



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«Μικροβιακή Βιοτεχνολογία»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Λειτουργική ανάλυση της *HUTth* πρωτεΐνης από το
θερμόφιλο βακτήριο *Thermus thermophilus* και *in*
silico ανάλυση ομόλογων HU πρωτεϊνών»

ANNA K. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ

Βιολόγος, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2014



**HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens**

**School of Science
Faculty of Biology**

M.Sc. in Microbial Biotechnology

M.Sc. Diploma Thesis

**« Functional studies of the *HUTth* protein from
Thermus thermophilus and *in silico* analyses of HU
homologs »**

ANNA K. PAPAGEORGIOU

Biologist, National and Kapodistrian University of Athens

ATHENS 2014



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«Μικροβιακή Βιοτεχνολογία»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Λειτουργική ανάλυση της HU*Tth* πρωτεΐνης από το θερμόφιλο
βακτήριο *Thermus thermophilus* και *in silico* ανάλυση ομόλογων HU
πρωτεϊνών»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Κωνσταντίνος Ε. Βοργιάς (Επιβλέπων)

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας

Καθηγητής Γεώργιος Διαλλινάς

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τομέας Βοτανικής

Επίκουρος Καθηγητής Δημήτριος Χατζηνικολάου

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τομέας Βοτανικής

ΑΘΗΝΑ 2014

Στους γονείς μου, πάντα ...

Στην αδερφή μου ...

&

Στους φίλους μου...

*«The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries,
is not “Eureka” but “That’s funny...”»*

Isaac Asimov (Αμερικανός συγγραφέας & Καθηγητής Βιοχημείας)

Αντί προλόγου...

Η παρούσα **Διπλωματική Εργασία**
πραγματοποιήθηκε
στο **Εργαστήριο Πρωτεϊνικής Δομής και Λειτουργίας,**
του **Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας,**
του **Τμήματος Βιολογίας,**
του **Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών,**
στα πλαίσια
του **Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία»,**
υπό την επίβλεψη
του **Καθηγητή Κωνσταντίνου Ε. Βοργιά.**

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους **Καθηγητές Α. Καραγκούνη, Γ. Διαλλινά,** και τον **Επίκουρο Καθηγητή Δ. Χατζηνικολάου** για την αρχική επιλογή μου, τον Οκτώβριο του 2012, στο Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία» και για την ευκαιρία που μου έδωσαν να διευρύνω και να εμβαθύνω τις γνώσεις μου στον τομέα αυτό. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους διδάσκοντες, μέλη Δ.Ε.Π, ερευνητές, Ι.Δ.Α.Χ για τις διαλέξεις και τη συνεισφορά τους στο Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, το ακαδημαϊκό έτος 2012-2013.

Στον **Καθηγητή μου** και επιβλέποντα της παρούσας εργασίας, **Κωνσταντίνο Ε. Βοργιά,** θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου πρωτίστως για την ευκαιρία που μου έδωσε, πριν κιόλας από τις μεταπτυχιακές μου σπουδές, να συνεργαστώ μαζί του στα ερευνητικά του ενδιαφέροντα. Τον ευχαριστώ, για την τύχη που είχα να μου μεταδώσει εκείνο το «μικρόβιο της μελέτης των πρωτεϊνών», να μου ανοίξει νέους επιστημονικούς ορίζοντες και να με διδάξει τον ενθουσιασμό και την περιέργεια που θα πρέπει να συνοδεύει κάθε μελέτη στη Βιολογία και την Έρευνα. Τέλος, επιθυμώ να τον ευχαριστήσω, για τη διάθεση που έχει πάντα, να πάρει ‘μολύβι και χαρτί’ και να καθίσει δίπλα μου λύνοντας μου κάθε απορία. Κύριε Βοργιά, ήταν μεγάλη μου τιμή να συνεργαστώ μαζί σας και σας ευχαριστώ πολύ- πολύ για όλα!

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον **Καθηγητή Γεώργιο Διαλλινά**, για τη συνεισφορά του στο Μ.Δ.Ε. τόσο σε επίπεδο διαλέξεων όσο και σε επίπεδο πρωτότυπων «ιδεών» για την εκπόνηση σεμιναρίου. Επίσης τον ευχαριστώ για τις συζητήσεις επιστημονικού ενδιαφέροντος που είχα την χαρά να μοιραστώ μαζί του.

Στο σημείο αυτό θέλω να ευχαριστήσω πολύ τον Επίκουρο **Καθηγητή Δημήτριο Χατζηνικολάου**, για τη συνεισφορά του στο Μ.Δ.Ε σε επίπεδο διαλέξεων.

Για την εύρυθμη λειτουργία του Μεταπτυχιακού και την επίλυση προβλημάτων πάσης φύσεως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον **Δρ. Στάθη Κατσίφα**. Η συνεισφορά του σε κάθε μικρό ή μεγάλο ζήτημα στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα ήταν πολύτιμη.

Οφείλω να αναφερθώ ονομαστικά στον **συνεργάτη και φίλο** μου πλέον, **Παναγιώτη Αδάμ**, που δουλεύουμε μαζί τον τελευταίο σχεδόν χρόνο. Με τον Παναγιώτη προσπαθούμε να 'αναστήσουμε' τους προγόνους της πρωτεϊνικής οικογένειας *histone-like DNA binding proteins* και όχι μόνο. Τον ευχαριστώ πολύ για την επιμονή και υπομονή του, χωρίς αυτά δεν θα μπορούσαμε να μάθουμε και να εφαρμόσουμε την πειραματική προσέγγιση *Ancestral Sequence Resurrection*. Επίσης, τον ευχαριστώ πολύ για τις εύστοχες παρατηρήσεις του, για τις επικοδομητικές συζητήσεις μας, για τις γνώσεις βιοπληροφορικής- εξελικτικής που μου μετέδωσε και ... για όλη την ευχάριστη συνεργασία που έχουμε και από την οποία έχει προκύψει πραγματική φιλία. Παναγιώτη, σε ευχαριστώ πολύ για όλα και σου εύχομαι καλή επιτυχία και πολλές συναρπαστικές στιγμές στα χρόνια της διδακτορικής διατριβής που ακολουθούν!

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω όλους τους συμφοιτητές μου από το Μ.Δ.Ε, **Γιώργο, Αλέκο, Νίκο, Άρη και Μαριάννα**, για το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε κατά τις διαλέξεις καθώς και για τις συζητήσεις επιστημονικού και μη ενδιαφέροντος που είχαμε.

Κλείνοντας, ένα μεγάλο ευχαριστώ στη **συμφοιτήτρια** μου **Μαρία Λούκα** και σε όλους όσους δουλεύουμε ή έχουμε δουλέψει μαζί στο εργαστήριο, για το φιλικό περιβάλλον και τις όμορφες στιγμές της καθημερινότητάς μας.

Με εκτίμηση,
Άννα Παπαγεωργίου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να επιβιώνουν σε μεγάλη ποικιλία αβιοτικών παραγόντων ανακλά τα ιδιαίτερα δομικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά τους. Η διαλεύκανση των μηχανισμών δομικής και βιολογικής σταθερότητας είναι ένα από τα πολύ δύσκολα βιολογικά ερωτήματα. Πέρα από την απόκτηση βασικής επιστημονικής γνώσης έχει σημαντικό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον και ιδιαίτερα για πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές εφαρμογές.

Οι μηχανισμοί σταθερότητας πρωτεϊνών είναι πολύπλοκοι και τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα δεν είναι σε θέση να μας οδηγήσουν σε κανόνες, παρά μόνο σε ενδεικτικά συμπεράσματα. Οι βαθμοί πολυπλοκότητας αυξάνονται με το μεγάλο μέγεθος των πρωτεϊνών, ως εκ τούτου, μία ασφαλής προσέγγιση στο θέμα αυτό είναι η μελέτη μικρών πρωτεϊνών, σαν πρότυπο σύστημα, που είναι συντηρημένες και υφίστανται σε οργανισμούς που επιβιώνουν σε διαφορετικά ακραία περιβάλλοντα. Μια βασική παράμετρος των βιοτεχνολογικών διαδικασιών είναι η θερμοκρασία. Ως εκ τούτου το εργαστήριο μας επέλεξε να μελετήσει τη βασική αυτή παράμετρο και έχει μακρά εμπειρία στη μελέτη πρωτεϊνών που προέρχονται από βακτήρια και αρχαία που επιβιώνουν σε εύρος θερμοκρασιών από 4- 120 °C.

Η πρωτεΐνη μας μοντέλο ανήκει στην οικογένεια των προκαρυωτικών πρωτεϊνών που έχουν βιολογική δράση παρόμοια με αυτή των ευκαρυωτικών ιστονών (histone- like). Η οικογένεια των πρωτεϊνών HU (PFAM: pF00216) είναι πολύ συντηρημένη και τα μέλη της έχουν την ίδια βιολογική ενεργότητα, να αλληλεπιδρούν με το DNA και να ρυθμίζουν τις λειτουργίες του. Ως εκ τούτου, οι διαφορές στην πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών αυτών είναι πολύ πιθανό, σε μεγάλο βαθμό, να αντικατοπτρίζουν την εξελικτική προσαρμογή τους στο θερμικό περιβάλλον στο οποίο επιβιώνουν τα βακτήρια στα οποία λειτουργούν. Από τα βακτήρια αυτά απομονώνουμε και μελετάμε τις αντίστοιχες HU πρωτεΐνες.

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, το χρωμοσωμικό DNA οργανώνεται σε μία μη τυπικά καθορισμένη δομή που ονομάζεται νουκλεοϊδές. Οι Histone- like (HU) πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στο πακετάρισμα της βακτηριακής χρωματίνης. Οι πρωτεΐνες HU υπάρχουν σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, οργανώνουν το βακτηριακό χρωμοσωμικό DNA και ρυθμίζουν εξαρτώμενες από το DNA

δραστηριότητες όπως: επιδιόρθωση του DNA, γονιδιακή ρύθμιση, τοπολογικά-εξειδικευμένο ανασυνδυασμό, κλπ.

Οι HU πρωτεΐνες είναι έντονα συντηρημένες στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και βρίσκονται σε όλα τα ευβακτήρια που έχουν αναλυθεί μέχρι στιγμής, σε λίγα αρχαία και σε χλωροπλάστες των φυτών.

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετάμε για πρώτη φορά την πρωτεΐνη HU από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus thermophilus*. Το θερμοφίλο βακτήριο *T. thermophilus* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο το οποίο έχει απομονωθεί από θερμές πηγές της Ιαπωνίας και η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής του κυμαίνεται μεταξύ 65- 75°C.

Για να πραγματοποιηθεί η συγκεκριμένη μελέτη απομονώσαμε και ενισχύσαμε το γονίδιο *hutth* από το γενωμικό DNA του *T. thermophilus* βασιζόμενοι στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης που είχε δημοσιευθεί εδώ και αρκετά χρόνια και προέρχεται από πεπτιδική ανάλυση. Υπερεκφράσαμε το γονίδιο *hutth* σε *E. coli* και επιτύχαμε σημαντικά επίπεδα παραγωγής ανασυνδιασμένης HUTth πρωτεΐνης. Η HUTth είναι βασική πρωτεΐνη, ομοδιμερής και έχει μοριακό βάρος 10KDa για το κάθε μονομερές. Με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας καθарίσαμε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη τόσο σε υψηλή καθαρότητα όσο και σε μεγάλες ποσότητες, ικανές να προχωρήσουμε σε περαιτέρω βιοχημική, βιοφυσική και δομική ανάλυση.

Σε επίπεδο βιοχημικής ανάλυσης, αρχικά, μελετήσαμε την αλληλεπίδραση της HUTth με το DNA. Ακριβέστερα, μετρήθηκε η σταθερά διάστασης (K_d) της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με πλασμιδιακό DNA με την τεχνολογία αιχμής MicroScale Thermophoresis (MST) που εφαρμόζεται σε ειδικούς- τελευταίας τεχνολογίας αναλυτές τύπου Monolith. Ο βαθμός συσσωμάτωσης της HUTth στο διάλυμα μελετήθηκε με τη χρήση της τεχνολογίας Dynamic Light Scattering (DLS), ενώ το μοριακό της βάρος μετρήθηκε με φασματοσκοπία μαζών. Με την τελευταία μέθοδο μελετήθηκε και η ύπαρξη ή όχι φαινομένων ολιγομερισμού.

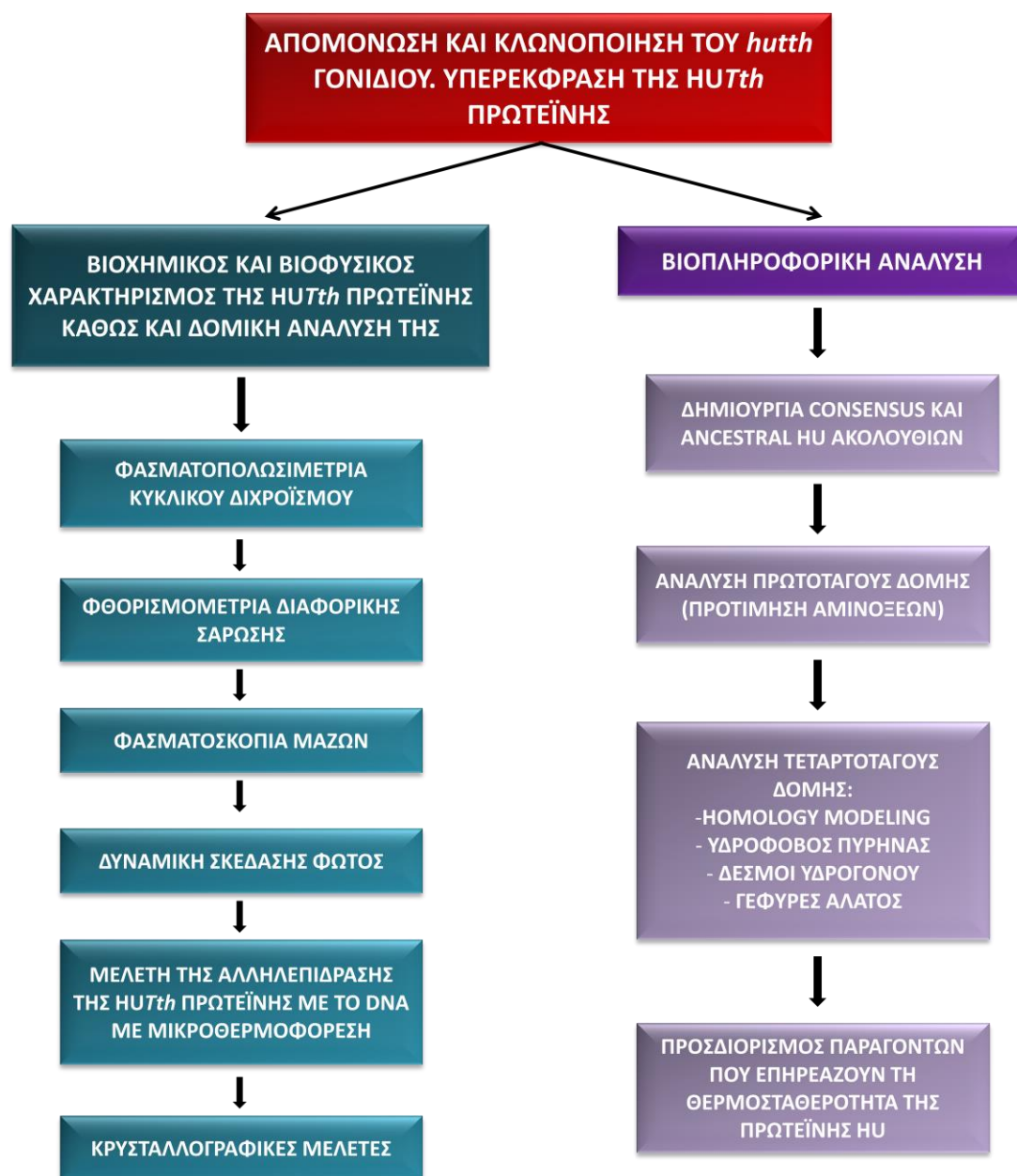
Σε επίπεδο βιοφυσικής ανάλυσης μελετήσαμε τη στεροδιαμόρφωση της πρωτεΐνης και το σημείο τήξης της σε πειράματα θερμικής αποδιάταξης με τη χρήση κυκλικού διχροϊσμού και φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης.

Σε επίπεδο δομικής ανάλυσης κρυσταλλώσαμε την πρωτεΐνη με τη χρήση ρομποτικών συστημάτων κρυστάλλωσης, εφαρμόζοντας τη μέθοδο της καθήμενης

σταγόνες (sitting drop) και την τεχνική εξάτμισης και διάχυσης των ατμών (vapor diffusion). Επόμενος στόχος είναι η μέτρηση των κρυστάλλων με ακτίνες- Χ ώστε να παράξουμε δεδομένα που θα μας επιτρέψουν να προσδιορίσουμε την 3D δομή της πρωτεΐνης.

Με εκτενή βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήσαμε, προσδιορίσαμε τους παράγοντες που επηρεάζουν τη θερμοσταθερότητα της πρωτεΐνης HU και αναλύσαμε τις στρατηγικές που επιλέγουν τα θερμόφιλα βακτήρια ώστε να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα της θερμικής σταθερότητας για την πρωτεΐνη αυτή.

Μία ολοκληρωμένη εικόνα της πειραματικής πορείας της παρούσας Μεταπτυχιακής Εργασίας συνοψίζεται στο παρακάτω διάγραμμα.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	4
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	7
1.1.1 ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	8
1.1.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	9
1.1.3 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	11
1.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑ	15
1.2.1 HADOBACTERIA. Η ΟΜΑΔΑ <i>DEINOCOCCUS- THERMUS</i>	17
1.2.2 ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>THERMUS</i> . ΤΟ ΕΙΔΟΣ <i>THERMUS THERMOPHILUS</i>	18
1.3 HISTONE- LIKE ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	20
1.3.1 ΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ HU	23
1.3.2 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HU	25
1.3.3 Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΗΣ HU ΣΤΟ DNA	28
1.4 ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	30
1.4.1 ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	34
1.5 ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ.	38
1.5.1 'ΑΝΑΣΤΑΙΝΟΝΤΑΣ' ΜΙΑ ΠΡΟΓΟΝΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ (ANCESTRAL SEQUENCE RESURRECTION)	40
1.6 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	42
1.7 Η ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ- Χ ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	42
1.8 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	50
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	51
2.2 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΥΛΙΚΟ	51
2.2.1 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E. coli</i>	51
2.2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	52
2.2.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E. coli</i>	53
Α' ΜΕΡΟΣ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ <i>hutth</i> ΓΟΝΙΔΙΟΥ. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ HU<i>Tth</i> ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.....	54
2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>hutth</i> ΑΠΟ ΤΟ ΓΕΝΩΜΙΚΟ DNA ΤΟΥ ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>THERMUS thermophilus</i>	54
2.3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΟΡΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ	

ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>hutth</i> ΑΠΟ ΤΟ ΓΕΝΩΜΙΚΟ DNA ΤΟΥ <i>THERMUS thermophilus</i> ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	56
2.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	57
2.4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA	57
2.4.2 ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	57
2.4.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ	58
2.4.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E. coli</i>	59
2.4.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	59
2.4.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ-ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	62
2.5 ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>hutth</i>	63
2.5.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ.....	63
2.5.2 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>hutth</i>	68
2.5.3 ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ- ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	68
2.5.4 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΘΕΙΙΚΟ ΑΜΜΩΝΙΟ	69
2.5.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ HU T_{th} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ	70
2.5.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΛΛΑΓΗΣ ΤΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΤΗΣ HU T_{th} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ	71
2.5.8 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ HU T_{th} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	72
2.5.9 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΡΙΧΛΩΡΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (TCA).....	73
2.5.10 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΚΑΜΙΔΗΣ (SDS PAGE)	74
2.5.11 ΣΥΣΤΑΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ	76
2.5.12 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ- ΧΡΩΣΗ COOMASIE... ..	77
Β' ΜΕΡΟΣ: ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ HUT_{th} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ	79
2.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ HU T_{th} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΟΪΣΜΟΥ	79
2.7 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ HU T_{th} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΣΑΡΩΣΗΣ (DSF, DIFFERENTIAL SCANNING FLUORIMETRY)	85
2.8 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ HU T_{th} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ (MALDI- TOF MASS SPECTROSCOPY).....	88
2.9 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ HU T_{th} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ (DLS, DYNAMIC LIGHT SCATTERING)	90
2.10 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ HU T_{th} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΟ DNA ΜΕ ΜΙΚΡΟΘΕΡΜΟΦΟΡΕΣΗ (MST, MICROSCALE THERMOPHORESIS)	

.....	92
2.11 ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ HUT θ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	94
Γ' ΜΕΡΟΣ: ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	96
2.12 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	96
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	99
3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ hut θ	99
3.2 ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ hut θ	102
3.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ HUT θ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	103
3.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ HUT θ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑΣ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΟΪΣΜΟΥ	105
3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΗΣ HUT θ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ	107
3.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ HUT θ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ	108
3.7 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ HUT θ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΣΑΡΩΣΗΣ	109
3.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ HUT θ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA ΜΕ ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΘΕΡΜΟΦΟΡΕΣΗ.....	111
3.9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΕΩΝ ΤΗΣ HUT θ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	112
3.10 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	113
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	135
5 ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	143
6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	Error! Bookmark not defined.
7 ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ	161

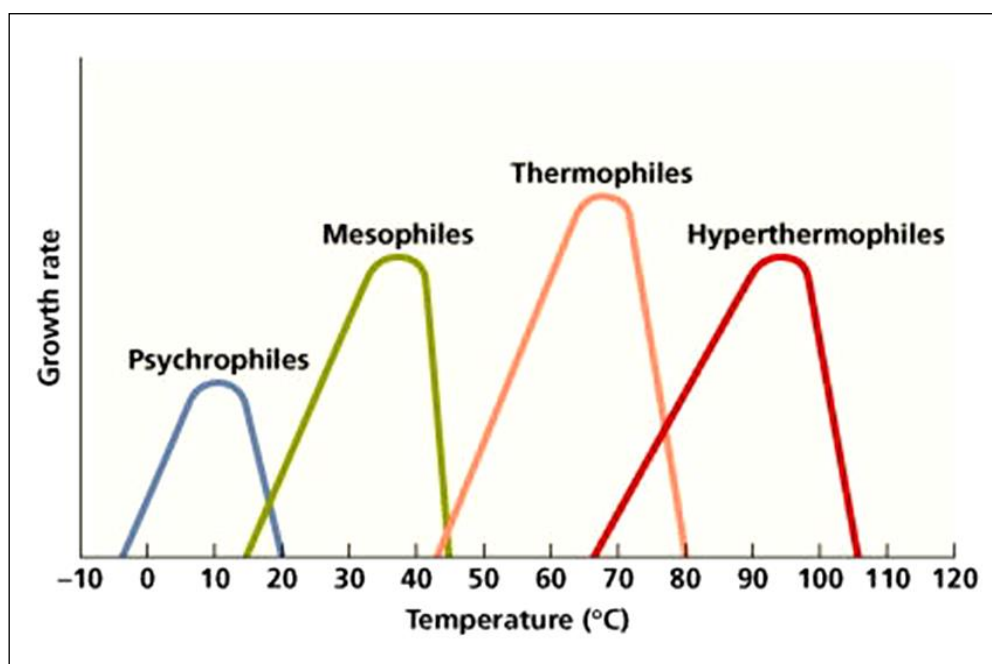
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Η επιβίωση, ο ρυθμός αύξησης και η δραστηριότητα των μικροοργανισμών επηρεάζονται σημαντικά από τις φυσικές και τις χημικές συνθήκες του περιβάλλοντος. Η βιόσφαιρα αποτελείται από ένα σύνολο οικοσυστημάτων με συνεχή εναλλαγή συνθηκών (θερμοκρασία, pH, διαθεσιμότητα νερού και οξυγόνου) η οποία επιβάλλει στους μικροοργανισμούς αντίστοιχη προσαρμογή και οδηγεί στην περιβαλλοντική κατανομή τους. Ο σημαντικότερος παράγοντας ελέγχου της μικροβιακής αύξησης θεωρείται η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, καθώς, οι μικροοργανισμοί δε διαθέτουν κανένα θερμορρυθμιστικό ομοιοστατικό μηχανισμό. Το θερμοκρασιακό εύρος αύξησης και μεταβολικής λειτουργίας των μικροοργανισμών περιλαμβάνει 3 θεμελιώδεις τιμές: την ελάχιστη, την άριστη και τη μέγιστη θερμοκρασία. Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες της ελάχιστης τιμής δεν παρατηρείται αύξηση καθώς η κυτταρική μεμβράνη ημιστερεοποιείται με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της σωστής λειτουργίας της. Κατά την άριστη θερμοκρασία, η οποία είναι συνήθως πλησιέστερη στη μέγιστη τιμή παρά στην ελάχιστη, παρατηρείται ο μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης εξαιτίας της άριστης λειτουργίας του ενζυμικού δυναμικού στο κύτταρο. Σε θερμοκρασίες υψηλότερες της μέγιστης τιμής επηρεάζεται η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών, συνεπώς και η λειτουργία τους, και η αύξηση καθίσταται αδύνατη. Οι μικροοργανισμοί, με κριτήριο τις θεμελιώδεις τιμές θερμοκρασίας ανάπτυξης, διαίρουνται σε 5 κατηγορίες: ψυχρόφιλοι, ψυχροανθεκτικοί, μεσόφιλοι, θερμόφιλοι και υπερθερμόφιλοι (Madigan, Martinko, & Brock, 2006). Στην εικόνα 1 απεικονίζονται οι κατηγορίες των μικροοργανισμών με βάση το θερμοκρασιακό τους άριστο.

Γενικά, το θερμοκρασιακό άριστο των θερμόφιλων μικροοργανισμών κυμαίνεται μεταξύ 45 και 75 °C. Σε μία αναλυτικότερη σύγχρονη διαίρεση, τα θερμόφιλα εμφανίζουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης πάνω από τους 55 °C, τα μέτρια θερμόφιλα πάνω από τους 65 °C, τα ακραία θερμόφιλα πάνω από τους 75 °C και τα υπερθερμόφιλα πάνω από τους 90 °C (Imanaka, 2011). Οι κυριότεροι αντιπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι προκαρυωτικής δομής και οι πλέον θερμόφιλοι ανήκουν στην ομάδα των Αρχαίων Προκαρυωτικών Οργανισμών. Ελάχιστοι ευκαρυωτικοί

οργανισμοί έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 50 °C, αν και μερικά γένη μυκήτων και πρωτόζωων εμφανίζουν ικανοποιητική μεταβολική δραστηριότητα και ανάπτυξη σε θερμοκρασιακό εύρος 50 – 55 °C (Gottschal & Prins, 1991; Maheshwari, Bharadwaj, & Bhat, 2000). Οι παραπάνω θερμοκρασίες θεωρούνται απαγορευτικές για την επιβίωση πολυκύτταρων φυτικών και ζωικών οργανισμών.



Εικόνα 1 Οι κατηγορίες των μικροοργανισμών με βάση το θερμοκρασιακό τους άριστο.

1.1.1 ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Φυσικά ενδιαστήματα με σχετικά υψηλές θερμοκρασίες και ιδιαίτερη μικροβιακή ποικιλότητα είναι ευρέως διαδεδομένα στη Γη αν και η έκτασή τους είναι συχνά περιορισμένη. Το πρώτο ακραίο περιβάλλον που συγκέντρωσε οικολογικό ενδιαφέρον ήταν αυτό των υδροθερμικών πηγών (Brock, 1967; Brock & Freeze, 1969). Πρόκειται για πανάρχαιους σχηματισμούς σε βάθη πάνω από 4 χιλιόμετρα που τροφοδοτούν από τα βάθη της γης τους ωκεανούς με απαραίτητα για τη ζωή στοιχεία. Στις συγκεκριμένες περιοχές οι θερμοκρασίες φτάνουν ή και ξεπερνούν το σημείο βρασμού του νερού.

Παράλληλα, τα ηφαιστειακά περιβάλλοντα θεωρούνται τα πλέον εκτεθειμένα σε ακραίες συνθήκες. Χαρακτηρίζονται από μεγάλες ποσότητες διοξειδίου του άνθρακα,

υδροθείου, θείου και ποικίλες ποσότητες μονοξειδίου του άνθρακα, μεθανίου, αζώτου, αμμωνίας και υδρογόνου (Stetter, 1999). Μεγάλος αριθμός θερμοφίλων και υπερθερμοφίλων μικροοργανισμών έχει απομονωθεί από ηπειρωτικές και υποβρύχιες ηφαιστειακές περιοχές (Meintanis, Chalkou, Kormas, & Karagouni, 2006; J. Zhang et al., 2010) (Urbietta, Gonzalez Toril, Aguilera, Giaveno, & Donati, 2012).

1.1.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Τα θερμοφιλα και τα υπερθερμοφιλα αλλά και εν γένει τα ακραιόφιλα, είναι μικροοργανισμοί που πρόσφατα ανακαλύφθηκαν και γοήτευσαν τους επιστήμονες. Προερχόμενοι από τα βακτήρια και τα αρχαία, οι (υπερ)θερμοφιλικοί οργανισμοί ζουν σε μέρη που ο άνθρωπος νους δεν μπορούσε να φανταστεί μέχρι πρόσφατα ότι μπορεί να υπάρξει ζωή. Είναι αξιοσημείωτη η προσαρμογή αυτών των οργανισμών σε ισχυρά όξινα ή βασικά περιβάλλοντα, με μεγάλη αλατότητα, σε περιβάλλοντα με μέταλλα που για τον άνθρωπο είναι τοξικά, σε τοποθεσίες με ακραίες θερμοκρασίες, πιέσεις και ακόμα με ισχυρή ακτινοβολία. Έτσι, το ενδιαφέρον των επιστημόνων, δικαιολογημένα στράφηκε στη μελέτη των μηχανισμών με τους οποίους οι μικροοργανισμοί αυτοί προσαρμόζονται σε ακραία περιβάλλοντα. Οι έρευνες για την πλήρη κατανόηση της θερμικής προσαρμογής των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων και των μεμβρανών βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη.

Η σταθερότητα των κυτταρικών συστατικών των θερμοφίλων μικροοργανισμών, σε μοριακή βάση, καθορίζει την επιβίωσή τους σε αντίξοες- ακραίες συνθήκες. Η προστασία του DNA από τις υψηλές θερμοκρασίες θεωρείται αναγκαία τόσο για τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας, όσο και για τη σωστή εκτέλεση της μεταβολικής λειτουργίας του κυττάρου. Οι θερμοφιλοι προκαρυωτικοί οργανισμοί εμφανίζουν διαφορετική αναλογία και προτίμηση στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, ευελιξία του σκελετού της διπλής έλικας, μετατροπές στις αζωτούχες βάσεις τους καθώς και πρόσδεση πρωτεϊνών (ιστόνες και μη) συγκριτικά με τους μεσόφιλους μικροοργανισμούς. Αναλυτικότερα, στους θερμοφίλους μικροοργανισμούς το ποσοστό GC, στις κωδικές περιοχές τους, εμφανίζεται αυξημένο (Singer & Hickey, 2003). Επιπρόσθετα χαρακτηριστικά που παίζουν ρόλο στη σταθερότητα του μορίου είναι η παρουσία κατιόντων καλίου τα οποία

ουδετεροποιούν το νουκλεϊκό οξύ και διατηρούν τη διπλή έλικα (Kawashima et al., 2000), η μεθυλίωση ορισμένων νουκλεοτιδίων (Ehrlich et al., 1985), και η ύπαρξη μίας αντίστροφης γηράσης η οποία προσδίδει θετικές υπερελικώσεις στο μόριο. Η συγκεκριμένη γηράση παίζει καθοριστικό ρόλο στην αντιγραφή και στη γονιδιακή ρύθμιση σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (Bao et al., 2002). Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο πακετάρισμα του μορίου αλλά και στην επιδιόρθωση των βλαβών λόγω των αντίξοων συνθηκών βοηθούν, επίσης, στη σταθερότητα του DNA.

Ως προς την αλληλουχία των μορίων RNA έχει παρατηρηθεί πως είναι πλούσια σε πουρίνες (με προτίμηση την αδερίνη), γεγονός που συνεισφέρει στην αποφυγή της ανεπιθύμητης υβριδοποίησης με άλλα μόρια RNA καθώς και εμφάνισης ανταγωνισμού με αντικωδικόνια. Επιπρόσθετα, τα πλούσια σε πουρίνες mRNA μεταγράφονται γρηγορότερα και αντιστέκονται στην υδρόλυση λόγω της υψηλής θερμοκρασίας (Paz, Mester, Baca, Nevo, & Korol, 2004).

Η ικανότητα επιβίωσης των μικροοργανισμών σε ακραίες συνθήκες εντοπίζεται όπως καταλαβαίνουμε σε μοριακό επίπεδο, και αντικατοπτρίζεται και στο επίπεδο της μεταγραφής και μετάφρασης. Τα πρωτεϊνικά μόρια των θερμοφίλων οργανισμών εμφανίζουν θερμοσταθερότητα, αυξημένη αντίσταση στη μετουσίωση και στην πρωτεόλυση (Kumar & Nussinov, 2001). Εξαιτίας της απενεργοποίησης των περισσότερων πρωτεϊνών σε υψηλές θερμοκρασίες, η μελέτη των μηχανισμών θερμικής σταθερότητας συγκέντρωσε γρήγορα το επιστημονικό ενδιαφέρον. Η πρώτη παρατήρηση αφορά στην αμινοξική αλληλουχία των θερμοφίλων πρωτεϊνών η οποία δεν εμφάνισε ιδιαίτερη διαφοροποίηση από τα αντίστοιχα μόρια των μεσόφιλων (Vieille & Zeikus, 2001). Ωστόσο, η έκφραση τους σε μεσόφιλα συστήματα οδηγεί και πάλι σε θερμοσταθερό προϊόν, γεγονός που υποδεικνύει ως βασικό παράγοντα σταθερότητας τη κωδική αλληλουχία. Η ενζυμική θερμοσταθερότητα περιλαμβάνει θερμοδυναμική και κινητική σταθερότητα. Θερμοδυναμικά, η σταθερότητα καθορίζεται από την ελεύθερη ενέργεια (ΔG stability) και από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) του πρωτεϊνικού μορίου. Η κινητική σταθερότητα καθορίζεται από την ενέργεια ενεργοποίησης αποδιάταξης της πρωτεΐνης (Vieille & Zeikus, 2001). Σε επόμενη παράγραφο θα αναλυθούν τα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών (δισουλφιδικές γέφυρες, αρωματικά κατάλοιπα, δεσμοί υδρογόνου) που σχετίζονται με την θερμική σταθερότητα.

Τέλος, οι κυτταρικές μεμβράνες των θερμόφιλων μικροοργανισμών είναι πλούσιες σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, με αποτέλεσμα να διαθέτουν υψηλό σημείο τήξης, εξασφαλίζοντας έτσι την ακεραιότητα του μορίου (Herbert & Sharp, 1992). Η μεμβράνη, για παράδειγμα, του βακτηριακού υπερθερμόφιλου *T. maritima* περιέχει ασυνήθιστα γλυκερο- αιθερο- λιπίδια. Αυτά, σε αντίθεση με τα εστερολιπίδια που συναντώνται στα μεσόφιλα, μπορούν να αυξήσουν σημαντικά την σταθερότητα των μεμβρανών ενάντια της υδρόλυσης σε υψηλές θερμοκρασίες. Επίσης, όλα τα αρχαία περιέχουν στις μεμβράνες τους αιθερολιπίδια, που αποτελούνται από διφυτανογλυκερόλη, η οποία προσδίδει μια αξιοσημείωτη προστασία ενάντια της υδρόλυσης σε υψηλές θερμοκρασίες και όξινο pH.

1.1.3 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Η ανακάλυψη ότι πολλοί οργανισμοί, που ονομάζονται ακραιόφιλοι, ζουν και ευδοκιμούν σε περιβάλλοντα που θεωρούνται ακραία για την ανθρώπινη ζωή (π.χ. υψηλές θερμοκρασίες, συνήθως άνω των 100 °C, ακραίες τιμές pH, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων άλατος) οδήγησε σε ένα μεγάλο ενδιαφέρον για αυτούς τους οργανισμούς καθώς και τα βιομόριά τους. Στη πραγματικότητα, οι πρωτεΐνες και τα ένζυμα που απομονώνονται από ακραιόφιλους μικροοργανισμούς θεωρούνται χρήσιμα για μια ποικιλία εφαρμογών, λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων που διαθέτουν και τους δίνουν τη δυνατότητα να εργάζονται σε αντίξοες συνθήκες. Οι ιδιότητες και τα πλεονεκτήματα των θερμοσταθερών ενζύμων που απομονώνονται από θερμόφιλους μικροοργανισμούς παρατίθενται στον Πίνακα 1- 1.

Πίνακας 1- 1 Ιδιότητες των θερμοσταθερών ενζύμων και βασικά πλεονεκτήματα που απορρέουν από τη χρήση τους στις βιομηχανικές διεργασίες.

Ιδιότητα	Πλεονεκτήματα (Kumar & Nussinov, 2001; Lasa & Berenguer, 1993)
Ενζυμική θερμοσταθερότητα	Αυξημένος χρόνος ημιζωής του ενζύμου, ανθεκτικότητα στους οργανικούς διαλύτες ή σε μεγάλο εύρος τιμών pH.
Αυξημένο άριστο ενζυμικής δράσης	Αυξημένος ρυθμός ενζυμικής δράσης, αυξημένος ρυθμός διάχυσης των υποστρωμάτων και των προϊόντων.
Διαλυτότητα	Αποδοτικότερη ενζυμική διεύθυνση και αποδόμηση σε ακατέργαστα υλικά, αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος .
Μικροβιακή μόλυνση	Μείωση πιθανότητας μόλυνσεων από μεσόφιλα ή ψυχρόφιλα, μείωση δράσης μη εξειδικευμένων ενζύμων λόγω απενεργοποίησής τους.

Σημαντικός αριθμός ενζύμων έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί από θερμοφίλους μικροοργανισμούς και συμμετέχει σε ποικίλες εφαρμογές. Πολλά ένζυμα που προέρχονται από (υπερ)θερμοφιλικά αρχαία εμπλέκονται στον μεταβολισμό των υδατανθράκων. Αυτά τα ένζυμα έχουν μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον, καθώς μετατρέπουν το άμυλο, το φυσικό αυτό πολυμερές, σε πολύτιμα προϊόντα, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Στη διαδικασία τροποποίησης αμύλου απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες αφενός για την ρευστοποίηση του αμύλου και αφετέρου για την πραγματοποίηση ενζυμικής υδρόλυσης. Αμυλολυτικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις διαδικασίες είναι η α- αμυλάση, η β- αμυλάση και η ισοαμυλάση. Η παρουσία των συγκεκριμένων ενζύμων στους θερμοφίλους μικροοργανισμούς είναι αρκετά διαδεδομένη αν και στα φυσικά τους ενδιαίτηματα υπάρχει μικρή ποσότητα αμύλου. Η ύπαρξη των αμυλολυτικών ενζύμων πιθανά σχετίζεται με τη διάσπαση του γλυκογόνου που αποτελεί την αποθηκευτική ουσία εντός του κυττάρου του θερμοφίλου μικροοργανισμού (Bertoldo & Antranikian, 2002). Τα επίπεδα παραγωγής των ενζύμων από τα στελέχη φυσικού τύπου συχνά δεν είναι ικανοποιητικά με αποτέλεσμα την κλωνοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων σε άλλα συστήματα έκφρασης. Για παράδειγμα, το γονίδιο της α- αμυλάσης του θερμοφιλικού

αρχαίου *Thermococcus hydrothermalis* κλωνοποιήθηκε πρόσφατα και εκφράστηκε στην *E. coli*. Αυτή η αμύλαση είναι άριστα ενεργή στους 75- 85 °C και σε pH 5- 5,5.

Γενικά, η ενζυμική κατεργασία του αμύλου διακρίνεται σε τρία στάδια: α) τη διάλυση του αμύλου σε υδατικό διάλυμα που απαιτεί υψηλή θερμοκρασία, β) τη ρευστοποίηση του διαλύματος με μερική υδρόλυση, και γ) τη σακχαροποίηση αυτού με περαιτέρω υδρόλυση. Η χρήση θερμοσταθερών ενζύμων επιτρέπει την απευθείας υδρόλυση ύστερα από τη διάλυση του αμύλου χωρίς ενδιάμεσο στάδιο μείωσης της θερμοκρασίας του διαλύματος μειώνοντας έτσι τον χρόνο αλλά και το κόστος της διαδικασίας (Niehaus, Bertoldo, Kahler, & Antranikian, 1999) (de Miguel Bouzas, Barros- Velazquez, & Villa, 2006; Haki & Rakshit, 2003).

Μία άλλη κατηγορία ενζύμων είναι οι εστεράσες και οι λιπάσες. Αυτές έχουν την πιο ευρεία χρήση ως βιοκαταλύτες σε χημικές εφαρμογές, κυρίως χάρη στα πλεονεκτήματα αυτών των καταλυτών για την παραγωγή οπτικά καθαρών ενώσεων. Μια λιπάση του *Bacillus thermocatenuatus* εκφράστηκε από την *E. coli*. Το ένζυμο ήταν σταθερό έως pH 11, ενώ η μέγιστη δραστηριότητά του ήταν σε pH 8- 9 στους 60- 70 °C. Η συγκεκριμένη λιπάση έδειξε μεγάλη σταθερότητα σε διάφορα απορρυπαντικά και οργανικά διαλύματα. Μια εστεράση από το *Bacillus lincheniformis* εκφράστηκε με την βοήθεια της *E. coli*. Το ένζυμο ήταν σταθερό σε pH 7- 8,5 στους 64 °C.

Επιπλέον, οι θερμοσταθερές πρωτεάσες αποτελούν βασικά βιομηχανικά ένζυμα με ευρύ πεδίο εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων, στην υφαντουργία και βυρσοδεψία καθώς και στη βιομηχανία φαρμάκων. Η πρωτεάση από το αρχαίο *Thermococcus stetteri* έχει χρόνο ημιζωής 2,5 ώρες στους 100 °C.

Επίσης, οι θερμοσταθερές χιτινάσες με την ιδιότητά τους να διασπούν την χιτίνη, οργανική ουσία αρκετά διαδεδομένη στο φυσικό περιβάλλον, αποτελούν βασικά βιομηχανικά ένζυμα. Ακριβέστερα, οι χιτινάσες εμφανίζουν εφαρμογές στη βιομηχανία χάρτου και καλλυντικών, στην υφαντουργία και στον καθαρισμό του νερού.

Επιπρόσθετα, οι αλκοολικές δεϋδρογονάσες εκπροσωπούν μια σημαντική κατηγορία βιοκαταλυτών καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στη σύνθεση αλκοολών που είναι βασικές ενώσεις στη χημική βιομηχανία. Η αλκοολική

δεϋδρογονάση από το ένζυμο *Thermococcus litoralis* καταλύει την οξείδωση των πρωτοταγών αλκοολών χρησιμοποιώντας NADP ως συμπαράγοντα. Είναι θερμικά σταθερή με χρόνο ημιζωής 15 λεπτά στους 98 °C και 2 ώρες στους 85 °C.

Τέλος, η χρήση των θερμοσταθερών ενζύμων είναι καθοριστική και στην επιστήμη. Η ανακάλυψη θερμοσταθερών πολυμερασών, δεσμάσων και περιοριστικών ενδονουκλεασών υπερπήδησε το πρόβλημα της αποδιάταξης της δευτεροταγούς δομής του DNA με την αύξηση της θερμοκρασίας και ήταν καθοριστική για την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA.

Σημαντικό στο σημείο αυτό είναι να αναφερθεί ότι παρόλο που οι θερμοφίλοι μικροοργανισμοί εμφανίζουν πολλές βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμες ιδιότητες, αρκετές φορές εμφανίζονται προβλήματα στην εφαρμογή αυτών και των ενζύμων τους στη βιομηχανία (Πίνακας 1- 2).

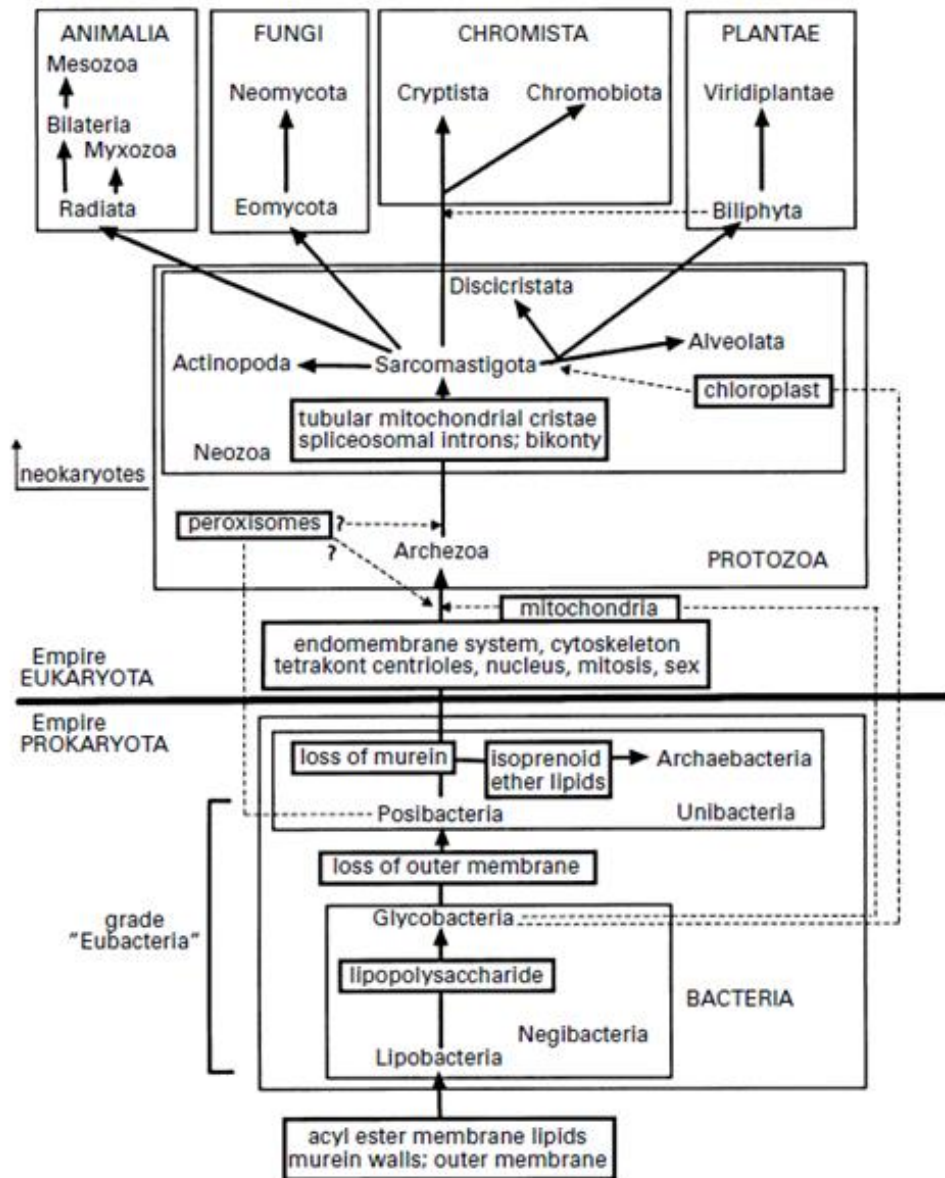
Πίνακας 1- 2 Βασικά προβλήματα εφαρμογής θερμοσταθερών ενζύμων στη βιομηχανία (Lasa and Berenguer, 1993, Holst et al., 1997).

Ιδιότητα	Μειονεκτήματα
Ευαισθησία στην υψηλή θερμοκρασία	Αρκετά υποστρώματα ή συμπαράγοντες ενδέχεται να μην είναι σταθερά στις υψηλές θερμοκρασίες.
Διαλυτότητα των αερίων	Η μειωμένη διαλυτότητα των αερίων εξαιτίας της αύξησης της θερμοκρασίας μπορεί να είναι περιοριστικός παράγοντας για πολλές αντιδράσεις.
Ενζυμική σταθερότητα	Η απενεργοποίηση πολλών ανεπιθύμητων ενζύμων μπορεί να είναι δύσκολη.
Ρυθμός αύξησης μικροοργανισμών	Τα θερμοφίλα εμφανίζουν χαμηλούς ρυθμούς αύξησης και παραγωγής προϊόντων.

Παρόλα τα μειονεκτήματα, οι μέχρι τώρα γνώσεις, έχουν οδηγήσει σε θαυμάσιες εφαρμογές των ενζύμων που απομονώνονται από θερμόφιλους μικροοργανισμούς στην ιατρική, στη βιοτεχνολογία, στην εγκληματολογία και στη βιομηχανία τις οποίες συναντάμε ακόμα και στην καθημερινή μας ζωή. Οι εφαρμογές αυτές χαρακτηρίζονται από ταχύτητα, αποτελεσματικότητα, ποιότητα και φυσικά οικολογική δραστηριότητα.

1.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Η ιδέα ότι η φύση μπορεί να διαιρεθεί σε δύο βασίλεια, τα φυτά και τα ζώα διαδόθηκε από τον Carl Von Linne τον δέκατο όγδοο αιώνα. Το 1997, ο Άγγλος Καθηγητής Εξελικτικής Βιολογίας, Thomas Cavalier- Smith καθιέρωσε το σύστημα ταξινόμησης των έξι Βασιλείων της ζωής που χρησιμοποιείται στις μέρες μας. Σύμφωνα με αυτό οι διάφορες μορφές ζωής, σύγχρονες και παλαιότερες, κατατάσσονται με βάση ανατομικά, μορφολογικά, βιοχημικά, φυσιολογικά, μοριακά, γενετικά και φυλογενετικά κριτήρια σε έξι Βασίλεια: Βακτήρια, Πρωτόζωα, Μύκητες, Χρώμιστα, Φυτά και Ζώα (Εικόνα 2) (Cavalier- Smith, 1998).



Εικόνα 2 Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των έξι Βασιλείων της ζωής.

Το Βασίλειο των Βακτηρίων διαθέτει μικροοργανισμούς που χαρακτηρίζονται από απουσία: εσωτερικού κυτταροσκελετού, μεμβρανικού συστήματος, πυρήνα, μίτωσης και φυλετικού διαχωρισμού. Τα βακτήρια χωρίζονται σε δύο υποβασιλεία: α) τα Negibacteria (διαθέτουν εξωτερική μεμβράνη, λιπίδια ακετυλεστέρα, τοίχωμα μουρεΐνης ανάμεσα στις μεμβράνες, ενώ χαρακτηρίζονται από μικρό σήμα αναγνώρισης σωματιδίων RNA) και β) τα Unibacteria (δεν διαθέτουν εξωτερική μεμβράνη αλλά μόνο απλή κυτταροπλασματική μεμβράνη, με μεγάλο σήμα αναγνώρισης RNA σωματιδίων όπως στα ευκαρυωτικά κύτταρα). Περαιτέρω, τα

Negibacteria αποτελούνται από τα Lipobacteria (κυτταρικό τοίχωμα μουρεΐνης, εξωτερική μεμβράνη φωσφολιπιδίων ενώ απουσιάζουν οι λιποπολυσακχαρίτες, δεν υπάρχει άξονας μαστιγίου εκτός από την εξωτερική μεμβράνη) και τα Glycobacteria (εξωτερική μεμβράνη με φωσφολιπίδια στο εσωτερικό τμήμα και λιποπολυσακχαρίτες στο εξωτερικό τμήμα της διπλοστοιβάδας, παρουσία της RuBisCo, το μαστίγιο περνά μέσω της εξωτερικής μεμβράνης), ενώ τα Unibacteria από τα Posibacteria (με λιπίδια ακετυλεστέρα) και τα Archaeobacteria (με λιπίδια ισοπρενοειδούς αιθέρα) (Cavalier- Smith, 1998; Woese & Fox, 1977).

1.2.1 HADOBACTERIA. Η ΟΜΑΔΑ *DEINOCOCCUS- THERMUS*

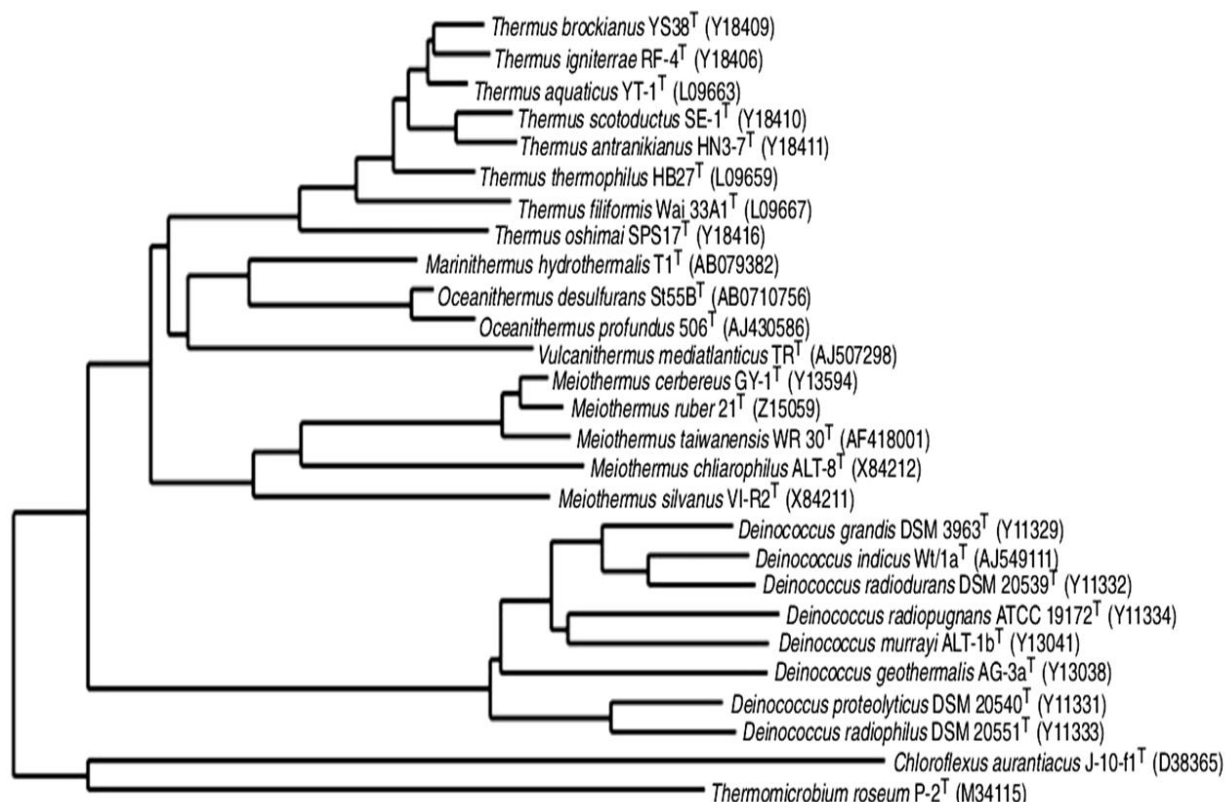
Τα *Deinococcus- Thermus* συνιστούν μια μικρή ομάδα βακτηρίων που είναι ιδιαίτερα ανθεκτική σε περιβαλλοντικούς κινδύνους. Ακριβέστερα, πρόκειται για θερμοφιλα, ετερότροφα βακτήρια που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην ακτινοβολία και στις υψηλές θερμοκρασίες (Griffiths & Gupta, 2007) και χαρακτηρίζονται από παχιά κυτταρικά τοιχώματα. Παρόλο που διαθέτουν παχύ κυτταρικό τοίχωμα, δεν ανήκουν στα Gram θετικά βακτήρια αλλά στα Gram αρνητικά βακτήρια. Η τελευταία κατηγοριοποίηση έγινε λόγω του ότι διαθέτουν διπλή κυτταρική μεμβράνη.

Τα βακτήρια αυτού του κλάδου ο Cavalier- Smith τα αποκαλεί Hadobacteria (Cavalier- Smith, 1986, 1998, 2010). Αναλυτικά η ταξινόμησή τους είναι:

Kingdom: Bacteria	Kingdom: Bacteria
Subkingdom: Negibacteria	Subkingdom: Negibacteria
Inrakingdom: Lipobacteria	Inrakingdom: Lipobacteria
Phylum: Hadobacteria	Phylum: Hadobacteria
Subphylum: Deinobacteria	Subphylum: Deinobacteria
Class: Deinococci	Class: Deinococci
Order: Deinococcales	Order: Thermales
Genus: <i>Deinococcus</i>	Genus: <i>Thermus</i>

Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δένδρο της ομάδας *Deinococcus- Thermus*, βασισμένο στις 16S rRNA γονιδιακές ευθυγραμμίσεις. Τα

Thermomicrobium roseum και *Chloroflexus aurantiacus* αποτελούν εξωομάδες. Όπως παρατηρείται, το *Thermus oshimai* είναι το λιγότερο συγγενικό ανάμεσα στα είδη του γένους *Thermus*, όπως αντικατοπτρίζεται από το ποσοστό ομοιότητας των 16S rDNA αλληλουχιών. Τα υπόλοιπα είδη του γένους *Thermus* έχουν ομοιότητες ως προς την 16S rDNA αλληλουχία σε ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ 94–96%. (Chung, Rainey, Valente, Nobre, & da Costa, 2000).



Εικόνα 3 Φυλογενετικό δένδρο της ομάδας *Deinococcus-Thermus*, βασισμένο στις 16S rRNA γονιδιακές ευθυγραμμίσεις.

1.2.2 ΤΟ ΓΕΝΟΣ *THERMUS*. ΤΟ ΕΙΔΟΣ *THERMUS THERMOPHILUS*

Το γένος *Thermus* περιλαμβάνει θερμόφιλα, αερόβια, Gram αρνητικά βακτήρια τα οποία μπορεί να εμφανίζουν κινητικότητα όταν διαθέτουν μαστίγια. Πρόκειται για βακτήρια που έχουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 70 °C και 75 °C, αν και μερικοί αντιπρόσωποι έχουν χαμηλότερες θερμοκρασίες ανάπτυξης που κυμαίνονται περίπου στους 60 °C (Henne et al., 2004). Είναι χαρακτηριστικό ότι κανένα στέλεχος του γένους *Thermus* είναι ικανό να πραγματοποιήσει ζύμωση.

Τα βακτήρια του γένους *Thermus* χρησιμοποιούν διάφορα υποστρώματα για την ανάπτυξή τους, συμπεριλαμβανομένων υδατανθράκων, αμινοξέων, καρβοξυλικών οξέων, και πεπτιδίων. Λόγω της ποικιλότητας των οικοτόπων, από τα οποία τα στελέχη του γένους έχουν απομονωθεί, οι διατροφικές του απαιτήσεις παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία.

Βακτήρια του γένους *Thermus*, έχουν βρεθεί σε τόσο σε ρηχά νερά όσο και σε βαθιά θαλάσσια υδροθερμικά συστήματα, καθώς επίσης και σε χαμηλής αλατότητας πηγές θείου. Το στέλεχος *T. aquaticus* για παράδειγμα, απομονώθηκε για πρώτη φορά στο Yellowstone National Park, το 1969 από τους Brock και Freeze, από ουδέτερες και αλκαλικές πηγές και από τότε έχει επίσης απομονωθεί και από θερμές πηγές που βρίσκονται στην Ισλανδία (Brock & Freeze, 1969).

Τα είδη που ανήκουν σε αυτό το γένος είναι τα εξής: *T. antranikianii*, *T. aquaticus*, *T. brockianus*, *T. caldophilus*, *T. filiformis*, *T. igniterrae*, *T. kawayuensis*, *T. nonproteolyticus*, *T. oshimai*, *T. rehai*, *T. scotoductus*, *T. thermophilus*, *T. thermophilus* HB27, *T. yunnanensis*, *T. sp.*, *T. sp. manikaranii*. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το είδος *Thermus thermophilus*.

Το είδος *T. thermophilus* συναντάται σε θερμοπηγές με ουδέτερο και αλκαλικό pH, καθώς και σε θερμά νερά ή σε φυσικά νερά που εκτίθενται σε θερμική ρύπανση και αναπτύσσεται βέλτιστα σε θερμοκρασίες 70- 85 °C περίπου (Oshima, 1974; Oshima, Sakaki, Wakayama, Watanabe, & Ohashi, 1976). Το στέλεχος HB8 (DSM 579) απομονώθηκε για πρώτη φορά από θερμές πηγές στην Ιαπωνία και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 70 °C μέχρι και 85 °C. Το *T. thermophilus* δεν παράγει σπόρια και δεν εμφανίζει κινητικότητα (Oshima, 1974).

Τα κύτταρα του *T. thermophilus*, εμφανίζονται με τη μορφή ράβδων και νηματίων. Η μορφή των κυττάρων εξαρτάται από τη θερμοκρασία και από το χρόνο ανάπτυξης. Σε θερμοκρασίες άνω των 75 °C αλλά και στη στατική φάση επικρατεί ο σχηματισμός νηματίων, τα οποία έχουν διάμετρο από 0.5 μέχρι και 0.8 μm. Οι ράβδοι έχουν την ίδια διάμετρο και μήκος από 5 μέχρι 10 μm.

Τα θερμοφιλά βακτήρια, όπως αναφέρεται και παραπάνω, εμφανίζουν υψηλά ποσοστά GC στο σύνολο των βάσεων του DNA. Στο *T. thermophilus* HB8 το ποσοστό G+C που περιέχεται στο χρωμοσωμικό του DNA είναι 69% (Oshima &

Imahori, 1974). Επιπλέον, διαλεύκανση του γονιδιώματος του *T. thermophilus* έδειξε ότι τα κωδικόνια που χρησιμοποιούνται διαφέρουν κατά πολύ από εκείνα της *E.coli*. Φαίνεται πως προτιμάται η χρήση κωδικονίων που περιέχουν ως τρίτη βάση G ή C σε ποσοστό που φτάνει σε ορισμένες περιπτώσεις το 89% (Kagawa et al., 1984). Προφανώς το υψηλό ποσοστό GC σταθεροποιεί τις δομές που σχηματίζονται στα στάδια της μεταγραφής και της μετάφρασης, στις υψηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης των κυττάρων.

Όσον αφορά το μέγεθος του γονιδιώματος του *T. thermophilus* HB8 είναι περίπου 1,74 Mbp και είναι από τα μικρότερα γονιδιώματα που έχουν βρεθεί. Είναι πολύ κοντά στο μέγεθος του γονιδιώματος του *Streptococcus thermophilus* (1.7 Mbp) και του αρχαιοβακτηρίου *Thermococcus celer* (1.9 Mbp). Αντίθετα, το γονιδίωμα της *E. coli* είναι 4.7 Mbp ενώ τα γονιδιώματα άλλων βακτηρίων, όπως των *Lactococcus lactis* και *Myxococcus xanthus* είναι από 2 έως 9 Mbp. Συμπεραίνεται λοιπόν πως το μέγεθος των θερμόφιλων βακτηρίων είναι παρόμοιο σε μέγεθος με αυτό των θερμόφιλων αρχαιοβακτηρίων και πολύ μικρότερο από εκείνο των μεσόφιλων βακτηρίων.

Από συγκρίσεις γονιδίων ριβοσωμικών πρωτεϊνών από κύτταρα του γένους *Thermus* με αντίστοιχες πρωτεΐνες άλλων μικροοργανισμών, προκύπτει ότι τα στελέχη αυτού του γένους αποτελούν μία κατηγορία βακτηρίων με πολύ αργή εξέλιξη. Είναι επομένως πιθανό, το μικρό γονιδίωμα να είναι χαρακτηριστικό παλαιότερων-προγονικών μικροοργανισμών και κατά την εξέλιξη να επήλθε αύξηση του μεγέθους στους επόμενους μικροοργανισμούς λόγω γονιδιακών διπλασιασμών και οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Borges & Bergquist, 1993).

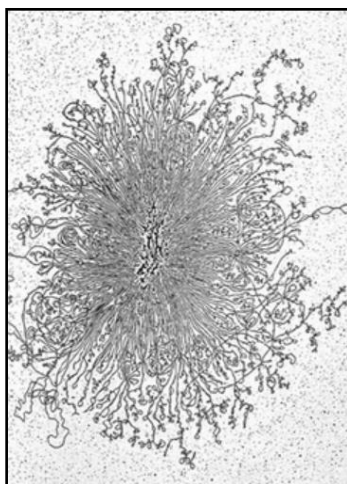
1.3 HISTONE- LIKE ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί, όπως και όλοι οι οργανισμοί 'αντιμετωπίζουν' το θέμα του πακεταρίσματος του γενετικού τους υλικού. Στα βακτήρια, το γενετικό υλικό καταλαμβάνει συγκεκριμένη περιοχή στο κυτταρόπλασμα και πακετάρεται με κατάλληλο τρόπο ώστε οι διάφορες περιοχές του να είναι ανά πάσα στιγμή προσιτές προς χρήση από τους μηχανισμούς αναγνώρισης, ρύθμισης, αντιγραφής, μεταγραφής του κυττάρου. Τα γονίδια ενός βακτηρίου περιέχονται σε ένα υπερελικωμένο,

κυκλικό, τις περισσότερες φορές, μόριο DNA που ονομάζεται βακτηριακό χρωμόσωμα και διαθέτει τα εξής δύο χαρακτηριστικά: α) 50 περίπου διακριτές τοπολογικές μονάδες- θηλιές (domains ή loops) μεγέθους περίπου 100 kbp οι οποίες μπορούν να διατηρούν διαφορετικά επίπεδα υπερελίκωσης (Pettijohn, 1988; Winston & Pettijohn, 1988) και β) μία κεντρική πυκνά πακεταρισμένη δομή ακανόνιστου σχήματος που αποτελείται από πρωτεΐνες και RNA (scaffold) (Εικόνα 4).

Το βακτηριακό χρωμοσωμικό DNA συμπυκνώνεται με τη βοήθεια DNA δεσμευτικών πρωτεϊνών (DNA- binding proteins) και έτσι χαρακτηρίζεται ως βακτηριακό νουκλεοϊδές (Drlica & Rouviere- Yaniv, 1987). Η σχετική σύσταση του νουκλεοϊδούς και η δομή του DNA ποικίλουν ανάλογα με το στάδιο και τις συνθήκες της κυτταρικής αύξησης (Almiron, Link, Furlong, & Kolter, 1992).

Οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με το βακτηριακό νουκλεοϊδές είναι οι εξής: H- NS (histone- like nucleoid structuring protein) (Dorman, 2014), HU (heat unstable protein) (Durrenberger, Bjornsti, Uetz, Hobot, & Kellenberger, 1988; Varshavsky, Nedospasov, Bakayev, Bakayeva, & Georgiev, 1977), Fis (factor for inversion stimulation), IHF (integration host factor) (Murphy & Zimmerman, 1997), Lrp (leucine responsive protein) και MukBEF (Bae, Liu, Lim, Lee, & Choi, 2008; Luijsterburg, Noom, Wuite, & Dame, 2006). Οι τέσσερις πρώτες πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα άφθονες στο βακτηριακό νουκλεοϊδές και έχουν μελετηθεί εκτενέστερα. Στη συγκεκριμένη εργασία θα επικεντρωθούμε στις histonelike πρωτεΐνες των βακτηρίων και πιο συγκεκριμένα στις HU πρωτεΐνες.



Εικόνα 4 Σχηματική αναπαράσταση του βακτηριακού χρωμοσώματος σε ένα αυξανόμενο βακτηριακό κύτταρο. Η πακεταρισμένη μάζα του DNA παρατηρείται στο κέντρο, και οι θηλιές γύρω από αυτή.

Οι HU πρωτεΐνες μαζί με τις IHF συνιστούν την οικογένεια: Bacterial_DNA_binding proteins (pF00216). Η οικογένεια έχει 36.101 αντίγραφα των γονιδίων από διάφορους κυτταρικούς οργανισμούς (Uniprot & EMBL) και 102 αντίγραφα των γονιδίων σε ιούς (dsDNA viruses και phages). Ακριβέστερα, οι πρωτεΐνες HU ή/και IHF εντοπίζονται σε 20 αρχαία (19 *Euryarchaeota* και 1 *Thaumarchaeota*), σε βακτηρία (με αντιπροσώπους από όλες τις ομάδες- φύλα βακτηρίων: *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes/ Chlorobi group*, *Chlamydiae/ Verrucomicrobia group*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deferribacteraceae*, *Deinococci*, *Dictyoglomus*, *Elusimicrobia*, *Fibrobacteres/ Acidobacteria group*, *Firmicutes*, *Fusobacteriales*, *Gemmatimonadetes*, *Mollicutes*, *Nitrospiraceae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetales*, *Synergistaceae*, *Thermodesulfobacteriaceae*, και *Thermotogaceae*) και σε 98 ευκαρυωτικά (με αντιπροσώπους από τα εξής φύλα- κλάσεις: *Alveolata*, *Cyanidiaceae*, *Opisthokonta*, *Pyrenomonadales*, *Stramenopiles*, *Viridiplantae*).

Το γεγονός ότι συναντάμε τις HU πρωτεΐνες σε ελάχιστους ευκαρυώτες και αρχαία οδηγεί στο συμπέρασμα πως πρόκειται για βακτηριακές πρωτεΐνες που πέρασαν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης με οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Είναι χαρακτηριστικό το ότι στους ευκαρυώτες εντοπίζονται σε κυτταρικά οργανίδια όπως είναι οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια, οργανίδια βακτηριακής προέλευσης.

Η πρωτεΐνη HU απομονώθηκε αρχικά από το στέλεχος U93 του εντεροβακτηρίου *E.coli* και ονομάστηκε παράγοντας U (Rouviere- Yaniv & Gros, 1975). Η αλλαγή του ονόματος σε HU έγινε μετά από τη παραδοχή ότι η βιολογική της δράση ομοιάζει με αυτή των ευκαρυωτικών ιστονών.

Η HU είναι μια μικρού μοριακού βάρους (~19 KDa), διμερής, άφθονη (30.000 αντίγραφα ανά κύτταρο), βασική πρωτεΐνη με την ιδιότητα να προσδένεται μη ειδικά, σε επίπεδα αλληλουχίας, στο DNA, προκαλώντας κάμψη της νουκλεοτιδικής αλυσίδας, και ρυθμίζοντας εξαρτώμενες από το DNA δραστηριότητες (για π.χ επιδιόρθωση του DNA, γονιδιακή ρύθμιση, τοπολογικά- εξειδικευμένο ανασυνδυασμό, κ.α) που θα αναλυθούν σε επόμενη παράγραφο (Balandina, Kamashev, & Rouviere- Yaniv, 2002; Drlica & Rouviere- Yaniv, 1987; Kamashev & Rouviere- Yaniv, 2000; Malik, Bensaid, Rouviere- Yaniv, & Drlica, 1996; Oberto, Nabti, Jooste, Mignot, & Rouviere- Yaniv, 2009; Rouviere- Yaniv, 1978).

Στα περισσότερα βακτήρια, η HU είναι ομοδιμερές, όμως σε πολλά πρωτεοβακτήρια, όπως για παράδειγμα στα είδη *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shewanella benthica*, κ.α, η HU είναι ετεροδιμερές (HUαβ). Στα βακτήρια που σχηματίζει ετεροδιμερές, η HU πρωτεΐνη αποτελείται από δυο υπομονάδες HUα (ή HU- 2) και HUβ (ή HU- 1) μοριακού βάρους περίπου 9,5 kD η καθεμία. Οι δύο υπομονάδες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *hupA* και *hupB*, αντίστοιχα. Όσον αφορά την HU της *E.coli*, *in vivo* αλλά και *in vitro* έχει παρατηρηθεί ότι απαντάται σε τρεις διαφορετικές διμερείς μορφές: τα δυο ομοδιμερή HUα₂ και HUβ₂, και το ετεροδιμερές HUαβ. Οι σχετικές ποσότητες των διμερών αυτών μορφών ποικίλουν ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του βακτηρίου και ως απόκριση σε αλλαγές περιβαλλοντικών συνθηκών, υποδεικνύοντας πως κάθε μορφή έχει διαφορετική φυσιολογική λειτουργία (Ramstein et al., 2003). Αναλυτικότερα, η HUα₂ συσσωρεύεται κατά τη φάση διαίρεσης του κυττάρου, ενώ η HUαβ εμφανίζεται κατά το μεταβατικό στάδιο και κυριαρχεί κατά το τέλος του εκθετικού σταδίου ανάπτυξης και στη συνέχεια κατά το στάδιο σταθεροποίησης. Στο στάδιο της σταθεροποίησης ανιχνεύεται σε χαμηλό ποσοστό (της τάξης του 5%), λόγω του ότι είναι τοξική για τα κύτταρα, η μορφή HUβ₂.

1.3.1 ΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ HU

Με βάση τις μέχρι τώρα, κυρίως *in vitro* μελέτες, διάφορες λειτουργίες έχουν αποδοθεί στις HU πρωτεΐνες. Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά οι βασικές λειτουργίες των συγκεκριμένων πρωτεϊνών:

1. Με μηχανισμό παρόμοιο με αυτό των ευκαρυωτικών ιστονών, η HU προσδένεται στο DNA και προκαλεί τη δημιουργία δομών που ομοιάζουν με τα νουκλεοσώματα, συνεισφέροντας έτσι στη δημιουργία του βακτηριακού νουκλεοϊδούς.
2. Η HU ρυθμίζει την αρνητική υπερέλικωση του DNA καθώς μπορεί να εισάγει αρνητικές στροφές υπερέλικας σε χαλαρό κυκλικό πλασμιδιακό DNA παρουσία της τοποισομεράσης I.
3. Μπορεί να προσδεθεί τόσο σε δίκλωνα όσο και σε μονόκλωνα μόρια DNA και RNA καθώς και σε υβρίδια DNA- RNA μόρια, χωρίς να αναγνωρίζει συγκεκριμένη αλληλουχία. Παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για μονόκλωνα

μόρια DNA και RNA. Ακριβέστερα, η HU σχηματίζει σύμπλοκα χαμηλής συγγένειας ($K_d = 10^7 \text{ M}^{-1}$) με το DNA- προσδεδεμένη με στοιχειομετρία 1 διμερές/9bp- καθώς και σύμπλοκα υψηλής συγγένειας όταν αναγνωρίζει ευέλικτες δευτεροταγείς δομές, όπως οι θηλειές (stem loops) και οι σταυροειδείς δομές (cruciform DNA), τα μονόκλωνα σπασίματα και κενά μερικών νουκλεοτιδίων (nicks and gaps), καθώς και τα σημεία επιχiasμών και συμπλόκων επιδιόρθωσης. Χαρακτηριστικό είναι το ότι προσδένεται με μεγαλύτερη προτίμηση σε μόρια DNA που είναι πλούσια σε GC% ποσοστό.

4. Σχηματίζει ανώτερης τάξης δομές, όπως διμερή, τριμερή και τετραμερή.
5. Συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως για παράδειγμα: α) στην έναρξη του διπλασιασμού του DNA ως βοηθητικός παράγοντας κατά το ξετύλιγμα της διπλής έλικας από την πρωτεΐνη DnaA στο σημείο oriC, β) στη μεταγραφή του DNA, γ) στη προστασία από την UV ακτινοβολία καθώς επίσης και στην επιδιόρθωση του DNA, δ) στη διαδικασία της μετάφρασης καθώς η HU αλληλεπιδρά με τη 30S ριβοσωμική υπομονάδα.
6. Συμμετέχει σε συστήματα ανασυνδυασμού στα οποία απαιτείται κατάλληλη τοποθέτηση και προσανατολισμός των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Οι περιπτώσεις που έχουν παρατηρηθεί είναι η ενσωμάτωση και μετάθεση των φάγων Mu και Tn10, και ορισμένες περιπτώσεις αναστροφής γονιδίων.
7. Προστατεύει τη δομή του νουκλεοειδούς από την αποδιάταξη που προκαλείται σε καταστάσεις θερμοκρασιακού stress. Η παρουσία της HU είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση του δίκλωνου DNA ενάντια στη θερμική αποδιάταξη.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, οι HU πρωτεΐνες προκαλούν κάμψη στο DNA, διατηρούν υπερελικωμένες δομές και διευκολύνουν ειδικές αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεϊνών, λειτουργίες που είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση της αντιγραφής, του γενετικού ανασυνδυασμού και της γονιδιακής έκφρασης (Aki & Adhya, 1997; Boubrik & Rouviere- Yaniv, 1995; Broyles & Pettijohn, 1986; Kobryn, Lavoie, & Chaconas, 1999; Lyubchenko, Shlyakhtenko, Aki, & Adhya, 1997; Rouviere- Yaniv & Kjeldgaard, 1979; Shindo, Furubayashi, Shimizu, Miyake, & Imamoto, 1992; H. Tanaka et al., 1995; Wada, Kano, Ogawa, Okazaki, & Imamoto, 1988).

1.3.2 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HU

Η τρισδιάστατη δομή της HU έχει προσδιοριστεί σε αρκετούς οργανισμούς: *E. coli*, *Bacillus anthracis*, *Borrelia burgdorferi*, *Thermotoga maritime*, *Anabaena sp.*, *Bacillus stearothermophilus*, *Mycobacterium tuberculosis* με κρυσταλλογραφία ακτίνων- X αλλά και σε διάλυμα με NMR.

Η HUBst ήταν η πρώτη από τις HU πρωτεΐνες για την οποία προσδιορίστηκε η αμινοξική της ακολουθία (Kimura & Wilson, 1983) και κρυσταλλώθηκε. Η τρισδιάστατη δομή της προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων- X αρχικά με διακριτικότητα 3Å (I. Tanaka, Appelt, Dijk, White, & Wilson, 1984), και αργότερα με διακριτικότητα 2Å. Επίσης έχει προσδιοριστεί η δομή της σε διάλυμα με τη χρήση NMR.

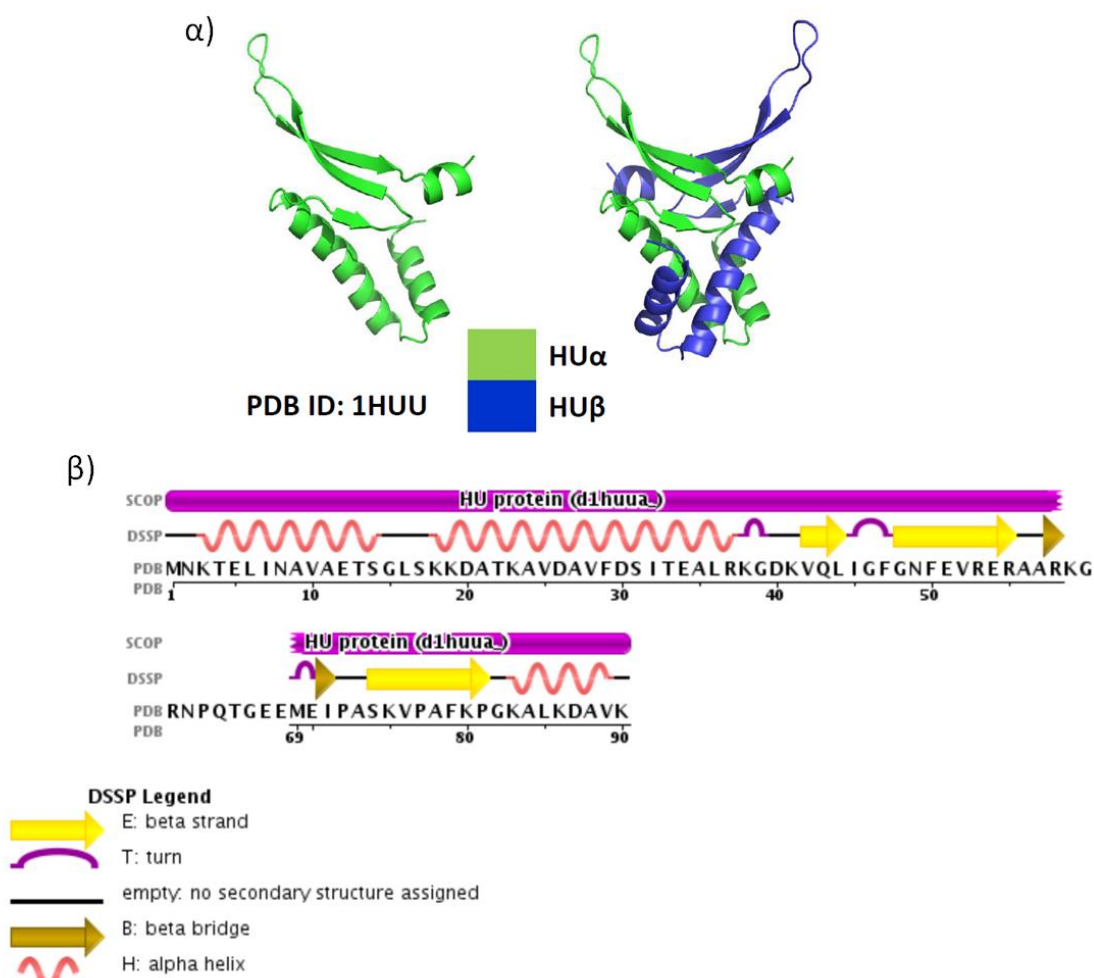
Η δομή της HUBst περιγράφεται παρακάτω και ισχύει σε μεγάλο βαθμό για τις περισσότερες HU πρωτεΐνες (Εικόνα 5). Η δομή του μονομερούς, όπως προκύπτει από τη μελέτη του μορίου σε διάλυμα με την τεχνική NMR σύμφωνα με τους Vis *et al* (1995) είναι όμοια με αυτή που προκύπτει με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και είναι η εξής: το αμινοτελικό άκρο του μορίου αποτελείται από δύο α- έλικες (α_1 : κατάλοιπα 4- 14, α_2 : κατάλοιπα 18- 38) οι οποίες συνδέονται με μια β- στροφή (κατάλοιπα 14- 18) σχηματίζοντας μια υπερδευτεροταγή δομή σχήματος V. Σε αυτή την περιοχή εντοπίζονται δύο συντηρημένα κατάλοιπα αλανίνης στις θέσεις 11 και 21. Το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου καταλαμβάνεται κυρίως από μια αντιπαράλληλη β- πτυχωτή επιφάνεια που αποτελείται από 3 β- κλώνους (β_1 : 41- 45, β_2 : 48- 52, β_3 : 77- 81), η οποία εντοπίζεται στο πάνω μέρος του σχηματισμού V «καλύπτοντας» τις α- έλικες. Μεταξύ της α_2 έλικας και του β_1 κλώνου υπάρχει μια β- στροφή με μια εξαιρετικά συντηρημένη γλυκίνη στη θέση 39. Οι κλώνοι β_1 και β_2 συνδέονται με μια οξεία β- στροφή στην οποία εντοπίζεται μια συντηρημένη αλληλουχία Gly- Phe- Gly (κατάλοιπα 46- 48). Οι κλώνοι β_2 και β_3 συνδέονται μέσω μιας ευέλικτης δομής που προεξέχει από το κυρίως σώμα του μορίου (arm region). Ουσιαστικά οι κλώνοι β_2 και β_3 επεκτείνονται μέχρι τα κατάλοιπα 56 και 73 σχηματίζοντας μια δίκλωνη αντιπαράλληλη β- πτυχωτή επιφάνεια. Στα κατάλοιπα Ala57 και Pro72 οι κλώνοι διασταυρώνονται και συνεχίζουν ως δίκλωνη αντιπαράλληλη β- πτυχωτή επιφάνεια μέχρι τα κατάλοιπα Asn62 και Glu67. Μεταξύ

των καταλοίπων 62 και 67 υπάρχει μια β - στροφή. Η όλη δομή χαρακτηρίζεται ως β -hairpin arm ή β - ribbon arm. Το τελευταίο στοιχείο δευτεροταγούς δομής είναι μια μικρή α - έλικα (α_3 : 82- 90) στο καρβοξυτελικό άκρο.

Τα δυο μονομερή έρχονται σε επαφή για το σχηματισμό του διμερούς. Η βάση του μορίου αποτελείται από τις δυο υπερδευτεροταγείς δομές σχήματος V που σχηματίζουν οι τέσσερις α - έλικες, δημιουργώντας μια πλατφόρμα τεσσάρων α -ελίκων. Ουσιαστικά οι α_2 έλικες εφάπτονται υπό γωνία μέσω μιας συντηρημένης αλανίνης στη θέση 24, και οι α_1 βρίσκονται σε κάθε πλευρά. Η βάση αυτή καλύπτεται από τις δυο τρίκλωνες β - πτυχωτές επιφάνειες, όμως επειδή η απόσταση μεταξύ των δυο β_3 κλώνων είναι 6,3Å και ο σχετικός προσανατολισμός των επιφανειών τους περίπου 65°, δεν μπορούν να σχηματίσουν μια β - πτυχωτή επιφάνεια έξι κλώνων. Ουσιαστικά τα καρβοξυτελικά άκρα των μονομερών δεν αλληλεπιδρούν αλλά αποκλίνουν σχηματίζοντας δυο ευέλικτα προεξέχοντα άκρα (β - arms) κατάλληλα για την αλληλεπίδραση με τη διπλή έλικα του DNA. Οι δύο α_3 έλικες διευθετούνται οριζοντίως σε αντίθετες πλευρές των β - πτυχωτών επιφανειών στην εξωτερική επιφάνεια του μορίου.

Το διμερές παρουσιάζει τυπικά δομικά χαρακτηριστικά διαλυτών πρωτεϊνών με υδρόφιλη επιφάνεια και έναν υδρόφοβο πυρήνα στο σχηματισμό του οποίου συμμετέχουν κατάλοιπα και των δυο μονομερών. Έτσι στο εσωτερικό του διμερούς κυριαρχούν οι αρωματικές και αλειφατικές πλευρικές ομάδες των καταλοίπων Leu6, Val10, Val25, Val28, Phe29, Ile32, Leu36, Val42, Leu44, Phe47, Phe50, Phe79, Leu85, Val89, τα οποία είναι εξαιρετικά συντηρημένα και υπεύθυνα για τη σταθεροποίηση του διμερούς. Επομένως οι δυο υπομονάδες συγκρατούνται με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, και η πρωτεΐνη υπάρχει σε διάλυμα σε μορφή διμερούς ή τετραμερούς. Τα προεξέχοντα άκρα του μορίου (β - arms) μαζί με τους συμμετρικά τοποθετημένους β_3 κλώνους ανάμεσα τους δημιουργούν μια κοιλότητα διαμέτρου ~25Å, η οποία είναι συμπληρωματική με τη διπλή έλικα του B- DNA. Επίσης, η αμινοξική αλληλουχία των προεξέχοντων άκρων είναι αρκετά συντηρημένη, υποδηλώνοντας τον λειτουργικό της ρόλο, και περιέχει τέσσερα από τα πέντε κατάλοιπα αργινίνης του κάθε μονομερούς (στις θέσεις 53, 55, 58, 61), τρία από τα οποία (στις θέσεις 55, 58, 61) έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στο μηχανισμό πρόσδεσης στο DNA. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι προεξέχοντες βραχίονες

εμφανίζουν κινητικότητα και ευλυγισία συγκριτικά με το υπόλοιπο σώμα του μορίου.



Εικόνα 5 α) Τρισδιάστατη αναπαράσταση του μονομερούς και διμερούς της HUBst με το πρόγραμμα PyMol. β) αμινοξική αλληλουχία της HUBst και δευτεροταγείς δομές.

Συνοψίζοντας, το μονομερές μόριο των HU μπορεί να χωριστεί σε τρεις δομικά και λειτουργικά διακριτές περιοχές (Christodoulou, Duffner, & Vorgias, 2001). Το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου αποτελεί τη θέση πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain, DBD) είναι εξαιρετικά συντηρημένο και εμφανίζει υψηλή περιεκτικότητα σε βασικά αμινοξέα. Το κεντρικό τμήμα του μορίου περιέχει την αλληλουχία “GFGXF” (κατάλοιπα 46- 50), κοινή στην οικογένεια των HU. Η αλληλουχία αυτή δημιουργεί έναν υδρόφοβο πυρήνα στην επιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων, και επειδή συμβάλλει στο σχηματισμό πολύ σταθερού διμερούς ονομάζεται σινιάλο διμερισμού (dimerization signal, DS). Το αμινοτελικό άκρο του μορίου περιλαμβάνει το δομικό μοτίβο έλικα- στροφή- έλικα (helix – turn – helix motif, HTH) μαζί με στοιχεία β- πτυχωτής επιφάνειας. Το τμήμα αυτό συνιστά το

κυρίως σώμα της πρωτεΐνης και είναι λιγότερο συντηρημένο όσον αφορά στην πρωτοταγή του δομή σε σύγκριση με το υπόλοιπο μόριο (Padas, Wilson, & Vorgias, 1992).

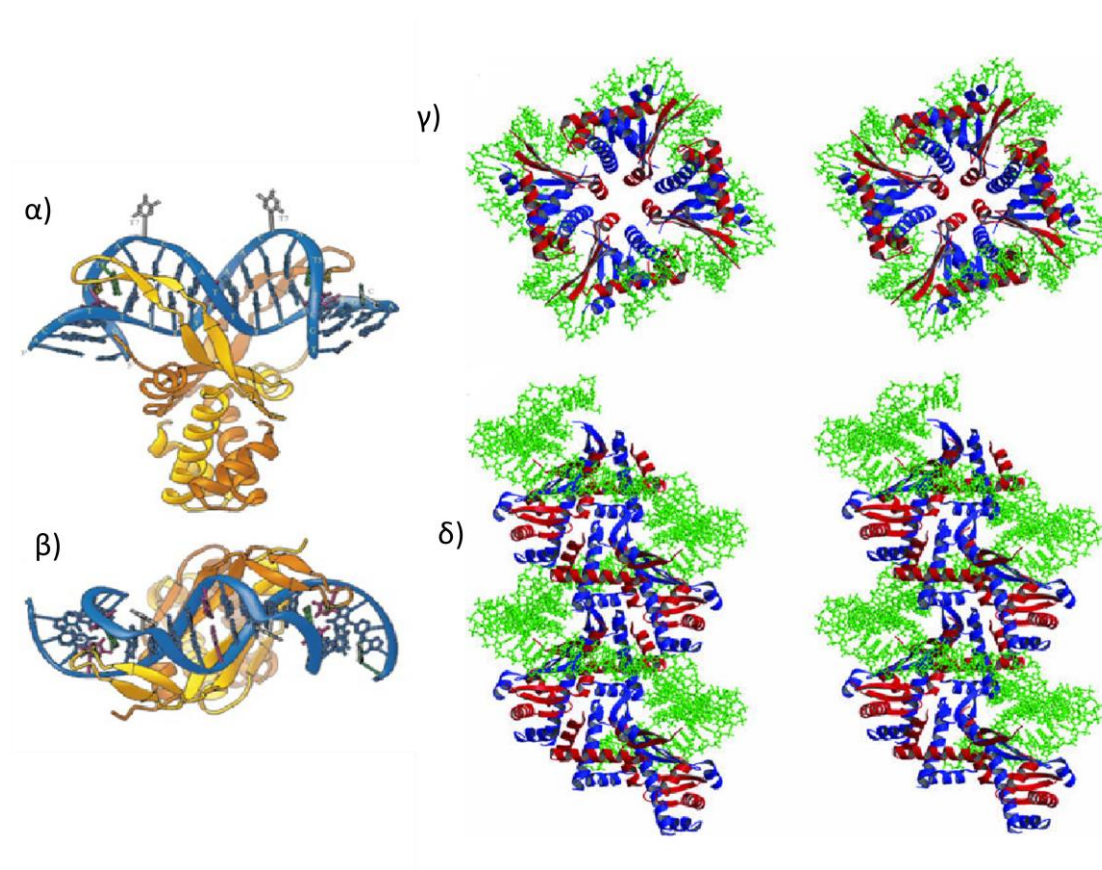
1.3.3 Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΗΣ HU ΣΤΟ DNA

Το δομικό μοντέλο αλληλεπίδρασης της HU με το DNA προτάθηκε αρχικά από τους Tanaka *et al.* (1984) και εμπλουτίστηκε και υποστηρίχθηκε πειραματικά από τους Sagi *et al.* (2004).

Σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο τα συμπλέγματα HU- DNA σχηματίζουν δομές που μοιάζουν με νουκλεοσώματα (nucleosome- like structures), στις οποίες η αλυσίδα του DNA εντοπίζεται στην περιφέρεια γύρω από έναν ελικοειδή σκελετό αποτελούμενο από διμερή μόρια HU. Ουσιαστικά πολλά διμερή προσδένονται κατά σειρά στην αλυσίδα του DNA και η ελικοειδής δομή προκύπτει από τον τρόπο που αλληλεπιδρούν τα διμερή μεταξύ τους.

Αποδείξεις για την αλληλεπίδραση των διμερών της πρωτεΐνης μεταξύ τους υπάρχουν στην αμινοξική αλληλουχία, καθώς εκτός από τις περιοχές που αναφέρθηκαν παραπάνω, τρεις ακόμα περιοχές του μορίου είναι εξαιρετικά συντηρημένες. Αυτές είναι το αμινοτελικό άκρο (κατάλοιπα 1- 3), η α_3 έλικα (κατάλοιπα 84- 89) και η β -στροφή στο πιο απομακρυσμένο σημείο των προεξεχόντων άκρων (κατάλοιπα 60- 65). Κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ δυο γειτονικών πρωτεϊνών η α_3 έλικα του ενός μορίου έρχεται σε επαφή με το αμινοτελικό άκρο του δευτέρου και τοποθετείται σε μια κατάλληλου μεγέθους υποδοχή στην επιφάνεια του δεύτερου μορίου. Επίσης οι περιοχές των β -στροφών των προεξεχόντων άκρων δυο διαδοχικών πρωτεϊνών εφάπτονται καθώς «τυλίγονται» γύρω από την αλυσίδα του DNA, σταθεροποιώντας τη συνολική δομή. Δεδομένης της υδρόφιλης επιφάνειας τους, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γειτονικών πρωτεϊνών πρέπει να είναι ηλεκτροστατικής φύσεως, όμως ασθενέστερες σε σχέση με τις αλληλεπιδράσεις κάθε διμερούς με το DNA, έτσι ώστε να ολοκληρώνεται πρώτα η πρόσδεση στο DNA. Κατά την αλληλεπίδραση των διμερών οι κατακόρυφοι άξονες των μορίων δεν βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης, αλλά υπό γωνία ο ένας προς τον άλλον, έτσι ώστε να σχηματίζεται ένα ελικοειδές πρωτεϊνικό σύμπλεγμα.

Τα προεξέχοντα άκρα τοποθετούνται κατά μήκος της μικρής αύλακας του B- DNA, όπου τα κατάλοιπα αργινίνης και τα υπόλοιπα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με το φωσφορικό σκελετό. Ένα συντηρημένο κατάλοιπο προλίνης στη θέση 63 παρεμβάλλεται μεταξύ των νουκλεοτιδικών βάσεων και προκαλεί την κάμψη της αλυσίδας του DNA, μηχανισμός που χρησιμοποιείται και από τον IHF (Integration Host Factor). Το μήκος της αλληλουχίας που προσδένεται από τα προεξέχοντα άκρα του μορίου είναι ~9bp, δηλαδή η πρωτεΐνη καλύπτει ένα βήμα της έλικας. Όμως οι αλληλουχίες πρόσδεσης που έχουν υπολογισθεί από διάφορους ερευνητές ποικίλλουν από 9 μέχρι 42bp, υποδεικνύοντας περαιτέρω αλληλεπιδράσεις μεταξύ του DNA και του κυρίως σώματος της πρωτεΐνης.



Εικόνα 6 Τρισδιάστατη αναπαράσταση του τρόπου πρόσδεσης του διμερούς της HU στο DNA: α) πλάγια όψη, β) άνω όψη. Τρισδιάστατη αναπαράσταση οκταμερούς συμπλόκου HUαβ- DNA: γ) πάνω όψη, δ) πλάγια όψη.

Η γωνία κάμψης ανά διμερές ποικίλλει μεταξύ $105^{\circ} - 140^{\circ}$, και τα πειραματικά αποτελέσματα συνηγορούν στο ότι η κάμψη που προκαλείται στην αλυσίδα του DNA

περιγράφεται καλύτερα ως «άρθρωση» (hinge) παρά ως στατική και μόνιμη κάμψη. Σύμφωνα με τη γεωμετρία του μοντέλου οι γωνίες κάμψης κάθε διμερούς αθροίζονται, με αποτέλεσμα μια μεγαλύτερη συνολική γωνία κάμψης της αλυσίδας του DNA. Οι γωνίες κάμψης που προκαλεί κάθε προεξέχον άκρο ενός διμερούς δεν είναι συνεπίπεδες, με αποτέλεσμα η συνολική γωνία κάμψης ανά διμερές να είναι διέδρη $\sim 40-73^\circ$. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης προκαλεί επίσης αλλαγή του βήματος της έλικας καθώς το μέσο βήμα της έλικας σε συμπλέγματα HU- DNA είναι $31\text{\AA}$, ενώ σε χαλαρωμένο B- DNA είναι $\sim 34,3\text{\AA}$. Τα δυο παραπάνω χαρακτηριστικά εξηγούν και την ιδιότητα της HU να προκαλεί αρνητική υπερελίκωση σε χαλαρωμένο DNA (Εικόνα 6) (Sagi, Friedman, Vorgias, Oppenheim, & Stavans, 2004; Swinger & Rice, 2007).

1.4 ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι πρωτεΐνες αποτελούν θεμελιώδη μόρια των οργανισμών, τα οποία λειτουργούν είτε ως δομικά στοιχεία είτε ως λειτουργικά μόρια σε πολλές διεργασίες. Ο δομικός λίθος των πρωτεϊνών είναι τα αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς για να σχηματίσουν πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Μια πρωτεΐνη είναι μια διπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα σε μια ή περισσότερες αυτοτελείς δομικές περιοχές, κάθε μια από τις οποίες αποτελείται από α - έλικες, β - πτυχωτές επιφάνειες και βρόχους. Η διαδικασία με την οποία μια πολυπεπτιδική αλυσίδα αποκτά τη σωστή τρισδιάστατη δομή της, για να επιτύχει τη βιολογικά ενεργή φυσική δομή (native state), ονομάζεται πρωτεϊνικό δίπλωμα. Παρότι μερικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες διπλώνουν αυθόρμητα στη φυσική δομή, άλλες απαιτούν τη βοήθεια ενζύμων, όπως για παράδειγμα, για να καταλύσουν τη δημιουργία και ανταλλαγή δισουλφιδικών δεσμών και πολλές απαιτούν τη βοήθεια μιας κατηγορίας πρωτεϊνών που ονομάζονται 'μοριακοί ακόλουθοι/συνοδοί'(chaperons) (Papsdorf & Richter, 2014).

Η ενεργειακή διαφορά που παρουσιάζει η αποδιαταγμένη κατάσταση από τη διπλωμένη, επηρεάζεται από δυο παράγοντες, την εντροπία και την ενθαλπία.

Η εντροπία προκύπτει σαν μια ποσοτική διατύπωση του δευτέρου νόμου της θερμοδυναμικής: απαιτείται ενέργεια για να δημιουργηθεί τάξη. Η αποδιαταγμένη

διαμόρφωση είναι ευνοϊκότερη εντροπικά. Όταν η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται, το κόστος της μετάβασης από την αδίπλωτη στην αναδιπλωμένη μορφή είναι να μειωθεί η εντροπία (να γίνει λιγότερο αρνητική). Από τη σκοπιά της στατιστικής μηχανικής είναι το μέτρο της αταξίας ενός συστήματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκφράσει τον αριθμό των διαμορφώσεων που θα μπορούσε να αποκτήσει ένα σύστημα. Οι πρωτεΐνες στη φυσική τους κατάσταση αποκτούν μία συμπαγή δομή με υψηλό βαθμό οργάνωσης, ενώ στην αποδιαταγμένη κατάσταση είναι ξεδιπλωμένες και μπορούν να υιοθετήσουν πολλές πιθανές διαμορφώσεις.

Η ενθαλπία είναι το μέτρο της ενέργειας που προέρχεται από μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των ατόμων των πρωτεϊνών όπως Van der Waals, δεσμούς υδρογόνου κ.α. Η ενεργειακή συνεισφορά των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων είναι πολύ σημαντική, διότι υπάρχει μεγάλος βαθμός διαφορετικότητας μεταξύ των αποδιαταγμένων δομών και της φυσικής κατάστασης και οι αλληλεπιδράσεις αυτές συνεισφέρουν με τον καλύτερα δυνατό τρόπο ώστε να δημιουργηθεί ένα συμπαγές μόριο. Ακριβέστερα, οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι ισχυρότερες στην φυσική από ότι στην αποδιαταγμένη κατάσταση. Η ολική διαφορά ενέργειας μιας πρωτεΐνης μεταξύ της αποδιαταγμένης και της φυσικής κατάστασης αποτελείται από το άθροισμα των διαφορών της εντροπίας και της ενθαλπίας και ονομάζεται διαφορά ελεύθερης ενέργειας.

Το γεγονός ότι η διαφορά ελεύθερης ενέργειας είναι της τάξης των 5- 15 kcal/mol υποδηλώνει ότι οι δύο καταστάσεις είναι σχεδόν ισόρροπες ενεργειακά. Έτσι, η σταθερότητα της φυσικής κατάστασης είναι οριακή και η ελεύθερη ενέργεια αποδιάταξης αντιστοιχεί σε ένα μικρό μόνο αριθμό ασθενών αλληλεπιδράσεων. Αυτή η πολύ μικρή διαφορά ενέργειας εξηγεί μερικώς τη δυσκολία της πρόβλεψης της τριτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης από την πρωτοταγή δομή βάσει ενεργειακών υπολογισμών.

Οι δεσμοί υδρογόνου, οι δυνάμεις Van der Waals, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, των πλευρικών ομάδων των καταλοίπων και διάφορων άλλων στοιχείων, και οι γέφυρες άλατος είναι γνωστό πως παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα των μορίων στη φυσική τους κατάσταση.

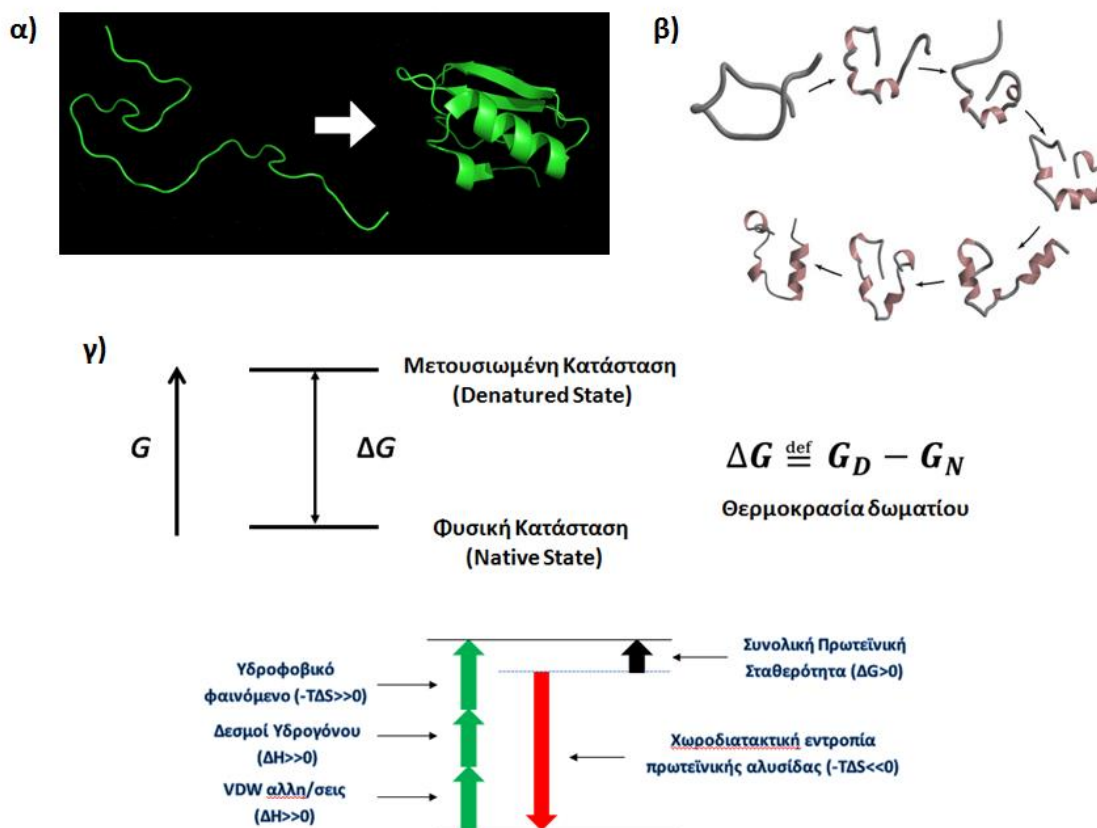
Η γνώση των βασικών αρχών της σταθερότητας των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για

την κατανόηση της δομής και λειτουργίας τους. Η σταθερότητα πρέπει να είναι αρκετή ώστε η πρωτεΐνη να μπορέσει να αναδιπλωθεί και να διατηρήσει τη φυσική της στερεοδιάταξη σε σχέση με τις υπόλοιπες δυνατές δομές, αλλά να επιτρέπει και την ευελιξία της πρωτεΐνης ώστε να μην καθίστανται αδύνατες στερεοδιαταξικές αλλαγές απαραίτητες για τον λειτουργικό της ρόλο. Ακριβέστερα, μια πρωτεΐνη στην φυσική της δομή δεν είναι στατική. Τα δευτεροταγή δομικά στοιχεία των αυτοτελών δομικών περιοχών, όπως και ολόκληρες οι αυτοτελείς δομικές περιοχές, συνεχώς εκτελούν μικρές κινήσεις στο χώρο, είτε μετατοπίσεις στο χώρο μεμονωμένων ατόμων είτε συλλογικές κινήσεις ομάδων ατόμων. Ακόμα, οι λειτουργικές δραστηριότητες πολλών πρωτεϊνών εξαρτώνται, πολλές φορές, από μεγάλες στερεοδιαταξικές αλλαγές, που προκαλούνται από την πρόσδεση υποκαταστατών (ligand binding).

Η οριακή σταθερότητα της φυσικής δομής σε σχέση με την αποδιαταγμένη δομή είναι, όπως αναφέραμε, βιολογικά πολύ σημαντική. Τα ζωντανά κύτταρα χρειάζονται διπλωμένες πρωτεΐνες σε σωστές ποσότητες την κατάλληλη στιγμή. Για να ολοκληρώνεται η αναδίπλωση μιας πρωτεϊνικής ακολουθίας σε διάστημα μεταξύ 0.1 και 1000 sec, όπως απαιτείται στο κύτταρο, πρέπει η πορεία αναδίπλωσης να κατευθύνεται με κάποιο τρόπο ακολουθώντας ένα μονοπάτι ασταθών ενδιαμέσων μετουσιωμένων μορφών, προκειμένου να αποφεύγεται το ψάξιμο ενός μεγάλου αριθμού άσχετων διαμορφώσεων (Neudecker et al., 2012; Rennella et al., 2012). Επομένως, η δίπλωση των πρωτεϊνών είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία. Στην εικόνα 7 παρατηρούμε το φαινόμενο της δίπλωσης των πρωτεϊνών από τη σκοπιά της θερμοδυναμικής καθώς και τα μονοπάτια της δίπλωσης (Brändén & Tooze, 2009; Dill & MacCallum, 2012).

Σημαντικό στο σημείο αυτό είναι να αναφερθεί ότι η ισορροπία μεταξύ των αλληλεπιδράσεων που αναφέρθηκαν, και ελέγχουν τη διαμόρφωση σταθερών πρωτεϊνών στον χώρο, επηρεάζεται από τους εξής παράγοντες: α) η θερμοκρασία: αύξηση της θερμοκρασίας, προκαλεί αύξηση της αταξίας των διαλελυμένων μορίων αλλά επίσης επιτρέπει μακρομοριακές διευθετήσεις υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας, β) το pH: αλλαγές του pH επηρεάζουν τόσο τον διαλύτη όσο και την διαλελυμένη ουσία, γ) τα αλάτια: δρουν με διάφορους τρόπους: (i) είναι υπεύθυνα για την ιοντική ισχύ και επηρεάζουν τις μακρομοριακές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η άπωση

μεταξύ ηλεκτρολυτών του ιδίου φορτίου μειώνεται, (ii) μπορούν να σχηματίζουν απευθείας αλληλεπιδράσεις με φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα (αργινίνη, λυσίνη, ασπαρτικό, γλουταμικό) στην επιφάνεια των πρωτεϊνών, (iii) δρουν με διπολικές-μονοπολικές αλληλεπιδράσεις με τις διπολικές ομάδες των μακρομορίων (πεπτιδικοί δεσμοί, άμινο, υδρόξυ, καρβοξυλικές ομάδες και αμίδια) και μπορούν να οδηγήσουν σε μερική αποδιάταξη της πρωτεΐνης, (iv) σχηματίζουν μη πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδροφοβικών καταλοίπων εκτεθειμένων στο διαλύτη και των υδροφοβικών τμημάτων των οργανικών αλατιών (σουλφονικών, καρβοξυλικών, αμμωνιακών), δ) οι ανταγωνιστές δεσμών υδρογόνου: μόρια όπως η ουρία, το φορμαμίδιο, τα γουανιδινικά αλάτια σε υψηλές συγκεντρώσεις (≥ 4 M) ανταγωνίζονται τους δεσμούς υδρογόνου των μορίων του νερού και τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου της πρωτεΐνης δρώντας σαν αποδιατακτικοί παράγοντες, ενώ στην αντίθετη περίπτωση σταθεροποιούν τους υδροφοβικούς δεσμούς, ε) οι οργανικοί διαλύτες: τροποποιούν την διηλεκτρική σταθερά και έτσι προκαλούν αλλαγές σε διάφορες αλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 7 Πρωτεϊνική σταθερότητα: α) το φαινόμενο της δίπλωσης των πρωτεϊνών, β) τα μονοπάτια της δίπλωσης και γ) θερμοδυναμική σταθερότητα των πρωτεϊνών.

1.4.1 ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι πρωτεΐνες των θερμόφιλων και υπερθερμόφιλων οργανισμών είναι μεγάλου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανική βιοτεχνολογία καθώς παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες σε σχέση με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες των μεσόφιλων, ενώ διατηρούν τα μοτίβα στερεοδιάταξης της πρωτεϊνικής οικογένειας στην οποία ανήκουν.

Οι περισσότερες απόπειρες διαλεύκανσης των μηχανισμών θερμοσταθερότητας περιλαμβάνουν συγκριτική θερμοδυναμική και αμινοξική ανάλυση ομόλογων πρωτεϊνών από οργανισμούς που διαβιούν σε πολύ διαφορετικές θερμοκρασίες. Η σύγκριση τέτοιων ομόλογων πρωτεϊνών αποτελεί ιδανικό μοντέλο μελέτης, καθώς οι θερμόφιλες και μεσόφιλες πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας συνήθως έχουν την ίδια λειτουργία, παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην αλληλουχία τους και την τριτοταγή δομή τους και χρησιμοποιούν τους ίδιους μηχανισμούς δράσης. Τα συνολικά συμπεράσματα των μελετών αυτών συγκλίνουν σε δύο γενικές αρχές σχετικά με την ασυνήθιστη σταθερότητα των πρωτεϊνών των θερμόφιλων οργανισμών:

- I. Οι δομικές αλλαγές που συμβάλλουν στη βελτιωμένη σταθερότητα των μορίων είναι σχετικά μικρής έκτασης.
- II. Η θερμοσταθερότητα δεν φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω ενός μοναδικού γενικού μηχανισμού, αλλά μέσω μιας ποικιλίας στρατηγικών που εφαρμόζονται συνδυαστικά.

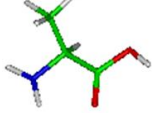
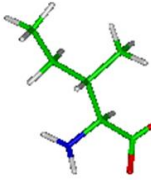
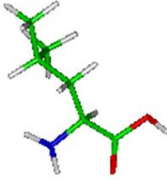
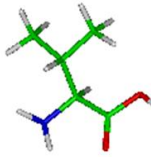
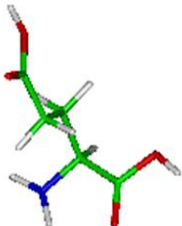
Αναλυτικότερα, έχει βρεθεί ότι τα βασικά χαρακτηριστικά των θερμόφιλων πρωτεϊνών είναι τα εξής:

- 1) Έχουν μεγαλύτερο υδρόφοβο πυρήνα.
- 2) Έχουν περισσότερες αλληλεπιδράσεις ιόντων.
- 3) Έχουν περισσότερα δίκτυα δεσμών υδρογόνου.
- 4) Σταθεροποιούνται από μοριακούς συνοδούς (chaperons).
- 5) Έχουν περισσότερους δισουλφιδικούς δεσμούς.
- 6) Τα αμινοξέα Gly, Ser, Lys, Asp, Trp που παρατηρούνται σε μεσόφιλες πρωτεΐνες αντικαθίστανται από Ala, Thr, Arg, Glu, Tyr στις θερμόφιλες.

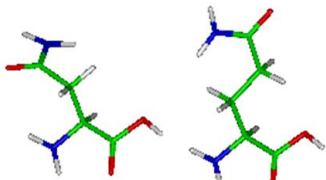
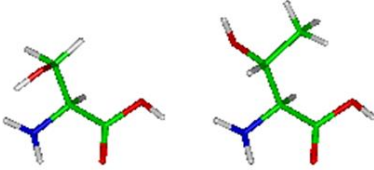
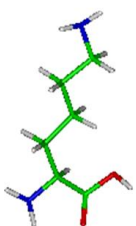
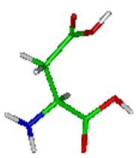
- 7) Διαθέτουν περισσότερα υδρόφοβα κατάλοιπα, περισσότερα φορτισμένα και λιγότερα μη φορτισμένα πολικά κατάλοιπα στην επιφάνεια δημιουργώντας περισσότερους δεσμούς άλατος και ζεύγη ιόντων ή ιοντικών δικτύων.
- 8) Έχουν περίπου ίδια κατανομή πολικών και μη πολικών αμινοξέων στην επιφάνειά τους.
- 9) Διαθέτουν αυξημένη πυκνότητα πακεταρίσματος.
- 10) Οι στροφές στην επιφάνειά τους έχουν μικρότερο μήκος.
- 11) Χαρακτηρίζονται από μικρότερο μήκος πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Στον πίνακα 1- 3 καταγράφονται τα αμινοξέα που έχουν μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στις θερμοφιλικές πρωτεΐνες, ενώ στον πίνακα 1- 4 καταγράφονται τα αμινοξέα με μικρή συχνότητα εμφάνισης σε θερμοφιλικές και υπερθερμοφιλικές πρωτεΐνες.

Πίνακας 1- 3 Αμινοξέα με μεγάλη συχνότητα εμφάνισης σε θερμοφίλες πρωτεΐνες.

Αμινοξέα με μεγάλη συχνότητα εμφάνισης	
 Alanine (Ala, A)  Isoleucine (Ile, I)  Leucine (Leu, L)  Valine (Val, V)	Μη πολικά αμινοξέα, συνεισφέρουν στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.
 Arginine (Arg, R)	Πολικό, σταθεροποιεί την εξωτερική επιφάνεια της πρωτεΐνης.
 Glutamic Acid (Glu, E)	Δημιουργεί δεσμούς άλατος.
 Proline (Pro, P)	Μη πολικό, συνεισφέρει στο καλύτερο πακετάρισμα λόγω συμμετοχής σε στροφές.

Πίνακας 1- 4 Αμινοξέα με μικρή συχνότητα εμφάνισης σε θερμοφιλικές πρωτεΐνες.

Αμινοξέα με μικρή συχνότητα εμφάνισης	
 Asparagine (Asn, N) Glutamine (Gln, Q)	Μη πολικά, υφίστανται απαμίνωση σε υψηλές θερμοκρασίες.
 Serine (Ser, S) Threonine (Thr, T)	Μη πολικά, προκαλούν deamidation στα Gln, Asn.
 Methionine (Met, M) Cysteine (Cys, C)	Μη πολικά, υφίστανται οξείδωση σε υψηλές θερμοκρασίες.
 Lysine (Lys, K)	Πολικό, φορτισμένο, αντικαθίσταται από Glu, Arg.
 Aspartic Acid (Asp, D)	Μη σταθερό σε υψηλές θερμοκρασίες.

Συνοψίζοντας, μπορούμε να παρατηρήσουμε πως η αυξημένη σταθερότητα των θερμόφιλων πρωτεϊνών είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης αλλαγών που αφορούν ασθενείς αλληλεπιδράσεις, με στόχο να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της αυξημένης εντροπίας του συστήματος σε υψηλές θερμοκρασίες (Beeby et al., 2005; Haslbeck, Franzmann, Weinfurtner, & Buchner, 2005; Kawashima et al., 2000; Kimura & Wilson, 1983; Russell, Ferguson, Hough, Danson, & Taylor, 1997; Sadeghi, Naderi-Manesh, Zarrabi, & Ranjbar, 2006; Schumann, Bohm, Schumacher, Rudolph, & Jaenicke, 1993; Trivedi, Gehlot, & Rao, 2006).

1.5 ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ.

Η ποικιλομορφία της ζωής στη Γη είναι αποτέλεσμα των αέναων εξελικτικών διαδικασιών που ξεκίνησαν κατά τη προέλευση της ζωής. Η εξέλιξη είναι η θεμελιώδης στρατηγική ανάπτυξης της ζωής. Σήμερα, οι μελέτες των γονιδιακών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών παρέχουν τη δυνατότητα μελέτης και παρατήρησης αυτών των εξελικτικών γεγονότων και διαδικασιών. Ωστόσο, τα δεδομένα που υπάρχουν ως προς τις αλληλουχίες, περιορίζονται μόνο σε υφιστάμενα γονίδια και πρωτεΐνες, με εξαίρεση κάποιων σπάνιων δειγμάτων γονιδιώματος που έχουν προκύψει από απολιθώματα (Callaway, 2010; Paabo et al., 2004), όπως για παράδειγμα ο Νεάντερταλ (Green et al., 2010), το αρχαϊκό ανθρωποειδές στη Σιβηρία (Krause et al., 2010; Reich et al., 2010), και οι αρχαίοι ελέφαντες, όπως τα μαστόδοντα και τα μαμούθ (Rohland et al., 2010). Το αρχείο των απολιθωμάτων, και οι αλληλουχίες των γονιδιωμάτων που προέρχονται από αυτό, έχουν τη δυνατότητα να διευκρινίσουν αρχαίες, εξαφανισμένες μορφές ζωής, που ενεργούν ως ελλείπουσες συνδέσεις για να συμπληρωθούν τα εξελικτικά κενά. Ωστόσο, το αλληλουχημένο από απολιθώματα γονιδίωμα είναι πολύ περιορισμένο, κυρίως λόγω της κατάστασης των δειγμάτων και των δυσκολιών που ανακύπτουν κατά την προετοιμασία τους.

Η ανακάλυψη των μορφών των αρχαίων οργανισμών είναι ένας από τους βασικούς σκοπούς της παλαιοντολογίας, και είναι πολύτιμη για την κατανόηση των μορφών της τρέχουσας ζωής, καθώς αυτές θα είναι μια αντανάκλαση της εξελικτικής ιστορίας τους. Ωστόσο, η ανασυγκρότηση ενός ζωντανού οργανισμού από απολιθώματα, η οποία θα αποτελούσε την απόλυτη παλαιοντολογική μεθοδολογία, είναι πολύ πέρα

από τις επί του παρόντος διαθέσιμες τεχνολογίες, παρόλο που υπήρξε πρόσφατα μια μελέτη κατά την οποία παράχθηκε το πρώτο τεχνητό βακτηριακό κύτταρο χρησιμοποιώντας χημικώς συνθετικό γονιδίωμα (Gibson et al., 2010).

Είναι χαρακτηριστικό το ότι το 1963, οι L. Pauling και E. Zuckerkandl προφήτευσαν ότι θα ήταν δυνατόν μια ημέρα να συναχθούν οι αλληλουχίες γονιδίων των προγονικών ειδών, να συντεθούν αυτά τα τεκμηριωμένα μόρια των εξαφανισμένων οργανισμών.... και τελικά να μελετηθούν οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Σήμερα, για τα γονίδια ή τις πρωτεΐνες που αυτά κωδικοποιούν, είναι εφικτό να ανασυντεθούν οι προγονικές τους μορφές χρησιμοποιώντας φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάζονται από τα δεδομένα που ανακύπτουν από αλληλουχίες. Αυτές οι τεχνικές μπορούν κάλλιστα να παρέχουν ενδείξεις για την εξελικτική ιστορία ορισμένων σωζόμενων γονιδίων και πρωτεϊνών σε σχέση με τους προγόνους τους. Έτσι, οι φυλογενετικές αναλύσεις από μόνες τους, ή σε συνδυασμό με προσομοιώσεις ως προς τη δομή της πρωτεΐνης, είναι χρήσιμες για την ανάλυση των σχέσεων δομής-λειτουργίας και εξελικτικής ιστορίας (Lai, Jin, Kubelka, & Liberles, 2012), ενώ σε συνδυασμό με την ανασυγκρότηση αρχαίων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν περισσότερες άμεσες παρατηρήσεις. Η σύνθεση προγονικών πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί συγκριτικά εύκολα λόγω της ανάπτυξης στον κλάδο της μοριακής βιολογίας και στις τεχνικές της πρωτεϊνικής μηχανικής, οι οποίες επιτρέπουν τη σύνθεση νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών αλληλουχιών. Προγονικές πρωτεΐνες μπορούν πλέον να μελετώνται στο εργαστήριο χρησιμοποιώντας βιοχημικές ή βιοφυσικές μεθόδους, ως προς την ενεργότητα, τη σταθερότητα, την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, και ακόμη και ως προς τη τρισδιάστατη δομή τους.

Έτσι, η ανασυγκρότηση προγονικών αλληλουχιών (Ancestral Sequence Reconstruction, ASR) έχει αποδειχθεί ένα χρήσιμο πειραματικό εργαλείο για τη μελέτη της ποικιλομορφίας που παρατηρείται ως προς τη δομή και τη λειτουργία ανάμεσα στις πρωτεΐνες (Harms & Thornton, 2010). Μέχρι σήμερα, αυτή η «πειραματική μοριακή αρχαιολογία ή αλλιώς πρωτεϊνικό μαστόρεμα», με τη χρήση ASR έχει εφαρμοστεί σε αρκετά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων των φωτοδραστικών πρωτεϊνών (Chang, Jonsson, Kazmi, Donoghue, & Sakmar, 2002; Chang, Ugalde, & Matz, 2005; Chinen, Matsumoto, & Kawamura, 2005; Shi & Yokoyama, 2003;

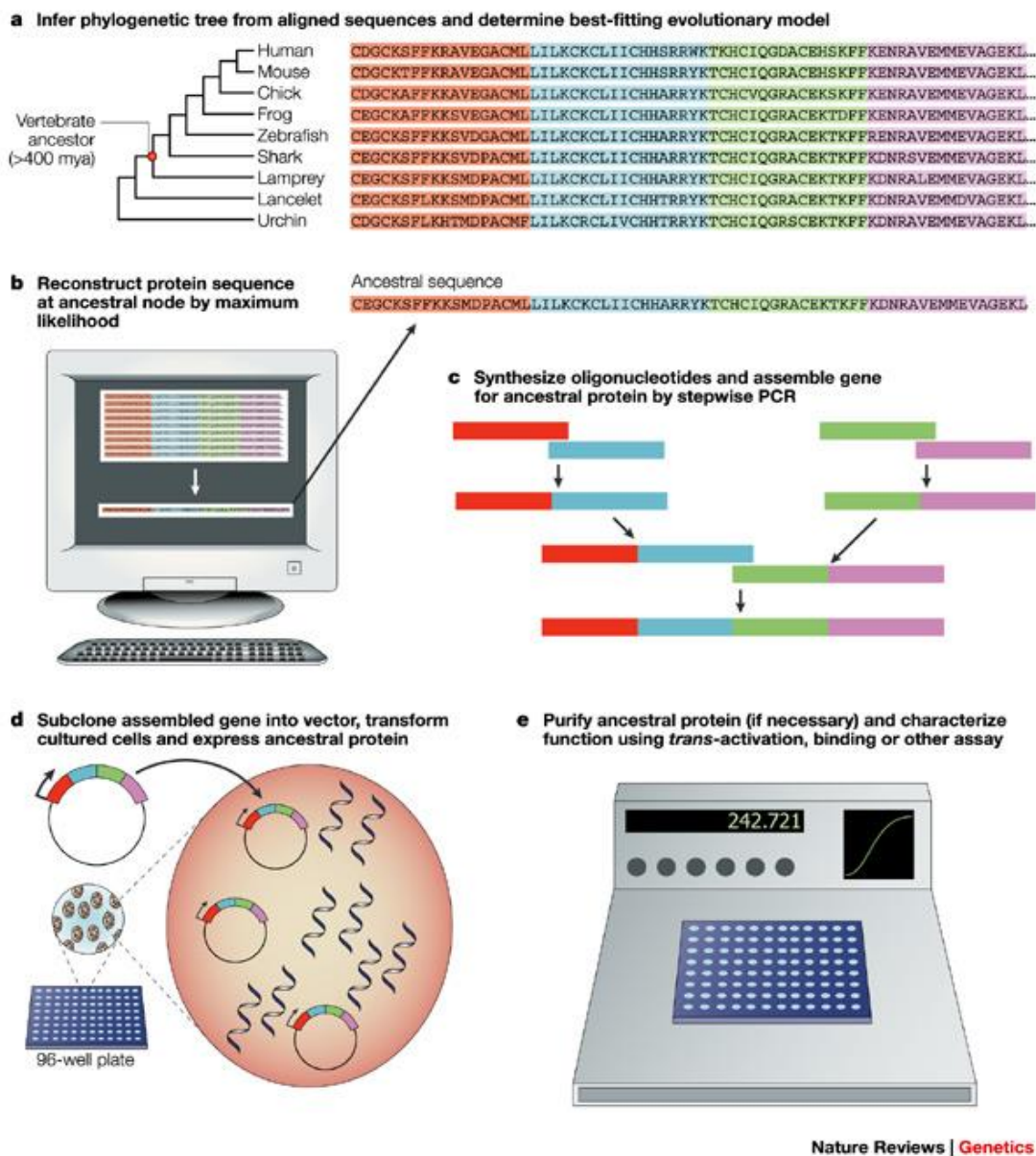
Yokoyama & Takenaka, 2004), πρωτεϊνών του πυρηνικού υποδοχέα και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (Bridgham, Carroll, & Thornton, 2006; Bridgham et al., 2010; Thornton, 2001, 2004; Thornton, Need, & Crews, 2003), λεκτινών (Konno, Ogawa, Shirai, & Muramoto, 2007; Yadid & Tawfik, 2011), ικών πρωτεϊνών (Gullberg et al., 2010; Kaiser, Malik, & Emerman, 2007), του παράγοντα επιμήκυνσης (Gaucher, Das, Miyamoto, & Benner, 2002; Hult, Weadick, Chang, & Tobe, 2008), της παραλβουμίνης (Whittington & Moerland, 2012), και σε μια σειρά άλλων πεπτιδίων και πρωτεϊνών (Hult et al., 2008).

1.5.1 ‘‘ΑΝΑΣΤΑΙΝΟΝΤΑΣ’’ ΜΙΑ ΠΡΟΓΟΝΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ (ANCESTRAL SEQUENCE RESURRECTION)

Προγονικά γονίδια μπορούν όπως αναφέραμε να ανακατασκευαστούν ("να αναστηθούν"), να εκφραστούν και λειτουργικά να χαρακτηριστούν, χάρη στις βελτιωμένες τεχνικές για τη πρόβλεψη και σύνθεση των προγονικών ακολουθιών. Η προσέγγιση αυτή, γνωστή ως «ανασύσταση ή ανασυγκρότηση προγονικών αλληλουχιών», Ancestral Sequence Reconstruction/ Resurrection, όπως αναφέραμε και παραπάνω, προσφέρει ένα ισχυρό νέο εργαλείο για εμπειρικό έλεγχο υποθέσεων σχετικά με την λειτουργία των γονιδίων από το βαθύ εξελικτικό παρελθόν.

Η ανασυγκρότηση ενός προγονικού γονιδίου περιλαμβάνει πέντε βήματα (Εικόνα 8).

1) Στο πρώτο στάδιο, οι αλληλουχίες που κατάγονται από το προγονικό γονίδιο λαμβάνονται και ευθυγραμμίζονται- μαζί με αλληλουχίες εξωομάδων και ανακτάται δέντρο που αναπαριστά τις σχέσεις τους. Σε αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιούνται αμινοξικές αλληλουχίες καθώς περιέχουν λιγότερο «θόρυβο» από τις αντίστοιχες αλληλουχίες DNA, διότι υπόκεινται περισσότερο σε σύγκλιση και αντιστροφή. Φυλογενετικές μέθοδοι, όπως η μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony) ή αυτή της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood, ML) ή και άλλες, στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για να συναχθεί η καλύτερη εκτίμηση της προγονικής κατάστασης για κάθε τμήμα της αλληλουχίας που δίνουν τα σημερινά δεδομένα αλληλουχιών.



Εικόνα 8 Η στρατηγική της προγονικής ανασυγκρότησης γονιδίου.

2) Στο δεύτερο στάδιο, μια αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί την προγονική πρωτεΐνη τεκμηριώνεται- εκτιμάται με βάσει τον γενετικό κώδικα. Επιλέγονται τα κωδικόνια (codon usage- codon bias) με βάση το σύστημα στο οποίο το γονίδιο θα εισαχθεί και θα εκφραστεί έτσι ώστε να βελτιωθεί ο μεταφραστικός ρυθμός. 3) Η κωδική αλληλουχία παράγεται έπειτα *de novo* (τρίτο βήμα) με σύνθεση επικαλυπτόμενων ολιγονουκλεοτιδίων και συναρμολόγησή τους με PCR ή με πέψη περιορισμού / αντίδραση λιγάσης, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση εάν η προγονική αλληλουχία μπορεί να φτιαχτεί με

την εισαγωγή μόνο λίγων αλλαγών σε ένα ήδη υπάρχον γονίδιο. 4) Στο τέταρτο στάδιο, το προγονικό γονίδιο κλωνοποιείται μέσα σε ένα πλασμίδιο που επιτρέπει την υψηλή έκφρασή του, και με το πλασμίδιο στη συνέχεια μετασχηματίζονται κύτταρα βακτηρίων ή θηλαστικών. 5) Τέλος, η προγονική πρωτεΐνη μπορεί να καθαριστεί εάν είναι απαραίτητο και οι λειτουργίες της να χαρακτηριστούν χρησιμοποιώντας διάφορες πειραματικές δοκιμές (Thornton, 2004).

1.6 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Η ανάπτυξη των φυλογενετικών μεθόδων για τη πρόβλεψη των αλληλουχιών προγονικών γονιδίων αποτελεί τη πιο σπουδαία πρόοδο για τη πραγματοποίηση των σύγχρονων μελετών γονιδιακής ανασυγκρότησης. Τρεις είναι οι φυλογενετικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα στην πειραματική πρωτεϊνική αρχαιολογία: 1) η μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony), 2) η μέθοδος της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood), και 3) η μέθοδος της μπεϊσιανής ανάλυσης (bayesian phylogenetic inference). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μπεϊσιανής ανάλυσης.

Στην μπεϊσιανή στατιστική ανάλυση (Bayesian phylogenetic inference) χρησιμοποιείται η συνάρτηση πιθανοφάνειας και συνήθως τα ίδια μοντέλα εξελικτικών μεταλλάξεων όπως και στην μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας. Διαφέρει ωστόσο, τόσο σε θεωρητικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο εφαρμογών. Η μπεϊσιανή ανάλυση χρησιμοποιεί το θεώρημα του Bayes, το οποίο σχετίζει την εκ των υστέρων (posterior) πιθανότητα ενός δέντρου με την εκ των προτέρων (prior) πιθανότητα του δέντρου και του μοντέλου αντικατάστασης.

1.7 Η ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ- Χ ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

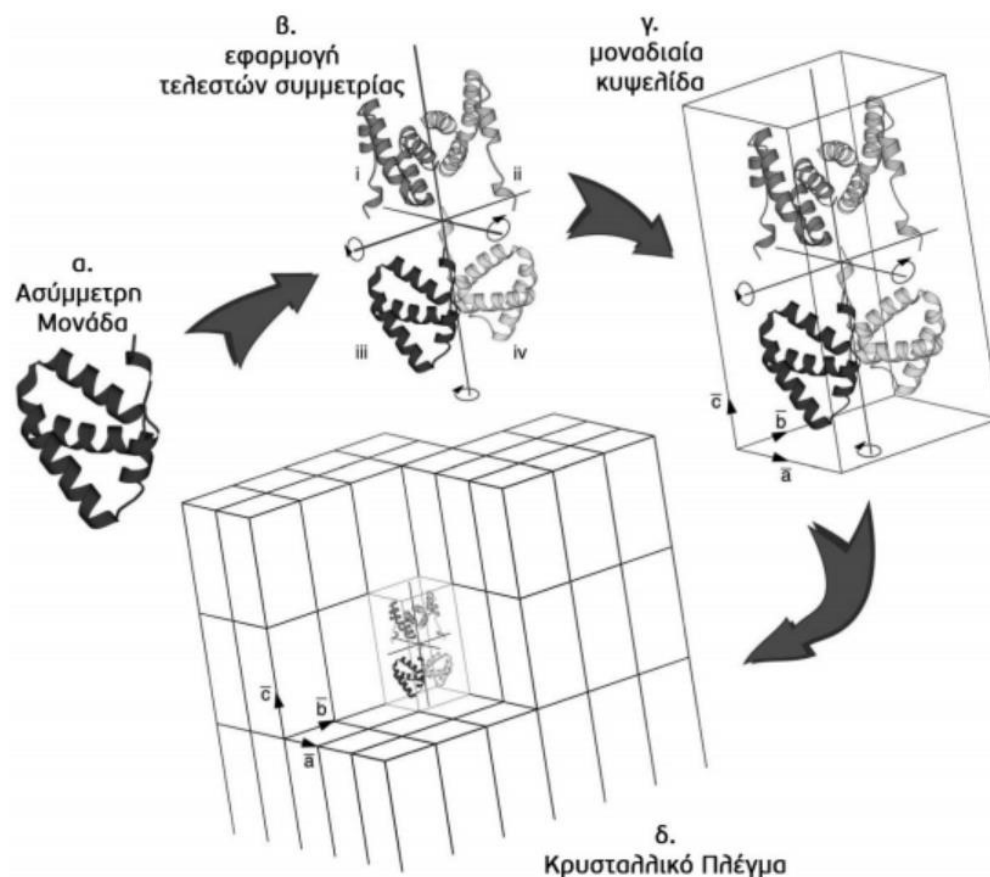
Το επιστημονικό πεδίο που αφορά στη συστηματική μελέτη της κατανομής, τροποποίησης και αλληλεπίδρασης των γονιδιακών προϊόντων (συνήθως πρωτεϊνών) είναι ευρέως γνωστό ως Λειτουργική Γονιδιωματική (Functional Genomics) και σημαντικός της κλάδος είναι η Δομική Γονιδιωματική (Structural Genomics). Η τελευταία έχει ως αντικείμενο το συστηματικό προσδιορισμό της δομής των

πρωτεϊνών για την κατανόηση της φυσιολογίας των κυττάρων σε μοριακό επίπεδο (Heinemann, Illing, & Oschkinat, 2001).

Μία από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές για τον προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνών σε υψηλή διακριτική ικανότητα είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων- X. Το 90% των κατατεθειμένων δομών στη βάση δεδομένων Protein Data Bank (PDB) έχει προσδιοριστεί με αυτή τη μέθοδο. Στη ραγδαία εξάπλωση της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας συνέβαλλαν η χρήση της συγχροτρονικής ακτινοβολίας από τις αρχές της δεκαετίας του '80, η συλλογή δεδομένων υπό κρυογενείς συνθήκες, η εφαρμογή της μεθόδου της ανώμαλης σκέδασης για τον προσδιορισμό των φάσεων. Φυσικά η χαρτογράφηση του γονιδιώματος του ανθρώπου (2001) καθώς και πολλών άλλων οργανισμών σε συνδυασμό με τις τεχνικές της μοριακής βιολογίας οδήγησαν σε μία έκρηξη του διαθέσιμου προς έρευνα υλικού (Jaskolski, 2010).

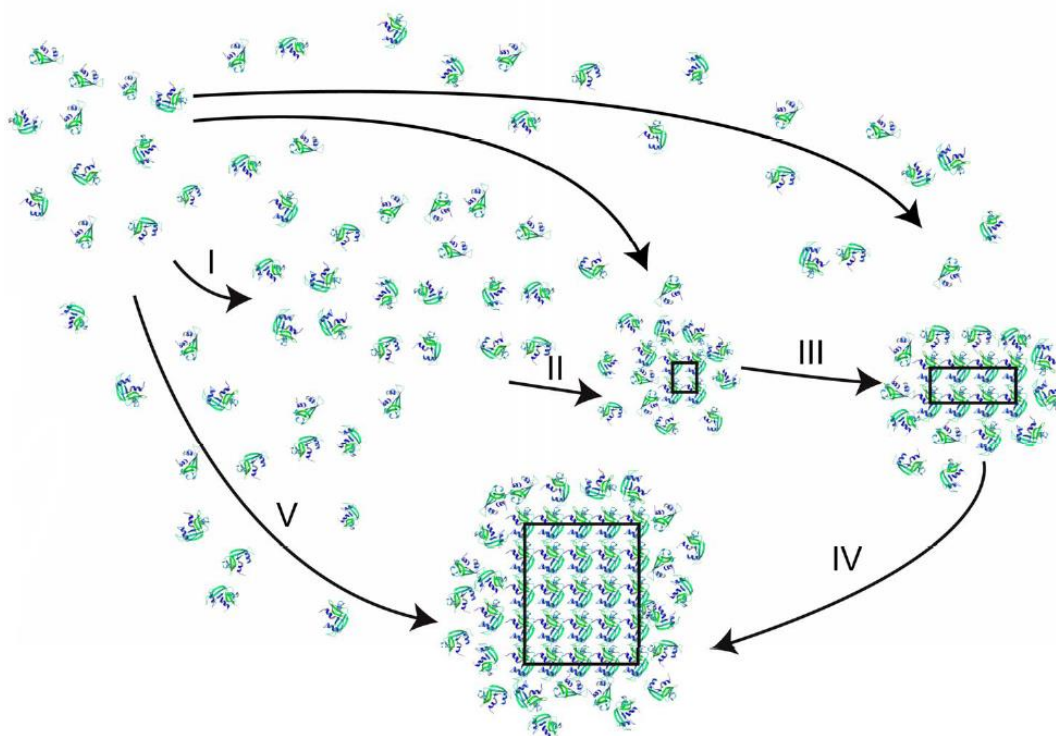
Η κρυσταλλογραφία αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο προσδιορισμού των σχετικών θέσεων των ατόμων των μορίων στο χώρο και η βασική της αρχή στηρίζεται στη περίθλαση των ακτίνων- X από έναν κρύσταλλο του μακρομορίου. Ο κρύσταλλος είναι η κανονική, επαναλαμβανόμενη διευθέτηση ατόμων ή μορίων σε τρεις διαστάσεις. Αποτελείται από όμοιες κυψελίδες που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και επαναλαμβάνονται στις τρεις διαστάσεις, ώστε να δημιουργούν ένα κανονικό τρισδιάστατο πλέγμα. Η κρυσταλλική δομή αποτελείται από μία περιοδικά επαναλαμβανόμενη βασική δομική μονάδα, την μοναδιαία κυψελίδα, που επεκτείνεται προς τις τρεις διαστάσεις (McPherson, 2004). Η τελευταία μπορεί να περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα μόρια ή ένα ή περισσότερα μόρια και ένα ή περισσότερα μόρια προσδέτη και διαλύτη (Εικόνα 9).

Επομένως, μελετώντας την ασύμμετρη μονάδα (μικρότερο δυνατό τμήμα της δομής που δεν επαναλαμβάνεται χωρίς συμμετρία στον χώρο) της κυψελίδας και προσδιορίζοντας τις θέσεις των ατόμων της, αποκτάται μια ολοκληρωμένη εικόνα του κρυστάλλου. Η κρυστάλλωση είναι απαραίτητη καθώς η μέθοδος στηρίζεται στην περίθλαση των ακτίνων- X όπως αναφέραμε και παραπάνω. Οι ακτίνες- X από ένα μόνο μόριο θα ήταν εξαιρετικά ασθενείς και μη ανιχνεύσιμες. Οι κρύσταλλοι δηλαδή λειτουργούν ως ενισχυτές του σήματος περίθλασης.



Εικόνα 9 Σχηματική αναπαράσταση της ασύμμετρης μονάδας, από την οποία με εφαρμογή κατάλληλων τελεστών συμμετρίας προκύπτει η μοναδιαία κυψελίδα. Από την επανάληψη της μοναδιαίας κυψελίδας σε διατεταγμένη μορφή σχηματίζεται ο κρύσταλλος.

Η κρυστάλλωση ενός μορίου και γενικότερα οποιασδήποτε χημικής ουσίας συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε δύο διαφορετικά, ωστόσο αλληλοεξαρτώμενα, στάδια: α) την πυρήνωση και β) την ανάπτυξη του κρυστάλλου (Εικόνα 10). Η πυρήνωση είναι ένα φαινόμενο δύσκολο να προσεγγιστεί τόσο θεωρητικά όσο και πειραματικά καθότι πρόκειται για αλλαγή φάσης πρώτης τάξης κατά την οποία τα μόρια μεταβαίνουν από μία τελείως τυχαία σε μία οργανωμένη διάταξη. Είναι πιθανό αυτό να συμβαίνει μέσω του σχηματισμού μερικώς δομημένων ή παρακρυσταλλικών ενδιάμεσων – σε αυτή την περίπτωση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων – τα οποία τελικά μετατρέπονται σε μικρές οργανωμένες δομές, τους «κρίσιμους πυρήνες» (Brändén & Tooze, 2009).

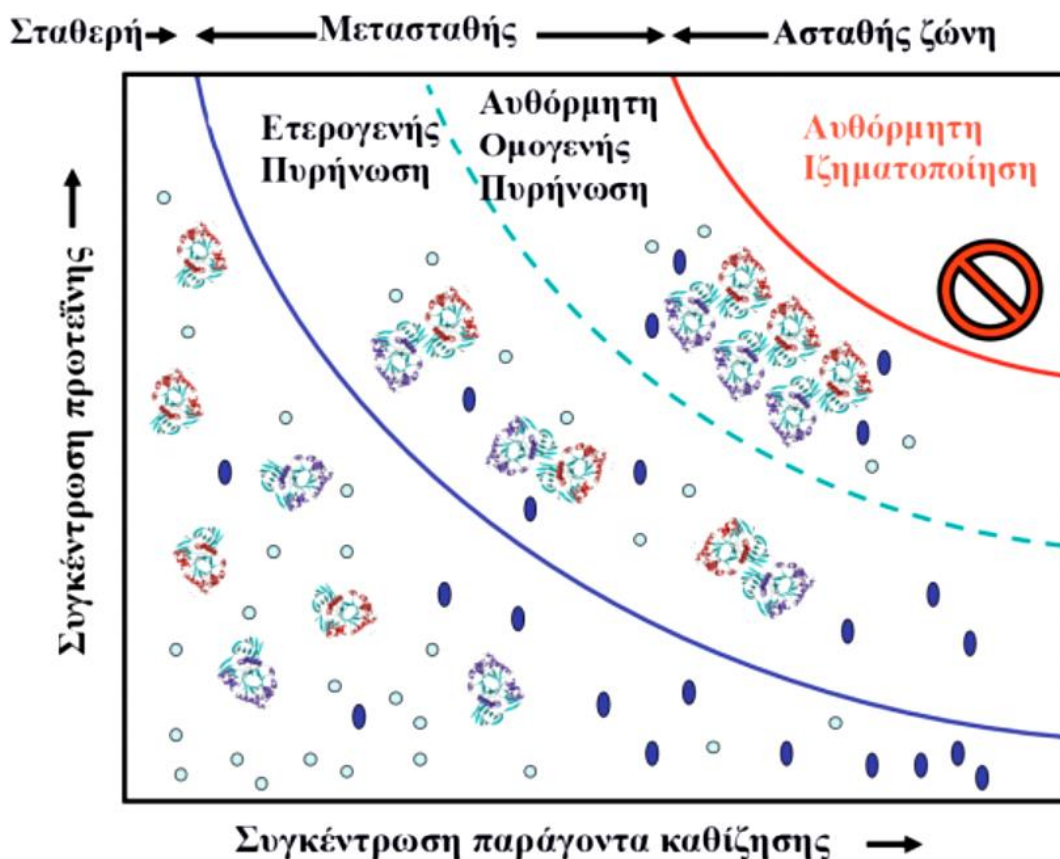


Εικόνα 10 Μονοπάτια πυρήνωσης για κρυστάλλους μακρομορίων.

Αναγκαία προϋπόθεση για την κρυστάλλωση των μακρομορίων είναι η δημιουργία κατάστασης υπερκορεσμού. Πρόκειται για μία θερμοδυναμικά ασταθή κατάσταση κατά την οποία η μακρομοριακή ουσία βρίσκεται σε διαλυμένη μορφή ενώ οι φυσικοχημικές συνθήκες του διαλύματος βρίσκονται εκτός του ορίου διαλυτότητάς της. Η ισορροπία αποκαθίσταται με το σχηματισμό στερεής φάσης όπως είναι οι κρύσταλλοι μέχρι να αποκατασταθεί η κατάσταση κορεσμού. Ο υπερκορεσμός επιτυγχάνεται με αλλαγή των ιδιοτήτων ενός ακόρεστου διαλύματος του βιομορίου έτσι ώστε να μειωθεί η διαλυτότητά του ή να αυξηθούν οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των διαλυμένων μορίων. Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την πυρήνωση και κρυσταλλική ανάπτυξη βιολογικών μακρομορίων. Ένας καθοριστικός παράγοντας που ρυθμίζει την κρυστάλλωση είναι οι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως κατακρημνιστές. Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για ουσίες (π.χ. PEG, αλάτια, κ.α.) που προστίθενται στο πρωτεϊνικό διάλυμα με σκοπό να αποδυναμώσουν τις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με τα μόρια του νερού που την περιβάλλουν και να ευνοήσουν έτσι τον σχηματισμό συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση του κατακρημνιστή είναι από τις κύριες παραμέτρους που εξετάζονται σε πειράματα κρυστάλλωσης. Επιπρόσθετα, οι ενδογενείς φυσικοχημικές παράμετροι του

συστήματος (υπερκορεσμός, θερμοκρασία, pH, χρόνος, ιοντική ισχύς και καθαρότητα των χημικών, διάχυση και μεταφορά, όγκος και γεωμετρία του δείγματος και των πειραματικών συσκευών (επιφάνεια των συσκευών κρυστάλλωσης), στερεά σωματίδια, αλληλεπιδράσεις με τα τοιχώματα και με τις διάμεσες επιφάνειες, κ.α), οι βιοχημικές και βιοφυσικές παράμετροι (ευαισθησία της δομής της πρωτεΐνης σε φυσικές παραμέτρους, δέσμευση άλλων υποκαταστατών (υποστρώματα, συνπαράγοντες, μεταλλικά ιόντα, άλλα ιόντα), ειδικές πρόσθετες ουσίες (ανταγωνιστικές ουσίες, μη ιοντικά απορρυπαντικά, πολυαμίνες), ιδιότητες των πρωτεϊνών (οξειδωση, υδροφοβικότητα, υδροφιλικότητα, κ.α), οι βιολογικές παράμετροι (πολύ μικρές ποσότητες των περισσοτέρων πρωτεϊνών στην φύση, βιολογικές πηγές και φυσιολογική κατάσταση των οργανισμών ή των κυττάρων που περιέχουν τις πρωτεΐνες (θερμόφιλοι, ψυχρόφιλοι, αλλόφιλοι, μεσόφιλοι οργανισμοί, στατική ή αναπτυσσόμενη φάση κυττάρων), επιμολύνσεις) καθώς και η καθαρότητα των μακρομορίων αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία της κρυστάλλωσης.

Η διαδικασία κρυστάλλωσης μπορεί να απεικονιστεί σε ένα διάγραμμα φάσεων (Εικόνα 11) που δείχνει ποια κατάσταση (υγρό, κρυσταλλικό ή άμορφο στερεό ίζημα) είναι σταθερή κάτω από διάφορες παραμέτρους κρυστάλλωσης. Παρέχει ένα μέσο για την ποσοτικοποίηση της επιρροής των παραμέτρων στην παραγωγή των κρυστάλλων. Ως εκ τούτου, τα διαγράμματα φάσεων αποτελούν τη βάση για το σχεδιασμό των συνθηκών ανάπτυξης των κρυστάλλων (Chayen et al., 1996; Koszelak, Leja, & McPherson, 1996; McPherson, 1997). Η εικόνα 8 αποτελεί ένα παράδειγμα ενός τυπικού διαγράμματος φάσεων κρυστάλλωσης. Σχηματικά απεικονίζονται τέσσερις περιοχές: α) μια περιοχή πολύ υψηλού υπερκορεσμού, όπου η πρωτεΐνη θα καθιζάνει, β) μια περιοχή μέτριου υπερκορεσμού όπου θα πραγματοποιηθεί αυθόρμητη πυρήνωση, γ) μια περιοχή υπερκορεσμού κάτω ακριβώς από την περιοχή πυρήνωσης, όπου οι κρύσταλλοι είναι σταθεροί και μπορεί να αυξηθούν, αλλά δε θα λάβει χώρα περαιτέρω πυρήνωση (αυτή η περιοχή αναφέρεται ως μετασταθής ζώνη η οποία πιστεύεται ότι περιέχει τις καλύτερες συνθήκες για την ανάπτυξη μεγάλων και καλά οργανωμένων κρυστάλλων) και δ) μια περιοχή υποκορεσμού όπου η πρωτεΐνη έχει διαλυθεί πλήρως και ποτέ δεν θα κρυσταλλωθεί (Chayen, 1996; Chayen et al., 1996).



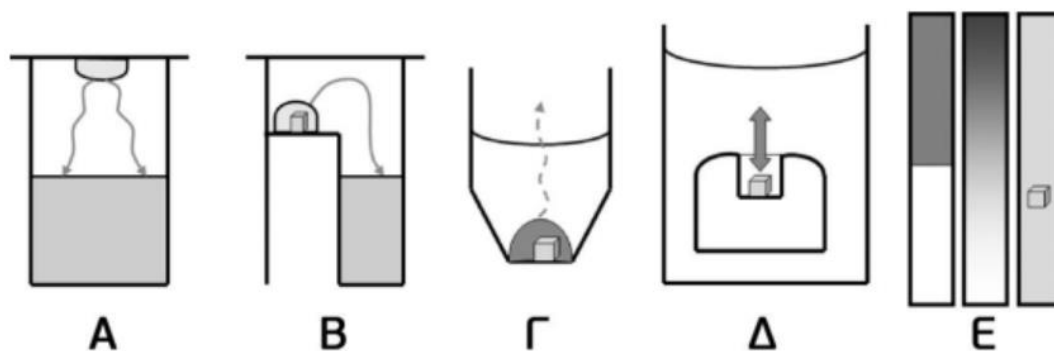
Εικόνα 11 Το διάγραμμα φάσεων κρυστάλλωσης.

Σε ένα ιδανικό πείραμα, αφού έχουν σχηματιστεί πυρήνες, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα θα μειωθεί, οδηγώντας έτσι φυσικά το σύστημα στη μετασταθή ζώνη, όπου η ανάπτυξη θα συμβεί, χωρίς το σχηματισμό περαιτέρω πυρήνων (Bergfors, 1999, 2009). Ωστόσο, ένα ιδανικό πείραμα δε συμβαίνει συχνά και τις περισσότερες φορές προκαλείται περίσσεια πυρήνωσης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολλών χαμηλής ποιότητας κρυστάλλων. Ο στόχος είναι ως εκ τούτου να επινοηθούν μέθοδοι που θα επιτρέψουν στον ερευνητή να οδηγήσει το πείραμα από την πυρήνωση στην ανάπτυξη ώστε να εξασφαλιστούν τα επιθυμητά αποτελέσματα (Chayen, 2005).

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιείται για την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι σχετικά απλή. Σε γενικές γραμμές, η πρωτεΐνη διαλυτοποιείται σε ήπιο ρυθμιστικό διάλυμα, αναμιγνύεται με το διάλυμα κρυστάλλωσης μέσα σε ένα κλειστό σύστημα και το μίγμα αφήνεται να φθάσει σε κατάσταση ισορροπίας μέχρι εκεί που

επιτρέπει η κινητική του συστήματος. Διάφορες τεχνικές κρυστάλλωσης με παραλλαγές ως προς τον τρόπο ανάμιξης και εξισορρόπησης έχουν αναπτυχθεί, όπως είναι η τεχνική άμεσης προσθήκης παράγοντα κατακρήμνισης (Batch), η τεχνική εξάτμισης και διάχυσης των ατμών (Vapor diffusion), η διαπίδυση (Dialysis) και η διάχυση ελεύθερης επιφάνειας (Free–interface diffusion). Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι η τεχνική διάχυσης των ατμών με κρεμάμενη (Hanging Drop Vapor Diffusion – HDVD) ή καθήμενη σταγόνα (Sitting Drop Vapor Diffusion – SDVD –) (Εικόνα 12). Η διάταξη περιλαμβάνει κλειστό σύστημα το οποίο αποτελείται από ένα βοθρίο που φέρει τη σταγόνα (μίγμα πρωτεΐνης και διαλύματος κρυστάλλωσης) και μία δεξαμενή με διάλυμα κρυστάλλωσης. Το διάλυμα της δεξαμενής απορροφά ατμούς ύδατος από τη σταγόνα λόγω της διαφοράς στη συγκέντρωση των επιμέρους συστατικών του. Η δε πρωτεΐνη που βρίσκεται στη σταγόνα οδηγείται με τον τρόπο αυτό σε κατάσταση υπερκορεσμού και κατ’ επέκταση σε ανάπτυξη κρυστάλλων (Korczynska et al., 2007).

Άλλες μέθοδοι περιλαμβάνουν την κρυστάλλωση όπου το προ κρυστάλλωση διάλυμα τοποθετείται σε ελαιώδες περιβάλλον και αφήνεται μέχρι να σχηματιστούν κρύσταλλοι (microbatch under oil)(Loll, Tretiakova, & Soderblom, 2003). Η μέθοδος ευνοεί τη διαχείριση μικρών όγκων, αν και η συγκομιδή είναι δυσκολότερη. Η μικροδιαπίδυση (microdialysis) (Bunick, North, & Stubbs, 2000; Trakhanov, 1989) αυτοματοποιείται δύσκολα, ενώ η διάχυση ελεύθερης επιφάνειας (free interface diffusion) χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο (Salemme, 1972, 1985; Segelke, 2005), αλλά η αυτοματοποίηση και η συγκομιδή είναι στοιχεία που χρήζουν βελτίωσης. Οι μέθοδοι διασχίζουν το διάγραμμα φάσης κρυστάλλωσης με μια διαφορετική διαδρομή και δεν παράγουν αναγκαστικά τα ίδια αποτελέσματα στις ίδιες συνθήκες (Rupp & Wang, 2004).



Εικόνα 12 Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης των κυριότερων τεχνικών διάχυσης: Α. Με κρεμάμενη σταγόνα, Β. Με καθήμενη σταγόνα, Γ. Τεχνική άμεσης προσθήκης παράγοντα κατακρήμνισης υπό έλαιο, Δ. Μικροδιαπίδυση, Ε. Διάχυση ελεύθερης επιφάνειας. Οι τεχνικές της κρεμάμενης και της καθήμενης σταγόνας είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες.

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την αυτοματοποίηση της διαδικασίας κρυστάλλωσης με τη χρήση ρομπότ τόσο για την παρασκευή των διαλυμάτων όσο και για την πραγματοποίηση και παρακολούθηση των πειραμάτων κρυστάλλωσης. Για παράδειγμα, ρομπότ κατασκευασμένο στο Ινστιτούτο Hauptman-Woodward των Η.Π.Α. μπορεί να εκτελέσει 9200 πειράματα την ώρα ενώ πολλά εμπορικά διαθέσιμα μηχανήματα είναι πλέον στη διάθεση και μικρότερων εργαστηρίων δομικής βιολογίας σε όλο τον κόσμο (Sharff & Jhoti, 2003). Εκτός από τη μείωση του πειραματικού χρόνου και τη δυνατότητα σάρωσης μεγαλύτερου πλήθους αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης, η αυτοματοποίηση συνέβαλλε και στη μείωση της απαιτούμενης ποσότητας πρωτεΐνης χάρη στη δυνατότητα χειρισμού πολύ μικρών όγκων διαλυμάτων (της τάξης ακόμα και μερικών nL) (Chayen, 2009). Όλα τα παραπάνω συνέβαλλαν σημαντικά στην αύξηση του ποσοστού επιτυχίας των προσπαθειών κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών – στόχων ταχύτερα, χωρίς ωστόσο να είναι σε θέση να αντικαταστήσουν την εμπειρία του πειραματιστή και να καταστήσουν την κρυστάλλωση μία διαδικασία ρουτίνας.

1.8 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ανάγκη για προσαρμογή των οργανισμών σε ακραία περιβάλλοντα (ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας) δημιούργησε και αντίστοιχες προσαρμογές σε μοριακό επίπεδο. Οι πρωτεΐνες των θερμοφίλων οργανισμών αναγκάστηκαν να υποστούν διαφοροποιήσεις στην αμινοξική τους αλληλουχία, συγκριτικά με τις ομόλογες μεσόφιλες. Οι αλλαγές αυτές δίνουν στα μόρια το πλεονέκτημα της θερμοσταθερότητας.

Με τον όρο θερμοσταθερότητα, αναφερόμαστε στο δυναμικό διατήρησης της δομής και λειτουργίας μίας πολυπεπτιδικής αλυσίδας κάτω από ακραίες συνθήκες.

Παρά τη μεγάλη προσπάθεια που έχει γίνει για τον προσδιορισμό των παραγόντων που επηρεάζουν την θερμοσταθερότητα των πρωτεϊνών, το πεδίο δεν έχει ξεκαθαρίσει ακόμα. Αυτό συμβαίνει διότι ενώ έχουν εξαχθεί κάποια γενικά συμπεράσματα που είναι καθολικά για όλες τις πρωτεΐνες, κάθε πρωτεΐνη χρησιμοποιεί ελάχιστες κομβικές αλλαγές για να επιτευχθεί η σταθερότητα.

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι πολύπλευροι. Αρχικός σκοπός είναι η απομόνωση του γονιδίου *hutth* από το γενωμικό DNA του *Thermus thermophilus*, η υπερέκφρασή του και η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων της ανασυνδυασμένης HUTth πρωτεΐνης για περαιτέρω βιοχημικό και βιοφυσικό χαρακτηρισμό καθώς και δομική ανάλυση.

Επόμενος στόχος της εργασίας είναι η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν τη θερμοσταθερότητα των πρωτεϊνών της οικογένειας HU. Για την επίτευξη του δεύτερου στόχου πραγματοποιείται εκτεταμένη βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιώντας τόσο την HUTth πρωτεΐνη, όσο και άλλες HU πρωτεΐνες που έχουν μελετηθεί καθώς και HU συναινετικές και προγονικές ακολουθίες που προβλέφθηκαν.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Το πειραματικό μέρος της Μεταπτυχιακής Εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο του Καθηγητή Βιοχημείας Δρ. Κων/νου Ε. Βοργιά, στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο εξοπλισμός του εργαστηρίου καθώς και τα απαραίτητα αντιδραστήρια.

Μέρος των πειραμάτων, μαζικής κρυστάλλωσης, πραγματοποιήθηκαν, ύστερα από κατάθεση και απόκτηση ευρωπαϊκού grant (BIOSTRUCT- X), στο SPC Facility του EMBL στο Αμβούργο, Γερμανία.

Αρχικά πειράματα κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Ιατρικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Τα πειράματα κυκλικού διχροϊσμού πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής, στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος».

2.2 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΥΛΙΚΟ

Τα κύτταρα ξενιστές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα *E. coli* DH5a, BL21(DE3) (STRATAGENE) και τα MAGIC. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι τα παραπάνω στελέχη δεν παράγουν τις πρωτεάσες Ipn και ompT, προστατεύοντας τις πρωτεΐνες που παράγονται από πρωτεολυτική πέψη.

2.2.1 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. coli*

Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε τα παρακάτω βήματα:

- ✓ Εμβολιασμός μίας αποικίας από το τρυβλίο LB- άγαρ σε 5 ml LB, με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Επώση στους 37 °C για 14- 16 ώρες
- ✓ Μεταφορά 750 μl της βακτηριακής καλλιέργειας σε 2 ml δοκιμαστικού σωλήνα και προσθήκη 750 μl αποστειρωμένου διαλύματος 100% (v/v) γλυκερόλης.

Έντονη ανακίνηση (vortex) ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη διασπορά της γλυκερόλης

- ✓ Ταχεία κατάψυξη σε υγρό άζωτο (- 150 °C) και αποθήκευση στους - 80 °C

Αξιίζει να σημειωθεί πως στα κύτταρα Magic για τη σταθερότητα του ενδογενούς πλασμιδίου, οι υγρές καλλιέργειές τους, εκτός από αμπικιλίνη (100 µg/ ml) περιείχαν και το αντιβιοτικό καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 50 µg/ ml.

2.2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύχθηκαν τόσο σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα (τρυβλία Petri) όσο και σε υγρές καλλιέργειες (κωνικές φιάλες διαφορετικού ενεργού όγκου). Κυτταρικό εναιώρημα προκαθορισμένης συγκέντρωσης αποτελούσε το εμβόλιο τόσο στις υγρές όσο και στις στερεές καλλιέργειες. Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο μέτρησης της οπτικής πυκνότητας στο ορατό, 600 nm (OD_{600nm}). Το βασικό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Θρεπτικό Άγαρ {Nutrient Agar (Day et al., 1989)} και η θερμοκρασία επώασης ήταν οι 37 °C.

Πίνακας 2- 1 Υγρό και στερεό θρεπτικό Άγαρ (Nutrient Agar)

Συστατικά		Σύσταση ανά λίτρο
LB	Τρυπτόνη	10 g
	Εκχύλισμα ζύμης	5 g
	NaCl	10 g
	Άγαρ (Bacto Agar)	15 g

2.2.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. coli*

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας του στελέχους της *E. coli* που προέρχεται από μονή αποικία σε 6 ml θρεπτικού LB (καλλιέργεια έναρξης). Επώαση με ανάδευση στους 37 °C για 16 ώρες, στις 220 rpm.
2. Εμβολιασμός 40 mL θρεπτικού με 350 μ L από την καλλιέργεια έναρξης. Επώαση στους 37 °C, με ανάδευση στις 220 rpm, για 3- 3,5 ώρες, έως ότου η οπτική πυκνότητα OD_{600nm} να είναι 0,35- 0,4 μονάδες.
3. Τοποθέτηση της καλλιέργειας στον πάγο για 15 λεπτά.
4. Φυγοκέντρηση στις 2500 rpm, στους 4 °C για 12 λεπτά. Απόρριψη του υπερκειμένου με αναστροφή του σωλήνα.
5. Επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 15 mL διαλύματος TF1 και επώαση των κυττάρων στον πάγο για 15- 20 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση όπως στο βήμα 4.
7. Επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 3 mL διαλύματος TF2 και επώαση των κυττάρων στον πάγο για 15 λεπτά.
8. Τα κύτταρα μοιράστηκαν ανά 200 μ L σε σωλήνες όγκου 1,5 mL.
9. Ταχεία κατάψυξη σε υγρό άζωτο και αποθήκευση στους - 80 °C.

Διαλύματα:

TF1: 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂·4H₂O, 30 mM KAc pH 7,5, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 15% γλυκερόλη, τελικό pH διαλύματος 5,8- ρύθμιση με διάλυμα 0,2M CH₃COOH

TF2: 10 mM MOPS pH 6,8, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂·2H₂O, 15% γλυκερόλη, τελικό pH διαλύματος 6,8- ρύθμιση με προσθήκη διαλύματος NaOH

Α΄ ΜΕΡΟΣ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ *hutth* ΓΟΝΙΔΙΟΥ. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ *HUTth* ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *hutth* ΑΠΟ ΤΟ ΓΕΝΩΜΙΚΟ DNA ΤΟΥ ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *THERMUS thermophilus*

Η απομόνωση ολόκληρου του γονιδίου *hutth* από το γενωμικό DNA του *Thermus Thermophilus* HB8 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την Taq Recombinant πολυμεράση.

Η Taq Recombinant πολυμεράση (InVitrogen, USA), δεν διαθέτει ενεργότητα 3'→5' εξωνουκλεάσης και δεν χαρακτηρίζεται από υψηλής πιστότητας ενίσχυση. Παρ' όλα αυτά, το ένζυμο συνθέτει DNA, *in vitro*, με εύλογη ακρίβεια. Ακριβέστερα, η Taq Recombinant DNA πολυμεράση παρουσιάζει τα ίδια χαρακτηριστικά με την κοινή Taq πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από τον *Thermus aquaticus*, όσον αφορά τη δραστηρότητα, εξειδίκευση, θερμοσταθερότητα και την απόδοσή της στην PCR. Επιπλέον, δημιουργεί τυφλά άκρα στο 30% των προϊόντων της αντίδρασης και έτσι καθίσταται ιδανική για την διαδικασία κλωνοποίησης που θα ακολουθήσει (TA cloning).

Το αντιδρών μείγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει:

Αντιδρώντα	Τελική Συγκέντρωση
Γενομικό DNA	160 ng
10 x PCR Buffer minus Mg ⁺⁺	1x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs mix	0,2 mM
CV619 εκκινητής (forward)	0,5 μM
CV620 εκκινητής (reverse)	0,5 μM
Taq Recombinant	2,5 Units

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή και χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο “Hot Start”. Αναλυτικότερα, ένα αρχικό στάδιο 3 λεπτών στους 94 °C, ακολουθείται από 5 λεπτά στους 80 °C, χρονικό διάστημα στο οποίο προστίθεται η Taq Recombinant πολυμεράση. Εν συνεχεία, πραγματοποιούνται 30 κύκλοι που περιλαμβάνουν 45 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 94 °C, 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 58 °C, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 1,5 λεπτό στους 72 °C, όπου σχηματίζονται οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Τέλος, ακολουθεί ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 10 λεπτά. Το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης από την PCR είναι 296 ζεύγη βάσεων.

2.3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΟΡΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *hutth* ΑΠΟ ΤΟ ΓΕΝΩΜΙΚΟ DNA ΤΟΥ *THERMUS thermophilus* ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Ο σχεδιασμός εκκινητικών μορίων για τον εντοπισμό του γονιδίου *HUTth* στο βακτηριακό γονιδίωμα προέκυψε από την ευθυγράμμιση των 5' και 3' συντηρημένων περιοχών του θερμοσταθερού αυτού γονιδίου στο είδος *Thermus Thermophilus*. Η ανάλυση ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδίου πραγματοποιήθηκε ύστερα από την ενσωμάτωσή του στον φορέα κλωνοποίησης pGEM- TEasy (Promega). Ακριβέστερα, για την ενίσχυση του γονιδίου *HUTth* χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα εκκινητικά μόρια τα οποία διέθεταν θέσεις περιορισμού από ενδονουκλεάσες:

CV619 (39 ζ.β., T_m 77, 8 °C)

5' –**GTGACACA**|**TA**|**TG**GCTGCGAAGAAGACGGTGACCAAAGCG- 3'

NdeI

CV620 (39 ζ.β., T_m 73 °C)

5' –**GTTACCG**|**GATC**|**CT**CACTTCTTGACCTTATCCTTCAGGGC- 3'

BamHI

Οι πρώτες βάσεις κάθε εκκινητή (πράσινο χρώμα) βοηθούν στη σταθεροποίηση της πολυμεράσης πάνω στο ολιγονουκλεοτίδιο κατά την έναρξη της αντιγραφής. Η επόμενη αλληλουχία (κόκκινο χρώμα) είναι η αλληλουχία αναγνώρισης του αντίστοιχου περιοριστικού ενζύμου και η τελευταία είναι στην περίπτωση του εκκινητή (F) για το 5' άκρο, η αρχή του γονιδίου, και στην περίπτωση του εκκινητή (R) για το 3' άκρο, η αντίστροφη και συμπληρωματική αλληλουχία της λήξης του γονιδίου. Επιδιώκεται κατά τον σχεδιασμό, οι τελευταίες αλληλουχίες να έχουν σχετικά υψηλό ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης (GC%> 40) και σχετικά παρόμοιο και υψηλό σημείο τήξης, T_m .

2.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

2.4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, έγινε με εφαρμογή είτε του πρωτοκόλλου Nucleospin® Plasmid (Macherey- Nagel, Γερμανία), είτε του πρωτοκόλλου QIAGEN® Plasmid Mini Prep Kit (QIAGEN, Γερμανία), ή με καταβύθιση παρουσία ισοπροπανόλης (Graham, Robertson, Sambrook, & Crossman, 1989).

Η διαδικασία της αλκαλικής λύσης των βακτηριακών κυττάρων περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- Ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο LB με προσθήκη κατάλληλου αντιβιοτικού για 16 ώρες στους 37 °C.
- Φυγοκέντρηση 4 ml βακτηριακής καλλιέργειας στις 8000 rpm για 5 λεπτά.
- Προσθήκη στο ίζημα 200 µL διαλύματος P1 (50 mM Tris- HCL, 10 mM EDTA, pH 7,5). Ανάδευση με στόχο την ολοκληρωτική αναδιαλυτοποίηση των κυττάρων.
- Προσθήκη 200 µL διαλύματος P2 (1% (w/v) SDS, 0,2N NaOH) και ήπια ανάδευση.
- Προσθήκη 200 µL διαλύματος P3 (3M CH₃COONa, pH 5,3) και ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 λεπτά
- Παραλαβή του υπερκειμένου με ιδιαίτερη προσοχή και προσθήκη σε αυτό 600 µl ισοπροπανόλης. Ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 λεπτά.
- Παραλαβή του ιζήματος και ξέπλυμα αυτού με 300 µL διαλύματος 70% (v/v) αιθανόλης. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 λεπτά
- Ξήρανση του ιζήματος στους 37 °C για περίπου 10 λεπτά και επαναδιάλυσή του σε 50 µL αποστειρωμένου νερού.
- Προσθήκη RNAσης για 15 λεπτά στους 37 °C.

2.4.2 ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Η διαδικασία πέψης του πλασμιδιακού DNA (ή προϊόντος της αντίδρασης PCR) με περιοριστική ενδονουκλεάση περιελάμβανε τα παρακάτω βήματα:

Προσθήκη σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα όγκου 1,5 mL:

- 1- 4 µg πλασμιδιακού DNA (ή προϊόντος της αντίδρασης PCR)
- 5- 20 Units περιοριστικής ενδονουκλεάσης
- 2 µL κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης (διατίθεται από την εταιρία και είναι ειδικό για το κάθε ένζυμο)
- απιονισμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών, έως τον τελικό όγκο των 20 µL

Ακολουθεί επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία για την περιοριστική ενδονουκλεάση, επί 1 με 2 ώρες, βάσει των οδηγιών της εταιρείας παραγωγής.

2.4.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ

Στη διαδικασία κλωνοποίησης ενός τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα, η αντίδραση συρραφής, πραγματοποιείται με την εξής διαδικασία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα όγκου 1,5 mL προστίθεται:

- 1 µL πλασμιδιακού φορέα συγκέντρωσης 0,1 µg/µL, ύστερα από επώαση με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και αποφωσφορυλίωση των άκρων του με αλκαλική φωσφατάση.
- 2- 3 µL καθαρού ενθέματος DNA συγκέντρωσης 0,1 µg/µL (αναφέρουμε ότι η αναλογία των τμημάτων DNA/ πλασμιδιακός φορέας πρέπει να είναι 2:1 ή 3:1 και σπάνια 5:1).
- 1 µL ρυθμιστικού διαλύματος της T4 DNA λιγάσης (50 mM Tris- HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5)
- 1 µL T4 DNA λιγάση
- Απιονισμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τον τελικό όγκο των 10 µL

Επώαση σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 16 °C, για 16 ώρες (Graham et al., 1989).

2.4.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. coli*

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Ταχεία απόψυξη του κατάλληλου στελέχους παρασκευασμένων επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* και επώασή του στον πάγο.
- Προσθήκη 1 ng υπερελικωμένου πλασμιδίου ή 2,5- 10 μL του μίγματος της αντίδρασης της λιγάσης σε 50- 100 μL αιωρήματος επιδεκτικών κυττάρων, με ήπια και πολύ προσεκτική ανάδευση.
- Επώαση του μίγματος κυττάρων- DNA στον πάγο, για 30 λεπτά.
- Επώαση του μίγματος σε υδατόλουτρο των 42 °C, για 90 δευτερόλεπτα.
- Άμεση επώαση του μίγματος στον πάγο, για 4 λεπτά.
- Προσθήκη 500 μL θρεπτικού μέσου SOC.
- Επώαση στους 37 °C για 1 ώρα της καλλιέργειας, με έντονη ανακίνηση στις 220 rpm για αποτελεσματικό αερισμό.
- Φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 2 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου, αφήνοντας περίπου 200 μL .
- Ελαφρά ανάμιξη με μικρο- σιφώνιο.
- Εμβολιασμός των 200 μL με πλάκες θρεπτικού- άγαρ παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού (προσθήκη IPTG, Xgal, εάν είναι απαραίτητο).
- Επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 16 ώρες, μέχρι να εμφανιστούν αποικίες κατάλληλου μεγέθους (Graham et al., 1989).

Διάλυμα: Θρεπτικό μέσο SOC: 2% (w/v) τρυπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂- 6H₂O, 2,5 mM KCl, 20 mM γλυκόζη

2.4.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

1^{ος} τρόπος: Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- Επιλογή των θετικών, από τον μετασχηματισμό, αποικιών και ανάπτυξή τους σε 5 mL θρεπτικού υποστρώματος LB με προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού.
- Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Προσθήκη σε δοκιμαστικό σωλήνα όγκου 1,5 mL:

- 3- 4 μL πλασμιδιακού DNA συγκέντρωσης 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- 2 Units κατάλληλης περιοριστικής ή περιοριστικών ενδονουκλεασών, που κόβουν εκατέρωθεν του τμήματος DNA που έχει κλωνοποιηθεί
- 1 μL κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για τη δράση της περιοριστικής ή των περιοριστικών ενδονουκλεασών (διατίθεται από την εταιρία και είναι ειδικό για κάθε ένζυμο)
- Απιονισμένο νερό, ελεύθερο νουκλεασών έως τον τελικό όγκο των 10 μL
- Επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία για την εκάστοτε περιοριστική ενδονουκλεάση, για 1- 2 ώρες
- Έλεγχος του μεγέθους του τμήματος DNA που προκύπτει από την παραπάνω πέψη με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2^{ος} τρόπος: Έλεγχος με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

- ❖ Επιλογή μερικών θετικών αποικιών από τον μετασχηματισμό, εμβολιασμός τους σε νέο τρυβλίο LB- άγαρ (replica) και διαλυτοποίηση κάθε αποικίας σε 20 μL απιονισμένου νερού ελεύθερο νουκλεασών.
- ❖ Βράσιμο κάθε διαλύματος αποικίας σε υδατόλουτρο στους 100 °C, για 2 λεπτά.
- ❖ Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου, για 2 λεπτά.
- ❖ Συλλογή 10 μL από το υπερκείμενο του διαλύματος αποικίας και χρήση του ως μήτρα σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, με ειδικούς εκκινητές που αναγνωρίζουν αλληλουχίες του πλασμιδίου εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης.
- ❖ Έλεγχος του μεγέθους του τμήματος DNA από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

3^{ος} τρόπος: Ανάλυση της αλληλουχίας βάσεων του DNA

Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε από την εταιρία VBC Biotech (Αυστρία). Η διαδικασία ταυτοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ηλεκτρονικού προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), (Sambrook et al., 1989) το οποίο εντοπίζει τμήματα από τις διεθνείς τράπεζες δεδομένων, που παρουσιάζουν

ομοιότητα με τμήματα της άγνωστης αλληλουχίας και διαθέτει τις παρακάτω εναλλακτικές δυνατότητες (Εικόνα 13):

BLAST p: Συγκρίνει την αμινοξική αλληλουχία με πρωτεϊνικά τμήματα, γνωστών πρωτεϊνών.

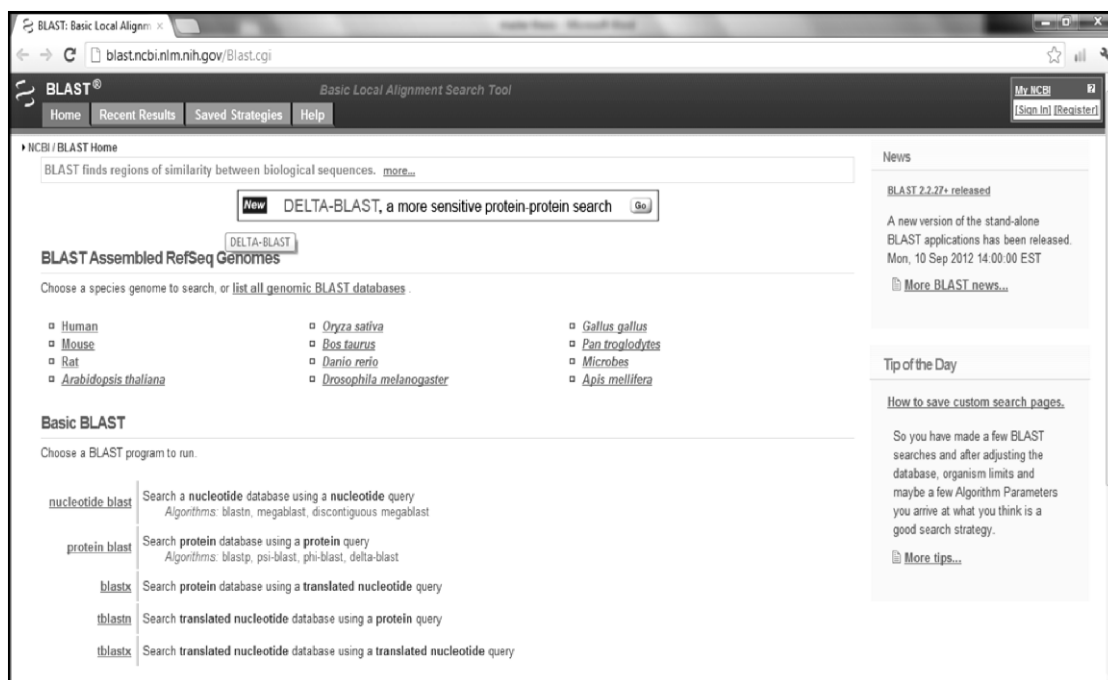
BLAST n: Συγκρίνει μια νουκλεοτιδική αλληλουχία με γνωστές νουκλεοτιδικές ακολουθίες από διεθνείς τράπεζες δεδομένων,

BLAST x: Συγκρίνει μία νουκλεοτιδική ακολουθία, μεταφρασμένη σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης, με πρωτεϊνικά τμήματα γνωστών πρωτεϊνών.

TBLAST n: Συγκρίνει μία αμινοξική ακολουθία, με τις νουκλεοτιδικές ακολουθίες από διεθνείς τράπεζες δεδομένων, μεταφρασμένες σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης.

TBLAST x: Συγκρίνει μία νουκλεοτιδική ακολουθία, μεταφρασμένη σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης με μία επίσης μεταφρασμένη σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης, νουκλεοτιδική ακολουθία από διεθνείς τράπεζες δεδομένων.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση του προγράμματος BLAST περιλαμβάνουν τις ακολουθίες (νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές) που ανιχνεύονται στις διεθνείς τράπεζες δεδομένων και παρουσιάζουν ομοιότητα με την άγνωστη αλληλουχία. Σε κάθε συστοιχία αναγράφεται η τιμή του αθροιστικού σκορ (high score) και της πιθανότητας λάθους (probability). Το αθροιστικό σκορ αποτελεί το βαθμό ομοιότητας των αμινοξέων που βρίσκονται απέναντι στη συστοιχία. Υποδηλώνει το πόσο συχνά συναντάμε ένα αμινοξύ απέναντι από ένα άλλο σε πραγματικές στοιχίσεις. Η πιθανότητα λάθους εκφράζει την πιθανότητα να είναι τυχαίο το αθροιστικό σκορ.



Εικόνα 13 Ηλεκτρονικό πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

2.4.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ- ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Το δείγματα DNA ύστερα από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή την απομόνωση πλασμιδιακού DNA ή από τις διάφορες διαγνωστικές πέψεις υπόκειντο σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκεκριμένης συγκέντρωσης (Πίνακας 2-2). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Διάλυμα TAE (1X): 0,04 M Tris- acetate, 0,001 M EDTA, pH 8,0. Το διάλυμα παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 50 φορές μεγαλύτερη από το διάλυμα εργασίας (1X) και φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκε λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με ανάλογη αραιώση (1:50) του πυκνού διαλύματος (50X).

Διάλυμα TBE (1X): 1 M Tris- acetate, 0,9 M Boric Acid και 0,01 M EDTA. Το διάλυμα παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 10 φορές μεγαλύτερη από το διάλυμα εργασίας (1X) και φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκε λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με ανάλογη αραιώση του πυκνού διαλύματος.

Ρυθμιστικό Διάλυμα Φόρτωσης: SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

Πίνακας 2- 2 Επιλογή ποσοστού αγαρόζης στο πήκτωμα διαχωρισμού με βάση το μοριακό βάρος των υπό διαχωρισμό μορίων DNA.

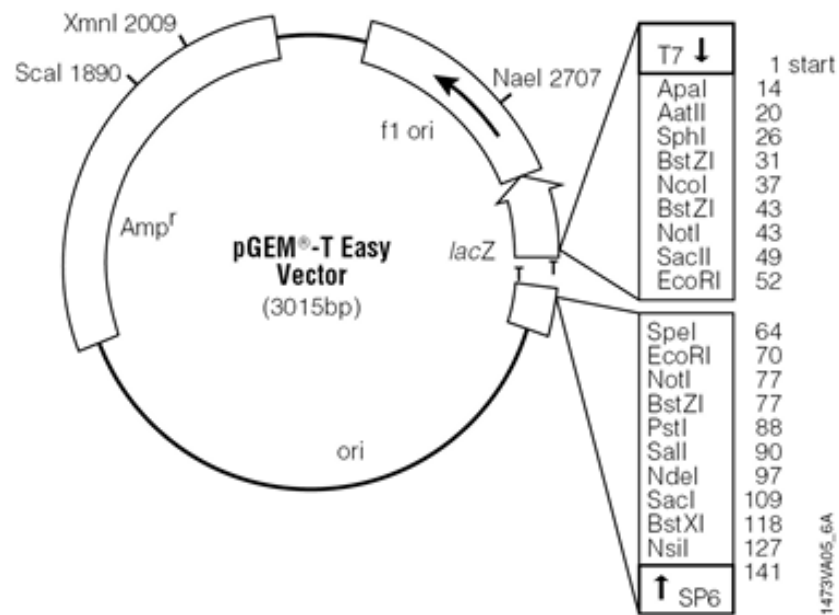
Συγκέντρωση αγαρόζης % (w/v)	Μέγεθος διαχωριζόμενων μορίων DNA (Kb)
0, 3	5- 60
0, 6	1- 20
0, 7	0, 8- 10
0, 9	0, 5- 7
1, 2	0, 4- 6
1, 5	0, 2- 3
2	0, 1- 2

2.5 ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *hutth*

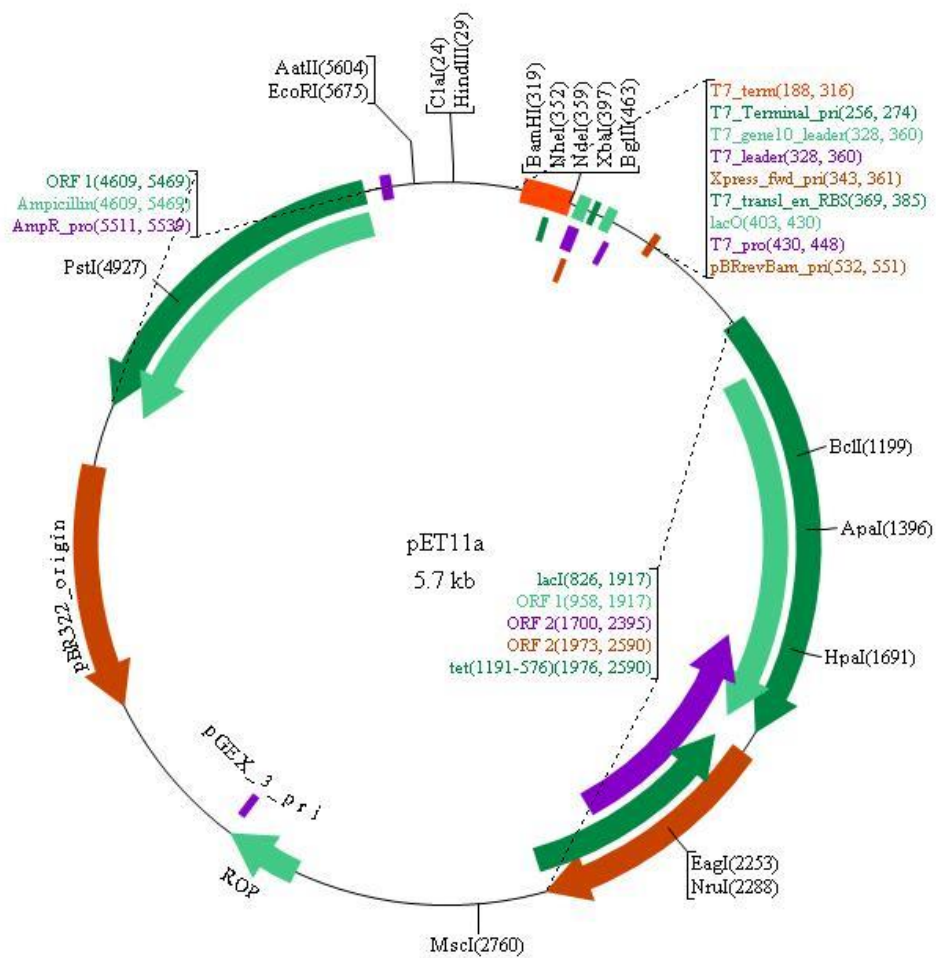
2.5.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου *hutth*, αμέσως μετά τη διαδικασία της PCR ήταν ο pGEM- T Easy (Promega) (Εικόνα 14), όπως αναφέρεται και παραπάνω.

Η υπερέκφραση του γονιδίου πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές σειρές δεκτικών κυττάρων *E. coli* μέσω του φορέα κλωνοποίησης pET- 11a (Εικόνα 15).



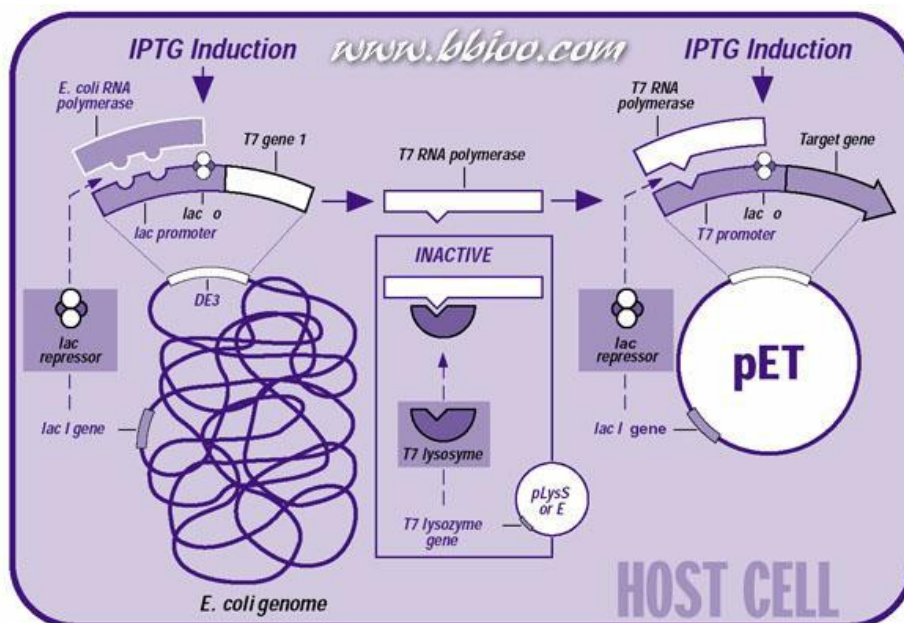
Εικόνα 14 Χάρτης του πλασμιδίου pGEM- T Easy.



Εικόνα 15 Χάρτης του πλασμιδίου pET- 11a.

Οι πλασμιδιακοί φορείς pET κατασκευάσθηκαν με στόχο την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων σε κύτταρα *Escherichia coli* υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή της RNA πολυμεράσης του φάγου T7 (Rosenberg et al., 1987; Studier & Moffatt, 1986). Η πολυμεράση αυτή, αποτελείται από μία υπομονάδα η οποία διαθέτει πολύ μεγάλη εξειδίκευση παρά το πολύ μικρό μεγεθός της, 23 ζ.β., ενώ παράλληλα η δράση της είναι ταχεία, αποτελεσματική και δεν απαιτεί επιπρόσθετους μεταγραφικούς παράγοντες στον ξενιστή.

Η RNA πολυμεράση της *E. coli* δεν διαθέτει ικανότητα αναγνώρισης του υποκινητή, επομένως, απουσία της T7 RNA πολυμεράσης δε μεταγράφεται το γονίδιο στόχος και η διαδικασία της κλωνοποίησης δεν είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη διαδικασία της έκφρασης. Άρα, αρχικά, το γονίδιο-στόχος, *hutth*, κοινοποιήθηκε σε κύτταρα ξενιστές (DH5a) που δεν διέθεταν την πολυμεράση του T7 φάγου και έτσι παρέμεναν μεταγραφικώς ανενεργά. Με τον τρόπο αυτό, εξαλείφεται η αστάθεια των πλασμιδίων εξαιτίας ενδεχόμενης παραγωγής τοξικών πρωτεϊνών. Έπειτα, τα πλασμίδια μεταφέρονται σε κύτταρα έκφρασης τα οποία διαθέτουν στο χρωμόσωμά τους το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης. Οι ξενιστές αυτοί έχουν ενσωματώσει στο βακτηριακό χρωμόσωμα το γονιδίωμα του φάγου DE3 (λυσιγονικός κύκλος), το οποίο περιλαμβάνει μεταξύ άλλων το γονίδιο *lacI* (lac καταστολέας) και το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης, υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lacUV5*. Η επαγωγή της μεταγραφής της T7 RNA πολυμεράσης γίνεται με την προσθήκη του IPTG (Iso-propyl- thio- galactoside), αντιδραστήριο που εμφανίζει



Εικόνα 16 Το σύστημα γονιδιακής υπερέκφρασης T7.

δομικές ομοιότητες με τη γαλακτόζη, αλλά δεν καταβολίζεται εξασφαλίζοντας έτσι συνεχή επαγωγή. Το IPTG δεσμεύεται με την πρωτεΐνη καταστολέα που κωδικοποιείται από το γονίδιο *lacI* και εμποδίζει την αλληλεπίδραση με τον υποκινητή *lacUV5*, επιτρέποντας τη μεταγραφή του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης. Η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας IPTG (καθώς σε αυξημένες συγκεντρώσεις η ουσία αυτή εμφανίζεται τοξική για τα κύτταρα) σε αυξανόμενη καλλιέργεια επάγει την παραγωγή T7 RNA πολυμεράσης, η οποία μεταγράφει το γονίδιο στόχο που έχουμε εισάγει στο πλασμίδιο pET (εικόνα 16). Κατά την επαγωγή της *HUTth* χρησιμοποιήσαμε IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM.

Σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι οι πλασμιδιακοί φορείς pET εμφανίζονται σε μεγάλη ποικιλία η οποία περιλαμβάνει:

- i. Τον T7 υποκινητή (ορισμένοι φέρουν τον T7 lac που περιέχει την αλληλουχία του lac χειριστή)
- ii. Τα σήματα έκφρασης
- iii. Τις θέσεις όπου αναγνωρίζουν και «κόβουν» οι διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες
- iv. Τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Παράλληλα, οι πλασμιδιακοί φορείς pET διαθέτουν α) τους μεταφραστικούς φορείς, οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί για την έκφραση γονιδίων- στόχων που περιέχουν κωδικόνιο έναρξης και θέση πρόσδεσης στο προκαρυωτικό ριβόσωμα και β) τους μεταγραφικούς φορείς που περιέχουν τη θέση πρόσδεσης στο ριβόσωμα της βασικής πρωτεΐνης του καψιδίου του T7 φάγου.

Οι δύο κατηγορίες διαφοροποιούνται στην ονομασία, καθώς οι μεταγραφικοί φορείς περιέχουν μία κατάληξη ενός γράμματος έπειτα από το όνομά τους, πχ pET- 11a. Το γράμμα αυτό υποδηλώνει το πλαίσιο ανάγνωσης σχετικά με τη θέση αναγνώρισης της *BamHI* (GGATCC). Οι φορείς με το γράμμα «a» εκφράζουν από την τριπλέτα GGA, με το γράμμα «b» από την τριπλέτα GAT και με το γράμμα «c» από την τριπλέτα ATC στη θέση αναγνώρισης της *BamHI*. Οι φορείς με το γράμμα «d» ακολουθούν το ίδιο πρότυπο με αυτό των «c» αλλά αντί για θέση αναγνώρισης από την ενδονουκλεάση *NdeI* διαθέτουν θέση αναγνώρισης από την *Nco I*. Η επιλογή του κατάλληλου φορέα pET απαιτεί να ληφθούν υπόψη αρκετοί παράγοντες, όπως: η εφαρμογή για την οποία προορίζεται η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, οι πληροφορίες που είναι γνωστές για τα χαρακτηριστικά της και η στρατηγική κλωνοποίησης.

Όσον αφορά τα κύτταρα ξενιστές των pET φορέων κλωνοποίησης, υπάρχει η δυνατότητα επιλογής ανάλογα με τη βασική μεταγραφική ενεργότητά τους (δηλαδή το επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου- στόχου απουσία επαγωγέα). Υπάρχουν τα κύτταρα με ενσωματωμένο το φάγο λDE3, όπου το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης ελέγχεται από τον υποκινητή *lacUV5*. Σε αυτά παρατηρείται χαμηλός ρυθμός μεταγραφής του γονιδίου- στόχου ακόμα και απουσία επαγωγής, γεγονός που μπορεί να αποσταθεροποιήσει ανασυνδυασμένα πλασμίδια με βλαβερά για το κύτταρο προϊόντα. Για πιο αυστηρό έλεγχο, υπάρχουν τα κύτταρα με ενδογενή πλασμίδια pLysS και pLysE. Τα κύτταρα αυτά φέρουν το πλασμίδιο pLys το οποίο κωδικοποιεί την T7 λυσοζύμη, φυσικό αναστολέα της T7 RNA πολυμεράσης, εμποδίζοντας τη μεταγραφή του γονιδίου- στόχου απουσία επαγωγέα. Τα κύτταρα με πλασμίδια pLysS παράγουν μικρή ποσότητα T7 λυσοζύμης, ενώ τα κύτταρα με πλασμίδια pLysE παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα.

2.5.2 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *hutth*

Για τη μελέτη της επαγωγής του γονιδίου- στόχου ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Εμβολιασμός μίας αποικίας μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* από τρυβλίο σε 10 mL LB, με αμπικιλίνη συγκέντρωσης 100 µg/mL.
- Επώαση στους 37 °C υπό ανάδευση στις 220 rpm, για 16 ώρες.
- Έλεγχος ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας OD_{600nm}.
- Αραίωση της βακτηριακής καλλιέργειας 1:100 σε LB που περιέχει αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/mL και επώαση στους 37 °C υπό ανάδευση στις 220 rpm μέχρι η καλλιέργεια να φτάσει τη λογαριθμική φάση αύξησής της (OD_{600nm}= 0,6- 0,7).
- Προσθήκη του επαγωγέα IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM.
- Επώαση της καλλιέργειας για 3 ώρες, στους 37 °C υπό ανάδευση στις 220 rpm.
- Φυγοκέντρωση της βακτηριακής καλλιέργειας στις 8000 rpm, στους 4 °C για 15 λεπτά.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και ταχεία αποθήκευση του κυτταρικού ιζήματος στους- 80 °C.
- Ηλεκτροφόρηση των συνολικών βακτηριακών πρωτεϊνών μετά από διαλυτοποίησή τους σε Laemli διάλυμα σε αναλογία 10 µL ανά 0.1 OD.

Η επαγωγή μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε μικρή κλίμακα (καλλιέργειες των 10 mL) για μια αρχική μελέτη και διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την συμπεριφορά της εκάστοτε πρωτεΐνης, είτε σε μεγάλη κλίμακα (καλλιέργειες του ενός ή των δύο λίτρων) για παραγωγή μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω καθαρισμό.

2.5.3 ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ- ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η λύση των κυττάρων, που αποκτήσαμε ύστερα από τη διαδικασία της επαγωγής, αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα για την πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης, αφού μπορεί

να επηρεάσει τη βιολογική της ενεργότητα και τη συνολική της ποσότητα. Η θραύση των κυττάρων μπορεί να γίνει ενζυμικά, μηχανικά ή με οσμωτική πίεση.

Εμείς χρησιμοποιήσαμε τον μηχανικό τρόπο λύσης των κυττάρων, αφού σε αυτή την πειραματική διαδικασία δεν απαιτείται η προσθήκη χημικών ουσιών που μπορεί να επηρεάσουν το προϊόν μας ή την περεταίρω πορεία καθαρισμού του.

Ακριβέστερα, το κυτταρικό ίζημα πρώτα ζυγίστηκε και στη συνέχεια επαναδιαλύθηκε σε Lysis Buffer (χρησιμοποιήθηκαν 5 mL του διαλύματος ανά 1 gr του κυτταρικού ιζήματος). Η επαναδιάλυση πραγματοποιήθηκε σε σωλήνα τύπου falcon τον οποίο είχαμε τοποθετήσει σε παγόνερο στον κρυοθάλαμο, επάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα. Μόλις το ίζημα απέκτησε ταινιοειδή μορφή σταματήσαμε την ανάδευση και συνεχίσαμε με τη θραύση των κυττάρων.

Η θραύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υπερήχων. Η διαδικασία περιλάμβανε την υποβολή του κυτταρικού εναιωρήματος σε 0, 2 κύκλους θραύσης, έντασης 35 Watt για χρονικό διάστημα των 40 λεπτών. Χαρακτηριστικό είναι το ότι ανά 10 λεπτά ελέγχουμε την θερμοκρασία, ώστε να μην ξεπεράσει τους 6 °C (κρατήσαμε τη θερμοκρασία χαμηλή για να εμποδίσουμε την δράση των πρωτεασών), ενώ το εναιώρημα βρισκόταν υπό συνεχή ανάδευση σε παγόνερο.

Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 20 λεπτά, στους 4 °C, στις 14000 rpm και τελικά κρατήσαμε το υπερκείμενο στο οποίο αναμέναμε τις πρωτεΐνες.

Διάλυμα: Lysis Buffer: 20 mM Na- P pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,1% PMSF, 0,5% Triton X- 100

2.5.4 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΘΕΪΚΟ ΑΜΜΩΝΙΟ

Το θειικό αμμώνιο (ammonium sulfate) χρησιμοποιείται συχνά για την επιλεκτική καθίζηση πρωτεϊνών. Είναι σημαντικό το ότι δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια των πρωτεϊνών που υπάρχουν σε ένα διάλυμα, αλλά με τα μόρια του διαλύτη, δηλαδή του νερού.

Το υπερκείμενο που κρατήσαμε ύστερα από τη λύση των κυττάρων (§ 2.5.3)

ογκομετρήθηκε προκειμένου να υπολογιστεί η ποσότητα του στερεού θεικού αμμωνίου που έπρεπε να προστεθεί. Τελικά, προστέθηκε 60- 80% κορεσμένο θεικό αμμώνιο, 12,9 gr/100 mL υπερκειμένου. Το θεικό αμμώνιο προστέθηκε αργά ενώ το διάλυμα είχε τεθεί υπό συνεχή ανάδευση, στον κρυοθάλαμο. Αφού ολοκληρώθηκε η προσθήκη του θεικού αμμωνίου, επώαστηκε το διάλυμα για 30 λεπτά στους 4 °C.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 14000 rpm, στους 4 °C για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο, το οποίο αραιώθηκε 10 φορές για την μείωση της συγκέντρωσης του θεικού αμμωνίου στο δείγμα, φυλάχθηκε στους 4 °C μέχρι που χρησιμοποιήθηκε για περεταίρω καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας.

2.5.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ HU*Tth* ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Για τον διαχωρισμό της υπερεκφρασμένης HU*Tth* πρωτεΐνης από τα λοιπά βιομόρια του δείγματος, ύστερα από τη διαδικασία της κλασμάτωσης με θεικό αμμώνιο (AS), χρησιμοποιήσαμε 5 mL στήλη ηπαρίνης (HiTrap Heparin) και πραγματοποιήσαμε χρωματογραφία συγγένειας. Η ακινητοποιημένη ηπαρίνη προσδένεται σε ένα ευρύ αριθμό βιομορίων, όπως ένζυμα, αναστολείς πρωτεασών, αυξητικούς παράγοντες, ορμονικούς υποδοχείς και πρωτεΐνες πρόσδεσης στο DNA ή RNA. Είναι χαρακτηριστικό ότι η HU*Tth* είναι πρωτεΐνη πρόσδεσης στο DNA.

Έτσι, το εξωκυτταρικό υγρό, το οποίο παρελήφθη με φυγοκέντρηση (14000 rpm, 4 °C, 20 λεπτά) μετά την διαδικασία της κλασμάτωσης με θεικό αμμώνιο και στο οποίο εντοπίστηκε η υπερεκφρασμένη HU*Tth*, αποτέλεσε την πρώτη ύλη για τον μετέπειτα καθαρισμό.

Αναλυτικά η πορεία καθαρισμού περιελάμβανε τα εξής:

- Αραίωση 10 φορές του πρωτεϊνικού δείγματος σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Na- P pH 8,0, 1 mM EDTA, με σκοπό τη μείωση της συγκέντρωσης του θεικού αμμωνίου) και εξισορρόπηση
- Έκπλυση της στήλης (10 όγκοι) με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης στο οποίο έχει προστεθεί διάλυμα NaCl τελικής συγκέντρωσης 2M

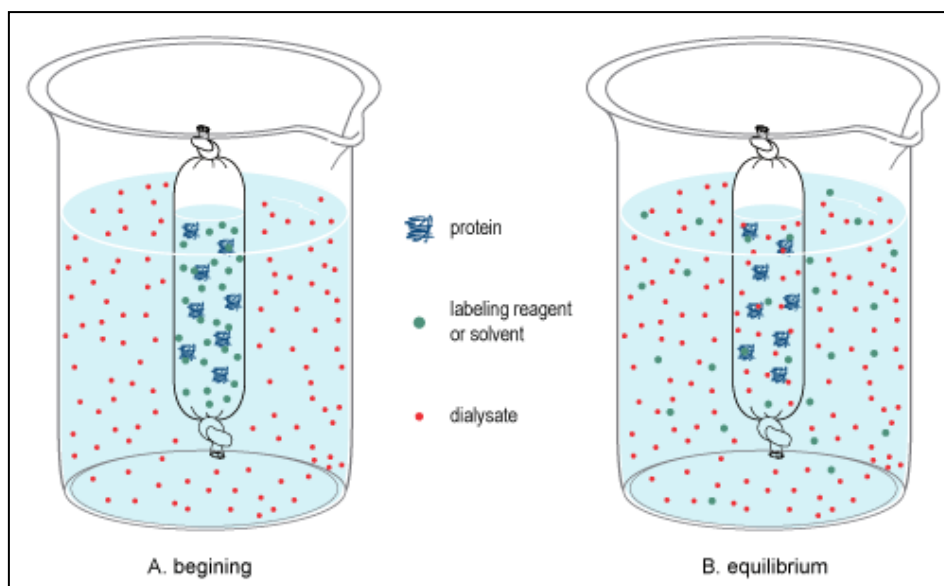
- Εξισορρόπηση της στήλης (10 όγκοι) με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Na- P pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl
- Προσθήκη του εξισορροπημένου πρωτεϊνικού δείγματος στη στήλη
- Έκπλυση της στήλης (10 όγκοι) με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Na- P pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl
- Έκπλυση της στήλης (6 όγκοι) με ρυθμιστικό διάλυμα διαβάθμισης 20 mM Na- P pH 8,0, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl → 20 mM Na- P pH 8,0, 1 mM EDTA, 2000 mM NaCl – Έκλυση της HUTth πρωτεΐνης.

2.5.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΛΛΑΓΗΣ ΤΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΤΗΣ HUTth ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ

Τα κλάσματα που έχουν σε μεγαλύτερο από 98% καθαρή HUTth πρωτεΐνη ενώνονται και ακολουθεί διαπίδυση με στόχο την αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος. Κύριος στόχος της τελευταίας διαδικασίας είναι η μείωση της συγκέντρωσης του NaCl στο διάλυμα σε 100 mM, συγκέντρωση που διατηρεί την πρωτεΐνη μας σταθερή αλλά και δεν είναι αποτρεπτική για τις πειραματικές διαδικασίες που ακολουθούν.

Συγκεκριμένα, κατά την διαπίδυση (Εικόνα 17), το διάλυμα της πρωτεΐνης τοποθετείται σε ημι- διαπερατή μεμβράνη (dialysis bag), δένονται τα άκρα και τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει το επιθυμητό τελικό ρυθμιστικό διάλυμα (dialysis buffer, D) σε όγκο τουλάχιστον 100πλάσιο του δείγματος. Αφήνεται να επιτευχθεί η ισορροπία, υπό ανάδευση, στο cold room για τουλάχιστον 12- 16 ώρες. Το εξωτερικό ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να ανανεωθεί όσες φορές επιθυμούμε κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης. Ουσιαστικά διαμέσου της ημι- διαπερατής μεμβράνης κινούνται μόρια νερού, μικρά διαλυτά μόρια και ιόντα, ενώ είναι αδιαπέρατη για μεγαλύτερα μόρια όπως οι πρωτεΐνες. Η σύσταση του διαλύματος πρωτεϊνών που προκύπτει είναι πρακτικά ίδια με τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος D, χωρίς σημαντική αύξηση του όγκου.

Οι ημι- διαπερατές μεμβράνες διαπίδυσης, είναι μεμβράνες οξικής κυτταρίνης, και διαθέτουν διάφορα μεγέθη πόρων (cutoffs) ώστε να είναι διαπερατές ακόμα και από διάφορα μεγέθη πρωτεϊνών. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την απομάκρυνση αλάτων από πρωτεϊνικά διαλύματα και τη μεταβολή του pH.



Εικόνα 17 Διαδικασία διαπίδυσης.

Μετά από την διαδικασία της διαπίδυσης, για να συγκεντρώσουμε την πρωτεΐνη μας-απαραίτητη διαδικασία για πειράματα κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης-χρησιμοποιούσαμε ειδικές συσκευές centricon της εταιρείας AMICON. Η διαδικασία περιελάμβανε φυγοκεντρήσεις στις 4.000 rpm. Στόχος ήταν η απόκτηση 500 μL δείγματος με συγκέντρωση πρωτεΐνης $[\text{HUT}h] \geq 10 \text{ mg/mL}$.

2.5.8 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ *HUT**h* ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Καθώς η *HUT**h* δεν έχει αμινοξικά κατάλοιπα τρυπτοφάνης, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής της χρησιμοποιούμε τη μέθοδο SCOPE . Στη συγκεκριμένη μέθοδο μετράται η απορρόφηση στα 205 nm. Η μέτρηση γίνεται στα 205 nm καθώς εκεί απορροφούν οι πεπτιδικοί δεσμοί. Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Brij35, σε διάλυμα του οποίου αραιώνεται η πρωτεΐνη προς μέτρηση. Η συγκέντρωση καθορίζεται από την εξής εξίσωση: $c(\text{mg/mL}) = A_{205}/(31 \times L)$.

2.5.9 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΡΙΧΛΩΡΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (TCA)

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι το TCA είναι πολύ ισχυρό οξύ που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των αλάτων από το πρωτεϊνικό δείγμα. Πιο συγκεκριμένα το TCA αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, οι οποίες στη συνέχεια με φυγοκέντρηση κατακρυμνίζονται σαν ίζημα. Η συγκεκριμένη μέθοδος βοηθάει στην καλή ηλεκτροφόρηση του δείγματος (Link & LaBaer, 2011). Η ακετόνη προστίθεται για να απομακρύνει το TCA. Είναι χαρακτηριστική η περίπτωση δειγμάτων έτοιμων προς ηλεκτροφόρηση τα οποία δεν έχουν το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα που τους προσδίδει η χρωστική, αλλά εμφανίζουν κίτρινο χρώμα. Αυτό οφείλεται στο ισχυρά όξινο περιβάλλον που δημιουργείται λόγω της παρουσίας του οξέος. Το χρώμα επανέρχεται σε αυτές τις περιπτώσεις με προσθήκη μικρής ποσότητας (2- 20 μ l) αλκαλικού ρυθμιστικού διαλύματος.

- Προσθήκη διαλύματος 100 % (w/v) TCA στο πρωτεϊνικό δείγμα, ώστε η τελική συγκέντρωση του TCA στο δείγμα να είναι 25 %. Επώαση για 30 λεπτά στους 4 °C.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 13000 rpm για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 200 μ l καθαρής, παγωμένης ακετόνης για πλύσιμο του δείγματος.
- Ανάμιξη του υλικού για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Επανάληψη του τελευταίου πλυσίματος και της φυγοκέντρησης.
- Αφαίρεση προσεκτικά του υπερκειμένου και στέγνωμα του δείγματος με την αντλία κενού. Επώαση του δείγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλο όγκο Laemli διαλύματος (1X) και θέρμανσή του στους 100 °C για 5 λεπτά.

Το δείγμα στο σημείο αυτό είναι έτοιμο προς ηλεκτροφόρηση. Σε περίπτωση που δεν επιθυμούμε να ηλεκτροφορήσουμε τα δείγματα άμεσα, παρακάμπτουμε τα δύο προηγούμενα βήματα και διατηρούμε το ίζημα στους - 20 °C.

2.5.10 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΚΑΜΙΔΗΣ (SDS PAGE)

Κατά την ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος. Η χρήση του θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS) συντελεί στη μερική αποδιάταξη των πρωτεϊνών και στη δέσμευση αρνητικά φορτισμένων θειικών δωδεκυλικών ιόντων σε ποσότητα ανάλογη του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η οποία έτσι φορτίζεται αρνητικά. Επειδή η ποσότητα του SDS που δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες είναι σταθερή (1,4 g SDS/g πρωτεΐνης), η κινητικότητα των πρωτεϊνών στο ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με χρήση ασυνεχών ρυθμιστικών διαλυμάτων σε αποδιατακτικές και αναγωγικές συνθήκες.

Η διάμετρος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από δύο παράγοντες: από το ποσοστό παρουσίας ακρυλαμίδης και από την ποσότητα του παράγοντα διασύνδεσης και επιλέγεται με βάση το μοριακό βάρος των υπό μελέτη δειγμάτων. Παρασκευάζονται δύο διαφορετικά πηκτώματα, το πήκτωμα συμπίκνωσης και αυτό του διαχωρισμού. Το πήκτωμα συμπίκνωσης είχε μεγάλης διαμέτρου πόρους ακρυλαμίδης (3%). Παρασκευάστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl pH 6,8 περίπου δύο μονάδες χαμηλότερο από το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris/γλυκίνη). Ο βασικός του ρόλος ήταν η συγκέντρωση των δειγμάτων σε ένα ενιαίο μέτωπο ανεξάρτητα από το μοριακό τους βάρος.

Το πήκτωμα διαχωρισμού αποτελείτο από μικρής διαμέτρου πόρους ακρυλαμίδης (3-30 %) και παρασκευάστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl pH 8,8 (Πίνακας 2- 3). Ο βασικός ρόλος του ήταν ο διαχωρισμός των μακρομορίων με βάση το μοριακό τους βάρος.

Πίνακας 2- 3 Επιλογή ποσοστού ακρυλαμίδης στο πήκτωμα διαχωρισμού με βάση το μοριακό βάρος των υπό διαχωρισμό πρωτεϊνών.

% πήκτωμα ακρυλαμίδης	Εύρος M.B.
7	50- 500 kDa
10	20- 300 kDa
12	10- 200 kDa
15	3- 100 kDa

Τα πρωτεϊνικά δείγματα επωάστηκαν στους 100 °C, επί 5 λεπτά σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 150 Volt στο πήκτωμα διαχωρισμού (ώστε να μην ξεπερνιόνται τα 30 mA) και 250 Volt στο πήκτωμα συμπύκνωσης, επί 1,5 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Στην παράγραφο 2.5.8 αναφέρονται αναλυτικά η σύσταση των πηκτωμάτων και των διαλυμάτων (Laemmli, 1970).

2.5.11 ΣΥΣΤΑΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ

Πίνακας 2- 4 Αποδιατακτικό πήκτωμα συμπύκνωσης.

	Σύσταση (mL)
Ακρυλαμίδη- Μπις- ακρυλαμίδη (30:0,8%)	1,3
1M Tris/HCl pH 6,8	1,25
10 % SDS	0,1
dH₂O	7,4
10% APS	0,05
TEMED	0,02

Πίνακας 2- 5 Αποδιατακτικό πήκτωμα διαχωρισμού διαφορετικών συγκεντρώσεων.

Ποσοστό Ακρυλαμίδης %	12	15	17
Ακρυλαμίδη- bis- ακρυλαμίδη (30:0,8%)	4,0	5,0	6,0
1M Tris/HCl pH 8,8	2,5	2,5	2,5
10 % SDS	0,1	0,1	0,1
dH₂O	3,35	2,35	1,35
10% APS	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,01	0,01	0,01

Πίνακας 2- 6 Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης SDS PAGE (4X).

Σύσταση	
1M Tris/HCl pH 6,8	2,5 mL
20 % SDS	4 mL
Γλυκερόλη	3 g
Μπλε της βρωμοφαινόλης 1 %	0,2 mL
Μερκαπτοαιθανόλη	1 mL

Πίνακας 2- 7 Ρυθμιστικό διάλυμα SDS ηλεκτροφόρησης.

Σύσταση (1X)	
Tris	25 mM
Γλυκίνη	200 mM
SDS	0,1 %

2.5.12 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ- ΧΡΩΣΗ COOMASIE

Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue όπως έχει ήδη αναφερθεί στην παράγραφο 2.5.6 χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών και εμφανίζεται με δύο μορφές. Ακριβέστερα, η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G- 250 διαφέρει από την αντίστοιχη R- 250 εξαιτίας της προσθήκης δύο μεθυλομάδων. Το γράμμα G προέρχεται από την πράσινη χροιά στο μπλε χρώμα της χρωστικής, ενώ το R από την κόκκινη χροιά. Στο διάλυμα χρώσης των πηκτωμάτων χρησιμοποιείται η Coomassie Brilliant Blue R- 250 με όριο ανίχνευσης τα 500 ng πρωτεΐνης.

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε:

- Αφαίρεση του πηκτώματος από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ξέπλυμα με νερό. Προσθήκη του διαλύματος χρώσης Coomassie (Πίνακας 2- 7) στο πηκτώμα (εμβάπτιση).
- Επώαση του πηκτώματος για 30 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαίρεση του διαλύματος χρώσης. Ξέπλυμα του πηκτώματος με απεσταγμένο νερό και προσθήκη του διαλύματος αποχρωματισμού (Πίνακας 2- 8). Έναλλαγή του τελευταίου με φρέσκο διάλυμα ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η χρήση χαρτιού Whatman που απορροφά τη χρωστική βοήθησε στον γρήγορο αποχρωματισμό.

Πίνακας 2- 8 Διάλυμα χρώσης Coomassie.

Σύσταση	
Coomassie Brilliant Blue R- 250	0,75 g/L
dH₂O	135 mL
Μεθανόλη	135 mL
Κρυσταλλικό Οξικό Οξύ	30 mL

Πίνακας 2- 9 Διάλυμα αποχρωματισμού Coomassie.

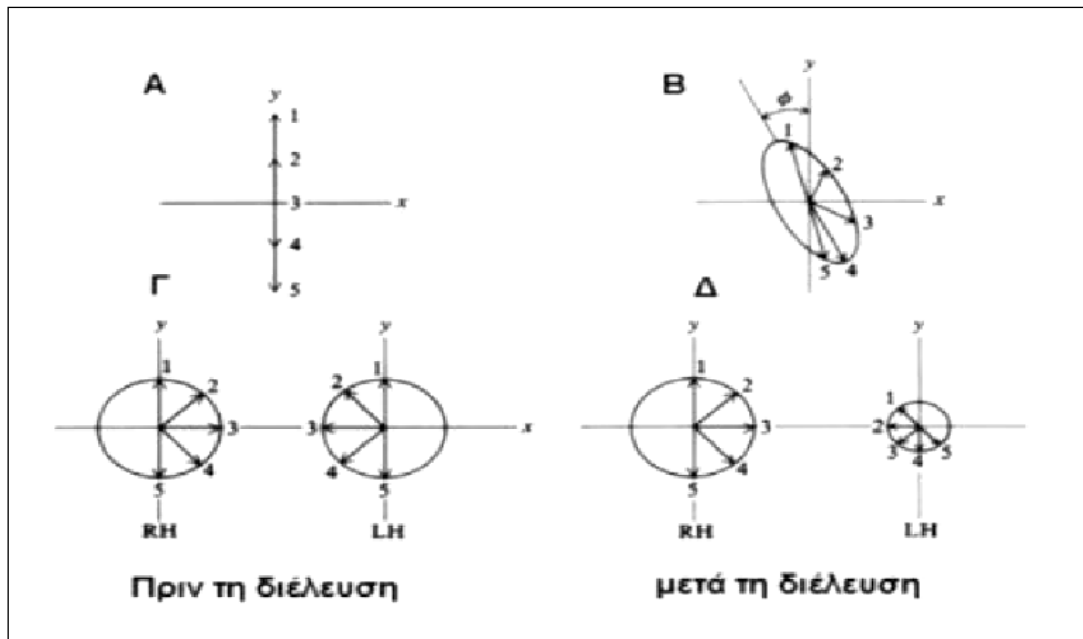
Σύσταση	
Κρυσταλλικό Οξικό Οξύ	10 % (v/v)
dH₂O	60 % (v/v)
Μεθανόλη	30 % (v/v)

Β' ΜΕΡΟΣ: ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ HUTth ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ

2.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ HUTth ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΟΪΣΜΟΥ

Με την τεχνική της φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχροϊσμού μετράμε την επαγόμενη ελλειπτικότητα στην πόλωση γραμμικά πολωμένου φωτός όταν αυτό διέρχεται από μία οπτικά ενεργό ουσία. Ως οπτικά ενεργές ουσίες χαρακτηρίζονται οι ουσίες που παρουσιάζουν τις εξής τέσσερις χαρακτηριστικές ιδιότητες αλληλεπίδρασης με το φως: (1) ισχύ οπτικής στρέψης (optical rotator power), στρέφουν δηλαδή το επίπεδο πόλωσης γραμμικά πολωμένου φωτός που διέρχεται μέσω αυτών, (2) κυκλική διπλοθλαστικότητα (circular birefringence), παρουσιάζουν δηλαδή διαφορετικό δείκτη διάθλασης για αριστερόστροφα και δεξιόστροφα κυκλικά πολωμένο φως, (3) κυκλικό διχροϊσμό (circular dichroism), την αλλαγή δηλαδή της πόλωσης από γραμμική σε ελλειπτική όταν γραμμικά πολωμένο φως διέρχεται μέσω αυτών και (4) παρουσιάζουν διαφορετικό συντελεστή απορρόφησης για δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένο φως.

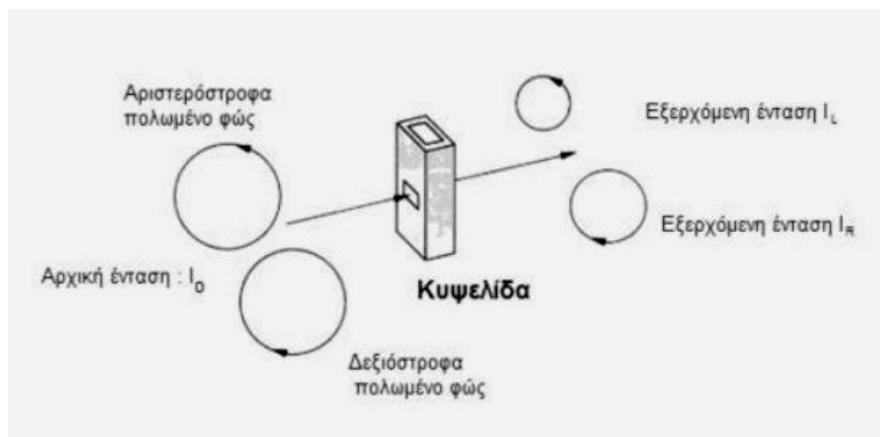
Η στρέψη του επιπέδου πόλωσης γραμμικά πολωμένου φωτός είναι συνέπεια της κυκλικής διπλοθλαστικότητας και ο κυκλικός διχροϊσμός είναι συνέπεια της διαφοράς των συντελεστών απορρόφησης για αντίθετης φοράς κυκλικά πολωμένο φως. Οι τέσσερις παραπάνω ιδιότητες ανάγονται σε δύο, με τις (1) και (2) να αφορούν στη διάθλαση και τις (3) και (4) να αφορούν στην απορρόφηση κυκλικά πολωμένου φωτός. Γνωρίζουμε από τη βασική θεωρία του ηλεκτρομαγνητισμού ότι η διάθλαση συνδέεται με την απορρόφηση, καθώς ισχυρότερη απορρόφηση συνεπάγεται ισχυρότερη διάθλαση. Με τον τρόπο αυτό, όποτε παρουσιάζεται ισχύς οπτικής στρέψης παρουσιάζεται και κυκλικός διχροϊσμός. Αυστηρά λοιπόν μιλώντας, ακόμα και σε περιοχές όπου το υλικό είναι διαφανές, θα πρέπει να αναφερόμαστε σε στρέψη του μεγάλου ημιάξονα της έλλειψης παρά σε στέψη του επιπέδου πόλωσης. Με την τεχνική φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχροϊσμού μετράται η ελλειπτικότητα θ στην πόλωση που προκαλεί μία οπτικά ενεργός ουσία σε γραμμικά πολωμένο φως, σαν συνάρτηση του μήκους κύματος λ (Εικόνα 18).



Εικόνα 18 Διανυσματική αναπαράσταση του ηλεκτρικού πεδίου στη διεύθυνση διάδοσης ακτινοβολίας για την περίπτωση ύπαρξης απορρόφησης οπτικά ενεργού ουσίας σε προσπίπτον γραμμικά πολωμένο φως. Οι θέσεις 1 έως 5 αντιστοιχούν σε ίσα χρονικά διαστήματα. (Α) Προσπίπτον γραμμικά πολωμένο φως. (Β) Εξερχόμενο ελλειπτικά πολωμένο φως με τον μεγάλο ημιάξονα της έλλειψης στραμμένο κατά γωνία ϕ ως προς το αρχικό επίπεδο πόλωσης. (Γ) Ανάλυση γραμμικά πολωμένου φωτός σε δύο κυκλικά πολωμένες συνιστώσες με αντίθετη φορά πόλωσης. (Δ) Η επίδραση της οπτικά ενεργού ουσίας στις κυκλικά πολωμένες συνιστώσες αντίθετης φοράς πόλωσης. Το άθροισμα των συνιστωσών του Δ δίνει το Β.

Η αρχή λειτουργίας βασίζεται στην ισοδυναμία που εκφράζουν τα διαγράμματα της εικόνας 20B και 20Δ. Γραμμικά πολωμένες δέσμες φωτός με δεξιόστροφες και αριστερόστροφες συνιστώσες της ίδιας αρχικής έντασης I_0 διέρχονται από την κυψελίδα που περιέχει το υπό μελέτη δείγμα (Εικόνα 19).

Από τις τελικές τιμές έντασης I_L και I_R της εξερχόμενης ακτινοβολίας υπολογίζεται η διαφορά των απορροφήσεων A_r και A_i και βάσει αυτής της διαφοράς υπολογίζεται τελικά η ελλειπτικότητα θ (σε μοίρες): $\theta = 2.303(A_i - A_r)180/4\pi$.



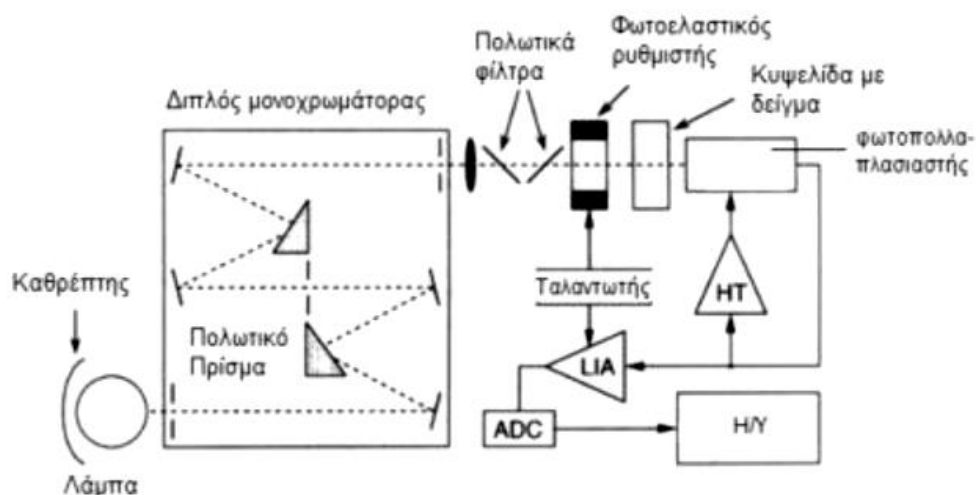
Εικόνα 19 Αντίθετης φοράς κυκλικά πολωμένες συνιστώσες της ίδιας έντασης I_0 προσπίπτουν στην κυψελίδα που περιέχει την οπτικά ενεργό ουσία. Με I_L και I_R παριστάνονται οι διαφορετικές τιμές έντασης για την εξερχόμενη αριστερόστροφα και δεξιόστροφα πολωμένου φωτός ακτινοβολία αντίστοιχα.

Σχεδόν όλα τα βιολογικά μόρια είναι οπτικά ενεργά μόρια. Επειδή τα επιμέρους δομικά συστατικά των βιομορίων απορροφούν ακτινοβολία σε διαφορετικές περιοχές μήκους κύματος, η φασματοσκοπία CD δίνει τη δυνατότητα, ανάλογα με την περιοχή κύματος, να διακρίνουμε διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά ενός μορίου σε διάλυμα. Το σήμα CD σε αυτές τις περιοχές μήκους κύματος είναι μη μηδενικό μόνο όταν το άμεσο περιβάλλον των οπτικά ενεργών μορίων είναι μη συμμετρικό, γιατί μόνο τότε το ηλεκτρονιακό νέφος των απεντοπισμένων π ηλεκτρονίων των αρωματικών δακτυλίων συστρέφεται και σχηματίζει μία <ελικοειδή> διάταξη.

Η σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης κυκλικού διχροϊσμού παρουσιάζεται στην εικόνα 20. Η πειραματική συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι το φασματοπολωσίμετρο JASCO- 715 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) με λειτουργικό εύρος μήκους κύματος στην περιοχή του ορατού (VIS) και του υπεριώδους (UV) ($\lambda_{\min} = 170 \text{ nm}$). Η φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχροϊσμού είναι μία τεχνική που μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στα ακόλουθα πεδία μελέτης:

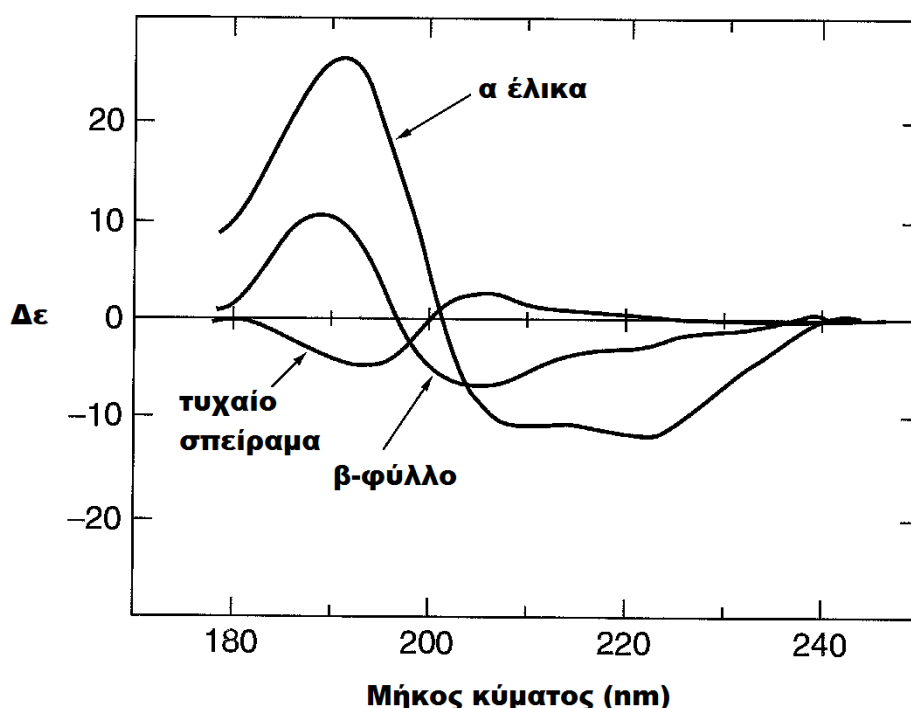
- Στο να διαπιστώσει κανείς αν η πρωτεΐνη βρίσκεται στην αναδιπλωμένη της μορφή, να προσδιορίσει την δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της και να την κατατάξει στην κατάλληλη δομική οικογένεια.

- Στη σύγκριση των δομών πρωτεϊνών που προέκυψαν από διαφορετικές πηγές, ή δομών της ίδιας πρωτεΐνης κάτω από διαφορετικές συνθήκες διαλύτη ή θερμοκρασίας ή ακόμα και μεταβολές στη δομή που προκαλούνται από μεταλλάξεις.
- Στη μελέτη του κατά πόσο αλληλεπιδράσεις τύπου πρωτεΐνης– πρωτεΐνης μεταβάλλουν τη δομή των αλληλεπιδρώντων μορίων.



Εικόνα 20 Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης κυκλικού διχροϊσμού.

Είναι χαρακτηριστικό ότι η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχροϊσμού στη περιοχή του άπω υπεριώδους (190- 250 nm). Στη περιοχή αυτή η χρωμοφόρος ομάδα είναι ο πεπτιδικός δεσμός και εμφανίζει μη μηδενικό σήμα όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στην αναδιπλωμένη δομή. Οι δομές α- έλικας, β- φύλλου και τυχαίου σπειράματος αποδίδουν ένα χαρακτηριστικό σε σχήμα και ένταση φάσμα κυκλικού διχροϊσμού (Εικόνα 21). Ακριβέστερα, η α- έλικα παρουσιάζει δυο αρνητικές κορυφές στα 208 και 222nm και μια θετική στα 193nm και η β- πτυχωτή επιφάνεια παρουσιάζει μια ευρεία αρνητική κορυφή στα 218nm και μια θετική στα 195nm. Όπως και οι υπόλοιπες φασματοσκοπικές τεχνικές, τα σήματα του κυκλικού διχροϊσμού απεικονίζουν τον μέσο όρο ολόκληρου του πρωτεϊνικού πληθυσμού. Για το λόγο αυτό, ενώ μπορεί κανείς να υπολογίσει ότι πχ. Το 50% των αμινοξικών καταλοίπων μίας πρωτεΐνης συμμετέχουν στον σχηματισμό κάποιας α- έλικας, δεν μπορεί να προσδιορίσει ποια ακριβώς είναι τα κατάλοιπα αυτά.



Εικόνα 21 Ιδανικό φάσμα κυκλικού διχροϊσμού της α- έλικας, του β- φύλλου και του τυχαίου σπειράματος.

Στα πειράματα CD που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία διαφανής στο εύρος 190- 350 nm με οπτική διαδρομή 1 cm για μετρήσεις στη περιοχή του εγγύς υπεριώδους και 1 nm για μετρήσεις στη περιοχή του άπω υπεριώδους. η χρήση ψυκτικού συστήματος Peltier με υδάτινο λουτρό επιτρέπει τη λήψη φάσματος CD σε επιλέξιμη σταθερή θερμοκρασία καθώς και την καταγραφή της μεταβολής της ελλειπτικότητας, σε επιλεγμένο, σταθερό μήκος κύματος, συναρτήσει της θερμοκρασίας για σταθερό ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας του δείγματος.

Ένα πείραμα κυκλικού διχροϊσμού απαιτεί περίπου 200 μL πρωτεϊνικού διαλύματος σε συγκεντρώσεις από 50 $\mu\text{g/mL}$ έως και 1 mg/mL , ανάλογα με την πρωτεΐνη, με διαλύτη οποιοδήποτε ρυθμιστικό διάλυμα που δεν εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση στην περιοχή αυτή (υψηλές συγκεντρώσεις DTT, ιμιδαζολίου ή ιστιδίνης δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην περιοχή του άπω υπεριώδους).

Οποιοδήποτε πρωτεϊνικό φάσμα κυκλικού διχροϊσμού μπορεί να αναλυθεί σαν

γραμμικός συνδυασμός των χαρακτηριστικών αυτών φασμάτων με την προσθήκη ενός όρου θορύβου, που αντικατοπτρίζει την συνεισφορά των αρωματικών χρωμοφόρων.

Επομένως, για τον υπολογισμό των στοιχείων δομής χρησιμοποιεί κανείς την εξίσωση: $\theta_\lambda = \sum F_{i,\lambda} S_{\lambda,i} + \theta_{\text{όρυβος}}$. Όπου θ_λ ο κυκλικός διχροϊσμός της πρωτεΐνης σαν συνάρτηση του μήκους κύματος λ , $F_{i,\lambda}$ το κλάσμα συμμετοχής του κάθε στοιχείου δευτεροταγούς δομής I στην όλη πρωτεϊνική διαμόρφωση και σε μήκος κύματος λ και όπου $S_{\lambda,i}$ η ελλειπτικότητα σε μήκος κύματος λ του χαρακτηριστικού φάσματος κάθε στοιχείου δευτεροταγούς δομής i .

Το πρωτεϊνικό φάσμα κυκλικού διχροϊσμού στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους (250- 350 nm) εμφανίζει ευαισθησία σε συγκεκριμένα στοιχεία τριτοταγούς δομής. Σε αυτά τα μήκη κύματος τα χρωμοφόρα είναι τα αρωματικά αμινοξέα και οι δισουλφιδικοί δεσμοί της πρωτεΐνης τα σήματα των οποίων είναι ευαίσθητα στην όλη διεύθυνση του μορίου στο χώρο. Στην περιοχή 250- 270 nm απορροφά κυρίως η φαινυλαλανίνη, στη περιοχή 270- 290 nm απορροφά η τρυπτοφάνη. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί δίνουν ασθενή σήματα σε όλη την περιοχή του εγγύς υπεριώδους. Αν η πρωτεΐνη διατηρεί στοιχεία δευτεροταγούς δομής αλλά δεν υπάρχει σαφώς καθορισμένη τριτοταγής δομή (πχ. αναδιπλωμένη πρωτεΐνη σε μη λειτουργική διαμόρφωση), τότε τα σήματα στη περιοχή αυτή θα κινούνται σε μηδενικές τιμές. Αν όμως υπάρχουν σημαντικά σήματα στο εγγύς υπεριώδες τότε μπορούμε να υποθέσουμε με ασφάλεια ότι η πρωτεΐνη που μελετάμε αναδιπλώθηκε σε μία αυστηρά καθορισμένη δομή. Το φάσμα κυκλικού διχροϊσμού στο εγγύς υπεριώδες είναι ευαίσθητο και σε μεταβολές στη δομή που οφείλονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων ή σε μεταβολή των συνθηκών του διαλύτη. Η ένταση των σημάτων στην περιοχή αυτή είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή του μακρινού υπεριώδους και για τη λήψη των φασμάτων αυτών απαιτούνται περίπου 600 μL διαλύματος πρωτεΐνης με συγκέντρωση 0,3- 2 mg/mL, ανάλογα πάντα με το πρωτεϊνικό μόριο (Greenfield, 2004, 2006a, 2006b; Kelly & Price, 1997; Yang, Wu, & Martinez, 1986).

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήσαμε 0.75 mg/mL καθαρής HUTth πρωτεΐνης η οποία βρισκόταν σε διάλυμα 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.0.

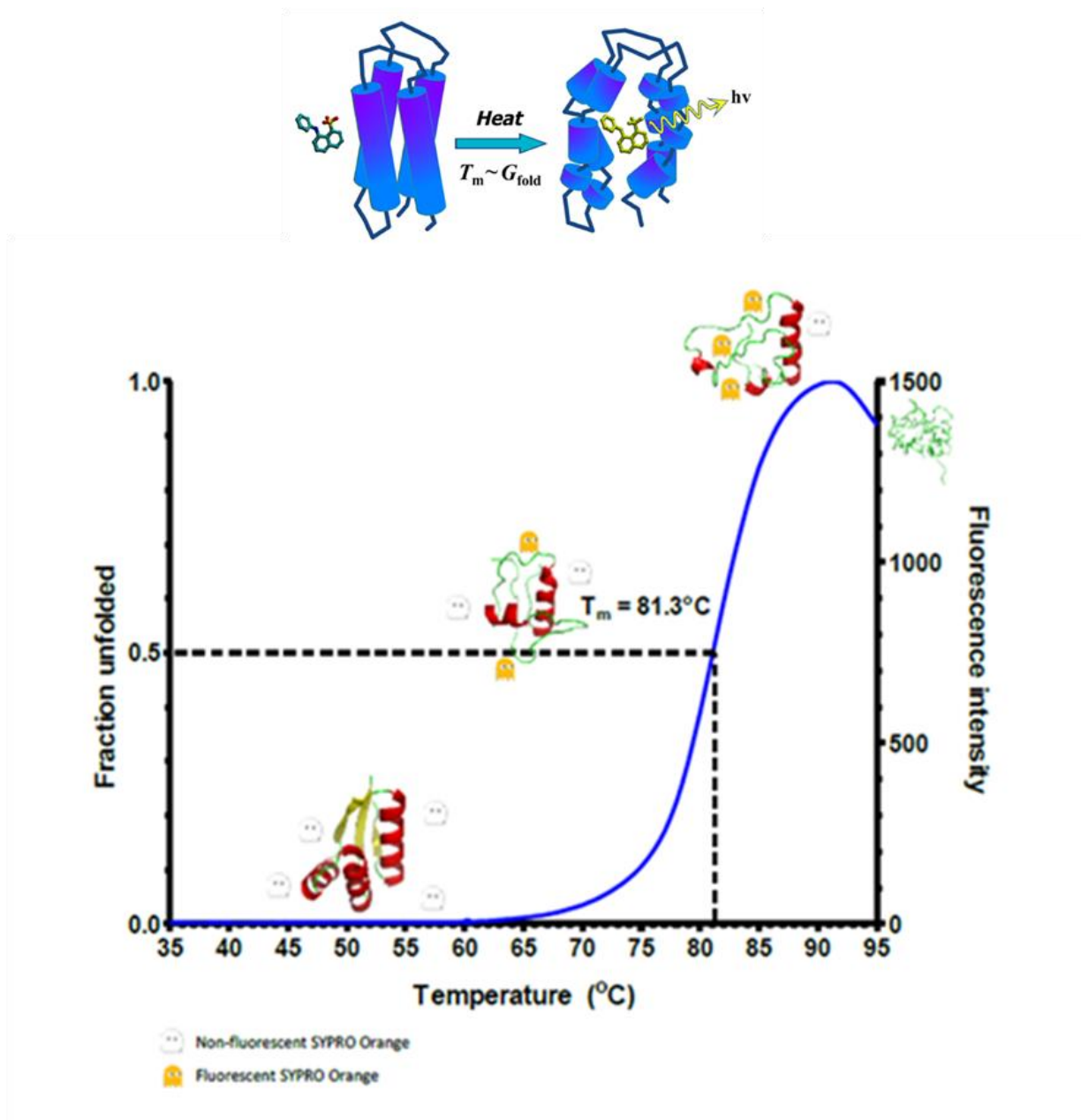
2.7 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ H_UT_{th} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΣΑΡΩΣΗΣ (DSF, DIFFERENTIAL SCANNING FLUORIMETRY)

Η φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης είναι μια δοκιμασία θερμικής μετουσίωσης που μετρά τη θερμική σταθερότητα της πρωτεΐνης- στόχου. Κατά τη διαδικασία, μία χρωστική (συνήθως η SYPRO Orange) αλληλεπιδρά με τις εκτεθειμένες υδρόφοβες περιοχές που παράγονται από μερική ή πλήρη αποδίπλωση των πρωτεϊνών.

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση αλλαγών λόγω της έκθεσης του υδρόφοβου πυρήνα της πρωτεΐνης κατά τη θερμική μετουσίωση. Ακριβέστερα, η χρωστική δεν φθορίζει όταν βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα, αλλά όταν τα αρωματικά της τμήματα παρεμβάλλονται σε ένα υδρόφοβο πυρήνα, ανακτά την δυνατότητα φθορισμού.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας ώστε όταν φτάσει στο T_m της πρωτεΐνης, τη θερμοκρασία όπου ο μισός πληθυσμός θα είναι ξεδιπλωμένος, να υπάρξει απότομος φθορισμός.

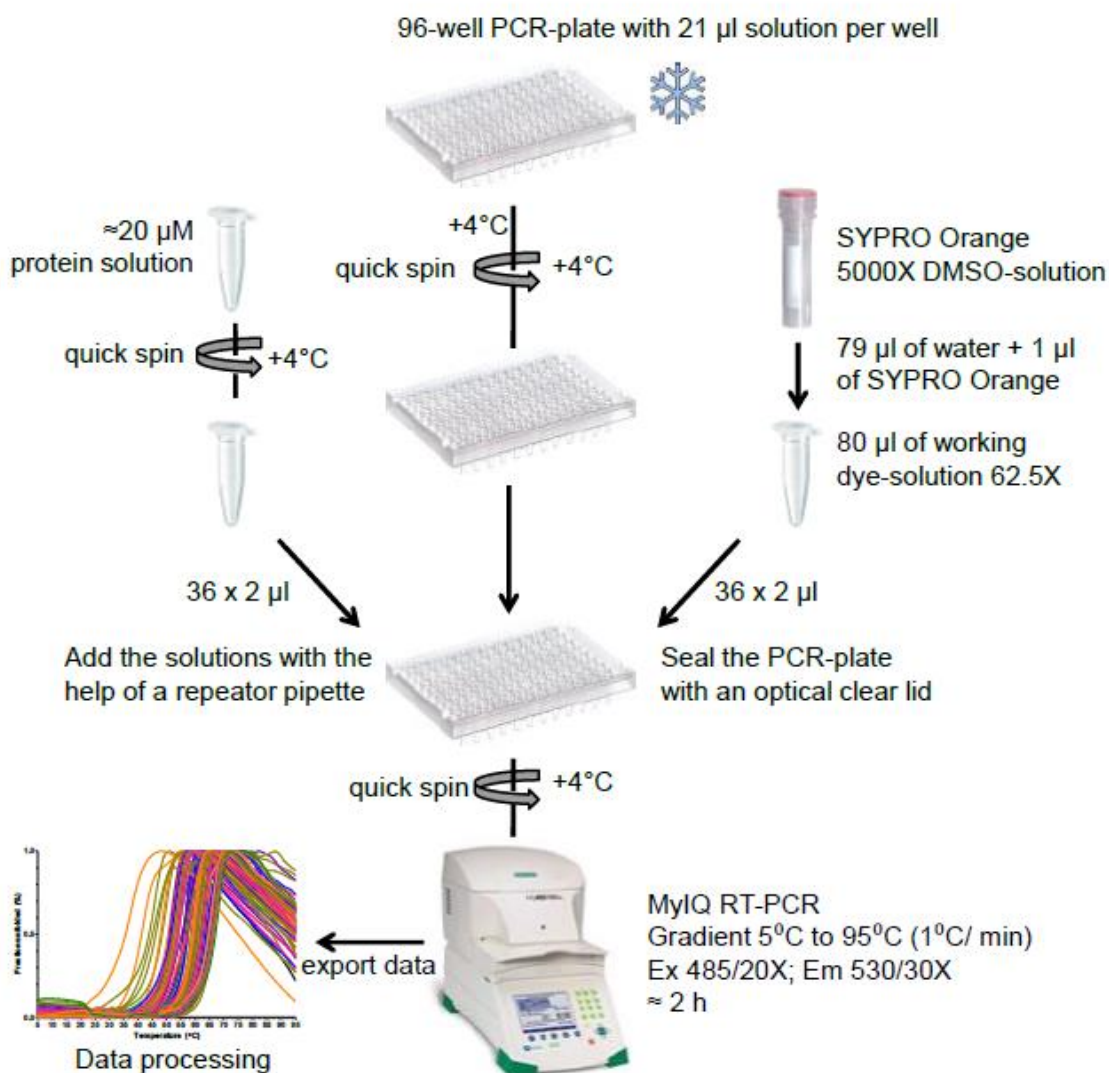
Ένα πείραμα φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης απαιτεί πρωτεΐνη συγκέντρωσης της τάξης των 20 μ M αν και εξαρτάται πάντα από το πρωτεϊνικό μόριο. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε Real- Time PCR θερμικούς κυκλοποιητές οι οποίοι μπορεί να δεχτούν και πλάκα 96 πηγαδιών, κάτι που προσδίνει τη δυνατότητα ελέγχου της θερμικής σταθερότητας της πρωτεΐνης σε πολλές διαφορετικές συνθήκες (Boivin, Kozak, & Meijers, 2013).



Εικόνα 22 Τυπική δοκιμασία θερμικής μετουσίωσης με φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης. Καμπύλη τήξεως της ισομεράσης της γλυκόζης σε 100 mM Tris- HCl pH 8.5.

Η φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του T_m της πρωτεΐνης καθώς επίσης και για τον ποιοτικό έλεγχο της πρωτεΐνης πριν αυτή χρησιμοποιηθεί για πειράματα κρυστάλλωσης κτλ. Μέσα από αυτή τη διαδικασία μπορούν να ανιχνευθούν τα διαλύματα που μεγιστοποιούν τη θερμοσταθερότητα της πρωτεΐνης. Στην εικόνα 22 περιγράφεται η αρχή της δοκιμασίας θερμικής μετουσίωσης ενώ στην εικόνα 23 παρατηρείται μια γενική επισκόπηση του

πρωτοκόλλου της συγκεκριμένης διαδικασίας.



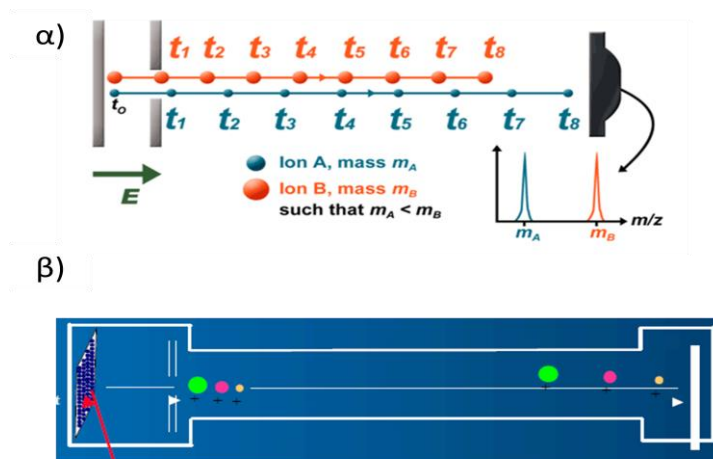
Εικόνα 23 Γενική επισκόπηση του πρωτοκόλλου της φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήσαμε $20 \mu\text{M}$ καθαρισμένης HUTth πρωτεΐνης η οποία βρισκόταν σε διάλυμα 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0, με σκοπό να μελετήσουμε τη θερμική σταθερότητα της πρωτεΐνης στο συγκεκριμένο διάλυμα, προτού προχωρήσουμε σε πειράματα κρυστάλλωσης. Επιπλέον, δεύτερος στόχος ήταν ο επανέλεγχος της θερμοκρασίας τήξης της πρωτεΐνης. Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η SYPRO Orange, και το δείγμα θερμάνθηκε από τους 5°C στους 95°C (με αύξηση της θερμοκρασίας $1^\circ\text{C}/1 \text{ min}$).

2.8 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ H_UT_{th} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ (MALDI- TOF MASS SPECTROSCOPY)

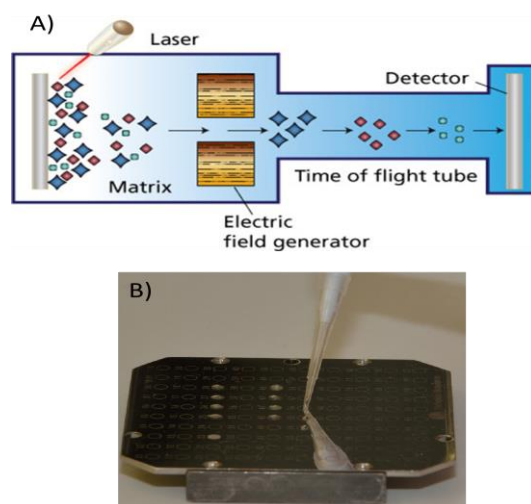
Η Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) φασματοσκοπία μαζών αποτελεί μία μέθοδο ιονισμού, ευρέως χρησιμοποιούμενη σε περιπτώσεις που τα πειράματα αφορούν τη μελέτη βιομορίων, όπως οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια, τα οποία γενικά τείνουν να είναι μη πτητικά και ασταθή, ιδιαίτερα κατά τη θέρμανσή τους.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο, αρχικά πραγματοποιείται ανάμειξη του προς μελέτη δείγματος με μια ουσία που ονομάζεται συστατικό μήτρας (matrix compound). Το μείγμα στη συνέχεια τοποθετείται σε ένα πλακίδιο, όπου και στεγνώνει. Έτσι τα μόρια της μήτρας και του δείγματος συν- κρυσταλλώνονται. Στην πορεία τα μόρια του μείγματος βομβαρδίζονται από μία δέσμη laser ώστε να ιονιστούν. Η ενέργεια που διοχετεύεται από το laser μετατρέπεται από τη μήτρα σε ενέργεια διέγερσης για το δείγμα, με αποτέλεσμα τόσο τα ιόντα της μήτρας όσο και του δείγματος να εκτοξεύονται από την επιφάνεια του πλακιδίου.



Εικόνα 24 MALDI- TOF: α) Διαχωρισμός με βάσει το Time of Flight, β) Σωλήνας πτήσης υπό συνθήκες κενού αέρα.

Πρέπει να σημειωθεί πως αυτή είναι μια ασφαλής μέθοδος για να μεταφερθεί μεγάλο ποσό ενέργειας στα μόρια του δείγματος χωρίς αυτά να καταστραφούν από την απευθείας πρόσληψη υπερβολικής ενέργειας, που θα μπορούσε υπό άλλες συνθήκες να οδηγήσει στην χημική τους διάσπαση.



Εικόνα 25 Η μέθοδος MALDI- TOF. Α) Αρχή λειτουργίας φασματογράφου MALDI – TOF. Β) Πλακίδιο πειράματος.

Στη συνέχεια, τα μόρια του δείγματος με την ενέργεια που έχουν προσλάβει εισέρχονται στον αναλυτή μάζας (mass analyzer) του φασματογράφου, ο οποίος, κάνοντας χρήση της τεχνικής Time- of- Flight (ToF), διαχωρίζει τα ιόντα του δείγματος με βάση τον λόγο m/z και τον χρόνο που αυτά χρειάζονται για να διασχίσουν τον σωλήνα πτήσης (flight tube). Αναλυτικότερα, η λειτουργία των Time-of- flight (ToF) αναλυτών στηρίζεται στην βασική αρχή ότι αν τα ιόντα έχουν το ίδιο φορτίο, η ταχύτητα που θα αναπτύξουν κατά την πτήση τους στο σωλήνα (flight tube), υπό συνθήκες κενού αέρα, θα εξαρτάται μόνο από τη μάζα τους. Έτσι, ελαφρύτερα μόρια θα χρειαστούν λιγότερο χρόνο για να διανύσουν την απόσταση έως τον ανιχνευτή, ενώ αντιθέτως τα πιο βαριά ιόντα θα φθάσουν αργότερα στον ανιχνευτή, όπως φαίνεται και στην εικόνα 24.

Τα αρχικά φάσματα που προκύπτουν από το πείραμα εκφράζουν τον χρόνο πτήσης (Time Of Flight) των ιόντων σε συνάρτηση με τον αριθμό των ιόντων που καταφθάνουν στον ανιχνευτή, και ορίζεται εναλλακτικά ως η ένταση (intensity) των ιόντων. Δεδομένου όμως ότι η ταχύτητα ενός ιόντος είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη μάζα του ιόντος και κατ' επέκταση με τον λόγο m/z , εφαρμόζεται ένας τετραγωνικός μετασχηματισμός στο χρόνο πτήσης για να προκύψουν οι αντίστοιχες m/z τιμές (Caprioli, Farmer, & Gile, 1997; Kondo & Nishimura, 2009; Nishimura et al., 2004; Tani et al., 2012).

Στην εικόνα 25 περιγράφεται η μέθοδος MALDI- TOF καθώς και η διάταξη των αναλυτών που χρησιμοποιούνται.

Πραγματοποιήσαμε τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία με σκοπό να μετρήσουμε το ακριβές μοριακό βάρος της HUTth πρωτεΐνης και την καθαρότητα του δείγματός μας. Ως μήτρα χρησιμοποιήσαμε σιναπινικό οξύ.

2.9 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ HUTth ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ (DLS, DYNAMIC LIGHT SCATTERING)

Η τεχνική της σκέδασης του φωτός αποτελεί μια από τις σημαντικότερες πειραματικές τεχνικές για το χαρακτηρισμό των μακρομορίων σε αραιά διαλύματα, διότι επιτρέπει τον προσδιορισμό της γυροσκοπικής ακτίνας, R_g (στατική σκέδαση φωτός), καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h (δυναμική σκέδαση του φωτός).

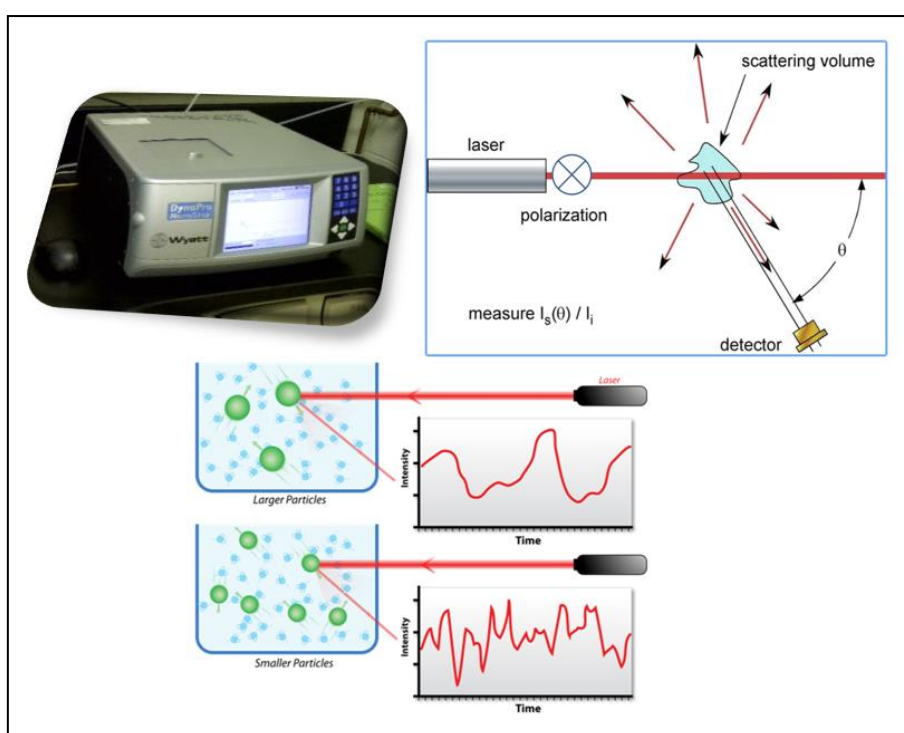
Όταν μια δέσμη φωτός προσπέσει σε ένα διάλυμα ένα μέρος της ακτινοβολίας διέρχεται μέσα από το διάλυμα και το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Στην περίπτωση διαλυμάτων μακρομορίων η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη των διαλυμάτων των “μικρών” μορίων. Η όλη τεχνική της σκέδασης του φωτός συνίσταται στη μέτρηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα σε διάφορες κατευθύνσεις σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία.

Η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering) είναι επίσης γνωστή με τα εναλλακτικά ονόματα: *οιονεί ελαστική σκέδαση φωτός* – QELS (quasi- elastic light scattering) και *φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων* – (photon correlation spectroscopy). Σήμερα, η τεχνική της δυναμικής σκέδασης του φωτός θεωρείται μια καθιερωμένη τεχνική μέτρησης του συντελεστή διάχυσης (μεταφοράς και περιστροφής) των μορίων σε αραιά διαλύματά τους, αλλά και του μεγέθους και του σχήματος των σωματιδίων καθώς και της πολυδιασποράς του συστήματος.

Στη δυναμική σκέδαση φωτός γίνεται χρήση μονοχρωματικής ακτινοβολίας και μετράται, υπό συγκεκριμένη γωνία, η χρονική διακύμανση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας υπό γωνία θ . Η χρονική αυτή διακύμανση οφείλεται στο γεγονός ότι η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός στον ανιχνευτή είναι αποτέλεσμα τη συμβολής της ακτινοβολίας, που προέρχεται από τα διάφορα σωματίδια, τα οποία

κινούνται άτακτα λόγω θερμικής κίνησης. Καθώς τα σωματίδια κινούνται από ή προς τον ανιχνευτή προκύπτει μια διεύρυνση των συχνοτήτων λόγω του φαινομένου Doppler.

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την δυναμική σκέδαση του φωτός καθώς και η αρχή της μεθόδου απεικονίζονται στην εικόνα 26. Το κυρίως κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας από το laser περνά μέσα από τη θερμοστατούμενη κυψελίδα του δείγματος. Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία ενισχύεται, διαχωρίζεται και διοχετεύεται στον συσχετιστή (correlator), απ' όπου η συσχετισμένη ακτινοβολία καταγράφεται στην οθόνη του υπολογιστή.



Εικόνα 26 Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την δυναμική σκέδαση του φωτός καθώς και η αρχή της μεθόδου.

Συνοψίζοντας, η δυναμική σκέδασης φωτός είναι μία μέθοδος που υπολογίζει τη σταθερά διάχυσης, την υδροδυναμική ακτίνα καθώς και την πολυδιασπορά και έτσι χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό πρωτεϊνικών διαλυμάτων. Η μέθοδος μπορεί να διαχωρίσει πληθυσμούς εφόσον η ακτίνα τους διαφέρει κατά 3- 5 φορές. Δεν αποτελεί ακριβή μέθοδο για την μελέτη του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης (Jans, Liu, Austin, Maes, & Huo, 2009; Wang, Cook, & Pecora, 1980). Πραγματοποιήσαμε τη συγκεκριμένη τεχνική με στόχο να μελετήσουμε την καθαρότητα της HUTth

καθώς και τον βαθμό συσσωμάτωσής της στο διάλυμα. Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήσαμε πρωτεΐνη συγκέντρωσης 1 mg/mL.

2.10 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ HUT_{th} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΟ DNA ΜΕ ΜΙΚΡΟΘΕΡΜΟΦΟΡΕΣΗ (MST, MICROSCALE THERMOPHORESIS)

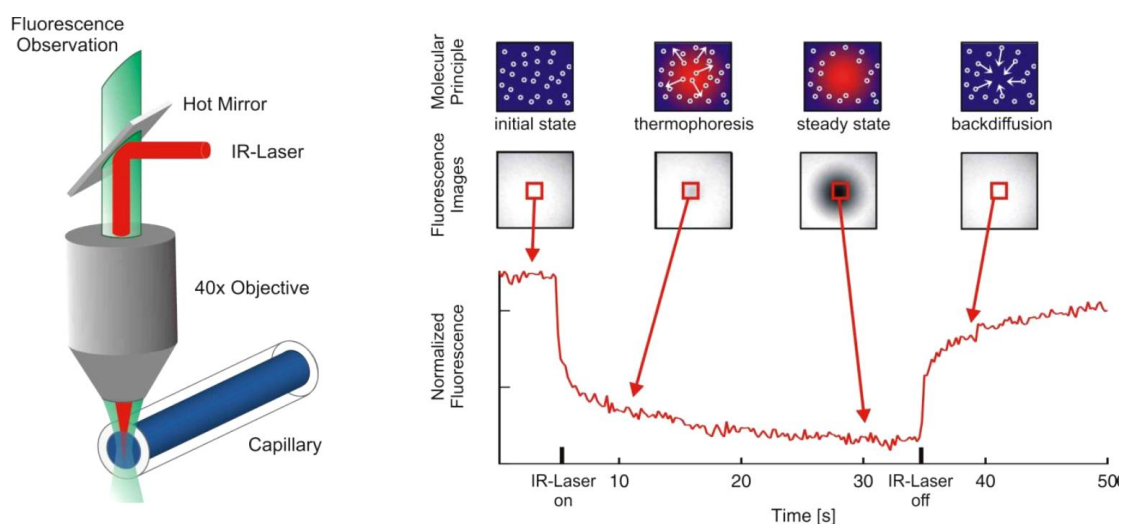
Η μικροθερμοφόρηση (MST) βασίζεται σε μια φυσική αρχή που χρησιμοποιείται για πρώτη φορά στην βιολογική ανάλυση. Ανιχνεύει αλλαγές στο κέλυφος ενυδάτωσης, στο φορτίο ή στο μέγεθος των μορίων με τη μέτρηση μεταβολών της κινητικότητάς τους σε μικροσκοπικές θερμοκρασιακές κλίσεις. Έτσι, επιτρέπει την ταχεία ανίχνευση ευρέος φάσματος βιομοριακών αλληλεπιδράσεων.

Η μέθοδος βασίζεται στην κατευθυνόμενη κίνηση των μορίων κατά μήκος μιας διαβάθμισης θερμοκρασίας, ένα φαινόμενο που ονομάζεται "θερμοφόρηση". Μια τοπική διαφορά θερμοκρασίας ΔT οδηγεί σε μια τοπική αλλαγή στη συγκέντρωση του μορίου (εξάντληση ή εμπλουτισμού), η οποία ποσοτικοποιείται από το συντελεστή Soret: $S_T: c_{hot} / c_{cold} = \exp(-S_T \Delta T)$.

Η θερμοφόρηση εξαρτάται από αλλαγές στο μέγεθος, το φορτίο και το κέλυφος ενυδάτωσης των μορίων. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο, μελετάται η θερμοφόρηση φθορίζοντων μορίων σε πειράματα τιτλοδότησης όπου το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρείται πάντα σταθερό. Καθώς το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρείται σταθερό, μεταβολές στην θερμοφορητική εξάντληση ή εμπλουτισμό μπορούν να προκύψουν μόνο από αλλαγές στο μέγεθος, το φορτίο ή την εντροπία ενυδάτωσης των φθορίζοντων μορίων. Δεδομένου ότι η δέσμευση ενός τιτλοδοτημένου, μη φθορίζοντα μορίου, σε ένα επισημασμένο μόριο αλλάζει τουλάχιστον μία από αυτές τις ιδιότητες, η σύνδεση μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με μέτρηση της αλλαγής ως προς τη θερμοφόρηση.

Η θερμοφορητική κίνηση του φθορίζοντος μορίου μετράται με παρακολούθηση της F κατανομής φθορισμού μέσα σε ένα τριχοειδές με το όργανο NanoTemper Monolith (Εικόνα 27, αριστερά). Η μικροσκοπική διαβάθμιση της θερμοκρασίας παράγεται από ένα λέιζερ IR, το οποίο εστιάζεται στον τριχοειδή σωλήνα και απορροφάται έντονα από το νερό. Η θερμοκρασία του υδατικού διαλύματος στο εσωτερικό της

κηλίδας του λέιζερ τυπικά αυξάνει κατά 2 K- 6 K σε σύγκριση με την περιφέρεια και δημιουργείται έτσι μια ισχυρή βαθμίδωση της θερμοκρασίας. Πριν την ενεργοποίηση του λέιζερ IR μία ομοιογενή κατανομή των μορίων παρατηρείται στο εσωτερικό του τριχοειδούς. Όταν το λέιζερ IR ενεργοποιείται, δύο φαινόμενα παρατηρούνται. Στο πρώτο φαινόμενο, ο φθορισμός της χρωστικής αλλάζει εξαιτίας της εγγενούς εξάρτησης του από τη θερμοκρασία. Στο δεύτερο φαινόμενο, τα μόρια κινούνται από τη τοπικά θερμαινόμενη περιοχή προς τις εξωτερικά ψυχρές περιοχές και ως εκ τούτου η συγκέντρωση των μορίων στην τοπικά θερμαινόμενη περιοχή μειώνεται μέχρι να φτάσει σε μια σταθερή κατάσταση σε μια χρονική κλίμακα από περίπου 10 s- 30 s η οποία καθορίζεται από τη διάχυση της μάζας. (Εικόνα 27, δεξιά) (Gaffarogullari, Krause, Balbo, Herten, & Jaschke, 2013; Seidel et al., 2013; Wienken, Baaske, Rothbauer, Braun, & Duhr, 2010; W. Zhang, Duhr, Baaske, & Laue, 2014; Zillner et al., 2012).



Εικόνα 27 Μέθοδος θερμοφόρησης. (αριστερά) Το διάλυμα εντός του τριχοειδούς τοπικά θερμαίνεται με το εστιασμένο λέιζερ IR. (δεξιά) Ο φθορισμός στο εσωτερικό του τριχοειδούς απεικονίζεται με μία φωτοδιόδο και ο κανονικοποιημένος φθορισμός στο θερμαινόμενο σημείο παρίσταται στο γράφημα έναντι του χρόνου. Το λέιζερ IR είναι ενεργοποιημένο σε χρόνο 5 δευτερολέπτων. Ο φθορισμός μειώνεται καθώς αυξάνει η θερμοκρασία και τα φθορίζοντα μόρια που σχηματίζουν σύμπλοκα κινούνται μακριά από το θερμαινόμενο σημείο λόγω της θερμοφόρησης.

Χρησιμοποιήσαμε τη συγκεκριμένη μέθοδο για να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση της HUTth πρωτεΐνης με πλασμιδιακό DNA. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήσαμε 20 μ M πρωτεΐνης και διαφορετικές συγκεντρώσεις πλασμιδιακού DNA (pUC18).

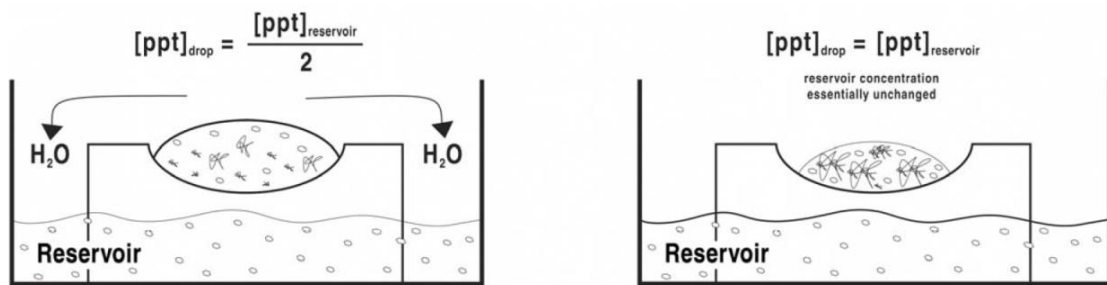
2.11 ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ HU*Tth* ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Σε επίπεδο δομικής ανάλυσης κρυσταλλώσαμε την HU*Tth* πρωτεΐνη με τη χρήση ρομποτικών συστημάτων κρυστάλλωσης, εφαρμόζοντας τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας (sitting drop) και την τεχνική εξάτμισης και διάχυσης των ατμών (vapour diffusion). Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου απεικονίζεται στην εικόνα 28.

Η διαδικασία μικροκρυστάλλωσης γίνεται με ρομποτικά συστήματα, όπως αναφέρεται και παραπάνω, διότι οι όγκοι που χρησιμοποιούνται είναι της τάξης των nL (nanodrops). Η επιλογή αυτής της διαδικασίας έχει τα πλεονεκτήματα ότι 1) χρησιμοποιείται ελάχιστο υλικό και 2) απαιτεί ελάχιστο χρόνο εξισορρόπησης των διαλυμάτων μεταξύ της σταγόνας και του reservoir. Επομένως, η μικροκρυστάλλωση είναι ιδανική για γρήγορο screening διαφόρων συνθηκών κρυστάλλωσης. Οι κρύσταλλοι που αποκτώνται με τη συγκεκριμένη μέθοδο χαρακτηρίζονται μικροκρύσταλλοι και είναι δυνατόν να σκεδαστούν με τη χρήση μικρο-ακτίνας σε πειραματική διάταξη συγχροτρονίου. Στα πλαίσια του Biostruct-X έχουμε τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε ακτίνες-X, κάτι που προβλέπεται να γίνει όταν έχουμε αρκετούς κρυστάλλους και χρόνο στο σύγχροτρονιο.

Ακριβέστερα, χρησιμοποιήσαμε εμπορικά screening kits (PACT Premier MD1-29, PEGs Suite, QIAGEN, Classics I, QIAGEN, Classics II, QIAGEN, Morpheus_HT- 96, MD, Nucleix, QIAGEN) και χρησιμοποιήσαμε πρωτεΐνη συγκέντρωσης 10 mg/ml. Οι σταγόνες είχαν τελικό όγκο 300 nL, ενώ η αναλογία πρωτεΐνης: reservoir ήταν 2:1. Το πείραμα πραγματοποιούνταν σε θερμοκρασία δωματίου ενώ η φύλαξη σε θερμοκρασία των 16 °C.

Με τα συγκεκριμένα screening kits που χρησιμοποιήσαμε μελετήσαμε διαφορετικές συνθήκες που περιελάμβαναν: διάφορα αλάτια, εύρος τιμών pH και διαφορετικούς κατακρημνιστές.



Εικόνα 28 Αρχή μεθόδου της καθήμενης σταγόνας με την τεχνική εξάτμισης και διάχυσης των ατμών.

Γ' ΜΕΡΟΣ: ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

2.12 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Στόχος της βιοπληροφορικής ανάλυσης είναι ο προσδιορισμός των παραμέτρων που σχετίζονται με τη θερμοσταθερότητα των πρωτεϊνών της οικογένειας HU. Για τη πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης κατασκευάστηκε μία βιβλιοθήκη ακολουθιών HU από το φύλο των αδοβακτηρίων [*Thermus* (θερμόφιλα βακτήρια)- *Deinococcus* (μεσόφιλα βακτήρια)] και χρησιμοποιήθηκαν δύο προσεγγίσεις α) ο υπολογισμός συναινετικών ακολουθιών από τη συγκεκριμένη βιβλιοθήκη και β) ο υπολογισμός προγονικών ακολουθιών.

Οι συγκεκριμένες ακολουθίες αναλύθηκαν σε επίπεδο πρωτοταγούς αλλά και τεταρτοταγούς δομής με στόχο να ι) να μελετηθούν οι προτιμήσεις των αμινοξέων ανά θέση και ιι) να μελετηθούν οι δεσμοί υδρογόνου και οι γέφυρες άλατος, χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη θερμοσταθερότητα των πρωτεϊνών. Δεν εξετάστηκαν οι θειογέφυρες καθώς οι HU πρωτεΐνες δεν περιέχουν κυστεΐνη και κατά συνέπεια η θερμοσταθερότητά τους είναι ανεξάρτητη από τις θειογέφυρες.

Για τον υπολογισμό συναινετικών ακολουθιών, ύστερα από τη πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα jalview (<http://www.jalview.org/>), ενώ για τον υπολογισμό προγονικών ακολουθιών, ύστερα από τη πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών και την φυλογενετική ανάλυση με τη μεθοδο της μπεισιανής ανάλυσης (MrBayes), χρησιμοποιήθηκε ο FastML διακομιστής (<http://fastml.tau.ac.il/>).

Η πολλαπλή στοίχιση των ακολουθιών που επιλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα muscle. Ακολούθησαν και επιπρόσθετες διορθώσεις στις οποίες τα συντηρημένα, λειτουργικά σημαντικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης, όπως αναφέρονται στην Conserved Domain Database του NCBI, κρατήθηκαν στοιχισμένα.

Η φυλογενετική ανάλυση με το πρόγραμμα MrBayes έγινε με τις παρακάτω παραμέτρους για τη βιβλιοθήκη των αδοβακτηρίων (*Thermus-Deinococcus*):

number of generations= 2.000.000, runs= 2, number of chains= 4, number of swaps= 2, sample frequency= 200, print frequency= 200, burn in fraction= 0.4, model= WAG + G, α = 1.2 Η πρόβλεψη των μοντέλων φυλογενετικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα TOPALI.

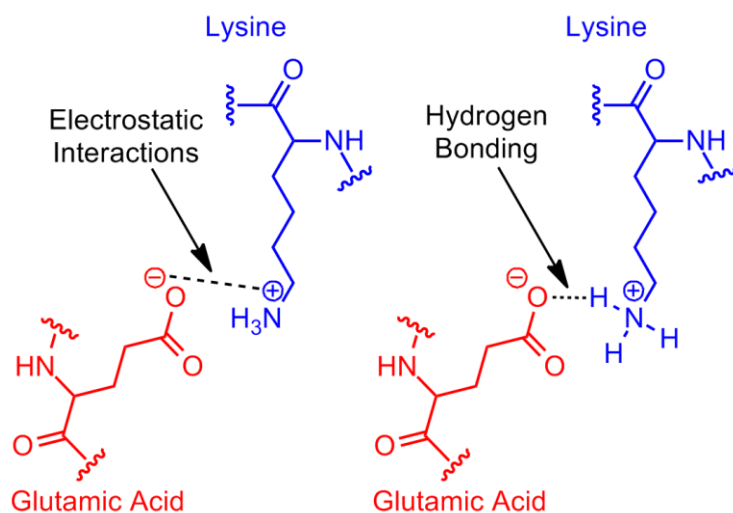
Για την εύρεση προτιμήσεων αμινοξέων ανά θέση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Unipro UGENE, ενώ η κατασκευή πρωτεϊνικών 3D μοντέλων έγινε με την τεχνική της Ομολογίας Προτυποποίησης (Homology Modeling) και χρησιμοποιώντας τον διακομιστή Swiss- Model του Expasy (<http://swissmodel.expasy.org/>). Με την προσέγγιση του Homology Modeling υπολογίζεται θεωρητικά η άγνωστη δομή μιας πρωτεΐνης εφόσον, υπάρχει σημαντική ομολογία (ομοιότητα) με πρωτεΐνη που έχει πειραματικά γνωστή δομή. Σε γενικές γραμμές, πρωτεΐνες με ομοιότητα στην ακολουθία σε ποσοστό άνω του 30% θεωρείται πως διπλώνουν στο χώρο με παρόμοιο τρόπο.

Για την εύρεση των δεσμών υδρογόνου κάθε δομής χρησιμοποιήθηκαν τα διαδικτυακά εργαλείο Optimal Hydrogen Bonding Network που διατίθεται από τον διακομιστή What If ενώ για τις γέφυρες άλατος χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό εργαλείο Salt Bridges που διατίθεται από τον διακομιστή What If.

Ο υδρογονικός δεσμός δημιουργείται στην περίπτωση που ένα άτομο υδρογόνου βρίσκεται μεταξύ δύο ηλεκτραρνητικών ατόμων στη διάταξη C- H...X- D, όπου C και X ηλεκτραρνητικά άτομα. Το μερικά θετικά φορτισμένο υδρογόνο (που είναι ομοιοπολικά ενωμένο με το C) έλκεται ηλεκτροστατικά από το X και έτσι παίζει ρόλο γέφυρας, δημιουργώντας ασθενή δεσμό μεταξύ τους. Επειδή είναι γνωστό ότι οι δεσμοί υδρογόνου είναι ένας από τους μηχανισμούς που συνεισφέρει στη σταθεροποίηση της δομής του μορίου και άρα στην αύξηση της θερμοσταθερότητάς του, ελέγξαμε συγκριτικά την ανάπτυξη δικτύων δεσμών υδρογόνου στις διάφορες πρωτεΐνες HU (μεσόφιλες και θερμόφιλες ακολουθίες).

Οι δεσμοί άλατος ανήκουν στην κατηγορία των μη ομοιοπολικών δεσμών. Μία γέφυρα άλατος είναι στην ουσία ένας συνδυασμός μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων: ενός δεσμού υδρογόνου και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Λόγω του ότι έχει διαπιστωθεί ότι οι γέφυρες άλατος είναι ένας από τους μηχανισμούς που συνεισφέρει στη σταθεροποίηση της δομής του

μορίου και άρα στην αύξηση της θερμοσταθερότητάς του, ελέγξαμε συγκριτικά την ανάπτυξη γεφυρών άλατος στις διάφορες πρωτεΐνες HU (μεσόφιλες και θερμόφιλες ακολουθίες).



Εικόνα 29 Παράδειγμα γέφυρας άλατος μεταξύ των αμινοξέων λυσίνη και γλουταμικού. Απεικονίζονται τόσο ο δεσμός υδρογόνου, όσο και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *hutth*

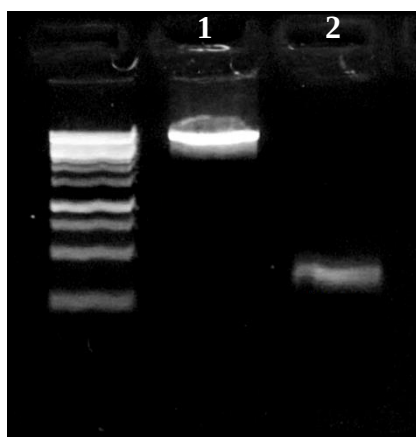
Η απομόνωση του γονιδίου *hutth* από το γενωμικό DNA του *T. thermophilus* HB8 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την Taq Recombinant πολυμεράση. Η ανάλυση ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδίου πραγματοποιήθηκε έπειτα από την κλωνοποίησή του στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pGEM- t easy αμέσως μετά την διαδικασία της pcr.

Η απομόνωση του γονιδίου *hutth* κατέσται δυνατή με τα μόρια εκκινητές huF- *Nde*I και huR- *Bam*HI και με μήτρα το γονιδίωμα του στελέχους *T. thermophilus* HB8. Τα συνθετικά μόρια εκκινητές διαθέτουν θέσεις περιορισμού από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Nde*I και *Bam*HI. Τα προϊόντα της αντίδρασης pcr ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 30).

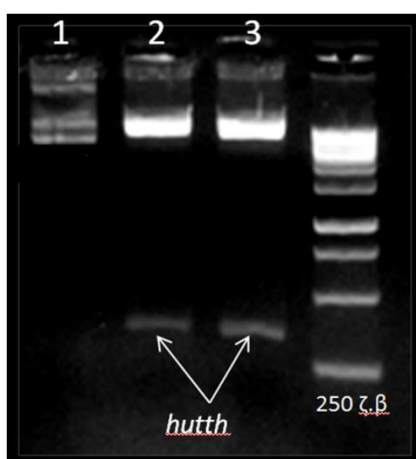


Εικόνα 30 Ενίσχυση, απομόνωση και εντοπισμός του γονιδίου *hutth* από το γενωμικό DNA του *T. thermophilus* HB8. Μελέτη επτά διαφορετικών συνθηκών pcr. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων pcr. Στις θέσεις 2 και 3 παρατηρείται η επιτυχής απομόνωση και ενίσχυση του γονιδίου *hutth*. Οι θέσεις 1, 4, 5, 6 και 7 αντιστοιχούν σε προϊόντα μη επιτυχούς pcr. Στη θέση 1 χρησιμοποιήθηκε τελική συγκέντρωση μαγνησίου: 2.5 mM, στις θέσεις 2 και 3 χρησιμοποιήθηκε τελική συγκέντρωση μαγνησίου: 1.5 mM και 58 °C, στις θέσεις 4, 5, 6 και 7 χρησιμοποιήθηκε τελική συγκέντρωση μαγνησίου: 1.5 mM και 62 °C, 64 °C, 66 °C και 68 °C, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη πέψη με τα ένζυμα *NdeI* και *BamHI* τόσο του γονιδίου όσο και του φορέα pET-11a για να δημιουργηθούν μονόκλωνα άκρα και να ενσωματωθεί το γονίδιο στον φορέα κατά την αντίδραση λιγάσης (Εικόνα 31). Τέλος, ο ανασυνδυασμένος φορέας κλωνοποιήθηκε σε κύτταρα *E. coli* DH5a ύστερα από μετασχηματισμό τους και επιλέχθηκαν αποικίες με βάση την ανθεκτικότητά τους στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Οι αποικίες (στο σύνολο 2) επανακαλλιεργήθηκαν και απομονώθηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Η επιτυχία της κλωνοποίησης πιστοποιήθηκε έπειτα από θετική αντίδραση pcr για το γονίδιο *hutth* στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια καθώς και από κατάλληλες πέψεις αυτών (Εικόνα 32).



Εικόνα 31 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωνα αгарόζης 1) του γραμμικού πλασμιδιακού φορέα pET-11a και 2) του ενθέματος-γονιδίου *hutth* ύστερα από διπλή πέψη τους με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσεις *NdeI* & *BamHI*.



Εικόνα 32 Έλεγχος κλώνων του γονιδίου *hutth* στον φορέα pET-11a σε κύτταρα *E.coli* DH5a. 1) άκοπο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, 2) και 3) θετικά ανασυνδυασμένοι φορείς. Οι αντιδράσεις αφορούν πλασμίδια από ανθεκτικές στην αμπικιλίνη αποικίες.

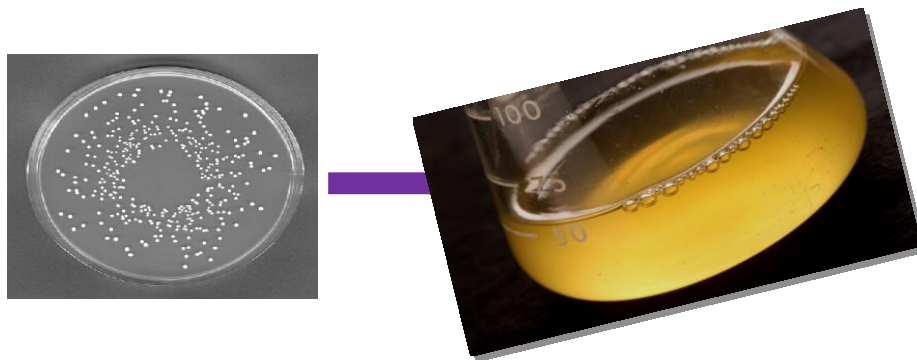
Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *hutth* πραγματοποιήθηκε στον ανασυνδυασμένο φορέα pGEM- t easy χρησιμοποιώντας τους διεθνείς εκκινητές T7 και SP6 οι οποίοι προσδένονται πριν και μετά το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Στην εικόνα 33 εμφανίζεται το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *hutth*. Η πρωτεΐνη HUTth έχει M.B 10 KDa, το μονομερές, και αποτελείται από 96 αμινοξέα (Εικόνα 33).

ATG	GCT	GCG	AAG	<u>AAG</u>	ACG	GTG	ACC	AAA	GCG	GAT	CTG	GTG	GAC	CAG	GTG	GCC	CAG	GCC	ACC
M	A	A	K	<u>K</u>	T	V	T	K	A	D	L	V	D	Q	V	A	Q	A	T
GGG	CTC	AAG	<u>AAG</u>	<u>AAG</u>	GAC	GTG	AAG	GCC	ATG	GTG	GAC	GCC	CTG	<u>CTG</u>	GCC	AAG	GTG	GAG	<u>GAG</u>
G	L	K	<u>K</u>	<u>K</u>	D	V	K	A	M	V	D	A	L	<u>L</u>	A	K	V	E	<u>E</u>
GCC	TTG	GCC	AAC	GGG	AGC	AAG	GTC	CAG	CTC	ACG	GGC	TTC	GGC	ACC	TTT	GAG	GTG	CGC	AAG
A	L	A	N	G	S	K	V	Q	L	T	G	F	G	T	F	E	V	R	K
CGC	AAG	GCC	CGC	ACC	GGG	GTG	AAG	CCG	GGC	ACC	AAG	GAG	AAG	ATC	AAG	ATC	CCC	GCC	ACC
R	K	A	R	T	G	V	K	P	G	T	K	E	K	I	K	I	P	A	T
CAG	TAT	CCC	GCC	TTC	AAG	CCC	GGC	AAG	GCC	CTG	AAG	GAT	AAG	GTC	AAG	<u>AAG</u>	<u>TGA</u>		
Q	Y	P	A	F	K	P	G	K	A	L	K	D	K	V	K	<u>K</u>	*		

Εικόνα 33 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *hutth* και αμινοξική αλληλουχία της HUTth πρωτεΐνης. Με πράσινο εμφανίζεται το κωδικόνιο έναρξης και με κόκκινο το κωδικόνιο λήξης.

Έπειτα από την πιστοποίηση του επιτυχούς ανασυνδυασμού του πλασμιδίου pET-11a με το γονίδιο *hutth* ακολούθησε ο μετασχηματισμός των κυττάρων ξενιστών BL21(DE3) και Magic και η μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης σε συνθήκες επαγωγής με IPTG. Η αποθήκευση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων δεν πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα έκφρασης καθώς εμφανίζουν αστάθεια. Ο έλεγχος του επιτυχούς μετασχηματισμού των BL21(DE3) κυττάρων πραγματοποιήθηκε άμεσα με την επίστρωση των επιλεγμένων αποικιών σε τρυβλία που περιείχαν αμικικιλίνη (100 µg/mL) ενώ ο έλεγχος του επιτυχούς μετασχηματισμού των Magic κυττάρων πραγματοποιήθηκε άμεσα με την επίστρωση των επιλεγμένων αποικιών σε τρυβλία που περιείχαν αμικικιλίνη (100 µg/mL) και καναμυκίνη (50 µg/mL). Τα τρυβλία εμβολιάστηκαν και επώστηκαν για 16 ώρες στους 37 °C για την ανάπτυξη των κυττάρων *E. coli*.

Ακολούθησαν καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων σε συνθήκες επαγωγής με IPTG σε διαφορετικούς χρόνους με στόχο την παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης (Εικόνα 34) που θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω βιοχημικό και βιοφυσικό χαρακτηρισμό καθώς και δομική ανάλυση.



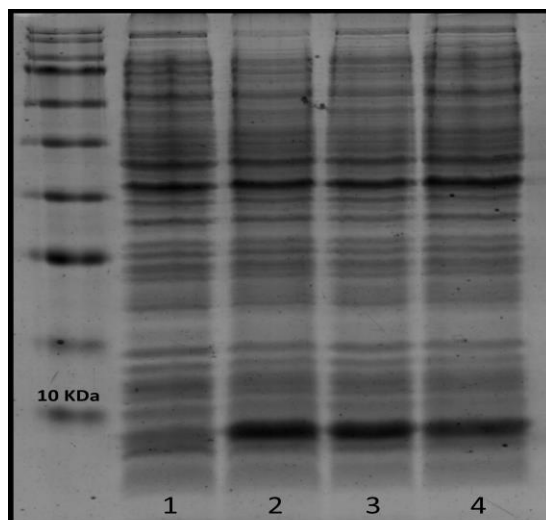
Εικόνα 34 Μετασχηματισμός σε *E. coli* του ανασυνδυασμένου με το *hutth* πλασμιδιακού φορέα και καλλιέργειες.

3.2 ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *hutth*

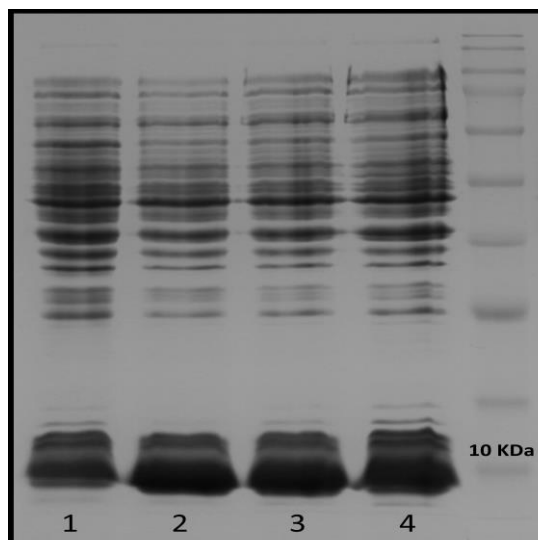
Η επαγωγή του *hutth* γονιδίου πραγματοποιήθηκε με IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM, αρχικά σε μικρή κλίμακα (καλλιέργειες των 10 mL) για μια πιλοτική μελέτη και έπειτα, σε μεγάλη κλίμακα σε καλλιέργειες 1- 2 L για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω καθαρισμό. Η επαγωγή ξεκινούσε κατά την εκθετική φάση αύξησης των βακτηρίων (χρόνος 0, OD₆₀₀= 0.7) σε θερμοκρασία 37 °C και κρατούσε 3 h. Αναλυτικά η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στην § 2.5.2.

Τα αποτελέσματα της επαγωγής για τα κύτταρα BL21(DE3) εμφανίζονται στην εικόνα 36, ενώ για τα κύτταρα Magic εμφανίζονται την εικόνα 35. Και στις δύο επαγωγές παρατηρούμε ότι ο βέλτιστος χρόνος για την παραγωγή της HUTth πρωτεΐνης είναι οι 3 h.

Ύστερα από τα μικρής κλίμακας πειράματα κινητικής της επαγωγής του *hutth* γονιδίου, ακολούθησαν πειράματα σε μεγάλη κλίμακα. Σε αυτά τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα μετασχηματισμένα Magic κύτταρα (Magic/pET-11a- *hutth*).



Εικόνα 35 SDS PAGE ανάλυση συνολικών πρωτεϊνών, κυττάρων BL21(DE3) που περιέχουν το πλασμίδιο pET-11a- *hutth*, σε χρόνους 1: 0 h, 2: 1 h, 3: 2 h, και 4: 3 h μετά από επαγωγή με IPTG στους 37 °C.



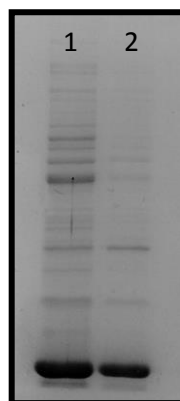
Εικόνα 36 SDS PAGE ανάλυση συνολικών πρωτεϊνών, κυττάρων Magic που περιέχουν το πλασμίδιο pET-11a- *hutth*, σε χρόνους 1: 0 h, 2: 1 h, 3: 2 h, και 4: 3 h μετά από επαγωγή με IPTG στους 37 °C.

3.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ HUT $_{th}$ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

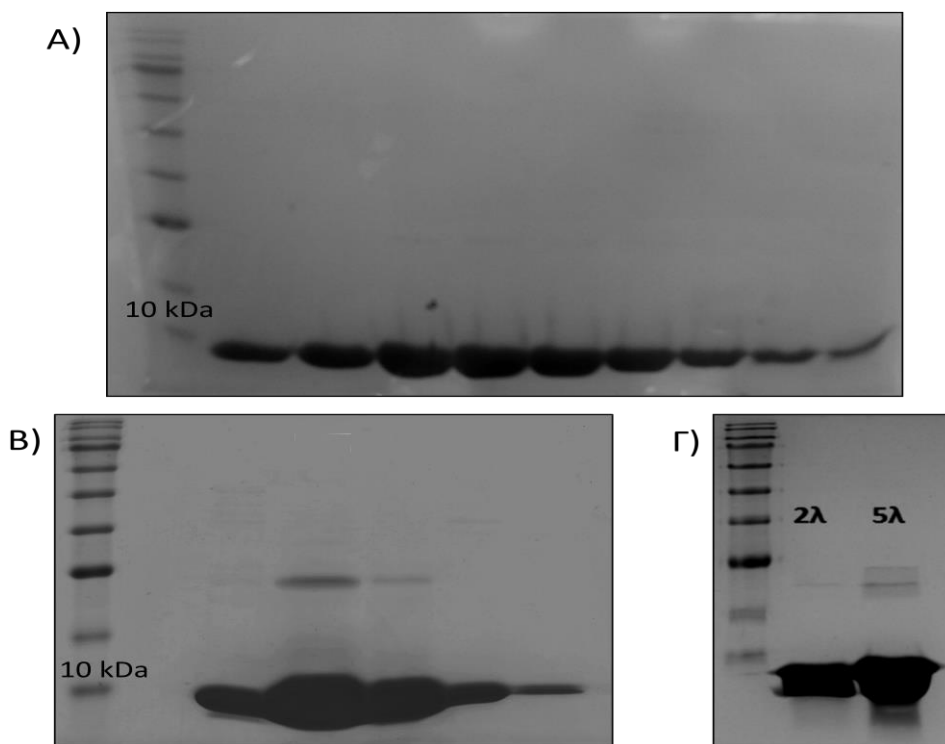
Η απομόνωση της υπερπαραγμένης HUT $_{th}$ πρωτεΐνης, ύστερα από τη διαδικασία της επαγωγής πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια: α) λύση των κυττάρων, β) κλασμάτωση με θειικό αμμώνιο (AS) και γ) χρωματογραφία συγγένειας, όπως περιγράφονται αναλυτικά στις § 2.5.3, § 2.5.4 και § 2.5.5 του κεφαλαίου 2.

Τα αποτελέσματα της διαφορικής κλασμάτωσης με θειικό αμμώνιο παρουσιάζονται στην εικόνα 37, ενώ τα κλάσματα της καθαρισμένης HUT $_{th}$ πρωτεΐνης

απεικονίζονται στην εικόνα 38 (Α και Β). Στην εικόνα 37 (Γ) απεικονίζεται η συγκεντρωμένη HUTth πρωτεΐνη. Ύστερα από τον καθαρισμό και την συγκέντρωση της πρωτεΐνης είχαμε HUTth = 10 mg/mL για την πραγματοποίηση των επόμενων πειραματικών διαδικασιών.



Εικόνα 37 SDS PAGE ανάλυση συνολικών πρωτεϊνών, κυττάρων Magic που περιέχουν το πλασμίδιο pET-11a- *hutth* ύστερα από διαφορετική κλασμάτωση με θειικό αμμώνιο. 1: πρωτεϊνικό κλάσμα 0-60% κορεσμένο σε θειικό αμμώνιο, 2: πρωτεϊνικό κλάσμα 60-80% κορεσμένο σε θειικό αμμώνιο



Εικόνα 38 Χρωματογραφικός καθαρισμός της HUTth πρωτεΐνης σε στήλη Ηπαρίνης. Α) και Β) SDS-PAGE ανάλυση των κλασμάτων από τον καθαρισμό της HUTth που εκλούθησαν από τη στήλη ηπαρίνης χρησιμοποιώντας αυξανόμενη διαβάθμιση συγκέντρωσης NaCl. Η πρωτεΐνη εκλούεται σε συγκέντρωση NaCl από 500 mM- > 1500 mM, Γ) Συγκεντρωμένη HUTth πρωτεΐνη.

3.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ HUTth ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑΣ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΟΪΣΜΟΥ

Προκειμένου να προσδιορίσουμε τη θερμοκρασία τήξης της πρωτεΐνης HUTth καθώς και τα στοιχεία δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής χρησιμοποιήσαμε την τεχνολογία της φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχροϊσμού. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με 0.75 mg/mL καθαρής HUTth πρωτεΐνης η οποία βρισκόταν σε διάλυμα 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.0.

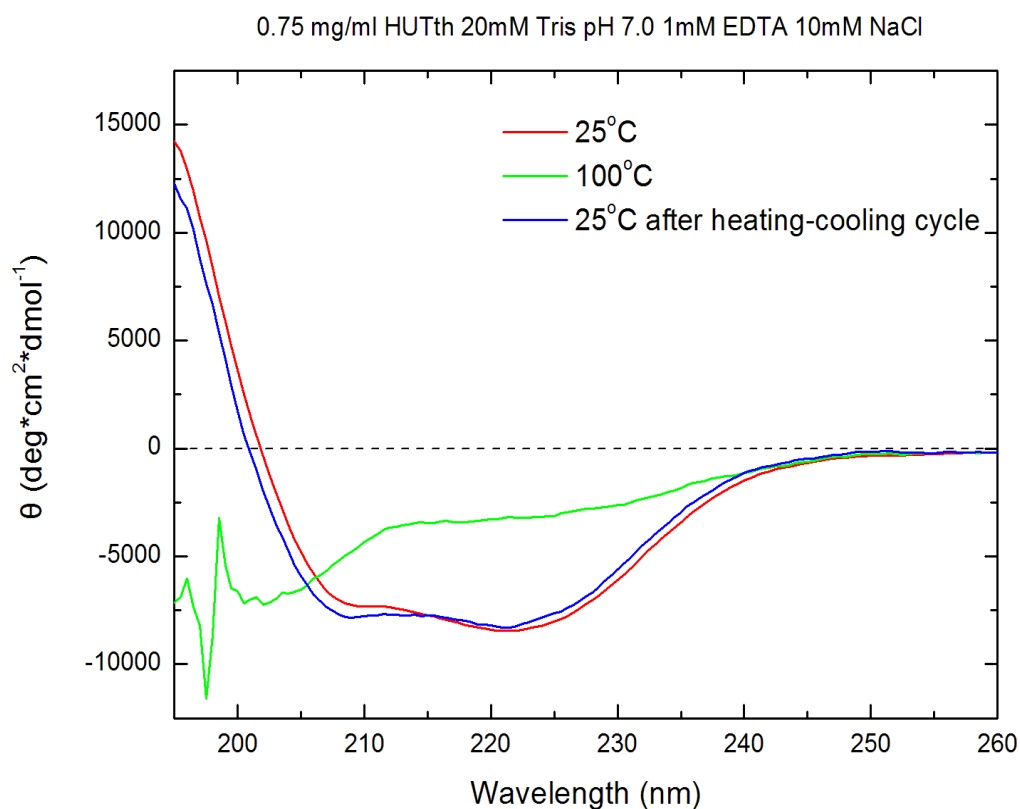
Τα αποτελέσματα της μέτρησης απεικονίζονται στις εικόνες 39 και 40. Ύστερα, από ένα κύκλο θέρμανσης και ψύξης (μελετήσαμε δύο θερμοκρασίες: 25 °C και 100 °C) παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη μας ξεδιπλώνεται και αναδιπλώνεται με πλήρη αντιστρεψιμότητα. Υδρόφοβα κατάλοιπα στην επιφάνεια του μορίου ή στην διεπιφάνεια μεταξύ των δύο μονομερών μπορούν να εξηγούν αυτή την αντιστρεψιμότητα.

Παράλληλα, η HUTth πρωτεΐνη έχει στοιχεία δευτεροταγούς δομής, α- έλικες και β- φύλλα καθώς από το φάσμα διαφαίνονται α) δυο αρνητικές κορυφές στα 208 και 222 nm και μια θετική στα 193 nm οι οποίες σχετίζονται με τις α- έλικες και β) μια ευρεία αρνητική κορυφή στα 218 nm και μια θετική στα 195 nm που παρουσιάζουν οι β- πτυχωτές επιφάνειες.

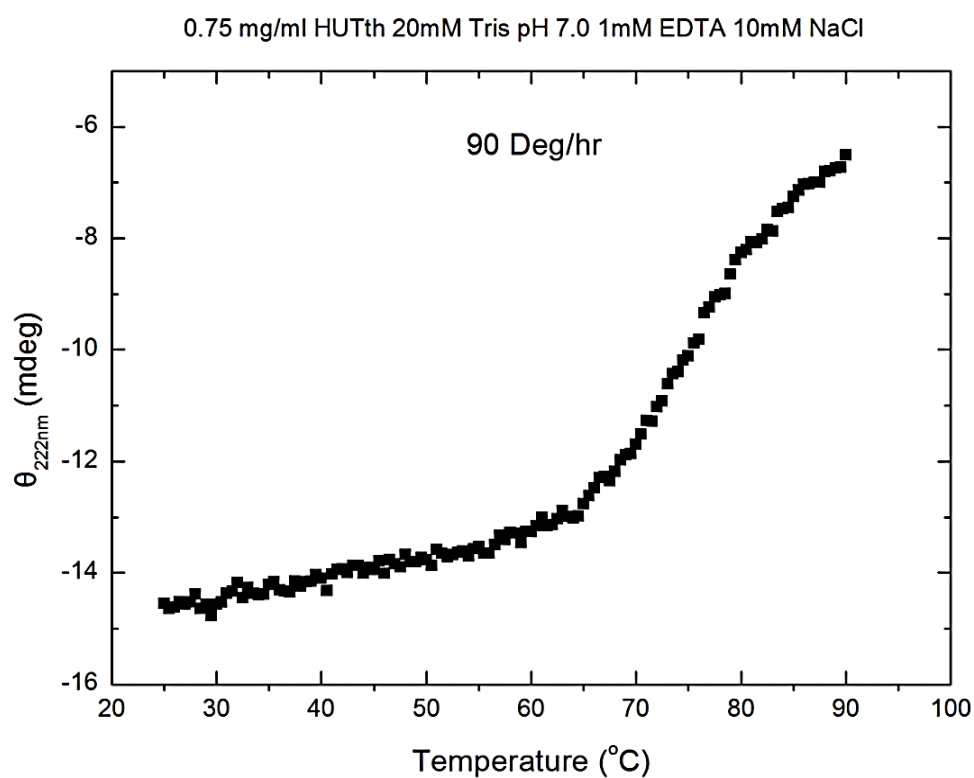
Στους 100 °C παρατηρείται η θερμικά μετουσιωμένη κατάσταση. Η αρνητική κορυφή στα 202 nm οφείλεται σε κάποια αρκετή εναπομείνουσα δομή στο μόριο. Πρόκειται για μη τακτική δομή, που οφείλεται σε χαμηλής τάξης ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις.

Η θερμοκρασία τήξης της HUTth πρωτεΐνης προσδιορίστηκε στα 222 nm και είναι 75 °C στις συγκεκριμένες συνθήκες διαλύματος και συγκέντρωσης. Κατά τη μέτρηση, η θερμοκρασία αυξανόταν με ρυθμό 90 °C/h.

Το φάσμα της θερμικής αποδιάταξης της HUTth δεν έχει σιγμοειδή καμπύλη. Αυτό πιθανά συμβαίνει για δύο λόγους: 1) υπάρχει επίδραση από τον διαλύτη και 2) στους 90 °C η πρωτεΐνη διατηρεί ακόμα κάποια μη τακτική δομή.



Εικόνα 39 Φάσμα κυκλικού διχροϊσμού της πρωτεΐνης HUTth.



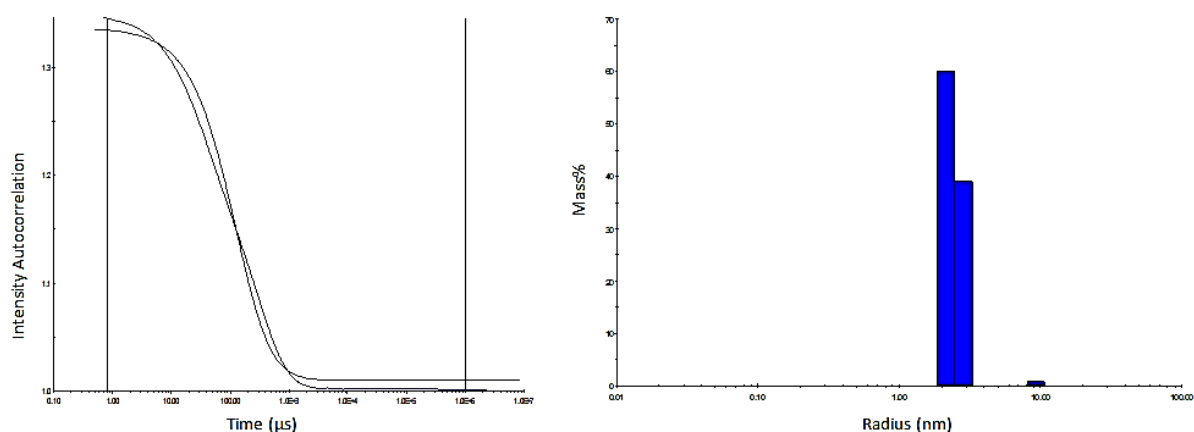
Εικόνα 40 Φάσμα θερμικής αποδιάταξης της πρωτεΐνης HUTth. Η θερμοκρασία τήξης της πρωτεΐνης είναι 75 °C.

3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΗΣ HUT θ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ

Προκειμένου να μελετήσουμε τον βαθμό συσσωμάτωσης της HUT θ πραγματοποιήσαμε δυναμική σκέδασης φωτός, με πρωτεΐνη συγκέντρωσης 1 mg/mL. Η πρωτεΐνη βρισκόταν σε διάλυμα 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας απεικονίζονται στις εικόνα 41.

Η πρωτεΐνη στο διάλυμα 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0 βρίσκεται ως διμερές. Το δείγμα χαρακτηρίζεται από μονοδιασπορά καθώς δεν παρατηρήθηκαν συσσωματώματα.



Intensity Distribution	Radius	%Pd	Mw-R	%Intensity	%Mass
	(nm)		(kDa)		
☒ Peak 1	2.598	13.8	31	15.8	99.0
☒ Peak 2	9.282	4.5	618	6.8	0.9
☒ Peak 3	49.188	13.8	30604	77.5	0.1

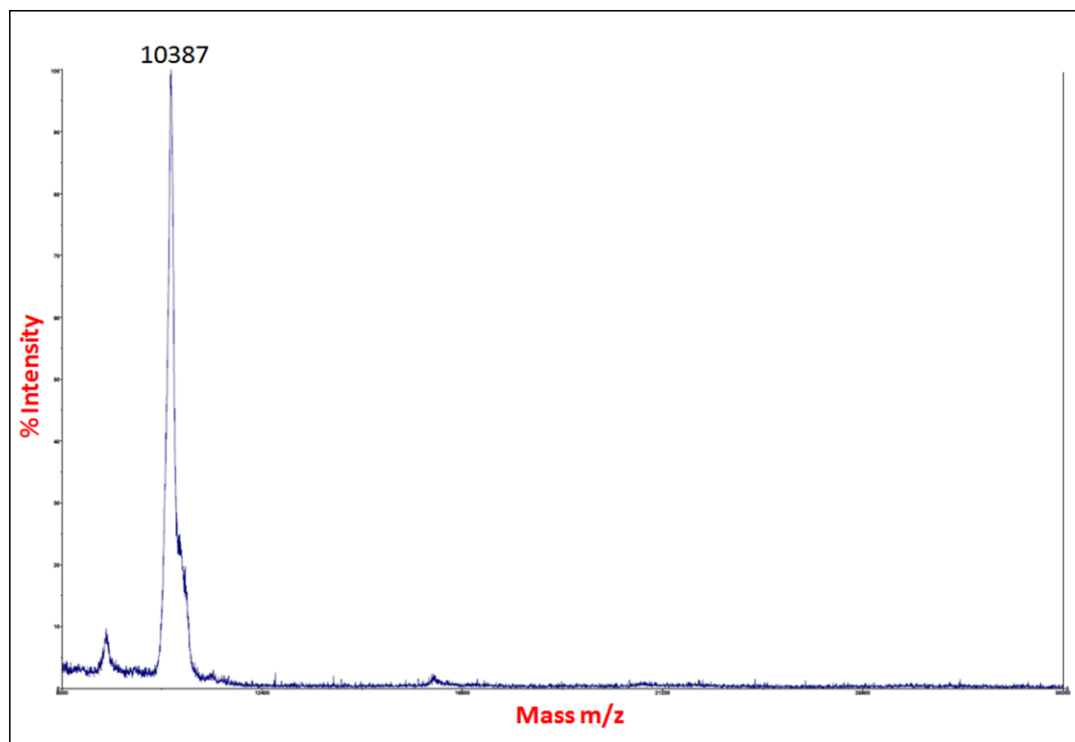
Εικόνα 41 Μέτρηση του βαθμού συσσωμάτωσης της HUT θ με δυναμική σκέδασης φωτός. Κατά τη μέτρηση η πρωτεΐνη βρισκόταν σε διάλυμα 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0

Η πρωτεΐνη σε διάλυμα 50 mM Na-P, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl και σε διαφορετικά pH βρίσκεται ως διμερές αλλά τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν από πολυδιασπορά, καθώς παρατηρήθηκε συσσωμάτωση.

3.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ HUT $_{th}$ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ

Προκειμένου να μετρήσουμε το ακριβές μοριακό βάρος της HUT $_{th}$ πραγματοποιήσαμε Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) φασματοσκοπία μαζών. Χρησιμοποιήσαμε πρωτεΐνη συγκέντρωσης 1 mg/mL σε διάλυμα 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας απεικονίζονται στην εικόνα 42 και καταδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 10.387 Da. Από το συγκεκριμένο πείραμα είναι φανερό πως το δείγμα χαρακτηρίζεται από μεγάλο βαθμό καθαρότητας καθώς συναντάται σε ποσοστό >95 % η πρωτεΐνη HUT $_{th}$.



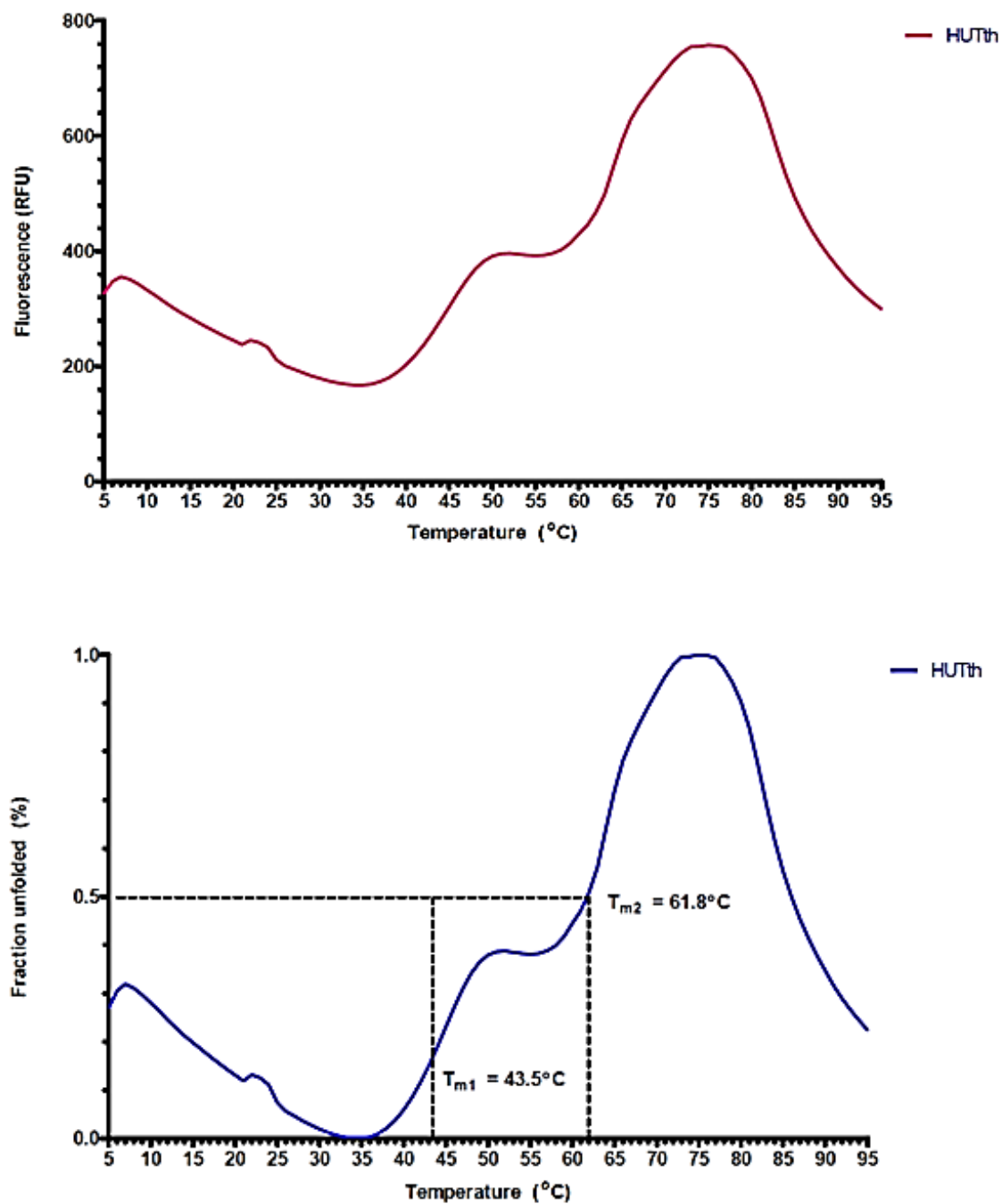
Εικόνα 42 Μέτρηση του μοριακού βάρους της ανασυνδυασμένης HUT $_{th}$ με Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) φασματοσκοπία μαζών.

3.7 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ HUT $_{th}$ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΣΑΡΩΣΗΣ

Προκειμένου να μελετήσουμε τη θερμική σταθερότητα της πρωτεΐνης HUT $_{th}$ στο διάλυμά της (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0), προτού προχωρήσουμε σε πειράματα κρυστάλλωσης, πραγματοποιήσαμε φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήσαμε 20 μ M HUT $_{th}$ πρωτεΐνης. Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η SYPRO Orange, και το δείγμα θερμάνθηκε από τους 5 °C στους 95 °C (με αύξηση της θερμοκρασίας 1°C/1 min) § 2.7.

Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος απεικονίζονται στην εικόνα 43. Η πρωτεΐνη στο συγκεκριμένο διάλυμα φαίνεται να έχει θερμοκρασία τήξης $T_m = 61.8$ °C. Το γεγονός ότι έχουμε και δεύτερη κορυφή στα γραφήματα με $T_m = 43.5$ °C καταδεικνύει την ύπαρξη δύο διαφορετικών πληθυσμών στο διάλυμα. Πιθανά να υπάρχει ολιγομερισμός δηλαδή διμερή αλλά και τριμερή ή τετραμερή, τα οποία έχουν διαφορετική θερμοκρασία τήξης.

Η παραμετρική αυτή προσέγγιση δεν έχει υψηλό βαθμό πιστότητας διότι το προς μελέτη μόριο α) είναι μικρό και 2) περιέχει περιορισμένο αριθμό υδρόφοβων περιοχών.



Εικόνα 43 Χαρακτηρισμός της HUTth με φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης.

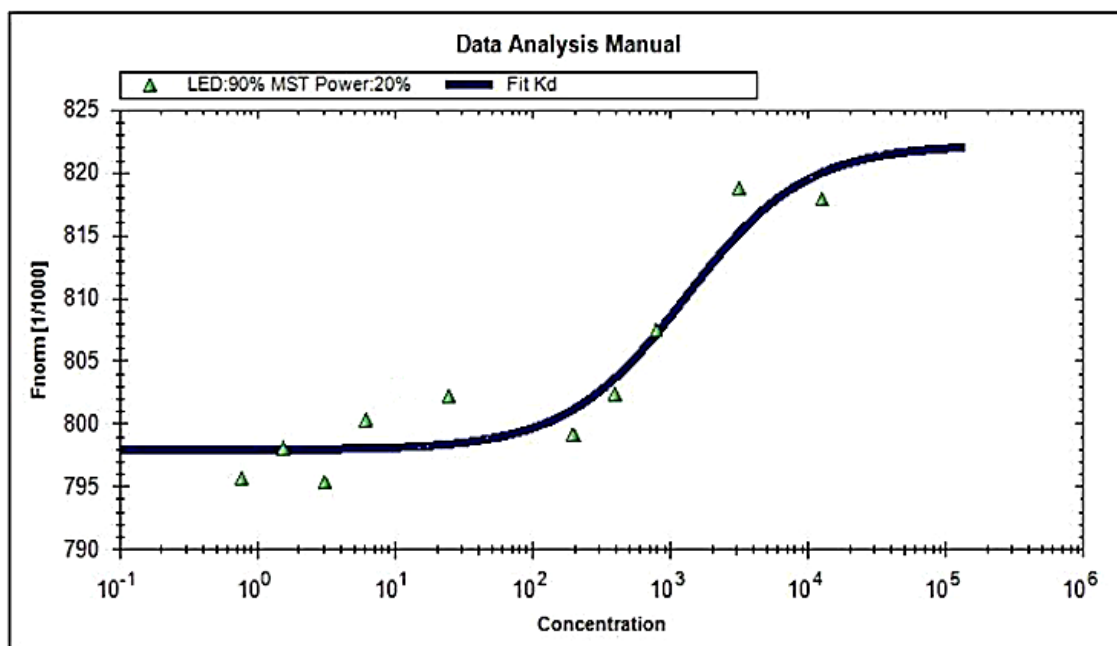
3.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ HUTth ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA ΜΕ ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΘΕΡΜΟΦΟΡΕΣΗ

Σε επίπεδο βιοχημικής ανάλυσης μελετήσαμε την αλληλεπίδραση της HUTth πρωτεΐνης με το DNA εφαρμόζοντας την τεχνολογία αιχμής Microscale Thermophoresis (MST).

Ακριβέστερα, μετρήσαμε τη σταθερά διάστασης (K_d) που προέκυψε από την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης μας με το πλασμιδιακό DNA pUC18. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας απεικονίζονται στην εικόνα 44 και φανερώνουν πως η HUTth αλληλεπιδρά με το DNA με σταθερά διάστασης: $K_d = 1.1 \mu\text{M} \pm 149 \text{ nM}$.

Για την πραγματοποίηση της μέτρησης, η HUTth πρωτεΐνη επισημάνθηκε με φθορίζουσα χρωστική που συνδέεται ομοιοπολικά στην πρωτεΐνη. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης καθόλη τη διάρκεια του πειράματος ήταν σταθερή, ενώ χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του πλασμιδιακού DNA. Αναλυτικότερα, η HUTth επώαστηκε και μετρήθηκε με συγκεντρώσεις pUC18 πλασμιδιακού DNA της τάξης των 0.8 nM έως 25 μM .

Όπως παρατηρείται και στο γράφημα, η συγκεκριμένη μέτρηση πρέπει να επαναληφθεί χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη συγκέντρωση DNA, ώστε να πάρουμε καμπύλη που θα παρουσιάζει την περιοχή κορεσμού (saturation plateau).



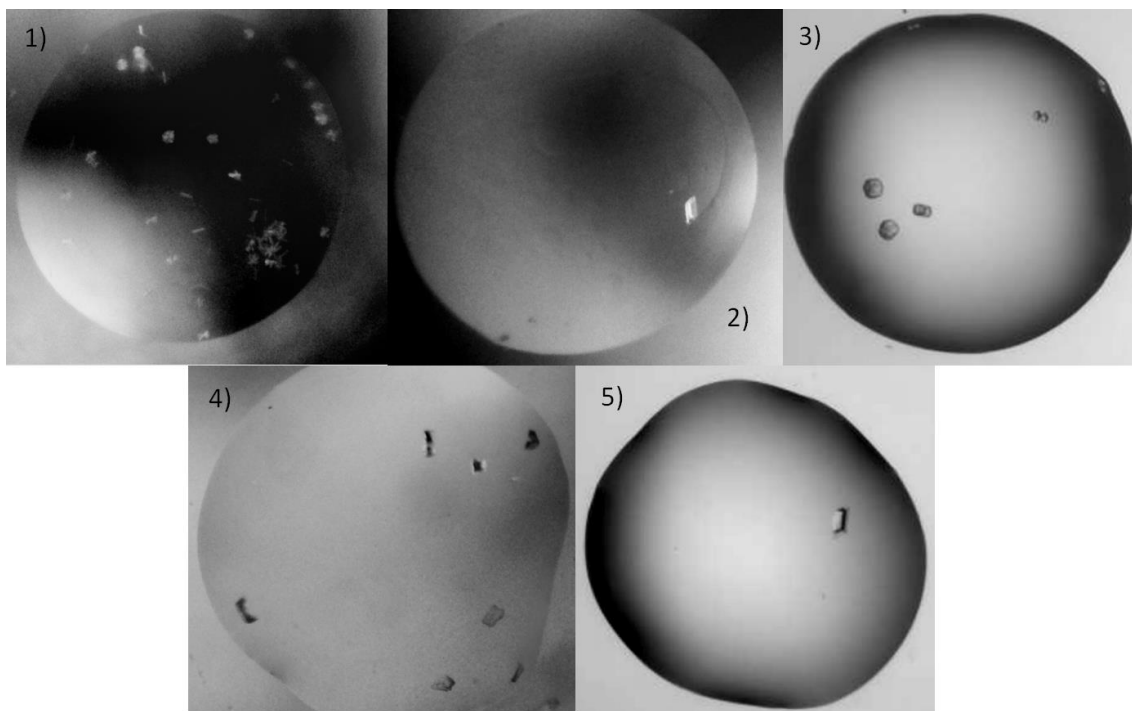
Εικόνα 44 Μελέτη της αλληλεπίδρασης της *HUTth* με το DNA. Ως DNA χρησιμοποιήσαμε τον πλασμιδιακό φορέα pUC18.

3.9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΕΩΝ ΤΗΣ *HUTth* ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα κρυστάλλωσης της *HUTth* με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας (sitting drop) και την τεχνική εξάτμισης και διάχυσης των ατμών (vapour diffusion) παρουσιάζονται στην εικόνα 45. Όπως παρατηρούμε, τα πειράματά μας ήταν επιτυχή, καθώς αποκτήσαμε κρυστάλλους (single crystals) διαφόρων μεγεθών και σχημάτων. Σε επόμενο βήμα, οι κρύσταλλοι θα μετρηθούν με ακτίνες- X ώστε να παραχθούν δεδομένα που θα μας επιτρέψουν να προσδιορίσουμε τη 3D δομή της πρωτεΐνης.

Οι συνθήκες στις οποίες η *HUTth* κρυσταλλώνει είναι οι εξής:

- 1) 0.2 M Lithium acetate, 20% w/v PEG3350
- 2) 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M Sodium cacodylate 6.5, 50 % v/v PEG 200
- 3) 0.2 M lithium sulfate, 0.1 M TRIS 8.5, 25 %(w/v) PEG 3350
- 4) 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M Sodium HEPES 7.5, 30 % v/v PEG 400
- 5) 0.1 M HEPES sodium salt 7.5, 1.5 M lithium sulfate



Εικόνα 45 Κρύσταλλοι της HUTth πρωτεΐνης.

Είναι απαραίτητη η επανάληψη των παραπάνω συνθηκών, σε μεγαλύτερους όγκους σταγόνas, με στόχο την παραγωγή περισσότερων και μεγαλύτερων κρυστάλλων που θα είναι πιο χρήσιμοι στον προσδιορισμό της 3D δομής της HUTth σε υψηλή διακριτικότητα.

3.10 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Ο προσδιορισμός των δομικών παραγόντων που σχετίζονται με τη θερμοσταθερότητα των πρωτεϊνών της οικογένειας HU μελετήθηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικές προσεγγίσεις βιοπληροφορικής ανάλυσης.

Για τη πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης κατασκευάστηκε μία βιβλιοθήκη ακολουθιών HU από το φύλο των αδοβακτηρίων [*Thermus* (θερμόφιλα βακτήρια)- *Deinococcus* (μεσόφιλα βακτήρια)] και χρησιμοποιήθηκαν δύο προσεγγίσεις α) ο υπολογισμός συναινετικών ακολουθιών από τη συγκεκριμένη βιβλιοθήκη και β) ο υπολογισμός προγονικών ακολουθιών.

Οι συγκεκριμένες ακολουθίες αναλύθηκαν σε επίπεδο πρωτοταγούς αλλά και τεταρτοταγούς δομής με στόχο να ι) να μελετηθούν οι προτιμήσεις των

αμινοξέων ανά θέση και ι) να μελετηθούν οι δεσμοί υδρογόνου και οι γέφυρες άλατος, χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη θερμοσταθερότητα των πρωτεϊνών. Δεν εξετάστηκαν οι θειογέφυρες καθώς οι HU πρωτεΐνες δεν περιέχουν κυστεΐνη και κατά συνέπεια η θερμοσταθερότητά τους είναι ανεξάρτητη από τις θειογέφυρες.

Στον πίνακα 3- 1 παρατίθενται οι ακολουθίες που προέκυψαν (συναινετικές, προγονικές) και με τις οποίες πραγματοποιήθηκε η περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση.

Πίνακας 3- 1: Ακολουθίες που χρησιμοποιήθηκαν στην βιοπληροφορική ανάλυση.

Ακολουθίες πρωτεϊνών

HU Ancestral_thermophiles:

VSKADLVDQVAETTGLKKKDVKAVVDAMLDQVAEALNSGDKVQLTGFGTFEVRERKA
RTGVKPGTTEKIEIPASKYPAFKPGKALKEKV

HU Consensus_thermophiles:

VTKADLVDQVAAATGLKKKDVKAAVDAFLAKVEEALANGNKVQLTGFGTFEVRKRKA
RTGVKPGTKEKIKIPATQYPAFKPGKALKEKV

HUT_{th}:

AAKKTVTKADLVDQVAQATGLKKKDVKAMVDALLAKVEEALANGSKVQLTGFGTFEV
RKRKARTGVKPGTKEKIKIPATQYPAFKPGKALKDKVKK

HU Ancestral_mesophiles:

IGKTQLVDQVADKTGLTKKQAEVVDTMLETVVEALRSGKSVSLPGLGTFSVKETAA
RTGVKPGTTEKIQIPAGKKVAFKVATTLKGTL

HU Consensus_mesophiles:

IAKTQLVXMVADRTGLTKKQAEAVATMLXVVVDALRXGKSVGLPGLGTXSVKETAA
RTGVRPGTSERIXIPAGKKVRFKVASTLKGNL

Οι προγονικές και συναινετικές ακολουθίες προβλέφθηκαν με βιοπληροφορική

ανάλυση που περιγράφεται στην § 2.12, χρησιμοποιώντας τις βιβλιοθήκες που απεικονίζονται στις εικόνες 46, 48 και 49.

Επιλέχθηκαν ακολουθίες HU από βακτήρια που ανήκουν στο φύλο των αδοβακτηρίων καθώς τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Thermus* είναι όλα θερμόφιλα και τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Deinococcus* είναι όλα μεσόφιλα. Η συγκεκριμένη βιβλιοθήκη που κατασκευάστηκε μας επιτρέπει να μελετήσουμε τις στρατηγικές που ακολουθούν τα θερμόφιλα βακτήρια έναντι των μεσόφιλων για να αντιμετωπίσουν τη θερμοσταθερότητα.

Ύστερα από pblast των συναινετικών και προγονικών ακολουθιών που προέκυψαν, στον διακομιστή NCBI, με αναζήτηση σε pdb, προέκυψαν τα παρακάτω δεδομένα:

- 1) HU Ancestral_thermophiles (N2): 85% ομοιότητα με DNA- binding protein *Geobacillus caldxylosilyticus* και 84% ομοιότητα με Histone- like protein *Geobacillus stearothermophilus*
- 2) HU Consensus_thermophiles: 55% ομοιότητα με DNA- binding protein *Geobacillus stearothermophilus* και 57% ομοιότητα με HU from *Thermotoga maritima*
- 3) HU Consensus _mesophiles: 43% ομοιότητα με Histone- like protein *Geobacillus stearothermophilus* και 39% ομοιότητα με histone- like protein *Bacillus anthracis*
- 4) HU Ancestral_mesophiles: 47% ομοιότητα με Histone- like protein *Geobacillus stearothermophilus* και 48% ομοιότητα με histone- like protein *Anabaena sp.*
- 5) HUTth: 57% ομοιότητα με HU from *Thermotoga maritima*

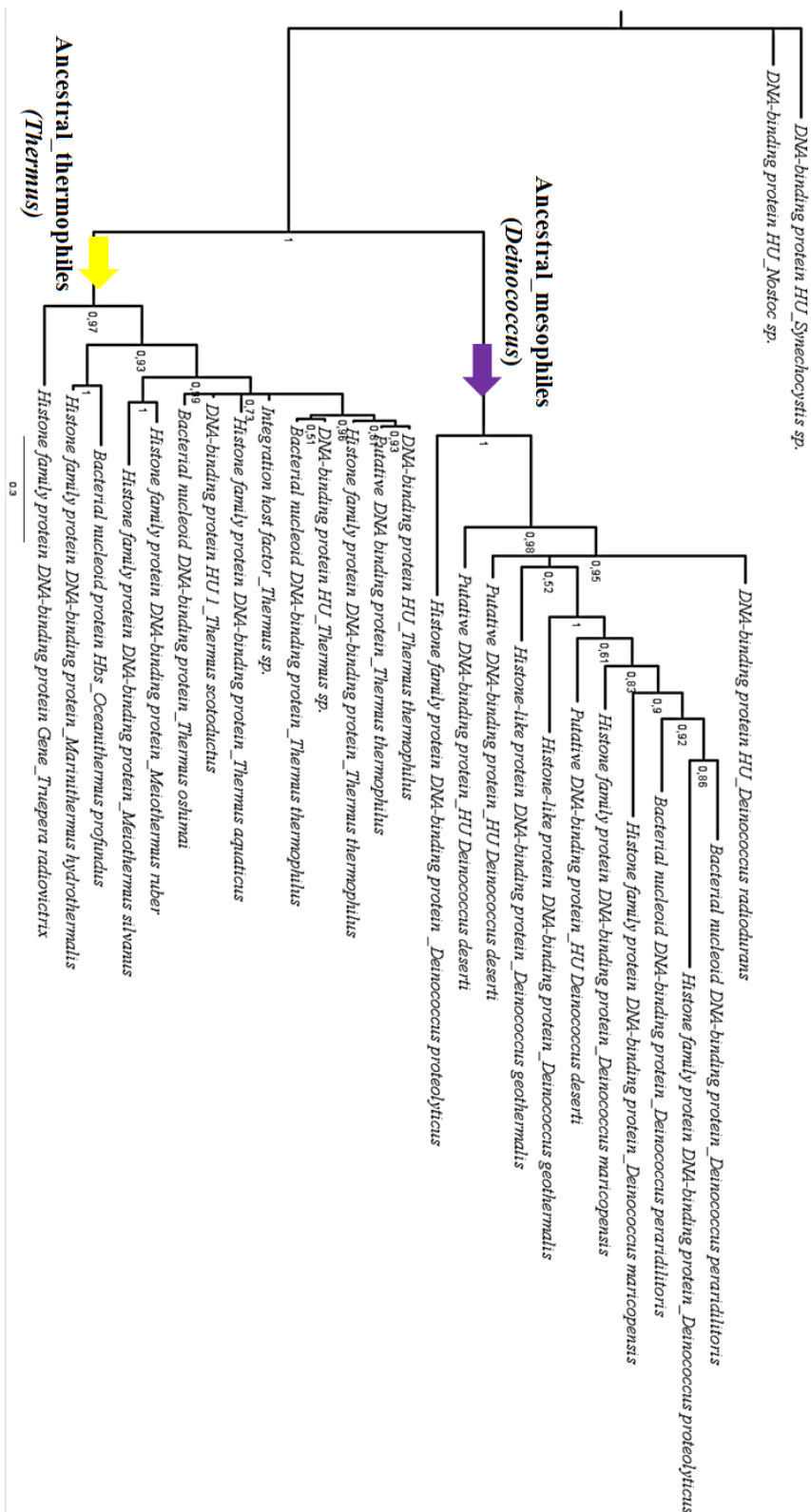
Με τις παραπάνω ακολουθίες καθώς και τις ομόλογές τους προβλέφθηκαν δομικά μοντέλα, με τη τεχνική του homology modeling (ομολογία προτοτυποποίησης), με σκοπό τη μελέτη παραμέτρων που σχετίζονται με την θερμοσταθερότητα (γέφυρες άλατος, δεσμοί υδρογόνου).

Η μελέτη μας ξεκίνησε αντιμετωπίζοντας την πρωτεΐνη HU σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής. Έτσι, αρχικά με μήτρα τις πρωτοταγείς δομές των παραπάνω ακολουθιών μελετήθηκε η προτίμηση σε αμινοξέα σε θέσεις που έχουν χαρακτηριστεί, από πειραματικές διαδικασίες, σημαντικές για τη θερμοσταθερότητα του μορίου (Boelens,

Vis, Vorgias, Wilson, & Kaptein, 1996; Christodoulou, Rypniewski, & Vorgias, 2003; Christodoulou & Vorgias, 1998; Ruiz- Sanz, Filimonov, Christodoulou, Vorgias, & Mateo, 2004; Serban, Arcineigas, Vorgias, & Thomas, 2003; Vis et al., 1995).

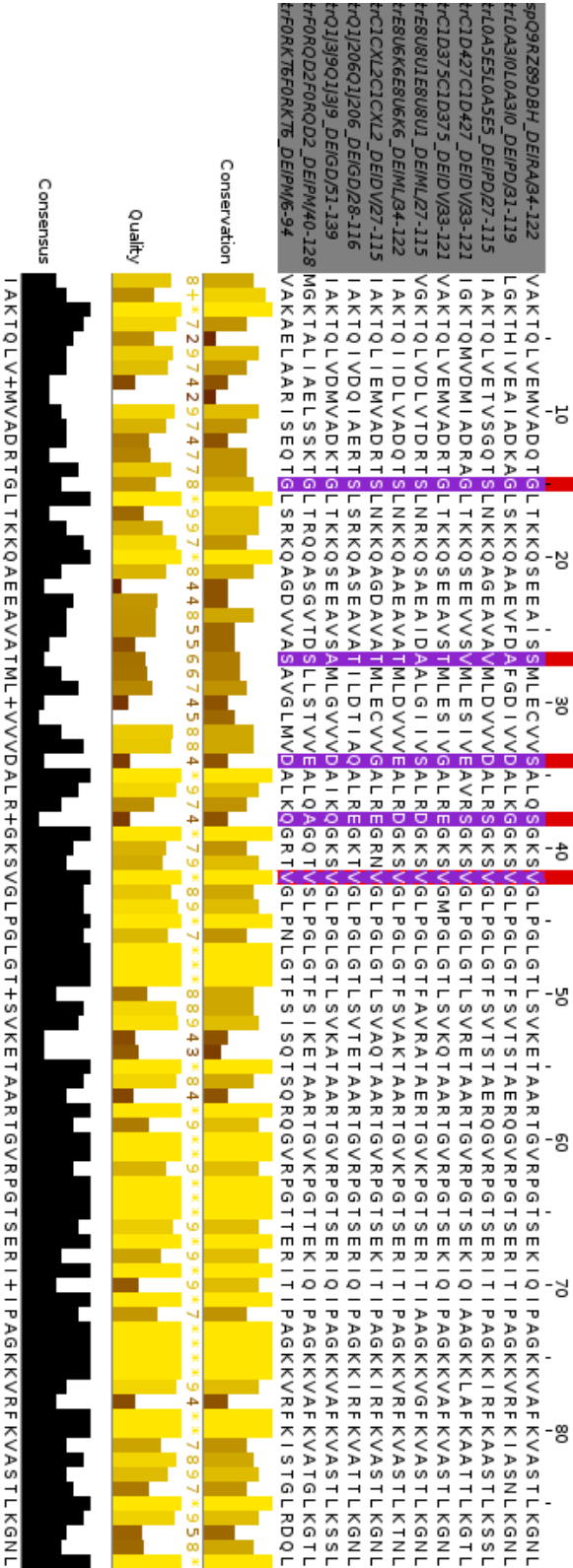
Στη συνέχεια, όπως αναφέραμε και παραπάνω, εξετάσθηκαν και άλλα δεδομένα σε επίπεδο τεταρτοταγούς δομής της HU πρωτεΐνης, από πιο ειδικές οπτικές γωνίες, όπως η ανάλυση των δεσμών υδρογόνου και των γεφυρών άλατος.

Τα αποτελέσματα όλης της βιοπληροφορικής ανάλυσης παρατίθενται στις παρακάτω εικόνες και πίνακες.



Εικόνα 47 Φυλογενετικό δένδρο που δημιουργήθηκε με HU ακολουθίες από αδοβακτήρια (*Thermus-Deinococcus*). Παρατηρούνται δύο υποδένδρα, στο ένα υπάρχουν HU του γένους *Thermus* και στο άλλο HU του γένους *Deinococcus*. Το δένδρο δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα MrBayes χρησιμοποιώντας ως outgroup HU ακολουθίες κυανοβακτηρίων. Οι τιμές που αναγράφονται αφορούν τα bootstrap. Με κίτρινο επισημαίνεται η *Thermus+Truepera* προγονική (Ancestral_thermophiles) και με μωβ η *Deinococcus* προγονική (Ancestral_mesophiles).

Εικόνα 49 Πολλαπλή στοίχιση HU ακολουθιών της οικογένειας pF00216 από μεσόφιλα βακτήρια του γένους *Deinococcus* (εκτός από τις HU ακολουθίες των βακτηρίων του γένους *Thermus*). Χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη βιβλιοθήκη προβλέφθηκε η συναινετική ακολουθία των μεσόφιλων βακτηρίων του γένους *Deinococcus* (Consensus_mesophiles).

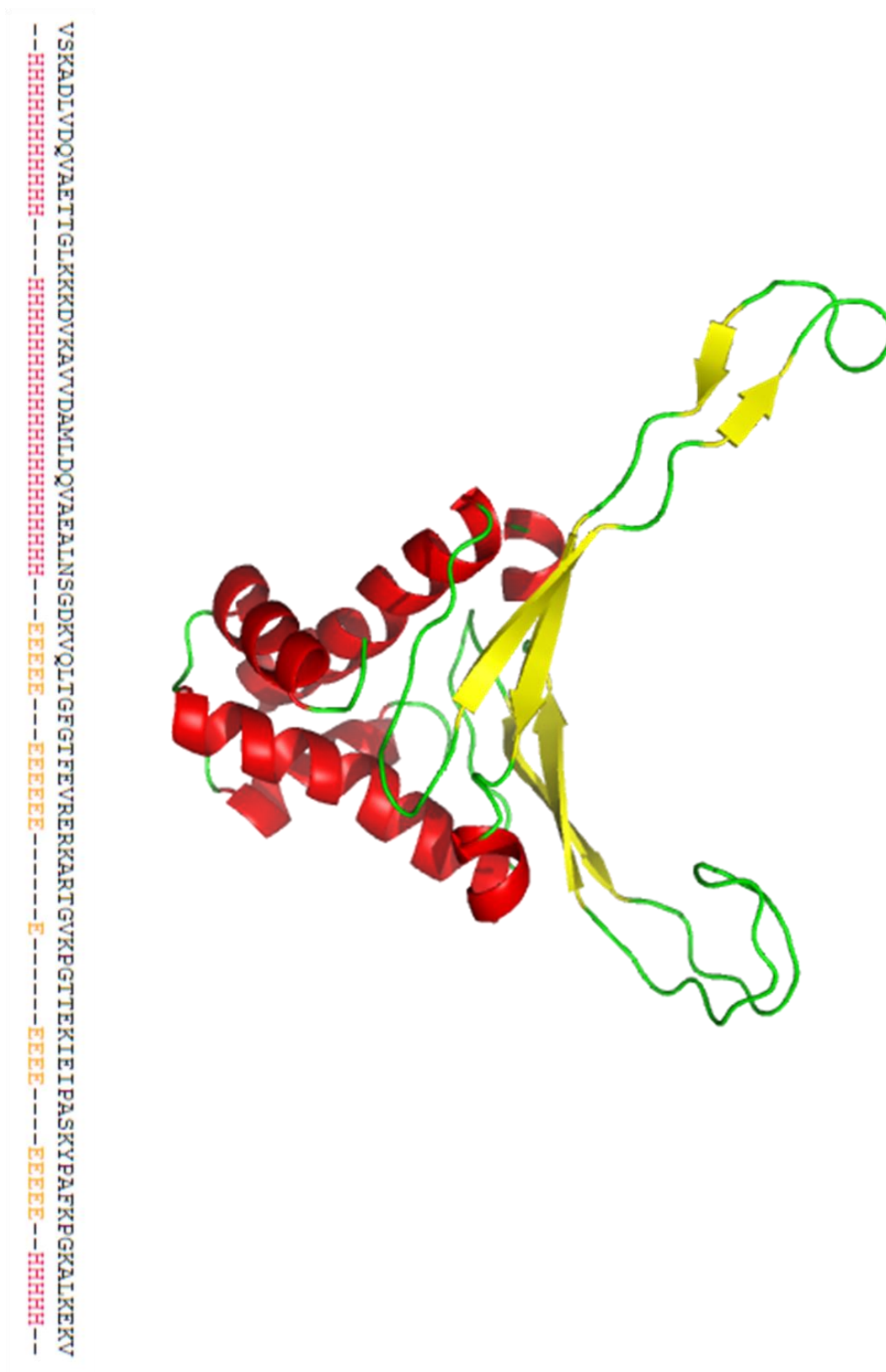




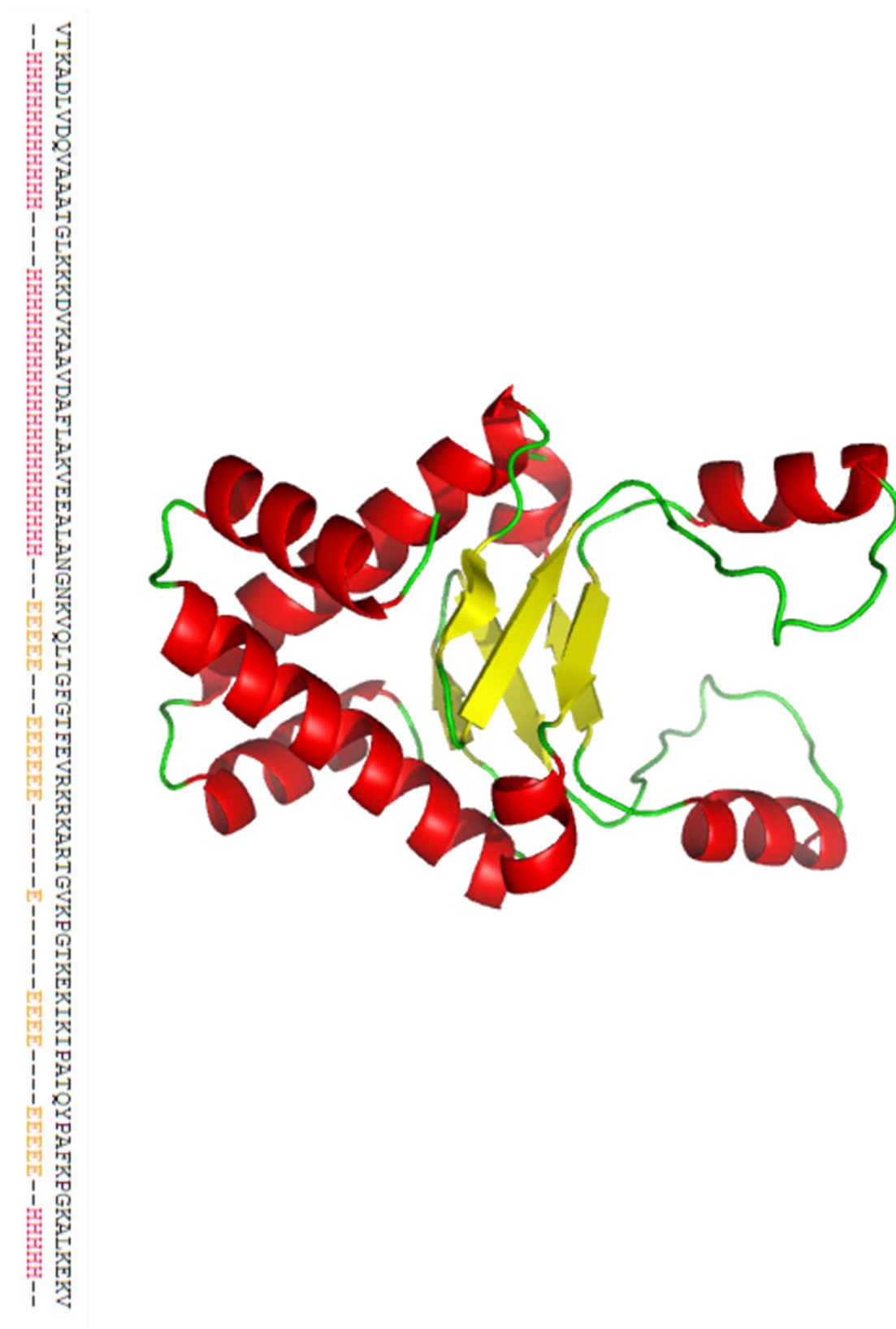
Εικόνα 50 Πολλαπλή στοίχιση όλων των HU ακολουθιών (συναινετικών και προγονικών, θερμόφιλων και μεσόφιλων) που προβλέφθηκαν και χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη βιοπληροφορική ανάλυση.

Εικόνα 52 Προτίμηση αμινοξέων ύστερα από στοίχιση των ακολουθιών HU (προγονική και συναινετική) από μεσόφιλα βακτήρια του γένους *deinococcus*. Τα αμινοξέα που υπογραμμίζονται με μαβ είναι αυτά που είναι υπεύθυνα για τη θερμοσταθερότητα της πρωτεΐνης.

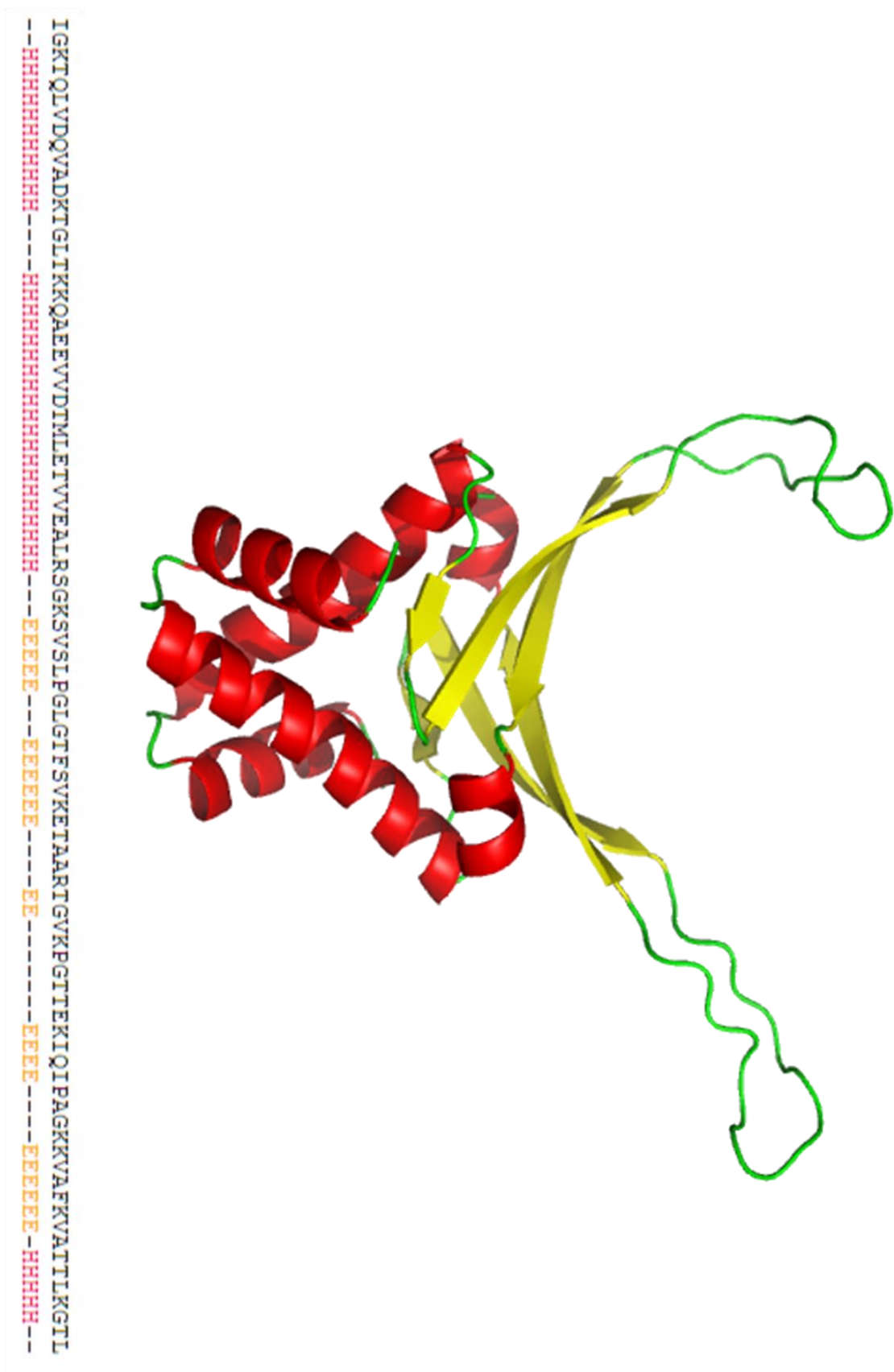
[illegible]



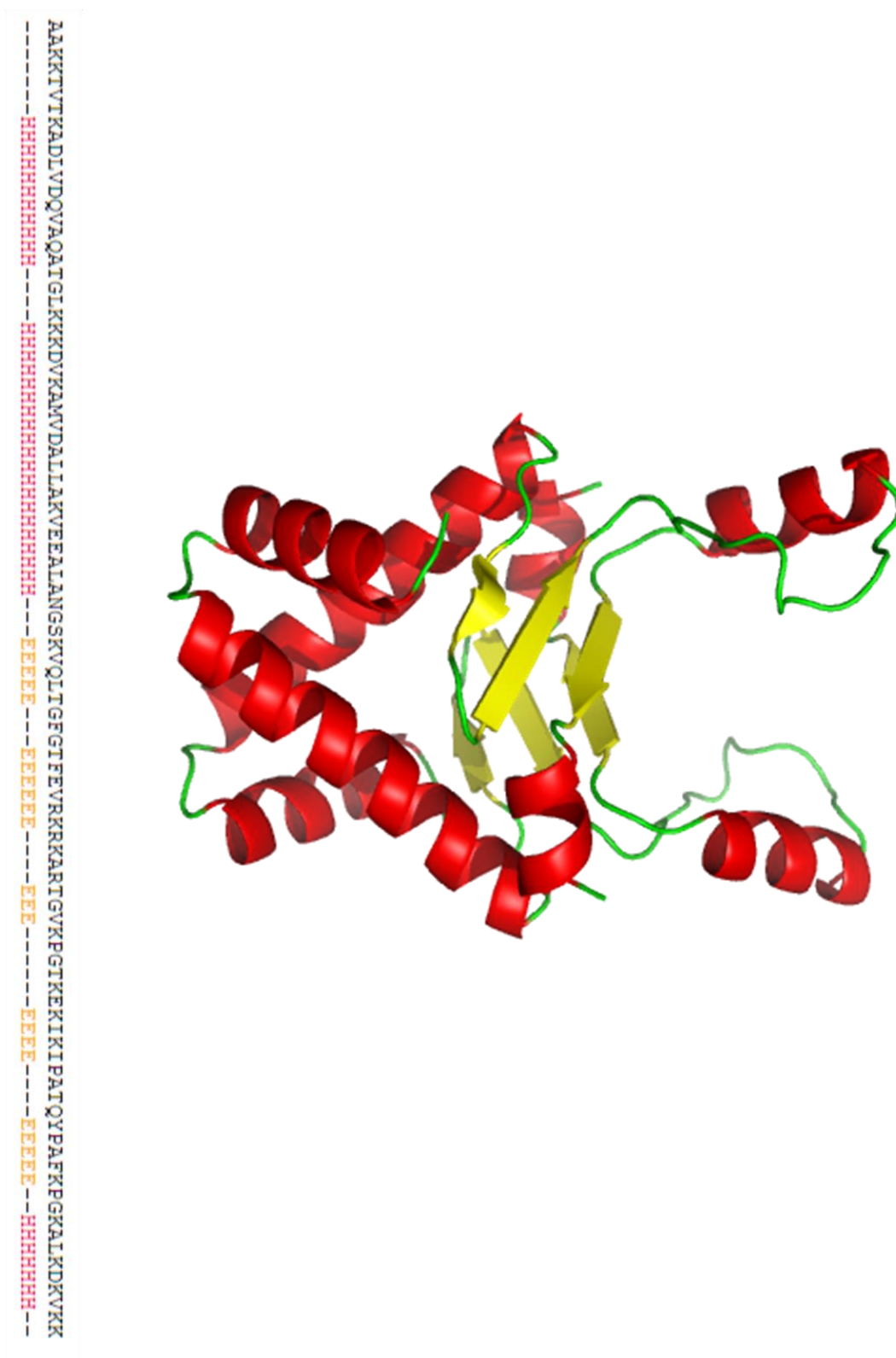
Εικόνα 53 Μοντέλο της HU Ancestral_thermophiles και πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της με το JPred3. Για την πρόβλεψη του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η HU του *Geobacillus stearothermophilus*.



Εικόνα 54 Μοντέλο της HU Consensus_thermophiles και πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της με το JPred3. Για την πρόβλεψη του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η HU της *Thermotoga maritima*.



Εικόνα 55 Μοντέλο της HU Ancestral_mesophiles και πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της με το JPred3. Για την πρόβλεψη του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η HU του *Geobacillus stearothermophilus*.



Εικόνα 56 Μοντέλο της *HUTth* και πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της με το JPred3. Για την πρόβλεψη του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η HU της *Thermotoga maritima*.

Πίνακας 3- 2 Αριθμός συνολικών δεσμών υδρογόνου των ακολουθιών.

Πρωτεΐνη	Αριθμός δεσμών υδρογόνου (Optimal Hydrogen Bonding Network)
HU Ancestral_mesophiles	80.185
HU Ancestral_thermophiles	81.447
HU consensus_thermophiles	82.480
HUT _{th}	84.056

Πίνακας 3- 3 Συνολικές γέφυρες άλατος των ακολουθιών.

Πρωτεΐνη		Γέφυρες άλατος (What If server)				
HU Ancestral_thermophiles	1	8 ASP (8)A	OD1 -	18 LYS (18)A	NZ	6.38
	2	8 ASP (8)A	OD2 -	18 LYS (18)A	NZ	6.75
	3	12 ASP (12)A	OD2 -	13 LYS (13)A	NZ	6.83
	4	22 GLU (22)A	OE1 -	3 LYS (3)A	NZ	6.53
	5	22 GLU (22)A	OE2 -	3 LYS (3)A	NZ	5.14
	6	22 GLU (22)A	OE1 -	19 LYS (19)A	NZ	4.66
	7	22 GLU (22)A	OE2 -	19 LYS (19)A	NZ	6.74
	8	23 GLU (23)A	OE1 -	19 LYS (19)A	NZ	5.55
	9	26 ASP (26)A	OD1 -	3 LYS (3)A	NZ	3.96
	10	26 ASP (26)A	OD2 -	3 LYS (3)A	NZ	3.90
	11	30 GLU (30)A	OE1 -	102 LYS (13)B	NZ	5.88
	12	30 GLU (30)A	OE2 -	102 LYS (13)B	NZ	5.03
	13	34 GLU (34)A	OE1 -	37 ARG (37)A	NH1	5.30
	14	34 GLU (34)A	OE1 -	37 ARG (37)A	NE	5.43
	15	34 GLU (34)A	OE2 -	37 ARG (37)A	NH1	5.64
	16	34 GLU (34)A	OE2 -	37 ARG (37)A	NH2	6.75
	17	34 GLU (34)A	OE2 -	37 ARG (37)A	NE	4.83
	18	54 GLU (54)A	OE1 -	75 LYS (75)A	NZ	3.42
	19	54 GLU (54)A	OE2 -	75 LYS (75)A	NZ	5.35
	20	67 GLU (67)A	OE1 -	68 LYS (68)A	NZ	3.65
	21	67 GLU (67)A	OE2 -	68 LYS (68)A	NZ	5.87
	22	89 LEU (89)A	O -	126 ARG (37)B	NE	6.83
	23	179 LEU (89)A	O'' -	126 ARG (37)B	NE	6.93
	24	89 LEU (89)A	O -	164 LYS (75)B	NZ	5.81
	25	179 LEU (89)A	O'' -	164 LYS (75)B	NZ	3.61
	26	97 ASP (8)B	OD1 -	107 LYS (18)B	NZ	3.92
	27	97 ASP (8)B	OD2 -	107 LYS (18)B	NZ	5.24
	28	101 ASP (12)B	OD1 -	102 LYS (13)B	NZ	4.31
	29	101 ASP (12)B	OD2 -	102 LYS (13)B	NZ	6.23
	30	112 GLU (23)B	OE2 -	13 LYS (13)A	NZ	6.87
	31	115 ASP (26)B	OD1 -	92 LYS (3)B	NZ	2.83
	32	115 ASP (26)B	OD2 -	92 LYS (3)B	NZ	4.64
	33	119 GLU (30)B	OE1 -	13 LYS (13)A	NZ	4.59
	34	119 GLU (30)B	OE2 -	13 LYS (13)A	NZ	4.69
	35	123 GLU (34)B	OE1 -	126 ARG (37)B	NH1	3.82
	36	123 GLU (34)B	OE1 -	126 ARG (37)B	NH2	5.60
	37	123 GLU (34)B	OE1 -	126 ARG (37)B	NE	4.39
	38	123 GLU (34)B	OE2 -	126 ARG (37)B	NH1	4.45
	39	123 GLU (34)B	OE2 -	126 ARG (37)B	NH2	5.36
	40	123 GLU (34)B	OE2 -	126 ARG (37)B	NE	4.48
	41	143 GLU (54)B	OE1 -	164 LYS (75)B	NZ	6.43
	42	156 GLU (67)B	OE1 -	151 LYS (62)B	NZ	5.68
	43	156 GLU (67)B	OE2 -	151 LYS (62)B	NZ	4.46
	44	180 LEU (89)B	O'' -	37 ARG (37)A	NE	6.98

HU Ancestral_mesophiles	1	5	ASP	(	5	)	A	OD1	-	1	VAL	(	1	)	A	N	6.03
	2	5	ASP	(	5	)	A	OD2	-	1	VAL	(	1	)	A	N	4.50
	3	8	ASP	(	8	)	A	OD1	-	18	LYS	(	18	)	A	NZ	4.66
	4	8	ASP	(	8	)	A	OD2	-	18	LYS	(	18	)	A	NZ	6.82
	5	12	GLU	(	12	)	A	OE1	-	18	LYS	(	18	)	A	NZ	6.69
	6	26	ASP	(	26	)	A	OD1	-	3	LYS	(	3	)	A	NZ	3.94
	7	26	ASP	(	26	)	A	OD2	-	3	LYS	(	3	)	A	NZ	5.88
	8	51	GLU	(	51	)	A	OE1	-	41	LYS	(	41	)	A	NZ	5.89
	9	54	GLU	(	54	)	A	OE1	-	75	LYS	(	75	)	A	NZ	6.79
	10	89	VAL	(	89	)	A	O	-	164	LYS	(	75	)	B	NZ	6.88
	11	179	VAL	(	89	)	A	O''	-	164	LYS	(	75	)	B	NZ	4.97
	12	94	ASP	(	5	)	B	OD1	-	90	VAL	(	1	)	B	N	6.08
	13	94	ASP	(	5	)	B	OD2	-	90	VAL	(	1	)	B	N	4.56
	14	97	ASP	(	8	)	B	OD1	-	107	LYS	(	18	)	B	NZ	4.63
	15	97	ASP	(	8	)	B	OD2	-	107	LYS	(	18	)	B	NZ	6.78
	16	115	ASP	(	26	)	B	OD1	-	92	LYS	(	3	)	B	NZ	4.10
	17	115	ASP	(	26	)	B	OD2	-	92	LYS	(	3	)	B	NZ	5.86
	18	140	GLU	(	51	)	B	OE1	-	130	LYS	(	41	)	B	NZ	4.60
	19	140	GLU	(	51	)	B	OE2	-	130	LYS	(	41	)	B	NZ	4.02
	20	140	GLU	(	51	)	B	OE1	-	169	LYS	(	80	)	B	NZ	5.48
	21	140	GLU	(	51	)	B	OE2	-	169	LYS	(	80	)	B	NZ	3.45
	22	143	GLU	(	54	)	B	OE1	-	164	LYS	(	75	)	B	NZ	6.95
	23	143	GLU	(	54	)	B	OE2	-	164	LYS	(	75	)	B	NZ	6.34
	24	156	GLU	(	67	)	B	OE2	-	157	LYS	(	68	)	B	NZ	5.77
	25	178	VAL	(	89	)	B	O	-	75	LYS	(	75	)	A	NZ	6.76
	26	180	VAL	(	89	)	B	O''	-	75	LYS	(	75	)	A	NZ	4.86

HUT_{th}	1	5	ASP	(	10	)	A	OD2-	1	VAL	(	6	)	A	N	5.50
	2	5	ASP	(	10	)	A	OD2-	121	LYS	(	36	)	B	NZ	6.97
	3	8	ASP	(	13	)	A	OD1-	18	LYS	(	23	)	A	NZ	2.90
	4	8	ASP	(	13	)	A	OD2-	18	LYS	(	23	)	A	NZ	3.82
	5	20	ASP	(	25	)	A	OD1-	17	LYS	(	22	)	A	NZ	6.16
	6	20	ASP	(	25	)	A	OD2-	17	LYS	(	22	)	A	NZ	4.88
	7	20	ASP	(	25	)	A	OD1-	19	LYS	(	24	)	A	NZ	5.96
	8	20	ASP	(	25	)	A	OD2-	19	LYS	(	24	)	A	NZ	6.62
	9	26	ASP	(	31	)	A	OD1-	3	LYS	(	8	)	A	NZ	2.71
	10	26	ASP	(	31	)	A	OD2-	3	LYS	(	8	)	A	NZ	4.07
	11	26	ASP	(	31	)	A	OD1-	22	LYS	(	27	)	A	NZ	6.44
	12	26	ASP	(	31	)	A	OD2-	22	LYS	(	27	)	A	NZ	5.11
	13	33	GLU	(	38	)	A	OE1-	178	LYS	(	93	)	B	NZ	3.31
	14	33	GLU	(	38	)	A	OE2-	178	LYS	(	93	)	B	NZ	5.35
	15	34	GLU	(	39	)	A	OE1-	31	LYS	(	36	)	A	NZ	5.90
	16	34	GLU	(	39	)	A	OE1-	178	LYS	(	93	)	B	NZ	5.93
	17	34	GLU	(	39	)	A	OE2-	178	LYS	(	93	)	B	NZ	4.79
	18	51	GLU	(	56	)	A	OE1-	41	LYS	(	46	)	A	NZ	4.49
	19	51	GLU	(	56	)	A	OE2-	41	LYS	(	46	)	A	NZ	6.43
	20	51	GLU	(	56	)	A	OE2-	54	LYS	(	59	)	A	NZ	6.39
	21	51	GLU	(	56	)	A	OE1-	55	ARG	(	60	)	A	NH1	6.83
	22	51	GLU	(	56	)	A	OE1-	55	ARG	(	60	)	A	NE	6.02
	23	51	GLU	(	56	)	A	OE1-	80	LYS	(	85	)	A	NZ	6.14
	24	51	GLU	(	56	)	A	OE2-	80	LYS	(	85	)	A	NZ	6.26
	25	67	GLU	(	72	)	A	OE1-	70	LYS	(	75	)	A	NZ	6.89
	26	67	GLU	(	72	)	A	OE2-	70	LYS	(	75	)	A	NZ	5.35
	27	87	ASP	(	92	)	A	OD1-	90	LYS	(	95	)	A	NZ	4.49
	28	87	ASP	(	92	)	A	OD2-	90	LYS	(	95	)	A	NZ	6.51
	29	95	ASP	(	10	)	B	OD1-	31	LYS	(	36	)	A	NZ	6.33
	30	95	ASP	(	10	)	B	OD2-	31	LYS	(	36	)	A	NZ	4.56
	31	95	ASP	(	10	)	B	OD2-	91	VAL	(	6	)	B	N	5.55
	32	98	ASP	(	13	)	B	OD1-	108	LYS	(	23	)	B	NZ	2.85
	33	98	ASP	(	13	)	B	OD2-	108	LYS	(	23	)	B	NZ	3.73
	34	110	ASP	(	25	)	B	OD1-	107	LYS	(	22	)	B	NZ	6.13
	35	110	ASP	(	25	)	B	OD2-	107	LYS	(	22	)	B	NZ	4.87
	36	110	ASP	(	25	)	B	OD1-	109	LYS	(	24	)	B	NZ	5.71
	37	110	ASP	(	25	)	B	OD2-	109	LYS	(	24	)	B	NZ	6.11
	38	116	ASP	(	31	)	B	OD1-	93	LYS	(	8	)	B	NZ	2.70
	39	116	ASP	(	31	)	B	OD2-	93	LYS	(	8	)	B	NZ	4.09
	40	116	ASP	(	31	)	B	OD1-	112	LYS	(	27	)	B	NZ	3.94
	41	116	ASP	(	31	)	B	OD2-	112	LYS	(	27	)	B	NZ	2.75
	42	123	GLU	(	38	)	B	OE1-	88	LYS	(	93	)	A	NZ	3.40
	43	123	GLU	(	38	)	B	OE2-	88	LYS	(	93	)	A	NZ	3.23
	44	124	GLU	(	39	)	B	OE1-	121	LYS	(	36	)	B	NZ	4.44
	45	124	GLU	(	39	)	B	OE2-	121	LYS	(	36	)	B	NZ	5.91
	46	141	GLU	(	56	)	B	OE1-	131	LYS	(	46	)	B	NZ	3.48
	47	141	GLU	(	56	)	B	OE2-	131	LYS	(	46	)	B	NZ	5.38
	48	141	GLU	(	56	)	B	OE2-	144	LYS	(	59	)	B	NZ	6.73
	49	141	GLU	(	56	)	B	OE1-	145	ARG	(	60	)	B	NH1	6.58
	50	141	GLU	(	56	)	B	OE1-	145	ARG	(	60	)	B	NE	5.88
	51	141	GLU	(	56	)	B	OE1-	170	LYS	(	85	)	B	NZ	4.47
	52	141	GLU	(	56	)	B	OE2-	170	LYS	(	85	)	B	NZ	2.86
	53	157	GLU	(	72	)	B	OE1-	160	LYS	(	75	)	B	NZ	6.88
	54	157	GLU	(	72	)	B	OE2-	160	LYS	(	75	)	B	NZ	5.34
	55	177	ASP	(	92	)	B	OD1-	180	LYS	(	95	)	B	NZ	5.47

Από την παραπάνω βιοπληροφορική ανάλυση, παρατηρούμε σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής της HU πρωτεΐνης τα εξής:

Στη θέση 15, οι HU που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια φέρουν το αμινοξύ γλυκίνη (G) σε ποσοστό 100%, ενώ δεν παρατηρείται ποσοστιαία

ταύτιση όσον αφορά τη προτίμηση του συγκεκριμένου αμινοξέος στις HU που προέρχονται από μεσόφιλα βακτήρια. Αναλυτικότερα, τα μεσόφιλα φέρουν σε ποσοστό 62% το αμινοξύ γλυκίνη (G) και σε ποσοστό 38% το αμινοξύ σερίνη (S). Επομένως, τα θερμόφιλα προτιμούν ένα πολύ μικρό, υδρόφοβο, μη πολικό αμινοξύ ενώ τα μεσόφιλα μπορεί να φέρουν και ένα μικρό, υδρόφιλο, πολικό αμινοξύ.

Στη θέση 27, οι HU που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια φέρουν το αμινοξύ αλανίνη (A) σε ποσοστό 100%, ενώ δεν παρατηρείται ποσοστιαία ταύτιση όσον αφορά τη προτίμηση του συγκεκριμένου αμινοξέος στις HU που προέρχονται από μεσόφιλα βακτήρια. Αναλυτικότερα, τα μεσόφιλα φέρουν σε ποσοστό 38% το αμινοξύ θρεονίνη (T), σε ποσοστό 23% το αμινοξύ σερίνη (S), σε ποσοστό 23% το αμινοξύ αλανίνη (A) και σε ποσοστό 15% το αμινοξύ βαλίνη (V). Επομένως, τα θερμόφιλα προτιμούν ένα μικρό, υδρόφοβο, μη πολικό αμινοξύ ενώ τα μεσόφιλα φαίνεται ότι προτιμούν ένα μικρό, υδρόφιλο, πολικό αμινοξύ. Παρατηρώντας τη δομή του μορίου (Εικόνα 57), το κατάλοιπο της θέσης 27 βρίσκεται στο μέσο της α_2 έλικας προς την εξωτερική πλευρά. Οι αλανίνες σταθεροποιούν τις α έλικες και ευνοούν το υδροφοβο πακετάρισμα του μορίου σε αντίθεση με τις θρεονίνες και σερίνες που είναι υδρόφιλες και αποσταθεροποιούν σε μικρό βαθμό την α έλικα και κατά συνέπεια το πακετάρισμα του υδρόφοβου πυρήνα του μορίου, δίνοντας τοπικό flexibility.

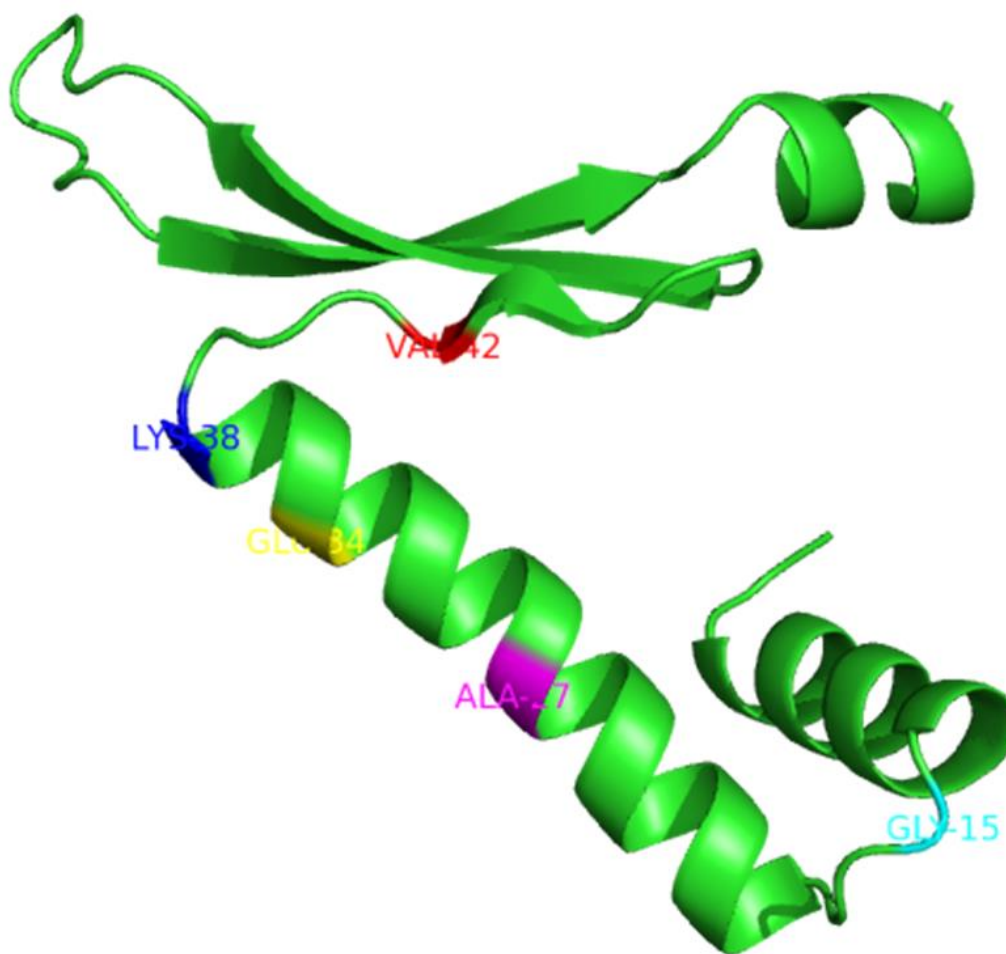
Στη θέση 34, οι HU που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια φέρουν το αμινοξύ γλουταμικό (E) σε ποσοστό 100%, ενώ δεν παρατηρείται ποσοστιαία ταύτιση όσον αφορά τη προτίμηση του συγκεκριμένου αμινοξέος στις HU που προέρχονται από μεσόφιλα βακτήρια. Αναλυτικότερα, τα μεσόφιλα φέρουν σε ποσοστό 31% το αμινοξύ γλουταμικό (E), σε ποσοστό 31% το αμινοξύ ασπαρτικό (D), σε ποσοστό 15% το αμινοξύ σερίνη (S) και σε ποσοστό 15% το αμινοξύ γλυκίνη (G). Επομένως, τα θερμόφιλα προτιμούν ένα μικρό, υδρόφοβο, μη πολικό αμινοξύ ενώ τα μεσόφιλα φαίνεται ότι προτιμούν ένα όξινα φορτισμένο, υδρόφιλο, πολικό αμινοξύ, ενώ τα μεσόφιλα δεν παρουσιάζουν κάποια ιδιαίτερη προτίμηση αμινοξέος στη συγκεκριμένη θέση. Παρατηρώντας τη δομή του μορίου (Εικόνα 57), το κατάλοιπο της θέσης 34 βρίσκεται λίγο πριν το τέλος της α_2 έλικας, προς την εξωτερική πλευρά του μορίου και στα θερμόφιλα που είναι

γλουταμικό, σχηματίζει δεσμό άλατος με τη λυσίνη της θέσης 37. Η αντικατάστασή του από το αμινοξύ ασπαρτικό, στα μεσόφιλα, οδηγεί σε μία κοντύτερη πλευρική αλυσίδα κατά ένα μεθύλιο η οποία καταργεί την σωστή απόσταση μεταξύ των δύο καταλοίπων και έχει ως συνέπεια την κατάργηση του δεσμού άλατος.

Στη θέση 38, οι HU που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια φέρουν είτε το αμινοξύ σερίνη (S) είτε το αμινοξύ ασπαργίνη (N) σε ίσα ποσοστά, ενώ δεν παρατηρείται ποσοστιαία ταύτιση όσον αφορά τη προτίμηση των συγκεκριμένων αμινοξέων στις HU που προέρχονται από μεσόφιλα βακτήρια. Αναλυτικότερα, οι τελευταίες φέρουν σε ποσοστό 31% το αμινοξύ σερίνη (S), σε ποσοστό 15% το αμινοξύ ασπαρτικό (D), σε ποσοστό 23% το αμινοξύ γλουταμικό (E) και σε ποσοστό 15% το αμινοξύ γλουταμίνη (Q). Επομένως, τα θερμόφιλα προτιμούν ένα μικρό, υδρόφιλο, πολικό αμινοξύ ενώ τα μεσόφιλα φαίνεται ότι προτιμούν ένα πολικό, υδρόφιλο και φορτισμένο αμινοξύ στην ίδια θέση.

Τέλος, στη θέση 42 τόσο οι HU που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια όσο και αυτές που προέρχονται από μεσόφιλα βακτήρια, φέρουν σε ποσοστό 100% το αμινοξύ βαλίνη (V). Παρατηρείται στη συγκεκριμένη θέση μεγάλη συντήρηση γεγονός που συνδέεται με το λειτουργικό της ρόλο, ο οποίος είναι η δημιουργία του διμερούς.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί στο συγκεκριμένο σημείο, ότι κατάλοιπα που σχετίζονται με τις λειτουργίες της πρωτεΐνης HU (δέσμευση στο DNA ή/και σχηματισμό διμερούς) είναι συντηρημένα, οπότε δεν οδηγούν σε συμπεράσματα σχετικά με τις στρατηγικές αντιμετώπισης της θερμοσταθερότητας. Από τις θέσεις που συγκρίναμε, μόνο οι θέσεις 27 και 42 σχετίζονται με κάποιο ρόλο της πρωτεΐνης, που πιο συγκεκριμένα, είναι η συμμετοχή στο σχηματισμό του διμερούς.



Εικόνα 57 Το μονομέρες της πρωτεΐνης HU από τον θερμόφιλο οργανισμό *Geobacillus stearothermophilus*. Τα κατάλοιπα που τονίζονται (G15, A27, E34, K38, V42) είναι αυτά που συμμετέχουν στην θερμοσταθερότητα του μορίου.

Επιπρόσθετα, σε επόμενο βήμα αναλύσαμε τους δεσμούς υδρογόνου και τις γέφυρες άλατος στις θερμόφιλες συναινετικές και προγονικές ακολουθίες καθώς και στην HUTth και τις συγκρίναμε με τις αντίστοιχες παραμέτρους στις μεσόφιλες HU ακολουθίες. Όπως φαίνεται και στους πίνακες 3-2 και 3-2, οι θερμόφιλες ακολουθίες χαρακτηρίζονται από περισσότερους δεσμούς υδρογόνου καθώς και από περισσότερες γέφυρες άλατος.

Παράλληλα, ύστερα από ανάλυση των λειτουργικά συντηρημένων καταλοίπων στο μόριο, προτείνουμε την εκτενέστερη μελέτη των καταλοίπων στις θέσεις 17, 21, 26, 30, 37 και 51 (Εικόνα 58). Τα κατάλοιπα στις συγκεκριμένες θέσεις παρουσιάζουν προτίμηση στις ακολουθίες που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια ενώ δεν παρουσιάζουν κάποια προτίμηση ή παρουσιάζουν εντελώς

διαφορετική προτίμηση σε ακολουθίες που ποροέρχονται από μεσόφιλους αντιπροσώπους. Αναλυτικότερα,

Στη θέση 17, οι HU που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια φέρουν το αμινοξύ λυσίνη (K) σε ποσοστό 100%, ενώ δεν παρατηρείται ποσοστιαία ταύτιση όσον αφορά τη προτίμηση των συγκεκριμένων αμινοξέων στις HU που προέρχονται από μεσόφιλα βακτήρια. Αναλυτικότερα, οι τελευταίες φέρουν σε ποσοστό 46% το αμινοξύ θρεονίνη (T), και σε χαμηλότερα ποσοστά τα αμινοξέα ασπαραγίνη και σερίνη. Επομένως, τα θερμόφιλα προτιμούν ένα υδρόφιλο, πολικό, φορτισμένο, βασικό αμινοξύ ενώ τα μεσόφιλα φαίνεται ότι προτιμούν μικρότερα, πολικά, υδρόφιλα, μη φορτισμένα αμινοξέα στην ίδια θέση.

Στη θέση 21, οι HU που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια φέρουν το αμινοξύ βαλίνη (V) σε ποσοστό 100%, ενώ δεν παρατηρείται ποσοστιαία ταύτιση όσον αφορά τη προτίμηση των συγκεκριμένων αμινοξέων στις HU που προέρχονται από μεσόφιλα βακτήρια. Αναλυτικότερα, οι τελευταίες φέρουν είτε το αμινοξύ αλανίνη (A) είτε το αμινοξύ σερίνη (S).

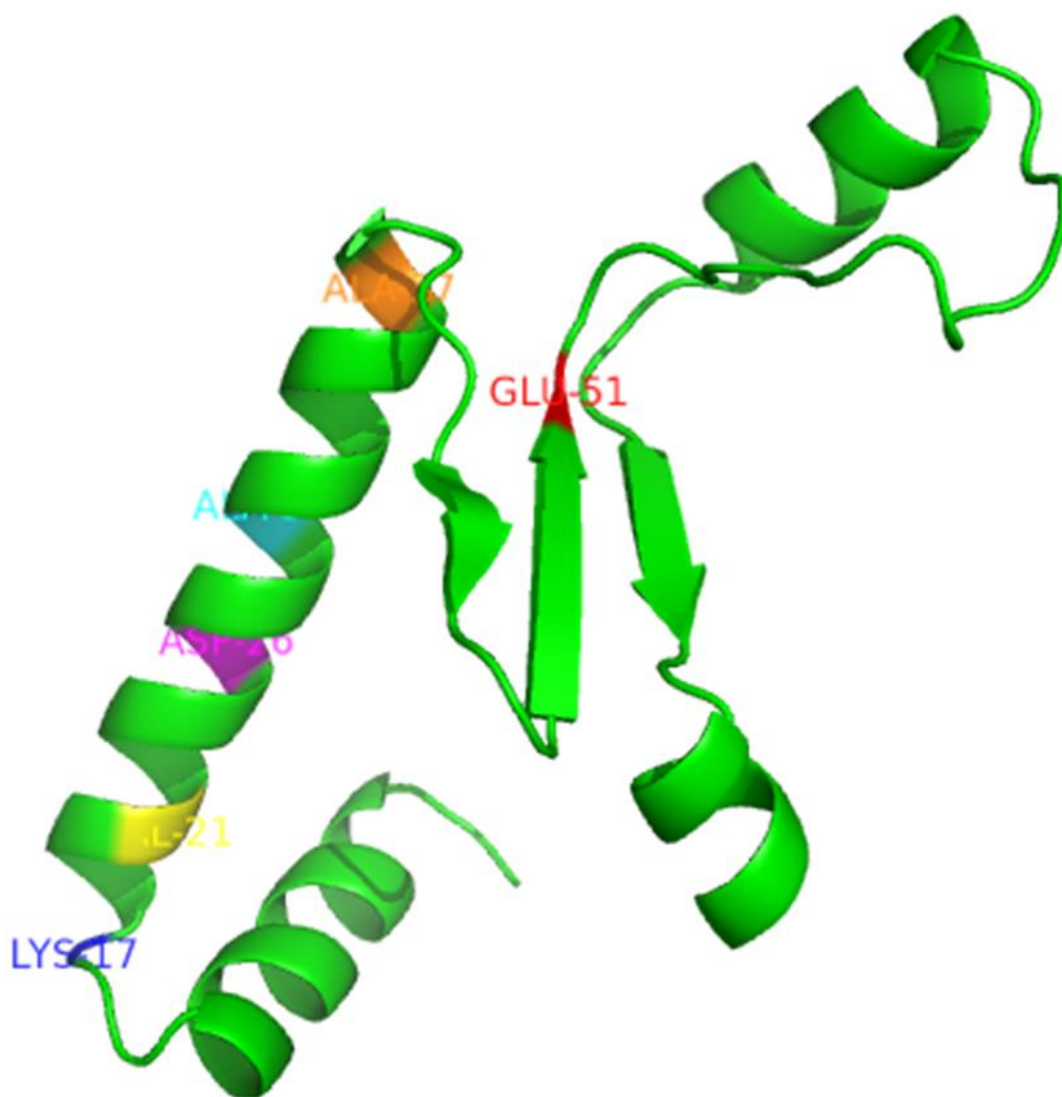
Στη θέση 26, οι HU που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια φέρουν σε ποσοστό 100% το αμινοξύ ασπαρτικό ενώ οι αντιστοιχες ακολουθίες από μεσόφιλα φέρουν είτε το αμινοξύ αλανίνη είτε το αμινοξύ ασπαρτικό. Το ασπαρτικό σε αντίθεση με την αλανίνη είναι υδρόφιλο και πολικό.

Στη θέση 30, οι HU που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια φέρουν το αμινοξύ αλανίνη (A) ή το αμινοξύ ασπαρτικό (D), ενώ δεν παρατηρείται ποσοστιαία ταύτιση όσον αφορά τη προτίμηση των συγκεκριμένων αμινοξέων στις HU που προέρχονται από μεσόφιλα βακτήρια. Αναλυτικότερα, τα μεσόφιλα φέρουν ασπαραγίνη ή ασπαρτικό ή γλυκίνη στην ίδια θέση.

Στη θέση 37, οι HU που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια φέρουν το αμινοξύ αλανίνη (A) ή το αμινοξύ ασπαραγίνη (N), ενώ δεν παρατηρείται ποσοστιαία ταύτιση όσον αφορά τη προτίμηση των συγκεκριμένων αμινοξέων στις HU που προέρχονται από μεσόφιλα βακτήρια. Αναλυτικότερα, τα μεσόφιλα φέρουν γλουταμίνη ή αργινίνη ή λυσίνη στην ίδια θέση.

Τέλος, στη θέση 51, οι HU που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια φέρουν το

αμινοξύ γλουταμικό (E) σε ποσοστό 100%, ενώ δεν παρατηρείται ποσοστιαία ταύτιση όσον αφορά τη προτίμηση των συγκεκριμένων αμινοξέων στις HU που προέρχονται από μεσόφιλα βακτήρια. Αναλυτικότερα, οι τελευταίες φέρουν είτε το αμινοξύ αλανίνη (A) είτε το αμινοξύ σερίνη (S). Το τελευταίο εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό.



Εικόνα 58 Το μονομερές της πρωτεΐνης HU consensus_thermophilles. Τα κατάλοιπα που τονίζονται (K17, V21, D26, A/D30, A/N37 και E51) δεν είναι λειτουργικά συντηρημένα και λόγω της διαφορετικής προτίμησης που παρουσιάζουν στις ακολουθίες που προέκυψαν από θερμοφίλους αντιπροσώπους συγκριτικά με αυτές που προέκυψαν από μεσόφιλους, πιθανά συμμετέχουν στην θερμοσταθερότητα του μορίου. Τα συγκεκριμένα κατάλοιπα προτείνονται για περαιτέρω ανάλυση ως προς τον ρόλο που παίζουν στη θερμοσταθερότητα του μορίου.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να επιβιώνουν σε μεγάλη ποικιλία αβιοτικών παραγόντων εξασφαλίζεται από τα ιδιαίτερα δομικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά τους. Η διαλεύκανση των μηχανισμών βιολογικής προσαρμοστικότητας και βιοχημικής-δομικής-θερμοδυναμικής σταθερότητας είναι ένα από τα πλέον δύσκολα και δυναμικά ερωτήματα της σύγχρονης βιολογίας. Πέρα από την απόκτηση βασικής επιστημονικής γνώσης το επιστημονικό αυτό πεδίο ξεκίνησε εκ του γεγονότος ότι έχει σημαντικό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, διότι ραγδαία αυξάνονται οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές εφαρμογές.

Οι μηχανισμοί σταθερότητας πρωτεϊνών είναι πολύπλοκοι και τα μέχρι στιγμής δεδομένα δεν είναι σε θέση να μας οδηγήσουν σε κανόνες, παρά μόνο σε ενδεικτικά συμπεράσματα και κατευθύνσεις. Η δυσκολία αντιμετώπισης του προβλήματος οφείλεται κυρίως στα δεδομένα ότι: (α) οι πρωτεΐνες είναι εν γένει ασταθείς-οριακά σταθερές, (β) ότι η διαφορά ενέργειας μεταξύ διπλωμένης και ξεδιπλωμένης πρωτεΐνης είναι της τάξεως των μερικών μη ομοιοπολικών δεσμών, (γ) οι πρωτεΐνες έχουν την δυνατότητα να αποσβήσουν σημειακές μεταλλάξεις εφόσον δεν επηρεάζουν την βιολογική τους ενεργότητα και, (δ) το μέγεθος όσο και η δημιουργία υπερτεταρτοταγών δομών αυξάνουν τον βαθμό δυσκολίας του προβλήματος.

Αυξανόμενου του μεγέθους των πρωτεϊνών οι πιθανές λύσεις στο πρόβλημα είναι ανέφικτο να προσδιοριστούν. Μια ασφαλής προσέγγιση στο θέμα αυτό είναι η μελέτη μικρών πρωτεϊνών, σαν πρότυπο σύστημα, που είναι συντηρημένες και προέρχονται από μικροοργανισμούς που επιβιώνουν σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Οι παράμετροι που επηρεάζουν την βιολογική και δομική σταθερότητα των πρωτεϊνών είναι φυσικοί (πίεση, θερμοκρασία) και χημικοί (pH, αποδιατακτικοί παράγοντες, οξειδώσεις κλπ).

Μια βασική παράμετρος των βιοτεχνολογικών διαδικασιών είναι η θερμοκρασία. Έτσι, το εργαστήριο μας επέλεξε να μελετήσει τη βασική αυτή παράμετρο και έχει μακρά εμπειρία στη μελέτη πρωτεϊνών που προέρχονται από βακτήρια και αρχαία που επιβιώνουν σε εύρος θερμοκρασιών από 4-120 °C.

Προκειμένου να προσδιορίσουμε τους παράγοντες που επηρεάζουν τη θερμοσταθερότητα των πρωτεϊνών, επιλέξαμε βακτηριακές και όχι ευκαρυωτικές

πρωτεΐνες. Η στρατηγική αυτή μας επιτρέπει να αποφύγουμε παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη θερμοσταθερότητα, όπως είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (πχ. γλυκοζυλιώσεις) και δημιουργούν επιπρόσθετες παραμέτρους. Επομένως δίνεται η δυνατότητα, να μελετηθεί το συγκεκριμένο ερώτημα απόλυτα στην ενδογενή δομική σταθερότητα ή διαφορετικά σε σχέση δομής και θερμικής σταθερότητας.

Η πρωτεΐνη μας μοντέλο ανήκει στην οικογένεια των προκαρυωτικών πρωτεϊνών που έχουν βιολογική δράση παρόμοια με αυτή των ευκαρυωτικών ιστονών (histone- like). Η οικογένεια των πρωτεϊνών HU (PFAM: pF00216) είναι πολύ συντηρημένη σε επίπεδο τριτοταγούς δομής και λιγότερο συντηρημένη σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής. Τα μέλη της έχουν την ίδια βιολογική ενεργότητα, να αλληλεπιδρούν με το DNA και να ρυθμίζουν τις λειτουργίες του. Οι διαφορές στην πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών αυτών είναι πολύ πιθανό, σε μεγάλο βαθμό, να αντικατοπτρίζουν την εξελικτική προσαρμογή τους στο θερμικό περιβάλλον στο οποίο επιβιώνουν τα βακτήρια στα οποία λειτουργούν. Από τα βακτήρια αυτά απομονώνουμε και μελετάμε τις αντίστοιχες HU πρωτεΐνες.

Οι HU πρωτεΐνες είναι μικρές, αρχιτεκτονικά συντηρημένες ενώ υπάρχουν ήδη αρκετά πειραματικά δεδομένα, από το εργαστηριό μας κυρίως, που σχετίζονται είτε με τη δομή είτε με τη θερμοσταθερότητα του μορίου. Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήσαμε λειτουργική ανάλυση της HUTth πρωτεΐνης, για πρώτη φορά, ενώ σε δεύτερο μέρος, συσχέτισαμε προηγούμενα πειραματικά δεδομένα με φυλογενετικά δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη.

Αρχικά απομονώσαμε και ενισχύσαμε το γονίδιο *hutth* από το γενωμικό DNA του *T. thermophilus* βασιζόμενοι στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης που είχε δημοσιευθεί εδώ και αρκετά χρόνια και προέρχεται από πεπτιδική ανάλυση. Υπερεκφράσαμε το γονίδιο *hutth* σε *E. coli* και επιτύχαμε σημαντικά επίπεδα παραγωγής ανασυνδιασμένης HUTth πρωτεΐνης. Η HUTth είναι βασική πρωτεΐνη, ομοδιμερής και έχει μοριακό βάρος 10 KDa για το κάθε μονομερές. Με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας καθарίσαμε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη τόσο σε υψηλή καθαρότητα όσο και σε μεγάλες ποσότητες, ικανές να προχωρήσουμε σε περαιτέρω βιοχημική, βιοφυσική και δομική ανάλυση.

Σε επίπεδο βιοχημικής ανάλυσης, μελετήσαμε την αλληλεπίδραση της *HUTth* με το DNA. Ακριβέστερα, μετρήθηκε η σταθερά διάστασης (K_d) της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με πλασμιδιακό DNA με την τεχνολογία MicroScale Thermophoresis (MST). Γενικά οι HU πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με το DNA μη ειδικά σε επίπεδο αλληλουχίας αλλά περισσότερο ειδικά σε επίπεδο στερεοδιάταξης όπως έχει δειχθεί από τη βιβλιογραφία και από προηγούμενες εργασίες του εργαστηρίου μας. Ο βαθμός συσσωμάτωσης της *HUTth* στο διάλυμα μελετήθηκε με τη χρήση της τεχνολογίας Dynamic Light Scattering (DLS), ενώ το μοριακό της βάρος μετρήθηκε με φασματοσκοπία μάζας. Η *HUTth* είναι διαλυτή, ομοδιμερής, ενώ δεν παρατηρήθηκαν συσσωματώματα ή φαινόμενα ολιγομερισμού.

Σε επίπεδο βιοφυσικής ανάλυσης μελετήσαμε τη στεροδιαμόρφωση της πρωτεΐνης και το σημείο τήξης της σε πειράματα θερμικής αποδιάταξης με τη χρήση κυκλικού διχροϊσμού και φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης. Η ανασυνδιασμένη *HUTth* είναι σωστά διπλωμένη στο χώρο όπως απεδείχθη από την φασματοσκοπία κυκλικού διχροϊσμού και έχει θερμοκρασία τήξης 75 °C στις συνθήκες που μελετήθηκε.

Σε επίπεδο δομικής ανάλυσης κρυστάλλωσαμε την πρωτεΐνη με τη χρήση ρομποτικών συστημάτων κρυστάλλωσης, εφαρμόζοντας τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας (sitting drop) και την τεχνική εξάτμισης και διάχυσης των ατμών (vapor diffusion). Αποκτήσαμε μικρο-κρυστάλλους (single crystals) διαφόρων μεγεθών και σχημάτων. Σε επόμενο βήμα, οι κρύσταλλοι θα μετρηθούν με ακτίνες- Χ τον επόμενο Απρίλιο όταν θα ανοίξει πάλι το συγχροτρόνιο στο EMBL στο Αμβούργο. Τα αναμενόμενα κρυσταλλογραφικά δεδομένα θα μας επιτρέψουν να προσδιορίσουμε τη 3D δομή της πρωτεΐνης.

Σε επίπεδο βιοπληροφορικής ανάλυσης για πρώτη φορά δοκιμάσαμε την προσέγγιση Ancestral Sequence Reconstruction για να μελετήσουμε τους μηχανισμούς θερμοσταθερότητας, αρχικά σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής. Η προσέγγιση αυτή μας δίνει την δυνατότητα, μέσα από φυλογενετική και εξελικτική δυναμική να αναστήσουμε ακολουθίες της πρωτεΐνης HU που ανήκαν σε αρχαίους πληθυσμούς και είδη σε βάθος δισεκατομμυρίων ετών. Ταυτόχρονα μπορούμε να πάρουμε μια λεπτομερή εικόνα της δυναμικής των διαδικασιών προσαρμογής σε μοριακό επίπεδο συμπληρώνοντας το puzzle των διαδικασιών εξελικτικής προσαρμογής των βακτηρίων στην θερμοκρασία. Η προσέγγιση αυτή ίσως μας δώσει νέες στρατηγικές-

μηχανισμούς θερμικής προσαρμογής σε ατομικό επίπεδο που δεν είναι ανιχνεύσιμες στο σημερινό βιολογικό περιβάλλον. Η προσέγγιση αυτή εφαρμόζεται για πρώτη φορά στο πεδίο που μελετάμε. Η μέχρι στιγμής εφαρμογές της αναφέρονταν κυρίως στην πρόβλεψη αρχέγονων πρωτεϊνών σε ένζυμα για πρακτικούς (σταθερότητα, διαλυτότητα, εξειδίκευση) και παλαιοβιολογικούς στόχους (καθορισμό παλαιοπεριβάλλοντος, συσχετισμό με φυσιολογία εξαφανισμένων οργανισμών).

Με την τεχνική της ομόλογης πρωτοτυποποίησης (homology modeling) κατασκευάστηκαν δομικά μοντέλα των ακολουθιών που προβλέφθηκαν (θερμόφιλων-μεσόφιλων) και πραγματοποιήθηκε σύγκριση της τεταρτοταγούς δομής, όπως του αριθμού των δεσμών υδρογόνου και των γεφυρών άλατος. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι θερμόφιλες ακολουθίες είχαν περισσότερες γέφυρες άλατος και δεσμούς υδρογόνου, παράμετροι που σχετίζονται με την θερμοσταθερότητα των πρωτεϊνών. Δεν εξετάστηκαν οι δισουλφιδικοί καθώς οι HU πρωτεΐνες (εκτός σπανιότατων εξαιρέσεων) δεν περιέχουν κυστεΐνες και κατά συνέπεια η θερμοσταθερότητά τους είναι ανεξάρτητη από δισουλφιδικούς δεσμούς.

Από την ανάλυση σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής, αρχικά, επιβεβαιώθηκαν οι θέσεις που έχουν ελεγχθεί και πειραματικά, από το εργαστήριό μας, και σχετίζονται με την θερμοσταθερότητα του μορίου. Ακριβέστερα, οι θερμόφιλες ακολουθίες προτιμούν τα αμινοξικά κατάλοιπα: G15, A27, E34, K38, V42. Επιπλέον, ύστερα από σύγκριση των μη λειτουργικά συντηρημένων καταλοίπων, δηλαδή των καταλοίπων που δεν σχετίζονται με τη δημιουργία του διμερούς ή με την αλληλεπίδραση με το DNA, παρατηρήθηκε προτίμηση συγκεκριμένων καταλοίπων σε θερμόφιλες ακολουθίες. Αναλυτικότερα, οι θερμόφιλες ακολουθίες προτιμούν τα εξής κατάλοιπα: K17, V21, D26 και E51.

Η εξειδίκευση στην αλληλεπίδραση με το DNA φαίνεται πως είναι απομορφικό χαρακτηριστικό (*εξελικτικό γνώρισμα που αναδύεται σε ένα κλάδο και το οποίο εμφανίζεται σε κάποιο είδος καθώς και στους απογόνους του*) που αποκτήθηκε αργότερα στην εξέλιξη. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν και οι πρωτεΐνες IHF (integration host factor) που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες ακολουθίες DNA κατά την βιολογική τους δράση να συμμετέχουν στην ενσωμάτωση του φάγου στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Έτσι, μέσα στην οικογένεια που ανήκουν οι HU, από μη εξειδικευμένη δέσμευση στο DNA (HU) αποκτάται εξειδίκευση στη δέσμευση (IHF+ ενδιάμεσες

ακολουθίες) (Εικόνα 59).

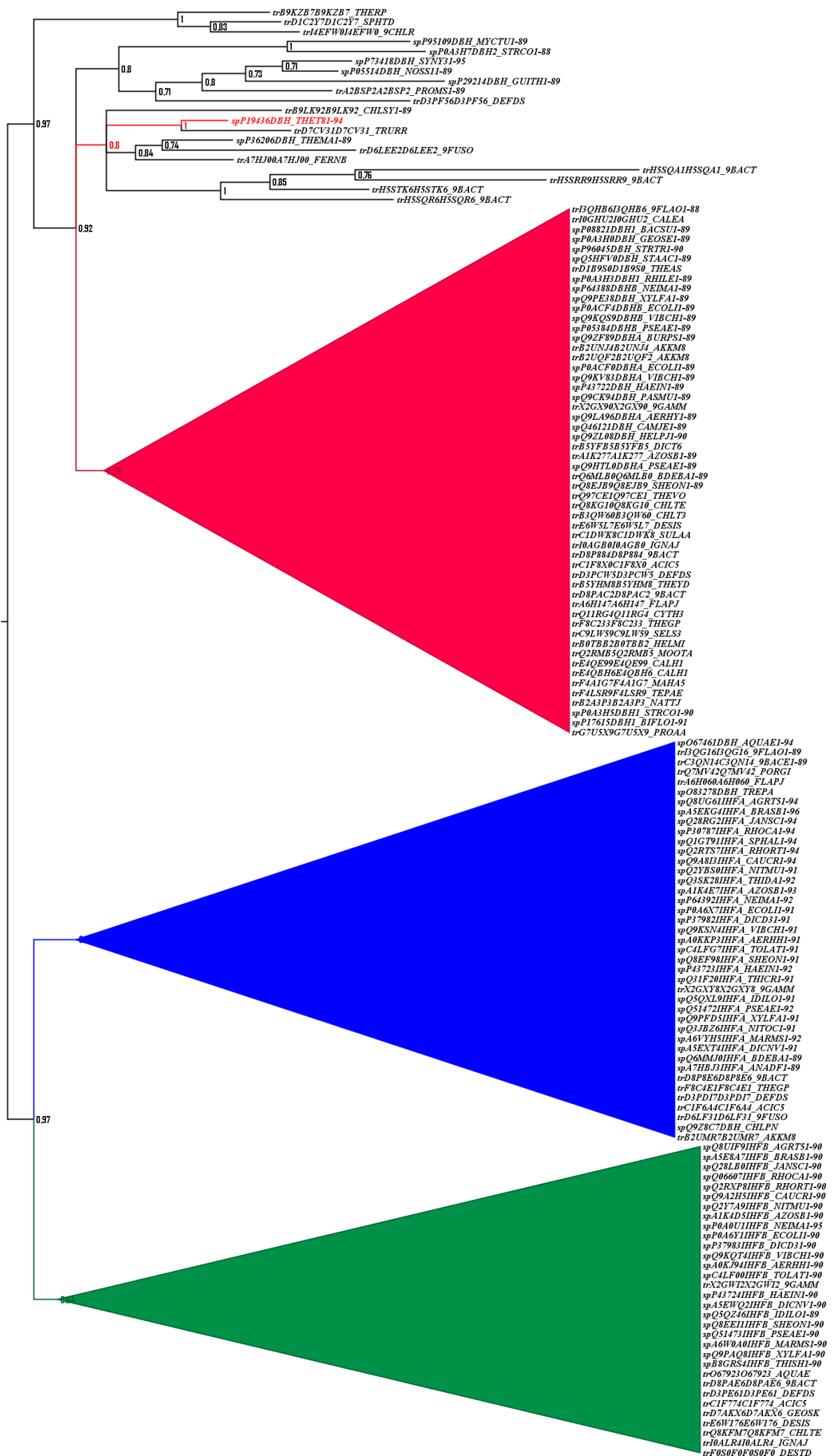
Τέλος, από τα φυλογενετικά δεδομένα, συνάγεται το συμπέρασμα ότι σε πρωτοταγές επίπεδο η βάση της θερμοσταθερότητας είναι κβαντισμένη σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Αντίγραφα της HU που φέρουν τη συναινετική αλληλουχία G15, A27, E34, K38, V42, είναι κατά κανόνα θερμόφιλα ή υπερθερμόφιλα. Εντούτοις, άνω των 60 °C, μπορεί να γίνει ανεκτή απόκλιση ενός καταλοίπου από τη συναινετική αλληλουχία. Στο εύρος 50-60 °C, το όριο είναι 2 αποκλίσεις και σπανιότερα 3, υπό την προϋπόθεση ότι παραμένει ο βιοφυσιτικός χαρακτήρας των καταλοίπων.

Μεσόφιλοι κλάδοι που εξελικτικά απέκτησαν την αλληλουχία ως πλεισιομορφία (πλεισιομορφία είναι το εξελικτικό γνώρισμα που είναι ομόλογο εντός μιας συγκεκριμένης ομάδας οργανισμών αλλά δεν είναι μοναδικό για τα μέλη της εν λόγω ομάδας, συγκριτικά με την απομορφία, και ως εκ τούτου δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός ή καθοριστικός για την ομάδα χαρακτήρας) με συγγενικούς θερμόφιλους, παύουν να έχουν εξελικτική πίεση και οι θέσεις δέχονται ουδέτερη επιλογή. Το αποτέλεσμα είναι ότι μπορούν να μεταλλαγούν ελεύθερα, εφόσον δεν επηρεάζεται η λειτουργικότητα και η δομική σταθερότητα του μορίου.

Σε επόμενο βήμα θα προσπαθήσουμε να συνδυάσουμε τα δεδομένα μας από τη φυλογενετική ανάλυση στα *Had bacteria* (ως θετικό και αρνητικό control-θερμόφιλος- μεσόφιλος κλάδος) με συναινετικές και προγονικές αλληλουχίες που θα προκύψουν από βιβλιοθήκη που θα περιέχει HU ακολουθίες που προέρχονται από θερμόφιλα βακτήρια όλων των φύλων. Μέσω της συγκεκριμένης στρατηγικής αναμένεται να εξαχθούν επιπρόσθετα συμπεράσματα ως προς τη μοριακή βάση της θερμοσταθερότητας στην οικογένεια των HU πρωτεϊνών. Με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία είναι πιθανό να καταστεί εφικτή η *in silico* πρόβλεψη θερμοευαίσθητων καταλοίπων σε οποιαδήποτε βακτηριακή πρωτεϊνική οικογένεια και να επιβεβαιωθεί σε πειραματικό επίπεδο. Ως εκ τούτου επόμενος στόχος είναι η μετάβαση από την βιοπληροφορική-φυλογενετική ανάλυση στη σύνθεση των προβλεπόμενων ακολουθιών και ο έλεγχός τους πειραματικά ως προς τη χημική και θερμοδυναμική θερμοσταθερότητα τους.

Η προσέγγιση αυτή ακολουθείται για πρώτη φορά και ελπίζουμε να εξάγουμε νέα συμπεράσματα για τους μηχανισμούς θερμοσταθερότητας απλών και περαιτέρω και

πιο πολύπλοκων πρωτεϊνών και συνάδει με τις μοντέρνες τάσεις της πρωτεϊνικής μηχανικής και συνθετικής βιολογίας.



Εικόνα 59 Φυλογενετικό δένδρο (gene tree) της υπερικογένειας HU-IHF με Bayesian inference (Adam P.S., Papageorgiou A.C, Vorgias C.E., *in preparation*).

5 ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Οι κατηγορίες των μικροοργανισμών με βάση το θερμοκρασιακό τους άριστο.....	8
Εικόνα 2 Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των έξι Βασιλείων της ζωής.	16
Εικόνα 3 Φυλογενετικό δένδρο της ομάδας <i>Deinococcus- Thermus</i> , βασισμένο στις 16S rRNA γονιδιακές ευθυγραμμίσεις.	18
Εικόνα 4 Σχηματική αναπαράσταση του βακτηριακού χρωμοσώματος σε ένα αυξανόμενο βακτηριακό κύτταρο. Η πακεταρισμένη μάζα του DNA παρατηρείται στο κέντρο, και οι θηλίες γύρω από αυτή.	21
Εικόνα 5 α) Τρισδιάστατη αναπαράσταση του μονομερούς και διμερούς της HUBst με το πρόγραμμα PyMol. β) αμινοξική αλληλουχία της HUBst και δευτεροταγείς δομές.	27
Εικόνα 6 Τρισδιάστατη αναπαράσταση του τρόπου πρόσδεσης του διμερούς της HU στο DNA: α) πλάγια όψη, β) άνω όψη. Τρισδιάστατη αναπαράσταση οκταμερούς συμπλόκου HUαβ- DNA: γ) πάνω όψη, δ) πλάγια όψη.	29
Εικόνα 7 Πρωτεϊνική σταθερότητα: α) το φαινόμενο της δίπλωσης των πρωτεϊνών, β) τα μονοπάτια της δίπλωσης και γ) θερμοδυναμική σταθερότητα των πρωτεϊνών.	33
Εικόνα 8 Η στρατηγική της προγονικής ανασυγκρότησης γονιδίου.	41
Εικόνα 9 Σχηματική αναπαράσταση της ασύμμετρης μονάδας, από την οποία με εφαρμογή κατάλληλων τελεστών συμμετρίας προκύπτει η μοναδιαία κυψελίδα. Από την επανάληψη της μοναδιαίας κυψελίδας σε διατεταγμένη μορφή σχηματίζεται ο κρύσταλλος.	44
Εικόνα 10 Μονοπάτια πυρήνωσης για κρυστάλλους μακρομορίων.....	45
Εικόνα 11 Το διάγραμμα φάσεων κρυστάλλωσης.	47
Εικόνα 12 Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης των κυριότερων τεχνικών διάχυσης: Α. Με κρεμάμενη σταγόνα, Β. Με καθήμενη σταγόνα, Γ. Τεχνική άμεσης προσθήκης παράγοντα κατακρήμνισης υπό έλαιο, Δ. Μικροδιαπίδυση, Ε. Διάχυση ελεύθερης επιφάνειας. Οι τεχνικές της κρεμάμενης και της καθήμενης σταγόνας είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες.....	49
Εικόνα 13 Ηλεκτρονικό πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).62	
Εικόνα 14 Χάρτης του πλασμιδίου pGEM- T Easy.....	64
Εικόνα 15 Χάρτης του πλασμιδίου pET- 11a.....	64

Εικόνα 16 Το σύστημα γονιδιακής υπερέκφρασης T7.	66
Εικόνα 17 Διαδικασία διαπίδυσης.	72
Εικόνα 18 Διανυσματική αναπαράσταση του ηλεκτρικού πεδίου στη διεύθυνση διάδοσης ακτινοβολίας για την περίπτωση ύπαρξης απορρόφησης οπτικά ενεργού ουσίας σε προσπίπτον γραμμικά πολωμένο φώς. Οι θέσεις 1 έως 5 αντιστοιχούν σε ίσα χρονικά διαστήματα. (Α) Προσπίπτον γραμμικά πολωμένο φώς. (Β) Εξερχόμενο ελλειπτικά πολωμένο φώς με τον μεγάλο ημιάξονα της έλλειψης στραμμένο κατά γωνία ϕ ως προς το αρχικό επίπεδο πόλωσης. (Γ) Ανάλυση γραμμικά πολωμένου φωτός σε δύο κυκλικά πολωμένες συνιστώσες με αντίθετη φορά πόλωσης. (Δ) Η επίδραση της οπτικά ενεργού ουσίας στις κυκλικά πολωμένες συνιστώσες αντίθετης φοράς πόλωσης. Το άθροισμα των συνιστωσών του Δ δίνει το Β.	80
Εικόνα 19 Αντίθετης φοράς κυκλικά πολωμένες συνιστώσες της ίδιας έντασης I_0 προσπίπτουν στην κυψελίδα που περιέχει την οπτικά ενεργό ουσία. Με I_L και I_R παριστάνονται οι διαφορετικές τιμές έντασης για την εξερχόμενη αριστερόστροφα και δεξιόστροφα πολωμένου φωτός ακτινοβολία αντίστοιχα.	81
Εικόνα 20 Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης κυκλικού διχροϊσμού.	82
Εικόνα 21 Ιδανικό φάσμα κυκλικού διχροϊσμού της α - έλικας, του β - φύλλου και του τυχαίου σπειράματος.....	83
Εικόνα 22 Τυπική δοκιμασία θερμικής μετουσίωσης με φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης. Καμπύλη τήξεως της ισομεράσης της γλυκόζης σε 100 mM Tris- HCl pH 8.5.....	86
Εικόνα 23 Γενική επισκόπηση του πρωτοκόλλου της φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης.....	87
Εικόνα 24 MALDI- TOF: α) Διαχωρισμός με βάσει το Time of Flight, β) Σωλήνας πτήσης υπό συνθήκες κενού αέρα.	88
Εικόνα 25 Η μέθοδος MALDI- TOF. Α) Αρχή Λειτουργίας φασματογράφου MALDI – TOF. Β) Πλακίδιο πειράματος.....	89
Εικόνα 26 Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την δυναμική σκέδαση του φωτός καθώς και η αρχή της μεθόδου.	91
Εικόνα 27 Μέθοδος θερμοφόρεσης. (αριστερά) Το διάλυμα εντός του τριχοειδούς τοπικά θερμαίνεται με το εστιασμένο λέιζερ IR. (δεξιά) Ο φθορισμός στο εσωτερικό του τριχοειδούς απεικονίζεται με μία φωτοδίοδο και ο κανονικοποιημένος φθορισμός στο θερμαινόμενο σημείο παρίσταται στο γράφημα έναντι του χρόνου. Το λέιζερ IR	

είναι ενεργοποιημένο σε χρόνο 5 δευτερολέπτων. Ο φθορισμός μειώνεται καθώς αυξάνει η θερμοκρασία και τα φθορίζοντα μόρια που σχηματίζουν σύμπλοκα κινούνται μακριά από το θερμαινόμενο σημείο λόγω της θερμοφόρησης.	93
Εικόνα 28 Αρχή μεθόδου της καθήμενης σταγόνας με την τεχνική εξάτμισης και διάχυσης των ατμών.....	95
Εικόνα 29 Παράδειγμα γέφυρας άλατος μεταξύ των αμινοξέων λυσίνη και γλουταμικού. Απεικονίζονται τόσο ο δεσμός υδρογόνου, όσο και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.	98
Εικόνα 30 Ενίσχυση, απομόνωση και εντοπισμός του γονιδίου <i>hutth</i> από το γενωμικό DNA του <i>T. thermophilus</i> HB8. Μελέτη επτά διαφορετικών συνθηκών pcr. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων pcr. Στις θέσεις 2 και 3 παρατηρείται η επιτυχής απομόνωση και ενίσχυση του γονιδίου <i>hutth</i> . Οι θέσεις 1, 4, 5, 6 και 7 αντιστοιχούν σε προϊόντα μη επιτυχούς pcr. Στη θέση 1 χρησιμοποιήθηκε τελική συγκέντρωση μαγνησίου: 2.5 mM, στις θέσεις 2 και 3 χρησιμοποιήθηκε τελική συγκέντρωση μαγνησίου: 1.5 mM και 58 °C, στις θέσεις 4, 5, 6 και 7 χρησιμοποιήθηκε τελική συγκέντρωση μαγνησίου: 1.5 mM και 62 °C, 64 °C, 66 °C και 68 °C, αντίστοιχα.	99
Εικόνα 31 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωνα αγαρόζης 1) του γραμμικού πλασμιδιακού φορέα pET-11a και 2) του ενθέματος-γονιδίου <i>hutth</i> ύστερα από διπλή πέψη τους με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσεις <i>NdeI</i> & <i>BamHI</i>	100
Εικόνα 32 Έλεγχος κλώνων του γονιδίου <i>hutth</i> στον φορέα pET-11a σε κύτταρα <i>E.coli</i> DH5a. 1) άκοπο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, 2) και 3) θετικά ανασυνδυασμένοι φορείς. Οι αντιδράσεις αφορούν πλασμίδια από ανθεκτικές στην αμπικιλίνη αποικίες.....	100
Εικόνα 33 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου <i>hutth</i> και αμινοξική αλληλουχία της HUTth πρωτεΐνης. Με πράσινο εμφανίζεται το κωδικόνιο έναρξης και με κόκκινο το κωδικόνιο λήξης.	101
Εικόνα 34 Μετασχηματισμός σε <i>E. coli</i> του ανασυνδυασμένου με το <i>hutth</i> πλασμιδιακού φορέα και καλλιέργειες.	102
Εικόνα 35 SDS PAGE ανάλυση συνολικών πρωτεϊνών, κυττάρων BL21(DE3) που περιέχουν το πλασμίδιο pET-11a- <i>hutth</i> , σε χρόνους 1: 0 h, 2: 1 h, 3: 2 h, και 4: 3 h μετά από επαγωγή με IPTG στους 37 °C.....	103
Εικόνα 36 SDS PAGE ανάλυση συνολικών πρωτεϊνών, κυττάρων Magic που περιέχουν το πλασμίδιο pET-11a- <i>hutth</i> , σε χρόνους 1: 0 h, 2: 1 h, 3: 2 h, και 4: 3 h μετά από επαγωγή με IPTG στους 37 °C.....	103

Εικόνα 37 SDS PAGE ανάλυση συνολικών πρωτεϊνών, κυττάρων Magic που περιέχουν το πλασμίδιο pET-11a- <i>hutth</i> ύστερα από διαφορετική κλασμάτωση με θειϊκό αμμώνιο. 1: πρωτεϊνικό κλάσμα 0- 60% κορεσμένο σε θειϊκό αμμώνιο, 2: πρωτεϊνικό κλάσμα 60- 80% κορεσμένο σε θειϊκό αμμώνιο.....	104
Εικόνα 38 Χρωματογραφικός καθαρισμός της HUTth πρωτεΐνης σε στήλη Ηπαρίνης. Α) και Β) SDS- PAGE ανάλυση των κλασμάτων από τον καθαρισμό της HUTth που εκλούθησαν από τη στήλη ηπαρίνης χρησιμοποιώντας αυξανόμενη διαβάθμιση συγκέντρωσης NaCl. Η πρωτεΐνη εκλύεται σε συγκέντρωση NaCl από 500 mM- > 1500 mM, Γ) Συγκεντρωμένη HUTth πρωτεΐνη.....	104
Εικόνα 39 Φάσμα κυκλικού διχροϊσμού της πρωτεΐνης HUTth.....	106
Εικόνα 40 Φάσμα θερμικής αποδιάταξης της πρωτεΐνης HUTth. Η θερμοκρασία τήξης της πρωτεΐνης είναι 75 °C.....	106
Εικόνα 41 Μέτρηση του βαθμού συσσωμάτωσης της HUTth με δυναμική σκέδασης φωτός. Κατά τη μέτρηση η πρωτεΐνη βρισκόταν σε διάλυμα 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0.....	107
Εικόνα 42 Μέτρηση του μοριακού βάρους της ανασυνδυασμένης HUTth με Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) φασματοσκοπία μαζών.	108
Εικόνα 43 Χαρακτηρισμός της HUTth με φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης. .	110
Εικόνα 44 Μελέτη της αλληλεπίδρασης της HUTth με το DNA. Ως DNA χρησιμοποιήσαμε τον πλασμιδιακό φορέα pUC18.	112
Εικόνα 45 Κρύσταλλοι της HUTth πρωτεΐνης.....	113
Εικόνα 46 Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών της οικογένειας pF00216 από θερμοφίλα και μεσόφιλα βακτήρια του φύλου των αδοβακτηρίων (<i>Thermus-Deinococcus</i>). Χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη βιβλιοθήκη πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση.	117
Εικόνα 47 Φυλογενετικό δένδρο που δημιουργήθηκε με HU ακολουθίες από αδοβακτήρια (<i>Thermus-Deinococcus</i>). Παρατηρούνται δύο υποδένδρα, στο ένα υπάρχουν HU του γένους <i>Thermus</i> και στο άλλο HU του γένους <i>Deinococcus</i> . Το δένδρο δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα MrBayes χρησιμοποιώντας ως outgroup HU ακολουθίες κυανοβακτηρίων. Οι τιμές που αναγράφονται αφορούν τα bootstrap. Με κίτρινο επισημαίνεται η <i>Thermus+Truepera</i> προγονική (Ancestral_thermophiles) και με μωβ η <i>Deinococcus</i> προγονική (Ancestral_mesophiles).	118
Εικόνα 48 Πολλαπλή στοίχιση HU ακολουθιών της οικογένειας pF00216 από θερμοφίλα βακτήρια του γένους <i>Thermus</i> . Χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη	

βιβλιοθήκη προβλέφθηκε η συναινετική ακολουθία των θερμόφιλων βακτηρίων γένους <i>Thermus</i> (Consensus_thermophiles).	119
Εικόνα 49 Πολλαπλή στοίχιση HU ακολουθιών της οικογένειας pF00216 από μεσόφιλα βακτήρια του γένους <i>Deinococcus</i> (εκτός από τις HU ακολουθίες των βακτηρίων του γένους <i>Thermus</i>). Χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη βιβλιοθήκη προβλέφθηκε η συναινετική ακολουθία των μεσόφιλων βακτηρίων του γένους <i>Deinococcus</i> (Consensus_mesophiles).	120
Εικόνα 50 Πολλαπλή στοίχιση όλων των HU ακολουθιών (συναινετικών και προγονικών, θερμόφιλων και μεσόφιλων) που προβλέφθηκαν και χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη βιοπληροφορική ανάλυση.	121
Εικόνα 51 Προτίμηση αμινοξέων ύστερα από στοίχιση των προγονικών και συναινετικών HU ακολουθιών από θερμόφιλα βακτήρια. Τα αμινοξέα που υπογραμμίζονται με μωβ είναι αυτά που είναι υπεύθυνα για τη θερμοσταθερότητα της πρωτεΐνης.	122
Εικόνα 52 Προτίμηση αμινοξέων ύστερα από στοίχιση των ακολουθιών HU (προγονική και συναινετική) από μεσόφιλα βακτήρια του γένους <i>deinococcus</i> . Τα αμινοξέα που υπογραμμίζονται με μωβ είναι αυτά που είναι υπεύθυνα για τη θερμοσταθερότητα της πρωτεΐνης.	123
Εικόνα 53 Μοντέλο της HU Ancestral_thermophiles και πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της με το JPred3. Για την πρόβλεψη του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η HU του <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	124
Εικόνα 54 Μοντέλο της HU Consensus_thermophiles και πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της με το JPred3. Για την πρόβλεψη του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η HU της <i>Thermotoga maritima</i>	125
Εικόνα 55 Μοντέλο της HU Ancestral_mesophiles και πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της με το JPred3. Για την πρόβλεψη του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η HU του <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	126
Εικόνα 56 Μοντέλο της HUTth και πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της με το JPred3. Για την πρόβλεψη του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η HU της <i>Thermotoga maritima</i>	127
Εικόνα 57 Το μονομερές της πρωτεΐνης HU από τον θερμόφιλο οργανισμό <i>Geobacillus stearothermophilus</i> . Τα κατάλοιπα που τονίζονται (G15, A27, E34, K38, V42) είναι αυτά που συμμετέχουν στην θερμοσταθερότητα του μορίου.	132
Εικόνα 58 Το μονομερές της πρωτεΐνης HU consensus_thermophiles. Τα κατάλοιπα	

που τονίζονται (K17, V21, D26,A/D30, A/N37 και E51) δεν είναι λειτουργικά συντηρημένα και λόγω της διαφορετικής προτίμησης που παρουσιάζουν στις ακολουθίες που προέκυψαν από θερμοφίλους αντιπροσώπους συγκριτικά με αυτές που προέκυψαν από μεσόφιλους, πιθανά συμμετέχουν στην θερμοσταθερότητα του μορίου. Τα συγκεκριμένα κατάλοιπα προτείνονται για περαιτέρω ανάλυση ως προς τον ρόλο που παίζουν στη θερμοσταθερότητα του μορίου.	134
Εικόνα 59 Φυλογενετικό δένδρο (gene tree) της υπεροικογένειας HU-IHF με Bayesian inference (Adam et al., in preparation).	142

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aki, T., & Adhya, S. (1997). Repressor induced site- specific binding of HU for transcriptional regulation. *EMBO J*, 16(12), 3666- 3674. doi: 10.1093/emboj/16.12.3666
- Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D., & Kolter, R. (1992). A novel DNA- binding protein with regulatory and protective roles in starved Escherichia coli. *Genes Dev*, 6(12B), 2646- 2654.
- Bae, S. H., Liu, D., Lim, H. M., Lee, Y., & Choi, B. S. (2008). Structure of the nucleoid- associated protein Cnu reveals common binding sites for H- NS in Cnu and Hha. *Biochemistry*, 47(7), 1993- 2001. doi: 10.1021/bi701914t
- Balandina, A., Kamashev, D., & Rouviere- Yaniv, J. (2002). The bacterial histone- like protein HU specifically recognizes similar structures in all nucleic acids. DNA, RNA, and their hybrids. *J Biol Chem*, 277(31), 27622- 27628. doi: 10.1074/jbc.M201978200201978200 [pii]
- Bao, Q., Tian, Y., Li, W., Xu, Z., Xuan, Z., Hu, S., . . . Yang, H. (2002). A complete sequence of the T. tengcongensis genome. *Genome Res*, 12(5), 689- 700. doi: 10.1101/gr.219302
- Beeby, M., O'Connor, B. D., Ryttersgaard, C., Boutz, D. R., Perry, L. J., & Yeates, T. O. (2005). The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. *PLoS Biol*, 3(9), e309. doi: 10.1371/journal.pbio.0030309
- Bergfors, T. M. (1999). *Protein crystallization : techniques, strategies, and tips : a laboratory manual*. La Jolla, Calif.: International University Line.
- Bergfors, T. M. (2009). *Protein crystallization*. La Jolla, Calif.: International University Line.
- Bertoldo, C., & Antranikian, G. (2002). Starch- hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr Opin Chem Biol*, 6(2), 151- 160. doi: S1367593102003113 [pii]
- Boelens, R., Vis, H., Vorgias, C. E., Wilson, K. S., & Kaptein, R. (1996). Structure and dynamics of the DNA binding protein HU from Bacillus stearothermophilus by NMR spectroscopy. *Biopolymers*, 40(5), 553- 559. doi: 10.1002/(SICI)1097- 0282(1996)40:5<553::AID-BIP13>3.0.CO;2- I
- Boivin, S., Kozak, S., & Meijers, R. (2013). Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expr Purif*, 91(2), 192- 206. doi: 10.1016/j.pep.2013.08.002
- Borges, K. M., & Bergquist, P. L. (1993). Genomic restriction map of the extremely thermophilic bacterium Thermus thermophilus HB8. *J Bacteriol*, 175(1), 103.
- Boubrik, F., & Rouviere- Yaniv, J. (1995). Increased sensitivity to gamma irradiation in bacteria lacking protein HU. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(9), 3958- 3962.
- Brändén, C.- I., & Tooze, J. (2009). *Introduction to protein structure* (2nd ed.). New York, NY: Garland Pub.

- Bridgham, J. T., Carroll, S. M., & Thornton, J. W. (2006). Evolution of hormone-receptor complexity by molecular exploitation. *Science*, 312(5770), 97- 101. doi: 312/5770/97 [pii]10.1126/science.1123348
- Bridgham, J. T., Eick, G. N., Larroux, C., Deshpande, K., Harms, M. J., Gauthier, M. E., . . . Thornton, J. W. (2010). Protein evolution by molecular tinkering: diversification of the nuclear receptor superfamily from a ligand- dependent ancestor. *PLoS Biol*, 8(10). doi: 10.1371/journal.pbio.1000497e1000497 [pii]
- Brock, T. D. (1967). Life at high temperatures. Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed. *Science*, 158(3804), 1012- 1019.
- Brock, T. D., & Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol*, 98(1), 289- 297.
- Broyles, S. S., & Pettijohn, D. E. (1986). Interaction of the Escherichia coli HU protein with DNA. Evidence for formation of nucleosome- like structures with altered DNA helical pitch. *J Mol Biol*, 187(1), 47- 60.
- Bunick, C., North, A. C., & Stubbs, G. (2000). Evaporative microdialysis: an effective improvement in an established method of protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56(Pt 11), 1430- 1431. doi: S0907444900011203 [pii]
- Callaway, E. (2010). Fossil genome reveals ancestral link. *Nature*, 468(7327), 1012. doi: 10.1038/4681012a4681012a [pii]
- Caprioli, R. M., Farmer, T. B., & Gile, J. (1997). Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI- TOF MS. *Anal Chem*, 69(23), 4751- 4760.
- Cavalier- Smith, T. (1986). The kingdoms of organisms. *Nature*, 324(6096), 416- 417. doi: 10.1038/324416a0
- Cavalier- Smith, T. (1998). A revised six- kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 73(3), 203- 266.
- Cavalier- Smith, T. (2010). Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1537), 111- 132. doi: 10.1098/rstb.2009.0161365/1537/111 [pii]
- Chang, B. S., Jonsson, K., Kazmi, M. A., Donoghue, M. J., & Sakmar, T. P. (2002). Recreating a functional ancestral archosaur visual pigment. *Mol Biol Evol*, 19(9), 1483- 1489.
- Chang, B. S., Ugalde, J. A., & Matz, M. V. (2005). Applications of ancestral protein reconstruction in understanding protein function: GFP- like proteins. *Methods Enzymol*, 395, 652- 670. doi: S0076687905950349 [pii]10.1016/S0076-6879(05)95034- 9
- Chayen, N. E. (1996). A novel technique for containerless protein crystallization. *Protein Eng*, 9(10), 927- 929.
- Chayen, N. E. (2005). Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation. *Prog Biophys Mol Biol*, 88(3), 329- 337. doi: S0079-6107(04)00096- 3 [pii]10.1016/j.pbiomolbio.2004.07.007

- Chayen, N. E. (2009). High- throughput protein crystallization. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 77, 1- 22. doi: 10.1016/S1876- 1623(09)77001- 4S1876- 1623(09)77001- 4 [pii]
- Chayen, N. E., Boggon, T. J., Cassetta, A., Deacon, A., Gleichmann, T., Habash, J., . . . Wulff, M. (1996). Trends and challenges in experimental macromolecular crystallography. *Q Rev Biophys*, 29(3), 227- 278.
- Chinen, A., Matsumoto, Y., & Kawamura, S. (2005). Reconstitution of ancestral green visual pigments of zebrafish and molecular mechanism of their spectral differentiation. *Mol Biol Evol*, 22(4), 1001- 1010. doi: msi086 [pii]10.1093/molbev/msi086
- Christodoulou, E., Duffner, F., & Vorgias, C. E. (2001). Overexpression, purification, and characterization of a thermostable chitinase (Chi40) from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC- 520. *Protein Expr Purif*, 23(1), 97- 105. doi: 10.1006/prep.2001.1490
- Christodoulou, E., Rypniewski, W. R., & Vorgias, C. R. (2003). High- resolution X- ray structure of the DNA- binding protein HU from the hyper- thermophilic *Thermotoga maritima* and the determinants of its thermostability. *Extremophiles*, 7(2), 111- 122. doi: 10.1007/s00792- 002- 0302- 7
- Christodoulou, E., & Vorgias, C. E. (1998). Cloning, overproduction, purification and crystallization of the DNA binding protein HU from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 54(Pt 5), 1043- 1045.
- Chung, A. P., Rainey, F. A., Valente, M., Nobre, M. F., & da Costa, M. S. (2000). *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50 Pt 1, 209- 217.
- Day, R. O., Graham, G. G., Bieri, D., Brown, M., Cairns, D., Harris, G., . . . et al. (1989). Concentration- response relationships for salicylate- induced ototoxicity in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 28(6), 695- 702.
- de Miguel Bouzas, T., Barros- Velazquez, J., & Villa, T. G. (2006). Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: a review. *Protein Pept Lett*, 13(7), 645- 651.
- Dill, K. A., & MacCallum, J. L. (2012). The protein- folding problem, 50 years on. *Science*, 338(6110), 1042- 1046. doi: 10.1126/science.1219021338/6110/104.
- Dorman, C. J. (2014). H- NS- like nucleoid- associated proteins, mobile genetic elements and horizontal gene transfer in bacteria. *Plasmid*, 75C, 1- 11. doi: S0147- 619X(14)00041- 9 [pii]10.1016/j.plasmid.2014.06.004
- Drlica, K., & Rouviere- Yaniv, J. (1987). Histone- like proteins of bacteria. *Microbiol Rev*, 51(3), 301- 319.
- Durrenberger, M., Bjornsti, M. A., Uetz, T., Hobot, J. A., & Kellenberger, E. (1988). Intracellular location of the histone- like protein HU in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 170(10), 4757- 4768.
- Ehrlich, M., Gama- Sosa, M. A., Carreira, L. H., Ljungdahl, L. G., Kuo, K. C., & Gehrke, C. W. (1985). DNA methylation in thermophilic bacteria: N4-

- methylcytosine, 5- methylcytosine, and N6- methyladenine. *Nucleic Acids Res*, 13(4), 1399- 1412.
- Gaffarogullari, E. C., Krause, A., Balbo, J., Hertzen, D. P., & Jaschke, A. (2013). Microscale thermophoresis provides insights into mechanism and thermodynamics of ribozyme catalysis. *RNA Biol*, 10(12), 1815- 1821. doi: 10.4161/rna.27101
- Gaucher, E. A., Das, U. K., Miyamoto, M. M., & Benner, S. A. (2002). The crystal structure of eEF1A refines the functional predictions of an evolutionary analysis of rate changes among elongation factors. *Mol Biol Evol*, 19(4).
- Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R. Y., Algire, M. A., Venter, J. C. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 329(5987), 52- 56. doi: 10.1126/science.1190719science.1190719 [pii]
- Gottschal, J. C., & Prins, R. A. (1991). Thermophiles: A life at elevated temperatures. *Trends Ecol Evol*, 6(5), 157- 162. doi: 10.1016/0169-5347(91)90057- 50169- 5347(91)90057- 5 [pii]
- Graham, W. C., Robertson, R. G., Sambrook, M. A., & Crossman, A. R. (1989). Extracellular amino acid levels in the globus pallidus of the conscious primate studied by intracerebral microdialysis. *Br J Pharmacol*, 98 Suppl.
- Green, R. E., Krause, J., Briggs, A. W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., . . . Paabo, S. (2010). A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*, 328(5979), 710- 722. doi: 10.1126/science.1188021328/5979/710 [pii]
- Greenfield, N. J. (2004). Circular dichroism analysis for protein- protein interactions. *Methods Mol Biol*, 261, 55- 78. doi: 10.1385/1- 59259- 762- 9:055
- Greenfield, N. J. (2006a). Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism. *Nat Protoc*, 1(6), 2733- 2741. doi: 10.1038/nprot.2006.229
- Greenfield, N. J. (2006b). Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc*, 1(6), 2527- 2535. doi: 10.1038/nprot.2006.204
- Griffiths, E., & Gupta, R. S. (2007). Identification of signature proteins that are distinctive of the Deinococcus- Thermus phylum. *Int Microbiol*, 10(3), 201- 208. doi: im2306067 [pii]
- Gullberg, M., Tolf, C., Jonsson, N., Mulders, M. N., Savolainen- Kopra, C., Hovi, T., Lindberg, A. M. (2010). Characterization of a putative ancestor of coxsackievirus B5. *J Virol*, 84(19), 9695- 9708. doi: 10.1128/JVI.00071-10JVI.00071- 10 [pii]
- Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol*, 89(1), 17- 34. doi: S0960852403000336 [pii]
- Harms, M. J., & Thornton, J. W. (2010). Analyzing protein structure and function using ancestral gene reconstruction. *Curr Opin Struct Biol*, 20(3), 360- 366. doi: 10.1016/j.sbi.2010.03.005S0959- 440X(10)00058- 8 [pii]

- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D., & Buchner, J. (2005). Some like it hot: the structure and function of small heat- shock proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 12(10), 842- 846. doi: 10.1038/nsmb993
- Heinemann, U., Illing, G., & Oschkinat, H. (2001). High- throughput three- dimensional protein structure determination. *Curr Opin Biotechnol*, 12(4), 348- 354. doi: S0958- 1669(00)00226- 3 [pii]
- Henne, A., Bruggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., . . . Fritz, H. J. (2004). The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat Biotechnol*, 22(5), 547- 553. doi: 10.1038/nbt956nbt956 [pii]
- Herbert, R. A., & Sharp, R. J. (1992). *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. GlasgowNew York: Blackie ;Chapman and Hall.
- Hult, E. F., Weadick, C. J., Chang, B. S., & Tobe, S. S. (2008). Reconstruction of ancestral FGLamide- type insect allatostatins: a novel approach to the study of allatostatin function and evolution. *J Insect Physiol*, 54(6), 959- 968. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.04.007S0022- 1910(08)00073- 5 [pii]
- Imanaka, T. (2011). Molecular bases of thermophily in hyperthermophiles. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 87(9), 587- 602. doi: JST.JSTAGE/pjab/87.587 [pii]
- Jans, H., Liu, X., Austin, L., Maes, G., & Huo, Q. (2009). Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies. *Anal Chem*, 81(22), 9425- 9432. doi: 10.1021/ac901822w
- Jaskolski, M. (2010). Personal remarks on the future of protein crystallography and structural biology. *Acta Biochim Pol*, 57(3), 261- 264. doi: 20102017 [pii]
- Kagawa, Y., Nojima, H., Nukiwa, N., Ishizuka, M., Nakajima, T., Yasuhara, T., . . . Oshima, T. (1984). High guanine plus cytosine content in the third letter of codons of an extreme thermophile. DNA sequence of the isopropylmalate dehydrogenase of *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem*, 259(5), 2956- 2960.
- Kaiser, S. M., Malik, H. S., & Emerman, M. (2007). Restriction of an extinct retrovirus by the human TRIM5alpha antiviral protein. *Science*, 316(5832), 1756- 1758. doi: 316/5832/1756 [pii]10.1126/science.1140579
- Kamashev, D., & Rouviere- Yaniv, J. (2000). The histone- like protein HU binds specifically to DNA recombination and repair intermediates. *EMBO J*, 19(23), 6527- 6535. doi: 10.1093/emboj/19.23.6527
- Kawashima, T., Amano, N., Koike, H., Makino, S., Higuchi, S., Kawashima- Ohya, Y., Suzuki, M. (2000). Archaeal adaptation to higher temperatures revealed by genomic sequence of *Thermoplasma volcanium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14257- 14262. doi: 10.1073/pnas.97.26.14257
- Kelly, S. M., & Price, N. C. (1997). The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim Biophys Acta*, 1338(2), 161- 185.
- Kimura, M., & Wilson, K. S. (1983). On the DNA binding protein II from *Bacillus stearothermophilus*. II. The amino acid sequence and its relation to those of homologous proteins from other prokaryotes. *J Biol Chem*, 258(6), 40074011.

- Kobryn, K., Lavoie, B. D., & Chaconas, G. (1999). Supercoiling- dependent site-specific binding of HU to naked Mu DNA. *J Mol Biol*, 289(4), 777- 784. doi: 10.1006/jmbi.1999.2805
- Kondo, N., & Nishimura, S. (2009). MALDI- TOF mass- spectrometry- based versatile method for the characterization of protein kinases. *Chemistry*, 15(6), 1413- 1421. doi: 10.1002/chem.200801650
- Konno, A., Ogawa, T., Shirai, T., & Muramoto, K. (2007). Reconstruction of a probable ancestral form of conger eel galectins revealed their rapid adaptive evolution process for specific carbohydrate recognition. *Mol Biol Evol*, 24(11), 2504- 2514. doi: msm185 [pii]10.1093/molbev/msm185
- Korczynska, J., Hu, T. C., Smith, D. K., Jenkins, J., Lewis, R., Edwards, T., & Brzozowski, A. M. (2007). Microscale vapour diffusion for protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 63(Pt 9), 1009- 1015. doi: S0907444907037857 [pii]10.1107/S0907444907037857
- Koszelak, S., Leja, C., & McPherson, A. (1996). Crystallization of biological macromolecules from flash frozen samples on the Russian Space Station Mir. *Biotechnol Bioeng*, 52(4), 449- 458. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19961120)52:4<449::AID- BIT1>3.0.CO;2- P
- Krause, J., Fu, Q., Good, J. M., Viola, B., Shunkov, M. V., Derevianko, A. P., & Paabo, S. (2010). The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia. *Nature*, 464(7290), 894- 897. doi: 10.1038/nature08976 [pii]10.1038/nature08976
- Kumar, S., & Nussinov, R. (2001). How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell Mol Life Sci*, 58(9), 1216- 1233.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680- 685.
- Lai, J., Jin, J., Kubelka, J., & Liberles, D. A. (2012). A phylogenetic analysis of normal modes evolution in enzymes and its relationship to enzyme function. *J Mol Biol*, 422(3), 442- 459. doi: 10.1016/j.jmb.2012.05.028 [pii]10.1016/j.jmb.2012.05.028
- Lasa, I., & Berenguer, J. (1993). Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. *Microbiologia*, 9(2), 77- 89.
- Link, A. J., & LaBaer, J. (2011). Trichloroacetic acid (TCA) precipitation of proteins. *Cold Spring Harb Protoc*, 2011(8), 993- 994. doi: 10.1101/pdb.prot5651 [pii]10.1101/pdb.prot5651
- Loll, P. J., Tretiakova, A., & Soderblom, E. (2003). Compatibility of detergents with the microbatch- under- oil crystallization method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59(Pt 6), 1114- 1116. doi: S0907444903008175 [pii]10.1107/S0907444903008175
- Luijsterburg, M. S., Noom, M. C., Wuite, G. J., & Dame, R. T. (2006). The architectural role of nucleoid- associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J Struct Biol*, 156(2), 262- 272. doi: S1047- 8477(06)00161- 4 [pii]10.1016/j.jsb.2006.05.006

- Lyubchenko, Y. L., Shlyakhtenko, L. S., Aki, T., & Adhya, S. (1997). Atomic force microscopic demonstration of DNA looping by GalR and HU. *Nucleic Acids Res*, 25(4), 873- 876.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Brock, T. D. (2006). *Brock biology of microorganisms* (11th ed.). Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., & Bhat, M. K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(3), 461- 488.
- Malik, M., Bensaid, A., Rouviere- Yaniv, J., & Drlica, K. (1996). Histone- like protein HU and bacterial DNA topology: suppression of an HU deficiency by gyrase mutations. *J Mol Biol*, 256(1), 66- 76. doi: S0022- 2836(96)90068- 6 [pii]10.1006/jmbi.1996.0068
- McPherson, A. (1997). Recent advances in the microgravity crystallization of biological macromolecules. *Trends Biotechnol*, 15(6), 197- 200. doi: S0167- 7799(97)01041- X [pii]10.1016/S0167- 7799(97)01041- X
- McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods*, 34(3), 254- 265. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.019S1046202304001094 [pii]
- Meintanis, C., Chalkou, K. I., Kormas, K. A., & Karagouni, A. D. (2006). Biodegradation of crude oil by thermophilic bacteria isolated from a volcano island. *Biodegradation*, 17(2), 105- 111. doi: 10.1007/s10532- 005- 6495- 6
- Murphy, L. D., & Zimmerman, S. B. (1997). Stabilization of compact spermidine nucleoids from Escherichia coli under crowded conditions: implications for in vivo nucleoid structure. *J Struct Biol*, 119(3), 336- 346. doi: S1047- 8477(97)93884- 3 [pii]10.1006/jsbi.1997.3884
- Neudecker, P., Robustelli, P., Cavalli, A., Walsh, P., Lundstrom, P., Zarrine- Afsar, A., Kay, L. E. (2012). Structure of an intermediate state in protein folding and aggregation. *Science*, 336(6079), 362- 366. doi: 10.1126/science.1214203336/6079/362 [pii]
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., & Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51(6), 711- 729.
- Nishimura, S., Niikura, K., Kuroguchi, M., Matsushita, T., Fumoto, M., Hinou, H., . . . Kondo, H. (2004). High- throughput protein glycomics: combined use of chemoselective glycoblotting and MALDI- TOF/TOF mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44(1), 91- 96. doi: 10.1002/anie.200461685
- Oberto, J., Nabti, S., Jooste, V., Mignot, H., & Rouviere- Yaniv, J. (2009). The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS One*, 4(2), e4367. doi: 10.1371/journal.pone.0004367
- Oshima, T. (1974). [Comparative studies on biochemical properties of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB 8 (author's transl)]. *Seikagaku*, 46(10), 887- 907.
- Oshima, T., & Imahori, K. (1974). Physiochemical properties of deoxyribonucleic acid from an extreme thermophile. *J Biochem*, 75(1), 179- 183.

- Oshima, T., Sakaki, Y., Wakayama, N., Watanabe, K., & Ohashi, Z. (1976). Biochemical studies on an extreme thermophile *Thermus thermophilus*: thermal stabilities of cell constituents and a bacteriophage. *Experientia Suppl*, 26, 317- 331.
- Paabo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke- Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., . . . Hofreiter, M. (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet*, 38, 645- 679. doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143214
- Padas, P. M., Wilson, K. S., & Vorgias, C. E. (1992). The DNA- binding protein HU from mesophilic and thermophilic bacilli: gene cloning, overproduction and purification. *Gene*, 117(1), 39- 44.
- Papsdorf, K., & Richter, K. (2014). Protein folding, misfolding and quality control: the role of molecular chaperones. *Essays Biochem*, 56(1), 53- 68. doi: 10.1042/bse0560053bse0560053 [pii]
- Paz, A., Mester, D., Baca, I., Nevo, E., & Korol, A. (2004). Adaptive role of increased frequency of polypurine tracts in mRNA sequences of thermophilic prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9), 2951- 2956. doi: 10.1073/pnas.03085941000308594100 [pii]
- Pettijohn, D. E. (1988). Histone- like proteins and bacterial chromosome structure. *J Biol Chem*, 263(26), 12793- 12796.
- Ramstein, J., Hervouet, N., Coste, F., Zelwer, C., Oberto, J., & Castaing, B. (2003). Evidence of a thermal unfolding dimeric intermediate for the *Escherichia coli* histone- like HU proteins: thermodynamics and structure. *J Mol Biol*, 331(1), 101- 121. doi: S0022283603007253 [pii]
- Reich, D., Green, R. E., Kircher, M., Krause, J., Patterson, N., Durand, E. Y., . . . Paabo, S. (2010). Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature*, 468(7327), 1053- 1060. doi: 10.1038/nature09710nature09710 [pii]
- Rennella, E., Cutuil, T., Schanda, P., Ayala, I., Forge, V., & Brutscher, B. (2012). Real- time NMR characterization of structure and dynamics in a transiently populated protein folding intermediate. *J Am Chem Soc*, 134(19), 8066- 8069. doi: 10.1021/ja302598j
- Rohland, N., Reich, D., Mallick, S., Meyer, M., Green, R. E., Georgiadis, N. J., . . . Hofreiter, M. (2010). Genomic DNA sequences from mastodon and woolly mammoth reveal deep speciation of forest and savanna elephants. *PLoS Biol*, 8(12), e1000564. doi: 10.1371/journal.pbio.1000564
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J., & Studier, F. W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, 56(1), 125- 135.
- Rouviere- Yaniv, J. (1978). Localization of the HU protein on the *Escherichia coli* nucleoid. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 42 Pt 1, 439- 447.
- Rouviere- Yaniv, J., & Gros, F. (1975). Characterization of a novel, low- molecular- weight DNA- binding protein from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(9), 3428- 3432.

- Rouviere- Yaniv, J., & Kjeldgaard, N. O. (1979). Native Escherichia coli HU protein is a heterotypic dimer. *FEBS Lett*, 106(2), 297- 300.
- Ruiz- Sanz, J., Filimonov, V. V., Christodoulou, E., Vorgias, C. E., & Mateo, P. L. (2004). Thermodynamic analysis of the unfolding and stability of the dimeric DNA- binding protein HU from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima* and its E34D mutant. *Eur J Biochem*, 271(8), 1497- 1507. doi: 10.1111/j.1432- 1033.2004.04057.x
- Rupp, B., & Wang, J. (2004). Predictive models for protein crystallization. *Methods*, 34(3), 390- 407. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.031S1046202304001203 [pii]
- Russell, R. J., Ferguson, J. M., Hough, D. W., Danson, M. J., & Taylor, G. L. (1997). The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, 36(33), 9983- 9994. doi: 10.1021/bi9705321
- Sadeghi, M., Naderi- Manesh, H., Zarrabi, M., & Ranjbar, B. (2006). Effective factors in thermostability of thermophilic proteins. *Biophys Chem*, 119(3), 256- 270. doi: 10.1016/j.bpc.2005.09.018
- Sagi, D., Friedman, N., Vorgias, C., Oppenheim, A. B., & Stavans, J. (2004). Modulation of DNA conformations through the formation of alternative high- order HU- DNA complexes. *J Mol Biol*, 341(2), 419- 428. doi: 10.1016/j.jmb.2004.06.023
- Salemme, F. R. (1972). A free interface diffusion technique for the crystallization of proteins for x- ray crystallography. *Arch Biochem Biophys*, 151(2), 533- 539.
- Salemme, F. R. (1985). Protein crystallization by free interface diffusion. *Methods Enzymol*, 114, 140- 141.
- Sambrook, P. N., Cohen, M. L., Eisman, J. A., Pocock, N. A., Champion, G. D., & Yeates, M. G. (1989). Effects of low dose corticosteroids on bone mass in rheumatoid arthritis: a longitudinal study. *Ann Rheum Dis*, 48(7), 535- 538.
- Schumann, J., Bohm, G., Schumacher, G., Rudolph, R., & Jaenicke, R. (1993). Stabilization of creatinase from *Pseudomonas putida* by random mutagenesis. *Protein Sci*, 2(10), 1612- 1620. doi: 10.1002/pro.5560021007
- Segelke, B. (2005). Macromolecular crystallization with microfluidic free- interface diffusion. *Expert Rev Proteomics*, 2(2), 165- 172. doi: 10.1586/14789450.2.2.165
- Seidel, S. A., Dijkman, P. M., Lea, W. A., van den Bogaart, G., Jerabek- Willemsen, M., Lazic, A., . . . Duhr, S. (2013). Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods*, 59(3), 301- 315. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.12.005
- Serban, D., Arcineigas, S. F., Vorgias, C. E., & Thomas, G. J., Jr. (2003). Structure and dynamics of the DNA- binding protein HU of *B. stearothermophilus* investigated by Raman and ultraviolet- resonance Raman spectroscopy. *Protein Sci*, 12(4), 861- 870. doi: 10.1110/ps.0234103
- Sharff, A., & Jhoti, H. (2003). High- throughput crystallography to enhance drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 7(3), 340- 345. doi: S1367593103000620.

- Shi, Y., & Yokoyama, S. (2003). Molecular analysis of the evolutionary significance of ultraviolet vision in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14), 8308-8313. doi: 10.1073/pnas.15325351001532535100 [pii]
- Shindo, H., Furubayashi, A., Shimizu, M., Miyake, M., & Imamoto, F. (1992). Preferential binding of E.coli histone- like protein HU alpha to negatively supercoiled DNA. *Nucleic Acids Res*, 20(7), 1553- 1558.
- Singer, G. A., & Hickey, D. A. (2003). Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content. *Gene*, 317(1- 2), 39- 47. doi: S0378111903006607 [pii]
- Stetter, K. O. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett*, 452(1- 2), 22- 25. doi: S0014- 5793(99)00663- 8 [pii]
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high- level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189(1), 113- 130. doi: 0022- 2836(86)90385- 2 [pii]
- Swinger, K. K., & Rice, P. A. (2007). Structure- based analysis of HU- DNA binding. *J Mol Biol*, 365(4), 1005- 1016. doi: 10.1016/j.jmb.2006.10.024
- Tanaka, H., Yasuzawa, K., Kohno, K., Goshima, N., Kano, Y., Saiki, T., & Imamoto, F. (1995). Role of HU proteins in forming and constraining supercoils of chromosomal DNA in Escherichia coli. *Mol Gen Genet*, 248(5), 518- 526.
- Tanaka, I., Appelt, K., Dijk, J., White, S. W., & Wilson, K. S. (1984). 3- A resolution structure of a protein with histone- like properties in prokaryotes. *Nature*, 310(5976), 376- 381.
- Tani, A., Sahin, N., Matsuyama, Y., Enomoto, T., Nishimura, N., Yokota, A., & Kimbara, K. (2012). High- throughput identification and screening of novel Methylobacterium species using whole- cell MALDI- TOF/MS analysis. *PLoS One*, 7(7), e40784. doi: 10.1371/journal.pone.0040784
- Thornton, J. W. (2001). Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(10), 5671- 5676. doi: 10.1073/pnas.091553298091553298 [pii]
- Thornton, J. W. (2004). Resurrecting ancient genes: experimental analysis of extinct molecules. *Nat Rev Genet*, 5(5), 366- 375. doi: 10.1038/nrg1324nrg1324 [pii]
- Thornton, J. W., Need, E., & Crews, D. (2003). Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science*, 301(5640), 1714- 1717. doi: 10.1126/science.1086185301/5640/1714 [pii]
- Trakhanov, S. D. (1989). [Modification of a microdialysis method for crystallization of proteins]. *Bioorg Khim*, 15(6), 725- 730.
- Trivedi, S., Gehlot, H. S., & Rao, S. R. (2006). Protein thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genet Mol Res*, 5(4), 816- 827.
- Urbietta, M. S., Gonzalez Toril, E., Aguilera, A., Giaveno, M. A., & Donati, E. (2012). First prokaryotic biodiversity assessment using molecular techniques of an acidic river in Neuquen, Argentina. *Microb Ecol*, 64(1), 91- 104. doi: 10.1007/s00248- 011- 9997- 2

- Varshavsky, A. J., Nedospasov, S. A., Bakayev, V. V., Bakayeva, T. G., & Georgiev, G. P. (1977). Histone- like proteins in the purified Escherichia coli deoxyribonucleoprotein. *Nucleic Acids Res*, 4(8), 2725- 2745.
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(1), 1- 43. doi: 10.1128/MMBR.65.1.1- 43.2001
- Vis, H., Mariani, M., Vorgias, C. E., Wilson, K. S., Kaptein, R., & Boelens, R. (1995). Solution structure of the HU protein from Bacillus stearothermophilus. *J Mol Biol*, 254(4), 692- 703. doi: 10.1006/jmbi.1995.0648
- Wada, M., Kano, Y., Ogawa, T., Okazaki, T., & Imamoto, F. (1988). Construction and characterization of the deletion mutant of hupA and hupB genes in Escherichia coli. *J Mol Biol*, 204(3), 581- 591.
- Wang, C. C., Cook, K. H., & Pecora, R. (1980). Dynamic light scattering studies of ribonuclease. *Biophys Chem*, 11(3- 4), 439- 442.
- Whittington, A. C., & Moerland, T. S. (2012). Resurrecting prehistoric parvalbumins to explore the evolution of thermal compensation in extant Antarctic fish parvalbumins. *J Exp Biol*, 215(Pt 18), 3281- 3292. doi: 10.1242/jeb.070615jeb.070615 [pii]
- Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D., & Duhr, S. (2010). Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun*, 1, 100. doi: 10.1038/ncomms1093
- Winston, S., & Pettijohn, D. E. (1988). Relaxation of DNA torsional tension in defined domains of bacterial chromosomes in vivo. *Can J Microbiol*, 34(4).
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(11).
- Yadid, I., & Tawfik, D. S. (2011). Functional beta- propeller lectins by tandem duplications of repetitive units. *Protein Eng Des Sel*, 24(1- 2), 185- 195. doi: 10.1093/protein/gzq053gzq053 [pii]
- Yang, J. T., Wu, C. S., & Martinez, H. M. (1986). Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol*, 130, 208- 269.
- Yokoyama, S., & Takenaka, N. (2004). The molecular basis of adaptive evolution of squirrelfish rhodopsins. *Mol Biol Evol*, 21(11), 2071- 2078. doi: 10.1093/molbev/msh217msh217 [pii]
- Zhang, J., Tang, S. K., Zhang, Y. Q., Yu, L. Y., Klenk, H. P., & Li, W. J. (2010). Laceyella tengchongensis sp. nov., a thermophile isolated from soil of a volcano. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60(Pt 9), 2226- 2230. doi: 10.1099/ijs.0.011767- 0ijs.0.011767- 0 [pii]
- Zhang, W., Duhr, S., Baaske, P., & Laue, E. (2014). Microscale thermophoresis for the assessment of nuclear protein- binding affinities. *Methods Mol Biol*, 1094, 269- 276. doi: 10.1007/978- 1- 62703- 706- 8_21
- Zillner, K., Jerabek- Willemsen, M., Duhr, S., Braun, D., Langst, G., & Baaske, P. (2012). Microscale thermophoresis as a sensitive method to quantify protein:

nucleic acid interactions in solution. *Methods Mol Biol*, 815, 241- 252. doi:
10.1007/978- 1- 61779- 424- 7_18

7 ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1) **“I know you are, but what am I? Resurrecting the ancestors of bacterial histone-like proteins”**. Adam PS, Papageorgiou AC, Vorgias CE

EMBO Practical Course: Protein expression, purification, and characterization (PEPC9), September 2014, Hamburg, Germany

- 2) **“Isolation and expression of the *hutH* gene of *Thermus thermophilus*. Production of the recombinant HUT $_{th}$ protein in *E. coli* and biochemical, biophysical and structural analyses”**. Papageorgiou AC, Chrysina ED, Stauros F, Nounesis, G, Vorgias CE

International workshop on “Strategic pipeline planning from sample preparation to 3D structure determination with bio SAXS and other biophysical techniques”, National Hellenic Research Foundation, April 2014, Athens, Greece



I know you are but what am I? Resurrecting the ancestors of bacterial histone-like proteins.

Adam P.S.¹, Papageorgiou A.C.², Vorgias C.E.²

¹: Department of Palaeontology & Historical Geology, Faculty of Geology & Geoenvironment, University of Athens
²: Department of Biochemistry & Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Athens

Introduction

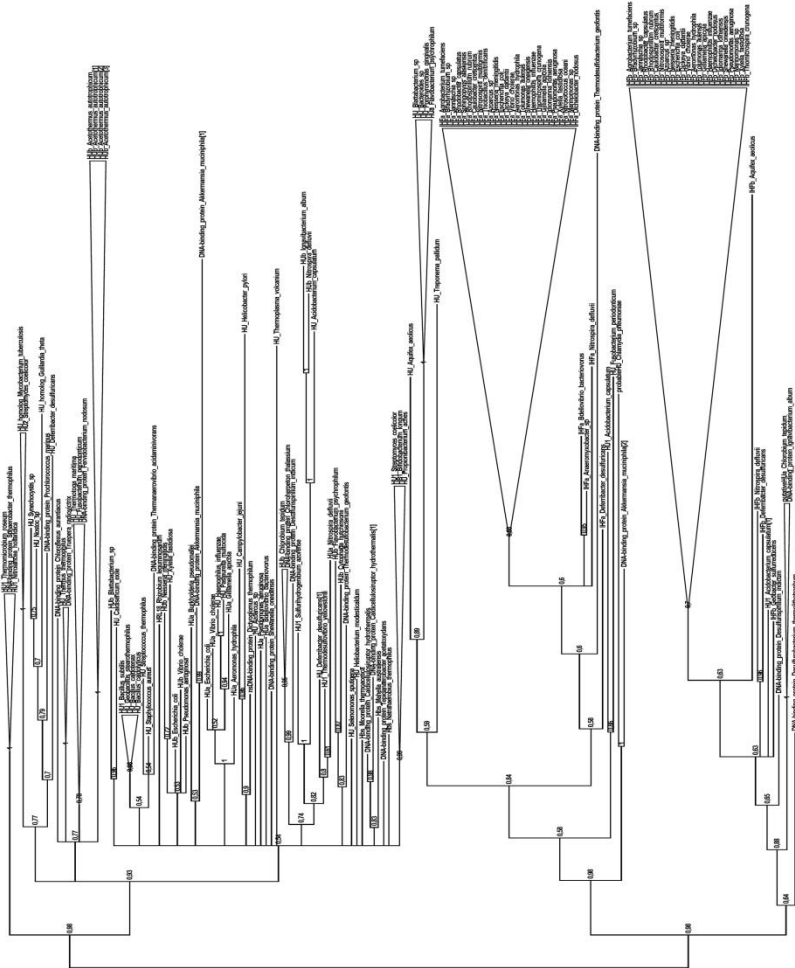
HU (heat-unstable) and IHF (integration host factor) constitute the protein family PF00216, found mainly in *Eubacteria*, but including a patchy distribution in plastid-bearing *Eukaryota*, *Euryarchaeota*, and some viruses. Members of the family are involved in bacterial DNA architecture and stabilisation, and by extension in regulation of processes such as virulence, DNA repair (SOS response), anaerobiosis, acid stress, and high osmolarity [1]. Furthermore, due to their small size, they can be used to model thermal stability and binding specificity down to amino acid level. Through phylogenetic inference and ASR (ancestral sequence reconstruction), we sought to resurrect the ancestors of the HU-IHF family, in an attempt to infer the palaeoenvironment of the last bacterial ancestor (LBCA), and the sequence-structure basis of DNA-protein interaction.

Materials & methods

A dataset of 149 protein sequences of pf00216, covering almost the entire bacterial taxonomic range -plus eukaryotes and archaea- was assembled from Uniprot. Sequences were trimmed to structurally well-defined length, aligned with MUSCLE, and the multiple alignment was corrected manually. Phylogenetic trees were reconstructed using MrBayes 3.2.1. Ancestral sequences were reconstructed on the FastML webserver with high probability.

Results

1) The annotated phylogenetic tree is displayed below. The root was placed arbitrarily, based on general topology, for reconstruction purposes.



Discussion & future perspectives

The PF00216 gene tree includes two major subtypes, one comprised of HU proteins from all bacterial phyla, and another with Gracilicutes, *Synergistetes*, *Acidobacteria* and *Aquificae*. Intermediate branches suggest an early duplication and multiple HGT events before the emergence of heterodimeric proteobacterial IHF. The HU branching order roughly corresponds to Cavalier-Smith's Eobacteria[2]. Reconstructed sequences raise a high possibility for a thermophilic and anaerobic LBCA (constrained between 3-3.45 and 4 Ga by fossil evidence), as they present moderate to high identity with *Thermoanaerobacteriales* HU sequences and it seems residue biophysical characteristics that determine specificity appeared much later. However, unless the distribution of family members is better resolved, especially by robustly placing groups such as the *Aquificae* and *Tenericutes* in the tree, the superfamily's history cannot be reconstructed with complete accuracy.

Proposed future directions include:

- 1) Improving the resolution of the reconstructed phylogenies, specifically within the HU soft polytomy and the "intermediate" IHF clades.
- 2) Resurrecting ancestral nodes as synthetic genes, and performing thermodynamics experiments to determine the growth temperature of the LBCA.
- 3) Protein-DNA interaction experiments for ancestors and intermediate nodes to elucidate the sequence requirements for specificity.
- 4) Crystallization and solution of the ancestors' structures.

References

- [1] Oberto, Jacques, et al. "The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction." *PLoS One* 4.2 (2009): e4367.
- [2] Cavalier-Smith, Thomas. "Rooting the tree of life by transition analyses." *Biol Direct* 1.1 (2006): 19.



Isolation and expression of the *hutH* gene of *Thermus thermophilus*, production of the recombinant HUT θ protein in *E. coli* and biochemical, biophysical and structural analyses

Anna K. Papageorgiou¹, Evangelia D. Chrysina², Philemon Stavros³, George Nounesis³ and Constantinos E. Vorgias¹

¹National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Athens Greece, ²Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece, ³Biomolecular Physics Laboratory, N.C.R.S. Demokritos

Scientific Background:

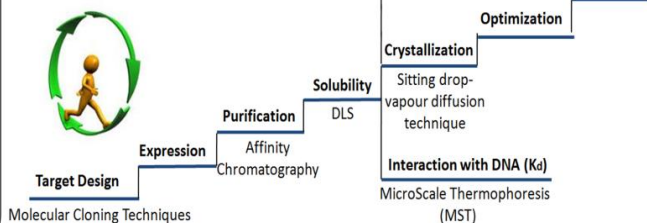
In prokaryotes, the chromosomal DNA is organized into a non typical defined structure called nucleoid in which a considerable number of proteins, the histone-like DNA-binding proteins (HU), are thought to play a major role in the compaction of bacterial chromatin.

HU proteins functions:

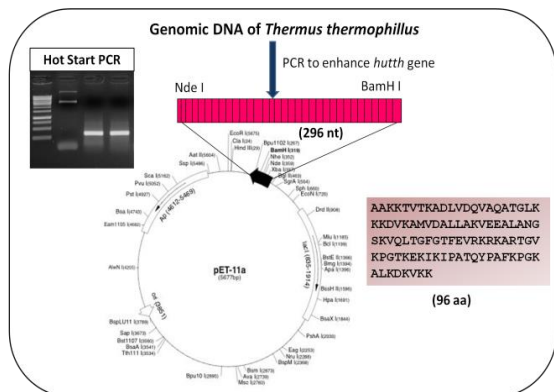
- Organize bacterial chromosomal DNA
- Regulate DNA-dependent activities: (DNA repair, gene regulation and site-specific recombination)
- HU proteins are highly conserved (in logarithmic phase ~50,000 copies per cell) and are found in all eubacteria analyzed so far as well as in few archaea and in plant chloroplasts.
- The histone-like DNA-binding proteins (HU) are a convenient model for studying factors affecting thermostability because of their relatively simple, easily comparable structures, their common function, and their presence in organisms of widely differing thermostability.
- Currently we are studying the HUT θ protein by conducting biochemical, biophysical and structural analyses experiments.

Laboratory Techniques Used:

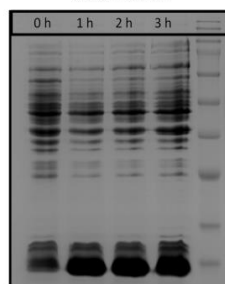
The Road is long...



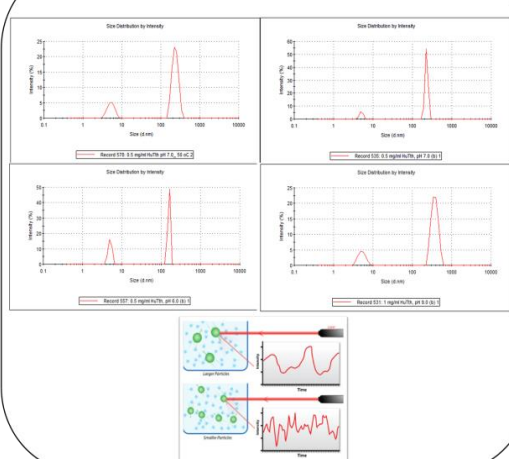
RESULTS:



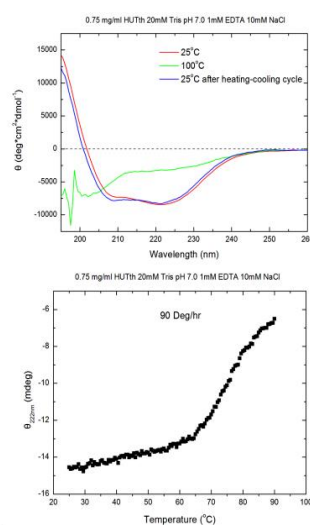
Gene overexpression in BL21(DE3) expression cells under the pET11-a transfer vector



Dynamic Light Scattering



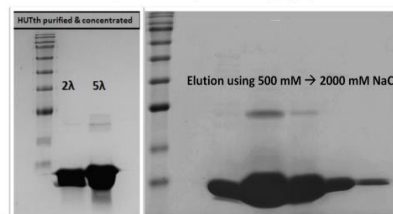
The secondary structure of HUT θ was determined and a thermal denaturation study was performed employing Circular Dichroism (CD) spectroscopy in Far UV



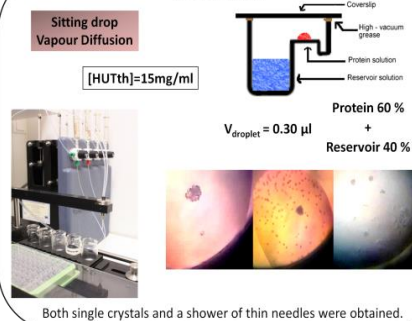
LITERATURE CITED:

- [1] Padas M. P., Wilson K. S. and Vorgias C. E. (1992) Gene 117, 39-44.
- [2] Christodoulou E. and Vorgias C. E. (2002) Extremophiles 6, 21-31.
- [3] Christodoulou E., Rypniewski W. and Vorgias C. E. (2003) Extremophiles 7, 111-122.
- [4] J. Ruiz-Sanz, V. V. Filimonov, E. Christodoulou, C. E. Vorgias and P. L. Mateo. (2004) Eur. J. Biochem 271, 1497-1507.
- [5] Schnurr B., C. E. Vorgias, J. Stavans (2006). Bioph. Rev. and Lett. 1, 29-44.

Heparin Affinity Chromatography



Crystallization



MicroScale Thermophoresis (MST) measurement of the interaction of HUTθ protein with pUC18 plasmid DNA

