

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ
ΑΜΙΔΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΟΥ
ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΑΡΧΑΙΟ *Pyrococcus abyssi*.

Βασιλική Σταματοπούλου

Διπλωματική εργασία

Λάρισα 2004



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

Αριθ. Εισ.: 3976/1

Ημερ. Εισ.: 27-10-2004

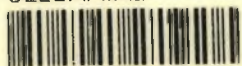
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΣΤΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075132

Ευχαριστίες :

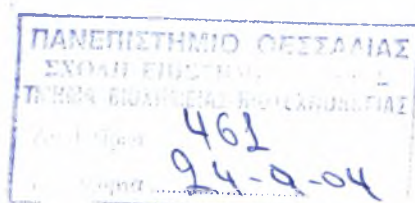
Με χαρά θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων η βοήθεια και οι υποδείξεις υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Κυρίως ευχαριστώ τους καθηγητές Becker H. D. και Kern D., με τους οποίους συνεργάστηκα για την πραγματοποίηση της διπλωματικής εργασίας, καθώς επίσης και τον Blaise M. για την μεγάλη βοήθειά του στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή μου, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Σταθόπουλο Κ. για την επιστημονική και ηθική υποστήριξή του. Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, του Πανεπιστημίου του Στρασβούργου, στη Γαλλία (10/01/2004 – 27/03/2004).

Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής:

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος. Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Ζήσης Μαμούρης. Αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Παναγιώτης Μαρκουλάτος. Αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	14
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	15
3.1 ΥΛΙΚΑ	15
3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	15
3.1.2. Ένζυμα	16
3.1.3. Κύτταρα	16
3.1.4. Θρεπτικά μέσα	17
3.1.5. Φορείς-πλασμίδια	17
3.1.6. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers)	19
3.1.7. Εκκινητές (primers)	20
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	21
3.2.1. Συγκέντρωση του DNA	21
3.2.2. Τεχνηκή μεταφοράς DNA στο <i>E.coli</i> με ηλεκτρισμό (electroporation)	21
3.2.3. Προετοιμασία των κυττάρων	21
3.2.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)	21
3.2.5. Διαχωρισμός του DNA	22
3.3. ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	24
3.3.1. Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού	24
3.3.2. Αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του DNA	24
3.3.3. Σύνδεση τμημάτων DNA	24
3.3.4. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	24
3.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	26
3.4.1. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών	26
3.4.2. Καθαρισμός πρωτεϊνών	27
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
4.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ GATD, GATE ΚΑΙ GLUX ΓΟΝΙΔΙΩΝ	29
4.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ GATD, GATE ΚΑΙ GLUX ΓΟΝΙΔΙΩΝ	33
4.3. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GATD ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ	39
4.4. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΟΠΕΡΟΝΙΟΥ GATDE	44
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αμινοακυλίωση των μορίων tRNA, όντας μια από τις κυριότερες κυτταρικές διεργασίες, πραγματοποιείται μέσω δυο βιοχημικών οδών στους οργανισμούς. Η μια οδός αφορά την άμεση αμινοακυλίωση των tRNA μορίων με τα αμινοξέα, μέσω της δράσης των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών. Ορισμένοι, όμως, οργανισμοί χρησιμοποιούν, για την εστεροποίηση κάποιων tRNA με τα αντίστοιχα αμινοξέα, ένα έμμεσο βιολογικό μονοπάτι που περιλαμβάνει την λειτουργία μιας μη εξειδικευμένης συνθετάσης και μιας αμιδοτρανσφεράσης (AdT). Τα ένζυμα AdT κωδικοποιούνται, στα βακτηριακά κύτταρα και στα οργανίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών, από το οπερόνιο *gatCAB*. Αντίθετα, στα αρχαία οι αμιδοτρανσφεράσες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gatD* και *gatE*, τα οποία βρίσκονται σε γειτονικές θέσεις στο γονιδίωμα των κυττάρων αυτών σχηματίζοντας το οπερόνιο *gatDE*. Τα γονίδια *gatD* και *gatE* μεταφραζόμενα συνθέτουν την αμιδοτρανσφεράση του γλουταμινικού οξέος, η οποία εμπλέκεται στη δημιουργία του Gln-tRNA^{Gln}. Εδώ αναφέρεται η προσπάθεια κλωνοποίησης και υπέρ-έκφρασης των δυο αυτών γονιδίων σε στελέχη του *E.coli*, καθώς και ο καθαρισμός με χρωματογραφία της υπομονάδας *gatD* του οπερονίου. Επίσης, δοκιμάστηκε η κλωνοποίηση και η έκφραση ολόκληρου του οπερονίου σε κατάλληλους φορείς και κύτταρα.

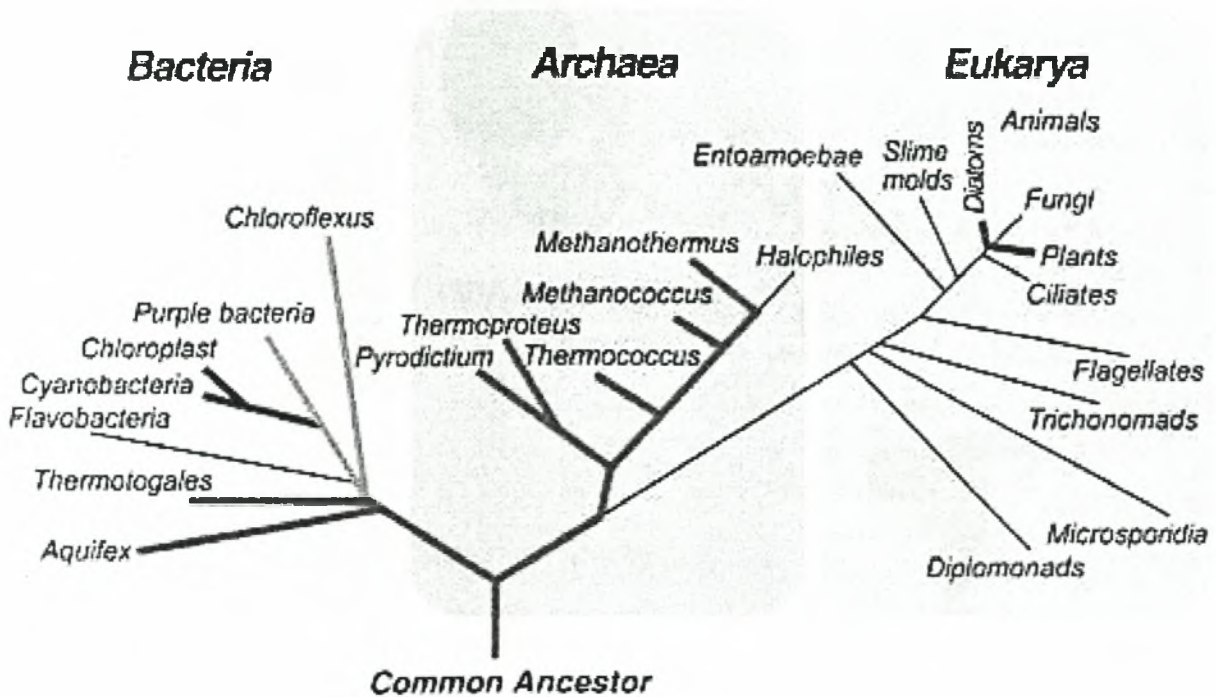
ABSTRACT

Aminoacylation is an important cellular process and it can be carried out through two possible biochemical ways. The direct pathway concerns the tRNA aminoacylation through the function of aminoacyl-tRNA synthetases, whereas some organisms use the indirect pathway. A non-discriminating aminoacyl-tRNA synthetase, firstly, and an amidotransferase (AdT), then, catalyze the ligation between the tRNA and its cognate amino acid. In bacteria and the organelles of eukarya, the AdT enzymes are encoded by the *gatCAB* operon, while in archaea, another operon, the *gatDE*, encodes these enzymes. Additionally, the GatDE enzyme is a glutamyl-amidotransferase, which is involved in the Gln-tRNA^{Gln} formation. Here is reported the sub-cloning, the over-expression of the *gatD* and *gatE* genes and the purification of the GatD subunit in several *E.coli* strains. We, also, tried to clone and express, in appropriate vectors and cells, the *gatD* and *gatE* genes in an operon-like manner.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μέχρι την δεκαετία του '80 θεωρείτο πως οι μορφές της ζωής κατηγοριοποιούνταν σε δυο μεγάλες ομάδες οργανισμών, τα βακτήρια και τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Παρ' όλα αυτά, με την ανάπτυξη καινούριων τεχνικών και την αποκωδικοποίηση ολοένα και περισσότερων γονιδιωμάτων, βρέθηκε πως τα βασίλεια της ζωής είναι τρία. Έτσι, στα βακτήρια και τους ευκαρυώτες, προστέθηκε και μια τρίτη οικογένεια οργανισμών, προκαρυωτικού τύπου, τα αρχαία (εικόνα 1). Επιπλέον μελέτες έδειξαν πως τα αρχαία και τα βακτήρια διαφέρουν σημαντικά ως προς τη κυτταρική δομή από τα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα οποία διαθέτουν οργανωμένο πυρήνα, πολλαπλά χρωμοσώματα, ποικιλία οργανιδίων, όπως μιτοχόνδρια, κλωροπλάστες, ενδοπλασματικό δίκτυο και άλλα. Το παράδοξο, όμως, είναι ότι τα αρχαία εμφανίζουν πολλά κοινά στοιχεία και με τους ευκαρυώτες. Για παράδειγμα, το γεγονός ότι κατά την πρωτεϊνοσύνθεση η μετάφραση των νέων πολυπεπτιδικών αλυσίδων ξεκινά με το αμινοξύ μεθειονίνη και στους δυο αυτούς τύπους κυττάρων, σε αντίθεση με τα βακτήρια που ως αμινοξύ έναρξης χρησιμοποιούν την φόρμυλ-μεθειονίνη, αποδεικνύει τις λειτουργικές ομοιότητες που παρουσιάζουν τα ευκαρυωτικά κύτταρα με τα αρχαιοβακτήρια. Το φαινόμενο αυτό εξηγεί, έως ένα βαθμό, γιατί βρίσκονται πιο κοντά φυλογενετικά τα αρχαία με τα ευκαρυωτικά κύτταρα από ότι με τα βακτήρια. Σήμερα πιστεύεται πως τα βακτήρια και τα αρχαία αναπτύχθηκαν ξεχωριστά από κοινό πρόγονο και πως ο πρόγονος των ευκαρυωτών προέκυψε από τα αρχαία.

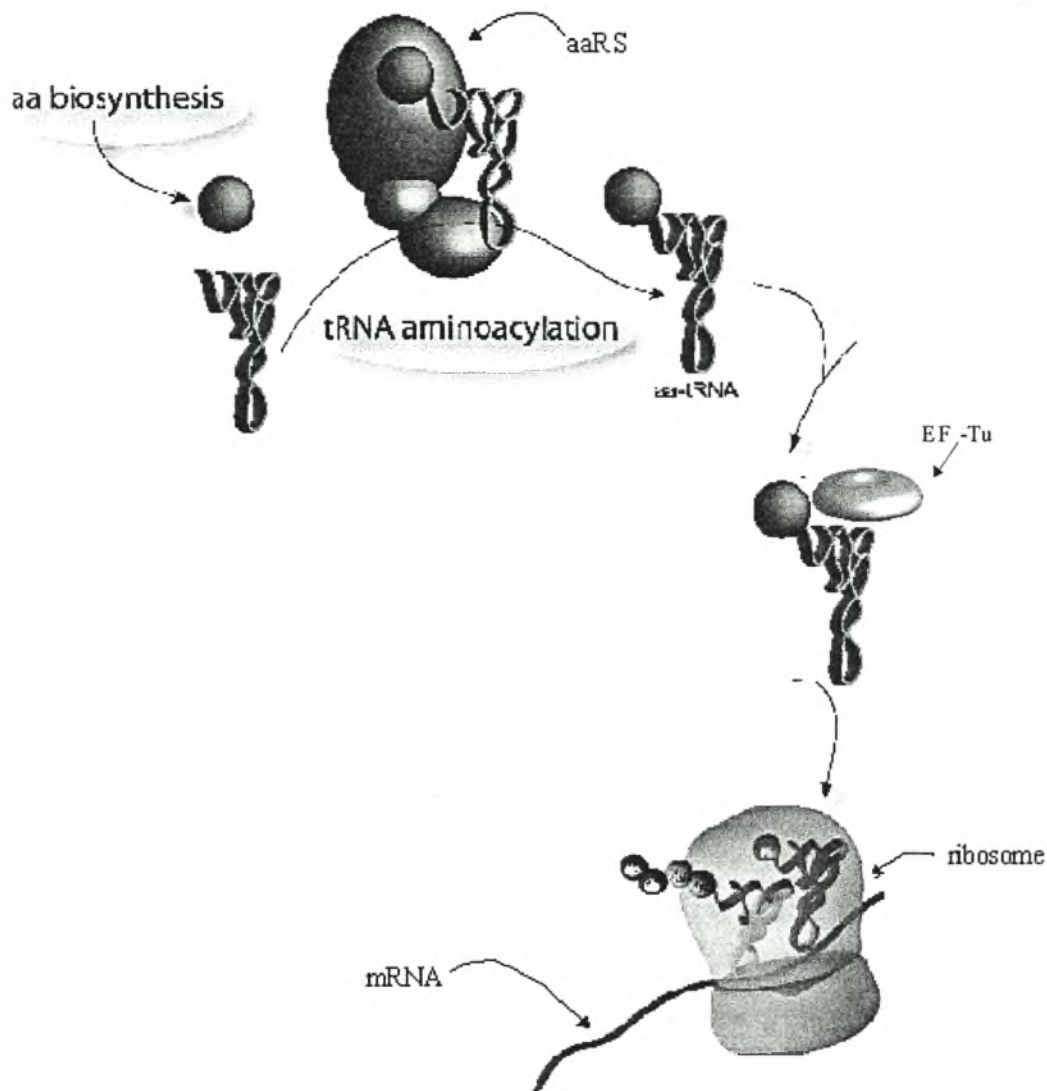
Εντούτοις, όπως αποκαλύφθηκε με συνεχείς έρευνες, πολλά βιοχημικά χαρακτηριστικά διαφέρουν μεταξύ και των τριών βασιλείων. Η ύπαρξη πολλών βακτηρίων και αρχαίων που επιβιώνουν και αναπτύσσονται σε ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες, που ανέρχονται στους 110 °C, αποτελεί παράδειγμα κατά το οποίο οι οργανισμοί χρησιμοποιούν διαφορετικές στρατηγικές, ώστε να αντεπεξέλθουν στις υψηλές θερμοκρασίες και να διατηρήσουν τη σταθερότητα των πρωτεϊνών τους, που κινδυνεύουν από μετουσίωση και αποικοδόμηση σε ένα τόσο θερμό περιβάλλον (Daniel R.M. et al. 2000). Έτσι, οι υπερθερμόφιλοι οργανισμοί συνθέτουν συνεχώς και με γρήγορους ρυθμούς τα θερμοευαίσθητα συστατικά τους (Vieille C. et al. 2001), καθώς επίσης στις πρωτεΐνες τους ανιχνεύονται μεγαλύτερα ποσοστά ζευγών G+C και μικρότερη παρουσία κάποιων αμινοξέων σε σύγκριση με τους μεσοφιλικούς οργανισμούς. Όμως, σε αντίθεση με όλες τις προηγούμενες περιπτώσεις, οι μηχανισμοί της αμινοακυλί-



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

ωσης είναι ίδιοι, με μικρές μόνο παραλλαγές, σε όλους τους οργανισμούς.

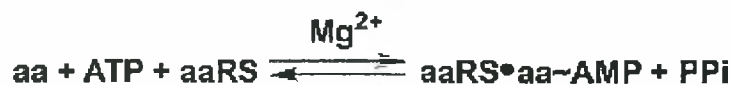
Με τον όρο αμινοακυλίωση αναφερόμαστε σε μια από τις πιο κεντρικές κυτταρικές διαδικασίες κατά την οποία συνθέτονται αμινοάκυλο-tRNA μόρια, που αποτελούν τα κατάλληλα υποστρώματα για την μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνες, το οποίο βρίσκεται προσδεδεμένο στο ριβόσωμα (εικόνα 2). Γι' αυτό το λόγο και η πιστότητα αυτής της βιολογικής διαδικασίας είναι κρίσιμoτατη για τη σωστή αποκωδικοποίηση των πληροφοριών που περιέχουν τα γονίδια (Ibba M. et al. 1999). Η διεργασία της αμινοακυλίωσης βασίζεται στη δράση των ενζύμων αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών (aaRS) που καταλύουν την εστεροποίηση ενός μόνο συγκεκριμένου αμινοξέος με την βάση της αδενίνης στο 3' άκρο του αντίστοιχου tRNA (Frugier M. et al. 2000). Το αμινοακυλωμένο tRNA (aa-tRNA), στη συνέχεια, δεσμεύεται από τον παράγο-



Εικόνα 2: Η διαδικασία του μηχανισμού της μετάφρασης. Φαίνεται ο σχηματισμός του αμινοακυλιωμένου tRNA (aa-tRNA) με τη μεσολάβηση της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης (aaRS), καθώς και η δημιουργία του συμπλόκου aa-tRNA:EF-Tu:GTP. Τελικά ολόκληρο το σύμπλοκο δεσμεύεται στο ριβόσωμα, ώστε να επιτευχθεί η επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου πεπτιδίου.

για επιμήκυνσης EF-Tu μαζί με ένα μόριο GTP (Sprinzl M. et al. 1994). Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου (aa-tRNA:EF-Tu:GTP) είναι απαραίτητη για τη περαιτέρω δέσμευση του aa-tRNA στο ριβόσωμα, όπου η τριπλέτα του αντικωδικονίου στο tRNA (Soll D. et al. 1995) θα αναγνωρίσει και θα συνδεθεί με το κατάλληλο κωδικόνιο του mRNA, ούτως ώστε να προχωρήσει η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Ουσιαστικά πρόκειται για μια αντίδραση δυο σταδίων (εικόνα 3), κατά την οποία στο πρώτο βήμα η αμινοάκυλο-tRNA συνθε-

Activation



Transfer



Εικόνα 3: Δύο είναι τα στάδια της αμινοακυλίωσης. Το πρώτο αφορά την ενεργοποίηση του αμινοξέος (aa) με την κατανάλωση ενός μορίου ATP και το δεύτερο τη μεταφορά αυτού του αμινοξέος στο tRNA. Και τα δύο στάδια καταλύει η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση (aaRS).

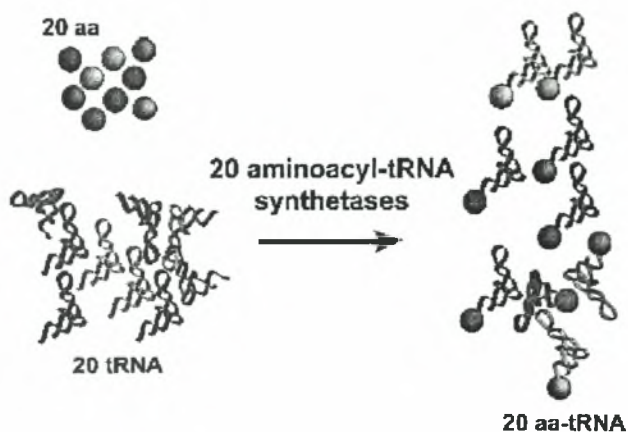
τάση ενεργοποιεί το αμινοξύ με την κατανάλωση δυο δεσμών υψηλής ενέργειας (ATP → AMP + PP_i) και κατά το δεύτερο βήμα το ίδιο ένζυμο μεταφέρει το ενεργοποιημένο αμινοξύ στο κατάλληλο tRNA. Τα ένζυμα αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες έχει βρεθεί πως χωρίζονται σε δύο δομικά διακριτές και εξελκτικά συντηρημένες ομάδες (class I και class II) (Eriani et al. 1990), που διαθέτουν αποκλειστικές αλληλουχίες και μοτίβα τα οποία αντικατοπτρίζουν ενεργά κέντρα που παρουσιάζουν διαφορετικές τοπολογίες (Ruff M. et al. 1991). Αναλύσεις στη δομή που έχουν γίνει στις κλάσης I συνθετάσες (περιλαμβάνονται οι συνθετάσες των γλουταμινικού οξέος, γλουταμίνης, τρυπτοφάνης, τυροσίνης, βαλίνης, λευκίνης, ισολευκίνης, μεθειονίνης, κυστεϊνης και αργινίνης), έχουν αποδείξει πως η αλληλουχία τους αποκαλύπτει την ύπαρξη δυο δομικών μοτίβων, του “HIGH” (His-Ile-Gly-His) και του “KMSKS” (Lys-Met-Ser-Lys-Ser), τα οποία απουσιάζουν από τα ένζυμα της κλάσης II (Burbaum J.J. et al. 1991). Επίσης, στο καταλυτικό κέντρο της πρώτης κλάσης πρωτεϊνών περιέχεται μια δινουκλεοτιδική Rossmann περιοχή, ενώ στις κλάσης II αυτή η μορφή αντικαθίσταται από ένα β-πυκνωτό φύλλο. Μια άλλη σημαντική διαφορά είναι ο τρόπος πρόσδεσης των μορίων tRNA από τις συνθετάσες, όπου τα I κλάσης ένζυμα προσεγγίζουν το βραχίονα υποδοχής του tRNA (acceptor stem) από την μικρή αύλακα και με το μεταβλητό βρόγχο (variable loop) να έχει κατεύθυνση προς τον διαλύτη. Σε αντίθεση τα ένζυμα της δεύτερης κλάσης πλησιάζουν το tRNA από τη μεγάλη αύλακα του βραχίονα υποδοχής, ενώ ο μεταβλητός βρόγχος κατευθύνεται προς τη συνθετάση. Βέβαια σε αυτές τις διαφορές εντάσσονται και εξαιρέσεις, όπως η αμινοάκυλο-tRNA

συνθετάση της αλανίνης (Ibba M. et al. 2000). Παρόλα αυτά η «συμμετρία» αυτών των ομάδων φαίνεται ότι εξελικτικά διατηρήθηκε με προσαρμογή των ενζύμων αυτών ως προς τα υποστρώματά τους (μόρια tRNA).

Προτού ακόμα απομονωθούν και χαρακτηριστούν οι παράγοντες που συμμετέχουν στο μηχανισμό της αμινοακυλίωσης, η ύπαρξή τους είχε προβλεφθεί από τον Crick, με την υπόθεση της προσαρμογής (Adaptor hypothesis) (Crick F.H.C., 1958). Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση όλοι οι οργανισμοί διαθέτουν 20 αμινοξέα και 20 αντίστοιχες αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες, μια για κάθε αμινοξύ, που τα μεταφέρουν στα μόρια tRNA (εικόνα 4). Η υπόθεση αυτή έγινε στη συνέχεια γενική παραδοχή με την ανακάλυψη των 20 αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών τις επόμενες δεκαετίες. Όμως η συνεχής βελτίωση των τεχνικών και η επακόλουθη, πλήρης ή μερική, αποκρυπτογράφηση πολλών γενωμάτων σε πολλούς οργανισμούς (από το *E.coli* έως τον άνθρωπο) αναδεικνύουν διαφορετική εικόνα. Στην πραγματικότητα παρατηρήθηκε ότι στο γενετικό υλικό κανενός βακτηρίου ή αρχαίου δεν υπάρχουν μόνο 20 αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες, ενώ αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων βρέθηκαν τα 20 αυτά ένζυμα. Ακόμα και στα οργανίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών, όπως τα μιτοχόνδρια και τους κλωροπλάστες, ανιχνεύθηκε έλλειψη κάποιων από τις 20 αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (Schon A. et al. 1988). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις η αντίδραση της αμινοακυλίωσης γίνεται με τη χρήση έμμεσων βιοσυνθετικών οδών για τη σύνθεση ορισμένων αμινοάκυλο-tRNA μορίων (Ibba M. et al. 2000).

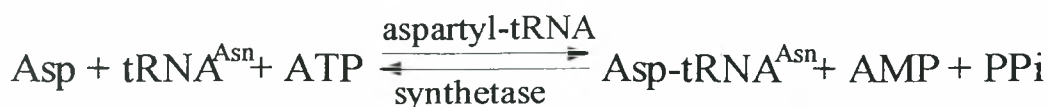
Έτσι στο γένωμα των αρχαίων και των βακτηρίων έχουν βρεθεί διπλασιασμοί, ελλείψεις των γονιδίων που κωδικοποιούν για αυτές τις συνθετάσες ή και επιμέρους τμήματα των γονιδίων αυτών, τα οποία δεν φαίνονται να λαμβάνουν μέρος στη tRNA αμινοακυλίωση. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έλλειψη της tRNA συνθετάσης της ασπαραγίνης (AsnRS) σε πολλούς προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως στο παθογόνο ευβακτήριο που προκαλεί την ασθένεια της μηνιγγίτιδας το *Neisseria meningitides*, καθώς και η παρουσία ενός ενζύμου ικανού για τη σύνθεση τόσο Pro-tRNA^{Pro}, όσο και Cys-tRNA^{Cys} σε ένα παθογόνο ευκαρυωτικό παράσιτο (*Giardia lamblia*) (Bunjun S. et al. 2000, Woese C.R. et al. 2000).

Στη πρώτη περίπτωση, στο βακτήριο διεξάγεται με έμμεσο τρόπο η αμινοακυλίωση του tRNA της ασπαραγίνης. Χρησιμοποιείται η tRNA συνθετάση του ασπαραγινικού οξέος (Asp) η οποία έχει το χαρακτηριστικό ότι εμφανίζει



Εικόνα 4: Στο κυτταρόπλασμα όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων υπάρχουν 20 αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες που καταλύουν τη δέσμευση των 20 αμινοξέων στα 20 μεταφορικά RNA (tRNA).

διπλή εξειδίκευση (non-discriminating, ND-AspRS) (Feng L. et al. 2003), δηλαδή μπορεί να καταλύει τη δέσμευση του ασπαργινικού οξέος τόσο στο tRNA^{Asp}, όσο και στο tRNA^{Asn}. Στη περίπτωση του tRNA^{Asp}, το νεοσυντιθέμενο Asp-tRNA^{Asp} συνδέεται φυσιολογικά στο παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu και μεταφέρεται στο ριβόσωμα όπου πραγματοποιείται η πρωτεϊνοσύνθεση. Στη περίπτωση του tRNA^{Asn}, η tRNA συνθετάση του ασπαργινικού οξέος (ND-AspRS) καταλύει τη δέσμευση του ασπαργινικού οξέος στο μεταφορικό tRNA της ασπαργίνης με κατανάλωση ενός μορίου ATP δημιουργώντας το Asp-tRNA^{Asn}. Σε αυτό το σημείο υπάρχει κίνδυνος το μη φυσιολογικά αμινοακυλωμένο tRNA να προκαλέσει μετάλλαξη στις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες εισάγοντας λανθασμένα στη πολυπεπτιδική αλυσίδα το ασπαργινικό οξύ αντί της ασπαργίνης. Η διατήρηση της πιστότητας της μετάφρασης, όμως, επιτυγχάνεται με τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu (Larivière F.J. et al. 2001, Asahara H. et al. 2002), ο οποίος έχει την δυνατότητα να αναγνωρίζει τη δομή του εσφαλμένα αμινοακυλωμένου tRNA και έτσι να μην πραγματοποιείται η δέσμευσή του στο ριβόσωμα. Έπειτα, το μόριο αυτό δεσμεύεται από ένα δεύτερο ένζυμο που εξαρτάται από τη παρουσία tRNA και ATP, το οποίο με τη μεταφορά μιας αμινομάδας στο ασπαργινικό οξύ και τη διάσπαση ενός μορίου ATP συνθέτει το Asn-tRNA^{Asn} (εικόνα 5). Το ένζυμο ονομάζεται αμιδοτρανσφεράση του ασπαργινικού οξέος και ανήκει σε μια οικογένεια ενζύμων τις αμιδοτρανσφεράσες (AdTs). Τα ένζυμα αυτά διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, οι οποίες διαφέρουν τόσο στη δομή, όσο και στην εξειδίκευση. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει ετεροτριμερείς αμιδοτρανσφεράσες με διπλή δραστικότητα που κωδικοποιούνται από το οπε-



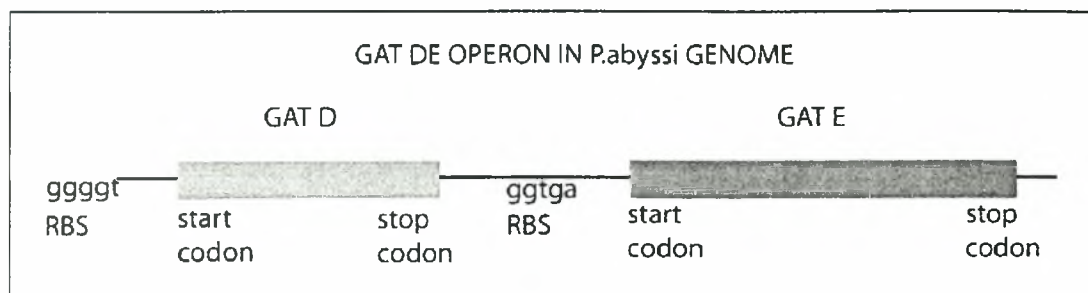
Εικόνα 5: Το έμμεσο μονοπάτι αμινοακυλίωσης του tRNA^{Asn} στο βακτήριο *Neisseria meningitidis*. Η αμιδοτρανσφεράση του ασπαραγινικού οξέος μπορεί να χρησιμοποιήσει, αντί για το αμινοξύ Asn (κόκκινος κύκλος), Gln ή NH₃.

ρόνιο *gatCAB* (Curnow A.W. et al. 1997), ενώ η δεύτερη συναντάται μόνο στα αρχαιοβακτήρια και αφορά ετεροδιμερή ένζυμα, με απλή εξειδίκευση που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gatD* και *gatE*, τα οποία στο γονιδίωμα των οργανισμών οργανώνονται με τη μορφή οπερονίου (Tumbula D.L. et al. 2000).

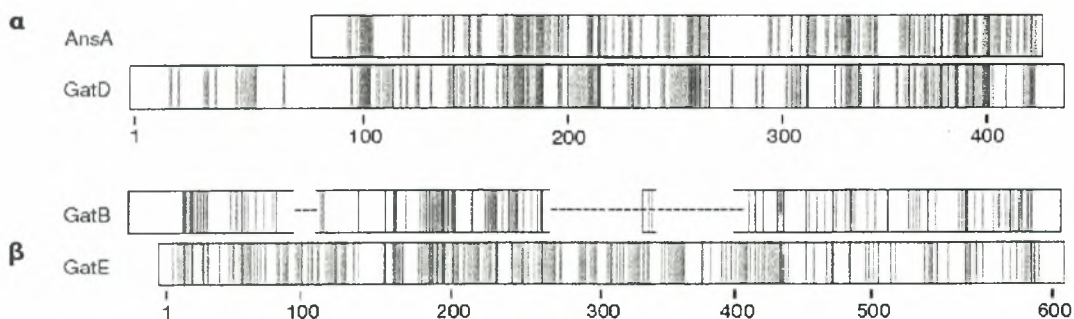
Το οπερόνιο *gatCAB* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που δύναται να συμπεριφέρεται κάτω από προϋποθέσεις, είτε ως αμιδοτρανσφεράση του γλουταμινικού, είτε του ασπαραγινικού οξέος. Η GatA υπομονάδα φαίνεται να έχει τη καταλυτική δραστηριότητα, αφού το καρβόξυ-τελικό άκρο της υπομονάδας αυτής είναι απαραίτητο για τη δράση τόσο της AspAdT, όσο και της GluAdT. Η υπομονάδα GatC συμμετέχει στη σωστή αναδίπλωση του ενζύμου και τη σταθεροποίηση της GatA υπομονάδας, ενώ η GatB παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της δομής και επομένως στη διατήρηση της δραστικότητας της αμιδοτρανσφεράσης σε υψηλά επίπεδα. Το ένζυμο Asp/GluAdT χρησιμοποιεί εξίσου τα αμινοξέα ασπαραγίνη, γλουταμίνη καθώς και το χλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl) ως δότες αμινομάδων. Το οπερόνιο αυτό έχει βρεθεί μετά από πειραματικές αναλύσεις σε πολλά βακτήρια, αρχαιοβακτήρια και μιτοχόνδρια ευκαρυωτικών οργανισμών με την εξαίρεση τα μιτοχόνδρια του οργανισμού *Leishmania tarentolae* (Nabholz C.E. et al. 1997).

Όσον αφορά την αμιδοτρανσφεράση που προκύπτει από την μετάφραση του οπερονίου *gatDE* (εικόνα 6) είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του Gln-tRNA^{Gln} και μέχρι τώρα έχει ανιχνευθεί μόνο στα γενώματα των αρχαίων. Στο ένζυμο αυτό η πρωτεΐνη GatD αποτελεί παράλογο του *asnA* (εικόνα 7a) (Spring K.J. et al. 1986), ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για μια L-ασπαραγινάση τύπου I (συνθάση της L-ασπαραγίνης) και που έχει εντοπιστεί σε κάποια βακτήρια και αρχαία. Επιπρόσθετα, η υπομονάδα GatE του ενζύμου έχει τα χαρακτηριστικά της GatB πρωτεΐνης της Asp/Glu-AdT αμιδοτρανσφεράσης

(εικόνα 7β), ενώ και η GatD και η GatE είναι μεγαλύτερες σε μήκος από αυτές τις πρωτεΐνες με τις οποίες ομοιάζουν. Οι επιπλέον αλληλουχίες που διαθέτουν βρίσκονται αποκλειστικά στο γενετικό υλικό των αρχαιοβακτηρίων και δεν παρουσιάζουν καμία ομολογία με γνωστή πρωτεΐνη. Τα γονίδια *gatD* και *gatE* ανέρχονται στις 1334 kb και 1919 kb, αντίστοιχα, ενώ το μέγεθος των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν είναι 48860 Da για την GatD και 71844 Da για την GatE. Αυτή η αμιδοτρανσφεράση του γλουταμινικού οξέος αποσπά αμινο-



Εικόνα 6 : Το οπερόνιο *gatDE* που κωδικοποιεί για την αμιδοτρανσφεράση του γλουταμινικού οξέος στο αρχαιοβακτήριο *Pyrococcus abyssi*.



Εικόνα 7: Συντηρημένες περιοχές της πρωτοταγούς δομής των συστατικών της αμιδοτρανσφεράσης του γλουταμινικού οξέος. α) AnsA και GatD. β) GatB και GatE. Οι μπλέ γραμμές αντιπροσωπεύουν περιοχές με 75% ομοιότητα, μεταξύ των AnsA και GatD, καθώς και ανάμεσα στις GatB και GatE πρωτεΐνες. Οι πορτοκαλί γραμμές αναφέρονται στις εναπομείναντες θέσεις που παρουσιάζουν 75% ομοιότητα σε κάθε αλληλουχία ξεχωριστά. Οι αριθμοί δείχνουν τις θέσεις των αμινοξέων για τις αλληλουχίες του GatD και GatE στο *M.thermoautotrophicum*, ενώ κενά μεγαλύτερα των 12 αμινοξέων αναγράφονται με διακεκομμένες γραμμές.

μάδες τόσο από τη γλουταμίνη, όσο και από την ασπαραγίνη, δεν χρησιμοποιεί, όμως, ιόντα αμμωνίου ως δότες αμινομάδων για το σχηματισμό του Gln-tRNA^{Gln}.

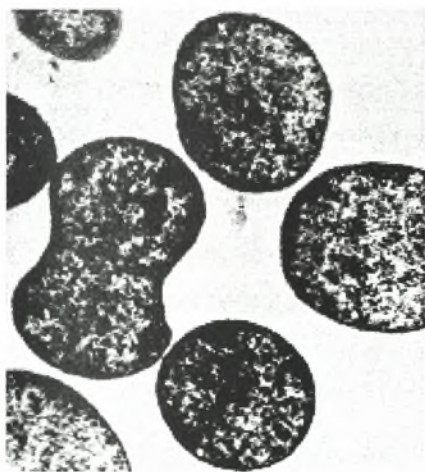
Το γεγονός ότι ο σχηματισμός του Gln-tRNA^{Gln} πραγματοποιείται στους περισσότερους προκαρυωτικούς οργανισμούς απουσία της συνθετάσης της γλουταμίνης (GlnRS) και μέσω της δράσης των αμιδοτρανοφερασών οδήγησε σε νέες μελέτες σχετικά με την εξελικτική προέλευση της GlnRS στα κύτταρα (Woese C.R. et al. 1977). Μοριακές και φυλογενετικές αναλύσεις κατέληξαν στο συμπέρασμα πως στους οργανισμούς προϋπήρχε ένα ένζυμο GluRS με διπλή δράση, ικανό να σχηματίσει εξίσου το Glu-tRNA^{Glu} και το Glu-tRNA^{Gln} (non-discriminating GluRS, ND-GluRS ή GluX). Αμέσως μετά τη διαφοροποίηση των αρχαιοβακτηρίων και των ευκαρυωτικών κυττάρων, η ND-GluRS (με διπλή εξειδίκευση) των ευκαρυωτών εξελίχθηκε και εξειδικεύτηκε για το σχηματισμό μόνο του Glu-tRNA^{Glu}. Επιπλέον, η εξέλιξη των βιοσυνθετικών μονοπατιών και η εμφάνιση ενός νέου αμινοξέος, όπως αυτό της γλουταμίνης, απαιτούσε την ύπαρξη ενός ενζύμου που θα κατέλυε την επιλεκτική σύνδεση της γλουταμίνης στο αντίστοιχο μεταφορικό RNA σχηματίζοντας έτσι το Gln-tRNA^{Gln}. Κατόπιν, και ενώ οι προκαρυωτικοί οργανισμοί διατήρησαν το έμμεσο μονοπάτι αμινοακυλίωσης, στους εξελικτικά ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς δημιουργήθηκε, με διπλασιασμό του προγονικού γονιδίου της ND-GluRS, η συνθετάση της γλουταμίνης. Έτσι, η πρωτεΐνη αυτή μεταφέρθηκε σε πολλά ευβακτήρια, όπως το εντεροβακτήριο *E. coli*, *T. Thermophilus*, *D. radiodurans*, με οριζόντια μεταφορά (συμβίωση, ιοί, κτλ.) (Lamour V. et al. 1994). Το παράδοξο αυτό φαινόμενο αποδεικνύεται από φυλογενετικά δέντρα, όπου οι GluRS των ευκαρυωτικών κυττάρων παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα και εξελικτικά είναι πιο συγγενείς με τα ένζυμα GlnRS τόσο των ευκαρυωτικών, όσο και των προκαρυωτικών οργανισμών, από ότι με τις λειτουργικά ομόλογές τους GluRS των προκαρυωτών (Brown J.R. et al. 1999). Εντούτοις, τα αρχαία στερούνται αυτής της συνθετάσης της γλουταμίνης, ενδεχομένως λόγω των σημαντικών διαφορών που παρουσιάζουν στην αλληλουχία των tRNA^{Gln} σε σχέση με τα αντίστοιχα tRNA^{Gln} των οργανισμών που διαθέτουν το ένζυμο GlnRS.

Συνοψίζοντας, τελικά είναι γεγονός η καθημερινή πρόοδος στο πεδίο της λειτουργικής γενωμικής (functional genomics) που έχει αναδείξει και συνεχώς αναδεικνύει την ποικιλομορφία των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών ανάμεσα σε διάφορους οργανισμούς και κυρίως ανάμεσα σε παθογόνους οργανισμούς και

τον άνθρωπο, η οποία μέχρι πρόσφατα ήταν αδιόρατη. Η ιδιαιτερότητα αυτή καθιστά τα σημαντικότερα αυτά ένζυμα ελκυστικούς μοριακούς στόχους έρευνας. Έτσι λοιπόν, το ενδιαφέρον μας σε αυτή την εργασία προσανατολίστηκε στις πρωτεΐνες που παίρνουν μέρος στην αμινοακυλίωση του μεταφορικού RNA της γλουταμίνης και κωδικοποιούνται από το οπερόνιο *gatDE*.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Αρχικός στόχος της έρευνας ήταν η κλωνοποίηση και η έκφραση σε στελέχη του βακτηρίου *E.coli*, του οπερονίου *gatDE*, του καθένα γονιδίου ξεχωριστά *gatD* και *gatE*, καθώς επίσης και του γονιδίου της μη εξειδικευμένης συνθετάσης του γλουταμινικού οξέος *gluX* από ένα αρχαίο, φυσικά, οργανισμό. Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια να καθαριστεί με στήλες χρωματογραφίας το ολοένζυμο GatDE, η GatD και GatE πρωτεΐνη, ούτως ώστε να μελετηθεί μετέπειτα η λειτουργικότητα και η δραστηριότητα του κάθε συστατικού του οπερονίου. Το αρχαιοβακτήριο που χρησιμοποιήθηκε είναι το *Pyrococcus abyssi* (εικόνα 8), που πρόκειται για ένα υπερθερμόφιλο οργανισμό, σε σχήμα κόκκου και το οποίο πρωτοανακαλύφθηκε και απομονώθηκε από τον πυθμένα του Ειρηνικού ωκεανού, όπου διαβιούσε σε θερμοκρασία των 100 °C. Το *Pyrococcus abyssi* χρησιμοποιεί το άμεσο βιοχημικό μονοπάτι για την εστεροποίηση του tRNA^{Asn} με την ασπαραγίνη, αφού στο γενετικό του υλικό περιέχεται το γονίδιο *asnS*, που κωδικοποιεί για μια συνθετάση της ασπαραγίνης (Roy H. et al. 2003), ενώ ταυτόχρονα δεν διαθέτει το οπερόνιο *gatCAB*. Ωστόσο σε αυτό τον οργανισμό η ύπαρξη μιας συνθετάσης του γλουταμινικού οξέος που εμφανίζει χαλαρότητα στο καταλυτικό της κέντρο (non-discriminating) GluX και της αμιδοτρανσφεράσης του γλουταμινικού οξέος, GatDE, αποτελεί το μοναδικό τρόπο σχηματισμού του Gln-tRNA^{Gln}, αφού το αρχαίο στερείται της συνθετάσης της γλουταμίνης, GlnRS.



Εικόνα 8: Το υπερθερμόφιλο αρχαιοβακτήριο *Pyrococcus abyssi* ανακαλύφθηκε στον πυθμένα του Ειρηνικού ωκεανού όπου η θερμοκρασία αγγίζει τους 100 °C.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

- ✓ Άγαρ (SIGMA)
- ✓ Αγαρόζη (SIGMA)
- ✓ Αιθανόλη 100 % (MERCK)
- ✓ Ακρυλαμίδιο (SIGMA)
- ✓ Αμπικιλλίνη (SERVA)
- ✓ APS (Ammonium persulfate) (MERCK)
- ✓ β-μερκαπτοαιθανόλη (SERVA)
- ✓ Βρωμιούχο αιθίδιο (SIGMA)
- ✓ BSA (Bovine Serum Albumin) (PROMEGA)
- ✓ Γλυκερόλη (MERCK)
- ✓ Γλυκίνη (MERCK)
- ✓ Γλυκόζη (SIGMA)
- ✓ Οξικό οξύ (SIGMA)
- ✓ Οξικό νάτριο (SIGMA)
- ✓ Οξικό αμμώνιο (MERCK)
- ✓ Coomassie Brilliant Blue (BIO-RAD)
- ✓ Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (HPO_4^- , PO_4^{-2}) (MERCK)
- ✓ Εκχύλισμα ζύμης (BIO-RAD)
- ✓ EDTA (SIGMA)
- ✓ Ηπαρίνη (WHATMAN)
- ✓ HCl (MERCK)
- ✓ IPTG (Isopropyl ThioGalactosyl) (MERCK)
- ✓ Κυτταρίνη (DEAE) (Whatman)
- ✓ X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside) (PROMEGA)
- ✓ Μπλε της βρωμοφαινόλης (SIGMA)
- ✓ Νουκλεοτιδία (dNTPs) (FINNZYME)
- ✓ NaCl (MERCK)
- ✓ Na_2EDTA (MERCK)
- ✓ NaOH (MERCK)
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα dynazyme ext (FINNZYME)

- ✓ Σακχαρόζη (SIGMA)
- ✓ Sarcosine (SIGMA)
- ✓ SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (SIGMA)
- ✓ TEMED (Tetramethylethylenediamine) (SIGMA)
- ✓ Tris base (MERCK)
- ✓ Tryptone (SERVA)
- ✓ Υδροξυαπατιτης (WHATMAN)
- ✓ Φαινόλη (MERCK)
- ✓ Χλωραμφαινικόλη (SIGMA)
- ✓ Χλωροφόρμιο (MERCK)

3.1.2. Ένζυμα

- ✓ Βακτηριακή αλκαλική φωσφατάση (STRATAGENE)
- ✓ BamH1 (NEW ENGLAND BIOLABS)
- ✓ Dynazyme ext πολυμεράση (Finnzyme)
- ✓ EcoR1 (NEW ENGLAND BIOLABS)
- ✓ Nde1 (NEW ENGLAND BIOLABS)
- ✓ Ριβονουκλεάση (NEW ENGLAND BIOLABS)
- ✓ Pac1 (NEW ENGLAND BIOLABS)
- ✓ T4 λιγάση (NEW ENGLAND BIOLABS)
- ✓ Xho1 (NEW ENGLAND BIOLABS)

3.1.3. Κύτταρα

XL 1 blue

Στέλεχος του *E.coli* που δεν διαθέτει το μηχανισμό αναγνώρισης και καταστροφής ξένων τμημάτων DNA (NOVAGEN), γι' αυτό και χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού γονιδιώματος.

BL 21 Rosetta

Είναι στέλεχος του *E.coli* και περιέχει πλασμίδια που του προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό της χλωραμφαινικόλης (NOVAGEN). Περιέχει στο γένωμά του τις πληροφορίες για τη σύνθεση έξι tRNAs που μπορούν και αναγνωρίζουν τέσσερα σπάνια κωδικόνια (rare codons) που χρησιμοποιούνται ευρέως από τα αρχαιοβακτήρια. Τα tRNAs αυτά ονομάζονται minor tRNAs.

BL 21 codon plus

Είναι στέλεχος του *E.coli* και περιέχει πλασμίδια που του προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό της κλωραμφαινικόλης (NOVAGEN). Στο γενετικό του υλικό επίσης διαθέτει τις πληροφορίες για τη σύνθεση τεσσάρων minor tRNAs.

3.1.4. Θρεπτικά μέσα

LB (Luriat Broth) υγρό μέσο (1L):

- Tryptone (10 g)
- Εκχύλισμα ζύμης (5 g)
- NaCl (5 g)
- Απιονισμένο H₂O

LB (Luriat Broth) στερεό μέσο (1L):

- Tryptone (10 g)
- Εκχύλισμα ζύμης (5 g)
- NaCl (5 g)
- Απιονισμένο H₂O
- Άγαρ (15 g)

Για την καλλιέργεια στελεχών ανθεκτικά στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης και της κλωραμφαινικόλης είναι απαραίτητη η προσθήκη στο θρεπτικό μέσο 200 µg/L θρεπτικού μέσου LB και 50 µg/L θρεπτικού μέσου LB, αντίστοιχα.

3.1.5. Φορείς-πλασμίδια

Τορο

Έχει μέγεθος 3,9 kb και χρησιμοποιείται μόνο για τη κλωνοποίηση γονιδίων (INVITROGEN). Περιέχει τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη. Επίσης διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης (*lacZ*). Το οπερόνιο της λακτόζης κωδικοποιεί για τρία ένζυμα, τη β-γαλακτοσιδάση που διασπά το δισακχαρίτη λακτόζη σε D-γλυκόζη και D-γαλακτόζη, τη περμεάση που καταλύει τη μεταφορά της λακτόζης μέσα στο κύτταρο και τη τρανσακετυλάση που δεν είναι απαραίτητη για τον μεταβολισμό της λακτόζης και ο φυσιολογικός της ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί μέχρι τώρα. Η μεταγραφή αυτού του οπερονίου

επάγεται από την ύπαρξη της λακτόζης στο περιβάλλον. Το χαρακτηριστικό της αντίδρασης διάσπασης της λακτόζης είναι η παραγωγή μπλέ χρωστικών.

Στα πλασμίδια, λοιπόν, που διαθέτουν το οπερόνιο της *lacZ*, ο πολυσυνδέτης (polylinker) βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία του οπερονίου αυτού και άρα το γονίδιο που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε θα διακόπτει και αυτό τη συνέχεια του οπερονίου. Η διακοπή της αλληλουχίας του οπερονίου φυσικά προκαλεί την απενεργοποίησή του. Το γεγονός αυτό εκμεταλλεύονται οι ερευνητές για να κλωνοποιήσουν γονίδια σε βακτηριακούς φορείς. Έτσι μετά τη μεταφορά του πλασμιδίου με το κλωνοποιημένο γονίδιο στα κύτταρα, αυτά επωάζονται και αναπτύσσεται καλλιέργεια. Τότε παρουσία του επαγωγέα λακτόζη (X-gal), οι αναπτυσσόμενες αποικίες που παρουσιάζονται λευκές σημαίνει ότι έχουν ενσωματώσει το πλασμίδιο με το κλωνοποιημένο γονίδιο, ενώ όσες χρωματίζονται μπλε σημαίνει πως τα κύτταρα τους δεν έχουν προσλάβει το πλασμίδιο ή το πλασμίδιο δεν έχει ενσωματώσει το επιθυμητό γονίδιο.

Το πλασμίδιο, επιπλέον, έχει τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης για τη μεταγραφή του *lacZ* οπερονίου. Το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης προέρχεται από βακτηριοφάγο με τον οποίο μεταφέρθηκε και ενσωματώθηκε στο χρωμόσωμα των κυττάρων που χρησιμοποιούμε. Στα κύτταρα του *E.coli*, όμως, αναστέλλεται η έκφραση του γονιδίου αυτού από τον καταστολέα LacI^Q. Γι' αυτό είναι απαραίτητη η προσθήκη του προαγωγέα IPTG (Isopropyl Thio Galactosyl), ο οποίος δεσμεύει και απομακρύνει τον καταστολέα από το DNA επιτρέποντας έτσι την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης. Αυτή με τη σειρά της θα αναγνωρίσει τον προαγωγέα της στο πλασμίδιο και θα μεταγράψει τα γονίδια που βρίσκονται μετά από αυτόν.

pET 3.1

Έχει μέγεθος 4,6 kb (NOVAGEN) και διαθέτει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση και έκφραση γονιδίων με τη χρήση της T7 RNA πολυμεράσης με τον ίδιο μηχανισμό που προαναφέρθηκε. Στο πλασμίδιο pET3,1 και pET15b και μετά τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης υπάρχει ο πολυσυνδέτης (polylinker), όπου βρίσκονται όλες οι θέσεις αναγνώρισης και κοπής από τα ένζυμα περιορισμού. Έτσι, με τη χρήση των κατάλληλων ενζύμων εισάγουμε το γονίδιο που θέλουμε να εκφράσουμε.

pET 15b

Έχει μέγεθος 5,6 kb (NOVAGEN) και προσδίδει στα κύτταρα που το περιέχουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Χρησιμοποιείται για κλωνοποίηση και έκφραση γονιδίων. Διαθέτει, επίσης, την ουρά των έξι ιστιδινών δίπλα στην οποία βρίσκεται ο πολυσυνδέτης (polylinker) για την εισαγωγή γονιδίων. Οι ιστιδίνες αυτές εκφράζονται μαζί με το κλωνοποιημένο γονίδιο και του δίνει το πλεονέκτημα εύκολου διαχωρισμού του σε στήλη με άτομα νικελίου (Ni). Τα άτομα αυτά του νικελίου δημιουργούν σύμπλοκα με το ιμιδαζολικό δακτύλιο των ιστιδινών κατακρατώντας έτσι την επιθυμητή πρωτεΐνη.

3.1.6. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffers)

Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και περιέχει:

- Tris base 400 mM
- Οξικό νάτριο 50 mM
- Na₂EDTA 10 mM
- Οξικό οξύ pH 7,9

Το διάλυμα της χρωστικής Sarkozyl Dye αποτελείται από:

- Sarcosine 2 % (w/v)
- Μπλέ της βρωμοφαινόλης 0,12 % (w/v)
- Na₂EDTA 125 mM
- Σακχαρόζη 25 % (v/v)

Το ρυθμιστικό διάλυμα για το gel πολυακρυλαμιδίου (10 % για 1L) περιέχει:

- Tris 30 g (pH 9,2)
- Γλυκίνη 140 g
- SDS 10 g

Το ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού που χρησιμοποιούμε για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών αποτελείται από:

- Tris HCl 0,4M (pH 6,8)
- SDS 8 % (w/v)
- Γλυκερόλη 40 %
- β-μερκαπτοαιθανόλη 8 %

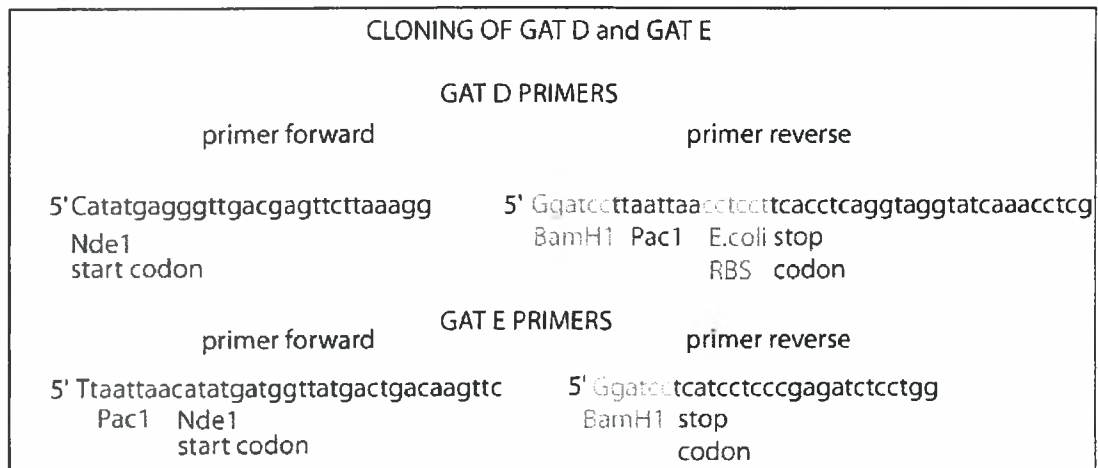
- Μπλε της βρωμοφαινόλης 0,05 %

Το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (breaking solution) που χρησιμοποιείται για να ανοιχθούν πόροι στις κυτταρικές μεμβράνες αποτελείται από:

- Tris 100 mL (pH 7,5)
- β-μερκαπτοαιθανόλη 5 mM
- EDTA 0,1 mM

3.1.7. Εκκινητές (primers)

Για την κλωνοποίηση των *gatD* και *gatE* γονιδίων (Γενωμικό DNA από STRATAGENE) χρησιμοποιούνται εξειδικευμένα ολιγονουκλεοτίδια, ως εκκινητές (primers), μήκους 28-46 βάσεων (εικόνα 9), συμπεριλαμβανομένων και των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στις θέσεις δράσης των ενζύμων περιορισμού που θα επιλεγθούν για την περαιτέρω επεξεργασία των γονιδίων (BIO-RAD).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της αλληλουχίας των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

3.2.1. Συγκέντρωση του DNA

Η συγκέντρωση του DNA καθορίζεται από την απορρόφησή του στα 260nm με τη χρήση φασματοφωτομέτρου. Οπτική πυκνότητα ίση με 1 ισοδυναμεί με 50 mg DNA ανά ml διαλύματος περίπου.

3.2.2. Τεχνική μεταφοράς DNA στο *E.coli* με ηλεκτρισμό (*electroporation*)

100 ng DNA προσθέτονται σε 800 μl κυττάρων και εφαρμόζεται τάση 2,2 kV.

3.2.3. Προετοιμασία των κυττάρων

Ανάπτυξη των κυττάρων μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να φτάσει στο 0,6. Στη συνέχεια η καλλιέργεια των κυττάρων αφήνεται για 30 *min* στο πάγο και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 rpm. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και πλένεται με κρύο και αποστειρωμένο νερό το ίζημα των κυττάρων. Αφού φυγοκεντρηθούν επαναλαμβάνεται η διαδικασία του πλυσίματος. Το ίζημα κρατείται σε διάλυμα με H₂O και 10% γλυκερόλη και αποθηκεύεται στους -80°C (όλα τα στάδια πραγματοποιούνται σε αυστηρώς αποστειρωμένες συνθήκες).

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

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Λαμβάνονται 2 mL από υγρή καλλιέργεια των κυττάρων και φυγοκεντρώνται για 1 *min*. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και κρατούμε το ίζημα των κυττάρων όπου προσθέτουμε 200 μL από το διάλυμα I και αναμιγνύουμε για να ομογενοποιήσουμε το διάλυμα. Η γλυκόζη, που περιέχεται στο διάλυμα I, διατηρεί την ωσμωτική πίεση στο διάλυμα των κυττάρων και τα προστατεύει από την πλασμόλυση. Το EDTA δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα που αποτελούν συνένζυμα στη δράση νουκλεασών. Έτσι αποφεύγεται η διάσπαση του πλασμιδίου. Στη συνέχεια προστίθενται 400 μL από το διάλυμα II και αφού αναδεύσουμε ελαφρώς αφήνουμε το διάλυμα για 5

min στο πάγο. Ακολούθως προστίθενται 200 μL από το διάλυμα III, αναμιγνύονται και αφήνεται το διάλυμα στο πάγο για 10 min. Το διάλυμα II δημιουργεί πόρους στη κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων, επιτρέποντας έτσι την έξοδο των νουκλεϊκών οξέων από το κύτταρο. Το διάλυμα III προκαλεί τη κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, αλλά λόγω των αλάτων που περιέχει ρυθμίζει και το pH του διαλύματος. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος στο πάγο το διάλυμα φυγοκεντρείται για 15 min στους 4000 rpm και κρατάμε το υπερκείμενο (το ίζημα περιέχει πρωτεΐνες που έχουν καθιζάνει μετά τη προσθήκη του διαλύματος III). Έπειτα στο υπερκείμενο προστίθεται αιθανόλη 100% 900 μL , αναμειγνύεται και φυγοκεντρείται για 10 min, στους 20°C και στις 4000 rpm. Σε αυτό το στάδιο καθιζάνουν τα πλασμίδια, το RNA διαλύεται και παραμένει στο υπερκείμενο. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου, προσθήκη 900 μL αιθανόλης 80 % στο ίζημα και φυγοκέντρηση για 5 min, 4°C και 4000 rpm. Ομοίως απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξηραίνεται για 5 min. Τελικά προστίθενται 40 μL H_2O και αναδεύεται. Πάντοτε ύστερα από την προετοιμασία αυτή του DNA αναλύουμε το διάλυμα σε πήκτωμα αγαρόζης για να βεβαιωθούμε ότι υπάρχει DNA στο διάλυμα.

Το διάλυμα I περιέχει:

- ▼ Γλυκόζη 50 mM
- ▼ EDTA 10 mM
- ▼ Tris 25 mM (pH 8)

Το διάλυμα II περιέχει:

- ▼ SDS 1% και
- ▼ NaOH 0,2 M

Το διάλυμα III αποτελείται από:

- ▼ Οξικό αμμώνιο 7,5 M (pH 6,5)

3.2.5. Διαχωρισμός του DNA

Ηλεκτροφορούμε το διάλυμα του DNA σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης 1% συγκέντρωσης. Για τη δημιουργία του gel χρησιμοποιείται αγαρόζη και ρυθμιστικό διάλυμα TAE (10x). Το διάλυμα που περιέχει αυτά τα δυο συστατικά, θερμαίνεται μέχρι να λιώσει η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο 2 μL και το διάλυμα τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή όπου και αφήνεται να πήξει. Εν τω μεταξύ προετοιμάζεται το δείγμα που θα ηλεκτροφορηθεί με τη προσθήκη της χρωστικής Sarkozyl Dye. Όταν το gel στερεοποιηθεί φορτώνουμε το δείγμα

στις θέσεις υποδοχής που υπάρχουν στο gel και εφαρμόζουμε τάση 150 V. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης ανιχνεύουμε την ύπαρξη DNA στην υπεριώδη ακτινοβολία, που επιτυγχάνεται με την προσθήκη του βρωμιούχου αιθιδίου που έχει προηγηθεί.

3.3. ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

3.3.1. Ανάλυση με ένζυμο περιορισμού

Η διεργασία αυτή πρόκειται για την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA με ένζυμο περιορισμού. Πλασμιδιακό DNA επωάζεται με το ένζυμο σε αναλογία 5 Units (ενζυμικές μονάδες)/μg DNA, παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος που προτείνεται από τον κατασκευαστή, και αφήνεται για 3 ώρες στους 37°C. Η ενζυμική μονάδα ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει 1 μg DNA από βακτηριοφάγο σε μια ώρα, σε βέλτιστες συνθήκες. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά είναι τα BamH1, Nde1, Xho1, Pac1, BglII και EcoR1. Κατά την επεξεργασία του πλασμιδίου με ένζυμο περιορισμού, προστίθεται επίσης μια ριβονουκλεάση (RNase) για την διάσπαση τυχόν RNA προσμίξεων, καθώς και BSA (10x). Η ουσία αυτή δεσμεύεται στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωλήνων, εμποδίζοντας έτσι την δέσμευση των ενδονουκλεασών σε αυτά και την επακόλουθη μείωση της δραστικότητάς των.

3.3.2. Αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του DNA

5 μg γραμμικού DNA επωάζονται για 2 ώρες, στους 60 °C με 260 Units βακτηριακής αλκαλικής φωσφατάσης στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

3.3.3. Σύδεση τμημάτων DNA

50 ng γραμμικού και αποφωσφορυλιωμένου φορέα παρουσία των τμημάτων, που επιθυμούμε να συνδέσουμε και σε αναλογία φορέα προς τμήμα DNA 1:10, επωάζονται με 1 Unit T4 λιγάσης για 18 ώρες στους 16°C. Επιπλέον, προσθέτουμε ATP τελικής συγκέντρωσης 2 mM στο διάλυμα.

3.3.4. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η Dynazyme ext πολυμεράση που χρησιμοποιείται προσθέτει στο τέλος κάθε αλυσίδας, που συνθέτει, αδενίνες. Αρχικά προσθέτουμε το ρυθμιστικό διάλυμα, τα νουκλεοτίδια, τους εκκινητές και το H₂O και φυγοκεντρούμε το διάλυμα. Στη συνέχεια προσθέτουμε το DNA και αναμιγνύουμε. Στο τέλος προσθέτουμε το ένζυμο, αναδεύουμε και φυγοκεντρούμε για ομοιόμορφη κατανομή του ενζύμου στο διάλυμα. Η PCR

ξεκινάει με ένα στάδιο μετουσίωσης σε θερμοκρασία 95°C για 4 min και ακολουθούν 30 κύκλοι καθένας από τους οποίους αποτελείται από ένα βήμα μετουσίωσης στους 95 °C για 45 sec, ένα στάδιο υβριδισμού στους 55 °C για 45 sec και ένα στάδιο πολυμερισμού στους 72 °C για 1 min και 30 sec. Κατόπιν διατηρείται η θερμοκρασία υβριδισμού (72°C) για 10 min. Τα υλικά που προστίθενται είναι τα κάτωθι:

- Ρυθμιστικό διάλυμα dynazyme ext 5 μ L
- Νουκλεοτίδια (dNTPs) (25 mM) 0,5 μ L
- Εκκινητές sense (100 μ M) 1 μ L
- Εκκινητές antisense (100 μ M) 1 μ L
- Γενωμικό DNA 0,3 μ L
- Dynazyme πολυμεράση ext 1 μ L

3.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

3.4.1. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, τη πηκτή διαχωρισμού και τη πηκτή συγκέντρωσης. Το πήκτωμα συγκέντρωσης, όπως φαίνεται και από την ονομασία του, συγκεντρώνει τη ποσότητα των δειγμάτων που έχουμε φορτώσει, τα οποία στη συνέχεια διαχωρίζονται στη πηκτή διαχωρισμού. Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν τα φορτώσουμε στην πηκτή περιλαμβάνει τη προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού (σε αναλογία 0,05%) και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η μετουσίωση των πρωτεϊνών υλοποιείται με την τοποθέτηση των δειγμάτων στους 100°C, για 2 min, ούτως ώστε να γίνει διαχωρισμός τους σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση το φορτίο τους. Στη συνέχεια, αφού φορτωθούν τα δείγματα στη πηκτή και προστεθεί στην ηλεκτροφορητική συσκευή το ρυθμιστικό διάλυμα, που περιέχει Tris, SDS και γλυκίνη, εφαρμόζεται τάση 200 V.

Πηκτή διαχωρισμού (10%)(ποσότητες για 4 πηκτές):

- ✦ Ακρυλαμίδιο 30% (6,6 mL)
- ✦ Tris HCl 1M (pH 8,8) (7,5 mL)
- ✦ H₂O (5,7 mL)
- ✦ SDS 10% (200 μL)
- ✦ TEMED (40 μL)
- ✦ APS 20% (120 μL)

Πηκτή συγκέντρωσης (4,5%) (ποσότητες για 4 πηκτές):

- ✦ Ακρυλαμίδιο 30% (1,5 mL)
- ✦ Tris HCl 1M (pH 6,8) (1,5 mL)
- ✦ H₂O (7,1 mL)
- ✦ SDS 10% (100 μL)
- ✦ TEMED (20 μL)
- ✦ APS 20% (60 μL)

3.4.2. Καθαρισμός πρωτεϊνών

Για τον καθαρισμό των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τρία διαφορετικά υλικά χρωματογραφίας (Becker H.D. et al. 1997). Η πρώτη στήλη ανιονανταλλαγής αποτελείται από κυτταρίνη (DEAE), όπου αρνητικά μόρια δεσμεύονται από τις διαιθυλοαμινοαιθυλο ομάδες που βρίσκονται προσδεσμεμένες στη μήτρα της κυτταρίνης (5 cm² x 25,5 cm). Για την έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών στη στήλη, κατασκευάζονται δυο ρυθμιστικά διαλύματα Α και Β που περιέχουν αντίστοιχα τα εξής:

- 20 mM φωσφορικών ιόντων (HPO₄⁻ και PO₄⁻²) (pH 7,2)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (2900x)
- EDTA (5000x)

και

- 300 mM φωσφορικών ιόντων, (pH 6,8)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (2900x)
- EDTA (5000x)

Εν συνεχεία, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) διεξάγεται σε στήλη διαχωρισμού από υδροξυαπατίτη [Ca₅(PO₄)₃OH]₂ (3,14 cm² x 15 cm) στην οποία οι ομάδες ανιοντικής ανταλλαγής είναι το άλας Ca₃(PO₄)₂. Τα διαλύματα έκλουσης που χρησιμοποιούνται C και D αποτελούνται, αντίστοιχα, από:

- 20 mM φωσφορικών ιόντων (pH 6,8)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (2900x)
- απιονισμένο H₂O

και

- 300 mM φωσφορικών ιόντων (pH 6,8)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (2900x)
- απιονισμένο H₂O

Η στήλη υδροξυαπατίτη έχει όγκο 5mL, ενώ ο ρυθμός ροής και συλλογής των κλασμάτων είναι 0,8 mL/min. Η πίεση που αναπτύσσεται κυμαίνεται στα 100 psi (60 bar=900 psi).

Τελικά για την επίτευξη μεγάλου βαθμού καθαρότητας της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης GatD πραγματοποιείται HPLC σε στήλη ηπαρίνης αυτή τη φορά. Η αгарόζη αποτελεί τη μήτρα αυτής της στήλης καθαρισμού, ενώ η ηπαρίνη είναι το θετικά φορτισμένο μόριο που βρίσκεται προσδεσμένο στην αгарόζη και στο οποίο οφείλεται η ηλεκτροστατική έλξη και συγκράτηση των αρνητικά φορτισμένων μορίων που διασχιίζουν τη στήλη. Για αυτή τη στήλη

χρωματογραφίας κατασκευάζονται δυο νέα ρυθμιστικά διαλύματα E και F. Το E αποτελείται από:

- ✓ 50 mM Tris, pH 7,5
- ✓ β-μερκαπτοαιθανόλη (2900x)
- ✓ EDTA (5000x)

ενώ το F διάλυμα περιέχει:

- ✓ 50 mM Tris, pH 7,5
- ✓ β-μερκαπτοαιθανόλη (2900x)
- ✓ EDTA (5000x)
- ✓ NaCl 2M

Αμέσως μετά την κατασκευή των παραπάνω διαλυμάτων, αυτά φιλτράρονται για την απομάκρυνση οποιονδήποτε μολύνσεων που μπορεί να περιέχουν και για την αποφυγή εσφαλμένων και μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων κατά το καθαρισμό των πρωτεϊνών.

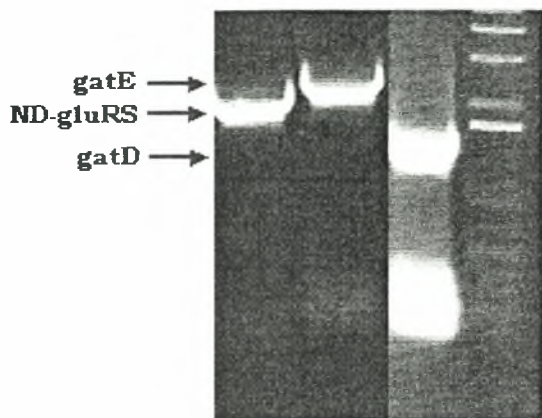
Κατά τη μεταφορά του διαλύματος της προς καθαρισμό πρωτεΐνης από τη μια στήλη καθαρισμού στην επόμενη απαιτείται μια διαδικασία αλλαγής του ρυθμιστικού διαλύματος, μέσα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη που πρόκειται να καθαριστεί. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως διαπίδυση (dylising), και κατά την διεξαγωγή της, το διάλυμα της πρωτεΐνης GatD μεταφέρεται κάθε φορά σε ημιπερατή μεμβράνη η οποία στη συνέχεια βυθίζεται σε δοχείο μεγάλου όγκου, το οποίο περιέχει το διάλυμα που είναι απαραίτητο να είναι διαλυμένη η πρωτεΐνη για να φορτωθεί στη κατάλληλη στήλη χρωματογραφίας και αφήνεται για 14 ώρες. Η διαφορά στην ωσμωτική πίεση που αναπτύσσεται προκαλεί αντικατάσταση του πρώτου διαλύματος, στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη, με το διάλυμα στο οποίο εμβαπτίζεται η ημιπερατή μεμβράνη.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

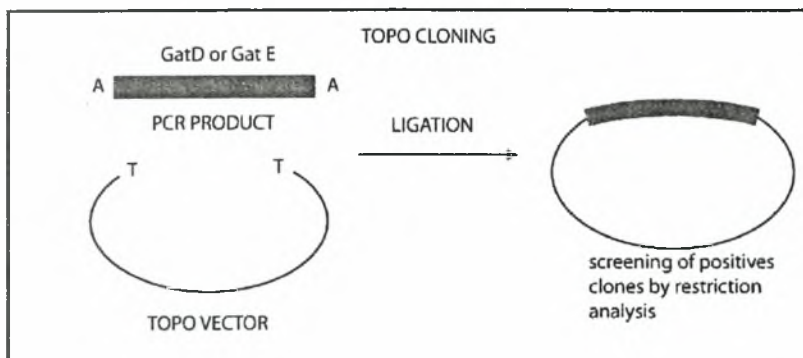
4.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ *gatD*, *gatE* ΚΑΙ *gluX* ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Αρχικός στόχος ήταν η κλωνοποίηση του κάθε γονιδίου, του *gatD*, του *gatE* και του *gluX* (ND-*gluRS*) σε ένα φορέα κλωνοποίησης και συγκεκριμένα στο πλασμίδιο *toro*. Ξεκινώντας με τον πολλαπλασιασμό των επιθυμητών γονιδίων, πραγματοποιήθηκε η PCR αντίδραση, αφού πρώτα προετοιμάστηκαν τρία δείγματα τελικού όγκου 50μl, ένα για κάθε γονίδιο. Αφού ολοκληρώθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης έγινε ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έγιναν ορατά σε υπεριώδη ακτινοβολία (εικόνα 10) και αφού πήραμε σωστά αποτελέσματα απομονώθηκαν από την πηκτική οι ζώνες που αντιστοιχούν στο τμήμα του *gatD*, του *gatE* και του *gluX*, ξεχωριστά, και τοποθετήθηκαν σε μικρούς σωλήνες. Οι σωλήνες αυτοί φυγοκεντρήθηκαν για 15 min, στους 4°C και σε 10000 rpm, ώστε η περίσσεια της αγαρόζης να απομακρυνθεί και να συγκρατηθεί στα σωληνάκια το DNA για περαιτέρω επεξεργασία. Ακολούθως σε αυτά τα δείγματα του DNA, διεξήχθη εκκύλιση με φαινόλη για να εξαλειφθούν τα κατάλοιπα της αγαρόζης, να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες από το DNA, καθώς και να κατακρημνισθεί το γενετικό υλικό. Έτσι λοιπόν, στο διάλυμα κάθε γονιδίου, και αφού προηγήθηκε ξήρανση του ιζήματος των DNA τμημάτων, προστέθηκε ο φορέας *toro* και ακολούθησε ένωση των τμημάτων αυτών με τη δράση της λιγάσης (εικόνα 11). Εν συνεχεία, το πλασμιακό DNA διαχωρίστηκε από το ένζυμο λιγάση και από την παρουσία τυχόν άλλων πρωτεϊνών με τη διεξαγωγή στα διαλύματα των τεχνικών εκκύλιση με φαινόλη και κατακρήμνιση του γενετικού υλικού. Καθένα από τα τρία διαλύματα αναμείχθηκαν με κύτταρα XL1 blue σε αναλογία 1:8 και με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης ανοίχθηκαν πόροι στις κυτταρικές μεμβράνες που διευκόλυναν το μετασχηματισμό των κυττάρων. Τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε τρυβλία που περιείχαν άγαρ, θρεπτικό μέσο LB και λακτόζη (X-gal). Όσες λευκές αποικίες αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία 24 υγρών καλλιεργειών, κάτω από ασηπτικές συνθήκες, για κάθε ένα από τα τρία κλωνοποιημένα γονίδια, σε σωλήνες των 10 mL (falcon). Σε αυτούς προστέθηκε υγρό θρεπτικό μέσο LB, το οποίο περιείχε το αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Όλες οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα, υπό συνεχή

ανάδευση για 14 ώρες στους 37°C. Για την εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA από τα κύτταρα ακολουθήθηκε η διεργασία απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα και κατακρήμνισή του.



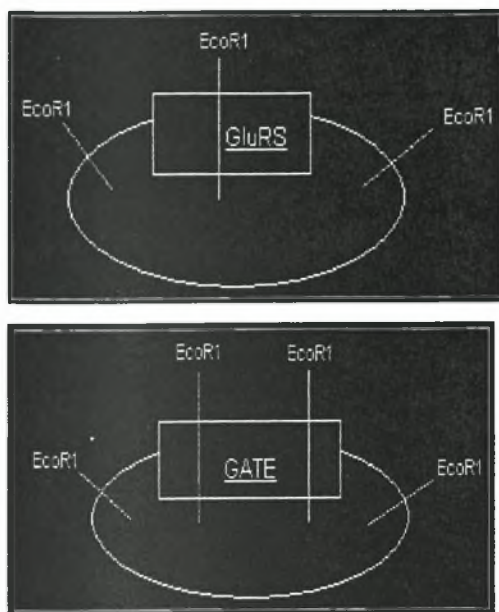
Εικόνα 10: Τα τμήματα του DNA, *gatE*, *ND-gluRS* και *gatD* μετά το πολλαπλασιασμό τους με την PCR. Το *gatE* έχει μέγεθος 1919 kb, ενώ ο αριθμός των ζευγών βάσεων για τα *gatD* και *gluX* ανέρχεται σε 1334 kb και 1716 kb, αντίστοιχα.



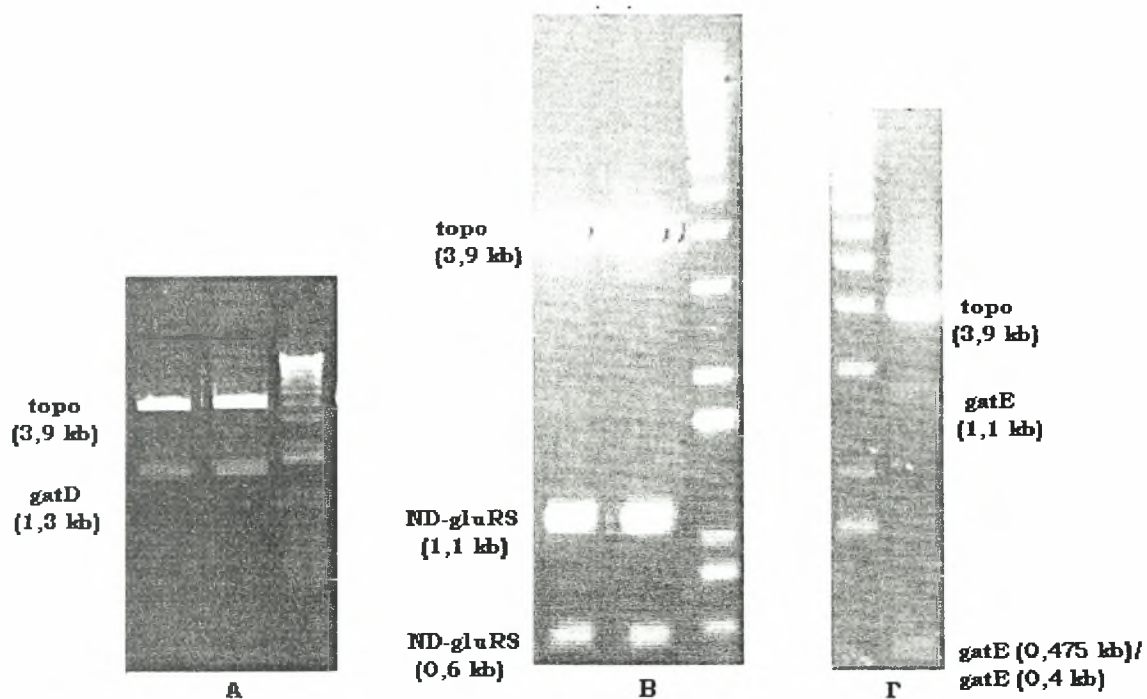
Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας κλωνοποίησης των *gatD*, *gatE*, *gluX* γονιδίων σε φορέα topo.

Για να αποφανθούμε για το αν τελικά τα πλασμίδια έχουν ενσωματώσει τα *gatD*, *gatE* και *gluX* γονίδια, πραγματοποιήσαμε ανάλυση με ένζυμο περιορισμού. Τα δείγματα του πλασμιδιακού DNA, που είχαν επωαστεί με το *gatD* γονίδιο επεξεργάστηκαν με τις ενδονουκλεάσες BamH1 και Nde1, ενώ τα δείγματα με τα κλωνοποιημένα *gatE* και *gluX* γονίδια με το ένζυμο EcoR1. Συγκεκριμένα το γονίδιο *gatE* διαθέτει δυο θέσεις κοπής για την ενδονουκλεάση EcoR1, μία το γονίδιο *gluX* και δυο θέσεις αναγνώρισης υπάρ-

χουν κατά μήκος του πλασμιδίου topo (εικόνα 12). Έτσι, στη πηκτή της αγαρόζης, όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα παραπάνω δείγματα μετά την πέψη



Εικόνα 12 : Οι θέσεις αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου EcoR1 για τον πλασμιδιακό φορέα topo και τα κλωνοποιημένα σε αυτόν γονίδια *ND-gluRS* (πρώτο σχήμα) και *gatE* (δεύτερο σχήμα).



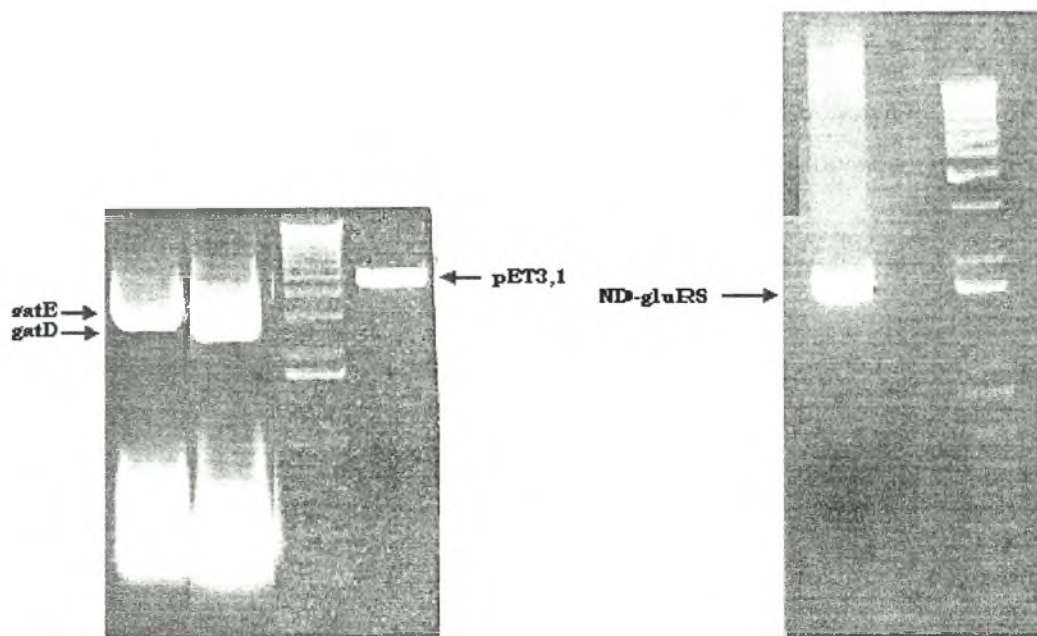
Εικόνα 13 : Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, μετά τη διεργασία mini preparation και τη πέψη των κλωνοποιημένων, σε topo φορέα, *gatD*, *ND-gluRS* και *gatE* γονιδίων. Α) Η πέψη, με τα ένζυμα περιορισμού BamH1 και Nde1, του

πλασμιδίου με το εισαχθέν *gatD* γονίδιο καταλήγει στην εμφάνιση δυο ζωνών. Το τμήμα του *gatD* είναι το μικρότερο σε μέγεθος και παρατηρείται στο κάτω μέρος της κλίμακας, ενώ το πλασμιδιακό DNA εμφανίζεται στο πάνω μέρος του πηκτώματος. Β) Ο τοπο φορέας που έχει συνδεθεί με το *ND-gluRS* γονίδιο. Στο αποτύπωμα του πηκτώματος φαίνονται οι τρεις ζώνες που προκύπτουν από πέψη με την ενδονουκλεάση EcoRI. Γ) Το EcoRI έχει δυο θέσεις αναγνώρισης στο πλασμίδιο και δυο στο *gatE* γονίδιο, οπότε προκύπτουν τέσσερις ζώνες, όπως φαίνεται και στην εικόνα. Οι δυο μικρού μεγέθους ζώνες, των 475 b και 400 b, έχουν μετατοπιστεί σχεδόν ισοδύναμα πάνω στο πήκτωμα της αγαρόζης (λόγω της μικρή διαφοράς τους στο μέγεθος) και έτσι δεν είναι ευδιάκριτες και φαίνονται σαν μια ενιαία ζώνη.

τους, αναμενόταν να παρατηρήσουμε δυο ζώνες για το πλασμίδιο με το κλωνοποιημένο *gatD* γονίδιο (εικόνα 13Α), τέσσερις για το φορέα με το *gatE* γονίδιο (εικόνα 13Γ) και τέλος τρεις ζώνες για το φορέα με το γονίδιο της *gluX* (εικόνα 13Β). Από τους 24 για κάθε γονίδιο κλώνους οι θετικοί για το *gatD* γονίδιο ήταν πέντε, για το *gatE* ήταν τέσσερις και για το *gluX* επτά.

4.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ *gatD*, *gatE* ΚΑΙ *gluX* ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Επειτα, η επιτυχής κλωνοποίηση των γονιδίων σε φορέα, όπου θα είναι δυνατόν η έκφρασή τους, απαιτούσε την λήψη των θετικών για το κάθε γονίδιο κλώνων (εικόνα 13) και επεξεργασία τους με ένζυμα περιορισμού. Για τα πλασμίδια με τα *gatD* και *gatE* έγινε πέψη με τα ένζυμα BamH1 και Nde1, ενώ για το *gluX* με τα Nde1 και Xho1 και δημιουργήθηκαν κατάλληλα αλληλεπικαλυπτόμενα άκρα που θα διευκολύνουν την ένωσή τους με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET3,1. Στη συνέχεια για την απομάκρυνση των ενζύμων από τα τμήματα DNA διεξήχθη η μέθοδος απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης (εικόνα 14). Ταυτόχρονα προετοιμάστηκε ο φορέας pET3,1 με πέψη με τις ενδονουκλεάσες BamH1 και Xho1 και ακολούθως με αποφωσφορυλίωσή του. Τα *gatD*, *gatE*, *gluX* απομονώθηκαν από το πήκτωμα και μαζί με τον φορέα pET3,1 υπέστησαν εκκύλιση με φαινόλη και τελικά κάθε ένα δείγμα των παραπάνω γονιδίων τοποθετήθηκε μαζί με μικρή ποσότητα του πλασμιδίου και αφέθηκαν στον επωαστήρα για να συνδεθούν. Μετά το πέρας

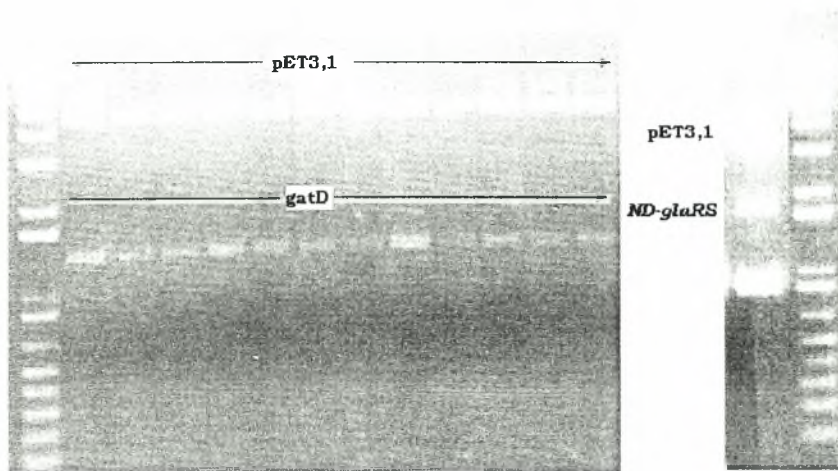
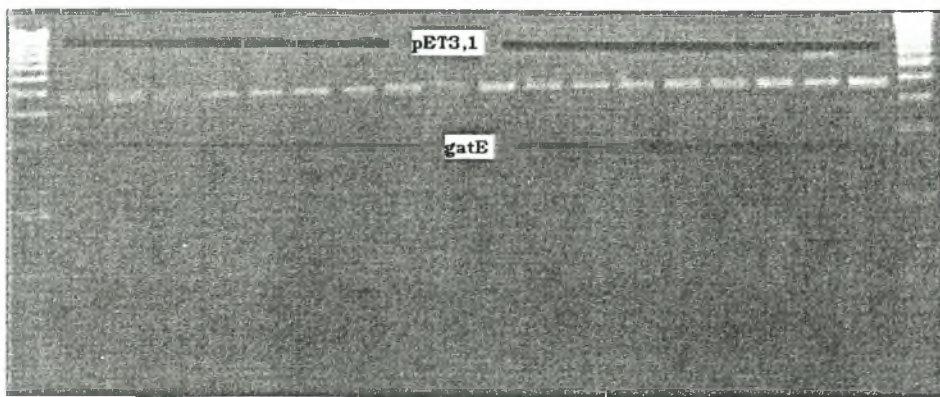


Εικόνα 14 : Την απομόνωση των *gatD*, *gatE* και *ND-gluRS* ακολούθησε η διαδικασία mini preparation για απομάκρυνση των ενδονουκλεασών. Μαζί με την ηλεκτροφόρηση των γονιδίων, ηλεκτροφορήθηκε και ο pET3,1 φορέας (αφού αποφωσφορυλιώθηκε πρώτα) που θα χρησιμοποιηθεί για την περαιτέρω κλωνοποίηση των γονιδίων.

της επώασης έγινε εκχύλιση με φαινόλη των τριών δειγμάτων και κατακρήμνιση του DNA για την μεταφορά του σε κύτταρα XL1 blue. Στα τρυβλία που επώαστηκαν οι λευκές αποικίες χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία 24 υγρών καλλιέργειών για κάθε κλώνο, με τη διαδικασία που έχει προαναφερθεί. Στις υγρές καλλιέργειες διεξήχθη η τεχνική απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα και συνεπακόλουθα πέψη, μέρους της ποσότητας του DNA που περιέχεται σε κάθε δείγμα, με τα ένζυμα BamH1 και Nde1 για την αποκοπή των *gatD* και *gatE* γονιδίων και με τα Nde1 και Xho1 για την αποκοπή του *gluX* από τους φορείς. Με την ηλεκτροφόρηση και μελέτη των 72 αυτών δειγμάτων προέκυψαν όλοι οι κλώνοι θετικοί για το *gatE* (24/24), 22 θετικοί κλώνοι για το *gatD* γονίδιο (22/24) και μόλις ένας κλώνος θετικός για το *gluX* (1/24) (εικόνα 15).

Βάσει των επιτυχών κλωνοποιήσεων των τριών γονιδίων, εφαρμόστηκαν στη συνέχεια πειράματα για την υπέρ-έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GatD, GatE και ND-GluRS. Η έκφραση των *gatD*, *gatE* και *gluX* γονιδίων πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλα κυτταρικά στελέχη, τα BL21 codon plus και BL21 Rosetta. Κάθε είδος κυττάρου μετασχηματίστηκε με δυο θετικούς κλώνους του *gatE* και *gatD*, καθώς και με τον μοναδικό θετικό κλώνο του *gluX* γονιδίου. Βασιζόμενοι στην εικόνα 15 επιλέχθηκαν οι κλώνοι E1 και E2 του *gatE*, D26 και D27 του *gatD* και ERS14 του *gluX* για την δημιουργία των δέκα καλλιεργειών. Τα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν μαζί με το θρεπτικό μέσο LB και τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και κλωραμφαινικόλη, ώστε να επιτραπεί η αύξηση μόνο των βακτηρίων που έχουν λάβει εξ' ολοκλήρου το πλασμιδιακό DNA. Οι αναπτυσσόμενες αποικίες από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκαν, κάτω από ασηπτικές συνθήκες, σε υγρό μέσο LB, μαζί με τα δυο αντιβιοτικά και όλες μαζί αφέθηκαν στους 37°C για 14 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (εκτός από τα BL21 codon plus κύτταρα που είχαν επωαστεί με τον φορέα που έφερε το *gatE* γονίδιο, από το δείγμα E2, και το *gluX*, τα οποία ύστερα από πολλαπλές προσπάθειες δε κατάφεραν να μετασχηματιστούν).

Η προετοιμασία των οκτώ πλέον υγρών καλλιεργειών αποτέλεσε ένα ενδιάμεσο στάδιο για την αμέσως επόμενη δημιουργία μεγάλων (σε όγκο) καλλιεργειών, σκοπεύοντας να υπέρ-εκφραστούν οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Σε οκτώ, λοιπόν, κωνικές φιάλες (250 mL) προστέθηκαν 100 mL θρεπτικού μέσου μαζί με τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη, κλωραμφαινικόλη, καθώς



Εικόνα 15 : Η ηλεκτροφόρηση των τμημάτων DNA, των κλωνοποιημένων με το φορέα έκφρασης pET3,1, μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν οι ενδονουκλεάσες BamH1 και Nde1 για τα γονίδια *gatD* και *gatE*, ενώ για το γονίδιο *ND-gluRS*, τα Nde1 και Xho1.

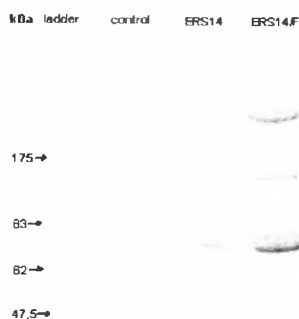
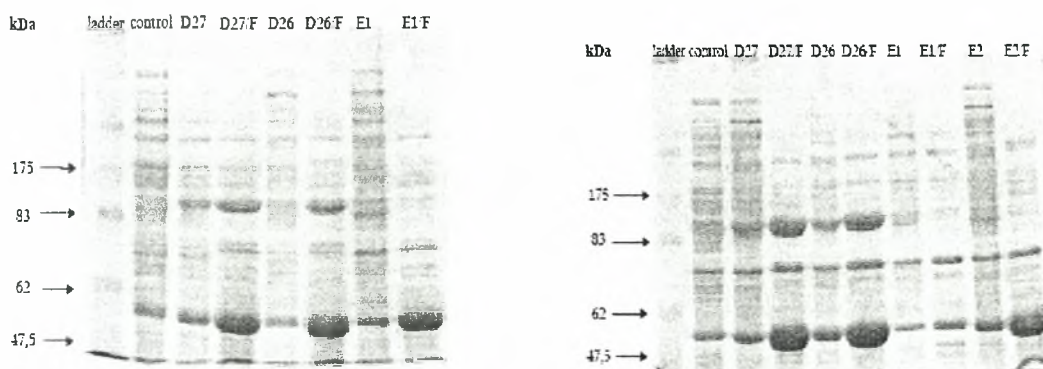
επίσης και 2 mL από τις υγρές καλλιέργειες, σε αυστηρά αποστειρωμένες συνθήκες. Οι οκτώ καλλιέργειες στις κωνικές φιάλες διατηρήθηκαν στους 37°C και η επώαση τους διακόπηκε μετά από 1 ώρα για να προστεθεί το μόριο IPTG (Isopropyl Thio Galactosyl) σε συγκέντρωση 0,5 M που λειτούργησε ως επαγωγέας της έκφρασης των κλωνοποιημένων γονιδίων. Μετά την προσθήκη

του επαγωγέα η επώαση συνεκίστηκε για 14 ώρες με συνεχή ανάδευση των καλλιιεργειών. Γενικά, η υπέρ-έκφραση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται εξαιτίας του γεγονότος ότι σε κάθε κύτταρο περιέχονται πολλαπλά αντίγραφα των πλασμιδίων pET3,1, τα οποία ανέρχονται στους 200 περίπου φορείς ανά κύτταρο. Τον επαγωγέα IPTG τον προσθέτουμε όταν η ανάπτυξη και αύξηση των κυττάρων βρίσκεται στην λογαριθμική της φάση, όταν δηλαδή η φαινομενική οπτική πυκνότητα της κυτταρικής μάζας είναι στα 0,6 (φαινόμενο που συμβαίνει συνήθως εντός της πρώτης ώρας επώσεως).

Για να ελεγχθεί η υπέρ-έκφραση των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών, ελήφθησαν 50 mL από κάθε μια από τις οκτώ καλλιέργειες και φυγοκεντρήθηκαν στους 4000 rpm για 10 min και στους 4°C. Συλλέχθηκαν τα κύτταρα που είχαν καθιζάνει μετά τη φυγοκέντρηση και προστέθηκε ένα διάλυμα λύσης (breaking solution) και με ήπια ανάδευση τα διαλύματα με τα κύτταρα έγιναν ομογενή. Έπειτα, 1,5 mL από τα οκτώ παραπάνω διαλύματα κατεργάστηκαν με υπερήχους (sonication) (15 επαναλήψεις το κάθε δείγμα με παλμό 10 sec και ισχύ 25 Watt), ούτως ώστε να διαρρηχθούν οι κυτταρικές μεμβράνες και έτσι να επιτραπεί στις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες των κυττάρων να εισέλθουν στον εξωκυττάριο χώρο. Στη συνέχεια τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στους 10000 rpm, για 15 min και στους 4°C για να απαλλαχθούν οι πρωτεΐνες από τα κυτταρικά τοιχώματα και άλλα κυτταρικά στοιχεία. Η ποσότητα του υπερκείμενου που περιέχει τις πρωτεΐνες χωρίστηκε σε δυο τμήματα, το ένα από τα οποία αφέθηκε για 20 min στους 73°C για να μετουσιωθούν και να ενσωματωθούν οι μη θερμό-ανθεκτικές πρωτεΐνες (Daniel R.M. et al. 1996) που υπάρχουν στο διάλυμα (flocculation), ενώ το άλλο διατηρήθηκε ως έχει (crude). Η διαδικασία αυτή (flocculation) αποτελεί ένα στάδιο μερικού καθαρισμού, αφού απαλλάσσονται τα πρωτεϊνικά διαλύματα από ένα μεγάλο ποσοστό ενδογενών πρωτεϊνών που παράγονται στο μεσοφιλικό βακτήριο *E.coli*. Οι πρωτεΐνες GatD, GatE και ND-GluRS προέρχονται από υπέρ-θερμόφιλο οργανισμό οπότε δεν επηρεάζονται από αυτή τη διεργασία. Κατόπιν, όταν φυγοκεντρηθούν τα διαλύματα αυτά στους 10000 rpm, για 15 min και στους 4°C οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες μένουν ως ίζημα στο πυθμένα του σωλήνα και οι υπόλοιπες βρίσκονται στο υπερκείμενο το οποίο και συλλέγεται. Παράλληλα είχε προετοιμαστεί το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών που περιέχονται στα δεκαοκτώ πλέον δείγματα. Ηλεκτροφορήθηκαν τα οκτώ δείγματα που είχαν επωαστεί στους 73°C, τα αντίστοιχα οκτώ που δεν είχαν υποστεί αυτή τη διαδικασία (crude), καθώς και

δύο δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (controls). Οι μάρτυρες αυτοί αποτελούνταν από διάλυμα πρωτεϊνών που είχαν παραχθεί σε κύτταρα BL21 codon plus και BL21 Rosetta και στα οποία είχαν μεταφερθεί τα πλασμίδια pET3,1, χωρίς να έχουν εισαχθεί σε αυτά γονίδια. Πριν φορτωθούν τα δείγματα στην ηλεκτροφορητική συσκευή, επώαστηκαν στους 100°C για 3 λεπτά.

Εφόσον ολοκληρώθηκαν οι ηλεκτροφορήσεις τα πηκτώματα επεξεργάστηκαν για να μπορούν να γίνουν ορατές οι ζωνώσεις των πρωτεϊνών που έχουν αποτυπωθεί μέσα σε αυτές. Τα πηκτώματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα οξικού οξέος 10% (acetic acid) και θερμάνθηκαν για λίγα λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων, σκοπεύοντας στην απομάκρυνση της περίσσειας του SDS που περιέχεται σε αυτά. Τότε τα πηκτώματα τοποθετήθηκαν μαζί με άλλο διάλυμα που αποτελείται από αιθανόλη 20%, οξικό οξύ 8% και μια χρωστική 0,01% (Coomassie Brilliant Blue). Η χρωστική αυτή δεσμεύεται στις λυσίνες των πρωτεϊνών και κατ' επέκταση τις χρωματίζει. Σε τελική φάση στα πηκτώματα προστέθηκε εκ νέου διάλυμα οξικού οξέος 10% και αιθανόλης 100% για να αποβληθεί η περίσσεια της χρωστικής. Οι πηκτές παρατηρήθηκαν (εικόνα 16) και διαπιστώθηκε ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GatD (48860 Da) υπέρ-



Εικόνα 16: Στα δυο πρώτα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου διαφαιίνεται η υπέρ-έκφραση της πρωτεΐνης GatD και στους δυο τύπους κυττάρων (BL21 codon plus : αριστερά, BL21 Rosetta : δεξιά). Η πρωτεΐνη GatE εκφράστηκε μόνο στα BL21 Rosetta κύτταρα (E2/F). Η GluX πρωτεΐνη (ERS) επίσης εκφράστηκε σε μεγάλο ποσοστό στα BL21 Rosetta κύτταρα (πήκτωμα κάτω αριστερά).

εκφράστηκε σε όλα τα δείγματα και στους δυο τύπους κυττάρων, ενώ η πρωτεΐνη GatE (71844 Da) εκφράστηκε μόνο στα BL21 Rosetta στελέχη και πιο συγκεκριμένα μόνο το δείγμα E1, που είχε αφεθεί στους 73°C, (flocculated:E1/F) εμφάνισε ικανοποιητικό επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης. Στα υπόλοιπα δείγματα του GatE, όπως αυτά του E1, E2, E2/F και E1/F στα BL21 codon plus κύτταρα, υπάρχει, όπως φαίνεται από τα πηκτώματα, υψηλό ποσοστό αποικοδόμησης των εκφραζόμενων πρωτεϊνών. Επίσης, και η συνθετάση του γλουταμινικού οξέος (GluX:65919 Da) εκφράστηκε στα BL21 Rosetta κύτταρα. Στα δείγματα που περιέχουν τις υπέρ-εκφρασμένες και ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες έγινε ανάλυση της αλληλουχίας τους για την επιβεβαίωση της έκφρασης και παρουσίας των σωστών μορίων (η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε στο Institut de Biologie Moleculaire et Cellulaire, CNRS, Strasbourg, France).

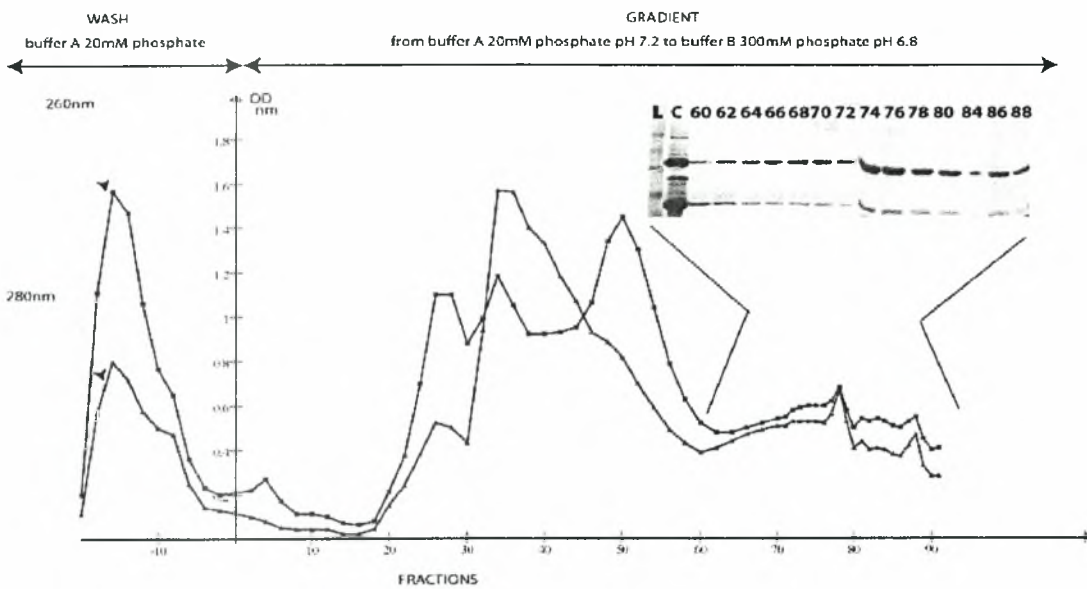
4.3. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ *GatD* ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ

Επειδή η υπομονάδα *GatD* εμφανίζει υψηλή ομολογία με το ένζυμο ασπαραγινάση A (*AsnA*) θεωρείται πως διαθέτει το καταλυτικό κέντρο του ολοενζύμου αμιδοτρανσφεράση του γλουταμινικού οξέος και γι' αυτό το λόγο έγινε προσπάθεια καθαρισμού της με σκοπό τον έλεγχο της δραστηριότητάς της. Αρχικά μετασχηματίστηκαν κύτταρα BL21 Rosetta με πλασμιδιακό DNA, όπου είχε κλωνοποιηθεί το *gatD* γονίδιο, και οι αποικίες που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την υπέρ-έκφραση της *GatD* πρωτεΐνης με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που προαναφέρθηκε. Μετά την επώαση των μεγάλων σε όγκο καλλιέργειών τοποθετήθηκαν 700 mL από αυτές σε δυο πλαστικά δοχεία, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C, στις 3500 rpm και για 20 min. Στη συνέχεια τα κύτταρα που είχαν καθιζάνει, αφού πρώτα υπολογίστηκε το καθαρό βάρος τους (7,7 gr), καταψύχθηκαν για 24 ώρες για να διευκολυνθεί η ρήξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών. Στα κατεψυγμένα κύτταρα προστέθηκαν 10 mL διαλύματος λύσης και μετά από ήπια ανάδευση τα δύο διαλύματα επεξεργάστηκαν με υπερήχους.

Ακολούθησε το πρώτο στάδιο καθαρισμού που ήταν η φυγοκέντρηση των διαλυμάτων για 2.30 ώρες, στους 4°C και στις 45000 rpm. Σε αυτή τη φυγοκέντρηση κατακρημνίζονται μικρότερου μεγέθους μόρια, όπως είναι τα κυτταρικά τοιχώματα και τα ριβοσώματα και κατακρατείται το υπερκείμενο που περιέχει τις πρωτεΐνες των κυττάρων. Τα διαλύματα αυτά χωρίζονται σε δυο μέρη, 200 mL κρατήθηκαν ως έχει (*crude*) και το υπόλοιπο επώαστηκε για 2 min στους 70°C. Η διαδικασία αυτή αποτελεί, όπως προείπαμε, ένα δεύτερο στάδιο καθαρισμού και οι μετουσιωμένες μη θερμό-ανθεκτικές πρωτεΐνες κατακρημνίζονται στη συνέχεια με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm, στους 4°C για 20 min. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου επιβεβαιώθηκε η υπέρ-έκφραση της *GatD* υπομονάδας και το δείγμα που είχε αφεθεί στους 70°C χρησιμοποιήθηκε για τον επακόλουθο καθαρισμό του σε ανιονανταλλακτική στήλη κυτταρίνης (DEAE cellulose).

Το διάλυμα λύσης που περιέχει τη πρωτεΐνη *GatD* αντικαταστάθηκε με το διάλυμα A κατά τη διαδικασία της διαπίδυσης. Το νέο διάλυμα με τη *GatD* ανασυνδυασμένη υπομονάδα φυγοκεντρήθηκε για 15 min, στις 3000 rpm και στους 4°C. Το υπερκείμενο φορτώθηκε στη στήλη. Για την απομάκρυνση τυχόν μολύνσεων (πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα) που δεν δεσμεύονται στη στήλη, η στήλη πλένεται με το ρυθμιστικό διάλυμα A. Η έκλυση της δεσμευμένης *GatD* πρωτεΐνης επιτεύχθηκε με τη δημιουργία διαβάθμισης του pH της

στήλης, με τη χρήση των ρυθμιστικών διαλυμάτων A και B. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων από 20 mM σε 300 mM. Συλλέχθηκαν 90 κλάσματα των 4 mL και μετρήθηκε σε αυτά η οπτική πυκνότητα στα 280 και 260 nm με φασματοφωτόμετρο. Στα πρώτα 42 κλάσματα η τιμή της οπτικής πυκνότητας του λόγου 280/260 nm υπήρξε μικρότερο της μονάδας, γεγονός που μας οδήγησε στο συμπέρασμα πως σε αυτά τα κλάσματα είχαν εκλουσθεί και νουκλεϊκά οξέα που είχαν συγκρατηθεί στη στήλη μαζί με κάποιες πρωτεΐνες. Επομένως ηλεκτροφορήθηκαν τα υπόλοιπα κλάσματα (42-90) σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, όπου και παρατηρήθηκε η περιεχόμενη στα διαλύματα αυτά και μερικώς καθαρισμένη πρωτεΐνη GatD (εικόνα 17). Αυτό που προέκυψε από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης είναι πως μαζί με τη



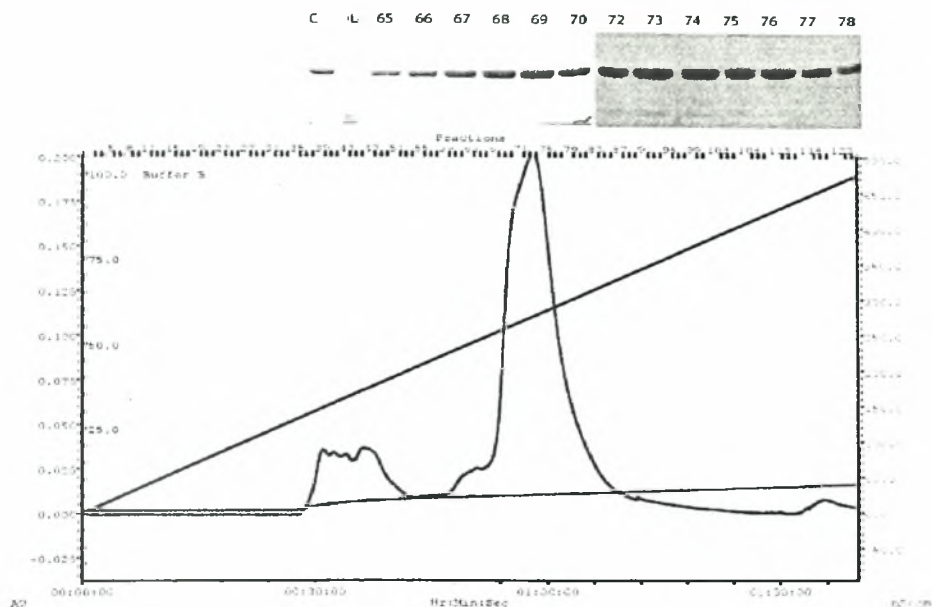
Εικόνα 17: Χρωματογράφημα που προέκυψε από το καθαρισμό σε στήλη κυτταρίνης. Παράλληλα φαίνονται τα ηλεκτρογραφήματα των κλασμάτων 60-88. Στην ηλεκτροφόρηση ως μάρτυρας (controls:C) χρησιμοποιήθηκε μέρος της ποσότητας του κυτταρικού εκχυλίσματος με την υπέρ-εκφρασμένη GatD πρωτεΐνη πριν τα στάδια καθαρισμού.

GatD πρωτεΐνη βρισκόταν σε μεγάλη ποσότητα (εφόσον και αυτή υπέρ-εκφράζεται στα κύτταρα μαζί με τη GatD) η πρωτεΐνη που προσέδιδε στα

κύτταρα αντίσταση για το αντιβιοτικό της αμπικιλλίνης. Από τα πηκτώματα ήταν φανερό πως τα κλάσματα 60 έως 88 περιείχαν σε μεγαλύτερο ποσοστό καθαρότητας τη πρωτεΐνη GatD, γι' αυτό και τοποθετήθηκαν μαζί για τον περαιτέρω καθαρισμό τους με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Το διάλυμα με το οποίο συλλέχθηκε και βρισκόταν διαλυμένη η υπομονάδα GatD είναι το Β και πριν την προσθήκη της στη στήλη υδροξυαπατιτη η πρωτεΐνη GatD μεταφέρθηκε στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα C (διαπίδυση). Έπειτα από 14 ώρες το νέο διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά και σε 3500 rpm, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κατάλοιπα από ανεπιθύμητες προσμίξεις. Με παρόμοιο τρόπο και αυτή η στήλη αρχικά ισορροπείται με το ρυθμιστικό διάλυμα C και ύστερα φορτώνεται το διάλυμα της πρωτεΐνης GatD. Κατά την έκλουση, που επιτυγχάνεται με διαβάθμιση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων με τα διαλύματα C και D, συλλέχθηκαν 120 κλάσματα. Μετά την ολοκλήρωση της χρωματογραφίας HPLC, στο χρωματογράφημα που προέκυψε εμφανίστηκε μια μεγάλη κορυφή, που μας καθοδήγησε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, μόνο των κλασμάτων που περιλαμβάνονται μεταξύ των ορίων της κορυφής αυτής. Έτσι, ηλεκτροφορήθηκαν τα κλάσματα από 65 έως 78 (εικόνα 18), όπου μελέτη τους δείχνει ξεκάθαρα την συνύπαρξη της ανασυνδυασμένης GatD υπομονάδας με την πρωτεΐνη που προσδίδει αντοχή στο αντιβιοτικό αμπικιλλίνη. Βέβαια οι προσμίξεις της τελευταίας πρωτεΐνης εντοπίζονται σε μικρό ποσοστό, παρ' όλα αυτά όμως ο βαθμός καθαρότητας της πρωτεΐνης GatD δεν είναι ικανοποιητικός, γι' αυτό και επαναλαμβάνεται ο καθαρισμός της με HPLC, αλλά με τη χρήση, αυτή τη φορά, στήλης ηπαρίνης.

Η προετοιμασία της στήλης της ηπαρίνης απαιτεί εξισορρόπησή της με το ρυθμιστικό διάλυμα E, ενώ τα κλάσματα που ηλεκτροφορήθηκαν (65-78) από τη προηγούμενη χρωματογραφία, αφού συγκεντρώθηκαν σε κοινό σωλήνα και μεταφέρθηκαν σε διάλυμα E (διαπίδυση), φυγοκεντρήθηκαν πριν να φορτωθούν στη στήλη της ηπαρίνης. Η έκλουση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης επιτεύχθηκε με τη χρήση των διαλυμάτων E και F. Το προφίλ που διαμορφώθηκε από το προκύπτον χρωματογράφημα εμφανίζει μια περιοχή με δυο διαδοχικές κορυφές, και τα κλάσματα στα οποία αναφέρονται οι δυο κορυφές συλλέχθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν. Στα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου διαφαίνονται οι ζώνες της GatD ανασυνδυασμένης υπομονάδας, καθώς και ελάχιστες προσμίξεις από την πρωτεΐνη που προσδίδει ανεκτικότητα στην αμπικιλλίνη. Όμως το ποσοστό καθαρότητας της GatD πρω-



Εικόνα 18: Το χρωματογράφημα από τη στήλη υδροξυαπατίτη και τα πηκτώματα ηλεκτροφόρησης. Στα πηκτώματα ηλεκτροφορήθηκαν τα κλάσματα που περιλαμβάνονται στην υψηλή κορυφή που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα. Ως μάρτυρας (control) για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα της GatD πρωτεΐνης από συλλεγόμενο κλάσμα της στήλης της κυτταρίνης. Φαίνεται πως στα κλάσματα αυτά περιέχονται η υπομονάδα GatD μαζί με μικρή ποσότητα της ανθιστάμενης στην αρπικιλίνη πρωτεΐνης.

τεΐνης μετά το δείγμα 48 ανέρχεται σε μεγαλύτερο του 95 %, ποσοστό ικανοποιητικό ώστε να ακολουθήσει προσπάθεια κρυστάλλωσης της πρωτεϊνικής δομής (εικόνα 19). Μειρώντας την οπτική πυκνότητα του πρωτεϊνικού διαλύματος στα 280 nm υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της υπομονάδας GatD, όπως φαίνεται από την κατωτέρω εξίσωση του Lambert-Beer:

$$C = OD \cdot MB / \epsilon \quad (1)$$

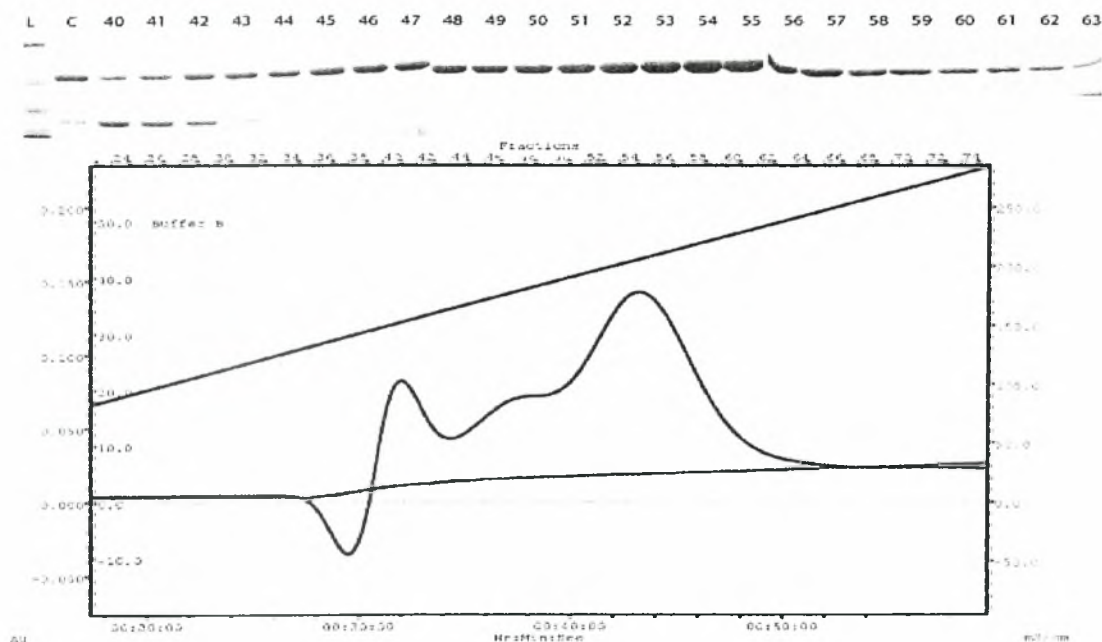
$$OD_{280} = 0,4959$$

$$MB = 48829$$

$$\epsilon = (N_{\text{τυτ}} \times 1280) + (N_{\text{τρρ}} \times 5690) = (18 \times 1280) + (3 \times 5690) = 40110$$

όπου OD_{280} η οπτική πυκνότητα στα 280 nm, MB το μοριακό βάρος της GatD

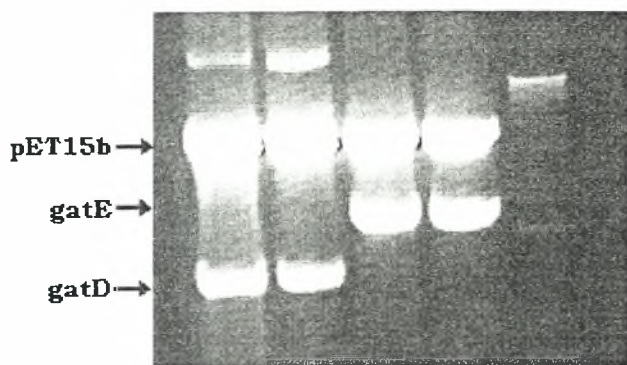
πρωτεΐνης και ϵ η μοριακή απορροφητικότητα. Αντικαθιστώντας στην (1) προκύπτει πως η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα μετά τον καθαρισμό είναι 0,59 mg/mL. Για την επίτευξη μεγαλύτερης συγκέντρωσης, η πρωτεΐνη μεταφέρθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 50% γλυκερόλη. Ο αρχικός όγκος του πρωτεϊνικού διαλύματος ήταν 13 mL και μετά τη προσθήκη του διαλύματος γλυκερόλης μειώθηκε στα 4 mL, γεγονός που μαρτυρεί την αύξηση της συγκέντρωσης κατά 3 φορές. Πράγματι με την εκ νέου μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος στα 280 nm ($OD_{280}=1,066$) και χρήση της εξίσωσης (1) καταλήγουμε σε συγκέντρωση της πρωτεΐνης 1,3 mg/mL.



Εικόνα 19: Το χρωματογράφημα από την HPLC με τη στήλη ηπαρίνης. Η δεύτερη μεγάλη κορυφή αναφέρεται σε κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη GatD σε υψηλό ποσοστό καθαρότητας.

4.4. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΟΠΕΡΟΝΙΟΥ *gatDE*

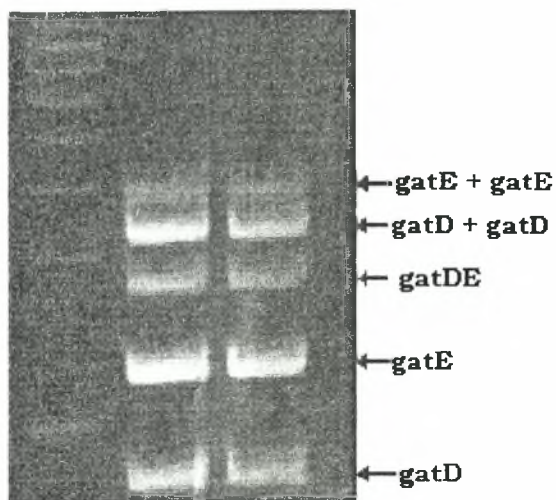
Για την επιτυχή κλωνοποίηση του οπερονίου έγινε χρήση μεγαλύτερου σε μέγεθος φορέα και συγκεκριμένα του pET15b. Τα αρχικώς κλωνοποιημένα γονίδια *gatD* και *gatE* στο φορέα *toro* επεξεργάστηκαν με τα ένζυμα περιορισμού Nde1 και BamH1 αντίστοιχα, ενώ παράλληλα έγινε πέψη και του φορέα έκφρασης pET15b με τις ενδονουκλεάσες Nde1 και BamH1 και όλα μαζί τα δείγματα αφέθηκαν για επώαση. Την πέψη ακολούθησε και για τα τρία δείγματα εκχύλιση με φαινόλη και κατόπιν αποφωσφορυλίωση των δειγμάτων *gatD* και *gatE*. Αφού τα δυο τελευταία δείγματα υπέστησαν και πάλι εκχύλιση με φαινόλη, κόπηκαν με το περιοριστικό ένζυμο Pac1, και η επακόλουθη ηλεκτροφόρησή τους (εικόνα 20) έδωσε σωστά αποτελέσματα που επέτρεψε την απομόνωση των γονιδίων και την σύνδεσή τους με λιγάση, της οποίας η δράση φαίνεται στην εικόνα 21. Κατ' επανάληψη, απομονώθηκε το οπερόνιο *gatDE* και προστέθηκε σε διάλυμα του πλασμιδιακού φορέα pET15b, όπου αφέθηκαν να συνδεθούν με το ένζυμο λιγάση. Μετά την επώαση το παραπάνω διάλυμα



Εικόνα 20 : Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πέψη των γονιδίων *gatD* και *gatE* με το PacI ένζυμο και του φορέα έκφρασης pET15b με τα ένζυμα Nde1 και BamH1. Η πέψη ήταν επιτυχής και τα τρία τμήματα DNA χρησιμοποιήθηκαν για την προσπάθεια κλωνοποίησης του οπερονίου.

χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό κυττάρων XL1blue, σε τρυβλία που περιείχαν εκτός των θρεπτικών συστατικών και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Με τρόπο που έχει περιγραφεί ανωτέρω, δημιουργούνται 24 υγρές καλλιέργειες που διαδοχικά υπέστησαν τη διεργασία απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα και πέψη με το ένζυμο BglII. Όμως η ηλεκτροφόρηση των 24 δειγμάτων δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Παρότι η διαδικασία πραγματοποιήθηκε πολλές φορές δεν καταφέραμε να κλωνοποιήσουμε το

οπερόνιο και να το εκφράσουμε, ενδεχομένως εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους του (3253 kb).



Εικόνα 21 : Στο πήκτωμα αυτό φαίνονται τα αποτελέσματα από την σύνδεση των γονιδίων *gatD* και *gatE* με το ένζυμο της λιγάσης. Εκτός από την επιθυμητή ζώνη που αφορά το οπερόνιο *gatDE*, επιπλέον υπάρχουν οι ζώνες των δυο γονιδίων ξεχωριστά που δεν κατάφεραν να ενωθούν. Επίσης, έχει προκύψει και σύνδεση, μέσω της λιγάσης, μεταξύ δυο όμοιων γονιδίων, όπως *gatE + gatE* και *gatD + gatD*.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNAs αποτελεί αφενός μια πολύ σπουδαία κυτταρική διαδικασία και αφετέρου στόχο διεξοδικής έρευνας για κατανόηση της λειτουργίας της σε πολλά επιστημονικά εργαστήρια παγκοσμίως. Τα αμινοακυλιωμένα tRNAs θεωρούνται σημαντικά μοριακά εργαλεία, λόγω της ενεργής συμμετοχής τους στην σύνθεση των πρωτεϊνών των κυττάρων, και η μελέτη τους αποσκοπεί στην λεπτομερέστερη κατανόηση της πρωτεϊνοσύνθεσης, την εμβάθυνση στην εξελικτική πορεία των διαφόρων μορφών ζωής, και κατ' επέκταση στην μελέτη και την αντιμετώπιση γενετικών ασθενειών που οφείλονται στην ελαττωματική διεξαγωγή των βιοχημικών μονοπατιών της αμινοακυλίωσης και της επιτυχούς σύνθεσης των απαραίτητων πρωτεϊνών.

Η αρχική θεωρία υποστήριζε την ύπαρξη 20 ενζύμων ικανών να αμινοακυλιώνουν τα 20 κύρια αμινοξέα των κυττάρων, των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών. Η πραγματικότητα, παρ' όλα αυτά, ήταν πολύ πιο πολύπλοκη και ποικιλόμορφη από ότι φαντάζονταν οι ερευνητές σε σχέση με αυτά τα ένζυμα. Βρέθηκε, λοιπόν, σε γονιδιώματα αρχαιοβακτηρίων, πως η συνθετάση της προλίνης (ProRS) μπορεί να λάβει μέρος στη διαδικασία της μετάφρασης και ως συνθετάση της κυστεΐνης (CysRS), σχηματίζοντας εξίσου Pro-tRNA^{Pro} και Cys-tRNA^{Cys} (Stathopoulos C. et al. 2000, Li T. et al. 1999). Σε περαιτέρω μελέτες βρέθηκε πως το πολυπεπτιδίο αυτό με τη δραστικότητα των δυο αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών (ProCysRS) εκφράζεται και στο θερμοφιλο βακτήριο, *Thermus thermophilus*, του οποίου, όμως, το γονιδίωμα περιέχει το γονίδιο για την παραγωγή εξειδικευμένης συνθετάσης της κυστεΐνης (CysRS) (Feng L. et al. 2002). Είναι ευρέως γνωστό, επίσης, πως στα αρχαία και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το εναρκτήριο αμινοακυλιωμένο tRNA που συμμετέχει στη μετάφραση είναι το Met-tRNA^{Met}, που σχηματίζεται άμεσα με τη δράση μιας συνθετάσης της μεθειονίνης. Όμως, στα βακτήρια και τα ημιαυτόνομα οργανίδια η κυτταρική διεργασία της μετάφρασης ξεκινά με το fMet-tRNA^{fMet} (Tan T. H. et al. 2002), το οποίο αρχικά σχηματίζεται ως Met-tRNA^{fMet} και στη συνέχεια, με την εμπλοκή μιας εξειδικευμένης φορμυλτρανοφεράσης, μετατρέπεται σε fMet-tRNA^{fMet} (Vial L. et al. 2003). Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό, της πολυπλοκότητας της αμινοακυλίωσης, παράδειγμα είναι και η εισαγωγή της σεληνοκυστεΐνης στα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτιδία. Σε αυτή τη περίπτωση, το βακτήριο *E.coli*, που είναι και το καλύτερα μελετημένο σύστημα (Bock A. et al. 2004), αμινοακυλιώνει το tRNA^{Sec} με το αμινοξύ της σερίνης σχηματίζοντας Ser-tRNA^{Sec} μέσω της μη

εξειδικευμένης συνθετάσης της σερίνης (ND-SerRS). Το Ser-tRNA^{Sec} μετατρέπεται σε Sec-tRNA^{Sec} με τη καταλυτική δράση της συνθετάσης της σεληνοκυστεΐνης SelA. Παρόμοιοι οδοί για τη δημιουργία του Sec-tRNA^{Sec} και την εισαγωγή της σεληνοκυστεΐνης σε νέες πολυπεπτιδικές αλυσίδες έχουν βρεθεί να χρησιμοποιούν αρχαία (Rother M. et al. 2003), ζώα (Kryukov G.V. et al. 2003) και πρόσφατα και φυτά (Novoselov S.V. et al. 2002, Rao M. et al. 2003). Ανάλογο βιοχημικό μονοπάτι ακολουθεί το κύτταρο και για τη μεταφορά της πυρολυσίνης (Pyl-tRNA^{Pyl}) στο ριβόσωμα κατά τη πρωτεϊνοσύνθεση (Polycarpo C. et al. 2003, Theobald-Dietrich A. et al. 2004).

Επιπλέον, γονιδιακές αναλύσεις απέδειξαν την ύπαρξη στην πλειοψηφία των οργανισμών ενζύμων, που επονομάζονται tRNA αμιδοτρανσφεράσες και δρουν εξαρτώμενες από το tRNA και το ATP, και που εμπλέκονται στην αμινοακυλίωση των μεταφορικών RNAs των αμινοξέων της γλουταμίνης και ασπαραγίνης. Η οικογένεια των αμιδοτρανσφερασών διακρίνεται σε δυο βασικές επιμέρους ομάδες ενζύμων. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει ετεροτριμερή ένζυμα με διπλή δραστικότητα (σχηματίζουν Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln}) που κωδικοποιούνται από το οπερόνιο *gatCAB*, ενώ στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται ένζυμα που έχουν εντοπιστεί μόνο σε αρχαία και που διαφέρουν από αυτά της πρώτης ομάδας στη δομή και στη δραστικότητα. Έτσι, οι τελευταίες αμιδοτρανσφεράσες είναι ετεροδιμερή ένζυμα που καταλύουν μόνο το σχηματισμό του tRNA^{Gln} και που κωδικοποιούνται από το οπερόνιο *gatDE*. Γι' αυτό και ανάλογα με τον τρόπο που οι οργανισμοί ακυλιώνουν τα tRNA της γλουταμίνης και της ασπαραγίνης, αυτοί διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες (Ibba M. et al. 2004).

Είναι η κατηγορία όπου οι οργανισμοί ακυλιώνουν άμεσα τα δυο αυτά μεταφορικά RNA, αφού διαθέτουν και τις δυο εξειδικευμένες συνθετάσες, AsnRS και GlnRS. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται οι ευκαρυωτικοί, φυσικά, οργανισμοί, και ορισμένα πρωτεοβακτήρια, όπως η *E.coli*, τα οποία με οριζόντια μεταφορά από τους ευκαρυώτες, έχουν λάβει την GlnRS. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οργανισμοί που στερούνται και των δυο παραπάνω συνθετασών (για παράδειγμα το βακτήριο *Chlamydia trachomatis* Raczniak G. et al. 2001) και χρησιμοποιούν για το σχηματισμό των Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln} τις ND-AspRS και ND-GluRS και την αμιδοτρανσφεράση Asp/Glu-AdT που κωδικοποιείται από το οπερόνιο *gatCAB*. Στη συνέχεια, η τρίτη ομάδα αφορά κύτταρα που παράγουν τη συνθετάση της γλουταμίνης, αλλά στερούνται τη συνθετάση της ασπαραγίνης (όπως το *Pseudomonas aeruginosa* Akochy

P.M. et al. 2004) και για τη δημιουργία του Asn-tRNA^{Asn} δρα η αμιδοτρανσφεράση Asp/Glu-AdT σε συνδιασμό με την ND-AspRS, ενώ το Gln-tRNA^{Gln} σχηματίζεται απευθείας από την GlnRS. Υπάρχουν, τελικά, οργανισμοί, που σε αντίθεση με τη προηγούμενη ομάδα, διαθέτουν AsnRS, παράγοντας άμεσα το Asn-tRNA^{Asn}, τους λείπει, όμως, η GlnRS. Σε αυτή τη περίπτωση, τα βακτήρια, όπως το *Bacillus subtilis*, εστεροποιούν τη γλουταμίνη με το tRNA^{Gln} με τη βοήθεια της αμιδοτρανσφεράσης Asp/Glu-AdT, ενώ από την άλλη πλευρά, τα αρχαιοβακτήρια, όπως το *Pyrococcus abyssi*, περιέχουν στο πυρήνα τους την πληροφορία για την σύνθεση της αμιδοτρανσφεράσης GatDE. Βέβαια, υπάρχουν και οι εξαιρέσεις που αναφέρονται στα βακτήρια *Thermus thermophilus* και *Deinococcus radiodurans*, και τα οποία περιέχουν στο γενετικό τους υλικό τα γονίδια για την σύνθεση όλων των δυνατών ενζύμων που μπορούν να συμμετάσχουν στο σχηματισμό των Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln}, δηλαδή την GlnRS, την AsnRS και Asp/Glu-AdT (Curnow A.W. et al. 1998, Becker H.D. et al. 1998).

Η ανάγκη και το ενδιαφέρον, λοιπόν, να διευκρινιστούν τα ακριβή βιοχημικά χαρακτηριστικά των ενζύμων που συμμετέχουν στην αμινοακυλίωση των tRNA και δη των αμιδοτρανσφερασών, μας οδήγησε στην διεξοδική μελέτη της αμιδοτρανσφεράσης του γλουταμινικού οξέος (GluAdT) που κωδικοποιείται από το οπερόνιο *gatDE*. Έτσι ο αρχικός σκοπός υλοποιήθηκε με την επιτυχημένη κλωνοποίηση των δυο επιμέρους γονιδίων του οπερονίου, του *gatD* και του *gatE*, τα οποία απομονώθηκαν από το γονιδίωμα του υπερθερμόφιλου αρχαιοβακτηρίου *Pyrococcus abyssi*. Παράλληλα κλωνοποιήθηκε και η μη εξειδικευμένη συνθετάση του γλουταμινικού οξέος από αυτό τον οργανισμό. Στη συνέχεια διεξήχθησαν τεχνικές για την αύξηση της μεταγραφής και την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων *gatD*, *gatE* και *gluX* σε διάφορα στελέχη των εντεροβακτηρίων *E.coli*, τα οποία χαρακτηρίζονται από ορισμένες ιδιαιτερότητες (minor tRNAs) που διευκολύνουν την επιτυχή μεταγραφή πρωτεϊνών που προέρχονται από αρχαίους οργανισμούς (Kim R. et al. 1998). Η δυσκολία που αντιμετωπίσαμε για την κλωνοποίηση του οπερονίου *gatDE* πιθανόν να οφείλεται στη λανθασμένη επιλογή κυτταρικών στελεχών και φορέων για τον μετασχηματισμό των κυττάρων και την έκφραση των κλωνοποιημένων τμημάτων. Μια άλλη εκδοχή, σχετικά με την αποτυχία της κλωνοποίησης του οπερονίου, είναι η πιθανότητα να υπήρχε, εξαιτίας εσφαλμένου τρόπου ανάγνωσης (open reading frame) της πρωτοταγούς δομής του κλωνοποιημένου στο πλασμίδιο pET15b οπερονίου, θέση αναγνώρισης για

περιοριστικό ένζυμο κατά μήκος της αλληλουχίας του. Έτσι, αμέσως μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και την ανάλυση με ένζυμα περιορισμού, οι ενδονουκλεάσες δρούσαν κάπου ενδιάμεσα στην αλληλουχία του *gatDE* και η ηλεκτροφόρησή του, μετά τη πέψη, δεν έδινε σωστό αποτέλεσμα, αφού στο πήκτωμα δεν υπήρχε ίχνος από DNA.

Το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στην υπομονάδα GatD, εξαιτίας της υποψίας των ερευνητών πως σε αυτήν περιέχεται το ενεργό κέντρο του ολοενζύμου. Βασιζόμενοι σε αυτή την υπόθεση καθαρίστηκε παρασκευαστικά η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GatD σε τρία στάδια, ξεκινώντας με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής σε στήλη κυτταρίνης, και ακολούθησαν διαδοχικά δυο υγρές χρωματογραφίες υψηλής απόδοσης σε στήλες υδροξυαπατίτη και ηπαρίνης. Ύστερα από αυτά τα στάδια υπολογίστηκε, και μετά από χρώση με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue, το ποσοστό καθαρότητας της πρωτεΐνης, που βρέθηκε να είναι μεγαλύτερο από 95%. Το ποσοστό αυτό θεωρείται ικανοποιητικό, ώστε να γίνει προσπάθεια κρυσταλλογράφησης της πρωτεϊνικής υπομονάδας GatD, με σκοπό την αποκάλυψη της ακριβούς τριτοταγούς δομής της.

Επόμενος στόχος των επιστημόνων είναι η κλωνοποίηση του οπερονίου και η έκφραση του ολοενζύμου, σε διαφορετικούς φορείς και με τη χρήση κατάλληλων κυτταρικών στελεχών. Ταυτόχρονα μελετάται η δεύτερη περίπτωση που προαναφέρθηκε, η εκδοχή, δηλαδή, οι χρησιμοποιούμενες ενδονουκλεάσες να αποικοδομούν το κλωνοποιημένο οπερόνιο *gatDE*, που αποτελεί και τη πιο πιθανή αιτία ανεπιτυχούς κλωνοποίησής του. Επίσης, ο καθαρισμός της δεύτερης πρωτεΐνης GatE και η δημιουργία κρυστάλλων και για τις δυο υπομονάδες του ενζύμου βρίσκονται υπό συνεχή έρευνα. Οι κρυστάλλοι αυτοί θα έδιναν πολλές πληροφορίες για τη λειτουργικότητα της αμιδοτρανσφοράς του γλουταμινικού οξέος και θα έλυναν τις απορίες σχετικά με τον ακριβή ρόλο του κάθε συστατικού που εμπλέκεται στο έμμεσο μονοπάτι της αμινοακυλίωσης. Τελικά, με τη βοήθεια περαιτέρω βιοχημικών μελετών θα αποκαλυφθούν τα αίτια που εμποδίζουν την, μέχρι τώρα, μεταφορά των γονιδίων των συνθετασών της γλουταμίνης από τους ευκαρυώτες σε ορισμένους οργανισμούς, και κυρίως τα αρχαιοβακτήρια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να μην μπορούν να υιοθετήσουν το άμεσο τρόπο αμινοακυλίωσης και να συνεχίζουν να συντηρούν τον προγονικό βιοχημικό δρόμο αμινοακυλίωσης του tRNA^{Gln}, χρησιμοποιώντας, έτσι τις αμιδοτρανσφεράσες για την αντίδραση μετατροπής του Glu-tRNA^{Gln} σε Gln-tRNA^{Gln}.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Akochy P. M., Bernard D., Roy P. H., Lapointe J. (2004). Direct glutaminyl-tRNA biosynthesis and indirect asparaginyl-tRNA biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAOI. *J. Bacteriol.*, **186**, 767-776.

Asahara H., Uhlenbeck O.C. (2002). The tRNA specificity of *Thermus thermophilus* EF-Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3499-3504.

Becker H.D., Reinbolt J., Kreutzer R., Giege R., Kern D. (1997). Existence of two distinct aspartyl-tRNA synthetases in *Thermus thermophilus*. Structural and biochemical properties of the two enzymes. *Biochemistry*, **36**, 8785-8797.

Becker H.D., Kern D. (1998). *Thermus thermophilus* : A link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12832-12837.

Bock A., Thanbichler M., Rother M., Resch A. (2004). Selenocysteine. In *aminoacyl-tRNA synthetases* (eds. Ibba M., Francklyn C.S., Cusack S.). Landes Bioscience (in press).

Brown J.R., Doolittle W.F. (1999). Gene descent, duplication and horizontal transfer in the evolution of glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetases. *Journal of molecular evolution*, **49**, 485-495.

Burbaum J.J., Schimmel P. (1991). Structural relationships and the classification of aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.*, **266**, 16965-16968.

Crick F.H.C. (1958). On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **12**, 138-163.

Curnow A.W., Hong K., Yuan R., Kim S., Martins O., Winkler W., Henkin T.M., Soll D. (1997). Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase : a novel heterotrimeric

enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11819-11826.

Curnow A.W., Tumbula D.L., Pelaschier J.T., Min B., Soll D. (1998). Glutamyl-tRNA^{Gln} amidotransferase in *Deinococcus radiodurans* may be confined to asparagine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12838-12843.

Daniel R.M., Dines M., Petach H.H. (1996). The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. *Biochem. J.*, **317**, 1-11.

Daniel R.M., Cowan D.A. (2000). Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**, 250-264.

Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., Moras D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, **347**, 203-206.

Feng L., Stathopoulos C., Ahel I., Mitra A., Tumbula-Hansen D., Hartsch T., Soll D. (2002). Aminoacyl-tRNA formation in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Extremophiles*, **6**, 167-174.

Feng L., Tumbula-Hansen D., Toogood H., Soll D. (2003). Expanding tRNA recognition of a tRNA synthetase by a single amino acid change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5676-5681.

Frugier M., Moulinier L., Giege R. (2000). A domain in the N-terminal extension of the class IIb eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases is important for RNA binding. *The EMBO Journal*, **19**, 2371-2380.

Ibba M., Soll D. (1999). Quality control mechanisms during translation. *Science*, **286**, 1893-1897.

Ibba M., Becker H.D., Stathopoulos C., Tumbula D.L., Soll D. (2000). The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 311-316.

Ibba M., Soll D. (2004). Aminoacyl-tRNAs : setting the limits of the genetic code. *Genes and Development*, **18**, 731-738.

Kryukov G.V., Castellano S., Novoselov S.V., Lobanov A.V., Zehtab O., Guigo R., Gladyshev V.N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, **300**, 1439-1443.

Lamour V., Quevillon S., Diriong S., N' Guyen V-C., Lipinski M., Mirande M. (1994). Evolution of the Glx-tRNA synthetase family : The glutaminyI enzyme as a case of horizontal gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8670-8674.

Lariviere F.J., Wolfson A.D., Uhlenbeck O.C. (2001). Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science*, **294**, 165-168.

Li T., Graham D., Stathopoulos C., Haney P., Kim H.S., Vothknecht U., Kitabatake M., Hong K.W., Eggertsson G., Curnow A.W., Lin W., Celic I., Whitman W., Soll D. (1999). CysteinyI-tRNA formation : the last puzzle of aminoacyl-tRNA synthesis. *FEBS Lett.*, **462**, 302-306.

Nabholz C.E., Hauser R., Schneider A. (1997). *Leishmania tarentolae* contains distinct cytosolic and mitochondrial glutaminyI-tRNA synthetase activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7903-7908.

Novoselov S.V., Rao M., Onoshko N.V., Zhi H., Kryukov G.V., Xiang Y., Weeks D.P., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. (2002). Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.*, **21**, 3681-3693.

Polycarpo C., Ambrogelly A., Ruan B., Tumbula-Hansen D., Ataide S.F., Ishitani R., Yokoyama S., Nureki O., Ibba M., Soll D. (2003). Activation of the pyrrolysine suppressor tRNA requires formation of a ternary complex with class I and class II lysyl-tRNA synthetases. *Mol. Cell*, **12**, 287-294.

Raczniak G., Becker H., Min B., Soll D. (2001). A single amidotransferase forms asparaginyl-tRNA and glutaminyl-tRNA in *Chlamydia trachomatis*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 45862-45867.

Rao M., Carlson B.A., Novoselov S.V., Weeks D.P., Gladyshev V.N., Hatfield D.L. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* selenocysteine tRNA^{(Ser)Sec}. *RNA*, **9**, 923-930.

Rother M., Mathes I., Lottspeich F., Bock A. (2003). Inactivation of the *selB* gene in *Methanococcus maripaludis* : Effect on synthesis of selenoproteins and their sulphur-containing homologs. *J. Bacteriol.*, **185**, 107-114.

Roy H., Becker H.D., Reinbolt J., Kern D. (2003). When contemporary aminoacyl-tRNA synthetases invent their cognate amino acid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9837-9842.

Ruff M., Krishnaswamy S., Boeglin M., Poterszman A., Mitschler A., Podjarny A., Rees B., Thierry J.-C., Moras D. (1991). Class II aminoacyl transfer RNA synthetases : crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Asp}. *Science*, **252**, 1682-1689.

Schon A., Kannangara C.G., Gough S., Soll D. (1988). Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. *Nature*, **331**, 187-190.

Soll D., RajBhandary U.L. (1995). tRNA : structure, biosynthesis and function. *ASM Press, Washington, D.C.*

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

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

Stathopoulos C., Li T., Longman R., Vothknecht U.C., Becker H.D., Ibba M., Soll D. (2000). One polypeptide with two aminoacyl-tRNA synthetase activities. *Science*, **287**, 479-482.

Tan T. H., Bochud-Allemann N., Horn E.K., Schneider A. (2002). Eukaryotic-type elongator tRNA^{Met} of *Trypanosoma brucei* becomes formylated after import into mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1152-1157.

Theobald-Dietrich A., Frugier M., Giege R., Rudinger-Thirion J. (2004). A typical archaeal tRNA pyrrolysine transcript behaves towards EF-Tu as atypical elongator tRNA. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1091-1096.

Tumbula D.L., Becker H.D., Chang W., Soll D. (2000). Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature*, **407**, 106-110.

Vial L., Gomez P., Panvert M., Schmitt E., Blanquet S., Mechulam Y. (2003). Mitochondrial methionyl-tRNA^{Met} formyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae* : Gene disruption and tRNA substrate specificity. *Biochemistry*, **42**, 932-939.

Vieille C., Zeikus G.J. (2001). Hyperthermophilic enzymes : sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 1-43.

Woese C.R., Fox G.E. (1977). The concept of cellular evolution. *J. Mol. Evol.*, **10**, 1-6.

Woese C.R., Olsen G.J, Ibba M., Soll D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**, 202-236.