



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

**Παρασκευή, απομόνωση,
χαρακτηρισμός και αλληλεπίδραση
με RNA της πρωτεΐνης La μέσω
φασματοσκοπίας NMR**

Αικατερίνη Αργυρίου
Φαρμακοποιός, MSc

Επιβλέπων Καθηγητής

Γεώργιος Α. Σπυρούλιας

Πάτρα, Μάιος 2019

Επιβλέπων Καθηγητής

Γεώργιος Α. Σπυρούλιας

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Γεώργιος Α. Σπυρούλιας

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

2. Σταύρος Τοπούζης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

3. Κωνσταντίνος Σταθόπουλος

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

4. Ανδρέας Παπαπετρόπουλος

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

5. Φωτεινή Λάμαρη

Αναπληρώτριας Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

6. Κωνσταντίνος Πουλάς

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

7. Μανώλης Φουστέρης

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Στην Οικογένειά μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών από τον Φεβρουάριο του 2012 έως τον Φεβρουάριο του 2019, στα πλαίσια της απόκτησης του Διδακτορικού Διπλώματος Ειδίκευσης «Φαρμακοχημεία-Φυσικά Προϊόντα: Σχεδιασμός, Σύνθεση και Ανάλυση Βιοδραστικών Ενώσεων».

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές ευχαριστίες στον επιβλέποντα Καθηγητή μου, τον κ. Γεώργιο Σπυρούλια, για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση, τη στήριξη, την ανταλλαγή ιδεών και τη συνεχή παρουσία του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ευκαιρία και την εμπιστοσύνη που μου έδωσε να ασχοληθώ με ενδιαφέροντα επιστημονικά θέματα και να εκπαιδευτώ σε πολλές διαφορετικές τεχνικές στο ερευνητικό πεδίο μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής και το μέλος της επταμελούς μου επιτροπής, Κωνσταντίνο Σταθόπουλο για την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και την άψογη συνεργασία. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής τον Καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ κ. Ανδρέα Παπαπετρόπουλο, και τα μέλη ΔΕΠ του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σταύρο Τοπούζη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Φωτεινή Λάμαρη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Πουλά και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μανώλη Φουστέρη για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την πολύ καλή συνεργασία μας σε εκπαιδευτικά και ερευνητικά θέματα.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Frédéric HT Allain, του Πανεπιστημίου ETH, της Ζυρίχης, για τη φιλοξενία του σε ένα από τα πιο ιστορικά εργαστήρια στο πεδίο του Βιομοριακού NMR και την καθοδήγησή του σε θέματα της τμηματικής επισήμανσης κατά το χρονικό διάστημα Ιούνιος 2015-Ιούλιος 2015. Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω θερμά την Christine Von Schroetter για τις επιστημονικές συμβουλές της, την εμπιστοσύνη, τη στήριξη και την άψογη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο αυτό, καθώς και τον Fred Damberger για τη διεξαγωγή των πειραμάτων NMR. Η δίμηνη επίσκεψή μου στο

εργαστήριο αυτό χρηματοδοτήθηκε στα πλαίσια των υποτροφιών «*FEBS Short Term Fellowship*».

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στον Dr. Detlef Betrop από το Τμήμα Φυσιολογίας II του Πανεπιστημίου του Freiburg της Γερμανίας, ο οποίος συνέβαλλε στη διεξαγωγή μέρους των NMR πειραμάτων και παράλληλα στην άριστη συνεργασία και καθοδήγηση σε ερευνητικά θέματα.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω το μεταπτυχιακό φοιτητή Γιώργο Μπούρα για την επίλυση των δομών της πρωτεΐνης La και την επεξεργασία των φασμάτων NMR. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου του Καθηγητή Κ. Σταθόπουλου και κυρίως την Μαρία Αποστολίδη για την καθοδήγηση σε θέματα παρασκευής των pre-tRNA και για την εκτέλεση των πειραμάτων EMSA. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου μας για το φιλικό κλίμα και τη συμπαράσταση του καθενός με τον τρόπο του όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τον σύζυγό μου Γιώργο, τον μικρό Γιάννη, τους γονείς και τον αδερφό μου για την αμέριστη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς την ηθική τους υποστήριξη είναι βέβαιο ότι δε θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση της εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Περίληψη

Η πρωτεΐνη La είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη που περιγράφηκε για πρώτη φορά στον άνθρωπο ως αυτο-αντιγόνο σε ασθενείς που έπασχαν από Ερυθματώδη Λύκο (Systemic Lupus Erythematosus) και σύνδρομο Sjögren. Αποτελεί την πρώτη πρωτεΐνη της υπεροικογένειας των LARP που περιγράφηκε. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, καθώς σχηματίζει ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα με ποικιλία διαφορετικών μορίων RNA. Βασικός ρόλος της πρωτεΐνης La είναι η προστασία του UUU-3'-OH άκρου των μεταγράφων της RNAP III, όπως των pre-tRNA κατά τη διάρκεια της βιογένεσής τους και η σωστή αναδίπλωσή τους στο χώρο. Η πρωτεΐνη La είναι συντηρημένη σε διάφορους οργανισμούς και εμφανίζει κοινή οργάνωση των επικρατειών. Το N-τελικό άκρο αποτελείται από τις επικράτειες LaM και RRM1, ενώ το C-τελικό της άκρο ποικίλει σε μέγεθος και αλληλουχία. Το C-τελικό άκρο της ανθρώπινης πρωτεΐνης La και της πρωτεΐνης La του οργανισμού *Dictyostelium discoideum* περιλαμβάνει ένα δεύτερο μοτίβο RRM, το RRM2α και μια ευκίνητη περιοχή στο C-τελικό άκρο.

Στην παρούσα διατριβή παρουσιάζεται ο σχεδιασμός, η έκφραση και η απομόνωση των επιμέρους επικρατειών και μεγαλύτερων πολυπεπτιδίων που περιλαμβάνουν τον συνδυασμό των επικρατειών αυτών της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* και της ανθρώπινης πρωτεΐνης La, ώστε να πραγματοποιηθεί η δομική και η λειτουργική τους μελέτη μέσω της Φασματοσκοπίας NMR. Η επικράτεια LaM εμφανίζει τα κλασικά δομικά στοιχεία των μοτίβων αυτών, ενώ οι επικράτειες RRM1 και RRM2α του *Dictyostelium discoideum* εμφανίζουν την κλασική δομή των μοτίβων RRM με την προσθήκη μίας έλικας στο C-τελικό και των δύο RRM. Η δομική μελέτη μέσω της Φασματοσκοπίας NMR του πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α πραγματοποιείται με εφαρμογή της τεχνικής της τμηματικής επισήμανσης, εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους του πολυπεπτιδίου. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σε μεγάλες πρωτεΐνες που αποτελούνται από διακριτές επικράτειες, καθώς είναι δυνατή η επισήμανση μίας επικράτειας της πρωτεΐνης παρουσία και των υπολοίπων μη-επισημασμένων επικρατειών. Ακολούθησε η χαρτογράφηση των περιοχών των επιμέρους επικρατειών και των συνδυασμών τους που υφίστανται αλλαγές μετά την προσθήκη του φυσιολογικού υποστρώματος (pre-tRNA_{Arg}) και ενός συνθετικού δεκαμερούς ολιγονουκλεοτιδίου αποτελούμενο από δέκα ουριδύλια (polyU).

Abstract

La protein is located in the nucleus and was first described as an auto-antigen in patients suffering from rheumatic systemic lupus erythematosus and Sjögren syndrome. It was the first protein of the LARPs superfamily to be described. La plays an important role in the physiological function of the organism, because it forms ribonucleoprotein complexes with a variety of different RNA molecules. La has a key role in biogenesis of the RNAP III transcripts such as pre-tRNAs by protecting their UUU-3'-OH end from exonucleases and in the adoption of the correct folding. La protein is conserved in various organisms and displays a common organization of its domains. The N-terminal domain consist of LaM and RRM1, while the C-terminal end varies in size and sequence. The C-terminal from human La and from *Dictyostelium discoideum* consist of an additional RRM motif, RRM2 α , and a C-terminus unstructured region.

This dissertation presents the design, the expression and the isolation of the individual domain and of the larger polypeptides, which are the combination of these domains from *Dictyostelium discoideum* and from *human* La protein in order to elucidate their structure and their function via NMR spectroscopy. The LaM domain adopts the classical structural elements of these motifs, while the RRM1 and RRM2a domains of La protein from *Dictyostelium discoideum* exhibit the classical structure of the RRM motifs with the addition of an α -helix in their C-terminal end of both RRMs. The NMR structural study of the RRM1-RRM2a polypeptide is performed by applying the segmental labeling technique because of the large size of the polypeptide. This technique is applied to large proteins consisting of distinct domains and makes it possible to label one domain of the protein in the presence of the other unlabeled domains. Moreover, we identify the binding sites of the individual domains and their combinations upon the addition of the pre-tRNA_{Arg} and a synthetic ten oligomeric oligonucleotide (polyU) by NMR study.

Περιεχόμενα

Ενότητα Α	1
A.1. Η υπερ-οικογένεια των πρωτεϊνών LARP (La-Related Proteins).....	3
A.2. Το μοτίβο αναγνώρισης RNA (RNA Recognition Motif-RRM).....	5
A.3. Δομικά χαρακτηριστικά των οικογενειών LARP	6
A.3.1. Η επικράτεια του μοτίβου La (LaM) των πρωτεϊνών LARP	8
A.3.2. Η επικράτεια του μοτίβου αναγνώρισης RNA (RNA Recognition Motif ή RRM) των πρωτεϊνών LARP	10
A.3.3. Πρωτεΐνες με LaM χωρίς RRM	11
A.4. Δέσμευση του RNA στο μοτίβο RRM	11
A.4.1. Συντηρημένες αλληλουχίες δέσμευσης RNA των μοτίβων RRM	11
A.4.2. Αλληλεπίδραση μοτίβων RRM-RNA για τη δημιουργία συμπλόκου	13
A.4.3. Ο ρόλος των επιπρόσθετων στοιχείων του μοτίβου RRM στην πρόσδεση με το RNA	15
A.4.4. Συνδυασμός πολλών μοτίβων RRM για τη δέσμευση του RNA	16
A.4.5. Ο ρόλος του συνδέτη (linker) μεταξύ των διαδοχικών μοτίβων RRM στην πρόσδεση με το RNA	20
A.5. Η «πρωτότυπη» πρωτεΐνη La	22
A.6. Βιογένεση του tRNA.....	24
A.7. Ο βιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης La	28
A.7.1. Η πρωτεΐνη La στον πυρήνα του κυττάρου	28
A.7.2. Ο ρόλος της πρωτεΐνης La στην ωρίμανση του tRNA	29
A.7.3. Η πρωτεΐνη La στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου	30
A.8. Δομική οργάνωση των πρωτεϊνών LARP3 ή της «πρωτότυπης» πρωτεΐνης La	32
A.9. Δομική μελέτη των επικρατειών της πρωτεΐνης La	34
A.9.1. Δομική μελέτη του μοτίβου La της ανθρώπινης πρωτεΐνης La (hLaM) μέσω φασματοσκοπίας NMR.....	34
A.9.2. Κρυσταλλική δομή του μοτίβου La από το « <i>Trypanosoma Brucei</i> »	37
A.9.3. Δομική μελέτη του RRM1 μέσω φασματοσκοπίας NMR	39
A.9.4.i). Δομική μελέτη του C-τελικού άκρου της πρωτεΐνης La (La225-408)	40
A.9.4.ii). Δομική μελέτη του RRM2α μέσω φασματοσκοπίας NMR	42
A.10. Δομική μελέτη των συμπλόκων των επικρατειών της πρωτεΐνης La με RNA	45
A.10.1. Δομική μελέτη του LaM-RRM1 προσδεμένου με το ολιγονουκλεοτίδιο (U)	45
A.10.2. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της περιοχής NTD με ολιγονουκλεοτίδια RNA με UUU-3'-OH άκρο	48

A.11. Φασματοσκοπία NMR.....	53
A.11.1. Τα φάσματα 1D και ^1H - ^{15}N HSQC.....	54
A.11.2. Ανάλυση της δομής ενός βιομορίου με τη Φασματοσκοπία NMR	55
A.12.1. Η τεχνική της τμηματικής επισήμανσης (segmental labeling) πρωτεϊνών για τη δομική μελέτη μέσω της Φασματοσκοπίας NMR.....	58
A.12.2. Η τεχνική EPL (Expressed Protein Ligation).....	59
A.12.3. Επιλογή της κατάλληλης περιοχής συνένωσης των πολυπεπτιδικών τμημάτων για το σχηματισμό της πρωτεΐνης-στόχου	61
Ενότητα Β.....	63
Β. Σκοπός Ερευνητικής Εργασίας	65
Ενότητα Γ	67
Γ.1. Υλικά	69
Γ.1.1. Εργαστηριακός Εξοπλισμός.....	69
Γ.1.2. Αναλώσιμα.....	70
Γ.1.3. Αντιδραστήρια	71
Γ.1.4. Επισημασμένα μέσα.....	73
Γ.1.5. Θρεπτικά Υλικά	73
Γ.1.6. Διαλύματα	74
Γ.1.7. Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης (cloning vector) και κυτταρικά στελέχη <i>Escherichia coli</i> που χρησιμοποιήθηκαν	76
Γ.1.8. Δημιουργία των διαλυμάτων αποθήκευσης των ATP, GTP, CTP και UTP.....	79
Γ.2. Μέθοδοι.....	80
Γ.2.1. Μοριακή κλωνοποίηση	80
Γ.2.1.i. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-PCR	80
Γ.2.1.ii. Πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού	82
Γ.2.1.iii. Ένθεση ενός τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης	82
Γ.2.1.iv. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	83
Γ.2.2. Εισαγωγή πλασμιδίου σε κύτταρα <i>E.coli</i> (μετασχηματισμός)	84
Γ.2.3. Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηρίων	85
Γ.2.4. Απομόνωση των πρωτεϊνών μέσω υγρής χρωματογραφίας	87
Γ.2.4.i. Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου	88
Γ.2.4.ii. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού	88
Γ.2.5. Τμηματική επισήμανση των επικρατειών της πρωτεΐνης La για τη δομική μελέτη με φασματοσκοπία NMR	89
Γ.2.5.i. Σχεδιασμός και έκφραση των επιμέρους τμημάτων.....	89

Γ.2.5.i.. Απομόνωση, ενεργοποίηση και σύζευξη των δύο τμημάτων της πρωτεΐνης....	90
Γ.2.6. Επιλεκτική Επισήμανση αμινοξέων	92
Γ.2.7. Σημειακή τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση	94
Γ.2.8. Παρασκευή των tRNA	96
Γ.2.8.i. <i>In-vitro</i> μεταγραφή γονιδίων tRNA.....	96
Γ.2.8.ii. UREA-PAGE	97
Γ.2.8.iii. UV Shadowing	97
Γ.2.8.iv. Εκχύλιση με προσθήκη διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1)-Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων (DNA/RNA) με αιθανόλη.....	98
Γ.2.9. Δοκιμή αλλαγής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)	99
Γ.2.10. Microscale Thermophoresis (MST)	100
Γ.2.11. Παρασκευή της TEV (Tobacco Etch Virus)	102
Γ.2.11.i. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS με το ανασυνδυασμένο με την TEV (Tobacco Etch Virus) πλασμίδιο pRK793.....	102
Γ.2.11.ii. Υγρή καλλιέργεια για την έκφραση της TEV.....	102
Γ.2.12. Παρασκευή της T7 RNA πολυμεράσης.....	105
Γ.2.12.i. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS με το ανασυνδυασμένο με την T7 RNA πολυμεράση	105
Γ.2.12.ii. Υγρή καλλιέργεια για την έκφραση της T7 RNA πολυμεράση	105
Ενότητα Δ.....	109
Δ.1. Σχεδιασμός των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i>	111
Δ.2. Έκφραση των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i>	112
Δ.2.1. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> BL21(DE3)ROSETTA 2 με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο	112
Δ.2.2. Υγρή καλλιέργεια για την έκφραση των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La ...	112
Δ.2.2.i. Προκαλλιέργεια.....	112
Δ.2.2.ii. Υγρή καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό 5XM9.....	112
Δ.2.2.iii. Συλλογή των κυττάρων	113
Δ.2.3. Λύση των βακτηριακών κυττάρων μέσω εφαρμογής υπερήχων	113
Δ.2.4. Απομόνωση των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου και με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού	113
Δ.2.5. Προετοιμασία δειγμάτων	115
Δ.3. Σχεδιασμός των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La του <i>human</i>	116
Δ.3.1. Ενίσχυση των τμημάτων DNA για τα πολυπεπτίδια της <i>human</i> La.....	117

Δ.3.2. Πέψη του ένθετου DNA και του πλασμιδιακού φορέα pET.20b(+) με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI	120
Δ.3.3. Συνένωση του ένθετου DNA και του πλασμιδιακού φορέα pET.20b(+)	122
Δ.3.4. Πολλαπλασιασμός και επιλογή του ορθού ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pET.20b(+) με το ένθετο DNA.....	122
Δ.4. Έκφραση, απομόνωση και προετοιμασία των δειγμάτων των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης <i>human La</i>	123
Δ.5. Σχεδιασμός και κλωνοποίηση γονιδίων για τα πολυπεπτίδια RRM1 και RRM2α που προορίζονται για συνένωση μέσω της τεχνικής της τμηματικής επισήμανσης	123
Δ.5.1. Ενίσχυση των τμημάτων DNA για τα πολυπεπτίδια της <i>human La</i>	124
Δ.5.2. Πέψη του ένθετου DNA για το RRM1 και του πλασμιδιακού φορέα pEM9B με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και SapI.....	127
Δ.5.3. Συνένωση του ένθετου DNA και του πλασμιδιακού φορέα pEM9B	129
Δ.5.4. Πολλαπλασιασμός και επιλογή του ορθού ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pEM9B με το ένθετο DNA.....	129
Δ.5.5. Πέψη του ένθετου DNA για το RRM2α, I-RRM2α, RRM2αCC, I-RRM2αCC και του πλασμιδιακού φορέα pEM5B με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και BamHI	130
Δ.5.6. Συνένωση του ένθετου DNA και του πλασμιδιακού φορέα pEM5B	131
Δ.5.7. Πολλαπλασιασμός και επιλογή του ορθού ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pEM5B με το ένθετο DNA.....	132
Δ.6. Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των Cys233 και Cys278	132
Δ.6.1 Σχεδιασμός των εκκινητών και εκτέλεση της PCR	132
Δ.6.2. Πέψη με τα περιοριστικό ένζυμο DpnI	134
Δ.6.3. Πολλαπλασιασμός και επιλογή του ορθού ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pEM5B με το ένθετο DNA που φέρει τη μετάλλαξη	135
Δ.7. Τμηματική επισήμανση στο πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2 της πρωτεΐνης <i>La</i> του <i>Dictyostelium discoideum</i>	135
Δ.7.1. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli BL21(DE3)</i> με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.....	135
Δ.7.2. Υγρή καλλιέργεια για την έκφραση των πολυπεπτιδίων που προορίζονται για τη συνένωση των δύο επικρατειών με τη τμηματική επισήμανση.....	136
Δ.7.2.i. Προκαλλιέργεια.....	136
Δ.7.2.ii. Υγρή καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό 5XM9 των πολυπεπτιδίων που προορίζονται για τη συνένωση των δύο επικρατειών με τη τμηματική επισήμανση..	136
Δ.7.2.iii Συλλογή των κυττάρων	136
Δ.7.3. Διάρρηξη των βακτηριακών κυττάρων με γαλλικό θάλαμο πίεσης κυττάρων (French cell press).....	137

Δ.7.4. Αλλαγή διαλύματος της πρωτεάσης TEV με μεμβράνη διαπίδησης.....	137
Δ.7.5. Σύζευξη των δύο επικρατειών σε ρητίνη χιτίνης παρουσία του αντιδραστηρίου MESNA και της πρωτεάσης TEV.	138
Δ.7.6. Απομόνωση του συζευγμένου πολυπεπτιδίου με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου	139
Δ.7.7. Απομόνωση του συζευγμένου πολυπεπτιδίου με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού	140
Δ.8. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λυσίνης (Lys) σε ^{15}N υπόβαθρο του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i>	141
Δ.9. <i>In vitro</i> μεταγραφή των γονιδίων για τα pre-tRNA _{Arg} και pre-tRNA _{Ser} του <i>Dictyostelium discoideum</i>	142
Δ.9.1. Γραμμοποίηση του πλαμιδίου puc57	142
Δ.9.2. Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για τη διαδικασία της <i>in vitro</i> μεταγραφής του pre-tRNA _{Arg}	144
Δ.9.3. <i>In vitro</i> μεταγραφή του pre-tRNA _{Arg}	145
Δ.9.4. <i>In vitro</i> μεταγραφή του pre-tRNA _{Ser}	146
Δ.10. Αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων LaM, RRM1 και LaM-RRM1 με το pre-tRNA _{Arg} με πειράματα MST	149
<i>Ενότητα Ε</i>	151
Ε.1. Έκφραση και απομόνωση των επικρατειών της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i>	153
Ε.1. Έκφραση και απομόνωση των επικρατειών της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου	153
Ε.1.2. Απομόνωση των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού	156
Ε.2. Λήψη των NMR φασμάτων για τα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i>	159
Ε.2.1. NMR φάσματα των πολυπεπτιδίων LaM και RRM1	159
Ε.2.2. NMR φάσματα του πολυπεπτιδίου RRM2α.....	160
Ε.2.3. NMR φάσματα του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1.....	162
Ε.2.4. NMR φάσματα του πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α.....	164
Ε.2.5. NMR φάσματα του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1-RRM2α	166
Ε.2.6. NMR φάσματα των πολυπεπτιδίων RRM2α-Cter και RRM1-RRM2α-Cter	167
Ε.3. Έκφραση και απομόνωση των επικρατειών της πρωτεΐνης <i>human</i> La	169
Ε.4. Λήψη των NMR φασμάτων για τα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης <i>human</i> La	174
Ε.4.1. NMR φάσματα των πολυπεπτιδίων hLaM, hRRM1 και hLaM-RRM1	174
Ε.4.2. NMR φάσματα των πολυπεπτιδίων hRRM2α και hRRM1-RRM2α.....	175

E.5. Αλληλεπίδραση των επικρατειών της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	178
E.5.1. Αλληλεπίδραση της επικράτειας LaM της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	179
E.5.2. Αλληλεπίδραση της επικράτειας RRM1 της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	180
E.5.3. Αλληλεπίδραση της επικράτειας RRM2α της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	182
E.5.4. Αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	184
E.6. Αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το pre-tRNA _{Arg}	187
E.6.1. Αλληλεπίδραση της επικράτειας LaM της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το pre-tRNA _{Arg}	187
E.6.2. Αλληλεπίδραση της επικράτειας RRM1 της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το pre-tRNA _{Arg}	189
E.6.3. Αλληλεπίδραση της επικράτειας RRM2α της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το pre-tRNA _{Arg}	192
E.6.4. Αλληλεπίδραση της επικράτειας LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το pre-tRNA _{Arg}	194
E.6.5. Αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων RRM1-RRM2α και LaM-RRM1-RRM2α της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το pre-tRNA _{Arg}	197
E.7. Αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων LaM και LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το pre-tRNA _{Ser}	202
E.8. Αλληλεπίδραση των επικρατειών της πρωτεΐνης <i>human</i> La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	205
E.8.1. Αλληλεπίδραση της επικράτειας hLaM της πρωτεΐνης <i>human</i> La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	205
E.8.2. Αλληλεπίδραση της επικράτειας hRRM1 της πρωτεΐνης <i>human</i> La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	207
E.8.3. Αλληλεπίδραση της επικράτειας hRRM2α της πρωτεΐνης <i>human</i> La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	208
E.8.4. Αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου hLaM-RRM1 της πρωτεΐνης <i>human</i> La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	210
E.9. Τμηματική επισήμανση	213
E.9.1. Δοκιμασίες έκφρασης των πολυπεπτιδίων RRM1 και RRM2α	213
E.9.2. Απομόνωση του προϊόντος συνένωσης RRM1-RRM2α	214

E.9.3. ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματα των πολυπεπτιδίων $\{^{15}\text{N}\text{-RRM1}\}$ - $\{^{14}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$ και $\{^{14}\text{N}\text{-RRM1}\}$ - $\{^{15}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$	215
E.9.4. Παρασκευή των πολυπεπτιδίων $\{^{15}\text{N}\text{-RRM1}\}$ - $\{^{14}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$ και $\{^{14}\text{N}\text{-RRM1}\}$ - $\{^{15}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$ με προσθήκη αναγωγικών μέσων.....	218
E.9.5. Παρασκευή νέων πολυπεπτιδίων RRM2α για τη σωστή αναδίπλωσή του κατά τη δημιουργία του RRM1-RRM2α	219
E.10. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λυσίνης ($^{14}\text{N}\text{-Lys}$) σε ^{15}N υπόβαθρο για το πολυπεπτίδιο LaM-RRM1 του <i>Dictyostelium discoideum</i>	222
E.11. Παραγωγή των pre-tRNA _{Arg} και pre-tRNA _{Ser} με <i>in vitro</i> μετραγραφή	223
E.12. Αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων LaM, RRM1 και LaM-RRM1 με το pre-tRNA _{Arg} μέσω δοκιμής αλλαγής της ηλεκτροφορητικής τους κινητικότητας (EMSA)	224
E.13. Αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων LaM, RRM1 και LaM-RRM1 με το pre-tRNA _{Arg} μέσω πειραμάτων MST	225
Ενότητα ΣΤ	227
ΣΤ.1. Δομική ανάλυση των επικρατειών της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> μέσω της Φασματοσκοπίας NMR	229
ΣΤ.1.1. Το LaM του <i>Dictyostelium discoideum</i>	229
ΣΤ.1.2. Το μοτίβο RRM1 του <i>Dictyostelium discoideum</i>	231
ΣΤ.1.3. Το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i>	234
ΣΤ.1.3.i. Το μοτίβο RRM2α της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i>	234
ΣΤ.1.3.ii. Άλλες περιοχές του C-τελικού άκρου της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i>	237
ΣΤ.1.4. Η δομή του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 του <i>Dictyostelium discoideum</i>	239
ΣΤ.1.5. Αυτονομία των επιμέρους επικρατειών της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i>	243
ΣΤ.1.6. Αυτονομία των επιμέρους επικρατειών της ανθρώπινης πρωτεΐνης La	245
ΣΤ.2. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης των επικρατειών της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	247
ΣΤ.2.1. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dLaM της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU.....	247
ΣΤ.2.2. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dRRM1 της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU.....	250
ΣΤ.2.3. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dRRM2α της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU.....	253
ΣΤ.2.4. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dLaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	255

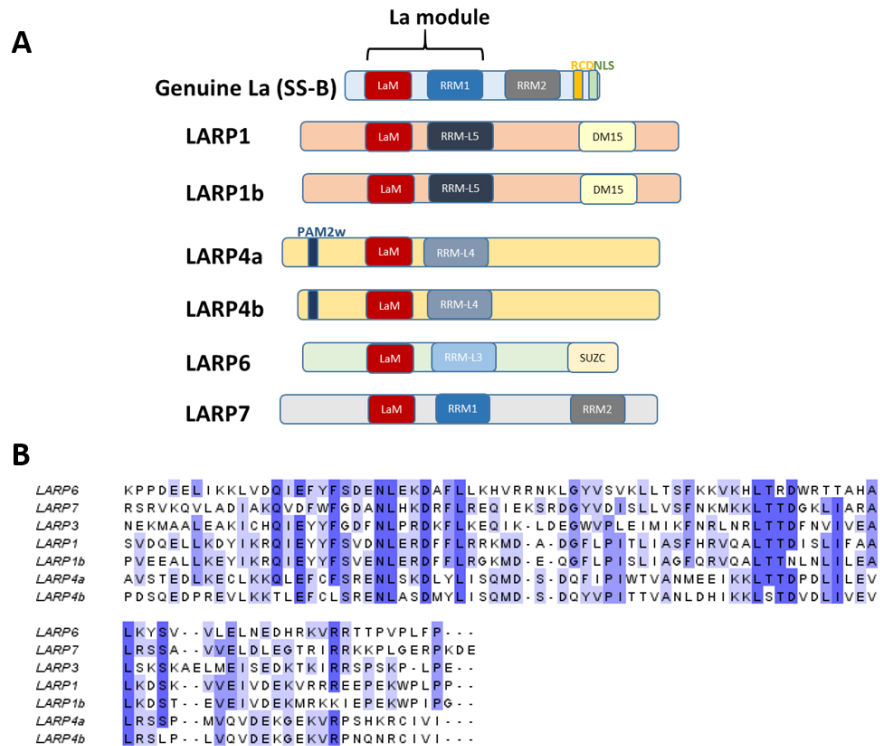
ΣΤ.3. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης των επικρατειών της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το pre-tRNA _{Arg}	260
ΣΤ.3.1. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dLaM της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το pre-tRNA _{Arg}	260
ΣΤ.3.2. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dRRM1 της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το με το pre-tRNA _{Arg}	263
ΣΤ.3.3. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dRRM2α της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το με το pre-tRNA _{Arg}	266
ΣΤ.3.4. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dLaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το pre-tRNA _{Arg}	268
ΣΤ.3.5. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dRRM1-RRM2α της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το pre-tRNA _{Arg}	272
ΣΤ.3.6. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dLaM-RRM1-RRM2α της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το pre-tRNA _{Arg}	277
ΣΤ.4. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dLaM της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i> με το με το pre-tRNA _{Ser}	283
ΣΤ.5. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης των επικρατειών της πρωτεΐνης <i>human</i> La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU.....	286
ΣΤ.5.1. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας hLaM της πρωτεΐνης <i>human</i> La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU.....	286
ΣΤ.5.2. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας hRRM1 της πρωτεΐνης <i>human</i> La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	289
ΣΤ.5.3. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας hRRM2α της πρωτεΐνης <i>human</i> La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	292
ΣΤ.5.4. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας hLaM-RRM1 της πρωτεΐνης <i>human</i> La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU	294
ΣΤ.6. Συγκριτική ανάλυση της αλληλεπίδρασης των επικρατειών της πρωτεΐνης La με RNA.	297
ΣΤ.7. Εφαρμογή της τμηματικής επισήμανσης στο πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α της πρωτεΐνης La του <i>Dictyostelium discoideum</i>	302
Ενότητα Ζ.....	307
Ζ. Βιβλιογραφία.....	309
Παράρτημα.....	327
Συντμήσεις.....	329

Ενότητα Α
Θεωρητικό Μέρος

A.1. Η υπερ-οικογένεια των πρωτεϊνών LARP (La-Related Proteins)

Η υπερ-οικογένεια των LARP (La-Related Proteins) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών (Εικόνα 1Α), οι οποίες φέρουν μια συντηρημένη αλληλουχία περίπου 70-80 αμινοξέων, το μοτίβο La (δηλαδή La motif ή LaM, Εικόνα 1Β) (1). Πρόκειται για αλληλουχίες συντηρημένες κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των ευκαρυωτικών οργανισμών με αξιοσημείωτο ρόλο στο μεταβολισμό του RNA (2, 3). Το μοτίβο La, δηλαδή το LaM εντοπίζεται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, και όχι στα *αρχαία*, γι' αυτό και θεωρείται ότι αποτελεί ένα προγονικό μοτίβο, το οποίο εμφανίστηκε μετά τη διαφοροποίηση των *αρχαίων*. Τα LARP κατατάσσονται φυλογενετικά σε 5 οικογένειες (1). Η πρώτη είναι αυτή της «*πρωτότυπης*» πρωτεΐνης La (Lupus antigen), στην οποία καθιερώθηκε για πρώτη φορά ως επικράτειά της το LaM. Είναι γνωστή και ως SS-B (Sjögren syndrome antigen B), ενώ πρόσφατα μετονομάστηκε σε LARP3. Άλλες οικογένειες των LARP είναι η LARP1 (παραλλάγματα 1a και 1b), η LARP4 (παραλλάγματα 4a και 4b), η LARP6 και η LARP7. Στα περισσότερα μέλη των οικογενειών αυτών φαίνεται ότι το LaM ακολουθείται από ένα συντηρημένο κλασικό μοτίβο αναγνώρισης RNA, το RRM (RNA Recognition Motif) ή ένα τύπου-RRM μοτίβο (RRM-Like ή RRM-L) (2, 3).

Οι πρωτεΐνες LARP είναι διαδεδομένες στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και χαρακτηρίζονται ως πρωτεΐνες πρόσδεσης με RNA με ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών καίριας σημασίας. Ορισμένα μέλη στοχεύουν σε συγκεκριμένα είδη RNA ως προσδέτες, όπως για παράδειγμα οι LARP7 στοχεύουν σε μικρά πυρηνικά μόρια RNA (snRNA) (4). Άλλα μέλη των LARP συνδέονται με mRNA για να παραχθούν λειτουργικές πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα η LARP1, η οποία αλληλεπιδρά με 5'TOP mRNA ρυθμίζοντας τη μετάφραση (5). Η ανθρώπινη LARP6 (hLARP6) στοχεύει σε ένα συντηρημένο μοτίβο στελέχους-θηλιάς (stem-loop ή SL), το οποίο εντοπίζεται σε mRNA, που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες α-κολλαγόνο τύπου I και III για να συντονίσουν τη μετάφρασή τους (6). Η LARP4 εμφανίζεται ως μετα-μεταφραστικός ρυθμιστής της έκφρασης των ριβοσωμικών πρωτεϊνών στα κύτταρα των θηλαστικών και η δράση της είναι δυνατόν να ελεγχθεί από τα επίπεδα του tRNA (7). Συνοπτικά, οι λειτουργίες της κάθε οικογένειας των LARP (8) παρατίθενται στον Πίνακα 1 παρακάτω.



Εικόνα 1: Α. Σχηματική οργάνωση των βασικών στοιχείων της δομής των πρωτεϊνών LARP. Β. Σύγκριση των αλληλουχιών των επικρατειών LaM των πρωτεϊνών LARP.

Πίνακας 1: Βασικά στοιχεία των οικογενειών των LARP.

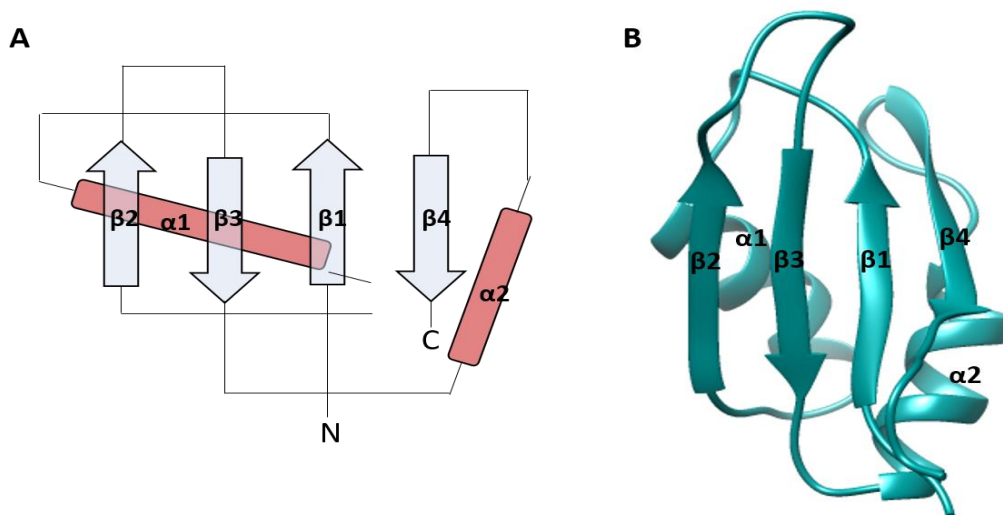
	«πρωτότυπη» πρωτεΐνη La	LARP1	LARP1b	LARP4a	LARP4b	LARP6	LARP7
Άλλες ονομασίες	SS-B, LARP3	LARP1a	LARP2	LARP4	LARP5, KIAA0217	Acheron, ACHN	PIP7S, HDCMA18
Αριθμός ισομορφών	2	3	9	7	2	2	3
Μέγεθος της κύριας ισομορφής (σε αμινοξέα)	408	1096	914	724	738	491	582
Ρόλος στη μεταγραφή	-προστατεύει τα μετάγραφα της RNAP III, -συμμετέχει στην ωρίμανση των pre-tRNA	-	-	-	-	αλληλεπίδραση με τους Id παράγοντες	Προσδένεται με 7SK snRNP και ρυθμίζει αρνητικά την μεταγραφή της RNAP III
Ρόλος στη μετάφραση	μέσω των IRES, 5'TOP	ρυθμίζει τη σταθερότητα ή/και τη μετάφραση των TOP mRNAs και άλλων	-	προάγει τη σταθερότητα των mRNA	διεγείρει τη μετάφραση και κυκλοποιεί τα mRNA	προάγει τη μετάφραση του κολλαγόνου	-

A.2. Το μοτίβο αναγνώρισης RNA (RNA Recognition Motif-RRM)

Το μοτίβο αναγνώρισης RNA (RNA Recognition Motif ή RRM) γνωστό και ως επικράτεια πρόσδεσης RNA (RNA Binding Domain ή RBD) ή ριβονουκλεοπρωτεϊνική επικράτεια (ribonucleoprotein domain ή RNP) αποτελεί μία επικράτεια πρωτεϊνών, η οποία εντοπίζεται συχνά στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Αναγνωρίστηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1980, όταν αποδείχθηκε ότι τα πρόδρομα μόρια των mRNA (pre-mRNAs) και τα πυρηνικά RNA (snRNAs) εντοπίζονται σε σύμπλοκο με πρωτεΐνες (9, 10). Τα μοτίβα RRM απαντώνται σε αφθονία στους περισσότερους οργανισμούς από τους κατώτερους προκαρυωτικούς μέχρι στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αλλά και στους ιούς. Τα μοτίβα RRM των προκαρυωτικών οργανισμών είναι, συνήθως, μικρότερα και εμφανίζουν ένα μόνο αντίγραφο του μοτίβου, ενώ στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αποτελούν συνήθως αυτοτελείς επικράτειες πρωτεϊνών. Στις ευκαρυωτικές πρωτεΐνες τα RRM συχνά απαντώνται ως πολλαπλά αντίγραφα εντός μιας πρωτεΐνης (από δύο έως έξι RRM), αλλά είναι δυνατό να συνυπάρχουν μαζί με άλλες επικράτειες. Τα μοτίβα RRM σε συνδυασμό με άλλες επικράτειες πρωτεϊνών ρυθμίζουν την αλληλουχία και την εξειδίκευση της δέσμευσης του RNA και με αυτό τον τρόπο διαφοροποιούν τις βιολογικές λειτουργίες.

Ένα μοτίβο RRM αποτελείται από περίπου 80-90 αμινοξέα και απαρτίζεται από δύο α -έλικες σε συνδυασμό με τέσσερις β -αντιπαράλληλους κλώνους, με τοπολογία $\beta1\alpha1\beta2\beta3\alpha2\beta4$ (Εικόνα 2). Οι β -κλώνοι φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση μονόκλωνου RNA. Αρκετά RRM που έχουν μελετηθεί δομικά με φασματοσκοπία NMR ή με κρυσταλλογραφία ακτίνων X παρουσιάζουν αρκετές διαφοροποιήσεις στην κλασική δομή του μοτίβου RRM. Συγκεκριμένα, οι θηλιές μεταξύ των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής ποικίλουν σε μέγεθος και σε δομή. Μία θηλιά ενός RRM είναι δυνατό να είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τις υπόλοιπες του ίδιου RRM (11) ή να αποτελεί επέκταση της επιφάνειας των β -κλώνων (12). Επίσης, τα διαφορετικά RRM εμφανίζουν ποικιλία στο μέγεθος των α -ελίκων και των β -κλώνων (13). Δομικές μελέτες σε διάφορα μοτίβα RRM αποκάλυψαν ότι, εκτός από τα βασικά στοιχεία δευτεροταγούς δομής των RRM είναι συχνή η εμφάνιση επιπλέον στοιχείων δευτεροταγούς δομής. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες hnRNP RRM3 (14), PTB RRM2 και PTB RRM3 (15) επεκτείνουν την επιφάνεια των β -κλώνων προς το C-τελικό τους άκρο με την προσθήκη ενός επιπλέον $\beta5$ -κλώνου, το οποίο είναι

αντιπαράλληλο στο $\beta 2$. Επιπλέον α -έλικες είναι δυνατό να ενσωματωθούν στη δομή του κλασικού μοτίβου RRM, όπως συμβαίνει στην C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης La (16).



Εικόνα 2: A. Τοπολογικό διάγραμμα του μοτίβου RRM. B. Δομή ενός τυπικού μοτίβου RRM με τοπολογία $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4$ PDB ID:2CQI

A.3. Δομικά χαρακτηριστικά των οικογενειών LARP

Τα μέλη της υπερ-οικογένειας των LARP δεν περιλαμβάνουν επικράτειες με ενζυμική δράση, ενώ φέρουν παραπλεύρως της επικράτειας του μοτίβου LaM ένα μοτίβο RRM, όπως αναφέρθηκε. Οι δύο αυτές επικράτειες μαζί αποτελούν τη δομική μονάδα La ή αλλιώς το «*la module*». Η διαμόρφωση του «*la module*» διαφέρει στις πρωτεΐνες LARP. Αν και οι πρωτεΐνες LARP παρουσιάζουν συντηρημένα γνωρίσματα, «*la module*» διαφορετικών LARP φαίνεται ότι αναγνωρίζουν διαφορετικούς στόχους RNA. Οι επικράτειες των LaM και RRM1 αποτελούνται από περίπου 70 και 80 αμινοξέα, αντίστοιχα, και εμφανίζονται ως αυτοτελείς δομικές επικράτειες. Το «*la module*» αποτελεί μια μοναδική περιοχή πρόσδεσης του RNA και προσδιορίστηκε μετά από δομική μελέτη της ανθρώπινης πρωτεΐνης La (*human La*) (17-19). Παρόλο που έχουν προσδιοριστεί εκατοντάδες RRM μοτίβα στο γονιδίωμα των μεταζώων (9, 20), τα RRM, τα οποία αποτελούν μέρος του «*la module*» περιορίζονται σε 6-9 μοναδικά σε LARP ανά γονιδίωμα. Φυλογενετική ανάλυση αποκάλυψε ότι το LaM και το RRM1 εξελίχθηκαν μαζί στις LARP, ενώ μόνο 5 από τις 134 πρωτεΐνες LARP

περιλαμβάνουν την επικράτεια του LaM, χωρίς την παρουσία του RRM, υπογραμμίζοντας τη σημασία του LaM στην αναγνώριση του RNA.

Στην «*πρωτότυπη*» πρωτεΐνη La το «*la module*» εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο, ενώ σε άλλες πρωτεΐνες LARP εντοπίζεται περισσότερο κεντρικά. Επίσης, υπάρχουν LARP, οι οποίες φέρουν το LaM στο C-τελικό άκρο τους, χωρίς να έχει ταυτοποιηθεί σε αυτές RRM ή RRM-L (RRM-Like) μοτίβο. Η οικογένεια των LARP7 περιλαμβάνει ένα κανονικό μοτίβο RRM όπως ακριβώς και στην «*πρωτότυπη*» πρωτεΐνη La, ενώ άλλες οικογένειες LARP περιλαμβάνουν ποικίλα μοτίβα RRM-L. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο βαθμός απόκλισης των RRM-L μοτίβων από το κλασικό RRM ποικίλει στα διαφορετικά LARP. Επίσης, συγκρίνοντας τα RRM-L των διαφόρων LARP παρατηρείται ότι η συντηρημένη ακολουθία τους ποικίλει με τέτοιο τρόπο, ώστε να καθίσταται δυνατή η κατηγοριοποίησή τους. Συγκρίνοντας την ακολουθία τους εμφανίζεται μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των RRM-L, τα οποία ανήκουν στην ίδια οικογένεια LARP αλλά παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις όταν συγκρίνονται RRM-L διαφορετικών οικογενειών.

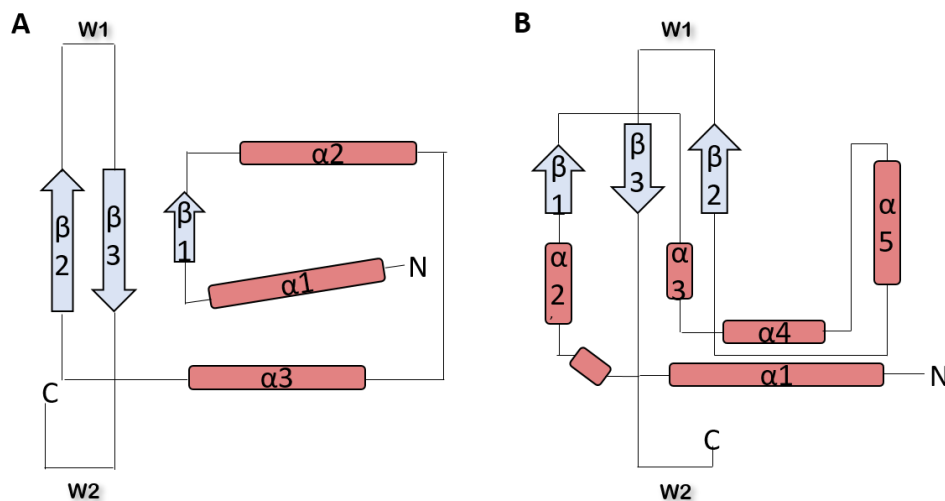
Η «*πρωτότυπη*» πρωτεΐνη La και η LARP7 φέρουν μια επιπλέον επικράτεια RRM, την RRM2a, η οποία απουσιάζει από τις υπόλοιπες οικογένειες LARP. Στην οικογένεια LARP1 και συγκεκριμένα στο C-τελικό άκρο εντοπίζεται ένα μοτίβο αποτελούμενο από τρεις συντηρημένες περιοχές. Αυτό, αρχικά ονομάστηκε επικράτεια DM15 (21), άλλα πλέον αποκαλείται μοτίβο LARP1, καθώς έχει αναγνωριστεί ως μοναδικό στο LARP1 (1). Αντιθέτως, η οικογένεια πρωτεϊνών LARP6 φέρει ένα μοτίβο 36 αμινοξέων, το SUZ-C, στο C-τελικό άκρο. Η επικράτεια αυτή εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο πρωτεϊνών, οι οποίες προσδένονται με RNA (RNPs ή Ribonucleoprotein) και απαιτείται η ύπαρξή της για τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους (22). Οι LARP4a και b δε φέρουν επιπλέον μοτίβα στο C-τελικό τους άκρο, ενώ εμφανίζουν μία άτυπη N-τελική PAM2 (poly(A)-binding protein-binding motif 2) επικράτεια, η οποία προσδένεται με πολύ-αδενυλιωμένες πρωτεΐνες (PABP ή poly(A)-binding protein) (23). Όλα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι οικογένειες των LARP εμφανίζουν διαφορετικές λειτουργίες και φαίνεται να είναι συντηρημένες στα διαφορετικά είδη των οργανισμών. Κάθε μέλος αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών φαίνεται να διαδραματίζει το δικό του ρόλο στη μεταγραφή ή/και στη μετάφραση (Πίνακας 1).

A.3.1. Η επικράτεια του μοτίβου La (LaM) των πρωτεϊνών LARP

Το μοτίβο La (LaM) εμφανίζεται ως η επικράτεια με το μεγαλύτερο βαθμό ομολογίας μεταξύ των πρωτεϊνών των οικογενειών των LARP. Η επικράτεια του LaM εντοπίστηκε στην «πρωτότυπη» πρωτεΐνη La θεωρώντας, αρχικά, ότι η περιοχή αυτή έχει τη διαμόρφωση μοτίβου τύπου «*winged helix*», ενός μοτίβου πρόσδεσης DNA. Το μοτίβο «*winged helix*» αποτελείται από τρεις α -έλικες και τρεις β -κλώνους με τοπολογία $\alpha 1\beta 1\alpha 2\alpha 3\beta 2\beta 3$, ενώ σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν η $\beta 2\beta 3$ θηλιά και η C-τελική περιοχή, όπου σχηματίζονται τα δύο «φτερά» (*wings*), στα οποία προσδένεται το DNA. Το LaM περιλαμβάνει τρεις επιπλέον α -έλικες (18, 24), προσαρτημένες στο κανονικό ικρίωμα των «*winged helix*» (Εικόνα 3). Τα επιπρόσθετα στοιχεία που εμφανίζουν τα LaM σε σχέση με τις διαμορφώσεις των «*winged helix*», όπως για παράδειγμα οι επιπλέον έλικες και οι θηλιές, επιτρέπουν το σχηματισμό μιας υδρόφοβης κοιλότητας με ικανότητα πρόσδεσης RNA. Με αυτόν τον τρόπο, επιτρέπεται στο LaM να υιοθετήσει ένα διαφορετικό τρόπο αναγνώρισης του RNA, κατά τον οποίο χρησιμοποιεί εντελώς διαφορετικές επιφάνειες πρόσδεσης από τις αντίστοιχες περιοχές πρόσδεσης DNA των «*winged helix*» επικρατειών. Σε αυτή την υδρόφοβη κοιλότητα διακρίνονται ειδικές και μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις με προσδέτη την περιοχή UUU-3'-OH του RNA. Ειδικότερα, αυτή η αλληλεπίδραση πραγματοποιείται μέσω των πλευρικών αλυσίδων έξι κύριων αμινοξικών καταλοίπων, συντηρημένων στις πρωτεΐνες LARP: γλουταμίνη 20 (Gln20), τυροσίνη 23, (Tyr23), τυροσίνη 24 (Tyr24), ασπαραγινικό οξύ 33 (Asp33), φαινυλαλανίνη 35 (Phe35) και φαινυλαλανίνη 55 (Phe55) (ακολουθείται η αρίθμηση της ανθρώπινης La) (17, 19). Επομένως, η δομή τύπου «*winged helix*» σε συνδυασμό με τις επιπλέον ειδικές έλικες των LaM καθίσταται καίριας σημασίας στην αναγνώριση του RNA καθορίζοντας μοναδικές λειτουργίες για τα «*La module*» των LARP.

Δομικές μελέτες σε συνδυασμό με μεταλλάξεις που πραγματοποιήθηκαν στην επικράτεια LaM των πρωτεϊνών LARP7 αποκάλυψαν ότι η υδρόφοβη κοιλότητα πρόσδεσης RNA εμφανίζεται λειτουργική για την αλληλεπίδρασή της με 7SK RNA UUU-3'-OH (25). Ο ίδιος συνδυασμός αμινοξέων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εσωτερική αναγνώριση του κολλαγόνου 5'UTR SL RNA από την ανθρώπινη LARP6. Η πρόσδεση αυτή αναμενόταν από τις πρωτεΐνες LARP7 εξαιτίας της υψηλής ομολογίας των αμινοξέων της με την «πρωτότυπη» ανθρώπινη La, καθώς επίσης και

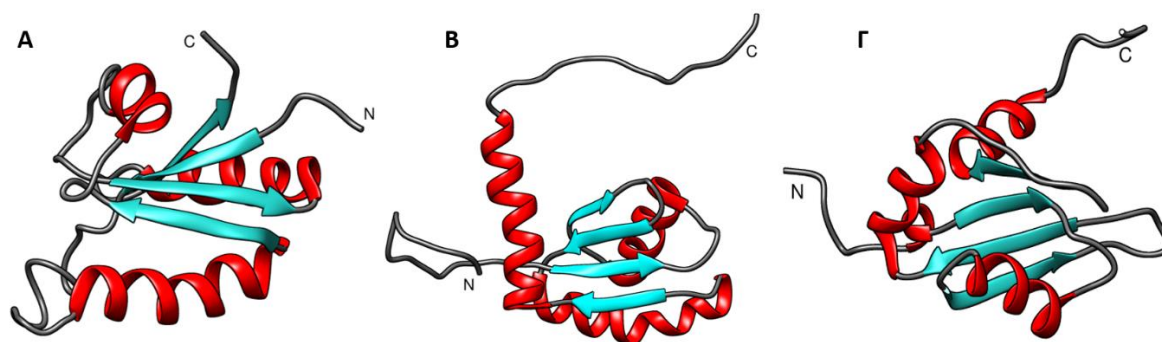
της ομοιότητας στο άκρο του RNA που αναγνωρίζεται από την La, σε σύγκριση με το αντίστοιχο RNA που αναγνωρίζεται από τις LARP7. Για την LARP6 το εύρημα αυτό θεωρείται ιδιαίτερος σημαντικό, δεδομένης της διαφοράς τους στο μέγεθος και στη συνολική δομή των δύο διαφορετικού τύπου RNA που προσδένονται στην «πρωτότυπη» La και στην LARP7. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι ότι τα έξι κύρια αμινοξικά κατάλοιπα που μεσολαβούν στην ειδική αναγνώριση του UUU-3'-OH άκρου εμφανίζονται να διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην πρόσδεση του RNA στην LARP6, παρόλο που το 3'-OH δε φαίνεται να αποτελεί στοιχείο αναγνώρισης για τις πρωτεΐνες της κατηγορίας των LARP6. Επιπροσθέτως, εμφανίζεται υψηλή συντήρηση των έξι αυτών αμινοξέων σε όλες τις οικογένειες των LARP. Συγκεκριμένα, στις αλληλουχίες που εξετάστηκαν η θέση 20 καταλαμβάνεται από το αμινοξύ γλουταμίνη (Q) κατά 96,6%, οι θέσεις 23 και 24 από φαινυλαλανίνη / τυροσίνη / τρυπτοφάνη (F/Y/W) κατά 97,9% και 99,9% αντιστοίχως, η θέση 33 από ασπαραγινικό οξύ (D) με ποσοστό 99,7%, η θέση 35 από φαινυλαλανίνη / τυροσίνη (F/Y) κατά 96,2% και η θέση 55 από φαινυλαλανίνη (F) κατά 97,6%. Η συντήρηση των αμινοξέων αυτών στις πρωτεΐνες LARP διαφορετικών οργανισμών αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα για την εξέλιξη των ειδών.



Εικόνα 3: Τοπολογικό διάγραμμα Α. του μοτίβου "winged helix" και Β του μοτίβου LaM.

Α.3.2. Η επικράτεια του μοτίβου αναγνώρισης RNA (RNA Recognition Motif ή RRM) των πρωτεϊνών LARP

Το μοτίβο αναγνώρισης RNA (RNA Recognition Motif ή RRM) των LARP αποτελείται από περίπου 90 αμινοξέα και υιοθετεί συνήθως την κλασική δομή των μοτίβων RRM, με τοπολογία $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4$. Οι β -κλώνοι φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση του μονόκλωνου RNA. Φυλογενετική ταξινόμηση των χαρακτηριστικών των επικρατειών RRM της οικογένειας των πρωτεϊνών των LARP, σε συνδυασμό με δομές που επιλύθηκαν για τα LARP6 και LARP7, αποκάλυψαν την ύπαρξη ποικιλομορφίας στα μοτίβα RRM των LARP (Εικόνα 4). Συγκεκριμένα, η επικράτεια RRM1 της LARP6 (PDB ID: 2MTG, Εικόνα 4Α) περιλαμβάνει μία επιπλέον α -έλικα στην $\beta 2\beta 3$ θηλιά (26). Το RRM2 της LARP7 (PDB ID: 5KNW, Εικόνα 4Β) περιλαμβάνει τέσσερις β -κλώνους και τρεις α -έλικες με τοπολογία $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4\alpha 3$, δηλαδή φέρει μία επιπλέον α -έλικα (4, 25), ενώ η επικράτεια του RRM1 της ανθρώπινης La (PDB ID: 1S79, Εικόνα 4Γ) υιοθετεί διαμόρφωση κανονικού RRM με μία επιπλέον α -έλικα στην C-τελική περιοχή. Επιπροσθέτως, μελέτη της δέσμησης του RNA με τα LARP6, LARP7 και LARP3 ή hLa (*human La protein*, «πρωτότυπη» πρωτεΐνη La του ανθρώπου) αποκάλυψε ότι οι επιφάνειες δέσμησης διαφέρουν αρκετά (25, 26). Τα διαφορετικά γνωρίσματα των επικρατειών RRM των διαφορετικών μελών της υπερ-οικογένειας πρωτεϊνών LARP αποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευση του υποστρώματος του RNA που δεσμεύεται. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται από την απώλεια πρόσδεσης ή συγγένειας όταν κάποιο από τα RRM των hLARP6 και hLARP7 αντικατασταθεί από το αντίστοιχο της hLa (26, 27).



Εικόνα 4: NMR τρισδιάστατες δομές των Α. RRM1 της LARP6 (PDB ID: 2MTG), Β. RRM2α της LARP7 (PDB ID: 5KNW) και Γ. RRM1 της ανθρώπινης πρωτεΐνης La (PDB ID: 1S79).

A.3.3. Πρωτεΐνες με LaM χωρίς RRM

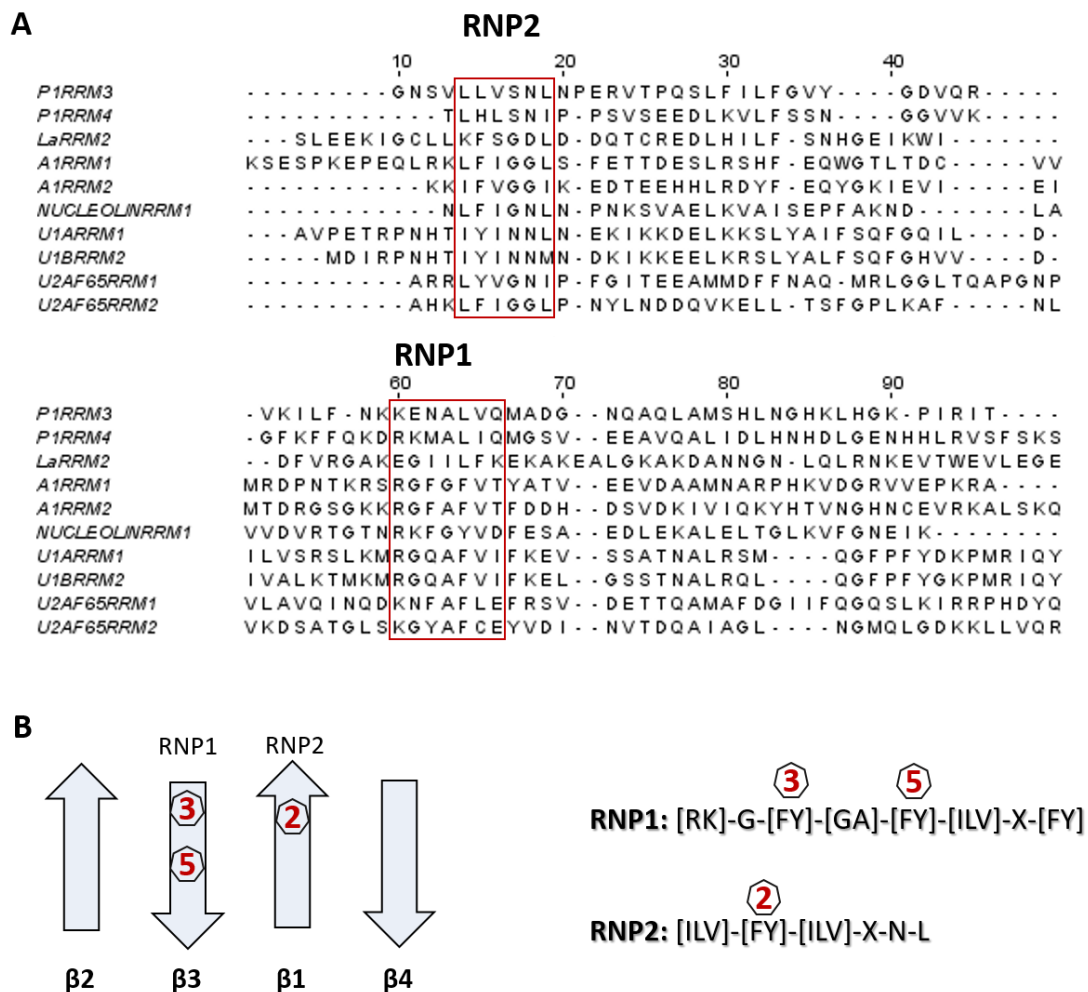
Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν μοτίβο LaM χωρίς την παρουσία γειτονικού RRM. Σε αυτή την κατηγορία των LARP εμπίπτουν τα *S. pombe* Slr1p, *Aspergillus niger* AnLARP, *Phytophthora Sojae* PsLARP, καθώς, επίσης, και τα χαρακτηριστικά *S. Cerevisiae* Sro9p και Slf1p (1). Τα τελευταία εμφανίζουν δράσεις στη μετάφραση του mRNA (28), με επιλεκτικότητα στα ομοπολυμερή RNA. Η Slf1 αποκαλύφθηκε ότι εμπλέκεται στο μεταβολισμό του χαλκού σε ζυμομύκητες πριν γίνει γνωστό ότι περιλαμβάνει μοτίβο LaM (29). Επιπλέον, γνωστοποιήθηκε ότι η Slf1 μέσω του LaM αλληλεπιδρά με mRNA, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αντοχή του οργανισμού σε χαλκό και για το οξειδωτικό στρες (29, 30). Οι πρωτεΐνες Slf1 και Sro1 εμφανίζουν λειτουργική σχέση με τις οικογένειες των LARP1 και LARP4, καθώς συνδέονται με ριβοσώματα και PABP πρωτεΐνες, ενώ αλληλεπιδρούν με πλήθος διαφορετικών μορίων mRNA, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που κωδικοποιούν ριβοσωμικές πρωτεΐνες (31, 32). Επομένως, είναι δυνατή η ύπαρξη ενός εναλλακτικού μηχανισμού αναγνώρισης RNA από τις πρωτεΐνες LARP που περιλαμβάνουν μόνο το μοτίβο LaM χωρίς την ύπαρξη ενός RRM.

A.4. Δέσμευση του RNA στο μοτίβο RRM

A.4.1. Συντηρημένες αλληλουχίες δέσμευσης RNA των μοτίβων RRM

Η δομή των μοτίβων δέσμευσης RNA, δηλαδή των RRM, έχει μελετηθεί αρκετά (20, 33). Παρόλο που φαίνεται να είναι αρκετά καλά συντηρημένη και περιορισμένη ως προς τα βασικά δομικά στοιχεία, είναι δυνατό να υιοθετήσει λεπτές δομικές παραλλαγές και να αναγνωρίσει μια ευρεία ποικιλία διαφορετικών σε δομή και αλληλουχία μορίων RNA (34). Συνήθως, τα μοτίβα RRM αλληλεπιδρούν με μονόκλωνο RNA χρησιμοποιώντας την επιφάνεια των β -κλώνων. Επιπλέον, δεσμεύουν μόρια RNA μέσω διαφορετικού αριθμού νουκλεοτιδίων, τα οποία κυμαίνονται από δύο, όπως στην περίπτωση της πρωτεΐνης CBP20 (35-37) και του μοτίβου RRM2 της πρωτεΐνης Nucleolin (38, 39), μέχρι το πολύ οκτώ νουκλεοτίδια, όπως στην περίπτωση της πρωτεΐνης U2B (40). Οι αζωτούχες βάσεις του RNA συνήθως απλώνονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, ενώ οι φωσφορικές ομάδες του RNA εντοπίζονται εκτεθειμένες στο διαλύτη. Το μόριο του RNA εκτείνεται στην

επιφάνεια από το $\beta 4$ προς τον $\beta 2$ -κλώνο με κατεύθυνση 5' προς 3'. Τα μοτίβα RRM σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας χαρακτηρίζονται από δύο συντηρημένες αλληλουχίες, την RNP1 και την RNP2 (ribonucleoprotein motif), οι οποίες εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με το RNA (Εικόνα 5A). Η ακολουθία του RNP1 είναι η Lys/Arg-Gly-Phe/Tyr-Gly/Ala-Phe/Tyr-Val/Ile/Leu-X-Phe/Tyr και εντοπίζεται στον $\beta 3$ -κλώνο. Η δε ακολουθία του RNP2 είναι Ile/Val/Leu-Phe/Tyr-Ile/Val/Leu-X-Asn-Leu και εντοπίζεται στον $\beta 1$ -κλώνο (Εικόνα 5B) (9, 10).



Εικόνα 5: Α. Σύγκριση των αλληλουχιών διαφορετικών μοτίβων RRM, στα οποία εντοπίζονται οι συντηρημένες αλληλουχίες RNP1 και RNP2. Με πλαίσιο επισημαίνονται τα συντηρημένα αρωματικά κατάλοιπα, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του RNA. Β. Σχηματική απεικόνιση της συντηρημένης δομής των μοτίβων RRM, η οποία αλληλεπιδρά με μονόκλωνο RNA, καθώς και οι βασικές, συντηρημένες θέσεις πρόσδεσης ενός δινουκλεοτιδίου.

Οι περιοχές RNP1 και RNP2 θεωρούνται απαραίτητες για τη δέσμευση των μορίων RNA (41-43). Στα περισσότερα κλασικά μοτίβα RRM, τρεις συντηρημένες πλευρικές αλυσίδες αμινοξικών καταλοίπων, οι οποίες εντοπίζονται στο $\beta 1$ -κλώνο

(RNP2) και στο $\beta 3$ -κλώνο (RNP1), είναι απαραίτητες για τη δέσμευση του RNA. Ειδικότερα, οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων, οι οποίες εντοπίζονται στη θέση 2 του RNP2 και στις θέσεις 3 και 5 του RNP1, αλληλεπιδρούν με δύο νουκλεοτίδια (Εικόνα 5B). Συγκεκριμένα, οι βάσεις του νουκλεοτιδίου στο 5' άκρο, το οποίο αναφέρεται ως N1 και του νουκλεοτιδίου στο 3' άκρο, το οποίο αναφέρεται ως N2, τοποθετούνται στους αρωματικούς δακτυλίους της θέσης 2 του RNP2 και της θέσης 5 του RNP1, αντιστοίχως. Ο αρωματικός δακτύλιος του τρίτου αμινοξέος, της θέσης 3 του RNP1 εντοπίζεται σε αυτή την περίπτωση μεταξύ των δύο δακτυλίων του σακχάρου του δινουκλεοτιδίου. Επίσης, η θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της θέσης 1 του RNP1 σχηματίζει γέφυρα άλατος με τη φωσφορική ομάδα που εντοπίζεται μεταξύ των δινουκλεοτιδίων. Η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ των RRM-RNA είναι συντηρημένη, παρόλο που απουσιάζει σε ορισμένα σύμπλοκα.

A.4.2. Αλληλεπίδραση μοτίβων RRM-RNA για τη δημιουργία συμπλόκου

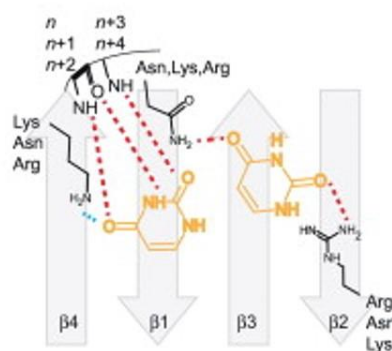
Οι αλληλουχίες RNP1 και RNP2 περιλαμβάνουν αρωματικά και βασικά αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με το RNA. Η αναγνώριση και η αλληλεπίδραση του RNA εξαρτάται από τη δευτεροταγή δομή του RNA και από την επιφάνεια της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, εξαρτάται από ένα δίκτυο μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων που περιλαμβάνει κυρίως δεσμούς υδρογόνου, δεσμούς Van der Waals και ιονικές αλληλεπιδράσεις. Κατά την αλληλεπίδρασή τους, οι πρωτεΐνες με το RNA σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, καθώς οι αζωτούχες βάσεις του RNA έχουν τη τάση να σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου με τα άτομα οξυγόνου της κύριας αλυσίδας, ενώ οι φωσφορικές ομάδες σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα του αζώτου (44). Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεγάλης απόστασης επιδρούν στην κατανομή του φορτίου της επιφάνειας πρόσδεσης, ώστε να δημιουργηθούν κατάλληλες συνθήκες για τη δημιουργία συμπλόκου. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μικρότερης απόστασης είναι δυνατό να προκαλέσουν παραμόρφωση στο RNA και να προσανατολίσουν κατάλληλα την πρωτεΐνη για τη δημιουργία συμπλόκου. Οι αλληλεπιδράσεις επιστοίβασης (stacking interaction, π-π stacking interaction) είναι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αρωματικών δακτυλίων. Σε τέτοιες αλληλεπιδράσεις εμπλέκονται όλα τα αρωματικά αμινοξέα και οι αζωτούχες βάσεις του RNA (45-48), αλλά συχνά εμπλέκονται και αμινοξικά κατάλοιπα αργινίνης στο

σχηματισμό π-π αλληλεπιδράσεων στοίβασης με την αζωτούχο βάση (45, 47). Αυτού του είδους οι αλληλεπιδράσεις, ανάλογα με τον προσανατολισμό των δακτυλίων που αλληλεπιδρούν, συμβάλουν στη σταθερότητα και στη λειτουργικότητα των συμπλόκων πρωτεΐνης-RNA (49-51). Οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals είναι βασικές διαμοριακές ηλεκτροστατικές δυνάμεις που σταθεροποιούν τη δομή του συμπλόκου (45, 52). Επιπλέον, σημαντικές είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ιδιαίτερα για τα σύμπλοκα μεγάλου μοριακού βάρους.

Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τα μόρια νερού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του RNA. Γενικά, τα μόρια νερού επιδρούν στην αναδίπλωση, τη διαμόρφωση της δομής, τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, ενώ αλληλεπιδράσεις των μοτίβων RRM με μεμονωμένα μόρια νερού θεωρούνται σημαντικές για να εκτελέσουν τις λειτουργίες τους και να αλληλεπιδράσουν με RNA. Μάλιστα, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν μόρια νερού θεωρούνται κρίσιμες για την κατανόηση της εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασης RRM-RNA.

Τα μοτίβα RRM, παρόλο το μικρό μέγεθός τους, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ποικιλία αλληλουχιών RNA. Όλοι οι τύποι των νουκλεοτιδίων RNA (αδενίνη, κυτοσίνη, γουανίνη, ουρακίλη) είναι δυνατόν να βρεθούν σε όλες τις πιθανές θέσεις πρόσδεσης RNA των μοτίβων RRM, αν και σε ορισμένες από αυτές φαίνεται να προτιμώνται κάποια νουκλεοτίδια. Έχουν επιλυθεί δομές μοτίβων RRM με διαφορετικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και σε αυτά οι θέσεις πρόσδεσης για τα νουκλεοτίδια N1 και N2 φαίνεται ότι μπορούν να διαμορφωθούν εύκολα για να αλληλεπιδράσουν με μία κυτοσίνη (C) ή μία αδενίνη (A), ενώ είναι δυνατή η πρόσδεση μιας γουανίνης (G) με μία διαφορετική διαμόρφωση, καθώς μπορούν να σχηματιστούν τέσσερις ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου μόνο με την κύρια αλυσίδα δύο αμινοξικών καταλοίπων στο τέλος του $\beta 4$ -κλώνου (37). Επομένως, τη θέση του N1 φαίνεται να καταλαμβάνουν συχνότερα οι κυτοσίνες (C) και οι αδενίνες (A), καθώς το 52% των κυτοσινών και το 35% των αδενινών αλληλεπιδρούν με RRM εντοπίζονται στη θέση N1. Επίσης, περίπου το 30% των γουανινών που αλληλεπιδρούν με RRM εντοπίζονται στη θέση N2. Το νουκλεοτίδιο ουρακίλη (U) αναγνωρίζεται ειδικά περισσότερο συχνά από τα μοτίβα RRM σε όλες τις θέσεις αναγνώρισης και δέσμευσης νουκλεοτιδίων. Μάλιστα, η αναγνώριση ενός δινουκλεοτιδίου UU παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των δομών (12, 19, 53-57). Γενικά, μία ουρακίλη στη θέση N1 σχηματίζει

δεσμό υδρογόνου με την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης, της ασπαραγίνης ή της αργινίνης του $\beta 4$ -κλώνου και έναν έως τρεις δεσμούς υδρογόνου με τις κύριες αλυσίδες μέχρι τεσσάρων αμινοξικών καταλοίπων που εντοπίζονται μετά τον $\beta 4$ -κλώνο. Η ουρακίλη στη θέση N2 δεν αναγνωρίζεται από την κύρια αλυσίδα, αλλά μέσω δύο πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων των $\beta 1$ και $\beta 2$ -κλώνων, όπου αλληλεπιδρά με το οξυγόνο (O) του καρβονυλίου O4 και O2, αντιστοίχως (Εικόνα 6). Επομένως, τα RRM φαίνεται ότι έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με όλες σχεδόν τις αλληλουχίες των δινουκλεοτιδίων στην κανονική θέση δέσμησης, παρόλο που οι κυτοσίνες είναι σπάνιες εκτός από τη θέση N1.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των πλευρικών αλυσίδων των μοτίβων RRM και των δεσμών υδρογόνου (με διακεκομμένες γραμμές), οι οποίοι εμπλέκονται στην αναγνώριση του δινουκλεοτιδίου UU για το σχηματισμό συμπλόκου RRM-RNA (58).

A.4.3. Ο ρόλος των επιπρόσθετων στοιχείων του μοτίβου RRM στην πρόσδεση με το RNA

Αρκετά μοτίβα RRM δεσμεύουν RNA με υψηλή συγγένεια και με εξειδίκευση στην αλληλουχία του RNA. Παρόλα αυτά, η εξειδίκευση στην αλληλουχία δε συνεπάγεται υψηλή συγγένεια μεταξύ των μορίων (59). Για να αλληλεπιδράσουν περισσότερο ισχυρά με το RNA, ορισμένα RRM αλληλεπιδρούν μέσω περισσότερων στοιχείων της δομής τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα RRM αλληλεπιδρούν με RNA και μέσω των κλώνων $\beta 2$ και $\beta 4$, δηλαδή χρησιμοποιούν, εκτός από την κλασική περιοχή πρόσδεσης ($\beta 1$ και $\beta 3$ -κλώνοι), και τα άλλους δύο κλώνους. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το RRM1 της πρωτεΐνης hnRNP A1, όπου καθένας από τους β -κλώνους αλληλεπιδρά με ένα νουκλεοτίδιο. Άλλα μοτίβα RRM για να αυξήσουν τη συγγένεια με το RNA, χρησιμοποιούν τις θηλιές 1, 3 ή 5 που εντοπίζονται στο κάτω μέρος του β -

κλώνου και έρχονται σε επαφή με αυτό. Η παρουσία πρόσθετων στοιχείων δευτεροταγούς δομής χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό από τα RRM για την αλληλεπίδραση με μεγαλύτερα-μακρύτερα μόρια RNA. Ένας επιπρόσθετος β -κλώνος ($\beta 5$), όπως αυτό στα RRM2 και RRM3 της πρωτεΐνης PTB, έχει ως αποτέλεσμα την επέκταση της β -επιφάνειας, η οποία επιτρέπει την πρόσδεση ενός επιπλέον νουκλεοτιδίου στην περίπτωση του RRM2, ή δύο επιπλέον νουκλεοτιδίων στην περίπτωση του RRM3 (15). Ομοίως, το RRM1 των πρωτεϊνών CPEB1 και CPEB4 περιλαμβάνει δύο επιπρόσθετους β -αντιπαράλληλους κλώνους (βa και βb) μεταξύ της $\alpha 2$ -έλικας και του $\beta 4$ -κλώνου, επεκτείνοντας την επιφάνεια των β -κλώνων (12).

Οι επιπρόσθετες περιοχές στα N- και οι C-τελικά άκρα των μοτίβων RRM διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του RNA. Σε αρκετά σύμπλοκα RRM-RNA, η συσσώρευση των αζωτούχων βάσεων στα αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα της θέσης 2 του RNP2 οδηγεί στο σχηματισμό δομής «σάντουιτς», είτε με την πλευρική αλυσίδα ενός ή περισσότερων αμινοξέων της N-τελικής περιοχής (60), είτε με την C-τελική περιοχή του RRM (36). Μάλιστα, σε ορισμένες περιπτώσεις, η C-τελική περιοχή εμφανίζεται ως μη-δομημένη στην ελεύθερη κατάσταση, ενώ δομείται παρουσία RNA. Επίσης, η C-τελική περιοχή μπορεί να συμβάλει στην επιλογή του RNA έναντι του DNA μέσω της αλληλεπίδρασής της με τη 2'-OH ομάδα του δακτυλίου του σακχάρου. Η υδροξυλομάδα στο σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου είναι δυνατό να δρα ως δέκτης υδρογόνου και να αλληλεπιδρά με τις πλευρικές ομάδες της πρωτεΐνης, καθώς και με τον αμιδικό σκελετό, είτε ως δότης υδρογόνου να αλληλεπιδρά με το οξυγόνο του καρβονυλίου του πεπτιδικού σκελετού (61). Άλλες περιοχές του μοτίβου RRM, όπως ο $\beta 2$ -κλώνος και οι θηλιές, αλληλεπιδρούν επίσης με τις ομάδες των 2'-OH, συμβάλλοντας στη διάκριση του RNA από το DNA (38, 57, 62, 63). Ωστόσο, αναφέρονται περιπτώσεις όπου η C-τελική περιοχή αναστέλλει τη δέσμευση του RNA (36), καθώς εξαιτίας της θέσης της παρεμποδίζεται η δημιουργία δεσμού του RNA με τη θέση κλειδί για τη δέσμευσή του (59).

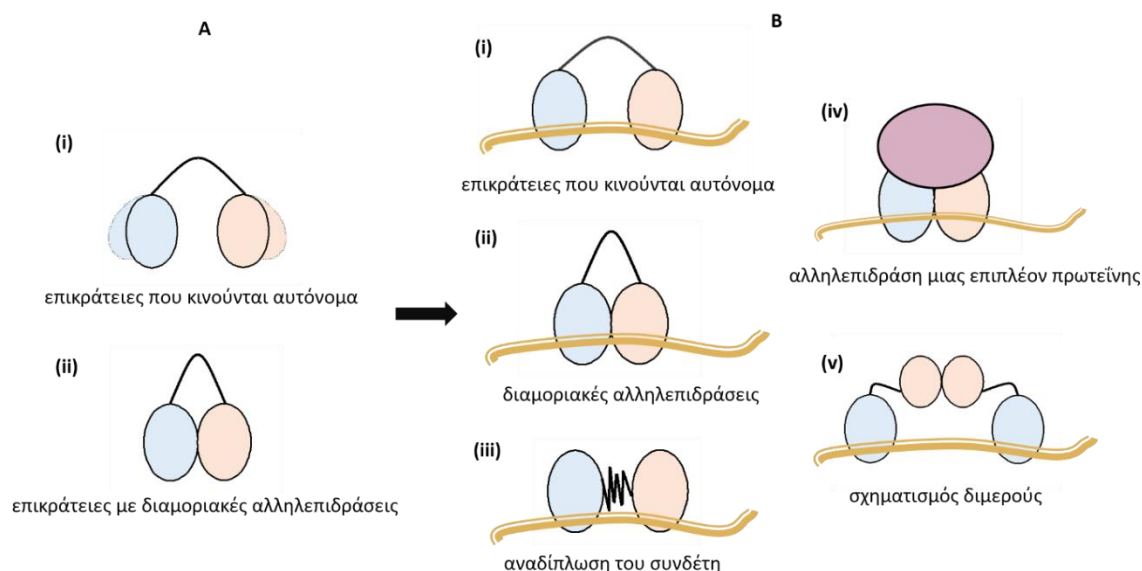
A.4.4. Συνδυασμός πολλών μοτίβων RRM για τη δέσμευση του RNA

Ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων επικρατειών RRM επιτρέπει την αναγνώριση και δέσμευση μιας αλληλουχίας 8-10 νουκλεοτιδίων αυξάνοντας τη

συγγένεια δέσμευσής τους με το RNA. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μία επικράτεια RRM είναι δυνατό να δεσμεύει δύο έως το πολύ οκτώ νουκλεοτίδια (σε περιπτώσεις όπου τα RRM φέρουν επιπλέον δομικά στοιχεία) (37). Επομένως, η αναγνώριση ενός μεγαλύτερου μορίου RNA απαιτεί συνδυασμό περισσοτέρων επικρατειών RRM, ώστε να σχηματίζουν μεγαλύτερη επιφάνεια πρόσδεσης για το RNA. Η επίλυση δομών διαδοχικών μοτίβων RRM ελεύθερα και προσδεδεμένα με RNA αποκάλυψαν ποικιλία στον τρόπο με τον οποίο συνδυάζονται οι επιμέρους επικράτειες RRM κατά τη διαδικασία αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης του RNA (Εικόνα 7). Διαδοχικά μοτίβα RRM με μεμονωμένες ασθενείς αλληλεπιδράσεις για το RNA-στόχο συνδυάζονται με σκοπό το σχηματισμό ενός ειδικού και υψηλής συγγένειας με το RNA συμπλόκου. Κάθε μοτίβο RRM είναι δυνατό να αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο στοιχείο του RNA-στόχου. Μεμονωμένα, οι επικράτειες μιας πρωτεΐνης μπορεί να εμφανίζουν ασθενή ειδικότητα ή συγγένεια για ένα προσδέτη, αλλά με ταυτόχρονη αλληλεπίδραση των δύο ή περισσοτέρων RRM της πρωτεΐνης με το RNA-στόχο να επιτυγχάνεται υψηλή συγγένεια και ειδικότητα. Η «συνδυαστική» αλληλεπίδραση των διαδοχικών επικρατειών RRM με το RNA θεωρείται κατάλληλη για το σχηματισμό συμπλόκων με διαφορετικά RNA-στόχους μέσω της αλληλεπίδρασης των διαδοχικών RRM με συντηρημένες και μικρές σε έκταση αλληλουχίες RNA (64-72).

Τα διαδοχικά μοτίβα RRM, ανάλογα με το τρόπο με τον οποίο συνδυάζονται πριν και μετά την πρόσδεση του RNA, είναι δυνατό να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες (Εικόνα 7B). Στην πρώτη κατηγορία, τα διαδοχικά RRM κινούνται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο στην ελεύθερη κατάσταση και υιοθετούν μία άκαμπτη δομή μετά τη δέσμευση του RNA (Εικόνες 7A(i), 7B(i), (ii)). Σε αυτήν την περίπτωση η κατεύθυνση του δεσμευμένου RNA διατηρείται, καθώς το 5' άκρο του δεσμεύεται στο δεύτερο RRM και το 3' άκρο του δεσμεύεται στο πρώτο RRM. Αυτή η περίπτωση είναι η πιο συχνά συναντώμενη και σε αυτή ανήκουν οι πρωτεΐνες Sxl, PABP, HrpI, HuR, HuD και άλλες (38, 39, 57, 63, 73, 74) (Εικόνα 8A). Σε όλες αυτές τις δομές τα δύο διαδοχικά RRM βρίσκονται το ένα πλάι στο άλλο σχηματίζοντας μια εκτεταμένη επιφάνεια πρόσδεσης του RNA, πάνω στην οποία το RNA συνδέεται γραμμικά και εκτείνεται σε όλη την έκταση των RRM. Παράλληλα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μοτίβων RRM σταθεροποιούν ακόμη περισσότερο το σύμπλοκο. Επιπλέον, η συγγένεια δέσμευσης της πρωτεΐνης που αποτελείται από τα διαδοχικά RRM για το

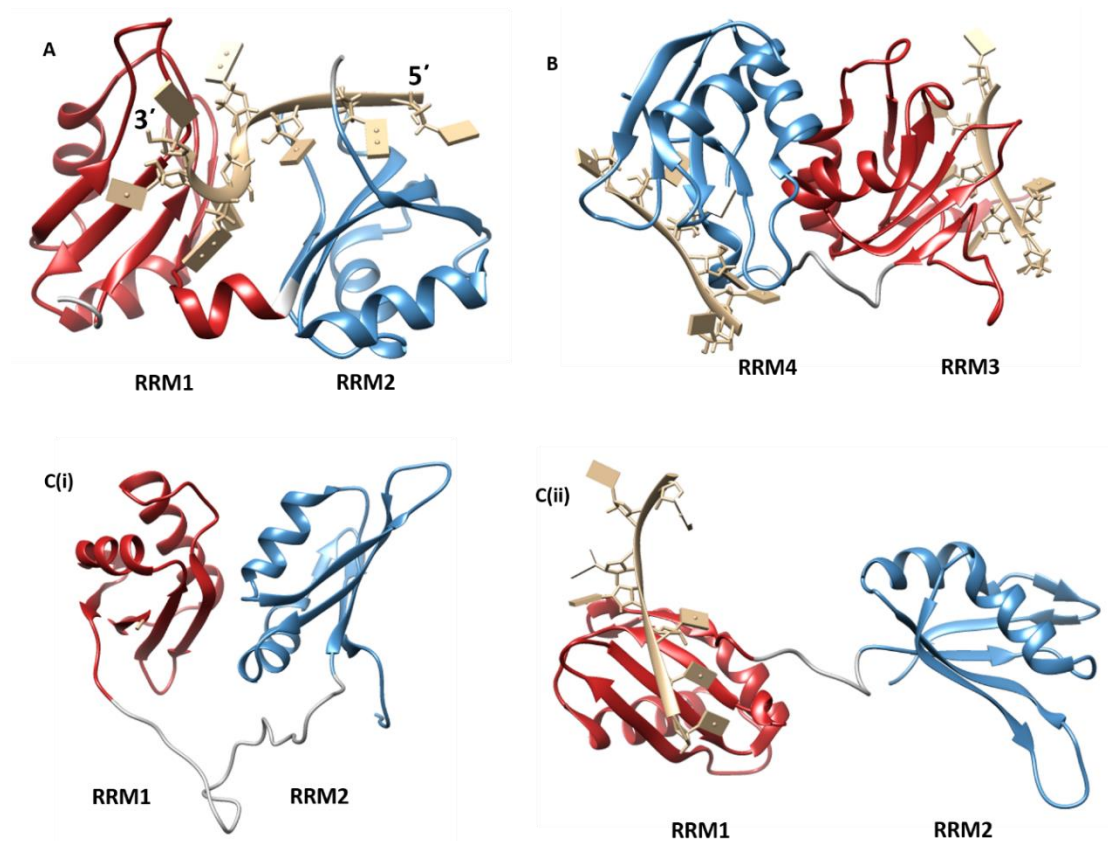
RNA εμφανίζεται αυξημένη έως και 1000 φορές σε σύγκριση με την αντίστοιχη για το κάθε RRM μόνο του.



Εικόνα 7: Καταστάσεις αλληλεπίδρασης διαδοχικών RRM-RNA. A. Τα διαδοχικά μοτίβα RRM στην ελεύθερη κατάσταση (i) κινούνται αυτόνομα ή (ii) εμφανίζουν διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. B. Μετά την αλληλεπίδραση με το RNA (i) κάθε επικράτεια αλληλεπιδρά με διαφορετική περιοχή του RNA χωρίς να έρχονται σε επαφή οι δύο επικράτειες, (ii) κάθε επικράτεια αναγνωρίζει γειτονικές αλληλουχίες RNA, ενώ το σύμπλοκο σταθεροποιείται με την επιπρόσθετη αλληλεπίδραση των δύο τομέων, (iii) ο συνδέτης που συνδέει τα δύο RRM σχηματίζει έλικα, (iv) το σύμπλοκο σταθεροποιείται με την αλληλεπίδραση μιας επιπλέον πρωτεΐνης ή (v) με το διμερισμό των RRM.

Στη δεύτερη κατηγορία συμπλόκων διαδοχικών RRM με RNA, τα RRM εμφανίζουν σταθερό προσανατολισμό στην ελεύθερη κατάσταση, οποίος παραμένει ίδιος και στη δεσμευμένη μορφή (Εικόνα 7A(ii), 7B(ii)). Παραδείγματα πρωτεϊνών που ανήκουν στην κατηγορία αυτή είναι οι hnRNPL (14) και PTB RRM3-4 (15). Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως συμβαίνει στην πρωτεΐνη PTB, τα δύο RRM εμφανίζουν τέτοιο προσανατολισμό (Εικόνα 8B), ώστε η δέσμευση μιας συνεχούς αλληλουχίας RNA από την επιφάνεια και των δύο RRM να είναι αδύνατη τοπολογικά. Τα διαδοχικά RRM αυτών των πρωτεϊνών αποτελούν ιδανικά ικρίωματα, τα οποία προάγουν τη δημιουργία θηλιάς από το μονόκλωνο RNA, διαδραματίζοντας με αυτόν τον τρόπο σημαντικό ρόλο σε διάφορες διαδικασίες, όπως σε αυτή της ρύθμισης του ματίσματος (75).

Στην τρίτη κατηγορία συμπλόκων διαδοχικών RRM-RNA παρατηρείται μεταβολή στη δομή ή διαμόρφωση των διαδοχικών RRM μετά τη δέσμευση του RNA. Στη δομή της πρωτεΐνης U2AF65, οι διαδοχικές επικράτειες RRM1-RRM2 υιοθετούν δύο διαφορετικές διαμορφώσεις στην ελεύθερη κατάσταση και παρουσία RNA (73). Συγκεκριμένα, στην ελεύθερη κατάσταση, τα διαδοχικά RRM υιοθετούν μία κλειστή διαμόρφωση, «καλύπτοντας» τη β -επιφάνεια πρόσδεσης του RNA του RRM1, εξαιτίας της αλληλεπίδρασής του με τις α -έλικες του RRM2 (Εικόνα 8C(i)). Ωστόσο, παρουσία RNA, τα διαδοχικά RRM υιοθετούν μία ανοιχτή διαμόρφωση, στην οποία η επιφάνεια των β -κλώνων του RRM1 εντοπίζεται πλάι στην επιφάνεια του δεύτερου RRM, ελευθερώνοντας έτσι την επιφάνεια πρόσδεσης του RNA (Εικόνα 8C(ii)).



Εικόνα 8: Δομή των διαδοχικών RRM A. του Hrp1 σε σύμπλοκο με RNA, B. του PTB σε σύμπλοκο με RNA και C(i) του U2AF65 ελεύθερο και C(ii) σε σύμπλοκο με RNA.

Στην επόμενη κατηγορία ανήκουν τα διαδοχικά RRM, των οποίων τα σύμπλοκα με το RNA απαιτούν επιπλέον σταθεροποίηση. Συγκεκριμένα, διαδοχικά RRM δεσμεύουν RNA και το σύμπλοκο που σχηματίζεται σταθεροποιείται μέσω της αλληλεπίδρασής του με μια επιπρόσθετη επικράτεια (76) ή με μια άλλη πρωτεΐνη

(Εικόνα 7B(iv)). Επιπλέον, ορισμένα διαδοχικά RRM επιτυγχάνουν περαιτέρω σταθεροποίηση του συμπλόκου πρωτεΐνης-RNA μέσω του διμερισμού τους (Εικόνα 7B(v)). Σε αυτή την περίπτωση ανήκει η δημιουργία του συμπλόκου της πρωτεΐνης U1A με το RNA. Το RNA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη U1A μέσω του μοτίβου RRM και οδηγεί σε μια διαμορφωτική αλλαγή, η οποία επιτρέπει το διμερισμό της πρωτεΐνης διαμέσου της C-τελικής έλικας (Εικόνα 7B(v)) (77).

A.4.5. Ο ρόλος του συνδέτη (linker) μεταξύ των διαδοχικών μοτίβων RRM στην πρόσδεση με το RNA

Οι διαδοχικές επικράτειες μιας πρωτεΐνης συνδέονται μέσω μικρών ή μεγάλων πολυπεπτιδίων, τα οποία ονομάζονται συνδέτες (linker). Οι συνδέτες χαρακτηρίζονται από ποικιλία στη δευτεροταγή δομή, με συνηθέστερη την εμφάνιση ελικοειδούς διαμόρφωσης, ενώ μεγάλο ποσοστό συνδετών χαρακτηρίζεται από έλλειψη δομικών στοιχείων, γεγονός το οποίο σχετίζεται με τη λειτουργία της πρωτεΐνης (78-81). Οι συνδέτες μεταξύ διαδοχικών επικρατειών δε συνδέουν μόνο τις διαδοχικές επικράτειες, αλλά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή και τη λειτουργία των επικρατειών αυτών. Ο συνδυασμός τους με τις επικράτειες που συνδέουν προσδίδει ποικιλία στη συνολική δομή της πρωτεΐνης και στη δράση της (82). Συγκεκριμένα, οι συνδέτες λειτουργούν ως ρυθμιστές της αναδίπλωσης των διαδοχικών RRM, ώστε να είναι δυνατή η αλληλεπίδρασή τους. Επιπλέον, ένας συνδέτης κατευθύνει τις σχετικές κινήσεις των επικρατειών ή διατηρεί τη μεταξύ τους απόσταση, δρώντας ως διαχωριστικό μεταξύ των τομέων (78, 81). Με αυτόν τον τρόπο συμβάλλουν στην επικοινωνία μεταξύ των επικρατειών με τη διαμόρφωση διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους (78, 79, 83), ή στην έλλειψη επικοινωνίας απομακρύνοντας τις δύο επικράτειες. Ταυτόχρονα, μεταβολές στην περιοχή του συνδέτη σχετίζονται με τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, την κατάσταση ολιγομερισμού της και τη διαλυτότητά της. Η διαλυτότητα της πρωτεΐνης συχνά σχετίζεται με το μέγεθος του συνδέτη, καθώς η μέση υδροφοβικότητα μειώνεται με την αύξηση του μήκους του συνδέτη.

Τα αμινοξέα που απαρτίζουν συνήθως το συνδέτη είναι μη-φορτισμένα ή φορτισμένα πολικά αμινοξέα. Η προλίνη είναι ένα αμινοξύ που εμφανίζεται συχνά στο συνδέτη. Αμινοξέα όπως η αργινίνη, η φαινυλαλανίνη, η θρεονίνη, το γλουταμινικό

οξύ και η γλουταμίνη εμφανίζονται, επίσης, συχνά στο συνδέτη (81). Ο προσδιορισμός της «τάσης» των αμινοξέων που εντοπίζονται σε συνδέτες στη διαμόρφωση της δομής τους είναι δύσκολος και εξαρτάται από τη λειτουργία τους, επισημαίνοντας τη σημασία των δομικών στοιχείων του συνδέτη στη συνολική διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Ωστόσο, προσδίδουν τις περισσότερες φορές συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά, είτε προσδίδοντας ευελιξία στην κίνηση των δύο επικρατειών, είτε λειτουργώντας ως μία «άκαμπτη» περιοχή που διατηρεί τις δύο περιοχές σε απόσταση. Εξαιτίας της ευελιξίας των διαδοχικών επικρατειών που επιτρέπει ο συνδέτης, είναι δυνατόν οι διαδοχικές επικράτειες να έρχονται κοντά η μία στην άλλη (84). Μάλιστα, υπάρχουν περιπτώσεις, όπου ο συνδέτης «τέμνεται» προκειμένου να έρθουν σε επαφή γειτονικές επικράτειες (85, 86). Ωστόσο, η μεγάλη ευκινησία του συνδέτη είναι δυνατό να είναι επιβλαβής στη σταθερότητα της πρωτεΐνης, αλλά και στην αναδίπλωση και το σωστό προσανατολισμό των δύο επικρατειών, με αποτέλεσμα την απώλεια της βιολογικής της λειτουργίας (87, 88). Σε τέτοιες περιπτώσεις οι συνδέτες είναι πλούσιοι σε γλυκίνες, καθώς προάγουν την ευκαμψία των δύο επικρατειών. Συνδέτες, οι οποίοι είναι άκαμπτοι διατηρούν μια σταθερή απόσταση μεταξύ των επικρατειών, χωρίς να επιτρέπεται η αλληλεπίδραση μεταξύ τους και επομένως οι επικράτειες είναι δυνατό να διατηρούν ανεξάρτητες λειτουργίες (89, 90). Συνδέτες αυτής της κατηγορίας αποτελούνται από αμινοξικά κατάλοιπα προλίνης. Η προλίνη δεν μπορεί να συνεισφέρει στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου ή να συμβάλει στη δημιουργία δομικών στοιχείων (88, 91-93).

Η παρουσία συνδέτη (linker) μεταξύ των διαδοχικών μοτίβων RRM, καθώς και οι περιοχές χωρίς δομή, φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό συμπλόκων πρωτεΐνης με διαδοχικά RRM-RNA. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα αμινοξικά κατάλοιπα του συνδέτη αποτελούν μέρος της επιφάνειας αναγνώρισης από το RNA ή σχηματίζουν μια άκαμπτη περιοχή μεταξύ των παρακείμενων επικρατειών. Τέτοιου είδους αναδίπλωση συνδέτη και αλληλεπίδραση με RNA παρατηρείται στις επικράτειες των συμπλόκων διαδοχικών RRM των Sxl, PAPB, HuD και nucleolin (20, 70, 72, 94). Σε άλλες περιπτώσεις, ο συνδέτης στερείται δευτεροταγούς δομής και δεν έρχεται σε επαφή με RNA (Εικόνα 7B(i), 7B(ii)). Σε αυτές τις περιπτώσεις το μήκος του συνδέτη μπορεί να διατηρηθεί και να καθορίσει την απόσταση μεταξύ των επικρατειών. Εάν οι διαδοχικές επικράτειες RRM δεν αλληλεπιδρούν και συμπεριφέρονται ως «δύο μπάλες δεμένες με σχοινί» (Εικόνα 7A(i)), η δέσμευση των

δύο τομέων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επιφάνειας πρόσδεσης του RNA (95). Η συγγένεια δέσμευσης του RNA των διαδοχικών μοτίβων RRM φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα του αθροίσματος των επιμέρους μοτίβων RRM σε περιπτώσεις όπου ο συνδέτης είναι μακρύς, ενώ σε περιπτώσεις ενός μικρού συνδέτη, το αποτέλεσμα φαίνεται να πολλαπλασιάζεται. (96). Όταν τα δύο RRM αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, ακόμη και αν ο συνδέτης τους είναι αρκετά μακρύς η συγγένεια δέσμευσης των διαδοχικών RRM δε θα εξαρτάται από το μήκος του αλλά από τις επιμέρους συγγένειες της κάθε επικράτειας ξεχωριστά (55, 72, 73).

A.5. Η «πρωτότυπη» πρωτεΐνη La

Η «πρωτότυπη» ανθρώπινη πρωτεΐνη La, η οποία ονομάζεται επίσης και SS-B (Sjogren syndrome antigen B), περιγράφηκε αρχικά ως ένα αυτό-αντιγόνο σε ασθενείς, οι οποίοι έπασχαν από τις ρευματικές παθήσεις του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου (systemic lupus erythematosus) και του συνδρόμου Sjögren (97-99). Το όνομα La (Lupus antigen) σχετίζεται με το αντίσωμα που ανιχνεύτηκε σε ασθενείς με ερυθηματώδη λύκο, ενώ το SS-B παραπέμπει στην ανίχνευση αντισωμάτων σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren. Η «πρωτότυπη» La αποτελεί το μικρότερο σε μέγεθος μέλος της οικογένειας των LARP (46kDa), αλλά και το πιο συχνά απαντώμενο στη φύση (8, 99). Παρόλο που η La χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά ως ανθρώπινη πρωτεΐνη, ομόλογα έχουν ταυτοποιηθεί σε μεγάλη ποικιλία ευκαρυωτικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των φυτών (100).

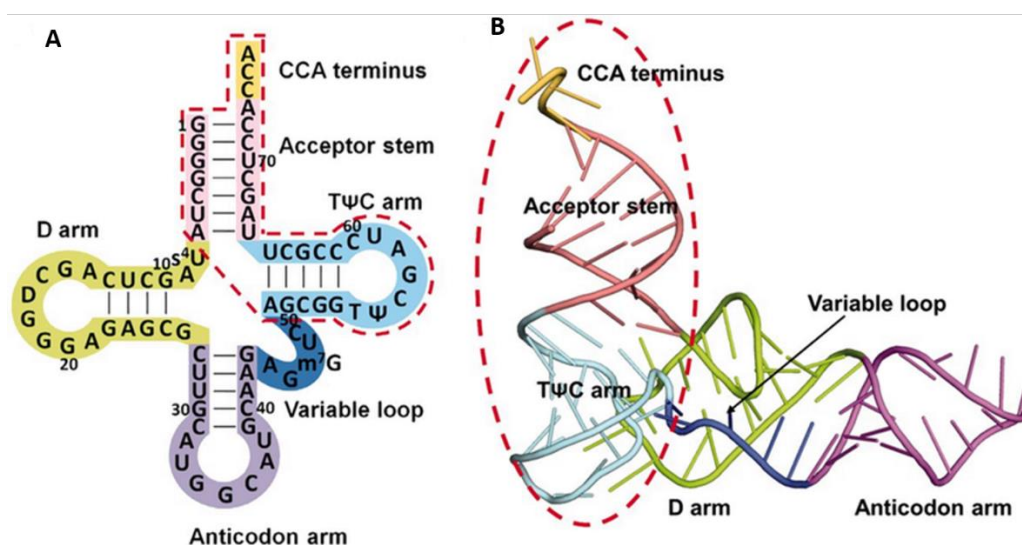
Βασικός ρόλος της «πρωτότυπης» πρωτεΐνης La είναι η σύνδεση με όλα τα νεοσυντιθέμενα μετάγραφα της RNA πολυμεράσης III, συμβάλλοντας στη σωστή ωρίμανσή τους. Η πρωτεΐνη La παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς την αλληλουχία και το μήκος για το UUU-3'-OH μοτίβο που εντοπίζεται στο άκρο των νεοσυντιθέμενων μεταγράφων της RNA πολυμεράσης III, συμπεριλαμβανομένων και των πρόδρομων μορίων tRNA (pre-tRNA) (101). Επομένως, η La, με το σχηματισμό της ως ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (RNP-ribonucleo-protein), καθίσταται απαραίτητη στη βιογένεση ενός μεγάλου ποσοστού διαφορετικών μορίων RNA μέσα στα κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο, η La προστατεύει τα pre-tRNA από τη δράση εξωνουκλεασών και ρυθμίζει τη διαδικασία της ωρίμανσης, η οποία ακολουθεί (99, 102). Η La

θεωρείται ότι δρα ως συνοδός πρωτεΐνη για τα pre-tRNA, ακόμη και όταν τα τελευταία δε φέρουν το UUU-3'-OH άκρο (103-106), καταδεικνύοντας το θεμελιώδη ρόλο της στη σωστή συναρμολόγηση του tRNA. Επιπροσθέτως, η La συμβάλλει στην ωρίμανση των miRNA (pre-miRNA) και την προστασία τους από τη δράση των εξωνουκλεασών. Η πλειοψηφία των pre-miRNA δε φέρει UUU άκρο, ωστόσο, η La αναγνωρίζει τη χαρακτηριστική διαμόρφωση στελέχους θηλιάς (stem loop). Έχει αποδειχθεί ότι παρόλο που το «La module» αποτελεί προαπαιτούμενο για τη δέσμευση του UUU-3'-OH άκρου, για την αλληλεπίδραση με RNA χωρίς UUU-3'-OH άκρο απαιτείται η πρωτεΐνη La σε όλη της την έκταση. Επίσης, έχουν ταυτοποιηθεί στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων και άλλα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα της La, όπως για παράδειγμα με 5SrRNA, U6 small nuclear RNA (snRNA), 7SLRNA, YRNA, RNase P RNA.

Η πρωτεΐνη La εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου. Ωστόσο, συναντάται στον πυρηνίσκο και στο κυτταρόπλασμα (99, 107, 108). Η κατανομή της πρωτεΐνης La στο κυτταρόπλασμα είναι δυνατό να αυξηθεί κάτω από ορισμένες συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των ιογενών λοιμώξεων και της απόπτωσης (109, 110). Η La εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, όπου εμπλέκεται στη ρύθμιση της μετάφρασης των mRNA, τα οποία φέρουν 5' ολιγοπυριμιδικές τερματικές αλληλουχίες (TOP mRNA). Οι τελευταίες είναι απαραίτητες στην έκφραση ριβοσωμικών πρωτεϊνών και σημαντικών παραγόντων του συστήματος της μετάφρασης (στη βιογένεση του ριβοσώματος) (111). Η πρωτεΐνη La συνδέεται επίσης με ένα μεγάλο αριθμό ιικών και κυτταρικών mRNA και φαίνεται ότι διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στη μετάφραση του mRNA (99, 108, 112). Ένα τυπικό χαρακτηριστικό αυτών των mRNA είναι ότι φέρουν άτυπα μοτίβα έναρξης της μετάφρασης, συμπεριλαμβανομένων των αλληλουχιών IRES (internal ribosome entry sites) (106, 113-120). Η La ενισχύει τη μετάφραση mRNA που φέρουν αυτές τις αλληλουχίες. Επιπροσθέτως, η La συμμετέχει στην παραγωγή μικρών ρυθμιστικών μορίων RNA (tRFs) ρυθμίζοντας σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

A.6. Βιογένεση του tRNA

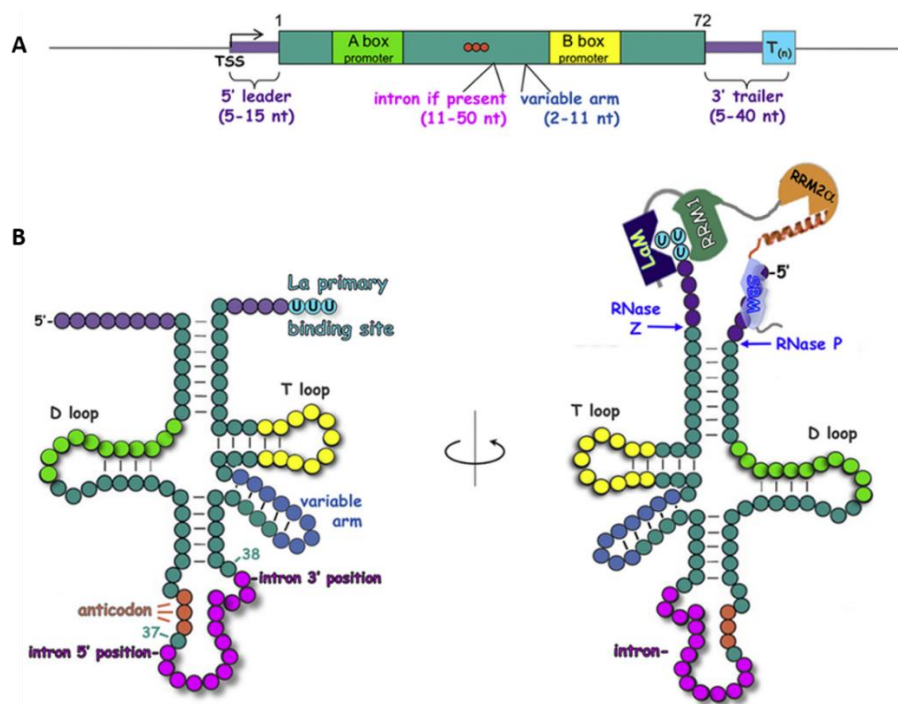
Το tRNA (transfer RNA ή μεταφορικό RNA) είναι το μόριο «προσαρμοστής» που αποτελείται από 76-90 νουκλεοτίδια και διαδραματίζει το ρόλο του φυσικού συνδέτη μεταξύ του mRNA (message RNA ή αγγελιοφόρο RNA) και της αλληλουχίας των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης. Τα tRNA λειτουργούν σε συγκεκριμένες θέσεις κατά τη διάρκεια της μετάφρασης. Όλα τα μόρια tRNA εμφανίζουν την ίδια γενική εικόνα, η οποία μοιάζει με τριφύλλι και αποτελείται από τρεις βρόγχους φουρκέτας (Εικόνα 9A). Η τριτοταγής δομή του tRNA μοιάζει με το κεφαλαίο λατινικό γράμμα L (L-μορφή), η οποία είναι ιδιαίτερα συμπαγής (Εικόνα 9B). Αυτή η δομή επιτρέπει στα tRNA να εκτελέσουν το ρόλο του προσαρμογέα κατά την πρωτεϊνσύνθεση. Το ένα άκρο τους (η περιοχή του αντικωδικονίου) αλληλεπιδρά ειδικά με το αντίστοιχο κωδικόνιο, ενώ το άλλο άκρο (στο βραχίονα-δέκτη ή acceptor stem) φέρει το αντίστοιχο αμινοξύ, το οποίο «παραδίδεται» στην πρωτεΐνη που συντίθεται. Το tRNA μαζί με το ριβόσωμα συνεχίζουν να αποκωδικοποιούν το μόριο του mRNA μέχρι να μεταφραστεί ολόκληρη η αλληλουχία του σε πρωτεΐνη.



Εικόνα 9: Η δομή του tRNA A. σε μορφή τριφυλλιού και B. σε L-μορφή, όπως διαμορφώνεται στο χώρο. Ο βραχίονας-δέκτης (acceptor stem) χρωματίζεται με ροζ, ο βραχίονας TΨC με γαλάζιο, βραχίονας D με πράσινο, ο βραχίονας του αντικωδικονίου με μωβ και η αλληλουχία CCA με πορτοκαλί χρώμα (121).

Τα tRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων συντίθενται ως πρόδρομα μετάγραφα (pre-tRNA) και η διαδικασία της ωρίμανσής τους ξεκινά μετά το τέλος της μεταγραφής

τους και την απελευθέρωσή τους από το ένζυμο RNA πολυμεράση III (pol III ή RNAP III). Τα πρόδρομα μόρια tRNA (pre-tRNA) φέρουν 5' οδηγούς αλληλουχίες και 3' ακόλουθες ακολουθίες με ποικιλία στο μέγεθός τους, ενώ υφίστανται επεξεργασία και τροποποίηση. Χαρακτηριστικό της RNA πολυμεράσης III αποτελεί το γεγονός ότι κατά το τερματισμό της διαδικασίας της μεταγραφής προσθέτει μία αλληλουχία ουριδινών στο 3' άκρο των νεοσυντιθέμενων tRNA, η οποία ποικίλει σε αριθμό ουριδινών και αφαιρείται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Η διαδικασία της ωρίμανσης διαφοροποιείται ανάλογα με το μόριο tRNA, τον οργανισμό στον οποίο ανήκει και τις διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες. Ωστόσο, είναι δυνατό να αντικατασταθεί από εναλλακτικούς μηχανισμούς. Τα αρχικά στάδια της βιογένεσης του tRNA είναι κοινά, ενώ εξειδικεύονται για ορισμένα tRNA σε μεταγενέστερα στάδια (122). Η 5' οδηγός αλληλουχία και η 3' ακόλουθος αλληλουχία αφαιρούνται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του tRNA (Εικόνα 10), η οποία ακολουθείται από την προσθήκη της αλληλουχίας CCA στο 3' άκρο, άλλες τροποποιήσεις και την εξαγωγή του tRNA στο κυτταρόπλασμα, πριν από τη συμμετοχή του στη διαδικασία της μετάφρασης (123-127).

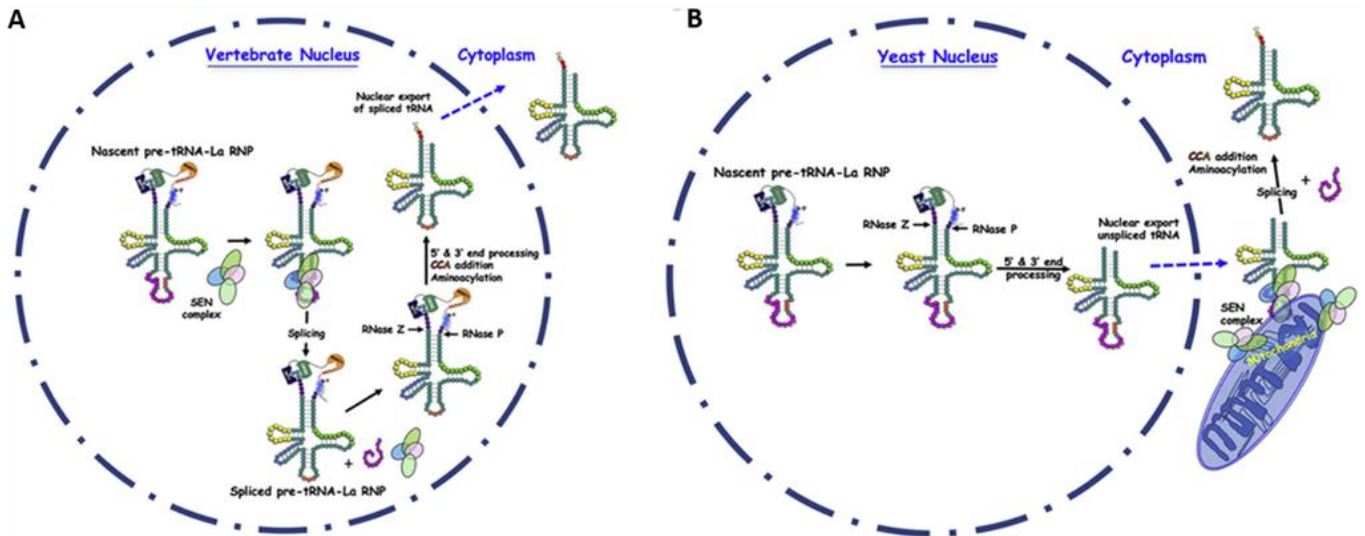


Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση Α. των δομικών και λειτουργικών στοιχείων ενός γονιδίου tRNA και Β. της δευτεροταγούς δομής ενός pre-tRNA, όπου εμφανίζονται η 5' οδηγός και η 3' ακόλουθη αλληλουχία καθώς και η θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης La (128).

Η απομάκρυνση της 5' οδηγού αλληλουχίας από το πρόδρομο μόριο tRNA πραγματοποιείται με τη δράση της ενδονουκλεάσης RNase P (129, 130). Η RNase P είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (RNP), το οποίο χρησιμοποιεί το RNA ως καταλυτική περιοχή του συμπλόκου (131) για τη διάσπαση του υποστρώματος του RNA, παράγοντας προϊόντα με 5'-μονοφωσφορικά και 3'-υδροξυλικά άκρα. Το πρωτεϊνικό μέρος του συμπλόκου αυτού ποικίλει στους διάφορους οργανισμούς, καθώς στα βακτήρια αποτελείται από μία πρωτεϊνική υπομονάδα (132), στα αρχαία από πέντε πρωτεϊνικές υπομονάδες (133, 134), ενώ στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως στους ζυμομύκητες και στον άνθρωπο, εμφανίζει εννέα ή δέκα πρωτεϊνικές υπομονάδες (129). Το RNA ως συστατικό του συμπλόκου εμφανίζει διαφορές σε περιοχές σημαντικές για τη σταθερότητα του συμπλόκου και για τη διαδικασία της κατάλυσης. (135, 136). Η ευκαρυωτική RNase P θεωρείται ότι αναγνωρίζει στο pre-tRNA τη θηλιά TΨC (137-140) μέσω του βραχίονα-δέκτη (acceptor stem), ενώ η διαδικασία αυτή υποβοηθείται από την πρόσδεση της πρωτεΐνης La στο pre-tRNA (103, 141).

Η ωρίμανση του 3' άκρου είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με περισσότερους από έναν μηχανισμούς (103, 142, 143). Το βασικό μονοπάτι ωρίμανσης του 3' άκρου είναι αυτό κατά το οποίο η ενδονουκλεάση RNase Z (ή αλλιώς tRNase Z) διασπά την 3' ακόλουθη αλληλουχία για να δημιουργήσει μία νέα θέση, στην οποία θα προστεθεί η αλληλουχία CCA. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς εντοπίζονται δύο ομόλογες πρωτεΐνες της RNase Z. Το μικρότερο από τα δύο ομόλογα εντοπίζεται εκτός από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, σε βακτήρια και αρχαία, αποτελείται από 280-360 αμινοξέα και ονομάζεται RNase ZS. Το μεγαλύτερο ομόλογο αποτελείται από 750-930 αμινοξέα, ονομάζεται RNase ZL (144, 145) και εντοπίζεται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ο λόγος ύπαρξης και των δύο ομολόγων σε ορισμένους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ενδεχομένως να εξηγείται από το γεγονός ότι αλληλεπιδρούν με διαφορετικά υποστρώματα (146) και εντοπίζονται σε διαφορετικά μέρη του κυττάρου. Επιπλέον, τα ευκαρυωτικά γονίδια tRNA δεν κωδικοποιούν την αλληλουχία CCA στο 3' άκρο, η οποία είναι απαραίτητη για τη διαδικασία της αμινοακυλίωσης του ώριμου tRNA. Επομένως, η ευκαρυωτική tRNase Z θα διασπάσει τα pre-tRNA αμέσως μετά τη βάση διαλογής (N73), η οποία είναι το μη-συζευγμένο νουκλεοτίδιο στο 3' άκρο του τελευταίου ζεύγους του βραχίονα-δέκτη. Η CCA νουκλεοτιδυλοτρανφεράση,

γνωστή και ως ένζυμο προσθήκης της αλληλουχίας CCA, προχωρά με την προσθήκη της αλληλουχίας CCA στο 3' άκρο (147, 148).



Εικόνα 11: Η ωρίμανση των pre-tRNA A. στα σπονδυλωτά και B. στους ζυμομύκητες (128).

Αρκετά pre-tRNA περιλαμβάνουν ιντρόνια (Εικόνα 10B), τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν από ένα σύμπλεγμα συντηρημένων ενδονουκλεασών ειδικών για το μάτισμα (splicing endonuclease, SEN) (149). Η ωρίμανση του tRNA περιλαμβάνει και άλλα στάδια (Εικόνα 11), όπως των απλών και σύνθετων τροποποιήσεων βάσεων, της τροποποίησης της ριβόζης, της προσθήκης νουκλεοτιδίων μετά τη μεταγραφή και κυρίως της προσθήκης της αλληλουχίας CCA στο 3' άκρο (127, 134, 150). Τα αρχικά στάδια της διαδικασίας της ωρίμανσης του tRNA πραγματοποιούνται στον πυρήνα, ενώ στη συνέχεια το tRNA εξάγεται προς το κυτταρόπλασμα μέσω εξειδικευμένων για το tRNA παραγόντων, όπως της Exportin-t (Xpo-t: Los1, στο *S. Cerevisiae*) (151-153). Τα tRNA που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα εισάγονται πίσω στον πυρήνα του κυττάρου με τη διαδικασία της «ανάδρομης μετακίνησης», όπου ορισμένα μόρια tRNA υφίστανται ειδικές τροποποιήσεις (154) ή έλεγχο της ποιότητάς τους (155). Κάθε pre-tRNA αποκτά την τελική του μορφή μετά από περίπου 12 μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, οι οποίες καταλύονται από 25 διαφορετικά ένζυμα τροποποίησης. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν συγκεκριμένα στοιχεία της αλληλουχίας και της δομής (134). Η διαδικασία της ωρίμανσης δεν είναι πετυχημένη για όλα τα pre-tRNA, εξαιτίας της ποικιλίας των παραγόντων που επιδρούν σε αυτό, συμπεριλαμβανομένων

των σφαλμάτων της μεταγραφής, της έλλειψης των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και των ατελειών στη δομή τους. Τα «ελαττωματικά tRNA» αναγνωρίζονται από το σύμπλοκο του πυρηνικού εξωσώματος που τα επισημαίνει με την προσθήκη μιας πολυ-αδενλικής αλληλουχίας στο 3' άκρο (156, 157). Η πρωτεΐνη La επηρεάζει τον έλεγχο της ποιότητας των pre-tRNA από την αποδόμηση κατά τη διάρκεια της μεταγραφής τους.

A.7. Ο βιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης La

A.7.1. Η πρωτεΐνη La στον πυρήνα του κυττάρου

Η πρωτεΐνη La εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου, όπου βασικός της ρόλος είναι να προστατεύει τα μετάγραφα της RNAP III, όπως των pre-tRNA, pre-5S rRNA, U6 snRNA (spliceosomal RNA), RNase P και RNase MRP RNA, 7SL RNA, Y RNA, ορισμένα miRNA και snoRNA, από την πέψη εξωνουκλεασών (99, 103, 158-163). Η La σταθεροποιεί με την πρόσδεσή της διαφορετικά μόρια RNA, παρόλο που έχει διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με το RNA, στο οποίο προσδένεται. Επομένως, η δέσμευση της La στο 3' άκρο των pre-tRNA, όπως περιγράφεται παρακάτω, επηρεάζει τη σειρά και το μηχανισμό απομάκρυνσης της τερματικής αλληλουχίας (103), ενώ παράλληλα ρυθμίζει την απομάκρυνση της 5' οδηγού αλληλουχίας από την RNase P (163, 164). Σε άλλα μικρά μόρια RNA η δέσμευση της La μπορεί να διευκολύνει τη συναρμολόγηση ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (159, 161), συμβάλλοντας έτσι στην παραμονή των νεοσυντιθέμενων RNA στον πυρήνα του κυττάρου (165, 166) ή στη σταθεροποίηση της δομής τους (103). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη La του *S. cerevisiae* με δέσμευσή της σταθεροποιεί πρόδρομα μόρια των U1, U2, U4, U5 RNA του σωματίου ματίσματος και του U3 snoRNA, μετάγραφα της RNAP II (167-170). Η πρωτεΐνη La φαίνεται να παίζει ρόλο στην κατακράτηση ορισμένων μορίων RNA στον πυρήνα του κυττάρου, όπως το Y1 RNA. Παρόλο που το Y1 RNA εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα προσδεδεμένο με την πρωτεΐνη Ro (99, 171-174), εντοπίζεται και στον πυρήνα του κυττάρου σε σύμπλοκο με την La (166).

Επιπλέον, η La, εκτός από το βασικό της ρόλο στην ωρίμανση του tRNA, συμμετέχει στο μονοπάτι του miRNA-μεσολαβούμενου ματίσματος. Συγκεκριμένα, η

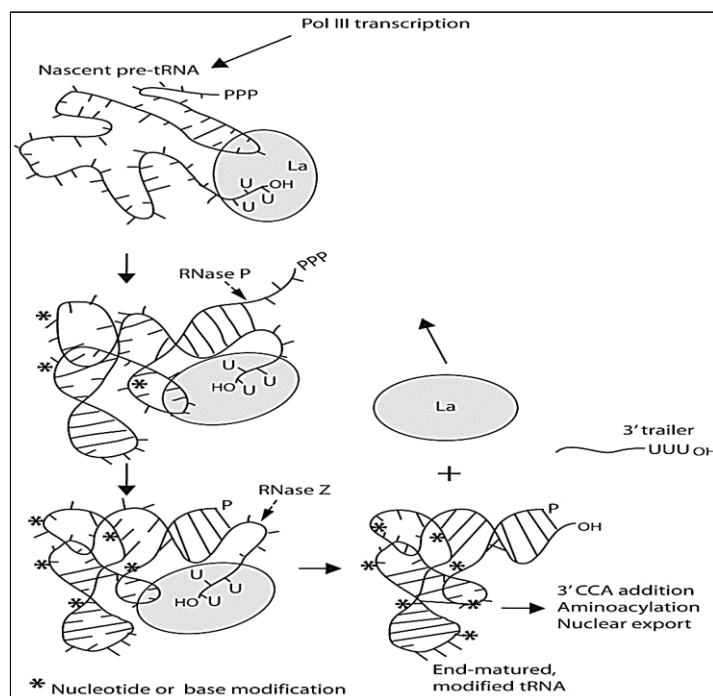
La αλληλεπιδρά με το στέλεχος θηλιάς (stem loop) των πρόδρομων μορίων miRNA (pre-miRNA) με τρόπο ανεξάρτητο από το UUU-3'-OH άκρο (175). Μάλιστα, αυτή η πρόσδεση επιτυγχάνεται μέσω της επικράτειας του RRM2α, η οποία απουσιάζει στους κατώτερους οργανισμούς (1, 2), όπως οι ζυμομύκητες, πιθανότατα εξαιτίας της απουσίας των miRNA μονοπατιών (176). Τέλος, η πρωτεΐνη La εντοπίζεται στον πυρηνίσκο διαφόρων τύπων κυττάρων, όπου η λειτουργία της παραμένει άγνωστη.

A.7.2. Ο ρόλος της πρωτεΐνης La στην ωρίμανση του tRNA

Οι 3' ακόλουθες αλληλουχίες των pre-tRNA, μετά την απελευθέρωσή τους από την RNAP III, εμφανίζουν ποικιλία στο μήκος τους. Ωστόσο, παρουσιάζουν ένα ομοιογενές μοτίβο στο 3' άκρο, την αλληλουχία UUU-3'-OH, η οποία αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη La (177). Η δέσμευση της πρωτεΐνης La στο UUU-3'-OH άκρο εξαρτάται από το μέγεθος του άκρου (178, 179) και είναι δυνατό να οδηγήσει σε διαφορετικό μονοπάτι ωρίμανσης των μεταγράφων της RNAP III (177). Με την αύξηση του μήκους του UUU-3'-OH άκρου αυξάνεται η αποτελεσματικότητα της δέσμευσης της πρωτεΐνης La (179). Η πρωτεΐνη La προστατεύει τα 3' άκρα από την πρόωρη εξωνουκλεολυτική πέψη και συγκεκριμένα διευκολύνει την απομάκρυνση νουκλεοτιδίων από το 5' άκρο των pre-tRNA (103), συμβάλλοντας στη σωστή σειρά των γεγονότων της ωρίμανσης (180). Μία συντηρημένη λειτουργία της πρωτεΐνης La είναι η κατακράτηση των μεταγράφων, με τα οποία σχετίζεται στον πυρήνα του κυττάρου (165, 166), ενώ διαταραχή αυτής της δράσης έχει ως αποτέλεσμα τη διατάραξη της σωστής διαδικασίας της ωρίμανσης (128, 181, 182). Επομένως, βοηθά στη σταθεροποίηση της δομής του tRNA.

Η πρωτεΐνη La λειτουργεί ως μοριακός συνοδός (molecular chaperone) στη βιογένεση μικρών μορίων RNA, καθώς διευκολύνει στη σωστή πορεία πολλών νεοσυντιθέμενων μικρών μορίων RNA (183-186). Η δράση της ως μοριακός συνοδός θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική για τη σωστή ωρίμανση και λειτουργία των διαφόρων tRNA, διαφορετικών οργανισμών (105, 106, 183, 187), καθώς, εκτός από την προστασία του 3' άκρου από τις νουκλεάσες, επιτρέπει στα pre-tRNA να υφίστανται πολλαπλές τροποποιήσεις (104, 128). Παράλληλα, παρεμποδίζει την εσφαλμένη αναδίπλωσή τους και τον σχηματισμό εναλλακτικών δομών του tRNA (2, 99, 182, 188-

190). Επιπλέον, η La ως μοριακός συνοδός φροντίζει ώστε να μην επηρεάσουν οι τυχόν μεταλλάξεις στο tRNA τη δομή τους και να μην οδηγηθούν σε αποσύνθεση (2, 24, 103, 105, 179, 189, 191).



Εικόνα 12: Μοντέλο των *pre-tRNA*, στο οποίο απεικονίζεται η πρόσδεση της πρωτεΐνης La(105).

A.7.3. Η πρωτεΐνη La στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου

Η πρωτεΐνη La, σε αντίθεση με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες, διαχέεται εύκολα στο κυτταρόπλασμα, ενώ εντοπίζεται σε σύμπλοκο με διάφορα μόρια RNA (2, 166, 181, 182, 192, 193). Στην πρωτεΐνη La έχουν ταυτοποιηθεί πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης. Συγκεκριμένα, φωσφορυλιώνεται στις θέσεις Thr302, Ser325, Thr362, Ser366 και Thr389 (194, 195), και πολλές από αυτές εμφανίζονται να ρυθμίζουν διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες (164, 196-200). Από αυτές, η πιο συχνά απαντώμενη ισομορφή με ρυθμιστικό ρόλο σε αρκετές λειτουργίες είναι αυτή της φωσφορυλιωμένης Ser366 (195). Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, όχι στον πυρήνα του κυττάρου, και μάλιστα η Ser366 μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί μετά την μετεγκατάσταση από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, η κατάσταση της φωσφορυλίωσης της Ser366 ελέγχει τη λειτουργία του μοτίβου SBM (short basic motif). Το μοτίβο SBM και οι αλληλουχίες που ακολουθούν μέχρι τη Ser366 αποτελούν μέρος μιας μη-δομημένης περιοχής με βασικά αμινοξέα, ενώ τα αμινοξέα

που ακολουθούν τη Ser366 είναι όξινα. Η φωσφορυλίωση της Ser366 πιθανόν αλλάζει τη διαμόρφωση της περιοχής και αναστέλλεται η δέσμευση του RNA από το SBM (164, 194).

Εκτός από τα μετάγραφα της RNAP III, η La φαίνεται να αλληλεπιδρά με μικρά μόρια RNA που σχετίζονται με ιούς, όπως τα μικρά VA RNAI ή VA RNAII (viral associated RNA) και EBER RNA (Epstein-Barr virus-encoded small RNAs), τα οποία κωδικοποιούνται από τον αδενοϊό και τον ιό Epstein-Barr, αντίστοιχα (114, 201). Η La του κυτταροπλάσματος αναγνωρίζει μικρές αλληλουχίες οδηγούς σε μετάγραφα, τα οποία συντίθενται από την ανεξάρτητη ιική RNAP (116), και φαίνεται να αλληλεπιδρά με το UUU-3'-OH άκρο τους. Επίσης, αναγνωρίζει μικρούς οδηγούς μη-κωδικευμένων μεταγράφων του RNA κλώνου του ιού της αφθώδους στοματίτιδας (VSV- Vesicular Stomatitis Virus) (116), του θανατηφόρου ιού της λύσσας (115, 117), καθώς και των ιών της παραγρίπης και της πανώλης (202, 203). Αυτοί οι RNA οδηγοί είναι μικρά μόρια, αποτελούμενα από περίπου 50nt, ενώ το 3' άκρο τους είναι συνήθως πλούσιο σε A και U, και έχουν ένα 5' τριφωσφορικό (5' ppp) άκρο. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι RNA οδηγοί προέρχονται από το 3' άκρο του RNA της ιικής μήτρας ιών, όπως του VSV, και προκαλούν αύξηση της πρωτεΐνης La στο κυτταρόπλασμα (116). Ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (respiratory syncytial virus ή RSV) αποτελεί την πρώτη αιτία θνητότητας σε μικρά παιδιά (204). Η RNA αλληλουχία οδηγός του αποτελείται από 49nt και φέρει ένα 5' τριφωσφορικό άκρο, ενώ το UUU-3'-OH άκρο δεσμεύεται στην πρωτεΐνη La αμέσως μετά τη λοίμωξη από τον ιό (205). Η λοίμωξη από τον ιό RSV προκαλεί ανακατανομή στα επίπεδα της La στο κυτταρόπλασμα και μέσω της δέσμευσής της με τον RNA οδηγό οδηγεί σε πολλαπλασιασμό του ιού (205). Με αυτό τον τρόπο, η La προστατεύει τις οδηγούς αλληλουχίες από την ανίχνευση τους και την έγκαιρη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Επιπλέον, υπάρχουν RNA ιοί, όπως της πολιομυελίτιδας, του HIV (Human Immunodeficiency Virus) και το HCV (Hepatitis C Virus), οι οποίοι χρησιμοποιούν την πρωτεΐνη La για τη μετάφραση του mRNA τους (109, 206-211). Οι ιοί αυτοί για την έναρξη της μετάφρασης χρησιμοποιούν τις αλληλουχίες IRES (Internal ribosome entry site), οι οποίες περιλαμβάνουν την περιοχή έναρξης AUG για άμεση εκκίνηση (212) της παραγωγής των ιικών πρωτεϊνών (213). Ιοί, όπως της πολιομυελίτιδας και του HCV, χρησιμοποιούν παράγοντες του ξενιστή για την έναρξη της μετάφρασης των mRNA τους μέσω των αλληλουχιών IRES. Η πρωτεΐνη La είναι ένας από τους

παράγοντες αυτούς και προάγει την έναρξη της μετάφρασης αρκετών ιικών και κυτταρικών mRNA (214-216). Η πρωτεΐνη La διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετάφραση και τον πολλαπλασιασμό του HCV RNA ιού (217-222), μέσω του μηχανισμού αναγνώρισής του από τη La, την ανακατανομή της πρωτεΐνης La στο κυτταρόπλασμα και την επίδραση στη δράση της τελομεράσης σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί από HCV (112, 223, 224). Στην περίπτωση της ηπατίτιδας B (HBV), η La δεσμεύει και σταθεροποιεί το RNA του ιού (225, 226), ενώ απαιτείται φωσφορυλίωση της Ser366 από την πρωτεΐνη κινάση CKII για τη θετική επίδραση στην έκφραση του HBV (227).

Μερικά mRNA των κυττάρων χρησιμοποιούν αλληλουχίες IRES για την έναρξη της μετάφρασης, στις οποίες η La λειτουργεί ως συνοδός-πρωτεΐνη (chaperone) (197, 228-232). Επομένως, η La λειτουργεί ως παράγοντας της μετάφρασης, πιθανότατα χρησιμοποιώντας τόσο την N-τελική περιοχή όσο και την C-τελική. Και οι δύο περιοχές εμφανίζουν ιδιότητες συνοδού-πρωτεΐνης (106), ενώ η πρόσδεση στις περιοχές IRES εξαρτάται από τα αμινοξέα La293-380 (109, 208, 233). Επιπλέον, η La προάγει τη μετάφραση των CCND1 mRNA σε όγκους (228) (το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Cyclin D1) μέσω της περιοχής La333-390, ενώ ρυθμίζεται μέσω της φωσφορυλίωσης της Thr389 (197).

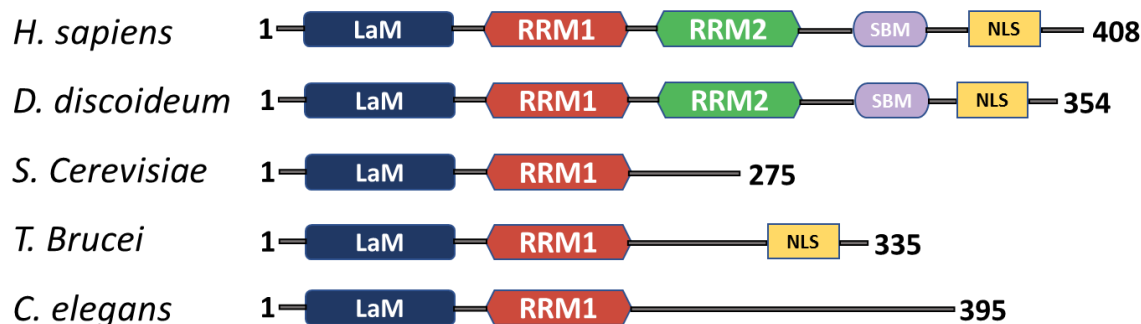
Επιπροσθέτως, η πρωτεΐνη La εμπλέκεται στην μετάφραση των 5' TOP mRNA (5'-terminal oligopyrimidine track). Ενώ τα 5' TOP mRNA μεταφράζονται αποτελεσματικά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, η φυσιολογική τους ρύθμιση περιλαμβάνει την καταστολή της μετάφρασης σε περιπτώσεις μεταβολικής αδράνειας του οργανισμού. Η κυτταροπλασματική μη-φωσφορυλιωμένη ισομορφή στη Ser366 σχετίζεται με τα 5' TOP mRNA (234).

A.8. Δομική οργάνωση των πρωτεϊνών LARP3 ή της «πρωτότυπης» πρωτεΐνης La

Η «πρωτότυπη» πρωτεΐνη La (LARP3) εκφράζεται σε διάφορους οργανισμούς από τον άνθρωπο μέχρι το τρυπανόσωμα. Η πρωτεΐνη La από διαφορετικούς οργανισμούς διακρίνεται σε τρεις επικράτειες. Στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης εντοπίζεται το μοτίβο La ή LaM, το οποίο εμφανίζει το μεγαλύτερο βαθμό ομολογίας

στους οργανισμούς (28, 235-237). Ακολουθεί το μοτίβο πρόσδεσης RNA ή RRM1, το οποίο είναι λιγότερο συντηρημένο στους οργανισμούς από το LaM, και μια C-τελική περιοχή, η οποία ποικίλει σε μέγεθος και αμινοξική ακολουθία. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης La ποικίλει από 32kDa στους ζυμομύκητες, όπως στον *S.cerevisiae*, μέχρι περίπου 50kDa στα σπονδυλωτά (Εικόνα 13). Η διαφορά αυτή στο μοριακό βάρος οφείλεται στο διαφορετικό μέγεθος της C-τελικής περιοχής. Ορισμένοι μάλιστα οργανισμοί φέρουν ένα επιπλέον μοτίβο αναγνώρισης RNA ή RRM2a στην C-τελική περιοχή.

Στην C-τελική περιοχή συμπεριλαμβάνεται ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal ή NLS) (166). Πρόκειται για μια περιοχή πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα (λυσίνες και αργινίνες), η οποία «επισημαίνει» μια πρωτεΐνη με σκοπό να εισαχθεί στον πυρήνα του κυττάρου. Επίσης, σε αρκετές πρωτεΐνες La η επικράτεια RRM2a ακολουθείται από μια περιοχή πλούσια σε GK/R (γλυκίνη, λυσίνη/αργινίνη), το μικρό βασικό μοτίβο (short basic motif ή SBM). Ακόμη, η ανθρώπινη La φαίνεται ότι περιλαμβάνει στο μικρό βασικό μοτίβο ένα μοτίβο τύπου Walker A, GXXXXXGKX, ήτοι ένα μοτίβο τύπου πρόσδεσης νουκλεοτιδίων. Το τελευταίο μοτίβο αναγνωρίζει το 5'-ppp τριφωσφορικό άκρο των πρόδρομων μορίων tRNA (pre-tRNA). Αυτή η δέσμευση ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση της σερίνης 366 για τον έλεγχο της ωρίμανσης του 5' άκρου των pre-tRNA από το ένζυμο RNase P (163, 164). Το C-τελικό άκρο περιλαμβάνει επίσης μία πιθανή περιοχή διμερισμού (233) και μια πιθανή περιοχή διάσπασης από κασπάση (110). Η ανθρώπινη πρωτεΐνη La (hLa) φωσφορυλιώνεται σε πολλές θέσεις που εντοπίζονται στην C-τελική περιοχή (238-241). Συγκεκριμένα, η hLa είναι δυνατό να φωσφορυλιωθεί στις θέσεις Thr302, Ser325, Thr362, Ser366 και Thr389 (194, 195, 242). Ορισμένες από αυτές έχει αποδειχθεί ότι ελέγχουν μια *in vivo* ή/και *in vitro* ρυθμιστική δραστηριότητα (164, 196-200, 227, 243). Από αυτές τις θέσεις το αμινοξύ που εμφανίζεται περισσότερο συχνά φωσφορυλιωμένο είναι η σερίνη 366 (θέση φωσφορυλίωσης της κινάσης καζεΐνης II ή CKII), ισομορφή που σχετίζεται με τα pre-tRNA (198). Ωστόσο, μετά από σύγκριση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών La των σπονδυλωτών, αποδείχθηκε ότι καμία από τις θέσεις φωσφορυλίωσης δεν είναι συντηρημένη.



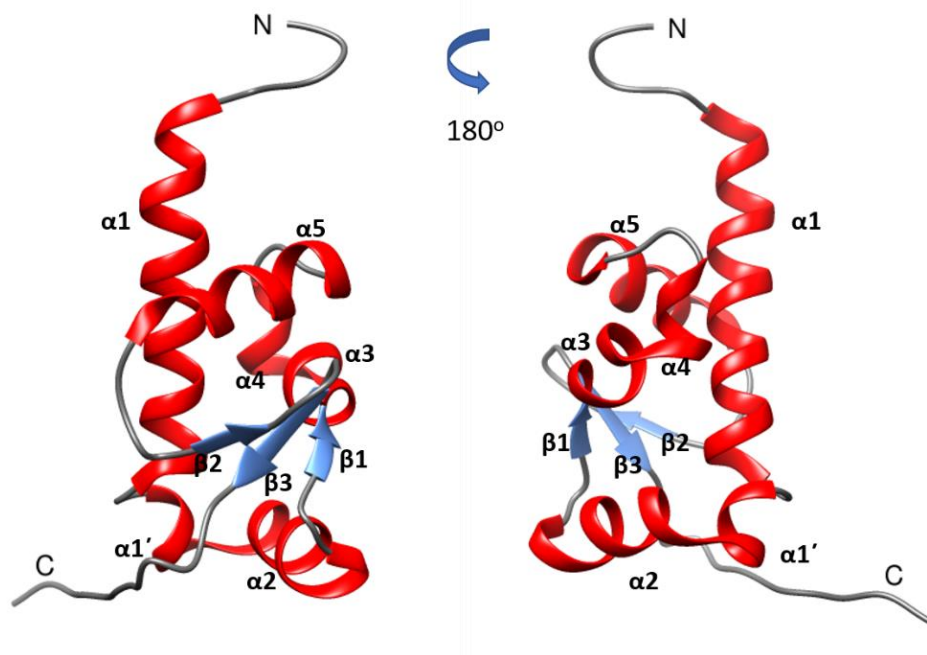
Εικόνα 13: Δομική οργάνωση της «πρωτότυπης» πρωτεΐνης La σε διάφορους οργανισμούς.

A.9. Δομική μελέτη των επικρατειών της πρωτεΐνης La

A.9.1. Δομική μελέτη του μοτίβου La της ανθρώπινης πρωτεΐνης La (hLaM) μέσω φασματοσκοπίας NMR

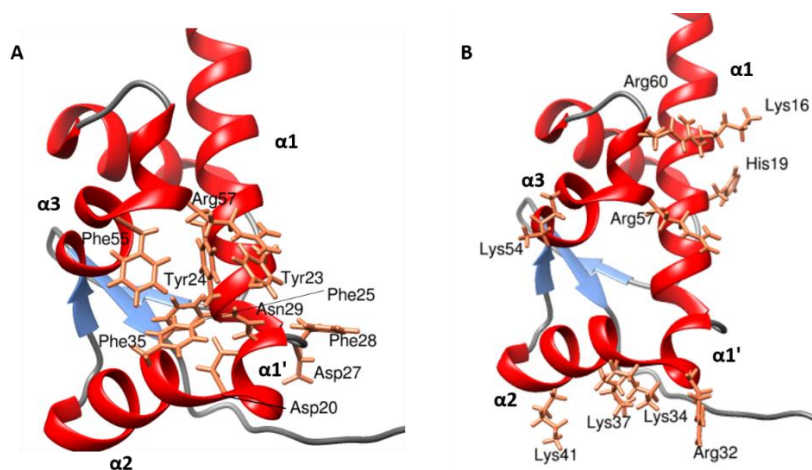
Το μοτίβο La της ανθρώπινης πρωτεΐνης La (hLaM) αποτελείται από περίπου 80 αμινοξέα. Πριν από την επίλυση της δομής του hLaM υπήρχαν μελέτες, οι οποίες ανέφεραν ότι το hLaM έχει αναδίπλωση κανονικού RRM, ενώ άλλες υποστήριζαν ότι υιοθετεί μια ελικοειδή διαμόρφωση. Η δομή του hLaM (La1-103) που επιλύθηκε μέσω φασματοσκοπίας NMR (Nuclear Magnetic Resonance), φαίνεται ότι είναι συμπαγής και περιλαμβάνει έξι α -έλικες και τρεις β -αντιπαράλληλους κλώνους (18) με τοπολογία $\alpha 1 \alpha 1' \alpha 2 \beta 1 \alpha 3 \beta 2 \beta 3$ (PDB ID: 1S7A), (Εικόνα 14). Συγκεκριμένα, η δομή του hLaM κυριαρχείται από μια αρκετά μεγάλη αμφιπαθή έλικα, την $\alpha 1$, η οποία εκτείνεται στα αμινοξικά κατάλοιπα La8-25. Η έλικα αυτή, μετά από μια μικρή συστροφή στο αμινοξύ γλυκίνη 26 (Gly26), ακολουθείται από μία βραχύτερη έλικα, την $\alpha 1'$. Η πολική πλευρά της $\alpha 1$ -έλικας είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη, ενώ η μη-πολική πλευρά της εμφανίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με άλλα δευτερεύοντα στοιχεία του hLaM, σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο έναν υδρόφοβο πυρήνα στην επικράτεια αυτή. Οι τρεις αντιπαράλληλοι β -κλώνοι συνεισφέρουν σε αυτόν τον υδρόφοβο πυρήνα με τα υδρόφοβα αμινοξέα τους, ενώ φέρουν μια επιφάνεια εκτεθειμένη σε διαλύτη στην αντίθετη πλευρά της επικράτειας σε σχέση με την $\alpha 1$ -έλικα. Η $\alpha 1$ -έλικα φαίνεται να παρέχει ένα ικρίωμα γύρω από το οποίο αναδιπλώνονται τα υπόλοιπα στοιχεία του τομέα. Για ορισμένες περιοχές του hLaM δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για την επίλυση της δομής, εξαιτίας της γρήγορης εσωτερικής κίνησης αυτών των περιοχών σε κλίμακα χρόνου από pico- σε nanosecond. Οι περιοχές αυτές εντοπίζονται στο N- και

στο C-τελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και στη θηλιά, η οποία ενώνει την $\alpha 5$ -έλικα με το $\beta 2$ -κλώνο. Στην επέκταση του $\beta 3$ -κλώνου προς το C-τελικό άκρο εντοπίζεται μια καλά καθορισμένη θηλιά. Η θηλιά αυτή ακολουθείται από έναν εκτεταμένο βραχίονα, ο οποίος διπλώνει πίσω στο μόριο και έρχεται σε επαφή με την $\alpha 1$ '-έλικα και τις θηλιές, οι οποίες ενώνουν την $\alpha 1$ '-έλικα με την $\alpha 1$ και την $\alpha 2$ -έλικα.



Εικόνα 14: NMR τρισδιάστατη δομή του μοτίβου LaM της ανθρώπινης πρωτεΐνης La (PDB ID: 1S7A).

Στην επιφάνεια του hLaM εντοπίζονται τα συντηρημένα αρωματικά αμινοξέα Tyr23, Tyr24, Phe25, Phe28, Phe35, Phe55, τα οποία σχηματίζουν μία κοιλότητα στο hLaM (Εικόνα 15A), και πιθανόν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και πρόσδεση του RNA μαζί με τα αμινοξικά κατάλοιπα Asn29, Asp33, Arg57, Arg60. Στην πρόσδεση με το RNA είναι δυνατόν να συμβάλλουν και τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα της επιφάνειας του hLaM (Εικόνα 15B), τα οποία περιβάλλουν την κοιλότητα των αρωματικών αμινοξέων. Τα αρωματικά και τα όξινα αμινοξέα εντοπίζονται στη μία πλευρά του hLaM, ενώ η αντίθετη πλευρά περιλαμβάνει κυρίως αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα.



Εικόνα 15: Α. NMR τρισδιάστατη δομή του hLaM, όπου απεικονίζονται τα αρωματικά αμινοξέα. Β. NMR τρισδιάστατη δομή του hLaM, όπου απεικονίζονται τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα της επιφάνειας.

Η σύγκριση της δομής του hLaM με άλλες δομές ομόλογων πολυπεπτιδίων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το hLaM εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με τη δομή των πρωτεϊνών των «winged helix» (Εικόνα 3), περιλαμβάνοντας όμως περισσότερα στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Οι πρωτεΐνες «winged helix» είναι πρωτεΐνες δέσμησης DNA με τοπολογία $\alpha 1\beta 1\alpha 2\alpha 3\beta 2\beta 3$, δηλαδή αποτελούνται από τρεις α -έλικες και τρεις β -κλώνους (Εικόνα 3Α) (244). Τα «φτερά» (wings) της επικράτειας αυτής σχηματίζονται από τη θηλιά που ενώνει τον $\beta 2$ -κλώνο με το $\beta 3$ και της επέκτασης του $\beta 3$ -κλώνου. Η σύγκριση των δομών των «winged helix» και του hLaM έδειξε ότι τα στοιχεία του hLaM που σχηματίζουν το μοτίβο «winged helix» είναι τα $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\alpha 3$ - $\alpha 5$ - $\beta 2$ - $\beta 3$. Επομένως, τα στοιχεία $\alpha 1'$, $\alpha 2$ και $\alpha 4$ είναι δυνατόν να θεωρηθούν ως επιπλέον στοιχεία των συντηρημένων των δομών «winged helix» (245, 246) (Εικόνα 16). Τα μέλη της οικογένειας των «winged helix» παρουσιάζουν ποικιλία στα χαρακτηριστικά των δομών που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με DNA. Αρκετές πρωτεΐνες «winged helix» δεσμεύονται στην κεντρική αύλακα του B-DNA, δημιουργώντας εκτεταμένες επαφές με την $\alpha 3$ -έλικα αναγνώρισης, η οποία αντιστοιχεί στην $\alpha 5$ -έλικα του hLaM, ενώ παράλληλα τα δύο «φτερά» συνεισφέρουν στην αναγνώριση του DNA με ποικίλους τρόπους (244, 245, 247). Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες η έλικα αναγνώρισης των πρωτεϊνών «winged helix» διαδραματίζει δευτερεύοντα ρόλο στη δέσμευση του DNA, ενώ τα «φτερά» και άλλες επιφάνειες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με DNA (246, 248). Το μοτίβο La

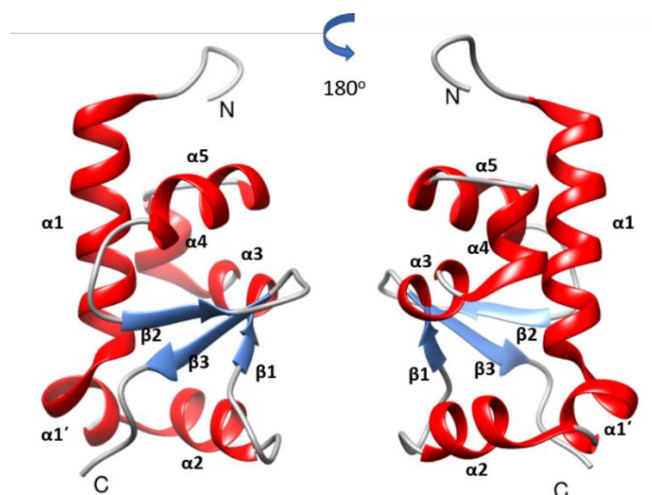
θεωρείται μια παραλλαγή των «winged helix» πρωτεϊνών, η οποία προσδένει RNA (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: NMR τρισδιάστατη δομή του hLaM, όπου απεικονίζονται με μπλε τα επιπλέον στοιχεία του LaM στις δομές των "winged-helix" πρωτεϊνών.

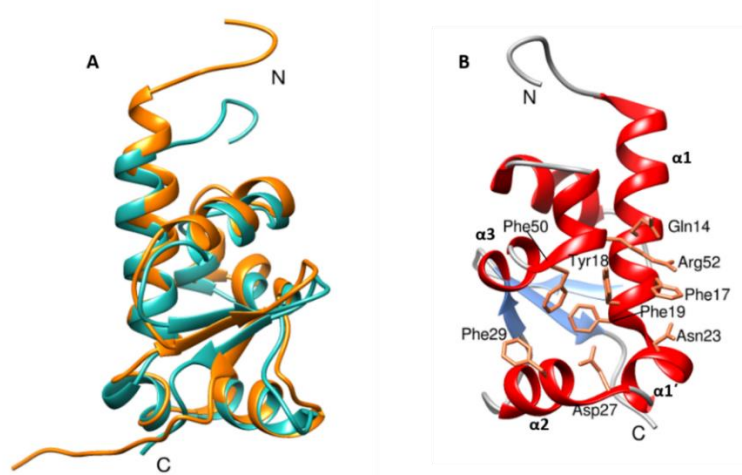
A.9.2. Κρυσταλλική δομή του μοτίβου La από το «*Trypanosoma Brucei*»

Η κρυσταλλική δομή του μοτίβου La (LaM) από το *Trypanosoma Brucei* La(1-89) υιοθετεί μια ελικοειδή διαμόρφωση, η οποία αποτελείται από έξι α -έλικες και τρεις β -αντιπαράλληλους κλώνους (Εικόνα 17) με τοπολογία $\alpha 1 \alpha 1' \alpha 2 \beta 1 \alpha 3 \alpha 4 \alpha 5 \beta 2 \beta 3$ PDB ID:1S29). Κυρίαρχο στοιχείο της διαμόρφωσής του διαδραματίζει η $\alpha 1$ -έλικα, όπως και στο αντίστοιχο μοτίβο LaM της ανθρώπινης πρωτεΐνης La, με το οποίο εμφανίζει αρκετά κοινά δομικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 18A) Η $\alpha 1$ -έλικα ακολουθείται από δύο μικρότερες α -έλικες, τις $\alpha 1'$ και $\alpha 2$ και τον $\beta 1$ -κλώνο. Μεταξύ του $\beta 1$ και του $\beta 2$ -κλώνου παρεμβάλλονται οι έλικες $\alpha 3$, $\alpha 4$ και $\alpha 5$, ενώ οι $\beta 2$ και $\beta 3$ -κλώνοι συνδέονται μέσω μιας θηλιάς που αποτελείται από έξι αμινοξέα. Το LaM φαίνεται να υιοθετεί μία διαμόρφωση παρόμοια με αυτή των πρωτεϊνών τύπου «winged helix» με κάποια επιπρόσθετα στοιχεία, όπως στο hLaM. Επομένως, οι δύο από τις τρεις α -έλικες της N-τελικής περιοχής, καθώς επίσης και η $\alpha 4$ -έλικα, εμφανίζονται ως επιπλέον στοιχεία στις δομές των πρωτεϊνών των «winged helix» (244). Τα αμινοξέα, καθώς και τα στοιχεία της δομής των πρωτεϊνών «winged helix», στα οποία συνδέεται το DNA, εμφανίζονται να συντηρούνται στο μοτίβο LaM από το *T. Brucei*.



Εικόνα 17: Κρυσταλλική δομή του μοτίβου LaM από το *T. Brucei* (PDB ID:1S29).

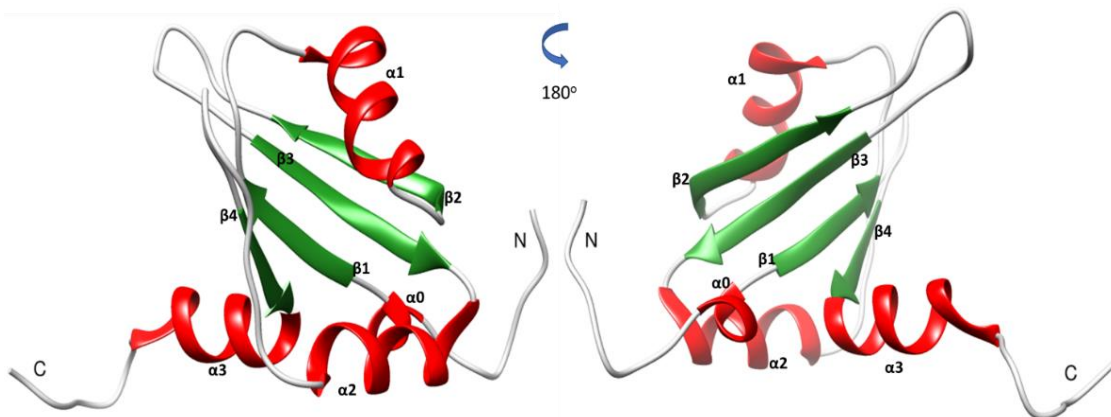
Στην επιφάνεια του LaM εντοπίζονται αρκετά συντηρημένα αρωματικά αμινοξέα, όπως τα αμινοξικά κατάλοιπα Phe17, Tyr18, Phe19, Phe29, Phe50, τα οποία, μαζί με τα αμινοξικά κατάλοιπα Asn23, Asp27, Gln14, Arg52, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του RNA (Εικόνα 18B). Μία περιοχή, η οποία εντοπίζεται παραπλεύρως της περιοχής με τα αρωματικά αμινοξέα και αποτελείται από τα βασικά αμινοξικά κατάλοιπα Lys10, Lys13, Arg26, Lys33, Lys51, Arg52 και Lys72, είναι δυνατόν να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του RNA. Αυτό συμβαίνει διότι τα βασικά αμινοξέα σχηματίζουν μη-ειδική επαφή με τον κορμό σακχαροφωσφορικών του RNA. Στην άλλη πλευρά του μορίου εντοπίζεται μία περιοχή με όξινα αμινοξέα (Glu36, Glu39, Glu45, Asp59, Glu77 και Asp78), η οποία δεν είναι δυνατό να αλληλεπιδράσει με το αρνητικά φορτισμένο RNA.



Εικόνα 18: Α. Υπέρθεση της NMR δομής του hLaM (με πορτοκαλί) με την κρυσταλλική δομή του LaM από το *T. Brucei* (με πράσινο). Β. Κρυσταλλική δομή του LaM από το *T. Brucei*, όπου απεικονίζονται τα αρωματικά αμινοξέα.

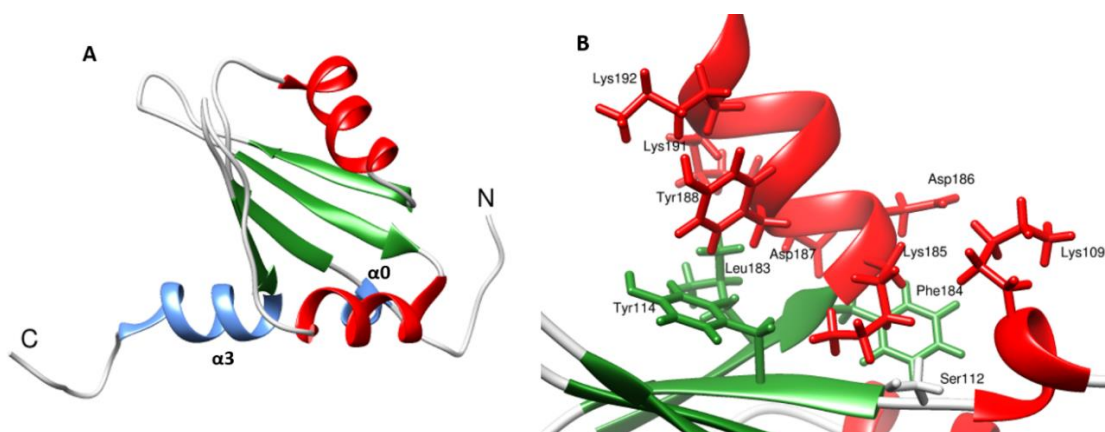
Α.9.3. Δομική μελέτη του RRM1 μέσω φασματοσκοπίας NMR

Η επίλυση της τρισδιάστατης δομής του πρώτου μοτίβου αναγνώρισης RNA, του RRM1 της ανθρώπινης πρωτεΐνης La (La105-202), απέδειξε ότι το RRM1 υιοθετεί τη διαμόρφωση ενός κλασικού μοτίβου RRM με την προσθήκη μιας επιπλέον α -έλικας στο C-τελικό άκρο (Εικόνα 19). Το RRM1 αποτελείται από τέσσερις β -κλώνους και τρεις α -έλικες με τοπολογία $\beta1\alpha1\beta2\beta3\alpha2\beta4\alpha3$ (PDB ID: 1S79) (18). Η $\alpha3$ -έλικα εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο και εκτείνεται στα αμινοξικά κατάλοιπα La185-194, ενώ συνδέεται με τον β -κλώνο μέσω της Phe184 που εντοπίζεται στον $\beta4$ -κλώνο, και συγκεκριμένα στην επιφάνεια όπου προσδένεται το RNA. Η $\alpha3$ -έλικα σταθεροποιείται στη θέση της σε σχέση με την επιφάνεια του β -κλώνου μέσω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Συγκεκριμένα, η Tyr188 και οι αλειφατικές αλυσίδες των αμινοξέων Lys185, Asp186, και Asp187 της α -έλικας με τα αμινοξέα Tyr114, Leu183 και Phe184 του β -κλώνου (Εικόνα 20B) σχηματίζουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Επίσης, στη σταθεροποίηση πιθανόν να συμβάλει ο σχηματισμός γέφυρας άλατος μεταξύ του Asp186 και Lys109. Η C-τελική α -έλικα βρίσκεται κοντά με τη μικρή 3/10 (ελικοειδή) στροφή του N-τελικού άκρου, η οποία εκτείνεται στα αμινοξέα La108-111, γεγονός το οποίο παρατηρείται στη δομή και άλλων πρωτεϊνών πρόσδεσης RNA (249, 250). Η $\alpha3$ -έλικα είναι κυρίως υδρόφιλη και βρίσκεται εκτεθειμένη σε διαλύτη, καθώς εκτείνεται πέρα από τη βασική δομή της επικράτειας (Εικόνα 20A). Αυτή η διαμόρφωση διαφοροποιεί την επικράτεια RRM1 από άλλες RRM επικράτειες που φέρουν στο C-τελικό τους άκρο α -έλικα (62, 74). Επίσης, η διαμόρφωση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τη διαμόρφωση της μακριάς αμφίφυλης $\alpha3$ -έλικας του RRM2α της ανθρώπινης πρωτεΐνης La.



Εικόνα 19: NMR τρισδιάστατη δομή του RRM1 της ανθρώπινης πρωτεΐνης La (PDB ID:1S79).

Τα συντηρημένα μοτίβα δέσμευσης RNA του RRM1 της ανθρώπινης πρωτεΐνης La εντοπίζονται στο κεντρικό ζευγάρι των β -κλώνων και είναι οι περιοχές 113-VYIKGF-118 και 151-KGSIFVVF-158. Αυτές περιλαμβάνουν δύο από τα τρία αμινοξικά κατάλοιπα, τα Tyr114 και Phe155, τα οποία είναι συντηρημένα σε επικράτειες RRM, καθώς συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με στοιβάδες βάσεων του RNA με τις αρωματικές, πλευρικές τους αλυσίδες (62). Το τρίτο αμινοξύ που συνεισφέρει στην αλληλεπίδραση αυτή είναι η Ser153. Η Tyr114 συμμετέχει σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τη βάση της C-τελικής α -έλικας απουσία RNA. Παρουσία RNA, και αν εμπλέκεται στη δέσμευση με αυτό, για την αλληλεπίδραση αυτή απαιτείται η μετατόπιση της α -έλικας.

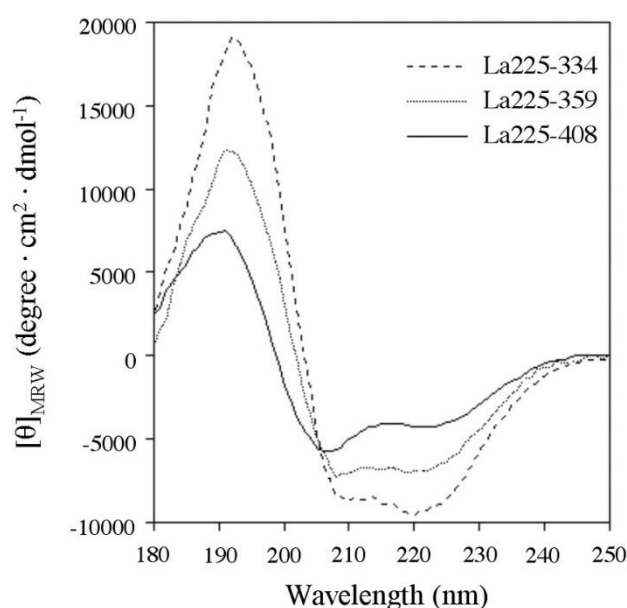


Εικόνα 20Α. NMR τρισδιάστατη δομή του RRM1, όπου απεικονίζονται με μπλε τα επιπλέον στοιχεία του RRM1 σε σύγκριση με τα κλασικά μοτίβα RRM. Β. Απεικόνιση των πολικών και υδρόφοβων αμινοξικών καταλοίπων, τα οποία σταθεροποιούν την $\alpha 3$ -έλικα.

A.9.4.i). Δομική μελέτη του C-τελικού άκρου της πρωτεΐνης La (La225-408)

Η δομική μελέτη του C-τελικού άκρου της πρωτεΐνης La αποκάλυψε ένα δεύτερο μοτίβο αναγνώρισης RNA, το RRM2 α , ένα μοτίβο RNA με νέα χαρακτηριστικά. Το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης La περιλαμβάνει, εκτός από το μοτίβο RRM που εκτείνεται στα αμινοξέα La225-334, μία μεγάλη, μη δομημένη περιοχή, η οποία ακολουθεί το RRM2 α (225, 233, 251). Για το δομικό χαρακτηρισμό της C-τελικής περιοχής μελετήθηκαν τρία διαφορετικά πολυπεπτίδια (La225-408, La225-359 και La225-334), τα οποία περιλάμβαναν την περιοχή του RRM2 α . Το RRM2 α ξεκινά στο αμινοξύ της θέσης 231 (43). Το πολυπεπτίδιο La225-408 περιλαμβάνει ολόκληρη την περιοχή του C-τελικού άκρου, το La225-359 περιλαμβάνει

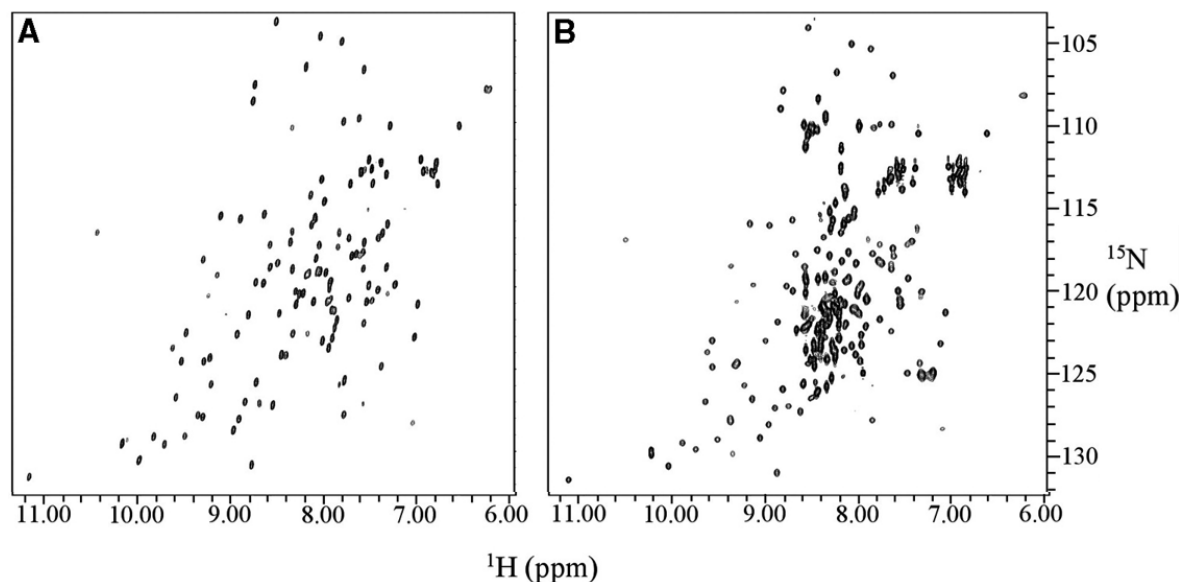
την περιοχή του C-τελικού άκρου που αποτελείται από το RRM2α και εκτείνεται μέχρι την περιοχή του μικρού βασικού μοτίβου SBM (252). Το τρίτο πολυπεπτίδιο περιλαμβάνει μόνο το RRM2α με την περιοχή NRE (nuclear retention element). Τα πολυπεπτίδια αυτά μελετήθηκαν με φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού (Circular Dichroism, CD). Η ανάλυση του φάσματος για το πολυπεπτίδιο La225-334 έδειξε ότι αποτελείται από 30% α -έλικα, 40% β -φύλλο και 20% τυχαίο σπείραμα. Το πολυπεπτίδιο La225-359 αποτελείται από 23% α -έλικα, 33% β -φύλλο και 36% τυχαίο σπείραμα, ενώ το πολυπεπτίδιο La225-408 αποτελείται από 18% α -έλικα, 30% β -φύλλο και 49% τυχαίο σπείραμα (Εικόνα 21). Τα φάσματα του Κυκλικού Διχρωισμού και για τα τρία πολυπεπτίδια μοιάζουν αρκετά, ωστόσο η μοριακή ελλειπτικότητα είναι σημαντικά λιγότερο αρνητική για τα μεγαλύτερα πολυπεπτίδια. Αυτό αποδεικνύει ότι οι πρόσθετες αλληλουχίες στο πολυπεπτίδιο La225-334 δεν προσθέτουν επιπλέον στοιχεία δευτεροταγούς δομής.



Εικόνα 21: Φάσματα Κυκλικού Διχρωισμού των πολυπεπτιδίων La225-334, La225-359 και La225-408 της ανθρώπινης πρωτεΐνης La(16).

Τα τρία πολυπεπτίδια του C-τελικού άκρου μελετήθηκαν και με Φασματοσκοπία NMR. Από την ανάλυση των φασμάτων NMR (Εικόνα 22) ταυτοποιήθηκε ότι ο βασικός πυρήνας της επικράτειας αυτής αποτελείται από τα αμινοξέα La231-325 (16, 252) και πλαισιώνεται από ένα μικρό ευκίνητο N-τελικό άκρο (La225-230) και από ένα μεγάλο C-τελικό άκρο (La326-408). Περαιτέρω δομική μελέτη των πολυπεπτιδίων αυτών μέσω φασματοσκοπίας NMR έδειξε ότι η

τρισδιάστατη δομή της περιοχής La230-325 παραμένει σχεδόν ίδια και στα τρία πολυπεπτίδια, ανεξάρτητα από το μήκος της C-τελικής περιοχής, ενώ το C-τελικό άκρο (La326-408) δεν είναι δομημένο. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των τριών πολυπεπτιδίων με φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού επιβεβαιώνονται με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της μελέτης των πολυπεπτιδίων με φασματοσκοπία NMR

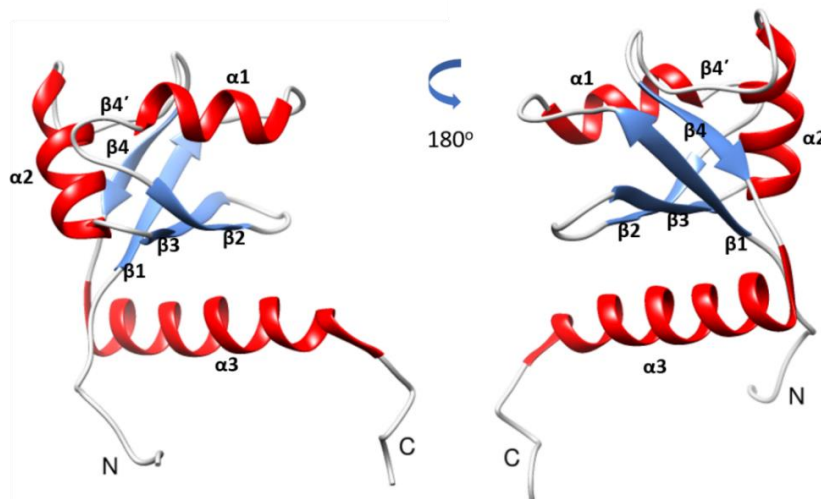


Εικόνα 22: ^1H - ^{15}N HSQC φάσμα Α. του πολυπεπτιδίου La225-334 και Β. του πολυπεπτιδίου La225-408.

A.9.4.ii). Δομική μελέτη του RRM2α μέσω φασματοσκοπίας NMR

Το δεύτερο μοτίβο RRM της ανθρώπινη πρωτεΐνης La, το RRM2α, αποτελείται από περίπου 90 αμινοξέα. Η τρισδιάστατη δομή του πολυπεπτιδίου La225-334, το οποίο περιλαμβάνει το RRM2α, επιλύθηκε με τη φασματοσκοπία NMR (Εικόνα 23, PDB ID: 1OWX). Η τοπολογία του πολυπεπτιδίου La225-334 διαφέρει από αυτήν ενός κλασικού RRM, καθώς φέρει επιπλέον στοιχεία δευτεροταγούς δομής σε σχέση με τη δομή ενός κλασικού RRM. Συγκεκριμένα, η τοπολογία ενός κλασικού RRM είναι $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4$ με τέσσερις αντιπαράλληλους β -κλώνους και δύο α -έλικες, ενώ η τοπολογία του μοτίβου RRM του C-τελικού άκρου της ανθρώπινης πρωτεΐνης La είναι $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4'\beta 4\alpha 3$. Φέρει, δηλαδή, έναν επιπλέον β -κλώνο, ο οποίος εντοπίζεται μεταξύ της $\alpha 2$ -έλικας και του $\beta 4$ -κλώνου και είναι αντιπαράλληλος ως προς το $\beta 4$ -κλώνο στο ένα άκρο του β -κλώνου υιοθετώντας έτσι μία διάταξη $\beta 4'-\beta 4-\beta 1-\beta 3-\beta 2$. Επιπλέον στοιχείο της δομής σε σχέση με το κλασικό μοτίβο RRM είναι η μεγάλη α -έλικα στο C-τελικό άκρο του πολυπεπτιδίου. Παρόλο που τα επιπλέον στοιχεία της

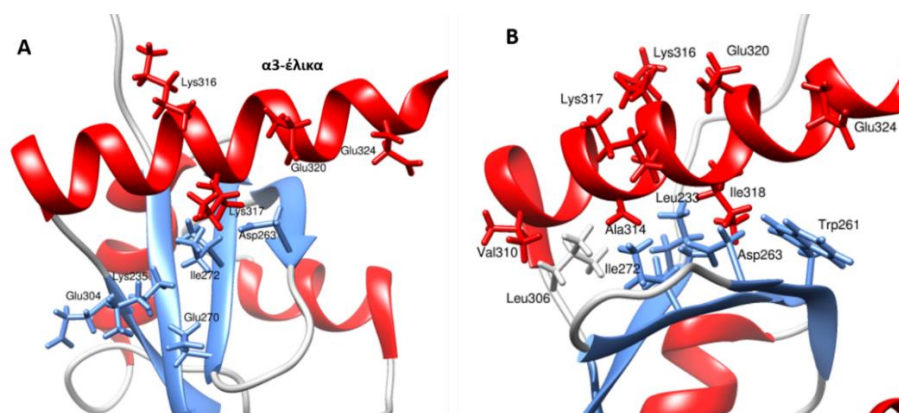
δομής του RRM2α είναι αρκετά, τα βασικά στοιχεία ενός RRM υφίστανται στη δομή, κατατάσσοντάς το στα μοτίβα RRM. Ωστόσο, η απουσία των αρωματικών αμινοξέων στο RRM2α, τα οποία παραμένουν συντηρημένα σε συγκεκριμένες θέσεις στην επιφάνεια δέσμευσης του RNA σε άλλες επικράτειες RRM, υπογραμμίζει τη διαφορετική, ασυνήθιστη φύση του RRM2α. Επιπλέον, στην επιφάνεια του β -κλώνου εντοπίζονται τρία αμινοξέα με όξινες πλευρικές αλυσίδες, το Asp263, το Glu270 και το Glu304. Παρόλο που συχνά σε κάποια από τις αντίστοιχες θέσεις των μοτίβων RRM εντοπίζονται όξινα αμινοξέα, είναι ασυνήθιστο να καταλαμβάνονται και οι τρεις θέσεις από όξινα αμινοξέα (43). Οι πλευρικές αλυσίδες του γλουταμινικού και του ασπαραγινικού οξέος συνήθως απουσιάζουν από την επιφάνεια πρόσδεσης με RNA, διότι αλληλεπιδρούν με τη φωσφορική ομάδα του σκελετού του RNA και με αυτό τον τρόπο δεν είναι δυνατή η δημιουργία δεσμού υδρογόνου με τις αζωτούχες βάσεις των νουκλεοτιδίων (61). Επίσης, σε πολλές επικράτειες με RRM, η $\beta 2\beta 3$ είναι μακριά και ευέλικτη και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση και την εξειδίκευση του RNA παρουσιάζοντας σημαντικές αλλαγές στη διαμόρφωσή της κατά την πρόσδεση του RNA (253). Αντιθέτως, στο RRM2α της La η θηλιά $\beta 2\beta 3$ είναι αρκετά μικρότερη και οριακά εύκαμπτη σε σχέση με το πυρήνα του RRM2α.



Εικόνα 23: NMR τρισδιάστατη δομή του RRM2α της ανθρώπινης πρωτεΐνης La (PDB ID: 1OWX).

Η μακριά $\alpha 3$ -έλικα στο C-τελικό άκρο, η οποία εκτείνεται στα αμινοξέα La308-325, αποτελεί ένα επιπλέον δομικό στοιχείο του RRM2α σε σύγκριση με τα κλασικά μοτίβα RRM. Η έλικα αυτή συνδέεται με τον $\beta 4$ -κλώνο μέσω ενός μικρού συνδέτη και εκτείνεται για πέντε στροφές για να βρεθεί στο άνω μισό του β -κλώνου (Εικόνα 24Α). Η δομή της έλικας είναι πολύ καλά καθορισμένη, ενώ σταθεροποιείται με υδρόφοβες

αλληλεπιδράσεις με τον β -κλώνο. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα Val310, Ala314 και Ile318 σχηματίζουν μία υδρόφοβη επιφάνεια στην κάτω πλευρά της έλικας που έρχεται σε επαφή με την μη-πολική περιοχή του β -κλώνου, η οποία σχηματίζεται από τη Leu233, Trp261, Ile272, Leu274 και Leu306 (Εικόνα 24B). Η στροφή της $\alpha 3$ -έλικας που εκτείνεται μετά τη Gln322 είναι λιγότερο καθορισμένη στη δομή, εξαιτίας της γρήγορης εσωτερικής κίνησης σε κλίμακα χρόνου από pico- σε nanosecond, ενώ δεν εμφανίζει επαφές με το υπόλοιπο μόριο (Εικόνα 24). Ο συνδυασμός μελέτης δομής και δράσης σε πρωτεΐνες που προσδένονται με RNA και φέρουν μία επιπλέον έλικα στην C-τελική περιοχή αποκάλυψαν ότι η έλικα αυτή μετατοπίζεται προς την κορυφή του β -κλώνου όταν η πρωτεΐνη προσδένεται με RNA στελέχους-θηλιάς (stem loop) (62). Επομένως, η α -έλικα είναι πιθανόν να προστατεύει την υδρόφοβη επιφάνεια πρόσδεσης RNA από το διαλύτη, μειώνοντας το κίνδυνο δημιουργίας συσσωμάτων (254), ενώ παρουσία του RNA η έλικα συμμετέχει στη δέσμευσή του. Τέλος, η αλληλουχία NRE εντοπίζεται στην περιοχή La316-332 και χρησιμεύει στη διατήρηση των pre-tRNA στον πυρήνα του κυττάρου διευκολύνοντας την ωρίμανσή τους (181). Αυτή η περιοχή NRE συμπεριλαμβάνεται στην α -έλικα του C-τελικού άκρου. Σε αυτήν την περιοχή εντοπίζονται τρία συντηρημένα στους οργανισμούς υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα, ήτοι η Ala314, η Ile318 και η Ile319, εκ των οποίων δύο εμπλέκονται στη σταθεροποίηση της α -έλικας στο βασικό κορμό του μοτίβου RRM. Επιπλέον, στην περιοχή αυτή εντοπίζεται ένα συντηρημένο ζεύγος βασικών αμινοξέων, τα Lys316 και Lys317 και ένα συντηρημένο ζεύγος όξινων αμινοξέων τα Glu320 και Glu324, τα οποία εκτίθενται στη μία πλευρά της C-τελικής έλικας απέναντι προς το κατώτερο μισό του β -κλώνου (Εικόνα 24B), καθιστώντας τα σημαντικά για τη λειτουργία της.



Εικόνα 24: NMR τρισδιάστατη δομή του RRM2α, στην οποία αποτυπώνεται Α. η θέση της $\alpha 3$ -έλικας ως προς τους β -κλώνους και Β. τα υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία εμπλέκονται στη σταθεροποίηση της $\alpha 3$ -έλικας στην επιφάνεια των β -κλώνων.

Συγκρίνοντας τις ελεύθερες δομές των δύο μοτίβων RRM της ανθρώπινης πρωτεΐνης La επισημαίνονται αρκετές διαφορές. Συγκεκριμένα, η θέση ελίκων $\alpha 1$ και $\alpha 2$ σε σχέση με τον β -κλώνο διαφέρει σημαντικά στους δύο τομείς. Το RRM1 πιθανόν να αλληλεπιδρά με RNA καλύτερα σε σύγκριση με το RRM2α εξαιτίας της ύπαρξης πέντε αμινοξέων της $\beta 2\beta 3$ θηλιάς, τα οποία εμπλέκονται συχνά σε αλληλεπιδράσεις με RNA. Αυτά τα αμινοξέα σχηματίζουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τη φωσφορική ομάδα του σακχάρου του σκελετού του RNA. Στο RRM2α εντοπίζονται μόνο δύο τέτοια αμινοξικά κατάλοιπα στην ίδια θηλιά. Επιπλέον, το RRM2α στην επιφάνεια του β -κλώνου φέρει αρκετά όξινα αμινοξέα, σε αντίθεση με το hRRM1 (16). Τα παραπάνω καθιστούν την επιφάνεια του β -κλώνου του hRRM1 περισσότερο βασική και πιθανότητα περισσότερο ικανή για τη δέσμευση του RNA.

A.10. Δομική μελέτη των συμπλόκων των επικρατειών της πρωτεΐνης La με RNA

A.10.1. Δομική μελέτη του LaM-RRM1 προσδεμένου με το ολιγονουκλεοτίδιο (U)

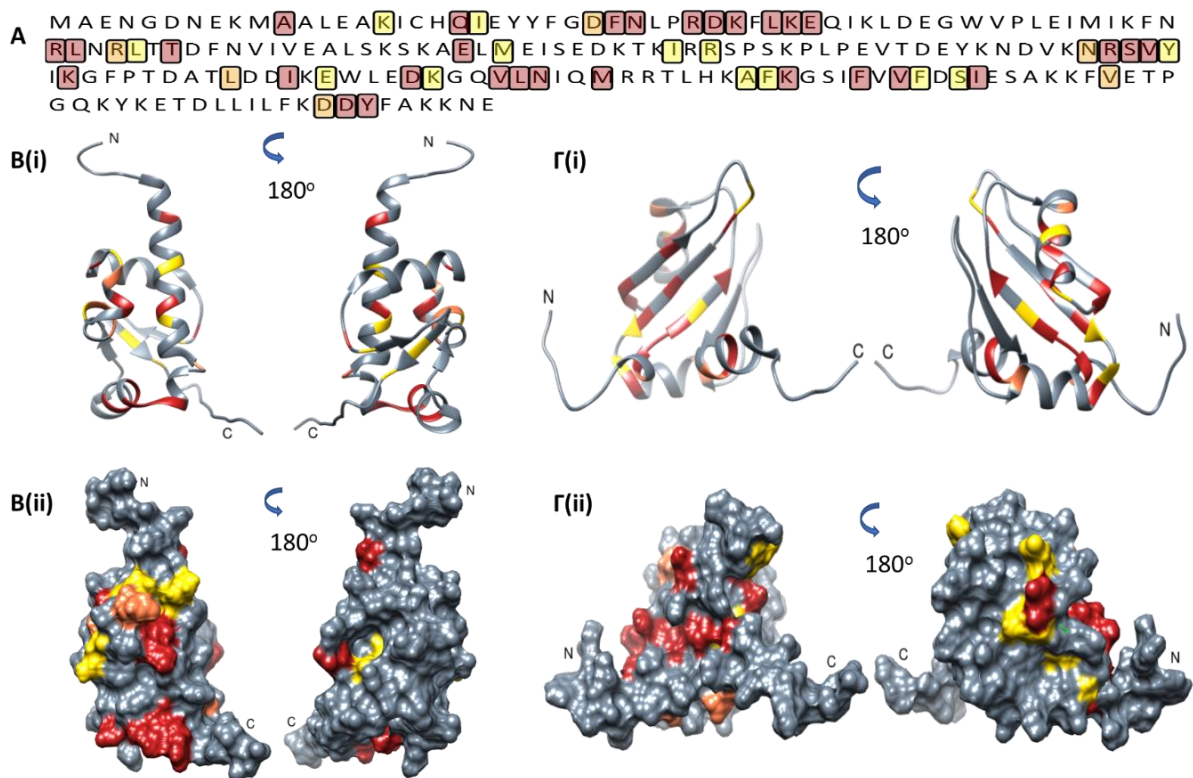
Η δομική ανάλυση της N-τελικής περιοχής της ανθρώπινης πρωτεΐνης La (NTD N-terminal domain, La1-194), η οποία αποτελείται από το LaM και το RRM1 και συνδέονται μέσω ενός μικρού συνδέτη (linker), πραγματοποιήθηκε μέσω της Φασματοσκοπίας NMR. Τα ασυνήθιστα χαρακτηριστικά αυτών των δύο επικρατειών που περιεγράφηκαν παραπάνω συμμετέχουν στη δέσμευση του RNA. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ικανότητα δέσμευσης της N-τελικής περιοχής με ένα ολιγονουκλεοτίδιο που αποτελείται από δέκα ουριδίλια (U). Χρησιμοποιώντας τα πειράματα ^1H - ^{15}N HSQC (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) του NMR, παρακολουθήθηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του αμιδικού σκελετού της NTD περιοχής της πρωτεΐνης La μετά την τιτλοδότηση με το ολιγονουκλεοτίδιο (255). Αυτή η ευαίσθητη μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση της διαταραχής της χημικής μετατόπισης, εξαιτίας της άμεσης δέσμευσης με το RNA ή των διαμορφωτικών αλλαγών που προκαλούνται από την αλληλεπίδραση του προσδέτη και μπορεί επομένως να περιγράψει τις περιοχές που επηρεάζονται άμεσα από το σχηματισμό του συμπλόκου. Η ανάλυση των χημικών μετατοπίσεων αποκάλυψε ότι περιοχές και των δύο επικρατειών συνεργάζονται, ώστε να δημιουργούν μία λειτουργική μονάδα για τη

δέσμευση του RNA. Η συνέργεια των δύο επικρατειών μπορεί να προκύψει από το RNA, το οποίο πιθανό να εντοπίζεται κατά μήκος μιας επιφάνειας πρόσδεσης που σχηματίζεται με τη συμμετοχή και των δύο επικρατειών. Εναλλακτικά, η πρόσδεση του RNA θα μπορούσε να προάγει μία στενότερη συσχέτιση του LaM και του RRM1 για το σχηματισμό μίας κοιλότητας δέσμευσης, στην οποία οι επιφάνειες πρόσδεσης της κάθε επικράτειας έρχονται σε επαφή με διάφορες περιοχές του RNA.

Τα αμινοξικά κατάλοιπα του LaM που υφίστανται τις μεγαλύτερες μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις εντοπίζονται στις έλικες $\alpha 1$, $\alpha 1'$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ και $\alpha 4$ (Εικόνα 25Bi) και συγκεντρώνονται στην επιφάνεια της μίας πλευράς του μορίου (Εικόνα 25Bii). Η άλλη πλευρά του LaM στερείται αλλαγών στις χημικές μετατοπίσεις, παρόλο που εμφανίζονται τρεις μικρές μεταβολές σε αμινοξικά κατάλοιπα του β -κλώνου. Τα αμινοξέα που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με το RNA εντοπίζονται στα επιπλέον στοιχεία του LaM ($\alpha 1'$, $\alpha 2$, $\alpha 4$) σε σύγκριση με το «winged-helix» και όχι στην $\alpha 5$ -έλικα, η οποία αντιστοιχεί στην $\alpha 3$ -έλικα των «winged-helix» πρωτεϊνών, και εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με το DNA. Επιπλέον, η περιοχή δέσμευσης του RNA εντοπίζεται στην πλευρά της έλικας του LaM, μια περιοχή, της οποίας η επιφάνεια είναι περισσότερο βασική (Εικόνα 25Bi). Η περιοχή αυτή βρίσκεται κοντά στον συνδέτη που εκτείνεται από τον $\beta 3$ -κλώνο και συνδέει το LaM με το RRM1 (Εικόνα 25A). Αυτή η περιοχή αντιστοιχεί στο w2 των «winged-helix» πρωτεϊνών και είναι δυνατό να εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με RNA. Τα αμινοξικά κατάλοιπα του RRM1, τα οποία επηρεάζονται από την προσθήκη RNA, εντοπίζονται στον κεντρικό β -κλώνο, στη θηλιά $\beta 2\beta 3$, στην α -έλικα του C-τελικού άκρου και στη 3/10 έλικα (Εικόνα 25A, Γ). Επιπροσθέτως μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις παρουσιάζονται σε αμινοξέα που εντοπίζονται στις θηλιές $\alpha 1\beta 2$ και $\beta 3\alpha 2$, καθώς επίσης και στην εσωτερική επιφάνεια των ελίκων $\alpha 1$ και $\alpha 2$ (Εικόνα 25Γ). Τα δομικά στοιχεία που χρησιμοποιεί το LaM και το RRM1 για να αλληλεπιδράσει με το RNA είναι διαφορετικά. Ωστόσο, η επιφάνεια αλληλεπίδρασης, η οποία σχηματίζεται και από τις δύο επικράτειες, περιλαμβάνει αρκετά συντηρημένα αρωματικά αμινοξέα (όπως Phe28, Tyr188), των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες είναι εκτεθειμένες στο διαλύτη και μπορούν να σχηματίσουν με το RNA αλληλεπιδράσεις τύπου base-stacking (62).

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ^1H - ^{15}N HSQC για να παρακολουθούνται οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις της LaNTD μετά από τιτλοδοτίσεις με ποικιλία ολιγονουκλεοτιδίων RNA (5'-UU-3'-OH, 5'-UUU-3'-OH,

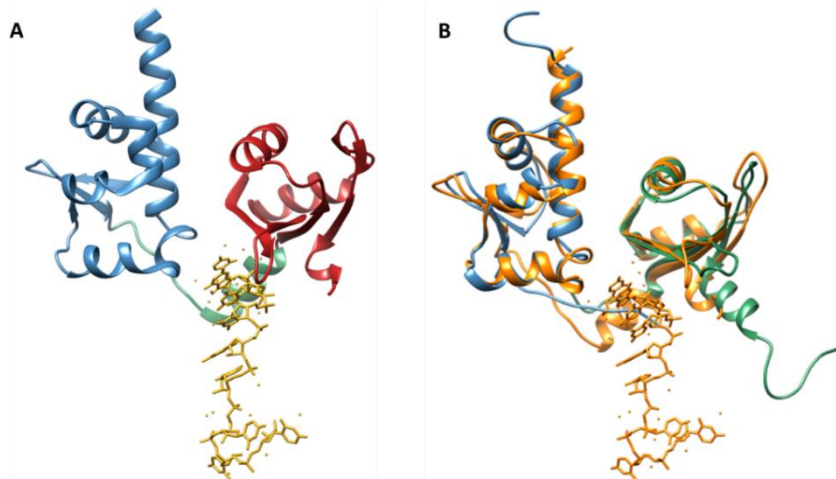
5'-UUUU-3'-OH, 5'-UCUU-3'-OH, 5'-AUUUU-3'-OH, 5'-UUUUUUUUUU-3'-OH). Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκαν παρόμοιες μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις. Μικρές διαφοροποιήσεις εντοπίζονται όταν η LaNTD αλληλεπιδρά με το 5'-UCUU-3'-OH στις περιοχές ανάμεσα στις δύο επικράτειες (La32-38, La58-60 και La140-145), γεγονός το οποίο υποδηλώνει μία πιθανή εναλλακτική θέση πρόσδεσης. Μικρές διαφοροποιήσεις εμφανίζονται και στο σύμπλοκο LaNTD: 5'-UU-3'-OH, εξαιτίας της έλλειψης του επιπλέον ουριδιλίου (17). Πειράματα δυναμικής πραγματοποιήθηκαν για το σύμπλοκο LaNTD: 5'-AUAAUUU-3'-OH. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με τα αντίστοιχα της ελεύθερης LaNTD έδειξε ότι οι δύο επικράτειες κινούνται ανεξάρτητα και σταθεροποιούνται με την πρόσδεση του RNA (17).



Εικόνα 25: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου hLa1-194 με το UUUUUUUUUU-3'-OH. Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις. Β, Γ. Χαρτογράφηση της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων στη δομή του Β(i). hLaM και του Γ(i). hRRM1 καθώς και στην επιφάνεια του Β(ii). hLaM και του Γ(ii). hRRM1. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,05 \leq \Delta\delta_{AV} \leq 0,07$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,07 \leq \Delta\delta_{AV} \leq 0,1$ και με κόκκινο οι $\Delta\delta_{AV} \geq 0,1$.

A.10.2. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της περιοχής NTD με ολιγονουκλεοτίδια RNA με UUU-3'-OH άκρο

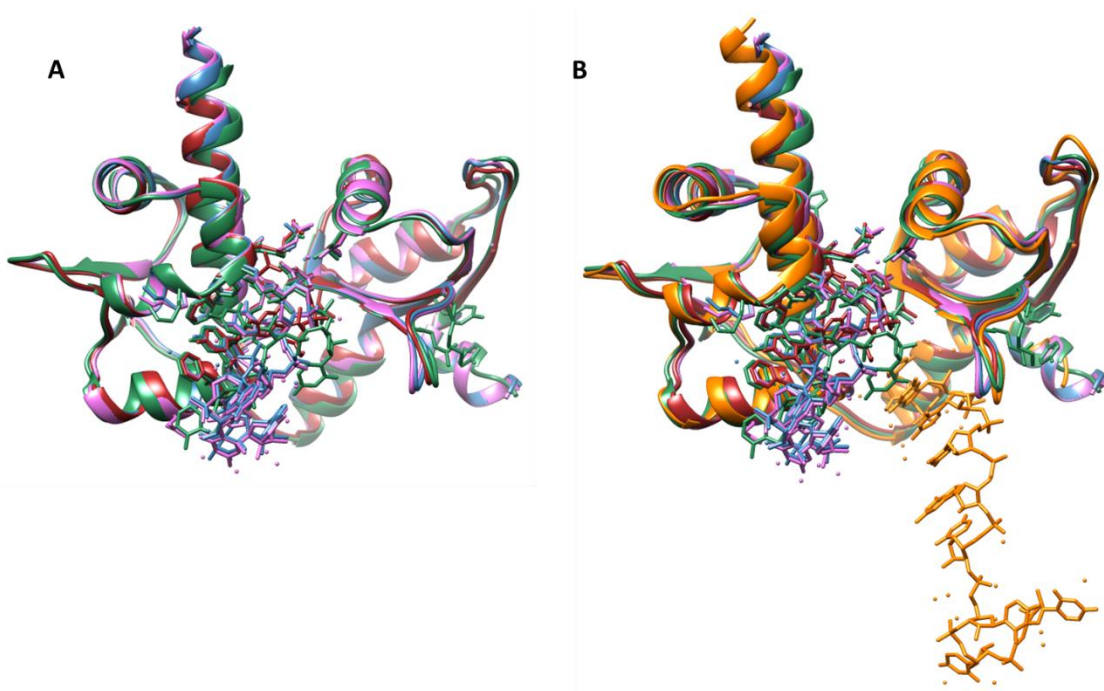
Πέντε διαφορετικές κρυσταλλικές δομές συμπλόκων της περιοχής NTD (hLa1-194) με αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων RNA που φέρουν την περιοχή UUU-3'-OH έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων PDB (ID: 1ZH5, 2VOD, 2VON, 2VOO, 2VOP). Η κοινή αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων είναι ίδια με αυτή η οποία εντοπίζεται στο 3' άκρο των νεοσυντιθέμενων μεταγράφων της RNAP III. Για τη δημιουργία του πρώτου συμπλόκου χρησιμοποιήθηκε το 9-νουκλεοτίδιο RNA με αλληλουχία 5'-UGCUGUUUU-3'-OH (Εικόνα 26A) (19). Ωστόσο, αυτό το ολιγονουκλεοτίδιο εμφανίζει μία δίκλωνη περιοχή, αφήνοντας ελεύθερες, χωρίς δεσμούς, τις βάσεις 5'-U και UUU-3'-OH. Το UUU-3'-OH άκρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια του hLaM με το hRRM1. Συγκρίνοντας τις ελεύθερες δομές των επικρατειών hLaM και hRRM1 με την αντίστοιχη περιοχή του συμπλόκου, παρατηρείται ότι η κάθε επικράτεια διατηρεί τη διαμόρφωσή της (Εικόνα 26B). Παράλληλα, ο συνδέτης μεταξύ των τομέων σχηματίζει α -έλικα και πιθανό να συμβάλλει στον προσανατολισμό των δύο επικρατειών για τη δημιουργία του συμπλόκου. Επίσης, οι δύο τομείς δρουν συνεργικά στην αναγνώριση της αλληλουχίας UUU-3'-OH (19). Οι ελεύθερες βάσεις U1 και U7-U8-U9-3'-OH εμφανίζονται ως προεξοχές στη διεπιφάνεια πρωτεΐνης-RNA του συμπλόκου. Η περιοχή UUU-3'-OH υιοθετεί μία νέα διαμόρφωση, όπου οι βάσεις U7 και U9 βρίσκονται κοντά η μία στην άλλη και κατευθύνονται προς το hLaM, ενώ η βάση U8 κατευθύνεται προς το hRRM1. Στην περιοχή αναγνώρισης της αλληλουχίας UUU-3'-OH ανήκουν τα συντηρημένα αμινοξέα Tyr23, Phe35 και Phe55.



Εικόνα 26: Α. Απεικόνιση της κρυσταλλογραφικής δομής του συμπλόκου του πολυπεπτιδίου hLa1-194 με το ολιγονουκλεοτίδιο 5'-UGCUGUUUU-3'-OH. Με μπλε χρωματίζεται το hLaM, με κόκκινο το hRRM1 και με πράσινο ο συνδέτης μεταξύ των επικρατειών (hLa93-110). Β. Υπέρθωση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου του hLa1-194 με το ολιγονουκλεοτίδιο (πορτοκαλί) και των δομών των ελεύθερων hLaM (μπλε) και hRRM1 (πράσινο).

Οι φυσιολογικοί προσδέτες της πρωτεΐνης La, όπως τα pre-tRNA και Y RNA, εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες με το RNA της δομής του πρώτου συμπλόκου, οι οποίες εντοπίζονται στην ύπαρξη του ελεύθερου UUU-3'-OH άκρου ως προεξοχή από τα ζεύγη βάσεων RNA (17, 185, 256, 257). Ωστόσο, παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, εξαιτίας της δίκλωνης περιοχής του RNA που σχηματίζεται. Με αυτό τον τρόπο το 5' άκρο έρχεται σε επαφή με την πρωτεΐνη, γεγονός το οποίο δημιουργεί ασαφή αποτελέσματα, καθώς δεν είναι γνωστός ο τρόπος αναγνώρισης του 5' τριφωσφορικού άκρου του RNA στην περιοχή NTD της πρωτεΐνης La. Για αυτό το λόγο, η αλληλεπίδραση της περιοχής του hLaM-RRM1 μελετήθηκε με άλλα ευθύγραμμα RNA-προσδέτες με τη κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Συγκεκριμένα, η LaNTD συγκρυσταλλώθηκε με τα ολιγονουκλεοτίδια 5'-AUAAUUU-3'-OH, 5'-AUAUUUU-3'-OH, 5'-AUUUU-3'-OH, 5'-UUUUUUUU-3'-OH, τα οποία φέρουν το χαρακτηριστικό UUU-3'-OH άκρο και είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί σε μελέτες με φασματοσκοπία NMR (17, 18). Και στις τέσσερις δομές των συμπλόκων, το RNA, διατηρώντας τη μονόκλωνη διαμόρφωσή του, εντοπίζεται στην περιοχή ανάμεσα στο hLaM και στο hRRM1 (Εικόνα 27Α). Η κάθε επικράτεια ξεχωριστά διατηρεί την ίδια δομή με την αντίστοιχη στη συνολική δομή του hLaM-RRM1 (18). Ο συνδέτης μεταξύ των δύο επικρατειών (La93-110) σχηματίζει έλικα, η οποία εκτείνεται στα αμινοξέα La102-110 (Εικόνα 27Α). Πειράματα NMR αποδεικνύουν ότι αυτή η α -έλικα σχηματίζεται στο διάλυμα μόνο μετά την πρόσδεση του RNA, ενώ στην ελεύθερη δομή

η περιοχή του συνδέτη δεν εμφανίζει δομικά στοιχεία, με εξαίρεση την 3/10 έλικα, η οποία σχηματίζεται από τα αμινοξέα 107-109. Η ίδια περιοχή σχηματίζει α -έλικα, ο σχηματισμός της οποίας είναι χαρακτηριστικό των συμπλόκων της πρωτεΐνης La με RNA (17). Η υπέρθεση των τεσσάρων δομών των συμπλόκων της hLa με μονόκλωνο RNA (ssRNA ή single-stranded RNA) αποκάλυψαν υψηλό βαθμό ομοιότητας (Εικόνα 27A), ενώ η υπέρθεση της δομής του συμπλόκου με το δίκλωνο RNA (dsRNA ή double-stranded RNA) αποκάλυψε ότι το dsRNA απομακρύνει το RRM1 από το hLaM, αυξάνοντας την απόσταση μεταξύ των δύο τομέων (Εικόνα 27B).



Εικόνα 27: Α. Υπέρθεση των τεσσάρων δομών των συμπλόκων της περιοχής NTD της hLa με το 5'-ΑΥΑΥΥΥΥ-3'-ΟΗ (μπλε), το 5'-ΑΥΑΑΥΥΥ-3'-ΟΗ (μωβ), το 5'-ΥΥΥΥΥΥΥ-3'-ΟΗ (κόκκινο) και με το 5'-ΑΥΥΥΥ-3'-ΟΗ (πράσινο). Β. Υπέρθεση των δομών των συμπλόκων της NTD περιοχής της hLa με μονόκλωνο και με δίκλωνο RNA (πορτοκαλί).

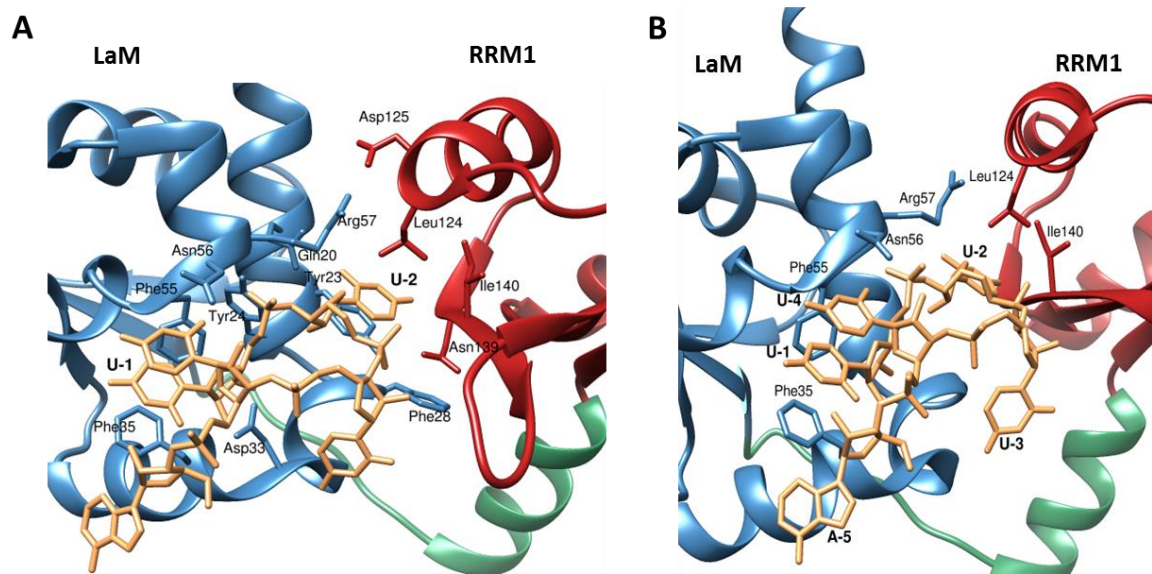
Η αλληλεπίδραση του RNA με την πρωτεΐνη έδειξε ότι οι διαφορετικές αλληλουχίες RNA που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζουν ομοιότητες στο 3' άκρο, αλλά διαφορετικές διαμορφώσεις στο 5' άκρο. Οι διαμορφώσεις των δύο τελευταίων αζωτούχων βάσεων του 3' άκρου, U-1 και U-2 (ακολουθείται η αρίθμηση, η οποία χρησιμοποιείται από την ερευνητική ομάδα που έλυσε τη δομή), ταυτίζονται σε όλες τις δομές. Η βάση U-1 αλληλεπιδρά αποκλειστικά με το hLaM (Εικόνα 28). Δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ του βασικού σκελετού του νουκλεοτιδίου και συγκεκριμένα οι ομάδες -OH των θέσεων 2' και 3' του δακτυλίου της ριβόζης

σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα οξυγόνου της πλευρικής αλυσίδας του καρβοξυλίου του Asp33 (Εικόνα 28Α). Επιπλέον, το O1 (οξυγόνο της θέσης 1) του δακτυλίου της ριβόζης σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τις NH ομάδες του βασικού σκελετού των αμινοξέων Asn56 και Arg57 και με την -OH ομάδα της πλευρικής αλυσίδας της Tyr24, αμινοξέα σημαντικά για την αναγνώριση του 3' άκρου (19, 24). Η βάση U-1 εντοπίζεται πάνω από την πλευρική αλυσίδα της Phe35, η οποία σχηματίζει μη πολικές αλληλεπιδράσεις με τη Lys54 και τη Phe55 (Εικόνα 28Α). Από τις δομές των συμπλόκων παρατηρείται ότι μόνο η μία πλευρά της βάσης U-1 έρχεται σε επαφή με το hLaM, ενώ η άλλη πλευρά παραμένει εκτεθειμένη στο διαλύτη, αποδεικνύοντας ότι υπάρχει αρκετός χώρος, ώστε να μπορούν να «φιλοξενηθούν» όλοι οι τύποι βάσεων, ακόμα και πουρίνες στη θέση αυτή.

Το προτελευταίο νουκλεοτίδιο της αλληλουχίας, το U-2, έρχεται σε επαφή με το hLaM και το hRRM1 (Εικόνα 28Α). Τα άτομα οξυγόνου O2 και O4 του πυριμιδινικού δακτυλίου του U-2 σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την αμιδική ομάδα της πλευρικής αλυσίδας του Gln20 (hLaM) και με την αμιδική ομάδα της κύριας αλυσίδας της Ile140 (hRRM1). Οι δεσμοί αυτοί συμβάλλουν στην προσέγγιση των δύο επικρατειών (17). Ο πυριμιδινικός δακτύλιος του U-2 στοιβάζεται πάνω από την Tyr23, η πλευρική ομάδα του οποίου σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την πλευρική ομάδα της Asn139 του hRRM1. Ταυτόχρονα, ο πυριμιδινικός δακτύλιος του U-2 στοιβάζεται κάτω από την Leu124, χωρίς το τελευταίο να προστατεύεται από τη γέφυρα άλατος που σχηματίζεται μεταξύ των Arg57 και Asp125. Με αυτόν τον τρόπο η αναγνώριση του U-2 εντάσσεται σε ένα σύνολο συντηρημένων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-RNA και πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες εμπλέκουν αμινοξικά κατάλοιπα και από τις δύο επικράτειες. Οι επικράτειες αυτές έχουν στόχο το σχηματισμό μίας κοιλότητας με συγκεκριμένο μέγεθος και σχήμα και με την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου για μία ουριδική βάση (Εικόνα 28Α) (17, 18, 24, 251, 258).

Το U-3 στοιβάζεται πάνω από το U-1. Με την ύπαρξη ουριδικής βάσης στη θέση -4, το RNA ακολουθεί μια ευρύτερη στροφή, τέτοια ώστε η U-4 να στοιβάζεται πάνω από την U-1. Σε αυτή την περίπτωση το U-3 μετατοπίζεται από τη θέση του, χωρίς να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη (Εικόνα 28Β). Η θέση του U-4 επιτρέπει στα άτομα του πυριμιδινικού δακτυλίου του να δημιουργήσουν δεσμούς υδρογόνου με το οξυγόνο του καρβονυλίου της Asn54 και με το αμιδικό υδρογόνο της Asn56,

αντίστοιχα. Τέλος, η πλευρική ομάδα της Asn56 σχηματίζει δεσμούς van der Waals με τη U-4 βάση.



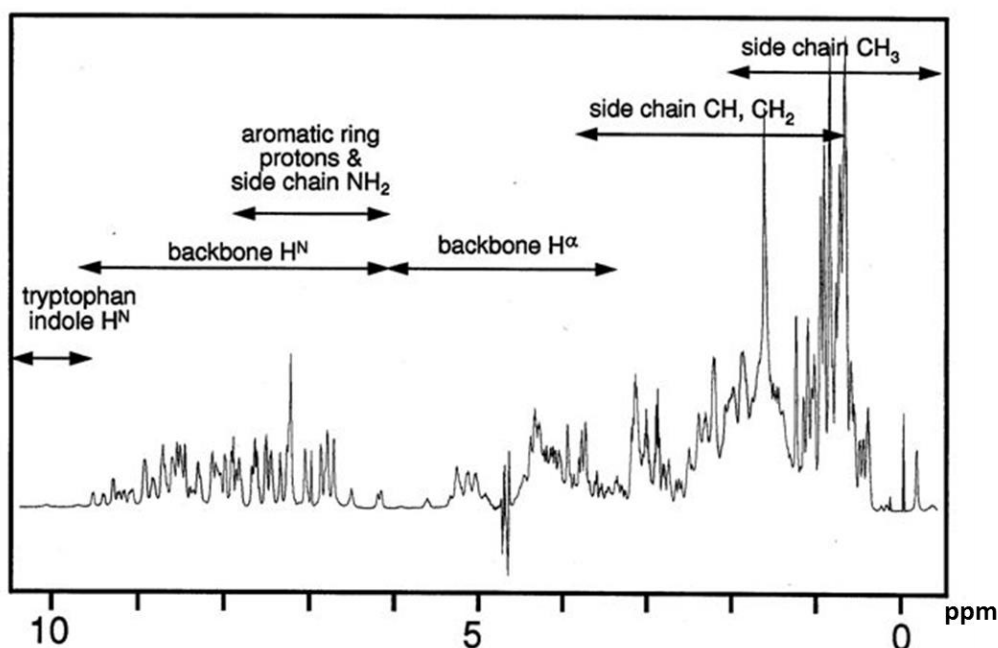
Εικόνα 28: Απεικόνιση λεπτομερειών της δομής του συμπλόκου LaNTD:AUUUU, στο οποίο απεικονίζονται Α. τα δύο τελευταία νουκλεοτίδια U-1 και U-2, Β. όλα τα νουκλεοτίδια U-1, U-2, U-3, U-4 και A-5.

A.11. Φασματοσκοπία NMR

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR-Nuclear Magnetic Resonance) αποτελεί μία από τις βασικές μεθόδους για τη μελέτη της τρισδιάστατης δομής και της δυναμικής βιομορίων, όπως των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων σε διάλυμα, δηλαδή σε συνθήκες που πλησιάζουν τις φυσιολογικές του ανθρώπινου οργανισμού (259). Η Φασματοσκοπία NMR (260, 261) βασίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων από πυρήνες που τίθενται εντός ενός μαγνητικού πεδίου. Τα φάσματα NMR μπορεί να θεωρηθεί ότι προκύπτουν από τη μετάβαση των ατομικών πυρήνων μεταξύ διαφορετικών ενεργειακών καταστάσεων. Οι πυρήνες πολλών ισοτόπων με περιττό ατομικό αριθμό, όπως οι ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P διαθέτουν την ιδιότητα της μαγνήτισης και υιοθετούν καταστάσεις ιδιοστροφορμής (spin) διαφορετικού προσανατολισμού και διαφορετικής ενέργειας σε ένα μαγνητικό πεδίο, όπως ο μαγνήτης ενός φασματογράφου NMR. Ο πληθυσμός διαταράσσεται με εφαρμογή ραδιοσυχνοτήτων. Οι πυρήνες επηρεάζονται από το μαγνητικό πεδίο, στο οποίο βρίσκονται και επηρεάζουν ο ένας τον άλλο μέσω χημικών δεσμών (spin-spin coupling) ή εξαιτίας της εγγύτητάς τους στο χώρο (dipole-dipole coupling). Η μετάβαση μεταξύ των καταστάσεων με συγκεκριμένες ενέργειες επιτρέπεται σύμφωνα με τους νόμους της κβαντικής μηχανικής. Όταν εφαρμόζονται παλμοί ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε συχνότητες που ταιριάζουν ακριβώς σε αυτά τα κενά ενέργειας, τότε είναι δυνατό να παρατηρούνται οι μεταβάσεις που δημιουργούν σήματα NMR (262). Η θέση ενός σήματος NMR σε μονάδα που καθορίζεται από τη συχνότητα του μαγνητικού πεδίου, στο οποίο μετρήθηκε το σήμα, προσδιορίζεται με τον όρο χημική μετατόπιση. Τη χημική μετατόπιση προκαλούν μικρά μαγνητικά πεδία που δημιουργούνται από τα ηλεκτρόνια καθώς κινούνται γύρω από τους πυρήνες. Σε ένα φάσμα NMR το μέγεθος ή ένταση του συντονισμού εμφανίζεται κατά μήκος ενός άξονα συχνοτήτων, στην περίπτωση του φάσματος μίας διάστασης (1D) ή αρκετούς άξονες στην περίπτωση του πολυδιάστατου NMR. Η χημική μετατόπιση εκφράζεται σε ppm (parts-per-million) ως προς ένα πρότυπο και όχι σε Hz.

Α.11.1. Τα φάσματα 1D και ^1H - ^{15}N HSQC

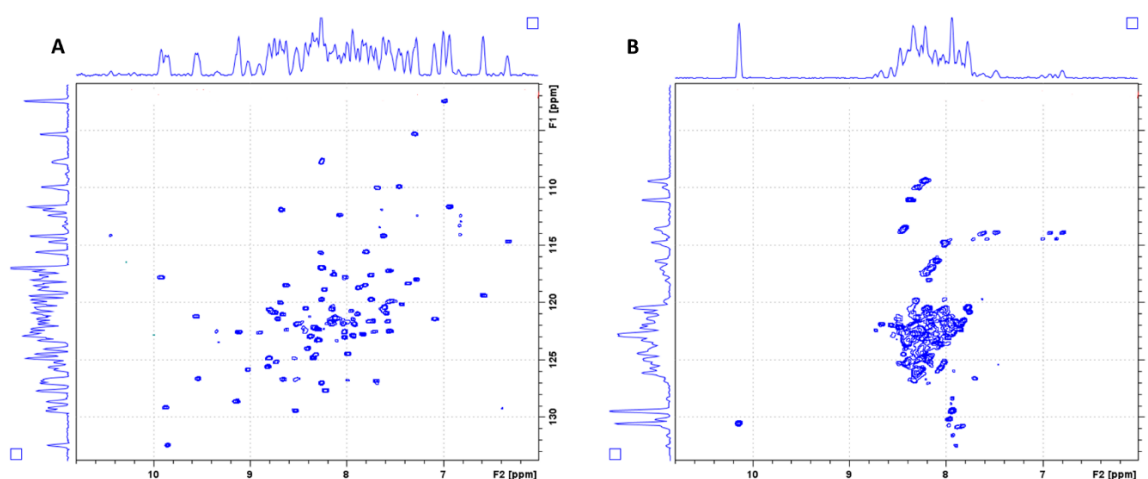
Δύο από τα πλέον χρήσιμα και ευαίσθητα φάσματα NMR που χρησιμοποιούνται σε βιομόρια είναι το φάσμα μίας διάστασης (1D) ^1H -NMR και το φάσμα δύο διαστάσεων (2D) ^1H - ^{15}N HSQC (Heteronuclear single quantum coherence) (263, 264) Το φάσμα ^1H -NMR αποτυπώνει τα σήματα για καθένα από τα άτομα του υδρογόνου, τα οποία αναφέρονται και ως πρωτόνια (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Φάσμα NMR μίας διάστασης (1D) ^1H -NMR

Το φάσμα ^1H - ^{15}N HSQC είναι φάσμα δύο διαστάσεων με τον έναν άξονα να αντιστοιχεί στο πρωτόνιο και τον άλλο στο ^{15}N (ή στο ^{13}C στην περίπτωση του ^1H - ^{13}C HSQC). Το πείραμα αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί σε πρωτεΐνη, η οποία είναι επισημασμένη με ^{15}N (ή και με ^{13}C στην περίπτωση του ^1H - ^{13}C HSQC). Οι πρωτεΐνες εκφράζονται επισημασμένες σε κύτταρα, συνήθως βακτηριακά (*E.coli*), τα οποία αναπτύσσονται με ^{15}N (ή/και με ^{13}C) επισημασμένα θρεπτικά μέσα. Το φάσμα ^1H - ^{15}N HSQC αποτελεί το δακτυλικό αποτύπωμα της πρωτεΐνης, καθώς για κάθε πρωτεΐνη το φάσμα αυτό είναι ξεχωριστό. Μάλιστα, είναι δυνατό να δώσει πληροφορίες για την ποιότητα του πρωτεϊνικού δείγματος που εξετάζεται. Αρχικά, εξετάζεται αν μία πρωτεΐνη είναι αναδιπλωμένη στο χώρο. Το ^1H - ^{15}N HSQC φάσμα μιας αναδιπλωμένης πρωτεΐνης εμφανίζει διασπορά σημάτων (Εικόνα 30Α). Αντίθετα, ένα φάσμα μιας μη αναδιπλωμένης πρωτεΐνης εμφανίζει φτωχή διασπορά σημάτων, η οποία προκύπτει

από το γεγονός ότι όλα τα αμιδικά πρωτόνια βρίσκονται σε παρόμοιο χημικό περιβάλλον (Εικόνα 30B). Το ίδιο συμβαίνει και στα 1D φάσματα. Επιπλέον, είναι δυνατό να μελετηθεί η σταθερότητα μιας πρωτεΐνης καταγράφοντας μία σειρά φασμάτων ^1H -NMR και ^1H - ^{15}N HSQC σε μία χρονική περίοδο (265). Η μείωση της έντασης των αρχικών σημάτων σε συνδυασμό, μάλιστα, με την εμφάνιση νέων σημάτων στο κέντρο του φάσματος κατά τη διάρκεια αυτής της χρονικής περιόδου υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη χάνει για κάποιο λόγο τη διαμόρφωσή της ή ότι καταβυθίζεται και οδηγεί στην αναζήτηση νέων συνθηκών καταλληλότερων για τη σταθερότητα του πρωτεϊνικού δείγματος και την περαιτέρω μελέτη της πρωτεΐνης αυτής (265).

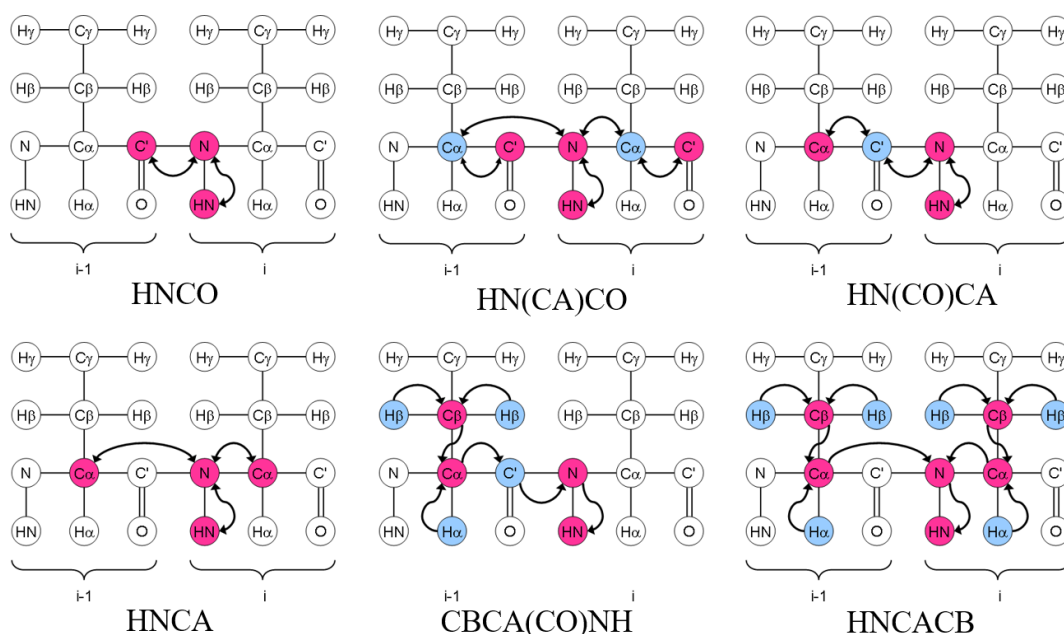


Εικόνα 30: ^1H - ^{15}N HSQC φάσμα Α. μιας αναδιπλωμένης πρωτεΐνης και Β. μιας μη-αναδιπλωμένης πρωτεΐνης.

A.11.2. Ανάλυση της δομής ενός βιομορίου με τη Φασματοσκοπία NMR

Για την επίλυση της δομής μιας πρωτεΐνης με τη Φασματοσκοπία NMR θα πρέπει αρχικά να παρασκευαστεί η πρωτεΐνη επισημασμένη με ^{15}N ή/και ^{13}C , τους ενεργούς για το NMR πυρήνες. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκφράζεται συνήθως σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*, τα οποία αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ή/και ^{13}C -γλυκόζη. Ακολουθεί η απομόνωση της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας διάφορα είδη υγρής χρωματογραφίας. Μετά την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών διαλύματος για τη σταθερότητα του πρωτεϊνικού δείγματος και την έκφραση της επισημασμένης πρωτεΐνης, ακολουθεί η καταγραφή μιας σειράς 2D και 3D (τριών διαστάσεων) φασμάτων NMR. Σκοπός αυτών των πειραμάτων είναι η

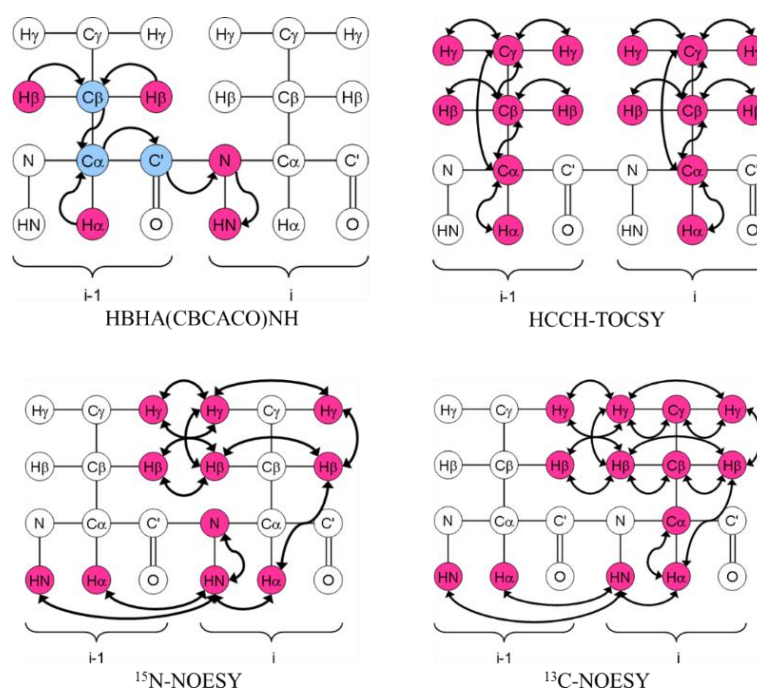
συλλογή επαρκών φασματικών δεδομένων, έτσι ώστε κάθε κορυφή (ή συντονισμός) των φασμάτων NMR να αντιστοιχίζεται σε κάθε ανιχνεύσιμο από το NMR άτομο ή πυρήνα της πρωτεΐνης (259, 266). Το πρώτο βήμα για την επίλυση της τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης αποτελεί η ταυτοποίηση των συχνοτήτων συντονισμού των πυρήνων του πολυπεπτιδικού σκελετού (backbone). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται 3D NMR πειράματα ώστε να ταυτοποιηθούν οι τύποι μεμονωμένων αμινοξέων και να προσδιοριστούν τα ζεύγη των διαδοχικών αμινοξέων. Τα 3D πειράματα που χρησιμοποιούνται στη ταυτοποίηση των πυρήνων του πεπτιδικού σκελετού προσφέροντας πληροφορίες για τις ενδοαμινοξικές και τις διααμινοξικές συσχετίσεις (267) είναι τα HNCO (268-270), HN(CA)CO (271), HN(CO)CA (269, 272), HNCA (268, 269, 273), CBCA(CO)NH (269) και HNCACB (269). Συνδυάζοντας τις πληροφορίες από τα πειράματα αυτά είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν οι χημικές μετατοπίσεις κατά μήκος του πεπτιδικού δεσμού για κάθε ζεύγος αμινοξέων. Επιπλέον, οι χημικές μετατοπίσεις των Cα κι Cβ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του τύπου του αμινοξέος, στον οποίο αντιστοιχούν, καθώς οι χημικές μετατοπίσεις για τα Cα και Cβ υιοθετούν χαρακτηριστικές τιμές για τον κάθε τύπο αμινοξέος.



Εικόνα 31: Περιγραφή του τρόπου μεταφοράς της μαγνήτισης μεταξύ των πυρήνων, οι οποίοι συμμετέχουν στα πειράματα HNCO, HN(CA)CO, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB, για την ταυτοποίηση των χημικών μετατοπίσεων κατά μήκος του πεπτιδικού σκελετού.

Ακολουθεί η ταυτοποίηση των πυρήνων των πλευρικών αλυσίδων, ακολουθώντας παρόμοια μεθοδολογία με την ταυτοποίηση του πεπτιδικού σκελετού. Αυτό επιτυγχάνεται με τα πειράματα HNHA και HBHA(CBCACO)NH (274), προσδιορίζοντας αρχικά τις χημικές μετατοπίσεις των H α και H β . Ακολουθεί ο προσδιορισμός των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων ^{13}C και ^1H των πλευρικών αλυσίδων με την ανάλυση του πειράματος HCCH-TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) (275, 276). Το πείραμα αυτό επιτρέπει την ταυτόχρονη συσχέτιση των ομάδων -CH σε μία πλευρική αλυσίδα, όπου διαχωρίζονται από έναν, δύο, τρεις ή ακόμη και τέσσερις δεσμούς άνθρακα-άνθρακα.

Την ταυτοποίηση των συσχετίσεων μέσω δεσμού διαδέχεται η ταυτοποίηση των σημάτων, τα οποία προέρχονται από συσχετίσεις μέσω χώρου. Οι πληροφορίες για τους γεωμετρικούς περιορισμούς προέρχεται από τα πειράματα ^{15}N -NOESY και ^{13}C -NOESY (277-279), τα οποία στηρίζονται στο πυρηνικό φαινόμενο Overhauser (NOE, Nuclear Overhauser Effect). Η ένταση του σήματος NOE είναι αντιστρόφως ανάλογη με την έκτη δύναμη της απόστασης μεταξύ των ατόμων. Επομένως, η τρισδιάστατη δομή προσδιορίζεται *de novo* από ένα μεγάλο αριθμό συσχετίσεων μεταξύ ατόμων που βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη από 5-5,5Å στην τρισδιάστατη δομή (280, 281).



Εικόνα 32: Περιγραφή του τρόπου μεταφοράς της μαγνήτισης μεταξύ των πυρήνων, οι οποίοι συμμετέχουν στα πειράματα HBHA(CBCACO)NH και HCCH-TOCSY, για την ταυτοποίηση των χημικών μετατοπίσεων των πλευρικών αλυσίδων και των πειραμάτων ^{15}N -NOESY και ^{13}C -NOESY για ταυτοποίηση των συσχετίσεων μέσω χώρου.

Ακολουθεί περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων κατάλληλων για τον υπολογισμό πρωτεϊνικών δομών. Μετά την ολοκλήρωση των δομικών υπολογισμών συλλέγεται μία οικογένεια δομών που συγκλίνουν σε μία διαμόρφωση, πληρώντας τα κριτήρια ακρίβειας.

A.12.1. Η τεχνική της τμηματικής επισήμανσης (segmental labeling) πρωτεϊνών για τη δομική μελέτη μέσω της Φασματοσκοπίας NMR

Οι διαθέσιμες τεχνικές NMR επιτρέπουν τη μελέτη πρωτεϊνών με μεγέθη που δεν μπορούν να ξεπεράσουν και τα 50-60kDa (282-285). Ωστόσο, όσο αυξάνεται το μέγεθος των πρωτεϊνών αυτών, αυξάνεται η πολυπλοκότητα των φασμάτων NMR, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζεται αλληλεπικάλυψη των σημάτων αυτών (286). Τα τελευταία χρόνια για την αύξηση της ανάλυσης των φασμάτων έχουν κατασκευαστεί φασματογράφοι NMR με υψηλότερα μαγνητικά πεδία, οι οποίοι συνδυάζονται με κρυογονικούς ανιχνευτές. Επίσης, η ανάπτυξη πειραμάτων NMR περισσότερων διαστάσεων βασιζόμενες σε εξελιγμένα σχήματα παλμών ενίσχυσε τη χρήση της Φασματοσκοπίας NMR στη μελέτη της δομής και της δυναμικής των μακρομορίων (287, 288). Παρόλα αυτά, ο συνδυασμός της ανάλυσης τριπυρηνικών φασμάτων NMR με την εφαρμογή της δευτερίωσης (αντικατάσταση του ^1H με ^2H ή δευτέριο) αποτελεί την περισσότερο διαδεδομένη τεχνική για την επίλυση της δομής πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους (288, 289). Ωστόσο, η μελέτη πρωτεϊνών μεγαλύτερων από 20kDa αντιμετωπίζει αρκετά προβλήματα εξαιτίας της πολυπλοκότητας των φασμάτων NMR. Για τις πρωτεΐνες που αποτελούνται από διακριτές επικράτειες είναι δυνατό να απλοποιηθούν τα φάσματα NMR με την εφαρμογή της τεχνικής της τμηματικής επισήμανσης των επικρατειών (segmental labeling) (290-299). Η εφαρμογή αυτής της τεχνικής έχει ως αποτέλεσμα την επισήμανση μιας επικράτειας της πρωτεΐνης με ^{15}N (ή/και ^{13}C) αφήνοντας την υπόλοιπη πρωτεΐνη μη-επισημασμένη. Με αυτόν τον τρόπο στα φάσματα NMR εμφανίζονται μόνο τα σήματα που αντιστοιχούν στην επισημασμένη επικράτεια μιας πρωτεΐνης (259, 300).

Η τεχνική της τμηματικής επισήμανσης εφαρμόζεται κυρίως για τον προσδιορισμό της δομής των μεγάλων πρωτεϊνών που αποτελούνται από επικράτειες, καθώς και των συμπλόκων τους. Επίσης, με την τεχνική αυτή είναι δυνατή η

«συναρμολόγηση» τοξικών πρωτεϊνών από μη-τοξικές περιοχές, οι οποίες μπορούν να εκφραστούν ξεχωριστά από τα κύτταρα. Η τμηματική επισήμανση εφαρμόζεται για την επισήμανση και κατά συνέπεια για την παρακολούθηση με τη Φασματοσκοπία NMR μιας περιοχής μιας πρωτεΐνης, για την οποία είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με κάποιο προσδέτη παρουσία ολόκληρης της πρωτεΐνης. Επιπροσθέτως, είναι δυνατό να παρατηρηθεί ο προσανατολισμός μιας επικράτειας ενός μεγάλου πρωτεϊνικού συστήματος, καθώς και οι διαταραχές που υφίστανται παρουσία κάποιου προσδέτη. Ακόμη, με την τεχνική αυτή εισάγονται επίτοποι για την ενίσχυση της διαλυτότητας μιας πρωτεΐνης χωρίς αυτή να γίνεται ορατή στα φάσματα NMR (295, 301, 302). Τέλος, χρησιμοποιείται για την εισαγωγή μη-φυσικών αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη.

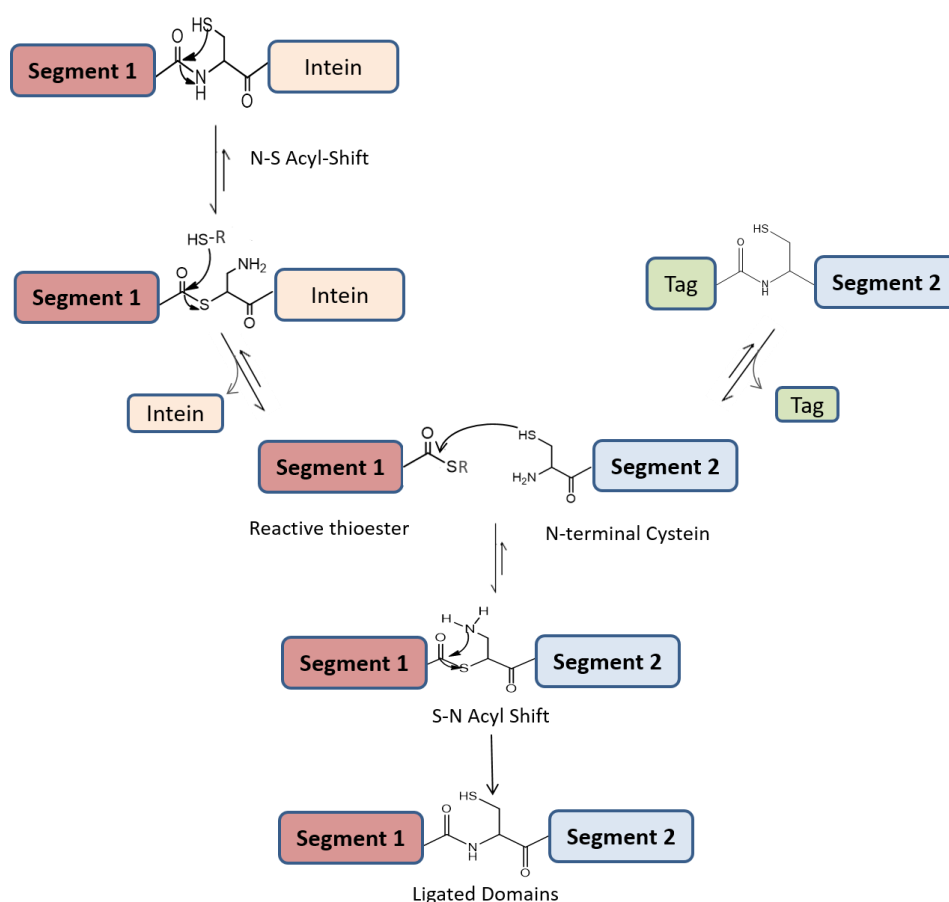
A.12.2. Η τεχνική EPL (Expressed Protein Ligation)

Έχουν αναπτυχθεί δύο διαφορετικές προσεγγίσεις της τμηματικής επισήμανσης πρωτεϊνών η EPL (Expressed Protein Ligation) και η PTS (Protein trans-splicing). Οι τεχνικές αυτές στηρίζονται στις ιντεΐνες, οι οποίες επιτρέπουν τη «συναρμολόγηση» μιας πρωτεΐνης από μικρότερα συνθετικά ή/και ανασυνδυασμένα πολυπεπίδια (Εικόνα 33). Η τεχνική EPL θεωρείται μια επέκταση της μεθόδου NCL (Native Chemical Ligation) (303), κατά την οποία δύο μη-προστατευμένα συνθετικά πεπτίδια συνδέονται χημικά μεταξύ τους. Στην EPL το στάδιο της συνένωσης των δύο πολυπεπτιδίων είναι μια χημική διαδικασία και μπορεί να πραγματοποιηθεί κάτω από ένα ευρύ φάσμα συνθηκών αντίδρασης (292, 304).

Το πρώτο στάδιο της αντίδρασης για τη συνένωση των δύο τμημάτων της πρωτεΐνης είναι η χημειο-εκλεκτική αντίδραση του α-θειοεστέρα ενός μη-προστατευμένου πολυπεπτιδίου (303, 305, 306) με ένα άλλο μη-προστατευμένο πολυπεπίδιο που περιλαμβάνει ένα αμινοξικό κατάλοιπο κυστεΐνης στο N-τελικό άκρο. Συγκεκριμένα, το πρώτο πολυπεπίδιο περιλαμβάνει ένα α-θειοεστέρα στην ομάδα του α-καρβονυλίου, ο οποίος υφίσταται πυρηνόφιλη προσβολή από την πλευρική αλυσίδα της κυστεΐνης του N-τελικού άκρου του δεύτερου πολυπεπτιδίου. Ο θειοεστέρας που σχηματίζεται υφίσταται αυθόρμητα S-N άκυλο-μετάθεση για να σχηματιστεί ένας πεπτιδικός δεσμός και να ληφθεί ως προϊόν ένα νέο πολυπεπίδιο (303) (Εικόνα 33). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε υδατικές συνθήκες και σε ουδέτερο

pH. Η απομόνωση του νέου πολυπεπτιδίου πραγματοποιείται μέσω ενός συστήματος ιντεϊνών (IMPACT- Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag system) (307, 308). Το σύστημα αυτό επιτρέπει την συνέκφραση του κάθε τμήματος του πολυπεπτιδίου με μία ιντεΐνη ως επίτοπο στο C-τελικό ή στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης-στόχου (309).

Αρκετοί παράγοντες θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την εφαρμογή της μεθόδου αυτής σε μία πρωτεΐνη. Αρχικά, εξετάζεται η επίδραση της διαδικασίας της συνένωσης στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης προτιμάται να πραγματοποιείται διατηρώντας δομημένα τα επί μέρους πολυπεπτιδικά τμήματα και τη διαμόρφωση ολόκληρης της πρωτεΐνης μετά τη συνένωσή της ή σε ανεξάρτητα αναδιπλωμένες περιοχές. Επιπλέον, οι αντιδράσεις της συνένωσης της τεχνικής EPL είναι πιθανό να επηρεάζουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς και τις ελεύθερες κυστεΐνες, γεγονός το οποίο θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν κατά την εφαρμογή της μεθόδου (293, 295).



Εικόνα 33: Βασική αρχή της αντίδρασης συνένωσης δύο τμημάτων μιας πρωτεΐνης μέσω της τεχνικής EPL.

A.12.3. Επιλογή της κατάλληλης περιοχής συνένωσης των πολυπεπτιδικών τμημάτων για το σχηματισμό της πρωτεΐνης-στόχου

Κατά την εφαρμογή της τεχνικής της τμηματικής επισήμανσης, ως περιοχή συνένωσης των δύο τμημάτων της πρωτεΐνης επιλέγεται, συνήθως μια περιοχή, η οποία δε συμμετέχει στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης (295, 310) ή μία περιοχή που ανήκει στο συνδέτη μεταξύ των δύο επικρατειών (294). Και στις δύο περιπτώσεις τα αμινοξικά κατάλοιπα που πλαισιώνουν τη θέση συνένωσης των δύο τμημάτων έχουν ιδιαίτερη σημασία. Ένα από αυτά είναι το αμινοξικό κατάλοιπο κυστεΐνης, το οποίο εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο του δευτέρου τμήματος της πρωτεΐνης (Εκόνα 33), και το άλλο είναι το αμινοξικό κατάλοιπο του C-τελικού τμήματος, το οποίο σχηματίζει τον α-θειοεστέρα για το πρώτο τμήμα της πρωτεΐνης. Η παρουσία της κυστεΐνης θεωρείται υποχρεωτική για τη συνένωση και επομένως είναι σημαντικό να επιλεγεί ως θέση συνένωσης η θέση πριν την κυστεΐνη που είναι πιθανό να υπάρχει στη φυσική ακολουθία της πρωτεΐνης. Σε περίπτωση απουσίας της κυστεΐνης στην επιθυμητή θέση συνένωσης, θα μπορούσε να εισαχθεί μία σε κατάλληλη θέση με μεταλλαξιγένεση. Η μετάλλαξη αυτή θα πρέπει να σχεδιάζεται με τέτοιο τρόπο, ώστε η κυστεΐνη που εισάγεται να μην εμπλέκεται στη δομή και στη δράση της πρωτεΐνης (293, 304, 311), ενώ συνήθως εισάγεται σε θέσεις, τις οποίες κατέχουν όμοια αμινοξέα, όπως η αλανίνη και η σερίνη.

Ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει τη θέση συνένωσης των δύο τμημάτων είναι το είδος των αμινοξέων που εντοπίζονται αμέσως πριν την ιντεΐνη. Το αμινοξικό κατάλοιπο που εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο στο τμήμα του α-θειοεστέρα επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του βήματος της θειόλυσης μεταξύ πρωτεΐνης-ιντεΐνης και η προτίμηση στον τύπο του αμινοξέος εξαρτάται από το είδος της ιντεΐνης (308, 312, 313). Συγκεκριμένα, η αύξηση του χώρου που καταλαμβάνει η πλευρική αλυσίδα επιβραδύνει την αντίδραση (293, 314). Επομένως, θα πρέπει να αποφεύγεται ο συνδυασμός των αμινοξέων Thr-Cys, Ile-Cys και Val-Cys στη θέση συνένωσης των δύο πολυπεπτιδικών τμημάτων.

Ενότητα Β
Σκοπός Ερευνητικής Εργασίας

B. Σκοπός Ερευνητικής Εργασίας

Η πρωτεΐνη La είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και του οργανισμού, καθώς σχηματίζει ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα με διαφορετικά μόρια RNA. Το πλήθος των διαφορετικών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων της πρωτεΐνης La αποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη αυτή επιδρά ποικιλοτρόπως στο κυτταρικό περιβάλλον, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την ανάγκη να μελετηθεί περαιτέρω η δομή και η δράση της. Βασικός ρόλος της είναι η προστασία του 3' άκρου των μεταγράφων της RNAP III, όπως των pre-tRNA, κατά τη διάρκεια της βιογένεσης και η σωστή διαμόρφωσή τους στο χώρο. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης La με τα μέταγραφα της RNAP III πραγματοποιείται μέσω της πολυ-ουριδυλικής ουράς του 3' άκρου, ενώ η εξειδίκευσή της εξαρτάται από τον αριθμό των ουριδυλικών βάσεων. Επιπλέον, η La αναγνωρίζει τη χαρακτηριστική διαμόρφωση στελέχους θηλιάς των pre-miRNA, τα σταθεροποιεί και τα προστατεύει από τη δράση των νουκλεασών, προάγοντας με αυτό τον τρόπο τη βιογένεση των miRNA. Η La δεσμεύεται, επίσης, με mRNA διαφόρων ιών.

Η πρωτεΐνη La διαφόρων οργανισμών παρουσιάζει συντηρημένη οργάνωση των επικρατειών της. Το N-τελικό άκρο των ομόλογων πρωτεϊνών La αποτελείται από τις επικράτειες LaM και RRM1, ενώ το C-τελικό άκρο ποικίλει σε μέγεθος και αλληλουχία. Το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης La του ανθρώπου και του *Dictyostelium discoideum*, ενός κατώτερου ευκαρυωτικού οργανισμού, περιλαμβάνει ένα επιπλέον μοτίβο RRM, το RRM2a και μια ευκίνητη περιοχή στο C-τελικό άκρο. Η πρωτεΐνη La αυτών των δύο οργανισμών παρουσιάζει υψηλή ομολογία, παρόλο που το *D. discoideum* αντιπροσωπεύει έναν από τους τελευταίους προγόνους όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών, ενώ άλλοι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που φυλογενετικά θεωρούνται ανώτεροι από αυτόν δε φέρουν το επιπλέον μοτίβο RRM2a.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας των ανεξάρτητων επικρατειών αλλά και των συνδυασμών τους, της πρωτεΐνης La των οργανισμών *D. discoideum* και του *Homo sapiens (human)* μέσω της Φασματοσκοπίας NMR. Η πρωτεΐνη La χωρίζεται στις τρεις διακριτές επικράτειες (LaM, RRM1 και RRM2a) και στόχος είναι η έκφραση και η απομόνωση της κάθε ανεξάρτητης επικράτειας, ώστε να πραγματοποιηθεί η μελέτη μέσω της

Φασματοσκοπίας NMR. Εκτός από τις ανεξάρτητες επικράτειες επιπλέον στόχο αποτελεί η NMR μελέτη της N-τελικής περιοχής (LaM-RRM1), η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και τη δέσμευση του φυσικού υποστρώματος (pre-tRNA). Επίσης, στόχο αποτελεί η NMR μελέτη των πολυπεπτιδίων RRM1-RRM2α και LaM-RRM1-RRM2α. Για τη μελέτη όλων των πολυπεπτιδίων με τη Φασματοσκοπία NMR, απαιτείται η παρασκευή και η απομόνωση ισοτοπικά επισημασμένων πρωτεϊνικών δειγμάτων με ^{15}N ή/και με ^{13}C , υψηλής συγκέντρωσης και καθαρότητας. Για τη δομική μελέτη του πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α εφαρμόζεται η τεχνική της τμηματικής επισήμανσης. Παράλληλα, δημιουργήθηκε βιβλιοθήκη γονιδίων για τα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης hLa, όμοια με αυτήν του *D. discoideum*. Τα τελευταία εκφράστηκαν επισημασμένα και απομονώθηκαν με σκοπό την καταγραφή φασμάτων NMR, ώστε να μελετηθούν οι περιοχές που συμβάλλουν στην αλληλεπίδρασή τους με το ίδιο ολιγονουκλεοτίδιο.

Εξίσου σημαντικός στόχος είναι η χαρτογράφηση των περιοχών της πρωτεΐνης La που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με μόρια pre-tRNA του *D. discoideum*, τα οποία φέρουν στο 3' άκρο τους βάσεις ουριδυλίου και αποτελούν το φυσικό υπόστρωμα της La. Παράλληλα, η αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων αυτών με ολιγονουκλεοτίδιο, το οποίο αποτελείται από δέκα ουριδύλια (polyU) και η ταυτοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων που αλληλεπιδρούν με αυτό αποτελεί επιμέρους στόχο. Η αλληλεπίδραση των αντίστοιχων πολυπεπτιδίων της hLa με το ίδιο ολιγονουκλεοτίδιο και η σύγκριση των αμινοξικών καταλοίπων, τα οποία επηρεάζονται με την αλληλεπίδραση αυτή, με τα αντίστοιχα του *D. discoideum* στοχεύουν στην αποκάλυψη συγκεκριμένων περιοχών που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση. Τέλος, η διερεύνηση της εξειδίκευσης της κάθε επικράτειας της πρωτεΐνης του *D. discoideum* ως προς το είδος των βάσεων που αναγνωρίζει θα είναι καθοριστικής σημασίας για την διερεύνηση της λειτουργίας της πρωτεΐνης και του μηχανισμού αναγνώρισης και δέσμευσης των υποστρωμάτων της.

Ενότητα Γ
Υλικά και Μέθοδοι

Γ.1. Υλικά

Γ.1.1. Εργαστηριακός Εξοπλισμός

- Επωαστήρας για καλλιέργειες βακτηρίων υπό ανάδευση, INFORS HT (Minitron)
- Επιδαπέδια φυγόκεντρος SL4OFR, Thermo Scientific
- Φυγόκεντρος Beckman Coulter
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus Fresco 21, Thermo Electron Corporation
- Ηλεκτρονικός ζυγός, Mettler Toledo
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας, Mettler Toledo
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο), Raypa (για την αποστείρωση των θρεπτικών υλικών)
- Μηχάνημα εφαρμογής υπερήχων για τη λύση των μεμβρανών των κυττάρων, Ultrasonic Processor
- Σύστημα επεξεργασίας νερού για την παραγωγή ddH₂O (double distilled H₂O-διπλά απεσταγμένου νερού), Direct Q (Millipore)
- Συσκευή μέτρησης pH, Sartorius
- Φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους Quawell UV-Vis Spectrometer Q5000
- Φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους Jasco V-630 UV/Vis Spectrophotometer
- Φασματοφωτόμετρο μονοχρωματικό για τη μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 600nm, Ultrospec 10, cell density meter, Amersham Biosciences
- Αναδευτήρας Vortex, Biorad
- Μαγνητικός αναδευτήρας, Heidolph Mr Hei-Standard
- Περισταλτική αντλία, Pharmacia Fine Chemicals
- Συσκευή αναρρόφησης Kif Lab Laboport
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για την απομόνωση των πρωτεϊνών (FPLC-Fast Protein Liquid Chromatography) Akta Pure 25L της GE Healthcare
- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για την απομόνωση των πρωτεϊνών (FPLC-Fast Protein Liquid Chromatography) Akta Purifier της GE Healthcare
- Στήλη μοριακού αποκλεισμού Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare
- Στήλη μοριακού αποκλεισμού Superose 12_10/300 GL, GE Healthcare

- Στήλη χρωματογραφίας συγγένειας His-Tag, GE Healthcare
- Στήλη μοριακού αποκλεισμού Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare (ETH)
- Στήλη μοριακού αποκλεισμού Hiload 16/60 superdex 200 pg, GE Healthcare (ETH)
- Στήλη μοριακού αποκλεισμού Hiload 16/60 superdex 75 pg, GE Healthcare (ETH)
- Ρητίνη χιτίνης (chitin resin), NEB
- Ρητίνη Ni-NTA αφαρόζης (Ni-NTA Agarose), QIAGEN
- Σύστημα ηλεκτροφόρησης, Biorad
- Θερμικός κυκλοποιητής PCR My Cyclor, Biorad.
- Thermo-shaker TS -100C
- Πιπέτες Gilsson για τη μετάγγιση υγρών από 1μl έως 1ml
- LM10, Microfluidizer (ETH)

Γ.1.2. Αναλώσιμα

- Τρυβλία petri για στερεές καλλιέργειες
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips), Greiner bio-one
- Πλαστικοί σωλήνες προπυλενίου μιας χρήσης 15 και 50ml, Greiner bio-one
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης 50 και 250ml
- Κωνικές φιάλες 250ml, 2 και 5L
- Πλαστικά σωληνάρια 1,5ml και 2ml (αποστειρωμένα και DNase/RNase free), Greiner bio-one
- Πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης
- Κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής για μέτρηση απορρόφησης διαλύματος 1cm
- NMR σωληνάκια
- Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,2μm, Whatman
- Φίλτρα συμπίκνωσης 3.000 και 10.000 MWCO, Amicon
- Μεμβράνες διαπίδησης 3.500 MWCO, spectrum
- Πλαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου μιας χρήσης 14ml, Greiner bio-one
- Φίλτρα διήθησης διαμέτρου πόρου 0,2μm, Thermo Scientific
- Συσκευή διήθησης, Thermo Scientific
- Ηθμοί πολυαιθυλενίου, Sigma-Aldrich

- Σωλήνες πολυπροπυλενίου που θα χρησιμοποιηθούν ως στήλες χρωματογραφίας, Sigma-Aldrich
- Ρυθμιστής ροής σύριγγας από πολυπροπυλένιο
- Σύριγγες μιας χρήσης
- Αποστειρωμένα νυστέρια
- Πλαστικά σιφόνια των 2, 5 και 10ml, Greiner bio-one

Όλα τα γυάλινα και πλαστικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα ή αποστειρώθηκαν με υγρή αποστείρωση στο αυτόκαυστο Raypa με εφαρμογή του πρωτοκόλλου: 20min σε 121°C και 1bar.

Γ.1.3. Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν χημικά αντιδραστήρια καθαρότητας αναλυτικού βαθμού από Sigma, Applichem Biochemica, Fluka και Reidel de Hae.

Bacto-tryptone, Bacto yeast extract και άγαρ, Applichem Biochemica

Αμπικιλίνη, Applichem Biochemica

Βιοτίνη, θειαμίνη, IPTG, θεικό μαγνήσιο, Applichem Biochemica

Γλυκόζη, θεικό αμμώνιο, Applichem Biochemica

¹⁴N-λυσίνη

Ιμιδαζόλιο, Applichem Biochemica

Μίγμα αναστολέων πρωτεασών για χρήση στην απομόνωση των πρωτεϊνών χωρίς EDTA (Protease Inhibitor Cocktail for use in purification of Histidine-tagged proteins), Sigma και Applichem Biochemica

Ταμπλέτες που περιέχουν μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Protease Inhibitor Cocktail), Roche

Θεικός ψευδάργυρος και γλυκερόλη, Fluka

Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (temed), ακρυλαμίδιο 40%, SDS, της Biorad, περοξυδιθειικό αμμώνιο (APS) της Applichem Biochemica και Trizma Base της Sigma
Έγχρωμοι μάρτυρες διαφόρων μοριακών μεγεθών, Nippon Genetics Europe GmbH
Αιθανόλη, μεθανόλη, οξικό οξύ, Applichem Biochemica

Γουανιδίνη και DTT, Applichem Biochemica και υδροξείδιο του νατρίου, Reidel-de Haën

TCEP, Thermo Fisher Scientific
Τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), Jena Bioscience
Τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP), Jena Bioscience
Τριφωσφορική κυτοσίνη (CTP), Jena Bioscience
Τριφωσφορική ουριδίνη (UTP), Jena Bioscience
dNTP mix, Invitrogen
NdeI, Takara
XhoI, Takara
XhoI, NEB
NdeI NEB
SapI, NEB
BamHI, NEB
DpnI, NEB
DraI, NEB
SspI, NEB
T7 RNA Polymerase (20 U/μL), Invitrogen
RNase Inhibitor (40 U/μl), Invitrogen
Pyrophosphatase (0.1 U/μl), Invitrogen
Platinum™ Pfx DNA Polymerase, Invitrogen
KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit, Kapa Biosystems
Quick Ligation Kit, NEB
T4 DNA Ligase, Invitrogen
PfuTurbo DNA Polymerase, Agilent Technologies
QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen
PureLink™ Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen
PureLink™ PCR Purification Kit, Invitrogen
QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen
QIAGEN Plasmid Midi Kit, Qiagen

Γ.1.4. Επισημασμένα μέσα

Τα επισημασμένα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών CortecNet και Cambridge Isotope Laboratories.

- ^{15}N -χλωριούχο αμμώνιο
- ^{13}C -γλυκόζη

Γ.1.5. Θρεπτικά Υλικά

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις καλλιέργειες κυττάρων *E.coli* ύστερα από υγρή αποστείρωση (20 min, 121°C, 2atm) ήταν της ακόλουθης σύστασης:

Θρεπτικό υλικό	Σύσταση
LB (rich media)	10g/L Bacto-tryptone 5g/L. Bacto-yeast extract 10g/L NaCl
5XM9 (minimal media)	3g/L KH_2PO_4 6,8g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g/L NaCl
Στερεό θρεπτικό υλικό: LB-άγαρ-αμπικιλίνη	10g/L Bacto-tryptone 5g/L. Bacto-yeast extract 10g/L NaCl 15g/L άγαρ 1mg/ml αμπικιλίνη

Γ.1.6. Διαλύματα

Διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην έκφραση της πρωτεΐνης με καλλιέργεια σε M9:

Διάλυμα	Σύσταση
Θειαμίνης/Βιοτίνης	0,5 mg/ml θειαμίνης και 0,5 mg/ml βιοτίνης (αποθήκευση στους 4°C)
I.P.T.G. (Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside)	1M I.P.T.G. (αποθήκευση στους -20°C)
Αμπικικιλίνης	0,1 g/ml σε 50% v/v αιθανόλης (αποθήκευση στους -20°C)
Solution Q	για την παρασκευή 1l απαιτούνται: 8ml HCl (5M), 5g FeCl ₂ ·4H ₂ O, 184mg CaCl ₂ ·2H ₂ O, 64mg H ₃ BO ₃ , 18mg CoCl ₂ ·6H ₂ O, 4mg CuCl ₂ ·2H ₂ O, 340mg ZnCl ₂ , 605mg Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O, 40mg MnCl ₂ ·4H ₂ O

Τα διαλύματα αυτά αποστειρώνονται (20 min, 121°C, 1Atm) ή φιλτράρονται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,2μm πριν από τη χρήση τους.

Διαλύματα για την απομόνωση των πρωτεϊνών με χρωματογραφίας συγγένειας

Διάλυμα	Σύσταση
ZnSO ₄	1M ZnSO ₄
Binding buffer (10mM ιμιδαζολίου)	20mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5mM NaCl, 10mM ιμιδαζολίου, pH 8
Wash 1 (20mM ιμιδαζολίου)	20mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5mM NaCl, 20mM ιμιδαζολίου, pH 8

Wash 2 (40mM ιμιδαζολίου)	20mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5mM NaCl, 40mM ιμιδαζολίου, pH 8
Wash 3 (100mM ιμιδαζολίου)	20mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5mM NaCl, 100mM ιμιδαζολίου, pH 8
Wash 4 (400mM ιμιδαζολίου)	20mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5mM NaCl, 400mM ιμιδαζολίου, pH 8
EDTA	0,1M EDTA

Τα παραπάνω διαλύματα φιλτράρονται με τη συσκευή και με φίλτρο μεγέθους πόρων 0,2μm της Thermo Scientific και πριν από τη χρήση τους.

Διαλύματα για την απομόνωση των πρωτεϊνών με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

Διάλυμα	Σύσταση
50mM KPi	50mM K ₂ HPO ₄ , 50mM KH ₂ PO ₄ , pH 7
οξικού οξέως	0,5M οξικό οξύ
αποθήκευσης της στήλης	20% αιθανόλη

Τα παραπάνω διαλύματα φιλτράρονται με τη συσκευή και με φίλτρο μεγέθους πόρων 0,2μm της Thermo Scientific και πριν από τη χρήση τους.

Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου

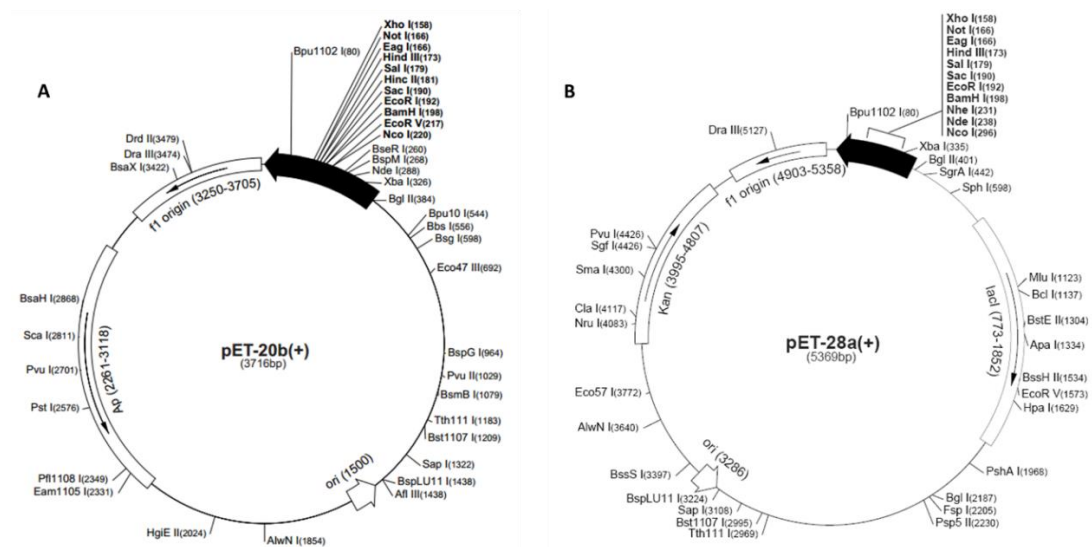
Διάλυμα	Σύσταση
Πήκτωμα διαχωρισμού 17%	2,9ml ddH ₂ O, 3,4ml ακρυλαμιδίου 40%, 2,2ml Tris-base 1,5M pH8,8, 10% w/v SDS, 50μl APS 10%, 5μl TEMED

Πήκτωμα φόρτωσης	3ml ddH ₂ O, 0,5ml ακρυλαμιδίου 40%, 1,25ml Tris-base 0,5M pH 6,8, 10% w/v SDS, 25μl APS 10%, 5μl TEMED
Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων 3x πυκνό	30% γλυκερόλης, 3%SDS, 60mM Tris-HCl pH 6,8-7, 0,09% μπλε της βρωμοφαινόλης, 150mM DTT
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης	3 g/l Tris-base, 14,4 g/l γλυκίνη, 1g/l SDS,
Διάλυμα χρώσης του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου	0,1%κ.β. Coomassie Blue R-250, 40%v/v μεθανόλη, 10% CH ₃ COOH
Διάλυμα αποχρωματισμού του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου	5%v/v μεθανόλη, 7,5% CH ₃ COOH

Γ.1.7. Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης (cloning vector) και κυτταρικά στελέχη *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκαν

pET.20b(+), pET.28b(+): Το σύστημα των φορέων κλωνοποίησης pET αναπτύχθηκε για τον ανασυνδυασμό και την έκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*. Η μετάφραση του γονιδίου υπόκειται στον έλεγχο του βακτηριοφάγου T7 με την προσθήκη μιας πηγής για την ενεργοποίηση της T7 πολυμεράσης στο κύτταρο-ξενιστή. Η T7 RNA πολυμεράση είναι αρκετά εκλεκτική και δραστική, ώστε το κύτταρο-ξενιστής να χρησιμοποιεί σχεδόν όλους τους πόρους του για την έκφραση της πρωτεΐνης-στόχου. Χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι πλασμιδιακών φορέων pET, ο pET.20b(+) με μέγεθος 3716bp και ο pET.28b(+) με μέγεθος 5368bp. Το πλασμίδιο pET.20b(+) φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη και το πλασμίδιο pET.28b(+) σε καναμυκίνη. Το πλασμίδιο pET.20b(+) φέρει μια ετικέτα 6xHis στο C-τελικό άκρο του γονιδίου που εκφράζεται, ενώ το pET.28b(+) φέρει δύο ετικέτες 6xHis, μία στο N-τελικό και μία στο C-τελικό άκρο, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την απομόνωση της πρωτεΐνης-στόχου από τις υπόλοιπες βακτηριακές πρωτεΐνες. Για το pET.28b(+) είναι δυνατή η απομάκρυνση της ετικέτας

του Ν-τελικού άκρου με επώση του εκφραζόμενου πολυπεπτιδίου με την πρωτεάση θρομβίνη.

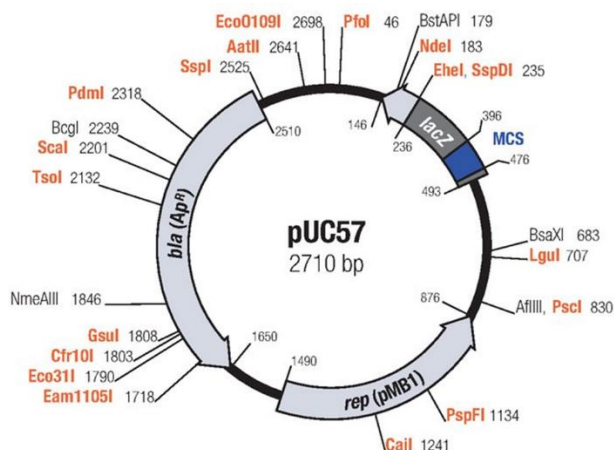


Εικόνα 34: Χάρτες των πλασμιδιακών φορέων κλωνοποίησης A. pET.20b(+) και B. pET.28b(+).

pEM5B, pEM9B: Για την εφαρμογή πρωτοκόλλων της τμηματικής επισήμανσης χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pEM5B, pEM9B (από την εργαστηριακή ομάδα του καθηγητή Frédéric Allain, του πανεπιστημίου ETH, Ζυρίχη). Τα πλασμίδια αυτά έχουν τροποποιηθεί από ερευνητές της εργαστηριακής ομάδας του καθηγητή F.Allain, έτσι ώστε να είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό. Συγκεκριμένα, το πλασμίδιο pEM9B φέρει την περιοχή πρόσδεσης στη στήλη απομόνωσης Chitin, την αλληλουχία της ιντεΐνης Mxe gyrA, ετικέτες που αυξάνουν τη διαλυτότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης και την περιοχή αναγνώρισης και πέψης από το ένζυμο TEV. Όλες αυτές οι περιοχές συνεκφράζονται μαζί με το πρώτο τμήμα της πρωτεΐνης-στόχου. Το πλασμίδιο pEM5B φέρει την περιοχή πρόσδεσης στη στήλη απομόνωσης Chitin, την περιοχή αναγνώρισης και πέψης από το ένζυμο TEV, μία ετικέτα 6xHis και την αλληλουχία για την Ssp DnaB ιντεΐνη στο C-τελικό άκρο του εκφραζόμενου πολυπεπτιδίου. Οι παραπάνω περιοχές συνεκφράζονται μαζί με το πολυπεπτίδιο του δευτέρου τμήματος της πρωτεΐνης-στόχου. Και τα δύο πλασμίδια φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε καρβενικιλίνη (ή πενικιλίνη) και T7 εκκινητή.

pUC57: Ο πλασμιδιακός φορέας puc57, μεγέθους 2710bp είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος φορέας, ο οποίος απομονώνεται εύκολα από βακτήρια της

κυτταρικής σειράς *DH5α* με τυποποιημένες διαδικασίες. Σε αυτό το πλασμίδιο αποθηκεύεται το γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA_{Arg} και του tRNA_{Ser}, που αναφέρονται παρακάτω.



Εικόνα 35: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pUC57.

DH5α: Τα κύτταρα *DH5α* αποτελούν στελέχη των βακτηρίων *E.coli* και εξαιτίας των μεταλλάξεων και των τροποποιήσεών τους επιτρέπουν την υψηλή απόδοση των μετασχηματισμένων από πλασμίδια κυττάρων. Χρησιμοποιείται ευρέως για τον πολλαπλασιασμό ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, καθώς παρέχουν σταθερότητα στο πλασμιδιακό DNA, με το οποίο έχουν μετασχηματιστεί. Τα κύτταρα αυτά είναι επιδεκτικά, δηλαδή, είναι δυνατό να μετασχηματιστούν από πλασμίδια, καθώς έχουν υποστεί ειδική κατεργασία με χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂).

BL21(DE3): Τα κύτταρα *BL21(DE3)*, στελέχη των βακτηρίων *E.coli* είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα για την έκφραση πρωτεϊνών, οι οποίες δεν είναι τοξικές. Είναι επιδεκτικά, καθώς έχουν υποστεί ειδική κατεργασία με χλωριούχο ασβέστιο και παρέχουν έκφραση της πρωτεΐνης σε υψηλά επίπεδα. Το σύστημα έκφρασης των γονιδίων στηρίζεται στην T7 RNA πολυμεράση και η έκφρασή τους επάγεται με προσθήκη του I.P.T.G. (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), μιας χημικής ένωσης που μιμείται την αλλολακτόζη, τον μεταβολίτη της λακτόζης που ρυθμίζει τη μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης. Με αυτό τον τρόπο ρυθμίζεται η έκφραση της πρωτεΐνης-στόχου, όπου η μεταγραφή του γονιδίου της ελέγχεται από το οπερόνιο της λακτόζης.

BL21(DE3) ROSETTA 2: Τα κύτταρα αυτά είναι παράγωγα των κυττάρων BL21(DE3), σχεδιασμένα να ενισχύουν την έκφραση με σπάνια κωδικόνια. Τα στελέχη αυτά παρέχουν tRNA για επτά σπάνια κωδικόνια (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, CGG) με ένα επιπλέον πλασμίδιο που φέρουν, με γονίδιο ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη.

Γ.1.8. Δημιουργία των διαλυμάτων αποθήκευσης των ATP, GTP, CTP και UTP

Για τη δημιουργία διαλύματος 100mM για το κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο (315) ATP, GTP, CTP και UTP υπολογίζεται, αρχικά, η ποσότητα για 500μl διαλύματος συγκέντρωσης 200mM. Συγκεκριμένα, ζυγίζονται 60,52mg ATP, 62,12mg GTP, 58,11mg CTP και 60,41mg UTP και διαλύονται σε 450μl αποστειρωμένου και ελεύθερου από DNase/RNase ddH₂O. Ακολουθεί πεχαμέτρηση του κάθε διαλύματος με πεχαμετρικό χαρτί. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται σε 7-7,5 με NaOH 1N. Κάθε φορά που προστίθεται NaOH ελέγχεται το pH του διαλύματος και σημειώνονται με ακρίβεια οι όγκοι που προστίθενται ή αφαιρούνται από το διάλυμα, ώστε να υπολογιστεί ο ακριβής όγκος του διαλύματος. Ακολουθεί η φωτομέτρηση του κάθε διαλύματος και ο υπολογισμός της πραγματικής συγκέντρωσης του διαλύματος. Τέλος, προστίθεται ddH₂O, ώστε η συγκέντρωση του κάθε διαλύματος να είναι 100mM. Τα διαλύματα χωρίζονται σε κλάσματα και αποθηκεύονται στους -20°C.

Γ.2. Μέθοδοι

Γ.2.1. Μοριακή κλωνοποίηση

Το ανασυνδυασμένο DNA περιέχει ένα μόριο DNA, το οποίο συνδυάζει γονίδια από διαφορετικούς οργανισμούς. Η μοριακή κλωνοποίηση (316) ανασυνδυασμένου DNA περιλαμβάνει ένα σύνολο πειραματικών μεθόδων της μοριακής βιολογίας με σκοπό την απομόνωση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη και την παραγωγή ενός πληθυσμού κυττάρων με ταυτόσημα μόρια DNA. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα εξής στάδια: 1). επιλογή του γονιδίου που κωδικοποιεί το πολυπεπτίδιο-στόχος και πολλαπλασιασμός του γονιδίου αυτού δηλαδή του ένθετου DNA (insert) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR (Polymerase Chain Reaction), 2). επιλογή του φορέα κλωνοποίησης και πολλαπλασιασμός του, 3). πέψη με περιοριστικά ένζυμα του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης και του ένθετου DNA και 4). αντίδραση σύνδεσης των δύο τμημάτων DNA, που φέρουν συμπληρωματικά άκρα.

Γ.2.1.i. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-PCR

Το πρώτο στάδιο για τον ανασυνδυασμό του DNA είναι η ενίσχυση του γονιδίου-στόχος με εφαρμογή της μεθόδου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction). Η PCR (317) είναι μία μέθοδος για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro* με τη συμβολή ενζύμων. Με τη μέθοδο αυτή ένα τμήμα DNA είναι δυνατό να πολλαπλασιαστεί εκατομμύρια φορές και στηρίζεται στην ικανότητα της δίκλωνης νουκλεοτιδικής αλυσίδας να αποδιατάσσεται και να επανασυντίθεται βασιζόμενη στη συμπληρωματικότητα των αζωτούχων βάσεων. Για τη διαδικασία αυτή απαραίτητη είναι η ύπαρξη ενός θραύσματος DNA (υπόστρωμα), το οποίο χρησιμεύει ως μήτρα για την περιοχή που πολλαπλασιάζεται. Επίσης, απαραίτητες είναι οι ειδικές εναρκτήριες αλληλουχίες ή εκκινητές (primer), οι οποίοι ορίζουν την περιοχή του DNA που πολλαπλασιάζεται, της DNA πολυμεράσης, του μίγματος των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Εξίσου σημαντική είναι η προσθήκη Mg^{2+} , απαραίτητο για τη δράση του ενζύμου. Όλα αυτά προστίθενται σε

ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να ρυθμίζεται το ιοντικό περιβάλλον της αντίδρασης και να είναι το βέλτιστο για τη δράση της DNA πολυμεράσης.

Η αντίδραση PCR περιλαμβάνει τρία επαναλαμβανόμενα στάδια, την αποδιάταξη των δύο αλυσίδων, τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση της νέας αλυσίδας. Κατά την αποδιάταξη οι δύο αλυσίδες DNA διαχωρίζονται με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (~95°C). Στη συνέχεια, η θερμοκρασία της αντίδρασης μειώνεται στους ~50-65°C, όπου οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους περιοχές στο 3' άκρο της κάθε αλυσίδας του DNA. Η θερμοκρασία της φάσης αυτής ρυθμίζεται 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης των εκκινητών (T_m). Ακολουθεί η φάση της επιμήκυνσης της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής ορίζεται στους 72°C, η οποία είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η DNA πολυμεράση επιμηκώνει την αλυσίδα χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA ως εκμαγείο ξεκινώντας από τους εκκινητές με την εισαγωγή τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTP-deoxynucleotide triphosphates). Η διαδικασία της PCR εκτελείται σε ειδική συσκευή, το θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος φέρει θερμαινόμενη πλάκα με την ικανότητα να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ακρίβεια και ταχύτητα.

Για το γονίδιο που κωδικοποιεί το πολυπεπτίδιο-στόχο σχεδιάζεται ένα ζεύγος εκκινητών. Οι εκκινητές αποτελούνται συνήθως από 18-30 νουκλεοτίδια, οι οποίοι οριοθετούν το τμήμα DNA που πολλαπλασιάζεται, καθώς υβριδοποιούνται με τη συμπληρωματική περιοχή στο 3' άκρο της κάθε αλυσίδας DNA. Η αλληλουχία των εκκινητών θα πρέπει να είναι συμπληρωματική ως προς το 3' άκρο του γονιδίου-στόχου, ώστε να επιτευχθεί υβριδοποίηση και παράλληλα δε θα πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους οι αλληλουχίες των δύο εκκινητών, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία διμερούς. Το περιεχόμενο σε βάσεις GC των εκκινητών αποτελεί το 40-60% της κοινής αλληλουχίας. Επιπλέον, η θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών θα πρέπει να είναι κατάλληλη για την υβριδοποίηση σε ~50-65°C και παράλληλα η T_m των δύο εκκινητών δε θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από ~1-2°C. Στο 3' άκρο του εκκινητή θα πρέπει να αποφεύγεται στο τέλος να έχει θυμίνη (T). Επίσης, θα πρέπει οι εκκινητές να αποφεύγεται να σχηματίζουν διμερή με τον εαυτό τους. Τέλος οι εκκινητές επιλέγεται να φέρουν αλληλουχίες αναγνώρισης των

περιοριστικών ενζύμων με τα οποία πρόκειται να πραγματοποιηθεί η πέψη των δύο τμημάτων DNA που πρόκειται να ανασυνδυαστούν.

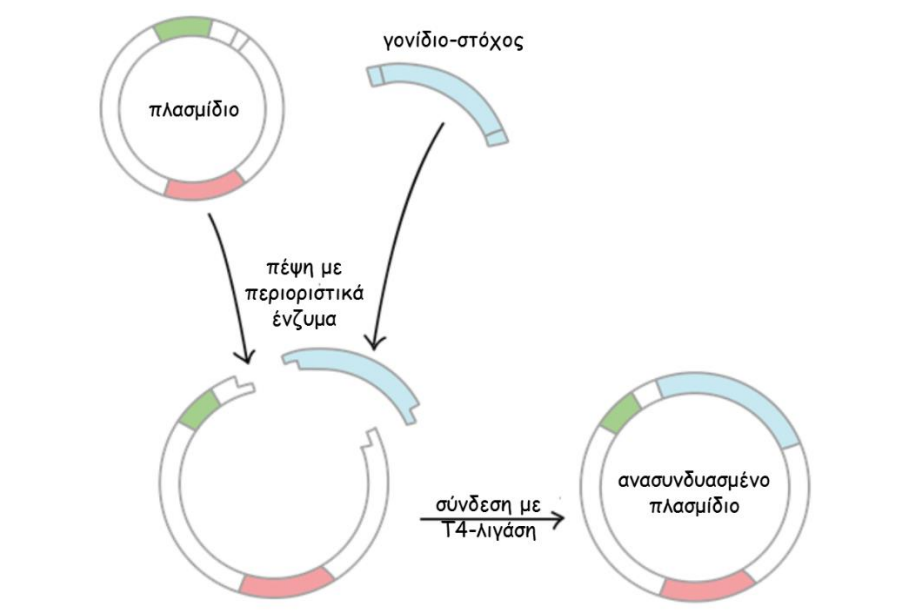
Γ.2.1.ii. Πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού

Η πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού είναι μία διαδικασία κατά την οποία το DNA κόβεται σε συγκεκριμένες θέσεις με υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA. Τα ένζυμα περιορισμού ή ενδονουκλεάσες είναι τα ένζυμα που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν ειδικές αλληλουχίες DNA και το διασπούν σε συγκεκριμένα νουκλεοτίδια. Η πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα μπορεί να οδηγήσει σε DNA με λεία άκρα (blunt ends), δηλαδή με άκρα που καταλήγουν σε ένα ζεύγος βάσεων ή με κολλώδη άκρα (sticky ends), δηλαδή τα άκρα του μορίου DNA καταλήγουν σε μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με επώαση του μορίου DNA-στόχου με ένζυμα περιορισμού. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχή κλωνοποίηση ενός ένθετου μορίου DNA σε ένα φορέα κλωνοποίησης είναι και τα δύο μόρια DNA να υποστούν πέψη με δύο περιοριστικά ένζυμα που δημιουργούν συμπληρωματικά άκρα. Δύο τμήματα DNA που προέρχονται από πέψη με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο φέρουν τα ίδια κολλώδη άκρα, τα οποία να μπορούν να συνδεθούν μέσω της συμπληρωματικότητας των βάσεων στα άκρα τους. Με τη χρήση των ίδιων περιοριστικών ενζύμων στο ένθετο DNA και στο φορέα κλωνοποίησης εξασφαλίζει ότι το ένθετο DNA θα ενσωματωθεί με σωστό προσανατολισμό κατά τη σύνδεσή τους. Μετά την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα τα δύο μόρια DNA ελέγχονται με πηκτή αгарόζης, από όπου και απομονώνονται.

Γ.2.1.iii. Ένθεση ενός τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης

Το επόμενο βήμα είναι η σύνδεση του ενθέματος με το γραμμοποιημένο φορέα κλωνοποίησης. Τα δύο μόρια DNA αναμειγνύονται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις παρουσία του ενζύμου T4-DNA λιγάση, το οποίο καταλύει το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 3'-OH ομάδας στο ένα άκρο ενός κλώνου DNA και της 5'-φωσφορικής ομάδας του άλλου κλώνου. Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης εξαρτάται από την αναλογία μεταξύ του φορέα κλωνοποίησης και του

ένθετου DNA που αναμιγνύονται και κυμαίνεται 1:1-1:5. Επιπλέον, η συγκέντρωση του DNA θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλή, ώστε να εξασφαλίζεται ότι η σύνδεση μεταξύ διαφορετικών μορίων DNA έναντι της αυτό-συνένωσης. Μετά την αντίδραση συνένωσης ακολουθεί μετασχηματισμός των κυττάρων *E.coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.



Εικόνα 36: Ένθεση ενός τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης.

Γ.2.1.ιv. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια πηκτή αгарόζης είναι μία τυποποιημένη διαδικασία για το διαχωρισμό και τη ταυτοποίηση μορίων DNA διαφορετικού μεγέθους (προϊόντα PCR και πλασμιδίων). Κατά την ηλεκτροφόρηση τα μόρια DNA, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα, μετακινούνται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο διανύοντας απόσταση αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθός τους. Επομένως, τα μικρότερα θραύσματα DNA μεταναστεύουν στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων DNA χρησιμοποιούνται πηκτές διαφορετικής περιεκτικότητας σε αгарόζη. Συγκεκριμένα, για την ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή περιεκτικότητας 1,8% σε αгарόζη, ενώ για την ηλεκτροφόρηση πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκε πηκτή 0,9-1% σε αгарόζη. Στα δείγματα DNA προστίθεται ειδικό διάλυμα «φόρτωσης» (loading buffer) και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα TAE 1x (Tris Acetate EDTA) παρουσία

βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το EtBr χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων, καθώς ενσωματώνεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων. Όταν η πηκτή εκτίθεται σε υπεριώδες φως, οι περιοχές όπου υπάρχει DNA φθορίζουν με έντονο πορτοκαλί χρώμα. Στην πηκτή αγαρόζης εφαρμόζεται ρεύμα έντασης 90-100mA. Στην ίδια πηκτή διαχωρίζονται παράλληλα μάρτυρες γνωστών μοριακών βαρών και συγκεντρώσεων για τον προσδιορισμό (συγκρίνοντας τις ζώνες του μάρτυρα με αυτές του δείγματος DNA) του μεγέθους και της συγκέντρωσης των δειγμάτων που αναλύονται. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εκτίθεται σε ακτινοβολία UV (302nm), όπου γίνονται ορατές οι ζώνες του DNA στις θέσεις στις οποίες έχουν μετακινηθεί ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, ενώ η ένταση στο χρώμα της ζώνης καθορίζεται από τη συγκέντρωση του DNA.

Γ.2.2. Εισαγωγή πλασμιδίου σε κύτταρα *E.coli* (μετασχηματισμός)

Μετασχηματισμός είναι η εισαγωγή ξένου DNA σε ένα κύτταρο. Ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων από πλασμίδια είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί τεχνητά σε βακτηριακές σειρές, των οποίων η κυτταρική μεμβράνη φέρει πόρους. Η διαδικασία είναι ιδιαίτερης σημασίας για την έκφραση μιας πρωτεΐνης, διότι τα βακτηριακά κύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται γρήγορα και να εκφράζουν τα γονίδια του πλασμιδίου. Ταυτόχρονα, το πλασμίδιο φέρει γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, γεγονός που διευκολύνει την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων. Για να μετασχηματιστούν τα βακτηριακά κύτταρα θα πρέπει τα τελευταία να είναι επιδεκτικά, δηλαδή να έχουν υποστεί ειδική επεξεργασία με ασβέστιο (Ca^{2+}). Τα ιόντα ασβεστίου αυξάνουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης από μόρια DNA μονόκλωνα ή δίκλωνα, γραμμικά και κυκλικά. Το πλασμίδιο εισάγεται στο βακτήριο με θερμικό σοκ. Το πλούσιο σε ασβέστιο περιβάλλον της κυτταρικής μεμβράνης έλκει το αρνητικά φορτισμένο πλασμιδιακό DNA, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας (θερμικό σοκ) δημιουργούνται πόροι στην κυτταρική μεμβράνη και το πλασμιδιακό DNA εισέρχεται στο βακτήριο.

Συγκεκριμένα, για το μετασχηματισμό των κυττάρων από πλασμίδιο αναμίχθηκαν 50μl εναιωρήματος επιδεκτικών κυττάρων (τα οποία αναφέρονται παραπάνω) με 2μl ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί

φορείς που αναφέρονται παραπάνω, ανασυνδυασμένοι με γονίδιο που αντιστοιχεί σε κάποιο πολυπεπτίδιο της πρωτεΐνης La) συγκέντρωσης περίπου 70ng/μl. Το μίγμα αυτό επωάζεται στους 0°C (σε πάγο) για 30min. Στη συνέχεια, ακολουθήσε θερμικό σοκ με επώαση στους 42°C για 45sec και άμεση ψύξη σε 0°C για 2min. Στη συνέχεια, προστίθενται 450μl υγρού θρεπτικού υλικού LB (Luria Bertani) και ακολουθεί επώαση για 1h σε 37°C και 220rpm (rounds per minute). Ακολουθεί επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υλικό LB, σε τρυβλίο petri, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού και επώαση για 12-16h σε 37°C. Μετά την επώαση εμφανίζονται στο τρυβλίο αποικίες. Οι συνθήκες της διαδικασίας αυτής διατηρούνται στείρες, ενώ χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα αναλώσιμα και θρεπτικά μέσα.

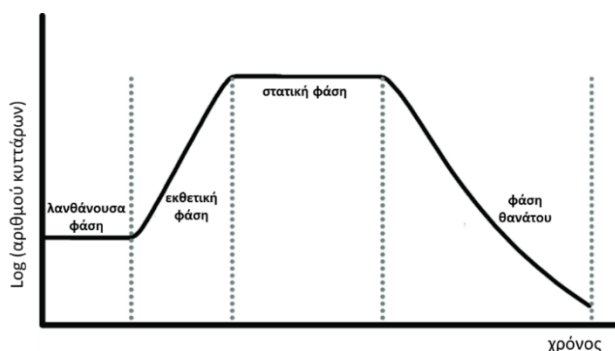
Γ.2.3. Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηρίων

Για την μελέτη των πρωτεϊνών με τη Φασματοσκοπία NMR απαιτείται η έκφρασή τους από βακτήρια *E.coli*, τα οποία αναπτύσσονται σε υγρά ή στερεά θρεπτικά μέσα που περιλαμβάνουν όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξή τους. Χημικά στοιχεία όπως ο άνθρακας, το άζωτο, το οξυγόνο, ο φώσφορος και το θείο είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των κυτταρικών συστατικών των βακτηρίων, ενώ στοιχεία όπως ο σίδηρος, το σελήνιο, το ασβέστιο, το νάτριο και πολλά άλλα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη συγκεκριμένων δομών του κυττάρου αλλά και την εκτέλεση κυτταρικών διεργασιών για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους. Μία καλλιέργεια μπορεί να είναι στερεή ή υγρή. Τα στερεά θρεπτικά μέσα αποτελούνται από τα ίδια συστατικά με τα υγρά με την επιπλέον προσθήκη του άγαρ, ενός πολυσακχαρίτη που παράγεται από θαλάσσια φύκη. Το άγαρ είναι ρευστό σε θερμοκρασίες πάνω από 45°C και πολυμερίζεται (στερεοποιείται) σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Επομένως, το θρεπτικό υλικό όσο είναι ακόμη υγρό διαμοιράζεται σε αποστειρωμένα τρυβλία petri και στερεοποιείται.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι θρεπτικών μέσων, τα πλούσια θρεπτικά μέσα (LB-Luria Bertani, rich media) και τα ελάχιστα θρεπτικά μέσα (M9 minimal media, 5XM9). Το LB περιλαμβάνει όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων. Το θρεπτικό υλικό ελαχίστων μέσων περιλαμβάνει άλατα όπου προστίθενται εξωγενώς μία πηγή άνθρακα, μία πηγή αζώτου, καθώς και

βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Επιπλέον τα 5XM9 χρησιμοποιούνται ευρέως για την έκφραση πρωτεϊνών με σκοπό τη δομική μελέτη τους με τη Φασματοσκοπία NMR, διότι είναι εύκολο να χρησιμοποιηθούν επισημασμένες πηγές αζώτου ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ή $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) και άνθρακα (^{13}C -γλυκόζη).

Τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση. Δηλαδή από ένα κύτταρο προκύπτουν δύο πανομοιότυπα κύτταρα με το αρχικό. Επομένως, σε μια βακτηριακή καλλιέργεια ο βακτηριακός πληθυσμός αυξάνεται εκθετικά. Η ανάπτυξη μιας βακτηριακής καλλιέργειας ξεκινά με τον εμβολιασμό της με μια μικρή ποσότητα κυττάρων. Ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C , που αποτελεί τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των βακτηρίων. Στην περίπτωση της υγρής καλλιέργειας απαιτείται και ανάδευση της κωνικής φιάλης (φλάσκα) ώστε να εμπλουτίζεται η καλλιέργεια με το απαραίτητο για την ανάπτυξη οξυγόνο. Οι φάσεις ανάπτυξης των βακτηρίων σε υγρά θρεπτικά υλικά περιγράφονται με την καμπύλη ανάπτυξης (Εικόνα 37) και περιλαμβάνουν τη λανθάνουσα, την εκθετική, τη στατική και τη φάση θανάτου. Κατά τη λανθάνουσα φάση ο πληθυσμός των βακτηρίων προσαρμόζεται στις συνθήκες όπου βρίσκεται και προσπαθεί να αναπτυχθεί. Ο πληθυσμός των κυττάρων εξαρτάται από τα κύτταρα του εμβολιασμού και παραμένει σχεδόν σταθερός. Κατά την εκθετική φάση ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων αυξάνεται εκθετικά στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Ακολουθεί η στατική φάση, στην οποία ο πληθυσμός των κυττάρων παραμένει σχεδόν σταθερός, εξαιτίας της εξάντλησης μεγάλου μέρους των θρεπτικών συστατικών του μέσου ανάπτυξης και της συσσώρευσης τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού τους. Ωστόσο, τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται και αντικαθιστούν τα νεκρά κύτταρα. Τέλος, τα βακτηριακά κύτταρα περνούν στη φάση θανάτου, όπου ο αριθμός τους μειώνεται.



Εικόνα 37: Γραφική παράσταση του χρόνου έναντι του $\log(\text{αριθμού των βακτηριακών κυττάρων})$, στην οποία απεικονίζονται οι διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης των βακτηρίων μιας καλλιέργειας.

Οι συνθήκες έκφρασης των πρωτεϊνών ποικίλουν ως προς τη θερμοκρασία, το χρόνο επαγωγής της έκφρασης, τη συγκέντρωση του IPTG που προστίθεται, αλλά και ως προς το θρεπτικό μέσο, την κυτταρική σειρά και το σύστημα έκφρασης που επιλέγεται. Η έκφραση της πρωτεΐνης στόχου επάγεται με προσθήκη του IPTG κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων. Η φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας ελέγχεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD, Optical Density) στα 600nm και θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,6-0,9. Για να επιλεγθούν οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης της πρωτεΐνης πραγματοποιούνται δοκιμασίες έκφρασης σε μικρής κλίμακας καλλιέργειες σε διαφορετικές συνθήκες. Ακολουθεί η έκφραση της πρωτεΐνης στόχου σε μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργειες στις βέλτιστες συνθήκες που έχουν καθοριστεί. Τα πολυπεπίδια της πρωτεΐνης La εκφράστηκαν με προσθήκη 1mM IPTG, σε 29°C, 180rpm για 16h.

Γ.2.4. Απομόνωση των πρωτεϊνών μέσω υγρής χρωματογραφίας

Η ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών αποτελεί μια μορφή υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται για την ανάλυση ή την απομόνωση πρωτεϊνικών μειγμάτων και στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ μιας κινούμενης φάσης (κινούμενο υδατικό διάλυμα) και μιας στατικής (πορώδες στερεό). Οι δύο φάσεις βρίσκονται στη στήλη χρωματογραφίας και το μείγμα διαχωρίζεται στα συστατικά του με βάση τις διαφορές τους σε φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως το μέγεθος των μορίων, το ηλεκτρικό φορτίο και άλλες. Η κινητή φάση εισέρχεται στη στατική, εξαιτίας των διαφορών στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τα συστατικά του μείγματος εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

Καθένα από τα αυτοματοποιημένα συστήματα FPLC (Akta Pure 25L/Purifier της GE Healthcare), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πολυπεπτιδίων ή νουκλεικών οξέων, αποτελούνται από δύο αντλίες υψηλής ακρίβειας, μία μονάδα ελέγχου, μία στήλη διαχωρισμού, ένα σύστημα ανίχνευσης και ένα συλλέκτη κλασμάτων. Όλα αυτά ελέγχονται με ειδικό λογισμικό (unicorn), ενώ παράλληλα καταγράφονται τα αποτελέσματα του διαχωρισμού με τη μορφή γραφικών παραστάσεων. Σε αυτά τα συστήματα μπορούν να προσαρμοστούν στήλες υγρής χρωματογραφίας και να εφαρμοστούν μέθοδοι για διαφορετικά είδη χρωματογραφίας.

Γ.2.4.i. Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου

Η χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου αποτελεί μια συχνά χρησιμοποιούμενη και αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και απομόνωσης πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στη χημική συγγένεια δέσμευσης που εμφανίζουν πολλές πρωτεΐνες για ειδικές χημικές ομάδες. Τα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης La συνεκφράστηκαν με μια ετικέτα 6 αμινοξικών καταλοίπων ιστιδίνης (6xHis-tag). Η ετικέτα των αμινοξέων αυτών έχει την ιδιότητα να προσδένεται ισχυρά σε ρητίνη που φέρει δισθενή ιόντα Zn^{2+} , τα οποία είναι ακινητοποιημένα επάνω στα σφαιρίδια νιτροτριακετικού οξέος (NTA) της ρητίνης. Η έκλουση της 6xHis-πρωτεΐνης από τη στήλη επιτυγχάνεται με προσθήκη στη στήλη διαλυμάτων αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου. Η δομή του ιμιδαζολίου προσομοιάζει αυτή της ιστιδίνης (που διαθέτει ιμιδαζολικό δακτύλιο). Το ιμιδαζόλιο αντικαθιστά την πρωτεΐνη στο δεσμό υψηλής συγγένειας με τα χηλικά σύμπλοκα των σφαιριδίων της ρητίνης της χρωματογραφικής στήλης, απελευθερώνοντάς την στο έκλουσμα. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται ο πρώτος διαχωρισμός των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La από το μίγμα των βακτηριακών πρωτεϊνών μετά τη λύση των κυττάρων.

Γ.2.4.ii. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

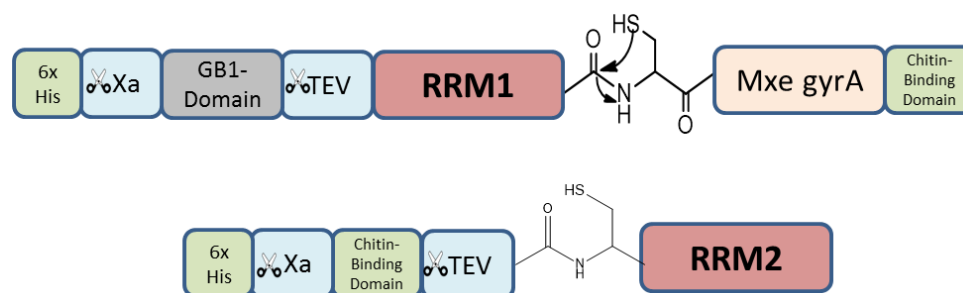
Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού ή μοριακής διήθησης είναι μία χρωματογραφική μέθοδος, κατά την οποία τα μόρια διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Η στατική φάση αποτελείται από πορώδες υλικό. Χρησιμοποιείται ποικιλία διαφορετικών υλικών πλήρωσης ανάλογα με το μοριακό βάρος του μείγματος που διαχωρίζεται. Τα λεπτά πορώδη σφαιρίδια σχηματίζονται από πολυμερή (π.χ. δεξτράνης, αγαρόζης, πολυακρυλαμίδιου κ.α.). Επομένως, η στήλη χρωματογραφίας πληρώνεται με πολυμερή με πόρους διαφορετικών μεγεθών. Καθώς το πρωτεϊνικό διάλυμα περνά από τη στήλη κάποια μόρια εισέρχονται στους πόρους. Τα μεγαλύτερα σωματίδια δεν μπορούν να εισέλθουν σε αρκετούς πόρους, καθώς τα μόρια αυτά είναι μεγαλύτερα από τη διάμετρο των πόρων και περνούν από τα διάκενα που δημιουργούνται. Επομένως τα μεγαλύτερα μόρια εκλούνται γρηγορότερα, ενώ όσο μικρότερο είναι ένα μόριο, τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος κατακράτησής του στη στήλη.

Γ.2.5. Τμηματική επισήμανση των επικρατειών της πρωτεΐνης La για τη δομική μελέτη με φασματοσκοπία NMR

Γ.2.5.i. Σχεδιασμός και έκφραση των επιμέρους τμημάτων

Για την εφαρμογή της τμηματικής επισήμανσης των επικρατειών μιας πρωτεΐνης που συνενώνονται απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις των αρχικών εκφραζόμενων τμημάτων καθώς και να επισημαίνεται κατάλληλα το καθένα από αυτά. Για τη συνένωση των δύο τμημάτων απαιτείται η ύπαρξη του α-θειοεστέρα στο πρώτο τμήμα και μιας Cys στο N-τελικό άκρο του δεύτερου τμήματος. Για το σκοπό αυτό το πρώτο τμήμα συνεκφράζεται με την ιντεΐνη Mxe GyrA (308), μια διαλυτή και σταθερή ιντεΐνη που παραμένει λειτουργική σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών, ενώ παράλληλα βοηθά στη σωστή αναδίπλωση και στην υψηλή απόδοση του πρώτου τμήματος της πρωτεΐνης (291, 294, 299). Η Cys στο N-τελικό άκρο του δεύτερου τμήματος εισάγεται είτε με μετάλλαξη του πρώτου αμινοξέος, είτε με PCR. Η τμηματική επισήμανση επιλέγεται να εφαρμοστεί στο πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*. Το πρώτο τμήμα περιλαμβάνει την αλληλουχία του πολυπεπτιδίου RRM1 και το δεύτερο αυτήν του RRM2α (πίνακας 2, ενότητα Δ1).

Αρχικά, επιλέγεται προσεκτικά η κατάλληλη θέση σύνδεσης (ενότητα A.12.3) και πραγματοποιείται ανασυνδυασμός των πλασμιδιακών φορέων pEM9B και pEM5B με τα γονίδια για τα πολυπεπτίδια που πρόκειται να συνενωθούν. Συγκεκριμένα, το γονίδιο για την πρώτη επικράτεια εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα pEM9B και για τη δεύτερη επικράτεια στον pEM5B (299). Το πρώτο θραύσμα συνεκφράζεται με την ετικέτα GB1 στο N-τελικό του άκρο, η οποία ενισχύει την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης και τη διαλυτότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης και στην C-τελική περιοχή συνεκφράζεται με την ιντεΐνη Mxe GyrA που ακολουθείται από την επικράτεια πρόσδεσης στη χιτίνη (CBD, Chitin-Binding Domain) (Εικόνα 38). Το δεύτερο θραύσμα στο N-τελικό του άκρο φέρει μια ετικέτα CBD μαζί με μια ετικέτα 6xHis, ενώ μεταξύ των δύο περιοχών εντοπίζεται η θέση αναγνώρισης και αποκοπής της πρωτεάσης TEV (ENLYFQ/C), η οποία εισάγεται μαζί με την απαραίτητη Cys μέσω του εκκινητή κατά τη διάρκεια της PCR του DNA-στόχου.



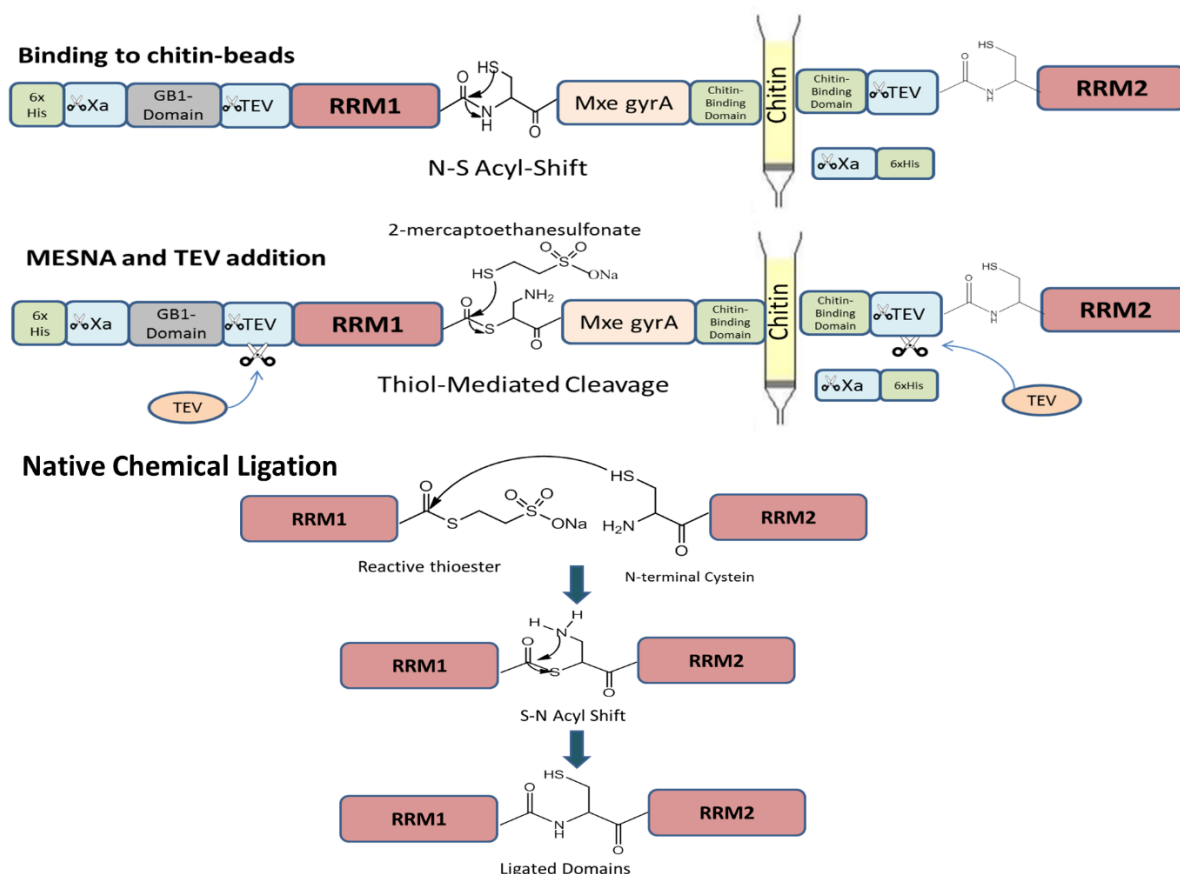
Εικόνα 38: Σχηματική απεικόνιση των εκφραζόμενων επιμέρους τμημάτων σε συνδυασμό με βοηθητικές για την απομόνωση και συνένωση αλληλουχιών.

Η έκφραση του κάθε τμήματος της πρωτεΐνης πραγματοποιείται ξεχωριστά σε κύτταρα *E.coli* BL21(DE3) και με την κατάλληλη επισήμανση. Το κάθε τμήμα της πρωτεΐνης επισημαίνεται διαφορετικά, ώστε να είναι ορατό στο NMR ένα από τα δύο τμήματα της συνενωμένης πρωτεΐνης (π.χ. ^{14}N RRM1- ^{15}N RRM2α, ^{15}N RRM1 ^{14}N RRM2α κλπ). Ακολουθεί η απομόνωση και των δύο τμημάτων της πρωτεΐνης σε μια στήλη χιτίνης (chitin column). Σε αυτήν τα δύο τμήματα της πρωτεΐνης μετατρέπονται σε αντιδρώντα και συνενώνονται μεταξύ τους.

Γ.2.5.ι. Απομόνωση, ενεργοποίηση και σύζευξη των δύο τμημάτων της πρωτεΐνης

Τα κύτταρα, στα οποία έχουν εκφραστεί τα δύο τμήματα της πρωτεΐνης επαναδιαλύονται σε διάλυμα 50mM Hepes, 1M NaCl, 1mM EDTA, 5mM DTT, pH 8. Σε αυτά προστίθεται η ανάλογη ποσότητα αναστολέων πρωτεασών. Τα σφαιρίδια χιτίνης που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και τη σύζευξη των τμημάτων έχουν εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Hepes, 1M NaCl, 1mM EDTA, 0,5mM TCEP, pH 8. Το κυτταρικό λύμα των δύο τμημάτων αναμειγνύεται, περνά αργά στη στήλη και τα τμήματα δεσμεύονται σε αυτή μέσω της περιοχής CBD. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια χιτίνης εκπλένονται με πέντε όγκους στήλης του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος. Παράλληλα, πραγματοποιείται αλλαγή του διαλύματος αποθήκευσης της πρωτεάσης TEV σε 50mM Hepes, 1M NaCl, 1mM EDTA, 0,5mM TCEP, 100mM MESNA, pH 8 με διαπίδυση για περίπου 6h. Ακολουθεί εισαγωγή του διαλύματος της αντίδρασης σύζευξης στη στήλη (50mM Hepes, 1M NaCl, 1mM EDTA, 0,5mM TCEP, 100mM MESNA, pH 8) και η προσθήκη 0,1mg TEV. Η στήλη με τα σφαιρίδια χιτίνης σφραγίζεται και ακολουθεί επώαση για 16h σε 25°C υπό ανάδευση (Εικόνα 39). Κατά

την αντίδραση σύζευξης με το αντιδραστήριο MESNA παρουσία της πρωτεάσης TEV φαίνεται ότι η επικράτεια RRM1 απελευθερώνεται από την ιντεΐνη και το CBD με το MESNA και από την επικράτεια GB1 μετά την πέψη με TEV. Αντίστοιχα, η επικράτεια RRM2 με την επιπλέον Cys στο N-τελικό άκρο απελευθερώνεται μετά την πέψη με TEV. Ταυτόχρονα, οι δύο επικράτειες συνενώνονται μέσω μιας πυρηνόφιλης αντίδρασης παρουσία του αντιδραστηρίου MESNA, όπως περιγράφεται στην εικόνα 39.



Εικόνα 39: Απομόνωση, ενεργοποίηση και σύζευξη των επιμέρους τμημάτων της πρωτεΐνης σε σφαιρίδια χιτίνης.

Το μίγμα των πρωτεϊνών που περιέχει το συζευγμένο προϊόν εκλούεται με δύο όγκους στήλης ρυθμιστικού διαλύματος 50mM Tris-HCl, 1M NaCl, 30mM ιμιδαζολίου, pH 7,4. Ακολουθεί χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Συγκεκριμένα, σε στήλη His-Trap ακινητοποιούνται δισθενή ιόντα νικελίου (Ni^{2+}) και εκπλένεται με 5 όγκους στήλης ddH₂O και 5 όγκους στήλης διαλύματος 50mM Tris-HCl, 1M NaCl, 30mM ιμιδαζολίου, pH 7,4. Ακολουθεί η εισαγωγή του

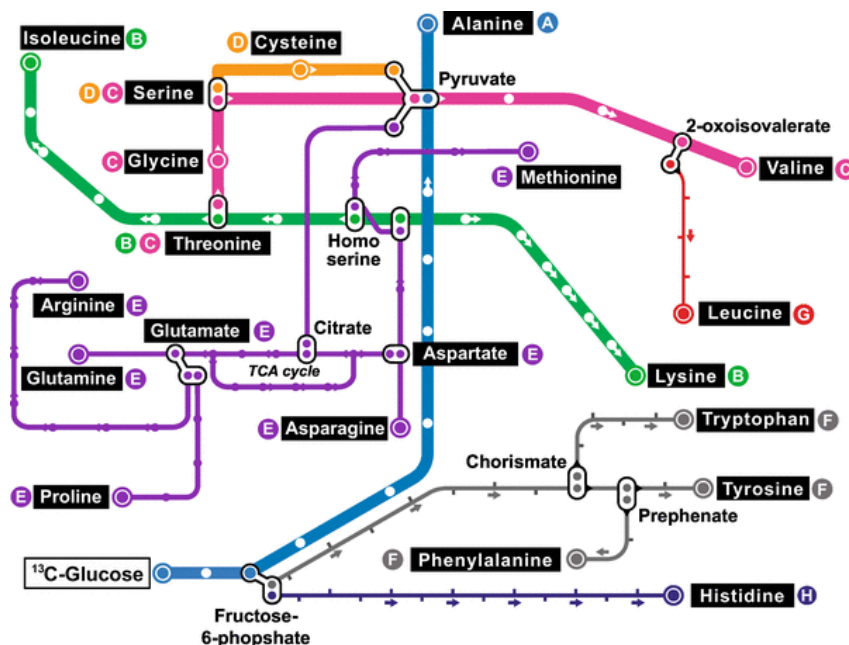
μίγματος των πρωτεϊνών που εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια χιτίνης. Στη στήλη His-Trap προσδένεται η TEV, η οποία φέρει ετικέτα 6xHis καθώς και το θραύσμα 6xHis-GB1, ενώ η πρωτεΐνη που προέκυψε μετά τη σύζευξη των επιμέρους τμημάτων καθώς και τα τμήματα που δεν έχουν συζευχθεί εκλούνται χωρίς να προσδεθούν από τη στήλη. Η TEV και το θραύσμα 6xHis-GB1 εκλούνται με 1M ιμιδαζόλιο, ενώ στη συνέχεια η στήλη εκπλένεται με 0,1M EDTA και ddH₂O. Για την απομόνωση ολόκληρης της συζεγμένης πρωτεΐνης από τα επιμέρους τμήματά της ακολουθεί χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

Γ.2.6. Επιλεκτική Επισήμανση αμινοξέων

Η τεχνική της επιλεκτικής επισήμανσης θεωρείται σημαντική στρατηγική για την απλοποίηση των φασμάτων NMR και τη δομική μελέτη πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους με τη φασματοσκοπία NMR) (318). Στηρίζεται στην επισήμανση ή μη επιλεκτικά ενός τύπου αμινοξέος σε μη επισημασμένες ή σε ¹⁵N ή/και ¹³C επισημασμένες πρωτεΐνες, αντίστοιχα (319-321). Η εφαρμογή της μεθόδου αυτής έχει ως αποτέλεσμα την απλοποίηση των φασμάτων και τη μείωση της αλληλοεπικάλυψης των σημάτων συντονισμού στο φάσμα. Με αυτό τον τρόπο ταυτοποιούνται ή επιβεβαιώνονται ευκολότερα οι κορυφές των φασμάτων. Μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής αποτελεί το υψηλό κόστος των επισημασμένων αμινοξέων ή των πρόδρομων ενώσεών τους. Μία εναλλακτική στρατηγική για τη μείωση του κόστους των αμινοξέων είναι η επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση αμινοξέων (selective unlabeled, reverse/inverse labeling), κατά την οποία σε μία πλήρως ¹⁵N επισημασμένη πρωτεΐνη δεν επισημαίνεται ένας τύπος αμινοξέος. Σε αυτή την περίπτωση στο φάσμα ¹H-¹⁵N HSQC εμφανίζονται όλες οι κορυφές που αντιστοιχούν σε όλα τα αμινοξέα της πρωτεΐνης εκτός από αυτά που αντιστοιχούν στο μη-επισημασμένο αμινοξύ. Άλλο ένα μειονέκτημα της μεθόδου είναι η παρεμβολή των κορυφών στο φάσμα ¹H-¹⁵N HSQC που αντιστοιχούν σε αμινοξέα, τα οποία δεν έχουν επιλεγεί να είναι επισημασμένα (scrambling/cross labeling). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι χρησιμοποιείται το σύστημα έκφρασης των πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*. Στα βακτηριακά κύτταρα είναι δυνατόν το επισημασμένο αμινοξύ να μεταβολιστεί σε κάποιο άλλο μέσω μεταβολικών μονοπατιών (Εικόνα 40) (322) παράγοντας έτσι επισημασμένα αμινοξέα, τα οποία δεν είχαν επιλεγεί αρχικά να επισημανθούν. Αυτό έχει σαν

αποτέλεσμα στο ^1H - ^{15}N HSQC φάσμα να εμφανίζονται εκτός από τις κορυφές του επιθυμητού αμινοξέος και άλλες που αντιστοιχούν σε αμινοξέα που έχουν προέλθει βιοσυνθετικά από αυτό. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μη ειδική επισήμανση.

Στα μεταβολικά μονοπάτια των βακτηρίων υπάρχουν αμινοξέα, τα οποία εμφανίζονται στο τελικό στάδιο της βιοσύνθεσής τους, επιτρέποντας την επιλεκτική επισήμανση με ευκολία. Άλλα αμινοξέα εντοπίζονται σε ενδιάμεσα στάδια των βιοσυνθετικών μονοπατιών των αμινοξέων και η επισήμανσή τους είναι πολύπλοκη. Το αμινοξύ Lys, καθώς και τα αμινοξέα Arg, Met, Pro, Cys, His και Asn, εμφανίζονται ως τελικά προϊόντα των βιοσυνθετικών μονοπατιών των αμινοξέων στα βακτηριακά κύτταρα (323). Επομένως, για την εφαρμογή της αντίστροφης επιλεκτικής επισήμανσης της Lys αρκεί η προσθήκη του μη-επισημασμένου αμινοξέος (^{14}N Lys) σε ^{15}N περιβάλλον. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν πρωτοτροφικά βακτηριακά κύτταρα, δηλαδή κύτταρα που έχουν την ικανότητα να συνθέτουν όλα τα αμινοξέα χρησιμοποιώντας μία πηγή αζώτου (NH_4Cl_2) και μία πηγή άνθρακα (γλυκόζη). Με προσθήκη του ^{14}N -αμινοξέος της κατηγορίας αυτής το κύτταρο δε χρειάζεται να βιοσυνθέσει το συγκεκριμένο αμινοξύ, ενώ τα υπόλοιπα βιοσυντίθενται αξιοποιώντας το $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}_2$ που προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Αυτό συμβαίνει, διότι το τελικό προϊόν της βιοσυνθετικής πορείας (π.χ. ^{14}N -Lys) αναστέλλει το ένζυμο, το οποίο καταλύει την αντίδραση σύνθεσής τους από κάποιο άλλο πρόδρομο αμινοξύ.



Εικόνα 40 :Μεταβολικά μονοπάτια για τη βιοσύνθεση των αμινοξέων σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*.

Η ^{15}N πρωτεΐνη εκφράζεται χωρίς αλλαγές στο πρωτόκολλο έκφρασής της σε ^{15}N -επισημασμένα μέσα με τη διαφορά ότι όταν η οπτική πυκνότητα είναι 0,3-0,4 προστίθενται 0,15g/L ^{14}N -Lys. Η διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης παραμένει ίδια. Ακολουθεί η λήψη του φάσματος ^1H - ^{15}N HSQC, το οποίο περιλαμβάνει όλες τις κορυφές των αμινοξέων της πρωτεΐνης εκτός από αυτές που αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα Lys. Η υπέρθεση του φάσματος αυτού με το φάσμα ^1H - ^{15}N HSQC που περιλαμβάνει την πλήρως ^{15}N -επισημασμένη πρωτεΐνη επιτρέπει την ταυτοποίηση των σημάτων συντονισμού (κορυφών) που αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα Lys. Ο συνδυασμός αυτών των φασμάτων με τα τρισδιάστατα ετεροπυρηνικά φάσματα έχει ως αποτέλεσμα τον προσδιορισμό της θέσης του κάθε αμινοξικού καταλοίπου Lys στην αλληλουχία της πρωτεΐνης.

Γ.2.7. Σημειακή τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση

Η *in vitro* τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση αποτελεί μία χρήσιμη τεχνική, κατά την οποία πραγματοποιείται αλλαγή στην αλληλουχία ενός γονιδίου με σκοπό να παρατηρηθούν και να μελετηθούν οι επακόλουθες αλλαγές στη λειτουργία του DNA/RNA και της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Με την αλλαγή ενός ή (δύο γειτονικών) νουκλεοτιδίων της νουκλεοτιδικής αλυσίδας είναι δυνατό να αλλάξει ένα αμινοξύ σε ένα άλλο. Επομένως μπορεί να μελετηθεί αν το αμινοξύ που αλλάζει διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δομή και τη δράση μιας πρωτεΐνης. Για τη μεταλλαξιγένεση υπάρχουν διάφορες μέθοδοι. Ωστόσο, η πλέον διαδεδομένη είναι αυτή της σημειακής τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, η οποία επιτρέπει τη μετάλλαξη σε οποιοδήποτε δίκλωνο πλασμίδιο, χωρίς να απαιτούνται ειδικοί πλασμιδιακοί φορείς και πολύπλοκα βακτηριακά συστήματα έκφρασης. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμικούς κυκλοποιητές παρουσία της DNA πολυμεράσης, dNTP και ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που περιλαμβάνουν την αλληλουχία της περιοχής που μεταλλάσσεται.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις των αμινοξικών καταλοίπων που εντοπίζονται στην επικράτεια του RRM2a Cys233 και Cys278 σε αλανίνες. Για την πραγματοποίηση αυτών των μεταλλάξεων, αρχικά, σχεδιάζονται δύο εκκινητές, ένας πρόσθιος και ένας ανάστροφος στην περιοχή της

μετάλλαξης. Οι εκκινητές που σχεδιάζονται θα πρέπει και οι δύο να περιλαμβάνουν την αλληλουχία DNA για την επιθυμητή μετάλλαξη και αυτή να εντοπίζεται περίπου στο μέσον του κάθε εκκινητή. Ταυτόχρονα, θα πρέπει να ικανοποιούν τα χαρακτηριστικά που περιγράφονται στην παράγραφο (Γ.2.1.i). Η αντίδραση της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης αποτελείται εκτός από τους εκκινητές και το DNA-μήτρα, από την DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας και dNTP. Όλα αυτά προστίθενται σε ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να ρυθμίζεται το ιοντικό περιβάλλον της αντίδρασης και να είναι το βέλτιστο για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Κατά τη διάρκεια της θερμικής κυκλοποίησης (αντίδραση PCR) οι εκκινητές, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί ως προς ένα κλώνο του φορέα ο καθένας, εκτείνονται. Με την ενσωμάτωση των εκκινητών επάγεται η δημιουργία του νέου πλασμιδιακού φορέα που φέρει τη μετάλλαξη με κομμένα άκρα. Οι βάσεις του αρχικού πλασμιδιακού DNA είναι μεθυλιωμένες, ενώ οι βάσεις του νεοσυντιθέμενου DNA με τη σημειακή μετάλλαξη όχι. Ακολουθεί η επώαση των προϊόντων της αντίδρασης με το ένζυμο DpnI (αλληλουχία αναγνώρισης 5'-Gm6ATC-3'), το οποίο πέπτει τις μεθυλιωμένες και ημιμεθυλιωμένες θέσεις του μητρικού DNA (αρχικό πλασμίδιο). Κατόπιν, κύτταρα *DH5α* μετασχηματίζονται με το νέο πλασμίδιο (που ενδεχομένως να φέρει τη μετάλλαξη). Το πλασμιδιακό DNA από τυχαίες αποικίες απομονώνεται και η νουκλεοτιδική αλληλουχία αναλύεται, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία της επιθυμητής μετάλλαξης (Εικόνα 41).



Εικόνα 41: Σημειακή τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση. Στο πρώτο στάδιο παράγεται το νέο μεταλλαγμένο DNA με αντίδραση PCR, στο δεύτερο πραγματοποιείται πέψη του μητρικού DNA με το ένζυμο DpnI και στο τρίτο μετασχηματισμός του μεταλλαγμένου πλασμιδίου σε κύτταρα *DH5α*.

Γ.2.8. Παρασκευή των tRNA

Γ.2.8.i. *In-vitro* μεταγραφή γονιδίων tRNA

Η *in vitro* μεταγραφή γονιδίων tRNA είναι μία απλή διαδικασία που επιτρέπει την κατευθυνόμενη σύνθεση μορίων RNA με ποικιλία σε μέγεθος και αλληλουχία χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο γραμμοποιημένο DNA και το ένζυμο T7 RNA πολυμεράση. Βασίζεται στο σχεδιασμό ενός προτύπου, το οποίο περιλαμβάνει την επιθυμητή αλληλουχία DNA που μεταγράφεται καθοδικά του υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης. Χρησιμοποιείται πλασμιδιακός φορέας ανασυνδυασμένος με τις παραπάνω αλληλουχίες. Το πλασμιδιακό DNA γραμμοποιείται είτε με πέψη με περιοριστικά ένζυμα, είτε με εφαρμογή της τεχνικής PCR. Το εκμαγείο DNA μεταγράφεται από την T7 RNA πολυμεράση (του φάγου), παρουσία τριφωσφορικών νουκλεοζιτών (rNTP-ribonucleoside triphosphate). Η T7 RNA πολυμεράση αναγνωρίζει τη θέση έναρξης της μεταγραφής στο γραμμοποιημένο εκμαγείο (T7-προαγωγός), ξετυλίγει το δίκλωνο μόριο DNA και παράγει μονόκλωνο εκμαγείο. Στη συνέχεια η T7 RNA πολυμεράση διατρέχει τον κλώνο του εκμαγείου και συνθέτει το νέο συμπληρωματικό κλώνο επιλέγοντας το κατάλληλο τριφωσφορικό νουκλεοζίτη. Η πολυμεράση κινείται από το 3' άκρο προς το 5' άκρο του εκμαγείου DNA και παράγει ένα μόριο RNA με κατεύθυνση 5'-3'. Η διαδικασία της μεταγραφής τερματίζεται όταν η T7 RNA πολυμεράση ανιχνεύσει τις θέσεις τερματισμού. Η αντίδραση για την *in-vitro* μεταγραφή των tRNA πραγματοποιείται παρουσία του γραμμοποιημένου εκμαγείου DNA, της T7 RNAP, MgCl₂, NTP, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις απαιτείται η προσθήκη του ενζύμου πυροφωσφατάση ή/και του GMP (μονοφωσφορική γουανωσίνη). Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται η διαδικασία της *in-vitro* μεταγραφής ποικίλουν. Συγκεκριμένα, ανάλογα με το μόριο RNA που μεταγράφεται είναι δυνατό να ποικίλουν οι συγκεντρώσεις των NTP, του γραμμοποιημένου DNA, του MgCl₂ και του ενζύμου T7 RNAP αλλά και ο χρόνος επώασης της αντίδρασης. Η αντίδραση επώάζεται συνήθως στους 37°C. Μετά το πέρας της μεταγραφής προστίθεται στην αντίδραση DNaseI και CaCl₂ και η αντίδραση επώάζεται στους 37°C για 30min για την καταστροφή του DNA. Ακολουθεί η εκχύλιση με προσθήκη διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και κατακρήμνιση του RNA με αιθανόλη, όπως περιγράφεται παρακάτω. Κατόπιν, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση του RNA σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμίδιου

(UREA-PAGE, περιγράφεται στην ενότητα Γ.2.8.ii και έκλυση του RNA με ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM KCl, 1 mM EDTA.

Γ.2.8.ii. UREA-PAGE

Τα προϊόντα της *in vitro* μεταγραφής αναλύονται σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμίδιου 10%-8M UREA ή αλλιώς UREA-page και οπτικοποιούνται με τη μέθοδο UV shadowing. Η ουρία στο UREA-page αποδιατάσσει τη δομή του RNA (και του DNA) και τα μόρια διαχωρίζονται στην πηκτή ακρυλαμίδιου με βάση το μοριακό τους βάρος, καθώς είναι αρνητικά φορτισμένα και κινούνται σε ηλεκτροστατικό πεδίο. Μεγάλο ποσοστό της πηκτής σε ακρυλαμίδιο διαχωρίζει θραύσματα μικρότερου μοριακού βάρους, ενώ μικρό ποσοστό σε ακρυλαμίδιο διαχωρίζει θραύσματα μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Για την παρασκευή της πηκτής προετοιμάζεται το παρακάτω διάλυμα: 5g ουρία, 2,5ml ακρυλαμίδιο 40%, 19:1, 1ml 10x TBE, 40μl APS, 4,1μl TEMED. Το διάλυμα θερμαίνεται ελαφρώς υπό ανάδευση για να διαλυθεί η ουρία. Στη συνέχεια, μόλις κρυώσει το διάλυμα προστίθενται τα APS και TEMED και αδειάζουμε το διάλυμα τη γέλης ανάμεσα στις δύο γυάλινες πλάκες της Biorad. Τέλος, τοποθετείται το αντίστοιχο χτενάκι και η γέλη πολυμερίζεται σε περίπου 30min.

Προετοιμασία δειγμάτων: Τα δείγματα που προορίζονται για ηλεκτροφόρηση αναμειγνύονται με το διάλυμα φόρτωσης (2x loading buffer for IVT: 90% φορμαμίδιο, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol). Ακολουθεί αποδιάταξη του RNA με θέρμανση στους 80°C.

Ηλεκτροφόρηση: Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ισχύ ρεύματος 15mA, σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTBE. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης οπτικοποιούνται με την τεχνική UV shadowing.

Γ.2.8.iii. UV Shadowing

Μία τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων ενός UREA-page χωρίς της χρώση τους με χρωστικές ουσίες είναι η τεχνική UV shadowing (324, 325). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί υπεριώδη

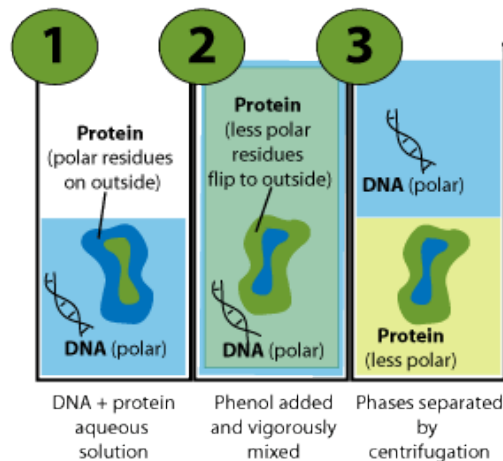
ακτινοβολία μήκους κύματος 254nm και μία πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) επικαλυμμένη με σίλικα. Η πηκτή καλυπτόμενη από διαφανή μεμβράνη τοποθετείται σε μία πλάκα TLC. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται από ψηλά ακτινοβολία UV στην πλάκα TLC. Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν το φως σε αυτό το μήκος κύματος και σχηματίζει σκιά στην πλάκα TLC. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να επισημανθούν και να αποκοπούν από την πηκτή οι περιοχές, στις οποίες εντοπίζονται τα νουκλεϊκά οξέα, για περαιτέρω επεξεργασία.

Γ.2.8.iv. Εκχύλιση με προσθήκη διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1)-Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων (DNA/RNA) με αιθανόλη

Η εκχύλιση με προσθήκη διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) εφαρμόζεται για την απομόνωση του DNA ή του RNA από ένα διάλυμα, το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει και πρωτεΐνες. Αρχικά, ένας όγκος φαινόλης προστίθεται στο υδατικό διάλυμα που περιέχει το DNA/RNA που πρόκειται να απομονωθεί και πρωτεΐνες. Η φαινόλη και το νερό δεν αναμειγνύονται και σχηματίζονται δύο φάσεις, μία υδατική και μία οργανική (φαινόλη). Η φαινόλη που έχει μεγαλύτερη πυκνότητα εντοπίζεται στο κάτω μέρος και το νερό στο πάνω. Οι δύο φάσεις αναμειγνύονται επιμελώς. Με αυτό τον τρόπο η φαινόλη ωθείται στην υδατική και σχηματίζεται παροδικά γαλάκτωμα. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες περνούν στην οργανική φάση, ενώ τα νουκλεϊκά οξέα παραμένουν διαλυμένα στο νερό (Εικόνα 42). Το DNA/RNA ως πολικό μόριο είναι περισσότερο διαλυτό στο νερό και λιγότερο στη φαινόλη. Επομένως, όταν αναμειγνύονται οι δύο φάσεις (υδατική και οργανική), το DNA/RNA δε διαλύεται στη φαινόλη αλλά παραμένει στην υδατική φάση.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση του μείγματος και διαχωρισμός των φάσεων. Η υδατική φάση απομακρύνεται με πιπέτα και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονται με αιθανόλη. Επομένως, για την εφαρμογή της παραπάνω διαδικασίας ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο: Αρχικά, σε eppendorf των 1,5 ή 2ml προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) με το αρχικό διάλυμα νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα αυτό αναδεύεται έντονα (vortex) για 30sec και φυγοκεντρείται για 5min. Η υδατική φάση (πάνω φάση) που περιέχει το DNA/RNA αφαιρείται με πιπέτα με προσοχή και μεταφέρεται σε νέο eppendorf. Σε αυτό το

διάλυμα προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Το διάλυμα αυτό αναδεύεται έντονα (vortex) για 30sec και φυγοκεντρείται για 5min και η υδατική φάση αφαιρείται με πιπέτα με προσοχή και μεταφέρεται σε νέο eppendorf. Ακολουθεί η κατακρήμνιση του DNA/RNA με αιθανόλη.



Εικόνα 42: Διαχωρισμός των νουκλεϊκών οξέων από τις πρωτεΐνες με τη μέθοδο της εκχύλισης με προσθήκη διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1)

Στο υδατικό διάλυμα που περιέχει το DNA/RNA προστίθεται όγκος ίσος με 2,5 φορές τον αρχικό όγκο του διαλύματος κρύας καθαρής αιθανόλης (99,8% αιθανόλη που φυλάσσεται στους -20°C) και 1/10 του αρχικού όγκου διαλύματος NaOAc 3M, pH 5,2. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA/RNA στους -80°C . Κατόπιν, το διάλυμα αυτό φυγοκεντρείται στη μέγιστη ταχύτητα για 30min, στους 4°C . Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 1ml 70% κρύας αιθανόλης (φυλάσσεται στους -20°C). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 15min, στους 4°C και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το ίζημα ξεραίνεται και επαναδιαλύεται σε αποστειρωμένο νερό που έχει υποστεί ειδική επεξεργασία (DEPC).

Γ.2.9. Δοκιμή αλλαγής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

Η δοκιμή αλλαγής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) είναι μία γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-νουκλεϊκών οξέων (RNA ή DNA) (326-329). Βασίζεται

στο γεγονός ότι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του συμπλόκου πρωτεΐνης-RNA (ή DNA) είναι τυπικά μικρότερη από εκείνη του ελεύθερου RNA σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μία χαρακτηριστική μετατόπιση του RNA σε μία πηκτή, ενώ το RNA που χρησιμοποιείται είναι ραδιοεπισημασμένο. Μετά την ηλεκτροφόρηση η κατανομή των προϊόντων της αντίδρασης προσδιορίζεται με αυτοραδιογραφία.

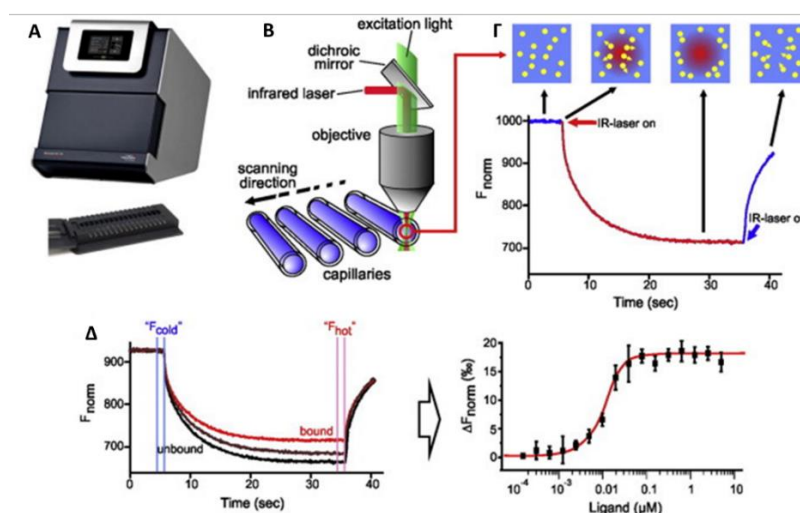
Αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης επωάζονται με [γ - ^{32}P] ATP σημασμένο πρόδρομο μόριο tRNA σε διάλυμα πρόσδεσης παρουσία 1U RNasin και 1mM EGTA για 30min σε 25°C. Αρχικά, το pre-tRNA αποδιατάσσεται στους 65°C για 3min και αφήνεται να φτάσει στους 37°C. Ακολουθεί η αναδιάταξη του tRNA παρουσία της πρωτεΐνης (πολυπεπτίδιο της πρωτεΐνης La του Dicty). Στη συνέχεια, σε κάθε αντίδραση προστίθενται 3μl διαλύματος χρωστικών (loading buffer EMSA) και τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 6% σε 3,5xTB στα 7mA σε 4°C. Ακολουθεί η έκθεση της πηκτής σε φωτογραφικό φιλμ και η ανάλυσή του στο μηχάνημα «phosphorimager».

Γ.2.10. Microscale Thermophoresis (MST)

Η τεχνική Microscale Thermophoresis (MST) είναι μία μέθοδος για την ποσοτικοποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ βιομορίων. Βασίζεται στην κατευθυνόμενη κίνηση των μορίων κατά μήκος μιας μικροσκοπικής βαθμίδωσης της θερμοκρασίας (thermophoresis). Με το MST παρακολουθείται η θερμοφόρηση των σημασμένων με φθορισμό μορίων σε πειράματα τιτλοδότησης όπου το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρείται σταθερό. Κατά συνέπεια, οποιαδήποτε παρατηρούμενη αλλαγή οφείλεται σε μεταβολές στο μέγεθος, στο φορτίο, στην εντροπία και την ενυδάτωση του κάθε σημασμένου μορίου. Η δέσμευση ενός τιτλοδοτούμενου μορίου (που δεν είναι σημασμένο) σε ένα σημασμένο μόριο αλλάζει μία από τις παραπάνω ιδιότητες και έτσι η δέσμευση μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με τη μέτρηση της μεταβολής της θερμοφόρησης.

Η θερμοφορητική κίνηση του σημασμένου μορίου μετριέται με την παρακολούθηση της κατανομής του φθορισμού σε ένα τριχοειδές με το όργανο «NanoTemper Monolith». Η μικροσκοπική βαθμίδωση της θερμοκρασίας

δημιουργείται από ένα λέιζερ IR (υπέρυθρης ακτινοβολίας), το οποίο στοχεύει στο τριχοειδές και απορροφάται έντονα από το νερό. Η θερμοκρασία του υδατικού διαλύματος αυξάνεται κατά 2-6°K σε σύγκριση με την περιφέρεια και έτσι δημιουργείται μια ισχυρή βαθμίδωση στη θερμοκρασία. Πριν την ενεργοποίηση του λέιζερ IR η κατανομή των μορίων εντός του τριχοειδούς είναι ομοιόμορφη. Με εφαρμογή του λέιζερ δύο φαινόμενα παρατηρούνται, τα οποία διαφέρουν ως προς τη χρονική κλίμακα. Ως πρώτη ανταπόκριση ο φθορισμός της βαφής αλλάζει εξαιτίας της εξάρτησής του από τη θερμοκρασία. Ως δεύτερη ανταπόκριση τα μόρια μετακινούνται από την τοπικά θερμαινόμενη περιοχή προς τις εξωτερικές ψυχρές περιοχές. Μια διαφορά θερμοκρασίας ΔT οδηγεί σε εξάντληση των διαλυμένων βιομορίων στην περιοχή της αυξημένης θερμοκρασίας, που υπολογίζεται από τον συντελεστή ST: $\text{Chot/Ccold} = \exp(-S_{\Delta T})$. Αυτή η θερμοφορητική εξάντληση εξαρτάται από τη διεπαφή μεταξύ μορίου και διαλύτη (Εικόνα 43B). Υπό συνθήκες σταθερού ρυθμιστικού διαλύματος, η θερμοφόρηση ανιχνεύει το μέγεθος, το φορτίο και την εντροπία των μορίων. Η θερμοφόρηση μιας πρωτεΐνης τυπικά διαφέρει σημαντικά από τη θερμοφόρηση ενός συμπλόκου πρωτεϊνών προσδέτη, εξαιτίας των επαγόμενων από τη δέσμευση αλλαγών σε μέγεθος, φορτίο και ενέργεια διαλυτοποίησης. Ακόμη και αν μια δέσμευση δεν μεταβάλλει σημαντικά το μέγεθος ή το φορτίο μιας πρωτεΐνης, η θερμοφόρηση μικρής κλίμακας μπορεί ακόμη να ανιχνεύσει τη σύνδεση λόγω επαγόμενων από δέσμευση μεταβολών στην εντροπία των μορίων.



Εικόνα 43: Α. Monolith NanoTemper Β. Δείγματα σταθερής συγκέντρωσης ενός σημασμένου μορίου-στόχου και του προσδέτη τοποθετούνται σε τριχοειδή. Το λέιζερ IR επάγει τη δημιουργία μιας μικροσκοπικής βαθμίδωσης θερμοκρασίας στο τριχοειδές. Γ. Τυπικό σήμα του πειράματος MST. Δ. Πείραμα δέσμευσης: Η θερμοφορητική κίνηση ενός σημασμένου μορίου (αδέσμευτο, με μαύρο) μεταβάλλεται με τη δέσμευση ενός προσδέτη (δεσμευμένο, με κόκκινο), με αποτέλεσμα τη διαφορετική μεταβολή.

Για την πραγματοποίηση ενός τυπικού πειράματος MST απαιτούνται ένα σημασμένο βιομόριο και μία μη-σημασμένη ουσία (βιομόριο ή χημική ένωση) που δεσμεύεται στο πρώτο. Ο φθορισμός στο σημασμένο βιομόριο παρέχεται από μια εξωτερική πηγή, ενώ η φθορίζουσα ουσία συνδέεται ομοιοπολικά στο μόριο που μελετάται. Η συγκέντρωση του φθορίζοντος μορίου διατηρείται σταθερή και χαμηλή. Παρασκευάζονται 16 διαφορετικά δείγματα, τα οποία περιέχουν σταθερή συγκέντρωση της πρωτεΐνης (φθορίζον μόριο) και αυξανόμενες συγκεντρώσεις του pre-tRNA_{Arg} (μη-φθορίζον μόριο), ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα παραμένει ίδιο. Με την ανάμειξη των αντιδρώντων τα δείγματα αφήνονται για μερικά λεπτά να φτάσουν σε ισορροπία. Το MST καταγράφει την κίνηση των φθορίζοντων μορίων (LaM, RRM1 και LaM-RRM1) και τις αλλαγές σε αυτήν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του προσδέτη (pre-tRNA_{Arg}). Μετά το πέρας των μετρήσεων χρησιμοποιείται ειδικό λογισμικό για να παραχθεί από τις μετρήσεις μία καμπύλη δέσμευσης και να υπολογιστεί η σταθερά αποδέσμευσης (K_d) του κάθε συμπλόκου.

Γ.2.11. Παρασκευή της TEV (Tobacco Etch Virus)

Γ.2.11.i. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων *E.coli* BL21(DE3)pLysS με το ανασυνδυασμένο με την TEV (Tobacco Etch Virus) πλασμίδιο pRK793

Ο μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* BL21(DE3)pLysS με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με την TEV (Tobacco Etch Virus) πλασμίδιο pRK793, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την τεχνική που περιγράφεται στην παράγραφο Γ.2.2. Μια θετική αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων η οποία αναπτύχθηκε στο τρυβλίο επιλέγεται για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού υλικού LB.

Γ.2.11.ii. Υγρή καλλιέργεια για την έκφραση της TEV

Γ.2.11.ii.α. Προκαλλιέργεια

Σε πλαστικό σωλήνα των 50ml προστίθενται 15ml αποστειρωμένου LB, 15ml καναμυκίνης, 15μl χλωραμφενικόλης και εμβολιάζεται με μια αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων, η οποία αναπτύχθηκε στο τρυβλίο. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση σε 37°C και 180rpm για 12-16 ώρες.

Γ.2.11.ii.β. Υγρή καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό LB

Σε κωνική φιάλη των 2,5L με 1L LB προστίθενται 15ml προκαλλιέργειας, 1ml καναμυκίνης,(50mg/ml) και 1ml χλωραμφενικόλης (34 mg/ml). Τα κύτταρα επωάζονται σε 220rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD) να φτάσει περίπου στο 0,8. Τότε προστίθεται στην υγρή καλλιέργεια 0,5ml/L διαλύματος IPTG (1M) και τα κύτταρα επωάζονται σε 25°C και 180rpm για 5 ώρες.

Γ.2.11.ii.γ. Συλλογή των κυττάρων

Μετά την έκφραση της πρωτεΐνης, ακολουθεί η συλλογή των κυττάρων από την υγρή καλλιέργεια. Η καλλιέργεια μοιράζεται σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες των 250ml και φυγοκεντρείται για 20 λεπτά, σε 6.000rpm (4°C). Στη συνέχεια, απορρίπτεται το υπερκείμενο, τα κύτταρα συλλέγονται σε πλαστικό σωλήνα των 50ml και αποθηκεύονται στους -20°C.

Γ.2.11.ii.δ. Λύση των βακτηριακών κυττάρων μέσω εφαρμογής υπερήχων

Η λύση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται με την εφαρμογή υπερήχων σε ειδικό μηχάνημα (μηχάνημα υπερήχων για τη λύση των μεμβρανών των κυττάρων Sonicator Ultrasonic Processor-QSONICA, LLC). Αρχικά, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 25ml διαλύματος για τη λύση των κυττάρων (lysis buffer: 20mM Tris, 10mM ιμιδαζολίου, 150mM NaCl, pH8). Κατά τη διάρκεια εφαρμογής των υπερήχων ο πλαστικός σωλήνας που περιέχει τα κύτταρα βρίσκεται σε πάγο, ώστε να αποφεύγεται η αύξηση της θερμοκρασίας των κυττάρων. Στο μηχάνημα εφαρμογής υπερήχων πραγματοποιούνται οι παρακάτω ρυθμίσεις: Amplitude:80, Process Time:00:03:30 (3min και 30sec), Pulse On-Time:00:00:15 (15sec), Pulse Off-Time:00:02:30. Αμέσως μετά τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε 14.000g για 45min (4°C). Το υπερκείμενο διηθείται με φίλτρο σύριγγας με πόρους διαμέτρου 0,2μm.

Γ.2.11.ii.ε. Απομόνωση της πρωτεΐνης TEV με χρωματογραφία συγγένειας

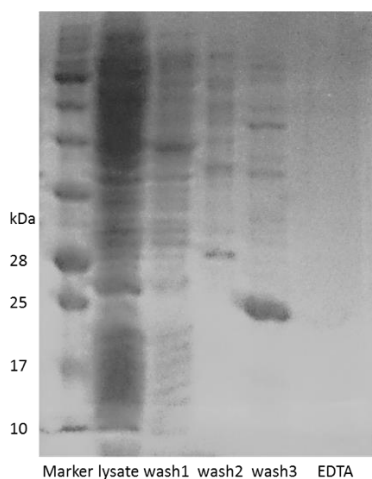
Η πρωτεάση TEV εκφράστηκε με ετικέτα 6 καταλοίπων ιστιδίνης (6xHis-tag) στο C-τελικό της άκρο. Επομένως, η πρώτη απομόνωση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με τη χρήση της στήλης His-Trap. Αρχικά, στη ρητίνη της στήλης ακινητοποιούνται δισθενή ιόντα ψευδαργύρου (Zn^{2+}) και στη συνέχεια εκπλένεται με 5CV (column volume-όγκοι στήλης) ddH₂O, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια ψευδαργύρου που δεν προσδέθηκε στη ρητίνη. Ακολουθεί η βαθμονόμηση της στήλης (calibration) με 5CV διαλύματος: 20mM Tris, 10mM ιμιδαζολίου, 150mM NaCl, pH8 και εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με χαμηλή ταχύτητα ροής. Κατόπιν, εισάγεται στη στήλη μια σειρά από διαλύματα σταδιακά αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου και συγκεκριμένα τα παρακάτω διαλύματα:

wash buffer 1: 20mM Tris, 10mM ιμιδαζολίου, 150mM NaCl, pH8 (45ml)

wash buffer 2: 20mM Tris, 50mM ιμιδαζολίου, 150mM NaCl, pH8 (40ml)

elution buffer 3: 20mM Tris, 330mM ιμιδαζολίου, 150mM NaCl, pH8 (45ml)

Τέλος, η στήλη εκπλένεται με EDTA (0,1mM) για την απομάκρυνση του ψευδαργύρου και στη συνέχεια εκπλένεται με άφθονο ddH₂O. Η στήλη αποθηκεύεται στους 4°C σε 20% αιθανόλη. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται στους 4°C.



Εικόνα 44: SDS-PAGE 17% που απεικονίζει την ποιότητα των κλασμάτων μετά τη χρωματογραφία συγγένειας. Η TEV εκκλύεται στα 330mM ιμιδαζολίου

Το κλάσμα που εκλούεται η TEV περιέχει περίπου 40ml. Χωρίζεται η ποσότητα αυτή σε δύο μέρη των 20ml και ακολουθεί αλλαγή διαλύματος για το καθένα από αυτά ξεχωριστά. Το διάλυμα αποθήκευσης της TEV είναι το: 20mM Tris, 150mM NaCl, 2mM DTT, 10% γλυκερόλη, pH8. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά φίλτρα συγκέντρωσης (amicon) των 10.000MWCO (Molecular Weight Cut-Off). Το δείγμα φυγοκεντρείται σε 3.700g και 4°C μέχρι να φτάσει περίπου στα 3ml και συμπληρώνεται ο όγκος του διαλύματος αποθήκευσης μέχρι τα 15ml. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Ακολουθεί η διαδικασία της διαπίδυσης, κατά την οποία σε μια μεμβράνη διαπίδυσης των 14.000MWCO προστίθεται το αρχικό διάλυμα της TEV (10ml). Το δείγμα τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 4L διαλύματος αποθήκευσης. Η αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος πραγματοποιείται υπό ολονύχτια ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C.

Ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της TEV με μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους Quawell UV-Vis Spectrometer Q5000. Η συγκέντρωση υπολογίστηκε στα 1,5mg/ml. Στη συνέχεια η TEV χωρίζεται σε ισόποσα κλάσματα του 1ml, τα οποία παγώνουν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80°C.

Γ.2.12. Παρασκευή της T7 RNA πολυμεράσης

Γ.2.12.i. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων *E.coli* BL21(DE3)pLysS με το ανασυνδυασμένο με την T7 RNA πολυμεράση

Ο μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* BL21(DE3)pLysS με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με την T7 RNA πολυμεράση, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την τεχνική που περιγράφεται στην παράγραφο Γ.2.2. Μια θετική αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων, η οποία αναπτύχθηκε στο τρυβλίο επιλέγεται για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού υλικού LB.

Γ.2.12.ii. Υγρή καλλιέργεια για την έκφραση της T7 RNA πολυμεράση

Γ.2.12.ii.α. Προκαλλιέργεια

Σε πλαστικό σωλήνα των 50ml προστίθενται 15ml αποστειρωμένου LB, 15μl αμπικιλίνης, 15μl χλωραμφενικόλης και εμβολιάζεται με μια αποικία

μετασχηματισμένων κυττάρων, η οποία αναπτύχθηκε στο τρυβλίο. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση σε 37°C και 180rpm για 12-16 ώρες.

Γ.2.12.ii.β. Υγρή καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό LB

Σε κωνική φιάλη των 2,5L με 1L LB προστίθενται 15ml προκαλλιέργειας, 1ml αμπικιλίνης, (100mg/ml) και 1ml χλωραμφενικόλης (34 mg/ml). Τα κύτταρα επωάζονται σε 220rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD) να φτάσει περίπου στο 0,7. Τότε προστίθεται στην υγρή καλλιέργεια 0,4ml/L διαλύματος IPTG (1M) και τα κύτταρα επωάζονται σε 37°C και 180rpm για 3 ώρες.

Γ.2.12.ii.γ. Συλλογή των κυττάρων

Μετά την έκφραση της πρωτεΐνης, ακολουθεί η συλλογή των κυττάρων από την υγρή καλλιέργεια. Η καλλιέργεια μοιράζεται σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες των 250ml και φυγοκεντρείται για 20 λεπτά, σε 6.000rpm (4°C). Στη συνέχεια, απορρίπτεται το υπερκείμενο, τα κύτταρα συλλέγονται σε πλαστικό σωλήνα των 50ml και αποθηκεύονται στους -20°C.

Γ.2.12.ii.δ. Λύση των βακτηριακών κυττάρων μέσω εφαρμογής υπερήχων

Η λύση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται με την εφαρμογή υπερήχων σε ειδικό μηχάνημα (μηχάνημα υπερήχων για τη λύση των μεμβρανών των κυττάρων Sonicator Ultrasonic Processor-QSONICA, LLC). Αρχικά, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 25ml διαλύματος για τη λύση των κυττάρων (lysis buffer: 50mM Na₂HPO₄, 10mM ιμιδαζολίου, 300mM NaCl, pH8). Κατά τη διάρκεια εφαρμογής των υπερήχων ο πλαστικός σωλήνας που περιέχει τα κύτταρα βρίσκεται σε πάγο, ώστε να αποφεύγεται η αύξηση της θερμοκρασίας των κυττάρων. Στο μηχάνημα εφαρμογής υπερήχων πραγματοποιούνται οι παρακάτω ρυθμίσεις: Amplitude:80, Process Time:00:03:30 (3min και 30sec), Pulse On-Time:00:00:15 (15sec), Pulse Off-Time:00:02:30. Αμέσως μετά τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε 14.000g για 45min (4°C). Το υπερκείμενο διηθείται με φίλτρο σύριγγας με πόρους διαμέτρου 0,2μm.

Γ.2.12.ii.ε. Απομόνωση της πρωτεΐνης T7 RNA πολυμεράση με χρωματογραφία συγγένειας

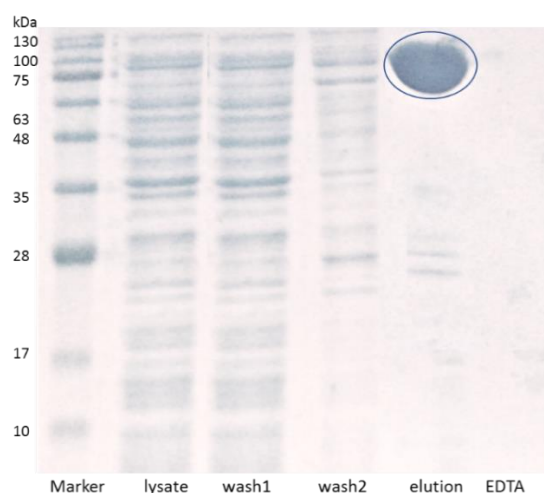
Η πρωτεΐνη T7 RNA πολυμεράση εκφράστηκε με ετικέτα 6 καταλοίπων ιστιδίνης (6xHis-tag) στο C-τελικό της άκρο. Επομένως, η πρώτη απομόνωση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με τη χρήση της στήλης His-Trap. Αρχικά, στη ρητίνη της στήλης ακινητοποιούνται δισθενή ιόντα ψευδαργύρου (Zn^{2+}) και στη συνέχεια εκπλένεται με 5CV (column volume-όγκοι στήλης) ddH₂O, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια ψευδαργύρου που δεν προσδέθηκε στη ρητίνη. Ακολουθεί η βαθμονόμηση της στήλης (calibration) με 5CV διαλύματος: 50mM Na₂HPO₄, 10mM ιμιδαζολίου, 300mM NaCl, pH8 και εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με χαμηλή ταχύτητα ροής. Κατόπιν, εισάγεται στη στήλη μια σειρά από διαλύματα σταδιακά αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου και συγκεκριμένα τα παρακάτω διαλύματα:

wash buffer 1: 50mM Na₂HPO₄, 10mM ιμιδαζολίου, 300mM NaCl, pH8 (45ml)

wash buffer 2: 50mM Na₂HPO₄, 50mM ιμιδαζολίου, 300mM NaCl, pH8 (40ml)

elution buffer 3: 50mM Na₂HPO₄, 500mM ιμιδαζολίου, 300mM NaCl, pH8 (20ml)

Τέλος, η στήλη εκπλένεται με EDTA (0,1mM) για την απομάκρυνση του ψευδαργύρου και στη συνέχεια εκπλένεται με άφθονο ddH₂O. Η στήλη αποθηκεύεται στους 4°C σε 20% αιθανόλη. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται στους 4°C.



Εικόνα 45: SDS-PAGE 17% που απεικονίζει την ποιότητα των κλασμάτων μετά τη χρωματογραφία συγγένειας. Η T7 RNA πολυμεράση εκκλύεται στα 500mM ιμιδαζολίου

Το κλάσμα που εκλούεται η T7 RNA πολυμεράση περιέχει περίπου 20ml. Ακολουθεί αλλαγή διαλύματος για το κλάσμα που περιέχει την T7 RNA πολυμεράση. Το διάλυμα αποθήκευσης της T7 RNA πολυμεράσης είναι το: 50mM Tris, 100mM NaCl, 1% β-mercaptoethanol, pH8.

Η αλλαγή του διαλύματος πραγματοποιείται με τη διαδικασία της διαπίδυσης, κατά την οποία σε μια μεμβράνη διαπίδυσης των 14.000MWCO προστίθεται το αρχικό διάλυμα της T7 RNA πολυμεράση (20ml). Το δείγμα τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 4L διαλύματος αποθήκευσης. Η αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος πραγματοποιείται υπό ολονύχτια ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C.

Ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της T7 RNA πολυμεράσης με μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους Quawell UV-Vis Spectrometer Q5000. Η συγκέντρωση υπολογίστηκε στα 2mg/ml. Στη συνέχεια, στα 20ml διαλύματος της T7 RNA πολυμεράσης προστίθενται και άλλα τόσα γλυκερόλης. Τέλος, η T7 RNA πολυμεράση αποθηκεύεται στους -20°C.

Ενότητα Δ
Πειραματικό Μέρος

Δ.1. Σχεδιασμός των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*

Πίνακας 2: Πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*

Πολυπεπτίδιο της πρωτεΐνης La	Αμινοξική ακολουθία
LaM (La Motif-91 aa)	MSEETSTQILKQVEYYFSDSNFPRDKFLRSEAAKNVDNYISIDVIASFNRMK TISTDLQLITEALKKSTRLQVSEDGKMVRRLDPLPENID
RRM1 (RNA Recognition Motif 1-99 aa)	GKTLYSKGWPEDTTIEKVQEFFNANGGYKVVSVRLRKKSDKSFKGSFLAD FETEEIVNKIITEAPKLGEKELIYQTFKQFSDEKKDEKEKFFASTNGDK
RRM2α (RNA Recognition Motif 2α-105 aa)	KDVKKEVEEEEVMIPGVILCFKGVGKGLHRGDIKEIFSQYGEVQFVGYN SDEENGSVRYKTAESCKRAIESLTETKKEIGGQIPTYNLLEGEEEKKEWEKIER K
LaM-RRM1 (191 aa)	MSEETSTQILKQVEYYFSDSNFPRDKFLRSEAAKNVDNYISIDVIASFNRMK TISTDLQLITEALKKSTRLQVSEDGKMVRRLDPLPENIDCGKTLYSKGWPE DTTIEKVQEFFNANGGYKVVSVRLRKKSDKSFKGSFLADFETEEIVNKIITE APKLGEKELIYQTFKQFSDEKKDEKEKFFASTNGDK
RRM1-RRM2α (226 aa)	GKTLYSKGWPEDTTIEKVQEFFNANGGYKVVSVRLRKKSDKSFKGSFLAD FETEEIVNKIITEAPKLGEKELIYQTFKQFSDEKKDEKEKFFASTNGDKKRRK AKKEADRENGDDDDNDGDNKDVKKEVEEEEVMIPGVILCFKGVGKGLHR GDIKEIFSQYGEVQFVGYN SDEENGSVRYKTAESCKRAIESLTETKKEIGGQ IPTYNLLEGEEEKKEWEKIERK
LaM- RRM1-RRM2α (318 aa)	MSEETSTQILKQVEYYFSDSNFPRDKFLRSEAAKNVDNYISIDVIASFNRMK TISTDLQLITEALKKSTRLQVSEDGKMVRRLDPLPENIDCGKTLYSKGWPE DTTIEKVQEFFNANGGYKVVSVRLRKKSDKSFKGSFLADFETEEIVNKIITEA PKLGEKELIYQTFKQFSDEKKDEKEKFFASTNGDKKRRKAKKEADRENGDD DDNDGDNKDVKKEVEEEEVMIPGVILCFKGVGKGLHRGDIKEIFSQYGEV QFVGYN SDEENGSVRYKTAESCKRAIESLTETKKEIGGQIPTYNLLEGEEEK KEWEKIERK
RRM2α-Cter (141 aa)	KDVKKEVEEEEVMIPGVILCFKGVGKGLHRGDIKEIFSQYGEVQFVGYN SDEENGSVRYKTAESCKRAIESLTETKKEIGGQIPTYNLLEGEEEKKEWEKIER KKNAAKNGGFKKGGFKKGGFKKGGFKKGGFNFKVKKE
RRM1-RRM2α-Cter (262 aa)	GKTLYSKGWPEDTTIEKVQEFFNANGGYKVVSVRLRKKSDKSFKGSFLAD FETEEIVNKIITEAPKLGEKELIYQTFKQFSDEKKDEKEKFFASTNGDKKRRK AKKEADRENGDDDDNDGDNKDVKKEVEEEEVMIPGVILCFKGVGKGLHR GDIKEIFSQYGEVQFVGYN SDEENGSVRYKTAESCKRAIESLTETKKEIGGQ IPTYNLLEGEEEKKEWEKIERKKNAAKNGGFKKGGFKKGGFKKGGFKKGG FNFKVKKE
La FL (354 aa)	MSEETSTQILKQVEYYFSDSNFPRDKFLRSEAAKNVDNYISIDVIASFNRMK TISTDLQLITEALKKSTRLQVSEDGKMVRRLDPLPENIDCGKTLYSKGWPE DTTIEKVQEFFNANGGYKVVSVRLRKKSDKSFKGSFLADFETEEIVNKIITEA PKLGEKELIYQTFKQFSDEKKDEKEKFFASTNGDKKRRKAKKEADRENGDD DDNDGDNKDVKKEVEEEEVMIPGVILCFKGVGKGLHRGDIKEIFSQYGEV QFVGYN SDEENGSVRYKTAESCKRAIESLTETKKEIGGQIPTYNLLEGEEEK KEWEKIERKKNAAKNGGFKKGGFKKGGFKKGGFKKGGFNFKVKKE

Δ.2. Έκφραση των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*

Δ.2.1. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων *E.coli* BL21(DE3)ROSETTA 2 με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Ο μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* BL21(DE3)ROSETTA 2 με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET.20b(+) με κάποιο από τα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης La πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την τεχνική που περιγράφεται στην παράγραφο Γ.2.2. Μια θετική αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων, η οποία αναπτύχθηκε στο τρυβλίο επιλέγεται για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού υλικού LB.

Δ.2.2. Υγρή καλλιέργεια για την έκφραση των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La

Δ.2.2.i. Προκαλλιέργεια

Σε πλαστικό σωλήνα των 50ml προστίθενται 10ml αποστειρωμένου LB, 10μl αμικικιλίνης, 10μl χλωραμφενικόλης και εμβολιάζεται με μια αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων, η οποία αναπτύχθηκε στο τρυβλίο. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση σε 37°C και 180rpm για 12-16 ώρες.

Δ.2.2.ii. Υγρή καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό 5XM9

Σε κωνική φιάλη των 2,5L με 0,5L 5XM9 προστίθενται 7ml προκαλλιέργειας, 1ml διαλύματος Q, 0,5ml διαλύματος MgSO₄ 1M, 1ml βιοτίνης-θειαμίνης (0,25mg/ml βιοτίνης και 0,25mg/ml θειαμίνης), 2g γλυκόζης, 0,5g NH₄Cl, 0,5ml αμικικιλίνης (0,1g/ml), και 0,5ml χλωραμφενικόλης (34 mg/ml). Τα κύτταρα επωάζονται σε 220rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD) να φτάσει περίπου στις τιμές 0,8. Τότε προστίθεται στην υγρή καλλιέργεια 0,5ml/L διαλύματος IPTG (1M) και τα κύτταρα επωάζονται σε 29°C και 180rpm για 16h (ολονύχτια επώαση). Σε περίπτωση έκφρασης του συγκεκριμένου πολυπεπτιδίου επισημασμένου με ¹⁵N ή/και ¹³C χρησιμοποιούνται επισημασμένες πηγές αζώτου ή/και άνθρακα δηλαδή ¹⁵NH₄Cl ή/και ¹³C-γλυκόζη, αντίστοιχα.

Δ.2.2.iii. Συλλογή των κυττάρων

Μετά την έκφραση της πρωτεΐνης, ακολουθεί η συλλογή των κυττάρων από την υγρή καλλιέργεια. Η καλλιέργεια μοιράζεται σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες των 250ml και φυγοκεντρείται για 20min, σε 6.000rpm (4°C). Στη συνέχεια, απορρίπτεται το υπερκείμενο, τα κύτταρα συλλέγονται σε πλαστικό σωλήνα των 50ml και αποθηκεύονται στους -20°C.

Δ.2.3. Λύση των βακτηριακών κυττάρων μέσω εφαρμογής υπερήχων

Η λύση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται με την εφαρμογή υπερήχων σε ειδικό μηχάνημα (μηχάνημα υπερήχων για τη λύση των μεμβρανών των κυττάρων Sonicator Ultrasonic Processor-QSONICA, LLC). Αρχικά, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 20ml διαλύματος για τη λύση των κυττάρων (lysis buffer: 20mM Na₂HPO₄, 10mM ιμιδαζολίου, 0,5M NaCl, pH8), στο οποίο προστίθενται μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Protease Inhibitor Cocktail). Κατά τη διάρκεια εφαρμογής των υπερήχων ο πλαστικός σωλήνας που περιέχει τα κύτταρα βρίσκεται σε πάγο, ώστε να αποφεύγεται η αύξηση της θερμοκρασίας των κυττάρων. Στο μηχάνημα εφαρμογής υπερήχων πραγματοποιούνται οι παρακάτω ρυθμίσεις: Amplitude:80, Process Time:00:03:30 (3min και 30sec), Pulse On-Time:00:00:15 (15sec), Pulse Off-Time:00:02:30. Αμέσως μετά τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε 14.000g για 45min (4°C). Το υπερκείμενο διηθείται με φίλτρο σύριγγας με πόρους διαμέτρου 0,2μm.

Δ.2.4. Απομόνωση των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου και με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

Τα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης La εκφράστηκαν με ετικέτα 6 καταλοίπων ιστιδίνης (6xHis-tag) στο C-τελικό της άκρο. Επομένως, η πρώτη απομόνωση των πρωτεϊνών αυτών πραγματοποιείται με τη χρήση της στήλης His-Trap. Αρχικά, στη ρητίνη της στήλης ακινητοποιούνται δισθενή ιόντα ψευδαργύρου (Zn²⁺) και στη συνέχεια εκπλένεται με 5CV (column volume-όγκοι στήλης) ddH₂O, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια ψευδαργύρου που δεν προσδέθηκε στη ρητίνη. Ακολουθεί

η βαθμονόμηση της στήλης (calibration) με 5CV διαλύματος: 20mM Na₂HPO₄, 10mM ιμιδαζολίου, 0,5M NaCl, pH8 και εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με χαμηλή ταχύτητα ροής. Κατόπιν, εισάγεται στη στήλη μια σειρά από διαλύματα σταδιακά αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου και συγκεκριμένα τα παρακάτω διαλύματα:

διάλυμα 1: 20mM Na₂HPO₄, 10mM ιμιδαζολίου, 0,5M NaCl, pH8 (45ml)

διάλυμα 2: 20mM Na₂HPO₄, 20mM ιμιδαζολίου, 0,5M NaCl, pH8 (40ml)

διάλυμα 3: 20mM Na₂HPO₄, 40mM ιμιδαζολίου, 0,5M NaCl, pH8 (40ml)

διάλυμα 4: 20mM Na₂HPO₄, 100mM ιμιδαζολίου, 0,5M NaCl, pH8 (30ml)

διάλυμα 5: 20mM Na₂HPO₄, 400mM ιμιδαζολίου, 0,5M NaCl, pH8 (40ml)

διάλυμα 5: EDTA 0.1M (25ml)

Τέλος, η στήλη εκπλένεται με άφθονο ddH₂O. Η στήλη αποθηκεύεται στους 4°C σε 20% αιθανόλη.

Η ανίχνευση των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων πραγματοποιείται σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE).

Τα κλάσματα στα οποία εκλούνται τα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης La συμπυκνώνονται με ειδικά φίλτρα συγκέντρωσης (amicon) των 3.000 και των 10.000MWCO (Molecular Weight Cut-Off). Η επιλογή του φίλτρου εξαρτάται από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης. Το δείγμα φυγοκεντρείται σε 3.700g και 4°C μέχρι να φτάσει περίπου στα 3ml και σε αυτά προστίθενται μέχρι τα 15ml διάλυμα 50mM KPi, pH 7. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Στη συνέχεια, με τον ίδιο τρόπο συμπυκνώνεται το διάλυμα αυτό σε 2ml και ακολουθεί η απομόνωση με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

Για την απομόνωση με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού επιλέχθηκαν οι στήλες μοριακής διήθησης Superose 12 10/300GL και Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare). Η επιλογή της στήλης γίνεται ανάλογα με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου που απομονώνεται. Η διαδικασία απομόνωσης που ακολουθείται είναι η ίδια και για τις δύο στήλες χρωματογραφίας. Αρχικά, η στήλη βαθμονομείται με διάλυμα KPi 50Mm, pH 7 και στη συνέχεια εισάγεται το δείγμα στη στήλη και ακολουθεί η έκλυση των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό βάρος τους. Με

ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων που αντιστοιχούν στην κορυφή για το κάθε πολυπεπίδιο της πρωτεΐνης La εντοπίζονται τα κλάσματα όπου το κάθε πολυπεπίδιο είναι καλύτερα απομονωμένο. Τα κλάσματα αυτά συμπυκνώνονται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω σε 500μl.

Δ.2.5. Προετοιμασία δειγμάτων

Στο NMR δείγμα για το κάθε πολυπεπίδιο της πρωτεΐνης La προστίθεται 2μl NaN_3 (1M), καθώς και 5μl μίγμα αναστολέων πρωτεασών. Η συγκέντρωση των δειγμάτων ήταν 0,8-1mM. Στις περιπτώσεις που κάποιο δείγμα προορίζεται για αλληλεπίδραση με RNA δεν προστίθεται μίγμα αναστολέων πρωτεασών και NaN_3 , ενώ οι συγκεντρώσεις ορίζονται από τη φύση του πειράματος. Όταν απαιτείται αραίωση του δείγματος, αυτή πραγματοποιείται με το διάλυμα KPi 50Mm, pH 7, που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

Δ.3. Σχεδιασμός των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La του *human*

Πίνακας 3: Πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης *human La*.

Πολυπεπτίδιο της πρωτεΐνης La	Αμινοξική ακολουθία
LaM (La Motif-103 aa)	MAENGDNKMAALEAKICHQIEYYFGDFNLPRDKFLKEQIKLDEGWVPLEI MIKFNRLNRLTTDFNVIVEALSKSKAELMEISEDKTKIRRSPLPEVTDE
RRM1 (RNA Recognition Motif 1-98 aa)	KNDVKNRSVYIKGFPTDATLDDIKEWLEDKGQVLNIQMRRTLHKAFKGSIF VVFDSIESAKKFVETPGQKYKETDLLILFKDDYFAKKNEERKQNKVE
RRM2α (RNA Recognition Motif 2α-110 aa)	SLEEKIGCLLKFSGLDDQTCREDLHILFSNHGEIKWIDFVRGAKEGIILFKE KAKEALGKAKDANNGNLQLRNKEVTWEVLEGEVEKEALKKIIEDQQESLN KWKSKGR
LaM-RRM1 (194 aa)	MAENGDNKMAALEAKICHQIEYYFGDFNLPRDKFLKEQIKLDEGWVPLEI MIKFNRLNRLTTDFNVIVEALSKSKAELMEISEDKTKIRRSPLPEVTDEY KNDVKNRSVYIKGFPTDATLDDIKEWLEDKGQVLNIQMRRTLHKAFKGSIF VVFDSIESAKKFVETPGQKYKETDLLILFKDDYFAKKNE
RRM1-RRM2α (230 aa)	KNDVKNRSVYIKGFPTDATLDDIKEWLEDKGQVLNIQMRRTLHKAFKGSIF VVFDSIESAKKFVETPGQKYKETDLLILFKDDYFAKKNEERKQNKVEAKLR AKQEQAQKLEEDAEMKSLEEKIGCLLKFSGLDDQTCREDLHILFSNHG EIKWIDFVRGAKEGIILFKEKAKEALGKAKDANNGNLQLRNKEVTWEVLE GEVEKEALKKIIEDQQESLNKWKSKGR
LaM- RRM1-RRM2α (334 aa)	MAENGDNKMAALEAKICHQIEYYFGDFNLPRDKFLKEQIKLDEGWVPLEI MIKFNRLNRLTTDFNVIVEALSKSKAELMEISEDKTKIRRSPLPEVTDEY KNDVKNRSVYIKGFPTDATLDDIKEWLEDKGQVLNIQMRRTLHKAFKGSIF VVFDSIESAKKFVETPGQKYKETDLLILFKDDYFAKKNEERKQNKVEAKLR AKQEQAQKLEEDAEMKSLEEKIGCLLKFSGLDDQTCREDLHILFSNHG EIKWIDFVRGAKEGIILFKEKAKEALGKAKDANNGNLQLRNKEVTWEVLE GEVEKEALKKIIEDQQESLNKWKSKGR
La FL (408 aa)	MAENGDNKMAALEAKICHQIEYYFGDFNLPRDKFLKEQIKLDEGWVPLEI MIKFNRLNRLTTDFNVIVEALSKSKAELMEISEDKTKIRRSPLPEVTDEY KNDVKNRSVYIKGFPTDATLDDIKEWLEDKGQVLNIQMRRTLHKAFKGSIF VVFDSIESAKKFVETPGQKYKETDLLILFKDDYFAKKNEERKQNKVEAKLR AKQEQAQKLEEDAEMKSLEEKIGCLLKFSGLDDQTCREDLHILFSNHG EIKWIDFVRGAKEGIILFKEKAKEALGKAKDANNGNLQLRNKEVTWEVLE GEVEKEALKKIIEDQQESLNKWKSKGRRFKGKGKGNKAAQPGSGKGKVQ FQGKKTGFASDDEHDEHDENGATGPVKRAREETDKEEPASKQKTENGA GDQ

Δ.3.1. Ενίσχυση των τμημάτων DNA για τα πολυπεπτίδια της *human La*

Για την ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης *human La* χρησιμοποιείται ως μήτρα το βελτιστοποιημένο γονίδιο ολόκληρης της πρωτεΐνης *human La*, το οποίο αποθηκεύεται στο πλασμιδιακό φορέα pUC57. Το γονίδιο αυτό βελτιστοποιήθηκε ως προς διάφορους παράγοντες που αφορούν στην έκφραση και τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Οι εκκινητές (primer) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων DNA που αντιστοιχούν στα πολυπεπτίδια της *human La* παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4: Εκκινητές (primer) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων DNA που αντιστοιχούν στα πολυπεπτίδια της *human La*. Με κόκκινο χρωματίζονται τα νουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στις επιθυμητές θέσεις πέψης από τα περιοριστικά ένζυμα *NdeI* και *XhoI*.

Εκκινητής	Αλληλουχία 5'-3'	Tm
For hmLaM	GGAATTCCATATGATGGCGGAAAACGGCG	62,9°C
Rev hmLaM	CGGCTCGAGTTCGTCGGTCACTTCC	64,2 °C
For hmRRM1	GGAATTCCATATGAAAAACGATGTGAAGAACCGTAGC	63,3°C
Rev hmRRM1	CGGCTCGAGTTCACCTTGTCTGTCTTACG	64,4 °C
Rev hm194 (LaM-RRM1)	CGGCTCGAGCTCGTTTTTCTTCGC	60,8 °C
For hmRRM2	GGAATTCCATATGAGCCTGGAGGAAAAGATCG	63,1°C
Rev hmRRM2	CGGCTCGAGACGGCCTTTGCTCTTC	64,2°C

Συγκεκριμένα, για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου για το πολυπεπτίδιο hLaM χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών «For hmLaM» και «Rev hmLaM», για το hRRM1 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών «For hmRRM1» και «Rev hmRRM1» και για το hRRM2α το ζεύγος «For hmRRM2» και «Rev hmRRM2». Για το γονίδιο που αντιστοιχεί στο hLaM-RRM1 χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθιος εκκινητής (forward) ο «For hmLaM» και ως ανάστροφος (reverse) ο «Rev hm194». Αντίστοιχα, για το γονίδιο που κωδικοποιεί το πολυπεπτίδιο hRRM1-RRM2α χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθιος εκκινητής ο «For hmRRM1» και ως ανάστροφος ο «Rev hmRRM2», ενώ για το γονίδιο του hLaM-RRM1-RRM2α αντιστοιχούν οι εκκινητές «For hmLaM» και

«Rev hmRRM2». Τα τμήματα DNA μετά τον πολλαπλασιασμό του με αντίδραση PCR φέρουν στο 5' άκρο τους αλληλουχία για την αναγνώριση και την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο NdeI και στο 3' άκρο τους για το XhoI. Οι αλληλουχίες αυτές εισάγονται στο τμήμα του DNA μέσω των εκκινητών.

Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιείται το έτοιμο μίγμα KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystems). Το μίγμα αυτό περιέχει Taq DNA-πολυμεράση (0,5U στα 25μl της αντίδρασης), dNTPs (0,2Mm από το καθένα), MgCl (1,5Mm στα 25μl της αντίδρασης) και το ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο είναι απαραίτητο για τη δράση της πολυμεράσης. Σε αυτό προστίθενται οι εκκινητές και το cDNA-μήτρα για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος DNA. Οι συγκεντρώσεις του κάθε αντιδραστήριου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5: Αντίδραση PCR

Αντιδραστήριο	Όγκος
αποστειρωμένο ddH ₂ O	8μl
2x KAPA Taq ReadyMix	12,5μl
10μM πρόσθιου εκκινητή	1,25μl
10μM ανάστροφου εκκινητή	1,25μl
cDNA	2μl
Συνολικός όγκος	25μl

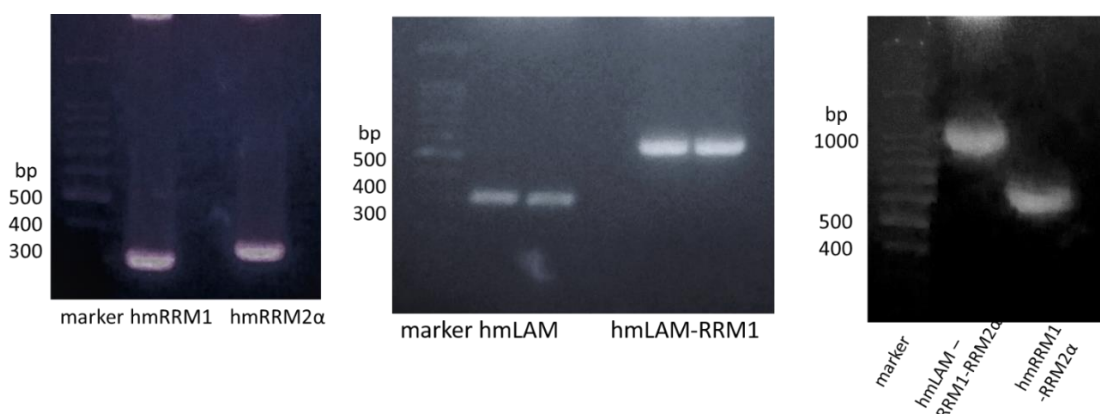
Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή (MyCycler, Biorad), τα στάδια της οποίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6: Στάδια της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων DNA των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης human La.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94°C	5min	1
Αποδιάταξη	94°C	30sec	30

Υβριδοποίηση	50°C	45sec	
Επιμήκυνση	68°C	1min	
Τελική επιμήκυνση	68°C	10min	1
Συντήρηση	10 °C	∞	-

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR για το κάθε πολυπεπτίδιο της πρωτεΐνης *human La* ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 1,8% (Εικόνα 46). Ταυτόχρονα, με την παρουσία μάρτυρα μοριακού βάρους ελέγχεται το μέγεθος του κάθε τμήματος DNA (και αντιστοιχίζεται στο τμήμα DNA-στόχος).



Εικόνα 46: Τμήματα DNA που αντιστοιχούν σε καθένα από τα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης *human La* μετά την αντίδρασή PCR σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 1,8%.

Η ζώνη που αντιστοιχεί στο τμήμα DNA-στόχος αποκόπτεται και εξάγεται με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο περιττός όγκος της πηκτής. Το DNA απομονώνεται με τη χρήση του Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του πρωτοκόλλου και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Το ένθετο DNA εκλύεται με 50μl αποστειρωμένου ddH₂O.

Δ.3.2. Πέψη του ένθετου DNA και του πλασμιδιακού φορέα pET.20b(+) με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιούνται για την πέψη του πλασμιδιακού DNA και του ένθετου DNA είναι τα NdeI και XhoI (Takara). Το DNA επωάζεται με το κάθε ένζυμο σε αναλογία 2U (Unit-ενζυμική μονάδα)/μg DNA.



Εικόνα 47: Οι αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζουν και η θέση κοπής των περιοριστικών ενζύμων NdeI και XhoI.

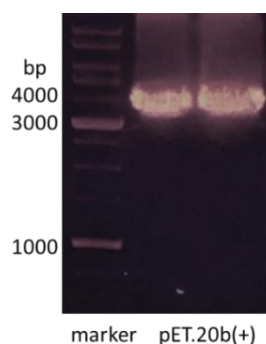
Η κάθε αντίδραση επωάζεται για περίπου 3h σε 37°C σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Αρχικά, πραγματοποιείται η αντίδραση πέψης για το NdeI, όπως περιγράφεται παρακάτω:

ένθετο DNA	50μl	pET.20b(+)	30μl
buffer H 10x	5,8μl	buffer H 10x	3,6μl
NdeI	2μl	NdeI	2μl
συνολικός όγκος	57,8μl	συνολικός όγκος	35,6μl

Επώαση για 2h σε 37°C.

Το ένθετο DNA μετά την πέψη του με το NdeI απομονώνεται με τη χρήση του PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του πρωτοκόλλου και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Το ένθετο DNA εκλύεται με 50μl αποστειρωμένου ddH₂O.

Για τον έλεγχο της αντίδρασης της πέψης του πλασμιδιακού DNA και την απομόνωση των προϊόντων, τα τελευταία ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 0,9% (Εικόνα 48).



Εικόνα 48: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 0,9%, στην οποία απεικονίζονται το γραμμικό πλασμιδιακό DNA μετά την πέψη του με NdeI.

Οι ζώνες που αντιστοιχούν στο γραμμικό πλασμιδιακό DNA μετά την πέψη του με NdeI αποκόπτεται και εξάγεται με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο περιττός όγκος της πηκτής. Το DNA απομονώνεται με τη χρήση του Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), ακολουθώντας πιστά τις οδηγίες του πρωτοκόλλου και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Το ένθετο DNA εκλούεται με 50μl αποστειρωμένου ddH₂O.

Ακολουθεί η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο XhoI του γραμμικού πλασμιδιακού DNA και του ένθετου DNA, όπως περιγράφεται παρακάτω:

ένθετο DNA	50μl	pET.20b(+)	50μl
buffer H 10x	5,8μl	buffer H 10x	5,8μl
XhoI	2μl	XhoI	2μl
συνολικός όγκος	57,8μl	συνολικός όγκος	57,8μl

Επώαση για 2h σε 37°C.

Το ένθετο και το πλασμιδιακό DNA μετά την πέψη του με το XhoI απομονώνεται με τη χρήση του PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες του πρωτοκόλλου και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Το ένθετο DNA και το γραμμικό πλασμιδιακό DNA (pET.20b(+)) εκλούνται με 50μl αποστειρωμένου ddH₂O. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση του κάθε DNA υπολογίζεται με φωτομέτρηση στο Φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους Quawell UV-Vis Spectrometer Q5000.

Δ.3.3. Συνένωση του ένθετου DNA και του πλασμιδιακού φορέα pET.20b(+)

Για τη συνένωση του ένθετου και του γραμμικού πλασμιδιακού φορέα pET.20b(+) μετά από την πέψη τους με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI, χρησιμοποιήθηκε το Quick Ligation Kit (NEB). Στην αντίδραση διατηρείται η αναλογία πλασμιδιακού DNA:ένθετο DNA 1:3-1:5. Σε κάθε αντίδραση προστίθεται περίπου 100ng πλασμιδιακού DNA και 300ng ένθετου DNA, όπως περιγράφεται παρακάτω:

ένθετο DNA (300ng)	6μl
pET.20b(+) (100ng)	3μl
Quick Ligation Reaction Buffer: 2x	10μl
Quick T4 DNA Ligase	1μl
συνολικός όγκος	20μl

Ακολουθεί επώαση της αντίδρασης για 5min σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Κατόπιν, κύτταρα *DH5α* μετασχηματίζονται με το νέο κλειστό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, όπως περιγράφεται στην ενότητα Γ.2.2.

Δ.3.4. Πολλαπλασιασμός και επιλογή του ορθού ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pET.20b(+) με το ένθετο DNA

Από το τρυβλίο, στο οποίο αναπτύσσονται τα μετασχηματισμένα κύτταρα *DH5α* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο επιλέγονται 3 μονήρης αποικίες. Καθεμιά από τις αποικίες αυτές αναπτύσσεται σε θρεπτικό υλικό LB παρουσία του αντιβιοτικού αμικικιλίνης. Δηλαδή, σε πλαστικό σωλήνα των 50ml προστίθενται 10ml αποστειρωμένου LB, 10μl αμικικιλίνης, και το θρεπτικό υλικό εμβολιάζεται με μια αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση σε 37°C και 180rpm για 12-16 ώρες και συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση σε 5.000rpm για 10min. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πραγματοποιείται με τη χρήση του QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) ακολουθώντας πιστά τις οδηγίες του πρωτοκόλλου και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται

στις αντιδράσεις αυτές. Ακολουθεί η αλληλούχιση των πλασμιδίων που απομονώνονται, ώστε να διαπιστωθεί αν ο ανασυνδυασμός τους είναι επιτυχής.

Δ.4. Έκφραση, απομόνωση και προετοιμασία των δειγμάτων των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης *human La*

Ο μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων *E.coli BL21(DE3)ROSETTA 2* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET.20b(+) με κάποιο από τα πολυπεπίδια της πρωτεΐνης *La* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την τεχνική που περιγράφεται στην παράγραφο Γ.2.2. Μια θετική αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων, η οποία αναπτύχθηκε στο τρυβλίο επιλέγεται για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού υλικού LB. Κατόπιν, για την έκφραση, την απομόνωση και την προετοιμασία των δειγμάτων των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης *human La* ακολουθούνται τα αντίστοιχα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πολυπεπίδια τη πρωτεΐνης *La* του *Dictyostelium discoideum*.

Δ.5. Σχεδιασμός και κλωνοποίηση γονιδίων για τα πολυπεπίδια RRM1 και RRM2α που προορίζονται για συνένωση μέσω της τεχνικής της τμηματικής επισήμανσης

Για την εφαρμογή της μεθόδου της τμηματικής επισήμανσης στο πολυπεπίδιο RRM1-RRM2α της πρωτεΐνης *La* του *Dictyostelium discoideum* σχεδιάστηκαν τα πολυπεπίδια RRM1, RRM2α, linker-RRM2α (l-RRM2α), RRM2α C233A C278A (RRM2αCC) και linker-RRM2α C233A C278A (l-RRM2αCC). Η αλληλουχία των πολυπεπτιδίων RRM1 και RRM2α αναφέρεται στον πίνακα 2. Η επιπλέον αλληλουχία του συνδέτη μεταξύ των δύο επικρατειών, η οποία σχεδιάστηκε να συνεκφάζεται σε κάποιες περιπτώσεις με το RRM2α είναι η εξής:

linker: KRKAKKEADRENGDDDDNDGDN

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν γονίδια στα οποία πραγματοποιήθηκαν μεταλλάξεις των αμινοξέων C233A και C278A. Με αυτά τα τμήματα DNA ανασυνδυάστηκαν τα

πλασμίδια pEM9B και pEM5B, ειδικά τροποποιημένοι φορείς που χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη τεχνική.

Δ.5.1. Ενίσχυση των τμημάτων DNA για τα πολυπεπίδια της *human* La

Για την ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα παραπάνω πολυπεπίδια της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* χρησιμοποιείται ως μήτρα το ανασυνδυασμένο με το τμήμα DNA για το πολυπεπίδιο RRM1-RRM2α πλασμίδιο pET.20b(+). Οι εκκινητές (primer) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων DNA που αντιστοιχούν στα πολυπεπίδια αυτά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7: Εκκινητές (primer) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων DNA που αντιστοιχούν στα πολυπεπίδια RRM1, RRM2α και IRRM2α. Με κόκκινο χρωματίζονται τα νουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στις επιθυμητές θέσεις πέψης από τα περιοριστικά ένζυμα NdeI, SspI, BamHI και XhoI.

Εκκινητής	Αλληλουχία 5'-3'	Tm
For RRM1seglab	GGAATTCCATATGGGTAAAACATTATATAGC	56,4°C
Rev RRM1seglab	TATATAGCTCTTCTGCACATTTTATCGCCATTTG	59,6 °C
For RRM2 seglab	CACCTCGAGAACCTGTACTTCCAGTGCAAAGATGTA AAAAAAGAAG	67,2°C
Rev RRM2seglab	GTGGGATCCTTATTTTCTTTCAATGAT	53,7 °C
For RRM2+link segl	CACCTCGAGAACCTGTACTTCCAGTGCAAGAGAAAA GCTAAGA	68,3 °C

Συγκεκριμένα, για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου για το πολυπεπίδιο RRM1 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών «For RRM1seglab» και «Rev RRM1seglab», για το RRM2α και το RRM2αCC χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών «For RRM2 seglab» και «Rev RRM2 seglab». Για το γονίδιο που αντιστοιχεί στο I-RRM2α και το I-RRM2αCC χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθιος εκκινητής (forward) ο «For RRM2+link segl» και ως ανάστροφος (reverse) ο «Rev RRM2 seglab».

Τα τμήματα DNA για το RRM1 μετά τον πολλαπλασιασμό του με αντίδραση PCR φέρουν στο 5' άκρο τους αλληλουχία για την αναγνώριση και την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο NdeI και στο 3' άκρο τους για το SapI. Οι αλληλουχίες αυτές εισάγονται στο τμήμα του DNA μέσω των εκκινητών. Τα τμήματα DNA για το RRM2α (για όλα τα παραγόμενα γονίδια για τα πολυπεπίδια του RRM2α) μετά τον πολλαπλασιασμό του με αντίδραση PCR φέρουν στο 5' άκρο τους αλληλουχία για την αναγνώριση και την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο XhoI, την περιοχή αναγνώρισης και πέψης από το ένζυμο TEV (AACCTGTACTTCCAG) και την αλληλουχία του κωδικονίου μιας κυστεΐνης (TGC). Πρόκειται για την επιπλέον κυστεΐνη που εκφράζεται στο N-τελικό άκρο του δευτέρου πολυπεπτιδίου που συνενώνεται κατά την εφαρμογή της τεχνικής της τμηματικής επισήμανσης. Στο 3' άκρο τους τα τμήματα DNA για το RRM2α φέρουν αλληλουχία για την αναγνώριση και την πέψη τους από το περιοριστικό ένζυμο BamHI. Οι αλληλουχίες αυτές εισάγονται στο τμήμα του DNA μέσω των εκκινητών.

Η αντίδραση PCR περιγράφεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 8: Αντίδραση PCR

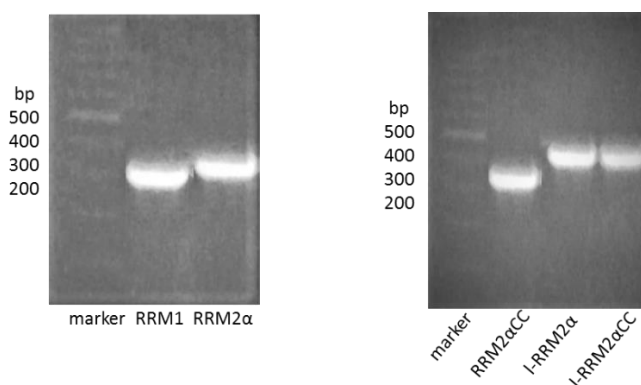
Αντιδραστήριο	Όγκος
dNTPmix	1,5μl
MgSO ₄ (50Mm)	1μl
10Mμ πρόσθιου εκκινητή	1,5μl
10Mμ ανάστροφου εκκινητή	1,5μl
cDNA	2μl
10x Pfx Amplification buffer	5μl
Platinum Pfx DNA polymerase	0,5μl
αποστειρωμένο ddH ₂ O	37μl
Συνολικός όγκος	50μl

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή (MyCycler, Biorad, ETH), τα στάδια της οποίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9: Στάδια της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων DNA που αντιστοιχούν στα πολυπεπτίδια RRM1, RRM2α και I-RRM2α.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94°C	5min	1
Αποδιάταξη	94°C	30sec	30
Υβριδοποίηση	50°C	45sec	
Επιμήκυνση	68°C	1min	
Τελική επιμήκυνση	68°C	10min	1
Συντήρηση	10 °C	∞	-

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR για το κάθε πολυπεπτίδιο που αντιστοιχεί στα RRM1, RRM2α και I-RRM2α, ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 1,8% (Εικόνα 49). Ταυτόχρονα, με την παρουσία μάρτυρα μοριακού βάρους ελέγχεται το μέγεθος του κάθε τμήματος DNA (και αντιστοιχίζεται στο τμήμα DNA-στόχος).



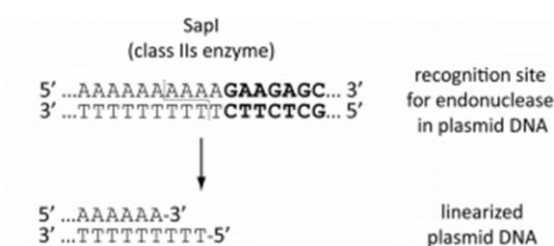
Εικόνα 49: Τμήματα DNA που αντιστοιχούν σε καθένα από τα πολυπεπτίδια RRM1, RRM2α, RRM2αCC, I-RRM2α και I-RRM2αCC της πρωτεΐνης La μετά την αντίδρασή PCR σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 1,8%.

Η ζώνη που αντιστοιχεί στο τμήμα DNA-στόχος αποκόπτεται και εξάγεται με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο περιττός όγκος της πηκτής. Το DNA απομονώνεται με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), ακολουθώντας τις οδηγίες που δίνονται και χρησιμοποιώντας τα

κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Το ένθετο DNA εκλούεται με 50μl αποστειρωμένου ddH₂O.

Δ.5.2. Πέψη του ένθετου DNA για το RRM1 και του πλασμιδιακού φορέα pEM9B με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και SapI

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιούνται για την πέψη του πλασμιδιακού DNA και του ένθετου DNA είναι τα NdeI και SapI (NEB). Το DNA επωάζεται με το κάθε ένζυμο σε αναλογία 2U (Unit-ενζυμική μονάδα)/μg DNA.



Εικόνα 50: Οι αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζουν και η θέση κοπής του περιοριστικού ενζύμου SapI.

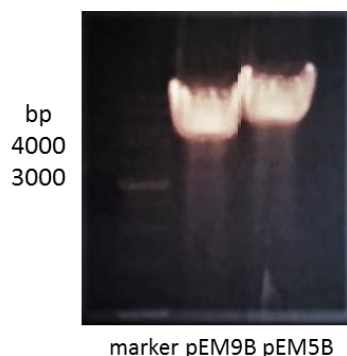
Η κάθε αντίδραση επωάζεται για περίπου 2h σε 37°C σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Αρχικά, πραγματοποιείται η αντίδραση πέψης για το NdeI, όπως περιγράφεται παρακάτω:

ένθετο DNA	50μl	pEM9B	30μl
buffer 10x cutsmart	5,8μl	buffer 10x cutsmart	3,6μl
NdeI	2μl	NdeI	2μl
συνολικός όγκος	57,8μl	συνολικός όγκος	35,6μl

Επώαση για 2h σε 37°C.

Το ένθετο DNA μετά την πέψη του με το NdeI απομονώνεται με τη χρήση του PureLink™ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), ακολουθώντας τις οδηγίες που δίνονται και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Το ένθετο DNA εκλούεται με 50μl αποστειρωμένου ddH₂O.

Για τον έλεγχο της αντίδρασης της πέψης του πλασμιδιακού DNA και την απομόνωση των προϊόντων, τα τελευταία ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 0,9% (Εικόνα 51).



Εικόνα 51: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 0,9% στην οποία απεικονίζονται το γραμμικό πλασμιδιακό DNA μετά την πέψη του με NdeI.

Οι ζώνες που αντιστοιχούν στο γραμμικό πλασμιδιακό DNA μετά την πέψη του με NdeI αποκόπτεται και εξάγεται με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο περιττός όγκος της πηκτής. Το DNA απομονώνεται με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), ακολουθώντας το πρωτόκολλο που δίνεται και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Το ένθετο DNA εκλούεται με 50μl αποστειρωμένου ddH₂O.

Ακολουθεί η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο SapI του γραμμικού πλασμιδιακού DNA και του ένθετου DNA, όπως περιγράφεται παρακάτω:

ένθετο DNA	50μl	pEM9B	50μl
buffer 10x cutsmart	5,8μl	buffer 10x cutsmart	5,8μl
SapI	2μl	SapI	2μl
συνολικός όγκος	57,8μl	συνολικός όγκος	57,8μl

Επώαση για 2h σε 37°C.

Το ένθετο και το πλασμιδιακό DNA μετά την πέψη του με το SapI απομονώνεται με τη χρήση του QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), ακολουθώντας τις οδηγίες που δίνονται και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα

που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Το ένθετο DNA και το γραμμικό πλασμιδιακό DNA (pEM9B) εκλούεται με 50μl αποστειρωμένου ddH₂O. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση του κάθε DNA υπολογίζεται με φωτομέτρηση στο Φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους Quawell UV-Vis Spectrometer Q5000.

Δ.5.3. Συνένωση του ένθετου DNA και του πλασμιδιακού φορέα pEM9B

Για τη συνένωση του ένθετου και του γραμμικού πλασμιδιακού φορέα pEM9B μετά από την πέψη τους με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI, χρησιμοποιήθηκε το Quick Ligation Kit (NEB). Στην αντίδραση διατηρείται η αναλογία πλασμιδιακού DNA:ένθετο DNA 1:3-1:5. Σε κάθε αντίδραση προστίθεται περίπου 100ng πλασμιδιακού DNA και 300ng ένθετου DNA, όπως περιγράφεται παρακάτω:

ένθετο DNA RRM1 (300ng)	6μl
pEM9B (100ng)	3μl
Quick Ligation Reaction Buffer: 2x	10μl
Quick T4 DNA Ligase	1μl
συνολικός όγκος	20μl

Ακολουθεί επώαση της αντίδρασης για 5min σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Κατόπιν, κύτταρα *DH5α* μετασχηματίζονται με το νέο κλειστό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, όπως περιγράφεται στην ενότητα Γ.2.2.

Δ.5.4. Πολλαπλασιασμός και επιλογή του ορθού ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pEM9B με το ένθετο DNA

Από το τρυβλίο, στο οποίο αναπτύσσονται τα μετασχηματισμένα κύτταρα *DH5α* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο επιλέγονται 3 μονήρης αποικίες. Καθεμιά από τις αποικίες αυτές αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό LB παρουσία του αντιβιοτικού καρβενικιλίνη. Δηλαδή, σε πλαστικό σωλήνα των 50ml προστίθενται 10ml

αποστειρωμένου LB, 10μl καρβενικιλίνης, και το θρεπτικό υλικό εμβολιάζεται με μια αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση σε 37°C και 180rpm για 12-16 ώρες και συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρωση σε 5.000rpm για 10min. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πραγματοποιείται με τη χρήση του QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) ακολουθώντας πιστά τις οδηγίες και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Ακολουθεί η αλληλούχιση των πλασμιδίων που απομονώνονται, ώστε να διαπιστωθεί αν ο ανασυνδυασμός τους είναι επιτυχής.

Δ.5.5. Πέψη του ένθετου DNA για το RRM2α, 1-RRM2α, RRM2αCC, 1-RRM2αCC και του πλασμιδιακού φορέα pEM5B με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και BamHI

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιούνται για την πέψη του πλασμιδιακού DNA και του ένθετου DNA είναι τα XhoI και BamHI (NEB). Το DNA επωάζεται με το κάθε ένζυμο σε αναλογία 2U (Unit-ενζυμική μονάδα)/μg DNA.



Εικόνα 52: Οι αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζει και η θέση κοπής του περιοριστικού ενζύμου BamHI.

Η κάθε αντίδραση επωάζεται για περίπου 2h σε 37°C σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η αντίδραση πέψης περιγράφεται παρακάτω:

ένθετο DNA	50μl	pEM5B	30μl
buffer 10x cutsmart	5,9μl	buffer 10x cutsmart	3,6μl
BamHI	1,5μl	BamHI	1,5μl
XhoI	1,5μl	XhoI	1,5μl
συνολικός όγκος	58,9μl	συνολικός όγκος	36,6μl

Επώαση για 2h σε 37°C.

Το ένθετο DNA μετά την πέψη του με τα XhoI και BamHI απομονώνεται με τη χρήση του PureLink™ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), ακολουθώντας τις οδηγίες που δίνονται και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Το ένθετο DNA εκλούεται με 50μl αποστειρωμένου ddH₂O. Για τον έλεγχο της αντίδρασης της πέψης του πλασμιδιακού DNA και την απομόνωση των προϊόντων, τα τελευταία ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 0,9%.

Οι ζώνες που αντιστοιχούν στο γραμμικό πλασμιδιακό DNA μετά την πέψη του με τα XhoI και BamHI αποκόπτεται και εξάγεται με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο περιττός όγκος της πηκτής. Το DNA απομονώνεται με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), ακολουθώντας τις οδηγίες που δίνονται και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Το ένθετο DNA εκλούεται με 50μl αποστειρωμένου ddH₂O. Το ένθετο DNA και το γραμμικό πλασμιδιακό DNA (pEM9B) εκλούεται με 50μl αποστειρωμένου ddH₂O. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση του κάθε DNA υπολογίζεται με φωτομέτρηση στο Φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους Quawell UV-Vis Spectrometer Q5000.

Δ.5.6. Συνένωση του ένθετου DNA και του πλασμιδιακού φορέα pEM5B

Για τη συνένωση του ένθετου και του γραμμικού πλασμιδιακού φορέα pEM5B μετά από την πέψη τους με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και BamHI, χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA λιγάση (Invitrogen) Στην αντίδραση διατηρείται η αναλογία πλασμιδιακού DNA:ένθετο DNA 1:3-1:5. Σε κάθε αντίδραση προστίθεται περίπου 100ng πλασμιδιακού DNA και 300ng ένθετου DNA, όπως περιγράφεται παρακάτω:

ένθετο DNA (61,4ng/ μl)	30μl
pEM5B (7,7ng/ μl)	35μl
T4 DNA Ligase Buffer: 10x	7,3μl
T4 DNA Ligase	1μl
συνολικός όγκος	73,3μl

Ακολουθεί επώαση της αντίδρασης για 16h σε θερμοκρασία 16°C. Κατόπιν, κύτταρα *DH5α* μετασχηματίζονται με το νέο κλειστό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Γ.2.2.

Δ.5.7. Πολλαπλασιασμός και επιλογή του ορθού ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pEM5B με το ένθετο DNA

Από το τρυβλίο, στο οποίο αναπτύσσονται τα μετασχηματισμένα κύτταρα *DH5α* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο επιλέγονται 6 μονήρης αποικίες. Καθεμιά από τις αποικίες αυτές αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό LB παρουσία του αντιβιοτικού καρβενικιλίνη. Δηλαδή, σε πλαστικό σωλήνα των 50ml προστίθενται 10ml αποστειρωμένου LB, 10μl καρβενικιλίνης, και το θρεπτικό υλικό εμβολιάζεται με μια αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση σε 37°C και 180rpm για 12-16 ώρες και συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση σε 5.000rpm για 10min. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πραγματοποιείται με τη χρήση του QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) ακολουθώντας τις οδηγίες που δίνονται και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Ακολουθεί η αλληλούχιση των πλασμιδίων που απομονώνονται, ώστε να διαπιστωθεί αν ο ανασυνδυασμός τους είναι επιτυχής.

Δ.6. Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των Cys233 και Cys278

Δ.6.1 Σχεδιασμός των εκκινήτων και εκτέλεση της PCR

Για την μετάλλαξη των αμινοξικών καταλοίπων C233A και C278A σχεδιάστηκαν οι εκκινήτες που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Η Cys233 κωδικοποιείται με τη τριπλέτα TGT του αγρίου τύπου DNA της πρωτεΐνης και μεταλλάσσεται σε αλανίνη με την τριπλέτα GCT. Η Cys278 κωδικοποιείται με τη τριπλέτα TGC του αγρίου τύπου DNA της πρωτεΐνης και μεταλλάσσεται σε αλανίνη με την τριπλέτα GCC.

Πίνακας 10: Εκκινητές (primer) που χρησιμοποιήθηκαν για τις μεταλλάξεις C233A και C278A. Με κόκκινο χρωματίζονται τα νουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στις τριπλέτες που κωδικοποιούν το αμινοξύ αλλανίνη που παίρνει τη θέση των κυστεϊνών.

Εκκινητής	Αλληλουχία 5'-3'	Tm
For C233A (RRM2)	CCAGGTGTTATCTTAGCTTTCAAAGGTGTTGG	61,9°C
Rev C233A (RRM2)	ACCAACACCTTTGAAAGCTAAGATAACACCTGG	61,9°C
For C278A (RRM2)	AAAACCGCTGAATCTGCCAAACGTGCCATAGAA	63,2°C
Rev C278A (RRM2)	TTCTATGGCACGTTTGGCAGATTCAGCGGTTTT	63,2°C

Αρχικά, πραγματοποιείται η πρώτη μετάλλαξη C233A στα γονίδια που κωδικοποιούν τα πολυπεπτίδια RRM2α και I-RRM2α σε πλασμιδιακό φορέα pEM5B. Αφού πραγματοποιηθεί η αλληλούχιση του γονιδίου και ελεγχθεί αν η μετάλλαξη ήταν επιτυχής, εφαρμόζεται η ίδια διαδικασία για τη μετάλλαξη της C278A. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιείται η PfuTurbo DNA Polymerase (Agilent Technologies), η οποία είναι υψηλής πιστότητας. Η αντίδραση PCR περιγράφεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 11: Αντίδραση PCR για τις μεταλλάξεις των C233A και C278A.

Αντιδραστήριο	Όγκος
dNTPmix	1μl
10μM πρόσθιου εκκινητή	1μl
10μM ανάστροφου εκκινητή	1μl
DNA-μήτρα	1μl
10x Pfu DNA polymerase reaction buffer	5μl
PfuTurbo DNA Polymerase	1μl
αποστειωμένο ddH ₂ O	40μl
Συνολικός όγκος	50μl

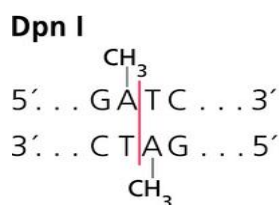
Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή (MyCycler, Biorad, ETH), τα στάδια της οποίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 12: Στάδια της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων DNA που αντιστοιχούν στα πολυπεπτίδια RRM1, RRM2α και I-RRM2α.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	30sec	1
Αποδιάταξη	95°C	30sec	18
Υβριδοποίηση	55°C	1min	
Επιμήκυνση	68°C	7min	
Τελική επιμήκυνση	68°C	12min	1
Συντήρηση	10 °C	∞	-

Δ.6.2. Πέψη με τα περιοριστικό ένζυμο DpnI

Το ένζυμο περιορισμού DpnI αναγνωρίζει τις μεθυλιωμένες και ημιμεθυλιωμένες θέσεις του μητρικού DNA (αρχικό πλασμίδιο). Το πλασμιδιακό DNA επωάζεται με το κάθε ένζυμο σε αναλογία 2U (Unit-ενζυμική μονάδα)/μg DNA.



Εικόνα 53: Οι αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζουν και η θέση κοπής του περιοριστικού ενζύμου DpnI.

Η κάθε αντίδραση επωάζεται για περίπου 2h σε 37°C σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και η αντίδραση πέψης για το κάθε πολυπεπτίδιο περιγράφεται παρακάτω:

αντίδραση PCR για το RRM2α	50μl	αντίδραση PCR για το I-RRM2α	50μl
buffer 10x cutsmart	5,6μl	buffer 10x cutsmart	5,6μl
DpnI	1μl	DpnI	1μl
συνολικός όγκος	56,6μl	συνολικός όγκος	56,6μl

Επώαση για 2h σε 37°C.

Κατόπιν, κύτταρα *DH5α* μετασχηματίζονται με το νέο κλειστό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Γ.2.2.

Δ.6.3. Πολλαπλασιασμός και επιλογή του ορθού ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pEM5B με το ένθετο DNA που φέρει τη μετάλλαξη

Από το τρυβλίο, στο οποίο αναπτύσσονται τα μετασχηματισμένα κύτταρα *DH5α* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο επιλέγονται 6 μονήρης αποικίες. Καθεμιά από τις αποικίες αυτές αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό LB παρουσία του αντιβιοτικού καρβενικιλίνη. Δηλαδή, σε πλαστικό σωλήνα των 50ml προστίθενται 10ml αποστειρωμένου LB, 10μl καρβενικιλίνης, και το θρεπτικό υλικό εμβολιάζεται με μια αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση σε 37°C και 180rpm για 12-16 ώρες και συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση σε 5.000rpm για 10min. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πραγματοποιείται με τη χρήση του QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) ακολουθώντας τις οδηγίες που δίνονται και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαλύματα που περιλαμβάνονται στις αντιδράσεις αυτές. Ακολουθεί η αλληλούχιση των πλασμιδίων που απομονώνονται, ώστε να διαπιστωθεί αν ο ανασυνδυασμός τους είναι επιτυχής.

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για την μετάλλαξη της C278A και στα δύο γονίδια που κωδικοποιούν τα πολυπεπτίδια RRM2α C233A και I-RRM2α C233A.

Δ.7. Τμηματική επισήμανση στο πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*

Δ.7.1. Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων *E.coli* BL21(DE3) με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Ο μετασχηματισμός των επιλεκτικών κυττάρων *E.coli* BL21(DE3) με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pEM9B με γονίδιο για το πολυπεπτίδιο RRM1 και των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pEM9B με τα γονίδια για τα πολυπεπτίδια RRM2α, RRM2αCC, I-RRM2α και I-RRM2αCC της πρωτεΐνης La πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την τεχνική που περιγράφεται στην παράγραφο Γ.2.2. Μια θετική αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων, η οποία αναπτύχθηκε στο τρυβλίο παρουσία του

αντιβιοτικού καρβενικιλίνη, επιλέγεται για τον εμβολιασμό υγρού θρεπτικού υλικού LB.

Δ.7.2. Υγρή καλλιέργεια για την έκφραση των πολυπεπτιδίων που προορίζονται για τη συνένωση των δύο επικρατειών με τη τμηματική επισήμανση

Δ.7.2.i. Προκαλλιέργεια

Σε πλαστικό σωλήνα των 50ml προστίθενται 15ml αποστειρωμένου LB, 15μl καρβεμπικιλίνης και εμβολιάζεται με μια αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων, η οποία αναπτύχθηκε στο τρυβλίο. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση σε 37°C και 180rpm για 12-16 ώρες.

Δ.7.2.ii. Υγρή καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό 5XM9 των πολυπεπτιδίων που προορίζονται για τη συνένωση των δύο επικρατειών με τη τμηματική επισήμανση

Σε κωνική φιάλη των 2,5L με 1L 5XM9 προστίθενται 10ml προκαλλιέργειας, 2ml διαλύματος Q, 1ml διαλύματος MgSO₄ 1M, 2ml βιοτίνης-θειαμίνης (0,25mg/ml βιοτίνης και 0,25mg/ml θειαμίνης), 4g γλυκόζης, 1g NH₄Cl και 1ml καρβεμπικιλίνης (0,1g/ml). Τα κύτταρα επωάζονται σε 220rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD) να φτάσει περίπου στις τιμές 0,8. Τότε προστίθεται στην υγρή καλλιέργεια 1ml/L διαλύματος IPTG (1M) και τα κύτταρα επωάζονται σε 29°C και 180rpm για 16h (ολονύχτια επώαση). Σε περίπτωση έκφρασης οποιουδήποτε από τα παραπάνω πολυπεπτίδια επισημασμένου με ¹⁵N χρησιμοποιούνται επισημασμένες πηγές αζώτου, δηλαδή ¹⁵NH₄Cl.

Δ.7.2.iii Συλλογή των κυττάρων

Μετά την έκφραση της πρωτεΐνης, ακολουθεί η συλλογή των κυττάρων από την υγρή καλλιέργεια. Η καλλιέργεια μοιράζεται σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες του 1l και φυγοκεντρείται για 20min, σε 6.000rpm (4°C). Στη συνέχεια, απορρίπτεται το υπερκείμενο, τα κύτταρα συλλέγονται σε πλαστικό σωλήνα των 50ml και αποθηκεύονται στους -20°C.

Δ.7.3. Διάρρηξη των βακτηριακών κυττάρων με γαλλικό θάλαμο πίεσης κυττάρων (French cell press)

Η λύση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται σε γαλλικό θάλαμο πίεσης κυττάρων (French cell press, LM10, Microfluidizer). Αρχικά, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε περίπου 20-30ml διαλύματος για τη λύση των κυττάρων (lysis buffer: 50 mM Hepes, 1M NaCl, 1mM EDTA, 5mM DTT, pH8 και μία ταμπλέτα που περιέχει μίγμα αναστολέων πρωτεασών-Protease Inhibitor Cocktail, Roche), ώστε να βρίσκονται σε αναλογία 0,2g/ml (g κυττάρων και ml διαλύματος). Στο διάλυμα των κυττάρων δε θα πρέπει να υπάρχουν συσσωματώματα. Το δοχείο που περιλαμβάνει τις αντιστάσεις γεμίζει με πάγο, ώστε να μην αυξάνεται η θερμοκρασία των αντιστάσεων, ενώ το δοχείο, στο οποίο θα προστεθεί το κυτταρικό διάλυμα ξεπλένεται καλά με ddH₂O και το διάλυμα λύσης των κυττάρων. Η πλύση του μηχανήματος πραγματοποιείται υπό πίεση 5.000psi, αφού πρώτα απομακρύνθηκε ο αέρας από αυτό. Στη συνέχεια, προστίθεται το κυτταρικό διάλυμα στο δοχείο και η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται υπό πίεση 15.000psi. Το κυτταρικό λύμα συλλέγεται σε κωνική φιάλη των 250ml. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται στο κυτταρικό λύμα άλλες τρεις φορές. Μετά το πέρας της διαδικασίας το μηχανήμα καθαρίζεται με ddH₂O και με διάλυμα αιθανόλης 20%.

Σε περιπτώσεις συνένωσης των δύο επικρατειών σε αυτό το στάδιο αναμιγνύονται το κυτταρικό διάλυμα των κυττάρων, όπου είχαν εκφραστεί και οι δύο επικράτειες (η μία ¹⁵N επισημασμένη και η άλλη μη επισημασμένη). Σε περίπτωση κατά την οποία έπρεπε να απομονωθεί μεμονωμένα ένας τομέας, τότε το κυτταρικό διάλυμα αποτελούνταν μόνο από τα κύτταρα, όπου είχε εκφραστεί η συγκεκριμένη επικράτεια. Αμέσως μετά τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε ειδικούς σωλήνες των 50ml σε 20.000g για 40min (4°C). Το υπερκείμενο απορρίπτεται σε καθαρή κωνική φιάλη των 250ml και φυλάσσεται σε πάγο.

Δ.7.4. Αλλαγή διαλύματος της πρωτεάσης TEV με μεμβράνη διαπίδησης

Η πρωτεάση TEV εκφράζεται και απομονώνεται όπως περιγράφεται στην ενότητα Γ.2.11. Αποθηκεύεται στους -80°C σε διάλυμα αποθήκευσης: 20mM Tris, 150mM NaCl, 2mM DTT, 10% γλυκερόλη, pH8. Επειδή το DTT παρεμποδίζει την

αντίδραση συνένωσης των δύο τομέων με το αντιδραστήριο MESNA, θα πρέπει να απομακρυνθεί. Επομένως, η TEV αφού αποψυχθεί σε πάγο σταδιακά, το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται αλλάζει με μεμβράνη διαπίδησης. Το νέο διάλυμα είναι το 50 mM Hepes, 1M NaCl, 1mM EDTA, 0,01mM TCEP, pH8. Χρησιμοποιούνται μεμβράνες διαπίδησης 3.500 MWCO (spectrum). Η TEV (1ml συγκέντρωσης 1,5mg/ml) τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 250ml του νέου διαλύματος. Η αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος πραγματοποιείται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C για 5-6h.

Δ.7.5. Σύζευξη των δύο επικρατειών σε ρητίνη χιτίνης παρουσία του αντιδραστηρίου MESNA και της πρωτεάσης TEV.

Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούμε ρητίνη χιτίνης. Σε ειδικές πλαστικές στήλες, στις οποίες έχει εφαρμοστεί ηθμός πολυαιθυλενίου προστίθενται σφαιρίδια χιτίνης σε 20% αιθανόλη. Η στήλη χιτίνης που δημιουργείται έχει όγκο περίπου 20ml. Αρχικά, η στήλη εκπλένεται με τουλάχιστον 5CV (column volume, όγκος στήλης), δηλαδή με τουλάχιστον 100ml ddH₂O και ακολουθεί η προετοιμασία της στήλης με περίπου 10CV διαλύματος βαθμονόμησης: 50mM Hepes, 1M NaCl, 1mM EDTA, 0,01mM TCEP, pH 8. Στη συνέχεια, στη στήλη «φορτώνεται» το κυτταρικό λύμα των κυττάρων, στα οποία έχουν εκφραστεί και οι δύο επικράτειες, (στην περίπτωση της συνένωσης των δύο επικρατειών. Σε αυτό το στάδιο προστίθεται το κυτταρικό λύμα μόνο από μία επικράτεια, σε περιπτώσεις όπου εξετάσαμε εάν επηρεάζει η διαδικασία της απομόνωσης και η προσθήκη του αντιδραστηρίου MESNA την κάθε επικράτεια ξεχωριστά). Σε αυτό το στάδιο το κυτταρικό λύμα ρέει μέσα από τη ρητίνη με αργή ροή, η οποία ρυθμίζεται από το ρυθμιστή ροής. Κατόπιν, η στήλη εκπλένεται με 5CV διαλύματος βαθμονόμησης, ώστε να απομακρυνθούν από τη ρητίνη οι βακτηριακές πρωτεΐνες και να παραμείνουν προσδεδεμένες σε αυτή μόνο οι δύο επικράτειες που θα συνενωθούν.

Στη συνέχεια, στη στήλη εισάγεται το διάλυμα αντίδρασης: 50mM Hepes, 1M NaCl, 1mM EDTA, 0,01mM TCEP, 100mM MESNA, pH 8, καθώς επίσης, και η πρωτεάση TEV (μετά την αλλαγή του διαλύματος με διαπίδηση, όπως περιγράφεται παραπάνω). Στη στήλη εφαρμόζεται το ειδικό πλαστικό κάλυμμα ώστε να κλείσει καλά. Η στήλη τοποθετείται σε τράπεζα ανάδευσης και ακολουθεί ήπια (150rpm),

ολονύχτια (16-17h) ανάδευσή της σε θερμοκρασία 25°C. Κατά την αντίδραση παρουσία του αντιδραστήριου MESNA και της πρωτεάσης TEV οι δύο επικράτειες αποκόπτονται από το υπόλοιπο πολυπεπτίδιο με το οποίο συνεκφράζονται και συνενώνονται μεταξύ τους. Την επόμενη μέρα εκλούνται από τη στήλη χιτίνης το νέο συζευγμένο πολυπεπτίδιο, το οποίο αποτελείται και από τις δύο επικράτειες με μία επιπλέον Cys μεταξύ των δύο επικρατειών, τα μη συζευγμένα πολυπεπτίδια, καθώς και το πολυπεπτίδιο του GB1, το οποίο προκύπτει μετά από την πέψη με TEV του πολυπεπτιδίου για το RRM1 και η πρωτεάση TEV. Η στήλη εκπλένεται με 2CV διαλύματος Ni-NTA: 50mM Tris-HCl, 1M NaCl, 30mM ιμιδαζολίου 0,01mM TCEP, pH 7,4.

Για τα κλάσματα που εκλούνται ακολουθεί περαιτέρω απομόνωση του νέου πολυπεπτιδίου με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Η στήλη χιτίνης αναγεννάται με πλύση με 3CV NaOH 0,3M, επώαση στο ίδιο διάλυμα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 25°C και πλύση με επιπλέον 7CV NaOH 0,3M. Η στήλη εκπλένεται με περίπου 20CV ddH₂O και αποθηκεύεται σε 20% αιθανόλη και στους 4°C.

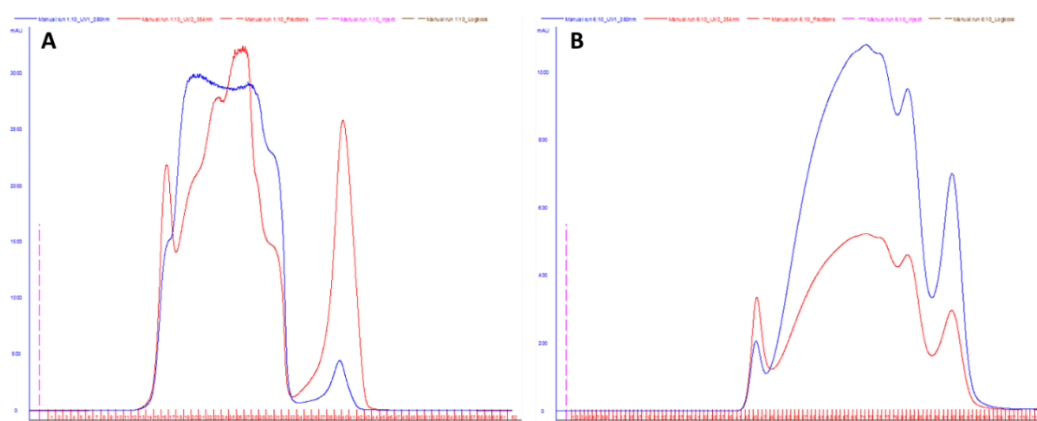
Δ7.6. Απομόνωση του συζευγμένου πολυπεπτιδίου με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου

Τα κλάσματα που προέκυψαν από την απομόνωση με τη χρωματογραφία συγγένειας μέσω της στήλης χιτίνης απομονώνονται με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου, χρησιμοποιώντας είτε προπακεταρισμένη στήλη His-Trap (GE Healthcare) είτε με τη χρήση σφαιριδίων που έχουν προστεθεί σε ειδικές πλαστικές στήλες, στις οποίες έχει εφαρμοστεί ηθμός πολυαιθυλενίου. Και στις δύο περιπτώσεις στη στήλη ακινητοποιούνται δισθενή ιόντα ψευδαργύρου (Zn²⁺) και στη συνέχεια αυτή εκπλένεται με 5CV ddH₂O, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια ψευδαργύρου που δεν προσδέθηκε στη ρητίνη. Ακολουθεί η βαθμονόμηση της στήλης με 5CV διαλύματος Ni-NTA και εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με χαμηλή ταχύτητα ροής. Τα κλάσματα αυτά εισάγονται στη στήλη τρεις φορές. Στη στήλη προσδέσεται η TEV, η οποία φέρει ετικέτα 6xHis καθώς και το θραύσμα 6xHis-GB1, ενώ η πρωτεΐνη που προέκυψε μετά τη συνένωση των επιμέρους τμημάτων καθώς και τα τμήματα που δεν έχουν προσδεθεί εκλούνται χωρίς να προσδεθούν από τη στήλη.

Ακολουθεί η έκλυση τους με 1M ιμιδαζόλιο ενώ στη συνέχεια η στήλη εκπλένεται με 0,1M EDTA και ddH₂O, ενώ η στήλη φυλάσσεται σε 20% αιθανόλη και στους 4°C. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων που προέκυψαν από τις παραπάνω διαδικασίες απομόνωσης του νέου πολυπεπτιδίου και η συμπύκνωση των κλασμάτων, στα οποία εντοπίζεται το συζευγμένο πολυπεπτιδίο RRM1-RRM2α με ειδικά φίλτρα συγκέντρωσης (amicon) των 10.000MWCO. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αλλαγή του διαλύματος των κλασμάτων αυτών σε διάλυμα 50mM KPi, 1M NaCl, pH 8 με amicon, όπως περιγράφεται παραπάνω και η τελική συμπύκνωση του πρωτεϊνικού δείγματος στα 1,5ml.

Δ.7.7. Απομόνωση του συζευγμένου πολυπεπτιδίου με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

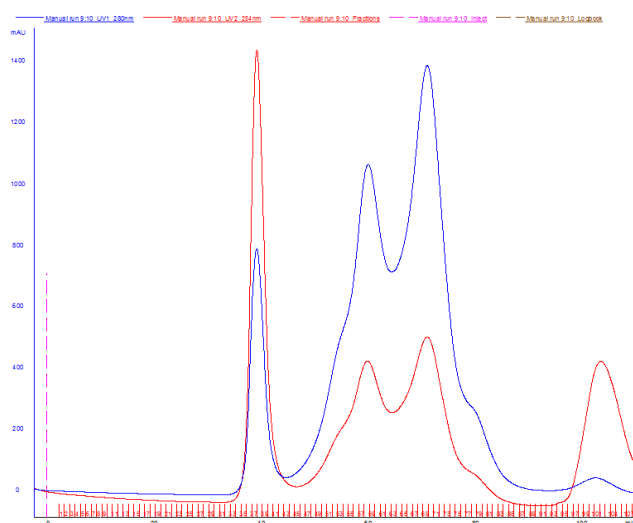
Για την απομόνωση του συζευγμένου πολυπεπτιδίου (RRM1-RRM2α) από τα υπόλοιπα μη συνενωμένα θραύσματα (RRM1, RRM2α) χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές στήλες χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού, μέχρι να επιτευχθεί καλύτερη απομόνωση. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες «Superdex 75 10/300 GL», η «Hiload 16/60 superdex 200 pg» και η «Hiload 16/60 superdex 75 pg».



Εικόνα 54: Απομόνωση του πολυπεπτιδίου ¹⁴N RRM1-¹⁴N RRM2α με τη χρήση της στήλης Α. «Superdex 75 10/300GL» και Β. «Hiload 16/60 Superdex 200pg».

Σε όλες ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, ενώ καλύτερος διαχωρισμός επιτεύχθηκε με τη στήλη «Hiload 16/60 superdex 75 pg». Αρχικά, η στήλη βαθμονομείται με διάλυμα 50mM KPi, 1M NaCl, pH 8 και στη συνέχεια εισάγεται το δείγμα στη στήλη και ακολουθεί η έκλυση των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό βάρος τους. Παρακάτω παρατίθεται η εικόνα του χρωματογραφήματος που αντιστοιχεί

στην απομόνωση του συζευγμένου πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α με τις διαφορετικές στήλες χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού.



Εικόνα 55: Απομόνωση του πολυπεπτιδίου ^{14}N RRM1- ^{14}N RRM2α με τη χρήση της στήλης «HiLoad 16/60 superdex 75 pg».

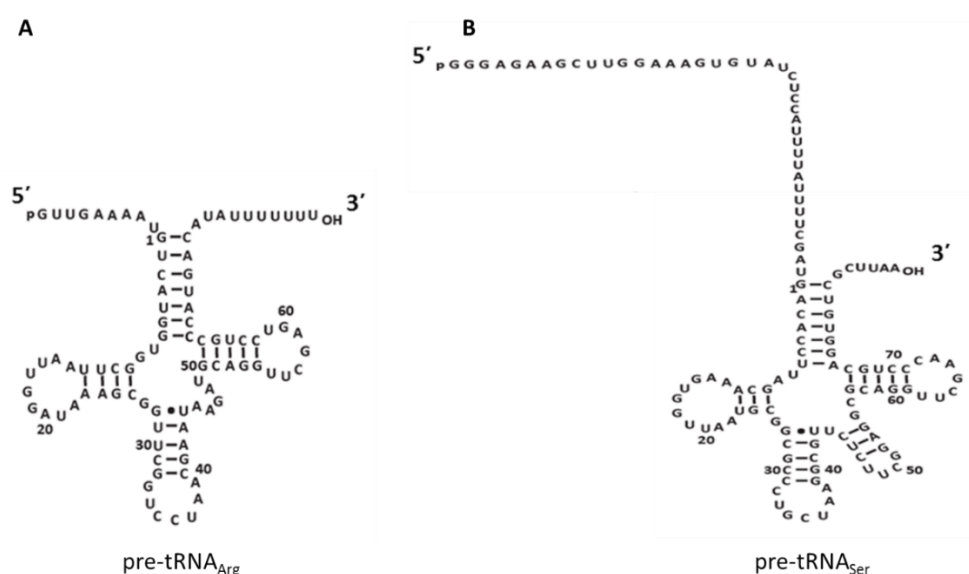
Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων που αντιστοιχούν στην κάθε κορυφή των γραφημάτων (Εικόνα 55) με σκοπό να εντοπιστούν τα κλάσματα όπου το συζευγμένο πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α είναι καλύτερα απομονωμένο. Τα κλάσματα αυτά συμπυκνώνονται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω σε 500μl.

Δ.8. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λυσίνης (Lys) σε ^{15}N υπόβαθρο του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*

Η ανάπτυξη της προκαλλιέργειας πραγματοποιείται χωρίς καμία αλλαγή, όπως περιγράφεται παραπάνω. Το ίδιο ισχύει και για την ανάπτυξη της καλλιέργειας της ^{15}N -LaM-RRM1 επισημασμένης πρωτεΐνης, με τη διαφορά ότι όταν η οπτική πυκνότητα φτάσει περίπου 0,3-0,4 προστίθενται 0,15g/L ^{14}N -Lys (περίπου μία με δύο ώρες πριν την επαγωγή της έκφρασης). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επαγωγή της έκφρασης (OD 0,6-0,9) και συλλογή των κυττάρων, διατηρώντας τις ίδιες συνθήκες. Η πειραματική πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης παραμένει ίδια.

Δ.9. *In vitro* μεταγραφή των γονιδίων για τα pre-tRNA_{Arg} και pre-tRNA_{Ser} του *Dictyostelium discoideum*

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των διαφορετικών πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* χρησιμοποιήθηκαν πρόδρομα μόρια tRNA, pre-tRNA_{Arg} και pre-tRNA_{Ser}. Το pre-tRNA_{Arg} (Εικόνα 56A) αποτελεί το φυσιολογικό υπόστρωμα για την πρωτεΐνη La του *Dictyostelium discoideum* και περιλαμβάνει την 5' οδηγό και την 3' ακόλουθο αλληλουχίες. Το pre-tRNA_{Ser} (Εικόνα 57B) περιλαμβάνει μία κοντή και μεταλλαγμένη 3' ακόλουθο αλληλουχία και μία μακριά και μεταλλαγμένη 5' οδηγό αλληλουχία.



Εικόνα 56: Δευτεροταγής δομή του A. pre-tRNA(Arg) και B. του pre-tRNA(Ser).

Δ.9.1. Γραμμοποίηση του πλασμίδιου puc57

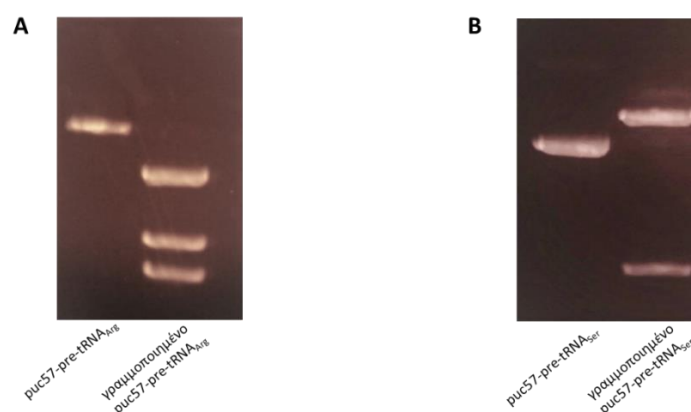
Πλασμιδιακός φορέας puc57 έχει ανασυνδυαστεί με τα γονίδια, τα οποία θα μεταγραφούν στα pre-tRNA_{Arg} και pre-tRNA_{Ser}. Το κάθε γονίδιο εντοπίζεται καθοδικά του υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης. Κύτταρα *DH5α* μετασχηματίζονται με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο puc57. Μετά τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση του πλασμίδιου puc57 με το QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen), ακολουθεί η γραμμοποίησή του με διαφορετικά ένζυμα περιορισμού για το κάθε γονίδιο. Συγκεκριμένα, το puc57 με το γονίδιο για το pre-tRNA_{Arg} γραμμοποιείται με το

περιοριστικό ένζυμο *DraI* και το *puc57* με το γονίδιο για το *pre-tRNA_{Ser}* γραμμοποιείται με το περιοριστικό ένζυμο *SspI*, όπως περιγράφεται παρακάτω.

<i>puc57</i> (<i>pre-tRNA_{Arg}</i>)	10μg	<i>puc57</i> (<i>pre-tRNA_{Ser}</i>)	10μg
buffer 10x cutsmart	5μl	buffer <i>SspI</i> 10x	5μl
<i>DraI</i>	5μl	<i>SspI</i>	5μl
αποστειρωμένο ddH ₂ O	μέχρι τελικό όγκο 50μl	αποστειρωμένο ddH ₂ O	μέχρι τελικό όγκο 50μl
συνολικός όγκος	50μl	συνολικός όγκος	50μl

Επώαση για 2h σε 37°C.

Ακολουθεί εκχύλιση της αντίδρασης γραμμοποίησης με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και κατακρήμνιση του γραμμοποιημένου πλασμιδίου με 2,5 φορές τον αρχικό όγκο του διαλύματος κρύας καθαρής αιθανόλης (99,8% αιθανόλη που φυλάσσεται στους -20°C) και 1/10 του αρχικού όγκου διαλύματος NaOAc 3M, pH 5,2. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA στους -80°C (Γ.2.8.iv.). Το ίζημα ξεραίνεται και επαναδιαλύεται σε 25μl αποστειρωμένου νερού. Για τον έλεγχο της αντίδρασης της πέψης του πλασμιδιακού DNA και την απομόνωση των προϊόντων, τα τελευταία ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 1% (Εικόνα 57).



Εικόνα 57: Πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 1%, όπου απεικονίζεται η γραμμοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *puc57* για το A. *pre-tRNA(Arg)* με το περιοριστικό ένζυμο *DraI* και για το B. *pre-tRNA(Ser)* με το περιοριστικό ένζυμο *SspI*.

Δ.9.2. Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για τη διαδικασία της *in vitro* μεταγραφής του pre-tRNA_{Arg}

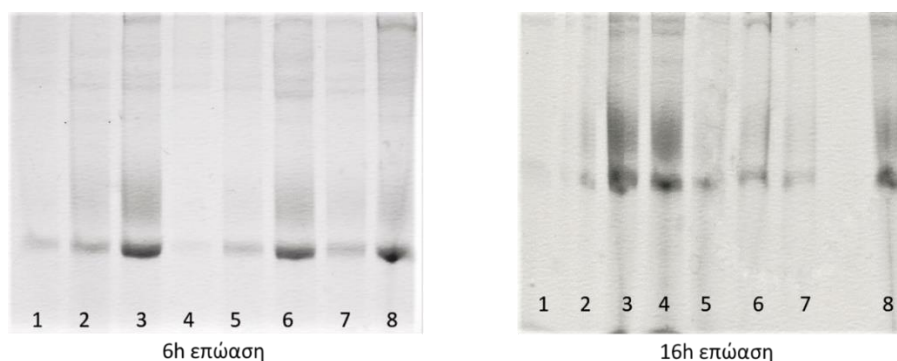
Πραγματοποιήθηκαν 8 διαφορετικές αντιδράσεις *in vitro* μεταγραφής για το pre-tRNA_{Arg}, ώστε να βρεθούν οι συνθήκες, στις οποίες η απόδοση της αντίδρασης ήταν η μέγιστη. Οι αντιδράσεις αυτές περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Η T7 RNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο Γ.2.12, ενώ ακολούθησε επώαση για 6h και ολονύχτια (περίπου 16h) σε θερμοκρασία 37°C.

Πίνακας 13: Αντιδράσεις *in vitro* μεταγραφής για το pre-tRNA(Arg) για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών.

Αριθμός δείγματος	1	2	3	4	5	6	7	8
αλλαγές	βασικό	Pyro	Mg	Mg	T7	DNA	NTPs (80)	NTPs (x2)
αποστειρωμένο ddH ₂ O	76.25	75.75	77.75	74.75	73.75	71.25	77.05	68.25
MgCl ₂ (1M)	3.25	3.25	1.75	4.75	3.25	3.25	3.25	3.25
γραμμοποιημένο πλασμίδιο	5	5	5	5	5	10	5	5
20xTB	5	5	5	5	5	5	5	5
ATP	2	2	2	2	2	2	1.8	4
GTP	2	2	2	2	2	2	1.8	4
CTP	2	2	2	2	2	2	1.8	4
UTP	2	2	2	2	2	2	1.8	4
Ppase		0.5						
T7pol	2.5	2.5	2.5	2.5	5	2.5	2.5	2.5
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

Από την κάθε αντίδραση λήφθηκαν 20μl, τα οποία αναμείχθηκαν με 20μl διαλύματος φόρτωσης μετά τη μεταγραφή (*in vitro* transcription-IVT) και ακολούθησε

ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμιδίου 10%-8M UREA (Γ.2.8.ii). Από τις πηκτές για 6 και 16h επώασης προέκυψε ότι οι βέλτιστες συνθήκες περιγράφονται στην αντίδραση 3 του παραπάνω πίνακα και η ολονύχτια επώαση στους 37°C είχε την υψηλότερη απόδοση σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες αλλά και με την αντίστοιχη αντίδραση όταν επώαστηκε για 6h (Εικόνα 58).



Εικόνα 58: UREA-page, στις οποίες απεικονίζεται το αποτέλεσμα των αντιδράσεων μετά από 6h και ολονύχτια επώαση.

Δ.9.3. *In vitro* μεταγραφή του pre-tRNA_{Arg}

Για την *in vitro* μεταγραφή των γονιδίων για το pre-tRNA_{Arg} του *D.discoideum* πραγματοποιούνται αντιδράσεις (>600) μεταγραφής, όπως περιγράφονται παρακάτω:

γραμμοποιημένο πλασμίδιο (puc57)	6μg
MgCl ₂ (1M)	3,5μl
20xTB	10μl
ATP (100mM)	4μl
GTP (100mM)	4μl
CTP (100mM)	4μl
UTP (100mM)	4μl
T7 RNA πολυμεράση	5μl
αποστειρωμένο ddH ₂ O	μέχρι τελικό όγκο 200μl
Συνολικός όγκος	200μl

Επώαση για 16h σε 37°C.

Η T7 RNA πολυμεράση και τα νουκλεοτίδια παρασκευάζονται όπως περιγράφονται στις παραγράφους Γ.2.12 και Γ.1.8, αντίστοιχα. Το διάλυμα αντίδρασης της T7 RNA πολυμεράσης είναι το: TB buffer 20x : 800mM Tris HCl pH 8.1, 20mM spermidine, 0.2% Triton X-100, 100mM DTT. Ως υπόστρωμα για την T7 RNA πολυμεράση χρησιμοποιείται το γραμμοποιημένο πλασμίδιο puc57 για το pre-tRNA_{Arg}, ενώ η αντίδραση επωάζεται για 16h σε 37°C. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται σε καθεμιά από αυτές 2μl DNase I (5U/μl) και 10μl CaCl₂ (11mM) και το μίγμα επωάζεται για περίπου 30-45min σε 37°C. Ακολουθεί εκχύλιση της αντίδρασης με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και κατακρήμνιση του γραμμοποιημένου πλασμιδίου με 2,5 φορές τον αρχικό όγκο του διαλύματος κρύας καθαρής αιθανόλης (99,8% αιθανόλη που φυλάσσεται στους -20°C) και 1/10 του αρχικού όγκου διαλύματος NaOAc 3M, pH 5,2. Ακολουθεί κατακρήμνιση του RNA στους -80°C (Γ.2.8.iv). Το ίζημα ξεραίνεται και επαναδιαλύεται σε 30μl αποστειρωμένου νερού και 30μl διαλύματος φόρτωσης IVT (2x) και η αντίδραση ηλεκτροφορείται σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμίδιου 10%-8M UREA (Γ.2.8.ii). Με αυτό τον τρόπο η αντίδραση ελέγχεται και απομονώνεται το RNA.

Οι ζώνες που αντιστοιχούν στο pre-tRNA_{Arg} αποκόπτεται και εξάγεται με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο περιττός όγκος της πηκτής. Το pre-tRNA_{Arg} εκλύεται με περίπου 400μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM KCl, 1 mM EDTA με επώαση του τμήματος της πηκτής για 16h, υπό ανάδευση στους 4°C. Ακολουθεί κατακρήμνιση του pre-tRNA_{Arg} με 2,5 φορές τον αρχικό όγκο του διαλύματος κρύας καθαρής αιθανόλης (99,8% αιθανόλη που φυλάσσεται στους -20°C) και 1/10 του αρχικού όγκου διαλύματος NaOAc 3M, pH 5,2. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA στους -80°C (Γ.2.8.iv). Το ίζημα ξεραίνεται και επαναδιαλύεται σε 25μl αποστειρωμένου νερού.

Δ.9.4. *In vitro* μεταγραφή του pre-tRNA_{Ser}

Για την *in vitro* μεταγραφή των γονιδίων για το pre-tRNA_{Ser}, το οποίο περιλαμβάνει μία κοντή και μεταλλαγμένη 3' ακόλουθο αλληλουχία και μία μακριά και μεταλλαγμένη 5' οδηγό αλληλουχία. Πραγματοποιούνται αντιδράσεις (~90) μεταγραφής, όπως περιγράφονται παρακάτω:

γραμμοποιημένο πλασμίδιο (puc57)	6μg
50mM DTT	20μl
10x T7 buffer	20μl
ATP (100mM)	4μl
GTP (100mM)	4μl
CTP (100mM)	4μl
UTP (100mM)	4μl
T7 RNA πολυμεράση	4μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	1,5μl
Pyrophosphatase (0,1 U/μl)	2μl
αποστειρωμένο ddH ₂ O	μέχρι τελικό όγκο 200μl
Συνολικός όγκος	200μl

Επώαση για 16h σε 37°C.

Η T7 RNA πολυμεράση αποτελεί προϊόν της εταιρίας Invitrogen. Ως υπόστρωμα για την T7 RNA πολυμεράση χρησιμοποιείται το γραμμοποιημένο πλασμίδιο puc57 για το pre-tRNA_{Ser}, ενώ η αντίδραση επωάζεται για 16h σε 37°C. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται σε καθεμιά από αυτές 2μl DNase I (5U/μl) και 10μl CaCl₂ (11mM) και το μίγμα επωάζεται για περίπου 30-45min σε 37°C. Ακολουθεί εκχύλιση της αντίδρασης με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και κατακρήμνιση του γραμμοποιημένου πλασμιδίου με 2,5 φορές τον αρχικό όγκο του διαλύματος κρύας καθαρής αιθανόλης (99,8% αιθανόλη που φυλάσσεται στους -20°C) και 1/10 του αρχικού όγκου διαλύματος NaOAc 3M, pH 5,2. Ακολουθεί κατακρήμνιση του RNA στους -80°C (Γ.2.8.iv). Το ίζημα ξεραίνεται και επαναδιαλύεται σε 30μl αποστειρωμένου νερού και 30μl διαλύματος φόρτωσης IVT (2x) και η αντίδραση ηλεκτροφορείται σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμιδίου 10%-8M UREA (Γ.2.8.ii). Με αυτό τον τρόπο η αντίδραση ελέγχεται και απομονώνεται το RNA.

Οι ζώνες που αντιστοιχούν στο pre-tRNA_{Ser} αποκόπτονται και εξάγονται με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο περιττός

όγκος της πηκτής. Το pre-tRNA_{Arg} εκλούεται με περίπου 400μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM KCl, 1 mM EDTA με επώαση του τμήματος της πηκτής για 16h, υπό ανάδευση στους 4°C. Ακολουθεί κατακρήμνιση του pre-tRNA_{Arg} με 2,5 φορές τον αρχικό όγκο του διαλύματος κρύας καθαρής αιθανόλης (99,8% αιθανόλη που φυλάσσεται στους -20°C) και 1/10 του αρχικού όγκου διαλύματος NaOAc 3M, pH 5,2. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA στους -80°C (Γ.2.8.iv). Το ίζημα ξηραίνεται και επαναδιαλύεται σε 25μl αποστειρωμένου νερού.

Δ.10. Αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων LaM, RRM1 και LaM-RRM1 με το pre-tRNA_{Arg} με πειράματα MST

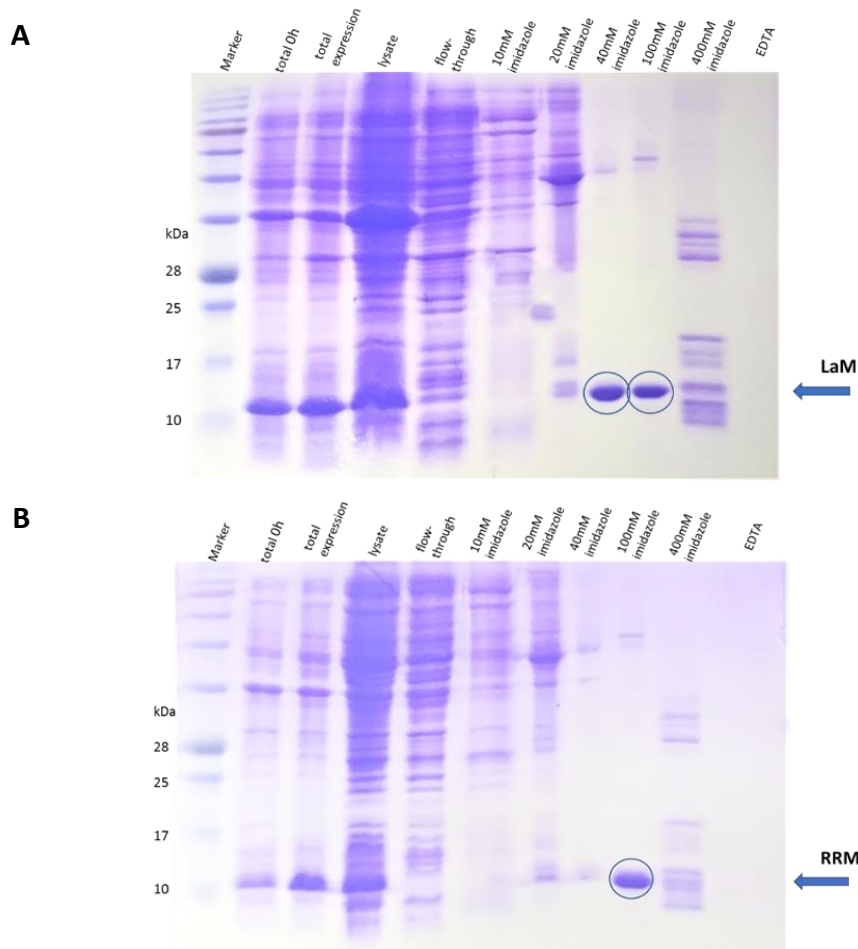
Με πειράματα MST μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων LaM, RRM1 και LaM-RRM1 με το pre-tRNA_{Arg}. Τα πολυπεπτίδια και το pre-tRNA_{Arg} παρασκευάστηκαν με τα πρωτόκολλα που έχουν ήδη αναφερθεί. Για την εκτέλεση των πειραμάτων MST σημάνθηκαν τα πολυπεπτίδια LaM, RRM1 και LaM-RRM1 σημάνθηκαν με τη φθορίζουσα ουσία NT-647, η οποία συνδέεται ομοιοπολικά με τη 6xHis επίτοπο που φέρουν. Η συγκέντρωση των σημασμένων πολυπεπτιδίων διατηρήθηκε σταθερή και η συγκέντρωση του μη-σημασμένου pre-tRNA_{Arg} κυμαινόταν μεταξύ 2μM-60pM. Το διάλυμα στο οποίο πραγματοποιήθηκε η αλληλεπίδραση ήταν το 50mM Tris, 5mM MgCl₂, 100mM NH₄CL, 10% γλυκερόλη, pH 7,5, παρουσία BSA (1mg/ml). Τα δείγματα μετά από μικρή χρονικά επώαση τοποθετούνται στα ειδικά τριχοειδή και η ανάλυση εκτελέστηκε στο Monolith NT.115.

Ενότητα Ε
Αποτελέσματα

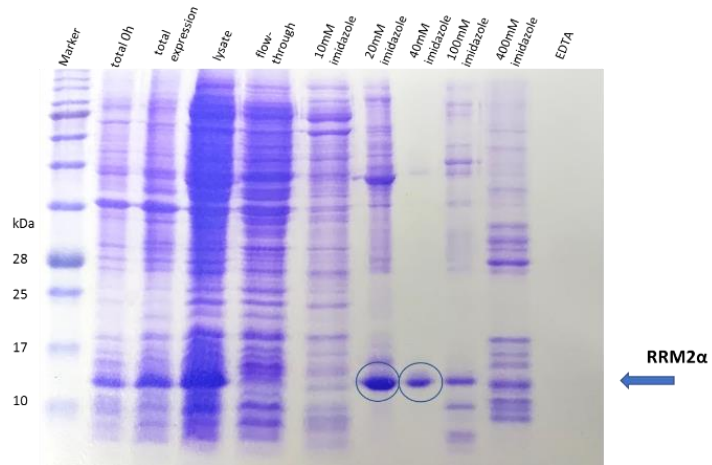
Ε.1. Έκφραση και απομόνωση των επικρατειών της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*

Ε.1. Έκφραση και απομόνωση των επικρατειών της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου

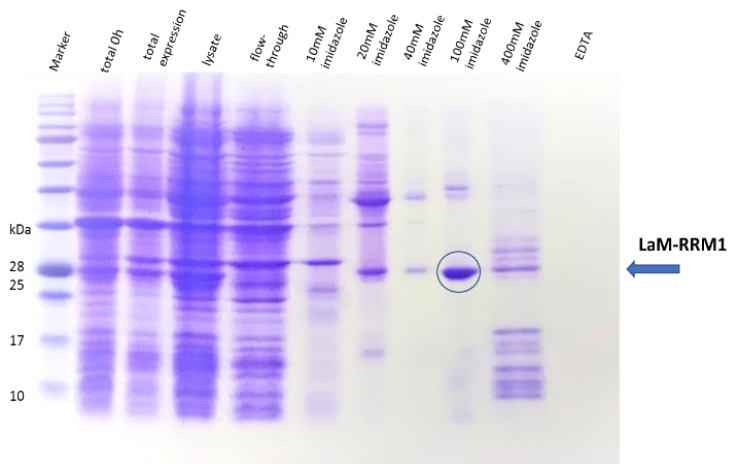
Κύτταρα *E.coli* BL21(DE3)ROSETTA 2 μετασχηματίστηκαν με τα ανασυνδυασμένα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης La, LaM, RRM1, RRM2α, LaM-RRM1, RRM1-RRM2α, LaM-RRM1-RRM2α, RRM1-RRM2α-SBM και RRM2α-SBM. Τα πολυπεπτίδια αυτά εκφράστηκαν σε βακτηριακές καλλιέργειες, σε θρεπτικό υλικό ελαχίστων μέσων (5XM9), με προσθήκη 0,5ml/L IPTG (1M), σε θερμοκρασία 25°C και 180rpm για 16h. Ακολουθεί η συλλογή, η λύση των βακτηριακών κυττάρων και η απομόνωση του κάθε πολυπεπτιδίου με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Η ανίχνευση του κάθε πολυπεπτιδίου της πρωτεΐνης La πραγματοποιείται σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE, Εικόνα 59).



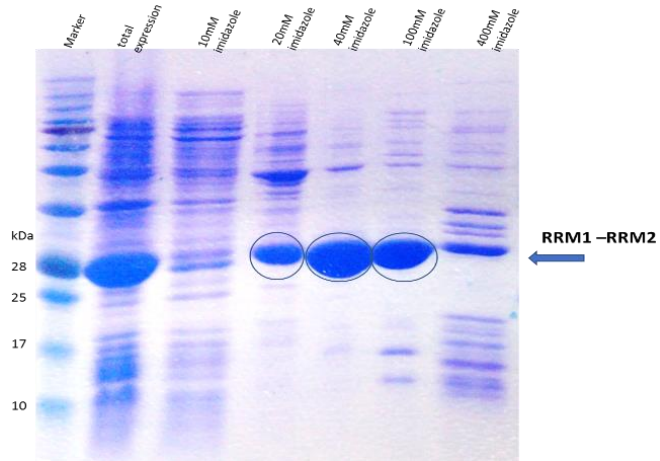
Γ

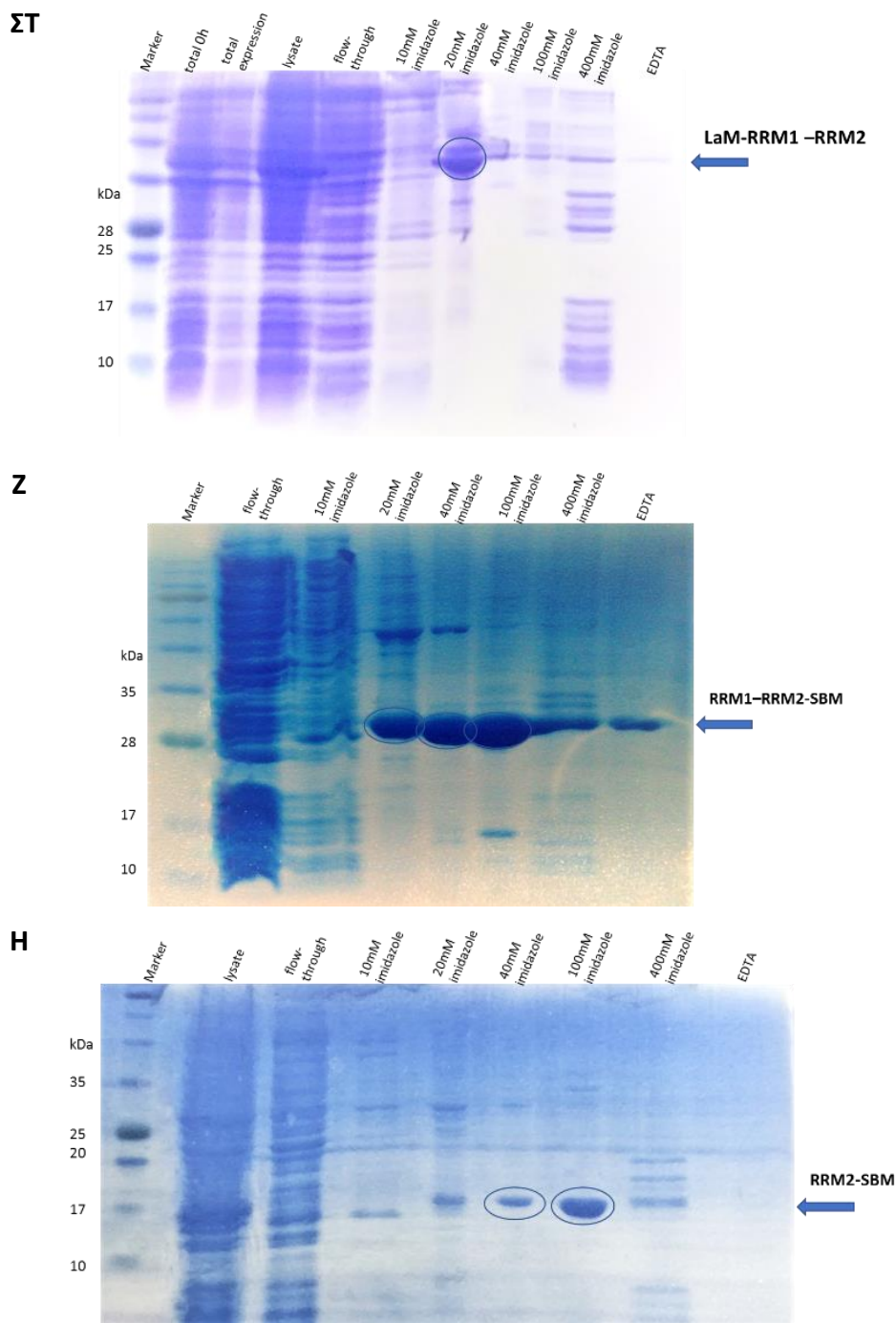


Δ



Ε





Εικόνα 59: SDS-PAGE που απεικονίζει την ποιότητα των κλασμάτων μετά τη χρωματογραφία συγγένειας για το πολυπεπτίδιο Α. LaM, Β. RRM1, Γ. RRM2α, Δ. LaM-RRM1, Ε. RRM1-RRM2α, ΣΤ. LaM-RRM1-RRM2α, Ζ. RRM1-RRM2α-SBM, Η. RRM2α-SBM.

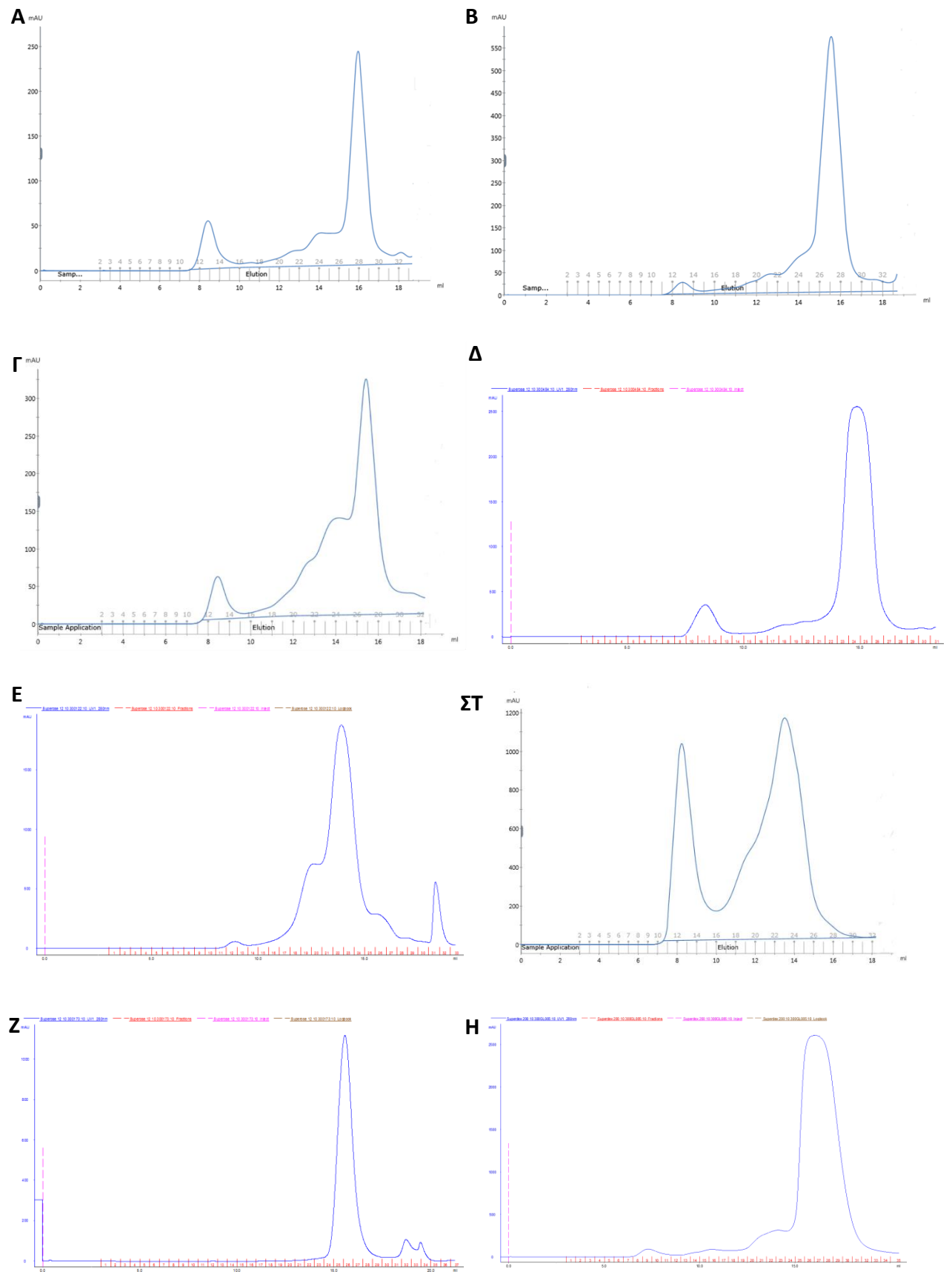
Το πολυπεπτίδιο LaM εκλούεται στα κλάσματα με 40 και 100mM ιμιδαζολίου (Εικόνα 59Α), το RRM1 εκλούεται στα κλάσματα με 100mM ιμιδαζολίου (Εικόνα 59Β), το RRM2α στα κλάσματα με 20 και 40mM ιμιδαζολίου (Εικόνα 59Γ) και το LaM-RRM1 στα 100mM ιμιδαζολίου (Εικόνα 59Δ). Επίσης, το πολυπεπτίδιο RRM1-

RRM2α εκλούεται στα 20, 40 και 100mM ιμιδαζολίου (Εικόνα 59Ε), αλλά τα κλάσματα με τα 40 και τα 100mM ιμιδαζολίου περιέχουν λιγότερες προσμίξεις. Το ίδιο συμβαίνει και με το πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α-SBM (Εικόνα 59Ζ). Τέλος, το πολυπεπτίδιο LaM-RRM1-RRM2α εκλούεται στα 20mM ιμιδαζολίου (Εικόνα 59ΣΤ), ενώ το πολυπεπτίδιο RRM2α-SBM εκλούεται στα 40 και 100mM ιμιδαζολίου με το κλάσμα των 100mM ιμιδαζολίου να περιέχει λιγότερες προσμίξεις (Εικόνα 59Η) και να προτιμάται για περαιτέρω επεξεργασία.

Τα κλάσματα, στα οποία εκλούνται τα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης La συμπυκνώνονται με ειδικά φίλτρα συγκέντρωσης (amicon) των 3.000 και των 10.000MWCO (Molecular Weight Cut-Off). Η επιλογή του φίλτρου εξαρτάται από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, τα πολυπεπτίδια για τα LaM, RRM1, RRM2α και το RRM2α-SBM συμπυκνώνονται με ειδικά φίλτρα συγκέντρωσης (amicon) των 3.000MWCO, ενώ για τα υπόλοιπα πολυπεπτίδια είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ειδικά φίλτρα συγκέντρωσης (amicon) των 3.000 και των 10.000MWCO. Το δείγμα φυγοκεντρείται σε 3.700g και 4°C μέχρι να φτάσει περίπου στα 3ml, όπου προστίθεται μέχρι τα 15ml διαλύματος 50mM KPi, pH 7. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Στη συνέχεια, με τον ίδιο τρόπο συμπυκνώνεται το διάλυμα αυτό σε 2ml και ακολουθεί η απομόνωση με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

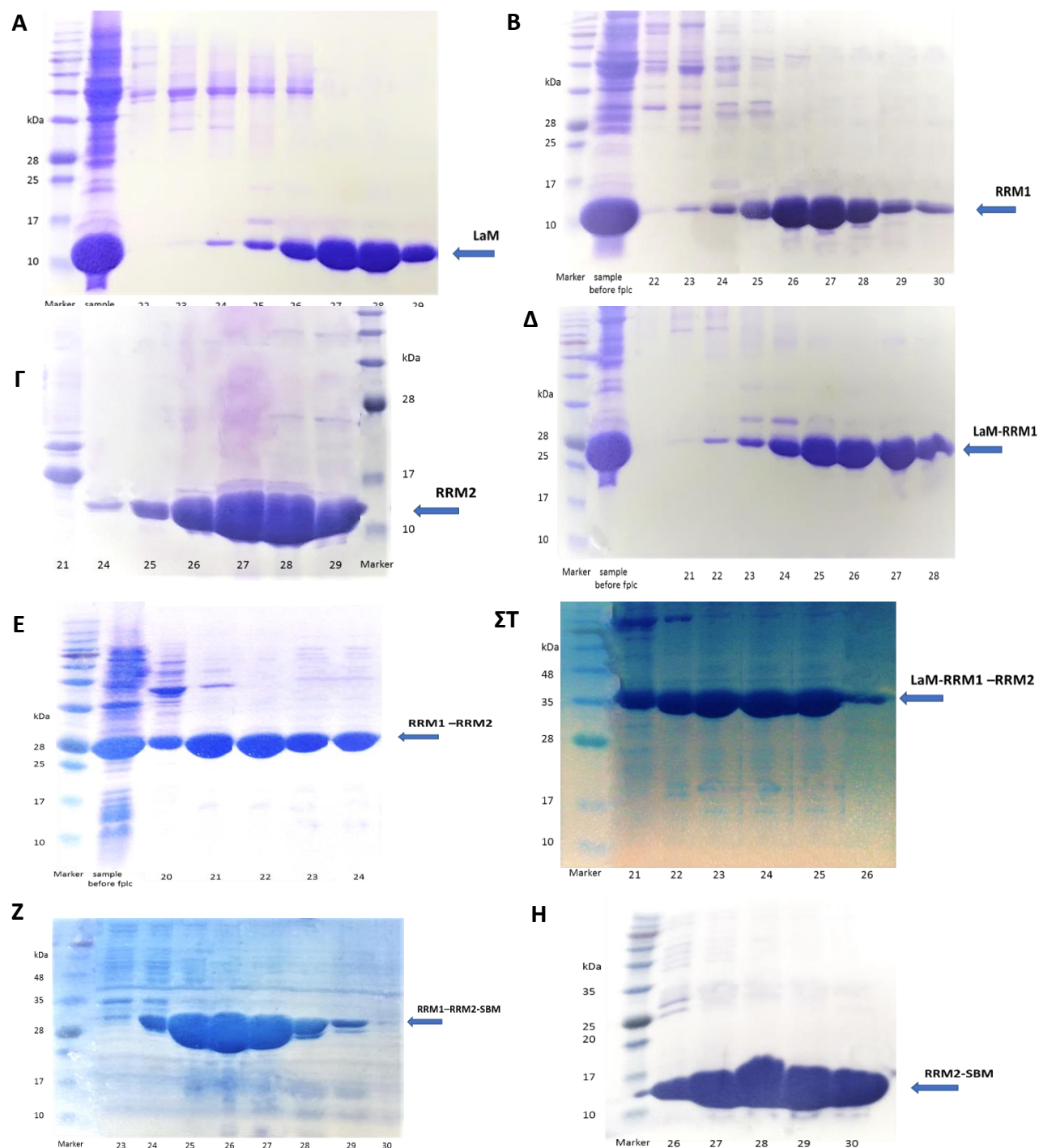
Ε.1.2. Απομόνωση των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

Τα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης La απομονώνονται σε δεύτερο στάδιο με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Για την απομόνωση των LaM, RRM1, RRM2α και του RRM2α-SBM επιλέχθηκε η στήλη μοριακής διήθησης Superose 12 10/300GL, ενώ για τα μεγαλύτερα πολυπεπτίδια επιλέγεται η στήλη μοριακής διήθησης Superdex 200 10/300GL. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη βαθμονόμηση της στήλης και την έκλυση των πρωτεϊνών είναι το KPi 50Mm, pH 7. Παρακάτω παρατίθεται η εικόνα του χρωματογραφήματος που αντιστοιχεί στην απομόνωση του κάθε πολυπεπτιδίου της πρωτεΐνης La με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.



Εικόνα 60: Απομόνωση των πολυπεπτιδίων Α. LaM, Β. RRM1, Γ. RRM2α, Δ. LaM-RRM1, Ε. RRM1-RRM2α, ΣΤ. LaM-RRM1-RRM2α, Ζ. RRM1-RRM2α-SBM, Η. RRM2α-SBM. της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων που αντιστοιχούν στην κορυφή για το κάθε πολυπεπίδιο της πρωτεΐνης La (Εικόνα 60) με σκοπό να εντοπιστούν τα κλάσματα όπου το κάθε πολυπεπίδιο είναι καλύτερα απομονωμένο. Τα κλάσματα αυτά συμπυκνώνονται με amicon σε 500μl.

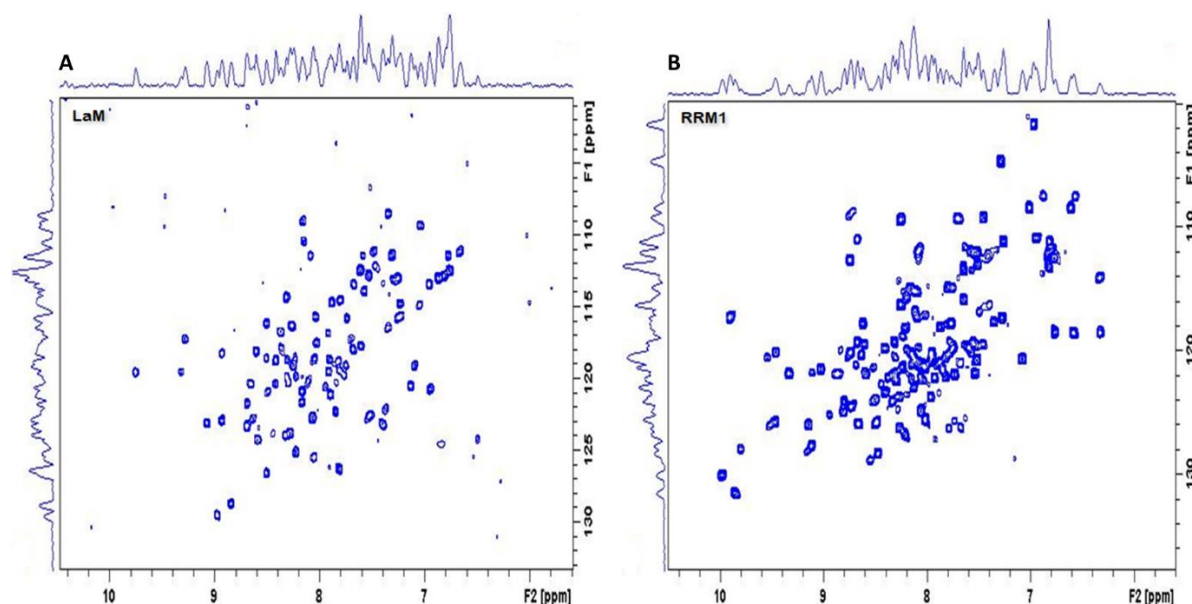


Εικόνα 61: SDS-PAGE που απεικονίζει την ποιότητα των κλασμάτων μετά τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού για το πολυπεπίδιο A. LaM, B. RRM1, Γ. RRM2α, Δ. LaM-RRM1, Ε. RRM1-RRM2α, ΣΤ. LaM-RRM1-RRM2α, Ζ. RRM1-RRM2α-SBM, Η. RRM2α-SBM.

Ε.2. Λήψη των NMR φασμάτων για τα πολυπεπίδια της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*

Ε.2.1. NMR φάσματα των πολυπεπτιδίων LaM και RRM1

Στα δείγματα για το LaM και το RRM1 αφού πρώτα συμπυκνώθηκαν με amicon στα 500μl προστίθενται 50μl D₂O, 5μl μίγματος αναστολέων πρωτεασών και 2μl NaN₃ (1M). Ακολούθησε η λήψη των NMR φασμάτων. Από τα ¹⁵N επισημασμένα πολυπεπίδια ¹⁵N-LaM και ¹⁵N-RRM1 προέκυψαν τα παρακάτω ¹H-¹⁵N-HSQC φάσματα των LaM και RRM1 σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz (Εικόνα 62).

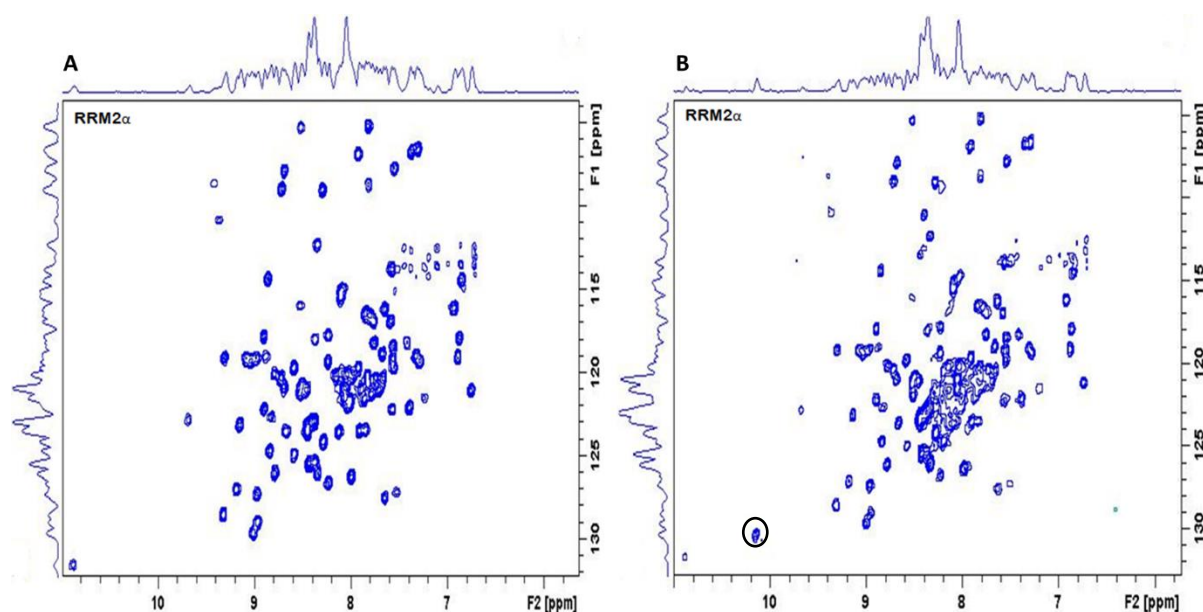


Εικόνα 62: ¹H-¹⁵N-HSQC φάσμα του Α. LaM και του Β. RRM1 σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz.

Τα φάσματα αυτά εμφανίζουν καλή διασπορά σημάτων, γεγονός που αντανακλάται στην καλή αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων αυτών στο χώρο. Στα φάσματα αυτά διακρίνονται τα σήματα συντονισμού NH, τα οποία αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα του κάθε πολυπεπτιδίου χωρίς να υπολογίζονται οι προλίνες που στερούνται αμιδικού NH.

Ε.2.2. NMR φάσματα του πολυπεπτιδίου RRM2α

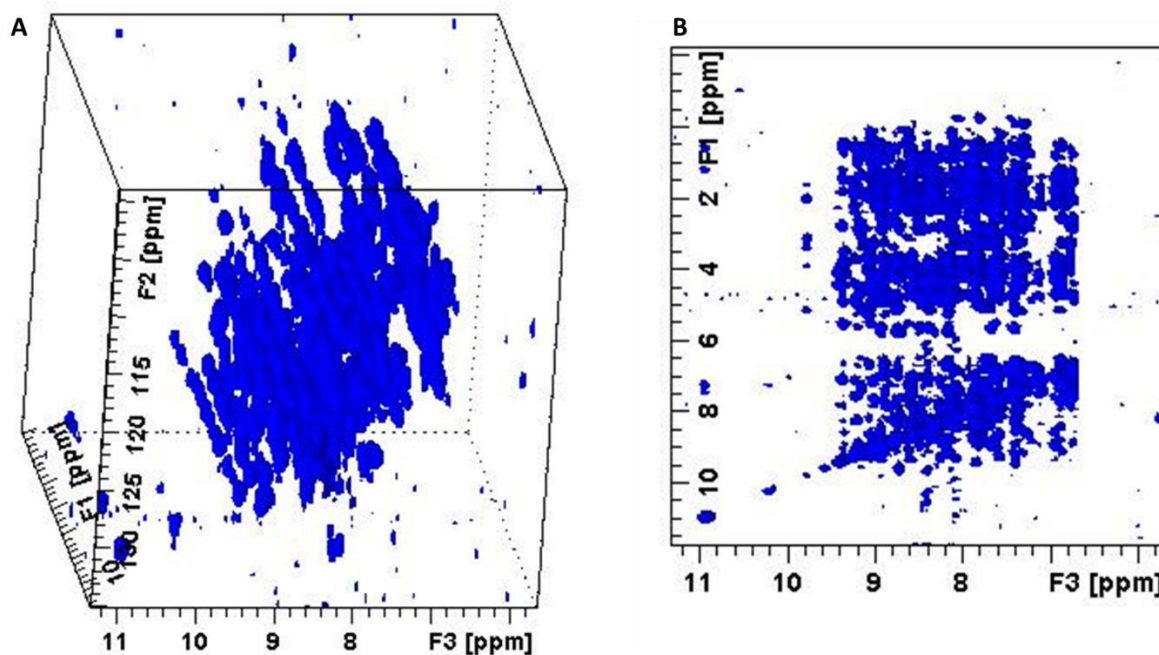
Στα δείγματα για το RRM2α εκτός από αυτά που αναφέρονται παραπάνω προστίθενται 2μl DTT (1M), καθώς στην αμινοξική του ακολουθία εντοπίζονται δύο αμινοξικά κατάλοιπα Cys, τα οποία θα πρέπει να διατηρούνται σε ανοιγμένη μορφή. Αρχικά στο NMR δείγμα του RRM2α προστέθηκε διάλυμα αναστολέων πρωτεασών χωρίς EDTA. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα το δείγμα να πρωτεολύεται σε διάστημα μίας ή δύο ημερών καθιστώντας το άχρηστο για περαιτέρω μετρήσεις (Εικόνα 63B). Η πρωτεόλυση αυτή εντοπίζεται στο φάσμα ^1H - ^{15}N -HSQC με τη συσσώρευση των κορυφών στο κέντρο του φάσματος, την εμφάνιση μιας επιπλέον κορυφής στα 10ppm περίπου, καθώς και από την ποιότητα του φάσματος. Το πρόβλημα αυτό επιλύθηκε με τη χρήση διαλύματος αναστολέων πρωτεασών με EDTA. Με τη χρήση των συγκεκριμένων αναστολέων η αντοχή του δείγματος του RRM2α αυξήθηκε σε ένα μήνα, γεγονός που επιτρέπει τις μετρήσεις στον μαγνήτη NMR για τη συλλογή όλων των δεδομένων (Εικόνα 63A).



Εικόνα 63: ^1H - ^{15}N -HSQC φάσμα Α. του RRM2α και Β. του RRM2α μετά από δύο ημέρες μετρήσεων και με τη χρήση αναστολέων πρωτεασών χωρίς EDTA. Με κύκλο σημειώνεται η επιπλέον κορυφή στα 10ppm.

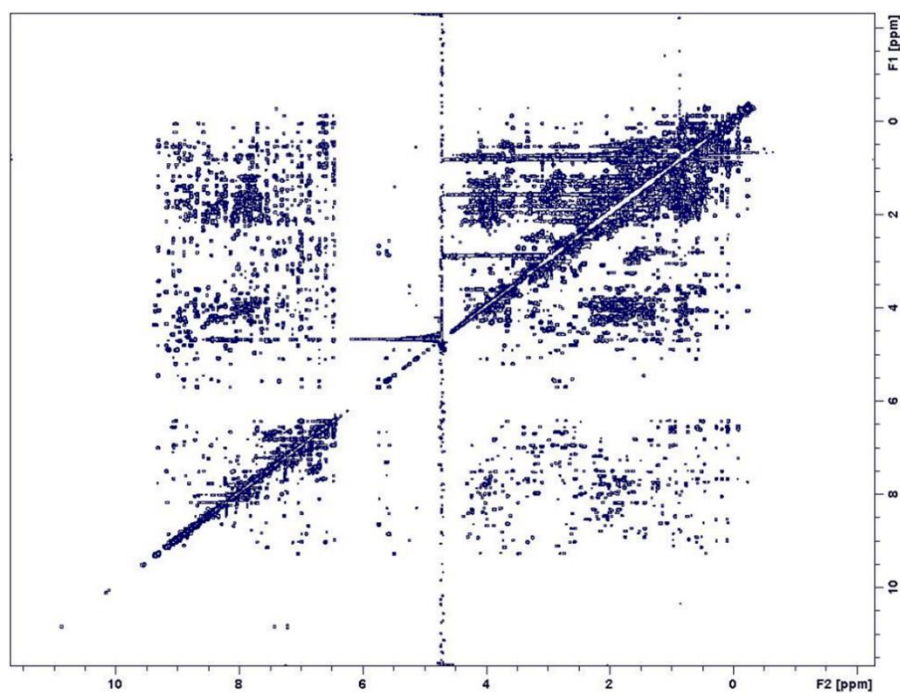
Ακολούθησε η προετοιμασία του ^{15}N - ^{13}C δείγματος διατηρώντας τις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται με μοναδική διαφορά την προσθήκη ^{13}C -D-γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό ελαχίστων μέσων M9 αντί της D-γλυκόζης. Με αυτόν τον τρόπο

καθίσταται δυνατή η ^{15}N - ^{13}C επισημάνση του RRM2α και η λήψη των τριπυρηνικών φασμάτων. Η συγκέντρωση του δείγματος αυτού ήταν ιδιαίτερα υψηλή (2mM) και το δείγμα ήταν σταθερό στο χρόνο, ώστε να συλλεχθούν όλα τα απαραίτητα τριπυρηνικά φάσματα για την επίλυση της δομής του RRM2α. Ενδεικτικά παρακάτω παρατίθεται το ^1H - ^1H - ^{15}N 3D ^{15}N NOESY φάσμα του RRM2α (Εικόνα 64).



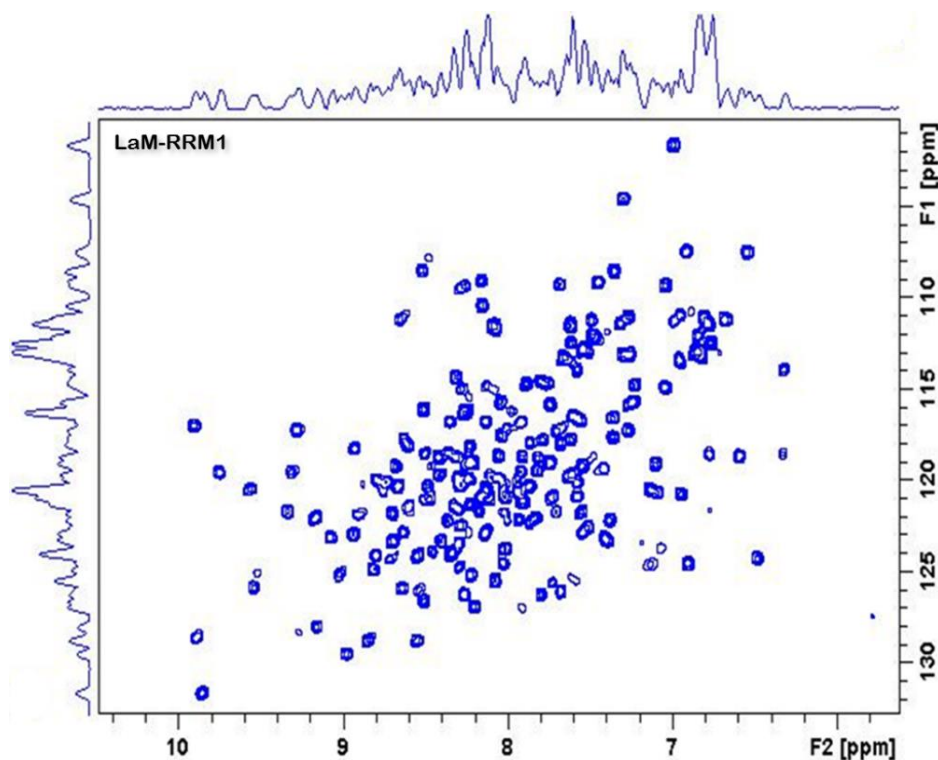
Εικόνα 64: Α. ^1H - ^1H - ^{15}N 3D ^{15}N NOESY φάσμα του RRM2α, Β. προβολή επιπέδου 2D ^1H - ^1H από το 3D ^{15}N NOESY του RRM2α.

Επίσης τα δι- και τριπυρηνικά φάσματα συνδυάστηκαν με το ^1H - ^1H φάσμα (πρωτονίου) για το RRM2α (Εικόνα 65). Με επεξεργασία των φασμάτων αυτών επιλύθηκε η τρισδιάστατη NMR δομή του RRM2α.

Εικόνα 65: ^1H - ^1H φάσμα για το RRM2α

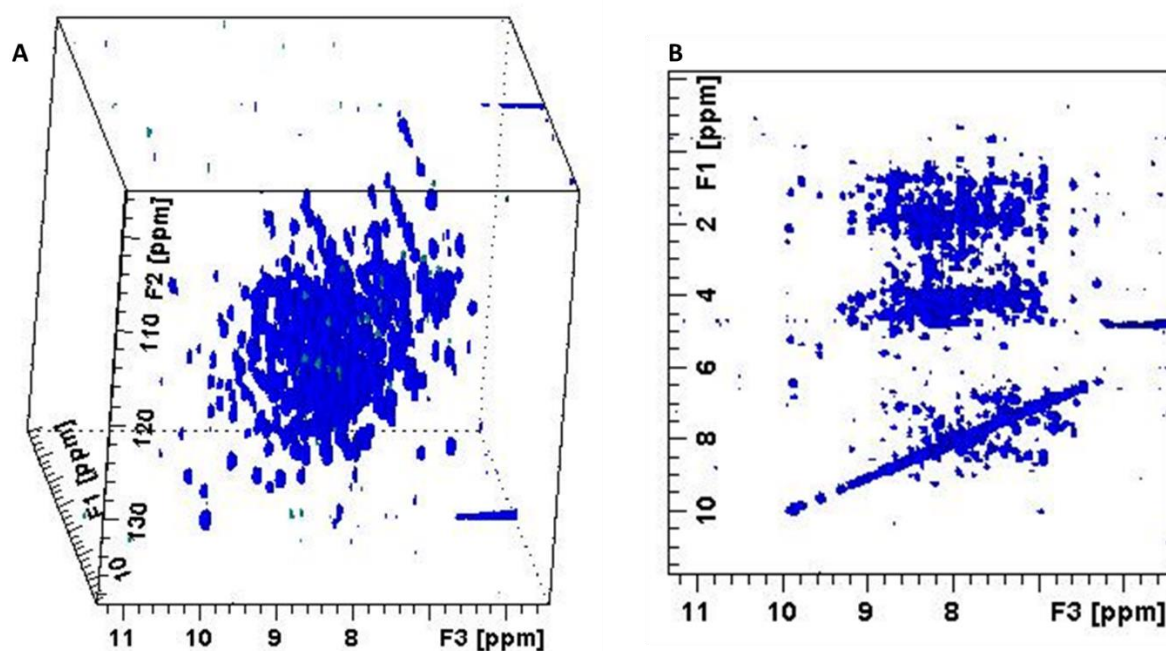
Ε.2.3. NMR φάσματα του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1

Τα δείγματα του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 προετοιμάστηκαν ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με την αντίστοιχη για την προετοιμασία του δείγματος RRM2α. Μετά από ^{15}N επισήμανση του πολυπεπτιδίου ^{15}N -LaM-RRM1 προέκυψε το παρακάτω ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του LaM-RRM1 σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz (Εικόνα 66). Το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY του LaM-RRM1 εμφανίζει καλή διασπορά σημάτων και κατά συνέπεια το πολυπεπτίδιο έχει καλή αναδίπλωση στο χώρο. Επίσης, διακρίνονται τα σήματα συντονισμού NH, τα οποία αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα του LaM-RRM1 χωρίς να υπολογίζονται οι προλίνες. Η συγκέντρωση του κάθε δείγματος που μετρήθηκε στο μαγνήτη εξαρτάται από τη φύση του πειράματος και κυμαινόταν από 0,3-1mM.



Εικόνα 66: ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του LaM-RRM1 σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz.

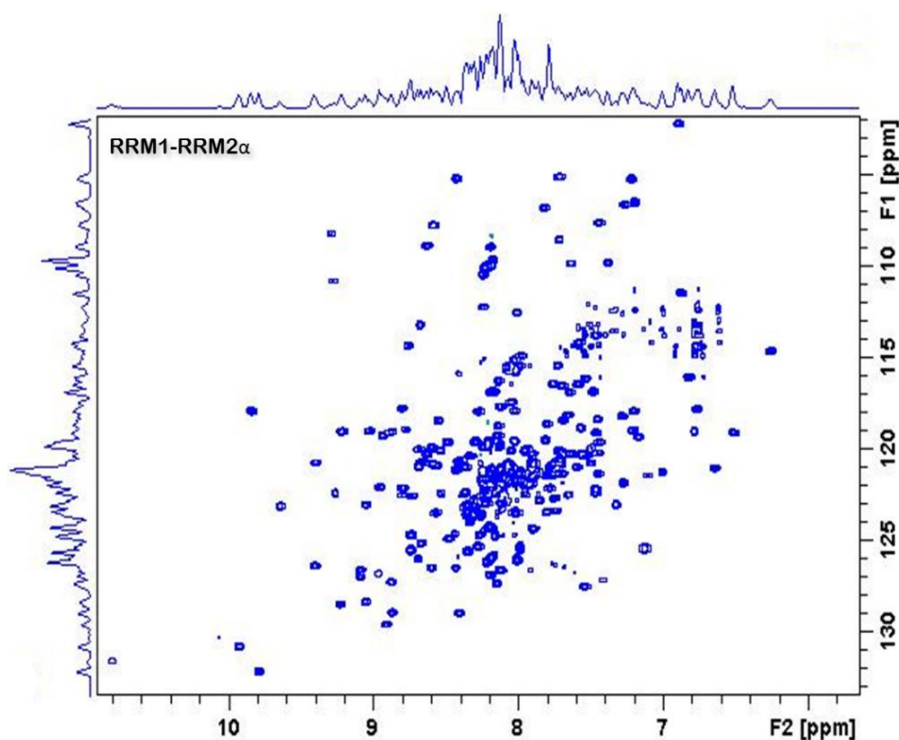
Ακολούθησε η ^{15}N - ^{13}C επισήμανση του LaM-RRM1, ώστε να καθίσταται δυνατή η λήψη των τριπυρηνικών φασμάτων. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 4 δείγματα ίσης συγκέντρωσης για τη συλλογή όλων των δεδομένων, καθώς το δείγμα παρέμενε σταθερό για περίπου μία εβδομάδα. Η συγκέντρωση των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ιδιαίτερα υψηλή (1mM) και τα δείγματα ήταν αρκετά σταθερά, ώστε να συλλεχθούν όλα τα απαραίτητα τριπυρηνικά φάσματα για την επίλυση της δομής του LaM-RRM1. Ενδεικτικά παρακάτω παρατίθεται το ^1H - ^{15}N 3D NOESY φάσμα του LaM-RRM1 (Εικόνα 67).



Εικόνα 67: Α. ^1H - ^1H - ^{15}N 3D ^{15}N NOESY φάσμα του LaM-RRM1, Β. προβολή επιπέδου 2D ^1H - ^1H από το 3D ^{15}N NOESY του LaM-RRM1.

Ε.2.4. NMR φάσματα του πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α

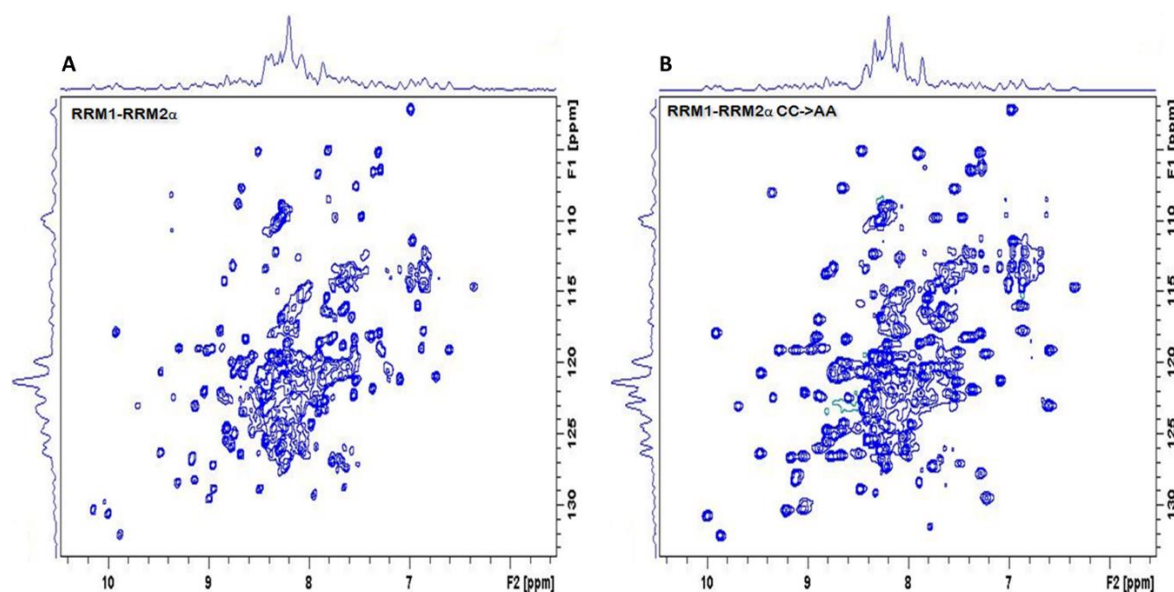
Τα δείγματα του πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α προετοιμάστηκαν ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με την αντίστοιχη για την προετοιμασία του δείγματος RRM2α. Μετά από ^{15}N επισήμανση του πολυπεπτιδίου προέκυψε το παρακάτω ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του RRM1- RRM2α σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz (Εικόνα 68). Τα φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY του RRM1- RRM2α εμφανίζει καλή διασπορά σημάτων και κατά συνέπεια το πολυπεπτίδιο έχει καλή αναδίπλωση στο χώρο. Η συγκέντρωση του κάθε δείγματος που μετρήθηκε μέσω Φασματοσκοπίας NMR κυμαινόταν από 0,64-1mM.



Εικόνα 68: ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του RRM1-RRM2α σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz.

Ωστόσο, το δείγμα του RRM1-RRM2α παρέμενε σταθερό χωρίς σημεία πρωτεόλυσης μόνο για μία ημέρα καθιστώντας τη διαδικασία λήψης των NMR φασμάτων για την επίλυση της δομής του RRM1-RRM2α και τη μελέτη της δυναμικής του αδύνατη (Εικόνα 69A). Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην ανεξάρτητη κίνηση των δύο επικρατειών και στην ύπαρξη ενός αρκετά μεγάλου (περίπου 30 αμινοξέα) και ενδεχομένως χωρίς δομικά στοιχεία συνδέτη. Είναι πιθανόν, επίσης, να οφείλεται στην οξείδωση των δύο αμινοξικών καταλοίπων Cys του RRM2α (Cys233 και Cys278).

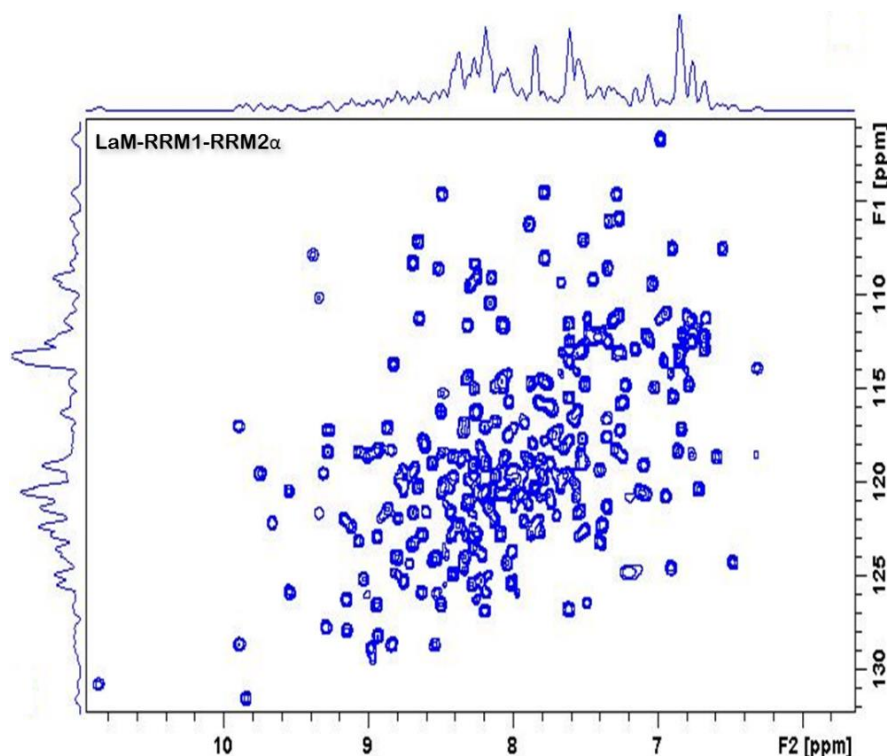
Έχοντας ως στόχο την αύξηση της σταθερότητας του πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α, σε όλα τα στάδια της απομόνωσης προστίθενται διάλυμα αναστολέων πρωτεασών και DTT. Με αυτόν τον τρόπο η σταθερότητα του RRM1-RRM2α αυξήθηκε στις 2-3 ημέρες, αλλά και πάλι ο χρόνος αυτός δεν επαρκεί για την ολοκλήρωση των μετρήσεων στο NMR. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των Cys αυτών σε Ala (C233A και C278A), αλλά ούτε και με αυτόν τον τρόπο ο χρόνος που το RRM1-RRM2α παραμένει σταθερό δεν ξεπερνά τις τρεις ημέρες (Εικόνα 69B).



Εικόνα 69: Α. ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του RRM1-RRM2α μετά από μία ημέρα μετρήσεων και Β. ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του RRM1-RRM2α (C233A, C278A) μετά από τρεις ημέρες σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz

Ε.2.5. NMR φάσματα του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1-RRM2α

Τα δείγματα του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1-RRM2α προετοιμάστηκαν ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με την αντίστοιχη για την προετοιμασία του δείγματος RRM1-RRM2α. Σε κάθε στάδιο της απομόνωσης και της συμπύκνωσης του δείγματος προστίθενται διάλυμα αναστολέων πρωτεασών και διάλυμα DTT. Το παρακάτω ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του LaM-RRM1-RRM2α (Εικόνα 70) προέκυψε μετά από ^{15}N επισήμανση του πολυπεπτιδίου ^{15}N -LaM-RRM1-RRM2α. Το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY του LaM-RRM1-RRM2α εμφανίζει καλή διασπορά σημάτων και κατά συνέπεια το πολυπεπτίδιο έχει καλή αναδίπλωση στο χώρο. Επίσης, διακρίνονται τα σήματα συντονισμού NH, τα οποία αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα του LaM-RRM1-RRM2α χωρίς να υπολογίζονται οι προλίνες. Η συγκέντρωση του δείγματος ήταν 0,58mM. Εξαιτίας του μεγέθους του πολυπεπτιδίου αυτού (318 αμινοξέα) δεν προχωρήσαμε στην παρασκευή διπλά επισημασμένων δειγμάτων και στη λήψη τριπυρηνικών φασμάτων για την επίλυση της δομής του πολυπεπτιδίου αυτού.

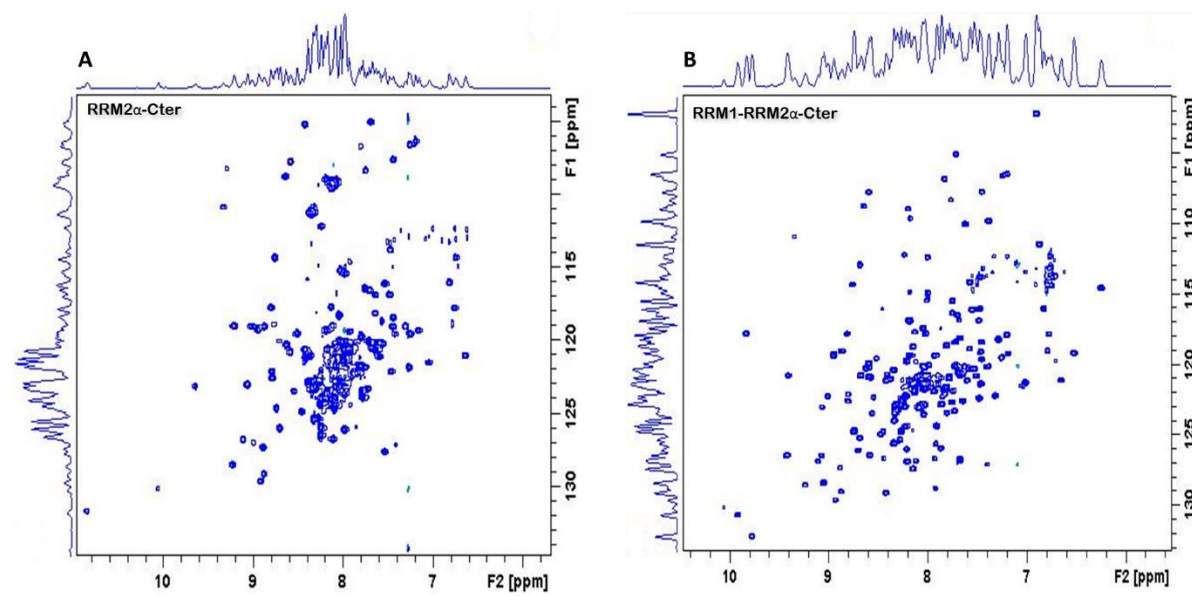


Εικόνα 70: ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του LaM-RRM1-RRM2α σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz.

Ε.2.6. NMR φάσματα των πολυπεπτιδίων RRM2α-Cter και RRM1-RRM2α-Cter

Τα δείγματα των πολυπεπτιδίων RRM2α-Cter και RRM1-RRM2α-Cter προετοιμάστηκαν ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με την αντίστοιχη για την προετοιμασία του δείγματος LaM. Μετά από την έκφραση και την απομόνωση των ^{15}N επισημασμένων πολυπεπτιδίων προέκυψαν τα παρακάτω ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματα για το RRM2α-Cter (Εικόνα 71A) και RRM1-RRM2α-Cter (Εικόνα 71B). Στα φάσματα αυτά φαίνεται ότι ένα μέρος των σημάτων εμφανίζει καλή διασπορά και ένα άλλο μέρος τους συσσωρεύονται στο κέντρο του κάθε φάσματος. Αυτό δείχνει ότι ένα μέρος των πολυπεπτιδίων αυτών έχει καλή διαμόρφωση και ένα άλλο είναι μη-δομημένο. Ενδεχομένως, το μη-δομημένο μέρος των πολυπεπτιδίων αυτών να είναι η C-τελική περιοχή, η οποία προστίθεται στα δομημένα πολυπεπτίδια. Τα πολυπεπτίδια αυτά παρέμεναν σταθερά για περίπου 1-2 ημέρες καθιστώντας τη λήψη των υπολοίπων φασμάτων NMR για την επίλυση των τρισδιάστατων δομών τους αδύνατη. Η

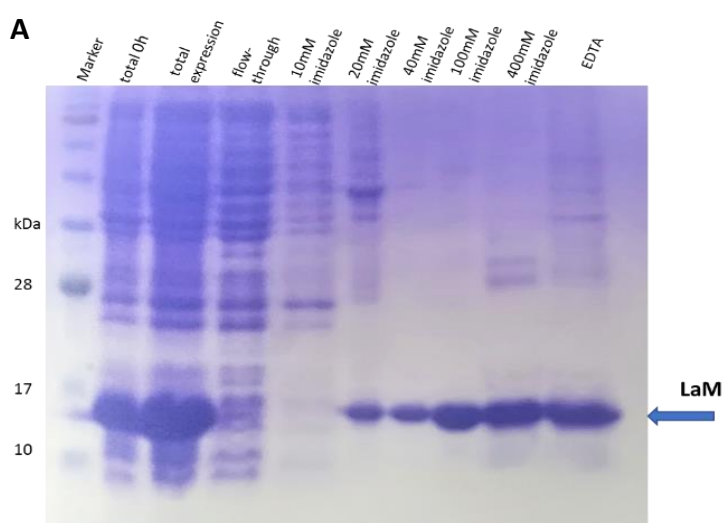
συγκέντρωση των δειγμάτων ήταν 0,45mM για το RRM2α-Cter και 0,52 για το RRM1-RRM2α-Cter.

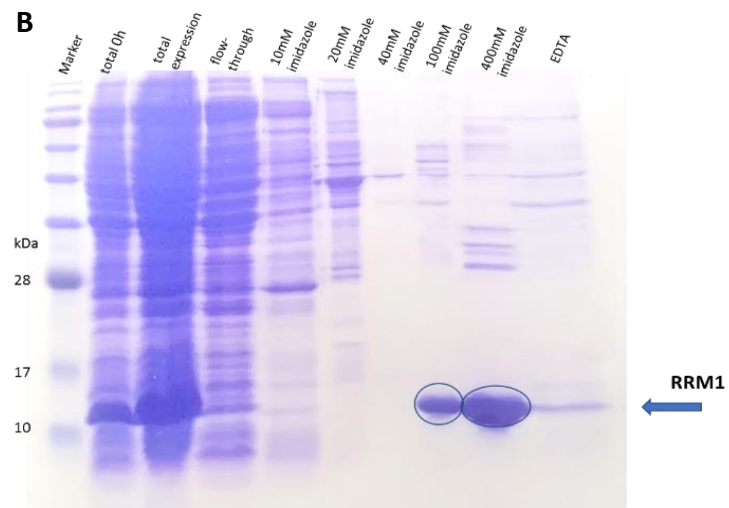
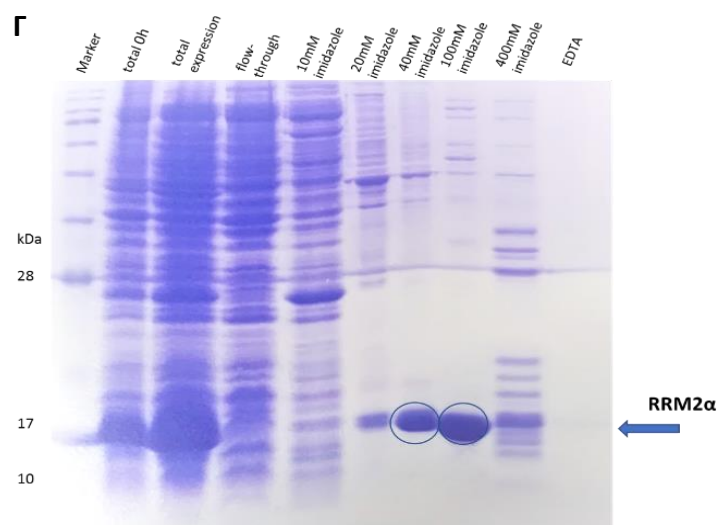
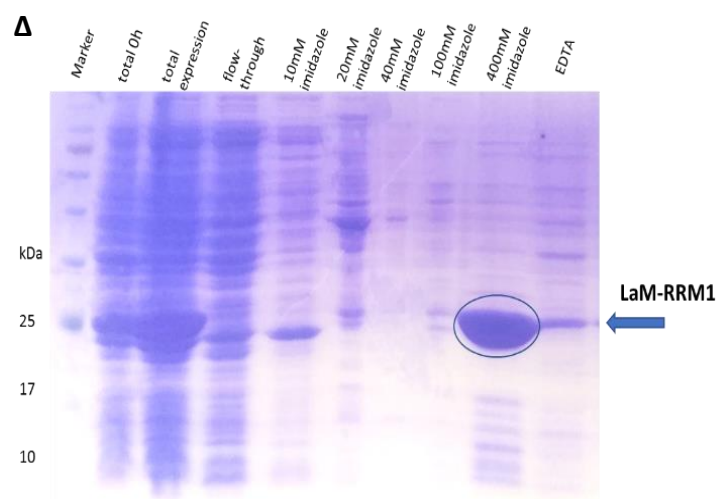


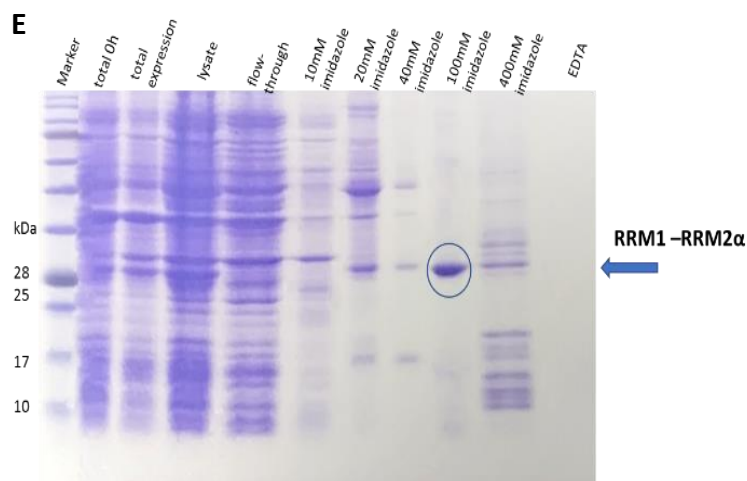
Εικόνα 71: ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του A. RRM2α-Cter και B RRM1-RRM2α-Cter σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz.

Ε.3. Έκφραση και απομόνωση των επικρατειών της πρωτεΐνης *human La*

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των γονιδίων για τα πολυπεπίδια LaM, RRM1, RRM2α, LaM-RRM1 και RRM1-RRM2α σε πλασμιδιακό φορέα pET.20b(+). Η επιτυχία του ανασυνδυασμού των πλασμιδίων ελέγχθηκε με αλληλούχιση των νέων πλασμιδίων. Ακολούθησε μετασχηματισμός των κυττάρων *E.coli BL21(DE3)ROSETTA 2* με καθένα από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Τα πολυπεπίδια αυτά εκφράστηκαν σε θρεπτικό υλικό ελαχίστων μέσων (5XM9) με προσθήκη 1ml/L IPTG (1M), σε θερμοκρασία 29°C και 180rpm για 16h. Μετά τη συλλογή των κυττάρων της καλλιέργειας, τα κύτταρα λύνονται με εφαρμογή υπερήχων και ακολουθεί η απομόνωση του κάθε πολυπεπτιδίου με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Η ανίχνευση του κάθε πολυπεπτιδίου της πρωτεΐνης hLa πραγματοποιείται σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE, Εικόνα 72)





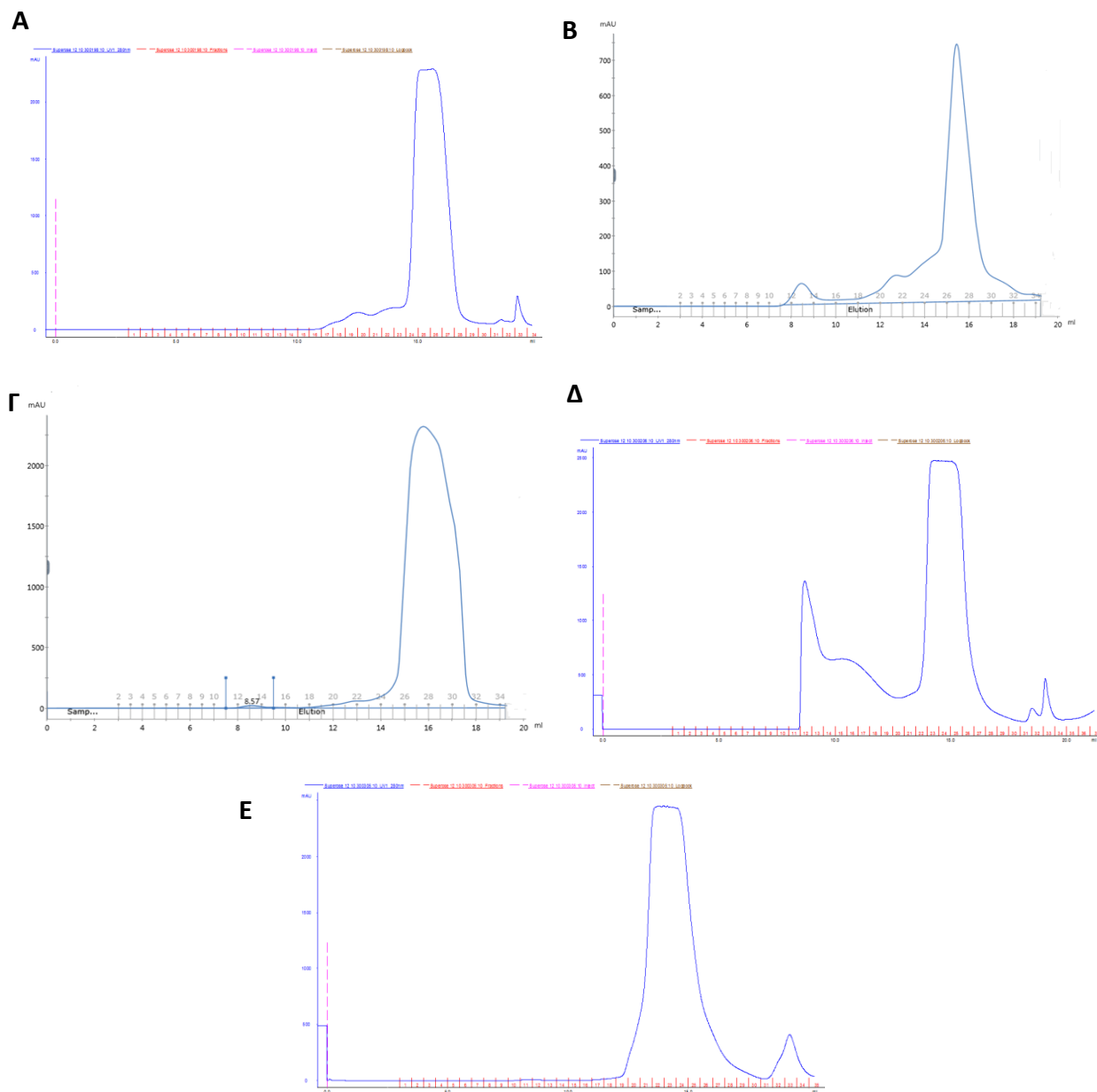


Εικόνα 72: SDS-PAGE που απεικονίζει την ποιότητα των κλασμάτων μετά τη χρωματογραφία συγγένειας για το πολυπεπτίδιο Α. LaM, Β. RRM1, Γ. RRM2α, Δ. LaM-RRM1, Ε. RRM1-RRM2α της πρωτεΐνης hLa.

Το πολυπεπτίδιο hLaM εκλούεται στα κλάσματα με 20, 40 και 100mM ιμιδαζολίου, καθώς και στο κλάσμα με το EDTA, αλλά τα κλάσματα με 40 και τα 100mM ιμιδαζολίου περιέχουν λιγότερες προσμίξεις. Το hRRM1 εκλούεται στα κλάσματα με 40 και 100mM ιμιδαζολίου και το hRRM2α στα κλάσματα με 20, 40 και 100mM ιμιδαζολίου αλλά τα κλάσματα με 40 και τα 100mM ιμιδαζολίου περιέχουν λιγότερες προσμίξεις. Αντιστοίχως, το hLaM-RRM1 εκλούεται στα 400mM ιμιδαζολίου, ενώ το πολυπεπτίδιο hRRM1-RRM2α εκλούεται στα 100mM ιμιδαζολίου.

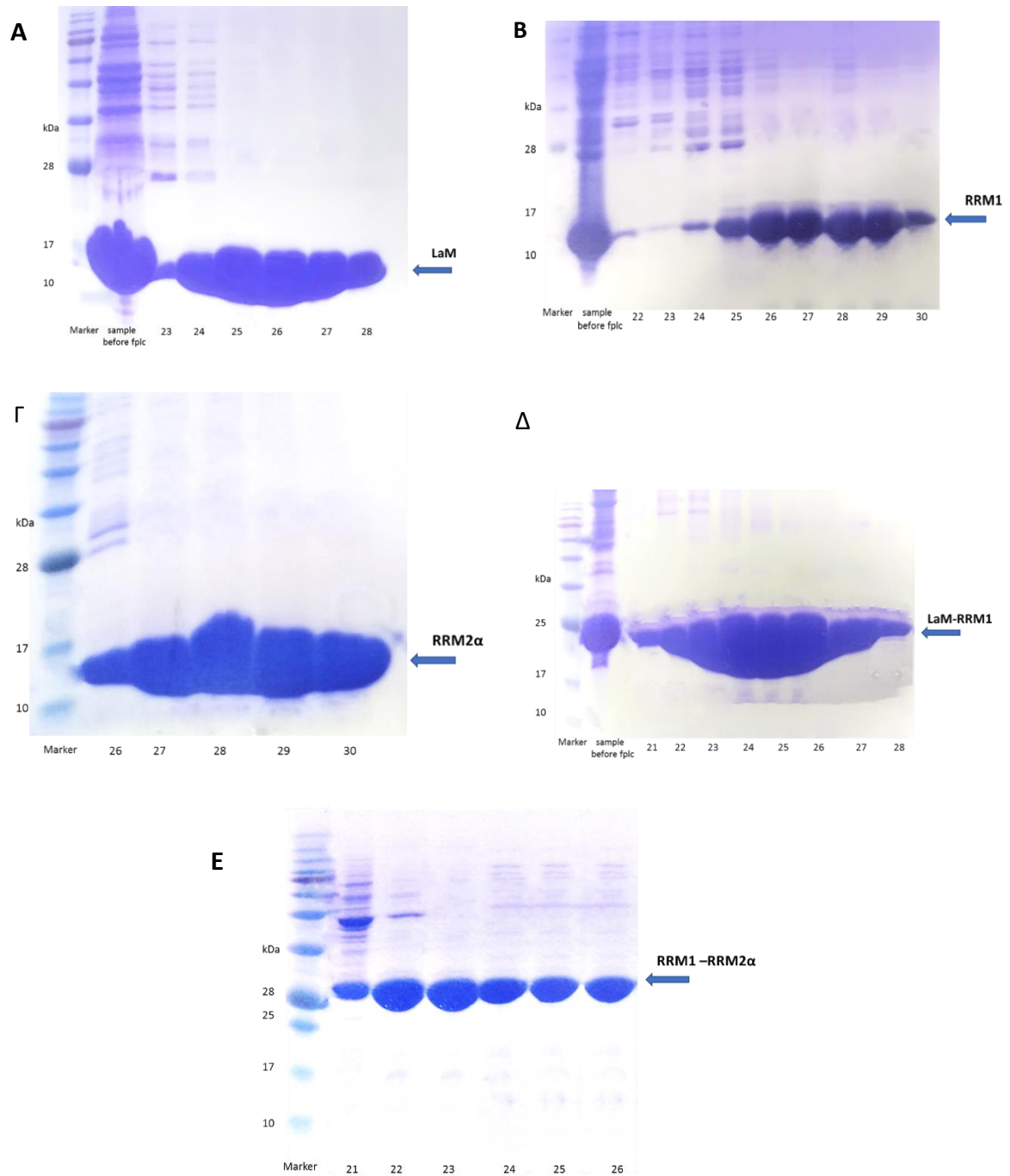
Τα κλάσματα, στα οποία εκλούνται τα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης La συμπυκνώνονται με ειδικά φίλτρα συγκέντρωσης (amicon) των 3.000 και των 10.000MWCO (Molecular Weight Cut-Off). Η επιλογή του φίλτρου εξαρτάται από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Ακολουθεί η απομόνωση του κάθε πολυπεπτιδίου της πρωτεΐνης human La με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Για την απομόνωσή των hLaM, hRRM1, hRRM2α επιλέγεται η στήλη μοριακής διήθησης Superose 12 10/300GL ενώ για την απομόνωση του hLaM-RRM1 και hRRM1-RRM2α επιλέγεται η στήλη μοριακής διήθησης Superdex 200 10/300GL. Η διαδικασία απομόνωσης που ακολουθείται είναι η ίδια και για τις δύο στήλες χρωματογραφίας, ενώ το διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι το KPi 50Mm, pH 7. Η έκλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ανάλογα με το μοριακό βάρος τους. Παρακάτω παρατίθεται η εικόνα

του χρωματογραφήματος που αντιστοιχεί στην απομόνωση του κάθε πολυπεπτιδίου της πρωτεΐνης *human* La με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.



Εικόνα 73: Απομόνωση των πολυπεπτιδίων Α. LaM, Β. RRM1, Γ. RRM2α, Δ. LaM-RRM1 και του Ε. RRM1-RRM2α της πρωτεΐνης La του *human* με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων που αντιστοιχούν στην κορυφή για το κάθε πολυπεπτίδιο της πρωτεΐνης La (Εικόνα 74) με σκοπό να εντοπιστούν τα κλάσματα όπου το κάθε πολυπεπτίδιο είναι καλύτερα απομονωμένο. Τα κλάσματα αυτά συμπεκνώνονται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω σε 500μl.

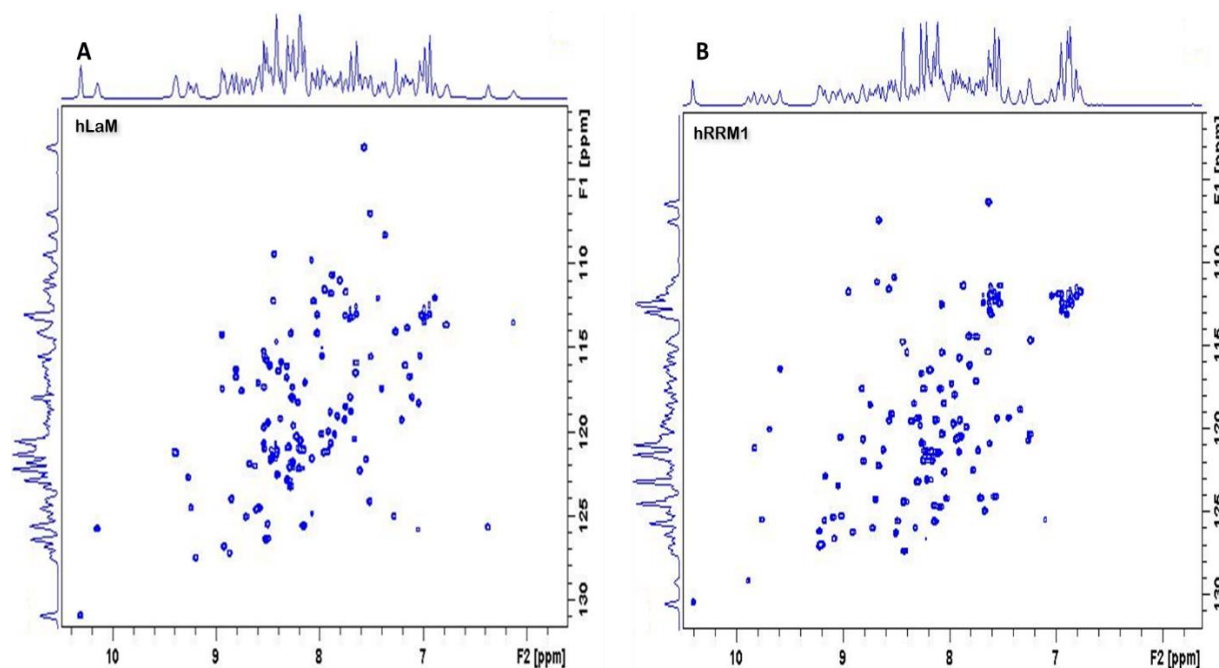


Εικόνα 74: SDS-PAGE που απεικονίζει την ποιότητα των κλασμάτων μετά τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού για το πολυπεπίδιο Α. LaM, Β. RRM1, Γ. RRM2α, Δ. LaM-RRM1, Ε. RRM1-RRM2α

Ε.4. Λήψη των NMR φασμάτων για τα πολυπεπίδια της πρωτεΐνης *human La*

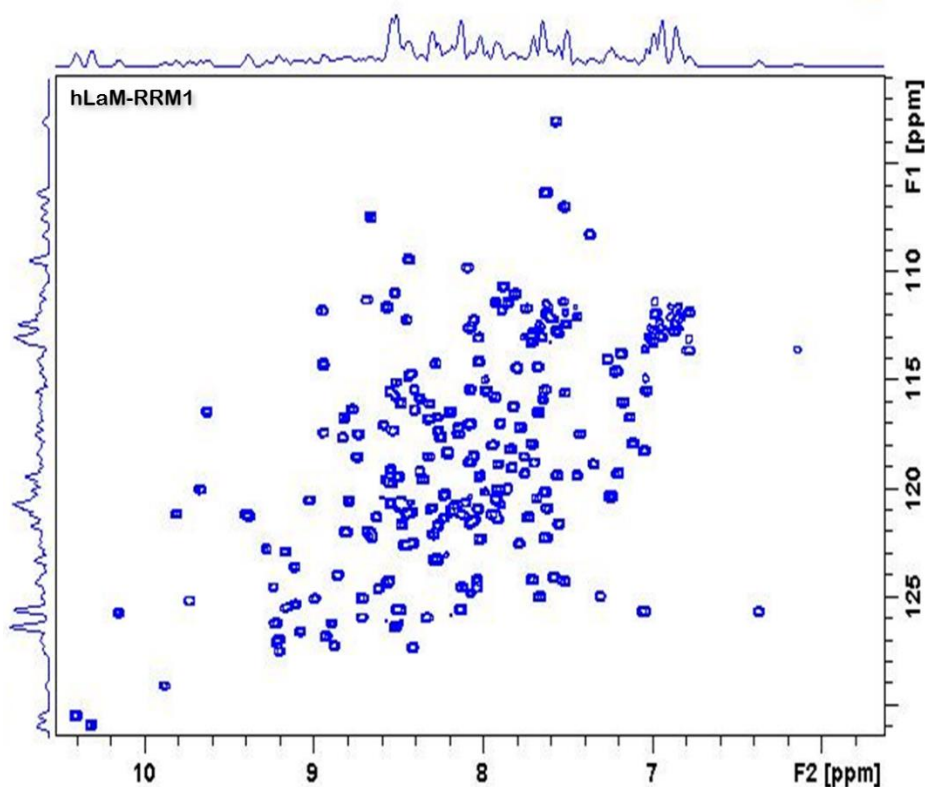
Ε.4.1. NMR φάσματα των πολυπεπτιδίων hLaM, hRRM1 και hLaM-RRM1

Τα δείγματα για τα πολυπεπίδια hLaM, hRRM1 και hLaM-RRM1, αρχικά, συμπυκνώθηκαν με amicon στα 500μl και σε αυτά προστίθενται 50μl D₂O, 5μl μίγματος αναστολέων πρωτεασών με EDTA και 2μl NaN₃ (1M). Ακολούθησε η λήψη των NMR φασμάτων. Από τα ¹⁵N επισημασμένα πολυπεπίδια ¹⁵N-hLaM και ¹⁵N-hRRM1 προέκυψαν τα παρακάτω ¹H-¹⁵N-HSQC φάσματα των hLaM και hRRM1 σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz (Εικόνα 75). Η συγκέντρωση του δείγματος για το hLaM που μετρήθηκε στο μαγνήτη ήταν 0,73mM και για το hRRM1 ήταν 0,58mM



Εικόνα 75: ¹H-¹⁵N-HSQC φάσμα του Α. hLaM και του Β. hRRM1 σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz.

Μετά από ¹⁵N επισημάνση του πολυπεπτιδίου ¹⁵N-LaM-RRM1 προέκυψε το παρακάτω ¹H-¹⁵N 2D TROSY φάσμα του hLaM-RRM1 σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz (Εικόνα 76). Η συγκέντρωση του δείγματος για το hLaM-RRM1 ήταν 0,85mM



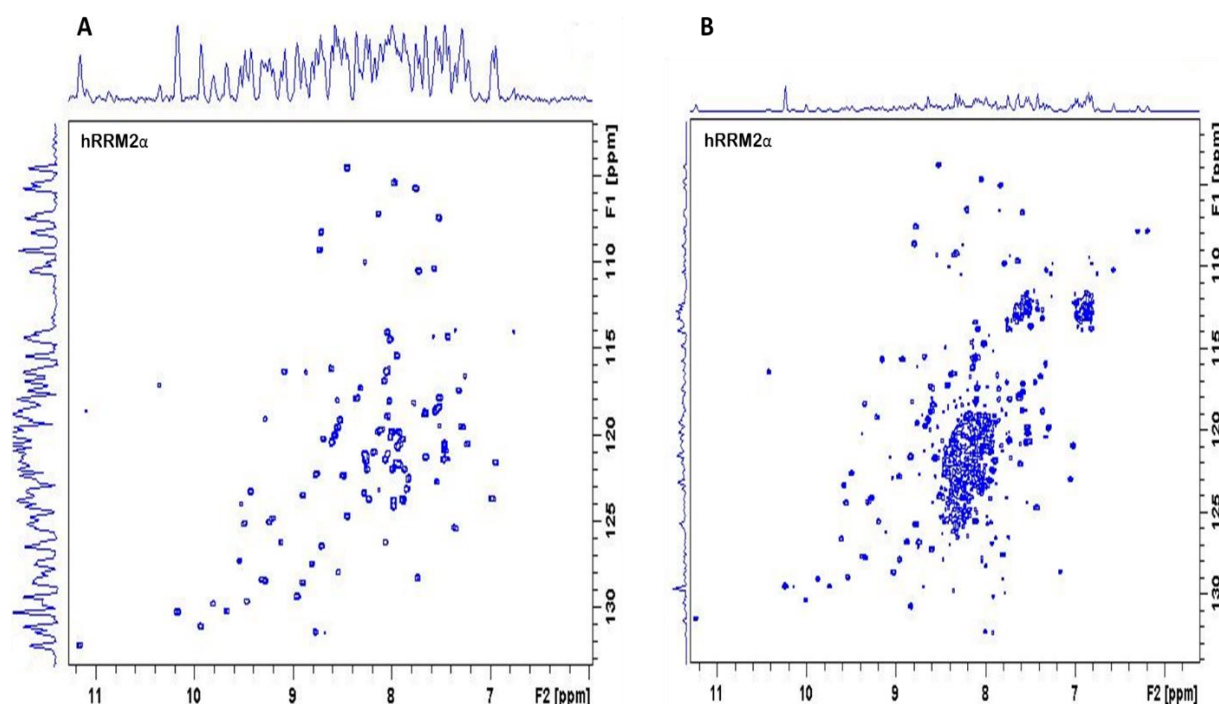
Εικόνα 76: ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του hLaM-RRM1 σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz.

Τα φάσματα αυτά εμφανίζουν καλή διασπορά σημάτων και κατά συνέπεια το πολυπεπίδιο έχει καλή αναδίπλωση στο χώρο. Σε όλα τα φάσματα διακρίνονται τα σήματα συντονισμού NH, τα οποία αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα του κάθε πολυπεπτιδίου χωρίς να υπολογίζονται οι προλίνες που στερούνται αμιδικού NH.

Ε.4.2. NMR φάσματα των πολυπεπτιδίων hRRM2α και hRRM1-RRM2α

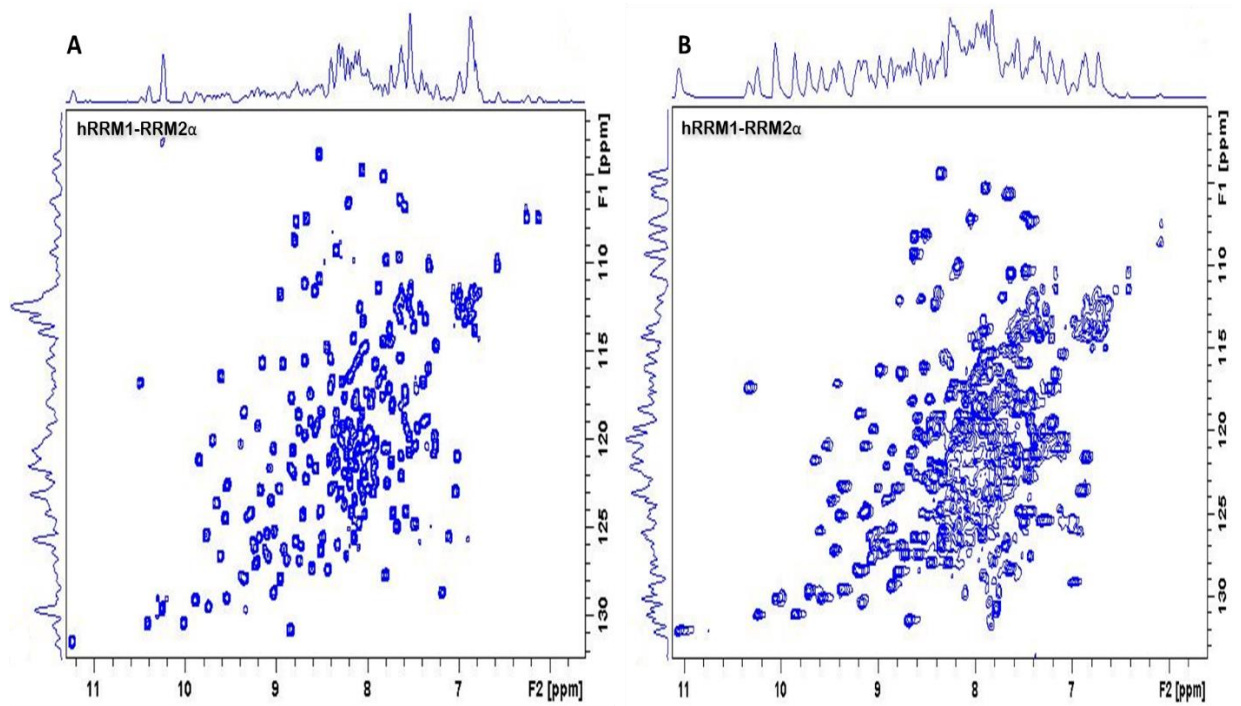
Τα δείγματα για τα πολυπεπίδια hRRM2α και hRRM1-RRM2α προετοιμάστηκαν ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με την αντίστοιχη για την προετοιμασία των παραπάνω δειγμάτων για τα υπόλοιπα πολυπεπίδια της ανθρώπινης πρωτεΐνης La. Για να παραμείνουν τα πολυπεπίδια hRRM2α και hRRM1-RRM2α σταθερά, καθώς στην αλληλουχία του hRRM2α εντοπίζονται δύο αμινοξικά κατάλοιπα Cys, όπως και στο αντίστοιχο πολυπεπίδιο του *Dictyostelium discoideum*, σε όλα τα στάδια της απομόνωσης προστίθενται διάλυμα αναστολέων πρωτεασών και DTT.

Μετά από έκφραση και απομόνωση των ^{15}N επισημασμένων πολυπεπτιδίων προέκυψαν τα παρακάτω ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματα του hRRM2α και του hRRM1-RRM2α σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz (Εικόνα 77Α και 77Β). Τα φάσματα αυτά εμφανίζουν καλή διασπορά σημάτων και κατά συνέπεια τα πολυπεπτίδια hRRM2α και hRRM1-RRM2α να εμφανίζουν καλή αναδίπλωση στο χώρο την πρώτη ημέρα παρασκευής τους. Η συγκέντρωση του κάθε δείγματος για το πολυπεπτίδιο hRRM2α που μετρήθηκε στο μαγνήτη ήταν 0,35mM και για το πολυπεπτίδιο hRRM1-RRM2α ήταν 0,63mM.



Εικόνα 77: Α. ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του hRRM2α και Β. ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του hRRM2α μετά από πέντε ημέρες σε pH7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz

Με την προσθήκη διαλύματος αναστολέων πρωτεασών με EDTA και DTT σε κάθε στάδιο της απομόνωσης του hRRM2α και του hRRM1-RRM2α, η σταθερότητα του hRRM2α αυξήθηκε στις πέντε ημέρες και του hRRM1-RRM2α αυξήθηκε στις 2-3 ημέρες. Ο χρόνος που παραμένει σταθερό το hRRM2α επαρκεί για την ολοκλήρωση των μετρήσεων, αλλά με περισσότερα του ενός δείγματα (Εικόνα 77Β). Ωστόσο, ο χρόνος που παραμένει σταθερό το hRRM1-RRM2α δεν επαρκεί για την ολοκλήρωση των 3D φασμάτων NMR. (Εικόνα 78Β).



Εικόνα 78: A. ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του hRRM1-RRM2α και B. ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσμα του hRRM1-RRM2α μετά από τρεις ημέρες σε pH 7, θερμοκρασία 298K, σε μαγνήτη NMR 700MHz

Ε.5. Αλληλεπίδραση των επικρατειών της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος η πρωτεΐνη La σχηματίζει ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο με τα νεοσυντιθέμενα μετάγραφα της RNA πολυμεράσης III αναγνωρίζοντας και αλληλεπιδρώντας με το UUU-3'-OH άκρο τους. Μελετήθηκε η ικανότητα δέσμευσης της κάθε επικράτειας με ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο που αποτελείται από δέκα ουριδύλια (U) μέσω της Φασματοσκοπίας NMR. Γι' αυτό πραγματοποιήθηκαν τιτλοδοτήσεις των πολυπεπτιδίων LaM, RRM1, RRM2a και LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο ώστε να εξεταστεί η ικανότητα δέσμευσης της κάθε επικράτειας και τα αμινοξέα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση αυτή.

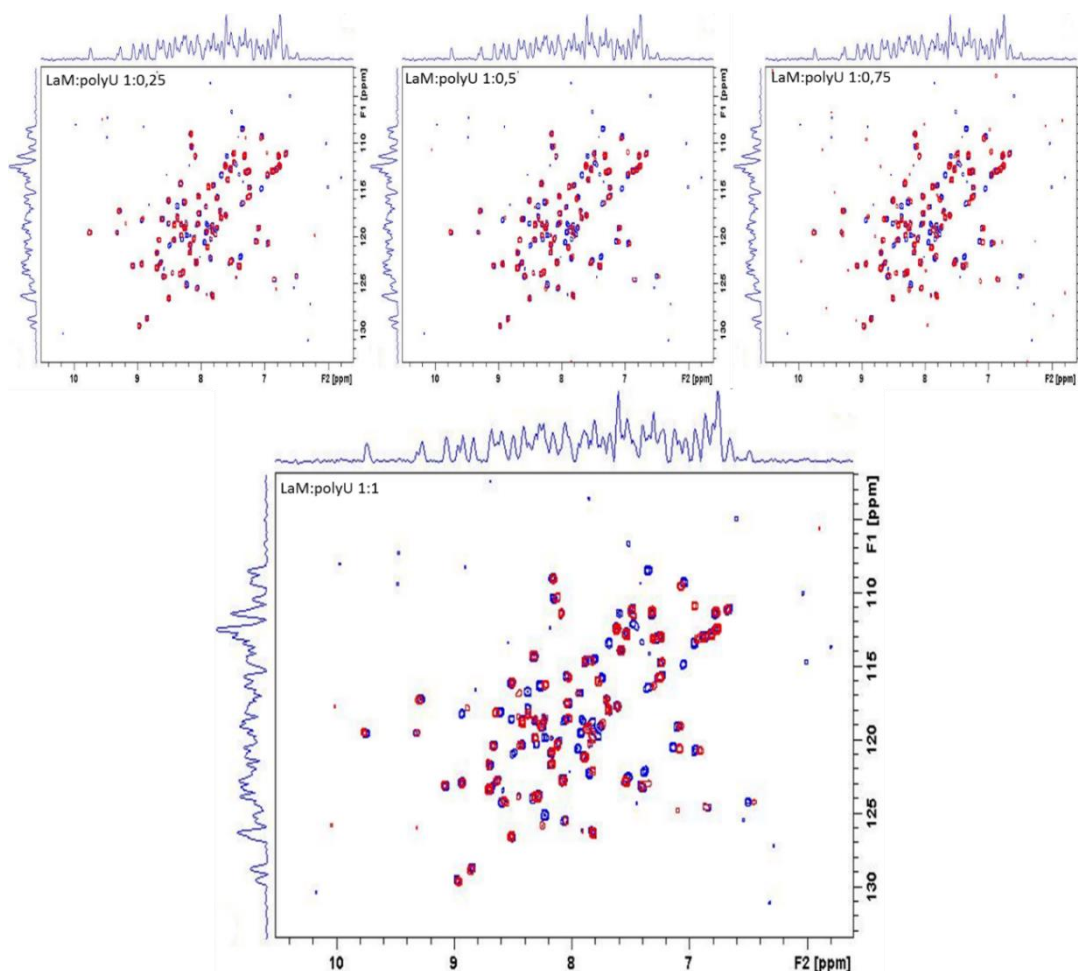
Τα πολυπεπτίδια αυτά παρασκευάστηκαν με ^{15}N επισήμανση σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στην ενότητα Δ.2. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων ήταν 0,025mM και το τελικό διάλυμα της πρωτεΐνης ήταν το 50mM KPi, pH7, ενώ σε αυτό δεν προστέθηκε διάλυμα αναστολέων πρωτεασών και DTT. Το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο που αποτελείται από δέκα ουριδύλια (polyU) διαλύεται σε αποστειρωμένο ddH₂O. Ακολούθησαν σταδιακές προσθήκες του polyU σε κάθε πολυπεπτίδιο που περιγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα. Μετά από κάθε προσθήκη πραγματοποιήθηκε η λήψη του φάσματος ^1H - ^{15}N 2D TROSY, όπου καταγράφηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του αμιδικού σκελετού των πολυπεπτιδίων αυτών.

Πίνακας 14: Τιτλοδότηση των ^{15}N πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με polyU.

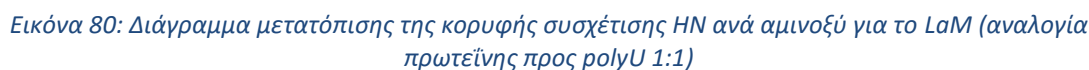
Προσθήκη	Όγκος polyU (σε μl)	Αναλογία πολυπεπτιδίου: polyU
1	5	1:0,25
2	10	1:0,5
3	15	1:0,75
4	20	1:1

Ε.5.1. Αλληλεπίδραση της επικράτειας LaM της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

Η αλληλεπίδραση της επικράτειας LaM της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το polyU μελετήθηκε με την καταγραφή των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το φάσμα αναφοράς που μετρήθηκε πριν την πρώτη προσθήκη παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 79). Από την πρώτη προσθήκη του polyU αρκετές κορυφές μετατοπίζονται ή εξαφανίζονται, αποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση του LaM με το polyU. Μέχρι την τελευταία προσθήκη παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα φάσματα αυτά, ενώ αρκετά σήματα του συμπλόκου εξαφανίζονται. Επιπλέον, υπάρχουν σήματα που η θέση τους αλλάζει σταδιακά στα φάσματα.



Εικόνα 79: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N LaM (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την 1^η, τη 2^η, 3^η και την 4^η προσθήκη (με κόκκινο χρώμα).

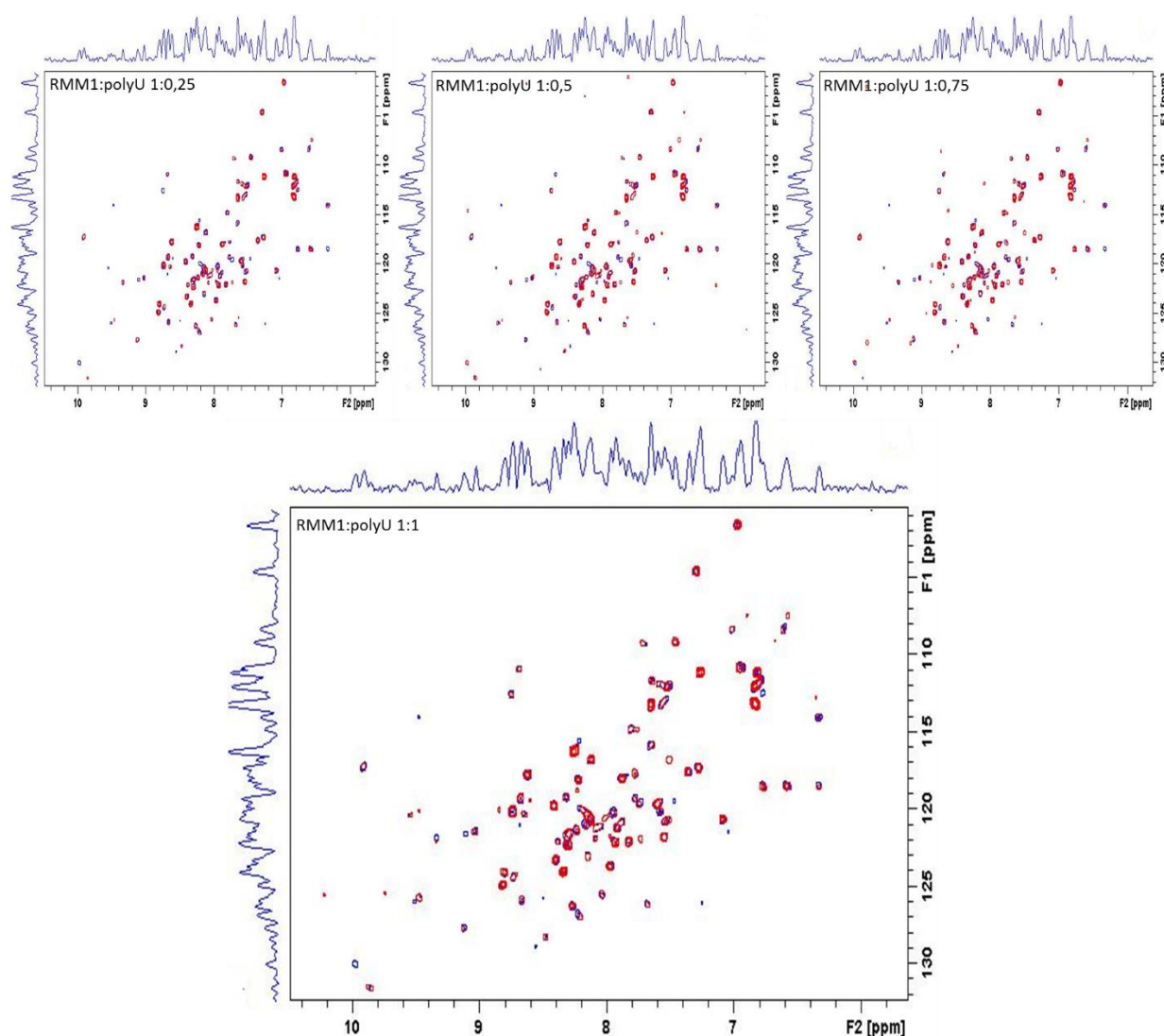


Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Leu10, Val13, Glu14, Phe17, Ser18, Ser20, Arg24, Asp25, Lys26, Arg29, Tyr39, Ser47 και Asn89. Επιπλέον, τα αμινοξέα Tyr16, Phe22, Phe27, Leu28, Phe48, Met51, Lys 52 και Thr53 εξαφανίζονται. Για τα Asn19, Pro23, Asp37, Asn49, Arg50, Pro85, Pro87 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH.

E.5.2. Αλληλεπίδραση της επικράτειας RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

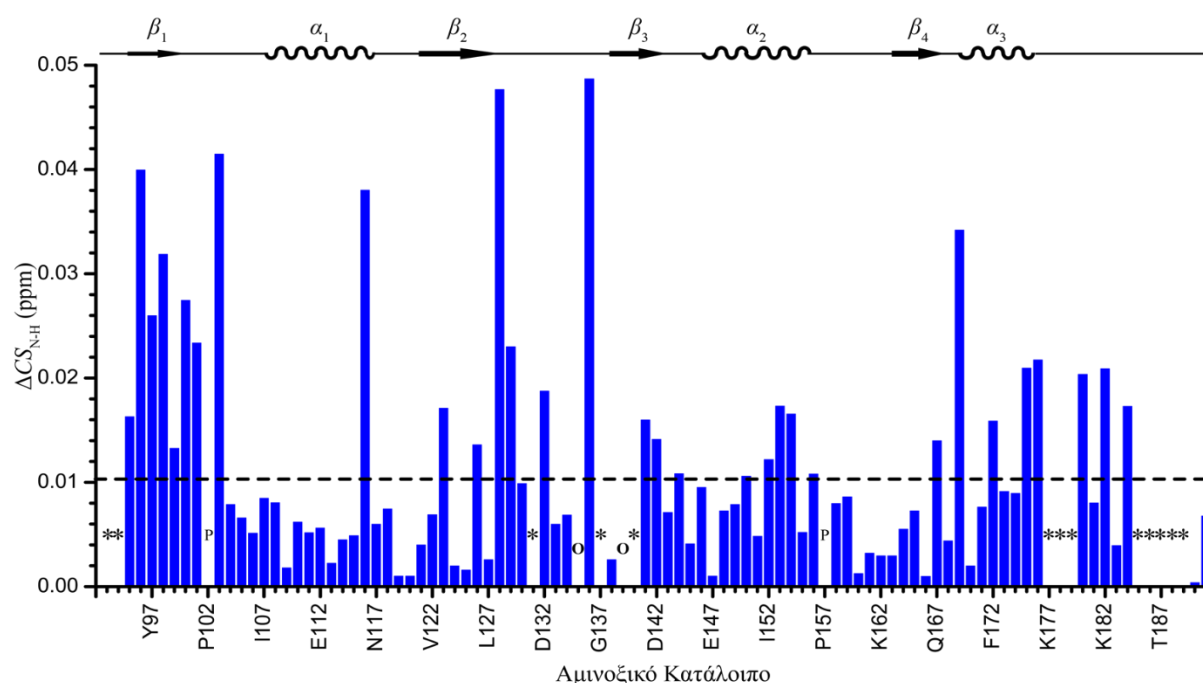
Η αλληλεπίδραση της επικράτειας RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το polyU μελετήθηκε με την καταγραφή των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D

TROSY. Κατά την προσθήκη του polyU στο διάλυμα της πρωτεΐνης σχηματίστηκε ίζημα. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το φάσμα αναφοράς που μετρήθηκε πριν την πρώτη προσθήκη παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 81). Μετά την πρώτη προσθήκη του polyU ορισμένες κορυφές μετατοπίζονται ή εξαφανίζονται, αποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση του RRM1 με το polyU. Μέχρι την τελευταία προσθήκη παρατηρούνται αρκετές αλλαγές στα φάσματα αυτά, ενώ υπάρχουν σήματα του σχηματιζόμενου συμπλόκου εξαφανίζονται. Τα σήματα που η θέση τους αλλάζει σταδιακά στα φάσματα είναι λιγότερα.



Εικόνα 81: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N RRM1 (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την 1^η, τη 2^η, 3^η και την 4^η προσθήκη (με κόκκινο χρώμα).

Στο διάγραμμα διαταραχής χημικών μετατοπίσεων (chemical shift perturbation, CSP) απεικονίζονται τα αμινοξέα του RRM1 που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία 1:1 (Εικόνα 82). Η ανάλυση των CSP πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γ. Μπούρα.



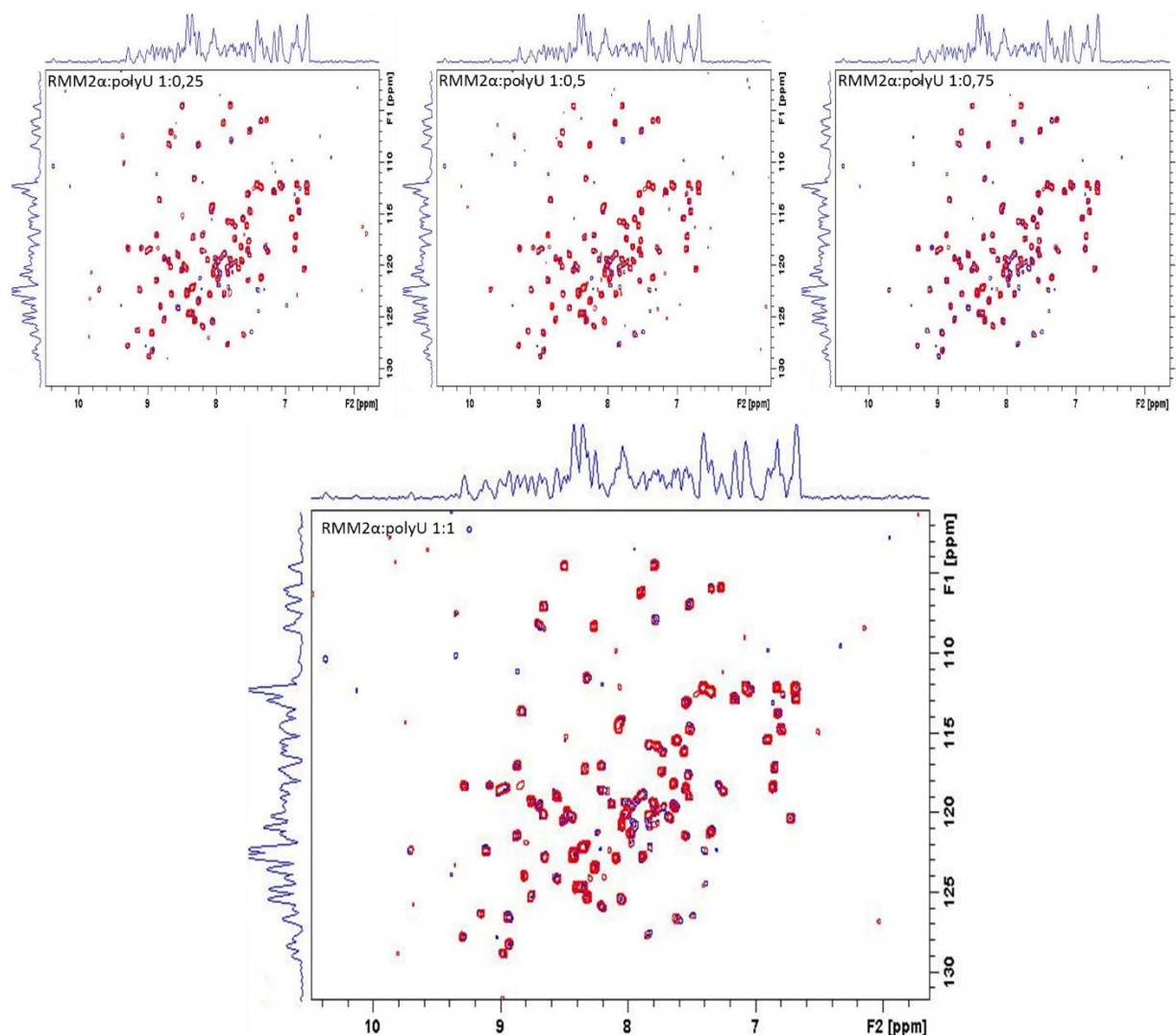
Εικόνα 82: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το RRM1 (αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1).

Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Leu96, Tyr97, Ser98, Gly100, Gly103, Ala116, Arg128, Lys136 και Phe169. Τα αμινοξέα Phe135 και Phe139 εξαφανίζονται, ενώ για τα αμινοξέα Gly93, Lys94, Pro102, Ser131, Gly137, Leu140, Pro157, Lys177, Asp178, Glu179, Ala185, Ser186, Thr187, Asn188, Gly189 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH.

Ε.5.3. Αλληλεπίδραση της επικράτειας RRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

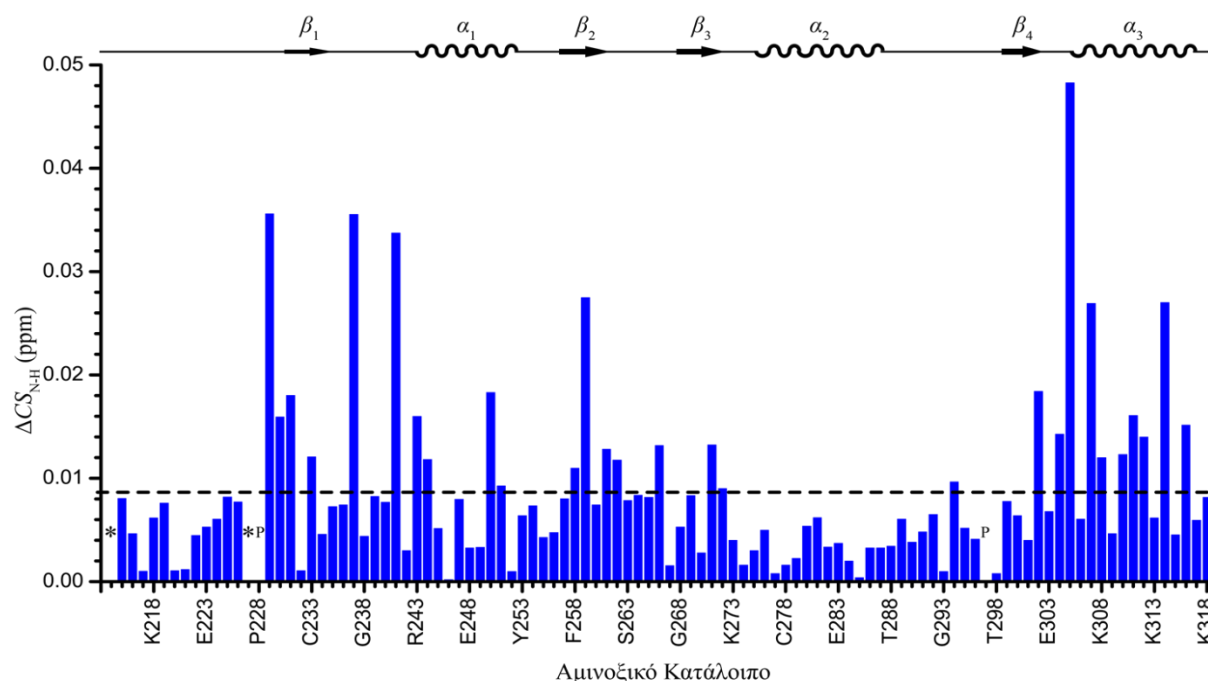
Η αλληλεπίδραση της επικράτειας RRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το polyU μελετήθηκε με την καταγραφή των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το αρχικό φάσμα αναφοράς

εντοπίστηκαν μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 83). Μετά την πρώτη προσθήκη του polyU εμφανίζονται μικρές διαφορές στο φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY του RRM2α, αποδεικνύοντας ότι το RRM2α αλληλεπιδρά ενδεχομένως ασθενώς με το polyU. Μετά την τελευταία προσθήκη παρατηρούνται αλλαγές στα φάσματα αυτά, καθώς υπάρχουν σήματα του RRM2α που μετατοπίζονται σταδιακά στα φάσματα.



Εικόνα 83: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N RRM2α (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την 1^η, τη 2^η, 3^η και την 4^η προσθήκη (με κόκκινο χρώμα).

Στο διάγραμμα διαταραχής χημικών μετατοπίσεων απεικονίζονται τα αμινοξέα του RRM2α που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία 1:1 (Εικόνα 84). Η ανάλυση των CSP πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γ. Μπούρα.



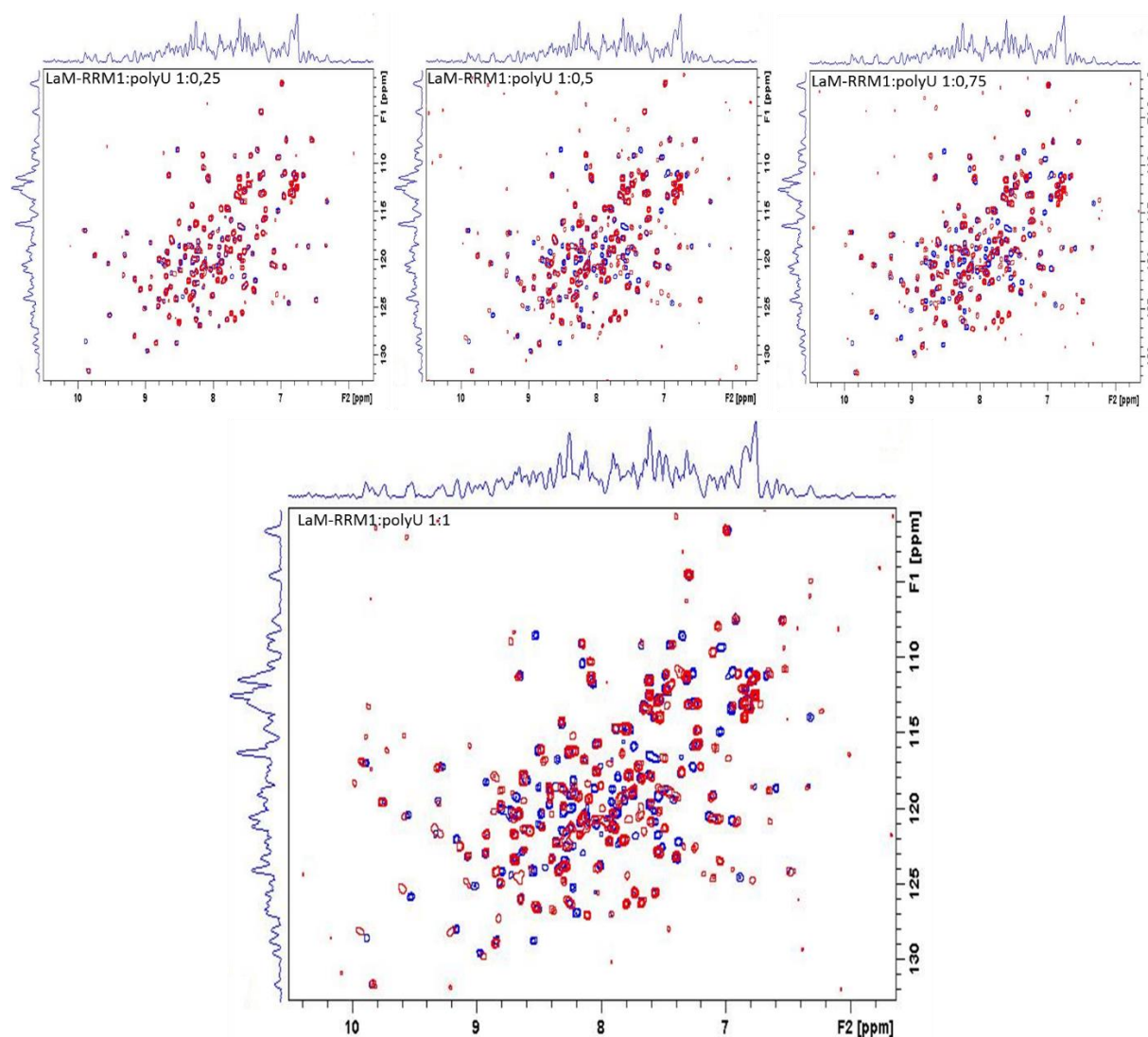
Εικόνα 84: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το RRM2α (αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1).

Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Gly229, Val237, Leu241, Val259, Glu305, Glu307 και Ile314. Κανένα από τα αμινοξέα του RRM2α δεν εξαφανίζεται μετά από την τελευταία προσθήκη του polyU σε αναλογία 1:1. Για τα αμινοξέα Lys214, Ile227, Pro228 και Pro297 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH.

E.5.4. Αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

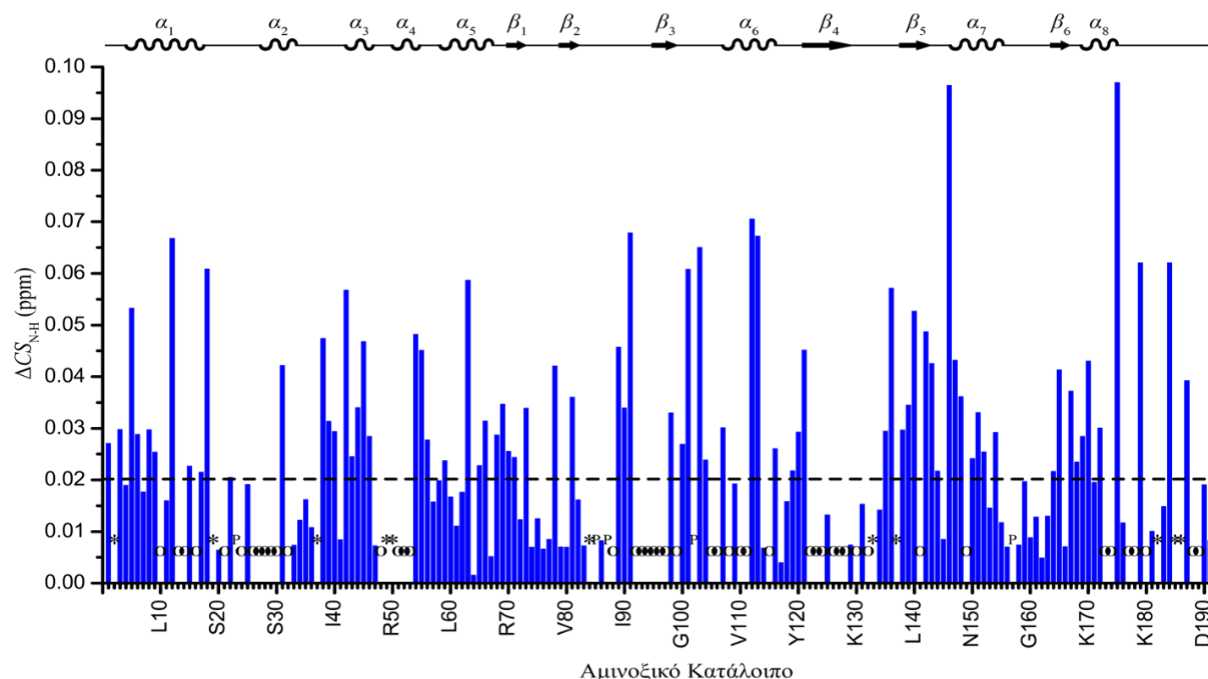
Η αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το polyU μελετήθηκε με την καταγραφή των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά από κάθε προσθήκη του polyU. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το φάσμα που μετρήθηκε πριν την πρώτη προσθήκη παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 85). Από την πρώτη προσθήκη του polyU αρκετές κορυφές μετατοπίζονται ή εξαφανίζονται, αποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση του LaM με το polyU. Μέχρι την τελευταία προσθήκη παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα φάσματα αυτά,

περισσότερες από τις υπόλοιπες αλληλεπιδράσεις με τις μεμονωμένες επικράτειες, ενώ αρκετά σήματα του συμπλόκου εξαφανίζονται. Από αυτά ορισμένα εμφανίζονται σε άλλη θέση στο φάσμα, ενώ άλλα δεν εμφανίζονται καθόλου. Επιπλέον, υπάρχουν σήματα που η θέση τους αλλάζει σταδιακά στα φάσματα.



Εικόνα 85: Υπέρθυση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N LaM-RRM1 (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την 1^η, τη 2^η, 3^η και την 4^η προσθήκη (με κόκκινο χρώμα).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η μετατόπιση της κορυφής συσχέτισης HN κάθε αμινοξέος του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 μετά την προσθήκη του polyU. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση (Εικόνα 86). Η ανάλυση των CSP πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γ. Μπούρα.



Εικόνα 86: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το LaM-RRM1 (αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1).

Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Thr5, Gln12, Ser18, Asn38, Ile42, Ile45, Ile54, Ser55, Glu63, Asn89, Asp91, Trp101, Glu103, Glu112, Phe113, Lys121, Lys136, Leu140, Asp142, Glu146, Glu175, Glu179 και Phe184. Επιπλέον, τα αμινοξέα Leu10, Val13, Glu14, Tyr16, Asn21, Arg24, Lys26, Phe27, Leu28, Arg29, Ser30, Ala32, Phe48, Met51, Lys52, Thr53, Glu88, Cys92, Gly93, Lys94, Thr95, Leu96, Tyr97, Lys99, Thr105, Thr106, Glu108, Val110, Gln111, Asn115, Val122, Val123, Ser124, Arg126, Leu127, Arg128, Lys130, Asp132, Ala141, Val149, Ser173, Asp174, Lys177, Asp178, Lys180, Asn188 και Gly189 εξαφανίζονται. Για τα Ser2, Asp19, Pro23, Asp37, Asn49, Arg50, Asp84, Pro85, Pro87, Pro102, Lys133, Gly137, Pro157, Lys182, Ala185 και Ser186 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH.

Ε.6. Αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg}

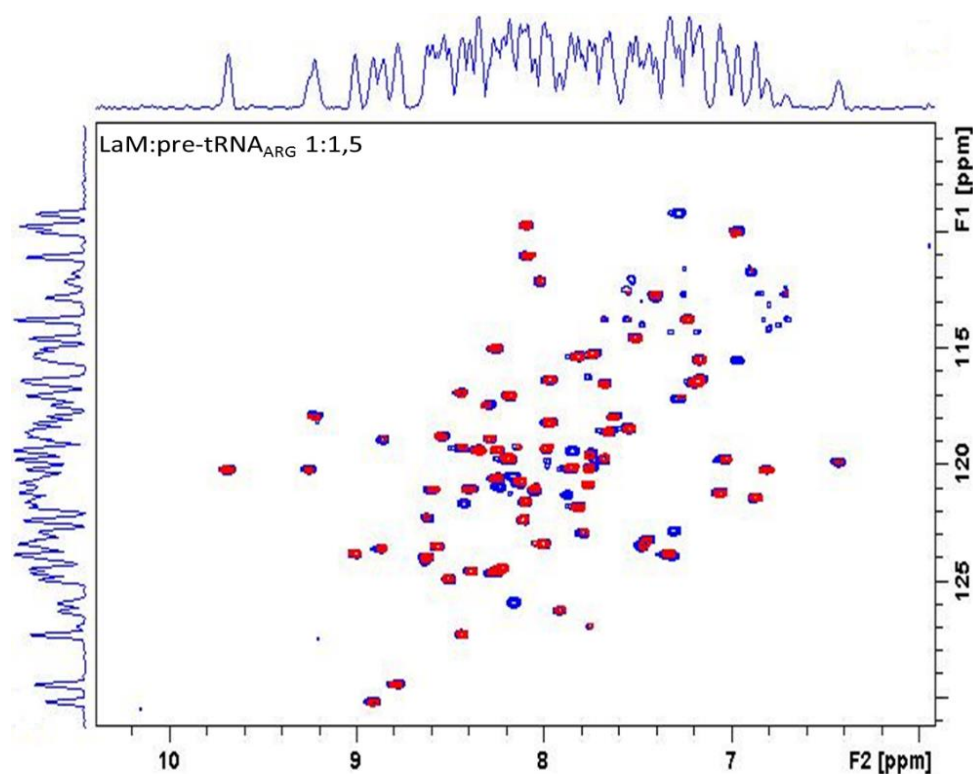
Η πρωτεΐνη La σχηματίζει ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο με τα πρόδρομα tRNA αναγνωρίζοντας το UUU-3'-OH άκρο τους. Μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της κάθε επικράτειας και των πολυπεπτιδίων που προκύπτουν από το συνδυασμό τους με το pre-tRNA_{Arg}, το οποίο φέρει το UUU-3'-OH άκρο, μέσω της Φασματοσκοπίας NMR. Γι' αυτό πραγματοποιήθηκαν τιτλοδοτήσεις των πολυπεπτιδίων LaM, RRM1, RRM2a και LaM-RRM1 καθώς και η αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων RRM1-RRM2a και LaM-RRM1-RRM2a της πρωτεΐνης La με το pre-tRNA_{Arg}. Επιπλέον, εξετάζονται τα αμινοξέα που επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση αυτή. Τα πολυπεπτίδια αυτά παρασκευάστηκαν με ¹⁵N επισήμανση σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στην ενότητα Δ.4. Το τελικό διάλυμα της πρωτεΐνης ήταν το 50mM KPi, pH7, ενώ σε αυτό δεν προστέθηκε διάλυμα αναστολέων πρωτεασών και DTT. Το pre-tRNA_{Arg} παρασκευάζεται με *in vitro* μεταγραφή όπως περιγράφεται στην ενότητα Δ.9. Το διάλυμα του pre-tRNA_{Arg} χωρίζεται σε eppendorf ανάλογα με τη ποσότητα του pre-tRNA_{Arg} που προστίθεται. Πριν από κάθε προσθήκη το pre-tRNA_{Arg} θερμαίνεται στους 60°C για 5min και στη συνέχεια αφήνεται να φτάσει η θερμοκρασία στους 37°C για προστεθεί στο πρωτεϊνικό διάλυμα.

Ε.6.1. Αλληλεπίδραση της επικράτειας LaM της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg}

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της επικράτειας LaM με το pre-tRNA_{Arg} η αλληλεπίδραση πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους, με σταδιακή προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} στο διάλυμα του LaM και με προσθήκη ολόκληρης της ποσότητας του pre-tRNA_{Arg} στο διάλυμα του LaM με αναλογία LaM προς pre-tRNA_{Arg} 1:1,5. Μετά από κάθε προσθήκη πραγματοποιήθηκε η λήψη του φάσματος ¹H-¹⁵N 2D TROSY, όπου καταγράφηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του αμιδικού σκελετού των πολυπεπτιδίων αυτών.

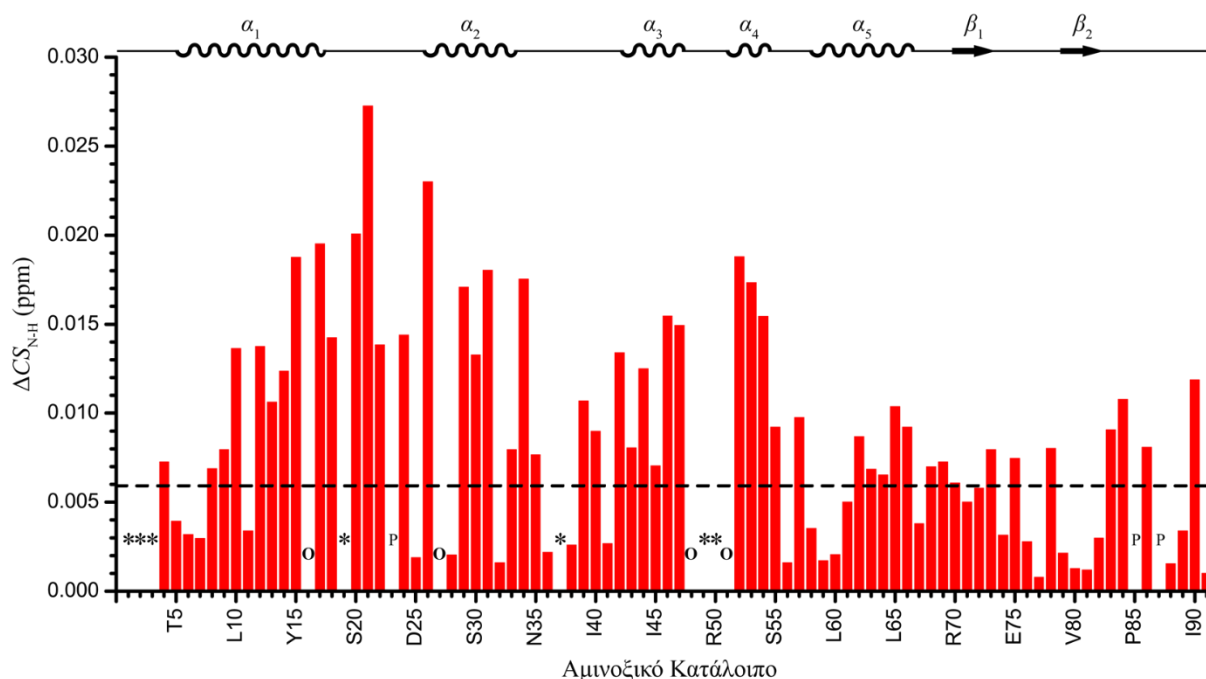
Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το φάσμα αναφοράς που μετρήθηκε πριν την πρώτη προσθήκη παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στις χημικές

μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 87). Συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} με αναλογία LaM προς pre-tRNA_{Arg} 1:1,5 παρατηρήθηκε ότι αρκετές κορυφές μετατοπίζονται ή εξαφανίζονται αποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση του LaM με το pre-tRNA_{Arg}. Επιπλέον, τα αμινοξέα του LaM που επηρεάζονται από την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} είναι τα ίδια κάθε φορά που πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση αυτή. Ενδεικτικά παρατίθεται υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N LaM και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την τελευταία προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} είναι 1:1,5. Σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση του πολυπεπτιδίου LaM ήταν 0,048mM.



Εικόνα 87: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N LaM (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την τελευταία προσθήκη (με κόκκινο χρώμα, αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1,5).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η μετατόπιση της κορυφής συσχέτισης HN κάθε αμινοξέος του LaM μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg}. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση (Εικόνα 88) μετά την τελευταία προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} στο LaM. Η ανάλυση των CSP πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γ. Μπούρα.



Εικόνα 88: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το LaM (αναλογία πρωτεΐνης προς *pre-tRNA_{Arg}* 1:1,5).

Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Leu10, Gln12, Tyr15, Phe17, Ser18, Ser20, Asn21, Phe22, Arg24, Lys26, Arg29, Ser30, Glu31, Lys34, Ile42, Ala46, Ser47, Lys52, Thr53 και Ile54. Επιπλέον, τα αμινοξέα Tyr16, Phe27, Phe48 και Met51 εξαφανίζονται. Για τα Met1, Ser2, Glu3, Asn19, Pro23, Asp37, Asn49, Arg50, Pro85, Pro87 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH.

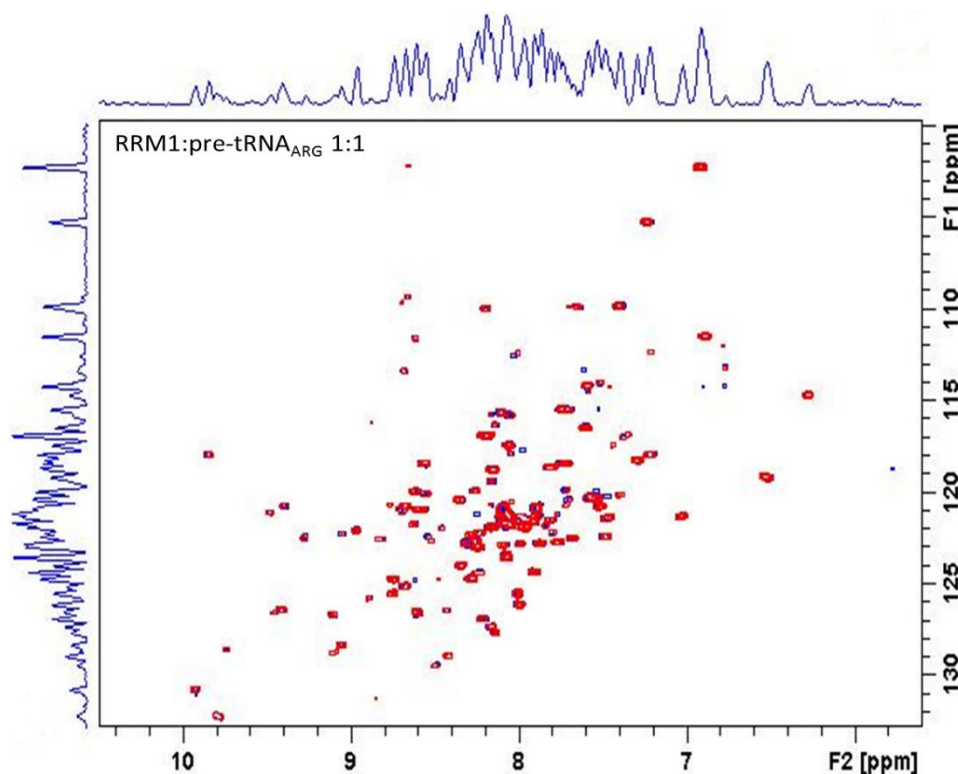
Ε.6.2. Αλληλεπίδραση της επικράτειας RRM1 της πρωτεΐνης La του του *Dictyostelium discoideum* με το *pre-tRNA_{Arg}*

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της επικράτειας RRM1 με το *pre-tRNA_{Arg}* πραγματοποιήθηκε σταδιακή προσθήκη του *pre-tRNA_{Arg}* στο διάλυμα του RRM1 που περιγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα. Μετά από κάθε προσθήκη πραγματοποιήθηκε η λήψη του φάσματος ^1H - ^{15}N 2D TROSY, όπου καταγράφηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του αμιδικού σκελετού των πολυπεπτιδίων αυτών.

Πίνακας 15: Τιτλοδότηση του ^{15}N RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με pre-tRNA_{Arg}.

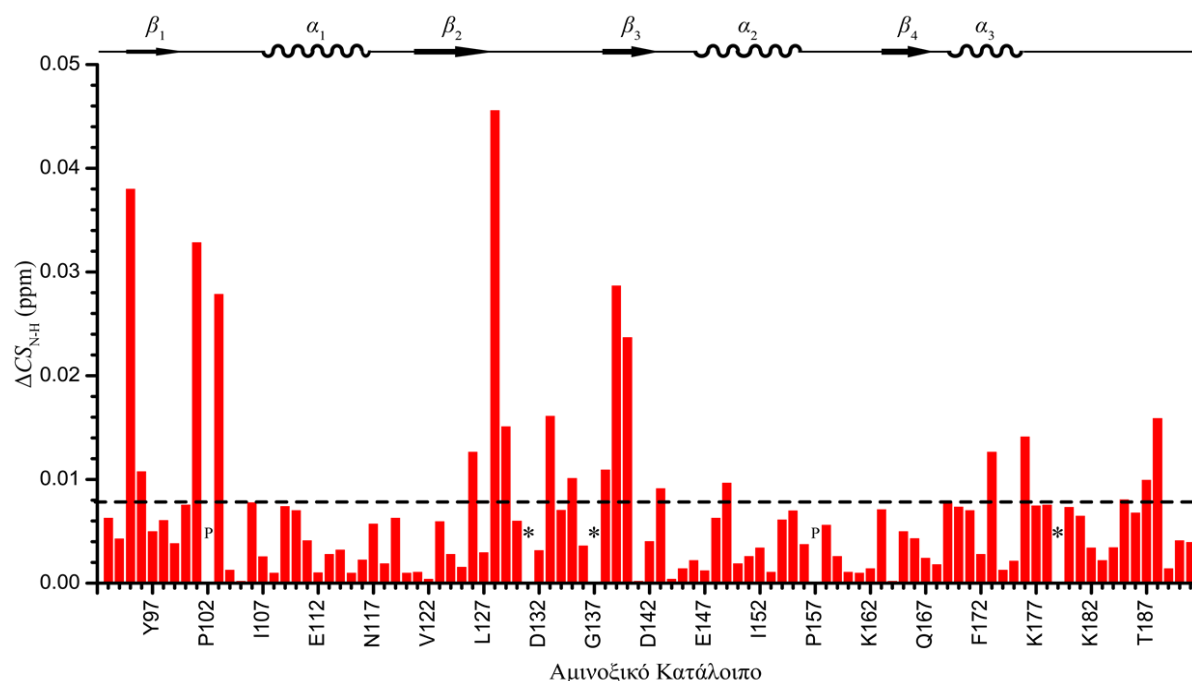
Προσθήκη	Όγκος pre-tRNA _{Arg} (σε μl)	Αναλογία RRM1:pre-tRNA _{Arg}
1	4	1:0,174
2	8	1:0,348
3	12	1:0,52
4	16	1:0,7
5	23	1:1

Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το φάσμα αναφοράς εντοπίστηκαν μικρές μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 89), αποδεικνύοντας ότι το RRM1 αλληλεπιδρά ενδεχομένως ασθενώς με το pre-tRNA_{Arg}. Μετά την τελευταία προσθήκη παρατηρούνται μικρές αλλαγές στα φάσματα αυτά, καθώς κάποια σήματα του RRM2α που μετατοπίζονται. Οι αλλαγές αυτές είναι όμοιες με αυτές που συμβαίνουν από την πρώτη προσθήκη.



Εικόνα 89: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N RRM1 (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την τελευταία προσθήκη (με κόκκινο χρώμα, αναλογία RRM1 προς pre-tRNA_{Arg} 1:1).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η μετατόπιση της κορυφής συσχέτισης HN κάθε αμινοξέος του RRM1 μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg}. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση (Εικόνα 90). Η ανάλυση των CSP πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γ. Μπούρα.



Εικόνα 90: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το RRM1 (αναλογία RRM1 προς pre-tRNA_{Arg} 1:1).

Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Thr95, Trp101, Glu103, Arg128, Lys129, Lys133, Phe139, Leu140 και Asn188. Κανένα από τα αμινοξέα του RRM1 δεν εξαφανίζεται στην τιτλοδότηση με το pre-tRNA_{Arg}. Για τα αμινοξέα Pro102, Ser131, Gly137, Pro157 και Glu179 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH.

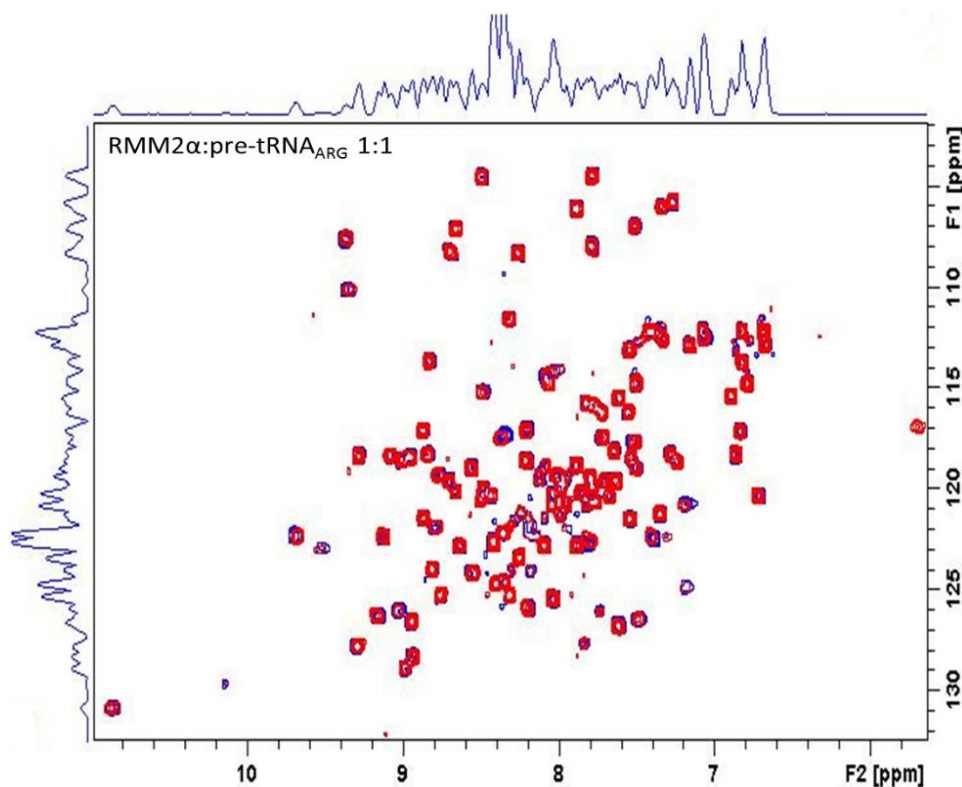
Ε.6.3. Αλληλεπίδραση της επικράτειας RRM2α της πρωτεΐνης La του του *Dictyostelium discoideum* με το *pre-tRNA_{Arg}*

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της επικράτειας RRM2α με το *pre-tRNA_{Arg}* πραγματοποιήθηκε σταδιακή προσθήκη του *pre-tRNA_{Arg}* στο διάλυμα του RRM2α που περιγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα. Μετά από κάθε προσθήκη πραγματοποιήθηκε η λήψη του φάσματος ^1H - ^{15}N 2D TROSY, όπου καταγράφηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του αμιδικού σκελετού των πολυπεπτιδίων αυτών.

Πίνακας 16: Τιτλοδότηση του ^{15}N RRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με *pre-tRNA_{Arg}*.

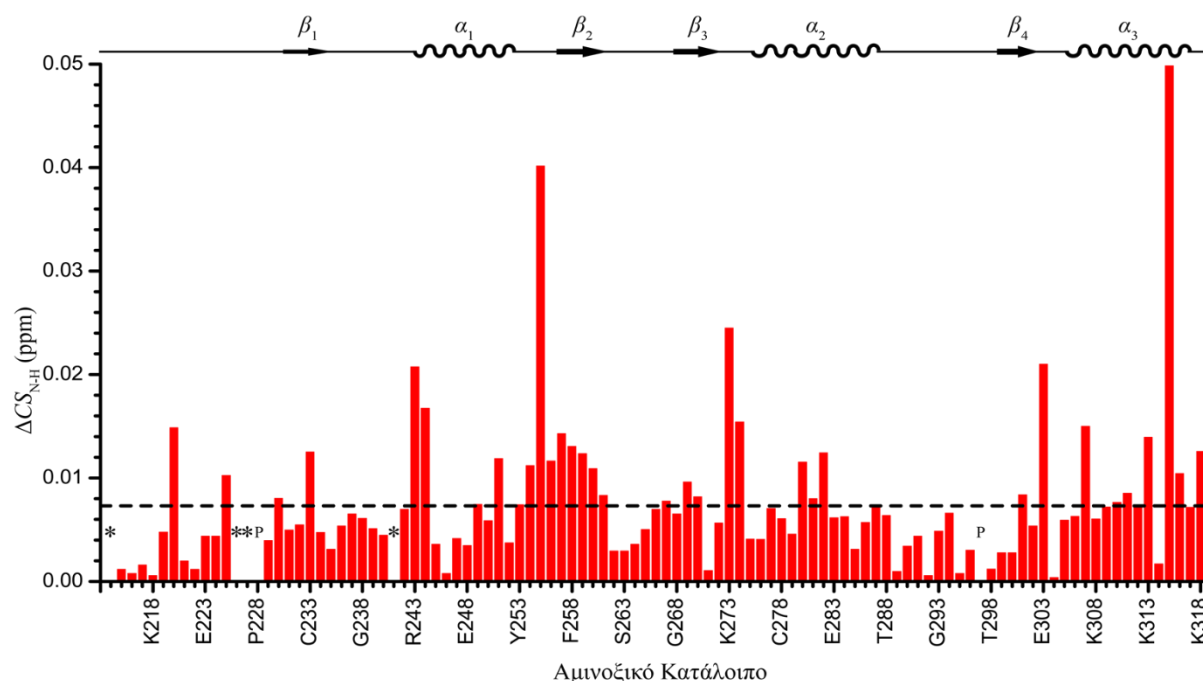
Προσθήκη	Όγκος <i>pre-tRNA_{Arg}</i> (σε μl)	Αναλογία πολυπεπτιδίου: <i>pre-tRNA_{Arg}</i>
1	10	1:0,25
2	20	1:0,5
3	30	1:0,75
4	40	1:1

Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το φάσμα αναφοράς εντοπίστηκαν μικρές μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 91), αποδεικνύοντας ότι το RRM2α αλληλεπιδρά ενδεχομένως ασθενώς με το *pre-tRNA_{Arg}*. Μετά την τελευταία προσθήκη παρατηρούνται αλλαγές στα φάσματα αυτά, καθώς υπάρχουν σήματα του RRM2α που μετατοπίζονται. Οι αλλαγές αυτές είναι όμοιες με αυτές που συμβαίνουν από την πρώτη προσθήκη.



Εικόνα 91: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N RRM2α (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την 4^η προσθήκη (με κόκκινο χρώμα, αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η μετατόπιση της κορυφής συσχέτισης HN κάθε αμινοξέος του RRM2α μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg}. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση (Εικόνα 92). Η ανάλυση των CSP πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γ. Μπούρα.



Εικόνα 92: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το RRM2α (αναλογία πρωτεΐνης προς *pre-tRNA_{Arg}* 1:1).

Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Arg243, Gly244, Glu255, Lys273, Thr274, Glu303, Glu307 και Ile315. Κανένα από τα αμινοξέα του RRM2α δεν εξαφανίζεται μετά από την τελευταία προσθήκη του *pre-tRNA_{Arg}* σε αναλογία 1:1. Για τα αμινοξέα Lys214, Met226, Ile227, Pro228, Leu241 και Pro297 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH.

Ε.6.4. Αλληλεπίδραση της επικράτειας LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το *pre-tRNA_{Arg}*

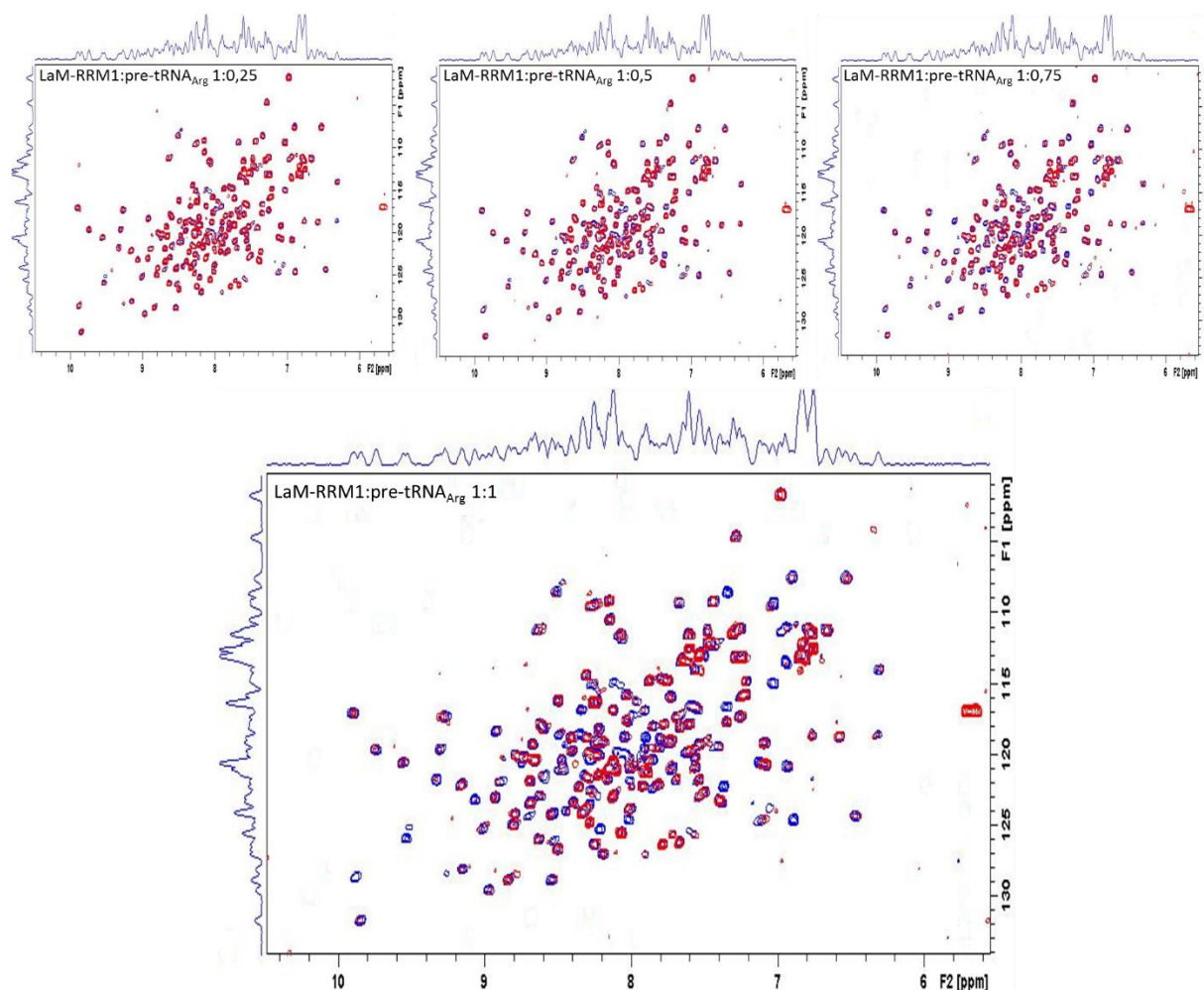
Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της επικράτειας LaM-RRM1 με το *pre-tRNA_{Arg}* πραγματοποιήθηκε συνολικά τρεις φορές με σταδιακή προσθήκη του *pre-tRNA_{Arg}* στο διάλυμα του LaM-RRM1. Στα δύο πρώτα πειράματα οι συγκεντρώσεις του *pre-tRNA_{Arg}* δεν ήταν ικανοποιητικές, ώστε να υπάρχει αναλογία του LaM-RRM1 με το *pre-tRNA_{Arg}* 1:1. Ωστόσο, τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν στα δύο πρώτα πειράματα είναι αντίστοιχα με αυτά που αλληλεπιδρούν στα πρώτα στάδια του τρίτου

πειράματος. Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται οι σταδιακές προσθήκες του pre-tRNA_{Arg} στο διάλυμα του LaM-RRM1.

Πίνακας 17: Τιτλοδότηση του ^{15}N LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με pre-tRNA_{Arg}.

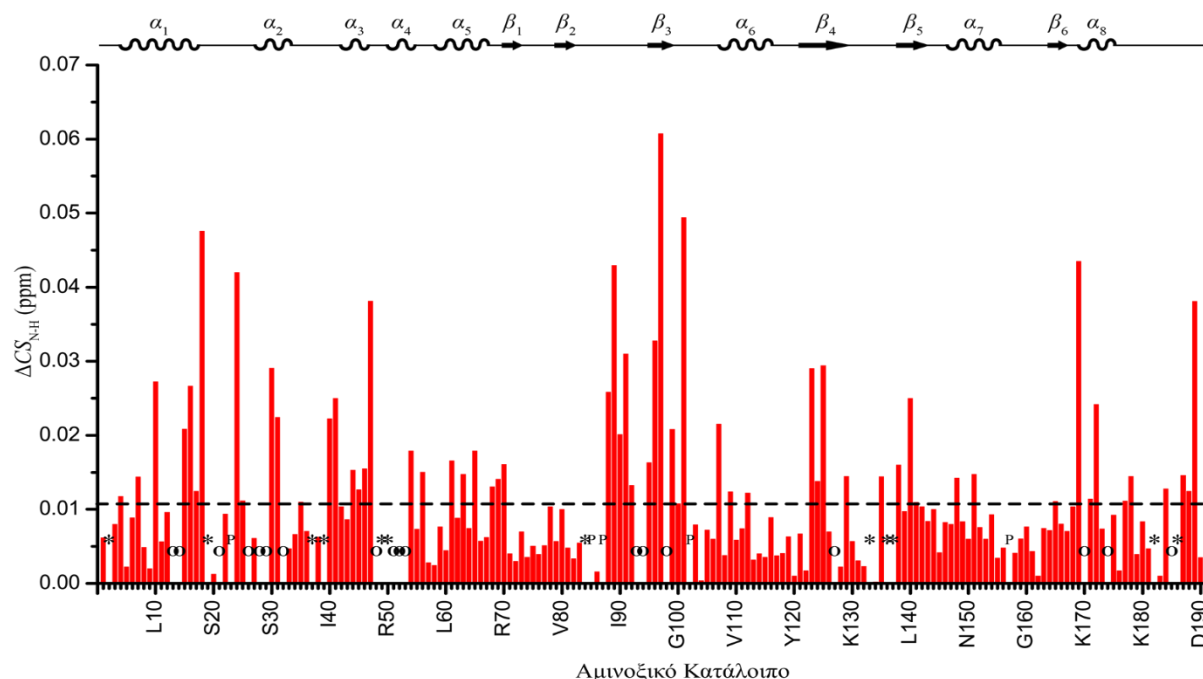
Προσθήκη	Όγκος pre-tRNA _{Arg} (σε μl)	Αναλογία πολυπεπτιδίου: pre-tRNA _{Arg}
1	4	1:0,1
2	10	1:0,25
3	20	1:0,5
4	30	1:0,75
5	40	1:1

Μετά από κάθε προσθήκη πραγματοποιήθηκε η λήψη του φάσματος ^1H - ^{15}N 2D TROSY, όπου καταγράφηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του αμιδικού σκελετού του LaM-RRM1. Από την υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το φάσμα αναφοράς που μετρήθηκε πριν την πρώτη προσθήκη παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 93). Συγκεκριμένα, ότι αρκετές κορυφές μετατοπίζονται ή εξαφανίζονται, αποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση του LaM-RRM1 με το pre-tRNA_{Arg}. Αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις παρατηρούνται από τις πρώτες προσθήκες (1^η και 2^η), ενώ οι περισσότερες αλλαγές στο φάσμα του ^1H - ^{15}N 2D TROSY συμβαίνουν μετά την 4^η προσθήκη (όπου η αναλογία LaM-RRM1 προς pre-tRNA_{Arg} είναι 1:0,75). Η συγκέντρωση του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 ήταν 0,025mM.



Εικόνα 93: Υπέρθυση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N LaM-RRM1 (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά τη 2^η, την 3^η, 4^η και την 5^η προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} (με κόκκινο χρώμα).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η μετατόπιση της κορυφής συσχέτισης HN κάθε αμινοξέος του RRM2a μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg}. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση (Εικόνα 94). Η ανάλυση των CSP πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γ. Μπούρα.



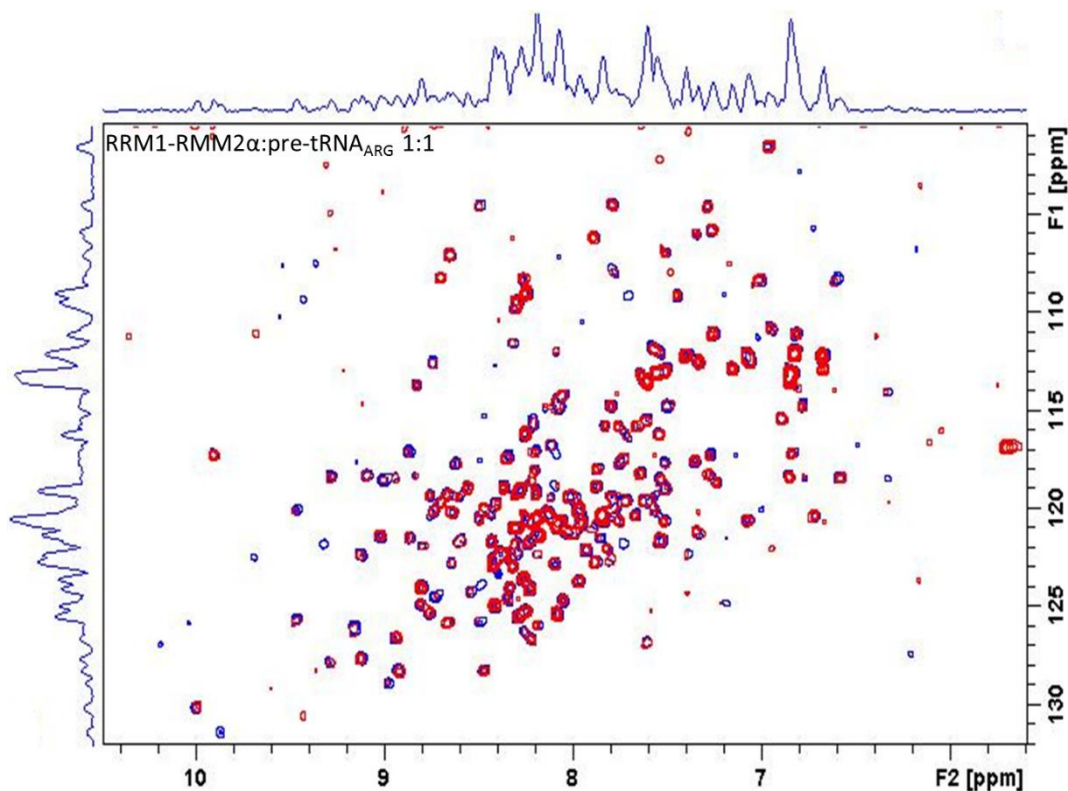
Εικόνα 94: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το LaM-RRM1 (αναλογία πρωτεΐνης προς *pre-tRNA_{Arg}* 1:1).

Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Leu10, Tyr15, Tyr16, Ser18, Arg24, Ser30, Glu31, Ile40, Ser41, Ser47, Glu88, Asn89, Ile90, Asp91, Leu96, Tyr97, Lys99, Trp101, Ile107, Val123, Val125, Leu140, Phe169, Phe172 και Gly189. Επιπλέον, τα αμινοξέα Val13, Glu14, Asn21, Lys26, Leu28, Arg29, Ala32, Phe48, Met51, Lys52, Thr53, Gly93, Lys94, Ser98, Leu127, Lys136, Lys170, Asp174 και Ala185 εξαφανίζονται. Για τα Met1, Ser2, Asp19, Pro23, Asp37, Tyr39, Asn49, Arg50, Asp84, Pro85, Pro87, Pro102, Lys133, Gly137, Pro157, Lys182 και Ser186 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH.

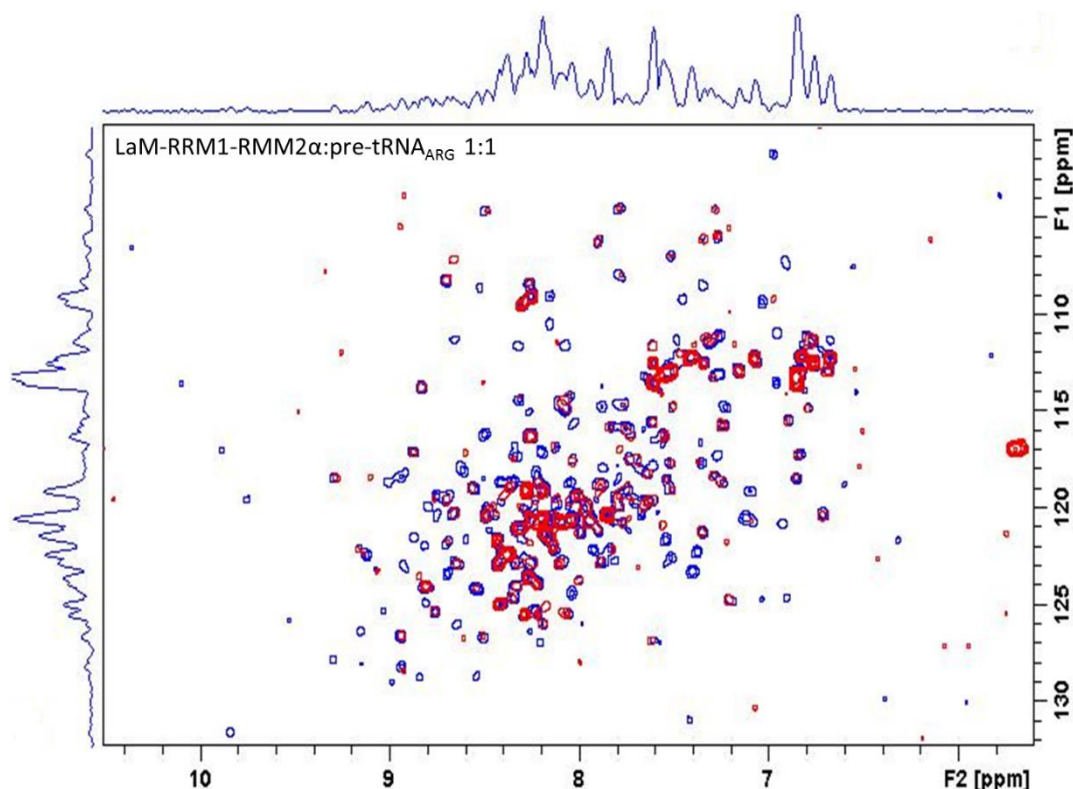
Ε.6.5. Αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων RRM1-RRM2α και LaM-RRM1-RRM2α της πρωτεΐνης La του του *Dictyostelium discoideum* με το *pre-tRNA_{Arg}*

Η αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων RRM1-RRM2α και LaM-RRM1-RRM2α με το *pre-tRNA_{Arg}* πραγματοποιήθηκε με προσθήκη ολόκληρης της ποσότητας του *pre-tRNA_{Arg}* στο διάλυμα των RRM1-RRM2α και LaM-RRM1-RRM2α με

αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1. Πριν την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} λήφθηκε το φάσμα αναφοράς ^1H - ^{15}N 2D TROSY για το κάθε πολυπεπτίδιο και μετά από κάθε προσθήκη πραγματοποιήθηκε επίσης η λήψη του φάσματος ^1H - ^{15}N 2D TROSY, όπου καταγράφηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του αμιδικού σκελετού των πολυπεπτιδίων αυτών. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών για τα πολυπεπτίδια RRM1-RRM2α και LaM-RRM1-RRM2α παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 95 και 96). Και στις δύο περιπτώσεις αρκετές κορυφές μετατοπίζονται ή εξαφανίζονται, αποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση των RRM1-RRM2α και LaM-RRM1-RRM2α με το pre-tRNA_{Arg}. Η συγκέντρωση των πολυπεπτιδίων ήταν 0,025mM, ενώ για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε σωληνάκι τύπου shigemī (ειδικό σωληνάκι NMR για τη μέτρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε όγκο 250μl, δηλαδή σε μικρότερο όγκο).

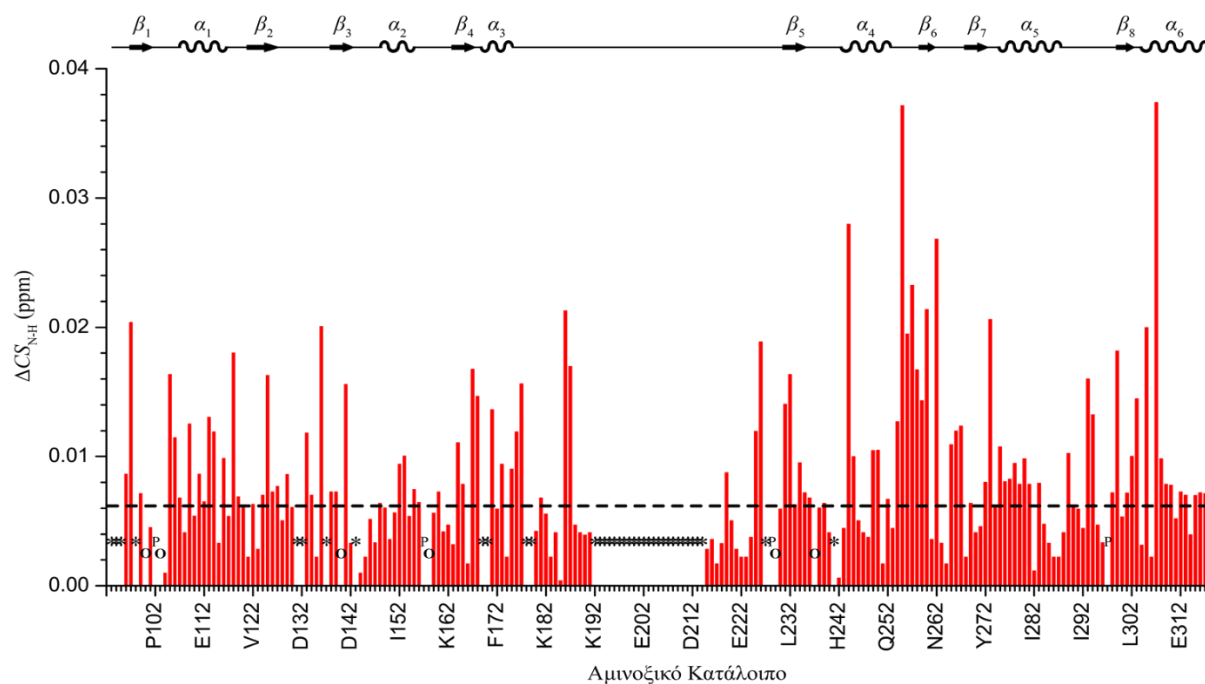


Εικόνα 95: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N RRM1-RRM2α (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} (με κόκκινο χρώμα, αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1).



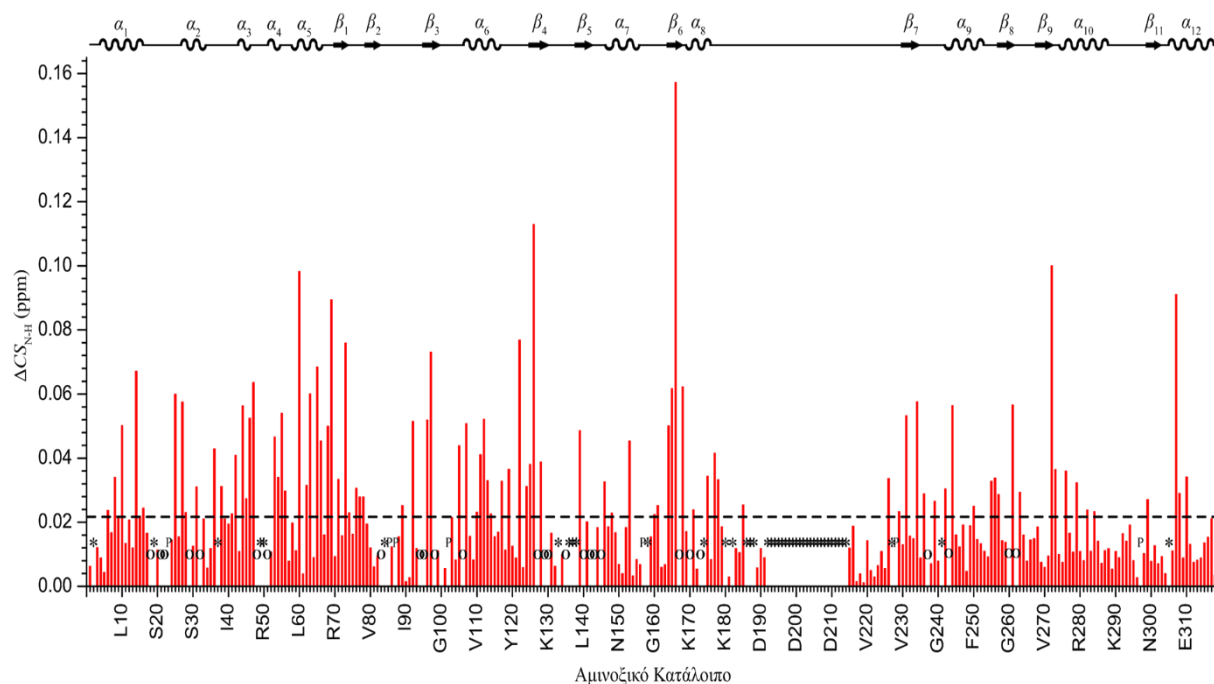
Εικόνα 96: Υπέρθυση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N LaM-RRM1-RRM2α (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} (με κόκκινο χρώμα, αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η μετατόπιση της κορυφής συσχέτισης HN κάθε αμινοξέος των πολυπεπτιδίων RRM1-RRM2α και LaM-RRM1-RRM2α μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg}. Τα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζουν τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση (Εικόνα 97 και 98). Η ανάλυση των CSP πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γ. Μπούρα. Από τα φάσματα και από τα διαγράμματα και των δύο πολυπεπτιδίων παρατηρούνται αρκετές διαφοροποιήσεις. Τα αμινοξέα που υφίστανται μεγάλες αλλαγές στις χημικές τους μετατοπίσεις ή που εξαφανίζονται εντοπίζονται σε όλες τις επικράτειες των πολυπεπτιδίων. Επομένως, όλες οι επικράτειες της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το pre-tRNA_{Arg}.



Εικόνα 97: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το RRM1-RRM2α (αναλογία πρωτεΐνης προς *pre*-tRNA_{Arg} 1:1).

Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων του πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Tyr97, Thr105, Lys109, Phe113, Gly118, Val125, Lys136, Ala141, Gln167, Thr168, Gln171, Lys177, Ser186, Thr187, Met226, Ile231, Leu232, Gly244, Gly254, Glu255, Val256, Gln257, Phe258, Val259, Gly260, Asn262, Asn267, Lys273, Gly293, Gly294, Tyr299, Glu303, Glu305 και Glu307. Επιπλέον, τα αμινοξέα Gly100, Glu103, Leu140, Lys158, Gly229, Val237 εξαφανίζονται. Για τα Gly293, Lys94, Thr95, Ser98, Pro102, Ser131, Asp132, Gly137, Phe143, Pro157, Asp178, Glu179, Lys214, Ile227, Pro228, Leu241 και Pro297 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH. Επίσης, δεν υπάρχουν πληροφορίες για την περιοχή του συνδέτη Lys192-Asn213, διότι δεν έχει πραγματοποιηθεί η ταυτοποίηση των πυρήνων για το πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α.



Εικόνα 98: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το LaM-RRM1-RRM2α (αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1).

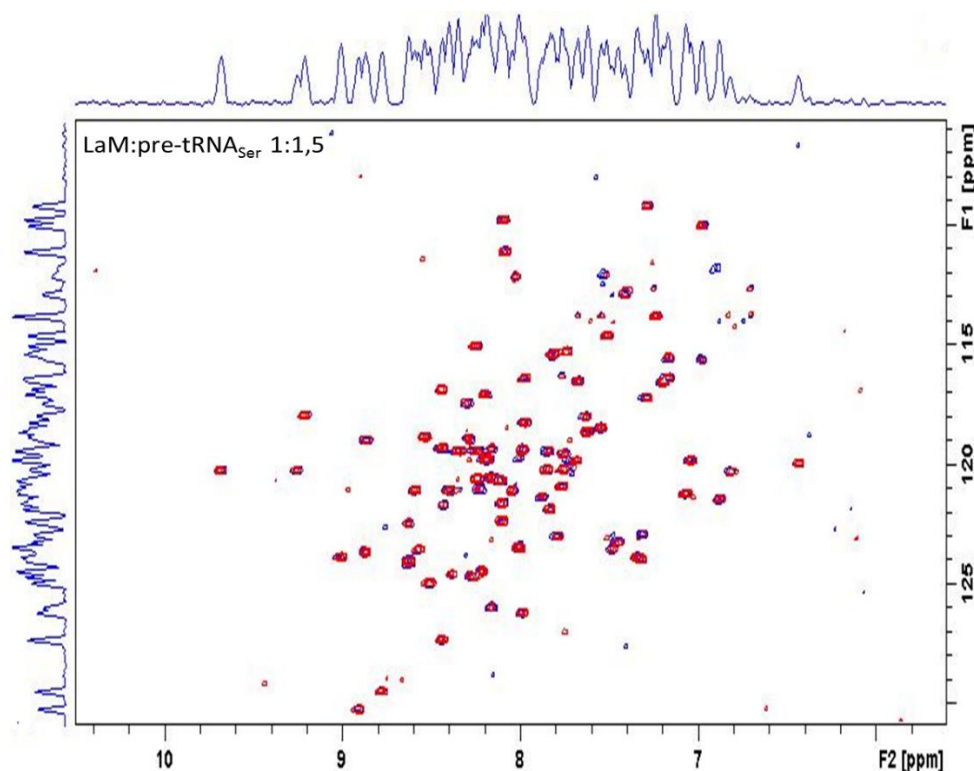
Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1-RRM2α παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Leu10, Glu14, Asp25, Phe27, Val44, Ala46, Ser47, Ser55, Leu60, Glu63, Leu65, Thr69, Val73, Cys92, Leu96, Tyr97, Ile107, Glu112, Val122, Arg126, Leu164, Ile165, Tyr166, Thr168, Ile231, Phe234, Gly244, Thr261, Tyr272 και Glu307. Επιπλέον, τα αμινοξέα Ser18, Asn21, Phe22, Arg29, Ala32, Phe48, Met51, Leu83, Lys94, Thr95, Ser98, Gly100, Thr106, Leu127, Lys129, Lys130, Lys133, Phe135, Leu140, Asp142, Phe143, Thr145, Gln167, Lys170, Ser173, Val237, Arg243, Gly260 και Asn262 εξαφανίζονται. Για τα Ser2, Asp19, Pro23, Asp37, Asn49, Arg50, Asp84, Pro85, Pro87, Pro102, Lys136, Gly137, Ser138, Pro157, Lys158, Asp174, Lys180, Lys182, Ser186, Thr187, Asn188, Lys214, Ile227, Pro228, Leu241, Pro297 και Glu305 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH. Επίσης, δεν υπάρχουν πληροφορίες για την περιοχή του συνδέτη μεταξύ του RRM1 και του RRM2α Lys192-Asn213, διότι δεν έχει πραγματοποιηθεί η ταυτοποίηση των πυρήνων για το πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α.

Ε.7. Αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων LaM και LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Ser}

Εξετάστηκε η ικανότητα της αλληλεπίδρασης των πολυπεπτιδίων LaM και LaM-RRM1 με το pre-tRNA_{Ser}, το οποίο φέρει μία κοντή και μεταλλαγμένη 3' ακόλουθο αλληλουχία (με GCUUAA-3'-OH άκρο) και μία μακριά και μεταλλαγμένη 5' οδηγό αλληλουχία μέσω της Φασματοσκοπίας NMR.

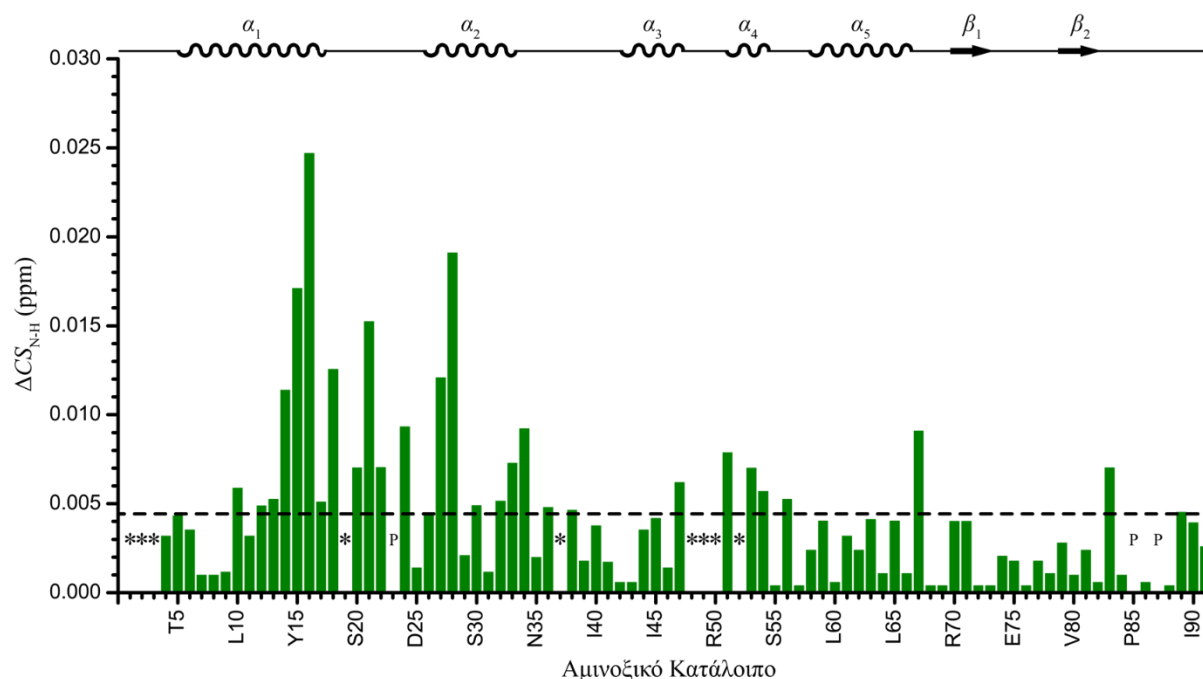
Η αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων LaM και LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La με το pre-tRNA_{Ser} πραγματοποιήθηκε με προσθήκη ολόκληρης της ποσότητας του pre-tRNA_{Ser} στο διάλυμα του LaM και του LaM-RRM1 με αναλογία LaM προς pre-tRNA_{Ser} 1:1,5 και LaM-RRM1 προς pre-tRNA_{Ser} 1:1. Επιπλέον, εξετάζονται τα αμινοξέα που επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση αυτή. Τα πολυπεπτίδια αυτά παρασκευάστηκαν με ¹⁵N επισήμανση σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στην ενότητα Δ.2. Το τελικό διάλυμα της πρωτεΐνης ήταν το 50mM KPi, pH7, ενώ σε αυτό δεν προστέθηκε διάλυμα αναστολέων πρωτεασών και DTT. Το pre-tRNA_{Ser} παρασκευάζεται με in vitro μεταγραφή όπως περιγράφεται στην ενότητα Δ.9. Πριν από την προσθήκη το pre-tRNA_{Ser} θερμαίνεται στους 60°C για 5min και στη συνέχεια αφήνεται να φτάσει η θερμοκρασία στους 37°C. Μετά από κάθε προσθήκη πραγματοποιήθηκε η λήψη του φάσματος ¹H-¹⁵N 2D TROSY, όπου καταγράφηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του αμιδικού σκελετού των πολυπεπτιδίων αυτών.

Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ¹H-¹⁵N 2D TROSY για το LaM πριν και μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Ser} παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 99). Συγκεκριμένα υπάρχουν κορυφές που μετατοπίζονται αποδεικνύοντας την ενδεχομένως ασθενώς αλληλεπίδραση του LaM με το pre-tRNA_{Ser}. Ωστόσο, καμία κορυφή του LaM δεν εξαφανίζεται. Η συγκέντρωση του πολυπεπτιδίου LaM ήταν 0,048mM.



Εικόνα 99: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N LaM (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Ser} (με κόκκινο χρώμα, αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Ser} 1:1,5).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η μετατόπιση της κορυφής συσχέτισης HN κάθε αμινοξέος του LaM μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Ser}. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση (Εικόνα 100). Η ανάλυση των CSP πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γ. Μπούρα. Στο διάγραμμα αυτό παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Glu14, Tyr15, Tyr16, Ser18, Asn21, Phe27 και Leu28. Κανένα από τα αμινοξέα του LaM δεν εξαφανίζεται μετά από την τελευταία προσθήκη του pre-tRNA_{Ser} σε αναλογία 1:1,5. Για τα αμινοξέα Met1, Ser2, Glu3, Asn19, Pro23, Asp37, Phe48, Asn49, Arg50, Lys52, Pro85 και Pro87 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH.



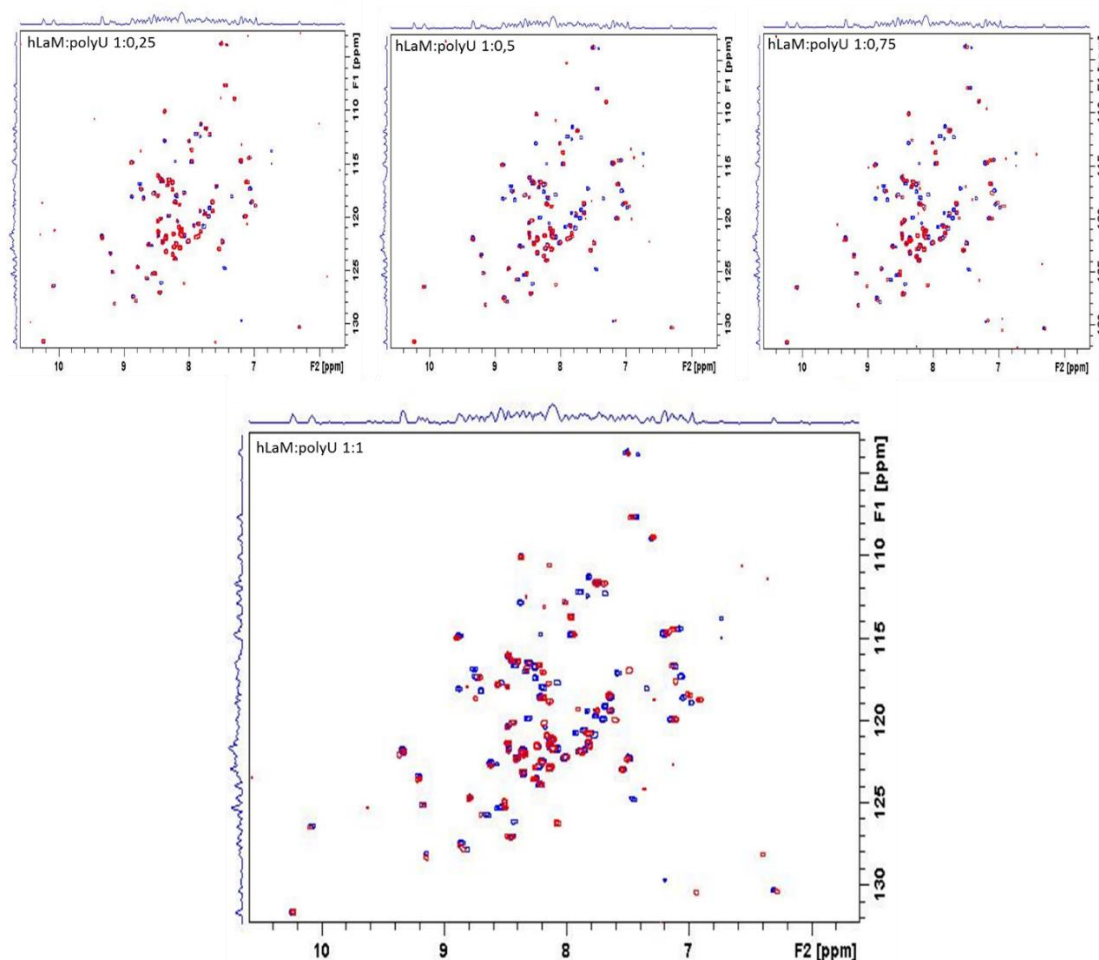
Εικόνα 100: : Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το LaM (αναλογία πρωτεΐνης προς *pre-tRNA_{Ser}* 1:1,5).

Ακολούθησε η ίδια διαδικασία για την αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 με το *pre-tRNA_{Ser}*. Η συγκέντρωση του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 ήταν 0,045Mm. Στο φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY του συμπλόκου παρατηρήθηκε η εξαφάνιση της πλειοψηφίας των σημάτων του πολυπεπτιδίου και γι' αυτό δεν ήταν δυνατό να καταλήξουμε σε συμπεράσματα.

Ε.8. Αλληλεπίδραση των επικρατειών της πρωτεΐνης *human* La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

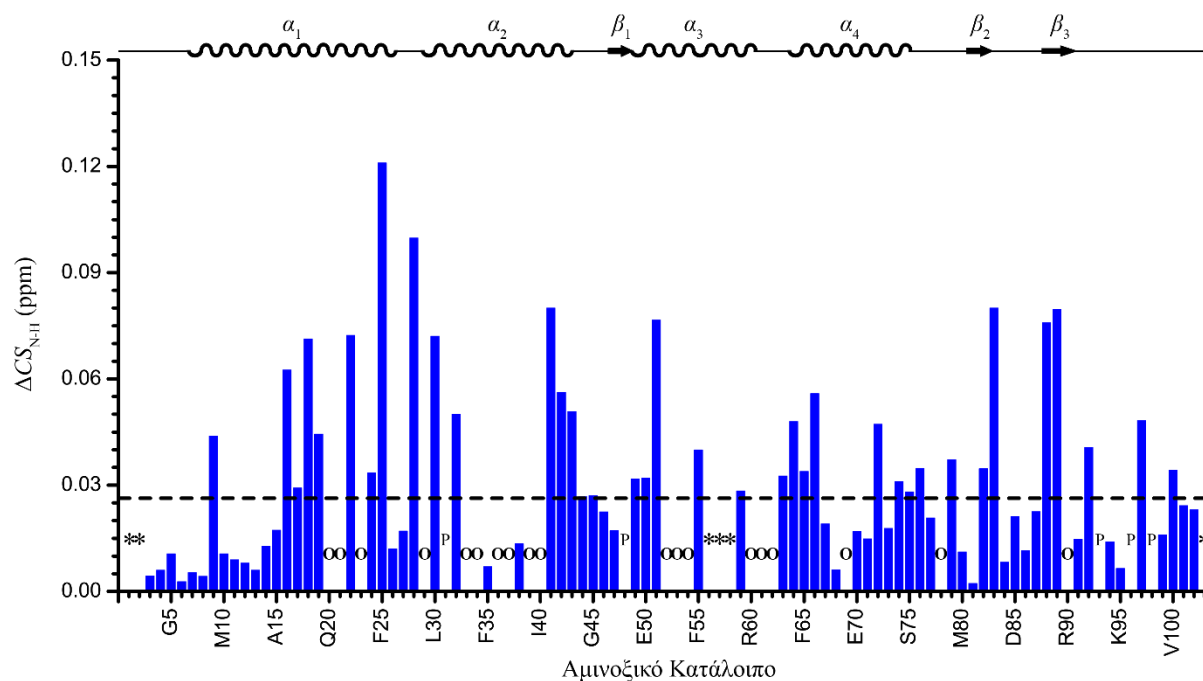
Ε.8.1. Αλληλεπίδραση της επικράτειας hLaM της πρωτεΐνης *human* La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

Η αλληλεπίδραση της επικράτειας hLaM της πρωτεΐνης *human* La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU μελετήθηκε με την καταγραφή των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του hLaM μετά από την κάθε προσθήκη του polyU. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το φάσμα αναφοράς που μετρήθηκε πριν την πρώτη προσθήκη παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 101). Από την πρώτη προσθήκη του polyU αρκετές κορυφές μετατοπίζονται ή εξαφανίζονται, αποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση του hLaM με το polyU. Μέχρι την τελευταία προσθήκη παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα φάσματα αυτά, ενώ αρκετά σήματα του συμπλόκου εξαφανίζονται.



Εικόνα 101: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N hLaM (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την 1^η, τη 2^η, 3^η και την 4^η προσθήκη (με κόκκινο χρώμα).

Ακολούθησε ο υπολογισμός της μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN κάθε αμινοξέος της επικράτειας hLaM μετά την προσθήκη του polyU. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση (Εικόνα 102). Η ανάλυση των CSP πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γ. Μπούρα.

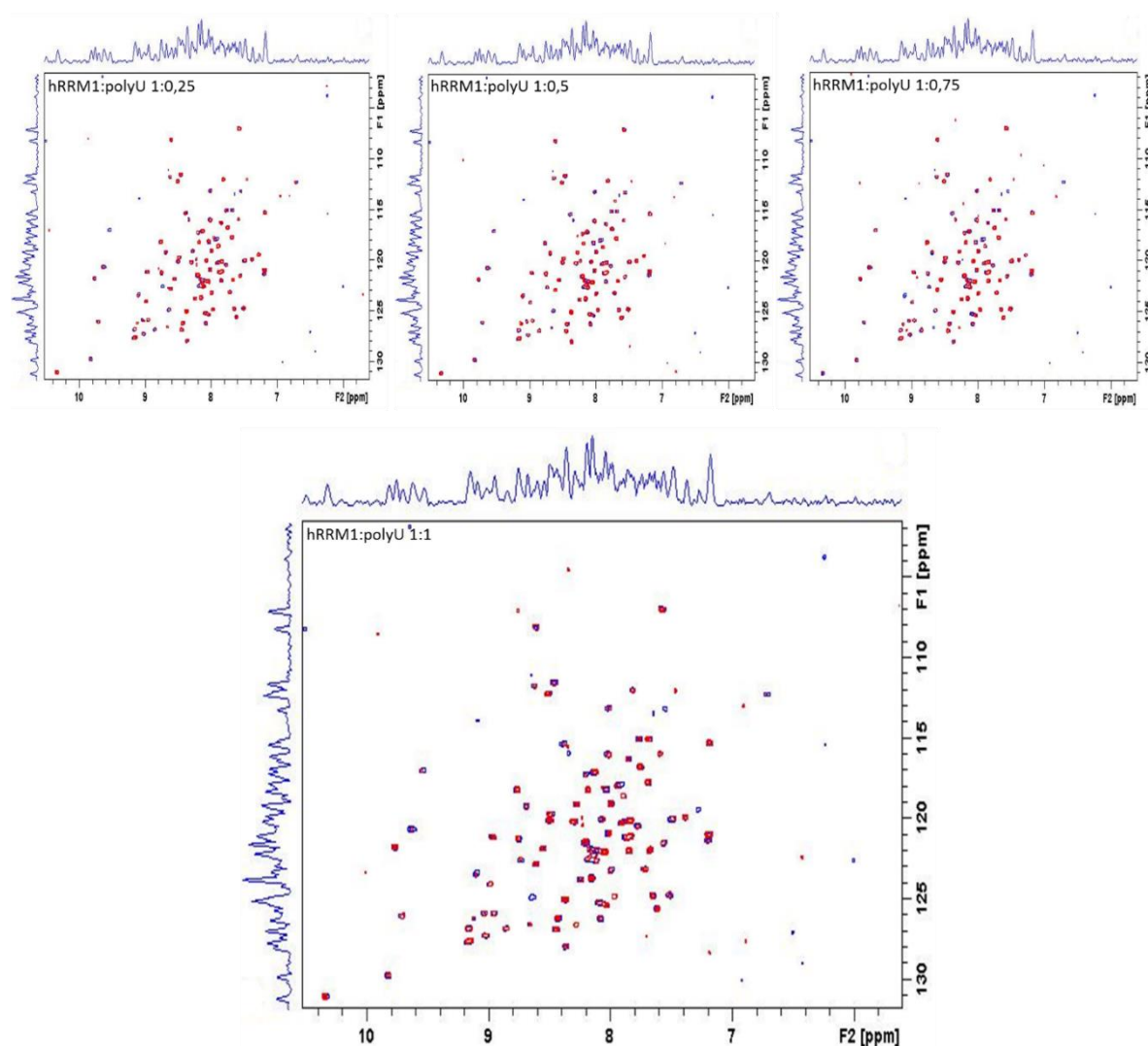


Εικόνα 102: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το hLaM (αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1).

Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Lys16, Cys18, Glu22, Phe25, Phe28, Leu30, Lys41, Ile51, Ser83, Lys88 και Ile89. Επιπλέον, τα αμινοξέα Gln20, Ile21, Tyr23, Asn29, Asp33, Lys34, Leu36, Lys37, Gln39, Ile40, Met52, Ile53, Lys54, Arg60, Leu61, Thr62, Val69, Glu78 και Arg90 εξαφανίζονται. Για τα Met1, Ala2, Pro31, Pro48, Asn56, Arg57, Leu58, Pro93, Pro96, Pro98 και Glu103 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH.

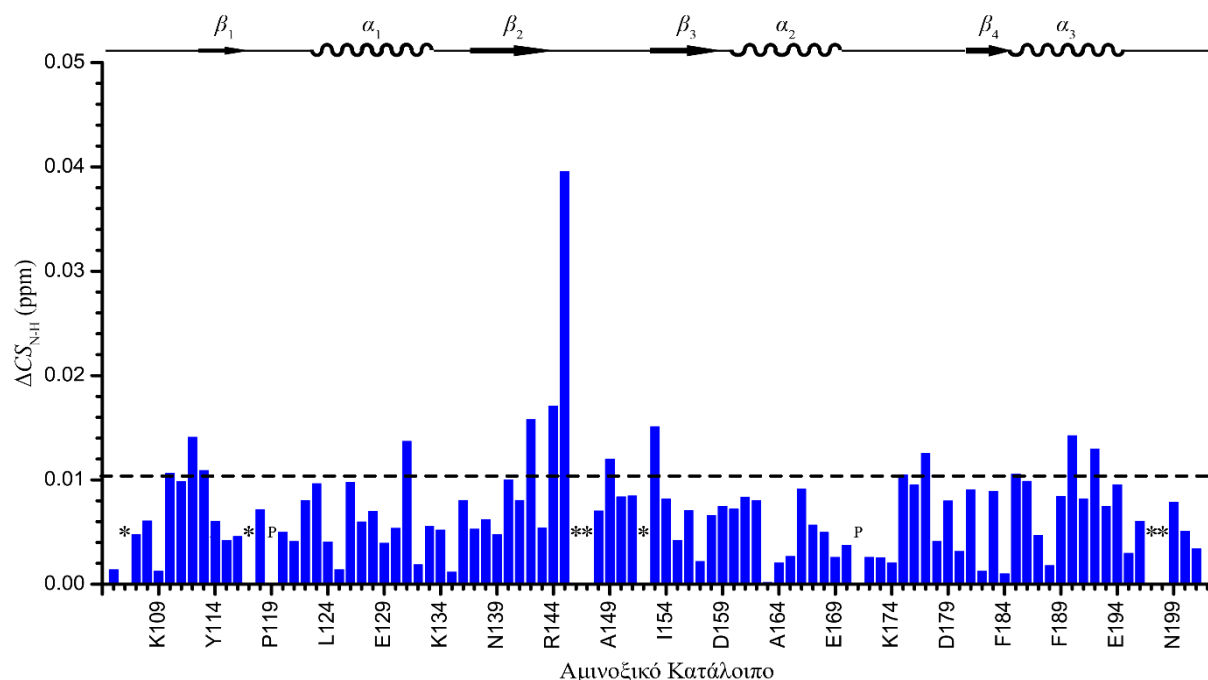
Ε.8.2. Αλληλεπίδραση της επικράτειας hRRM1 της πρωτεΐνης *human* La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

Η αλληλεπίδραση της επικράτειας hRRM1 της πρωτεΐνης *human* La με το polyU μελετήθηκε με την καταγραφή των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY. Κατά την προσθήκη του polyU στο διάλυμα της πρωτεΐνης σχηματίστηκε ίζημα. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το φάσμα αναφοράς παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 103). Μετά την πρώτη προσθήκη του polyU ορισμένες κορυφές μετατοπίζονται ή εξαφανίζονται, αποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση του hRRM1 με το polyU. Μέχρι την τελευταία προσθήκη παρατηρούνται αρκετές αλλαγές στα φάσματα αυτά, Αρκετά σήματα εξαφανίζονται, ενώ σε άλλα αλλάζει η θέση τους σταδιακά στα φάσματα.



Εικόνα 103: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N hRRM1 (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την 1^η, τη 2^η, 3^η και την 4^η προσθήκη (με κόκκινο χρώμα).

Ακολουθεί το διάγραμμα διαταραχής χημικών μετατοπίσεων που απεικονίζονται τα αμινοξέα του hRRM1 που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία 1:1 (Εικόνα 104). Η ανάλυση των CSP πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γ. Μπούρα.



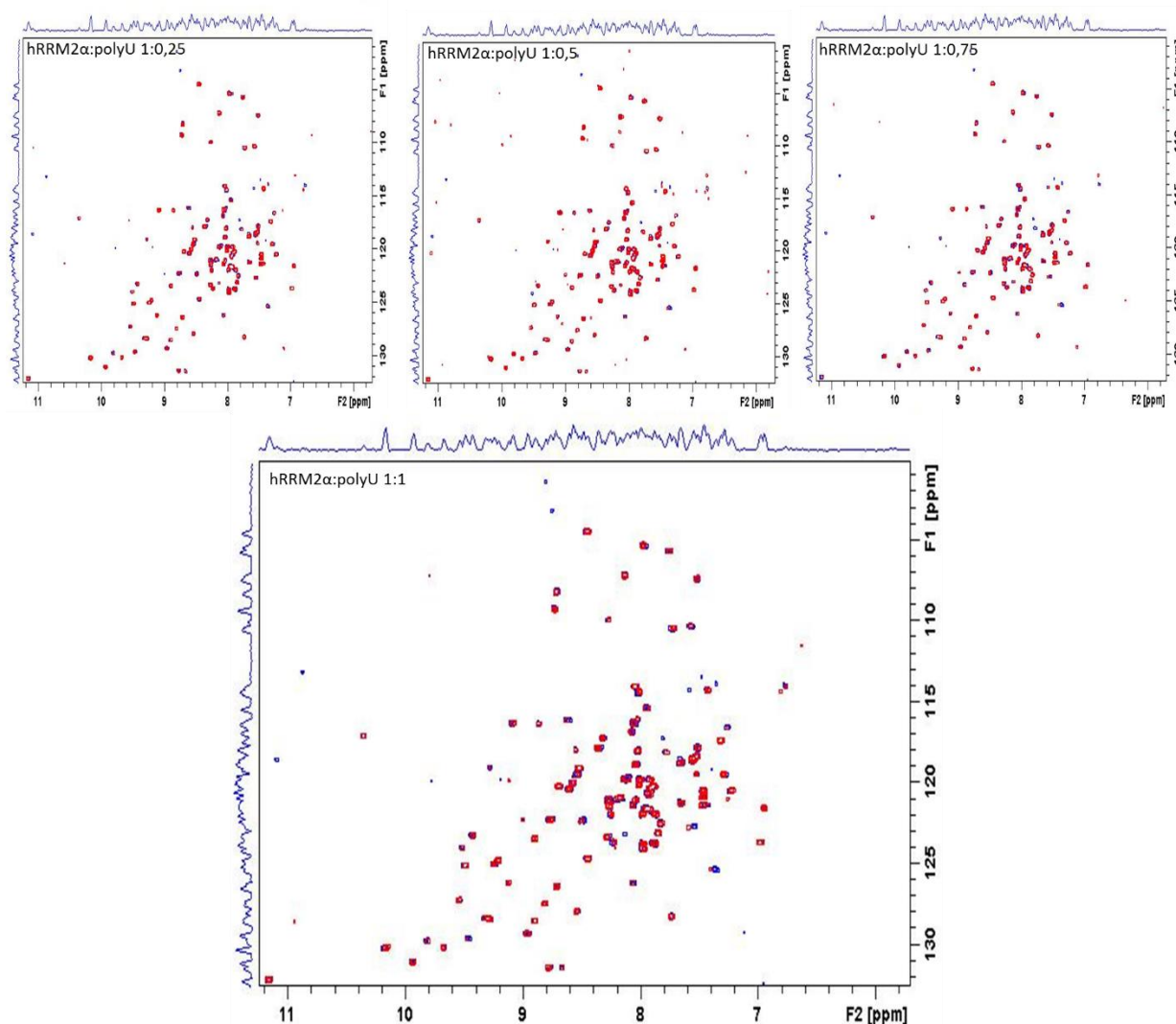
Εικόνα 104: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το hRRM1 (αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1).

Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Asn110, Ser112, Val113, Leu131, Met142, Arg144, Thr145, Ala149, Ser153, Tyr175, Glu177, Lys185, Ala190 και Lys192. Κανένα από τα σήματα δεν εξαφανίζεται, ενώ για τα αμινοξέα Asn106, Gly117, Pro119, Leu146, His147, Gly152, Pro171, Lys197, Gln 198 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH

Ε.8.3. Αλληλεπίδραση της επικράτειας hRRM2α της πρωτεΐνης *human* La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

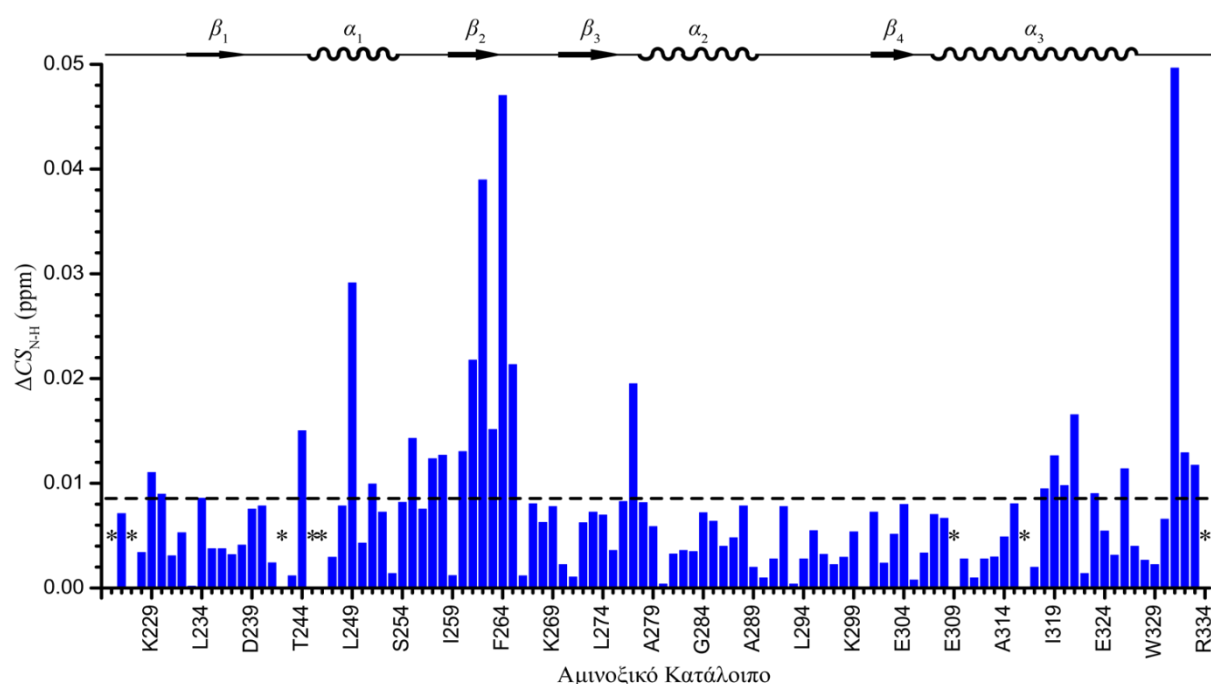
Η αλληλεπίδραση της επικράτειας hRRM2α της πρωτεΐνης *human* La με το polyU μελετήθηκε με την καταγραφή των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά από

κάθε προσθήκη του polyU. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το φάσμα αναφοράς εντοπίστηκαν μικρές μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 105). αποδεικνύοντας ότι το hRRM2α αλληλεπιδρά ενδεχομένως ασθενώς με το polyU. Μετά την τελευταία προσθήκη παρατηρούνται αλλαγές στα φάσματα αυτά, καθώς υπάρχουν σήματα του hRRM2α που μετατοπίζονται σταδιακά στα φάσματα.



Εικόνα 105: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N hRRM2α (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την 1^η, τη 2^η, 3^η και την 4^η προσθήκη (με κόκκινο χρώμα).

Στο διάγραμμα διαταραχής χημικών μετατοπίσεων απεικονίζονται τα αμινοξέα του hRRM2α που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία 1:1 (Εικόνα 106).



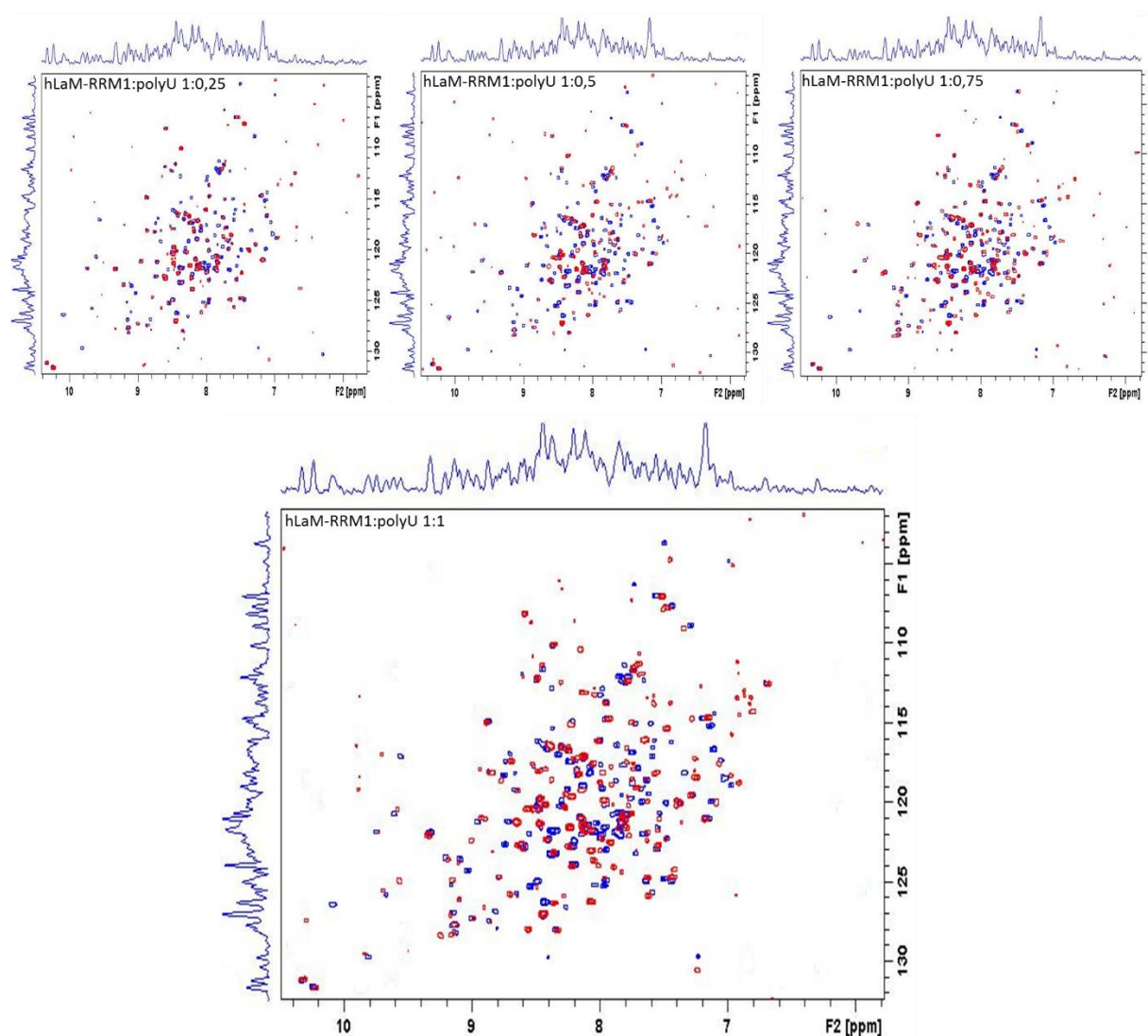
Εικόνα 106: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το hRRM2α (αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1).

Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Leu249, Trp261, Ile262, Phe264, Val265, Glu277 και Ser331. Κανένα από τα αμινοξέα του hRRM2α δεν εξαφανίζεται μετά από την τελευταία προσθήκη του polyU σε αναλογία 1:1. Για τα αμινοξέα Ser225, Glu227, Asp242, Cys245, Arg246, Glu309, Lys310 και Arg334 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή δεν εμφανίζονται τα σήματά τους στο φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης του πολυπεπτιδίου.

E.8.4. Αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου hLaM-RRM1 της πρωτεΐνης human La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

Η αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου hLaM-RRM1 της πρωτεΐνης human La με το polyU μελετήθηκε με την καταγραφή των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά από κάθε προσθήκη του polyU. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων αυτών με το φάσμα που μετρήθηκε πριν την πρώτη προσθήκη παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων (Εικόνα 107). Από την πρώτη προσθήκη του polyU αρκετές κορυφές μετατοπίζονται ή εξαφανίζονται, αποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση

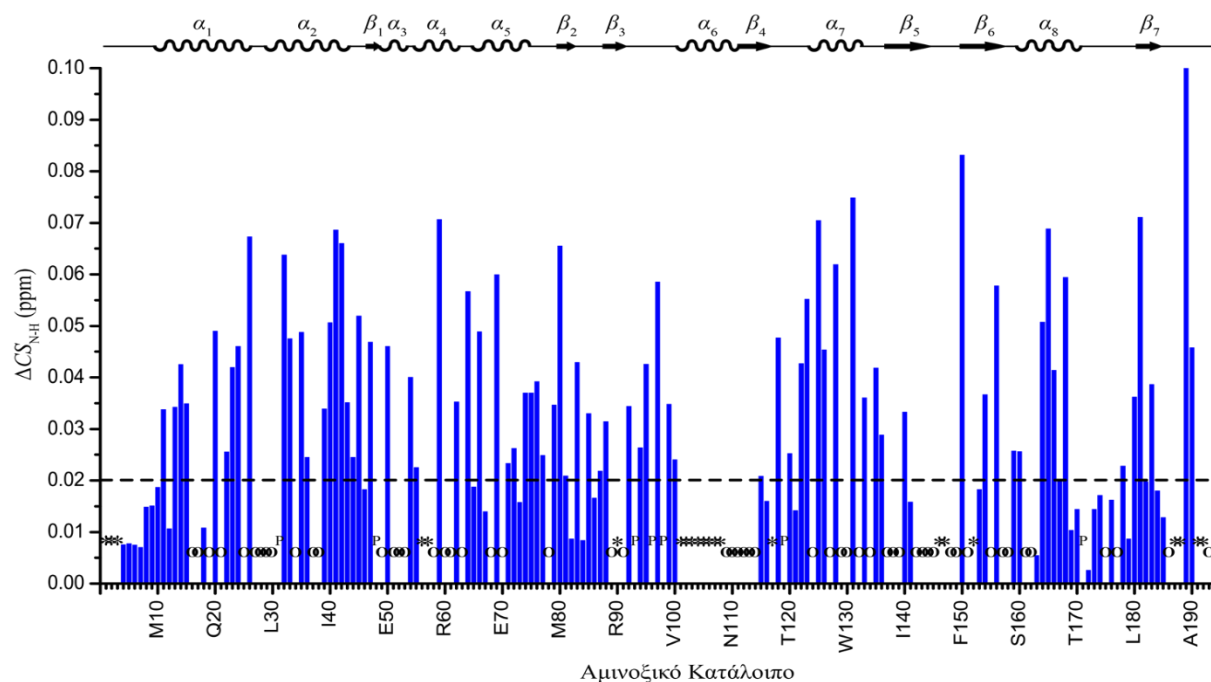
του hLaM-RRM1 με το polyU και τη συμμετοχή αρκετών αμινοξέων στην αλληλεπίδραση αυτή. Μέχρι την τελευταία προσθήκη παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα φάσματα αυτά περισσότερες από τις υπόλοιπες αλληλεπιδράσεις με τις μεμονωμένες επικράτειες, ενώ αρκετά σήματα του συμπλόκου εξαφανίζονται. Από αυτά ορισμένα εμφανίζονται σε άλλη θέση στο φάσμα, ενώ άλλα δεν εμφανίζονται καθόλου. Επιπλέον, υπάρχουν σήματα που η θέση τους αλλάζει σταδιακά στα φάσματα.



Εικόνα 107: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος αναφοράς του ^{15}N hLaM-RRM1 (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος μετά την 1^η, τη 2^η, 3^η και την 4^η προσθήκη (με κόκκινο χρώμα).

Ακολούθησε ο υπολογισμός της μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN κάθε αμινοξέος της επικράτειας hLaM-RRM1 μετά την προσθήκη του polyU. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στη χημική

τους μετατόπιση (Εικόνα 108). Η ανάλυση των CSP πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γ. Μπούρα.



Εικόνα 108: Διάγραμμα μετατόπισης της κορυφής συσχέτισης HN ανά αμινοξύ για το hLaM-RRM1 (αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1).

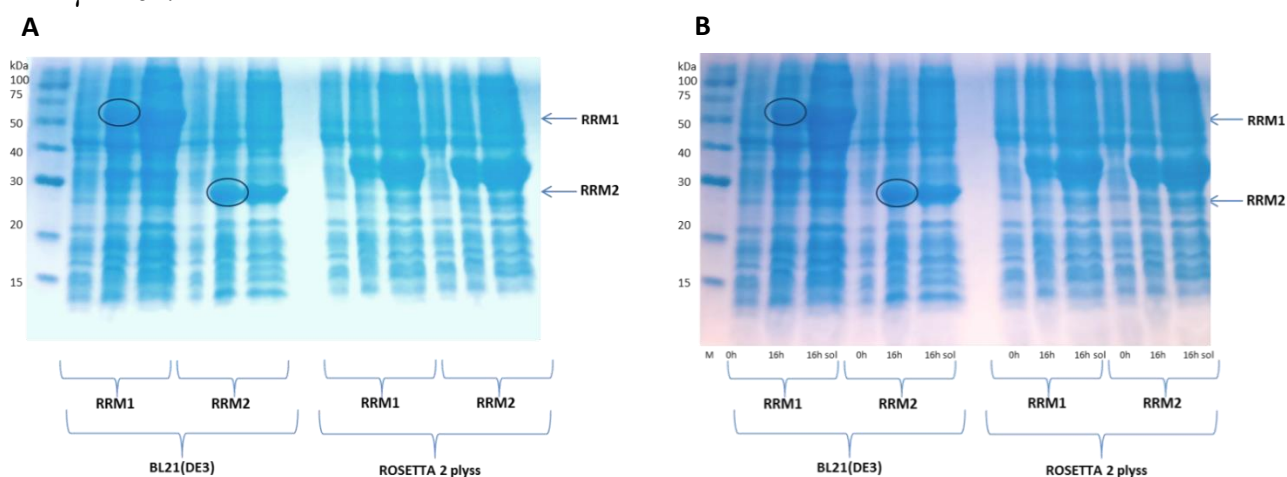
Από το διάγραμμα μετατόπισης των σημάτων των αμινοξέων παρατηρείται ότι τα αμινοξέα που υφίστανται τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι τα εξής: Glu14, Gln20, Tyr23, Tyr24, Gly26, Arg32, Asp33, Phe35, Ile40, Lys41, Leu42, Gly45, Val47, Glu50, Lys54, Asn59, Asp64, Asn66, Val69, Met80, Ser83, Lys95, Leu97, Phe118, Ala122, Thr123, Asp125, Asp126, Lys128, Leu131, Gly135, Phe150, Val156, Ala164, Lys165, Lys166, Val168, Leu181, Phe189 και Ala190. Επιπλέον, τα αμινοξέα Lys16, Ile17, His19, Ile21, Phe25, Asp27, Glu28, Asn29, Leu30, Lys34, Lys37, Glu38, Leu49, Ile51, Met52, Ile53, Leu58, Arg60, Leu61, Thr63, Ile68, Glu70, Glu78, Ile89, Arg91, Lys109, Asn110, Arg111, Ser112, Val113, Tyr114, Leu124, Ile127, Glu129, Trp130, Glu132, Lys134, Val137, Leu138, Asn139, Met142, Arg143, Arg144, Thr145, Lys148, Ala149, Lys151, Phe155, Val157, Phe158, Ile161, Glu162, Tyr175, Glu177, Asp186 και Asn193 εξαφανίζονται. Για τα Met1, Ala2, Glu3, Pro31, Pro48, Asn56, Arg57, Arg90, Pro93, Pro96, Pro98, Thr101, Asp102, Glu103, Tyr104, Lys105, Asn106, Asp107, Val108, Gly117, Pro119, Leu146, His147, Gly152, Pro171, Asp187, Tyr188, Lys191 και Lys192 δεν υπάρχουν πληροφορίες, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ή πρόκειται για Pro που δεν έχουν NH.

Ε.9. Τμηματική επισήμανση

Ε.9.1. Δοκιμασίες έκφρασης των πολυπεπτιδίων RRM1 και RRM2α

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου για το πολυπεπτίδιο RRM1 σε πλασμιδιακό φορέα pEM9B και του γονιδίου για το πολυπεπτίδιο RRM2α με μία επιπλέον Cys στο N-τελικό του άκρο σε πλασμιδιακό φορέα pEM5B. Η κλωνοποίηση και στις δύο περιπτώσεις ήταν επιτυχής και ελέγχθηκε με αλληλούχιση της περιοχής των πλασμιδίων με τη χρήση των πρόσθιων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ενίσχυση των αντίστοιχων τμημάτων με PCR. Το πολυπεπτίδιο RRM1 συνεκφράζεται μετά από προσθήκη IPTG με την ιντεΐνη Mxe GyrA (μια μικρή ιντεΐνη του *Mycobacterium xenopi*, η οποία έχει τροποποιηθεί ώστε να υφίσταται αποκοπή διαμεσολαβούμενη από τη θειόλη στο N-τελικό της άκρο) και την επικράτεια πρόσδεσης στη χιτίνη (CBD, Chitin Binding Domain) στην καλλιέργεια. Το πολυπεπτίδιο RRM2α συνεκφράζεται με τις ετικέτες CBD μαζί με την 6xHis, ενώ μεταξύ της Cys και των ετικετών αυτών εντοπίζεται η θέση αναγνώρισης και αποκοπής της πρωτεάσης TEV.

Κύτταρα *BL21(DE3)* και *Rosetta 2 plyss* μετασχηματίστηκαν με τα παραπάνω ανασυνδυασμένα πλασμίδια pEM9B και pEM5B. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες έκφρασης και για τα δύο πολυπεπτίδια, *BL21(DE3)* και *Rosetta 2 plyss* με επώαση μετά την επαγωγή της έκφρασης με 0,1mM IPTG και επώαση σε 37°C για 4h και σε 25°C για 16h.

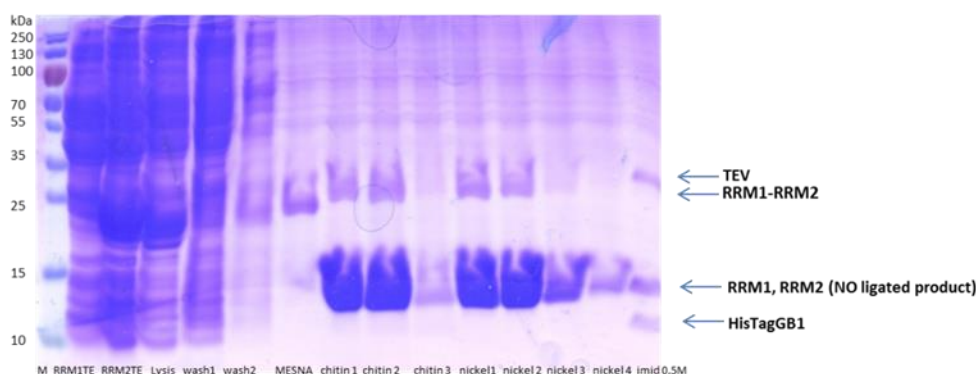


Εικόνα 109: SDS-PAGE, στο οποίο αποτυπώνεται η δοκιμή έκφρασης των RRM1 και RRM2 σε κύτταρα *BL21(DE3)* and *Rosetta 2 plyss* A. σε 37°C και B. σε 25°C.

Οι επικράτειες RRM1 και RRM2, όπως φαίνεται από την πηκτή ακρυλαμιδίου εκφράζονται σε υψηλή απόδοση σε κύτταρα *Bl21(DE3)* τόσο σε 37°C για 4h όσο και σε 25°C για 16h. Αντίθετα σε κύτταρα τύπου *Rosetta 2 plyss* δεν εκφράζονται τα δύο πολυπεπίδια (Εικόνα 109).

Ε.9.2. Απομόνωση του προϊόντος συνένωσης RRM1-RRM2α

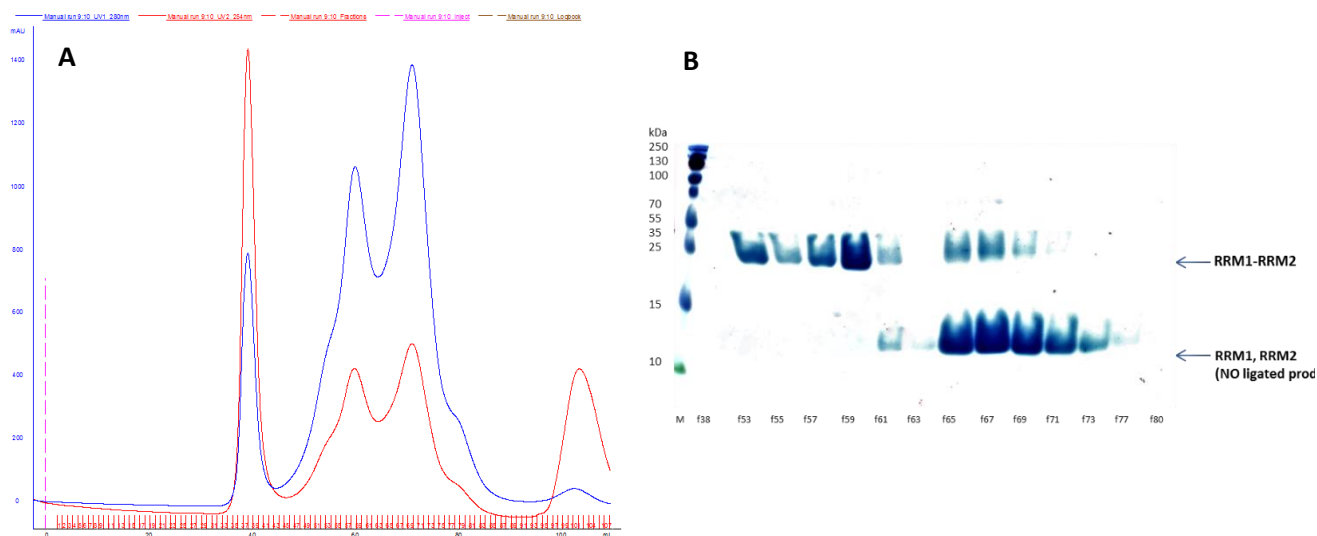
Μετά την αντίδραση συνένωσης των δύο τομέων $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ RRM1 και $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ RRM2α στη στήλη χιτίνης ακολούθησε η απομόνωση του προϊόντος συνένωσης από τα αρχικά πολυπεπίδια, τα οποία δεν είχαν συζευχθεί με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου, όπου προσδένεται η πρωτεάση TEV και το πολυπεπίδιο 6xHis-GB1, τα οποία φέρουν ετικέτα 6xHis. Στην πηκτή ακρυλαμιδίου (Εικόνα 110) απεικονίζεται η ποιότητα των κλασμάτων πριν και μετά από τη συνένωση στη στήλη της χιτίνης και μετά την απομόνωση με στήλη Ni-NTA.



Εικόνα 110: SDS-PAGE όπου απεικονίζεται η ποιότητα των κλασμάτων κατά την απομόνωση του συζευγμένου πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α χρησιμοποιώντας τη στήλη της χιτίνης και Ni-NTA στήλης.

Από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου διακρίνεται το συζευγμένο πολυπεπίδιο $\{^{14}\text{N}\text{-RRM1}\}\text{-}\{^{15}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$ (ή $\{^{15}\text{N}\text{-RRM1}\}\text{-}\{^{14}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$) και τα πολυπεπίδια, τα οποία δεν έχουν συζευχθεί, καθώς και η πρωτεάση TEV και το 6xHis-GB1, τα οποία εκλύονται από τη στήλη Ni-NTA με 0,5M ιμιδαζολίου. Για την περαιτέρω απομόνωση του πολυπεπτιδίου $\{^{14}\text{N}\text{-RRM1}\}\text{-}\{^{15}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$ (ή $\{^{15}\text{N}\text{-RRM1}\}\text{-}\{^{14}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$) ακολούθησε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, χρησιμοποιώντας τη στήλη «Hiload 16/60 superdex 75 pg». Από την πηκτή ακρυλαμιδίου παρατηρείται ότι

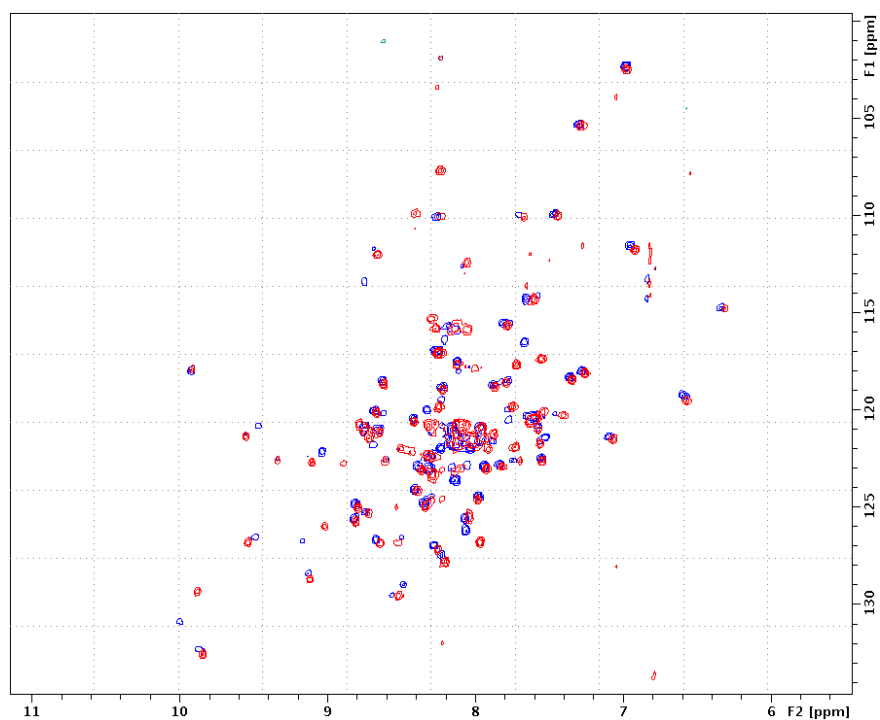
η απομόνωση του συζευγμένου πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α από τα μη-συνδεδεμένα πολυπεπτίδια RRM1, RRM2α ήταν επιτυχής (Εικόνα 111B).



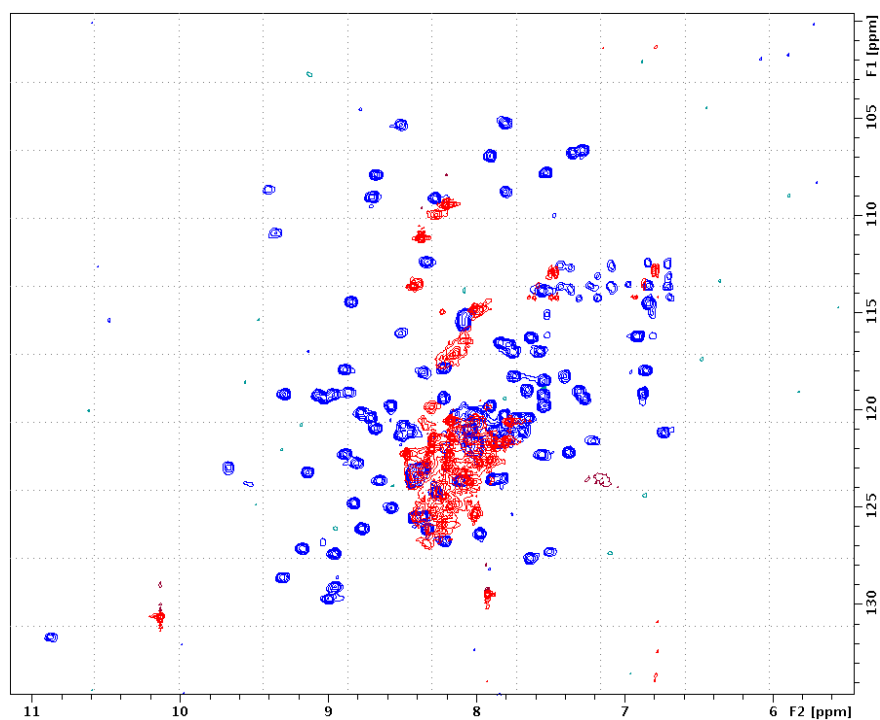
Εικόνα 111: Α. Απομόνωση του συνενωμένου πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με τη στήλη "HiLoad 16/60 Superdex 75pg". Β. SDS-page όπου απεικονίζεται η ποιότητα των κλασμάτων μετά τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

Ε.9.3. ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματα των πολυπεπτιδίων $\{^{15}\text{N}\text{-RRM1}\}$ - $\{^{14}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$ και $\{^{14}\text{N}\text{-RRM1}\}$ - $\{^{15}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$

Από το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY του πολυπεπτιδίου $\{^{15}\text{N}\text{-RRM1}\}$ - $\{^{14}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$ αποκαλύφθηκε ότι το RRM1 συζευγμένο με το πολυπεπτίδιο RRM2α εμφανίζει καλή διασπορά σημάτων και επομένως αναδιπλώνεται καλά στο χώρο. Η υπέρθεση του φάσματος αυτού με το αντίστοιχο φάσμα αναφοράς για το πολυπεπτίδιο $^{15}\text{N}\text{-RRM1}$ έδειξε ότι τα φάσματα αυτά σχεδόν ταυτίζονται. Παράλληλα, κάποιες μικροδιαφορές, οι οποίες εντοπίζονται από την υπέρθεση των δύο φασμάτων ενδεχομένως να οφείλονται στην έλλειψη του συνδέτη μεταξύ των επικρατειών RRM1 και RRM2α (Εικόνα 112).

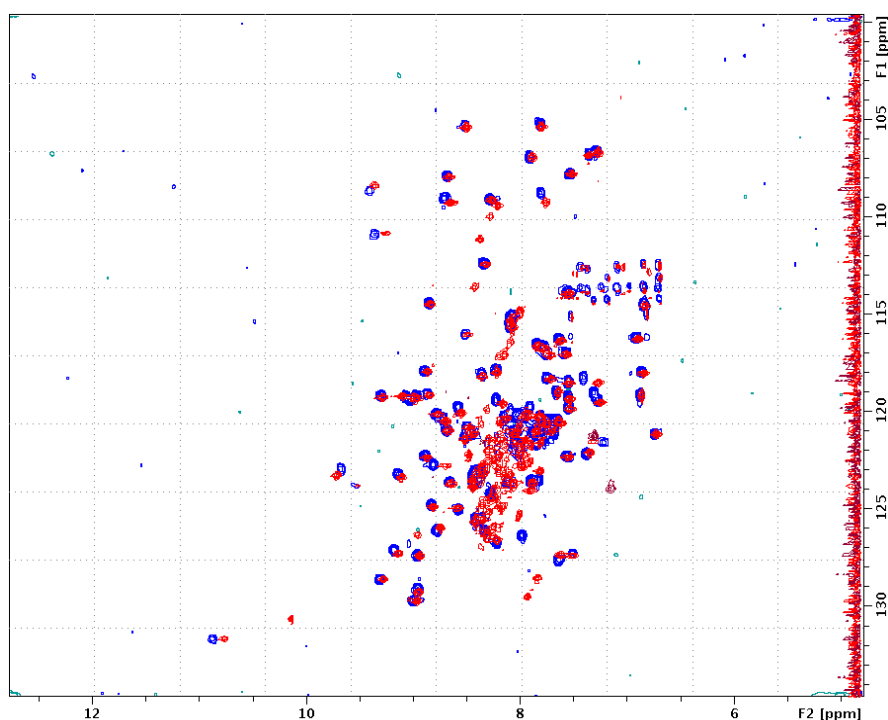


Εικόνα 112: Υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του πολυπεπτιδίου $\{^{15}\text{N}$ -RRM1 $\}$ - $\{^{14}\text{N}$ -RRM2α $\}$ με κόκκινο και του ^{15}N -RRM1 με μπλε.



Εικόνα 113: Υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του πολυπεπτιδίου $\{^{14}\text{N}$ -RRM1 $\}$ - $\{^{15}\text{N}$ -RRM2α $\}$ με κόκκινο και του ^{15}N -RRM2α με μπλε.

Από το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY του πολυπεπτιδίου $\{^{14}\text{N-RRM1}\}$ - $\{^{15}\text{N-RRM2}\alpha\}$ αποδείχθηκε ότι το RRM2α είναι ένα μη-δομημένο πολυπεπτίδιο (Εικόνα 113). Τα δύο αμινοξικά κατάλοιπα κυστεΐνης, τα οποία εντοπίζονται στη φυσική αμινοξική ακολουθία του RRM2α, εκτός από το επιπλέον αμινοξικό κατάλοιπο κυστεΐνης στο N-τελικό άκρο του RRM2α (απαραίτητο για τη σύζευξη των δύο επικρατειών) φαίνεται ότι επηρεάζονται από την αντίδραση σύζευξης των δύο επικρατειών παρουσία του αντιδραστηρίου MESNA. Μετά από προσθήκη 20mM DTT στο δείγμα NMR του $\{^{14}\text{N-RRM1}\}$ - $\{^{15}\text{N-RRM2}\alpha\}$ παρατηρήθηκε ότι το RRM2α (συνενωμένο με το RRM1) αποκτά αναδίπλωση, παρόλο που το RRM2α εμφανίζει δυο διαμορφώσεις αναδιπλωμένο και μη-αναδιπλωμένο (Εικόνα 114). Από τα αρχικά φάσματα σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα μετά την προσθήκη DTT στο δείγμα NMR προκύπτει ότι η αντίδραση συνένωσης παρουσία του αντιδραστηρίου MESNA επιδρά και στις κυστεΐνες του RRM2α και κατά συνέπεια και στην αναδίπλωσή του.



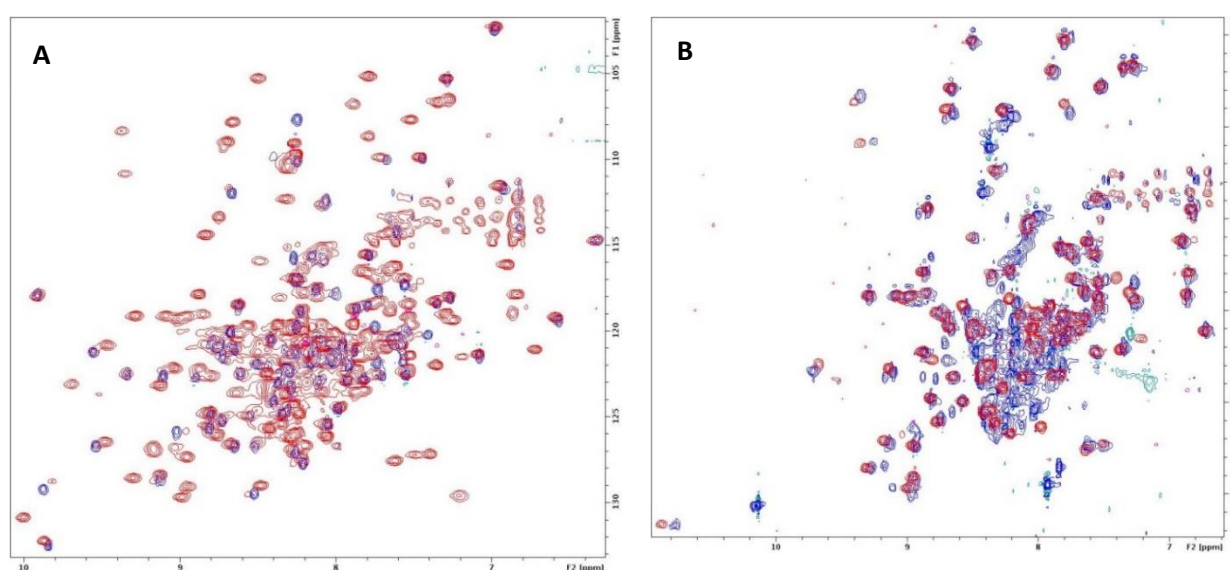
Εικόνα 114: Υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του πολυπεπτιδίου $\{^{14}\text{N-RRM1}\}$ - $\{^{15}\text{N-RRM2}\alpha\}$ μετά την προσθήκη 20mM DTT με κόκκινο και του $^{15}\text{N-RRM2}\alpha$ με μπλε.

Ε.9.4. Παρασκευή των πολυπεπτιδίων $\{^{15}\text{N-RRM1}\}$ - $\{^{14}\text{N-RRM2}\alpha\}$ και $\{^{14}\text{N-RRM1}\}$ - $\{^{15}\text{N-RRM2}\alpha\}$ με προσθήκη αναγωγικών μέσων

Η διαδικασία σύζευξης των πολυπεπτιδίων $\{^{15}\text{N-RRM1}\}$ - $\{^{14}\text{N-RRM2}\alpha\}$ και $\{^{14}\text{N-RRM1}\}$ - $\{^{15}\text{N-RRM2}\alpha\}$ πραγματοποιείται όπως περιγράφεται στην ενότητα Δ.7 με την προσθήκη ενός επιπλέον σταδίου στη διαδικασία. Συγκεκριμένα, μετά την αντίδραση σύζευξης των πολυπεπτιδίων παρουσία του αντιδραστηρίου MESNA και την απομόνωσή του με τη στήλη χιτίνης και τη στήλη Ni-NTA, προστίθενται 50mM DTT (τελική συγκέντρωση στο διάλυμα) στα δείγματα. Ακολουθεί επώαση σε 25°C για 2h και αλλαγή διαλύματος σε 50mM KPi, pH 7 με ειδικά φίλτρα συγκέντρωσης (amicon) των 10.000 MWCO. Κάθε δείγμα συμπυκνώθηκε σε 1,5ml και πραγματοποιείται απομόνωση με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, χρησιμοποιώντας τη στήλη Hiload 16/60 superdex 75 pg. Τα κλάσματα, στα οποία εκλύεται το συζευγμένο πολυπεπτίδιο συμπυκνώνονται στα 500μl και ακολουθεί η λήψη των φασμάτων $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ 2D TROSY. Το φάσμα $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ 2D TROSY του $\{^{15}\text{N-RRM1}\}$ - $\{^{14}\text{N-RRM2}\alpha\}$ ταυτίζεται με το αντίστοιχο φάσμα του χωρίς την προσθήκη DTT (Εικόνα 112). Το φάσμα $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ 2D TROSY του $\{^{14}\text{N-RRM1}\}$ - $\{^{15}\text{N-RRM2}\alpha\}$ εμφανίζεται βελτιωμένο σε σύγκριση με το αντίστοιχο φάσμα για το πολυπεπτίδιο πριν την προσθήκη DTT (Εικόνα 113). Ωστόσο, εμφανίζονται και σε αυτή την περίπτωση δύο διαφορετικές μορφές του RRM2α, μια δομημένη και μια μη-δομημένη. Το φάσμα αυτό εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με αυτό του δείγματος $\{^{14}\text{N-RRM1}\}$ - $\{^{15}\text{N-RRM2}\alpha\}$, στο οποίο είχαν προστεθεί 20mM DTT (Εικόνα 114).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή του $^{15}\text{N-RRM1}$ και του $^{15}\text{N-RRM2}\alpha$, για τα οποία ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία χωρίς την προσθήκη της δεύτερης επικράτειας με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση του αντιδραστηρίου MESNA στη διαμόρφωση της κάθε επικράτειας ξεχωριστά. Από τα φάσματα $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ 2D TROSY για τα $^{15}\text{N-RRM1}$ και $^{15}\text{N-RRM2}\alpha$ προέκυψε ότι το αντιδραστήριο MESNA δεν επιδρά στο RRM1, αλλά επιδρά στο RRM2α. Από το φάσμα $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ 2D TROSY του $^{15}\text{N-RRM1}$ φαίνεται ότι το πολυπεπτίδιο μόνο του αναδιπλώνεται. Αντίστοιχα, το φάσμα $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ 2D TROSY του $^{15}\text{N-RRM2}\alpha$ είναι χαρακτηριστικό μιας πρωτεΐνης χωρίς αναδίπλωση. Επομένως, ακολούθησε η παρασκευή δειγμάτων $^{15}\text{N-RRM2}\alpha$, στα οποία προστίθενται αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αναγωγικού TCEP [tris(2-carboxyethyl) phosphine] κατά τη

διάρκεια της αντίδρασης. Η επιλογή του συγκεκριμένου αναγωγικού αντιδραστήριου, καθώς και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση συνένωσης παρουσία του MESNA δεν αναστέλλει ή παρεμποδίζει την αντίδραση αυτή. Επομένως, παρασκευάστηκαν τέσσερα διαφορετικά δείγματα ^{15}N -RRM2α με τον ίδιο τρόπο, αλλά στην αντίδραση παρουσία του MESNA προστέθηκαν 50, 100, 250 και 500 μM TCEP στο καθένα ξεχωριστά. Τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY των παραπάνω δειγμάτων έδειξαν ότι το RRM2α όταν προστίθενται 50 ή 100 μM TCEP κατά την αντίδραση ήταν μη-αναδιπλωμένο, ενώ όταν προστίθενται 250 ή 500 μM TCEP είναι όμοια με τα αντίστοιχα φάσματα του RRM2α παρουσία 20mM DTT.



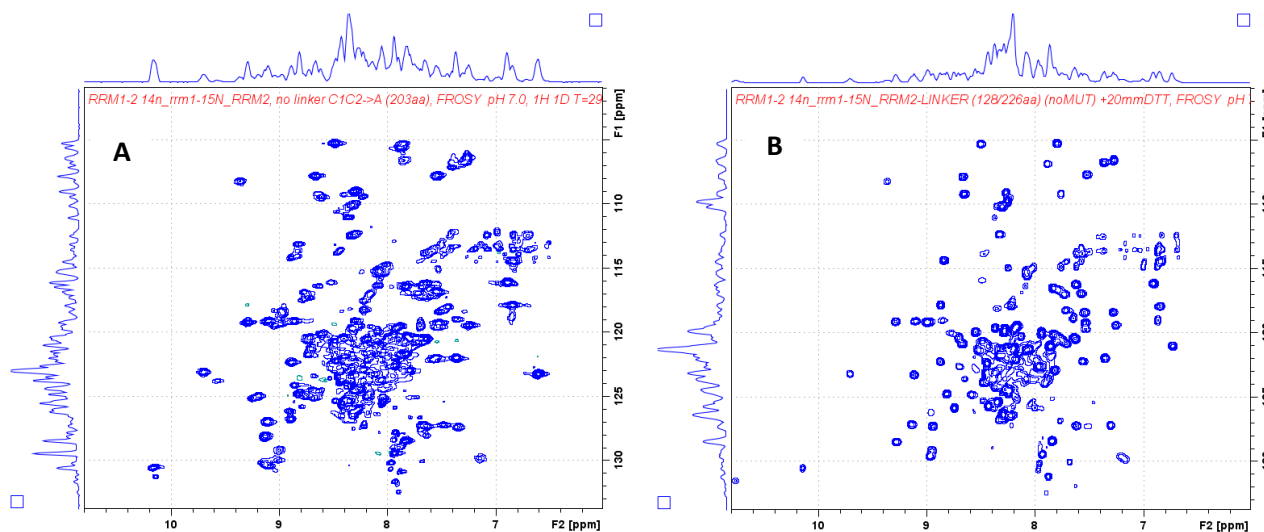
Εικόνα 115: Υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY A. του δείγματος $\{^{15}\text{N}\text{-RRM1}\}\text{-}\{^{14}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$ με κόκκινο με του δείγματος αναφοράς $^{15}\text{N}\text{-RRM1}$ με μπλε, B. του δείγματος $\{^{15}\text{N}\text{-RRM1}\}\text{-}\{^{14}\text{N}\text{-RRM2}\alpha\}$ με μπλε και του δείγματος αναφοράς $^{15}\text{N}\text{-RRM2}\alpha$.

Ε.9.5. Παρασκευή νέων πολυπεπτιδίων RRM2α για τη σωστή αναδίπλωσή του κατά τη δημιουργία του RRM1-RRM2α

Τρεις διαφορετικές στρατηγικές ακολουθήθηκαν με σκοπό τη σωστή αναδίπλωση του RRM2α στο πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σημειακή κατευθυνόμενη μετάλλαξη των δύο κυστεϊνών της φυσικής ακολουθίας (Cys233 και Cys278) σε αλανίνες. Παράλληλα, ένα νέο πολυπεπτίδιο για το RRM2α, το οποίο περιλαμβάνει το συνδέτη μεταξύ των επικρατειών RRM1-RRM2α, σχεδιάστηκε και εκφράστηκε. Με αυτό τον τρόπο και οι δύο επικράτειες διαθέτουν αρκετό χώρο για να αναδιπλωθούν κατάλληλα και

ταυτόχρονα εκφράζεται ολόκληρη η φυσική ακολουθία για το πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α. Ο συνδυασμός της επίδρασης του MESNA στις Cys233 και Cys278 και της έλλειψης του χώρου για να αναδιπλωθούν σωστά οι δύο επικράτειες είναι δυνατό να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση του RRM2α. Γι' αυτό το λόγο συνδυάστηκαν οι παραπάνω στρατηγικές. Τα αποτελέσματα των μεταλλάξεων αλλά και της κλωνοποίησης του νέου γονιδίου επιβεβαιώθηκαν με αλληλούχιση του πλασμιδίου.

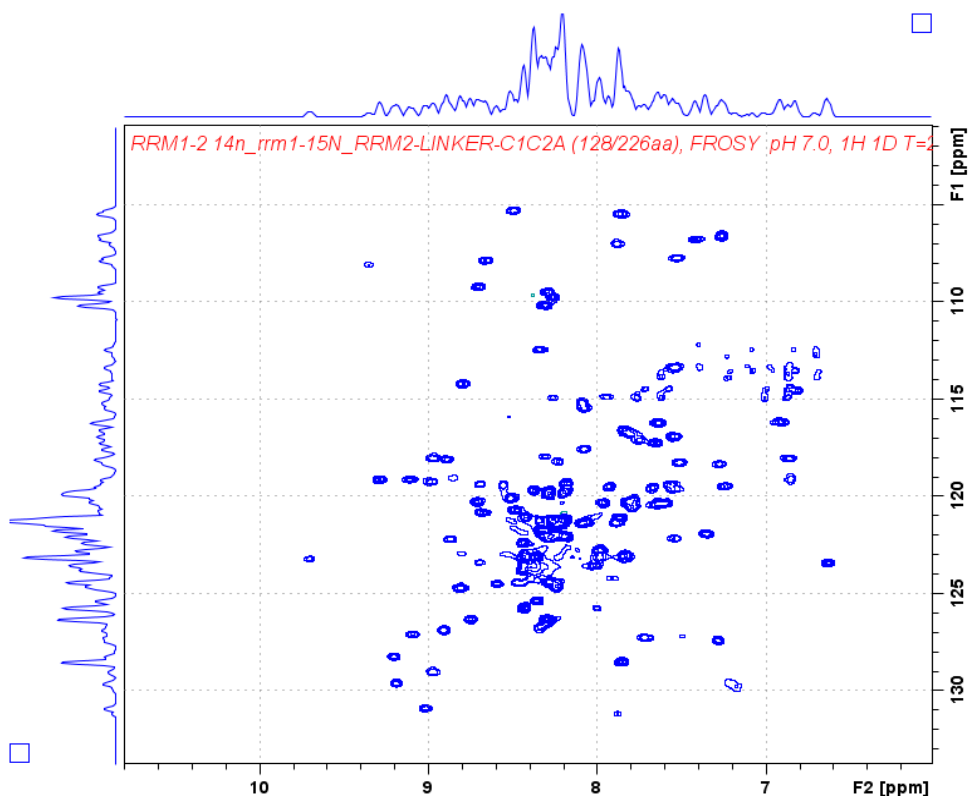
Ακολούθησε η παρασκευή των δειγμάτων $\{^{15}\text{N}-\text{RRM1}\}-\{^{14}\text{N}-\text{RRM2}\alpha\text{ C1C2-}>\text{A1A2}\}$, $\{^{14}\text{N}-\text{RRM1}\}-\{^{15}\text{N}-\text{RRM2}\alpha\text{ C1C2-}>\text{A1A2}\}$, $^{15}\text{N}-\text{RRM2}\alpha\text{ C1C2-}>\text{A1A2}$, $\{^{15}\text{N}-\text{RRM1}\}-\{^{14}\text{N}-\text{linker RRM2}\alpha\}$, $\{^{14}\text{N}-\text{RRM1}\}-\{^{15}\text{N}-\text{linker RRM2}\alpha\}$, $^{15}\text{N}-\text{linker RRM2}\alpha$, $\{^{15}\text{N}-\text{RRM1}\}-\{^{14}\text{N}-\text{linker RRM2}\alpha, \text{C1C2-}>\text{A1A2}\}$, $\{^{14}\text{N}-\text{RRM1}\}-\{^{15}\text{N}-\text{linker RRM2}\alpha, \text{C1C2-}>\text{A1A2}\}$, $^{15}\text{N}-\text{linker RRM2}, \text{C1C2-}>\text{A1A2}$ με σκοπό τη διερεύνηση της σύνδεσης των νέων πολυπεπτιδίων που δημιουργήθηκαν για το RRM2α με το RRM1. Ταυτόχρονα, παρασκευάστηκε ένα δείγμα αναφοράς για το κάθε πολυπεπτίδιο του RRM2α με σκοπό να μελετηθεί η αναδίπλωσή του.



Εικόνα 116: $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 2D TROSY του δείγματος Α. $\{^{14}\text{N}-\text{RRM1}\}-\{^{15}\text{N}-\text{RRM2}\alpha\text{ C1C2-}>\text{A1A2}\}$ και Β. $\{^{14}\text{N}-\text{RRM1}\}-\{^{15}\text{N}-\text{linker RRM2}\alpha\}$ μετά από προσθήκη 20mM DTT στο δείγμα.

Η διαδικασία παρασκευής και η σύζευξη των επιμέρους τμημάτων για την παρασκευή των παραπάνω δειγμάτων είναι ίδια με αυτή που είχαν συζευχθεί τα προηγούμενα. Τα φάσματα $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 2D TROSY των παραπάνω δειγμάτων στα οποία επισημαίνεται με ^{15}N το RRM1 δείχνουν ότι η επικράτεια αυτή είναι αναδιπλωμένη σε

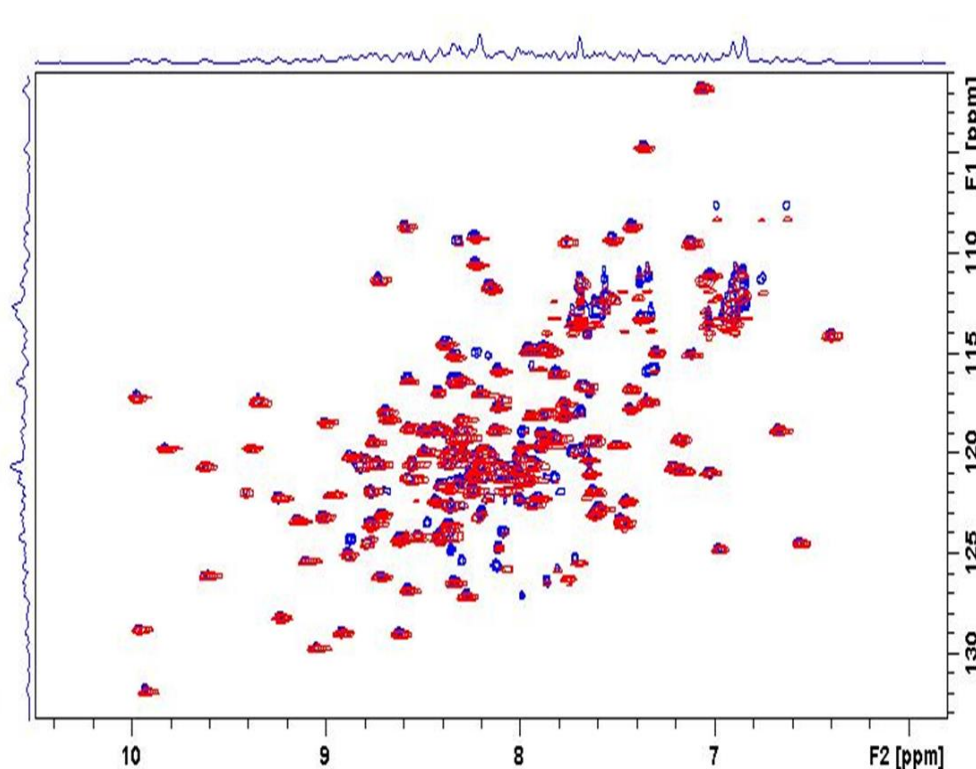
όλες τις περιπτώσεις. Επιπλέον, τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY για τα δείγματα $\{^{14}\text{N}$ -RRM1}- $\{^{15}\text{N}$ -RRM2α C1C2->A1A2}, ^{15}N -RRM2α C1C2->A1A2, $\{^{14}\text{N}$ - RRM1}- $\{^{15}\text{N}$ -linker RRM2α, C1C2->A1A2} και ^{15}N -linker RRM2, C1C2->A1A2 δείχνουν ότι το πολυπεπίδιο RRM2α αναδιπλώνεται. Αντίθετα, το RRM2α είναι μη-δομημένο στα $\{^{14}\text{N}$ - RRM1}- $\{^{15}\text{N}$ -linker RRM2α}, ^{15}N -linker RRM2α, ενώ μόνο με προσθήκη 20mM DTT αναδιπλώνονται με τον ίδιο τρόπο με το αρχικό δείγμα όταν πραγματοποιείται ο ίδιος χειρισμός με το DTT.



Εικόνα 117: ^1H - ^{15}N 2D TROSY του δείγματος $\{^{14}\text{N}$ - RRM1}- $\{^{15}\text{N}$ -linker RRM2α, C1C2->A1A2}.

Ε.10. Επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση της λυσίνης (^{14}N -Lys) σε ^{15}N υπόβαθρο για το πολυπεπτίδιο LaM-RRM1 του *Dictyostelium discoideum*

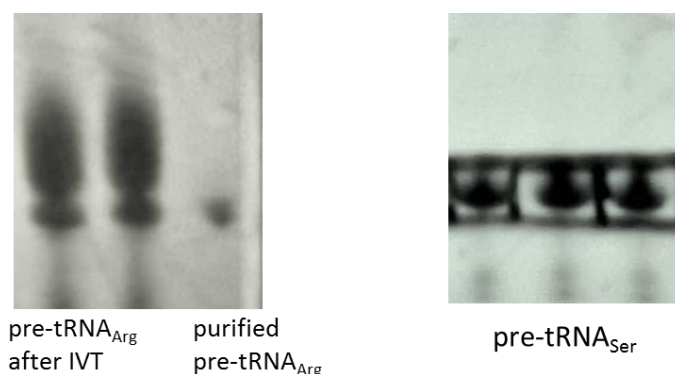
Η διαδικασία έκφρασης και απομόνωσης του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 του *Dictyostelium discoideum* με επιλεκτική αντίστροφη επισήμανση ^{14}N -Lys πραγματοποιείται όπως περιγράφεται στην ενότητα Δ.8. Ακολούθησε η λήψη του φάσματος ^1H - ^{15}N 2D TROSY. Στο φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY για την ^{14}N -Lys παρατηρείται ότι εμφανίζονται όλες οι κορυφές που αντιστοιχούν στις συσχετίσεις NH όλων των αμινοξέων εκτός από αυτά που αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα της Lys του πολυπεπτιδίου αυτού. Μετά από υπέρθεση του φάσματος αυτού με το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY του LaM-RRM1 (Εικόνα 118) εντοπίζονται τα σήματα συντονισμού που αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα Lys. Η θέση του κάθε αμινοξικού καταλοίπου Lys του LaM-RRM1 εντοπίζεται σε συνδυασμό με τα τρισδιάστατα ετεροπυρηνικά φάσματα που συνδυάζουν το κάθε αμινοξύ με το προηγούμενό του. Με τη διαδικασία αυτή ταυτοποιούνται ή επιβεβαιώνονται 21 από τις 24 λυσίνες του LaM-RRM1.



Εικόνα 118: Υπέρθεση του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος του ^{15}N LaM-RRM1 (με μπλε χρώμα) και του ^1H - ^{15}N 2D TROSY φάσματος για την επιλεκτικά αντίστροφη επισήμανση της Lys (με κόκκινο χρώμα).

Ε.11. Παραγωγή των pre-tRNA_{Arg} και pre-tRNA_{Ser} με *in vitro* μεταγραφή

Πρώτο στάδιο της παραγωγής των pre-tRNA_{Arg} και pre-tRNA_{Ser} αποτελεί η γραμμοποίηση του ανασυνδυασμένου με το αντίστοιχο γονίδιο πλασμιδίου *puc57*. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Ακολουθεί η διαδικασία της εκχύλισης του DNA, της κατακρήμνισής του και η επαναδιάλυσή του στην επιθυμητή ποσότητα αποστειρωμένου ddH₂O. Στη συνέχεια, ακολουθεί η αντίδραση της *in vitro* μεταγραφής των pre-tRNA_{Arg} και pre-tRNA_{Ser} παρουσία της T7 RNA πολυμεράσης στις συνθήκες που περιγράφονται στην ενότητα Δ.9. Τα προϊόντα της *in vitro* μεταγραφής αναλύονται σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (UREA-page) και παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 119), ενώ οπτικοποιούνται με UV shadowing.

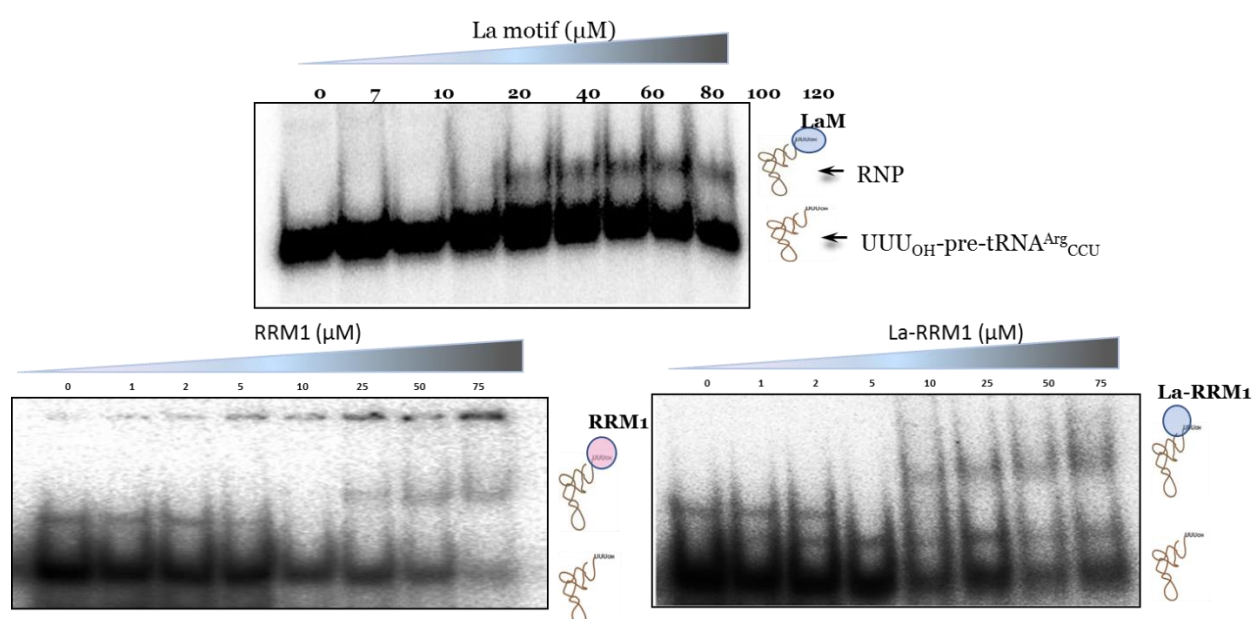


Εικόνα 119: UREA-PAGE, όπου απεικονίζεται το αποτέλεσμα της *in vitro* μεταγραφής του pre-tRNA_{Arg} και του pre-tRNA_{Ser}.

Ακολούθησε έκλυση, κατακρήμνιση και επαναδιάλυση του RNA στην επιθυμητή ποσότητα αποστειρωμένου ddH₂O. Στη συνέχεια, το RNA φωτομετρείται στο φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους (Quawell UV-Vis Spectrometer Q5000) και υπολογίζεται η συγκέντρωσή του. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η απόδοση της αντίδρασης για το pre-tRNA_{Ser} ήταν καλύτερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη για το pre-tRNA_{Arg}. Αυτό είναι δυνατό να οφείλεται σε παραπροϊόντα της *in vitro* μεταγραφής που παράγονται μαζί με το pre-tRNA_{Arg} και διακρίνονται ως επιπλέον ζώνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους (Εικόνα 119). Πιο συγκεκριμένα μπορεί να οφείλεται σε ελαττωματική αποδέσμευση της T7 πολυμεράσης από το εκμαγείο DNA και η συνέχιση της μεταγραφής. Συνολικά για όλες τις αλληλεπιδράσεις που περιγράφονται παρακάτω πραγματοποιήθηκαν περισσότερες από 600 αντιδράσεις *in vitro* μεταγραφής για το pre-tRNA_{Arg} και περίπου 70 αντιδράσεις *in vitro* μεταγραφής για το pre-tRNA_{Ser}.

Ε.12. Αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων LaM, RRM1 και LaM-RRM1 με το pre-tRNA_{Arg} μέσω δοκιμής αλλαγής της ηλεκτροφορητικής τους κινητικότητας (EMSA)

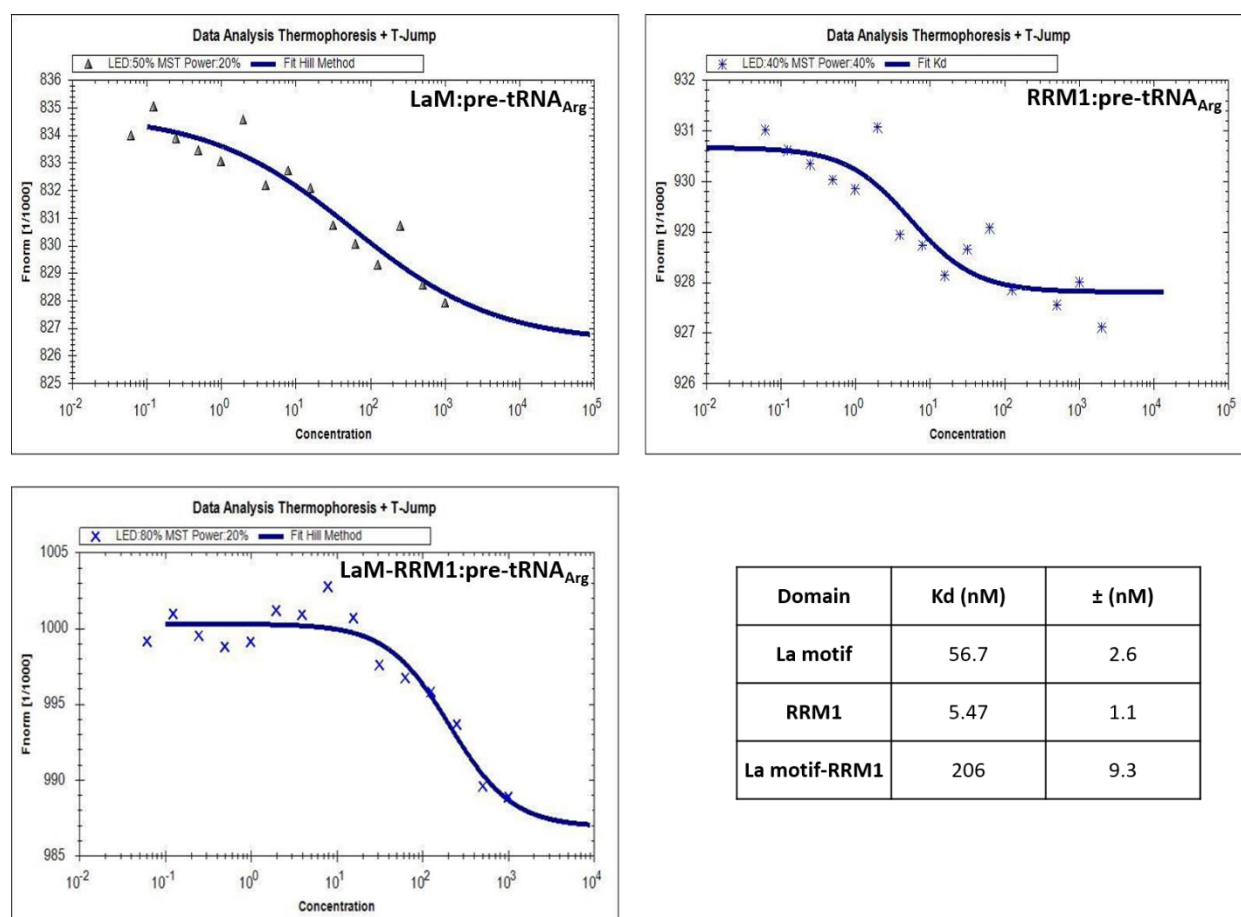
Το pre-tRNA_{Arg} που παρασκευάστηκε με *in vitro* μεταγραφή, σημάνθηκε με γ-³²P ATP στο 5' άκρο του και χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη της αλληλεπίδρασής του με τα πολυπεπτίδια LaM, RRM1 και LaM-RRM1 μέσω EMSA. Το pre-tRNA_{Arg} σταθερής συγκέντρωσης επώάζεται με αυξανόμενη συγκέντρωση του κάθε πολυπεπτιδίου. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε μη-αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8%, σε 3,5xTB, 7mA και 4°C. Τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν με αυτοραδιογραφία. Η δοκιμή αλλαγής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας έδειξε ότι και τα τρία πολυπεπτίδια της La δεσμεύονται με το pre-tRNA_{Arg}. Εκτός από το πολυπεπτίδιο LaM-RRM1, το οποίο είναι γνωστό ότι δεσμεύεται στο UUU-3'-OH άκρο, το LaM μόνο του και το RRM1 μόνο του σχηματίζουν ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα με το pre-tRNA_{Arg} (Εικόνα 120). Επίσης, ένα ποσοστό του σχηματιζόμενου συμπλόκου εγκλωβίζεται στα πηγάρια της πηκτής.



Εικόνα 120: EMSA του pre-tRNA_{Arg} με τα πολυπεπτίδια LaM, RRM1 και LaM-RRM1. Και τα τρία πολυπεπτίδια σχηματίζουν ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο με το pre-tRNA_{Arg}.

Ε.13. Αλληλεπίδραση των πολυπεπτιδίων LaM, RRM1 και LaM-RRM1 με το pre-tRNA_{Arg} μέσω πειραμάτων MST

Οι ιδιότητες πρόσδεσης των πολυπεπτιδίων LaM, RRM1 και LaM-RRM1 του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg} επιβεβαιώθηκαν με την ευαίσθητη μέθοδο Microscale Thermophoresis (MST). Στην συγκεκριμένη τεχνική, οι πρωτεΐνες κινούνται σε μία διαβάθμιση της θερμοκρασίας. Σε σταθερή συγκέντρωση του κάθε πολυπεπτιδίου, το οποίο είχε επισημανθεί κατάλληλα, προστίθενται αυξανόμενες συγκεντρώσεις του pre-tRNA_{Arg}. Η δημιουργία συμπλόκου με ένα άλλο μόριο ανιχνεύεται σαν αλλαγή στην κινητικότητα αυτή. Κινητική ανάλυση έδειξε πως και οι τρεις τομείς παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια για το tRNA και σταθερές διάσπασης συμπλόκου της τάξης των nM (Εικόνα 121).



Εικόνα 121: Ανάλυση της κινητικής και αποτίμηση της σταθεράς αποδέσμευσης (K_d) των πολυπεπτιδίων LaM, RRM1 και LaM-RRM1 με το pre-tRNA_{Arg} με την τεχνική MST.

Ενότητα ΣΤ
Συζήτηση

ΣΤ.1. Δομική ανάλυση των επικρατειών της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* μέσω της Φασματοσκοπίας NMR

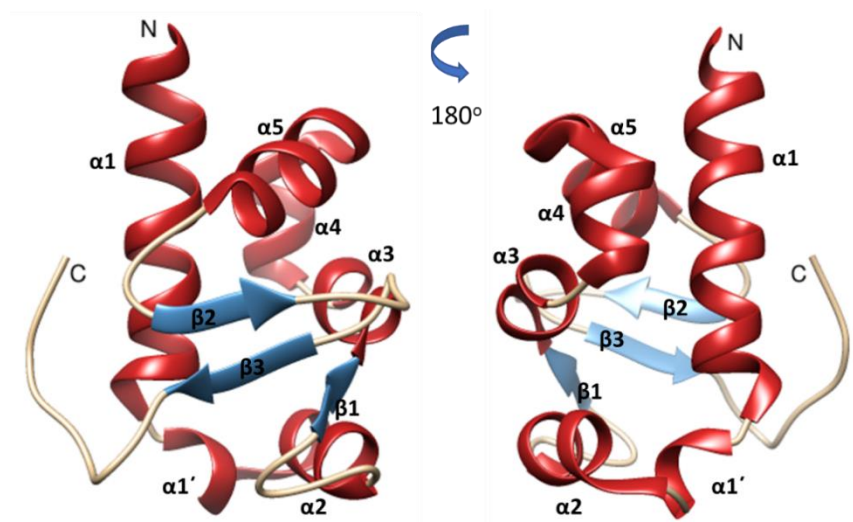
ΣΤ.1.1. Το LaM του *Dictyostelium discoideum*

Η επικράτεια LaM (La1-91) του *Dictyostelium discoideum* (dLaM) περιλαμβάνει τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών LARP, Gln20, Tyr23, Tyr24, Asp33, Phe35 και Phe55 (ακολουθείται η αρίθμηση της hLa, ενώ τα αντίστοιχα αμινοξέα στο *Dictyostelium discoideum* είναι τα Gln12, Tyr15, Tyr16, Asp25, Phe27 και Phe48, Εικόνα 122). Εκτός από αυτά τα αμινοξέα συντηρημένα στα hLaM και dLaM είναι τα αρωματικά αμινοξέα, καθώς από τα 8 αρωματικά του hLaM, τα 7 εντοπίζονται στις αντίστοιχες θέσεις του dLaM.

LARP1x2	SVDQELLKDYIKRQIEYYFSVDNLERDFFLRKMD--ADGFLPITLIASFHRVQALTTDISLIFAA
LARP1b	PVEEALLKEYIKRQIEYYFSVENLERDFFLRGKMD--EQGFLPISLIAGFQRVQALTTNLNLILEA
genuine	NEKMAALEAKICHQIEYYFGDFNLPRDKFLKEQIKL-DEGWVPLEIMIKFNRLNRLTTDFNVIVEA
LARP6x6	KPPDEELIKKLVDQIEFYFSDENLEKDAFLKHHVRRNKLQYVSVKLLTSFKKVKHLTRDWRRTAHA
dictyLaM	--MSEETSTQILKQVEYYFSDSNFPRDKFLRSEAAKNVDNYISIDVIAFNRMKTISTDQLLITEA
LARP7x7	RSRVKQVLADIAKQVDFWFGDANLHKDRFLREQIEKSRDQYVDISLLVSFNKMKKLLTDDGKLARA
LARP4a	AVSTEDLKECLKKQLFCEFSRENLSKDLYLISQMD--SDQFIPITWTVANMEEIKKLLTDPDLILEV
LARP4b	PDSQEDPREVLKKTLEFCLSRENLASDMYLISQMD--SDQYVPITTVANLDHIKKLLSTDVDLIVEV
LARP1x2	LKDS--KVVEIVDEKVRREEEPEKWPLPP--
LARP1b	LKDS--TEVEIVDEKMRKKIEPEKWPIPG--
genuine	LSKSKAELMEISEDKTKIRRSFSK-PLPE--
LARP6x6	LKYS--VVLELNEHRKVRRTTPV-PLFP--
dictyLaM	LKKS--TRLQVSEDKMVRRLDPLPENID--
LARP7x7	LRSS--AVVELDLEGTRIRRKKPLGERPKDE
LARP4a	LRSS--PMVQVDEKGEKVRPSHKRCIVI--
LARP4b	LRSL--PLVQVDEKGEKVRPNQNRRCIVI--

Εικόνα 122: Σύγκριση των αλληλουχιών των επικρατειών LaM του ανθρώπου και του *Dictyostelium discoideum* και των υπολοίπων πρωτεϊνών LARP.

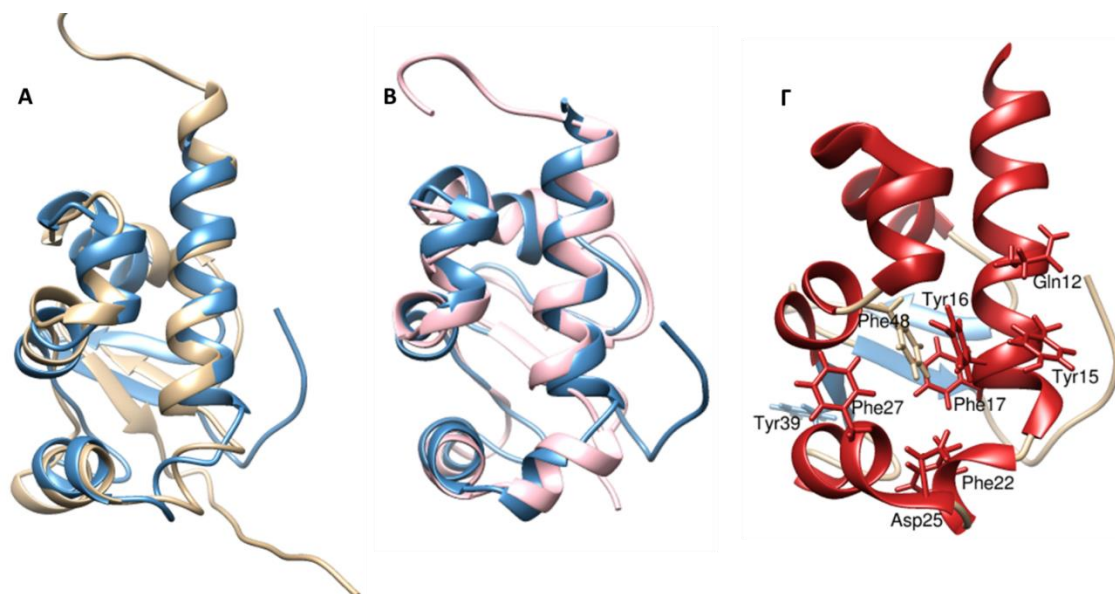
Το μοτίβο La του *Dictyostelium discoideum* (dLaM) αποτελείται από περίπου 83 αμινοξέα. Η δομή του επιλύθηκε με φασματοσκοπία NMR (PDB ID: 2M5W) και περιλαμβάνει 6 α -έλικες και 3 β -κλώνους με τοπολογία $\alpha 1 \alpha 1' \alpha 2 \beta 1 \alpha 3 \alpha 4 \alpha 5 \beta 2 \beta 3$. Η δομή του dLaM περιλαμβάνει την $\alpha 1$ -έλικα που ακολουθείται από τις δύο μικρότερες έλικες, τις $\alpha 1'$ και $\alpha 2$, και το $\beta 1$ κλώνο. Ακολουθούν οι μικρές έλικες $\alpha 3$, $\alpha 4$ και $\alpha 5$, και οι β -κλώνοι $\beta 2$ και $\beta 3$. Η $\alpha 1$ -έλικα καλύπτει τη μεγαλύτερη έκταση της δομής, η οποία εκτείνεται στα αμινοξικά κατάλοιπα dLa1-19. Η έλικα αυτή μαζί με τις βραχύτερες έλικες $\alpha 1'$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ και $\alpha 4$ σχηματίζουν τον υδρόφοβο πυρήνα του μορίου. Σε αυτόν τον υδρόφοβο πυρήνα συνεισφέρουν οι τρεις β -κλώνοι, οι οποίοι εντοπίζονται στην αντίθετη πλευρά του dLaM (Εικόνα 123)



Εικόνα 123: NMR τρισδιάστατη δομή της επικράτειας LaM του *Dictyostelium discoideum* (PDB ID:2M5W).

Η δομή της επικράτειας dLaM εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με την NMR δομή του hLaM (PDB ID: 1S7A) και την κρυσταλλική δομή του LaM από το *Trypanosoma Brucei* (PDB ID: 1S29). Το μοτίβο LaM του *Dictyostelium discoideum* εμφανίζει περισσότερες ομοιότητες με αυτό του *T. Brucei*. Συγκεκριμένα, η $\alpha 1$ -έλικα είναι κατά μία στροφή μικρότερη από την $\alpha 1$ του hLaM, ενώ έχει περίπου το ίδιο μέγεθος με αυτή του *T. Brucei*. Επιπλέον, η περιοχή των β -κλώνων του dLaM ταντίζεται καλύτερα με την αντίστοιχη του LaM του *T. Brucei*. Παρόλα αυτά, το dLaM εμφανίζει όλα τα δομικά στοιχεία του hLaM, με την ίδια διάταξη, όπως παρουσιάζεται με την υπέρθεση των δομών (Εικόνα 124A και 124B).

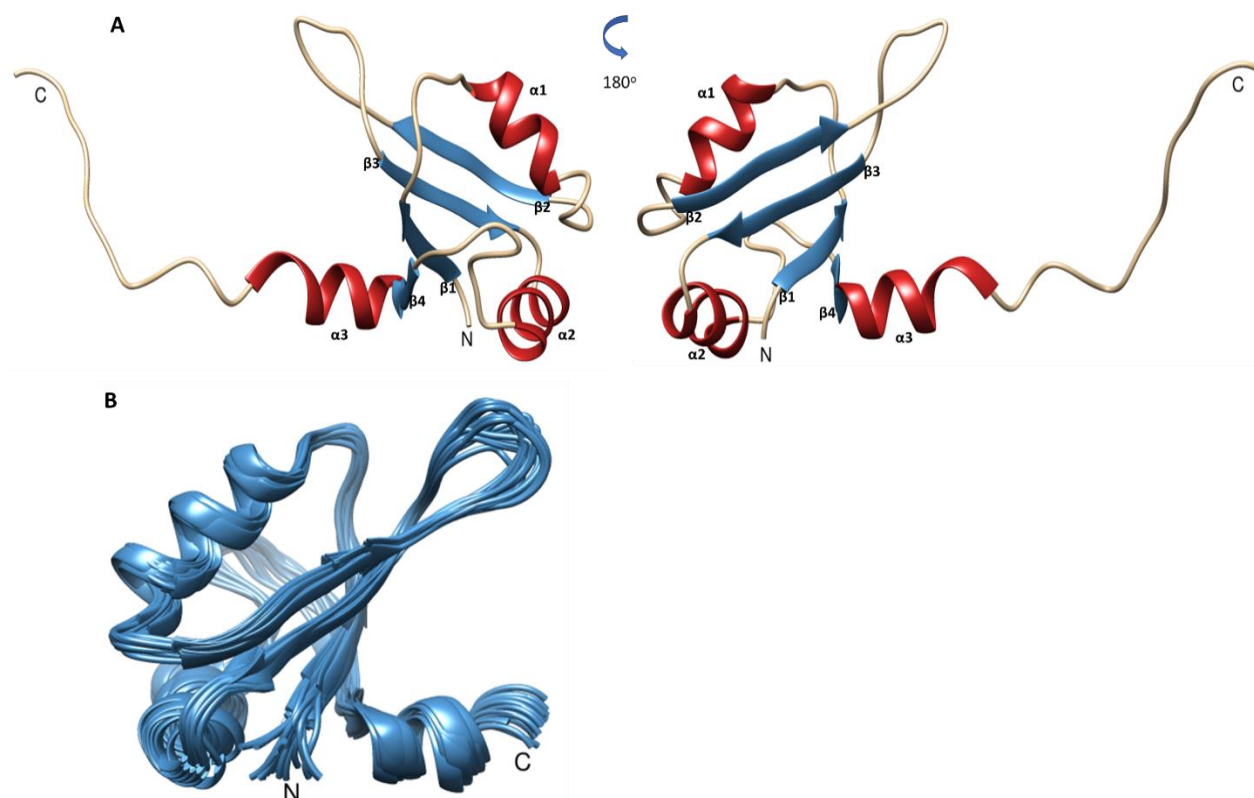
Η υδρόφοβη κοιλότητα που σχηματίζεται από τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών LARP και από τα αρωματικά αμινοξέα του dLaM διατηρείται ίδια (Εικόνα 124Γ). Η περιοχή αυτή θεωρείται υπεύθυνη για την αναγνώριση και τη πρόσδεση του RNA. Τα αμινοξέα αυτά εντοπίζονται στην ίδια πλευρά του μοτίβου, ενώ η αντίθετη πλευρά περιλαμβάνει κυρίως αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα.



Εικόνα 124: Α. Υπέρθεση της NMR δομής της επικράτειας LaM του *Dictyostelium discoideum* και της NMR δομής του ανθρώπινου LaM. Β. Υπέρθεση της NMR δομής της επικράτειας LaM του *Dictyostelium discoideum* και της NMR δομής της επικράτειας LaM του *T. Brucei*. Γ. NMR δομή της επικράτειας LaM του *Dictyostelium discoideum*, όπου απεικονίζονται τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών LARP και τα συντηρημένα αρωματικά αμινοξέα.

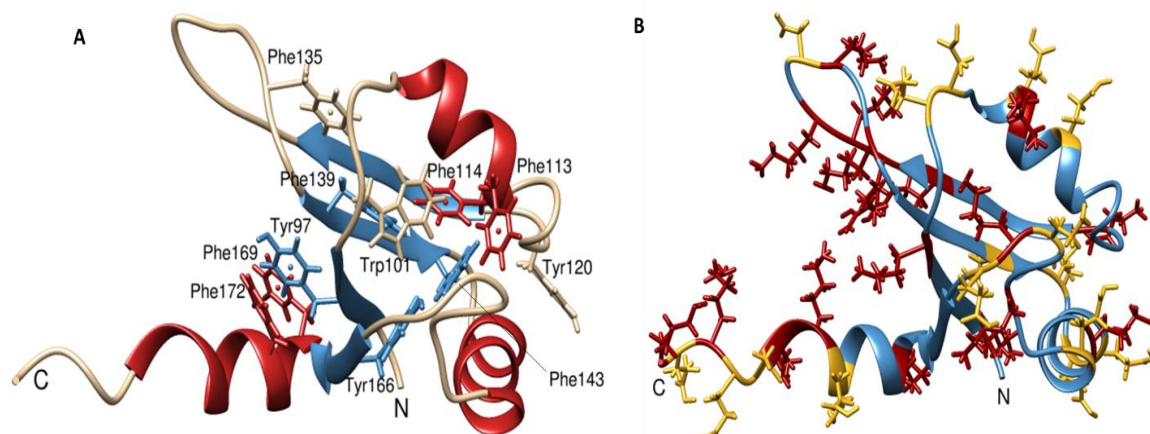
ΣΤ.1.2. Το μοτίβο RRM1 του *Dictyostelium discoideum*

Η δομή του πρώτου μοτίβου RRM, του RRM1, της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* (La93-191) επιλύθηκε με Φασματοσκοπία NMR. Το dRRM1 αποτελείται από 85 αμινοξέα και υιοθετεί τη διαμόρφωση του κλασικού μοτίβου RRM με την προσθήκη μίας επιπλέον α -έλικας στο C-τελικό άκρο (Εικόνα 125). Αποτελείται από τρεις α -έλικες και τέσσερις β -κλώνους με τοπολογία $\beta 1 \alpha 1 \beta 2 \beta 3 \alpha 2 \beta 4 \alpha 3$. Οι β -κλώνοι είναι αντιπαράλληλοι και υιοθετούν τη διάταξη $\beta 4$ - $\beta 1$ - $\beta 3$ - $\beta 2$. Επιπλέον στοιχείο του κλασικού μοτίβου RRM στη δομή του dRRM1 αποτελεί η $\alpha 3$ -έλικα που εκτείνεται στα αμινοξέα La169-177, ενώ το υπόλοιπο C-τελικό άκρο παραμένει μη-δομημένο (La178-191). Επίσης το dRRM1 εμφανίζει μεγαλύτερες και ευέλικτες θηλιές σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των κλασικών μοτίβων RRM. Συγκεκριμένα, η θηλιά $\beta 2 \beta 3$, η οποία αποτελείται από 12 αμινοξέα, είναι μεγάλη και ευκίνητη, και πιθανώς να συμμετέχει στην αλληλεπίδραση του RNA μαζί με τους β -κλώνους. Επίσης, μεγαλύτερες είναι και οι θηλιές $\alpha 1 \beta 2$ και $\alpha 2 \beta 4$ που αποτελούνται από 7 και 9 αμινοξέα, αντίστοιχα. Μάλιστα η θηλιά $\beta 2 \beta 3$ εντοπίζεται στην ίδια περιοχή με τη θηλιά $\alpha 2 \beta 4$ και ενδέχεται να συνεισφέρει και αυτή στην αλληλεπίδραση του RNA.



Εικόνα 125: Α. NMR τρισδιάστατη δομή του μοτίβου RRM1 του *Dictyostelium discoideum*. Β. Οικογένεια των 20 δομών χωρίς τα 12 αμινοξέα του N-τελικού άκρου που εμφανίζουν ευκινησία.

Η C-τελική $\alpha 3$ -έλικα εκτείνεται πέρα από τη βασική δομή του dRRM1. Η περιοχή που σχηματίζεται από την $\alpha 3$ -έλικα, την επιφάνεια των $\beta 1$ και $\beta 3$ κλώνων που εντοπίζεται προς την C-τελική περιοχή και τις θηλιές $\beta 2\beta 3$ και $\alpha 2\beta 4$ κατευθύνει το RNA για την πρόσδεσή του στο dRRM1. Η περιοχή αυτή αποτελείται κυρίως από θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα (Lys, Arg, Εικόνα 126B), ενώ οι περιοχές στην αντίθετη πλευρά του μορίου, που περιλαμβάνουν τις $\alpha 2$ - και $\alpha 3$ -έλικες, το εξωτερικό τμήμα της $\alpha 3$ -έλικας και την $\alpha 2\beta 4$ θηλιά καλύπτονται από όξινα αμινοξέα (Asp, Glu). Παράλληλα οι β -κλώνοι είναι πλούσιοι σε αρωματικά αμινοξέα, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με το RNA (Εικόνα 126A).



Εικόνα 126: NMR δομή του RRM1 του *Dictyostelium discoideum*, όπου απεικονίζονται Α. τα αρωματικά αμινοξέα και Β. τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα (Lys και Arg) με κόκκινο και τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (Asp, Glu) με κίτρινο.

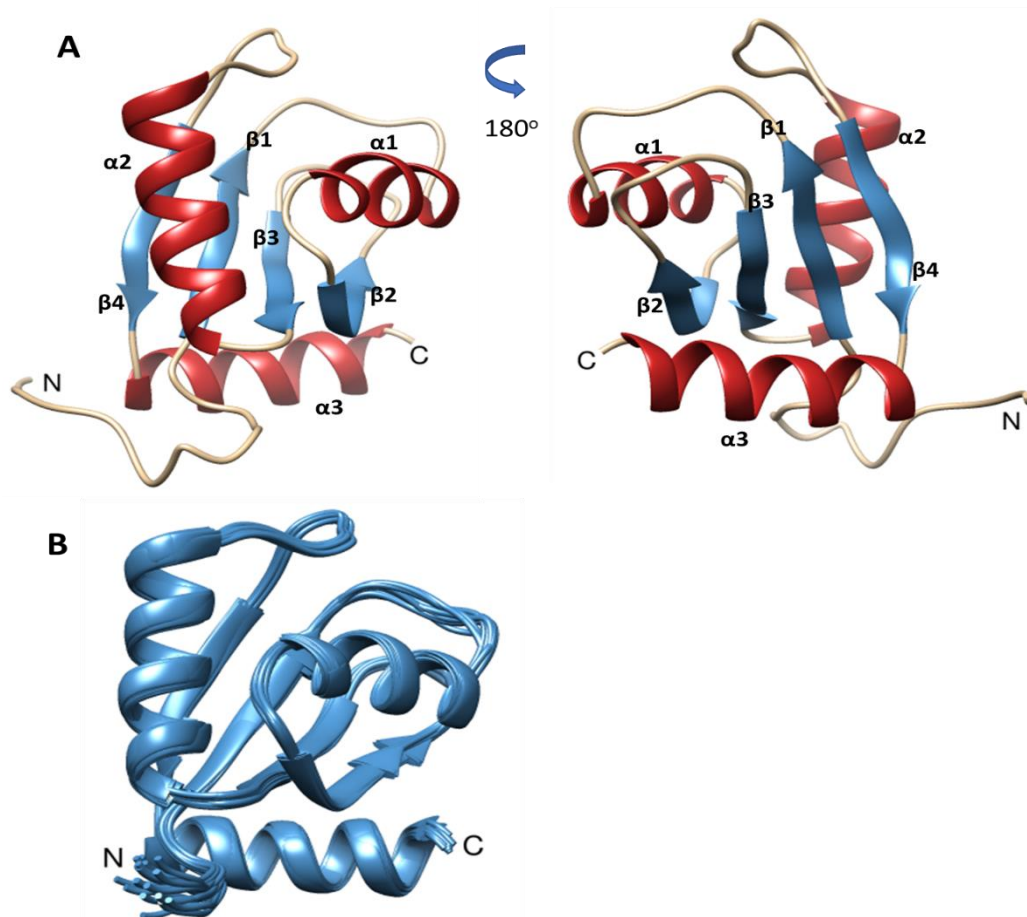
Τα συντηρημένα μοτίβα δέσμευσης RNA, RNP2 και RNP1 του dRRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* εντοπίζονται στις περιοχές 96-LYSKGW-101 και 136-KGSFLADF-143 (Εικόνα 127). Στο πρώτο μοτίβο δέσμευσης RNP1 περιλαμβάνονται τρία αμινοξικά κατάλοιπα από τα συντηρημένα στα μοτίβα RRM, τα Lys136, Gly137 και Phe143. Στο RNP2 του dRRM1 περιλαμβάνονται δύο από τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα, τα Leu96 και Tyr97. Η ύπαρξη των αμινοξέων αυτών θεωρείται σημαντική, καθώς με τις πλευρικές τους ομάδες είναι δυνατό να δημιουργήσουν δεσμούς με το RNA. Τα RNP1 και RNP2 εντοπίζονται στο κεντρικό ζευγάρι των β -κλώνων του dRRM1. Συγκεκριμένα, το RNP1 εντοπίζεται στον $\beta 3$ -κλώνο και το RNP2 εντοπίζεται στον $\beta 1$ -κλώνο.

	RNP2	RNP1
HNRNPc3	...KSESPKEPEQL...RKLFIOGLSFETTTDESLR-SHF...EQWOTLTDCVVMRDPNT...KRSRGFGFVTYATV	
HNRNPc4	...KKIFVGGIKEDTEEHHLR-DYF...EQYKIEVIEIMTDGGS...GKKRGFAFVTFDDH	
U1Aox7	...AVPETRPN...HTIYINNLNEKIKKDELKKSLEY...AIFSQFGQILDILVSR...LKMRRGQAFVIFKEV	
U1Bxx8	...MDIRPN...HTIYINNMNDKIKKEELKRSLY...ALFSQFGHVVDIVALKT...MKMRGQAFVIFKEL	
NUCLEOLINRRM2	...LLAKNLSFNITEDELK...EVFEDALEIRLVSDG...KSKGIAYIEFKSE	
dLaRRM1	...G...KTLYSKGWPEDTTIEKVQ-EFF...NANOGYKVVSRLRKKKS-DKSFKGSFLADFETE	
hLaRRM1	...KNDVKN...RSVYIKGFPDADLDDIK-EWL...EDKQVNLIQMRRTLHK...AFKGSIFVVFDSI	
PTBP1x1	...TLHLSNIPPSVSEEDLK-VLF...SSNGGVVKGFKFFQKD...RKMALIQMGSV	
PTBP1x0	...GN...SVLLVSNLNPVTPQSLF-ILF...GVYGDVQVRVKILFNKK...ENALVQADG	
hLaRRM2	...SLEEKIG-C...LLKFSDDLDDOTCREDLH-ILF...SNHGEIKWIDFVRGAKEGILFKEKAKEALGKA	
dLaRRM2	KDVKKVEVEEEMIPGVILCFKGVKGLHRGDIK-EIF...SQYGEVQFVGYSDEEN...GSVRYKTAESC	
NUCLEOLINRRM1	...NLFIQNLNPNKSVAEKVAIS...EPFAKNDLAVVDVRTG...TNRKFGYDFESA	
HU2AF65RRM2	...AHKLFIOGLPNYLNDDQVK-ELL...TSFQPLKAFNLVKDSATG...LSKGYAFCEYVDI	
HU2AF65RRM1	...ARRLYVGNIPFGITEEAMM-DFNAQMRLGGLTQAPGNPVLAVQINODKNFAFLERSV	
HNRNPc3	EEVDAAMNARP...HKVDG-RVVEPK...RA...	
HNRNPc4	DSVDKIVIQKY...HTVNG-HNCEVR...KALSKQ...	
U1Aox7	SSATNALRSMQG...FPFYD-KPMRIQ...YAKTDSDI IAKMKGTFV...	
U1Bxx8	GSSTNALRQLQG...FPFYD-KPMRIQ...YAKTDSDI IAKMRG...	
NUCLEOLINRRM2	ADAENLEEEKQG...AEIDG-RSVSLY...YTGEKG...	
dLaRRM1	EIVNKIITEAP...KLGE-KELIYQTFKQFSDKKDEKEKFFASTNGDK	
hLaRRM1	ESAKKFVETPG...QKYKE-TDLLILFKDDYFAKKNEERKQNKVE...	
PTBP1x1	EEAVQALIDLHN...HDLGENHHLRVS...FSKSTI...	
PTBP1x0	NQAQLAMSHLNG...HKLHG-KPIRIT...	
hLaRRM2	KDANNGLNQLRNKEVTWEVLE...EVEKEALKKI IEDQGESLNKWKSKGR...	
dLaRRM2	KRAIESLTETK...KEIGD-QIPTYN...LLEGEKEK-KWEKIIERK...	
NUCLEOLINRRM1	EDLEKALELTG...LKVFQ-NEIK...	

Εικόνα 127: Σύγκριση των αλληλουχιών διαφορετικών μοτίβων RRM, συμπεριλαμβανομένων των human RRM1 και RRM2α και του *Dictyostelium discoideum* RRM1 και RRM2α, καθώς και των υπολοίπων πρωτεϊνών LARP.

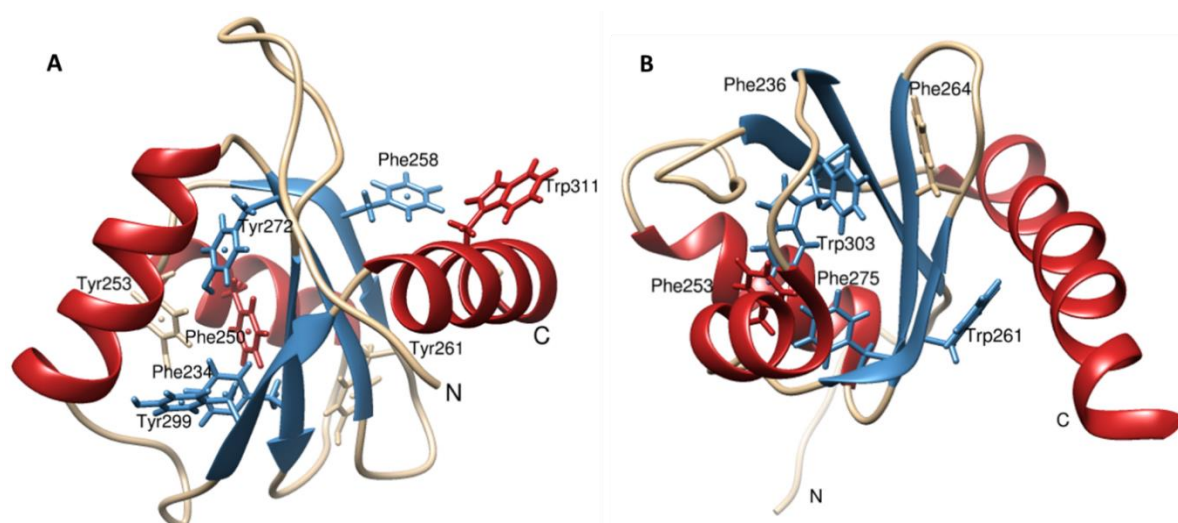
ΣΤ.1.3. Το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*ΣΤ.1.3.i. Το μοτίβο RRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*

Η δομή του μοτίβου RRM2α στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* επιλύθηκε με φασματοσκοπία NMR (Εικόνα 128). Το dRRM2α αποτελείται από 90 αμινοξέα. Τα συντηρημένα ως προς την τοπολογία μοτίβα δέσμησης RNA, RNP1 και RNP2 του dRRM2α εντοπίζονται στις περιοχές 268-GSVRYKTA-275 και 232-LCFKGV-237 αντίστοιχα (Εικόνα 127). Ωστόσο, μόνο ένα αμινοξικό κατάλοιπο από τα συντηρημένα του κάθε μοτίβου δέσμησης εντοπίζεται. Συγκεκριμένα το αμινοξικό κατάλοιπο Tyr272 εντοπίζεται στο RNP1 και το Leu232 στο RNP2, αντίστοιχα. Στο RNP2 του dRRM2α συμπεριλαμβάνεται η Phe234, δηλαδή το αμινοξικό κατάλοιπο, που φυσιολογικά εντοπίζεται στη θέση 2 του συντηρημένου μοτίβου των RRM, εμφανίζεται στη θέση 3 στο dRRM2α.



Εικόνα 128: Α. NMR τρισδιάστατη δομή του μοτίβου RRM2α του *Dictyostelium discoideum*. Β. Οικογένεια των 20 NMR δομών χωρίς τα 10 αμινοξέα του N-τελικού άκρου που εμφανίζουν ευκινησία

Το dRRM2α υιοθετεί τη διαμόρφωση του μοτίβου RRM με την προσθήκη μίας επιπλέον α -έλικας στο C-τελικό άκρο. Αποτελείται από τρεις α -έλικες και τρεις β -κλώνους με τοπολογία $\beta 1 \alpha 1 \beta 2 \beta 3 \alpha 2 \beta 4 \alpha 3$. Συγκεκριμένα, το N-τελικό άκρο του αποτελείται από μία περιοχή χωρίς δομικά στοιχεία (La214-230), η οποία ενδεχομένως να αποτελεί μέρος του συνδέτη μεταξύ των RRM1 και RRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*. Ακολουθεί ο πρώτος $\beta 1$ -κλώνος (La231-235) και η $\alpha 1$ -έλικα (La243-252). Στη συνέχεια, εντοπίζονται οι $\beta 2$ (La256-261) και $\beta 3$ (La268-271) κλώνοι και η $\alpha 2$ -έλικα (La275-289). Το τελευταίο τμήμα της δομής του dRRM2α αποτελείται από τον τελευταίο β -κλώνο, τον $\beta 4$ (La298-302), και την τελευταία α -έλικα, την $\alpha 3$ (La304-317, Εικόνα 128). Οι αντιπαράλληλοι β -κλώνοι υιοθετούν τη διάταξη $\beta 4$ - $\beta 1$ - $\beta 3$ - $\beta 2$. Η $\alpha 3$ -έλικα που εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο αποτελεί επιπλέον στοιχείο των κλασικών μοτίβων RRM και εντοπίζεται στο κάτω μέρος της β -επιφάνειας (Εικόνα 128). Ενδεχομένως να συμμετέχει στην επιλογή του RNA, το οποίο προσδένεται στην πρωτεΐνη La.



Εικόνα 129: NMR δομή του RRM2α Α. του *Dictyostelium discoideum* και Β. του *human*, όπου απεικονίζονται τα αρωματικά αμινοξέα.

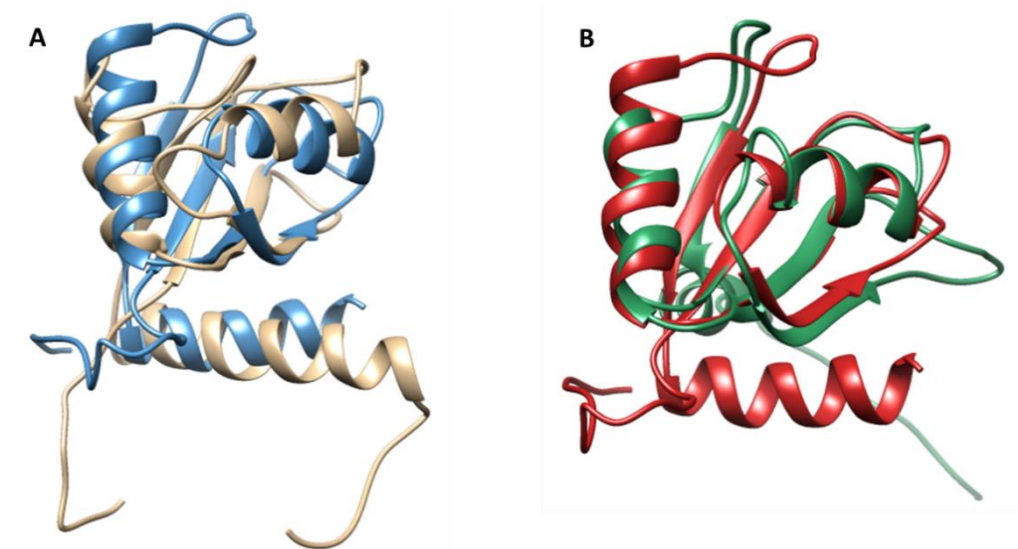
Τα μοτίβα RRM είναι συνήθως πλούσια σε αρωματικά αμινοξέα, καθώς αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδρασή τους με το RNA. Ωστόσο, στην επικράτεια RRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* εντοπίζονται λιγότερα αρωματικά αμινοξέα (8 αρωματικά αμινοξέα, Εικόνα 129Α), ενώ το dRRM1 περιλαμβάνει 11 αρωματικά αμινοξέα. Το ίδιο συμβαίνει και στο RRM2α της *human* La. Μάλιστα, στο hRRM2α εντοπίζονται 6 αρωματικά αμινοξέα (Εικόνα 129Β),

δηλαδή λιγότερα από το dRRM2α. Συγκεκριμένα, στον $\beta 1$ -κλώνο του dRRM2α εντοπίζεται η Phe234, ενώ αντίστοιχα στο hRRM2α εντοπίζεται η Phe236. Αντίστοιχα, στην $\alpha 1$ -έλικα εντοπίζεται η Phe250 για το dRRM2α και η Phe253 για το hRRM2α. Τα επόμενα συντηρημένα αρωματικά αμινοξέα εντοπίζονται στον $\beta 2$ -κλώνο (Phe258 του dRRM2α και Trp261 του hRRM2α), στον $\beta 3$ -κλώνο (Tyr272 του dRRM2α και Phe275 του hRRM2α), στον $\beta 4$ -κλώνο (Tyr299 του dRRM2α και Trp303 του hRRM2α), καθώς και στη θηλιά $\beta 2\beta 3$ (Tyr261 του dRRM2α και Phe264 του hRRM2α). Τα επιπλέον αρωματικά αμινοξέα του dRRM2α είναι τα Phe253 και Trp311 που εντοπίζονται στη θηλιά $\alpha 1\beta 2$ και στην $\alpha 3$ -έλικα, αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τις NMR δομές του RRM2α του *Dictyostelium discoideum* και του ανθρώπου παρατηρούνται αρκετές διαφορές μεταξύ τους. Οι διαφορές αυτές εντοπίζονται κυρίως στις α -έλικες των μορίων αυτών. Η $\alpha 1$ -έλικα του dRRM2α εμφανίζει μία στροφή παραπάνω σε σχέση με την αντίστοιχη του hRRM2α. Το ίδιο συμβαίνει και με την $\alpha 2$ -έλικα, η οποία εμφανίζει δύο περισσότερες στροφές στο dRRM2α σε σύγκριση με την αντίστοιχη του hRRM2α. Οι διαφορές σε αυτές τις έλικες έχουν ως αποτέλεσμα να εντοπίζονται μικρές διαφορές στη διεύθυνση των β -κλώνων. Παρόλα αυτά, οι β -κλώνοι των RRM2α των διαφορετικών οργανισμών εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες ως προς το μέγεθος και τη δομή τους. Η $\alpha 3$ -έλικα αποτελεί επιπλέον στοιχείο (των κλασικών μοτίβων RRM) και στις δύο δομές. Ωστόσο, η $\alpha 3$ -έλικα του dRRM2α είναι λίγο πιο κοντή σε σύγκριση με την αντίστοιχη του hRRM2α, ίσως εξαιτίας του μικρότερου πολυπεπτιδίου που έχει επιλεγεί για τη δομική ανάλυση. Επιπλέον, η $\alpha 3$ -έλικα εντοπίζεται σχεδόν κάθετα στην $\alpha 2$ -έλικα του dRRM2α, ενώ στο hRRM2α στρέφεται ελαφρώς προς τα κάτω (Εικόνα 130Α).

Παρατηρώντας τα δύο διαδοχικά μοτίβα RRM της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* διακρίνονται αρκετές ομοιότητες και διαφορές (Εικόνα 130Β). Αρχικά, και τα δύο RRM φέρουν μία επιπλέον έλικα, την $\alpha 3$. Παρόλα αυτά, η διάταξή της στο χώρο είναι διαφορετική, καθώς στο dRRM1 στρέφεται προς την αντίθετη κατεύθυνση από το βασικό σκελετό, ενώ στο dRRM2α εντοπίζεται στο κάτω μέρος του βασικού σκελετού. Επιπλέον, η $\alpha 2$ -έλικα του dRRM2α είναι κατά μία στροφή μεγαλύτερη σε σύγκριση με την $\alpha 2$ -έλικα του dRRM1. Οι θηλιές του dRRM1 είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες του dRRM2α. Παρόλα αυτά, το μοτίβο των β -κλώνων παραμένει ίδιο, όπως στα κλασικά μοτίβα RRM. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στο dRRM1 εντοπίζονται περισσότερα αρωματικά αμινοξέα απ' ό,τι στο dRRM2α.

Ακόμη, στο dRRM2α δεν υπάρχει συγκεκριμένη περιοχή όπου εντοπίζονται κυρίως θετικά φορτισμένα αμινοξέα όπως συμβαίνει στο dRRM1. Τέλος, η N-τελική περιοχή του dRRM2α και η C-τελική περιοχή του dRRM1 δεν εμφανίζουν δομικά στοιχεία. Οι περιοχές αυτές αποτελούν μέρος του συνδέτη μεταξύ των δύο διαδοχικών RRM, που ενδέχεται να μην είναι δομημένος.



Εικόνα 130: Υπέρθεση Α. της NMR δομής του RRM2α του *Dictyostelium discoideum* (μπλε) και της NMR δομής του human RRM2α (μπεζ) και Β. της NMR δομής του RRM2α του *Dictyostelium discoideum* (κόκκινο) και της NMR δομής του RRM1 του *Dictyostelium discoideum* (πράσινο).

ΣΤ.1.3.ii. Άλλες περιοχές του C-τελικού άκρο της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*

Η C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης La διαφορετικών οργανισμών εμφανίζει τις περισσότερες διαφορές σε σύγκριση με την καλά συντηρημένη N-τελική περιοχή. Μάλιστα το μέγεθος της C-τελικής περιοχής αυξάνεται στους ανώτερους οργανισμούς. Η προσθήκη του δεύτερου μοτίβου RRM (RRM2α) αποτελεί χαρακτηριστικό των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Η ύπαρξη του επιπλέον μοτίβου RRM στην πρωτεΐνη La του *Dictyostelium discoideum* προκαλεί εντύπωση καθώς μόνο οι πρωτεΐνες La των ανώτερων οργανισμών φέρουν το επιπλέον RRM. Αυτό ενδεχομένως να αποτελεί μέρος της «αρχαίας» πρωτεΐνης La καθώς εντοπίζεται σε εκπροσώπους που φυλογενετικά προϋπήρχαν.

Αμέσως μετά το RRM2α ακολουθεί μία περιοχή γνωστή ως στοιχείο κατακράτησης στον πυρήνα (NRE ή Nuclear Retention Element), το οποίο έχει αποδεχθεί ότι σχηματίζει μία ελικοειδή διαμόρφωση που αποκλείει εν μέρει την περιοχή του β 4-κλώνου του RRM2α στην πρόσδεση του RNA. Η περιοχή του NRE εντοπίζεται στα αμινοξέα 316-332 στη hLa. Η περιοχή αυτή είναι συντηρημένη και στην πρωτεΐνη La του *Dictyostelium discoideum*, η οποία εντοπίζεται στα αμινοξέα 311-327. Αμέσως μετά την περιοχή NRE ακολουθεί το μικρό βασικό μοτίβο (SBM ή short basic motif), το οποίο είναι συντηρημένο στην πρωτεΐνη La του *Dictyostelium discoideum* (Εικόνα 131). Αυτή η περιοχή αποτελείται από το μοτίβο τύπου Walker-A (GXXXXXGKX) και εντοπίζεται στην dLa. Η C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* περιλαμβάνει αμέσως μετά το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS ή Nuclear Localization Signal).



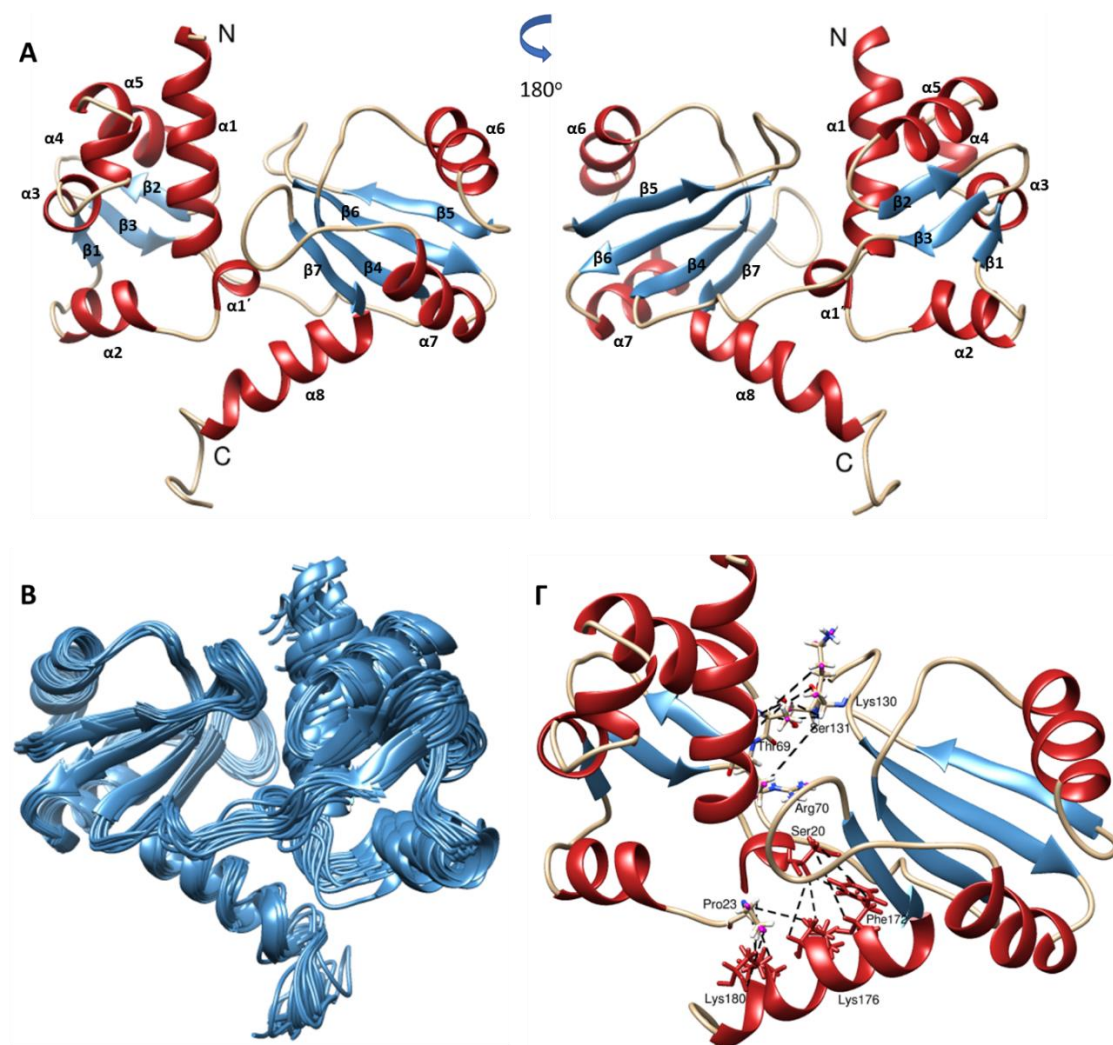
Εικόνα 131: Σύγκριση των αλληλουχιών των C-τελικών περιοχών συμπεριλαμβανομένου του RRM2α της ανθρώπινης πρωτεΐνης La και της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη La περιλαμβάνει πέντε θέσεις φωσφορυλίωσης (Thr302, Ser325, Thr362, Ser366 και Thr389), με σημαντικότερη αυτή της Ser366 που ελέγχει ρυθμιστικές δραστηριότητες. Ωστόσο, καμία από αυτές τις θέσεις φωσφορυλίωσης δεν εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται σε λιγότερες λειτουργίες της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* σε σύγκριση με την hLa, αλλά και στις απλοποιημένες κυτταρικές λειτουργίες των κυττάρων του *Dictyostelium discoideum* σε σύγκριση με τα πολύπλοκα κύτταρα του *human*.

ΣΤ.1.4. Η δομή του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 του *Dictyostelium discoideum*

Η δομή του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 (N-τελική περιοχή) της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* επιλύθηκε με Φασματοσκοπία NMR (Εικόνα 132Α, 132Β). Στη δομή του LaM-RRM1 διατηρείται η δομή των επιμέρους επικρατειών LaM και RRM1, όπως αυτές επιλύθηκαν χωρίς την παρουσία της δεύτερης επικράτειας. Περιλαμβάνει οκτώ α -έλικες και επτά β -κλώνους με τοπολογία $\alpha 1 \alpha 1' \alpha 2 \beta 1 \alpha 3 \alpha 4 \alpha 5 \beta 2 \beta 3 \beta 4 \alpha 6 \beta 5 \beta 6 \alpha 7 \beta 7 \alpha 8$. Από τη δομή του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 διακρίνεται ότι οι επικράτειες LaM και RRM1 δεν κινούνται ανεξάρτητα η μία από την άλλη, διότι μεταξύ τους αναπτύσσονται NOE συσχετίσεις, δηλαδή συσχετίσεις μεταξύ των ατόμων που βρίσκονται σε απόσταση 5-5,5Å. Συγκεκριμένα, NOE συσχετίσεις αναπτύσσονται μεταξύ των ατόμων $\beta\text{CH}_{2/3}$ της Pro23 και του NH της Lys180, HA της Ser20 και των Ha της Phe172 και Ha/H β της Lys176, του H β της Ser20 και του Ha της Phe172, του H β της Ser20 και του H β της Lys176, του Ha της Pro23 και των H β της Lys176, H β και H γ της Lys180, καθώς και του H δ της Pro23 και του H β της Lys180. NOE συσχετίσεις αναπτύσσονται, επίσης, μεταξύ των ατόμων NH της Thr69 με τα H β και H γ της Ser131, του NH της Arg70 και του H β της Ser131, του NH της Ser131 και του δCH_3 της Arg70, του Ha της Thr69 και του H γ της Lys130, του H β της Thr69 και των Ha και H γ της Lys130, του $\delta\text{CH}_{3/2}$ της Thr69 και του Ha της Lys130, καθώς και του Ha της Thr69 και του δCH_3 της Lys136 (Εικόνα 132Γ).

Από τη διευθέτηση των δύο επικρατειών παρατηρείται ότι η συντηρημένη περιοχή του LaM των πρωτεϊνών LARP και η περιοχή του RRM1 με τα περισσότερα θετικά φορτισμένα αμινοξέα εντοπίζονται στη διεπιφάνεια των δύο επικρατειών που σχηματίζεται. Τα αρωματικά αμινοξέα εντοπίζονται στη διεπιφάνεια των δύο επικρατειών καθώς και στην περιοχή πρόσδεσης του RNA στο LaM και στους β -κλώνους του RRM1.



Εικόνα 132: Α. NMR τρισδιάστατη δομή του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 του *Dictyostelium discoideum*. Β. Οικογένεια των 20 NMR δομών του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1. Γ. NOE συσχετίσεις μεταξύ των δύο επικρατειών.

Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N HSQC του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 και των πολυπεπτιδίων LaM και RRM1 (Εικόνα 133Α), παρατηρούνται ελάχιστες διαφορές, καθώς οι περισσότερες κορυφές του LaM και του RRM1 ταυτίζονται με τις αντίστοιχες του LaM-RRM1. Παρόλα αυτά, υπάρχουν σήματα, κυρίως του RRM1, τα οποία είναι ελαφρώς μετατοπισμένα στο πολυπεπτίδιο LaM-RRM1. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται σε μικρές διαφορές στη δομή του εκφραζόμενου πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 σε σχέση με τα επιμέρους πολυπεπτίδια LaM και RRM1.

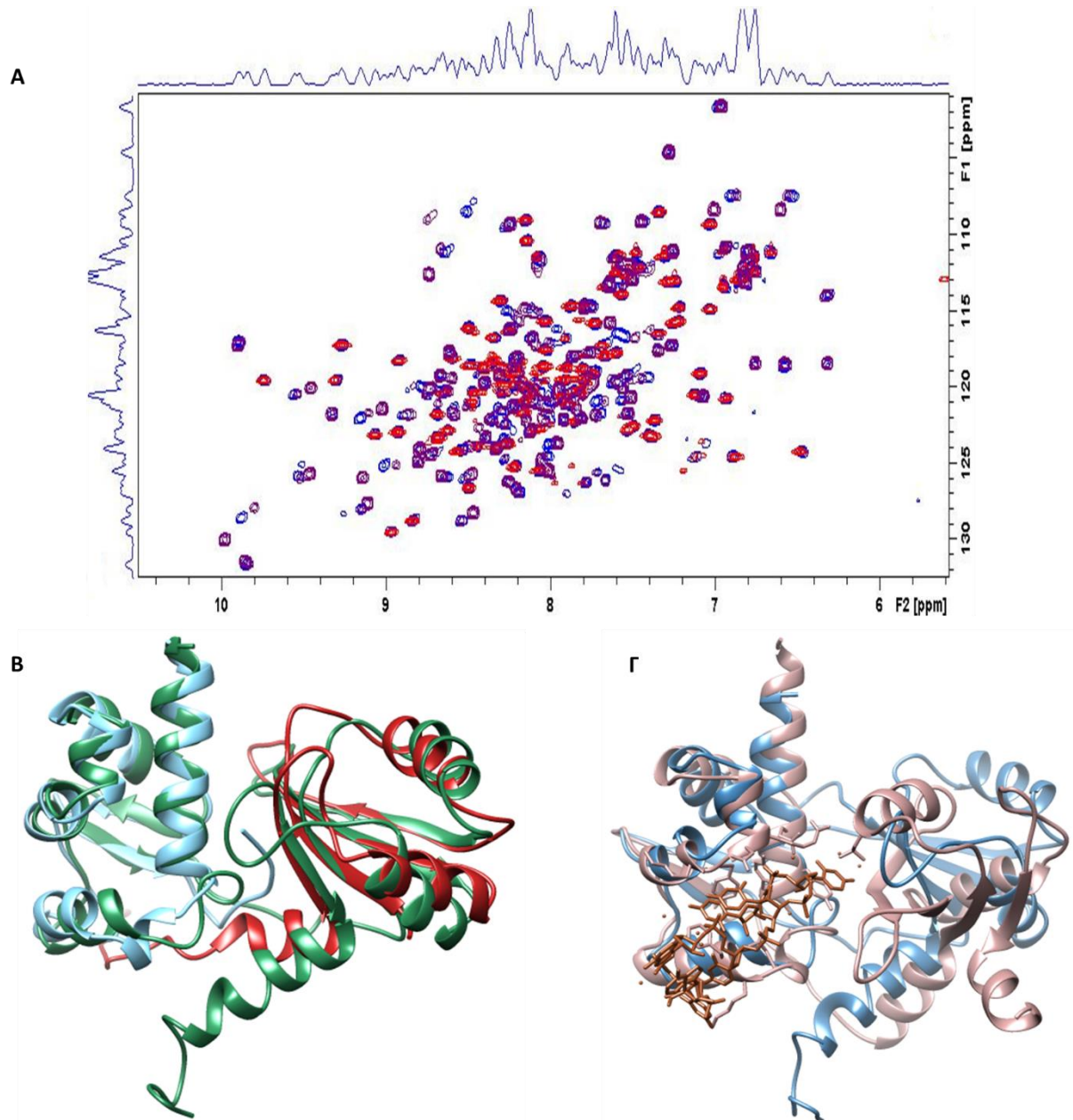
Η εικόνα αυτή της υπέρθεσης των φασμάτων ^1H - ^{15}N HSQC αντικατοπτρίζεται στην υπέρθεση των δομών των τριών πολυπεπτιδίων. Από τη σύγκριση της δομής του

πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 με τις δομές των επιμέρους επικρατειών LaM και RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* παρατηρούνται αρκετές ομοιότητες (Εικόνα 133B). Συγκεκριμένα, η περιοχή του LaM στη δομή του LaM-RRM1 σχεδόν ταυτίζεται με τη δομή του LaM. Οι διαφορές στις δομές αυτές εντοπίζονται στις έλικες $\alpha 1'$ και $\alpha 2$. Η διαφορά στην $\alpha 1'$ -έλικα οφείλεται στην ύπαρξη NOE συσχετίσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων Ser20 και Phe172, Ser20 και Lys176, Pro23 και Lys180, καθώς και Pro23 και Lys176 (Εικόνα 132Γ). Με αυτόν τον τρόπο, η $\alpha 1'$ -έλικα μετατοπίζεται ελαφρώς προς το RRM1, συμπαρασύροντας προς την ίδια πλευρά και την $\alpha 2$ -έλικα. Επομένως, οι διαφορές μεταξύ της περιοχής του LaM του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 με το πολυπεπτίδιο LaM εντοπίζονται μόνο στις $\alpha 1'$ και $\alpha 2$ -έλικες (Εικόνα 133B).

Διαφορές εντοπίζονται και στη διαμόρφωση του RRM1 όταν συνεκφράζεται με το LaM. Παρόλο που διατηρούνται και στην περίπτωση του RRM1 όλα τα δομικά στοιχεία, παρατηρούνται διαφορές ως προς τη διεύθυνση των $\alpha 6$, $\alpha 7$ και $\alpha 8$ -ελίκων καθώς και των θηλιών. Οι διαφορές στις θηλιές οφείλονται κυρίως στην ευκινησία τους. Στην περίπτωση της $\beta 5\beta 6$ θηλιάς, αυτή η διαφορά ενδεχομένως να οφείλεται σε συσχετίσεις μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων Ser131 με την Thr69 και Arg70, της Lys130 με την Thr69 και της Lys136 με την Thr69. Επιπλέον, μετά από σύγκριση της δομής του RRM1 μόνο του και όταν συνεκφράζεται με το LaM, παρατηρείται ότι οι έλικες υφίστανται μία μετατόπιση. Συγκεκριμένα, η $\alpha 6$ -έλικα μετατοπίζεται λίγο χαμηλότερα και η $\alpha 7$ λίγο χαμηλότερα και αριστερά σε σύγκριση με την αντίστοιχη του απομονωμένου RRM1. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην ευκινησία των θηλιών και των ελίκων αυτών. Η $\alpha 8$ -έλικα μετατοπίζεται περισσότερο κοντά στο μόριο, καθώς αναπτύσσονται συσχετίσεις μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων Ser20 με τη Phe172 και τη Lys176, καθώς της Pro23 με τη Lys176 και τη Lys180. Παρόλα αυτά δε διακρίνονται διαφορές στους β -κλώνους.

Συγκρίνοντας την NMR δομή του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με την κρυσταλλική δομή του LaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του *human*, στο οποίο είναι προσδεμένο RNA (PDB ID: 2vod), παρατηρείται ότι τα LaM των δύο πολυπεπτιδίων σχεδόν ταυτίζονται, ενώ διαφορές παρατηρούνται στη διεύθυνση του RRM1 σε σχέση με το LaM. Συγκεκριμένα, το RRM1 φαίνεται να στρέφεται με τέτοιο τρόπο ώστε οι β -κλώνοι να είναι παράλληλοι προς το LaM και παράλληλα η $\alpha 6$ -έλικα και ο $\beta 5$ -κλώνος να έρχονται κοντά στο hLaM.

Οι αλλαγές στη διευθέτηση του RRM1 σε σχέση με το LaM ενδεχομένως να οφείλονται στην αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 με RNA.

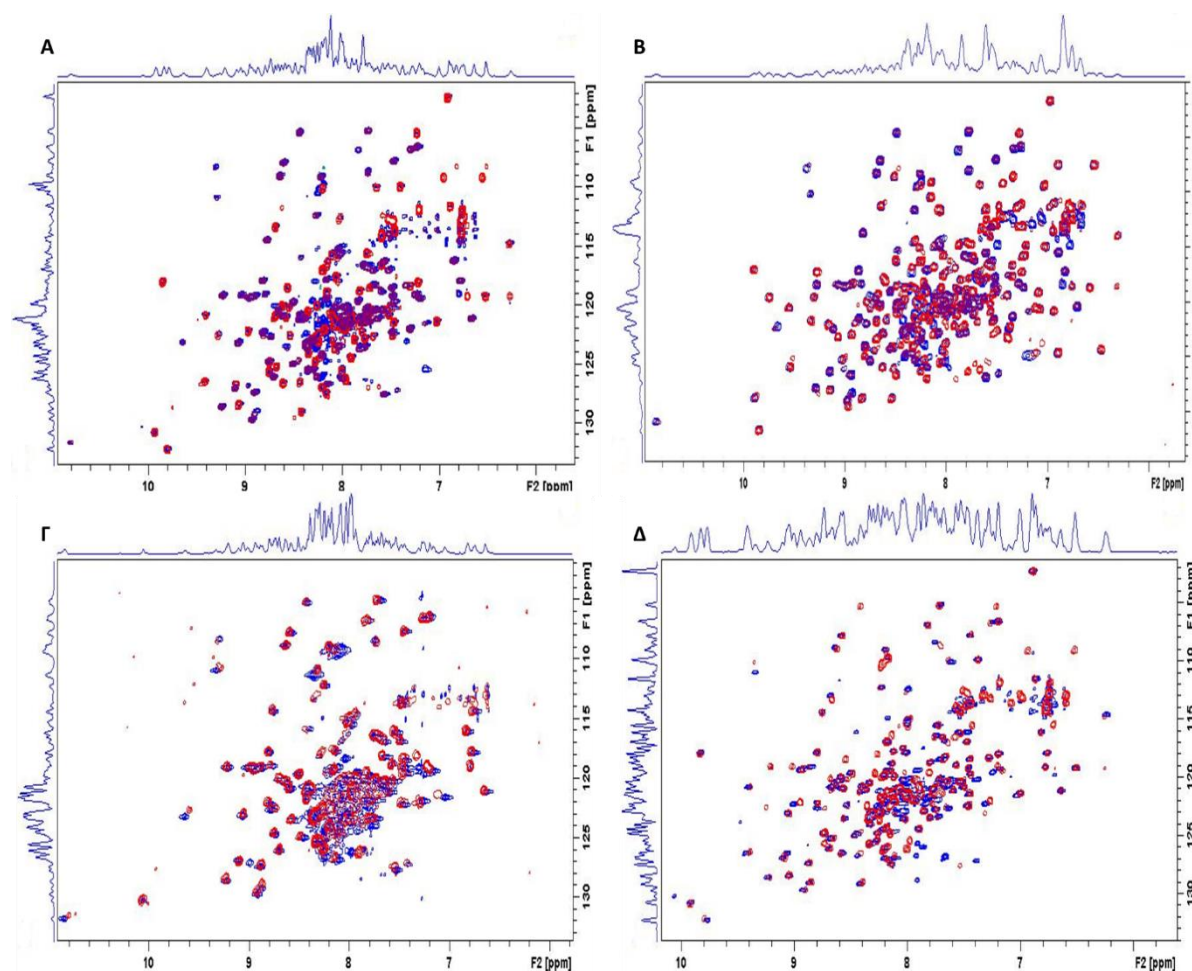


Εικόνα 133: Α. Υπέρθυση του φάσματος ^1H - ^{15}N HSQC του ^{15}N LaM-RRM1 (με μπλε χρώμα) και των φασμάτων ^1H - ^{15}N HSQC των LaM και RRM1 (με κόκκινο και μωβ χρώμα, αντίστοιχα). Β. Υπέρθυση της NMR δομής του LaM-RRM1 του *Dictyostelium discoideum* (πράσινο) και των NMR δομών των LaM και RRM1 του *Dictyostelium discoideum* (γαλάζιο και κόκκινο, αντίστοιχα). Γ. . Υπέρθυση της NMR δομής του LaM-RRM1 του *Dictyostelium discoideum* (μπλε) και της κρυσταλλικής δομής του human LaM-RRM1 προσδεμένο με RNA (μωβ, PDB ID: 2vod).

ΣΤ.1.5. Αυτονομία των επιμέρους επικρατειών της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*

Οι επιμέρους επικράτειες της πρωτεΐνης La διατηρούν τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής τους ακόμη και όταν αυτές συνδυάζονται μεταξύ τους σε μεγαλύτερα πολυπεπίδια. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, όταν οι επικράτειες LaM και RRM1 συνδυαστούν μεταξύ τους στο πολυπεπίδιο LaM-RRM1, παρατηρείται ότι διατηρούν όλα τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής. Ωστόσο, μετά την επίλυση της δομής του LaM-RRM1, οι επικράτειες LaM και RRM1 δε φαίνεται να κινούνται ανεξάρτητα, αλλά αναπτύσσονται NOE συσχετίσεις μεταξύ ατόμων του LaM και του RRM1 που σταθεροποιούν τις δύο επικράτειες μεταξύ τους.

Η υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N HSQC του πολυπεπτιδίου ^{15}N -RRM1-RRM2α με τα επιμέρους πολυπεπίδια ^{15}N -RRM1 και ^{15}N -RRM2α αποκάλυψε ότι τα φάσματα των επιμέρους επικρατειών ταυτίζονται και συμπληρώνουν το φάσμα ολόκληρου του πολυπεπτιδίου (Εικόνα 134Α). Παρόλα αυτά, υπάρχουν κάποια σήματα NH που δεν ανήκουν ούτε στο RRM1, ούτε στο RRM2α, αλλά στον συνδέτη μεταξύ των δύο επικρατειών. Από την υπέρθεση των φασμάτων αυτών παρατηρείται ότι οι δύο επικράτειες κινούνται ανεξάρτητα. Ενδεικτικό της ευκινησίας αυτής αποτελεί και η έλλειψη σταθερότητας του πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α, καθώς το πολυπεπίδιο αυτό μετά από 2-3 ημέρες τέμνεται στις επιμέρους επικράτειες. Όσον αφορά στο πολυπεπίδιο LaM-RRM1-RRM2α, μετά από υπέρθεση του φάσματος ^1H - ^{15}N HSQC για το συγκεκριμένο πολυπεπίδιο με τα αντίστοιχα φάσματα των πολυπεπτιδίων LaM-RRM1 και RRM2α, παρατηρήθηκε ότι το φάσμα ^1H - ^{15}N HSQC του πολυπεπτιδίου ταυτίζεται με τα αντίστοιχα φάσματα των τριών επικρατειών (Εικόνα 134Β). Εξαίρεση αποτελούν τα σήματα NH που ανήκουν στο συνδέτη μεταξύ του RRM1 και του RRM2α που δεν ανήκουν σε κανένα πολυπεπίδιο. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα πολυπεπίδια LaM-RRM1 βρίσκονται σε επαφή και κινούνται αυτόνομα με το RRM2α στο πολυπεπίδιο LaM-RRM1-RRM2α.



Εικόνα 134: Υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N HSQC A. του πολυπεπτιδίου ^{15}N -RRM1-RRM2α (μπλε) και των ^{15}N -RRM1 (κόκκινο) και ^{15}N -RRM2α (μωβ), B. του πολυπεπτιδίου ^{15}N -LaM-RRM1-RRM2α (μπλε) και των ^{15}N -LaM-RRM1 (κόκκινο) και ^{15}N -RRM2α (μωβ), Γ του πολυπεπτιδίου ^{15}N -RRM2α-Cter (μπλε) και του ^{15}N -RRM2α (κόκκινο) και Δ. του πολυπεπτιδίου ^{15}N -RRM1-RRM2α-Cter (μπλε) και του ^{15}N -RRM1-RRM2α (κόκκινο).

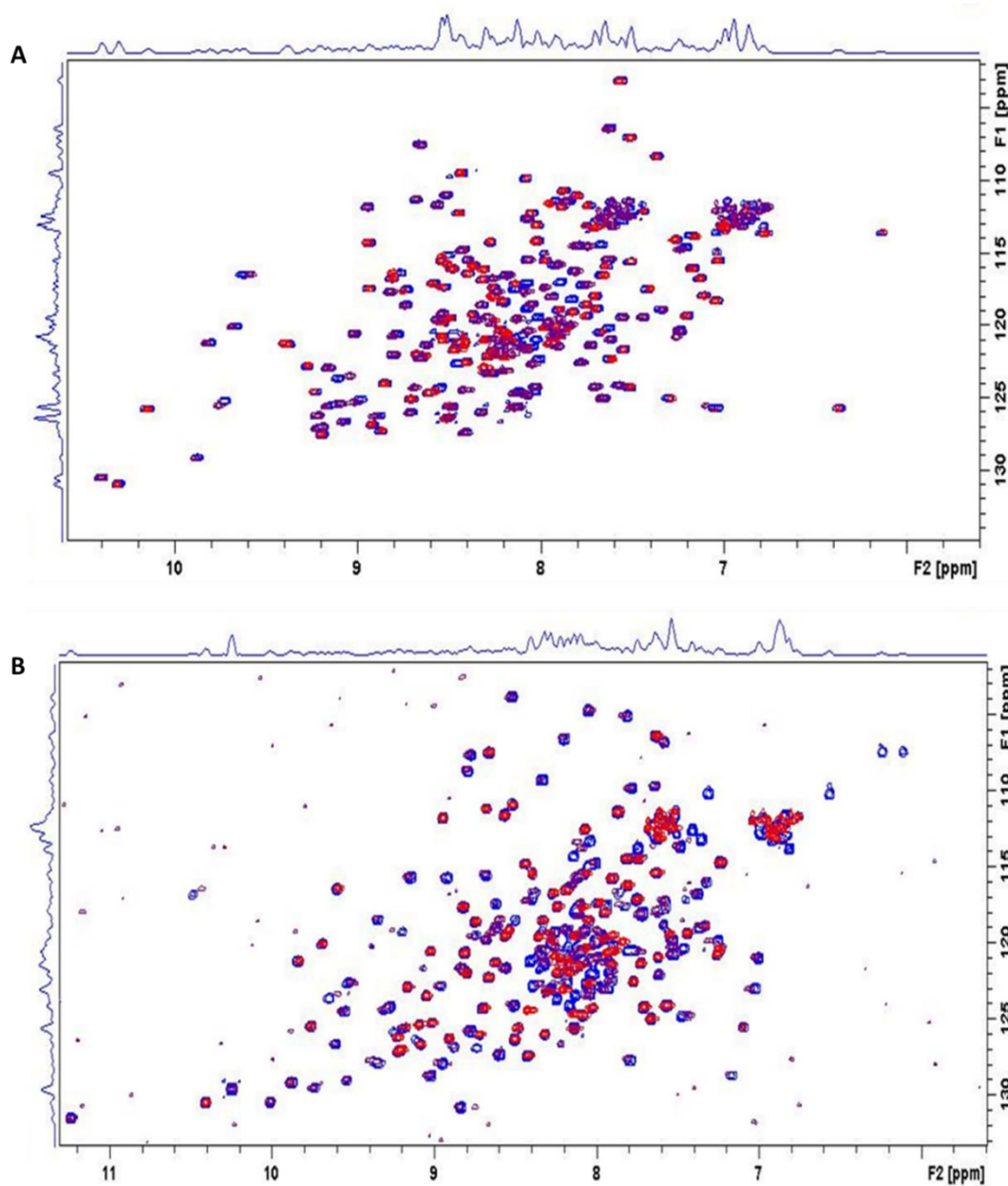
Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N HSQC του πολυπεπτιδίου RRM2α-Cter με το φάσμα ^1H - ^{15}N HSQC του RRM2α παρατηρείται ότι το πολυπεπτίδιο RRM2α-Cter περιλαμβάνει το RRM2α και μία περιοχή χωρίς στοιχεία δευτεροταγούς δομής στην C-τελική περιοχή (Εικόνα 134Γ). Το ίδιο συμβαίνει και με το πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α-Cter. Συγκεκριμένα, μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N HSQC του πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α-Cter με το αντίστοιχο φάσμα του RRM1-RRM2α, αποκαλύφθηκε ότι το πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α-Cter αποτελείται από την αυτόνομη περιοχή του RRM1-RRM2α και από μία περιοχή χωρίς δομικά στοιχεία στην C-τελική περιοχή (Εικόνα 134Δ).

ΣΤ.1.6. Αυτονομία των επιμέρους επικρατειών της ανθρώπινης πρωτεΐνης La

Από την NMR μελέτη του πολυπεπτιδίου *human* LaM-RRM1 σε συνδυασμό με την μελέτη με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ που πραγματοποιήθηκε στο παρελθόν από την ερευνητική ομάδα της M. Conte προέκυψε ότι στην ελεύθερη μορφή του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 οι δύο επικράτειες στο διάλυμα κινούνται ανεξάρτητα και καταβυθίζονται (17). Επιπλέον, ο συνδέτης μεταξύ τους δεν εμφανίζει στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Εξαιτίας της ανεξάρτητης κίνησης των δύο επικρατειών, έχει πραγματοποιηθεί μόνο ταυτοποίηση των πυρήνων του πεπτιδικού σκελετού, χωρίς να προχωρήσει η συγκεκριμένη ομάδα σε επίλυση της δομής με τη Φασματοσκοπία NMR (17). Ωστόσο, μετά από πρόσδεση του RNA, ο συνδέτης αποκτά τη δομή α -έλικας και οι δύο επικράτειες υιοθετούν μία σταθερή διαμόρφωση με συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά, χωρίς να εμπλέκονται τα δομικά στοιχεία των δύο επικρατειών μεταξύ τους. Παρόλα αυτά, όταν εξετάστηκε το ελεύθερο πολυπεπτίδιο *human* LaM-RRM1 ως προς τη σταθερότητα και τις ομοιότητες των φασμάτων ^1H - ^{15}N HSQC με τις επιμέρους επικράτειες, παρατηρήθηκαν αρκετές ομοιότητες στη συμπεριφορά του πολυπεπτιδίου με το αντίστοιχο πολυπεπτίδιο του *Dictyostelium discoideum*. Ειδικότερα, το πολυπεπτίδιο αυτό φαίνεται να διατηρεί τα δομικά στοιχεία των επιμέρους επικρατειών (Εικόνα 135Α), ενώ περαιτέρω NMR ανάλυσή του θα μπορούσε να αποκαλύψει εάν αυτές οι δύο επικράτειες κινούνται αυτόνομα ή εμφανίζουν NOE συσχετίσεις μεταξύ τους. Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το πολυπεπτίδιο αυτό θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω, καθώς μετά την υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N HSQC εντοπίζονται μικρές διαφορές στην ταύτιση των σημάτων NH του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 με τις επιμέρους επικράτειες (Εικόνα 135Α).

Όσον αφορά στο πολυπεπτίδιο *human* RRM1-RRM2α, μετά από υπέρθεση του φάσματος ^1H - ^{15}N HSQC του πολυπεπτιδίου αυτού με τα αντίστοιχα φάσματα των επιμέρους επικρατειών, παρατηρείται ότι τα φάσματα αυτά ταυτίζονται και συμπληρώνουν αυτό του ολόκληρου πολυπεπτιδίου. Ωστόσο, τα σήματα NH του συνδέτη μεταξύ των δύο επικρατειών δεν ταυτίζονται με κανένα φάσμα, καθώς ο συνδέτης δεν συμπεριλαμβάνεται σε κανένα εκφραζόμενο επιμέρους πολυπεπτίδιο. Ειδικότερα, παρατηρείται ότι οι επικράτειες RRM1 και RRM2α του πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α διατηρούν την αυτονομία τους και ως προς τα δομικά τους στοιχεία

και ως προς την κίνησή τους. Αυτό αντικατοπτρίζεται και στην έλλειψη σταθερότητας του δείγματος και στην τομή του πολυπεπτιδίου στις επιμέρους επικράτειες, φαινόμενο που συναντάται και στο αντίστοιχο πολυπεπτίδιο του *Dictyostelium discoideum*.



Εικόνα 135: Α. Υπέρθυση του φάσματος ^1H - ^{15}N HSQC του ^{15}N LaM-RRM1 (με μπλε χρώμα) και των φασμάτων ^1H - ^{15}N HSQC των LaM και RRM1 (με κόκκινο και μωβ χρώμα, αντίστοιχα) της human La. Β. Υπέρθυση του φάσματος ^1H - ^{15}N HSQC του ^{15}N RRM1-RRM2α (με μπλε χρώμα) και των φασμάτων ^1H - ^{15}N HSQC των RRM1 και RRM2α (με κόκκινο και μωβ χρώμα, αντίστοιχα) της human La.

ΣΤ.2. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης των επικρατειών της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

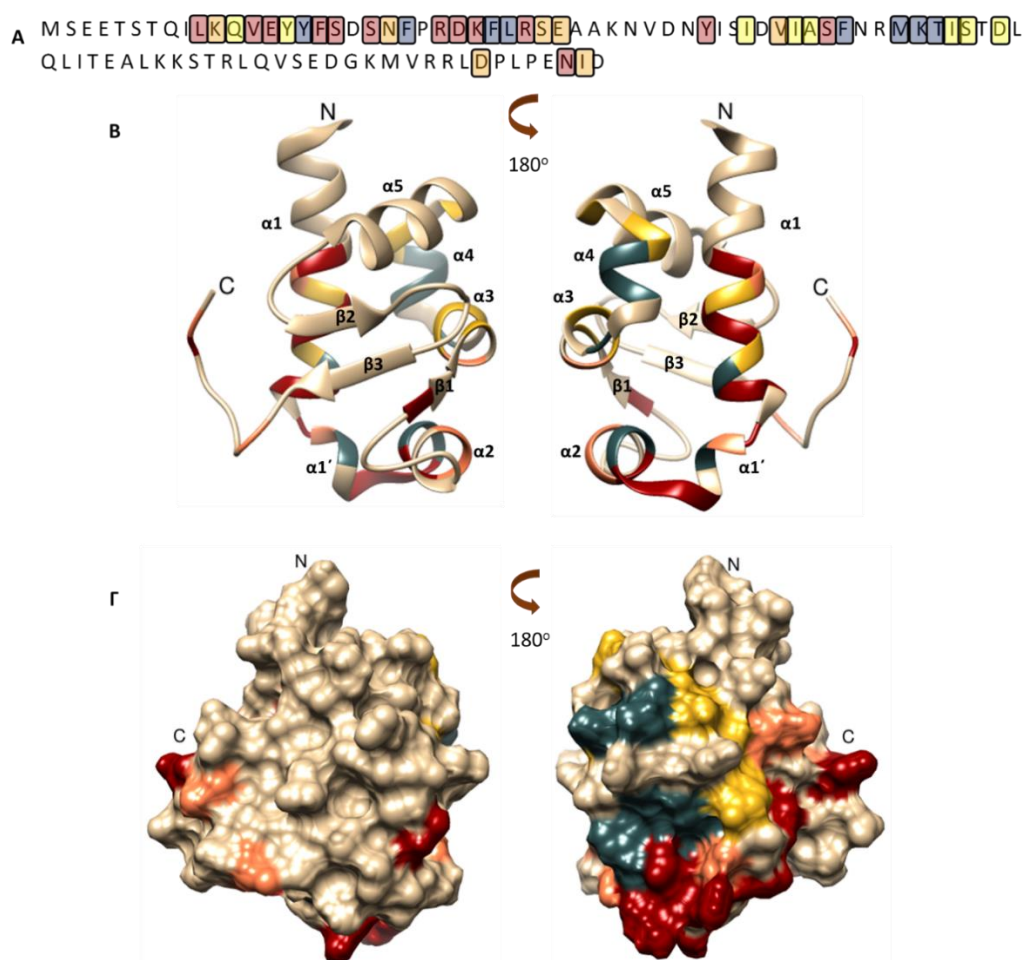
ΣΤ2.1. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dLaM της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του dLaM (La1-91) της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με RNA εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του dLaM πριν και μετά από την προσθήκη του polyU σε αναλογία dLaM προς polyU 1:1 παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων και εξαφάνιση κορυφών (Πίνακας 18). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το dLaM αλληλεπιδρά με το συνθετικό δεκαμερές ολιγονουκλεοτίδιο polyU απουσία του γειτονικού dRRM. Τα αποτελέσματά μας αυτά έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενα πειραματικά δημοσιευμένα αποτελέσματα (16, 18, 19, 24). Τα αμινοξικά κατάλοιπα ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις οργάνωθηκαν σε τρεις κατηγορίες, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 18). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,031 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,045$, στη δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,045 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,060$ και στην τρίτη ανήκουν αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,060 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$. Στον πίνακα αυτόν περιλαμβάνεται και μία επιπλέον κατηγορία με τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων τα σήματα NH εξαφανίζονται από το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία dLaM προς polyU 1:1.

Πίνακας 18: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του dLaM ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1.

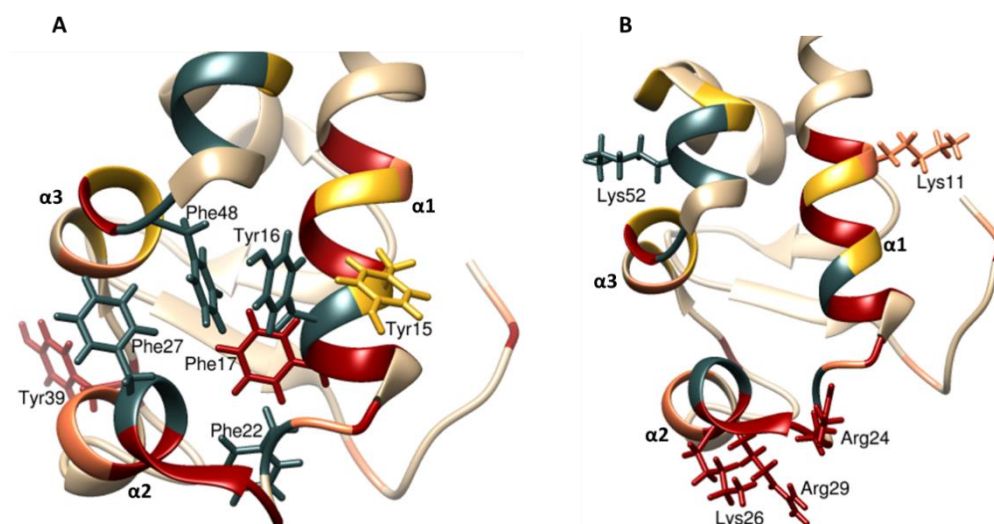
$0,031 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,045$	$0,045 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,060$	$0,060 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$	Εξαφάνιση των NH
Gln12, Tyr15, Ile42, Ile45, Ala46, Ile54, Ser55, Asp57	Lys11, Asn21, Ser30, Glu31, Val44, Asp84, Ile90	Leu10, Val13, Glu14, Phe17, Ser18, Ser20, Arg24, Asp25, Lys26, Arg29, Tyr39, Ser47, Asn89	Tyr16, Phe22, Phe27, Leu28, Phe48, Met51, Lys52, Thr53

Η χαρτογράφηση των περιοχών του dLaM που αλληλεπιδρούν με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU έδειξε ότι οι περιοχές με τις μεγαλύτερες τιμές CSP (Chemical Shift Perturbation, μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις) εντοπίζονται στις $\alpha 1$, $\alpha 1'$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, και $\alpha 4$ -έλικες και σε τμήμα του $\beta 1$ -κλώνου (Εικόνα 136). Οι περιοχές αυτές φαίνεται να σχηματίζουν μία κοιλότητα δέσμευσης στο dLaM για το polyU. Τα αμινοξικά κατάλοιπα του dLaM που αλληλεπιδρούν με το polyU, δηλαδή εμφανίζουν υψηλές τιμές CSP ή εξαφανίζονται οι κορυφές τους στο φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY, εντοπίζονται στην μία πλευρά του μορίου (Εικόνα 136Γ). Η αντίθετη πλευρά του μορίου δε φαίνεται να επηρεάζεται από την παρουσία του polyU και κατά συνέπεια να αλληλεπιδρά με αυτό. Επομένως, το polyU αλληλεπιδρά ειδικά με την μία πλευρά του μορίου, υποδεικνύοντας την επιφάνεια αλληλεπίδρασης του polyU στο dLaM.



Εικόνα 136: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dLaM με το UUUUUUUUUU-3'-OH . Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων στη δομή του dLaM καθώς και Γ. στην επιφάνεια του dLaM. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,031 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,045$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,045 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,060$ και με κόκκινο οι $0,060 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$.

Στην αλληλεπίδραση του dLaM με το polyU σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα αρωματικά και ορισμένα βασικά αμινοξέα. Όλα τα αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του dLaM με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο. Συγκεκριμένα, τα Phe17 ($\alpha 1$ -έλικα) και Tyr39 ($\beta 1$ -κλώνος) εμφανίζουν αρκετά υψηλές τιμές CSP (3^η κατηγορία), ενώ ακολουθούν η Tyr15 ($\alpha 1$ -έλικα, 1^η κατηγορία). Επιπλέον, τα σήματα NH των αμινοξέων Tyr16 ($\alpha 1$ -έλικα), Phe22 ($\alpha 1'$ -έλικα), Phe27 ($\alpha 2$ -έλικα) και Phe48 ($\alpha 3$ -έλικα) εξαφανίζονται μετά την προσθήκη του polyU στο dLaM με αναλογία dLaM προς polyU 1:1. Μαζί με τα αρωματικά αμινοξέα σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή δέσμευσης του dLaM για το polyU. Πιο συγκεκριμένα, τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα με τις υψηλότερες τιμές CSP είναι τα Arg24 ($\alpha 1'$ -έλικα, 3^η κατηγορία), Lys26 και Arg29 ($\alpha 2$ -έλικα, 3^η κατηγορία), ενώ τιμή CSP υψηλότερη της τυπικής απόκλισης (standard deviation) παρουσιάζει η Lys11 ($\alpha 1$ -έλικα). Ταυτόχρονα, το σήμα NH της Lys52 ($\alpha 4$ -έλικα) του φάσματος ^1H - ^{15}N 2D TROSY εξαφανίζεται μετά την προσθήκη του polyU. Παρόλα αυτά τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα που εντοπίζονται στην αντίθετη πλευρά του dLaM δε συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το polyU. Επιπλέον, αρκετά από τα συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών LARP, και συγκεκριμένα τα Gln12 ($\alpha 1$ -έλικα, 1^η κατηγορία), Asp25 ($\alpha 1'$ -έλικα, 3^η κατηγορία) και Lys26 ($\alpha 2$ -έλικα, 3^η κατηγορία), μαζί με τα αρωματικά (Tyr15, Tyr16, Phe48), συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή.



Εικόνα 137: NMR δομή του LaM του *Dictyostelium discoideum*, όπου απεικονίζονται Α. τα αρωματικά αμινοξέα και Β. τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα (Lys και Arg) που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το polyU.

Τα αμινοξέα που αναφέρθηκαν παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης, γεγονός που αποδεικνύει ότι είτε έρχονται σε άμεση επαφή με το polyU, είτε επηρεάζονται από αλλαγές στη διαμόρφωση του μορίου που επάγονται από τη δέσμευση του polyU σε άλλες περιοχές. Ακόμη, τα σήματα συντονισμού NH ορισμένων αμινοξικών καταλοίπων εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία dLaM προς polyU 1:1. Αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό ενδιάμεσης χημικής ανταλλαγής μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του συμπλόκου, ενώ η σταθερά αποδέσμευσης K_d κυμαίνεται μεταξύ 10^{-6} - 10^{-9}M .

ΣΤ.2.2. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dRRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dRRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με RNA εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του dRRM1 πριν και μετά από την προσθήκη του polyU σε αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1 παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων και εξαφάνιση κορυφών (Πίνακας 19), εξαιτίας της πιθανής διεύρυνσης των σημάτων. Επομένως, το πολυπεπτίδιο dLaM αλληλεπιδρά με το συνθετικό δεκαμερές ολιγονουκλεοτίδιο polyU απουσία του γειτονικού dRRM, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενα πειραματικά δημοσιευμένα αποτελέσματα (16, 18, 19, 24). Τα αμινοξικά κατάλοιπα ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις οργανώθηκαν σε τρεις κατηγορίες, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 19). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,011 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,020$, στη δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,020 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,025$ και στην τρίτη ανήκουν αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,025 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$. Στον πίνακα αυτόν περιλαμβάνεται και μία επιπλέον κατηγορία με τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων τα σήματα NH εξαφανίζονται από το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία dRRM1 προς polyU 1:1.

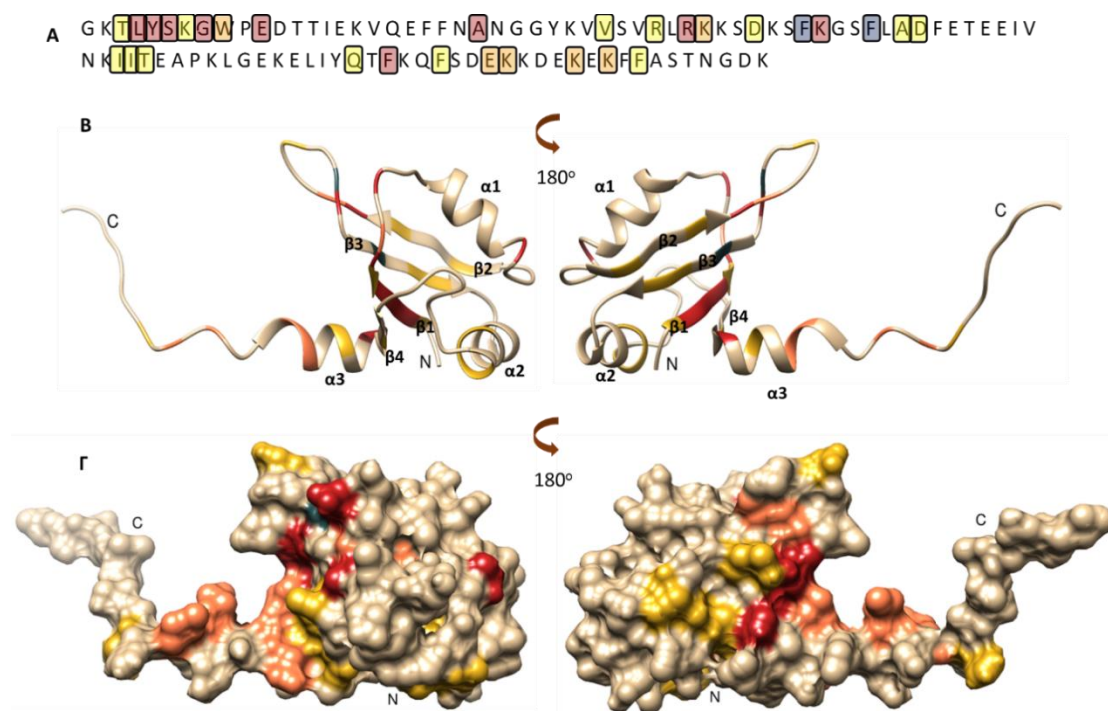
Πίνακας 19: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του dRRM1 ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1.

$0,011 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,020$	$0,020 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,025$	$0,025 \leq \Delta CS_{N-H}$	Εξαφάνιση των NH
Thr95, Lys99, Val123, Arg126, Asp132, Ala141, Asp142, Ile152, Ile153, Thr154, Gln167, Phe172, Phe184	Trp101, Lys129, Glu175, Lys176, Lys180, Lys182	Leu96, Tyr97, Ser98, Gly100, Glu103, Ala116, Arg128, Lys136, Phe169	Phe135, Phe139

Χαρτογραφώντας τις περιοχές που αλληλεπιδρούν με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU, δηλαδή τις περιοχές που εμφανίζουν τιμές CSP υψηλότερες από την τυπική απόκλιση, παρατηρείται ότι εντοπίζονται στην περιοχή που αποτελείται από θετικά φορτισμένα αμινοξέα και από τους β -κλώνους. Οι τιμές με τις υψηλότερες τιμές CSP εντοπίζονται στον $\beta 1$ -κλώνο και στις $\beta 1\alpha 2$ και $\beta 2\beta 3$ θηλίες, ενώ τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής εντοπίζονται σε αμινοξικά κατάλοιπα των $\beta 2$, $\beta 3$ -κλώνων, καθώς και στο τμήμα των $\alpha 2$ και $\alpha 3$ -ελίκων και του $\beta 4$ -κλώνου. Μεγάλο μέρος του dRRM1 εμφανίζεται να συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με το polyU, ωστόσο, η περιοχή αυτή εντοπίζεται σε μία πλευρά του μορίου (Εικόνα 138). Επομένως, η πρόσδεση του polyU στο dRRM1 είναι ειδική. Η μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις ενδεχομένως να οφείλεται σε απευθείας αλληλεπίδραση του polyU με το συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο ή στο γεγονός ότι αμινοξικά κατάλοιπα υφίστανται αλλαγές στη διαμόρφωση που επάγονται από τη δέσμευση του polyU σε άλλα αμινοξέα. Επίσης, η υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY πριν την πρώτη και κατά τις διαδοχικές προσθήκες του polyU αποκάλυψε ότι η χημική ανταλλαγή μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του συμπλόκου είναι γρήγορη έως ενδιάμεση (fast-intermediate exchange). Αυτό συνεπάγεται ασθενή δέσμευση του polyU στο dRRM1, ενώ η εκτιμώμενη σταθερά αποδέσμευσης K_d κυμαίνεται μεταξύ 10^{-5} - $10^{-8}M$.

Τα συντηρημένα μοτίβα δέσμευσης του RNA στο dRRM1, RNP1 και RNP2 εντοπίζονται στις περιοχές 136-KGSFLADF-143 και 96-LYSKGW-101 αντίστοιχα. Οι περιοχές αυτές συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή, καθώς σχεδόν όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα εμφανίζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης. Ειδικότερα, όσον αφορά στο RNP1 ($\beta 3$ -κλώνος), η Lys136 ($\beta 3$ -κλώνος, 3^η κατηγορία), το Asp142 ($\beta 3$ -κλώνος, 1^η κατηγορία) και η Ala141 ($\beta 3$ -κλώνος, 1^η κατηγορία)

εμφανίζουν υψηλές τιμές CSP. Οι κορυφές NH των αμινοξέων Phe135 και Phe139 στα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY εξαφανίζονται ενώ δεν υπάρχουν πληροφορίες για τα Gly137 και Phe140. Τα αμινοξικά κατάλοιπα του RNP2 ($\beta 1$ -κλώνος) συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση και ειδικότερα τα Leu96, Tyr97, Ser98, Gly100 (3^η κατηγορία), Lys99 (1^η κατηγορία) και Trp101.



Εικόνα 138: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dRMM1 με το UUUUUUUUU-3'-OH . Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων στη δομή του dRMM1 καθώς και Γ. στην επιφάνεια του dRMM1. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,011 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,020$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,020 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,025$ και με κόκκινο οι $0,025 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$.

Σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με το polyU διαδραματίζουν τα αρωματικά αμινοξέα των β -κλώνων και των $\beta 1\alpha 2$ και $\beta 2\beta 3$ θηλιών και η περιοχή με τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Η Tyr97 ($\beta 1$ κλώνος, 3^η κατηγορία) εμφανίζει υψηλή τιμή CSP ακολουθούμενη από τα Trp101 ($\beta 1\alpha 2$ θηλιά, 2^η κατηγορία) και Phe172 ($\alpha 3$ -έλικα, 1^η κατηγορία), ενώ τα σήματα NH των των Phe135 ($\beta 2\beta 3$ θηλιά) και Phe139 ($\beta 3$ -κλώνος) εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία dRRM1 προς polyU 1:1. Επιπλέον, η περιοχή με τα περισσότερα θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα (αριθμητικά σε σύγκριση με τα

αρνητικά φορτισμένα) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση του polyU, καθώς από τα 11 θετικά φορτισμένα αμινοξέα (Arg, Lys) της περιοχής τα 8 συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή. Τα υπόλοιπα θετικά φορτισμένα αμινοξέα δε συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το polyU.

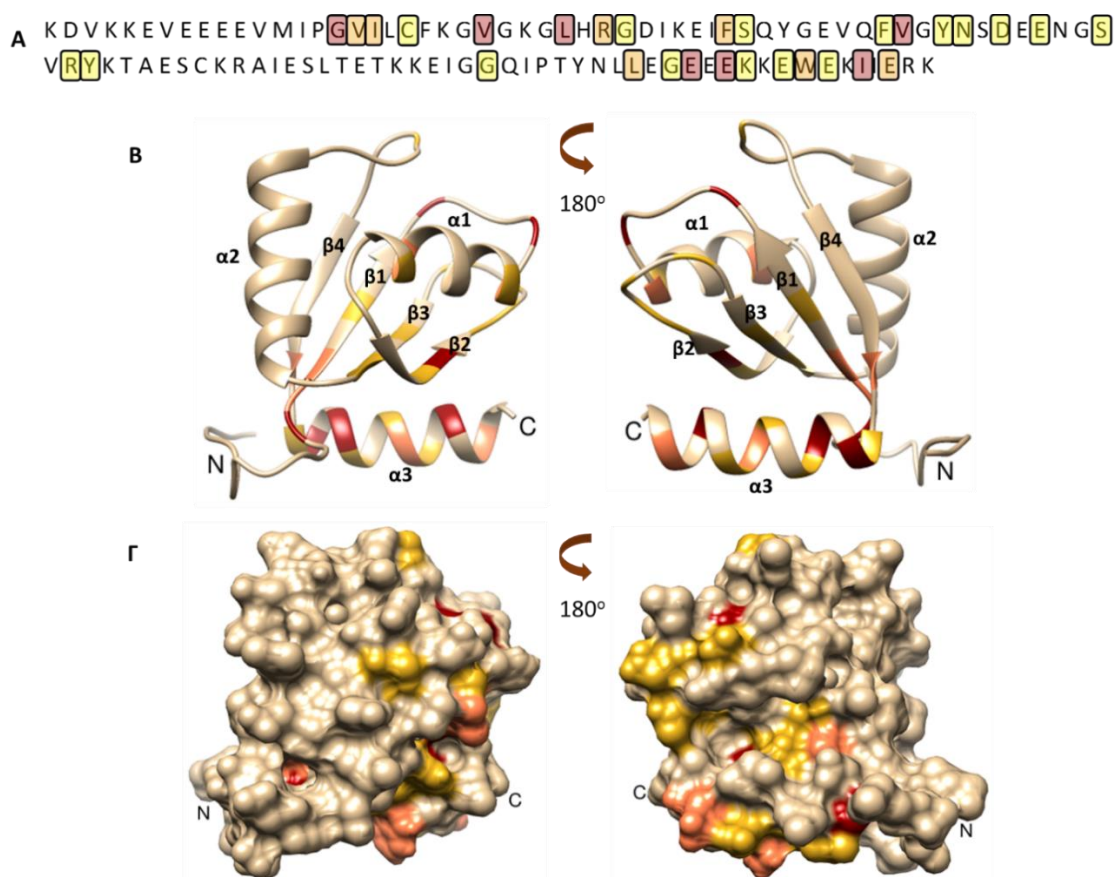
ΣΤ.2.3. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dRRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του dRRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με RNA εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του dRRM2α και μετά από την προσθήκη του polyU σε αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1 με το φάσμα αναφοράς παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων (Πίνακας 20). Επομένως, το πολυπεπτίδιο dRRM2α αλληλεπιδρά με το συνθετικό δεκαμερές ολιγονουκλεοτίδιο polyU, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα (18). Τα αμινοξικά κατάλοιπα ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις οργανώθηκαν σε τρεις κατηγορίες, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 20). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,008 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,015$, στη δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,015 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,020$ και στην τρίτη ανήκουν αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,020 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$.

Πίνακας 20: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του dRRM2α ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1.

$0,008 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,015$	$0,015 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,020$	$0,020 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$	Εξαφάνιση των NH
Cys233, Gly244, Ser251, Phe258, Tyr261, Tyr262, Asp264, Glu266, Ser269, Arg271, Tyr272, Gly294, Gly304, Lys308, Glu310, Glu312	Val230, Ile231, Arg243, Phe250, Leu302, Trp311, Glu316	Gly229, Val237, Leu241, Val259, Glu305, Glu307, Ile314	

Οι περιοχές του dRRM2α που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το polyU, δηλαδή οι περιοχές με τις μεγαλύτερες τιμές εντοπίζονται κυρίως στο $\beta 2$ -κλώνο και στην $\alpha 3$ -έλικα, καθώς επίσης, και στους $\beta 1$ και $\beta 3$ -κλώνους (Εικόνα 139). Η περιοχή αυτή είναι εντοπισμένη στην μία πλευρά του μορίου (Εικόνα 139Γ). Επομένως η πρόσδεση του polyU στο dRRM2α είναι ειδική. Παράλληλα, μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY πριν την πρώτη προσθήκη και μετά τις σταδιακές προσθήκες του polyU προέκυψε ότι η χημική μεταβολή μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του συμπλόκου είναι γρήγορη (fast exchange). Επομένως, η δέσμευση του polyU στο dRRM2α είναι ασθενής, ενώ η εκτιμώμενη τιμή της σταθεράς αποδέσμευσης K_d κυμαίνεται μεταξύ 10^{-3} - 10^{-6}M .



Εικόνα 139: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dRRM2α με το UUUUUUUUUU-3' -OH .

A. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. B. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων στη δομή του dRRM2α καθώς και Γ. στην επιφάνεια του dRRM2α. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,008 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,015$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,015 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,020$ και με κόκκινο οι $0,020 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Τα συντηρημένα μοτίβα δέσμησης RNA, RNP1 (268-GSVRYKTA-275) και RNP2 (232-LCFKGV-237) συμμετέχουν εν μέρει στην αλληλεπίδραση του dRRM2α με το polyU. Συγκεκριμένα, τα αμινοξικά κατάλοιπα Ser269, Arg271, Tyr272 (β 3-κλώνος, 1^η κατηγορία) του RNP1 και της Cys233 (β 1-κλώνος, 1^η κατηγορία) και Val237 (β 1α1 θηλιά, 3^η κατηγορία) του RNP2 εμφανίζουν τιμές CSP μεγαλύτερες της τυπικής απόκλισης. Τα αρωματικά αμινοξέα, γενικά, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις των μοτίβων RRM με το RNA. Μόνο τα μισά αρωματικά αμινοξέα του μορίου συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του dRRM2α με το polyU και αυτά εντοπίζονται στους β 2, β 3-κλώνους, στην α 3-έλικα και στην β 2 β 3 θηλιά. Ειδικότερα, τα αρωματικά αμινοξέα Phe258 (β 2-κλώνος, 1^η κατηγορία), Tyr272 (β 3-κλώνος, 1^η κατηγορία), Tyr261 (β 2 β 3 θηλιά, 1^η κατηγορία), Phe250 (α 1-έλικα, 2^η κατηγορία) και Trp311 (α 3-έλικα, 2^η κατηγορία) συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή.

ΣΤ.2.4. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dLaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του dLaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με RNA εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του dLaM-RRM1 πριν από την πρώτη προσθήκη και μετά από την προσθήκη του polyU σε αναλογία dLaM προς polyU 1:1 παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων, ενώ αρκετές NH κορυφές αμινοξέων εξαφανίζονται (Πίνακας 21). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το dLaM-RRM1 αλληλεπιδρά με το συνθετικό δεκαμερές ολιγονουκλεοτίδιο polyU. Μάλιστα τα αμινοξέα που φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν στη δική μας περίπτωση είναι περισσότερα σε σύγκριση με αντίστοιχα αποτελέσματα πειραμάτων που έχουν δημοσιευτεί από την επιστημονική ομάδα της M. Conte για το hLaM-RRM1 (18). Παράλληλα, συσχετίζονται με την κρυσταλλική δομή του ίδιου πολυπεπτιδίου παρουσία RNA, η οποία επιλύθηκε από την ίδια ερευνητική ομάδα (24). Τα αμινοξικά κατάλοιπα ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις οργανώθηκαν σε τρεις κατηγορίες και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

(Πίνακας 21). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,020 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,030$, στη δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,030 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,045$ και στην τρίτη ανήκουν αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,045 \leq \Delta CS_{N-H}$. Στον πίνακα αυτόν περιλαμβάνεται και μία επιπλέον κατηγορία με τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων τα σήματα NH εξαφανίζονται από το φάσμα $^1H-^{15}N$ 2D TROSY μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία dLaM προς polyU 1:1.

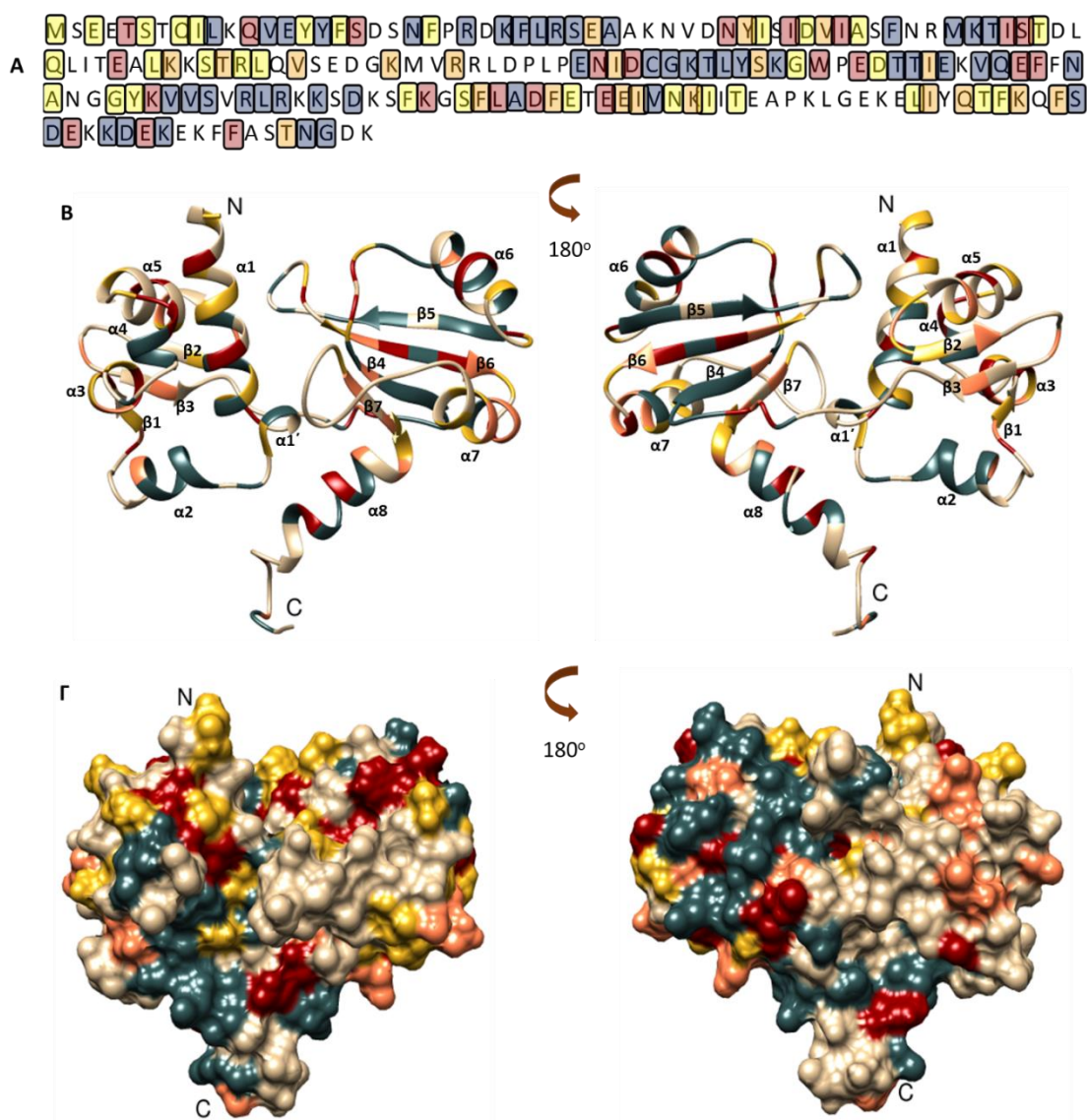
Πίνακας 21: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του dLaM-RRM1 ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1.

$0,020 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,030$	$0,030 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,045$	$0,045 \leq \Delta CS_{N-H}$	Εξαφάνιση των NH
Met1, Glu3, Ser6, Gln8, Ile9, Tyr15, Phe17, Phe22, Ile40, Asp43, Ala46, Thr56, Gln59, Leu65, Ser68, Arg70, Leu71, Gly100, Asp104, Ala116, Gly119, Tyr120, Phe135, Ser138, Glu144, Asn150, Ile152, Thr154, Leu164, Thr168, Phe169	Glu31, Tyr39, Val44, Lys66, Thr69, Val73, Lys78, Arg81, Ile90, Ser98, Ile107, Phe139, Phe143, Glu147, Ile148, Lys151, Ile165, Gln167, Lys170, Phe172, Thr187	Thr5, Gln12, Ser18, Asn38, Ile42, Ile45, Ile54, Ser55, Glu63, Asn89, Asp91, Trp101, Glu103, Glu112, Phe113, Lys121, Lys136, Leu140, Asp142, Glu146, Glu175, Glu179, Phe184	Leu10, Val13, Glu14, Tyr16, Asn21, Arg24, Lys26, Phe27, Leu28, Arg29, Ser30, Ala32, Phe48, Met51, Lys52, Thr53, Glu88, Cys92, Gly93, Lys94, Thr95, Leu96, Tyr97, Lys99, Thr105, Thr106, Glu108, Val110, Gln111, Asn115, Val122, Val123, Ser124, Arg126, Leu127, Arg128, Lys130, Asp132, Ala141, Val149, Ser173, Asp174, Lys177, Asp178, Lys180, Asn188, Gly189

Η χαρτογράφηση των περιοχών του dLaM-RRM1 που αλληλεπιδρούν με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU έδειξε ότι σχεδόν όλα τα δομικά στοιχεία του μορίου συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή. Αρκετές αλλαγές εντοπίζονται στην μία πλευρά του dLaM και στην αντίθετη του dRRM1 παρουσία του polyU (Εικόνα 140). Ενδεχομένως, αυτό να οφείλεται σε μεγάλες αλλαγές στη δομή του dLaM-RRM1 παρουσία του polyU. Οι περιοχές αλληλεπίδρασης του dLaM είναι ίδιες με τις αντίστοιχες στο dLaM απουσία του γειτονικού RRM1. Η περιοχή αλληλεπίδρασης του dLaM στο dLaM-RRM1 αποτελείται από τις α -έλικες, δηλαδή τις $\alpha 1$, $\alpha 1'$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ και $\alpha 4$ (Εικόνα 140). Στην αντίθετη πλευρά του μορίου παρουσιάζονται ασθενείς αλληλεπιδράσεις που ενδέχεται να οφείλονται σε μη-ειδική πρόσδεση του polyU. Περισσότερες αλλαγές υφίσταται η επικράτεια dRRM1 παρουσία του γειτονικού dLaM σε σύγκριση με την αλληλεπίδραση της ίδιας επικράτειας χωρίς το γειτονικό

dLaM. Οι κύριες περιοχές του dRRM1 που αλληλεπιδρούν με το polyU, παρουσία του γειτονικού dLaM, είναι οι $\beta 4$, $\beta 5$ και $\beta 6$ -κλώνοι μαζί με τις $\alpha 6$ και $\alpha 8$ -έλικες και τις $\beta 4\alpha 6$ και $\beta 5\beta 6$ θηλιές, αλλά και ο συνδέτης μεταξύ του dLaM και του dRRM1.

Τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση μαζί με αυτά που στα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY εξαφανίζονται οι κορυφές των NH είναι αρκετά (Πίνακας 21). Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται είτε σε μη-ειδική πρόσδεση του polyU στο dLaM-RRM1 είτε σε αλλαγές στη διαμόρφωση του μορίου παρουσία του polyU. Η κρυσταλλική δομή του hLaM-RRM1 παρουσία του AUAUUUU (PDB ID: 2VOD) δείχνει ότι το hRRM1 παρουσία του RNA έχει διαφορετικό προσανατολισμό και φαίνεται να στρέφεται σχεδόν 90° σε σύγκριση με την NMR δομή του ελεύθερου dLaM-RRM1 (Εικόνα 140). Πιθανώς οι αλλαγές στην επικράτεια αυτή να οφείλονται σε αυτή την κίνηση του RRM1. Στις κρυσταλλικές δομές με όλα τα RNA παρατηρείται ότι τα RNA προσδένονται κυρίως στο LaM και μάλιστα στην περιοχή αλληλεπίδρασης του LaM που εντοπίζονται και στα NMR πειράματα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία. Επομένως, οι αλλαγές που υφίσταται το dLaM ίσως να οφείλονται κυρίως στην απευθείας πρόσδεση του polyU σε αυτό, ενώ οι αλλαγές στο dRRM1 ίσως να οφείλονται όχι μόνο στην απευθείας πρόσδεση του polyU, αλλά και στις διαμορφωτικές αλλαγές της επικράτειας μετά την πρόσδεση του polyU. Επιπροσθέτως, μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY πριν την πρώτη προσθήκη του polyU με τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY που λήφθηκαν μετά από κάθε προσθήκη προέκυψε ότι η χημική ανταλλαγή μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του συμπλόκου είναι ενδιάμεση έως αργή (intermediate-slow exchange). Επομένως η δέσμευση του polyU στο dLaM-RRM1 είναι ισχυρή, ενώ η εκτιμώμενη τιμή της σταθεράς αποδέσμευσης K_d είναι μικρότερη από 10^{-9}M . Από αυτά προκύπτει ότι οι επιμέρους επικράτειες LaM και RRM1 δρουν συνεργατικά για να πετύχουν ισχυρότερη πρόσδεση του RNA σε σχέση με την πρόσδεση που επιτυγχάνει η κάθε επικράτεια μεμονωμένη με το ίδιο ολιγονουκλεοτίδιο.



Εικόνα 140: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1 με το UUUUUUUUUU-3'-OH. A. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. B. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων στη δομή του dLaM καθώς και στην επιφάνεια του Γ. dLaM Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,020 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,030$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,030 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,045$ και με κόκκινο οι $0,045 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Τα αρωματικά αμινοξέα και των δύο επικρατειών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του dLaM-RRM1 με το polyU. Συγκεκριμένα, στο dLaM τα Tyr15, Phe17 ($\alpha 1$ -έλικα, 1^η κατηγορία), Phe22 ($\alpha 1'$ -έλικα, 1^η κατηγορία) και Tyr39 ($\beta 1$ -κλώνος, 2^η κατηγορία) εμφανίζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης, ενώ τα σήματα NH των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY των αμινοξέων Tyr16 ($\alpha 1$ -έλικα), Phe27 ($\alpha 2$ -έλικα) και Phe48 ($\alpha 3\alpha 4$ θηλιά) εξαφανίζονται. Αντίστοιχα, στην

επικράτεια dRRM1 τα αρωματικά αμινοξέα Trp101 ($\beta 4\alpha 6$ θηλιά, 3^η κατηγορία), Phe13 ($\alpha 6$ -έλικα, 3^η κατηγορία), Tyr120 ($\alpha 6\beta 5$ θηλιά, 1^η κατηγορία), Phe135 ($\beta 5\beta 6$ θηλιά, 1^η κατηγορία), Phe139, Phe143 ($\beta 6$ -κλώνος, 2^η κατηγορία), Phe169 ($\alpha 8$ -έλικα, 1^η κατηγορία), Phe172 ($\alpha 8$ -έλικα, 2^η κατηγορία) και Phe184 ($\alpha 8$ -έλικα, 3^η κατηγορία) παρουσιάζουν υψηλές τιμές CSP ενώ η κορυφή NH της Tyr97 ($\beta 4$ -κλώνος) εξαφανίζεται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία dLaM-RRM1 προς polyU 1:1.

Επιπροσθέτως, τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα του dLaM-RRM1 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του dLaM-RRM1 με το polyU, καθώς τα περισσότερα υφίστανται μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις ή εξαφανίζονται. Ιδιαίτερως, η περιοχή με τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα του dRRM1 φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στην αλληλεπίδραση αυτή. Το ίδιο συμβαίνει με τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα της περιοχής αλληλεπίδρασης του polyU στο dLaM. Είναι πιθανόν το RNA που προσδένεται στο dLaM-RRM1 να κατευθύνεται στη διεπιφάνεια των επικρατειών LaM και RRM1 μέσω αυτών των περιοχών.

Όλα τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών LARP εκτός από το Asp25 (ακολουθείται η αρίθμηση της dLaM) συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα Gln12 ($\alpha 1$ -έλικα, 3^η κατηγορία) και Tyr15 ($\alpha 1$ -έλικα, 1^η κατηγορία) εμφανίζουν υψηλές τιμές CSP, ενώ τα σήματα NH των Tyr16 ($\alpha 1$ -έλικα), Lys26 ($\alpha 2$ -έλικα) και Phe48 ($\alpha 3\alpha 4$ θηλιά) εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία dLaM-RRM1 προς polyU 1:1. Ταυτόχρονα, στην αλληλεπίδραση αυτή σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και τα συντηρημένα μοτίβα δέσμησης του RNA, RNP1 (136-KGSFLADF-143) και RNP2 (96-LYSKGW-101) του dRRM1. Ειδικότερα, τα αμινοξέα του RNP1 Lys136, Leu140, Asp142 (3^η κατηγορία) εμφανίζουν υψηλές τιμές CSP, ακολουθούμενες από τις τιμές των Phe139, Phe143 (2^η κατηγορία) και τη Ser138 (1^η κατηγορία), ενώ η κορυφή NH της Ala141 εξαφανίζεται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY. Αντίστοιχα, τα αμινοξέα του RNP2 Trp101 (3^η κατηγορία) και Ser98 (2^η κατηγορία) εμφανίζουν τιμές CSP υψηλότερες από την τυπική απόκλιση, ενώ τα Leu96, Tyr97 και Lys99 εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY.

ΣΤ.3. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης των επικρατειών της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg}

ΣΤ.3.1. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dLaM της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg}

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του dLaM της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg} εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του dLaM πριν την πρώτη προσθήκη και μετά από την τελευταία προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dLaM προς pre-tRNA_{Arg}, παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων και εξαφάνιση κορυφών (Πίνακας 22). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το dLaM αλληλεπιδρά με το pre-tRNA_{Arg} απουσία του γειτονικού dRRM. Τα αποτελέσματά μας αυτά έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενα πειραματικά δημοσιευμένα αποτελέσματα (166,18,19,24), παρόλο που σε αυτή την περίπτωση η αλληλεπίδραση πραγματοποιήθηκε με ολόκληρο το πρόδρομο μόριο tRNA σε αντίθεση με τα πειράματα άλλων ερευνητικών ομάδων που χρησιμοποιήθηκαν συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο. Τα αμινοξικά κατάλοιπα ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις οργανώθηκαν σε τρεις κατηγορίες, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 22). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,006 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,008$, στη δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,008 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,013$ και στην τρίτη ανήκουν αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,013 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$. Στον πίνακα αυτόν περιλαμβάνεται και μία επιπλέον κατηγορία με τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων τα σήματα NH εξαφανίζονται από το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dLaM προς pre-tRNA_{Arg} 1:1,5.

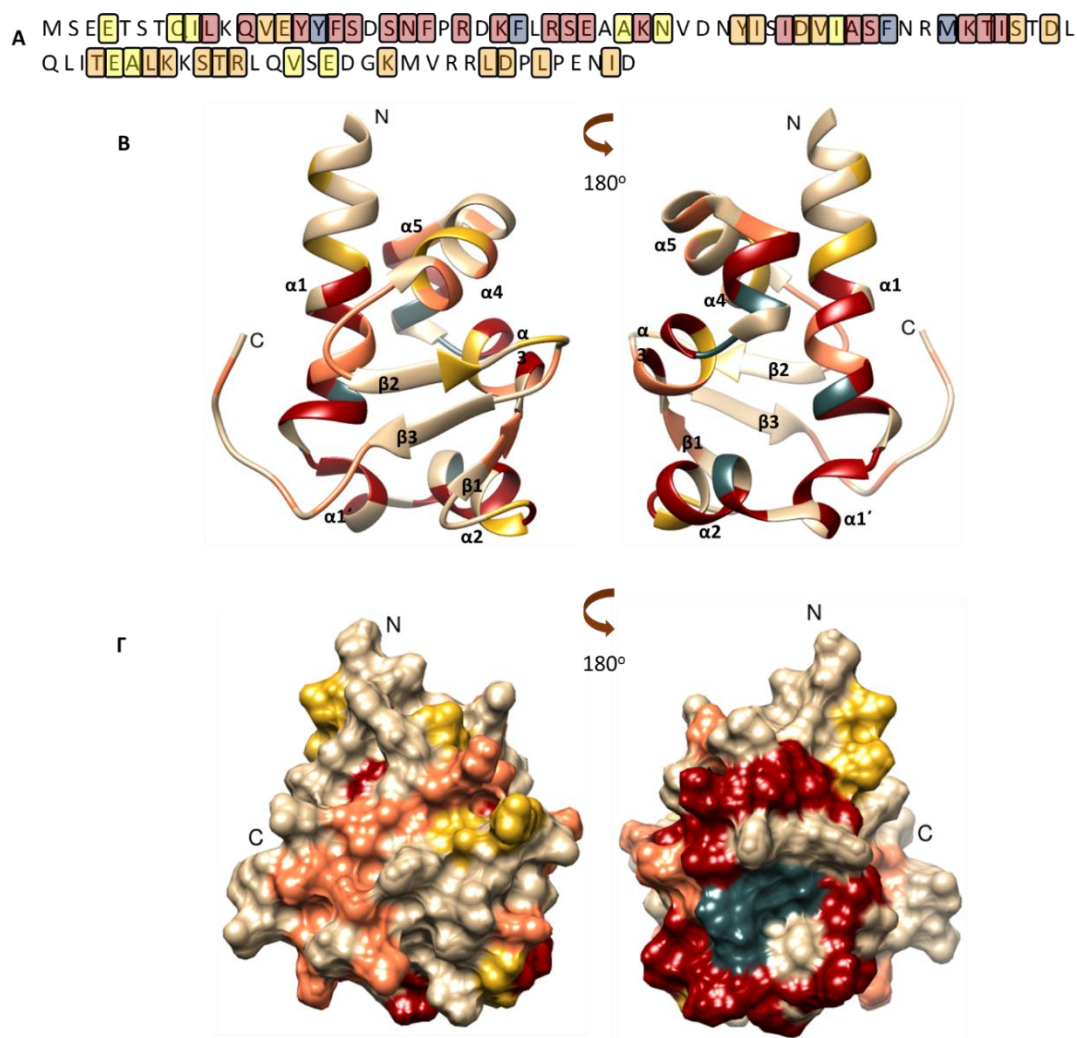
Πίνακας 22: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών κατάλοιπων του dLaM ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1,5.

$0,006 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,008$	$0,008 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,013$	$0,013 \leq \Delta CS_{N-H}$	Εξαφάνιση των NH
Glu4, Gln8, Ile9, Ala33, Asn35, Ile45, Glu63, Ala64, Val73, Glu75	Val13, Glu14, Tyr39, Ile40, Asp43, Val44, Ser55, Asp57, Thr62, Leu65, Lys66, Ser68, Thr69, Arg70, Lys78, Leu83, Asp84, Leu86, Ile90	Leu10, Gln12, Tyr15, Phe17, Ser18, Ser20, Asn21, Phe22, Arg24, Lys26, Arg29, Ser30, Glu31, Lys34, Ile42, Ala46, Ser47, Lys52, Thr53, Ile54	Tyr16, Phe27, Phe48, Met51

Η χαρτογράφηση των περιοχών του dLaM που αλληλεπιδρούν με το pre-tRNA_{Arg} στηρίχθηκε στη μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων, δηλαδή των τιμών CSP μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dLaM προς pre-tRNA_{Arg} 1:1,5. Οι περιοχές με τις μεγαλύτερες τιμές CSP εντοπίζονται στις $\alpha 1$, $\alpha 1'$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ $\alpha 4$ -έλικες και σε μέρος του $\beta 1$ -κλώνου. Επίσης, τιμές CSP μεγαλύτερες από την τυπική απόκλιση εντοπίζονται και στην $\alpha 5$ -έλικα, στον $\beta 3$ -κλώνο, στην $\beta 2\beta 3$ θηλιά και στο C-τελικό τμήμα του dLaM. Οι περιοχές του dLaM που αλληλεπιδρούν με το pre-tRNA_{Arg} φαίνεται ότι σχηματίζουν κοιλότητα δέσμευσης του pre-tRNA_{Arg} στο dLaM (Εικόνα 141).

Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές CSP ή εξαφανίζονται τα σήματα από το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY εντοπίζονται στη μία πλευρά του μορίου (Εικόνα 141Γ). Στην αντίθετη πλευρά του μορίου εμφανίζονται κάποια αμινοξικά κατάλοιπα να αλληλεπιδρούν ασθενώς με το pre-tRNA_{Arg}, δηλαδή να εμφανίζουν τιμές CSP υψηλότερη από την τυπική απόκλιση αλλά αρκετά χαμηλότερες σε σύγκριση με τις τιμές CSP της πλευρά του dLaM που αλληλεπιδρά ισχυρότερα με το pre-tRNA_{Arg}. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στο μέγεθος του μορίου RNA και σε μη-ειδική αλληλεπίδραση του dLaM με το pre-tRNA_{Arg} εκτός της περιοχής του UUU-3'-OH. Επομένως, το pre-tRNA_{Arg} φαίνεται να αλληλεπιδρά ειδικά με την μία πλευρά του μορίου, υποδεικνύοντας την επιφάνεια αλληλεπίδρασης του pre-tRNA_{Arg} στο dLaM. Όπως και στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο, έτσι και στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης με το pre-tRNA_{Arg}, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα αρωματικά αμινοξέα και ορισμένα θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Όλα τα αρωματικά αμινοξέα συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το pre-tRNA_{Arg}. Συγκεκριμένα, τα Tyr15, Phe17 ($\alpha 1$ -έλικα, 3^η κατηγορία) και Tyr39

($\beta 1$ -κλώνος, 2^η κατηγορία) εμφανίζουν υψηλές τιμές CSP, ενώ τα σήματα NH των αρωματικών αμινοξέων Tyr16 ($\alpha 1$ -έλικα), Phe27 ($\alpha 2$ -έλικα) και Phe48 ($\alpha 3$ -έλικα) εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά από την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dLaM προς pre-tRNA_{Arg} 1:1,5.



Εικόνα 141: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dLaM με το pre-tRNA_{Arg}. Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στη δομή του dLaM καθώς και Γ. στην επιφάνεια του dLaM. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,006 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,008$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,08 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,013$ και με κόκκινο οι $0,013 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Στην αλληλεπίδραση του dLaM με το pre-tRNA_{Arg} συμμετέχουν αρκετά από τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα του dLaM και συγκεκριμένα αυτά που εντοπίζονται στην περιοχή δέσμευσης του dLaM για το pre-tRNA_{Arg}. Ειδικότερα, τα θετικά φορτισμένα

αμινοξέα με αρκετά υψηλές τιμές CSP είναι τα Arg24 ($\alpha 1'$ -έλικα, 3^η κατηγορία), Lys26, Arg29, Lys34 ($\alpha 2$ -έλικα, 3^η κατηγορία) και Lys52 ($\alpha 4$ -έλικα, 3^η κατηγορία). Ωστόσο, τρία από τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα της αντίθετης πλευράς του μορίου εμφανίζουν τιμές CSP μεγαλύτερες της τυπικής απόκλισης. Αυτά είναι τα Lys66 ($\alpha 5$ -έλικα, 2^η κατηγορία), Arg70 ($\alpha 5\beta 2$ θηλιά, 2^η κατηγορία) και Lys78 ($\beta 2\beta 3$ θηλιά, 2^η κατηγορία), ενώ τα υπόλοιπα θετικά φορτισμένα αμινοξέα αυτής της πλευράς του μορίου δε συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του dLaM με το pre-tRNA_{Arg}. Μάλιστα αυτά τα τρία θετικά φορτισμένα αμινοξέα είναι αυτά που αλληλεπιδρούν κυρίως στην περιοχή αυτή και ίσως να οφείλεται στο θετικό τους φορτίο η αλληλεπίδραση του RNA με αυτά, δημιουργώντας μη-ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων αυτών. Επιπροσθέτως, τα περισσότερα από τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών LARP συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή. Συγκεκριμένα, τα Gln12 ($\alpha 1$ -έλικα, 3^η κατηγορία), Lys26 ($\alpha 2$ -έλικα, 3^η κατηγορία), Lys52 ($\alpha 4$ -έλικα, 3^η κατηγορία) μαζί με τα Tyr15, Tyr16 και Phe48 που έχουν ήδη αναφερθεί παρουσιάζουν υψηλές τιμές CSP.

Τα παραπάνω αμινοξέα παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης. Αυτό αποδεικνύει ότι είτε έρχονται σε άμεση επαφή με το pre-tRNA_{Arg}, είτε επηρεάζονται από αλλαγές στη διαμόρφωση του μορίου που επάγεται από τη δέσμευση του pre-tRNA_{Arg}. Υπάρχουν σήματα συντονισμού NH των αμινοξικών καταλοίπων, τα οποία εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dLaM προς pre-tRNA_{Arg} 1:1,5. Αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό ενδιάμεσης χημικής ανταλλαγής μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του συμπλόκου. Δηλαδή, η εκτιμώμενη της σταθεράς αποδέσμευσης K_d κυμαίνεται μεταξύ 10^{-6} - 10^{-9} M. Αυτό δε διαφέρει με την υπολογιζόμενη τιμή του K_d 56,7 $\pm$ 2,6nM, όπως υπολογίστηκε με την τεχνική του MST (Εικόνα 121).

ΣΤ.3.2. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dRRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το με το pre-tRNA_{Arg}

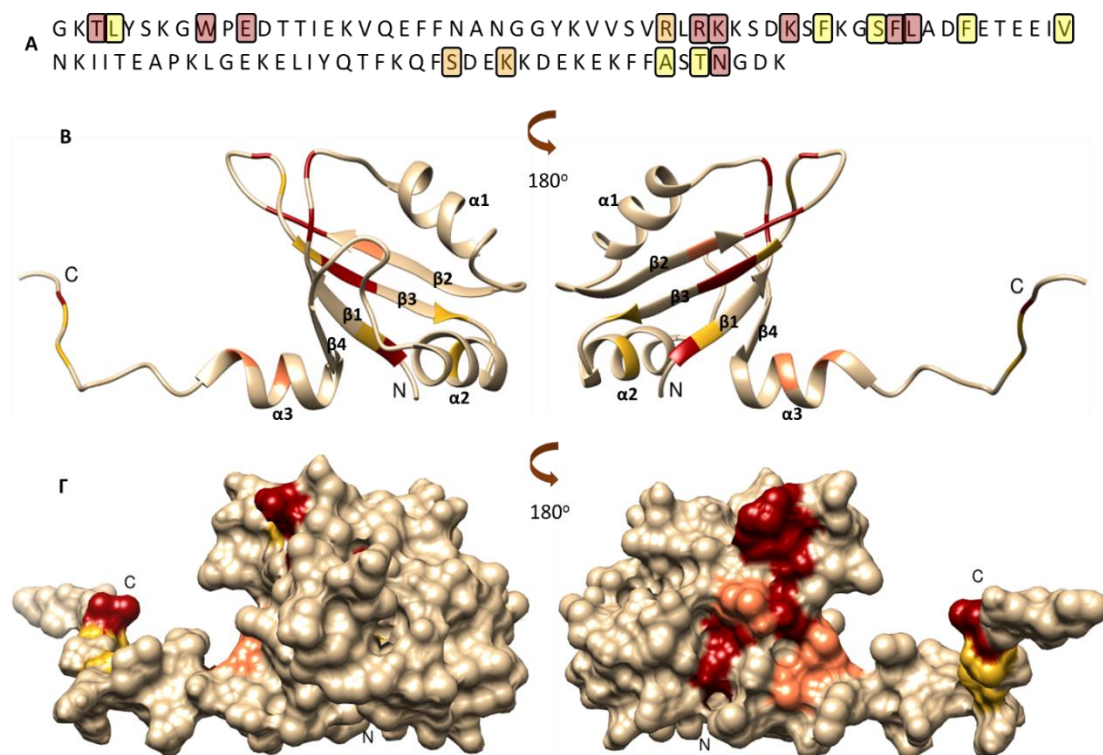
Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του dRRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg} εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του dRRM1 πριν και μετά από την

προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1, παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις ορισμένων αμινοξικών καταλοίπων (Πίνακας 23). Επομένως, το πολυπεπίδιο dRRM1 αλληλεπιδρά με το πρόδρομο μόριο tRNA (pre-tRNA_{Arg}) απουσία του γειτονικού dRRM, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενα δημοσιευμένα πειραματικά αποτελέσματα (16,18,19,24). Οι χημικές μετατοπίσεις των αμινοξικών καταλοίπων που μεταβλήθηκαν οργανώθηκαν σε τρεις κατηγορίες, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 23). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,0079 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,012$, στη δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,012 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,015$ και στην τρίτη ανήκουν αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,015 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Πίνακας 23: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του dRRM1 ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1.

$0,0079 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,012$	$0,012 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,015$	$0,015 \leq \Delta CS_{N-H}$	Εξαφάνιση των NH
Leu96, Phe135, Ser138, Phe143, Val149, Ala185, Thr187	Arg126, Ser173, Lys176	Thr95, Trp101, Glu103, Arg128, Lys129, Lys133, Phe139, Leu140, Asn188	

Οι περιοχές του dRRM1 που αλληλεπιδρούν περισσότερο με το pre-tRNA_{Arg} είναι κυρίως ο $\beta 3$ -κλώνος και οι $\beta 1\alpha 1$ και $\beta 2\beta 3$ θηλιές, ενώ στην αλληλεπίδραση συμμετέχουν και τμήματα των $\beta 1$ και $\beta 2$ -κλώνων και της $\alpha 3$ -έλικας (Εικόνα 142). Η αλληλεπίδραση του dRRM1 με το pre-tRNA_{Arg} εντοπίζεται σε συγκεκριμένη περιοχή του dRRM1 (Εικόνα 142Γ), καθιστώντας την ειδική. Από την υπέρθεση των φασμάτων αναφοράς ^1H - ^{15}N 2D TROSY με τα αντίστοιχα μετά από κάθε προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} στο dRRM1 προέκυψε ότι η χημική ανταλλαγή μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του συμπλόκου είναι γρήγορη (fast exchange). Επομένως, η δέσμευση του pre-tRNA_{Arg} στο dRRM1 είναι ασθενής, δηλαδή η εκτιμώμενη τιμή της σταθεράς αποδέσμευσης K_d κυμαίνεται μεταξύ του 10^{-3} - 10^{-6} M, τιμή που συγκλίνει με την πειραματική μέτρηση του K_d μέσω MST ($5,47 \pm 1,1$ nM, Εικόνα 121).



Εικόνα 142: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dRRM1 με το *pre*-tRNA_{Arg}. Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στη δομή του dRRM1 καθώς και Γ. στην επιφάνεια του dRRM1. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,0079 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,012$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,012 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,015$ και με κόκκινο οι $0,015 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Τα συντηρημένα μοτίβα δέσμευσης RNA, RNP1 (136-KGSFLADF-143, β 3-κλώνος) και RNP2 (96-LYSKGW-101, β 1-κλώνος) συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το *pre*-tRNA_{Arg}. Ωστόσο, λιγότερα αμινοξικά κατάλοιπα των μοτίβων αυτών συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το *pre*-tRNA_{Arg} σε σύγκριση με αυτά που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το polyU. Ειδικότερα, οι τιμές CSP είναι υψηλότερες της τυπικής απόκλισης στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser138 (1^η κατηγορία), Phe139 (3^η κατηγορία), Leu140 (3^η κατηγορία) και Phe143 (1^η κατηγορία) του RNP1 και στα Lys96 (1^η κατηγορία) και Trp101 (3^η κατηγορία) του RNP2. Επιπλέον, τα αρωματικά και τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και σε αυτήν την αλληλεπίδραση, παρόλο που ο συνολικός αριθμός των αμινοξικών καταλοίπων που ανήκουν στις κατηγορίες αυτές και συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση είναι μικρότερος συγκρινόμενος με τον αριθμό των αμινοξέων που αλληλεπιδρούν με το polyU. Συγκεκριμένα, τα αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανίζουν τιμές

CSP μεγαλύτερες της τυπικής απόκλισης εντοπίζονται στο $\beta 3$ -κλώνο και στις $\beta 1\alpha 1$ και $\beta 1\beta 2$ θηλίες και είναι τα αμινοξέα Phe135 ($\beta 3$ -κλώνος, 3^η κατηγορία), Phe143 ($\beta 3$ -κλώνος, 1^η κατηγορία), Trp101 ($\beta 1\alpha 1$ θηλιά, 3^η κατηγορία). Τέλος, τα θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν εντοπίζονται στη $\beta 1\beta 2$ θηλιά και στην $\alpha 3$ -έλικα και είναι τα Arg126 ($\beta 1\beta 2$ θηλιά, 2^η κατηγορία), Arg128, Lys129, Lys133 ($\beta 1\beta 2$ θηλιά, 2^η κατηγορία) και Lys176 ($\alpha 3$ -έλικα, 2^η κατηγορία).

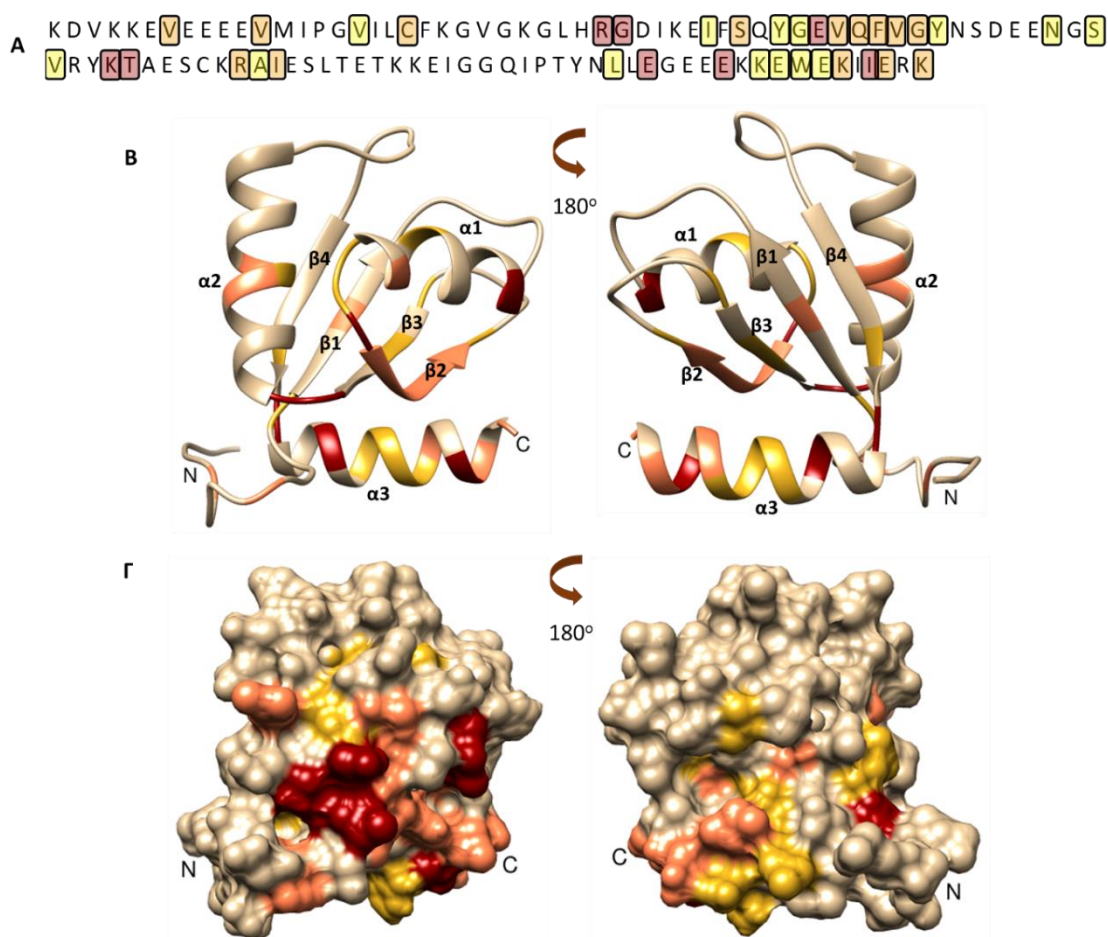
ΣΤ.3.3. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dRRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το με το pre-tRNA_{Arg}

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του dRRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg} εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ¹H-¹⁵N 2D TROSY του dRRM2α μετά από την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1 με το φάσμα αναφοράς, παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων (Πίνακας 24). Επομένως, το πολυπεπίδιο dRRM2α αλληλεπιδρά με το pre-tRNA_{Arg}. Οι χημικές μετατοπίσεις των αμινοξικών καταλοίπων που μεταβλήθηκαν οργανώθηκαν σε τρεις κατηγορίες, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 24). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,007 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,010$, στη δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,010 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,015$ και στην τρίτη ανήκουν αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,015 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Πίνακας 24: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του dRRM2α ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1.

$0,007 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,010$	$0,010 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,015$	$0,015 \leq \Delta CS_{N-H}$	Εξαφάνιση των NH
Val230, Ile249, Thr253, Gly254, Tyr261, Asn267, Ser269, Val270, Ala281, Leu301, Lys309, Glu310, Trp311, Glu312	Val220, Val225, Cys233, Ser251, Val256, Gln257, Phe258, Val259, Gly260, Arg280, Ile282, Lys313, Glu316, Lys318	Arg243, Gly244, Glu255, Lys273, Thr274, Glu303, Glu307 και Ile315	

Οι περιοχές του dRRM2α που αποτελούνται από τα αμινοξικά κατάλοιπα με τις υψηλότερες τιμές CSP εντοπίζονται κυρίως στον $\beta 2$ -κλώνο και στην $\alpha 3$ -έλικα, ενώ στην αλληλεπίδραση του dRRM2α με το pre-tRNA_{Arg} συμμετέχουν και οι $\beta 1$ και $\beta 3$ -κλώνοι και οι $\alpha 1$ και $\alpha 2$ -έλικες (Εικόνα 143). Τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολές στις χημικές τους μετατοπίσεις εντοπίζονται κυρίως σε μια περιοχή του μορίου, δηλαδή η δέσμευση του pre-tRNA_{Arg} στο dRRM2α είναι ειδική. Επίσης, μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY πριν την πρώτη και μετά από κάθε προσθήκη προέκυψε ότι η χημική ανταλλαγή μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του συμπλόκου είναι γρήγορη. Δηλαδή η δέσμευση του pre-tRNA_{Arg} στο dRRM2α είναι ασθενής και η εκτιμώμενη σταθερά αποδέσμευσης K_d κυμαίνεται μεταξύ 10^{-3} - 10^{-6}M .



Εικόνα 143: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dRRM2α με το pre-tRNA_{Arg}. Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στη δομή του dRRM2α καθώς και Γ. στην επιφάνεια του dRRM2α. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,007 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,010$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,010 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,015$ και με κόκκινο οι $0,015 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Τα συντηρημένα μοτίβα δέσμευσης του RNA, RNP1 (268-GSVRYKTA-275) και RNP2 (232-LCFKGV-237) συμβάλλουν στην παραπάνω αλληλεπίδραση. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα Ser269, Val270 ($\beta 3$ -κλώνος, 1^η κατηγορία), Lys273, Thr274 ($\beta 3a2$ θηλιά, 3^η κατηγορία) του RNP1 και η Cys233 του RNP2 παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης. Επιπροσθέτως, τέσσερα από τα αρωματικά αμινοξέα του dRRM2α υφίστανται μεταβολές στις χημικές τους μετατοπίσεις. Από αυτά μόνο η Phe258 (2^η κατηγορία) αυτή ανήκει σε κάποιον από τους β -κλώνους και συγκεκριμένα στο $\beta 2$. Στην αλληλεπίδραση αυτή συμβάλλουν και τα αρωματικά αμινοξέα Tyr253 ($\alpha 1\beta 2$ θηλιά, 1^η κατηγορία), Tyr261 ($\beta 2\beta 3$ θηλιά, 1^η κατηγορία) και η Trp111 ($\alpha 3$ -έλικα, 1^η κατηγορία).

ΣΤ.3.4. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dLaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg}

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1 της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg} εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του dLaM-RRM1 πριν την πρώτη προσθήκη και μετά από την τελευταία προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dLaM-RRM1 προς pre-tRNA_{Arg}, παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων και εξαφάνιση κορυφών (Πίνακας 25). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το dLaM-RRM1 αλληλεπιδρά με το pre-tRNA_{Arg}. Τα αποτελέσματά μας αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενα πειραματικά δημοσιευμένα αποτελέσματα με το αντίστοιχο πολυπεπίδιο άλλου οργανισμού αλλά με μικρότερο συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο (16, 18, 19, 24). Τα αμινοξέα που έχουν υποστεί μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις παρουσία του pre-tRNA_{Arg} οργανώθηκαν σε τρεις κατηγορίες, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 25). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,010 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,015$, στη δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,015 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,020$ και στην τρίτη ανήκουν αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,020 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$. Στον πίνακα αυτόν περιλαμβάνεται και μία επιπλέον κατηγορία με τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων τα σήματα NH εξαφανίζονται από το φάσμα ^1H - ^{15}N

2D TROSY μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dLaM-RRM1 προς pre-tRNA_{Arg} 1:1.

Πίνακας 25: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του dLaM-RRM1 ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1.

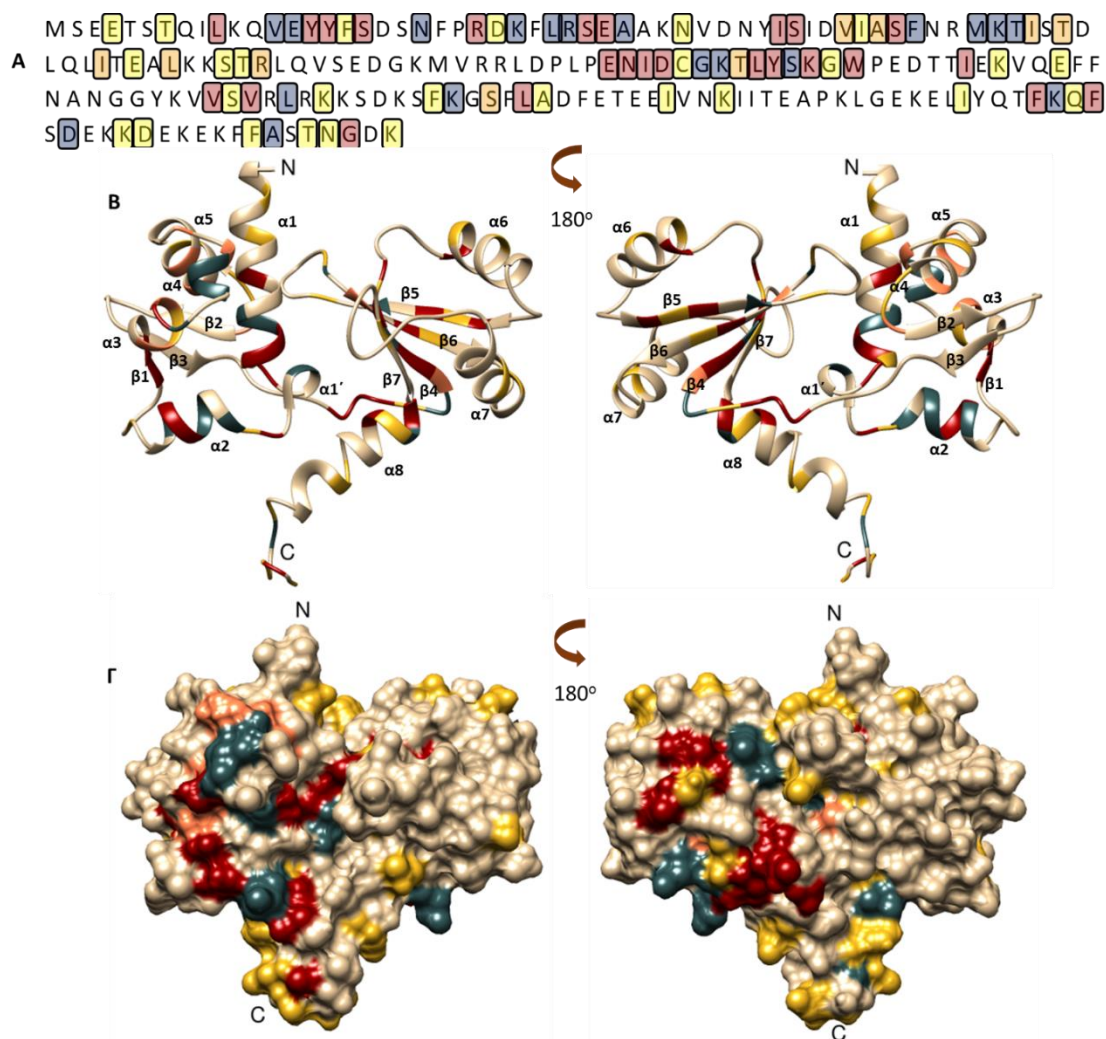
$0,010 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,015$	$0,015 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,020$	$0,020 \leq \Delta CS_{N-H}$	Εξαφάνιση των NH
Glu4, Thr7, Phe17, Asp25, Asn35, Ile45, Glu63, Ser68, Thr69, Cys92, Gly100, Lys109, Glu112, Ser124, Lys129, Phe135, Ala141, Ile148, Lys151, Ile165, Gln171, Lys177, Asp178, Phe184, Thr187, Asn188, Lys191	Val44, Ala46, Ile54, Thr56, Ile61, Leu65, Arg70, Thr95, Ser138	Leu10, Tyr15, Tyr16, Ser18, Arg24, Ser30, Glu31, Ile40, Ser41, Ser47, Glu88, Asn89, Ile90, Asp91, Leu96, Tyr97, Lys99, Trp101, Ile107, Val123, Val125, Leu140, Phe169, Phe172, Gly189	Val13, Glu14, Asn21, Lys26, Leu28, Arg29, Ala32, Phe48, Met51, Lys52, Thr53, Gly93, Lys94, Ser98, Leu127, Lys136, Lys170, Asp174, Ala185

Χαρτογραφώντας τις περιοχές που αλληλεπιδρούν με το pre-tRNA_{Arg}, δηλαδή τις περιοχές που εμφανίζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης, παρατηρείται ότι εντοπίζονται στην μία πλευρά του dLaM, ενώ η αντίστοιχη πλευρά του dRRM1 δε συμμετέχει στην αλληλεπίδραση. Παράλληλα, μετά από περιστροφή του dLaM-RRM1 κατά 180° στον άξονα των y, παρατηρείται ότι η πίσω πλευρά του dLaM δε συμμετέχει στην αλληλεπίδραση, ενώ η πίσω πλευρά του RRM1 εμφανίζεται να αλληλεπιδρά με το pre-tRNA_{Arg}. Η περιοχή του dLaM που υφίσταται αλλαγή μετά την πρόσδεση του pre-tRNA_{Arg} είναι ίδια με την περιοχή αλληλεπίδρασης του pre-tRNA_{Arg} όταν το γειτονικό RRM1 απουσιάζει. Όσον αφορά στο RRM1 η περιοχή που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση του pre-tRNA_{Arg} είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη απουσία του γειτονικού dLaM (Εικόνα 144). Μάλιστα, η περιοχή του dRRM1, η οποία αλληλεπιδρά με το pre-tRNA_{Arg} (απουσία του dLaM) συμπεριλαμβάνεται στην περιοχή αλληλεπίδρασης του dRRM1 του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1 με το pre-tRNA_{Arg}. Επομένως, η πρόσδεση του pre-tRNA_{Arg} στο dLaM-RRM1 είναι ειδική. Η μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξικών καταλοίπων οφείλεται είτε σε απευθείας πρόσδεση του pre-tRNA_{Arg} με το συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο, είτε στο γεγονός ότι ορισμένα αμινοξικά κατάλοιπα υφίστανται αλλαγές στη διαμόρφωση που επάγονται από τη δέσμευση του pre-tRNA_{Arg} σε άλλα αμινοξέα. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ¹H-¹⁵N 2D

TROSY πριν την πρώτη και μετά από κάθε προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} στο dLaM-RRM1 προέκυψε ότι η χημική ανταλλαγή μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του συμπλόκου είναι από ενδιάμεση έως αργή (intermediate-slow exchange). Δηλαδή, η δέσμευση του pre-tRNA_{Arg} στο dLaM-RRM1 είναι ισχυρή και η εκτιμώμενη τιμή της σταθεράς αποδέσμευσης K_d είναι μικρότερη από 10^{-9} M. Επομένως, οι επιμέρους επικράτειες δρουν συνεργατικά ώστε να επιτευχθεί ισχυρότερη δέσμευση του RNA σε σχέση με τη δέσμευση που επιτυγχάνεται από την κάθε επικράτεια ξεχωριστά με το pre-tRNA_{Arg}. Η εκτιμώμενη τιμή K_d όπως προκύπτει από την αλληλεπίδραση του dLaM-RRM1 με το pre-tRNA_{Arg} με τη Φασματοσκοπία NMR συγκλίνει με την μέτρηση του K_d ($206 \pm 9,3$ nM) μέσω του MST (Εικόνα 121).

Η περιοχή αλληλεπίδρασης του dLaM στο dLaM-RRM1 αποτελείται από τις α -έλικες, δηλαδή από τις $\alpha 1$, $\alpha 1'$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ και τμήμα της $\alpha 5$ -έλικας και του $\beta 1$ -κλώνου. Οι κύριες περιοχές αλληλεπίδρασης του dRRM1 που αλληλεπιδρούν με το pre-tRNA_{Arg}, παρουσία του γειτονικού dLaM, είναι οι $\beta 4$, $\beta 5$ και $\beta 6$ -κλώνοι, η 1^η στροφή της $\alpha 6$ -έλικας, η 1^η στροφή της $\alpha 8$ -έλικας και μέρος της $\beta 5\beta 6$ θηλιάς. Στην αλληλεπίδραση αυτή συμμετέχει και μέρος του συνδέτη μεταξύ του dLaM και του dRRM1 (Εικόνα 144).

Τα αρωματικά αμινοξέα και των δύο επικρατειών εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1 με το pre-tRNA_{Arg} και κυρίως αυτά που εντοπίζονται στο dLaM. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα του dLaM, Tyr15, Tyr16 ($\alpha 1$ -έλικα, 3^η κατηγορία) και Phe17 ($\alpha 1$ -έλικα, 1^η κατηγορία) εμφανίζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης, ενώ το σήμα NH του αμινοξέος Phe48 εξαφανίζεται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY. Επίσης, για το αμινοξύ Tyr39 δεν υπάρχουν πληροφορίες από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY, ενώ τα Phe22 και Phe27 δε συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση, παρόλο που οι τιμές CSP τους πλησιάζουν την τιμή της τυπικής απόκλισης. Αντίστοιχα, τα αρωματικά αμινοξέα του dRRM1, Tyr97 ($\beta 1$ -κλώνος, 3^η κατηγορία), Tyr101 ($\beta 1\alpha 1$ θηλιά, 3^η κατηγορία), Phe135 ($\beta 2\beta 3$ θηλιά, 1^η κατηγορία), Phe169, Phe172 ($\alpha 8$ -έλικα, κοντά στους β -κλώνους και στο συνδέτη, 3^η κατηγορία) και Phe184 (C-τελικό άκρο, 1^η κατηγορία) παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης. Τα υπόλοιπα αρωματικά αμινοξέα Phe113, Phe114, Tyr120, Phe139, Phe143, Tyr160 και Phe183 δεν συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή.



Εικόνα 144: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1 με το *pre*-tRNA_{Arg}. Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στη δομή του dLaM-RRM1 καθώς και Γ. στην επιφάνεια του dLaM-RRM1. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,010 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,015$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,015 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,020$ και με κόκκινο οι $0,020 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Επιπλέον, αρκετά από τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα (Arg, Lys) του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1 συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτού με το *pre*-tRNA_{Arg}. Από αυτά, αρκετά εντοπίζονται στη θετικά φορτισμένη περιοχή του dRRM1. Ωστόσο, συνολικά τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση είναι λιγότερα σε σύγκριση με αυτά που συμμετέχουν σε άλλες αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια RNA.

Όλα τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών LARP εκτός από το Gln12 συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του dLaM-RRM1 με το pre-tRNA_{Arg}. Ειδικότερα, τα αμινοξέα Tyr15, Tyr16 (α 1-έλικα, 3^η κατηγορία) και Asp25 (α 2-έλικα, 1^η κατηγορία) εμφανίζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης, ενώ τα σήματα NH των αμινοξέων Lys26 (α 2-έλικα) και Phe48 (α 3-έλικα) εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dLaM-RRM1 προς pre-tRNA_{Arg} 1:1. Εκτός από τα συντηρημένα αμινοξέα των LARP σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και τα συντηρημένα μοτίβα δέσμευσης του RNA, RNP1 (136-KGSFLADF-143) και RNP2 (96-LYSKGW-101) του dRRM1. Συγκεκριμένα, τα αμινοξικά κατάλοιπα Ser138 (2^η κατηγορία), Leu140 (3^η κατηγορία) και Ala141 (1^η κατηγορία) παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης, ενώ η κορυφή NH της Lys136 εξαφανίζεται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY. Τα αμινοξικά κατάλοιπα του RNP2 συμμετέχουν αρκετά στην αλληλεπίδραση αυτή καθώς εμφανίζουν αρκετά υψηλές τιμές CSP. Συγκεκριμένα, τα Lys96, Tyr97, Lys99, Trp101 (3^η κατηγορία) εμφανίζουν αρκετά υψηλές τιμές CSP και ακολουθεί η Gly100, ενώ η κορυφή NH της Ser98 εξαφανίζεται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY.

ΣΤ.3.5. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dRRM1-RRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg}

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dRRM1-RRM2α (226 αμινοξέα) της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg} εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του dRRM1-RRM2α πριν και μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dRRM1-RRM2α προς pre-tRNA_{Arg} 1:1, παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων και εξαφάνιση κορυφών (Πίνακας 26). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το dRRM1-RRM2α αλληλεπιδρά με το pre-tRNA_{Arg}. Τα αμινοξέα που έχουν υποστεί μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις παρουσία του pre-tRNA_{Arg} οργανώθηκαν σε τρεις κατηγορίες, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 26). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,006 \leq \Delta\text{CS}_\text{N}$.

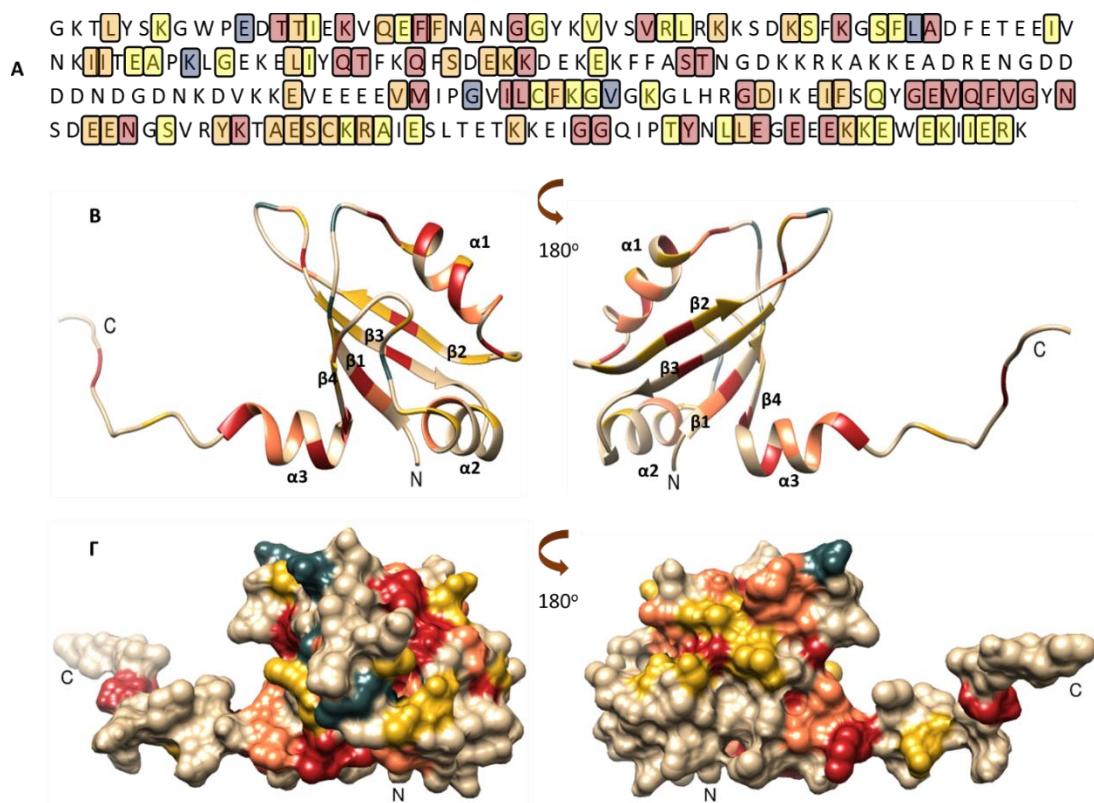
$\Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,008$, στη δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,008 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,012$ και στην τρίτη ανήκουν αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,012 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$. Στον πίνακα αυτόν περιλαμβάνεται και μία επιπλέον κατηγορία με τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων τα σήματα NH εξαφανίζονται από το φάσμα $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 2D TROSY μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dRRM1-RRM2α προς pre-tRNA_{Arg} 1:1. Αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό ενδιάμεσης χημικής ανταλλαγής μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του συμπλόκου, ενώ η εκτιμώμενη τιμή της σταθεράς αποδέσμευσης K_d κυμαίνεται μεταξύ 10^{-6} - 10^{-9}M .

Πίνακας 26: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του dRRM1-RRM2α ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1.

$0,006 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,008$	$0,008 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,012$	$0,012 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$	Εξαφάνιση των NH
Lys99, Ile107, Glu111, Gly119, Val122, Ser124, Arg126, Leu127, Ser134, Ser138, Phe139, Ile148, Glu155, Ala156, Gly160, Ile165, Glu181, Cys233, Lys235, Gly236, Lys239, Gln252, Ser269, Lys279, Ala281, Glu283, Thr298, Leu301, Lys309, Glu310, Glu312, Lys313, Ile315, Glu316, Arg317	Leu96, Thr106, Gln111, Phe114, Ala116, Lys129, Lys133, Ile152, Ile153, Leu164, Ser173, Glu175, Lys176, Glu219, Val225, Phe234, Asp245, Ile249, Phe250, Glu265, Glu266, Tyr272, Ala275, Glu276, Ser277, Cys278, Arg280, Lys289, Leu302, Lys308	Tyr97, Thr105, Lys109, Phe113, Gly118, Val125, Lys136, Ala141, Gln167, Thr168, Gln171, Lys177, Ser186, Thr187, Met226, Ile231, Leu232, Gly244, Gly254, Glu255, Val256, Gln257, Phe258, Val259, Gly260, Asn262, Asn267, Lys273, Gly293, Gly294, Tyr299, Glu303, Glu305, Glu307	Gly100, Glu103, Leu140, Lys158, Gly229, Val237

Η χαρτογράφηση των περιοχών του πολυπεπτιδίου dRRM1-RRM2α που αλληλεπιδρούν με το pre-tRNA_{Arg} πραγματοποιήθηκε στις δομές των επιμέρους επικρατειών dRRM1 και dRRM2α, ενώ δεν είναι δυνατόν να αποδοθούν οι αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις στα αμινοξέα που ανήκουν στον συνδέτη, καθώς τα αμινοξέα 192-213 δεν αποτελούν μέρος κανενός από τα δύο πολυπεπτίδια. Μεγάλο μέρος των πολυπεπτιδίων dRRM1 και dRRM2α φαίνεται να συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με το pre-tRNA_{Arg}, καθώς αρκετά από τα αμινοξέα τους παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης. Οι περιοχές του dRRM1 που υφίστανται εντονότερες αλλαγές μετά την αλληλεπίδραση του dRRM1-RRM2α με το pre-tRNA_{Arg} εντοπίζονται κυρίως στην μία πλευρά του μορίου και περιλαμβάνουν την α1 και α3-έλικα, τους β1 και β2 κλώνους, τη β3β4 θηλιά και τμήμα της α2-έλικας (Εικόνα 145). Η αντίθετη πλευρά του dRRM1 υφίσταται αλλαγές μετά την αλληλεπίδραση με το pre-

tRNA_{Arg}, αλλά είναι ασθενέστερες. Όσον αφορά στο dRRM2α, τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές CSP εντοπίζονται κυρίως στον β1 και β2-κλώνο, στην α3-έλικα και στη β2β3 θηλιά (Εικόνα 146). Μαζί με αυτά, στην αλληλεπίδραση αυτή συμμετέχουν τμήματα των β3 και β4-κλώνων και τμήματα των α1 και α2-ελίκων. Μάλιστα, οι πιο έντονες αλλαγές στους β-κλώνους εντοπίζονται προς την περιοχή κοντά στην α3-έλικα. Από αυτά προκύπτει ότι η μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξικών καταλοίπων οφείλεται είτε σε απευθείας πρόσδεση του pre-tRNA_{Arg} σε αυτά τα αμινοξέα, είτε σε αλλαγές στη διαμόρφωσή τους που επάγονται από την αλληλεπίδραση του pre-tRNA_{Arg} σε άλλα αμινοξικά κατάλοιπα.



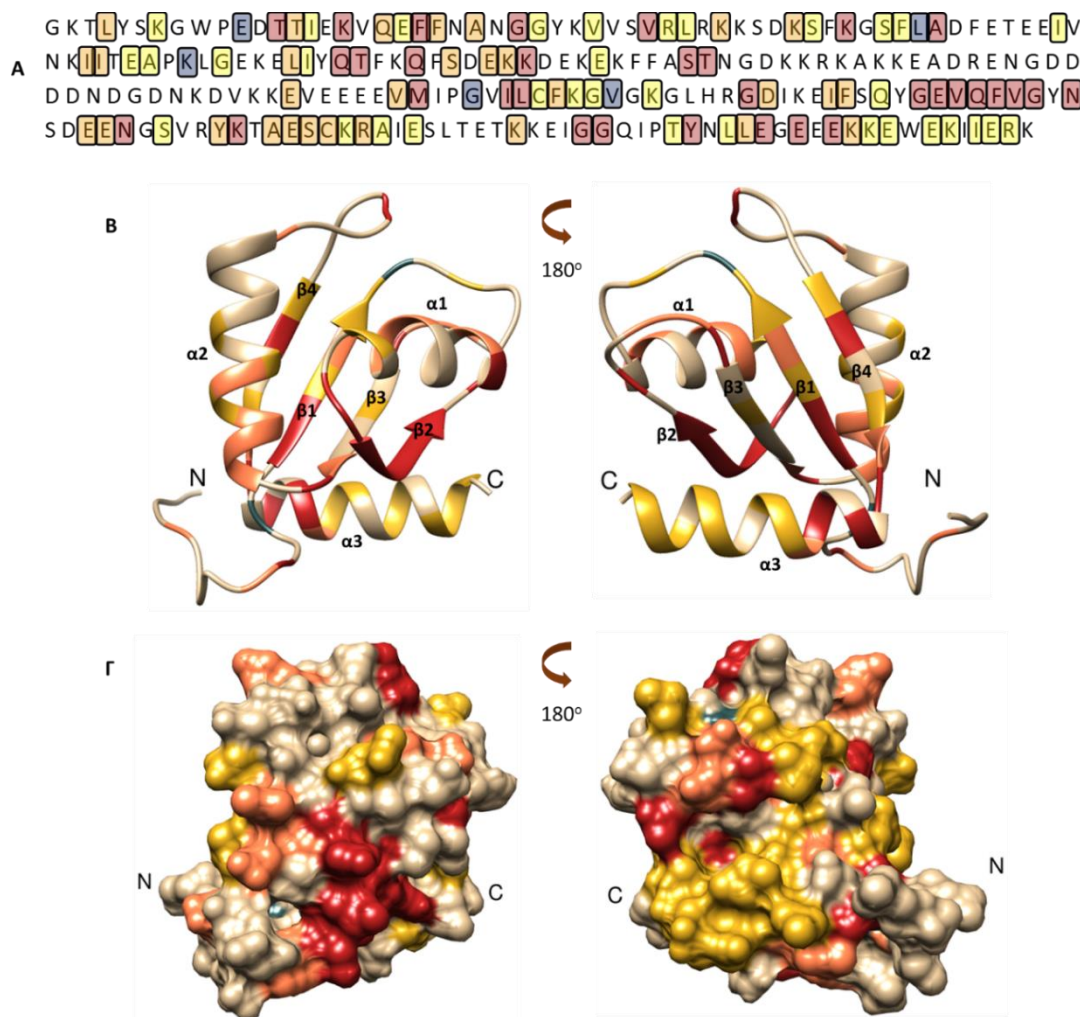
Εικόνα 145: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του dRRM1 του πολυπεπτιδίου dRRM1-RRM2α (226 αμινοξέα) με το pre-tRNA_{Arg}. Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στη δομή του dRRM1 του πολυπεπτιδίου dRRM1-RRM2α καθώς και Γ. στην επιφάνεια του dRRM1. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,006 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,008$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,008 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,012$ και με κόκκινο οι $0,012 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Στην αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου dRRM1-RRM2α με το pre-tRNA_{Arg} σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα συντηρημένα μοτίβα πρόσδεσης του RNA (RNP)

που εντοπίζονται σε κάθε επικράτεια RRM. Συγκεκριμένα, τα μοτίβα RNP1 (136-KGSFLADF-143) και RNP2 (96-LYSKGW-101) του dRRM1 συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή. Ειδικότερα, τα αμινοξικά κατάλοιπα Lys136 (3^η κατηγορία), Ser138, Phe139 (1^η κατηγορία) και Ala141 (3^η κατηγορία) του RNP1 (που ανήκει στο dRRM1) παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης. Επίσης, τα αμινοξικά κατάλοιπα Lys96 (2^η κατηγορία), Tyr97 (3^η κατηγορία) και Lys99 (1^η κατηγορία) του RNP2 παρουσιάζουν μεγάλη μεταβολή στη χημική τους μετατόπιση. Παράλληλα, η κορυφή NH της Gly100 του RNP2 εξαφανίζεται από τα φάσματα ¹H-¹⁵N 2D TROSY μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dRRM1-RRM2α προς pre-tRNA_{Arg} 1:1. Επιπροσθέτως, τα αμινοξικά κατάλοιπα που ανήκουν στα μοτίβα δέσμευσης RNP1 (268-GSVRYKTA-275) και RNP2 (232-LCFKGV-237) του dRRM2α υφίστανται μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg}. Συγκεκριμένα, τα αμινοξικά κατάλοιπα Ser269 (1^η κατηγορία), Tyr272 (2^η κατηγορία), Lys273 (3^η κατηγορία) και Ala275 (2^η κατηγορία) του RNP1 που ανήκει στο dRRM2α παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης. Μαζί με αυτά, όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα του RNP2 συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή. Ειδικότερα, η Leu232 (3^η κατηγορία), η Cys236 (1^η κατηγορία), η Phe234 (2^η κατηγορία), η Lys235 και η Gly236 (1^η κατηγορία) παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες από την τυπική απόκλιση, ενώ το σήμα NH της Val237 εξαφανίζεται από τα φάσματα ¹H-¹⁵N 2D TROSY μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dRRM1-RRM2α προς pre-tRNA_{Arg} 1:1.

Επιπλέον, στην αλληλεπίδραση που εξετάζεται συμμετέχουν τα αρωματικά αμινοξέα και των δύο επικρατειών RRM1 και RRM2α. Όσον αφορά στο dRRM1 δύο από τα τέσσερα αρωματικά αμινοξέα των β-κλώνων παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης και συγκεκριμένα τα Tyr97 (β1-κλώνος, 3^η κατηγορία) και Phe139 (β3-κλώνος, 1^η κατηγορία). Σε αυτά προστίθενται και τα αμινοξικά κατάλοιπα Phe113 (3^η κατηγορία) και Phe114 (2^η κατηγορία) της α1-έλικας που εμφανίζουν υψηλές τιμές CSP. Συνολικά μόνο τέσσερα από τα δεκατρία αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα του dRRM1 συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το pre-tRNA_{Arg}. Αντιθέτως, όλα τα αρωματικά αμινοξέα των β-κλώνων του dRRM2α συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του dRRM1-RRM2α με το pre-tRNA_{Arg}. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα Phe258 (β2-κλώνος, 3^η κατηγορία) και Tyr299 (β4-κλώνος, 3^η κατηγορία) εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές CSP και ακολουθούνται από

τα αμινοξέα Phe234 (β 1-κλώνος, 2^η κατηγορία) και Tyr272 (β 3-κλώνος, 2^η κατηγορία). Εκτός από αυτά και η Phe250 (α 1-έλικα, 2^η κατηγορία) εμφανίζει τιμές CSP υψηλότερες από την τυπική απόκλιση. Τα τέσσερα επιπλέον αρωματικά αμινοξέα, τα οποία εντοπίζονται σε θηλιές ή έλικες του dRRM2α δε συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή.



Εικόνα 146: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του dRRM2α του πολυπεπτιδίου dRRM1-RRM2α (226 αμινοξέα) με το *pre*-tRNA_{Arg}. Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στη δομή του dRRM2α του πολυπεπτιδίου dRRM1-RRM2α καθώς και Γ. στην επιφάνεια του dRRM2α. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,006 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,008$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,008 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,012$ και με κόκκινο οι $0,012 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Επιπροσθέτως, περισσότερα θετικά φορτισμένα αρωματικά κατάλοιπα του dRRM1 συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του dRRM1-RRM2α με το *pre*-tRNA_{Arg} σε

σύγκριση με τα αντίστοιχα που συμμετέχουν στην ίδια αλληλεπίδραση απουσία του dRRM2α. Ειδικότερα, τα αμινοξικά κατάλοιπα Lys99 ($\beta 1$ -κλώνος, 1^η κατηγορία), Lys109 ($\alpha 1$ -έλικα, 3^η κατηγορία), Arg126 ($\beta 2$ -κλώνος, 1^η κατηγορία), Lys133 ($\beta 1/\beta 2$ θηλιά, 2^η κατηγορία), Lys136 ($\beta 1/\beta 2$ θηλιά, 3^η κατηγορία), Lys176 ($\alpha 3$ -έλικα, 2^η κατηγορία) και Lys177 ($\alpha 3$ -έλικα, 3^η κατηγορία) εμφανίζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης. Η κορυφή NH του αμινοξικού καταλοίπου Lys158 ($\alpha 2/\beta 4$ θηλιά) εξαφανίζεται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dRRM1-RRM2α προς pre-tRNA_{Arg} 1:1. Παρόμοια κατανομή θετικά και αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων δεν εντοπίζεται στο dRRM2α.

ΣΤ.3.6. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dLaM-RRM1-RRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg}

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1-RRM2α (318 αμινοξέα) της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Arg} εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του dLaM-RRM1-RRM2α πριν και μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dLaM-RRM1-RRM2α προς pre-tRNA_{Arg} 1:1, παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων και εξαφάνιση αρκετών κορυφών (Πίνακας 27). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το dLaM-RRM1-RRM2α αλληλεπιδρά με το pre-tRNA_{Arg}. Τα αμινοξέα που έχουν υποστεί μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις παρουσία του pre-tRNA_{Arg} οργανώθηκαν σε τρεις κατηγορίες, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 27). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,021 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,030$, στη δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,030 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,050$ και στην τρίτη ανήκουν αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,050 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$. Στον πίνακα αυτόν περιλαμβάνεται και μία επιπλέον κατηγορία με τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων τα σήματα NH εξαφανίζονται από το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dLaM-RRM1-RRM2α προς pre-tRNA_{Arg} 1:1. Από την υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY πριν και μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} προέκυψε ότι η χημική ανταλλαγή μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του

συμπλόκου είναι από ενδιάμεση έως αργή (intermediate-slow exchange). Επομένως, η πρόσδεση του pre-tRNA_{Arg} στο dLaM-RRM1-RRM2α είναι ισχυρή, ενώ η εκτιμώμενη τιμή της σταθεράς αποδέσμευσης K_d είναι μικρότερη από 10^{-9} M.

Πίνακας 27: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του dLaM-RRM1-RRM2α ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Arg} 1:1.

$0,021 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,030$	$0,030 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,050$	$0,050 \leq \Delta CS_{N-H}$	Εξαφάνιση των NH
Ser6, Ile9, Tyr15, Tyr16, Leu28, Ser41, Ile45, Thr56, Ser74, Gly77, Lys78, Asn89, Val110, Phe114, Asn117, Ile148, Gly160, Glu161, Gln171, Ala185, Gly229, Gly236, Lys239, Phe250, Gln257, Ser263, Ile282, Ser284, Tyr299, Lys308	Asp8, Glu31, Val36, Asn38, Ile42, Thr53, Ile54, Thr62, Lys66, Ser68, Leu71, Asp76, Thr105, Gln111, Phe113, Gly119, Ser124, Val125, Arg128, Phe139, Glu146, Ile153, Glu175, Lys177, Asp178, Met226, His242, Glu255, Val256, Lys273, Glu276, Lys279, Glu310	Leu10, Glu14, Asp25, Phe27, Val44, Ala46, Ser47, Ser55, Leu60, Glu63, Leu65, Thr69, Val73, Cys92, Leu96, Tyr97, Ile107, Glu112, Val122, Arg126, Leu164, Ile165, Tyr166, Thr168, Ile231, Phe234, Gly244, Thr261, Tyr272, Glu307	Ser18, Asn21, Phe22, Arg29, Ala32, Phe48, Met51, Leu83, Lys94, Thr95, Ser98, Gly100, Thr106, Leu127, Lys129, Lys130, Lys133, Phe135, Leu140, Asp142, Phe143, Thr145, Gln167, Lys170, Ser173, Val237, Arg243, Gly260, Asn262

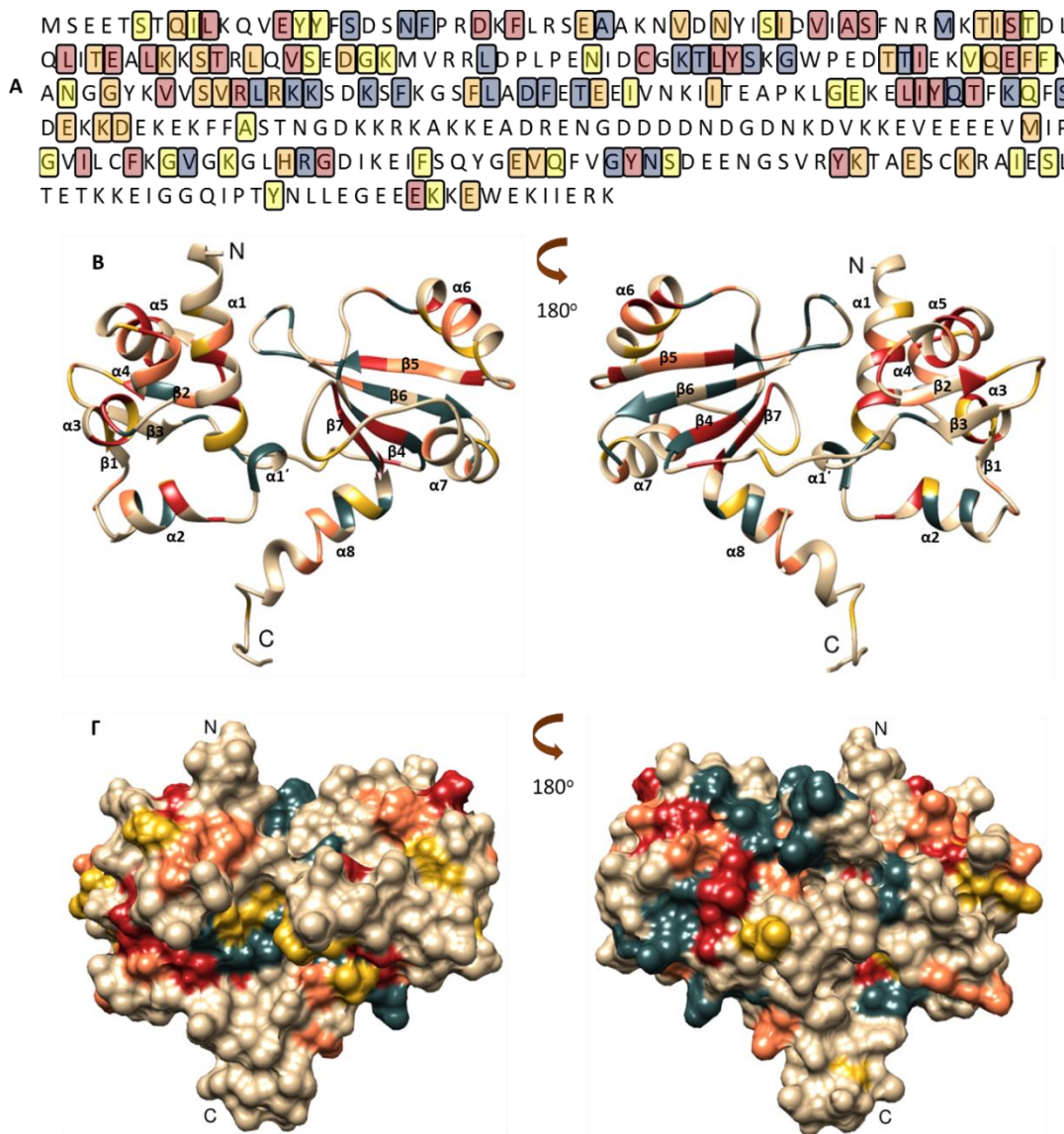
Η χαρτογράφηση των περιοχών του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1-RRM2α που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το pre-tRNA_{Arg} πραγματοποιήθηκε στις δομές των πολυπεπτιδίων dLaM-RRM1 και RRM2α. Επιλέγονται αυτά τα δύο πολυπεπτίδια για την αποτύπωση των αλλαγών στις χημικές μετατοπίσεις του dLaM-RRM1-RRM2α, διότι μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του dLaM-RRM1-RRM2α με τα φάσματα των dLaM-RRM1 και dRRM2α ταυτίζονται καλύτερα σε σύγκριση με την υπέρθεση του φάσματος του dLaM-RRM1-RRM2α με τα αντίστοιχα των επιμέρους επικρατειών. Επίσης, δεν είναι δυνατό να αποδοθούν οι αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων που ανήκουν στο συνδέτη μεταξύ του dRRM1 και του dRRM2α, καθώς τα αμινοξέα 192-213 δεν αποτελούν μέρος κανενός εξεταζόμενου πολυπεπτιδίου. Οι περισσότερες και οι μεγαλύτερες μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις στο πολυπεπτίδιο dLaM-RRM1-RRM2α μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} συμβαίνουν στο dLaM-RRM1 και λιγότερες στο dRRM2α. Ειδικότερα, για το dLaM-RRM1 τα αμινοξέα με τις μεγαλύτερες τιμές CSP εντοπίζονται στην μία πλευρά του dLaM, ενώ η αντίστοιχη του dRRM1 δεν εμφανίζει αρκετές αλλαγές. Μετά από περιστροφή του dLaM-RRM1 κατά 180° στον άξονα των

υ παρατηρείται ότι στο dLaM δεν υπάρχουν αρκετά αμινοξέα που να παρουσιάζουν μεγάλη μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις, ενώ αντίθετα στο dRRM1 αρκετά αμινοξέα υφίστανται έντονη μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις (Εικόνα 147 και 148). Επίσης, αρκετά σήματα NH των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY που ανήκουν στο dRRM1 εξαφανίζονται μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg}. Υπάρχουν αμινοξέα, τα οποία ανήκουν στο dRRM2α και υφίστανται μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις, ωστόσο τα αμινοξέα αυτά δεν εντοπίζονται σε μια περιοχή. Από αυτά προκύπτει ότι η δέσμευση του pre-tRNA_{Arg} στο dLaM-RRM1 είναι ειδική, ενώ στο dRRM2α είναι μη-ειδική. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στο μεγάλο μέγεθος του pre-tRNA_{Arg}.

Η περιοχή του dLaM που υφίσταται τις εντονότερες αλλαγές μετά την αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1-RRM2α με την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} είναι οι α -έλικες και κυρίως οι $\alpha 1$, $\alpha 1'$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ και τμήμα της $\alpha 5$ -έλικας, καθώς και τμήμα του $\beta 2$ -κλώνου (Εικόνα 147Α). Οι περισσότερες και εντονότερες αλλαγές εντοπίζονται κυρίως στο dRRM1. Στην αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να συμμετέχουν κυρίως οι β -κλώνοι, η $\beta 5\beta 6$ θηλιά και τμήματα της $\alpha 6$ και της $\alpha 8$ -έλικας (Εικόνα 147Α). Όσον αφορά στο dRRM2α οι περιοχές που επηρεάζονται από την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} εντοπίζονται κυρίως στο $\beta 1$ και $\beta 2$ -κλώνο, στην πρώτη στροφή της $\alpha 3$ -έλικας και σε τμήματα των $\beta 2\beta 3$ και $\beta 1\alpha 1$ θηλιών. Η μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξικών καταλοίπων οφείλεται είτε σε απευθείας πρόσδεση του pre-tRNA_{Arg} σε αυτά τα αμινοξέα, είτε σε αλλαγές στη διαμόρφωσή τους που επάγονται από την άμεση αλληλεπίδραση του pre-tRNA_{Arg} σε άλλα αμινοξικά κατάλοιπα.

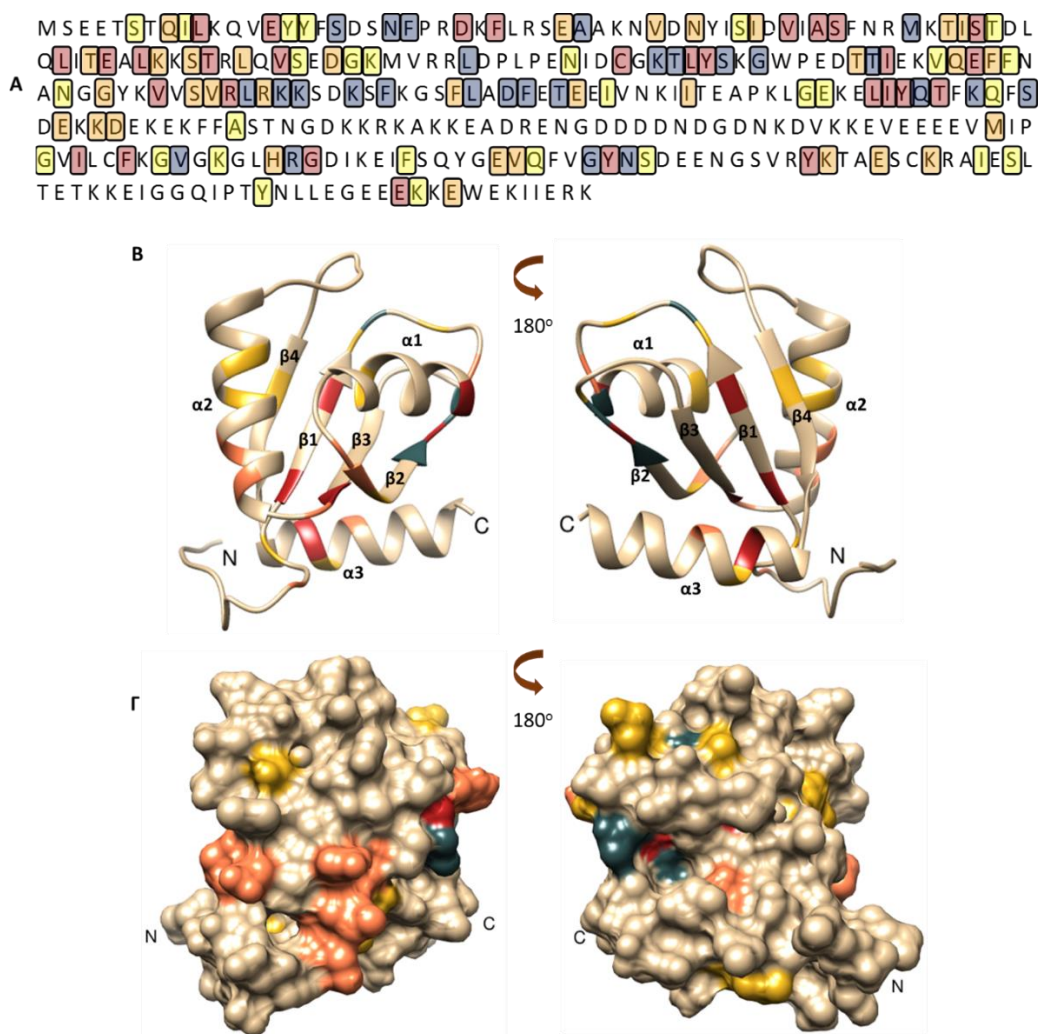
Σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση διαδραματίζουν τα αρωματικά αμινοξέα και των τριών επικρατειών. Τα περισσότερα αρωματικά αμινοξέα του dLaM συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1-RRM2α με το pre-tRNA_{Arg}. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα Tyr15, Tyr16 ($\alpha 1$ -έλικα, 1^η κατηγορία) και Phe27 ($\alpha 2$ -έλικα, 3^η κατηγορία) εμφανίζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης. Επιπλέον, τα σήματα NH των αμινοξέων Phe22 ($\alpha 1'$ -έλικα) και Phe48 ($\alpha 3$ -έλικα) εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY. Οι τιμές CSP των αμινοξέων Phe17 ($\alpha 1$ -έλικα) και Tyr39 ($\beta 1$ -κλώνος) είναι κοντά στην τυπική απόκλιση, χωρίς ωστόσο να την ξεπερνούν. Συνεπώς, τα δύο παραπάνω αμινοξέα δε συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση. Από τα αρωματικά αμινοξέα του dRRM1,

συμμετέχουν τα μισά στην αλληλεπίδραση με το RNA. Ειδικότερα, η Phe113 ($\alpha 6$ -έλικα, 2^η κατηγορία), Phe114 ($\alpha 6$ -έλικα, 1^η κατηγορία), Phe139 ($\beta 6$ -κλώνος, 2^η κατηγορία) και Tyr166 ($\beta 4$, 3^η κατηγορία) παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης. Επίσης, τα σήματα NH των κορυφών Phe135 ($\beta 5\beta 6$ θηλιά) και Phe143 ($\beta 6$ -κλώνος) εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY.



Εικόνα 147: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του dLaM-RRM1 του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1-RRM2α με το pre-tRNA_{Arg}. A. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. B. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στη δομή του dLaM-RRM1 του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1-RRM2α καθώς και Γ στην επιφάνειά του. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,021 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,030$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,030 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,050$ και με κόκκινο οι $0,050 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Όσον αφορά στο dRRM2α έξι από τα εννιά αρωματικά αμινοξέα συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα Phe234 ($\beta 1$ -κλώνος, 3^η κατηγορία), His242 ($\beta 1\alpha 1$ θηλιά, 2^η κατηγορία), Phe250 ($\alpha 1$ -έλικα, 1^η κατηγορία), Tyr261 ($\beta 2\beta 3$ θηλιά, 3^η κατηγορία), Tyr272 ($\beta 3$ -κλώνος, 3^η κατηγορία) και Tyr299 ($\beta 4$ -κλώνος, 1^η κατηγορία) παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης, δηλαδή συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία του dLaM-RRM1-RRM2α προς pre-tRNA_{Arg} 1:1. Αντίθετα, τα Tyr253, Phe258 και Trp311 δε συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση παρόλο που οι τιμές CSP τους πλησιάζουν αυτήν της τυπικής απόκλισης.



Εικόνα 148: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του dRRM2α του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1-RRM2α με το pre-tRNA_{Arg}. Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στη δομή του dRRM2α του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1-RRM2α καθώς και Γ στην επιφάνεια του. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,021 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,030$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,030 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,050$ και με κόκκινο οι $0,050 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Επιπροσθέτως, τα συντηρημένα μοτίβα του dLaM και των δύο διαδοχικών RRM συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1-RRM2α με το pre-tRNA_{Arg}. Όσον αφορά στο συντηρημένο μοτίβο των πρωτεϊνών LARP τα αμινοξέα Tyr15, Tyr16 ($\alpha 1$ -έλικα, 1^η κατηγορία) και Asp25 ($\alpha 2$ -έλικα, 3^η κατηγορία) παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης, ενώ η κορυφή NH της Phe48 ($\alpha 3$ -έλικα) εξαφανίζεται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία dLaM-RRM1-RRM2α προς pre-tRNA_{Arg} 1:1. Αντίθετα, τα αμινοξέα Gln12 και Lys26 δεν επηρεάζονται από την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg}. Από τα μοτίβα πρόσδεσης του RNA, RNP1 (136-KGSFLADF-143) και RNP2 (96-LYSKGW-101) του dRRM1, αρκετά αμινοξέα συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή. Συγκεκριμένα, η τιμή CSP της Phe139 (2^η κατηγορία) του RNP1 είναι υψηλή, ενώ τα σήματα NH των αμινοξέων Leu140, Asp142 και Phe143 του RNP1 εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg}. Επίσης, ορισμένα αμινοξέα του RNP1 (268-GSVRYKTA-275) και του RNP2 (232-LCFKGV-237) του dRRM2α επηρεάζονται από την προσθήκη pre-tRNA_{Arg}. Συγκεκριμένα, η Tyr272 (3^η κατηγορία) και η Lys273 (1^η κατηγορία) του RNP1 και η Phe234 (3^η κατηγορία) και Gly236 (1^η κατηγορία) του RNP2 παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης, ενώ η κορυφή NH της Val237 του RNP2 εξαφανίζεται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} σε αναλογία του dLaM-RRM1-RRM2α προς pre-tRNA_{Arg} 1:1. Τέλος, η περιοχή με τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα του dRRM1 συμμετέχει στην αλληλεπίδραση αυτή κυρίως μέσω της $\beta 2\beta 3$ θηλιάς.

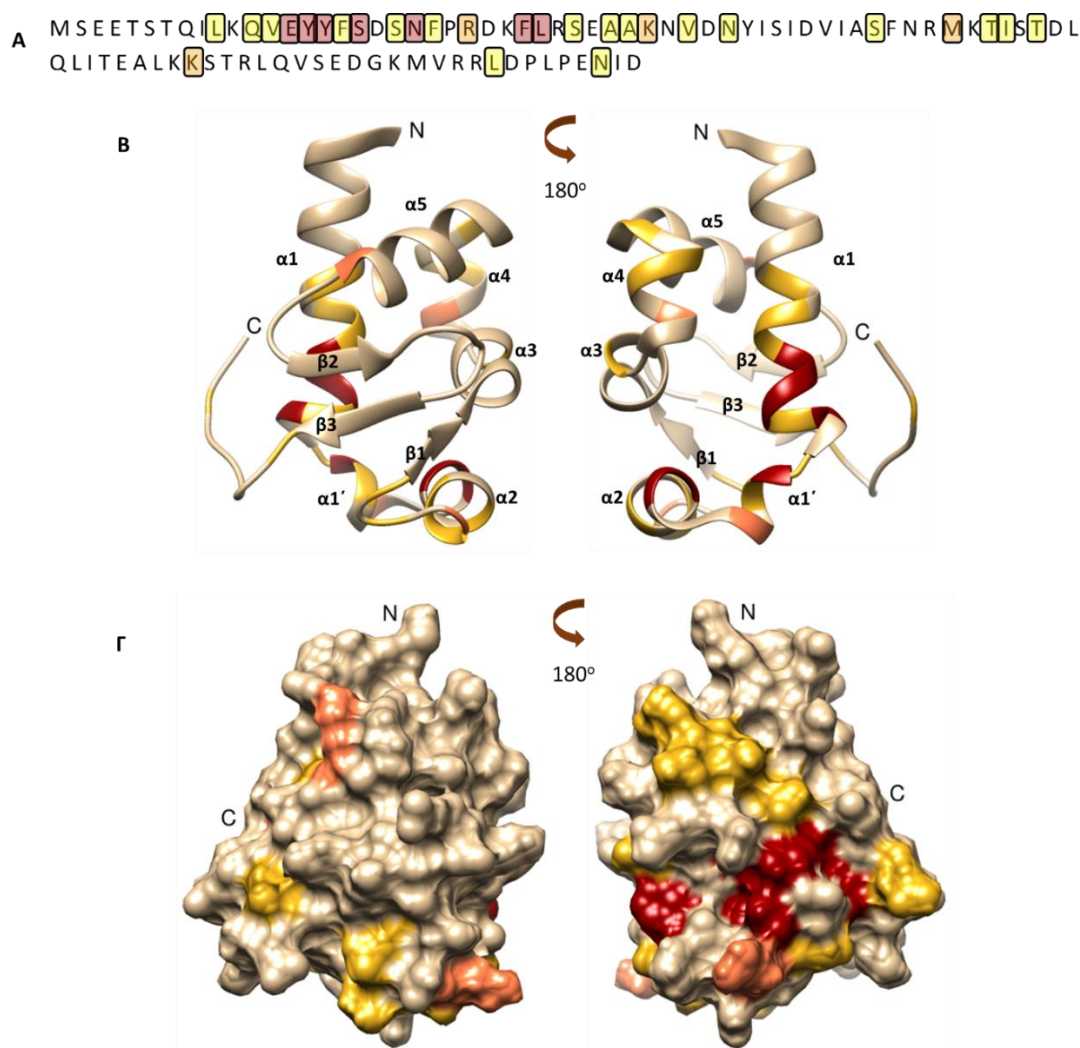
ΣΤ.4. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας dLaM της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Ser}

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του LaM της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* με το pre-tRNA_{Ser} εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ¹H-¹⁵N 2D TROSY του LaM έπειτα από την προσθήκη του pre-tRNA_{Ser} σε αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Ser} 1:1 με το φάσμα αναφοράς, παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων (Πίνακας 28). Επομένως, το πολυπεπίδιο LaM αλληλεπιδρά με το pre-tRNA_{Ser}. Τα αμινοξέα του dLaM ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις οργανώθηκαν σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 28). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,004 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,007$, στη δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,007 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,010$ και στην τρίτη ανήκουν αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,010 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Πίνακας 28: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του dLaM ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Ser} σε αναλογία πρωτεΐνης προς pre-tRNA_{Ser} 1:1.

$0,004 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,007$	$0,007 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,010$	$0,010 \leq \Delta CS_{N-H}$	Εξαφάνιση των NH
Leu10, Gln12, Val13, Phe17, Ser20, Phe22, Ser30, Ala32, Ala33, Val36, Asn38, Ser47, Thr53, Ile54, Thr56, Leu83, Asn89	Arg24, Lys34, Met51, Lys67	Glu14, Tyr15, Tyr16, Ser18, Asn21, Phe27, Leu28	

Από τη χαρτογράφηση των περιοχών του dLaM που αλληλεπιδρούν με το pre-tRNA_{Ser} παρατηρήθηκε ότι οι περιοχές με τις μεγαλύτερες τιμές CSP μετά την προσθήκη του pre-tRNA_{Ser} εντοπίζονται στις $\alpha 1$, $\alpha 1'$, $\alpha 2$ και $\alpha 4$ έλικες, καθώς και σε τμήμα της $\alpha 3$ -έλικας και του $\beta 1$ -κλώνου (Εικόνα 149). Οι περιοχές αυτές αποτελούν μέρος της βασικής περιοχής αλληλεπίδρασης του LaM με RNA.



Εικόνα 149: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου dLaM με το pre-tRNA_{Ser}. Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στη δομή του dLaM καθώς και Γ. στην επιφάνεια του dLaM. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,004 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,007$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,007 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,010$ και με κόκκινο οι $0,010 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Τα αμινοξικά κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με το pre-tRNA_{Ser} εντοπίζονται στην μία πλευρά του μορίου (Εικόνα 149Γ). Δηλαδή, το pre-tRNA_{Ser} φαίνεται να αλληλεπιδρά ειδικά στην περιοχή αυτή. Παρόλο που το pre-tRNA_{Ser} δε φέρει το UUU-3'-OH άκρο, το οποίο προστατεύει η πρωτεΐνη La, ωστόσο το 3' άκρο είναι το GCUUAA-3'-OH. Είναι πιθανόν, λοιπόν, το dLaM να αλληλεπιδρά με την 3'-OH ομάδα, αλλά να συμβάλλουν και σε αυτήν την αλληλεπίδραση τα δύο U. Διαφορετικά το dLaM μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλη περιοχή του pre-tRNA_{Ser}.

Σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν και σε αυτή την περίπτωση τα αρωματικά και ορισμένα θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Ειδικότερα, πέντε από τα επτά αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα και συγκεκριμένα τα Tyr15, Tyr16 (α I-έλικα, 3^η κατηγορία), Phe17 (α I-έλικα, 1^η κατηγορία), Phe22 (α I-έλικα, 1^η κατηγορία) και Phe27 (α 2-έλικα, 3^η κατηγορία) παρουσιάζουν τιμές CSP μεγαλύτερες της τυπικής απόκλισης. Λιγότερα είναι τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα του dLaM που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το pre-tRNA_{Ser} σε σχέση με αυτά που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις με το polyU και το pre-tRNA_{Arg}. Από τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα, μόνο τα Arg24 (α I'-έλικα, 2^η κατηγορία), Lys34 (α 2-έλικα, 2^η κατηγορία) και Lys67 (α 5-έλικα, 2^η κατηγορία) παρουσιάζουν υψηλές τιμές CSP, και αυτά εντοπίζονται στην περιοχή αλληλεπίδρασης του dLaM με RNA. Επιπλέον, από τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών LARP εκτός από τις Tyr15 και Tyr16, που έχουν ήδη αναφερθεί, μόνο η Gln12 (α I-έλικα, 1^η κατηγορία) συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με το pre-tRNA_{Ser}. Τα αμινοξέα που εμφανίζουν τιμές CSP μεγαλύτερες της τυπικής απόκλισης είτε έρχονται σε άμεση επαφή με το pre-tRNA_{Ser}, είτε επηρεάζονται από αλλαγές στη διαμόρφωση που επάγεται από τη δέσμευση του pre-tRNA_{Ser} σε άλλα αμινοξικά κατάλοιπα. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ¹H-¹⁵N 2D TROSY μετά από κάθε προσθήκη του pre-tRNA_{Ser} προκύπτει ότι υπάρχει γρήγορη χημική ανταλλαγή (fast exchange) μεταξύ του ελεύθερου dLaM και του συμπλόκου του με το pre-tRNA_{Ser}. Δηλαδή, η αλληλεπίδραση είναι ασθενής, ενώ η εκτιμώμενη τιμή της σταθεράς αποδέσμευσης K_d κυμαίνεται μεταξύ 10⁻³-10⁻⁶M.

ΣΤ.5. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης των επικρατειών της πρωτεΐνης *human* La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

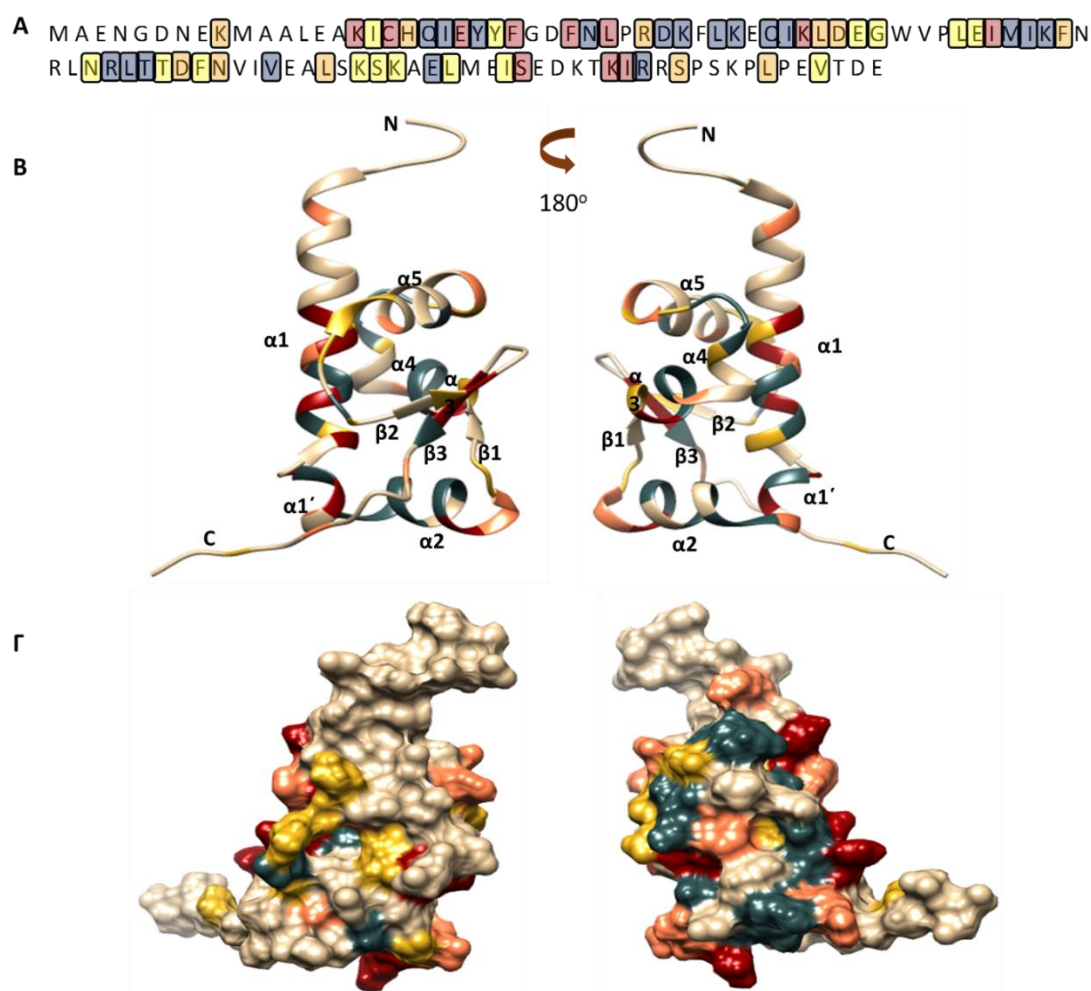
ΣΤ.5.1. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας hLaM της πρωτεΐνης *human* La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του hLaM της πρωτεΐνης *human* La με RNA εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του hLaM πριν και μετά από την προσθήκη του polyU σε αναλογία hLaM προς polyU 1:1, παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων και εξαφάνιση κορυφών (Πίνακας 29). Αυτό σημαίνει ότι το hLaM αλληλεπιδρά με το συνθετικό δεκαμερές ολιγονουκλεοτίδιο polyU απουσία του γειτονικού RRM1, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενα πειραματικά δεδομένα (16, 18, 19, 24). Τα αμινοξικά κατάλοιπα που έχουν υποστεί μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,025 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,040$, η δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,040 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,060$ και η τρίτη περιλαμβάνει αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,060 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$ (Πίνακας 29). Στον πίνακα αυτόν περιλαμβάνεται και μία επιπλέον κατηγορία με τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων τα σήματα NH εξαφανίζονται από το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία hLaM προς polyU 1:1.

Πίνακας 29: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του hLaM ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1.

$0,025 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,040$	$0,040 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,060$	$0,060 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$	Εξαφάνιση των NH
Ile17, Tyr24, Glu44, Gly45, Leu49, Glu50, Asn59, Thr63, Phe65, Lys74, Ser75, Lys76, Leu79, Ile82, Val100	Lys9, His19, Arg32, Leu42, Asp43, Phe55, Asp64, Asn66, Leu72, Ser92, Leu97	Lys16, Cys18, Glu22, Phe25, Phe28, Leu30, Lys41, Ile51, Ser83, Lys88, Ile89	Gln20, Ile21, Tyr23, Asn29, Asp33, Lys34, Leu36, Lys37, Gln39, Ile40, Met52, Ile53, Lys54, Arg60, Leu61, Thr62, Val69, Glu78, Arg90

Χαρτογραφώντας τις περιοχές του hLaM που αλληλεπιδρούν περισσότερο με το polyU, παρατηρείται ότι οι περιοχές με τις μεγαλύτερες τιμές των CSP (Chemical Shift Perturbation, μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις) εντοπίζονται στις $\alpha 1$, $\alpha 1'$, $\alpha 2$ και $\alpha 3$ -έλικες και στον $\beta 3$ -κλώνο (Εικόνα 150). Οι περιοχές αυτές σχηματίζουν την κοιλότητα δέσμευσης του RNA στο hLaM. Επιπλέον, από την αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται ότι δεν εμπλέκονται οι περιοχές που στις πρωτεΐνες *winged-helix* αλληλεπιδρούν κλασικά με DNA, όπως τα «φτερά» w1 και w2, τα οποία αντιστοιχούν στη $\beta 2\beta 3$ θηλιά και στο C-τελικό άκρο του hLaM. Αντίθετα, οι περιοχές αυτές που αλληλεπιδρούν με polyU είναι τα επιπλέον στοιχεία που φέρουν τα μοτίβα LaM έναντι των πρωτεϊνών *winged-helix*.



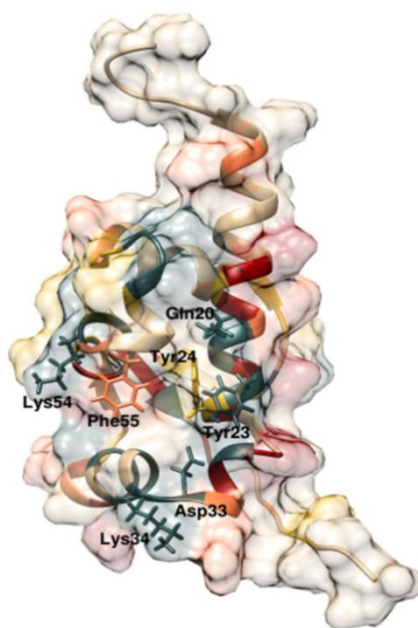
Εικόνα 150: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου hLaM με το 5'-UUUUUUUUUUU-3'-OH.

A. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. B. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεων στη δομή του hLaM καθώς και Γ. στην επιφάνεια του hLaM. Το μέγεθος της μεταβολής μετατοπίσεις αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,025 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,040$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,040 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,060$ και με κόκκινο οι $0,060 \leq \Delta CS_{N-H}$.

Στην αλληλεπίδραση του hLaM με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU σημαντική συνεισφορά έχουν τα αρωματικά και τα βασικά αμινοξέα, καθώς επηρεάζονται περισσότερο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αμινοξικά κατάλοιπα του hLaM. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που επηρεάζονται περισσότερο ή εξαφανίζονται μετά την προσθήκη του ολιγονουκλεοτιδίου εντοπίζονται στη μία πλευρά του μορίου, υποδεικνύοντας την επιφάνεια αλληλεπίδρασης του RNA στο hLaM (Εικόνα 150Γ). Η αντίθετη πλευρά είναι φτωχή σε αμινοξικά κατάλοιπα που επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση με RNA. Επομένως, το RNA αλληλεπιδρά ειδικά μόνο με τη μία πλευρά του hLaM. Στο πολυπεπτίδιο hLaM εντοπίζονται εκτός από τα συντηρημένα αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών LARP (Tyr23, Phe35 και Phe55) και άλλα πέντε αρωματικά αμινοξέα (Tyr24, Phe25, Phe28, Trp46 και Phe65). Από αυτά τα Phe25 και Phe28 επηρεάζονται περισσότερο, καθώς εμφανίζουν τις μεγαλύτερες τιμές CSP, ενώ ακολουθούν τα Tyr24 και Phe65. Αυτά τα αμινοξικά κατάλοιπα εντοπίζονται στην περιοχή αλληλεπίδρασης του RNA που αναφέρθηκε παραπάνω. Επιπλέον, τα σήματα NH των αμινοξικών καταλοίπων Gln20 και Tyr23 εξαφανίζονται στο φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του RNA. Επίσης, βασικά αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία εντοπίζονται στις έλικες $\alpha 1$ (Lys9, Lys16, His19), $\alpha 1'$ (Arg32), $\alpha 2$ (Lys41) και στον $\beta 3$ -κλώνο (Lys88) παρουσιάζουν τιμές CSP μεγαλύτερες της τυπικής απόκλισης (standard deviation), αποδεικνύοντας ότι αυτά τα αμινοξέα είτε έρχονται σε άμεση επαφή με το RNA, είτε επηρεάζονται από τις αλλαγές στη διαμόρφωση που επάγονται από τη δέσμευση του RNA. Επιπροσθέτως, τα σήματα συντονισμού NH των αμινοξικών καταλοίπων που εξαφανίζονται μετά την προσθήκη του RNA (Πίνακας 29). Η χημική ανταλλαγή μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του συμπλόκου είναι από ενδιάμεση έως αργή (intermediate-slow exchange), ενώ η εκτιμώμενη τιμή της σταθεράς αποδέσμευσης K_d κυμαίνεται κάτω από 10^{-5} - 10^{-8}M .

Η περιοχή αλληλεπίδρασης του RNA στο hLaM απουσία του γειτονικού RRM1, που χαρτογραφήθηκε με βάση τα NMR δεδομένα είναι ίδια με την αντίστοιχη περιοχή αλληλεπίδρασης στο hLaM παρουσία του γειτονικού RRM1, όπως παρουσιάζεται από προηγούμενα δεδομένα (16, 19). Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, τα αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα Tyr23, Tyr24, Phe55 μαζί με τα Gln20, Asp33, Lys34, Lys54 και Arg57 του hLaM διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με το RNA (Εικόνα 151). Συγκρίνοντας τις περιοχές αλληλεπίδρασης του hLaM με το RNA παρουσία και χωρίς το RRM1 παρατηρούνται

μικρές διαφορές. Συγκεκριμένα, η περιοχή αλληλεπίδρασης του hLaM-RRM1 εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο επικρατειών. Απουσία του RRM1, περισσότερα αμινοξικά κατάλοιπα του hLaM επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση του RNA. Ειδικότερα, αμινοξικά κατάλοιπα που εντοπίζονται στον β 1-κλώνο και στο εσωτερικό της α 5-έλικας εμφανίζουν υψηλές τιμές CSP. Η διαφορά αυτή πιθανό να οφείλεται στην απουσία του hRRM1 που σταθεροποιεί το RNA στη σχηματιζόμενη διεπιφάνεια των επικρατειών hLaM και hRRM1.



Εικόνα 151: Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης του RNA στο hLaM παρουσία/απουσία του hRRM1.

ΣΤ.5.2. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας hRRM1 της πρωτεΐνης *human* La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

Η ικανότητα δέσμευσης του RNA στην επικράτεια hRRM1 της πρωτεΐνης *human* La εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του hRRM1 πριν και μετά την προσθήκη του συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου (polyU) σε αναλογία hRRM1 προς polyU 1:1, παρατηρήθηκε μεταβολή σε χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων (Πίνακας 30). Από αυτά προκύπτει ότι το hRRM1 αλληλεπιδρά με το polyU απουσία του γειτονικού hLaM. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενα πειραματικά δεδομένα (16, 18, 19, 24). Από την υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του hRRM1

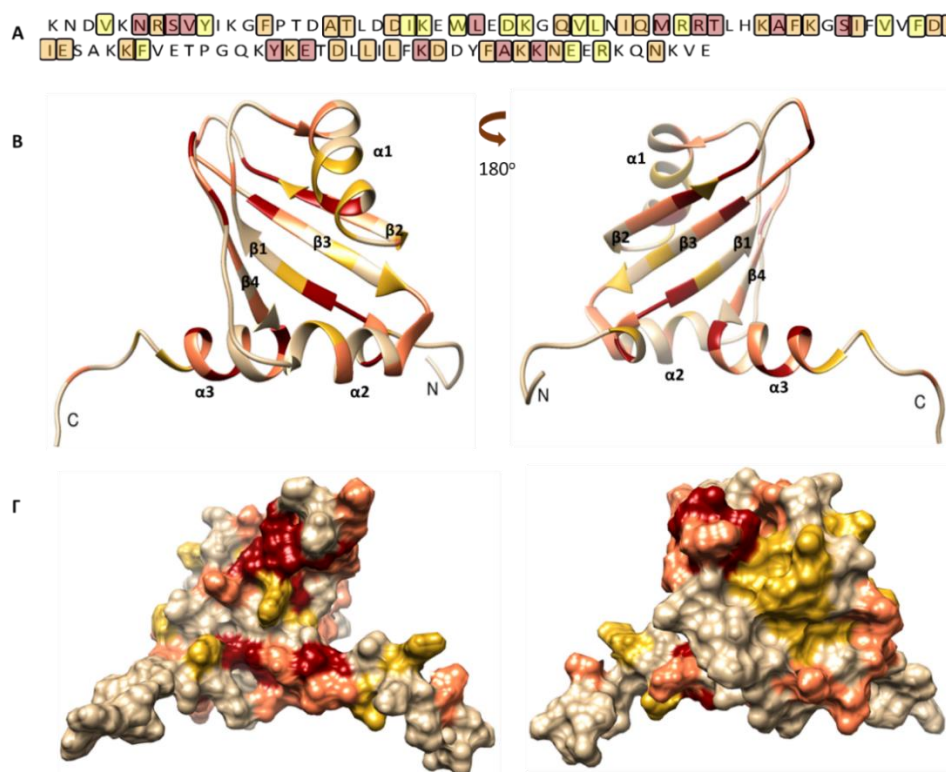
μετά από κάθε προσθήκη polyU προκύπτει ότι επικρατεί γρήγορη χημική ανταλλαγή (fast exchange) μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του συμπλόκου, δηλαδή η αλληλεπίδραση μεταξύ του hRRM1 και του polyU είναι ασθενής και η εκτιμώμενη τιμή της σταθεράς αποδέσμευσης K_d κυμαίνεται μεταξύ 10^{-3} - 10^{-6} M. Τα αμινοξικά κατάλοιπα του hRRM1 ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 κατηγορίες. Στην πρώτη ανήκουν τα αμινοξικά κατάλοιπα με μεταβολή $0,005 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,007$, στη δεύτερη $0,007 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,010$ και στην τρίτη η μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων είναι $0,010 \leq \Delta CS_{N-H}$ (Πίνακας 30), ενώ καμία κορυφή NH των αμινοξέων δεν εξαφανίζεται.

Πίνακας 30: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του hRRM1 ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1.

$0,005 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,007$	$0,007 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,010$	$0,010 \leq \Delta CS_{N-H}$	Εξαφάνιση των NH
Val108, Tyr114, Ile127, Lys128, Trp130, Asp133, Lys134, Val137, Leu138, Arg143, Val156, Phe158, Phe167, Glu194, Arg196	Arg111, Phe118, Ala122, Thr123, Asp126, Gln136, Ile140, Gln141, Lys148, Phe150, Lys151, Ile154, Asp159, Ser160, Ile161, Glu162, Lys166, Lys176, Asp179, Leu181, Leu183, Asp186, Phe189, Lys191, Asn193, Asn199	Asn110, Ser112, Val113, Leu131, Met142, Arg144, Thr145, Ala149, Ser153, Tyr175, Glu177, Lys185, Ala190, Lys192	

Οι περιοχές του hRRM1 που αλληλεπιδρούν περισσότερο με το polyU, δηλαδή αυτές που αποτελούνται από αμινοξέα με τις μεγαλύτερες τιμές CSP εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή που αποτελείται από θετικά φορτισμένα αμινοξέα και στα αρωματικά αμινοξέα των β -κλώνων. Συγκεκριμένα, στην πρόσδεση του RNA συμμετέχουν οι $\beta 2$ και $\beta 3$ -κλώνοι και ειδικότερα οι περιοχές προς τη $\beta 2\beta 3$ θηλιά, μαζί με τη $\beta 2\beta 3$ θηλιά, καθώς και μέρος του $\beta 4$ -κλώνου με την περιοχή της $\alpha 2\beta 4$ θηλιάς προς το $\beta 4$ -κλώνο. Επιπλέον, συμμετέχει η $\alpha 1$ -έλικα και μέρος της $\beta 1\alpha 1$ θηλιάς. Τέλος, στην αλληλεπίδραση με το RNA εμπλέκονται και περιοχές της $\alpha 2$ και $\alpha 3$ -έλικας καθώς και του $\beta 4$ -κλώνου (Εικόνα 152). Παρατηρείται ότι στη δέσμευση του polyU συμμετέχουν αρκετές περιοχές του hRRM1. Αυτό πιθανό να αποδίδεται σε μη ειδική πρόσδεση του RNA στο hRRM1 ή στο γεγονός ότι η μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις οφείλεται όχι μόνο σε απευθείας αλληλεπίδραση αλλά ότι αρκετά αμινοξικά κατάλοιπα επηρεάζονται από αλλαγές στη διαμόρφωση που επάγονται από τη δέσμευση του polyU σε άλλα αμινοξέα.

Τα συντηρημένα μοτίβα δέσμευσης του RNA, RNP1 και RNP2 εντοπίζονται στις περιοχές 151-KGSIFVVF-158 του $\beta 3$ -κλώνου και 113-VYIKGF-118 του $\beta 2$ -κλώνου αντίστοιχα. Οι περιοχές αυτές συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του hRRM1 με το polyU. Πιο συγκεκριμένα, η Val113 του RNP2 εμφανίζει υψηλές τιμές CSP (3^η κατηγορία), ενώ ακολουθεί η Phe118 (2^η κατηγορία) και η Tyr114 (1^η κατηγορία). Αντίστοιχα, για το RNP1, υψηλές τιμές CSP εμφανίζει η Ser153 (3^η κατηγορία), ενώ ακολουθούν τα αμινοξικά κατάλοιπα Lys151 και Ile154 (2^η κατηγορία) και τα Val156 και Phe158 (1^η κατηγορία). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση διαδραματίζουν τα αρωματικά αμινοξέα και ιδιαίτερα αυτά που εντοπίζονται στις θηλιές. Ειδικότερα, η Tyr175 της $\alpha 2\beta 4$ θηλιάς εμφανίζει υψηλές τιμές CSP και ακολουθούν η Phe150 της $\beta 2\beta 3$ θηλιάς και η Phe118 της $\beta 1\alpha 1$ θηλιάς. Τα αμινοξέα Tyr114 του $\beta 4$ -κλώνου και Phe158 του $\beta 3$ -κλώνου εμφανίζουν τιμές CSP μεγαλύτερες της τυπικής απόκλισης. Το ίδιο ισχύει και για την Trp130 της $\alpha 1$ -έλικας και της Phe167 της $\alpha 2$ -έλικας, ενώ υψηλές τιμές CSP εμφανίζει η Phe189 της $\alpha 3$ -έλικας.



Εικόνα 152: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου hRRM1 με το 5'-UUUUUUUUUU-3'-OH. Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στη δομή του hRRM1 καθώς και Γ. στην επιφάνεια του hRRM1. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,005 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,007$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,007 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,010$ και με κόκκινο οι $0,010 \leq \Delta CS_{N-H}$.

ΣΤ.5.3. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας hRRM2α της πρωτεΐνης *human* La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

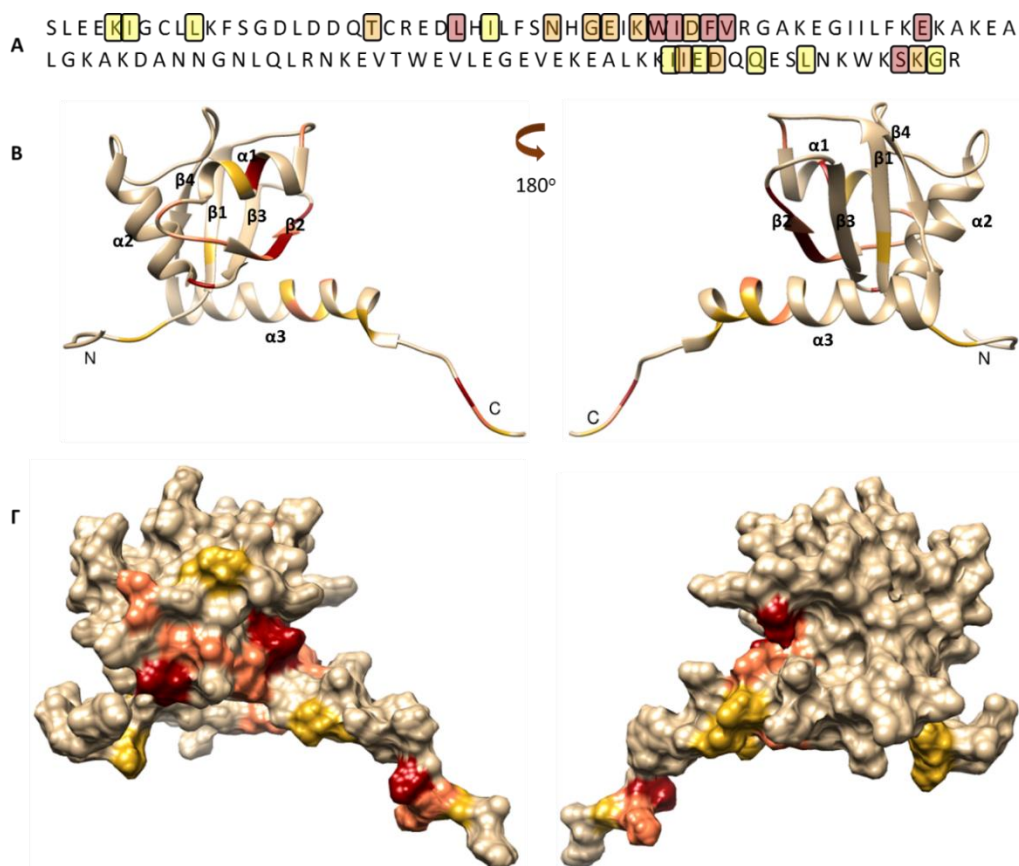
Η αλληλεπίδραση του hRRM2α της πρωτεΐνης *human* La με RNA εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Από την υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του hRRM2α πριν και μετά την προσθήκη του δεκαμερούς ολιγονουκλεοτιδίου (polyU) σε αναλογία hRRM2α προς polyU 1:1, παρατηρήθηκε μεταβολή σε χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων (Πίνακας 31). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το hRRM2α αλληλεπιδρά με το δεκαμερές ολιγονουκλεοτίδιο polyU, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με πειραματικά αποτελέσματα άλλων επιστημονικών ομάδων (16, 18, 19, 24). Τα αμινοξικά κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με RNA κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες ανάλογα με τη μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων: $0,008 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,012$, $0,012 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,018$ και $0,018 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$. Παρατηρείται ότι κανένα σήμα NH δεν εξαφανίζεται από το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του polyU. Από την υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY των διαδοχικών προσθηκών polyU, παρατηρείται ότι υπάρχει γρήγορη χημική ανταλλαγή μεταξύ του ελεύθερου hRRM2α και του συμπλόκου του με το polyU, Δηλαδή η αλληλεπίδραση του hRRM2α με το polyU είναι ασθενής, ενώ η εκτιμώμενη τιμή της σταθεράς αποδέσμευσης K_d κυμαίνεται μεταξύ 10^{-3} - 10^{-6}M .

Πίνακας 31: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του hRR2α ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1.

$0,008 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,012$	$0,012 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,018$	$0,018 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$	Εξαφάνιση των NH
Lys229, Ile230, Leu234, Ile251, Ile318, Glu320, Gln323, Leu326, Gly333	Lys229, Ile230, Leu234, Ile251, Ile318, Glu320, Gln323, Leu326, Gly333	Leu249, Trp261, Ile262, Phe264, Val265, Glu277, Ser331	

Μετά από χαρτογράφηση των περιοχών του hRRM2α που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το polyU, παρατηρείται ότι οι περιοχές με τις μεγαλύτερες τιμές CSP εντοπίζονται στο $\beta 2$ -κλώνο, στις $\alpha 1\beta 2$ και $\beta 2\alpha 3$ θηλιές, καθώς επίσης και στην $\alpha 1$ -έλικα και στο C-τελικό τμήμα της $\alpha 3$ -έλικας (Εικόνα 153). Η περιοχή αυτή είναι εντοπισμένη στην μία πλευρά του μορίου αυτού (Εικόνα 153Γ). Από τα συντηρημένα μοτίβα πρόσδεσης του RNA, RNP1 (270-EGILFK-276) και RNP2 (233-KFSGDL-

240) παρατηρείται ότι κανένα αμινοξικό κατάλοιπο δεν συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με το polyU. Επιπλέον, παρόλο που δε φέρει αρκετά αρωματικά αμινοξέα, από αυτά μόνο δύο συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το polyU. Συγκεκριμένα, η Trp261 και η Phe264 εμφανίζουν υψηλές τιμές CSP και εντοπίζονται στο β 2-κλώνο του hRRM2α κοντά στην α 3-έλικα. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το hRRM2α ενδέχεται να εμφανίζει ένα μηχανισμό επιλογής του RNA που προσδένει. Συγκεκριμένα, το RNA, όταν έρχεται σε πρώτη επαφή με το hRRM2α, αλληλεπιδρά με τις περιοχές που παρουσιάζονται στην περίπτωση αυτή. Παράλληλα, από τη θέση της α 3-έλικας φαίνεται ότι προστατεύονται οι κλασικές περιοχές αλληλεπίδρασης του RNA των μοτίβων RRM. Σε περίπτωση που η αλληλουχία του RNA, είναι η επιθυμητή για το hRRM2α είναι πιθανή η μετακίνηση της α 3-έλικας και η αποκάλυψη των περιοχών RNP1 και RNP2 για την αλληλεπίδρασή τους με το RNA.



Εικόνα 153: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου hRR2α με το 5'-UUUUUUUUUU-3'-OH. Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στη δομή του hRR2α καθώς και Γ. στην επιφάνεια του hRR2α. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,008 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,012$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,012 \leq \Delta CS_{N-H} < 0,018$ και με κόκκινο οι $0,018 \leq \Delta CS_{N-H}$.

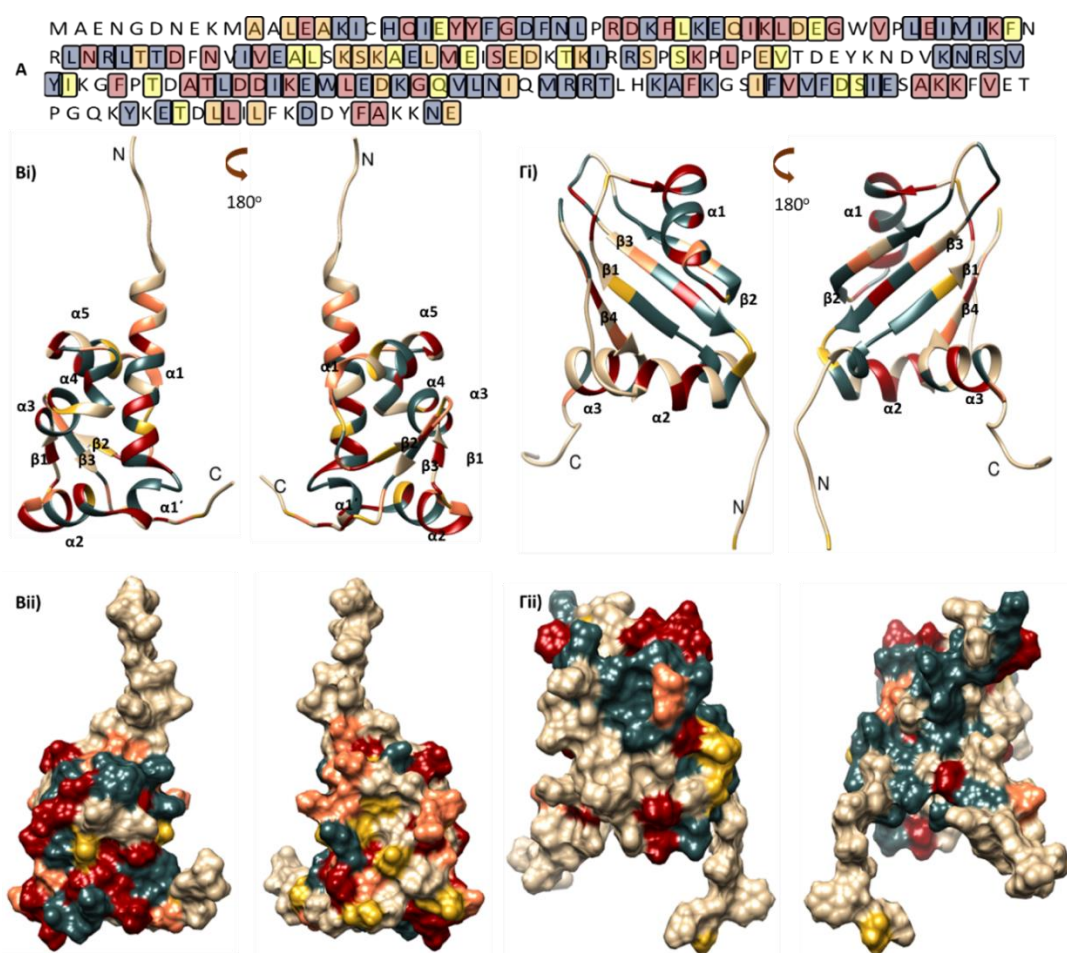
ΣΤ.5.4. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης της επικράτειας hLaM-RRM1 της πρωτεΐνης *human* La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU

Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του hLaM-RRM1 της πρωτεΐνης *human* La με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU εξετάστηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY του hLaM-RRM1 πριν και μετά από την προσθήκη του polyU σε αναλογία hLaM-RRM1 προς polyU 1:1, παρατηρήθηκε μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις αμινοξικών καταλοίπων και εξαφάνιση αρκετών κορυφών NH (Πίνακας 32). Αυτό σημαίνει ότι το hLaM-RRM1 αλληλεπιδρά με το συνθετικό δεκαμερές ολιγονουκλεοτίδιο polyU, γεγονός που ανταποκρίνεται στα πειραματικά αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών ομάδων (16, 18, 19, 24). Τα αμινοξέα, των οποίων η χημική τους μετατόπιση μεταβλήθηκε ήταν αρκετά και κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα αμινοξικά κατάλοιπα που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις κυμαίνεται $0,020 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,030$, η δεύτερη αυτά που οι χημικές τους μετατοπίσεις μεταβάλλονται $0,030 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,040$ και η τρίτη περιλαμβάνει αυτά που η μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις είναι $0,040 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$ (Πίνακας 32). Στον πίνακα αυτόν περιλαμβάνεται και μία επιπλέον κατηγορία με τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων τα σήματα NH εξαφανίζονται από το φάσμα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία hLaM-RRM1 προς polyU 1:1.

Πίνακας 32: Κατηγοριοποίηση των αμινοξικών καταλοίπων του hLaM-RRM1 ανάλογα με τη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία πρωτεΐνης προς polyU 1:1.

$0,020 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,030$	$0,030 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,040$	$0,040 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$	Εξαφάνιση των NH
Glu22, Leu36, Glu44, Phe55, Ala71, Leu72, Ala77, Glu81, Thr87, Ser94, Val100, Ile115, Thr120, Gln136, Asp159, Ser160, Thr178	Ala11, Leu13, Ala15, Gln39, Asp43, Thr62, Lys74, Ser75, Lys76, Leu79, Glu84, Asp85, Lys88, Ser92, Glu99, Asp133, Ile140, Ile154, Leu180, Leu183, Glu194	Glu14, Gln20, Tyr23, Tyr24, Gly26, Arg32, Asp33, Phe35, Ile40, Lys41, Leu42, Gly45, Val47, Glu50, Lys54, Asn59, Asp64, Asn66, Val69, Met80, Ser83, Lys95, Leu97, Phe118, Ala122, Thr123, Asp125, Asp126, Lys128, Leu131, Gly135, Phe150, Val156, Ala164, Lys165, Lys166, Val168, Leu181, Phe189, Ala190	Lys16, Ile17, His19, Ile21, Phe25, Asp27, Phe28, Asn29, Leu30, Lys34, Lys37, Glu38, Leu49, Ile51, Met52, Ile53, Leu58, Arg60, Leu61, Thr63, Ile68, Glu70, Glu78, Ile89, Arg91, Lys109, Asn110, Arg111, Ser112, Val113, Tyr114, Leu124, Ile127, Glu129, Trp130, Glu132, Lys134, Val137, Leu138, Asn139, Met142, Arg143, Arg144, Thr145, Lys148, Ala149, Lys151, Phe155, Val157, Phe158, Ile161, Glu162, Tyr175, Glu177, Asp186, Asn193

Η χαρτογράφηση των περιοχών που αλληλεπιδρούν με το polyU, δηλαδή οι περιοχές που περιλαμβάνουν αμινοξικά κατάλοιπα με τιμές CSP υψηλότερες της τυπική απόκλισης ή με σήματα NH που εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY, εντοπίζονται σε ολόκληρο το πολυπεπτίδιο hLaM-RRM1. Οι περιοχές, όμως, που υφίστανται εντονότερες αλλαγές μετά την πρόσδεση του polyU εντοπίζονται στην μία πλευρά του polyU, ενώ στην αντίθετη πλευρά τα αμινοξικά κατάλοιπα δεν υφίστανται τόσο έντονη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις (Εικόνα 154B). Επίσης, στο hRRM1 οι μεγαλύτερες αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων και κυρίως εξαφανίσεις των σημάτων NH στα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY εντοπίζονται στη μία πλευρά του hRRM1 και συγκεκριμένα προς την περιοχή της $\alpha 1$ -έλικας (Εικόνα 154Γ).



Εικόνα 154: Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του πολυπεπτιδίου hLaM-RRM1 με το 5'-UUUUUUUUU-3'-OH. Α. Αμινοξική αλληλουχία, στην οποία σημειώνονται τα αμινοξέα που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις. Β,Γ. Χαρτογράφηση των αμινοξέων που υφίστανται μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στη δομή του Βi).hLaM και Βii) hRRM1 καθώς και στην επιφάνειά τους, αντίστοιχα. Το μέγεθος της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων αποτυπώνεται με διαφορετικά χρώματα. Συγκεκριμένα, με κίτρινο χρωματίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις είναι $0,020 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,030$, με πορτοκαλί χρωματίζονται οι $0,030 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}} < 0,040$ και με κόκκινο οι $0,040 \leq \Delta\text{CS}_{\text{N-H}}$.

Η περιοχή του hLaM στο πολυπεπτίδιο hLaM-RRM1 που επηρεάζεται περισσότερο από την αλληλεπίδραση με το polyU αποτελείται από τις α -έλικες και συγκεκριμένα τις $\alpha 1$, $\alpha 1'$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ και $\alpha 5$ -έλικες, ενώ στην αλληλεπίδραση συμμετέχει και ο $\beta 1$ -κλώνος (Εικόνα 154Bi). Η κύρια περιοχή του hRRM1 που υφίσταται αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις αποτελείται από τους $\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 3$ -κλώνους, την $\alpha 1$ -έλικα τη $\beta 2\beta 3$ θηλιά, ενώ συμμετέχουν και τμήματα των $\alpha 2$ και $\alpha 3$ -ελίκων (Εικόνα 154Gi). Παρατηρείται ότι μεγάλο μέρος του πολυπεπτιδίου hLaM-RRM1 υφίσταται αλλαγές μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία hLaM-RRM1 προς polyU 1:1 και μάλιστα αρκετά σήματα NH των αμινοξέων εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY. Επιπλέον, μετά από υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{15}N 2D TROSY πριν από την πρώτη και μετά από κάθε προσθήκη του polyU προέκυψε ότι επικρατεί ενδιάμεση με αργή χημική ανταλλαγή (intermediate-slow exchange) μεταξύ της ελεύθερης πρωτεΐνης και του συμπλόκου με το polyU. Επομένως, η αλληλεπίδραση μεταξύ του hLaM-RRM1 με το polyU είναι ισχυρή και η σταθερά αποδέσμευση K_d εκτιμάται ότι είναι μικρότερη από 10^{-9}M . Επίσης, φαίνεται ότι οι δύο επικράτειες hLaM και hRRM1 συνεργάζονται ώστε να επιτευχθεί ισχυρότερη πρόσδεση του polyU σε σχέση με τις μεμονωμένες επικράτειες.

Τα αρωματικά αμινοξέα και των δύο επικρατειών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του hLaM-RRM1 με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU. Ειδικότερα, τα αρωματικά αμινοξέα του hLaM Tyr23, Tyr24 ($\alpha 1$ -έλικα, 3^η κατηγορία), Phe35 ($\alpha 2$ -έλικα, 3^η κατηγορία) και Phe55 ($\alpha 3$ -έλικα, 1^η κατηγορία) παρουσιάζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης, ενώ τα σήματα NH των αμινοξέων His19, Phe25 ($\alpha 1$ -έλικα) και Phe28 ($\alpha 1'$ -έλικα) εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY. Τα αμινοξέα Trp46 και Phe65 δε συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το polyU και εντοπίζονται στην αντίθετη πλευρά του hLaM από την κλασική περιοχή της αλληλεπίδρασης του RNA. Όσον αφορά στα αμινοξέα του hRRM1 του πολυπεπτιδίου hLaM-RRM1, τα αμινοξέα Phe118 ($\beta 1\alpha 1$ θηλιά, 3^η κατηγορία), Phe150 ($\beta 2\beta 3$ θηλιά, 3^η κατηγορία) και Phe189 ($\alpha 3$ -έλικα, 3^η κατηγορία) εμφανίζουν αρκετά υψηλές τιμές CSP. Επιπλέον, τα σήματα NH των αμινοξέων Tyr114 ($\beta 1$ -κλώνος), Trp130 ($\alpha 1$ -έλικα), Phe158 ($\beta 3$ -κλώνος) εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY. Για τα αμινοξέα Trp102, His147 και Tyr188 δεν υπάρχουν πληροφορίες στα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY, ενώ η Phe167 και Phe184 δε συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση.

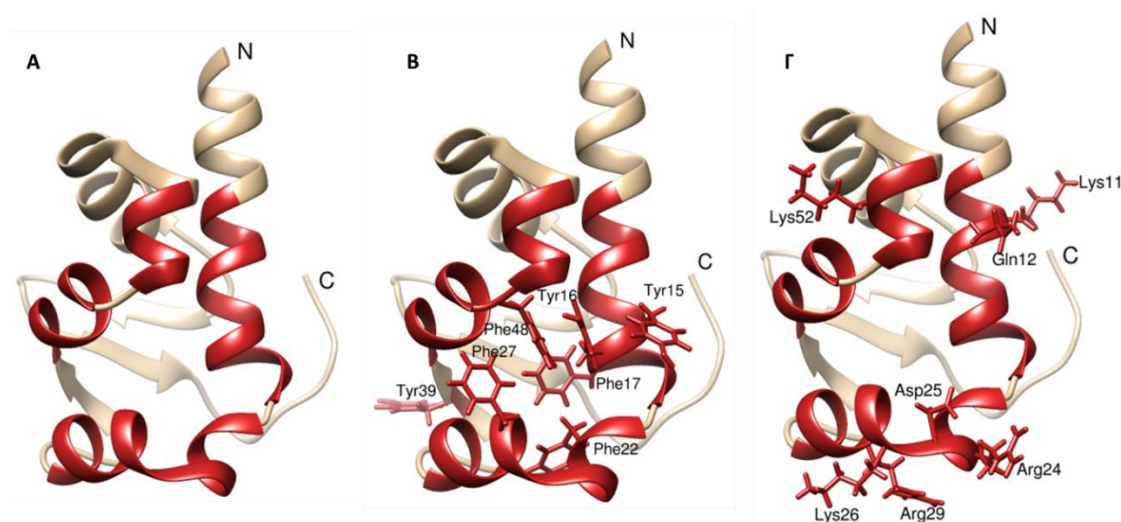
Επιπλέον, αρκετά από τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα υφίστανται μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του polyU. Τα περισσότερα από αυτά εντοπίζονται στο hLaM και μάλιστα στις $\alpha 1$, $\alpha 1'$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ και $\alpha 4$ -έλικες, δηλαδή στην κλασική περιοχή αλληλεπίδρασης του LaM. Το ίδιο συμβαίνει και με τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα της $\beta 2\beta 3$ θηλιάς του hRRM1. Επομένως, είναι πιθανό το RNA να κατευθύνεται στην σχηματιζόμενη διεπιφάνεια των επικρατειών LaM και RRM1.

Επιπροσθέτως, όλα τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών LARP υφίστανται μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις. Συγκεκριμένα, τα Gln20, Tyr23, Tyr24 ($\alpha 1$ -έλικα, 3^η κατηγορία), Asp33 ($\alpha 2$ -έλικα, 3^η κατηγορία) και Phe55 ($\alpha 3$ -έλικα, 1^η κατηγορία) εμφανίζουν τιμές CSP υψηλότερες της τυπικής απόκλισης, ενώ η κορυφή NH της Lys34 εξαφανίζεται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του polyU σε αναλογία hLaM-RRM1 προς polyU 1:1. Εξίσου σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και τα συντηρημένα μοτίβα πρόσδεσης RNA, RNP1 (151-KGSIFVVF-158) και RNP2 (113-VYIKGF-118) στην πρόσδεση του polyU στο hRRM1 του πολυπεπτιδίου hLaM-RRM1. Ειδικότερα, τα αμινοξέα Ile154 ($\beta 3$ -κλώνος, 2^η κατηγορία) και Val156 ($\beta 3$ -κλώνος, 3^η κατηγορία) του RNP1 εμφανίζουν υψηλές τιμές CSP. Οι κορυφές NH των αμινοξέων Lys151, Phe155, Val157 και Phe158 του RNP1 εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY μετά την προσθήκη του polyU. Επίσης, οι τιμές CSP των αμινοξέων Ile115 (1^η κατηγορία) και Phe118 (3^η κατηγορία) του RNP2 είναι υψηλότερες της τυπικής απόκλισης, ενώ τα σήματα NH των Val113 και Tyr114 εξαφανίζονται από τα φάσματα ^1H - ^{15}N 2D TROSY.

ΣΤ.6. Συγκριτική ανάλυση της αλληλεπίδρασης των επικρατειών της πρωτεΐνης La με RNA.

Το LaM της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* ως απομονωμένη επικράτεια βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τρία διαφορετικά μόρια RNA μετά από μελέτη που πραγματοποιήθηκε με τη Φασματοσκοπία NMR. Συγκεκριμένα, το LaM αλληλεπιδράσε με το pre-tRNA_{Arg}, το pre-tRNA_{Ser}, αλλά και με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο polyU. Η αλληλεπίδραση του συγκεκριμένου πολυπεπτιδίου με το pre-tRNA_{Arg} μελετήθηκε, εκτός από τη Φασματοσκοπία NMR, με EMSA και MST.

Με τις τρεις διαφορετικές τεχνικές αποδεικνύεται η αλληλεπίδραση του LaM με το pre-tRNA_{Arg}, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες αλληλεπίδρασης του LaM με διάφορα μόρια RNA. Μάλιστα, το LaM είτε του *Dictyostelium discoideum* είτε του ανθρώπινου όταν αλληλεπιδρά με RNA ως απομονωμένο πολυπεπίδιο εμφανίζει μία συγκεκριμένη περιοχή αλληλεπίδρασης του RNA (Εικόνα 155Α). Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει τις $\alpha 1$, $\alpha 1'$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ και $\alpha 4$ -έλικες, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις συμμετέχει και ο $\beta 1$ -κλώνος. Η περιοχή αυτή αποτελείται από αρκετά αρωματικά και από θετικά αμινοξέα που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις με το RNA. Συγκεκριμένα, τα αρωματικά αμινοξέα που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις με το RNA είναι τα Tyr15, Tyr16, Phe17, Phe22, Phe27 και Phe48 (Εικόνα 155Β, ακολουθείται η αρίθμηση του *Dictyostelium discoideum*), ενώ τα θετικά φορτισμένα είναι τα Lys11, Arg24, Lys26, Arg29 και Lys52 (Εικόνα 155Γ). Σε αυτά προστίθενται και τα αμινοξέα Gln12 και Asp25 που ανήκουν στα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών LARP και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση του RNA στο LaM.



Εικόνα 155: NMR δομή του LaM του *Dictyostelium discoideum*, όπου απεικονίζονται Α. η περιοχή αλληλεπίδρασης του RNA με κόκκινο, Β. τα συντηρημένα αρωματικά αμινοξέα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με το RNA και Γ. τα συντηρημένα θετικά αμινοξέα και τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών LARP που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το RNA.

Το πολυπεπίδιο RRM1, τόσο του *Dictyostelium discoideum* όσο και του *human*, ως απομονωμένη επικράτεια, αλληλεπιδρά με RNA, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενα πειραματικά αποτελέσματα. Όσον αφορά στο RRM1 του *Dictyostelium discoideum*, η αλληλεπίδρασή του με το pre-tRNA_{Arg} έχει επιβεβαιωθεί

όχι μόνο με Φασματοσκοπία NMR, αλλά και με EMSA και MST. Οι περιοχές του dRRM1 που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το polyU και με το pre-tRNA_{Arg} εντοπίζονται κυρίως στους $\beta 1$ και $\beta 3$ -κλώνους και στις $\beta 2\beta 3$ και $\beta 1\alpha 1$ θηλιές. Ωστόσο, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα και ιδιαίτερα αυτό με το polyU σχηματίζουν ίζημα από την πρώτη προσθήκη, γεγονός που υποδηλώνει ότι το σύμπλοκο που σχηματίζει το πολυπεπίδιο με το RNA είναι ισχυρό. Ενδεχομένως, εξαιτίας του σχηματιζόμενου ιζήματος να μην αποτυπώνονται όλες οι αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις στο dRRM1. Περισσότερα αμινοξέα φαίνεται να επηρεάζονται στο human RRM1 μετά την προσθήκη του polyU, συμπεριλαμβανόμενων και των αμινοξέων που εντοπίζονται στους $\beta 1$, $\beta 3$ -κλώνους και στις $\beta 2\beta 3$ και $\beta 1\alpha 1$ θηλιές. Από αυτό προκύπτει ότι είναι δυνατόν να αντικατοπτρίζονται καλύτερα στο hRRM1 οι αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις μετά την προσθήκη του polyU.

Το πολυπεπίδιο LaM-RRM1, είτε του *Dictyostelium discoideum*, είτε του *human*, συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με RNA μέσω αρκετών αμινοξέων, τα οποία υφίστανται μεταβολή στις χημικές τους μετατοπίσεις. Συγκεκριμένα, περισσότερα αμινοξικά κατάλοιπα υφίστανται μεγαλύτερη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις στο LaM-RRM1 σε σύγκριση με αυτά που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις με τα αντίστοιχα μόρια RNA των επιμέρους επικρατειών LaM, RRM1. Επομένως οι επικράτειες LaM και RRM1 δρουν συνεργατικά με στόχο την ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το RNA. Η περιοχή αλληλεπίδρασης του LaM του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1 τόσο στο *Dictyostelium discoideum* όσο και στο *human* LaM-RRM1 με οποιοδήποτε μόριο RNA (pre-tRNA_{Arg} ή polyU) παραμένει ίδια με αυτήν του μεμονωμένου πολυπεπτιδίου LaM. Αντίθετα, στο RRM1 εντοπίζονται αλλαγές σε πλήθος αμινοξέων πολύ περισσότερων σε αριθμό αλλά και με υψηλότερη μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις που υφίστανται σε σύγκριση με το μεμονωμένο RRM1. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στη διαφορετική διευθέτηση των δύο επικρατειών στο χώρο παρουσία του RNA. Ειδικότερα, οι δύο επικράτειες μπορεί να σχηματίζουν ένα V παρουσία του RNA, σχηματίζοντας μία σχισμή δέσμησης στη διεπαφή μεταξύ των δύο επικρατειών, η οποία να προσαρμόζεται στο στόχο, όπως περιγράφεται στις κρυσταλλικές δομές του hLaM-RRM1 παρουσία ενός ολιγονουκλεοτιδίου, που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων PDB. Στην περίπτωση των δομών της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, αλλά και στην δική μας μελέτη, αρκετά αμινοξέα είναι δυνατόν να συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή. Τα αμινοξέα Gln12, Tyr15,

Tyr16, Asp25, Phe27, Phe48 του LaM, μαζί με αμινοξέα της πρώτης στροφής της $\alpha 1$ -έλικας και του $\beta 2$ -κλώνου του RRM1, είναι δυνατόν να δημιουργήσουν δεσμούς με το U2 του RNA, όπως για παράδειγμα συμβαίνει με το αντίστοιχο πολυπεπτίδιο της *human* La με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, όπου τα άτομα O2 και O4 του πυριμιδινικού δακτυλίου του U2 σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας του Gln20 (LaM) και τη αμινομάδα της Ile140 (RRM1) (17). Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο μπορεί να διαδραματίσει το Asp25, καθώς μπορεί να αλληλεπιδράσει με ομάδες 2'-OH ή με την 3'-OH της τελικής ριβόζης (17). Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο $\beta 2$ -κλώνος, η $\alpha 1$ -έλικα, ενώ η $\beta 2\beta 3$ θηλιά στρέφεται ανάποδα σε σχέση με την ελεύθερη δομή του dLaM-RRM1. Το θετικό φορτίο της $\beta 2\beta 3$ θηλιάς σε συνδυασμό με αυτήν την κίνησή της ενδεχομένως να καθοδηγεί το RNA στη σωστή θέση, στη σχηματιζόμενη σχισμή ανάμεσα στους δύο τομείς. Με αυτόν τον τρόπο το RNA «αγκαλιάζεται» από την επιφάνεια αλληλεπίδρασης του LaM και τους β -κλώνους του RRM1 που έρχονται κοντά σε αυτό.

Το πολυπεπτίδιο RRM2α, είτε του *Dictyostelium discoideum*, είτε του *human*, παρουσία του polyU, παρουσιάζει μικρή μεταβολή στις χημικές μετατοπίσεις των αμινοξέων που εντοπίζονται κυρίως στο $\beta 2$ -κλώνο, στην $\alpha 1$ -έλικα και σε τμήμα της $\alpha 3$ -έλικας. Παρουσία όμως του pre-tRNA_{Arg}, το dRRM2α παρουσιάζει μεταβολή σε χημικές μετατοπίσεις περισσότερων αμινοξικών καταλοίπων. Τα αμινοξέα αυτά εντοπίζονται στις ίδιες περιοχές που επηρεάζονται στο RRM2α με το polyU, αλλά σε αυτές προστίθενται και τμήματα των $\beta 1$ και $\beta 3$ -κλώνων καθώς και το μεγαλύτερο τμήμα της $\alpha 3$ -έλικας. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην έλλειψη της εκλεκτικότητας ως προς το UUU-3'-OH και σε πιθανή αλληλεπίδραση του RRM2α με άλλη περιοχή του pre-tRNA_{Arg}. Κατά την αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου dRRM1-RRM2α με το pre-tRNA_{Arg} το dRRM2α εμφανίζει διαφορετική συμπεριφορά σε σύγκριση με την αλληλεπίδραση του dRRM2α ως μεμονωμένο πολυπεπτίδιο με το pre-tRNA_{Arg}. Τα αμινοξέα που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του dRRM2α με το pre-tRNA_{Arg} είναι αρκετά και εντοπίζονται σε όλο το μόριο με υψηλότερες τιμές CSP στα αμινοξέα των β -κλώνων. Είναι πιθανόν το πολυπεπτίδιο dRRM1-RRM2α να μην εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς το UUU-3'-OH εξαιτίας της απουσίας του LaM. Με αυτόν τον τρόπο, τα RRM1 και RRM2α του πολυπεπτιδίου dRRM1-RRM2α μπορεί να λειτουργούν σαν διαδοχικά RRM και η εκλεκτικότητα του πολυπεπτιδίου αυτού ως προς το RNA που προσδένει να είναι διαφορετική. Αυτό ενδεχομένως να

αποδεικνύεται με την αλληλεπίδραση του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1-RRM2α με το pre-tRNA_{Arg}. Ειδικότερα, οι περιοχές που επηρεάζονται από την προσθήκη του pre-tRNA_{Arg} εντοπίζονται κυρίως στο LaM-RRM1 και είναι ίδιες με αυτές του μεμονωμένου dLaM-RRM1 όταν αλληλεπιδρά με το pre-tRNA_{Arg}. Το dRRM2α του πολυπεπτιδίου dLaM-RRM1-RRM2α συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με το pre-tRNA_{Arg}, αλλά η περιοχή αλληλεπίδρασής του δεν είναι τόσο εκτεταμένη όσο στην περίπτωση του dRRM1-RRM2α. Οι περιοχές του dRRM2α του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1-RRM2α που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή εντοπίζονται κυρίως στο β1 και στο β2-κλώνο, στην πρώτη στροφή της α3-έλικας και σε τμήματα των β2β3 και β1α1 θηλιών. Η περιοχή αλληλεπίδρασης του RRM2α ως μέρος του πολυπεπτιδίου LaM-RRM1-RRM2α με το pre-tRNA_{Arg} είναι αντίστοιχης με αυτή που επηρεάζεται από την ίδια αλληλεπίδραση όταν το RRM2α είναι μεμονωμένο πολυπεπτίδιο. Σημαντικό ρόλο στην επιλογή του RNA που θα προσδεθεί στο RRM2α πιθανόν να διαδραματίζει η α3-έλικα, η οποία όταν εντοπίζεται κοντά στους β-κλώνους προστατεύει τα αρωματικά αμινοξέα και τις περιοχές αλληλεπίδρασης του RNA και εμποδίζει την πρόσδεση του RNA. Στην περίπτωση που το RNA επιλέγεται να προσδεθεί στις περιοχές, αυτές τότε η α3-έλικα είναι δυνατόν να απομακρύνεται από τους β-κλώνους και να απελευθερώνονται οι περιοχές αλληλεπίδρασης του RNA.

Πίνακας 33: Συνολική ανάλυση της αλληλεπίδρασης των επικρατειών της πρωτεΐνης La με RNA.

Επικράτεια	pre-tRNA _{Arg}	pre-tRNA _{Ser}	polyU	Method			Εκτιμώμενο K_d	Ενότητα
				NMR	MST	EMSA		
dLaM			✓	✓			10 ⁻⁶ -10 ⁻⁹ M	ΣΤ.2.1
dRRM1			✓	✓			10 ⁻⁵ -10 ⁻⁸ M	ΣΤ.2.2
dRRM2α			✓	✓			10 ⁻³ -10 ⁻⁶ M	ΣΤ.2.3
dLaM-RRM1			✓	✓			≤10 ⁻⁹ M	ΣΤ.2.4
dLaM	✓			✓	✓	✓	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁹ M	ΣΤ.3.1
dRRM1	✓			✓	✓	✓	10 ⁻³ -10 ⁻⁶ M	ΣΤ.3.2
dRRM2α	✓			✓			10 ⁻³ -10 ⁻⁶	ΣΤ.3.3
dLaM-RRM1	✓			✓	✓	✓	≤10 ⁻⁹ M	ΣΤ.3.4
dRRM1-RRM2α	✓			✓			10 ⁻⁶ -10 ⁻⁹ M	ΣΤ.3.5
dLaM-RRM1-RRM2α	✓			✓			≤10 ⁻⁹ M	ΣΤ.3.6
dLaM		✓		✓			10 ⁻³ -10 ⁻⁶ M	ΣΤ.4
hLaM			✓	✓			10 ⁻⁵ -10 ⁻⁸ M	ΣΤ.5.1
hRRM1			✓	✓			10 ⁻³ -10 ⁻⁶ M	ΣΤ.5.2
hRRM2α			✓	✓			10 ⁻³ -10 ⁻⁶ M	ΣΤ.5.3
hLaM-RRM1			✓	✓			≤10 ⁻⁹ M	ΣΤ.5.4

ΣΤ.7. Εφαρμογή της τμηματικής επισήμανσης στο πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum*

Η τεχνική της τμηματικής επισήμανσης επιλέχθηκε για να εφαρμοστεί στην πρωτεΐνη La, καθώς η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από διακριτές επικράτειες, γεγονός που καθιστά την εφαρμογή αυτής της τεχνικής ιδανική. Το εργαστήριο του καθηγητή F. Allain, ETH (<http://www.allainlab.ethz.ch/>) που επιλέχθηκε ειδικεύεται στην εφαρμογή αυτής της τεχνικής και μάλιστα σε διαδοχικά RRM, όπως στην περίπτωση του RRM1-RRM2α. Για την επιτυχή εφαρμογή της τεχνικής της τμηματικής επισήμανσης στο πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* πραγματοποιήθηκαν διαφορετικά πειράματα έκφρασης και απομόνωσης του πολυπεπτιδίου. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκαν διαφορετικά πειράματα (Πίνακας 34) που είχαν ως στόχο να διαπιστωθεί, αρχικά, η αιτία της μη-σωστής αναδίπλωσης του RRM2α στο χώρο παρουσία του RRM1 και στη συνέχεια για την καταγραφή των φασμάτων NMR.

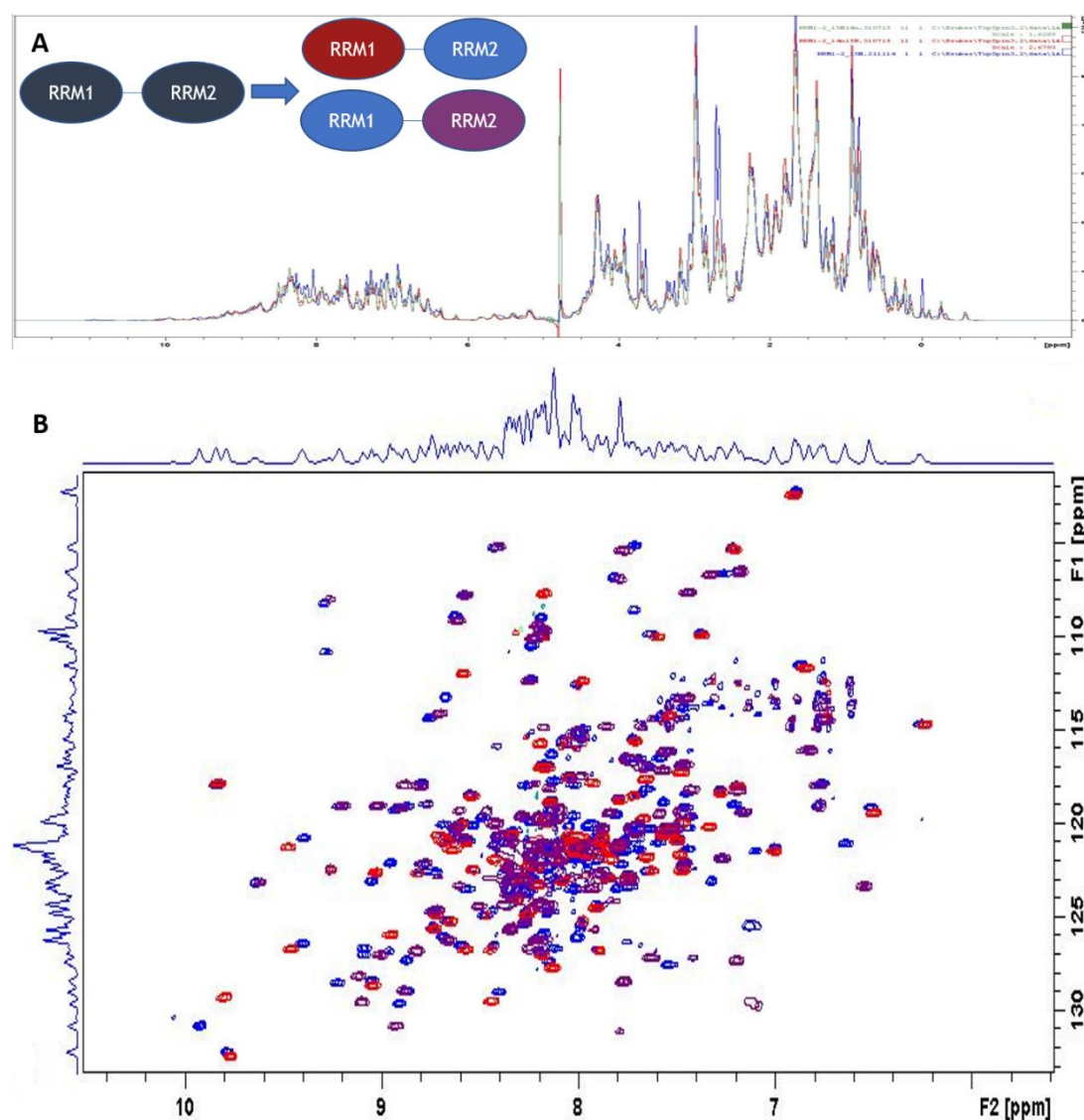
Πίνακας 34: Καταγραφή όλων των δειγμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του F. Allain με σχόλια ως προς την αναδίπλωσή τους.

δείγμα	καθορισμένη δομή/μη αναδιπλωμένο	σύγκριση με το φάσμα αναφοράς
¹⁵ N- RRM1	καθορισμένη δομή	-
{ ¹⁵ N-RRM1}-{ ¹⁴ N-RRM2α}	καθορισμένη δομή	ίδιο
{ ¹⁴ N-RRM1}-{ ¹⁵ N-RRM2α}	μη αναδιπλωμένο	ίδιο
{ ¹⁴ N-RRM1}-{ ¹⁵ N-RRM2α}+20mM DTT (στο τελικό διάλυμα)	μερικώς αναδιπλωμένο	-
{ ¹⁵ N-RRM1}-{ ¹⁴ N-RRM2α}+50mM DTT (κατά τη διάρκεια της απομόνωσης)	καθορισμένη δομή	ίδιο
{ ¹⁴ N-RRM1}-{ ¹⁵ N-RRM2α}+50mM DTT (κατά τη διάρκεια της απομόνωσης)	μερικώς αναδιπλωμένο	-
¹⁵ N-RRM2α +50μM TCEP (κατά τη διάρκεια της συνένωσης παρουσία του MESNA)	μη αναδιπλωμένο	-
¹⁵ N-RRM2α+100μM TCEP	μη αναδιπλωμένο	-

(κατά τη διάρκεια της συνένωσης παρουσία του MESNA)		
¹⁵ N-RRM2α+250μM TCEP (κατά τη διάρκεια της συνένωσης παρουσία του MESNA)	μερικώς αναδιπλωμένο	-
¹⁵ N-RRM2α+500μM TCEP (κατά τη διάρκεια της συνένωσης παρουσία του MESNA)	μερικώς αναδιπλωμένο	-
{ ¹⁵ N-RRM1}-{ ¹⁴ N-RRM2α C1C2->A1A2}	καθορισμένη δομή	ίδιο
{ ¹⁴ N-RRM1}-{ ¹⁵ N-RRM2α C1C2->A1A2}	καθορισμένη δομή	ίδιο
{ ¹⁵ N-RRM2α C1C2->A1A2}	καθορισμένη δομή	-
{ ¹⁵ N-RRM1}-{ ¹⁴ N-linker RRM2α }	μη αναδιπλωμένο	ίδιο
{ ¹⁴ N-RRM1}-{ ¹⁵ N-linker RRM2α }	μη αναδιπλωμένο	ίδιο
¹⁵ N-linker RRM2α	μη αναδιπλωμένο	-
{ ¹⁵ N-RRM1}-{ ¹⁴ N-linker RRM2α, C1C2->A1A2}	καθορισμένη δομή	ίδιο
{ ¹⁴ N-RRM1}-{ ¹⁵ N-linker RRM2α, C1C2->A1A2}	καθορισμένη δομή	ίδιο
¹⁵ N-linker RRM2α, C1C2->A1A2	καθορισμένη δομή	-

Από τα φάσματα ¹H-¹⁵N-HSQC των παραπάνω δειγμάτων παρατηρήθηκε ότι το πολυπεπίδιο RRM1 παρουσία ή απουσία του RRM2α δεν επηρεάζεται από την εφαρμογή του πρωτοκόλλου απομόνωσης της τμηματικής επισήμανσης, παρόλο που μετά από σύγκριση του RRM1 που απομονώθηκε με τον κλασικό τρόπο εντοπίζονται μικρές διαφορές. Αντίθετα, το RRM2α εμφανίζεται ως μη-δομημένο μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου σύζευξης με το RRM1. Μετά από κατεργασία των δειγμάτων με αναγωγικά μέσα (DTT, TCEP) παρατηρήθηκε ότι το RRM2α αναδιπλώνεται μερικώς και εμφανίζει ορισμένα στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Την ίδια εικόνα παρουσιάζει το RRM2α παρουσία ή απουσία τόσο του συνδέτη μεταξύ του RRM1 και του RRM2α, όσο και της επικράτειας RRM1. Από αυτά προέκυψε ότι για τη μη-σωστή αναδίπλωση του RRM2α στο χώρο ευθύνεται η επίδραση του αντιδραστηρίου MESNA (χρησιμοποιείται για τη σύζευξη μεταξύ των δύο επικρατειών) όχι μόνο στην επιπλέον Cys που προστίθεται ανάμεσα στις δύο επικράτειες αλλά και στις Cys233 και Cys278 που υπάρχουν στην φυσική ακολουθία του RRM2α. Επίσης, η έλλειψη στοιχείων δευτεροταγούς δομής του RRM2α δεν οφείλεται στην έλλειψη χώρου που δημιουργείται εξαιτίας της απουσίας του συνδέτη

μεταξύ των δύο επικρατειών. Από τα φάσματα ^1H - ^{15}N -HSQC των δειγμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί οι μεταλλάξεις των Cys σε Ala παρατηρείται ότι το πολυπεπίδιο RRM2α διατηρεί τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Επιπλέον, η ύπαρξη του συνδέτη μεταξύ των επικρατειών δε διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην αναδίπλωση των δύο επικρατειών. Επομένως, αφού προετοιμάστηκαν τα δείγματα $\{^{15}\text{N}\text{-RRM1}\}\text{-}\{^{14}\text{N}\text{-linker RRM2}\alpha, \text{C1C2}\rightarrow\text{A1A2}\}$ και $\{^{14}\text{N}\text{-RRM1}\}\text{-}\{^{15}\text{N}\text{-linker RRM2}\alpha, \text{C1C2}\rightarrow\text{A1A2}\}$ συλλέχθηκαν τα απαραίτητα δεδομένα NMR.



Εικόνα 156:Υπέρθεση των φασμάτων A. 1D και B. ^1H - ^{15}N -HSQC των δειγμάτων $^{15}\text{N}\text{-RRM1}\text{-RRM2}\alpha$, $\{^{15}\text{N}\text{-RRM1}\}\text{-}\{^{14}\text{N}\text{-linker RRM2}\alpha, \text{C1C2}\rightarrow\text{A1A2}\}$ και $\{^{14}\text{N}\text{-RRM1}\}\text{-}\{^{15}\text{N}\text{-linker RRM2}\alpha, \text{C1C2}\rightarrow\text{A1A2}\}$.

Μετά από υπέρθεση των φασμάτων ID και ^1H - ^{15}N -HSQC των δειγμάτων ^{15}N -RRM1-RRM2α, $\{^{15}\text{N}$ -RRM1 $\}$ - $\{^{14}\text{N}$ -linker RRM2α, C1C2->A1A2 $\}$ και $\{^{14}\text{N}$ -RRM1 $\}$ - $\{^{15}\text{N}$ -linker RRM2α, C1C2->A1A2 $\}$, παρατηρείται ότι η εφαρμογή της μεθόδου της τμηματικής επισήμανσης για το πολυπεπτίδιο RRM1-RRM2α ήταν επιτυχής, καθώς τα φάσματα ID και των τριών δειγμάτων σχεδόν ταυτίζονται και τα φάσματα ^1H - ^{15}N -HSQC των $\{^{15}\text{N}$ -RRM1 $\}$ - $\{^{14}\text{N}$ -linker RRM2α, C1C2->A1A2 $\}$ και $\{^{14}\text{N}$ -RRM1 $\}$ - $\{^{15}\text{N}$ -linker RRM2α, C1C2->A1A2 $\}$ συμπληρώνουν το φάσμα του δείγματος ^{15}N -RRM1-RRM2α. Από αυτά προκύπτει ότι και τα τρία πολυπεπτίδια αποτελούνται και από τις δύο επικράτειες, ενώ σε κάθε περίπτωση επισημαίνεται με ^{15}N μία μόνο επικράτεια. Με αυτόν τον τρόπο τα φάσματα ^1H - ^{15}N -HSQC απλοποιούνται και καθίσταται εφικτή η δομική μελέτη του πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α με τη φασματοσκοπία NMR. Μικρές διαφορές στα φάσματα αυτά οφείλονται στις μεταλλάξεις των Cys223 και Cys278 σε Ala, καθώς και στην επιπλέον Cys μεταξύ των δύο επικρατειών. Με εφαρμογή της μεθόδου αυτής με ^{13}C επισήμανση, είναι δυνατή η λήψη τριπυρηνικών φασμάτων για την επίλυση της δομής του πολυπεπτιδίου RRM1-RRM2α. Τέλος, είναι εφικτή η εφαρμογή της τεχνικής αυτής σε μεγαλύτερα πολυπεπτίδια της πρωτεΐνης La του *Dictyostelium discoideum* ή της ανθρώπινης πρωτεΐνης La όπως στο πολυπεπτίδιο LaM-RRM1-RRM2α ή και σε ολόκληρη την πρωτεΐνη.

Ενότητα Z
Βιβλιογραφία

Z. Βιβλιογραφία

1. Bousquet-Antonelli C, Deragon JM. A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *Rna*. 2009;15(5):750-64.
2. Maraia RJ, Mattijssen S, Cruz-Gallardo I, Conte MR. The La and related RNA-binding proteins (LARPs): structures, functions, and evolving perspectives. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2017;8(6).
3. Bayfield MA, Yang R, Maraia RJ. Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1799(5-6):365-78.
4. Eichhorn CD, Chug R, Feigon J. hLARP7 C-terminal domain contains an xRRM that binds the 3' hairpin of 7SK RNA. *Nucleic acids research*. 2016;44(20):9977-89.
5. Lahr RM, Mack SM, Heroux A, Blagden SP, Bousquet-Antonelli C, Deragon JM, et al. The La-related protein 1-specific domain repurposes HEAT-like repeats to directly bind a 5'TOP sequence. *Nucleic acids research*. 2015;43(16):8077-88.
6. Zhang Y, Stefanovic B. LARP6 Meets Collagen mRNA: Specific Regulation of Type I Collagen Expression. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(3):419.
7. Mattijssen S, Arimbasseri AG, Iben JR, Gaidamakov S, Lee J, Hafner M, et al. LARP4 mRNA codon-tRNA match contributes to LARP4 activity for ribosomal protein mRNA poly(A) tail length protection. *eLife*. 2017;6.
8. Stavrika C, Blagden S. The La-Related Proteins, a Family with Connections to Cancer. *Biomolecules*. 2015;5(4):2701-22.
9. Maris C, Dominguez C, Allain FH. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *The FEBS journal*. 2005;272(9):2118-31.
10. Dreyfuss G, Swanson MS, Pinol-Roma S. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends in biochemical sciences*. 1988;13(3):86-91.
11. Liu X, Niu C, Ren J, Zhang J, Xie X, Zhu H, et al. The RRM domain of human fused in sarcoma protein reveals a non-canonical nucleic acid binding site. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1832(2):375-85.
12. Afroz T, Skrisovska L, Belloc E, Guillen-Boixet J, Mendez R, Allain FH. A fly trap mechanism provides sequence-specific RNA recognition by CPEB proteins. *Genes & development*. 2014;28(13):1498-514.
13. Kielkopf CL, Rodionova NA, Green MR, Burley SK. A novel peptide recognition mode revealed by the X-ray structure of a core U2AF35/U2AF65 heterodimer. *Cell*. 2001;106(5):595-605.
14. Zhang W, Zeng F, Liu Y, Zhao Y, Lv H, Niu L, et al. Crystal structures and RNA-binding properties of the RNA recognition motifs of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L: insights into its roles in alternative splicing regulation. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(31):22636-49.
15. Oberstrass FC, Auweter SD, Erat M, Hargous Y, Henning A, Wenter P, et al. Structure of PTB bound to RNA: specific binding and implications for splicing regulation. *Science*. 2005;309(5743):2054-7.
16. Jacks A, Babon J, Kelly G, Manolaridis I, Cary PD, Curry S, et al. Structure of the C-terminal domain of human La protein reveals a novel RNA recognition motif coupled to a helical nuclear retention element. *Structure*. 2003;11(7):833-43.
17. Kotik-Kogan O, Valentine ER, Sanfelice D, Conte MR, Curry S. Structural analysis reveals conformational plasticity in the recognition of RNA 3' ends by the human La protein. *Structure*. 2008;16(6):852-62.

18. Alfano C, Sanfelice D, Babon J, Kelly G, Jacks A, Curry S, et al. Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein. *Nature structural & molecular biology*. 2004;11(4):323-9.
19. Teplova M, Yuan YR, Phan AT, Malinina L, Ilin S, Teplov A, et al. Structural basis for recognition and sequestration of UUU(OH) 3' termini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen. *Molecular cell*. 2006;21(1):75-85.
20. Clery A, Blatter M, Allain FH. RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Current opinion in structural biology*. 2008;18(3):290-8.
21. Ponting CP, Mott R, Bork P, Copley RR. Novel protein domains and repeats in *Drosophila melanogaster*: insights into structure, function, and evolution. *Genome research*. 2001;11(12):1996-2008.
22. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, et al. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D222-6.
23. Yang R, Gaidamakov SA, Xie J, Lee J, Martino L, Kozlov G, et al. La-related protein 4 binds poly(A), interacts with the poly(A)-binding protein MLE domain via a variant PAM2w motif, and can promote mRNA stability. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(3):542-56.
24. Dong G, Chakshusmathi G, Wolin SL, Reinisch KM. Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *The EMBO journal*. 2004;23(5):1000-7.
25. Uchikawa E, Natchiar KS, Han X, Proux F, Roblin P, Zhang E, et al. Structural insight into the mechanism of stabilization of the 7SK small nuclear RNA by LARP7. *Nucleic acids research*. 2015;43(6):3373-88.
26. Martino L, Pennell S, Kelly G, Busi B, Brown P, Atkinson RA, et al. Synergic interplay of the La motif, RRM1 and the interdomain linker of LARP6 in the recognition of collagen mRNA expands the RNA binding repertoire of the La module. *Nucleic acids research*. 2015;43(1):645-60.
27. He N, Jahchan NS, Hong E, Li Q, Bayfield MA, Maraia RJ, et al. A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis. *Molecular cell*. 2008;29(5):588-99.
28. Sobel SG, Wolin SL. Two yeast La motif-containing proteins are RNA-binding proteins that associate with polyribosomes. *Molecular biology of the cell*. 1999;10(11):3849-62.
29. Yu W, Farrell RA, Stillman DJ, Winge DR. Identification of SLF1 as a new copper homeostasis gene involved in copper sulfide mineralization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(5):2464-72.
30. Schenk L, Meinel DM, Strasser K, Gerber AP. La-motif-dependent mRNA association with Slf1 promotes copper detoxification in yeast. *Rna*. 2012;18(3):449-61.
31. Kershaw CJ, Costello JL, Castelli LM, Talavera D, Rowe W, Sims PF, et al. The yeast La related protein Slf1p is a key activator of translation during the oxidative stress response. *PLoS genetics*. 2015;11(1):e1004903.
32. Zhang C, Wang X, Park S, Chiang YC, Xi W, Laue TM, et al. Only a subset of the PAB1-mRNP proteome is present in mRNA translation complexes. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2014;23(8):1036-49.
33. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51.
34. Muto Y, Yokoyama S. Structural insight into RNA recognition motifs: versatile molecular Lego building blocks for biological systems. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2012;3(2):229-46.
35. Calero G, Wilson KF, Ly T, Rios-Steiner JL, Clardy JC, Cerione RA. Structural basis of m7GpppG binding to the nuclear cap-binding protein complex. *Nature structural biology*. 2002;9(12):912-7.

36. Mazza C, Segref A, Mattaj IW, Cusack S. Large-scale induced fit recognition of an m(7)GpppG cap analogue by the human nuclear cap-binding complex. *The EMBO journal*. 2002;21(20):5548-57.
37. Auweter SD, Oberstrass FC, Allain FH. Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition? *Nucleic acids research*. 2006;34(17):4943-59.
38. Deo RC, Bonanno JB, Sonenberg N, Burley SK. Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell*. 1999;98(6):835-45.
39. Allain FH, Bouvet P, Dieckmann T, Feigon J. Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *The EMBO journal*. 2000;19(24):6870-81.
40. Price SR, Evans PR, Nagai K. Crystal structure of the spliceosomal U2B'-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature*. 1998;394(6694):645-50.
41. Bandziulis RJ, Swanson MS, Dreyfuss G. RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes & development*. 1989;3(4):431-7.
42. Kenan DJ, Query CC, Keene JD. RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends in biochemical sciences*. 1991;16(6):214-20.
43. Birney E, Kumar S, Krainer AR. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic acids research*. 1993;21(25):5803-16.
44. Bahadur RP, Zacharias M, Janin J. Dissecting protein-RNA recognition sites. *Nucleic acids research*. 2008;36(8):2705-16.
45. Morozova N, Allers J, Myers J, Shamoo Y. Protein-RNA interactions: exploring binding patterns with a three-dimensional superposition analysis of high resolution structures. *Bioinformatics*. 2006;22(22):2746-52.
46. Baker CM, Grant GH. Role of aromatic amino acids in protein-nucleic acid recognition. *Biopolymers*. 2007;85(5-6):456-70.
47. Barik A, C N, Pilla SP, Bahadur RP. Molecular architecture of protein-RNA recognition sites. *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2015;33(12):2738-51.
48. Wilson KA, Holland DJ, Wetmore SD. Topology of RNA-protein nucleobase-amino acid pi-pi interactions and comparison to analogous DNA-protein pi-pi contacts. *Rna*. 2016;22(5):696-708.
49. Rutledge LR, Durst HF, Wetmore SD. Evidence for Stabilization of DNA/RNA-Protein Complexes Arising from Nucleobase-Amino Acid Stacking and T-Shaped Interactions. *Journal of chemical theory and computation*. 2009;5(5):1400-10.
50. Wilson KA, Kellie JL, Wetmore SD. DNA-protein pi-interactions in nature: abundance, structure, composition and strength of contacts between aromatic amino acids and DNA nucleobases or deoxyribose sugar. *Nucleic acids research*. 2014;42(10):6726-41.
51. Wilson KA, Wells RA, Abendong MN, Anderson CB, Kung RW, Wetmore SD. Landscape of pi-pi and sugar-pi contacts in DNA-protein interactions. *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2016;34(1):184-200.
52. Ellis JJ, Broom M, Jones S. Protein-RNA interactions: structural analysis and functional classes. *Proteins*. 2007;66(4):903-11.
53. Cienikova Z, Damberger FF, Hall J, Allain FH, Maris C. Structural and mechanistic insights into poly(uridine) tract recognition by the hnRNP C RNA recognition motif. *Journal of the American Chemical Society*. 2014;136(41):14536-44.
54. Jenkins HT, Malkova B, Edwards TA. Kinked beta-strands mediate high-affinity recognition of mRNA targets by the germ-cell regulator DAZL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(45):18266-71.
55. Sickmier EA, Frato KE, Shen H, Paranawithana SR, Green MR, Kielkopf CL. Structural basis for polypyrimidine tract recognition by the essential pre-mRNA splicing factor U2AF65. *Molecular cell*. 2006;23(1):49-59.

56. Wang H, Zeng F, Liu Q, Liu H, Liu Z, Niu L, et al. The structure of the ARE-binding domains of Hu antigen R (HuR) undergoes conformational changes during RNA binding. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2013;69(Pt 3):373-80.
57. Wang X, Tanaka Hall TM. Structural basis for recognition of AU-rich element RNA by the HuD protein. *Nature structural biology*. 2001;8(2):141-5.
58. Afroz T, Cienikova Z, Clery A, Allain FH. One, Two, Three, Four! How Multiple RRM's Read the Genome Sequence. *Methods in enzymology*. 2015;558:235-78.
59. Auweter SD, Oberstrass FC, Allain FH. Solving the structure of PTB in complex with pyrimidine tracts: an NMR study of protein-RNA complexes of weak affinities. *Journal of molecular biology*. 2007;367(1):174-86.
60. Ding J, Hayashi MK, Zhang Y, Manche L, Krainer AR, Xu RM. Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes & development*. 1999;13(9):1102-15.
61. Allers J, Shamoo Y. Structure-based analysis of protein-RNA interactions using the program ENTANGLE. *Journal of molecular biology*. 2001;311(1):75-86.
62. Oubridge C, Ito N, Evans PR, Teo CH, Nagai K. Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature*. 1994;372(6505):432-8.
63. Handa N, Nureki O, Kurimoto K, Kim I, Sakamoto H, Shimura Y, et al. Structural basis for recognition of the tra mRNA precursor by the Sex-lethal protein. *Nature*. 1999;398(6728):579-85.
64. Chao JA, Patskovsky Y, Patel V, Levy M, Almo SC, Singer RH. ZBP1 recognition of beta-actin zipcode induces RNA looping. *Genes & development*. 2010;24(2):148-58.
65. Diaz-Moreno I, Hollingworth D, Kelly G, Martin S, Garcia-Mayoral M, Briata P, et al. Orientation of the central domains of KSRP and its implications for the interaction with the RNA targets. *Nucleic acids research*. 2010;38(15):5193-205.
66. Teplova M, Malinina L, Darnell JC, Song J, Lu M, Abagyan R, et al. Protein-RNA and protein-protein recognition by dual KH1/2 domains of the neuronal splicing factor Nova-1. *Structure*. 2011;19(7):930-44.
67. Edwards J, Malaurie E, Kondrashov A, Long J, de Moor CH, Searle MS, et al. Sequence determinants for the tandem recognition of UGU and CUG rich RNA elements by the two N-terminal RRM's of CELF1. *Nucleic acids research*. 2011;39(19):8638-50.
68. Teplova M, Song J, Gaw HY, Teplov A, Patel DJ. Structural insights into RNA recognition by the alternate-splicing regulator CUG-binding protein 1. *Structure*. 2010;18(10):1364-77.
69. Teplova M, Patel DJ. Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nature structural & molecular biology*. 2008;15(12):1343-51.
70. Lunde BM, Moore C, Varani G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(6):479-90.
71. Mackereth CD, Simon B, Sattler M. Extending the size of protein-RNA complexes studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2005;6(9):1578-84.
72. Mackereth CD, Sattler M. Dynamics in multi-domain protein recognition of RNA. *Current opinion in structural biology*. 2012;22(3):287-96.
73. Mackereth CD, Madl T, Bonnal S, Simon B, Zanier K, Gasch A, et al. Multi-domain conformational selection underlies pre-mRNA splicing regulation by U2AF. *Nature*. 2011;475(7356):408-11.
74. Perez Canadillas JM, Varani G. Recognition of GU-rich polyadenylation regulatory elements by human CstF-64 protein. *The EMBO journal*. 2003;22(11):2821-30.

75. Lamichhane R, Solem A, Black W, Rueda D. Single-molecule FRET of protein-nucleic acid and protein-protein complexes: surface passivation and immobilization. *Methods*. 2010;52(2):192-200.
76. Moreno-Morcillo M, Minvielle-Sebastia L, Fribourg S, Mackereth CD. Locked tether formation by cooperative folding of Rna14p monkeytail and Rna15p hinge domains in the yeast CF IA complex. *Structure*. 2011;19(4):534-45.
77. Varani L, Gunderson SI, Mattaj JW, Kay LE, Neuhaus D, Varani G. The NMR structure of the 38 kDa U1A protein - PIE RNA complex reveals the basis of cooperativity in regulation of polyadenylation by human U1A protein. *Nature structural biology*. 2000;7(4):329-35.
78. Wriggers W, Chakravarty S, Jennings PA. Control of protein functional dynamics by peptide linkers. *Biopolymers*. 2005;80(6):736-46.
79. Gokhale RS, Khosla C. Role of linkers in communication between protein modules. *Current opinion in chemical biology*. 2000;4(1):22-7.
80. George RA, Heringa J. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein engineering*. 2002;15(11):871-9.
81. Papaleo E, Saladino G, Lambrugh M, Lindorff-Larsen K, Gervasio FL, Nussinov R. The Role of Protein Loops and Linkers in Conformational Dynamics and Allostery. *Chemical reviews*. 2016;116(11):6391-423.
82. Apic G, Huber W, Teichmann SA. Multi-domain protein families and domain pairs: comparison with known structures and a random model of domain recombination. *Journal of structural and functional genomics*. 2003;4(2-3):67-78.
83. Reddy Chichili VP, Kumar V, Sivaraman J. Linkers in the structural biology of protein-protein interactions. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2013;22(2):153-67.
84. Bennett MJ, Choe S, Eisenberg D. Domain swapping: entangling alliances between proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(8):3127-31.
85. Henkel T, Zabel U, van Zee K, Muller JM, Fanning E, Baeuerle PA. Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. *Cell*. 1992;68(6):1121-33.
86. Bobrowski K, Wierzchowski KL, Holcman J, Ciurak M. Intramolecular electron transfer in peptides containing methionine, tryptophan and tyrosine: a pulse radiolysis study. *International journal of radiation biology*. 1990;57(5):919-32.
87. Robinson CR, Sauer RT. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(11):5929-34.
88. Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(10):1357-69.
89. Amet N, Lee HF, Shen WC. Insertion of the designed helical linker led to increased expression of tf-based fusion proteins. *Pharmaceutical research*. 2009;26(3):523-8.
90. Arai R, Wriggers W, Nishikawa Y, Nagamune T, Fujisawa T. Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering. *Proteins*. 2004;57(4):829-38.
91. Lupas A. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends in biochemical sciences*. 1996;21(10):375-82.
92. Parry DA, Fraser RD, Squire JM. Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure. *Journal of structural biology*. 2008;163(3):258-69.
93. Parry DA, Smith TA. A different conformation for linker L12 in IF molecules in the molecular and filamentous forms: an hypothesis. *Journal of structural biology*. 2010;170(2):364-8.

94. Messias AC, Sattler M. Structural basis of single-stranded RNA recognition. *Accounts of chemical research*. 2004;37(5):279-87.
95. Kelly RC, Jensen DE, von Hippel PH. DNA "melting" proteins. IV. Fluorescence measurements of binding parameters for bacteriophage T4 gene 32-protein to mono-, oligo-, and polynucleotides. *The Journal of biological chemistry*. 1976;251(22):7240-50.
96. Shamoo Y, Abdul-Manan N, Williams KR. Multiple RNA binding domains (RBDs) just don't add up. *Nucleic acids research*. 1995;23(5):725-8.
97. Mattioli M, Reichlin M. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis and rheumatism*. 1974;17(4):421-9.
98. Alspaugh MA, Tan EM. Antibodies to cellular antigens in Sjogren's syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 1975;55(5):1067-73.
99. Wolin SL, Cedervall T. The La protein. *Annual review of biochemistry*. 2002;71:375-403.
100. Westermann S, Weber K. Cloning and recombinant expression of the La RNA-binding protein from *Trypanosoma brucei*. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1492(2-3):483-7.
101. Stefano JE. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell*. 1984;36(1):145-54.
102. Bhattacharya R, Perumal K, Sinha K, Maraia R, Reddy R. Methylphosphate cap structure in small RNAs reduces the affinity of RNAs to La protein. *Gene expression*. 2002;10(5-6):243-53.
103. Yoo CJ, Wolin SL. The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell*. 1997;89(3):393-402.
104. Copela LA, Chakshumathi G, Sherrer RL, Wolin SL. The La protein functions redundantly with tRNA modification enzymes to ensure tRNA structural stability. *Rna*. 2006;12(4):644-54.
105. Bayfield MA, Maraia RJ. Precursor-product discrimination by La protein during tRNA metabolism. *Nature structural & molecular biology*. 2009;16(4):430-7.
106. Naeeni AR, Conte MR, Bayfield MA. RNA chaperone activity of human La protein is mediated by variant RNA recognition motif. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(8):5472-82.
107. Maraia RJ. La protein and the trafficking of nascent RNA polymerase iii transcripts. *The Journal of cell biology*. 2001;153(4):F13-8.
108. Maraia RJ, Intine RV. Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(2):367-79.
109. Meerovitch K, Svitkin YV, Lee HS, Lejbkiewicz F, Kenan DJ, Chan EK, et al. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *Journal of virology*. 1993;67(7):3798-807.
110. Ayukawa K, Taniguchi S, Masumoto J, Hashimoto S, Sarvotham H, Hara A, et al. La autoantigen is cleaved in the COOH terminus and loses the nuclear localization signal during apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(44):34465-70.
111. Meyuhas O, Kahan T. The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1849(7):801-11.
112. Martino L, Pennell S, Kelly G, Bui TT, Kotik-Kogan O, Smerdon SJ, et al. Analysis of the interaction with the hepatitis C virus mRNA reveals an alternative mode of RNA recognition by the human La protein. *Nucleic acids research*. 2012;40(3):1381-94.
113. Rosa MD, Gottlieb E, Lerner MR, Steitz JA. Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Molecular and cellular biology*. 1981;1(9):785-96.

114. Lerner MR, Andrews NC, Miller G, Steitz JA. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(2):805-9.
115. Kurilla MG, Cabradilla CD, Holloway BP, Keene JD. Nucleotide sequence and host La protein interactions of rabies virus leader RNA. *Journal of virology*. 1984;50(3):773-8.
116. Kurilla MG, Keene JD. The leader RNA of vesicular stomatitis virus is bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell*. 1983;34(3):837-45.
117. Wilusz J, Kurilla MG, Keene JD. A host protein (La) binds to a unique species of minus-sense leader RNA during replication of vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(19):5827-31.
118. Wilusz J, Keene JD. Interactions of plus and minus strand leader RNAs of the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus with the cellular La protein. *Virology*. 1984;135(1):65-73.
119. Francoeur AM, Mathews MB. Interaction between VA RNA and the lupus antigen La: formation of a ribonucleoprotein particle in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(22):6772-6.
120. Reddy R, Henning D, Tan E, Busch H. Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase III transcript (4.5 I RNA). *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(13):8352-6.
121. Ito K, Murakami R, Mochizuki M, Qi H, Shimizu Y, Miura K, et al. Structural basis for the substrate recognition and catalysis of peptidyl-tRNA hydrolase. *Nucleic acids research*. 2012;40(20):10521-31.
122. Hopper AK, Pai DA, Engelke DR. Cellular dynamics of tRNAs and their genes. *FEBS letters*. 2010;584(2):310-7.
123. Wichtowska D, Turowski TW, Boguta M. An interplay between transcription, processing, and degradation determines tRNA levels in yeast. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2013;4(6):709-22.
124. De Robertis EM, Olson MV. Transcription and processing of cloned yeast tyrosine tRNA genes microinjected into frog oocytes. *Nature*. 1979;278(5700):137-43.
125. Mao J, Schmidt O, Soll D. Dimeric transfer RNA precursors in *S. pombe*. *Cell*. 1980;21(2):509-16.
126. Hopper AK. Transfer RNA post-transcriptional processing, turnover, and subcellular dynamics in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2013;194(1):43-67.
127. Hopper AK, Phizicky EM. tRNA transfers to the limelight. *Genes & development*. 2003;17(2):162-80.
128. Blewett NH, Maraia RJ. La involvement in tRNA and other RNA processing events including differences among yeast and other eukaryotes. *Biochimica et biophysica acta*. 2018;1861(4):361-72.
129. Walker SC, Engelke DR. Ribonuclease P: the evolution of an ancient RNA enzyme. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2006;41(2):77-102.
130. Xiao S, Scott F, Fierke CA, Engelke DR. Eukaryotic ribonuclease P: a plurality of ribonucleoprotein enzymes. *Annual review of biochemistry*. 2002;71:165-89.
131. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*. 1983;35(3 Pt 2):849-57.
132. Torres-Larios A, Swinger KK, Krasilnikov AS, Pan T, Mondragon A. Crystal structure of the RNA component of bacterial ribonuclease P. *Nature*. 2005;437(7058):584-7.
133. Cho IM, Lai LB, Susanti D, Mukhopadhyay B, Gopalan V. Ribosomal protein L7Ae is a subunit of archaeal RNase P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(33):14573-8.

134. Phizicky EM, Hopper AK. tRNA biology charges to the front. *Genes & development*. 2010;24(17):1832-60.
135. Marquez SM, Harris JK, Kelley ST, Brown JW, Dawson SC, Roberts EC, et al. Structural implications of novel diversity in eucaryal RNase P RNA. *Rna*. 2005;11(5):739-51.
136. Marquez SM, Chen JL, Evans D, Pace NR. Structure and function of eukaryotic Ribonuclease P RNA. *Molecular cell*. 2006;24(3):445-56.
137. Baird NJ, Fang XW, Srividya N, Pan T, Sosnick TR. Folding of a universal ribozyme: the ribonuclease P RNA. *Quarterly reviews of biophysics*. 2007;40(2):113-61.
138. Carrara G, Calandra P, Fruscoloni P, Tocchini-Valentini GP. Two helices plus a linker: a small model substrate for eukaryotic RNase P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(7):2627-31.
139. Levinger L, Greene V, Birk A, Bourne R, Kolla S, Whyte S. RNase P and 3'-tRNase processing matrices in the analysis of *Drosophila* transfer RNA D/T loop tertiary contacts. *Nucleic acids symposium series*. 1995(33):82-4.
140. Yuan Y, Altman S. Substrate recognition by human RNase P: identification of small, model substrates for the enzyme. *The EMBO journal*. 1995;14(1):159-68.
141. Esakova O, Krasilnikov AS. Of proteins and RNA: the RNase P/MRP family. *Rna*. 2010;16(9):1725-47.
142. Kufel J, Tollervey D. 3'-processing of yeast tRNA^{Trp} precedes 5'-processing. *Rna*. 2003;9(2):202-8.
143. Foretek D, Wu J, Hopper AK, Boguta M. Control of *Saccharomyces cerevisiae* pre-tRNA processing by environmental conditions. *Rna*. 2016;22(3):339-49.
144. Spath B, Canino G, Marchfelder A. tRNase Z: the end is not in sight. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007;64(18):2404-12.
145. Hasler D, Meister G. From tRNA to miRNA: RNA-folding contributes to correct entry into noncoding RNA pathways. *FEBS letters*. 2016;590(15):2354-63.
146. Takaku H, Minagawa A, Takagi M, Nashimoto M. A novel 4-base-recognizing RNA cutter that can remove the single 3' terminal nucleotides from RNA molecules. *Nucleic acids research*. 2004;32(11):e91.
147. Mohan A, Whyte S, Wang X, Nashimoto M, Levinger L. The 3' end CCA of mature tRNA is an antideterminant for eukaryotic 3'-tRNase. *Rna*. 1999;5(2):245-56.
148. Xiong Y, Steitz TA. A story with a good ending: tRNA 3'-end maturation by CCA-adding enzymes. *Current opinion in structural biology*. 2006;16(1):12-7.
149. Trotta CR, Miao F, Arn EA, Stevens SW, Ho CK, Rauhut R, et al. The yeast tRNA splicing endonuclease: a tetrameric enzyme with two active site subunits homologous to the archaeal tRNA endonucleases. *Cell*. 1997;89(6):849-58.
150. Nishikura K, De Robertis EM. RNA processing in microinjected *Xenopus* oocytes. Sequential addition of base modifications in the spliced transfer RNA. *Journal of molecular biology*. 1981;145(2):405-20.
151. Kohler A, Hurt E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(10):761-73.
152. Chatterjee K, Majumder S, Wan Y, Shah V, Wu J, Huang HY, et al. Sharing the load: Mex67-Mtr2 cofunctions with Los1 in primary tRNA nuclear export. *Genes & development*. 2017;31(21):2186-98.
153. Chatterjee K, Nostramo RT, Wan Y, Hopper AK. tRNA dynamics between the nucleus, cytoplasm and mitochondrial surface: Location, location, location. *Biochimica et biophysica acta*. 2018;1861(4):373-86.
154. Ohira T, Suzuki T. Retrograde nuclear import of tRNA precursors is required for modified base biogenesis in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(26):10502-7.

155. Hopper AK, Huang HY. Quality Control Pathways for Nucleus-Encoded Eukaryotic tRNA Biosynthesis and Subcellular Trafficking. *Molecular and cellular biology*. 2015;35(12):2052-8.
156. Schneider C, Anderson JT, Tollervey D. The exosome subunit Rrp44 plays a direct role in RNA substrate recognition. *Molecular cell*. 2007;27(2):324-31.
157. Vanacova S, Wolf J, Martin G, Blank D, Dettwiler S, Friedlein A, et al. A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS biology*. 2005;3(6):e189.
158. Kufel J, Allmang C, Chanfreau G, Petfalski E, Lafontaine DL, Tollervey D. Precursors to the U3 small nucleolar RNA lack small nucleolar RNP proteins but are stabilized by La binding. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(15):5415-24.
159. Xue D, Robinson DA, Pannone BK, Yoo CJ, Wolin SL. U snRNP assembly in yeast involves the La protein. *The EMBO journal*. 2000;19(7):1650-60.
160. Maraia RJ, Kenan DJ, Keene JD. Eukaryotic transcription termination factor La mediates transcript release and facilitates reinitiation by RNA polymerase III. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(3):2147-58.
161. Pannone BK, Xue D, Wolin SL. A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. *The EMBO journal*. 1998;17(24):7442-53.
162. Lin-Marq N, Clarkson SG. Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in *Xenopus* extracts depleted of La protein. *The EMBO journal*. 1998;17(7):2033-41.
163. Fan H, Goodier JL, Chamberlain JR, Engelke DR, Maraia RJ. 5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(6):3201-11.
164. Intine RV, Sakulich AL, Koduru SB, Huang Y, Pierstorff E, Goodier JL, et al. Control of transfer RNA maturation by phosphorylation of the human La antigen on serine 366. *Molecular cell*. 2000;6(2):339-48.
165. Boelens WC, Palacios I, Mattaj JW. Nuclear retention of RNA as a mechanism for localization. *Rna*. 1995;1(3):273-83.
166. Simons FH, Broers FJ, Van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Characterization of cis-acting signals for nuclear import and retention of the La (SS-B) autoantigen. *Experimental cell research*. 1996;224(2):224-36.
167. Chanfreau G, Elela SA, Ares M, Jr., Guthrie C. Alternative 3'-end processing of U5 snRNA by RNase III. *Genes & development*. 1997;11(20):2741-51.
168. Abou Elela S, Ares M, Jr. Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA. *The EMBO journal*. 1998;17(13):3738-46.
169. Allmang C, Kufel J, Chanfreau G, Mitchell P, Petfalski E, Tollervey D. Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *The EMBO journal*. 1999;18(19):5399-410.
170. Seipelt RL, Zheng B, Asuru A, Rymond BC. U1 snRNA is cleaved by RNase III and processed through an Sm site-dependent pathway. *Nucleic acids research*. 1999;27(2):587-95.
171. Hendrick JP, Wolin SL, Rinke J, Lerner MR, Steitz JA. Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Molecular and cellular biology*. 1981;1(12):1138-49.
172. O'Brien CA, Margelot K, Wolin SL. *Xenopus* Ro ribonucleoproteins: members of an evolutionarily conserved class of cytoplasmic ribonucleoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(15):7250-4.

173. Peek R, Pruijn GJ, van der Kemp AJ, van Venrooij WJ. Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *Journal of cell science*. 1993;106 (Pt 3):929-35.
174. Wolin SL, Steitz JA. Genes for two small cytoplasmic Ro RNAs are adjacent and appear to be single-copy in the human genome. *Cell*. 1983;32(3):735-44.
175. Liang C, Xiong K, Szulwach KE, Zhang Y, Wang Z, Peng J, et al. Sjogren syndrome antigen B (SSB)/La promotes global microRNA expression by binding microRNA precursors through stem-loop recognition. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(1):723-36.
176. Liu Y, Tan H, Tian H, Liang C, Chen S, Liu Q. Autoantigen La promotes efficient RNAi, antiviral response, and transposon silencing by facilitating multiple-turnover RISC catalysis. *Molecular cell*. 2011;44(3):502-8.
177. Maraia RJ, Lamichhane TN. 3' processing of eukaryotic precursor tRNAs. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2011;2(3):362-75.
178. Merret R, Martino L, Bousquet-Antonelli C, Fneich S, Descombin J, Billey E, et al. The association of a La module with the PABP-interacting motif PAM2 is a recurrent evolutionary process that led to the neofunctionalization of La-related proteins. *Rna*. 2013;19(1):36-50.
179. Huang Y, Intine RV, Mozlin A, Hasson S, Maraia RJ. Mutations in the RNA polymerase III subunit Rpc11p that decrease RNA 3' cleavage activity increase 3'-terminal oligo(U) length and La-dependent tRNA processing. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(2):621-36.
180. O'Connor JP, Peebles CL. In vivo pre-tRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 1991;11(1):425-39.
181. Intine RV, Dundr M, Misteli T, Maraia RJ. Aberrant nuclear trafficking of La protein leads to disordered processing of associated precursor tRNAs. *Molecular cell*. 2002;9(5):1113-23.
182. Bayfield MA, Kaiser TE, Intine RV, Maraia RJ. Conservation of a masked nuclear export activity of La proteins and its effects on tRNA maturation. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(9):3303-12.
183. Iben JR, Epstein JA, Bayfield MA, Bruinsma MW, Hasson S, Bacikova D, et al. Comparative whole genome sequencing reveals phenotypic tRNA gene duplication in spontaneous *Schizosaccharomyces pombe* La mutants. *Nucleic acids research*. 2011;39(11):4728-42.
184. Hamada M, Sakulich AL, Koduru SB, Maraia RJ. Transcription termination by RNA polymerase III in fission yeast. A genetic and biochemically tractable model system. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(37):29076-81.
185. Lee Y, Kindelberger DW, Lee JY, McClennen S, Chamberlain J, Engelke DR. Nuclear pre-tRNA terminal structure and RNase P recognition. *Rna*. 1997;3(2):175-85.
186. Nashimoto M, Nashimoto C, Tamura M, Kaspar RL, Ochi K. The inhibitory effect of the autoantigen La on in vitro 3' processing of mammalian precursor tRNAs. *Journal of molecular biology*. 2001;312(5):975-84.
187. Belisova A, Semrad K, Mayer O, Kocian G, Waigmann E, Schroeder R, et al. RNA chaperone activity of protein components of human Ro RNPs. *Rna*. 2005;11(7):1084-94.
188. Kucera NJ, Hodsdon ME, Wolin SL. An intrinsically disordered C terminus allows the La protein to assist the biogenesis of diverse noncoding RNA precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(4):1308-13.
189. Chakshusmathi G, Kim SD, Robinson DA, Wolin SL. A La protein requirement for efficient pre-tRNA folding. *The EMBO journal*. 2003;22(24):6562-72.
190. Wolin SL, Wurtmann EJ. Molecular chaperones and quality control in noncoding RNA biogenesis. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2006;71:505-11.
191. Huang Y, Bayfield MA, Intine RV, Maraia RJ. Separate RNA-binding surfaces on the multifunctional La protein mediate distinguishable activities in tRNA maturation. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(7):611-8.

192. Fok V, Friend K, Steitz JA. Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *The Journal of cell biology*. 2006;173(3):319-25.
193. Rosenblum JS, Pemberton LF, Bonifaci N, Blobel G. Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein. *The Journal of cell biology*. 1998;143(4):887-99.
194. Fan H, Sakulich AL, Goodier JL, Zhang X, Qin J, Maraia RJ. Phosphorylation of the human La antigen on serine 366 can regulate recycling of RNA polymerase III transcription complexes. *Cell*. 1997;88(5):707-15.
195. Broekhuis CH, Neubauer G, van der Heijden A, Mann M, Proud CG, van Venrooij WJ, et al. Detailed analysis of the phosphorylation of the human La (SS-B) autoantigen. (De)phosphorylation does not affect its subcellular distribution. *Biochemistry*. 2000;39(11):3023-33.
196. Intine RV, Dundr M, Vassilev A, Schwartz E, Zhao Y, Zhao Y, et al. Nonphosphorylated human La antigen interacts with nucleolin at nucleolar sites involved in rRNA biogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(24):10894-904.
197. Kuehnert J, Sommer G, Zierk AW, Fedarovich A, Brock A, Fedarovich D, et al. Novel RNA chaperone domain of RNA-binding protein La is regulated by AKT phosphorylation. *Nucleic acids research*. 2015;43(1):581-94.
198. Intine RV, Tenenbaum SA, Sakulich AL, Keene JD, Maraia RJ. Differential phosphorylation and subcellular localization of La RNPs associated with precursor tRNAs and translation-related mRNAs. *Molecular cell*. 2003;12(5):1301-7.
199. Brenet F, Socci ND, Sonenberg N, Holland EC. Akt phosphorylation of La regulates specific mRNA translation in glial progenitors. *Oncogene*. 2009;28(1):128-39.
200. Fairley JA, Kantidakis T, Kenneth NS, Intine RV, Maraia RJ, White RJ. Human La is found at RNA polymerase III-transcribed genes in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(51):18350-5.
201. Lerner MR, Boyle JA, Hardin JA, Steitz JA. Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science*. 1981;211(4480):400-2.
202. De BP, Gupta S, Zhao H, Drazba JA, Banerjee AK. Specific interaction in vitro and in vivo of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and LA protein with cis-acting RNAs of human parainfluenza virus type 3. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(40):24728-35.
203. Raha T, Pudi R, Das S, Shaila MS. Leader RNA of Rinderpest virus binds specifically with cellular La protein: a possible role in virus replication. *Virus research*. 2004;104(2):101-9.
204. McLellan JS, Chen M, Leung S, Graepel KW, Du X, Yang Y, et al. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science*. 2013;340(6136):1113-7.
205. Bitko V, Musiyenko A, Bayfield MA, Maraia RJ, Barik S. Cellular La protein shields nonsegmented negative-strand RNA viral leader RNA from RIG-I and enhances virus growth by diverse mechanisms. *Journal of virology*. 2008;82(16):7977-87.
206. Meerovitch K, Pelletier J, Sonenberg N. A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus RNA: implications for internal translation initiation. *Genes & development*. 1989;3(7):1026-34.
207. Chang YN, Kenan DJ, Keene JD, Gatignol A, Jeang KT. Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *Journal of virology*. 1994;68(11):7008-20.
208. Svitkin YV, Meerovitch K, Lee HS, Dholakia JN, Kenan DJ, Agol VI, et al. Internal translation initiation on poliovirus RNA: further characterization of La function in poliovirus translation in vitro. *Journal of virology*. 1994;68(3):1544-50.

209. Svitkin YV, Pause A, Sonenberg N. La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *Journal of virology*. 1994;68(11):7001-7.
210. Ali N, Siddiqui A. The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(6):2249-54.
211. Ali N, Pruijn GJ, Kenan DJ, Keene JD, Siddiqui A. Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(36):27531-40.
212. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*. 1988;334(6180):320-5.
213. Walsh D, Mohr I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nature reviews Microbiology*. 2011;9(12):860-75.
214. Lloyd RE. Nuclear proteins hijacked by mammalian cytoplasmic plus strand RNA viruses. *Virology*. 2015;479-480:457-74.
215. Macejak DG, Sarnow P. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature*. 1991;353(6339):90-4.
216. Heise T, Kota V, Brock A, Morris AB, Rodriguez RM, Zierk AW, et al. The La protein counteracts cisplatin-induced cell death by stimulating protein synthesis of anti-apoptotic factor Bcl2. *Oncotarget*. 2016;7(20):29664-76.
217. Shwetha S, Kumar A, Mullick R, Vasudevan D, Mukherjee N, Das S. HuR Displaces Polypyrimidine Tract Binding Protein To Facilitate La Binding to the 3' Untranslated Region and Enhances Hepatitis C Virus Replication. *Journal of virology*. 2015;89(22):11356-71.
218. Manna AK, Kumar A, Ray U, Das S, Basu G, Roy S. A cyclic peptide mimic of an RNA recognition motif of human La protein is a potent inhibitor of hepatitis C virus. *Antiviral research*. 2013;97(3):223-6.
219. Kumar A, Ray U, Das S. Human La protein interaction with GCAC near the initiator AUG enhances hepatitis C Virus RNA replication by promoting linkage between 5' and 3' untranslated regions. *Journal of virology*. 2013;87(12):6713-26.
220. Pudi R, Srinivasan P, Das S. La protein binding at the GCAC site near the initiator AUG facilitates the ribosomal assembly on the hepatitis C virus RNA to influence internal ribosome entry site-mediated translation. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(29):29879-88.
221. Pudi R, Abhiman S, Srinivasan N, Das S. Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(14):12231-40.
222. Das S, Ott M, Yamane A, Venkatesan A, Gupta S, Dasgupta A. Inhibition of internal entry site (IRES)-mediated translation by a small yeast RNA: a novel strategy to block hepatitis C virus protein synthesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 1998;3:D1241-52.
223. Romero V, Fellows E, Jenne DE, Andrade F. Cleavage of La protein by granzyme H induces cytoplasmic translocation and interferes with La-mediated HCV-IRES translational activity. *Cell death and differentiation*. 2009;16(2):340-8.
224. Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, et al. La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202(1):75-85.
225. Horke S, Reumann K, Rang A, Heise T. Molecular characterization of the human La protein.hepatitis B virus RNA.B interaction in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(38):34949-58.
226. Heise T, Guidotti LG, Chisari FV. La autoantigen specifically recognizes a predicted stem-loop in hepatitis B virus RNA. *Journal of virology*. 1999;73(7):5767-76.

227. Tang J, Zhang ZH, Huang M, Heise T, Zhang J, Liu GL. Phosphorylation of human La protein at Ser 366 by casein kinase II contributes to hepatitis B virus replication and expression in vitro. *Journal of viral hepatitis*. 2013;20(1):24-33.
228. Sommer G, Dittmann J, Kuehnert J, Reumann K, Schwartz PE, Will H, et al. The RNA-binding protein La contributes to cell proliferation and CCND1 expression. *Oncogene*. 2011;30(4):434-44.
229. Kim YK, Back SH, Rho J, Lee SH, Jang SK. La autoantigen enhances translation of BiP mRNA. *Nucleic acids research*. 2001;29(24):5009-16.
230. Trotta R, Vignudelli T, Candini O, Intine RV, Pecorari L, Guerzoni C, et al. BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. *Cancer cell*. 2003;3(2):145-60.
231. Petz M, Them N, Huber H, Beug H, Mikulits W. La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic acids research*. 2012;40(1):290-302.
232. Petz M, Them NC, Huber H, Mikulits W. PDGF enhances IRES-mediated translation of Laminin B1 by cytoplasmic accumulation of La during epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic acids research*. 2012;40(19):9738-49.
233. Craig AW, Svitkin YV, Lee HS, Belsham GJ, Sonenberg N. The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(1):163-9.
234. Cardinali B, Carissimi C, Gravina P, Pierandrei-Amaldi P. La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polysomes. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(37):35145-51.
235. Yoo CJ, Wolin SL. La proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(8):5412-24.
236. Bachmann M, Pfeifer K, Schroder HC, Muller WE. The La antigen shuttles between the nucleus and the cytoplasm in CV-1 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 1989;85(2):103-14.
237. Tan Q, Li X, Sadhale PP, Miyao T, Woychik NA. Multiple mechanisms of suppression circumvent transcription defects in an RNA polymerase mutant. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(21):8124-33.
238. Van Horn DJ, Yoo CJ, Xue D, Shi H, Wolin SL. The La protein in *Schizosaccharomyces pombe*: a conserved yet dispensable phosphoprotein that functions in tRNA maturation. *Rna*. 1997;3(12):1434-43.
239. Chan EK, Francoeur AM, Tan EM. Epitopes, structural domains, and asymmetry of amino acid residues in SS-B/La nuclear protein. *Journal of immunology*. 1986;136(10):3744-9.
240. Pizer LI, Deng JS, Stenberg RM, Tan EM. Characterization of a phosphoprotein associated with the SS-B/La nuclear antigen in adenovirus-infected and uninfected KB cells. *Molecular and cellular biology*. 1983;3(7):1235-45.
241. Francoeur AM, Chan EK, Garrels JI, Mathews MB. Characterization and purification of lupus antigen La, and RNA-binding protein. *Molecular and cellular biology*. 1985;5(3):586-90.
242. Moritz A, Li Y, Guo A, Villen J, Wang Y, MacNeill J, et al. Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases. *Science signaling*. 2010;3(136):ra64.
243. Schwartz EI, Intine RV, Maraia RJ. CK2 is responsible for phosphorylation of human La protein serine-366 and can modulate rpl37 5'-terminal oligopyrimidine mRNA metabolism. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(21):9580-91.
244. Gajiwala KS, Burley SK. Winged helix proteins. *Current opinion in structural biology*. 2000;10(1):110-6.

245. Schwartz T, Rould MA, Lowenhaupt K, Herbert A, Rich A. Crystal structure of the Zalpha domain of the human editing enzyme ADAR1 bound to left-handed Z-DNA. *Science*. 1999;284(5421):1841-5.
246. Okuda M, Watanabe Y, Okamura H, Hanaoka F, Ohkuma Y, Nishimura Y. Structure of the central core domain of TFIIEbeta with a novel double-stranded DNA-binding surface. *The EMBO journal*. 2000;19(6):1346-56.
247. Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*. 1993;364(6436):412-20.
248. Gajiwala KS, Chen H, Cornille F, Roques BP, Reith W, Mach B, et al. Structure of the winged-helix protein hRF1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature*. 2000;403(6772):916-21.
249. Shamoo Y, Krueger U, Rice LM, Williams KR, Steitz TA. Crystal structure of the two RNA binding domains of human hnRNP A1 at 1.75 Å resolution. *Nature structural biology*. 1997;4(3):215-22.
250. Xu RM, Jokhan L, Cheng X, Mayeda A, Krainer AR. Crystal structure of human UP1, the domain of hnRNP A1 that contains two RNA-recognition motifs. *Structure*. 1997;5(4):559-70.
251. Ohndorf UM, Steegborn C, Knijff R, Sondermann P. Contributions of the individual domains in human La protein to its RNA 3'-end binding activity. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(29):27188-96.
252. Jacks A, Kelly G, Curry S, Conte MR. Resonance assignment and secondary structure determination of a C-terminal fragment of the lupus autoantigen (La) protein containing a putative RNA recognition motif (RRM). *Journal of biomolecular NMR*. 2002;22(4):387-8.
253. Leulliot N, Varani G. Current topics in RNA-protein recognition: control of specificity and biological function through induced fit and conformational capture. *Biochemistry*. 2001;40(27):7947-56.
254. Avis JM, Allain FH, Howe PW, Varani G, Nagai K, Neuhaus D. Solution structure of the N-terminal RNP domain of U1A protein: the role of C-terminal residues in structure stability and RNA binding. *Journal of molecular biology*. 1996;257(2):398-411.
255. Foster MP, Wuttke DS, Clemens KR, Jahnke W, Radhakrishnan I, Tennant L, et al. Chemical shift as a probe of molecular interfaces: NMR studies of DNA binding by the three amino-terminal zinc finger domains from transcription factor IIIA. *Journal of biomolecular NMR*. 1998;12(1):51-71.
256. van Gelder CW, Thijssen JP, Klaassen EC, Sturchler C, Krol A, van Venrooij WJ, et al. Common structural features of the Ro RNP associated hY1 and hY5 RNAs. *Nucleic acids research*. 1994;22(13):2498-506.
257. Farris AD, Koelsch G, Pruijn GJ, van Venrooij WJ, Harley JB. Conserved features of Y RNAs revealed by automated phylogenetic secondary structure analysis. *Nucleic acids research*. 1999;27(4):1070-8.
258. Goodier JL, Fan H, Maraia RJ. A carboxy-terminal basic region controls RNA polymerase III transcription factor activity of human La protein. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(10):5823-32.
259. Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*: Wiley; 1986.
260. Bloch F. Nuclear Induction. *Physical Review*. 1946;70(7-8):460-74.
261. Keeler J. *Understanding NMR Spectroscopy*: Wiley; 2011.
262. Levitt MH. *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*: Wiley; 2013.
263. Cavanagh J, Fairbrother WJ, Palmer AG, Skelton NJ. *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*: Elsevier Science; 1995.
264. Bodenhausen G, Ruben DJ. Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chemical Physics Letters*. 1980;69(1):185-9.
265. Kwan AH, Mobli M, Gooley PR, King GF, Mackay JP. Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist. *The FEBS journal*. 2011;278(5):687-703.

266. Wuthrich K. NMR - this other method for protein and nucleic acid structure determination. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 1995;51(Pt 3):249-70.
267. Sattler M, Schleucher J, Griesinger C. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 1999;34(2):93-158.
268. Kay LE, Ikura M, Tschudin R, Bax A. Three-dimensional triple-resonance NMR Spectroscopy of isotopically enriched proteins. 1990. *Journal of magnetic resonance*. 2011;213(2):423-41.
269. Grzesiek S, Bax A. Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. 1992;96(2):432-40.
270. Muhandiram DR, Kay LE. Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity. *Journal of Magnetic Resonance, Series B*. 1994;103(3):203-16.
271. Clubb RT, Thanabal V, Wagner G. A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue ^1HN , ^{15}N , and $^{13}\text{C}'$ chemical shifts in $^{15}\text{N} \cdot ^{13}\text{C}$ -labelled proteins. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. 1992;97(1):213-7.
272. Bax A, Ikura M. An efficient 3D NMR technique for correlating the proton and ^{15}N backbone amide resonances with the α -carbon of the preceding residue in uniformly $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ enriched proteins. *Journal of biomolecular NMR*. 1991;1(1):99-104.
273. Farmer BT, 2nd, Venters RA, Spicer LD, Wittekind MG, Muller L. A refocused and optimized HNCA: increased sensitivity and resolution in large macromolecules. *Journal of biomolecular NMR*. 1992;2(2):195-202.
274. Grzesiek S, Bax A. Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *Journal of biomolecular NMR*. 1993;3(2):185-204.
275. Bax A, Clore GM, Gronenborn AM. $^1\text{H} \cdot ^1\text{H}$ correlation via isotropic mixing of ^{13}C magnetization, a new three-dimensional approach for assigning ^1H and ^{13}C spectra of ^{13}C -enriched proteins. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. 1990;88(2):425-31.
276. Olejniczak ET, Xu RX, Fesik SW. A 4D HCCH-TOCSY experiment for assigning the side chain ^1H and ^{13}C resonances of proteins. *Journal of biomolecular NMR*. 1992;2(6):655-9.
277. Marion D, Driscoll PC, Kay LE, Wingfield PT, Bax A, Gronenborn AM, et al. Overcoming the overlap problem in the assignment of ^1H NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear ^1H - ^{15}N Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1 beta. *Biochemistry*. 1989;28(15):6150-6.
278. Zuiderweg ERP, Fesik SW. Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a. *Biochemistry*. 1989;28(6):2387-91.
279. Marion D, Kay LE, Sparks SW, Torchia DA, Bax A. Three-dimensional heteronuclear NMR of nitrogen-15 labeled proteins. *Journal of the American Chemical Society*. 1989;111(4):1515-7.
280. Wüthrich K, Spitzfaden C, Memmert K, Widmer H, Wider G. Protein secondary structure determination by NMR Application with recombinant human cyclophilin. *FEBS letters*. 1991;285(2):237-47.
281. Wüthrich K, Billeter M, Braun W. Polypeptide secondary structure determination by nuclear magnetic resonance observation of short proton-proton distances. *Journal of molecular biology*. 1984;180(3):715-40.
282. Pervushin K, Riek R, Wider G, Wuthrich K. Attenuated T_2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(23):12366-71.

283. Riek R, Wider G, Pervushin K, Wuthrich K. Polarization transfer by cross-correlated relaxation in solution NMR with very large molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(9):4918-23.
284. Kay LE. Solution NMR spectroscopy of supra-molecular systems, why bother? A methyl-TROSY view. *Journal of magnetic resonance*. 2011;210(2):159-70.
285. Religa TL, Sprangers R, Kay LE. Dynamic regulation of archaeal proteasome gate opening as studied by TROSY NMR. *Science*. 2010;328(5974):98-102.
286. Wider G, Wuthrich K. NMR spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution. *Current opinion in structural biology*. 1999;9(5):594-601.
287. Mittermaier A, Kay LE. New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics. *Science*. 2006;312(5771):224-8.
288. Wuthrich K. NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture). *Journal of biomolecular NMR*. 2003;27(1):13-39.
289. Wider G. NMR techniques used with very large biological macromolecules in solution. *Methods in enzymology*. 2005;394:382-98.
290. Iwai H, Zuger S. Protein ligation: applications in NMR studies of proteins. *Biotechnology & genetic engineering reviews*. 2007;24:129-45.
291. Skrisovska L, Schubert M, Allain FH. Recent advances in segmental isotope labeling of proteins: NMR applications to large proteins and glycoproteins. *Journal of biomolecular NMR*. 2010;46(1):51-65.
292. Muir TW, Sondhi D, Cole PA. Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(12):6705-10.
293. Muralidharan V, Muir TW. Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins. *Nature methods*. 2006;3(6):429-38.
294. Vitali F, Henning A, Oberstrass FC, Hargous Y, Auweter SD, Erat M, et al. Structure of the two most C-terminal RNA recognition motifs of PTB using segmental isotope labeling. *The EMBO journal*. 2006;25(1):150-62.
295. Xu R, Ayers B, Cowburn D, Muir TW. Chemical ligation of folded recombinant proteins: segmental isotopic labeling of domains for NMR studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(2):388-93.
296. Zuger S, Iwai H. Intein-based biosynthetic incorporation of unlabeled protein tags into isotopically labeled proteins for NMR studies. *Nature biotechnology*. 2005;23(6):736-40.
297. Hofmann RM, Muir TW. Recent advances in the application of expressed protein ligation to protein engineering. *Current opinion in biotechnology*. 2002;13(4):297-303.
298. Minato Y, Ueda T, Machiyama A, Shimada I, Iwai H. Segmental isotopic labeling of a 140 kDa dimeric multi-domain protein CheA from *Escherichia coli* by expressed protein ligation and protein trans-splicing. *Journal of biomolecular NMR*. 2012;53(3):191-207.
299. Michel E, Skrisovska L, Wuthrich K, Allain FH. Amino acid-selective segmental isotope labeling of multidomain proteins for structural biology. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2013;14(4):457-66.
300. Dyson HJ, Wright PE. Equilibrium NMR studies of unfolded and partially folded proteins. *Nature structural biology*. 1998;5 Suppl:499-503.
301. Kim I, Lukavsky PJ, Puglisi JD. NMR study of 100 kDa HCV IRES RNA using segmental isotope labeling. *Journal of the American Chemical Society*. 2002;124(32):9338-9.
302. Varadan R, Assalg M, Haririnia A, Raasi S, Pickart C, Fushman D. Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(8):7055-63.
303. Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SB. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*. 1994;266(5186):776-9.

304. Muir TW. Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation. *Annual review of biochemistry*. 2003;72:249-89.
305. Blake J. Peptide segment coupling in aqueous medium: silver ion activation of the thiolcarboxyl group. *International journal of peptide and protein research*. 1981;17(2):273-4.
306. Yamashiro D, Li CH. New segment synthesis of alpha-inhibin-92 by the acyl disulfide method. *International journal of peptide and protein research*. 1988;31(3):322-34.
307. Chong S, Xu MQ. Protein splicing of the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein without the endonuclease motifs. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(25):15587-90.
308. Southworth MW, Amaya K, Evans TC, Xu MQ, Perler FB. Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the *Mycobacterium xenopi* gyrase A intein. *BioTechniques*. 1999;27(1):110-4, 6, 8-20.
309. Xu MQ, Evans TC, Jr. Intein-mediated ligation and cyclization of expressed proteins. *Methods*. 2001;24(3):257-77.
310. Ottesen JJ, Bar-Dagan M, Giovani B, Muir TW. An amalgamation of solid phase peptide synthesis and ribosomal peptide synthesis. *Biopolymers*. 2008;90(3):406-14.
311. Schwarzer D, Cole PA. Protein semisynthesis and expressed protein ligation: chasing a protein's tail. *Current opinion in chemical biology*. 2005;9(6):561-9.
312. Chong S, Williams KS, Wotkowicz C, Xu MQ. Modulation of protein splicing of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane ATPase intein. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(17):10567-77.
313. Xu MQ, Paulus H, Chong S. Fusions to self-splicing inteins for protein purification. *Methods in enzymology*. 2000;326:376-418.
314. Hackeng TM, Griffin JH, Dawson PE. Protein synthesis by native chemical ligation: expanded scope by using straightforward methodology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(18):10068-73.
315. rNTP solution. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2006;2006(1):pdb.rec403.
316. Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nature methods*. 2007;4:251.
317. Mullis KB, Faloona FA. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*. 155: Academic Press; 1987. p. 335-50.
318. Goto NK, Kay LE. New developments in isotope labeling strategies for protein solution NMR spectroscopy. *Current opinion in structural biology*. 2000;10(5):585-92.
319. Parker MJ, Aulton-Jones M, Hounslow AM, Craven CJ. A combinatorial selective labeling method for the assignment of backbone amide NMR resonances. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(16):5020-1.
320. Simplaceanu V, Lukin JA, Fang TY, Zou M, Ho NT, Ho C. Chain-selective isotopic labeling for NMR studies of large multimeric proteins: application to hemoglobin. *Biophysical journal*. 2000;79(2):1146-54.
321. Weigelt J, Wikstrom M, Schultz J, van Dongen MJ. Site-selective labeling strategies for screening by NMR. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 2002;5(8):623-30.
322. Lacabanne D, Meier BH, Bockmann A. Selective labeling and unlabeled strategies in protein solid-state NMR spectroscopy. *Journal of biomolecular NMR*. 2018;71(3):141-50.
323. Fiaux J, Bertelsen EB, Horwich AL, Wuthrich K. Uniform and residue-specific ¹⁵N-labeling of proteins on a highly deuterated background. *Journal of biomolecular NMR*. 2004;29(3):289-97.
324. Thurston SJ, Saffer JD. Ultraviolet shadowing nucleic acids on nylon membranes. *Analytical biochemistry*. 1989;178(1):41-2.
325. Hendry P, Hannan G. Detection and quantitation of unlabeled nucleic acids in polyacrylamide gels. *BioTechniques*. 1996;20(2):258-64.
326. Garner MM, Revzin A. The use of gel electrophoresis to detect and study nucleic acid—protein interactions. *Trends in biochemical sciences*. 1986;11(10):395-6.

- 327. Fried MG. Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay. *Electrophoresis*. 1989;10(5-6):366-76.
- 328. Carey J. Gel retardation. *Methods in enzymology*. 1991;208:103-17.
- 329. Lane D, Prentki P, Chandler M. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiological reviews*. 1992;56(4):509-28.

Παράρτημα

Συντμήσεις

Αμινοξέα

Γλυκίνη	G	Gly	Προλίνη	P	Pro
Αλανίνη	A	Ala	Φαινυλαλανίνη	F	Phe
Βαλίνη	V	Val	Τυροσίνη	Y	Tyr
Λευκίνη	L	Leu	Τρυπτοφάνη	W	Trp
Ισολευκίνη	I	Ile	Σερίνη	S	Ser
Μεθειονίνη	M	Met	Θρεονίνη	T	Thr
Κυστεΐνη	C	Cys	Ασπαργινικό	D	Asn
Λυσίνη	K	Lys	Γλουταμινικό	E	Glu
Αργινίνη	R	Arg	Ασπαργίνη	N	Asn
Ιστιδίνη	H	His	Γλουταμίνη	Q	Gln

Αρκτικόλεξα

LARP: La-Related Proteins

La: Lupus antigen

LaM: La Motif

RRM: RNA Recognition Motif

RNA: Ribonucleic Acid

RNP: Ribonucleoprotein domain

NTD: N-terminal domain

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

TOCSY: Total Correlation Spectroscopy

NOE: Nuclear Overhauser Effect

^1H - ^{15}N HSQC: Heteronuclear single quantum coherence

EPL: Expressed Protein Ligation

PTS: Protein trans-splicing

NCL: Native Chemical Ligation

FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη

GTP: Τριφωσφορική γουανοσίνη

CTP: Τριφωσφορική κυτοσίνη

UTP: Τριφωσφορική ουριδίνη

PCR: Polymerase Chain Reaction

CBD: Chitin-Binding Domain

EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay

TEV: Tobacco Etch Virus

IVT: In Vitro Transcription

CSP: Chemical Shift Perturbation

TROSY: Transverse Relaxation Spectroscopy

RNA: Ribonucleic Acid

DNA: Deoxyribonucleic Acid

tRNA: transfer RNA

PDB: Protein Data Bank

Backbone and side chain NMR assignment, along with the secondary structure prediction of RRM2 domain of La protein from a lower eukaryote exhibiting identical structural organization with its human homolog

Aikaterini I. Argyriou · Christos T. Chasapis · Maria Apostolidi ·
Parthena Konstantinidou · Constantinos Stathopoulos · Detlef Bentrop ·
Georgios A. Spyroulias

Received: 5 June 2014 / Accepted: 26 September 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract The La protein (Lupus antigen), a key mediator during biogenesis of RNA polymerase III transcripts, contains a characteristic La motif and one or two RNA recognition motif (RRM) domains, depending on the organism of origin. The RRM1 domain is conserved in higher eukaryotes and located in the N-terminal region, whereas the C-terminal RRM2 domain is absent in most lower eukaryotes and its specific role remains, so far, uncharacterized. Here, we present the backbone and side-chain assignment of the ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonances of RRM2 of La protein from *Dictyostelium discoideum*. Interestingly, the La protein in this lower eukaryote, exhibits high homology to its human counterpart. Moreover, it contains two RRM domains, instead of one, raising questions on its evolutionary origin and the putative role of RRM2 in vivo. We also provide its secondary structure as predicted by the TALOS+ online tool.

Keywords La protein · RNA polymerase III · RNA binding · Recombinant protein expression · NMR spectroscopy

Abbreviations

NMR Nuclear magnetic resonance
HSQC Heteronuclear single quantum coherence
RRM RNA recognition motif
RRM1 N-terminal RNA recognition motif
RRM2 C-terminal RNA recognition motif

Biological context

The La protein is a molecular scaffold which facilitates proper folding and directs processing of nascent RNA polymerase III transcripts, including miRNAs (Maraia and Bayfield 2006; Liang et al. 2013). It is a nuclear basic phosphoprotein that associates with UUU-3'OH trailers of pre-mature transcripts such as pre-tRNAs, thus protecting them from exonuclease digestion during subsequent processing steps (Bayfield et al. 2010). In addition, La protein associates with viral RNAs during infection and in human, it was first observed as the main antigen in autoimmune diseases like systemic Lupus erythematosus and Sjögrens syndrome (Wolin and Cedervall 2002). Interestingly, homologs of La protein that constitute a large protein family with representatives in all eukaryotes (Bousquet-Antonelli and Deragon 2009) have been identified as components of telomerase Ribonucleoprotein complexes (RNPs). Comparison of all available La sequences revealed that the N-terminal domain (NTD) of the protein (which consists of two motifs: La and RRM1) is more conserved than the

Aikaterini I. Argyriou and Christos T. Chasapis have contributed equally to this work.

A. I. Argyriou · C. T. Chasapis · G. A. Spyroulias (✉)
Department of Pharmacy, University of Patras, 26504 Patras,
Greece
e-mail: G.A.Spyroulias@upatras.gr
URL: <http://www.bionmr.upatras.gr>

M. Apostolidi · P. Konstantinidou · C. Stathopoulos
Department of Biochemistry, School of Medicine, University of
Patras, 26504 Patras, Greece

D. Bentrop
Institute of Physiology II, University of Freiburg,
79104 Freiburg, Germany

C-terminal domain (CTD). It has been proposed that the domain complexity of La CTD was expanded in higher eukaryotes during evolution by addition of sequence motifs and domains including a second RRM (termed RRM2) which is absent in most lower eukaryotes like yeast (Wolin and Cedervall 2002). In mammals, the CTD is comprised of the RRM2 domain and a long unstructured tail containing a short basic motif (SBM) followed by a nuclear localization signal (NLS) (Jacks et al. 2003). La CTD is thought to be involved in interactions with the 5'-UTR of various cellular mRNAs and recognition of the 5'-ppp end of nascent RNAs via a mechanism that is modulated by phosphorylation (Maraia and Intine 2001). However RRM2 does not seem to participate in direct RNA binding, raising questions on its function.

The human RRM2 domain has already been structurally analyzed by solution NMR spectroscopy (pdb id: 1OWX, Jacks et al. 2002, 2003) revealing a single monomeric domain with unique structural characteristics. Its topology differs significantly from canonical RRM1s (four-stranded antiparallel β sheet and two helices: $\beta 1$ – $\alpha 1$ – $\beta 2$ – $\beta 3$ – $\alpha 2$ – $\beta 4$) due to the insertion of an additional β strand $\beta 4'$ (between $\alpha 2$ and $\beta 4$) and the addition of a long C-terminal helix $\alpha 3$ (Jacks et al. 2003).

The lower eukaryote *Dictyostelium discoideum* encompass a La protein that is surprisingly similar and homologous to its human counterpart. In contrast to La proteins from many *Saccharomyces* species that contain only the RRM1 domain, it contains in addition, a characteristic RRM2 domain, as the human protein, raising questions on the evolutionary origin of La and the actual functional role of RRM2 in this organism. Recently, we reported the sequence-specific assignments of La and RRM1 motifs of *D. discoideum* La protein (Uniprot id: Q54TG6; Apostolidi et al. 2014). In this work, we present the heterologous expression and purification of the recombinant RRM2 domain (Lys214-Lys318) of *D. discoideum* La protein along with the completion of its sequence-specific assignment and the prediction of its secondary structure using TALOS+ (Shen et al. 2009).

Methods and experiments

Protein expression and purification

The PCR product encoding the *D. discoideum* RRM2 domain (Lys214-Lys318) was cloned into pET20b(+) vector, which encodes a C-terminal His₆-tag, between the *Nde*I–*Xho*I cloning sites with no additional residues between the coding region and the His-tag. Protein expression was carried out in *E. coli* BL21 (DE3) strains using IPTG. Purification of RRM2 was based on standard

protocols of His-Trap affinity chromatography followed by size exclusion chromatography on a Superdex 200 10/300 GL column using an ÄKTA purifier 10 FPLC system (GE Healthcare).

¹³C, ¹⁵N isotope labeling

Isotope enrichment for heteronuclear NMR spectroscopy was achieved in M9 minimal medium supplemented with 1 g/l ¹⁵NH₄(SO₄)₂ or/and 4 g/l uniformly ¹³C-labeled glucose as nitrogen and carbon sources, respectively.

Sample preparation

Protein samples for NMR experiments were prepared in a mixed solvent of 90 % H₂O (50 mM KPi, pH 6.9) and 10 % ²H₂O. The concentration of RRM2 in the final NMR sample was 0.82 mM.

Data acquisition, processing and assignment

All NMR experiments were recorded at 298 K on a Bruker Avance III High-Definition four-channel 700 MHz NMR spectrometer equipped with a cryogenically cooled 5 mm ¹H–¹³C/¹⁵N/D Z-gradient probe.

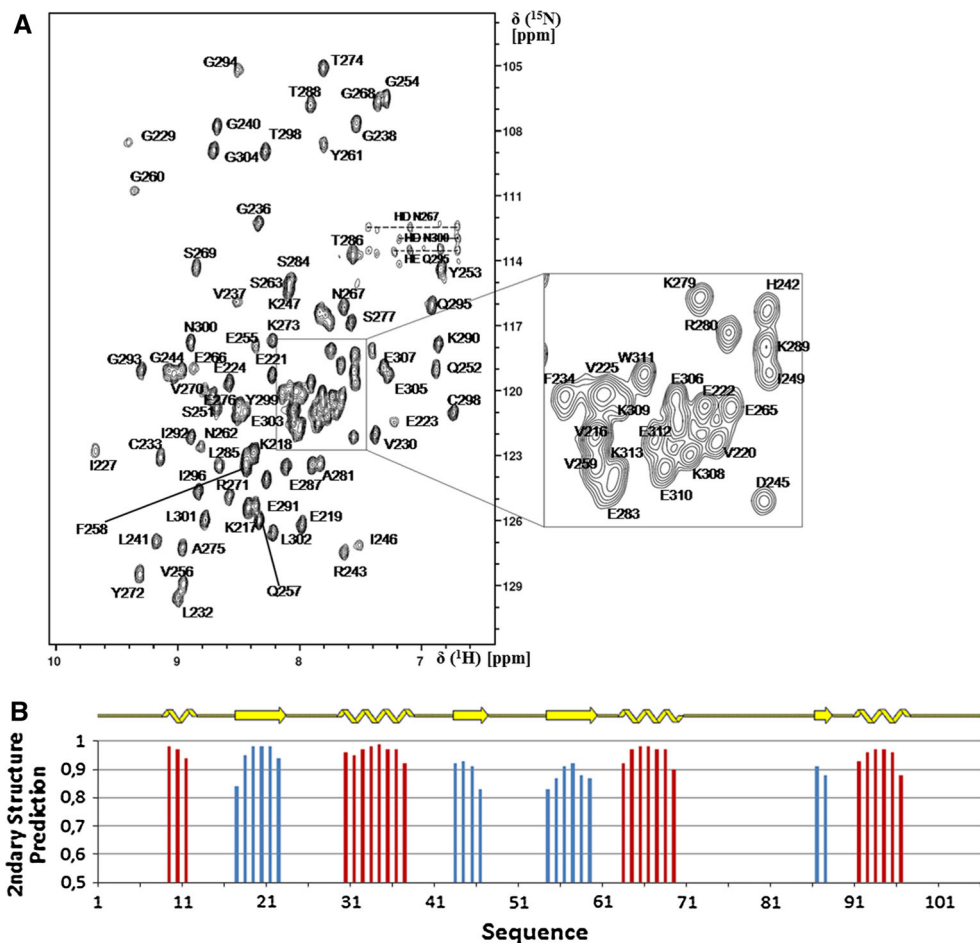
Sequence specific assignments of RRM2 were obtained from the following experiments: 2D [¹H–¹⁵N]-HSQC, 3D HNCA, 3D HN(CO)CA, 3D CBCA(CO)NH, 3D CBCANH, 3D HNCO, 3D HN(CA)CO, 3D HBHA(CO)NH, 3D HNHA, 3D ¹⁵N-edited NOESY, 3D (H)CCH-TOCSY and modified versions of the 3D CBCA(CO)NH experiment for the effective correlation of [NH](i) and [CBCA](i – 1) when the (i – 1) residue lacks an aliphatic C γ atom (Ala, Asn, Asp, Cys, Gly, Ser and aromatic residues) or a γ CO (Ala, Cys, Ser and aromatic residues); both experiments are included in the Bruker pulse sequence library. Internal 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS) was used as a chemical shift reference for ¹H. All NMR data were processed with the Bruker TOPSPIN 3.2/3.3 software and analyzed with XEASY (Bartels et al. 1995) and CARA (Keller 2004).

Results

Assignments and data deposition

The La protein from *D. discoideum* is generally very easy to obtain after overexpression in bacterial environment. This feature along with its high homology to the human counterpart makes this specific protein an ideal candidate for studying many aspects of its function through extensive mutagenesis and analysis of its domains. In the current

Fig. 1 **a** 700 MHz 2D [^1H - ^{15}N] TROSY spectrum at 298 K of uniformly [^{15}N]-labelled RRM2 domain. Resonance assignments are numbered according to the native sequence of La protein. **b** Secondary structure of RRM2 domain as predicted by TALOS+



study, the isolated RRM2 domain (Lys214-Lys318; 105 residues) of La protein was obtained with a yield of 9.6 mg/l from M9 minimal medium cultures. The polypeptide was mainly detected in the soluble fraction of the bacterial lysate and remained soluble throughout the two-step purification procedure and the NMR experiments. Analysis of the NMR spectra revealed a large chemical shift dispersion, indicative of a stably folded domain (Fig. 1a). Analysis of the heteronuclear NMR experiments resulted in the sequence-specific assignment of the backbone ^1H - ^{15}N resonances of almost all residues (100 assigned out of 105 total residues, i.e. 95 %). 91 % of the ^{15}N , 96 % of the C^α , C^αH 94.6 % of the C^β , C^βH and 53 % of C' resonances were unambiguously assigned. In addition, the side chains ^1H and ^{13}C resonances were assigned for most of the residues (71 % of ^1H resonances, 72 % of ^{13}C resonances). The ^1H , ^{15}N , and ^{13}C chemical shifts have been deposited in the BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) under the Accession No. 19967. The identification of the *cis/trans* conformations of prolines was based on the analysis of the 3D HBHA(CO)NH, 3D CBCA(CO)NH, 3D CBCANH and 3D (H)CCH-TOCSY spectra.

Comparison of the proline $^{13}\text{C}^\beta$ and $^{13}\text{C}^\gamma$ chemical shifts to reference values in the literature (*trans*-Pro: $^{13}\text{C}^\beta$ 31.75, $^{13}\text{C}^\gamma$ 27.26; *cis*-Pro: $^{13}\text{C}^\beta$ 34.16, $^{13}\text{C}^\gamma$ 24.52) (Schubert et al. 2002) clearly showed that the two prolines of the construct adopt the *trans* conformation: Pro228 ($^{13}\text{C}^\beta$ 30.11, $^{13}\text{C}^\gamma$ 27.29) and Pro297 ($^{13}\text{C}^\beta$ 32.92, $^{13}\text{C}^\gamma$ 27.87).

The assigned chemical shifts of RRM2 were analyzed with TALOS+ (<http://spin.niddk.nih.gov/bax/software/TALOS/>) to identify the elements of secondary structure. As shown in Fig. 1b, the domain is characterized by 4 α -helices and 4 β -strands in an $\alpha 0 \beta 1 \alpha 1 \beta 2 \beta 3 \alpha 2 \beta 4 \alpha 3$ arrangement. This distribution of secondary structure elements is somewhat different from the solution NMR structure of RRM2 from human La protein (26 % sequence identity). The short N-terminal helix ($\alpha 0$) is not present in the human homolog while the $\beta 4'$ strand is not detected in the RRM2 domain of *D. discoideum* La protein.

In summary, this report presents an efficient method for the heterologous expression and purification of the RRM2 domain of La protein from *D. discoideum* as a soluble protein. NMR analysis showed that the polypeptide is well folded and an almost complete sequence-specific

assignment as a prerequisite for further structure determination by NMR was obtained. Since the exact function of the RRM2 domain is still elusive, its solution structure and dynamic properties are expected to provide essential insights into the role of the distinct La protein motifs during the biogenesis of RNA polymerase III transcripts.

Acknowledgments The authors thank Prof. D. Drainas for kindly providing the cDNA library. “SEE-DRUG” Grant (EU FP7REGPOT CT-2011-285950; www.seedrug.upatras.gr) and “K. Karatheodori” Grant 2010 (D.164; UPAT Research Committee to C.S.) are acknowledged for financial support of this work. It was additionally supported in part and implemented under the “ARISTEIA” Action of the “OPERATIONAL PROGRAMME EDUCATION AND LIFE-LONG LEARNING” and is co-funded by the European Social Fund (ESF) and National Resources (MIS 1225, No. D608). D.B. thanks Dr. B. Fakler (University of Freiburg) for continued support.

References

- Apostolidi M, Vourtsis DJ, Chasapis CT, Stathopoulos C, Bentrop D, Spyroulias GA (2014) ^1H , ^{15}N , ^{13}C assignment and secondary structure determination of two domains of La protein from *D. discoideum*. *Biomol NMR Assign* 8:47–51
- Bartels C, Xia T, Billeter M, Güntert P, Wüthrich K (1995) The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J Biomol NMR* 6:1–10
- Bayfield MA, Yang R, Maraia RJ (2010) Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochim Biophys Acta* 1799:365–378
- Bousquet-Antonelli C, Deragon JM (2009) A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA* 15:750–764
- Jacks A, Kelly G, Curry S, Conte MR (2002) Resonance assignment and secondary structure determination of a C-terminal fragment of the lupus autoantigen (La) protein containing a putative RNA recognition motif (RRM). *J Biomol NMR* 22:387–388
- Jacks A, Babon J, Kelly G, Manolaridis I, Cary PD, Curry S, Conte MR (2003) Structure of the C-terminal domain of human La protein reveals a novel RNA recognition motif coupled to a helical nuclear retention element. *Structure* 7:833–843
- Keller R (2004) The computer aided resonance assignment tutorial CH-6410. Cantina Verlag, Goldau
- Liang C, Xiong K, Szulwach KE, Zhang Y, Wang Z, Peng J, Fu M, Jin P, Suzuki HI, Liu Q (2013) Sjogren syndrome antigen B (SSB)/La promotes global microRNA expression by binding microRNA precursors through stem-loop recognition. *J Biol Chem* 288:723–736
- Maraia RJ, Bayfield MA (2006) The La protein-RNA complex surfaces. *Mol Cell* 21:149–152
- Maraia RJ, Intine RVA (2001) Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. *Mol Cell Biol* 21:367–379
- Schubert M, Labudde D, Oschkinat H, Schmieder P (2002) A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on ^{13}C chemical shift statistics. *J Biomol NMR* 24:149–154
- Shen Y, Delaglio F, Cornilescu G, Bax A (2009) TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J Biomol NMR* 44:213–223
- Wolin SL, Cedervall T (2002) The La protein. *Annu Rev Biochem* 71:375–403

^1H , ^{13}C and ^{15}N backbone and side-chain resonance assignment of the LAM–RRM1 N-terminal module of La protein from *Dictyostelium discoideum*

Christos T. Chasapis · Aikaterini I. Argyriou ·
Maria Apostolidi · Parthena Konstantinidou ·
Detlef Bentrop · Constantinos Stathopoulos ·
Georgios A. Spyroulias

Received: 7 October 2014 / Accepted: 9 February 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract The N-terminal half of La protein consists of two concatenated motifs: La motif (LAM) and the N-terminal RNA recognition motif (RRM1) both of which are responsible for poly(U) RNA binding. Here, we present the backbone and side-chain assignments of the ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonances of the 191-residue LAM–RRM1 region of the La protein from the lower eukaryote *Dictyostelium discoideum* and its secondary structure prediction.

Keywords La protein · RNA polymerase III · RNA binding · Recombinant protein expression · NMR spectroscopy

Abbreviations

NMR Nuclear magnetic resonance
HSQC Heteronuclear single quantum coherence
LAM La motif
RRM RNA recognition motif
RRM1 N-terminal RNA recognition motif

Christos T. Chasapis and Aikaterini I. Argyriou have contributed equally to this work.

C. T. Chasapis · A. I. Argyriou · G. A. Spyroulias (✉)
Department of Pharmacy, University of Patras, 26504 Patras,
Greece
e-mail: G.A.Spyroulias@upatras.gr
URL: <http://www.bionmr.upatras.gr>

M. Apostolidi · P. Konstantinidou · C. Stathopoulos
Department of Biochemistry, School of Medicine, University of
Patras, 26504 Patras, Greece

D. Bentrop
Institute of Physiology II, University of Freiburg,
79104 Freiburg, Germany

Biological context

In eukaryotes, nascent RNA polymerase III (pol III) transcripts utilize the abundant La protein for proper folding and subsequent maturation (Maraia and Bayfield 2006; Liang et al. 2013). La protein is located in the nucleus exhibiting enhanced RNA binding properties. In humans the phosphorylation of Ser366 was proposed to inhibit La/RNA pol III transcription complexes in vitro (Fan et al. 1997). La is attracted by the UUU-3'OH trailers of RNA pol III transcripts and protects them from exonuclease degradation, although these signature nucleotides are not always essential for the initiation of La-RNA binding (Bayfield et al. 2010; Liang et al. 2013). A very important class of La protein ligands includes premature tRNA molecules (pre-tRNA). Since the first discovery of La antigen in patients suffering from autoimmune diseases like systemic Lupus erythematosus and Sjögren's syndrome, the repertoire of La ligands has expanded considerably. La is now considered a key modulator protein which interacts with viral RNAs and even pre-miRNAs (Liang et al. 2013) and has also been found as part of RNPs such as telomerase RNPs (Ford and Shay 2001; van Venrooij and Pruijn 1995). It is therefore no surprise that La protein homologs are found in almost all eukaryotes. However, La proteins can differ in the number of structural domains that are characteristic for this protein (Bousquet-Antonelli and Deragon 2009). La proteins contain two RNA binding domains in their N-terminal region, namely La motif (LAM) and RRM1. A second RRM motif (termed RRM2 or C-RRM) appears C-terminally to RRM1 as we move higher on the evolutionary ladder. Note that LAM and RRM1 are highly conserved whereas RRM2 does not exhibit the same level of conservation and is absent in lower eukaryotes (i.e. yeast) with the exception of the

slime mold *Dictyostelium discoideum*. La protein from this organism contains the same structural domains as its human homolog raising questions on (1) the role and evolutionary origin of the individual motifs of La protein, (2) their contribution to RNA recognition and binding, and (3) the origin of the observed antigenic properties in human (Wolin and Cedervall 2002). RNA binding to the LAM–RRM1 region of human La protein was investigated using a synthetic poly(U) RNA as ligand and the strong RNA binding properties of full-length La protein were attributed to this N-terminal region comprising the two most characteristic motifs of La proteins (Alfano et al. 2004). Based on previous structural studies via NMR and extensive biochemical analyses, it was proposed that neither LAM nor RRM1 alone can sustain strong RNA binding (Horke et al. 2004; Kucera et al. 2011). It is rather the synergy between the two domains that results in the overall RNA binding properties of La proteins. Moreover, it is worth mentioning that both LAM and RRM1 of human La protein contain distinct structural cores and can fold independently (Alfano et al. 2004). As it has been observed that the formation of the primary RNA-binding surfaces of both domains favors such interactions, the RNA binding properties that lie on the combination of both the LAM and RRM1, allow potential interactions with RNA molecules (Alfano et al. 2004; Bayfield and Maraia 2009). On the other hand, the C-terminal domain of La is involved in interactions with the 5′-UTR of various cellular mRNAs and recognition of the 5′-ppp end of nascent RNAs via a mechanism that is modulated by phosphorylation (Maraia and Intine 2001).

As already mentioned the structural organization of La protein from *D. discoideum* (Uniprot id:Q54TG6) is similar to human La. Both proteins contain the LAM–RRM1 region and a RRM2 domain and are therefore well-suited for comparative structural and biochemical studies. So far, we have initiated the production of the recombinant domains of *D. discoideum* La protein, both individually and in combination. The sequence-specific assignments of the isolated LAM, RRM1, and RRM2 domains along with the prediction of their secondary structure by TALOS+ were reported recently (Apostolidi et al. 2014; Argyriou et al. 2014).

The human LAM–RRM1 domain was already structurally analyzed by solution NMR spectroscopy (pdb id: 2VOP, Martino et al. 2012) revealing the surfaces that could bind RNA, as well as a synergetic mechanism for synthetic poly(U) RNA binding. Herein, we provide the backbone and side chain NMR assignments and the prediction of the secondary structure elements of the LAM–RRM1 region (residues 1–191) of *D. discoideum* La. Furthermore, we discuss our results in comparison to the human LAM–RRM1 region.

Fig. 1 **a** Domain organization in La proteins illustrating the great similarities between La protein from *D. discoideum* and its human homologue, **b** 700 MHz 2D [^1H – ^{15}N] TROSY spectrum at 298 K of uniformly [^{15}N]-labelled La-RRM1. Resonance assignments are numbered according to the native sequence of La protein, **c** upper panel secondary structure of the LAM–RRM1 construct as predicted by TALOS+, lower panel secondary structure of the individual LAM and RRM1 domain (Apostolidi et al. 2014) as predicted by TALOS+

Methods and experiments

Protein expression and purification

The LAM–RRM1 construct comprising residues 1–191 of *D. discoideum* La protein was cloned into a pET20b(+) vector which encodes a C-terminal His₆ tag, and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) strains. The purification of the recombinant protein was based on standard protocols of His-Trap affinity chromatography and size exclusion chromatography (Superdex 200_10/300GL GE Healthcare).

Uniform ^{13}C , ^{15}N isotope labeling

Isotope enrichment for NMR spectroscopy was achieved in M9 minimal medium supplemented with 1 g/l $^{15}\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ or/and 4 g/l uniformly ^{13}C -labeled glucose as nitrogen and carbon sources, respectively, according to the experimental procedure reported earlier (Apostolidi et al. 2014).

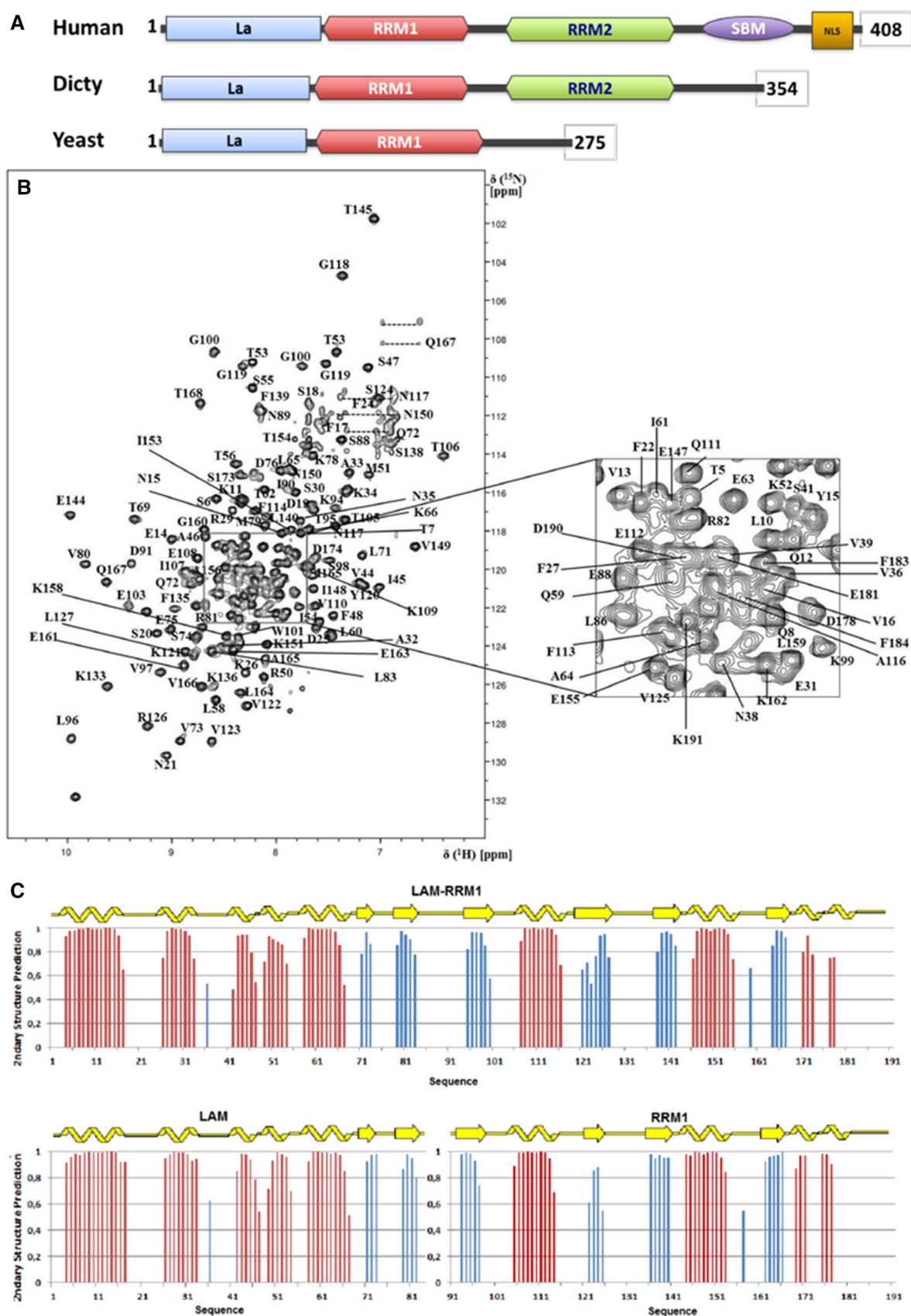
Sample preparation

Protein samples for NMR experiments were prepared in a mixed solvent of 90 % H_2O (50 mM KPi, pH 6.9) and 10 % $^2\text{H}_2\text{O}$. The protein concentration in the LAM–RRM1 sample was 0.68 mM.

Data acquisition, processing and assignment

All NMR data were acquired at 298 K on a Bruker Avance III High-Definition, four-channel 700 MHz NMR spectrometer equipped with a cryogenically cooled 5 mm ^1H – ^{13}C / ^{15}N /D Z-gradient probe.

Sequence specific assignments were obtained from the following experiments: 2D [^1H – ^{15}N]–HSQC and TROSY, 3D TROSY HNCA, 3D TROSY HN(CO)CA, 3D TROSY CBCA(CO)NH, 3D TROSY CBCANH, 3D TROSY HNCO, 3D TROSY HN(CA)CO, 3D HNHA, 3D ^{15}N -edited NOESY. Internal 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS) was used as a chemical shift reference for ^1H . All NMR data were processed with the TOPSPIN 3.2/3.3 software (Bartels et al. 1995) and analyzed with CARA (Keller 2004).



Results

Assignments and data deposition

The 23 kDa LAM–RRM1 construct was readily expressed in *E. coli* and detected mainly in the soluble fraction of the bacteria from which it was purified for further NMR structural analysis. The yield was 7.5 mg/l of M9 minimal growth medium. The NMR spectra showed significant chemical shift dispersion indicative of folded domains with stable tertiary structure (Fig. 1). The backbone ^1H – ^{15}N resonances of 183 out of 186 non-proline residues were assigned. All backbone and side chain NMR assignments of LAM–RRM1 have been deposited in the BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) under the accession no. 25239. 63 % of the ^{15}N , 73 % of the ^{13}C (95.8 % of the C^α , 92.5 % of the C^β and 71.6 % of C') and 72 % of the ^1H resonances were unambiguously assigned. The identification of the *cis/trans* conformations of the five proline residues was based on the analysis of the 3D HBHA(-CO)NH, 3D CBCA(CO)NH, 3D CBCANH and 3D (H)CCH-TOCSY spectra. Comparison of the proline $^{13}\text{C}^\beta$ and $^{13}\text{C}^\gamma$ chemical shifts to reference values in the literature (*trans*-Pro: $^{13}\text{C}^\beta$ 31.75, $^{13}\text{C}^\gamma$ 27.26; *cis*-Pro: $^{13}\text{C}^\beta$ 34.16, $^{13}\text{C}^\gamma$ 24.52 (Schubert et al. 2002) clearly showed that all prolines in LAM–RRM1 adopt the *trans* conformation. The assigned chemical shifts were analyzed with TALOS+ [<http://spin.niddk.nih.gov/bax/software/TALOS/>; (Shen et al. 2009)] to determine the secondary structure of the protein. According to TALOS+, as seen in Fig. 1b, the LAM domain is characterized mainly by four α -helices and two short β -strands. This distribution of secondary structure elements is similar to human La motif (Sanfelice et al. 2008) and also to *D. discoideum* LAM when individually expressed and studied in solution (Apostolidi et al. 2014). On the other hand, the RRM1 region of the LAM–RRM1 construct contains four β -strands and two α -helices (Fig. 1b) following the same pattern as in the human homolog and the isolated *D. discoideum* RRM1 domain studied by NMR (Sanfelice et al. 2008; Apostolidi et al. 2014). The NMR data and the secondary structure prediction of the LAM–RRM1 construct clearly indicate that its two domains are well-folded, both as single domains and in the present concatenated form that represents the N-terminal half of La protein.

In summary, this report presents an efficient method for heterologous expression in *E. coli* and purification of the LAM–RRM1 protein from *D. discoideum*, as a soluble protein. NMR analysis showed that the LAM–RRM1 construct is well-folded and an almost complete sequence-specific assignment was obtained, which is crucial for further solution structure determination by NMR. Since the LAM–RRM1 region is crucial for RNA–La protein

interactions, its conformation and dynamic properties should provide essential insights into the mechanism of RNA binding and, moreover, into the exact role of La protein during RNA biogenesis. Finally, comparison of the interaction of RNA ligands with the isolated LAM or RRM1 domains and the LAM–RRM1 construct will provide additional information on the structural basis of RNA recognition by La protein.

Acknowledgments The authors thank Prof. D. Drinas for kindly providing the cDNA library. “SEE-DRUG” Grant (EU FP7 REGPOT CT-2011-285950; www.seedrug.upatras.gr) and “K. Karatheodori” Grant 2010 (D.164; UPAT Research Committee to C.S.) are acknowledged for financial support. This work was additionally supported in part and implemented under the “ARISTEIA” action of the “OPERATIONAL PROGRAMME EDUCATION AND LIFELONG LEARNING” and is co-funded by the European Social Fund (ESF) and National Resources (MIS 1225, No. D608). D.B. thanks Dr. B. Fakler (University of Freiburg) for continued support.

References

- Alfano C, Sanfelice D, Babon J, Kelly G, Jacks A, Curry S, Conte MR (2004) Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein. *Nat Struct Mol Biol* 14:323–329
- Apostolidi M, Vourtsis DJ, Chasapis CT, Stathopoulos C, Bentrop D, Spyroulias GA (2014) ^1H , ^{15}N , ^{13}C assignment and secondary structure determination of two domains of La protein from *D. discoideum*. *Biomol NMR Assign* 8:47–51
- Argyriou A, Chasapis CT, Apostolidi M, Konstantinidou P, Stathopoulos C, Bentrop D, Spyroulias GA (2014) Backbone and side chain NMR assignment, along with the secondary structure determination of RRM2 domain of La protein from a lower eukaryote exhibiting identical structural organization with its human homolog. *Biomol NMR Assign*. doi:10.1007/s12104-014-9578-7
- Bartels C, Xia T, Billeter M, Güntert P, Wüthrich K (1995) The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J Biomol NMR* 6:1–10
- Bayfield MA, Maraia RJ (2009) Precursor-product discrimination by La protein during tRNA metabolism. *Nat Struct Mol Biol* 16:430–437
- Bayfield MA, Yang R, Maraia RJ (2010) Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochim Biophys Acta* 1799:365–378
- Bousquet-Antonelli C, Deragon JM (2009) A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA* 15:750–764
- Fan H, Sakulich AL, Goodier JL, Zhang X, Qin J, Maraia RJ (1997) Phosphorylation of the human La antigen on serine 366 can regulate recycling of RNA polymerase III transcription complexes. *Cell* 88:707–715
- Ford LP, Shay JW, Wright WE (2001) The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. *RNA* 7:1068–1075
- Horke S, Reumann K, Schulze C, Grosse F, Heise T (2004) The La motif and the RNA recognition motifs of human La autoantigen contribute individually to RNA recognition and subcellular localization. *J Biol Chem* 279:50302–50309
- Keller R (2004) The computer aided resonance assignment tutorial CH-6410. Cantina Verlag, Goldau

- Kucera NJ, Hodsdon ME, Wolin SL (2011) An intrinsically disordered C terminus allows the La protein to assist the biogenesis of diverse noncoding RNA precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:1308–1313
- Liang C, Xiong K, Szulwach KE, Zhang Y, Wang Z, Peng J, Fu M, Jin P, Suzuki HI, Liu Q (2013) Sjogren syndrome antigen B (SSB)/La promotes global microRNA expression by binding microRNA precursors through stem-loop recognition. *J Biol Chem* 288:723–736
- Maraia RJ, Bayfield MA (2006) The La protein-RNA complex surfaces. *Mol Cell* 21:149–152
- Maraia RJ, Intine RVA (2001) Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. *Mol Cell Biol* 21:367–379
- Martino L, Pennell S, Kelly G, Bui TT, Kotik-Kogan O, Smerdon SJ, Drake AF, Curry S, Conte MR (2012) Analysis of the interaction with the hepatitis C virus mRNA reveals an alternative mode of RNA recognition by the human La protein. *Nucleic Acids Res* 3:1381–1394
- Sanfelice D, Kelly G, Curry S, Conte MR (2008) NMR assignment of the N-terminal region of human La free and in complex with RNA. *Biomol NMR Assign* 2:107–109
- Schubert M, Labudde D, Oschkinat H, Schmieder P (2002) A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on ^{13}C chemical shift statistics. *J Biomol NMR* 24:149–154
- Shen Y, Delaglio F, Cornilescu G, Bax A (2009) TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J Biomol NMR* 44:213–223
- van Venrooij WJ, Pruijn GJ (1995) Ribonucleoprotein complexes as autoantigens. *Curr Opin Immunol* 7:819–824
- Wolin SL, Cedervall T (2002) The La protein. *Annu Rev Biochem* 71:375–403