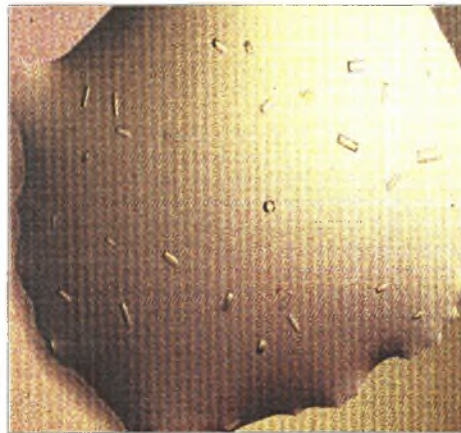




Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Καθαρισμός και κρυστάλλωση της  $m^5U$  μεθυλ-  
τρανσφεράσης του tRNA από το αρχαίο *Pyrococcus abyssi*  
και από το βακτήριο *Bacillus subtilis*



Νατάσα Σ. Χατζηπρίμου

Διπλωματική εργασία

Λάρισα 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4651/1  
Ημερ. Εισ.: 27-10-2005  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΧΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087871

# Ευχαριστίες

Θα ήθελα, κατ' αρχήν, να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο που με προέτρεψε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο Εθνικό Κέντρο Επιστημονικής Έρευνας (C.N.R.S., Centre National de la Recherche Scientifique) στο Gif sur Yvette, στη Γαλλία.

Στη συνέχεια, θα ήθελα, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον υπεύθυνο καθηγητή μου στη Γαλλία, τον Dr. Henri Grosjean για τη θερμή του υποδοχή και την βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της διαμονής μου στο εξωτερικό.

Επίσης, καταλυτικό ρόλο στην διεξαγωγή αυτής της διπλωματικής εργασίας έπαιξε η υπεύθυνη μου, Walbott H elene, χωρίς τη βοήθεια της οποίας δε θα είχα τόσα θετικά αποτελέσματα σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα. Την ευχαριστώ για την υπομονή της και για τις ατελείωτες ώρες που πέρασε μαζί μου στο εργαστήριο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στην Dr. Sylvie Auxilien και στον Dr. Jaunius Urbonavicius για τις πολύτιμες ιδέες τους όσον αφορά την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Dr. Benoit Gigant και στον Vincent Chaptal για την βοήθειά τους στη μεταφορά των κρυστάλλων για την περαιτέρω επεξεργασία τους στο κέντρο της Grenoble.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της ομάδας που με υποδέχτηκε και των υπόλοιπων ομάδων για ένα τρίμηνο υπέροχων στιγμών και αξέχαστης εμπειρίας.

## *Τριμελής εξεταστική επιτροπή:*

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος - Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μαρία Κοντού - Λέκτορας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Γεώργιος Σίμος - Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

*Theory is when we know why everything should work but nothing does  
and practice is when everything works but we do not know why...*

*Albert Einstein*

# Περιεχόμενα

Συντομογραφίες	5
Περίληψη	6
Abstract	7
I. Εισαγωγή	8
I.1. Μετα-μεταγραφικές Τροποποιήσεις του RNA	8
I.1.1. Τύποι τροποποιήσεων	8
I.1.2. Γενική κατανομή τροποποιήσεων	9
I.1.3. Κατανομή τροποποιήσεων στο tRNA	10
I.1.4. Ρόλος τροποποιήσεων	11
I.2. Οι m <sup>5</sup> U μεθυλ-τρανσφεράσες	13
I.2.1. Χαρακτηριστικά	13
I.2.2. m <sup>5</sup> U54MTάση από <i>Pyrococcus abyssi</i>	14
I.2.3. m <sup>5</sup> U54MTάση από <i>Bacillus subtilis</i>	15
I.3. Στόχος της διπλωματικής εργασίας	15
II. Υλικά και Μέθοδοι	18
II.1. Κλωνοποίηση των δυο γονιδίων της m <sup>5</sup> U54MTάσης από <i>P. abyssi</i> και <i>B. subtilis</i>	18
II.1.1. m <sup>5</sup> U54MTάση από <i>Pyrococcus abyssi</i>	18
II.1.2. m <sup>5</sup> U54MTάση από <i>Bacillus subtilis</i>	18
II.2. Υπερέκφραση γονιδίων	18
II.2.1. Βακτηριακά στελέχη	18
II.2.2. Μέσον καλλιέργειας	19
II.3. Χρωματογραφία συγγένειας	19
II.4. Χρωματογραφία σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες- Διαπίδυση	21
II.5. Στήλες χρωματογραφίας, αρχές καθαρισμού πρωτεϊνών και διαλύματα	22
II.5.1. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Στήλες MonoS και MonoQ)	23
II.5.2. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	24
II.5.3. Στήλη Υδροξυαπατίτη	25
II.6. Συμπύκνωση	25
II.7. Κρυστάλλωση	26
II.8. Ενζυμικές δοκιμές για ανίχνευση ριβονουκλεασών	28
III. Αποτελέσματα	29
III.1. Καθαρισμός των πρωτεϊνών με χρωματογραφικές μεθόδους	29
III.1.1. m <sup>5</sup> U54MTάση από <i>Pyrococcus abyssi</i>	29
III.1.1.1. Χρωματογραφία συγγένειας	29
III.1.1.2. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (στήλες MonoS και MonoQ)	31
III.1.1.3. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	32
III.1.1.4. Στήλη υδροξυαπατίτη	34
III.1.2. m <sup>5</sup> U54MTάση από <i>Bacillus subtilis</i>	35
III.1.2.1. Χρωματογραφία συγγένειας	35
III.1.2.2. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (στήλες MonoS και MonoQ)	37
III.1.2.3. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	38
III.1.2.4. Στήλη υδροξυαπατίτη	39
III.2. Ενζυμικές δοκιμές για ανίχνευση ριβονουκλεασών	39
III.2.1. m <sup>5</sup> U54MTάση από <i>Pyrococcus abyssi</i>	40
III.2.2. m <sup>5</sup> U54MTάση από <i>Bacillus subtilis</i>	41
III. 3. Κρυστάλλωση	42
III.3.1. Συμπύκνωση	43
III.3.2. Αποτελέσματα κρυστάλλωσης	43
III.3.2.1. m <sup>5</sup> U54MTάση από <i>Pyrococcus abyssi</i>	43

III.3.2.2. m <sup>5</sup> U54ΜΤάση από <i>Bacillus subtilis</i> -----	44
Συμπεράσματα-Συζήτηση-----	45
Παράρτημα -----	50
Βιβλιογραφία-----	51

## ΣΥΝΤΟΜΟΤΡΑΦΙΕΣ

β-ME = β-MercaptoEthanol

C.N.R.S. = Centre National de la Recherche Scientifique

E.S.R.F. = European Synchrotron Radiation Facility

FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography

FT = Flow Through

KDa = KiloDalton

MAD = Multiple-wavelength Anomalous Diffraction

MPD = 2-Methyl-2,4-pentanediol

MTase = Methyl-Transferase

o/n = overnight

PCR = Polymerase Chain Reaction

PEG = Polyethylene Glycol

PIC = Protease Inhibitor Coctail

rpm = Rounds per minute

RNAses = RiboNucleAses

SAM = S-adenosyl-L-Methionine

TBE = Tris base, Boric acid, EDTA

tRNA = transfer RiboNucleic Acid

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεθυλίωση της ουρακίλης στη θέση 54 (βρόγχος T) στο tRNA είναι παρούσα και στα τρία βασίλεια της ζωής (Βακτήρια, Ευκαρυώτες και Αρχαία), αποτελώντας μια ενδιαφέρουσα εστία μελέτης της εξελικτικής καταγωγής της τροποποιητικής διαδικασίας του μεταφορικού RNA. Ένας τρόπος προσέγγισης είναι η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών που καταλύουν αυτή την αντίδραση και η μελέτη και σύγκριση των τρισδιάστατων δομών τους. Έτσι επελέχθησαν δύο τροποποιητικά ένζυμα από δύο διαφορετικούς οργανισμούς (η  $m^5U54MTάση$  από *Pyrococcus abyssi* και από *Bacillus subtilis*) τα οποία μεθυλιώνουν τη θέση 54 με χρήση διαφορετικών συμπαραγόντων (η πρώτη το συνένζυμο SAM και η δεύτερη το 5,10 μεθυλ-τετραφολικό οξύ). Αρχικά έγινε υπερέκφραση και καθαρισμός των πρωτεϊνών με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας και ακολούθως με άλλες χρωματογραφίες καθαρισμού (χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (στήλες MonoS και MonoQ), χρωματογραφία μοριακής διήθησης, στήλη Υδροξυαπατίτη). Παρατηρήθηκε ότι με τη χρήση αυτών των στηλών δεν επέρχεται ιδιαίτερη αλλαγή στην καθαρότητα και των δύο πρωτεϊνών. Ακολούθησε η συμπύκνωση των πρωτεϊνών ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση για να μπορέσουν να πραγματοποιηθούν οι δοκιμές κρυστάλλωσης. Η  $m^5U54MTάση$  από *P. abyssi* συμπυκνώνεται επιτυχώς στα 18mg/ml ενώ το στάδιο αυτό παραβλέπεται για την  $m^5U54MTάση$  από *B. subtilis* λόγω του ήδη υψηλού βαθμού έκφρασής της μετά τη χρωματογραφία συγγένειας (36mg/ml). Επίσης διεξήχθησαν ενζυμικές δοκιμές για ανίχνευση ριβονουκλεασών, ώστε να διαπιστωθεί εάν οι πρωτεΐνες είναι αρκετά απαλλαγμένες από ριβονουκλεάσες ώστε να είναι δυνατή η κρυστάλλωση συμπλόκων με tRNA. Όσον αφορά τα αποτελέσματα κρυστάλλωσης, τόσο δείγματα της  $m^5U54MTάσης$  από *P. abyssi* όσο και της  $m^5U54MTάσης$  από *B. subtilis* κρυσταλλώθηκαν, ενώ ένας από τους κρυστάλλους ( $m^5U54MTάση$  από *P. abyssi* + SAM) σκέδασε με διακριτική ικανότητα 2,5Å.

## *Abstract*

The methylation of the uracil at position 54 (T loop) of the tRNA is present in the three domains of life (Bacteria, Eukaryota and Archaea), constituting an interesting point of study of the evolutionary origin of the modification machinery of the transfer RNA. A way to approach this, is the crystallization of the proteins which catalyse this reaction and the study and comparison of their 3D structures. Two modifying enzymes were selected from two different organisms (the m<sup>5</sup>U54MTase from *Pyrococcus abyssi* and from *Bacillus subtilis*) which methylate the uracil at position 54 using different co-factors (the first uses SAM and the second uses 5,10 methyl-tetrafollic acid). Initially, the proteins were overexpressed and purified with an affinity chromatography and then with other purification chromatographies (ion exchange chromatography (columns MonoS and MonoQ), Gel Filtration, Hydroxyapatite column). After using these columns, no further purification was observed. The concentration of the proteins followed to achieve the appropriate one so as to be able to continue to the crystallization trials. The m<sup>5</sup>U54MTase from *Pyrococcus abyssi* was concentrated successfully at 18mg/ml while this step was disregarded for the m<sup>5</sup>U54MTase from *Bacillus subtilis* due to its already high concentration after the affinity chromatography (36mg/ml). Also, RNase free tests were conducted to ascertain if the proteins were RNase free enough to continue to the crystallization of complexes between the proteins and their substrates. As far as the crystallization results are concerned, both samples of the m<sup>5</sup>U54MTase from *Pyrococcus abyssi* and *Bacillus subtilis* crystallized and one of the crystals (m<sup>5</sup>U54MTase from *Pyrococcus abyssi* + SAM) diffracted at a resolution of 2,5Å.

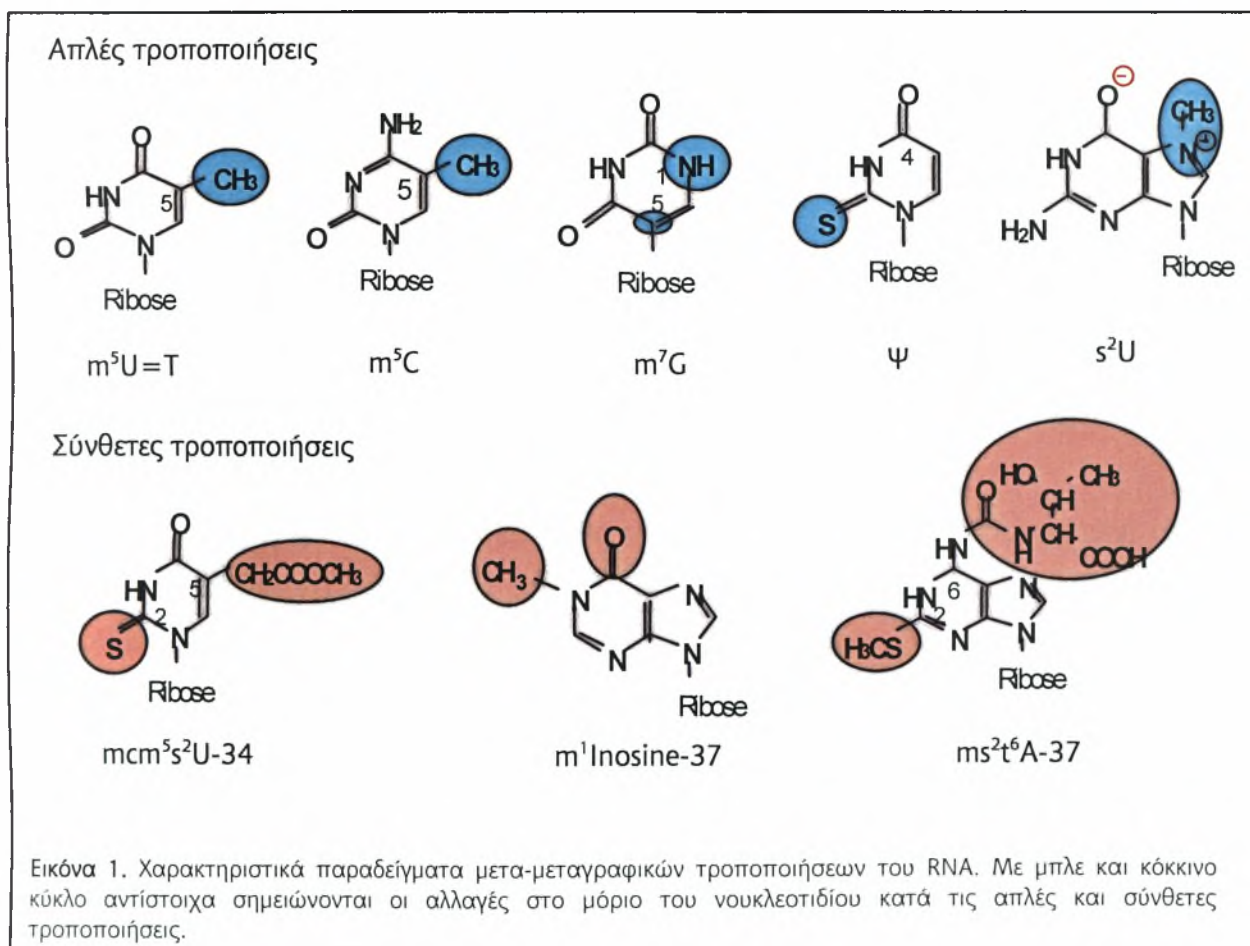


# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΟΥ RNA

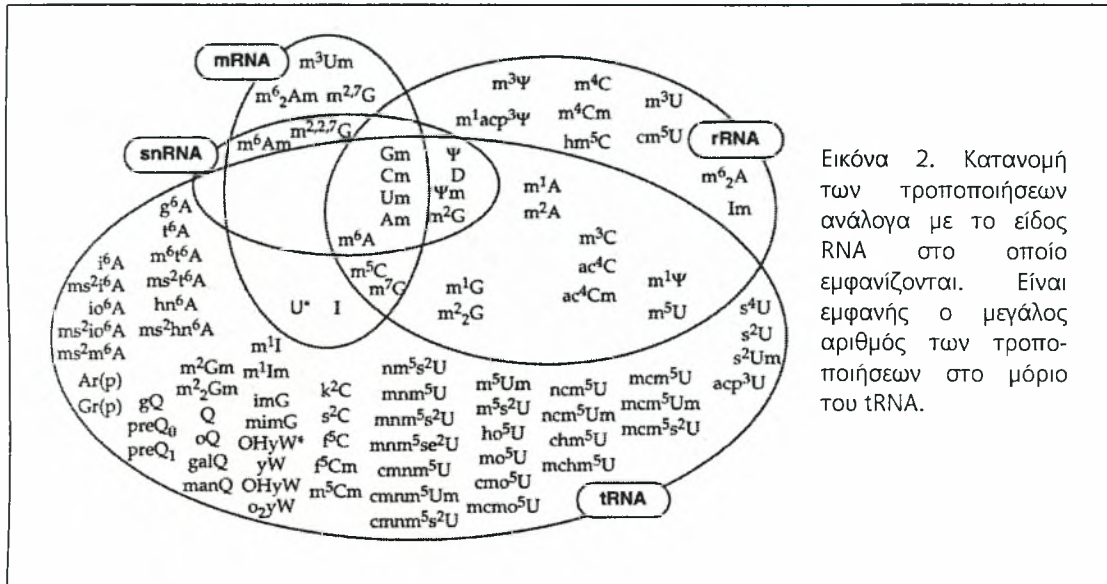
### 1.1.1. Τύποι τροποποιήσεων

Κάθε μόριο RNA, περιέχει έναν αριθμό νουκλεοτιδίων, τα οποία έχουν υποστεί κάποιου είδους χημική τροποποίηση ανάλογα με τον οργανισμό και το μόριο RNA στο οποίο βρίσκονται. Αυτές οι τροποποιήσεις, οι οποίες συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του RNA, μπορούν να είναι πολύ απλές όπως μεθυλίωση ριβόζης ή βάσης (π.χ.  $m^5U$ ,  $m^5C$  ή  $m^5C$ ,  $m^6A$ ,  $m^2G$ ,  $m^7G$ ,  $m^1A$ ), ισομερίωση βάσης ( $\Psi$ ), θειόλυση βάσης (για παράδειγμα  $s^2C$ ,  $s^2U$ ,  $s^4U$ ), απαμίνωση (Ινοσίνη) καθώς και πιο σύνθετες όπως προσθήκη μιας ομάδας ή μια υπέρ-τροποποίηση μιας βάσης (όπως  $i^6A$ ,  $t^6A$ ,  $k^2C$ ) ή μιας ριβόζης (Arp, Grp,  $mcm^5Um$ ) (Εικ. 1).



### 1.1.2. Γενική κατανομή τροποποιήσεων

Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί 96 χημικώς τροποποιημένα νουκλεοτίδια, τα οποία προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς και από διαφορετικά είδη RNA (Εικ. 2).



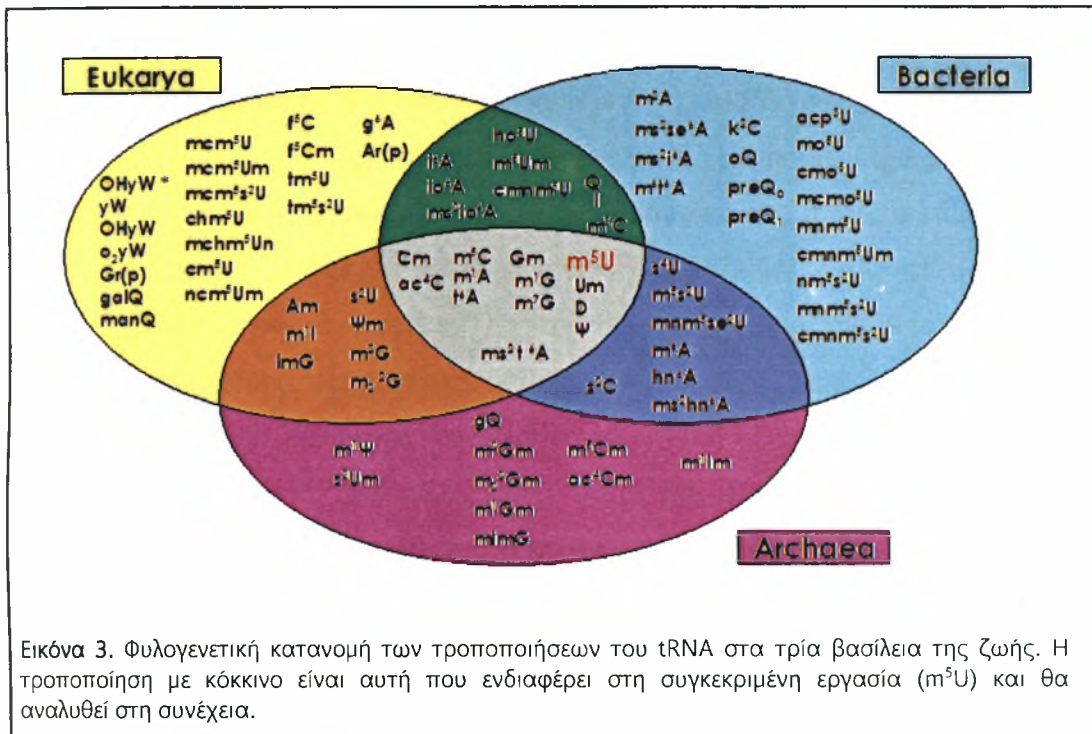
Εικόνα 2. Κατανομή των τροποποιήσεων ανάλογα με το είδος RNA στο οποίο εμφανίζονται. Είναι εμφανής ο μεγάλος αριθμός των τροποποιήσεων στο μόριο του tRNA.

Το είδος της τροποποίησης των νουκλεοτιδίων (τύπος και τοποθεσία) σε κάθε RNA εξαρτάται από την καταγωγή του (Βακτήρια, Ευκαρυώτες και Αρχαία). Ακόμη και στενά φυλογενετικής συνδεδεμένοι οργανισμοί μπορούν να έχουν εμφανείς διαφορές στα τροποποιημένα νουκλεοτιδιά τους. Για παράδειγμα, μόρια RNA από απλούς οργανισμούς όπως το *Mycoplasma* ή από κυτταρικά οργανίδια όπως μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες είναι πολύ λιγότερο τροποποιημένα απ' ό τι αυτά του κυτταροπλασματικού RNA από ανώτερους ευκαρυώτες.

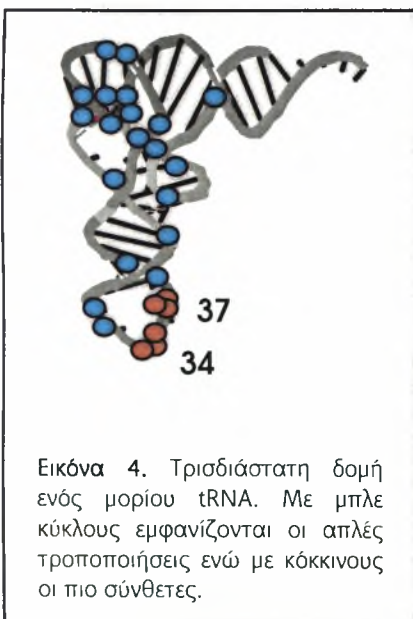
Για ένα δεδομένο τροποποιημένο νουκλεοτίδιο, ο βαθμός τροποποίησής του μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τους φυσικούς περιορισμούς του κυττάρου από το οποίο προέρχεται το συγκεκριμένο RNA (αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες, θερμοκρασία, διαθεσιμότητα ενδιάμεσων μεταβολιτών ή συμπαραγόντων των τροποποιητικών ενζύμων, διάφορες μεταβολικές συνθήκες stress κτλ.). Αυτό είναι εμφανές σε περιπτώσεις ορισμένων τροποποιημένων νουκλεοτιδίων παρόντα στο αντικωδικόνιο του tRNA (βλ. Κατανομή τροποποιήσεων στο tRNA) ή σε ορισμένες 2-O- μεθυλριβόζες παρούσες σε μόρια rRNA (Persson, 1993; Bjork and Rasmuson, 1998; Winkler, 1998; Kowalak *et al.*, 1994).

### 1.1.3. Κατανομή τροποποιήσεων στο tRNA

Η μεγαλύτερη ποικιλία τροποποιήσεων έχει ανιχνευθεί στο tRNA, με 81 τροποποιημένα νουκλεοτίδια, εκ των οποίων 43 εντοπίζονται στο βασιλείο των Βακτηρίων, 47 στο βασιλείο των Ευκαρυωτών και 37 στο βασιλείο των Αρχαίων (Εικ. 3).



Οι τροποποιήσεις που συμβαίνουν στα νουκλεοτίδια του tRNA εντοπίζονται σε



διαφορετικές θέσεις του μορίου, όπως φαίνεται στην εικόνα 4. Οι πιο απλές τροποποιήσεις (μπλε χρώμα) εμφανίζονται διάσπαρτες στο μόριο σε αντίθεση με τις πιο πολύπλοκες (κόκκινο χρώμα) οι οποίες φαίνονται συγκεντρωμένες στη τριπλέτα του αντικωδικονίου του μορίου. Αυτό δικαιολογείται λόγω της σπουδαιότητας του συγκεκριμένου τμήματος στην σωστή ανάγνωση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της μετάφρασης.

#### 1.1.4. Ρόλος τροποποιήσεων

Κάθε μετα-μεταφραστική τροποποίηση έχει τον δικό της ρόλο στη λειτουργικότητα του RNA ανάλογα με το σημείο όπου λαμβάνει χώρα, τον οργανισμό στον οποίο συναντάται και τη λειτουργία του συγκεκριμένου μορίου. Γενικότερα, η δράση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων έχει ως στόχο την καλύτερη λειτουργία των μορίων RNA.

Ορισμένα από αυτά τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια σχετίζονται με μοριακή αναγνώριση των μορίων στα οποία συναντώνται. Παράδειγμα αποτελεί ο βρόγχος του αντικωδικονίου των περισσότερων μορίων tRNA, ο οποίος περιέχει μια μεγάλη ποικιλία τροποποιημένων νουκλεοτιδίων, περιλαμβάνοντας τα πιο τροποποιημένα στις θέσεις 34 και 37. Αυτές οι τροποποιήσεις συμβάλλουν στον καθορισμό των χαρακτηριστικών αποκωδικοποίησης (αποτελεσματικότητα και ακρίβεια) των μορίων tRNA κατά τη διάρκεια της μετάφρασης (Bjork *et al.*, 1999; Giege *et al.*, 1998; Marck and Grosjean, 2002; Yokoyama and Nishimura, 1995). Παράδειγμα αποτελούν τα μιτοχονδριακά tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> και tRNA<sup>Lys</sup> στα οποία έχει αποδειχθεί ότι η έλλειψη της τροποποίησης στην ουρακίλη του αντικωδικονίου λόγω μεταλλάξεων, είναι υπεύθυνη για τις δυο μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) και MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers) (Suzuki *et al.*, 2002). Η έλλειψη αυτής της τροποποίησης επηρεάζει την αναγνώριση κωδικονίου-αντικωδικονίου (Yasukawa, 2001). Επίσης ορισμένα τροποποιημένα νουκλεοτίδια αποτελούν θετικούς ή αρνητικούς δείκτες στην αναγνώριση και αμινοακυλίωση των tRNA από διάφορες αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες, ένζυμα τα οποία τοποθετούν το σωστό αμινοξύ στο κατάλληλο tRNA, με αποτέλεσμα να ενισχύεται ή να αποφεύγεται το σωστό ή το λάθος ζευγάρισμα αντίστοιχα μεταξύ αμινοξέως και μορίου tRNA.

Μια άλλη σημαντική δράση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων απαντάται στη δομή και σταθερότητα των λειτουργικών μορίων RNA (Charette and Gray, 2000; Horie *et al.*, 1985; Kawai *et al.*, 1992). Πολλές ανθρώπινες ασθένειες, σχετιζόμενες με τη δομή των μορίων RNA, δίνουν έμφαση στην σημασία των τροποποιήσεων του RNA. Υπάρχουν αρκετές ασθένειες σχετιζόμενες με έλλειψη των RNA-τροποποιητικών ενζύμων, όπως η εκ γενετής δυσκεράτωση (dyskeratosis congenita, DC). Αυτή η νόσος έχει σχέση με μια διαταραχή στο X χρωμόσωμα και χαρακτηρίζεται από πρόωρη γήρανση και αυξημένη ευαισθησία στην παρουσία όγκων (Heiss *et al.*, 1999). Ασθενείς



που πάσχουν από αυτή τη νόσο έχουν μια μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, γνωστή ως δυσκερίνη/Cbf5p, συστατικό του μικρού ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου (snRNP), το οποίο είναι υπεύθυνο για την ψευδοουριδιλίωση των snRNAs και των rRNAs (Heiss *et al.*, 1998; Lafontaine *et al.* 1998). Επίσης, η δράση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων είναι ιδιαίτερα εμφανής στη δομή των tRNA, των οποίων η λειτουργία εξαρτάται από την σωστή αναδίπλωσή τους στην δισδιάστατη και στην τρισδιάστατη δομή τους. Αν και μη τροποποιημένα μετάγραφα tRNA είναι εξίσου λειτουργικά, τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια βοηθούν στη σταθερότητα του μορίου όσον αφορά τέτοιου είδους δι και τρισδιάστατων αλληλεπιδράσεων με τη δημιουργία επιπρόσθετων δεσμών υδρογόνου, με την βελτιστοποίηση της επιστοίβαξης των βάσεων (base stacking) και με την δημιουργία νέων θέσεων δέσμευσης μετάλλων (κυρίως  $Mg^{+2}$ ). Το αποτέλεσμα αυτών των δράσεων περιλαμβάνει την καλύτερη αντίσταση των μορίων tRNA σε θερμική μετουσίωση και συνεπώς στην αποφυγή της λανθασμένης αναδίπλωσης των μορίων. Η δράση αυτή των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων φαίνεται και στην περίπτωση των μορίων rRNA στα Αρχαία, όπου η αύξηση της θερμοκρασίας της καλλιέργειας στο υπερθερμόφιλο αρχαίο *Sulfolobus solfataricus* έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση στον αριθμό των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων, επισημαίνοντας για ακόμη μια φορά την λειτουργία των συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων στη σταθερότητα του RNA όσον αφορά την αύξηση τη θερμοκρασίας (Noon *et al.*, 1998).

Η σημασία των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων έχει μελετηθεί και σε βακτηριακά συστήματα. Για παράδειγμα, ένα ριβόσωμα με ένα μη τροποποιημένο rRNA συστατικό έχει λιγότερη δράση πεπτιδικής μεταφοράς συγκρινόμενο με ένα πλήρως τροποποιημένο rRNA (Green and Noller, 1999; Khaitovich *et al.*, 1999). Στο *E. coli* η διαγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί τη ψευδοουριδινό (Ψ)-συνθάση του tRNA (TruB) ή του rRNA (RluD) κατέληξε σε μειωμένη ανάπτυξη (Gutgsell *et al.*, 2000; Ofengand, 2002).

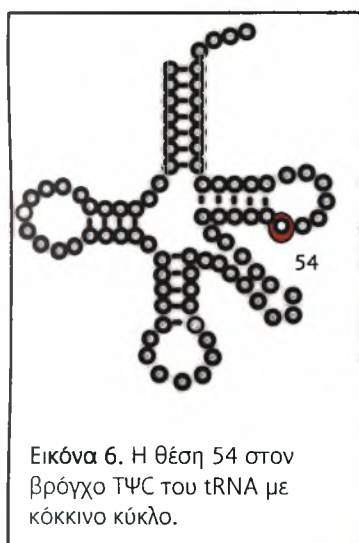
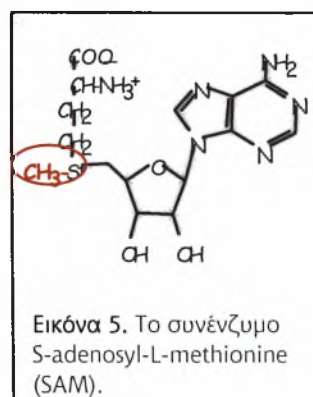
Μια τελευταία δράση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων αποτελεί η αναγνώρισή τους στα ξένα μόρια RNA από πρωτεΐνες, προκαλώντας ανοσοποιητικές αντιδράσεις. Για παράδειγμα, κάποιες πρωτεΐνες (Toll-like υποδοχείς) στην επιφάνεια ανοσοποιητικών κυττάρων αναγνωρίζουν βακτηριακό και μιτοχονδριακό RNA στον ανθρώπινο οργανισμό, με αποτέλεσμα να ξεχωρίζει το RNA από το δικό του και να προκαλεί ανοσοποιητικές αντιδράσεις.

## 1.2. ΟΙ $m^5U$ ΜΕΘΥΛ-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ

### 1.2.1. Χαρακτηριστικά

Αν και έχει χαρακτηριστεί ένας μεγάλος αριθμός τροποποιήσεων, λίγα ένζυμα έχουν μελετηθεί εις βάθος μέχρι σήμερα. Οι τροποποιήσεις που πρώτες απασχόλησαν τους επιστήμονες είναι αυτές οι οποίες συναντώνται σε όλα τα βασίλεια της ζωής και συνεπώς υποθέτεται ότι θα έχουν μια ιδιαίτερη λειτουργία. Η πιο συνηθισμένη διατηρημένη τροποποίηση είναι η μεθυλίωση. Αυτή εμφανίζεται με διάφορες μορφές, από τις πιο απλές, όπως η  $m^5U$  που περιλαμβάνει την μεθυλίωση του άνθρακα 5 της ουρακίλης και αποτελεί την τροποποίηση που ενδιαφέρει στην συγκεκριμένη εργασία,

έως τις πιο πολύπλοκες όπως την  $ncm^5Um$  (Garcia *et al.*, 1998). Με δύο εξαιρέσεις (T54 στο *S. faecalis* και *B. subtilis*) έχει αποδειχθεί (Keally *et al.*, 1991) ότι ο μηχανισμός της αντίδρασης των ενζύμων που καταλύουν αυτή την



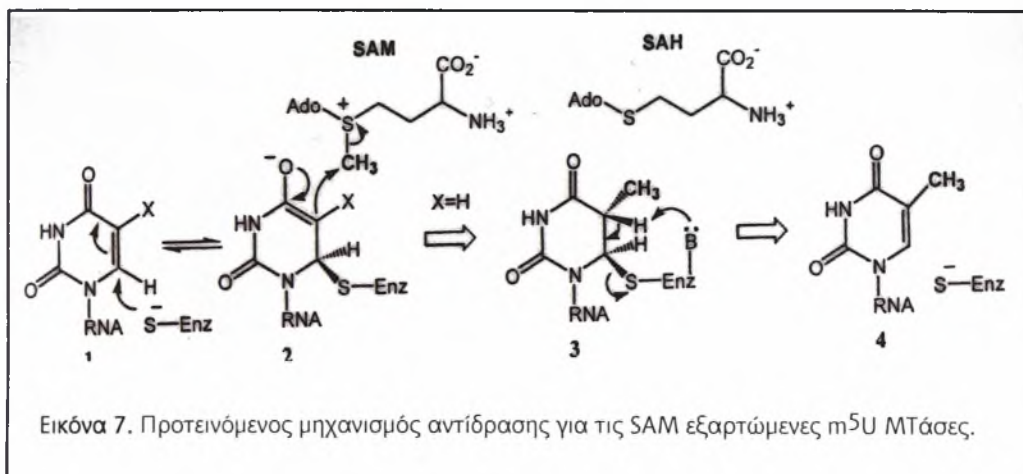
αντίδραση και ονομάζονται  $m^5UMT$ άσες, περιλαμβάνει την μεταφορά μιας μεθυλικής

ομάδας από το συνένζυμο S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη (S-Adenosyl-L-Methionine, SAM, Εικ. 5) στον άνθρακα 5 της ουρακίλης.

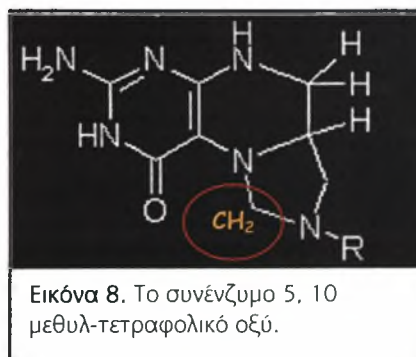
Το πρώτο γονίδιο, που ταυτοποιήθηκε (Fleissner and Borek, 1962 and Svensson *et al.*, 1963) και κλωνοποιήθηκε (Ny and Björk, 1980), υπεύθυνο για την παραγωγή μιας (tRNA)  $m^5U$  ΜΤάσης στη θέση 54 (βρόγχος ΤΨC) (Εικ. 6) του μορίου tRNA (συντομογραφικά (tRNA)  $m^5U54$ ), είναι το *trmA* που τοποθετείται στο 89 λεπτό του χρωμοσωμικού χάρτη του *E. coli*. Το ένζυμο που κωδικοποιείται ονομάζεται RUMT και καταλύει την μεθυλίωση της U54 στον άνθρακα 5 σχηματίζοντας  $m^5U54$  σχεδόν σε όλα τα tRNA (Gustafsson and Björk, 1993).

Ο μηχανισμός της αντίδρασης, ο οποίος, όπως έχει ήδη αναφερθεί, πιθανόν ισχύει σε όλους τους οργανισμούς, εκτός από τους *S. faecalis* και *B. subtilis*, πραγματοποιείται σε δύο βήματα. Αρχικά η θειική ομάδα από το αμινοξύ κυστεΐνη, κατάλοιπο 324 του ενζύμου, αντιδρά με τον άνθρακα 6 της ουρακίλης στη θέση 54

του μορίου tRNA δημιουργώντας ένα πυρηνόφιλο κέντρο. Έπειτα, η μεθυλική ομάδα από το συνένζυμο SAM μεταφέρεται στον άνθρακα 5 της ουρακίλης 54 και μέσω β-απόσπασης (β-elimination) παράγεται το μεθυλιωμένο νουκλεοτίδιο m<sup>5</sup>U και απελευθερώνεται το ένζυμο (Εικ. 7). Αυτός ο καταλυτικός μηχανισμός μοιάζει με αυτόν στην περίπτωση της 5-μεθυλκυτοσίνης (m<sup>5</sup>C) (Wu *et al.*, 1985).



Όσον αφορά τις δύο εξαιρέσεις, η πρώτη παρατήρηση για την (tRNA) m<sup>5</sup>U ΜΤάση για τα Gram <sup>+</sup> βακτήρια έγινε από τον Samuel (1973), ο οποίος έθεσε την παρουσία φολικού οξέος στο καλλιεργητικό μέσο απαραίτητη για την κατάλυση της τροποποίησης m<sup>5</sup>U54 στα κύτταρα του *Streptococcus faecalis*, ενώ η ίδια τροποποίηση είναι ανεξάρτητη από το φολικό οξύ για το *E. coli*. Αργότερα (Delk, 1974) επιβεβαιώνεται ότι το συγκεκριμένο βακτήριο αλλά και το βακτήριο *Bacillus subtilis* δεν χρησιμοποιεί ως δότη μεθυλομάδας το συνένζυμο SAM αλλά ένα παράγωγο φολικού οξέως, το 5,10 μεθυλ-τετραφολικό οξύ (Εικ. 8). Επιπλέον, απαραίτητη είναι και η παρουσία του ανηγμένου φλαβινο-αδενινοδινουκλεοτιδίου (FADH<sub>2</sub>) για την αναγωγή της μεθυλικής ομάδας.



### 1.2.2. m<sup>5</sup>U54ΜΤάση από *Pyrococcus abyssi*

Η πληροφορία για την παρουσία της SAM-εξαρτώμενης (tRNA) m<sup>5</sup>U54 ΜΤάσης στην οικογένεια των Pyrococcales αρχαίων είναι σχετικά πρόσφατη. Το πρώτο ένζυμο το οποίο αναγνωρίστηκε είναι στο αρχαίο *Pyrococcus furiosus* (Constantinesco *et al.*, 1999). Μετά από επαλήθευση της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας κυτταρικό εκχύλισμα από το αρχαίο *Pyrococcus abyssi*, ακολούθησε η κλωνοποίησή, η έκφραση και δοκιμές ενεργότητας και εξειδίκευσης του ενζύμου.

Οι πληροφορίες που υπάρχουν για το συγκεκριμένο ένζυμο περιλαμβάνουν το μοριακό του βάρος (49,1KDa), τον αριθμό των αμινοξέων του (426αα), την παρουσία ουράς ιστιδίνης στο C τελικό άκρο και την καλή διαλυτότητά του.

### 1.2.3. m<sup>5</sup>U54ΜΤάση από *Bacillus subtilis*

Η (tRNA) m<sup>5</sup>U54ΜΤάση του μικροοργανισμού *Bacillus subtilis* αποτελεί το δεύτερο ένζυμο το οποίο ενδιαφέρει στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία.

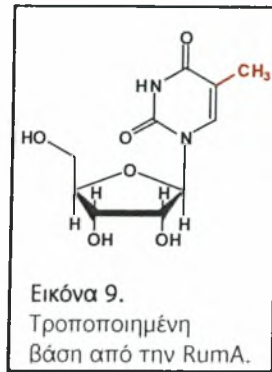
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το συγκεκριμένο ένζυμο αποτελεί παράδειγμα ΜΤάσης η οποία δεν χρησιμοποιεί ως συνένζυμο το SAM αλλά το 5,10 μεθυλ-τετραφολικό οξύ και ως αναγωγικό παράγοντα της μεθυλικής ομάδας το φλαβινοσυνένζυμο FADH<sub>2</sub>. Οι πληροφορίες που υπάρχουν για αυτό το ένζυμο περιλαμβάνουν το μοριακό του βάρος (48KDa), τον αριθμό των αμινοξέων του (435αα), την παρουσία ουράς ιστιδίνης στο N τελικό άκρο και την καλή διαλυτότητά του.

## 1.3. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

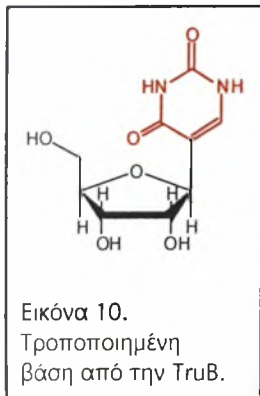
Η γενική ιδέα της ερευνητικής αυτής δουλειάς είναι η σύγκριση των μηχανισμών αντίδρασης δύο ενζύμων που προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς (η m<sup>5</sup>U54 ΜΤάση από *Pyrococcus abyssi* και από *Bacillus subtilis*) αλλά καταλύουν ακριβώς την ίδια αντίδραση στο ίδιο υπόστρωμα (tRNA). Ένας τρόπος προσέγγισης είναι η κρυστάλλωση των δύο ενζύμων, μεμονωμένων, με τα συνένζυμά τους (SAM για την πρωτεΐνη από *Pyrococcus abyssi* και 5,10 μεθυλ-τετραφολικό οξύ για την πρωτεΐνη από *Bacillus subtilis*) και σε σύμπλοκο με το υπόστρωμά τους, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των 3D δομών τους.



Μέχρι σήμερα, έχουν κρυσταλλωθεί, συμπλοκοποιημένα με το υπόστρωμά τους, τέσσερα τροποποιητικά ένζυμα του RNA. Το πιο πρόσφατο είναι μια  $m^5U$  rRNA ΜΤάση, γνωστή ως RumA,



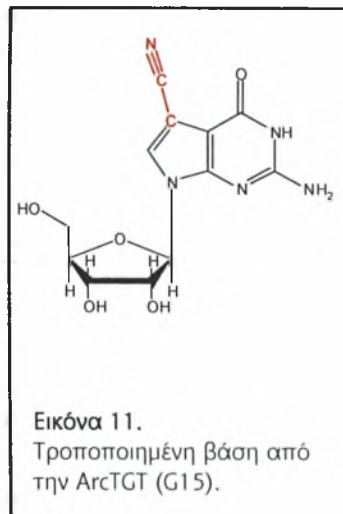
Εικόνα 9.  
Τροποποιημένη  
βάση από την RumA.



Εικόνα 10.  
Τροποποιημένη  
βάση από την TruB.

από τον οργανισμό *E. coli*. Έχει κρυσταλλωθεί σε σύμπλοκο με ένα mini-υπόστρωμα rRNA<sup>1</sup> (Lee *et al.*, 2005) και

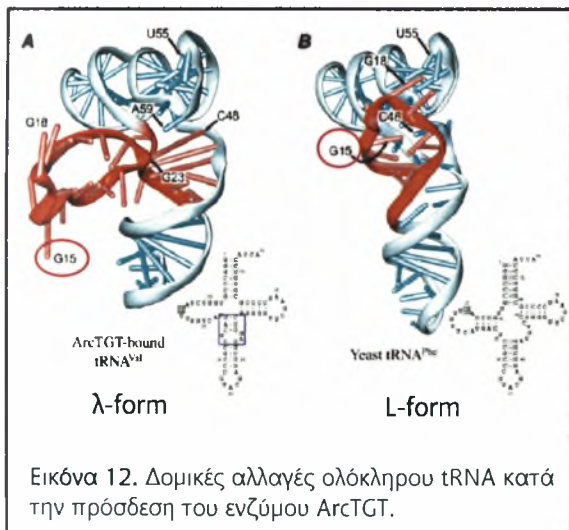
έφτασε σε ανάλυση 2,15Å (Εικ. 9). Πριν από την RumA είχε κρυσταλλωθεί η TruB, μια tRNA ψευδοουριδινο-συνθάση<sup>2</sup> από τους



Εικόνα 11.  
Τροποποιημένη βάση από  
την ArcTGT (G15).

οργανισμούς *T. maritima* και *E. coli* σε σύμπλοκο με ένα mini-υπόστρωμα tRNA σε ανάλυση 2,1Å και 1,85Å αντίστοιχα (Pan *et al.*, 2003; Hoang *et al.*, 2001)(Εικ. 10). Τέλος, έχει κρυσταλλωθεί και η ArcTGT, μια αρχαιοσίνη tRNA γουανίνο-τρανσγλυκοσυλάση<sup>3</sup> από τον μικροοργανισμό *P. horikoshii* σε σύμπλοκο με ολόκληρο tRNA σε ανάλυση 3,3Å (Ishtani *et al.*, 2003)(Εικ. 11).

Η κρυστάλλωση των παραπάνω ενζύμων έχει



προμηθεύσει με σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά τις δομικές αλλαγές που θα μπορούσαν να συμβαίνουν στο υπόστρωμα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Παράδειγμα τέτοιων αλλαγών φαίνεται στην εικόνα 12 όπου παρατηρείται μια μεταβολή του tRNA από την L-μορφή στην λ-μορφή κατά την πρόσδεση της ArcTGT.

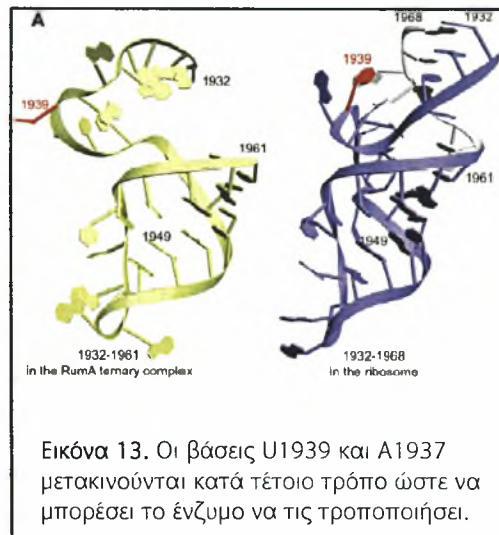
<sup>1</sup> Με την έννοια mini-rRNA εννοούμε υπόστρωμα το οποίο δεν περιέχει όλη την αλληλουχία αλλά ένα μέρος της. Θεωρείται πιο εύκολος ο σχηματισμός ενός mini υποστρώματος, αλλά σε περίπτωση κρυστάλλωσης δεν δίνει όλες τις πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν, σε αντίθεση με ένα ολόκληρο υπόστρωμα.

<sup>2</sup> Ένζυμο το οποίο καταλύει την ισομερίωση συγκεκριμένων ουριδίων σε ψευδοουριδίνες. Η αντίδραση περιλαμβάνει το σπάσιμο το γλυκοσιδικού δεσμού, την περιστροφή της ελεύθερης βάσης και την επανασύνδεση μέσω του άνθρακα 5.

<sup>3</sup> Ένζυμο το οποίο καταλύει την αλλαγή της γουανίνης στη θέση 15 στον βρόγχο D στα tRNA των αρχαίων με μια βάση 7-κυανό-7-δεαζαγουανίνης (preQ(0)).

Μετά από αυτή τη μεταβολή, η γουανίνη στη θέση 15 είναι προσιτή και μπορεί να τροποποιηθεί από το ένζυμο. Άλλο παράδειγμα αποτελεί η εικόνα 13 όπου είναι εμφανείς οι αλλαγές που συμβαίνουν στο mini-υπόστρωμα rRNA κατά τη δέσμευση της RumA. Παρατηρούνται δύο βάσεις (U1939 και A1937) να μετακινούνται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να είναι προσβάσιμες στην τροποποίηση του ενζύμου.

Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι οι αλλαγές που μπορούν να λάβουν χώρα κατά την πρόσδεση ενός τροποποιητικού ενζύμου σε ένα υπόστρωμα ποικίλλουν από το ένζυμο, το είδος του υποστρώματος και τον οργανισμό. Το ενδιαφέρον, λοιπόν, επικεντρώνεται σε αυτού του είδους τις δομικές αλλαγές που μπορεί να γίνουν κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης της m<sup>5</sup>U54 ΜΤάσης από *P. abyssi* και από *B. subtilis* στο tRNA.



Η σύγκριση των δομών των δύο ενζύμων μεταξύ τους αλλά και με τα προαναφερθέντα ένζυμα, θα δώσει σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά το μηχανισμό με τον οποίο λειτουργούν, αλλά και πιο μακροπρόθεσμα, για την εξελικτική τους πορεία. Μια μέθοδος προσέγγισης είναι η κρυστάλλωσή τους, η οποία για να επιτευχθεί απαιτούνται κάποια στάδια προετοιμασίας.

Αρχικά, πρέπει να γίνει ο καθαρισμός των ενζύμων από διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες μπορεί να συνεκφράζονται και ειδικά από RNAσες, ώστε να μπορεί να δημιουργηθεί στη συνέχεια σύμπλοκο με RNA. Αυτό το στάδιο είναι αρκετά χρονοβόρο διότι απαιτεί να βρεθεί η πιο αποτελεσματική μέθοδος και στη συνέχεια να γίνει βελτιστοποίηση των συνθηκών καθαρισμού.

Ακολουθεί η συμπύκνωση των ενζύμων ώστε να επέλθει η κατάλληλη συγκέντρωση για να μπορέσουν να κρυσταλλωθούν. Αποτελεί στάδιο το οποίο απαιτεί προσοχή και συστηματική παρακολούθηση.

Τέλος, απομένει ο σχηματισμός των υποστρωμάτων για την περίπτωση δημιουργίας συμπλόκου, ειδάλλως, ακολουθεί το τελικό στάδιο το οποίο περιλαμβάνει τις δοκιμές κρυστάλλωσης και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## II.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ m<sup>5</sup>U54ΜΤάσης ΑΠΟ *P. abyssi* ΚΑΙ *B. subtilis*

### II.1.1. m<sup>5</sup>U54ΜΤάση από *Pyrococcus abyssi*

Το γονίδιο της m<sup>5</sup>U54ΜΤάσης του οργανισμού *Pyrococcus abyssi* αφού ταυτοποιήθηκε μέσω της βάσης δεδομένων Clusters of Orthologous Groups, ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τα παρακάτω ολιγονουκλεοτίδια :

- 5' –AAA ACC ATG GGG AGG GGA GTC ATA AGA – 3' (NcoI)
- 5' –AAA AGA ATT CGC GAC TAG CTT CGC AAC GAG CTC –3' (EcoRI)

απομονώθηκε και ενσωματώθηκε στον προετοιμασμένο φορέα κλωνοποίησης pET28b.

### II.1.2. m<sup>5</sup>U54ΜΤάση από *Bacillus subtilis*

Το πιθανό γονίδιο της m<sup>5</sup>U54ΜΤάσης του οργανισμού *Bacillus subtilis* αφού εντοπίστηκε μέσω γενωμικής ανάλυσης και ταυτοποιήθηκε στη συνέχεια με διαφορετικές διαδικασίες, ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τα παρακάτω ολιγονουκλεοτίδια:

- 5' –CGG GAT CCA TGA ACC AAC AAA CAG TGA ATG TA – 3' (BamHI)
- 5' –TCC CCC GGG CTA TAT TGT TTT CGA AAT TGT TTG – 3' (SmaI)

απομονώθηκε και ενσωματώθηκε στον προετοιμασμένο φορέα κλωνοποίησης pQE80L.

## II.2. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ m<sup>5</sup>U54ΜΤάσης ΑΠΟ *P. abyssi* ΚΑΙ *B. subtilis*

### II.2.1. Βακτηριακά στελέχη

Το στέλεχος το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της m<sup>5</sup>U54ΜΤάσης από *Pyrococcus abyssi* είναι το *E. coli* BL21 Plus codon, ενώ για την έκφραση της m<sup>5</sup>U54ΜΤάσης από *Bacillus subtilis* χρησιμοποιήθηκε το GRB113.

### II.2.2. Μέσον καλλιέργειας

Μικρή ποσότητα των μετασχηματισμένων βακτηρίων τοποθετείται σε κωνική φιάλη που περιέχει 60ml υγρού LB (1% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 1% NaCl), 60ml χλωραμφενικόλη και 30ml καναμυκίνη εάν πρόκειται για την πρωτεΐνη από *P. abyssi* ενώ 60ml αμπικιλλίνης εάν πρόκειται για την πρωτεΐνη από *B. subtilis* και επωάζεται 12h με 14h στους 37°C. Στη συνέχεια, το υγρό LB μοιράζεται σε 3 λίτρα LB όπου προστίθεται 1ml επιπλέον χλωραμφενικόλη, 500μl καναμυκίνη για την πρωτεΐνη από *Pyrococcus abyssi* και 1ml αμπικιλλίνη για την πρωτεΐνη από *Bacillus subtilis* και αφήνεται να επωαστεί στους 37°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 595nm είναι μεταξύ 0,6-0,8 (ένδειξη καλής έκφρασης της πρωτεΐνης). Στη συνέχεια, προστίθεται 1ml IPTG και οι καλλιέργειες επωάζονται για 3 ώρες επιπλέον στην επιθυμητή θερμοκρασία (20°C για την πρωτεΐνη από *P. abyssi* και 28°C για την *B. subtilis*). Τα κύτταρα, στη συνέχεια, συλλέγονται με συνεχείς φυγοκεντρήσεις στις 6000rpm και καταψύχονται στους -20°C για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια.

### II.3. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Αρχικά γίνεται απόψυξη των βακτηριακών κυττάρων τα οποία περιέχουν τις δύο διαφορετικές πρωτεΐνες και διαλυτοποιούνται σε διάλυμα λύσης. Η αναλογία υπολογίζεται με δεδομένο ότι για 1gr χρησιμοποιούνται 5ml διαλύματος λύσης το οποίο περιέχει Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 1M, ιμιδαζόλιο 0.01M ή 0,02M (εάν πρόκειται για την GID), H<sub>2</sub>O, Protease Inhibitor Coctail 1% (4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonul fluoride (AEBSF), bestatin, pepstatin A, trans-epoxysuccinyl-L-leucyl-amido(4guanidino)butane (E-64), και N-(α-Rhamnopyranosyloxyhydroxy-phosphinyl)-Leu-Trp.) και β-μερκαπτοαιθανόλη 5mM). Ακολουθεί η λύση των κυττάρων, η οποία γίνεται με χρήση υπερήχων. Οι συνθήκες που επικρατούν είναι 4°C και η δύναμη είναι 4,5 ενώ η διαδικασία περιλαμβάνει 6 επαναλήψεις των 30sec με παύση ανάμεσά τους 30sec. Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε αποστειρωμένους σωλήνες για 30 min σε 30.000g στους 4°C με χρήση του ρότορα JA 2550. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης, προετοιμάζεται η στήλη της χρωματογραφίας.

Η διαδικασία καθαρισμού πραγματοποιείται με τη βοήθεια της στήλης χρωματογραφίας Chelating Sepharose Fast Flow (1x30 Amersham Biosciences). Η αρχή

καθαρισμού των πρωτεϊνών με τη χρωματογραφία συγγένειας βασίζεται στη συγγένεια που έχει η ουρά ιστιδίνης, η οποία έχει εισαχθεί στις δύο πρωτεΐνες, με το νικέλιο το οποίο βρίσκεται πάνω στη στήλη. Με χρήση διαφορετικής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου, το οποίο έχει παρόμοια δομή με την ιστιδίνη (και συνεπώς παρόμοια συγγένεια με το νικέλιο), επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός και τελικά η έκλυση των πρωτεϊνών.

Η προετοιμασία της στήλης περιλαμβάνει έκπλυση της ρητίνης με 2 όγκους αποστειρωμένου νερού και στη συνέχεια με διάλυμα λύσης (η ποσότητα της ρητίνης υπολογίζεται έχοντας ως δεδομένο ότι χρησιμοποιείται 1 ml για κάθε 5mg πρωτεΐνης, συνεπώς χρησιμοποιούνται 3ml ρητίνης εφόσον έχει υπολογιστεί η ποσότητα της πρωτεΐνης στα 12gr περίπου από προηγούμενα δεδομένα).

Το υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρωση συλλέγεται, εκχύνεται σε έναν σωλήνα Falcon των 50ml μαζί με 3ml ρητίνης και τοποθετείται σε περιστρεφόμενη ρόδα για 30min στους 4°C. Ακολούθως, η ρητίνη τοποθετείται στη στήλη και λαμβάνουν χώρα τρεις εκπλύσεις με περίπου 40ml των διαλυμάτων λύσης, πλύσης ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$  50mM, NaCl 0.3M, ιμιδαζόλιο 0.02M,  $\text{H}_2\text{O}$ , και β-μερκαπτοαιθανόλη 5mM) και έκπλυσης ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$  50mM, NaCl 0.3M, ιμιδαζόλιο 0.25M,  $\text{H}_2\text{O}$ , και β-μερκαπτοαιθανόλη 5mM) αντίστοιχα. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, η στήλη είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό μηχάνημα καταγραφής αποτελεσμάτων. Συλλέγονται δείγματα των 1ml και με βάση τα αποτελέσματα, φασματοφωτομετρούνται με τη μέθοδο Bradford στα 595nm (ώστε να



Εικόνα 14. Συσκευή χρωματογραφίας.

ποσοτικοποιηθούν, στηριζόμενοι στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες και το σύμπλοκο παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 595nm), ώστε να επιλεγθούν τα δείγματα τα οποία θα μπορούσαν να διαπιδυθούν στη συνέχεια. Επίσης γίνεται φάσμα των δειγμάτων από τα 200nm έως τα 400nm ώστε να διαπιστωθεί η σύστασή τους.



## II.4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥ-ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ - ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ

Πριν λάβει χώρα η διαπίδυση των δειγμάτων, επιλεγμένα δείγματα τοποθετούνται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-page υπό αποδιατακτικές συνθήκες οι οποίες οφείλονται στο δωδεκανοθειικό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate, SDS) και στη β-μερκαπταιθανόλη που ήδη υπάρχει στο διάλυμα. Τα συστατικά APS (υπερθειικό αμμώνιο) και TEMED (N,N,-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη) είναι απαραίτητα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Η ακριβής σύσταση της πηκτής αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Πήκτωμα διαχωρισμού 10% (2gels)		Πήκτωμα επιστοιβαξης 5% (2gels)	
40% Acryl-Bis 29:1	2,5ml	40% Acryl-Bis 29:1	0,5ml
1M Tris-Cl pH 8,8	3,75ml	1M Tris-Cl pH 6,8	0,5ml
H <sub>2</sub> O	3,5ml	H <sub>2</sub> O	2,9ml
10% SDS	100μl	10% SDS	40μl
10% APS	100μl	10% APS	40μl
TEMED	10μl	TEMED	10μl

Ο μέγιστος τελικός όγκος που μπορεί να φορτωθεί είναι 20μl, με αναλογία 1:1 δείγμα:μπλε. Οι συνθήκες που επιλέγονται είναι 200V και 50mA για περίπου 45-50min. Για την εμφάνιση του πηκτώματος απαιτείται, στη συνέχεια, χρώση με Coomassie Brilliant Blue για 45min και ακολούθως πλύση με αποχρωματικό διάλυμα. Τα πηκτώματα, στη συνέχεια, τοποθετούνται για 5 λεπτά σε διάλυμα σταθεροποίησης το οποίο αποτελείται από 70% αιθανόλη, 5% γλυκερόλη, H<sub>2</sub>O και αφήνονται να στεγνώσουν 12h-14h ανάμεσα σε δύο λεπτά διαφανή φύλλα.

Ακολουθεί η διαπίδυση των δειγμάτων που επελέχθησαν με βάση τον υψηλότερο καθαρισμό. Για την m<sup>5</sup>U54MTάση από *P. abyssii* χρησιμοποιήθηκαν μεσαίου μεγέθους θήκες και διαφορετικά διαλύματα και θερμοκρασίες (4°C και 18°C), τα οποία φαίνονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα:

Διάλυμα	Tris-HCl pH=8	NaCl	Imidazole	DTT	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Hepes	Glycerol	Na-Mes
1	20mM	100mM	-	2mM	-	-	-	-
2	20mM	100mM	100mM	2mM	-	-	-	-
3	-	300mM	250mM	-	50mM	-	-	-
4	20mM	300mM	250mM	-	-	-	-	-
5	20mM	100mM	-	-	-	-	-	-
6	20mM	100mM	250mM	-	-	-	-	-
7	20mM	300mM	-	-	-	-	-	-
8	-	100mM	-	-	-	20mM	-	-
9	20mM	100mM	-	-	-	-	10%	-
10	20mM	100mM	-	-	-	-	50%	-
11	-	300mM	-	-	50mM	-	-	-
12	-	300mM	-	-	10mM	-	-	-
13	-	300mM	250mM	-	10mM	-	-	-
14	20mM	700mM	250mM	-	-	-	-	-
15	20mM	700mM	-	-	-	-	-	-
16	-	700mM	-	-	-	-	-	20mM
17	-	700mM	-	-	-	20mM	-	-

Βασισμένοι στα αποτελέσματα, αποφασίστηκε η πρωτεΐνη να παραμείνει στο διάλυμα εκλούσης της χρωματογραφίας νικελίου. (λεπτομέρειες στο τμήμα Αποτελέσματα).

Όσον αφορά τη m<sup>5</sup>U54MTάση από *B. subtilis*, έγινε διαπίδυση έναντι του διαλύματος με την παρακάτω σύσταση: Hepes 20mM pH=7,5, NaCl 200mM και H<sub>2</sub>O.

## II.5. ΣΤΗΛΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ, ΑΡΧΕΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Για τον καλύτερο καθαρισμό των δυο πρωτεϊνών, μετά το πρώτο στάδιο, το οποίο περιλαμβάνει τη χρωματογραφία συγγένειας, ακολουθούν διαφορετικές χρωματογραφίες όπως ιοντοανταλλαγής (στήλες MonoS και MonoQ), η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (gel filtration) και η στήλη υδροξυαπατίτη. Οι τέσσερις μέθοδοι δοκιμάστηκαν και στις δύο πρωτεΐνες με παρόμοιο τρόπο.

### II.5.1. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Στήλες MonoS-MonoQ)

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιεί την διαφορετική συγγένεια φορτισμένων ιόντων ή μορίων σε διάλυμα, για αδρανείς, ακίνητες φορτισμένες ενώσεις. Όταν το φορτισμένο ιόν ή μόριο περιέχει ένα ή περισσότερα θετικά φορτία και αυτά εναλλάσσονται με άλλα θετικά φορτισμένα φορτία σωμάτων που έλκονται ιοντικά με μια αρνητικά φορτισμένη ακίνητη φάση, αυτή η διαδικασία καλείται ανταλλαγή κατιόντων (στη προκειμένη περίπτωση το υλικό που χρησιμοποιείται είναι η στήλη MonoS και θα δοκιμαστεί στην πρωτεΐνη από *Pyrococcus abyssi*, η οποία στο διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι θετικά φορτισμένη λόγω pI και pH του διαλύματος). Η αντίστροφη διαδικασία καλείται ανταλλαγή ανιόντων (στη προκειμένη περίπτωση το υλικό που χρησιμοποιείται είναι η στήλη MonoQ και θα δοκιμαστεί στην πρωτεΐνη από *Bacillus subtilis*, η οποία στο διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι αρνητικά φορτισμένη λόγω pI και pH του διαλύματος). Η συσκευή



Εικόνα 15. Συσκευή FPLC.

στην οποία συνδέονται οι στήλες είναι η FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) (Εικ.15) και επιτυγχάνεται διαχωρισμός μέχρι  $10^7$ Da, όριο στο οποίο συμπεριλαμβάνονται και οι δύο πρωτεΐνες. Βασισμένοι στις αρχές λειτουργίας των στηλών, θα έπρεπε η MonoS να δοκιμαστεί μόνο στην m<sup>5</sup>U54MTάση από *Pyrococcus abyssi* και η MonoQ μόνο στην m<sup>5</sup>U54MTάση από *Bacillus subtilis* αλλά επειδή υπάρχει πάντα η πιθανότητα να δεσμευτεί η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντός στις στήλες και να εκλουστούν οι υπόλοιπες, με αποτέλεσμα να υπάρξει και πάλι καθαρισμός της πρωτεΐνης, οι δύο στήλες δοκιμάζονται και στις δύο πρωτεΐνες.

Η διαδικασία περιλαμβάνει φιλτράρισμα 500ml H<sub>2</sub>O για τον καθαρισμό των βαλβίδων της συσκευής και φιλτράρισμα 1L διαλύματος A και 500ml διαλύματος B. Ανάλογα με την στήλη που χρησιμοποιείται και την πρωτεΐνη που θα εγχυθεί, τα διαλύματα A και B διαφέρουν. Συνοπτικά, τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

	MonoS	MonoQ
Διάλυμα A	Tris-HCl 20mM pH=8 NaCl 50mM	Hepes 20mM pH=7.25 NaCl 50mM



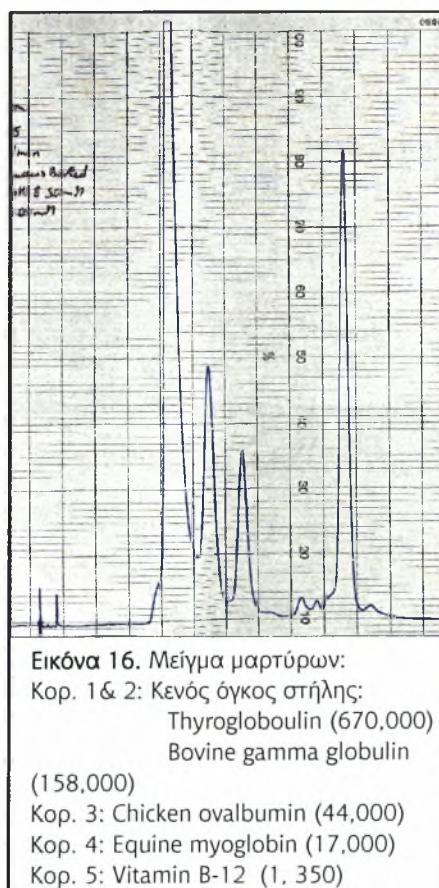
Διάλυμα Β	Tris-HCl 20mM pH=8 NaCl 1M	Hepes 20mM pH=7.25 NaCl 1M
-----------	-------------------------------	-------------------------------

Εφόσον ετοιμαστούν τα διαλύματα, ξεπλένονται οι βαλβίδες Α και Β πρώτα με H<sub>2</sub>O και στη συνέχεια η βαλβίδα Α με διάλυμα Α και η βαλβίδα Β με διάλυμα Β. Ακολουθεί η έκπλυση της στήλης πρώτα με 5 όγκους διαλύματος Α, στη συνέχεια με 5 όγκους διαλύματος Β και τέλος, ξανά με 5 όγκους διαλύματος Α. Γίνεται επίσης πλύση του βρόγχου έγχυσης (loop) με διάλυμα Α. Ρυθμίζονται οι παράμετροι της συσκευής όπως ο ρυθμός εναλλαγής των διαλυμάτων, η πίεση και η ευαισθησία. Οι ποσότητες των πρωτεϊνών, οι οποίες εξαρτώνται από τη συγκέντρωσή τους, κυμαίνονται μεταξύ 30μl και 200μl. Εάν πρόκειται για την πρωτεΐνη από *P. abyssī*, επειδή βρίσκεται στο διάλυμα έκλουσης της χρωματογραφίας συγγένειας (δηλαδή σε Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) και όπως έχει αναφερθεί η διαπίδυση παραβλέφθηκε, λίγο πριν την έγχυση, η πρωτεΐνη αλλάζει διάλυμα, ώστε να μην επηρεαστεί η δέσμευσή της από την στήλη (λόγω Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, λεπτομέρειες στο τμήμα Αποτελέσματα).

## II.5.2. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Gel Filtration)

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης αποσκοπεί στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι η Superdex 75 HR 10/30, και έχει διαχωριστική ικανότητα από 670.000Da έως 1.350Da, συνεπώς και οι δύο πρωτεΐνες, με μοριακό βάρος γύρω στα 49KDa, θα μπορέσουν να διαχωριστούν από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες.

Αρχικά γίνεται πλύση της βαλβίδας Α με διάλυμα Α (το οποίο είναι κοινό και για τις δυο πρωτεΐνες: Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM pH=8, NaCl 300mM, H<sub>2</sub>O, με ή χωρίς 250mM ιμιδαζόλιο) και στη συνέχεια της στήλης και του βρόγχου. Ακολουθεί, πρώτα, η έγχυση των μαρτύρων μοριακού βάρους (Εικ. 16) (ώστε να υπάρχουν οπτικά συμπεράσματα του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών



που θα εκλούονται) και ακολούθως αυτή των πρωτεϊνών. Οι ποσότητες των πρωτεϊνών που εγχύθηκαν κυμαίνονται μεταξύ 75μl και 150μl. Σε αυτό το σημείο αναφέρεται ότι η χρωματογραφία μοριακής διήθησης δοκιμάστηκε αμέσως μετά τη χρωματογραφία συγγένειας αλλά και μετά τη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.

### II.5.3. Στήλη Υδροξυαπατίτη

Η στήλη υδροξυαπατίτη χρησιμοποιείται στον καθαρισμό των πρωτεϊνών λόγω της συνδυασμένης ιοντοανταλλακτικής του συμπεριφοράς, η οποία οφείλεται στη δομή του (ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  στα θετικά φορτισμένα κέντρα και ιόντα  $\text{PO}_4^{3-}$  στα αρνητικώς φορτισμένα κέντρα).

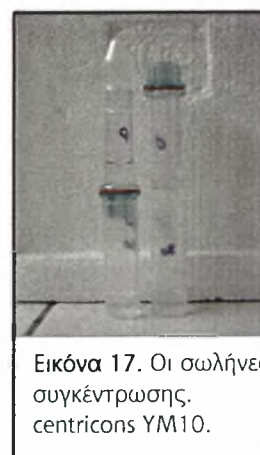
Αρχικά γίνεται πλύση των βαλβίδων Α και Β, της στήλης και του βρόγχου με τα αντίστοιχα διαλύματα Α και Β, όπως αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

	m <sup>5</sup> U54MTάση <i>Pyrococcus abyssi</i>	m <sup>5</sup> U54MTάση <i>Bacillus subtilis</i>
Διάλυμα Α	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05M pH=8 NaCl 0,3M H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05M pH=7 NaCl 0,2M H <sub>2</sub> O
Διάλυμα Β	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4M pH=8 NaCl 0,3M H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4M pH=8 NaCl 0,2M H <sub>2</sub> O

Οι ποσότητες οι οποίες εγχύθηκαν κυμαίνονται μεταξύ 100μl και 1ml, ανάλογα με τη συγκέντρωση της κάθε πρωτεΐνης.

## II.6. ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

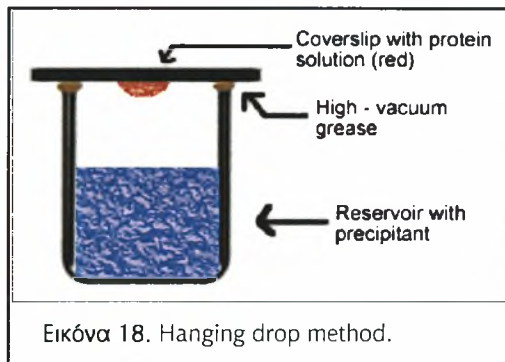
Για να μπορέσουν να κρυσταλλωθούν οι πρωτεΐνες θα πρέπει να έχουν μια συγκέντρωση από 5mg/ml έως 10mg/ml. Για αυτό το λόγο, χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί σωλήνες συγκέντρωσης, οι centricons YM10 (Εικ. 17), οι οποίοι έχουν την ικανότητα να μην επιτρέπουν πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους από 10KDa να διαπερνάνε τη μεμβράνη που έχουν ανάμεσα στον σωλήνα υποδοχής και στον σωλήνα συγκέντρωσης. Οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται μετά από συνεχείς φυγοκεντρήσεις στις 7000rpm (2ml πρωτεΐνης τοποθετούνται στον σωλήνα υποδοχής κάθε φορά λόγω της χωρητικότητας του σωλήνα).



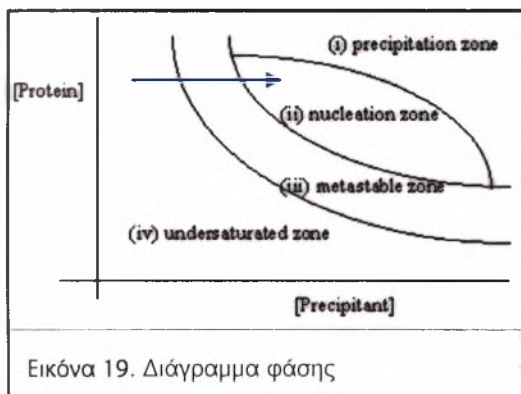
Εικόνα 17. Οι σωλήνες συγκέντρωσης, centricons YM10.

## 11.7. ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ

Η κρυστάλλωση και των δύο πρωτεϊνών έγινε με την πιο γνωστή μέθοδο, αυτή της κρεμαστής σταγόνας (hanging drop method, Εικ.18). Η αρχή της μεθόδου είναι απλή και βασίζεται σε μια σταγόνα η οποία περιέχει όσο το δυνατόν πιο καθαρή πρωτεΐνη, ρυθμιστικό διάλυμα και κατακρημνιστικά μέσα τα οποία μπορεί να είναι PEG (Polyethylene Glycol), MPD (2-Methyl-



2,4- pentanediol) κ.α.). Αυτή η σταγόνα τοποθετείται πάνω σε ένα πλαστικό πλακίδιο, αναποδογυρίζεται και κολλάει (λόγω σιλικόνης) πάνω σε μια μικρή δεξαμενή, η οποία περιέχει παρόμοια διαλύματα και κατακρημνιστικά μέσα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Καθώς περνάει ο χρόνος, η σταγόνα τείνει να εξισορροπήσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Αρχικά, η σταγόνα δεν περιέχει επαρκή ποσότητα ουσίας



κατακρήμνισης για να μπορέσει να κρυσταλλωθεί η πρωτεΐνη, αλλά καθώς το νερό εξατμίζεται από τη σταγόνα και μεταφέρεται στη δεξαμενή, η συγκέντρωση της αυξάνεται σε ένα επίπεδο ώστε να επέλθουν οι κατάλληλες συνθήκες για κρυστάλλωση. Εάν τυχόν, όπως φαίνεται στην εικόνα 19, δεν επιτευχθεί η

κρυστάλλωση για να σταθεροποιηθεί αυτό το στάδιο, αλλά συνεχιστεί η εξάτμιση του νερού, περνάμε στο στάδιο στο οποίο παρατηρείται κατακρήμνιση της πρωτεΐνης.

Έγινε χρήση πλακών που περιέχουν 24 δεξαμενές από την εταιρεία Limbro (Εικ. 20) ενώ τα διαλύματα που δοκιμάστηκαν είναι της εταιρίας Hampton Research (Crystal Screen Cryo, Crystal Screen 1, Crystal Screen 2, Peg/Ion Screen, Natrix) και JenaBioscience (1 → 10). Τα συγκεκριμένα διαλύματα παρέχονται έτοιμα από την κατασκευάστρια εταιρεία (Εικ. 21) με γραμμένη την περιεκτικότητα σε ρυθμιστικό διάλυμα, κατακρημνιστικό μέσο, άλατα (βλ. Παράρτημα). Η διαδικασία προετοιμασίας περιλαμβάνει την τοποθέτηση της



σιλικόνης στα άκρα των δεξαμενών και την πλήρωσή τους με 600μl από τα διαφορετικά kit. Ακολουθεί η μίξη 1μl του δείγματος της πρωτεΐνης με 1μl από το διάλυμα που βρίσκεται στη δεξαμενή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν υπάρχει ο κίνδυνος δημιουργίας κρυστάλλων από το διάλυμα, τοποθετείται και μια σταγόνα μόνο διαλύματος ως μάρτυρας. Οι πλάκες τοποθετούνται στην ειδική αίθουσα κρυστάλλωσης στους 18°C και παρακολουθούνται ανά τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε τρεις μέρες αρχικά και αργότερα ανά εβδομάδα).



Εικόνα 21. Kit της εταιρίας Hampton Research.

Όσον αφορά την πρωτεΐνη από *Pyrococcus abyssi*, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις όπως: 5mg/ml, 6,3 mg/ml, 8mg/ml, 8,3mg/ml, 8,7mg/ml, 10mg/ml και 25,2 mg/ml ενώ η πρωτεΐνη από *Bacillus subtilis* δοκιμάστηκε από 3,125mg/ml έως 25mg/ml. Επίσης έγινε προσπάθεια και για κρυστάλλωση της πρωτεΐνης από *Pyrococcus abyssi* με τη SAM σε αναλογία 1:2.

Εφόσον και αν, παρατηρηθούν κρύσταλλοι με τη χρήση ειδικών μικροσκοπίων, οι κρύσταλλοι 'ψαρεύονται' σε μικρο-απόχες και τοποθετούνται στην γεννήτρια που εκπέμπει ακτίνες X (Εικ. 22) για να υπάρχει ένα πρώτο συμπέρασμα για την προέλευση του κρυστάλλου. Η γεννήτρια αυτή μπορεί και εκπέμπει τις ακτίνες υπό καθορισμένη γωνία και για ορισμένο χρονικό διάστημα. Σε περίπτωση που το κρυσταλλογράφημα έχει την εικόνα που θα μπορούσε να έχει



Εικόνα 22. Μικρή εργαστηριακή γεννήτρια ακτίνων X.

ένας κρύσταλλος πρωτεΐνης, ο κρύσταλλος αυτός ψύχεται αμέσως με υγρό άζωτο και αποστέλλεται για περαιτέρω μετρήσεις στο κέντρο ερευνών της Grenoble (E.S.R.F.)



## II.8. ENZYMIKES ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ

Οι ενζυμικές δοκιμές για την ανίχνευση ριβονουκλεασών έχουν ως στόχο να δείξουν την παρουσία ριβονουκλεασών, ενζύμων τα οποία αποικοδομούν υδρολυτικά μόνο RNA. Για να επιτευχθεί η κρυστάλλωση των δυο πρωτεϊνών, απαιτείται η απουσία αυτών των ενζύμων τόσο ώστε να προλάβει να σχηματιστεί το σύμπλοκο μεταξύ της πρωτεΐνης και του πιθανού υποστρώματος που θα χρησιμοποιηθεί (mini ή ολόκληρο tRNA).

Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά μίξη 5μl των δειγμάτων των δύο πρωτεϊνών με 5μl ουρίας 7M και ισομοριακή ποσότητα tRNA<sup>Asp</sup> από ζύμη (59 βάσεις) μετά από τη χρωματογραφία συγγένειας και σε συνδυασμό με τις υπόλοιπες στήλες καθαρισμού (χρωματογραφία συγγένειας και στήλη καθαρισμού MonoS για παράδειγμα) και αμέσως ψύξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Αυτό αποτελεί το δείγμα σε χρόνο  $t=0$  μέρες. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για χρόνο  $t=3$  μέρες και  $t=7$  μέρες. Μέχρι να περάσουν αυτές οι 3 ή 7 μέρες, τα δείγματα διατηρούνται σε σταθερή θερμοκρασία  $18^{\circ}\text{C}$  στο αίθουσα κρυστάλλωσης. Ακολουθεί η τοποθέτηση των δειγμάτων σε πηκτή η οποία έχει την εξής σύσταση:

Συστατικό	Ποσότητα
Ακρυλαμίδιο 19:1 10%	5ml
TBE 1x%	
Ουρία 7M	
APS 30%	10μl
TEMED	10μl

Μόλις δημιουργηθεί το μίγμα του πηκτώματος, αφήνεται για 30 λεπτά να πολυμεριστεί. Ακολούθως 'μεταναστεύει' για 10 λεπτά με 15 Watt ώστε να ξεχωρίσουν τα δύο διαφορετικά μπλε που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μετανάστευσης. Τέλος, 'μεταναστεύουν' τα δείγματα έως ότου βγει από το πήκτωμα το πρώτο μπλε. Γίνεται βαφή του πηκτώματος σε 20ml H<sub>2</sub>O και 15μl TBE και αφήνεται για επώαση για 30 λεπτά σε συνεχή κίνηση. Στη συνέχεια, το πήκτωμα ξεπλένεται με 20ml H<sub>2</sub>O για 30 λεπτά και μεταφέρεται στην κατάλληλη συσκευή για την αποτύπωση με φωτογραφία.

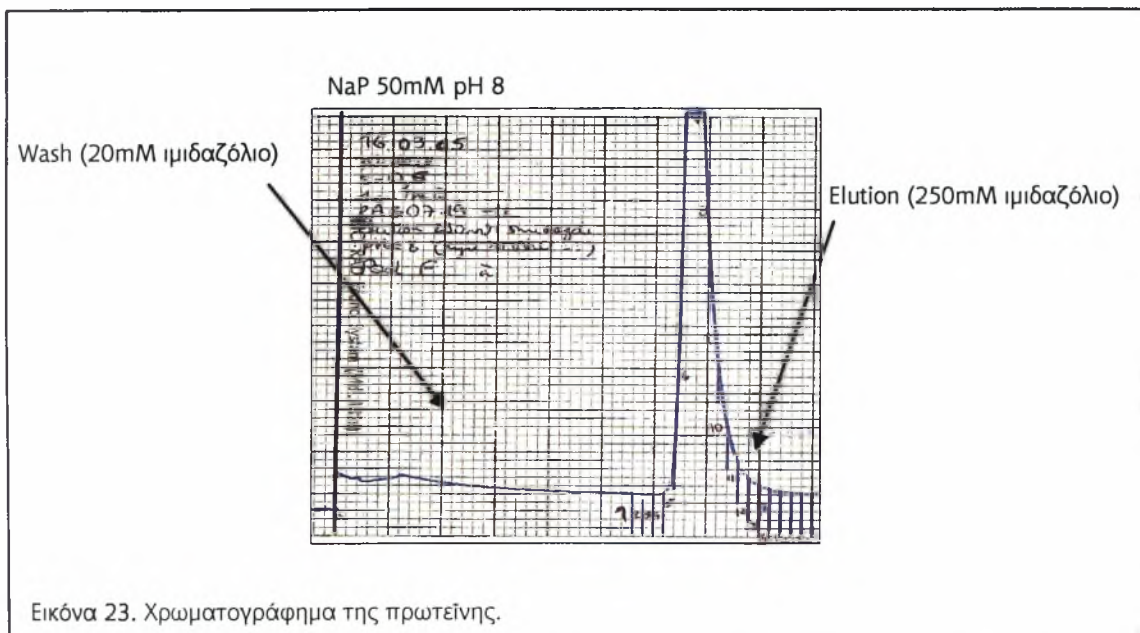
# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## III.1. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

### III.1.1. m<sup>5</sup>U54ΜΤάση από *Pyrococcus abyssi*

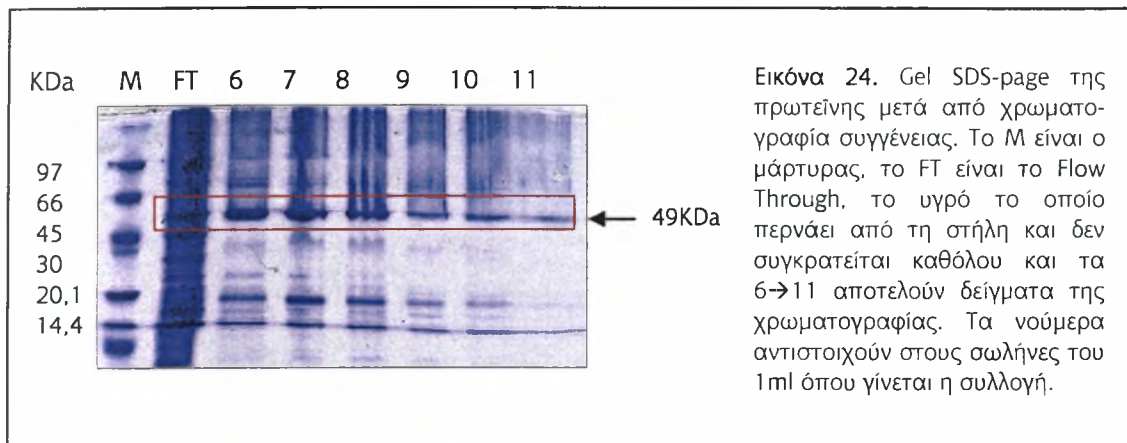
#### III.1.1.1. Χρωματογραφία συγγένειας

Για την πρωτεΐνη από *Pyrococcus abyssi* χρησιμοποιήθηκε διάλυμα λύσης (Iusis buffer), πλύσης (wash buffer) και έκπλυσης (elution buffer) ώστε να γίνει αρχικά καθαρισμός από τις διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες δεν προσδένονται στη στήλη, ακολούθως να αποδεσμευτούν εκείνες οι οποίες προσδένονται μη ειδικά στη στήλη, και τέλος να αποδεσμευτεί και η πρωτεΐνη η οποία ενδιαφέρει. Το χρωματογράφημα που λήφθηκε είχε την εξής μορφή:



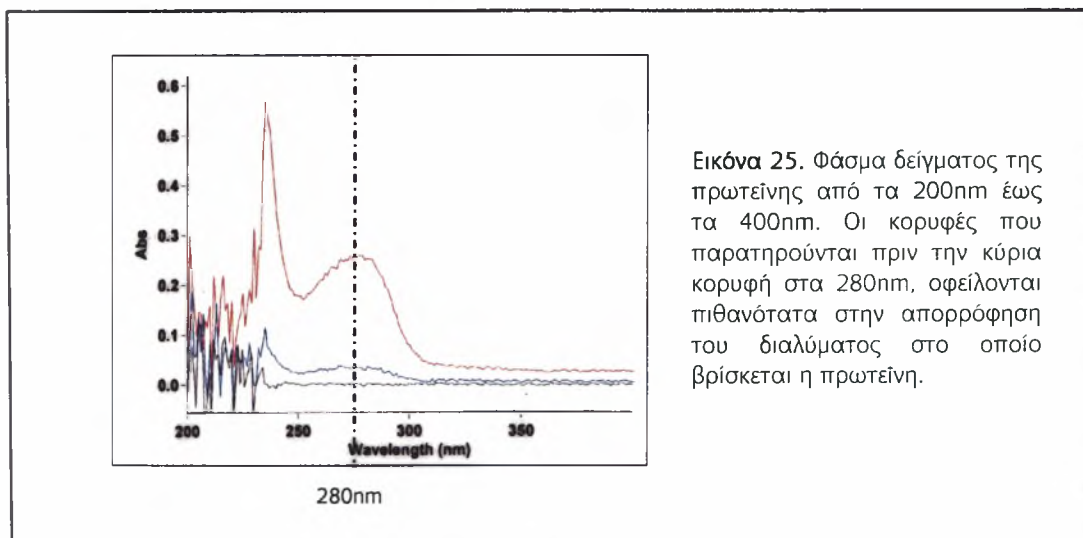
Παρατηρείται η κλασική κορυφή κατά την έκλυση της πρωτεΐνης με χρήση αυξημένης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (250mM). Όπως αναφέρθηκε και στο τμήμα Υλικά και Μέθοδοι, ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση για να αποφασιστεί ποια δείγματα θα επεξεργαστούν περαιτέρω. Η απόφαση λαμβάνεται με βάση την κορυφή. Επιλέγονται συνήθως δείγματα από την αρχή και το τέλος της κορυφής καθώς και ένα ή δύο από το κέντρο για να υπολογιστεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Βασισμένοι σε ένα πρότυπο διάγραμμα απορρόφησης-συγκέντρωσης, υπολογίζεται ότι η ποσότητα της πρωτεΐνης μετά από τη χρωματογραφία συγγένειας είναι 12mg/λίτρο

καλλιέργειας. Ακολουθεί η τοποθέτηση ορισμένων δειγμάτων σε gel SDS-page 10% για να υπάρχει μια εικόνα της καθαρότητας της πρωτεΐνης. Η εικόνα που λήφθηκε είναι η εξής:



Παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη που ενδιαφέρει είναι στο αναμενόμενο μέγεθος, δηλαδή στα 49KDa (η πρωτεΐνη είναι στα 49,1KDa). Είναι εμφανής η παρουσία κάποιων άλλων πρωτεϊνών, γύρω στα 20KDa και στα 15KDa ενώ παρατηρείται και ένα νέφος στην αρχή του πηκτώματος, το οποίο μπορεί να οφείλεται στην κακή μετανάστευση της πρωτεΐνης.

Εκτός από την φασματοφωτομέτρηση στα 595nm, έγινε και φάσμα ενός δείγματος από τα 200nm έως τα 400nm για να αποφανθεί τι άλλο εκλούσθηκε εκτός από την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντός. Το αποτέλεσμα είχε την εξής μορφή:



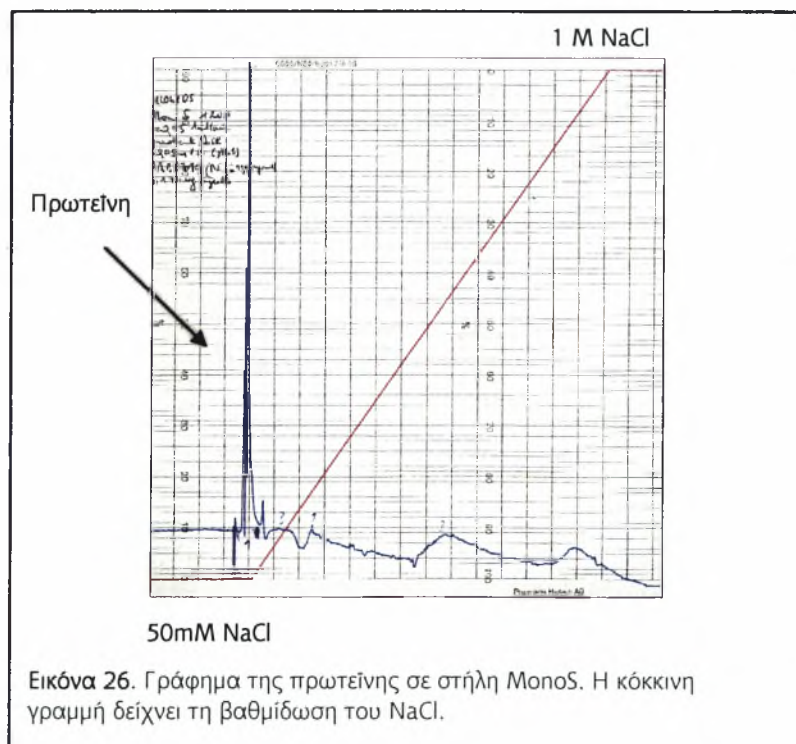
Παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη απορρόφηση βρίσκεται στα 280nm, μια απορρόφηση χαρακτηριστική για πρωτεΐνη. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να επιβεβαιωθεί ότι στο

διάλυμα, μετά τη χρωματογραφία συγγένειας, υπάρχει μόνο πρωτεΐνη, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι υπάρχει αποκλειστικά η συγκεκριμένη.

Ακολουθεί η χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής για την περαιτέρω απομάκρυνση προσμίξεων της πρωτεΐνης. Επειδή όμως το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα στη δέσμευσή της, γίνεται προσπάθεια αλλαγής του διαλύματος αυτού με διαπίδυση. Παρά τη χρήση διαφορετικών διαλυμάτων, η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται. Συνεπώς, για τη χρήση των υπόλοιπων στηλών, γίνεται αλλαγή του διαλύματος λίγο πριν την έγχυση. Εκτός, όμως, από το πρόβλημα που μπορεί να δημιουργηθεί στη δέσμευση της πρωτεΐνης στις υπόλοιπες στήλες, η αλλαγή του συγκεκριμένου διαλύματος είναι επιθυμητή για τις δοκιμές κρυστάλλωσης, καθ' ότι το  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  κρυσταλλώνεται αρκετά εύκολα και θα αποτελούσε λανθασμένο θετικό αποτέλεσμα.

### III. 1. 1. 2. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (στήλες MonoS και MonoQ)

Το γράφημα από τη χρήση της στήλης MonoS στην πρωτεΐνη είχε την εξής μορφή:

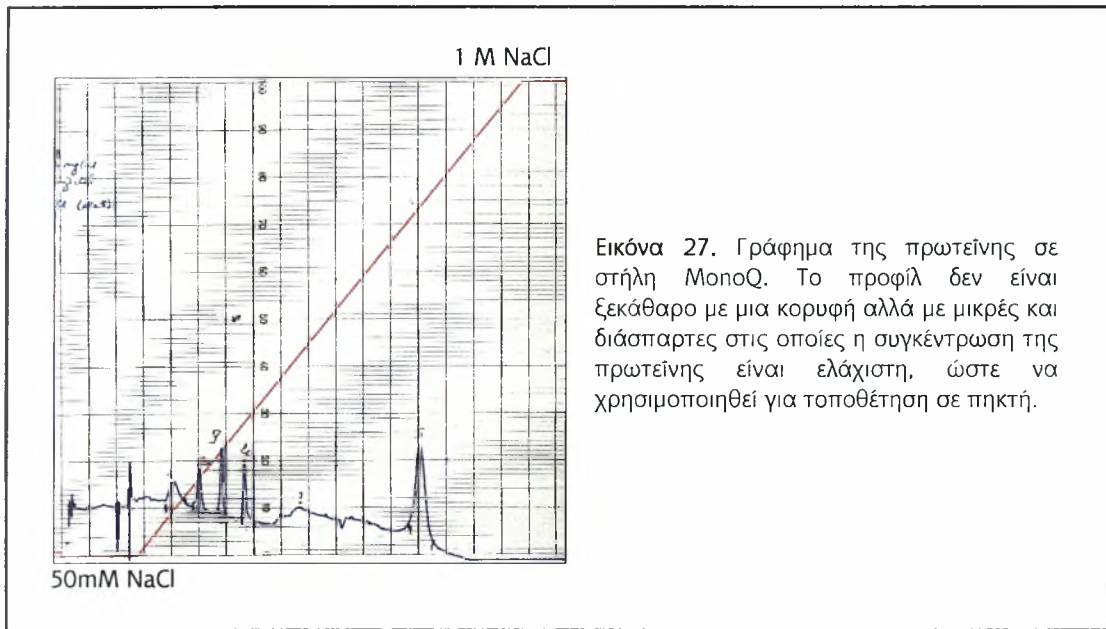


Βασισμένοι στις αρχές λειτουργίας της στήλης (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), η κορυφή, η οποία παρατηρείται πριν την βαθμίδωση NaCl, θα έπρεπε να παρατηρείται



αργότερα. Αυτό σημαίνει ότι η πρωτεΐνη δεν δεσμεύτηκε καθόλου στη στήλη, φαινόμενο το οποίο δεν εξηγείται δεδομένου το ότι έχει χρησιμοποιηθεί το κατάλληλο διάλυμα.

Το γράφημα, χρησιμοποιώντας τη στήλη MonoQ (Εικ. 29), είναι το αναμενόμενο, δηλαδή δεν έχει καθόλου ξεκάθαρο προφίλ με μία κορυφή που να επιδεικνύει τη αποδέσμευση της πρωτεΐνης (εφόσον η πρωτεΐνη δεν καλείται να δεσμευτεί).



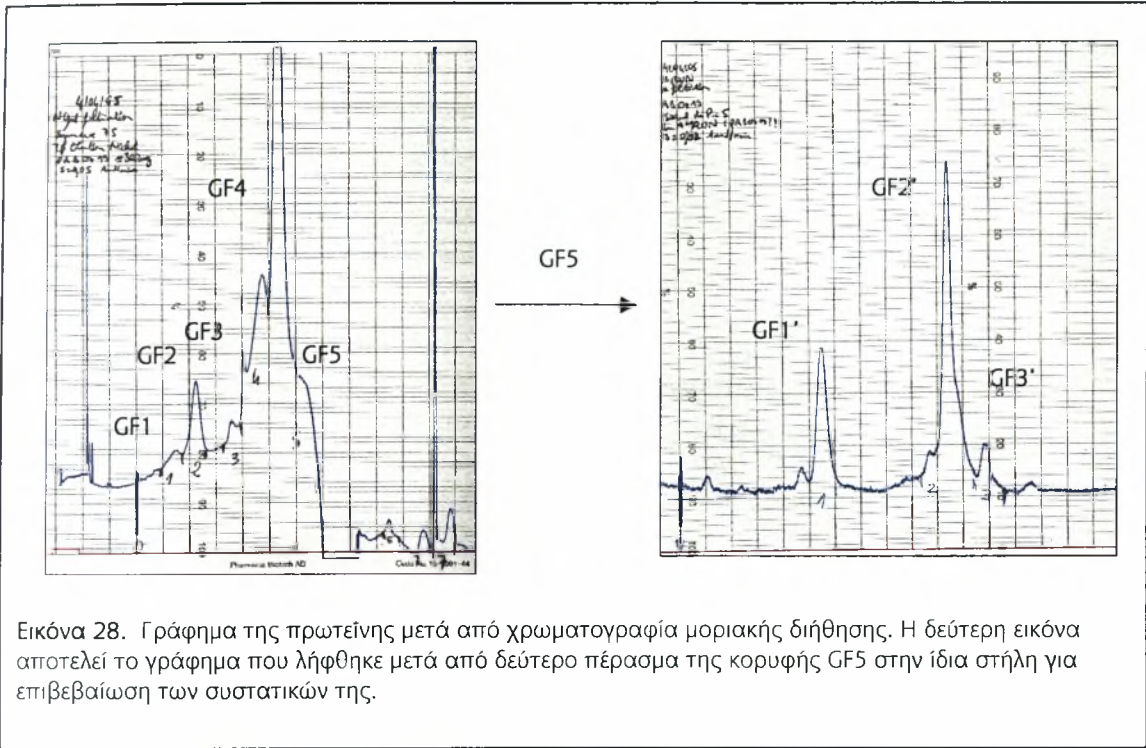
Εικόνα 27. Γράφημα της πρωτεΐνης σε στήλη MonoQ. Το προφίλ δεν είναι ξεκάθαρο με μια κορυφή αλλά με μικρές και διάσπαρτες στις οποίες η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι ελάχιστη, ώστε να χρησιμοποιηθεί για τοποθέτηση σε πηκτή.

Διαπιστώνοντας ότι η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής δεν αποτελεί κατάλληλη μέθοδος καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

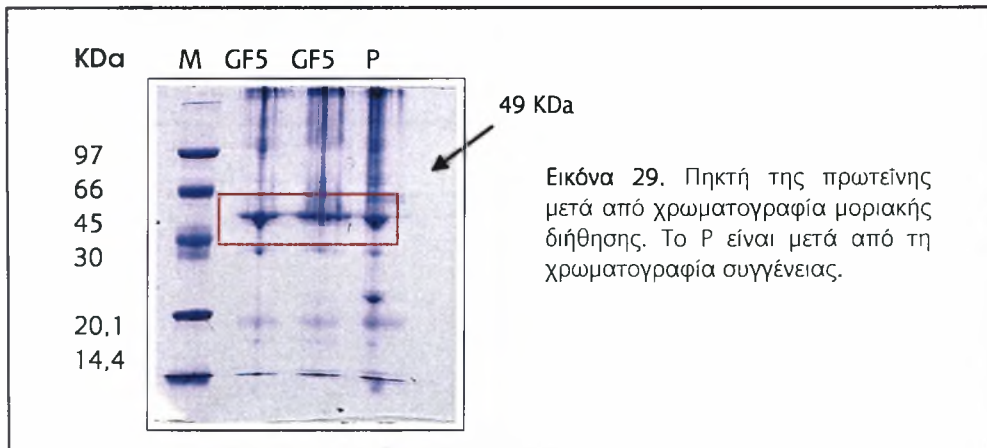
### III.1.1.3. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Ο διαχωρισμός στη συγκεκριμένη μέθοδο οφείλεται στα διαφορετικά μοριακά βάρη που έχουν οι πρωτεΐνες που υπάρχουν πιθανόν μαζί με τη πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος.

Το γράφημα που λήφθηκε από την πρωτεΐνη είχε την εξής μορφή:



Παρατηρούνται διαφορετικές κορυφές σε τέτοιες αποστάσεις που να είναι πιθανό η πρωτεΐνη να βρίσκεται σε πολυμερή. Γι' αυτό το λόγο, η κορυφή GF5, που είναι πιο πιθανό να είναι η πρωτεΐνη, εγχύθηκε ξανά και λήφθηκε η δεύτερη εικόνα. Λόγω του παρόμοιου προφίλ που παρουσιάζει, υποθέτεται ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται 80% σε μονομερή και 20% σε πολυμερή (αυτό βασίζεται στο ύψος των διαφόρων κορυφών και στο παρόμοιο προφίλ που παρουσιάζουν τα δυο γραφήματα, υποδηλώνοντας μια τάση για εξισορρόπηση των διαφορετικών μορφών της πρωτεΐνης). Τοποθετώντας την κορυφή GF5 σε πηκτή (οι υπόλοιπες κορυφές είχαν αμελητέα ποσότητα πρωτεΐνης), λήφθηκε η εξής εικόνα:

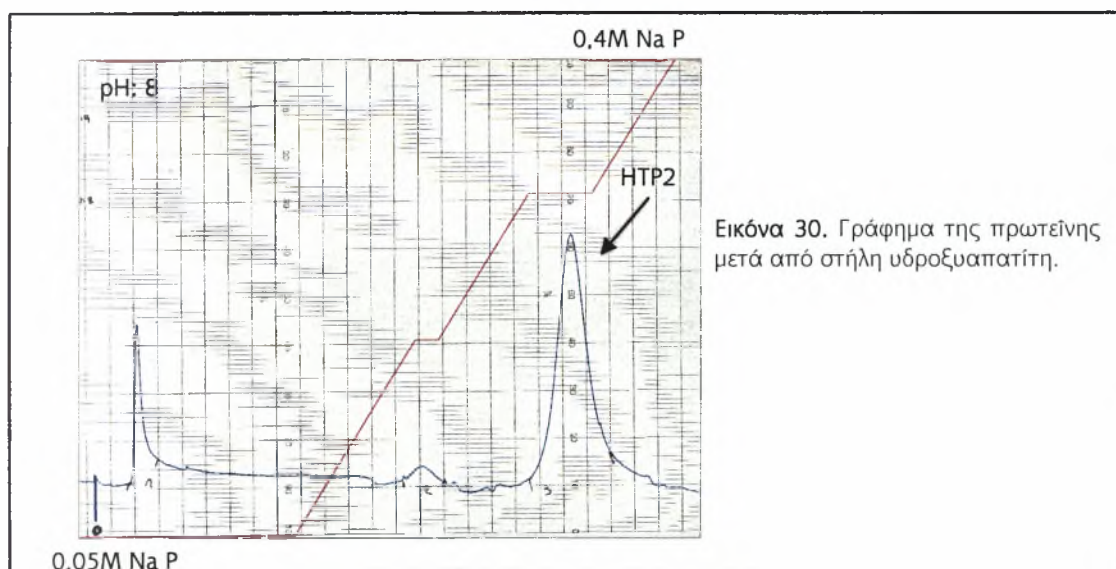


Ενώ είναι εμφανής η μπάντα των 49KDa στη κορυφή GF5, σε σύγκριση με το αποτέλεσμα μετά τη χρωματογραφία συγγένειας (P) δεν παρατηρείται καμία ιδιαίτερη αλλαγή σε σχέση με το βαθμό καθαρότητας της πρωτεΐνης, κάτι που σημαίνει ότι θα πρέπει να βρεθεί άλλη μέθοδος επιπλέον καθαρισμού.

#### III.1.1.4. Στήλη υδροξυαπατίτη

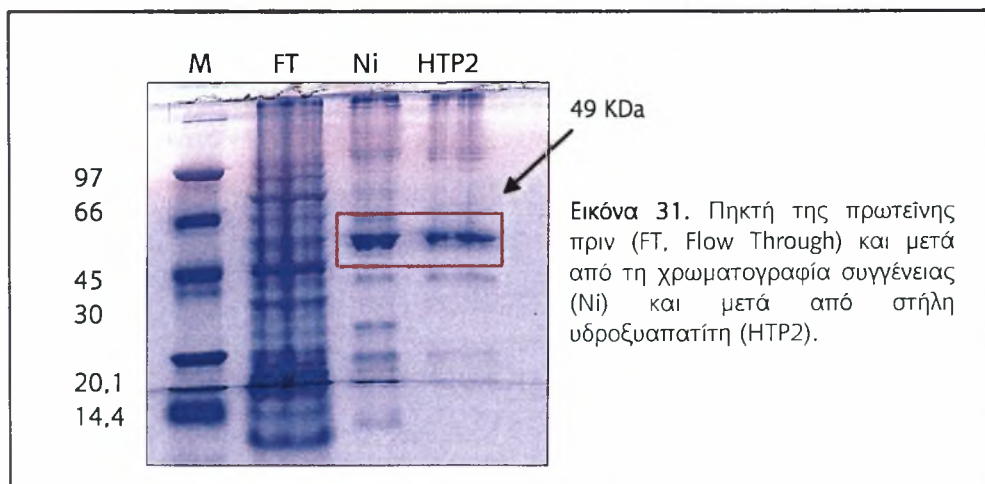
Ο διαχωρισμός στη στήλη υδροξυαπατίτη επιτυγχάνεται με μια βαθμίδωση φωσφορικών. Στη συγκεκριμένη στήλη δεν είναι απαραίτητη η αλλαγή του διαλύματος της πρωτεΐνης από  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , εφόσον δεν παρεμποδίζεται η δέσμευση της.

Το γράφημα της πρωτεΐνης είναι το εξής:



Εικόνα 30. Γράφημα της πρωτεΐνης μετά από στήλη υδροξυαπατίτη.

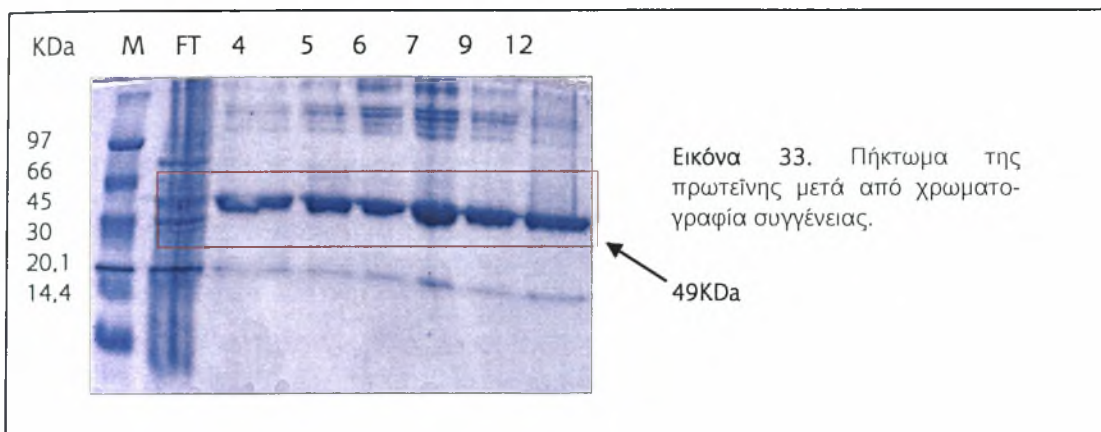
Μετά από τοποθέτηση της κορυφής HTP2 σε πηκτή (που πιθανόν να είναι η πρωτεΐνη), μαζί με δείγμα πριν (FT, Flow Through) και μετά από τη χρωματογραφία συγγένειας (Ni) λήφθηκε η παρακάτω εικόνα:



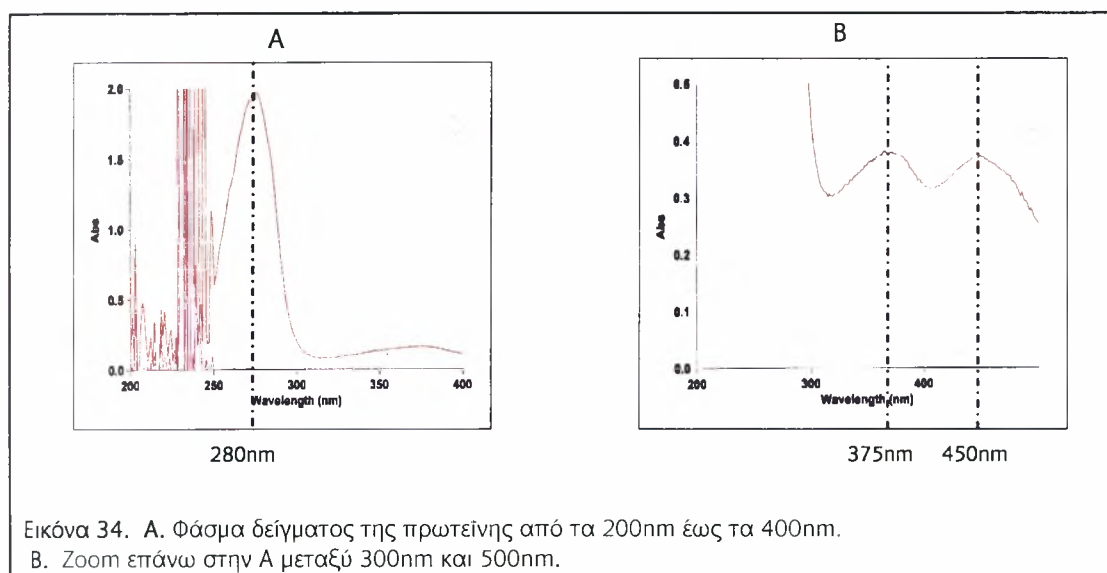
Εικόνα 31. Πηκτή της πρωτεΐνης πριν (FT, Flow Through) και μετά από τη χρωματογραφία συγγένειας (Ni) και μετά από στήλη υδροξυαπατίτη (HTP2).







Ακολούθησε φάσμα της πρωτεΐνης, το οποίο είχε την εξής μορφή:

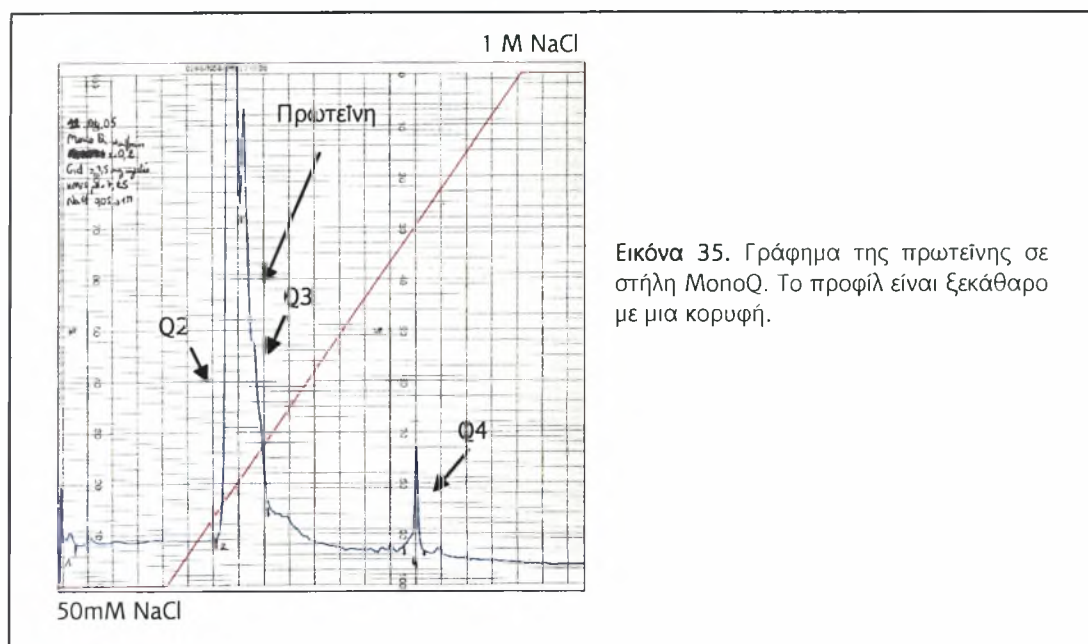


Όπως και στην περίπτωση της  $m^5U54M$ τάσης του *Pyrococcus abyssi*, είναι έντονη η μέγιστη κορυφή στα 280nm επιβεβαιώνοντας την παρουσία πρωτεϊνών. Στη Β, κάνοντας zoom, παρατηρούνται δύο κορυφές στα 375nm και στα 450nm, οι οποίες οφείλονται στο FAD (το οποίο, όπως έχει αναφερθεί, είναι παρών) και είναι χαρακτηριστικές των οξειδωμένων φλαβινών.

Ακολουθεί η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής με τις στήλες MonoS και MonoQ όπως και στην περίπτωση της πρωτεΐνης του *Pyrococcus abyssi*, για περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη διαπιδύθηκε επιτυχώς έναντι διαλύματος με την εξής σύσταση: Hepes 20mM pH=7,5, NaCl 200mM και H<sub>2</sub>O.

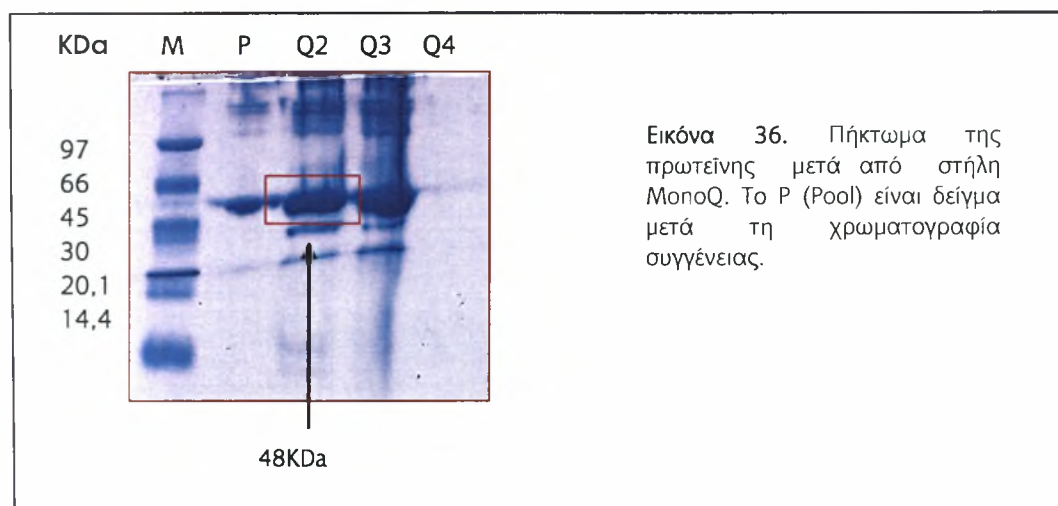
### III.1.2.2. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (στήλες MonoS και MonoQ)

Το γράφημα από τη στήλη MonoQ για την πρωτεΐνη έχει την εξής μορφή:



Εικόνα 35. Γράφημα της πρωτεΐνης σε στήλη MonoQ. Το προφίλ είναι ξεκάθαρο με μια κορυφή.

Όπως είναι αναμενόμενο, υπάρχει μια ξεκάθαρη κορυφή, η οποία υποδηλώνει την αποδέσμευση της πρωτεΐνης γύρω στα 150mM NaCl. Υπάρχει περίπου 50% της αρχικής πρωτεΐνης η οποία τοποθετήθηκε στη στήλη και η τοποθέτηση σε πήκτωμα έχει αυτή τη μορφή:



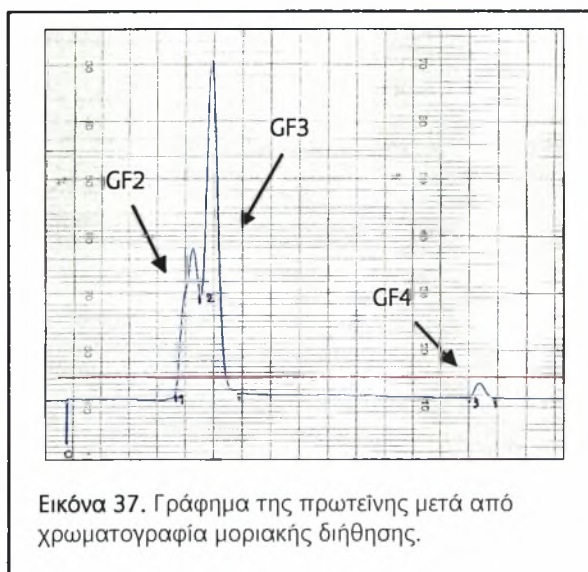
Εικόνα 36. Πήκτωμα της πρωτεΐνης μετά από στήλη MonoQ. Το P (Pool) είναι δείγμα μετά τη χρωματογραφία συγγένειας.

Παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη μετά από καθαρισμό στη στήλη MonoQ δεν είναι πιο καθαρή απ' ό τι μετά τη χρωματογραφία συγγένειας. Υπάρχουν έντονες μπάντες αρχικά και μια λίγο μετά τη μπάντα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Το γράφημα της πρωτεΐνης σε στήλη MonoS έχει το αναμενόμενο ακαθόριστο προφίλ που έχει και η m<sup>5</sup>U54Mτάση του *Pyrococcus abyssi* στη MonoQ και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η οποία εκλούεται είναι πολύ μικρή για να τοποθετηθεί το δείγμα σε πήκτωμα και να αποφανθεί αν είναι ένας τρόπος περαιτέρω καθαρισμού.

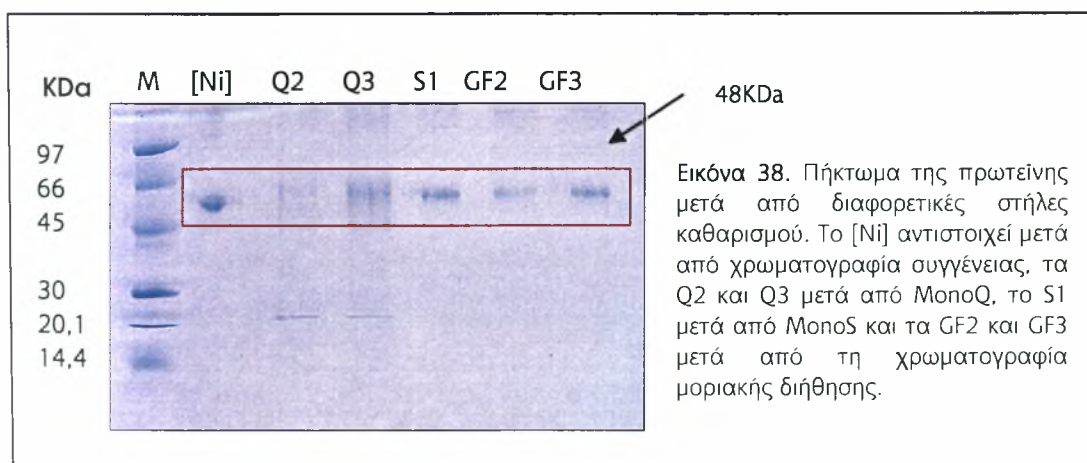
### III.1.2.3. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η εικόνα που λήφθηκε μετά την χρωματογραφία μοριακής διήθησης είναι η εξής:



Εικόνα 37. Γράφημα της πρωτεΐνης μετά από χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

Παρατηρούνται δύο έντονες κορυφές, σε τέτοια απόσταση τη μία από την άλλη ώστε να υποθέτεται ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται σε μονομερή και διμερή μορφή σε αναλογία 60/40. Μετά από τοποθέτηση των κορυφών σε πήκτωμα, λήφθηκε η παρακάτω εικόνα:

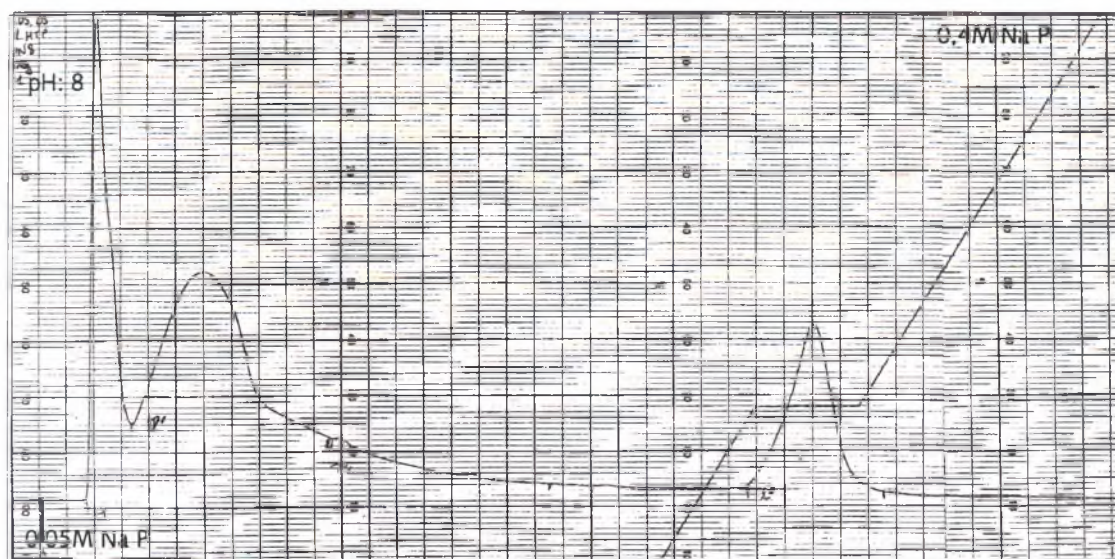


Εικόνα 38. Πήκτωμα της πρωτεΐνης μετά από διαφορετικές στήλες καθαρισμού. Το [Ni] αντιστοιχεί μετά από χρωματογραφία συγγένειας, τα Q2 και Q3 μετά από MonoQ, το S1 μετά από MonoS και τα GF2 και GF3 μετά από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

Παρατηρείται ότι, συγκριτικά με τις προηγούμενες μεθόδους, η χρωματογραφία μοριακής διήθησης δεν έχει κάποιο ιδιαίτερα θετικό προφίλ καθαρισμού. Συνεπώς, δοκιμάστηκε μια τρίτη στήλη καθαρισμού, η στήλη υδροξυαπατίτη.

#### III.1.2.4. Στήλη υδροξυαπατίτη

Το γράφημα της πρωτεΐνης μετά από τη στήλη υδροξυαπατίτη είναι το εξής:



Εικόνα 39. Γράφημα της πρωτεΐνης μετά από στήλη υδροξυαπατίτη.

Το προφίλ είναι ακαθόριστο και μετά από τοποθέτηση των κορυφών σε πηκτή λαμβάνεται παρόμοια εικόνα με αυτή της m<sup>5</sup>U54Mτάσης του *Pyrococcus abyssi*.

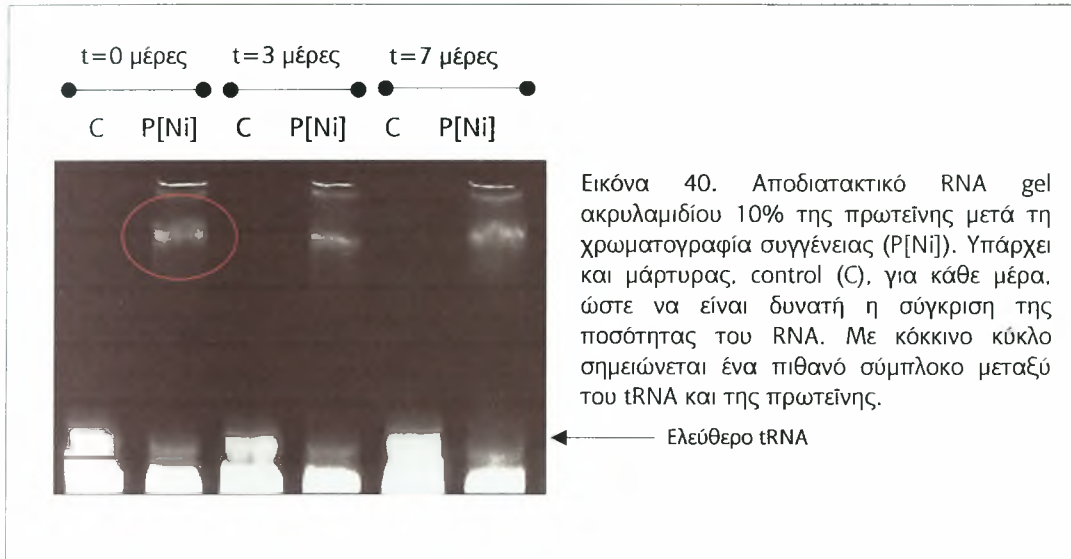
## III.2. ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ

Για να μπορέσει μια μέθοδος καθαρισμού να θεωρηθεί κατάλληλη στη συγκεκριμένη εργασία, θα πρέπει οι πρωτεΐνες οι οποίες επεξεργάζονται να μπορέσουν να κρυσταλλωθούν. Προτού, όμως, ακολουθήσουν δοκιμές κρυστάλλωσης, θα πρέπει οι πρωτεΐνες να απαλλαγούν όσο το δυνατόν περισσότερο από RNAses, ώστε να είναι δυνατή η συμπλοκοποίηση με το υπόστρωμά τους (tRNA).

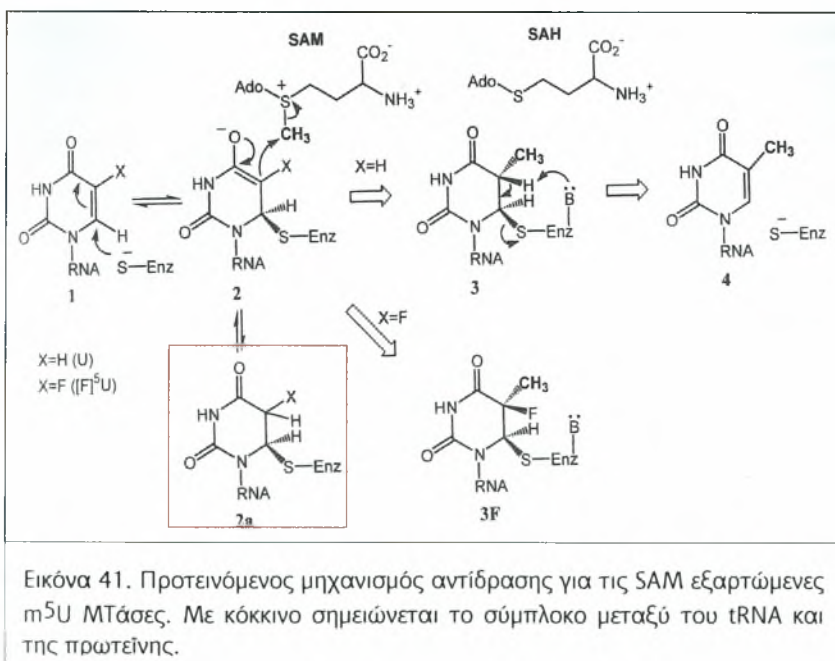


### III.2.1. m<sup>5</sup>U54MTάση από *Pyrococcus abyssi*

Η φωτογραφία που τραβήχτηκε για την πρωτεΐνη αποτελεί παράδειγμα δοκιμής ανίχνευσης ριβονουκλεασών μετά από τη χρωματογραφία συγγένειας.



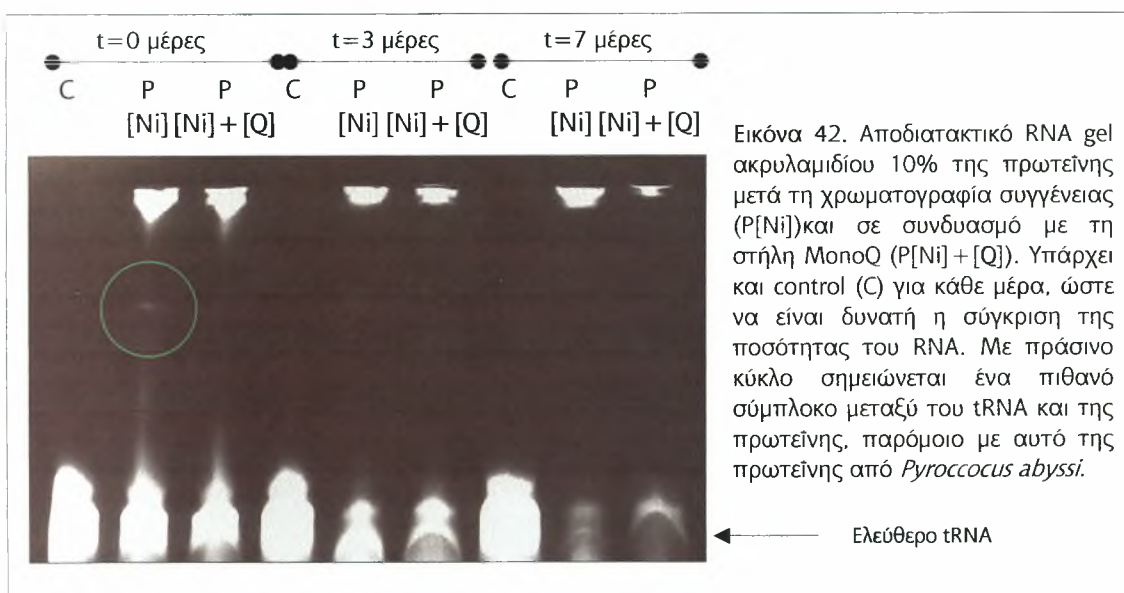
Παρατηρείται ότι, η ποσότητα που υπάρχει στη βάση του πηκτώματος δεν είναι μειωμένη κατά πολύ μεταξύ της μέρας 0 και της μέρας 7. Αυτό σημαίνει ότι, όσον αφορά τη χρωματογραφία συγγένειας, η πρωτεΐνη παραμένει αρκετά απαλλαγμένη από ριβονουκλεάσες ώστε να δοκιμαστεί για κρυστάλλωση σε σύμπλοκο με tRNA. Με κόκκινο κύκλο σημειώνεται μια μπάντα, η οποία πιθανόν να είναι σύμπλοκο του tRNA και της πρωτεΐνης. Αυτό βασίζεται στο μηχανισμό της αντίδρασης των m<sup>5</sup>UMΤασών που παρουσιάζεται παρακάτω:



Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή, ο καταλυτικός μηχανισμός της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι μια νουκλεόφιλη επίθεση ενός κατάλοιπου του ενζύμου (όπως η κυστεΐνη από την TrmA ή το ασπαρτικό οξύ από την RumA του *E. coli*) στον άνθρακα 6 της ουρακίλης 54 του tRNA. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλόκου, το οποίο σταθεροποιείται απουσία της SAM και που πιθανόν είναι η μπάντα ψηλά στη πηκτή. Σε περίπτωση παρουσίας του συμπαραγόντα SAM, ο άνθρακας ενεργοποιείται για τη μεθυλίωσή του, σχηματίζεται SAH και τέλος το μεθυλιωμένο tRNA απελευθερώνεται από το σύμπλοκο με τη δράση μιας βάσης του ενζύμου (ένα άλλο κατάλοιπο) στον άνθρακα 5 της ουρακίλης 54 του tRNA.

### III.2.2. m<sup>5</sup>U54MTάση από *Bacillus subtilis*

Όσον αφορά την m<sup>5</sup>UMTάση από *Bacillus subtilis*, η φωτογραφία από τη δοκιμή μετά από τη χρωματογραφία συγγένειας αλλά και σε συνδυασμό μετά τη στήλη ΜονοQ είναι η εξής:



Παρατηρείται ότι κατά τη διάρκεια του χρόνου, η ποσότητα του ελεύθερου tRNA στη βάση του πηκτώματος συνεχώς μειώνεται, κάτι το οποίο αποτελεί ένδειξη δράσης RNAσων. Αυτό αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για τις δοκιμές κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης σε σύμπλοκο με tRNA. Επίσης, είναι εμφανής μια μπάντα στο ίδιο σημείο που είχε εμφανιστεί και στην m<sup>5</sup>U54MTάση από *Pyrococcus abyssi*, σημειωμένη με πράσινο κύκλο. Θα μπορούσε να αποτελεί σύμπλοκο της πρωτεΐνης με tRNA, αλλά δε μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα εφόσον ο μηχανισμός για τις μη SAM εξαρτωμένες m<sup>5</sup>U MTάσεις δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα.

Επειδή οι παραπάνω φωτογραφίες αποτελούν παραδείγματα των δοκιμών που διεξήχθησαν, ακολουθεί ένας συγκεντρωτικός πίνακας με τα αποτελέσματα όλων των στηλών.

	m <sup>5</sup> U54MTάση <i>Pyrococcus abyssi</i>	m <sup>5</sup> U54MTάση <i>Bacillus subtilis</i>
Ni	Αρκετά	Όχι
Ni + MonoQ (0,05M→1 M NaCl)	Αρκετά	Όχι
Ni + MonoS (0,05M→1 M NaCl)	Αρκετά	Όχι
Ni + Μοριακή διήθηση	Αρκετά	Όχι
Ni + Υδροξυαπατίτης (0,05M→0,4M Na P )	Αρκετά	Όχι

Παρατηρείται ότι, για την m<sup>5</sup>U54MTάση από *Pyrococcus abyssi*, μετά τη χρωματογραφία συγγένειας (Ni) αλλά και σε συνδυασμό με άλλες στήλες, η πρωτεΐνη είναι αρκετά απαλλαγμένη από ριβονουκλεάσες ώστε να γίνουν δοκιμές κρυστάλλωσης σε σύμπλοκο με tRNA. Αντίθετα, η m<sup>5</sup>U54MTάση από *Bacillus subtilis* δεν είναι αρκετά απαλλαγμένη από ριβονουκλεάσες, οπότε για τη κρυστάλλωση σε σύμπλοκο με το tRNA θα πρέπει να βρεθεί άλλη μέθοδος περαιτέρω καθαρισμού.

### III.3. ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ

Εφόσον θεωρηθεί ότι οι δύο πρωτεΐνες είναι αρκετά καθαρές ώστε ο κρύσταλλοι που ίσως σχηματιστούν να είναι των πρωτεϊνών, ακολουθεί το στάδιο της συμπύκνωσής τους (αφού λόγω των διαφόρων στηλών έχουν αραιωθεί) για να αποκτήσουν την κατάλληλη συγκέντρωση και να μπορέσουν να κρυσταλλωθούν (Βλ. Υλικά και Μέθοδοι).

### III.3.1. Συμπύκνωση

Η συμπύκνωση των δύο πρωτεϊνών, εφόσον χρειαστεί, πραγματοποιείται στους ειδικούς σωλήνες συγκέντρωσης *centricon*s YM10. Η ιδανική συγκέντρωση είναι μεταξύ 5mg/ml και 10mg/ml, χωρίς αυτό να αποκλείει την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών σε διαφορετικές από αυτές συγκεντρώσεις.

Η m<sup>5</sup>U54MTάση από *Pyrococcus abyssi* συμπυκνώθηκε στα 18mg/ml ενώ η m<sup>5</sup>U54MTάση από *Bacillus subtilis* δε χρειάστηκε να συμπυκνωθεί αφού μετά τη χρωματογραφία συγγένειας βρίσκεται ήδη σε μια συγκέντρωση 36mg/ml.

### III.3.2. Αποτελέσματα κρυστάλλωσης

Όπως αναφέρθηκε στο τμήμα Υλικά και Μέθοδοι, όταν ετοιμαστούν οι κατάλληλες πλάκες με τις σταγόνες και τοποθετηθούν στην αίθουσα κρυστάλλωσης (Εικ. 43), ελέγχονται στο μικροσκόπιο αρχικά κάθε μέρα, μετά κάθε τρεις μέρες και τέλος κάθε εβδομάδα. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των δύο πρωτεϊνών και διαφορετικά kits από τις εταιρείες Hampton Research και Jena Bioscience.



Εικόνα 43. Η αίθουσα κρυστάλλωσης στους 18°C.

#### III.3.1. m<sup>5</sup>U54MTάση από *Pyrococcus abyssi*

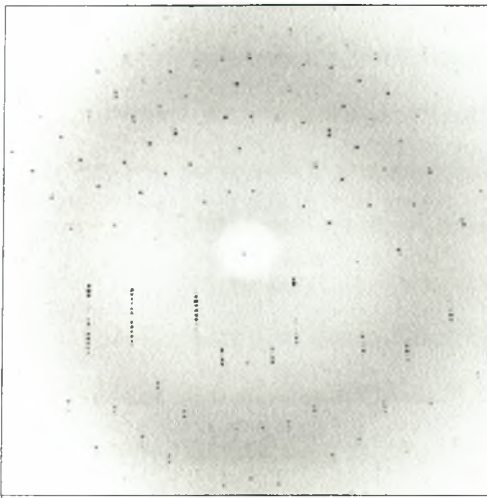
Όσον αφορά την πρωτεΐνη από *Pyrococcus abyssi*, κρυσταλλώθηκε σε διαφορετικές συνθήκες μόνη της, σε μια συγκέντρωση 8,3mg/ml (166μM), αλλά και σε σύμπλοκο με τη SAM (332μM, όπως είχε αναφερθεί στο αντίστοιχο τμήμα Υλικά και Μέθοδοι υπάρχει μια αναλογία 1:2 πρωτεΐνη -SAM). Μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών, η κρυστάλλωση επιτυγχάνεται μέσα στις πρώτες τρεις μέρες.

Η μορφή των κρυστάλλων είναι μικρές μπαγκέτες, οι οποίες μοιάζουν με αυτές της εικόνας 44. Όπως το απαιτεί η καθορισμένη διαδικασία, μετά την παρατήρηση των κρυστάλλων, οι κρύσταλλοι 'ψαρεύονται' με χρήση ειδικής



Εικόνα 44. Κρύσταλλοι σε μορφή μπαγκέτας.

μικρό-απόχης και τοποθετούνται στη γεννήτρια του εργαστηρίου. Με την ακτινοβολία υπό διαφορετικές γωνίες και για διάφορα χρονικά διαστήματα, λαμβάνονται κρυσταλλογράφημα, παρόμοια με το παρακάτω:



Εικόνα 45. Κρυσταλλογράφημα πρωτεΐνης.

Είναι εμφανείς οι διάσπαρτες κουκκίδες οι οποίες δηλώνουν τις ανακλάσεις της πρωτεΐνης. Σε περίπτωση που υπήρχαν πολύ λιγότερες και μόνο σε συγκεκριμένα σημεία, θα σήμαινε ότι ο κρύσταλλος αποτελείται από άλας. Οι συνθήκες στις οποίες σχηματίστηκαν κρύσταλλοι και οι οποίοι στη γεννήτρια είχαν παρόμοιο κρυσταλλογράφημα είναι οι εξής:

- ◆ 0,2M di-NH<sub>4</sub> tartrate, 20% PEG 3350
- ◆ 0,2M Mg sulfate, 20% PEG 4000

◆ 0,1M Sodium Citrate, 0,05M Ammonium Sulfate, 15% PEG 8000

◆ 0,1M Tris-HCl pH=8,5, 0,2M Lithium Sulfate, 18% PEG 8000

Για περισσότερες πληροφορίες, ένας από τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης σε σύμπλοκο με τη SAM ψύχθηκε με χρήση υγρού αζώτου και αποστάλθηκε με χρήση ειδικών δοχείων στο E.S.R.F. στη Grenoble. Τα δεδομένα έδειξαν σκεδασμό της πρωτεΐνης στα 2,5Å, το οποίο θεωρείται καλό αποτέλεσμα, δεδομένου το ότι όσο μικρότερη είναι η διακριτική ικανότητα, τόσο περισσότερες πληροφορίες θα παρέχονται για τις συγκεκριμένες θέσεις των ατόμων, τις αλληλεπιδράσεις τους, την προσπελασιμότητά τους στο διαλυτικό μέσο και τις διακυμάνσεις στην ελαστικότητα/κινητικότητα του μορίου.

### III.3.2. m<sup>5</sup>U54MΤάση από *Bacillus subtilis*

Όσον αφορά την πρωτεΐνη από *Bacillus subtilis*, αν και σχηματίστηκαν κρύσταλλοι στις δεξαμενές, το μικρό μέγεθός τους δεν επέτρεψε την περαιτέρω επεξεργασία τους κατά τη διάρκεια αυτής της διπλωματικής εργασίας.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο στόχος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η κρυστάλλωση του τροποποιητικού ενζύμου m<sup>5</sup>U54ΜΤάση από το αρχαίο *Pyrococcus abyssi* και από το Gram<sup>+</sup> βακτήριο *Bacillus subtilis*, το οποίο καταλύει την ίδια χημική αντίδραση (την μεθυλίωση του άνθρακα 5 της ουρακίλης στη θέση 54 του βρόγχου ΤΨC) στο ίδιο υπόστρωμα (tRNA), με χρήση διαφορετικών συμπαραγόντων (SAM για την m<sup>5</sup>U54ΜΤάση από το αρχαίο *Pyrococcus abyssi* και 5,10 μεθυλ-τετραφολικό οξύ για την m<sup>5</sup>U54ΜΤάση από το Gram<sup>+</sup> βακτήριο *Bacillus subtilis*). Οι πληροφορίες, οι οποίες θα συλλεχθούν από την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών αυτών, μεμονωμένων αλλά και συμπλοκοποιημένων με τους συμπαραγόντες και το υπόστρωμά τους θα αποτελέσουν τη βάση για τη σύγκριση των τρισδιάστατων δομών τους αλλά και των δομικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί μια ιδέα για τον τρόπο εξέλιξης της πολύπλοκης αυτής τροποποιητικής διαδικασίας.

Ο δρόμος για την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών περνάει από διάφορα στάδια, τα οποία χρίζουν ειδικής προσοχής και βελτιστοποίησης. Βασικό στάδιο αποτελεί ο καθαρισμός των πρωτεϊνών από άλλες πρωτεΐνες και ιδιαίτερα από RNAses, οι οποίες αποτελούν μέγιστο πρόβλημα για τη κρυστάλλωση των συμπλοκοποιημένων με tRNA πρωτεϊνών καθώς αποικοδομούν το συγκεκριμένο υπόστρωμα πριν προλάβει να σχηματιστεί το σύμπλοκο. Συνεπώς μια μέθοδος καθαρισμού δεν επιλέγεται μόνο από την ικανότητά της να καθαρίζει την πρωτεΐνη, αλλά και από το πόσο βοηθάει στην κρυστάλλωσή της. Τα αποτελέσματα των χρωματογραφικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν μετά τη χρωματογραφία συγγένειας συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

	m <sup>5</sup> U54ΜΤάση <i>P. abyssi</i> (pI=8,9)	m <sup>5</sup> U54ΜΤάση <i>B. subtilis</i> (pI=5,73)
MonoQ (0,05M→1M NaCl)	pH: 8 - 50%	pH: 7,25 + 50%
MonoS (0,05M→1M NaCl)	pH: 7,25 -(?) 50%	pH: 7,25 - 60%
Gel Filtration	pH: 8 70% 80% μονομερή 20% πολυμερή	pH: 7,25 70% 60% μονομερή 40% διμερή
Υδροξυαπατίτης (0,05M→0,4M Na P)	pH: 8 + 60%	pH: 7 + 60%

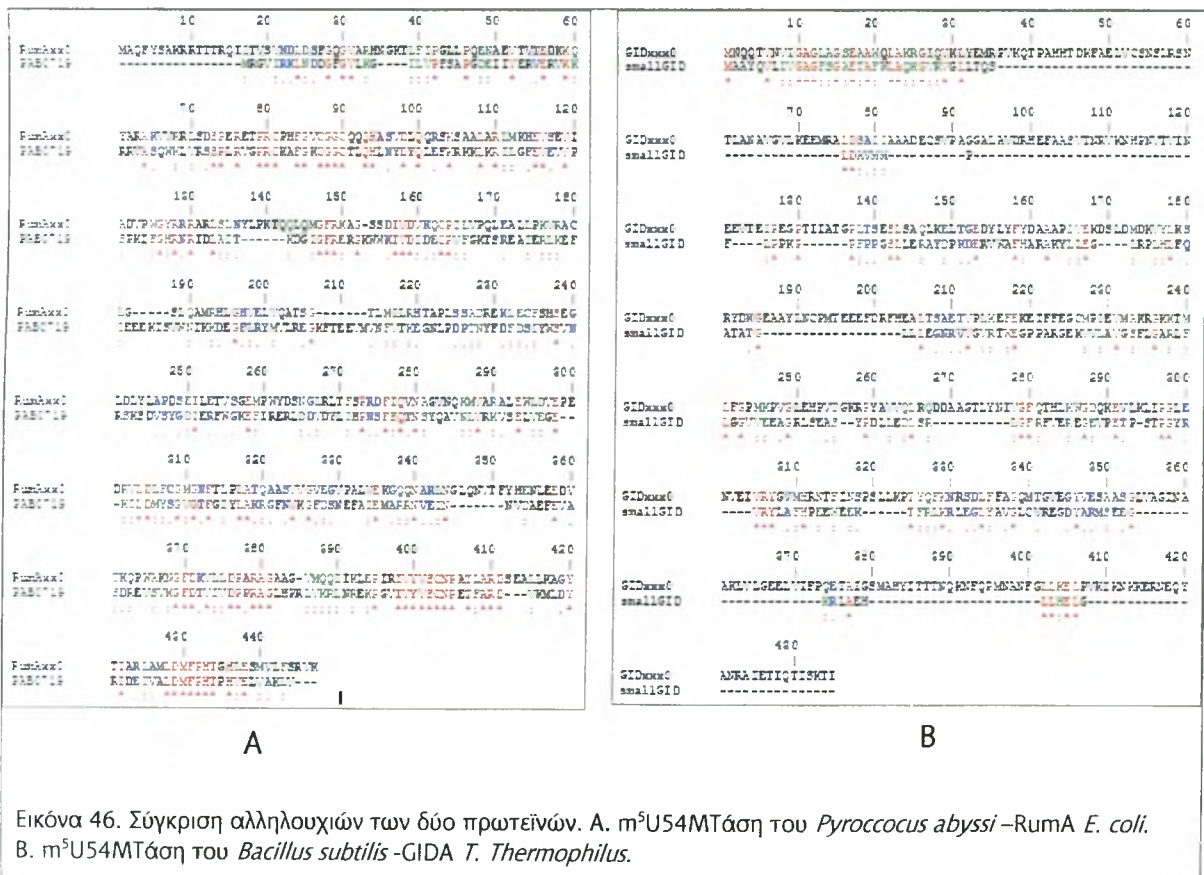
Το - δηλώνει την μη δέσμευση της πρωτεΐνης, ενώ το + το αντίθετο. Το ερωτηματικό συμβολίζει το μη αναμενόμενο αποτέλεσμα, το οποίο έχει ήδη αναφερθεί στο αντίστοιχο τμήμα, ενώ είναι εμφανή τα ποσοστά των μονομερών, διμερών και πολυμερών των πρωτεϊνών. Το ποσοστό επάνω δεξιά αντιστοιχεί στο ποσοστό της πρωτεΐνης το οποίο συλλέχθηκε μετά τη στήλη. Βασισμένοι στα παραπάνω αποτελέσματα αλλά και στις πηκτές που αναφέρονται σε κάθε τμήμα, οι χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, μοριακής διήθησης και η στήλη υδροξυαπατίτη δεν άλλαξαν σε ιδιαίτερο βαθμό την καθαρότητα της πρωτεΐνης. Όσον αφορά την παρουσία ριβονουκλεασών, η χρωματογραφία συγγένειας είναι αρκετή για την απαλλαγή τους στην m<sup>5</sup>U54MTάση του *Pyrococcus abyssi* αλλά όχι και για την m<sup>5</sup>U54MTάση του *Bacillus subtilis*. Συνεπώς για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη θα πρέπει να βρεθεί άλλη μέθοδος καθαρισμού μετά τη χρωματογραφία συγγένειας εφόσον, με τις υπόλοιπες στήλες δεν επέρχεται επαρκής απαλλαγή των ριβονουκλεασών ή να δοκιμαστεί μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης. Το τελευταίο βασίζεται στο ότι οι ριβονουκλεάσες αποτελούν αμυντικό μηχανισμό του κυττάρου για τον περιορισμό του μεγάλου αριθμού των RNA μεταγράφων της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Οπότε, περιορίζοντας αυτόν τον αριθμό με μικρότερο χρόνο επαγωγής της έκφρασης, με χαμηλότερες θερμοκρασίες ή με χρήση ελάχιστου μέσου καλλιέργειας θα μπορούσαν να περιοριστούν αυτές οι ριβονουκλεάσες.

Εφόσον θεωρηθεί ότι οι πρωτεΐνες είναι καθαρές σε ικανοποιητικό βαθμό, ακολουθούν οι δοκιμές κρυστάλλωσής τους. Αν και υπάρχουν κρύσταλλοι της m<sup>5</sup>U54MTάσης του *Pyrococcus abyssi* με τον συμπαράγοντά της, δεν έχουν γίνει ακόμα δοκιμασίες για κρυστάλλωσή της με tRNA. Για να γίνει αυτό, θα πρέπει πρώτα να δημιουργηθεί το κατάλληλο υπόστρωμα, το οποίο μπορεί να είναι ολόκληρο tRNA ή mini-tRNA (βλ. σελ.16). Και στις δύο περιπτώσεις, απαιτείται χρονοβόρος διαδικασία ώστε να μπορούν τα υποστρώματα να αναγνωριστούν και από τις δύο πρωτεΐνες.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι για επιβεβαίωση ότι ο κρύσταλλος που σχηματίστηκε είναι της πρωτεΐνης που ενδιαφέρει και όχι κάποιας άλλης, ο κρύσταλλος διαλύεται στο διάλυμα στο οποίο ήδη βρίσκεται και ακολούθως εκπλένεται και φυγοκεντρείται τρεις φορές με νερό ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα. Στο νερό ο κρύσταλλος λιώνει και μια ικανοποιητική ποσότητα τοποθετείται σε πηκτή ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το μοριακό βάρος είναι το αναμενόμενο.

Ακολουθεί, η διαλεύκανση της δομής του κρυστάλλου που, στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, αναφέρεται στη πρωτεΐνη συμπλοκοποιημένη με τον συμπαράγοντα SAM. Ήδη, ο επαναλήψιμος σχηματισμός των κρυστάλλων μέσα σε τρεις μέρες (μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών) αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα, καθώς έχουν σημειωθεί περιπτώσεις μη επαναλήψιμου σχηματισμού ενός μονάχα κρυστάλλου μετά από ένα χρόνο (Wakana *et al.*, 2003). Ακολουθεί ο απαραίτητος σκεδασμός του κρυστάλλου, ο οποίος δεν είναι πάντα εφικτός, και η μελέτη των δεδομένων η οποία είναι διαδικασία δύσκολη.

Το επόμενο στάδιο χωρίζεται σε δύο κατηγορίες. Η μία είναι η μοριακή αντικατάσταση (Molecular Replacement, MR) όπου χρησιμοποιείται μια γνωστή τρισδιάστατη δομή σαν ένα κατά προσέγγιση ατομικό μοντέλο το οποίο παρέχει αρχικές τιμές φάσης (ένα από τα τρία χαρακτηριστικά των ανακλάσεων οι οποίες φαίνονται στο κρυσταλλογράφημα σαν κουκίδες) για τους παράγοντες δομής της άγνωστης πρωτεΐνης. Αυτό φυσικά θεωρεί δεδομένο ότι υπάρχει μια στενή δομική ομοιότητα μεταξύ της γνωστής δομής και του άγνωστου μορίου. Κατά κανόνα, η μέθοδος είναι εφαρμόσιμη μόνο αν η πρωτεΐνη έχει ένα υψηλό επίπεδο αμινοξικής ομολογίας (το ελάχιστο 30% αλλά προτιμότερο 50% ή μεγαλύτερο). Για παράδειγμα,



για την m<sup>5</sup>U54ΜΤάση του *Pyrococcus abyssi* θεωρήθηκε ότι θα υπάρχει μεγάλη ομολογία με την RumA του *E. coli* ενώ για την m<sup>5</sup>U54ΜΤάση του *Bacillus subtilis* με τη GIDA του *Thermus thermophilus*. Μετά από σύγκριση, όμως των τριών αλληλουχιών μεταξύ τους, τα αποτελέσματα έδειξαν το αντίθετο. Για την m<sup>5</sup>U54ΜΤάση του *Pyrococcus abyssi* υπάρχει ομολογία 23%, ενώ για τη m<sup>5</sup>U54ΜΤάση του *Bacillus subtilis* μόνο 13% (Εικ. 46). Συνεπώς, αυτή η μέθοδος δεν είναι επιτρεπτή και θα πρέπει να ακολουθηθεί μια άλλη μέθοδος, όπως για παράδειγμα MAD (Multiple-wavelength Anomalous Diffraction, ανώμαλη σκέδαση και τεχνικές ανώμαλης σκέδασης με πολλαπλό μήκος κύματος) όπου πραγματοποιείται εισαγωγή νέων κέντρων σκέδασης ακτίνων-Χ μέσα στον κρύσταλλο με τη χρήση βαρέων ατόμων (έτσι ώστε να δίδουν σημαντική συνεισφορά στην περίθλαση) τα οποία δεν αλλάζουν την δομή του μορίου. Αυτό πρακτικά γίνεται συνήθως με τη διάχυση συμπλεγμάτων βαρέων μετάλλων εντός ήδη σχηματισμένων πρωτεϊνικών κρυστάλλων. Με λίγη τύχη, τα πρωτεϊνικά μόρια εκθέτουν πλευρικές αλυσίδες που είναι ικανές να συνδεθούν με βαρέα μέταλλα. Επειδή τα βαρέα μέταλλα περιέχουν πολύ περισσότερα ηλεκτρόνια, σκεδάζουν τις ακτίνες-Χ ισχυρότερα. Ακολουθεί η κατασκευή του τρισδιάστατου μοντέλου της πρωτεΐνης με χρήση ειδικών προγραμμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και η ερμηνεία των δεδομένων.

Μετά τις παραπάνω διαδικασίες και σε συνδυασμό με παρόμοιες έρευνες, οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε παγκόσμια κλίμακα, θα συλλεχθούν πληροφορίες οι οποίες θα μπορέσουν να ρίξουν φως στα ερωτήματα που απασχολούν τους ερευνητές όσον αφορά τελικά τη λειτουργία των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων, τον μηχανισμό με τον οποίο σχηματίζονται και την εξελικτική τους πορεία.

Από προηγούμενες μελέτες διαπιστώνεται η δράση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων σε ορισμένους τομείς. Αυτά τα νουκλεοτίδια, ανάλογα με το που εντοπίζονται, παίζουν βασικό ρόλο στη δομή και τη σταθερότητα των μορίων RNA. Δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις όπου η έλλειψη τροποποιήσεων σε συγκεκριμένα σημεία του μορίου δημιουργεί αστάθεια και συνεπώς καταλήγει στην κακή λειτουργία του. Παράδειγμα αποτελούν μόρια tRNA όπου η έλλειψη τροποποιήσεων εμποδίζει τη σωστή αναδίπλωσή τους και επηρεάζει την αντοχή τους σε θερμική μετουσίωση. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι έχει υπολογιστεί ότι ο βαθμός τροποποίησης των μορίων tRNA είναι πολύ μεγαλύτερος απ' ότι αυτός των μορίων rRNA. Εικάζεται ότι αυτό το φαινόμενο βασίζεται στο ότι τα μόρια rRNA έρχονται σε επαφή με

ριβοσωμικές πρωτεΐνες, οι οποίες προσδίδουν αντοχή στα μόρια, σε αντίθεση με τα μόρια tRNA τα οποία καλούνται να είναι πιο ανεξάρτητα και συνεπώς έχουν περισσότερη ανάγκη από τη θετική δράση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων (Noon *et al.*, 1998).

Επίσης, η δράση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων επηρεάζει την αναγνώρισή του μορίου στο οποίο εντοπίζονται. Παράδειγμα αποτελεί η ελλιπής αναγνώριση των tRNA από τις αμινο-ακυλοtRNA συνθετάσες με αποτέλεσμα τη δημιουργία λαθών κατά τη διάρκεια της μετάφρασης. Αυτή η ελλιπής αναγνώριση (και κατά συνέπεια δέσμευση) μπορεί να αναχθεί βέβαια και σε επόμενο στάδιο, όσον αφορά τη δημιουργία του συμπλόκου μεταξύ tRNA και ριβοσώματος. Σοβαρά είναι και τα αποτελέσματα δημιουργίας λαθών μεταξύ κωδικονίου-αντικωδικονίου, τα οποία οφείλονται σε μεταλλάξεις οι οποίες καταλήγουν σε έλλειψη τροποποιήσεων, ιδιαίτερα στις θέσεις 34 και 37 των μορίων mt-tRNA. Αυτό το λάθος ζευγάρωμα βάσεων μπορεί να προκαλέσει σοβαρές μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες, όπως τη MELAS και τη MERFF (Βλ. Εισαγωγή).

Τα παραπάνω αποτελούν ορισμένες μόνο περιπτώσεις όπου είναι εμφανής η σημασία των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων. Οι πληροφορίες, οι οποίες συνεχώς συλλέγονται, ίσως θα μπορούσαν να δώσουν απαντήσεις όχι μόνο όσον αφορά την εξελικτική πορεία των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων αλλά και την πιθανή τους χρήση προς όφελος της ανθρώπινης κοινωνίας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανακάλυψη ότι μπορεί ορισμένο RNA από ιούς, το οποίο είναι υπερ-τροποποιημένο, να διαφεύγει της ανοσοποιητικής αντίδρασης. Ερευνάται η πιθανότητα χρήσης υπερ-τροποποιημένων μορίων RNA για παράδοση θεραπευτικών μορίων σε ασθενή κύτταρα.

Όσον αφορά την εξελικτική πορεία των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων, μετά τη συλλογή δεδομένων και πληροφοριών από έρευνες, ίσως να δοθεί απάντηση στο αν ορισμένα από αυτά τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια αντιστοιχούν σε απομεινάρια ενός προ-βιοτικού RNA κόσμου ή αν αποτελούν απόδειξη ενός εξελίσιμου προγράμματος, το οποίο επιτρέπει την αργή αλλά σταδιακή εισαγωγή νέων ξεχωριστών λειτουργιών.



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## Crystal Screen Cryo

## Reagent Formulation

Tube Number	Salt	Tube Number	Buffer †	Tube Number	Precipitant	Tube Number	Glycerol anhydrous
1.	0.02 M Calcium Chloride dihydrate	1.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	1.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	1.	None
2.	None	2.	None	2.	0.26 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate	2.	35% w/v
3.	None	3.	None	3.	0.26 M Ammonium dihydrogen Phosphate	3.	35% w/v
4.	None	4.	0.075 M Tris Hydrochloride pH 8.5	4.	1.5 M Ammonium Sulfate	4.	25% w/v
5.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	5.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	5.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	5.	None
6.	0.16 M Magnesium Chloride hexahydrate	6.	0.08 M Tris Hydrochloride pH 8.5	6.	24% w/v Polyethylene Glycol 4000	6.	20% w/v
7.	None	7.	0.07 M Sodium Cacodylate pH 6.5	7.	0.98 M Sodium Acetate trihydrate	7.	30% w/v
8.	0.14 M tri-Sodium Citrate dihydrate	8.	0.07 M Sodium Cacodylate pH 6.5	8.	21% v/v iso-Propanol	8.	30% w/v
9.	0.17 M Ammonium Acetate	9.	0.085 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	9.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 4000	9.	15% w/v
10.	0.17 M Ammonium Acetate	10.	0.085 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	10.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 4000	10.	15% w/v
11.	None	11.	0.07 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	11.	0.7 M Ammonium dihydrogen Phosphate	11.	30% w/v
12.	0.18 M Magnesium Chloride hexahydrate	12.	0.09 M HEPES - Na pH 7.5	12.	27% v/v iso-Propanol	12.	10% w/v
13.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	13.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	13.	30% v/v Polyethylene Glycol 400	13.	None
14.	0.19 M Calcium Chloride dihydrate	14.	0.085 M HEPES - Na pH 7.5	14.	26.6% w/v Polyethylene Glycol 400	14.	5% w/v
15.	0.17 M Ammonium Sulfate	15.	0.085 M Sodium Cacodylate pH 6.5	15.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 8000	15.	15% w/v
16.	None	16.	0.075 M HEPES - Na pH 7.5	16.	1.125 M Lithium Sulfate monohydrate	16.	25% w/v
17.	0.17 M Lithium Sulfate monohydrate	17.	0.085 M Tris Hydrochloride pH 8.5	17.	25.5% Polyethylene Glycol 4000	17.	15% w/v
18.	0.16 M Magnesium Acetate tetrahydrate	18.	0.08 M Sodium Cacodylate pH 6.5	18.	16% Polyethylene Glycol 8000	18.	20% w/v
19.	0.16 M Ammonium Acetate	19.	0.08 M Tris Hydrochloride pH 8.5	19.	24% v/v iso-Propanol	19.	20% w/v
20.	0.16 M Ammonium Sulfate	20.	0.08 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	20.	20% w/v Polyethylene Glycol 4000	20.	20% w/v
21.	0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	21.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	21.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	21.	None
22.	0.17 M Sodium Acetate trihydrate	22.	0.085 M Tris Hydrochloride pH 8.5	22.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 4000	22.	15% w/v
23.	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	23.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	23.	30% v/v Polyethylene Glycol 400	23.	None
24.	0.14 M Calcium Chloride dihydrate	24.	0.07 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	24.	14% v/v iso-Propanol	24.	30% w/v
25.	None	25.	0.07 M Imidazole pH 6.5	25.	0.7 M Sodium Acetate trihydrate	25.	30% w/v
26.	0.2 M Ammonium Acetate	26.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	26.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	26.	None
27.	0.14 M tri-Sodium Citrate dihydrate	27.	0.07 M HEPES - Na pH 7.5	27.	14% v/v iso-Propanol	27.	30% w/v
28.	0.17 M Sodium Acetate trihydrate	28.	0.085 M Sodium Cacodylate pH 6.5	28.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 8000	28.	15% w/v
29.	None	29.	0.065 M HEPES - Na pH 7.5	29.	0.52 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate	29.	35% w/v
30.	0.17 M Ammonium Sulfate	30.	None	30.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 8000	30.	15% w/v
31.	0.17 M Ammonium Sulfate	31.	None	31.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 4000	31.	15% w/v
32.	None	32.	None	32.	1.5 M Ammonium Sulfate	32.	25% w/v
33.	None	33.	None	33.	3.6 M Sodium Formate	33.	10% w/v
34.	None	34.	0.07 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	34.	1.4 M Sodium Formate	34.	30% w/v
35.	None	35.	0.075 M HEPES - Na pH 7.5	35.	0.6 M Sodium dihydrogen phosphate 0.6 M Potassium dihydrogen phosphate	35.	25% w/v
36.	None	36.	0.085 M Tris Hydrochloride pH 8.5	36.	5.2% w/v Polyethylene Glycol 8000	36.	35% w/v
37.	None	37.	0.07 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	37.	5.6% w/v Polyethylene Glycol 4000	37.	30% w/v
38.	None	38.	0.09 M HEPES - Na pH 7.5	38.	1.26 M tri-Sodium Citrate dihydrate	38.	10% w/v
39.	None	39.	0.085 M HEPES - Na pH 7.5	39.	1.7% v/v Polyethylene Glycol 400, 1.7 M Ammonium Sulfate	39.	15% w/v
40.	None	40.	0.095 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	40.	19% w/v iso-Propanol, 19% w/v Polyethylene Glycol 4000	40.	5% w/v
41.	None	41.	0.085 M HEPES - Na pH 7.5	41.	8.5% v/v iso-Propanol, 17% w/v Polyethylene Glycol 4000	41.	15% w/v
42.	0.04 M Potassium dihydrogen Phosphate	42.	None	42.	16% w/v Polyethylene Glycol 8000	42.	20% w/v
43.	None	43.	None	43.	24% w/v Polyethylene Glycol 1500	43.	20% w/v
44.	None	44.	None	44.	0.1 M Magnesium Formate	44.	50% w/v
45.	0.16 M Zinc Acetate dihydrate	45.	0.08 M Sodium Cacodylate pH 6.5	45.	14.4% w/v Polyethylene Glycol 8000	45.	20% w/v
46.	0.16 M Calcium Acetate hydrate	46.	0.08 M Sodium Cacodylate pH 6.5	46.	14.4% w/v Polyethylene Glycol 8000	46.	20% w/v
47.	None	47.	0.08 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	47.	1.6 M Ammonium Sulfate	47.	20% w/v
48.	None	48.	0.08 M Tris Hydrochloride pH 8.5	48.	1.6 M Ammonium dihydrogen Phosphate	48.	20% w/v
49.	0.8 M Lithium Sulfate monohydrate	49.	None	49.	1.6% w/v Polyethylene Glycol 8000	49.	20% w/v
50.	0.4 M Lithium Sulfate monohydrate	50.	None	50.	12% w/v Polyethylene Glycol 8000	50.	20% w/v

† Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components. pH with HCl or NaOH.

Crystal Screen Cryo contains fifty unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bjork G.R., Durand J.M., Hagervall T.G., Leipuviene R., Lundgren H.K., Nilson K., chen P., Qian Q., Urbonavicius J. : *Transfer RNA modification: influence on translational frameshifting and metabolism*. FEBS Lett. (1999), 452, pp. 47-51.
- Bjork G.R., Rasmuson T. : *Links between tRNA modification and metabolisms and modified nucleosides as tumor markers*. In : Grosjean H., Benne R (eds) *Modification and editing of RNA* (1998), ASM Press, Washington DC, Chap. 26, pp. 471-491.
- Charette M., Gray M.W. : *Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why*. IUBMB Life (2000), 49, pp.341-351.
- Constantinesco F., Motorin Y., Grosjean H. : *Transfer RNA modification enzymes from Pyrococcus furiosus: detection of the enzymatic activities in vitro*. Nucleic Acids Research (1999), 27, pp. 1308-1315.
- Delk A.S., Rabinowitz J.C. : *Biosynthesis of ribothymidine in the transfer RNA of Streptococcus faecalis: a folate-dependent methylation, not involving S-Adenosylmethionine*. PNAS (1975), 72, pp. 528-530.
- Fleissner E., Borek E. : *A new enzyme of RNA synthesis: RNA methylase*. Proc Natl Acad Sci USA (1962), 48, pp. 1199-1203.
- Garcia G., Goodenough-Lashua D. : *Chapter 8: Mechanisms of RNA modifying and editing enzymes*. *Modification and editing of RNA* (1998), ASM Press, Washington D.C.
- Giege R., Sissler M., Florentz C. : *Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity*. Nucleic Acids Res. (1998), 26, pp. 5017-5035.
- Green R., Noller H.F. : *Reconstitution of functional 50S ribosomes from in vitro transcripts of Bacillus stearothermophilus 23S rRNA*. Biochemistry (1999), 38, pp. 1772-1779.
- Gustafsson C., Bjork G. : *The tRNA (m<sup>5</sup>U54)methyltransferase of Escherichia coli is present in two forms in vivo, one of which is present as bound to tRNA and to tRNA and to a 3'- end fragment of 16s rRNA*. Journal of Biological Chemistry (1993), 268, pp. 1326-1331.

- Gutgsell N., Englund N., Niu L., Kaya Y., Lane B.G., Ofengand J. : *Deletion of the Escherichia coli pseudouridine synthase gene truB blocks formation of pseudouridine 55 in tRNA in vivo, does not affect exponential growth, but confers a strong selective disadvantage in competition with wild-type cells.* RNA (2000), 6, pp. 1870-1881.
- Gutgsell N.S., Del Campo M.D., Raychaudhuri S., Ofengand J. : *A second function for pseudouridine synthases: A point mutant of RluD unable to form pseudouridines 1911, 1915 and 1917 in Escherichia coli 23S ribosomal RNA restores normal growth to an RluD-minus strain.* RNA (2001), 7, pp. 990-998.
- Heiss N.S., Knight S.W., Vulliamy T.J., Klauck S.M., Wiemann S., Mason P.J., Poustka A., Dokal I. : *X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions.* Nat. Genet. (1998), 19, pp. 32-38.
- Hoang C., Ferre-D'Amare A.R. : *Co-crystal structure of a tRNA  $\Psi$ 55 pseudouridine synthase: nucleotide flipping by an RNA-modifying enzyme.* Cell (2001), 107, pp. 929-939.
- Horie N., Hara-Yokoyama M., Yokoyama S., Watanabe K., Kuchino Y., Nishimura S., Miyazawa T. : *Two tRNA<sup>Leu1</sup> species from an extreme thermophile, Thermus thermophilus HB8: effect of 2-thiolation of ribothymidine on the thermostability of tRNA.* Biochemistry (1985), 24, pp. 5711-5715.
- Ishitani R., Nureki O., Nameki N., Okada N., Nishimura S., Yokoyama S. : *Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a posttranscriptional modification enzyme.* Cell (2003), 113, pp. 383-394.
- Iwasaki W., Miyatake H., Ebihara A., Miki K. : *Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the small form of glucose-inhibited division protein A from Thermus thermophilus HB8.* Acta Crystallographica (2004), D60, pp. 515-517.
- Kawai G., Yamamoto Y., Kamimura T., Masegi T., Sekine M., Hata T., Limori T., Watanabe T., Miyazawa T., Yokoyama S. : *Conformational rigidity of specific pyrimidine residues in tRNA arises from posttranscriptional modifications that enhance steric interactions between the base and the 2'-hydroxyl group.* Biochemistry (1992), 31, pp. 1040-1046.

- Khaitovich P., Tenson T., Kloss P., Mankin A.S. : *Reconstitution of functionally active Thermus aquaticus large ribosomal subunits with in vitro-transcribed rRNA*. Biochemistry (1999), 38, pp. 1780-1788.
- Kealy J.T., Lee S., Floss H.G., Santi D.V. : *Stereochemistry of methyltransfer catalysed by tRNA (m<sup>5</sup>U54)methyltransferase*. Nucleic Acids Research (1991), 19, pp. 6465-6468.
- Kowalak J.A., Dalluge J.J., McCloskey J.A., Stetter K.O. : *The role of posttranscriptional modification in stabilization of transfer RNA from hyperthermophiles*. Biochem. (1998), 33, pp. 7869-7876.
- Lafontaine D.L., Bousquet-Antonelli C., Henry Y., Caizerques-Ferrer M., Tollervey D. : *The box H+ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase*. Genes Dev. (1998), 12, pp. 527-537.
- Lee T., Agarwalla S., Stroud R.M. : *A unique RNA fold in the Ruma-RNA-Cofactor ternary complex contributes to substrate selectivity and enzymatic function*. Cell (2005), 120, pp. 599-611.
- Marck C., Grosjean H. : *tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features*. RNA (2002), 8, pp. 1189-1232.
- Noon K., Bruenger E, McCloskey J. : *Posttranscriptional Modifications in 16S and 23S rRNAs of the Archaeal Hyperthermophile Sulfolobus solfataricus*. J. Bacteriol. (1998), 180, pp. 2883-2888.
- Ny T., Bjork G.R. : *Cloning and restriction mapping of the trmA gene coding for the transfer ribonucleic acid (5-methyluridine) methyltransferase in Escherichia coli K-12*. Journal Bacteriol (1980), 142, pp. 371-379.
- Ofengand J. : *Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases*. FEBS Lett. (2002), 514, pp. 17-25.
- Pan H., Agarwalla S., Moustakas D.T., Finer-Moore J., Stroud R.M. : *Structure of tRNA pseudouridine synthase TruB and its RNA complex: RNA recognition through a combination of a rigid docking and induced fit*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003), 100, pp. 12648-12653.
- Persson B.C. : *Modification of tRNA as a regulatory device*. Mol. Microbiol. (1993), 8, pp. 1011-1016.

- Samuel C.e., Rabinowitz J.C. : *Initiation of protein synthesis by folate-sufficient and folate-deficient Streptococcus faecalis R.* J Biol Chem (1974), 249, pp. 1198-1206.
- Suzuki T., Suzuki T., Wada T., Saigo K., Watanabe K. : *Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases.* EMBO J. (2002), 21, pp. 6581-6589.
- Svensson I., Boman H.G., Eriksson K.G., Kjellin K. : *Studies on microbial RNA I Transfer of methyl groups from methionine to soluble RNA from Escherichia coli.* J. Mol. Biol. (1963), 7, pp. 254-271.
- Urbonavicius J., Skouloubris S., Myllykallio H., Grosjean H. : *Identification of a novel gene encoding a flavin-depedent tRNA:m<sup>5</sup>U methyltransferase in bacteria-evolutionary implications.* Nucleic Acids Research (2005), 33, pp. 3955-3964.
- Winkler M.E. : *Genetics and regulation of base modification in the tRNA and rRNA of prokaryotes and eukaryotes.* In: Grosjean H., Benne R (eds): Modification and editin of RNA (1998), ASM Press, Washington DC, Chap. 25, pp. 441-469.
- Wu J.C., Santi D.V. : *On the mechanism and inhibition of DNA cytosine methyltransferases.* Prog. Clin. Biol. Res. (1985), 198, pp. 119-129.
- Yasukawa T., Suzuki T., Ishii N., Ohta S., Watanabe K. : *Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease.* EMBO J.(2001), 20, pp. 4794-4802.
- Yokoyama S., Nishimura S. : *Modified nucleosides and codon recognition.* In: tRNA: Structure, Biosynthesis and Function., D. Soll and U. RajBhandary, eds ASM Press (1995), pp. 207-223.