

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας»

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ- ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

Ασημάκη Αδαμαντία

Πρωτόκολλο απομόνωσης και δομικές μελέτες της
κικκάδιας απαδενυλάσης AtHESPERIN

Μεταπτυχιακή Διατριβή

2022

ΤΙΤΛΟΣ: Πρωτόκολλο απομόνωσης και δομικές μελέτες της κερκάδιας
απαδενυλασης AtHESPERIN

TITLE: Protocol for the purification and structural studies of the circadian
deadenylase AtHESPERIN

Τριμελής Επιτροπή:

- Νικόλαος Μπαλατσός (επιβλέπων καθηγητής), Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
- Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
- Βασιλική Σκαμνάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

*Στον μπαμπά μου,
Ταξιάρχη*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κιρκάδιος ρυθμός είναι εσωτερική διεργασία απόκρισής των οργανισμών σε εναλλαγές που κατευθύνονται από την περιστροφή της γης περί τον ήλιο καθώς και σε άλλες περιοδικές περιβαλλοντικές αλλαγές. Ο ρυθμός διαρκεί 24 ώρες, κατευθύνεται από τα κιρκάδια ρολόγια, τα οποία αποτελούνται από τον κεντρικό ταλαντωτή και μια σειρά από εισερχόμενα και εξερχόμενα σήματα που καθορίζουν φυσιολογικές αποκρίσεις, συμπεριφορές καθώς και βιοχημικά μονοπάτια στους οργανισμούς. Στα τελευταία, καθορίζουν μηχανισμούς που εμπλέκεται άμεσα την γονιδιακή ρύθμιση.

Έτσι, η σωστή λειτουργία του κιρκάδιων ρολογιών διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη διάρκεια ζωής του mRNA. Στην αποικοδόμηση του mRNA καθοριστικό βήμα αποτελεί η απαδενυλίωση, η αφαίρεση δηλαδή της πολυ(A) ουράς από το μόριο του mRNA. Η απαδενυλίωση επιτυγχάνεται με την βοήθεια ενζύμων γνωστά ως απαδενυλάσες. Η AtHESPERIN προέρχεται από το φυτό *Arabidopsis thaliana* και έχει χαρακτηριστεί ως απαδενυλάση. Στην παρούσα εργασία έγινε βελτιστοποίηση της απομόνωσης του ενζύμου από συγκεκριμένα βακτήρια και πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για τη κρυστάλλωση της AtHESP. Οι προσπάθειες για τη κρυσταλλοποίηση έγιναν με την βοήθεια εμπορικών κιτ συνθήκων κρυσταλλώσεων. Τα αποτελέσματα αποτελούν ένα σημαντικό βήμα για την βελτιστοποίηση των συνθηκών με σκοπό να ληφθούν κρύσταλλοι κατάλληλης ποιότητας για πειράματα περίθλασης ακτίνων-X.

Λέξεις κλειδιά: κιρκάδιοι ρυθμοί, αποικοδόμηση mRNA, απαδενυλίωση, πολυ(A) ουρά, AtHESPERIN, κρυστάλλωση

ABSTRACT

The circadian rhythm is a natural, internal process of organisms responding to changes occur by the rotation of the earth around the sun as well as to other periodic environmental changes. The rhythm lasts for 24 hours, and it is directed by the circadian clocks, which consist of the central oscillator and a series of incoming and outgoing signals that determine normal responses, behaviors and biochemical pathways in organisms. The latter defines mechanisms that are directly involved in gene regulation. The functioning of circadian clocks plays an important role in the mRNA regulation. The decisive step of mRNA degradation is the deadenylation ie the removal of the poly(A) tail from the mRNA molecule. Depadenylation can be achieved

with the aid of enzymes called deadenylases. For instance, AtHESP which is derived from the plant *Arabidopsis thaliana* has been classified as deadenylase. The present work aimed to optimize the isolated enzyme from specific bacteria for the crystallization of AtHESPERIN. For this scope, commercial crystallization kits were used. The results were very promising regarding the optimizing conditions and could shed light in obtaining crystals of appropriate quality for X-ray diffraction experiments.

Keywords: Circadian rhythms, mRNA decay, deadenylation, poly(A) tail, AtHESPERIN, crystallization

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Ο ΗΜΕΡΟΝΥΚΤΙΟΣ (ΚΙΡΚΑΛΙΟΣ) ΡΥΘΜΟΣ.....	7
1.2 ΣΥΜΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ.....	9
1.2.1 ΑΠΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ	11
1.2.2 ΑΠΑΔΕΝΥΛΑΣΕΣ.....	11
1.3 Α α HESPERIN	12
1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ	14
1.6 ΣΤΑΔΙΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ	15
1.7 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ.....	17
1.8 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ.....	18
1.9 ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ.....	19
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	20
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
3.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	21
3.2 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ.....	21
3.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	21
3.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ SDS-PAGE.....	22
3.4.1 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ.....	24
3.4.1.1 Χρώση με Coomassie.....	24
3.4.1.2 Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO ₃)	24
4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	26
4.1 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ BL21-GOLD ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pATHRA.....	26
4.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ Α α HESPERIN	26
4.3 ΛΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	27
4.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ Α α HESPERIN ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΓΧΙΣΤΕΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ (IMAC).....	27
4.4.1 ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΕΤΙΚΕΤΑΣ ΑΓΧΙΣΤΕΙΑΣ ΜΕΣΩ ΠΕΨΗΣ ΜΕ ΠΡΩΤΕΑΣΗ 3C	28
4.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD.....	28
4.6 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ.....	29
4.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΕΩΝ.....	30
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ -ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	31
5.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΗΣ Α α HESPERIN	31
5.2 ΕΞΕΤΑΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ.....	33
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	46

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο ΗΜΕΡΟΝΥΚΤΙΟΣ (ΚΙΡΚΑΔΙΟΣ) ΡΥΘΜΟΣ

Ο κirkάδιος ρυθμός είναι ένα εσωτερικό σύστημα μέτρησης του χρόνου που παρουσιάζει ενδογενή περιοδική μεταβολή σε μία περίοδο 24 ωρών με σκοπό να αφομοιώσει όλες τις αλλαγές του περιβάλλοντος. Το σύστημα αυτό έχει μελετηθεί σε πολλούς ζωντανούς οργανισμούς όπως σε φυτά, ζώα, μύκητες και κυανοβακτήρια. Το βιολογικό ρολόι λειτουργεί όμοια τόσο στον άνθρωπο όσο και στους υπόλοιπους πολυκύτταρους οργανισμούς. Ο όρος κirkάδιος προέρχεται από την λατινική φράση «circa diem» που σημαίνει «περίπου μία μέρα». Οι κirkάδιοι ρυθμοί είναι αυτοσυντηρούμενοι και ανεξάρτητοι αλλά συγχρονίζονται με τα εξωτερικά ερεθίσματα. Το φως της ημέρας είναι ίσως το κύριο περιβαλλοντικό ερέθισμα που επηρεάζει διάφορες πτυχές της φυσιολογίας του εκάστοτε οργανισμού. Οι κirkάδιοι ρυθμοί καθιστούν τους οργανισμούς ικανούς να προσμένουν και να προετοιμάζονται για τις επερχόμενες περιβαλλοντικές αλλαγές [1].

Η ικανότητα αυτή, η οποία είναι σημαντική για τον έλεγχο και το συντονισμό των εσωτερικών μεταβολικών διεργασιών με το περιβάλλον, επιτυγχάνεται με συγκεκριμένους εσωτερικούς ταλαντωτές που ονομάζονται κirkάδια ρολόγια [2]. Τα κirkάδια ρολόγια καθοδηγούν ρυθμικά την έκφραση γονιδίων συγχρονίζοντας έτσι τον μεταβολισμό με την φυσιολογία και τη συμπεριφορά, όπως ο προσανατολισμός των πτηνών και των μελισσών και οι κινήσεις φύλλων στα φυτά [3]. Οι διαδικασίες που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του κirkάδιου ρολογιού είναι σημαντικό χαρακτηριστικό του ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης [4].

Τα κirkάδια ρολόγια αποτελούν ένα αρκετά πολύπλοκο σύστημα χωρίς όμως να έχουν γίνει απολύτως κατανοητές όλες οι λειτουργίες τους. Τα κύτταρα που αποτελούν τον μηχανισμό του κirkάδιου ρολογιού απαντώνται σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς και αποτελούν μεμονωμένα κύτταρα. Εντοπίζονται πολλοί διαφορετικοί τύποι κυττάρων που ρυθμίζουν τον κirkάδιο ρυθμό ακόμα και όταν έχουν απομονωθεί από το υπόλοιπο οργανισμό. Σε αυτά τα κύτταρα τα κirkάδια ρολόγια είναι σε θέση να ρυθμίσουν ξανά τους κύκλους φως και σκότους.

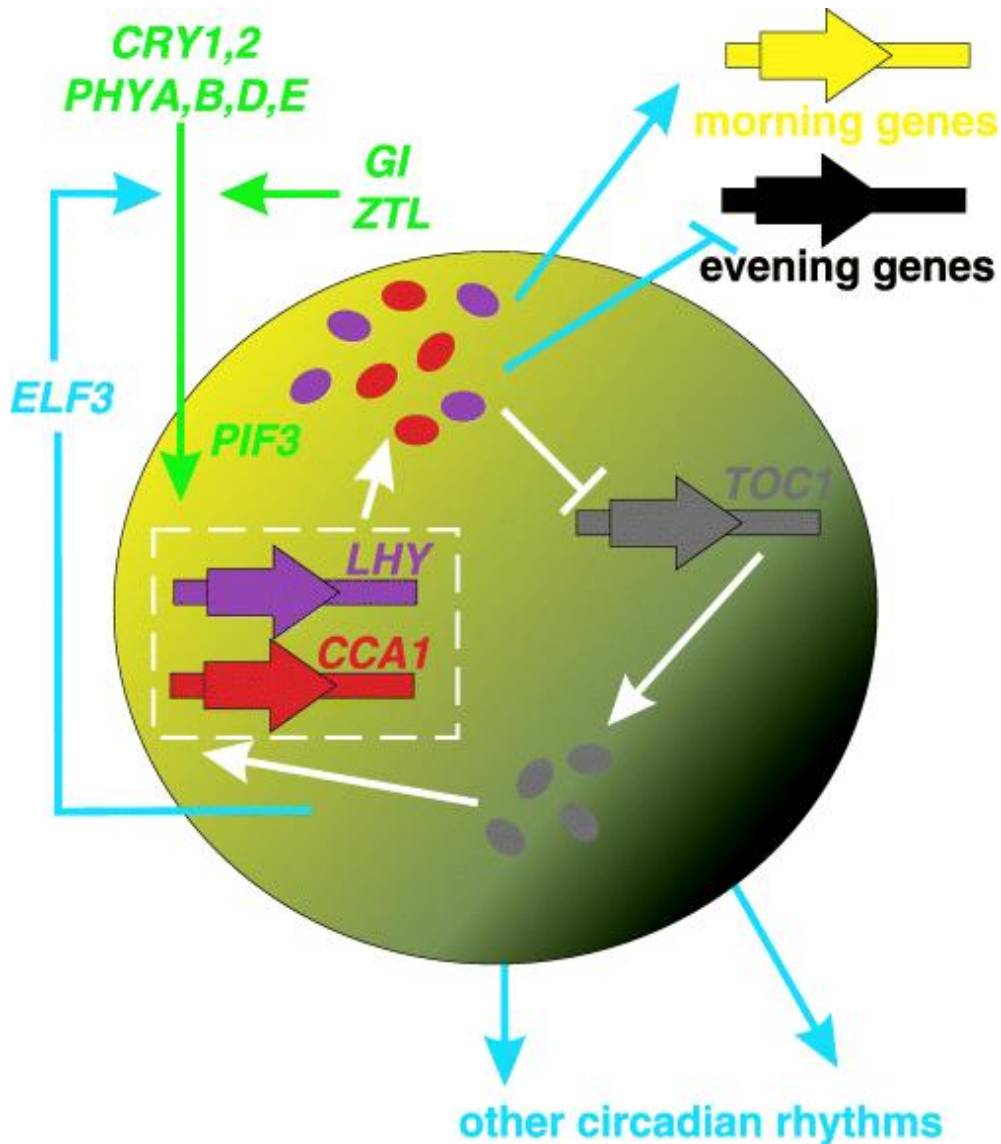
Ο κirkάδιος ρυθμός ελέγχεται από πολλαπλά γονίδια που είναι υπεύθυνα για μια ποικιλία σημαντικών λειτουργιών. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κirkάδιου ρυθμού όπως τα *Per 1*, *Per 2*,

Per 3, Bmal, Clock, Cry 1, Cry 2 και *Tim*. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα αυτών των γονιδίων σχηματίζουν τον πρωτογενή κικκάδιο, περιοδικά μεταβαλλόμενο, μοριακό ρυθμό.

Για παράδειγμα στη *Drosophila melanogaster*, εντοπίζονται οι πρωτεΐνες *Tim* (timeless) και *Per* (period) των οποίων η μετάφραση των mRNA πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα σχηματίζοντας ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο με στόχο τη σταδιακή συσσώρευσή τους [5]. Ύστερα από ένα χρονικό διάστημα το ετεροδιμερές σύμπλοκο διασπάται και οι πρωτεΐνες *Tim* και *Per* κατευθύνονται στον πυρήνα. Εκεί καταστέλλεται η έκφραση των γονιδίων *Per* και *Tim* από τη *Per* σχηματίζοντας ένα σύστημα μεταγραφικής ανατροφοδότησης. Η επαναφορά του ρολογιού επιτυγχάνεται ως απόκριση σε νέο κύκλο φωτός σκότους [6]. Ανάλογη διαδικασία πραγματοποιείται και για τη ρύθμιση του βασικού μοριακού μηχανισμού του κικκάδιου ρυθμού και στα θηλαστικά [7].

Τα φυτά, ως ζωντανοί οργανισμοί, υπόκεινται σε πολλά ερεθίσματα. Η φωτοπερίοδος των φυτών ελέγχεται από τον κικκάδιο ρυθμό. Κατά το φαινόμενο αυτό πραγματοποιούνται λειτουργίες που εκτελούνται από τα φυτά ανάλογα με το αν είναι μέρα ή νύχτα, ακόμη και ανάλογα με την εποχή του έτους. Μια τέτοια ικανότητα επιτρέπει στα φυτά να πραγματοποιήσουν σπουδαίες μεταβολικές δραστηριότητες όπως είναι η φωτόσυνθεση, η αναπνοή και η ανάπτυξη φύλλων με σκοπό την πραγματοποίηση της αναπαραγωγής. Οι μεταβολές του περιβάλλοντος, όπως η θερμοκρασία και η ρύθμιση της άνθησης ενισχύουν τον επαναπροσδιορισμό του κικκάδιου ρολογιού [8] [9].

Στην *Arabidopsis thaliana* τον κύριο ταλαντωτή ρυθμίζουν γονίδια μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης. Ο μοριακός μηχανισμός στηρίζεται στην αλληλεπίδραση γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες *LHY* και *CCA1* τις πρώτες ώρες της ημέρας και αποτελούν τα αρνητικά στοιχεία του βρόχου. Το γονίδιο που λειτουργεί ως θετικός ρυθμιστής του και εκφράζεται κατά τις βραδινές ώρες ονομάζεται *TOC1*. Έτσι λοιπόν, με το φως ενεργοποιούνται τα *LHY* και *CCA1* γονίδια και γίνεται καταστολή των *TOC* γονιδίων. Όσο μειώνεται η έκφραση των *LHY* και *CCA1*, αυξάνεται η *TOC1*. Η μέγιστη επίτευξη των επιπέδων παρατηρείται στο τέλος της ημέρας [10]. Επομένως, τα κύρια γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ρύθμιση του κεντρικού ταλαντωτή του φυτού είναι τα *LHY*, *CCA1* και *TOC1* [11].



Εικόνα 1. Το μοντέλο του κεντρικού ταλαντωτή στο *Arabidopsis thaliana* [12].

1.2 ΣΥΜΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

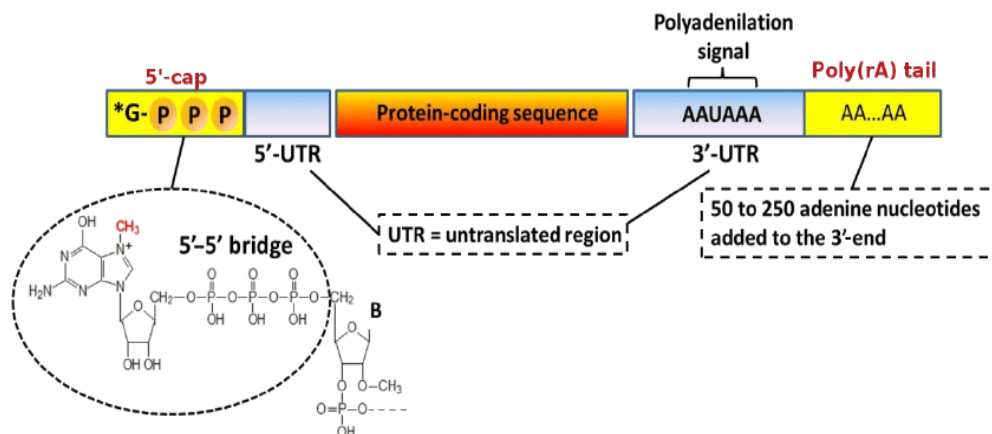
Το RNA είναι μακρομόριακη ένωση μεγάλου μοριακού βάρους και αποτελεί μόριο ζωτικής σημασίας για οποιαδήποτε μορφή ζωής μαζί με το DNA και τις πρωτεΐνες [13]. Τα κύρια είδη μορίων του RNA αποτελούνται από το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) που στην ουσία αποτελεί ένα ενδιάμεσο μόριο που οδηγεί στηνσύνθεση των πρωτεϊνών και αποτελεί περίπου το 5% του συνολικού RNA του κυττάρου, το μεταφορικό RNA (tRNA) και το ριβοσωματικό RNA (rRNA). Το mRNA παράγεται από το DNA μέσω μιας αρκετά πολύπλοκης διαδικασίας που ονομάζεται μεταγραφή. Η μεταγραφή λαμβάνει χώρα στον πυρήνα και το πρώιμο mRNA που δημιουργείται υφίσταται μια σειρά πολύπλοκων επεξεργασιών που το τροποποιούν σημαντικά για να εξέλθει στο κυτταρόπλασμα και να μεταφραστεί στα ριβοσώματα.

Για την αύξηση της σταθερότητας των μορίων mRNA αλλά και για την διασφάλιση του μηνύματος πριν τη έξοδο τους προς το κυτταρόπλασμα πραγματοποιούνται τροποποιήσεις. Οι περισσότερες τροποποιήσεις γίνονται ενώ διαρκεί η μεταγραφή και για το λόγο αυτό ονομάζονται συμμεταγραφικές.

Οι συμμεταγραφικές τροποποιήσεις σε πρώιμα μόρια mRNA περιλαμβάνουν την προσθήκη καλύπτρας στο 5' άκρο του mRNA, την προσθήκη της ουράς πολυ(A) στο 3' άκρο του mRNA καθώς και τη διαδικασία του ματίσματος [14]. Στο 5' άκρο προστίθεται η καλύπτρα ενός τροποποιημένου νουκλεοτιδίου γουανίνης που συνδέεται με δεσμό 5'-5' στο πρώτο νουκλεοτίδιο που μεταγράφεται. Η καλύπτρα προστατεύει το μόριό του mRNA από τις εξωριβονουκλεάσες και αποτελεί υπόστρωμα για πάρα πολλές αντιδράσεις μεθυλίωσης που πραγματοποιούνται [2]. Κατά την διαδικασία του ματίσματος πραγματοποιείται απομάκρυνση αλληλουχιών του πρώιμου μετάγραφου, που ονομάζονται ιντρόνια και γίνεται συνένωση των τμημάτων που απαρτίζουν το ώριμο mRNA και ονομάζονται εξόνια [15].

Η τροποποίηση του 3' άκρο του mRNA πραγματοποιείται με τη προσθήκη 250-300 νουκλεοτιδίων αδενοσίνης που ονομάζεται ουρά πολυ(A). Η διαδικασία αυτή είναι γνώστη ως πολυαδενυλίωση και τα ένζυμα που την καταλύουν ονομάζονται πολυ(A) πολυμεράσες. Η πολυαδενυλίωση αποτελεί μια πάρα πολύ σημαντική διεργασία και μπορεί να ευθύνεται για την σταθερότητα του μορίου ακόμα και για την ενίσχυση της μετάφρασης mRNA που εκφράζονται σε χαμηλό βαθμό [16]. Η ενίσχυση της εκκίνησης της μετάφρασης επιτυγχάνεται μέσω των πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες με την πολυαδενυλική αλληλουχία του άκρου 3' mRNA, προσδίδοντάς έτσι μια πιο εξειδικευμένη δομή στο άκρο αυτό. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι γνωστές ως PABPs [Poly(A) Binding Proteins] [17]. Επιπρόσθετα, οι PABPs συνδέονται στο παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4G, ο οποίος στην συνέχεια συνδέεται με την πρωτεΐνη eIF4E3. Η αλληλεπίδραση του eIF4G και PABP, ενώνει το mRNA τοποθετώντας κοντά το 3' με το 5' άκρο του μορίου [18]. Το μήκος της πολυ(A) ουράς που προστίθεται παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο, συχνά μεγάλες πολυ(A) ουρές ενισχύουν την πρωτεϊνοσυνθεση [19]. Ο μοριακός μηχανισμός της κερκάδιας συμπεριφοράς και της φυσιολογίας του κεντρικού ταλαντωτή στηρίζεται στην αυτορρύθμιση του μέσω αλληλένδετων μεταγραφικών και μεταφραστικών βρόχων ανατροφοδότησης (transcription/translation feedback loops :-TTFL) στους οποίους εμπλέκονται τα κεντρικά γονίδια του ρολογιού, που καθορίζουν τη ρυθμική έκφραση

γονιδίων. Έτσι οι πολυ(A) ουρές των RNA, διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην σταθερότητα ή την αποδόμηση τους [4].



Εικόνα 2. mRNA με 5' καλύπτρα και 3' πολυ(A) ουρά [20].

1.2.1 ΑΠΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ

Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης της μετάφρασης και την αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών mRNAs. Η αποικοδόμηση τους συνεισφέρει στην έκφραση του κικκάδιου ρυθμού και αρχίζει με την αφαίρεση της ουράς πολυ(A). Η διαδικασία όπου αφαιρείται η ουρά από το 3' άκρο ονομάζεται απαδενυλίωση και τα ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή απαδενυλάσες [21]. Οι ρυθμοί σύνθεσης και αποικοδόμησης συσχετίζονται άμεσα με τα μήκη των πολυ(A) ουρών του mRNA και επηρεάζουν ουσιαστικά την σταθερότητα του [22]. Έτσι λοιπόν, όταν η μείωση της ουράς φτάσει σε κομβικό μήκος αφαιρείται το άκρο 5' που φέρει την καλύπτρα και το εκτεθειμένο mRNA ανοικοδομείται άμεσα. Επιπλέον, μετά την αφαίρεση της ουράς πολυ(A) συνεχίζεται η αποδόμηση του mRNA από το άκρο 3'. Οι μηχανισμοί ρύθμισης της αποικοδόμησης εξασφαλίζουν ότι mRNAs δεν αυξάνονται στο κύτταρο και δεν ενισχύουν τη σύνθεση μη απαραίτητων πρωτεϊνών [23]. Επομένως, η διαδικασία της απαδενυλίωσης επηρεάζει άμεσα την μεταγραφή και μετάφραση καθώς και τη διάρκεια ζωής των μορίων mRNA [24].

1.2.2 ΑΠΑΔΕΝΥΛΑΣΕΣ

Οι απαδενυλάσες είναι εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολυ(A) ουρά των mRNA με κατεύθυνση 3'→5', απελευθερώνοντας, παράλληλα, 5'-AMP. Αν και οι απαδενυλάσες έχουν ως βασικό υπόστρωμα τις πολυ(A) ουρές σε έρευνες που έχουν διεξαχθεί έχει βρεθεί ότι μπορούν να ανοικοδομήσουν και μη-αδενοσινικά

ομοπολυμερή [25]. Οι απαδενυλάσες είναι ένζυμα που εξαρτώνται από Mg^{2+} , και χωρίζονται σε δυο υπερικογενείες την DEDD και την EEP. Οι απαδενυλασες της οικογένειας DEDD περιέχουν καταλυτικά αμινοξέα Asp (D) και Glu (E), τα οποία είναι απαραίτητα για την κατάλυση με βασικό ρόλο τον προσανατολισμό των ιόντων Mg. Η οικογένεια EEP περιέχει καταλυτικά Asp και His στους επίτοπους νουκλεάσης. Στον Πίνακα 1 δίνονται οι οικογένειες των απαδενυλασών όπως επίσης και οι οργανισμοί που εντοπίζονται [17].

Πίνακας 1. Οικογένειες απαδενυλασών

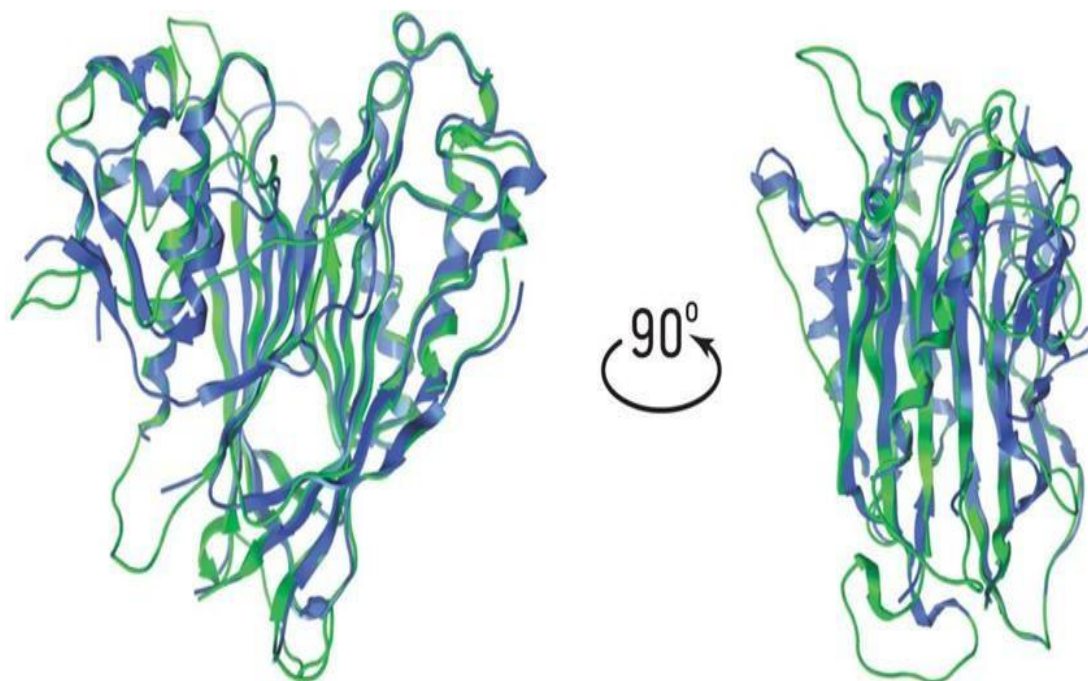
		Οργανισμός					
		<i>Sc</i>	<i>Ce</i>	<i>Dm</i>	<i>Xl</i>	<i>Mm</i>	<i>Hs</i>
Οικογένεια DEDD	CNOT7/POP2	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
Οικογένεια EEP	CNOT6/CCR4	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	+	+
	2' PDE	-	+	+	+	+	+

Τα είδη όπου έχει αποδειχθεί ενζυμική δραστηριότητα επισημαίνονται με +, με + επισημαίνονται τα είδη όπου προβλέπεται να υπάρχει ενζυμική δραστηριότητα και με - επισημαίνονται τα είδη στα οποία δεν έχει καθοριστεί η ενζυμική δραστηριότητα. *Sc*: *S.cerevisiae*, *Ce*: *C. elegans*, *Dm*: *D.melanogaster*, *Xl*: *X.laevis*, *Mm*: *M. musculus*, *Hs*: *H.sapiens* [16].

Οι απαδενυλασες έχουν εξειδικευμένους ρόλους στην ρύθμιση αρκετών βιολογικών διεργασιών αποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο ότι διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο, εκτός από την αποικοδόμηση του mRNA, και στην βιωσιμότητα των οργανισμών [26].

1.3 AtHESPERIN

Η AtHESP προέρχεται από το φυτό *Arabidopsis thaliana*. Η AtHESP είναι μια 3'-εξωριβονουκλεάση με δράση απαδενυλάσης και παρουσιάζει δηλαδή την ικανότητα να βραχάινει ή να αφαιρεί την πολυ(A) ουρά μορίων mRNA επηρεάζοντας την έκφραση και τη ρυθμικότητα των γονιδίων του κεντρικού ταλαντωτή TOC και CCA. Συγκαταλέγεται στα αλλοστερικά ένζυμα και ανήκει στις νουκλεάσες που εξαρτώνται από μαγνήσιο [27]. Η πρωτεΐνη είναι η πρώτη απαδενυλάση που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του κερκάδιου ρυθμού και σχετίζεται με τα φυτά. Πήρε το όνομά της από τον Έσπερο καθώς το μέγιστο επίπεδο έκφρασης εμφανίζεται το απόγευμα. Επιπλέον, είναι πιθανό η AtHESP να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις των φυτών, γεγονός που την καθιστά άξια περαιτέρω έρευνας [24].



Εικόνα 3. Μοντέλο ομολογίας της AtHESPERIN. Το μοντέλο της δομής της AtHESPERIN (μπλέ χρώμα) δημιουργήθηκε με βάση την δομή-οδηγό της CNOT6L ανθρώπου (πράσινο χρώμα) [27].

1.4 ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ

Ως κρυστάλλωση ορίζεται η απομάκρυνση ενός συστατικού από ένα διάλυμα με τη μορφή στερεών κρυσταλλικών σωματιδίων, των κρυστάλλων. Κρύσταλλος είναι το στερεό το οποίο αποτελείται από στοιχειώδη δομικά τμήματα (άτομα, μόρια ή ολόκληρες πρωτεΐνες), τακτοποιημένα σε μια σταθερή, τριπλή και περιοδική διάταξη [28]. Οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι είναι συνήθως εύθραυστοι ενώ περιθλούν τις ακτίνες Χ ασθενώς. Είναι ευαίσθητοι στη θερμοκρασία και καταστρέφονται μετά από παρατεταμένη έκθεση σε ακτινοβολία λόγω σχηματισμού ελεύθερων ριζών και καταστροφής του κρυσταλλικού πλέγματος [29]. Η παρουσία υψηλών ποσοστών διαλύτη, που αποτελεί σημαντικό παράγοντα εξασθένησης του σήματος περίθλασης, συμβάλλει ταυτόχρονα και στη διατήρηση των δομικών και βιολογικών ιδιοτήτων των μακρομορίων που εισέρχονται στον κρύσταλλο, γεγονός που επιτρέπει τη μελέτη τους με τη διάχυση υποστρωμάτων, συνενζύμων, παρεμποδιστών, προσδετών ή ιόντων μέσα και έξω από το πλέγμα [30]. Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι το βασικό βήμα της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας. Οι πρωτεΐνες, ως μακρομόρια, είναι πολύ ενδιαφέροντα φυσικοχημικά συστήματα οι ιδιότητες των οποίων ποικίλλουν ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως είναι η θερμοκρασία, το pH, οι ιοντικές δυνάμεις. Είναι δομικά δυναμικά συστήματα [31].

Η κρυσταλλογραφική ανάλυση μιας πρωτεΐνης στηρίζεται σε μια σειρά πειραματικών διαδικασιών. Πρώτο στάδιο αποτελεί η απομόνωση της πρωτεΐνης σε μεγάλη ποσότητα και βιοχημική καθαρότητα. Ακολουθούν δοκιμές σε διάφορες συνθήκες κρυστάλλωσης και έπειτα αναπτύσσονται κρύσταλλοι της πρωτεΐνης. Οι κρύσταλλοι υπόκεινται σε ακτινοβολία ακτίνων X με σκοπό τη συλλογή δεδομένων από τη περίθλαση. Μετά την κρυστάλλωση είναι πιθανό να αναπτυχθούν αρκετά προβλήματα όπως ο μεγάλος αριθμός ανακλάσεων, δυσκολίες στη μέτρηση ασθενών ανακλάσεων, καθώς και η καταστροφή των κρυστάλλων από τις ακτίνες X [32].

1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ

Η δημιουργία κρυστάλλων αποτελεί ένα εξαιρετικά πολύπλοκο στάδιο λόγω του μεγάλου αριθμού παραμέτρων που εμπλέκονται στην διαδικασία ανάπτυξης. Δυο από τους κυριότερους παράγοντες είναι η θερμοκρασία και το pH καθώς επηρεάζουν άμεσα την διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων των πρωτεϊνών σχετίζονται άμεσα με την ανάπτυξη ή την αναστολή των κρυστάλλων. Τα περισσότερα εργαστηριακά πειράματα λαμβάνουν χώρα σε θερμοκρασίες 4° C, 16° C, 20° C και δοκιμάζεται ένα ευρύ φάσμα τιμών pH με τη χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων. Θεωρητικά, καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται το ίδιο συμβαίνει και με τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών κι έτσι δε σχηματίζονται κρύσταλλοι. Επιπλέον, ένας ακόμα καθοριστικός παράγοντας είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Πολλές πρωτεΐνες έχουν κρυσταλλωθεί από διαλύματα που περιέχουν ένα έως εκατοντάδες mg/ml πρωτεΐνης. Ωστόσο για πειραματικές δοκιμές είναι επιθυμητή συγκέντρωση 10-20 mg/ml, εάν αυτό είναι δυνατόν. Όλοι οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη πιθανότητα εμφάνισης, των ρυθμό ανάπτυξης, την ποιότητα και το μέγεθος των κρυστάλλων ελέγχοντας τον υπερκορεσμό του συστήματος δίνονται παρακάτω (Πιν. 2) [33].

Πίνακας 2. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών [33].

<i>Φυσικοί Παράγοντες</i>	<i>Χημικοί Παράγοντες</i>	<i>Βιοχημικοί παράγοντες</i>
<ul style="list-style-type: none">• Θερμοκρασία	<ul style="list-style-type: none">• Κατακρημνιστικοί παράγοντες	<ul style="list-style-type: none">• Καθαρότητα δείγματος
<ul style="list-style-type: none">• Πίεση	<ul style="list-style-type: none">• pH	<ul style="list-style-type: none">• Ομοιογένεια δείγματος
<ul style="list-style-type: none">• Βαρύτητα	<ul style="list-style-type: none">• Ρυθμιστικό διάλυμα	<ul style="list-style-type: none">• Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις
<ul style="list-style-type: none">• Μαγνητικό και ηλεκτρικό πεδίο	<ul style="list-style-type: none">• Ιοντική ισχύ	<ul style="list-style-type: none">• Χημικές τροποποιήσεις
<ul style="list-style-type: none">• Ιζώδες	<ul style="list-style-type: none">• Συγκέντρωση δείγματος	<ul style="list-style-type: none">• Στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων
<ul style="list-style-type: none">• Δονήσεις και ήχος	<ul style="list-style-type: none">• Μεταλλικά ιόντα	<ul style="list-style-type: none">• Πρωτεόλυση
<ul style="list-style-type: none">• Χρόνος	<ul style="list-style-type: none">• Απορρυπαντικά	<ul style="list-style-type: none">• Ισοηλεκτρικό σημείο
<ul style="list-style-type: none">• Ποσοστό εξισορρόπησης	<ul style="list-style-type: none">• Βαρέα μέταλλα	<ul style="list-style-type: none">• Προσδέτες, αναστολείς
<ul style="list-style-type: none">• Πυρήνες	<ul style="list-style-type: none">• Προσμίξεις	<ul style="list-style-type: none">• Ιδιότητες πρωτεϊνών
<ul style="list-style-type: none">• Μεθοδολογία	<ul style="list-style-type: none">• Πηγή και σύνθεση αντιδραστηρίου	<ul style="list-style-type: none">• Συμμετρία
<ul style="list-style-type: none">• Δειγματοληψία	<ul style="list-style-type: none">• Βαθμός υπερκορεσμού	<ul style="list-style-type: none">• Σταθερότητα

1.6 ΣΤΑΔΙΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

Το πιο σημαντικό σημείο στην κρυσταλλογραφία είναι η ανάπτυξη κρυστάλλων άριστης ποιότητας, ώστε να είναι εφικτό να ακολουθήσουν οι κρυσταλλογραφικές μελέτες. Τα μεγέθη και τα σχήματα των κρυστάλλων είναι πιθανό να διαφέρουν και μπορεί να είναι από μακριές λεπτές βελόνες μέχρι και τέλειους κύβους. Ο χρόνος, που απαιτείται ώστε να προκύψει ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος μπορεί να είναι ελάχιστος έως και πολύ μεγάλος γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η συχνή παρατήρηση και έλεγχος εφόσον οι αλλαγές σε κάποιες παραμέτρους μπορούν να επιφέρουν οπτικά παρατηρήσιμες μεταβολές στους κρυστάλλους [34]. Για να επιτευχθεί η κρυστάλλωση απαραίτητη προϋπόθεση είναι να δημιουργηθεί κατάσταση υπερκορεσμού ώστε τα μόρια της πρωτεΐνης να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους. Η

κρυστάλλωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται γενικά σε τρία στάδια, εκ των οποίων τα δυο πρώτα βασίζονται στον υπερκορεσμό:

Πυρήνωση: Η ανάπτυξη των πυρήνων αποτελεί ίσως το σημαντικότερο βήμα για τον σχηματισμό των κρυστάλλων. Ο σχηματισμός ενός κρυστάλλου εξαρτάται αρχικά από το σχηματισμό ενός σταθερού πυρήνα, μια διαδικασία γνωστή ως πυρήνωση (nucleation), η οποία δεν είναι απαραίτητο ότι θα συμβεί αυθόρμητα αμέσως μετά την υπέρβαση του ορίου του κορεσμού. Αυτό συμβαίνει γιατί απαιτείται ενέργεια γι' αυτή τη διεργασία. Σ' ένα υπέρκορο διάλυμα, τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και να σχηματίσουν συσσωματώματα γύρω από συγκεκριμένα κέντρα σύνδεσης (κρίσιμοι πυρήνες).

Η κατάσταση υπερκορεσμού επιτυγχάνεται όταν το χημικό δυναμικό της πρωτεΐνης στο διάλυμα γίνει μεγαλύτερο από ό,τι στον κρύσταλλο. Αναγκαία προϋπόθεση για την κρυστάλλωση των μακρομορίων είναι η δημιουργία κατάστασης υπερκορεσμού. Ωστόσο, αντί της κρυσταλλικής δομής που αναμένεται υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να εμφανιστεί ένα άμορφο ίζημα. Το ίζημα τις περισσότερες φορές εμφανίζεται όταν η κατάσταση υπερκορεσμού πραγματοποιείται με μεγάλη ταχύτητα, αυτό έχει ως αποτέλεσμα μα μην δίνεται στα πρωτεϊνικά μόρια ο αναγκαίος χρόνος, ώστε να αλληλοεπιδράσουν με τα γειτονικά τους και να διευθετηθούν κατάλληλα.

Ανάπτυξη κρυστάλλων: Η διαδικασία ανάπτυξης κρυστάλλων αρχίζει, μετά το στάδιο της πυρήνωσης, με τη εναπόθεση μορίων πρωτεΐνης στους πυρήνες, ενώ παράλληλα μειώνεται και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης αυτής επιτυγχάνεται στην περιοχή κοντά στην επιφάνεια του κρυστάλλου, με αποτέλεσμα νέα μόρια να διαχέονται προς αυτή και να υπάρχει μια διαρκής μεταφορά μάζας.

Στη συνέχεια, η ανάπτυξη των κρυστάλλων επιβραδύνεται με την κίνηση του διαλύματος προς την ισορροπία. Η ισορροπία επιτυγχάνεται με αλλαγή των ιδιοτήτων ενός ακόρεστου διαλύματος του βιομορίου έτσι ώστε να μειωθεί η διαλυτότητά του ή να αυξηθούν οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των διαλυμένων μορίων. Αυτό γίνεται με διάφορους τρόπους όπως α) αλλαγή της ιοντικής ισχύος (προσθήκη άλατος), β) αλλαγή των ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων (αλλαγή pH, προσθήκη ιόντων που υποβοηθούν τη σύζευξη των μορίων), γ) αλλαγή της φύσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων και του διαλύτη (προσθήκη

πολυμερών ή ιόντων) και δ) αλλαγή θερμοκρασίας [35]. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η συμπεριφορά του κάθε πρωτεϊνικού μορίου είναι μοναδική, γεγονός που μας δείχνει πως είναι αρκετά περίπλοκο να επιτευχθούν οι συνθήκες εκείνες που θα δώσουν ένα μικρό αριθμό μεγάλων κρυστάλλων[36] [37].

Παύση ανάπτυξης κρυστάλλων: Με βάση το νόμο του Fick για τη διάχυση μάζας, αν ο μέσος συντελεστής διάχυσης είναι μεγαλύτερος του συντελεστή ταχύτητας ανάπτυξης, τότε η ταχύτητα ανάπτυξης καθορίζεται από τη μορφολογία του κρυστάλλου. Στην αντίθετη περίπτωση η ταχύτητα καθορίζεται από τη διάχυση των πρωτεϊνικών μορίων. Δεδομένου ότι στα συστήματα κρυστάλλωσης δεν μπορεί να προστεθεί πρωτεΐνη από εξωτερικούς παράγοντες, η ταχύτητα ανάπτυξης ελαττώνεται με το χρόνο και τελικά μηδενίζεται. Η χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη είναι απαραίτητο να έχει όσο το δυνατόν υψηλότερο βαθμό καθαρότητας καθώς αν υπάρχουν ξένα σωματίδια είναι πιθανό να λειτουργήσουν ως κέντρα σύνδεσης και να επιταχύνουν τη διαδικασία της πυρήνωσης. Αποτέλεσμα της ύπαρξης προσμίξεων είναι να αναπτύσσονται γρηγορότερα οι κρύσταλλοι, οι οποίοι όμως είναι μικρότερου μεγέθους, κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό [38].

1.7 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

Για να κρυσταλλωθεί μια πρωτεΐνη είναι απαραίτητη η χρήση κάποιων ουσιών, οι οποίες ονομάζονται παράγοντες κατακρήμνισης. Μια μεγάλη κατηγορία κατακρημνιστικών παραγόντων είναι τα άλατα (π.χ. θειικό αμμώνιο), τα οποία έχουν την δυνατότητα να οδηγήσουν σε κατακρήμνιση των πρωτεϊνών ενός διαλύματος μέσω της διαδικασίας της εξαλάτωσης. Αυτό σημαίνει πρακτικά ότι θα μειωθεί η διαλυτότητα της πρωτεΐνης επειδή τα μόρια του νερού, που υπό άλλες συνθήκες θα συνδέονταν στην επιφάνεια της και θα τη διαλυτοποιούσαν, σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μικρά ιόντα του άλατος. Επιπροσθέτως, οι οργανικοί διαλύτες (π.χ. αιθανόλη) έχουν παρόμοια δράση με τα άλατα. Τα μόριά τους ενώνονται με τα μόρια του νερού και μειώνουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την καθίζηση των πρωτεϊνών ή την κρυστάλλωσή τους. Παράλληλα μια ακόμα μεγάλη κατηγορία κατακρημνιστικών παραγόντων είναι οι πολυαιθυλενογλυκόλες. Το πιο γνωστό μέσο κατακρήμνισης είναι το υδατοδιαλυτό πολυμερές της πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG). Η παραγωγή ενός κρυστάλλου εξαρτάται από τις ιδιότητες του διαλύματος όπως είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Η επίτευξη των απαιτούμενων συνθηκών για την ικανοποιητική

παραγωγή κρυστάλλων απαιτεί πολλές δοκιμές οι οποίες στη μελέτη αυτή επιτυγχάνονται με την χρήση ρομπότ κρυσταλλώσεων. Οι πλέον κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη των κρυστάλλων είναι αυτές οι οποίες προκαλούν λίγη ή και καθόλου διαταραχή των ιδιοτήτων των πρωτεϊνικών μορίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται ένα μέσο ανάπτυξης με σταθερή θερμοκρασία και εύρος pH 3-10 [39].

Συνεπώς οι κρύσταλλοι πρέπει να διατηρούνται σε επαφή με το μητρικό υγρό κατά τη κρυστάλλωση καθώς επίσης και κατά τη διάρκεια της συλλογής δεδομένων, ώστε να αποφευχθεί η αφυδάτωση η οποία με τη σειρά της θα οδηγούσε στην κατάρρευση της κρυσταλλικής δομής. Σαν σύνολο η διαδικασία της κρυστάλλωσης είναι πολυπαραμετρική και φυσικά η κρυστάλλωση των πρωτεϊνικών μορίων δεν αποτελεί εξαίρεση [40].

Μόλις μερικοί κρύσταλλοι ή ακόμη και ένας μόνο μικροκρύσταλλος παρατηρηθεί και αποδειχθεί ότι είναι πρωτεϊνης προέλευσης (και όχι κρύσταλλος άλατος), τότε ξεκινάει η διαδικασία της βελτιστοποίησης. Κάθε συστατικό στοιχείο στο διάλυμα που απέδωσε κρυστάλλους, πρέπει να σημειωθεί και να θεωρηθεί ότι θα μπορούσε να έχει αντίκτυπο στην ποιότητα των αποτελεσμάτων. Κάθε μία από τις παραμέτρους ή παράγοντες στη συνέχεια προσεκτικά επαυξάνεται ή μειώνεται διαδοχικά και δοκιμάζεται για το εάν αποδίδει καλύτερους κρυστάλλους. Επειδή το πρόβλημα είναι μη γραμμικό, και η μία μεταβλητή μπορεί να συνδέεται την άλλη, αυτή η διαδικασία είναι συχνά πιο πολύπλοκη και δύσκολη [41].

1.8 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε εμπειρικές παρατηρήσεις. Υπάρχει ένα σύνολο αποτελεσμάτων που μπορεί να προσδιοριστεί με σαφήνεια όταν γίνεται παρατήρηση των κρυσταλλογραφικών πειραμάτων μέσω στερεοσκοπίου. Αυτά είναι η δημιουργία καθαρής σταγόνας, ο διαχωρισμός φάσεων, ο σχηματισμός ιζήματος και η ύπαρξη μη κρυσταλλικών ξένων σωμάτων και φυσικά η εμφάνιση κρυστάλλων. Σε μια καθαρή σταγόνα υπάρχει μόνο η υγρή φάση που δείχνει ότι το δείγμα είναι εντελώς διαλυτό εντός των ορίων του συστήματος απεικόνισης. Το διάλυμα μπορεί απλά να είναι ακόρεστο χωρίς να επηρεάζεται από τις συνθήκες κρυστάλλωσης [42].

Ο διαχωρισμός φάσεων θεωρείται ως ύπαρξη σταγόνας μέσα σε σταγόνα, μορφές παρόμοιες με αυτές που προκύπτουν από την ανάμιξη νερού με λάδι. Ο διαχωρισμός φάσεων είναι μια κατάσταση του διαλύματος που συχνά συγγέεται με τη δημιουργία στη σταγόνα μορφών που καλούνται σφαιρουλίτες. Οι σφαιρουλίτες είναι στερεοί και τα άκρα τους δεν είναι στρόγγυλα όπως συμβαίνει με τα υγρά και ελαία στο διαχωρισμό φάσεων. Αυτά είναι δυο χαρακτηριστικά που τους διαχωρίζουν από τις μορφές που εμφανίζει η σταγόνα όταν υφίσταται διαχωρισμό φάσεων.

Η κατακρήμνιση (σχηματισμός ιζήματος) υποδεικνύει ότι οι συνθήκες κρυστάλλωσης έχουν οδηγήσει το διάλυμα της πρωτεΐνης σε κατάσταση υπερκορεσμού. Αυτό υποδεικνύει ότι οι βιοχημικές συνθήκες έχουν οδηγήσει το δείγμα σε υπερκορεσμό πέρα από το επίπεδο που απαιτείται για ανάπτυξη κρυστάλλων. Το ίζημά μπορεί να εμφανιστεί με δύο μορφές, κακό (άμορφο) ή καλό (μικροκρυσταλλικό). Το άμορφο ίζημά μπορεί να έχει σκούρο καφέ χρώμα, δεν επαναδιαλυτοποιείται, δεν απορροφά χρωστικές και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διάλυμα πυρήνων.

Αντίθετα, το κρυσταλλικό ίζημα είναι η συσσωμάτωση πρωτεϊνών όπου το χημικό περιβάλλον επιτρέπει τη φυσική διαμόρφωση να παραμείνει ανέπαφη και οδηγούν στην ανάπτυξη κρυστάλλων με ελάχιστες δυνατότητες βελτίωσης. Τα κρυσταλλικά ιζήματα έχουν σχήμα, μπορεί να είναι αμμώδη, μπορεί να εμφανίζουν διχρωμία, επαναδιαλυτοποιούνται, απορροφούν χρωστικές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διάλυμα πυρήνων.

1.9 ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ X

Με την πραγματοποίηση της κρυστάλλωσης δημιουργούνται κρύσταλλοι υψηλής ποιότητας. Επομένως, για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής μια πρωτεΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ιδιότητά τους να περιθλούν τις ακτίνες X. Οι κρύσταλλοι τοποθετούνται ενδιάμεσα μιας πηγής ακτινών X και ενός ανιχνευτή ακτινών X. Η πηγή παράγει τις ακτίνες X οι οποίες διαπερνούν τον κρύσταλλο και περιθλούν τις ακτίνες X σε ένα ανιχνευτή ακτινών X όπως για παράδειγμα ένα φιλμ ακτινών X. Τα άτομα του κρυστάλλου ανακλούν τις ακτίνες δίνοντας έτσι μια συγκεκριμένη πρόβλεψη της δομής του κρυστάλλου.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το κικκάδιο ρολόι επιτρέπει στους οργανισμούς να προετοιμάζονται για τις περιβαλλοντικές αλλαγές που πρόκειται να συμβούν καθώς αποτελεί έναν ενδογενή μηχανισμό αντίληψης του χρόνου. Τα γονίδια που εμπλέκονται στο κικκάδιο ρολόι εκφράζονται ρυθμικά στη διάρκεια του 24ώρου, γεγονός που αποδεικνύει την σημαντικότητα του μηχανισμού στη διατήρηση της σωστής λειτουργίας του ρολογιού [43]. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η AtHESPERIN που προέρχεται από το φυτό *Arabidopsis thaliana*, η οποία ρυθμίζεται από το κικκάδιο ρολόι παρουσιάζοντας μέγιστη έκφραση τις βραδινές ώρες, ενώ παράλληλα συνδυάζει την έκφρασή της με τη δράση της ως αποαδενυλάση. [4].

Η εργασία αποτελεί μέρος μιας συνολικότερης έρευνας για τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου απομόνωσης και υπερέκφρασης της AtHESPERIN. Πιο συγκεκριμένα, σε συνέχεια προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, έγινε προσπάθεια αύξησης της απόδοσης της απομόνωσης της AtHESPERIN. Αναλυτικότερα, η AtHESPERIN που χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω εργαστηριακές μελέτες προήλθε από την απομόνωση της σε βέλτιστες συνθήκες απομόνωσης όπως αυτές περιγράφονται από τη Ριζούλη Μ.(2021) [44].

Η κρυσταλλική δομή της AtHESPERIN δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ετερόλογη έκφραση και ο καθαρισμός της AtHESPERIN και να εξεταστούν συνθήκες κρυστάλλωσης που θα οδηγήσουν στην αποκάλυψη της δομής της.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Όλα τα στάδια για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος.

3.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Για την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά κύτταρα BL21 – Gold (DE3). Η επιλογή των συγκεκριμένων στελεχών έγινε καθώς από αυτά απουσιάζουν οι πρωτεάσες *Lon* και *OmpT*, οι οποίες εάν είναι παρούσες μπορεί να ευθύνονται για χαμηλά επίπεδα παραγόμενης πρωτεΐνης. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα κύτταρα περιέχουν κωδικόνια που επιτρέπουν την έκφραση πρωτεϊνών με μεγάλο ποσοστό [45].

3.2 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

Τα πλασμίδια είναι κυκλικά μόρια (υπάρχουν και αρκετά γραμμικά) δίκλωνου DNA μεγέθους 1-300 Kb και έχουν την ιδιότητα εκτός των άλλων να εκφράζουν συγκεκριμένα γονίδια. Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε για τη παραγωγή πρωτεΐνης συζευγμένης με έξι ιστιδίνες (His Tag) που φέρει αλληλουχία αναγνώρισης για την πρωτεάση 3C και ονομάζεται pATHRA, κατασκευάστηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

3.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται παρακάτω (Πιν. 3, Πιν. 4)

Πίνακας 3. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη υλοποίηση της εργασίας

Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης βακτηρίων	
LB Broth	1% tryptone, 0.5% yeast extract και 0.17M sodium chloride.
TB Broth	1.2% tryptone, 2.4% γραμμάρια yeast extract, 0.4% Glycerol, 70mM K ₂ HPO ₄ και 16mM KH ₂ PO ₄ .

Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης βακτηριακών κυττάρων	
<u>Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 1:</u>	0.1M Sodium Phosphate buffer (pH 6), 0.2M NaCl, 10% Glycerol, 0.1% MTG, 1mg/mL lysozyme, 1mM PMSF, 50U βενζονάση
<u>Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 2:</u>	50mM Sodium Phosphate buffer (pH8), 0.2M NaCl, 5% Glycerol, 1mg/mL lysozyme, 1mM PMSF, 50U βενζονάση

Πίνακας 4. Διαλύματα υγρής χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC), ανάλογα με το είδος της στήλης.

Ρυθμιστικά διαλύματα Υγρής Χρωματογραφίας Συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC)	
Χρωματογραφία ιόντων Co	Χρωματογραφία ιόντων Ni
<p><u>Ρυθμιστικό διάλυμα</u> <u>εξισορρόπησης:</u> 0.1M Phosphate Buffer, 0.2M NaCl, 0.1% MTG ρύθμιση έως pH 6.0</p> <p><u>Ρυθμιστικό Διάλυμα έκλουσης:</u> 0.1M Phosphate Buffer, 0.6M Imidazole, 0.2M NaCl, 0.1% MTG ρύθμιση έως pH 6.0</p> <p><u>Διάλυμα διαπίδυσης:</u> 0,1M Tris buffer (pH 8), 0.2M NaCl, 0.1% MTG, 0.5M Imidazole</p>	<p><u>Ρυθμιστικό διάλυμα</u> <u>εξισορρόπησης:</u> 50mM Sodium Phosphate buffer, 0.2M NaCl, 0.1M Imidazole έως pH 8.0</p> <p><u>Ρυθμιστικό Διάλυμα</u> <u>έκλουσης:</u> 50mM Sodium Phosphate buffer, 0.2M NaCl, 0.5M Imidazole έως pH 8.0</p> <p><u>Dialysis buffer:</u> 0,05 Phosphate Buffer, 0.2M NaCl</p>

Για την ρύθμιση του pH του διαλύματος χρησιμοποιείται το διάλυμα διαπίδυσης. Η μεμβράνη διαπίδυσης που εμπεριέχει το δείγμα βυθίζεται μέσα στο διάλυμα διαπίδυσης, ενώ παράλληλα αναδεύεται για 16 ώρες, ώστε η αλλαγή του διαλύματος να πραγματοποιείται σταδιακά μέσω των πόρων της μεμβράνης.

3.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE αποτελεί μια ταχεία, χαμηλού κόστους και αρκετά αξιόπιστη μέθοδο για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών που τίθενται προς ανάλυση βασίζεται στη μοριακή τους μάζα. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό διαφορετικών πρωτεϊνών που συνυπάρχουν σε ένα δείγμα καθώς επίσης και για τον έλεγχο της καθαρότητας πρωτεϊνικών δειγμάτων και την ανίχνευση ανεπιθύμητων προσμίξεων. Βασική αρχή της μεθόδου αποτελεί ο διαχωρισμός των μορίων ανάλογα με το μέγεθος και το φορτίο τους ή συνδυασμό των παραμέτρων κατά τη μετακίνησή τους εντός ομογενούς ηλεκτρικού πεδίου [46].

Αρχικό στάδιο της μεθόδου αυτής είναι η δημιουργία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Ο προσδιορισμός της πυκνότητας της πηκτής εξαρτάται από την πρωτεΐνη που πρόκειται να εξεταστεί. Το σύστημα που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι ασυνεχές, απαρτίζεται από 2 πηκτές διαφορετικής πυκνότητας. Η πηκτική επιστίβαξης (stacking gel) έχει σταθερή πυκνότητα 5% ενώ πηκτική διαχωρισμού (separating gel) εναλλάσσεται ανάλογα με τις απαιτήσεις της πειραματικής διαδικασίας. Ο ρόλος της πηκτικής επιστίβαξης είναι η κίνηση των πρωτεϊνών έτσι ώστε να συγκεντρωθούν όλες μαζί και να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτική διαχωρισμού. Στην πηκτική διαχωρισμού, η κίνηση των πρωτεϊνών περιορίζεται από την πηκτική καθώς η κινητικότητα της πρωτεΐνης επηρεάζεται από το μέγεθος της. Όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος της τόσο μικρότερη είναι η κινητικότητα των μορίων. [47].

Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται με την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου, σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία των παραγόντων υπερθεϊκό αμμώνιο (APS) και TEMED. Το TEMED είναι επιταχυντής και καταλύει την αντίδραση πολυμερισμού των ελεύθερων ριζών του θείου που δημιουργούνται από το APS. Η πηκτική του πολυακρυλαμιδίου δημιουργείται σε κάθετη συσκευή που αποτελείται από 2 τζάμια τα οποία απέχουν 1mm. Με την βοήθεια μιας χτένας δημιουργούνται οι θέσεις υποδοχής του δείγματος. Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1× (Running Buffer 1×) το οποίο πρέπει να καλύπτει όλη την επιφάνεια της πηκτής

Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων 4× και έπειτα την τοποθέτηση τους για 5min στους 95° C για να επιτευχθεί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η φόρτωση των δειγμάτων και του μάρτυρα στις ειδικές θέσεις υποδοχής του δείγματος. Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται στο τροφοδοτικό το οποίο διαβιβάζει ρεύμα τάσης 120V [48]. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, η σύσταση των πηκτών και των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Σύσταση πηκτών και ρυθμιστικών διαλυμάτων

Πηκτή διαχωρισμού 10%		Πηκτή επισίβαξης 5%	
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	1.7 mL	Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	0.5 mL
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1.3 mL	Tris-HCl 1.5M pH 6.8	380 µL
dH ₂ O	1.9 mL	dH ₂ O	2.1 mL
APS 10%	50 µL	APS 10%	30 µL
TEMED	2 µL	TEMED	3 µL
SDS 10%	50 µL	SDS 10%	30 µL

Ρυθμιστικά διαλύματα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE	
Running Buffer 10×	250mM Tris, 1.92M Glycine (pH8-8.8)
Sample Buffer 4×	500mM Tris-HCl pH 6.8, 40% Glycerol, 8% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.04% Bromophenol Blue.

3.4.1 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

3.4.1.1 Χρώση με Coomassie

Μετά την ηλεκτροφόρηση οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με χρώση Coomassie. Η χρώση Coomassie της πηκτής πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιήθηκε με 10% Acetic Acid, Coomassie Blue 0.05% (40% Methanol, 10% Acetic Acid, dH₂O, Coomassie Blue R-250 ~0.1%). Η χρώση Coomassie έχει αρνητικό φορτίο και δεσμεύεται μη ειδικά στις πρωτεΐνες. Πραγματοποιείται ανάδευση του διαλύματος και στη συνέχεια γίνεται διήθηση για απομάκρυνση πιθανών συσσωματωμάτων από το Coomassie Blue R-250. Η πηκτή επωάζεται στο διάλυμα χρώσης, ώστε να γίνει κατακρήμνιση των πρωτεϊνών χωρίς τη διάχυσή τους. Μετά το πέρας της διαδικασίας λαμβάνουμε την εικόνα των ηλεκτροφορημένων πρωτεϊνών.

3.4.1.2 Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO₃)

Για την μονιμοποίηση χρησιμοποιήθηκε 50% Methanol, 5% Acetic Acid. Κατά τη μονιμοποίηση απομακρύνονται από την πηκτή ουσίες που επηρεάζουν τη χρώση, όπως το ρυθμιστικό διάλυμα, αποδιατακτικοί παράγοντες κ.α. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της χρώσης οι πρωτεΐνες ακινητοποιούνται αποτρέποντας τη διάχυσή τους από την πηκτή. Ακολουθεί η ευαισθητοποίηση όπου πραγματοποιείται αντίδραση των πρωτεϊνών με τον άργυρο με την βοήθεια διαλύματος 0.02% Na₂S₂O₃. Στη συνέχεια το οξυανιόν του θείου (S₂O₃²⁻), δημιουργεί σύμπλοκο με τα ελεύθερα ιόντα του αργύρου εμποδίζοντάς το να αναχθεί σε μεταλλικό άργυρο. Για την ανάπτυξη του

σήματος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 2% Na₂CO₃, 0.04% Formaldehyde. Η φορμαλδεΐδη ανάγει τον άργυρο ενώ η ύπαρξη του ανθρακικού νατρίου είναι αναγκαία για τη δημιουργία διαλύματος με αλκαλικό pH. Ο τερματισμός της αντίδρασης επιτυγχάνεται με διάλυμα 5% Acetic acid. Η οξείδωση του αργύρου σταματά με τη προσθήκη του οξικού οξέος την [49][50].

3.5 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Το εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας παρείχε όλο τον εξοπλισμό και τα όργανα που ήταν απαραίτητα για την πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής. Αναφέρονται τα σημαντικότερα εξ αυτών:

- ÄKTA purifier (FPLC system) (GE Healthcare Life Sciences)
- Αυτόματες πιπέτες (Gilson)
- Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini PROTEAN® Tetra Cell (BioRad)
- Μετρητής pH (Metrohm)
- Σύστημα απεικόνισης (XR doc, BioRad και Uvitec, Cambridge)
- Φυγόκεντροι (Centrifuge 5814R, eppendorf Z36HK, Hermle CR-22N, Himac, HITACHI)
- Φασματοφωτόμετρο (VWR 1600-PC)
- Ρομπότ κρυστάλλωσης OryxNano (Douglas Instruments)
- Τριβλία κρυσταλλώσεων 96 θέσεων τύπου καθημερινής σταγόνας (Molecular Dimensions)
- Στερεοσκόπιο (Olympus)

4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ BL21-GOLD ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pATHRA

Η διαδικασία για το σχηματισμό βακτηρίων *E.coli BL21-Gold* βασίζεται στη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Τα κύτταρα υποβάλλονται σε υψηλή θερμοκρασία για σύντομο χρονικό διάστημα με αποτέλεσμα το πλασμίδιο να εισέρχεται ευκολότερα στο κύτταρο καθώς οι πόροι της μεμβράνης είναι ανοιχτοί. Η διαδικασία πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες και τα βασικότερα στάδια της μεθόδου είναι:

- Στα επιδεικτικά βακτηριακά κύτταρα γίνεται προσθήκη 1μL ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pATHRA
- Ήπια ανάδευση και επώαση για 30min στον πάγο
- Τοποθέτηση για 45 δευτερόλεπτα σε υδατόλουτρο στους 42°C
- Επώαση για 2min σε πάγο
- Προσθήκη 900μL αποστειρωμένο LB Broth χωρίς την παρουσία αντιβιοτικού
- Επώαση στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) για 1h
- Καλλιέργεια με στερεό θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με το κατάλληλο αντιβιοτικό (50 μg/ml Αμπικιλίνη)
- Επίστρωση 50 μL σε τρυβλία petri με θρεπτικό μέσο LB Agar
- Επώαση overnight σε θερμοκρασία 37°C στα 210 rpm

4.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ AtHESPERIN

Μετά το μετασχηματισμό των βακτηριακών στελεχών με το επιθυμητό πλασμίδιο έγινε εμβολιασμός μιας καλλιέργειας 50 mL. Η καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 3 L αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού μέσου σε αναλογία 1/100 και επωάζονται στους 37°C με συνεχή ανάδευση (210rpm), αφού έχει προστεθεί κατάλληλη συγκέντρωση από το αντιβιοτικό (50μg/ml).

Η διαδικασία της ανάπτυξης των βακτηρίων παρακολουθήθηκε φασματοφωτομετρικά. Η επώαση θεωρήθηκε ολοκληρωμένη όταν η οπτική απορρόφηση της ήταν $A_{600nm}=0.6-0.7$ (περίπου μετά από 3 ώρες). Ακολούθησε επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Με προσθήκη του επαγωγέα (IPTG) οι καλλιέργειες μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης αφέθηκαν να

αναπτυχθούν για ακόμη 4h στους 37° C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm). Ακολούθησε φυγοκέντρωση και μετά αποθήκευση των κυττάρων στους -80° C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

4.3 ΛΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα κυτταρικά ιζήματα που συλλέχθηκαν μετά την επαγωγή επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Μετά την ομογενοποίησή τους πραγματοποιήθηκε προθήκη βενζονάσης, για την μείωση του ιξώδους μέσω της διάσπασης του DNA. Το διάλυμα επωάστηκε σε πάγο για 20 λεπτά ανακατεύοντας ανά διάστημα 5 λεπτών. Στη συνέχεια, τα διαλύματα υποβλήθηκαν σε μηχανική λύση με υπερήχους. Η ολοκληρωτική λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με χρήση υπερήχων, η οποία έγινε σε 9 κύκλους των 20 sec ενώ το κυτταρόλυμμα βρίσκεται σε πάγο. Η συσκευή παράγει υπερήχους για 20 sec σε εύρος 75%, σε συνεχόμενους κύκλους, ενώ για 20 sec σταματάει την παραγωγή υπερήχων. Αυτό συμβαίνει διότι κατά την εφαρμογή υπερήχων αυξάνεται η θερμοκρασία του διαλύματος. Έπειτα, το διάλυμα με τα υπόλοιπα λυμμένα κύτταρα υποβλήθηκε σε φυγοκέντρωση στις 45000×g/4° C για 45min. Πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του υπερκείμενου το οποίο αποτελείται από το διάλυμα των πρωτεϊνών, από το κυτταρικό ίζημα και φιλτράρεται με τη βοήθεια φίλτρου 0,45μm.

4.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ AtHESPERIN ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΓΧΙΣΤΕΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ (IMAC)

Πρωτεΐνες και πεπτίδια που εμφανίζουν συγγένεια με μεταλλικά ιόντα μπορούν να απομονωθούν χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου. Τα μέταλλα στη στήλη ακινητοποιούνται με τον σχηματισμό χηλικών συμπλόκων [51]. Η χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ ιόντων στοιχείων μετάπτωσης (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) που βρίσκονται ακινητοποιημένα πάνω σε ρητίνη, και συγκεκριμένων πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων [52]. Από τα αμινοξέα, ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τις ρητίνες παρουσιάζει η ιστιδίνη [52][53].

Για την απομόνωση της AtHESPERIN με χρωματογραφία αγκιστείας ακινητοποιημένων μετάλλων (IMAC) χρησιμοποιήθηκε στήλη όγκου 1mL με ιόντα κοβαλτίου (Talon crude, Cytiva) και ιόντα νικελίου (HisTrap FF, Cytiva). Πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση με τουλάχιστον 10 όγκους στήλης (cv) από το

αντίστοιχο διάλυμα. Κατόπιν, αφού ρυθμίστηκαν οι παράγοντες της πίεσης και ο ρυθμός ροής, πραγματοποιήθηκε πρόσδεση της πρωτεΐνης μέσω του His-Tag στα ιόντα μετάλλου, ενώ τα μη ειδικά απομακρύνθηκαν στα κλάσματα υπερδιηθήματος (flow-through). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η έκλυση της πρωτεΐνης, η οποία επιτεύχθηκε με βαθμίδωση συγκέντρωσης (0- 100%) του διαλύματος έκλυσης.

4.4.1 ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΕΤΙΚΕΤΑΣ ΑΓΧΙΣΤΕΙΑΣ ΜΕΣΩ ΠΕΨΗΣ ΜΕ ΠΡΩΤΕΑΣΗ 3C

Οι ετικέτες αγκιστείας (affinity tags) είναι απαραίτητες για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών αφού μέσα από αυτές πραγματοποιείται η αναγνώριση και η απομόνωση των πρωτεϊνών με τις οποίες είναι συγχωνευμένες [54]. Παρά το γεγονός ότι διαδραματίζουν ένα σπουδαίο ρόλο στο προσδιορισμό των πρωτεϊνών, είναι ικανές να επηρεάσουν τη βιολογική δράση τους, να εμποδίσουν την κρυστάλωσή τους, κ.α. Ένας τρόπος για την αφαίρεση των ετικετών αγκιστείας είναι η χρήση ενζύμων τα οποία ονομάζονται πρωτεάσες [55].

Για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η πρωτεάση 3C. Η επιλογή της συγκεκριμένης πρωτεάσης έγινε καθώς παρουσιάζει αυστηρή εξειδίκευση ως προς την αλληλουχία αναγνώρισης LEVLFQ/GP. Με το καθαρισμό της πρωτεΐνης από τη στήλη αγκιστείας, γίνεται ανάμιξη της πρωτεΐνη με την πρωτεάση 3C. Μόλις αναμιχθούν τα διαλύματα των πρωτεϊνών, αναδεύονται και επωάζονται για 16 ώρες στους 4°C για να ολοκληρωθεί η αντίδραση πέψης, υπό ήπια ανάδευση σε κυκλική κίνηση.

Αφού το δείγμα τοποθετηθεί στη στήλη αγκιστείας πραγματοποιείται απομόνωση των κλασμάτων του υπερδιηθήματος. Εκεί αναμένουμε την πρωτεΐνη καθώς πλέον δεν εμφανίζει συγγένεια προς τη στήλη. Στη συνέχεια, πραγματοποιώντας ένα ακόμα βήμα καθαρισμού η πρωτεάση 3C με την ετικέτα αγκιστείας GST, εκλύεται από τη στήλη.

4.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του δείγματος σε πρωτεΐνη πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford, μετά την απομόνωση της πρωτεΐνης από τη στήλη. Η μέθοδος στηρίζεται στην αλλαγή του χρώματος της χρωστικής (Coomassie Blue G) όταν υπάρχουν μόρια πρωτεΐνης στο διάλυμα [56]. Πιο συγκεκριμένα η

χρωστική δεσμεύεται σε κατάλοιπα λυσίνης πάνω στις πρωτεΐνες, παράγοντας έγχρωμο προϊόν, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Σε ορισμένο εύρος συγκεντρώσεων, στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης, η ένταση της σχηματιζόμενης έγχρωμης ένωσης είναι ανάλογη της ποσότητας της αρχικής ουσίας. Για την ποσοτικοποίηση του δείγματος με τη μέθοδο αυτή, είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης, με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Ακολουθεί η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 595nm.

4.6 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για την κρυστάλλωση των βιολογικών μακρομορίων και όλες έχουν ως στόχο να φέρουν τα διαλύματα σε κατάσταση υπερκορεσμού. Αυτές που χρησιμοποιούνται στις περισσότερες περιπτώσεις είναι η κρυστάλλωση μέσω διάχυσης ατμών (vapour diffusion), η κρυστάλλωση με διαπίδυση (dialysis) και η μέθοδος batch (batch crystallization). Οι μέθοδοι αυτές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη διαλυτότητα του πρωτεϊνικού διαλύματος και τον τρόπο με τον οποίο εκτίθεται το διάλυμα αυτό στο διάλυμα κρυστάλλωσης/ εξισορρόπησης.

Η μέθοδος διάχυσης ατμών που εκμεταλλεύεται την εξάτμιση και διάχυση των υδρατμών ανάμεσα σε υδατικά διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται με δυο τεχνικές:

- Τη τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας: Το διάλυμα της πρωτεΐνης αναμιγνύεται σε αναλογία 1:1 ή 1:2 με το διάλυμα που περιέχει τον κατακρημνιστικό παράγοντα και με τη μορφή σταγόνας αιωρείται πάνω από το «μητρικό» διάλυμα (reservoir) που περιέχει τον κατακρημνιστικό παράγοντα. Το διάλυμα αυτό πρέπει να έχει συγκέντρωση ίση με την επιθυμητή τελική συγκέντρωση του κατακρημνιστικού παράγοντα στο διάλυμα κρυστάλλωσης αφού πάψει η διάχυση και επέλθει ισορροπία. Η διαφορά της συγκέντρωσης του κατακρημνιστικού παράγοντα ανάμεσα στη σταγόνα και το μητρικό διάλυμα είναι η κινητήρια δύναμη που προκαλεί τη διάχυση των ατμών από τη σταγόνα στο φρεάτιο του μητρικού διαλύματος, μέχρι να εξισωθούν οι δύο συγκεντρώσεις. Δεδομένου ότι ο όγκος της σταγόνας (1-5μl) είναι πολύ μικρότερος του όγκου του διαλύματος στο φρεάτιο (100μl) το νερό που εξατμίζεται είναι ελάχιστο και δεν επηρεάζει τον όγκο της [57][58].

- Τη τεχνική της καθήμενης σταγόνας: Η τεχνική αυτή διαφοροποιείται μόνο από το γεγονός ότι η σταγόνα τοποθετείται σε ένα βοθρίο το οποίο διαχωρίζεται από τη δεξαμενή. Η προετοιμασία της μεθόδου της καθήμενης σταγόνας είναι απλή είτε πρόκειται για δοκιμή με το χέρι είτε για δοκιμή με τη χρήση ρομπότ επιτρέποντας τη διαλογή ενός μεγάλου αριθμού συνθηκών κρυστάλλωσης [33].

Στην κρυστάλλωση με τη μέθοδο της διαπίδωσης, η συγκέντρωση των μακρομορίων παραμένει σταθερή γιατί επιβάλλεται στα μόρια να παραμείνουν μέσα σε ένα καθορισμένο όγκο. Η σύσταση του διαλύματος αλλάζει με τη διάχυση των χαμηλού μοριακού βάρους συστατικών μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης.

Στη μέθοδο batch το πρωτεϊνικό διάλυμα και ο κατακρημνιστικός παράγοντας αναμιγνύονται και τοποθετούνται σε μικρά φρεάτια που στη συνέχεια σκεπάζονται με παραφινέλαιο που εμποδίζει την εξάτμιση[57][59]. Το σημείο που αντιστοιχεί στην αρχική κατάσταση του διαλύματος θα πρέπει να βρίσκεται στη μετασταθερή ζώνη προκειμένου να επιτευχθεί η κρυστάλλωση.

4.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΕΩΝ

Για τον προσδιορισμό των συνθηκών κρυστάλλωσης χρησιμοποιήθηκαν δύο εμπορικά σκευάσματα. Τα κιτ αυτά ήταν το PEG-Malonate Custom Screen MD1 1+2 και το AMS-MPD Custom screen MD1 1+2 της εταιρίας Molecular Dimensions. Το κιτ περιέχει διαλύματα με καθορισμένες συνθήκες που αποτελούνται από γνωστή συγκέντρωση αλάτων, ρυθμιστικών διαλυμάτων και κατακρημνιστικών παραγόντων και δίνονται αναλυτικά στο παράρτημα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η διάχυση ατμών με καθήμενη σταγόνα. Το διάλυμα πρωτεΐνης φυγοκεντρήθηκε για 10 min σε 10000 rpm και σε θερμοκρασία 4°C. Οι συνθήκες και η πρωτεΐνη τοποθετήθηκαν σε τριβλίο καθήμενης σταγόνας με 50μl διάλυμα reservoir, όγκο σταγόνας 0,4 μl σε αναλογία 2:1 πρωτεΐνη προς διάλυμα reservoir. Η τοποθέτηση πραγματοποιήθηκε με την χρήση robot κρυσταλλώσεων Oryxpano ενώ στο τέλος το τριβλίο κλείστηκε αεροστεγώς. Τα ρομπότ κρυσταλλώσεων προγραμματίζονται ώστε να επιτευχθεί η πραγματοποίηση πολλών δοκιμών διαφορετικών συνθηκών δοκιμών διαφορετικών συνθηκών. Χρησιμοποιήθηκαν δυο (2) τριβλία 96 θέσεων και αφέθηκαν για επώαση στους 16°C. Συνολικά εξετάστηκαν 172 συνθήκες. Η παρατήρηση γινόταν στο στερεοσκόπιο κάθε 48-72 ώρες ενώ παράλληλα συνέχιζε η επώαση στους 16°C.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ -ΣΥΖΗΤΗΣΗ

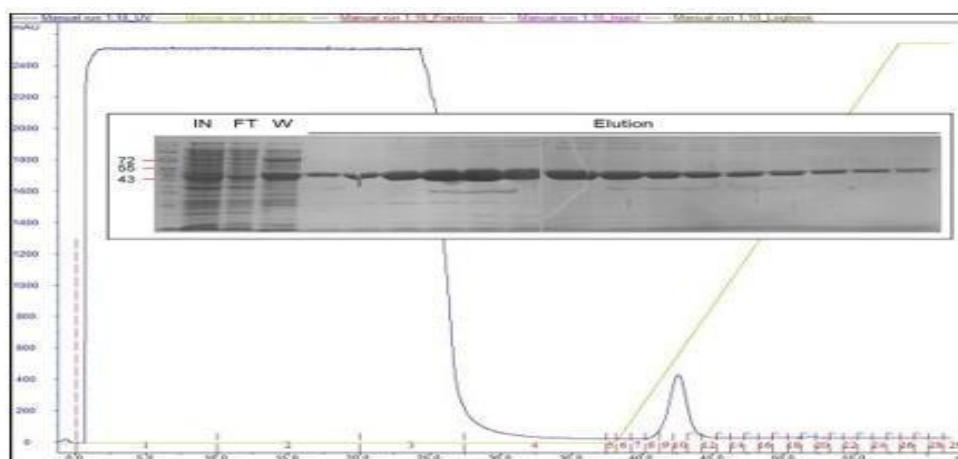
5.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΗΣ AtHESPERIN

Στην προσπάθεια να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο απομόνωσης και να εξασφαλιστεί η σταθερότητα της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας κατά την υπερέκφραση της AtHESPERIN. Επιπλέον, κατά τη διαδικασία απομόνωσης χρησιμοποιήθηκε στήλη IMAC ιόντων νικελίου και τέλος μειώθηκαν τα στάδια απομόνωσης κατά ένα, με τη χρήση πρωτεάσης 3C η οποία έφερε ετικέτα αγκιστείας ιστιδίνων (6HisTag). Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται συνολικά οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν και η συνολική απόδοση της διαδικασίας απομόνωσης.

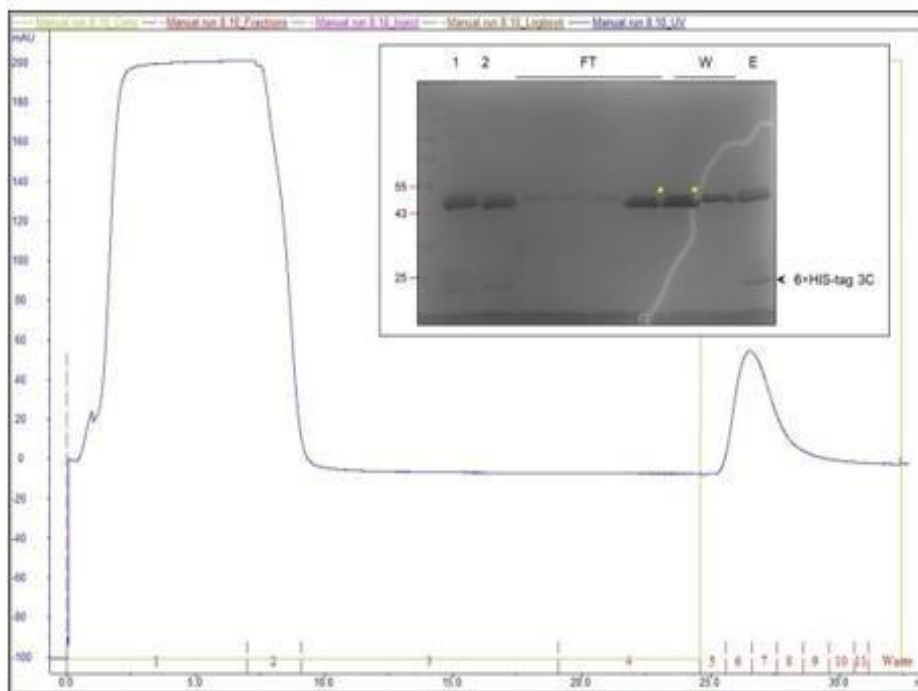
Πίνακας 6. Συνοπτική περιγραφή των συνθηκών της διαδικασίας απομόνωσης της AtHESPERIN.

Θρεπτικό μέσο	Είδος στήλης	Απόδοση mg HESP/L καλλιέργειας	Αριθμός σταδίων καθαρισμού
LB Broth	Co ²⁺	0.2	4
TB Broth	Ni ²⁺	0.5	3

Πιο συγκεκριμένα, στην Εικόνα 4 φαίνεται η απομόνωση της AtHESPERIN από τη στήλη νικελίου, ενώ στην Εικόνα 5 φαίνεται η απομόνωση της καθαρής AtHESPERIN μετά την πέψη με την πρωτεάση 3C-HisTag.



Εικόνα 4. Χρωματογράφημα από τη στήλη Νικελίου της πρωτεΐνης AtHESP (Histrap FF). Ένθετο: Ηλεκτροφόρηση υπό αφοδιαστικές συνθήκες σε πηκτή πυκνότητας 10%. IN: input FT: Flow through W: εκπλύσεις (wash). Αριστερά της πηκτής φαίνονται οι δείκτες μοριακής μάζας.



Εικόνα 5. Χρωματογράφημα στήλης αγχιστείας GST. Η κόκκινη κάθετος αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. **Ένθετο:** Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Οι δείκτες μοριακής μάζας δίνονται στα αριστερά της πηκτής.

Η καθαρότητα της πρωτεΐνης μετά τη συμπύκνωση προσδιορίζεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου 10%. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αυτής φαίνονται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6. Ανάλυση της συμπυκνωμένης πρωτεΐνης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% μετά από όλα τα στάδια καθαρισμού

Η απόδοση της απομόνωσης υπολογίστηκε σε 0,5mg πρωτεΐνης ανά L καλλιέργειας βακτηρίων. Με την παραπάνω διαδικασία κατέστη δυνατή η απομόνωση της AtHESPERIN σε ικανή ποσότητα, καθαρότητα έτσι ώστε να συνεχιστούν κρυσταλλογραφικές μελέτες.

5.2 ΕΞΕΤΑΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

Τελικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η κρυστάλλωση της AtHESPERIN. Οι δοκιμές κρυσταλλώσεων πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες συνθήκες κατακρημνιστικού παράγοντα με τη μέθοδο της καθημερινής σταγόνας. Η απομόνωση της AtHESPERIN σε ικανοποιητική ποσότητα και καθαρότητα επέτρεψε την συνέχιση της πειραματικής διαδικασίας με την αναζήτηση κατάλληλων συνθηκών για τη κρυστάλλωση της. Η βέλτιστη συγκέντρωση της πρωτεΐνης για δοκιμασία κρυστάλλωσης προσδιορίστηκε με το με το *pre-crystallization test* της εταιρείας Hampton Research το οποίο πραγματοποιήθηκε σε δυο συνθήκες θερμοκρασίας (22°C και 16°C). Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν συγκέντρωση πρωτεΐνης 5,7mg/ml και θερμοκρασία 16°C.

Στους πίνακες που ακολουθούν δίνονται οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για τη δημιουργία κρυστάλλων. Κατά την διεξαγωγή του πειράματος γινόταν συχνή παρακολούθηση των τριβλίων κρυσταλλώσεων με την βοήθεια στερεοσκοπίου. Για την διευκόλυνση των παρατηρήσεων χρησιμοποιήθηκε αριθμητικό σύστημα αντιστοίχισης από 0 έως 5, όπως φαίνεται παρακάτω για την ύπαρξη η όχι ιζήματος καθώς και για τη δημιουργία κρυστάλλων. Επιπλέον, σε μερικές θέσεις καταγράφηκε μη κρυσταλλικό ξένο σώμα (Junk).

- 0-> Μηδενική ύπαρξη ιζήματος ή Ξένο σώμα (J)
- 1-> Ελάχιστο ίζημα
- 2-> Ήπιο ίζημα
- 3-> Μεσαίας περιεκτικότητας ίζημα
- 4-> Βαρύ ίζημα
- 5-> Κρύσταλλος

Μετά από τις 7 πρώτες ημέρες επώασης στους 16°C, καταγράφηκαν οι μετρήσεις και για τα 2 τριβλία με τα διαφορετικά κιτ. Όσον αφορά στο κιτ PEG-Malonate Custom Screen MD1 1+2 η συνθήκη στην οποία εμφανίστηκε βαρύ ίζημα ήταν η E1 (0,1 M Sodium acetate, 5 pH, 10% w/v PEG 4000). Στην πλειοψηφία των συνθηκών εμφανίστηκε ελάχιστο έως ήπιο ίζημα με κάποιες εξαιρέσεις όπου καταγράφηκε μεσαίας περιεκτικότητας ίζημα (Πιν. 7). Έπειτα από 72 ώρες πραγματοποιήθηκε εκ νέου παρατήρηση των τριβλίων χωρίς όμως να παρατηρηθεί

ιδιαίτερη διαφοροποίηση στην ποσότητα ιζήματος. Οι διαφοροποιήσεις εντοπίστηκαν στα χαμηλότερα επίπεδα ιζήματος. (Πιν. 8).

Πίνακας 7: Αποτελέσματα 1^{ης} παρατήρησης των δοκιμών κρυσταλλώσεων με τη μέθοδο της καθημερινής σταγόνας σε τριβλία 96 θέσεων (5,7mg/mL).

PEG - MALONATE PLATE											
Ημερομηνία παρατήρησης: 24/05/2019											
0	3	2	3	3	3	0	1	2	3	3	1
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
0	0	2	2	3	1	0	1	2	2	2	1
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
0	1	1	2	2	3	0	1	2	2	2	3
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0	1	1	2	2	2	0	1	0	2	2	2
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
4	1	1	1	1	2	2	2	1	0	1	1
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
0	0	0	1	1	1	2	1	0	0	0	1
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
0	1	0	0	1	1	1	2	0	3	0	1
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
0	2	3	1	3	1	0	1	3	0	0	0
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Πίνακας 8: Αποτελέσματα 2ης παρατήρησης των δοκιμών κρυσταλλώσεων με τη μέθοδο της καθημερινής σταγόνας σε τριβλία 96 θέσεων (5,7mg/mL).

PEG - MALONATE PLATE											
Ημερομηνία παρατήρησης: 27/05/2019											
0 A1	3 A2	2 A3	3 A4	3 A5	3 A6	0 A7	1 A8	2 A9	3 A10	3 A11	1 A12
1 B1	2 B2	2 B3	2 B4	3 B5	1 B6	0 B7	1 B8	2 B9	2 B10	3 B11	1 B12
0 C1	2 C2	2 C3	2 C4	2 C5	3 C6	0 C7	1 C8	2 C9	3 C10	3 C11	3 C12
0 D1	1 D2	1 D3	3 D4	3 D5	3 D6	0 D7	1 D8	1 D9	2 D10	3 D11	3 D12
4 E1	2 E2	1 E3	1 E4	1 E5	2 E6	2 E7	2 E8	1 E9	0 E10	1 E11	1 E12
0 F1	0 F2	0 F3	1 F4	1 F5	1 F6	3 F7	1 F8	1 F9	1 F10	1 F11	1 F12
0 G1	1 G2	0 G3	1 G4	1 G5	1 G6	2 G7	2 G8	0 G9	3 G10	1 G11	1 G12
0 H1	2 H2	3 H3	1 H4	3 H5	1 H6	0 H7	1 H8	3 H9	0 H10	0 H11	1 H12

Μετά από περίοδο επώασης 12 ημερών καταγράφηκαν διαφοροποιήσεις στην παρουσία ιζήματος που για ορισμένες συνθήκες έφτασαν μέχρι το επίπεδο 4, την ύπαρξη δηλαδή βαρύ ιζήματος. Πιο συγκεκριμένα, οι συνθήκες αυτές ήταν οι **A4** (2,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate, 5 pH, 0,1 M Sodium acetate), **B4** (2,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate, 6 pH, 0,1 M MES), **B11** (2,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate, 6,5 pH, 0,1 M MES), **C12** (3,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate, 7,5 pH, 0,1 M HEPES). Η συνθήκη **E1** στην οποία είχε καταγραφεί εξ αρχής βαρύ ίζημα δεν μεταβλήθηκε με την πάροδο του χρόνου όπως αυτό φάνηκε και στις επόμενες παρατηρήσεις (Πιν. 9).

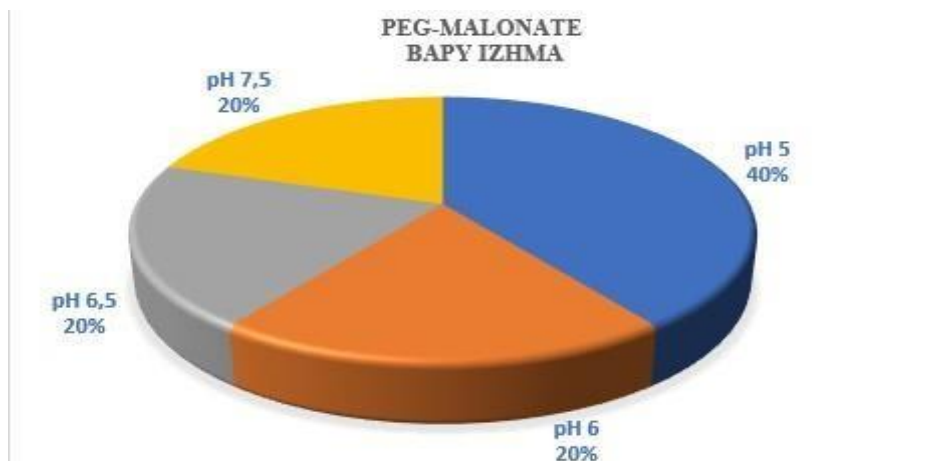
Πίνακας 9: Αποτελέσματα 3^{ης} παρατήρησης των δοκιμών κρυσταλλώσεων με τη μέθοδο της καθημερινής σταγόνας σε τριβλία 96 θέσεων (5,7mg/mL).

PEG - MALONATE PLATE											
Ημερομηνία παρατήρησης: 29/05/2019											
0	3	3	4	3	3	0	2	3	3	3	1
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
1	3	3	4	3	2	0	1	2	3	4	2
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
0	2	3	3	2	3	0	1	2	3	3	4
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0	1	1	3	3	3	0	1	1	2	3	3
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
4	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
0	0	0	1	1	1	3	1	1	1	1	1
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
0	1	1	1	1	2	3	1	1	3	1	1
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
0	2	3	1	3	2	0	1	3	0	1	1
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Όπως προαναφέρθηκε τα συστατικά των συνθηκών ποικίλλουν και είναι πιθανό να επηρεάζουν την κρυστάλλωση. Έτσι λοιπόν έγινε ομαδοποίηση ορισμένων συστατικών από τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν με σκοπό την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων. Όσον αφορά την σχέση μεταξύ των τιμών pH και της ποσότητας ιζήματος που εμφανίστηκε, παρατηρήθηκε ότι οι συνθήκες με τιμές pH 6 και 8 που καταγράφηκε μηδενική ύπαρξη ιζήματος αγγίζουν το 22% (Σχ 1.).

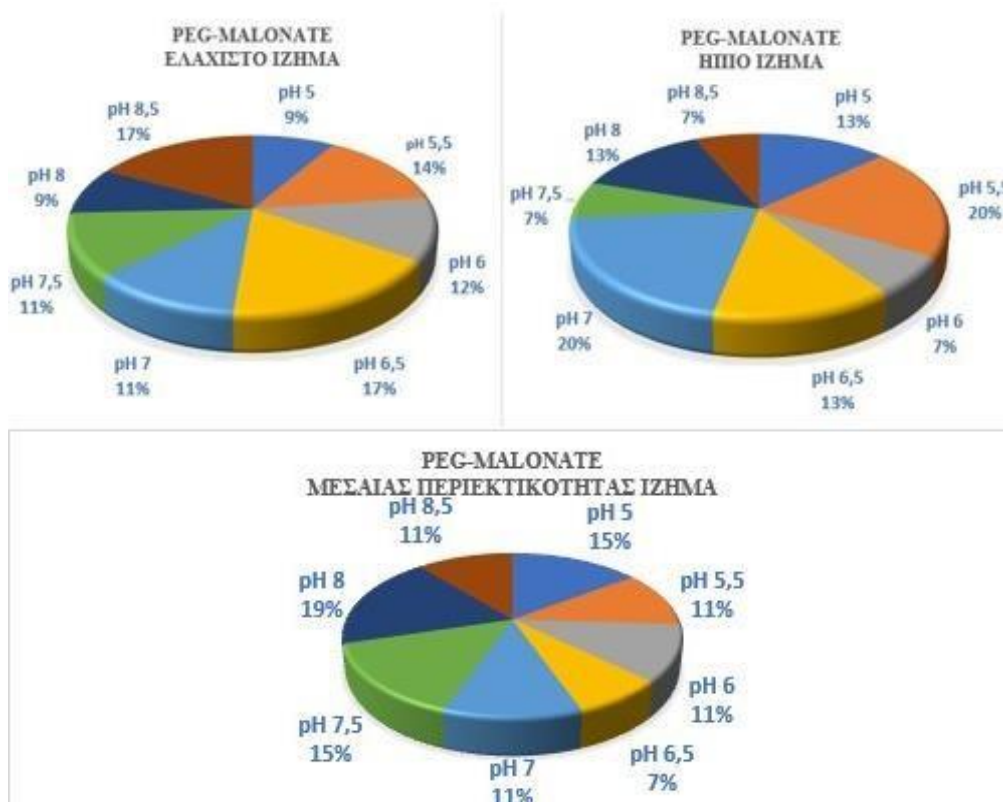


Σχήμα 1. Ποσοτικοποίηση των συνθηκών χωρίς ύπαρξη ιζήματος ανάλογα με τις τιμές pH του κит συνθηκών PEG-Malonate



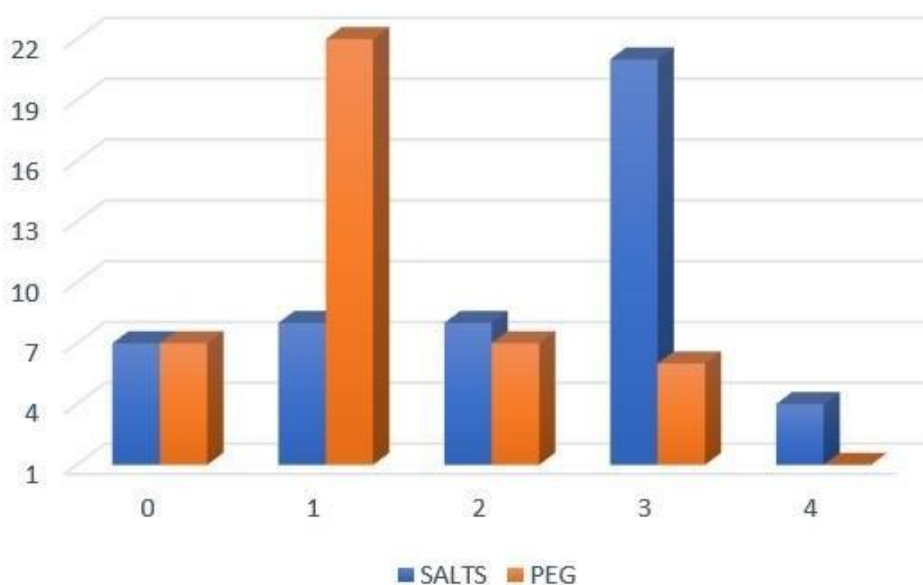
Σχήμα 2. Ποσοτικοποίηση των συνθηκών με βαρύ ίζημα ανάλογα με τις τιμές pH του κιτ συνθηκών PEG-Malonate

Αντίθετα εμφανίστηκε βαρύ ίζημα σε ποσοστό 40% των συνθηκών στην τιμή pH 5 (Σχ 2). Στο Σχήμα 3 δίνονται τα ποσοστά σε μορφή πίτας που καταγράφηκαν για τις υπόλοιπες κατηγορίες παρατηρήσεων ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές pH των συνθηκών.



Σχήμα 3. Ποσοτικοποίηση των συνθηκών ανάλογα με τις τιμές pH του κιτ συνθηκών PEG-Malonate

Η ομαδοποίηση βάσει του παράγοντα κατακρήμνισης έδειξε ότι στις συνθήκες που εμφάνισαν βαρύ και μεσαίας περιεκτικότητας ίζημα, ο παράγοντας ήταν κάποιο άλας και ελάχιστες περιείχαν PEG (Σχ.4).



Σχήμα 4. Ομαδοποίηση συνθηκών με βάση τον παράγοντα κατακρήμνισης στο κιτ συνθηκών PEG-Malonate

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι η πρωτεΐνη εμφανίζει μεγάλη διαλυτότητα όταν ο κατακρημνιστικός παράγοντας είναι η PEG ενώ όταν σαν κατακρημνιστικός παράγοντας χρησιμοποιείται κάποιο άλας η πρωτεΐνη εμφανίζει μικρή διαλυτότητα και για αυτό το λόγο υπήρξε η εναπόθεση βαρέος ιζήματος.

Παράλληλα, στην πρώτη παρατήρηση του κιτ AMS-MPD Custom screen MD1 1+2 η μέγιστη καταγραφή ήταν για μεσαίας περιεκτικότητας ίζημα. Επιπλέον, σημειώνεται ότι σε μερικές θέσεις στο τρυβλίο αυτό εντοπίστηκαν μη κρυσταλλικά ξένα σώματα ενώ σε άλλες θέσεις δεν είχε γίνει σωστή έκχυση της πρωτεΐνης και τις αντίστοιχες συνθήκες (Πιν. 10). Στη πορεία των παρατηρήσεων σημειώθηκε μόνο μια καταγραφή βαρύ ιζήματος στην συνθήκη **G6** (0,1 M HEPES, 7 pH, 65% v/v MPD) που όμως δεν οδήγησε σε δημιουργία κρυσταλλου.

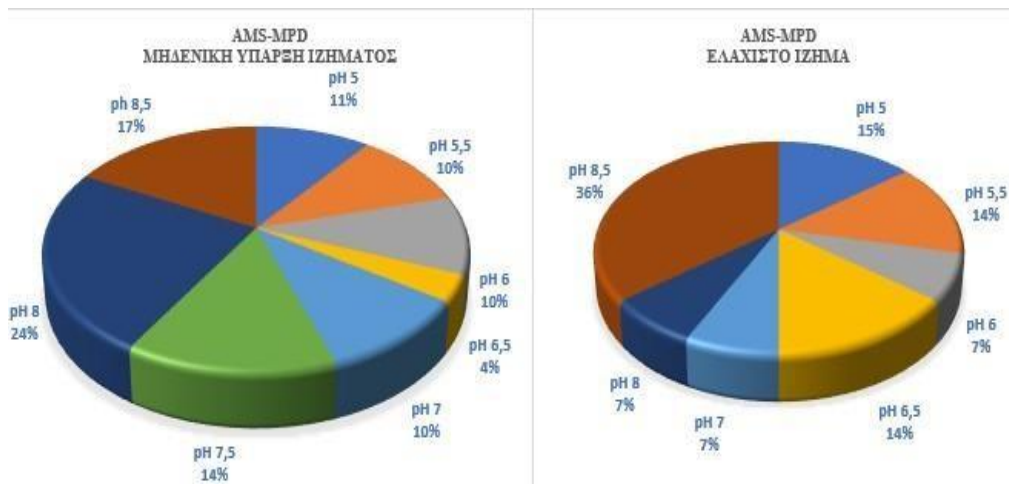
Αξίζει να σημειωθεί ότι αρκετές ήταν οι θέσεις όπου εμφανίστηκαν καθαρές σταγόνες και παρέμειναν χωρίς τη δημιουργία ιζήματος καθ' όλη τη διάρκεια των παρατηρήσεων (Πιν. 11).

Πίνακας 10: Αποτελέσματα 1^{ης} παρατήρησης των δοκιμών κρυσταλλώσεων με τη μέθοδο της καθημερινής σταγόνας σε τριβλία 96 θέσεων (5,7mg/mL).

AMS – MPD PLATE											
Ημερομηνία παρατήρησης: 24/05/2019											
0	0	0	1	1	0	2	0	1	2	0	0
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
0	0	-	3	1	0	1	1	0	3	J	0
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
0	0	0	-	-	-	-	0	0	J	1	0
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	2
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
-	-	-	2	3	3	2	2	3	3	2	2
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
-	-	-	-	3	3	2	2	3	3	2	2
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
-	-	-	-	3	3	1	1	0	3	2	2
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
-	-	-	-	0	0	0	0	2	1	1	1
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Πίνακας 11: Αποτελέσματα 2^{ης} παρατήρησης των δοκιμών κρυσταλλώσεων με τη μέθοδο της καθημερινής σταγόνας σε τριβλία 96 θέσεων (5,7mg/mL).

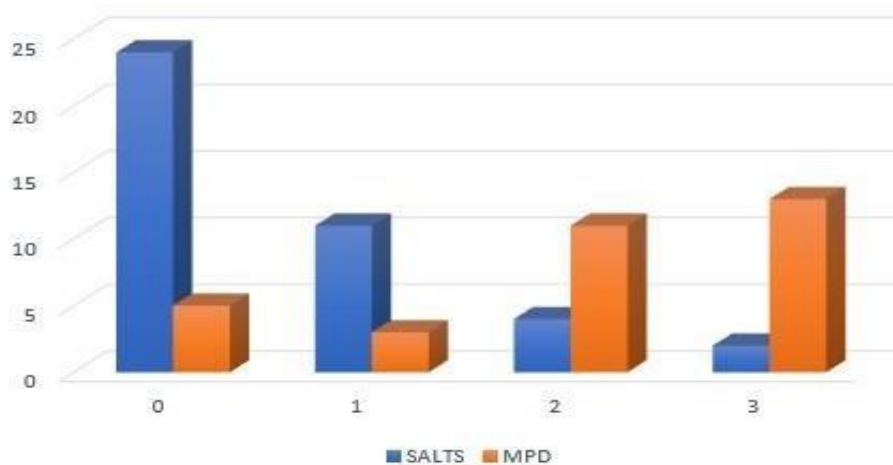
AMS – MPD PLATE											
Ημερομηνία παρατήρησης: 29/05/2019											
0	0	0	1	2	1	2	0	1	1	0	0
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
0	0	-	3	1	0	1	1	0	3	J	1
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
0	0	0	-	-	-	-	0	0	J	2	0
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	2
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
-	-	-	2	3	3	2	3	3	3	2	2
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
-	-	-	-	3	3	3	2	3	3	2	2
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
-	-	-	-	3	4	2	2	0	3	2	2
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
-	-	-	-	0	0	0	0	3	1	1	1
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12



Σχήμα 5. Ποσοτικοποίηση των συνθηκών με μηδενικό και ελάχιστο ίζημα ανάλογα με τις τιμές pH του κιτ συνθηκών AMS-MPD

Ομοίως, μετά από ομαδοποίηση των συνθηκών με βάση την τιμή του pH για το κιτ συνθηκών AMS-MPD παρατηρείται ότι οι συνθήκες που δεν εμφάνισαν καθόλου ή εμφάνισαν ελάχιστο ίζημα ήταν εκείνες που είχαν τιμές pH 8,5. (Σχ.5).

Σε αντίθεση με το προηγούμενο κιτ συνθηκών το κιτ συνθηκών AMS-MPD διαφέρει στα αποτελέσματα της ομαδοποίησης όσον αφορά τον κατακρημνιστικό παράγοντα. Έτσι λοιπόν, παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη εμφάνιζε μεγαλύτερη διαλυτότητα όταν ο κατακρημνιστικός παράγοντας ήταν κάποιο άλας και μικρότερη όταν υπήρχε κάποιος οργανικός διαλύτης (Σχ.6). Εντούτοις, πρέπει να τονισθεί ότι στο συγκεκριμένο κιτ συνθηκών μόνο μια συνθήκη εμφάνισε βαρύ ίζημα και αυτή περιείχε οργανικό διαλύτη ως συστατικό της.



Σχήμα 6. Ομαδοποίηση συνθηκών με βάση τον παράγοντα κατακρήμνισης στο κιτ συνθηκών AMS-MPD

Από την παρακολούθηση των τρυβλίων για τα 2 κιτ συνθήκων παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις μόνο σε ότι αφορά την ποσότητα ιζήματος. Παρά το μεγάλο αριθμό των διαλυμάτων που δοκιμάστηκαν οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν δεν κατέστησαν δυνατή τη παραγωγή κρυστάλλου στο σύντομο χρονικό διάστημα όπου διήρκησε η εξέταση τους.

Ωστόσο, υπάρχει σημαντική πιθανότητα να παρατηρηθεί ανάπτυξη κρυστάλλων στις συνθήκες που δοκιμάστηκαν μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Κατά συνέπεια, χρειάζεται διαρκής αποτίμηση της κατάστασης των σταγόνων των δοκιμών κρυστάλλωσης που πραγματοποιήθηκαν καθώς όπως προαναφέρθηκε η διαδικασία της κρυστάλλωσης μπορεί να είναι μια αρκετά χρονοβόρα διαδικασία.

Συμπερασματικά, οι διάφορες συνθήκες που δοκιμάστηκαν με σκοπό την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης AtHesp, έδωσαν πολύτιμες πληροφορίες όσον αφορά τη συμπεριφορά του ενζύμου. Η ομαδοποίηση των συνθήκων βάση του παράγοντα κατακρήμνισης έδειξε πως η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται σχηματίζοντας ίζημα μετουσιωμένης πρωτεΐνης όταν οι παράγοντες κατακρήμνισης είναι άλας ή οργανικοί διαλύτες, ενώ εμφανίζει μεγάλη διαλυτότητα όταν ο παράγοντας κατακρήμνισης είναι πολυμερείς κατακρημνιστικοί παράγοντες (PEG). Όσον αφορά την ομαδοποίηση με βάση τις τιμές του pH η πρωτεΐνη εμφανίζει μεγαλύτερη διαλυτότητα όταν οι τιμές κυμαίνονται από 8- 8.5. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να εστιαστεί στη δοκιμή ανάπτυξης κρυστάλλων σε ακόμα περισσότερες συνθήκες, σε διαφορετική θερμοκρασία και ενδεχομένως παρουσία πρόσθετων ουσιών, ώστε να ληφθούν κρύσταλλοι κατάλληλης ποιότητας για πειράματα περίθλασης ακτίνων-X.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] McClung, C.R. 2014, Wheels within wheels: new transcriptional feedback loops in the Arabidopsis circadian clock., 6: p. 2.
- [2] Alberts B, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. Molecular Biology of the Cell 5th ed. USA: Garland Science; 2008
- [3] Robles, M. S., Cox, J. & Mann, M. 2014. In-vivo quantitative proteomics reveals a key contribution of post-transcriptional mechanisms to the circadian regulation of liver metabolism. PLoS Genet, 10, e1004047
- [4] Beta, R. a. A. & Balatsos, N. a. A. 2018. Tales around the clock: Poly(A) tails in circadian gene expression. Wiley Interdiscip Rev RNA, e1484.
- [5] Yanovsky MJ., Kay SA. Living by the calendar: how plants know when to flower. Nature 2003; 4: 265-275
- [6] Saez, L., Meyer, P. & Young, M. W. 2007. A PER/TIM/DBT interval timer for Drosophila's circadian clock. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 72, 69-74.
- [7] Ko CH and Takahashi J. Molecular components of the mammalian circadian clock. Human Molecular Genetics, 2006, 15
- [8] Harmer S. L. 2009. The Circadian System in Higher Plants. pp 357-377
- [9] K., X., Αναπτυξιακή & Μοριακή Βιολογία φυτών.
- [10] Alabadi, D., et al., Science, 2001. 293(5531): p. 880-3
- [11] McClung, C. R. 2006. Plant circadian rhythms. Plant Cell, 18, 792-803
- [12] Webb Alex A. R. 2003. The physiology of circadian rhythms in plants. New Phytologist 160: 281–303
- [13] Stryer L., 1997. Βιοχημεία-Τόμος Πρώτος (3^η Έκδοση). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, pp.73-74.
- [14] Alberts, B., Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. 2006. Water, Essential Cell Biology (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη. p. 285
- [15] Lewin B. GENES VIII, κεφάλαιο 5
- [16] Gorgoni, B. & Gray, N. 2004. The roles of cytoplasmic poly (A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. Brief Funct. Genomic Proteomic3: 125-141
- [17] Goldstrohm, A.C. and M. Wickens, 2008. Nat Rev Mol Cell Biol., 9(4): p. 337-44.
- [18] Tarun, S. Z., Jr. & Sachs, A. B. 1996. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. EMBO J, 15, 7168-77
- [19] Sachs AB, Varani G. 2000. Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. Nat Struct Biol 7:356–61.

- [20] Roviello, G. N., Musumeci, D., Roviello, V., Pirtskhalava, M., Egoyan, A. & Mirtskhulava, M. 2015. Natural and artificial binders of polyriboadenylic acid and their effect on RNA structure. *Beilstein J Nanotechnol*, 6, 1338-47.
- [21] Tucker, M. & Parker, R. 2000. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 571-595
- [22] Audic Y. and Hartley R. 2004. Post-transcriptional regulation in cancer. *Biology of the Cell.*, σσ. 479–498
- [23] David L. Nelson, M.M.C., *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2000, New York, USA: Worth Publishers
- [24] Delis, C., Krokida, A., Tomatsidou, A., Tsikou, D., Beta, R. A., Tsioumpekou, M., Moustaka, J., Stravodimos, G., Leonidas, D. D., Balatsos, N. A. & Papadopoulou, K. K. 2016. AtHESPERIN: a novel regulator of circadian rhythms with poly(A)-degrading activity in plants. *RNA Biol*, 13, 68-82.
- [25] Yan, Y.B. 2014. Deadenylation: enzymes, regulation, and functional implications. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 5, 421-43.
- [26] Parker, R. and H. Song, The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. 11(2): p. 121-7.
- [27] Beta, R. a. A., Kyritsis, A., Douka, V., Papanastasi, E., Rizouli, M., Leonidas, D. D., Vlachakis, D. & Balatsos, N. a. A. 2020. Biochemical and in silico identification of the active site and the catalytic mechanism of the circadian deadenylase HESPERIN. *FEBS Open Bio*.
- [28] Μαύρος Π., "Στοιχεία Φυσικών Διεργασιών", (2009). 11)
- [29] Garman, E. (1999). "Cool data: quantity and quality." *Acta Cryst. D Biol Crystallogr* 55(Pt 10): 1641–165
- [30] Rupp, B. (2009). "Biomolecular Crystallography. Principles, Practice and Application to Structural Biology." Garland Science
- [31] Littlechild, J. A "Protein crystallization: magical or logical: can we establish some general rules? ", (1990).
- [32] Rhodes, G. *Crystallography Made Crystal Clear*. (Academic Press, 1999)
- [33] Krauss, R. I., Merlino, A., Vergara A., Sica F., An Overview of Biological Macromolecule Crystallization, *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 11643-11691
- [34] Acharya R, & Rees AR, (1997). «Encyclopedia of Molecular Biology & Molecular Medicine». Volume 6, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Federal Republic of Germany, 275-282.
- [35] Δημαρόγκωνα, Μ. (2012). "Διδακτορική Διατριβή: Μοριακές και δομικές μελέτες βιοκαταλυτών που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης." Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών
- [36] David Sheehan, "Physical Biochemistry: Principles and Applications", (2009).

- [37] Dale J. Benos, Sidney A. Simon, "Current Topics in Membranes, Volume 63, Chapter 1: Alex McPherson, Introduction to the Crystallization of Biological Macromolecules", (2009).
- [38] Blundell TL., Elliott G., Gardner SP., Hubbard T., Islam S., Johnson M., Mantafounis D., Murray-Rust P., Overington J., Pitts JE. et al. "Protein engineering and design." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1989.
- [39] Mullin J. W., 'Crystallization', Butterworth-Heinemann, 4th Edition, (2001), 125
- [40] Christoffersen J. and Christoffersen M. R., 1990. *Journal of Crystal Growth* 100, 203
- [41] McPherson, A. (2004). "Introduction to protein crystallization." *Methods* 34(3): 254–265
- [42] Lufta J.R., Wolfleya J. R., Snella E. H., What's in a drop? Correlating observations and outcomes to guide macromolecular crystallization experiments, NIH Public Access Author Manuscript, March 2011.
- [43] Baggs J. GC. Functional Analysis of Nocturnin. *Methods in Molecular Biology* 2003;317:243-54.
- [44] Ριζούλη, Μ., 2021, Ετερόλογη έκφραση, απομόνωση, χαρακτηρισμός και δοκιμασίες προσδιορισμού της δομής της απαδενυλάσης AtHESPERIN, Μεταπτυχιακή εργασία, TBB
- [45] Phillips, T. A., Vanbogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. 1984. Ion gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *J Bacteriol*, 159, 283-7.
- [46] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680 - 685.
- [47] Smith, B. J. (1984). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In *Proteins* (Vol. 1, pp. 41–56). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:41>
- [48] John M, Clark, J.R., Switzer, R.L. Ηλεκτροφόρηση. Πειραματική Βιοχημεία: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης; 1991. p. 45.
- [49] Switzer, R. C., 3rd, Merril, C. R. & Shifrin, S. 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 98, 231-7
- [50] Chevallet, M., Luche, S. & Rabilloud, T. 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc*, 1, 1852-8.
- [51] Bornhorst, J.A. and J.J. Falke, *Methods Enzymol*, 2000. 326: p. 245-54. 28
- [52] Sulkowski, E. (1985). Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, 3(1), 1-7.
- [53] Porath, J., *Protein Expr Purif*, 1992. 3(4): p. 263-81 29
- [54] Waugh, D.S., *Protein Expr Purif*, 2011. 80(2): p. 283-93. 30

- [55] Waugh, D.S., Trends Biotechnol, 2005. 23(6): p. 316-20. 31.
- [56] Kruger, N. J. 1994. The Bradford method for protein quantitation. Methods Mol Biol, 32, 9- 15
- [57] Chirgadze D., (2001), Protein Crystallization in Action
- [58] JBS Crystallization Freshman Kit, (2009), Get a head start crystallizing your protein, Jena, Jena Biosciences
- [59] Rayment, I. (2002), Small-Scale Batch Crystallization of Proteins Revisited: An Underutilized Way to Grow Large Protein Crystals

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Molecular Dimension PEG-malonate I&II			
	Salt	Buffer	pH
A1	1,0 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Sodium acetate	5
A2	1,5 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Sodium acetate	5
A3	1,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Sodium acetate	5
A4	2,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Sodium acetate	5
A5	2,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Sodium acetate	5
A6	3,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Sodium acetate	5
A7	1,0 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Sodium acetate	5,5
A8	1,5 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Sodium acetate	5,5
A9	1,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Sodium acetate	5,5
A10	2,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Sodium acetate	5,5
A11	2,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Sodium acetate	5,5
A12	3,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Sodium acetate	5,5
B1	1,0 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M MES	6
B2	1,5 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M MES	6
B3	1,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M MES	6
B4	2,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M MES	6
B5	2,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M MES	6
B6	3,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M MES	6
B7	1,0 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M MES	6,5
B8	1,5 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M MES	6,5
B9	1,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M MES	6,5
B10	2,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M MES	6,5
B11	2,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M MES	6,5
B12	3,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M MES	6,5
C1	1,0 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M HEPES	7
C2	1,5 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M HEPES	7
C3	1,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M HEPES	7
C4	2,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M HEPES	7
C5	2,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M HEPES	7
C6	3,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M HEPES	7
C7	1,0 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M HEPES	7,5
C8	1,5 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M HEPES	7,5
C9	1,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M HEPES	7,5
C10	2,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M HEPES	7,5
C11	2,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M HEPES	7,5
C12	3,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M HEPES	7,5
D1	1,0 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Tris	8
D2	1,5 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Tris	8
D3	1,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Tris	8
D4	2,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Tris	8
D5	2,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Tris	8
D6	3,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Tris	8
D7	1,0 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Tris	8,5
D8	1,5 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Tris	8,5
D9	1,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Tris	8,5
D10	2,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Tris	8,5
D11	2,9 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Tris	8,5
D12	3,4 M Sodium malonate dibasic monohydrate	0,1 M Tris	8,5

Molecular Dimension PEG-malonate I&II

	Buffer	pH	Precipitant
E1	0,1 M Sodium acetate	5	10% w/v PEG 4000
E2	0,1 M Sodium acetate	5	15% w/v PEG 4000
E3	0,1 M Sodium acetate	5	20% w/v PEG 4000
E4	0,1 M Sodium acetate	5	25% w/v PEG 4000
E5	0,1 M Sodium acetate	5	30% w/v PEG 4000
E6	0,1 M Sodium acetate	5	35% w/v PEG 4000
E7	0,1 M Sodium acetate	5,5	10% w/v PEG 4000
E8	0,1 M Sodium acetate	5,5	15% w/v PEG 4000
E9	0,1 M Sodium acetate	5,5	20% w/v PEG 4000
E10	0,1 M Sodium acetate	5,5	25% w/v PEG 4000
E11	0,1 M Sodium acetate	5,5	30% w/v PEG 4000
E12	0,1 M Sodium acetate	5,5	35% w/v PEG 4000
F1	0,1 M MES	6	10% w/v PEG 4000
F2	0,1 M MES	6	15% w/v PEG 4000
F3	0,1 M MES	6	20% w/v PEG 4000
F4	0,1 M MES	6	25% w/v PEG 4000
F5	0,1 M MES	6	30% w/v PEG 4000
F6	0,1 M MES	6	35% w/v PEG 4000
F7	0,1 M MES	6,5	10% w/v PEG 4000
F8	0,1 M MES	6,5	15% w/v PEG 4000
F9	0,1 M MES	6,5	20% w/v PEG 4000
F10	0,1 M MES	6,5	25% w/v PEG 4000
F11	0,1 M MES	6,5	30% w/v PEG 4000
F12	0,1 M MES	6,5	35% w/v PEG 4000
G1	0,1 M HEPES	7	10% w/v PEG 4000
G2	0,1 M HEPES	7	15% w/v PEG 4000
G3	0,1 M HEPES	7	20% w/v PEG 4000
G4	0,1 M HEPES	7	25% w/v PEG 4000
G5	0,1 M HEPES	7	30% w/v PEG 4000
G6	0,1 M HEPES	7	35% w/v PEG 4000
G7	0,1 M HEPES	7,5	10% w/v PEG 4000
G8	0,1 M HEPES	7,5	15% w/v PEG 4000
G9	0,1 M HEPES	7,5	20% w/v PEG 4000
G10	0,1 M HEPES	7,5	25% w/v PEG 4000
G11	0,1 M HEPES	7,5	30% w/v PEG 4000
G12	0,1 M HEPES	7,5	35% w/v PEG 4000
H1	0,1 M Tris	8	10% w/v PEG 4000
H2	0,1 M Tris	8	15% w/v PEG 4000
H3	0,1 M Tris	8	20% w/v PEG 4000
H4	0,1 M Tris	8	25% w/v PEG 4000
H5	0,1 M Tris	8	30% w/v PEG 4000
H6	0,1 M Tris	8	35% w/v PEG 4000
H7	0,1 M Tris	8,5	10% w/v PEG 4000
H8	0,1 M Tris	8,5	15% w/v PEG 4000
H9	0,1 M Tris	8,5	20% w/v PEG 4000
H10	0,1 M Tris	8,5	25% w/v PEG 4000
H11	0,1 M Tris	8,5	30% w/v PEG 4000
H12	0,1 M Tris	8,5	35% w/v PEG 4000

Molecular Dimension AMS-MPD I&II

	Salt	pH
A1	1 M Ammonium sulfate	5
A2	1,3 M Ammonium sulfate	5
A3	1,6 M Ammonium sulfate	5
A4	1,9 M Ammonium sulfate	5
A5	2,2 M Ammonium sulfate	5
A6	2,5 M Ammonium sulfate	5
A7	1 M Ammonium sulfate	5,5
A8	1,3 M Ammonium sulfate	5,5
A9	1,6 M Ammonium sulfate	5,5
A10	1,9 M Ammonium sulfate	5,5
A11	2,2 M Ammonium sulfate	5,5
A12	2,5 M Ammonium sulfate	5,5
B1	1 M Ammonium sulfate	6
B2	1,3 M Ammonium sulfate	6
B3	1,6 M Ammonium sulfate	6
B4	1,9 M Ammonium sulfate	6
B5	2,2 M Ammonium sulfate	6
B6	2,5 M Ammonium sulfate	6
B7	1 M Ammonium sulfate	6,5
B8	1,3 M Ammonium sulfate	6,5
B9	1,6 M Ammonium sulfate	6,5
B10	1,9 M Ammonium sulfate	6,5
B11	2,2 M Ammonium sulfate	6,5
B12	2,5 M Ammonium sulfate	6,5
C1	1 M Ammonium sulfate	7
C2	1,3 M Ammonium sulfate	7
C3	1,6 M Ammonium sulfate	7
C4	1,9 M Ammonium sulfate	7
C5	2,2 M Ammonium sulfate	7
C6	2,5 M Ammonium sulfate	7
C7	1 M Ammonium sulfate	7,5
C8	1,3 M Ammonium sulfate	7,5
C9	1,6 M Ammonium sulfate	7,5
C10	1,9 M Ammonium sulfate	7,5
C11	2,2 M Ammonium sulfate	7,5
C12	2,5 M Ammonium sulfate	7,5
D1	1 M Ammonium sulfate	8
D2	1,3 M Ammonium sulfate	8
D3	1,6 M Ammonium sulfate	8
D4	1,9 M Ammonium sulfate	8
D5	2,2 M Ammonium sulfate	8
D6	2,5 M Ammonium sulfate	8
D7	1 M Ammonium sulfate	8,5
D8	1,3 M Ammonium sulfate	8,5
D9	1,6 M Ammonium sulfate	8,5
D10	1,9 M Ammonium sulfate	8,5
D11	2,2 M Ammonium sulfate	8,5
D12	2,5 M Ammonium sulfate	8,5

Molecular Dimension AMS-MPD I&II

	Buffer	pH	Precipitant
E1	0,1 M Sodium acetate	5	15% v/v MPD
E2	0,1 M Sodium acetate	5	25% v/v MPD
E3	0,1 M Sodium acetate	5	35% v/v MPD
E4	0,1 M Sodium acetate	5	45% v/v MPD
E5	0,1 M Sodium acetate	5	55% v/v MPD
E6	0,1 M Sodium acetate	5	65% v/v MPD
E7	0,1 M Sodium acetate	5,5	15% v/v MPD
E8	0,1 M Sodium acetate	5,5	25% v/v MPD
E9	0,1 M Sodium acetate	5,5	35% v/v MPD
E10	0,1 M Sodium acetate	5,5	45% v/v MPD
E11	0,1 M Sodium acetate	5,5	55% v/v MPD
E12	0,1 M Sodium acetate	5,5	65% v/v MPD
F1	0,1 M MES	6	15% v/v MPD
F2	0,1 M MES	6	25% v/v MPD
F3	0,1 M MES	6	35% v/v MPD
F4	0,1 M MES	6	45% v/v MPD
F5	0,1 M MES	6	55% v/v MPD
F6	0,1 M MES	6	65% v/v MPD
F7	0,1 M MES	6,5	15% v/v MPD
F8	0,1 M MES	6,5	25% v/v MPD
F9	0,1 M MES	6,5	35% v/v MPD
F10	0,1 M MES	6,5	45% v/v MPD
F11	0,1 M MES	6,5	55% v/v MPD
F12	0,1 M MES	6,5	65% v/v MPD
G1	0,1 M HEPES	7	15% v/v MPD
G2	0,1 M HEPES	7	25% v/v MPD
G3	0,1 M HEPES	7	35% v/v MPD
G4	0,1 M HEPES	7	45% v/v MPD
G5	0,1 M HEPES	7	55% v/v MPD
G6	0,1 M HEPES	7	65% v/v MPD
G7	0,1 M HEPES	7,5	15% v/v MPD
G8	0,1 M HEPES	7,5	25% v/v MPD
G9	0,1 M HEPES	7,5	35% v/v MPD
G10	0,1 M HEPES	7,5	45% v/v MPD
G11	0,1 M HEPES	7,5	55% v/v MPD
G12	0,1 M HEPES	7,5	65% v/v MPD
H1	0,1 M Tris	8	15% v/v MPD
H2	0,1 M Tris	8	25% v/v MPD
H3	0,1 M Tris	8	35% v/v MPD
H4	0,1 M Tris	8	45% v/v MPD
H5	0,1 M Tris	8	55% v/v MPD
H6	0,1 M Tris	8	65% v/v MPD
H7	0,1 M Tris	8,5	15% v/v MPD
H8	0,1 M Tris	8,5	25% v/v MPD
H9	0,1 M Tris	8,5	35% v/v MPD
H10	0,1 M Tris	8,5	45% v/v MPD
H11	0,1 M Tris	8,5	55% v/v MPD
H12	0,1 M Tris	8,5	65% v/v MPD