

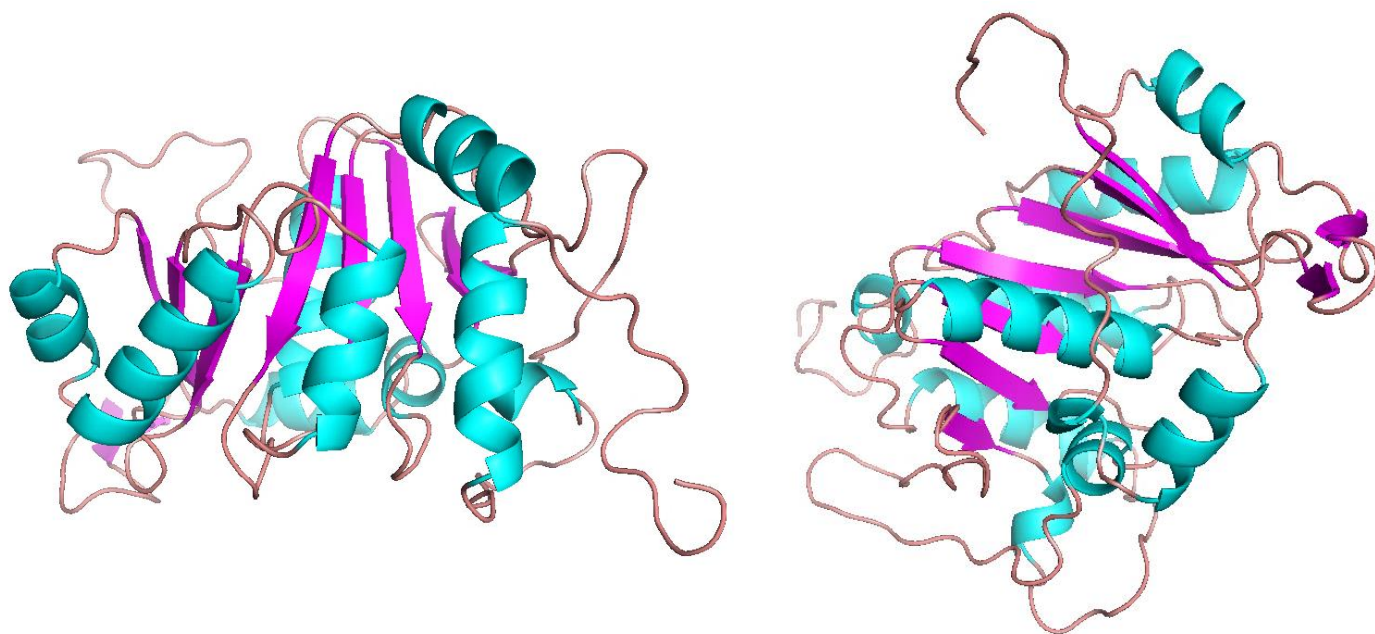


ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ  
ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ : ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Κυτταρική Έκφραση, Απομόνωση, Καθαρισμός και  
Κρυστάλλωση των Ανασυνδυασμένων Πρωτεϊνών που  
Εμπλέκονται στη Βλεφαριδογένεση

(Nbp35 και Cfd1)



ΣΛΑΒΑΚΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

Αθήνα 2014

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ : ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Μεταπτυχιακή μελέτη

Κυτταρική Έκφραση, Απομόνωση, Καθαρισμός και Κρυστάλλωση των  
Ανασυνδυασμένων Πρωτεϊνών που Εμπλέκονται στη Βλεφαριδογένεση

(Nbr35 και Cfd1)

Σλαβάκη Ευαγγελία

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Μπεθάνης Κωνσταντίνος (Επιβλέπων)**

Επίκουρος Καθηγητής, Εργαστήριο Φυσικής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Σχολή Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας  
και Ανάπτυξης Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Ηλιόπουλος Ηλίας**

Καθηγητής, Εργαστήριο Γενετικής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Σχολή Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας και  
Ανάπτυξης Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Ζωγράφος Σπυρίδων**

Ερευνητής Β, Εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής  
Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης «Θετικές Επιστήμες στη Γεωπονία και στο Περιβάλλον» του κλάδου «Μελέτη και αξιοποίηση φυσικών προϊόντων» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα πειράματα της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, κάτω από την επίβλεψη του Κου Ζωγράφου Σπύρου και στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «Nbp35- Cfd1 : Ρυθμιστές της βλαφαριδογένεσης». Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Κο Ζωγράφο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ με τον ίδιο και τους συνεργάτες του, την επιστημονική καθοδήγησή του καθώς και την εμπιστοσύνη που έδειξε σε εμένα ώστε να ασχοληθώ με το παραπάνω θέμα. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συνεργάτες του, την Κα Τσιτσάνου Κατερίνα καθώς και την Κα Δράκου Χριστίνα για την καθοδήγησή τους και τη χρήσιμη βοήθεια που μου προσέφεραν με προθυμία κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής μου και του ενός έτους συνεργασίας μας.

Οφείλω ακόμα ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Κο Ηλιόπουλο Ηλία για τη δυνατότητα που μου έδωσε για άλλη μια φορά να ασχοληθώ με τον τομέα της δομική μελέτης πρωτεϊνών και να εμβαθύνω τις γνώσεις μου, ενθαρρύνοντας τη συνεργασία με το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Δε θα μπορούσα βεβαίως να παραλείψω τον Κο Μπεθάνη Κων/νο για την υποστήριξή του κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής μου μελέτης και τη χρήσιμη καθοδήγησή του για την ολοκλήρωσή της. Ευχαριστώ ακόμα θερμά την Κα Ανδρέου Αθηνά για την αμέριστη βοήθειά και υποστήριξή της, επιστημονική και ηθική καθ' όλο το έτος, αλλά και τον Κο Αναγνώστου Δημήτριο για τις χρήσιμες συμβουλές και τη βοήθειά του.

Αθήνα , Οκτώβριος 2014

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT .....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> –Εισαγωγή.....	9
1.1    Σύμπλοκα Fe –S : Σχηματισμός, πρόσδεση σε πρωτεΐνες και βιολογικός ρόλος .....	9
1.2    Βιοσυνθετικοί μηχανισμοί σχηματισμού συμπλόκων Fe/S.....	12
1.3    ISC ( Iron Sulphate Cluster assembly) : Το βακτηριακό και μιτοχονδριακό σύστημα σχηματισμού συμπλόκων Fe/S.....	14
1.4    CIA (Cytosolic Iron- Sulfur Assembly): Ο μηχανισμός σύνθεσης των πρωτεϊνών Fe/S στο κυτταρόπλασμα.....	17
1.5    Οι πρωτεΐνες συναρμολόγησης συμπλόκων Fe/S - Nbr35 και Cfd1 .....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> – Υλικά και μέθοδοι.....	27
2.1    Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης και βακτηριακά στελέχη.....	27
2.1.1    Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης πρωτεϊνών (Nbr35 και Cfd1) .....	27
2.1.2    Πλασμιδιακοί φορείς συνέκφρασης πρωτεϊνών (Nbr35 και Cfd1) και τσαπερονίων.....	29
2.1.3    Βακτηριακά στελέχη.....	31
2.2    Παρασκευή Θρεπτικών υλικών για στερεές και υγρές καλλιέργειες βακτηρίων.....	31
2.2.1    Υλικά.....	31
2.2.2    Πειραματική πορεία.....	31
2.3    Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	32
2.2.2    Υλικά.....	33
2.2.3    Πειραματική πορεία.....	33
2.4    Καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων.....	33
2.2.2    Υλικά.....	34
2.2.3    Πειραματική πορεία.....	34
2.3    Επαγωγή έκφρασης πρωτεΐνης.....	35
2.5.1.    Υλικά.....	35
2.5.2    Πειραματική πορεία.....	35
2.6    Λύση κυττάρων .....	36
2.6.1    Υλικά.....	36

2.6.2	Πειραματική πορεία .....	36
2.7	Φυγοκέντρηση για διαχωρισμό του κλάσματος που περιέχει τη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη .....	37
2.8	Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE) .....	38
2.8.1	Υλικά .....	39
2.8.2	Διαλύματα .....	39
2.8.3	Πειραματική πορεία .....	40
2.9	Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford .....	42
2.9.1	Υλικά .....	42
2.9.2	Πειραματική πορεία .....	42
2.10	Απομόνωση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από έγκλειστα σωματίδια (inclusion bodies) .....	43
2.10.1	Υλικά .....	43
2.10.2	Διαλύματα .....	44
2.10.3	Πειραματική πορεία .....	45
2.11	Συνέκφραση πρωτεΐνης Cfd1 σε πλασμιδιακό φορέα pRSET-A και τσαπερονίων .....	46
2.11.1	Υλικά .....	47
2.11.2	Πειραματική πορεία .....	48
	Μετασχηματισμός κυττάρων .....	48
2.12	Καθαρισμός ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας και μοριακού αποκλεισμού .....	48
2.12.1	Χρωματογραφία συγγένειας .....	48
2.12.2	Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC-Size Exclusion Chromatography) .....	51
2.12.3	Υλικά .....	53
2.12.4	Διαλύματα .....	53
2.12.5	Πειραματική πορεία .....	54
2.13	Κρυστάλλωση πρωτεϊνών .....	57
2.13.1	Υλικά .....	60
2.13.2	Πειραματική πορεία .....	60
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> -Αποτελέσματα .....	61
3.1	Έλεγχος έκφρασης των πρωτεϊνών με χρήση των πλασμιδιακών φορέων pGEX-6P-1 .....	61
3.2	Έλεγχος συνέκφρασης της πρωτεΐνης Cfd1 με τσαπερόνια. ....	63
3.3	Έκφραση , απομόνωση και καθαρισμός Nbr35 .....	66
3.4	Έκφραση , απομόνωση και καθαρισμός Cfd1 .....	71

3.5 Έλεγχος συνθηκών κρυστάλλωσης πρωτεϊνών.....	73
3.6 Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής πρωτεϊνών.....	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> - Συμπεράσματα .....	78
4.1 Μελλοντικοί στόχοι- Προοπτικές έρευνας.....	80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	81

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα σύμπλοκα σιδήρου – θείου (Fe/S) αποτελούν τους πιο γνωστούς συμπαράγοντες πρωτεϊνών κι εμπλέκονται σε πολλές λειτουργίες του κυττάρου. Οι σημαντικότερες από αυτές, είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων, η καταλυτική καθώς και η ρυθμιστική λειτουργία τους. Η απλούστερες μορφές συμπλόκων είναι είτε του τύπου [2Fe-2S] είτε του [4Fe-4S] και σχηματίζονται από ιόντα σιδήρου ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ή ( $\text{Fe}^{3+}$ ) και ιόντα θείου ( $\text{S}^{2-}$ ). Αν και η χημική τους δομή είναι αρκετά απλή, η βιοσύνθεσή τους απαιτεί τη λειτουργία αρκετών παραγόντων οι οποίοι στα ευκαρυωτικά κύτταρα οργανώνονται σε δύο βασικούς μηχανισμούς. Τα συστήματα ISC του μιτοχονδρίου και CIA του κυτταροπλάσματος, αποτελούν τους μηχανισμούς αυτούς και λειτουργούν στη σειρά για το σχηματισμό και τη μεταφορά των συμπλόκων στο κύτταρο.

Οι πρωτεΐνες Nbp35 και Cfd1 αποτελούν παράγοντες του συστήματος CIA και λειτουργούν ως μήτρες για ο σχηματισμό των συμπλόκων Fe/S *in vivo*. Ανήκουν στην οικογένεια των P-loop NTPασών και συγκεκριμένα στην υποοικογένεια Mgp/Nbp35, όπως διευκρινίζεται από τη συντηρημένη αλληλουχία των τεσσάρων κυστεϊνών στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Και οι δύο πρωτεΐνες περιέχουν μία αλληλουχία πρόσδεσης νουκλεοτιδίων, ενώ η Nbp35 περιέχει μία επιπλέον συντηρημένη αλληλουχία τεσσάρων κυστεϊνών στο άμινοτελικό της άκρο. Οι δύο πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα ετεροτετραμερές το οποίο προσδένει τέσσερα σύμπλοκα της μορφής [4Fe-4S]. Τα δύο κεντρικά αμινοξέα κυστεΐνης που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο είναι απαραίτητα τόσο για το σχηματισμό του ετεροτετραμερούς συμπλόκου, όσο και για τη λειτουργία των πρωτεϊνών και την επιβίωση του κυττάρου.

Επιπλέον, οι ομόλογες πρωτεΐνες NBP35 (Nubp1) και CFD1 (Nubp2) των ανώτερων ευκαρυωτών εμπλέκονται μαζί με τον παράγοντα KIFC5A στο σχηματισμό των βλεφαρίδων και λειτουργούν ως ρυθμιστές της βλεφαριδογένεσης, ενώ έχει μελετηθεί και η αλληλεπίδρασή τους με παράγοντες του συστήματος τσαπερονίων CCT/TRiC. Η κατανόηση της σχέσης δομής - λειτουργίας των NBP35 και CFD1, μπορεί να προσφέρει αρκετές πληροφορίες σχετικά με διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με τη βλαφαριδογένεση.

Στη παρούσα εργασία, μελετήσαμε μεθόδους υπερέκφρασης και καθαρισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών Nbp35 και Cfd1 του οργανισμού *Mus musculus* σε κύτταρα *E.coli*. Οι

πρωτεΐνες που απομονώθηκαν, έπειτα από τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή κρυστάλλων με στόχο τη μελέτη της τρισδιάστατης δομής με χρήση περίθλασης ακτίνων Χ. Η βελτιστοποίηση των τεχνικών καθαρισμού που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έδειξε ότι τα σύμπλοκα Fe/S είναι απαραίτητα για τη σταθερότητα των πρωτεϊνών, ενώ η χρήση του συμπλόκου Nbr35 - Cfd1 μπορεί να χρησιμεύσει για τη δομική τους μελέτη.



## ABSTRACT

Iron- sulfur (Fe/S) clusters belong to the most ancient co-factors of proteins and they are involved in many processes of the cell. The most important of them are electron transfer, catalysis and regulatory processes. The simplest Fe/S clusters are either of the [2Fe-2S] and [4Fe-4S] types and they contain either ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ) or ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) iron and sulfide ( $\text{S}^{2-}$ ). Despite their chemical simplicity Fe/S cluster biosynthesis requires numerous components which are organized in two basic mechanisms for the eukaryotic cells. The ISC mitochondrial and CIA cytosolic systems work in concert for the maturation and transfer of Fe/S clusters in the cell.

The Nbp35 and Cfd1 proteins are components of the CIA system and they perform a scaffold function for Fe-S cluster synthesis *in vivo*. They belong to the P-loop NTPases family and especially in the Mrp/Nbp35 subclass, which is defined by their C-terminal motif, formed by four conserved cysteine residues. Both proteins contain a nucleotide binding motif, while Nbp35 contains also a conserved N-terminal motif of four cysteine residues. The two proteins form an hetero-tetramer complex which coordinates four [4Fe-4S] clusters. The two central cysteine residues of the C-terminal motif are essential for and Cfd1-Nbp35 hetero-tetramer formation, protein function and cell viability.

On top of that, the homologous proteins of higher Eukaryotes NBP35 (Nubp1) and CFD1 (Nubp2), are involved together with protein KIFC5A on the formation of primary cilia, acting as regulators for ciliogenesis. NBP35 (Nubp1) and CFD1 (Nubp2) also are shown to interact with several members of the CCT/TRiC molecular chaperone system. Understanding the structure-function relationship of NBP35 and CFD1 and their interacting proteins could offer critical insights in the molecular pathology of ciliary disease.

In the present study, we investigate the overexpression and purification methods of recombinant Nbp35 and Cfd1 proteins of the organism *Mus musculus* in *E.coli* cells. The purified proteins are used to generate crystals and solve their 3D structure by X-ray diffraction. The optimization methods of protein purification used in this study, show that Fe/S clusters are vital for their stability while the complex of Nbp35 - Cfd1 may be the key for structural identification using crystallography.

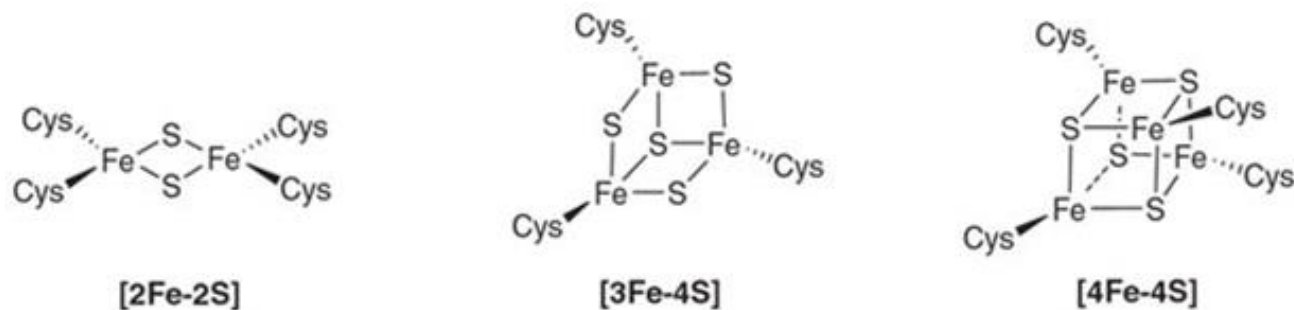
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> –Εισαγωγή

## 1.1 Σύμπλοκα Fe –S : Σχηματισμός, πρόσδεση σε πρωτεΐνες και βιολογικός ρόλος

Τα σύμπλοκα Fe/S αποτελούν προσθετικές ομάδες πρωτεϊνών οι οποίες σχηματίζονται από ιόντα σιδήρου ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) και θείου ( $\text{S}^{2-}$ ) και σε ορισμένες περιπτώσεις περιέχουν επιπλέον άτομα μετάλλων (Rao *et al*, 2004, Beinert *et al*, 2004). Πρόκειται για εξελικτικά συντηρημένες δομές οι οποίες υπάρχουν σε όλους τους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων φυτών, ζώων και προκαρυωτικών οργανισμών (βακτηρίων και Αρχαίων). Η πιθανότερη αιτία του υψηλού επιπέδου διατήρησης των δομών αυτών κατά την εξελικτική πορεία των οργανισμών, φαίνεται να είναι η συμβολή των Fe/S συμπλόκων στα πρώιμα στάδια ζωής λόγω της παρουσίας τους στις υδροθερμικές πηγές (Martin *et al.*, 2008)

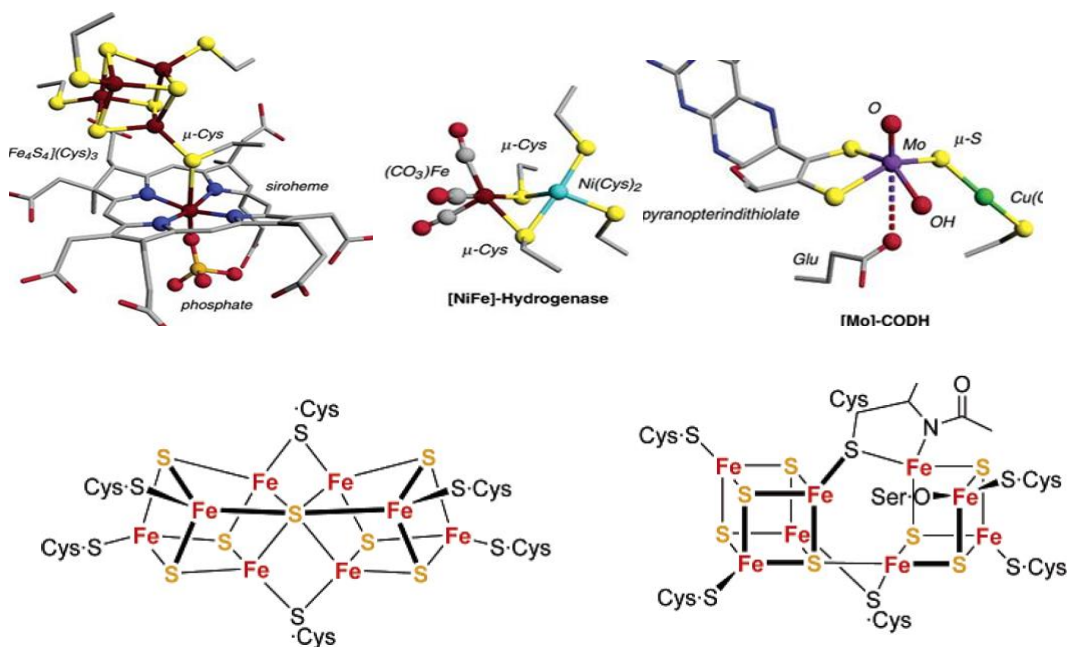
Το επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος μετακινήθηκε προς την κατεύθυνση των συμπλόκων Fe/S το 1960, όταν μελέτες φασματοσκοπίας παραμαγνητικού συντονισμού σε συνδυασμό με χημικές αναλύσεις υπέδειξαν την παρουσία τους ως συμπαραγοντες πρωτεϊνών, οι οποίες συμμετέχουν σε πολύπλοκα βιολογικά συστήματα όπως η αναπνοή, η φωτοσύνθεση καθώς και η γονιδιακή ρύθμιση (Lill *et al.*, 2006). Ο σχηματισμός τους *in vivo* πραγματοποιείται με τη συμμετοχή πολύπλοκων μηχανισμών εντός του κυττάρου που έχουν ως στόχο τη σύνδεση και τη μεταφορά των ανόργανων ιόντων από την ελεύθερη μορφή στην οργανωμένη δομή του συμπλόκου. Ο λόγος που οι ανόργανες αυτές ενώσεις σχηματίζουν σύμπλοκα εντός του κυττάρου είναι κυρίως η τοξικότητα που παρουσιάζουν οι υψηλές συγκεντρώσεις των ελεύθερων ιόντων τους στο κυτταρόπλασμα.

Η βασικότερη και πιο απλή μορφή σύνδεσης που συναντάται είναι η μορφή  $[\text{2Fe-2S}]$  όπου τα δύο ιόντα σιδήρου συνδέονται μεταξύ τους με δύο ιόντα θείου. Αντίστοιχα, στο κυβικό σύμπλοκο  $[\text{4Fe-4S}]$  τα ιόντα διευθετούνται στις ακμές ενός κύβου, ο οποίος λόγω των ελάχιστων αποστάσεων μεταξύ των ιόντων, είναι συνήθως παραμορφωμένος. Επιπλέον, από το κυβικό σύμπλοκο, μπορεί να προκύψει και το σύμπλοκο της μορφής  $[\text{3Fe-4S}]$  με την έλλειψη ενός ατόμου σιδήρου στην μία ακμή του κύβου (Εικόνα 1.1). Σε όλες τις περιπτώσεις η πρόσδεση μεταξύ των ατόμων σιδήρου και θείου πραγματοποιείται μέσω ομοιοπολικών δεσμών (Fontecave, 2006).



**Εικόνα 1.1 :** Μορφές συμπλόκων σιδήρου – θείου (Fontecave, 2006)

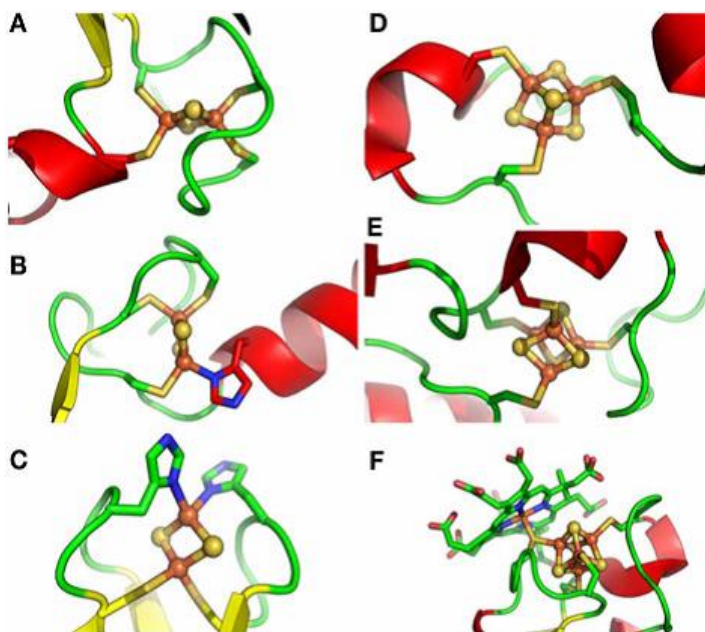
Εκτός των βασικών συμπλόκων που παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.1, έχει παρατηρηθεί και ο σχηματισμός πιο πολύπλοκων δομών. Οι δομές αυτές είτε περιέχουν μεγαλύτερους πυρήνες οργάνωσης είτε προκύπτουν από τη σύνδεση μεταξύ συμπλόκων [4Fe-4S] και άλλων μορίων που περιέχουν σίδηρο. Επίσης, είναι δυνατό να δεσμεύουν και άλλα άτομα όπως άτομα μολβδου (Mo) ή νικελίου (Ni) (Εικόνα 1.2)(Venkateswara Rao & Holm, 2004)(Fontecave, 2006).



**Εικόνα 1.2 :** Παραδείγματα πολυπύρηνων Fe-S συμπλόκων. Από αριστερά προς τα δεξιά και από πάνω προς τα κάτω: Σύμπλοκο [4Fe-4S] συνδεδεμένο με άτομο σιδήρου άλλου μορίου (siroheme), δέσμευση ατόμων Ni και Mo από σύμπλοκα Fe-S, σύμπλοκα που περιέχουν μεγαλύτερους πυρήνες οργάνωσης . Τα διάφορα άτομα υποδεικνύονται με διαφορετικά χρώματα: C γκρι, N, μπλε, O κόκκινο, S κίτρινο, Fe σκούρο κόκκινο, Ni κυανό, Cu πράσινο, Mo ματζέντα(Venkateswara Rao & Holm, 2004)

Η πρόσδεση των συμπαραγόντων αυτών στα πρωτεϊνικά μόρια πραγματοποιείται με τη δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού μέσω των καταλοίπων κυστεΐνης της πρωτεΐνης και των ατόμων σιδήρου του συμπλόκου (Εικόνα 1.1, Εικόνα 1.2). Με βάση την ιδιότητα αυτή, έχει παρατηρηθεί η παρουσία συγκεκριμένης αλληλουχίας των πρωτεϊνών που προσδένουν σύμπλοκα Fe/S και καθορίζει τη θέση των καταλοίπων κυστεΐνης στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Έτσι, η παρουσία του μοτίβου CX<sub>4</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>~30</sub>C (όπου C, κυστεΐνη και X οποιοδήποτε αμινοξικό κατάλοιπο) σε φυτά και θηλαστικά σχετίζεται με την πρόσδεση [2Fe-2S] συμπλόκων ενώ τα [4Fe-4S] σύμπλοκα προσδένονται σε δομές του τύπου CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>20-40</sub>C. Ωστόσο η συσχέτιση αυτή δεν αποτελεί τον κανόνα (Lill *et al.*, 2006).

Όπως αναφέρθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις η σύνδεση των συμπλόκων με τον πρωτεϊνικό σκελετό πραγματοποιείται μέσω των καταλοίπων κυστεΐνης. Ωστόσο, η πρόσδεση μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω άλλων αμινοξέων όπως η ιστιδίνη, και σε σπανιότερες περιπτώσεις η αργινίνη, η σερίνη και το γλουταμικό οξύ αλλά και με μη πρωτεϊνικούς υποκαταστάτες όπως το CO και το CN<sup>-</sup> (Εικόνα 1.3)(Couturier *et al.*, 2013).



**Εικόνα 1.3 :** Σχηματική αναπαράσταση ομοιοπολικών δεσμών που σχηματίζονται με σύμπλοκα σιδήρου-θείου και πρωτεΐνες φωτοσυνθετικών οργανισμών. Τα άτομα σιδήρου, θείου και αζώτου απεικονίζονται με πορτοκαλί, κίτρινο και μπλέ χρώμα αντίστοιχα. (Couturier *et al.* 2013)

Η παρουσία των συμπλόκων ως συμπράγοντες πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες καθιστά την παρουσία τους απαραίτητη για τους οργανισμούς. Όσον αφορά το βιολογικό τους ρόλο, μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις βασικές κατηγορίες: μεταφορά ηλεκτρονίων, ενζυμική κατάλυση και ρύθμιση (Beinert *et al.*, 1997).

Η μεταφορά ηλεκτρονίων βασίζεται στην ιδιότητα των συμπλόκων να μεταβάλλουν την οξειδωτική κατάσταση του σιδήρου που περιέχουν από την ανηγμένη ( $\text{Fe}^{2+}$ ) στην οξειδωμένη μορφή ( $\text{Fe}^{3+}$ ) παρέχοντας τα  $e^-$  από ένα μόριο δότη, σε ένα άλλο μόριο δέκτη. Τα σύμπλοκα της μορφής  $[\text{2Fe-2S}]$  και  $[\text{3Fe-4S}]$  χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις μεταφοράς ενός  $e^-$ , ενώ αντίστοιχα τα  $[\text{4Fe-4S}]$  σε πιο πολύπλοκες αντιδράσεις. Παραδείγματα πρωτεϊνών που περιέχουν σύμπλοκα Fe/S που συμμετέχουν σε αυτές τις διεργασίες, είναι οι φερεδοξίνες καθώς και οι πρωτεΐνες τύπου Rieske των συμπλόκων του κυτοχρώματος.

Αρκετά σημαντική είναι ακόμα η συμβολή των συμπλόκων στο ενεργό κέντρο ποικίλων ενζύμων, είτε συμμετέχοντας στη διαμόρφωσή του είτε ενεργοποιώντας το υπόστρωμα, είτε παρέχοντας ηλεκτρόνια στο υπόστρωμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ένζυμο της ακονιτάσης όπου το ένα άτομο σιδήρου του συμπλόκου που προσδένεται στο ένζυμο συμμετέχει στην κατάλληλη διαμόρφωση του υποστρώματος (κιτρικού οξέος) (Kennedy *et al.*, 1987).

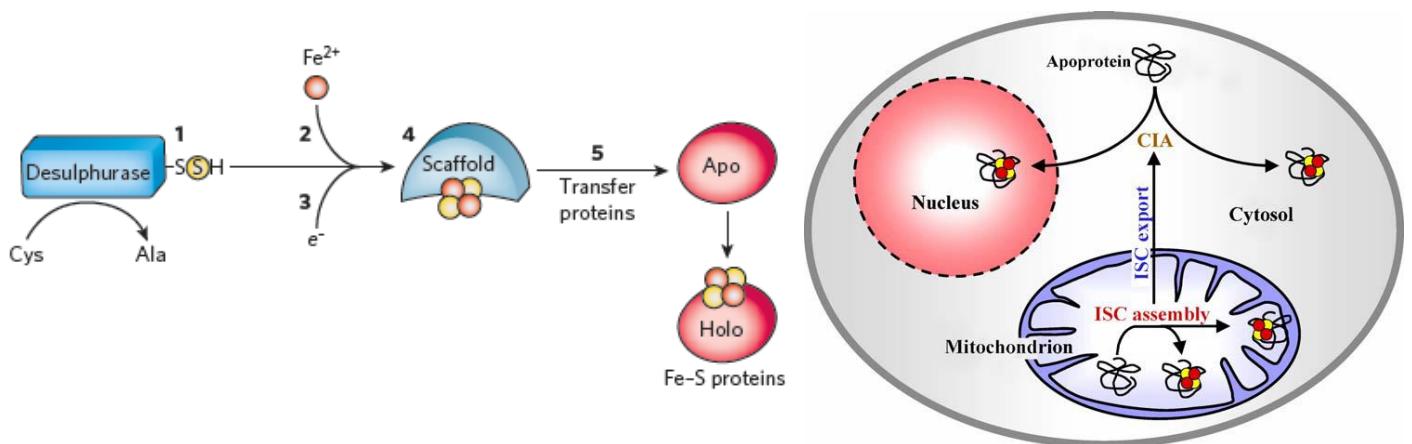
Επιπρόσθετα, στους βακτηριακούς οργανισμούς αναφέρονται ποικίλοι μεταγραφικοί παράγοντες (SoxR, IscR, NsrR και FNR) οι οποίοι χρησιμοποιούν τα σύμπλοκα αυτά ως ρυθμιστικούς παράγοντες για την απόκριση στις κυτταρικές αλλαγές των επιπέδων υπεροξειδίου, NO καθώς και οξυγόνου (Kiley & Beinert, 2003).

## 1.2 Βιοσυνθετικοί μηχανισμοί σχηματισμού συμπλόκων Fe/S

Τα σύμπλοκα Fe/S, αν και αποτελούν δομικές μονάδες σχετικά απλές στη χημική τους σύνθεση, ο σχηματισμός και η μεταφορά τους εντός του κυττάρου απαιτεί τη δράση αρκετών μηχανισμών και τη συμμετοχή μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών. Η μελέτη των συστημάτων διαμόρφωσης και μεταφοράς τους πραγματοποιήθηκε αρχικά στους βακτηριακούς οργανισμούς *Escherichia coli* και τον αζωτοτροφικό *Azotobacter vinelandii*. Παρατηρήθηκε η συμμετοχή τριών κυρίως μηχανισμών: του συστήματος NIF, το οποίο συμμετέχει στην ωρίμανση του ενζύμου της νιτρογενάσης σε αζωτοτροφικά βακτήρια, του

συστήματος ISC και του συστήματος SUF, τα οποία συμμετέχουν στη διαμόρφωση των συμπλόκων Fe/S σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης αντίστοιχα. Οι δύο τελευταίοι μηχανισμοί μέσω της ενδοσυμβίωσης, έχουν μεταφερθεί και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Έτσι, τα μιτοχόνδρια φαίνεται να διατηρούν μηχανισμούς ομόλογους με το μηχανισμό των βακτηρίων, ενώ τα πλαστίδια το μηχανισμό SUF με βάση μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζύμες (*Saccharomyces cerevisiae*). Ωστόσο, τα συστήματα αυτά διατηρούνται και στους ανώτερους ευκαρυώτες όπως ο άνθρωπος (Lill, 2009).

Τα κύρια στάδια για το σχηματισμό και τη μεταφορά των συμπλόκων παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.4. Αναλυτικότερα, κατά το 1<sup>ο</sup> στάδιο, έχουμε το σχηματισμό των ατόμων S, τα οποία παρέχονται από τη λειτουργία ενζύμων με δράση δεσουλφουράσης και τη μετρατροπή ενός αμινοξέος κυστεΐνης σε αλανίνη. Στη συνέχεια (στάδια 2 και 3) με τη χρήση πρωτεϊνών, πραγματοποιείται η μεταφορά των ιόντων σιδήρου και e<sup>-</sup> για την πρόσδεση και το σχηματισμό των συμπλόκων μέσω πρωτεϊνών που χρησιμεύουν ως «μήτρες» (στάδιο 4). Τελικά τα σχηματισμένα σύμπλοκα μεταφέρονται και προσδένονται στις πρωτεΐνες στόχους για να επιτελέσουν τις διάφορες βιολογικές λειτουργίες.



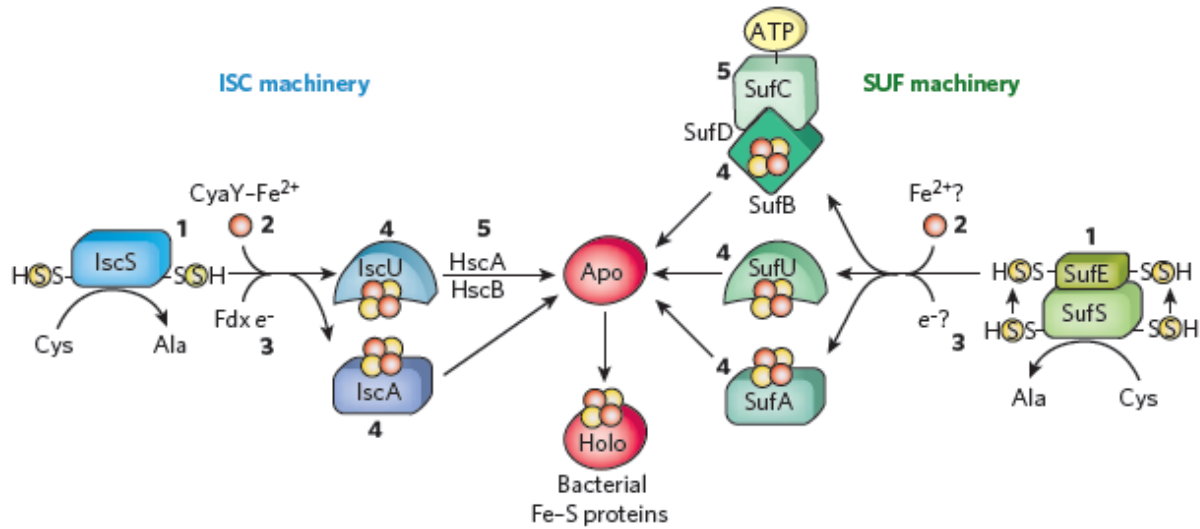
**Εικόνα 1.4:** Σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού και μεταφοράς των συμπλόκων Fe /S στις πρωτεΐνες στόχους (Lill, 2009)(Lill et al., 2006).

### 1.3 ISC ( Iron Sulphate Cluster assembly) : Το βακτηριακό και μιτοχονδριακό σύστημα σχηματισμού συμπλόκων Fe/S.

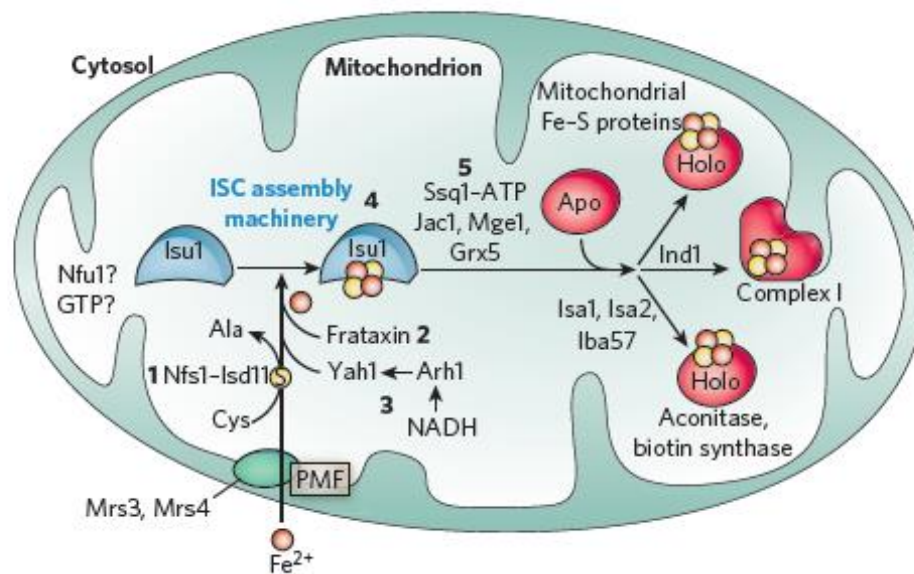
Το αρχικό στάδιο για τη δημιουργία ενός συμπλόκου Fe/S *de novo* είναι η λειτουργία της πρωτεΐνης Isu1 για τους ευκαρυώτες, ή της ομόλογης βακτηριακής IscU, που χρησιμεύει ως μήτρα για την αρχική διαμόρφωση του συμπλόκου προσδένοντας παροδικά τα ιόντα και οργανώνοντας τη δομή του συμπλόκου. Τα σύμπλοκα Fe/S, έπειτα από το σχηματισμό τους μεταφέρονται από την Isu1/ IscU σε πρωτεΐνες δέκτες που βρίσκονται σε μορφή από-ενζύμου κι ενσωματώνονται μέσω πρόσδεσης σε συγκεκριμένα αμινοξέα (Εικόνα 1.5) (Mühlenhoff,2003).

Για την αρχική αντίδραση είναι απαραίτητη η δράση του ενζύμου της δεσουλφουράσης της κυστεΐνης ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση σχηματισμού του κι η πρόσδεση στη Isu1/ IscU. Το ένζυμο καταλύει τα σχηματισμό του αμινοξέος Αλανίνη (Ala) από το αμινοξύ L-κυστεΐνη (Cys) ελευθερώνοντας μια ομάδα θείου ( $S^0$ ) η οποία προσδένεται στην Isu1/ IscU. Η δράση της δεσουλφουράσης στους βακτηριακούς οργανισμούς πραγματοποιείται από την πρωτεΐνη IscS ενώ η αντίστοιχη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι ένα σύμπλοκο των πρωτεϊνών Nfs1 και Isd11. Στην περίπτωση αυτή, η Nfs1 δρά ως δεσουλφουράση της κυστεΐνης, ενώ η Isd11 είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του συμπλόκου των δύο στην Isd11 (Adam *et al.*, 2006, Wiedemann *et al.*,2006) .

Ο μηχανισμός πρόσδεσης των ιόντων σιδήρου στην Isu1/ IscU δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, ωστόσο ως δότης ιόντων σιδήρου θεωρείται η πρωτεΐνη CyaY για τους βακτηριακούς οργανισμούς, ενώ η ομόλογη στους ευκαρυώτες είναι η Yfh1. Στους ευκαρυώτες, τα ιόντα  $Fe^{2+}$  μεταφέρονται από το σύστημα των πρωτεϊνών Mrs3 και Mrs4 διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων (Εικόνα 1.6). Παράλληλα, για το σχηματισμό των συμπλόκων απαιτείται η μεταφορά  $e^-$  για την αναγωγή της ομάδας  $S^0$  που έχει προέλθει από την κυστεΐνη σε  $S^{2-}$  που χρησιμοποιείται στα σύμπλοκα και πραγματοποιείται με τη δράση της πρωτεΐνης Yah1 για του ευκαρυώτες και της ομόλογης βακτηριακής Fdx (Lill, 2009).



**Εικόνα 1.5:** Σχηματική απεικόνιση των βιοσυνθετικών μηχανισμών σύνθεσης συμπλόκων Fe- S σε βακτηριακούς οργανισμούς. Τα στάδια 1-5: 1.δημιουργία ιόντων S, 2.μεταφορά ιόντων Fe, 3.μεταφορά  $e^-$ , 4.πρόσδεση στην πρωτεΐνη σχηματισμού, 5.μεταφορά σε πρωτεΐνες στόχους (Lill, 2009).



**Εικόνα 1.6:** Σχηματική απεικόνιση του μιτοχondριακού συστήματος ISC. Τα στάδια 1-5: 1.δημιουργία ιόντων S, 2.μεταφορά ιόντων Fe, 3.μεταφορά  $e^-$ , 4.πρόσδεση στην πρωτεΐνη σχηματισμού, 5.μεταφορά σε πρωτεΐνες στόχους (Lill, 2009).



Το επόμενο βήμα στη βιοσυνθετική πορεία των συμπλόκων είναι η απελευθέρωση και η πρόσδεσή τους στις πρωτεΐνες στόχους. Η μεταφορά από την Isu1/IscU στις πρωτεΐνες που βρίσκονται σε μορφή άπο-ενζύμου, υποστηρίζεται από τη συμμετοχή ενός συστήματος τσαπερονίων, των Ssq1 και Jac1 για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και των ομόλογων HscA–HscB για τους βακτηριακούς. Η αντίδραση πρόσδεσης των τσαπερονίων HscA–HscB στην IscU απαιτεί την υδρόλυση του ATP και πραγματοποιείται μέσω μιας συντηρημένης αλληλουχίας αμινοξέων (Leu-Pro-Pro-Val- Lys) (Hoff *et al.*, 2003, Dutkiewicz *et al.*, 2004). Αντίστοιχα, στα μιτοχόνδρια η αντίδραση αυτή απαιτεί τη λειτουργία και του παράγοντα Mge1, που δρα ως παράγοντας ανταλλαγής νουλεοτιδίων. Και στην περίπτωση αυτή, η πρόσδεση της Ssq1 πραγματοποιείται μέσω της αλληλουχίας Leu-Pro-Pro-Val- Lys της Isu1, ενώ η Jac1 δρα βοηθητικά, και φαίνεται να προσδένεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο της Isu1 (Andrew *et al.*, 2006).

Με την παραπάνω αντίδραση, τα σχηματισμένα σύμπλοκα Fe-S μεταφέρονται και προσδένονται μέσω συγκεκριμένων αλληλουχιών στις πρωτεΐνες δέκτες οι οποίες στη συνέχεια μετατρέπονται από την «άπο» στην «όλο» μορφή ώστε να επιτελέσουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες (Εικόνα 1.5, Εικόνα 1.6)(Lill, 2009).

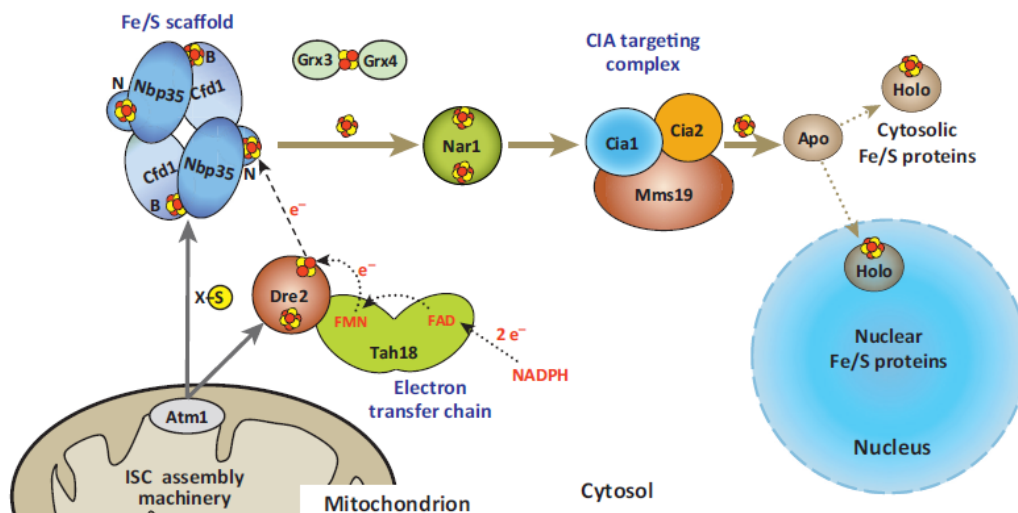
Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ο μηχανισμός οργάνωσης των συμπλόκων ISC είναι απαραίτητος για τη βιοσύνθεση και «ωρίμανση» όλων των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που προσδένουν τα σύμπλοκα Fe-S, ενώ επιπλέον συμμετέχει στη βιογένεση των πρωτεϊνών Fe-S που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα του κυττάρου, καθώς επίσης και στη μεταγραφική ρύθμιση του σιδήρου μέσω των μιτοχονδρίων. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον παραπάνω μηχανισμό ονομάζονται και πρωτεΐνες πυρήνα του συστήματος ISC των μιτοχονδρίων (Couturier *et al.*, 2013). Η «ωρίμανση» των Fe-S πρωτεϊνών των μιτοχονδρίων απαιτεί τη λειτουργία επιπλέον παραγόντων οι οποίοι αναφέρονται ως ρυθμιστικοί παράγοντες του συστήματος ISC των μιτοχονδρίων, και δε συμμετέχουν σε λειτουργίες εκτός των μιτοχονδρίων (Εικόνα 6)(Lill, 2009). Αναλυτικότερα, αυτοί οι παράγοντες είναι οι ακόλουθοι. Οι πρωτεΐνες Isa1, Isa2 και Iba57, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη λειτουργία συγκεκριμένων Fe-S ενζύμων, όπως η μιτοχονδριακή ακονιτάση και η συνθάση της βιοτίνης (Gelling *et al.*, 2008, Mühlhoff *et al.*, 2011, Sheftel *et al.*, 2012). Η πρωτεΐνη Ind1 αντίστοιχα, συμμετέχει στη διαμόρφωση του συμπλέγματος I της αναπνοής στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που διαθέτουν το μηχανισμό αυτό (Bych *et al.*, 2008, Sheftel *et al.*, 2009).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι βακτηριακοί οργανισμοί, εκτός του συστήματος ISC διαθέτουν έναν επιπλέον μηχανισμό δημιουργίας συμπλόκων, το σύστημα SUF (sulfur mobilization), το οποίο αποτελείται από έξι πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μηχανισμό αυτό είναι οργανωμένες σε ένα οπερόνιο (suf) που ενεργοποιείται σε συνθήκες οξειδωτική καταπόνησης. Όπως και στο μηχανισμό ISC, η δημιουργία των συμπλόκων ξεκινά με τη δράση της δεσουλφουράσης της κυστεΐνης SufS. Στην περίπτωση αυτή ωστόσο, η ομάδα S προσδένεται πρώτα στην SufE μέσω μιας κυστεΐνης, κι έπειτα στην SufS. Οι δότες  $e^-$  και ιόντων σιδήρου δεν έχουν πλήρως διασαφηνιστεί. Επιπλέον, τρεις παράγοντες είναι πιθανό να χρησιμοποιούνται ως πρωτεΐνες διαμόρφωσης των συμπλόκων, SufU και SufA, οι οποίες εμφανίζουν ομοιότητες με τις IscU IscA, και SufB, που σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο σύνδεσης με τις SufC–SufD. Αντίστοιχα, για την αποσύνδεση των σχηματισμένων συμπλόκων και την πρόσδεση στις άπο- πρωτεΐνες στόχους, φαίνεται να συμμετέχει η SufC η οποία έχει δράση ATPάσης (Εικόνα 5) (Lill, 2009).

#### **1.4 CIA (Cytosolic Iron- Sulfur Assembly): Ο μηχανισμός σύνθεσης των πρωτεϊνών Fe/S στο κυτταρόπλασμα.**

Η λειτουργία του μιτοχονδριακού συστήματος ISC στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση των συμπλόκων Fe/S και την περαιτέρω σύνθεση των κυτταροπλασματικών και μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που χρησιμοποιούν τα σύμπλοκα αυτά ως προσθετικές ομάδες. Στους οργανισμούς αυτούς παρατηρείται η λειτουργία ενός δευτέρου συστήματος σύνθεσης στο κυτταρόπλασμα, του συστήματος CIA (Cytosolic Iron- Sulfur Assembly). Η λειτουργία αυτού του μηχανισμού χρειάζεται εκ νέου ιόντα σιδήρου, θείου και ηλεκτρόνια. Η πηγή θείου παρέχεται από το σύστημα ISC, το οποίο εξάγει από τη μιτοχονδριακή μεμβράνη ένα προϊόν αγνώστου σύστασης που περιλαμβάνει την ομάδα θείου (Kispal *et al.*, 1999) (Biederbick *et al.*, 2006). Η διακίνηση αυτή πραγματοποιείται μέσω του ABC μεμβρανικού μεταφορέα Atm1, ενώ συμμετέχουν το ένζυμο Ern1 καθώς και η GSH (Εικόνα 1.7). Οι παράγοντες αυτοί αποτελούν το μηχανισμό διακίνησης του συστήματος ISC (ISC export system), ενώ έλλειψη σε οποιονδήποτε από αυτούς δημιουργεί ελαττωματική βιοσύνθεση των πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος και αυξημένη πρόσληψη σιδήρου από το κύτταρο και τα μιτοχόνδρια (Kispal *et al.*, 1999) (Lill, 2009).

Το πρωταρχικό βήμα λειτουργίας του μηχανισμού βιοσύνθεσης CIA, είναι η πρόσδεση συμπλόκων [4Fe–4S] στις πρωτεΐνες Nbp35 και Cfd1, που χρησιμεύουν ως μήτρα για την περαιτέρω οργάνωση του συμπλόκου. Η πηγή θείου παρέχεται από το μιτοχονδριακό σύστημα ISC. Οι Nbp35 και Cfd1 φαίνεται να δημιουργούν ένα ισχυρό τετραμερές το οποίο προσδένει τέσσερα σύμπλοκα της μορφής [4Fe–4S], ένα στο καρβόξυτελικό άκρο κάθε πρωτεΐνης και δύο σύμπλοκα στο άμινοτελικό άκρο κάθε μονομερούς της Nbp35 (Εικόνα 7)(Netz *et al.*,2012, 2014). Η παραπάνω αντίδραση πρόσδεσης απαιτεί τη μεταφορά  $e^-$  από το NADPH στη πρωτεΐνη Tah18 κι έπειτα στην Fe/S πρωτεΐνη Dre2 (Zhang *et al.*,2008, Netz *et al.*,2010). Το επόμενο βήμα είναι η αποδέσμευση των σχηματισμένων [4Fe–4S] συμπλόκων από τις Nbp35-Cfd1 και η μεταφορά και πρόσδεση σε άπο-πρωτεΐνες. Η αντίδραση αυτή απαιτεί τη λειτουργία των πρωτεϊνών Nar1 και του συμπλέγματος που διαμορφώνεται από τις πρωτεΐνες Cia1, Cia2 και Mms19 (CIA targeting complex) (Εικόνα 7) (Balk,*et al.*,2004, 2005). Τέλος, στη βιοσυνθετική πορεία φαίνεται να είναι απαραίτητη και η δράση των Grx3–Grx4 οι οποίες προσδένουν παροδικά ένα σύμπλοκο της μορφής [2Fe–2S] (Εικόνα 7). Ωστόσο, δε θεωρούνται ως πρωτεΐνες του συστήματος CIA, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι εμπλέκονται γενικότερα στο σύστημα ομοιόστασης σιδήρου του κυττάρου (Haunhorst *et al.*, 2013. Mühlhoff *et al.*, 2010)



**Εικόνα 1.7 :** Σχηματική απεικόνιση του μιτοχονδριακού συστήματος σύνθεσης συμπλόκων Fe/S

(Netz *et al.*, 2014)

## 1.5 Οι πρωτεΐνες συναρμολόγησης συμπλόκων Fe/S - Nbp35 και Cfd1

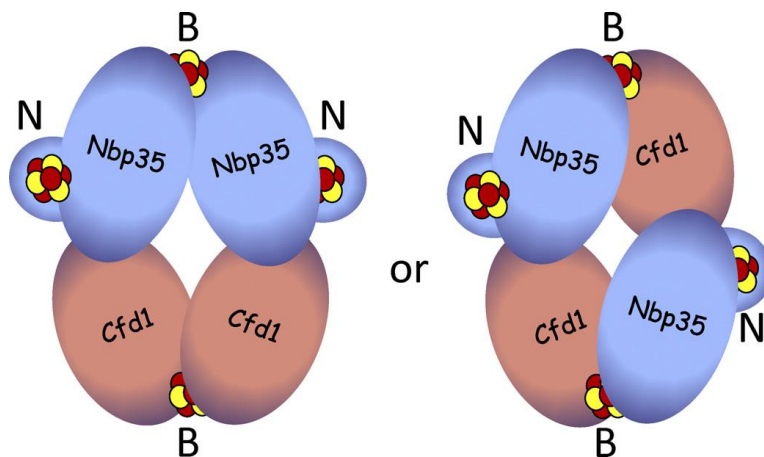
Ο κύριος βιολογικός ρόλος των Nbp35 και Cfd1 είναι η συμμετοχή στο σχηματισμό των συμπλόκων Fe/S στο κυτταρόπλασμα, λειτουργώντας ως «μήτρα» για τη διαμόρφωσή τους. Ως παράγοντας του βιοσυνθετικού μηχανισμού CIA στο κυτταρόπλασμα πρώτα αναγνωρίστηκε η Cfd1 η οποία φάνηκε να σχετίζεται με την πρόσδεση συμπλόκων Fe/S ενώ στη συνέχεια, η ιδιότητα αυτή οδήγησε στην εύρεση και άλλων παραγόντων του βιοσυνθετικού αυτού μηχανισμού (Nbp35, Cia1, Nar1) (Roy *et al.*, 2003)

Εξελικτικά, οι πρωτεΐνες Nbp35 και Cfd1 ανήκουν στην οικογένεια των P-loop NTPασών και συγκεκριμένα στην υποοικογένεια που αναφέρεται ως MRP/Nbp35. Πρόκειται για μία κατηγορία πρωτεϊνών που είναι αρκετά συντηρημένη σε όλους τους ευκαρυωτικούς και βακτηριακούς οργανισμούς. Κοινό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών που ανήκουν στη κατηγορία αυτή είναι η παρουσία μιας αλληλουχίας, της -ENMS- (γλουταμινικό οξύ, ασπαραγίνη, μεθειονίνη, σερίνη) την οποία ακολουθεί συνήθως η αλληλουχία CX<sub>2</sub>C (όπου C κυστεΐνη και X οποιοδήποτε αμινοξικό κατάλοιπο) που συμμετέχει στην πρόσδεση ιόντων μετάλλων και κυρίως ιόντων Fe/S. Επιπλέον, η αλληλουχία GXXXXGK[S/T] η οποία αντιστοιχεί στη δευτεροταγή διαμόρφωση που χαρακτηρίζεται ως μοτίβο Walker A ή αλλιώς P βρόχος, αποτελεί κριτήριο κατάταξης στην παραπάνω οικογένεια (Leipe *et al.*, 2002). Τα χαρακτηριστικά αυτά αναγνωρίζονται και στις Nbp35 και Cfd1 (Εικόνα 9,10) ενώ επιπλέον η πρόσδεση ή υδρόλυση ATP ή GTP, χαρακτηριστικό των P-loop NTPασών, δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Σημαντική για τη πρόσδεση των συμπλόκων *in vivo* είναι η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο μοτίβο Walker A. Μεταλλάξεις στην αλληλουχία αυτή είναι μη βιώσιμες για ευκαρυωτικά κύτταρα, επηρεάζοντας την ενσωμάτωση των Fe/S συμπλόκων σε αυτές κι επομένως τη λειτουργία του μηχανισμού CIA (Netz *et al.*, 2012).

Η αλληλουχία των δύο πρωτεϊνών είναι κατά 49% όμοια. Η βασική διαφορά είναι ότι η Nbp35 έχει μια επιπρόσθετη ακολουθία 52 αμινοξέων στο άμινοτελικό της άκρο, χαρακτηριστικό που εξυπηρετεί στο διαχωρισμό τους. Παρά το υψηλό ποσοστό ομοιότητας, και οι δύο πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για το σχηματισμό των συμπλόκων στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών οργανισμών με εξαίρεση τους φυτικούς οργανισμούς, στους οποίους η Cfd1 απουσιάζει και παρατηρείται μόνο η Nbp35 (Bych *et al.*, 2008)(Netz *et al.*, 2007) (Netz *et al.*, 2012)(Hausmann *et al.*, 2005).

Οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν ένα ισχυρό τετραμερές, το οποίο προσδένει τέσσερα σύμπλοκα της μορφής [4Fe-4S]. Η πρόσδεση των συμπλόκων φαίνεται να εξαρτάται από τη

δέσμευση ATP ή GTP και την κατανάλωση ενέργειας, χωρίς όμως να έχει αποδοθεί δράση ΑΤΡασης ή GΤΡασης στις δύο πρωτεΐνες προς το παρόν. Τα σύμπλοκα συγκρατούνται μέσω των κυστεϊνών που υπάρχουν στο καρβοξυ-τελικό άκρο του κάθε μονομερούς, καθώς και στο άμινο-τελικό άκρο της Nbp35 (Εικόνα 1.8 )(Netz *et al.*, 2012). Η αλληλουχία CX13CX2CX5C (όπου C κυστεΐνη και X οποιοδήποτε αμινοξικό κατάλοιπο) του αμινο-τελικού άκρου της είναι αρκετά συντηρημένη και απαντάται σε όλους τους οργανισμούς (Εικόνα 9,10). Επιπλέον, η πρόσδεση δυο συμπλόκων στο καρβοξυτελικό άκρο των δύο πρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσω των κυστεϊνών της αλληλουχίας CX2C (Εικόνα 9,10) και λειτουργούν ως «γέφυρα» για το σχηματισμό του τετραμερούς σταθεροποιώντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των ετεροτεταμερών. Η αλληλουχία είναι συντηρημένη στους περισσότερους οργανισμούς, ενώ απουσιάζει από την ομόλογη Nbp35 των φυτικών οργανισμών, πιθανώς λόγω της απουσίας της Cfd1 (Bych *et al.*, 2008). Μετάλλαξη είτε σε μια εκ των δυο κεντρικών κυστεϊνών της αλληλουχίας CX13CX2CX5C είτε σε οποιαδήποτε κυστεΐνη της CX2C οδηγεί σε μη βιώσιμα κύτταρα, φανερώνοντας τη σημασία τους για την πρόσδεση των συμπλόκων (Netz *et al.*, 2007) (Netz *et al.*, 2012).



**Εικόνα 1.8:** Διαμόρφωση τετραμερών των πρωτεϊνών Nbp35 και Cfd1. Εμφανίζονται δύο πιθανές διαμορφώσεις στις οποίες συνδέονται τέσσερα σύμπλοκα [4Fe-4S] στο άμινοτελικό άκρο (N) της Nbp35 καθώς και τα σύμπλοκα που χρησιμεύουν για τη σταθεροποίηση των τετραμερών (B) των δυο πρωτεϊνών.(Netz *et al.*, 2012)

Στους ανώτερους ευκαρυώτες, όπως ο άνθρωπος, οι ομόλογες πρωτεΐνες NBP35 και CFD1 (ή Nubp1 και Nubp2 αντίστοιχα), διατηρούν τις συντηρημένες αλληλουχίες των κυστεϊνών (Εικόνα 1.9, 1.10) προσδένοντας σύμπλοκα της μορφής [4Fe-4S] (Stehling *et al.*, 2008). Ωστόσο, η δράση τους στους μηχανισμούς ομοιόστασης σιδήρου εντός του κυττάρου είναι πιο πολύπλοκη. Πιο συγκεκριμένα, μείωση των επιπέδων έκφρασης της NBP35 σε κύτταρα του ανθρώπου οδήγησε σε βλάβη των μηχανισμών διαμόρφωσης των συμπλόκων Fe/S στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, χωρίς να επηρεάζει τους αντίστοιχους μηχανισμούς στα μιτοχόνδρια. Στο κυτταρόπλασμα, απουσία συμπλόκων [4Fe-4S], η πρωτεΐνη της κυτταροπλασματικής ακονιτάσης λειτουργεί ως ρυθμιστής σιδήρου (IRP1 iron regulatory protein 1) και προσδένεται σε δομές βρόχων ορισμένων mRNA πρωτεϊνών που σχετίζονται με την πρόσληψη και κατανομή του σιδήρου στο κυτταρόπλασμα. Με το τρόπο αυτό, η NBP35 συμμετέχει σε ένα μηχανισμό ανίχνευσης και ρύθμισης των επιπέδων σιδήρου στο κυτταρόπλασμα που έχει ως αποτέλεσμα την υψηλότερη πρόσληψη σιδήρου από τον υποδοχέα τρανσφερίνης (TfR), κι επομένως την εισαγωγή στο κυτταρόπλασμα, ενώ παράλληλα, μειώνεται η πρόσληψη σιδήρου από τη φεριτίνη (Stehling *et al.*, 2008). Αντίστοιχη λειτουργία της ομόλογης Nbp35 του οργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* δεν έχει σημειωθεί (Netz *et al.*, 2014).

human	1	-----MEEVPHD	CPGADSAQAGRGAS	CGGC	25	
chimpanzee	1	-----MEEVPHD	CPGADSAQAGRGAS	CGGC	25	
dog	1	-----MEEVPQC	PGTGSQAQAGRGAS	CGGC	25	
mouse	1	-----MEEAPHG	CPGADSAQAGRGAS	CGGC	25	
chicken	1	-----MAEVAEGR	RPEDCPGTSSAQAGRAA	CGGC	30	
cow	1	-----MEEVPHD	CPGADSAQAGRGAS	CGGC	25	
zebrafish	1	MADVFNDAPEH	CPGTSSDQAGKSSA	CGCPNQSI	CASGATK	41
rat	1	-----MEGAPHG	CPGADSAQAGRGAS	CGGC	25	
saccharomyces	1	-----MTEILPH				7
arabidopsis	1	MENGDIPEDANEH	CPGPQSESAGKSDS	CGAGCPNQEA	CATAPKGPD	45
frog	1	-----				0
mosquito	1	-----				0

CX13CX2CX5C

human	26	PNQRL	CASGAGATP	-----	DTAIEEIKEMK	51				
chimpanzee	26	PNQRL	CASGAGATP	-----	DPAIGEIKEMK	51				
dog	26	PNQRL	CASGAGAAP	-----	DPAIEEIKEMK	51				
mouse	26	PNQRL	CASGAGAAP	-----	DPAVEEIREMK	51				
chicken	31	PNQKL	CAAGAAATD	-----	PAEAAELRERLR	56				
cow	26	PNQRL	CASGAGAAA	-----	DPAIEEIKEMK	51				
zebrafish	42		APD	-----	PAIEEIKQKMT	55				
rat	26	PNQKL	CASGAGAAP	-----	DPAVEEIREMK	51				
saccharomyces	8		VND	-----	EVLPAEYELNQPEPEH	CGPESDMAGKSDA	CGGANKEIKESLE	54		
arabidopsis	46		PDL	-----	VATAERMS	56				
frog	1	MADV	PNAPQ	CPGTGST	EAGKSSA	CGCPNQSI	CASGTM	SGPDP	AAIEIKELLS	55
mosquito	1	-----							MLD	3

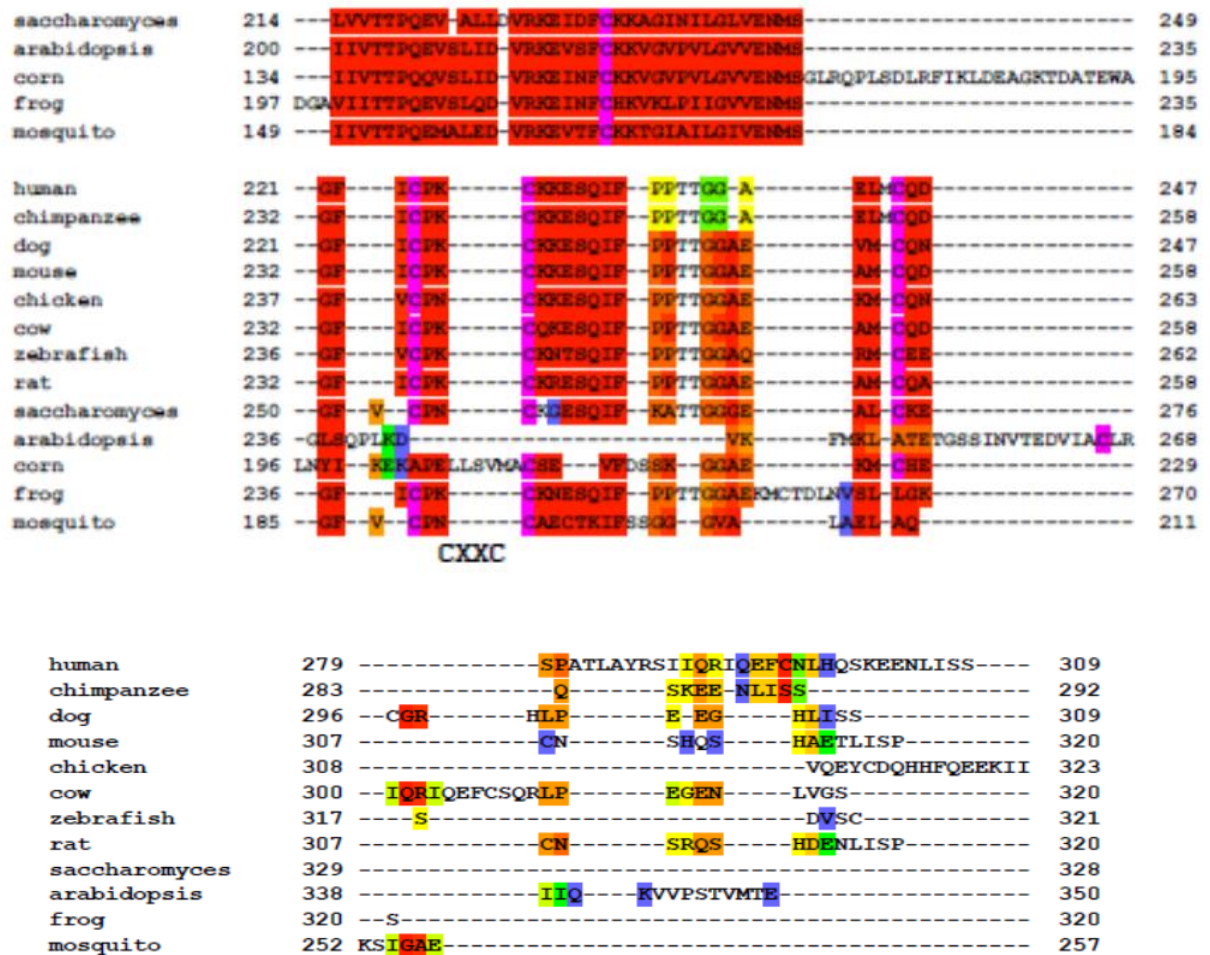
human	52	T	-----VKHKILVLS	GKGGVGKST	FSAHL	AH	GLAE	DENT	QIALLDIDICGFSI	99				
chimpanzee	52	T	-----VKHKILVLS	GKGGVGKST	FSAHL	AH	GLAE	DENT	QIALLDIDICGFSI	99				
dog	52	T	-----VKHKILVLS	GKGGVGKST	FSAHL	AH	GLAE	DENT	QVALLDIDICGFSI	99				
mouse	52	T	-----VRHKLLVLS	GKGGVGKST	FSAHL	AH	GLAE	DGDT	QVALLDIDICGFSI	99				
chicken	57	B	-----VKHI	VVVLS	GKGGVGKST	FSAHL	AH	GLAAD	ESK	QVALLDIDICGFSI	104			
cow	52	T	-----VKHKILVLS	GKGGVGKST	FSAHL	AH	GLAE	DENT	QVALLDIDICGFSI	99				
zebrafish	56	S	-----VKHKILVLS	GKGGVGKST	FSAHL	SH	ALAS	DSK	EVALLDVIDICGFSI	103				
rat	52	T	-----VRHRILVLS	GKGGVGKST	FSAHL	AH	GLAE	DGDT	QVALLDIDICGFSI	99				
saccharomyces	55	K	GPDPD	IPLITD	NSGTEH	KILVLS	GKGGVGKST	FAAM	SWALS	AD	EDL	QVGM	LDICGFSI	117
arabidopsis	57	T	-----VKHKILVLS	GKGGVGKST	FSAQL	S	FALAG	MDH	QVGLMD	IDICGFSI	103			
frog	56	S	-----VKHKILVLS	GKGGVGKST	FSAHL	AH	GLAE	ESK	EVALLDVIDICGFSI	103				
mosquito	4	K	-----IKHILVLS	GKGGVGKST	VSTQL	A	LTLAE	SGH	KVGLLD	IDICGFSV	50			

Walker A motif

human	100	FKIMGLE	GE	QVEDN		L	GVMSVGFLL	SSPDDAVI	W	-----R	134					
chimpanzee	100	FKIMGLE	GE	QVEDN		DNL	GVMSVGFLL	SSPDDAVI	W	-----R	145					
dog	100	FKIMGLE	GE	QVEDN		L	GVMSVGFLL	SSPDDAVI	W	-----R	134					
mouse	100	FKIMGLE	GE	QVEDN		NL	GVMSVGFLL	SSPDDAVI	W	-----R	145					
chicken	105	FKMGLG	GE	QVEDN		ENL	GVMSVGFLL	SSPDDAVI	W	-----R	150					
cow	100	FKIMGLE	GE	QVEDN		NL	GVMSVGFLL	SSPDDAVI	W	-----R	145					
zebrafish	104	FKIMGLE	GE	QVEDN		ENL	AVMSIGFLL	SSPDDAVI	W	-----R	149					
rat	100	FKIMGLE	GE	QVEDN		DNL	GVMSVGFLL	SSPDDAVI	W	-----R	145					
Saccharomyces	118	FKMLG	CI	KET	VHES	NSG	WSPV	V	DNL	ATMS	IQYML	PEOD	SAI	W	-----R	163
arabidopsis	104	FKMLG	LE	QQR	IQSN	L	WSPV	V	DNL	EDNL	GVMS	IGFMI	-----FN	-----SDEAVI	WR	149
frog	104	FKMGLG	GE	QVEDN		DNL	AVMSVGFLL	SSPDDAVI	W	-----R	149					
mosquito	51	FFLLGLE	GH	Q	VE	Q	Q	WVVFV	SGAD	QR	L	AVMSIGFLL	KNRDEA	VI	-----W	98

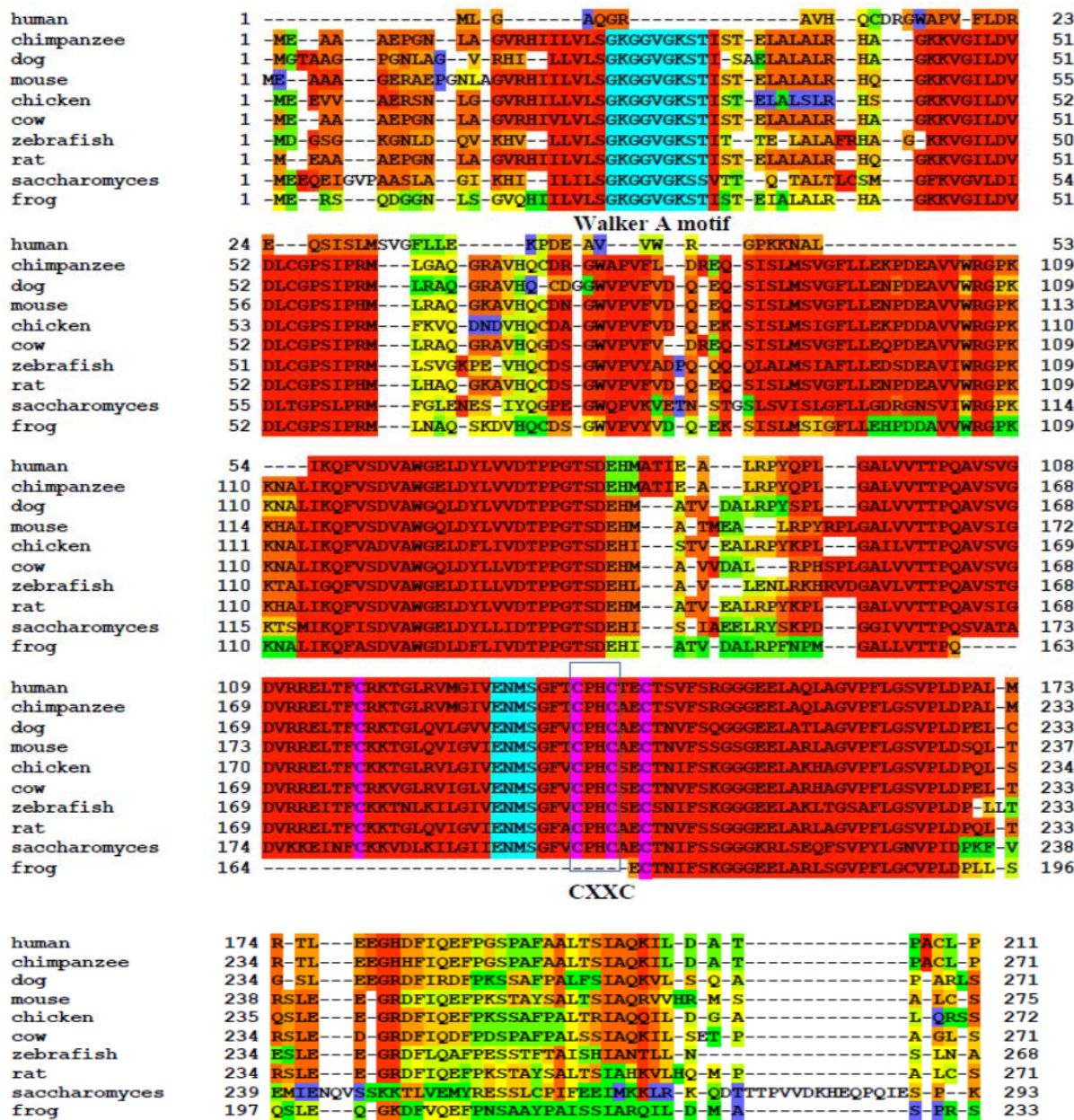
human	135	GP	-----KKN		MIK	QFLRDVDW	GEVDYLIVDT	PPGTS	DEHLSV	VR	YLA	TA	HID	-----S	A	184
chimpanzee	146	GP	-----KKN		MIK	QFLRDVDW	GEVDYLIVDT	PPGTS	DEHLSV	VQ	YLAAA	HID	-----S	A	195	
dog	135	GP	-----KKN		MIK	QFLRDVDW	GEVDYLIVDT	PPGTS	DEHLSA	VQ	YLS	ST	HID	-----S	A	184
mouse	146	GP	-----KKN		MIK	QFLRDVDW	GEVDYLIVDT	PPGTS	DEHLSV	VQ	YLAAA	HID	-----S	A	195	
chicken	151	GP	-----KKN		LTK	QFLRDVDW	GEVDYLIVDT	PPGTS	DEHLSI	VQ	YLSA	SNID	-----S	A	200	
cow	146	GP	-----KKN		MIK	QFLRDVDW	GEVDYLIVDT	PPGTS	DEHLSV	VQ	YLTAA	HID	-----S	A	195	
zebrafish	150	GP	-----KKN		MIK	QFLRDVDW	GEVDYLIVDT	PPGTS	DEHLSI	VQ	YL	SGA	-----S	I	196	
rat	146	GP	-----KKN		MIK	QFLRDVDW	GEVDYLIVDT	PPGTS	DEHLSV	VQ	YLAAA	HID	-----S	A	195	
saccharomyces	164	GS	KKNL	-----	LTK	QFLRDVDW	GEVDYLIVDT	PPGTS	DEHLSI	NKY	MR	ES	-----S	A	213	
arabidopsis	150	GP	-----R	KN	GLTK	QFLRDVDW	GEVDYLIVDT	PPGTS	DEHLSI	VQ	YLT	PTGI	-----S	A	199	
frog	150	GP	-----KKN		MIK	QFLRDVDW	GEVDYLIVDT	PPGTS	DEHLSV	VQ	YL	SVA	-----S	T	196	
mosquito	99	-----	PKKTAMIK	QFLRDVDW	GEVDYLIVDT	PPGTS	DEHITV	ME	CL	SGVNADGA	-----	-----	-----	-----	148	

human	185	---	VLTTPQ	EVSLQD	VRKEIR	CHKVKL	PI	IGVVENMS	-----	220
chimpanzee	196	---	VLTTPQ	EVSLQD	VRKEIR	CHKVKL	PI	IGVVENMS	-----	231
dog	185	---	VLTTPQ	EVSLQD	VRKEIR	CHKVKL	PI	IGVVENMS	-----	220
mouse	196	---	VLTTPQ	EVSLQD	VRKEIR	CHKVKL	PI	IGVVENMS	-----	231
chicken	201	---	VLTTPQ	EVSLQD	VRKEIR	CHKVKL	PI	IGVVENMS	-----	236
cow	196	---	VLTTPQ	EVSLQD	VRKEIR	CHKVKL	PI	IGVVENMS	-----	231
zebrafish	197	DGA	VLTTPQ	EVSLQD	VRKEIR	CHKVKL	PI	IGVVENMS	-----	235
rat	196	---	VLTTPQ	EVSLQD	VRKEIR	CHKVKL	PI	IGVVENMS	-----	231
saccharomyces	214	---	LVVTPQ	EVSLQD	VRKEIR	CHKVKL	PI	IGVVENMS	-----	249
arabidopsis	200	---	IVVTPQ	EVSLQD	VRKEIR	CHKVKL	PI	IGVVENMS	-----	235
frog	197	DGA	VLTTPQ	EVSLQD	VRKEIR	CHKVKL	PI	IGVVENMS	-----	235
mosquito	149	---	IVVTPQ	EVSLQD	VRKEIR	CHKVKL	PI	IGVVENMS	-----	184



**Εικόνα 1.9:** Συσχέτιση αλληλουχιών της πρωτεΐνης Nbr35 σε διάφορους οργανισμούς. Οι υψηλά συντηρημένες περιοχές μεταξύ των ομόλογων πρωτεϊνών εμφανίζονται με κόκκινο, χρώμα ενώ οι λιγότερο συντηρημένες με μπλέ. Με ρόζ έχουν σημειωθεί τα συντηρημένα αμινοξέα κυστεΐνης που σχετίζονται με την πρόσδεση συμπλόκων, ενώ με κυανό περιοχές που σχετίζονται με την οικογένεια P-loop NTPασών. Από πάνω προς τα κάτω : *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Canis lupus familiaris*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Bos Taurus*, *Danio rerio*, *Rattus norvegicus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Xenopus tropicalis*, *Culex quinquefasciatus*. Οι αλληλουχίες των ομόλογων πρωτεϊνών έχουν ληφθεί από την NCBI, ενώ για την ευθυγράμμιση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα T-COFFEE, Version\_11.00





**Εικόνα 1.10:** Συσχέτιση αλληλουχιών της πρωτεΐνης Cfd1 σε διάφορους οργανισμούς. Οι υψηλά συντηρημένες περιοχές μεταξύ των ομόλογων πρωτεϊνών εμφανίζονται με κόκκινο, χρώμα ενώ οι λιγότερο συντηρημένες με μπλέ. Με ρόζ έχουν σημειωθεί τα συντηρημένα αμινοξέα κυστεΐνης που σχετίζονται με την πρόσδεση συμπλόκων, ενώ με κυανό περιοχές που σχετίζονται με την οικογένεια P-Loop NTPασών. Από πάνω προς τα κάτω : *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Canis lupus familiaris*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Bos Taurus*, *Danio rerio*, *Rattus norvegicus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenopus tropicalis* Οι αλληλουχίες των ομόλογων πρωτεϊνών έχουν ληφθεί από την NCBI , ενώ για την ευθυγράμμιση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα T-

COFFEE, Version\_11.00

Επιπρόσθετα, οι NBP35 και CFD1 φαίνεται να σχετίζονται με τη βλεφαριδογένεση των ευκαρυωτικών κυττάρων και συγκεκριμένα λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές της βλεφαριδογένεσης σε κύτταρα ποντικού (Kyrgi *et al.*, 2013). Οι CFD1 (Nubp2) και NBP35 (Nubp1) αλληλεπιδρούν μεταξύ του και με τον παράγοντα KIFC5A, ο οποίος συμμετέχει στον κυτταρικό κύκλο και συγκεκριμένα στη δημιουργία της ατράκτου κατά τη μίτωση (Kyrgi *et al.*, 2013). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Kyrgi *et al.*, ο σχηματισμός των βλεφαρίδων στα ευκαρυωτικά κύτταρα εξαρτάται από το κεντριόλιο των κυττάρων, το οποίο έχει μια ενδογενή ιδιότητα σχηματισμού βλεφαρίδων, ανεξάρτητη από τον συνολικό αριθμό κεντριολίων στο κύτταρο. Τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες φαίνεται να σχετίζονται με τη δημιουργία βλεφαρίδων στο κύτταρο, η NBP35 (Nubp1), η CFD1 (Nubp2) και ο παράγοντας KIFC5A. Έλλειψη των δύο πρώτων οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των κυττάρων που φέρουν βλεφαρίδες, ενώ έλλειψη του KIFC5A οδηγεί αντίστοιχα σε μείωση της βλεφαριδογένεσης. Η αλληλεπίδραση της NBP35 (Nubp1) με τη CFD1 (Nubp2) *in vivo*, καθώς και ο κοινός τους εντοπισμός στα μιτωτικά και μεσοφασικά κεντριόλια πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, αλλά και στο βασικό σώμα των κεντριολίων αδρανών κυττάρων, φαίνεται να είναι συντηρημένη σε σπονδυλωτά και ασπόνδυλα, υπογραμμίζοντας τη σημασία τους για το σχηματισμό βλεφαρίδων. Επιπρόσθετα, η NBP35 (Nubp1), φαίνεται να έχει πολλαπλό ρόλο για το κύτταρο και δρα ως συμπαράγοντας τσαπερονίων (CCT/TRiC), αλληλεπιδρώντας με ποικίλες πρωτεΐνες και διευκολύνοντας την αναδίπλωση ή διαφοροποιώντας τη λειτουργία τους. Το σύστημα τσαπερονίων CCT/TRiC, αφορά ένα σύμπλοκο οκτώ υπομονάδων (CCT1-8), το οποίο έχει μοριακό βάρος 900 kDa και είναι εξελικτικά συντηρημένο σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η χρησιμότητα του συμπλόκου για το κύτταρο αφορά τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών που εγκλείονται εντός της κοιλότητας του. Επιπλέον το σύμπλοκο σχετίζεται με το σχηματισμό των βλεφαρίδων των κυττάρων, καθώς έλλειψη των τσαπερονίων οδηγεί σε βράχυνση του κεντρικού άξονα των βλεφαρίδων και πλάτυνση των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνης στο άκρο της. Η NBP35 (Nubp1) αλληλεπιδρά σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη με πέντε από τις υπομονάδες του συστήματος τσαπερονίων CCT/TRiC και συγκεκριμένα με της υπομονάδες CCT3 έως CCT8 υποδηλώνοντας το ρόλο της είτε ως συμπαράγοντα του συστήματος τσαπερονίων CCT/TRiC ή ακόμα ως υπόστρωμα.

Οι βλεφαρίδες αφορούν εξελικτικά συντηρημένα οργανίδια τα οποία συμμετέχουν στην κίνηση των κυττάρων, λειτουργούν ως αισθητήρια όργανα ή επιτρέπουν την κίνηση ρευστών γύρω από το κύτταρο. Τα οργανίδια αυτά απαντώνται και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς επενδύοντας το επιθήλιο αρκετών ιστών. Δεδομένου του υψηλού επιπέδου συντήρησης τους και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, υπάρχουν αρκετές ασθένειες στον άνθρωπο που σχετίζονται με βλάβες στο μηχανισμό σχηματισμού των βλεφαρίδων και συγκεκριμένα στη δομή οργάνωσής τους, το βασικό σώμα. Οι ασθένειες αυτές σχετίζονται είτε με οργανοειδικές διαταραχές, όπως η πολυκυστική νόσος των νεφρών, είτε με γενετικές νόσους όπως το σύνδρομο Bardet-Biedl (BBS) και το σύνδρομο Alstrom (ALMS) (Badano *et al.*, 2006).

Οι πρωτεΐνες NBP35 και CFD1 σχετίζονται όπως αναφέρθηκε, με το μηχανισμό σχηματισμού των βλεφαρίδων στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ενώ αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με το σύστημα τσαπερονίων CCT/TRiC. Επιπλέον η μεταξύ τους αλληλεπίδραση έχει μελετηθεί στις ομόλογες πρωτεΐνες του οργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* δίνοντας μια εικόνα για τη συμμετοχή τους στη διαμόρφωση συμπλόκων Fe/S στους ευκαρυώτες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η παραγωγή μεγάλης ποσότητας των ομόλογων πρωτεϊνών Nbp35 και Cfd1 του οργανισμού *Mus musculus* σε διαλυτή μορφή και υψηλή καθαρότητα που θα επιτρέψει τη μελέτη της δομής τους και των αλληλεπιδράσεών τους με τα τσαπερόνια CCT/TRiC σε συνεργασία με το Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογίας στην Ισπανία (Centro Nacional de Biotecnología, Spain) .

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν,

- i. μελέτη των συνθηκών έκφρασης και συνέκφραση με τσαπερόνια με σκοπό τη βελτιστοποίηση παραγωγής διαλυτών πρωτεϊνών.
- ii. η ανάκτηση της Cfd1 από σωματίδια εγκλεισμού μέσω εφαρμογής κατάλληλου πρωτοκόλλου αναδίπλωσης
- iii. καθαρισμός των πρωτεϊνών με μεθόδους ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών (FPLC)
- iv. μελέτη των προκαταρκτικών συνθηκών κρυστάλλωσης με τη χρήση ρομπότ κρυστάλλωσης

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> – Υλικά και μέθοδοι

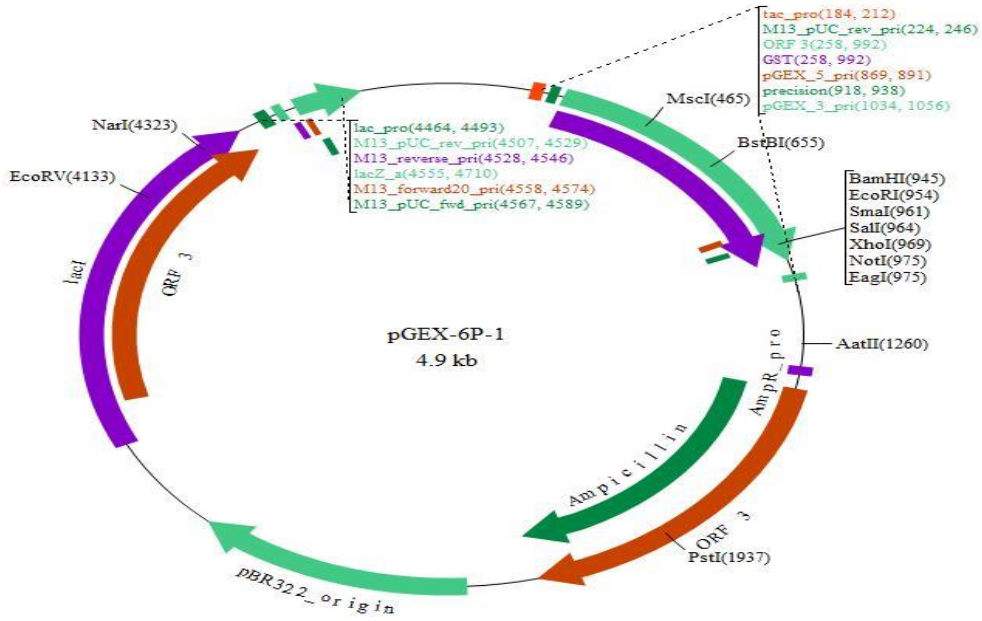
### 2.1 Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης και βακτηριακά στελέχη

#### 2.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης πρωτεϊνών (*Nbp35* και *Cfd1*)

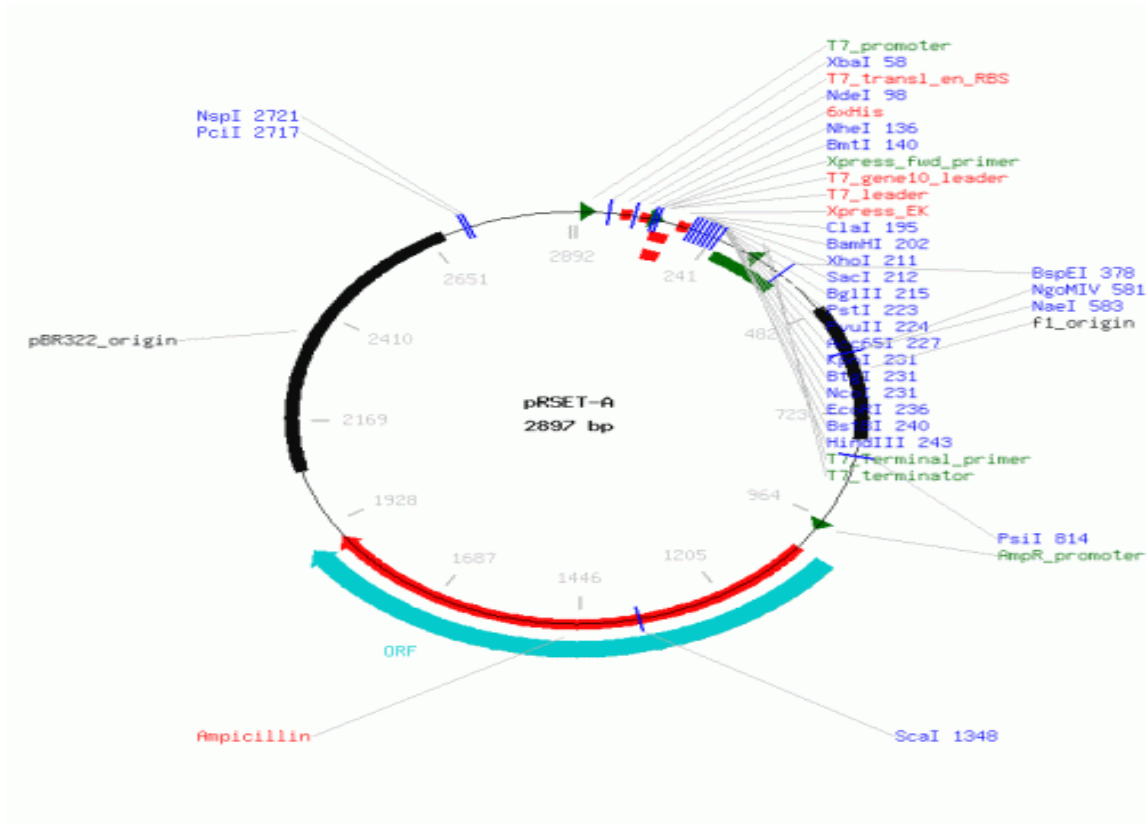
Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ήταν οι pGEX-6P-1, στον οποίο έχει πραγματοποιηθεί η ένθεση του γονιδίου της *Nbp35*, ο pRSET-A στον οποίο έχει πραγματοποιηθεί ένθεση του γονιδίου *Nbp35*, αλλά και ο pRSET-A που περιέχει το γονίδιο της *Cfd1*. Και οι δύο τύποι πλασμιδιακών φορέων έχουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (Amp), ώστε να χρησιμοποιηθεί ως επιλογή των ανασυνδυασμένων κυττάρων, ενώ και οι δύο περιέχουν πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων (Εικόνα 2.1, 2.2).

Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P-1 έχει σχεδιαστεί ώστε να παράγεται η πρωτεΐνη της *Nbp35* συγχωνευμένη με τη πρωτεΐνη GST (Glutathione S-transferase) στο N τελικό άκρο της. Η έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ρυθμίζεται από τον προαγωγέα *tac*, κι επάγεται με την προσθήκη ισοπροπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοζίτη isopropyl b-D thiogalactoside (IPTG) που αποτελεί ένα ανάλογο λακτόζης. Επιπλέον, εντός του πλασμιδιακού φορέα υπάρχει ένθεση του γονιδίου *lacI*. Το προϊόν της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου είναι μια πρωτεΐνη καταστολέας, η οποία προσδένεται στη ρυθμιστική περιοχή του προαγωγέα *tac*, εμποδίζοντας την έκφραση των γονιδίων πριν την επαγωγή με IPTG.

Αντίστοιχα, ο πλασμιδιακός φορέας pRSET-A έχει σχεδιαστεί για την έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης (*Nbp35*, *Cfd1*) με τη σύντηξη ενός πεπτιδίου 6 ιστιδινών (His tag) στο αμινοτελικό της άκρο. Η έκφραση ρυθμίζεται από τον προαγωγέα T7, ο οποίος αναγνωρίζεται ειδικά από το ένζυμο της T7 RNA πολυμεράσης. Επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου μπορεί να πραγματοποιηθεί με προσθήκη IPTG, που τελικά οδηγεί στην έκφραση του τελικού προϊόντος.



**Εικόνα 2.1:** Χάρτης του φορέα έκφρασης pGEX-6P-1(BVTech)



**Εικόνα 2.2:** Χάρτης του φορέα έκφρασης pRSET- A (LabLife)

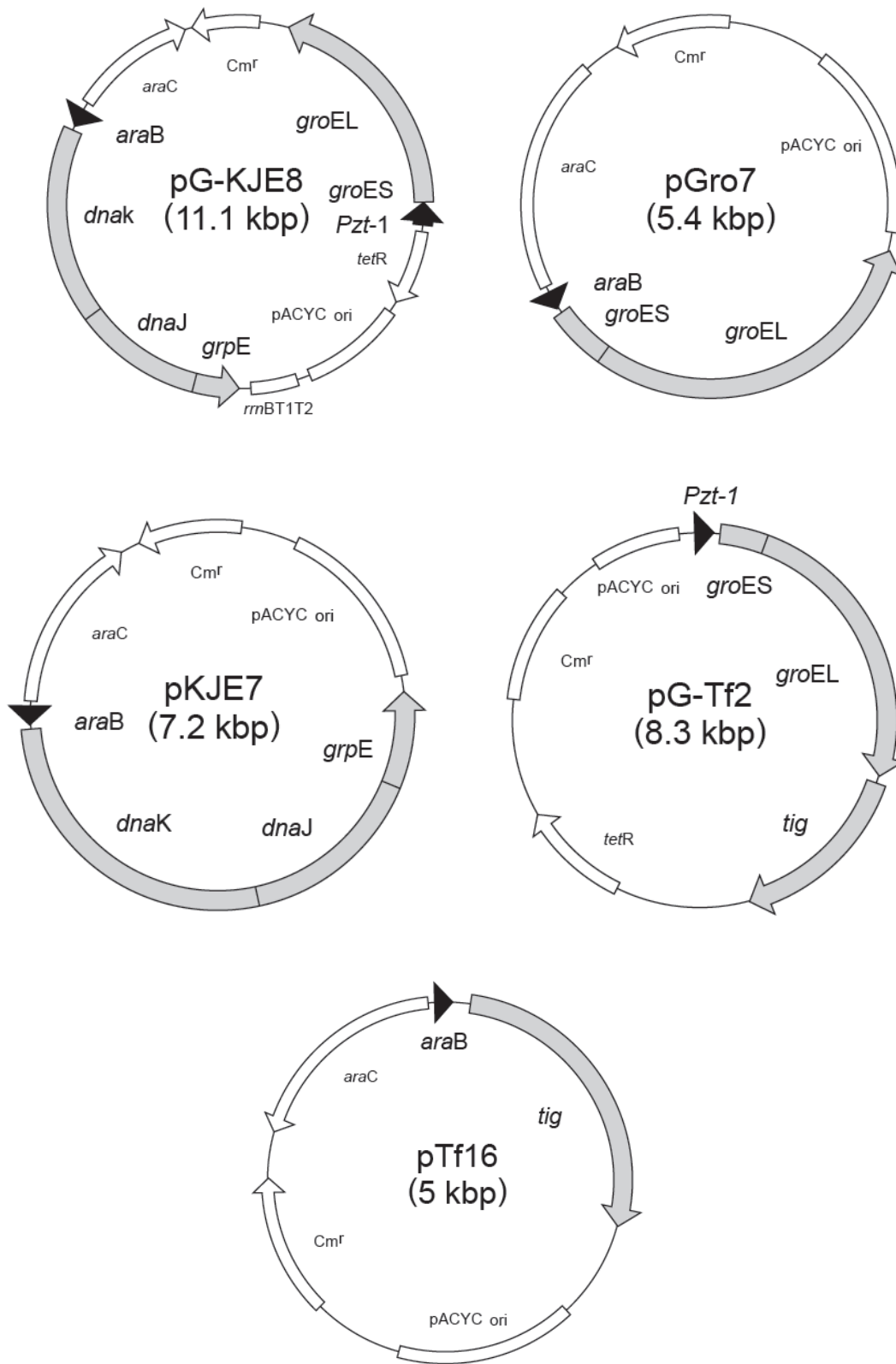
### 2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς συνέκφρασης πρωτεϊνών (*Nbr35* και *Cfd1*) και τσαπερονίων

Επιπλέον της έκφρασης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε και συνέκφραση των πλασμιδιακών φορέων pRSET-A με πλασμιδιακούς φορείς που περιέχουν γονίδια τσαπερονίων. Αναλυτικότερα, οι φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στην Εικόνα 2.3 και περιέχουν είτε γονίδια ενός τσαπερονίου, είτε περισσότερων από ένα, τα οποία συνεκφράζονται .

Όλοι οι τύποι φορέων, φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας σε χλωραμφενικόλη ( $Cm^+$ ) κι επιπλέον θέση αρχής αντιγραφής (*ori*) που προέρχεται από φορέα pACYC (Εικόνα 2.4). Επομένως, είναι δυνατή η χρήση τους για μετασχηματισμό κυττάρων μαζί με τους πλασμιδιακούς φορείς pRSET-A που χρησιμοποιούν διαφορετικό σύστημα αντιγραφής. Ακόμα, τα γονίδια των τσαπερονίων, βρίσκονται καθοδικά, είτε του προαγωγέα *araB*, είτε του *Pzt-1* (*tet*), συνεπώς η επαγωγή της έκφρασης των τσαπερονίων μπορεί να πραγματοποιηθεί ανεξάρτητα της έκφρασης των πρωτεϊνών που βρίσκονται υπό τον προαγωγέα T7 (Εικόνα 2.2, 2.4). Η επαγωγή της έκφρασης μπορεί να πραγματοποιηθεί με προσθήκη L-αραβινόζης και τετρακυκλίνης αντίστοιχα, ή σε συνδυασμό και των δύο (Εικόνα 2.3) (Bonner ,2007)( Ahmad, 2011)..

No.	Plasmid	Chaperone	Promoter	Inducer	Resistant Marker
1	pG-KJE8	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i> <i>groES-groEL</i>	<i>araB</i> <i>Pzt1</i>	L-Arabinose Tetracyclin	Cm
2	pGro7	<i>groES-groEL</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm
3	pKJE7	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm
4	pG-Tf2	<i>groES-groEL-tig</i>	<i>Pzt1</i>	Tetracyclin	Cm
5	pTf16	<i>tig</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm

**Εικόνα 2.3:** Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης ομάδων τσαπερονίων (TaKaRa Bio Inc.)



**Εικόνα 2.4:** Χάρτες των φορέων έκφρασης τσαπερονίων (*pG-KJE8*, *pGro7*, *pKJE7*, *pG-Tf2*, *pTf16*) (*TaKaRa Bio Inc.*)

### 2.1.3 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των πρωτεϊνών ήταν τα *E.coli* και συγκεκριμένα τα στελέχη BL21(DE3) pLysS τα οποία έχουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη (chloramphenicol), καθώς και τα BL21(DE3) που δεν έχουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Τα στελέχη BL21(DE3) χρησιμοποιήθηκαν για τα πρωτόκολλα συνέκφρασης πρωτεϊνών και τσαπερονίων.

## 2.2 Παρασκευή Θρεπτικών υλικών για στερεές και υγρές καλλιέργειες βακτηρίων

### 2.2.1 Υλικά

Αντιβιοτικά stock 30 mg/ml Chloramphenicol, 30mg/ml Carbenicillin

Tryptone

NaCl

Yeast Extract

Agar

Απιονισμένο νερό

Φούρνος μικροκυμάτων

Πάγος

Λυχνία

### 2.2.2 Πειραματική πορεία

Θρεπτικό υλικό LB (1L)

10 g Tryptone



10 g NaCl

5g Yeast Extract

15g Agar ( χρησιμοποιείται μόνο για τη παρασκευή θρεπτικού υλικού για στερεή καλλιέργεια)

Απιονισμένο νερό

Τα θρεπτικά υλικά παρασκευάζονται και αποστειρώνονται, στη συνέχεια φυλάσσονται στους 4°C.

Για την προετοιμασία της στερεής καλλιέργειας, 30 ml από το θρεπτικό υλικό μεταφέρονται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο (falcon) ασηπτικά , εφ όσον το θρεπτικό υλικό έχει θερμανθεί σε φούρνο μικροκυμάτων. Το θρεπτικό παραμένει στον πάγο έως ότου η θερμοκρασία του να μειωθεί περίπου στους 40°C. Παράλληλα το αντιβιοτικό μεταφέρεται από τους -20°C , στον πάγο ώστε να ξεπαγώσει. Στη συνέχεια προστίθεται ασηπτικά η κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 50μg/ml Carbenicilin και 34μg/ml Chloramphenicol, το θρεπτικό αναδεύεται ελαφρώς και μεταφέρεται σε στερεή καλλιέργεια. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πήξει.

### **2.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων**

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των κυττάρων ήταν η μέθοδος του θερμικού σοκ. Η μέθοδος στηρίζεται στην παροδική διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος με την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας. Η δημιουργία πόρων στο κυτταρικό τοίχωμα επιτρέπει την είσοδο του πλασμιδιακού DNA και το μετασχηματισμό των κυττάρων. Η μείωση της θερμοκρασίας στη συνέχεια οδηγεί στην επαναφορά του κυτταρικού τοιχώματος κλείνοντας του πόρους που έχουν δημιουργηθεί (Bonner ,2007).

### 2.2.2 Υλικά

Κύτταρα BL21(DE3) pLysS 20μl (-80°C)

Πλασμιδιακό DNA

Θρεπτικό υλικό LB (agar) , SOC medium

Στερεές καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό (34μg/ml Chloramphenicol, 50μg/ml Carbenicillin)

Υδατόλουτρο

Λυχνία

Πάγος

### 2.2.3 Πειραματική πορεία

20μl κυττάρων μεταφέρονται από τους -80°C στον πάγο . Στη συνέχεια 2μl του πλασμιδιακού φορέα που θα χρησιμοποιηθεί για το μετασχηματισμό προστίθενται ασηπτικά και ακολουθεί επώαση στον πάγο για μισή ώρα. Το erpendorf που περιέχει τα κύτταρα και τον πλασμιδιακό φορέα επωάζεται για 45s στους 42°C κι έπειτα στον πάγο. Προστίθενται ασηπτικά 250μl θρεπτικού υλικού SOC medium και τα κύτταρα επωάζονται για μία ώρα στους 37°C υπό ανάδευση (200rpm) . Έπειτα από την επώαση, 150μl των μετασχηματισμένων κυττάρων μεταφέρονται ασηπτικά σε σε τριβλίο Petri που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό και διασπείρονται με γυάλινη ράβδο. Το τριβλίο επωάζεται ανεστραμμένο στους 37°C ολονύκτια.

## 2.4 Καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων

Για την ανάπτυξη των βακτηριακών ανασυνδυασμένων κυττάρων *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες δύο μεγεθών. Μικρής κλίμακας (50ml) για δοκιμή έκφρασης της πρωτεΐνης και μεγάλης κλίμακας (1L) για παραγωγή και απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

### 2.2.2 Υλικά

Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB

Αντιβιοτικά stock 30 mg/ml Chloramphenicol, 30mg/ml Ampicillin

Αποικίες ανασυνδυσαμένων βακτηρίων

Αποστειρωμένες φιάλες υγρών καλλιέργειών

Πάγος

Λυχνία

### 2.2.3 Πειραματική πορεία

#### Προκαλλιέργεια βακτηρίων (5ml, 50 ml)

Τα αντιβιοτικά μεταφέρονται από τους  $-20^{\circ}\text{C}$  στον πάγο ώστε να ξεπαγώσουν. Για τις καλλιέργειες μικρής κλίμακας οι προκαλλιέργειες που χρησιμοποιούνται είναι 5ml ενώ για τις μεγάλης 50ml. Θρεπτικό υλικό μεταφέρεται ασηπτικά σε αποστειρωμένα φιαλίδια (falcon) των 15 ml ή αντίστοιχα σε αποστειρωμένες φιάλες . Κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 50μg/ml Ambicillin και 34μg/ml Chloramphenicol, προστίθεται ασηπτικά και στη συνέχεια γίνεται εμβολιασμός με μια μεμονωμένη καλλιέργεια βακτηρίων από το τριβλίο. Οι υγρές καλλιέργειες επωάζονται στους  $37^{\circ}\text{C}$  ολονύκτια υπό ανάδευση (200rpm).

#### Καλλιέργεια βακτηρίων (50ml, 1000ml)

Τα αντιβιοτικά μεταφέρονται από τους  $-20^{\circ}\text{C}$  στον πάγο ώστε να ξεπαγώσουν. Οι καλλιέργειες μικρής κλίμακας είναι 50ml ενώ για την παραγωγή της πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται δύο καλλιέργειες των 500ml .Φιάλες που περιέχουν αποστειρωμένο θρεπτικό επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου. Κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού προστίθεται ασηπτικά ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 50μg/ml Ambicillin και 34μg/ml Chloramphenicol και στη συνέχεια γίνεται εμβολιασμός με μια προκαλλιέργεια βακτηρίων η οποία έχει επωαστεί ολονύκτια στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Η αραίωση που χρησιμοποιείται για τον

εμβολιασμό είναι 1:20. Οι υγρές καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C μέχρι η απορρόφηση στα 600nm ( $D_{600}$ ) να είναι ίση με 0,6, που αντιστοιχεί στην εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων.

### 2.3 Επαγωγή έκφρασης πρωτεΐνης

Η επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιείται μέσω προσθήκης IPTG, η οποία αποτελεί ένωση μιμητή της λακτόζης. Απουσία λακτόζης στο κύτταρο, η πρωτεΐνη καταστολέας lac, προσδένεται ισχυρά στον προαγωγέα του γονιδίου ένθεσης με αποτέλεσμα να αποτρέπει την πρόσδεση της T7 RNA πολυμεράσης και συνεπώς υπάρχει καταστολή της έκφρασης. Με την προσθήκη IPTG, η ένωση προσδένεται στην πρωτεΐνη καταστολέα, αλλάζοντας τη διαμόρφωσή της. Η θέση του προαγωγέα πλέον είναι ελεύθερη για την πρόσδεση της T7 RNA πολυμεράσης με αποτέλεσμα την έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης (Bonner, 2007)( Ahmad, 2011).

#### 2.5.1. Υλικά

Διάλυμα IPTG 0,1M

Καλλιέργεια βακτηρίων ( $D_{600} = 0,6$ )

Πάγος

Λυχνία

#### 2.5.2 Πειραματική πορεία

Διάλυμα IPTG 0,1 M παρασκευάζεται , φιλτράρεται (0.22  $\mu\text{m}$ ) και φυλάσσεται στον πάγο. Οι καλλιέργειες επωάζονται για μία ώρα πριν την επαγωγή έκφρασης στην επιθυμητή θερμοκρασία επαγωγής (16°C, 18°C, 20°C). Ποσότητα IPTG (0,25mM - 0,5mM) προστίθεται στις καλλιέργειες βακτηρίων ασηπτικά και ακολουθεί επώαση ολονύκτια υπό ανάδευση στην επιθυμητή θερμοκρασία.

## 2.6 Λύση κυττάρων

Για τη λύση των κυττάρων και την απελευθέρωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της λύσης με υπέρηχους, έπειτα από την επαναδιασπορά και επώαση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης.

### 2.6.1 Υλικά

Imidazole (Mr= 68,08)

Tris-HCl (Mr=121,1)

NaCl (Mr= 58,44)

Triton X-10

Glycerol

Protease Inhibitors( 1x Roche complete)

Φυγόκεντρος

Ακίδα υπερήχων

Πάγος

### 2.6.2 Πειραματική πορεία

Επειτα από την επαγωγή της έκφρασης και την ανάπτυξη της υγρής καλλιέργειας τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση (5000 x g, 4°C, 30min). Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το κυτταρικό ίζημα κυττάρων διατηρείται στον πάγο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επαναδιασπορά των κυττάρων με 20 ml ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (20 mM Tris –HCl, 0,5M NaCl, 8mM Imidazole, 2% Glycerol ,0,5% Triton, 1 x Protease Inhibitors, pH 7,4). Το διάλυμα παρασκευάζεται, φιλτράρεται και φυλάσσεται στον πάγο. Η επαναδιασπορά και ομογενοποίηση πραγματοποιείται με 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης ανά 1L καλλιέργεια κυττάρων, με τη χρήση γυάλινης πιπέτας Pasteur. Τα κύτταρα

μεταφέρονται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο (falcon), προστίθενται 0,1% λυσοζύμη κι επωάζονται για 30min στους 4°C υπό ανάδευση.

### Χρήση υπερήχων:

Για τη θραύση της κυτταρικής μεμβράνης και την ομογενοποίηση του δείγματος χρησιμοποιήθηκε η χρήση υπερήχων με ακίδα. Τα δείγματα καθ όλη τη διάρκεια διατηρούνται στον πάγο ώστε να μην προκληθεί μετουσίωση της πρωτεΐνης.

Δείγματα μικρού όγκου (1ml) : 10sec x 3 επαναλήψεις με ενδιάμεσα διαλύματα 15sec στον πάγο

Δείγματα μικρού όγκου (5ml) : 20sec x 3 επαναλήψεις με ενδιάμεσα διαλύματα 20sec στον πάγο

Δείγματα μεγάλου όγκου (5ml) : 10sec x 10 επαναλήψεις με ενδιάμεσα διαλύματα 20sec στον πάγο

## **2.7 Φυγοκέντρηση για διαχωρισμό του κλάσματος που περιέχει τη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη**

- ✓ Στην περίπτωση που η καλλιέργεια των κυττάρων είναι μικρής κλίμακας για έλεγχο της έκφρασης της πρωτεΐνης, το ομογενοποιημένο διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρείται 10000 x g, 4°C, 30min, και διαχωρίζεται σε υπερκείμενο και κυτταρικό ίζημα. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιασπείρεται σε 5ml ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (2mM Tris –HCl, 0,5M NaCl, 8mM Imidazole, 2% Glycerol , 0,5% Triton, 1x Protease Inhibitors, pH 7,4). Στη συνέχεια ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με ανάλυση πηκτικής πολακρυλαμιδίου (SDS page analysis).
- ✓ Εφ' όσον έχει ελεγχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης και βρίσκεται στο διαλυτό μέρος του κυτταρολύματος, πραγματοποιείται επώαση με 2μl benzonase/ 1 L καλλιέργειας κυττάρων, στους 4°C, 15min υπό ανάδευση, ώστε γίνει θραύση του DNA στο κυτταρόλυμα . Στη συνέχεια πραγματοποιείται υπερφυγοκέντρηση του δείγματος στις 130000 x g (Beckman ti70 rotor) 30 min , 4°C. Το υπερκείμενο φυλάσσεται και πραγματοποιείται καθαρισμός με στήλη συγγένειας.
- ✓ Στην περίπτωση που η πρωτεΐνη δε βρίσκεται στο διαλυτό μέρος του δείγματος αλλά στο κυτταρικό ίζημα, ακολουθείται πρωτόκολλο καθαρισμού μέσω έγκλειστων σωματίων (inclusion

bodies). Το κυτταρόλυμα φυγοκεντρείται σε 10000 x g, 4°C, 30min , απομακρύνεται το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα φυλάσσεται στους -20°C.

## **2.8 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE)**

Η μεθόδους της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στο διαχωρισμό βιολογικών μορίων (πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων) με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους, καθώς αυτά κινούνται διαμέσου πορώδους υλικού υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Για τα πρωτεϊνικά μόρια, ο διαχωρισμός με βάση το μοριακό τους βάρος πραγματοποιείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Το πρωτεϊνικό διάλυμα επωάζεται παρουσία του δωδεκυλο θειικού νατρίου (sodium dodecyl sulfate SDS), το οποίο αποτελεί ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό που διαταράσσει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών. Ανιόντα του SDS προσδένονται σε αναλογία ενός ανιόντος ανά δυο αμινοξέα περίπου. Η αποδιάταξη της πρωτεΐνης οδηγεί στο σχηματισμό ενός ευθύγραμμου μορίου το οποίο φέρει ισχυρό αρνητικό φορτίο. Με το τρόπο αυτό είναι δυνατός ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του δείγματος με βάση μόνο το μέγεθός τους και όχι το φορτίο ή το σχήμα τους (Stryer Biochemistry, Fifth edition 2002).

Για το σχηματισμό της πηκτής πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται κατάλληλο διάλυμα που περιέχει μίγμα ακρυλαμιδίου, Tris-HCl, SDS, APS, TEMED. Παρασκευάζονται δυο διαφορετικές ζώνες πηκτώματος (running gel, stacking gel ) με διαφορετική σύσταση και πάχος. Σε κάθε περίπτωση το μείγμα που χρησιμοποιείται καθορίζει και το ποσοστό ακρυλαμιδίου στο πήκτωμα (11%,12%,15%) και συνεπώς το μέγεθος των πόρων. Τα μικρά πρωτεϊνικά μόρια διατρέχουν το πήκτωμα με μικρότερη ταχύτητα καθώς παγιδεύονται εντός των πόρων , ενώ τα μεγαλύτερα με μεγαλύτερη ταχύτητα. Η παρατήρηση του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται με χρώση του πηκτώματος με χρωστική που περιέχει Coomassie blue και προσδένεται στα πρωτεϊνικά μόρια, επομένως έπειτα από τον αποχρωματισμό του πηκτώματος, παρατηρούνται μόνο μπλε ζώνες στα σημεία που βρίσκονται οι πρωτεΐνες, ενώ ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους πραγματοποιείται με τη χρήση μείγματος πρωτεϊνών μαρτύρων (Stryer Biochemistry, Fifth edition 2002).

### 2.8.1 Υλικά

30% acrylamide mix

Tris-HCl, (1.5 M, pH 8.8) (1.0 M, pH 6.8)

SDS (10%, 4% w/v)

Ammonium persulfate (APS) (10% w/v)

Glycerol 100%

1M DTT (dithiothreitol)

Brilliant Blue R-250

TEMED

Απιονισμένο νερό

Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Συσκευή παραγωγής ηλεκτρικού πεδίου

### 2.8.2 Διαλύματα

#### **1× Διάλυμα παρασκευής δειγμάτων (Loading buffer)**

100 mM Tris-Cl (pH 6.8)

4% (w/v) SDS

0.2% (w/v) Brilliant Blue R-250

20% (v/v) glycerol

200 mM DTT



### **Διάλυμα Χρώσης (Staining buffer )**

0.1 % (w/v) Brilliant Blue R-250

5 % (v/v) Acetic acid

50% (v/v) Methanol

### **Διάλυμα Αποχρωματισμού (Destaining buffer)**

5 % (v/v) Acetic acid

50% (v/v) Methanol

### **Διάλυμα Ξήρανσης πηκτής (Drying buffer)**

20 % (v/v) Ethanol

2 % (v/v) Glycerol

### **5X Διάλυμα Tris- Glycine (Running buffer)**

15.1 g Tris

94 g glycine

50 ml 10% SDS

## 2.8.3 Πειραματική πορεία

### **2.8.3.1 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου**

Τα 2 γυάλινα τμήματα της συσκευής ηλεκτροφόρησης συναρμολογούνται για την παρασκευή του πηκτώματος. Αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα 12% για το διαχωρισμό (Running gel). Στη συνέχεια, τοποθετείται μεταξύ των δυο γυάλινων επιφανειών της συσκευής έως το 60% του όγκου που

δέχονται κι έπειτα προστίθεται βουτανόλη. Εφ όσων το μίγμα πήξει, η βουτανόλη απομακρύνεται και η επιφάνεια του πηκτώματος στεγνώνεται καλά. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το Stacking με το οποίο πληρώνεται ο χώρος μεταξύ των γυάλινων επιφανειών και στην άκρη το τοποθετείται η υποδοχή για το σχηματισμό των πηγαδιών φόρτωσης δειγμάτων. Εφ όσων το πήκτωμα πολυμεριστεί, αφαιρείται η υποδοχή για το σχηματισμό των πηγαδιών και το σχηματισμένο πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης έπειτα από έκπλυση με απιονισμένο νερό. Η συσκευή πληρώνεται με 1x διάλυμα Tris-Glycine εως το 60% του όγκου της.

### **2.8.3.2 Παρασκευή δειγμάτων**

Για την παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιείται 2x διάλυμα (Loading buffer) σε αναλογία 1:1 ή 5x διάλυμα σε αναλογία 1:10. Τα δείγματα επιάζονται στους 100°C για 10min ώστε να αναδιαταχτούν οι πρωτεΐνες κι έπειτα δείγμα κατάλληλου όγκου φορτώνεται στο πήκτωμα. Επιπλέον προστίθενται μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των δειγμάτων. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 120V έως ότου το μέτωπο της χρωστικής διατρέξει όλο το μήκος του πηκτώματος.

### **2.8.3.3 Παρατήρηση πηκτώματος έπειτα από την ηλεκτροφόρηση**

Η χρώση του πηκτώματος πραγματοποιείται με διάλυμα χρώσης το οποίο καλύπτει την επιφάνεια του πηκτώματος, κι εφ όσων το πήκτωμα έχει μεταφερθεί σε πλαστικό δοχείο. Για τη χρώση γίνεται επώαση για περίπου μία ώρα υπό ανάδευση (100rpm). Για τον αποχρωματισμό γίνεται αρχικά έκπλυση με νερό, εφ όσων απομακρυνθεί η περίσσεια χρωστικής κι έπειτα συνεχόμενες εκπλύσεις με διάλυμα αποχρωματισμού. Τέλος για το στέγνωμα του πηκτώματος, χρησιμοποιούνται μεμβράνες στις οποίες τοποθετείται το πήκτωμα έπειτα από επώαση της μεμβράνης με διάλυμα ξήρανσης. Απομακρύνεται ο αέρας που εγκλωβίζεται και η μεμβράνη αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσει για περίπου 1 ημέρα.

## 2.9 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μια φασματοφωτομετρική μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε ανά διάλυμα. Η μέθοδος βασίζεται στη αλλαγή χρώματος κι επομένως στην απορρόφηση του φωτός, της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία κάτω από όξινες συνθήκες εμφανίζει κόκκινο χρώμα. Παρουσία πρωτεΐνης στο διάλυμα, το χρώμα της χρωστικής μεταβάλλεται από κόκκινο σε μπλέ, λόγω της δημιουργίας συμπλόκου μεταξύ χρωστικής και πρωτεΐνης. Η απορρόφηση του διαλύματος χρωστικής- πρωτεΐνης στη συνέχεια εμφανίζει απορρόφηση στα 595nm όπου πραγματοποιείται και η μέτρηση του δείγματος. Η σχέση μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης πρωτεΐνης είναι γραμμική και μπορεί να προσδιοριστεί με τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς με πρωτεΐνες γνωστής συγκέντρωσης. Από τον προσδιορισμό της γραμμικής αυτής σχέσης είναι δυνατός ο προσδιορισμός τελικά της άγνωστης συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα, από τη μέτρηση απορρόφησης του δείγματος στα 595 nm (Bonner 2007).

### 2.9.1 Υλικά

Αντιδραστήριο Bradford

Απιονισμένο νερό

Φασματοφωτόμετρο

### 2.9.2 Πειραματική πορεία

Σε φιαλίδιο (ependorf) μεταφέρονται 200μl αντιδραστηρίου Bradford (τελική αραίωση 1:5). Για το τυφλό δείγμα προστίθενται 800μl απιονισμένου H<sub>2</sub>O, ενώ για τη μέτρηση του πρωτεϊνικού δείγματος προστίθεται ποσότητα πρωτεΐνης (5μl-10μl) και συμπληρώνεται ο όγκος δείγματος με απιονισμένο H<sub>2</sub>O έως το 1ml. Τα δείγματα αναδεύονται ελαφρώς, και μεταφέρονται σε κυψελίδα φωτομέτρησης. Η απορρόφηση στα 595nm μηδενίζεται με χρήση του τυφλού δείγματος και στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση του πρωτεϊνικού δείγματος. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται από τη σχέση (1) :

$$C = A_{595} V_{\text{δείγματος}} / \alpha \quad (1)$$

C : συγκέντρωση πρωτεΐνης

$A_{595}$  : απορρόφηση δείγματος στα 595 nm

$V_{\text{δείγματος}}$  : όγκος πρωτεΐνης (5μl-10μl)

$\alpha$  : συντελεστής απορρόφησης , προκύπτει από τη καμπύλη αναφοράς και για τα συγκεκριμένα πειράματα ήταν 16.

## **2.10 Απομόνωση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από έγκλειστα σωματία (inclusion bodies)**

Η υψηλού επιπέδου έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* σε ορισμένες περιπτώσεις έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των έγκλειστων σωματίων, τα οποία αποτελούν μη διαλυτά συσσωματώματα της πρωτεΐνης που εκφράζεται. Τα έγκλειστα σωματία σχηματίζονται συνήθως στο κυτταρόπλασμα και μπορούν να απομονωθούν από το κυτταρόλυμα με φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται έκπλυση των έγκλειστων σωματίων με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιέχει απορρυπαντικό (TritonX-100), γουανιδίνη και αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) ώστε να απομακρυνθούν τα συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης που προέκυψαν από τη λύση των κυτάρων, καθώς και οι βακτηριακές μη επιθυμητές πρωτεΐνες. Για την απομόνωση της διαλυτής πρωτεΐνης, πραγματοποιείται διαλυτοποίηση των κυτταρικό ίζημα που έχουν εκπλυθεί, υπο διατακτικές συνθήκες. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη απομονώνεται αποδιαταγμένη και στη συνέχεια πραγματοποιείται αναδίπλωσή της στη βιολογικά ενεργή της διαμόρφωση, με σταδιακή αφαίρεση του αποδιατακτικού παράγοντα, πριν τον περαιτέρω καθαρισμό (Palmer *et al.*, 2012).

### **2.10.1 Υλικά**

1 M Tris-HCl (pH = 8)

0, 5 M EDTA (pH = 8)

NaCl (Mr = 58,44)

0,1 M PMSF

L- Arginine ( Mr= 174,2)

Glutathione oxidized (Mr = 612, 6)

Glutathione reduced (Mr = 307, 3)

Triton X-100

dd H<sub>2</sub>O

Ομογενοποιητής

Φυγόκεντρος (4°C)

Πάγος

## 2.10.2 Διαλύματα

### **Διάλυμα έκπλυσης (IB wash buffer) 500ml:**

50 mM Tris-HCl (pH = 8)

2mM EDTA

0,3 M NaCl

1mM PMSF

dd H<sub>2</sub>O

### **Διάλυμα αποδιάταξης (Denaturation buffer) 15 ml:**

0,1M Tris-HCl (pH = 8)

6M Guanidine Hydrochloride

2mM EDTA

80mM Glutathione reduced (GSH)

dd H<sub>2</sub>O

**Διάλυμα αναδίπλωσης (Refolding buffer) :**

0,1M Tris-HCl (pH = 8)

0,5 M L-Arginine

Glutathione oxidized (GSSG)

Ο όγκος του διαλύματος αναδίπλωσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Η επιθυμητή συγκέντρωση πρωτεΐνης στο διάλυμα είναι 100 µg/ml . Με βάση τη συγκέντρωση καθορίζεται η συγκέντρωση της GSSG ώστε  $[GSH] / [GSSG] = 1 : 4$

### 2.10.3 Πειραματική πορεία

#### **2.10.3.1 Έκπλυση των μη διαλυτών έγκλειστων σωματίων**

Το διάλυμα έκπλυσης παρασκευάζεται, χωρίζεται σε δύο ποσότητες των 300ml και 200 ml, φιλτράρεται και διατηρείται στον πάγο. Τα κυτταρικό ίζημα των κυττάρων, εφ όσον έχουν διατηρηθεί στους -20°C μεταφέρονται στον πάγο ώστε να ξεπαγώσουν. Πραγματοποιούνται συνολικά τέσσερις εκπλύσεις. Για τις δύο πρώτες εκπλύσεις χρησιμοποιούνται τα 300 ml διαλύματος έκπλυσης στα οποία προστίθεται 0,1 % Triton X-100, ενώ για τις δυο τελευταίες τα υπόλοιπα 200 ml . Σε κάθε φιαλίδιο φυγοκέντρησης προστίθενται 10 ml περίπου διάλυμα έκπλυσης και το κυτταρικό ίζημα κυττάρων διαλυτοποιείται με χρήση γυάλινης ράβδου και μεταφέρεται σε σωλήνα ομογενοποίησης. Τα κύτταρα ομογενοποιούνται με χρήση μηχανικού ομογενοποιητή εφ όσον προστεθούν άλλα 10 ml διαλύματος έκπλυσης και μεταφέρονται σε φιαλίδια φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται 17000 x g, 4°C, 1 h , απομακρύνεται το υπερκείμενο και πραγματοποιείται η επόμενη έκπλυση με τα ίδια βήματα. Έπειτα από τη τελευταία έκπλυση , ου πραγματοποιείται με 7 ml διαλύματος έκπλυσης ανά φιαλίδιο, τα κύτταρα μεταφέρονται σε ένα φιαλίδιο φυγοκέντρησης, φυγοκεντρείται εκ νέου σε 17000 x g, 4°C, 1 h, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το κυτταρικό ίζημα φυλάσσεται στους -20°C.

### **2.10.3.2 Διαλυτοποίηση σε αποδιατακτικές συνθήκες:**

Τα κυτταρικό ίζημα κυττάρων μεταφέρονται από τους  $-20^{\circ}\text{C}$  στο πάγο. Παρασκευάζεται το διάλυμα αποδιάταξης και φιλτράρεται. Προστίθεται 14 ml από το διάλυμα και το κυτταρικό ίζημα κυττάρων διαλυτοποιείται με χρήση γυάλινης ράβδου και μεταφέρεται σε σωλήνα ομογενοποίησης. Τα κύτταρα ομογενοποιούνται με χρήση μηχανικού ομογενοποιητή. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε φιαλίδιο υπερφυγοκέντρωσης κι επωάζονται στους  $4^{\circ}\text{C}$  υπό ανάδευση για 2 h. Έπειτα πραγματοποιείται υπερφυγοκέντρωση του δείγματος στις  $130000 \times g$  (Beckman ti70 rotor) 30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ . Το υπερκείμενο φυλάσσεται καθώς περιέχει τη διαλυτή πλέον αποδιαταγμένη πρωτεΐνη.

### **2.10.3.3 Αναδίπλωση της πρωτεΐνης**

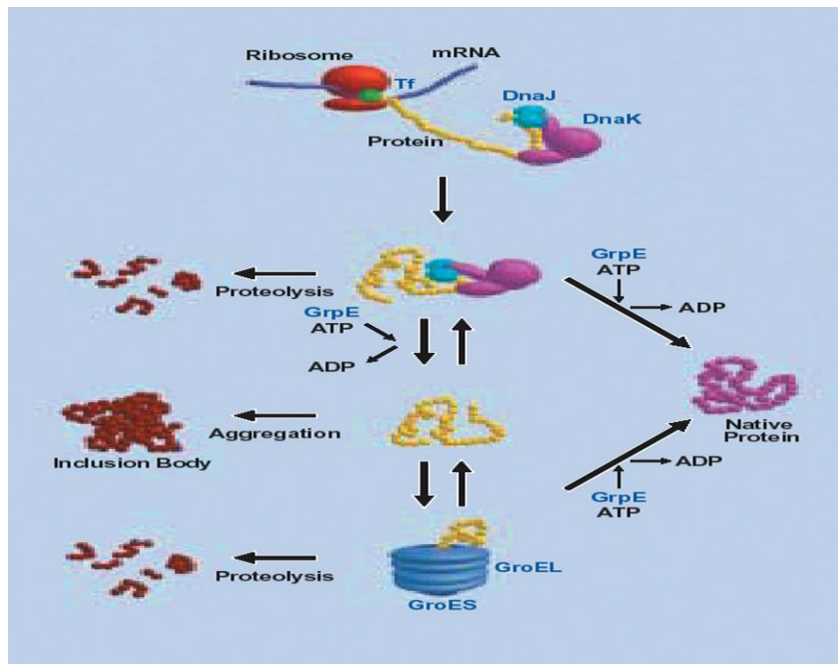
Το υπερκείμενο των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών διατηρείται στον πάγο και προσδιορίζεται η συγκέντρωση με τη μέθοδο Bradford, ενώ ελέγχεται και με ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης (SDS). Ανάλογα με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης παρασκευάζεται και ο κατάλληλος όγκος διαλύματος αναδίπλωσης και φιλτράρεται. Το διάλυμα αναδίπλωσης μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και το διάλυμα της αποδιαταγμένης πρωτεΐνης σε προχοΐδα με χαμηλή ροή. Η αναδίπλωση πραγματοποιείται στους  $4^{\circ}\text{C}$ , με ήπια ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 72 h.

Έπειτα από την αναδίπλωση της πρωτεΐνης και πριν τον καθαρισμό είναι απαραίτητη η συμπύκνωση του δείγματος, σε τελικό όγκο 30ml περίπου.

## **2.11 Συνέκφραση πρωτεΐνης *Cfd1* σε πλασμιδιακό φορέα *pRSET-A* και τσαπερονίων**

Η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε ορισμένες περιπτώσεις στη δημιουργία συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών (έγκλειστων σωματίων) λόγω λανθασμένης αναδίπλωσής τους. Οι πρωτεΐνες των τσαπερονίων αποτελούν μόρια τα οποία φυσιολογικά διευκολύνουν και ρυθμίζουν τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών εντός του κυττάρου. Αναλυτικότερα, μέσα από κύκλους πρόσδεσης κι απελευθέρωσης των πρωτεϊνών, αποτρέπουν τη λανθασμένη αναδίπλωσή τους και το σχηματισμό των συσσωματωμάτων (Εικόνα 2.5). Η συνέκφραση των τσαπερονίων μαζί με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες στο ίδιο κύτταρο μπορεί να σε αυτές τις

περιπτώσεις να επάγει την αναδίπλωση της πρωτεΐνης και συνεπώς τη διαλυτότητά της, εξυπηρετώντας τη δυνατότητα απομόνωσης από το διαλυτό κλάσμα του κυτταρολύματος (Ali *et al.*, 2010)



**Εικόνα 2.5:** Αναδίπλωση πρωτεΐνης με τη συμμετοχή των τσαπερονίων *in vivo* (TaKaRa Bio Inc)

### 2.11.1 Υλικά

Αντιβιοτικά stock 30 mg/ml Chloramphenicol, 30mg/ml Ampicillin, 50mg/ml L-Arabinose, 10μg/ml Tetracyclin

Διάλυμα IPTG 0,1M

Κύτταρα BL21(DE3) 20μl (-80°C)

Πλασμιακό DNA

Θρεπτικό υλικό LB (agar) , SOC medium

Στερεές καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό (20μg/ml Chloramphenicol, 50μg/ml Carbenicillin)

Υδατόλουτρο

Λυχνία



Πάγος

## 2.11.2 Πειραματική πορεία

### Μετασχηματισμός κυττάρων

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι όμοια με την παράγραφο 2.3. Συνολικά 5 φιαλίδια (erpendorf) που περιέχουν 20 μl κυττάρων μεταφέρονται από τους -80°C στον πάγο και προστίθεται 1μl πλασμιδιακού φορέα pRSET-A και 1μl πλασμιδιακού φορέα που περιέχει τα τσαπερόνια (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16). Ο μετασχηματισμός πραγματοποιείται όμοια με την παράγραφο 2.3.

### Επαγωγή έκφρασης τσαπερονίων

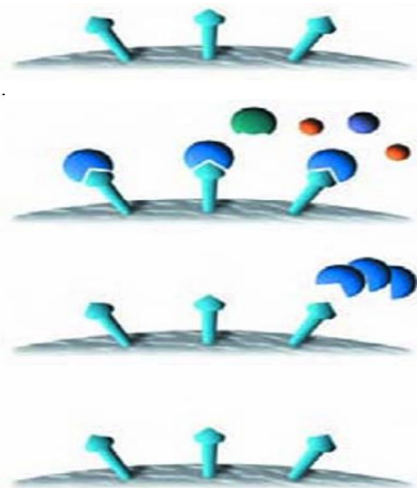
Η επαγωγή της έκφρασης των τσαπερονίων πραγματοποιήθηκε πριν την έκφραση της Cfd1. Η επαγωγή της έκφρασης για τους φορείς, pGro7, pKJE7 και pTf16 πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη L -Arabinose σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml για το φορέα pG-Tf2 προστέθηκε tetracycline τελικής συγκέντρωσης 5ng/ml ενώ για τον pG-KJE8 L -Arabinose σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml και προστέθηκε tetracycline τελικής συγκέντρωσης 5ng/ml. Τα αντιβιοτικά προστίθενται πριν τον εμβολιασμό της υγρής καλλιέργειας με την ολονύχτια καλλιέργεια. Για την επαγωγή της έκφρασης της Cfd1 προστίθεται IPTG (0,25mM - 0,5mM) εφ' όσον η απορρόφηση των κυττάρων στα 600nm ( $D_{600}$ ) είναι ίση με 0,6 .

## **2.12 Καθαρισμός ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας και μοριακού αποκλεισμού**

### 2.12.1 Χρωματογραφία συγγένειας

Η μέθοδος της χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό της επιθυμητής πρωτεΐνης από ένα μείγμα πρωτεϊνών, και στηρίζεται στις παροδικές ειδικές αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται μέσω μορίων ενός προσδέτη (στατική φάση) και των πρωτεϊνικών μορίων στο διάλυμα (κινητή φάση). Μπορεί να διαχωριστεί σε τρία βασικά στάδια : την πρόσδεση του δείγματος ,

την έκπλυση του διαλύτη και την έκλουση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Κατά την πρόσδεση, το ακάθαρτο δείγμα (κυτταρόλυμα) διέρχεται διαμέσου της στήλης και η επιθυμητή πρωτεΐνη προσδένεται στον ακινητοποιημένο προσδέτη που βρίσκεται στο υπόστρωμα της στήλης μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων. Η έκπλυση του μη προσδεμένου δείγματος στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέσω ρυθμιστικών διαλυμάτων που διατηρούν όμως σταθερές τις συνθήκες για τις αλληλεπιδράσεις πρόσδεσης μεταξύ του ακινητοποιημένου υποκαταστάτη και της πρωτεΐνης. Η έκλουση της επιθυμητής πρωτεΐνης πραγματοποιείται, αλλάζοντας τις συνθήκες που επιτρέπουν την πρόσδεση μεταξύ των μορίων προσδέτη και της πρωτεΐνης. Στην περίπτωση αυτή, η συνθήκη ισορροπίας μεταξύ της προσδεμένης πρωτεΐνης και της ελεύθερης στο διάλυμα, μετακινείται προς την κατεύθυνση της ελεύθερης πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η αποδέσμευσή της. Η έκλουση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε αλλάζοντας σταδιακά τις συνθήκες του διαλύματος (βαθμιδωτή έκλουση) είτε σε ένα βήμα, ενώ οι αλλαγές μπορεί να αφορούν αλλαγή στην ιοντική ισχύ, το pH, την πολικότητα ή πιο ειδικά, χρησιμοποιώντας ένα μόριο προσδέτη που λειτουργεί ανταγωνιστικά προς τον ακινητοποιημένο προσδέτη για τη σύνδεση στη πρωτεΐνη. Πριν από την πρόσδεση του δείγματος κι έπειτα από την έκλουση είναι απαραίτητη η εξισορρόπηση της στήλης με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, ώστε υπολείμματα προσδεμένων πρωτεϊνών να απομακρυνθούν (Εικόνα 2.5) (Bonner ,2007)( Ahmad, 2011).



***Εικόνα 2.5 :*** Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων καθαρισμού του πρωτεϊνικού δείγματος με χρωματογραφία συγγένειας. Από επάνω προς τα κάτω, εξισορρόπηση της στήλης , πρόσδεση της πρωτεΐνης στα ακινητοποιημένα μόρια προσδετών κι έκπλυση των μη προσδεμένων μορίων, έκπλυση της πρωτεΐνης, εξισορρόπηση της στήλης (GE Healthcare Life Science)

### Καθαρισμός με χρήση στήλης ιόντων μετάλλου (IMAC)- Στήλη Ni-NTA

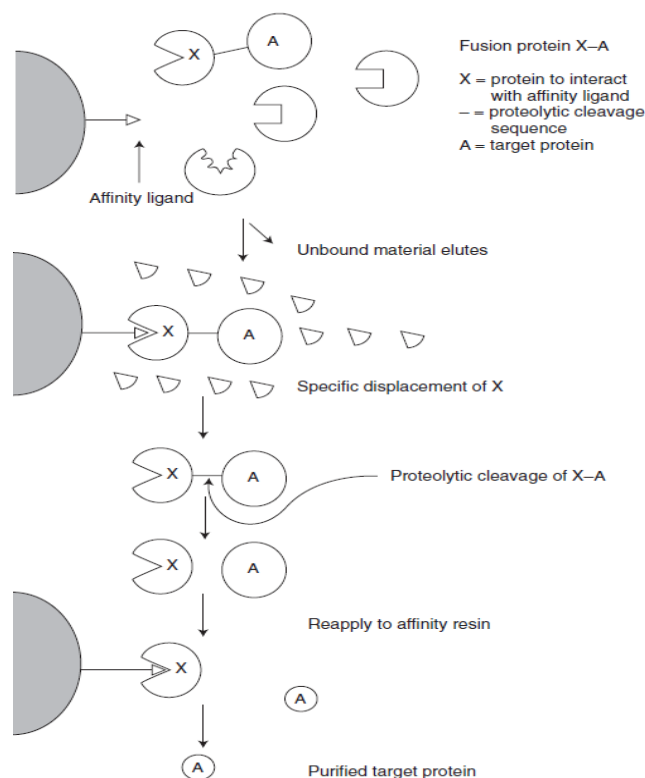
Η μέθοδος καθαρισμού με χρήση στήλης νικελίου στηρίζεται στη χρωματογραφία συγγένειας. Στην περίπτωση αυτή ο ακινητοποιημένος υποκαταστάτης είναι ιόντα μετάλλου και συγκεκριμένα νικελίου στα οποία προσδένονται μέσω ειδικών παροδικών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνες οι οποίες έχουν μια αλληλουχία πολλαπλών ιστιδινών (poly- His tag). Η ιστιδίνη αποτελεί το αμινοξύ που παρουσιάζει την ισχυρότερη πρόσδεση στα ακινητοποιημένα ιόντα Ni, λειτουργώντας ως ηλεκτρονιοδότης και σχηματίζοντας δομές συντονισμού μέσω του δακτυλίου ιμιδαζολίου που περιέχει. Με το τρόπο αυτό, πεπτίδια που περιέχουν αλληλουχίες από διαδοχικές ιστιδίνες (4-6) προσδένονται στα ακινητοποιημένα ιόντα της στήλης με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους. Ωστόσο, επειδή τα διαδοχικά κατάλοιπα ιστιδίνης είναι δύσκολο να υπάρχουν στην αλληλουχία των περισσότερων πρωτεϊνών φυσικά, χρησιμοποιούνται ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες στις οποίες προστίθεται είτε στο αμινοτελικό, είτε στο καρβοξυτελικό άκρο μια αλληλουχία έξι διαδοχικών ιστιδινών (His tag) μέσω ένθεσης του γονιδίου της πρωτεΐνης σε κατάλληλο φορέα έκφρασης. Η έκλουση της πρωτεΐνης μπορεί να πραγματοποιηθεί από τη στήλη αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ιμιδαζολίου στο διάλυμα, ενώ η απομάκρυνση της «ουράς ιστιδίνης» μπορεί να πραγματοποιηθεί και με ειδική πρωτεόλυση (Bonner, 2007)(Terpe, 2003).

### Καθαρισμός με χρήση στήλης GST (Glutathione S-transferase-tag)

Μία ακόμη μέθοδος για τον καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι η χρήση της στήλης GST, στην οποία προσδένονται ειδικά ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που έχουν συντηχθεί με την πρωτεΐνη GST (Glutathione S-transferase). Η GST αποτελεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 26 kDa, η οποία μπορεί να συντηχθεί με την επιθυμητή πρωτεΐνη μέσω ένθεσης του γονιδίου της δεύτερης σε κατάλληλο φορέα έκφρασης (pGEX vector). Ο λόγος που χρησιμοποιείται η συγκεκριμένη μεθοδολογία, είναι αφενός διότι εξυπηρετεί τον καθαρισμό της επιθυμητής πρωτεΐνης, ενώ αφετέρου σε ορισμένες περιπτώσεις η χρήση της GST αυξάνει τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Η πρόσδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στη στήλη πραγματοποιείται μέσω της «ουράς GST» η οποία προσδένεται σε ακινητοποιημένη γλουταθειόνη της στήλης. Η αποκοπή της συγχωνευμένης GST επιτυγχάνεται με τη χρήση πρωτεάσης 3C του ανθρώπινου ρινοϊού. Η πρωτεάση κόβει ειδικά, στην αλληλουχία LeuGluValLeuPheGln/GlyPro και συγκεκριμένα μεταξύ Gln και Gly, απομονώνοντας την επιθυμητή πρωτεΐνη από τη GST (Εικόνα 2.6). Η έκλουση στη συνέχεια πραγματοποιείται με τη χρήση

κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει και ανηγμένη γλουταθειόνη, ώστε να απομακρυνθεί και η προσδεμένη GST από τη στήλη (Bonner, 2007)(Terpe, 2003).

Η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος διαχωρίζεται από την ελεύθερη GST με διέλευση από δεύτερη στήλη γλουταθειόνης. Εναλλακτικά η πρωτεόλυση λαμβάνει χώρα με ένεση της πρωτεάσης στην στήλη, επώαση για 48 h, 4 C, σύνδεση με δεύτερη στήλη και έκλυση με ρυθμιστικό διάλυμα. Σε αυτή τη περίπτωση η ελεύθερη πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος εκλύεται από τις δύο στήλες ενώ η ελεύθερη GST δεσμεύεται από τη δεύτερη στήλη.



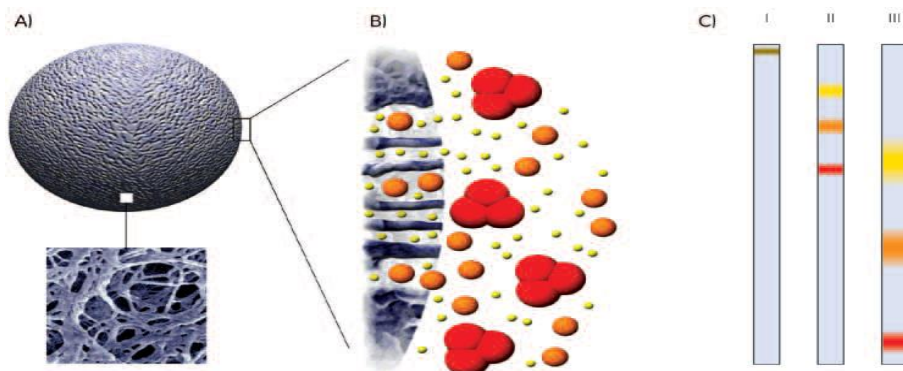
**Εικόνα 2.6 :** Σχηματική απεικόνιση χρωματογραφίας συγγένειας με χρήση GST στήλης. Πρόσδεση της ανασυνδρασμένης GST – πρωτεΐνης, αποκοπή της GST και έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης (Bonner ,2007)

### 2.12.2 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC-Size Exclusion Chromatography)

Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού αποτελεί μια αναλυτική μέθοδο για το διαχωρισμό των βιολογικών μορίων (πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα και ολιγοσακχαρίτες) με βάση το μοριακό τους

βάρος και το σχήμα τους. Είναι επίσης γνωστή ως χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής (gel permeation chromatography) ή χρωματογραφία διήθησης πηκτής (gel filtration chromatography). Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται δια μέσου μιας πορώδους επιφάνειας που διαμορφώνεται από μόρια δεξτράνης, πολυακρυλαμίδης, πυριτίου ή πολυμερών (Εικόνα 2.7). Σε αντίθεση με τη χρωματογραφία συγγένειας στη SEC δεν υπάρχει αλληλεπίδραση του υποστρώματος της στήλης με την πρωτεΐνη, ενώ το διάλυμα που χρησιμοποιείται για την έκλυση δεν επηρεάζει άμεσα την αποδέσμευση από τη στήλη. Τα μόρια του διαλύματος κινούνται δια μέσου του πορώδους το οποίο έχει συγκεκριμένο μέγεθος πόρων (Bonner ,2007).

Μόρια με μέγεθος μεγαλύτερο από αυτό των πόρων διατρέχουν τη στήλη χωρίς να εισέρχονται εντός του πορώδους υλικού, με αποτέλεσμα να εξέρχονται πρώτα. Ο όγκος διαλύματος στον οποία εντοπίζεται αυτή η πρώτη κορυφή στο διάγραμμα απορρόφησης UV- όγκου διαλύματος, αντιστοιχεί στον όγκο που καταλαμβάνει το διάλυμα εξωτερικά του υλικού πλήρωσης. Αντίστοιχα, μόρια μικρού μοριακού βάρους διατρέχουν το μήκος της στήλης σε όγκο που αντιστοιχεί, τόσο σε αυτό που περιβάλλει το υλικό πλήρωσης αλλά και σε αυτό που εγκλωβίζεται εντός των πόρων του υλικού, καθώς εισέρχονται σε αυτούς. Επομένως, τα μόρια του δείγματος εκλούνται από τη στήλη ανάλογα με το μέγεθός τους, με τα μεγαλύτερα μόρια να εκλούνται στην αρχή και τα μικρότερα στο τέλος (Εικόνα). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται στη φυσική του διαμόρφωση χωρίς να αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα της στήλης, με αποτέλεσμα να έχουν καλή ανάκτηση της βιολογικής δραστηριότητάς τους. Ωστόσο η μέθοδος της SEC παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα, λόγω του μικρού όγκου δείγματος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί αλλά και της αραίωσης του δείγματος, για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται προς τα τελικά στάδια της διαδικασίας καθαρισμού (Bonner, 2007).



**Εικόνα 2.7:** Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. *A.* Πορώδες υλικό στήλης. *B.* Διαχωρισμός των πρωτεϊνικών μορίων με βάση το μέγεθος και το σχήμα τους. *C.* Διαχωρισμός κλασμάτων κατά μήκος της στήλης (GE Healthcare Life Science)

### 2.12.3 Υλικά

Imidazole (Mr = 68.08)

Tris-HCl (Mr=121.1)

NaCl (Mr = 58.44)

Triton X-10 100%

Glycerol 100%

1M DTT

HPLC H<sub>2</sub>O

3C protease (4,5 mg/ml)

Glutathione Reduced (Mr= 307.7)

Στήλες συγγένειας HisTrap HP 5ml και GSTrap 4B 5ml (GE Healthcare Life Science)

Στήλη Superdex 200 (GE Healthcare Life Science)

AKTA purifier (GE Healthcare Life Science)

### 2.12.4 Διαλύματα

#### **Διαλύματα πρόσδεσης – εξισορρόπησης**

##### **Διάλυμα Α ( pH 8.2)**

20 mM Tris –HCl, 0.5M NaCl, 8mM Imidazole, 2% (v/v) Glycerol ,0.5% (v/v) Triton,

##### **Διάλυμα Β ( pH 8.2)**

50 mM Tris –HCl, 0.2M NaCl, 0.5mM DTT, 10% (v/v) Glycerol

#### **Διαλύματα έκλουσης**

##### **Διάλυμα Α ( pH 8.2)**

20 mM Tris –HCl, 0.5M NaCl, 500mM Imidazole, 2% Glycerol ,0.5% Triton

### Διάλυμα Β ( pH 8.2)

50 mM Tris –HCl, 0.2M NaCl, 0,5mM DTT, 20mM Glutathione Reduced ,10% (v/v) Glycerol

### Διαλύματα για χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

#### Διάλυμα Α ( pH 7.5)

20 mM Tris –HCl, 0.2M NaCl, 0,5mM DTT

#### Διάλυμα διαπίδυσης

#### Διάλυμα Α ( pH 7.5)

20 mM Tris –HCl, 0.2M NaCl, 0,5mM DTT

## 2.12.5 Πειραματική πορεία

*Καθαρισμός με χρήση στήλης HisTrap HP*



**Εικόνα 2.8 :** Στήλη συγγένειας HisTrap HP 5ml (*GE Healthcare Life Science*)

Χρησιμοποιείται για ανασυνδυσμένες πρωτεΐνες που φέρουν τον επίτοπο ιστοιδινών (His tag). Αρχικά πραγματοποιείται εξισορρόπηση τη στήλης με το διάλυμα πρόσδεσης του δείγματος χρησιμοποιώντας 5 όγκους στήλης με ροή 0,5- 1ml /min. Παράλληλα, το δείγμα της απομονωμένης

πρωτεΐνης έπειτα από φυγοκέντρηση φορτώνεται στη στήλη δείγματος (Superloop AKTA purifier). Ο όγκος του δείγματος κυμαίνεται από 25-30 ml. Το δείγμα προσδένεται σταδιακά στη στήλη με ροή περίπου 0,5 ml/ min. Έπειτα από την πρόσδεση ακολουθεί η έκλουση με χρήση διαλύματος έκλουσης (διαλύμα Α) και σταδιακή έκλουση του δείγματος με αύξηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση από το σύστημα καθαρισμού AKTA. Τα κλάσματα συλλέγονται με βάση την απορρόφηση στα 280nm κι ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 12%. Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη συγκεντρώνονται και τοποθετούνται εντός ημιπερατής μεμβράνης σε διάλυμα διαπίδυσης για 1 ημέρα πριν τον περαιτέρω καθαρισμό. Παράλληλα πραγματοποιείται έκπλυση της στήλης με H<sub>2</sub>O και αποθήκευση σε 20% αιθανόλη.

#### *Καθαρισμός με χρήση στήλης GSTrap 4B*



**Εικόνα 2.9 :** Στήλη συγγένειας GSTrap 4B 5ml (GE Healthcare Life Science)

Χρησιμοποιείται για ανασυνδυσμένες πρωτεΐνες συγχωνευμένες με GST. Αρχικά πραγματοποιείται εξισορρόπηση τη στήλης με το διάλυμα πρόσδεσης του δείγματος (Διάλυμα Β) χρησιμοποιώντας 5 όγκους στήλης με ροή 0,5 ml /min, 4°C. Παράλληλα, το δείγμα της απομονωμένης πρωτεΐνης έπειτα από φυγοκέντρηση φορτώνεται στη στήλη δείγματος (Superloop AKTA purifier). Ο



όγκος του δείγματος κυμαίνεται από 30-40 ml. Το δείγμα προσδένεται σταδιακά στη στήλη με ροή περίπου 0,5 ml/ min. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έκπλυση με το διάλυμα πρόσδεσης του δείγματος χρησιμοποιώντας 5 όγκους στήλης. Για την αποκοπή της GST παρασκευάζεται διάλυμα 1/20 w/w 3C σε διάλυμα πρόσδεσης το οποίο ενίεται με σύριγγα. και ακολουθεί επώαση για 48h στους 4°C. Για την έκλυση του δείγματος γίνεται εξισορρόπηση 2<sup>ns</sup> στήλης και στη συνέχεια συνδέεται στη σειρά με την 1<sup>n</sup> (Εικόνα 2.9). Η έκλυση γίνεται με 5 όγκους στήλης διαλύματος πρόσδεσης και στη συνέχεια με 10 όγκους στήλης διαλύματος έκλυσης (διάλυμα Β). Τα κλάσματα συλλέγονται με βάση την απορρόφηση στα 280nm κι ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 12%. Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη ενώνονται και τοποθετούνται εντός ημιπερατής μεμβράνης σε διάλυμα διαπίδυσης για 1 ημέρα πριν τον περαιτέρω καθαρισμό.

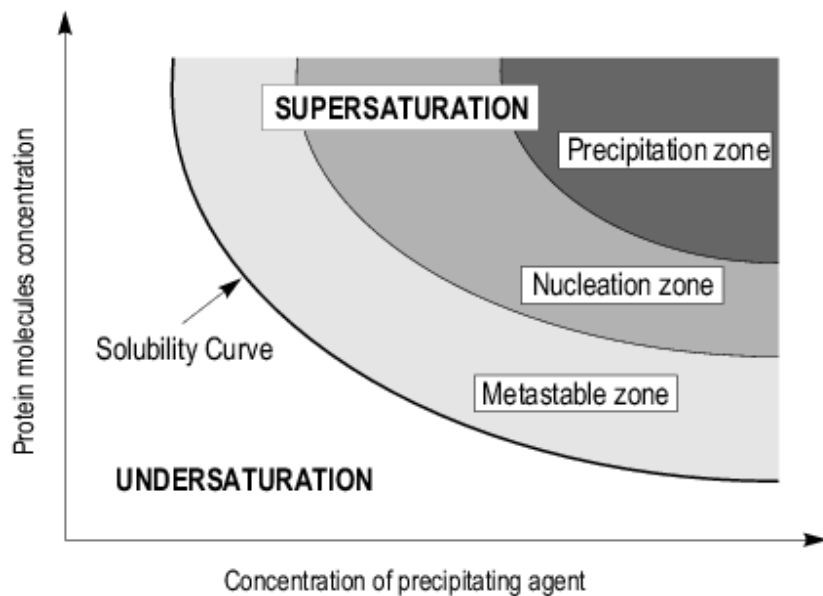
*Καθαρισμός με χρήση στήλης μοριακού αποκλεισμού .*

Η εξισορρόπηση της στήλης πραγματοποιείται με 1 όγκο στήλης , ενώ η έκλυση του δείγματος με 2 όγκους στήλης και ροή περίπου 1ml/min. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι κοινό (διάλυμα για χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού Α ή Β). Το πρωτεϊνικό δείγμα πριν τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού έχει καθαριστεί με χρωματογραφία συγγένειας κι έχει τοποθετηθεί σε διάλυμα διαπίδυσης ώστε να γίνει αλλαγή των συστατικών του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο βρίσκεται. Πριν την εισαγωγή του δείγματος είναι απαραίτητη η συμύκνωσή του σε τελικό όγκο 500μl -800μl. Η συμύκνωση πραγματοποιείται με χρήση φίλτρου υπερδιήθησης (MWCO 10 kDa) και φυγοκέντρηση 15000 x g, 15min, 4°C . Τα κλάσματα συλλέγονται με βάση την απορρόφηση στα 280nm κι ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 12%. Τα κλάσματα που περιέχουν τη τελική πρωτεΐνη συγκεντρώνονται και συμυκνώνονται με χρήση φίλτρου υπερδιήθησης (MWCO 10 kDa) και φυγοκέντρηση έως τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης περίπου 10 mg/ml ώστε να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα κρυστάλλωσης.

### 2.13 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης μπορεί να πραγματοποιηθεί από τα δεδομένα περίθλασης ακτίνων X ενός πρωτεϊνικού κρυστάλλου. Ο πρωτεϊνικός κρύσταλλος αποτελεί μια οργανωμένη τρισδιάστατη δομή όμοιων μορίων τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Για το σχηματισμό των κρυστάλλων η πρωτεΐνη που βρίσκεται στο διάλυμα θα πρέπει σταδιακά και ελεγχόμενα να εισέλθει στην κρυσταλλική φάση, μέσω ελεγχόμενης κατακρήμνισης. Ως κατακρημνιστές χρησιμοποιούνται διάφοροι οργανικοί διαλύτες, ή πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και προστίθενται στο υδατικό διάλυμα που βρίσκεται διαλυμένη η πρωτεΐνη σε συγκέντρωση μικρότερη από αυτή που οδηγεί στην κατακρήμνισή της (Rhodes, 1993).

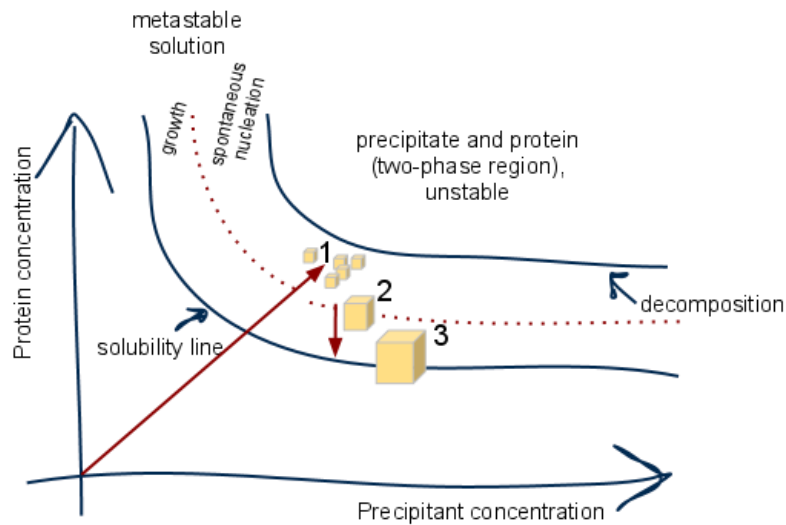
Η πορεία που ακολουθεί η κρυστάλλωση μια πρωτεΐνης μπορεί να περιγραφεί με την καμπύλη διαλυτότητας της πρωτεΐνης (solubility, S) (Εικόνα 2.10) που ορίζει τις φάσεις υποκορεσμού (undersaturation) και υπερκορεσμού (supersaturation). Η καμπύλη διαλυτότητας διαχωρίζει την κατάσταση εξισορρόπησης μεταξύ της κρυσταλλωμένης και κορεσμένης πρωτεΐνης στο διάλυμα, καθώς κάτω από την καμπύλη διαλυτότητας, η πρωτεΐνη δε μπορεί να κρυσταλλωθεί λόγω υποκορεσμού, ενώ πάνω από την καμπύλη η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι υψηλότερη από τη μέγιστη διαλυτότητα της με αποτέλεσμα τη δυνατότητα μετάπτωσης στην κρυσταλλική φάση. Η φάση υπερκορεσμού μπορεί να διαχωριστεί περαιτέρω στη μετασταθερή (metastable) ζώνη, τη ζώνη πυρήνωσης (nucleation) και τη ζώνη κατακρήμνισης (precipitation) (Εικόνα 2.10). Η δυνατότητα δημιουργίας κρυστάλλων υπάρχει στη ζώνη πυρήνωσης όπου δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλωσης και η περίσσεια πρωτεΐνης παίρνει κρυσταλλική μορφή, ενώ η μετασταθερή ζώνη είναι κατάλληλη για την αύξηση κρυστάλλων που έχουν ήδη δημιουργηθεί στη ζώνη πυρήνωσης. Αντίστοιχα, η ζώνη κατακρήμνισης αφορά την περιοχή όπου η πρωτεΐνη μετατρέπεται σε άμορφη μάζα (Ducruix *et al.*, 1992).



**Εικόνα 2.10:** Διάγραμμα της καμπύλης διαλυτότητας της πρωτεΐνης. Ορίζονται η καμπύλη διαλυτότητας, η μετασταθερή (*metastable*) ζώνη, η ζώνη πυρήνωσης (*nucleation*) και η ζώνη κατακρήμνισης (*precipitation*) (Ducruix *et al.*, 1992)

Μια από τις τεχνικές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών αποτελεί η τεχνική διάχυσης ατμών και διαχωρίζεται σε δύο μεθόδους, τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας (*sitting drop*) και τη μέθοδο της επικαθήμενης σταγόνας (*sitting drop*). Σύμφωνα με τη τεχνική διάχυσης ατμών, το πρωτεϊνικό διάλυμα φέρεται σε υπέρκορη κατάσταση λόγω απομάκρυνσης διαλύτη μέσω διάχυσης ατμών. Κατά τη διαδικασία που ακολουθείται συνήθως, μια σταγόνα διαλύματος πρωτεΐνης αναμιγνύεται με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος κατακρήμνισης σε αναλογία 1:1, με αποτέλεσμα στο τελικό μείγμα ανάμειξης η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και του κατακρημνιστή να έχει μειωθεί στο μισό. Η σταγόνα αυτή τοποθετείται πάνω από τη δεξαμενή που περιέχει το διάλυμα του κατακρημνιστή, κλείνεται αεροστεγώς και αφήνεται προς εξισορρόπηση. Οι δύο διαφορετικές μεθοδολογίες αφορούν τις διαφορετικές διατάξεις που χρησιμοποιούνται. Κατά τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας, η σταγόνα που περιέχει την πρωτεΐνη και το διάλυμα κατακρήμνισης τοποθετείται σε καλυπτρίδα η οποία τοποθετείται στη συνέχεια πάνω από το βοθρίο που περιέχει το διάλυμα κατακρήμνισης, ενώ η διάταξη της επικαθήμενης σταγόνας περιέχει γέφυρα εντός του βοθρίου στην οποία τοποθετείται η σχηματισμένη σταγόνα. Η διαφορά της συγκέντρωσης του κατακρημνιστή μεταξύ σταγόνας και δεξαμενής θα ωθήσει τα μόρια διαλύτη της σταγόνας σε εξάτμιση, μέχρι του σημείου εξίσωσης των δύο συγκεντρώσεων. Η ταχύτητα εξισορρόπησης εξαρτάται από τη ταχύτητα της διάχυσης ανάμεσα στα δύο διαλύματα. Λόγω φαινομένων μεταφοράς, τα οποία δημιουργούνται από την αυξημένη συγκέντρωση του κατακρημνιστή στην άκρη της σταγόνας η ταχύτητα διάχυσης του ύδατος στο διάλυμα της σταγόνας είναι μεγαλύτερη από αυτή μεταξύ των δύο διαλυμάτων. Καθώς ο όγκος της σταγόνας μειώνεται, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυξάνεται σταδιακά και περνάει από τη ζώνη διαλυτότητας στη μεσοσταθερή ζώνη και μετά

στη ζώνη κατακρήμνισης (υπερκορεσμός του διαλύματος). Αν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές κατά το πέρασμα από τη μετασταθερή ζώνη μπορεί να σχηματισθούν πυρήνες κρυστάλλωσης (ζώνη πυρήνωσης) και κατόπιν να αναπτυχθούν σε κρυστάλλους (Εικόνα 2.11) (Rhodes, 1993)(Ducruix *et al.*,1992).



**Εικόνα 2.11:** Κρυστάλλωση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών. Με κόκκινο βέλος περιγράφονται τα στάδια σχηματισμού κρυστάλλων. 1: Ο σχηματισμός των κρυστάλλων πραγματοποιείται στη ζώνη πυρήνωσης. 2: Εφόσον οι πυρήνες κρυστάλλωσης έχουν σχηματιστεί, ανάπτυξη πραγματοποιείται στη μετασταθερή ζώνη. 3: Το τελικό μέγεθος του κρυστάλλου επιτυγχάνεται όταν βρίσκεται σε εξισσορόπηση με την κορεσμένη πρωτεΐνη στο διάλυμα. (Rupp, 2009)

### 2.13.1 Υλικά

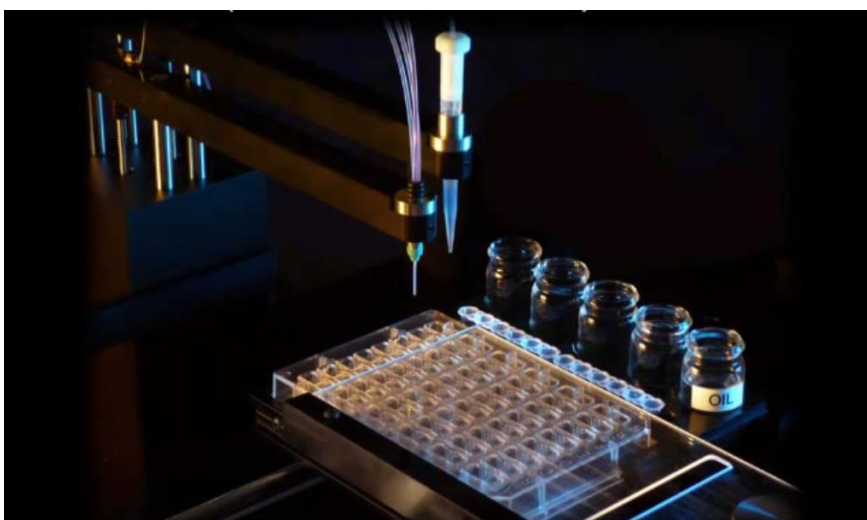
Μικροπλάκες δοκιμασιών κρυστάλλωσης (crystallization microplates) 96 βοθρίων

Μεμβράνη κάλυψης (Microplate Seal)

Διαλύματα διάφορων συνθηκών κρυστάλλωσης (Molecular Dimensions)

Ρομπότ κρυστάλλωσης (OryxNano, Douglas Instruments)

### 2.13.2 Πειραματική πορεία



**Εικόνα 2.12:** Κρυστάλλωση πρωτεΐνης με χρήση ρομπότ κρυστάλλωσης OryxNano  
(Douglas Instruments Ltd)

Τα πειράματα κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν στους 18°C με χρήση αυτόματου συστήματος κρυστάλλωσης (Εικόνα 2.12). Η απαιτούμενη ποσότητα πρωτεΐνης για το πείραμα κρυστάλλωσης, έπειτα από διαύγαση (φυγοκέντρηση 11000 x g, 20 min, 4°C), μεταφέρεται από τον πάγο σε κατάλληλο φιαλίδιο. Σε κάθε βοθρίο της πλάκας έχει τοποθετηθεί το αντίστοιχο διάλυμα κατακρήμνισης γνωστής σύστασης. Ανάλογα με τις συνθήκες που θα ελεγχθούν και την αναλογία πρωτεΐνης- διαλύματος κατακρήμνισης διαμορφώνεται και το αντίστοιχο πρόγραμμα του ρομπότ μέσω υπολογιστή. Έπειτα από την ολοκλήρωση του πειράματος οι δίσκοι κλείνονται αεροστεγώς με κατάλληλη μεμβράνη κι επωάζονται στην επιθυμητή θερμοκρασία ανάπτυξης κρυστάλλων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup> -Αποτελέσματα

Οι πρωτεΐνες Nbp35 και Cfd1 του οργανισμού *Mus musculus*, αποτελούν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 35,72 kDa και 29,52,9 kDa και αποτελούνται από 329 και 275 αμινοξικά κατάλοιπα αντίστοιχα. Για την έκφραση και των πρωτεϊνών αυτών, χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς pRSET-A καθώς και pGEX-6P-1 που φέρουν την ένθεση του κάθε γονιδίου ξεχωριστά, ενώ η έκφραση πραγματοποιήθηκε σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*. Προηγούμενη δοκιμή έκφρασης τους από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου για τους πλασμιδιακούς φορείς pRSET-A έδειξε ότι :

- Η Nbp35 εκφράζεται ως αδιάλυτη κυρίως αλλά και ως διαλυτή σε μικρό ποσοστό.
- Η Cfd1 εκφράζεται ως αδιάλυτη και για τον καθαρισμό απαιτείται η απομόνωση από έγκλειστα σωματίδια κι έπειτα η αναδίπλωση της πρωτεΐνης.

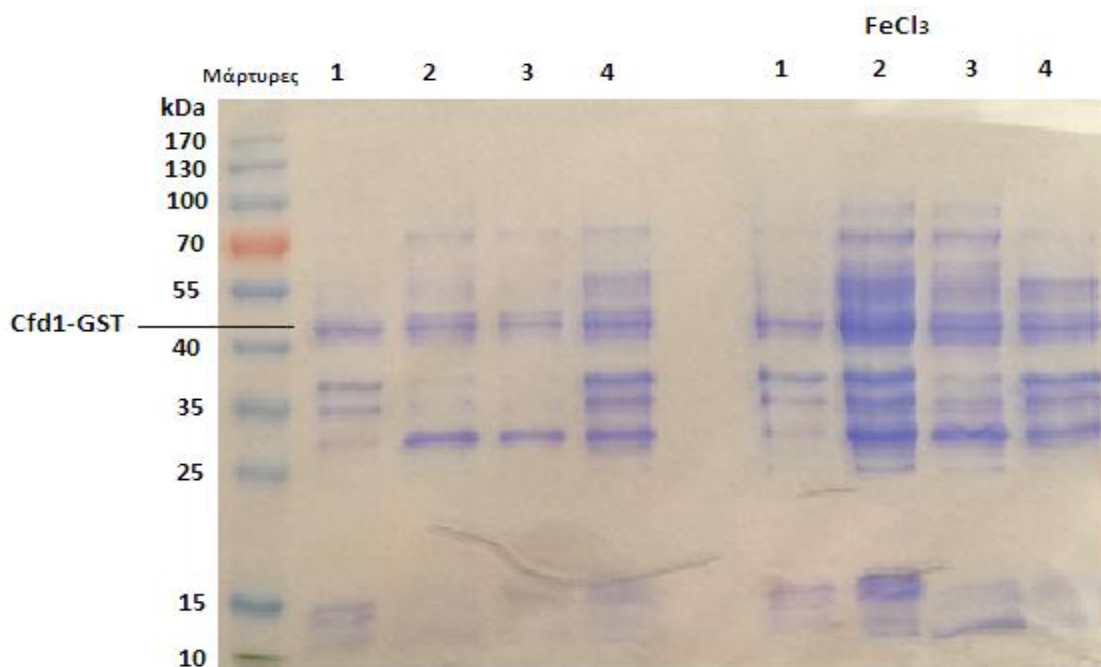
Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκαν εκ νέου οι συνθήκες έκφρασης των δύο πρωτεϊνών με στόχο την απομόνωση τους στο διαλυτό κλάσμα του κυτταρολύματος και δοκιμάστηκε η έκφραση με χρήση του πλασμιδιακού φορέα pGEX-6P-1. Οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο πρωταρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης.

### **3.1 Έλεγχος έκφρασης των πρωτεϊνών με χρήση των πλασμιδιακών φορέων pGEX-6P-1.**

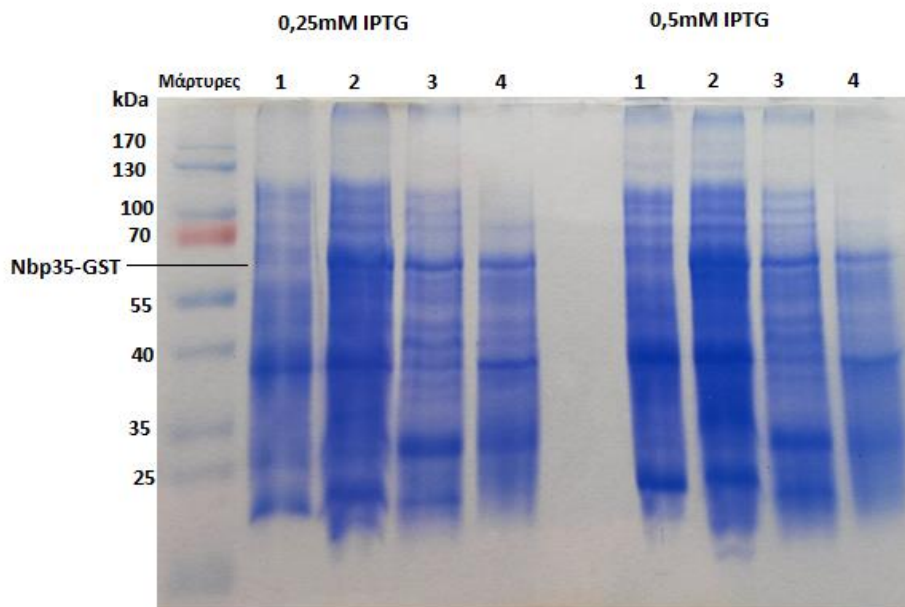
Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το BL21(DE3) pLysS . Ο μετασχηματισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του θερμικού σοκ, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.3. Για τον έλεγχο της έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες μικρής κλίμακας των 50ml. Η επαγωγή της έκφρασης πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές συνθήκες :

- Για τον pGEX-Cfd1, προσθήκη 0,1mM IPTG και 50μM FeCl<sub>3</sub> κι επώαση στους 16°C ολονύκτια υπό ανάδευση (200 rpm).
- Για τον pGEX- Nbp35 προσθήκη 0,25mM IPTG και 0,5mM IPTG κι επώαση στους 20°C ,ολονύκτια υπό ανάδευση (200 rpm).

Για τη λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης, για τον pGEX-Cfd1 διάλυμα 50 mM Tris –HCl, 0,2M NaCl, 1% Glycerol, 0,1% Triton, 1mM PMSF, pH 8,0 και για τον pGEX- Nbp35 διάλυμα 10 mM Tris –HCl, 0,2M NaCl, 10% Glycerol, 0,1% Triton, 1mM PMSF, pH 8,0. Πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση του κυτταρικό ίζημα σε 5ml διάλυμα λύσης και στη συνέχεια χρήση υπερήχων για τη θραύση των κυττάρων. Στη συνέχεια το κυτταρόλυμα φυγοκεντρήθηκε σε 10000 x g , 30min, 4°C το υπερκείμενο διαχωρίστηκε από το κυτταρικό ίζημα και πραγματοποιήθηκε επαναδιασπορά του κυτταρικό ίζημα σε αντίστοιχο διάλυμα λύσης (5ml). Η έκφραση των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης 12%. Σε κάθε διαδρομή δείγματος φορτώθηκαν 10μl από το δείγμα ηλεκτροφόρησης που παρασκευάστηκε (10μl δείγματος και 10 μl διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων 2x).



**Εικόνα 3.1 :** Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης 12% για τον έλεγχο έκφρασης pGEX- Cfd1: 1. Σύνολο κυττάρων πριν την έκφραση., 2. Επαγωγή έκφρασης ,3. Υπερκείμενο, 4. Κυτταρικό ίζημα



**Εικόνα 3.2 :** Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης 12% για τον έλεγχο έκφρασης pGEX- Nbp35: 1. Σύνολο κυττάρων πριν την έκφραση, 2. Επαγωγή έκφρασης, 3. Υπερκείμενο, 4. Κυτταρικό ίζημα

Με βάση τις εικόνες 3.1 και 3.2 , παρατηρείται η έκφραση της ανασυνδυασμένης GST-Cfd1 (ζώνη στα 50 kDa περίπου) (Εικόνα 3.1) σε υψηλό ποσοστό στο μη διαλυτό κλάσμα του κυταρρολύματος, ενώ η προσθήκη FeCl<sub>3</sub> δεν έχει επιδράσει στην έκφραση της πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα. Αντίστοιχα, η GST-Nbp35 (ζώνη στα 60 kDa περίπου) φαίνεται να εκφράζεται και στο διαλυτό κλάσμα σε ικανοποιητικό ποσοστό για περαιτέρω καθαρισμό και με εντονότερη ζώνη σε 0,5mM IPTG.

### 3.2 Έλεγχος συνέκφρασης της πρωτεΐνης Cfd1 με τσαπερόνια.

Για τη συνέκφραση χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pRSET-A και pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16 (TaKaRa Bio Inc) ενώ για τη συνέκφραση χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στη παράγραφο. Ο έλεγχος έκφρασης έγινε σε μικρή κλίμακα καλλιέργειας κυττάρων (50ml) και χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος BL21(DE3).

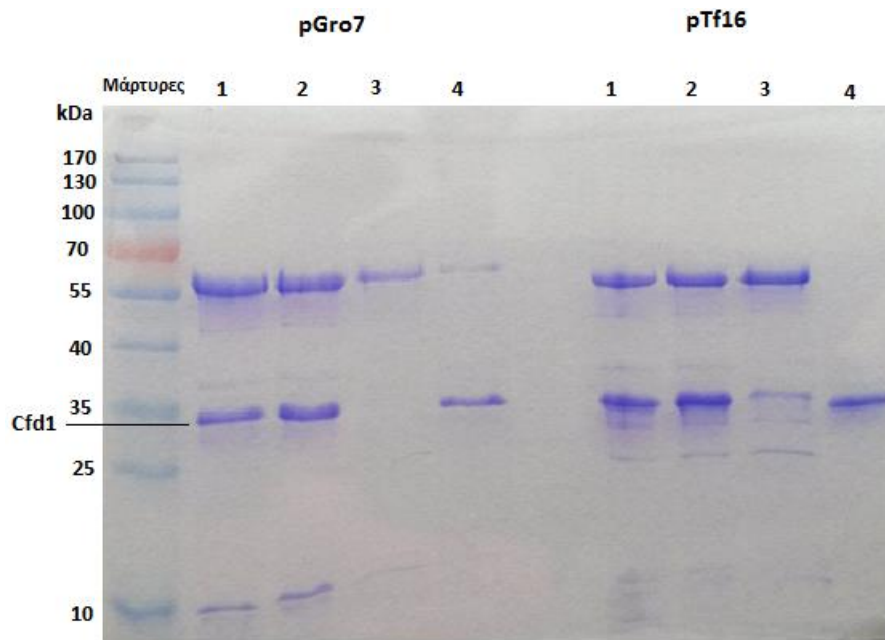
Η επαγωγή της έκφρασης των τσαπερονίων πραγματοποιήθηκε πριν την επαγωγή της Cfd1 όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στην παράγραφο 2.11. Η επαγωγή της έκφρασης της Cfd1 πραγματοποιήθηκε όταν η οπτική πυκνότητα των κυττάρων ήταν 0,6- 0,7 χρόνος που διέφερε για κάθε σύστημα



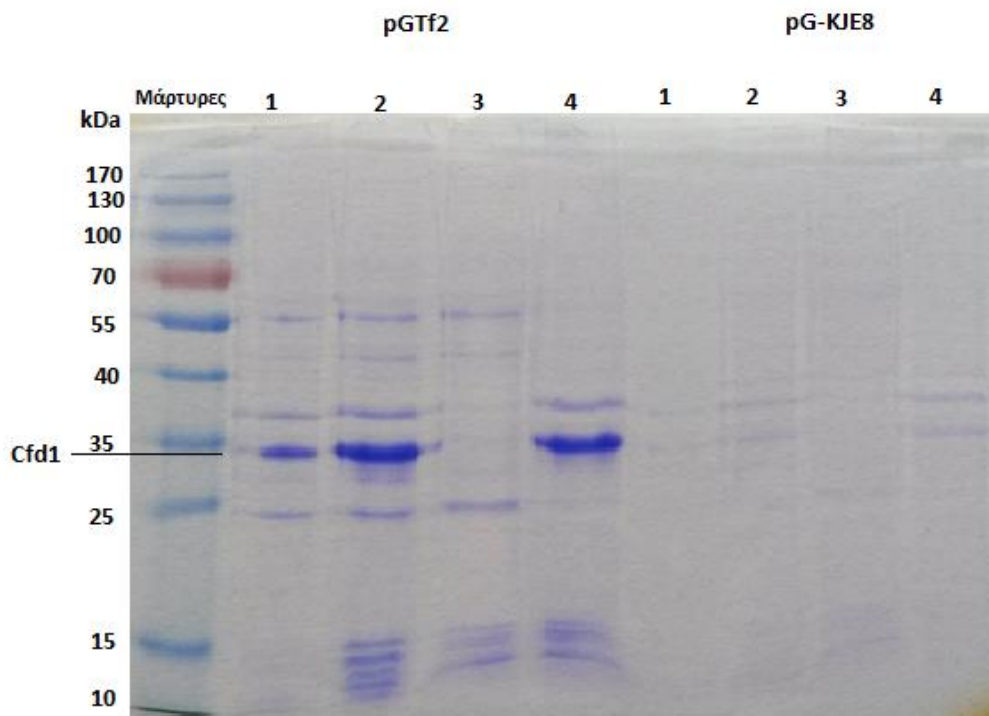
συνέκφρασης (περίπου 5h) ενώ για τη συνέκφραση των pKJE7 και pRSET- A Cfd1 τα κύτταρα δεν αναπτύχθηκαν πλέον της οπτικής πυκνότητας των 0,3 πιθανώς λόγω τοξικότητας των προϊόντων έκφρασης για το βακτηριακό οργανισμό. Η επαγωγή έκφρασης της Cfd1 πραγματοποιήθηκε με 0,5mM IPTG κι επώαση στους 20°C ,ολονύκτια υπό ανάδευση (200 rpm).Για τη λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα λύσης 10 mM Tris –HCl, 0,2M NaCl, 10% Glycerol, 0,1% Triton, 1mM PMSF, pH 8,0. Πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση του κυτταρικό ίζημα σε 5ml διάλυμα λύσης και στη συνέχεια χρήση υπερήχων για τη θραύση των κυττάρων. Στη συνέχεια το κυτταρόλυμα φυγοκεντρήθηκε σε 10000 x g, 30min, 4°C το υπερκείμενο διαχωρίστηκε από το κυτταρικό ίζημα και πραγματοποιήθηκε επαναδιασπορά του κυτταρικό ίζημα σε αντίστοιχο διάλυμα λύσης (5ml). Η έκφραση των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης 12%. Σε κάθε διαδρομή δείγματος φορτώθηκαν 10μl από το δείγμα ηλεκτροφόρησης που παρασκευάστηκε (10μl δείγματος και 10 μl διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων 2x) .

Τα μοριακά βάρη των τσαπερονίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη συνέκφραση είναι τα παρακάτω. Ορισμένοι φορείς έκφρασης περιέχουν ομάδα τσαπερονίων, ενώ άλλοι μόνο ένα (εικόνα 2.3)

- GroEL (60 kDa)
- GroES (10 kDa)
- DnaK (70 kDa)
- DnaJ (40 kDa)
- Tf (56 kDa)
- GrpE (22 kDa)



**Εικόνα 3.3 :** Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης 12% για τον έλεγχο συνέκφρασης pRSET-A- Cfd1 και pGro7, pTf16 :  
 1. Σύνολο κυττάρων πριν την έκφραση, 2. Επαγωγή έκφρασης, 3. Υπερκείμενο, 4. Κυτταρικό ίζημα



**Εικόνα 3.4:** Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης 12% για τον έλεγχο συνέκφρασης pRSET-A- Cfd1 και pGTf2, pG-JEK8: 1. Σύνολο κυττάρων πριν την έκφραση, 2. Επαγωγή έκφρασης, 3. Υπερκείμενο, 4. Κυτταρικό ίζημα

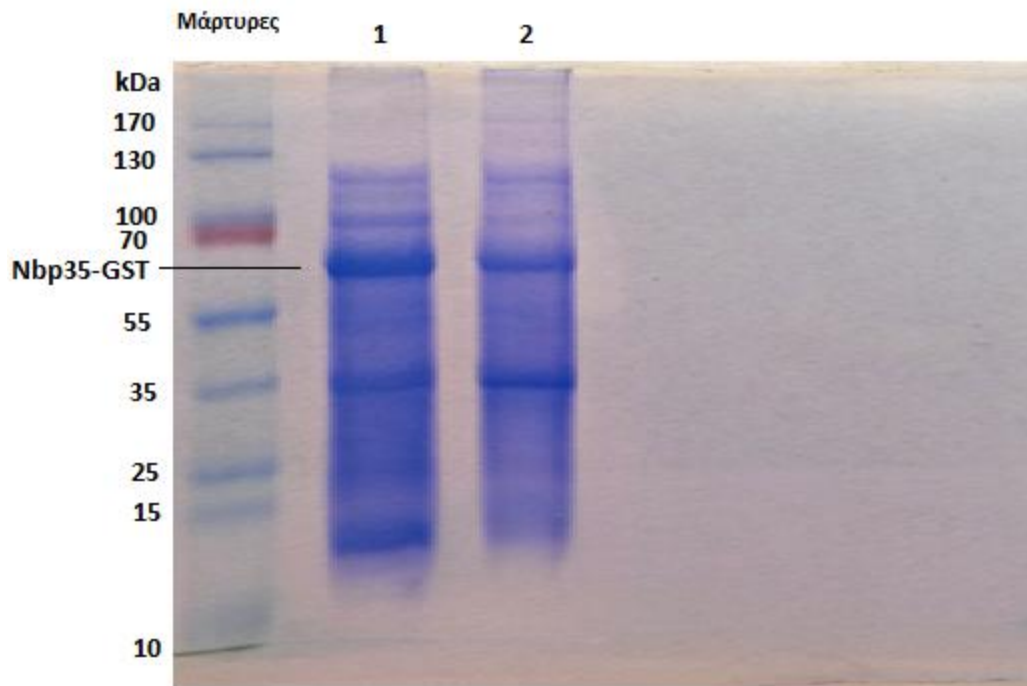
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των εικόνων 3.3 και 3.4 το σύστημα συνέκφρασης που φαίνεται να εξυπηρετεί για την απομόνωση της Cfd1 από το διαλυτό κλάσμα του κυτταρολύματος είναι το pRSET-A- Cfd1 και pTf16 το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για έκφραση σε μεγάλη κλίμακα ώστε να δοκιμαστεί η απομόνωση.

### **3.3 Έκφραση , απομόνωση και καθαρισμός Nbr35**

Για την απομόνωση της Nbr35 χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έκφρασης με χρήση του πλασμιδιακού φορέα pGEX-6P-1 ώστε να παραλάβουμε την ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη από το διαλυτό κλάσμα.

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση ήταν τα BL21(DE3). Γι την απομόνωση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (1L). Ο μετασχηματισμός και η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με βάση την παράγραφο 2.3. Η επαγωγή της έκφρασης πραγματοποιήθηκε με 0,5mM IPTG σε κύτταρα οπτικής πυκνότητας 0,7 κι εφόσον είχαν επωαστεί για μια ώρα στους 20°C. Η επώαση έπειτα έγινε στους 33°C ολονύκτια. Για τη λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50 mM Tris –HCl, 0,2M NaCl, 0,5mM DTT, 0,5mM PMSF, 1x PI, pH 8,2 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λύση με χρήση υπερήχων (παράγραφος). Το κυτταρόλυμα υπερφυγοκεντρήθηκε σε 130000 x g (70Ti rotor Beckman) , 4°C, 30min και ελέγχθηκε η έκφραση της ανασυνδυσμένης Nrb35 με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδιου (12% ) (Εικόνα 3.5).

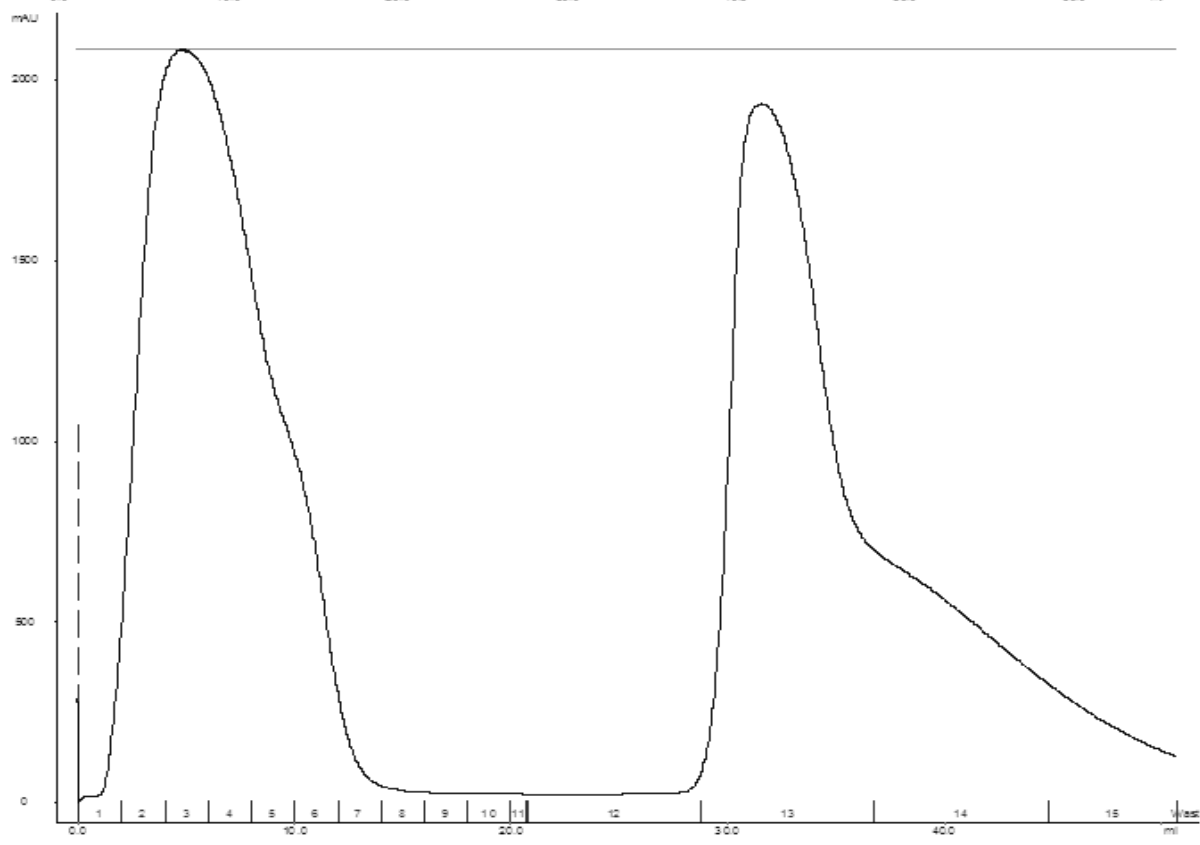
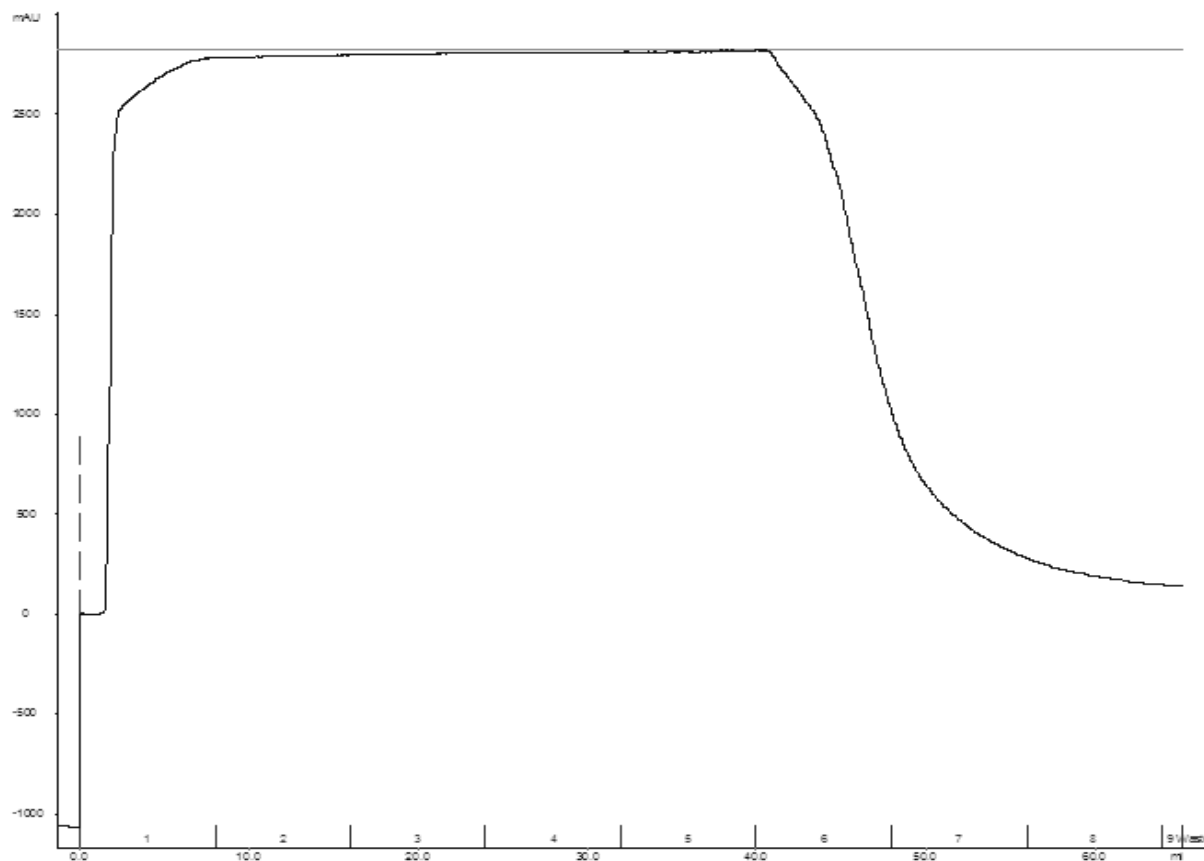
Παρατηρείται η έκφραση της συντηγμένης Nbr35 πρωτεΐνης με τη GST σε υψηλό ποσοστό στο διαλυτό κλάσμα (ζώνη στα 60 kDa περίπου, δείγμα 1), επομένως το υπερκείμενο της υπερφυγοκέντρωσης χρησιμοποιείται στη συνέχεια για καθαρισμό με στήλη συγγένειας GSTrap 4B (GE Healthcare Life Science).



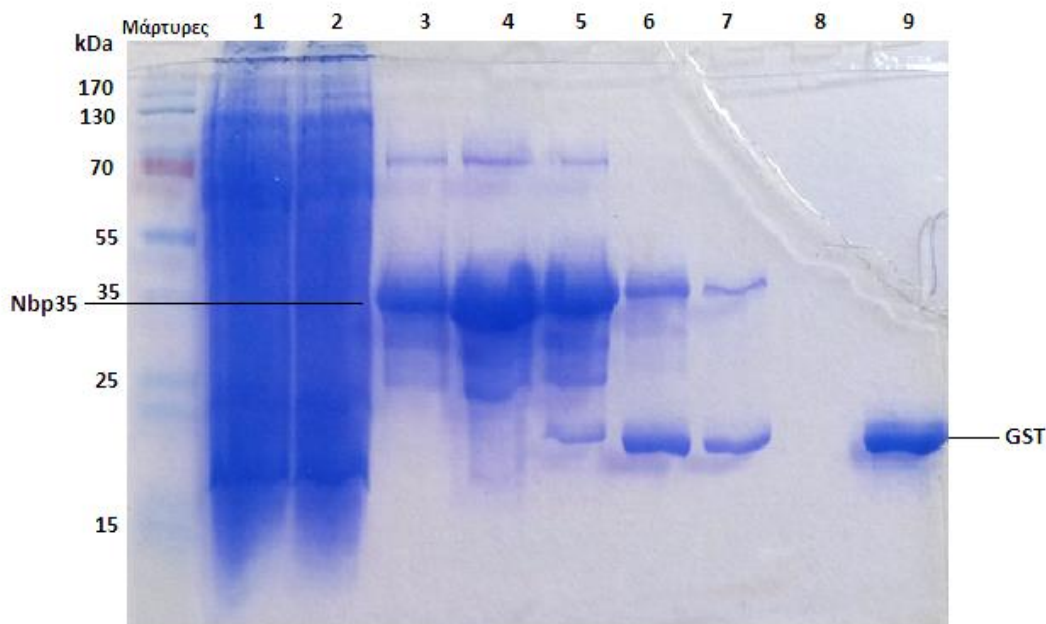
**Εικόνα 3.5 :** Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης 12% για τον έλεγχο έκφρασης pGEX- Nbp35: 1. Υπερκείμενο, 2. Κυτταρικό ίζημα

Καθαρισμός ανασυνδυασμένης Nbp35-GST με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας και μοριακού αποκλεισμού.

Για τον αρχικό καθαρισμό του κυτταρολύματος ( 40 ml ) χρησιμοποιήθηκε στήλη συγγένειας GSTrap 4B (GE Healthcare Life Science) και ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.12.1. Το διάλυμα εξισορρόπησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 50 mM Tris –HCl, 0.2M NaCl, 0.5mM DTT, 10% (v/v) Glycerol , pH 8.2 (Διάλυμα Β) ενώ για την έκλυση της Nbp35 έπειτα από την αποκοπή της GST με χρήση πρωτεάσης 3C, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα έκλυσης 50 mM Tris–HCl, 0.2M NaCl, 0,5mM DTT, 20mM Glutathione Reduced ,10% (v/v) Glycerol, pH 8.2 (Διάλυμα Β). Τα διαγράμματα απορρόφησης όγκου δείγματος φαίνονται στις Εικόνες 3.6 και 3.7. Με βάση το παραπάνω διάγραμμα πραγματοποιήθηκε και έλεγχος των κλασμάτων έκλυσης με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου (12%) (Εικόνα 3.7).

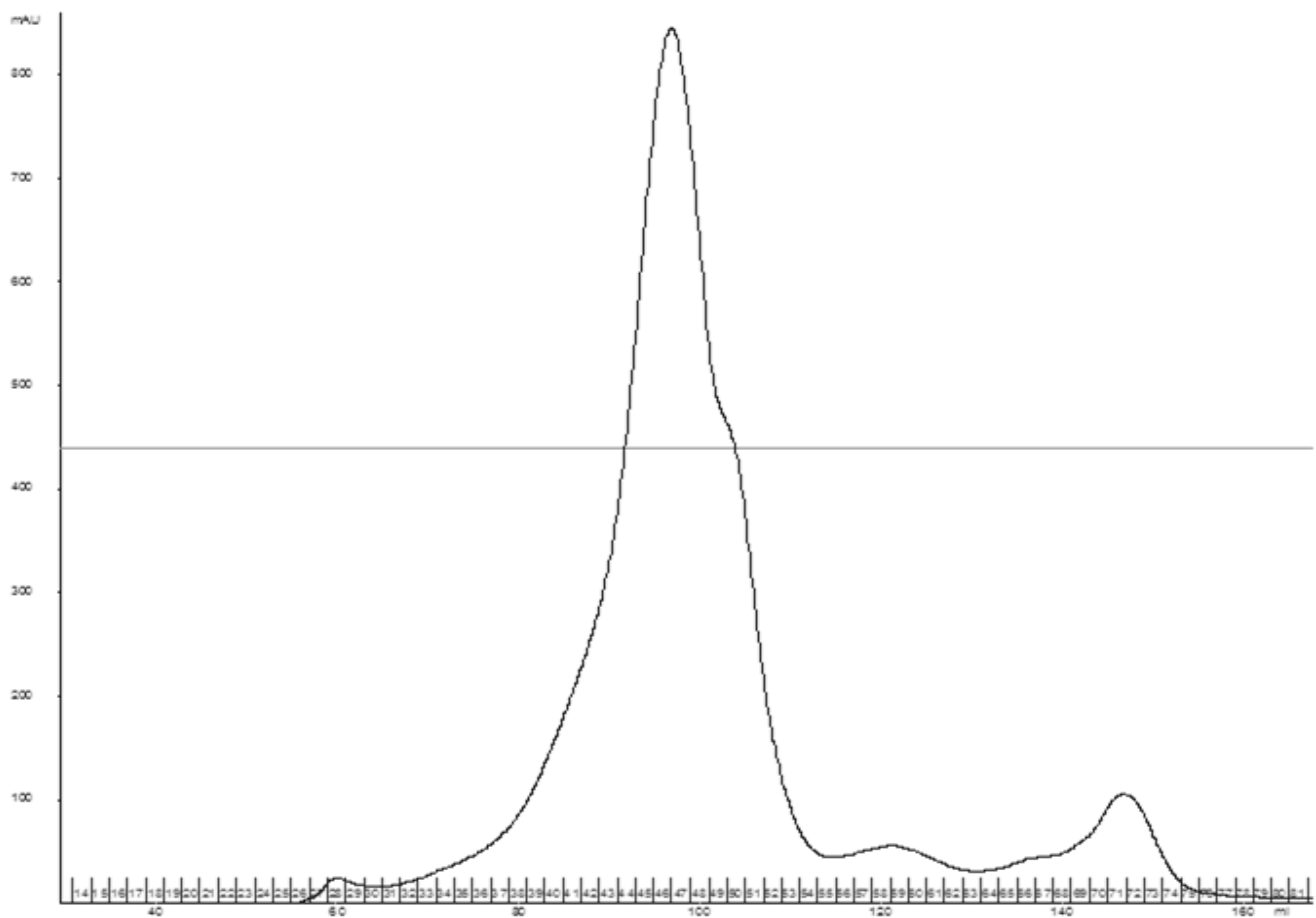


**Εικόνα 3.6 :** Διάγραμμα απορρόφησης – όγκου δείγματος κατά την πρόσδεση (πάνω) κι έκλουση (κάτω) του δείγματος από τη στήλη GSTrap 4B .

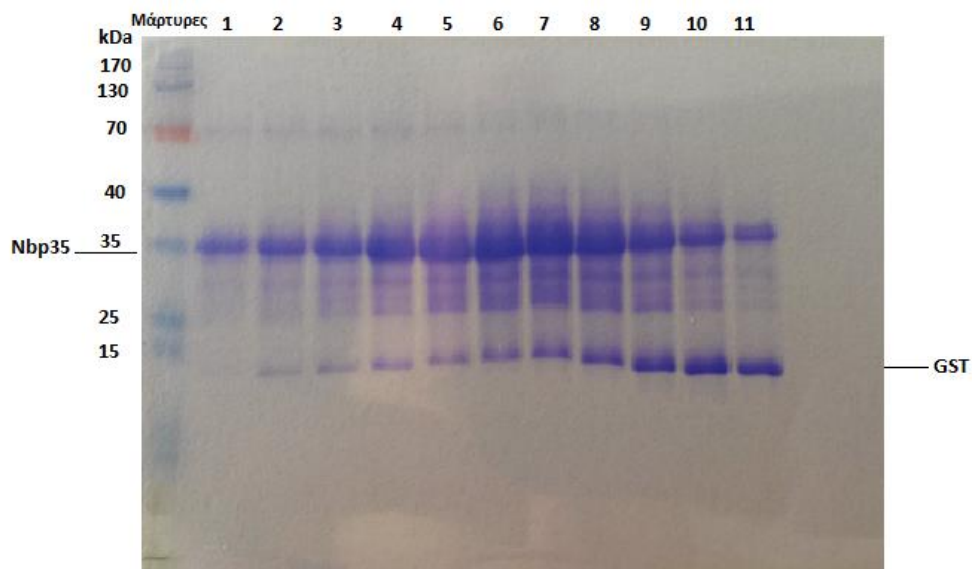


**Εικόνα 3.7 :** Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης 12% για τον έλεγχο καθαρισμού της *Nbr35-GST* με χρωματογραφία συγγένειας: 1. Κλάσματα 1-7 (μη προσδεμένο), 2. Κλάσμα 1 έκλουσης, 3. Κλάσμα 2 έκλουσης 4. Κλάσμα 3 έκλουσης, 5. Κλάσμα 4 έκλουσης, 6. Κλάσμα 5 έκλουσης, 7. Κλάσμα 6 έκλουσης, 8.Κλάσμα 7 έκλουσης, 9. Κλάσμα 13 έκλουσης

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα τα κλάσματα έκλουσης 3, 4 και 5 συγκεντρώθηκαν και τοποθετήθηκαν σε μεμβράνη διαπίδωσης σε διάλυμα 20 mM Tris –HCl, 0.2M NaCl, 0.5mM DTT, pH 7,5 για μία ημέρα. Στη συνέχεια συμπυκνώθηκαν με χρήση φίλτρου και φυγοκέντρωση έως τελικό όγκο των 500μl για περαιτέρω καθαρισμό με χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με χρήση στήλης Superdex 200 (GE Healthcare Life Science) και διαλύματος 20 mM Tris –HCl, 0.2M NaCl, 0.5mM DTT, pH 7,5. Το διάγραμμα απορρόφησης - όγκου δείγματος παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.8.



**Εικόνα 3.8:** Διάγραμμα απορρόφησης – κλάσματος έκλουσης έπειτα από καθαρισμό με στήλη αποκλεισμού *Superdex 200*

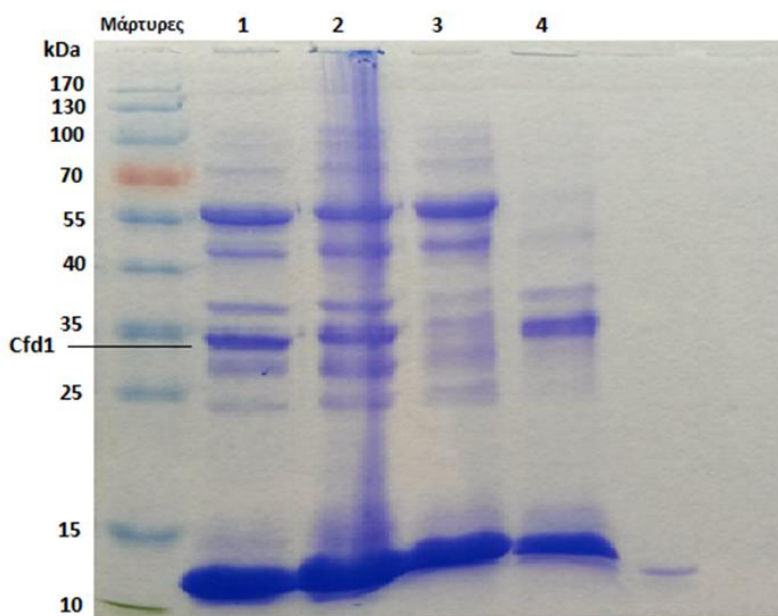


**Εικόνα 3.9 :** Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης 12% για τον έλεγχο καθαρισμού της *Nbp35-GST* με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού: 1-11. Κλάσματα έκλουσης 41-51

Με βάση την εικόνα 3.9 πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση των κλασμάτων 41 έως 47 με χρήση φίλτρου και φυγοκέντρηση έως τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης 10mg/ml (μέτρηση με τη μέθοδο Bradford) ώστε να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα κρυστάλλωσης. Τα κλάσματα που περιείχαν την Nbr35 καθώς και το τελικό συμπυκνωμένο δείγμα ήταν χρώματος καφέ, χαρακτηριστικό λόγω της πρόσδεσης των συμπλόκων Fe/S .

### 3.4 Έκφραση , απομόνωση και καθαρισμός Cfd1

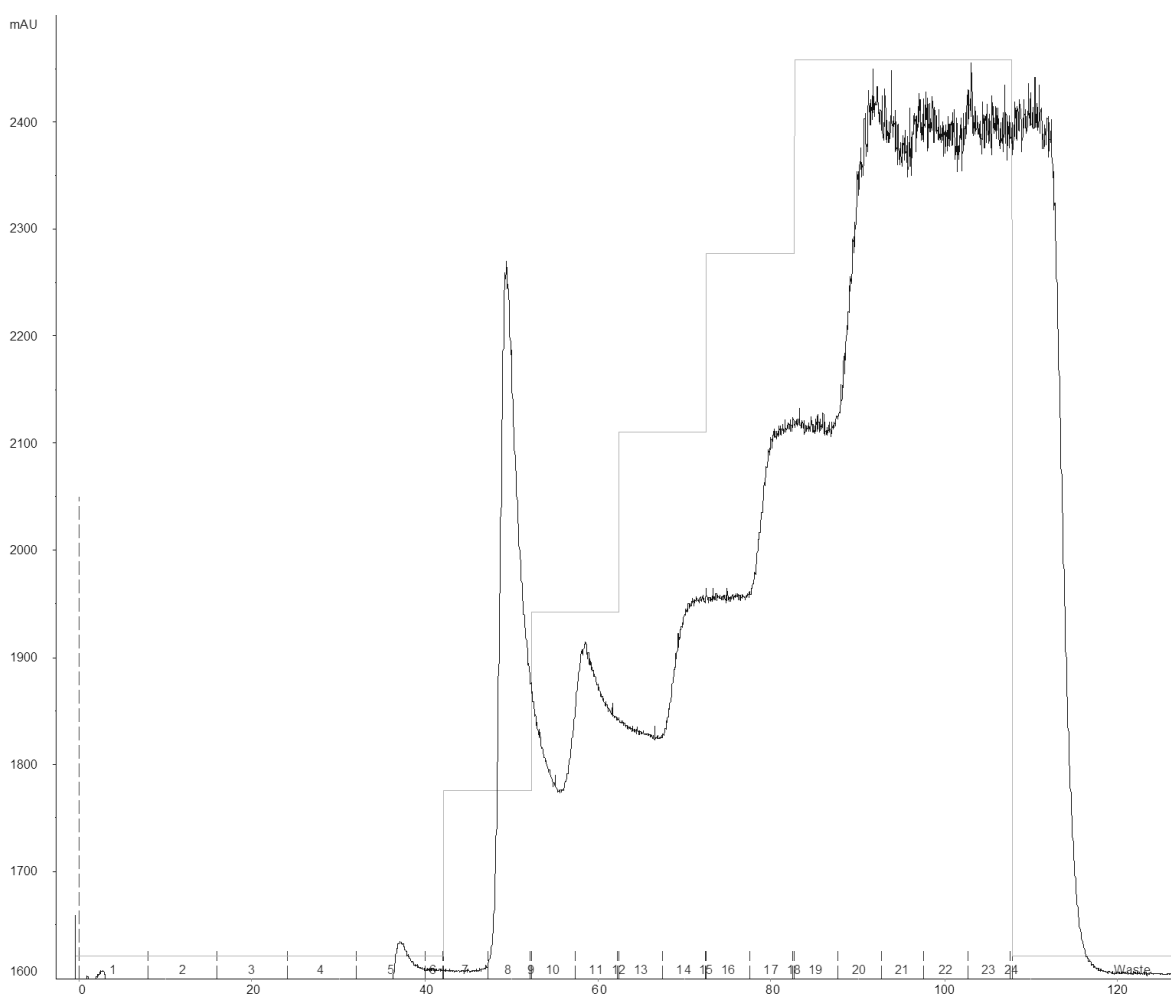
Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα συνέκφρασης p-RSET-A Cfd1 και pTf16 το οποίο με βάση την παράγραφο 3.2 είχε θετικά αποτελέσματα για την απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από το διαλυτό κλάσμα. Οι συνθήκες ανάπτυξης ήταν ίδιες με τη παράγραφο και χρησιμοποιήθηκαν 2L καλλιέργειας κυττάρων για την απομόνωση της πρωτεΐνης. Για το 1L καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης από το διαλυτό κλάσμα του κυτταρολύματος και πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου (12%) (Εικόνα 3.10).



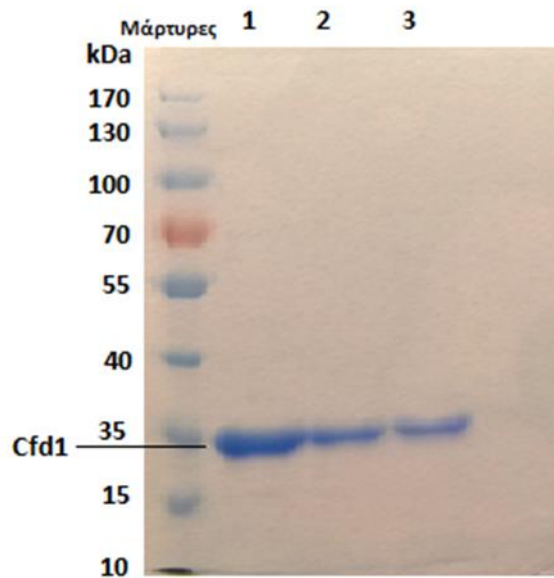
**Εικόνα 3.10:** Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης 12% για τον έλεγχο συνέκφρασης pRSET-A- Cfd1 και pTf16 από 2L καλλιέργειας : 1. Σύνολο κυττάρων πριν την έκφραση, 2. Επαγωγή έκφρασης, 3. Υπερκείμενο, 4. Κυτταρικό ίζημα



Με βάση την εικόνα 3.9, η ποσότητα της πρωτεΐνης που βρίσκεται στο διαλυτό κλάσμα είναι μικρή ώστε να πραγματοποιηθεί περαιτέρω καθαρισμός με στήλη συγγένειας. Επομένως, για το 1L καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο καθαρισμού μέσω έγκλειστων σωματίων και αναδίπλωση της πρωτεΐνης (παράγραφος 2.10). Για την αναδίπλωση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αναδίπλωσης 308 ml, καθώς η συγκέντρωση της αναδιαταγμένης πρωτεΐνης ήταν 2,46 mg/ml. Το δείγμα έπειτα από την αναδίπλωση συμπυκνώθηκε σε τελικό όγκο 30ml και στη συνέχεια έγινε καθαρισμός με χρήση συγγένειας His Trap 5ml (GE Healthcare Life Science) με βαθμιδωτή έκλυση μέσω AKTA purifier (GE Healthcare Life Science) 100-500 mM ιμιδαζολίου ανά 100mM. Το διάγραμμα απορρόφησης- όγκου έκλυσης παρουσιάζεται στην εικόνα 3.10. Ο έλεγχος των κλασμάτων για την παρουσία της πρωτεΐνης έγινε με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου (12%) (Εικόνα 3.11).



**Εικόνα 3.11 :** Διάγραμμα απορρόφησης – όγκου δείγματος έπειτα από καθαρισμό με στήλη HisTrap



**Εικόνα 3.12:** Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης 12% για τον έλεγχο καθαρισμού της *Cfd1* με χρωματογραφία συγγένειας

Με βάση την απορρόφηση και των έλεγχο των κλασμάτων 8,10 και 11 σύμφωνα με την Εικόνα 3.11, τα κλάσματα συγκεντρώθηκαν και συμπυκνώθηκαν σταδιακά με χρήση φίλτρου και φυγοκέντρηση (3000 x g, 4°C, 10 min) έως τελική συγκέντρωση 4 mg/ml. Στη περίπτωση αυτή η πρωτεΐνη δεν μπορούσε να συμπυκνωθεί περαιτέρω λόγω κατακρήμνισης. Επιπλέον, δε χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού διότι η πρωτεΐνη ήταν ήδη καθαρή χωρίς προσμίξεις έπειτα από τη χρωματογραφία συγγένειας (Εικόνα 3.11). Στη συνέχεια ακολούθησε δοκιμή συνθηκών κρυστάλλωσης.

### 3.5 Έλεγχος συνθηκών κρυστάλλωσης πρωτεϊνών

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών Nbp35 10mg/ml και Cfd1 4 mg/ml με τη χρήση αυτόματου συστήματος κρυστάλλωσης (Oryx Nano) με τη τεχνική της επικαθήμενης σταγόνας (sitting drop). Για κάθε πρωτεΐνη ελέγχθηκαν 192 συνθήκες και χρησιμοποιήθηκαν δύο διατάξεις έτοιμων διαλυμάτων κατακρήμνισης (Structure Screen 1-2, JCSG-plus, Molecular Dimensions). Οι σταγόνες είχαν τελικό όγκο 0,6 μL με αναλογία όγκου διαλύματος πρωτεΐνης προς όγκο διαλύματος κατακρήμνισης 1:1 και 2:1. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 18°C και ακολούθως οι δίσκοι τοποθετήθηκαν για επώαση στους 20°C.

Ο έλεγχος των αποτελεσμάτων των κρυσταλλώσεων έγινε στις 48 ώρες, 3 ημέρες, 5 ημέρες, 7 ημέρες, 10 ημέρες, 15 ημέρες και μετά ακολούθησε η παρατήρησή τους ανά εβδομάδα. Σε καμία από τις συνθήκες που ελέγχθηκαν σε παρατηρήθηκε η δημιουργία κρυστάλλων. Για τη Cfd1 (4mg/ml) οι περισσότερες σταγόνες παρέμειναν διαυγείς, ενώ σε μερικές συνθήκες παρατηρήθηκε η δημιουργία ιζήματος λόγω κατακρήμνισης της πρωτεΐνης. Αντίστοιχα για την Nbp35 (10mg/ml) παρατηρήθηκε στα περισσότερες σταγόνες ο σχηματισμός ιζήματος, ενώ ορισμένες παραμένουν διαυγείς.

### **3.6 Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής πρωτεϊνών**

Για τη πρόβλεψη της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής της κάθε πρωτεΐνης βάσει της αλληλουχίας τους χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα Raptor X, webserver. Για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων και τη μελέτη της τριτοταγούς διαμόρφωσης, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PyMOL Viewer, Schrödinger, version 1.7.

Για κάθε πρωτεΐνη τα αποτελέσματα εκτιμούνται με τον υπολογισμό των παραμέτρων P-value, Score και uGDT(GDT). Όσο μεγαλύτερος ο αριθμός της βαθμολογίας και του δείκτη uGDT (GDT) της υπολογιζόμενης δομής, τόσο πιο αξιόπιστη θεωρείται η πρόβλεψη της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης για τη διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής. Γενικότερα, ο δείκτης uGDT (GDT) για μία πρωτεΐνη με περισσότερα από 100 κατάλοιπα, θα πρέπει να έχει τιμή μεγαλύτερη από 50 ενώ παράλληλα, η τιμή P-value να είναι αρκετά χαμηλή (0,001) ώστε το προσδιοριζόμενο μοντέλο να είναι αποδεκτό.

#### **Προσδιορισμός της διαμόρφωσης της Nbp35**

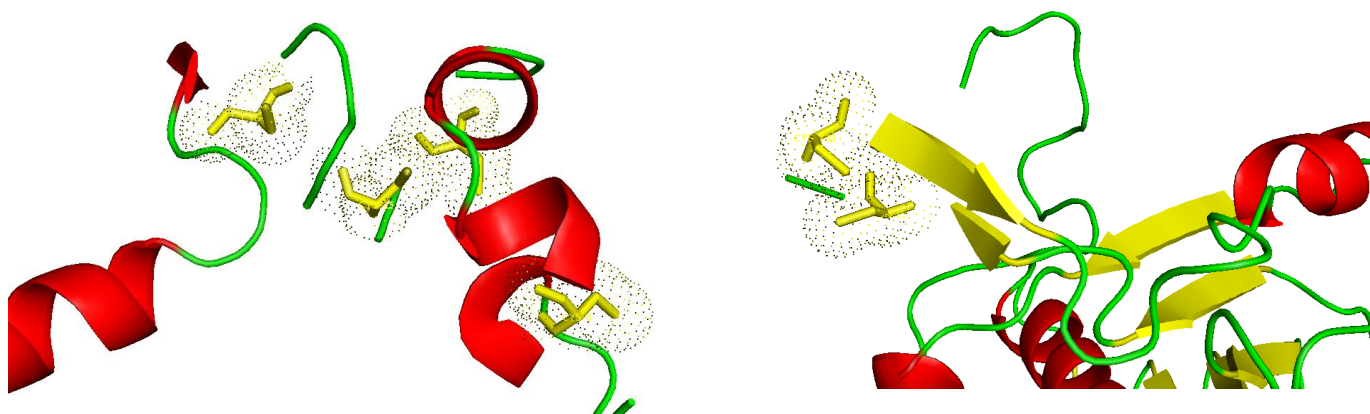
Το μοντέλο με την καλύτερη βαθμολογία εμφανίζεται στην (Εικόνα 3.13). Επιπρόσθετα, οι δείκτες P-value ( $5.64e^{-09}$ ) και uGDT 181 προσδιορίζουν μια δομή που είναι αποδεκτή για τη συγκεκριμένη αλληλουχία.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την αλληλουχία της Nbp35, φαίνεται ότι η δευτεροταγής διαμόρφωση της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται κατά 34% από έλικα, 21% από β πτυχωτή επιφάνεια και 44% από διαμόρφωση βρόχου (Εικόνα 3.13). Η αναδίπλωση της πρωτεΐνης οδηγεί τα περισσότερα αμινοξέα (38%) στο εσωτερικό της διαμόρφωσης, με αποτέλεσμα να μη βρίσκονται σε άμεση επαφή με τα μόρια του διαλύτη, ενώ αντίστοιχα το 29% των αμινοξέων βρίσκεται εκτεθειμένο.



**Εικόνα 3.13 :** Απεικόνιση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης Nbr35. Οι διάφορες τοπολογίες της πρωτεΐνης υποδεικνύονται με διαφορετικό χρώμα. Κόκκινο: α έλικα, Πράσινο: βρόχος, Κίτρινο: Β πτυχωτή επιφάνεια

Όσον αφορά τις αλληλουχίες των κυστεϊνών που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Nbr35 και Cfd1, καθώς και στην πρόσδεση ιόντων Fe/S, παρουσιάζονται στην εικόνα 3.14. Οι αλληλουχίες των κυστεϊνών που βρίσκονται στην Nbr35 είναι της μορφής CX13CX2CX5C και με βάση την παράγραφο 1.5 συμμετέχουν στο σχηματισμό του τετραμερούς του συμπλόκου Nbr35-Cfd1, καθώς και στην πρόσδεση των συμπλόκων Fe/S. Σύμφωνα με το προβλεπόμενο μοντέλο, τα αμινοξέα βρίσκονται κυρίως στο εξωτερικό τμήμα της Nbr35 και είναι εκτεθειμένα στα μόρια διαλύτη, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.

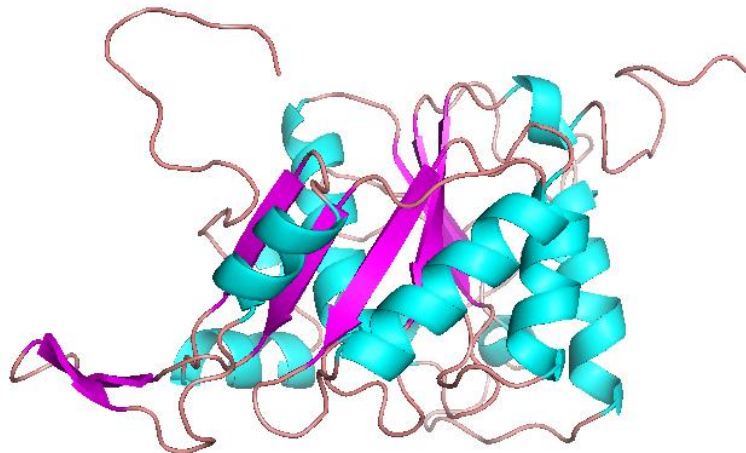


**Εικόνα 3.14:** Απεικόνιση των αμινοξέων κυστεΐνης της Nbr35 που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών και την πρόσδεση ιόντων Fe/S. Αριστερά, τα κατάλοιπα κυστεΐνης του αμινοτελικού άκρου. Δεξιά τα κατάλοιπα κυστεΐνης στο καροξυτελικό άκρο

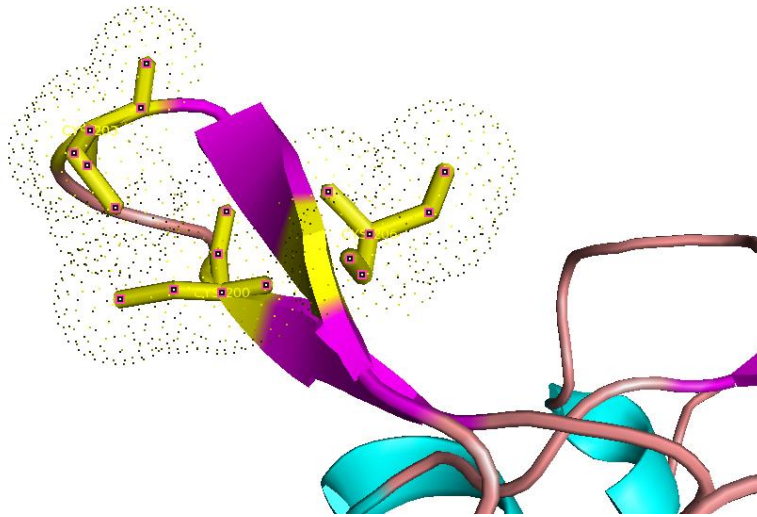
## Προσδιορισμός της διαμόρφωσης της Cfd1

Αντίστοιχα με την Nbr35 το μοντέλο με το καλύτερο με score για τη Cfd1, εμφανίζεται στην (Εικόνα 3.15). Επιπρόσθετα, οι δείκτες P-value ( $4.40e^{-09}$ ) και uGDT 185 προσδιορίζουν μια δομή που είναι αποδεκτή για τη συγκεκριμένη αλληλουχία.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την αλληλουχία της Cfd1, φαίνεται ότι η δευτεροταγής διαμόρφωση της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται κατά 32% από έλικα, 18% από β πτυχωτή επιφάνεια και 49% από διαμόρφωση βρόχου (Εικόνα 3.13). Η αναδίπλωση της πρωτεΐνης οδηγεί τα περισσότερα αμινοξέα (38%) στο εσωτερικό της διαμόρφωσης, με αποτέλεσμα να μη βρίσκονται σε άμεση επαφή με τα μόρια του διαλύτη, ενώ αντίστοιχα το 23% των αμινοξέων βρίσκεται εκτεθειμένο. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντίστοιχα του μοντέλου δομής της Nbr35, κυρίως λόγω της υψηλής ομολογίας στην αλληλουχία των δύο πρωτεϊνών. Επιπλέον, τα αμινοξέα κυστεΐνης που συμμετέχουν στην πρόσδεση των συμπλόκων, καθώς και στο σχηματισμό του τετραμερούς των Nbr35 και Cfd1 βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της πρωτεΐνης και είναι πλήρως εκτεθειμένες (Εικόνα 3.16).



**Εικόνα 3.15:** Απεικόνιση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης Cfd1 . Οι διάφορες τοπολογίες της πρωτεΐνης υποδεικνύονται με διαφορετικό χρώμα. Γαλάζιο: έλικα, Ροζ: βρόχος, Μωβ: Β πτυχωτή επιφάνεια



**Εικόνα 3.16:** Απεικόνιση των αμινοξέων κυστεΐνης της *Cfd1* που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών και την πρόσδεση ιόντων *Fe/S*

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> - Συμπεράσματα

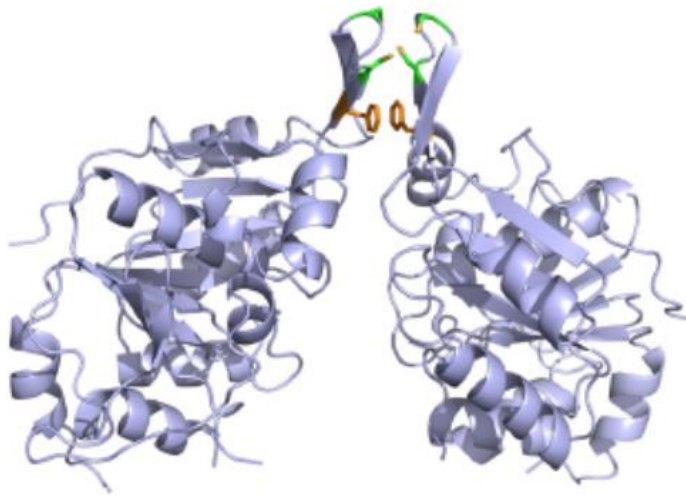
Οι ευκαρυωτικές πρωτεΐνες Nbr35 και Cfd1 αφορούν παράγοντες του συστήματος CIA κι εμπλέκονται στη δημιουργία και μετακίνηση των συμπλόκων Fe/S εντός του κυττάρου. Επιπλέον, η συσχέτιση των πρωτεϊνών με τη βλεφαριδογένεση και την πιθανή εμπλοκή τους με ασθένειες που εμπλέκονται με το σχηματισμό των βλεφαρίδων έχει στρέψει το ενδιαφέρον της έρευνας στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο πρωτεϊνών αλλά και με άλλους παράγοντες του ευκαρυωτικού κυττάρου (σύστημα τσαπερονίων CCT/ TRiC), καθώς και στη μελέτη του είδους συμπλόκων Fe/ S που προσδένονται σε αυτές και του τρόπου αλληλεπίδρασης. Η δομική μελέτη των πρωτεϊνών μέσω κρυσταλλογραφίας, μπορεί να δώσει πληροφορίες για το τρόπο πρόσδεσης των συμπλόκων, καθώς και τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση ώστε να διευκρινιστεί ο ρόλος τους στο μηχανισμό CIA. Για το σκοπό αυτό, στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση των ομόλογων πρωτεϊνών Nbr35 και Cfd1 του οργανισμού *Mus musculus*, σε βακτηριακό σύστημα έκφρασης ανασυνδυασμένων κυττάρων *E.coli.*, η απομόνωση και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών.

Η μελέτη πρόσδεσης των συμπλόκων Fe/S στις πρωτεΐνες Nbr35 και Cfd1 που προέρχονται από τον οργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* έχει καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι δύο πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα ισχυρό ετεροτετραμερές, το οποίο προσδένει συνολικά τέσσερα σύμπλοκα της μορφής [4Fe-4S], ένα εκ των οποίων λειτουργεί ως γέφυρα για τη σταθεροποίηση της δομής. Επιπρόσθετα, η Nbr35 φαίνεται να προσδένει τόσο ένα σταθερό σύμπλοκο Fe/S, όσο κι ένα ασταθές, ενώ αντίστοιχα, η Cfd1 προσδένει μόνο ένα ασταθές, το οποίο απομακρύνεται σχετικά γρήγορα από τη δομή της (Netz *et al.*, 2012). Σε συμφωνία με αυτές μελέτες, στη παρούσα εργασία παρατηρήθηκε ότι η Nbr35, εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό καφέ χρώμα, τόσο στο τελικό συγκεντρωμένο δείγμα, όσο και στα κλάσματα που προκύπτουν από τον καθαρισμό πιθανώς λόγω της πρόσδεσης των δύο διαφορετικών τύπων συμπλόκων ο χρωματισμός έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες καθαρισμού της ομόλογης Nbr35 που προέρχεται από τον *S. Cerevisiae* (Pallesen *et al.*, 2013). Αντίστοιχα, η Cfd1 ήταν σχεδόν άχρωμη, πιθανώς λόγω του ευκίνητου συμπλόκου που αποδεσμεύεται έπειτα από τη λύση των κυττάρων. Επιπλέον, η Cfd1 παρουσιάζει μια αστάθεια κατά τον καθαρισμό, καθώς σχηματίζει αρκετά εύκολα ίζημα όταν η συγκέντρωσή της είναι υψηλή (μεγαλύτερη από 3mg/ml). Η χρήση διαλύματος που περιέχει παράγοντες αύξησης της διαλυτότητας (Triton X-100 και Glycerol) είχε ως στόχο τη βελτίωση της σταθερότητας της πρωτεΐνης στο διάλυμα χωρίς το σχηματισμό ιζήματος κατά τη διαδικασία καθαρισμού. Η τεχνική

αυτή μπορεί να θεωρηθεί επιτυχής, καθώς βελτιστοποίησε τη διαδικασία του καθαρισμού και τη σταθερότητα των πρωτεϊνών στο διάλυμα. Ωστόσο, ο σχηματισμός ιζήματος στην περίπτωση της Cfd1 δεν εκμηδενίστηκε. Από τις διαφορετικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την παραλαβή της Cfd1 στο διαλυτό κλάσμα του κυτταρολύματος, καμία δε φαίνεται να λειτούργησε επιτυχώς με αποτέλεσμα την παραλαβή της πρωτεΐνης από έγκλειστα σωμάτια κι έπειτα την αναδίπλωσή της. Η τεχνική αυτή είχε ως αποτέλεσμα την υψηλή καθαρότητα της πρωτεΐνης, χωρίς επιπλέον προσμίξεις. Ωστόσο η κρυστάλλωσή της δεν ήταν δυνατή, πιθανώς λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης της. Αντίστοιχα, η Nbr35 ενώ απομονώθηκε από το διαλυτό κλάσμα του κυτταρολύματος και συγκεντρώθηκε σε υψηλή περιεκτικότητα (7-10mg/ml) η κρυστάλλωση της δεν ήταν επίσης δυνατή, λόγω χαμηλής καθαρότητας. Με βάση τη βιβλιογραφία που μελετήθηκε (Κεφάλαιο «Βιβλιογραφία») η δομική μελέτη των συγκεκριμένων πρωτεϊνών μέσω κρυσταλλογραφίας, δεν έχει πραγματοποιηθεί προς το παρόν, ωστόσο ο καθαρισμός με χρήση στήλης συγγένειας για κάθε πρωτεΐνη ξεχωριστά καθώς και για το σύμπλοκο τους έχει αναφερθεί σε διάφορες συνθήκες χωρίς να παρέχονται αναλυτικά στοιχεία για την καθαρότητά τους και τη τελική τους συγκέντρωση (Netz *et al.*, 2012) (Pallesen, *et al.*, 2013).

Επιπλέον, όσον αφορά τα δομικά χαρακτηριστικά της κάθε πρωτεΐνης, με βάση το μοντέλο της τριτοταγούς διαμόρφωσης που υπολογίστηκε, παρατηρείται μεγάλη ομοιότητα με τη βακτηριακή πρωτεΐνη Af226, η οποία προέρχεται από τον οργανισμό *Archaeoglobus fulgidus* και ανήκει στην ίδια οικογένεια με τις Nbr35 και Cfd1. Η δομή της Af226 έχει περιγραφεί μέσω κρυσταλλογραφίας (PDB ID: 3KB1). Η Af226 σχηματίζει ετεροδιμερές το οποίο συγκροτείται μέσω π-π επιστοιβαξης των φαινολικών δακτυλίων των καταλοίπων φαινυλαλανίνης (Phe 193) κάθε μονομερούς (Εικόνα 4.1). Το κατάλοιπο της φαινυλαλανίνης που συμμετέχει στη συγκρότηση, βρίσκεται 2 αμινοξέα ανοδικά της αλληλουχίας CX2C και είναι συντηρημένο και στις πρωτεΐνες Nbr35 και Cfd1 (Pallesen, *et al.*, 2013). Δεδομένου ότι η Nbr 35 και Cfd1 φαίνεται να σχηματίζουν έτεροδιμερή προς συγκρότηση των συμπλόκων Fe/ S και της ομοιότητας της δομής με την Af226, μια πιθανή αλληλεπίδραση για τη συγκρότησή τους, εκτός των συμπλόκων Fe/S, θα μπορούσε να είναι αντίστοιχη με αυτή της Af226. Επιπλέον, οι θέσεις των καταλοίπων κυστεΐνης και για τις δύο πρωτεΐνες με βάση τα αποτελέσματα υπολογισμού της τρισδιάστατης διαμόρφωσής τους, φαίνεται να είναι στο εξωτερικό της πρωτεΐνης κι επομένως είναι δυνατή η αλληλεπίδραση τόσο μεταξύ τους, όσο και με τα σύμπλοκα Fe/S.





**Εικόνα 4.1 :** Η δομή της πρωτεΐνης Af226 όπως προέκυψε από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Με πορτοκαλί φαίνονται οι φαινολικοί δακτύλιοι που συμμετέχουν στη συγκρότηση του διμερούς

(Pallesen, *et al.*, 2013)

#### **4.1 Μελλοντικοί στόχοι- Προοπτικές έρευνας**

Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών, φαίνεται να είναι καθοριστική για τη σταθεροποίηση της δομής τους, καθώς η διαδικασία καθαρισμού που ακολουθήσαμε, οδήγησε στην απομόνωση της τελικής πρωτεΐνης, η οποία ωστόσο ήταν ασταθής. Επιπλέον, σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη, κατά τη συνέκφραση των δύο πρωτεϊνών, αυξάνεται τα ποσοστά της απομονωμένης πρωτεΐνης στο σύμπλοκο λόγω της αλληλεπίδρασης για το σχηματισμό του ετεροτετραμερούς (Netz *et al.*, 2012). Αντίστοιχα επομένως, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί και η δοκιμή συνέκφρασης των δύο ομόλογων πρωτεϊνών, του οργανισμού *M.musculus*. Για το σκοπό αυτό, ξεκίνησε η κατασκευή ενός πλασμιδιακού φορέα (pRSFDuet-1) που θα φέρει τα γονίδια των δύο πρωτεϊνών σε διαφορετικές θέσεις κλωνοποίησης και θα είναι δυνατή η συνέκφραση και ο καθαρισμός τους ως σύμπλοκο. Οι μελέτες συνέκφρασης είναι σε εξέλιξη και είναι πιθανό να οδηγήσουν στην υπερέκφραση συμπλόκου Nbr35-Cfd1 στο διαλυτό κλάσμα και στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών στο διάλυμα. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα τη διευκόλυνση του καθαρισμού και την εξασφάλιση επαρκούς ποσότητας υψηλής καθαρότητας συμπλόκου για δομικές μελέτες και μελέτη των αλληλεπιδράσεων με το σύστημα τσαπερονίων CCT/TRiC.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adam, A. C., Bornhövd, C., Prokisch, H., Neupert, W. & Hell, K. The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J.* 25, 174–183 (2006)
- Ahmad R. (2011), Protein Purification , InTech
- Andrew A.J, R. Dutkiewicz, H. Knieszner, E.A. Craig, J. Marszalek, (2006) Characterization of the interaction between the J-protein Jac1 and Isu1, the scaffold for Fe–S cluster biogenesis, *J. Biol. Chem.* 281 (21) 14580–14587.
- Ali, Y. O., Kitay, B. M., & Zhai, R. G. (2010). Dealing with misfolded proteins: examining the neuroprotective role of molecular chaperones in neurodegeneration. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(10), 6859–87. doi:10.3390/molecules15106859
- Badano, J. L., Mitsuma, N., Beales, P. L., & Katsanis, N. (2006). The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7, 125–48. doi:10.1146/annurev.genom.7.080505.115610
- Bych, K., Netz, D. J. a, Vigani, G., Bill, E., Lill, R., Pierik, A. J., & Balk, J. (2008). The essential cytosolic iron-sulfur protein Nbp35 acts without Cfd1 partner in the green lineage. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(51), 35797–804. doi:10.1074/jbc.M807303200
- Couturier, J., Touraine, B., Briat, J.-F., Gaymard, F., & Rouhier, N. (2013). The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions. *Frontiers in Plant Science*, 4(July), 259. doi:10.3389/fpls.2013.00259
- Fontecave, M. (2006). Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nature Chemical Biology*, 2(4), 171–4. doi:10.1038/nchembio0406-171
- Hausmann, A., Aguilar Netz, D. J., Balk, J., Pierik, A. J., Mühlhoff, U., & Lill, R. (2005). The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3266–71. doi:10.1073/pnas.0406447102
- Kiley, P. J., & Beinert, H. (2003). The role of Fe–S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), 181–185. doi:10.1016/S1369-5274(03)00039-0
- Kypri, E., Christodoulou, A., Maimaris, G., Lethan, M., Markaki, M., Lysandrou, C., ... Santama, N. (2014). The nucleotide - binding proteins Nubp1 and Nubp2 are negative regulators of ciliogenesis, 517–538. doi:10.1007/s00018-013-1401-6

- Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology*, *317*(1), 41–72. doi:10.1006/jmbi.2001.5378
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, *460*(7257), 831–8. doi:10.1038/nature08301
- Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsässer, H.-P., Hausmann, A., Netz, D. J. a, Pierik, A. J., ... Mühlhoff, U. (2006a). Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1763*(7), 652–67. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.011
- Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsässer, H.-P., Hausmann, A., Netz, D. J. a, Pierik, A. J., ... Mühlhoff, U. (2006b). Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1763*(7), 652–67. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.011
- Netz, D. J. a, Mascarenhas, J., Stehling, O., Pierik, A. J., & Lill, R. (2014). Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends in Cell Biology*, *24*(5), 303–12. doi:10.1016/j.tcb.2013.11.005
- Netz, D. J. a, Pierik, A. J., Stümpfig, M., Bill, E., Sharma, A. K., Pallesen, L. J., ... Lill, R. (2012). A bridging [4Fe-4S] cluster and nucleotide binding are essential for function of the Cfd1-Nbp35 complex as a scaffold in iron-sulfur protein maturation. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(15), 12365–78. doi:10.1074/jbc.M111.328914
- Netz, D. J. a, Pierik, A. J., Stümpfig, M., Mühlhoff, U., & Lill, R. (2007). The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nature Chemical Biology*, *3*(5), 278–86. doi:10.1038/nchembio872
- Pallesen, L. J., Solodovnikova, N., Sharma, A. K., & Walden, W. E. (2013). Interaction with Cfd1 increases the kinetic lability of FeS on the Nbp35 scaffold. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(32), 23358–67. doi:10.1074/jbc.M113.486878
- Palmer, I., & Wingfield, P. T. (2012). NIH Public Access, (8 M), 1–25. doi:10.1002/0471140864.ps0603s38.Preparation
- Roy, A., Solodovnikova, N., Nicholson, T., Antholine, W., & Walden, W. E. (2003). A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *The EMBO Journal*, *22*(18), 4826–35. doi:10.1093/emboj/cdg455
- Stehling, O., Netz, D. J. a, Niggemeyer, B., Rösser, R., Eisenstein, R. S., Puccio, H., ... Lill, R. (2008). Human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(17), 5517–28. doi:10.1128/MCB.00545-08
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*(5), 523–33. doi:10.1007/s00253-002-1158-6

Venkateswara Rao, P., & Holm, R. H. (2004). Synthetic analogues of the active sites of iron-sulfur proteins. *Chemical Reviews*, 104(2), 527–59. doi:10.1021/cr020615+

Zhang, Y. et al. (2008) Dre2, a conserved eukaryotic Fe/S cluster protein, functions in cytosolic Fe/S protein biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5569–5582

Wiedemann, N. et al. Essential role of Isd11 in iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *EMBO J.* 25, 184–195 (2006).

### ***Διαδικτυακές αναφορές***

[www.bv-tech.it](http://www.bv-tech.it)

[www.lablife.org](http://www.lablife.org)

[www.takara-bio.com](http://www.takara-bio.com)

[brc.ncsu.edu](http://brc.ncsu.edu)

[www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com)