ZHUHAN

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑΣ

Ανάπτυξη χιμαιρικών μορίων για πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές κατά της COVID-19

Κυριακή Μαρία Λιούτα

Επιβλέπων Καθηγητής: Ομ. Καθ. Μ. Κοκκινίδης Τριμελής Επιτροπή: Ομ. Καθ. Μ. Κοκκινίδης Καθ. Ε. Αθανασάκη, Καθ. Ι. Βόντας

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2021 ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΚΡΗΤΗ

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες Abstract	
Περίληψη 1. Εισαγωγή	1 3
1.1 Χιμαιρικές πρωτεΐνες	3
1.2 Χιμαιρικές πρωτεΐνες ως «μοριακά ψαλίδια»	6
1.3 Χιμαιρικές πρωτεΐνες και SARS-CoV-2	14
1.4 Πρωτεϊνικές πλατφόρμες στήριξης (scaffolds) βασισμένες σε α-ελικοειδή δεμάτια	22
2. Σκοπός της διατριβής	24
3. Υλικά και μέθοδοι	25
3.1 Σχεδιασμός πρωτεϊνικών μοντέλων	25
3.2 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής	27
3.3 Τεχνικές μοριακής βιολογίας	28
3.4 Τεχνικές υπερέκφρασης και απομόνωσης πρωτεϊνών	34
3.5 Βιοφυσικός χαρακτηρισμός πρωτεϊνών	42
3.6 Ηλεκτρονική μικροσκοπία	45
4. Αποτελέσματα	46
5. Συζήτηση	67
Βιβλιογραφία	71
Παράρτημα	78

<u>Ευχαριστίες</u>

Η παρούσα εργασία εκτυλίχθηκε κατά την διάρκεια μιας άκρως ιδιαίτερης περιόδου, λόγω της Πανδημίας Covid-19. Σε μια τόσο δυστοπική εποχή, η δουλειά μου για την διατριβή ήταν μια ανάσα αισιοδοξίας και απόστασης από την μονότονη καθημερινότητα της απομόνωσης/καραντίνας. Σε μια περίοδο που επικρατεί ο άκρατος ανορθολογισμός και η παράνοια, η επιστήμη ήταν η όαση της λογικής και προσωπικά ήμουν ευγνώμων που τουλάχιστον τα πειράματά μου έβγαζαν νόημα.

Σε αυτή την τόσο δύσκολη κατάσταση, νιώθω τυχερή που ήμουν μέλος της ερευνητικής ομάδας του ομότιμου καθηγητή Μ. Κοκκινίδη, στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπαιδευτώ από τους καλύτερους σε έναν χώρο που ποτέ δεν ξεχνούσαν τον καθοδηγητικό/εκπαιδευτικό τους ρόλο! Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την υποστήριξη και τα εφόδια που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα, ώστε με δυναμισμό να πραγματοποιήσω τα επόμενα επαγγελματικά και ερευνητικά μου βήματα. Εν τέλη κατάλαβα πως το μυστικό της επιτυχίας βρίσκεται στο «όλα λάθος».

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, την κ. Ε. Αθανασάκη και τον κ. Ι. Βόντα, για την συμβολή τους στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης δουλειάς, τους ευχαριστώ για όλες τις συμβουλές και συζητήσεις καθόλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Θα συνεχίσω με τις ευχαριστίες μου στα μέλη του εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας «Βασίλης Γαλανόπουλος» του Παν. Κρήτης, και ιδιαιτέρως στην κ. Σεβαστή Παπαδογεωργάκη, για την βοήθειά της κατά τη διάρκεια της διατριβής μου.

Στα μέλη του εργαστηρίου του κ. Κοκκινίδη οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για το οικογενειακό κλίμα, το οποίο ήταν τόσο σημαντικό την συγκεκριμένη περίοδο: Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Κατερίνα Κεφάλα, που ήταν δίπλα μου από τα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο μέχρι και το τέλος της συγκεκριμένης εργασίας, την ευχαριστώ για την υπομονή της κατά την εκπαίδευσή μου και ιδιαίτερα για την καθοριστική της βοήθειά, σε όλα τα ζητήματα που προέκυψαν μέσα σε αυτό το διάστημα.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τις τεχνικούς του εργαστηρίου Ντίνα Κοτσιφάκη και Μαίρη Προβιδάκη που ήταν πάντα πρόθυμες να με βοηθήσουν και να με υποστηρίξουν, σε οποιαδήποτε δυσκολία συναντούσα. Επίσης ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Κωνσταντίνο Κοτσαρίδη για την βοήθειά του στην εκπαίδευσή μου στις τεχνικές μοριακής βιολογίας, καθώς και για τις ιδιαίτερες και έντονες συζητήσεις. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Στράτο Μυλωνά για την βοήθειά του και εκπαίδευση στις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής. Τέλος ευχαριστώ πολύ την τεχνικό του εργαστηρίου «Δομή Πρωτεϊνών» Παπαδοβασιλάκη Μαρία, τους υποψήφιους διδάκτορες Κάλλια Κουγιανού, Αλέξη Μολφέτα, την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Σπυριδούλα Χαρόβα και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ειρήνη Λίτσο, για την βοήθεια την παρέα και την συμπαράστασή τους.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου Ηλέκτρα, Δήμητρα, Σταυρούλα Βάσια και Αναστασία, για την συμπαράστασή τους σε όλους τους τομείς της ζωής μου, παλιοί και νέοι φίλοι, να συντροφεύουμε ο ένας τα βήματα του άλλου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον φίλου μου Δημήτρη Μήτσικα που με συντρόφευσε όχι μόνο ως φίλος αλλά και ως συμφοιτητής στο εργαστήριο του κ. Κοκκινίδη, χωρίς την συμβολή του η δουλειά μου δεν θα είχε τελειοποιηθεί. Ο άνθρωπος που βασανίστηκε ιδιαίτερα, καθόλη την διάρκεια της παρούσας εργασίας, είναι ο σύντροφός μου Δημήτρης, η βοήθειά του ήταν ανεκτίμητη τον ευχαριστώ πολύ. Χωρίς την υποστήριξη της οικογένειάς μου τίποτα από αυτά δεν θα είχε συμβεί, ευχαριστώ τους γονείς μου Αστέριο και Μαρία για την αγάπη και την υπομονή τους, τα αδέρφια μου Φιλιώ, Αθηνά και Απόστολο που ξέρω πως είναι πάντα εκεί για μένα.

> There is no royal road to science, and only those who do not dread the fatiguing climb of its steep paths have a chance of gaining its luminous summits.

> > -Karl Marx-

<u>Abstract</u>

In the present work, we are developing a templating technology to fuse different protein epitopes, from native proteins, into 4 a-helical bundles creating new chimeric protein. This procedure involves a process called templating where two protein domains of interest are inserted into a parallel two-stranded a-helical coiled-coil, which forces their interaction. Due to their homotetrameric, antiparallel conformation, but also the stability of their structure, the 4 α -helical bundles are ideal scaffolds. In the present work, two heat-resistant mutants of Rop (Repressor of Primer), RM6 and its reverse sequence, the rRM6 protein, are proposed as protein templates.

As part of the work, two chimeric proteins were constructed, A11/rRM6/M8 and A1/RM6/RBM. In the first case, the two meganuclease I-CreI mutants, A11 and M8, were used as functional units. This construct aims to create heterodimers of I-CreI, preventing the homodimerization of the mutants, in order to obtain the desired new specificities. The organization of the chimeric protein into larger fibrous structures, formed during its purification procedure, gives even more perspectives to this project. In the second case a chimeric protein was designed using the RM6 scaffold, as functional groups were selected, the RBM motif of the SARS-COV-2 spike glycoprotein and the α 1-helix of the human ACE2 receptor. According to the Molecular Dynamics simulations, performed of the chimeric protein, a loop (L1) of the RBM motif, seem to be stabilized by the α 1-helix, through their interaction. This information could be useful in the design of peptide (protein) vaccines. Finally, a purification protocol of this chimeric protein is proposed, utilizing the SUMO3 protein.

<u>Περίληψη</u>

Τα α-ελικοειδή δεμάτια σχηματίζονται συχνά από 4 α-έλικες οι οποίες διασταυρώνονται με γωνία 20° και πακετάρονται με αντιπαράλληλο τρόπο. Στο κέντρο του δεματίου εμφανίζεται ένας υδρόφοβος πυρήνας, ο σχηματισμός του οφείλεται στο χαρακτηριστικό μοτίβο επανάληψης της επτάδας, όπου τοποθετούνται υδρόφοβα και υδρόφιλα αμινοξέα με περιοδικότητα επτά καταλοίπων. Οι τοπολογίες των 4-α-ελικοειδών δεματίων χαρακτηρίζουν μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών οι οποίες υπάρχουν σε μονομερείς μορφές ή σε ολιγομερή σύμπλοκα.

Στην συγκεκριμένη εργασία αναπτύσσεται μια τεχνική παρουσίασης πρωτεϊνικών λειτουργικών μονάδων με την βοήθεια ελικοειδών δεματίων, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η αλληλεπίδρασή τους. Η γειτνίαση των λειτουργικών μονάδων, προκύπτει από μια ειδική πρωτεϊνική πλατφόρμα δομικής στήριξης/προσανατολισμού, με χαρακτηριστικά 4 α-ελικοειδών δεματίων. Λόγω της ομοτετραμερούς, αντιπαράλληλης διαμόρφωσής τους, αλλά και της σταθερότητας της δομής τους, τα 4 α-ελικοειδή δεμάτια αποτελούν ιδανικά ικριώματα. Στη παρούσα εργασία, ως δομική πλατφόρμα προτείνεται η χρήση δυο θερμοανθεκτικών μεταλλαγμάτων της Rop (Repressor Of Primer), η RM6 και η αντίστροφη αλληλουχία αυτής, η πρωτεΐνη rRM6.

Στα πλαίσια της εργασίας, κατασκευάστηκαν δυο χιμαιρικές πρωτεΐνες, οι A₁₁/rRM6/M₈ και A₁/RM6/RBM. Στην πρώτη περίπτωση ως λειτουργικές μονάδες χρησιμοποιήθηκαν τα δυο μεταλλάγματα της μεγανουκλεάσης I-Crel, A₁₁ και M₈ τα οποία συνδυαζόμενα αναγνωρίζουν αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε γονίδιο υπεύθυνο για την ασθένεια Xeroderma Pigmentosum. Η συγκεκριμένη κατασκευή στοχεύει στην δημιουργία ετεροδιμερών της I-Crel, αποτρέποντας τον ομοδιμερισμό των μεταλλαγμάτων, προκειμένου να προκύψουν οι επιθυμιτές νέες εξειδικεύσεις, ως προς την αλληλουχία αναγνώρισης. Η οργάνωση της χιμαιρικής πρωτεΐνης σε μεγαλύτερες ινώδεις δομές, η οποία διαπιστώθηκε στα πλαίσια του καθαρισμού της, προσδίδει ακόμα περισσότερες προοπτικές στην συγκεκριμένη κατασκευή.

Στη δεύτερη περίπτωση σχεδιάστηκε μια χιμαιρική πρωτεΐνη χρησιμοποιώντας το ικρίωμα της RM6, ως λειτουργικές ομάδες επιλέχθηκαν, το μοτίβο RBM της πρωτεΐνης ακίδας (S glycoprotein) του SARS-COV-2 και η α₁-έλικα του ανθρώπινου υποδοχέα ACE2. Τα συγκεκριμένα μοτίβα επιλέχθηκαν σύμφωνα με την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων του συμπλόκου ACE2/S glycoprotein, όπως προκύπτουν από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου (pdb: 6M0J). Η μελέτη της χιμαιρικής πρωτεΐνης, με προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, ανέδειξε την σταθεροποίηση μιας λούπας (L1) του μοτίβου RBM, η οποία σταθεροποιείται από την α₁-έλικα, μέσω της αλλήλεπίδρασή τους. Η συγκεκριμένη πληροφορία μπορεί να αξιοποιηθεί κατά τον σχεδιασμό πεπτιδικών (πρωτεΐνικών) εμβολίων. Τέλος προτείνεται πρωτοκολλο καθαρισμού της συγκεκριμένης χιμαιρικής πρωτεΐνης, αξιοποιώντας την πρωτεΐνη SUMO3. Η Α₁/RM6/RBM

πρωτεΐνη, προσφέρεται να αξιοποιηθεί ως υπόστρωμα σε *in vitro* πειράματα αξιολόγησης μικρών μορίων, σχεδιασμένων για την αναστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ ACE2/ S glycoprotein.

1. <u>Εισαγωγή</u>

1.1 ΧΙΜΑΙΡΕΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Η Χίμαιρα εμφανίζεται στην ελληνική μυθολογία ως ένα τερατώδες πλάσμα με κεφάλι λιονταριού, σώμα κατσίκας και ουρά φιδιού. Κατ' αναλογία οι χιμαιρικές πρωτεΐνες δημιουργούνται από διαφορετικές μεμονωμένες πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικές επικράτειες (protein domains) οι οποίες χρησιμοποιούνται ως δομικά στοιχεία, συγχωνευμένα σε μια ενιαία δομή (πολυπεπτίδιο). Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες παράγονται φυσικά ή τεχνητά, μέσω γενετικής μηχανικής (Strohl, 2017). Όσες συναντώνται στην φύση προκύπτουν μετά από χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (χρωμοσωμική μετατόπιση ή μετάθεση, διπλασιασμός γονιδίου) και συχνά παρατηρούνται σε καρκινικά κύτταρα όπου πιθανώς έχουν ρόλο ογκοπρωτεΐνης (oncogenic protein) (Edwards, 2010). Όσον αφορά τις τεχνητές χιμαιρικές ή πρωτεΐνες σύντηξης (fusion proteins), παράγονται με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA (Bonde & Bülow, 2013). Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες παρουσιάζουν διάφορες εμπορικές εφαρμογές που κυμαίνονται από την ανάπτυξη θεραπευτικών πρωτεϊνών για την θεραπεία ασθενειών, την χρήση τους ως διαγνωστικές πρωτεΐνες, στη μεταβολική μηχανική προκυμμένου να κατευθυνθεί ένας μεταβολίτης προς επιθυμητή οδό καθώς και στην διαδικασία καθαρισμού πρωτεϊνών κατά την κατιούσα επεξεργασία (Strohl, 2017).

Έχουν καταγραφεί διάφοροι τρόποι ταξινόμησης των χιμαιρικών πρωτεϊνών, ένας αρκετά άμεσος τρόπος ομαδοποίησης είναι, βάση της λειτουργίας που εμφανίζουν οι ενσωματωμένες επικράτειες τους. Συνήθως παρατηρείται ως μοτίβο: μια από τις επικράτειες να λειτουργεί αναγνωρίζοντας ή και προσδένοντας συγκεκριμένες μοριακές αλληλουχίες, ενώ διαφορετική επικράτεια χρησιμοποιείται προκειμένου η νέα πρωτεΐνη να διαθέτει τροποποιημένα χαρακτηριστικά όπως παρατεταμένο χρόνο ημιζωής και αυξημένη σταθερότητα, κυτταροτοξικότητα, ανάπτυξη νέων οδών μεταφοράς και στόχευσης (S. R. Schmidt, 2009). Ο Stefan R. Schmidt στο βιβλίο Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges, πρότεινε μια εναλλακτική ταξινόμηση βασισμένη σε τρεις άξονες τον «χρόνο ημιζωής» (t_{1/2}, half-life), την «τοξικότητα» (toxicity) και την «στόχευση» (targeting), που εμφανίζουν οι χιμαιρικές πρωτεΐνες (the triple T paradigm). Στο ίδιο βιβλίο ο Giles Somers στο κεφάλαιο Structural Aspects of Fusion Proteins Determining the Level of Commercial Success, κατατάσσει τις διάφορες επικράτειες των χιμαιρικών πρωτεϊνών σε μια από τις τρεις λειτουργικές ομάδες: «δραστικότητα» (activity), «στόχευση» (targeting) και «χρόνο ημιζωής» (half life). Πρακτικά επισημαίνουν πως στις περισσότερες περιπτώσεις χιμαιρικών πρωτεϊνών, επιλεγμένες επικράτειες με συγκεκριμένη δραστικότητα ενώνονται με πρωτεϊνικές επικράτειες που χρησιμοποιούνται, προκειμένου να εξασφαλιστεί η μεταφορά τους προς τον στόχο δράσης.

Αυτό είναι εφικτό είτε τροποποιώντας την στόχευση της πρωτεΐνης, αλλάζοντας τις θέσεις δράσης στις οποίες κατανέμεται, είτε αυξάνοντας την διάρκεια για την οποία παραμένει ενεργή (χρόνος ημιζωής) (S. Schmidt, 2013).

Οι επικράτειες στόχευσης σχεδιάζονται να αναγνωρίζουν με υψηλή εξειδίκευση τον στόχο, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται αύξηση της κατανομής της πρωτεΐνης σε συγκεκριμένα σημεία και αποφυγή μη ειδικής στόχευσης (off target effect). Ένας άλλος τρόπος να περιοριστούν φαινόμενα μη ειδικής στόχευσης είναι η αλλαγή της διάρκειας κατά την οποία η πρωτεΐνη παραμένει ενεργή. Σε αυτή την περίπτωση επικράτειες ικανές να τροποποιήσουν τον χρόνο ημιζωής της δραστικής επικράτειας, μπορούν να συμπεριληφθούν στον σχεδιασμό χιμαιρικών πρωτεϊνών. Ως αποτέλεσμα, η χιμαιρική πρωτεΐνη δρα υπό χρονικό περιορισμό, επί του στόχου. Οι ιδιαίτερες ιδιότητες των χιμαιρικών πρωτεϊνών αναδεικνύουν θεραπευτικά οφέλη, όσον αφορά την μείωση των παρενεργειών, τον καλύτερο έλεγχο στις δοσοληψίες καθώς και την βελτίωση της δραστικότητας. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τις χιμαιρικές πρωτεΐνες ιδιαίτερα ελκυστικές (S. Schmidt, 2013).

Παρόλα τα σημαντικά πλεονεκτήματα που εμφανίζουν οι χιμαιρικές πρωτεΐνες, υπάρχουν και αρκετές προκλήσεις που χαρακτηρίζουν αυτήν την καινοτόμα τεχνολογία. Πιο συγκεκριμένα ο συνδυασμός ανεξάρτητων πρωτεϊνών μπορεί να αποδειχθεί πολύπλοκος, σε περίπτωση μη συμβατών επικρατειών. Σε αυτές τις συνθήκες συνήθως προκαλείται συσσωμάτωμα ή λανθασμένη αναδίπλωση (misfolding) της μιας επικράτειας, ενώ ταυτόχρονα οι συνθήκες μπορεί να είναι ιδανικές για την άλλη. Παρά το γεγονός ότι ορισμένες επικράτειες χιμαιρικών πρωτεϊνών αποτελούν στοιχεία καλά χαρακτηρισμένων μορίων, όπως των αντισωμάτων, οι καθιερωμένες διαδικασίες σύντηξης (platform processes) μπορεί να μην είναι εφαρμόσιμες, καθώς άλλα χαρακτηριστικά των ίδιων επικρατειών, μπορεί να επισκιάζουν τις επιθυμητές ιδιότητές τους. Το πρόβλημα που μπορεί να προκύψει και να μην καταφέρει τελικά να σχηματιστεί η χιμαιρική πρωτεΐνη, είναι η παρουσία αντικρουόμενων απαιτήσεων σταθερότητας. Επιπλέον η ρύθμιση και ο έλεγχος της στοιχειομετρίας των επικρατειών, ώστε να επιφέρουν τα μέγιστα σε αποδοτικότητα και ασφάλεια, αποτελεί δύσκολο εγχείρημα. Ωστόσο ίσως το σημαντικότερο πρόβλημα είναι η μεγάλη πιθανότητα πρόκλησης ανοσογονικότητας, λόγω σχηματισμού νέων επιτόπων από την ένωση των πρωτεϊνικών επικρατειών, ακόμα και στην περίπτωση που έχουν ανθρώπινη προέλευση (S. Schmidt, 2013).

Όσον αφορά τον σχεδιασμό μιας νέας χιμαιρικής πρωτεΐνης, υπάρχει μια σειρά παραμέτρων που πρέπει να ληφθούν υπόψιν. Ο προσανατολισμός τον οποίο θα επιλέξουμε για κάθε μια επικράτεια, στο αμινικό (Ν-άκρο) είτε στο καρβοξυτελικό (C-άκρο) άκρο, μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργικότητά της. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αφορά την περίπτωση των Fcχιμαιρικών πρωτεϊνών. Στις χιμαιρικές πρωτεΐνες στις οποίες χρησιμοποιείται η Fc επικράτεια των αντισωμάτων, μπορεί να τοποθετηθεί στο Ν-άκρο, σε αντίθεση με την θέση της στο C-άκρο των αντισωμάτων. Συγκρίνοντας την λειτουργικότητά της, αντίστοιχα στις δυο θέσεις σε χιμαιρικά πεπτίδια, παρατηρήθηκε πως στο Ν-άκρο παρουσίαζε μικρότερο χρόνο ημιζωής και πιο αδύναμη πρόσδεση, ωστόσο καλύτερη ειδικότητα (Oliner et al., 2004). Μια άλλη σημαντική παράμετρος, που καθορίζει την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, αποτελεί ο τρόπος με τον οποίο θα προσδεθούν οι επικράτειες μεταξύ τους. Σε σπάνιες περιπτώσεις όπου οι επικράτειες διαθέτουν ευέλικτα άκρα, ο σχεδιασμός τεχνητού πεπτιδικού συνδέσμου(linker) δεν είναι απαραίτητος, ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις, η προσθήκη κατάλληλου συνδέσμου μεταξύ των επικρατειών, είναι αναγκαία (Wriggers et al., 2005). Ως επί το πλείστων, η χωρική διαμόρφωση (spatial conformation) των επικρατειών μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης, είναι απαραίτητη προκειμένου να διατηρηθεί η λειτουργικότητά της και εξασφαλίζεται, χάρη στους πεπτιδικούς συνδέσμους (S. Schmidt, 2013).

Τόσο το μήκος όσο και η διαμόρφωση ενός συνδέσμου, βασίζονται στον λογικό σχεδιασμό (rational engineering). Πιο συγκεκριμένα, προκειμένου να επιτευχθεί ελεγχόμενη απόσταση μεταξύ των επικρατειών, χρησιμοποιούνται σύνδεσμοι επαναλαμβανόμενων α-ελικοειδών πεπτιδίων A(EAAAK)nA, τα οποία διατηρούν τις αποστάσεις μεταξύ των επικρατειών, σε αντίθεση με τους ευέλικτους συνδέσμους (Arai et al., 2001).

Το επόμενο επίπεδο σχεδιασμού αφορά τον σωστό ολιγομερισμό της πρωτεϊνης. Σε αρκετές περιπτώσεις, οι πρωτεϊνες εξαρτώνται από τον πολυμερισμό ή μπορεί να εμφανίζουν υψηλότερη βιοδραστικότητα ως πολυμερές. Ένα παράδειγμα αποτελεί ο συνδυασμός ενός παράγοντα βλαστοκυττάρων (SCF) και ενός διεγερτικού παράγοντα αποικιών μακροφάγων (M-CSF) με ευέλικτο σύνδεσμο 12 αμινοξέων. Η χιμαιρική πρωτεΐνη σχηματίζει διμερή που έχουν 10 έως 20 φορές μεγαλύτερη ισχύ από τις μεμονωμένες μονομερείς πρωτεΐνες, επωφελούμενη επίσης από τη συνεργιστική δράση (S. Schmidt, 2013).



Εικόνα 1.1: Διαμόρφωση Χιμαιρικών Πρωτεϊνών. Οι βασικές παραλλαγές χιμαιρικών πρωτεϊνών αφορούν τον προσανατολισμό, τους συνδέσμους και τον ολογομερισμό. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι πρωτεϊνές απαιτούν ένα ελεύθερο αμινικό ή καρβοξυτελικό άκρο για την δραστηριότητά τους. Ο σύνδεσμος μπορεί να ποικίλει σε μήκος, ευελιξία και ευαισθησία στην πρωτεόλυση. Όσον αφορά τον ολιγομερισμό: ο διμερισμός μπορεί να επιτευχθεί συμπεριλαμβάνοντας φερμουάρ λευκίνης (leucine zippers) στην περιοχή του συνδέσμου, στα 2 παραδείγματα τριμερισμού και εξαμερισμού χρησιμοποιήθηκαν μια επικράτεια τριμερισμού από ανθρώπινη ενδοστατίτη και ένας συνδυασμός τριών Fc διμερών ενωμένων με ILZ σπειρωμένο σπείραμα σε δυο τριμερή, αντίστοιχα (S. Schmidt, 2013).

1.2 ΧΙΜΑΙΡΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΩΣ «ΜΟΡΙΑΚΑ ΨΑΛΙΔΙΑ»

Κοινή παράμετρος μεταξύ όλων των οργανισμών είναι ο θεμελιώδης γενετικός κώδικας, η ιδέα της χειραγώγησης του γονιδιώματος έφερε στο φως πολλές στρατηγικές επεξεργασίας γονιδίων. Οι τεχνικές επεξεργασίας γονιδιώματος νέας γενιάς, έχουν την ικανότητα τροποποίησης συγκεκριμένων χρωμοσωμικών τόπων σε καθορισμένες θέσεις, υπό συγκεκριμένες συνθήκες: (α) την ακριβής αναγνώριση του γενετικού τόπου που πρόκειται να τροποποιηθεί, (β) την ικανότητα δημιουργίας των αναγκαίων προϋποθέσεων για να πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες (εντός στόχου) τροποποιήσεις (Takeuchi et al., 2014; Hsu et al., 2014; Sander & Joung, 2014). Οι ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα ικανά να αναγνωρίζουν με μεγάλη εξειδίκευση και να προσδένονται σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, προκαλώντας τοπικά ρήξη και των δύο κλώνων του DNA (double strand brakes, DSBs). Ο μηχανισμός της ενζυμικής τους ενεργότητας κατά την διάρκεια της γενετικής τροποποίησης, αποτυπώνεται εν συντομία ως εξής: με έναν ιδιαίτερα επιλεκτικό τρόπο αναγνωρίζεται η αλληλουχία στόχος στην οποία προσδένονται, στη συνέχεια κόβουν το DNA τοπικά ή σε κοντινή από τον στόχο, διασπώντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς της απόσταση πολυνουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Σύμφωνα με αυτό, η τροποποιημένη αλληλουχία μπορεί να αντιστοιχεί είτε στην αλληλουχία στόχο, είτε σε γειτονικές αλληλουχίες (Maggio & Gonc, 2015). Παρόλο που οι ενδονουκλεάσες έχουν κεντρικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία δημιουργώντας DSBs, οι απαραίτητες ενέργειες για την αλλαγή στην νουκλεοτιδική αλληλουχία εκτελούνται από το κύτταρο και πιο συγκεκριμένα από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (Hsu et al., 2014; Sander & Joung, 2014).

Χιμαιρικές Ενδονουκλεάσες στην επεξεργασία του γονιδιώματος

Η γενετική επεξεργασία βασίζεται στη δραστηριότητα των ενδονουκλεασών, καθώς καθορίζουν την αλληλουχία στόχο. Για να επιτευχθεί αυτό, πρέπει να αποκτήσουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, τα οποία δεν υπάρχουν σε όλες τις φυσικές νουκλεάσες. Ορισμένες τεχνητές νουκλεάσες που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία γονιδίων μοιάζουν με τις φυσικές ανάλογές τους, ενώ άλλες είναι χιμαιρικές πρωτεΐνες, που έχουν σχεδιαστεί με βάση φυσικές νουκλεάσες χρησιμοποιώντας τις πρωτεϊνικές τους επικράτειες. Παρ 'όλα αυτά, και οι δύο κατηγορίες ενδονουκλεασών που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία γονιδίων, δημιουργούν δίκλωνα θραύσματα στο DNA με μεγάλη εξειδίκευση, όσον αφορά την αλληλουχία στόχο. Προκειμένου να αποφευχθούν ενέργειες μη ειδικής στόχευσης (off target effect), είναι αναγνώρισης της ίδιας αλληλουχίας αλλού στο γονιδίωμα (Nóbrega et al., 2020).

Όσον αφορά τη δυνατότητα στόχευσης διαφορετικών αλληλουχιών, οι νουκλεάσες πρέπει να ανασχεδιαστούν (Nóbrega et al., 2020). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετά εργαλεία επεξεργασίας γονιδιώματος με ποικίλες εφαρμογές σε τομείς όπως η συνθετική βιολογία, γεωργικές επιστήμες και ιδιαίτερα στην ιατρική στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας, στη μοντελοποίηση ασθενειών και την ανακάλυψη καινοτόμων φαρμάκων (Broeders et al., 2020; Gaj et al., 2016). Μερικές επιτυχημένες προσεγγίσεις απολελούν οι Μεγανουκλεάσες (MNs), οι νουκλεάσες τύπου TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (Zinc Finger Nucleases, ZFNs) και οι νουκλεάσες του συστήματος CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/associated protein-9 nuclease) (Guha et al., 2017).



Εικόνα 1.2: Βασικές προσεγγίσεις γονιδιακής επεξεργασίας. Οι Μεγανουκλεάσες αποτελούν φυσικά περιοριστικά ένζυμα με μεγάλες αλληλουχίες αναγνώρισης (12-40bp). TALENs και ZFNs είναι χιμαιρικές πρωτεΐνες αποτελούμενες από δύο επικράτειες: Η πρώτη, αναγνωρίζει και προσδένει μοτίβα διαδοχικά διατεταγμένων βάσεων (array), που σχηματίζονται από μονές βάσεις και τριπλέτες βάσεων αντίστοιχα. Η δεύτερη χρησιμοποιείται για την κοπή της αλληλουχίας DNA στόχου, συνήθως χρησιμοποιείται το περιοριστικό ένζυμο Fokl. Τα συστήματα αυτά είναι λειτουργικά μόνο σε ομοδιμερή. Το σύστημα CRISPR-Cas βασίζεται κυρίως στην ριβονουκλεοπρωτεΐνη Streptococcus pyogenes Cas9. Αυτή η ενδονουκλεάση έχει δύο ενεργές θέσεις κοπής DNA και καθοδηγείται από μια μονόκλωνη αλληλουχία RNA, συμπληρωματική της αλληλουχίας στόχου. (Nóbrega et al., 2020)

Η χρήση και η προτίμηση της επιστημονικής κοινότητας μεταξύ των τεσσάρων συστημάτων, εξαρτάται από τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν. Το σύστημα CRISPR/Cas είναι ένα καινοτόμο εργαλείο, το οποίο κυριαρχεί στον τομέα της γονιδιακής επεξεργασίας, καθώς η διαδικασία ανασχεδιασμού του είναι απλή και οικονομική, αφού απαιτεί τον σχεδιασμό ενός νέου RNA-οδηγού (gRNA)συμπληρωματικού της νέας ακολουθίας στόχου (Nóbrega et al., 2020). Αντίθετα, ο επαναπρογραμματισμός των ZFN και TALEN είναι ακριβή και χρονοβόρα διαδικασία, ενώ οι Μεγανουκλεάσες είναι μέχρι τώρα το πιο δύσκολο σύστημα για ανασχεδιασμό, καθώς οι λειτουργίες αναγνώρισης/πρόσδεσης της αλληλουχίας DNA στόχου και οι λειτουργία διάσπασής της, περιλαμβάνονται στην ίδια επικράτεια (Sander & Joung, 2014). Επιπλέον, ενώ τα ZFN και TALEN λειτουργούν ως ομοδιμερή, αυτό δεν συμβαίνει με το σύστημα CRISPR/Cas, το οποίο δεν απαιτεί ολιγομερισμό. Παράλληλα το σύστημα CRISPR/Cas παρέχει πολλαπλή χρήση, στοχεύοντας ταυτόχρονα διάφορες αλληλουχίες, χρησιμοποιώντας την ίδια πρωτεΐνη με πολλαπλά μόρια gRNA (Carroll, 2021). Ωστόσο παρόλη την ευρεία χρήση του, χάρη στα σημαντικά πλεονεκτήματα που ήδη αναφέρθηκαν, δεν καταφέρνει να εξαλείψει το σημαντικό πρόβλημα της μη ειδικής στόχευσης (off-target effect). Αυτό το πρόβλημα βασίζεται στην λειτουργία της Cas9, η οποία δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη εξειδίκευση και ευαισθησία κατά την στόχευση (Mali et al., 2013). Στον αντίποδα, οι Μεγανουκλεάσες, οι ZFN και TALEN παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση, καθώς αναγνωρίζουν σπάνιες αλληλουχίες DNA, παρόλο που υπάρχει κάποια ανεκτικότητα σε πολυμορφισμούς, παρόμοιους με την αλληλουχία στόχο (Molina et al., 2011).

Όλες οι προσεγγίσεις της γενετικής μηχανικής παρουσιάζουν περιορισμούς, οι οποίοι πρέπει να μελετηθούν, προκειμένου να βελτιωθεί η πρακτική τους εφαρμογή. Ως περιοριστικοί παράγοντες παρουσιάζονται προβλήματα όσον αφορά την ειδικότητα, την αποτελεσματικότητα των μεθόδων μεταφοράς του συστήματος, καθώς και την χειραγώγηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης δίκλωνων θραυσμάτων DNA (Hsu et al., 2014); Maggio & Gonc, 2015;Sander & Joung, 2014). Λαμβάνοντας υπόψη, τη μη ειδική στόχευση ως μείζον πρόβλημα δύσκολο να επιλυθεί, ο τομέας της βιοτεχνολογίας και της γενετικής μηχανικής, αναπτύσσουν συστηματικά νέες πολλά υποσχόμενες τεχνικές και παράλληλα βελτιώνουν τις ήδη υπάρχουσες, με σκοπό την αντιμετώπισή του (Khan, 2019).

Αυτοκατευθυνόμενες Ενδονουκλεάσες (Homing Endonuclease)

Οι Αυτοκατευθυνόμενες Ενδονουκλεάσες (ΑΕ) είναι μια ευρέως διαδεδομένη οικογένεια φυσικών μεγανουκλεασών που περιλαμβάνουν εκατοντάδες πρωτεΐνες (Β. S. Chevalier & Stoddard, 2001), οι οποίες συναντώνται σε όλα τα βασίλεια της φύσης (S. Arnould et al., 2011). Όπως προκύπτει και από την ονομασία τους, οι συγκεκριμένες ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν και υδρολύουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μεγάλου μήκους (12-45bp) (Thierry & Dujon, 1992), έτσι χρησιμοποιούνται για της εξειδικευμένη στόχευση γονιδίων σε κύτταρα φυτών και θηλαστικών (Choulika et al., 1995; Puchta et al., 1996).

Σύμφωνα με την αλληλουχία και συγκεκριμένα δομικά μοτίβα του ενεργού τους κέντρου, κατηγοριοποιούνται σε πέντε οικογένειες: LADGLIDADG, HNH, GIY-YIG, His-Cys box και PD-(D/E)XK (S. Arnould et al., 2011). Για τους εκπροσώπους όλων αυτών των οικογενειών διατίθενται δομικά δεδομένα, αποκαλύπτοντας με ποιόν τρόπο αυτά τα ένζυμα καταφέρνουν να αναγνωρίσουν και να δεσμεύσουν τις μεγάλες αλληλουχίες αναγνώρισης τους.



Εικόνα 1.3: Αντιπροσωπευτικές νουκλεάσες από κάθε οικογένεια. I-Crel (pdb: 6FB7) αντιπροσωπεύει την οικογένεια LADGLIDADG, I-Hmul (pdb: 1U3E) για την HNH, I-Ppol (pdb: 1A73) για την His-Cys Box, I-Ssp6803I (pdb: 2OST) για PD-(D/E)xK και η επικράτεια πρόσδεσης DNA της I-TevI (pdb: 1T2T) ως μέλος της οικογένειας GIY-YIG.

Αυτές οι πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από κινητά γενετικά στοιχεία «introns» τύπου Ι και ΙΙ είτε υπάρχουν ως «inteins», ωστόσο παρατηρούνται και ανεξάρτητα «freestanding» ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF) (Belfort & Roberts, 1997). Η διάδοση των γονιδίων τους πραγματοποιήται με έναν μοριακό μηχανισμό που ονομάζεται αυτοκατεύθυνση «homing». Πιο συγκεκριμένα η διαδικασία επάγεται από μια ενδονουκλεάση που κωδικοποιείται από ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) εντός του μεταθετού στοιχείου (B. Chevalier et al., 2003). Στη συνέχεια η ενδονουκλεάση αναγνωρίζει και υδρολύει, δημιουργώντας δίκλωνα θραύσματα (DSBs), στο αλληλόμορφο από το οποίο απουσιάζει το μεταθετό στοιχείο, πυροδοτώντας έτσι τον μηχανισμό επιδιόρθωσης του κυττάρου-ξενιστή και συγκεκριμένα το μονοπάτι ομόλογου ανασυνδυασμού (Homology-directed repair, HDR). Κατά την επιδιόρθωση χρησιμοποιείται ως εκμαγείο το αλληλόμορφο που διαθέτει ήδη το μεταθετό στοιχείο, με αποτέλεσα να αντιγραφεί στην θέση «πρόσληψης» του άλλου (Sylvain Arnould et al., 2006). Με τον τρόπο αυτό ολοκληρώνεται ο κύκλος αυτοκατεύθυνσης «homing cycle» (B. Chevalier et al., 2003).

Οι ενδονουκλεάσες της οικογένειας LADGLIDADG διαθέτουν την συντηρημένη αλληλουχία LADGLIDADG και αποτελούν την μεγαλύτερη και καλύτερα χαρακτηρησμένη οικογένεια μεταξύ των ΑΕ. Τα μέλη αυτής της οικογένειας διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες, στις ενδονουκλεάσες που δρουν ως ομοδιμερή και διαθέτουν ένα αντίγραφο του μοτίβου LADGLIDADG σε κάθε μονομερές και σε όσες δρουν ως μονομερή, διαθέτοντας δυο αντίγραφα του ίδιου μοτίβου, καθώς αποτελούνται από δυο δομικά όμοιες επικράτειες νουκλεασών, ενωμένες στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Τα ένζυμα της πρώτης κατηγορίας, όπως οι I-Crel, I-Ceul και I-Msol, αναγνωρίζουν αλληλουχίες DNA παλίνδρομες ή ψεύδο-παλίνδρομες. Τα ένζυμα της δεύτερης



Εικόνα 1.4: Κύκλος Αυτοκατεύθυνσης. Allele1: αλληλόμορφο χωρίς intron/intein, Allele2: αλληλόμορφο με intron/intein. Οι Plενδονουκλεάσες, υπάρχουν ως «inteins», αποκτούν λειτουργικότητα μετά από διαδικασία ματίσματος στο επίπεδο της πρωτεΐνης. Οι l-ενδονουκλεάσες κωδικοποιούνται από ιντρόνια, τα οποία μεταφράζονται μετά την διαδικασία του RNAματίσματος. Ο μηχανισμός είναι ο ίδιος και στις δυο περιπτώσεις, οι ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν την αλληλουχία στόχο στο αλληλόμορφο 1 και δημιουργούν δίκλωνο θραύσμα, αυτό επιδιορθώνεται χρησιμοποιώντας το αλληλόμορφο 2 ως εκμαγείο, με αποτέλεσμα την δημιουργεία ομόζυγων αλληλόμορφων (Ines Fonfara, 2011).

κατηγορίας, όπως οι I-Anil, I-Dmol και I-Scel, σχηματίζονται από δύο επικράτειες και δεν περιορίζονται σε συμμετρικούς στόχους DNA (Molina et al., 2011). Οι μονομερείς ενδονουκλεάσες διαχωρίζονται περαιτέρω σε όσες κωδικοποιούνται από ιντρόνια και σε όσες υπάρχουν ως «inteins» (PI-Scel). Οι τελευταίες διαθέτουν μια επιπλέον επικράτεια, υπεύθυνη για το μάτισμα στο οποίο υπόκειται μια πρόδρομη πρωτεΐνη από την οποία τελικά προκύπτει η λειτουργική ενδονουκλεάση. Επίσης η συγκεκριμένη επικράτεια επεκτείνει την ικανότητα πρόσδεσης του ενζύμου στο DNA (Ines Fonfara, 2011).

Η λύση της κρυσταλλικής δομής, μίας σειράς LAGLIDADG πρωτεϊνών, οδήγησε στην παρατήρηση ενός αυστηρά διατηρημένου δομικού μοτίβου που χαρακτηρίζει όλες τις πρωτεϊνες της οικογένειας LAGLIDADG, ωστόσο αυτά τα ευρήματα έρχονται σε αντίθεση με τις διαφορές που παρουσιάζουν στην πρωτοταγή τους δομή. Στον πυρήνα του δομικού μοτίβου, παρατηρούνται δύο χαρακτηριστικές αναδιπλώσεις abbabba, σχηματίζονται από δύο μονομερή, είτε από δυο επικράτειες στην περίπτωση των πρωτεϊνών με δυο αντίγραφα LAGLIDAG και τοποθετούνται η μια απέναντι από την άλλη σε άξονα διπλής συμμετρίας (Sylvain Arnould et al., 2006). Το μοτίβο LAGLIDADG βρίσκεται στο τέλος της πρώτης α-έλικας κάθε

μονομερούς ή επικράτειας και λόγω της στενής διάταξης των ελίκων LAGLIDADG, και οι δύο καταλυτικές θέσεις τοποθετούνται κατά μήκος της μικρής αύλακας του DNA, διατεταγμένες κατάλληλα ώστε να αποδίδουν προεξέχοντα 3΄ άκρα τεσσάρων νουκλεοτιδίων (4nt 3΄) (B. S. Chevalier & Stoddard, 2001). Η πρόσδεση στο DNA εξαρτάται από τους 4 β κλώνους της κάθε επικράτειας, καθώς αναδιπλώνονται σε αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια, σχηματίζουν ένα «σαμάρι» που εφαρμόζει στην κύρια αύλακα του DNA (Sylvain Arnould et al., 2006).



Εικόνα 1.5: Επισκόπηση των δημοσιευμένων κρυσταλλικών δομών που αντιπροσωπεύουν τις δομικές υποοικογένειες, ομοδιμερών και μονομερών κωδικοποιημένων από intron ή intein, ενδονουκλεασών της οικογένειας LAGLIDADG. Το μοτίβο LAGLIDADG φαίνεται με κίτρινο χρώμα και το καταλυτικό τους κέντρο με κόκκινο. Στα ομοδιμερή ένζυμα μόνο το ένα μονομερές φαίνεται με πράσινο χρώμα, στην περίπτωση των μονομερών που υπάρχουν ως inteins η επικράτεια με γκρι χρώμα αντιστοιχεί στην περιοχή αναγνώρισης DNA (DNA-recognition region, DRR) και με πιο σκούρο γκρι απεικονίζεται η επικράτεια περιοριστικής κοπής (protein splicing domain, Hint) (Ines Fonfara, 2011).



Εικόνα 1.6: Αλληλεπιδράσεις I-Crel με αλληλουχία στόχο. (α) Το σύμπλοκο της I-Crel με την αλληλουχία στόχο. Με πράσινο εμφανίζονται οι θέσεις αλλήλεπίδρασεις με τα νουκλεοτίδια ±8, ±9, ±10, ενώ με κόκκινο οι θέσεις αλληλεπίδρασης με τα ±3, ±4, ±5 της παλίνδρομης αλληλουχίας στόχου, η οποία αποτελείται από 22 ζεύγη βάσεων. (b) Μεγέθυνση της πράσινης περιοχής του συμπλόκου, όπου εμφανίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα 28, 30, 33, 38 και 40 και δίπλα η αλληλεπιδράσεις τους με τα νουκλεοτίδια στις θέσεις -8, -9, -10 της αλληλουχίας στόχου (Smith et al., 2006b). (c) Μεγέθυνση της κόκκινης περιοχής του συμπλόκου, όπου εμφανίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα 44, 68 και 70, ακριβώς από κάτω φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις τους με τα νουκλεοτίδια στις θέσεις ±3, ±4, ±5 της αλληλουχίας στόχου (Sylvain Arnould et al., 2006). Οι θέσεις ±8, ±9, ±10 και ±3, ±4, ±5 εμφανίζονται οι οιθέσεις πάνω στην αλληλουχία στόχο (α), (b), καθώς επίσης και οι θέσεις κοπής υποδεικνύονται με βέλη.

Οι Μεγανουκλεάσες ήταν οι πρώτες νουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να παραχθούν δίκλωνα θραύσματα DNA σε ζωντανά κύτταρα. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η χρήση τους έχει περιοριστεί λόγω της δυσκολίας επαναπρογραμματισμού τους προς νέο στόχο. Αν και έχουν εντοπιστεί αρκετές εκατοντάδες φυσικές μεγανουκλεάσες, αυτή η ποικιλομορφία εξακολουθεί να είναι ανεπαρκής για την αντιμετώπιση της πολυπλοκότητας του γονιδιώματος, καθώς η πιθανότητα εύρεσης θέση αναγνώρισης εντός ενός γονιδίου επιλογής, είναι ακόμα εξαιρετικά χαμηλή. Αυτά τα δεδομένα αναδεικνύουν την ανάγκη κατασκευής τεχνητών ενδονουκλεασών, με προσαρμοσμένες ειδικότητες, στοχεύοντας επιλεγμένες αλληλουχίες με την ίδια επιλεκτικότητα που χαρακτηρίζει τις φυσικές ενδονουκλεάσες. Ο δομικός προσδιορισμός πολλών μεγανουκλεασών και η πρόσφατη πρόοδος στις στρατηγικές πρωτεϊνικής μηχανικής, επικαιροποίησαν τον ρόλο των μεγανουκλεασών με αποτέλεσμα να εμφανίζονται πάλι ως δομικοί λίθοι για την παραγωγή εργαλείων γενετικής μηχανικής (Galetto et al., 2009). Ωστόσο, το ένζυμο που επιλέγεται ως πρότυπο πρέπει πρώτα να κατασκευαστεί έτσι ώστε να αναγνωρίσει συγκεκριμένα τη νέα αλληλουχία στόχου DNA. Ως εκ τούτου, μια

12

προηγούμενη κατανόηση της σχέσης δομής - λειτουργίας αυτών των ενζύμων με τους στόχους DNA τους είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη προσαρμοσμένων ενζύμων που στοχεύουν συγκεκριμένη αλληλουχία DNA που μας ενδιαφέρει, αποφεύγοντας παράλληλα τις επιβλαβείς παρενέργειες στα κύτταρα (Molina et al., 2011).

Επιτυχημένα παραδείγματα της χρήσης των ΑΕ ως εργαλείων γονιδιακής στόχευσης, παρουσιάζονται από την εταιρεία Cellectis, SA (Romainville, Γαλλία), η οποία ανέπτυξε μια μέθοδο που συνδυάζει ημι-ορθολογική προσέγγιση μεταλλάξεων και διαλογή υψηλής απόδοσης (high-throughput screening) των μεταλλαγμάτων της I-Crel καταλήγοντας σε ετεροδιμερή ένζυμα με ανασχεδιασμένη ειδικότητα (Chames et al., 2005; Sylvain Arnould et al., 2006; Smith et al., 2006b). Με αυτόν τον τρόπο, εξέτασαν εκατομμύρια παραλλαγές που διέθεταν δύο έως τέσσερις μεταλλαγές αμινοξέων σε καίριες θέσεις που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση με το DNA στόχο. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή εκατοντάδων μεταλλαγμάτων της I-Crel, με τοπικά τροποποιημένα μοτίβα αναγνώρισης, τα οποία στη συνέχεια συνδυάστηκαν σε διαφορετικά σύνολα μεταλλαγμάτων, για την δημιουργία μια πλήρως ανασχεδιασμένης μεγανουκλεάσης. Με αυτήν την τεχνική η Cellectis κατάφερε να δημιουργήσει μια βιβλιοθήκη με περισσότερα από 30.000 μεταλλάγματα της I-Crel, ικανά να αναγνωρίσουν σχεδόν οποιαδήποτε επιθυμητή αλληλουχία DNA στόχου (Chames et al., 2005).

Μια διαφορετική προσέγγιση για τη σύνδεση δυο μονομερών διαφορετικών ενδονουκλεασών έχει επιχειρηθεί και μέσω κάποιου πεπτιδικού συνδέσμου (linker) με σκοπό να επιτευχθεί ο σχηματισμός ετεροδιμερών που αποτελούνται από συγκενικές μεγανουκλεάσες όπως η I-Dmol και η I-Crel (Silva & Belfort, 2004; Silva et al., 2006; B. S. Chevalier et al., 2002). Επίσης μια προσέγγιση κατασκευής ετεροδημερών της I-Crel, αποκλείοντας την πιθανότητα σχηματισμού ομοδιμερών παραπροϊόντων, προτείνεται από τον ερευνητή Fajardo-Sanchez και την ερευνητική του ομάδα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο σχεδιασμός του ετεροδιμερούς πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του αλγόριθμου FoldX, με τον οποίο επανασχεδιάστηκαν οι επιφάνειες αλληλεπίδρασης των μονομερών της φυσικής I-Crel (Fajardo-Sanchez et al., 2008).

Όπως αποδεικνύεται από τις παραπάνω προσεγγίσεις, ο ετεροδιμερισμός μπορεί να ευνοείται, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, έναντι του ομοδιμερισμού. Προκειμένου να κατευθύνουμε τον σχηματισμό του μορίου προς συγκεκριμένη επιθυμητή διαμόρφωση, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν κατάλληλες πρωτεϊνικές πλατφόρμες στήριξης (scaffold) που φέρουν τα διαφορετικά μονομερή σε κατάλληλο προσανατολισμό έτσι ώστε να ευνοηθεί στερεοχημικά ο ετεροδιμερισμός έναντι του ομοδιμερισμού. Σε προηγούμενες έρευνες που διεξήχθησαν από το εργαστήριο είχαν κατασκευασθεί χιμαιρικά μόρια των μεταλλαγμένων Ι-Crel μονομερών A₁₁ και M₈ (κατασκευασμένα από την εταιρία Cellectis) προσαρμοσμένα στον δομικό λίθο της Rop καθώς και του μεταλλάγματος RM6, με στόχο τη δημιουργία ινιδίων με ενεργότητα ενδονουκλεάσης και αφετέρου την απόδοση στην Ι-Crel νέων εξειδικεύσεων ως προς την αλληλουχία αναγνώρισης DNA. Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια μεταλλάγματα, A₁₁ και M₈ της I-Crel, ενώ ως πρωτεϊνική πλατφόρμα στήριξης, χρησιμοποιήθηκε, η αντίστροφη αλληλουχία της RM6, η πρωτεϊνη rRM6.



Εικόνα 1.7: Στρατηγική επαναπρογραμματισμού Μεγανουκλεασών. Δημιουργείται μια μεγάλη συλλογή μεταλλαγμάτων I-Crel, με τοπικά τροποποιημένη εξειδίκευση. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται μια συνδυαστική προσέγγιση για τη συναρμολόγηση αυτών των μεταλλαγμάτων σε ομοδιμερείς πρωτεΐνες, και στη συνέχεια σε ετεροδιμερή, με αποτέλεσμα την κατασκευή μεγανουκλεάσης με πλήρως ανασχεδιασμένη ειδικότητα (Smith et al., 2006a).

1.3 ΧΙΜΑΙΡΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ SARS-CoV-2

Στις αρχές Δεκεμβρίου 2019, σημειώθηκε έξαρση περιστατικών πνευμονίας, άγνωστης αιτιολογίας, στην πόλη Γουχάν, στην επαρχία Χουμπέι της Κίνας. Στις 31 Δεκεμβρίου 2019, ερευνητές του Ινστιτούτου ιολογίας Wuhan, διαπίστωσαν τον αιτιολογικό παράγοντα της νόσου που ονομάστηκε nCoV-2019 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ). Τελικά, η ερευνητική ομάδα «Coronaviridae Study Group» (CSG), ονόμασε επίσημα τον ιό ως SARS-CoV-2 με βάση την φυλογένεση και την ταξινόμηση. Ο γρήγορος ρυθμός μετάδοσης του ιού από άνθρωπο σε άνθρωπο συνέβαλε στη διάδοση της νόσου σε άλλες χώρες του κόσμου με αποτέλεσμα να κηρυχθεί επίσημα ως πανδημία από τον ΠΟΥ στις 12 Μαρτίου 2020 (Parikhani et al., 2021). Σύμφωνα με την πρόσφατη αναφορά της κατάστασης του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) στις 7 Σεπτεμβρίου 2021, ŋ πανδημία COVID-19 έχει φτάσει τα 221.134.742 επιβεβαιωμένα κρούσματα και έχει στοιχίσει τη ζωή σε 4.574.089, όπως τεκμηριώθηκε παγκοσμίως σε 223 χώρες παγκοσμίως (WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data).

Ο COVID-19 είναι κατά μέσω όρο 10-100 φορές πιο θανατηφόρος από την εποχιακή γρίπη, λαμβάνοντας υπόψιν ότι τα ποσοστά θνησιμότητας διαφοροποιούνται από χώρα σε χώρα ανάλογα με τις ιατρικές υποδομές. Η πλειοψηφία των ασθενών που είναι θετικοί στην Covid-19 (υπολογίζεται περίπου στο 70%-80%) εμφανίζουν συμπτώματα όπως πυρετό με ρίγος, έντονο μυϊκό άλγος, βήχα και άλλα συμπτώματα συμβατά με λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού τα οποία υποχωρούνε μετά από 2-3 εβδομάδες. Ωστόσο το υπόλοιπο 20%-30% αυτών των ασθενών θα χρειαστούν νοσηλεία, περίπου 5% θα νοσήσουν βαριά και θα χρειαστούν εντατική θεραπεία ενώ ένα μικρό ποσοστό καταλήγει να αναπτύξει σοβαρή πνευμονία (σύνδρομο οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας) καρδιαγγειακή βλάβη, οξεία νεφρική ανεπάρκεια, καταστροφική πολυοργανική ανεπάρκεια, πιθανώς λόγω αυξημένης συγκέντρωσης κυτοκινών που οφείλεται στην γενικευμένη ανοσολογική απόκριση του ασθενή(Huang et al., 2020; Lake, 2020; Mehta et al., 2020). Το ποσοστό των συμπτωματικών φορέων του ιού είναι άγνωστο, λόγω του ανεπαρκούς ελέγχου αντισωμάτων στον γενικό πληθυσμό. Η διαλυτή ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ACE2 έχει φανεί ότι μπορεί να μειώσει δραστικά τους τίτλους του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες, δεσμεύοντας τον ιό και αποτρέποντας την εκ νέου μόλυνση (Monteil et al., 2020).

Ο SARS-CoV-2 είναι ένας ιός με μονόκλωνο RNA (+ssRNA), θετικής πολικότητας, ο οποίος ανήκει στο γένος του Beta-coronavirus στην οικογένεια Coronaviridae (Naqvi et al., 2020). Το γονιδίωμα του SARS-CoV-2, το οποίο αλληλουχήθηκε πρόσφατα, έχει μήκος 29,9 kb και παρουσιάζει ~ 78% ομολογία ακολουθίας με τον SARS-CoV (Naqvi et al., 2020; Lu et al., 2020). Το γονιδιωματικό RNA του SARS-CoV-2 περιλαμβάνει δύο μεγάλα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), ORF1a και ORF1b, τα οποία αποτελούν τα δύο τρίτα το γονιδιώματος και μεταφράζονται στις πρωτεΐνες pp1a και pp1b. Το γονιδίωμα του ιού κωδικοποιεί 2 πρωτεάσες κυστεΐνης, μια πρωτεάση που μοιάζει με παπαΐνη (PLpro) ή nsp3 και μια πρωτεάση που μοιάζει με 3C-πρωτεΐνες (Wu et al., 2020; Gordon et al., n.d.).



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση του σωματιδίου του ιού SARS-CoV-2 και του γονιδιώματός του. (a) Τέσσερις δομικές πρωτεΐνες του SARS-CoV-2: πρωτεΐνη ακίδας (S), πρωτεΐνη μεμβράνης (M), νουκλεοκασπιδική πρωτεΐνη (N) και πρωτεΐνη φακέλου (E). (b) Το γονιδίωμα περιλαμβάνει ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-ORF6-ORF7 (7a και 7b) -ORF8-ORF9b-N κατά σειρά. Δεκαέξι μη δομικές πρωτεΐνες (nsp1-11, 12-16) κωδικοποιούνται από τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης ORF1a και ORF1b, αντίστοιχα, επίσης έχουν οριστεί έξι βοηθητικές πρωτεΐνες. Plpro, 3CLPro, RdRp, Hel ελικάση, S η οποία αποτελείται από τις εξής υπομονάδες: NTD N-terminal domain, RBD, SD1, SD2, FL fusion loop, HR1, HR2, TM. Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει την θραύση μεταξύ της θέσης S1/S2 και S2΄ από τις πρωτεάσες «Furin» και «TMPRSS2» (Zhang et al., 2021).

Ο πυρήνας της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RNA- dependent RNA polymerase, RdRp) αποτελείται από την nsp12, απαραίτητη πρωτεΐνη για την αντιγραφή/μεταγραφή του γενετικού υλικού του ιού. Οι πρωτεΐνες nsp7 και nsp8 συνεισφέρουν στην σύνδεση nsp12 με το πρόδρομο-εκμαγείο RNA. То υπόλοιπο ένα τρίτο του γονιδιώματος διαθέτει αλληλεπικαλυπτόμενα ORFs, που κωδικοποιούν τέσσερις κύριες δομικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των S (γλυκοπρωτεΐνη ακίδας), N (πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου), Μ (πρωτεΐνη μεμβράνης) και Ε (πρωτεΐνη καψιδίου) και μερικές βοηθητικές πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη S αποτελείται από το πεπτίδιο οδηγό (signal peptide, SP), την επικράτεια πρόσδεσης στον υποδοχέα (receptor-binding domain, RBD), τις υπομονάδες SD1 και SD2, της μονάδας S1. Το πεπτίδιο σύντηξης (fusion peptide, FP), την επανάληψη επτάδας 1 (HR1), την επανάληψη επτάδας 2 (HR2), και τη διαμεμβρανική επικράτεια (TM), της μονάδας σύντηξης μεμβράνης S2 (Zhang et al., 2021). Ο SARS-CoV-2 κωδικοποιεί επίσης βοηθητικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των ORF3, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 και ORF9b, οι οποίες είναι όλες κατανεμημένες μεταξύ των δομικών γονιδίων (Wu et al., 2020).

Οι κορονοϊοί χρησιμοποιούν την ομοτριμερή πρωτεΐνη ακίδας (που περιλαμβάνει μια μονάδα S1 και μια μονάδα S2 σε κάθε μονομερές) του καψιδίου τους, προκειμένου να συνδεθούν με τους υποδοχείς ACE2 (ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2) στις μεμβράνες των κυττάρων-ξενιστή. Μια τέτοια δέσμευση πυροδοτεί έναν καταρράκτη γεγονότων που οδηγεί στη σύντηξη κυτταρικών και ιικών μεμβρανών για την είσοδό τους στα κύτταρα-ξενιστή(Lan et al., 2020). Πρόσφατες μελέτες τόνισαν επίσης τον σημαντικό ρόλο του ACE2 στη διαμεσολάβηση εισόδου του SARS-CoV-2 στα κύτταρα-ξενιστές. In vitro μετρήσεις δέσμευσης έδειξαν επίσης ότι η επικράτεια RBD του SARS-CoV-2 συνδέεται με υψηλή συγγένεια στον ACE2, υποδεικνύοντας την βασική λειτουργική σημασία της RBD (εντός της μονάδας S1), υπεύθυνη για τη σύνδεση του SARS-CoV-2 στον ACE2 (Walls et al., 2020). Πιο συγκεκριμένα



Εικόνα 1.9: Συνολική δομή της RBD του SARS-CoV-2 που συνδέεται με το ACE2. (α) Συνολική τοπολογία του μονομερούς ακίδας SARS-CoV-2. FP, πεπτίδιο σύντηξης. HR1, επανάληψη επτάδας 1 · HR2, επανάληψη επτάδας 2. IC, ενδοκυτταρική επικράτεια. NTD, N-τερματική επικράτεια. SD1, υπομονάδα 1. SD2, υπομονάδα 2. TM, διαμεμβρανική περιοχή. (b) Πρωτεϊνική Αλληλουχία και Δευτεροταγής δομή του SARS-CoV-2 RBD. Η αλληλουχία RBM (μοτίβο πρόσδεσης υποδοχέα) εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα. (c) Δομή συμπλόκου RBD/ACE2. Το ACE2 εμφανίζεται με πράσινο χρώμα. Ο πυρήνας (core) SARS-CoV-2 RBD εμφανίζεται με κυανό χρώμα και το RBM με κόκκινο χρώμα. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί στο SARS-CoV-2 υποδεικνύονται με βέλη. Η N-τελική έλικα του ACE2 που είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση είναι επισημασμένη (Lan et al., 2020).

στην S1 συμπεριλαμβάνεται η επικράτεια πρόσδεσης στον υποδοχέα (RBD), η οποία προσδένεται απευθείας στην επικράτεια πεπτιδάσης (PD) που διαθέτει ο ACE2. Η S2 από την άλλη είναι υπεύθυνη για την σύντηξη των κυτταρικών μεμβρανών. Κατά την διάρκεια της ιικής μόλυνσης, το ομοτριμερές της ακίδας κόβεται μεταξύ των μονάδων S1 και S2, η S1 αλλάζει διάταξη και προσδένεται στον ACE2, αποκαλύπτοντας μια νέα θέση κοπής στην S2, η πέψη της συγκεκριμένης, παρουσιάζει καταλυτικό ρόλο στη διαδικασία της μόλυνσης (Yan et al., 2020).

Αν και ο ACE2 αξιοποιείται από κάποιους κορονοϊούς, ο κύριος φυσιολογικός του ρόλος αφορά την ωρίμανση της αγγειοτενσίνης (Ang), μιας πεπτιδικής ορμόνης που ελέγχει την αγγειοσυστολή και την αρτηριακή πίεση. Ο ACE2 είναι μια πρωτεΐνη μεμβράνης τύπου Ι που εκφράζεται στους πνεύμονες, την καρδιά, τα νεφρά και το έντερο. Μειωμένη έκφραση του ACE2 έχει συσχετιστεί με καρδιαγγειακές παθήσεις. Ο πλήρους μήκους ACE2 αποτελείται από την επικράτεια PD στο αμινοτελικό του άκρο και την επικράτεια CLD (collectrin-like domain) στο καρβοξυτελικό του άκρο, η οποία καταλήγει σε μια διαμεμβρανική έλικα και ένα ενδοκυτταρικό τμήμα περίπου 40 αμινοξικών καταλοίπων. Η επικράτεια PD του ACE2 διασπά την αγγειοτενσίνη (Ang) Ι, προς παραγωγή Ang-(1-9), η οποία στην συνέχεια επεξεργάζεται περαιτέρω από άλλα ένζυμα, προκειμένου να παραχθεί Ang-(1-7). Ο ACE2 μπορεί επίσης να επεξεργαστεί απευθείας την Ang ΙΙ προς παραγωγή Ang-(1-7). Οι δομές της επικράτειας PD του ACE2 μεμονομένης και σε σύμπλεγμα με την RBD ή την πρωτεΐνη S του SARS-CoV, αποκάλυψαν τις μοριακές λεπτομέρειες της αλληλεπίδρασης μεταξύ της RBD της πρωτεΐνης S και της PD του ACE2 (Yan et al., 2020).



Εικόνα 1.10: Δομή συμπλόκου ACE2-B⁰AT1. (a) σχηματική αναπαράσταση του ατομικού μοντέλου του συμπλόκου ACE2-B⁰AT1. Οι γλυκοζυλιωμένες επιφάνειες παρουσιάζονται ως "sticks". Το σύμπλοκο έχει χρωματιστεί ανά υπομονάδα, όπως παρατηρείται στο μονομερές της ACE2 με τις επικράτειες PD και CLD χρωματισμένες κυανή και μπλε, αντίστοιχα. (b) Η «ανοιχτή» διαμόρφωση του συμπλόκου ACE2-B⁰AT1. Οι 2 επικράτειες PD που αλληλεπιδρούσαν μεταξύ τους στην «κλειστή» διαμόρφωση, έχουν διαχωριστεί στην «ανοιχτή» διαμόρφωση (Yan et al., 2020).

Ο ACE2 λειτουργεί επίσης ως τσαπερόνη για τη διακίνηση, μεταξύ μεμβρανών, του μεταφορέα ουδέτερων αμινοξέων B⁰AT1, επίσης γνωστό ως SLC6A19 (25), ο οποίος μεσολαβεί στην πρόσληψη ουδέτερων αμινοξέων στα εντερικά κύτταρα με τρόπο εξαρτώμενο από το νάτριο. Σε πρόσφατη έρευνα ο Yan και συνεργάτες παρουσιάζουν δομές κρυο-ηλεκτρονικής

μικροσκοπίας του ACE2 σε πλήρες μήκος, παρουσία του μεταφορέα ουδέτερων αμινοξέων B⁰AT1, με ή χωρίς την παρουσία του RBD της πρωτεΐνης ακίδας (S protein) του SARS-CoV-2, και στις δύο περιπτώσεις σε υψηλότερη ανάλυση (overall resolution) 2.9 angstroms. Το σύμπλοκο ACE2-B⁰AT1 οργανώνεται ως διμερές ετεροδιμερών. Η επικράτεια RBD αναγνωρίζεται από την εξωκυττάρια επικράτεια PD του ACE2, κυρίως μέσω πολικών αμινοξικών καταλοίπων (Yan et al., 2020).

Σε αντίθεση με το σύμπλοκο ACE2-B⁰AT1, το οποίο διαθέτει δύο διαμορφώσεις την «κλειστή» και την «ανοιχτή», στην περίπτωση του τριαδικού συμπλόκου RBD-ACE2- B⁰AT1 παρατηρήθηκε μόνο η «κλειστή» διαμόρφωση. Όπως ήταν αναμενόμενο κάθε PD επικράτεια αλληλεπιδρά με μία RBD (Yan et al., 2020).



Εικόνα 1.11: Δομή του συμπλόκου RBD-ACE2- B^oAT1. (a) Χάρτης κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του συμπλόκου RBD-ACE2-B^oAT1. Στο πλαίσιο φαίνεται μεγεθυμένη η RBD. (b) σχηματική αναπαράσταση του ατομικού μοντέλου του συμπλόκου RBD-ACE2-B^oAT1. Οι γλυκοζυλιωμένες επιφάνειες παρουσιάζονται ως "sticks". Το σύμπλοκο έχει χρωματιστεί ανά υπομονάδα, όπως παρατηρείται στο μονομερές της ACE2 με τις επικράτειες PD και CLD χρωματισμένες κυανή και μπλε, αντίστοιχα. Οι δύο RBD επικράτειες φαίνονται με κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα (Yan et al., 2020).



Εικόνα 1.12: Δομές κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της πρωτεΐνης ακίδας του SARS-CoV-2 (S Glycoprotein). (a) «Κλειστή» διαμόρφωση του τριμερούς της πρωτεΐνη ακίδας. (b) Μερικώς «ανοιχτή» διαμόρφωση τριμερούς της πρωτεΐνης της ακίδας (μόνο ένα μονομερές S^B βρίσκεται στην «ανοιχτή» διαμόρφωση) (Walls et al., 2020).

Ο B⁰AT1 δεν εμπλέκεται στον διμερισμό του ACE2, υποδηλώνοντας την ύπαρξή του ως ομοδιμερές ακόμη και απουσία του B⁰AT1. Περαιτέρω εξέταση απέδειξε πως ένα διμερές ACE2 μπορεί να προσδέσει δύο τριμερή πρωτεΐνης S, το καθένα αλληλεπιδρα με ένα μονομερές του ACE2. Η τριμερής δομή της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 αναφέρθηκε πρόσφατα, πως παρουσιάζει μια επικράτεια RBD στην «ανοιχτή» διαμόρφωση με τις υπόλοιπες δύο στην «κλειστή» διαμόρφωση (Yan et al., 2020).

Όσον αφορά τις επιφάνειες αλληλεπίδρασης μεταξύ της επικράτειας RBD του SARS-CoV-2 με τον ACE2, παρουσιάζουν ομοιότητα με αυτές του SARS-CoV και ACE2. Πιο συγκεκριμένα, Μια εκτεταμένη περιοχή βρόχου του RBD εκτείνεται σαν «γέφυρα», προς την α₁-έλικα της PD επικράτειας του ACE2. Η α₂-έλικα και ένας βρόχος που συνδέει τους αντιπαράλληλους κλώνους β3 και β4, που αναφέρονται ως βρόχος 3-4 της επικράτειας PD, παρουσιάζουν περιορισμένη συνεισφορά στον συντονισμό του RBD. Η επαφή εντοπίζεται σε τρεις περιοχές. Τα δύο άκρα της «γέφυρας» αλληλεπιδρούν με τα N- και C-άκρα της α₁-έλικας, καθώς και με περιορισμένες περιοχές της α₂-έλικας και του βρόχου 3-4 της επικράτειας PD. Το μεσαίο τμήμα της α₁ ενισχύει την αλληλεπίδραση εμπλέκοντας δύο πολικά αμινοξικά κατάλοιπα. Στο N-άκρο της α₁, το Gln⁴⁹⁸, Thr⁵⁰⁰ και το Asn⁵⁰¹ του RBD σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου με Tyr41, Gln⁴², Lys³⁵³



Εικόνα 1.13: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ SARS-CoV-2-RBD και ACE2. (a) Η επικράτεια PD του ACE2 αλληλεπιδρά κυρίως μέσω της α₁-έλικας στην αναγνώριση του RBD. Η α₂-έλικα και ο βρόχος 3-4 συμβάλλουν επίσης στην αλληλεπίδραση. Εμφανίζεται μόνο ένα σύμπλοκο RBD-ACE2. **(b-d)** Λεπτομερής ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ SARS-CoV-2-RBD και ACE2. Οι πολικές αλληλεπιδράσεις υποδεικνύονται με κόκκινες διακεκομμένες γραμμές. NAG, N-ακετυλογλυκοζαμίνη (Yan et al., 2020)

και Arg³⁵⁷ από τον ACE2. Στη μέση της γέφυρας, τα Lys⁴¹⁷ και Tyr⁴⁵³ του RBD αλληλεπιδρούν με τα Asp³⁰ και His³⁴ του ACE2, αντίστοιχα. Στο C-άκρο της α_1 , το Gln⁴⁷⁴ του RBD συνδέεται με δεσμό υδρογόνου με το Gln24 του ACE2, ενώ το Phe486 του RBD αλληλεπιδρά με το Met⁸² του ACE2 μέσω των δυνάμεων van der Waals(Yan et al., 2020).

Παρόλη την συνολική ομοιότητα μεταξύ των SARS-CoV-2 και SARS-CoV, οι βασικές μεταλλάξεις που έχουν συμβεί και τους διαφοροποιούν σε επίπεδο αλληλουχίας και δομής, παρατηρούνται στις περιοχές αλληλεπίδρασης με τον ACE2. Όσον αφορά την αλληλεπίδραση στο N-άκρο της α₁-έλικας παρατηρούνται διαφορές Arg⁴²⁶ \rightarrow Asn⁴³⁹, Tyr⁴⁸⁴ \rightarrow Gln⁴⁹⁸, και Thr⁴⁸⁷ \rightarrow Asn⁵⁰¹, μεταξύ SARS-CoV- RBD και SARS-CoV-2-RBD. Περισσότερες διαφορές παρουσιάζονται στο ενδιάμεσο της «γέφυρας». Η πιο σημαντική αλλαγή είναι η αντικατάσταση του Val⁴⁰⁴ στο SARS-CoV-RBD με το Lys⁴¹⁷ στο SARS-CoV-2-RBD. Επιπλέον, από το SARS-CoV-RBD στο SARS-CoV-2-RBD, η υποκατάσταση των καταλοίπων Tyr⁴⁴² \rightarrow Leu⁴⁵⁵, Leu⁴⁴³ \rightarrow Phe⁴⁵⁶, Phe⁴⁶⁰ \rightarrow Tyr⁴⁷³, και Asn⁴⁷⁹ \rightarrow Gln⁴⁹³ μπορεί επίσης να τροποποιήσει τη συγγένεια για τον ACE2. Στην αλληλεπίδραση με το C-άκρο της α₁-έλικας, το κατάλοιπο Leu472 του SARS-CoV-RBD αντικαταστάθηκε από Phe⁴⁸⁶ στον SARS-CoV-2-RBD (Yan et al., 2020).



Συγκρίνοντας τις επιφάνειες αλληλεπίδρασης των SARS-CoV-2 και SARS-CoV με τον ACE2, παρατηρείται πως ορισμένες μεταλλάξεις ενισχύσουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ SARS-CoV-2-RBD και ACE2 και άλλες φαίνεται να μειώνουν τη συγγένεια σε σύγκριση με το SARS- CoV-RBD προς τον ACE2. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη από Val⁴⁰⁴ σε Lys³¹⁷ μπορεί να οδηγήσει σε πιο στενή επαφή λόγω του σχηματισμού γέφυρας άλατος μεταξύ Lys³¹⁷ και Asp³⁰ του ACE2. Η αλλαγή από Leu⁴⁷² σε Phe⁴⁸⁶ μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ισχυρότερη επαφή van der Waals με το Met⁸². Ωστόσο, η αντικατάσταση του Arg⁴²⁶ με Asn⁴³⁹ φαίνεται να αποδυναμώνει την αλληλεπίδραση εξαλείφοντας μία σημαντική γέφυρα άλατος με το Asp³²⁹ του ACE2 (Yan et al., 2020).

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, η πρωτεΐνη της ακίδας (S glycoprotein) βρίσκεται εκτεθειμένη στην επιφάνεια του ιού και μεσολαβεί για την είσοδο στα κύτταρα ξενιστές. Καθώς είναι ο κύριος στόχος των αντισωμάτων εξουδετέρωσης (Neutralizing Antibodies) κατά τη μόλυνση, έχει τοποθετηθεί στο επίκεντρο της μελέτης για τον σχεδιασμό φαρμάκων και εμβολίων. Τα τριμερή S είναι διακοσμημένα με N-γλυκάνες οι οποίες είναι σημαντικές για τη σωστή αναδίπλωσή της, ιδιαίτερη σημασία για την μετάβαση από την «κλειστή» στην «ανοιχτή» διαμόρφωση της επικράτειας RBD, φαίνεται να παίζουν οι Ν-γλυκάνες που είναι συνδεδεμένες με τα κατάλοιπα Asn¹⁶⁵ και Asn²³⁴. Εκτός από τον δομικό τους ρόλο, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς, λειτουργούν ως «καμουφλάζ» προσφέροντας στον ιό προστασία από το ανοσοποιητικό του ξενιστή. Ωστόσο, για να λειτουργήσει αποτελεσματικά, η ακίδα χρειάζεται να αναγνωρίζει και να συνδέεται με τους υποδοχείς ACE2. Για το λόγο αυτό, το μοτίβο RBM χρειάζεται να είναι πλήρως εκτεθειμένο και προσβάσιμο. Με βάση αυτό το σενάριο, συγκεκριμένες Ν-γλυκάνες συνεισφέρουν σε μια μεγάλη αλλαγή στη διαμόρφωση, που επιτρέπει στο RBD να αναδυθεί πάνω από την κάλυψη της «ασπίδας» των Ν-γλυκανών. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η στόχευση της «κλειστής» διαμόρφωσης RBD από αντισώματα φαίνεται πως είναι αναποτελεσματική, αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με δομικά δεδομένα που αναφέρουν την «ανοιχτή» διαμόρφωση ως προϋπόθεση για την εξουδετέρωση (neutralization) του RBD από αντισώματα εξουδετέρωσης του ξενιστή (Casalino et al., 2020).

Σύμφωνα με τις πληροφορίες που αναφέρθηκαν, προκειμένου να πλησιάσουμε την φυσική παρουσία της «ανοιχτής» διαμόρφωσης RBD του SARS-Cov-2 και από δομική αλλά και στοιχειομετρική άποψη, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν κατάλληλες πρωτεϊνικές πλατφόρμες στήριξης (scaffold) που φέρουν το μοτίβο RBM και την α₁-έλικα της επικράτειας PD του ACE2 σε κατάλληλο προσανατολισμό έτσι ώστε να ευνοηθεί στερεοχημικά η αλληλεπίδρασή τους. Ως πρωτεϊνική πλατφόρμα στήριξης χρησιμοποιήθηκε το μετάλλαγμα της πρωτεΐνης Rop (Repressor Of Primer), η RM6.

1.4 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΠΛΑΤΦΟΡΜΕΣ ΣΤΗΡΙΞΗΣ (SCAFFOLDS) ΒΑΣΙΣΜΕΝΕΣ ΣΕ Α-ΕΛΙΚΟΕΙΔΗ ΔΕΜΑΤΙΑ

Τα 4-α-ελικοειδή δεμάτια σχηματίζονται από 4 αντιπαράλληλες α-έλικες που σχηματίζουν γωνία 20°. Είναι αμφιπαθή, καθώς οι έλικες διευθετούνται ανά ζεύγη, πακετάρονται η μία απέναντι στην άλλη και χαρακτηρίζονται από ένα συγκεκριμένο μοτίβο επανάληψης υδρόφιλων και υδρόφοβων αμινοξέων με περιοδικότητα επτά αμινοξέων, το μοτίβο της «επανάληψης της επτάδας» (Crick, 1953). Πιο συγκεκριμένα, τα αμινοξάα που συμμετέχουν στο μοτίβο «επανάληψης της επτάδας», συμβολίζονται με τα γράμματα a-g (Cohen & Parry, 1990) όπου τα κατάλοιπα στις θέσεις a και d είναι υδρόφοβα και οι πλευρικές τους ομάδες πακετάρονται προς το εσωτερικό της δομής σύμφωνα με το μοντέλο «κουμπιά σε τρύπες» ("knobs in holes" model) σχηματίζοντας τον υδρόφοβο πυρήνα των 4-α-ελικοειδών δεματίων (Banner, 1987). Σύμφωνα με τον Crick, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων 2 α-ελίκων βελτιστοποιούνται όταν οι 2 α-έλικες τυλίγονται μεταξύ τους σε μια διπλή υπερέλικα, μια διευθέτηση που ονομάζεται σπειρωμένο σπείραμα (coiled coils), μέσω του μοτίβου της «επανάληψης της επτάδας»

Η πρωτεΐνη Rop (Repressor Of Primer) είναι μια μικρή διμερής πρωτεΐνη του βακτηρίου *E.coli*, η οποία παίρνει μέρος στο μηχανισμό ελέγχου των αντιγράφων των πλασμιδίων ColE1 της E.coli. Πιο συγκεκριμένα η Rop αλληλεπιδρά με δυο μόρια RNA, το RNA Ι και το RNA ΙΙ, ελέγχοντας αρνητικά τη συχνότητα των γεγονότων έναρξης της αντιγραφής (Castagnoli et al., 1989).Η Rop αποτελεί παράδειγμα αριστερόστροφου, αντιπαράλληλου 4-α -ελικοειδούς δεματίου, και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως ένα πολύ καλό μοντέλο για τη διερεύνηση σχέσεων αλληλουχίαςδομής κατά την αναδίπλωση των δεματίων, και γενικά των πρωτεϊνών. Το RM6 είναι ένα από τα μεταλλάγματά της, προέκυψε μετά από την αφαίρεση των αμινοξικών καταλοίπων 30-34 (περιοχή στροφής), γεγονός που προκάλεσε την πλήρη αναδιοργάνωση του δεματίου. Πιο συγκεκριμένα, αποτελεί ένα ομοτετραμερές, αντιπαράλληλο, αριστερόστροφο 4- α-δεμάτιο, με μήκος 78Å και διάμετρο 28Å, το οποίο διατηρεί την οργάνωση του υδρόφοβου πυρήνα σε κατανομή "adad". Κάθε μονομερές αντιστοιχεί σε μια αλυσίδα του Rop σε συνεχή έλικα και όχι σε μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα. Οι τέσσερις έλικες περιελίσσονται η μια γύρω από την άλλη και σχηματίζουν ένα αριστερόστροφο σπειρωμένο σπείραμα (δομή coiled coil), το οποίο σχηματίζεται μέσω διπλού κρυσταλλογραφικού άξονα συμμετρίας. Το δεμάτιο του RM6 είναι αρνητικά φορτισμένο στο μέσον του και θετικά φορτισμένο στα άκρα του, κάτι εντελώς διαφορετικό από το αγρίου τύπου Rop, το οποίο χαρακτηρίζεται από δυο επιφάνειες, μια θετικά φορτισμένη και μια αρνητικά φορτισμένη. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα Rop-μεταλλάγματα, το RM6 είναι πιο σταθερό από την αγρίου τύπου Rop (wild type Rop), το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό σε συνδυασμό με την συμμετρία του μορίου του (Glykos et al., 2006), το καθιστά εξαιρετική επιλογή για την χρήση του ως πρωτεϊνική πλατφόρμα στήριξης.



Εικόνα 1.15: Σχέσεις αλληλουχίας-δομής των μορίων της οικογένειας Rop. Σύγκριση μεταξύ των αλληλουχιών, των δομών και των τοπολογικών διαγραμμάτων της Rop άγριου τύπου (PDB 1rop), των μεταλλαγμάτων A31P (PDB 1b6q), A₂I₂ (PDB 1f4n) και RM6 (PDB 1qx8). Στις στοιχισμένες αλληλουχίες (επάνω), οι διαφορές μεταξύ τους επισημαίνονται χρησιμοποιώντας έντονα κόκκινα γράμματα. Τα υπογραμμισμένα αμινοξέα στην αλληλουχία RM6 (συν το Gln34 στην ακολουθία Rop άγριου τύπου) αντιστοιχούν σε αμινοξικά κατάλοιπα που καταλαμβάνουν τις θέσεις a και d της επανάληψης της επτάδας. Η σχηματική αναπαράσταση των δομών (κέντρο) που αντιστοιχούν στις αλληλουχίες, έχει προσαρμοστεί στην ίδια κλίμακα και προσανατολιστεί ώστε να ευθυγραμμιστούν (τόσο στον προσανατολισμό όσο και τη θέση) με την έλικα που εμφανίζεται με ένα βέλος στη δομή A31P. Το χρωματικό μοτίβο που χρησιμοποιείται, είναι το ίδιο για όλες τις δομές και αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο χρωματικό φάσμα για κάθε μονομερές (αλυσίδα πολυπεπτιδίου) που κυμαίνεται από μπλε για το N-άκρο έως κόκκινο για το C-άκρο. Στα τοπολογικά διαγράμματα (κάτω), κάθε κύκλος αντιστοιχεί σε μία α-έλικα, με το χρώμα του να υποδηλώνει τη σχετική κατεύθυνση της έλικας. Οι βρόχοι σύνδεσης αναπαρίστανται ως πράσινες γραμμές (Glykos et al., 2006).

Αποτέλεσμα πρόσφατης έρευνας του εργαστηρίου μας (διδακτορική διατριβή Dr. Κεφάλα A.), ήταν η παραγωγή της αντίστροφης αλληλουχίας rRM6. Σύμφωνα με την προσέγγιση της εργασίας δοκιμάστηκε η πιο ακραία περίπτωση διαφοράς μεταξύ 2 αμινοξικών αλληλουχιών, που είναι η σύγκριση μιας αλληλουχίας με την αντίστροφή της, προκειμένου να προσδιοριστούν οι διάφορες καταστάσεις οι οποίες χαρακτηρίζουν το μονοπάτι αναδίπλωσης της. Ο σχεδιασμός του μεταλλάγματος βασίστηκε στη αντιστροφή της αλληλουχίας του RM6. Πιο συγκεκριμένα η RM6 και η rRM6 είναι πολύ κοντά στον τρόπο που αναδιπλώνονται, καθώς το μονομερές τους είναι μια συνεχόμενη α-έλικα με τα υδρόφοβα-πολικά κατάλοιπά της, οργανωμένα σύμφωνα με το μοτίβο «επανάληψης της επτάδας». Σύμφωνα με βιοφυσικές μελέτες, το rRM6 εμφανίζεται ως ομοτετραμερές, αντιπαράλληλο, αριστερόστροφο 4-α-δεμάτιο, με τις 4-α-έλικες να σχηματίζουν σπειρωμένο σπείραμα (δομή coiled coil). Όσον αφορά τη συμπεριφορά τους κατά τη θερμική αποδιάταξη (εύρος θερμοκρασιών 20-90°C), φάνηκε πως το rRM6 είναι μια πολύ σταθερή α -ελικοειδής πρωτεΐνη, με πολύ παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά του RM6, με Tm (protein melting point) 92°C. Έκαστες διατηρούν ένα πολύ υψηλό α-ελικοειδές περιεχόμενο έως και τη μέγιστη θερμοκρασία του πειράματος (Kefala et al., 2021).

2. Σκοπός της Διατριβής

Η παρούσα εργασία αφορά την μελέτη 2 χιμαιρικών πρωτεϊνών που σχεδιάστηκαν με βάση την σύνδεση διαφορετικών λειτουργικών μονάδων σε πρωτεϊνικές πλατφόρμες στήριξης ή ικριώματα (scaffolds), έτσι ώστε να ευνοείται η αλληλεπίδρασή τους και να δημιουργηθούνε νέες ιδιότητες. Τα πρωτεϊνικά ικριώματα που προτείνουμε είναι το μετάλλαγμα της Rop (Repressor Of Primer), η RM6 και η αντίστροφη αλληλουχία της, rRM6.

Μέρος Α:

Όσον αφορά την πρώτη χιμαιρική πρωτεΐνη, αποτελείται από 2 μεταλλάγματα της I-Crel, κατασκευασμένα από την εταιρία Cellectis. Τα μεταλλάγματα συμβολίζονται M₈, A₁₁ αντίστοιχα και οι αλληλουχίες αναγνώρισής τους αντιστοιχούν σε γονίδιο υπεύθυνο για την ασθένεια Xeroderma Pigmentosum. Η πρωτεϊνική πλατφόρμα που χρησιμοποιήθηκε είναι η rRM6, σε προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου (διδακτορική διατριβή Dr. Αμπράζη M.) χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια μεταλλάγματα της I-Crel με την πλατφόρμα RM6-T19P, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενεργού I-Crel ετεροδιμερούς. Ωστόσο παρατηρήθηκαν τόσο διμερή όσο και τετραμερή, τα οποία με την πάροδο του χρόνου σχημάτιζαν συσσωματώματα, τα οποία μελετήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) και παρατηρήθηκε η ύπαρξη ινωδών δομών. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η χιμαιρική πρωτεΐνη με βιοφυσικές τεχνικές (Size-Exclusion Chromatography, CD, Transmission electron microscopy), προκειμένου να χαρακτηριστεί περαιτέρω ο σχηματισμός χιμαιρικών πρωτεϊνών πάνω στο ικρίωμα rRM6, καθώς και να ελεγχθεί η οργάνωσή του σε μεγαλύτερες δομές.

Μέρος Β:

Όσον αφορά την δεύτερη χιμαιρική πρωτεΐνη, ως πλατφόρμα στήριξης έχει χρησιμοποιηθεί η RM6 στην οποία έχει προσαρμοστεί στο N-άκρο η α₁-έλικα του ανθρώπινου υποδοχέα ACE2 και στο C-άκρο το μοτίβο RBM της πρωτεΐνης ακίδας (S glycoprotein) του SARS-CoV-2, ούτως ώστε, από γεωμετρική άποψη, να βρίσκονται σε απόσταση αλληλεπίδρασης. Η συγκεκριμένη χιμαιρική πρωτεΐνη μελετήθηκε με υπολογιστικές μεθόδους, χρησιμοποιώντας προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (MD simulations), προκειμένου να διαπιστωθεί αν ευνοείται στερεοχημικά η αλληλεπίδρασή τους, έτσι ώστε να προσομοιάσουμε την φυσική αλληλεπίδρααση της «ανοιχτής» διαμόρφωσης RBD του SARS-Cov-2 με τον ανθρώπινο υποδογέα ACE2, τόσο από δομική όσο και από στοιχειομετρική σκοπιά. Επιπλέον μετά την υπολογιστική προσέγγιση, προχωρήσαμε σε πειράματα έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης.

3. <u>Υλικά και Μέθοδοι</u>

3.1 Σχεδιασμός Πρωτεϊνικών Μοντέλων

Τρία μοντέλα σχεδιάστηκαν και στην συνέχεια μελετήθηκαν με προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (MD). Πιο συγκεκριμένα, σχεδιάστηκε ένα μοντέλο RM6/RBM, το οποίο αποτελείται από την RM6, συνδεδεμένη στο C-άκρο της με το μοτίβο RBM. Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν δύο μοντέλα A1/RM6/RBM, η α1-έλικα του ACE2 (A1) και το μοτίβο RBM τοποθετήθηκαν στο Nάκρο και στο C-άκρο της RM6, αντίστοιχα. Αυτό επιτρέπει την αλληλεπίδραση του A1 με το RBM διαφορετικών μονομερών. Στην μία περίπτωση η αρχική διευθέτηση του Α1 και RBM προέρχεται από την κρυσταλλική δομή 6ΜΟΙ, διατηρώντας την αλληλεπίδρασή τους, ενώ στη δεύτερη (Free A1/RM6/RBM), τα μοτίβα Α1 και RBM δεν αλληλεπιδρούν. Τα μοντέλα σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος «Ensemble Optimization Method» (EOM). Χρησιμοποιώντας την πρωτεϊνική αλληλουχία της χιμαιρικής πρωτεΐνης και τις πρωτεϊνικές επικράτειες που συντελούν τη χιμαιρική πρωτεΐνη με συμμετρία «p222» (απομονωμένα με τη βοήθεια του προγράμματος PyMOL από τις κρυσταλλικές δομές 6MOJ και 1QX8). Επιλέχθηκε ένα από τα 10 μοντέλα που προέκυψαν, το οποίο επεξεργάστηκε περαιτέρω με τη βοήθεια του προγράμματος Chimera, προκειμένου να βελτιώσουμε τους βρόγχους που διαθέτει. Τα συγκεκριμένα βήματα ακολουθήθηκαν και για τα τρία μοντέλα, τα οποία μετά το σχεδιασμό τους χρησιμοποιήθηκαν για προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (MD).



Εικόνα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση των μοντέλων χιμαιρικών πρωτεϊνών. Fixed ACE2/RM6/RBM: η αρχική διευθέτηση του A₁ και RBM προέρχεται από την κρυσταλλική δομή 6M0J. **Free ACE2/RM6/RBMQ** τα μοτίβα A₁ και RBM δεν αλληλεπιδρούν. **RM6/RBD:** το μοτίβο RBM είναι ελεύθερο πάνω στην πρωτεϊνική πλατφόρμα της RM6.

3.2 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Στην Κλασική Μηχανική η κίνηση των μορίων διέπεται, σε γενικές γραμμές, από τις εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα. Στις προσομοιώσεις MD, η κίνηση των σωματιδίων προσομοιώνεται σε έναν υπολογιστή σύμφωνα με τις εξισώσεις κίνησης. Στην περίπτωση που δεχθούμε πως ένα άτομο κινείται αποκλειστικά σε επίπεδο Κλασικής Μηχανικής, μαθηματικοί υπολογισμοί με μολύβι και χαρτί είναι αρκετοί, προκειμένου να ανακαλύψουμε την κίνηση του μορίου. Ωστόσο, δεδομένου ότι τα άτομα σε ένα πραγματικό σύστημα είναι πολλά και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, μια τέτοια μαθηματική ανάλυση είναι ανέφικτη. Υπό αυτές τις συνθήκες, οι υπολογιστικές προσομοιώσεις προσφέρουν ένα ισχυρό εργαλείο για μικροσκοπική ανάλυση (Sharma et al., 2019).

Η μέθοδος MD αποτελεί ένα ισχυρό υπολογιστικό εργαλείο, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προσομοίωση πολλών φυσικών φαινομένων, καθώς εφαρμόζεται ακόμα και αν το σύστημα δεν βρίσκεται σε ισορροπία. Η κύρια διαδικασία για τη διεξαγωγή της προσομοίωσης MD βασίζεται σε μια αλληλουχία βημάτων: i) καθορίζονται οι αρχικές θέσεις και ταχύτητες όλων των μορίων, ii) υπολογίζονται οι δυνάμεις που ασκούνται στα μόρια, iii) προσδιορίζονται οι θέσεις όλων των μορίων του επόμενου χρονικού βήματος, iv) προσδιορίζονται οι ταχύτητες όλων των μορίων του επόμενου χρονικού βήματος, v) τα βήματα επαναλαμβάνονται από το ii) και μετά, για όσο διάστημα διαρκεί η προσομοίωση (Sharma et al., 2019).

Η χρήση του όρου «Δυναμικό Πεδίο» στην χημεία και την Υπολογιστική Βιολογία, αφορά μια μαθηματική περιγραφή της δυναμικής ενέργειας ενός συστήματος ατόμων. Στην περίπτωση της μοριακής δυναμικής, τα δυναμικά πεδία αποτελούν εμπειρικές εξισώσεις. Γνωρίζοντας τις θέσεις των ατόμων ενός συστήματος αλλά και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, προσφέρουν την δυνατότητα υπολογισμού των δυνάμεων καθώς και της δυναμικής ενέργειας του συστήματος. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων διακρίνονται σε δεσμικές και μη δεσμικές. Όσον αφορά τις πρώτες, περιλαμβάνουν το μήκος του δεσμού, τη γωνία δεσμού και την περιστροφή δίεδρων γωνιών, αντίστοιχα οι μη δεσμικές περιλαμβάνουν τις ηλεκτροστατικές και van der Waals αλληλεπιδράσεις (Sharma et al., 2019).

E = Ebonded + Enonbonded	(1.1)
$E_{bonded} = E_{bond} + E_{angle} + E_{dihedral}$	(1.2)
Enonhonded = Eelectrostatic + EvanderWaals	(1.3)

Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER)

Το AMBER περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό προγραμμάτων τα οποία συμβάλλουν στην εγκατάσταση, στην εκτέλεση και στην ανάλυση των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Η λειτουργική μορφή του δυναμικού πεδίου «AMBER» εμφανίζεται στην εξίσωση (1.4). Για την χρήση του δυναμικού πεδίου AMBER, είναι απαραίτητο να προσδιορισθούν οι τιμές συγκεκριμένων παραμέτρων του δυναμικού πεδίου (π.χ. σταθερές δυνάμεων, μήκη και γωνίες ισορροπίας των δεσμών και φορτία). Κάθε ξεχωριστό σύνολο παραμέτρων διαθέτει ένα διακριτικό και προσφέρει πληροφορίες για τις σταθερές που χαρακτηρίζουν συγκεκριμένους τύπους μορίων (πχ. Όσον αφορά σταθερές πρωτεϊνών και συνεχίζει με διψήφιο αριθμό έτους, «FF99») (Hornak et al., 2006; Sharma et al., 2019).

$$V(r^{N}) = \sum_{bonds} \frac{1}{2} k_{b} (l - l_{0})^{2} + \sum_{angles} \frac{1}{2} k_{a} (\theta - \theta_{0})^{2} + \sum_{torsions} \frac{1}{2} V_{n} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) + \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^{N} \left(\varepsilon_{i,j} \left[\left(\frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^{6} \right] + \frac{q_{i}q_{j}}{4\pi\varepsilon_{0}r_{ij}} \right)$$
(1.4)

Στην εξίσωση (1.4) από τα αριστερά προς τα δεξιά κάθε όρος αναφέρεται στην ενέργεια που προκύπτει αντίστοιχα: από τα ομοιοπολικά συνδεδεμένα άτομα κατά την έκταση δεσμού, από την κάμψη των δεσμικών ατόμων, από την περιστροφή των ατόμων γύρω από τους δεσμούς και από τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις (ενέργεια που οφείλεται σε δυνάμεις van der Waals και σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις) (Wendy D. Cornell et al., 1996).

Τρία διαφορετικά σύμπλοκα **RM6/RBD**, **Free ACE2/RM6/RBD**, **Fixed ACE2/RM6/RBD**, μελετώνται με την προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής. Το δυναμικό πεδίο που χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση είναι το «FF14SB». Το πρόγραμμα «AMBER14 tleap» χρησιμοποιήθηκε για να επιτευχθεί ουδέτερο φορτίο και να προστεθούν τα άτομα υδρογόνου που λείπουν. Το σύστημα-μοντέλο τοποθετήθηκε σε κόλουρο οκτάεδρο (truncated octahedron) το οποίο πληρώθηκε με μόρια νερού (μοντέλο «TIP3P»). Κάθε σύστημα-μοντέλο προσομοιώθηκε συνθήκες (periodic boundary conditions, PBC) και ο υπολογισμός των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων έγινε με βάση τη μέθοδο Particle Mesh Ewald (PME), με «cutoff» 10 Å. Αρχικά, εφαρμόστηκε το στάδιο Ελαχιστοποίησης Ενέργειας του συστήματος με 10.000 βήματα. Στην συνέχεια η θερμοκρασία αυξήθηκε από 0 έως 300K, υπό σταθερό όγκο (NVT), με την χρήση του δυναμικού Langevin. Ο αλγόριθμος «SHAKE» χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να περιοριστούν όσοι δεσμοί περιλαμβάνουν άτομα υδρογόνου άτομα

Το βήμα της προσομοίωσης ήταν 2fs. Τέλος πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις, Root Mean Square Deviation (RMSD), Root Mean Square Fluctuation (RMSF), προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητα του συστήματος κατά τη διάρκεια την προσομοίωσης. Οι συγκεκριμένες αναλύσεις αλλά και οι ανάλυση δεσμών υδρογόνου πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα «CPPTRAJ». Οι τροχιές παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος «VMD».

3.3 Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

I. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η τεχνική PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος, κατά την οποία επιλεγμένα τμήματα γενετικού υλικού ενισχύονται in vitro. Η διαδικασία πραγματοποιείται εντός θερμικού κυκλοποιητή (Thermal cycler), προκειμένου να εναλλάσσονται οι διάφορες θερμοκρασίες που είναι απαραίτητες για την ολοκληρωσή της. Κατά την έναρξη εφαρμόζεται υψηλή θερμοκρασία προκειμένου το DNA να αποδιαταχθεί, στη συνέχεια σε χαμηλότερη θερμοκρασία ευνοείται η υβριδοποίηση του DNA με τους εκκινητές, η DNA πολυμεράση ξεκινάει να επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο, σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία εξαρτάται από τις βέλτιστες συνθήκες του ενζύμου. Μετά από πολλές επαναλήψεις αυτών των κύκλων επικρατεί μόνο το επιθυμητό προϊόν.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ: Χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση Pfu (ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg2+) από την εταιρία «Promega», Νουκλεοτίδια (dNTP mix), «Forward Primer» και «Reverse Primer» της «eurofins» και ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε A₁-RM6-RBM (4,23ng/μl)

BHMATA	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΚΥΚΛΟΙ
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	2min	1
Αποδιάταξη	95°C	30sec	
Υβριδισμός Εκκινητών	72 °C	30sec	30
Επιμήκυνση	72 °C	1min	
Τελική Επιμήκυνση	72 °C	1min	1
«Heat soak»	4 °C	00	1

ΣΥΝΘΗΚΕΣ:

ΙΙ. Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί τυπική εργαστηριακή διαδικασία διαχωρισμού του DNA κατά μέγεθος, για οπτικοποίηση και απομόνωση. Κατά την ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, χάρη στο οποίο μετακινείται το αρνητικά φορτισμένο DNA μέσω του πηκτώματος αγαρόζης προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Τα μικρότερα θραύσματα DNA, μετακινούνται πιο γρήγορα μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης, σε σχέση με τα μεγαλύτερου μεγέθους μόρια DNA. Με τον τρόπο αυτό, προσδιορίζεται το κατά προσέγγιση μήκος ενός θραύσματος DNA συγκρίνοντας το με μια συλλογή θραυσμάτων DNA γνωστών μηκών (DNA μάρτυρας). Στο πήκτωμα αγαρόζης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο αυτό μπορούν να διακριθούν οι ζώνες του DNA σε συσκευή με UV light.

ΥΛΙΚΑ:

Tris Acetate Acid/EDTA (TAE), Αγαρόζη, βρωμιούχο αιθίδιο, loading buffer (Orange G)

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ:

1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης, συγκέντρωσης 1% κατάλληλη για το μέγεθος του μορίου DNA A₁/RM6/RBM (474bp) και χρώση του πηκτώματος.

2. Ανάμειξη δειγμάτων DNA με loading buffer (1X), τοποθέτηση των δειγμάτων και του DNA μάρτυρα (λDNA/Pstl), στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα. Εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση 100V στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης για 60min.

3. Παρατήρηση και φωτογράφισή του σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

ΙΙΙ. Απομόνωση DNA από Πήκτωμα Αγαρόζης

Προκειμένου να απομονωθεί το επιθυμητό DNA από το πήκτωμα αγαρόζης, με την χρήση αποστειρωμένης λεπίδας απομακρύνουμε το τμήμα του πηκτώματος αγαρόζης στο οποίο εμφανίστηκε η ζώνη του επιθυμητού DNA. Το κομμάτι που απομακρύνεται ζυγίζεται και ανάλογα με το βάρος του διαλύεται σε συγκεκριμένο όγκο buffer NTI. Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το kit της Macherey-Nagel. Αφού το δείγμα μου διαλυθεί πλήρως στο buffer ακολουθεί το στάδιο δέσμευσης του DNA σε ειδική κολώνα «NucleoSpin Gel and PCR Clean up Column» ακολουθούν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις κάθε φορά απορρίπτεται το υπερκείμενο και φορτώνεται εναπομείναν δείγμα DNA. Στη συνέχεια ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις της κολώνας με buffer NTI3 του kit. Τέλος το DNA εκλούεται σε 30μl ddH₂O.

ΙV. Πέψεις με Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες

Η πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού έγινε σε δυο περιπτώσεις. Πρώτον, για κλωνοποίηση του γονιδίου A₁/RM6/RBM στον πλασμιδιακό φορέα LIC 1.10 και δεύτερον, για τον έλεγχο των αποικιών των μετασχηματισμένων βακτηρίων για την ύπαρξη του τμήματος του DNA που επιλέξαμε να εισάγουμε.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ: Οι πέψεις έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (Minotech) των ενζύμων KpnI (τελικό όγκο 50μΙ) και EcoRV (τελικό όγκο 20μΙ).

V. Κλωνοποίηση Πλασμιδιακού Φορέα LIC 1.10 (Ligation Independent Cloning)

Η διαδικασία «Ligation Independent Cloning» είναι μια τεχνική που αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 ως εναλλακτική λύση στην κλωνοποίηση με χρήση του περιοριστικού ενζύμου λιγάσης (ligase). Το γονίδιο επιλογής συνήθως ενισχύεται με PCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς για την διαδικασία εκκινητές και ο φορέας γίνεται γραμμικός με πέψη περιοριστικού ενζύμου. Προκειμένου να δημιουργηθούν συμπληρωματικά άκρα μεταξύ του φορέα και του γονιδίου ένθεσης, χρησιμοποιείται η T4 DNA πολυμεράση (New England Biolabs) με ενεργότητα 3'→5' εξωνουκλεάσης. Πιο συγκεκριμένα, όταν δεν υπάρχουν τα απαραίτητα νουκλεοτίδια (dNTPs) για τον πολυμερισμό μίας πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας, το ένζυμο αποκτά ενεργότητα εξωνουκλεάσης και σταματά μόλις συναντήσει dNTP που υπάρχει στο περιβάλλον του. Στην προκειμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν dTTPs στο διάλυμα του φορέα και dATPs στο διάλυμα του γονιδίου.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ:

Ο πλασμιδιακός φορέας κόβεται με την βοήθεια του περιοριστικού ενζύμου Kpnl. Η βέλτιστη συγκέντρωση του φορέα, που απαιτείται για την διεξαγωγή του πειράματος είναι ≈0.03 pmol/μl (≈100ng/μl). Στην περίπτωση που η συγκέντρωση είναι διαφορετική, απαιτείται προσαρμογή του όγκου στον πίνακα που ακολουθεί.

Φορέας	A ₁ /RM6/RBM
5,5 μl κομμένου πλασμιδίου (0.01pmol/μl)	x μl απομονωμένο DNA (0,1pmol/μl)
1 μl NEB buffer 2	1µl NEB buffer 2
1 μl 25mM dTTP	1 μl 25mM dATP
1 μl 50mM DTT	1 μl 50mM DTT
1 μl 1mg/ml BSA (10x BSA)	1 µl 10x BSA
0.5μl Τ4 DNA πολυμεράση (NEB)	0.5μl Τ4 DNA πολυμεράση (NEB)
x μl ddH₂O	x μl ddH₂O
Τελικό Όγκος: 10μΙ	Τελικός Όγκος: 10μl

Προκειμένου να δημιουργήσουμε συμπληρωματικά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα και τα θραύσματα DNA, προετοιμάζω τα παρακάτω διαλύματα.

Προκειμένου να ενεργοποιηθεί η αντίδραση εξωνουκλεάσης, τα δείγματα επωάζονται σε θερμικό κυκλοποιητή αρχικά σε 22 °C για 25min και στη συνέχεια ακολουθεί απενεργοποίηση της στους 75 °C για 20min. Η διαδικασία υβριδοποίησης πραγματοποιήθηκε, παρουσία φορέα (0,015 pmol) και γονιδίου (0,03 pmol), αφού επωάστηκαν για 5min σε θερμοκρασία δωματίου (RT), προστέθηκε 50mM EDTA και το δείγμα επωάστηκε για 5min σε RT. Ακολουθεί μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων DH10b.

VI. Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA σε Μικρή Κλίμακα (miniprep)

Προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της διαδικασίας κλωνοποίησης, απαιτείται απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα, ο οποίος στη συνέχεια κόβεται με περιοριστικά ένζυμα και τα θραύσματα DNA ηλεκτροφορούνται. Στην παρούσα διατριβή η απομόνωση πλασμιδιακού DNA επαναλήφθηκε προκειμένου να σταλεί δείγμα για αλληλούχιση. Ανάλογα με την καθαρότητα που επιθυμούμε να έχει το τελικό μας δείγμα, μπορούμε να εφαρμόσουμε διαφορετικές τεχνικές απομόνωσης πλασμιδιακού DNA. Στην συγκεκριμένη εργασία προκειμένου να ελεγχθεί η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο «Quick and Dirty», ενώ στην περίπτωση της απομόνωσης του πλασμιδίου για αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκε το "miniprep kit" της QIAGEN, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.
ΥΛΙΚΑ:

- Buffer I: 50mM Glucose, 25mM Tris-HCL PH=8, 10mM EDTA PH=8, 100ng RNase A
- Buffer II: 0,2M NaoH, 1% SDS
- Buffer III: 5M Potassium acetate, 11.5 ml Glacial acetic acid, 28.5 ml H₂O

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ: «Quick and Dirty»

- Κυτταρικές πελέτες επαναδιαλύονται στο Buffer I (100μΙ), προκειμένου να δημιουργηθεί ισοσμωτικό περιβάλλον
- Προστίθεται Buffer II (200μl), σπάνε οι κυτταρικές μεμβράνες (5min)
- Προστίθεται Buffer III (150μl), εξουδετερώνει την δράση του Buffer II (max spin, 5min)
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε διαφορετικό «eppendorf» και προστίθεται οξικό νάτριο 1/10V και 100% αιθανόλη 2.5V (max spin, 10min)
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml 70% αιθανόλη (max spin, 5min)
- Η πελέτα που προκύπτει, στεγνώνει και στη συνέχεια επεξεργάζεται κατάλληλα για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

VII. Παρασκευή Επιδεκτικών Κυττάρων *E.coli* (competent cells)

Πριν μετασχηματίσω κύτταρα *E.coli* με πλασμίδια, χρειάζεται να τα επεξεργαστώ ώστε να τα καταστήσω επιδεκτικά για μετασχηματισμό. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν με σοκ-θερμότητας (heat-sock).

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ:

- Μια μοναδική αποικία βακτηρίων, από στερεή καλλιέργεια LB agar, ενοφθαλμίζεται σε 5ml LB και η καλλιέργεια επωάζεται στους 37° C για 16 h υπό ανάδευση.
- 1ml από αυτή την καλλιέργεια εμβολιάζεται σε 100ml LB και η καλλιέργεια επωάζεται, υπό ανάδευση, στους 37 ^oC μέχρι η οπτική της πυκνότητα να γίνει O.D._{600nm}= 0.6-0.8.
- Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 2000rpm για 10min. στους 4 ^οC.
- Ακολουθεί επαναδιάλυση των κυττάρων σε 30ml παγωμένου διαλύματος Tfbl και επώαση στον πάγο για 30min.
- Φυγοκέντρηση κυττάρων στις 3500rpm για 10min. στους 4 ^oC.
- Επαναδιάλυση κυττάρων σε 4ml παγωμένου διαλύματος Tfbll.
- Τα κύτταρα χωρίζονται σε aliquots των 100μλ σε παγωμένους σωλήνες μικροφυγοκέντρησης.
- Τελικά, τα κύτταρα ψύχονται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80 °C

Tfbl (per 100ml)	Tfbll (per 100 ml)	
3ml 1M CH3COOK	1ml 1M MOPS pH=7.0	
5ml 1M MnCl2	7,5ml 1M CaCl2	
10ml 1M KCl	1ml 1M KCl	
1ml 1M CaCl2	18ml Glycerol	
18ml 1M Glycerol	72,5ml H2O	

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ:

VIII. Μετασχηματισμός Επιδεκτικών Κυττάρων *E.coli* με Πλασμιδιακό DNA με Σοκ-Θερμότητας (heat-sock)

Τα βακτηριακά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τύπου BL21DE3. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν,

Μέρος Α: για την χιμαιρική πρωτεΐνη Α₁₁/rRM6/M₈, η κυτταρική σειρά BL21DE3,

Μέρος Β: στην περίπτωση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Α₁/RM6/RBM χρησιμοποιήθηκαν παράγωγα στελέχη των BL21 DE3, τύπου C43, Rosetta και DH10B.

Κύτταρα BL21 DE3: στο γονιδίωμά τους εμφανίζεται ενσωματωμένο το DNA του βακτηριοφάγου DE3, από το οποίο εκφράζεται η T7 RNA πολυμεράση. Το αντίστοιχο γονίδιο ρυθμίζεται από τον υποκινητή lac UV5 και η έκφρασή του επάγεται μέσω IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Το γονίδιο στόχος ρυθμίζεται από τον υποκινητή T7 και εκφράζεται από την T7 RNA πολυμεράση.

Κύτταρα C43 (DE3): αποτελούν ένα μεταλλαγμένο στέλεχος που προέρχεται από το BL21 (DE3), αυτό το στέλεχος χρησιμοποιείται συνήθως για να αντιμετωπιστεί η τοξικότητα που σχετίζεται με την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Κύτταρα Rosetta: έχουν σχεδιαστεί για ενίσχυση της έκφρασης πρωτεϊνών ευκαρυωτικής προέλευσης οι οποίες περιέχουν κωδικόνια που δεν χρησιμοποιούνται στο *E. coli*. Αυτά τα στελέχη παρέχουν tRNA για τα κωδικόνια AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA σε συμβατό πλασμίδιο ανθεκτικό στη χλωραμφαινικόλη. Τα γονίδια των tRNAs ρυθμίζονται από τους φυσικούς τους υποδοχείς στο πλασμίδιο pLys που φέρει και το γονίδιο T7 λυσοζύμης.

Κύτταρα DH10B: Το στέλεχος DH10B είναι κατάλληλο για κλωνοποίηση τόσο προκαρυωτικού όσο και του ευκαρυωτικού γονιδιωματικού DNA. Αυτά τα κύτταρα είναι ιδανικά για την κατασκευή τράπεζας γονιδίων ή για τη δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών χρησιμοποιώντας πλασμιδιακούς φορείς.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ:

- Ένα aliquot 100μl επιδεκτικών κυττάρων αφήνεται να ξεπαγώσει σε πάγο για 5min.
- Προστίθενται 1-10ng πλασμιδιακού DNA.
- Τα δείγματα ανακινούνται ελαφρά και επωάζονται σε πάγο για 30min.
- Ακολουθεί heat shock των κυττάρων στους 42 °C για 1min.
- Τα δείγματα επωάζονται σε πάγο για 1min.
- Προστίθενται 1ml LB και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση των κυττάρων στους 37 °C για 60min.
- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία petri, με LB agar και το κατάλληλο αντιβιοτικό και επωάζονται στους 37 °C, 16 h.

3.4 Τεχνικές Υπερέκφρασης και Απομόνωσης Πρωτεϊνών

Α. Πρωτεϊνική Έκφραση

Μέρος Α: Στην περίπτωση της A₁₁/rRM6/M₈, χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης pET26b(+).

Μέρος Β: Για την υπερέκφραση της A₁/RM6/RBM αρχικά χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης pET26b(+), τελικά η υπερέκφραση επιτεύχθηκε με την χρήση του φορέα έκφρασης LIC 1.10.

Στις δύο περιπτώσεις η επαγωγή της έκφρασης επιτεύχθηκε μέσω IPTG (Isopropyl β-D-1thiogalactopyranoside).

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ:

Μέρος Α: Α₁₁/rRM6/M₈

Μετά το μετασχηματισμό των BL21DE3 επιδεκτικών κυττάρων με τον κατάλληλο κλώνο, μια μοναδική αποικία από τη στερεή καλλιέργεια ενοφθαλμίζεται (εναλλακτικά, γίνεται εμβολιασμός από stub) σε 100ml Luria-Bertani (LB), που περιέχει καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 30µg/ml και η καλλιέργεια επωάζεται στους 37° C με ανάδευση (250rpm) για 16 h. Από αυτή την καλλιέργεια, 50ml ενοφθαλμίζονται σε 1L LB (αραίωση 1:20) με κατάλληλο αντιβιοτικό (καναμικίνη) και η καλλιέργεια επωάζεται στους 37° C με έντονη ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητά της να γίνει O.D.600nm = 0.6-0.8. Σε αυτό το σημείο προστίθεται ο επαγωγέας IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) σε τελική συγκέντρωση 0,1mM και η καλλιέργεια συνεχίζει να επωάζεται στους 37° C για 16 h. Την επόμενη μέρα ακολουθεί φυγοκέντρηση των

κυττάρων για 30min, στις 4300rpm, στους 4° C. Τα κυτταρικά ιζήματα αναλύονται μέσω 12,5% SDS-PAGE.

Μέρος Β: Α₁/RM6/RBM

Έλεγχος Έκφρασης: ελέγχθηκαν BL21(DE3), Rosetta και C43 επιδεκτικά κύτταρα μετασχηματισμένα με τον κλώνο pET26b(+)_A₁/RM6/RBM και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο έκφρασης που αναφέρεται στο Μέρος Α, με μοναδική διαφορά στην τελική συγκέντρωση του επαγωγέα IPTG όπου χρησιμοποιήθηκε 1mM για τα BL21(DE3) και 0,5mM για τα Rosetta και C43.

Έλεγχος Έκφρασης: Χρησιμοποιήθηκαν Rosetta επιδεκτικά κύτταρα μετασχηματισμένα με τον κλώνο LIC1.10_A₁/RM6/RBM. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός από stub σε θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (LB), που περιέχει καναμυκίνη και χλωραμφαινικόλη σε τελική συγκέντρωση 30µg/ml και 34µg/ml αντίστοιχα, η καλλιέργεια επωάζεται στους 37° C με ανάδευση (250rpm) για 16 h. Την επόμενη μέρα η καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για εμβολιασμό (αραίωση: 1/25), σε φρέσκο θρεπτικό υλικό (LB) παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερεις διαφορετικές καλλιέργειες προκειμένου να ελεγχθούν διαφορετικές συνθήκες. Αρχικά επωάζονται όλες στους 37° C με ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητά τους να γίνει O.D._{600nm} = 0.6-0.8, στην συνέχεια εφαρμόζονται διαφορετικές συνθήκες στην κάθε καλλιέργεια (πίνακας 1) και συνεχίζουν να επωάζονται για 16 h. Την επόμενη μέρα να 30min, στις 4300rpm, στους 4°C. Τα κυτταρικά ιζήματα αναλύονται μέσω 12,5% SDS-PAGE.

ΣΥΝΘΗΚΗ	Καλλιέργεια Α	Καλλιέργεια Β	Καλλιέργεια C	Καλλιέργεια D
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	16 ⁰ C	20° C	37º C	37° C
ΕΠΑΓΩΓΕΑΣ (IPTG)	0,5mM	0,5mM	0,5mM	0,1mM

Πίνακας 1: Μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης σε διαφορετικές θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις επαγωγέα

B. Απομόνωση Πρωτεϊνών

Ι. Έλεγχος Διαλυτότητας

Μέρος Α: Α₁₁/rRM6/M₈

Τα παρακάτω 6 ρυθμιστικά διαλύματα ελέγχθηκαν προκειμένου να διερευνηθούν οι βέλτιστες συνθήκες, στις οποίες παράγεται επαρκής ποσότητα διαλυτής πρωτεΐνης:

Διάλυμα 1: 50mM NaCl, 10% Γλυκερόλη, 25mM Tris (pH 8), 5mM Ιμιδαζόλιο, 15mM βμερκαπτοαιθανόλη.

Διάλυμα 2: 200mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris (pH 8), 5mM Ιμιδαζόλιο, 15mM βμερκαπτοαιθανόλη.

Διάλυμα 3: 400mM NaCl, 25mM Tris (pH 8), 5mM Ιμιδαζόλιο, 15mM β- μερκαπτοαιθανόλη.

Διάλυμα 4: 300mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris (pH 8), 5mM Ιμιδαζόλιο, 15mM βμερκαπτοαιθανόλη.

<u>Διάλυμα 5:</u> 50mM NaCl, 0,05% Chaps, 25mM Tris (pH 8), 5mM Ιμιδαζόλιο, 15mM βμερκαπτοαιθανόλη.

Διάλυμα 6: 400mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris (pH 8), 5mM Ιμιδαζόλιο, 15mM βμερκαπτοαιθανόλη.

Μετά την διαδικασία επαγωγής, οι κυτταρικές πελέτες απομονώθηκαν ανά 50ml καλλιέργειας και επαναδιαλύθηκαν σε 1,5ml από κάθε διαφορετικό διάλυμα. Τα κύτταρα διαρρήχθηκαν με ηχοβολισμό (sonication) το κάθε δείγμα για συνολικό χρόνο 1min, 30sec ηχοβολισμού συνοδευόμενα από 30sec επώασης, όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000rpm για 45min στους 4°C. Στη συνέχεια οι πελέτες επαναδιαλύθηκαν σε ίσο όγκο (1,5ml) από κάθε ρυθμιστικό διάλυμα και μαζί με τα υπερκείμενα αναλύθηκαν περαιτέρω μέσω 12,5% SDS-PAGE.

Μέρος Β: Α₁/RM6/RBM

pET26b+: ελέγχθηκαν 3 ρυθμιστικά διαλύματα για να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες

Διάλυμα 1: 50mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris (pH8), 5mM Ιμιδαζόλιο, 15mM βμερκαπτοαιθανόλη.

Διάλυμα 2: 300mM NaCl, 25mM Tris (pH8), 5mM Ιμιδαζόλιο, 15mM β-μερκαπτοαιθανόλη.

Διάλυμα 3: 200mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris (pH8), 5mM Ιμιδαζόλιο, 15mM βμερκαπτοαιθανόλη. LIC1.10: Μετά την διαδικασία επαγωγής, οι κυτταρικές πελέτες από τις διαφορετικές καλλιέργειες (A, B, C, D) απομονώθηκαν ανά 10ml καλλιέργειας και επαναδιαλύθηκαν σε 1ml από κάθε διαφορετικό διάλυμα. Κατά τα επόμενα βήματα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που αναφέρεται στο «Μέρος Α»

Διάλυμα 1: 50mM NaCl, 25mM Tris (pH 8), 5mM Ιμιδαζόλιο, 10mM β- μερκαπτοαιθανόλη.

Διάλυμα 2: 300mM NaCl, 25mM Tris (pH 8), 5mM Ιμιδαζόλιο, 10mM β- μερκαπτοαιθανόλη.

Διάλυμα 3: 300mM NaCl, 10% Γλυκερόλη, 25mM Tris (pH 8), 5mM Ιμιδαζόλιο, 10mM βμερκαπτοαιθανόλη.

ΙΙ. Χρωματογραφία Συγγένειας σε Στήλη Ni-NTA

Για την απομόνωση της πρωτεΐνης που μελετάται, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη 10ml ρητίνη αγαρόζης Ni-NTA (Qiagen). Η πρωτεΐνη έχει κατασκευαστεί ώστε να φέρει μια ιστιδινική ουρά (His₆ tag) στο C-άκρο της, η οποία προσδένεται στο Ni²⁺, αυτό με την σειρά του αλληλεπιδρά με τους δακτυλίους Ιμιδαζολίου. Σε μικρές συγκεντρώσεις Ιμιδαζολίου, οι πρωτεΐνες με μικρή συγγένεια στο Ni-NTA δεν μπορούν να προσδεθούν στην στήλη και εκλούονται. Η πρωτεΐνη που φέρει His₆ tag προσδένεται με υψηλή συγγένεια, στη συνέχεια αυξάνοντας την συγκέντρωση Ιμιδαζολίου η πρωτεΐνη εκλούεται από την στήλη.

Μέρος Α: Απομόνωση Α₁₁/rRM6/M₈

Από 2L επαγώμενης καλλιέργειας απομονώθηκε κυτταρική πελέτα *E. coli* BL21(DE)3, η οποία επαναδιαλύθηκε σε 80ml «lysis buffer» με σύσταση: 25 mM Tris pH=8, 300 mM NaCl, 5 mM Ιμιδαζόλιο, 15 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 5% Γλυκερόλη. Προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών 1mM PMSF και 150μg/ml benzamidine και στη συνέχεια τα κύτταρα διαρρήχθηκαν με ηχοβολισμό συνολικού χρόνου 6min (12 x 30sec), στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000rpm για 50min στους 4°C. Τα υπερκείμενα φορτώθηκαν σε χρωματογραφική στήλη Ni-NTA της Qiagen, εξισορροπημένη με 170ml «lysis buffer». Στη συνέχεια, συλλέγεται το διάλυμα που διαπερνά τη ρητίνη (flowthrough) και ακολουθούν 3 διαλύματα έκπλησης (Wash), τα οποία διαθέτουν σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος εκλούεται από την στήλη με συγκέντρωση 200mM Ιμιδαζόλιο. Κλάσματα έκλουσης (Elutions) συλλέγονται ανά 10ml και αναλύονται περαιτέρω μέσω 12,5 SDS-PAGE.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και η σύστασή τους:

<u>Wash 1 (100ml)</u>: 300mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris(pH8), 15mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 10mM Ιμιδαζόλιο.

<u>Wash 2 (100ml):</u> 300mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris(pH8), 15mM β- μερκαπτοαιθανόλη, 20mM Ιμιδαζόλιο.

<u>Wash 3 (50ml):</u> 300mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris(pH8), 15mM β- μερκαπτοαιθανόλη, 30mM Ιμιδαζόλιο.

<u>Elutions 1,2 (20ml):</u> 300mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris(pH8), 15mM β- μερκαπτοαιθανόλη, 100mM Ιμιδαζόλιο.

<u>Elutions 3,4 (20ml):</u> 300mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris(pH8), 15mM β- μερκαπτοαιθανόλη, 200mM Ιμιδαζόλιο.

<u>Elutions 5-10 (60ml):</u> 300mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris(pH8), 15mM βμερκαπτοαιθανόλη, 300mM Ιμιδαζόλιο.

Μέρος Β: Απομόνωση Α1/RM6/RBM

Από 2L επαγώμενης καλλιέργειας απομονώθηκε κυτταρική πελέτα *E. coli* C43, η οποία επαναδιαλύθηκε σε 80ml «lysis buffer» με σύσταση: 25 mM Tris (pH8), 50mM NaCl, 5 mM Ιμιδαζόλιο, 15 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 5% Γλυκερόλη. Το πρωτόκολλο συνεχίστηκε όπως αναφέρεται στο «Μέρος Α».

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και η σύστασή τους:

<u>Wash 1 (100ml)</u>: 50mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris(pH8), 15mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 10mM Ιμιδαζόλιο.

<u>Wash 2 (100ml):</u> 50mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris(pH8), 15mM β- μερκαπτοαιθανόλη, 20mM Ιμιδαζόλιο.

<u>Wash 3 (50ml):</u> 50mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris(pH8), 15mM β- μερκαπτοαιθανόλη, 30mM Ιμιδαζόλιο.

<u>Elutions 1,2 (20ml):</u> 50mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris(pH8), 15mM β- μερκαπτοαιθανόλη, 100mM Ιμιδαζόλιο.

<u>Elutions 3,4 (20ml):</u> 50mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris(pH8), 15mM β- μερκαπτοαιθανόλη, 200mM Ιμιδαζόλιο.

<u>Elutions 5-10 (60ml):</u> 50mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 25mM Tris(pH8), 15mM β- μερκαπτοαιθανόλη, 300mM Ιμιδαζόλιο.

Απομόνωση Α1/RM6/RBM Παρουσία Ουρίας

Η διαδικασία εφαρμόζεται σε επαγώμενη κυτταρική πελέτα *E.coli* C43 (1L). Ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο που αναφέρεται παραπάνω με τα εξής διαλύματα:

Διάλυμα Λύσης : 8Μ ουρία, 25Mm Tris (pH7.5), 50mM NaCl και 5mM ιμιδαζόλιο.

Διαλύματος Έπλυσης 1 (50ml): 8Μ ουρία, 50mM Tris (pH7.5), 50mM NaCl και 10mM ιμιδαζόλιο.

Διαλύματος Έκπλυσης 2 (50ml): 6Μ ουρία, 50mM Tris (pH7.5), 50mM NaCl και 30mM ιμιδαζόλιο.

Διαλύματος Έκπλυσης 3 (50ml): 4Μ ουρία, 50mM Tris (pH7.5), 50mM NaCl και 30mM ιμιδαζόλιο.

Διαλύματος Έκπλυσης 4 (50ml): 2Μ ουρία, 50mM Tris (pH7.5), 50mM NaCl και 30mM ιμιδαζόλιο.

<u>Διαλύματος Έκπλυσης 5 (50ml):</u> 1Μ ουρία, 50mM Tris (pH7.5), 50mM NaCl και 30mM ιμιδαζόλιο, 1% Triton X-100.

<u>Διαλύματος Έκπλυσης 6 (50ml):</u> 0,5M ουρία, 50mM Tris (pH7.5), 50mM NaCl και 30mM ιμιδαζόλιο, 1% Triton X-100.

<u>Διαλύματος Έκπλυσης 7 (50ml):</u> 50mM Tris (pH7.5), 50mM NaCl και 30mM ιμιδαζόλιο, 1% Triton X-100.

<u>Διαλύματος Έκλουσης 1,2 (10ml):</u> 50mM Tris (pH7.5), 50mM NaCl και 100mM ιμιδαζόλιο, 1% Triton X-100.

<u>Διαλύματος Έκλουσης 3-8 (30ml):</u> 50mM Tris (pH7.5), 50mM NaCl και 300mM ιμιδαζόλιο, 1% Triton X-100.

<u>Διαλύματος Έκλουσης 9-11 (15ml):</u> 50mM Tris (pH7.5), 50mM NaCl και 500mM ιμιδαζόλιο, 1% Triton X-100.

ΙΙΙ. Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης (SEC)

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (SEC) είναι μια μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών που βασίζεται στην υδροδυναμική ακτίνα της πρωτεϊνης, η οποία εξαρτάται από το μοριακό της βάρος, στην περίπτωση των σφαιρικών μορίων. Το υλικό της στήλης (Sephacryl, Sephadex, Sepharose) περιλαμβάνει σφαιρίδια με συγκεκριμένους πόρους. Μόρια χαμηλού μοριακού βάρους κινούνται μέσα από τους πόρους, ενώ μόρια μεγάλου μοριακού βάρους μετακινούνται στο χώρο έξω από τα σφαιρίδια. Κατά συνέπεια οι πρωτεΐνες εκλούονται σταδιακά ξεκινώντας με τις πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους ακολουθούμενες από αυτές με χαμηλότερο μοριακό βάρος.

Μέρος Α: A₁₁/rRM6/M₈

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ:

Το πρωτεϊνικό δείγμα επωάζεται (16 h) σε διάλυμα διαπύδησης 2L (5% Γλυκερόλη, 25 mM Tris pH=8, 300 mM NaCl and 15 mM β-μερκαπτοαιθανόλη), χρησιμοποιείται ημιπερατή μεμβράνη (6-8kD cutoff). Αφού απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο το διάλυμα της πρωτεΐνης συγκεντρώνεται μέχρι ~2,5ml, με τη χρήση συγκεντρωτικών σωλήνων Amicon Ultra (30.000MW cutoff) και φορτώνεται σε στήλη μοριακής διήθησης. Η διαδικασία μοριακής διήθησης, πραγματοποιήθηκε στους 20°C με τον εξοπλισμό Äkta purifier system (Amersham) και χρωματογραφικής στήλης υψηλής ανάλυσης Sephacryl S-200 (GE Healthcare), η διαχωριστική της ικανότητα περιλαμβάνει πρωτεΐνες μοριακού βάρους 1 έως 200kD. Η αυτόματη διεκπεραίωση των βημάτων καθαρισμού, με την χρήση του Äkta Purifier της Amersham, πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης της κατασκευάστριας εταιρίας.. Πριν τη χρήση της στήλης, πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση με το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται συγκεντρωμένη η πρωτεΐνη (5% Γλυκερόλη, 25 mM Tris pH=8, 300 mM NaCl and 15 mM β-μερκαπτοαιθανόλη).. Το πρωτεϊνικό δείγμα φορτώνεται, χρησιμοποιώντας κατάλληλη λούπα (2ml) και διατρέχει την κολώνα με ρυθμό 0,8ml/min. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας συλλέγονται κλάσματα των 2ml, τα οποία στη συνέχεια αναλύονται μέσω 12,5% SDS-PAGE. Μετά την ταυτοποίηση, τα κλάσματα που αντιστοιχούν στις διαφορετικές κορυφές στο χρωματογράφημμα, συνδυάστηκαν χωριστά σε ημιπερατή μεμβράνη (6-8kD cutoff) προκειμένου να απομακρυνθεί η β-μερκαπτοαιθανόλη και η Γλυκερόλη σε 2 στάδια με ολονύχτια διαπύδηση. Στο διάλυμα Ι, τα πρωτεϊνικά κλάσματα επωάζονται για 4h, ενώ στο διάλυμα ΙΙ πραγματοποιείται επώαση για 16 h.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και η σύστασή τους:

Διάλυμα Ι (1L): 150mM NaCl, 25mM Tris(pH8), 15mM β-μερκαπτοαιθανόλη

Διάλυμα ΙΙ (2L): 50mM NaCl, 25mM Tris(pH8)

IV. Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Πήκτωμα Δωδεκυλθειϊκού Πολυακρυλαμιδίου, υπό Αποδιατακτικές Συνθήκες (SDS-PAGE)

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Ο διαχωρισμός και η μετουσίωση της πρωτεϊνης πραγματοποιείται παρουσία SDS, το οποίο αντιδρά μη ομοιοπολικά με την πρωτεΐνη, φορτίζοντας την αρνητικά. Κατά την ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, χάρη στο οποίο μετακινούνται οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες μέσω των πόρων του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες αναγκάζονται να μετακινηθούν κατά μήκος του πηκτώματος ανάλογα με το μέγεθός τους. Το μέγεθος των πόρων μπορεί να τροποποιηθεί για να βελτιστοποιηθεί το αποτέλεσμα.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ:

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12,5% SDS και για τις δυο χιμαιρικές πρωτεΐνες. Επίσης χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικός μάρτυρας LMW (kit βαθμονόμησης χαμηλού μοριακού βάρους για ηλεκτροφόρηση SDS) από την Pharmacia συμπεριλαμβάνει δείγματα διαφορετικών μοριακών βαρών: 94 kD, 66 kD, 45 kD, 29 kD, 20 kD, 14 kD. Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται για 45 λεπτά υπό ηλεκτρική τάση 200V. Στη συνέχεια το πηκτωμα τοποθετείται σε χρωστική Coomassie blue R για 20 λεπτά, η οποία συνδέεται στις πρωτεΐνες προκαλώντας έντονο μπλε χρωματισμό. Το ρυθμιστικό διάλυμα (10% οξικό οξύ, 5% μεθανόλη) εφαρμόζεται στη συνέχεια, προκειμένου να απομακρυνθεί η χρωστική από οποιονδήποτε μη πρωτεΐνικό στόχο. Τέλος, τα δείγματα πρωτεΐνης εμφανίζονται ως μπλε ζώνες σε διαφανές φόντο.

V. Western Blot (Immunodetection with anti-His Antibodies-Chromogenic method)

Η τεχνική Western χρησιμοποιείται για την απεικόνιση πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος. Το τζελ τοποθετείται δίπλα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF (polyvinylidene fluoride) και ένα ηλεκτρικό ρεύμα προκαλεί τη μετανάστευση των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Η μεμβράνη μπορεί στη συνέχεια να ανιχνευθεί με αντισώματα ειδικά για τον στόχο που μας ενδιαφέρει και να απεικονιστεί χρησιμοποιώντας δευτερεύοντα αντισώματα και αντιδραστήρια ανίχνευσης. Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά δείγματα που προέκυψαν από

Μέρος Β: Α1/RM6/RBM

Αφού τα πρωτεϊνικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 12,5% SDS-PAGE, στη συνέχεια μεταφέρθηκαν από το πήκτωμα στην μεμβράνη PVDF μέσω της τεχνικής «Tank-blotting

procedure». Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε το kit της QIAGEN, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

Υλικά/Διαλύματα: TBS Buffer, TBS-Tween/Triton Buffer, Blocking buffer (TBS + 3% w/v BSA), χρωστική (staining solutions for alkaline phosphatase, AP), Prestained Low Range Μάρτυρας MW: 104.36 kD, 97.27kD, 50.42kD, 37.17kD, 29.18kD, 20.16kD. (BioRad), για θετικό control χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη γνωστού μοριακού βάρους (BC1960, 30kD), η οποία φέρει εξαϊστιδινικό επίτοπο.

Αντισώματα: 1° Anti·His (Αραίωση 1/1.200), 2° Anti-mouse (Αραίωση 1/12.500)

VI. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Πρωτεϊνών με ΦασματομετρίαΤεχνολογίας Nanodrop

Η συσκευή NanoDrop ND-1000 είναι ένα φασματοφωτόμετρο πλήρους φάσματος (220-750nm) που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων. Οι πρωτεϊνες απορροφούν στα 200nm και 280nm. Η απορρόφηση A280 οφείλεται σε αρωματικά αμινοξέα (φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη και τυροσίνη). Τοποθετείται μικρή ποσότητα δείγματος (2μl), το φασματοφωτόμετρο εκπέμπει στο φάσμα UV, στη συνέχεια μετρά την απορρόφηση της πρωτεΐνης στα 280 nm (A280) και υπολογίζει τη συγκέντρωση (mg/ml). Ο υπολογισμός απορρόφησης βασίζεται στην εξίσωση Beer-Lambert, η οποία χρησιμοποιείται για να συσχετίσει την υπολογισμένη απορρόφηση με τη συγκέντρωση:

$$A = E * b * c$$

Όπου (Α) η απορρόφηση, (Ε) ο συντελεστής της πρωτεΐνης extinction coefficient, (b) το μήκος μέτρησης σε cm και (c) η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε mg/ml.

3.5 Βιοφυσικός Χαρακτηρισμός Πρωτεϊνών

Ι. Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού (CD)

Ο Κυκλικός Διχρωισμός (Circular Dichroism, CD) υπολογίζει την διαφορά απορρόφησης, του αριστερόστροφα (L) και δεξιόστροφα (R) κυκλικά πολωμένου φωτός, που εμφανίζει το δείγμα στο οποίο προσπίπτουν. Το σήμα CD παρατηρείται όταν ένα χρωμοφόρο είναι χειρόμορφο (οπτικά ενεργό) για έναν από τους ακόλουθους λόγους: (α) είναι εγγενώς χειρόμορφο λόγω της δομής του, για παράδειγμα, ένα άτομο C με 4 διαφορετικούς υποκαταστάτες, (β) συνδέεται ομοιοπολικά με ένα χειρόμορφο κέντρο του μορίου ή (γ) τοποθετείται σε ασύμμετρο περιβάλλον λόγω της τρισδιάστατης δομή που υιοθετείται από το μόριο. Αν και το φασματόμετρο υπολογίζει διαφορά απορρόφησης (ΔΑ=ΑL-AR), χάρη στην σχέση θ= 32.98 ΔΑ,

δίνεται η δυνατότητα υπολογισμού της ελλειπτικότητας (θ) που παρουσιάζει το πολωμένο φως που ανιχνεύεται (Kelly et al., 2005).

Η Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού είναι μια χρήσιμη φασματοσκοπική τεχνική, η οποία μας δίνει πληροφορίες για την δευτεροταγή δομή, την τεταρτοταγή της διάταξη, την σταθερότητα της αναδιπλωμένης μορφής, δομικές αλλαγές που προκύπτουν λόγω αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης με άλλα πρωτεϊνικά μόρια όπως με το υπόστρωμά του, τον αναστολέα του ή ένα πεπτίδιο (π.χ. ligand) και την διαδικασία αναδίπλωσης. (Kelly et al., 2005)

Η μελέτη της περιεκτικότητας σε δευτεροταγή στοιχεία βασίζεται στην ιδιότητα των πεπτιδικών δεσμών της κύριας αλυσίδας και των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων να απορροφούν το πολωμένο φως, ως οπτικά ενεργές ομάδες της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα οι πεπτιδικοί δεσμοί απορροφούν το πολωμένο φως σε μικρότερα μήκη κύματος (far UV 240-180nm) αντίθετα οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες απορροφούν σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (near UV 320-260nm). Με βάση αυτές τις ιδιότητες τα φάσματα απορρόφησης των πεπτιδικών δεσμών είναι μοναδικά για τα διαφορτετικά στοιχεία της δευτεροταγούς δομής (Εικόνα 3.2). Με την ανάλυση αυτών των φασμάτων λαμβάνουμε πληροφορίες για τα δευτεροταγή της στοιχεία. (Greenfield, 2007b; Kelly et al., 2005)



Εικόνα 3.2: Φάσμα Κυκλικού Διχρωισμού ως συνάρτηση της ελλειπτικότητας θ/του μήκους κύματος. Η πράσινη γραμμή δείχνει την α-έλικα με της δυο χαρακτηριστικές αρνητικές κορυφές στα 208nm και 222nm και μια θετική κορυφή στα 193nm. Η μπλε την β-πτυχωτή με μια αρνητική κορυφή στα 218nm και θετική στα 195nm. Η κόκκινη τις τυχαίες διαμορφώσεις (random coil) η οποίες εμφανίζουν μια αρνητική στα 195nm. (Kelly et al., 2005)

Μελέτη Θερμικής Αποδιάταξης:

Σημαντική είναι η μελέτη της θερμοσταθερότητας της χιμαιρικής πρωτεΐνης, μέσω της τεχνικής CD. Όπως αναφέρφηκε παραπάνω το κάθε στοιχείο της δευτεροταγούς δομής έχει διαφορετικό φάσμα απορρόφησης. Για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει μελετώ την ελλειπτικότητα (θ) σε εύρος φάσματος ανάλογο με τα δευτεροταγή της στοιχεία, κατά την θερμοεπαγώμενη αποδιάταξη από τους 20° C έως τους 90° C (διάγραμμα θ/wavelength). Στο συγκεκριμένο γράφημα, παρουσιάζται το φάσμα απορρόφησης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σε όλες τις θερμοκρασίες (από 20° C έως τους 90° C). Ανάλογα με την μορφή της καμπύλης αποδιάταξης μπορώ να προσδιορίσω το σημείο τήξης της πρωτεΐνης (Tm) και να βγάλω συμπεράσματα για την θερμοσταθερότητά της. Όταν η καμπύλη αποδιάταξης είναι σιγμοειδής, μπορούμε να υπολογίσουμε το Tm, ενώ όταν η καμπύλη είναι μονότονη τότε δεν μπορούμε να προσδιορίσω η καμπύλη συναντάται συχνά στην περίπτωση που η πρωτεΐνη είναι παγιδευμένη σε κατάσταση εύπλαστης σφαίρας(molten globe) (Greenfield, 2007).

ΠΡΩΤΟΚΚΟΛΟ:

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο J-810 της Jasco στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας, του τμήματος Βιολογίας του Παν/μιου Κρήτης. Για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας χρησιμοποιήθηκε το PTC-423S/L Peltier Type Temperature Control System της Jasco. Η βαθμονόμηση του οργάνου έγινε με τη χρήση του άλατος αμμωνίου του d-10καμφορσουλφονικού οξέος. Η ροή του αζώτου (απαραίτητο για την καλή λειτουργία του φασματοφωτομέτρου, καθώς απομακρύνει το O_2 από τα εσωτερικά συστήματά του) ήταν 3-5l/min. Για τη λήψη των φασμάτων δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης (0.25, 0.35, 0.8 mg/ml) και διαφορετικές κυψελίδες (0,1 και 1mm). Η ανάλυση των φασμάτων έγινε με τα προγράμματα Spectra Analysis και Interval Analysis της Jasco.

Μέρος Α: A₁₁/rRM6/M₈

Το πρωτεϊνικό δείγμα αναλύθηκε σε διάλυμα 25mM Tris pH8 και 50mM NaCl, μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διαλύματα με μικρότερες συγκεντρώσεις NaCl, παρουσίαζαν πολύ χαμηλό σήμα, καθώς η πρωτεΐνη δεν διατηρούταν διαλυτή και κατακρημνιζόταν. Η ελλειπτικότητα (θ) του πρωτεϊνικού δείγματος καταγράφηκε σε εύρος φάσματος από 190 έως 260 nm κατά τη διάρκεια θερμοεπαγόμενης αποδιάταξής από τους 20 έως τους 90° C σε βήματα των 10°C. Οι μετρήσεις έγιναν σε κυψελίδα μήκους 0,1mm και το πρωτεϊνικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είχε συγκέντρωση 0,8 mg/ml.

3.6 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

I. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)

Η Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης είναι μια από τις πιο ισχυρές και διαδεδομένες τεχνικές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, για τη μελέτη της μορφολογίας και της δομής μικροσκοπικών υλικών, κυττάρων και βιολογικών νανοδομών. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο επιτρέπει τη μεγέθυνση του εικονιζόμενου δείγματος με διακριτική ικανότητα της τάξης του nm, μέσω της αλληλεπίδρασής του με μια δέσμη ηλεκτρονίων. Το TEM λειτουργεί σύμφωνα με την αρχή της οπτικής μικροσκοπίας. Τα φωτόνια αντικαθίστανται από ηλεκτρομαγνητικούς φακούς και οι εικόνες προβάλλονται σε οθόνη αντί για προσοφθάλμιο (Senthil Kumar et al., 2019).

Πιο συγκεκριμένα το δείγμα ακτινοβολείται από μια δέσμη ηλεκτρονίων ομοιόμορφης πυκνότητας ρεύματος. Το δυναμικό επιτάχυνσης σε ένα τυπικό μικροσκόπιο είναι 80-120kV, ενώ τα μικροσκόπια υψηλής τάσης φτάνουν μέχρι τα 3MV. Το δείγμα βρίσκεται σε μια πολύ λεπτή επιφάνεια και συνήθως χρησιμοποιούνται ειδικά πλέγματα χαλκού ή νικελίου, με 100-400 περιοχές παρατήρησης, που καλύπτονται από μια λεπτή μεμβράνη formvar που συγκρατεί το δείγμα. Η παρατήρηση πραγματοποιείται με την μέθοδο αρνητικής χρώσης, χρησιμοποιώντας διάλυμα βαρέων μετάλλων (phosphotungstic acid, PTA), μέσω της οποία αυξάνεται η αντίθεση μεταξύ δείγματος και φόντου/πλέγματος.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ:

Μέρος Α: A₁₁/rRM6/M8

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (JEOL-JEM 100C και HR-JEOL-JEM 2100 στα 80kV) του εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας «Βασίλης Γαλανόπουλος» του τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με την εξής διαδικασία, 8μl πρωτεϊνικού δείγματος τοποθετείται πάνω σε πλέγμα (formvar/carbon 300 mesh Ni-Agar Scientific) για 2 λεπτά. Απορροφάται με διηθητικό χαρτί και προστίθενται 8μl διαλύματος 1% PTA για 1,5 λεπτό. Απορροφάται ομοίως η περίσσεια και το πλέγμα αφήνεται να στεγνώσει για 2 ώρες πριν την παρατήρηση.

4. <u>Αποτελέσματα</u>

Μέρος Α: Χιμαιρική Πρωτεΐνη Α11/rRM6/M8

Η χιμαιρική πρωτεΐνη A₁₁/rRM6/M₈ σχεδιάστηκε με βάση προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο, οι οποίες ανέδειξαν την ικανότητα σχηματισμού ετεροδιμερούς μορίου χρησιμοποιώντας πρωτεΐνικές πλατφόρμες 4-α-ελικοειδών δεματίων. Επίσης σύμφωνα με τον πρόσφατο σχεδιασμό και βιοφυσικό χαρακτηρισμό του μορίου rRM6, προτάθηκε ως ένα ιδιαίτερα θερμοσταθερό μόριο. Στην συγκεκριμένη εργασία προκειμένου να χαρακτηριστεί περαιτέρω ο σχηματισμός χιμαιρικών πρωτεΐνών πάνω στο ικρίωμα rRM6, αναλύθηκαν οι βιοφυσικές ιδιότητες της χιμαιρικής πρωτεΐνης με χρωματογραφία μοριακής διήθησης και κυκλικό διχρωισμό (circular dichroism). Στη συνέχεια ελέγχθηκε ως προς την οργάνωσή της σε μεγαλύτερες δομές με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM).

4.1 Πρωτεϊνική Έκφραση

Τα μεταλλάγματα A₁₁, M₈ της I-Crel παρήχθησαν από την εταιρία Cellectis και χρησιμοποιήθηκαν για τον σχηματισμό της χιμαιρικής πρωτεΐνης. Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pET26b(+), στα πλαίσια παλαιότερων εργασιών που πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου. Σημειώνεται πως ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας προσθέτει έναν εξαϊστιδινικό επίτοπο (6-His-tag) στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών.



Εικόνα 4.1: Αμινοξική αλληλουχία χιμαιρικής πρωτεΐνης A11/rRM6/M8. Με μπλε και μωβ χρώμα υποδεικνύονται τα μεταλλάγματα A11 και M8 αντίστοιχα. Η αλληλουχία της rRM6 υποδεικνύεται με ροζ χρώμα. Οι συνδέτες που ενώνουν τα μεταλλάγματα στην πρωτεϊνική πλατφόρμα, υπογραμμίζονται με πράσινο.

Κύτταρα BL21(DE3) μετασχηματίστηκαν με το κλωνοποιημένο πλασμίδιο, ακολούθησε έκφραση και έλεγχος διαλυτότητας (παράγραφος 3.4^A), τελικά πραγματοποιήθηκε παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα. Η πρωτεΐνη που εκφράζεται αποτελείται από 411 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 46.451 kD υπολογίστηκε με τη χρήση ExPASy Tool (Gasteiger et al., n.d.).

4.2 Απομόνωση και καθαρισμός

Α. Έλεγχος Διαλυτότητας:

Ελέγχθηκαν 6 διαφορετικά διαλύματα προκειμένου να διαπιστωθούν οι βέλτιστες συνθήκες, έτσι ώστε να ευνοείται η διαλυτότητα την πρωτεΐνης.



Εικόνα 4.2: Έλεγχος διαλυτότητας της πρωτεΐνης παρουσία διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12,5%. **1S-6S:** Τα υπερκείμενα που αντιστοιχούν στα διαλύματα 1-6. **1P-6P:** Οι κυτταρικές πελέτες που αντιστοιχούν στα διαλύματα 1-6. **M:** Μάρτυρας (LMW) με μοριακά βάρη: 94kD, 66kD, 45kD, 29kD,20kD,14kD.

Λαμβάνοντας υπόψη την ηλεκτροφορητική ανάλυση SDS-PAGE παρατηρούμε ότι η χιμαιρική πρωτεΐνη εκφράζεται τόσο στο υπερκείμενο όσο και στην κυτταρική πελέτα. Συγκρίνοντας τις δύο περιπτώσεις για κάθε διάλυμα, επιλέχθηκε το διάλυμα 4, καθώς υπάρχει διαφοροποίηση, όσον αφορά την έκφραση μεταξύ υπερκειμένου και πελέτας, με το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης να είναι διαλυτό στο υπερκείμενο. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα με σύνθεση 300 mM NaCl, 5% γλυκερόλη, 25 mM Tris (pH 8), 5 mM ιμιδαζόλιο, 15 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, καθ' όλη την διαδικασία καθαρισμού της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Β. Χρωματογραφία Συγγένειας σε στήλη Ni-NTA

Αφού επιλέχθηκε το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα, με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη Ni-NTA. Από την ηλεκτροφορητική ανάλυση (SDS-PAGE) εμφανίζονται τα βήματα καθαρισμού της A₁₁/rRM6/M₈ χάρη στον εξαϊστιδινικό επίτοπο που φέρει στο C-άκρο της. Η έκλουση από τη στήλη έγινε με αύξηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου σε διαδοχικά βήματα, η χιμαιρική πρωτεΐνη ξεκινάει να εκλούεται μετά από χρήση 100mM Ιμιδαζόλιο, η μεγαλύτερη ποσότητά της εκλούεται με χρήση 200mM Ιμιδαζόλιο.



Εικόνα 4.3: Τα δείγματα που συλλέχθηκαν κατά την διάρκεια της χρωματογραφίας συγγένειας σε πήκτωμα 12,5% SDS. S: Υπερκείμενο που φορτώθηκε στη στήλη νικελίου. P: Κυτταρική πελέτα δεν φορτώθηκε στην στήλη νικελίου. ft: διάλυμα που διαπερνά τη ρητίνη. W₁-W₃: διαλύματα έκπλυσης. E₁-E₅: διαλύματα έκλουσης. M: μάρτυρας μοριακών βαρών σε σειρά (97kD, 66kD, 45kD, 29kD, 20kD, 14.4kD)

Από το προφίλ πυκτώματος 12,5% SDS μετά από ηλεκτροφόρηση, παρατηρούμε ότι μια σημαντική ποσότητα πρωτεΐνης εμφανίζεται στην κυτταρική πελέτα (P), επίσης παρατηρείται απώλεια στο διάλυμα που διαπερνά τη ρητίνη, χωρίς να εμφανίζει συγγένεια προς τη στήλη (flowthrough). Ωστόσο, λαμβάνουμε μια ικανοποιητική ποσότητα διαλυτής πρωτεΐνης στα κλάσματα E₃,E₄,E₅. Τα κλάσματα E₁ και E₂, παρόλο που διαθέτουν ποσότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης, απορρίπτονται λόγω χαμηλού επιπέδου καθαρότητας Τα κλάσματα που επιλέχθηκαν συνδυάστηκαν και συμπυκνώθηκαν στα 1,35 mg/ml (σε τελικό όγκο 3,5ml) για περαιτέρω καθαρισμό με ανάλυση SEC.

Γ. Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης (SEC)

Μετά από την απομόνωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας, πραγματοποιήθηκε SEC με σκοπό τον χαρακτηρισμό και περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης. Τα κλάσματα στα οποία υπάρχει η χιμαιρική πρωτεΐνη (E₃,E₄,E₅), ενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε ολονύχτια διαπίδυση, προκειμένου να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο. Μετά την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου η πρωτεΐνη διατηρείται σε διάλυμα 300mM NaCl, 25mM Tris pH8, 5% Γλυκερόλη και 15mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Το δείγμα στη συνέχεια συμπυκνώθηκε στα 1,35mg/ml και φορτώθηκε σε χρωματογραφική στήλη υψηλής ανάλυσης Sephacryl S-200 (GE Healthcare), η διαχωριστική της ικανότητα περιλαμβάνει πρωτεΐνες μοριακού βάρους 1 έως 200kD και η απορρόφηση στα 280nm καταγράφηκε ηλεκτρονικά.



Εικόνα 4.4: Το διάγραμμα της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης της Α₁₁/rRM6/M₈ σε σε στήλη Sephacryl S-200. Στο διάγραμμα περιλαμβάνεται και διάγραμα χρωμματογραφίας μοριακής διήθησης πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών σε στήλη Sephacryl S-200 (GE Healthcare, 2005).

Σύμφωνα με το διάγραμμα που προέκυψε από την χρωματογραφία μοριακής διήθησης της χιμαιρικής πρωτεΐνης, η έκλουσή της πραγματοποιείται σε 4 στάδια, αντίστοιχα στις κορυφές που εμφανίζονται (A, B,C, D). Οι όγκοι έκλουσης που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή (35ml, 40-45ml, 60ml, 70ml) απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE.

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε διάγραμμα χρωματογραφίας μοριακής διήθησης πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών (IgG:160.000Da, BSA:67.000Da, β-lactoglobulin:34.000Da, Cytochrome c:12.400Da, Cytidine:240Da) σε στήλη υψηλής ανάλυσης Sephacryl S-200, η οποία προσφέρεται από την κατασκευάστρια εταιρία.



Εικόνα 4.5: Δείγματα που συλλέχθηκαν κατά την διάρκεια χρωματογραφίας μοριακής διήθησης σε πήκτωμα 12,5% SDS. 15-17: κλάσματα έκλουσης που αντιστοιχούν στην κορυφή A, 18-22: κλάσματα έκλουσης που αντιστοιχούν στην κορυφή B, που παρατηρήθηκαν στο διάγραμμα. M: μάρτυρας μοριακών βαρών σε σειρά (97kD, 66kD, 45kD, 29kD, 20kD, 14.4kD)

Σύμφωνα με την ανάλυση του πηκτώματος SDS η πρωτεΐνη εκλούεται στους όγκους που αντιστοιχούν στις κορυφές A και B, όσον αφορά τις κορυφές C και D δεν εντοπίστηκε ποσότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης. Συνδυάζοντας την πληροφορία από την ανάλυση του διαγράμματος SEC και την περαιτέρω ανάλυση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν, συμπεραίνουμε πως οι πρωτεΐνικοί πληθυσμοί που εκλούονται στα 35ml και 40-45ml, αντιστοιχούν σε μεγαλομοριακά μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 160.000Da. Η συγκεκριμένη παρατήρηση υποδηλώνει την πιθανότητα, η χιμαιρική πρωτεΐνη να εκφράζεται ως τετραμερές, καθώς το τετραμερές υπολογίζεται στα 185.800Da (μοριακό βάρος μονομερούς 46,451 kD). Ωστόσο, σύμφωνα με παλαιότερες εργασίες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο (διδακτορική διατριβή Dr. Κεφάλα Α.), η rRM6 έχει την ικανότητα να πολυμερίζεται δημιουργώντας μεγαλύτερες δομές.

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω τους πρωτεϊνικούς πληθυσμούς της κορυφής Α και Β, συλλέχθηκαν ξεχωριστά τα κλάσματα που αντιστοιχούν στην κάθε κορυφή και επωάστηκαν διαδοχικά σε τετράωρη και ολονύχτια διαπίδυση, προκειμένου να προετοιμάσουμε τα δείγματα για ανάλυση μέσω φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD). Αυτή η τεχνική θα παράσχει περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με τις βιοφυσικές ιδιότητες της πρωτεΐνης που απομονώθηκε.

4.3 Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού (CD)

Μέσω της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού μπορούμε να εκμαιεύσουμε πολύτιμες πληροφορίες για τα δευτεροταγή δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης που μελετάμε, καθώς και τις βιοφυσικές της ιδιότητες. Συγκεκριμένα δίνεται η δυνατότητα μελέτης, της σταθερότητάς κατά τη θερμική ή χημική της μετουσίωση. Η εκτίμηση των δευτεροταγών δομικών της στοιχείων πραγματοποιείται από το φάσμα απορρόφησης της πρωτεΐνης στο άπω-υπεριώδες φως (far UV 240-180nm). Προκειμένου οι παρατηρήσεις μας να βασίζονται σε αξιόπιστα αποτελέσματα, είναι απαραίτητο να τηρούνται κάποιες βασικές αρχές. Συγκεκριμένα, το μέτρο σύγκρισης ενός επιθυμητού σήματος σε σχέση με το επίπεδο θορύβου περιβάλλοντος δίνεται από τον λόγο σήματος προς θόρυβο (signal/noise ratio, S/N). Ο λόγος αυτός θα πρέπει να είναι υψηλός, για να επιτευχθεί αυτό είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, βασικό κριτήριο αποτελεί το αν απορροφά έντονα στο άπω-υπεριώδες.

Για την μελέτη της σταθερότητας μιας πρωτεΐνης, υπολογίζεται η θερμοκρασία αποδιάταξης ή τήξης (Tm), μέσω της σταθερής παρακολούθησης του φάσματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, ενώ αυξάνεται σταθερά η θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα η τιμή Tm αντιστοιχεί στη θερμοκρασία όπου ≈50% της πρωτεΐνης είναι αποδιαταγμένη και ≈50% αναδιπλωμένη.

Στην προκειμένη περίπτωση, πραγματοποιήθηκε θερμική μετουσίωση της χιμαιρικής πρωτεΐνης με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους 20°C μέχρι τους 90° C σε βήματα των 10°C και συνεχή μέτρηση του φάσματος στα 222nm. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα μήκους 0,1mm στην οποία φορτώθηκε πρωτεϊνικό δείγμα συγκέντρωσης 0,8mg/ml, το διάλυμα με το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις έχει την σύσταση: 50mM NaCl, 25mM Tris pH8. Το συγκεκριμένο πρωτεϊνικό δείγμα αντιστοιχεί στην κορυφή Β που παρατηρήθηκε στο διάγραμμα χρωματοφραφίας μοριακής διήθησης. Το πρωτεϊνικό δείγμα που αντιστοιχούσε στην κορυφή Α συμπυκνώθηκε μέχρι τα 1,20mg/ml σε όγκο 1,5ml, αμέσως μετά την συμπύκνωση παρατηρήθηκε ίζημα, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η περαιτέρω μελέτη του με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού.



Εικόνα 4.6: Φάσμα της μοριακής ελλειπτικότητας προς το μήκος κύματος κατά τη θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της πρωτεΐνης A₁₁/rRM6/M₈, από τους 20°C(ανοιχτό μπλε) έως τους 90°C(κόκκινο).

Για την A₁₁/rRM6/M₈ μελετήθηκε η ελλειπτικότητα (θ) σε εύρος φάσματος ανάλογο με τα δευτεροταγή της στοιχεία, κατά την θερμοεπαγώμενη αποδιάταξη από τους 20°C έως τους 90°C (διάγραμμα θ/wavelength). Με την αύξηση της θερμοκρασίας η πρωτεΐνη αποδιατάσεται, η ένδειξη αυτή παρουσιάζεται στο γράφημα, όπου όσο η θερμοκρασία αυξάνει, τόσο περισσότερο εξαλείφονται τα ελάχιστα της καμπύλης. Αφού δημιουργηθεί το γράφημα που εμφανίζει την ελλειπτικότητα (θ) σε συνάρτηση με την θερμοκρασία (Τ), όπου παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σε όλες τις θερμοκρασίες (από 20°C έως τους 90° C), κατασκευάζεται η καμπύλη αποδιάταξης (μέθοδος Savitzky-Golay)και από την πρώτη παράγωγο αυτής υπολογίστηκε το σημείο τήξης (Tm=60°C) της πρωτεΐνης.

Σύμφωνα με το φάσμα που λαμβάνουμε από την ανάλυση κυκλικού διχρωισμού, η χιμαιρική πρωτεΐνη εμφανίζει δευτεροταγή χαρακτηριστικά α-ελικοειδούς πρωτεΐνης, με τα χαρακτηριστικό ελάχιστα στα 208nm και στα 222nm. Η φυσική κατάσταση της πρωτεΐνης, η οποία έχει την τάση να πολυμερίζεται και να σχηματίζει ίζημα, δεν επέτρεψε την καταγραφή πολύ καλής ποιότητας σήματος στον κυκλικό διχρωϊσμό. Τα παραπάνω είναι συναφή με την δημιουργία ινιδίων στο δείγμα μας, τα οποία παρατηρήθηκαν και αναλύονται παρακάτω με οπτική μικροσκοπία. Επίσης η μείωση την συγκέντρωσης του άλατος στο διάλυμα, από 300mM στα 50mM, σε συνδυασμό με την απουσία γλυκερόλης και β-μερκαπτοαιθανόλης, δυσχεραίνει ακόμα περισσότερο τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης.

4.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης

Κατά την διάρκεια ενός από τους καθαρισμούς της χιμαιρικής πρωτεΐνης, ακολουθώντας το πρωτόκολλο που έχει αναφερθεί (3.6), μετά το στάδιο της χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη νικελίου, σε ένα από τα στάδια συμπύκνωσης παρατηρήθηκε ίζημα στο πρωτεϊνικό διάλυμα (τελικού όγκου 8,5ml). Απομονώθηκαν 20μl από το διάλυμα και το δείγμα προετοιμάστηκε για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Το υπόλοιπο επωάστηκε διαδοχικά σε τετράωρη και ολονύχτια διαπίδυση, προκειμένου να απομακρυνθεί η Γλυκερόλη. Στην συνέχεια το πρωτεϊνικό δείγμα (20μl) προετοιμάστηκε για παρατήρηση. Η σύσταση του διαλύματος στο οποίο παρατηρήθηκε το πρώτο πρωτεϊνικό δείγμα ήταν: 300mM NaCl, 25mM Tris pH8, 5% Γλυκερόλη, 15mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Το δεύτερο πρωτεϊνικό δείγμα παρατηρήθηκε απουσία Γλυκερόλης.



Εικόνα 4.7: Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο πρωτεϊνικού δείγματος A₁₁/rRM6/M₈ παρουσία 5% γλυκερόλης. Τα βέλη υποδεικνύουν τις διαφορετικές διαμορφώσεις που παρατηρήθηκαν στο δείγμα.

Στα πρωτεϊνικά δείγματα που παρατηρήθηκαν, παρουσία 5% Γλυκερόλης, εμφανίζονται δομές ινιδίων. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούνται γραμμικές διατάξεις ινιδίων διαφορετικού μήκους οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζουν διακλαδώσεις όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4.7(α). Εκτός από την γραμμική, παρατηρείται και μια δεύτερη διάταξη η οποία υποδεικνύεται με κόκκινα βέλη στην εικόνα 4.7.



Εικόνα 4.8: Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο πρωτεϊνικού δείγματος A₁₁/rRM6/M₈ απουσία γλυκερόλης. Τα βέλη υποδεικνύουν τις διαφορετικές διαμορφώσεις που παρατηρήθηκαν στο δείγμα.

Στο πρωτεϊνικό δείγμα που παρατηρήθηκε απουσία γλυκερόλης, εμφανίζονται λιγότερα ινίδια σε σχέση με τα δείγματα παρουσία γλυκερόλης, ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση εμφανίζονται ινίδια, στις δυο διαφορετικές διατάξεις.

Το συγκεκριμένο δείγμα προετοιμάστηκε για την παρατήρηση, μια μέρα μετά τον σχηματισμό του ιζήματος, σε αντίθεση με το πρώτο δείγμα που προετοιμάστηκε αμέσως μετά την δημιουργία του ιζήματος. Πιθανότατα η εικόνα ενός πιο αραιού δείγματος, να οφείλεται στην καθίζηση του μορίου, σε συνδυασμό με την έλλειψη γλυκερόλης, η οποία ήταν απαραίτητη για την διατήρηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης, κατά την διαδικασία του καθαρισμού.

<u>Μέρος Β: Χιμαιρική Πρωτεΐνη Α₁/RM6/RBM</u>

Η χιμαιρική πρωτεΐνη A₁/RM6/RBM σχεδιάστηκε βάση υπολογιστικών μελετών, χρησιμοποιώντας προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (MD simulations), οι οποίες ανέδειξαν την ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων A₁/RBM, χρησιμοποιώντας ως πρωτεϊνική πλατφόρμα το ομοτετραμερές, αντιπαράλληλο, αριστερόστροφο 4-α-δεμάτιο της RM6. Η επιλογή του ως πλατφόρμα πρωτεϊνικής στήριξης βασίζεται στην θερμοσταθερότητα και την συμμετρία που το χαρακτηρίζουν. Τελικά η χιμαιρική πρωτεΐνη εκφράστηκε και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαλυτότητας, όπου προσδιορίστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα με το οποίο θα συνεχιστεί η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού.

4.5 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamics, MD)



Εικόνα 4.9: Ανάλυση RMSF. (α) Το διάγραμμα απεικονίζει τις κινητικότητα των αμινοξικών καταλοίπων του μοτίβου RBM, κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Με μπλε απεικονίζεται το διάγραμμα που αντιστοιχεί στο μοντέλο **Fixed A₁/RM6/RBM**, με κόκκινο φαίνεται το διάγραμμα για το μοντέλο **Free A₁/RM6/RBM**, με πράσινο το διάγραμμα για το μοντέλο **RM6/RBM**. Ο γ-άξονας αντιπροσωπεύει την κινητικότητα ενός καταλοίπου γύρω από την μέση θέση του. Ο x-άξονας αντιπροσωπεύει τα αμινοξικά κατάλοιπα του μοτίβου RBM. (**b**) Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης A₁/RBM στο μοντέλο **Fixed A₁/RM6/RBM**. Με μπλε φαίνεται η RM6, με πράσινο η A₁, με γκρι το μοτίβο RBM. Με πορτοκαλί και magenta φαίνονται οι λούπες του RBM, L1 και L2 αντίστοιχα.

Η ανάλυση Root mean square fluctuation (RMSF), αποτελεί ανάλυση σταθερότητας και βοηθά στη διερεύνηση της κινητικότητας συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων, υπό την επίδραση των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια ολόκληρης της προσομοίωσης. Στο πάνω μέρος της εικόνας 4.9 απεικονίζεται με μορφή διαγράμματος η κινητικότητα των καταλοίπων του μοτίβου RBM γύρω από μια μέση θέση, κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Οι κορυφές αντιπροσωπεύουν αμινοξικά κατάλοιπα αυξημένης ευελιξίας, αντίθετα τα ελάχιστα αντιπροσωπεύουν σταθερότητα. Σε κάθε περίπτωση η κινητικότητα των καταλοίπων του μοτίβου RBM επηρεάζεται από την αλληλεπιδράση με την A1. Πιο συγκεκριμένα στο διάγραμμα γίνεται μία σύγκριση μεταξύ των τριών μοντέλων, σύμφωνα με την οποία στα μοντέλα **Free A₁/RM6/RBM** και **RM6/RBM** η κινητικότητα των μοτίβων RBM είναι παρόμοια. Ωστόσο, όσον αφορά το μοντέλο **Fixed A₁/RM6/RBM** παρατηρούνται διαφοροποιήσεις. Τα κατάλοιπα S⁴⁵⁹-R⁴⁶⁶ φαίνεται να αποσταθεροποιούνται, ενώ τα κατάλοιπα G⁴⁷⁶-F⁴⁸⁶ σταθεροποιούνται. Στην πρώτη περίπτωση τα συγκεκριμένα κατάλοιπα ανήκουν στην L1 λούπα, τα κατάλοιπα που σταθεροποιούνται ανήκουν στη L2 λούπα (εικόνα 4.9(b)).

Η διαφοροποίηση που παρατηρείται, οφείλεται στην αρχική διευθέτηση του A₁ και RBM, η οποία προέρχεται από την κρυσταλλική δομή 6MOJ, με στόχο τη διατήρηση της αλληλεπίδρασής τους. Στο δεύτερο μοντέλο (**Free A₁/RM6/RBM**), τα μοτίβα A₁ και RBM δεν αλληλεπιδρούν κατά την έναρξη της προσομοίωσης. Η αυξημένη ευελιξία των N- και C-άκρων ήταν αναμενόμενη για τα κατάλοιπα όλων των μοντέλων, όσον αφορά τις 2 λούπες, η αντίθεση στην συμπεριφορά τους μπορεί να εξηγηθεί αν αντιληφθούμε πως η συγκεκριμένη προσομοίωση, αφορά μια αλληλεπίδραση δυο μοτίβων, τα οποία στην κρυσταλλική δομή σταθεροποιούνται χάρη στις αλληλεπιδράσεις τους με όλο το μόριο και των δυο πρωτεϊνών (ACE2, S glycoprotein).

4.6 Πρωτεϊνική Έκφραση

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος pET26b+_ A₁/RM6/RBM (κατασκευή της Genescript), προκειμένου να εκφραστεί η χιμαιρική πρωτεΐνη ελέγχθηκαν διαφορετικές κυτταρικές σειρές και συνθήκες έκφρασης. Συγκεκριμένα αποτελείται από 167 αμινοξέα και το μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στο μονομερές, υπολογίστηκε από το πρόγραμμα Expasy Tool, στα 19,38kD (Gasteiger et al., n.d.).



Εικόνα 4.10: (α) Αμινοξική αλληλουχία χιμαιρικής πρωτεϊνης A1/RM6/RBM κλωνοποιημένη στο πλασμιδιακό φορέα pET26b+. Με μπλε χρώμα υποδεικνύεται η α1αλυσίδα του ανθρώπινου υποδοχέα ACE2, με κίτρινο χρώμα υποδεικνύεται η αλληλουχία της RM6 και με πράσινο του μοτίβου RBM. (b) Αμινοξική αλληλουχία χιμαιρικής πρωτεϊνης A1/RM6/RBM κλωνοποιημένη στο πλασμιδιακό φορέα LIC 1.10. Α₁, RM6, RBM υποδεικνύονται με τα ίδια χρώματα όπως στην (α), με ροζ χρώμα υποδεικνύεται η αμινοξική αλληλουχία της SUMO3 και ο εξαιστιδινικός επίτοπος.

Τελικά η χιμαιρική πρωτεΐνη εκφράστηκε χρησιμοποιώντας τον κλώνο LIC 1.10_ A₁/RM6/RBM. Ο συγκεκριμένος φορέας κλωνοποίησης προσθέτει έναν εξαϊστιδινικό επίτοπο στο N-άκρο της χιμαιρικής πρωτεΐνης σε αντίθεση με τον pET26b+ που προσθέτει τον εξαϊστιδινικό επίτοπο στο C-άκρο της χιμαιρικής πρωτεΐνης. Επίσης ο φορέας LIC 1.10 επιλέχθηκε προκειμένου να συντηχθεί η πρωτεΐνη SUMO3 με την A₁/RM6/RBM. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η σύντηξη της SUMO3 με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος μπορεί να ενισχύσει την έκφραση και να προωθήσει τη διαλυτότητα και σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης (LifeSensors Inc., 2007). Κύτταρα Rosetta μετασχηματίστηκαν με το κλωνοποιημένο πλασμίδιο, ακολούθησε έκφραση και έλεγχος διαλυτότητας (4.6^B, 4.6^Γ) Η πρωτεΐνη που εκφράζεται αποτελείται από 262 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 30.11 kD.

pET26b+_A₁/RM6/RBM:



Εικόνα 4.11: Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές και συνθήκες έκφρασης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12,5%. Χρήση κλώνου pET26b+_ A₁/RM6/RBM. (-): αρνητικό control, δείγμα από καλλιέργεια στην οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή με IPTG. (+): δείγμα από καλλιέργεια στην οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή με IPTG. (col): αντιστοιχεί στις αποικίες από κάθε βακτηριακή κυτταρική σειρά που ελέγχθηκε: BL21(DE3), Rosetta, C43. Το βέλος υποδεικνύει το ύψος στο οποίο παρατηρείται η ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη επιλογής. Μ: Μάρτυρας (LMW) με μοριακά βάρη: 94kD, 66kD, 45kD, 29kD,20kD,14kD.

Σε κάθε περίπτωση προκειμένου να διαπιστωθεί αν ο μετασχηματισμός ήταν επιτυχημένος, αλλά και προκειμένου να αποκτήσουμε μια πρώτη εικόνα για την έκφραση της πρωτεΐνης, ακολουθείται η διαδικασία ελέγχου διαφορετικών αποικιών από την στερεή καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με πήκτωμα SDS 12,5%. Συγκεκριμένα για τα κύτταρα BL21(DE3) παρατηρείται μια πολύ αχνή ζώνη κοντά στα 20kD, το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με την μέτρηση του μονομερούς που αντιστοιχεί στα 19,38kD. Στην περίπτωση των Rosetta δεν παρατηρείται έκφραση καθώς δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δειγμάτων με και άνευ IPTG. Όσον αφορά τα C43 παρατηρείται στην 2ⁿ αποικία μια πιο έντονη ζώνη κοντά στα 20kD, η οποία δεν παρατηρείται στο δείγμα άνευ IPTG. Η καλλιέργεια από την οποία προέκυψε το συγκεκριμένο δείγμα, επιλέγεται και παρασκευάζεται «στοκ γλυκερόλης».

Α/Β. Έλεγχος Έκφρασης / Διαλυτότητας:

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαφορετικών συνθηκών έκφρασης, έτσι ώστε να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες.



Εικόνα 4.12: Έλεγχος διαλυτότητας της πρωτεΐνης παρουσία διαφορετικών συνθηκών έκφρασης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12,5%. (P): κυτταρικές πελέτες. (S): τα αντίστοιχα υπερκείμενα που αντιστοιχούν στις κυτταρικές πελέτες. (0.5-1): αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση IPTG που χρησιμοποιείται σε κάθε συνθήκη. (16°C, 28°C, 37°C): αντιπροσωπεύουν τις διαφορετικές θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε συνθήκη. Μ: Μάρτυρας (LMW) με μοριακά βάρη: 94kD, 66kD, 45kD, 29kD,20kD,14kD.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε πήκτωμα SDS, παρατηρούμε ότι η χιμαιρική πρωτεΐνη εκφράζεται τόσο στο υπερκείμενο όσο και στην κυτταρική πελέτα. Δεν παρατηρείται έκφραση στις συνθήκες των 16°C, ενώ στους 28°C παρατηρείται μια πολύ αχνή ζώνη. Συγκρίνοντας τις δύο περιπτώσεις για κάθε συνθήκη στους 37°C, επιλέχθηκε: 1mM IPTG, με επώαση 18h. Η συγκεκριμένη συνθήκη παρουσιάζει διαφοροποίηση, όσον αφορά την έκφραση μεταξύ υπερκειμένου και πελέτας.

Μετά την επιλογή της κατάλληλης συνθήκης έκφρασης, ελέγχονται 3 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, έτσι ώστε να ευνοείται η διαλυτότητα την πρωτεΐνης.



Εικόνα 4.13: Έλεγχος διαλυτότητας της πρωτεΐνης παρουσία διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12,5%. (S): Τα υπερκείμενα που αντιστοιχούν στα διαλύματα B1-B3. (P): Οι κυτταρικές πελέτες που αντιστοιχούν στα διαλύματα B1-B3. (P): 94kD, 66kD, 45kD, 29kD,20kD,14kD.

Από την ανάλυση SDS-PAGE παρατηρούμε ότι η χιμαιρική πρωτεΐνη εκφράζεται τόσο στο υπερκείμενο όσο και στην κυτταρική πελέτα. Συγκρίνοντας τις δύο περιπτώσεις για κάθε διάλυμα, επιλέχθηκε το διάλυμα B1, καθώς υπάρχει διαφοροποίηση, όσον αφορά την έκφραση μεταξύ υπερκειμένου και πελέτας, με το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης να είναι διαλυτό στο υπερκείμενο. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα με σύνθεση 50mM NaCl, 5% γλυκερόλη, 25mM Tris (ρH 8), 5mM ιμιδαζόλιο, 15mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Ωστόσο παρόμοια εικόνα παρουσιάζει και η περίπτωση έκφρασης με το ρυθμιστικό διάλυμα B3.

Γ. Western Blot Ανάλυση

Η ποσότητα της πρωτεΐνης, η οποία εμφανίζεται στις αναλύσεις SDS-PAGE, δεν είναι ικανοποιητική. Εφαρμόστηκε η ανάλυση «western blot», προκειμένου να ανιχνευθεί η πρωτεΐνη εξειδικευμένα, με χρήση αντισωμάτων, το ένα από τα δύο (anti-His αντίσωμα) θα αναγνωρίσει και θα προσδέσει τον εξαϊστιδινικό επίτοπο.



Εικόνα 4.14: Ανάλυση Western Blot. (S): Τα υπερκείμενα που αντιστοιχούν στα διαλύματα B1, B3. **(P):** Οι κυτταρικές πελέτες που αντιστοιχούν στα διαλύματα B1, B3. **(C+):** θετικό control, πρωτεΐνη γνωστού μοριακού βάρους η οποία διαθέτει εξαϊστιδινικό επίτοπο. **M:** Mάρτυρας (Prestained Low Range) MW: 104.36 kD, 97.27kD, 50.42kD, 37.17kD, 29.18kD, 20.16kD.

Σύμφωνα με τον έλεγχο διαλυτότητας που πραγματοποιήθηκε, 2 ρυθμιστικά διαλύματα εμφάνισαν παρόμοια εικόνα, όσον αφορά την έκφραση την πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Πρόκειται για τα διαλύματα B1, B3 (εικόνα 4.14), τα οποία στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν και στην ανάλυση «Western blot». Προκειμένου να ελεγχθεί η απόδοση των αντισωμάτων χρησιμοποιείται μια γνωστή πρωτεΐνη (BC1960, 30kD) η οποία διαθέτει εξαϊστιδινικό επίτοπο. Κατά την διαδικασία εμφάνισης των αποτελεσμάτων στην μεμβράνη PVDF (polyvinylidene fluoride), το θετικό control έδωσε αμέσως σήμα, γεγονός που υποδηλώνει λειτουργικότητα αντισωμάτων. Δεν εμφανίζεται χαρακτηριστική ζώνη στο αναμενόμενο ύψος.

Δ. Χρωματογραφία Συγγένειας σε στήλη Ni-NTA

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά από διαδικασία έκφρασης της πρωτεΐνης σε μικρή κλίμακα. Προκειμένου να αυξηθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο έκφρασης και καθαρισμού της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα (επαγωγή σε 2L καλλιέργειας), με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη Ni-NTA (3.4^{BII}). Από την ηλεκτροφορητική ανάλυση (SDS-PAGE) εμφανίζονται τα βήματα καθαρισμού της Α₁/RM6/RBM χάρη στον εξαϊστιδινικό επίτοπο που φέρει στο C-άκρο της. Η διαδικασία έκλουση από τη στήλη πραγματοποιήθηκε με αύξηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου σε διαδοχικά βήματα.



Εικόνα 4.15: Τα δείγματα που συλλέχθηκαν κατά την διάρκεια της χρωματογραφίας συγγένειας σε πήκτωμα 12,5% SDS. S: Υπερκείμενο που φορτώθηκε στη στήλη νικελίου. P: Κυτταρική πελέτα δεν φορτώθηκε στην στήλη νικελίου. ft: διάλυμα που διαπερνά τη ρητίνη. W₁-W₃: διαλύματα έκπλυσης. E₁-E₁₀: διαλύματα έκλουσης. M: μάρτυρας μοριακών βαρών σε σειρά (97kD, 66kD, 45kD, 29kD, 20kD, 14.4kD)

Από το προφίλ πηκτώματος 12,5% SDS μετά από ηλεκτροφόρηση, παρατηρούμε ότι δεν απομονώθηκε η πρωτεΐνη, καθώς δεν υπάρχει ζώνη στα διαλύματα έκλουσης, που να αντιστοιχεί στο σωστό μοριακό βάρος. Επίσης, παρατηρούμε πως το δείγμα που φορτώθηκε στην στήλη νικελίου (S) είναι όμοιο με το δείγμα που διαπερνά τη ρητίνη, χωρίς να εμφανίζει συγγένεια προς τη στήλη (flowthrough). Αυτό σημαίνει, είτε πως η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, απομακρύνεται χωρίς να έχει προσδεθεί στην στήλη, είτε πως η συγκεκριμένη ζώνη που παρατηρείται στο δείγμα (S) και (ft) δεν αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Προκειμένου να εξακριβώσουμε, αν πρόκειται για «θάψιμο» της εξαϊστιδινικής ουράς κατά την αναδίπλωση, προχωρήσαμε σε διαδικασία απομόνωσης, παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα.

Ε. Απομόνωση Α1/RM6/RBM παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (ουρία):

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος εφαρμόζεται πρωτόκολλο απομόνωσης παρουσία ουρίας. Σκοπός είναι να φορτωθεί στην στήλη Ni-NTA ως αποδιαταγμένη πρωτεΐνη, έτσι ώστε να συγκρατηθεί μέσω του εξαϊστιδινικού επιτόπου της, λόγω της αποδιάταξης αποκλείεται το ενδεχόμενο να «θάβετε» στο εσωτερικό της πρωτεΐνης.



Εικόνα 4.16: Τα δείγματα που συλλέχθηκαν κατά την διάρκεια της χρωματογραφίας συγγένειας παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (ουρία), σε πήκτωμα 12,5% SDS. S: Υπερκείμενο που φορτώθηκε στη στήλη νικελίου. P: Κυτταρική πελέτα δεν φορτώθηκε στην στήλη νικελίου. ft: διάλυμα που διαπερνά τη ρητίνη. W₁-W₆: διαλύματα έκπλυσης. E₁-E₈: διαλύματα έκλουσης. M: μάρτυρας μοριακών βαρών σε σειρά (97kD, 66kD, 45kD, 29kD, 20kD, 14.4kD)

Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε, σε κυτταρική πελέτα απομονωμένη από 1L καλλιέργειας, κατά την διαδικασία έκφρασης. Κατά την διάρκεια του πρωτοκόλλου, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα έκπλυσης (W₁-W₆) διαφορετικής συγκέντρωσης ουρίας (8M-0,5M). Τα πρώτα διαλύματα διαθέτουν υψηλή συγκέντρωση ουρίας για να επιτευχθεί η πρωτεϊνική αποδιάταξη, προκειμένου η πρωτεϊνη να αναδιπλωθεί πάλι, αφαιρούμε σταδιακά την ουρία από τα διαλύματα. Στα διαλύματα έκλουσης δεν υπάρχει ουρία, σε αυτό το στάδιο αυξάνουμε την συγκέντρωση του ιμιδαζολίου σταδιακά, έτσι ώστε να αποδεσμευτεί η πρωτεϊνη από τη στήλη NI-NTA. Η εικόνα από την ανάλυση SDS PAGE, υποδεικνύει έλλειψη της αναμενόμενης ζώνης σε όλα τα κλάσματα έκλουσης. Αυτή η παρατήρηση μας οδήγησε στο συμπέρασμα πως η πρωτεϊνη A₁/RM6/RBM δεν εκφράζεται υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες. Προκειμένου να αντιμετωπίσουμε αυτό το πρόβλημα και να καταφέρουμε να εκφράσουμε την πρωτεϊνη, το γονίδιο απομακρύνεται από τον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+) και ενσωματώνεται στον πλασμιδιακό φορέα LIC.1.10.

LIC.1.10_ A₁/RM6/RBM:

Προκειμένου να καταφέρουμε να εκφράσουμε την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, το γονίδιο της πρωτεΐνης μεταφέρθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+), στον πλασμιδιακό φορέα LIC.1.10.



Εικόνα 4.17: Ρλασμιδιακή κατασκευή LIC.1.10 με το κλωνοποιημένο γονίδιο της A₁/RM6/RBM. Με πράσινο εμφανίζεται το περιοριστικό ένζυμο Kpnl και με πορτοκαλί το EcoRV.

Η ένθεση του γονιδίου πραγματοποιήθηκε στην θέση περιοριστικής κοπής του ενζύμου Kpnl, ακριβώς πίσω από την αλληλουχία του εξαϊστιδινικού επιτόπου και της πρωτεΐνης SUMO3.

Αρχικά το γονίδιο επιλογής ενισχύθηκε με PCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές, για την διαδικασία που ακολουθεί «ligase independent cloning». Στη συνέχεια το ενισχυμένο γονίδιο απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης. Ο φορέας γίνεται γραμμικός με πέψη περιοριστικού ενζύμου Kpnl, τα δύο μόρια DNA (πλασμιδιακός φορέας, γονίδιο επιλογής) επωάζονται σε ξεχωριστό διάλυμα, παρουσία T4 DNA πολυμεράσης με ενεργότητα 3'→5' εξωνουκλεάσης, προκειμένου να δημιουργηθούν συμπληρωματικά άκρα μεταξύ του φορέα και του γονιδίου ένθεσης. Τέλος τα δυο μόρια επωάζονται από κοινού, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί το στάδιο υβριδοποίησης και το κλωνοποιημένο πλασμίδιο εισάγεται σε επιδεκτικά κύτταρα DH10B.

Προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της διαδικασίας κλωνοποίησης, απαιτείται απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα (miniprep protocol), ο οποίος στη συνέχεια κόβεται με περιοριστικό ένζυμο EcoRV και τα θραύσματα DNA ηλεκτροφορούνται.



Α. Έλεγχος κλωνοποίησης με περιοριστικές πέψεις

Εικόνα 4.18: Πέψεις πλασμιδιακών φορέων με περιοριστικό ένζυμο EcoRV, για τον έλεγχο ένθεσης του γονιδίου επιλογής. Μ: μάρτυρας μοριακών βαρών (λDNA/pstl), ο οποίο wπαρατίθεται (δεξιά). Col₁₋₁₀: αντιπροσωπεύουν τις βακτηριακές αποικίες που ελέγχθηκαν.

Το κλωνοποιημένο πλασμίδιο έχει μήκος 6.051bp, το περιοριστικό ένζυμο EcoRV κόβει σε 2 θέσεις σε περίπτωση που έχει πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση. Η μία θέση (3.819bp) ανήκει στο πλασμίδιο, ενώ η δεύτερη θέση (5.755bp) ανήκει στο γονίδιο ένθεσης. Σε περίπτωση που υπάρχει στην αποικία που ελέγχεται, το κλωνοποιημένο πλασμίδιο τότε θα δημιουργηθούν 2 ζώνες, μήκους 1.937bp (εμπεριέχει το γονίδιο) και 4.114bp. Στην περίπτωση που δεν υπάρχει το γονίδιο, το πλασμίδιο θα φέρει μια θέση περιοριστικής κοπής και μόλις κοπεί θα συμπεριφέρεται κατά την ηλεκτροφόρηση, σαν γραμμικό μόριο DNA μήκους 5.571bp. Σύμφωνα με τα παραπάνω, επιλέχθηκε η αποικία 10 (Col10), καθώς εμφανίζει μια ικανοποιητική ποσότητα στην ζώνη μήκους 1737bp, επίσης εμφανίζει και την ζώνη μήκους 4.114bp. Εκτός από αυτές εμφανίζονται άλλε 2 ζώνες, οι οποίες αντιστοιχούν στις δομές του κυκλικού πλασμιδίου «nicked» και «supercoiled». Στην πρώτη περίπτωση παρατηρείται μια κυκλική δομή η οποία δεν είναι υπερελικομένη και για αυτό τον λόγο τρέχει πιο αργά κατά την ηλεκτροφόρηση (πιο ψηλή ζώνη), στην δεύτερη περίπτωση το πλασμίδιο βρίσκεται σε κυκλική μορφή, ωστόσο είναι υπερελικομένο, με αποτέλεσμα να τρέχει πιο γρήγορα από το γραμμικό μόριο DNA αντίστοιχου μήκους. Το γεγονός ότι παρατηρούνται αυτές οι δυο ζώνες, σημαίνει πως η αντιδράσεις πέψης δεν πραγματοποιήθηκαν πλήρως. Πιθανότατα να χρειαζόταν περισσότερος χρόνος, έτσι ώστε να κόψει όλα τα πλασμίδια. Μετά την επιλογή της αποικίας Νο. 10, ακολούθησε η απομόνωση πλασμιδιακού DNA (miniprep) προκειμένου να σταλεί δείγμα για αλληλούχιση.

Β. Έλεγχος Έκφρασης



Χρησιμοποιήθηκαν Rosetta επιδεκτικά κύτταρα μετασχηματισμένα με τον κλώνο LIC1.10_A1/RM6/RBM.

Εικόνα 4.19 Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης σε διαφορετικές αποικίες Rosetta. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12,5%. Χρήση κλώνου LIC.1.10_ A₁/RM6/RBM. (-): αρνητικό control, δείγμα από καλλιέργεια στην οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή με IPTG. (+): δείγμα από καλλιέργεια στην οποία έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή με IPTG. (col): αντιστοιχεί στις αποικίες από κάθε βακτηριακή κυτταρική σειρά που ελέγχθηκε. Το βέλος υποδεικνύει το ύψος στο οποίο παρατηρείται η ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη επιλογής. **M**: Μάρτυρας (LMW) με μοριακά βάρη: 94kD, 66kD, 45kD, 29kD,20kD,14kD.

Σε κάθε περίπτωση προκειμένου να διαπιστωθεί αν ο μετασχηματισμός ήταν επιτυχημένος, αλλά και προκειμένου να αποκτήσουμε μια πρώτη εικόνα για την έκφραση της πρωτεΐνης, ακολουθείται η διαδικασία ελέγχου διαφορετικών αποικιών από την στερεή καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με πήκτωμα SDS 12,5%. Συγκεκριμένα παρατηρείται ικανοποιητική ποσότητα πρωτεΐνης, η αντίστοιχη ζώνη εμφανίζεται λίγο πιο πάνω από τα 30kD, σε όλες τις αποικίες εκτός της 4^{ης} και της 6^{ης}. Η καλλιέργεια από την οποία προέκυψε το συγκεκριμένο δείγμα, επιλέγεται και παρασκευάζεται «στοκ γλυκερόλης» το οποίο αποθηκεύεται στους -80°C.

Γ. Έλεγχος Διαλυτότητας



Εικόνα 4.20 Έλεγχος έκφρασης / διαλυτότητας της πρωτεΐνης παρουσία διαφορετικών συνθηκών έκφρασης και ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12,5%. (B1-B3): διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα (0.1, 0.5): αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση IPTG που χρησιμοποιείται σε κάθε συνθήκη. (16°C, 20°C, 37°C): αντιπροσωπεύουν τις διαφορετικές θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε συνθήκη. (S): Τα υπερκείμενα (P): Οι κυτταρικές πελέτες. Μ: Μάρτυρας (LMW) με μοριακά βάρη: 94kD, 66kD, 45kD, 29kD,20kD,14kD.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε πήκτωμα SDS, παρατηρούμε ότι η χιμαιρική πρωτεΐνη εκφράζεται ελάχιστα στο υπερκείμενο σε σχέση με την έκφραση που παρατηρείται στην κυτταρική πελέτα. Δεν παρατηρείται διαφορά, όσον αφορά την διαλυτότητα της πρωτεΐνης, για τα διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Την καλύτερη εικόνα όσον αφορά την ποσότητα έκφρασης την παίρνουμε από την έκφραση στους 37°C ανεξάρτητα από οποιαδήποτε άλλη συνθήκη φαίνεται στην εικόνα 4.20.

5. <u>Συζήτηση</u>

Τα δυο θέματα της παρούσας εργασίας, παρότι αναλύθηκαν ξεχωριστά, ουσιαστικά αποτελούν διαφορετικές συνθήκες της ίδιας μελέτης. Όπου και στις δυο περιπτώσεις, διαφορετικές λειτουργικές μονάδες εναποτίθενται σε πρωτεϊνικές πλατφόρμες στήριξης, έτσι ώστε στερεοχημικά, να ευνοείται η αλληλεπίδρασή τους. Οι πλατφόρμες που επιλέχθηκαν διαθέτουν ένα από τα πιο συχνά δομικά μοτίβα, το 4-α-ελικοειδές δεμάτιο. Οι τοπολογίες των 4-α-ελικοειδών δεματίων χαρακτηρίζουν μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών οι οποίες υπάρχουν σε μονομερείς μορφές ή σε ολιγομερή σύμπλοκα. Το συγκεκριμένο μοτίβο αποτελεί ένα ιδιαίτερα ελκυστικό σύστημα για την ανάλυση του protein folding και του protein engineering, χάρη στην λειτουργική ποικιλομορφία και τη δομική απλότητά του (Banner, 1987; Degrado et al., 2018 DeGrado, 1989; Chou, 1988; Paliakasis and Kokkinidis, 1991).

Οι δομικές προσαρμογές της πρωτεΐνης Rop στις διάφορες μεταλλάξεις της αλληλουχίας της, οδηγούν σε μία όλο και αυξανόμενη βάση δεδομένων Rop ανταποκρινόμενων δομών. Μεταλλάγματα τα οποία εμφανίζουν αυξημένη σταθερότητα όπως στην περίπτωση των RM6, rRM6, παρουσιάζουν δομή σπειρωμένου σπειράματος (coiled coil). Μελέτες κυκλικού διχρωισμού που πραγματοποιήθηκαν από μέλη του εργαστηρίου, έδειξαν πως τα συγκεκριμένα μόρια είναι τετραμερή και ιδιαίτερα θερμοανθεκτικά, παρουσιάζοντας υψηλές τιμές Tm. Ta συγκεκριμένα χαρακτηριστικά αποτέλεσαν έμπνευση για τη αξιοποίηση των συγκεκριμένων αελικοειδών μορίων, προκειμένου να αναπτύξουμε μια νέα πρωτεϊνική πλατφόρμα στήριξης, έτσι ώστε να ευνοείται γεωμετρικά η αλληλεπίδραση συγκεκριμένων λειτουργικών μορίων.

Μέρος Α: Χρήση rRM6 πρωτεϊνικής πλατφόρμας για τον σχηματισμό ετεροδιμερών I-Crel

Οι αυτοκατευθυνόμενες ενδονουκλεάσες αποτελούν πολύτιμα εργαλεία γενετικής μηχανικής. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι αλληλουχίες αναγνώρισής τους μπορούν να διευρυνθούν τροποποιώντας τις ειδικότητές τους ή δημιουργώντας χιμαιρικές πρωτεΐνες συνδυάζοντας υπομονάδες διαφορετικών ενδονουκλεασών. Διάφορες πρωτεΐνικές δομές ενδονουκλεασών, οι οποίες έχουν λυθεί σε σύμπλοκο με το DNA-στόχο, έχουν τροποποιηθεί ώστε να εμφανίζουν νέες αλληλουχίες αναγνώρισης. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μια συνδυαστική προσέγγιση, κατά την οποία διαφορετικά μεταλλάγματα συνδυάστηκαν σε μία νέα πρωτεΐνη, η οποία σχεδιάστηκε ώστε να εμφανίζει επιθυμητή εξειδίκευση (Grizot et al., 2009). Οι πιο πρόσφατες τεχνικές τροποποίησης μεγανουκλεασών, συνδέονται με την απόδοση νέων εξειδικεύσεων. Αυτό επιτυχγάνεται χάρη στην παράλληλη έκφραση διαφορετικών μεταλλαγμάτων της I-CreI, προκειμένου να δημιουργηθεί ετεροδιμερές, ωστόσο η συγκεκριμένη τεχνική δεν έχει καταφέρει να εξαλείψει τον σχηματισμό παραπροϊόντων, καθώς εξακολουθούν να σχηματίζονται ομοδιμερή. Το συγκεκριμένο φαινόμενο προκειμένου να ξεπεραστεί, προτείνεται να τροποποιηθεί η περιοχή αλληλεπίδρασης μεταξύ των ομοδιμερών
έτσι θα πραγματοποιείται συν-μεταφορά των διαφορετικών υπομονάδων στα κύτταρα στόχους, αποκλείοντας τον σχηματισμό ομοδιμερούς, ωστόσο με αυτόν τον τρόπο δεν είναι δυνατός ο έλεγχος της στοιχειομετρίας των δυο μονομερών (Galetto et al., 2009). Στην συγκεκριμένη εργασία προτείνεται μια νέα στρατηγική μηχανικής επεξεργασίας πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας την πρωτεϊνική πλατφόρμα στήριξης rRM6. Τα μεταλλάγματα που χρησιμοποιήθηκαν προσαρμόζονται στο ικρύωμα της rRM6, δημιουργώντας μια σταθερή κατασκευή ετεροδιμερούς I-Crel. Η διαμόρφωση αντιπαράλληλου τετραμερούς α-ελικοειδούς μορίου, που προσφαίρει το πρωτεϊνικό ικρύωμα της rRM6, ευνοεί τον σχηματισμό ετεροδιμερούς χιμαιρικού μορίου I-Crel αποκλείοντας παράλληλα τον ομοδιμερισμό των επιμέρους μονομερών. Επίσης η σταθερή σύνδεση των μεταλλαγμάτων της μεγανουκλεάσης, στο ικρύωμα, εξασφαλίζει την συνμεταφορά τους στα κύτταρα στόχους.

Η χρήση μεγανουκλεασών ως εργαλεία γενετικής μηχανικής, χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό εξειδίκευσης και ως εκ τούτου χαμηλά επίπεδα τοξικότητας. Έτσι μπορούν να προσφέρουν νέες δυνατότητες για διάφορες εφαρμογές γονιδιακής μηχανικής. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, έχει παρατηρηθεί η χρήση της μεγανουκλεάσης I-Scel, για την στόχευση και απομάκρυνση αλληλουχιών από το γονιδίωμα ρετροϊών. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη παρατήρηση, οι μεγανουκλεάσες θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως μια νέα κατηγορία αντι-ιικών παραγόντων, κατορθώνοντας να στοχεύσουν το γονιδίωμα του ιού και όχι μόνο να μπλοκάρει ένα βήμα του ιικού κύκλου (Galetto et al., 2009). Επιπλέον, καθώς η χρήση εργαλείων γενετικής μηχανικής, σε ζωντανά κύτταρα έχει εξελιχθεί τα τελευταία χρόνια, προτείνεται η χρήση "έξυπνων" υλικών, ικανών να ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένα ερεθίσματα. Τέτοιου είδους υλικά είναι τα θερμοεπαγώμενα πολυμερή, με χαρακτηριστικό γνώρισμα την αλλαγή των ιδιοτήτων τους ανάλογα με την αλλαγή της θερμοκρασίας στο περιβάλλον του (English et al., 2019).

Όσον αφορά τις πιθανές εφαρμογές της χιμαιρικής πρωτεΐνης που σχεδιάστηκε στα πρότυπα της συγκεκριμένης εργασίας, η παρατήρηση των ινιδίων που σχηματίστηκαν πριν το στάδιο την χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, συνδυάζουν την τεχνολογία γενετικής μηχανικής με το πεδίο των "Stimuli-responsive" Βιοϋλικών. Προκειμένου να γίνει εφικτή τέτοιου είδους συνδυαστική εφαρμογή, είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη των συνθηκών υπό τις οποίες σχηματίζονται οι δομές ινιδίων και κατά πόσο εξαρτώνται από τις αλλαγές στην θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Οι βιοχημικές μελέτες για να διαπιστωθούν τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του μορίου όπως η πρόσδεση και η διάσπαση του DNA, καθώς και η εξειδίκευση για την αλληλουχία στόχο προτείνεται να πραγματοποιηθούν παρουσία και απουσία ινιδίων.

Μέρος Β: Χρήση RM6 πρωτεϊνικής πλατφόρμας για τον σχηματισμό ετεροδιμερών I-Crel

Η πρόσφατη έξαρση του betacoronavirus SARS-CoV-2 έχει τοποθετήσει στο επίκεντρο, τη δημόσια υγειονομική περίθαλψη Παγκοσμίως. Σύμφωνα με την πρόσφατη αναφορά της κατάστασης του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) στις 25 Οκτωβρίου 2021, η πανδημία COVID-19 έχει φτάσει τα 242.348.657 επιβεβαιωμένα κρούσματα και έχει στοιχίσει τη ζωή σε 4.927.723, όπως τεκμηριώθηκε παγκοσμίως σε 223 χώρες παγκοσμίως (WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data).

Ο SARS-CoV-2 εμφανίζει υψηλότερο ποσοστό μολυσματικότητας και πιο εκτεταμένη περίοδο επώασης, σε σχέση με προηγούμενους κορονοϊούς. Ο SARS-CoV-2 συνδέεται πολύ πιο ισχυρά από το SARS-CoV με το τον ίδιο υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή, το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2). Δεδομένου ότι ο SARS-CoV-2 χρησιμοποιεί την (S) πρωτεΐνη ακίδας, για είσοδο στο κύτταρο ξενιστή, είναι ένας από τους πλέον προτιμώμενους στόχους για την κατασκευή εμβολίων ή θεραπευτικών σκευασμάτων κατά του SARS-CoV-2 (Kumar et al., 2020). Η ανταπόκριση των επιστημόνων ήταν έγκαιρη και τεράστια, χιλιάδες δημοσιεύσεις σχετικά με διάφορες πτυχές και επιπτώσεις των ασθενειών και του ιού που προκαλείται υπάρχουν στη βάση δεδομένων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Αυτή τη στιγμή ένας αριθμός εμβολίων είναι διαθέσιμος και πολλές ακόμη μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη (Naz et al., 2021).

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η πρωτεϊνική πλατφόρμα στήριξης RM6, προκειμένου να πλησιάσουμε την φυσική παρουσία της «ανοιχτής» διαμόρφωσης RBD του SARS-Cov-2 και από δομική αλλά και στοιχειομετρική άποψη. Η διαμόρφωση αντιπαράλληλου τετραμερούς α-ελικοειδούς μορίου, που προσφαίρει το πρωτεϊνικό ικρύωμα της RM6, ευνοεί την αλληλεπίδραση του μοτίβου RBM και της α₁-έλικα της επικράτειας PD του ACE2, τοποθετώντας τα δύο μόρια σε κατάλληλο προσανατολισμό. Χρησιμοποιώντας προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (MD simulations), παρατηρήθηκε σταθεροποίηση της λούπας L2, χάρη στην αλλήλεπίδρασή της με της α₁-έλικα του υποδοχέα ACE2.

Η συγκεκριμένη πληροφορία μπορεί να αξιοποιηθεί κατά τον σχεδιασμό εμβολίων τα οποία βασίζονται σε πεπτίδια. Η διαμόρφωση του πεπτιδικού επιτόπου κατά την πρόσδεση στο αντίσωμα, μπορεί να είναι α-έλικας, β-πτυχωτής επιφάνειας, είτε σε μορφή λούπας. Η ακριβής διαμόρφωση που αποκτά το επίτοπο, όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με το αντίσωμα, είναι σημαντική για την ενεργοποίηση του αντισώματος (Malonis et al., 2020). Προκειμένου να μην διακινδυνέψουμε αντιγονοπαρουσίαση της α₁-έλικας του ανθρώπινου υποδοχέα ACE2, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη αυτοάνοσης κατάστασης(Malonis et al., 2020), προτείνεται η τροποποίηση της α₁-έλικας, σύμφωνα με την τεχνική που προτάθηκε από τον Jiang et al. Σύμφωνα με την οποία μπορούμε να διατηρήσουμε τα αμινοξέα της α₁-έλικας στις θέσεις «d» και «α» και να αλλάξουμε τα αμινοξέα στις θέσεις «b, c, e, f, g» (Jiang et al., 2016). Με αυτήν την τεχνική πιθανός να μπορούμε να μεταβάλουμε ένα τμήμα της α₁-έλικας και να διατηρήσουμε την επιφάνεια που είναι απαραίτητη για την διατήρηση της διαμόρφωσης της λούπας L2. Στα πλαίσια της μελέτης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ A₁/RBM, προσπαθήσαμε να εκφράσουμε την χιμαιρική πρωτεΐνη, η οποία αρχικά δεν έδωσε σήμα έκφρασης στις διαδικασίες ανίχνευσης (Western blot, χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη Ni-NTA). Στην βιβλιογραφία αναφέρεται αντίστοιχη περίπτωση χιμαιρικής πρωτεΐνης συνδεδεμένη με ACE2, η οποία εμφάνιζε ακριβώς το ίδιο προφίλ. Υπέθεσαν πως η χιμαιρική πρωτεΐνη είναι τοξική για το κύτταρο και την ένωσαν με MBP (Maltose Binding Protein), προκειμένου να εκφράζεται περιπλασματικά (Xu et al., 2021). Τελικά καταφέραμε να εκφράσουμε την χιμαιρική πρωτεΐνη, όταν την ενώσαμε με την πρωτεΐνη SUMO3, η οποία εμφανίζει λειτουργικότητα τσαπερόνης υποβοηθώντας την αναδίπλωση χιμαιρικών πρωτεΐνών σε κύτταρα *E.coli*. Η συγκεκριμένη χιμαιρική πρωτεΐνη είναι τοξική για το κύτταρο και την ένωσαν με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως υλικό για *in vitro* δοκιμές της λειτουργικότητας μικρών μορίων, σχεδιασμένων ως αναστολείς της αλληλεπίδρασης ACE2/RBM. Καθώς η αλληλεπίδρασή τους, φαίνεται να προσομοιάζει την φυσική αλληλεπίδρααση της «ανοιχτής» διαμόρφωσης RBD του SARS-Cov-2 με τον ανθρώπινο υποδογέα ACE2, τόσο από δομική όσο και από στοιχειομετρική σκοπιά, προσφέρεται ένα ρεαλιστικό υπόστρωμα.

6. <u>Βιβλιογραφία</u>

- Arai, R., Ueda, H., Kitayama, A., Kamiya, N., & Nagamune, T. (2001). Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. *Protein Engineering*, 14(8), 529–532. https://doi.org/10.1093/protein/14.8.529
- Arnould, S., Delenda, C., Grizot, S., Desseaux, C., Pâques, F., Silva, G. H., & Smith, J. (2011). The I-Crel meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Engineering, Design and Selection*, 24(1–2), 27–31. https://doi.org/10.1093/protein/gzq083
- Arnould, Sylvain, Chames, P., Perez, C., Lacroix, E., Duclert, A., Epinat, J. C., Stricher, F., Petit, A. S., Patin, A., Guillier, S., Rolland, S., Prieto, J., Blanco, F. J., Bravo, J., Montoya, G., Serrano, L., Duchateau, P., & Pâques, F. (2006). Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *Journal of Molecular Biology*, 355(3), 443–458. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.065
- 4. Belfort, M., & Roberts, R. J. (1997). Homing endonucleases: Keeping the house in order. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3379–3388. https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3379
- 5. Bonde, J. S., & Bülow, L. (2013). Chimeric Genes, Proteins. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 519–520.
- Broeders, M., Herrero-hernandez, P., Ernst, M. P. T., & Ploeg, A. T. Van Der. (2020). Sharpening the Molecular Scissors : Advances in Gene-Editing Technology. *ISCIENCE*, 23(1), 100789. https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.100789
- 7. Carroll, D. (2021). A short, idiosyncratic history of genome editing. *Gene and Genome Editing*, 1(March), 100002. https://doi.org/10.1016/j.ggedit.2021.100002
- Casalino, L., Gaieb, Z., Goldsmith, J. A., Hjorth, C. K., Dommer, A. C., Harbison, A. M., Fogarty, C. A., Barros, E. P., Taylor, B. C., Mclellan, J. S., Fadda, E., & Amaro, R. E. (2020). Beyond shielding: The roles of glycans in the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Central Science*, 6(10), 1722–1734. https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01056
- Castagnoli, L., Scarpa, M., Kokkinidis, M., Banner, D. W., Tsernoglou, D., & Cesareni, G. (1989). Genetic and structural analysis of the ColE1 Rop (Rom) protein. *The EMBO Journal*, 8(2), 621–629. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03417.x

- Chevalier, B. S., Kortemme, T., Chadsey, M. S., Baker, D., Monnat, R. J., & Stoddard, B. L. (2002). Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease. *Molecular Cell*, 10(4), 895–905. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00690-1
- Chevalier, B. S., & Stoddard, B. L. (2001). Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *SURVEY AND SUMMARY*, 29, 3757–3774.
- Chevalier, B., Turmel, M., Lemieux, C., Monnat, R. J., & Stoddard, B. L. (2003). Flexible DNA target site recognition by divergent homing endonuclease isoschizomers I-CreI and I-Msol. *Journal of Molecular Biology*, *329*(2), 253–269. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00447-9
- Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B., & Ois Nicolas, J. (1995). Induction of Homologous Recombination in Mammalian Chromosomes by Using the I-Scel System of Saccharomyces cerevisiae. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 15, Issue 4). https://journals.asm.org/journal/mcb
- Cohen, C., & Parry, D. A. D. (1990). α-Helical coiled coils and bundles: How to design an α-helical protein. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 7(1), 1–15. https://doi.org/10.1002/prot.340070102
- 15. Crick, F. H. C. (1953). The packing of α-helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallographica*, *6*(8), 689–697. https://doi.org/10.1107/S0365110X53001964
- Degrado, W. F., Wasserman, Z. R., Lear, J. D., Degrado, W. F., Wasserman, Z. R., & Lear, J. D. (2018). Linked references are available on JSTOR for this article : Protein Design, a Minimalist Approach. 243(4891), 622–628.
- 17. Edwards, P. A. W. (2010). Fusion genes and chromosome translocations in the common epithelial cancers. In *Journal of Pathology* (Vol. 220, Issue 2, pp. 244–254). https://doi.org/10.1002/path.2632
- English, M. A., Soenksen, L. R., Gayet, R. V, Puig, H. De, Angenent-mari, N. M., Mao, A. S., Nguyen, P. Q., & Collins, J. J. (2019). *Programmable CRISPR-responsive smart materials*. 785(August), 780–785.
- Fajardo-Sanchez, E., Stricher, F., Pâques, F., Isalan, M., & Serrano, L. (2008). Computer design of obligate heterodimer meganucleases allows efficient cutting of custom DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 36(7), 2163–2173. https://doi.org/10.1093/nar/gkn059

- 20. Gaj, T., Sirk, S. J., Shui, S., & Liu, J. (2016). *Genome-Editing Technologies : Principles and Applications*.
- Galetto, R., Duchateau, P., & Pâques, F. (2009). Targeted approaches for gene therapy and the emergence of engineered meganucleases. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(10), 1289–1303. https://doi.org/10.1517/14712590903213669
- 22. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (n.d.). Protein Analysis Tools on the ExPASy Server 571 571 From: The Proteomics Protocols Handbook Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Retrieved October 27, 2021, from http://www.expasy.org/tools/.
- 23. GE Healthcare. (2005). HiPrep 16/60 \& 26/60 Sephacryl S-200 High Resolution. *Instructions 28-4026-53 AE*, 15–16. www.gelifesciences.com/protein-purification
- Glykos, N. M., Papanikolau, Y., Vlassi, M., Kotsifaki, D., Cesareni, G., & Kokkinidis, M. (2006). Loopless rop: Structure and dynamics of an engineered homotetrameric variant of the repressor of primer protein. *Biochemistry*, 45(36), 10905–10919. https://doi.org/10.1021/bi060833n
- Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K. M., OMeara, M. J., Rezelj, V. V, Guo, J. Z., Swaney, D. L., Tummino, T. A., Hüttenhain, R., Kaake, R. M., Richards, A. L., Tutuncuoglu, B., Foussard, H., Batra, J., Haas, K., Modak, M., ... Krogan, N. J. (n.d.). A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9
- 26. Greenfield, N. J. (2007). Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature Protocols*, 1(6), 2527–2535. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.204
- Grizot, S., Epinat, J. C., Thomas, S., Duclert, A., Rolland, S., Pâques, F., & Duchateau, P. (2009). Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds. *Nucleic Acids Research*, *38*(6), 2006–2018. https://doi.org/10.1093/nar/gkp1171
- Guha, T. K., Wai, A., & Hausner, G. (2017). Programmable Genome Editing Tools and their Regulation for Efficient Genome Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 15, 146–160. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.12.006
- 29. Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *65*(3), 712–725.

https://doi.org/10.1002/PROT.21123

- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010
- 31. Ines Fonfara, D.-B. (2011). *Generating meganucleases with new specificities by directed evolution and rational engineering approaches*.
- Jiang, Z., Gera, L., Mant, C. T., Hirsch, B., Yan, Z., Shortt, J. A., Pollock, D. D., Qian, Z., Holmes, K. V, & Hodges, R. S. (2016). *Platform Technology to Generate Broadly Cross-Reactive Antibodies to a -Helical Epitopes in Hemagglutinin Proteins From Influenza A Viruses*. 106(2), 144–159. https://doi.org/10.1002/bip.22808
- 33. Kefala, A., Amprazi, M., Mylonas, E., Kotsifaki, D., Providaki, M., Pozidis, C., Fotiadou, M., & Kokkinidis, M. (2021). Probing Protein Folding with Sequence Reversed α Helical Bundles. 1–21.
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 1751(2), 119–139. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005
- 35. Khan, S. H. (2019). Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *16*(June), 326–334. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.027
- Kumar, S., Tharappel, A. M., Li, Z., & Li, H. (2020). Prospect of SARS-CoV-2 spike protein : Potential role in vaccine and therapeutic development. *Virus Research*, *288*(June), 198141. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198141
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, *581*(7807), 215–220. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5
- 38. LifeSensors Inc. (2007). SUMOpro ® Gene Fusion Technology. 8845(1010).
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, *395*(10224), 565–574. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8

- 40. Maggio, I., & Gonc, M. A. F. V. (2015). *Genome editing at the crossroads of delivery*, *specificity*, *and fidelity*. 33(5). https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.02.011
- 41. Mali, P., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature Methods*, *10*(10), 957–963. https://doi.org/10.1038/nmeth.2649
- 42. Malonis, R. J., Lai, J. R., & Vergnolle, O. (2020). *Peptide-Based Vaccines : Current Progress and Future Challenges*. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00472
- 43. Molina, R., Montoya, G., & Prieto, J. (2011). Meganucleases and Their Biomedical Applications. *ELS, January 2011*. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0023179
- Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., Atif, S. M., Hariprasad, G., Hasan, G. M., & Hassan, M. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165878. https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165878
- 45. Naz, S., Zahoor, M., Sahibzada, M. U. K., Ullah, R., & Alqahtani, A. S. (2021). COVID-19 and SARS-CoV-2: Everything we know so far - A comprehensive review. *Open Chemistry*, *19*(1), 548–575. https://doi.org/10.1515/chem-2021-0049
- 46. Nóbrega, C., Mendonça, L., & Matos, C. A. (2020). A handbook of gene and cell therapy. In A Handbook of Gene and Cell Therapy. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41333-0
- Oliner, J., Min, H., Leal, J., Yu, D., Rao, S., You, E., Tang, X., Kim, H., Meyer, S., Han, S. J., Hawkins, N., Rosenfeld, R., Davy, E., Graham, K., Jacobsen, F., Stevenson, S., Ho, J., Chen, Q., Hartmann, T., ... Kendall, R. (2004). Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell*, 6(5), 507–516. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.030
- 48. P, C., JC, E., S, G., A, P., E, L., & F, P. (2005). In vivo selection of engineered homing endonucleases using double-strand break induced homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, 33(20). https://doi.org/10.1093/NAR/GNI175
- Parikhani, A. B., Masoume Bazaz, ·, Hadi Bamehr, ·, Fereshteh, S., Amiri, S., Salehi-Vaziri, M., Arash Arashkia, ·, & Azadmanesh, K. (2021). The Inclusive Review on SARS-CoV-2 Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Potential Management Options. *Current Microbiology*, *78*, 1099–1114. https://doi.org/10.1007/s00284-021-02396-x
- 50. Puchta, H., Dujon, B., & Hohn, B. (1996). Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination

(site-specific integration/one-sided invasion/I-Sce I/DNA polymerase slippagelAgrobacterium). In *Genetics* (Vol. 93).

- 51. Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4), 347–350. https://doi.org/10.1038/nbt.2842
- 52. Schmidt, S. (2013). FUSION PROTEIN TECHNOLOGIES Applications and Challenges.
- 53. Schmidt, S. R. (2009). Fusion Proteins: Applications and Challenges. *Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges, April 2009*, 1–24. https://doi.org/10.1002/9781118354599.ch1
- 54. Senthil Kumar, P., Grace Pavithra, K., & Naushad, M. (2019). Characterization techniques for nanomaterials. *Nanomaterials for Solar Cell Applications*, 97–124. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813337-8.00004-7
- Sharma, S., Kumar, P., & Chandra, R. (2019). Introduction to molecular dynamics. In Molecular Dynamics Simulation of Nanocomposites using BIOVIA Materials Studio, Lammps and Gromacs. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816954-4.00001-2
- 56. Silva, G. H., & Belfort, M. (2004). Analysis of the LAGLIDADG interface of the monomeric homing endonuclease I-Dmol. *Nucleic Acids Research*, 32(10), 3156–3168. https://doi.org/10.1093/nar/gkh618
- 57. Silva, G. H., Belfort, M., Wende, W., & Pingoud, A. (2006). From Monomeric to Homodimeric Endonucleases and Back: Engineering Novel Specificity of LAGLIDADG Enzymes. *Journal of Molecular Biology*, *361*(4), 744–754. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.063
- Smith, J., Grizot, S., Arnould, S., Duclert, A., Epinat, J. C., Chames, P., Prieto, J., Redondo, P., Blanco, F. J., Bravo, J., Montoya, G., Pâques, F., & Duchateau, P. (2006a). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Research*, 34(22), 1–12. https://doi.org/10.1093/nar/gkl720
- Smith, J., Grizot, S., Arnould, S., Duclert, A., Epinat, J. C., Chames, P., Prieto, J., Redondo, P., Blanco, F. J., Bravo, J., Montoya, G., Pâques, F., & Duchateau, P. (2006b). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Research*, 34(22), 1–12. https://doi.org/10.1093/nar/gkl720
- 60. Strohl, W. (2017). Chimeric Genes, Proteins. *Reference Module in Life Sciences*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06199-9

- Takeuchi, R., Choi, M., & Stoddard, B. L. (2014). Redesign of extensive protein-DNA interfaces of meganucleases using iterative cycles of in vitro compartmentalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(11), 4061–4066. https://doi.org/10.1073/pnas.1321030111
- Thierry, A., & Dujon, B. (1992). Nested chromosomal fragmentation in yeast using the meganuclease I- Sce I: a new method for physical mapping of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 20(21), 5625–5631. https://doi.org/10.1093/NAR/20.21.5625
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058
- 64. Wendy D. Cornell, Piotr Cieplak, Christopher I. Bayly, Ian R. Gould, Kenneth M. Merz, J. ., David M. Ferguson, David C. Spellmeyer, Thomas Fox, James W. Caldwell, and, & Kollman*, P. A. (1996). A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 5179–5197. Journal of the American Chemical Society, 118(9), 2309–2309. https://doi.org/10.1021/JA955032E
- 65. Wriggers, W., Chakravarty, S., & Jennings, P. A. (2005). Control of protein functional dynamics by peptide linkers. *Biopolymers Peptide Science Section*, *80*(6), 736–746. https://doi.org/10.1002/bip.20291
- 66. Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., & Jiang, T. (2020). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host and Microbe*, *27*(3), 325–328. https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001
- Xu, S., Fomenkov, A., Chen, T., & Yigit, E. (2021). Expression of Human ACE2 N-terminal Domain, Part of the Receptor for SARS-CoV-2, in Fusion With Maltose-Binding Protein, E. coli Ribonuclease I and Human RNase A. 12(June), 1–17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.660149
- 68. Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., & Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. In *Science* (Vol. 367).
- 69. Zhang, Q., Xiang, R., Huo, S., Zhou, Y., Jiang, S., Wang, Q., & Yu, F. (2021). Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1). https://doi.org/10.1038/s41392-021-00653-w

<u>Παράρτημα</u>

1. Φορέας κλωνοποίησης pET26b(+).

Η κατασκευή του κλώνου πραγματοποιήθηκε από την εταιρία genscript, κατά την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα Xhol και Ndel. Το γονίδιο ένθεσης διαθέτει μια θέση περιοριστικής κοπής Ndel στα 438bp. Η συγκεκριμένη θέση μεταλλάχθηκε προκειμένου να μην την αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο. Πραγματοποιήθηκε σιωπηλή μεταλλαγή προκειμένου να μην αλλάξει η αμινοξική αλληλουχία της χιμαιρικής πρωτεΐνης. Επίσης πραγματοποιήθηκε "codon optimization" από την κατασκευάστρια εταιρία.



Εικόνα 6. Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pET-26b(+)

2. Ειδικοί εκκινιτές για την κλωνοποίηση του πλασμιδιακού φορέα LIC.1.10

Fw_	_1	ccagcagcagacgggaggtATGACCATCGAGGAACAGGCGAAGACCTTCC
Rv_	159	ggcggcggagcccgttaTTGGTAGCCAACACCGTTGGTCGGTTGAAAGC