



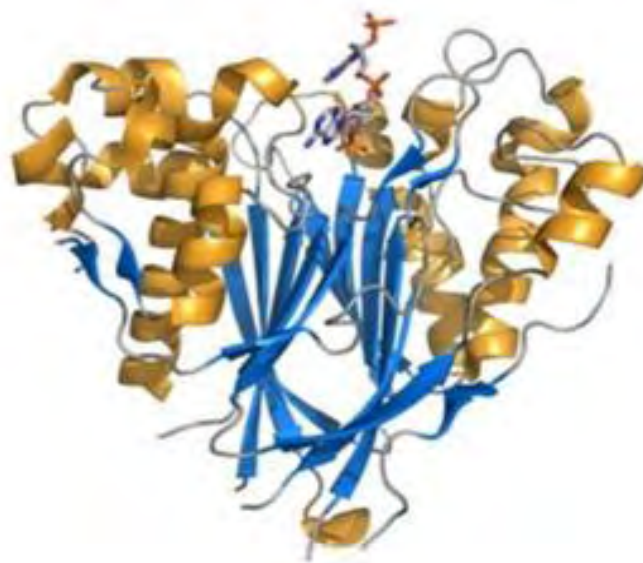
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

Κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου της
Ανθρώπινης Angel 2



ΜΑΡΟΥΣΩ ΑΛΙΠΡΑΝΤΗ

Λάρισα 2017



UNIVERSITY *of* THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES



FACULTY OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

Diploma thesis

Cloning and expression of the Human Angel 2 gene



MAROUSSO ALIPRANTI

Larissa 2017

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Επικ. Καθηγητή Βιοχημείας Δρ. Μπαλατσού Νικόλαου.

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
2. Λεωνίδας Δημήτριος, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
3. Κοντού Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα εργασία καθώς επίσης και για τις γνώσεις και τις εμπειρίες που μου μετέδωσε και το χρόνο που διέθεσε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λεωνίδα Δημήτριο και την κ. Κοντού Μαρία, που αποτελούν μέλη της τριμελούς επιτροπής για τη συμβολή τους στη διεξαγωγή της διπλωματικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Ρ. Μπέτα και Θ. Κυρίτση για τη αμέριστη βοήθεια τους, τη σημαντική συμβολή τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων και για την άψογη συνεργασία μας καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου και στον σύντροφό μου που βρίσκονται δίπλα μου και με στηρίζουν συνεχώς ηθικά και πνευματικά.

Τέλος, η παρούσα εργασία αφιερώνεται στον ξάδερφο μου Νικόλα και στον αδερφικό μου φίλο Νίκο, όπου τους ευχαριστώ που συνέβαλαν στην εκπλήρωση του στόχου μου.

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι συν-μεταγραφικοί μηχανισμοί ρυθμίζουν την σταθερότητα του mRNA και συμβάλλουν στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Η απαδενυλίωση είναι στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και καταστολής της μετάφρασης του mRNA, γεγονός που την καθιστά ως το κυριότερο σημείο ελέγχου για τις δύο αυτές διαδικασίες. Οι απαδενυλάσες είναι μία συντηρημένη κατηγορία ενζύμων μέσω των οποίων γίνεται η βράχυνση των πολύ(A) ουρών των ευκαρυωτικών mRNAs και οι βιοχημικές τους δραστηριότητες έχουν κατά βάση μελετηθεί στο πλαίσιο των μονοκύτταρων οργανισμών. Λίγα είναι γνωστά σχετικά με τον βιολογικό ρόλο των απαδενυλασών στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Τουλάχιστον εννέα απαδενυλάσες έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο. Η ANGEL2 είναι μια απαδενυλάση η οποία ανήκει στην υπερικογένεια των EEP απαδενυλασών, η οποία δεν έχει μελετηθεί και ο ρόλος της *in vivo* και *in vitro* είναι διφορούμενος. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε προσπάθεια εντοπισμού της ANGEL2 σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών και η κλωνοποίηση του γονιδίου της σε φορέα κλωνοποίησης ώστε να ακολουθήσει η έκφραση του γονιδίου.

II. ABSTRACT

Co-transcriptional mechanisms modulate mRNA stability and contribute to the control of gene expression. Deadenylation is the rate-limiting step for mRNA decay and translational silencing, making it an ideal control point for both processes. Deadenylases are a conserved class of enzymes that facilitate poly(A) tail removal, and their biochemical activities have been mainly studied in the context of single-cell systems. Little is known about the different deadenylases and their biological role in multicellular organisms. At least 9 deadenylases have been recognized in humans. ANGEL2 is a deadenylase belonging in the EEP superfamily of deadenylases and its role is poorly understood since it has not been studied in the past, leading to its role *in vivo* and *in vitro* to be ambiguous. In this study, we aimed at identifying ANGEL 2 in mammal cell lines and subsequent cloning, followed by expression attempts.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
II. ABSTRACT	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
1.1 Επεξεργασία του mRNA	9
1.2 Ωρίμανση του mRNA	9
1.2.1 Κυριότερα στάδια της ωρίμανσης του mRNA	9
1.3 Αποικοδόμηση του mRNA	16
1.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποικοδόμηση του mRNA.....	19
1.4 Απαδενυλίωση.....	20
1.4.1 Απαδενυλάσες.....	21
1.4.2 Τρόπος δράσης των απαδενυλασών	22
1.4.3 Βιολογικές λειτουργίες των απαδενυλασών	23
1.5 Η ανθρώπινη απαδενυλίωση Angel 2 (Ccr4d)	24
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	26
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
3.1 Υλικά.....	27
3.1.1 Αντιδραστήρια	27
3.1.2 Βακτηριακά στελέχη.....	27
3.1.3 Δείκτες μοριακών βαρών	27
3.1.4 Kit	28
3.1.5 Διαλύματα.....	28
3.1.6 Πλασμιδιακός Φορέας pET-33b(+)	29
3.2 Μέθοδοι.....	30
3.2.1 Κλωνοποίηση βάσει πρωτοκόλλου Infusion HD Cloning.....	30

3.2.2	Χημικός μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων XL1Blue, BL21 Gold και Rosetta 2 με τον πλασμιδιακό φορέα pET-33b(+) - ANGEL 2.....	37
3.2.3	Δημιουργία υγρών καλλιιεργειών X11Blue για απομόνωση πλασμιδίου	38
3.2.4	Υπερέκφραση πρωτεΐνης από μετασχηματισμένα βακτήρια.....	38
3.2.5	Λύση βακτηριακών κυττάρων	40
3.2.6	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	40
3.2.7	Χρώση πηκτώματος ακρυλαμιδίου με Coomassie 0.05%.....	42
3.2.8	Καθορισμός συνθηκών υπερέκφρασης πρωτεΐνης με σφαιρίδια αгарόζης Ni ²⁺ (IDA)/Protino	43
3.2.9	Απομόνωση σε Ni-NTA Agarose (beads)	43
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
4.1	Κλωνοποίηση της ANGEL2	45
4.2	Δοκιμασία υπερέκφρασης της ANGEL2	47
4.2.1	Ομοπαράθεση του cDNA της ANGEL2 με τον αλγόριθμό BLASTn... ..	48
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Επεξεργασία του mRNA

Αν και η μεταγραφή είναι το πρώτο και το πιο περίπλοκο ρυθμιζόμενο βήμα γονιδιακής έκφρασης, συνήθως αποτελεί μόνο την αρχή μιας σειράς γεγονότων που χρειάζεται να εκτελεστούν προκειμένου να παραχθεί λειτουργικό RNA. Τα περισσότερα νεοσύστατα RNA πρέπει να υποστούν διάφορες τροποποιήσεις, προκειμένου να καταστούν λειτουργικά. Εξαιρέση στον κανόνα αυτό αποτελούν τα βακτηριακά mRNAs, τα οποία αρχίζουν να χρησιμοποιούνται ως μήτρα για την σύνθεση των πρωτεϊνών πριν ακόμα ολοκληρωθεί η σύνθεση τους από την RNA πολυμεράση. Ωστόσο, τόσο στα προκαρυωτικά όσο και στα ευκαρυωτικά κύτταρα τα πρωτογενή μετάγραφα των rRNAs και των tRNAs πρέπει να υποστούν διαφόρων τύπων επεξεργασίας πριν καταστούν λειτουργικά. Ομοίως, και τα πρωτογενή μετάγραφα των ευκαρυωτικών mRNAs, πριν εξαχθούν από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου θα χρησιμοποιηθούν ως μήτρα για τη σύνθεση πρωτεϊνών, πρέπει να υποστούν εκτεταμένες τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της απομάκρυνσης των ιντρονίων μέσω του ματίσματος. Ο έλεγχος των διαφόρων σταδίων επεξεργασίας του RNA αποτελεί ένα επιπλέον επίπεδο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Η γονιδιακή έκφραση μπορεί επίσης να ρυθμιστεί μέσω του καθορισμού του ρυθμού με τον οποίο αποικοδομείται ένα mRNA μέσα στο κύτταρο. (1)

1.2 Ωρίμανση του mRNA

1.2.1 Κυριότερα στάδια της ωρίμανσης του mRNA

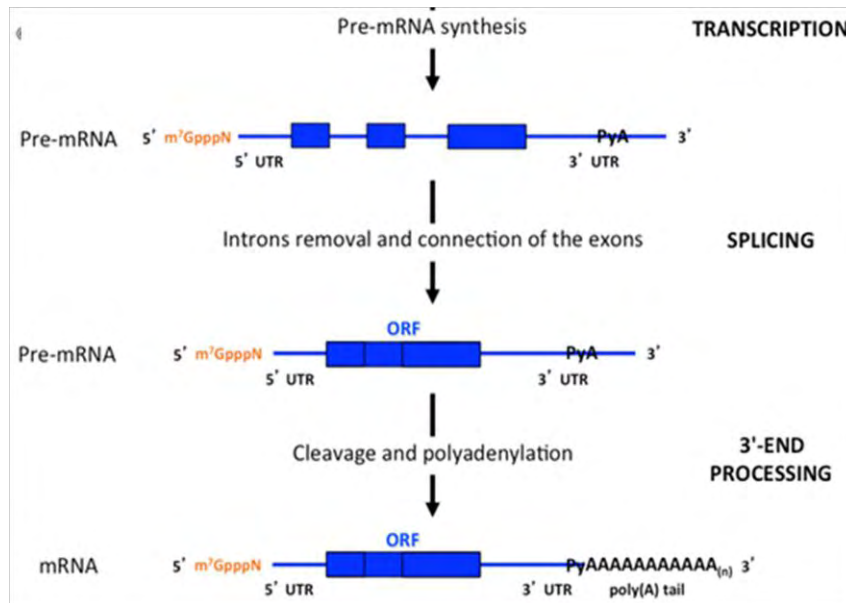
Ο μηχανισμός της μεταγραφής του DNA σε RNA είναι ο ίδιος σε όλους τους οργανισμούς. Ωστόσο, το βακτηριακό DNA είναι άμεσα εκτεθειμένο στο κυτταρόπλασμα, το οποίο περιέχει τα ριβοσώματα πάνω στα οποία επιτελείται η σύνθεση των πρωτεϊνών. Καθώς διεξάγεται η μεταγραφή των μορίων του mRNA, τα ριβοσώματα προσκολλώνται αμέσως στο ελεύθερο 5' άκρο του mRNA μεταγράφου και αρχίζει η πρωτεϊνοσύνθεση (2). Στα προκαρυωτικά κύτταρα το mRNA είναι πολυκιστρονικό, κατά συνέπεια δεν τροποποιείται μετά τη μεταγραφή. Είναι άμεσα

λειτουργικό μετά τη σύνθεση του, και η μετάφραση του συχνά ξεκινά πριν η μεταγραφή ολοκληρωθεί.

Αντίθετα, στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το mRNA συντίθεται στον πυρήνα και πρέπει πρώτα να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα πριν χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η μεταγραφή ξεκινάει με τη δημιουργία ενός μεταγράφου με 5' τριφωσφορικό άκρο. Ωστόσο, το 3' άκρο δημιουργείται αποκόπτοντας ένα τμήμα του μεταγράφου και όχι τερματίζοντας τη μεταγραφή σε μια προκαθορισμένη θέση (2). Πριν από την έξοδο από τον πυρήνα, το αρχικό προϊόν της μεταγραφής στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το πρόδρομο mRNA, (pre-mRNA, precursor mRNA), υποβάλλεται σε αρκετά διαφορετικά στάδια επεξεργασίας (μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις). Τα διάφορα mRNAs πρέπει να εξέλθουν έχοντας αποκτήσει χαρακτηριστικά που θα τα καθιστούν λειτουργικά στο κυτταρόπλασμα, όπου επιτελείται η μετάφραση. Τα κύριο όμως χαρακτηριστικό είναι η ρυθμιζόμενη σταθερότητα που καθορίζει τη γονιδιακή ρύθμιση (3).

Οι τροποποιήσεις αυτές είναι: *Στάδιο I*: η προσθήκη της 5' καλύπτρας (capping), *Στάδιο II*: το μάτισμα (splicing) και *Στάδιο III*: η προσθήκη poly(A) ουράς στο 3' άκρο (πολυαδενυλίωση)(*Εικόνα 1*).

Οι διαδικασίες αυτές δεν συμβαίνουν ανεξάρτητα, αλλά είναι στενά συνδεδεμένες με τη διαδικασία της μεταγραφής. Επομένως, η σύνθεση και η κατεργασία του mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αποτελούν δύο στενά συνδεδεμένα στάδια της γονιδιακής έκφρασης. Η καρβοξυτελική επικράτεια της RNA πολυμεράσης II (CTD) έχει καθοριστικό ρόλο στον συντονισμό των παραπάνω τροποποιήσεων, λειτουργώντας ως θέση πρόσδεσης ενζυμικών συμπλόκων τα οποία ενέχονται στην κατεργασία του mRNA. Η εξειδίκευση αυτών των ενζύμων στην κατεργασία του mRNA οφείλεται ακριβώς στην σύνδεσή τους με τη CTD της RNA πολυμεράσης II. Καθώς οι πολυμεράσες I και III του RNA δεν διαθέτουν μια ανάλογη CTD, τα μετάγραφα τους δεν αποτελούν στόχους των ίδιων ενζυμικών συμπλόκων. (1)



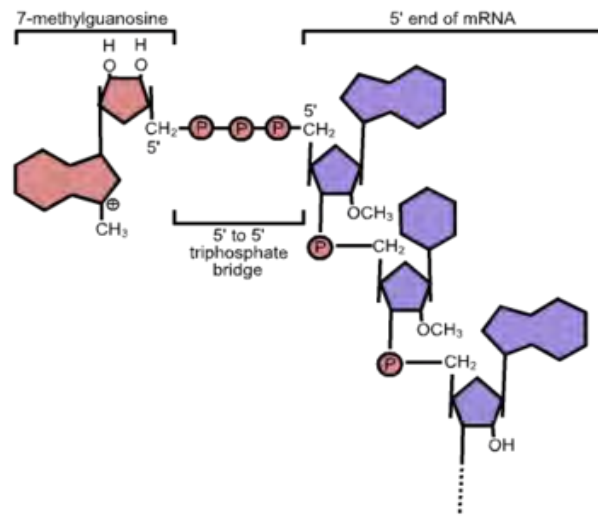
Εικόνα 1. Επεξεργασία του ευκαρυωτικού αγγελιοφόρου RNA. Η επεξεργασία του mRNA περιλαμβάνει την τροποποίηση του 5' άκρου του μέσω της προσθήκης μιας καλύπτρας 7-μεθυλογουανοσίνης, το μάτισμα (splicing) και την προσθήκη poly(A)- ουράς στο 3' άκρο (πολυαδενοιλώση) (4).

Στάδιο I: Ο σχηματισμός της καλύπτρας του RNA περιλαμβάνει μια τροποποίηση του 5' άκρου του mRNA μεταγράφου, δηλαδή του άκρου που συντίθεται πρώτο κατά τη διάρκεια της μεταγραφής. Το 5' άκρο καλύπτεται με την προσθήκη ενός ασυνήθιστου νουκλεοτιδίου, ένα νουκλεοτίδιο γουανίνης (G) το οποίο περιέχει μια μεθυλομάδα. Το ένζυμο που ευθύνεται για αυτή την τροποποίηση ονομάζεται 7-μεθυλο-τρανσφεράση της γουανίνης. Συνεπώς, ο σχηματισμός της καλύπτρας είναι μια ανεστραμμένη 7-μεθυλογουανοσίνη που προσδένεται μέσω μιας τριφωσφορικής γέφυρας (5'-5' τριφωσφορικός δεσμός) στο πρώτο νουκλεοτίδιο του mRNA (5). Έτσι εμφανίζεται και ένα “νοητικό παράδοξο” στα καλυμμένα mRNA, δηλαδή να έχουν δηλαδή 3'-OH και στα δύο άκρα (**Εικόνα 2**). Στην προσθήκη αυτή συμμετέχουν και άλλα δύο ένζυμα, μια φωσφατάση, και μία μεθύλαση. Ο σχηματισμός της καλύπτρας γίνεται αμέσως, μόλις η RNA πολυμεράση συνθέσει περίπου 25 νουκλεοτίδια RNA, πολύ προτού ολοκληρώσει τη μεταγραφή του γονιδίου. Τρία είδη καλύμματος διακρίνουμε, που εξαρτώνται απ' την παρουσία ή όχι μεθυλομάδων στα δύο καθοδικά νουκλεοτίδια της έναρξης, δηλαδή ανάλογα με το πλήθος μεθυλιώσεων που φέρουν (**Εικόνα 2**):

- Κάλυμμα 0, προκύπτει όταν δεν υπάρχει επιπρόσθετη μεθυλίωση καθοδικά.
- Κάλυμμα 1, προκύπτει όταν το πρώτο σάκχαρο ριβόζης καθοδικά είναι μεθυλιωμένο.

γ) Κάλυμμα 2, προκύπτει όταν και τα δύο σάκχαρα ριβόζης καθοδικά είναι μεθυλιωμένα.

Η καλύπτρα τοποθετείται για να εξυπηρετήσει δύο λειτουργίες: Πρώτον, τα mRNAs με καλύπτρα μεταφράζονται πιο αποδοτικά διότι αναγνωρίζονται από το ριβόσωμα για το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης. Δεύτερον η καλύπτρα σταθεροποιεί τα mRNAs, προστατεύοντάς τα από ριβονουκλεάσες που δρουν στο 5' άκρο (5' νουκλεάσες και φωσφατάσες). Κατά συνέπεια, η καλύπτρα φαίνεται να εμπλέκεται τόσο στην πολυαδενυλίωση του mRNA, όσο στην έξοδο του από τον πυρήνα, καθώς και στη σταθερότητα του mRNA και στην αναγνώριση του από το ριβόσωμα. Επιπλέον, η καλύπτρα βοηθά στην αποκοπή και στην απομάκρυνση των ιντρονίων (6).



Εικόνα 2. Σχηματισμός 5' καλύπτρας. Η 5' καλύπτρα σχηματίζεται με την προσθήκη στο 5' άκρο του mRNA ενός GTP σε αντίστροφο προσανατολισμό, σχηματίζοντας έναν δεσμό 5' - 5'. Το πρόσθετο G μεθυλιώνεται στη θέση N-7 και μεθυλομάδες προστίθενται επίσης στις ριβόζες του ενός ή των δύο πρώτων νουκλεοτιδίων του mRNA. (1).

Στάδιο II: Η διαδικασία του ματίσματος περιλαμβάνει την αποκοπή των ιντρονίων και συρραφή των εξονίων, με στόχο να παραμείνει στο μετάγραφο το κωδικό τμήμα του γονιδίου, το οποίο είναι συμπληρωματικό με το πολυπεπτιδικό προϊόν (5). Η διαδικασία αυτή καταλύεται από μικρά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (small nuclear ribonucleoprotein, snRNPs), δηλαδή ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών και RNA, γνωστό ως σωματίδιο συρραφής (spliceosome). Σε κάθε ιντρόνιο, μια ομάδα snRNPs συναθροίζεται πάνω στο RNA, αποκόπτει το ιντρόνιο, επανασυνδέει την

αλυσίδα του RNA και απελευθερώνει το κομμένο ιντρόνιο υπό μορφή μιας θηλιάς. Ένας ρόλος των snRNPs είναι να αναγνωρίζουν τις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων που σημαδεύουν την αρχή και το σημείο διακλάδωσης κάθε ιντρονίου και να ζευγαρώνουν μαζί τους σύμφωνα με τους κανόνες της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Με τον τρόπο αυτό τα snRNPs φέρνουν τα δύο άκρα του ιντρονίου κοντά το ένα στο άλλο έτσι ώστε να συμβεί η συρραφή. Μολονότι τα snRNPs κατέχουν κεντρική θέση στην αντίδραση της συρραφής, εντούτοις για την πραγματοποίηση της απαιτούνται επιπρόσθετες πρωτεΐνες.

Στάδιο III: Η πολυαδενυλίωση παρέχει στα περισσότερα νεοσυντιθέμενα mRNAs μετάγραφα μια εξειδικευμένη δομή στο 3' άκρο και είναι το τελευταίο στάδιο στην συν-μεταγραφική επεξεργασία του mRNA. Στα βακτήρια, το 3' άκρο ενός mRNA είναι απλώς το τέλος της αλυσίδας που έχει συντεθεί από την RNA πολυμεράση. Αντίθετα, στους ευκαρυώτες, το 3' άκρο του mRNA παράγεται με αποκοπή και πολυαδενυλίωση. Συγκεκριμένα, τα 3' άκρα των RNA μεταγράφων βραχύνονται από ένα σύμπλοκο ενζύμων που κόβει την αλυσίδα του RNA σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Το σύμπλοκο αυτό είναι μια ενδονουκλεάση που αποτελείται από τους παράγοντες CFI και CFII (Cleavage Factor I και II, παράγοντες αποκοπής I και II) (3). Στη συνέχεια η αλυσίδα ολοκληρώνεται από ένα δεύτερο σύμπλοκο ενζύμων, το οποίο προσθέτει στο κομμένο άκρο μια σειρά διαδοχικών (250-300) νουκλεοτιδίων αδενίνης (A), ή αλλιώς, μια ουρά πολύ-(A) (2).

Συγκεκριμένα, η RNA πολυμεράση II μεταγράφει πέρα από την θέση που αντιστοιχεί στο 3' άκρο, 1500 ακόμη νουκλεοτίδια και κάποιες αλληλουχίες στο RNA αναγνωρίζονται ως στόχοι για ενδονουκλεοτιδική πέψη (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**). Πριν το τέλος της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την πολυπεπτιδική αλυσίδα μεταγράφεται η αλληλουχία AAUAAA. Η αλληλουχία AAUAAA αποτελεί σήμα για την προσθήκη της poly (A) ουράς και βρίσκεται 10-30 περίπου νουκλεοτίδια ανοδικά της τελικής θέσης της πολυαδενυλίωσης στους ανώτερους ευκαρυώτες. Το σήμα αυτό αναγνωρίζεται από ένα ειδικό πρωτεϊνικό παράγοντα CPSF. Επίσης, στο σημείο αυτό προσδένονται και άλλοι πρωτεϊνικοί παράγοντες (2) (3).

Η αλληλουχία πολύ (A) δεν κωδικοποιείται στο DNA, αλλά προστίθεται στο RNA, μέσα στον πυρήνα, μετά τη μεταγραφή. Το σύμπλοκο που αναλαμβάνει την

πολυαδενυλίωση είναι μια πολυ(A) πολυμεράση (PAP, Poly(A) Polymerase), για να συνθέσει την ουρά πολυ(A), προσθέτοντας κατάλοιπα A στο ελεύθερο 3'-OH άκρο του mRNA. Όμως, το 5' άκρο που δημιουργείται από την αποκοπή είναι απροστάτευτο, με συνέπεια το υπόλοιπο του μεταγράφου να αποικοδομείται γρήγορα. Αυτό δυσχεραίνει τον προσδιορισμό των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα πέραν του σημείου αποκοπής (5).

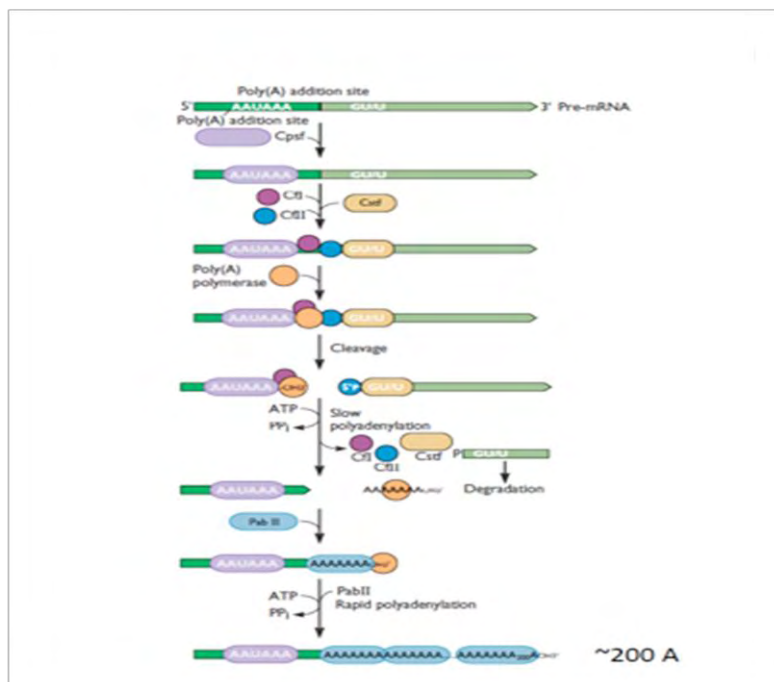
Η διαγραφή ή μετάλλαξη του εξαμερούς AAUAAA εμποδίζει την παραγωγή του πολυαδενυλιωμένου 3' άκρου. Το σήμα χρειάζεται τόσο για την αποκοπή όσο και για την πολυαδενυλίωση. Η αλληλουχία πολυ(A), τόσο του πυρηνικού RNA όσο και του mRNA, είναι συνδεδεμένη με την πολυ(A)-συνδεόμενη πρωτεΐνη (PABP, Poly(A) binding protein). Ο παράγοντας έναρξης της μετάφρασης 4G (eIF4G) αλληλεπιδρά με την PABP και τον παράγοντα eIF3, ο οποίος συνδέει τον eIF4G και την ριβοσωμική υπομονάδα 40S (7). Επίσης στην παραπάνω διαδικασία συμμετέχει και ο παράγοντας ενίσχυσης (CstF, Cleavage stimulatory Factor), που προσδέεται σε μια αλληλουχία πλούσια σε G-U καθοδικά της περιοχής αποκοπής.

Η PABP είναι μια εξελικτικά συντηρημένη πρωτεΐνη, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά, πριν από τέσσερις δεκαετίες η οποία προστατεύει το mRNA από εξωριβονουκλεάσες. Η PABP περιέχει τέσσερα μοτίβα αναγνώρισης του RNA (RRMs) και μία C- τελική περιοχή, πλούσια σε προλίνη, η οποία συμμετέχει στη αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Όπως προαναφέρθηκε, αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με την 3' πολυ(A)- ουρά του mRNA και με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4G (eIF4G) , για την έναρξη της μετάφρασης με ένα συνεργατικό τρόπο και έχει περιοδικότητα 27 νουκλεοτιδίων. Το 3'-άκρο, στο οποίο συνδέεται η PABP είναι ένας καθοριστικός παράγοντας της μεταφραστικής δραστηριότητας του mRNA, το οποίο δρα in cis. Ένα μονομερές PABP των 70 kDa συνδέεται σε κάθε 10-20 βάσεις της ουράς πολυ(A) (8).

Έχουν βρεθεί δύο PABP-πρωτεΐνες αλληλεπίδρασης, η Paip1 και Paip2, που τροποποιούν την δραστηριότητα της PABP κατά την μετάφραση. Η Paip1 είναι ένας θετικός ρυθμιστής της μετάφρασης . Σε αντίθεση, η Paip2 αναστέλλει την μετάφραση, εκτοπίζοντας την PABP από την πολυ(A)- ουρά και τον παράγοντα eIF4G. Η απενεργοποίηση της PABP, μειώνει τη σχέση δέσμευσης του eIF4E στην καλύπτρα και αναστέλλει δραματικά τον σχηματισμό των ριβοσωμικών υπομονάδων 48S και 80S (5).

Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι όταν αναστέλλεται η PABP, μια ισομορφή 2 της πυρηνικής πρωτεΐνης Q του ποντικού, η hnRNP-Q2/SYNCRIP, δεσμεύεται στην πολύ(A) ουρά. In vitro, η hnRNP-Q2 συναγωνίζεται την PABP για την πρόσδεση της στην πολύ (A) ουρά. Έτσι η αντικατάσταση της PABP από την hnRNP-Q2, μειώνει την σχέση σύνδεσης του eIF4G με 5'- m⁷G- καλύπτρα του mRNA, που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του σχηματισμού του συμπλόκου έναρξης των ριβοσωμικών υπομονάδων 48S και 80S . Επιπλέον έχει παρατηρηθεί και στους ινοβλάστες των ποντικών, πως η απενεργοποίηση της hnRNP-Q2 διεγείρει την μετάφραση. Συνεπώς, η hnRNP-Q2, ανταγωνιζόμενη με την PABP, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μετάφρασης και στην miRNA- μεσολαβούμενη καταστολή συγκεκριμένων mRNAs. (7).

Εν κατακλείδι, η πολυαδενυλίωση σταθεροποιεί τα mRNAs διότι στο κυτταρόπλασμα η πολύ(A)-ουρά μειώνεται σταδιακά. Όταν αυτή έχει πλήρως απομακρυνθεί τα mRNAs είναι επιδεκτικά στην αποικοδόμηση.



Εικόνα 3. Διαδικασία της Πολυαδενυλίωσης. Τα σήματα πολυαδενυλίωσης στα θηλαστικά αποτελούνται από ένα εξανουκλεοτίδιο, το AAUAAA, και μια πλούσια σε G και U αλληλουχία η οποία βρίσκεται καθοδικά από αυτό. Επιπλέον, σε ορισμένα mRNA υπάρχει και μια πλούσια σε U αλληλουχία ανοδικά του στοιχείου AAUAAA. Κατά την πολυαδενυλίωση, μια ενδονουκλεάση κόβει το pre-mRNA 10 έως 30 νουκλεοτίδια καθοδικά του στοιχείου AAUAAA, συνήθως μετά από ένα δινουκλεοτίδιο CA. Κατόπιν, η PAP (πολυ(A)πολυμεράση) προσθέτει στο 3' άκρο του RNA μια ουρά πολύ (A) η οποία αποτελείται από 200 περίπου νουκλεοτίδια αδενίνης.

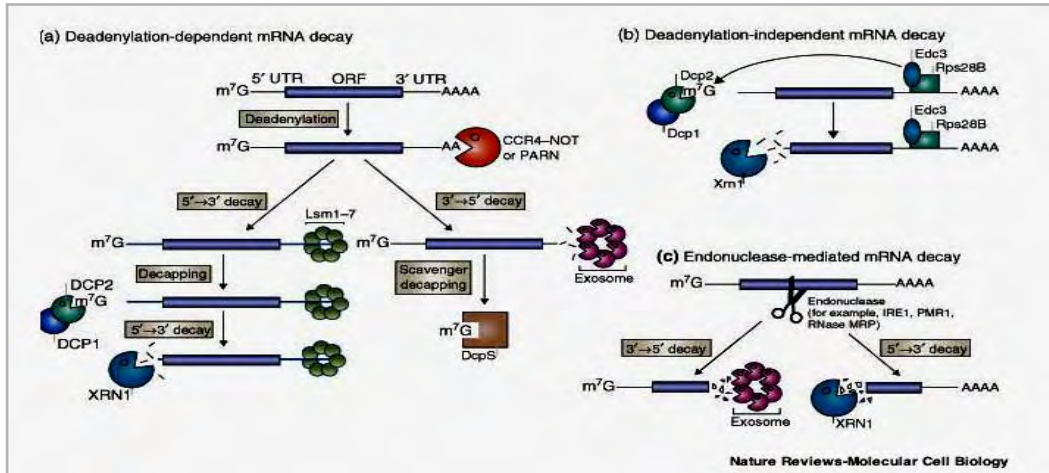
Εναλλακτική πολυαδενυλίωση: Έρευνες έχουν δείξει ότι περισσότερα από τα μισά ανθρώπινα γονίδια έχουν πολλαπλά σημεία πολυαδενυλίωσης (9). Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση συμβάλει στην πολυπλοκότητα που παρουσιάζουν τα ανθρώπινα κύτταρα σε σχέση με τους άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με την παραγωγή mRNAs με διαφορετικές 3' αμετάφραστες περιοχές (3' UTRs) κωδικοποιώντας έτσι διάφορων ειδών πρωτεΐνες. Η επίδραση της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης στην διαδικασία της μετάφρασης είναι συνήθως συνδεδεμένη με το εναλλακτικό μάτισμα. (Alternative Splicing) όπως έχει αποδειχθεί για διάφορα γονίδια (3).

1.3 Αποικοδόμηση του mRNA

Η αποικοδόμηση mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η αποικοδόμηση του mRNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα συμβαίνει μέσω διαφόρων οδών οι οποίες διαφοροποιούνται ανάλογα με το αν η αποικοδόμηση του «σώματος» του mRNA συμβαίνει είτε με κατεύθυνση 5'→3' ή 3'→5' και αν η απαδενυλίωση προηγείται ή όχι της αποικοδόμησης αυτής (10). Μόλις το mRNA βρεθεί στο κυτταρόπλασμα, η πολύ- (A) έχει δύο καθήκοντα: την προώθηση της μετάφρασης και τη σταθεροποίηση του mRNA. Και οι δύο αυτές διεργασίες προκαλούνται από την πολύ- (A) συνδεδεμένη πρωτεΐνη (PABP), που επικαλύπτει την πολυ(A)- ουρά. Η αποικοδόμηση του mRNA μπορεί να ξεκινήσει με απαδενυλίωση στο 3' άκρο και στη συνέχεια με την αφαίρεση της 5' καλύπτρας ή με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση.

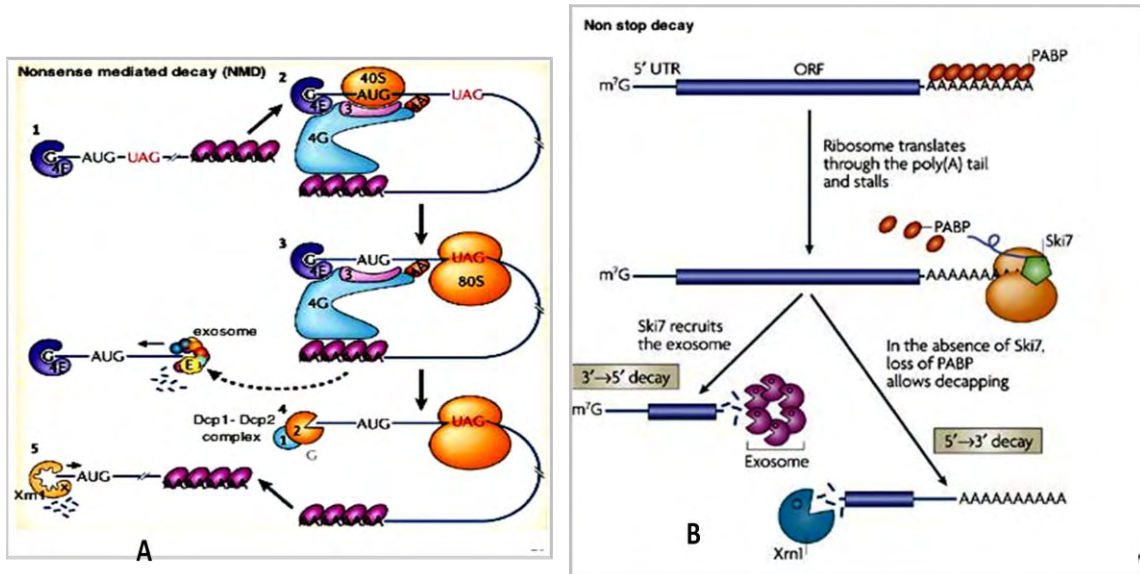
Στα θηλαστικά η αποδόμηση των περισσότερων mRNAs πυροδοτείται με τη βράχυνση της πολυ(A)- ουράς από ειδικά ένζυμα, τις απαδενυλάσες. Ακολουθώντας την απαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο αποτελούμενο από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί το κάλυμμα, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από μια 5'→3' εξωνουκλεάση την Xrn1p. Εναλλακτικά, μετά την απαδενυλίωση, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών. Στην περίπτωση αυτή, το κάλυμμα υδρολύεται από το ένζυμο DcpS. Ωστόσο, η αποικοδόμηση ορισμένων μορίων mRNA μπορεί να ξεκινήσει με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες, είτε από το μηχανισμό του RNAi (μονοπάτι αποικοδόμησης διαμεσολαβούμενο από ενδονουκλεάσες). Στο μονοπάτι αυτό μετά τη δράση των ενδονουκλεασών, παράγονται δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα, τα οποία και

αποικοδομούνται στη συνέχεια με τη δράση του εξώσωματος και της Xrn1p (**Εικόνα 4**) (11)



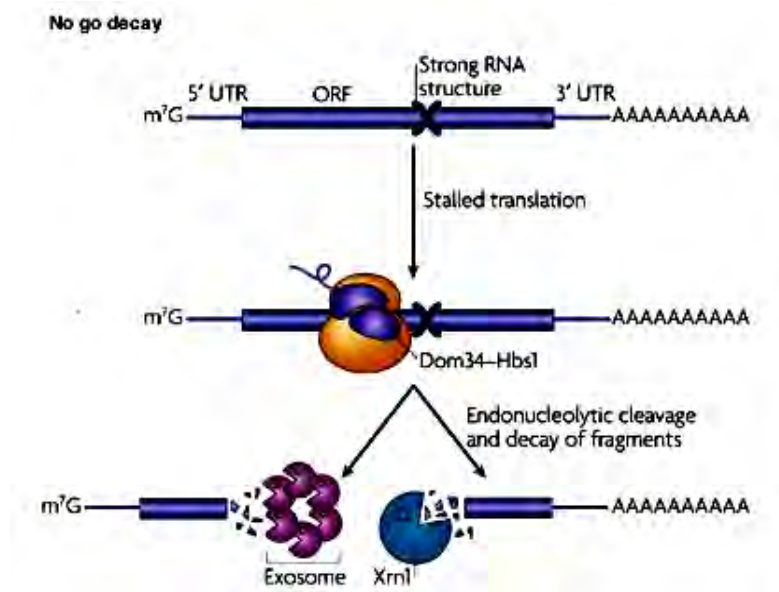
Εικόνα 4. Μονοπάτια αποικοδόμησης ευκαρυωτικού mRNA. (11)

Επίσης, τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα μη φυσιολογικά mRNAs χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNAs. Για παράδειγμα, πρόδρομα RNAs τα οποία αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν την διαδικασία ωρίμανσης, είναι δυνατόν να παραμείνουν στον πυρήνα, ή να αποικοδομηθούν μέσω μίας διαδικασίας που εξαρτάται από το εξώσωμα. Εναλλακτικά, mRNAs που διαθέτουν μία πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται μέσω μίας πορείας που ονομάζεται “μη-νοηματικά διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση” (nonsense-mediated decay, NMD). Τέτοια μετάγραφα αποικοδομούνται είτε μετά από αφαίρεση του καλύμματος μέσω μίας διαδικασίας η οποία είναι ανεξάρτητη από την απαδενυλίωση, είτε από επιτάχυνση της απαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (**Εικόνα 5A**). Ομοίως, σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως αποικοδόμηση μη-τερματισμού (nonstop decay, NSD) τα mRNAs στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (**Εικόνα 5B**).



Εικόνα 5. A. Nonsense-mediated decay (NMD) B. Nonstop decay (NSD)

Τέλος, στη ζύμη ανακαλύφθηκε και η no- go αποικοδόμηση (no- go decay, NGD) κατά την οποία το ριβόσωμα ακινητοποιείται στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης λόγω σχηματισμού δευτεροταγούς δομής στο ελαττωματικό mRNA. Κατά συνέπεια πυροδοτείται η διαμεσολαβούμενη από ενδονουκλεάσες αποικοδόμηση του mRNA και απελευθερώνεται το ριβόσωμα, (Εικόνα 6) (12).



Εικόνα 6. No- go decay, (NGD).

1.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποικοδόμηση του mRNA

Αναλύσεις μικροσυστοιχιών αποκάλυψαν ότι το 40-50% των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης παρουσιάζονται στο επίπεδο σταθερότητας του mRNA. Οι αλλαγές αυτές συνήθως προκαλούνται από αλλαγές στη σύνθεση των mRNPs που είτε αναστέλλουν ή διεγείρουν την αποικοδόμηση. Βρέθηκε ότι οι καθοριστές της σταθερότητας των mRNAs βρίσκονται κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) όπου τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα προστατεύονται από τη διάσχιση των ριβοσωμάτων κατά μήκος των mRNAs, αλλά και στην 5' UTR καθώς και στην κωδική περιοχή (13). Τα πιο καλά μελετημένα στοιχεία σταθερότητας των mRNAs, είναι οι αλληλουχίες που περιέχουν βάσεις A και U σε διάφορα μοτίβα (AU-rich elements, ARE). Οι αλληλουχίες αυτές βρίσκονται στην 3' UTR περιοχή πολλών μεταγράφων που κωδικοποιούν κυτοκίνες, πρωτοογκογονίδια και μεταγραφικούς παράγοντες. Το πιο απλό μοτίβο ενός στοιχείου ARE συνίσταται στο πεντανουκλεοτίδιο AUUUA, ενώ η αποσταθεροποίηση που προκαλείται από τα στοιχεία αυτά είναι αποτέλεσμα οργάνωσης των διαφόρων μοτίβων (πεντανουκλεοτίδια AUUUA, εννιαμερή UUAUUUUA (U/A)(U/A), κ.α.) σε δευτεροταγείς ή τριτοταγείς δομές. Ανάλογα με το μοτίβο του στοιχείου ARE και την αντίστοιχη κινητική της αποικοδόμησης του μορίου mRNA που το περιέχει, χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: α) ARE τύπου I, β) ARE τύπου II και γ) ARE τύπου III.

Στα στοιχεία ARE τύπου I και τύπου III η αποικοδόμηση πραγματοποιείται σε δυο στάδια– στο πρώτο στάδιο συμβαίνει η απαδενυλίωση όπου η νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA δεν μεταβάλλεται, και στο δεύτερο στάδιο τα μόρια mRNA αποικοδομούνται ταχύτατα και έχουν πλέον μια πολύ μικρή poly (A)ουρά (30-60 βάσεις αδενοσίνης). Η κινητική της αποδόμησης στις περιπτώσεις των ARE τύπου II, διαφέρει στο ότι η απαδενυλίωση και η αποικοδόμηση του μορίου mRNA συμβαίνουν ταυτόχρονα (14).

Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με τα στοιχεία ARE μπορεί να είναι είτε ειδικές όπως παράγοντες AUBFs (AU-rich binding factors, AUBFs), είτε να ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών hnRNP. Αρκετοί τέτοιοι παράγοντες έχουν ταυτοποιηθεί όπως : AUF1, TTP, KSRP , RHAU, TIAR. Οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με παράγοντες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση mRNA όπως οι απαδενυλάσες (PARN, CCR4-NOT), τα DCP1-2

και το εξώσωμα.. Αναλυτικότερα το AUF1 αλληλεπιδρά με το εξώσωμα, το KSRP και το RHAU προσδένονται στην απαδενυλάση PARN και στο εξώσωμα, με αποτέλεσμα αυτό να οδηγεί σε αυξημένη διάσπαση του mRNA-στόχου (13).

1.4 Απαδενυλίωση.

Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται σε πολλά επίπεδα. Ένας κρίσιμος παράγοντας που ελέγχει την έκφραση ενός γονιδίου είναι η συγκέντρωση του mRNA του συγκεκριμένου γονιδίου στο κύτταρο. Η συγκέντρωση οποιουδήποτε μορίου εξαρτάται από δυο παράγοντες: το ρυθμό σύνθεσής του και το ρυθμό αποικοδόμησής του. Όταν η σύνθεση και η αποικοδόμηση ενός mRNA είναι σε ισορροπία, τότε η συγκέντρωση του mRNA διατηρείται σταθερή. Μια αλλαγή σε οποιαδήποτε διαδικασία μπορεί να οδηγήσει είτε σε συσσώρευση ή έλλειψη του mRNA. Τα μη σταθερά και μη φυσιολογικά mRNAs πρέπει να αποικοδομηθούν ενώ τα σταθερά να προστατευθούν από την απαδενυλίωση. Η ρύθμιση της απαδενυλιωτικής δραστηριότητας είναι ζωτικής σημασίας καθώς η ανεξέλεγκτη απαδενυλίωση θα οδηγούσε στην καταστροφή του mRNA. Τα μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA εξασφαλίζουν ότι τα διάφορα mRNAs, που οδηγούν στη σύνθεση μη απαραίτητων πρωτεϊνών, δεν συσσωρεύονται στο κύτταρο (15). Δυναμικές αλλαγές στα μήκη των πολυ(A)-ουρών των mRNAs καταλύονται από διάφορα ένζυμα που ονομάζονται απαδενυλάσες. Η διαμόρφωση της πολυ(A)-ουράς ενός mRNA είναι ένα ευρύ μέσο ελέγχου της παραγωγής πρωτεϊνών και της σταθερότητας του mRNA (16). Στον πυρήνα, με την διαδικασία της απαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες πολυ(A)-ουρές, στο κατάλληλο μήκος. Οι πολυ(A)-ουρές, όταν είναι σε ένα συγκεκριμένο μήκος, είναι απαραίτητες για την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα και όταν αυτό φτάσει στο κυτταρόπλασμα του προσδίδουν σταθερότητα και έναυσμα για μετάφραση. Τα mRNAs αποικοδομούνται στο κυτταρόπλασμα με συνεχή βράχυνση της πολυ(A)-ουράς κατά τη διάρκεια ζωής του mRNA. Τα επόμενα βήματα της αποικοδόμησης των mRNAs καθυστερούν έως ότου η απαδενυλίωση να ξεπεράσει ένα ορισμένο όριο. Έτσι, η απαδενυλίωση μπορεί να θεωρηθεί και ως χρονομετρητής της αποικοδόμησης του mRNA και η ίδια η πολυ(A)-ουρά μια τροποποίηση που διατηρεί σταθερό το mRNA (17).

1.4.1 Απαδενυλάσες

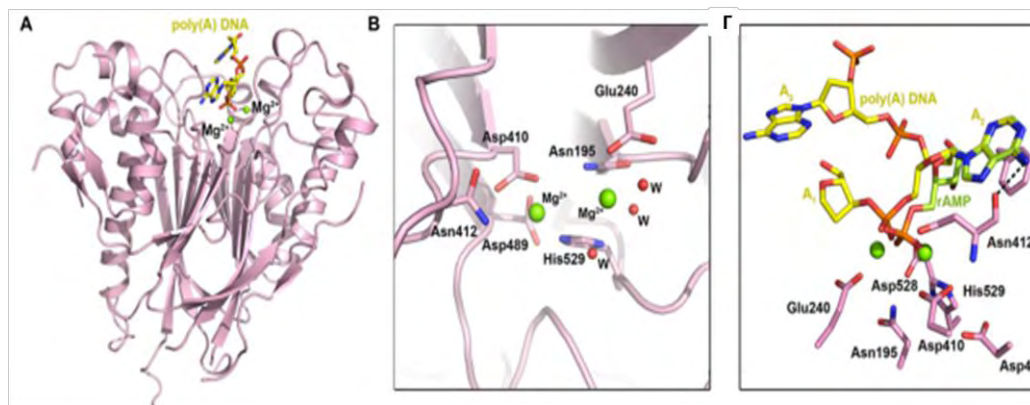
Οι απαδενυλάσες είναι εξωριβονουκλεάσες, των οποίων η δράση εξαρτάται από Mg^{2+} και υδρολύουν το mRNA σε 3'→5' κατεύθυνση, απελευθερώνοντας 5'-AMP. Κύριο υπόστρωμα των απαδενυλασών αποτελεί η πολυ(A)- ουρά και στη συνέχεια το mRNA υφιστάμενο τη δράση άλλων ενζύμων αποδομείται. Οι απαδενυλάσες με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο ταξινομούνται σε δύο μεγάλες υπερ- οικογένειες.

Η **DEDD υπερ-οικογένεια**, η ονομασία της οποίας προέρχεται από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ των τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης και συντονίζουν τα ιόντα Mg^{2+} . Στην ομάδα αυτή ανήκουν η απαδενυλάση POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 απαδενυλασών (*Εικόνα7*).



Εικόνα 7. Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής της πολύ(A) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN)

Η **EEP υπερ-οικογένεια**, ονομάζεται η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών- ενδονουκλεασών- φωσφατασών (exonuclease- endonuclease- phosphatase, EEP), περιλαμβάνει απαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Παραδείγματα EEP ενζύμων αποτελούν οι απαδενυλάσες Nocturnin, CCR4 και Angel (*Εικόνα 8*) (18).



Εικόνα 8. EEP υπερ-οικογένεια απαδενυλασών. **A.** Κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης CCR4-NOT σε σύμπλοκο με την poly (A) DNA. Η πρόσδεση της poly (A) DNA απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα και τα ιόντα Mg^{2+} σαν πράσινες σφαίρες. **B.** Μεγεθυμένη απεικόνιση του ενεργού κέντρου της CCR4-NOT, όπου απεικονίζονται τα κατάλοιπα, τα ιόντα Mg^{2+} παρουσιάζονται σαν πράσινες σφαίρες και τα H_2O σαν μικρές κόκκινες σφαίρες. **Γ.** Απεικόνιση της δέσμευσης του υποστρώματος [poly (A)] στο ενεργό κέντρο της ανθρώπινης CCR4-NOT (18).

Οι απαδενυλάσες χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία, επειδή πιθανότατα συγκεκριμένες απαδενυλάσες δρουν σε συγκεκριμένα mRNAs, ωστόσο είναι δυνατή η δράση διαφορετικών απαδενυλασών στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες (Πίνακας 1) (16).

Πίνακας 1. Ποικιλομορφία των απαδενυλασών

Ομάδα	Όνομα	<i>SC</i>	<i>CE</i>	<i>DM</i>	<i>XL</i>	<i>MM</i>	<i>HS</i>
<i>DEDD</i> νοκλεάσες	CNOT7/Caf1a	+	+	+	+	+	+
	CNOT8/Caf1b	-	-	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
<i>EEP</i> νοκλεάσες	CNOT6/CCR4a	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L/CCR4b	-	-	-	-	+	+
	NOC/CCR4C	-	-	+	+	+	+
	2'PDE	-	+	+	+	+	+

1.4.2 Τρόπος δράσης των απαδενυλασών

Όπως προαναφέρθηκε, οι απαδενυλάσες χωρίζονται σε δυο οικογένειες βάσει των αμινοξέων του ενεργού κέντρου τους. Η δραστηριότητα της PARN, η οποία ανήκει στην τάξη DEDD, διεγείρεται μετρίως από την αλληλεπίδρασή της με την

καλύπτρα στο 5' άκρο των mRNA (**Εικόνα 7**). Η καλύπτρα προσδένεται στην RRM επικράτεια με συγγένεια της τάξης λίγων μM , συγγένεια η οποία είναι αρκετά ασθενέστερη σε σύγκριση με τη συγγένεια της τάξης των nM των "κανονικών" πρωτεϊνών που προσδέονται στην καλύπτρα (cap-binding proteins) (19).

Στην τάξη EEP, ανήκει η CCR4 (*Carbon Catabolite Repressor-4*) (**Εικόνα 8**) που είναι μια Mg^{+2} εξαρτώμενη 3' εξωνουκλεάση ειδική για πολυ-(A). Παρότι δεν έχουν αναλυθεί άμεσα τα νουκλεοτίδια που απομακρύνονται μέσω της αντίδρασης, η αντίδραση φαίνεται να συμβαίνει κατά ένα νουκλεοτίδιο τη φορά, και η οικογένεια στην οποία ανήκει το ένζυμο υποδεικνύει ότι συμβαίνει αντίδραση υδρόλυσης απελευθερώνοντας 5' AMP (17).

1.4.3 Βιολογικές λειτουργίες των απαδενυλασών

Οι απαδενυλάσες έχουν διάφορες βιολογικές λειτουργίες. (**Πίνακας 2**) Κάποιες από αυτές είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάξεις άλλων απαδενυλασών παρουσιάζουν μια ποικιλία φαινοτύπων. Αρκετές απαδενυλάσες συμμετέχουν στην εμβρυογένεση, στον κυτταρικό κύκλο, στην ανάπτυξη, στη γονιμότητα, στη μεταβολική ομοιόσταση.

Πίνακας 2. Βιολογικές Λειτουργίες Απαδενυλασών

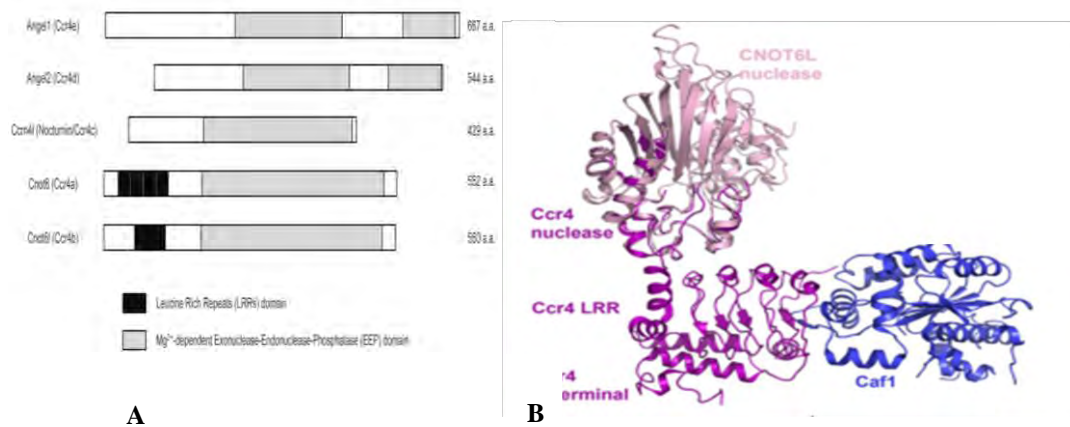
Οικογένεια	Βιολογικές λειτουργίες
<u>DEDD νουκλεάσες</u>	
POP2	Καταστροφή DNA Κυτταρικό κύκλο (Sc) Ανάπτυξη Γονιμότητα (Ce) Κυτταρική μάζα Ρύθμιση miRNA (Dm) Σπερματογένεση Οστική μάζα (Mm)
CAF1Z	NMD
PARN	Ωοκύτωση Ωρίμανση (Xl) NMD (Hs)
PAN2	Βράχυνση poly (A) Replication stress (Sc)

EEP νουκλεάσεις	
CCR4	Καταστροφή DNA Κυτταρικό κύκλο Replication stress (Sc) Ωογένεση (Dm) NMD (Mm) Κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Mm)
Nocturnin	Κιρκάδιος ρυθμός (Xl, Mm) Ομοιόσταση (Mm)
Angel	Επεξεργασία του 5,8S Rrna Πηγή άνθρακα (Sc)
2' PDE	Αποικοδόμηση του 2'-5' oligo(A) από ιντερφερόνη (Hs)

1.5 Η ανθρώπινη απαδενυλάση Angel 2 (Ccr4d)

Στα ανθρώπινα κύτταρα έχει γίνει ταυτοποίηση πέντε ομόλογων CCR4, συμπεριλαμβανομένων των Ccr4a (CNOT6), Ccr4b (CNOT6L), Ccr4c (nocturnin, Ccn4L), Ccr4d (ANGEL2), και Ccr4e (ANGEL1). Οι Ccr4a και Ccr4b παρουσιάζουν 74% αλληλουχική ομοιότητα και περιέχουν περιοχές επανάληψων πλούσιες σε λευκίνη που απαιτούνται για τις αλληλεπιδράσεις με το σύμπλοκο Caf1a / Caf1b. Και οι δύο παίζουν ρόλο στη απαδενυλίωση και συμβάλλουν στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου και της γήρανσης. Η Ccr4c έχει χαρακτηριστεί σε ποντικούς και *Xenopus laevis* και έχει προταθεί ότι παίζει ένα ρόλο στην λειτουργία του κιρκάδιου ρυθμού (20).

Η Ccr4d (ANGEL2), βάσει της αλληλουχικής ομοιολογία με τα άλλα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών CCR4, είναι ένα καινούργιο μέλος της οικογένειας EEP που λειτουργεί ως απαδενυλάση. Όμως, η Ccr4d δεν περιέχει επανάληψεις πλούσιες σε λευκίνη και ως πυρηνοκυτταροπλασματική πρωτεΐνη (**Εικόνα**) (20).



Εικόνα 9Α. Σχηματική απεικόνιση των ομόλογων Ccr4. Καθένα από τα ομόλογα έχει μια συντηρημένη περιοχή νουκλεάσης(απεικονίζεται με γκρι χρώμα) που σχετίζεται με τις Mg^{2+} εξαρτώμενες εξωνουκλεάσες-ενδονουκλεάσες-φωσφατάσες, γνωστές ως υπεροικογένεια EEP. Οι Cnot6 και Cnot6l διαθέτουν στο αμινοτελικό τους άκρο περιοχές επαναλήψεων πλούσιες σε λευκίνη (LRRs) (φαίνεται με μαύρο), οι οποίες είναι συντηρημένες στην Ccr4p της ζύμης. (21) **B.** Απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου Ccr4(CNOT6L)-Caf1 της ζύμης (18)

Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο ρόλος της Angel ως απαδενυλάση προήλθε από την απόδειξη ότι οι πρωτεΐνες Angel αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Caf1 οι οποίες ανήκουν στην DEDD υπερ-οικογένεια με ενεργότητα απαδενυλάσης (**Εικόνα9B**). Ωστόσο, προς το παρόν δεν έχουν αναφερθεί *in vitro* πειραματικές μετρήσεις της δραστηριότητας της Angel1. Η Angel 2 όταν εκφράζεται εξωγενώς φαίνεται να εντοπίζεται στον πυρήνα, ενώ η πλειονότητα των αντιδράσεων της απαδενυλίωσης συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα καθώς άλλες απαδενυλάσες όπως οι Ccr4a/b και Nocturnin εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (21).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, που αφορούν την κατανόηση της βιοχημικής σημασίας των ενζύμων που καταλύουν την αντίδραση της απαδενυλίωσης, έγινε η κλωνοποίηση και η προσπάθεια έκφρασης του γονιδίου της ανθρώπινης ANGEL 2. Η ANGEL2 είναι ένα νέο ένζυμο, το οποίο δεν έχει μελετηθεί και δεν είναι γνωστή η λειτουργία του ακόμη. Πιθανά υποστρώματα της Angel2 είναι πυρηνικά mRNAs ή pre-mRNAs όπου η Angel2 προωθεί την αποικοδόμηση τους ως ένας πυρηνικός μηχανισμός ελέγχου της ποιότητας τους.

Για το σκοπό αυτό έγινε η κλωνοποίηση του cDNA της ANGEL2 σε φορέα έκφρασης ιδανικό για υπερέκφραση από βακτήρια και η προσπάθεια έκφρασης της σε διαφορετικές συνθήκες.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

Acetic Acid	Merck
Acrylamide	SERVA
Ammonium Persulfate (APS)	SIGMA
Bis Acrylamide	SERVA
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay	Bio-rad
Bromophenol Blue	Research Organics
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
Ethanol Absolute	SIGMA
Glycerol	Panreac
Glycine	Biochemica
Hydrochloric Acid (HCl)	Merck
Imidazole	Applichem, SIGMA
Isopropanol	Scharlau
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Fermentas
LB Agar	SIGMA
LB Broth	Merck
Pink prestained protein marker	Nippon Genetics
Potassium Hydroxide (KOH)	Merck
SDS (Sodium dodecyl Sulfate)	SERVA
Sodium Chloride (NaCl)	Applichem
Sodium diHydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine)	Research Organics
Tris Base	Merck
Αγαρόζη	SIGMA

3.1.2 Βακτηριακά στελέχη

BL21- Gold (DE3) ¹	Agilent Technologies
Rosetta 2 ¹	Novagen
X11Blue	Agilent Technologies

3.1.3 Δείκτες μοριακών βαρών

PiNK prestained protein marker	Nippon Genetics
1kb Gene ruler	Thermo Scientific

¹ Στέλεχος *Escherichia coli* ικανό για μετασχηματισμό και υπερέκφραση πρωτεΐνης από ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

3.1.4 Kit

NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
PCR clean-up Gel extraction	Macherey-Nagel
Infusion HD cloning kit	Clontech
Agarose-beads (Ni ²⁺ -IDA)/Protino	Macherey-Nagel
Agarose-beads (Ni ²⁺ -NTA)/Protino	Macherey-Nagel

3.1.5 Διαλύματα

Ρυθμιστικά διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων

- TAE 50x: Tris base 24,2% v/w, ακετοξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, pH 8,6. Χρησιμοποιήθηκε TAE 1x. Σε 100ml TAE 1x προστέθηκε 1gr αγαρόζης
- Loading buffer 6x: Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM

Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (ενδεικτικά 100Mm)

- 12mM Na₂HPO₄, 88mM NaH₂PO₄ (pH 6)

Ρυθμιστικά Διαλύματα λύσης βακτηριακών κυττάρων με χρήση υπερήχων

- 0.5M NaCl, 0.1M Phosphate buffer (pH 6.1) (για απομόνωση με Ni-NTA Agarose)
- 0,2M NaCl, 0.1M Phosphate buffer (pH 6), 10% Glycerol, 0,1% MTG, 1mM PMSF, ίχνη λυσοζύμης (για απομόνωση με το σύστημα FPLC). Το PMSF είναι αναστολέας πρωτεασών σερίνης. Τόσο η σερίνη, όσο και η ιστιδίνη είναι στόχοι πρωτεόλυσης (22).

Διαλύματα για απομόνωση με Ni-NTA Agarose (Beads)

- Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης: 100mM Phosphate Buffer, 10mM Imidazole, 300mM NaCl,
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης : 100mM Phosphate Buffer, 20mM Imidazole, 300mM NaCl,
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης: 100mM Phosphate Buffer, 10mM Imidazole, 250mM NaCl,

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (Running Buffer) 10x:

- 250mM Tris, 1.92M Glycine. Το διάλυμα δε χρειάζεται ρύθμιση του pH και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Για την παρασκευή Running Buffer 1X, 1L: Αραίωση 100mL R.B.10X σε 900mL dH₂O. Στο διάλυμα προστίθεται

και SDS σε τελική αναλογία 0,1% (23). Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων SDS-PAGE 4x (Sample Buffer)

- 240mM Tris-HCl pH 6.8, 40% Glycerol, 8% SDS, 5% β- mercaptoethanol, 0.04% Bromophenol Blue. Διατηρείται στους -20°C.

Διαλύμα βαφής πηκτής πολυακρυλαμίδιου

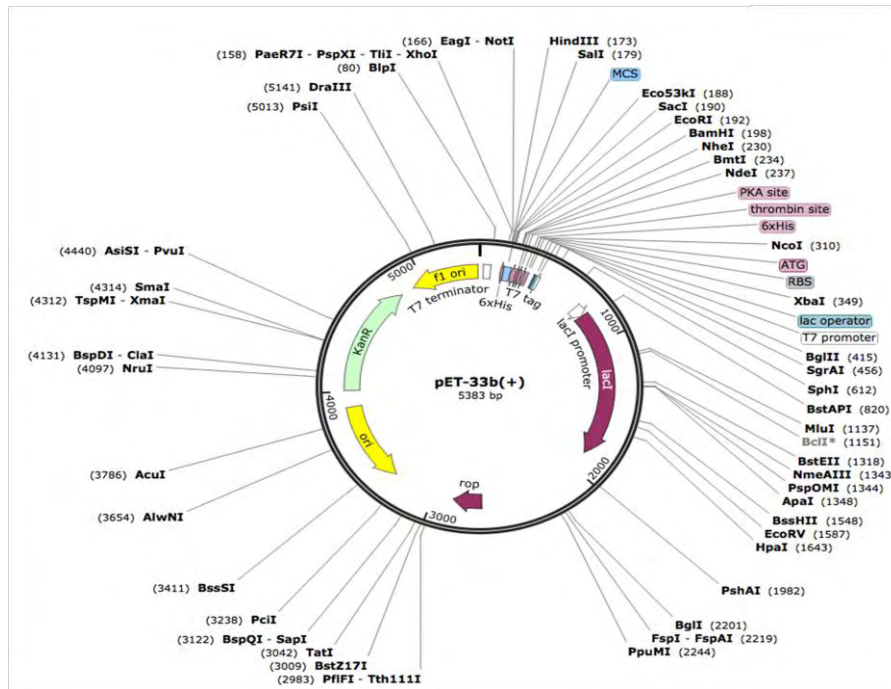
- Coomassie Blue 0.05% (40% Methanol, 10% Acetic Acid, dH₂O, Coomassie Blue R-250 ~0.1%)
- 10% Acetic Acid

3.1.6 Πλασμιδιακός Φορέας pET-33b(+)

Το σύστημα pET είναι κατάλληλο για την υποκλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων σε κύτταρα του στελέχους *E.coli*, με αποτέλεσμα, όταν ενεργοποιηθεί, να είναι δυνατή η γρήγορη παραγωγή μεγάλης ποσότητας οποιασδήποτε επιθυμητής πρωτεΐνης (24). Υπάρχουν δύο γενικές κατηγορίες pET φορέων φορείς μεταγραφής και φορείς μετάφρασης.

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση της ANGEL 2 είναι ο pET-33b(+) και είναι φορέας μετάφρασης (**Εικόνα 10**). Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας προέρχεται από τον πλασμιδιακό φορέα pET-28b(+) και φέρει μια αλληλουχία 15bp που κωδικοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) (Εικόνα) (25). Το πλασμίδιο διαθέτει διάφορα σημαντικά στοιχεία: το γονίδιο *lacI* το οποίο κωδικοποιεί τον καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης, τον T7 προαγωγέα εξειδικευμένο για την T7 πολυμεράση -ο οποίος είναι ενεργός μόνον όταν η T7 RNA πολυμεράση είναι παρούσα-, το χειριστή του οπερονίου της λακτόζης -ο οποίος παρεμποδίζει τη μεταγραφή-, την περιοχή πολυσυνδέτη, την περιοχή έναρξης της αντιγραφής και το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη για επιλογή σε καλλιέργειες στελεχών *E. Coli*. Το υπό μελέτη γονίδιο κλωνοποιήθηκε στην περιοχή του πολυσυνδέτη. Ο προαγωγέας και ο χειριστής βρίσκονται στο 5' άκρο του κλωνοποιημένου γονιδίου. Παρουσία της T7 πολυμεράσης ο χειριστής δεν καταστέλλει το γονίδιο και μεταγράφεται κανονικά. Ο έλεγχος του συστήματος έκφρασης επιτυγχάνεται μέσω του προαγωγέα και του χειριστή *lac*. Το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή φέρει ένα επαγωγίμο

προαγωγέα που ενεργοποιείται από το IPTG. Το IPTG είναι ανάλογο της λακτόζης που δεσμεύει τον καταστολέα του ρυθμιστή lac (24). Όταν η T7 RNA πολυμεράση έχει πλήρως επαχθεί, το επιθυμητό προϊόν μπορεί να περιλαμβάνει περισσότερο από το 50% της συνολικής κυτταρικής πρωτεΐνης λίγες ώρες μετά την επαγωγή. Αν και αυτό το σύστημα είναι εξαιρετικά ισχυρό, είναι επίσης δυνατό να μειωθούν τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης λόγω μείωσης της συγκέντρωσης του επαγωγέα. (25).

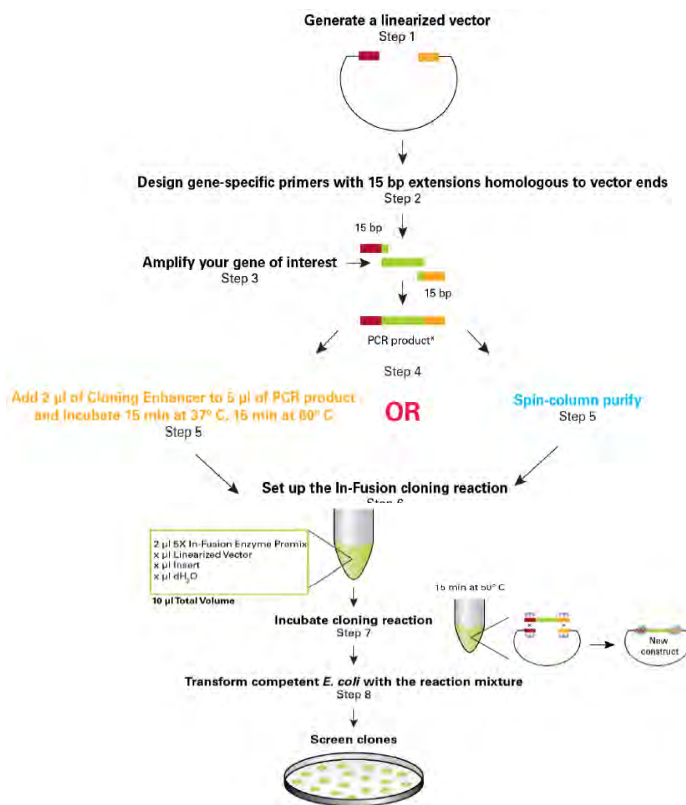


Εικόνα 10. Ο πλασμιδιακός φορέας pET-33b(+). Η περιοχή κλωνοποίησης/έκφρασης της κωδικής αλυσίδας βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της T7 πολυμεράσης. Ο συγκεκριμένος φορέας διαθέτει μια σηματοδοτική αλληλουχία έξι καταλοίπων ιστοδίνης (His-Tag®) στο αμινοτελικό άκρο της προς έκφραση πρωτεΐνης (*Snar gene, Novagen, 2016*)

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Κλωνοποίηση βάσει πρωτοκόλλου Infusion HD Cloning

Το πρωτόκολλο είναι σχεδιασμένο για γρήγορη και κατευθυνόμενη κλωνοποίηση ενός ή περισσότερων τμημάτων DNA σε έναν φορέα. Η τεχνολογία που χρησιμοποιεί βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ ενός τμήματος DNA και ενός γραμμικοποιημένου φορέα.



Εικόνα 11. Συνοπτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου κλωνοποίησης

✚ Ενζυμική πέψη του φορέα κλωνοποίησης

Η πέψη του φορέα κλωνοποίησης pET-33b(+) έγινε με τη χρήση του ενζύμου περιορισμού EcoRI, το οποίο αναγνωρίζει μία μοναδική αλληλουχία στην περιοχή πολυσυνδέτη του πλασμιδίου (*Εικόνα 7*). Τα επιμέρους συστατικά και οι όγκοι της αντίδρασης πέψης, ορίστηκαν σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο TAKARA για το EcoRI, και φαίνονται στον Πίνακα 1. Οι όγκοι ορίστηκαν ώστε το υπόστρωμα DNA να έχει ποσότητα $\leq 1\mu\text{g}$. Στη συνέχεια έγινε επώαση της αντίδρασης στους 37°C για 2 ώρες. Η αντίδραση μετά τερματίστηκε μετά από 2 ώρες με την προσθήκη loading buffer(6x).



Εικόνα 7. Η περιοχή κλωνοποίησης του πλασμιδιακού φορέα pET-33b(+). Multiple cloning sites/MCS (BamHI-XhoI). Ο φορέας διαθέτει μια σηματοδοτική αλληλουχία έξι καταλοίπων ιστιδίνης (His-Tag®) στο αμινοτελικό άκρο της προς έκφραση πρωτεΐνης (*pET Manual 10th Edition, Novagen, 2003*)

Πίνακας 3. Σύσταση ενζυμικής αντίδρασης πέψης του φορέα pET-33b(+)

Αντιδραστήρια	Όγκος
EcoR1	1 μl
10 x Buffer H	2 μl
Πλασμιδιακό DNA[pET-33b(+)]	10 μl
dd H₂O	7 μl
Total vol.	20 μl

✚ Σχεδιασμός ειδικών PCR εκκινητών

Οι In-Fusion PCR εκκινητές σχεδιάστηκαν με τρόπο τέτοιο ώστε να παράγουν προϊόν ενίσχυσης PCR με άκρα ομόλογα με τα άκρα του επιθυμητού φορέα στη γραμμικοποιημένη του μορφή (**Εικόνα 13**). Κάθε In-Fusion εκκινητής πρέπει να έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Οι εκκινητές θα πρέπει να παράγουν μία επιπλέον αλληλουχία των 15 bp στα άκρα του γονιδίου-στόχος, η οποία θα είναι ομόλογη με τα άκρα του γραμμικοποιημένου φορέα.
- Το 3' τμήμα κάθε εκκινητή θα πρέπει να είναι ειδικό για το γονίδιο στόχο, να έχει GC περιεχόμενο 40-60%, μήκος 18-25 νουκλεοτίδια, T_m 58-65°C (η διαφορά της T_m μεταξύ Fwd και Rev δεν πρέπει να ξεπερνά τους 4°C). Η

τιμή της T_m πρέπει να υπολογίζεται βάσει της γονιδιο-ειδικής αλληλουχίας του εκκινητή.

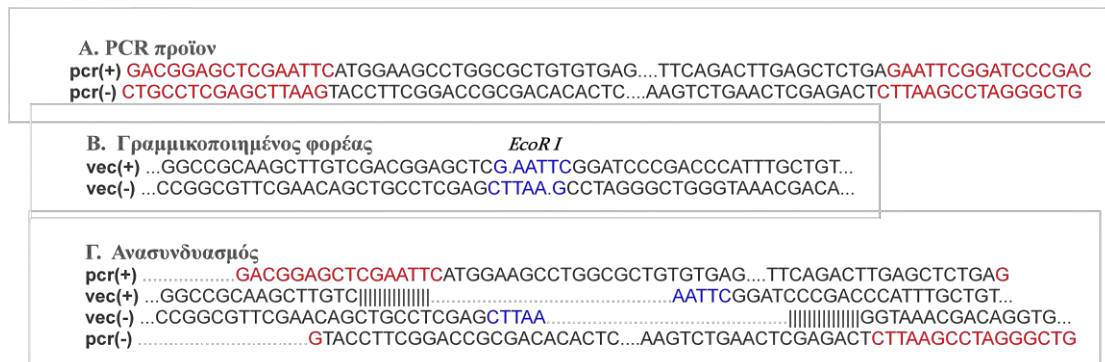
- Θα πρέπει να αποφεύγεται η συμπληρωματικότητα εντός του ίδιου εκκινητή, καθώς και μεταξύ των εκκινητών.
- Οι εκκινητές να είναι απομονωμένοι με HPLC ή desalted.
- Να έχει ελεγχθεί η ορθότητα και η εξειδίκευσή τους ως προς το γονίδιο-στόχος με BLAST.

Η Clontech παρέχει ένα δωρεάν εύχρηστο εργαλείο στην ιστοσελίδα της, με τη βοήθεια του οποίου ο κάθε ενδιαφερόμενος απλά παρέχοντας την αλληλουχία του επιθυμητού γονιδίου, την αλληλουχία του φορέα στον οποίο επιθυμεί να εισάγει το γονίδιο καθώς και επιλέγοντας το ένζυμο περιορισμού με το οποίο θα πραγματοποιηθεί η γραμμικοποίηση του φορέα, μπορεί εύκολα και γρήγορα να σχεδιάσει εκκινητές κατάλληλους για χρήση με το HD-In Fusion cloning kit.

Με τη βοήθεια του παραπάνω εργαλείου σχεδιάστηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές με T_m περίπου 65°C , όπου με κόκκινο επισημαίνεται το τμήμα των εκκινητών που είναι ειδικό για την αλληλουχία του γονιδίου-στόχος και με μαύρο το τμήμα του φορέα.

- FW: GACGGAGCTCGAATTC**ATGGAAGCCTGGCGCTGTGTGAG**
- REV: GTCGGGATCCGAATTC**TCAGAGCTCAAGTCTGAA**

Στην παρακάτω εικόνα παρατίθεται ένα διάγραμμα κλωνοποίησης μετά τον σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών.



Εικόνα 8. Διάγραμμα κλωνοποίησης της ANGEL 2 στον πλασμιδιακό φορέα pET-33b(+) Α. Αναμενόμενο προϊόν PCR, Β. Απεικόνιση της αλληλουχίας του γραμμικοποιημένου φορέα, που αναγνωρίζεται από το EcoRI, Γ. Προϊόν μετά την αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού.

✚ Ενίσχυση του υπό μελέτη γονιδίου με απλή PCR

Ως DNA μήτρα (template) χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη αλληλουχία της ANGEL2 από την εταιρία SourceBioScience (Αγγλία). Η εταιρία παρείχε την δυνατότητα αγοράς της κωδικής αλληλουχίας της ANGEL2 κλωνοποιημένη στο φορέα pBlueScript.

Το cDNA της ANGEL2 ενισχύθηκε με απλή PCR, με τη χρήση του KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το πλασμιδιακό DNA pBlueScript-ANGEL2. Προστέθηκαν οι ειδικοί εκκινητές και DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (**Πίνακας 4**). Η εν λόγω DNA πολυμεράση φέρει ένα αντίσωμα το οποίο αποδεσμεύεται από το ένζυμο όταν υποβληθεί απότομα σε υψηλή θερμοκρασία (hot start), με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η δράση του ενζύμου πριν ξεκινήσει η αντίδραση PCR, και ως εκ τούτου την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

Πίνακας 4. Σύσταση αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της ANGEL 2

Αντιδραστήρια	Όγκος
H₂O	21 μl
Kapa Hifi Ready Mix	25 μl
Primer FND (10 Μμ)	1,5 μl
Primer REV (10 Μμ)	1,5 μl
Template	1,0 μl
Total vol	50 μl

Πίνακας 5. Το θερμικό προφίλ της αντίδρασης PCR

Βήματα	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 ° C	3 min
Αποδιάταξη	98 ° C	20 sec
Υβριδοποίηση	65 ° C	15 sec
Επέκταση²	72° C	13 sec/kb
Τελική επέκταση	72° C	10min

² Ο χρόνος επέκτασης, του πολυμερισμού δηλαδή του νεοσυντιθέμενου κλώνου DNA, εξαρτάται από το μήκος του τμήματος που ενισχύεται. Γενικά ισχύει ότι για κάθε 1kb DNA που ενισχύεται, ο χρόνος επέκτασης ισούται με ≈ 1min.

Πραγματοποιήθηκαν 24 κύκλοι και ακολούθησε αποθήκευση στους 4°C

Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

Η επιβεβαίωση των ειδικών προϊόντων της PCR και της πέψης, έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1%. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία αναλυτική μέθοδος που επιτρέπει το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων μπορούν να διαχωριστούν τμήματα DNA μεγέθους από 20bp έως 50kb. Πρώτα χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα ώστε με θέρμανση διαλυθεί η αγαρόζη. Όταν το μίγμα έγινε διαυγές περιχύθηκε στο ικρύωμα και στη συνέχεια παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στερεοποιηθεί. Η αγαρόζη πήζοντας φτιάχνει ένα δίκτυο του οποίου η πυκνότητα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αγαρόζης που χρησιμοποιήσαμε. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε οριζόντιο επίπεδο υπό ηλεκτρικό πεδίο σταθερής τάσης. Στην παρούσα εργασία έγινε εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα 60V και παρακολούθηση του μετώπου των χρωστικών που ενυπάρχουν στο loading buffer. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα άκρα του πηκτώματος, το DNA, το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο, κινείται προς την άνοδο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται από ορισμένες παραμέτρους, όπως το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, την στερεοδιαμόρφωση του DNA, την εφαρμοζόμενη τάση και την σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης.

Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction)

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του προϊόντος της PCR και του προϊόντος της πέψης του πλασμιδιακού φορέα pET-33b(+) από την πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου PCR Clean-up Gel extraction, όπου παρακάτω αναφέρονται τα βήματα.

Εξαγωγή του τμήματος DNA- Διάλυση της πηκτής. Αρχικά αποκόπτεται από την πηκτή αγαρόζης η ζώνη με το τμήμα του DNA που επιθυμούμε να απομονώσουμε. Η εξαγωγή πραγματοποιείται με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν ο περιττός όγκος της πηκτής. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε το βάρος του τμήματος του πηκτώματος και μεταφέρθηκε σε ένα αποστειρωμένο σωλήνα τύπου eppendorf. Για

τον σωλήνα που περιέχει το DNA του φορέα υπολογίζεται το βάρος ως εξής: Αρχικά ζυγίστηκε το άδειο σωλήνα και στην συνέχεια ζυγίστηκε το σωλήνα που περιέχει το DNA του φορέα. Η διαφορά των 2 σωλήνων είναι το βάρος του τμήματος του πηκτώματος που περιέχει το DNA του φορέα. Αντίστοιχα, η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τον υπολογισμό του βάρους του τμήματος του πηκτώματος που περιέχει το DNA του υπό μελέτη γονιδίου. Έπειτα σε κάθε σωλήνα προστέθηκε Buffer NTI, όπου για κάθε 100mg πηκτώματος προστέθηκαν 200μL Buffer NTI (για πηκτική αгарόζης <2%)³. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 5-10 λεπτά στους 50°C και ανακίνηση κάθε 2-3 λεπτά μέχρις ότου η πηκτική αгарόζης να διαλυθεί.

Δέσμευση του DNA. Στη συνέχεια 700 μl δείγματος φορτώνονται σε στήλη, η οποία τοποθετείται σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 11000 x g, απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα. Ακολούθως, φορτώθηκε και το υπόλοιπο δείγμα και επανελήφθη το στάδιο της φυγοκέντρησης.

Πλύση της Silica membrane. Στην στήλη προστέθηκαν 700 μL NT3 buffer και ακολούθησε φυγοκέντρηση 30sec στις 11000xg, απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται.

Ξήρανση μεμβράνης. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000g ώστε να αφαιρεθεί εντελώς το NT3 buffer

Έκλυση DNA. Ακολούθως, η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα (Recovery Tube) και προστίθενται 23μl του Elution buffer ώστε να αποδεσμευτεί το DNA από την στήλη. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 ° C) για 1 λεπτό με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της έκλυσης του DNA. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτά στις 11000 x g. Το εκλουόμενο DNA φυλάσσεται στους -20°C και χρησιμοποιείται για την αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού.

³ Συγκεκριμένα προστέθηκαν 1.038 μl buffer NTI στο *erppendorf* με το πλασμιακό DNA pET-33b(+) και 618 μl buffer NTI στο *erppendorf* με το ενισχυμένο γονίδιο της ANGEL2

🚦 Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού

Η αντίδραση καταλύεται από μία ανασυνδυάση που αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση τα κοινά άκρα των 15bp που έχουν ο φορέας και το υπό μελέτη γονίδιο το οποίο, όπως προαναφέρθηκε, έχει ενισχυθεί με PCR με ειδικούς εκκινητές. Η αναλογία της ποσότητας του ενθέματος προς αυτή του φορέα κλωνοποίησης, προκειμένου η απόδοση του ομόλογου ανασυνδυασμού να είναι υψηλή, ορίστηκε ως 3 προς 1 αντίστοιχα (ANGEL2 DNA: pET-33b(+) DNA=3:1), (**Πίνακας 6**). Στη συνέχεια έγινε επώαση της αντίδρασης στους 50°C για 30min. Μετά το πέρας της επώασης, η αντίδραση περατώθηκε με αποθήκευση στους -20°C.

Πίνακας 6. Σύσταση αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού

Αντιδραστήρια	Όγκος
pET-33b(+)	2 μl
ANGEL 2 (100ng)	6 μl
5x In-fusion HD Enzyme (35ng)	2 μl
ddH ₂ O	-
Υτελ	10 μl

3.2.2 Χημικός μετασχηματισμός επιλεκτικών βακτηριακών κυττάρων XL1Blue, BL21 Gold και Rosetta 2 με τον πλασμιδιακό φορέα pET-33b(+) - ANGEL 2.

Αρχικά, τα επιλεκτικά κύτταρα (τα οποία φυλάσσονται στους -80 °C) *XL1Blue* και *BL21 Gold* αποψύχονται στον πάγο και στη συνέχεια αναμιγνύονται με 50 ng DNA [στην προκειμένη περίπτωση το προϊόν του ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ ANGEL 2 και pET-33b(+)]. Μετά από ήπια ανάδευση πραγματοποιείται επώαση στους 4°C για 30min. Ακολούθως, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, το οποίο είναι ρυθμισμένο στους 42°C για 45sec ακριβώς (heat shock), η διάρκεια αυτού του βήματος είναι μείζονος σημασίας για την επιτυχία του μετασχηματισμού. Στη συνέχεια, μεταφέρονται για επώαση στους 4°C για 2min. Μετά το πέρας των 2 λεπτών προστίθενται 900 μl προθερμασμένου (στους 37°C) θρεπτικού υλικού LB Broth άνευ αντιβιοτικού. Τα μετασχηματισμένα, πλέον, βακτηριακά κύτταρα

επώζονται στους 37°C υπό ανάδευση (160-210 rpm) για 1h. Μετά το πέρας της επώασης τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία petri με θρεπτικό μέσο LB Agar, στα οποία έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής, καναμυκίνη, τελικής συγκέντρωσης 50µg/ml, με γυάλινο διανομέα (πιπέττα pasteur). Τέλος, τα τρυβλία επώζονται για 12-16h σε ξηρό θερμαινόμενο θάλαμο θερμοκρασίας 37°C.

3.2.3 Δημιουργία υγρών καλλιιεργειών XI1Blue για απομόνωση πλασμιδίου

Σε 2 αποστειρωμένους σωλήνες τύπου falcon προστίθενται 7ml LB Broth και 7µl του αντιβιοτικού καναμυκίνη και εφόσον υπάρχουν διακριτές αποικίες πραγματοποιείται παραλαβή μιας αποικίας ευδιάκριτης και όχι κοντά σε άλλες και ενοφθαλμίζεται το θρεπτικό υλικό του σωλήνα. Οι σωλήνες με τις καλλιέργειες τοποθετούνται για επώαση O/N στους 37°C και 210 rpm.

Την επομένη, δημιουργούμε stock γλυκερόλης (700 µl κυττάρων + 300 µl αποστειρωμένη 50% γλυκερόλη) από τις συγκεκριμένες καλλιέργειες, τα οποία και φυλάσσονται στους -80 °C. Όλα τα βήματα της διαδικασίας μετασχηματισμού εκτελούνται υπό φλόγα.

Από τις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν, έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας. Το DNA που απομονώθηκε ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1%.

3.2.4 Υπερέκφραση πρωτεΐνης από μετασχηματισμένα βακτήρια

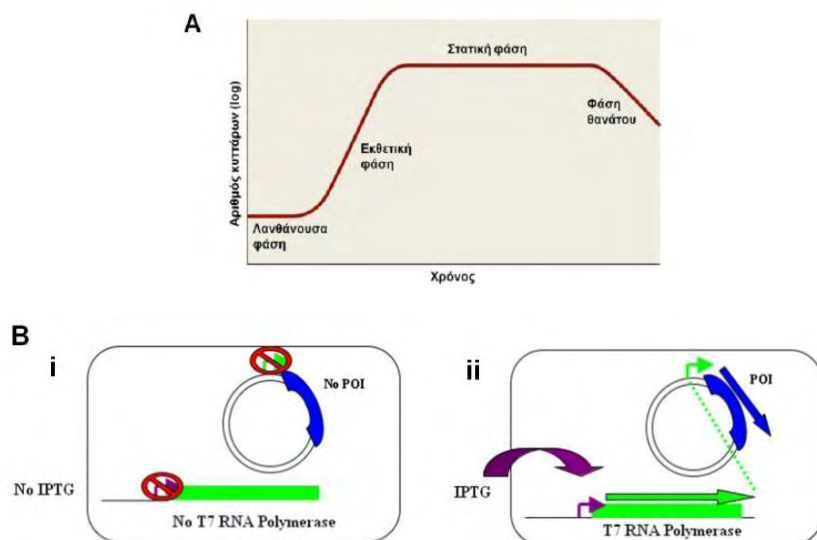
3.2.4.1 Αναζήτηση βέλτιστων συνθηκών έκφρασης της ανασυνδυασμένης ANGEL2 από το στέλεχος BL21-Gold

Για τον έλεγχο της παραγωγής της πρωτεΐνης σε διάφορες συνθήκες, εξετάστηκαν οι κυτταρικές σειρές BL21- Gold (DE3) και Rosetta 2, η επαγωγή της υπερέκφρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα (IPTG) ώστε να γίνει έλεγχος εάν η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκφράζεται σε αδιάλυτη μορφή ως κυτταρικό έγκλειστο.

Σε 3 σωλήνες τύπου falcon των 50ml προστίθενται 10ml LB Broth και 6µl αντιβιοτικού καναμυκίνη τελικής συγκέντρωσης 30µg/ml στον κάθε σωλήνα. Εμβολιάζουμε από μια ήδη έτοιμη υγρή καλλιέργεια των BL21-Gold σε αναλογία 1/100. Πριν πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός φυλάσσεται 1 ml LB Broth, το οποίο θα

χρησιμοποιηθεί ως τυφλό για την διαδικασία της φασματοφωτομετρικής παρακολούθησης της πορείας της καλλιέργειας.

Ακολουθως, γίνεται επώαση των 3 σωλήνων στους 37°C υπό ανάδευση στα 210 rpm, μέχρι $OD_{600nm} \sim 0,5-0,7$. Η καλλιέργεια παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά λαμβάνοντας 1mL καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα και γνωρίζοντας ότι τα βακτήρια ανά 20 λεπτά διαιρούνται, μπορεί να υπολογιστεί ο χρόνος επώασης της καλλιέργειας μέχρι να φτάσει να έχει $OD = 0.7$ A, όπου και θεωρείται, για το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, πως η καλλιέργεια θα βρίσκεται στο απόγειο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (**Εικόνα 14**). Είναι επιθυμητό, η καλλιέργεια να φτάσει στο μέγιστο σημείο της εκθετικής φάσης όπου και θα ξεκινήσει η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης προς μελέτη.



Εικόνα 9. Α. Διαγραμματική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης (σε αριθμό κυττάρων) στο πέρασμα του χρόνου (Pearson Education ©, Benjamin Cummings, 2006). **Β.** Απεικόνιση του ελέγχου της επαγωγής της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης με το IPTG. **i.** Απεικονίζεται η απουσία επαγωγής, απουσία IPTG καθώς δεν επάγεται το τροποποιημένο οπερόνιο της λακτόζης που φέρει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης, **ii.** Απεικονίζεται η έναρξη της επαγωγής της μεταγραφής της προς μελέτη πρωτεΐνης με την προσθήκη του επαγωγέα IPTG (POI: πρωτεΐνη προς μελέτη) (openwetware.org)

Μόλις η απορρόφηση της καλλιέργειας είναι η κατάλληλη (μετά από 3.30 ώρες) γίνεται προσθήκη IPTG τελικής συγκέντρωσης 0,5 mM στον έναν σωλήνα και 1mM στον άλλον σωλήνα. Ο τρίτος σωλήνας ορίζεται ως τυφλό. Ακολουθεί επαγωγή της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης για 3h στους 37°C υπό ανάδευση (180-210 rpm). Όσο είναι παρόν το IPTG στη βακτηριακή καλλιέργεια, θα παράγεται το RNA της υπό μελέτη πρωτεΐνης (Εικόνα 17B). Μετά το πέρας της επαγωγής, τα falcon τοποθετούνται στους 4° C ώστε να βραχυνθεί η βακτηριακή ανάπτυξη. Η καλλιέργεια

των βακτηρίων φυγοκεντρείται σε erpendorf των 1,5ml στις 11.000xg/4°C για 1min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται καθώς αποτελεί το θρεπτικό μέσο και το κυτταρικό ίζημα φυλάσσεται στους -20°C.

3.2.5 Λύση βακτηριακών κυττάρων

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε μετά την υπερέκφραση εναποτίθεται σε πάγο έτσι ώστε να ξεπαγώσει ελαφρώς και να μπορεί να είναι εύκολο στη μεταχείριση. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε 4 κύκλους των 20 sec, όπου η συσκευή υπερήχων επί 20 sec παράγει υπερήχους εύρους 25%, σε συνεχόμενους κύκλους, οι οποίοι διαπερνούν το κυτταρόλυμμα και για 20 sec σταματάει την παραγωγή υπερήχων. Κατά τη διάρκεια της λύσης με υπερήχους αυξάνεται κατά πολύ η θερμοκρασία του διαλύματος, και για το λόγο αυτό, η λύση γίνεται ενώ ο σωλήνας, στον οποίο εμπεριέχεται το διάλυμα προς λύση, βρίσκεται σε πάγο ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη αυτή αύξηση της θερμοκρασίας. Στη συνέχεια, το διάλυμα των λυμένων κυττάρων υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση στις 13000rpm/4°C για 30min. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε 3 erpendorf με τα διακριτικά: control, soluble^{0,5}, soluble¹ όπου περιέχονται τα διαλυτά συστατικά. Το ίζημα καθώς αποτελείται από τα κυτταρικά υπολείμματα, αποστραγγίζεται για να απομακρυνθεί οποιαδήποτε ποσότητα από τις διαλυτές πρωτεΐνες, ώστε να αποφευχθούν οι ψευδώς θετικές ζώνες στην ηλεκτροφόρηση που θα ακολουθήσει. Στην συνέχεια, το ίζημα (pellet) επαναδιαλυτοποιείται σε 200μl SDS-PAGE Sample buffer 4x και έπειτα επαναλαμβάνεται η κατεργασία με υπερήχους. Η πλήρης λύση των κυττάρων γίνεται σε 1 κύκλο των 4 sec. Τα επαναδιαλυμένα ιζήματα μεταφέρονται σε 3 σωλήνες τύπου erpendorf με τα διακριτικά: control, insoluble^{0,5}, insoluble¹ καθώς εκεί περιέχονται τα αδιάλυτα συστατικά. Ακολούθως, πραγματοποιείται αραιώση 1:10 σε 2μl από τους συγκεκριμένους σωλήνες. Οι σωλήνες με τα διαλυτά και τα αδιάλυτα συστατικά τοποθετούνται στους -20°C.

3.2.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έχει ως στόχο το διαχωρισμό τους βάσει του μοριακού τους βάρους, επιλέγεται κάθε φορά η πυκνότητα της πηκτής που θα χρησιμοποιηθεί

ανάλογα με την πρωτεΐνη που επιλέγεται να ανιχνευθεί. Το σύστημα ηλεκτροφόρησης αποτελείται από 2 πηκτές διαφορετικής πυκνότητας. Η πηκτή συγκέντρωσης (stacking gel) η οποία έχει σταθερή πυκνότητα 5% και ο ρόλος της είναι η κίνηση και η στοίβαξη των πρωτεϊνών σε μια κοινή ζώνη ώστε να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού και να δημιουργηθεί ένα ενιαίο μέτωπο κατά την ηλεκτροφόρηση της πηκτής (**Πίνακας 8**). Η πυκνότητα της πηκτή διαχωρισμού (separating gel) κάθε φορά προσαρμόζεται ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Η συγκέντρωση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου που παρουσιάζεται στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι 10% (**Πίνακας 7**).

Η πηκτή συγκέντρωσης έχει μικρότερη πυκνότητα από την πηκτή διαχωρισμού και συγκεντρώνει τη ποσότητα των δειγμάτων που έχουν φορτωθεί στα πηγάδια, τα οποία όταν εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Ο σχηματισμός της πηκτής πολυακρυλαμιδίου γίνεται με την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου θερμοκρασία δωματίου παρουσία των παραγόντων υπερθειικό αμμώνιο (APS) και TEMED. Αρχικά, η πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται από πάνω της μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας της πηκτής. Αφού πήξει, αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται στη συσκευή η πηκτή συγκέντρωσης ακριβώς πάνω από την πηκτή διαχωρισμού, η οποία αφήνεται να πήξει. Στη συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X, έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή. Προετοιμάζονται τα δείγματα φόρτωσης με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4x έτσι ώστε σε όλα η τελική αραιώση των δειγμάτων να είναι 1X. Το ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4x περιέχει SDS που είναι ο κύριος αποδιατακτικός παράγοντας που θα αποδιατάξει τη δευτεροταγή και την τριτοταγή δομή (που δεν αποτελείται από δισουλφιδικούς δεσμούς) και επιπροσθέτως θα αποδώσει στις πρωτεΐνες ένα ενιαίο αρνητικό φορτίο ανάλογο της μάζας κάθε πρωτεΐνης (26). Στη συνέχεια, η πλήρης αποδιάταξη της τριτοταγούς δομής επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C, για 5 λεπτά. Η προσθήκη της β-μερκαπτοαιθανόλης έχει ως σκοπό την πλήρη αποδιάταξη της πρωτεΐνης καθώς ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, εμποδίζοντας την εκ νέου αναδίπλωση της πρωτεΐνης μετά το βρασμό. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην αποδιάταξη της τεταρτοταγούς δομής της πρωτεΐνης σε υπομονάδες. Το κυανό της βρωμοφαινόλης προστίθεται ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης, καθώς έχει ταχύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα από τις

ηλεκτροφορούμενες πρωτεΐνες (27). Ακολούθως, φορτώνονται τα δείγματα, καθώς και οι μάρτυρες μοριακών μαζών, στις ειδικές υποδοχές της πηκτής. Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται στο τροφοδοτικό το οποίο διαβιβάζει ρεύμα τάσης 130V στο κλειστό κύκλωμα μεταξύ της δεξαμενής της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Πίνακας 7 Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 10% (10ml)

Αντιδραστήρια	Όγκος
dH₂O	4.0 ml
Tris-HCl 1.5M pH8.8	2.5 ml
SDS 10%	100 μl
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	3.3 ml
APS 10%	100 μl
TEMED	4 μl

Πίνακας 8 Σύσταση πηκτής συγκέντρωσης 5% (4ml)

Αντιδραστήρια	Όγκος
dH₂O	2.7 ml
Tris-HCl 1M pH6.8	0.5 ml
SDS 10%	40 μl
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	0.67 ml
APS 10%	40 μl
TEMED	4 μl

3.2.7 Χρόση πηκτώματος ακρυλαμιδίου με Coomassie 0.05%

Η πηκτή μετά την ηλεκτροφόρηση, επώαζεται για 1 ώρα υπό ανάδευση σε διάλυμα που περιέχει 50 % (v/v) μεθανόλη και 10 % (v/v) οξικό οξύ. Ακολουθεί επώαση με το διάλυμα χρωστικής Coomassie για 20 λεπτά υπό ανάδευση και τέλος ο αποχρωματισμός της πηκτής με αρκετές πλύσεις με διάλυμα που περιέχει 40 % μεθανόλη (v/v) και 10 % (v/v) οξικό οξύ. Η πηκτή αποθηκεύεται σε διάλυμα 5 % (v/v) οξικού οξέος.

3.2.8 Καθορισμός συνθηκών υπερέκφρασης πρωτεΐνης με σφαιρίδια αγαρόζης Ni²⁺(IDA)/Protino

Αρχικά, διαλύονται 0,1 gr από τα σφαιρίδια αγαρόζης σε 1 ml MilliQ dH₂O και καθίζηση των σφαιριδίων με φυγοκέντρηση στα 500 rcf για 5 min. Στη συνέχεια, το υλικό (που περιέχει τα σφαιρίδια) εξισορροπείται με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης και κατόπιν, προστίθενται 400μl από τα διαλυτά δείγματα (soluble) και επωάζονται για 2 ώρες υπό διαρκή περιστροφή στους 4°C.

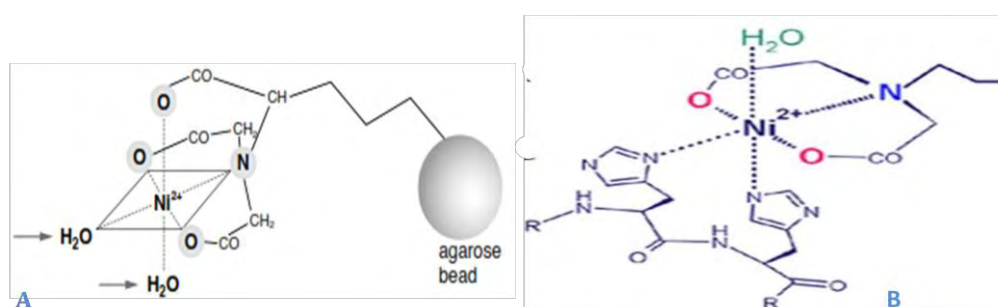
Στη συνέχεια, φυγοκεντρώνεται στα 500 rcf/ 4°C για 6 min και αφαιρείται το υπερκείμενο. Τα σφαιρίδια που απομένουν αναμιγνύονται με 1X Sample buffer. Τα δείγματα επωάζονται στους 95°C για 15min και εν συνεχεία φυγοκεντρώνεται για 2 min σε 500rcf/ 4°C. Συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο αναλύεται σε πηκτική ακρυλαμιδίου.

3.2.9 Απομόνωση σε Ni-NTA Agarose (beads)

Το σύστημα Ni-NTA Agarose είναι ένας τύπος χρωματογραφίας συγγένειας και επιτρέπει την γρήγορη και εύκολη απομόνωση της υπό μελέτη πρωτεΐνης που φέρει κατάλοιπα ιστιδίνης (His-Tag). Τα κατάλοιπα ιστιδίνης λόγω υψηλής εξειδίκευσης και συγγένειας, δεσμεύονται με τα ιόντα νικελίου (**Εικόνα 10**). Για την απομόνωση τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι τα διαλύματα εξισορρόπησης-έκπλυσης και έκλουσης. Καθώς τα beads είναι αποθηκευμένα σε 20% αιθανόλη, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 400 x g για 5min, όπου το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στη συνέχεια γίνεται εξισορρόπηση με 10 όγκους στήλης ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 400 x g για 5min και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το υπερκείμενο των λυμμένων κυττάρων, στη συνέχεια αναμιγνύεται με τα beads υπό ήπια ανάδευση για 1 ώρα και 30 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 400 x g για 5min στους 4°C και συλλέγεται το υπερδιήθημα (flow-through). Στο ίζημα προστίθενται 1mL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης στο οποίο περιέχεται μεγαλύτερη συγκέντρωση ιμιδαζολίου ώστε να γίνει απομάκρυνση των μη-ειδικών ουσιών που κατακρατήθηκαν και στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 400 x g για 5min, όπου συλλέγεται το υπερκείμενο. Το βήμα της έκπλυσης επαναλαμβάνεται δυο φορές.

Στο στάδιο της έκλουσης προστίθενται 100μl ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης στο ίζημα και ακολουθεί ήπια ανάδευση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και

φυγοκέντρωση στις 400 x g για 5min. Το διάλυμα έκλουσης περιέχει μιδαζόλιο σε συγκέντρωση 250mM. Ο ρόλος του μιδαζολίου είναι να δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου και να ανταγωνίζεται τη δέσμευση των πρωτεϊνών που φέρουν τα κατάλοιπα ιστιδίνης. Η έκλουση πραγματοποιείται με φυγοκέντρωση στις 400 x g για 5min, συλλέγοντας κάθε φορά το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται 5 φορές. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και στη συνέχεια πραγματοποιείται χρώση της πηκτής χρησιμοποιώντας Coomassie.

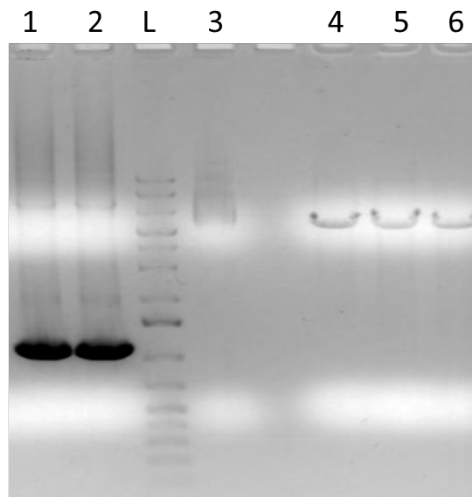


Εικόνα 10. A Protino® Νί-NTA Αγαρόζης. Δομή του NTA σε σύμπλοκο με ιόντα νικελίου. Ο προσδέτης νιτριλοτριοξικό οξύς (NTA) είναι προσδεμένος σε σφαιρίδια αγαρόζης που είναι κατάλληλα για την σύνδεση της πρωτεΐνης. Ο προσδέτης NTA καταλαμβάνει τέσσερις από τις έξι θέσεις πρόσδεσης στην σφαίρα συντονισμού των ιόντων νικελίου **B. Αντίδραση νικελίου με 2 ιστιδίνες** Οι υπόλοιπες δύο θέσεις συνήθως καταλαμβάνονται από μόρια νερού και μπορούν να ανταλλάσσονται με κατάλοιπα ιστιδίνης, που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Κλωνοποίηση της ANGEL2

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET-33b(+), όπου η απομόνωση του είχε προηγηθεί από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ακολούθησε η ενζυμική πέψη του φορέα pET-33b(+) και η ενίσχυση του cDNA της ANGEL2 με απλή PCR όπως περιγράφεται παραπάνω (3.2.1). Τα προϊόντα της PCR και η επιβεβαίωση της πέψης του πλασμιδιακού φορέα pET-33b(+) έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (**Εικόνα 11**). Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 11, το αρνητικό control που χρησιμοποιήθηκε (άπεπτος φορέας), εμφανίζει ένα μικρό smear (διαδρομή 3), το οποίο οφείλεται στις διάφορες μορφές υπερελίκωσης στις οποίες μπορεί να βρίσκεται ο άκοπος, κυκλικός φορέας, σε αντίθεση με το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο, το οποίο εμφανίζει ξεκάθαρη ζώνη στο ίδιο ύψος (διαδρομές 4-6).

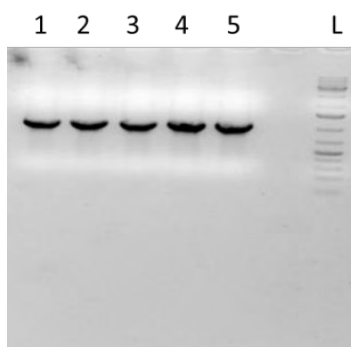


Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR της ANGEL2 και προϊόντων της πέψης του πλασμιδιακού φορέα pET-33b(+). Διαδρομές 1-2: το προϊόν της ενίσχυσης του cDNA της ANGEL2 στο αναμενόμενο ύψος. Διαδρομή 3: φορέας pET-33b(+) που δεν έχει υποστεί πέψη. Διαδρομές 4-6: φορέας pET-33b(+) μετά την πέψη με EcoRI. L: δείκτης μοριακών μαζών.

Αφότου επαληθεύτηκε η πέψη του φορέα pET-33b(+) και η ενίσχυση του ειδικού προϊόντος της PCR, προβήκαμε σε ανάκτηση του DNA από την πηκτή

αγαρόζης χρησιμοποιώντας το PCR gel extraction clean-up kit. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού, προκειμένου τα άκρα του γραμμικού πλασμιδίου pET-33b(+) να ανασυνδυαστούν με τα ομόλογά τους άκρα όπως προστέθηκαν στο γονίδιο της ANGEL2 μετά από ενίσχυσή του με ειδικούς PCR εκκινητές. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί πως ο χρόνος επώασης ήταν 30 λεπτά, ενώ τηρήθηκε και η αναλογία 3:1 μεταξύ ANGEL2 DNA και pET-33b(+) DNA.

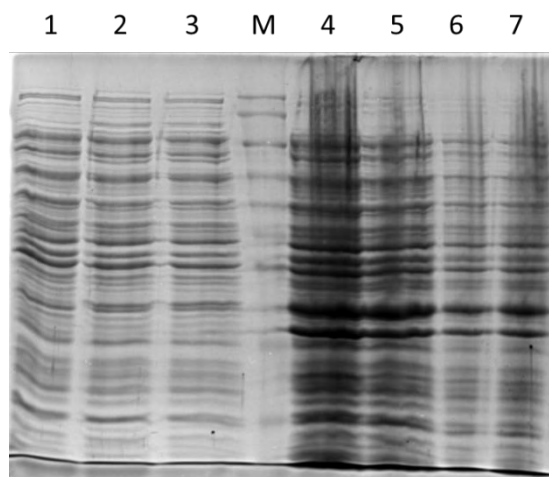
Ακολούθησε μετασχηματισμός επιλεκτικών βακτηριακών κυττάρων XL1Blue το προϊόν της αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού. Στη συνέχεια, έγινε επίστρωση τρυβλίων (LB άγαρ, με προσθήκη καναμυκίνης), υπό φλόγα, με 50μl και 150μl αντίστοιχα από την αντίδραση μετασχηματισμού, και επακόλουθη επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για περίπου 12-16h. Μετά το πέρας των 16 ωρών, έγινε δημιουργία μικρών βακτηριακών καλλιέργειών με ενοφθαλμισμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία (συνολικά 5) σε LB broth (με καναμυκίνη) και επώασή τους στους 37°C, υπό ανάδευση στις 210rpm για 12-16h. Από τις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν, έγινε απομόνωση πλασμδιακού DNA μικρής κλίμακας. Το DNA που απομονώθηκε ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1%. (*Εικόνα 17*). Ο έλεγχος της θετικότητας των πλασμιδίων (δηλαδή αν φέρουν το cDNA της ANGEL2) έγινε με PCR. Από τα 5 δείγματα που αναλύθηκαν, και στα 5 είχαμε ειδική ενίσχυση προϊόντος στο αναμενόμενο μήκος που αντιστοιχεί στο μέγεθος του cDNA της ANGEL2. Και τα 5 «θετικά» πλασμίδια στάλθηκαν για ανάλυση αλληλούχισης, η οποία και επιβεβαίωσε την επιτυχία της κλωνοποίησης της ANGEL2 στον πλασμδιακό φορέα pET-33b(+). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης (sequencing) έγινε με το πρόγραμμα MEGA 3.1.



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR της ANGEL2 που εμπεριέχεται στα 5 πλασμίδια (διαδρομές 1-5). L: δείκτης μοριακών μαζών.

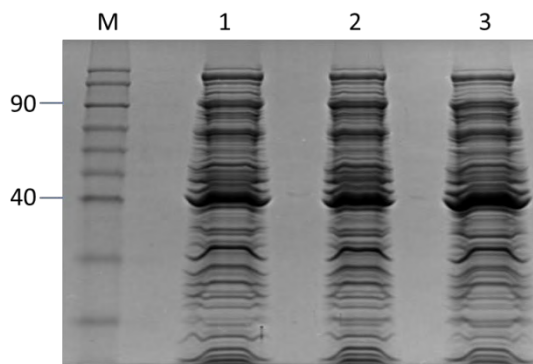
4.2 Δοκιμασία υπερέκφρασης της ANGEL2

Αρχικά, κύτταρα BL21 Gold μετασχηματίστηκαν με πλασμίδιο από τις αποικίες που επιβεβαιώθηκαν θετικές ότι περιέχουν την ANGEL2. Ακολούθησε δοκιμασία των βέλτιστων συνθηκών υπερέκφρασης όπως περιγράφεται παραπάνω (3.2.4) και εν συνεχεία ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της ANGEL2 σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (SDS-PAGE) (*Εικόνα 18*).



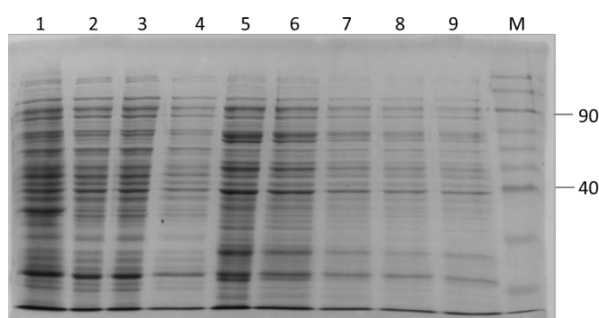
Εικόνα 18. Δοκιμασία υπερέκφρασης της ANGEL2 από το στέλεχος BL21-Gold στους 37°C. 1: διαλυτό απουσία IPTG, 2: διαλυτό παρουσία 0,5mM IPTG, 3: διαλυτό παρουσία 1mM IPTG, 4: αδιάλυτο απουσία IPTG, 5: διάχυση από διαδρομή 4, 6: αδιάλυτο παρουσία 0,5mM IPTG, 7: αδιάλυτο παρουσία 1mM IPTG, M: δείκτης μοριακών μαζών.

Η επιβεβαίωση υπερέκφρασης της πρωτεΐνης επιχειρήθηκε να γίνει με Agarose-beads (Ni^{2+} - IDA) /Protino)- Macherey-Nagel (*Εικόνα 13*).



Εικόνα 13. Δοκιμασία υπερέκφρασης της ANGEL2 από το στέλεχος BL21-Gold στους 37°C κατόπιν επώασης με τα σφαιρίδια αгарόζης Ni^{2+} . 1: διαλυτό παρουσία 1mM IPTG, 2: διαλυτό παρουσία 0,5mM IPTG, 3: διαλυτό απουσία IPTG, M: δείκτης μοριακών μαζών.

Καθώς δεν οδηγηθήκαμε σε κάποιο συμπέρασμα για το ποιες είναι οι βέλτιστες συνθήκες υπερέκφρασης, δοκιμάσαμε και την κυτταρική σειρά Rosetta 2 ακολουθώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται παραπάνω (3.2.2, 3.2.4) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της ANGEL2 σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% (SDS-PAGE). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η επιβεβαίωση υπερέκφρασης της πρωτεΐνης επιχειρήθηκε με Agarose-beads (Ni^{2+} - IDA) /Protino)- Macherey-Nagel (*Εικόνα 14*).



Εικόνα 14. Δοκιμασία υπερέκφρασης της ANGEL2 από το στέλεχος Rosetta 2 στους 37°C και επακόλουθη επώασης με τα σφαιρίδια αгарόζης Ni^{2+} . 1: αδιάλυτο απουσία IPTG, 2: αδιάλυτο παρουσία 0,5mM IPTG, 3: αδιάλυτο παρουσία 1mM IPTG, 4: διαλυτό απουσία IPTG, 5: διαλυτό παρουσία 0,5mM IPTG, 6: διαλυτό παρουσία 1mM IPTG, Διαδρομές 7-9: διαλυτά κλάσματα που υπέστην επώαση με τα σφαιρίδια Ni^{2+} . 7: διαλυτό απουσία IPTG, 8: διαλυτό παρουσία 0,5mM IPTG, 9: διαλυτό παρουσία 1mM IPTG, M: δείκτης μοριακών μαζών.

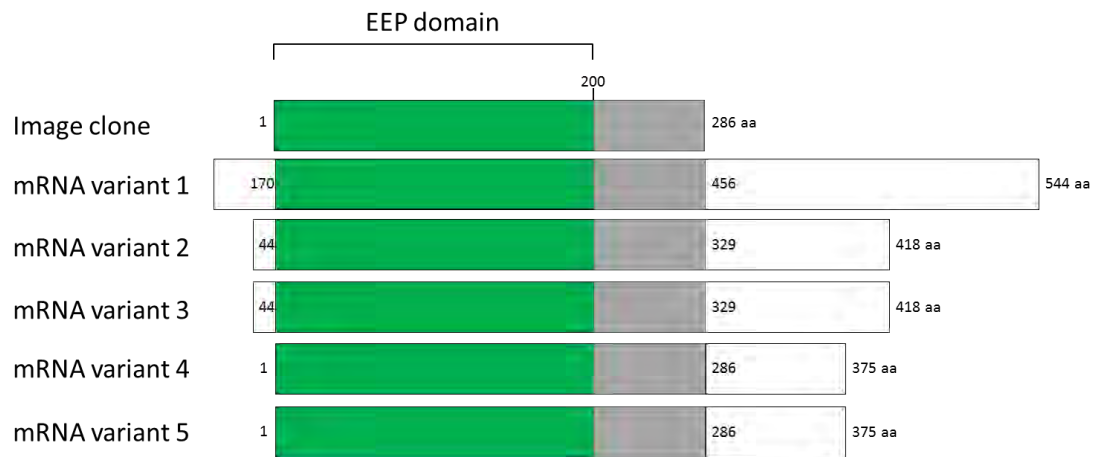
4.2.1 Ομοπαράθεση του cDNA της ANGEL2 με τον αλγόριθμο BLASTn

Η δυσκολία που αντιμετωπίσαμε κατά την έκφραση της ANGEL2 μας οδήγησε να εξετάσουμε το κατά πόσο η αλληλουχία που είχε κλωνοποιηθεί στο φορέα ήταν ορθή. Έχοντας αποκλείσει το ενδεχόμενο αποτυχίας της κλωνοποίησης, καθώς με τη μέθοδο του HD Infusion cloning ο προσανατολισμός του ενθέματος στο φορέα κλωνοποίησης είναι υποχρεωτικά σωστός, και η ύπαρξη του ενθέματος επιβεβαιώθηκε με PCR και αλληλούχιση, ακολούθησαμε μια υπολογιστική προσέγγιση. Για το λόγο αυτό, η αλληλουχία cDNA της ANGEL2 χρησιμοποιήθηκε ως ακολουθία επερώτησης στον αλγόριθμο BLASTn, ώστε να εξακριβώσουμε εάν ο κλώνος που ήταν εμπορικά διαθέσιμος από την εταιρία SourceBioScience αντιστοιχούσε στην κωδική αλληλουχία του γονιδίου της ANGEL2.

Το αποτέλεσμα της ομοπαράθεσης συνοψίζεται στο παρακάτω

Σχήμα

1.



Σχήμα 1. Το αποτέλεσμα της ομοπαράθεσης του εμπορικού κλώνου της ANGEL2.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η τελική μοίρα κάθε RNA είναι η πλήρης αποικοδόμησή του. Ο ρυθμός της ανακύκλωσης των RNA παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας των επιπέδων τους και το ρυθμό με τον οποίο τα κύτταρα σταματούν την έκφραση ενός γονιδίου του οποίου το προϊόν δε χρειάζεται πλέον το κύτταρο. Η ποικιλομορφία των απαδενυλασών, η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδρώντων μορίων, καθώς και η ρύθμισή τους, δημιουργεί ένα περίπλοκο δίκτυο ώστε να ρυθμίζεται ακριβώς η ενδοκυττάρια ομοιόσταση του RNA.

Γενικά, τα mRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι πιο σταθερά. Υπάρχουν mRNA τα οποία έχουν χρόνο ημιζωής παραπάνω από 10 ώρες, ενώ άλλα mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, όπως αυξητικοί παράγοντες και πρωτεΐνες-ρυθμιστές γονιδίων, των οποίων οι ρυθμοί παραγωγής απαιτούν ταχεία αλλαγή επιπέδων έκφρασης, έχουν ιδιαίτερα μικρούς χρόνους ημιζωής (5).

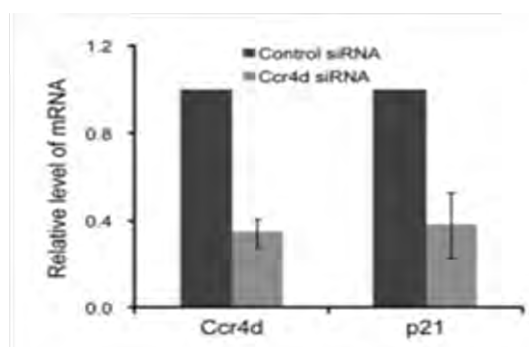
Ένας πιθανός ρόλος της Angel2 είναι ότι βοηθά στη διατήρηση του μήκους της πολυ(A)-ουράς των πυρηνικών mRNAs (~200-250nt). Όπως έχει αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος, ο μηχανισμός της πυρηνικής πολυαδενυλίωσης προσθέτει στα νεοσυντιθέμενα mRNAs μια πολυ(A) ουρά, που το μέγεθος της στον πυρήνα φαίνεται να καθορίζεται από τους φυσικούς περιορισμούς που επιβάλλονται από τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-RNA, τα οποία περιλαμβάνουν τις πυρηνικές πολυ(A) συνδεόμενες πρωτεΐνες που δεσμεύονται στις πολυ(A)-ουρές. Έχει προταθεί σε ζυμομύκητες ότι η πυρηνική απαδενυλίωση περιορίζει τις πρόσφατα προστιθέμενες mRNA πολυ(A)-ουρές για τα σωστή μήκη τους έτσι ώστε τα mRNAs να μπορούν να μεταφερθούν εύκολα στο κυτταρόπλασμα (21), (28).

Όμως, πρόσφατες έρευνες αντικρούονται με τα παραπάνω και αποδεικνύουν ότι η Ccr4d (Angel2) δεν εμπλέκεται στην απαδενυλίωση του mRNA. Ως γνωστό, η G1 φάση ελέγχεται από ένα σύνολο κυκλινεξεαρτώμενων κινασών (CDKs), οι οποίες ενεργοποιούνται από συνδεδεμένες κυκλίνες (CDKs) αλλά αναστέλλονται από δύο κατηγορίες αναστολέων των CDKs. Μία ομάδα είναι η INK4 οικογένεια, συμπεριλαμβανομένης της p16, p15, p18 και p19, οι οποίες στοχεύουν ειδικά τις CDK4 και CDK6. Η άλλη ομάδα είναι η CIP / KIP οικογένεια, συμπεριλαμβανομένης της p21, p27 και p57 που αναστέλλουν ένα ευρύ φάσμα των CDKs. Η p21 είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της σηματοδότησης της p53 στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου κατά την μετάβαση από την G1 φάση στην S και από

την G2 στην M. Εκτός από την μεταγραφική ρύθμιση από την οικογένεια p53, τα επίπεδα της p21 βρέθηκε να ελέγχονται από μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς. Όλο και περισσότερες ενδείξεις προτείνουν ότι η σταθερότητα του mRNA της p21 ρυθμίζεται από μια οικογένεια RNA-δεσμευόμενων πρωτεϊνών που περιέχουν μια περιοχή αναγνώρισης RNA και να έχουν συγγένεια με την 3' UTR.

Η Ccr4d σε γενικές γραμμές εκφράζεται σε διάφορους φυσιολογικούς ιστούς και η έκφραση της αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και επάγει την διατήρηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Πειράματα έδειξαν ότι Ccr4d έχει υψηλή συγγένεια δέσμευσης στην 3' UTR του mRNA της p21, οδηγώντας στη σταθεροποίηση του mRNA της και η εκτοπική έκφραση, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την διατήρηση του κυτταρικού κύκλου στη G φάση. Παράλληλα, η μείωση της Ccr4d οδηγεί στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου. Έχει αποδειχθεί ότι η εκτοπική έκφραση της Ccr4d οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας της p21, ενώ αποσιώπηση της Ccr4d οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητας της p21. (*Εικόνα 15*).

Συνεπώς, λόγω της αναστολής του κυτταρικού κύκλου μέσω της p21-εξαρτώμενη και p53-ανεξάρτητης πορείας, η Ccr4d μπορεί να χαρακτηριστεί ως αποπτωτική πρωτεΐνη και θα μπορούσε να έχει ένα σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Έχει δείχθει ότι η έκφραση της Ccr4d μεταβάλλεται σε διάφορους ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς (20).



Εικόνα 15. Ρύθμιση της έκφρασης της p21 από την Ccr4d. Η Ccr4d επάγει την έκφραση της p21 ενισχύοντας την σταθερότητα του mRNA της p21. Συγκεκριμένα MCF-7 κύτταρα μετασχηματίστηκαν με control siRNA ή Ccr4d siRNAs και όλα τα mRNAs αναλύθηκαν ως προς την έκφραση του mRNA της p21 με την μέθοδο της real-time RT-PCR. Στην εικόνα παρατηρείται μείωση των επιπέδων των mRNAs της Ccr4d καθώς και μείωση των επιπέδων των mRNAs της p21 (20)

Ένα άλλο πιθανό υπόστρωμα ήρθε στο φως με την ανακάλυψη των μεγάλων μη-κωδικοποιημένων RNAs (lncRNAs). Τα lncRNAs, που ορίζονται ως μετάγραφα

RNAs μεγαλύτερα από 200nt σε μήκος, βιοχημικά μοιάζουν με τα συμβατικά mRNAs, δηλαδή έχουν 5'-καλύπτρα, έχουν υποστεί μάτισμα και πολυαδενυλίωση, αλλά δεν υπόκεινται σε πρωτεϊνοσύνθεση. Το γονιδίωμα κωδικοποιεί τουλάχιστον τόσα lncRNAs όσα κωδικοποιούν πρωτεΐνες και περίπου το 30% των lncRNAs βρίσκονται στον πυρήνα. Θα ήταν ενδιαφέρον να αποδειχθεί ότι η Angel2 είναι υπεύθυνη για απαδενυλίωση αυτών των lncRNAs που εντοπίζονται στον πυρήνα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιχειρήθηκε η κλωνοποίηση και η έκφραση του γονιδίου της ANGEL2 με σκοπό την αποσαφήνιση του ρόλου της πρωτεΐνης αυτής και τη διαπίστωση εάν διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα απαδενυλάσης. Παρόλα αυτά, η απόπειρα δε στέφθηκε με επιτυχία (Εικόνα 11, Εικόνα 12), παρότι η διαδικασία της κλωνοποίησης ήταν καθόλα επιτυχής, ο στόχος της παραγωγής πρωτεΐνης από ειδικά βακτηριακά στελέχη δεν επετεύχθη (Εικόνα, Εικόνα 13, Εικόνα 14). Αυτό είναι κυρίως εμφανές στις εικόνες 18 και 19, όπου στο προφίλ των ηλεκτροφορημένων πρωτεϊνών δεν παρατηρείται καμία απολύτως διαφορά σε κάποια από τις ζώνες των πρωτεϊνών από τα βακτήρια που έχουν καλλιεργηθεί υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα (IPTG) ή και απουσία αυτού.

Παρότι έγινε προσπάθεια να επαναπροσεγγιστεί η δοκιμασία της υπερέκφρασης της ANGEL2 αλλάζοντας βακτηριακό στέλεχος (Rosetta2 από BL21-GOLD), και πάλι επιλέγοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα, πάλι δεν επήλθε το επιθυμητό αποτέλεσμα. Και στις δυο περιπτώσεις, για την αύξηση της ευαισθησίας και της ανίχνευσης με μεγαλύτερη ευκολία της πρωτεΐνης προς μελέτη, έγινε κατεργασία των διαλυτών στοιχείων των κυττάρων, κατόπιν της λύσης τους με υπερήχους (3.2.4, 3.2.5), με σφαιρίδια αγκιστείας. Στόχος αυτής της προσέγγισης ήταν να εμπλουτιστεί το δείγμα, που επρόκειτο να ηλεκτροφορηθεί, στην πρωτεΐνη προς μελέτη, ώστε αυτή να είναι πιο εύκολα παρατηρήσιμη στην πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Όπως προέκυψε από την ομοπαράθεση του εμπορικά διαθέσιμου κλώνου της ANGEL2 (Σχήμα 1), ο κλώνος αυτός δεν είχε το μήκος που θα έπρεπε (Σχήμα 1, mRNA variant 1), αλλά ούτε αποτελούσε κάποιο προϊόν εναλλακτικού ματίσματος της ANGEL2 (Σχήμα 1, mRNA variants 1-5). Αντίθετα, ο εμπορικά διαθέσιμος κλώνος της ANGEL2 διέθετε ένα τμήμα που αντιστοιχούσε στην καταλυτική περιοχή της οικογένειας των EEP απαδενυλασών. Δηλαδή, το τμήμα που κλωνοποιήθηκε στο φορέα pET33b(+) δεν αποτελούσε το πλήρες μήκος του cDNA της ANGEL2, αλλά

μόνο ένα τμήμα αυτού, και μάλιστα ένα τμήμα που ήταν κοινό για όλα τα εναλλακτικά μετάγραφα της ANGEL2.

Η δυσκολία στην έκφραση μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι αυτό το τμήμα της ANGEL2, μπορεί να μην αποτελούσε ένα σωστό αναγνωστικό πλαίσιο ώστε να μεταγραφεί σωστά. Για να επιτευχθεί η έκφραση του γονιδίου της ANGEL2 απαιτείται βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου υπερέκφρασής της με τη δοκιμασία περισσότερων συνθηκών υπερέκφρασης, δηλαδή τη δοκιμή περισσότερων συνθηκών θερμοκρασίας, δοκιμή σε άλλα βακτηριακά στελέχη, ή δοκιμή δημιουργίας τμημάτων διαφορετικού μήκους του cDNA της ANGEL2 τα οποία εκφράζονται πιθανώς πιο εύκολα από την *Escherichia coli*. Μελλοντικούς στόχους της μελέτης της πρωτεΐνης ANGEL2 είναι η παραγωγή της σε μεγάλη κλίμακα από βακτήρια και απομόνωσή της με σκοπό την ανάπτυξη κρυστάλλων της ANGEL2 και απώτερο σκοπό τη επίλυση της δομής της μέσω περίθλασης ακτίνων X, αλλά και την παράλληλη μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς της, αλλά και η κατά θέση μετάλλαξη της πρωτεΐνης στα υποψήφια αμινοξέα του ενεργού της κέντρου, εφόσον προκύψει από τις δοκιμασίες ότι έχει δραστηριότητα απαδενυλάσης. Τέλος, έντονο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η μελέτη των πιθανών στόχων και μορίων που αλληλεπιδρά η ANGEL2 με στόχο την αποσαφήνιση του βιολογικού της ρόλου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Geofrey M. Cooper, ROBERT E.HAUSMAN.** TO ΚΥΤΤΑΡΟ-Μια Μοριακή Προσέγγιση. s.l. : Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2011, σσ. 429-434.
2. **Bruce Alberts, Lewis J et al.** *Cell biology*. s.l. : Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης Ε.Π.Ε, 2006.
3. **Edwalds-Gilbert et al, Edwalds-Gilbert G, Veraldi KL, Milcarek C.** Alternative poly(A) site selection in complex transcription units. 1997, σσ. 2547-2561.
4. **Viphakone, N et al.** Molecular dissection of mRNA poly(A) tail length. *Nucleic Acids Res.* 2008.
5. **Lewin.** *Genes VIII*. s.l. : Pearson Education, 2004.
6. **Haibo Zhang, Jun Hu et al.** PolyA_DB: a database for mammalian mRNA polyadenylation. *Nucleic Acids Research- NCBI*. 2004.
7. **Yuri V. Svitkin, Akiko Yanagiya, Alexey E. Karetnikov et al.** Control of Translation and miRNA-Dependent Repression by a Novel Poly(A) Binding Protein, hnRNP-Q. *Plos.* 21 05 2013.
8. **Eric Huntzinger, Duygu Kuzuog, lu-O ztu" rk, Joerg E. Braun, Ana Eulalio, Lara Wohlbold.** The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. 2012.
9. **Tian, Yan J et al.** 2005.
10. **Paker, Beelman C.A. and.** Degradation of mRNA in eukaryotes, *Cell*. 1995, σσ. 179–183.
11. **Garneau N. L., Wilusz J. and Wilusz C. J.** The highways and byways of mRNA decay, . *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*,. 2007, Τόμ. 8: 113–126.
12. **Parker, Song.** 2004.
13. *neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer.* **Carney D.N., Marangos P.J., Ihde D.C., Bunn P.A. Jr, Cohen M.H., Minna J.D., Gazdar A.F.** 1982, σσ. 583-5.
14. **Xu N., Chen C. and Shyu A.** Modulation of the Fate of Cytoplasmic mRNA by AU-Rich Elements: Key Sequence Features Controlling mRNA Deadenylation and Decay, *Molecular and Cellular Biology*. 1997, σσ. 4611–4621.
15. **Nelson, D.L., Cox, M.M.** RNA metabolism. *Principles of Biochemistry*. s.l. : 3rd Edition, 2000, σ. Chapter 26.
16. **Wichens, Goldstrom.** Multifunctional deadenylase complexes diversify. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 2008.

17. **Harnisch, C., Moritz, B., Rammelt, C., Temme, C., Wahle, E.,** Activity and Function of Deadenylases. 2012, σ. Chapter 9.
18. **Kun Xu, Yuwei Bai et al.** Insights into the structure and architecture of the CCR4-NOT complex. *Frontiers in Genetics*. 16 May 2014.
19. **Gancendo, J.M.,** Yeast carbon catabolite repression, *Microbiol Mol Biol*. 1998.
20. **Xia Yi, Mei Hong et al.** RNA Processing and Modification protein, carbon catabolite repression 4 (Cc4), arrests the cell cycle through p21-dependent and p53-independent pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 30 April 2012.
21. **Alan R. Godwin, Shihoko Kojima et al.** Kiss your tail goodbye: the role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology. *NIH Public Access*. 1 June 2014.
22. **Μπαλατσός, Ν.Α.Α.,** Δράση τροποποιητών βιολογικής απόκρισης και αντικαρκινικών στη δομή και στη λειτουργία ενζύμων σταθερότητας μηνύματος RNA, ο ρόλος τους στη βιολογία του καρκίνου και η σημασία τους στη διάγνωση και στη θεραπεία. *Διαδακτορική διατριβή, Τμήμα Ιατρικής, Παν.Αθηνών*. 1999.
23. **Robles, M.S., Cox, J., Mann, M.** In-Vivo Quantitative Proteomics Reveals a Key Contribution of Post-Transcriptional Mechanisms to the Circadian Regulation of Liver Metabolism. *PlosOne*. 2014.
24. **Γιαννούλη, Σ.Ε.** Γονιδιωματική ανάλυση και λειτουργικός χαρακτηρισμός ασύνηθων συστημάτων αμινοακυλίωσης του μεταφορικού RNA σε παθογόνους μικροοργανισμούς. *Διδακτορική διατριβή, ΤΒΒ*. 2008.
25. **Edition, Novagen 10th.** *pET Manual*. May 2003.
26. **Schoenberg D.R., Maquat L.E.,** Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Na Rev Genet*. 2012.
27. **Weber, K., Osborn, M.** The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*. 1969.
28. **Brown CE, Sachs AB.** Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol. Cell. Biol*. 1998;.
29. **Robbins.** *Lung*. 2000.
30. **Laura Boyero, Abel Sánchez-Palencia, M^a Teresa Miranda-León et all.** Survival, Classifications and Desmosomal Plaque Genes. *International Journal of Medical Sciences*. 10 07 2013, σσ. 1166-1173.
31. **Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM.** *Initial evaluation of the patient with lung cancer*. 2003.
32. **Park BJ, Altorki NK.** *Diagnosis and management of early lung cancer*. 2002. σσ. 76-457.