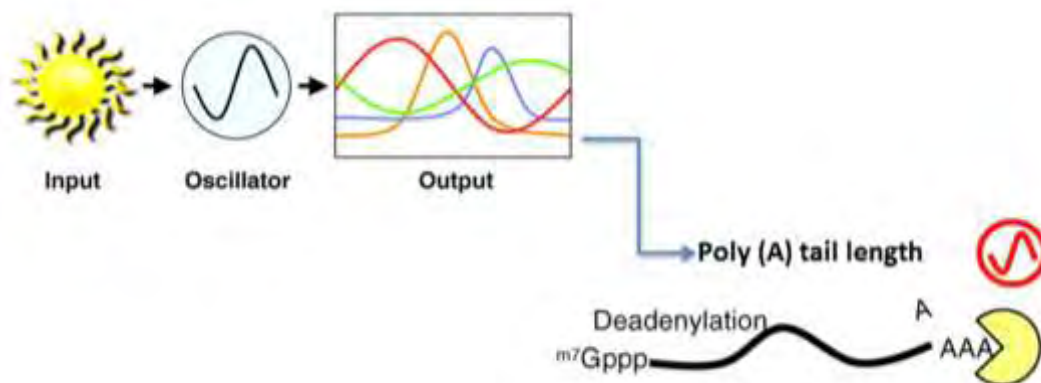




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**Έκφραση, καθαρισμός και χαρακτηρισμός της ανασυνδυασμένης  
*AtHESP* από το φυτό *Arabidopsis thaliana*.**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ- ΧΑΤΖΗ ΜΑΡΙΑ-ΖΑΧΑΡΟΥΛΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2012**

## Διπλωματική Εργασία Χατζή Μαρία-Ζαχαρούλα

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

### Υπεύθυνος Καθηγητής:

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Επίκουρος καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

### Τριμελής Επιτροπή:

**Μπαλατσός Νικόλαος**, Επίκουρος καθηγητής ΤΒΒ, Π.Θ

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη**, Επίκουρη Καθηγήτρια ΤΒΒ, Π.Θ

### Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, και κυρίως τον κύριο Μπαλατσό Νικόλαο ο οποίος ανέλαβε την εποπτεία της παρούσας πτυχιακής μελέτης και συνέλαβε στην ομαλή διεξαγωγή και περάτωση της εργασίας, καθώς και όλους τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την ευχάριστη συνεργασία, τις συμβουλές τους και τη συντροφικότητα όλο αυτό το διάστημα.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1. Οι κίρκαδικοί ρυθμοί.....	6
1.2. Το κίρκαδικό ρολόι των φυτών.....	7
1.2.1. Γενικά στοιχεία – Η εξέλιξη των φυτικών κίρκαδικών ρολογιών.....	7
1.2.2. Η αρχιτεκτονική του κίρκαδικού ρολογιού.....	8
1.3. Τα μονοπάτια εισόδου στον κεντρικό ταλαντωτή.....	10
1.3.1. Συγχρονισμός του ρολογιού.....	10
1.3.2. Φυτοχρώματα (phytochromes).....	11
1.4. Ο κεντρικός ταλαντωτής του κίρκαδικού ρολογιού των φυτών.....	12
1.5. Μονοπάτια εξόδου από τον κεντρικό ταλαντωτή (εκροές κίρκαδικού συστήματος).....	16
1.6. Οι μηχανισμοί αποικοδόμησης mRNA στους ευκαρυώτες.....	16
1.6.1. Μηχανισμοί αποικοδόμησης του mRNA στο φυτικό κύτταρο.....	19
1.7. Αποαδενλίωση.....	21
1.7.1. Ποικιλότητα και βιοχημική δράση αποαδενυλασών.....	22
1.7.2. Σύμπλοκα αποαδενυλασών.....	24
1.7.3. Βιολογική λειτουργία αποαδενυλασών.....	26
1.7.4. Ρύθμιση της αποαδενλίωσης.....	27
1.7.5. Επαγωγή της αποαδενλίωσης από ρυθμιστικές πρωτεΐνες.....	28
1.7.6. Παράγοντες που διεγείρουν ή αναστέλλουν την αποαδενλίωση.....	29
1.8. Νοκτουρνίνη (Nocturnin), μια αποαδενυλάση που ελέγχεται από το κίρκαδιο ρολόι.....	31
1.8.1. Μεταγραφική ρύθμιση της νοκτουρνίνης.....	32
2. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	35
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
3.1. ΥΛΙΚΑ.....	36
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
3.2.1. Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένης AtHESP.....	42
3.2.2. Μελέτη της AtHESP σε αντιδράσεις αποαδενλίωσης με καθορισμένα υποστρώματα RNA.....	49
3.2.3. Ομολογία της AtHESP με την Nocturnin.....	54
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	56
4.1. Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένης AtHESP.....	56
4.1.1. Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης.....	56
4.1.2. Έκφραση και απομόνωση AtHESP.....	57

4.2. Μελέτη της AtHESP σε αντιδράσεις αποαδενλίωσης με γνωστά υποστρώματα.....	64
4.2.1. Προετοιμασία υποστρωμάτων αντιδράσεων αποαδενλίωσης: Απομόνωση και πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	64
4.2.2. Προετοιμασία υποστρωμάτων αντιδράσεων αποαδενλίωσης με μεταγραφή <i>in vitro</i> .....	65
4.2.3. Αντιδράσεις RNA υποστρωμάτων (μεταγραφή <i>in vitro</i> ) με αποαδενυλάσες.....	66
4.3. Ομολογία της AtHESP με την Nocturnin.....	69
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	73

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στους περισσότερους οργανισμούς έχει βρεθεί πως ορισμένες συμπεριφορές και βιολογικές διαδικασίες παρουσιάζουν περιοδικότητα περίπου 24 ωρών, ως απόκριση και προσαρμογή σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα με κυριότερο τον κύκλο ημέρας/νύχτας. Περιγράφονται με τον όρο ημερονύκτιος ή κίρκαδικός ρυθμός και απαντούν σε μεγάλο εύρος οργανισμών από κυανοβακτήρια, μύκητες, φυτά ως τον άνθρωπο. Εμπλέκονται σε κρίσιμες λειτουργίες και διεργασίες, όπως στην ανάπτυξη και την περίοδο άνθησης στα φυτά, την έκκριση ορμονών και τον κύκλο ύπνου – εγρήγορσης στον άνθρωπο. Σε μοριακό επίπεδο έχει δειχθεί πως μια σειρά γονιδίων υπακούει σε κίρκαδική ρύθμιση. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια εκφράζουν μεταγραφικούς παράγοντες. Πρόσφατα, αναγνωρίστηκε σε κύτταρα θηλαστικών μια αποαδενυλάση, η νοκτουρνίνη, που υπόκειται σε κίρκαδική ρύθμιση, γεγονός που υπαινίσσεται πως η αποικοδόμηση ορισμένων τουλάχιστον mRNAs υπόκειται σε κίρκαδικό έλεγχο. Από μελέτες εργαστηρίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας εντοπίστηκε πρόσφατα μια νέα αποαδενυλάση που ρυθμίζεται από το κίρκαδικό ρολόι, η εσπερίνη ή AtHESP, στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και είναι ομόλογη της νοκτουρνίνης. Σκοπός της εργασίας είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός της ανασυνδυασμένης AtHESP. Εξετάστηκαν συνθήκες για να αυξηθεί η απόδοση και ο εμπλουτισμός εκχυλισμάτων μετά από παραγωγή της AtHESP σε ετερόλογο σύστημα. Για τη μελέτη των βιοχημικών ιδιοτήτων του ενζύμου επιχειρήθηκε η ανάπτυξη πρωτοκόλλου αντιδράσεων αποαδενυλίωσης χρησιμοποιώντας καθορισμένα, μη-ραδιενεργά υποστρώματα RNAs. Τα αποτελέσματα έδειξαν καταρχήν πως η AtHESP μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τέτοιες αντιδράσεις. Τέλος, πειράματα ανοσοαποτύπωσης με κατάλληλα αντισώματα έδειξαν την ομολογία της AtHESP με την νοκτουρνίνη. Η εργασία αναμένεται να συμβάλει στην παραγωγή AtHESP ικανοποιητικής απόδοσης και εμπλουτισμού για χρήση σε δομικές μελέτες. Επίσης, η χρήση του τροποποιημένου πρωτοκόλλου αντιδράσεων αποαδενυλίωσης είναι ιδιαίτερης σημασίας για περαιτέρω μελέτες βιοχημικού χαρακτηρισμού του ενζύμου στο μέλλον.

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

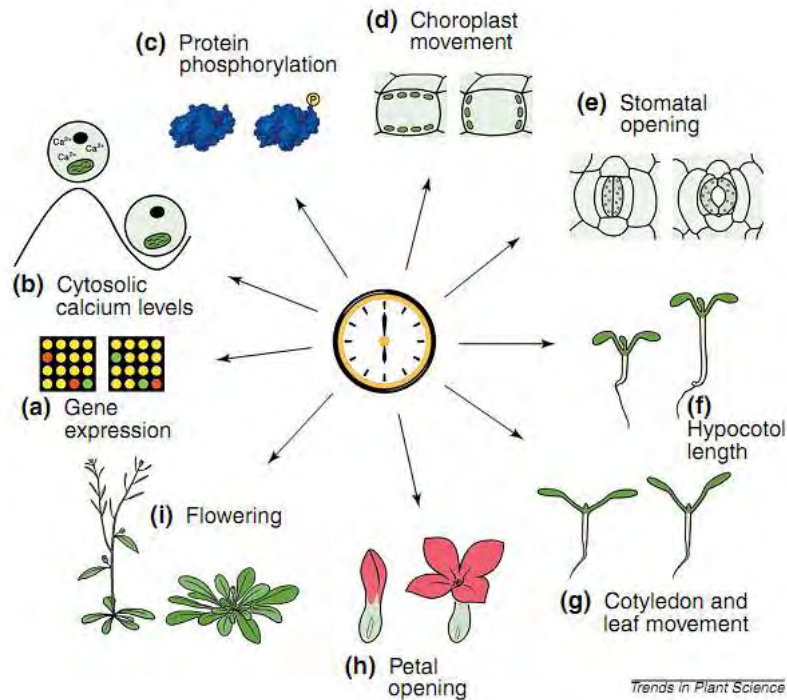
### 1.1. Οι κირκαδικοί ρυθμοί.

Πολλές πτυχές της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας, τόσο των φυτών όσο και των ζώων, εμφανίζουν μια 24ωρη ταλάντωση (επαναλαμβανόμενο φαινόμενο εναλλαγής μεταξύ δυο ακραίων θέσεων με 24ωρη περίοδο) κατά τη διάρκεια κάθε ημέρας. Κάποιες από αυτές τις ταλαντώσεις συμβαίνουν αποκλειστικά ως απόκριση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι κύκλοι ημέρας/νύχτας και διατηρούνται κάτω από σταθερές συνθήκες. Τέτοιοι ρυθμοί, των οποίων οι περίοδοι αντιστοιχούν στην περιστροφή της γης γύρω από τον άξονα της (περίπου 24 ώρες) ονομάζονται κირκαδικοί (circadian, από το λατινικό: circa-dies, περίπου μια ημέρα).

Οι κირκαδικοί ρυθμοί (circadian rythms) παρατηρούνται σε ένα ευρύ φάσμα πολύ διαφορετικών μεταξύ τους οργανισμών, από τα κυανοβακτήρια και τους μύκητες μέχρι τα φυτά, τα έντομα και τα θηλαστικά. Ο άνθρωπος, για παράδειγμα, όπως και άλλα ημερόβια θηλαστικά έχει μεγαλύτερο βαθμό ευστροφίας, αυξημένη πίεση αίματος, θερμοκρασία σώματος και νεφρική λειτουργία κατά την διάρκεια της ημέρας, με μια αυξημένη τάση για ύπνο τη νύχτα. Στα έντομα, το ακμαίο της μύγας βγαίνει από το κουκούλι του σε συγχρονισμό με το ξημέρωμα για να έχει μεγαλύτερες πιθανότητες επιβίωσης (Pittendrigh 1993). Ακόμα και είδη εντόμων και ψαριών που διαβιούν σε σπηλιά διατηρούν τους ημερήσιους ρυθμούς των προγόνων τους.

Κιρκαδικοί ρυθμοί στα φυτά συμπεριλαμβάνουν την κίνηση φυτικών οργάνων όπως φύλλων και πετάλων, το άνοιγμα των στοματιών, καθημερινές ταλαντώσεις σε μεταβολικές δραστηριότητες όπως η αναπνοή και η φωτοσύνθεση. Οι κირκαδικοί ρυθμοί κυμαίνονται από τους σχετικά μη-εμφανείς, όπως οι ρυθμοί στη φωτοσύνθεση, μέχρι τους συγκριτικά εμφανείς, όπως οι ρυθμοί στην κίνηση των φύλλων των φυτών (Εικ 1.1) και το άνοιγμα των άνθεων.

Οι κირκαδικοί ρυθμοί χαρακτηρίζονται από ένα σύνολο ιδιοτήτων, πέρα από την 24ωρη περίοδο τους. Αρχικά, υπάρχει ενδογενής διατήρηση του ρυθμού (free running rythm) κάτω από σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες. Η περίοδος του ρυθμού είναι ανεξάρτητη από τις θερμοκρασιακές αλλαγές. Η αλλαγή φάσης της ταλάντωσης (phase-shift) του ρυθμού προκαλείται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (κυρίως από το φως και δευτερευόντως η θερμοκρασία). Ανεξάρτητα με τον οργανισμό, οι κირκαδικοί ρυθμοί εμφανίζονται στο επίπεδο του κυττάρου. Ανάλογα όμως με τον οργανισμό τα κύτταρα διαφορετικών ιστών μπορεί να εκτελούν διαφορετικές ταλαντώσεις. Τέλος η ύπαρξη ενός συστήματος καταγραφής του χρόνου δίνει τη δυνατότητα στις διάφορες φυσιολογικές διεργασίες να συντονίζονται με βάση τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, τόσο σε επίπεδο οργανισμού όσο και σε επίπεδο πληθυσμού (π.χ. άνθιση, επικοινωνία κ.λ.π).



**Εικ. 1.1.a)** Η έκφραση πολλών γονιδίων δείχνει κιρκαδική ρύθμιση. Δύο παραδείγματα αποτελούν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που προσδένονται στην χλωροφύλλη α ή β (Lhcβ ή CAB) και την αναγωγή των νιτρικών αλάτων (NIA2). Πολλά από αυτά τα γονίδια σχετίζονται με τη φωτοσύνθεση και με βιοχημικές και φυσιολογικές δραστηριότητες. Είναι πιθανό ότι η χρονική στιγμή της έκφρασης αυτών των γονιδίων (για παράδειγμα, η αύξηση των επιπέδων της Lhcβ πριν την αυγή), υποδεικνύει ένα ρόλο του κιρκαδικού ρολογιού στο συντονισμό του μεταβολισμού για τη μεγιστοποίηση των αποδόσεων της φωτοσύνθεσης. Η χρήση FDD (fluorescent differential display) και υψηλής πυκνότητας DNA μικροσυστοιχίες για την παρακολούθηση του παγκόσμιου προφίλ έκφρασης θα πρέπει να μας δώσει μια ένδειξη του εύρους των γονιδίων που υπόκεινται σε κιρκαδικό έλεγχο. **b)** Οι συγκεντρώσεις του ελεύθερου ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα έχει αποδειχθεί ότι ταλαντώνονται με κιρκάδιο ρυθμό στο *Arabidopsis*. Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία του ασβεστίου και ως δευτερεύων αγγελιοφόρο και συμπαράγοντα για πολλά ένζυμα, αυτό μπορεί να είναι ένα μέσο με το οποίο το ρολόι του ρυθμίζει μια ποικιλία από κυτταρικές διαδικασίες. **c)** Το ρολόι ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση ορισμένων πρωτεϊνών. Το καλύτερο παράδειγμα είναι η μελέτη στην *Kalanchoe fedtschenkoi*, η οποία παρουσιάζει την κιρκαδική δραστηριότητα μιας κινάσης που φωσφορυλιώνει την φωσφοενολοπυροσταφυλική καρβοξυλάση. Σε ένα υψηλότερο επίπεδο οργάνωσης, η κίνηση του χλωροπλάστη **(d)**, το άνοιγμα των στομάτων **(e)**, η επιμήκυνση του υποκοτυλίου **(f)** και η κίνηση των φύλλων και της κοτυληδόνας **(g)** στο φυτό *Arabidopsis*, όλα δείχνουν κιρκαδική ρύθμιση. Στην *Kalanchoe*, το άνοιγμα του πέταλου **(h)** δείχνει κιρκαδική ρύθμιση. Το ρολόι είναι επίσης ζωτικής σημασίας για το συγχρονισμό διαδικασιών ανάπτυξης, όπως η άνθηση **(i)**. Πράγματι, μεταλλάξεις σε όλα τα πιθανά γονίδια που σχετίζονται με το ρολόι μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση του φωτοπεριοδικού ελέγχου της ανθοφορίας (Barak S., 2000).

## 1.2. Το κιρκαδικό ρολόι των φυτών

### 1.2.1. Γενικά στοιχεία – Η εξέλιξη των φυτικών κιρκαδικών ρολογιών

Η φωτοπεριοδική ρύθμιση μιας βιολογικής διαδικασίας σημαίνει ότι αυτή συνδέεται με μια χρονική μέτρηση. Οι οργανισμοί έχουν μια εγγενή χρονική κλίμακα στη διάθεση τους. Μέρα με τη μέρα, κατά τη διάρκεια του χρόνου, συγκρίνουν την κλίμακα αυτή με το πραγματικό μήκος της ημέρας ή της νύχτας. Όταν το πραγματικό μήκος της ημέρας ή της νύχτας είναι μεγαλύτερο (ή μικρότερο, ανάλογα με την περίπτωση) από την εγγενή χρονική κλίμακα, συμβαίνει μια αλλαγή στη φυσιολογία

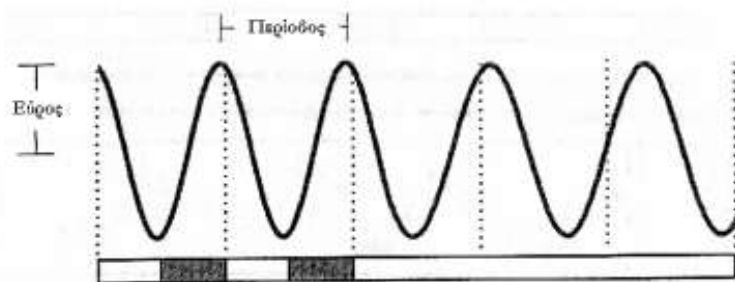
του οργανισμού. Αυτή είναι μια «φωτοπεριοδική αντίδραση» (photoperiodic response) (Engelman, 2007).

Δεδομένου ότι η φωτοπερίοδος μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του έτους, ένας μηχανικός πιθανόν να χρησιμοποιούσε κάποιου είδους κλεψύδρα ή χρονόμετρο για να κατασκευάσει ένα μετρητή για την εκτίμηση του μήκους της φωτεινής ή της σκοτεινής περιόδου. Εάν μια συγκεκριμένη χρονική περίοδος, η οποία αντιστοιχεί στο μήκος της ημέρας στο οποίο μια διαδικασία πρέπει να λάβει χώρα, έχει περάσει, το χρονόμετρο χτυπάει ή η άμμος της κλεψύδρας έχει συσσωρευτεί στο κάτω μέρος αυτής. Έτσι, θα μπορούσε να ξεκινήσει η φωτοπεριοδική αντίδραση. Παρόλα αυτά, δεν είναι αυτός ο τρόπος με τον οποίο μετρούν οι οργανισμοί το μήκος της ημέρας. Αντί για αυτό, όπως είχε προταθεί από τον Bünning (1936), χρησιμοποιούν ένα ρολόι τύπου εκκρεμούς (Engelman, 2007). Το εκκρεμές αυτό αναφέρεται ως το κίρκαδικό ρολόι (circadian clock), το οποίο διέπει τους κίρκαδικούς ρυθμούς ως ο εγγενής βηματοδότης (endogenous pacemaker) των οργανισμών (Gardner και συν, 2006).

Για ποιο λόγο όμως τα φυτά ανέπτυξαν ένα τόσο πολύπλοκο, όπως θα φανεί στη συνέχεια, σύστημα καταγραφής χρόνου; Για να γίνει κατανοητός ο λόγος που ώθησε στη δημιουργία κίρκαδικών ρολογιών στα φυτά είναι απαραίτητο να εξηγηθεί η εξελικτική πίεση που αυτά υφίστανται. Τα φυτά είναι οργανισμοί χωρίς δυνατότητα μετακίνησης, έτσι βρίσκονται σε στενή αλληλεπίδραση με το άμεσο περιβάλλον τους. Η δυνατότητα συγχρονισμού των λειτουργιών του φυτού με τις ημερήσιες εναλλαγές στη θερμοκρασία και το φως παρέχει μεγάλο πλεονέκτημα στα φυτά. Ο Pittendrigh (1993) υπέθεσε ότι η κινητήρια δύναμη πίσω από την εξέλιξη των κίρκαδικών ρολογιών είναι το κληρονομούμενο πλεονέκτημα πρόβλεψης των αντιδράσεων που επηρεάζονται αρνητικά από το φως έτσι ώστε να συμβούν κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η πρόβλεψη τακτικών αλλαγών στο περιβάλλον μειώνει την καθυστέρηση μεταξύ μιας αλλαγής στο περιβάλλον και της κατάλληλης μεταβολής στη φυσιολογία του οργανισμού (Harmer και συν, 2001; Johnson και συν, 2001). Στα φυτά, η επαγωγή των μονοπατιών πρόσληψης φωτός πριν το ξημέρωμα επιτρέπει την πλήρη εκμετάλλευση της φωτεινής περιόδου, ενώ η επαγωγή του μηχανισμού απόκρισης σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης λόγω ανεπάρκειας νερού αργά το απόγευμα, μπορεί να προβλέψει και να προετοιμάσει το φυτό (Harmer και συν, 2000; Millar και συν, 2004).

### 1.2.2. Η αρχιτεκτονική του κίρκαδικού ρολογιού

Το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας σχετικά με το κίρκαδικό ρολόι έχει πραγματοποιηθεί στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Στη συνέχεια της παρούσας εισαγωγής, εάν δε διευκρινίζεται κάτι διαφορετικό, θα εννοείται ότι αναφερόμαστε σε δεδομένα που έχουν προέλθει από τη σχετική έρευνα στο φυτό αυτό.

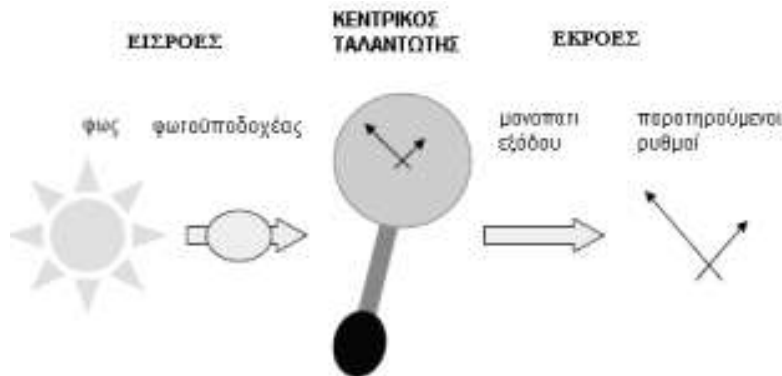


**Εικ. 1.2.** Παράδειγμα ταλάντωσης: ιδανικός κίρκαδικός ρυθμός (αρχικά σε φωτοπερίοδο [εναλλαγή άσπρου και μαύρου πλαισίου] και στη συνέχεια σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού [συνεχές άσπρο πλαίσιο]). Στο σχήμα φαίνονται και οι βασικές παράμετροι μιας ταλάντωσης: εύρος (amplitude) και περίοδος (period).



Γενικά, οι κίρκαδικές ταλαντώσεις είναι ένα βιοχημικό σύστημα που εναλλάσσεται με έναν κανονικό ρυθμό μεταξύ δυο ακραίων καταστάσεων (Εικ.1.2). Προσομοιάζει, όπως προαναφέρθηκε, με ένα εκκρεμές που ταλαντώνεται σταθερά μεταξύ δυο αντίθετων θέσεων (Εικ.1.3). Ως εύρος της ταλάντωσης ορίζεται το ήμισυ της διαφοράς της τιμής του ελάχιστου από την τιμή του μέγιστου. Η περίοδος της ταλάντωσης αναφέρεται ως ο χρόνος που απαιτείται για τη συμπλήρωση ενός πλήρους κύκλου ταλάντωσης (Εικ. 1.2). Το επίπεδο (level) ενός ρυθμού είναι η βάση γύρω από την οποία συμβαίνουν οι ρυθμικές μεταβολές και η φάση (phase) του ρυθμού αναφέρεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του ρυθμού, όπως είναι η μέγιστη ή η ελάχιστη τιμή, σε σχέση με την αντίστοιχη χρονική κλίμακα.

Σε ένα υπεραπλουστευμένο μοντέλο, το οποίο προτάθηκε αρχικά από τον Bünning (1936), το ρολόι χωρίζεται σε τρία δομικά συστατικά (Εικ.1.3). Το πρώτο, τα μονοπάτια εισόδου του κεντρικού ταλαντωτή ή εισροές του συστήματος (input pathways), αφορά το πώς οι εξωτερικοί παράγοντες συντονίζουν το δεύτερο συστατικό, δηλαδή τον ενδογενή κεντρικό ταλαντωτή (central oscillator), με το περιβάλλον. Έτσι, δίνεται το έναυσμα στο τρίτο συστατικό του ρολογιού, τα μονοπάτια εξόδου από τον κεντρικό ταλαντωτή ή εκροές (output pathways), τα οποία είναι οι εμφανείς ρυθμοί κάτω από τον έλεγχο του κίρκαδικού συστήματος (Cuiñ, 2007). Παρόλα αυτά, το παραδοσιακό αυτό μοντέλο των τριών συστατικών (Εικ.1.3) είναι υπεραπλουστευμένο και μία πολύ πιο περίπλοκη εικόνα φαίνεται να αναδύεται, με συστατικά των μονοπατιών εξόδου να ρυθμίζουν το 'βήμα' (pace) του ταλαντωτή και συστατικά των μονοπατιών εισαγωγής να ρυθμίζονται στενά τα ίδια από το ρολόι. Η ύπαρξη πολλαπλών μονοπατιών εισόδου-φωτοϋποδοχέων, καθώς και μονοπατιών εξόδου από τον κεντρικό ταλαντωτή έχουν ως αποτέλεσμα μια επιπλέον κλιμάκωση της πολυπλοκότητας του μοντέλου. Τέλος, μπορεί να υπάρχουν πολλαπλά ρολόγια τα οποία να λειτουργούν εντός του ίδιου του οργανισμού ή ακόμα και μέσα στο ίδιο το κύτταρο.



**Εικ. 1.3.** Οργάνωση του κίρκαδικού συστήματος. Η πληροφορία από το φως ακολουθείται από τον φωτοϋποδοχέα ο οποίος την προωθεί στον κεντρικό ταλαντωτή, συντονίζοντας τον στη σωστή ώρα της ημέρας. Ο κεντρικός ταλαντωτής, μέσω του μονοπατιού εξόδου ελέγχει τους παρατηρούμενους ρυθμούς (Cuiñ, 2007).

Τα τρία βασικά μέρη του ρολογιού στα οποία αναφερθήκαμε παραπάνω διαχωρίζονται χωρικά μέσα στο κύτταρο. Τα στοιχεία του πρώτου μέρους, οι φωτοϋποδοχείς, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα αλλά η δράση τους εκδηλώνεται στον πυρήνα. Τα στοιχεία του κεντρικού ταλαντωτή, οι μεταγραφικοί παράγοντες που εκτελούν τις ταλαντώσεις, εδρεύουν στον πυρήνα όπου και εκδηλώνεται η δράση τους. Τέλος, τα στοιχεία του τρίτου μέρους θα εκδηλώσουν τη δράση του κεντρικού

ταλαντωτή μέσω βιοχημικών μονοπατιών του φυτού που θα παράγουν συγκεκριμένους φαινοτύπους.

### 1.3. Τα μονοπάτια εισόδου στον κεντρικό ταλαντωτή

#### 1.3.1. Συγχρονισμός του ρολογιού

Τα ρολόγια στα διάφορα Βασίλεια των οργανισμών αποτελούνται από ένα δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων τοποθετημένων σε αλληλοεξαρτώμενους βρόγχους αρνητικής ανάδρασης (negative feedback loop) (Barak και συν, 2000: Harmer και συν, 2001: Lakin-Thomas, 2000). Το ρολόι διατηρεί ένα εσωτερικό μέτρο της παρέλευσης του χρόνου και προγραμματίζει τις φυσιολογικές διεργασίες ώστε να συμβούν στις ενδεικνυόμενες ώρες της ημέρας. Οι κερκαδικοί ρυθμοί που παράγει το κερκαδικό ρολόι είναι ενδογενείς, δηλαδή είναι γενετικά ελεγχόμενοι. Αυτό το αποδεικνύει πλήθος μελετών που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία και οι οποίες φανερώνουν ότι ένας κερκαδικός ρυθμός είναι ικανός να διατηρεί τη φάση της ταλάντωσης του σε σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος. Ωστόσο, για να μπορεί να λειτουργήσει σωστά το κερκαδικό ρολόι θα πρέπει να έχει έναν μηχανισμό που θα του επιτρέπει να συγχρονίζεται με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και να αυτορυθμίζεται με βάση αυτές. Για να μείνουν συγχρονισμένα με το περιβάλλον τους, τα κερκαδικά ρολόγια επαναπροσδιορίζονται ή συντονίζονται (entrainment) από συγκεκριμένους παράγοντες οι οποίοι αναμεταδίδουν πληροφορίες σχετικά με την ώρα της ημέρας. Οι «χρονοδότες» («time-givers» ή Zeitgebers) είναι γενικά οι κύκλοι της παρουσίας/απουσίας φωτός και οι κύκλοι της θερμοκρασίας, αν και ρυθμοί στη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων μπορούν επίσης να δράσουν ως σήμα συγχρονισμού σε κάποιους οργανισμούς, όπως θηλαστικά (Harmer και συν, 2001: Roenneberg και Mellow, 1998).

Ο συγχρονισμός του ρολογιού επιτυγχάνεται προκαλώντας μία σταθερή αλλαγή φάσης μέσω της μεταβολής στα επίπεδα mRNA, πρωτεΐνης και/ή τα επίπεδα δράσης ενός ή περισσότερων στοιχείων του κεντρικού ταλαντωτή. Αυτή η αλλαγή φάσης δεν αλλάζει την εσωτερική ροή των διεργασιών, αλλά την επανατοποθετεί σύμφωνα με την ημερήσια πρόοδο στο περιβάλλον επιτρέποντας, για παράδειγμα, την προσαρμογή ενός οργανισμού στο μεταβαλλόμενο μήκος της ημέρας κατά τις εναλλαγές των εποχών (Devlin, 2002).

Τα κερκαδικά ρολόγια των διάφορων οργανισμών ανταποκρίνονται χωρίς καμία εξαίρεση στο φως, το οποίο και είναι το καλύτερα μελετημένο ερέθισμα συγχρονισμού στα φυτά (Devlin, 2002: Somers, 2005). Ο σωστός συγχρονισμός βασίζεται, εν μέρει, στη διαφορετική απόκριση στο φως κατά τη διάρκεια του κύκλου – η απόκριση υφίσταται το λεγόμενο ‘gating’ (χρονοεξαρτώμενη απόκριση): ο ταλαντωτής φαίνεται να αποκρίνεται σε ερεθίσματα συγχρονισμού μόνο σε συγκεκριμένες και κατάλληλες ώρες του 24ώρου (Somers, 2005). Το φωτεινό σήμα πρέπει επίσης να είναι σχετικά έντονο και παρατεταμένο (Devlin, 2002), αποτρέποντας έτσι συγχρονισμό από «λανθασμένα» σήματα, όπως το φως του φεγγαριού ή φως από αστραπή.

Το ρόλο της αντίληψης (perception) του φωτεινού σήματος αναλαμβάνουν οι φωτοϋποδοχείς (photoreceptors). Στα φυτά υπάρχουν τρεις κύριες οικογένειες φωτοϋποδοχέων: (α) τα φυτοχρώματα (phytochromes), τα οποία απορροφούν στο

ερυθρό και υπέρυθρο μήκος φωτός (Quail, 2002), (β) τα κρυπτοχρώματα (cryptochromes) και (γ) οι φωτοτροπίνες (phototropines), που απορροφούν στο μπλε και υπεριώδες φάσμα του φωτός (Whitelam και Devlin, 1998: Christie και Briggs, 2001). Η οικογένεια πρωτεϊνών ZEITLUPE μπορεί επίσης να ανιχνεύσει μπλε και υπεριώδες (UV-A) φως (Imaizumi και συν, 2003) και υπάρχουν στοιχεία για την ύπαρξη ενός φωτουποδοχέα πράσινου φωτός, αν και η φύση του είναι ακόμα άγνωστη (Folta, 2004).

### 1.3.2. Φυτοχρώματα (phytochromes)

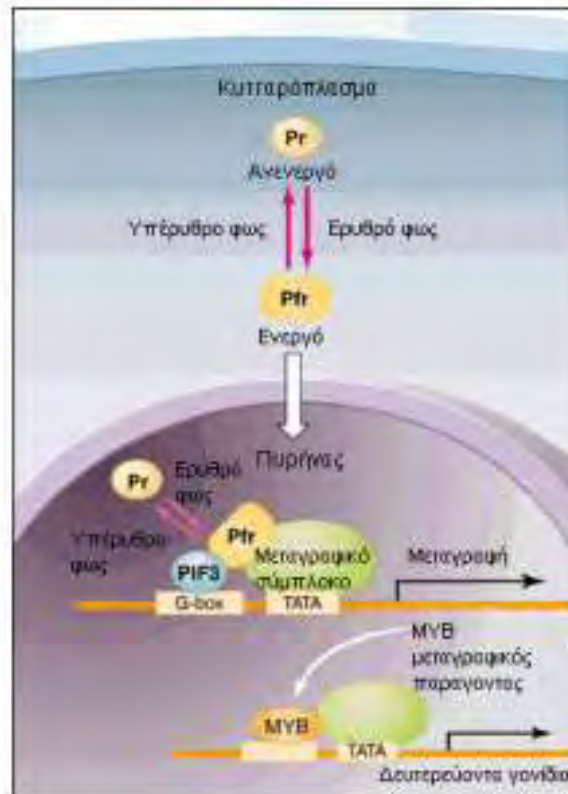
Τα φυτοχρώματα είναι από τους πιο καλά μελετημένους φωτουποδοχείς των φυτών. Ανακαλύφθηκαν πριν από περισσότερα από 50 χρόνια ως υπεύθυνοι παράγοντες της άνθισης των φυτών μικρής ημέρας (Borthwick και συν, 1952). Τα φυτοχρώματα ανήκουν σε μια οικογένεια που αριθμεί πέντε μέλη PHYA-E (Sharrock και Quail, 1989). Με βάση τη σταθερότητα του πρωτεϊνικού τμήματος του φυτοχρώματος τα πέντε μέλη μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες. Στην κατηγορία I ανήκουν τα φυτοχρώματα που είναι ευαίσθητα και αποικοδομούνται παρουσία έντονου φωτός (PHYA), ενώ στην κατηγορία II ανήκουν τα μη φωτοευαίσθητα φυτοχρώματα (PHYB-E) (Clough και Vierstra, 1997: Quail, 1997).

Όλα τα μέλη είναι φωτουποδοχείς του ορατού φάσματος του φωτός και ανιχνεύονται σε δύο μορφές. Η πρώτη καλείται  $P_r$  (Phytochrome red form), είναι η ανενεργός μορφή των φυτοχρωμάτων και σε αυτή τη μορφή βιοσυντίθεται το μόριο. Η δεύτερη είναι η  $P_{fr}$  (Phytochrome far-red form) και είναι η βιολογικά ενεργή μορφή του φωτουποδοχέα. Έκθεση στο ερυθρό μήκος κύματος του φωτός (667nm) έχει ως αποτέλεσμα τη μετάπτωση της  $P_r$  (667) μορφής στη βιολογικά ενεργή  $P_{fr}$  (730) μορφή που συνοδεύεται τόσο από αλλαγές στη δομή του μορίου όσο και στο μήκος κύματος που απορροφά. Έκθεση σε ακτινοβολία στο υπέρυθρο μήκος κύματος του φωτός (730 nm) μετατρέπει το φυτόχρωμα από τη  $P_{fr}$  μορφή, ξανά στη βιολογικά ανενεργή  $P_r$  μορφή του.

Από την αρχή της ανακάλυψης τους μέχρι και σήμερα, τα φυτοχρώματα θεωρούνται ότι ελέγχουν άμεσα ή έμμεσα ένα πλήθος φυσιολογικών διεργασιών του φυτού, είτε από μόνα τους είτε μέσω συνδυασμένης δράσης με τις υπόλοιπες οικογένειες φωτουποδοχέων (κρυπτοχρώματα και φωτοτροπίνες). Η καρβοξυτελική περιοχή του μορίου του φυτοχρώματος περιέχει δύο PAS μοτίβα (Period circadian protein, Ah receptor nuclear translocator protein και Single-minded protein) τα οποία σηματοδοτούν ένα πλήθος διεργασιών μέσω της αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον bHLH (basic Helix Loop Helix) παράγοντα, PIF3 (Phytochrome Interacting Factor 3). Τα φυτοχρώματα θεωρούνται ότι είναι οι κινάσες με φωτοεξαρτώμενη ικανότητα φωσφορυλίωσης. Η δράση τους αυτή, αποδίδεται στην ύπαρξη μιας περιοχής με παραπλήσια δομή με την κινάση της ιστιδίνης (Histidine – Kinase-Related-Domain, HKRD) με αποτέλεσμα να μπορούν να φωσφορυλιώσουν άλλες πρωτεΐνες όταν βρίσκονται στη βιολογικά ενεργή ( $P_{fr}$ ) μορφή τους (Quail, 1997).

Το κερκαδικό ρολόι των φυτών σηματοδοτείται από πολλούς φωτουποδοχείς οι οποίοι χρησιμοποιούν αρκετά μονοπάτια εισόδου στον κεντρικό ταλαντωτή. Αυτά τα μονοπάτια ακόμα δεν είναι γνωστά, αν και υπάρχουν διάφορες σχετικές προτάσεις. Μία από αυτές συμπεριλαμβάνει τη μεταγωγή του φωτεινού σήματος μέσω του παράγοντα PIF3, μίας πρωτεΐνης που προσδέεται στο DNA, μέλος της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων bHLH (Heim και συν, 2003: Toledo-Ortiz και συν, 2003). Το PHYB όταν εισέλθει στον πυρήνα σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το πυρρηνο-εντοπιζόμενο PIF3 ο

οποίος είναι ήδη συνδεδεμένος σε G-πλαίσια (G-box) (Ni και συν, 1999). Οι αλληλουχίες των G-πλαισίων βρίσκονται σε διάφορα φωτο-επαγόμενα γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων-κεντρικών στοιχείων του ρολογιού όπως τα *LHY* και *CCA1* (Martinez-Garcia και συν, 2000). Παρόλα αυτά παραμένει ακόμα άγνωστο ποιοί παράγοντες συμμετέχουν στη σηματοδότηση του κεντρικού ταλαντωτή από το φυτόχρωμα.



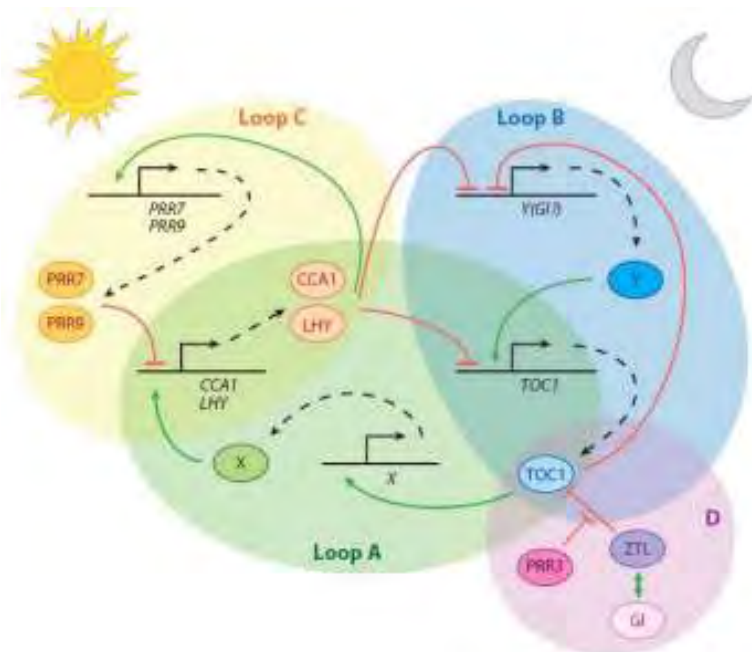
**Εικ. 1.4.** Μοντέλο της λειτουργίας του κερκαδικού ρολογιού στα φυτά μέσω της σηματοδότησης του κεντρικού ταλαντωτή από το ενεργοποιημένο φυτόχρωμα B (PHY B). Το φυτόχρωμα B παραμένει στο κυταρόπλασμα στην ανενεργή (P<sub>r</sub>) μορφή του. Με την επίδραση της ακτινοβολίας στην περιοχή του ερυθρού, το PHY B μεταπίπτει στη φυσιολογικά ενεργή (P<sub>fr</sub>) μορφή του και εισέρχεται στον πυρήνα. Εκεί αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα PIF3 και το ενεργοποιημένο σύμπλοκο δεσμεύεται στο G-πλαίσιο του υποκινητή των γονιδίων *LHY* και *CCA1*, δύο μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας MYB. Οι πρωτεΐνες *LHY* και *CCA1* δεσμεύονται με τη σειρά τους στον υποκινητή δευτερευόντων (secondary genes) πρωϊνών γονιδίων, όπως τα γονίδια *CAB*, ενεργοποιώντας έτσι την μεταγραφή τους (Nagatani, 2000).

#### 1.4. Ο κεντρικός ταλαντωτής του κερκαδικού ρολογιού των φυτών

Ο κεντρικός ταλαντωτής είναι η καρδιά του ρολογιού σε κάθε οργανισμό. Οι κεντρικοί ταλαντωτές (Central Oscillators) των οργανισμών δεν είναι τίποτα άλλο από αυτορυθμιζόμενοι βρόγχοι επανατροφοδότησης που αποτελούνται από συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες (Autoregulatory Transcriptional Feedback Loops). Στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis*, ο μηχανισμός του ρολογιού θεωρείται ότι περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις θηλιές ανατροφοδότησης: την κεντρική θηλιά (centralloop), τη θηλιά

που είναι συγχρονισμένη με το πρωί (morning-phased loop) και τη θηλιά που είναι συγχρονισμένη με το βράδυ (evening-phased loop) (Εικ.1.5) (James και συν, 2008).

Πρόσφατα προτάθηκε ότι η θηλιά ανατροφοδότησης, η οποία είναι κρίσιμη για την κirkάδια ρυθμικότητα στο *Arabidopsis* (η κεντρική θηλιά) (Εικ.1.6), βασίζεται στην αλληλεπίδραση του LHY [Late elongated HYpocotyl (Shaffer και συν, 1998)] και CCA1 [Circadian Clock Associated 1 (Wang και Tobin και συν, 1998)] που αποτελούν τα αρνητικά στοιχεία του βρόγχου και του APRR1/TOC1 [Arabidopsis Pseudo Response Regulator 1/Timing Of CAB expression 1 (Strayer και συν, 2000)] ή απλά παράγοντας TOC1, ο οποίος αποτελεί το θετικό παράγοντα του βρόγχου. Οι μεταγραφικοί παράγοντες LHY και CCA1 παρουσιάζουν τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης των mRNAs τους την αυγή, είναι δηλαδή «πρωινά» γονίδια. Στον αντίποδα αυτού, ο μεταγραφικός παράγοντας TOC1 παρουσιάζει το μέγιστο των επιπέδων έκφρασης του mRNA του κατά τη δύση του και θεωρείται «απογευματινό γονίδιο». Άλλα γνωστά γονίδια του κirkαδικού ρολογιού του *A.thaliana* παρατίθενται στον πίνακα 1.

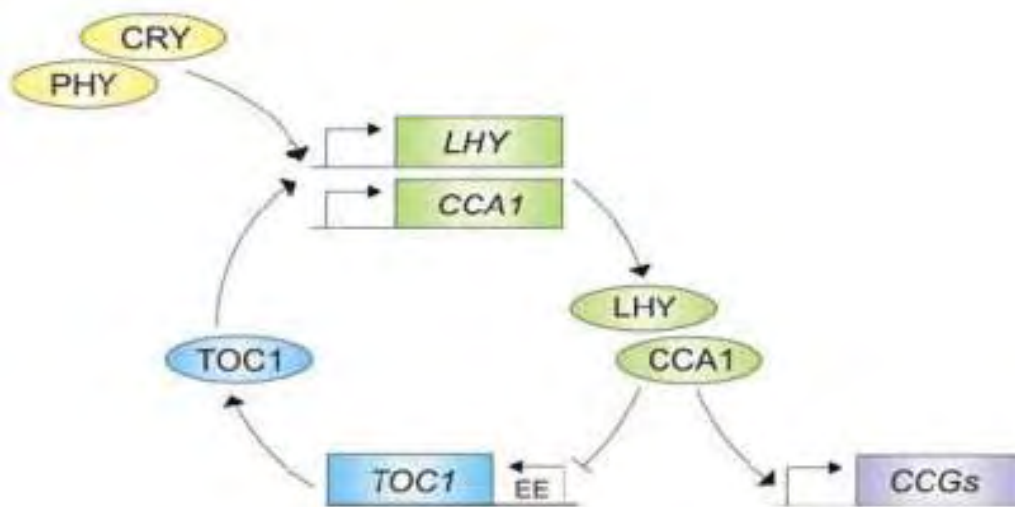


**Εικ. 1.5** Μοντέλο του ρολογιού στο φυτό *A.thaliana*. Ο πρώτος ταυτοποιημένος βρόγχος επανατροφοδότησης (Loop A) αποτελείται από τους «πρωινούς» παράγοντες LHY και CCA1, οι οποίοι ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση του TOC1. Ο TOC1 εικάζεται ότι ενεργοποιεί άμεσα ή έμμεσα το συστατικό X, έναν άγνωστο παράγοντα ο οποίος επάγει την έκφραση των LHY και CCA1. Ο δεύτερος βρόγχος (Loop B) αποτελείται από δύο ή περισσότερα «απογευματινά» γονίδια: έναν άγνωστο παράγοντα Y και τον TOC1 (πιθανά ο GIGANTEA [GI] να καλύπτει μέρος της δράσης του Y). Ο τρίτος βρόγχος (Loop C), αποτελείται από τα πρωινά γονίδια PRR7, PRR9, CCA1 και LHY. Σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ρολογιού παίζουν και οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις (D). Ο ZTL ρυθμίζει αρνητικά την αφθονία της πρωτεΐνης TOC1 και η δράση του ελέγχεται από τους GI και PRR3 (Harmer, 2009).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο TOC1 μικραίνουν την περίοδο όλων των κirkάδιων ρυθμών που έχουν ελεγχθεί μέχρι τώρα. Επιπρόσθετα, αύξηση στη δόση του TOC1 μεγαλώνει την περίοδο των κirkάδιων ταλαντωτών ενώ η υπερέκφρασή του από έναν ιδιοσύστατο υποκινητή προκαλεί αρρυθμία. Ο TOC1 έχει αρκετά μοτίβα που δείχνουν ότι συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση και, πράγματι, τα επίπεδα του mRNA των παραγόντων CCA1 και LHY μειώνονται στο μετάλλαγμα *toc1-2* (που είναι πιθανόν αλληλόμορφο με μηδενική μετάλλαξη). Η έκφραση του CCA1 μειώνεται αξιοσημείωτα στο μετάλλαγμα *elf4*, το οποίο δεν εμφανίζει ρυθμικότητα τόσο στο συνεχές φως όσο

και στο συνεχές σκοτάδι. Το ELF4 (early flowering 4) δεν εμφανίζει ομολογία με πρωτεΐνες γνωστής λειτουργίας αλλά η έκφρασή του είναι κυκλική με φάση που είναι παρόμοια με αυτή του TOC1, πράγμα που δείχνει ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορεί να λειτουργούν μαζί για να προωθήσουν την έκφραση του CCA1 και του LHY. Το CCA1 και το LHY ρυθμίζουν καθοδικά την ίδια τους την έκφραση, καταστέλλοντας την έκφραση του *TOC1*. Αυτό συμβαίνει μέσω της πρόσδεσής τους σε ένα στοιχείο 9 νουκλεοτιδίων που βρίσκεται στον υποκινητή του *TOC1* (AAATATCT), το οποίο είναι κρίσιμο για την κερκάρια ρύθμιση (McClung, 2006).

Το στοιχείο που αναγνωρίζουν οι παράγοντες CCA1 και LHY στον υποκινητή του *TOC1* υπάρχει σε μια ομάδα γονιδίων συγχρονισμένων με το βράδυ (evening-phased) και είναι γνωστό ως evening-element (EE). Επιπλέον, τα EE είναι πανομοιότυπα με την αλληλουχία που αναγνωρίζει ο CCA1 στον υποκινητή του γονιδίου *LIGHT HARVESTING CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1* (AAAAATCT), ένα γονίδιο που ρυθμίζεται από το ρολόι και η έκφραση του οποίου παρουσιάζει μέγιστο το πρωί. Πέραν του ότι ο CCA1 και ο LHY είναι μέλη μιας θηλιάς ανατροφοδότησης για την κερκάρια ρυθμικότητα, πιθανόν λειτουργούν για να καταστείλουν την έκφραση αρκετών γονιδίων που είναι συγχρονισμένα με το βράδυ και για να προωθήσουν την έκφραση γονιδίων που είναι συγχρονισμένα με το πρωί, παρέχοντας ένα μηχανισμό που συνδέει τον κερκάρδιο ταλαντωτή με πολλές βιοχημικές και φυσιολογικές διεργασίες. Τα κερκάρια ρολόγια, από τα φυτά μέχρι τα θηλαστικά, ρυθμίζουν τις μεταβολικές και αναπτυξιακές δραστηριότητες, ελέγχοντας την έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων-κλειδιών (Yanovsky και Kay, 2003; McClung, 2006).



**Εικ. 1.6** Προτεινόμενη δομή του βρόγχου επανατροφοδότησης των *LHY/CCA1* και *TOC1*. Η είσοδος φωτός, μαζί με τον TOC1, επάγει την έκφραση των *LHY* και *CCA1*. Ο CCA1 και ο LHY ενεργοποιούν την έκφραση των ελεγχόμενων από το ρολόι γονιδίων (CCGs, Clock Controlled Genes, αναπαριστώνται με μωβ χρώμα) και καταστέλλουν την έκφραση του *TOC1* (Alabadi και συν, 2001), καταστέλλοντας έτσι και την έκφραση των ίδιων των *LHY/CCA1*. Η είσοδος φωτός διαμεσολαβείται από τα φυτοχρώματα (PHY) και κρυπτοχρώματα (CRY). Τα βέλη αναπαριστούν θετικά ρυθμιστικά βήματα, ενώ οι γραμμές που απολήγουν σε κάθετο αναπαριστούν αρνητικές αλληλεπιδράσεις. Τα γονίδια βρίσκονται μέσα σε ορθογώνια και οι πρωτεΐνες σε οβάλ (Gardner και συν, 2006).

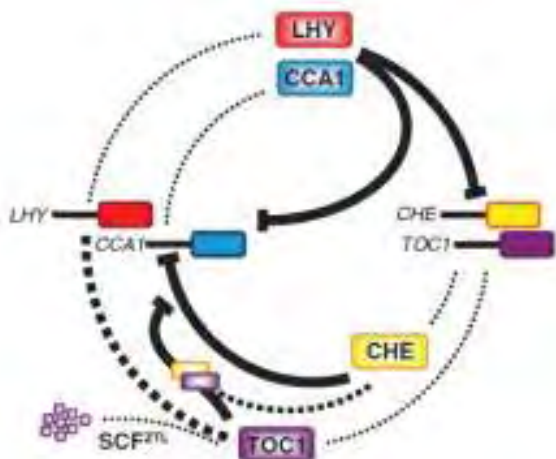


**Πίνακας 1**

Γνωστά γονίδια του κερκάδιου ρολογιού στο *Arabidopsis thaliana*. (McClung, 2006)

Gene	Locus ID	Function	Circadian Clock Phenotype	
			Loss of Function	Overexpression
CCA1	At2g46830	Single Myb domain transcription factor	Short period	Arrhythmic
CKB3	At3g60250	Casein kinase II regulatory subunit	Not known (gene family)	Short period
CRY1	At4g08920	Blue light photoreceptor	Long period in blue light	Short period in blue light
CRY2	At1g04400	Blue light photoreceptor	Long period in blue light	Short period in blue light
DET1	At4g10180	Repressor of photomorphogenesis	Short period	Not known
ELF3	At2g25930	Unknown	Arrhythmic in continuous light	Long period
ELF4	At2g40080	Unknown	Arrhythmic	Not known
GI	At1g22770	Unknown	Short period, low amplitude	Short period, low amplitude
LHY	At1g01060	Single Myb domain transcription factor	Short period	Arrhythmic
LUX	At3g46640	Myb transcription factor	Arrhythmic	Arrhythmic
PHYA	At1g09570	Red light photoreceptor	Long period in far-red light	Short period in far-red light
PHYB	At2g18790	Red light photoreceptor	Long period in red light, leading phase in white light	Short period in red light, lagging phase in white light
PIF3	At1g09530	Basic helix-loop-helix transcription factor	Wild type	Wild type
PRR3	At5g60100	Pseudo-response regulator	Short period	Wild type
PRR5	At5g24470	Pseudo-response regulator	Short period	Low amplitude, long period
PRR7	At5g02810	Pseudo-response regulator	Long period	Not known
PRR9	At2g46790	Pseudo-response regulator	Long period	Short period
SRR1	At5g59560	Unknown	Leading phase, low amplitude	Not known
TIC		Gene not yet identified	Short period, low amplitude	Not known
TOC1	At5g61380	Pseudo-response regulator	Short period	Arrhythmic
ZTL	At5g57360	F-box protein	Long period	Arrhythmic

Στον κεντρικό βρόγχο φαίνεται να ενσωματώνεται ένας πρόσφατα χαρακτηρισμένος παράγοντας, ο CHE (CCA1 HIKING EXPEDITION). Ο παράγοντας αυτό βρέθηκε να προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου *CCA1* (όχι όμως στον υποκινητή του *LHY*) και να τον καταστέλλει, καθώς και να αλληλεπιδρά in vitro με τον *TOC1*. Ο τρόπος δράσης του, έχει προταθεί πως έχει ως εξής: Την αυγή, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των *CCA1* και *LHY* καταστέλλουν τον CHE, αλλά και την ίδια τους την έκφραση. Τα επίπεδα του CHE αυξάνονται, καθώς η ημέρα προχωρά, ώστε να διατηρήσουν τον *CCA1* στο ελάχιστο. Μέχρι το τέλος της ημέρας, ο *TOC1* ανταγωνίζεται τον CHE, επαναφέροντας τον κύκλο, ώστε να ξεκινήσει από την αρχή (Pruneda-Paz και συν, 2010).



**Εικ.1.7** Μοντέλο για τον προτεινόμενο ρόλο του παράγοντα CHE στο ρολόι του φυτού *A.thaliana*. Την αυγή, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των *CCA1* και *LHY* καταστέλλουν τον CHE, αλλά και την ίδια τους την έκφραση. Τα επίπεδα του CHE αυξάνονται, καθώς η ημέρα προχωρά, ώστε να διατηρήσουν τον *CCA1* στο ελάχιστο. Μέχρι το τέλος της ημέρας, ο *TOC1* ανταγωνίζεται τον CHE, επαναφέροντας τον κύκλο, ώστε να ξεκινήσει από την αρχή ( $SCF^{ZTL}$ : αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα-διαμεσολαβούμενη από τον παράγοντα ZEITLUPE) (Pruneda-Paz και συν, 2010).

### 1.5. Μονοπάτια εξόδου από τον κεντρικό ταλαντωτή (εκροές κίρκαδικού συστήματος)

Το φυτό *A.thaliana* παρουσιάζει πάρα πολλές ρυθμικές εκροές του κίρκαδικού συστήματος (αποτελέσματα, outputs) ή αλλιώς «δείκτες του ρολογιού» και ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων εξαρτώμενων από το ρολόι (Clock-Controlled Genes, CCGs), με περισσότερο από 6% του γονιδιώματος του να βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του κίρκαδικού ρολογιού (Harmer και συν, 2000: Schaffer και συν, 2001: Michael και McClung, 2003). Οι εκροές του κεντρικού ταλαντωτή είναι μονοπάτια τα οποία οδηγούν σε φυσιολογικούς και βιοχημικούς ρυθμούς, όπως η φωτοσύνθεση, την κίνηση των φύλλων, το άνοιγμα και κλείσιμο των στοματιών και την ελικοειδή κίνηση των φυτών (νεύση) (Webb, 1998: Harmer και συν, 2001: McClung και συν, 2002: Webb, 2003). Είναι αυτοί οι ρυθμοί στις εκροές του ρολογιού οι οποίοι, σε τελική ανάλυση, παρέχουν τα πλεονεκτήματα στην ανάπτυξη και στον ανταγωνισμό που παρέχονται από το ρολόι (Dodd και συν, 2005a). Γενικά, τα μονοπάτια μέσω των οποίων η χρονική πληροφορία από τον κεντρικό ταλαντωτή ελέγχει την κυτταρική φυσιολογία δεν έχουν περιγραφεί εκτενώς.

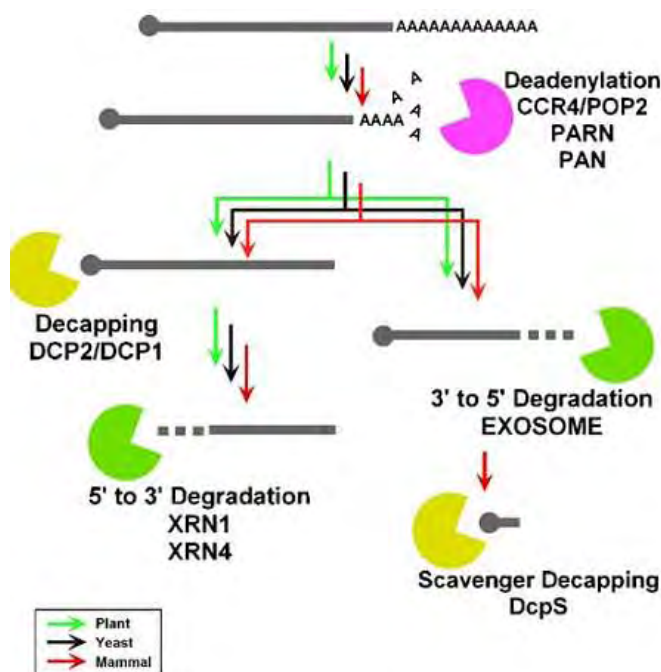
Οι ρυθμοί στα επίπεδα mRNA είναι σχεδόν σίγουρα μια αρχική εκροή (αποτέλεσμα) του κίρκαδικού ταλαντωτή, αφού αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες που συνιστούν τον πυρήνα του ρολογιού ρυθμίζουν άμεσα την έκφραση των μετέπειτα συστατικών του ίδιου του ρολογιού. Για παράδειγμα ο CCA1 ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων του συμπλόκου συλλογής φωτός (Mizoguchi και συν, 2002) και καταστέλλει την έκφραση αρκετών άλλων γονιδίων, προσδεδεμένος στα απογευματινά στοιχεία των υποκινητών τους (Harmer και συν, 2000: Alabadi και συν, 2001). Περίπου το 2-6% των mRNA που κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα του φυτού *A.thaliana* έχουν ρυθμούς στα επίπεδα τους. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τα mRNAs γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην άνθιση, τη σύνθεση φλαβονοειδών, τη σύνθεση λιγνίνης, την κυτταρική επιμήκυνση, το μεταβολισμό του άνθρακα, την αφομοίωση θρεπτικών στοιχείων και φωτοσύνθεση (Harmer και συν, 2000: Schaffer και συν, 2001: Edwards και συν, 2006).

### 1.6. Οι μηχανισμοί αποικοδόμησης mRNA στους ευκαρυώτες

Ο έλεγχος της σταθερότητας του mRNA είναι σημαντικός για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η αύξηση μελετών σχετικά με τις γενικές οδούς αποικοδόμησης του mRNA στη ζύμη υποδεικνύουν ότι υπάρχουν δύο γενικά μονοπάτια, ένα μονοπάτι αφαίρεσης του 5' cap εξαρτώμενο από την αποαδενυλίωση του mRNA και ένα μονοπάτι αποικοδόμησης με κατεύθυνση 3' → 5' (Εικ. 1.8). Σε κάθε περίπτωση, η αφαίρεση της πολυ (A) ουράς από το 3' άκρο των μεταγράφων, μια διαδικασία που καλείται αποαδενυλίωση, είναι το αρχικό και το καθοριστικό βήμα για την αποικοδόμηση του mRNA. Το σύμπλοκο της Ccr4p και της Pop2p έχει αναγνωριστεί ως μια κυρίαρχη αποαδενυλάση (Tucker και συν 2001, 2002: Chen και συν, 2002). Η αποαδενυλίωση προκαλεί την αφαίρεση του καλύμματος από το 5' άκρο του mRNA μέσω του ενζύμου που αφαιρεί το 5' cap, το σύμπλοκο της Dcp2p και της Dcp1p (Beelman και συν, 1996: La Grandeur και Parker, 1998: Dunckley και Parker, 1999). Μετά την αφαίρεση του 5' cap, το mRNA αποικοδομείται από την Xrn1p, μία

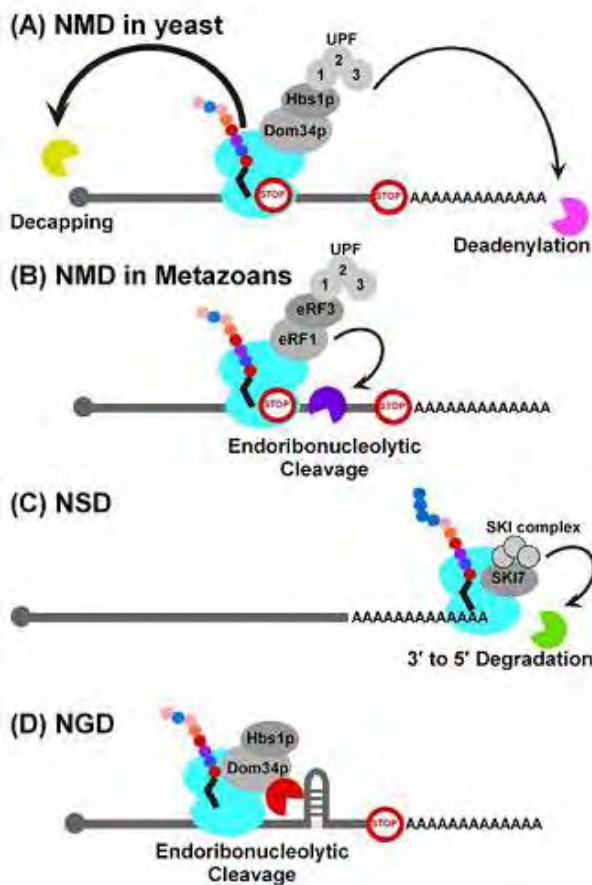


εξωριβονουκλεάση, που υδρολύει το RNA σε κατεύθυνση 5'→3' μέχρι το τέλος (Muhlrad και Parker 1994). Εναλλακτικά, τα μετάγραφα μπορούν να αποικοδομηθούν σε κατεύθυνση 3'→5' από το εξώσωμα μετά την αποαδενυλίωση. Αυτές οι δύο οδοί αποτελούν τον πιο διαδεδομένο τρόπο αποικοδόμησης των mRNA στη ζύμη (Anderson και Parker 1998). Ως ειδικά μονοπάτια ελέγχου ποιότητας του mRNA έχουν αναφερθεί τα: nonsense-mediated mRNA decay (NMD), nonstop mRNA decay (NSD) και no-go decay (NGD) (Εικ.1.9). Το μονοπάτι NMD είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση των mRNA που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού. Τέτοια μετάγραφα αποικοδομούνται είτε μέσω του μονοπατιού αφαίρεσης του 5' καλύμματος που δεν εξαρτάται από τη αποαδενυλίωση ή μέσω της ταχείας αποαδενυλίωσης πιθανώς ακολουθούμενη από την αποικοδόμηση σε 3'→5' κατεύθυνση (Elliott και συν, 1989: Muhlrad και Parker, 1994: Cao και Parker, 2003: Lejeune και συν, 2003: Mitchell και Tollervey, 2003: Takahashi και συν, 2003). Στο μονοπάτι NSD, τα μετάγραφα δεν έχουν αλληλουχία τερματισμού και αποικοδομούνται ταχέως σε κατεύθυνση 3'→5' από το εξώσωμα (Frischmeyer και συν, 2002: van Hoof και συν, 2002). Η επιμήκυνση της μετάφρασης, η οποία επάγεται από δευτεροταγείς δομές ενεργοποιεί ένα τελευταίο μονοπάτι ελέγχου, το no-go decay (NGD). Κατά την διαδικασία αυτή ανιχνεύονται ριβοσώματα τα οποία έχουν κολλήσει πάνω σε ένα mRNA με αποτέλεσμα να διασπάται το mRNA μόριο με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση κοντά στο σημείο αυτό. Τα ριβοσώματα απελευθερώνονται και τα παραγόμενα τμήματα RNA αποικοδομούνται από το εξώσωμα και την Xrn1. Εκτός από την ενεργή μετάφραση, είναι απαραίτητοι οι παράγοντες Dom34p και Hbs1p, ομόλογοι των παραγόντων τερματισμού της μετάφρασης eRF1 και eRF3 (Doma και Parker, 2006). Είναι ενδιαφέρον, ότι το σύμπλοκο των παραγόντων Dom34p και Hbs1p δείχνει να έχει δραστηριότητα ενδοριβονουκλεάσης *in vitro*, με τον παράγοντα Dom34p ως ενεργή μονάδα (Lee και συν, 2007: Yukako Chiba, 2009).



**Εικ.1.8** Γενικά μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Το σώμα του mRNA προστατεύεται από μια δομή-κάλυμμα και την πολυ (A) ουρά στο 5' άκρο και 3' άκρο, αντίστοιχα. Τα μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA στη ζύμη (μαύρο), στα θηλαστικά (κόκκινο), και στα φυτά (πράσινο), υποδεικνύονται με βέλη. Αρχικά, η πολυ (A) ουρά αφαιρείται με αποαδενυλίωση. Το αποαδενυλιωμένο mRNA αποικοδομείται με κατεύθυνση 5'→3' ενώ ακολουθεί η αφαίρεση του 5' cap ή εναλλακτικά, με κατεύθυνση 3'→5'. Στα θηλαστικά ακολουθεί η υδρόλυση της προκύπτουσας ολιγονουκλεοτιδικής δομής 5' cap (scavenger decapping enzyme, DcpS). Το αρμόδιο ενζύμιο για κάθε βήμα εκπροσωπείται από το Pac-Man. Επίσης, η δραστηριότητα του εξωσώματος ως ενδονουκλεάση, δεν φαίνεται στο σχήμα, είναι πιθανό να εμπλέκεται (Yukako Chiba, 2009).

Πληροφορίες σχετικά με τα μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA σε πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των φυτών, περιορίζονται σε αντίθεση με την ζύμη. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα περισσότερα συστατικά του γενικού μηχανισμού αποικοδόμησης του mRNA διατηρούνται σε ευκαρυωτικά κύτταρα, πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί και ζύμη είναι πιθανό να χρησιμοποιούν παρόμοιους βασικούς μηχανισμούς αποικοδόμησης των mRNA. Ωστόσο, ορισμένες διαφορετικές πτυχές έχουν επίσης αναφερθεί. Για παράδειγμα, αρκετές μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι η αποικοδόμηση με κατεύθυνση 3'→5' από το εξώσωμα είναι η κύρια οδός αποικοδόμησης τουλάχιστον για ορισμένα mRNAs σε θηλαστικά, αν και δεν είναι ακόμη σαφές ποια οδός είναι κυρίαρχη *in vivo* (Chen και συν, 2001; Wang και Kiledjian, 2001; Mukherjee και συν, 2002). Σε αυτό το μονοπάτι αποικοδόμησης με κατεύθυνση 3'→5', η προκύπτουσα ολιγονουκλεοτιδική δομή 5' cap υδρολύεται από το ένζυμο DcpS (scavenger decapping enzyme) (Liu και συν, 2002; Yukako Chiba, 2009).

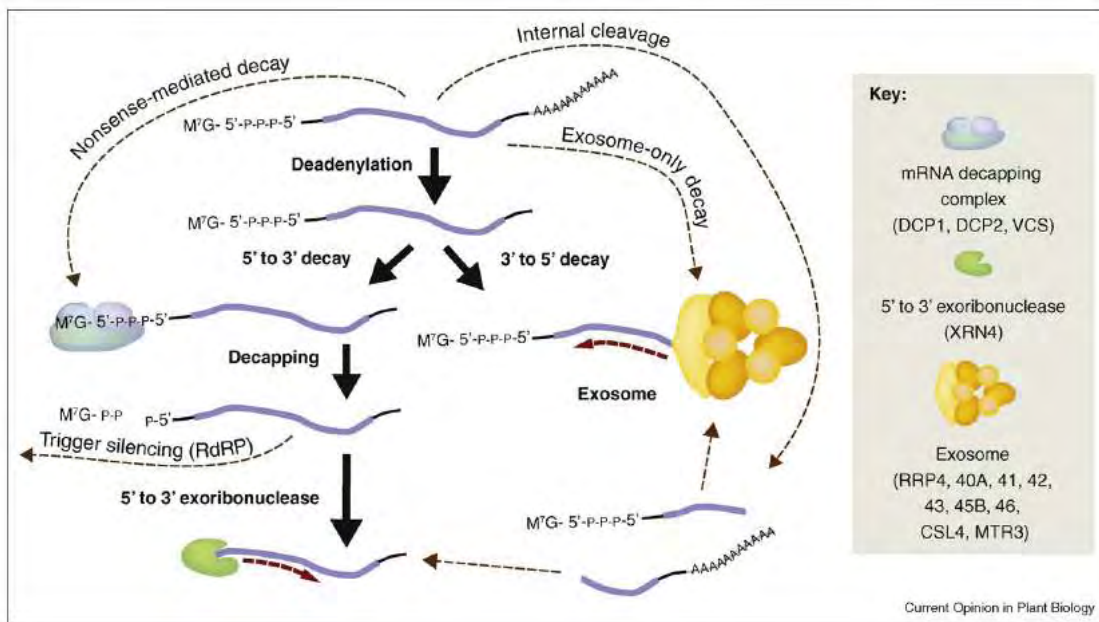


**Εικ.1.9** Το σύστημα επιτήρησης του mRNA. Σχηματική αναπαράσταση των nonsense-mediated mRNA decay (NMD), nonstop mRNA decay (NSD) και no-go decay (NGD) μονοπατιών. **A** Μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζεται από ένα σύμπλοκο επιτήρησης, UPF1, UPF2, και UPF3. Το NMD μονοπάτι στη ζύμη προκαλεί αφαίρεση του 5' καλύμματος που είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση ή επιταχύνει την αποαδενυλίωση. **B** Το μονοπάτι NMD στα μετόζωα προκαλεί ενδοριβονουκλεοτιδική διάσπαση στην πρόωρη αλληλουχία τερματισμού. **C** Στο μονοπάτι NSD, ένα μπλοκαρισμένο ριβόσωμα στο άκρο 3' του μεταγράφου στρατολογεί τον παράγοντα Ski7p, το Ski σύμπλοκο, το εξώσωμα και αποικοδομεί το mRNA με κατεύθυνση 3'→5'. **D** Στο μονοπάτι NGD, η επιμήκυνση της μετάφρασης προκαλεί ενδοριβονουκλεοτιδική διάσπαση στην περιοχή που είναι μπλοκαρισμένο το ριβόσωμα. Οι eRF3 και eRF1 παράγοντες (Dom34p και Hbs1p τα αντίστοιχα ομόλογά τους στη ζύμη) είναι παράγοντες λήξης της μετάφρασης. (Yukako Chiba, 2009).

Επιπλέον, οι αναλύσεις των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του mRNA στα φυτά, αποκάλυψε τη σχέση μεταξύ του ελέγχου ποιότητας του mRNA και την αποσιώπηση των γονιδίων καθώς και τη συμμετοχή του ελέγχου ποιότητας του mRNA στις αναπτυξιακές διαδικασίες και στις ορμονικές αποκρίσεις. Ως εκ τούτου, η κατανόηση του μηχανισμού αποικοδόμησης του mRNA στα φυτά είναι σημαντική δεδομένου ότι θα βοηθήσει και στην κατανόηση της γενικής σημασίας των εργασιών του ελέγχου ποιότητας του mRNA (Yukako Chiba, 2009).

1.6.1. Μηχανισμοί αποικοδόμησης του mRNA στο φυτικό κύτταρο

Όπως αναφέρθηκε, η αποικοδόμηση του mRNA στο κυτταρόπλασμα, ξεκινά με την αποαδενλίωση, τη βράχυνση ή την πλήρη αφαίρεση της πολυ(A)-ουράς (Εικ.1.10). Αρκετά βιοχημικά σύμπλοκα που πραγματοποιούν αποαδενλίωση στα ζώα και στα φύκη, είναι συντηρημένα και στα φυτά: η πολυ(A) ριβονουκλεάση PARN, το σύμπλοκο αποαδενλίωσης CCR4/CAF1 και η πολυ(A) νουκλεάση PAN (Πίνακας 2). Για να πραγματοποιηθεί η αποαδενλίωση απαιτούνται τόσο η δράση της PARN όσο και η δράση του συμπλόκου CCR4/CAF1. Κάθε σύμπλοκο στοχεύει εξειδικευμένα υποστρώματα mRNAs, όμως παραμένει άγνωστος ο βαθμός εξειδίκευσης των αποαδενυλασών καθώς και το πώς επιτυγχάνεται αυτή η εξειδίκευση.



**Εικόνα 1.10.** Μονοπάτια της αποικοδόμησης του mRNA στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου. Τα κύρια μονοπάτια που εμφανίζονται με έντονα μαύρα βέλη. Στα ώριμα RNAs η πολυ(A) ουρά και το 5' κάλυμμα αποτελούν τους γενικούς καθοριστικούς παράγοντες σταθερότητας. Το πρώτο βήμα για την έναρξη της αποικοδόμησης είναι η αποαδενλίωση. Μετά την αποαδενλίωση, η αποικοδόμηση μπορεί να συνεχιστεί από το 3'-άκρο, μέσω της δραστηριότητας του εξωσώματος, ή μπορεί να αφαιρεθεί το 5' cap (από το σύμπλοκο αφαίρεσης του 5' cap) και η δραστηριότητα της 5'→3' εξωριβονουκλεάσης XRN4 μπορεί να αποικοδομήσει το υπόλοιπο μετάγραφο. Τέσσερα εξειδικευμένα μονοπάτια εμφανίζονται επίσης, με διακεκομμένα καφέ βέλη. Στο πάνω αριστερά μονοπάτι, NMD (nonsense-mediated decay), αφαιρείται απευθείας το 5' cap των mRNAs με πρόωρα κωδικόνια τερματισμού ή με πολύ μεγάλη 3'-UTRs, αρχίζοντας την αποικοδόμηση χωρίς αποαδενλίωση. Στο κάτω αριστερά μονοπάτι, τα RNA που δεν έχουν πλέον 5' cap, μπορούν αντί να υποβάλλονται σε αποικοδόμηση με κατεύθυνση 5'→3' από την XRN4, να αποτελούν υπόστρωμα για τις RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες και να προκαλέσουν την αποσιώπησή τους. Στο πάνω δεξιά μονοπάτι, η εσωτερική διάσπαση έχει ως αποτέλεσμα δύο τμήματα RNA, το καθένα με ένα απροστάτευτο άκρο, και τα οποία αποικοδομούνται απευθείας με το 5'→3' και το 3'→5' μονοπάτι. Επίσης, επάνω δεξιά υπάρχει το μονοπάτι αποικοδόμησης μόνο με εξώσωμα, όπου το μονοπάτι του εξωσώματος 3'→5' περιλαμβάνει αποαδενλίωση (Belostotsky και Sieburth, 2009).

Το εξώσωμα αποτελεί την μεγαλύτερη πηγή της εξωνουκλεολυτικής δραστηριότητας, με φορά 3'→5', στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Είναι ένας πολύπλευρος μακρομοριακός μηχανισμός που μπορεί πρώτον, να επεξεργαστεί μερικώς το RNA ή δεύτερον, να αποικοδομήσει πλήρως το RNA ή τρίτον, να πραγματοποιήσει ποιοτικό έλεγχο του RNA. Το τελευταίο σημαίνει ότι αποικοδομεί επιλεκτικά μόνο τα

ελαττωματικά μόρια RNA, για παράδειγμα tRNA που δεν έχει αναδιπλωθεί σωστά. Η αποαδενυλίωση συμβαίνει πριν από την αποικοδόμηση του mRNA από το εξώσωμα.

Το αποαδενυλιωμένο mRNA μπορεί να υποστεί και αποικοδόμηση κατά τη φορά 5'→3' όμως πρώτα απαιτείται η απομάκρυνση της καλύπτρας στο 5' άκρο του mRNA. Η απομάκρυνση του 5' cap πραγματοποιείται από το σύμπλοκο απομάκρυνσης του 5' cap (decapping). Τα κύρια συστατικά του συμπλόκου, οι παράγοντες DCP1 και DCP2, είναι συντηρημένοι στα φυτά. Ένα τρίτο συστατικό του συμπλόκου απομάκρυνσης της καλύπτρας είναι ο παράγοντας VARICOSE (VCS)/HEDLS, ο οποίος πρωτοχαρακτηρίστηκε στα φυτά. Το ομόλογο στα θηλαστικά, που ονομάζεται HEDLS, εμπλέκεται στην απομάκρυνση της καλύπτρας του mRNA και λειτουργεί ως μοριακή σκαλωσιά για τα μόρια DCP1 και DCP2. Έτσι, τα σύμπλοκα απομάκρυνσης του καλύμματος στα φυτά και στα ζώα, φαίνεται να είναι όμοια μεταξύ τους, (στο *Arabidopsis* τα VCS, DCP2 και DCP1 αλληλεπιδρούν και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα) ενώ και τα δύο διαφέρουν από αυτό της ζύμης, το οποίο στερείται το ομόλογο VCS/HEDLS. Η απώλεια απομάκρυνσης του 5' cap επηρεάζει το ρυθμό αποικοδόμησης μόνο σε συγκεκριμένα υποστρώματα, υποδηλώνοντας ότι για κάποια mRNAs είναι προκαθορισμένο να απομακρυνθεί το κάλυμμα τους ενώ για κάποια άλλα όχι. Στα mRNAs των θηλαστικών το DCP2 αναγνωρίζει αλληλουχίες που έχουν χαρτογραφηθεί στην 5'-αμετάφραστη περιοχή. Μετά την απομάκρυνση του 5' cap, το 5' μονοφωσφορυλιωμένο άκρο του RNA γίνεται ευάλωτο στην XRN4 εξωριβονουκλεάση (Belostotsky και Sieburth, 2009).

## Πίνακας 2.

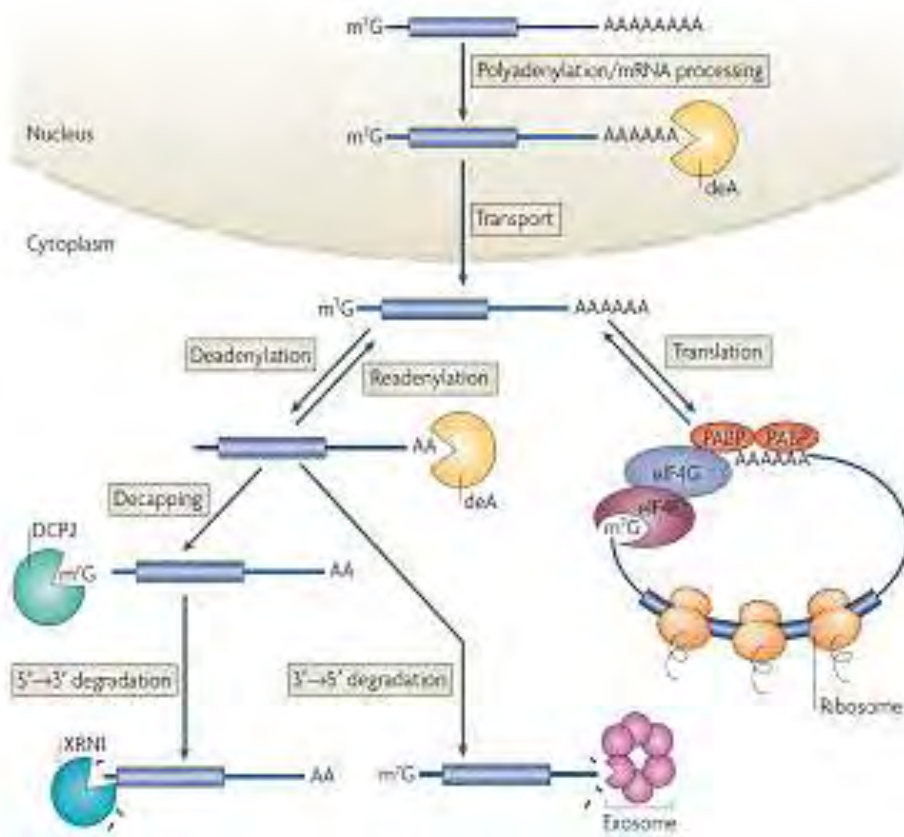
Κυτταροπλασματικοί παράγοντες του *Arabidopsis Thaliana* που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του RNA. (Belostotsky και Sieburth, 2009)

Cytoplasmic RNA decay machinery – ( <i>Arabidopsis</i> ).	
Subunit name	Function
Poly(A) ribonuclease (PARN)	Deadenylation
CCR4/CAF1	Deadenylation
PAN-like	Deadenylation
RRP4	Exosome, S1 + KH domain
RRP40A	Exosome, S1 + KH domain
RRP40B	Exosome, S1 + KH domain
CSL4	Exosome, S1 + KH domain
RRP41	Exosome, RNase PH domain
RRP42	Exosome, RNase PH domain
RRP43	Exosome, RNase PH domain
RRP45A	Exosome, RNase PH domain
RRP45B	Exosome, RNase PH domain
RRP46	Exosome, RNase PH domain
MTR3	Exosome, RNase PH domain
RRP44A	Exosome, RNase II
RRP44B	Exosome, RNase II
RRP6A	RNase D
RRP6B	RNase D
RRP6C	RNase D
DCP2/TDT	Decapping enzyme
DCP1	Decapping subunit
VARICOSE	Scaffold for decapping complex assembly, P-body core
XRN4	5'-3' exoribonuclease
UPF1	Nonsense-mediated decay
UPF2	Nonsense-mediated decay
UPF3	Nonsense-mediated decay
SMG-7	Nonsense-mediated decay
UBP1	TIA1-like, stress granules
UBP47	TIA1-like, stress granules



### 1.7. Αποαδενλίωση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αποικοδόμηση του mRNA υπό φυσιολογικές συνθήκες συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της poly(A) ουράς. Η αποαδενλίωση είναι το σημαντικότερο στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και της μεταφραστικής αποσιώπησης του mRNA. Το γεγονός αυτό καθιστά την αποαδενλίωση ως το κυριότερο σημείο ελέγχου για τις δύο αυτές διαδικασίες. Τα ένζυμα που καταλύουν την αποαδενλίωση είναι εξωνουκλεάσες εξαρτώμενες από  $Mg^{+2}$  που υδρολύουν το mRNA με κατεύθυνση  $3' \rightarrow 5'$ , απελευθερώνοντας 5'-AMP. Οι poly(A) ουρές είναι το κυριότερο υπόστρωμα των ενζύμων αυτών, ωστόσο μερικές αποαδενυλάσες μπορούν να διασπών και άλλα μόρια RNA in vitro. Από την στιγμή που η poly(A) ουρά έχει αφαιρεθεί από το mRNA, άλλα υδρολυτικά ένζυμα ξεκινούν την διάσπαση του (Εικόνα 1.11).



**Εικ.1.11** Η αποαδενλίωση είναι συνήθως το στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και της αποσιώπησης του mRNA. Στον πυρήνα, ο σχηματισμός του 3'-άκρου και η προσθήκη poly(A) ουράς είναι απαραίτητα γεγονότα για την εξαγωγή του mRNA. Στη ζύμη, η Pan2 αποαδενυλάση (deA) «αγαλίδιζει» τις ουρές στο κατάλληλο μήκος. Μόλις το mRNA εξαχθεί στο κυτταρόπλασμα, η πολύ(A) ουρά του mRNA ενισχύει τη μετάφραση και σταθεροποιεί το mRNA. Η PABP (Poly(A)-bound poly(A)-binding protein) αλληλεπιδρά με τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης που δεσμεύονται στο 5'-cap, τους eIF4G, eIF4E, ώστε μαζί να ενισχύσουν την έναρξη της μετάφρασης. Με την αφαίρεση της poly(A) ουράς από το mRNA, οι αποαδενυλάσες προκαλούν την αποικοδόμηση του mRNA ή τη μεταγραφική καταστολή, ενώ η επαναδενλίωση μπορεί να ενεργοποιήσει κάποια μόρια mRNA. Πιο συχνά, τα αποαδενυλωμένα mRNAs αποικοδομούνται μέσω μία από τις δύο οδούς: το  $5' \rightarrow 3'$  μονοπάτι, όπου μετά την αφαίρεση του 5' cap του mRNA (η αφαίρεση του 5' καλύμματος γίνεται από το ένζυμο DCP2), ακολουθεί η αποικοδόμηση του από την εξωριβονουκλεάση XRN1 ή η αποικοδόμηση με κατεύθυνση  $3' \rightarrow 5'$  που καταλύεται από το εξώσωμα (Goldstohm και Wickens, 2008).

### 1.7.1. Ποικιλότητα και βιοχημική δράση αποαδενυλασών

Ο αριθμός των γνωστών αποαδενυλασών έχει επεκταθεί πρόσφατα, κυρίως μέσω βιοχημικών και γενετικών μελετών. Υποψήφιες αποαδενυλάσες έχουν ταυτοποιηθεί με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής, ωστόσο η δράση τους δεν έχει αποδειχθεί. Σύμφωνα με συγκριτικές μελέτες των περιοχών με δράση ριβονουκλεάσης των ενζύμων αυτών, όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες ανήκουν σε μία από τις δύο ομάδες, την DEDD (Asp-Glu-Asp-Asp) ή την exonuclease–endonuclease–phosphatase (EEP) υπέρ-οικογένεια. Οι DEDD νουκλεάσες ονομάστηκαν έτσι εξαιτίας των συντηρημένων καταλυτικών αμινοξικών καταλοίπων Asp και Glu τα οποία είναι διάσπαρτα ανάμεσα σε τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης που δεσμεύουν ιόντα μαγνησίου (Zuo Y. και Deutscher, 2001). Μέλη της ομάδας αυτής περιλαμβάνουν τις οικογένειες της POP2 (γνωστή και ως CAF1), της poly(A) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN), την CAF1Z, και την PAN2. Τα ένζυμα της ομάδας EEP περιλαμβάνουν την CCR4, την Nocturinin, την ANGEL και 2' phosphodiesterase (2' PDE) και έχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στην περιοχή με δράση νουκλεάσης (Πίνακας 3) (Dlakic M, 2000). Είναι πιθανό να υπάρχουν και άλλες νουκλεάσες εκτός των υπέρ-οικογενειών DEDD και EEP ωστόσο δεν έχει ταυτοποιηθεί καμία ακόμη. Με αποαδενυλίωση είναι δυνατό να αφαιρεθούν poly(A) που προστίθενται σε μη κωδικοποιούμενα μόρια. Το πυρηνικό σύμπλοκο εξωσώματος εμπλέκεται σε τέτοιες αποαδενυλίωσεις, με την RRP6 υπομονάδα, η οποία είναι μια DEDD τύπου εξωνουκλεάση, να είναι πιθανόν το καταλυτικό ένζυμο του συμπλόκου (Conti E. και Izaurralde E., 2005: Badis G., 2004). Οι ποικιλία των αποαδενυλασών μεταβάλλεται μέσα στα είδη. Μέλη των POP2, CCR4, PAN2 και ANGEL οικογενειών εντοπίζονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Πίνακας 3), ενώ άλλες αποαδενυλάσες είναι λιγότερο συντηρημένες. Για παράδειγμα από την *Drosophila melanogaster* λείπουν η PARN και CAF1Z (Πίνακας 3). Στο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν 26 αποαδενυλάσες, πιθανότατα λόγω γεγονότων γενωμικού διπλασιασμού. Στα θηλαστικά, οι οικογένειες POP2, CCR4, PARN και ANGEL έχουν επεκταθεί χάρη σε διπλασιασμό γονιδίων (Πίνακας 3) (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Μέσω βιοπληροφορικής έχουν προβλεφθεί νέες αποαδενυλάσες όπως η Poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1 (PNLDC1) και η ANGEL1 (Πίνακας 3) (Dupressoir A. και συν, 2001: Wagner E., 2007). Το γονίδιο *pnldc1* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 και ο υποκινητής περιέχει CpG νησίδες και υπερμεθυλιώνεται σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου και περιφερικά κύτταρα αίματος (Tessema M., 2008). Τουλάχιστον ένα ορθόλογο από κάθε οικογένεια διαθέτει δράση νουκλεάσης και το μοτίβο νουκλεάσης είναι συντηρημένο (Πίνακας 3). Σε ορισμένες περιπτώσεις η δράση αποαδενυλάσης επιδείχθηκε χρησιμοποιώντας *in vitro* και *in vivo* τεχνικές. Η ταυτοποίηση της ANGEL και της 2' PDE είναι μεμονωμένη. Η ανθρώπινη ANGEL έχει βρεθεί σε σύμπλοκο αποαδενυλίωσης (Zuo Y. και Deutscher, 2001) και διατηρεί τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου, ενώ η Ngl2, μια ορθόλογη της ANGEL στον μύκητα, είναι μία εξωνουκλεάση (Faber A. W., 2002). Η ανθρώπινη 2' PDE μπορεί να διασπά το poly(A) όταν το 5' φωσφορικό κάθε αδενοσίνης είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το 2' ή 3' υδροξύλιο. Ωστόσο ο μοναδικός βιολογικός ρόλος της είναι η αποικοδόμηση του 2'-5' oligo(A) (Goldstrohm και Wickens, 2008).

**Πίνακας 3**

Όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες. Ανήκουν σε μία από της δύο ομάδες, την DEDD ή την exonuclease–endonuclease–phosphatase (EEP) υπέρ-οικογένεια. Κάποιες έχουν προβλεφθεί μέσω βιοπληροφορικής. (Goldstrohm και Wickens, 2008)

Family	Sc	Ce	Dm	Xl	Mm	Hs	Active	Notes	Protein domains	Local-ization	Biological functions	Ref
<b>DEDD nucleases</b>												
POP2	Pop2	CCF-1	POP2	CNOT7	CNOT7	CNOT7	Sc, Dm, Mm, Hs	Inhibited by PABP	DEDD	C, PB, Sh	DNA damage, cell cycle (Sc) Development, fertility (Ce) Cell size, miRNA control (Dm) Spermatogenesis, bone mass (Mm)	4, 10, 20, 22, 28, 32, 33, 34, 36, 66, 68, 69
				CNOT8	CNOT8	CNOT8	Hs		DEDD		ND	
CAF1Z		CAF-1z		CAF1Z	CAF1Z	CAF1Z	Hs		DEDD, C3H Znf, NLS	N, CB, Sh	ND	16
PARN		PARN		PARN	PARN	PARN	Xl, Hs	Binds and stimulated by cap; inhibited by PABP and CBP80	DEDD, R3H, NBD, NLS	N, C, Sh	Oocyte maturation (Xl) NMD (Hs)	4, 20, 27, 38, 61
					PARNL	PARNL	ND		DEDD			
PAN2	Pan2	PAN-2	PAN2	PAN2	PAN2	PAN2	Sc, Mm, Hs	Stimulated by PABP	DEDD, WD40, UCH	N, C, Sh	Nuclear poly(A) shortening, replication stress (Sc)	4, 20, 70
<b>EEP nucleases</b>												
CCR4	Ccr4	CCR-4	CCR4	CNOT6	CCR4	CNOT6	Sc, Dm, Mm, Hs	Inhibited by PABP	EEP, LRR	C, PB, Sh	DNA damage, cell cycle, replication stress (Sc) Oogenesis (Dm) NMD (Mm)	4, 20, 23, 29, 69
				CNOT6L	CCR4L	CNOT6L	Mm, Hs		EEP, LRR	C, Sh	Cell proliferation (Mm)	
Nocturnin			NOC	Noc	NOC	NOC	Xl, Mm, Hs		EEP	C	Circadian (Xl, Mm) Homeostasis (Mm)	35, 40, 71
ANGEL	Ng1	Angel	Angel	Angel1	ANGEL1	ANGEL1	ND		EEP	C, MA (Sc)		15–17
	Ng12			Angel2	ANGEL2	ANGEL2	Sc		EEP	C (Sc); N, CB, Sh (Hs)	5.8S rRNA processing, carbon source (Sc)	
	Ng13						ND		EEP	ND		
2'PDE		2'PDE	2'PDE	2'PDE	2'PDE	2'PDE	Hs	Degrades 2'-5'A and 3'-5'A	EEP	ND	Interferon response (Hs)	18

C3HZnF, Cys-His zincfinger; C, cytoplasm; CB, cajalbody; Ce, Caenorhabditiselegans; Dm, Drosophilamelanogaster; Hs, Homosapiens; LRR, Leu-richrepeat; MA, mitochondrialassociated; Mm, Musmusculus; N, nucleus; ND, notdetermined; NBD, nucleotide-bindingdomain, related to the RNA-recognition motif; NLS, nuclear localization signal; PB, processingbody; R3H, Arg-His motif; Sc, Saccharomyces cerevisiae; Sh, nucleocytoplasmic shuttling; UCH, ubiquitin C-terminal hydrolase; Xl, Xenopus laevis

Επιπλέον στο *Arabidopsis thaliana*, έχει μελετηθεί το ομόλογο της πολυ(A)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN). Η PARN του *Arabidopsis* (AtPARN) που εκφράστηκε σε κύτταρα *E.coli* διαθέτει αποικοδομητική ενεργότητα *in vitro*, γεγονός που συνδέεται με την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών και κατάλοιπων αμινοξέων που είναι σημαντικά για την καταλυτική ενεργότητα (Reverdatto, 2004). Η N-τελική περιοχή της παρουσιάζει ομοιότητα με την N-τελική περιοχή της HuPARN, όπου βρίσκονται οι καταλυτικές περιοχές. Η συντηρημένη N-τελική περιοχή της PARN είναι πιο σημαντική για την ενεργότητά της από την C-τελική περιοχή. Επιπλέον, διαθέτει τρεις κρίσιμες Εχο-περιοχές χαρακτηριστικές της οικογένειας των ενζύμων RNaseD (Chiba και συν, 2003). Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η PARN εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά ιόντα ενώ εμφανίζει μέγιστη δραστηριότητα παρουσία ιόντων  $Mg^{+2}$ , τα οποία πιθανόν βρίσκονται στο μοτίβο DEDD του ενεργού κέντρου, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης. Η PARN περιέχει επίσης μια σπάνια διατηρημένη RH3 περιοχή που φαίνεται να έχει δομή όμοια με αυτήν της IF3 καρβοξυτελικής περιοχής (Wu και συν, 2005). Η RH3 περιοχή προσδένεται σε μονόκλωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν επιστρατεύει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA. Τα πειράματα πρωτεϊνικού εντοπισμού σε φυτικά κύτταρα δείχνουν ότι η AtPARN βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Ακόμη, πειράματα με μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της AtPARN δείχνουν ότι το γονίδιο της είναι σημαντικό κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης. Αν και μέχρι τώρα, δεν έχουν απενεργοποιηθεί ομόλογα γονίδια της AtPARN σε άλλους οργανισμούς, όλες οι παρατηρήσεις φανερώνουν τη σημαντικότητα του ενζύμου και τη χρησιμότητά του σε πολλούς άλλους πολυκύτταρους οργανισμούς (Chiba και συν, 2003).

Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για να ταυτοποιηθούν όλες οι δραστικές αποαδενυλάσες και να διευκρινιστεί ο βιολογικός τους ρόλος. Δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητό το πλεονέκτημα της ύπαρξης τόσων πολλών αποαδενυλασών. Είναι πιθανόν ειδικές αποαδενυλάσες να στοχεύουν σε διακριτές ομάδες mRNA με αποτέλεσμα να ελέγχεται κάθε ομάδα από την δράση ενός ενζύμου. Από την άλλη διάφορες αποαδενυλάσες μπορούν να δρουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενες δράσεις. Στο μύκητα η PAN2 αποαδενυλιώνει νεοσυντιθέμενα μόρια mRNA μέσα στον πυρήνα (Εικόνα 1.10) (Garneau N. L., 2007). Παρολ' αυτά αν ακολουθήσουμε το mRNA στο κυτταρόπλασμα θα δούμε ότι η Ccr4 είναι η επικρατούσα αποαδενυλάση (Tucker M. και συν, 2001). Σε κύτταρα θηλαστικών, η PAN2 αφαιρεί την μισή ουρά, οπότε μέλη της POP2 και CCR4 αποικοδομούν την υπόλοιπη (Yamashita A. και συν, 2005: Goldstrohm και Wickens, 2008).

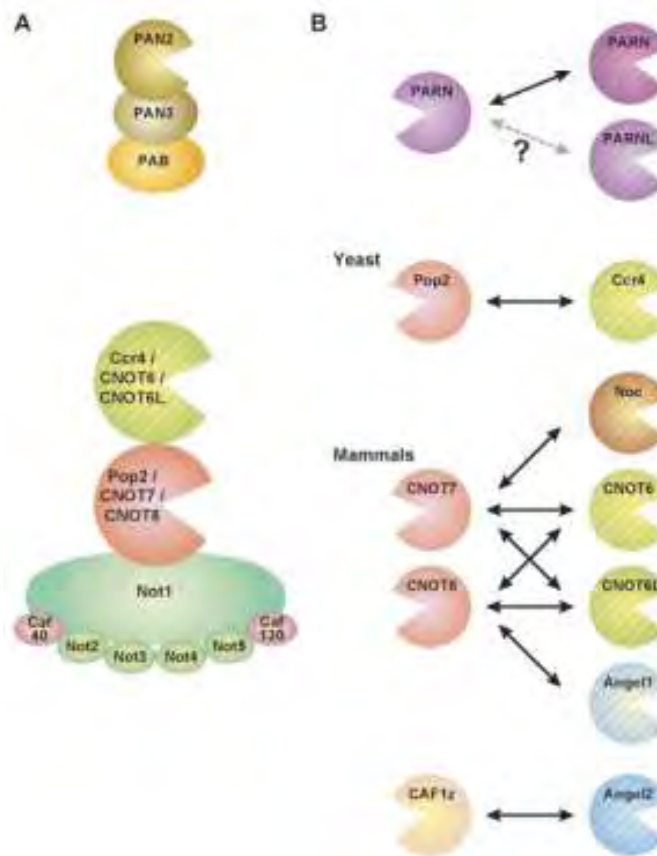
#### 1.7.2. Σύμπλοκα αποαδενυλασών

Οι αποαδενυλάσες συνήθως σχηματίζουν σύμπλοκα. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα σύμπλοκα αυτά μπορεί να επηρεάζουν την δραστηριότητα των αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, η αποαδενυλάση PAN2 προσδένεται στην PAN3 η οποία με την σειρά της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABP 4 (Εικόνα 1.12). Η PABP ρυθμίζει την δράση του συμπλόκου PAN2-PAN3 προσελκύνοντας το στην poly(A) ουρά. Κάποιες αποαδενυλάσες σχηματίζουν ομο- ή ετεροδιμερή (Εικόνα 1.12). Σε κάποιες περιπτώσεις ο ομοδιμερισμός είναι απαραίτητος για την ενεργότητα της (Faber A. W., 2002). Η Ccr4 και η Pop2 στο *S. cerevisiae* σχηματίζουν ετεροδιμερή (Deni C. L. και Chen J., 2003). Επίσης ο ετεροδιμερισμός επεκτείνει το ρεπερτόριο των αποαδενυλασών στα θηλαστικά. Εφτά διακριτά σύμπλοκα μεταξύ των αποαδενυλασών



έχουν καταγραφεί (Wagner E., 2007: Morita M. και συν, 2007). Διάφορα ετεροδιμερή μπορεί να έχουν διαφορετική ενζυμική ή ρυθμιστική ικανότητα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η CNOT8 η οποία είναι μέλος της POP2 οικογένειας και έχει την ικανότητα να προσδένεται στην PUF ρυθμιστική πρωτεΐνη περισσότερο από ότι προσδένεται η CNOT7, ένα άλλο μέλος της POP2 οικογένειας (Goldstrohm A.C., 2006). Ανώτερα σύμπλοκα όσον αφορά το επίπεδο οργάνωσης προσθέτουν επιπλέον λειτουργίες και ρυθμιστική δυνατότητα. Υπάρχουν ειδικά ετεροδιμερή αποτελούμενα από την CCR4 και την POP2 πρωτεΐνη σε διάφορα είδη και συνδέονται με πρωτεΐνες NOT για να σχηματίσουν μεγάλα συμπλέγματα πολλαπλών υπομονάδων (Wagner E., 2007: Deni C. L. και Chen J., 2003: Goldstrohm και Wickens, 2008).

Το σύμπλοκο CCR4–POP2–NOT εμφανίζεται σε διαφορετικές μορφές με μοριακά βάρη να κυμαίνονται από 0,65 έως 2 MDa (Deni C. L. και Chen J., 2003). Οι πρωτεΐνες NOT μπορούν να δρουν ως συνδέτες. Η NOT4 της *D. melanogaster* συνδέει το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης σε μία 3'UTR ρυθμιστική πρωτεΐνη. Μεταξύ ετεροδιμερών και υψηλού επιπέδου πολυπλοκότητας συμπλόκων στα οποία μπορούν να προσδένονται διαφορετικά, το ρεπερτόριο των αποαδενυλασών και του βιολογικού τους ρόλου είναι αρκετά εκτενές (Goldstrohm και Wickens, 2008).



**Εικ.1.12.** Σύμπλοκα αποαδενυλασών Α| Οι αποαδενυλάσες PAN2, CCR4, και POP2 βρέθηκαν σε πρωτεϊνικό σύμπλοκο με πολλαπλές υπομονάδες, όπως απεικονίζεται. Το CCR4-POP2-NOT σύμπλοκο είναι ετερογενές. Η μορφή1 MDA αποικονίζεται. Τα CCR4 και POP2 ορθόλογα ορισμένων θηλαστικών επιλεκτικά συνδέονται με NOT σύμπλοκα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών είναι σχηματικές, και δεν δείχνουν αναγκαστικά περιοχές της άμεσης επαφής. Β | Η PARN αποαδενυλάση σχηματίζει ομοδιμερή. Εικάζεται ότι μπορεί επίσης η PARN να σχηματίζει ετεροδιμερή με την αντίστοιχη πρωτεΐνη PARNL (υποδεικνύεται από διακεκομμένα, διπλής όψης βέλη και ερωτηματικό). Τα CCR4 και POP2 ορθόλογα σχηματίζουν ετεροδιμερή επιλεκτικά (οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις υποδεικνύονται από δύο όψεων βέλη) (Goldstrohm και Wickens, 2008).

### 1.7.3. Βιολογική λειτουργία αποαδενυλασών

Οι αποαδενυλάσες έχουν διάφορες βιολογικές λειτουργίες όπως έχει δειχθεί από πειράματα γενετικής και RNA παρεμβολής (Πίνακας 3). Μερικά από τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για την βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάγματα των ενζύμων αυτών επιφέρουν συγκεκριμένο φαινότυπο. Στα μετάζωα, τα φυτά και τους μύκητες διατάραξη της φυσιολογικής λειτουργίας των αποαδενυλασών επιφέρει ένα εύρος περιεργων φαινοτύπων (Πίνακας 3), ενώ για την βιωσιμότητα του ζυμομύκητα καμία αποαδενυλάση δεν είναι απαραίτητη. Παρόλο που η αποαδενυλίωση δεν αναστέλλεται με μεταλλάξεις στα γονίδια *pan2* ή *ccr4*, μπλοκάρεται σε διπλά μεταλλάγματα *pan2* και *ccr4*. Τα διπλά μεταλλάγματα είναι βιώσιμα γεγονός που υποδεικνύει ότι άλλα μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA συμπληρώνουν την αποαδενυλίωση μολονότι ο ρυθμός είναι πολύ πιο αργός (Tucker M., 2002: Goldstrohm και Wickens, 2008).

Ειδικές αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βιολογικές διαδικασίες, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ρύθμιση των επιπέδων mRNA είναι σημαντική για τις διαδικασίες αυτές. Διάφορες αποαδενυλάσες όπως η PARN του *A. thaliana* και *Xenopus laevis*, η CCR4 της *D. melanogaster* και η CCF-1 του *C. elegans*, είναι κρίσιμες στην εμβρυογένεση (Korner C. και συν, 1998: Molin L. και Puisieux A., 2005: Morris J.Z., 2005: Chiba Y. και συν, 2004: Reverdatto S.V., 2004). Άλλες είναι απαραίτητες για την γονιμότητα. *Cnot7*-knockout ποντίκια παρόλο που είναι βιώσιμα χωρίς σωματικά ελαττώματα εμφανίζουν ελαττωματική σπερματογένεση και κατ' επέκταση τα αρσενικά είναι στείρα (Berthet C. και συν, 2004: Nakamura T. και συν, 2004). Η CCR4 από την *D. melanogaster* και η CCF-1 από τον *C. elegans* παίζουν σημαντικό ρόλο στη γαμετογένεση τόσο ώστε μεταλλάγματα τους να επιφέρουν στειρότητα (Molin L. και Puisieux A., 2005: Morris J.Z., 2005: Goldstrohm και Wickens, 2008).

Επιπροσθέτως, οι αποαδενυλάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία. Τα *Cnot7*-knockout ποντίκια έχουν αυξημένη μάζα οστών (Washio-Oikawa K. και συν, 2007). Διατάραξη της φυσιολογικής λειτουργίας της *Nocturnin* του ποντικού προκαλεί ελαττωματικό έλεγχο μεταβολισμού προσφέροντας αντίσταση σε παχυσαρκία προκαλούμενη από την δίαιτα. Πράγματι τα ποντίκια αυτά παίρνουν πιο δύσκολα βάρος παρόλο που συμπεριφέρονται και τρέφονται φυσιολογικά (Green C.B. και συν, 2007: Goldstrohm και Wickens, 2008).

Οι αποαδενυλάσες ελέγχουν την ανάπτυξη ακόμη και σε επίπεδο κυττάρου. Μεταλλάγματα της *D. melanogaster* *Ccr4* προκαλούν ελαττωματικό κυτταρικό κύκλο, όπως επίσης και μεταλλάγματα *rop2* και *ccr4* στον ζυμομύκητα (Deni C. L. και Chen J., 2003). Σε κυτταρικές σειρές, αποσιώπηση της *rop2* επιφέρει διαταραχή στον έλεγχο της κυτταρικής μάζας. Στα θηλαστικά υπερ-έκφραση της *Cnot7* ή της *Caf1Z* ή μείωση έκφρασης της *Cnot6L*, προκαλεί μειωμένη κυτταρική αύξηση (Morita M. και συν, 2007: Bogdan J.A., 1998). Αυτά τα παράξενα ευρήματα παρέχουν μία πρώτη ματιά στον ρόλο των αποαδενυλασών. Έως τώρα είναι δύσκολο να διακρίνει κανείς άμεσες ή έμμεσες επιπτώσεις. Για παράδειγμα ο φαινότυπος που προκαλείται παρεμβάλλοντας το γονίδιο της *Nocturnin* μπορεί να οφείλεται σε διατάραξη πολλών mRNA ή μόνο αυτών που εμπλέκονται στον μεταβολισμό. Η ταυτοποίηση των συγκεκριμένων μορίων mRNA στόχων των οποίων η απορρύθμιση είναι υπεύθυνη για τους φαινοτύπους που περιγράφηκαν προηγουμένως κρίνεται απαραίτητη (Goldstrohm και Wickens, 2008).

#### 1.7.4. Ρύθμιση της αποαδενυλίωσης

Η ρύθμιση της δράσης των αποαδενυλασών είναι αναγκαία, καθώς μη φυσιολογική αποαδενυλίωση επιφέρει γενική απορρύθμιση. Σταθερά και μεταφραζόμενα mRNA πρέπει να προστατεύονται από την αφαίρεση της poly(A) ουράς, ενώ μη σταθερά ή προβληματικά mRNA πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να αποικοδομούνται (Lejeune F., 2003; Chen C.Y. και Shyu, 2003). Ταχεία αποαδενυλίωση συγκεκριμένων στόχων ξεχωρίζει σημαντικά από την φυσιολογική αποαδενυλίωση. Έτσι οι αποαδενυλάσες πρέπει να ρυθμίζονται γενικά αλλά και ειδικά σύμφωνα με τον στόχο (Εικόνα 1.13) (Goldstrohm και Wickens, 2008).

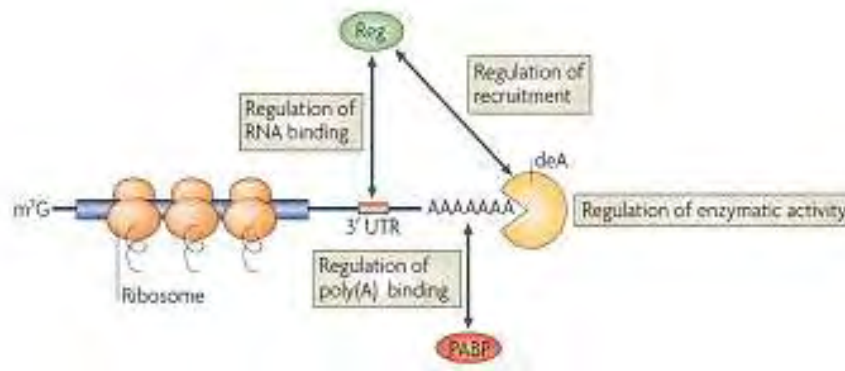
Οι αποαδενυλάσες και οι ρυθμιστές τους εκφράζονται σε δεδομένη χρονική στιγμή και τόπο όταν μπορεί να υπάρχει και η ρύθμιση τους. Για παράδειγμα η έκφραση της Nocturnin είναι ρυθμική, πιθανόν μέσου ημερονυκτίου ρυθμού (Green C.B. και Besharse, 1996; Goldstrohm και Wickens, 2008).

Άλλες αποαδενυλάσες, όπως μέλη της POP2 και CCR4 οικογένειας εκφράζονται ευρέως και σταθερά (Prevo D. και συν, 2001). Ένας δεύτερος μηχανισμός για γενική ρύθμιση της αποαδενυλίωσης είναι η αναστολή της ενζυμικής δράσης (Εικόνα 1.13). Ειδικά στρεσογόνα, όπως η υπερϊώδης ακτινοβολία, οξειδωτικά, οσμωτική πίεση ή θερμικό στρες, έλλειψη γλυκόζης, αναστέλλουν την αποαδενυλίωση, ενώ μελέτες επί της ανθρώπινης PARN δείχνουν ότι αναστέλλεται από νουκλεοτίδια και συνθετικά τους ανάλογα. (Balatsos NA, 2009; Balatsos NA και Stathopoulos C., 2009; Gowri shankar G. και συν, 2006; Bonisch C., 2007; Goldstrohm και Wickens, 2008).

Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται από δύο τοπολογικά διακριτές μορφές ελέγχου: α) πυρηνική – κυτταροπλασματική και β) εντοπισμός σε κοκκία. Διάφορες αποαδενυλάσες κινούνται παλινδρομικά από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Πίνακας 3) (Wagner E., 2007; Yamashita A. και συν, 2005). Αλλαγές στην διαμερισματοποίηση επιφέρουν δραματικά αποτελέσματα. Στα αμφίβια, αποσύνθεση του πυρήνα κατά την μείωση απελευθερώνει την PARN στο κυτταρόπλασμα όπου και αποαδενυλιώνει μητρικά mRNA (Korner C. και συν, 1998; Goldstrohm και Wickens, 2008).

Διάφορες αποαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία (Πίνακας 3). Τα γαμετοκύτταρα, τα νευρωνικά κοκκία και τα σωματίδια P (P bodies) περιέχουν mRNA μόρια σε καταστολή τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν (Eulalio A., 2007). Ο συνεντοπισμός των ενζύμων με τα υποστρώματα μπορεί να διεγείρει την αποαδενυλίωση αλλά αυτό δεν έχει αποδειχθεί πλήρως. Από την άλλη η αποαδενυλίωση δεν φαίνεται να περιορίζεται στα κοκκία γιατί οι ίδιες αποαδενυλάσες έχουν βρεθεί και στο κυτταρόπλασμα (Conrad N.K., 2007; Goldstrohm και Wickens, 2008).

Η αποαδενυλίωση μπορεί να επηρεάζεται από χαρακτηριστικά του mRNA. Η 5' καλύπτρα διεγείρει την ενεργότητα και την διαρκή εξωνουκλεοτιδική δράση δηλαδή την συνεχή αποαδενυλίωση από την PARN, ενώ δεν έχει επίδραση στην δράση άλλων αποαδενυλασών (Πίνακας 3). Αυτή η ιδιαίτερη ιδιότητα της PARN οφείλεται στην ικανότητα πρόσδεσης του ενζύμου αυτού στην 5' καλύπτρα του mRNA μέσω μια ειδικής περιοχής πρόσδεσης (Garneau N. L., 2007). Σε κάποια mRNA η poly(A) ουρά μπορεί να προστατευθεί από τις αποαδενυλάσες μέσω ζευγαρώματος βάσεων. Για παράδειγμα το πυρηνικό RNA της PAN στο σάρκωμα Kaposi, προκαλούμενο από ερπιτοϊό, αποτρέπει την αποαδενυλίωση του με ζευγάρωμα των βάσεων μεταξύ της poly(A) ουράς και μίας περιοχής πλούσιας σε ουριδίνη (Conrad N.K., 2007). Η U-rich περιοχή Edc1 mRNA του *Saccharomyces cerevisiae* λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο (Muhlrad D. και Parker R., 2005; Goldstrohm και Wickens, 2008).



**Εικ.1.13.** Οι αποαδενυλάσες ρυθμίζονται γενικά αλλά και ειδικά σύμφωνα με τον στόχο. Ρυθμιστικοί παράγοντες (Reg), που δεσμεύουν RNA, συγκεκριμένες αλληλουχίες, ενισχύουν την αποαδενυλίωση με τη δέσμευση τους σε ακολουθίες της 3'(UTR) αμετάφραστης περιοχής ενός mRNA και με την στρατολόγηση αποαδενυλασών (deA) μέσω φυσικής σύνδεσης. Η στρατολογημένη αποαδενυλάση τότε αποικοδομεί την πολυ(A) ουρά, αρχίζει η αποικοδόμηση του mRNA και η καταστολή της μετάφρασης. Ειδικά παραδείγματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Η ρύθμιση της αποαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω της επίδρασης της δέσμευσης του RNA από πρωτεΐνη, μεταξύ του ρυθμιστή και του στόχου mRNA ή της πολυ(A)-δεσμευτικής πρωτεΐνης (PABP) και της mRNA πολυ(A) ουράς. Ομοίως, αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, που είναι κρίσιμες για την στρατολόγηση αποαδενυλασών, είναι κόμβοι της ρύθμισης. Η αποαδενυλίωση μπορεί επίσης να ελεγχθεί από την άμεση διαμόρφωση της ενζυμικής δραστηριότητας των αποαδενυλασών. Αμφίδρομα βέλη δείχνουν πρωτεΐνη-πρωτεΐνη ή πρωτεΐνη-RNA αλληλεπιδράσεις (Goldstrohm και Wickens, 2008).

#### 1.7.5. Επαγωγή της αποαδενυλίωσης από ρυθμιστικές πρωτεΐνες.

Η ρύθμιση ειδικών mRNA οφείλεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες που συχνά βρίσκονται στο 3'UTR και προάγουν την αποαδενυλίωση. Στις αλληλουχίες αυτές προσδένονται παράγοντες που στρατολογούν αποαδενυλάσες και διεγείρουν την αποαδενυλίωση (Εικ.1.13). Διάφορες RNA προσδενόμενες πρωτεΐνες (CUG-BP, PUF και CPEB), στρατολογούν τις αποαδενυλάσες αλληλεπιδρώντας άμεσα με αυτές (Πίνακας 4) (Kim J.H. και Richter J.D., 2006; Ezzeddine N. και συν, 2007). Ακόμα και η PABP μπορεί να ενεργοποιήσει την αποαδενυλίωση έλκοντας το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στο mRNA. Στα θηλαστικά η PABP μπορεί να στρατολογήσει σύμπλοκα μελών των οικογενειών POP2-CCR4 μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που συσχετίζονται με TOB πρωτεΐνες (Ezzeddine N. και συν, 2007; Goldstrohm και Wickens, 2008).

Η συνδυαστική δράση των ρυθμιστών επεκτείνει την πολυπλοκότητα των διαδικασιών αποαδενυλίωσης. Πολλαπλοί καταστολείς είτε πρωτεΐνες είτε miRNAs, συχνά προσδένονται στο ίδιο mRNA 3' UTR. Για παράδειγμα οι κατασταλτικές πρωτεΐνες του ζυμομύκητα Puf4 και Puf5 προσδένονται στο 3' UTR του *HO* mRNA και κάθε πρωτεΐνη επιστρατεύει τα σύμπλοκα Ccr4-Pop2 για να επιταχυνθεί η αποαδενυλίωση (Hook B.A., 2007). Επιπλέον σύμπλοκα που προσδένονται στο 3'-UTR μπορούν να προσελκύσουν αποαδενυλάσες μέσω διαφορετικών υπομονάδων. Στην *D. melanogaster* οι πρωτεΐνες Pumilio και Nanos προσδένονται στο hunchback mRNA και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Το σύμπλοκο Pumilio-Nanos με την σειρά του προσελκύει το σύμπλοκο CCR4-POP2-NOT με αλληλεπιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν και οι δύο υπομονάδες. Η Pumilio προσδένεται στην POP2, ενώ η Nanos προσδένεται στην NOT4 (Πίνακας 4) (Kadyrova L.Y., 2007). Έλεγχος της αποαδενυλίωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τροποποίηση της πρόσδεση του

ρυθμιστή ενός mRNA ή της αποαδενυλάσης (Εικ.1.13). Η φωσφορυλίωση της RNA προσδεδεμένης πρωτεΐνης KSRP από το p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) μονοπάτι αναστέλλει την προσδεση της στο RNA και εμποδίζει την ρύθμιση της αποαδενυλίωσης του mRNA στόχου κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης κυττάρων ποντικού σε μυοκύτταρα (Hook B.A., 2007). Παρομοίως η πρωτεΐνη της *D. melanogaster* Oskar έχει προταθεί ότι αναστέλλει την πρόσδεση του καταστολέα της μετάφρασης Smaug στο mRNA στόχο μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, που οδηγεί στην ενεργοποίηση του mRNA του nanos γονιδίου κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης (Εικ. 1.13) (Zaessinger S., 2006: Goldstrohm και Wickens, 2008).

Άλλο ένα σημείο ελέγχου είναι η αλληλεπίδραση ρυθμιστή – αποαδενυλάσης. Η Pbp1 του ζυμομύκητα προσδέεται στην PABP και αναστέλλει την δραστηριότητα της Pan2–Pan3 πιθανόν εμποδίζοντας την πρόσδεση (Zaessinger S., 2006: Goldstrohm και Wickens, 2008).

#### Πίνακας 4

Παράγοντες που στρατολογούν αποαδενυλάσες και διεγείρουν την αποαδενυλίωση. (Goldstrohm και Wickens, 2008)

Regulator	Deadenylase	RNA-binding cofactors	mRNA-decay cofactors	Translation cofactors
CUGBP ↔	PARN			
PABP ↔	PAN2–PAN3 or POP2–CCR4–TOB			
PUF ↔	POP2–CCR4–NOT	↔ Nanos	DCP1	Dhh1, 4EHP, Brat
CPEB	POP2–CCR4–NOT	CPSF, Symplekin		Maskin, GLD2
KSRP	PARN		DCP2, XRN1, exosome	
Smaug	POP2–CCR4–NOT			CUP
TTP	POP2–CCR4–NOT		DCP1, DCP2, HEDLS, XRN1, exosome	
UNR	POP2–CCR4–NOT	PABP, hnRNP D		PAIP1, NSAP1
UPF1, UPF2, UPF3	PARN or POP2–CCR4–NOT and PAN2		DCP1, DCP2, XRN1, exosome,	
MicroRNA	POP2–CCR4–NOT	Argonaute, GW182	DCP1, DCP2, XRN1	Argonaute, RCK/p54

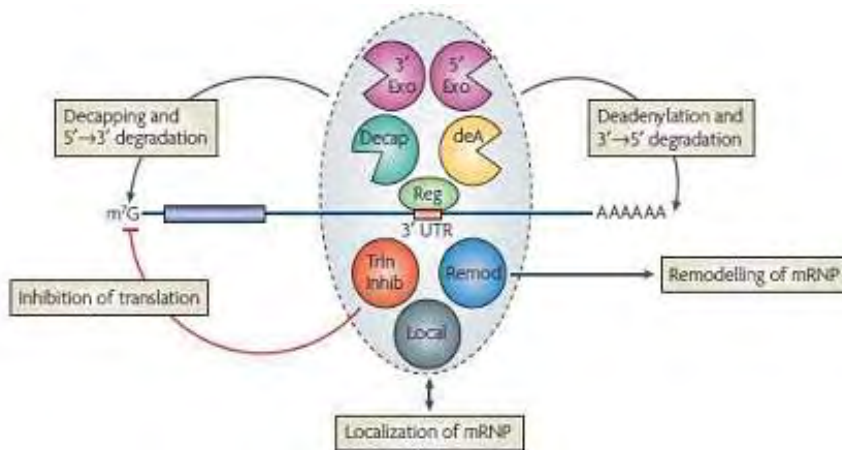
4EHP, eIF4E-homologous protein; CPEB, cytoplasmic polyadenylation element binding protein; CPSF, cleavage polyadenylation specificity factor; DCP, decapping protein; hnRNP D, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D; PABP, poly(A)-binding protein; PAIP1, PABP-interacting protein-1; PARN, poly(A)-specific ribonuclease; XRN1, exoribonuclease-1.

#### 1.7.6. Παράγοντες που διεγείρουν ή αναστέλλουν την αποαδενυλίωση

Το υπόστρωμα των αποαδενυλασών, η poly(A) ουρά του mRNA είναι καλυμμένη με μόρια PABP που εμποδίζουν την πρόσβαση σε αυτήν (Εικ.1.13),



π.χ. η PABP του ζυμομύκητα αναστέλλει την δραστικότητα της απομονωμένης Ccr4p (Tucker M., 2002). Στα θηλαστικά η PABP αναστέλλει την PARN (Zaessinger S., 2006). Στο *X. Laevis*, η ePAB, μια ομόλογη της PABP επίσης αναστέλλει την αποαδενυλίωση του mRNA (Mangus D.A. και συν, 2004). Η ρυθμιζόμενη αποδέσμευση της PABP από την poly(A) του mRNA ή η αλληλεπίδραση της PABP με μία αποαδενυλάση μπορεί να διεγείρει την αποαδενυλίωση (Voeltz G.K., 2001). Στον άνθρωπο υπάρχουν τουλάχιστον 6 μορφές της PABP, ενώ υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που επίσης προσδένονται στη poly(A) ουρά (όπως η NAB2), για τις οποίες δεν είναι γνωστό εάν επηρεάζουν την αποαδενυλίωση. Οι ρυθμιστές είναι δυνατόν να μπλοκάρουν την αποαδενυλίωση με το να σταθεροποιούν σύμπλοκα PABP – mRNA. Το  $\alpha$ -CP σύμπλοκο των RNA προσδενόμενων πρωτεϊνών σταθεροποιεί το mRNA της  $\alpha$ -globin με το να προσδένεται στην PABP. Συγγρόνως άλλες πρωτεΐνες προσδέτες μπορούν να επηρεάζουν την αποαδενυλίωση. Η CBP80, μία υπομονάδα του πυρηνικού συμπλόκου πρόσδεσης στο 5' κάλυμμα προσδένεται και ανταγωνίζεται την δράση της PARN, πιθανόν περιορίζοντας την δράση της σε νεοσυντιθέμενα pre-mRNAs (Balatsos N.A., 2006; Goldstrohm και Wickens, 2008).



**Εικ.1.14.** Πολυλειτουργικός έλεγχος της αποικοδόμησης και της μετάφρασης του mRNA. Οι ρυθμιστές (Reg) μπορούν να ελέγξουν την αποαδενυλίωση του mRNA, την αποικοδόμηση και τη μετάφραση με την στρατολόγηση πολυλειτουργικών συμπλόκων σε μόρια mRNA. Η σύνθεση, η συναρμολόγηση και οι ενζυματικές δραστηριότητες του συμπλόκου υπαγορεύουν το ρυθμιστικό αποτέλεσμα. Αυτά τα συμπλοκα (όπως φαίνεται στο γκρι οβάλ) μπορούν να περιέχουν τα ένζυμα που αποαδενυλιώνουν (αποαδενυλάσες; deA), που αφαιρούν την 5' καλύπτρα και που αποικοδομούν τα mRNAs (για παράδειγμα, 5' εξωνουκλεάσες όπως XRN1 ή 3' εξωνουκλεάσες όπως το εξώσωμα). Τα συμπλοκα μπορούν επίσης να αποτελούνται από πρωτεΐνες που αναστέλλουν τη μετάφραση (5'-cap ή eIF4E δεσμευτικές πρωτεΐνες, ή ελικάσες όπως ορθόλογα της Dhh1, εμφανίζονται ως TrIn Inhib), που αναδιαμορφώνουν τα συμπλοκα πρωτεΐνη-mRNA (για παράδειγμα, ελικάσες, εμφανίζονται ως Remod) ή που ελέγχουν την θέση του mRNA (εμφανίζεται ως Local). Η αναδιαμόρφωση του συμπλόκου mRNA-πρωτεΐνες (mRNP) μπορεί να επηρεάσει ένα ή περισσότερα ρυθμιστικά βήματα. Η στρατολόγηση ενός πολυλειτουργικού ρυθμιστικού συμπλόκου μπορεί να προκύψει μέσα από την μοριακή επαφή με μια ενιαία υπομονάδα του εν λόγω συμπλόκου. Ομοίως, ο ρυθμιστής μπορεί να οργανώσει την συναρμολόγηση ενός πολυλειτουργικού συμπλόκου στο mRNA μέσω ξεχωριστών επαφών με πολλαπλούς ρυθμιστικούς παράγοντες. Σε άλλες περιπτώσεις, η στρατολόγηση μπορεί να συμβεί μέσω της συνδυαστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των ρυθμιστών που είναι συνδεδεμένοι με την 3' αμετάφραστη περιοχή και με αρκετές υπομονάδες των συμπλόκων (Goldstrohm και Wickens, 2008).

Επιπλέον ρυθμιστικές πρωτεΐνες μπορούν να δρουν μέσω της PABP για να διεγείρουν την αποαδενυλίωση του mRNA (Εικ.1.14). Πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με ελικάση όπως η RHAU μπορούν να διεγείρουν την αποαδενυλίωση αντικαθιστώντας την PABP από την poly(A) ουρά (Voeltz G.K., 2001). Η TOB

των θηλαστικών διεγείρει την αποαδενυλίωση με το να στρατολογεί μέλη της CCR4–POP2 οικογένειας μέσω αλληλεπιδράσεων με την C-τελική περιοχή (non-RNA-binding) της PABP. Η TOB λειτουργεί ως γέφυρα συνδέοντας την PABP με σύμπλοκα αποαδενυλίωσης (Funakoshi Y. και συν, 2007: Ezzeddine N. και συν, 2007: Goldstrohm και Wickens, 2008).

### **1.8. Νοκτουρνίνη (Nocturnin), μια αποαδενυλίωση που ελέγχεται από το κιρκάδιο ρολόι**

Πέραν του μεταγραφικού και μετά-μεταφραστικού ελέγχου, το κιρκάδιο ρολόι υπόκειται σε ρύθμιση και από ένα μετά-μεταγραφικό μηχανισμό. Δεδομένα από το *Arabidopsis*, από τη *Drosophila* και από θηλαστικά δείχνουν ότι οι μετά-μεταγραφικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί είναι σημαντικοί στον έλεγχο της διατήρησης των επιπέδων των mRNAs που σχετίζονται με το κιρκάδιο ρολόι. Αν και τίποτα δεν είναι γνωστό για τη μοριακή φύση του μετά-μεταγραφικού ελέγχου, δεδομένα από τη *Drosophila* προτείνουν ότι το ρυθμιστικό αυτό βήμα διαθέτει από μόνο του ρυθμικότητα.

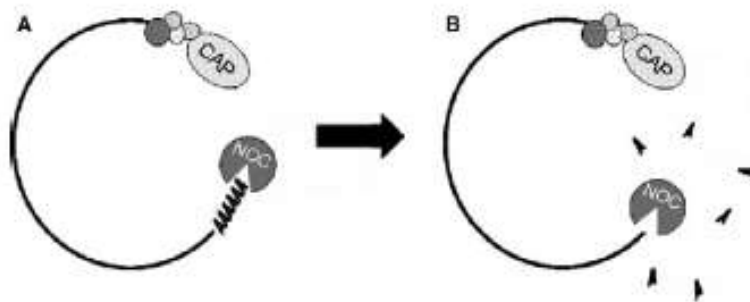
Στο *Xenopus* ταυτοποιήθηκε ένα γονίδιο με ρυθμική έκφραση, η νοκτουρνίνη (nocturnin), που ονομάστηκε έτσι επειδή το mRNA της μεταγράφεται σε υψηλά επίπεδα νωρίς τη νύχτα. Στον αμφιβληστροειδή του *Xenopus* υπάρχει ένα ενδογενές κιρκάδιο ρολόι που ρυθμίζει έναν αριθμό φυσιολογικών και βιοχημικών διεργασιών. Το γονίδιο της νοκτουρνίνης παρουσιάζει υψηλό ρυθμό έκφρασης mRNA σε έναν κύκλο φωτός και σε συνεχείς συνθήκες. Στον αμφιβληστροειδή του *Xenopus*, το mRNA της νοκτουρνίνης εντοπίζεται αποκλειστικά στα ραβδία και στα κωνία των φωτοϋποδοχέων της κυτταρικής στιβάδας. Στα κύτταρα αυτά εντοπίζεται το κιρκάδιο ρολόι, που οδηγεί στη ρυθμική απελευθέρωση της μελατονίνης και στην έκφραση των ομόλογων γονιδίων του ρολογιού του *Xenopus*.

Το ομόλογο της νοκτουρνίνης στον ποντικό (mNoc) έχει ταυτοποιηθεί ότι είναι ιδιαίτερα συντηρημένο στο επίπεδο των αμινοξέων. Παρόλα αυτά, σε αντίθεση με το *Xenopus*, το mRNA της mNoc εκφράζεται ευρέως σε ιστούς του ποντικού συμπεριλαμβανομένου του συκωτιού, του νεφρού, του εγκεφάλου (περιλαμβάνεται το υπερχιασματικό δίκτυο (SCN) και την υπόφυση), του πνεύμονα, της καρδιάς και του αμφιβληστροειδούς. Η υψηλή κιρκάδια έκφραση του mRNA της νοκτουρνίνης, έχει παρατηρηθεί σε αρκετούς από αυτούς τους ιστούς, εμφανίζοντας μέγιστο έκφρασης νωρίς τη νύχτα (Baggs και Green, 2003). Η νοκτουρνίνη είναι συντηρημένη στους ευκαρυώτες και εκφράζεται στον κύριο βηματοδότη των θηλαστικών, τον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου, χωρίς όμως να έχει ρυθμική έκφραση. Μέσα στο κύτταρο, η πρωτεΐνη της νοκτουρνίνης βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Douris και Green, 2009). Ομόλογα της νοκτουρνίνης έχουν κλωνοποιηθεί από τον άνθρωπο, την αγελάδα, το κοτόπουλο και τη *Drosophila*, ενώ είναι πιθανό, να υπάρχει ομόλογο και στο *Arabidopsis*.

Η ανάλυση της βάσης δεδομένων έδειξε ότι η νοκτουρνίνη είναι μια νέα πρωτεΐνη με ακολουθία όμοια, μόνο στο C-τελικό άκρο, με την πρωτεΐνη Ccr4p του *Sacharomyces cerevisiae* που ταυτοποιήθηκε ως ένας μεταγραφικός συνενεργοποιητής (Baggs και Green, 2003). Ο Ccr4p δεν προσδένει άμεσα το DNA, αλλά αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες μέσω μιας περιοχής πλούσιας σε λευκίνες. Η νοκτουρνίνη, στο N-τελικό της άκρο, διαθέτει μια περιοχή που μοιάζει με φερμουάρ λευκίνης (Green, 2003). Η νοκτουρνίνη και ο Ccr4p ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια νουκλεασών εξαρτώμενων από το μαγνήσιο ( $Mg^{+2}$ ). Τα μέλη της οικογένειας αυτής όπως η DNaseI,

η APEI (DNA-repair apurinic/apirimidinic endonuclease) και η οικογένεια IP5P (inositol polyphosphate 5-phosphatases) διαθέτουν "τσέπες" με παρόμοια κατάλοιπα αμινοξέων. Τα συντηρημένα κατάλοιπα είναι σημαντικά για την κατάλυση. Σε αυτά συμπεριλαμβάνεται και η περιοχή πρόσδεσης του  $Mg^{+2}$ . Επιπλέον, ύστερα από ανάλυση της αναδίπλωσης με ειδικό λογισμικό φαίνεται ότι η νοκτουρνίνη έχει δομικές ομοιότητες με την APEI (Baggs και Green, 2003). Αν και η ομοιότητα μεταξύ των δύο πρωτεϊνών είναι μικρή, οι περιοχές ομοιότητας αντιστοιχούν σε ακολουθίες που είναι κρίσιμες για τη δομή και τη λειτουργία της οικογένειας νουκλεασών (Green, 2003). Η C-τελική περιοχή του Ccr4p, που εμφανίζει ομοιότητα με τη νοκτουρνίνη και με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας των  $Mg^{+2}$ -εξαρτώμενων νουκλεασών, φαίνεται να έχει δράση αποαδενύλασης (Baggs και Green, 2003).

Η νοκτουρνίνη είναι μια 3'-εξωριβονουκλεάση, με εξειδίκευση στο πολυ(A). Έχει δράση αποαδενύλασης, δηλαδή έχει την ικανότητα να αφαιρεί την πολυ(A)-ουρά από τα mRNAs (Εικ.1.15). Η αποαδενύλωση αποτελεί το πρώτο βήμα στην αποικοδόμηση του mRNA και συμμετέχει στη μεταφραστική αποσιώπηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις η απώλεια της πολυ(A)-ουράς οδηγεί σε ταχεία αποικοδόμηση του mRNA, με φορά 3'→5', ενώ σε άλλες περιπτώσεις η απώλεια της ουράς εμποδίζει τη μετάφραση μέσω της εξασθένησης σχηματισμού των κυκλικών πολυσωμάτων. Ο ρόλος της νοκτουρνίνης στην αποαδενύλωση δεν είναι ακόμα γνωστός, αλλά υπάρχουν αποδείξεις ότι ελέγχεται από τον κερκάδιο ρυθμό δρώντας στο επίπεδο της αποικοδόμησης του mRNA και της μετάφρασης (Douris και Green, 2009).



**Εικ.1.15.** Μετά-μεταγραφική αποαδενύλωση mRNA από την εξωριβονουκλεάση νοκτουρνίνη. Α. Η νοκτουρνίνη προσδένεται στην πολυ(A)-ουρά και ξεκινά την αποικοδόμηση. Β. Η μείωση του μήκους πολυαδενύλωσης μπορεί να οδηγήσει σε εναλλακτική μετάφραση και/ή σε πλήρη αποικοδόμηση του μεταγράφου (Douris και Green, 2009).

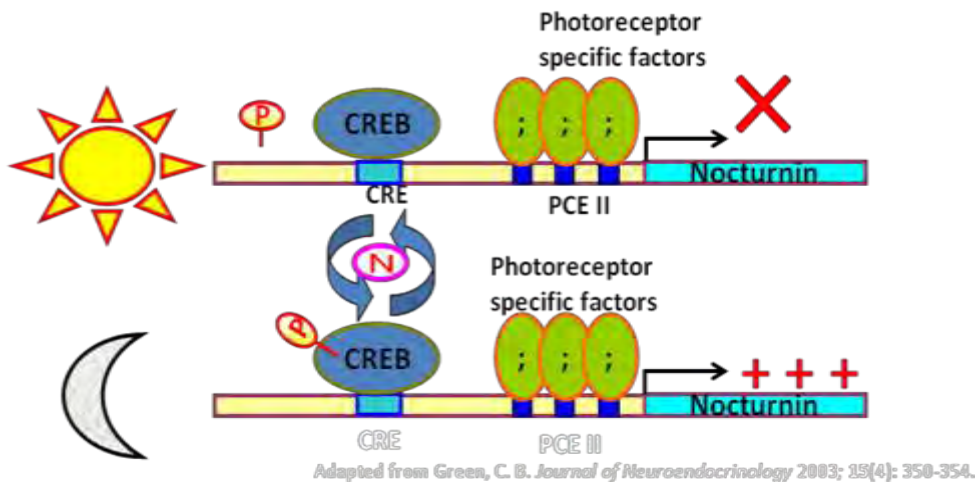
### 1.8.1. Μεταγραφική ρύθμιση της νοκτουρνίνης

Ο υποκινητής της νοκτουρνίνης αναλύθηκε ώστε να καθοριστούν τα στοιχεία που συμβάλλουν στην περιορισμένη μεταγραφή του, στο χώρο και στο χρόνο. Στην κεντρική 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου, ακριβώς ανοδικά από το σημείο έναρξης μεταγραφής, ταυτοποιήθηκε μια σειρά τριών επαναλήψεων ενός νέου στοιχείου πρόσδεσης πρωτεΐνης που ονομάστηκε PCEII (photoreceptor conserved element II). Το στοιχείο PCEII του DNA προσδένει με υψηλή συγγένεια πυρηνικές πρωτεΐνες, που απομονώθηκαν από τον αμφιβληστροειδή του *Xenopus*, αλλά δεν έδειξε ιδιαίτερη συγγένεια με πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από άλλους ιστούς. Το στοιχείο PCEII είναι απαραίτητο και επαρκές για την έκφραση της νοκτουρνίνης, όμως οι παράγοντες που



προσδένονται σε αυτό δεν είναι ακόμα γνωστοί. Η αλληλουχία του στοιχείου αυτού, είναι διαφορετική από αυτές που ταυτοποιήθηκαν σε άλλα γνωστά γονίδια φωτούποδοχέων.

Έπειτα από έρευνα για στοιχεία που συμβάλλουν στην έκφραση της νοκτουρνίνης, εξετάστηκε ένα μοτίβο που βρίσκεται ακριβώς ανοδικά από τα τρία PCEII στοιχεία, το οποίο προσομοιάζει με ένα E-box. Τα στοιχεία E-box προσδένουν μεταγραφικούς παράγοντες bHLH (basic-helix-loop-helix) και αυτή η συγκεκριμένη ομάδα των E-boxes (group C: NACGTG) συχνά προσδένεται από πρωτεΐνες bHLH-PAS, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών CLOCK και BMAL1 του κερκάδιου ρολογιού. Το ετεροδιμερές CLOCK/BMAL1 αποτελεί ένα ακέραιο κομμάτι του κεντρικού κερκάδιου μηχανισμού και ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων *PER* (*PERIOD*) και *CRY* (*CRYPTOCHROME*) στα σπονδυλωτά μέσω αλληλεπιδράσεων με στοιχεία E-boxes στους υποκινητές αυτών των γονιδίων. Και άλλα γονίδια με ρυθμική έκφραση όπως το *AVP* (*ARGININE VASOPRESSIN*), το *DBP* (*D-ELEMENT-BINDING PROTEIN*) και το *AA-NAT* (*ARYLALKYLAMINE N-ACETYLTRANSFERASE*) ρυθμίζονται από την πρόσδεση του ετεροδιμερούς CLOCK/BMAL1 στα στοιχεία E-boxes. Παρόλα αυτά, τα E-boxes που έχουν χαρακτηριστεί στους υποκινητές αυτών των γονιδίων, έχουν αλληλουχία CACGTG ενώ ο υποκινητής της νοκτουρνίνης περιέχει την αλληλουχία GACGTG. Επιπλέον, η μεταγραφή της νοκτουρνίνης στον αμφιβληστροειδή του *Xenopus* είναι διαφορετική από τη μεταγραφή γονιδίων που πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ετεροδιμερούς CLOCK/BMAL1. Πράγματι, πειράματα έδειξαν ότι το ετεροδιμερές CLOCK/BMAL1 δεν προσδένεται *in vivo* στο στοιχείο E-box του υποκινητή του γονιδίου της νοκτουρνίνης.



**Εικ.1.16.** Προτεινόμενος μηχανισμός της κερκάδιας ρύθμισης της μεταγραφής της νοκτουρνίνης (Green, 2003).

Η αλληλουχία που είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του πρωτεϊνικού συμπλόκου είναι 5'-GTGACGTG-3' (είναι υπογραμμισμένο το κομμάτι της αλληλουχίας που μοιάζει με την αλληλουχία του E-box) και εμφανίζει σημαντική ομοιότητα με το στοιχείο CRE (cyclic AMP response element). Η πρωτεΐνη που προσδένεται στο στοιχείο CRE ονομάζεται CREB (CRE binding protein) και ρυθμίζεται με φωσφορύλιωση.

Ο CREB εμπλέκεται στη ρύθμιση αρκετών διαδικασιών που σχετίζονται με τον κερκάρδιο ρυθμό και σε άλλα είδη εκτός από το *Xenopus* και η ομοιότητα στην ακολουθία του CRE και του E-box έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι τα δύο στοιχεία σχετίζονται εξελικτικά. Στα κύτταρα των φωτοϋποδοχέων του αμφιβληστροειδούς του *Xenopus* παρατηρήθηκαν ρυθμοί φωσφορυλίωσης του CRE, με μέγιστο από νωρίς τη νύχτα μέχρι τα μεσάνυχτα, παρόμοιο με το ρυθμό μεταγραφής της νοκτουρνίνης. Όλα αυτά τα δεδομένα προτείνουν ότι ο CREB οδηγεί τη ρυθμική μεταγραφή της νοκτουρνίνης (και πιθανόν και άλλων γονιδίων που είναι συγχρονισμένα με τη νύχτα), μέσω του τροποποιημένου CRE (Εικ.1.16) (Green, 2003).

## 2.ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Πρόσφατες μελέτες για αναζήτηση νέων αποαδενυλασών στο *Arabidopsis thaliana*, που ελέγχονται από τον κερκαδικό ρυθμό οδήγησαν στην ανακάλυψη της AtHESP.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής διατριβής είναι η συμβολή στο βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου. Για το λόγο αυτό, βελτιώθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης της ανασυνδυασμένης AtHESP, που είναι απολύτως απαραίτητο για επικείμενες κρυσταλλογραφικές μελέτες, καθώς και ο προσδιορισμός χαρακτηριστικών του ενζύμου με ανοσοαποτύπωση. Επιπλέον, επιχειρήθηκε η ανάπτυξη πρωτοκόλλου αντιδράσεων αποαδενυλίωσης με τη χρήση καθορισμένων, μη-ραδιενεργών υποστρωμάτων RNA.

### 3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΥΛΙΚΑ

- Χημικά

AcOH	SIGMA
Agar	CHEMBIOTIN
AgNO <sub>3</sub>	SIGMA
AmmoniumPersulfate (APS)	SIGMA
Ampicillin	SIGMA
Boricacid	SIGMA
Bovine Serum Albumin (BSA)	New Engl. Biolabs
Bromophenol blue	SIGMA
CaCl <sub>2</sub>	SIGMA
CH <sub>3</sub> COONa	SIGMA
Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Merck
CoomasieBrilliantBlue	Fluka
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Research Organics
Dithiothreitol (DTT)	SERVA
EDTA	Panreac
Formamide	SIGMA
Glycine	SIGMA
Glycogen	Roche
HCHO	SIGMA
HCl	Merck
HEPES	SERVA
Imidazole	SIGMA
Isopropyl ThioGalactosyl (IPTG)	Fermentas
KCl	Merck
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	SIGMA
KOH	SIGMA
LB Agar	Scharlau
LB Broth	Scharlau
LiCl	SIGMA
Maleic acid	SIGMA
Methanol	SIGMA
Methylene blue	SIGMA
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	Alfa Aesar
NaCl	Panreac
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	SIGMA
NaHCO <sub>3</sub>	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	SIGMA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	SIGMA
NaOH	Merck
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	SERVA
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	SIGMA
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	Research Organics

Tris base	Merck
Triton X	Merck
Tween 20	SIGMA
Urea	Riedel de Haen
Xylene Cyanol	SIGMA
Αγαρόζη (Agarose)	SeaKem
Αιθανόλη	Panreac
Ακρυλαμίδα (Acrylamide)	SIGMA
Βαροϋδρίδιο του νατρίου	SIGMA
Β-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Haen
Γάλα σε σκόνη (για Nothern)	SIGMA
Γλυκερόλη (gluceroI)	Panreac
Δις-ακρυλαμίδιο (Bis-acrylamide)	SIGMA
Ισοπροπανόλη (Isopropanole)	Scharlau
Λυσοζύμη	FLUKA
Οξικόοξύ	Merck
Φαινόλη/Χλωροφόρμιο	SIGMA
Φορμαλδεΐδη	SIGMA
Χλωραμφαινικόλη	SIGMA

- **Βακτηριακά στελέχη**

**BL21 (DE3)** {γονότυπος: E. coli B F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal λ (DE3)}

**BL21 (DH5α)** [γονότυπος: F-φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 rela1 λ-]

- **Θρεπτικά υλικά**

LB Broth	Scharlau
LB Agar	Scharlau

- **Πρωτεΐνες και ένζυμα**

Anti-NOC	SIGMA
His6-AtHESP Από E.coli BL21	
PARN 74 kDa Από E.coli BL21	
DNase	TAKARA
RNase A	SIGMA
RNase inhibitor	Invitrogen
EcoRI	New Engl Biolabs
NsiI	SIGMA
T3 πολυμεράση	Roche
T7 πολυμεράση	Roche

Πρωτεΐνωση Κ SIGMA

- **Νουκλεοσίδια και συνθετικά νουκλεοσίδια**

Roche DIG labeling mix SIGMA

7' methyl Gouanosine (Cap) 4mM SIGMA

- **Πλασμίδια**

pET15b (AtHESP)

pBS (υπόστρωμα με υποκινητή T3)

pcDNA 3.1 (υπόστρωμα με υποκινητή T7· ευγενική προσφορά του Αν. Καθ. Κ. Σταθόπουλου, Παν/μιο Πατρών)

- **Υλικά χρωματογραφίας**

Ni<sup>2+</sup>-NTA- Sepharose GE Healthcare  
Cellulose phosphate P11 (cation exchanger) Whatman

- **Υλικά διαπίδυσης**

Μεμβράνη διαπίδυσης SIGMA

### Διαλύματα

- **Θρεπτικά υλικά**

Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth) μαζί με Αμπικιλίνη (1:1000 αραίωση)

Στερεό θρεπτικό μέσο (LB Agar)

Για την παρασκευή ενός λίτρου διαλύματος προστίθενται: 10ng Bacto tryptone, 10 gr yeast extract, 5gr NaCl. Για την παρασκευή θρεπτικού μέσου τρυβλίων προστίθενται στα παραπάνω 15gr άγαρ.

- **Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης**

- TAE (1X TAE: 40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)

- Red gel. Διατηρείται στους -20 °C. Προστίθεται 1μl/10000μl.

-DNA Loading Buffer 6X (0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη)

- **Διαλύματα για απομόνωση πρωτεΐνης με στήλη Ni<sup>+2</sup>-NTA-SEPHAROSE**

- Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (Phosphate buffer pH 6, 500mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 10% γλυκερόλη, 5mM μερκαπτοαιθανόλη, 5mM MgCl<sub>2</sub>, PMSF 1mM, λυσοζύμη)

- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1 (Phosphate buffer pH 6, 0,5M NaCl, 50mM ιμιδαζόλιο)

- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 2 (Phosphate buffer pH 6, 0,5M NaCl, 200mM ιμιδαζόλιο)

- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (Phosphate buffer pH 6, 0,5M NaCl, 500mM ιμιδαζόλιο)

- Διάλυμα εξισορρόπησης (Phosphate buffer pH 6, 0,5M NaCl)

- Phosphate Buffer pH 6 (12mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 88mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Οι παραπάνω συνθήκες έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Ωστόσο είχαμε ελέγξει και άλλες συνθήκες :

- Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης με Tris-HCl pH 8 αντί Phosphate buffer pH 6 (ομοίως για ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1 & 2 και για διάλυμα εξισορρόπησης)

- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1 με συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου 20 mM και ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 2 με συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου 100mM, 150mM

- **Διαλύματα για απομόνωση πρωτεΐνης με στήλη cellulose phosphate P11**

- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (Phosphate buffer pH 6.8, 0,5M NaCl, 500mM ιμιδαζόλιο)

- **Διαλύματα βρασμού και αποθήκευσης μεμβρανών διαπίδυσης**

- Διάλυμα βρασμού των μεμβρανών διαπίδυσης : 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50mM EDTA

- διάλυμα αποθήκευσης μεμβρανών : 10% αιθανόλη

Ανάλογα με την εταιρεία των μεμβρανών διαπίδυσης αλλάζει το διάλυμα βρασμού-προετοιμασίας των μεμβρανών. Ένα άλλο διάλυμα που είχαμε χρησιμοποιήσει ήταν : 4g NaHCO<sub>3</sub> σε 350 ml H<sub>2</sub>O

- **Διαλύματα διαπίδυσης**

- Διάλυμα διαπίδυσης AtNOC: 1,5mM Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,2mM EDTA, 20mM KCl, Phosphate Buffer pH 6

Επίσης είχαμε ελέγξει το ίδιο διάλυμα διαπίδυσης όπου αντί για Phosphate Buffer pH 6 είχε 20mM Tris, αλλά δεν είχε την ίδια απόδοση με το παραπάνω.

- **Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου**

-4x Sample Buffer: 50 mM Tris HCl pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 2% SDS, 0.02% bromophenol blue, 1% Β-Μερκαπταιθανόλη, 12,5 mM EDTA

-Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (10x): Tris base 1,5%, Γλυκίνη 7,2% v/w, SDS 0,5%, pH 8,3

Διαλύματα stock για πήκτωμα ακρυλαμιδίου:

-Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1,5M, pH 8,8

-Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,5M, pH 6,8

-SDS 10% v/w

-Ακρυλαμίδιο 40% v/w (ακρυλαμίδιο/δις-ακρυλαμίδιο: 38/2) σε ddH<sub>2</sub>O

- **Διαλύματα για το πήκτωμα ακρυλαμιδίου**

Ανάλογα με την συσκευή και την περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου που θα χρειαστούμε θα αναζητήσουμε τους πίνακες για την αναλογία των διαλυμάτων stock που θα πρέπει να αναμείξουμε και προσθέτουμε στο τέλος τους καταλύτες APS 10% και TEMED.

- **Διαλύματα για τη χρώση του πηκτώματος ακρυλαμιδίου (πρωτεϊνών)**

-Διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% w/v, ισοπροπανόλη 33%, οξικό οξύ 2%

-Διάλυμα αποχρωματισμού, Οξικό οξύ 10%

- **Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου**

-Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (TBE 10x): Tris 107,81 g/L, EDTA 7,44 g/L, Boric acid 55,03 g/L και DEPC

Για πήκτωμα ακρυλαμιδίου: 12% Acrylamide solution - 8MUrea

-Ακρυλαμίδιο 40% v/w (Acrylamide/ bis-acrylamide: 38/2) σε DEPC H<sub>2</sub>O

-Urea (ώστε τελική συγκέντρωση 8M)

-TBE 10X (ώστε τελική συγκέντρωση 1X).

Το διάλυμα θερμαίνεται στους 60 °C μέχρι να γίνει διαυγές και φυλάσσεται σε σκοτάδι.

Προσθέτουμε στο τέλος τους καταλύτες APS 20% και TEMED

2x RNA loading buffer: 90% formamide, 0,05% Bromophenol blue, 0,05% Xylene cyanol και DEPC H<sub>2</sub>O.



- **Διαλύματα για ανίχνευση RNA σε μεμβράνη PVDF**

- Διάλυμα έκπλυσης (Washing buffer): Maleic acid 0,1M, NaCl 0,15M, Tween 20 0,3% v/v ρύθμιση pH 7,5 με NaOH

- Blocking buffer: Maleic acid buffer (Maleic acid 0,1M, NaCl 0,15M, pH 7,5) + Blocking solution (1gr γάλα για 100ml Maleic acid buffer)

- Antibody Buffer: 4μl Antibody solution σε 20ml Blocking buffer

- Διάλυμα ανίχνευσης (Detection buffer): Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1M, pH 9,5

- **Διαλύματα για μεταφορά πρωτεΐνης από gel πολυακρυλαμιδίου σε PVDF μεμβράνη και για έκπλυση της μεμβράνης**

- Transfer buffer 10X: Tris 48mM, Γλυκίνη 39mM, SDS 1,3mM, Μεθανόλη 20%

- Washing Buffer: PBS 1X-0,1% Tween 20 (PBS 1X: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

- **Διαλύματα για ανίχνευση πρωτεΐνης σε μεμβράνη PVDF**

- 1) Blocking Buffer (5% Skim Milk, 0,1 % Tween 20 σε PBS 1x)

- 2) Washing Buffer (0,1% Tween 20 σε PBS 1x)

- 3) ECL (Solution A και B)

- 4) Developer Solution (Kodak)

- 5) Fixer Solution (Kodak)

- **Διαλύματα για χρώση με**

- **Silver staining (για πρωτεΐνες)**

- Διάλυμα 1: 2,5% αιθανόλη

- Διάλυμα 2: 0,1 % AgNO<sub>3</sub>

- Διάλυμα 3: 0,4mM NaOH, 0,5 % Φορμαλδεΐδη, βαροϋδρίδιο του νατρίου

- **Διαλύματα για χρώση με**

- **Silver staining (για RNA)**

- Διάλυμα 1: 50% αιθανόλη, 10% ακετόνη

- Διάλυμα 2: 10% αιθανόλη, 1% ακετόνη

- Διάλυμα 3: 12mM AgNO<sub>3</sub>

- Διάλυμα 4: 0,28% HCHO, 0,75M KOH

- Διάλυμα 5: 0,07 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

- **Διαλύματα αντιδράσεων της**

- **AtHESP με in vitro transcripts**

- Pre Stop Buffer: 20mM NaCl, 0,4% SDS, 100mM Tris-HCl pH 8, 20mM EDTA, Proteinase K 200 mg/ml, DEPC.

- Storage Buffer for Proteinase K: 50% Glycerol, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 2,5mM CaCl<sub>2</sub>

- Stop Buffer: Pre Stop Buffer 3,33ml, Glycogen 10μl, NaCl 5M 160μl

- Διάλυμα αντίδρασης για AtHESP: 20mM HEPES, 100mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM EDTA, 20% Glycerol, 0,5mM DTT

Το ρυθμίζουμε σε pH 6.5. Για την PARN αποαδενυλάση το διάλυμα αντίδρασης είναι το ίδιο απλά το ρυθμίζουμε σε pH 7.4.

## 3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1. Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένης AtHESP

#### Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μια θερμοκρασία στην άλλη. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την PCR – εκτός του στόχου DNA – είναι οι εκκινητές, τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, η DNA πολυμεράση, τα ιόντα μαγνησίου και το ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει :

- Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93–95°C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (Denaturation step).
- Θερμοκρασία υβριδισμού (Annealing step), προκειμένου οι εκκινητές να υβριδίσουν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητά του σε G και C. Ένας τρόπος υπολογισμού της θερμοκρασίας του εκκινητή είναι μέσω του τύπου  $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$ . Η θερμοκρασία του υβριδισμού είναι τελικά 5°C κάτω από τον μέσο όρο των τιμών  $T_m$  των δύο εκκινητών της αντίδρασης.
- Θερμοκρασία επιμήκυνσης ή πολυμερισμού (Extentionstep). Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος λαμβάνει χώρα η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, με τη δράση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται για 25–30 κύκλους συνήθως. Κατά τη διάρκεια των κύκλων η παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό, εφόσον βέβαια δεν παρουσιαστούν περιοριστικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα έλλειψη νουκλεοτιδίων. Η PCR βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς και, τελευταία, έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της παραπάνω βασικής αντίδρασης. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη παραλλαγή είναι η RT-PCR, κατά την οποία χρησιμοποιείται - ως μήτρα για ενίσχυση - RNA, το οποίο πρώτα μεταγράφεται σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή (Reverse transcriptase).

- PCR για τον έλεγχο ύπαρξης γενωμικού DNA

Αρχικά για να επιβεβαιωθεί ότι το πλασμίδιο-φορέας pET15b έφερε το ένθεμα της AtHESP πραγματοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Σε σωλήνα erppendorf προστίθενται τα παρακάτω σε τελικό όγκο 50μl.

- 5μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα Taq Πολυμεράση
- 2μl μίγμα dNTPs

- 5μl pET15b-AtHESP
- 1μl εκκινητής έμπροσθεν
- 1μl εκκινητής ανάστροφος
- 1μl DNA πολυμεράση Taq (1Unit/μl)
- 35μl ddH<sub>2</sub>O

Το μίγμα αναμιγνύεται με γρήγορη φυγοκέντρηση και τοποθετείται στη συσκευή PCR, προκειμένου να εκτελεστεί το παρακάτω πρόγραμμα (Πίνακας 5):

**Πίνακας 5.**

	<b>Θερμοκρασία</b>	<b>Χρόνος</b>	<b>Αρ. κύκλων</b>
<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95 °C	4 λεπτά	1
<b>Αποδιάταξη αλυσίδων DNA</b>	95 °C	45 δευτερόλεπτα	30
<b>Υβριδισμός εκκινητών</b>	56 °C	1 λεπτό	30
<b>Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA</b>	72 °C	1 λεπτό	30
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72 °C	10 λεπτά	1

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:  
**Nocturnin primers**

**NOC-FGCCAAACACTGAACAGCAG**

**NOC-RGGCAATCTGTCCTCAGATCC**

Μετά το τέλος της διαδικασίας το προϊόν της PCR αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης.

- Μετασχηματισμός BL21 DE3 με pET15b AtHESP

Σε 40μl επιδεικτικών κυττάρων BL21 DE3, τα οποία μόλις έχουν ξεπαγώσει, γίνεται προσθήκη 1μl του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA pET15b AtHESP το οποίο εκφράζει την AtHESP η οποία φέρει 6 ιστιδίνες στο αμινοτελικό της άκρο. Στη συνέχεια τοποθετείται όλη η ποσότητα στην κυψελίδα η οποία είναι κατάλληλη για την συσκευή που χρησιμοποιούμε για το electroporation. Έπειτα τοποθετείται η κυψελίδα με τα κύτταρα και το πλασμίδιο στη συσκευή και πατάμε 'pulse'. Για να γίνει ο μετασχηματισμός, 4-5msec ρεύματος είναι ιδανικά. Μόλις διαπεράσει το ρεύμα τα κύτταρα προστίθεται 200μl υλικό SOC (SOB+Glycose 2M). Τέλος, επιστρέφονται 30μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό, ανάλογα με τα γονίδια ανθεκτικότητας που διαθέτει το εκάστοτε πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό

(αμπικιλίνη). Ακολουθεί επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 12-14 ώρες (O/N).

Σε 30ml LB Broth με αμπικιλίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml, ενοφθαλμίζονται μετασχηματισμένα κύτταρα BL21 και επωάζονται για 12-14 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm). Ακολουθεί μεταφορά των 30ml της O/N καλλιέργειας σε 3Lt, φρέσκου θρεπτικού μέσου LB Broth με αμπικιλίνη (μεγάλη καλλιέργεια κυττάρων). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD<sub>600</sub>) και επώαση των καλλιεργειών στους 37°C υπό ανάδευση μέχρι το OD<sub>600</sub> να φτάσει περίπου το 0,4 που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Προσθέτουμε IPTG (Isopropyl Thio Galactosyl, 1M) σε τελική συγκέντρωση 1mM, το οποίο επάγει την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, ενώ ξαναπροστίθεται αμπικιλίνη. Οι καλλιέργειες επωάζονται υπό ανάδευση για 4 ώρες στους 37°C. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 20min στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε επιπλέον και για 2Lt, 1,5Lt, 800ml, 600ml μεγάλη καλλιέργεια κυττάρων.



Εικ.3.1. Ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός φορέας pET15b

- Απομόνωση της AtHESP

#### Ομογενοποίηση των κυττάρων

Τα κατεψυγμένα ιζήματα των κυττάρων διαλύονται στον πάγο σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης ~10ml (5-6 gr κυττάρων). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία του σπασίματος των κυττάρων με υπέρηχους (sonicator) μέσα στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12.000 rpm, για 60min στους 4°C. Το υπερκείμενο διαχωρίζεται από το ίζημα και ακολουθεί η απομόνωση της πρωτεΐνης, η οποία βρίσκεται στο υπερκείμενο.

#### Χρωματογραφία συγγένειας

Το υπερκείμενο αναμιγνύεται με ρητίνη νικελίου σεφαρόζης (Ni-NTA-Sepharose), η οποία έχει εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης, και το

μείγμα αναδεύεται ήπια για 30min στους 4°C, ενώ στο μείγμα προστίθεται ποσότητα DNase και Ιμιδαζολίου 20mM για να καταστραφεί το DNA που πιθανόν υπάρχει από τα κύτταρα και για να καθαρίσουμε επιπλέον την στήλη αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που έχει στο αμινοτελικό άκρο, με τα άτομα νικελίου. Το διάλυμα εκχυλίζεται προσεκτικά μέσα από στήλη που κατακρατά την ρητίνη (Flow through). Η στήλη ξεπλένεται με 2,5ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1 (wash buffer1) και με 2,5 ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 2 (wash buffer 2) ώστε να γίνει απομάκρυνση των μη-ειδικών ουσιών που κατακρατήθηκαν στη στήλη. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με 4ml ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης (elution buffer) το οποίο περιέχει ιμιδαζόλιο σε συγκέντρωση 500mM. Ο ρόλος του ιμιδαζολίου είναι να δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου και να ανταγωνίζεται τη δέσμευση των πρωτεϊνών συνδεδεμένων με ιστιδίνη (His-tagged). Συλλέγουμε 15 κλάσματα από τη στήλη (FT, W<sup>1</sup>1-W<sup>1</sup>3, W<sup>2</sup>1-W<sup>2</sup>3 και E1-E8, τα τελευταία συλλέγονταν ανά 0,5ml) για μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης σε καθένα από αυτά και για ηλεκτροφόρηση. Ο συνήθης τρόπος συλλογής των κλασμάτων είναι ανά 0,5 ml, ωστόσο τα κλάσματα των διαλυμάτων έκπλυσης γίνεται και ανά 1 ml.

### Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Σε σωλήνες eppendorf προστίθενται τα παρακάτω:

Πίνακας 6.

	H <sub>2</sub> O	Δείγμα	Χρωστική
<b>Input*</b>	18μl	2μl	980μl
<b>FT</b>	18μl	2μl	980μl
<b>W<sup>1</sup>1</b>	18μl	2μl	980μl
<b>W<sup>1</sup>2</b>	18μl	2μl	980μl
<b>W<sup>1</sup>3</b>	-	20μl	980μl
<b>W<sup>2</sup>1</b>	15μl	5μl	980μl
<b>W<sup>2</sup>2</b>	15μl	5μl	980μl
<b>W<sup>2</sup>3</b>	-	20μl	980μl
<b>E1</b>	18μl	2μl	980μl
<b>E2</b>	18μl	2μl	980μl
<b>E3</b>	-	20μl	980μl
<b>E4</b>	-	20μl	980μl
<b>E5</b>	-	20μl	980μl
<b>E6</b>	-	20μl	980μl
<b>E7</b>	-	20μl	980μl
<b>E8</b>	-	20μl	980μl

\*υπερκείμενο από την φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος των κυττάρων που έσπασαν.

Επωάζουμε για 15 λεπτά και φωτομετρούμε σε οπτική απορρόφηση 595nm (OD<sub>595</sub>). Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης με βάση την πρότυπη καμπύλη. Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης προετοιμάζεις τα ακόλουθα δείγματα:

**Πίνακας 7.**

Final Concentration (mg/ml)	BSA* (μl)	dH <sub>2</sub> O (μl)	Bradford (μl)
T	-	20,0	980
0,2	0,4	19,6	980
0,4	0,8	19,2	980
0,6	1,2	18,8	980
0,8	1,6	18,4	980
1,0	2,0	18,0	980
1,2	2,4	17,6	980

\*BSA (10mg/ml Stock)

Επωάζουμε για 15 λεπτά και φωτομετρούμε σε οπτική απορρόφηση 595nm (OD<sub>595</sub>). Οι τιμές που προκύπτουν αποτελούν την πρότυπη καμπύλη η εξίσωση της οποίας χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των mg πρωτεΐνης που περιέχονται στα κλάσματα της στήλης.

### Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου

✓ Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Υπολογίζουμε με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης τα mg/ml πρωτεΐνης που έχουμε σε κάθε κλάσμα. Στην συνέχεια βρίσκουμε τα mg [(mg/ml)×ml] και έπειτα με τον τύπο [20/mg πρωτεΐνης] την ποσότητα πρωτεΐνης σε μl που πρέπει να φορτώσω ώστε να είναι ορατή στη πηκτή. Η ποσότητα loading buffer SDS page που προσθέτω σε κάθε δείγμα βρίσκεται από τον τύπο [C1×V1=C2×(V1+X)]. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 95°C.

✓ Προετοιμασία πηκτής SDS- πολυακρυλαμιδίου

Στήνουμε τη συσκευή. Φτιάχνουμε πηκτή SDS- πολυακρυλαμιδίου 7,5%. Πρώτα, φτιάχνουμε το Running Gel προσθέτοντας 50μl APS και 5μl TEMED στα 7ml Running Gel buffer. Αναδεύουμε και εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια μέχρι τα ~3/5 του ύψους. Για να οριζοντιοποιηθεί η πηκτή και να σπάσουν οι φουσκάλες εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια ισοπροπανόλη.

Καθώς περιμένουμε να πήξει φτιάχνουμε το Stacking Gel προσθέτοντας 25μl APS και 5μl TEMED στα 3,5ml Stacking Gel buffer. Αφαιρούμε την ισοπροπανόλη και εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια. Τέλος, τοποθετούμε το χτενάκι για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια.

✓ Φόρτωση και ηλεκτροφόρηση δειγμάτων στην πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου

Αφού πήξει η πηκτή, φορτώνουμε τα δείγματα στα πηγαδάκια. Ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 110V και αφήνουμε τα δείγματα να "τρέξουν" μέχρι να φτάσουν στο Running Gel buffer. Στη συνέχεια ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 200V μέχρι τα δείγματα να φτάσουν στο τέλος της πηκτής.

✓ Χρώση της πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, τοποθετούμε την πηκτή σε ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε οξικό οξύ 10%. Βράζουμε στο φούρνο μικροκυμάτων και τοποθετούμε την πηκτή σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει Coomassie Brilliant Blue. Βράζουμε και πάλι στο φούρνο μικροκυμάτων και αφήνουμε για ανάδευση για πέντε λεπτά. Ξεπλένουμε την πηκτή με λίγο απιονισμένο νερό και την τοποθετούμε στο ποτήρι ζέσεως με το οξικό οξύ. Βράζουμε στο φούρνο μικροκυμάτων. Τέλος, τοποθετούμε την πηκτή σε ένα πλαστικό δοχείο με οξικό οξύ και την αφήνουμε για ανάδευση ώσπου να ξεβάνει καλά.

### Διαπίδυση

Αφού κόψουμε ένα κομμάτι (~10cm) μεμβράνης διαπίδυσης, τη βράζουμε σε υψηλή θερμοκρασία σε διάλυμα βρασμού (5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 50mM EDTA pH 8), για 15 λεπτά και ξεπλένουμε με απιονισμένο νερό. Σφραγίζουμε τη μεμβράνη από τη μία πλευρά με ένα πιαστράκι και με πιπέτα μεταφέρουμε το κλάσμα ή τα κλάσματα, στα οποία είδαμε από την πηκτή ότι υπάρχει το υπό μελέτη ένζυμο. Σφραγίζουμε τη μεμβράνη και από την άλλη πλευρά κατά τον ίδιο τρόπο. Τοποθετούμε τη μεμβράνη σε ποτήρι ζέσεως το οποίο περιέχει 1000ml διαλύματος διαπίδυσης με pH=6.0. Τοποθετούμε το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο έχουμε προσθέσει και ένα μαγνήτη, σε συσκευή μαγνητικής ανάδευσης έτσι ώστε να αναδεύεται το διάλυμα απαλά στους 4°C για όλο το βράδυ. Την επόμενη ημέρα αφαιρούμε προσεκτικά το περιεχόμενο της μεμβράνης και, αφού πραγματοποιήσουμε μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, το μοιράζουμε σε μικροσωλήνες φυγοκέντρωσης (eppendorf tubes 1.5 ml).

### Στήλες συμπύκνωσης για φυγοκέντρωση

Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο γίνεται να αλλάξει το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη (έναντι της διαπίδυσης) είναι η προσθήκη των κλασμάτων της στήλης σε στήλες συμπύκνωσης και η φυγοκέντρωσή τους. Από αυτά περνάνε μόρια μικρού μοριακού βάρους όπως το ιμιδαζόλιο που πρέπει να φύγουν από το διάλυμα, ενώ η πρωτεΐνη παραμένει. Αρχικά αφού συμπυκνωθούν τα κλάσματα με την πρωτεΐνη μέσα στο φίλτρο μέχρι ένα συγκεκριμένο όγκο, στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος που επιθυμούμε να βρίσκεται η πρωτεΐνη, περίπου πέντε φορές, για να αντικαταστήσει το προηγούμενο διάλυμα. Συγκεκριμένα για την AtHESP το διάλυμα που προστίθεται είναι Phosphate Buffer pH 6 με 500mM NaCl.

- Περαιτέρω καθαρισμός AtHESP (χρωματογραφία συγγένειας)

Τα κλάσματα από την στήλη Ni-NTA-Sepharose που περιέχουν την AtHESP, δηλαδή τα E1-E3, συνήθως ξαναπερνιούνται από την στήλη αυτή για επιπλέον καθαρισμό. Η διαδικασία παραμένει ακριβώς ίδια. Τα κλάσματα E1-E3 αναμιγνύονται με ρητίνη νικελίου σεφαρόζης (Ni-NTA-Sepharose), η οποία έχει εξισορροπηθεί με



ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης, και το μείγμα (E1-E3 μαζί) αναδεύεται ήπια για 30min στους 4°C. Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που έχει στο αμινοτελικό άκρο, με τα άτομα νικελίου. Το διάλυμα εκχυλίζεται προσεκτικά μέσα από στήλη που κατακρατά την ρητίνη. Η στήλη ξεπλένεται με 2,5ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1(wash buffer 1) και με 2,5 ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 2 (wash buffer 2) ώστε να γίνει απομάκρυνση των μη-ειδικών ουσιών που κατακρατήθηκαν στη στήλη. Η έκλουση της πρωτεΐνης γίνεται με 4ml ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (elution buffer) το οποίο περιέχει ιμιδαζόλιο σε συγκέντρωση 500mM (οι ποσότητες των διαλυμάτων έκπλυσης και έκλουσης μπορεί να είναι μικρότερες ή μεγαλύτερες ανάλογα με την ποσότητα του μείγματος που εκχυλίζεται από την στήλη). Τα κλάσματα που προκύπτουν FT,W<sup>1</sup>1-W<sup>1</sup>3, W<sup>2</sup>1-W<sup>2</sup>3και E1-E8, θα χρησιμοποιηθούν για μέτρηση ολικής πρωτεΐνης σε καθένα από αυτά και για ηλεκτροφόρηση.

Ως δεύτερη στήλη για επιπλέον καθαρισμό χρησιμοποιείται και η cellulose phosphate P11 η οποία αποτελεί μια δι-λειτουργική κατιονανταλλακτική στήλη (η ρητίνη είναι αρνητικά φορτισμένη και αλληλεπιδρά με θετικά φορτισμένα μόρια). Αυτή περιέχει πλήρως ιονισμένες και ασθενείς ομάδες οξέος που βασίζονται σε μια λειτουργική ορθοφωσφορική ομάδα συνδεδεμένη με εστέρα. Αυτές οι στήλες χρησιμοποιούνται για διαχωρισμό βιοπολυμερών και ειδικότερα ενζύμων που καταλύουν αλληλεπιδράσεις φωσφορικών ομάδων εξαρτώμενων από ATP, όπως πρωτεϊνικές κινάσες, ένζυμα περιορισμού, νουκλεάσες, πολυμεράσες. Η εξαιρετικά υψηλής αντοχής σύνδεση και η εκλεκτικότητα που παρέχεται από αυτούς τους δι-λειτουργικούς εναλλάκτες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο για το διαχωρισμό των σχετικά μικρών βιοπολυμερών που φέρουν θετικά φορτία πάνω από φάσμα pH 3 έως 7, όπως πεπτιδία, μικρά πολυπεπτιδία και πρωτεΐνες (δηλ. MB μικρότερο από 15.000).

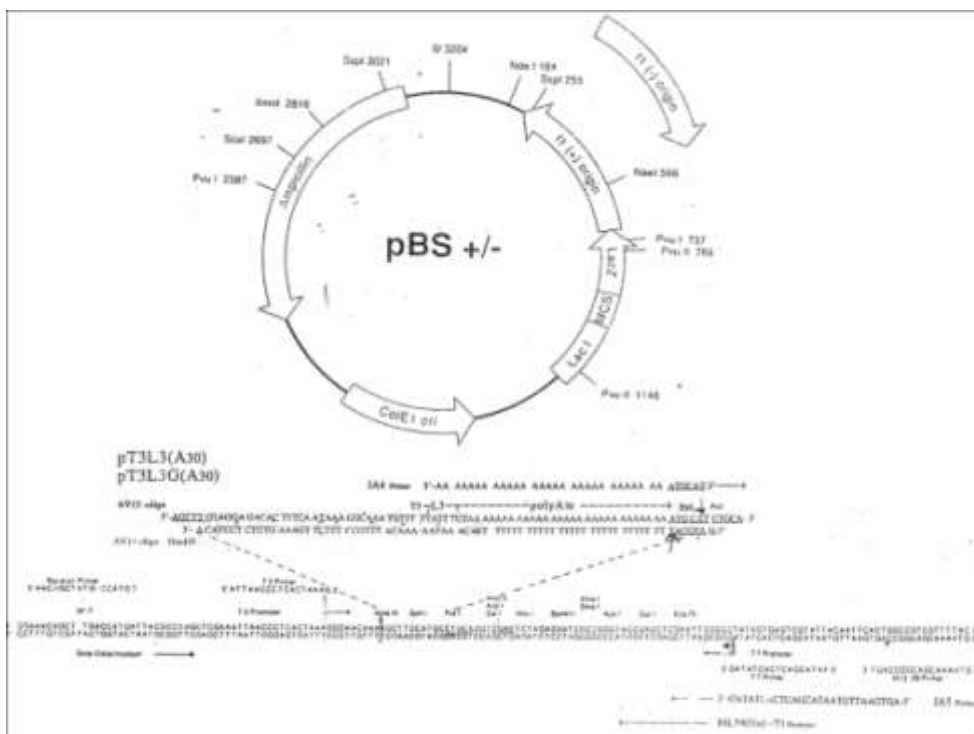
Για την προετοιμασία της στήλης, αναμιγνύεται η cellulose phosphate με 37% HCl για 5 λεπτά. Έπειτα αποχύνεται ή διηθείται το υπερκείμενο και εκπλένεται το διήθημα σε χοάνη μέχρι το pH να δείξει 3.0. Τέλος εξισορροπείται με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης. Το εκχύλισμα που προκύπτει από την στήλη πρέπει να έχει το ίδιο pH με αυτό που είχε το διάλυμα πριν εκχυλιστεί, διαφορετικά η στήλη δεν θεωρείται έτοιμη προς χρήση και χρειάζεται επιπλέον ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης.

Μόλις η στήλη ετοιμαστεί, τα κλάσματα από την πρώτη στήλη (Ni-NTA-Sepharose) που περιέχουν την AtHESP, συνήθως τα E1-E3, περνιούνται 5 φορές από αυτή την στήλη, ώστε να δεθεί ισχυρά η θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη με την αρνητικά φορτισμένη ρητίνη. Στη συνέχεια προστίθενται περίπου 5 ml διάλυμα έκλουσης με pH ίσο με το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης, συγκεκριμένα pH 6,8. Αυτό γίνεται διότι στο συγκεκριμένο pH η πρωτεΐνη έχει μηδενικό φορτίο. Έτσι η πρωτεΐνη παύει να αλληλεπιδρά με την ρητίνη και εκλύεται. Τα 6 κλάσματα που προκύπτουν (Ft, E1-E5), χρησιμοποιούνται για ολική μέτρηση της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford και ηλεκτροφόρηση.

Οι δεύτερες στήλες χρησιμοποιούνται αφού πραγματοποιηθεί η διαπίδυση των κλασμάτων της I<sup>ns</sup> στήλης, ενώ τα κλάσματα που προκύπτουν από αυτές υφίστανται διαπίδυση για διαφορετικούς λόγους. Για τα κλάσματα της Ni-NTA-Sepharose πραγματοποιείται διαπίδυση για να φύγει το ιμιδαζόλιο που περιέχουν λόγω των ρυθμιστικών διαλυμάτων έκπλυσης και έκλουσης, διότι καταστρέφει την πρωτεΐνη. Για τα κλάσματα της cellulose phosphate P11 πραγματοποιείται διαπίδυση ώστε να αλλάξει το pH και να μην βρίσκεται πια στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης διαφορετικά θα καθιζάνει και μπορεί να μην είναι πλέον λειτουργική.

### 3.2.2. Μελέτη της AtHESP σε αντιδράσεις αποαδενύλιωσης με καθορισμένα υποστρώματα RNA.

Σκοπός των πειραμάτων είναι να χρησιμοποιηθούν κατάλληλα υποστρώματα RNA που θα προκύψουν από μεταγραφή *in vitro* κατάλληλων ενθεμάτων σε φορείς με υποκινητές για μεταγραφή. Ως τέτοιος χρησιμοποιείται ο pBS που φέρει υποκινητές για T3 και T7 πολυμεράσες, όπως εικονίζεται στην Εικόνα 3.2.



Εικ.3.2. Πλασμιδιακός φορέας pBS (+/-) PHAGEMID.

- Μετασχηματισμός BL21 DH5a με pcDNA 3.1 construct

Αρχικά γίνεται η επαναδιάλυση του λυοφιλιωμένου construct σε 15μl H<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια σε 40μl κυττάρων BL21 DH5a, τα οποία μόλις έχουν ξεπαγώσει, γίνεται προσθήκη 1μl του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA pcDNA 3.1 το οποίο εκφράζει το υπόστρωμα με υποκινητή T7. Στη συνέχεια τοποθετείται όλη η ποσότητα στην κυψελίδα η οποία είναι κατάλληλη για την συσκευή που χρησιμοποιούμε για το electroporation. Έπειτα τοποθετείται η κυψελίδα με τα κύτταρα και το πλασμίδιο στη συσκευή και πατάμε 'pulse'. Για να γίνει ο μετασχηματισμός 4-5msec ρεύματος είναι ιδανικά. Μόλις διαπεράσει το ρεύμα τα κύτταρα προστίθεται 200μl υλικό SOC (SOB+Glycose 2M). Τέλος, επιστρώνονται 30μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό, ανάλογα με τα γονίδια ανθεκτικότητας που διαθέτει το εκάστοτε πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό (αμπικιλίνη). Ακολουθεί επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 12-14 ώρες (O/N). Μετά την O/N επώαση λαμβάνεται μια

αποικία από το τριβλίο και προστίθεται σε 7,5 ml υγρή καλλιέργεια (ομοίως για το υπόστρωμα με υποκινητή T3, όπου το πλασμίδιο-φορέας του, pBS, μετασχηματίζει BL21 DE3 κύτταρα).

- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

#### Πρωτόκολλο Miniprep (Macherey nagel-nucleospin plasmid)

Μετά από φυγοκέντρηση 7,5ml υγρής καλλιέργειας, τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 250μl ρυθμιστικό διάλυμα A1 που περιέχει Rnase A. Προστίθενται 250μl ρυθμιστικό διάλυμα A2 και γίνεται ελαφρά ανακίνηση του φυγοκεντρικού σωλήνα (eppendorf). Προστίθενται επιπλέον 350μl ρυθμιστικό διάλυμα A3 και αμέσως αναποδογυρίζεται το eppendorf 4-6 φορές. Το εναιώρημα θολώνει. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα λευκό ίζημα. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται με πιπέτα σε στήλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60sec και απορρίπτεται το υγρό που έχει διέλθει από το φίλτρο. Η στήλη ξεπλένεται με 0,75ml ρυθμιστικό διάλυμα A4 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60sec. Το διερχόμενο από το φίλτρο υγρό απορρίπτεται και επαναφυγοκεντρείται για 1 λεπτό μέχρι να απαλειφθεί το υπολειπόμενο διάλυμα ξεπλύματος. Εάν παραμείνει αιθανόλη από το διάλυμα A4 ίσως παρεμποδιστούν περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό φυγοκεντρικό σωλήνα 1,5ml. Προκειμένου να ληφθεί το DNA, προστίθεται διάλυμα 50μl AE (10mM Tris-HCl, pH=8,5) ή νερό. Το διάλυμα έκλουσης αφήνεται για 1 λεπτό και, τέλος, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό, οπότε και λαμβάνεται το καθαρό πλασμιδιακό DNA.

- Πέψη του πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Πραγματοποιούμε πέψη με το ένζυμο περιορισμού NsiI και EcoRI αντίστοιχα. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50μl και περιλαμβάνει τα παρακάτω συστατικά:

-5μl buffer (3-NEB 10X για NsiI ή H buffer 10X για EcoRI)

-2μl NsiI ή EcoRI

-7μl DNA

-36μl ddH<sub>2</sub>O

Το δείγμα επωάζεται για 3 ώρες στους 37°C

#### **Ηλεκτροφόρηση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αгарόζης**

Στόχος μας είναι ο έλεγχος της πέψης του πλασμιδιακού DNA συγκρίνοντας κομμένο και άκοπο DNA. Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται, με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Αν πρέπει να διαχωριστούν γραμμικά δίκλιωνα μόρια, η σχέση που συνδέει την κινητικότητα των μορίων με το μέγεθός τους είναι ημιλογαριθμική. Η κινητικότητα μη γραμμικών μορίων εντός του ηλεκτρικού πεδίου της πηκτής δεν είναι άμεση συνάρτηση του μεγέθους τους, αλλά εξαρτάται και από τη διαμόρφωσή τους στο χώρο. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αгарόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αгарόζη, για παράδειγμα σε 0,8% συγκέντρωση αгарόζης μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, τμήματα του DNA που

κυμαίνονται από 1 έως 12 kb. Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη gelred, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής :

Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (συνήθως 1,2-1,5%) προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1X και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει. Στην λιωμένη αγαρόζη προστίθεται 0,001% v/v διάλυμα gelred και αφήνεται να κρυώσει. Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως στην πηκτή βυθίζεται ειδική "χτένα" που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων. Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής DNA Loading Buffer 6X. Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή απομακρύνεται η "χτένα" και τοποθετείται στο δοχείο ηλεκτροφόρησης, το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1X. Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5V/cm.

- Καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Ο καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο αποσκοπεί στην απομάκρυνση πρωτεϊνών και RNA από το πλασμιδιακό DNA. Αρχικά προσθέτουμε ίσο όγκο Ph/Chl στην πέψη που έχει προηγηθεί. Παρατηρούμε τη δημιουργία δυο φάσεων. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 13.000 στροφές. Τοποθετούμε την υδατική φάση στην οποία βρίσκεται το DNA σε νέο erpendorf και προσθέτουμε ίσο όγκο Ph/Chl. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 13.000 στροφές. Τοποθετούμε την υδατική φάση σε νέο erpendorf και προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 13.000 στροφές. Στη συνέχεια, τοποθετούμε την υδατική φάση σε νέο erpendorf και προσθέτουμε 2,5 όγκους EtOH 100% και 1/20 όγκου CH<sub>3</sub>COONa pH 5,3 (ώστε να δημιουργηθούν συσσωματώματα με το DNA). Αφήνουμε O/N στους -20 °C και φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά σε 14.000 στροφές σε 4°C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα EtOH 70%. Φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά σε 14.000 στροφές σε 4°C και αφαιρούμε το υπερκείμενο κι αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει. Επαναδιαλύουμε σε 11 μldH<sub>2</sub>O. Δείγμα από τις πέψεις που έγινε ο καθαρισμός τρέχει σε gel αγαρόζης 1% προκειμένου να ελεγχθεί αν χάθηκαν οι πέψεις κατά τον καθαρισμό.

- Μεταγραφή *in vitro*

Στόχος είναι η μεταγραφή *in vitro* του DNA που προέκυψε από την πέψη με NsiI με σκοπό τη δημιουργία τμήματος RNA με 30 αδενosίνες στο άκρο του καθώς και του DNA με πέψη με EcoRI (L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub>) που αποσκοπεί στη δημιουργία τμήματος RNA με αδενosίνες στο μέσο του. Να σημειωθεί ότι η ουριδίνη που χρησιμοποιείται για τη μεταγραφή είναι σημασμένη με DIG. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μl και περιλαμβάνει τα παρακάτω συστατικά:

- 5μl πλασμιδιακού DNA( pcDNA3.1 ή pBS)
- 2μl Roche DIG labeling mix
- 2μl transcription buffer
- 2μl T7πολυμεράση (ή T3 πολυμεράση)
- 3μl Cap 4mM (σε ένα erpendorf)

-3μl ddH<sub>2</sub>O

Το δείγμα επωάζεται για 2 ώρες στους 37°C.

Σημείωση: Συνθέτονται δυο RNA από το DNA που έχει κοπεί από το NsiI. Στο ένα, κατά τη μεταγραφή *in vitro* προστίθεται 5' καλύπτρα [m<sup>7</sup>GpppGL3(A30), ή c-L3A<sub>30</sub>], ενώ στο άλλο δεν γίνεται καμία τροποποίηση (L3(A30)).

Προσθέτουμε 2 μl DNase (40 units) και επωάζουμε για 30 λεπτά στους 37°C. Σταματάμε την αντίδραση με 2 μl EDTA 0,2 M pH 8. Κατακρημνίζουμε το RNA με 1,25μl LiCl 8 M, 1μl γλυκογόνο και 75μl αιθανόλη 100%. Αφήνουμε στους -80°C overnight. Την επόμενη μέρα φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά σε 14.000 στροφές σε 4°C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα EtOH 70%, Φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά σε 14.000 στροφές σε 4°C και στη συνέχεια αφαιρούμε το υπερκείμενο κι αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει. Τέλος επαναδιαλύουμε σε 103 μl dH<sub>2</sub>O.

- Φωτομέτρηση των RNA (μεταγραφή *in vitro*) υποστρώματων και υπολογισμός της συγκέντρωσής τους

Τα υποστρώματα στη συνέχεια φωτομετρούνται ώστε να υπολογισθεί η συγκέντρωσή τους και κατ'επέκταση η ποσότητα που θα προστεθεί στις παρακάτω αντιδράσεις. Ως control στην φωτομέτρηση χρησιμοποιείται H<sub>2</sub>O, ενώ ως δείγμα 75μl H<sub>2</sub>O μαζί με 5μl δείγμα από το κάθε υπόστρωμα. Η συγκέντρωση έχει μονάδες μέτρησης ng/μl.

- Αντιδράσεις του RNA (μεταγραφή *in vitro*) με αποαδενυλάσες

Γνωρίζοντας το μήκος του RNA που δημιουργήσαμε καθώς και την ακριβή αλληλουχία του, στόχος μας είναι να πραγματοποιήσουμε αντιδράσεις με αποαδενυλάσες (PARN και AtHESP) και να αποδείξουμε με τον τρόπο αυτό την αποικοδόμηση των αδενοσινών στο άκρο του RNA. Εξετάζουμε τη δράση των αποαδενυλασών σε δυο ή τέσσερις χρονικές στιγμές: παραδείγματος χάριν 0, 10, 30, 60 λεπτά. Οι αντιδράσεις έχουν τελικό όγκο 45 μl και περιλαμβάνουν τα ακόλουθα συστατικά:

- RNA (υπόστρωμα με υποκινητή T7 ή T3)
- Buffer D pH 6.5
- 0,5 RNase inhibitor (40u/μl)
- AtHESP (0,125 mg/ml).

Η αντίδραση που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας (χρόνος 0) δεν περιέχει AtHESP. Η αντίδραση με PARN (0,23mg/ml) περιέχει το ίδιο υπόστρωμα αλλά Buffer D pH 7.4, ενώ η αντίδραση με RNase A έχει δικό της διάλυμα αντίδρασης. Οι δυο αντιδράσεις με την PARN και RNase A πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 30°C, ενώ η αντίδραση με την AtHESP στους 25°C. Επιπλέον η ποσότητα του υποστρώματος και του ενζύμου που προστίθονται στην αντίδραση εξαρτώνται από τον τύπο: [υπόστρωμα] ≥ 5×[ένζυμο] ή [S] ≥ 5× [E]. Έτσι αρχικά υπολογίζονται τα mol του ενζύμου, εφόσον είναι γνωστή η συγκέντρωσή του και στη συνέχεια από τον παραπάνω τύπο τα mol του υποστρώματος που είναι μεγαλύτερα ή ίσα με πεντέ φορές τα mol του ενζύμου. Έπειτα υπολογίζουμε την μάζα του υποστρώματος από τον τύπο: ms=ns × MW, όπου το MW το βρίσκουμε εάν πολλαπλασιάσουμε τα νουκλεοτίδια που περιέχει το υπόστρωμα με το μέσο όρο μοριακού βάρους ενός νουκλεοτιδίου που είναι 340 Daltons. Τέλος από την συγκέντρωσή του υποστρώματος, που είναι γνωστή, υπολογίζουμε την ποσότητα που

προστίθεται στην αντίδραση ώστε τα mol του υποστρώματος να είναι ίσα με πέντε φορές τα mol του ενζύμου. Για να φτάσουμε την ποσότητα των 45μl της αντίδρασης συμπληρώνουμε με Buffer D.

Μόλις ετοιμάσουμε τα eppendorf με τις αντιδράσεις, προσθέτουμε ένζυμο AtHESP στην αντίδραση των 60 λεπτών και επωάζουμε στους 25°C. Μετά από 30 λεπτά προσθέτουμε ένζυμο στην αντίδραση των 30 λεπτών και μετά από 20 λεπτά προσθέτουμε ένζυμο στην αντίδραση των 10 λεπτών. Αφήνουμε για 10 λεπτά και σταματάμε ταυτόχρονα όλες τις αντιδράσεις με Stop Buffer.

Stop Buffer (3,5ml): Pre Stop Buffer (3,33 ml), Glycogen (10μl), NaCl 5M (160 μl)

Pre Stop Buffer: 20 mM NaCl, 0,02M EDTA, 100mM Tris pH 8, 0,4% SDS, 200μg/ml Proteinase K, DEPC H<sub>2</sub>O.

Πραγματοποιούμε καθαρισμό με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρημνίζουμε το RNA για 30 λεπτά σε -80°C σε 3 όγκους EtOH 100% και NaCl 5M ώστε 200mM. Στη συνέχεια, φυγοκεντρούμε τα δείγματα σε 14 krpm σε 4°C για 30 λεπτά. Αφαιρούμε την αιθανόλη κι αφήνουμε τα ιζήματα να στεγνώσουν. Επαναδιαλύουμε τα ιζήματα σε 10-20 μl DEPC H<sub>2</sub>O.

### **Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου**

#### Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Σε 10μl από τα δείγματα προσθέτουμε 10μl 2X loading buffer.

#### Προετοιμασία

Συναρμολογούμε την συσκευή αφού πρώτα την αποστειρώσουμε. Στα 10ml 12% Ακρυλαμίδιου-8M Ουρίας αφού τα φιλτράρουμε, προσθέτουμε 40μl APS 20% και 10μl TEMED, αναδεύουμε και εκχύνουμε με πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζάμια μέχρι 2-3 χιλιοστά από πάνω και τοποθετούμε το χτενάκι για να σχηματιστούν τα βοθρία στα οποία θα τοποθετήσουμε τα δείγματα εφόσον σχηματιστεί η πηκτή. Τοποθετούμε την πηκτή στη συσκευή ηλεκτροφόρησης την οποία έχουμε γεμίσει με TBE 1X (50ml TBE 10X και 450ml dH<sub>2</sub>O) και τρέχουμε την πηκτή χωρίς δείγματα για 20 λεπτά στα 200V για να καθαρίσει η ουρία. Στη συνέχεια, καθαρίζουμε τα βοθρία με σύριγγα για να φύγει η ουρία και φορτώνουμε τα δείγματα. Ηλεκτροφορούμε στα 110V μέχρι να φύγει η δεύτερη χρωστική εντελώς από την πηκτή.

### **Ανίχνευση RNA σε μεμβράνη PVDF**

Το RNA είναι σημασμένο με DIG καθώς κατά τη μεταγραφή η ουριδίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν σημασμένη με σκοπό την ανίχνευση μέσω αντίδρασης με αλκαλική φωσφατάση. Η μεταφορά του RNA γίνεται σε PVDF μεμβράνη με τη συσκευή Semidry Transfer System στα 400mA για 30 λεπτά 10V. Μόλις τελειώσει η μεταφορά, τοποθετώ τη μεμβράνη για 3 λεπτά σε UV για να μονιμοποιηθεί το RNA στη μεμβράνη. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με 100ml Διάλυμα έκπλυσης για 2 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση σε rollers. Επωάζουμε τη μεμβράνη με 100ml Blocking buffer για 30 λεπτά υπό ανάδευση και έπειτα για 30 λεπτά με το αντίσωμα (20ml Antibody Solution) υπό ανάδευση. Συνεχίζουμε με 2 πλυσίματα με Διάλυμα έκπλυσης για 15 λεπτά το καθένα. Ακολουθεί επώαση για 3 λεπτά με 20ml Διάλυμα ανίχνευσης χωρίς ανάδευση. Για την εμφάνιση, προσθέτουμε 37,5 μl από κάθε υπόστρωμα σε 20ml Διάλυμα ανίχνευσης και επωάζουμε τη μεμβράνη χωρίς ανάδευση σε σκοτεινό μέρος

για 25 λεπτά, στο τέλος των οποίων επιβεβαιώνεται η μεταφορά. Η αντίδραση σταματά μετά από 12 ώρες περίπου ξεπλένοντας τη μεμβράνη με dH<sub>2</sub>O.

#### **Ανίχνευση RNA σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου με την μέθοδο Silver Staining**

Αρχικά προστίθενται στην πήκτη 100 ml Διαλύματος 1 (50% αιθανόλη, 10% ακετόνη), με το οποίο αναδεύεται για 60 λεπτά. Έπειτα αποχύνεται το Διάλυμα 1 και προστίθενται 100ml Διαλύματος 2 (10% αιθανόλη, 1% ακετόνη), με το οποίο αναδεύεται επίσης για 60 λεπτά. Εφόσον αποχύνεται και το Διάλυμα 2 προστίθενται 100 ml Διαλύματος 3 (12mM AgNO<sub>3</sub>), το οποίο χρωματίζει την πήκτη. Ακολουθεί ανάδευση για 60 λεπτά και αμέσως μετά αποχύνεται το Διάλυμα 3, ενώ στην συνέχεια η πήκτη ξεπλένεται με H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί η προσθήκη 100 ml Διαλύματος 4 (0,28% HCHO, 0,75M KOH), το οποίο αποχρωματίζει την πήκτη. Αυτή αναδεύεται μέσα στο διάλυμα και αναμένεται η εμφάνιση των RNA υποστρωμάτων. Τέλος μόλις εμφανιστούν οι ζώνες προστίθενται 100 ml Διαλύματος 5 (0,07 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), χωρίς να χρειάζεται η απόχυση του προηγούμενου διαλύματος, προκειμένου να σταματήσει ο αποχρωματισμός.

#### **Ανίχνευση RNA σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου με την μέθοδο Silver Staining (για πρωτεΐνες)**

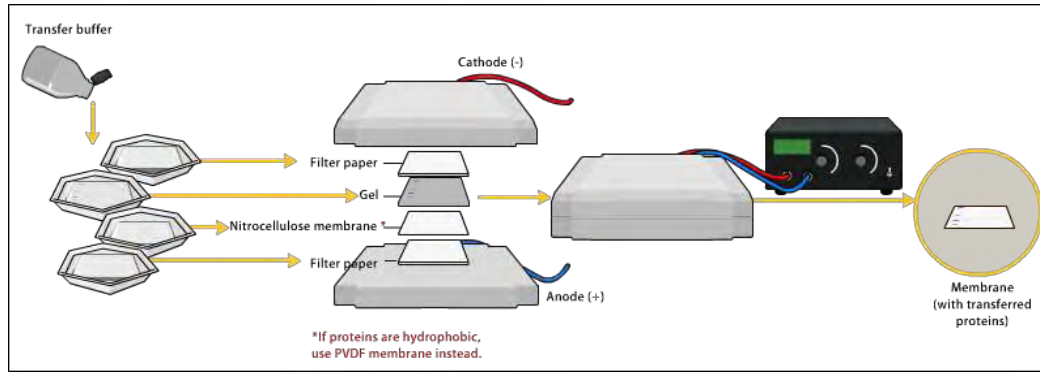
Η συγκεκριμένη μέθοδος Silver Staining χρησιμοποιείται για ανίχνευση πρωτεϊνών, ωστόσο παρατηρήσαμε ότι με την μέθοδο αυτή ανιχνεύονταν και RNA υποστρώματα. Αρχικά πραγματοποιείται πλύση της πήκτη με ανάδευση για 3 λεπτά σε 100 ml από τα 200 ml του Διαλύματος 1 (2,5% αιθανόλη). Ακολουθεί έκχυση του διαλύματος και προσθήκη των υπόλοιπων 100 ml, ενώ πραγματοποιείται ξανά πλύση με ανάδευση για 3 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση με H<sub>2</sub>O. Έπειτα προστίθεται στην πήκτη 100 ml Διαλύματος 2 (0,1% AgNO<sub>3</sub>), το οποίο χρωματίζει την πήκτη. Αυτή αναδεύεται για 15 λεπτά και εκπλένεται δύο φορές με H<sub>2</sub>O. Τέλος προστίθενται 100 ml Διαλύματος 3 (0,4mM NaOH, 0,5% Φορμαλδεΐδη, βαρουδρίδιο του νατρίου), το οποίο την αποχρωματίζει. Πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των υποστρωμάτων. Μόλις εμφανιστούν γίνεται έκπλυση με H<sub>2</sub>O.

### 3.2.3. Ομολογία της AtHESP με την Nocturnin

- Ανίχνευση πρωτεϊνών με Western blot

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε 7,5% SDS-gel πολυακρυλαμιδίου στα 110V. Η τάση είναι αυτή που καθορίζει το πόσο γρήγορα τρέχουν οι πρωτεΐνες στο gel. Η μέγιστη ποσότητα πρωτεΐνης που πρέπει να φορτωθεί στο gel πολυακρυλαμιδίου, ώστε να ανιχνευθεί με την μέθοδο Western blot είναι 150μg σε 25μl που χωράει το κάθε πηγαδάκι. Αφού τρέξουν τα δειγματά στο gel μεταφέρονται οι πρωτεΐνες σε PVDF μεμβράνη. Η μεταφορά γίνεται με τη συσκευή Semidry Transfer System στα 400mA για 45 λεπτά.

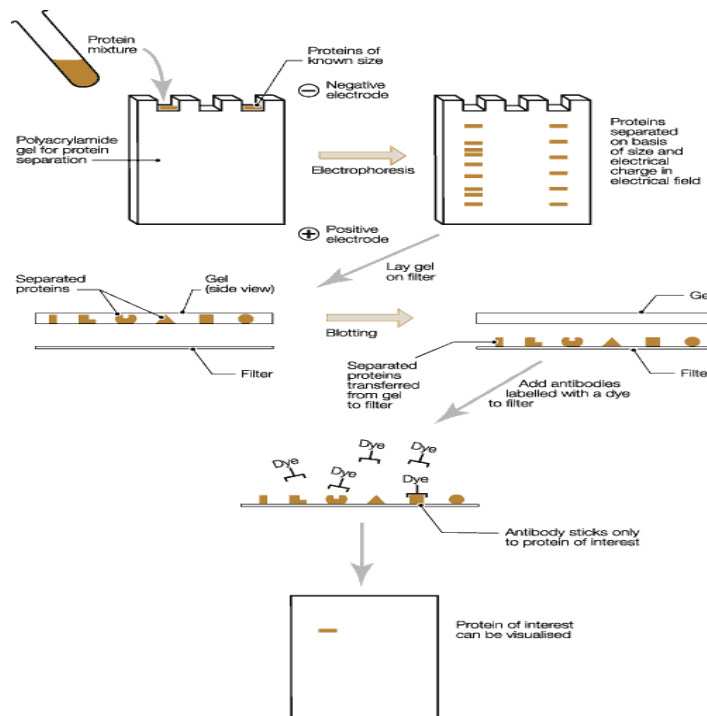




**Εικ.3.3.** Μεταφορά πρωτεϊνών από ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνη PVDF

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με Blocking Buffer για 1 ώρα, υπό συνεχή ανάδευση σε rollers. Το πρώτο anti-NOC αντίσωμα προστίθεται σε αραιώση 1:1000 και επώάζεται όλο το βράδυ στους 4°C. Συνεχίζουμε με 4 πλυσίματα με washing Buffer για 15 λεπτά το καθένα. Η αραιώση του δεύτερου αντισώματος goat anti-rabbit IgG-HRP αντιστοιχεί σε 1:10000 και η επώασή του γίνεται για 1 ώρα σε rollers.

Ακολουθούν 4 πλυσίματα με PBS-T (washingbuffer) για 10-15 λεπτά το καθένα. Η εμφάνιση (ECL ή ECL Plus) γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham. Για επανάληψη της ανοσοανίχνευσης με το ίδιο αντίσωμα ή για επώαση με διαφορετικό (reprobing), ακολουθείται η διαδικασία της αποσύνδεσης (stripping) των αντισωμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham.



Source: Konrad Bishop, BSE Inquiry, London, 2000

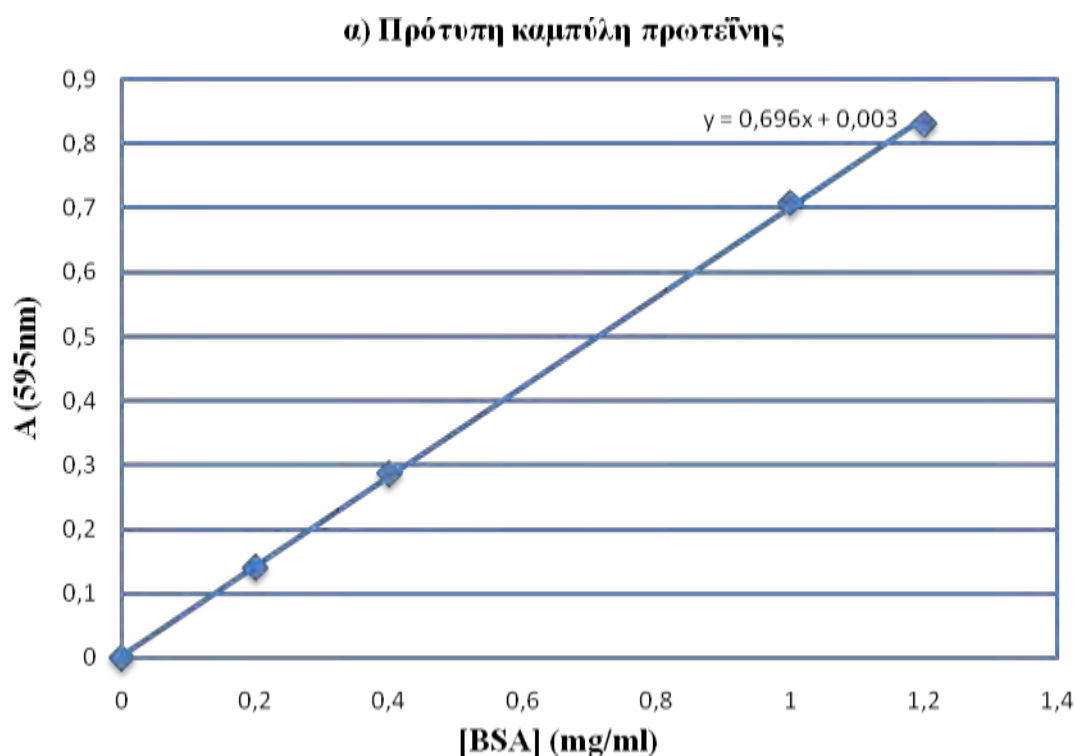
**Εικ.3.4.** Απεικόνιση της μεθόδου western blot

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένης AtHESP

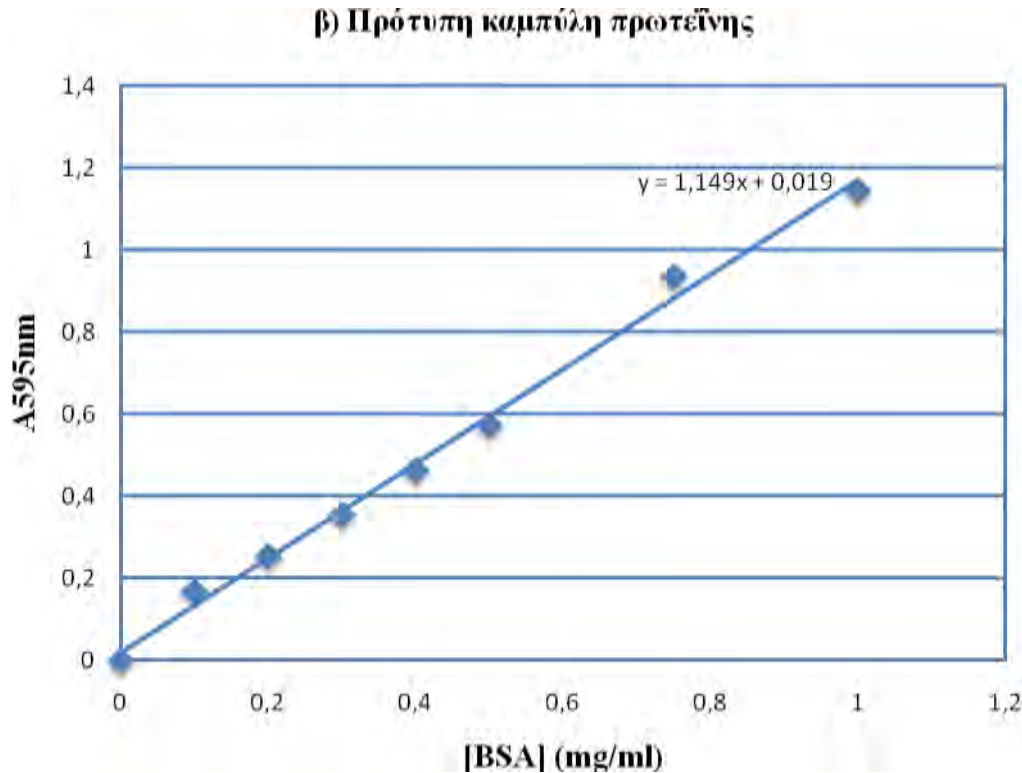
#### 4.1.1. Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης

Η κατασκευή πρότυπης καμπύλης πραγματοποιήθηκε μετρώντας διάφορες αραιώσεις διαλύματος BSA με την μέθοδο Bradford (αναλυτικότερα στα Υλικά και Μέθοδοι). Οι πρότυπες καμπύλες που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα μας για τον υπολογισμό της ολικής συγκέντρωσης της AtHESP στα δείγματα από τα διάφορα στάδια της απομόνωσης είναι:



Η εξίσωση που προκύπτει είναι από την α) πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης είναι:

$$A_{595} = 0,696C + 0,003$$



Η εξίσωση που προκύπτει είναι από την β) πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης είναι:  
 $A_{595} = 1,149C + 0,019$

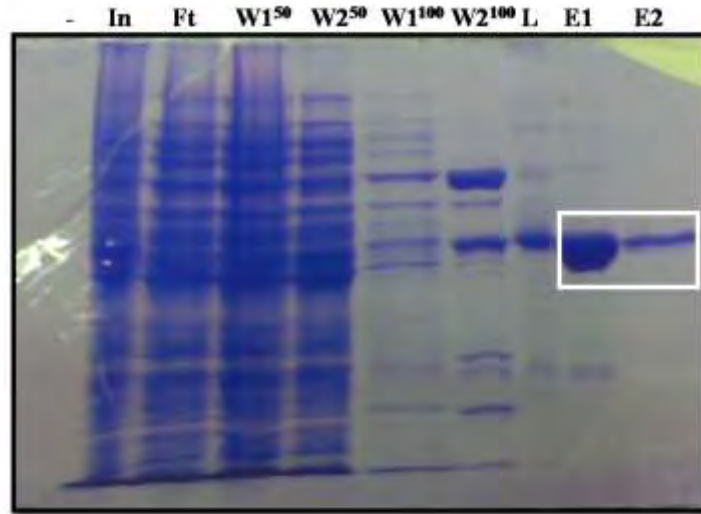
Οι διαφορετικές πρότυπες καμπύλες προέκυψαν για διαφορετικά αντιδραστήρια Bradford.

#### 4.1.2. Έκφραση και απομόνωση AtHESP

##### Στήλη νικελίου (Ni-NTA)

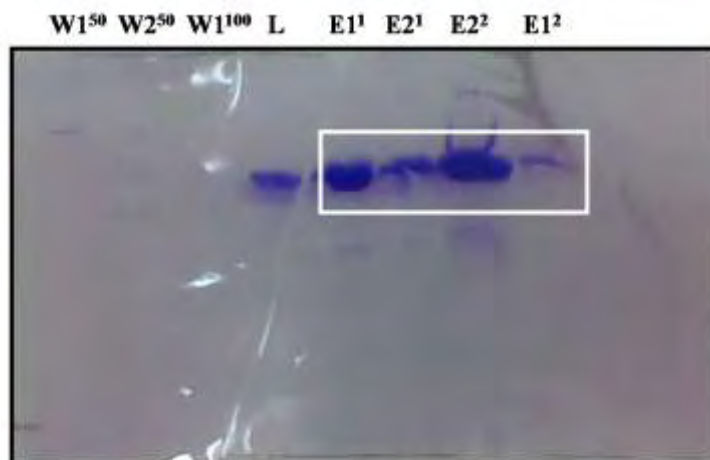
Η διαδικασία της έκφρασης και απομόνωσης της AtHESP περιγράφεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Στην Εικόνα 4.1. παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της πρωτεΐνης AtHESP, με τη βοήθεια ρητίνης νικελίου σεφαρόζης, σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου 10%. Αρχικά ετοιμάσαμε 800ml καλλιέργεια κυττάρων Ecoli BL21 DE3 pET15b-AtHESP. Από αυτήν απομονώσαμε 4,8g κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια λύσαμε με υπερήχους και φυγοκεντρήσαμε. Στη στήλη προστέθηκε το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης και μετά την έκλουσή του προστέθηκαν 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 50mM Imidazole, κατόπιν 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 100mM Imidazole, και τέλος 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 500mM Imidazole. Τα κλάσματα των διαλυμάτων έκπλυσης συλλέχτηκαν ανά 0,5 ml (W1<sup>50</sup>-W5<sup>50</sup>, W1<sup>100</sup>-W5<sup>100</sup>) και της έκπλυσης ανά 1 ml (E1-E4). Όπως φαίνεται και στην εικόνα η πρωτεΐνη βρίσκεται στα κλάσματα E1 και E2 τα οποία στη συνέχεια ετοιμάσαμε για διαπίδωση. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford υπολογίστηκε από την εξίσωση της α) πρότυπης καμπύλης της BSA που παρατίθεται παραπάνω και είναι ίση στο E1 κλάσμα με 2,14

mg/ml και στο E2 κλάσμα με 0,25 mg/ml. Μετά την διαπίδυση για το E1 είναι 4,26 mg/ml και για το E2 0,125mg/ml.



**Εικ.4.1.** Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων στήλης Ni-NTA από τα στάδια απομόνωσης της AtHESP. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. In: υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μετά την λύση των κυττάρων, Ft: το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μετά την λύση των κυττάρων που έχει εκχυλιστεί από την στήλη, L: ως Ladder χρησιμοποιείται απομονωμένη AtHESP από προηγούμενη πτυχιακή, E1-E2: κλάσματα του διαλύματος έκπλυσης, W1<sup>50</sup>-W2<sup>50</sup>: κλάσματα διαλύματος έκπλυσης με 50mM Imidazole, W1<sup>100</sup>-W2<sup>100</sup> : κλάσματα διαλύματος έκπλυσης με 100mM Imidazole. Το λευκό πλαίσιο δείχνει την AtHESP.

Μετά την διαπίδυση, για επιπλέον καθαρισμό της AtHESP, επαναλάβαμε την ίδια διαδικασία με την στήλη Ni-NTI-Sepharose για τα E1 και E2 μόνο (Εικ.4.2.). Αφού ενώσαμε τα κλάσματα E1 και E2, τα αφήσαμε για περίπου 1h να προσδεθούν στην ρητίνη με ανάδευση και κατόπιν να εκχυλιστούν από την στήλη. Έπειτα προσθέσαμε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 50mM Imidazole, 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 100mM Imidazole και 1ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 500mM Imidazole. Το 1ml διαλύματος συλλεγόταν ανά 0,5ml (W1<sup>50</sup>-W2<sup>50</sup>, W1<sup>100</sup>, E1-E2). Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου 10%. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford υπολογίστηκε από την εξίσωση της α) πρότυπης καμπύλης της BSA και είναι ίση στο E1 κλάσμα με 1,44mg/ml και στο E2 κλάσμα 2,05 mg/ml πριν την διαπίδυση. Μετά την διαπίδυση είναι 0,29mg/ml και 1,34mg/ml αντίστοιχα.

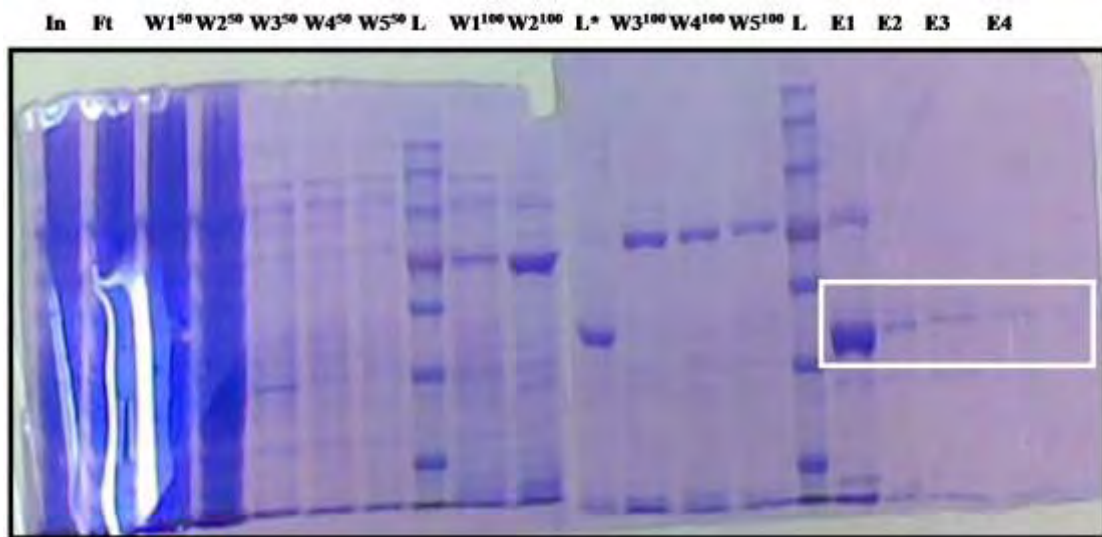


**Εικ.4.2.** Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων στήλης Ni-NTA από τα στάδια απόνωσης της AtHESP. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue., L: ως Ladder χρησιμοποιείται απομονωμένη AtHESP από προηγούμενη πτυχιακή, E1<sup>1</sup>, E2<sup>1</sup>: τα κλάσματα E1 και E2 της δεύτερης στήλης Ni-NTA-Sepharose, E2<sup>2</sup>, E1<sup>2</sup>: τα κλάσματα E1 και E2 της δεύτερης στήλης

Ni-NTA-Sepharose μετά την διαπίδυση, W1<sup>50</sup>-W2<sup>50</sup>: κλάσματα διαλύματος έκπλυσης με 50mM Imidazole, W1<sup>100</sup> : κλάσμα διαλύματος έκπλυσης με 100mM Imidazole. Το λευκό πλαίσιο δείχνει την AtHESP.

Οι τιμές της AtHESP που πήραμε με την μέθοδο Bradford μετά την πρώτη και την δεύτερη διαπίδυση καθώς και από την δεύτερη στήλη δεν θεωρούνται έγκυρες, διότι δεν είναι λογικό η ποσότητα της πρωτεΐνης να αυξάνει. Πιθανόν κατά την διαπίδυση να εισήλθαν άλλες ουσίες που αντιδρούν με το αντιδραστήριο Bradford και δίνουν υψηλές τιμές. Παρόλα αυτά όπως φαίνεται και από την πηκτή η πρωτεΐνη παραμένει σε αρκετή ποσότητα.

Στην Εικόνα 4.3. παρουσιάζεται η συνολική διαδικασία και δείχνονται όλα τα στάδια της απομόνωσης. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της πρωτεΐνης AtHESP, με τη βοήθεια ρητίνης νικελίου σεφαρόζης, πραγματοποιήθηκε σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου 7,5%. Η πρωτεΐνη AtHESP φαίνεται να έχει μέγεθος 40kDa. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford υπολογίστηκε από την εξίσωση της α) πρότυπης καμπύλης της BSA και είναι ίση στο E1 κλάσμα με 1,89mg/ml και στο E2 κλάσμα με 0,044 mg/ml πριν την διαπίδυση. Μετά την διαπίδυση είναι 0,572mg/ml για το κλάσμα E1.

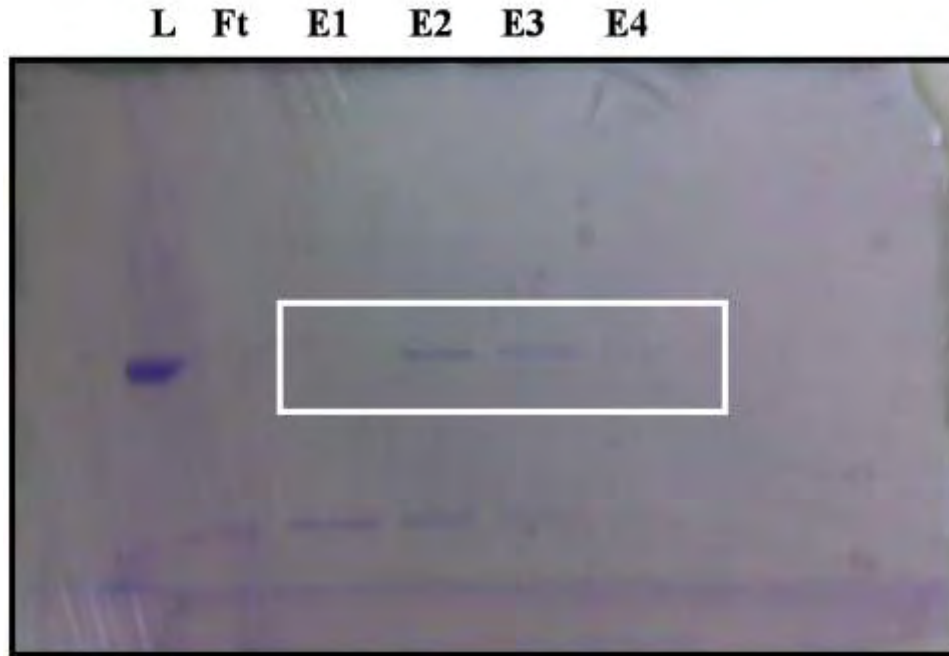


**Εικ.4.3.** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της AtHESP σε στήλη Ni-NTA. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. In: υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης μετά την λύση των κυττάρων, Ft: το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης μετά την λύση των κυττάρων που έχει εκχυλιστεί από την στήλη, L\*: ως Ladder χρησιμοποιείται απομονωμένη AtHESP από προηγούμενη πτυχιακή, L: protein marker, W1<sup>50</sup>-W5<sup>50</sup>: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 50mM Imidazole, W1<sup>100</sup>- W5<sup>100</sup>: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 100mM Imidazole, E1-E2: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 500mM Imidazole. Το λευκό πλαίσιο δείχνει την AtHESP.

#### *Χρήση της κατιονανταλλακτικής ρητίνης P11*

Μετά την διαπίδυση του E1, για επιπλέον καθαρισμό το περάσαμε από την κατιονανταλλακτική στήλη cellulose phosphate P11 (αναλυτικότερα στα Υλικά και Μέθοδοι). Αφού προετοιμάσαμε την στήλη για τον καθαρισμό και την εξισορροπήσαμε στη συνέχεια αφήσαμε το κλάσμα E1 να εκχυλιστεί από αυτήν και το εκχύλισμα αυτό το ξαναπεράσαμε ώστε να εκχυλιστεί ξανά. Επαναλάβαμε άλλες 5 φορές. Η επανάληψη αυτή συμβάλει στην ισχυρή πρόσδεση της πρωτεΐνης στην ρητίνη της στήλης P11. Έπειτα προσθέσαμε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με pH 6,8 (ισοηλεκτρικό σημείο AtHESP). Τα κλάσματα συλλέχτηκαν ανά 1ml. Η συγκέντρωση

της AtHESP ήταν πολύ χαμηλή με αποτέλεσμα μετά την διαπίδυση των κλασμάτων έκλυσης που ακολούθησε να χαθεί εντελώς (Εικ.4.4) [εξίσωση α) πρότυπης καμπύλης]. Συμπερασματικά, η στήλη P11 δεν βελτίωσε σημαντικά τη διαδικασία απομόνωσης της AtHESP.

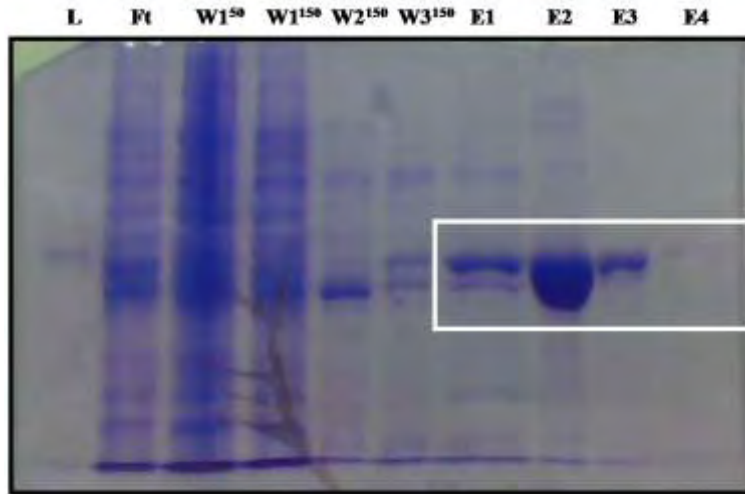


**Εικ.4.4.** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της AtHESP με χρήση στήλης P11 σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου 7,5%. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Ft: το κλάσμα E1 που έχουμε εκχυλιστεί από την στήλη 5 φορές, L: ως Ladder χρησιμοποιείται απομονωμένη AtHESP από προηγούμενη πτυχιακή, E1-E4: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης με 500mM Imidazole. Το λευκό πλαίσιο δείχνει την AtHESP.

*Βελτίωση συνθηκών απομόνωσης: συγκέντρωση ιμιδαζολίου στο διάλυμα έκπλυσης.*

Στην εικόνα 4.5. πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση δειγμάτων πρωτεΐνης από τα κλάσματα στήλης Ni-NTA-Sepharose, σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου 7,5%. Η διαδικασία καθαρισμού ξεκινά με την ανάπτυξη καλλιέργειας 600ml κυττάρων E.coli BL21 DE3 pET15b-AtHESP. Από αυτήν απομονώσαμε 4,2g κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια λύθηκαν με υπερήχους και φυγοκεντρήσαμε. Στη στήλη προστέθηκε το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης και κατόπιν της εκχύλισης του προστέθηκαν 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 50mM Imidazole, 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 150mM Imidazole και 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης με 500mM Imidazole. Τα κλάσματα των διαλυμάτων έκπλυσης συλλέχτηκαν ανά 1 ml (W1<sup>50</sup>-W3<sup>50</sup>, W1<sup>150</sup>-W3<sup>150</sup>) και της έκλυσης ανά 0,5 ml (E1-E8). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της AtHESP στα κλάσματα της στήλης πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της εξίσωσης της α) πρότυπης καμπύλης πρωτεΐνης. Για το E1 κλάσμα ήταν 0,28mg/ml, για το E2 κλάσμα ήταν 2,11 mg/ml και για το E3 0,36 mg/ml. Η συγκέντρωση μετά την διαπίδυση ήταν 0,0014 mg/ml για το E1 κλάσμα, 2,02 mg/ml για το E2, ενώ δεν προσδιορίστηκε πρωτεΐνη στο E3.

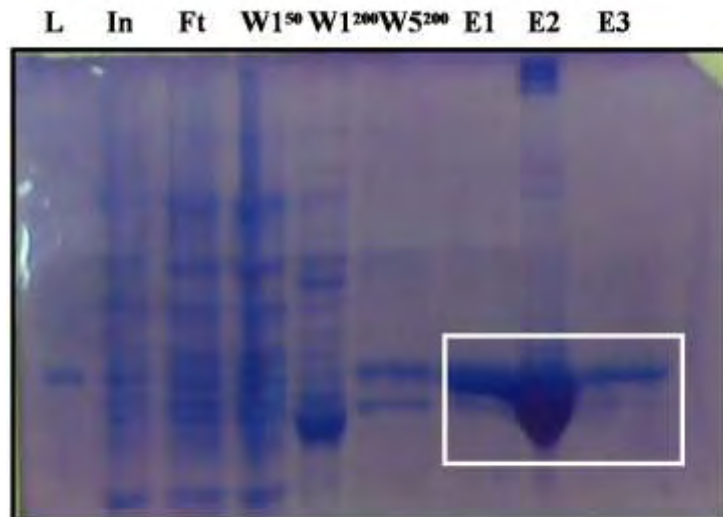




**Εικ.4.5.** Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων στήλης Ni-NTA από τα στάδια απομόνωσης της AtHESP και έκλυση σε αυξημένες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Ft: το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μετά την λύση των κυττάρων που έχει εκχυλιστεί από την στήλη, L: ως Ladder χρησιμοποιείται απομονωμένη AtHESP από προηγούμενη πτυχιακή, W1<sup>50</sup>: κλάσμα ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης με 50mM Imidazole, W1<sup>150</sup>-W3<sup>150</sup>: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης με 150mM Imidazole, E1-E4: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης με 500mM Imidazole. Το λευκό πλαίσιο δείχνει την AtHESP.

Δεν πραγματοποιήθηκε επιπλέον καθαρισμός. Το κλάσμα E2 αφού συμπυκνώθηκε με στήλη συμπύκνωσης (Υλικά και Μέθοδοι), αποθηκεύτηκε στους -80°C.

Η διαδικασία καθαρισμού που περιγράφηκε στην Εικόνα 4.5. είναι η ίδια με της Εικόνας 4.6. Η διαφορά έγκειται στο ότι δεν προσθέτουμε στην στήλη ρυθμιστικό διάλυμα με 150mM Imidazole, αλλά με 200mM Imidazole. Όλα τα διαλύματα συλλέχτηκαν ανά 0,5ml (W1<sup>50</sup>-W5<sup>50</sup>, W1<sup>200</sup>-W5<sup>200</sup>, E1-E8). Επιπλέον οι συγκεντρώσεις της AtHESP στα κλάσματα έκλυσης υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση της β) πρότυπης καμπύλης πρωτεΐνης. Για το E1 κλάσμα ήταν 1,32mg/ml, για το E2 5,46mg/ml και για το E3 0,055mg/ml. Δεν πραγματοποιήθηκε διαπίδυση, ωστόσο για να αλλάξει το διάλυμα στο οποίο βρισκόταν διαλυτή η πρωτεΐνη και να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο, χρησιμοποιήσαμε τις στήλες συμπύκνωσης (Υλικά και Μέθοδοι).

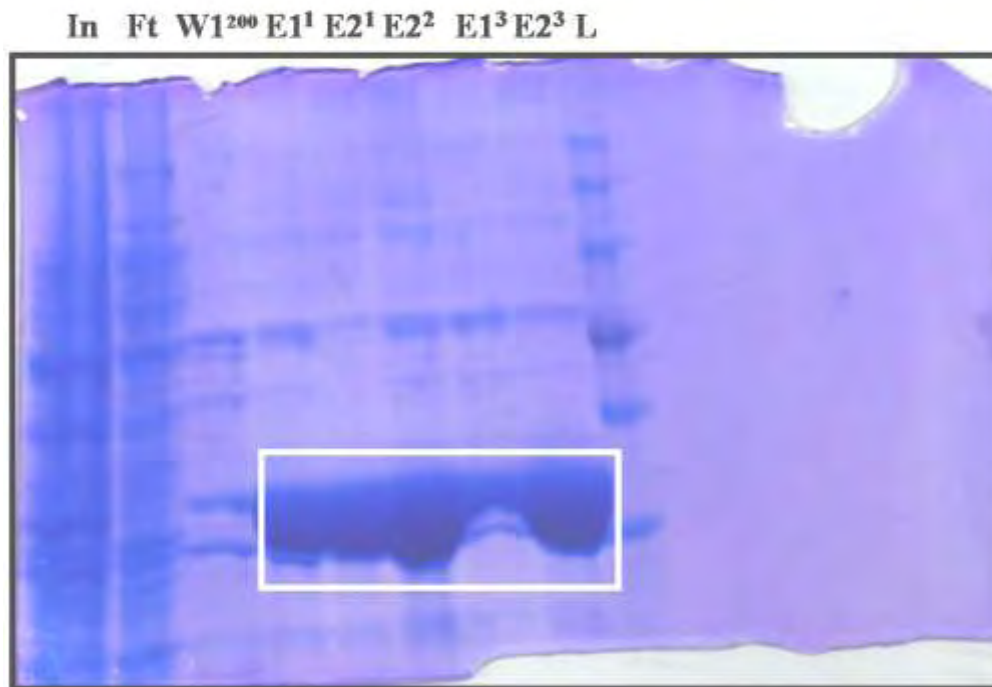


**Εικ.4.6.** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της AtHESP. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. In: υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μετά την λύση των κυττάρων, Ft: το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μετά την λύση των κυττάρων που έχει εκχυλιστεί από την στήλη, L: ως Ladder χρησιμοποιείται απομονωμένη AtHESP από προηγούμενη πτυχιακή, W1<sup>50</sup>: κλάσμα ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης με 50mM Imidazole, W1<sup>200</sup>-W5<sup>200</sup>: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης με 200mM Imidazole, E1-E3: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης με 500mM Imidazole. Το λευκό πλαίσιο δείχνει την AtHESP.



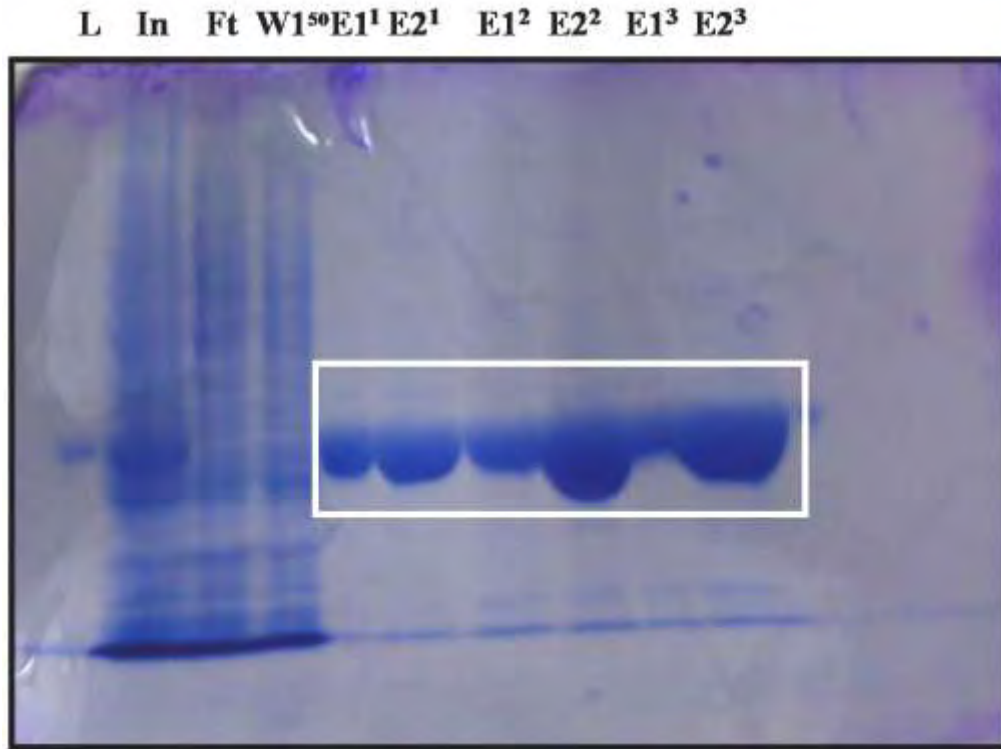
*Βελτίωση απόδοσης: Απομόνωση AtHESP από καλλιέργεια 3 λίτρων*

Τέλος για να λάβουμε ακόμα μεγαλύτερη ποσότητα AtHESP από τον καθαρισμό εκχυλίσματος κυττάρων *E.coli* BL21 DE3 pET15b-AtHESP, στα οποία υπερεκφράστηκε η πρωτεΐνη, αναπτύξαμε καλλιέργεια 3 λίτρων. Η καλλιέργεια αυτή μας έδωσε 12,5 g κύτταρα. Ωστόσο αρχικά δεν χρησιμοποιήσαμε όλα τα γραμμάρια κυττάρων, αλλά πήραμε 6,25g κύτταρα, ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση μεγάλης ποσότητας DNA στη στήλη, η οποία θα εμπόδιζε την εκχύλιση του υπερκείμενου. Ακολούθησε η διάσπαση των κυττάρων με υπερήχους και η φυγοκέντρωση τους. Έπειτα αφήσαμε το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης να αναδευτεί με ρητίνη τριών στηλών Ni-NTI-Sepharose για 1h. Αυτό συνέβη για λόγους επιτάχυνσης της διαδικασίας. Κατόπιν αυτού το υπερκείμενο χωρίζεται σε τρεις στήλες και εκχυλίζεται από αυτές. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε κάθε στήλη 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 50mM Imidazole, 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 200mM Imidazole και 4ml ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης με 500mM Imidazole. Τα διαλύματα έκπλυσης συλλέχτηκαν ανά 1ml και το διάλυμα έκλουσης ανά 0,5ml (W1<sup>50</sup>-W3<sup>50</sup>, W1<sup>200</sup>-W3<sup>200</sup>, E1-E8). Η συγκέντρωση της AtHESP στα κλάσματα έκλουσης υπολογίστηκε με βάση της εξίσωσης της β) πρότυπης καμπύλης πρωτεΐνης. Έτσι η συγκέντρωση στο κλάσμα E1<sup>1</sup> είναι 3,15 mg/ml, στο E2<sup>1</sup> 5,67mg/ml, στο E2<sup>2</sup> 9,7mg/ml, στο E1<sup>3</sup> 0,75mg/ml και στο E2<sup>3</sup> 9,19 mg/ml. Επιπλέον δεν πραγματοποιήθηκε διαπίδυση, αλλά χρησιμοποιήθηκαν στήλες συμπίκνωσης για τα κλάσματα των στηλών. Τέλος η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απομόνωσης της AtHESP έγινε σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου 7,5%.



**Εικ.4.7.** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από κλάσματα στήλης Ni-NTA από τα στάδια απομόνωσης της AtHESP από αρχική καλλιέργεια 3 λίτρων. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. In: υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης μετά την λύση των κυττάρων, Ft: το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης μετά την λύση των κυττάρων που έχει εκχυλιστεί από την στήλη, L: protein marker, W1<sup>200</sup>:κλάσμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 200mM Imidazole, E1<sup>1</sup>- E2<sup>1</sup>: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης με 500mM Imidazole από την στήλη 1, E2<sup>2</sup>: κλάσμα ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης με 500mM Imidazole από την στήλη 2, E1<sup>3</sup>-E2<sup>3</sup>: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης με 500mM Imidazole από την στήλη 3. Το λευκό πλαίσιο δείχνει την AtHESP.

Η ίδια διαδικασία με την παραπάνω ακολούθησε για τα υπόλοιπα 6,25g κύτταρα. Η Εικόνα 4.8. παρουσιάζει την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων απομόνωσης της AtHESP σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου 7,5%. Η συγκέντρωση της AtHESP στα κλάσματα έκλουσης υπολογίστηκε με βάση της εξίσωσης της β) πρότυπης καμπύλης πρωτεΐνης. Έτσι η συγκέντρωση στο κλάσμα E1<sup>1</sup> είναι 3,69 mg/ml, στο E2<sup>1</sup> 0,905mg/ml, στο E2<sup>1</sup> 0,685mg/ml, στο E2<sup>2</sup> 1,105mg/ml, στο E1<sup>3</sup> 4,57mg/ml και στο E2<sup>3</sup> 0,844 mg/ml.



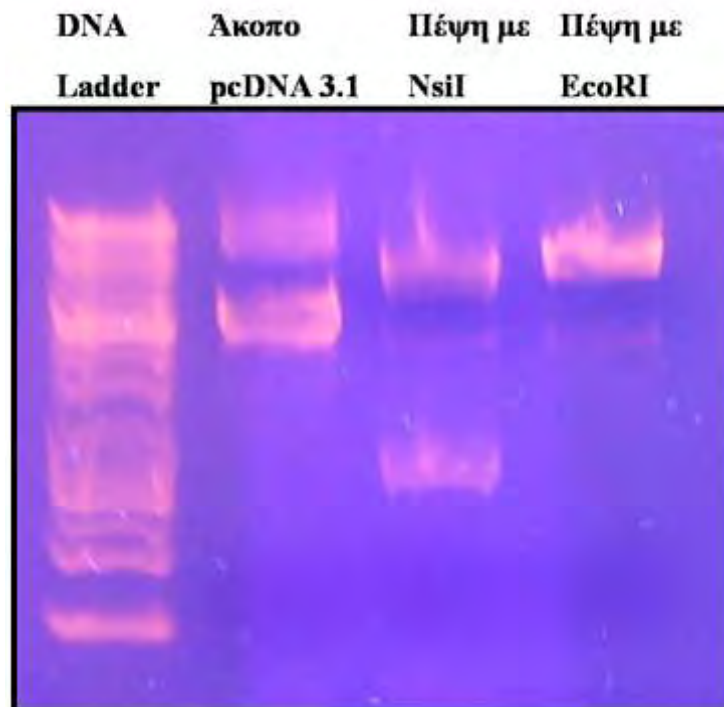
**Εικ.4.8.** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από τα στάδια απομόνωσης της AtHESP. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue. In: υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μετά την λύση των κυττάρων, Ft: το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μετά την λύση των κυττάρων που έχει εκχυλιστεί από την στήλη, L: ως Ladder χρησιμοποιείται απομονωμένη AtHESP από προηγούμενη πτυχιακή, W1<sup>50</sup>: κλάσμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 50mM Imidazole , E1<sup>1</sup>-E2<sup>1</sup>: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης με 500mM Imidazole από την στήλη 1, E1<sup>2</sup>-E2<sup>2</sup>: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης με 500mM Imidazole από την στήλη 2, E1<sup>3</sup>-E2<sup>3</sup>: κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης με 500mM Imidazole από την στήλη 3. Το λευκό πλαίσιο δείχνει την AtHESP.

Συμπερασματικά, οι τροποποιήσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία και αφορούν κυρίως στη συγκέντρωση του ιμιδαζολίου και την αρχική ποσότητα καλλιέργειας δίνουν ικανοποιητική απόδοση της AtHESP. Η χρήση της στήλης P11 βελτίωσε τον εμπλουτισμό του δείγματος, μειώνοντας όμως αισθητά την λαμβανόμενη πρωτεΐνη. Έχει σχεδιασθεί η εξέταση άλλων ρητινών, κυρίως κατιονανταλλακτικών, για την περαιτέρω βελτίωση της απόδοσης και εμπλουτισμού στο άμεσο μέλλον.

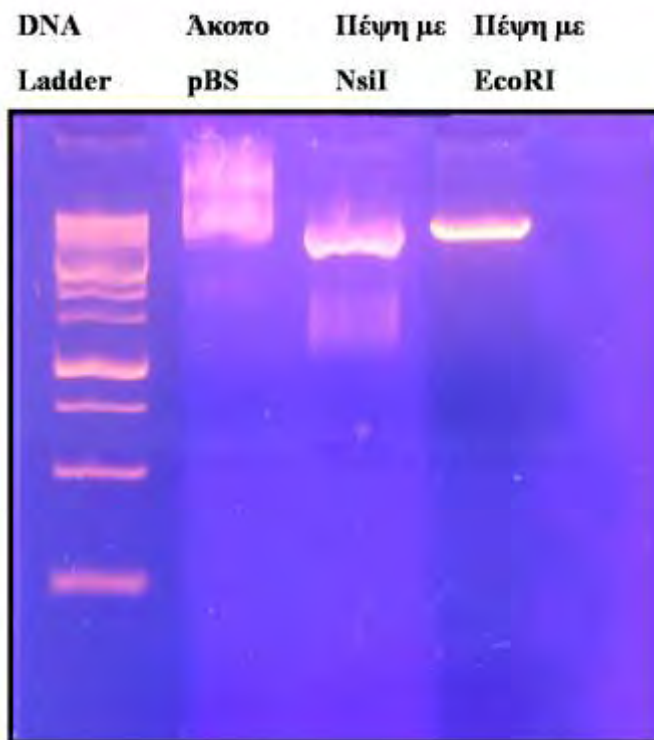
#### 4.2. Μελέτη της AtHESP σε αντιδράσεις αποαδενυλίωσης με γνωστά υποστρώματα.

##### 4.2.1. Προετοιμασία υποστρωμάτων αντιδράσεων αποαδενυλίωσης: Απομόνωση και πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Σε προηγούμενη διπλωματική εργασία (Τοματσίδου Νατάσα, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας), ο χαρακτηρισμός της AtHESP έγινε φωτομετρικά με χρήση υποστρωμάτων πολυ(A) χωρίς καθορισμένο μήκος. Σκοπός των ακολούθων πειραμάτων είναι η μελέτη της AtHESP σε αντιδράσεις αποαδενυλίωσης κατάλληλων υποστρωμάτων RNA γνωστού συνολικού μήκους και καθορισμένης πολυ(A) ουράς που αναλύονται/οπτικοποιούνται σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου-ουρίας. Επίσης, τα υποστρώματα αυτά δεν ακολουθούν τη συνήθη πρακτική σήμανσης με ραδιενέργο  $^{32}\text{P}$ , αλλά η εμφάνιση των αντιδράσεων αποαδενυλίωσης στα πηκτώματα γίνεται με χρήση χρώσης αργύρου (silver stain). Πραγματοποιήθηκε μεταγραφή *in vitro* κατάλληλου ενθέματος από πλασμίδια που έφεραν διαφορετικούς υποκινητές (Εικόνα 3.2). Το ένα ένθεμα είχε υποκινητή που αναγνωριζόταν από τη T3 πολυμεράση (pBS) και το άλλο ένθεμα είχε υποκινητή που αναγνωριζόταν από την T7 πολυμεράση (pcDNA 3.1). Η απομόνωση έγινε με βάση το πρωτόκολλο Miniprep. Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε πέψη του πλασμιδίου (pBS ή pcDNA 3.1) με ένζυμα περιορισμού NsiI και EcoRI (αναλυτικότερα Υλικά και Μέθοδοι). Δείγματα από την απομόνωση και τις πέψεις αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% για το κάθε πλασμίδιο (Εικ.4.9 και 4.10) (Υλικά και Μέθοδοι).



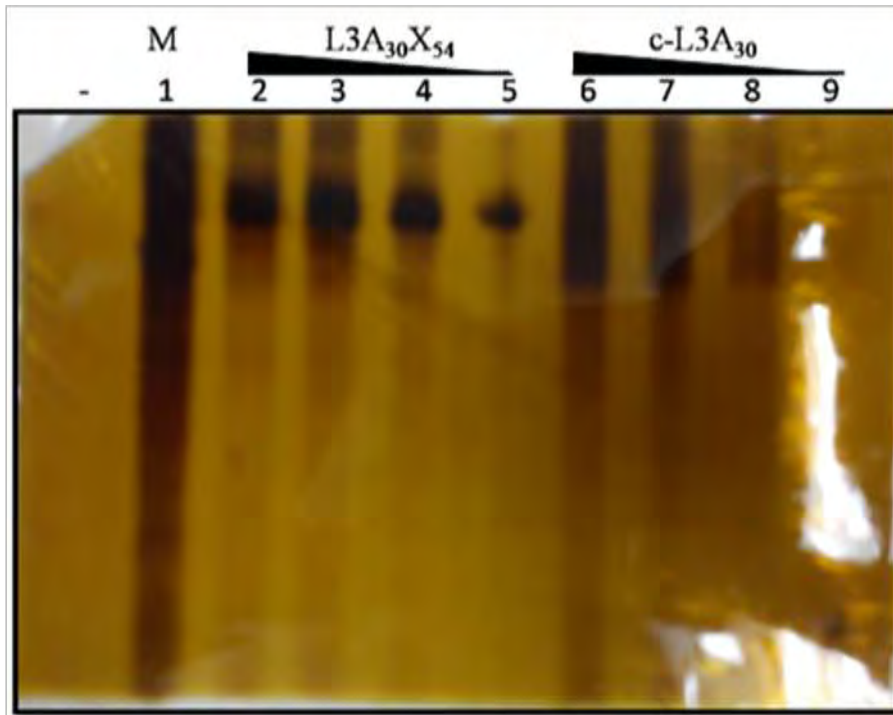
Εικ.4.9.Απομόνωση και πέψη του πλασμιδίου pcDNA 3.1 με τα ένζυμα περιορισμού NsiI και EcoRI.



Εικ.4.10. Απομόνωση του πλασμιδίου pBS και πέψη του με τα ένζυμα περιορισμού NsiI και EcoRI.

#### 4.2.2. Προετοιμασία υποστρωμάτων αντιδράσεων αποαδενυλίωσης με μεταγραφή *in vitro*.

Μετά την μεταγραφή *in vitro* και την φωτομέτρηση των μεταγράφων (Υλικά και Μέθοδοι), δείγματα από τα μετάγραφα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή 12% Ακρυλαμίδιου - 8M ουρία. Αυτό έγινε για τον έλεγχο των υποστρωμάτων και των ποσοτήτων που αυτά είναι διακριτά στην πηκτή. Στην Εικόνα 4.11 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση του υποστρώματος που έχει προκύψει από την μεταγραφή *in vitro*, του ευθυγραμμισμένου από το ένζυμο NsiI πλασμιδίου pBS. Το υπόστρωμα αυτό φέρει στο 3' άκρο του μια πολυ(A) ουρά μήκους 30 αδενοσινών (L3A<sub>30</sub>). Επίσης, συντέθηκε υπόστρωμα που φέρει κάλυμμα (cap) στο 5' άκρο (m<sup>7</sup>GpppGL3A<sub>30</sub>, ή c-L3A<sub>30</sub>) ώστε να προσομοιάζει πραγματικά mRNAs που στο κύτταρο φέρουν κάλυμμα. Παράλληλα, μεταγράφηκε υπόστρωμα L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub> από το πλασμίδιο pBS, ευθυγραμμισμένο όμως από το ένζυμο EcoRI. Το υπόστρωμα αυτό φέρει μια αλληλουχία 54 νουκλεοτιδίων μετά την αλληλουχία των 30 αδενοσινών. Έτσι η πολυ(A) αλληλουχία είναι «εσωτερική» και όχι στο 3' άκρο του μεταγράφου και αποσκοπεί στο να ελεγχθεί κατά πόσο η AtHESP μπορεί να απομακρύνει μόνο αδενοσίνες εξειδικευμένα από το 3' άκρο. Η χρώση της πηκτής έγινε με την μέθοδο Silver Staining.

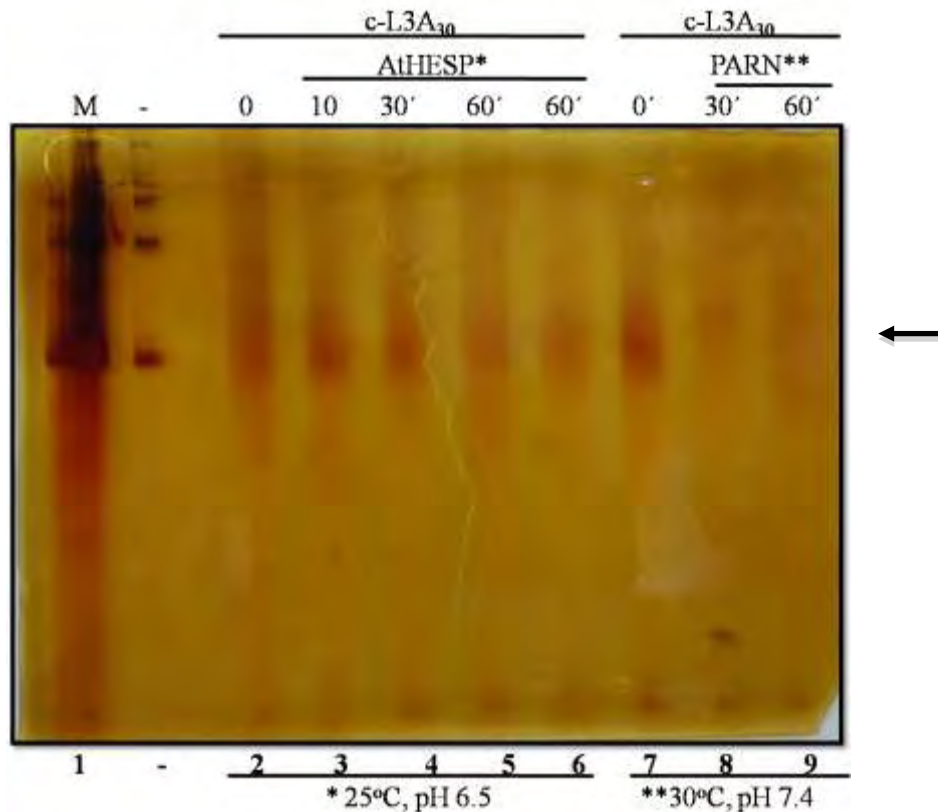


**Εικ.4.11.** Ηλεκτροφόρηση RNA υποστρώματων που έχουν προκύψει από την μεταγραφή *in vitro*. Η χρώση έγινε με την μέθοδο Silver Staining (για πρωτεΐνες). Σειρά και ποσότητες δειγμάτων που ηλεκτροφορήθηκαν : 1<sup>η</sup> διαδρομή=> 1 μl RNA marker, 2<sup>η</sup> διαδρομή=> 8 μl L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub> (60 ng/μl), 3<sup>η</sup> διαδρομή=> 4 μl L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub> (60 ng/μl), 4<sup>η</sup> διαδρομή=> 2 μl L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub> (60 ng/μl), 5<sup>η</sup> διαδρομή=> 0,5 μl L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub> (60 ng/μl), 6<sup>η</sup> διαδρομή=> 3 μl c-L3A<sub>30</sub> (NsiI) (264,4 ng/μl), 7<sup>η</sup> διαδρομή=> 2 μl c-L3A<sub>30</sub> (NsiI) (264,4 ng/μl), 8<sup>η</sup> διαδρομή=> 1 μl c-L3A<sub>30</sub> (NsiI) (264,4 ng/μl), 9<sup>η</sup> διαδρομή=> 0,5 μl c-L3A<sub>30</sub> (NsiI) (αραιωμένο 1:10). Το c-L3A<sub>30</sub> αποτελεί το υπόστρωμα που προέκυψε από μεταγραφή του pBS πλασμιδίου, το οποίο είχε κοπεί από το ένζυμο NsiI και φέρει την 5' καλύπτρα (capped). Το L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub> αποτελεί το υπόστρωμα που προέκυψε από μεταγραφή του pBS πλασμιδίου, το οποίο είχε κοπεί από το ένζυμο EcoRI και δεν φέρει την 5' καλύπτρα.

#### 4.2.3. Αντιδράσεις RNA υποστρωμάτων (μεταγραφή *in vitro*) με αποαδενυλάσες

Προκειμένου να ελεγχθεί η δράση της AtHESP στα υποστρώματα σχεδιάστηκε μια σειρά πειραμάτων και πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με τα μετάγραφα που περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο και τα αποτελέσματα των οποίων απεικονίζονται παρακάτω (αναλυτικότερα για τον σχεδιασμό των αντιδράσεων στα Υλικά και Μέθοδοι). Στην Εικόνα 4.12 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση αντιδράσεων της AtHESP με το μετάγραφο capped L3A<sub>30</sub> (NsiI), που έχει προκύψει από την μεταγραφή του pBS πλασμιδίου, το οποίο έχει κοπεί με NsiI. Η χρώση της πηκτής έγινε με την μέθοδο Silver Staining. Ως ένζυμο-μάρτυρας χρησιμοποιείται η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN, μια πολύ καλά μελετημένη αποαδενυλάση για το χαρακτηρισμό της οποίας έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τα υποστρώματα που περιγράφονται εδώ (L3A<sub>30</sub>, c-L3A<sub>30</sub> και L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub>).



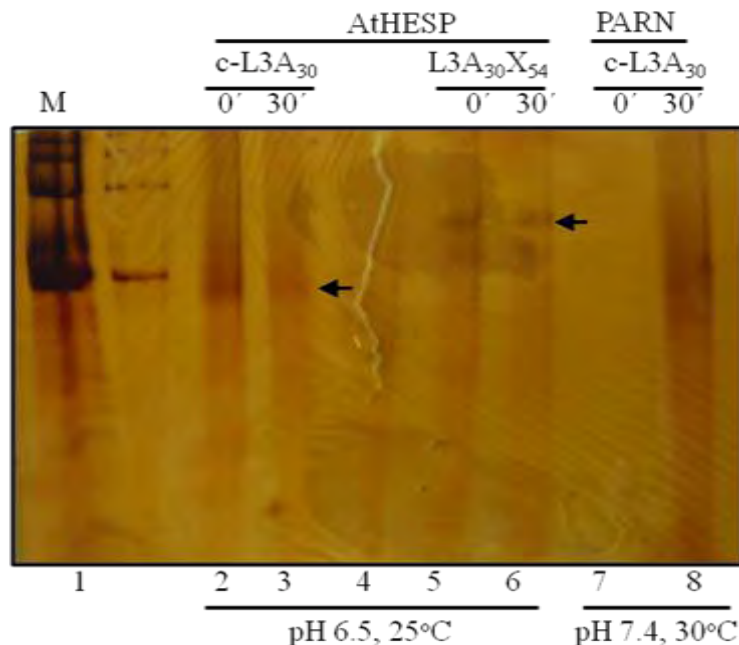


**Εικ.4.12.** Ηλεκτροφόρηση RNA υποστρώματων που έχουν προκύψει από την μεταγραφή in vitro. Η χρώση έγινε με την μέθοδο Silver Staining. Σειρά δειγμάτων που ηλεκτροφορήθηκαν: 1<sup>η</sup> διαδρομή => RNA marker, 2<sup>η</sup> διαδρομή=> 15  $\mu$ l c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), χωρίς ένζυμο, 3<sup>η</sup> διαδρομή => 15  $\mu$ l c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), με 4  $\mu$ l AtHESP (αραίωση 1:10 => 0,0125mg/ml τελική συγκέντρωση), αντίδραση για 10min, 25<sup>o</sup>C , pH=6,5, 4<sup>η</sup> διαδρομή =>15  $\mu$ l c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), με 4  $\mu$ l AtHESP (αραίωση 1:10 => 0,0125mg/ml τελική συγκέντρωση), αντίδραση για 30min, 25<sup>o</sup>C , pH=6,5, 5<sup>η</sup> διαδρομή => 15  $\mu$ l c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), με 4  $\mu$ l AtHESP (αραίωση 1:10 => 0,0125mg/ml τελική συγκέντρωση), αντίδραση για 60 min , 25<sup>o</sup>C , pH=6,5, 6<sup>η</sup> διαδρομή =>15  $\mu$ l c-L3A<sub>30</sub> (NsiI) με 4  $\mu$ l AtHESP (χωρίς αραίωση => 0,125mg/ml τελική συγκέντρωση), αντίδραση για 60min, 25<sup>o</sup>C, pH=6,5, 7<sup>η</sup> διαδρομή => 25  $\mu$ l c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), χωρίς ένζυμο, 8<sup>η</sup> διαδρομή => 25  $\mu$ l c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), με 4  $\mu$ l PARN (0,23mg/ml, χωρίς αραίωση), αντίδραση για 30 min, 30<sup>o</sup>C , pH=7,4, 9<sup>η</sup> διαδρομή => 25  $\mu$ l c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), με 4  $\mu$ l PARN (0,23mg/ml, χωρίς αραίωση), αντίδραση για 60 min, 30<sup>o</sup>C, pH=7,4. Το υπόστρωμα c-L3A<sub>30</sub> (NsiI) που χρησιμοποίησα στις αντιδράσεις 2-6 έχει συγκέντρωση 70 ng/ $\mu$ l, ενώ το υπόστρωμα c-L3A<sub>30</sub> (NsiI) που χρησιμοποίησα στις αντιδράσεις 7-9 έχει συγκέντρωση 50 ng/ $\mu$ l. Το c-L3A<sub>30</sub> αποτελεί το υπόστρωμα που προέκυψε από μεταγραφή του pBS πλασμιδίου, το οποίο είχε κοπεί από το ένζυμο NsiI και φέρει την 5' καλύπτρα (capped). Το βέλος δεξιά δείχνει τη θέση του υποστρώματος.

Η εικόνα δείχνει πως με την πάροδο του χρόνου η ένταση της ζώνης του υποστρώματος στις διαδρομές 2-6 εξασθενεί (σημειώνεται με το βέλος δεξιά), γεγονός που υπαινίσσεται ενζυμική δράση από την AtHESP. Ανάλογη εικόνα λαμβάνεται και από την PARN στις διαδρομές 7-9.

Στην Εικόνα 4.13.παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση αντιδράσεων της AtHESP και της PARN με τα μετάγραφα c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), L3A<sub>30</sub> (NsiI) χωρίς κάλυμμα και L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub> (EcoRI) που έχουν προκύψει από την μεταγραφή του pBS πλασμιδίου, σε πηκτή 12%-Ακρυλαμιδίου-8M Ουρίας. Η χρώση της πηκτής έγινε με την μέθοδο Silver Staining. Οι αντιδράσεις για την AtHESP πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 25<sup>o</sup>C και pH 6,5 για χρόνους 0 και 30 λεπτά, ενώ για την PARN σε θερμοκρασία 30<sup>o</sup>C, pH 7,4 σε χρόνο 30 λεπτών. Οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων που προέκυψαν από την φωτομέτρηση είναι 75 ng/ $\mu$ l για το μετάγραφο capped L3A<sub>30</sub> (NsiI), 90 ng/ $\mu$ l για το μετάγραφο non capped L3A<sub>30</sub> (NsiI) και 117 ng/ $\mu$ l για το μετάγραφο L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub> (EcoRI). Σε όλες τις αντιδράσεις η ποσότητα υποστρώματος που προστέθηκε ήταν 7,5  $\mu$ l και η

ποσότητα ενζύμου 4μl (στις αντιδράσεις των 30 λεπτών). Η εικόνα δείχνει πως η ένταση της ζώνης του υποστρώματος c-L3A30 μειώνεται ελαφρά, όπως υποδεικνύει το βέλος στη διαδρομή 3 σε σχέση με αυτή της διαδρομής 2. Αυτό υποδηλώνει πως το ένζυμο αποικοδόμησε το υπόστρωμα αυξάνοντας την κινητικότητα του. Παρόλα αυτά δεν διακρίνεται κάποια ζώνη σε χαμηλότερες περιοχές που θα αποδείκνυε την ύπαρξη αποαδενυλιωμένων υποστρωμάτων. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη διακριτική ανάλυση της μεθόδου και σίγουρα απαιτείται βελτίωση των συνθηκών του πειράματος (περισσότερο υπόστρωμα, τροποποίηση χαρακτηριστικών πηκτώματος, κ.α.). Η ένταση των ζωνών στις διαδρομές 5 και 6 δεν μεταβλήθηκαν, γεγονός που υπαινίσσεται πως το ένζυμο δεν αποικοδόμησε το υπόστρωμα, πιθανόν γιατί η πολυ(A) ουρά είναι «εσωτερική» και δεν έχει πρόσβαση σε αυτή. Αυτή η παρατήρηση δείχνει πως το ένζυμο δεν λειτουργεί ούτε ως 5' εξονουκλεάση, ούτε ως ενδονουκλεάση, διότι τότε η ζώνη στη διαδρομή 6 δεν θα ήταν διακριτή ή θα ήταν χαμηλότερης έντασης, όπως συμβαίνει στη διαδρομή 3. Συνολικά, από τα αποτελέσματα των εικόνων 4.13 και 4.14 μπορεί να υποστηριχθεί πως η AtHESP αποικοδομεί υποστρώματα που φέρουν αλληλουχία αδενοσινών στο 3' άκρο, λειτουργεί δηλαδή ως μια αποαδενυλάση.

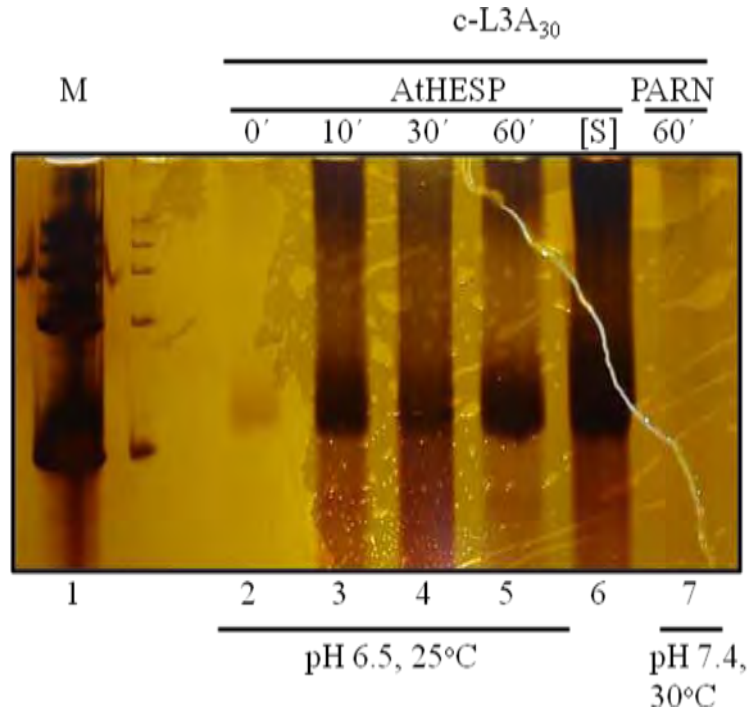


**Εικ.4.13.** Ηλεκτροφόρηση RNA υποστρωμάτων που έχουν προκύψει από την μεταγραφή *in vitro*. Η χρώση έγινε με την μέθοδο Silver Staining. Σειρά δειγμάτων που ηλεκτροφορήθηκαν: 1<sup>η</sup> διαδρομή => RNA marker, 2<sup>η</sup> διαδρομή=>c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), χωρίς ένζυμο, 3<sup>η</sup> διαδρομή =>c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), με AtHESP (0,125mg/ml), αντίδραση για 30min, 25<sup>o</sup>C, pH=6,5, 4<sup>η</sup> διαδρομή => κενό πηγαδάκι, 5<sup>η</sup> διαδρομή =>L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub> (EcoRI), χωρίς ένζυμο, 6<sup>η</sup> διαδρομή =>L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub> (EcoRI) με AtHESP (0,125mg/ml), αντίδραση για 30 min, 25<sup>o</sup>C, pH=6,5, 7<sup>η</sup> διαδρομή => c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), χωρίς ένζυμο, 8<sup>η</sup> διαδρομή =>c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), με PARN (0,23mg/ml), αντίδραση για 30 min, 30<sup>o</sup>C, pH=7,4. Σε όλες τις αντιδράσεις η ποσότητα υποστρώματος που προστέθηκε ήταν 7,5μl και η ποσότητα ενζύμου 4μl (στις αντιδράσεις των 30 λεπτών). Το c-L3A<sub>30</sub> αποτελεί το υπόστρωμα που προέκυψε από μεταγραφή του pBS πλασμιδίου, το οποίο είχε κοπέι από το ένζυμο NsiI και φέρει την 5' καλύπτρα (capped), ενώ το L3A<sub>30</sub> όχι. Το L3A<sub>30</sub>X<sub>54</sub> αποτελεί το υπόστρωμα που προέκυψε από μεταγραφή του pBS πλασμιδίου, το οποίο είχε κοπέι από το ένζυμο EcoRI και δεν φέρει πολυ(A) ουρά ούτε την 5' καλύπτρα.

Τέλος στην Εικόνα 4.14. φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων της AtHESP και PARN με το μεταγράφο capped L3A<sub>30</sub> (NsiI), που έχει προκύψει από την μεταγραφή του πλασμιδίου pCDNA3.1 (με T7 πολυμεράση), καθώς και υπόστρωμα απουσία ενζύμου. Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι 60ng/μl και η ποσότητα που προστέθηκε στις αντιδράσεις είναι 16,5 μl, ενώ του ενζύμου είναι 4μl. Οι χρόνοι των αντιδράσεων για την AtHESP είναι 0, 10, 30 και 60 λεπτά, ενώ ο χρόνος για την PARN



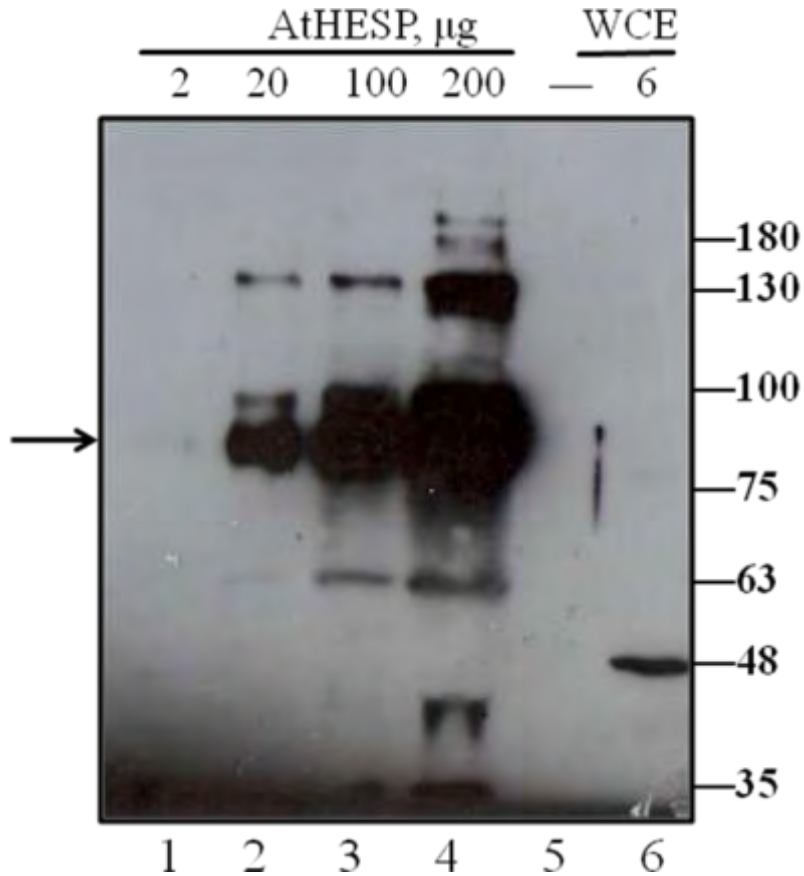
είναι 60 λεπτά. Οι συνθήκες των αντιδράσεων για το κάθε ένζυμο είναι οι ίδιες με τις προαναφερθείσες.



**Εικ.4.14.** Ηλεκτροφόρηση RNA υποστρώματων που έχουν προκύψει από την μεταγραφή *in vitro*. Η χρώση έγινε με την μέθοδο Silver Staining (για πρωτεΐνες). Σειρά δειγμάτων που ηλεκτροφορήθηκαν: 1<sup>η</sup> διαδρομή => RNA marker, 2<sup>η</sup> διαδρομή=>c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), χωρίς ένζυμο, 3<sup>η</sup> διαδρομή =>c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), με AtHESP (0,125mg/ml), αντίδραση για 10min, 25<sup>o</sup>C , pH=6,5, 4<sup>η</sup> διαδρομή =>c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), με AtHESP (0,125mg/ml), αντίδραση για 30min, 25<sup>o</sup>C , pH=6,5, 5<sup>η</sup> διαδρομή =>c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), με AtHESP (0,125mg/ml), αντίδραση για 60 min , 25<sup>o</sup>C , pH=6,5, 6<sup>η</sup> διαδρομή =>c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), χωρίς ένζυμο και διάλυμα αντίδρασης, 7<sup>η</sup> διαδρομή =>c-L3A<sub>30</sub> (NsiI), με PARN (0,23mg/ml), αντίδραση για 60 min, 30<sup>o</sup>C , pH=7,4. Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι 60ng/μl και η ποσότητα αυτού που προστέθηκε στις αντιδράσεις είναι 16,5 μl, ενώ των ενζύμων 4μl. Το μεταγράφο c-L3A<sub>30</sub> έχει προκύψει από την μεταγραφή του πλασμιδίου pcDNA3.1, έχει κοπέι από το NsiI ένζυμο και φέρει την 5' καλύπτρα (capped).

### 4.3. Ομολογία της AtHESP με την Nocturnin

Για να ενισχύσουμε τα δεδομένα μας πως η AtHESP είναι μια αποαδενυλάση με ομολογία με την νοκτουρνίνη χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο Western Blot με αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης νοκτουρνίνης. Αρχικά ηλεκτροφορήσαμε σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδιου 7,5% διαφορετική ποσότητα πρωτεΐνης AtHESP (20, 100 και 200μg, από διάλυμα AtHESP με συγκέντρωση 20mg/ml, καθώς και 2μg AtHESP, από διάλυμα συγκέντρωσης 2mg/ml (αραίωση 1:10 των 20mg/ml)). Επιπλέον στο πήκτωμα ηλεκτροφορήθηκαν 6μg κυτταρικού εκχυλίσματος που περιείχαν την Νοκτουρνίνη και ο πρωτεϊνικός δείκτης μοριακής μάζας. Η προετοιμασία των δειγμάτων καθώς και η μέθοδος Western Blot περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Για την ανίχνευση της AtHESP μεμβράνη χρησιμοποιήσαμε ως πρώτο αντίσωμα πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης NOC που αναπτύχθηκε σε κουνέλι και ως δεύτερο goat anti-rabbit IgG-HRP. Η εικόνα 4.15. παρουσιάζει το αποτέλεσμα της διεργασίας με την εμφάνιση της AtHESP σε film για χρόνο έκθεσης 5 λεπτών. Αν και η εικόνα της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης είναι εμφανής (δείχνεται με το βέλος αριστερά), εντούτοις η θέση της είναι σε σημαντικά χαμηλότερη κινητικότητα (~90kDa) από την αναμενόμενη (~40 kDa), γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.



**Εικ.4.15.** Ανοσοαποτύπωση εκχυλισμάτων ανασυνδυασμένης AtHESP με αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης Νοκτουρνίνης (αραίωση 1:00). Δεξιά της εικόνας παρατίθενται οι ζώνες του protein marker. Στην πρώτη διαδρομή έχουν ηλεκτροφορηθεί τα 2μg AtHESP, στην δεύτερη τα 20μg, στην τρίτη τα 100μg και στη τέταρτη τα 200μg AtHESP. Η πέμπτη διαδρομή αποτελεί κενό πηγαδάκι και στην έκτη έχουν ηλεκτροφορηθεί τα 6μg του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος (WCE) ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων Her2 που περιέχουν την Νοκτουρνίνη. Ο χρόνος διάρκειας της εμφάνισης είναι 5 λεπτά. Η θέση της AtHESP σημειώνεται με το βέλος.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο Στόχος της παρούσας πτυχιακής είναι να πάει ένα βήμα πιο μπροστά την έρευνα σχετικά με την ανασυνδυασμένη αποαδενυλάση AtHESP, της οποίας, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα επίπεδα έκφρασης ελέγχονται από τον κερκαδικό ρυθμό, καθώς και να επιβεβαιώσει ευρήματα μελετών που έχουν γίνει στο παρελθόν.

Απαραίτητη λοιπόν, αρχικά, υπήρξε η έκφραση και η απομόνωση της πρωτεΐνης σε όσο το δυνατό μεγαλύτερο βαθμό καθαρότητας, ενώ ταυτόχρονα η διατήρηση της λειτουργικότητάς της, προκειμένου η καθαρή αυτή πρωτεΐνη να χρησιμοποιηθεί για κρυσταλλογραφικές και κινητικές μελέτες στο άμεσο μέλλον. Η υπερέκφραση της πραγματοποιήθηκε σε καλλιέργεια κυττάρων *E.coli* BL21 DE3, που έφεραν τον πλασμιδιακό φορέα pET15b του ενθέματος της AtHESP. Στη συνέχεια με την βοήθεια της στήλης Ni-NTA-Sepharose διεξήχθη η απομόνωση και ταυτόχρονα ο καθαρισμός της AtHESP, όπου και δόθηκε μεγάλη σημασία. Προκειμένου να ληφθεί όσο το δυνατό πιο καθαρή πρωτεΐνη προστέθηκε δεύτερη στήλη Ni-NTA-Sepharose, καθώς δοκιμάστηκε και στήλη cellulose phosphate P11. Ωστόσο το αποτέλεσμα ήταν η απομόνωση μιας αρκετά καθαρής πρωτεΐνης αλλά σε χαμηλή ποσότητα. Αυτό συνέβη διότι απαραίτητα βήματα που λάμβαναν χώρα ανάμεσα στους δύο καθαρισμούς, όπως η διαπίδυση ή η χρήση στηλών συμπίκνωσης, οδηγούσαν στο να χάνεται μεγάλο μέρος της ποσότητας της AtHESP που απομονωνόταν από τον πρώτο καθαρισμό. Έπειτα η επανάληψη αυτών των βημάτων μετά τον δεύτερο καθαρισμό καθώς και ο ίδιος ο καθαρισμός οδηγούσε σε ακόμα μεγαλύτερη μείωση της ποσότητας της AtHESP, με αποτέλεσμα πολλές φορές να μην συλλέγεται καθόλου πρωτεΐνη. Για αυτό το λόγο καταργήσαμε το βήμα του επιπλέον καθαρισμού με δεύτερη στήλη και δώσαμε κυρίως προσοχή στην συγκέντρωση του ιμιδαζολίου των διαλυμάτων έκπλυσης και έκλουσης. Ο ρόλος του ιμιδαζολίου σε χαμηλή συγκέντρωση (διαλύματα έκπλυσης) είναι να αντικαταστήσει πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί στην ρητίνη της στήλης με ασθενείς δεσμούς, ενώ σε υψηλή συγκέντρωση (διάλυμα έκλουσης) να αντικαταστήσει την ίδια την AtHESP, η οποία έχει ισχυρή πρόσδεση στην ρητίνη λόγω των ιστιδίων που αλληλεπιδρούν με τα ιόντα Ni στη στήλη. Με αυτό τον τρόπο το μεγαλύτερο ποσοστό των άγνωστων πρωτεϊνών εκχυλίζονταν μαζί με τα διαλύματα έκπλυσης και η AtHESP συλλεγόταν μαζί με ελάχιστες ακόμα πρωτεΐνες με το διάλυμα έκλουσης. Αλλάζοντας την συγκέντρωση του ιμιδαζολίου στα διαλύματα έκπλυσης, προσπαθήσαμε να εκχυλίσουμε όσο το δυνατό περισσότερες άγνωστες πρωτεΐνες, ώστε να απομονωθεί η AtHESP στο μέγιστο δυνατό βαθμό καθαρότητας. Έτσι καταλήξαμε ότι οι βέλτιστες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου στα δύο ρυθμιστικά διαλύματα έκπλυσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 50 mM και 200 mM, ενώ στο διάλυμα έκλουσης αφήσαμε σταθερή την συγκέντρωση των 500mM. Επίσης παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη παρέμενε λειτουργική σε διάλυμα με pH 6-6,5 και περιεκτικότητα σε NaCl 500mM διαφορετικά η πρωτεΐνη καθίζανε, γεγονός που μπορεί να οδηγούσε σε απώλεια της ενεργότητας της. Μέρος από την ποσότητα που απομονώθηκε στάλθηκε στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών για προσπάθειες εύρεσης της δομής του ενζύμου με κρυσταλλογραφία. Ωστόσο οι μελέτες συνεχίζονται και είναι σαφές ότι πρέπει να σταλούν και άλλα δείγματα για την διεξαγωγή τους.

Μετά την απομόνωση ξεκίνησαν οι κινητικές μελέτες. Σε προηγούμενη πτυχιακή της αποφοίτου του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Αναστασίας Τοματσίδου είχε δειχθεί με φωτομετρικές μεθόδους η προτίμηση και η εξειδίκευση του ενζύμου να αποικοδομεί πολυ(A) έναντι πολυ(U), πολυ(C) και πολυ(G). Θέλαμε να δείξουμε και οπτικά με ανάλυση δοκιμασμένων μεθόδων ανάλυσης αντιδράσεων αποαδενυλίωσης σε

κατάλληλα πηκτώματα και χωρίς ραδιενεργά υποστρώματα, πως η AtHESP είναι μια αποαδενυλάση. Κατασκευάσαμε μετάγραφα *in vitro* με πολύ(A) ουρά με η χωρίς την 5' καλύπτρα καθώς και μετάγραφα όπου έφεραν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αδενοσινών στο εσωτερικό τους, χωρίς 5' καλύπτρα επίσης. Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις της AtHESP συγκρίνοντας παράλληλα και με αυτές της PARN με αυτά τα υποστρώματα. Οι εικόνες από τις ηλεκτροφορήσεις των αντιδράσεων αυτών είναι ενθαρρυντικές, χρειάζεται όμως να βελτιωθεί η διαδικασία, αλλάζοντας τις συνθήκες των αντιδράσεων και ελέγχοντας την ποιότητα των υποστρωμάτων.

Τέλος δείξαμε με την μέθοδο Western Blot ότι η AtHESP είναι ομόλογη της νοκτουρνίνης, μιας αποαδενυλάσης που υπάρχει στα θηλαστικά, μιας και το αντίσωμα της Νοκτουρνίνης αναγνωρίζει την ανασυνδυασμένη AtHESP.

Η εργασία αναμένεται να συμβάλει στην παραγωγή AtHESP ικανοποιητικής απόδοσης και εμπλουτισμού για χρήση σε δομικές μελέτες. Επίσης, η χρήση του τροποποιημένου πρωτοκόλλου αντιδράσεων αποαδενυλίωσης είναι ιδιαίτερης σημασίας για περαιτέρω μελέτες βιοχημικού χαρακτηρισμού του ενζύμου στο άμεσο μέλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ajay J.Y., Gajula P.K., Kalaimagal K., Vedha Hari B.N.; 2012. Chronopharmacognosy. Phcog Rev. 6:6-15.
- Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Más, P., and Kay, S.A.; 2001. Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. Science 293:880–883.
- Anderson J.S., Parker R.P.; 1998. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. EMBO J. 17(5):1497–1506.
- Badis G., Saveanu C., Fromont-Racine M. & Jacquier A. Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. (2004) Mol. Cell 15: 5–15.
- Baggs JE., Green CB. ; 2003. Current Biology 13: 189-198.
- Balatsos N.A., Nilsson P., Mazza C., Cusack S. & Virtanen A.; 2006. Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). J. Biol. Chem. 281: 4517–4522.
- Balatsos NA, Anastasakis D, Stathopoulos C.; 2009. Inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by purine nucleotides: kinetic analysis. J. Enzyme Inhib. Med. 24(2):516-23.
- Balatsos NA, Vlachakis D, Maragozidis P, Manta S, Anastasakis D, Kyritsis A, Vlassi M, Komiotis D, Stathopoulos C.; 2009. Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides. Biochemistry. 48(26):6044-51.
- Barak S, Tobin EM, Andronis C, Sugano S, Green RM.; 2000. All in good time: The *Arabidopsis* circadian clock. Trends Plant Sci. 5:517-22.
- Beelman C.A., Stevens A., Caponigro G., LaGrandeur T.E., Hatfield L., Fortner D.M., Parker R.; 1996. An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. Nature 382(6592):642–646.
- Belostotsky D.A., Sieburth L.E.; 2009. Kill the messenger: mRNA decay and plant development. Current Opinion in Plant Biology 12: 96-102.
- Berthet C. et al.; 2004. CCR4-associated factor CAF1 is an essential factor for spermatogenesis. Mol. Cell Biol. 24: 5808–5820.
- Bogdan J.A.; 1998. Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG1. Biochem. J. 336: 471–481.
- Bonisch C., Temme C., Moritz B. & Wahle E.; 2007. Degradation of hsp70 and other mRNAs in *Drosophila* via the 5'-3' pathway and its regulation by heat shock. J. Biol. Chem. 282: 21818–21828.
- Borthwick H.A., Hendricks S.B., Parker M.W., Toole E.H., Toole V.K.; 1952. A reversible photoreaction controlling seed germination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38:662–666.
- Cao D., Parker R.; 2003. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. Cell 113(4):533–545.
- Chen C.Y., Gherzi R., Ong S.E., Chan E.L., Raijmakers R., Pruijn G.J., Stoecklin G., Moroni C., Mann M., Karin M.; 2001. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. Cell 107(4):451–464.
- Chen J., Chiang Y.C., Denis C.L.; 2002. CCR4, a 3'–5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic

- deadenylase. *EMBO J.* 21(6):1414–1426.
- Chen C.Y. & Shyu, A.B.; 2003. Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway. *Mol. Cell Biol.* 23: 4805–4813.
- Chiba Y. et al.; 2004. AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in *Arabidopsis*. *Gene.* 328: 95–102.
- Christie J.M. and Briggs W.R.; 2001. Blue light sensing in higher plants. *J. Biol. Chem.* 276:11457–11460.
- Clough R.C. and Vierstra, R.D.; 1997. Phytochrome degradation. *Plant Cell Environ.* 20: 713–721.
- Conrad N.K., Shu M.D., Uyhazi K.E. & Steitz J.A.; 2007. Mutational analysis of a viral RNA element that counteracts rapid RNA decay by interaction with the polyadenylate tail. *Proc. Natl Acad. Sci.* 104: 10412–10417.
- Conti E. & Izaurralde E.; 2005. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 316–325.
- Cuin T.-A.; 2007. Rhythms in Plants: Phenomenology, Mechanisms, and Adaptive Significance. Molecular aspects of the *Arabidopsis* circadian clock. Mancuso S, Shabala S, editors. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Deni C. L. and Chen J.; 2003. The CCR4–NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Prog. Nucleic Acid Res.* 73: 221–250.
- Devlin P.F.; 2002. Signs of time: environmental input to the circadian clock. *Journal of Experimental Botany*; 53:1535–1550.
- Dlatic M.; 2000. Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg<sup>2+</sup>-dependent endonucleases. *Trends Biochem. Sci.* 25: 272–273.
- Dodd, A.N., Salathia, N., Hall, A., Kevei, E., Toth, R., Nagy, F., Hibberd, J.M., Millar, A.J., and Webb, A.A.R.; 2005 (a). Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 309, 630–633.
- Doma M.K., Parker R.; 2006. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440 (7083):561–564.
- Douris N., Green C.B. ; 2008. *Annals of Medicine* 40: 622–626.
- Dunckley T., Parker R.; 1999. The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.* 18(19):5411–5422
- Dupressoir A. et al.; 2001. Identification of four families of yCCR4- and Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. *BMC Genomics* 2:9.
- Elliott R.C., Dickey L.F., White M.J., Thompson W.F.; 1989. cis-Acting elements for light regulation of pea ferredoxin I gene expression are located within transcribed sequences. *Plant Cell* 1(7):691–698.
- Engelmann W.; 2007. How plants identify the season by using a circadian clock. Rhythms in plant. Mancuso S, Shabala S, editors. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag p. 182–94.
- Eulalio A., Behm-Ansmant I. & Izaurralde E.; 2007. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Mol. Biol. Cell.* 8: 9–22.
- Ezzeddine N. et al.; 2007. Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a PABP-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. *RNA.* 27:1084–1091.
- Faber A. W., Van Dijk M., Raue H. A. & Vos J.C.; 2002. Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the

- final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. 8: 1095–1101.
- Folta, K.M.; 2004. Green light increases early stem elongation rate, antagonizing light-mediated growth inhibition. *Plant Physiol.* 135: 1407-1416.
- Frischmeyer P.A., van Hoof A., O'Donnell K., Guerrerio A.L., Parker R., Dietz H.C.; 2002. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295(5563):2258–2261.
- Funakoshi Y. et al.; 2007. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev.* 21: 3135–3148.
- Gardner M.J., Hubbard K.E., Hotta C.T., Dodd A.N., Webb A.A.R.; 2006. How plants tell the time. *Biochem. J.* 397:15-24.
- Garneau N. L., Wilusz J. & Wilusz C. J.; 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 113–126.
- Goldstrohm A.C., Wickens M.; 2008. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 337–344.
- Goldstrohm A.C., Hook B.A., Seay D.J. and Wickens, M.; 2006. PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. *Nature Struct. Mol. Biol.* 13: 533–539.
- Gowrishankar G. et al.; 2006. Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by different types of cell stress. *Biol. Chem.* 387: 323–327.
- Green C.B. & Besharse, J.C.; 1996. Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin. *Proc. Natl Acad. Sci.* 93: 14884–14888.
- Green C.B. ; 2003. *Journal of Neuroendocrinology* 15: 350-354.
- Green C.B. et al.; 2007. Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity. *Proc. Natl Acad. Sci.* 104: 9888–9893.
- Harmer S.L., Hogenesch L.B., Straume M., Chang H.S., Han B., Zhu T., Wang X., Kreps J.A., Kay S.A.; 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290:2110-2113.
- Harmer S.L., Panda S., Kay S.A.; 2001. Molecular bases of circadian rhythms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:215-253.
- Harmer S.L.; 2009. The circadian system in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 60:357-377.
- Heim M.A., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B., Bailey P.C.; 2003. The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* 20:735–747.
- Hook B.A., Goldstrohm, A.C., Seay, D. J. & Wickens, M.; 2007. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.* 282: 15430–15438.
- Imaizumi T., Tran H.G., Swartz T.E., Briggs W.R., Kay S.A.; 2003. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 426:302-306.
- James, M. R., S. J. Lane, and S. B. Corder ; 2008. Modelling the rapid near- surface expansion of gas slugs in low viscosity magmas, in *Fluid Motion in Volcanic Conduits: A Source of Seismic and Acoustic Signals*, edited by S. J. Lane and J. S. Gilbert, *Geol. Soc. Spec. Publ.* 307:147–167.
- Johnson CH.; 2001. Endogenous timekeepers in photosynthetic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* 63:695-728.
- Kadyrova L.Y., Habara, Y., Lee, T.H. & Wharton, R.P.; 2007. Translational control of maternal Cyclin B mRNA

- by Nanos in the *Drosophila* germline. *Development*. 134: 1519–1527.
- Kieron D. Edwards, Paul E. Anderson, Anthony Hall, Neeraj S. Salathia, James C.W. Locke, James R. Lynn, Martin Straume, James Q. Smith, and Andrew J. Millar; 2006. FLOWERING LOCUS C Mediates Natural Variation in the High-Temperature Response of the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant Cell* 18:639–650.
- Kim J.H. and Richter J.D.; 2006. Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Mol. Cell*. 24: 173–183.
- Korner C. et al.; 1998. The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J*. 17: 5427–5437.
- LaGrandeur T.E., Parker R.; 1998. Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *EMBO J*. 17(5):1487–1496.
- Lakin -Thomas P.L.; 2000. Circadian rhythms: new functions for old genes? *Trends Genet*. 16:135-142.
- Lee H.H., Kim Y.S., Kim K.H., Heo I., Kim S.K., Kim O., Kim H.K., Yoon J.Y., Kim H.S., Kim do J., Lee S.J., Yoon H.J., Kim S.J., Lee B.G., Song H.K., Kim V.N., Park C.M., Suh S.W.; 2007. Structural and functional insights into Dom34, a key component of no-go mRNA decay. *Mol. Cell* 27(6):938–950.
- Lejeune F., Li, X. & Maquat, L. E.; 2003. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell*. 12: 675–687
- Liu H., Rodgers N.D., Jiao X., Kiledjian M.; 2002. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J*. 21(17):4699–4708.
- Martínez-García J.F., Huq E., Quail P.H.; 2000. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288:859–863.
- McClung C.R., Salomé P.A., Michael T.P.; 2002. The Arabidopsis circadian system. In the Arabidopsis Book (Sommerville C.R. and Meyerowitz E.M. eds.) American Society of Plant Biologists Rockville doi: 10.1199/tab.0044
- McClung CR.; 2006. Plant Circadian Rhythms. *Plant Cell* 18:792-803.
- Michael, T.P., and McClung, C.R. ; 2002. Phase-specific circadian clock regulatory elements in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*. 130:627–638.
- Millar A.J.; 2004. Input signals to circadian clock. *J. Exp. Bot.* 55:277-283.
- Mitchell P., Tollervey D.; 2003. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* 11(5):1405–1413.
- Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H.-R., Carré, I.A., and Coupland, G.; 2002. LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in Arabidopsis. *Dev. Cell* 2, 629–641.
- Molin L. & Puisieux A.; 2005. C. elegans homologue of the Caf1 gene, which encodes a subunit of the CCR4–NOT complex, is essential for embryonic and larval development and for meiotic progression. *Gene*. 358: 73–81.
- More A.P. et al.; 2003. BTG2 antiproliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing in vivo in three cell cycle regulated forms. *J. Cell Sci*. 116: 2929–2936.
- Morita M. et al.; 2007. Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1



- mRNA level and impairs cell growth. *Mol. Cell Biol.* 27: 4980–4990.
- Morris J.Z., Hong A., Lilly M.A. & Lehmann R.; 2005. Twin, a CCR4 homolog, regulates cyclin poly(A) tail length to permit *Drosophila* oogenesis. *Development.* 132: 1165–1174.
- Muhlrad D., Parker R.; 1994. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370(6490):578–581.
- Muhlrad D. & Parker R.; 2005. The yeast EDC1 mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p. *EMBO J.* 24: 1033–1045.
- Mukherjee D., Gao M., O'Connor J.P., Rajmakers R., Pruijn G., Lutz C.S., Wilusz J.; 2002. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 21(1–2):165–174.
- Nagatini A.; 2000. Lighting up the nucleus. *Science* 288:821–822.
- Nakamura T. et al.; 2004. Oligoastheno-teratozoospermia in mice lacking CNOT7, a regulator of retinoid X receptor *β*. *Nature Genet.* 36: 528–533.
- Pittendrigh C.S.; 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55:17–54.
- Prevo D. et al.; 2001. Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: involvement in estrogen receptor alpha signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 9640–9648.
- Pruneda-Paz, J.L., Breton, G., Para, A., Kay, S.A.; 2009. A functional genomics approach reveals CHE as a novel component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 323:1481–1485.
- Quail P.H.; 1997. An emerging molecular map of the photochromes. *Plant Cell. Environ.* 20:657–666.
- Quail P.H.; 2002. Photosensory perception and signalling in plants cell: news paradigms? *Curr. Opin Cell Biol.* 14:180–188.
- Reverdatto S.V., Dutko, J.A., Chekanova, J.A., Hamilton, D.A. & Belostotsky, D.A.; 2004. mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *RNA.* 10: 1200–1214.
- Roenneberg T. And Merrow M.; 1998. Molecular circadian oscillators: an alternative hypothesis. *J. Biol. Rhythms* 13:198–207.
- Schaffer R., Ramsay N., Samach A., Corden S., Putterill J., Carré I.A., and Coupland G.; 1998. The late elongate hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93:1219–29.
- Schaffer R., Landgraf J., Accerbi M., Simon V., Larson M., Wisman E.; 2001. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:113–123.
- Sharrock R.A. and Quail P.H.; 1989. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev* 3:1745–1757.
- Sommer D.E.; 2005. Entrainment of the circadian clock. In: Hall AJW, McWitter HG, editors. *Endogenous plant rhythms.* Blackwell Oxford pp:85–106.
- Strayer C., Oyama T., Schultz T.F., Raman R., Somers D.E., Más P., Panda S., Kreps J.A., Kay S.A.; 2000. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 289:768–771.
- Takahashi S., Araki Y., Sakuno T., Katada T.; 2003. Interaction between Ski7p and Upf1p is required for

- nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 22(15):3951–3959.
- Tessema M., Willink R., Do K., Yu Y.Y., Yu W., Machida E.O., Brock M., Van Neste L., Stidley C.A., Baylin S.B. & Belinsky S.A.; 2008. Promoter methylation of genes in and around the candidate lung cancer susceptibility locus 6q23-25. *Cancer Res.* 68: 1707-14.
- Toledo-Ortiz G., Huq E., Quail P.H.; 2003. The Arabidopsis basic/helix–loop–helix transcription factor family. *Plant Cell* 15: 1749–1770.
- Tucker M., Valencia-Sanchez M.A., Staples R.R., Chen J., Denis C.L., Parker R.; 2001. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104(3):377–386.
- Tucker M., Staples R.R., Valencia-Sanchez M.A., Muhrad D., Parker R.; 2002. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21(6):1427–1436.
- van Hoof A., Frischmeyer P.A., Dietz H.C., Parker R.; 2002. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295(5563):2262–2264.
- Voeltz G.K., Ongkasuwan J., Standart N. & Steitz J.; 2001. A novel embryonic poly(A) binding protein, ePAB, regulates mRNA deadenylation in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev.* 15: 774–788.
- Wagner E., Clement S.L. and Lykke-Andersen J.; 2007. An unconventional human CCR4–CAF1 deadenylase complex in nuclear cajal bodies. *Mol. Cell Biol.* 27: 1686–1695.
- Wang Z.Y. and Tobin E.M.; 1998. Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93:1207-1217.
- Wang Z., Kiledjian M.; 2001. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107(6):751–762J.
- Plant Biol. (2009) 52:114–124.
- Washio-Oikawa K. et al.; 2007. Cnot7-null mice exhibit high bone mass phenotype and modulation of BMP actions. *J. Bone Miner. Res.* 22: 1217–1223.
- Webb A.A.R.; 1998. Stomatal rhythms in biological rhythms and photoperiodism in plants. Lumsden P.J. and Millar A.J. eds pp. 69-67, Bios Scientific Publications, Oxford.
- Webb A.A.R.; 2003. The physiology of circadian rhythms in plants. *New Phytol.* 160:281-303.
- Whitelam G.C. and Devlin P.F.; 1998. Light signalling in Arabidopsis. *Plant Physiol. Biochem.* 36:125-133.
- Yanovsky, M. J. and Kay, S. A.; 2003. Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:265-275.
- Yamashita A. et al.; 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nature Struct. Mol. Biol.* 12: 1054–1063.
- Yukako Chiba and Pamela J. Green; 2009. mRNA Degradation Machinery in Plants.
- Zaessinger S., Busseau I. & Simonelig M.; 2006. Oskar allows nanos mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. *Development.* 133: 4573–4583.
- Zuo Y. & Deutscher, M.P.; 2001. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.* 29: 1017–1026.