

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πρώτο μέρος της διατριβής, ριβοσώματα μη ειδικά σημασμένα με το φθορισμοφόρο Atto655 συνδέθηκαν σε χάντρες SiO₂ επικαλυμμένες με στρεπταβιδίνη. Η σύνδεση έγινε μέσω της ριβοσωμικής πρωτεΐνης L4, η οποία βιοτινυλιώθηκε *in vivo* και κατόπιν ενσωματώθηκε στα ριβοσώματα.

Οι χάντρες SiO₂ με τα συνδεδεμένα ριβοσώματα χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα με οπτικές λαβίδες. Τα ριβοσώματα συνέθεσαν τις πρωτεΐνες GFPem και ουβικιτίνη πάνω σε μία χάντρα με την εισαγωγή ενός μίγματος *in vitro* μεταγραφής-μετάφρασης, το οποίο δεν περιείχε το αμινοξύ ιστιδίνη, ώστε να σταματάει η σύνθεση σε μία ουρά έξι ιστιδινών. Το αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών, το οποίο είχε βιοτινυλιωθεί κατά την σύνθεση με την τεχνική του κατασταλτικού tRNA, ξεπρόβαλε από το κανάλι του ριβοσώματος και ήταν προσβάσιμο για να συνδεθεί μέσω στρεπταβιδίνης σε μία χάντρα πολυστυρενίου, η οποία ήταν παγιδευμένη στις οπτικές λαβίδες.

Με τις οπτικές λαβίδες κατέστη δυνατό να μετρηθούν δυνάμεις στην κλίμακα των pN. Αποδείχθηκε ότι απαιτείται δύναμη μικρότερη των 10 pN, ώστε να διατηρηθεί ανέπαφη η σύνδεση του συστήματος, καθώς με εφαρμογή μεγαλύτερης δύναμης παρατηρήθηκε ρήξη της σύνδεσης. Το επόμενο βήμα θα ήταν να συνεχιστεί η σύνθεση της πρωτεΐνης και να προσδιοριστούν οι δυνάμεις που ασκούνται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα κατά τη διάρκεια της σύνθεσης.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής, τα ίδια ριβοσώματα μη ειδικά σημασμένα με το φθορισμοφόρο Atto655 συνδέθηκαν πάνω σε επιφάνειες μέσω της βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης L4. Τα ριβοσώματα αυτά ανιχνεύθηκαν πάνω στην επιφάνεια λόγω του φθορισμού τους με ένα μικροσκόπιο ευρέως φάσματος και ήταν ικανά να συνθέσουν, *in situ* πάνω στο μικροσκόπιο, πλήρως λειτουργική πρωτεΐνη GFPem. Η πρωτεΐνη είχε τροποποιηθεί κατάλληλα ώστε να παραμένει προσκολλημένη στο ριβόσωμα μετά το τέλος της σύνθεσης και ανιχνεύθηκε λόγω του ενδογενούς φθορισμού της. Με το σύστημα αυτό έγινε δυνατή η παρατήρηση των χρόνων εμφάνισης πλήρως λειτουργικών πρωτεϊνών GFPem από μεμονωμένα ριβοσώματα.

Ακολούθησε η σύνδεση στις επιφάνειες αυτή τη φορά ριβοσωμάτων ειδικά σημασμένων είτε στην πρωτεΐνη L24 είτε στην πρωτεΐνη L29 με το φθορισμοφόρο

Alexa633 (δέκτης). Τα ριβοσώματα αυτά συνέθεσαν την πρωτεΐνη GFPem, στην οποία εισήχθη το φθορισμοφόρο BODIPY-TMR (δότης) κατά την διάρκεια της σύνθεσης με την τεχνική του κατασταλτικού tRNA. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, γινόταν διέγερση μόνο του δότη ανά τακτά χρονικά διαστήματα αλλά ανίχνευση του φθορισμού και του δότη και του δέκτη.

Η σύνθεση σταμάτησε και πάλι σε μία ουρά έξι ιστιδινών, αμέσως μετά την εισαγωγή του BODIPY-TMR. Σε αυτό το σημείο τα φθορισμοφόρα απείχαν μεταξύ τους 111 Å, απόσταση αρκετά μακρινή και δεν παρατηρήθηκε FRET. Με την επανέναρξη, όμως, της σύνθεσης, παρατηρήθηκε ότι κάποιοι από τους δέκτες άρχισαν να φθορίζουν, γεγονός που οφειλόταν αποκλειστικά στο φαινόμενο του FRET. Το επόμενο βήμα θα ήταν να προσδιοριστούν επακριβώς οι εντάσεις φθορισμού των δύο φθορισμοφόρων για κάθε χρονική στιγμή, ώστε να υπολογιστούν οι αποστάσεις μεταξύ τους και να δοθεί μία πρώτη εντύπωση για το πως αναδιπλώνεται η πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της σύνθεσής της.