



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΜΙΔΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ Glu/Asp-AdT ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ
ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Helicobacter pylori* & ΤΟ ΑΡΧΑΙΟ *Methanococcus
jannaschii* ΣΕ ΜΟΡΦΗ ΟΠΕΡΟΝΙΟΥ**



ΒΑΪΑ ΓΩΤΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΜΙΔΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ Glu/Asp-AdT ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ
ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Helicobacter pylori* & ΤΟ ΑΡΧΑΙΟ *Methanococcus
jannaschii* ΣΕ ΜΟΡΦΗ ΟΠΕΡΟΝΙΟΥ**



ΒΑΪΑ ΓΩΤΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4658/1
Ημερ. Εισ.: 2-11-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΓΩΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087868

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΜΙΔΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ Glu/Asp-AdT ΑΠΟ ΤΟ
ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Helicobacter pylori* & ΤΟ ΑΡΧΑΙΟ
Methanococcus jannaschii ΣΕ ΜΟΡΦΗ ΟΠΕΡΟΝΙΟΥ**



Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, του Πανεπιστημίου Louis Pasteur του Στρασβούργου, στη Γαλλία (07/03/2005 – 10/06/2005).

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ

Μέλη τοιμελής επιτροπής:

- ❖ Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ
- ❖ Μαρκουλάτος Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ
- ❖ Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κο Σταθόπουλο Κ., επίκουρο καθηγητή βιοχημείας, που με επέλεξε προκειμένου να συμμετάσχω στο πρόγραμμα ERASMUS για να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία καθώς και για την ηθική του υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εξωτερικό. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Becker H. D. και Kern D. που με δέχτηκαν στο εργαστήριό τους και με βοήθησαν έτσι ώστε να εξοικειωθώ με τις διάφορες τεχνικές και μου παρήχαν όλα τα απαραίτητα μέσα για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας. Τέλος, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτωρα Blaise M. για την πολύτιμη καθοδήγηση και συμπαράσταση κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	20
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
3.1 ΥΛΙΚΑ	
3.1.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	
3.1.2 ΈΝΖΥΜΑ	
3.1.3 ΓΕΝΩΜΙΚΟ DNA	
3.1.4 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	
3.1.5 ΦΟΡΕΙΣ – ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ	
3.1.6 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ	
3.1.7 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	
3.2.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	
3.2.2 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	
3.2.3 ΕΚΧΥΛΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ & ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΜΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ	
3.2.4 ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA (LIGATION)	
3.2.5 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E.coli</i> ΓΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑ DNA ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΙΣΗ (ELECTROCOMPETENT CELLS)	
3.2.6 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΙΣΜΟ	
3.2.7 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΧΗΜΙΚΑ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	
3.2.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΈΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ	
3.2.9 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ	
3.2.10 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ DNA	
3.2.11 ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ 5' ΑΚΡΟΥ ΤΟΥ DNA	
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
4.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΦΟΡΕΑ ΤΟΡΟ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>gatC</i> , <i>gatA</i> ΚΑΙ <i>gatB</i> ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ <i>Helicobacter pylori</i> & <i>Methanococcus jannaschii</i>	
4.2 ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΡΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΟΠΕΡΟΝΙΟΥ	
4.3 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΟΠΕΡΟΝΙΟΥ ΣΕ ΦΟΡΕΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αντίδραση της αμινοακυλίωσης αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια κατά την πρωτεϊνοσύνθεση, αφού η αμινοακυλίωση ενός tRNA με το λάθος αμινοξύ μπορεί να επιφέρει την παραγωγή μιας μη λειτουργικής πρωτεΐνης και κατά συνέπεια το θάνατο του κυττάρου. Τα ένζυμα που συμμετέχουν σ' αυτή την αντίδραση καλούνται αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες. Η αντίδραση της αμινοακυλίωσης διαφέρει ανάμεσα στους οργανισμούς και μπορεί να διεξαχθεί μέσω δύο μονοπατιών. Το πρώτο μονοπάτι περιλαμβάνει την άμεση αμινοακυλίωση του tRNA από μία συνθετάση με το κατάλληλο αμινοξύ ενώ το δεύτερο μονοπάτι περιλαμβάνει την έμμεση αμινοακυλίωση του tRNA από μία μη εξειδικευμένη συνθετάση (ND-AARS) και μία αμιδοτρανσφεράση (AdT). Το ένζυμο AdT, που έχει εντοπιστεί στα βακτήρια και στα διάφορα οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων, αποτελείται από τρεις υπομονάδες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gatC*, *gatA* και *gatB*. Σε μερικά αρχαία, οι αμιδοτρανσφεράσες είναι ετεροδιμερή μόρια και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gatD* και *gatE*. Σε αντίθεση, με την αμιδοτρανσφεράση *gatCAB*, η οποία έχει διπλή δράση Asp-AdT και Glu-AdT δηλαδή καταλύει τη μετατροπή του Asp-tRNA^{Asn} σε Asn-tRNA^{Asn} και του Glu-tRNA^{Gln} σε Gln-tRNA^{Gln} αντίστοιχα, η αμιδοτρανσφεράση *gatDE* έχει δράση μόνο Glu-AdT. Η παρούσα εργασία περιλαμβάνει πειράματα κλωνοποίησης των γονιδίων *gatC*, *gatA* και *gatB* του παθογόνου βακτηρίου *Helicobacter pylori* και του αρχαίου *Methanococcus jannaschii*. Ακολούθησε ο σχηματισμός των οπερονίων και η κλωνοποίησή τους σε φορέα έκφρασης.

ABSTRACT

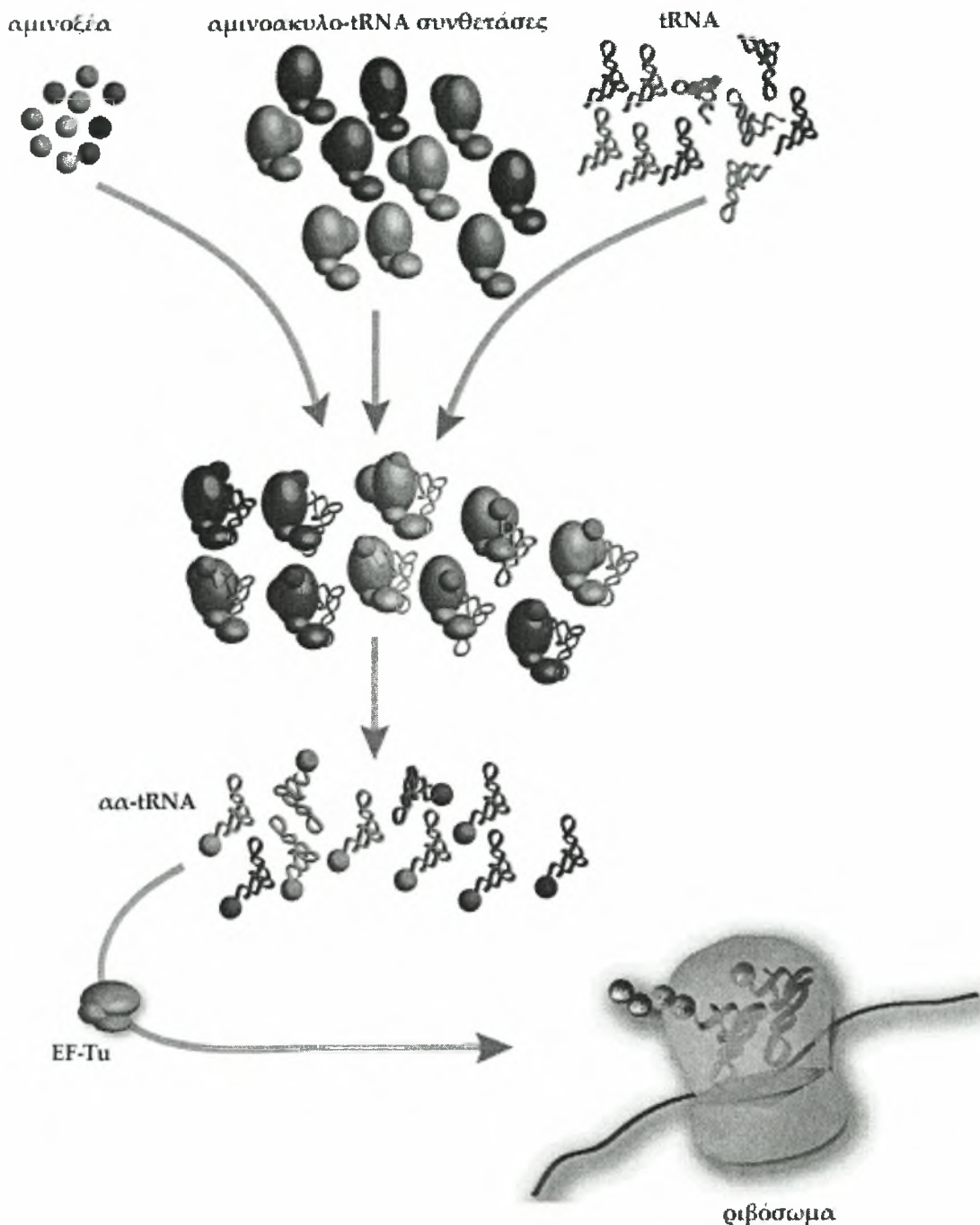
The reaction of aminoacylation is one of the most important steps during protein synthesis, since the formation of a mischarged tRNA can have as a result the production of an unfunctional protein, which would be lethal for the cell. The enzymes that take part in this reaction, is called aminoacyl-tRNA synthetases (AARSs). The aminoacylation among the organisms differentiate and it can be carried out via two pathways. The first pathway includes the direct aminoacylation of a tRNA with the suitable amino acid by a synthetase while the second pathway includes the indirect aminoacylation of a tRNA by one non-discriminating synthetase and one tRNA dependent amidotransferase (AdT). The AdT enzyme has been detected in bacteria and in some eukaryotic organelles. It is consisted by three subunits, which are encoded by *gatC*, *gatA* and *gatB* genes. In some archaea, the amidotransferases are heterodimeric molecules and the *gatD* and *gatE* genes are encoding them. In contrast to the *gatCAB* amidotransferase, which has a double action as Asp-AdT and Glu-AdT catalyzing the conversion of Asp-tRNA^{Asn} into Asn-tRNA^{Asn} and Glu-tRNA^{Gln} into Gln-tRNA^{Gln} respectively, the *gatDE* amidotransferase acts as Glu-AdT only. In this experiment, we occupied with cloning of *gatC*, *gatA* and *gatB* genes from the pathogenic bacteria *Helicobacter pylori* and the archaea *Methanococcus jannaschii*. After that we continued with the formation of the operon and cloning into an expression vector.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σύνθεση των πρωτεϊνών από ένα αγγελιοφόρο RNA (mRNA) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες του κεντρικού δόγματος της βιοχημείας αφού από αυτήν εξαρτάται κατά ένα μεγάλο βαθμό η βιωσιμότητα των κυττάρων. Η σύνθεση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με την αναγνώριση μιας συγκεκριμένης τριπλέτας κωδικονίου στο mRNA από μία αντίστοιχη συμπληρωματική τριπλέτα αντικωδικονίου που αποτελεί τμήμα ενός μορίου tRNA και μεταφέρουν το σωστό αμινοξύ για το συγκεκριμένο αυτό κωδικόνιο. Τα αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση παρέχονται υπό τη μορφή αμινοακυλιωμένων μορίων tRNA (aa-tRNA). Τα αμινοακυλιωμένα-tRNA μόρια έχουν σκοπό να εξυπηρετούν ως υποστρώματα για τη μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνες.

Η μετάφραση περιλαμβάνει τρία στάδια: 1) τη σύνδεση των αμινοξέων με τα tRNA μόρια, 2) τη μεταφορά των aa-tRNA στο ριβόσωμα με τη βοήθεια του παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu και 3) τη δημιουργία πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των αμινοξέων (Εικόνα 1). Το πρώτο στάδιο που είναι και το πιο σημαντικό και περιλαμβάνει την αντίδραση της αμινοακυλίωσης του μορίου tRNA με το κατάλληλο αμινοξύ, καταλύεται από μια οικογένεια ενζύμων γνωστών ως αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (aminoacyl-tRNA synthetase, AARS). Η διεργασία αυτή περιλαμβάνει την εστεροποίηση της καρβοξυλομάδας ενός και μόνο συγκεκριμένου αμινοξέος με την υδροξυλομάδα της αδενίνης στο 3' CCA άκρο του μορίου tRNA [Ibba M. *et al.*, 2000]. Συγκεκριμένα, πρόκειται για μια αντίδραση δύο σταδίων κατά την οποία στο πρώτο στάδιο η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση ενεργοποιεί το αμινοξύ με την κατανάλωση δύο δεσμών υψηλής ενέργειας ($ATP \Leftrightarrow AMP + PP_i$) και κατά το δεύτερο στάδιο το ίδιο ένζυμο μεταφέρει το ενεργοποιημένο αμινοξύ στο tRNA. Στη συνέχεια, το αμινοακυλιωμένο tRNA δεσμεύεται από τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu μαζί με ένα μόριο GTP [Sprinzl M. *et al.*, 1994]. Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου είναι απαραίτητη για τη δέσμευση των αμινοακυλιωμένων μορίων tRNA στο ριβόσωμα, όπου η τριπλέτα του αντικωδικονίου στο μόριο του 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.

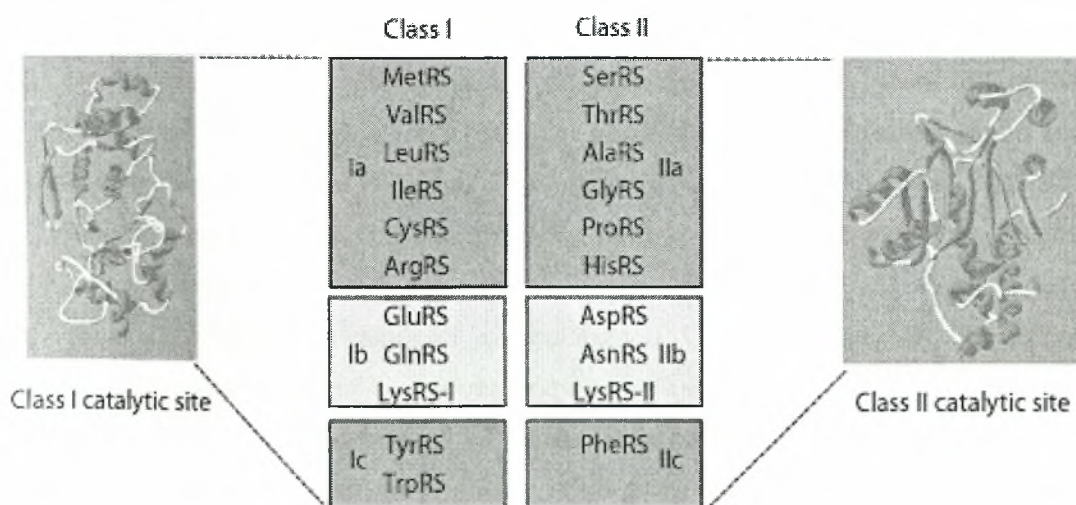
Παρ' όλο που οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες χρησιμοποιούν κοινούς μηχανισμούς για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων αμινοακυλίωσης των μορίων tRNA, διακρίνονται σε δύο δομικά διακριτές και εξελικτικά



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού της μετάφρασης. Αρχικά, τα αμινοξέα αμινοακυλιώνονται με τα αντίστοιχα μόρια t-RNA από τις κατάλληλες αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες. Στη συνέχεια, τα αμινοακυλιωμένα-tRNA μεταφέρονται με τη βοήθεια του παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu στο ριβόσωμα για τη δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού.

συντηρημένες ομάδες (class I και class II) [Eriani *et al.*, 1990], οι οποίες διαθέτουν αποκλειστικές αλληλουχίες και μοτίβα, τα οποία εντοπίζονται στα ενεργά κέντρα των συνθετασών (Εικόνα 2). Δομικές μελέτες έδειξαν ότι στις συνθετάσες

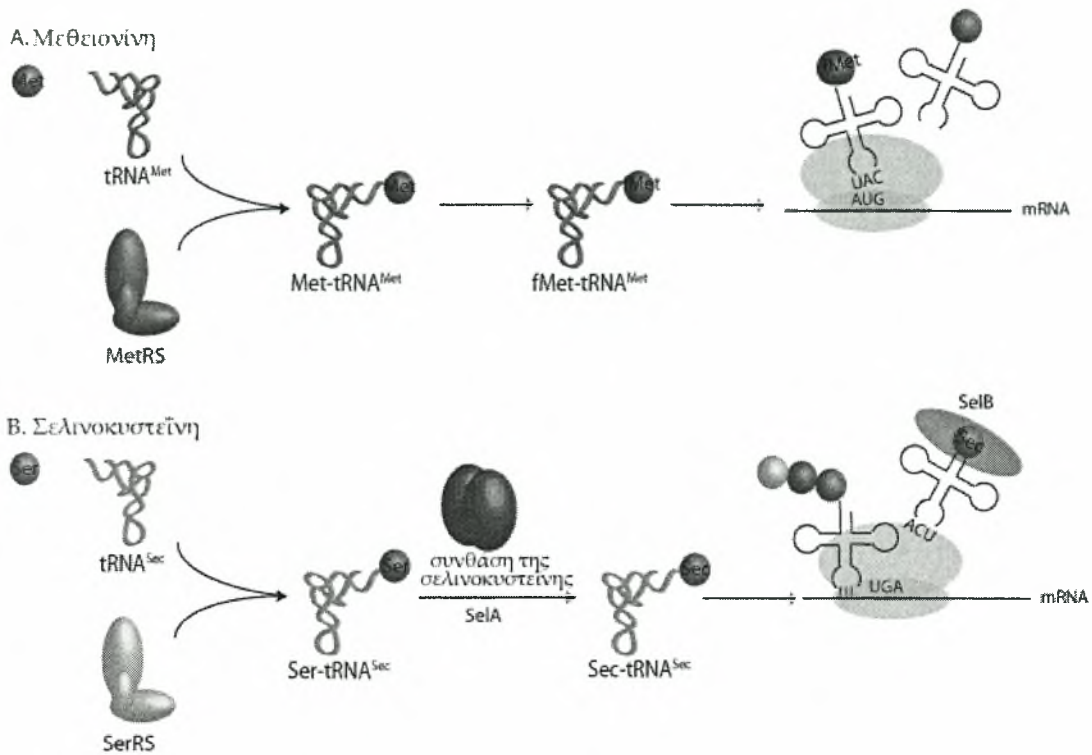
της κλάσης I το ενεργό κέντρο αποτελείται από μία δινουκλεοτιδική Rossmann περιοχή ενώ η περιοχή αυτή λείπει από το ενεργό κέντρο των ενζύμων της κλάσης II, τα οποία αντί αυτής περιέχουν δομές αντιπαράλληλου β-πτυχωτού φύλλου. Αποτέλεσμα αυτής της διαφοράς στη δομή του ενεργού κέντρου είναι ο τρόπος με τον οποίο το μόριο ATP προσεγγίζει τις συνθετάσες των δύο ομάδων. Μία άλλη σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κλάσεων των AARS είναι ο τρόπος πρόσδεσης των μορίων tRNA από τις συνθετάσες. Συγκεκριμένα, οι κλάσης I συνθετάσες προσεγγίζουν το βραχίονα υποδοχής του μορίου tRNA (acceptor stem) από την μικρή αύλακα και με το μεταβλητό βρόγχο να έχει κατεύθυνση προς το διαλύτη. Αντίθετα, οι συνθετάσες της κλάσης II πλησιάζουν το μόριο tRNA από τη μεγάλη αύλακα του βραχίονα υποδοχής, ενώ ο μεταβλητός βρόγχος κατευθύνεται προς τη συνθετάση. Τέλος, οι συνθετάσες της κλάσης I διαθέτουν δύο δομικά μοτίβα, τα "HIGH" (His-Ile-Gly-His) και "KMSKS" (Lys-Met-Ser-Lys-Ser), τα οποία απουσιάζουν από τις συνθετάσες της κλάσης II [Burbaum J.J. *et al.*, 1991]. Περαιτέρω γονιδιωματικές και δομικές αναλύσεις από εκατοντάδες αλληλουχίες ενζύμων της κλάσης I και II από προκαρυώτες, αρχαία και ευκαρυώτες συνηγορούν στο γεγονός ότι οι συνθετάσες και των δυο κλάσεων μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις υποομάδες Ia, Ib, Ic και αντίστοιχα IIa, IIb, IIc [Schimmel P. *et al.*, 2001]. Τα ένζυμα της κάθε υποομάδας για την κλάση I και II αναγνωρίζουν αμινοξέα, τα οποία είναι χημικά παρόμοια. Για παράδειγμα τα ένζυμα της υποομάδας Ia και IIa αναγνωρίζουν υδρόφοβα αμινοξέα, της Ib και IIb αμινοξέα που φέρουν φορτίο και της Ic και IIc αρωματικά αμινοξέα.



Εικόνα 2: Κατάταξη των συνθετασών σε δύο ομάδες (class I και class II) και υποομάδες a, b και c (Schimmel P. *et al.*, 2001, *Trends in Biochemical Sciences*).

Το 1958 ο Crick στην “υπόθεση προσαρμογής” (Adaptor Hypothesis) [Crick F.H.C., 1958] υποστήριξε την ύπαρξη 20 διαφορετικών αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών (AARS) όσο και ο αριθμός των αντίστοιχων αμινοξέων. Λίγα χρόνια αργότερα αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε με την ανακάλυψη 20 AARS. Η πρώτη εξαίρεση στον κανόνα των 20 διαφορετικών αμινοξέων παρατηρήθηκε στα βακτήρια το 1968 [Wilcox M. *et al.*] και ακολούθησαν και άλλες αναφορές στα αρχαία [White B.N. *et al.*, 1972] και στα ευκαρυωτικά οργανίδια [Martin N.C. *et al.*, 1977, Schön A. *et al.*, 1988]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση του φορμυλμεθειόνυλο-tRNA^{Met} ως πρώτο αμινοξύ κατά την σύνθεση των πρωτεϊνών στα βακτήρια, μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες των ευκαρυωτών αντί της μεθειονίνης που χρησιμοποιείται στους ευκαρυώτες. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, αρχικά σχηματίζεται Met-tRNA^{Met} και στη συνέχεια η μεθειονίνη φορμυλιώνεται σχηματίζοντας fMet-tRNA^{Met} αναγνωρίζοντας το ίδιο κωδικόνιο έναρξης (AUG) με τη μεθειονίνη επιτρέποντας την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης [Tan *et al.*, 2002] (Εικόνα 3A). Αν και η φορμυλομεθειονίνη είναι ένα αμινοξύ που δεν ανήκει στην ίδια ομάδα των 20 κανονικών αμινοξέων που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση, δεν αναγνωρίστηκε ως το 21^ο αμινοξύ. Αυτό σχετίζεται με το γεγονός ότι η N-φορμυλοομάδα αποσπάται από τις πρωτεΐνες μετά το τέλος της ωρίμανσής τους από μία πεπτιδική αποφορμύλαση [Giglione and Meinel, 2001].

Αντίθετα, το μη κανονικό αμινοξύ σελινοκυστεΐνη, το οποίο παραμένει στην πρωτεΐνη ως έχει και μετά την ωρίμανσή της, χαρακτηρίζεται ως το 21^ο αμινοξύ. Ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιείται η αμινοακυλίωση μελετήθηκε στο βακτήριο *E. coli* [Bock *et al.*, 2004]. Το κωδικόνιο UGA αναγνωρίζεται από το tRNA^{Sec}, το οποίο αμινοκυλιώνεται από το αμινοξύ σερίνη (Ser) σχηματίζοντας Ser-tRNA^{Sec} και στη συνέχεια μετατρέπεται σε Sec-tRNA^{Sec} από μία συνθάση της σελινοκυστεΐνης (SelA). Έπειτα, το σωστά αμινοακυλιωμένο tRNA^{Sec} προσδένεται στον παράγοντα επιμήκυνσης SelB και σε μια ειδική δομή (SECIS) που εντοπίζεται στο mRNA και κατευθύνει το Sec-tRNA^{Sec} στη θέση A του ριβοσώματος όταν αναγνωριστεί το κωδικόνιο UGA (Εικόνα 3B). Ανάλογα μονοπάτια σχηματισμού σελινοκυστεΐνης έχουν βρεθεί στα αρχαία [Rother *et al.*, 2003], στα ζώα (το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί για 25 σελινοπρωτεΐνες [Kryukov *et al.*, 2003]) και πολύ πρόσφατα στα φυτά [Novoselov *et al.*, 2002, Rao *et al.*, 2003].

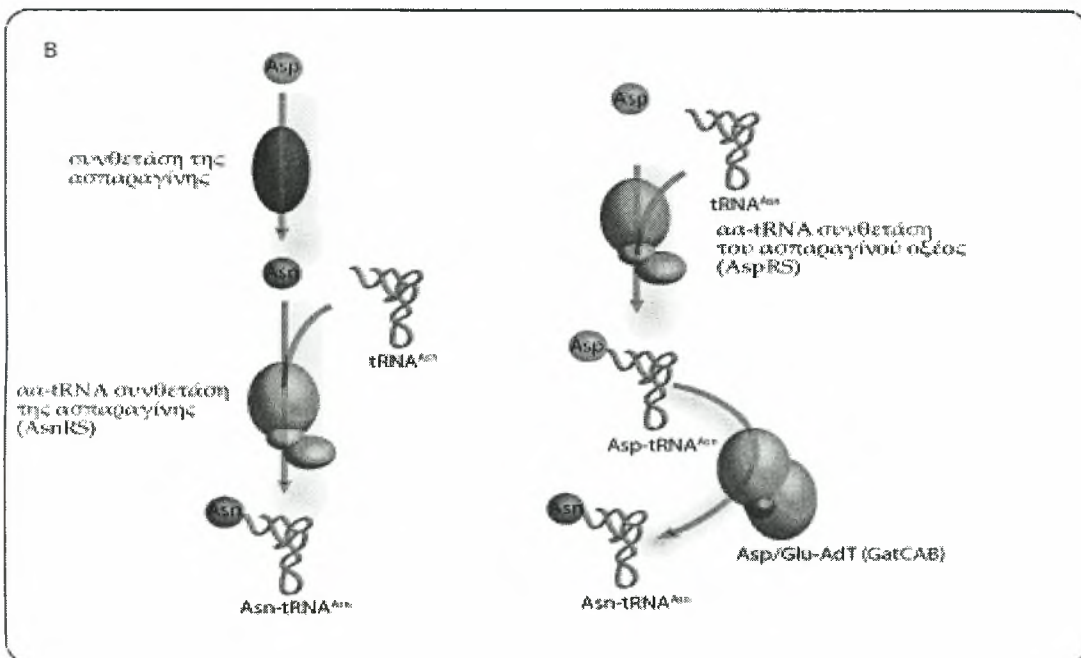
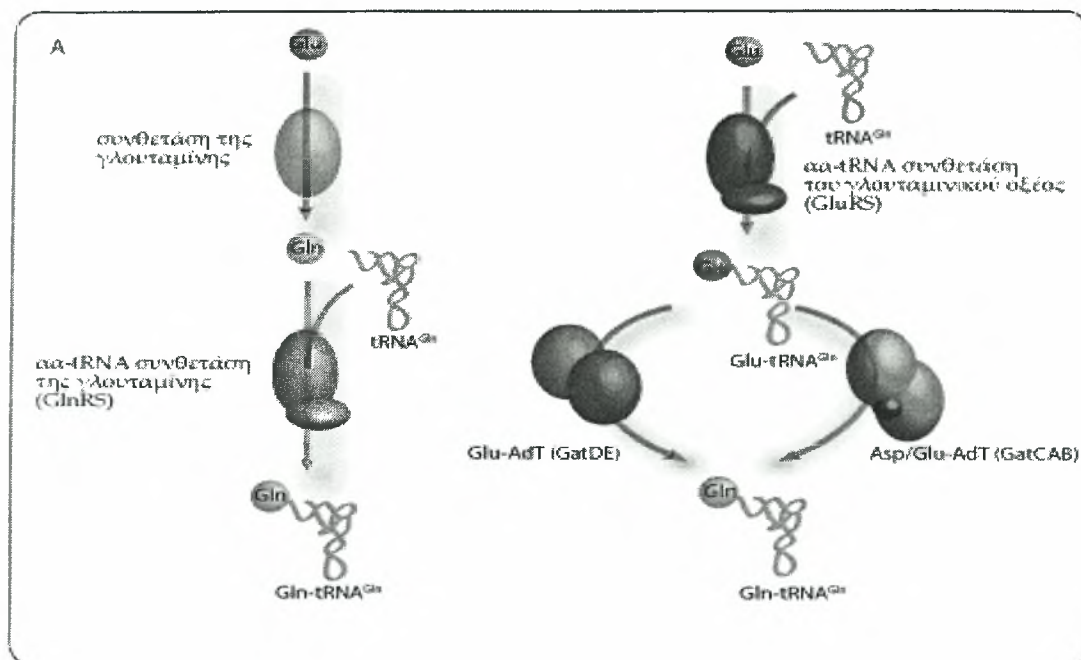


Εικόνα 3: (Α) Στα βακτήρια το $tRNA^{Met}$ αμινοακυλιώνεται από την συνθετάση της μεθειονίνης για το σχηματισμό $Met-tRNA^{Met}$. Στη συνέχεια, το αμινοξύ μεθειονίνη φορμυλιώνεται και παράγει φορμυλομεθειονίνη αποτελώντας το πρώτο αμινοξύ για την πρωτεϊνοσύνθεση. (Β) Αρχικά, η συνθετάση της σερίνης (SerRS) αμινοακυλιώνει το $tRNA^{Sec}$ και σχηματίζει $Ser-tRNA^{Sec}$. Έπειτα, με τη βοήθεια μιας συνθάσης, η σερίνη μετατρέπεται σε σελινोकυστεΐνη σχηματίζοντας $Sec-tRNA^{Sec}$. Τέλος, ο παράγοντας επιμήκυνσης SelB μεταφέρει το αμινοακυλιωμένο tRNA στο ριβόσωμα για να πραγματοποιηθεί η πρωτεϊνοσύνθεση.

Πλέον πρόσφατες μελέτες σε πλήρεις αλληλουχίες γονιδιωμάτων έδειξαν ότι αρκετοί μικροοργανισμοί δε διαθέτουν όλα τα γονίδια για την έκφραση των 20 κανονικών AARS ενζύμων έτσι ώστε να συνθέσουν τα σωστά αμινοάκυλο-tRNA μόρια, τα οποία είναι απαραίτητα για την σύνθεση των πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γενώματος των αρχαίων *Methanococcus jannaschii* και *Methanobacterium thermoautotrophicum* αποκάλυψε γονίδια, τα οποία αντιστοιχούν στην αποκωδικοποίηση 16 μόνο από τα 20 μέλη της οικογένειας των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών [Bult C.J. *et al.*, 1996, Smith D.G *et al.*, 1997]. Η tRNA συνθετάση της ασπαραγίνης (AsnRS) και η tRNA συνθετάση της γλουταμίνης (GlnRS) είναι δύο από τα γονίδια των συνθετασών που λείπουν από το γένωμα των δύο αυτών αρχαίων.

Για τη σύνθεση των γλουταμίνυλο-tRNA^{Gln} (Gln-tRNA^{Gln}) και ασπαραγίνυλο-tRNA^{Asn} (Asn-tRNA^{Asn}) οι οργανισμοί ακολουθούν δύο ειδών μονοπάτια, το άμεσο και το έμμεσο. Η χρήση αυτών των δύο μονοπατιών εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες. Παρουσία των γονιδίων για την AsnRS και GlnRS πραγματοποιείται το άμεσο μονοπάτι. Σύμφωνα με αυτό, τα Gln-tRNA^{Gln} και Asn-tRNA^{Asn} σχηματίζονται από την απευθείας αμινοακυλίωση του tRNA^{Gln} και tRNA^{Asn} από τις συνθετάσες GlnRS και AsnRS αντίστοιχα. Όμως, απουσία των γονιδίων για την AsnRS και GlnRS, καθώς και των γονιδίων που συνθέτουν Asn και Gln στα κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα τη χρήση του έμμεσου μονοπατιού. Κατά την σύνθεση του Gln-tRNA^{Gln} (Εικόνα 4A) χρησιμοποιείται η tRNA συνθετάση του γλουταμινικού οξέος (GluRS), η οποία έχει διπλή εξειδίκευση (non-discriminating), δηλαδή μπορεί να αμινοακυλώνει και το tRNA^{Glu} αλλά και το tRNA^{Gln} με γλουταμινικό οξύ και έτσι να σχηματίζεται Glu-tRNA^{Glu} και Glu-tRNA^{Gln}. Στην πρώτη περίπτωση, το σωστό αμινοακυλωμένο tRNA προσλαμβάνεται από τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu, ο οποίος θα το οδηγήσει στο ριβόσωμα και θα πραγματοποιηθεί η πρωτεϊνοσύνθεση. Στη δεύτερη περίπτωση το “κακοφορτισμένο” Glu-tRNA^{Gln} που δημιουργείται θα προσληφθεί από ένα δεύτερο ένζυμο, το οποίο θα μετατρέψει το γλουταμινικό οξύ (Glu) σε γλουταμίνη (Gln). Το ένζυμο αυτό είναι μία αμιδοτρανσφεράση, η οποία τρανσαμινώνει το γλουταμινικό οξύ σε γλουταμίνη μέσω μιας αντίδρασης που απαιτεί την κατανάλωση ATP και χρησιμοποιεί ως δότη αμινομάδων γλουταμίνη, ασπαραγίνη και χλωριούχο αμμώνιο. Το ένζυμο αυτό ονομάζεται αμιδοτρανσφεράση του Glu-tRNA^{Gln} (Glu-AdT) [Curnow AW *et al.*, 1997].

Με ανάλογο τρόπο γίνεται και η σύνθεση του Asn-tRNA^{Asn} (Εικόνα 4B). Η αμινοακυλίωση του tRNA^{Asn} πραγματοποιείται από την αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση του ασπαραγινικού οξέος (AspRS) που και αυτή έχει διπλή εξειδίκευση. Έχει τη δυνατότητα να αμινοακυλώνει και το tRNA^{Asp} αλλά και το tRNA^{Asn} προς σχηματισμό Asp-tRNA^{Asp} και Asp-tRNA^{Asn}. Στη συνέχεια, το σωστά φορτισμένο μόριο tRNA μεταφέρεται στο ριβόσωμα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών ενώ το “κακοφορτισμένο” μόριο tRNA μετατρέπεται σε Asn-tRNA^{Asn} με τη βοήθεια της αμιδοτρανσφεράσης του Asp-tRNA^{Asn} (Asp-AdT) [Curnow *et al.*, 1996]. Σχηματισμός, όμως, των “κακοφορτισμένων” μορίων tRNA έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της πιστότητας της μετάφρασης, καθώς τα αμινοακυλωμένα μόρια tRNA δεν αναγνωρίζονται από τον παράγοντα επιμήκυνσης [Stanzel M *et al.*, 1994, Becker HD., 1998] και συνεπώς δεν μπορούν να συμμετάσχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση. Αυτή η έλλειψη εξειδίκευσης κατά τη



Εικόνα 4: Το άμεσο και έμμεσο μονοπάτι κατά τη σύνθεση του (A) Gln-tRNA^{Gln} και (B) Asn-tRNA^{Asn}. Κατά την άμεση οδό αφού συντίθεται Gln και Asn αμινοξέα, τα tRNA^{Gln} και tRNA^{Asn} μόρια αμινοακυλιώνονται από τις αντίστοιχες συνθετάσες GlnRS και AsnRS. Κατά την έμμεση οδό τα tRNA^{Gln} και tRNA^{Asn} μόρια αμινοακυλιώνονται από τις συνθετάσες GluRS και AspRS σχηματίζοντας Glu-tRNA^{Gln} και Asp-tRNA^{Asn} αντίστοιχα. Έπειτα, τα "κακοφορτισμένα" μόρια tRNA με τη δράση μιας αμιδοτρανσφεράσης μετατρέπονται σε Gln-tRNA^{Gln} και Asn-tRNA^{Asn}.

διάρκεια της σύνθεσης των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη χρήση αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών διπλής εξειδίκευσης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι

οποίες έχει βρεθεί ότι στερούνται ενός βρόγχου που είναι υπεύθυνος για την αναγνώριση της τρίτης θέσης του αντικωδικονίου [Schmitt E *et al.*, 1998]. Έτσι, αναγνωρίζουν το tRNA^{Asp} (GUC αντικωδικόνιο) και tRNA^{Asn} (GUU αντικωδικόνιο), όπως έχει αναφερθεί ότι συμβαίνει στο *Thermus thermophilus* [Becker H.D., 1998].

Στα βακτήρια και στα αρχαία οι αμιδοτρανσφεράσες Asp-AdT και Glu-AdT είναι ετεροτριμερή ένζυμα και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gatC*, *gatA* και *gatB* [Curnow AW *et al.*, 1998, Tumbula *et al.*, 2000]. Σε μερικά βακτήρια, όπως στο *B. Subtilis*, τα γονίδια αυτά είναι οργανωμένα σε μορφή οπερονίου [Curnow AW *et al.*, 1997], ενώ σε κάποια άλλα βακτήρια, όπως στο *Deinococcus*, είναι διασκορπισμένα στο χρωμόσωμα [Curnow AW *et al.*, 1998]. Ο ρόλος των τριών υπομονάδων δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Πιστεύεται, όμως ότι η *gatA* υπομονάδα αποτελεί το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, προσδένει το ATP, το οποίο είναι απαραίτητο για την τρανσαμίνωση και έχει ρόλο αμιδοϋδρολάσης. Η *gatB* υπομονάδα παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και στην πρόσδεση του μορίου tRNA κατά την αντίδραση της τρανσαμίνωσης ενώ ο ρόλος της *gatC* υπομονάδας δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Πιστεύεται όμως ότι συμμετέχει στη σωστή αναδίπλωση του ενζύμου και τη σταθεροποίηση της *gatA* υπομονάδας [Curnow AW *et al.*, 1997]. Σε πειράματα καθαρισμού των υπομονάδων έχει παρατηρηθεί ότι μόνο οι υπομονάδες *gatA* και *gatB* ανακτώνται ενώ η *gatC* υπομονάδα εντοπίζεται σε μικρότερη ποσότητα [Curnow AW *et al.*, 1997]. Το ένζυμο *gatCAB* κατέχει διπλή εξειδίκευση. Μπορεί να σχηματίζει τόσο Asn-tRNA^{Asn} όσο Gln-tRNA^{Gln}. Γι' αυτό το λόγο είναι γνωστό και ως Asp/Glu-AdT. Το οπερόνιο αυτό έχει βρεθεί μετά από πειραματικές αναλύσεις σε πολλά βακτήρια, αρχαία και μιτοχόνδρια ευκαρυωτικών οργανισμών με εξαίρεση τα μιτοχόνδρια του οργανισμού *Leishmania tarentolae* [Nabholz C.E. *et al.*, 1997].

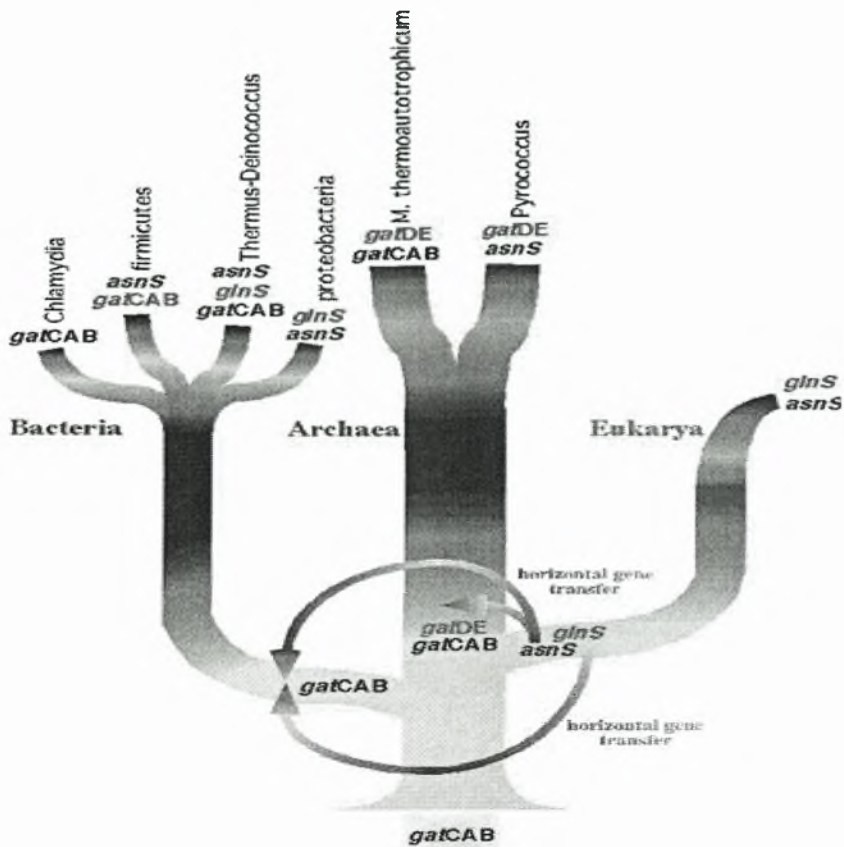
Στις μέχρι τώρα γνωστές γενωμικές αλληλουχίες αρχαίων έχει βρεθεί και ένα δεύτερο ένζυμο που έχει δράση αμιδοτρανσφεράσης και είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό του Gln-tRNA^{Gln} από Glu-tRNA^{Gln} αλλά όχι για το σχηματισμό Asn-tRNA^{Asn} από Asp-tRNA^{Asn}. Είναι ένα ετεροδιμερές ένζυμο και κωδικοποιείται από τα γονίδια *gatD* και *gatE*. Τα δύο αυτά γονίδια βρίσκονται στο γένωμα των περισσότερων αρχαίων υπό τη μορφή οπερονίου (*gatDE*) και είναι γνωστό ως γλουτάμυλο-tRNA^{Gln} αμιδοτρανσφεράση (Glu-AdT). Η *gatD* υπομονάδα αποτελεί παράλογο του γονιδίου *asnA* [Spring K.J. *et al.*, 1986], ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για μια L-ασπαραγινάση τύπου I (συνθάση της L-ασπαραγίνης) και έχει εντοπιστεί σε κάποια βακτήρια και αρχαία. Επιπλέον, η υπομονάδα *gatE* του

ενζύμου έχει παρόμοιο ρόλο με αυτό της *gatB*, πρωτεΐνης της Asp/Glu-AdT αμιδοτρανσφεράσης.

Οι αμιδοτρανσφεράσες *gatCAB* και *gatDE* παρόλο που καταλύουν την ίδια αντίδραση, δηλαδή το σχηματισμό του Gln-tRNA^{Gln} από Glu-tRNA^{Gln}, έχει βρεθεί ότι συνυπάρχουν στο γένωμα των αρχαίων. Έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν το ίδιο υπόστρωμα που είναι το tRNA^{Gln} ενώ οι δότες αμινομάδων που είναι απαραίτητοι για την πραγματοποίηση της αντίδρασης δεν είναι γνωστοί. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν και αφορούσαν μόρια, τα οποία θα μπορούσαν να θεωρηθούν δότες αμινομάδων κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι κανένα από τα δύο ένζυμα δεν υπερτερεί έναντι του άλλου. Επομένως, είναι πολύ πιθανό ότι η ύπαρξη του γονιδίου *gatDE* ακόμη και παρουσία του γονιδίου *gatCAB* να έχει κρίσιμο ρόλο στο μεταβολισμό αμινοξέων.

Η ύπαρξη του άμεσου και του έμμεσου μονοπατιού για το σχηματισμό των tRNA^{Gln} και tRNA^{Asn} οδήγησε τους επιστήμονες σε περαιτέρω μελέτες για την εξελικτική προέλευση της GlnRS και AsnRS. Η γλουταμίνη αποτελεί έναν από τους αρχαίους μεταβολίτες που εμπλέκονται στη ρύθμιση του αζώτου. Όμως, η χρήση της γλουταμίνης και της ασπαραγίνης ως αμινοξέα κατά τη μετάφραση πραγματοποιήθηκε μετά τη διάκριση των τριών βασιλείων. Η παρουσία του *gatCAB* στα βακτήρια και στα αρχαία, αλλά και η παρουσία του AsnRS στα βακτήρια και στους ευκαρυώτες συνηγορούν στο γεγονός ότι οι προγονικές μορφές και των δύο ενζύμων υπήρχαν στους μετέπειτα πληθυσμούς [Woese C.R *et al.*, 1977], οι οποίοι επιλέχθηκαν ή απορρίφθηκαν και που αποτελούν τους πρόσφατους εκπροσώπους του κάθε βασιλείου. Η GlnRS και η *gatDE* εξελίχθηκαν γρήγορα στο βασίλειο των ευκαρυωτών και των αρχαίων αντίστοιχα. Οι GlnRS και AsnRS εξαιτίας της απλότητάς τους μεταφέρθηκαν με ιδιαίτερη επιτυχία στα άλλα βασίλεια. Τέλος, η *gatDE-GluAdT* παρέμεινε αποκλειστικά στο βασίλειο των αρχαίων, πιθανό λόγω τόσο της παρουσίας μιας μη εξειδικευμένης GluRS (ND-GluRS) όσο και της ανάγκης για σχηματισμό μη “κακοφορισμένων” μορίων tRNA κατά την πρωτεϊνοσύνθεση (Εικόνα 5) [Ibba M. *et al.*, 2000].

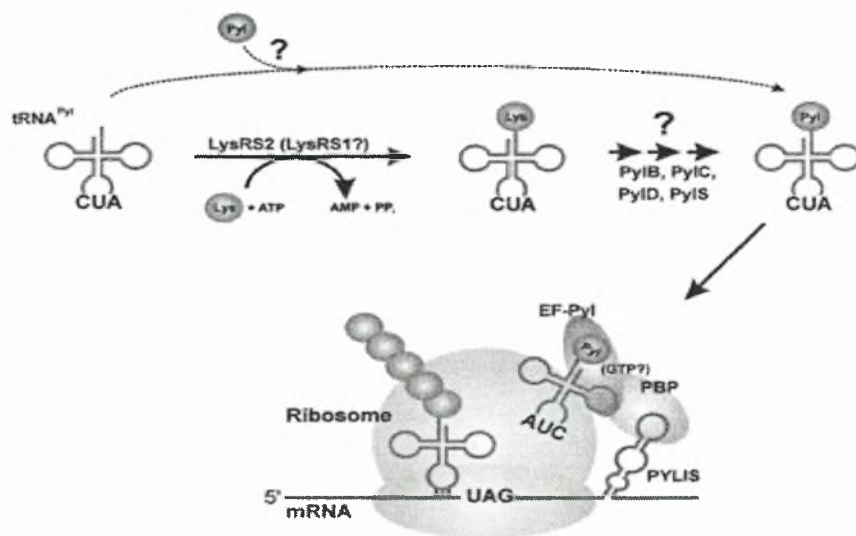
Όμως, η απουσία των GlnRS και AsnRS συθετασών από το γένωμα των αρχαίων *Methanococcus jannaschii* και *Methanobacterium thermoautotrophicum* δεν είναι και η μοναδική που παρατηρήθηκε. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η απώλεια των συθετασών της λυσίνης (LysRS) και της κυστεΐνης (CysRS) [Ibba M. *et al.*, 2000].



Εικόνα 5: Αναπαράσταση φυλογενετικής κατανομής του άμεσου και έμμεσου μονοπατιού κατά την αμινοακυλίωση των tRNA^{Gln} και tRNA^{Asn} (Από Ibba M. *et al.*, 2001, *Acta Biochimica Polonica*).

Όπως, αναφέρθηκε παραπάνω οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες διακρίνονται σε δύο κλάσεις όπου τα μέλη κάθε κλάσης διαφέρουν ως προς τη δομή τους και τον τρόπο αναγνώρισης των υποστρωμάτων. Οι AARS που ανήκουν σε κάθε κλάση έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα και η ικανότητά τους αυτή έχει διατηρηθεί πλήρως κατά την εξελικτική πορεία των συνθετασών. Αυτό σημαίνει ότι ανεξάρτητα της προέλευσής τους μία συγκεκριμένη AARS θα είναι μέλος της ίδιας κλάσης. Σήμερα, η μόνη γνωστή εξαίρεση στον κανόνα αποτελεί η LysRS. Η συνθετάση αυτή των περισσότερων αρχαίων και λιγοστών βακτηρίων ανήκει στις συνθετάσες της κλάσης I ενώ έχει βρεθεί ότι σε ορισμένα αρχαία και βακτήρια ανήκει και στην κλάση II [Ibba *et al.*, 1997a; 1997b]. Παρά την έλλειψη ομολογίας στη δομή τους, οι LysRS της κλάσης I και II είναι ικανές να αναγνωρίζουν το ίδιο αμινοξύ και παρόμοια tRNA υποστρώματα [Ibba *et al.*, 1999]. Επιπλέον, αυτή η ομοιότητα που παρουσιάζουν στην αναγνώριση των μορίων tRNA οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως το tRNA^{Lys} εμφανίστηκε εξελικτικά νωρίτερα

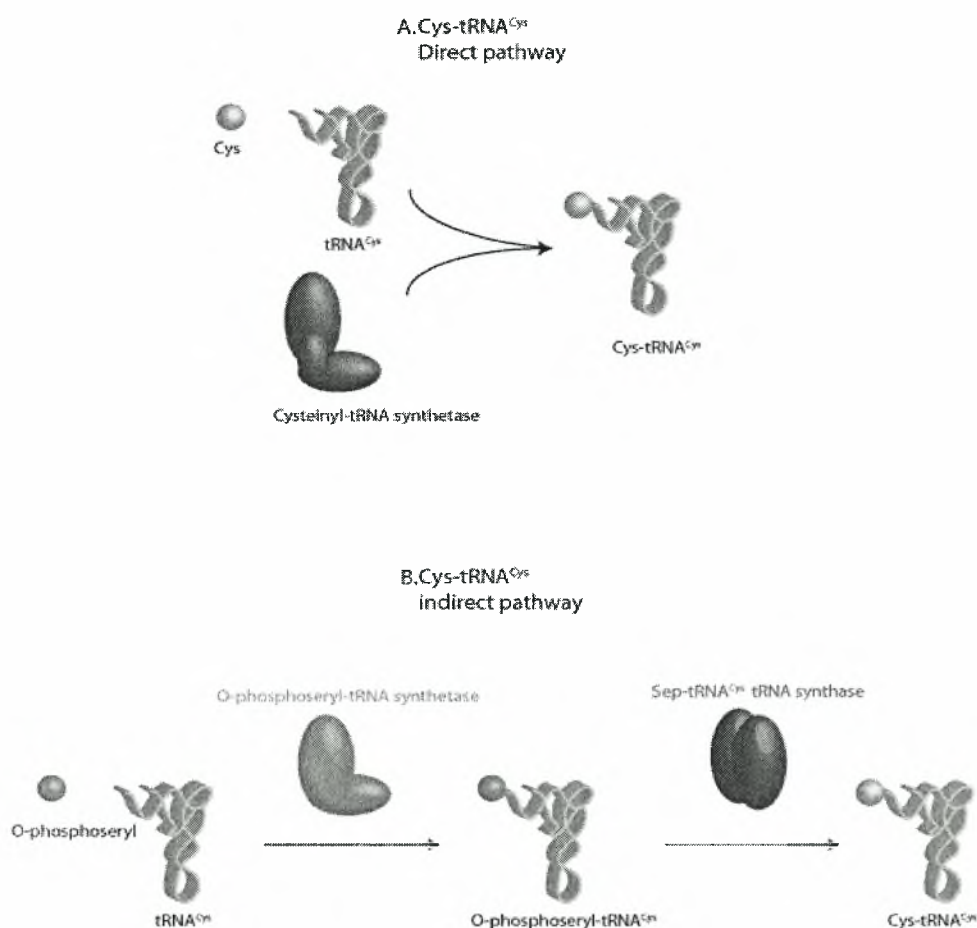
συγκρίνοντάς το με τις δύο LysRS [Ribas de Pouplana *et al.*, 1998, Ibba *et al.*, 1999]. Επίσης, πρόσφατες μελέτες εμπλέκουν στην αμινοακυλίωση του tRNA^{Pyl} τη συνθετάση της λυσίνης της κλάσης II [Polycarpo *et al.*, 2003, Theobald-Dietrich *et al.*, 2004] ενώ η συνθετάση της κλάσης I δεν έχει βρεθεί ότι έχει κάποιο ρόλο σε αυτή την αμινοακυλίωση. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία το tRNA μόριο της πυρολυσίνης αμινοακυλιώνεται από την συνθετάση της λυσίνης LysRS II και σχηματίζει Lys-tRNA^{Pyl}. Όμως, δεν έχει διευκρινιστεί μέσω ποιου μηχανισμού η λυσίνη μετατρέπεται σε πυρολυσίνη ώστε να σχηματιστεί Pyl-tRNA^{Pyl}. Επίσης, λόγω έλλειψης πειραματικών αποδείξεων δεν αποκλείεται και η άμεση αμινοακυλίωση του tRNA^{Pyl} από ένα άγνωστο μηχανισμό σε Pyl-tRNA^{Pyl} (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Υποθετική αναπαράσταση του μηχανισμού της αμινοακυλίωσης του tRNA της πυρολυσίνης. Το tRNA^{Pyl} είτε αμινοακυλιώνεται πρώτα από την LysRS II με λυσίνη και στη συνέχεια τροποποιείται για να παράγει Pyl-tRNA^{Pyl}, είτε παράγεται απευθείας Pyl-tRNA^{Pyl} μέσω ενός άγνωστου μονοπατιού. Έπειτα, θα προσδεθεί στον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Pyl, ο οποίος θα οδηγήσει το tRNA μόριο στο ριβόσωμα όπου θα αναγνωρίσει το κωδικόνιο UAG (Από Ibba M. *et al.*, 2004, *Genes & Development*).

Όσο αναφορά το σχηματισμό του Cys-tRNA^{Cys} έχει βρεθεί ότι η συνθετάση της προλίνης (ProRS) μπορεί να ενεργεί και ως συνθετάση της κυστεΐνης (CysRS), σχηματίζοντας εξίσου Pro-tRNA^{Pro} και Cys-tRNA^{Cys} [Li T. *et al.*, 1999, Stathopoulos C. *et al.*, 2000,]. Η συνθετάση αυτή, γνωστή και ως ProCysRS, δεν απαιτεί την παρουσία του tRNA^{Pro} για το σχηματισμό του Pro-tRNA^{Pro}, σε αντίθεση με το σχηματισμό του Cys-tRNA^{Cys} όπου η παρουσία του tRNA^{Cys} κρίνεται απαραίτητη [Stathopoulos C *et al.*, 2001]. Όμως, παρά την παρουσία της

ProCysRS στο γένωμα των *Methanococcus jannaschii* και *Methanobacterium thermoautotrophicum* ορισμένοι οργανισμοί (π.χ *Giardia*, *Methanococcus maripaludis* και *Thermus thermophilus*) εκφράζουν την CysRS [Bunjun *et al.*, 2000, Stathopoulos *et al.*, 2000]. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες στο μεθανιογενές αρχαίο *Methanocaldococcus jannaschii*, από το οποίο λείπει η CysRS, βρέθηκε ότι το tRNA^{Cys} αμινοακυλιώνεται με Ο-φωσφοσερίνη (Sep) και όχι με κυστεΐνη [Sauerwald A. *et al.*, 2005]. Το ένζυμο που καταλύει το σχηματισμό του Sep-tRNA^{Cys} είναι η συνθετάση της Ο-φωσφοσερίνης (SepRS). Στη συνέχεια, η Ο-φωσφοσερίνη (Sep) μετατρέπεται σε κυστεΐνη με τη βοήθεια της Sep-tRNA:Cys-tRNA συνθάσης με αποτέλεσμα το σχηματισμό του Cys-tRNA^{Cys} (Εικόνα 7).



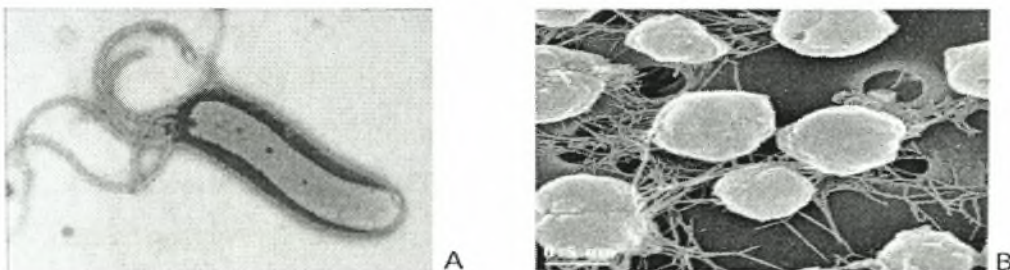
Εικόνα 7: Το άμεσο και έμμεσο μονοπάτι προς σχηματισμό Cys-tRNA^{Cys}. Α) Το tRNA^{Cys} αμινοακυλιώνεται άμεσα από τη συνθετάση CysRS, Β) Το tRNA^{Cys} αμινοακυλιώνεται αρχικά, από τη συνθετάση της Ο-φωσφοσερίνης και στη συνέχεια με τη δράση της συνθάσης Sep-tRNA:Cys-tRNA σε κυστεΐνη.

Αν και το μονοπάτι της τρανσαμίνωσης αποτελεί ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα εξελικτικής ποικιλομορφίας των αμινοάκυλο-

tRNA συνθετασών, όπως φαίνεται και από τα παραπάνω δεν είναι και το μοναδικό. Η διαθεσιμότητα όλο και περισσότερων αλληλουχιών των γονιδίων των συνθετασών επέτρεψε τον προσδιορισμό συγκεκριμένων διατηρημένων περιοχών και τον καθορισμό φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών των τριών βασιλείων. Αυτή η ποικιλομορφία που παρουσιάζουν οι AARS στα τρία βασίλεια και κυρίως ανάμεσα σε παθογόνους οργανισμούς και τον άνθρωπο, καθιστά τα σημαντικότερα αυτά ένζυμα ελκυστικούς μοριακούς στόχους έρευνας για την ανάπτυξη αντιβακτηριακών και αντιμυκηκών παραγόντων. Έτσι, αντικείμενο μελέτης στη συγκεκριμένη εργασία είναι η πρωτεΐνη εκείνη (Asp/Glu-AdT) που συμμετέχει στο μονοπάτι της τρoνσαμίνωσης για το σχηματισμό Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln}.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Αρχικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η κλωνοποίηση του οπερονίου *gatCAB*, η έκφρασή του σε βακτηριακά στελέχη *E. coli* και ο καθαρισμός του με στήλη χρωματογραφίας. Αρχικά, ενισχύθηκε χωριστά η κάθε μία υπομονάδα της αμιδοτρανσφεράσης *gatCAB* και ακολούθησε η κλωνοποίηση της κάθε υπομονάδας σε φορέα ΤΟΡΟ. Έπειτα, αφού εξετάστηκε η αλληλουχία των τμημάτων αυτών επιχειρήθηκε ο σχηματισμός του οπερονίου έτσι ώστε οι τρεις υπομονάδες να τεθούν κάτω από τον έλεγχο του ίδιου προαγωγέα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του οπερονίου σε φορέα έκφρασης. Επιχειρήθηκε ο σχηματισμός του οπερονίου με τα γονίδια δύο οργανισμών. Του παθογόνου βακτηρίου *Helicobacter pylori* και του αρχαίου *Methanococcus jannaschii* (Εικόνα 8). Τα γονίδια *gatC*, *gatA* και *gatB* εντοπίζονται στο γενετικό υλικό του *H. pylori* σε μορφή οπερονίου ενώ στο *M. jannaschii* διασκορπισμένα στα χρωμοσώματα. Το *H. pylori* έχει σπειροειδές σχήμα και ανιχνεύεται στο γαστρικό επιθήλιο κάτω από το στρώμα βλέννας του στομαχιού και του δωδεκαδακτύλου. Το βακτήριο αυτό πιστεύεται ότι καταστρέφει αυτό το στρώμα βλέννας, το οποίο είναι η φυσική προστασία του στομαχιού και του δωδεκαδακτύλου από το γαστρικό οξύ. Η φλεγμονή που προκαλείται σε αυτή την περιοχή εξαιτίας της παρουσίας του βακτηρίου και της έκθεσης στο οξύ μπορεί να βλάψει την επένδυση του στομαχιού και του δωδεκαδακτύλου, οδηγώντας τελικά στο έλκος και ενδεχομένως στο γαστρικό καρκίνο. Το *M. jannaschii* ήταν το πρώτο αρχαίο που προσδιορίστηκε η πλήρης αλληλουχία του γονιδιώματός του και έτσι ανοίχτηκε ο δρόμος για τη σύγκριση των γονιδίων του με τους οργανισμούς των άλλων βασιλείων. Είναι ένας αναερόβιος οργανισμός και παράγει μεθάνιο. Πρωτοανακαλύφθηκε και απομονώθηκε από τον πυθμένα του Ειρηνικού ωκεανού, όπου διαβιούσε σε βάθος 2.600m, θερμοκρασία 85°C και ατμοσφαιρική πίεση 200atm.



Εικόνα 8: A) Το βακτήριο *Helicobacter pylori*, B) Το αρχαίο *Methanococcus jannaschii*

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Αντιδραστήρια

- ✓ Αγαρόζη [Bio-Rad]
- ✓ Αιθανόλη 100% [Bio-Rad]
- ✓ Ακρυλαμίδιο [Bio-Rad]
- ✓ Αμπικιλλίνη [Bio-Rad]
- ✓ APS (Ammonium Per Sulfate 20% w/v) [Bio-Rad]
- ✓ ATP^{S35}
- ✓ β-μερκαπτοαιθανόλη [Bio-Rad]
- ✓ Βρωμιούχο αιθίδιο [Bio-Rad]
- ✓ BSA (Bovine Serum Albumin) [Bio-Rad]
- ✓ Γλυκίνη [Bio-Rad]
- ✓ Γλυκόζη [Bio-Rad]
- ✓ DTT
- ✓ EDTA [Bio-Rad]
- ✓ HCl [Bio-Rad]
- ✓ IPTG (Isopropyl ThioGalactosyl) [Bio-Rad]
- ✓ KCl [Bio-Rad]
- ✓ DNA molecular weight marker
- ✓ LB agar [Bio-Rad]
- ✓ LB broth [Bio-Rad]
- ✓ Μεθανόλη
- ✓ Μπλε της βρωμοφαινόλης [Bio-Rad]
- ✓ MgCl₂
- ✓ MgSO₄
- ✓ NaCl [Bio-Rad]
- ✓ Na₂EDTA [Bio-Rad]
- ✓ Νουκλεοτίδια (dNTPs) [Stratagene]
- ✓ Διδεόξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) [Stratagene]
- ✓ Οξικό αμμώνιο [Bio-Rad]
- ✓ Οξικό κάλιο (KOH) [Bio-Rad]
- ✓ Οξικό νάτριο (NaOH) [Bio-Rad]

- ✓ Οξικό οξύ (CH₃COOH) [Bio-Rad]
- ✓ Ουρία
- ✓ Ριβονουκλεάση [New England Biolabs]
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) [New England Biolabs]
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα Dianazyme Ext [New England Biolabs]
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα Phusion High Fidelity (HF) [New England Biolabs]
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA Ligase [Qbiogene]
- ✓ Sarcosyl Dye
- ✓ SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate) [Bio-Rad]
- ✓ Sequenase Buffer [USB]
- ✓ Sequenase dilution Buffer [USB]
- ✓ TBE
- ✓ TEMED [Bio-Rad]
- ✓ Tris base [Bio-Rad]
- ✓ Tryptone [Bio-Rad]
- ✓ Φαινόλη [Bio-Rad]
- ✓ Formamide Dye
- ✓ Χλωροφόρμιο [Bio-Rad]
- ✓ X-Gal [Bio-Rad]
- ✓ Yeast extract [Bio-Rad]

3.1.2 Ένζυμα

Πολυμεράσες

Dynazyme Ext [Finnzyme]

Phusion [New England Biolabs]

Taq polymerase [Qbiogene]

Ένζυμα Περιορισμού

HindIII [New England Biolabs]

NdeI [Stratagene]

PacI [New England Biolabs]

E.coRI [New England Biolabs]

XhoI [New England Biolabs]

Λινάσες

T4 DNA Ligase [Qbiogene]

Φωσφατάσες

BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) [Stratagene]

3.1.3 Γενωμικό DNA

Helicobacter pylori

Methanococcus jannaschii

3.1.4 Βακτηριακά Στελέχη

JM109 *E. coli*

Top10 *E. coli*

One Shot Mach-1 *E. coli* (Invitrogen)

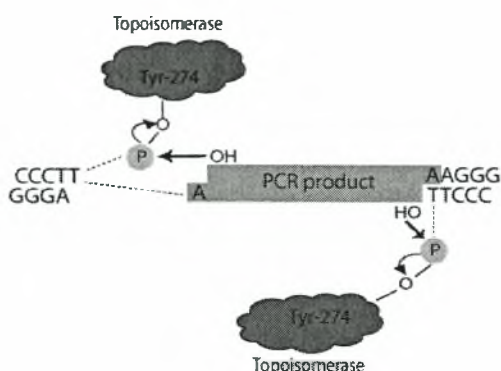
3.1.5 Φορείς-Πλασμίδια

pCR4-Topo (Invitrogen)

Έχει μέγεθος 3,9 kb και χρησιμοποιείται μόνο για κλωνοποίηση γονιδίων. Παρέχεται σε ανοιχτή μορφή και κάθε του άκρο περιλαμβάνει μία 3' θυμιδίνη, έτσι ώστε να σχηματίσει υδρογονικό δεσμό με την αδενίνη που βρίσκεται στα άκρα κάθε γονιδίου έτοιμου προς κλωνοποίηση και μία τοποϊσομεράση ομοιοπολικά συνδεδεμένη με τον φορέα.

Η σύνδεση ενός τμήματος DNA με τον φορέα πραγματοποιείται ως εξής: Η Taq πολυμεράση, που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση των γονιδίων, έχει την ικανότητα να προσθέτει στο 3' άκρο κάθε τμήματος DNA μία δεοξυαδενοσίνη. Έτσι, ο γραμμικός φορέας μπορεί να συνδεθεί με το τμήμα του DNA εξαιτίας της συμπληρωματικότητας που εμφανίζουν τα άκρα τους. Επιπλέον, η τοποϊσομεράση I που βρίσκεται στα άκρα του φορέα, είναι αυτή που προσφέρει την ενέργεια για τη σύνδεση των δύο τμημάτων. Η τοποϊσομεράση I προέρχεται από τον ιό *Vaccinia* και έχει την ικανότητα να προσδένεται σε συγκεκριμένα τμήματα στη διπλή έλικα του DNA και να διασπά τον φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ δύο βάσεων μετά από το τμήμα 5'-CCCTT στη μία μόνο έλικα [Shuman, 1991]. Η ενέργεια που παράγεται από τη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού διατηρείται μέσω του σχηματισμού ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του 3' φωσφορικού της κομμένης έλικας και ενός

καταλοίπου τυροσίνης (Tyr-274) της τοποϊσομεράσης (Εικόνα 9). Στη συνέχεια, ο δεσμός αυτός μπορεί να διασπασθεί από μία ελεύθερη 5' OH του τμήματος του DNA που θέλουμε να εισάγουμε στο φορέα, αντιστρέφοντας την αντίδραση και απελευθερώνοντας την τοποϊσομεράση [Shuman, 1994].



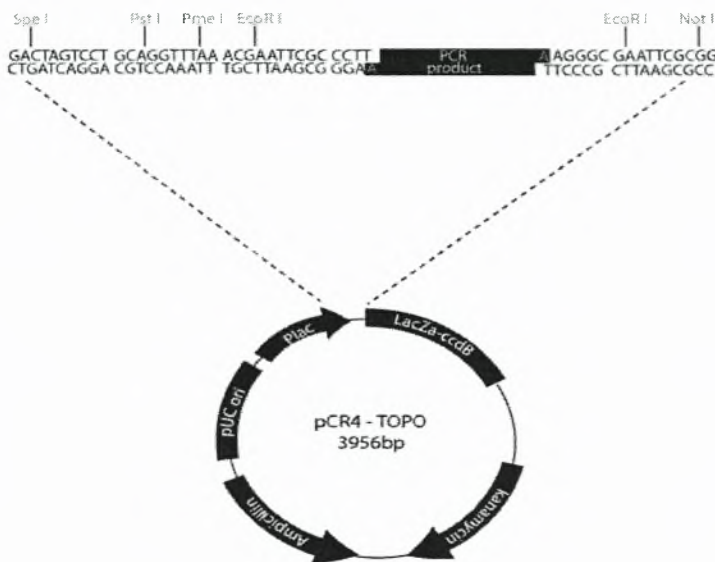
Εικόνα 9: Μηχανισμός σύνδεσης ενός τμήματος DNA με την ανοικτή περιοχή του φορέα pCR4. Οι ελεύθερες υδροξυλομάδες του τμήματος DNA αλληλεπιδρούν με την φωσφορική ομάδα του φορέα. Η τοποϊσομεράση απελευθερώνεται και παράγεται ενέργεια ικανή να συνδέσει τα δύο τμήματα.

Ο φορέας στο γονιδιώμά του περιέχει το θνησιγόνο γονίδιο *ccdB* του *E. coli* [Bernard and Couturier, 1992, Bernard *et al.*, 1994,], το οποίο βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του γονιδίου *LacZα*, κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της λακτόζης. Η είσοδος ενός τμήματος DNA στο φορέα δεν επιτρέπει την έκφραση του *LacZα-ccdB* γονιδίου και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα ανασυνδυασμένα κύτταρα. Εκείνα τα κύτταρα που περιέχουν μη ανασυνδυασμένο φορέα δεν αναπτύσσονται λόγω έκφρασης του θνησιγόνου γονιδίου *LacZα-ccdB*. Επιπλέον, ο φορέας διαθέτει τα γονίδια εκείνα που προσδίδουν στα κύτταρα που το περιέχουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη (Εικόνα 10).

pGEM T vector [Promega]

Έχει μέγεθος 3kb και χρησιμοποιείται για κλωνοποίηση γονιδίων. Στο γονιδιώμά του περιέχει το γονίδιο για την ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. 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, την περμεάση που καταλύει τη μεταφορά της λακτόζης μέσα στο κύτταρο και την 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 θρεπτικό υλικό του κυττάρου.



Εικόνα 10: Φαίνονται η περιοχή εισαγωγής του τμήματος DNA καθώς και τα γονίδια που περιέχει. Ο φορέας περιέχει στο γονιδιώμα του το θνησιγόνο γονίδιο *LacZα-ccdB* και τα γονίδια εκείνα που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη.

Επιπλέον, ο φορέας διαθέτει μια περιοχή που ονομάζεται πολυσυνδέτης (polylinker) και βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία του οπερονίου *lacZ*. Επομένως, το γονίδιο που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε θα συνδεθεί στην περιοχή του πολυσυνδέτη και έτσι θα διακόπτει τη συνέχεια του οπερονίου. Η διακοπή αυτή θα προκαλέσει φυσικά και απενεργοποίηση του οπερονίου. Στη συνέχεια, αφού το πλασμίδιο με το κλωνοποιημένο γονίδιο μεταφερθεί μέσα στα κύτταρα, αυτά επωάζονται και αναπτύσσονται σε καλλιέργεια παρουσία του X-gal που είναι ανάλογο της λακτόζης και του επαγωγέα IPTG (Isopropyl Thio Galactosyl). Το IPTG έχει την ικανότητα να δεσμεύει και να απομακρύνει τον καταστολέα του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης, υπεύθυνη για την μεταγραφή του *lacZ* οπερονίου. Το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης προέρχεται από βακτηριοφάγο με τον οποίο μεταφέρθηκε και ενσωματώθηκε στο χρωμόσωμα των κυττάρων που χρησιμοποιήσαμε. Στα κύτταρα του *E.coli*, όμως, αναστέλλεται η έκφραση του γονιδίου αυτού από τον καταστολέα LacI_Q. Γι' αυτό είναι απαραίτητη η προσθήκη του επαγωγέα IPTG. Όσες αποικίες αναπτυχθούν και είναι λευκές σημαίνει ότι έχουν ενσωματώσει το πλασμίδιο με το κλωνοποιημένο γονίδιο,

ενώ όσες αναπτυχθούν μπλε σημαίνει πως τα κύτταρα τους δεν έχουν προσλάβει το πλασμίδιο ή το πλασμίδιο δεν έχει ενσωματώσει το επιθυμητό γονίδιο στην περιοχή απενεργοποίησης του οπερονίου. Επομένως, τα γονίδια εκφράζονται και το ανάλογο της λακτόζης X-gal που βρίσκεται στο θρεπτικό μέσο θα διασπασθεί και θα παράγει το μπλε χρώμα.

pET 15b [Novagene]

Έχει μέγεθος 5,6 kb και προσδίδει στα κύτταρα που το περιέχουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Χρησιμοποιείται για κλωνοποίηση και έκφραση γονιδίων. Επίσης, διαθέτει μία ουρά έξι ιστιδινών δίπλα στην οποία βρίσκεται ο πολυσυνδέτης (polylinker) για την εισαγωγή γονιδίων. Οι ιστιδίνες αυτές εκφράζονται μαζί με το κλωνοποιημένο γονίδιο και 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.

pCYB1 [New England Biolabs]

Έχει μέγεθος 6,8kb και χρησιμοποιείται αποκλειστικά για κλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Η έκφρασή τους βρίσκεται υπό τον έλεγχο του προαγωγέα P_{lac}. Οπότε παρουσία του επαγωγέα IPTG το γονίδιο εκφράζεται.

3.1.6 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 χλωραμφαινικόλης είναι απαραίτητη η προσθήκη στο θρεπτικό μέσο 200 µg/L αμπικιλίνης και 50 µg/L χλωραμφαινικόλης, αντίστοιχα.

3.1.7 Εκκινητές (Primers)

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων *gatA*, *gatB* και *gatC* των δύο οργανισμών *Methanococcus jannaschii* και *Helicobacter pylori* σχεδιάστηκαν εξειδικευμένα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), μήκους 20-48 νουκλεοτίδια. Ο σχεδιασμός βασίστηκε στην αλληλουχία του κάθε γονιδίου έτσι ώστε οι εκκινητές 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). Επιπλέον, οι εκκινητές περιέχουν και τις αλληλουχίες εκείνες που θα αναγνωριστούν από τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα για την περαιτέρω επεξεργασία των γονιδίων (Εικόνα 11).

A. *Helicobacter pylori*



NdeI - *gatC* sense: GGCATATGCAAATTGATGACGC
 PacI/HindIII - *gatC* antisense: TTAATTAAGCTTCTATTCAATGATCTTGGG
 SapI - *gatC* antisense: GGTGGTTGCTCTCCACCATGCAAATTGATGACGC

HindIII/PacI - *gatA* sense: GGAAGCTTAGGAGGTTAATTAATGATCACTTTAAACAAGCCC
 EcoRI/PstI - *gatA* antisense: TAGAATTCCTCTCTATGCAGTTAATCTAATTTAAATC

PstI/EcoRI - *gatB* sense: GGCTGCATAGGAGCGAATTCTAATGATGCCATTTGAAGCTGTAATCGG
 XhoI - *gatB* antisense: GGCCTCGAGTCAACCCCAATTTCTC

B. *Methanococcus jannaschii*



NdeI - *gatC* sense: GGCATATGGATGAAAAAACC
 PmeI/HindIII - *gatC* antisense: TTTAAACCTCTCTAAGCTTTTATTTAACCAGCTACC

HindIII/PmeI - *gatA* sense: GGAAGCTTAGGAGGTTAATTAACATGATTGTTGAGAGAGTTG
 PacI/BamHI - *gatA* antisense: TTAATTAAGCTTGGATCCTTACTCCATGCTCTCTC

BamHI/PacI - *gatB* sense: GGGGATCCAGGAGGTTAATTAATGGGTGAAATATGGAAG
 XhoI - *gatB* antisense: GGCCTCGAGTTATTTATCTAATCTCTC

Εικόνα 11: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του κάθε γονιδίου με PCR αντίδραση.

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

3.2.1 Κλωνοποίηση γονιδίων με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η ενίσχυση μιας επιθυμητής αλληλουχίας πραγματοποιείται με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ένα μονόκλωνο τμήμα DNA ως εκμαγείο και εκκινητές, οι οποίοι θα υβριδιστούν εκατέρωθεν της επιθυμητής αλληλουχίας DNA και έτσι θα επιτευχθεί η σύνθεση του τμήματος. Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλο για τη δράση της πολυμεράσης, dNTPs σε συγκέντρωση 250μM, εκκινητών σε συγκέντρωση 1μM και γενωμικού DNA ~100ng. Μετά από το πρώτο στάδιο αποδιάταξης προστίθεται και το ένζυμο.

Η PCR αποτελείται από τρία στάδια. Το πρώτο είναι το στάδιο αποδιάταξης κατά το οποίο οι δύο κλώνοι του DNA διαχωρίζονται. Πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 95°C για 45sec. Ακολουθεί το στάδιο υβρισμού των δύο κλώνων με τους εκκινητές σε θερμοκρασία 30 - 65°C. Η θερμοκρασία υβριδισμού ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος και τη σύσταση των εκκινητών. Συγκεκριμένα, είναι 5°C λιγότερο από το σημείο τήξεως του ζεύγους των εκκινητών. Η θερμοκρασία τήξεως υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο: $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)^{\circ}C$. Τέλος, είναι το στάδιο πολυμερισμού όπου λαμβάνει χώρα στους 72°C για 2min. Αυτά τα τρία στάδια αποτελούν έναν κύκλο. Για να παραχθεί επαρκής ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος πρέπει ο κύκλος αντιγραφής του DNA να επαναληφθεί για περίπου 30 φορές. Μετά το στάδιο των 30 κύκλων ακολουθούν 10min επώασης στους 72°C για την τελική επιμήκυνση των μορίων DNA.

Για την ενίσχυση των τριών γονιδίων του κάθε οργανισμού εφαρμόστηκαν διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης PCR. Συγκεκριμένα, για τα γονίδια *gatA*, *gatB* και *gatC* του αρχαίου *M. jannaschii* και για τα γονίδια *gatA* και *gatB* του βακτηρίου *H. pylori* εφαρμόστηκε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας ($\uparrow 0,5^{\circ}C$) σε κάθε κύκλο στο στάδιο υβριδισμού με ελάχιστο τους 45°C και μέγιστο τους 60°C (Πίνακας 1), ενώ για το γονίδιο *gatC* του *H. pylori* εφαρμόστηκε σταθερή θερμοκρασία στους 35°C (Πίνακας 2).

	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός επαναλήψεων
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5min	1
Αποδιάταξη	95°C	30sec	35
Υβριδοποίηση εκκινητή	45°C~60°C (↑0.5°C/κύκλο)	1:30min	
Επιμήκυνση	72°C	2min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	20min	1

Πίνακας 1: Συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την πραγματοποίηση της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση των γονιδίων *gatA*, *gatB* και *gatC* του *M. jannaschii* και *gatA* και *gatB* του *H. pylori*.

	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός επαναλήψεων
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5min	1
Αποδιάταξη	95°C	30sec	35
Υβριδοποίηση εκκινητή	35°C	1:30min	
Επιμήκυνση	72°C	45sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	20min	1

Πίνακας 2: Συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *gatC* του *H. pylori*.

3.2.2 Διαχωρισμός τμημάτων DNA με ηλεκτροφόρηση

Ο διαχωρισμός των τμημάτων DNA πραγματοποιείται σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης. Για την προετοιμασία του gel χρησιμοποιείται αγαρόζη και ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X ως διαλύτης. Η ποσότητα της αγαρόζης που χρησιμοποιείτε για να ετομαστεί η πηκτή εξαρτάται από το μέγεθος του DNA που θα διαχωριστεί. Θερμαίνεται το διάλυμα αυτό ωσότου η αγαρόζη διαλυθεί και το διάλυμα γίνει διαυγές. Για να είναι δυνατή η ανίχνευση των τμημάτων στην πηκτή, προστίθεται στο διάλυμα βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο είναι μια χρωστική που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και κάνει εμφανείς τις ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV). Στη συνέχεια, τοποθετείται η πηκτή στην ηλεκτροφορητική συσκευή και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση προστίθεται η χρωστική Sarkozyl Dye και τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις υποδοχείς της πηκτής. Παράλληλα, ηλεκτροφορούνται και ένα ή δύο μάρτυρες μεγέθους DNA (ladders), ανάλογα με

την περίπτωση, ώστε να διευκολύνεται ο υπολογισμός του μεγέθους των τμημάτων DNA.

Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50X:

- ✓ Tris base 2M
- ✓ Οξικό νάτριο 250mM
- ✓ Na₂EDTA 50mM
- ✓ Οξικό οξύ (ρύθμιση pH στο 7,9)

Χρωστική Sarkozyl Dye:

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

3.2.3 Εκχύλιση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζη/κατακρήμιση DNA

Σε ένα σωληνάκι των 1,5mL, αφού δημιουργηθεί μία τρύπα στον πάτο του, τοποθετείται στο εσωτερικό του αποστειρωμένο βαμβάκι. Στη συνέχεια, προστίθεται το κομμάτι εκείνο της αγαρόζης που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA και το σωληνάκι των 1,5mL τοποθετείται μέσα σε ένα σωληνάκι των 2mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 10.000rpm. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το σωληνάκι των 2mL κρατείται και προστίθεται 1V φαινόλης/χλωροφόρμιου. Η φαινόλη και το χρωροφόρμιο έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν τις πρωτεΐνες και την αγαρόζη. Αναδεύεται το μείγμα στον κυκλικό αναδευτήρα για μερικά δευτερόλεπτα και φυγοκεντρείται για 1min στις 4.000rpm. Ακολουθεί συλλογή του υπερκείμενου. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται. Έπειτα, προστίθεται 1V χλωροφόρμιου και το δείγμα αναδεύεται και φυγοκεντρείται στις 4.000rpm για 1min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο συλλέγεται. Προστίθενται NaCl τελικής συγκέντρωσης 250mM και 3V αιθανόλης 100%, όπου συμβάλουν στην κατακρήμιση του DNA και τη δημιουργία ιζήματος. Το δείγμα αναδεύεται και αφήνεται στο ξηρό πάγο για 10min. Φυγοκεντρείται για 10min στις 10.000rpm. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθενται 3V αιθανόλης 80% και φυγοκεντρείται για 5min στις 10.000rpm. Ομοίως, το υπερκείμενο

απομακρύνεται και το ίζημα ξηραίνεται για 5min. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 20μL νερό.

3.2.4 Σύνδεση τμημάτων DNA (ligation)

Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία του επιθυμητού τμήματος DNA και του φορέα σε αναλογία 1/3. Επίσης, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ειδικό για τη δράση της T4 DNA λιγάσης, ένζυμο T4 DNA λιγάσης (5U/μL) και ATP τελικής συγκέντρωσης 1mM. Το μείγμα αφήνεται να επωαστεί για 16-18h στους 16°C.

3.2.5 Προετοιμασία κυττάρων *E. coli* για μεταφορά DNA με ηλεκτροδιάτωση (electrocompetent cells)

Για την προετοιμασία electrocompetent κυττάρων, αρχικά προετοιμάζεται καλλιέργεια των 4mL, η οποία αφήνεται να αναπτυχθεί για 12-14h στους 37°C. Στη συνέχεια, μεταφέρονται 2mL από την παραπάνω καλλιέργεια σε 250mL υγρού θρεπτικού μέσου και αφήνεται να αναπτυχθεί έως ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει στο 0,6 OD. Έπειτα, η υγρή καλλιέργεια τοποθετείται για 30min στον πάγο και φυγοκεντρείται για 15min στις 3.000rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα πλένονται με 250mL κρύου αποστειρωμένου νερού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στις 3.000rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Το ίζημα που απομένει ξεπλένεται με νερό και φυγοκεντρείται για 15min στις 3.000rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 250mL 10% αποστειρωμένης γλυκερόλης διαλυμένης σε νερό. Φυγοκέντρηση για 15min στις 3.000rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Έπειτα, προστίθενται 5mL του ίδιου διαλύματος γλυκερόλης και τα κύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C (όλα τα στάδια πραγματοποιούνται σε αυστηρώς αποστειρωμένες συνθήκες).

3.2.6 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων με ηλεκτροισμό

Με αυτή την τεχνική δίνεται η δυνατότητα να μεταφερθούν ανασυνδυασμένα πλασμίδια μέσα στα κύτταρα εφαρμόζοντας ηλεκτρισμό. Σε 40μL κυττάρων *E. coli* προστίθενται 2μL από το διάλυμα σύνδεσης και

εφαρμόζεται τάση 2,2kV. Στη συνέχεια, το μείγμα επιστρώνεται σε τρυβλία και τα κύτταρα αναπτύσσονται για 12-14h στους 37°C.

3.2.7 Μετασχηματισμός χημικά επιδεκτικών κυττάρων

Αρχικά, προστίθεται ένα μέρος από το μείγμα σύνδεσης ενός τμήματος DNA με τον φορέα σε κύτταρα που έχουν μετατραπεί σε επιδεκτικά με χημική επεξεργασία και αναμιγνύονται απαλά. Στη συνέχεια, το μείγμα επωάζεται στον πάγο για 30min. Έπειτα, τοποθετείται σε υδατόλουτρο 42°C για 30sec, για να προκληθεί "heat shock" στα κύτταρα και μετά 2min στον πάγο. Ακολουθεί προσθήκη 250μL SOC θρεπτικού μέσου και ανάπτυξη των κυττάρων με ανάδευση στους 37°C για 1h. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία και αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37°C για 12-14h.

SOC θρεπτικό μέσο:

- ✓ Tryptone 2%
- ✓ Yeast extract 0,5%
- ✓ NaCl 10mM
- ✓ KCl 2,5mM
- ✓ MgCl₂ 10mM
- ✓ MgSO₄ 10mM
- ✓ Glucose 20mM

3.2.8 Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί αν ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA εισήχθει στον φορέα. Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στο γονιδίωμα και να διασπών τον φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ των βάσεων. Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία πλασμιδιακού DNA, περιοριστικών ενζύμων, ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλο για τη βέλτιστη δράση οποιουδήποτε περιοριστικού ενζύμου που χρησιμοποιείται και BSA, το οποίο δεσμεύεται στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωλήνων έτσι ώστε να εμποδίζεται η δέσμευση των περιοριστικών ενζύμων σε αυτά και να αυξάνεται η δραστηρότητά τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, προστίθεται ριβονουκλεάση

(RNase) για τη διάσπαση τυχόν RNA προσμίξεων. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37°C για 3h.

3.2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Από καλλιέργεια κυττάρων των 4mL που αναπτύχθηκαν στους 37°C για 12-14h λαμβάνονται 2mL και φυγοκεντρώνται για 1min στις 4.000rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και κρατείται το ίζημα των κυττάρων όπου και προστίθονται 200μL από το διάλυμα I. Το διάλυμα αναμιγνύεται έτσι ώστε να ομογενοποιηθεί. 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, προστίθονται 400μL από το διάλυμα II και αφού αναδευτούν ελαφρώς το διάλυμα αφήνεται για 5min στον πάγο. Ακολουθεί, προσθήκη 200μL από το διάλυμα III, ανάμιξη και παραμονή του διαλύματος στον πάγο για 10min. Το διάλυμα II δημιουργεί πόρους στη κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων, επιτρέποντας έτσι την έξοδο των νουκλεϊκών οξέων από το κύτταρο. Το διάλυμα III προκαλεί την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, αλλά λόγω των αλάτων που περιέχει ρυθμίζει και το pH του διαλύματος. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος στον πάγο το διάλυμα φυγοκεντρείται για 30min στις 10.000rpm και στους 4 °C και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε διαφορετικό σωληνάκι (το ίζημα περιέχει πρωτεΐνες που έχουν καθιζάνει μετά τη προσθήκη του διαλύματος III). Έπειτα, προστίθονται στο υπερκείμενο 3V αιθανόλης 100% και ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10min, στους 20°C και στις 10.000rpm. Σ' αυτό το στάδιο προκαλείται κατακρήμνιση των πλασμιδίων και το RNA διαλύεται και παραμένει στο υπερκείμενο. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθονται 3V αιθανόλης 80% στο ίζημα και το δείγμα φυγοκεντρείται για 5min στους 4°C και στις 4.000rpm. Ομοίως, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα ξηραίνεται για 5min. Τέλος, το ίζημα αναδιαλύεται σε 40μL νερού. Πάντοτε ύστερα από την προετοιμασία αυτή του DNA το διάλυμα αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης για να βεβαιωθεί ότι υπάρχει DNA στο διάλυμα.

Διάλυμα I:

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

Διάλυμα II:

- ✓ SDS 1%
- ✓ NaOH 0,2 M

Διάλυμα III:

- ✓ Οξικό αμμώνιο 7,5M (pH 6,5)

3.2.10 Ένζυμική μέθοδος ανάλυσης αλληλουχίας DNA

Αρχικά, το πλασμίδιο εκείνο που φέρει το τμήμα του DNA προς ανάλυση απομονώνεται σε μικρή κλίμακα με miniprep kit. Για την ανάλυση της αλληλουχίας είναι απαραίτητα 2μg πλασμιδίου. Η συγκέντρωση του πλασμιδίου καθορίζεται από την απορρόφηση του DNA στα 260nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου. Οπτική πυκνότητα ίση με 1 ισοδυναμεί με 50 mg DNA ανά ml διαλύματος περίπου. Στη συνέχεια, προστίθεται NaOH τελικής συγκέντρωσης 0,2M και το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 10min. Το NaOH συμβάλλει στην αποικοδόμηση των μορίων RNA και στο διαχωρισμό της διπλής έλικας του DNA. Έπειτα, προστίθεται οξικό κάλιο (AcK⁺) τελικής συγκέντρωσης 0,4M και 3V αιθανόλης 100%. Το δείγμα τοποθετείται στο ξηρό πάγο για λίγα λεπτά και φυγοκεντρείται για 10min στις 10.000rpm στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθονται 3V αιθανόλης 80%. Η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα ξηραίνεται. Το ίζημα επαναδιαλύεται με το μείγμα υβριδοποίησης, το οποίο αποτελείται από εκκινήτες (1μM), που παρέχονται μαζί με το φορέα από την κάθε εταιρία και υβριδοποιούνται κοντά στην περιοχή που το τμήμα του DNA έχει εισαχθεί, ρυθμιστικό διάλυμα για το ένζυμο sequenase 5X (seq buffer) και απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί επώαση του μείγματος υβριδοποίησης για 1h στους 37 °C.

Παράλληλα, προετοιμάζεται το μείγμα αλληλούχισης. Για μία αντίδραση περιέχει:

- ✓ ATP^{S35} 0,2μL

- ✓ DTT 1μL (προστατεύει τους δισουλφιδικούς δεσμούς (-SH) του ενζύμου από την οξείδωση)
- ✓ Ένζυμο sequenase 0,2μL
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα seq (seq dilution buffer) 1,8μL
- ✓ Extention Mix 0,4μL (περιέχει dNTPs)
- ✓ Απεσταγμένο H₂O 1,9μL

Από το παραπάνω μείγμα προστίθονται 5,5μL στο σωληνάκι, που περιέχει το ίζημα και ακολουθεί αναμονή για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε εσοχή ενός ειδικού πιάτου προστίθονται 2,5μL από κάθε ddNTPs με σειρά ACGT. Τα ddNTPs είναι τριφωσφορικοί διδεοξυριβονουκλεοζίτες, όπου η 3'-OH της διδεοξυριβόζης που υπάρχει στα κανονικά νουκλεοτίδια λείπει. Όταν ένα τέτοιο τροποποιημένο νουκλεοτίδιο ενσωματώνεται σε μία αλυσίδα DNA, παρεμποδίζει την προσθήκη του επόμενου νουκλεοτιδίου. Επομένως, η αντίδραση αυτή δίνει μία διαβάθμιση DNA τμημάτων. Στη συνέχεια, προστίθεται στην κάθε εσοχή 3,5μL από το προς ανάλυση δείγμα και επώαζεται για 10min στους 37 °C. Ακολουθεί προσθήκη 4μL χρωστικής Formamide dye, επώαση για 5min στους 102°C και παραμονή στον πάγο για λίγα λεπτά.

	A	C	G	T
1	○	○	○	○
2	○	○	○	○
3	○	○	○	○
4	○	○	○	○

Προετοιμασία αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου για ανάλυση αλληλουχίας DNA

Αφού προετοιμαστεί η συσκευή ηλεκτροφόρησης, ετοιμάζονται 100mL πηκτής.

Αποτελείται από 80mL:

TBE 1X

Ακρυλαμίδιο 8%

Ουρία 8M (καταστρέφει τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA έτσι ώστε να γίνει γραμμικό)

+ 240μL APS 20% w/v (ενεργοποιεί το πολυακρυλαμίδιο έτσι ώστε να σχηματιστούν συμπλέγματα)

+ 80μL TEMED

Η πηκτική αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30min ωστόσο να στερεοποιηθεί. Έπειτα, αφού τα δείγματα μεταφερθούν στην πηκτική και προστεθεί στην ηλεκτροφορητική συσκευή το ρυθμιστικό διάλυμα, που περιέχει Tris, SDS και γλυκίνη, εφαρμόζεται τάση 3.000V για 3h.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτική τοποθετείται σε οξικό οξύ 10% για να απομακρυνθεί η ουρία και στη συνέχεια, τοποθετείται σε χαρτί Whatman καλυμμένο με πλαστικό φιλμ και αφήνεται να στεγνώσει για 1:30h στους 80°C. Έπειτα, η πηκτική αποτυπώνεται σε φωτογραφικό φιλμ.

3.2.11 Αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του DNA

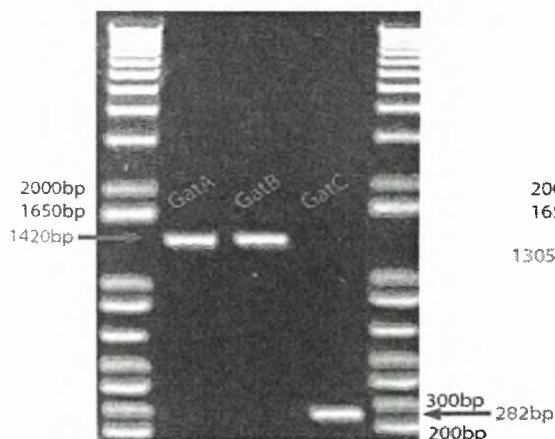
Γραμμικό τμήμα DNA μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί στο 5' άκρο του επωάζοντας το δείγμα για 2h στους 60°C αφού προηγουμένως έχουν προστεθεί το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για τη δράση του ενζύμου της βακτηριακής αλκαλικής φωσφατάσης και το ένζυμο.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

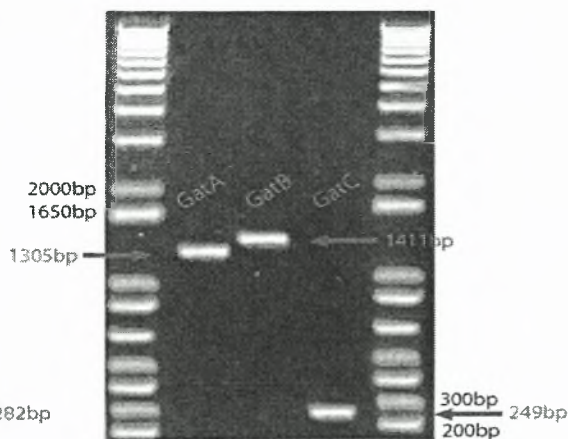
4.1 Ενίσχυση και κλωνοποίηση σε φορέα topo των γονιδίων *gatC*, *gatA* και *gatB* των οργανισμών *Helicobacter pylori* και *Methanococcus jannaschii*

Για το σκοπό αυτό, αφού προσδιορίστηκε η αλληλουχία DNA του κάθε γονιδίου για κάθε οργανισμό με τη βοήθεια των προγραμμάτων της βιοπληροφορικής, σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές απαραίτητοι για την ενίσχυση των γονιδίων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση χρησιμοποιώντας το ένζυμο Dynazyme Ext για τα γονίδια *gatA*, *gatB* και *gatC* του *M. jannaschii* και *gatA* και *gatB* του *H. pylori* ενώ χρησιμοποιήθηκε Phusion για το *gatC* του *H. pylori*. Μετά το τέλος της PCR έγινε πηκτή αγαρόζης και στη συνέχεια, τα προϊόντα της αντίδρασης ανιχνεύτηκαν με τη βοήθεια υπεριώδους φωτός (UV). Οι ζώνες που προέκυψαν ήταν οι αναμενόμενες για κάθε γονίδιο. Συγκεκριμένα, για το βακτήριο *H. pylori* προέκυψαν δύο ζώνες με μέγεθος 1420bp και μία με μέγεθος 282bp για τα γονίδια *gatA*, *gatB*, και *gatC* αντίστοιχα. Για το αρχαίο *M. jannaschii* προέκυψαν ζώνες με μέγεθος 1305bp, 1411bp και 249bp για τα γονίδια *gatA*, *gatB*, και *gatC* αντίστοιχα (Εικόνα 12). Στη συνέχεια, απομονώθηκαν οι ζώνες από τη πηκτή και τοποθετήθηκαν σε διαφορετικά σωληνάκια των 1,5mL, έτσι ώστε να απομονωθεί το κάθε τμήμα του DNA και να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία. Για την απομόνωση πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και έπειτα εκχύλιση με φαινόλη και κατακρήμνιση με αιθανόλη.

A. *Helicobacter pylori*

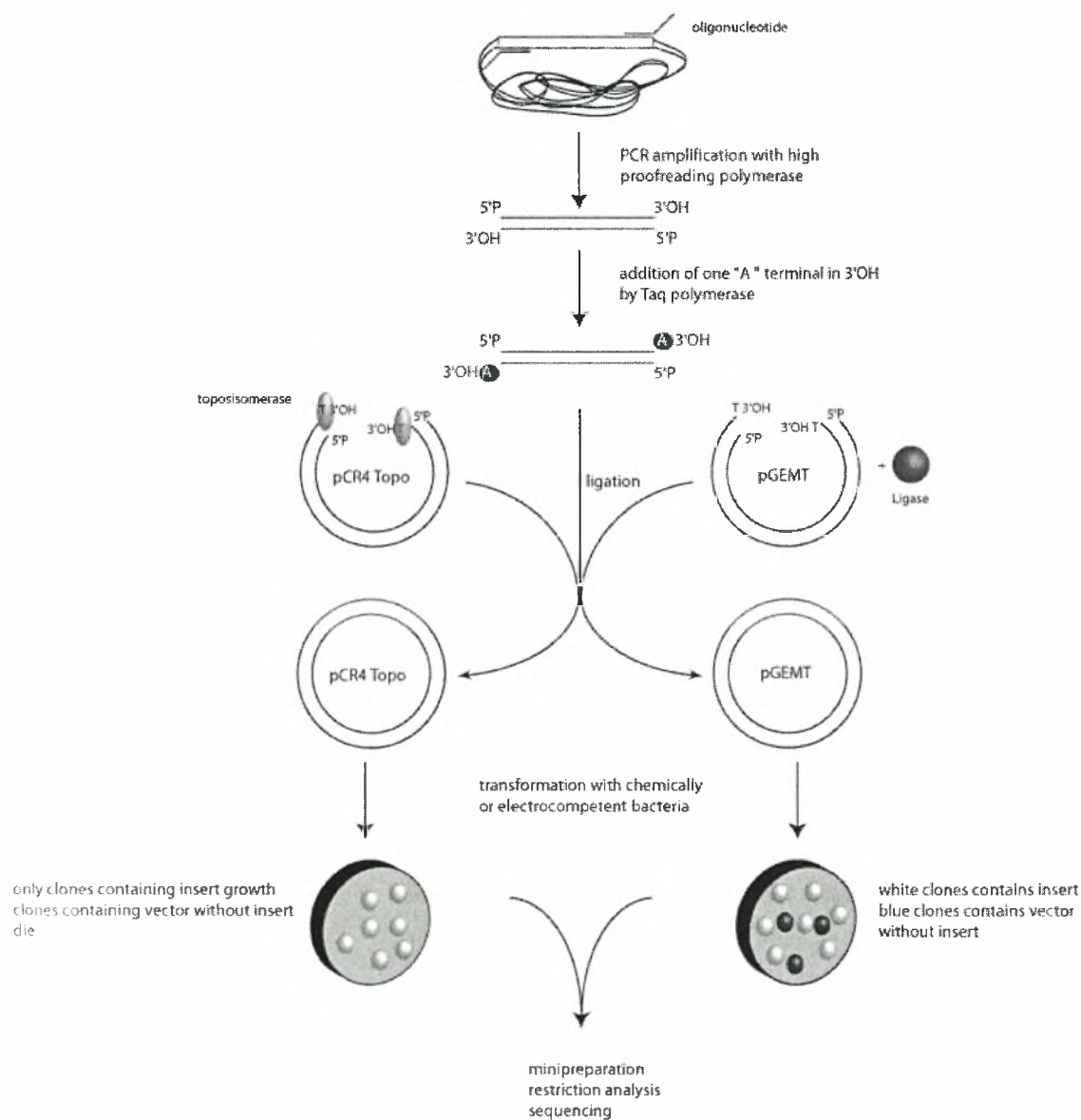


B. *Methanococcus jannaschii*



Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR. Για το *H. pylori* προέκυψαν οι 2 ζώνες στις 1420bp και μία στις ~300bp ενώ για το *M. jannaschii* προέκυψαν ζώνες στις 1,3kb, 1,4kb και 249bp.

Μετά την επαναδιάλυση του ιζήματος με νερό, ετοιμάστηκαν έξι δείγματα, ένα για κάθε γονίδιο και σε κάθε σωληνάκι προστέθηκε ποσότητα TOPO φορέα σε αναλογία 1:3 (φορέα:insert) και το ένζυμο λιγάση, ώστε να πραγματοποιηθεί η σύνδεση μεταξύ των δύο τμημάτων DNA. Χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη φορέα: ο pGEM και ο pCR4 TOPO. Ο pGEM χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου *gatC* του *M. jannaschii* και στο διάλυμα της αντίδρασης προστέθηκε λιγάση ενώ για τα υπόλοιπα γονίδια χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pCR4 και δεν προστέθηκε ένζυμο αφού ο φορέας αυτός διαθέτει το ένζυμο τοποϊσομεράση συνδεδεμένο στο γονιδιώμα του (Εικόνα 13). Στη συνέχεια, τα παραπάνω μείγματα καθαρίστηκαν από τυχόν προσμείξεις με τη μέθοδο της εκχύλισης με φαινόλη και της κατακρήμνισης του

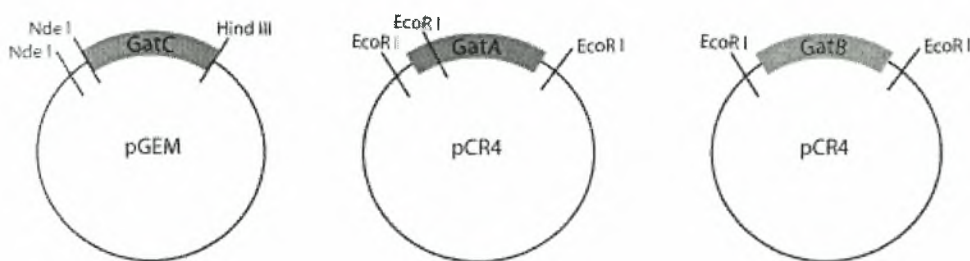


Εικόνα 13: Κλωνοποίηση των γονιδίων σε φορέα pGEM και pCR4 TOPO.

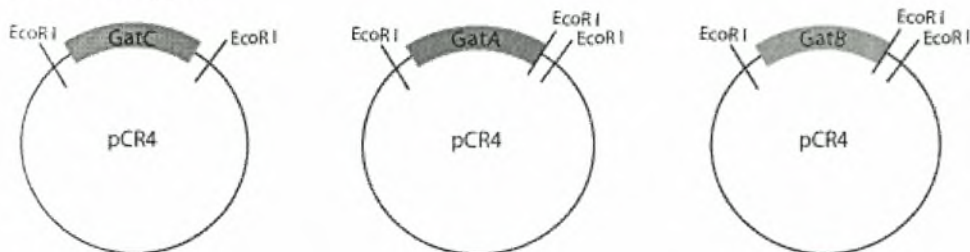
DNA με αιθανόλη. Το πλασμιδιακό DNA που ανακτήθηκε με την παραπάνω μέθοδο χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό ηλεκτρικών επιδεκτικών κυττάρων JM109 και χημικών επιδεκτικών κυττάρων One Shot Mach1. Τα κύτταρα JM109 μετασχηματίστηκαν με το φορέα pGEM και αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε αμπικιλίνη, παρουσία X-gal και IPTG ενώ τα κύτταρα One Shot Mach1 μετασχηματίστηκαν με το φορέα pCR4 και αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε αμπικιλίνη. Μετά από ανάπτυξη 12 ωρών στους 37°C έγινε η επιλογή των κλώνων. Όσες λευκές αποικίες αναπτύχθηκαν, συλλέχθηκαν και προετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες 4mL για κάθε μία από αυτές τις αποικίες. Ύστερα, από ανάπτυξη 12 ωρών στους 37°C πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA από τα κύτταρα με τη μέθοδο της απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα.

Για να διαπιστωθεί αν τα πλασμίδια περιείχαν ενσωματωμένα στο γονιδιώμα τους τα γονίδια *gatA*, *gatB* και *gatC* πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις με ένζυμα περιορισμού. Προετοιμάστηκαν δείγματα, καθένα από τα οποία περιείχαν το πλασμιδιακό DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα και τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού που θα κόψουν στις άκρες κάθε γονιδίου. Επομένως, για τα γονίδια που κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pCR4 χρησιμοποιήθηκε η ενδονουκλεάση EcoRI ενώ για το γονίδιο *gatC* που κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM χρησιμοποιήθηκαν οι ενδονουκλεάσες HindIII και NdeI (Εικόνα 14).

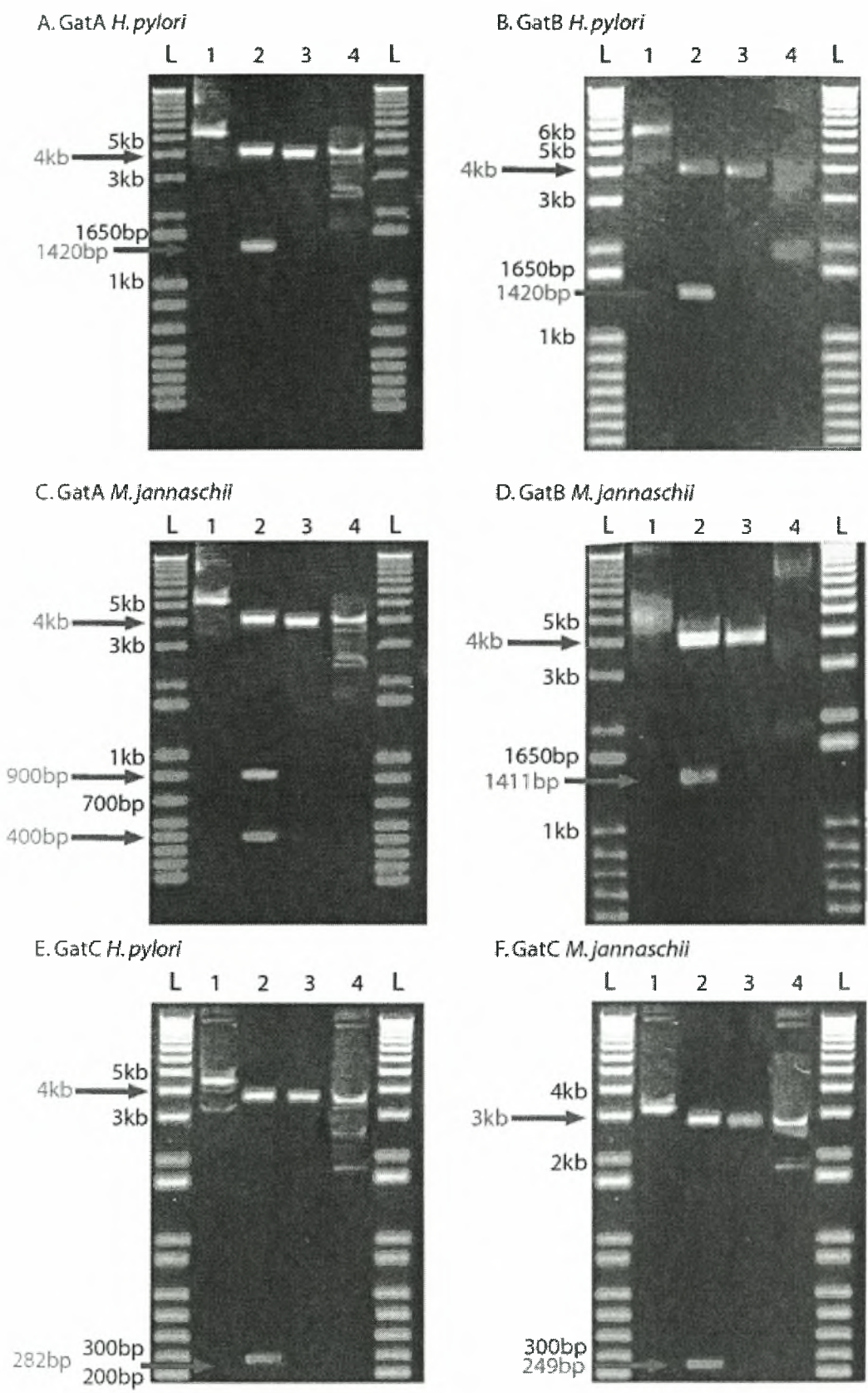
A. *Methanococcus jannaschii*



B. *Helicobacter pylori*



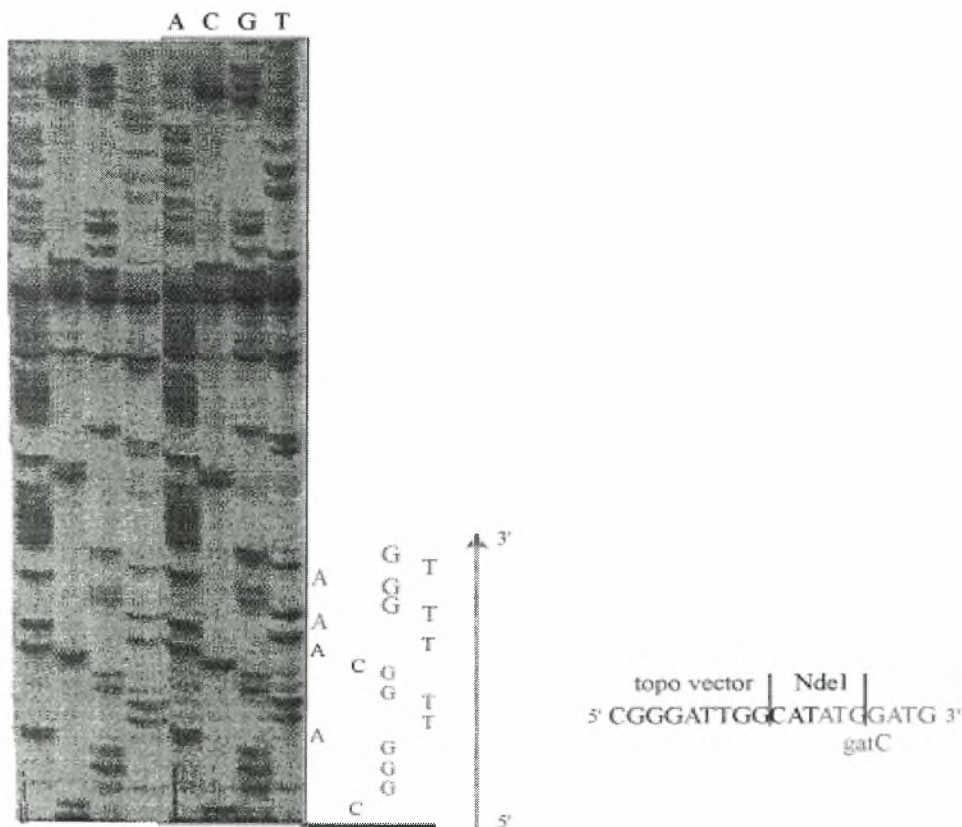
Εικόνα 14: Θέσεις κοπής των πλασμιδίων από τα ένζυμα NdeI, HindII και EcoRI



Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων πέψης. Η πρώτη διαδρομή κάθε gel απεικονίζει άκοπο φορέα με insert, η δεύτερη κομμένο φορέα με insert, η τρίτη κομμένο φορέα χωρίς insert και η τέταρτη άκοπο φορέα χωρίς insert.

Έπειτα, έγινε πηκτή αγαρόζης για να ανιχνευτούν τα αποτελέσματα της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, για τα γονίδια *gatA M.j*, *gatB M.j*, *gatB H.p* και *gatC H.p* αναμένεται μία ζώνη στις 1,3kb, 1,4kb, ~1,4kb και ~0,3kb αντίστοιχα και μία στις 3,9kb που αντιστοιχεί στο φορέα. Για το γονίδιο *gatA H.p* υπάρχουν τρεις θέσεις κοπείς στο πλασμίδιο. Η δύο εντοπίζονται στα άκρα του γονιδίου ενώ η τρίτη στο εσωτερικό. Επομένως, αναμένονται μία ζώνη στις 3,9kb που αντιστοιχεί στο φορέα, μία στις ~0,9kb και μία στις ~0,4kb. Τέλος, για το γονίδιο *gatC M.j* προέκυψαν δύο ζώνες μεγέθους 3kb και ~0,3kb (Εικόνα 15).

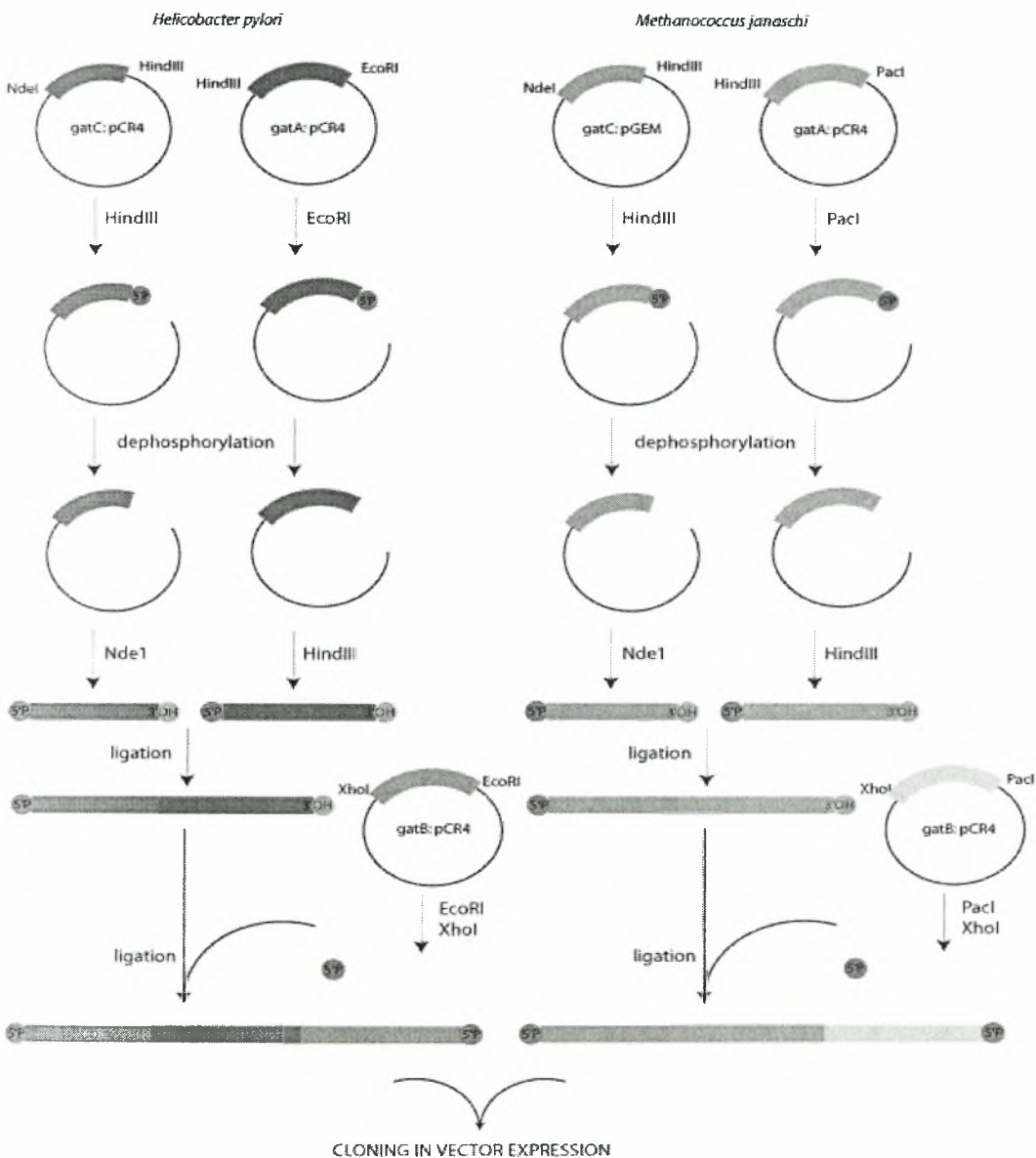
Μετά την ανίχνευση των θετικών δειγμάτων, ακολούθησε ο εντοπισμός των θετικών κλώνων και η προετοιμασία υγρών καλλιιεργειών, για να επαναληφθεί η μέθοδος της απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα έτσι ώστε τα πλασμίδια που έχουν ενσωματώσει στο γονιδιώμά τους τα γονίδια να σταλούν για προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων. Στο εργαστήριο προσδιορίστηκε η αλληλουχία του γονιδίου *gatC M.j* με την ενζυμική μέθοδο ανάλυσης (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Αποτελέσματα ανάλυσης αλληλουχίας του γονιδίου *gatC*. Η σειρά των βάσεων σε κάθε διαδρομή είναι ACGT και η πηκτή διαβάζεται με φορά από πάνω προς τα κάτω (5' → 3'). Οι πρώτες βάσεις αντιστοιχούν στο φορέα και οι επόμενες στο γονίδιο *gatC*.

4.2 Σύνδεση των τριών γονιδίων προς σχηματισμό οπερονίου

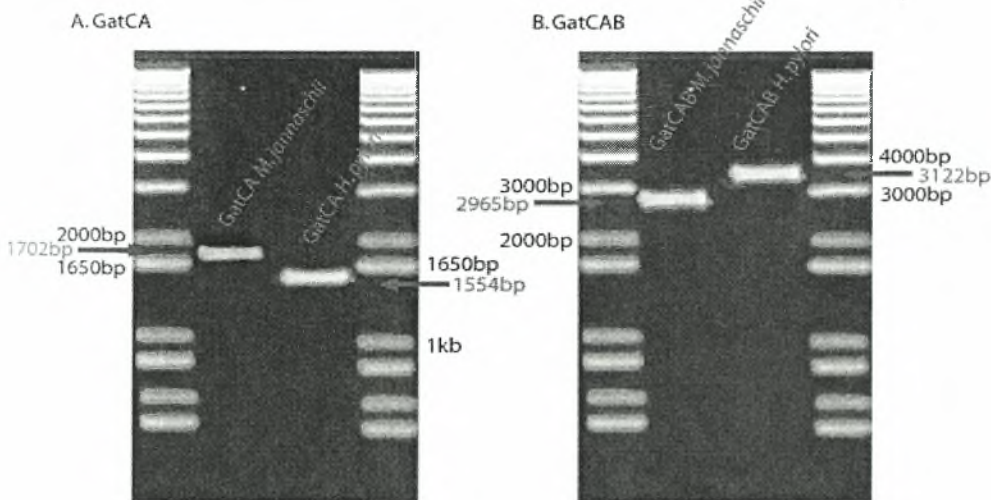
Στη συνέχεια, ασχοληθήκαμε με το σχηματισμό του οπερονίου, έτσι ώστε και οι τρεις υπομονάδες να βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του ίδιου προαγωγέα. Το πρώτο στάδιο σ' αυτή τη διαδικασία ήταν η πέψη του κάθε πλασμιδίου που φέρει τα γονίδια με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (Εικόνα 17). Συγκεκριμένα, για το σχηματισμό του οπερονίου με τα γονίδια του *H. pylori* χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα HindIII για το *gatC*, PacI για το *gatA* και XhoI για το



Εικόνα 17: Απεικόνιση του μηχανισμού για το σχηματισμό του οπερονίου στους δύο οργανισμούς. Αρχικά, πραγματοποιείται πέψη στα γονίδια *gatC*, *gatA* και *gatB* με τα κατάλληλα ένζυμα. Έπειτα, αποφωσφορυλίωση και σύνδεση του *gatC* με το *gatA*. Τέλος, πραγματοποιείται σύνδεση μεταξύ του *gatCA* και *gatB*.

gatB. Για το σχηματισμό του οπερονίου με τα γονίδια του *M. jannaschii* τα πλασμίδια που φέρουν το *gatC* υπέστησαν πέψη με HindIII, το *gatA* με EcoRI και το *gatB* με XhoI. Έπειτα, κάθε δείγμα καθαρίστηκε από τυχόν προσμείξεις με τη μέθοδο της εκχύλισης με φαινόλη και της κατακρήμνισης του DNA με αιθανόλη. Ακολούθησε αποφωσφορυλίωση των άκρων του ανακτημένου DNA. Αυτό επέτρεψε στα διάφορα τμήματα του DNA να συνδεθούν με τον κατάλληλο προσανατολισμό. Μετά το τέλος της αποφωσφορυλίωσης πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των μειγμάτων και πέψη του κάθε τμήματος DNA με το δεύτερο ένζυμο. Για το *gatC H.p* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο NdeI, για το *gatA H.p* το HindIII και για το *gatB H.p* το PacI ενώ για το *gatC M.j* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο NdeI, για το *gatA M.j* το HindIII και για το *gatB M.j* το EcoRI.

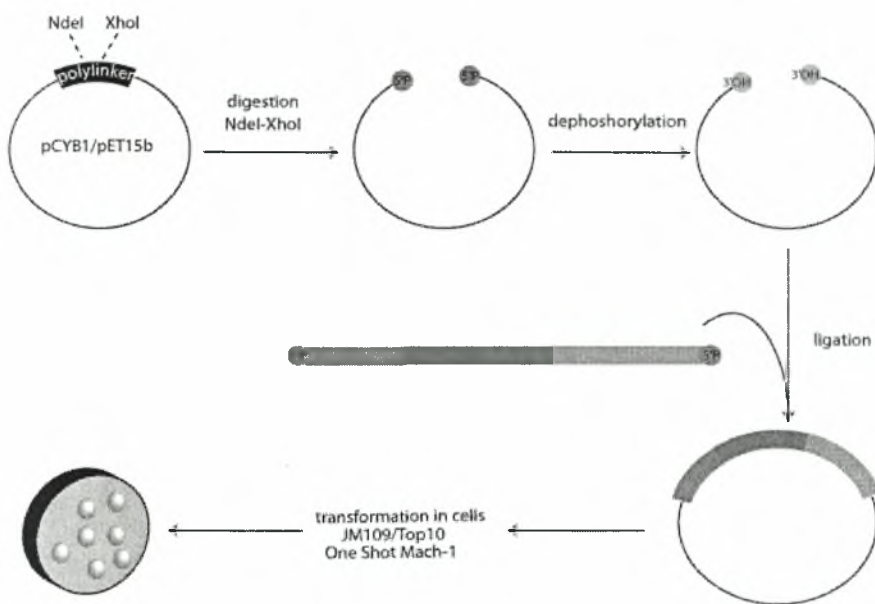
Επόμενο βήμα ήταν η διαδοχική σύνδεση των γονιδίων μεταξύ τους. Προετοιμάστηκαν δύο δείγματα, ένα για κάθε οργανισμό, και πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης μεταξύ του *gatC* και *gatA*, αφού προστέθηκε στην αντίδραση ATP και ένζυμο λιγάση. Έπειτα, έγινε πηκτή αγαρόζης για να ανιχνευτούν τα αποτελέσματα της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν τα αναμενόμενα αφού το μέγεθος κάθε ζώνης αντιστοιχούσε σε 1,7kb για το *H. pylori* και σε ~1,6kb για το *M. jannaschii* (Εικόνα 18Α). Στη συνέχεια, και αφού απομονώθηκε το DNA από κάθε ζώνη, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης μεταξύ του *gatCA* και του τρίτου γονιδίου *gatB*. Έγινε πηκτή αγαρόζης και το μέγεθος της κάθε ζώνης που προέκυψε ήταν 3,1kb για το *H. pylori* και 2,9kb για το *M. jannaschii* (Εικόνα 18Β).



Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 1% Α) Αποτελέσματα σύνδεσης των γονιδίων *gatC* και *gatA* και Β) των *gatCA* και *gatB*. Η πρώτη διαδρομή κάθε gel απεικονίζει τα αποτελέσματα σύνδεσης για το *M. jannaschii* και η δεύτερη για το *H. pylori*.

4.3 Κλωνοποίηση του οπερονίου σε φορέα έκφρασης

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο φορείς: ο pET15b (5,7kb) και ο pCYB (~6,9kb). Καθένας τους προετοιμάστηκε με πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI και ακολούθησε αποφωσφορυλίωση. Η επιλογή των ενζύμων καθορίστηκε έτσι ώστε οι φορείς να διαθέτουν συμπληρωματικά άκρα με τα άκρα του οπερονίου για να διευκολυνθεί η σύνδεση των δύο τμημάτων. Υστερα, από επώαση του κάθε γονιδίου με τον κάθε φορέα κλωνοποίησης, τα μείγματα καθαρίστηκαν από τυχόν προσμείξεις. Το πλασμιδιακό DNA που ανακτήθηκε χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό ηλεκτρικών επιδεικτικών κυττάρων JM109 και Top10 αλλά και χημικών επιδεικτικών κυττάρων One Shot Mach1 (Εικόνα 19). Τα κύτταρα JM109 και Top10 αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε αμπικιλίνη, παρουσία X-gal και IPTG ενώ



Εικόνα 19: Κλωνοποίηση του οπερονίου *gatCAB* σε φορέα pCYB1 και pET15b. Αρχικά, πραγματοποιείται πέψη με τα ένζυμα NdeI και XhoI έτσι ώστε να σχηματιστούν συμπληρωματικά άκρα με το οπερόνιο. Στη συνέχεια, αποφωσφορυλιώνονται τα άκρα του φορέα και πραγματοποιείται σύνδεση των δύο τμημάτων. Τέλος, το πλασμίδιο χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό κατάλληλων κυττάρων.

τα κύτταρα One Shot Mach1 αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε αμπικιλίνη. Όσες λευκές αποικίες αναπτύχθηκαν, συλλέχθηκαν και προετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες των 4mL για κάθε μία από αυτές τις

αποικίες. Ύστερα, από ανάπτυξη 12 ωρών στους 37°C πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα κύτταρα σε μικρή κλίμακα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI για να διαπιστωθεί αν τα κύτταρα περιέχουν το οπερόνιο. Από τους κλώνους που εξετάστηκαν κανένας δεν περιείχε το οπερόνιο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αμινοάκυλο-tRNA (α -tRNA) είναι υποστρώματα που έχουν καίρια σημασία κατά την πρωτεϊνοσύνθεση, αφού ρόλος τους είναι η προσαρμογή των νουκλεοτιδίων του γενετικού κώδικα σε αμινοξέα. Η λειτουργία τους βασίζεται στο ακριβές ταίριασμα των κατάλληλων αμινοξέων με τα σωστά μόρια tRNA που φέρουν τα αντίστοιχα αντικωδικόνια. Όπως, έχει ήδη αναφερθεί, οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (AARS) είναι τα ένζυμα εκείνα που είναι υπεύθυνα για την πραγματοποίηση αυτής της αντίδρασης. Κατά συνέπεια, οι AARS θα έπρεπε να διαθέτουν εξειδίκευση στην αναγνώριση των σωστών υποστρωμάτων, αφού δημιουργία ενός μη σωστού ζεύγους αμινοξέος και μόριου tRNA μπορεί να αποβεί μοιραίο για τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Γι' αυτό το λόγο, ο σχηματισμός των αμινοάκυλο-tRNA αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς μοριακούς στόχους έρευνας πολλών εργαστηρίων ανά τον κόσμο, αφού μπορεί να οδηγήσει στην περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών και των μορίων που εμπλέκονται στην πρωτεϊνοσύνθεση στοχεύοντας στην αντιμετώπιση ασθενειών παράγοντας κατάλληλα αντιβιοτικά.

Μελέτες και αναλύσεις γενωμικών αλληλουχιών από αντιπροσώπους και των τριών βασιλείων (ευκαρυώτες, βακτήρια και αρχαία) οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός της αμινοακυλίωσης είναι διαφορετικός ανάμεσα στους οργανισμούς. Συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες σε αρχαία και βακτήρια αναίρεσαν την αρχική υπόθεση που ισχυριζόταν την ύπαρξη 20 ενζύμων ικανών να αμινοακυλιώνουν τα 20 διαφορετικά αμινοξέα με τα αντίστοιχα μόρια tRNA. Έτσι, εκτός από την άμεση αμινοακυλίωση των μορίων tRNA από τις συνθετάσες, απεδείχθη η ύπαρξη ενός δεύτερου ενζύμου που εμπλέκεται στην αμινοακυλίωση. Αυτό το ένζυμο είναι μία εξαρτώμενη από το tRNA και το ATP αμιδοτρανσφεράση, η οποία χρησιμοποιεί ως δότη αμινομάδων αργινίνη, γλουταμίνη και χλωριούχο αμμώνιο. Τα ένζυμα αυτά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει ετεροτριμερή ένζυμα υπεύθυνα για τη μετατροπή του Asp-tRNA^{Asn} και Glu-tRNA^{Gln} σε Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln} αντίστοιχα και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gatC*, *gatA* και *gatB*. Τα γονίδια αυτά μπορεί να βρίσκονται είτε διασκορπισμένα στο γένωμα όπως συμβαίνει στα *T. thermophilus*, *D. radiodurans* και στα αρχαία είτε οργανωμένα σε μορφή οπερονίου (*gatCAB*) όπως στα *B. subtilis*, *A. ferrooxidans* και *C. trachomatis*. Η δεύτερη περιλαμβάνει ετεροδιμερή ένζυμα υπεύθυνα όμως, μόνο για τη

μετατροπή του Glu-tRNA^{Gln} σε Gln-tRNA^{Gln} και κωδικοποιούνται από το οπερόνιο gatDE.

Το μονοπάτι που θα επιλέξει ο κάθε οργανισμός για να επιτύχει το σχηματισμό των σωστά αμινοακυλιωμένων-tRNA μορίων εξαρτάται από το περιβάλλον μέσα στο οποίο γίνεται η αμινοακυλίωση. Έτσι, στους ευκαρυώτες αλλά και σε μερικά πρωτεοβακτήρια (πχ. *E. coli*), όπου συνέβη οριζόντια μεταφορά γονιδίων, η αμινοακυλίωση πραγματοποιείται μέσω του άμεσου μονοπατιού, αφού διαθέτουν στο γονιδιώμα τους τις συνθετάσες GlnRS και AsnRS. Ορισμένα βακτήρια παρουσιάζουν έλλειψη των συνθετασών GlnRS και AsnRS και επομένως, το έμμεσο μονοπάτι με τη χρήση της αμιδοτρανσφεράσης Asp/Glu-AdT είναι και ο μοναδικός τρόπος σχηματισμού αμινοακυλιωμένων tRNA^{Asn} και tRNA^{Gln}. Όμως, σ' αυτή την περίπτωση τα βακτήρια θα πρέπει να διαθέτουν μία ND-GluRS και μία ND-AspRS, οι οποίες να έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν τα tRNA^{Gln} και tRNA^{Asn} με την ίδια ικανότητα όπως τα tRNA^{Glu} και tRNA^{Asp}. Οι ND-συνθετάσες πιθανολογείται ότι προέρχονται από το διπλασιασμό των συνθετασών GluRS και AspRS στο γονιδίωμα αυτών των οργανισμών. Επίσης, υπάρχουν βακτήρια που ενώ στερούνται μιας ND-GluRS, χρησιμοποιούν τη GlnRS για το σχηματισμό Gln-tRNA^{Gln} ενώ χρησιμοποιούν την αμιδοτρανσφεράση Asp/Glu-AdT σε συνδυασμό με τη ND-AspRS για να παρέχει στα κύτταρα αμινοακυλιωμένα tRNA^{Asn}. Τέλος, υπάρχει και μία άλλη ομάδα βακτηρίων, η οποία χρησιμοποιεί AsnRS για το σχηματισμό Asn-tRNA^{Asn} ενώ χρησιμοποιεί το έμμεσο μονοπάτι αμινοακυλίωσης λόγω απουσίας GlnRS. Τα βακτήρια *Deinococcus radiodurans* και *Thermus thermophilus* είναι τα μοναδικά βακτήρια που διαθέτουν στο γονιδιώμα τους όλα τα πιθανά ένζυμα (AsnRS, GlnRS και Asp/Glu-AdT) για το σχηματισμό Asn-tRNA^{Asn} και Gln-tRNA^{Gln}. Σε αντίθεση με τα βακτήρια, τα αρχαία στερούνται της συνθετάσης GlnRS και χρησιμοποιούν την αμιδοτρανσφεράση Asp-AdT για την παραγωγή Gln-tRNA^{Gln}. Παρατηρείται λοιπόν, ότι η χρήση των AdT στους περισσότερους προκαρυωτικούς οργανισμούς για την αμινοακυλίωση υπερτερεί έναντι στους ευκαρυωτικούς. Αυτό, πολύ εύκολα θα μπορούσε να μας οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι οι AsnRS και GlnRS δεν υπήρχαν στο γονιδίωμα των προκαρυωτών αλλά εμφανίστηκαν μετά τη διάκριση των οργανισμών στα τρία βασίλεια.

Στο περιβάλλον του κυτταροπλάσματος του βακτηρίου *H. pylori* και του αρχαίου *M. jannaschii* απουσιάζουν οι συνθετάσες AsnRS και GlnRS. Επομένως, η μόνη οδός αμινοακυλίωσης που χρησιμοποιείται από το βακτήριο είναι η

έμμεση, με την παρουσία μιας ND-AspRS και μιας ND-GluRS και του *gatCAB*. Επιπλέον, το *M. jannaschii* διαθέτει στο γονιδιώμα του την αμιδοτρανσφεράση *gatDE*. Παρόλο την ύπαρξη και των δύο AdT, το *gatCAB* ευθύνεται αποκλειστικά για την αμινοακυλίωση του tRNA^{Asn} ενώ όπως αναμενόταν το *gatDE* ευθύνεται για την αμινοακυλίωση του tRNA^{Gln}.

Για την καλύτερη μελέτη και αποσαφήνιση του μηχανισμού της αμινοακυλίωσης και πιο συγκεκριμένα της δράσης των αμιδοτρανσφερασών, η *gatCAB* αμιδοτρανσφεράση του *H. pylori* και του *M. jannaschii* αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης αυτής της εργασίας. Έτσι, αφού πρώτα ενισχύθηκαν και κλωνοποιήθηκαν το κάθε γονίδιο χωριστά σε TOPO φορέα με επιτυχία, αναλύθηκε η αλληλουχία του κάθε γονιδίου. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, αναλύθηκαν και παρατηρήθηκαν κάποιες διαφορές στην αλληλουχία. Συγκεκριμένα, στο *gatA* και *gatB* γονίδιο του *M. jannaschii* διαπιστώθηκαν δύο μεταλλάξεις, μία σε κάθε γονίδιο. Κάνοντας ομοπαράθεση αυτών των αλληλουχιών των γονιδίων με τις αλληλουχίες των *gatA* και *gatB* γονιδίων άλλων αρχαίων, διαπιστώθηκε ότι οι βάσεις αυτές δεν είναι συντηρημένες και ότι ίσως να μην έχουν καθοριστικό ρόλο στην δραστηριότητα του ενζύμου. Για να ληφθούν, όμως, υπόψη όλοι οι παράμετροι που θα προκαλούσαν κάποια αλλαγή στην δραστηριότητά του, οι μεταλλάξεις μπορούν να διορθωθούν με PCR βασιζόμενοι στην τεχνική της σημείου κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης και έπειτα να συνεχιστεί ο σχηματισμός του οπερονίου. Αντίστοιχα, για το *H. pylori* παρατηρήθηκε το ίδιο πρόβλημα. Επιπλέον, το στέλεχος του *H. pylori* με το οποίο πραγματοποιήσαμε την PCR δεν αντιστοιχούσε με την αλληλουχία με κάποιου από τα στελέχη που υπήρχαν στη βάση δεδομένων, αλλά ήταν ένας συνδυασμός αυτών. Παράλληλα, σε κάποιες περιοχές που περιείχαν μετάλλαξη πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση με τις αλληλουχίες των τμημάτων αυτών από άλλα βακτήρια και διαπιστώθηκε ότι οι βάσεις αυτές δεν ανήκαν στις συντηρημένες περιοχές.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας ανάλυσης των αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε σύνδεση των τριών γονιδίων μεταξύ τους και επιχειρήθηκε η κλωνοποίησή του σε φορέα έκφρασης. Η δυσκολία που αντιμετωπίσαμε κατά την κλωνοποίηση του οπερονίου *gatCAB* ίσως να οφείλεται σε φαινόμενα ανασυνδυασμού μεταξύ των πλασμιδίων ή του γονιδιώματος των κυττάρων. Μία άλλη παράμετρος, η οποία πρέπει να είχε καθοριστικό ρόλο για τη μη επιτυχή κλωνοποίηση είναι το στέλεχος των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν. Είναι πολύ πιθανό αυτά τα στελέχη να αναγνώρισαν το πλασμίδιο που εισήλθε ως

“ξένο” και να ενεργοποιηθήκαν ενδονουκλεάσες, οι οποίες κατέστρεψαν το “ξένο” DNA.

Επόμενος στόχος των επιστημόνων είναι η κλωνοποίηση του οπερονίου *gatCAB* του *H. pylori* και του *M. jannaschii* χωριστά σε κατάλληλα στελέχη του βακτηρίου *E. coli*. Συγκεκριμένα, για το *H. pylori* στόχος τους είναι η εισαγωγή του *gatCAB* και μιας διπλής εξειδίκευσης (double specific) AspRS σε στελέχη *E. coli* που να στερούνται την AsnRS συνθετάση αλλά να διαθέτουν μια ασπαραγινάση (*asnA*). Στη συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί screening test με αντιβιοτικά εναντίον είτε της αμιδοτρανσφεράσης είτε της double specific AspRS. Με αυτό τον τρόπο θα μπορούσε να προληφθεί και να αντιμετωπιστεί ο γαστρικός καρκίνος που προκαλεί η μόλυνση από αυτό το βακτήριο. Οι μέχρι τώρα προκαταρκτικές μελέτες της αμιδοτρανσφεράσης των αρχαίων έχει δείξει ότι οι θέσεις αναγνώρισης του tRNA^{Asp} από αυτή διαφέρουν σε σχέση με αυτές που αναγνωρίζονται από την αμιδοτρανσφεράση των βακτηρίων. Επομένως, στόχος των επιστημόνων είναι να κλωνοποιήσουν το *gatCAB* του *M. jannaschii* σε στελέχη *E. coli*, να υπερεκφράσουν την πρωτεΐνη και να την καθαρίσουν με σκοπό τη μελέτη της κινητικής του ενζύμου.

Αν και το μονοπάτι της τρανσαμίνωσης αποτελεί ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα εξελικτικής ποικιλομορφίας στους μηχανισμούς αμιναοακυλίωσης των tRNAs, δεν είναι όμως και το μοναδικό. Όσο περισσότερα γονιδιώματα θα αποκρυπτογραφούνται, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η ευκολία να παρατηρηθεί η ποικιλομορφία των συνθετών ανάμεσα στους οργανισμούς. Στο μέλλον νέα ευρήματα θα έχουν να προσφέρουν νέους θεραπευτικούς και διαγνωστικούς στόχους που θα περιλαμβάνουν τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ◆ 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.
- ◆ Böck A., Thanbichler M., Rother M. and Resch A. (2004). Selenocysteine. In *Aminoacyl-tRNA synthetases* (eds. M. Ibba, C.S. Francklyn and S. Cusack). *Lands 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.
- ◆ Bult C.J., White O., Olsen G.J., Zhou L., Fleischmann R.D. et al. (1996). *Science*, **273**, 1058-73
- ◆ 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., Söll 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., Söll 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.

- ◆ Debra L. Tumbula, Hubert D. Becker, Wel-zhong Chang & Dieter Söll (2000). Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature*, **407**, 106-109
- ◆ 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.
- ◆ Giglione C. and Meinnel T. (2001). Organellar peptide deformylases: Universality of the N-terminal methionine cleavage mechanism. *Trends Plant Sci.*, **6**, 566-572
- ◆ 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.
- ◆ Ibba M., Söll D. (2001). The renaissance of aminoacyl-tRNA synthesis. *EMBO*, **21**, 382-387
- ◆ Ibba M., Söll D. (2000). Aminoacyl-tRNA Synthesis. *Annu. Rev. Biochem*, **69**, 617-650
- ◆ Ibba M., Hong K-W., Söll D. (1996). Glutaminyl-tRNA synthetase: from genetics to molecular recognition. *Genes to Cells*, **1**, 421-427
- ◆ Kern D., Roy H., Becker D. B. (2005). Asparaginyl-tRNA Synthetases. Chapter 18, *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*, edited by Michael Ibba, Christopher Franklyn and Stephen Cusak
- ◆ 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 glutaminyl 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). Cysteinyl-tRNA formation : the last puzzle of aminoacyl-tRNA synthesis. *FEBS Lett.*, **462**, 302-306.
- ◆ Lluís Ribas de Pouplana and Paul Schimmel (2001). Aminoacyl-tRNA synthetases : potential markers of genetic code development. *TRENDS in Biochemical Sciences*, **26**, 591-596
- ◆ Martin N.C. *et al.* (1977). Yeast mitochondrial DNA specifies tRNA for 19 amino acids. Deletion mapping of the tRNA genes. *Biochemistry*, **16**, 4672-4677
- ◆ Nabholz C.E., Hauser R., Schneider A. (1997). *Leishmania tarentolae*
- ◆ contains distinct cytosolic and mitochondrial glutaminyl-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., Ataíde 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.
- ◆ Racznik 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.

- ◆ Ruan B., Ahel I., Ambrogelly A., Becker D. H., Bunjun S., Feng L., Tumbula-Hansen D., Ibba M., Korencic D., Kobayashi H., Jacquin-Becker C., Mejlhede N., Min B., Raczniak G., Rinehart J., Stathopoulos C., Li T., Söll D. (2001). Genomics and the evolution of aminoacyl-tRNA synthesis. *Acta Biochimica Polonica*, **48**, 313-321
- ◆ 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.
- ◆ Sauerwald A., Zhu W., Major T. A., Roy H., Palioura S., Jahn D., Whitman W. B., Yates R. J., Ibba M., Soll D. (2005). RNA-Dependent Cysteine Biosynthesis in Archaea. *Science*, **307**, 1969-1972
- ◆ Schon A., Kannangara C.G., Gough S., Soll D. (1988). Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. *Nature*, **331**, 187-190.
- ◆ Smith D.R., Doucette-Stamm L.A., Deloughery C., Lee H., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lumm W., Pothier B., Qiu D., Spadafora R., Vicaire R., Wang Y, Wierzbowski J., Gibson R., Jiwani N., Caruso A., Bush D., Reeve J.N., *et al.*, (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.*, **179**, 7135-55.
- ◆ 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.
- ◆ Sprinzl 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.
- ◆ Stathopoulos C., Jacquin-Becker C., Becker H.D., Li T., Ambrogelly A., Longman R., Söll D. (2001). *Methanococcus jannaschii* prolyl-cysteinyl-tRNA synthetase possesses overlapping amino acid binding sites. *Biochemistry*, **40**, 46-52

- ◆ 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^{fMet} 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.
- ◆ Wilcox M., Nirenberg M. (1968). Transfer RNA as a cofactor coupling amino acid synthesis with that of protein. *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **61**, 229-236
- ◆ White B.N., Bayley S.T. (1972). Further codon assignments in an extremely hallophilic bacterium using a cell-free protein synthesizing system and a ribosomal binding assay. *Can. J. Biochem.*, **50**, 600-609
- ◆ 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.