρικής της ομάδας που δεν της επιτρέπει να σχηματίσει τους κατάλληλους δεσμούς³⁶. Στην περίπτωση της σερίνης όμως ο αρχικός αποκλεισμός δεν είναι εφικτός και για το λόγο αυτό μόρια tRNA^{Thr} κακοφορτίζονται με το συγκεκριμένο αμινοξύ. Το σφάλμα επιδιορθώνεται από την ThrRS μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από το μόριο tRNA, το οποίο ουσιαστικά μετακινεί το λανθασμένα εστεροποιημένο άκρο του στην περιοχή ελέγχου, όπου και επιδιορθώνεται το σφάλμα³⁷. Ο τρίτος μηχανισμός επιδιόρθωσης που έχει σε κάποιο βαθμό προσδιοριστεί είναι η tRNA-εξαρτώμενη υδρόλυση των μη συγγενών αμινοάκυλο-αδενυλικών συμπλόκων που είναι προσδεδεμένα στη συνθετάση. Ο μηχανισμός αυτός έχει περιγραφεί κυρίως για τη MetRS, που επιδιορθώνει την εσφαλμένα ενεργοποιημένη ομοκυστεΐνη³⁸. Στη διαδικασία αυτή το κρίσιμο στάδιο είναι η κυκλοποίηση της ομοκυστεΐνης από την οποία προκύπτει θειολακτόνη.

Εκτός από τις συνθετάσες, στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης εμπλέκονται σε πολλές περιπτώσεις και κάποιες άλλες πρωτεΐνες που δρουν αυτόνομα. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με τα γονίδια που κωδικοποιούν τις AARS. Θεωρείται ότι τα γονίδια αυτά προέκυψαν κατά την εξέλιξη μέσω διπλασιασμών γονιδίων και ο κύριος ρόλος τους είναι, στις περισσότερες των περιπτώσεων, η ενίσχυση της εξειδίκευσης και της επιδιορθωτικής δράσης των συνθετασών¹⁵. Οι γενωμικές αναλύσεις των γονιδιωμάτων, που είναι μέχρι σήμερα γνωστά, συνεχώς αποκαλύπτουν την ύπαρξη τέτοιων γονιδίων που η δράση τους θα πρέπει να διερευνηθεί. Όπως προαναφέρθηκε οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών είναι ποικίλοι και δρουν σε διάφορα στάδια της αντίδρασης της αμινοακυλίωσης. Η μελέτη, λοιπόν, του ρόλου των ομόλογων προς τις συνθετάσες πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την διερεύνηση των επιδιορθωτικών μηχανισμών των συνθετασών θα μπορούσε να βοηθήσει στο λεπτομερή προσδιορισμό των βιοχημικών μονοπατιών που εμπλέκονται στις διεργασίες αυτές.

Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της φαινυλαλανίνης παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση σύμφωνα με *in vitro* και *in vivo* μελέτες. Η εξειδίκευση της οφείλεται όχι μόνο στην επιλεκτική δέσμευση των συγγενών υποστρωμάτων αλλά και στον επιδιορθωτικό της μηχανισμό⁴⁵. Πολλές από τις περιοχές της συνθετάσης που εμπλέκονται σε αυτόν έχουν προσδιοριστεί αλλά η ακριβής διαδικασία μέσω της οποίας η PheRS επιδιορθώνει τα σφάλματα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η προετοιμασία των απαιτούμενων παραγόντων για τη διερεύνηση του επιδιορθωτικού μηχανισμού

της συνθετάσης αυτής με *in vitro* και *in vivo* αναλύσεις. Για το σκοπό αυτό αρχικά ενισχύθηκαν, κλωνοποιήθηκαν και έγινε μια προσπάθεια να εκφραστούν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της PheRS του *E.coli*. Στο συγκεκριμένο στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε, το γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα φέρει μια συγκεκριμένη υποκατάσταση στη θέση 294, από αλανίνη σε γλυκίνη (A294G). Η μετάλλαξη αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για την εξειδίκευση της PheRS ως προς την επιλογή του συγγενούς αμινοξέος, όπως έχει περιγραφεί⁴¹. Ακολούθως, ενισχύθηκε και κλωνοποιήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα της PheRS του *Methanobacterium thermoautotrophicum* καθώς και ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια συντηρημένη πρωτεΐνη. Το γονίδιο αυτό (αναφέρεται ως γονίδιο που κωδικοποιεί τη β_{cons} υπομονάδα) παρουσιάζει ομολογία με το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β υπομονάδα της PheRS του ίδιου αρχαίου. Ωστόσο, η δράση της συντηρημένης πρωτεΐνης παραμένει άγνωστη. Τελικός στόχος ήταν τα δύο γονίδια να συνενωθούν μεταξύ τους σε ένα φορέα έκφρασης και να αποτελέσουν ένα οπερόνιο, δηλαδή να ελέγχεται η έκφρασή τους από τον ίδιο προαγωγέα. Έτσι θα ήταν εφικτός τόσο ο προσδιορισμός της δράσης της β_{cons} υπομονάδας όσο και ο έλεγχος της πιθανής εμπλοκής της στον μηχανισμό επιδιόρθωσης της PheRS.

Η ενίσχυση του τμήματος που περιλαμβάνει τα γονίδια που κωδικοποιούν τη μεταλλαγμένη (A294G) α και τη β υπομονάδα της PheRS του *E.coli* πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ακολούθησε κλωνοποίησή του σε πλασμιδιακό φορέα TOPO. Και τα δύο αυτά στάδια ήταν επιτυχή και μετά το μετασχηματισμό των κυττάρων υπήρχαν θετικοί ως προς το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο κλώνοι. Ακολούθως, για να εκφραστούν τα γονίδια μεταφέρθηκαν σε ένα πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET11b. Με το ανασυνδυασμένο αυτό πλασμίδιο μετασχηματίστηκαν κύτταρα *S.cerevisiae*. Τα κύτταρα αυτά αναπτύχθηκαν στους 30°C για τον προβλεπόμενο από το πρωτόκολλο χρόνο. Χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο θρεπτικό μέσο επιλογής που δεν περιείχε τρυπτοφάνη, ώστε να επιζήσουν μόνο οι μετασχηματισμένοι κλώνοι. Η επιλογή αυτή βασίζεται στο ότι το συγκεκριμένο στέλεχος του ζυμομύκητα είναι αυξότροφο ως προς την τρυπτοφάνη και ο πλασμιδιακός φορέας pET11b φέρει τα γονίδια για τη σύνθεση του αμινοξέος αυτού.

Αν και εφαρμόστηκαν οι προτεινόμενες συνθήκες τα κύτταρα του ζυμομύκητα χρωματίστηκαν ροζ κατά την ανάπτυξή τους. Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτικές συνθήκες, δεν παραγόταν οι δύο υπομονάδες της PheRS σε κανέναν από τους κλώνους. Εξίσου παράδοξο θεωρήθηκε και το γεγονός ότι η ανάπτυξη των κυττάρων ήταν ιδιαίτερα αργή και στο ηλεκτρογράφημα παρουσιάστηκαν πολύ λιγότερες ζώνες πρωτεϊνών από ότι αναμενόταν, για ένα φυσιολογικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο κυττάρων ζυμομύκητα. Τελικά, διαπιστώθηκε ότι το συγκεκριμένο στέλεχος του *S.cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκε, όπως φαίνεται και από το γονότυπο του (ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ), δεν έφερε το γονίδιο ADE2. Το γονίδιο αυτό χρησιμοποιείται ως μάρτυρας διότι απουσία του ενζύμου που κωδικοποιεί διακόπτεται το μονοπάτι βιοσύνθεσης της αδενίνης και τα κύτταρα χρωματίζονται ροζ. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι το θρεπτικό μέσο δεν περιείχε διφωσφορονουκλεοτίδια αδενίνης έδωσαν τα στοιχεία για τη επεξήγηση του φαινομένου που παρατηρήθηκε. Καθώς λοιπόν από το θρεπτικό υπόστρωμα εξέλειπαν τα dATPs, τα κύτταρα για την αντιγραφή του γενωμικού τους DNA και τη μεταγραφή των γονιδίων τους επιστράτευαν τον ενδογενή μηχανισμό παραγωγής των συγκεκριμένων μορίων. Ωστόσο από το μονοπάτι αυτό έλειπε το ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο ADE2. Το ένζυμο αυτό έχει δράση φωσφοριβοσυλογλυκοναμίδινο

συνθετάσης. Η έλλειψη του έχει ως αποτέλεσμα το μονοπάτι της βιοσύνθεσης της συγκεκριμένης πουρίνης να διακόπτεται στο σημείο που δρα το ένζυμο αυτό και να συσσωρεύεται το μεταβολικό ενδιάμεσο 5-phosphoribosyl-aminimidazole στο εσωτερικό των κυττάρων του ζυμομύκητα. Η ουσία αυτή έχει χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα και ευθύνεται για τη ροζ απόχρωση των κυττάρων.

Εναλλακτικά, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα διαφορετικής σύστασης θρεπτικό υπόστρωμα. Το θρεπτικό αυτό μέσο θα πρέπει να μην περιέχει τρυπτοφάνη, ώστε να είναι παράλληλα και μέσο επιλογής των κυττάρων που δε μετασχηματίστηκαν. Επιπλέον, θα πρέπει να περιέχει αδενίνη, ώστε τα μετασχηματισμένα κύτταρα να μη χρειάζεται να ενεργοποιούν το ενδογενές μονοπάτι και δημιουργούνται όλα τα προβλήματα που περιγράφηκαν παραπάνω. Αν τα μετασχηματισμένα κύτταρα του ζυμομύκητα αναπτυχθούν σε ένα τέτοιο θρεπτικό υπόστρωμα θα παράγουν τις απαραίτητες για αυτά πρωτεΐνες και μεταξύ αυτών τη μεταλλαγμένη α υπομονάδα και τη β υπομονάδα της PheRS του *E.coli*. Έπειτα, με μια ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες θα είναι δυνατή η επιβεβαίωση της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Επόμενο βήμα θα αποτελέσει ο καθαρισμός ολόκληρου του ενζύμου από το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των μετασχηματισμένων κλώνων. Τέλος, θα μπορεί να προσδιοριστεί η ενζυμική του δραστηριότητα και να ελεγχθεί η επιδιορθωτική του δράση. Καθώς η υπομονάδα α φέρει τη μετάλλαξη A294G, η PheRS θα ενεργοποιεί τυροσίνη και αναμένεται έπειτα να υδρολύει τα τυροσουλ-αδενυλικά σύμπλοκα. Στην υπόθεση αυτή στηρίζεται και η μελέτη του μηχανισμού επιδιόρθωσης με *in vitro* αναλύσεις ώστε να προσδιοριστεί όχι μόνο αυτός καθ' αυτός ο μηχανισμός αλλά και τα τμήματα της συνθετάσης που εμπλέκονται, σε κάποιο βαθμό, στην επιδιόρθωση του σφάλματος.

Οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν ομολογία με τις αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες, όπως έχει ήδη περιγραφεί, συμμετέχουν συχνά στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των συνθετασών. Στο γονιδίωμα του αρχαίου *M.thermoautotrophicum* έχει ανιχνευτεί ένα γονίδιο που παρουσιάζει ομολογία με το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β υπομονάδα της PheRS του μικροοργανισμού αυτού. Η δράση του προϊόντος του ενζύμου αυτού, που αναφέρεται ως β_{cons} υπομονάδα, παραμένει άγνωστη. Για τον προσδιορισμό του ρόλου του, το γονίδιο αυτό ενισχύθηκε και κλωνοποιήθηκε παράλληλα με το γονίδιο που κωδικοποιεί την α υπομονάδα της ίδιας συνθετάσης. Για να ελεγχθεί η πιθανή εμπλοκή της υπομονάδας β_{cons} στην αντίδραση της αμινοακυλίωσης ή σε κάποιο σημείο του επιδιορθωτικού μηχανισμού της PheRS έγινε μια προσπάθεια το γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα α και εκείνο που κωδικοποιεί την υπομονάδα β_{cons} να τεθούν υπό τον έλεγχο του ίδιου προαγωγέα. Για το σκοπό αυτό επιχειρήθηκε η τμηματική συρραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τις δύο υπομονάδες και ακολούθως η εισαγωγή του τμήματος αυτού σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης. Στην πρώτη αντίδραση αναμενόταν να συνενωθούν τα δύο γονίδια λόγω συμπληρωματικών άκρων και στη δεύτερη το ανασυνδυασμένο τμήμα να συνδεθεί με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης. Διάφορα τμήματα DNA φάνηκε να συνδέονται μεταξύ τους στην αντίδραση λιγάσης αλλά όχι τα επιθυμητά. Με βάση το χάρτη των θέσεων κοπής των ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν αναμενόταν ένα τμήμα περί τις 2.0kb που θα υποδείκνυε την ύπαρξη μετασχηματισμένων κλώνων με το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Καμία όμως πέψη πλασμιδιακού DNA δεν είχε το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Έγιναν πολλές ακόμα προσπάθειες για τη συνένωση των γονιδίων αλλά πάντα τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια παρά τις μεταβολές των παραμέτρων.

Θεωρήθηκε ότι η βασική αιτία της αδυναμίας σύνδεσης των μορίων ήταν η καθαρότητα των DNA τμημάτων των γονιδίων που είχαν απομονωθεί από τα πηκτώματα αγαρόζης. Πραγματοποιήθηκαν διάφορες εναλλακτικές μέθοδοι ώστε να αυξηθεί η καθαρότητα των μορίων και να επιτευχθεί η σύνδεση μεταξύ τους αρχικά και έπειτα με το φορέα έκφρασης. Στην περίπτωση που η συνένωση των γονιδίων είναι επιτεύξιμη αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασής τους ως μια πρωτεΐνη. Έπειτα, με μια ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων των μετασχηματισμένων κλώνων σε αποδιατακτικές συνθήκες και εφαρμογή της τεχνικής της ανοσοαποτύπωσης (Western blot) θα επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των υπομονάδων στο εσωτερικό των κυττάρων. Η χρήση εξειδικευμένων αντισωμάτων προσδιορίζει την ύπαρξη ή μη των υπό μελέτη πρωτεϊνών καθώς δίνει τη δυνατότητα εξειδικευμένης ανίχνευσης πρωτεϊνών ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις στο κυτταρικό εκχύλισμα. Τα αντισώματα για την τεχνική αυτή θα σχεδιαστούν έτσι ώστε να αναγνωρίζουν ένα μοναδικό επιτόπιο της υπομονάδας β_{cons} . Ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης στην οποία θα δεσμευτεί το αντίσωμα μπορεί να εκτιμηθεί κατά πόσο οι δύο υπομονάδες εκφράζονται σαν μια πολυπεπτιδική αλυσίδα ή αν μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης οι υπομονάδες διαχωρίζονται.

Αν με την εφαρμογή της παραπάνω τεχνικής δεν ανιχνευτούν οι δύο υπομονάδες θα πρέπει να ελεγχθούν και άλλες παράμετροι. Υπάρχει το ενδεχόμενο οι υπομονάδες α και β_{cons} να διαμορφώνουν ένα ένζυμο με δράση συνθετάσης, αλλά με μειωμένη εξειδίκευση. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευση μη συγγενών υποστρωμάτων και τελικά τη σύνθεση κακοφορισμένων μορίων tRNA. Μια τέτοια κατάσταση είναι κρίσιμη για τη βιωσιμότητα των κυττάρων και οδηγεί σε χαμηλούς, ακόμα και μηδαμινούς, ρυθμούς ανάπτυξης. Επιπλέον, το ένζυμο αυτό μπορεί να έχει λανθασμένη διαμόρφωση στο χώρο. Και στις δύο περιπτώσεις, το κύτταρο στην προσπάθειά του να διατηρήσει την ομοιοστάσή του εγκολπώνει το ένζυμο σε μεμβρανικά κυστίδια με σκοπό την αποικοδόμηση ή την εξωκύττωση της πρωτεΐνης. Κατά την επεξεργασία και λύσης των κυττάρων τα κυστίδια αυτά κατακρημνίζονται με το σύνολο των μεμβρανών χωρίς όμως να χάνου την ακεραιότητά τους. Για να διαπιστωθεί η ύπαρξη των υπομονάδων στο ίζημα θα πρέπει αρχικά να πραγματοποιηθεί κατεργασία του για τη λύση των μεμβρανών των κυστιδίων. Ακολούθως, με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες και χρήση αντισωμάτων που δεσμεύονται στη β_{cons} υπομονάδα, μπορεί να ανιχνευτεί η πιθανή ύπαρξη των υπομονάδων. Υπάρχει επίσης η δυνατότητα να εκτιμηθεί, όπως περιγράφηκε παραπάνω, κατά πόσο οι δύο υπομονάδες εκφράζονται ως ένα πολυπεπτιδιο ή προοδευτικά διαχωρίζονται. Εναλλακτικά, με μελέτες αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-πρωτεϊνών μπορεί να ελεγχθεί αν οι δύο αυτές υπομονάδες, α και β_{cons} , αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν ένα ένζυμο. Αν αυτό ισχύει, τότε θα πρέπει να προσδιοριστεί η αντίδραση που καταλύει το ένζυμο αυτό και η δραστηριότητά του. Αν όμως οι δύο υπομονάδες δεν αλληλεπιδρούν τότε θα πρέπει να απομονωθεί η β_{cons} υπομονάδα και να ελεγχθεί η εμπλοκή της αρχικά στην αντίδραση αμινοακυλίωσης ή/και στον επιδιορθωτικό μηχανισμό της PheRS και κατά δεύτερο λόγο σε άλλες διεργασίες του κυττάρου. Η πιθανή εμπλοκή της υπομονάδας β_{cons} στον επιδιορθωτικό μηχανισμό της PheRS μπορεί να μελετηθεί με σύγκριση των επιπέδων αμινοακυλίωσης των μορίων tRNA παρουσία και απουσία της υπομονάδας αυτής.

Η ίδια πορεία πειραμάτων μπορεί να ακολουθηθεί και για την περίπτωση των υπομονάδων α (A294G) και β της PheRS του *E.coli*. Η εκτίμηση ότι οι δύο υπομονάδες δεν εκφράστηκαν στηρίχτηκε στο ηλεκτρογράφημα, ωστόσο δεν μπορεί να θεωρηθεί επακριβώς ενδεικτική. Η εφαρμογή των

τεχνικών που περιγράφηκαν παραπάνω μπορεί να επιβεβαιώσει ή να απορρίψει την υπόθεση αυτή και να δώσει την κατεύθυνση προς την οποία μπορούν να προσανατολιστούν μελλοντικές μελέτες.

Η μελέτη της επιδιορθωτικής δράσης των αμινοκύκλο-tRNA συνθετασών μπορεί να πραγματοποιηθεί *in vitro*. Ουσιαστικά, αυτό που υποδεικνύει την ύπαρξη ενός τέτοιου μηχανισμού είναι η απακυλίωση των κακοφορισμένων μορίων tRNA. Οπότε, βασικό υπόστρωμα για τη διερεύνηση της επιδιορθωτικής δράσης της PheRS είναι τα κακοφορισμένα μόρια tRNA^{Phe}. Τα μόρια αυτά μπορούν να παρασκευαστούν συνθετικά. Σύμφωνα όμως με βιβλιογραφικές αναφορές, η TyrRS του *Bacillus stearothermophilus* όταν φέρει τη μετάλλαξη E152A ή E152R κακοφορτίζει τα μόρια tRNA^{Phe} με τυροσίνη⁵⁰. Τελικά, λοιπόν, προκύπτουν τα κατάλληλα μόρια που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διευκρίνιση του επιδιορθωτικού μηχανισμού της PheRS *in vitro*. Το μεταλλαγμένο γονίδιο δεν είναι πλέον διαθέσιμο οπότε και κρίθηκε απαραίτητη η εκ νέου εισαγωγή της μετάλλαξης στο γονίδιο άγριου τύπου.

Αρχικά το γονίδιο που κωδικοποιεί την TyrRS του *G.stearothermophilus* ενισχύθηκε με αντίδραση PCR, στην οποία ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA του μικροοργανισμού αυτού. Το ενισχυμένο γονίδιο κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα και μετά από μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων επιλέχθηκαν οι θετικοί ως προς το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο κλώνοι. Επόμενος στόχος ήταν η εισαγωγή της θέση-κατευθυνόμενης μετάλλαξης στο κατάλοιπο 152 από γλουταμινικό οξύ σε αλανίνη ή αργινίνη. Για την επίτευξή του πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το ενισχυμένο γονίδιο και τελικά προέκυψαν, όπως αναμενόταν, δύο τμήματα που έφεραν την επιθυμητή μετάλλαξη. Αθροιστικά, το μέγεθός τους ήταν λίγο μεγαλύτερο από αυτό του γονιδίου διότι τα τμήματα αυτά είναι επικαλυπτόμενα στην περιοχή της μετάλλαξης. Στην επόμενη αντίδραση PCR αναμενόταν να ενισχυθεί το μεταλλαγμένο γονίδιο στο σύνολο του αλλά αυτό δεν επιτεύχθηκε. Τα δείγματα σε κάποιες περιπτώσεις περιείχαν παραπροϊόντα, που κατά την ηλεκτροφόρηση κάλυψαν όλο το μήκος του ηλεκτώματος αгарόζης. Επιπλέον, υπήρχαν δείγματα στα οποία δεν είχε ενισχυθεί κανένα τμήμα DNA και κάποια άλλα στα οποία φάνηκε να είχε ενισχυθεί ένα τμήμα περίπου 600bp. Ωστόσο κανένα από τα αποτελέσματα αυτά δεν ήταν το αναμενόμενο.

Η επανάληψη των αντιδράσεων πρώτου και δεύτερου σταδίου αρχικά έδινε τα αναμενόμενα προϊόντα, αλλά από κάποιο σημείο και έπειτα τα αποτελέσματα δεν ήταν επαναλήψιμα. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά ελέγχων για να διαπιστωθεί η καταλληλότητα των αντιδραστηρίων και το αν χρησιμοποιούνταν οι σωστές συγκεντρώσεις αλλά δεν υπήρχε κάποιο σταθερό προφίλ αποτελεσμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν νέοι εκκινητές καθώς και DNA πολυμεράσες και αντικαταστάθηκε το 90% των αντιδραστηρίων. Τελικά, μετά τη βελτιστοποίηση όλων των παραμέτρων και την αντικατάσταση των αντιδραστηρίων επιτεύχθηκε η μέγιστη δυνατή απόδοση των αντιδράσεων. Οπότε, οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν στην αντίδραση PCR για την ενίσχυση του μεταλλαγμένου γονιδίου. Τα αποτελέσματα ήταν συνεχώς παρόμοια: παραπροϊόντα, μια ζώνη στις 600bp ή κανένα ενισχυμένο τμήμα.

Η ύπαρξη παραπροϊόντων υποτέθηκε ότι οφειλόταν στην αυξημένη συγκέντρωση του DNA που χρησιμοποιούταν ως εκμαγείο για την αντίδραση τρίτου σταδίου ή στον μεγάλο αριθμό των κύκλων της PCR. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με μειωμένη συγκέντρωση DNA και τον αρχικό αριθμό κύκλων, με την ίδια συγκέντρωση DNA και μειωμένο αριθμό κύκλων και τέλος αντιδράσεις με

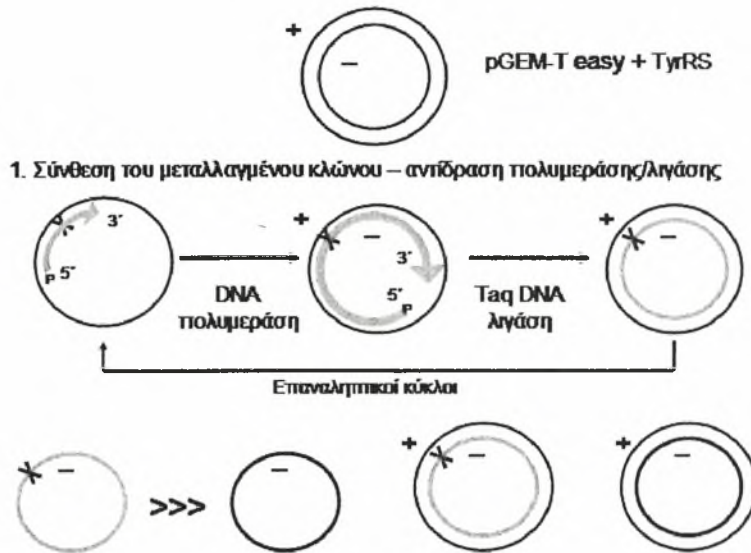
μειωμένη ποσότητα DNA και μειωμένο αριθμό κύκλων. Σε καμία αντίδραση δεν ενισχύθηκε το επιθυμητό γονίδιο.

Η ενίσχυση του τμήματος των 600bp θεωρήθηκε ότι οφειλόταν στο γεγονός ότι ο εκκινητής BamHI antisense παρουσιάζει συμπληρωματικότητα περί το 50% με μια περιοχή που απέχει περίπου 500-600bp από τη θέση δέσμευσης του εκκινητή NdeI sense. Καθώς αυτό το τμήμα είναι πιο σταθερό σε αντίθεση με το συνολικό γονίδιο, υπάρχει περίπτωση οι εκκινητές να προσελκύονται στην περιοχή αυτή την οποία και ενισχύουν και έτσι δεν προκύπτει ως προϊόν το γονίδιο που κωδικοποιεί τη μεταλλαγμένη TyrRS. Για την επίλυση του εν λόγω προβλήματος επαναλήφθηκε η αντίδραση τρίτου σταδίου με αυξημένη συγκέντρωση του αντινοσηματικού εκκινητή. Επίσης, για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκε DNA πρόσφατα ενισχυμένο ώστε να μειωθεί η πιθανότητα να υδρολύονται τα άκρα του μετά από συνεχή ψύξη και απόψυξη. Όλα τα αντιδραστήρια αντικαταστάθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν νέες DNA πολυμεράσες, ώστε να εκμηδενιστεί η πιθανότητα τα προβλήματα να οφείλονται σε κάποιους από τους παράγοντες αυτούς. Παρ' όλα αυτά και πάλι δεν προέκυψε το επιθυμητό αποτέλεσμα. Επαναρρυθμίστηκαν οι συνθήκες της αντίδρασης και εφαρμόστηκαν διάφορες παραλλαγές για την εισαγωγή των θέση-κατευθυνόμενων μεταλλάξεων με χρήση επέκτασης επικαλυπτόμενων εκκινητών, αλλά το επιθυμητό αποτέλεσμα δεν προέκυψε με καμία τροποποίηση.

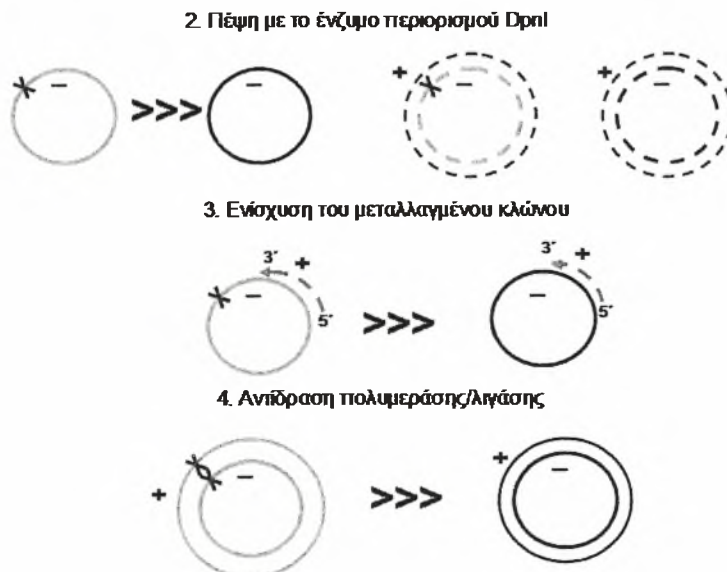
Για την επίτευξη της εισαγωγής της μετάλλαξης θα εφαρμοστεί μια μέθοδος που αναφέρεται ως ολιγονουκλεοτίδιο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιογένεση με τη χρήση πλασμιδιακού DNA⁵⁴. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αντίδραση PCR, κατά την οποία υπάρχει παράλληλη δράση της πολυμεράσης και μιας θερμοάντοχης λιγάσης (Taq DNA λιγάση). Συγκεκριμένα, στην αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται ως εκμαγείο πλασμιδιακό DNA το οποίο φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί την TyrRS και ένας αντινοσηματικός εκκινητής που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη και είναι φωσφορυλιωμένος στο 5' άκρο του. Οι συνθήκες ρυθμίζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχει εναλλαγή της δράσης των δύο ενζύμων. Αρχικά, η λιγάση επιδιορθώνει τις ασυνέχειες που μπορεί να υπάρχουν στο πλασμιδιακό DNA. Έπειτα ακολουθούν 18 κύκλοι για την ενίσχυση του πλασμιδιακού DNA. Στο τέλος κάθε κύκλου υπάρχει μια μεγάλη διάρκεια επώαση στους 65°C που εξυπηρετεί αφενός την επιμήκυνση του τμήματος DNA και αφετέρου τη δράση της λιγάσης ώστε να κυκλοποιηθεί το θυγατρικό μόριο που προκύπτει. Από το στάδιο αυτό προκύπτουν προϊόντα τεσσάρων ειδών που όλα είναι κυκλικά · δίκλινα μόρια DNA που και οι δυο κλώνοι είναι άγριου τύπου, δίκλινα μόρια DNA που ο ένας κλώνος είναι μεταλλαγμένος, μονόκλινα μόρια DNA που φέρουν τη μετάλλαξη και αντίστοιχα μόρια που δεν έχουν μεταλλαχθεί. Τα μονόκλινα τμήματα που φέρουν τη μετάλλαξη παράγονται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τα αντίστοιχα μόρια άγριου τύπου (εικόνα 31).

Μετά το πέρας των κύκλων ακολουθεί μια πέψη με το ένζυμο περιορισμού DpnI. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ενζύμου αυτού δεν είναι τόσο η αλληλουχία που αναγνωρίζει όσο το γεγονός ότι πέπτει την αλληλουχία του DNA μόνο εφόσον αναγνωρίσει ότι υπάρχει μεθυλιωμένη βάση. Οπότε, το DpnI διασπά ουσιαστικά τα δύο από τα τέσσερα προϊόντα της αντίδρασης, δηλαδή τα δύο δίκλινα μόρια που είτε και οι δύο αλυσίδες είτε μόνο η μια είναι μεθυλιωμένες. Τα μονόκλινα μεταλλαγμένα και μη τμήματα DNA παραμένουν ανέπαφα. Ακολουθεί μια ακόμη αντίδραση PCR για την περαιτέρω ενίσχυση του μεταλλαγμένου κυκλικού τμήματος DNA και το προϊόν της αντίδρασης χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων. Παράλληλα βέβαια ενισχύεται και ο κλώνος

του άγριου τύπου αλλά η συγκέντρωση του είναι πολύ μικρή σε σχέση με αυτή του μεταλλαγμένου, οπότε το μεγαλύτερο ποσοστό των μετασχηματισμένων κυττάρων φέρουν τελικά το μεταλλαγμένο γονίδιο (εικόνα 32).

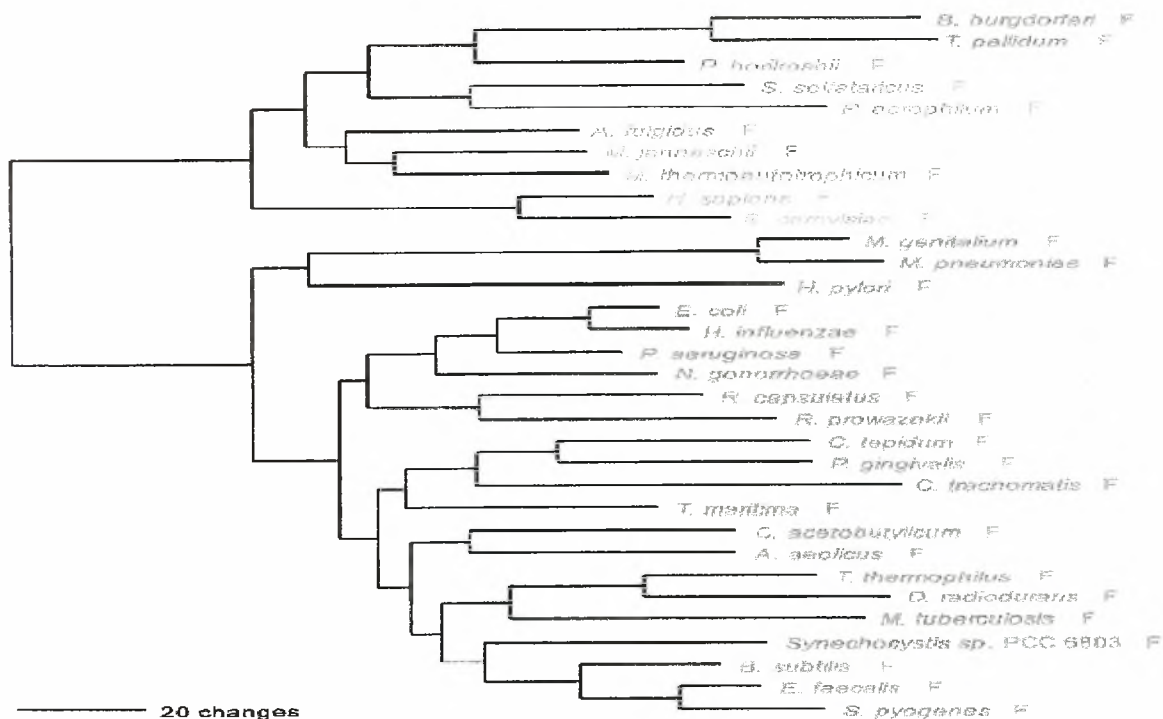


Εικόνα 31: Το πρώτο στάδιο της μεθόδου της ολιγονουκλεοτίδιο-κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης με τη χρήση πλασμιδιακού DNA. Σε μια αντίδραση πολυμεράσης/λιγάσης χρησιμοποιείται ως εκμαγείο πλασμιδιακό DNA που φέρει το επιθυμητό γονίδιο και ένας μεταλλαγμένος εκκινητής φωσφορυλιωμένος στο 5' άκρο. Η πολυμεράση ενισχύει το τμήμα DNA και έπειτα η λιγάση κυκλοποιεί το μόριο. Τελικά προκύπτουν τεσσάρων ειδών προϊόντα. Με X δηλώνεται η θέση της μετάλλαξης. Με κόκκινο απεικονίζονται οι μεταλλαγμένοι κλώνοι ενώ με μαύρο οι κλώνοι άγριου τύπου.



Εικόνα 32: Τα προϊόντα του πρώτου σταδίου της ολιγονουκλεοτίδιο-κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης με τη χρήση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιούνται για τα επόμενα στάδια. Με μια πέψη με το περιοριστικό ένζυμο DpnI διασπώνται τα δίκλινα μόρια και παραμένουν μόνο το μεταλλαγμένο και το άγριου τύπου μονόκλινο τμήμα DNA. Ακολουθεί αντίδραση πολυμεράσης/λιγάσης και αφού τα τμήματα ενισχυθούν χρησιμοποιούνται για μετασχηματισμό κυττάρων. Η συγκέντρωση των μεταλλαγμένων τμημάτων είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από αυτή του άγριου τύπου, οπότε το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων θα φέρει το μεταλλαγμένο γονίδιο.

Η μελέτη και ο λεπτομερής προσδιορισμός του επιδιορθωτικού μηχανισμού των αμινοκύκλο-tRNA συνθετασών ενδέχεται μελλοντικά να υποδείξει εν δυνάμει στόχους για το σχεδιασμό θεραπευτικών προσεγγίσεων. Στην περίπτωση της PheRS παρατηρείται ότι η δομή και η δράση της προσομοιάζει σε όλα τα επίπεδα της ζωής και οι διαφορές που εντοπίζονται είναι δευτερεύουσας σημασίας. Ωστόσο, η PheRS του *Homo sapiens* δεσμεύει το συγγενές μόριο tRNA αναγνωρίζοντας κάποιες περιοχές αυτού διαφορετικές από τις αντίστοιχες που αναγνωρίζονται από τη PheRS του *S.cerevisiae* και *E.coli*⁵⁵. Επιπλέον, σύμφωνα με φυλογενετικά δέντρα που στηρίζονται στις αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες της PheRS από αρχαία, βακτήρια και ευκαρυώτες, προκύπτει ότι η PheRS του *Homo Sapiens* προσομοιάζει περισσότερο με την αντίστοιχη συνθετάση των αρχαίων ενώ παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τη PheRS των βακτηρίων⁵⁶ (εικόνα 33). Η αποσαφήνιση του επιδιορθωτικού μηχανισμού της PheRS ενδέχεται να υποδείξει τα σημεία εκείνα που διαφοροποιούν τη συνθετάση στα διάφορα επίπεδα της ζωής. Η αποκάλυψη αυτή θα δώσει το έναυσμα για μελέτες που θα επικεντρώνονται στο σχεδιασμό θεραπευτικών προσεγγίσεων κυρίως για την αντιμετώπιση βακτηριακών και μυκητιακών μολύνσεων. Τα εν δυνάμει σημεία στόχοι θα είναι αυτά που θα διαφοροποιούνται μεταξύ του επιδιορθωτικού μηχανισμού της PheRS του *Homo sapiens* και των *E.coli* και *S.cerevisiae*.



Εικόνα 33: Φυλογενετικό δέντρο των αλληλουχιών της PheRS. Το δέντρο κατασκευάστηκε με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood). Παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ της PheRS του *Homo sapiens* και εκείνης του *E.coli* και σε μικρότερο βαθμό με τη PheRS του *S.cerevisiae*. Με κόκκινο χρωματίζονται τα βακτήρια, με γαλάζιο τα αρχαία και με πορτοκαλί οι ευκαρυώτες.

Συμπερασματικά, η μελέτη της επιδιορθωτικής δράσης της PheRS είναι κρίσιμη για τον προσδιορισμό διαφοροποιήσεων μεταξύ των οργανισμών των τριών επιπέδων της ζωής. Η προετοιμασία των απαραίτητων υποστρωμάτων είναι το αρχικό βήμα για μια εκτενή μελέτη. Τα υποστρώματα αυτά θα πρέπει να εξυπηρετούν τόσο τη διεξαγωγή *in vitro* όσο και *in vivo* αναλύσεων. Η έκφραση των υπομονάδων α(A294G) και β της PheRS του *E.coli* και ο ακόλουθος καθαρισμός του ενζύμου θα δώσει τη δυνατότητα πραγματοποίησης ελέγχων επί του επιδιορθωτικού μηχανισμού της PheRS. Η έκφραση

της συντηρημένης υπομονάδας β_{cons} του *M.thermoautotrophicum* θα οδηγήσει στον προσδιορισμό της δράσης της πρωτεΐνης αυτής, που μέχρι σήμερα παραμένει άγνωστη, και στην αποκάλυψη της πιθανής εμπλοκής της στον επιδιορθωτικό μηχανισμό της PheRS. Για να επιτευχθεί αυτό παράλληλα κρίνεται απαραίτητη και η έκφραση της υπομονάδας α της PheRS του ίδιου αρχαίου για να μελετηθούν δυναμικές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και να υποβοηθηθεί η αποκάλυψη του ρόλου της άγνωστης υπομονάδας. Τέλος, η μελέτη της επιδιορθωτικής δράσης *in vitro* απαιτεί την ύπαρξη κακοφορτισμένων μορίων tRNA^{Phe}, τα οποία προκύπτουν από τη δράση της μεταλλαγμένης (E152A ή E152R) TyrRS του *G.stearothermophilus*, που κακοφορτίζει μόρια tRNA^{Phe} με τυροσίνη.

Στην παρούσα εργασία προετοιμάστηκαν έως κάποιο σημείο οι απαραίτητοι παράγοντες για τη μελέτη της επιδιορθωτικής δράσης της PheRS. Ουσιαστικά, λοιπόν, τέθηκαν οι βάσεις για μια εκτενή διερεύνηση της συγκεκριμένης συνθετάσης, η οποία μπορεί να μην περιοριστεί μόνο στην αποκάλυψη του μηχανισμού επιδιόρθωσης αλλά να προεκταθεί και σε άλλα σημεία της διαδικασίας της πρωτεΐνοσύνθεσης και να δώσει σημαντικά στοιχεία για εν δυνάμει στόχους νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

-
1. Ibba M, Becker HD, Stathopoulos C, Tumbula DL and Söll D. The Adaptor Hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.* (2000) 25:311-316.
 2. Ibba M. and Söll D. The renaissance of aminoacyl-tRNA synthesis. *EMBO Reports* (2001) 2:382-387.
 3. Ibba M. and Söll D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* (2000) 69:617-650
 4. Cavalcanti ARO, Leite ES, Neto BB and Ferreira R. On the classes of aminoacyl-tRNA synthetases, amino acids and the genetic code. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* (2004) 34: 407-420
 5. Eriani G, Delarue M, Poch O, Gangloff J and Moras D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* (1990) 347(6289):203-206.
 6. Cusack S. Aminoacyl-tRNA synthetases. *Current Opinion in Structural Biology* (1997) 7:881-889
 7. Ibba M, Morgan S, Curnow AW, Pridmore DR, Vothknecht UC, Gardner W, Lin W, Woese CR and Soll D. A euryarchaeal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases. *Science* (1997) 278:1119-1122
 8. Ibba M and Soll D. Quality control mechanisms during translation. *Science* (1999) 286:1893-1897
 9. Woese CR, Olsen GJ, Ibba M and Soll D. Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2000) 64(1):202-236
 10. Curnow A, Tumbula DL, Pelaschier JT, Min B and Soll D. Glutamyl-tRNA (Gln) amidotransferase in *Deinococcus radiodurans* may be confined to asparagine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1998) 95(22):12838-12843
 11. Curnow A, Ibba, M and Söll D. tRNA-dependent asparagine formation. *Nature* (1996) 382:589-590.
 12. Ibba M and Soll D. Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code. *Genes and Development* (2004) 18:731-738
 13. Commans S and Bock A. Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. *FEMS Microbiol. Rev.* (1999) 23(3):335-351
 14. Stathopoulos C, Li T, Longman R, Vothknecht UC, Becker H, Ibba M and Söll, D. One polypeptide with two aminoacyl-tRNA synthetase activities. *Science* (2000) 287:479-482
 15. Ribas de Pouplana L and Schimmel P. Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere. *Trends Biochem. Sci.* (2000) 25:207-209.
 16. Sissler M, Delorme C, Bond J, Ehrlich SD, Renault P and Franclyn C. An aminoacyl-tRNA synthetase paralog with a catalytic role in histidine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1999) 96:8985-8990.
 17. Simos G, Sauer A, Fasiolo F and Hurt EC. A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol. Cell.* (1998) 1(2):235-242.
 18. Morales AJ, Swairjo MA, and Schimmel P. Structure-specific tRNA-binding protein from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus*. *EMBO J.* (1999) 18(12):3475-3483.
 19. Salazar JC, Ambrogelly A, Crain PF, McCloskey JA and Soll D. A truncated aminoacyl-tRNA synthetase modifies RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2004) USA 101: 7536-7541.

-
20. Dubois DY, Blaise M, Becker HD, Campanacci V, Keith G, Giege, R, Cambillau, C, Lapointe, J and Kern D. An aminoacyl-tRNA synthetase-like protein encoded by *E. coli* yadB gene glutamylates specifically tRNA^{Asp}. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2004) USA 101: 7530-7535.
 21. Ahel I, Korencic D, Ibba M and Soll D. Trans-editing of mischarged tRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003) 10(26) 15422-15427.
 22. Korencic D, Ahel I, Scheclert J, Sacher M, Ruan B, Stathopoulos C, Blum P, Ibba M and Soll D. A freestanding proofreading domain is required for protein quality control in Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2004) 101(28) 10260-10265
 23. Beebe K, Merriman E, Ribas de Pouplana L and Schimmel P. A domain for editing by an archaeobacterial tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2004) 101(16): 5958-5963
 24. Salazar JC, Ahel I, Orellana O, Tumbula-Hansen D, Krieger R, Daniels L and Soll D. Coevolution of an aminoacyl-tRNA synthetase with its tRNA substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003) 100(24):13863-13868
 25. Ribas de Pouplana L and Schimmel P. Aminoacyl-tRNA synthetases: Potential markers of genetic code development. *Trends Biochem. Sci.* (2001) 26:591-596.
 26. Eriani G, Delarue M, Poch O, Gangloff J and Moras D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* (1990) 347(6289):203-206
 27. Ribas de Pouplana L and Schimmel P. Two classes of tRNA synthetases suggested by sterically compatible dockings on tRNA acceptor stem. *Cell* (2001) 104(2):191-193
 28. McClain WH. Transfer RNA identity. *FASEB J.* (1993) 7(1):72-78.
 29. Charles W and Carter JR. Cognition, mechanism and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases. *Annu. Rev. Biochem.* (1993) 62:715-748
 30. Steer BA and Schimmel P. Domain-domain communication in a miniature archaeobacterial tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1999) 96(24):13644-13649
 31. Hendricson TL. Recognizing the D-loop of transfer RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2001) 98(24):13473-13475
 32. Lofffield RB and Vanderjagt D. The frequency of errors in protein biosynthesis. *Biochem. J.* (1972). 128:1353-1356.
 33. Ibba M and Soll D. Quality control mechanisms during translation. *Science* (1999) 286:1893-1897
 34. Nureki O, Vassilyev DG, Tatenno M, Shimada A, Nakama T, Fukai S, Konno M, Hendrickson TL, Schimmel P and Yokoyama S. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* (1998) 280:578-582.
 35. Silvan LF, Wang J and Steitz TA. Insights into editing from an ile-tRNA synthetase structure with tRNA^{Ile} and mupirocin. *Science* (1999) 285:1074-1077.
 36. Sankaranarayanan R, Dock-Bregeon AC, Rees B, Bovee M, Caillet J, Romby P, Francklyn CS and Moras D. Zinc ion mediated amino acid discrimination by threonyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Biol.* (2000) 7(6):461-465

-
37. Dock-Bregeon A, Sankaranarayanan R, Romby P, Caillet J, Springer M, Rees B, Francklyn CS, Ehresmann C and Moras D. Transfer RNA-mediated editing in threonyl-tRNA synthetase: The class II solution to the double discrimination problem. *Cell* (2000) 103(6):877-884.
38. Jakubowvski H. Proofreading in vivo. Editing of homocysteine by aminoacyl-tRNA synthetases in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* (1995) 270:17672-17673
39. Goldgur Y, Mosyak L, Reshetnikova L, Ankilova V, Lavric O, Khodyreva S and Safro M. The crystal structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* complexed with cognate tRNA^{Phe}. *Structure* (1997) 5(1):59-68
40. Das R and Vothknecht UC. Phenylalanyl-tRNA synthetase from the archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* is an ($\alpha\beta$)₂ heterotetrameric protein. *Biochimie* (1999) 81:1037-1039
41. Moor N, Lavrik O, Favre A and Safro M. Procaryotic and eukaryotic tetrameric phenylalanyl-tRNA synthetase display conservation of the binding mode of the tRNA^{Phe} CCA end. *Biochemistry* (2003) 42:10697-10708
42. Peterson ET and Uhlenbeck OC. Determination of recognition nucleotides for *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* (1992) 31(42):10380-10389
43. Vasileva IA, Ankilova VN, Lavric OI, Moor NA. tRNA discrimination by *T.thermophilus* phenylalanyl-tRNA synthetase at the binding step. *J. Mol. Rec.* (2002) 15:188-196
44. Ibba M, Kast P and Hennecke H. Substrate specificity is determined by amino acid binding pocket size in *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* (1994) 33:7107-7112
45. Lin SX, Baltzinger M and Remy P. Fast kinetic study of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase: An efficient discrimination between tyrosine and phenylalanine at the level of the aminoacyladenylate enzyme complex. *Biochemistry* (1983) 22:681-689
46. Lin SX, Baltzinger M and Remy P. Fast kinetic study of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase: Role of tRNA^{Phe} in the discrimination between tyrosine and phenylalanine. *Biochemistry* (1984) 23:4109-4116
47. Fersht A. Structure and mechanism in protein synthesis. WH Freeman and Company, New York. (1999) pp 420-449.
48. Yaremchuk A, Krikiviy I, Tukalo M and Cusack S. Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition. *EMBO J.* (2002) 21(14):3829-3840.
49. Bedouelle H and Nageotte R. Macromolecular recognition through electrostatic repulsion. *EMBO J.* (1995) 14(12):2945-2950
50. Vidal-Cross A and Bedouelle H. Role of residue Glu152 in the discrimination between transfer RNAs by tyrosyl-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.* (1992) 223:801-810
51. Bedouelle H and Nageotte R. Macromolecular recognition through electrostatic repulsion. *EMBO J.* (1995) 14(12):2945-2950
52. Bedouelle H, Guez V, Vidal-Cross A and Hermann M. Overproduction of tyrosyl-tRNA synthetase is toxic to *Escherichia coli*: a genetic analysis. *J. Bacteriol.* (1990) 172(7):3940-3945

-
53. Kuipers OP, Boot HJ, Vos WM. Improved site-directed mutagenesis method using PCR. *Nucleic Acids Research* (1991) 19(16) 4558
54. Sawano A and Miyawaki A. Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic Acids Research* (2000) 28(16): e78
55. Nazarenko IA, Peterson ET, Zakharova OD, Lavrik OI and Uhlenbeck OC. Recognition nucleotides for human phenylalanyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Research* (1991) 20(3):475-478
56. Woese CR, Olsen GJ, Ibba M and Soll D. Aminoacyl-tRNA Synthetases, the Genetic Code, and the Evolutionary Process. *Microb. Mol. Biol. Rev.* (2000) 64(1):202-236