ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

Βιοχημικός Χαρακτηρισμός της *AtHesperin*

Ραφαηλία Α. Μπέτα

Λάρισα 2014

UNIVERSITY *of* THESSALY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

FACULTY OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

Diploma thesis

Biochemical assessment of *AtHesperin*

Rafailia A. Beta

Larissa 2014

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Δρ Μπαλατσός Νικόλαος, (επιβλέπων καθηγητής)
Επίκ. Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

Δρ Λεωνίδας Δημήτριος
Αναπ. Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

Δρ Παπαδοπούλου Καλλιόπη
Αναπ. Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, ΤΒΒ, Π.Θ.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, από το Φεβρουάριο του 2013 έως το Σεπτέμβριο του 2014, υπό την επίβλεψη του Επικ. Καθηγητή Βιοχημείας Δρ Μπαλατσού Νικόλαου.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ Μπαλατσό Νικόλαο, για την υπόδειξη του θέματος, την εμπιστοσύνη του, την καθοδήγησή του, και την υπομονή του, το Δρ Λεωνίδα Δημήτριο για την καθοδήγησή του και τη συνεισφορά του στην ομαλή διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας, και την Δρ Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την άριστη συνεργασία της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την ευχάριστη συνεργασία και τη συντροφικότητά τους. Αρχικά, θα ήταν σημαντική παράλειψη να μην αποδώσω ευχαριστίες προς τη Λέκτορα Βιοχημείας - Μεταβολισμού, Δρ Σκαμνάκη Βασιλική, για τις πολύτιμες συμβουλές της επί της απομόνωσης και του καθαρισμού ενζύμων. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του τμήματος Αθανάσιο Κυρίτση για την καθοδήγηση, τις συμβουλές, και τη συμπαράστασή του, τους υποψήφιους διδάκτορες Αναστασία Καντσάδη, Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου και Γεώργιο Στραβοδήμο, για την προσοχή και τις συμβουλές τους κατά την απομόνωση της *AtHesp,* καθώς και για τα εποικοδομητικά διαλείμματά μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιο διδάκτορα Βύρωνα Γοργογιέτα και Παναγιώτη Μαραγκοζίδη για τις συμβουλές τους, την πρόθυμη βοήθειά που μου προσέφεραν και την ευχάριστη παρέα τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και, ιδιαίτερα, την οικογένειά μου για την υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ 7
II. ABSTRACT 7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 8
1.1. Ο ημερονύκτιος (κιρκαδικός) ρυθμός 8
1.1.1. Το κιρκάδιο ρολόι στα φυτά 10
1.2. Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις 11
1.2.1. Πολυαδενυλίωση 12
1.1. Αποικοδόμηση του mRNA 13
1.1.1. Ρύθμιση της αποαδενυλίωσης 14
1.1.2. Αποαδενυλίωση 16
1.2. Η Arabidopsis thaliana Hesperin 18
2. ΣΚΟΠΟΣ 20
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ 20
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 21
3.1. Υλικά 21
3.1.1. Αντιδραστήρια 21
3.1.2. Βακτηριακά στελέχη 22
3.1.3. Ένζυμα 22
3.1.4. Δείκτες μοριακών βαρών 22
3.1.5. Χρωματογραφία συγγένειας 22
3.1.6. Πλασμιδιακός Φορέας 22
3.1.7. Διαλύματα 23
3.1.8. Οργανολογία 26
3.2. Μέθοδοι 27
1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 47
2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 59

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο έλεγχος της αποικοδόμησης του ευκαρυωτικού mRNA είναι ένα σημαντικό στοιχείο της ρεύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Το πρώτο και καθοριστικό βήμα της αποικοδόμησης ου mRNA αποτελεί η απομάκρυνση της πολυ(Α) ουράς του (αποαδενυλίωση), από μια οικογένεια ενζύμων που ονομάζονται αποαδενυλάσες. Τουλάχιστον εννέα τέτοια ένζυμα έχουν βρεθεί για τον άνθρωπο, ενώ το *Arabidopsis thaliana* μπορεί να έχει ίσως και 26 αποαδενυλάσες. Ο αυξημένος αριθμός αποαδενυλασών πιθανόν αντανακλά τις διαφορετικές ανάγκες για έκφραση συγκεκριμένων mRNA σε διαφορετικές στιγμές σε κύτταρα ή ιστούς, αλλά και την παρουσία διαφορετικών mRNA σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Τέτοια φαινόμενα συμβαίνουν κατά τον έλεγχο των ταλαντώσεων της γονιδιακής έκφρασης που σχετίζονται με τους ημερήσιους ρυθμούς στο μεταβολισμό και τη φυσιολογία των ευκαρυωτικών οργανισμών. Ωστόσο, η αποαδενυλίωση στα φυτά δεν έχει μελετηθεί σε βάθος. Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε μια νέα αποαδενυλάση από το φυτό *Arabidopsis thaliana*, η AtHESP. Μέσω πειραματικών αλλά και *in silico* δεδομένων η μοριακή μάζα του ενζύμου υπολογίζεται στα 47kDa, ενώ κινητικές μελέτες υποδεικνύουν πως πρόκειται για αλλοστερικό και ολογομερές ένζυμο. Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζεται σε μεθόδους βελτίωσης των διαδικασιών απομόνωσης του ενζύμου, με απώτερο σκοπό τη διερεύνηση της δομής του και την κατανόηση της κινητικής συμπεριφοράς του.

II. ABSTRACT

The control of eukaryotic mRNA degradation is an important component of the regulation of gene expression. The first and rate-limiting step of eukaryotic mRNA degradation is the removal of their poly(A) tails (deadenylation), catalysed by a family of enzymes known as deadenylases. At least nine such enzymes have been recognized in human, while *Arabidopsis thaliana* may have as many as 26 deadenylases. The increased number of deadenylases may reflect on the different needs for specific mRNAs expression at different times in cells or tissues, but also on the presence of specific mRNAs in different time periods. Such phenomena occur during the control of the oscillations in gene expression associated with daily rhythms in metabolism and physiology across eukaryotic organisms. However, deadenylation in plants has not been extensively studied. We have recently identified a novel deadenylase in *Arabidopsis thaliana*, AtHESP. Computational analysis and SDS-PAGE revealed that enzyme has an estimated molecular mass of 47 kDa, while kinetic analysis suggests that it is allosteric and oligomeric. Herein, we focus on methods to ameliorate purification procedures, in an attempt to elucidate the structure and understand the kinetic behavior of the enzyme.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ο ημερονύκτιος (κιρκαδικός) ρυθμός

Η ζωή στη γη εξελίχθηκε παρουσία ενός ημερήσιου κύκλου ημέρας και νύχτας, και πολλοί οργανισμοί (που κυμαίνονται από τα αρχαία και τα φυτά μέχρι τον άνθρωπο) έχουν καταλήξει να διαθέτουν έναν εσωτερικό μηχανισμό ο οποίος υπαγορεύει διαφορετικές συμπεριφορές κατά τις διάφορες ώρες της ημέρας. Αυτές οι συμπεριφορές ποικίλουν, από την κυκλική αλλαγή της δραστικότητας των μεταβολικών ενζύμων ενός μύκητα έως τον περίπλοκο κύκλο ύπνου-ξύπνιου των ανθρώπων. Οι εσωτερικοί ταλαντωτές που ρυθμίζουν αυτούς τους ημερήσιους ρυθμούς ονομάζονται κιρκάδια ρολόγια[1] [1].

Οι περισσότεροι οργανισμοί υποβάλλονται σε ρυθμικές αλλαγές σε καθημερινή βάση ώστε να συγχρονίσουν τα διάφορα γεγονότα συμπεριφοράς και φυσιολογίας με τις δραματικές αλλαγές του φυσικού περιβάλλοντος. Πολλές από αυτές τις αλλαγές ελέγχονται από ενδογενή κιρκάδια ρολόγια τα οποία ελέγχουν γεγονότα όπως η μεταγωγή σήματος, η γονιδιακή έκφραση, η παραγωγή ορμονών, η δραστηριότητα των νευρώνων, και πολλές πλευρές της συμπεριφοράς [20]. Τα κιρκάδια ρολόγια είναι ενδογενείς αυτοσυντηρούμενοι ταλαντωτές που καθοδηγούν μια ευρέως φάσματος ρυθμική έκφραση γονιδίων, εναρμονίζοντας έτσι το μεταβολισμό και τη φυσιολογία [32]. Πρόσφατες μελέτες έχουν διαφωτίσει με πολλές λεπτομέρειες περί των μοριακών μηχανισμών που απαρτίζουν το κιρκάδιο ρολόι, αλλά το πώς ο μηχανισμός του κιρκάδιου ταλαντωτή μεταφράζεται σε τόσο μεγάλη ποικιλία ρυθμικών βιολογικών διεργασιών δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Κάτι που μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα, ωστόσο, είναι ότι ο ρυθμικός έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του ελέγχου των ρυθμικών διαδικασιών που υπόκεινται στον έλεγχο του κιρκάδιου ρολογιού. Πρόσφατες αναλύσεις μικροσυστοιχιών σε εύρος γονιδιώματος ανέδειξαν ένα πλήθος γονιδίων που υπόκεινται σε κιρκάδιο έλεγχο.

Οι μεταγραφικοί και μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί που διέπουν τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης γενικά δεν είναι γνωστοί [20], ωστόσο, παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση παροδικής γονιδιακής έκφρασης για τη σωστή λειτουργία του κιρκάδιου ρολογιού και ιδιαίτερα για το μοριακό μηχανισμό του ρολογιού. Στα θηλαστικά ο μοριακός μηχανισμός που διέπει τους κιρκάδιους ταλαντωτές βασίζεται σε αλληλένδετους μεταγραφικούς και μεταφραστικούς αναδραστικούς μηχανισμούς που, τελικά, ρυθμίζουν τη ρυθμική έκφραση γονιδίων που ελέγχονται από τα ρολόγια. Πειράματα γονιδιακής έκφρασης σε κεντρικούς (υπερχιασματικού πυρήνα και υποθαλάμου) και περιφερικούς ιστούς έχουν αναδείξει χιλιάδες ρυθμικών μεταγράφων που εμπλέκονται στον καθημερινό έλεγχο του μεταβολισμού [32].

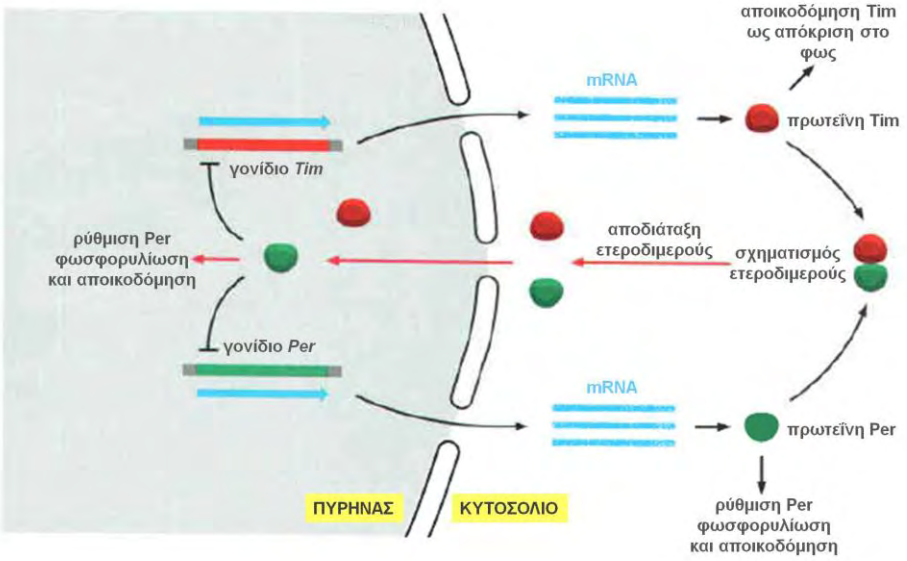
Θα περίμενε κανείς, πως το κιρκάδιο ρολόι σε έναν οργανισμό όπως ο άνθρωπος θα ήταν από μόνη της μια περίπλοκη πολυκυτταρική συσκευή, με διαφορετικές ομάδες κυττάρων υπεύθυνες για τα διαφορετικά τμήματα του μηχανισμού του ταλαντωτή. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο πως σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων, ο μηχανισμός μέτρησης της ώρας είναι μεμονωμένα κύτταρα. Συγκεκριμένα στη Drosophila melanogaster (μύγα του ξυδιού), πολλοί διαφορετικοί τύποι κυττάρων, όπως κύτταρα του θώρακα, της κοιλιακής χώρας, της κεραίας, των άκρων, των πτερύγων και των όρχεων, διατηρούν έναν κιρκάδιο κύκλο όταν έχουν ανατετμηθεί (dissected) από το υπόλοιπο

[1] Κιρκάδιος, αγγλ. circadian> λατιν. circa diem: ελλ. περίπου μια μέρα

ζώο. Τα ρολόγια σε αυτούς τους απομονωμένους ιστούς, μπορούν να ρυθμιστούν εκ νέου με κύκλους φωτός και σκοταδιού εξωτερικώς επιβαλλόμενους.

Παρόλα αυτά, δεν είναι πλήρως κατανοητές όλες οι λεπτομέρειες της λειτουργίας του κιρκάδιου ρολογιού, και μελέτες σε μεγάλη ποικιλία οργανισμών έχουν αναδείξει πολλές από τις βασικές αρχές και τα μοριακά συστατικά του κιρκάδιου ρολογιού. Για τα ζώα, οι περισσότερες από τις πληροφορίες που είναι γνωστές προέρχονται από έρευνες στη Drosophila με μεταλλάξεις που είτε καθιστούν το κιρκάδιο ρολόι της μύγας να "τρέχει" πιο γρήγορα, είτε πιο αργά, είτε καθόλου· και αυτές οι εργασίες έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη πως πολλά ίδια συστατικά εμπλέκονται και στο κιρκάδιο ρολόι των θηλαστικών [1].

Ένα κεντρικό χαρακτηριστικό του ρολογιού είναι η περιοδική συσσώρευση και αποικοδόμηση δυο πρωτεϊνών-ρυθμιστών γονιδίων, της Tim (συντομογραφία του timeless, διαχρονικός, που ονομάστηκε από το φαινότυπο που προκαλείται από τη μετάλλαξη του γονιδίου αυτού) και της Per (συντομογραφία του period, περίοδος). Τα mRNA που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες αυτές μεταφράζονται στο κυτοσόλιο και όταν συσσωρευτούν σε κρίσιμα επίπεδα, σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές. Μετά από μια χρονοκαθυστέρηση, το ετεροδιμερές απομακρύνεται/διασπάται και οι Tim και Per μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν έναν αριθμό γονιδιακών προϊόντων μέσω των οποίων μεσολαβούνται τα αποτελέσματα του ρολογιού. Μόλις βρεθούν στον πυρήνα, η Per καταστέλλει τα γονίδια Per και Tim, δημιουργώντας ένα σύστημα ανατροφοδότησης εφόσον τα επίπεδα των πρωτεϊνών Per και Tim μειώνονται. Μαζί με αυτό το σύστημα μεταγραφικής ανατροφοδότησης, το ρολόι εξαρτάται και από άλλες πρωτεΐνες. Για παράδειγμα η ρυθμιζόμενη αποικοδόμηση της Per επιβάλλει καθυστέρηση στην περιοδική συσσώρευση των Tim και Per, η οποία είναι κρίσιμη για τη λειτουργία του ρολογιού. Η επαναφορά του ρολογιού συμβαίνει σε απόκριση στους νέους κύκλους φωτός-σκοταδιού. Παρότι, τα περισσότερα κύτταρα της Drosophila δεν έχουν φωτουποδοχείς, το φως γίνεται αντιληπτό από διακυτταρικές ριβοφλαβίνες, που επίσης ονομάζονται και κρυπτοχρώματα. Παρουσία φωτός, αυτές οι πρωτεΐνες συνδέονται με την πρωτεΐνη Tim και προκαλούν την αποικοδόμησή της, και ως εκ τούτου, ρυθμίζουν εκ νέου το ρολόι.



Εικόνα 1. Συνοπτική περιγραφή του μηχανισμού του ρολογιού της Drosophila. Στην καρδιά του ταλαντωτή υπάρχει μια θηλιά μεταγραφικής ανατροφοδότησης η οποία διαθέτει μια έμφυτη χρονοκαθυστέρηση: η συσσώρευση των προϊόντων συγκεκριμένων γονιδίων-κλειδιών "σβήνει" τη μεταγραφή των γονιδίων αυτών, αλλά με καθυστέρηση, έτσι ώστε -χοντρικά- το κύτταρο να ταλαντώνεται μεταξύ μιας κατάστασης στην οποία τα προϊόντα είναι παρόντα και δεν γίνεται μεταγραφή, και σε μια κατάσταση όπου τα προϊόντα είναι απόντα και ξεκινάει η μεταγραφή (επισημαίνονται με κόκκινο: τα στάδια στα οποία επιβάλλονται συγκεκριμένες καθυστερήσεις). Alberts. (2008). Molecular Biology of the Cell (5th ed.). Garland Science.

1.1.1. Το κιρκάδιο ρολόι στα φυτά

Το μήκος της μέρας σα μέρος της οριοθέτησης του χρόνου στο διάστημα του έτους (μεγάλες ημέρες το καλοκαίρι και βραχύτερες ημέρες το χειμώνα) επιτρέπει στα φυτά -και σε άλλους οργανισμούς- να αντιδρούν φωτοπεριοδικά με αναπτυξιακά βήματα και μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως ο σχηματισμός κυσών σε διάφορα φύκη, η ανάπτυξη των βλαστών και των φύλλων, ο σχηματισμός άνθεων και αποθηκευτικών οργάνων. Το 1936 προτάθηκε από τον Bünning ότι το κιρκάδιο ρολόι των φυτών, με την 24ωρη περίοδό του, χρησιμοποιείται στις φωτοπεριοδικές αντιδράσεις για τη μέτρηση του μήκους της ημέρας.

1.1.1.1. Φωτοτροπισμός

Τα φυτά, σε αντίθεση με τα ζώα, δεν έχουν ικανότητα μετακίνησης και αλλαγής περιβάλλοντος ώστε να βρίσκονται διαρκώς υπό τις πιο ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης. Παρόλα αυτά, τα φυτά αντιδρούν στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν συνεχώς το πρόγραμμα ανάπτυξής τους ακολουθώντας την πηγή φωτισμού· η απόκριση αυτού του τύπου ονομάζεται φωτοτροπισμός. Συνήθως, οι βλαστοί και τα φωτοσυνθετικά μέρη του φυτού παρουσιάζουν θετική φωτοτροπική απόκριση και στρέφονται προς την πηγή του φωτός. Στα περισσότερα φυτικά είδη, μόλις ένα τμήμα του ελάσματος του φύλλου σκιαστεί, ο μίσχος του φύλλου συστρέφεται προκειμένου το έλασμα να απομακρυνθεί από τη σκιά [47].

1.1.1.2. Χρονομέτρηση της φωτοπεριόδου

Τα φωτοπεριοδικά φυτά ταξινομούνται με κριτήριο την επίδραση της διάρκειας της ημέρας στην άνθηση. Σε συνθήκες περιβάλλοντος, η φωτοπερίοδος αντιστοιχεί σε 24ωρο κύκλο που καθορίζεται από τη διάρκεια της ημέρας και της νύχτας. Πειραματικά δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι τα φυτά αντιλαμβάνονται το ερέθισμα της φωτοπεριόδου μέσω των ώριμων φύλλων και με πειραματικές παρατηρήσεις υποστηρίζουν τη θεωρία ότι το ερέθισμα της άνθισης (florigen) συντίθεται στα φύλλα μόλις αυτά δεχθούν ευνοϊκό φωτοπεριοδικό κύκλο [47].

1.1.1.3. Το κιρκάδιο ρολόι ρυθμίζει τη φωτοπεριοδική απόκριση

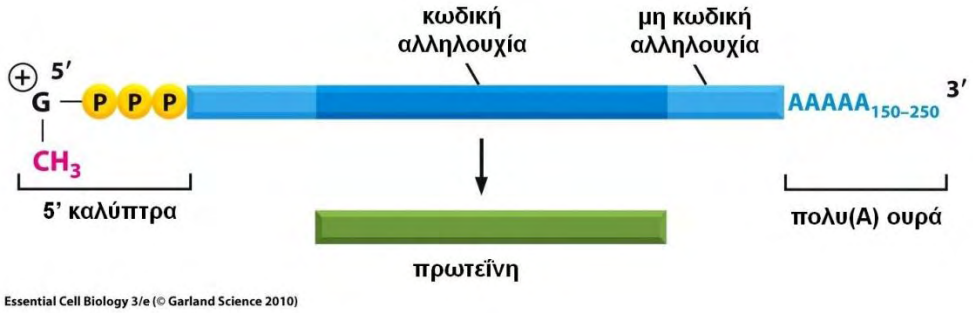
Τα φυτά, καθώς αντιλαμβάνονται τη διάρκεια της νύχτας, συγχρονίζονται με την κατάλληλη εποχή του χρόνου για να ξεκινήσει ευνοϊκά η διαδικασία της άνθησης. Ουσιαστικά, όμως, το φαινόμενο καθορίζεται από τη λειτουργία ενός εσωτερικού ρολογιού, το οποίο σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, διατηρεί σε καθημερινή βάση σταθερούς ρυθμούς-κύκλους. Το κιρκάδιο ρολόι μηδενίζεται κάθε φορά που μεταβάλλονται σημαντικές περιβαλλοντικές παράμετροι, όπως η διάρκεια του φωτισμού ή η θερμοκρασία, ώστε να συγχρονίζεται με τις εποχιακές μεταβολές του φυσικού περιβάλλοντος [47].

1.2. Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις

Ένα αρτιγενές RNA ονομάζεται πρώιμο μετάγραφο. Πιθανώς η πιο εκτενής επεξεργασία μεταγράφων συμβαίνει στα ευκαρυωτικά mRNA και tRNA των ευκαρυωτών και προκαρυωτών. Το πρώιμο μετάγραφο ενός ευκαρυωτικού mRNA τυπικά περιέχει αλληλουχίες που περιέχονται σε ένα γονίδιο, αν και οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν ένα πολυπεπτίδιο μπορεί να μην είναι συνεχείς (ιντρόνια).

Η τελική μοίρα κάθε RNA είναι η πλήρης αποικοδόμησή του. Ο ρυθμός της ανακύκλησης 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.

Στις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις περιλαμβάνεται η διαδικασία του ματίσματος, και η προσθήκη της καλύπτρας στο 5' αμινοτελικό άκρο του mRNA, η οποία είναι ένα κατάλοιπο 7-μεθυλογουανοσίνης, και της πολυ(Α) ουράς που αποτελείται από μια σειρά 80-250 αδενυλικών καταλοίπων στο 3' άκρο του mRNA [22]. Η πολυαδενυλίωση είναι ένα υποχρεωτικό χαρακτηριστικό της επεξεργασίας των πυρηνικών mRNA και καταλύεται από την πολυ(Α) πολυμεράση [14]. Ο κύριος ρόλος της ύπρξης της 5' καλύπτρας και της ουράς πολυ(Α) είναι κυρίως για την προστασία από την ενζυμική αποικοδόμηση [22].



Εικόνα 2. mRNA με 5'καλύπτρα και 3' πολυ(Α) ουρά. Essential Cell Biology, Garland Science 2010

1.2.1. Πολυαδενυλίωση

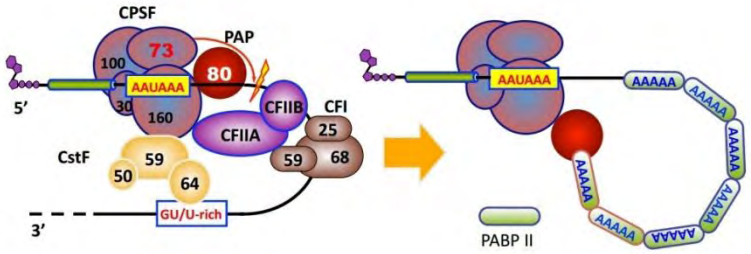
Ο κύριος ρόλος της πολυ(Α) ουράς είναι η σταθεροποίηση του mRNA, προστατεύοντάς το από την αποικοδόμηση εφόσον συνδέεται με την πολυ(Α) συνδεόμενη πρωτεΐνη (PABP). Πειραματικά προκύπτει ότι η απουσία της πολυ(Α) ουράς οδηγεί σε μείωση της ικανότητας του mRNA να μεταφράζεται, το ίδιο και η απουσία της PABP. Σχεδόν όλα τα κυτταρικά mRNA περιέχουν πολυ(Α) ουρά. Εξαίρεση αποτελούν τα mRNA που κωδικοποιούν τις ιστόνες των μεταζώων, χωρίς ο ρόλος της απουσίας της πολυ(Α) ουράς να είναι πλήρως κατανοητός [49].

Η διεργασία του 3' άκρου που οδηγεί στην πολυαδενυλίωση είναι μια διαδικασία που αποτελείται από δυο αντιδράσεις. Αρχικά γίνεται τμήση του RNA και δημιουργείται ένα νέο 3'-OH άκρο και ακολουθεί η αντίδραση της πολυαδενυλίωση. Η διεργασία αυτή απαντάται σε όλα σχεδόν τα mRNA των ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών (βλ. εικόνα 3).

Μια αλληλουχία που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία του 3' άκρου και την πολυαδενυλίωση είναι το εξανουκλεοτίδιο AAUAAA που αποτελεί χαρακτηριστική αλληλουχία πολυ(Α) θέσεων, των θέσεων, δηλαδή, όπου θα δημιουργηθεί η πολυ(Α) ουρά. Η αλληλουχία βρίσκεται 10-30 νουκλεοτίδια ανοδικά της πολυ(Α) θέσης. Η αλληλουχία AAUAAA σε συνδυασμό με τα καθοδικά στοιχεία ολοκληρώνουν τον καθορισμό της θέσης τμήσης και της αντίδρασης πολυαδενυλίωσης. Έχουν αναγνωριστεί δύο κύριοι τύποι καθοδικών στοιχείων, ο πρώτος είναι μια αλληλουχία από 4 έως 5 κατάλοιπα U. Ο δεύτερος συνιστά συνήθως μια G/U πλούσια περιοχή. Και οι δύο τύποι αλληλουχιών εντοπίζονται σε μια περιοχή εύρους 30 νουκλεοτιδίων καθοδικά από τη θέση πολυ(Α). Η απόσταση της AAUAAA από τα καθοδικά στοιχεία καθορίζει την περιοχή όπου θα γίνει η τμήση.

Η αλληλουχία πολυ(Α) δεν κωδικοποιείται στο DNA, αλλά προστίθεται στο mRNA, στον πυρήνα, μετά τη μεταγραφή. Η προσθήκη της πολυ(Α) ουράς καταλύεται από την πολυ(Α)-τελική-αδενοσινοτρανσφεράση ή πολυ(Α) πολυμεράση η οποία προσθέτει ~200 κατάλοιπα Α στο 3'-OH άκρο του mRNA. Η αντίδραση τμήσης και πολυαδενυλίωσης σε *in vitro* συστήματα είναι συζευγμένες, υπό την έννοια ότι δεν έχουν ανιχνευθεί ως τώρα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, τετμημένα ενδιάμεσα χωρίς πολυ(Α) ουρά. Η τμήση του πρόδρομου RNA δημιουργεί ένα ανοδικό θραύσμα, το οποίο πολυαδενυλιώνεται αμέσως από την πολυ(Α) πολυμεράση.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, το ένζυμο δεν έχει ιδιαίτερη προτίμηση για πρόσδεση στο RNA και δεν εμφανίζει ιδιαίτερη δράση πολυμεράσης. Προσθέτει μονομερή κατάλοιπα Α, χωρίς να έχει προσδεθεί σε κάποιο συγκεκριμένο μετάγραφο, δηλαδή με ένα διανεμητικό μηχανισμό (distributive). Το ένζυμο ενεργοποιείται με την πρόσδεση του στον CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor), ο οποίος έχει ήδη προσδεθεί στα μετάγραφα που φέρουν την αλληλουχία AAUAAA. Η αλλαγή έστω και ενός από τα νουκλεοτίδια του εξανουκλεοτιδίου καθιστά την πρόσδεση του CPSF αδύνατη. Η πολυ(Α) πολυμεράση είναι εξειδικευμένη στη διαχείριση του ATP. Η προσθήκη μονομερών AMP από το ένζυμο είναι ανεξάρτητη από εκμαγείο, και γίνεται μέσω ενός S_N2 μηχανισμού με αναστροφή της διαμόρφωσης του α-φωσφόρου του μονομερούς [43].



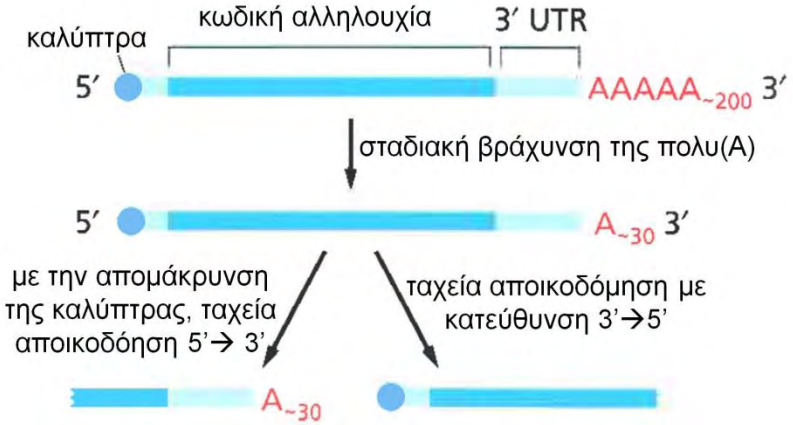
Εικόνα 3. Επισκόπηση της αντίδρασης της πολυαδενυλύωσης. CPSF: (*Cleavage and polyadenylation specificity factor*), παράγοντας τμήσης και πολυαδενυλίωσης, PAP: *(poly(A) polymerase)*, πολύ(Α) πολυμεράση, CF: *(cleavage factor)* παράγοντας τμήσης, CstF: *(cleavage-stimulating factor)* διεγείρων παράγοντας τμήσης, PABPII: *(poly(A) binding protein)* πρωτεΐνη πρόσδεσης στην πολυ(Α) ουρά [52].

1.1. Αποικοδόμηση του mRNA

Τα περισσότερα mRNA ενός βακτηριακού κυττάρου είναι πολύ ασταθή, με ολιγόλεπτο χρόνο ημιζωής. Οι εξωνουκλεάσες, που αποδομούν στην κατεύθυνση 3' προς 5', είναι αυτές που είναι υπεύθυνες για την αποδόμηση αυτών των mRNA [1].

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 [1].

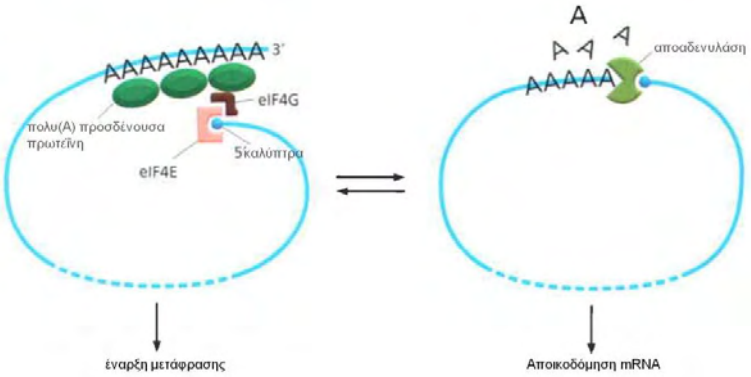
Υπάρχουν δυο γενικοί μηχανισμοί αποδόμησης των ευκαρυωτικών mRNA. Και οι δυο ξεκινούν με τη σταδιακή βράχυνση της πολυ(Α) ουράς από μια εξωνουκλεάση, μια διαδικασία που ξεκινάει αμέσως μόλις το mRNA φτάσει στο κυτταρόπλασμα. Η βράχυνση αυτή λειτουργεί σα χρονομετρητής και μετρά αντίστροφα τη διάρκεια ζωής του κάθε mRNA μορίου. Μόλις η ουρά πολυ(Α) έχει μειωθεί σε κρίσιμο σημείο (περίπου 25 νουκλεοτίδια στον άνθρωπο) τα δυο μονοπάτια αποκλίνουν. Στη μια περίπτωση, η απομάκρυνση της 5' καλύπτρας σηματοδοτεί τη ραγδαία αποικοδόμηση του εκτεθειμένου mRNA από το 5' άκρο του. Στην άλλη περίπτωση, το mRNA συνεχίζει να αποικοδομείται από το 3' άκρο ακόμη και αφού έχει αφαιρεθεί η πολυ(Α) ουρά και έχει ξεκινήσει η αποδόμηση της κωδικής αλληλουχίας (βλ. εικόνα 4). Τα περισσότερα mRNA αποικοδομούνται και με τους δυο μηχανισμούς [1].



Εικόνα 4. Δυο μηχανισμοί αποικοδόμησης του ευκαρυωτικού mRNA. Υπάρχει ένα κρίσιμο μήκος της ουράς πολυ(Α) που λειτουργεί σαν κατώφλι και οδηγεί σε αποικοδόμηση με κατεύθυνση 3' προς 5', το οποίο μπορεί να

οφείλεται και στις πολυ(Α) προσδένουσες πρωτεΐνες. Η αποαδενυλάση προσδένεται και με την 3' πολυ(Α) ουρά και την 5' καλύπτρα, και αυτό το σήμα μπορεί να είναι αυτό που σηματοδοτεί την απομάκρυνση της καλύπτρας μετά τη βράχυνση της πολυ(Α) ουράς. Παρότι στην εικόνα η αποικοδόμηση 5' προς 3' και η 3' προς 5' φαίνονται σε δυο διαφορετικά μόρια mRNA, αυτές οι δυο διαδικασίες μπορούν να συμβούν ταυτόχρονα στο ίδιο μόριο [1].

Σχεδόν όλα τα mRNA υποβάλλονται σε αυτούς τους δυο μηχανισμούς αποικοδόμησης, και οι συγκεκριμένες αλληλουχίες σε κάθε mRNA καθορίζουν πόσο γρήγορα διαδραματίζεται κάθε βήμα και επομένως για πόσο θα παραμείνει το mRNA στο κυτταρο και για πόση ώρα θα είναι ικανό να παράγει πρωτεΐνη. Οι 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη ρύθμιση της διάρκειας ζωής των mRNA και συχνά οι αλληλουχίες αυτές φέρουν σημεία πρόσδεσης για συγκεκριμένες πρωτεΐνες που είτε αυξάνουν είτε μειώνουν το ρυθμό της βράχυνσης της πολυ(Α) ουράς, την απομάκρυνση της καλύπτρας, ή την αποικοδόμηση με κατεύθυνση 3' προς 5'. Ο χρόνος ημιζωής ενός mRNA επηρεάζεται επίσης από το πόσο αποτελεσματικά μεταφράζεται. Οι διαδικασίες βράχυνσης της καλύπτρας και της πολυ(Α) ουράς ανταγωνίζονται άμεσα το μηχανισμό που μεταφράζει το mRNA και επομένως, οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης ενός mRNA έχουν την τάση να έχουν αντίθετη δράση στην αποικοδόμηση του συγκεκριμένου μορίου (βλ. εικόνα 5) [1].



Εικόνα 5. Ο ανταγωνισμός μεταξύ μετάφρασης και αποικοδόμησης του mRNA. Τα δυο κύρια στοιχεία ενός μορίου mRNA, δηλαδή η 5' καλύπτρα και η 3' πολυ(Α) ουρά, χρησιμοποιούνται και για την έναρξη της μετάφραση και την αποικοδόμηση του mRNA που εξαρτάται από την αποαδενυλίωση. Η αποαδενυλάση που βραχύνει την πολυ(Α) ουρά σε κατεύθυνση 3' προς 5' σχετίζεται με την καλύπτρα στο 5' άκρο [1].

Παρότι η βράχυνση της πολυ(Α) ουράς ρυθμίζει το χρόνο ημιζωής των περισσότερων ευκαρυωτικών mRNA, μερικά αποικοδομούνται μέσω ενός εξειδικευμένου μηχανισμού που παρακάμπτει αυτό το βήμα εντελώς. Σε αυτές τις περιπτώσεις, συγκεκριμένες νουκλεάσες κόβουν το mRNA εσωτερικά, με τρόπο τέτοιο ώστε να απομακρύνεται η καλύπτρα και η πολυ(Α) ουρά από τα δυο άκρα με αποτέλεσμα τα δυο μισά που προκύπτουν να αποικοδομούνται τάχιστα. Τα μόρια mRNA που αποικοδομούνται μέσω αυτής της οδού, φέρουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, συχνά στις 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές, που λειτουργούν ως αλληλουχίες αναγνώρισης για αυτές τις ενδονουκλεάσες. Αυτή η στρατηγική κάνει πολύ εύκολη την προσεκτική ρύθμιση της σταθερότητας των mRNA παρεμποδίζοντας την περιοχή της ενδονουκλεάσης ως απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα [1].

1.1.1. Ρύθμιση της αποαδενυλίωσης

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες (RNA-binding proteins, RBPs) μπορούν να επηρεάσουν δραματικά τη σταθερότητα των mRNAs [25],[6],[27]. Αυτές δεν

επιτρέπουν μόνο τη διακύμανση των χρόνων ημιζωής των mRNAs [39], αλλά, επίσης, είναι ικανές να ελέγχουν το ρυθμό αποικοδόμησης συγκεκριμένων mRNAs ως απόκριση σε διαφορετικά ερεθίσματα [33]. Οι αποαδενυλάσες συνήθως αποτελούν τμήμα συμπλόκων. Οι παρακείμενες υπομονάδες, επηρεάζουν τη δραστικότητα των αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, η PAN2 δεσμεύεται στην PAN3, που με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την PABP. Η τελευταία στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στην πολυ(A) ουρά των mRNA-στόχων [50].

Η ρύθμιση της δραστικότητας των αποαδενυλασών κρίνεται απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης αποαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε καταστροφή και θάνατο του κυττάρου. Σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs πρέπει να προστατευθούν από την αποαδενυλίωση ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να οδηγούνται στην αποικοδόμηση. Ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται από ρυθμιστικούς παράγοντες οι οποίοι προσδένονται σε εξειδικευμένες αλληλουχίες των mRNAs. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3΄ αμετάφραστες περιοχές συγκεκριμένων mRNAs (3΄-UTR) διαμεσολαβούν και ενισχύουν την αποαδενυλίωση τους. Αυτά τα στοιχεία αναγνωρίζονται από παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν τις αποαδενυλάσες προωθώντας έτσι την αποαδενυλίωση. Παραδείγματα παραγόντων που δεσμεύονται στις 3΄-UTR περιοχές των mRNA, αποτελούν τα miRNAs και οι CUG-BP, PUF και CPEB πρωτεΐνες [10], [18], [15].

Ρύθμιση της αποαδενυλίωσης και, κατά συνέπεια, της αποικοδόμησης των mRNA επέρχεται και μέσω της κυτταροπλασματικής πολυαδενυλίωσης. Η κυτταροπλασματική πολυαδενυλίωση είναι σημαντική για τη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της επανα-ενεργοποίησης των αποαδενυλιωμένων και αδρανών, αλλά κατά τα άλλα άθικτων, κυτταροπλασματικών mRNA, που καθοδηγείται από την παρουσία των στοιχείων κυτταροπλασματικής αποαδενυλίωσης (cytoplasmic polyadenylation element -CPE) στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή των mRNAs [17]. Η ρύθμιση της πολυ(A) ουράς στο κυτταρόπλασμα, είναι στενά συνδεδεμένη με τον έλεγχο της μετάφρασης. Συνήθως μια πολυ(A) ουρά μεγάλου μήκους σχετίζεται με αποτελεσματική πρωτεϊνοσύνθεση.

Από τα παραπάνω, είναι φανερό ότι οι καταλυτικές οντότητες που εμπλέκονται στη σύνθεση, την τροποποίηση, την επεξεργασία και την αποικοδόμηση της 5΄-καλύπτρας και της πολυ(A) ουράς, επηρεάζουν τη λειτουργία και την αφθονία του mRNA στο κύτταρο [8], [10], [21],[24],[34], [38].

Σε συνθήκες έλλειψης μηχανισμών ελέγχου, οι ενδονουκλεάσες μπορεί να έχουν μια βαθιά επίδραση στη γονιδιακή έκφραση, καθώς μια και μόνο ενδονουκλεολυτική τμήση στο εσωτερικό του mRNA, συνεπάγεται την αδρανοποίησή του. Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που εμποδίζουν τέτοιου είδους ανώμαλη αποικοδόμηση των mRNAs, μέσω της ρύθμισης των ενδονουκλεασών. Μ’ αυτό τον τρόπο, τα κύτταρα αποκρίνονται αποτελεσματικά στις αλλαγές του περιβάλλοντός τους με τη ρύθμιση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA.

Ο ρυθμός αποαδενυλίωσης επηρεάζεται από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: τον πυρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών και την εντόπισή τους σε κοκκία. Στην πρώτη περίπτωση, προβλήματα σωστού διαχωρισμού των αποαδενυλασών μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος μπορούν να αποβούν μοιραία για την τύχη mRNAs που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Από τη άλλη μεριά, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία, τα οποία περιέχουν κατασταλμένα mRNAs, τα οποία στη συνέχεια

μπορούν να ενεργοποιηθούν. Η συν-εντόπιση αυτών των αποαδενυλασών με τα υποστρώματά τους πιθανότατα διευκολύνει την κινητική της αποαδενυλίωσης [10].

1.1.2. Αποαδενυλίωση

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 μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA εξασφαλίζουν ότι τα διάφορα mRNA δεν συσσωρεύονται στο κύτταρο και οδηγούν στη σύνθεση μη απαραίτητων πρωτεϊνών [22]. Δυναμικές αλλαγές στα μήκη των πολυ(Α) ουρών των mRNA καταλύονται από διάφορα ένζυμα που ονομάζονται αποαδενυλάσες. Η διαμόρφωση της πολυ(Α) ουράς ενός mRNA είναι ένα ευρύ μέσο ελέγχου της παραγωγής πρωτεϊνών και της σταθερότητας του mRNA [10]. Στον πυρήνα, με την διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες πολυ(Α) ουρές, στο κατάλληλο μήκος. Οι πολυ(Α) 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 mRNA αποικοδομούνται στο κυτταρόπλασμα με συνεχή βράχυνση της πολυ(Α) ουράς κατά τη διάρκεια ζωής του mRNA. Τα επόμενα βήματα της αποικοδόμησης των mRNA καθυστερούν έως ότου η αποαδενυλίωση να ξεπεράσει ένα ορισμένο όριο· έτσι, η αποαδενυλίωση μπορεί να θεωρηθεί και ως χρονομετρητής της αποικοδόμησης του mRNA και η ίδια η πολυ(Α) ουρά μια τροποποίηση που διατηρεί σταθερό το mRNA [14].

1.1.2.1. Αποαδενυλάσες

Ως αποαδενυλάσες ορίζουμε τις εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολύ(Α) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3΄→5΄ απελευθερώνοντας 5΄-AMP. Οι αποαδενυλάσες έχουν ως κύριο στόχο την αποικοδόμηση των mRNA, αλλά επίσης, επιτελούν αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς, ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών. Άλλες, όπως είναι η PARN (*Xenopus laevis*) είναι σημαντικές κατά την πρώιμη ανάπτυξη, ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα και τη μεταβολική ομοιόσταση (CNOT7 και Nocturnin στα ποντίκια). Βάσει συγκρίσεων μεταξύ των επικρατειών με δράση νουκλεάσης, όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες χωρίζονται σε δυο υπερ-οικογένειες, την οικογένεια DEDD ή την EEP (ενδονουκλεάσες- εξωνουκλεάσες-φωσφατάσες). Οι ουρές πολυ(Α) που προστίθενται σε πολλά πυρηνικά, μη κωδικά RNA επίσης απομακρύνονται μέσω αποαδενυλίωσης. Το εξώσωμα του πυρήνα εμπλέκεται ισχυρά σε αυτού του είδους την αποαδενυλίωση, πιθανότατα με μια εξωνουκλεάση τύπου DEDD [10].

1.1.2.1.1. Οικογένεια DEDD

Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας έχουν ένα χαρακτηριστικό πυρήνα που αποτελείται από τέσσερα αμετάβλητα όξινα αμινοξέα και άλλα συντηρημένα αμινοξέα διασκορπισμένα σε τρία ξεχωριστά μοτίβα αλληλουχιών [40]. Μέλη αυτής της ομάδας είναι και οι οικογένειες POP2 (επίσης γνωστή και ως CAF1), CAF1Z, PARN και PAN2 [10],[40].

1.1.2.1.2. Οικογένεια EEP

Τα ένζυμα τύπου EEP έχουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις επικράτειες νουκλεάσης τους. Στα ένζυμα EEP ανήκουν και οι αποαδενυλάσες CCR4, Nocturnin, ANGEL και 2' φωσφοδιεστεράση (2′PDE) [10],[40].

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι. ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ

		Οργανισμός					
		Sc	Ce	Dm	Xl	Mm	Hs
Οικογένεια DEDD	CNOT7/POP2	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
Οικογένεια EEP	CNOT6/CCR4	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	+	+
	NOC	-	-	+	+	+	+
	2' PDE	-	+	+	+	+	+

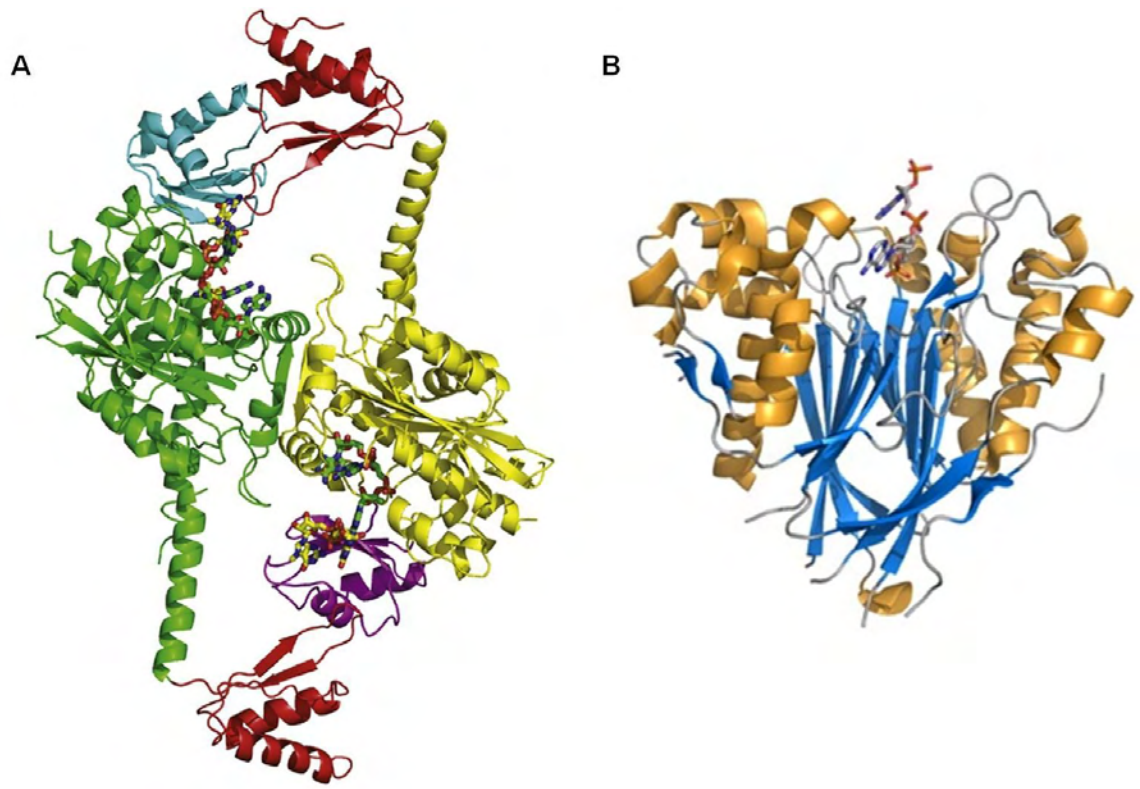
Οι αποαδενυλάσες από κάθε είδος κατηγοριοποιήθηκαν είτε προς την οικογένεια DEDD (Asp-Glu-Asp-Asp) είτε προς την οικογένεια εξονουκλεασων-ενδονουκλεασών-φωσφατασών βάσει των αμινοξικών αλληλουιών των επικρατειών εξωνουκλεάσης τους. Τα είδη όπου έχει αποδειχθεί ενζυμική δραστικότητα επισημαίνονται με **+**, με **+** επισημαίνονται τα είδη όπου προβλέπεται να υπάρχει ενζ. δραστικότητα και με **–** επισημαίνονται τα είδη στα οποία δεν έχει καθοριστεί η ενζ. δραστικότητα. Sc: S.cerevisiae, Ce: C. elegans, Dm: D.melanogaster, Xl: X.laevis, Mm: M. musculus, Hs: H.sapiens [10]

1.1.2.2. Τρόπος δράσης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι αποαδενυλάσες χωρίζονται σε δυο οικογένειες βάσει των αμινοξέων του ενεργού κέντρου τους. Στην τάξη DEDD ανήκουν 3' εξωνουκλεάσες που διαθέτουν μια συγκεκριμένη συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία στο ενεργό κέντρο τους και σε αυτή την τάξη ανήκει η πολυ(A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN). Στην τάξη EEP, των ενδο-έξωνουκλεασών- φωσφατασών, ανήκουν ένζυμα τα οποία έχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στις επικράτειες νουκλεάσης τους, στην τάξη αυτή ανήκει ο CCR4 (*Carbon Catabolite Repressor-4*) [10], [14], [7].

Η δραστικότητα της PARN (βλ. εικόνα 3.A) διεγείρεται μετρίως από την αλληλεπίδρασή της με την καλύπτρα στο 5' άκρο των mRNA. Η καλύπτρα προσδένεται στην RRM επικράτεια με συγγενεια της τάξης λίγων μM, συγγένεια η οποία είναι αρκετά ασθενέστερη σε σύγκριση με τη συγγένεια της τάξης των nM των "κανονικών" πρωτεϊνών που προσδένονται στην καλύπτρα (cap binding proteins) [14].

Ο CCR4 (βλ. εικόνα 3.B)είναι μια Mg^{+2} εξαρτώμενη 3' εξωνουκλεάση ειδική για πολυ(A). Παρότι δεν έχουν αναλυθεί άμεσα τα νουκλεοτίδια που απομακρύνονται μέσω της αντιδρασης, 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 [14].

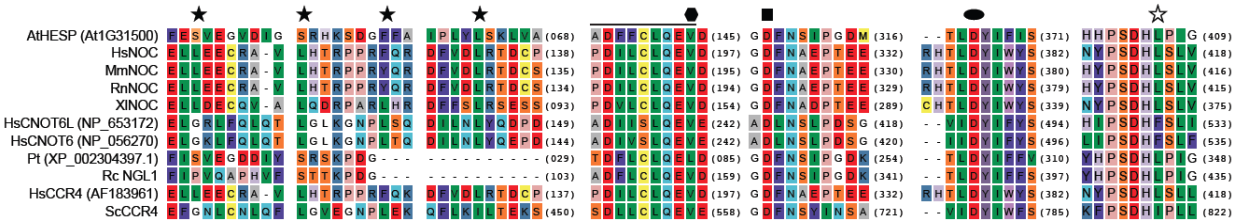


Εικόνα 6. Α. Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής της πολυ(Α) εξειδικευμένης ριβολουκλεάσης (PARN), Β. Τρισδιάστατη δομή του CCR4) [14].

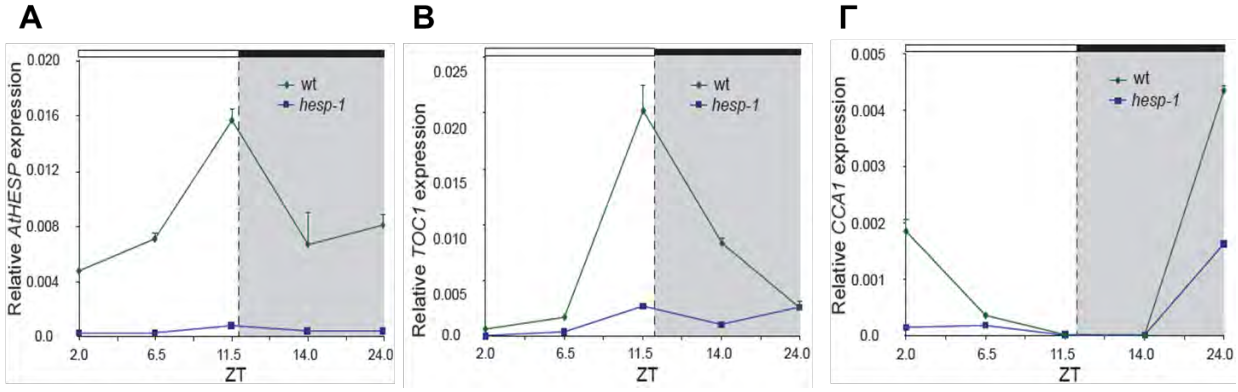
1.2. Η Arabidopsis thaliana Hesperin

Η *AtHesperin* είναι μια 3'-εξωριβονουκλεάση με δράση αποαδενυλάσης, δηλαδή έχει την ικανότητα να αφαιρεί την πολυ(Α) ουρά από τα mRNA. Η AtHesp ταυτοποιήθηκε βάσει της ομολογίας της με την Nocturnin, την πρώτη αποαδενυλάση που χαρακτηρίστηκε ότι ρυθμίζεται από τον κιρκαδικό ρυθμό (βλ. εικόνα 7) [55]. Πρόκειται για ένα αλλοστερικό ένζυμο και ανήκει στις νουκλεάσες που εξαρτώνται από μαγνήσιο [46]. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το γονίδιο *AtHesp* ελέγχεται από τον κιρκάδιο ρυθμό και η έκφρασή του παρουσιάζει τα μέγιστα λίγο πριν το σκοτάδι, γεγονός που φανερώνει πως η AtHesp μπορεί να στοχεύει, να αποικοδομεί και γενικώς μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση επιλεγμένων μεταγράφων (βλ. εικόνα 8) [55]. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου λίγο πριν την νυχτερινή περίοδο μπορεί να σημαίνει την προετοιμασία και προσδοκία του φυτού για τις επερχόμενες διεργασίες της νύχτας [46].

Η Hesperin (εσπερίνη) πήρε το όνομά της από τον Έσπερο, το πρώτο άστρο του ουρανού πριν τη νύχτα [55]. Στην ελληνική μυθολογία ο Έσπερος ήταν η προσωποποίηση του φωτεινού αστέρα που βγαίνει τα βράδια («εσπέρες»), του Αποσπερίτη. Στην Ιλιάδα, του Ομήρου, αναφέρεται ως ο ωραιότερος από τους αστέρες του ουρανού, ενώ στην Οδύσσεια, ως ο φωτεινότερος. Ουσιαστικά είναι η προσωποποίηση του «εσπερινού αστέρος», δηλαδή του πλανήτη Αφροδίτη [26].



Εικόνα 7. Στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας της AtHesp με τη Nocturnin από διάφορους οργανισμούς (HsNOC, MmNOC, RnNOC and XlNOC), με ορθόλογες αποαδενυλάσες της οικογένειας EEP (HsCNOT6, HsCNOT6L and ScCCR4) και με φυτικά ορθόλογα τις RcNGL1 και PtEEP. Η μαύρη γραμμή υποδεικνύει ένα συντηρημένο επίτοπο PDILCLQEV για πρόσδεση Mg^{2+}/Mn^{2-}, το οποίο περιλαμβάνει και τα καταλυτικά αμινοξέα E193 της MmNoc ή το E556 της ScCCR4 (και τα δυο καταδεικνύονται με μαύρο πολύγονο). Τα καταλυτικά αμινοξέα του ScCCR4 καταδεικνύονται από το μαύρο τετράγωνο και η μαύρη έλλειψη και το άσπρο αστέρι και αντιστοιχούν στα καταλυτικά αμινοξέα D713, D780 and H818 [55]



Εικόνα 8. Ημετονύκτια χρονική εξέλιξη της έκφρασης της AtHesp, του TOC1 και του CCA1 σε φυτά από τα οποία απουσιάζει η AtHesp (hesp-1). Α. Η έκφραση της AtHesp σε φυτά hesp-1 σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (wt), Β. Η έκφραση του γονιδίου TOC1 σε φυτά hesp-1 σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (wt), Γ. Η έκφραση του CCA1 σε φυτά hesp-1 σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (wt). Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε φωτοπερίοδο 12h-12h φωτός-σκοταδιού. Οι συνθήκες φωτός και σκοταδιού καταδεικνύονται με την άσπρη/μαύρη γραμμή, αντιστοίχως, στο επάνω μέρος των διαγραμμάτων. Η σχετική γονιδιακή έεκφραση υπολογίσθηκε βάσει των μεταγράφων του γονιδίου UBI. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα από Μ.Ο. (n=3, κάθε ένα αποτελείται από 15 φυτά). Δυο ανεξάρτητες πειραματικές δοκιμές ανέδειξαν παρόμοια αποτελέσματα [55]

2. ΣΚΟΠΟΣ

Έχοντας κατανοήσει τη βιοχημική σημασία των ενζύμων που καταλύουν την αντίδραση της αποαδενυλίωσης και ιδιαίτερα όταν τυγχάνει τα ένζυμα αυτά είναι ρυθμιζόμενα από το κιρκάδιο ρολόι έγινε η προσπάθεια του βιοχημικού χαρακτηρισμού του ενζύμου AtHesp. Σκοπός της εργασίας είναι η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου καθαρισμού της AtHesp, η διερεύνηση της δομής του ενζύμου καθώς και ο πιθανός ρόλος μικρών ρυθμιστικών μορίων, όπως το AMP, στην ενζυμική δραστικότητα του ενζύμου.

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Ο πρώτος στόχος της εργασίας, ήταν η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου απομόνωσης της AtHesp μέσω ετερόλογης έκφρασής της σε βακτηριακό στέλεχος ειδικό για υπερέκφραση πρωτεΐνης από ανασυνδυασμένο φορέα. Για το σκοπό αυτό, είχε προηγηθεί σε άλλη διπλωματική εργασία διερεύνηση του πρότυπο υπερέκφρασης της AtHesp σε βακτήρια και στην παρούσα διπλωματική εργασία δόθηκε έμφαση στη βελτιστοποίηση της απομόνωσης με χρωματογραφία συγγένειας σε σύστημα FPLC.

Δεύτερος στόχος της εργασίας ήταν η εκτίμηση της κινητικής συμπεριφοράς του ενζύμου. Καθώς έχει ήδη αποδειχθεί πως η AtHesp είναι μια αποαδενυλάση εξαρτώμενη από μαγνήσιο [46], και πως ανήκει στην οικογένεια EEP (λόγω μεγάλης ομολογίας προς τη Nocturnin), ήταν έντονο το ενδιαφέρον για την εξακρίβωση της αντίδρασης της αποαδενυλίωσης. Επιχειρήθηκε έμμεση εξακρίβωση του προϊόντος με μέτρηση ενζυμικής δραστικότητας της AtHesp με τη μέθοδο του κυανού του μεθυλενίου υπό αυξανόμενη συγκέντρωση 5' AMP, ώστε να διαπιστωθεί εάν το υποτιθέμενο προϊόν της αντίδρασης της αποαδενυλίωσης (5' AMP) αναστέλλει τη δραστικότητα του ενζύμου μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης.

Τρίτο, και τελευταίο, στόχο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε ο προσδιορισμός της τεταρτοταγούς δομής του μορίου. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκαν δυο στρατηγικές. Η πρώτη προσέγγιση ήταν η ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native-PAGE) ώστε να διαπιστωθεί από πόσες υπομονάδες αποτελείται, διότι προηγούμενες κινητικές μελέτες [46] έδειξαν συμπεριφορά αλλοστερικού ενζύμου. Τη δεύτερη προσέγγιση αποτέλεσε η προσπάθεια κρυστάλλωσης που απαιτεί την απομόνωση του ενζύμου σε μεγάλη ποσότητα και κατά το δυνατόν απόλυτη καθαρότητα ώστε να γίνουν απόπειρες κρυστάλλωσής του σε διάφορες συνθήκες κρυστάλλωσης με τη βοήθεια του Oryxnano της Douglas instruments. Η μετέπειτα υποβολή του κρυστάλλου σε περίθλαση ακτίνων X θα έδινε ολοκληρωμένη εικόνα για τη δομή της πρωτεΐνης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

3.1.1. Αντιδραστήρια

Acetic Acid	Merck
Acrylamide	SERVA
Ammonium Persulfate (APS)	SIGMA
Ampicillin	SERVA
Bis Acrylamide	SERVA
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay	Bio-rad
Bromophenol Blue	Research Organics
Calcium Chloride dehydrate	Merck
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Research Organics
Dithiothreitol (DTT)	SERVA
DOC (deoxycholic acid)	SERVA
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Panreac
Ethanol Absolute	SIGMA
Formaldehyde	Applichem
Glycerol	Panreac
Glycine	Biochemica
Hydrocloric Acid (HCl)	Merck
Imidazole	Applichem, SIGMA
Isopropanol	Scharlau
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Fermentas
LB Agar	SIGMA
LB Broth	Merck
Magnesium Chloride Hexahydrate ($MgCl_2$•$6H_2O$)	Panreac
Methanol	Applichem
Methylene Blue Solution	Merck
MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid]	SIGMA
Pink prestained protein marker	Nippon Genetics
PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)	Applichem
Potassium Chloride (KCl)	Merck
Potassium Hydroxide (KOH)	Merck
Protein markers for Native PAGE	SIGMA
SDS (Sodium dodecyl Sulfate)	SERVA
Silver Nitrate ($AgNO_3$)	Panreac
Sodium Bicarbonate ($NaHCO_3$)	Merck
Sodium Carbonate Anydrous (Na_2CO_3)	Panreac
Sodium Chloride (NaCl)	Applichem
Sodium diHydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Sodium Thiosulfate pentahydrate ($Na_2S_2O_3$)	ChemLab
TCA (Trichloroacetic Acid)	Merck
TEMED (*N,N,N΄,N΄-tetramethylethylenediamine)*	Research Organics
Tris Base	Merck
Tween- 20	Biochemica
Αγαρόζη	SIGMA
β- Mercaptoethanol	Riedel de Haën

3.1.2. Βακτηριακά στελέχη

BL21- Gold (DE3)	Agilent Technologies

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

3.1.3. Ένζυμα

Benzonase	SIGMA
RNase inhibitors	TAKARA
DNase	Thermo Scientific

3.1.4. Δείκτες μοριακών βαρών

PiNK prestained protein marker	Nippon Genetics
Kit for Molecular Weights 14,000–500,000 Non-denaturing PAGE	SIGMA-ALDRICH

3.1.5. Χρωματογραφία συγγένειας

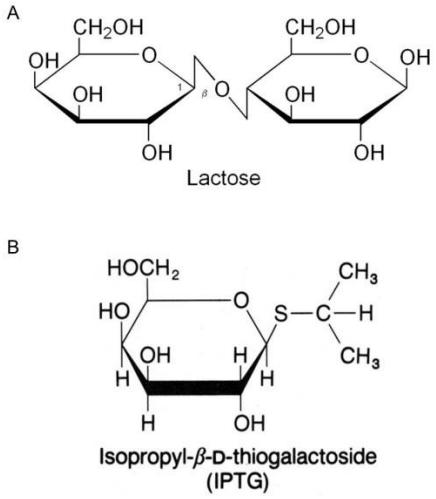
Ni^{2+}-NTA- Sepharose	GE Healthcare
HisTrap HP (Ni^{2+}-Sepharose)	GE Healthcare
Minisart (0.45μm)	Sartorius stedim
Minisart (0.22μm)	Sartorius stedim
Tricorn Superpose 12 10/300 GL	GE Healthcare
Vivaspin 4 (10000 cutoff)	Sartorius stedim
Μεμβράνη διαπίδυσης (10000 cutoff)	SIGMA

3.1.6. Πλασμιδιακός Φορέας

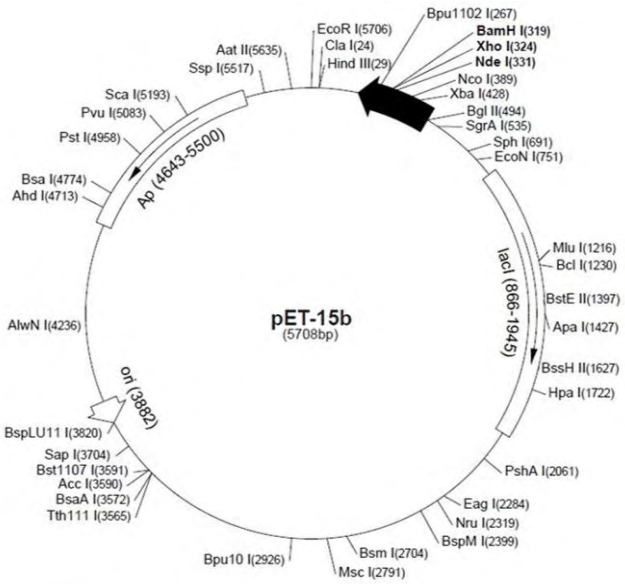
pET-15b (βλ. εικόνα 10)	

Το σύστημα pET έχει σχεδιαστεί για την υποκλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων σε κύτταρα του στελέχους E.coli [41], με αποτέλεσμα, όταν ενεργοποιηθεί, να είναι δυνατή η γρήγορη παραγωγή μεγάλης ποσότητας οποιασδήποτε επιθυμητής πρωτεΐνης. Το πλασμίδιο διαθέτει διάφορα σημαντικά στοιχεία: τον 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 αμπικιλλίνη. 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 επαγώγιμο προαγωγέα που ενεργοποιείται από το IPTG. Το

IPTG είναι ανάλογο της λακτόζης (βλ. εικόνα 9) που δεσμεύει τον καταστολέα του ρυθμιστή lac [41].



Εικόνα 9. Α. Μόριο λακτόζης Β. IPTG



Εικόνα 10. Ο πλασμιδιακός φορέας pET-15b. Η περιοχή κλωνοποίησης/εκφρασης της κωδικής αλυσιδας βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της T7 πολυμεράσης. Ο συγκεκριμένος φορές διαθέτει μια σηματοδοτική αλληλουχία έξι καταλοίπων ιστιδίνης (His·Tag®) στο αμινοτελικό άκρο της προς έκφραση πρωτεΐνης *(pET Manual 10th Edition, Novagen, 2003)*

3.1.7. Διαλύματα

<u>Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης βακτηριακών κυττάρων με χρήση υπερήχων:</u>

0.5M NaCl, 0.1% Triton-X, 10% Glycerol, 5mM $MgCl_2$, 5mM β-mercaptoethanol, 1mM PMSF, lysozyme ίχνη, διαλύονται σε 100mM phosphate buffer (pH .)

Η προσθήκη της β-μερκαπτοαιθανόλης, του αναστολέα πρωτεασών PMSF και της λυσοζύμης γίνεται λίγο πριν τη χρήση του διαλύματος. Το PMSF είναι ένας γενικός αναστολέας

πρωτεασών σερίνης. Οι πρωτεάσες σερίνης χρησιμοποιούν ένα πυρηνόφιλο κατάλοιπο σερίνης για να προσβάλλουν τον καρβονυλικό άνθρακα του δεσμού που θα τμηθεί. Αυτή η σερίνη είναι πολύ ισχυρό πυρηνόφιλο και αυτή η ακραία ιδιότητα διευκολύνεται από την μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα κατάλοιπο ασπαργινικού οξέος μέσω μιας ιστιδίνης. Τόσο η σερίνη, όσο και η ιστιδίνη είναι στόχοι πρωτεόλυσης. Το PMSF εκτός από πρωτεάσες σερίνης αναστέλλει και τύπους ενζύμων με σερίνη στο ενεργό τους κέντρο [43].

Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (ενδεικτικά 100mM):

12mM Na_2HPO_4, 88mM NaH_2PO_4 (pH 6)

Ρυθμιστικά διαλύματα απομόνωσης πρωτεΐνης:

1. *Διαλύματα για απομόνωση σε στήλη βαρύτητας Ni^{2+}-NTA-Sepharose*
   - Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1 (Wash1): 0,5M NaCl, 50mM Imidazole, 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
   - Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 2: 0,5M NaCl, 200mM Imidazole, 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
   - Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης: 0,5M NaCl, 500mM Imidazole, 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
2. *Διαλύματα για απομόνωση με το σύστημα FPLC*
   - *Χρωματογραφία Συγγένειας (Ni^{+2}- Sepharose, HisTrapHP)*
     - Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπισης: 100mM Phosphate Buffer, 20mM Imidazole, 500mM NaCl, pH 6.0
     - Ρυθμιστικό Διάλυμα έκλουσης: 100mM Phosphate Buffer, 700mM Imidazole, 500mM NaCl, pH 6.0
   - *Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης (Gel Filtration, Tricorn Superose 12)*
     - 100mM Phosphate Buffer, 0.5M NaCl, pH 6.0

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

250mM Tris, 1.92M Glycine. Το διάλυμα δε χρειάζεται ρύθμιση του pH και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Για την παρασκευή Running Buffer 1×, 1L: Αραίωση 100mL R.B.10× σε 900mL dH_2O. Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε τελική αναλογία 0,1% [34]. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων SDS-PAGE 4× (Sample Buffer):

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

Το SDS 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 [34]. Η πλήρης αποδιάταξη της τριτοταγούς δομής γίνεται με θέρμανση τους 95-98°C. 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 βρομοφαινόλης προστίθεται ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης, καθώς έχει ταχύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα από τις ηλεκτροφορούμενες πρωτεΐνες [37].

Ρυθμιστικό διάλυμα Basic Native PAGE (Running Buffer) 10×:

500mM Tris, 3.8M Glycine. Το pH του διαλύματος που προκύπτει πρέπει να είναι πάνω από 8. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων Basic Native PAGE 4× (Sample buffer):

40% Glycerol, 250mM Tris-Hcl pH 6.8, 0.015% Bromophenol blue, dH_2O.

1% Bromohenol Blue:

0.2gr Bromophenol Blue διαλύονται σε 100% αιθανόλη. Το διάλυμα αποκτά πορτοκαλί χρώμα.

Διαλύματα βαφής πηκτής πολυακρυλαμιδίου

- *Χρώση με Coomassie*
  10% Acetic Acid, Coomassie Blue 0.05% (40% Methanol, 10% Acetic Acid, dH_2O, Coomassie Blue R-250 ~0.1%). Η χρωστική προσδένεται μη ειδικά σε όλες τις πρωτεΐνες. Η πηκτή επωάζεται με το διάλυμα της χρωστικής και όση χρωστική δεν έχει προσδεθεί σε πρωτεΐνες διαχέεται από την πηκτή στα επακόλουθα βήματα της χρώσης, ώστε να λάβουμε την επιθυμητή εικόνα των ηλεκτροφορημένων πρωτεϊνών.
- *Χρώση με Νιτρικό άργυρο ($AgNO_3$)*
  - *Fixation:* 50% Methanol, 5% Acetic Acid, dH_2O. Στο βήμα της μονιμοποίησης, τα μακρομόρια γίνονται αδιάλυτα λόγω της παρουσίας του οξεος, μην επιτρέποντας τη διάχυση από την πηκτή κατά τα επόμενα στάδια της χρώσης. Επίσης, σε αυτό το βήμα, απομακρύνονται και ουσίες από την πηκτή που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη χρώση, όπως ρυθμιστικά διαλύματα, ιόντα, αποδιατακτικοί παράγοντες κ.α..
  - *Sensitization:* 0.02% $Na_2S_2O_3$. Αυτό το διάλυμα βοηθά τις πρωτεΐνες που βρίσκονται καθηλωμένες στην πηκτή να αντιδράσουν με τον άργυρο καθώς, επίσης, επιταχύνει την επακόλουθη αναγωγή του ιόντος του αργύρου. Παράλληλα, το οξυανιόν του θείου ($S_2O_3^{2-}$) σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τα ελεύθερα ιόντα του αργύρου εμποδίζοντάς το να αναχθεί σε μεταλλικό άργυρο. Η πλεονάζουσα ευαισθητοποίηση της πηκτής οδηγεί σε αύξηση του θορύβου, και για το λόγο αυτό, ακολουθούν βήματα πλύσεων της πηκτής από το θιοθειικό νάτριο.
  - *$AgNO_3$:* 0.1% $AgNO_3$.
  - *Development:* 2% Na_2CO_3, 0.04% Formaldehyde, dH_2O. Το διάλυμα αυτό περιέχει φορμαλδεΰδη, η οποία ανάγει τον άργυρο. Η προσθήκη του

ανθρακικού νατρίου κρίνεται απαραίτητη για να γίνει το διάλυμα αλκαλικό, καθώς αυτή η αντίδραση λαμβάνει χώρα μόνο σε υψηλό pH,.

- *Stopping:* 5% Acetic acid. Η προσθήκη του οξικού οξέος αποτρέπει την πην περεταίρω οξείδωση του αργύρου, λόγω του όξινου χαρακτήρα του διαλύματος.

Όλα τα διαλύματα διατηρούνται σε θερμοκρασία +4°C. Τα διαλύματα για το *development* και το διάλυμα $AgNO_3$ φυλάσσονται στο σκοτάδι [35].

Διαλύματα για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της AtHesperin:

- *Νερό ελεύθερο νουκλεασών:* *MilliQ* ddH_2O 18.2 mΩ, 0.05% DEPC, εξάτμιση του DEPC κατά τη διάρκεια της νύχτας και αποστείρωση. Φυλάσσεται στο σκοτάδι.
- *Διάλυμα αντίδρασης:* 2mM $MgCl_2$, 50mM Phosphate Buffer, 0.5mM DTT, 10% glycerol, η διθειοτρεϊτόλη έχει ως σκοπό την απορρόφηση των δραστικών ριζών κατά τη διάρκεια των ενζυμικών αντιδράσεων, μέσω της δράσης της ως αναγωγικός παράγοντας.
- *Διάλυμα Κυανού του Μεθυλενίου 0.0012%:* 0.01% κυανό του μεθυλενίου, 0,1M Phosphate Buffer (αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι).
- *Διάλυμα Κυανού του Μεθυλενίου 0.01%:* Κατάλληλη αραίωση του διαλύματος Löffler's Methylene blue 48,5% στον επιθυμητό τελικό όγκο με νερό ελεύθερο νουκλεσών. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.

Διάλυμα διαπίδυσης -αποθήκευσης AtHesperin

1.5mM $MgCl_2$, 0.2mM EDTA, 20mM KCl, διαλύονται σε dH_2O. Η προσθήκη του EDTA γίνεται με σκοπό την αναστολή μεταλλοπρωτεασών που εξαρτώνται από δισθενή ιόντα μετάλλων για την πρωτεολυτική τους δράση [43].

3.1.8. Οργανολογία

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν κατά κύριο λόγο διαθέσιμα στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς επίσης και στους κοινόχρηστους χώρους του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας. Αναφέρονται τα σημαντικότερα εξ αυτών:

ÄKTA purifier (FPLC system)	GE Healthcare Life Sciences
Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Nichiryo
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης	BioRad
Μετρητής Ph	Metrohm
Oryxnano ρομπότ σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης	Douglas Instruments
Στερεοσκόπιο	Olympus TL2
Σύστημα απεικόνισης (FluorChem™ E)	Protein Simple
Φυγόκεντροι	eppendorf Centrifuge 5810R Hermle Z36HK
Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός	Spectronic® 20 GENESYS™

3.2. Μέθοδοι

– *Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων με τον πλασμιδιακό φορέα pET-15b-AtHesp*

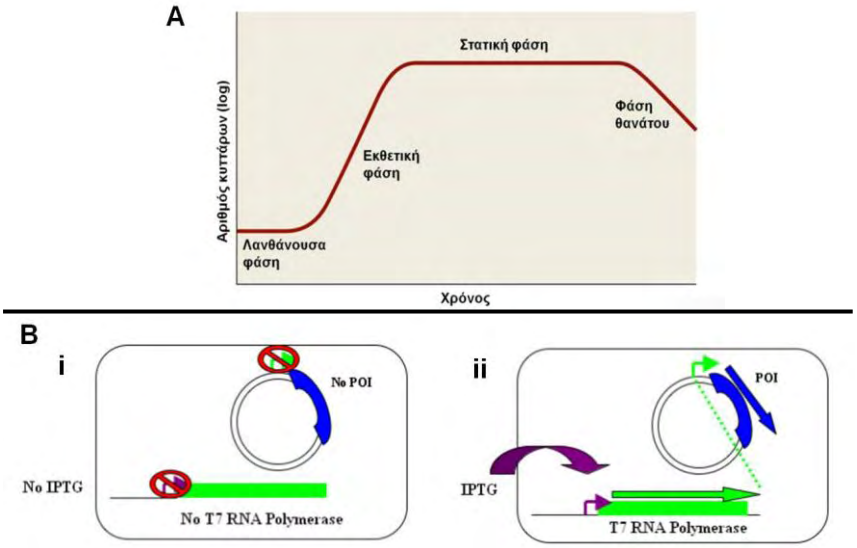
Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων E.coli στελέχους BL21-Gold (DE3) με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Στο σωληνάριο eppendorf όπου ήταν αποθηκευμένα τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα προστίθενται 50μg ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και αναδεύονται πολύ ήπια και αφήνονται για επώαση στους 4°C για 30min. Ακολούθως, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, το οποίο είναι ρυθμισμένο στους 42°C για 45sec ακριβώς. Στη συνέχεια, μεταφέρονται για επώαση στους 4°C για 2min. Μετά το πέρας των 2 λεπτών τοποθετείται 1ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth, άνευ αντιβιοτικού. Τα μετασχηματισμένα, πλέον, βακτηριακά κύτταρα επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση (180-210 rpm) για 1h. Μετά το πέρας της επώασης το 1/500 του αρχικού όγκου της υγρής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία petri με θρεπτικό μέσο LB Agar, στα οποία έχει προστεθεί το αντιβιοτικό αμπικιλλίνη σε τελική συγκέντρωσης 50μg/ml, με γυάλινο διανομέα (πιπέττα pasteur). Τα τρυβλία επωάζονται για 14-16h σε ξηρό θερμαινόμενο θάλαμο θερμοκρασίας 37°C. Σημειώνεται ότι όλες οι διαδικασίες που περιλαμβάνουν μεταχείριση βακτηρίων και αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων, γίνονται υπό στείρες συνθήκες.

– *Υπερέκφραση AtHesperin σε βακτήρια E.coli στελέχους BL21-Gold*

Σε δυο αποστειρωμένες φλάσκες, χωρητικότητας 2L η κάθε μία, με υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth, όγκου ≤1/3 της χωρητικότητας της φλάσκας. Οι αποστειρωμένες φλάσκες διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση τους. Υπό στείρες συνθήκες προστίθενται στις φλάσκες από 50μg/mL του αντιβιοτικού αμπικιλλίνη. Λαμβάνεται 1mL του θρεπτικού μέσου μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού, το οποίο θα αποτελεί το μάρτυρα κατά τη φασματοφωτομετρική παρακολούθηση της πορείας της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, οι φλάσκες εμβολιάζονται με όγκο 1/100 από μια υγρή καλλιέργεια των BL21-Gold και επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση (180-210rpm).

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 καλλιέργεια μέχρι να φτάσει να έχει OD_{600nm}= 0.7 A, όπου και θεωρείται, για το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, πως η καλλιέργεια θα βρίσκεται στο απόγειο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (βλ. εικόνα 11.A). Είναι επιθυμητό, η καλλιέργεια να φτάσει στο μέγιστο σημείο της εκθετικής φάσης όπου και θα ξεκινήσει η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης προς μελέτη.

Μόλις η απορρόφηση της καλλιέργειας είναι η κατάλληλη γίνεται προσθήκη IPTG τελικής συγκέντρωσης 1mM. Η υπερέκφραση επάγεται για 4h στους 37 ^{o}C υπό ανάδευση (180-210 rpm).'Οσο είναι παρόν το IPTG στη βακτηριακή καλλιέργεια, θα παράγεται το RNA της προς μελέτη πρωτεΐνης (βλ. εικόνα 11.B). Μετά το πέρας της επαγωγής, οι φλάσκες τοποθετούνται στους 4 ^{o}C ώστε να βραχυνθεί η βακτηριακή ανάπτυξη. Η καλλιέργεια των βακτηρίων φυγοκεντρείται σε δοχεία συλλογής στις 4000rpm/4°C για 30min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται καθώς αποτελεί το θρεπτικό μέσο και το κυτταρικό ίζημα φυλάσσεται στους -80 ^{o}C.



Εικόνα 11. 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: πρωτεϊνη προς μελέτη) *(openwetware.org)*.

- *Λύση βακτηριακών κυττάρων*

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε μετά την υπερέκφραση, καταψύχεται κατά τη διάρκεια της νύχτας, εναποτίθεται σε πάγο έτσι ώστε να ξεπαγώσει ελαφρώς και να μπορεί να είναι εύκολο στη μεταχείριση. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Το διάλυμα λύσης περιέχει, μεταξύ άλλων, απορρυπαντικό (Triton X-100) ώστε να γίνει διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και λυσοζύμη για τη διάσπαση των πεπτιδογλυκανών του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και να καθίσταται πιο ευπαθής η κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου στα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος. Στο διάλυμα που προκύπτει προστίθενται είτε 50U DNase, είτε 50U βενζονάση, που είναι νουκλεάση, ώστε να μειωθεί το ιξώδες του διαλύματος μέσω της διάσπασης του DNA. Η νουκλεάση επωάζεται με το κυτταρόλυμμα για 10 λεπτά (ήπια ανάδευση) στον πάγο και στη συνέχεια το διάλυμα υποβάλλεται σε μηχανική λύση μέσω υπερήχων. Η πλήρης λύση των κυττάρων γίνεται σε 10 κύκλους των 30 sec, όπου η συσκευή υπερήχων επί 30 sec παράγει υπερήχους εύρους 70%, σε συνεχόμενους κύκλους, οι οποίοι διαπερνούν το κυτταρόλυμμα, για 30 sec σταματάει την παραγωγή υπερήχων. Κατά τη διάρκεια της λύσης με υπερήχους αυξάνεται κατά πολύ η θερμοκρασία του διαλύματος, 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 λυμμένων κυττάρων υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση στις 15000rpm/4°C για 60 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, απορρίπτεται το ίζημα καθώς αποτελείται από τα κυτταρικά υπολείμματα και το υπερκείμενο φυλάσσεται, καθώς, περιέχει τα διαλυτά συστατικά, μεταξύ των οποίων και την προς μελέτη πρωτεΐνη.

- *Απομόνωση πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας*

  - *Απομόνωση σε χειροκίνητη στήλη βαρύτητας Ni^{2+}-NTA-Sepharose*

    Η απομόνωση βασίζεται στο ότι τα διάφορα συστατικά ενός διαλύματος έχουν διαφορετική συγγένεια για την κινητή και τη σταθερή, πορώδη, φάση της στήλης. Η κινητή φάση είναι το υγρό ρυθμιστικό διάλυμα και η σταθερή φάση είναι μια ρητίνη σφαιριδίων πακεταρισμένων μέσα σε μια κυλινδρική γυάλινη ή πλαστική στήλη. Το μέγεθος των πόρων, η φύση των σφαιριδίων, καθώς και οι παράγοντες που είναι προσδεδεμένοι στα σφαιρίδια, εξαρτάται από τη χρήση για την οποία προορίζεται. Μετά τη λύση και τη φυγοκέντρηση των βακτηριακών κυττάρων, λαμβάνεται το υπερκείμενο και προστίθενται σε αυτό 20U DNάσης, με σκοπό την αποικοδόμηση του DNA που περιέχεται στο υπερκείμενο. Για την απομόνωση τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι τα διαλύματα εξισορρόπισης-έκλπυσης και έκλουσης. Καθώς η στήλη είναι αποθηκευμένη σε 30% αιθανόλη, ξεπλένεται από την αιθανόλη με περίσσεια απιονισμένου νερού και στη συνέχεια εξισορροπείται με 10 όγκους στήλης[2] ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης. Το υπερκείμενο των λυμμένων κυττάρων, στη συνέχεια, αναμιγνύεται με τη στήλη υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C για χρονικό διάστημα 30 λεπτών. Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στη ρητίνη μέσω σύνδεσης των ιστιδινών (His·Tag) που έχει στο αμινοτελικό άκρο, με τα ιόντα νικελίου. Το διάλυμα εκχυλίζεται προσεκτικά μέσα από στήλη που κατακρατά την ρητίνη, και συλλέγεται το υπερδιήθημα (flow-through). Η στήλη εκπλένεται με 1 mL ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1 (wash 1) και συλλέγονται κλάσματα ανά 1 mL. Στη συνέχεια ακολουθεί έκπλυση με 2 ml ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 2 (wash 2), στο οποίο περιέχεται μεγαλύτερη συγκέντρωση ιμιδαζολίου ώστε να γίνει απομάκρυνση των μη-ειδικών ουσιών που κατακρατήθηκαν στη στήλη. Η έκλουση της πρωτεΐνης γίνεται με 2 mL ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης 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 συνδεμένων με ιστιδίνη (βλ. εικόνα 13).

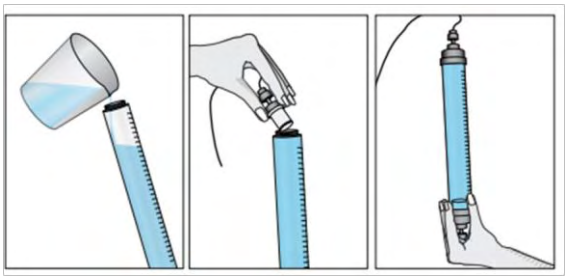
    Στη συνέχεια, η στήλη επλύθηκε με περίσσεια ρυθμιστικού διαλύματος έξισορρόπησης, στη συνέχεια με περίσσεια ddH_2O και, τέλος, με περίσσεια διαλύματος NaOH. Η στήλη αποθηκεύεται με περίσσεια 30% αιθανόλης στους 4°C.

  - *Απομόνωση με το αυτοματοποιημένο σύστημα FPLC σε στήλη HisTrapHP (Ni^{2+}-NTA-Sepharose)*

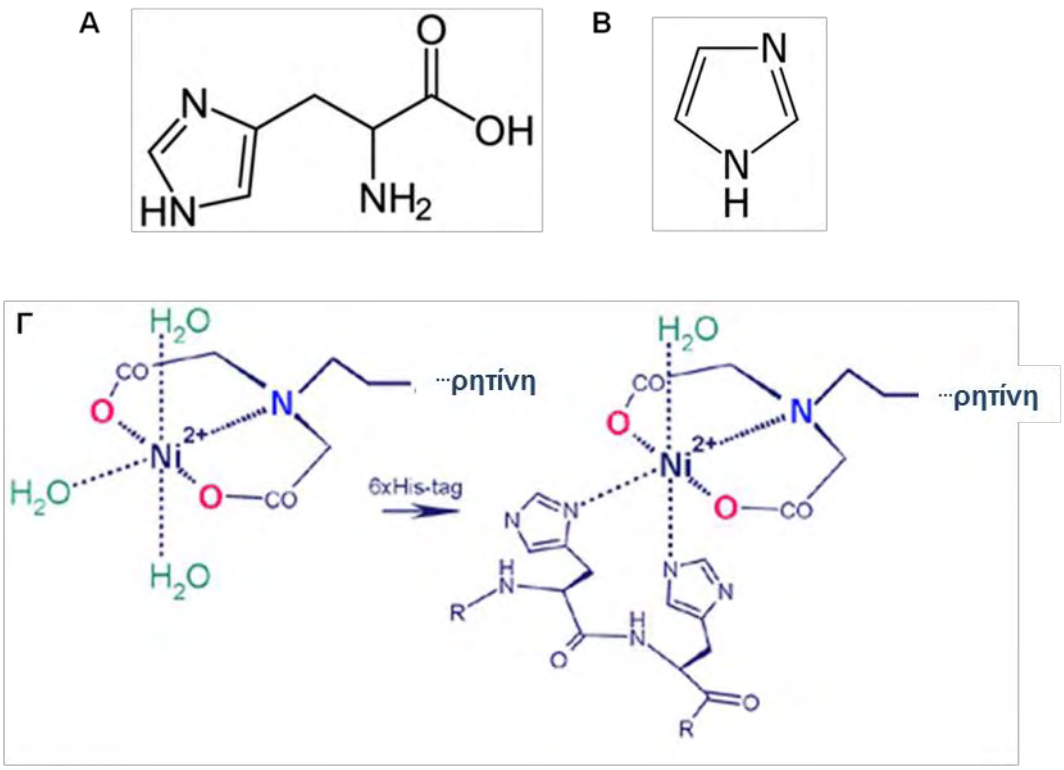
    Το σύστημα FPLC είναι ένας τύπος υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών από ένα μίγμα. Η βασική αρχή της δεν διαφέρει από αυτή της απλής υγρής χρωματογραφίας συγγένειας, με τη διαφορά ότι το σύστημα είναι πιο αυτοματοποιημένο και τα διαλύματα περνούν μέσα από το σύστημα χρησιμοποιώντας αντλίες θετικής μετατόπισης, οι οποίες μεταφέρουν υγρό μέσα στο σύστημα υπό υψηλή πίεση. Μετά τη λύση και τη

[2] Όγκος στήλης: $V_e = \pi \cdot R^2 \cdot L = 1/4\ \pi \cdot D^2 \cdot L$ (V_e = κενός όγκος στήλης, R = ακτίνα στήλης, L = μήκος στήλης, D = διάμετρος στήλης, εκφράζεται σε mL) και εκφράζει τον όγκο της ρητίνης που πακετάρεται μέσα στη στήλη

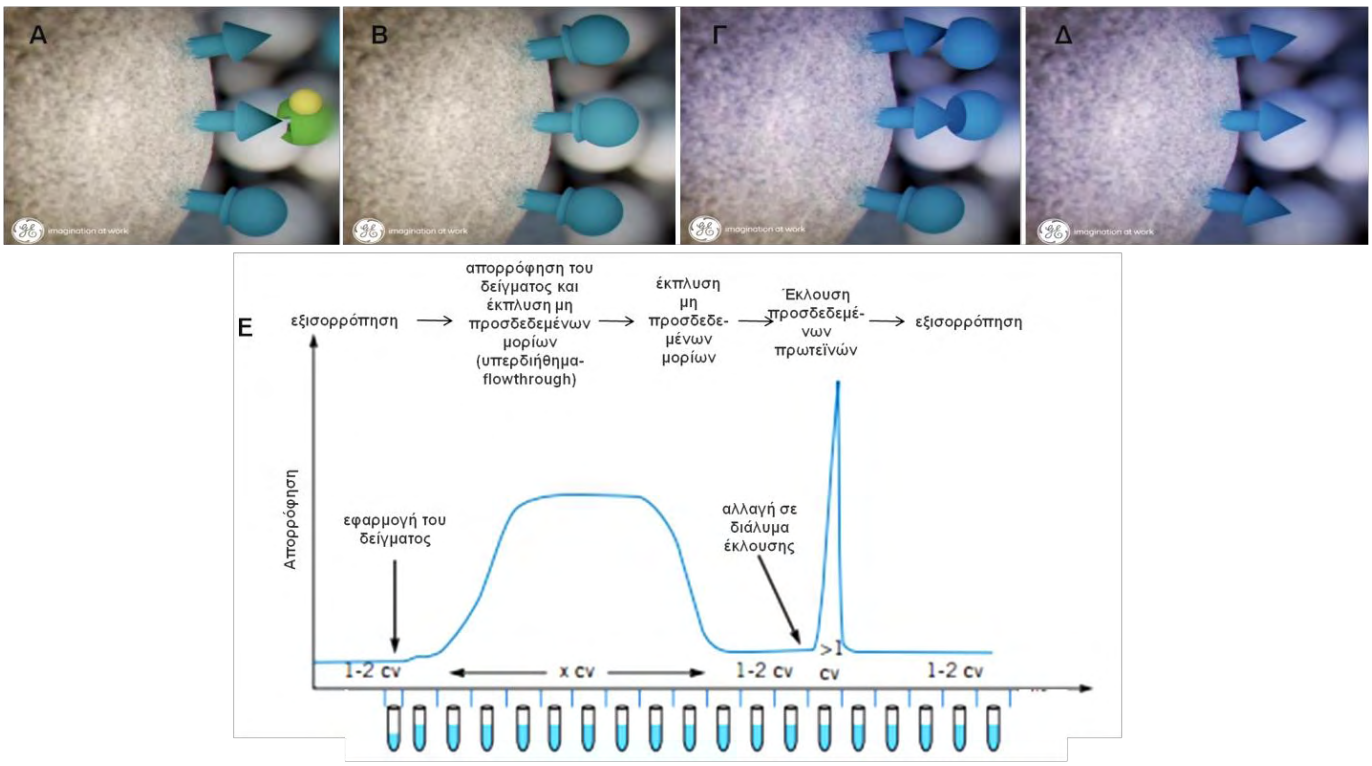
φυγοκέντρηση των βακτηριακών κυττάρων, λαμβάνεται το υπερκείμενο και φιλτράρεται από φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45μm. Για την απομόνωση τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι τα διαλύματα εξισορρόπησης-έκλπυσης και έκλουσης, τα οποία πριν χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση φιλτράρονται υπό κενό με φίλτρο 0.45μm και απαερώνονται με χρήση υπερήχων. Τα διαλύματα εξισσορόπησης-έκπλυσης και έκλουσης τοποθετούνται στις αντίστοιχες αντλίες του μηχανήματος ÄKTA purifier (GE Healthcare). Η πορεία της χρωματογραφίας ελέγχεται από το υπολογιστικό πρόγραμμα Unicorn™. Το διάλυμα των πρωτεϊνών εναποτίθεται στο σωλήνα superloop (βλ. Εικόνα 12). Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι η HisTrapHP, η οποία είναι μια στήλη όγκου 1mL Ni^{+2} σεφαρόζης, η οποία εξισορροπείται με 15-20 όγκους στήλης από το αντίστοιχο διάλυμα. Στη συνέχεια, ρυθμίζοντας την πίεση και το ρυθμό ροής, αρχίζει να περνάει η πρωτεϊνη μέσα από τη στήλη, ώστε ό,τι είναι ειδικό προς αυτή να προσδεθεί στα σφαιρίδια αγαρόζης που φέρουν Ni^{+2} και ότι δεν είναι ειδικό να εκπλυθεί στα κλάσματα υπερδιηθήματος (flow-through). Η χρωματογραφία συγγένειας βασίζεται στην αρχή πως τα ιόντα Ni^{+2} έχουν συγγένεια με την σηματοδοτική αλληλουχία ιστιδινών που φέρει η πρωτεΐνη που έχει υπερεκφραστεί (βλ. εικόνα 13). Κατά την έκλπυση της στήλης, ό,τι δεν έχει αγχιστεία για τα σφαιρίδια σεφαρόζης, που φέρουν το νικέλιο, θα εκπλυθεί και θα συλλεχθεί σε κλάσματα (βλ. εικόνα 14. Ε.). Ακολούθως, συνεχίζει η έκλουση της πρωτεΐνης, η οποία γίνεται με βαθμίδωση συγκέντρωσης (0-100%) του διαλύματος έκλουσης. Μόλις το διάλυμα έκλουσης έχει φτάσει στο 100% της συγκέντρωσής του, εξισορροπείται εκ νέου η στήλη με διάλυμα εξισορρόπησης-έκπλυσης και στη συνέχεια αποθηκεύεται σε 20% αιθανόλη. Με τη χρήση του προγράμματος Unicorn™ λαμβάνεται το χρωματογράφημα, στο οποίο αποτυπώνεται η απορρόφηση στο υπεριώδες φάσμα των κλασμάτων και για όλες τις δεδομένες συγκεντρώσεις διαλύματος έκλουσης (βλ. Εικόνα 14).



Εικόνα 12. Εισαγωγή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στον κύλινδρο superloop. *(GE Healthcare, Affinity Chromatography, Methods & Principles, 2007)*



Εικόνα 13. Α. Ιστιδίνη, Β. Ιμιδαζόλιο, Γ. αντίδραση νικελίου με 2 ιστιδίνες.



Εικόνα 14. Επισκόπηση της αρχής της χρωματογραφίας συγγένειας. Α. εξισορρόπηση, Β. δέσμευση δείγματος. Το δείγμα εφαρμόζεται υπό συνθήκες που ευνοούν την πρόσδεση των μορίων στόχων με τα σφαιρίδια ρητίνης. Οι ουσίες-στόχοι προσδένονται ειδικά, αλλά αντιστρέψιμα και τα μη προσδεδεμένα μόρια εκλπένονται από τη στήλη, **Γ. έκλουση.** Η πρωτεΐνη στόχος ανασύρεται με αλλαγή των συνθηκών, έτσι ώστε να ευνοηθεί η έκλουση

των προσδεδεμένων μορίων. Η έκλουση γίνεται εξειδικευμένα χρησιμοποιώντας έναν προσδέτη ανταγωνιστικό για πρόσδεση στα σφαιρίδια. Η πρωτεΐνη στόχος συλλέγεται καθαρισμένη, **Δ. εξισορρόπηση. Ε. Επισκόπηση της χρωματογραφίας συγγένειας σε σχέση με τους όγκους στήλης των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται** (cv: όγκοι στήλης)**.** *(GE Healthcare, Affinity Chromatography, Methods & Principles, 2007).*

- *Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνών με τη μέθοδο Bradford*

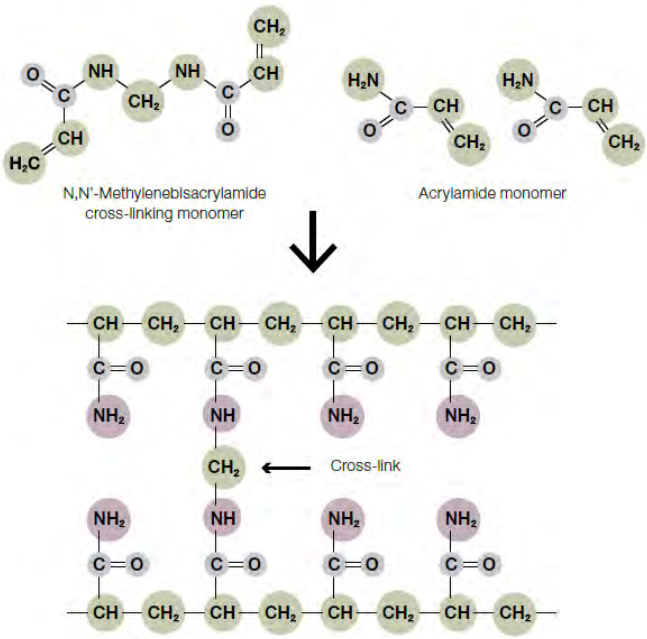
Για τον προσδιορισμό της συγκέντωσης πρωτεΐνης σε κάθε κλάσμα που συλλέχθηκε από τη στήλη, λαμβάνεται μικρή ποσότητα από κάθε κλάσμα και προστίθεται σε τελικό όγκο 1mL αντιδραστηρίου *Bradford* και τα διαλύματα επωάζονται για 10 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η φασματοφωτομετρική τους απορρόφηση σε λ= 595nm. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της περιεχόμενης πρωτεΐνης σε κάθε διάλυμα έχει πραγματοποιηθεί προηγουμένως προσδιορισμός της πρότυπης καμπύλης με γνωστές συγκεντρώσεις της βόειας αλβουμίνης ορού (*BSA*). Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης (OD_{595nm} = f(C_{BSA})) γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στα διαλύματα σε μονάδες mg/mL. Η δοκιμασία Bradford είναι μια μέθοδος ποσοτικού καθορισμού πρωτεϊνών και περιλαμβάνει την πρόσδεση του Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες [2]. Όταν η χρωστική προσδεθεί στην πρωτεΐνη, μετατρέπεται σε μια σταθερή μη πρωτονιωμένη μπλε μορφή (A_{max}= 595nm) [29],[12]. Αυτό που ανιχνεύεται, δηλαδή, σε λ= 595nm είναι η μπλε μορφή πρωτεΐνης- χρωστικής. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 προσδένεται αρχικά στα βασικά (και ιδιαίτερα στην αργινίνη) και στα αρωματικά αμινοξέα [4].

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

Πρώτο βήμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών είναι η προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Καθώς, 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 πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα ηλεκτροφόρησης είναι ασυνεχές, δηλαδή αποτελείται από 2 πηκτές διαφορετικής πυκνότητας. Η πηκτή επιστοίβαξης η οποία έχει σταθερή πυκνότητα 5%, και η πηκτή διαχωρισμού της οποίας η πυκνότητα είναι που κάθε φορά προσαρμόζεται ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβαξης είναι να κινηθούν οι πρωτεΐνες (εξ ου και η πιο αραιή του σύσταση) και να στοιβαχτούν σε μια κοινή ζώνη ώστε να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού και να δημιουργηθεί ένα ενιαίο μέτωπο κατά την ηλεκτροφόρηση της πηκτής. Η συγκέντρωση της πηκτής πολυακριλαμιδίου που παρουσιάζεται στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι 10% (βλ. Πίνακας ΙΙ). Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται με την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου (βλ. Εικόνα 18) σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία των παραγόντων υπερθειικό αμμώνιο (APS) και TEMED. Το TEMED είναι επιταχυντής, το οποίο καταλύει την αντίδραση πολυμερισμού των ελεύθερων ριζών του θείου που δημιουργούνται από το APS. Η κατασκευή όπου θα δημιουργηθεί η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου είναι μια κάθετη

διάταξη 2 τζαμιών τα οποία μεταξύ τους απέχουν 1mm. Οι θέσεις υποδοχής του δείγματος (ή πηγάδια) δημιουργούνται με την προσθήκη μιας χτένας που δημιουργεί τα πηγάδια κατά την πήξη της πηκτής επιστοίβαξης. Μόλις η πηκτή είναι έτοιμη τοποθετείται, μαζί με το ικρίωμά της, στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1× *(Running Buffer 1×)* (βλ. διαλύματα) το οποίο πρέπει να είναι σε επαφή με την πηκτή σε όλο της το μήκος και πλάτος. Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν κανονικοποιούνται σύμφωνα με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους, που πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο *Bradford*, ώστε σε όλα τα πηγάδια της πηκτής να φορτωθεί ίση συγκέντρωση πρωτεϊνών. Προετοιμάζονται τα δείγματα φόρτωσης με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4× έτσι ώστε σε όλα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης και η τελική αραίωση των δειγμάτων να είναι 1×. Στη συνέχεια, τοποθετούνται για 5min στους 95-98 ^{o}C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξή των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί η φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια, ενώ παράλληλα σε ένα από τα πηγάδια φορτώνεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται στο τροφοδοτικό το οποίο διαβιβάζει ρεύμα τάσης 120V στο κλειστό κύκλωμα μεταξύ της δεξαμενής της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Η ηλεκτροφόρηση πηκτών ακρυλαμιδίου, γενικά, είναι μια αναλυτική μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους τους. Η τεχνική αυτή βσίζεται στην αρχή πως ένα φορτισμένο μόριο θα μεταναστεύσει σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η κοινή πορεία, από την κάθοδο προς την άνοδο, όλων των μορίων που περιέχονται σε κάθε δείγμα, εξασφαλίζεται με την προσθήκη του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, ο οποίος θα καταργήσει τις ενδομοριακές αλληλεπιράσεις μεταξύ των μορίων φορτίζοντάς τες αρνητικά και προσδίδοντάς τους ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα, ώστε να μεταναστεύσουν όλα προς την άνοδο, και να διαχωριστούν όχι βάσει του φορτίου τους, αλλά βάσει του μοριακού τους βάρους. Καθώς οι πρωτεΐνες ανάλογα με το μέγεθός τους εμφανίζουν αντίστοιχη αύξηση της τριβής κατά την κίνησή τους διαμέσου των πόρων της πηκτής, όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης, άρα και όσο μεγαλύτερο το μέγεθός της, τόσο μικρότερη είναι η κινητικότητα του μορίου αυτού στην πηκτή [16].



Εικόνα 15. Πολυμερισμός μονομερών ακρυλαμιδίου και δισακρυλαμιδίου

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ. ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΗΚΤΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ & ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ

Πηκτή διαχωριμού			**Πηκτή επιστοίβαξης**	
	10%	**7.5%**		**4%**
dH_2O	2.425 mL	2.730 mL	dH_2O	2.025 mL
Tris-HCl 1.5M pH8.8	1.25 mL	1.25 mL	Tris-HCl 1M pH6.8	210 μL
SDS 10%	50 μL	50 μL	SDS 10%	25 μL
Μίγμα ακρυλαμιδίου **40%**	1.25 mL	930 μL	Μίγμα ακρυλαμιδίου **40%**	250 μL
APS 10%	25 μL	25 μL	APS 10%	12.5 μL
TEMED	2.5 μL	2.5 μL	TEMED	2.5 μL

Πηκτή διαχωριμού			**Πηκτή επιστοίβαξης**	
	10%	**8%**		**5%**
dH_2O	1.9 mL	2.3 mL	dH_2O	2.1 mL
Tris-HCl 1.5M pH8.8	1.3 mL	1.3 mL	Tris-HCl 1M pH6.8	380 μL
SDS 10%	50 μL	50 μL	SDS 10%	30 μL
Μίγμα ακρυλαμιδίου **30%**	1.7 mL	1.3 mL	Μίγμα ακρυλαμιδίου **30%**	500 μL
APS 10%	50 μL	50 μL	APS 10%	30 μL
TEMED	2 μL	3 μL	TEMED	3 μL

- *Διαπίδυση και συμπύκνωση κλασμάτων έκλουσης*

Τα κλάσματα έκλουσης που έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση και είναι πιο καθαρά μετά την απομόνωση, συλλέγονται σε μεμβράνη διαπίδυσης και γίνεται αλλαγή διαλύματος, σε διάλυμα διαπίδυσης, στο οποίο θα αποθηκευτεί η πρωτεΐνη. Η διαπίδυση γίνεται σε ένα ποτήρι ζέσεως που περιέχει το διάλυμα που θα αποκτήσει η πρωτεΐνη, την κατασκευή της μεμβράνης η οποία είναι κλειστή στα δυο άκρα της και

τοποθετείται στον ψυκτικό θάλαμο υπό ανάδευση για περίπου 12 ώρες. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη τοποθετείται σε φίλτρο vivaspin 4 με κατώτατο όριο μοριακού μεγέθους (cut off) 10 kDa ώστε να μην διαφύγει η προς μελέτη πρωτεΐνη από τους πόρους του φίλτρου (MW_{AtHesp}= 47 kDa). Η συμπύκνωση και η αλλαγή διαλύματος στην πρωτεΐνη μπορούν να γίνουν και ταυτόχρονα στο φίλτρο vivaspin 4 ή για μεγαλύτερους όγκους στο φίλτρο συμπύκνωσης και αλλαγής διαλύματος της Millipore. Η συμπύκνωση της πρωτεΐνης γίνεται μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Μετά το πέρας της συμπύκνωσης λαμβάνεται όλος ο όγκος του δείγματος και από τον όγκο αυτόν, λαμβάνεται μικρή ποσότητα για να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή του με τη μέθοδο *Bradford.* Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη αναμιγνύεται με γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 25% και διαμοιράζεται σε σωλήνες τύπου eppendorf και αποθηκεύεται στους -20°C. Προστίθεται γλυκερόλη λόγω της δράσης της σαν κρυοπροστατευτικό, αφού δεν παγώνει, έτσι ώστε η πρωτεΐνη να μη χάσει τη δραστικότητά της κατά την ψύξη και την απόψυξη.

Εναλλακτικά, η πρωτεΐνη μετά το πέρας της συμπύκνωσης και της αλλαγής διαλύματος, αφού προσδιοριστεί η συγκέντρωσή της με τη μέθοδο Bradford, διαμοιράζεται σε μικρά κλάσματα και καταψύχεται στους -80°C με ταχεία ψύξη (flash freeze), δηλαδή την εναπόθεση του σωλήνα τύπου eppendorf σε ένα δοχείο με 70-100% αιθανόλη θερμοκρασίας -80°C.

- *Χρωματογραφία μοριακής διήθησης*

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (επίσης αναφέρεται και ως Gel Filtration ή Size exclusion Chromatography, SEC) είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μορίων ανάλογα με τις διαφορές τους σε μέγεθος καθώς περνούν μέσα από το μέσο που είναι πακεταρισμένο μέσα στη στήλη [53]. Τα διάφορα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης είναι σφαιρικά σωματίδια, τα οποία διαθέτουν πόρους διαφόρων μεγεθών (βλ. Εικόνα 20 Α), έτσι ώστε τα μόρια πού είναι αρκετά μικρά και μπορούν να εισέλθουν διαμέσου των πόρων να καθυστερούν περισσότερο σε σχέση με τα μεγαλύτερου μεγέθους μόρια που δεν μπορούν να εισέλθουν στους πόρους (βλ. Εικόνα 20 Β, Γ) . Τα δείγματα εκλούονται ισοκρατικά (με τη χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος και χωρίς την εφαρμογή βαθμίδωσης συγκέντρωσης που επιτυγχάνεται με δυο ρυθμιστικά διαλύματα) [54].

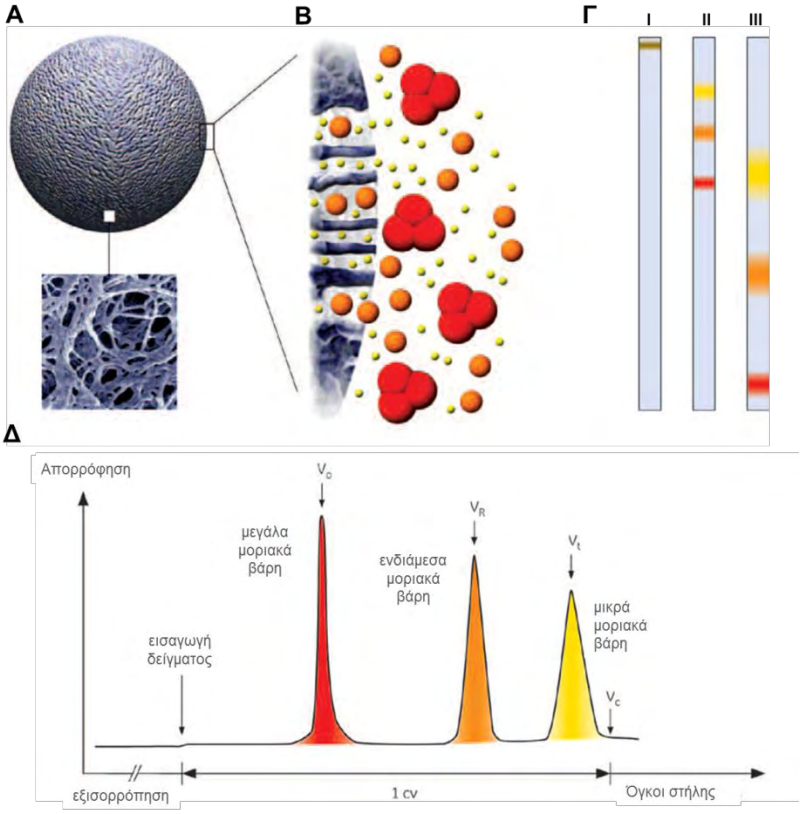
Σε αντίθεση με την χρωματογραφία συγγένειας ή ιοντοανταλλαγής, τα μόρια δεν προσδένονται πάνω στο υλικό της χρωματογραφίας, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται να μην επηρεάζει ιδιαίτερα το βαθμό διαχωρισμού μεταξύ των κορυφών. Αυτό το χαρακτηριστικό, χαρίζει το πλεονέκτημα στο χειριστή να μεταβάλει τις συνθήκες ώστε να ανταποκρίνονται στις ανάγκες του δείγματος και τις μετέπειτα διαδικασίες που θα υποστεί (περαιτέρω καθαρισμός, ανάλυση ή αποθήκευση) χωρίς να μεταβάλλεται ο διαχωρισμός [53].

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιείται σε δυο περιπτώσεις:

- Ομαδικός διαχωρισμός: τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται σε δυο βασικές κατηγορίες ανάλογα με το εύρος μεγέθους. Αυτό το είδος διαχωρισμού χρησιμοποιείται ώστε να απομακρυνθούν μεγάλου ή μικρού μοριακού μεγέθους επιμολύνσεις του δείγματος ή ώστε να αφαλατωθεί ή να αλλάξει ρυθμιστικό διάλυμα το δείγμα.
- Υψηλής ευκρίνειας κλασμάτωση βιομορίων: όπου τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται βάσει των διαφορών του μοριακού βάρους (βλ.

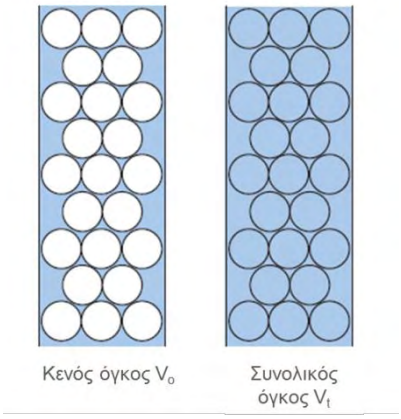
Εικόνα 20 Γ,Δ). Αυτό το είδος διαχωρισμού χρησιμοποιείται ώστε να απομονωθεί ένα ή περισσότερα συστατικά, ώστε να διαχωριστούν μονομερή από συσσωματώματα, ή ώστε να πραγματοποιηθεί ανάλυση κατανομής βάσει του μοριακού βάρους. Αυτό το είδος διαχωρισμού εφαρμόζεται σε δείγματα που εξ αρχής διαθέτουν λίγα συστατικά ή σε δείγματα που έχουν καθαριστεί μερικών από άλλες χρωματογραφικές τεχνικές έτσι ώστε οι ανεπιθύμητες πρωτεΐνες παρόμοιων μοριακών μεγεθών να έχουν εξαλειφθεί [54].

Η διαδικασία λαμβάνει χώρα ως εξής: Η στήλη ξεπλένεται με έναν όγκο στήλης 0,5M NaOH σε χαμηλή ροή, στη συνέχεια, ξεπλένεται με έναν όγκο στήλης ddH_2O και στη συνέχεια εξισορροπείται με τουλάχιστον δυο όγκους στήλης με το ρυθμιστικό διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί για το δείγμα. Πριν τη φόρτωση του δείγματος, ξεπλένεται με περίσσεια ddH_2O, 20%EtOH, ddH_2O, ρυθμιστικού διαλύματος ο σωλήνας τύπου loop από όπου θα περάσει το δείγμα. Αφού τοποθετηθεί ο σωλήνας τύπου loop πάνω στη συσκευή, ξεπλένεται με περίσσεια ρυθμιστικού διαλύματος. Αφού ξεπλυθεί, φορτώνεται το δείγμα με σύριγγα. Μετά το τέλος του τρεξίματος, ακολουθείται η διαδικασία ξεπλύματος της στήλης, ξεπλένεται με έναν όγκο στήλης 0,5M NaOH σε χαμηλή ροή, στη συνέχεια, ξεπλένεται με τουλάχιστον έναν όγκο στήλης ddH_2O και αποθηκεύεται σε 20% EtOH.



Εικόνα 16. Επισκόπηση της διαδικασίας χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Α. Σχηματική αναπαράσταση του πορώδους χρωματογραφικού υλικού σε μεγέθυνση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου **Β**. Σχηματική απεικόνιση των μορίων του δείγματος καθώς διαχέονται διαμέσου των πόρων των σφαιριδίων **Γ. Γραφική αναπαράσταση της απομόνωσης I.** Εφαρμογή του δείγματος στη στήλη, **II.** Το μικρότερο μόριο (κίτρινο) καθυστερεί περισσότερο από

ότι το μεγαλύτερο μόριο (κόκκινο) **III.** Το μεγαλύτερο μόριο εκλούεται πρώτο από τη στήλη. Η επιμήκυνση των ζωνών επιφέρει σημαντική αραίωση στις πρωτεΐνες κατά τη χρωματογραφία **Δ. Χρωματογράφημα.** Cv: όγκος στήλης, V_o: κενός όγκος στήλης (void volume) V_t: συνολικός όγκος στήλης (total volume) (*GE Healthcare, Gel Filtration, Methods & Principles, 2010*)



Εικόνα 17. Διαγραμματική αναπαράσταση του κενού όγκου και του συνολικού όγκου στήλης. Να σημειωθεί ότι $V_t - V_o$ ισούται με τον όγκο που καταλαμβάνει το στερεό υλικό που απαρτίζει το υλικό της στήλης (*GE Healthcare, Gel Filtration, Methods & Principles, 2010*)

– *Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ*

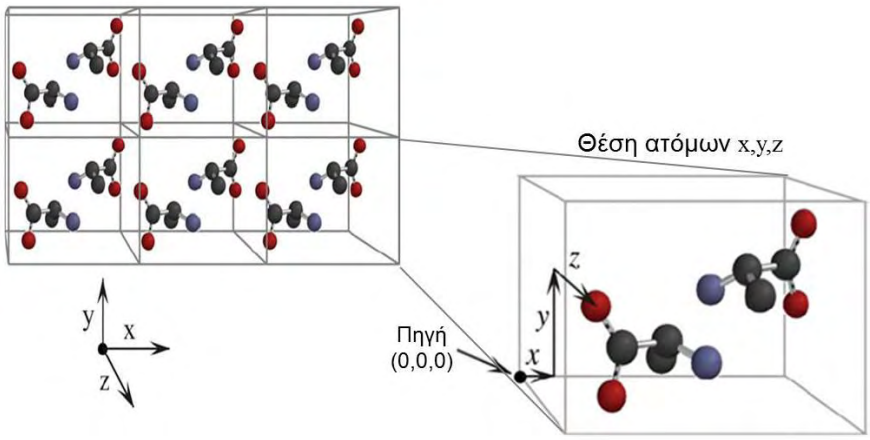
Κάτω απο συγκεκριμένες συνθήκες πολλά μόρια, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, σταθεροποιούνται και σχηματίζουν κρυστάλλους. Οι κρύσταλλοι είναι στερεά σωμάτα που αποτελούνται απο ακριβείς επαναλήψεις ενός συμμετρικού μοτίβου. Κατά την έξοδο από τη διαλυτή στην κρυσταλλική κατάσταση, μεμονωμένα μόρια υιοθετούν μια ή περισσότερες ίδιες κατευθύνσεις. Ο κρύσταλλος που προκύπτει είναι μια επαναλαμβανόμενη τρισδιάστατη συστοιχία μορίων που συγκρατούνται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις [30],[36]. Στην *εικόνα 8* απεικονίζεται μια τέτοια συστοιχία μορίων. Οι γραμμές στην εικόνα διαιρούν τον κρύσταλλο σε πανομοιότητες μοναδιαίες κυψελίδες[3]. Η συστοιχία των σημείων στις γωνίες ή στις κορυφές των μοναδιαίων κυψελίδων ονομάζεται πλέγμα. Εάν γνωρίζουμε το ακριβές περιεχόμενο της μοναδιαίας κυψελίδας μπορούμε να φανταστούμε ολόκληρο τον κρύσταλλο σαν μια αποτελεσματικά πακεταρισμένη συστάδα πολλών μοναδιαίων κυψελίδων που στοιβάζονται η μία δίπλα και πάνω από την άλλη, περίπου, σαν πανομοιότυπα κουτιά σε μια αποθήκη [30].

Η θέση ενός ατόμου περιγράφεται από ένα σύνολο τρισδιάστατων καρτεσιανών συντεταγμένων *x, y* και *z*. Μία από τις κορυφές χρησιμοποιείται ως η αρχή του συστήματος των συντεταγμένων των στοιχειωδών κυψελίδων και της ανατίθενται οι συντεταγμένες $x = 0$, $y = 0$ και $z = 0$, που συνήθως αναγράφονται (0,0,0) όπως φαίνεται και στην *εικόνα 7* [30]. Μέσα στη μοναδιαία κυψελίδα το μεγαλύτερο άθροισμα των μορίων που δεν διαθέτουν στοιχεία συμμετρίας, αλλά μπορούν να αντιπαρατίθενται

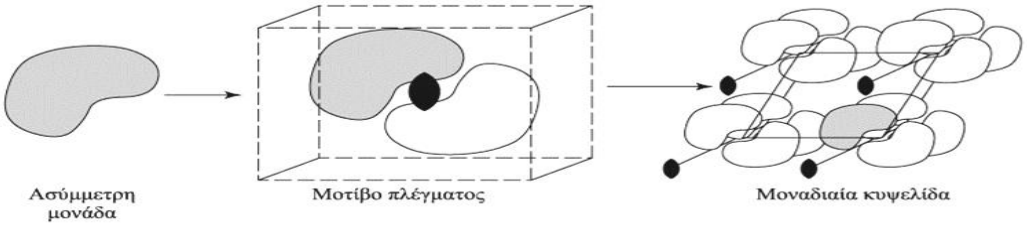
[3] Με τον όρο μοναδιαία (ή στοιχειώδη) κυψελίδα εννοούμε τη βασική και απλούστερη μονάδα που συγκροτεί έναν κρύσταλλο [30],[36].

σε άλλες ταυτόσημες οντότητες με ενέργειες συμμετρίας[4], ονομάζεται ασύμμετρη μονάδα (βλ. εικόνα 9). Στις απλούστερες περιπτώσεις που αφορούν πρωτεΐνες, η ασύμμετρη μονάδα είναι ένα μονομερές μόριο πρωτεΐνης. Όλες οι μοριακές ιδιότητες ενός κρυστάλλου μπορούν να αποδοθούν σε εκείνες της ασύμμετρης μονάδας.

Εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων μπορεί να βεβαιωθεί ότι όλα τα μόρια ή οι ομάδες μορίων που αποτελούν την ασύμμετρη μονάδα σε ένα κρύσταλλο, κατάλληλο για μελέτη με περίθλαση ακτίνων-Χ, έχουν ουσιαστικά την ίδια στερεοδιάταξη. Επομένως, για να επιλυθεί η δομή ενός κρυστάλλου, χρειάζεται να επιλυθεί η δομή μόνο της ασύμμετρης μονάδας [30],[36].



Εικόνα 18. Απεικόνιση κρυσταλλικού πλέγματος στο οποίο είναι μεγεθυμένη μια μοναδιαία κυψελίδα. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα περιέχει δύο μόρια αλανίνης (τα άτομα του υδρογόνου δεν φαίνονται) σε διαφορετικές διαμορφώσεις. Η θέση ενός ατόμου στη μοναδιαία κυψελίδα μπορεί να ταυτοποιηθεί από ένα σύνολο συντεταγμένων στο χώρο [30]



Εικόνα 19. Τα στοιχεία ενός κρυστάλλου. Η ασύμμετρη μονάδα είναι εκείνο το μέρος του κρυστάλλου που δεν εμφανίζει καμία συμμετρία. Ένας τελεστής συμμετρίας παράγει το μοτίβο του δικτυωτού πλέγματος. Η επανάληψη αυτού του μοτίβου από τη μετατόπιση παράγει τις κορυφές της μοναδιαίας κυψελίδας, η οποία είναι η βασική μονάδα επανάληψης του πλέγματος του κρυστάλλου [36].

– *Ανάπτυξη κρυστάλλων*

Οι κρυσταλλογράφοι αναπτύσσουν κρυστάλλους πρωτεϊνών με ελεγχόμενη βραδεία κατακρήμνιση από υδατικό διάλυμα κάτω από συνθήκες που δεν προκαλείται

[4] Οι απλούστερες ενέργειες συμμετρίας και τα στοιχεία που χρειάζονται για να περιγράψουν μια μοναδιαία κυψελίδα είναι η μετατόπιση, η περιστροφή (στοιχείο: άξονες περιστροφής) και η αντανάκλαση (στοιχείο: επίπεδο κάτοπτρο) [30].

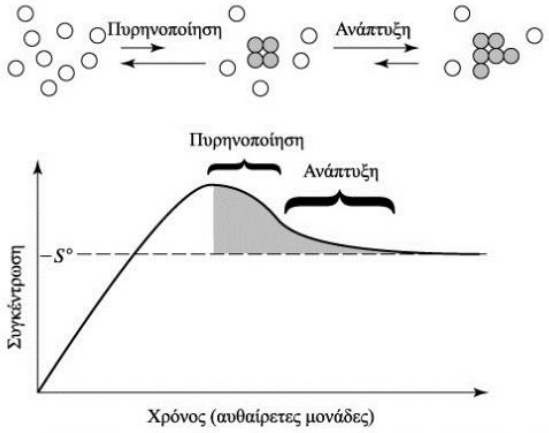
μετουσίωση της πρωτεΐνης. Υπάρχουν ουσίες που έχουν την δυνατότητα να επιφέρουν κατακρήμνιση πρωτεϊνών. Ιοντικές ενώσεις, όπως είναι τα άλατα, οδηγούν στην κατακρήμνιση πρωτεϊνών μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται "εξαλάτωση". Οι οργανικοί διαλύτες προκαλούν επίσης κατακρήμνιση πρωτεϊνών, αλλά συχνά αλληλεπιδρούν με τα υδρόφοβα τμήματα των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να τις αφυδατώνουν. Το υδατοδιαλυτό πολυμερές πολυαιθυλενική γλυκόλη *(PEG)* χρησιμοποιείται ευρέως επειδή αποτελεί ταυτόχρονα ισχυρό κατακρημνιστικό και ασθενές μετουσιωτικό. Ένας απλός τρόπος για να επιτευχθεί βραδεία κατακρήμνιση είναι να γίνει προσθήκη ενός κατακρημνιστικού σε ένα υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης μέχρις ότου η συγκέντρωση του κατακρημνιστικού να είναι ακριβώς παρακάτω από εκείνη που απαιτείται για την καθίζηση της πρωτεΐνης. Τότε, το νερό αφήνεται να εξατμιστεί βραδέως, κάτι το οποίο αυξάνει ελαφρώς τη συγκέντρωση τόσο της πρωτεΐνης όσο και του κατακρημνιστικού έως ότου συμβεί η κατακρήμνιση. Η πιθανότητα η πρωτεΐνη να σχηματίσει κρύσταλλο ή αντιθέτως ένα περιττό άμορφο στερεό εξαρτάται από πολλές ιδιότητες του διαλύματος, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, της θερμοκρασίας, του pH και της ιοντικής ισχύος. Η εύρεση των συγκεκριμένων συνθηκών για την παραγωγή ικανοποιητικών κρυστάλλων μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, απαιτεί συνήθως αρκετές δοκιμές [30]. Επίσης το προς κρυστάλλωση δείγμα θα πρέπει να είναι βιοχημικά καθαρό[5] και στις περισσότερες περιπτώσεις θα πρέπει να είναι περισσότερο από 95% καθαρό για να παράγει έναν κρύσταλλο. Επιπλέον το δείγμα θα πρέπει να είναι και δομικά καθαρό[6] και κατά συνέπεια τα διαλύματα και οι μέθοδοι κρυστάλλωσης επιλέγονται έτσι, ώστε να ευνοήσουν τη φυσική διαμόρφωση του μακρομορίου.

Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου, επομένως, συμβαίνει σε δύο διακριτικά βήματα: ένα βήμα χαμηλής πιθανότητας για την ανάπτυξη πυρήνων και ένα βήμα υψηλής πιθανότητας για την αύξηση (ή διάδοση) του μεγέθους του κρυστάλλου (βλ. εικόνα 10).

Το στάδιο της ανάπτυξης πυρήνων απαιτεί μια πολύ μεγάλη οδηγό δύναμη. Η απαραίτητη οδηγός δύναμη για την ανάπτυξη πυρήνων προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων σε τιμή αρκετά υψηλότερη από την εγγενή διαλυτότητά τους (υπερκορεσμένη). Η επακόλουθη προσθήκη μορίων στις κρυσταλλικές επιφάνειες λαμβάνει χώρα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τον υπερκορεσμό, κοντά στην εγγενή διαλυτότητα. Κατά συνέπεια, η αύξηση είναι μια σειρά βημάτων μικροϊσορροπίας για τα μακρομόρια του διαλύματος που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του κρυσταλλικού πλέγματος. Η ανάπτυξη πυρήνων[7] αποτελεί το σημαντικότερο από τα δύο βήματα που αναφέρθηκαν. Εάν το διάλυμα δεν προσεγγίσει τον υπερκορεσμό, ο πυρήνας δεν σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δεν μπορεί να δημιουργηθεί. Από την άλλη, ένα υπέρκορο διάλυμα θα σχηματίσει πολύ γρήγορα πολλαπλούς πυρήνες, που θα εξαντλήσουν τα μόρια από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Αυτό οδηγεί σε μία πληθώρα μικροσκοπικών κρυστάλλων. Πρέπει να υπάρξει μια ισορροπία μεταξύ των δύο ακραίων καταστάσεων, προκειμένου να αναπτυχθούν

[5] Βιοχημικά καθαρό ονομάζεται ένα δείγμα όταν κάθε μακρομόριο στο δείγμα έχει τον ίδιο μοριακό τύπου [36]
[6] Η δομική καθαρότητα αναφέρεται στη διαμόρφωση των μορίων σε ένα συγκεκριμένο δείγμα [36]
[7] Η ανάπτυξη πυρήνων αναφέρεται στο σχηματισμό εναρκτήριων μοριακών συμπλεγμάτων από τα οποία αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι [30].

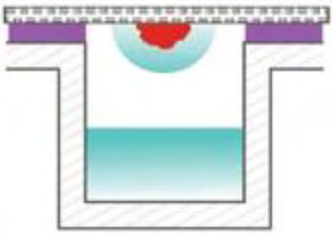
αρκούντως μεγάλοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι να παράσχουν υψηλής ευκρίνειας, δεδομένα περίθλασης ακτίνων-Χ. Κατά συνέπεια, το διάλυμα των μακρομορίων πρέπει να συμπυκνωθεί με έναν πολύ καλό ελεγχόμενο τρόπο. Στην *εικόνα 10* παρουσιάζεται η διαδικασία της κρυστάλλωσης [36].



Εικόνα 20. Μηχανισμός της κρυστάλλωσης. Το αρχικό βήμα στην κρυστάλλωση είναι ο σχηματισμός πυρήνων ενός ελάχιστου κρυσταλλικού πλέγματος. Αυτό είναι ένα μικρής πιθανότητα βήμα που εμφανίζεται σε ένα υπέρκορο διάλυμα. Ο κρύσταλλος αναπτύσσεται με την προσθήκη μορίων στην επιφάνεια του πυρήνα. Αυτό συμβαίνει σε συγκεντρώσεις κοντά στην διαλυτότητα S^o του μορίου [36]

– *Μέθοδοι ανάπτυξης κρυστάλλων*

Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος κρυστάλλωσης είναι η διάχυση ατμών, κατά την οποία το διάλυμα πρωτεΐνης/κατακριμνιστηκού παράγοντα εξισορροπούνται σε ένα κλειστό δοχείο με μια μεγαλύτερη δεξαμενή υδατικού διαλύματος στο οποίο η συγκέντρωση του κατακριμνιστηκού παράγοντα είναι η βέλτιστη για ανάπτυξη κρυστάλλων. Παράδειγμα αυτής της μεθόδου είναι η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας. Κατά τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας δημιουργείται ένα σε μια καλυπτρίδα μια σταγόνα διαλύματος πρωτεΐνης και κατακρημνιστηκών παραγόντων και τοποθετείται ανάποδα και σφραγίζεται πάνω από μια δεξαμενή που περιέχει μεγαλύτερο όγκο διαλύματος κατακριμνιστικών, αλάτων κα, χωρίς να περιέχει πρωτεΐνη (βλ. εικόνα 11) . Επειδή ο κατακρημνιστηκός παράγοντας είναι η κύρια διαλυμένη ουσία, η διάχυση ατμών (εξάτμιση και συμπύκνωση) σε αυτό το κλειστό σύστημα έχει ως αποτέλεσμα την καθαρή μεταφορά νερού από το διάλυμα της πρωτεΐνης της σταγόνας προς τη δεξαμενή, μέχρι να εξισωθεί η συγκέντρωση του κατακρημνιστηκού παράγοντα στα δυο διαλύματα. Επειδή η δεξαμενή είναι πολύ μεγαλύτερη από το διάλυμα της σταγόνας, η συγκέντρωση του κατακρημνιστικού είναι σχεδόν είναι ίση με αυτή στη δεξαμενή. Όταν το σύστημα φτάσει σε ισορροπία, η καθαρή μεταφορά νερού σταματά, και το πρωτεϊνικό διάλυμα διατηρείται σε σταθερή συγκέντρωση κατακρημνιστικού.



Εικόνα 21. Απεικόνιση της κρεμάμενης σταγόνας [30], [48]

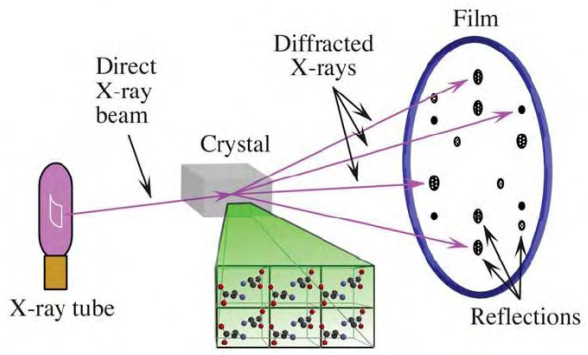
Μικροί κρύσταλλοι καλής ποιότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φύτρα ώστε να μεγαλώσουν μεγαλύτεροι κρύσταλλοι. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με πριν, με τη διαφορά ότι σε κάθε κρεμάμενη σταγόνα διασπείρονται και μερικοί μικροί κρύσταλλοι. Με αυτόν τον τρόπο, οι κρύσταλλοι μεγαλώνουν πιο γρήγορα, καθώς η διαλυμένη πρωτεΐνη διοχετεύεται σε λιγότερους ήδη υπάρχοντες κρυστάλλους.

Πολλές είναι οι παράμετροι που επηρεάζουν τη δημιουργία κρυστάλλων μακρομορίων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται κάπως προφανείς παράμετροι όπως η καθαρότητα της πρωτεΐνης, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και του κατακρημνιστικού παράγοντα, το pH και η θερμοκρασία, αλλά και λιγότερο προφανείς όπως η καθαριότητα, οι δονήσεις και ο ήχος, η μεταγωγή, η πηγή και η «ηλικία» της πρωτεΐνης, και η παρουσία ή όχι προσδετών. Όπως φαίνεται ξεκάθαρα, το πρόβλημα της ανάπτυξης αξιόπιστης πηγής κρυστάλλων περιλαμβάνει τον έλεγχο και τη δοκιμή ενός μεγάλου αριθμού παραμέτρων. Η δυσκολία και η σημασία της απόκτησης καλών κρυστάλλων έχει οδηγήσει στην εφεύρεση ρομπότ κρυσταλλώσεων τα οποία προγραμματίζονται έτσι ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος πολλών δοκιμών κάτω από ένα σύστημα ποικίλων συνθηκών [30].

– *Περίθλαση ακτίνων Χ*

Η συνηθέστερη μέθοδος για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής των χημικών και φαρμακευτικών κρυσταλλικών δομών, καθώς και των πρωτεϊνών και άλλων βιολογικών μορίων είναι η περίθλαση των ακτίνων-Χ. Οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων στα κρυσταλλικά σώματα είναι της ίδιας τάξης μεγέθους (από 0.1 μέχρι 25Å) με τα μήκη κύματος των ακτίνων-Χ. Έτσι οι κρύσταλλοι δρουν σαν φράγματα περίθλασης για τις ακτίνες-Χ. Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής των δομών που προαναφέρθηκαν γίνεται από τα διαγράμματα περίθλασης, που λαμβάνονται από χιλιάδες προσανατολισμούς, σε σχέση με τη διεύθυνση της δέσμης των ακτίνων-Χ [42].

Φαίνεται λοιπόν ότι ένα κρύσταλλος τοποθετείται μεταξύ μια πηγής ακτίνων-Χ και ενός ανιχνευτή ακτίνων-Χ. Ο κρύσταλλος διαπερνάται από μια στενή ακτίνα ακτίνων-Χ, η οποία προέρχεται από την πηγή. Η απλούστερη πηγή είναι ένας σωλήνας ακτίνων-Χ και ο απλούστερος ανιχνευτής είναι ένα φιλμ ακτίνων-Χ, στο οποίο θα εμφανιστούν σκούρες κηλίδες όπου προσπέσουν οι ακτίνες-Χ. Αυτά τα σημεία ονομάζονται ανακλάσεις επειδή προκύπτουν από τον κρύσταλλο σαν να ανακλώνται από την επιφάνεια των ατόμων [30].



Εικόνα 22. Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Η ακτίνα-Χ περιθλάται από τον κρύσταλλο σε πολλές διακεκριμένες δέσμες (ανάκλαση) πάνω στο φιλμ. Οι θέσεις και οι εντάσεις αυτών των ανακλάσεων περιέχουν την πληροφορία που χρειάζεται για να καθοριστεί η μοριακή δομή [30].

- *Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native-PAGE)*

Η μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, επιτρέπει στην πρωτεΐνη να διατηρήσει τη διαμόρφωση της φυσικής της κατάστασης και της τεταρτοταγούς δομής της με το πλεονέκτημα της απαράμμιλλης διαχωριστικής ικανότητας που προσφέρει η ηλεκτροφόρηση πηκτής και είναι μια τεχνική ιδανική για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών. Στην παρούσα διπλωματική η τεχνική αυτή είχε ως σκοπό να διαλευκάνει αν η φυσική κατάσταση της δομής της AtHesp είναι μονομερής, διμερής κλπ. Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα της μελέτης της σύστασης και της δομής της πρωτεΐνης στη φυσική της κατάσταση, καθώς διατηρούνται άθικτες και η διαμόρφωση και η βιολογική της δράση κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, το ρυθμιστικό διάλυμα (Running buffer) μεταναστεύει εντός της πηκτής. Το κύριο και ακολουθών ιόν της ηλεκτροφόρησης, δημιουργούν μια περιοχή που κινείται μέσα στην πηκτή αφήνοντας πίσω της ομοιόμορφη τάση και συνεχές pH (pH 8.8). Καθώς αυτή η περιοχή ξεπερνά την περιοχή εφαρμογής των δειγμάτων, οι πρωτεΐνες εισέρχονται στην πηκτή. Το pH της πηκτής είναι 8.8 έτσι ώστε οι πρωτεΐνες με ισοηλεκτρικό σημείο (pI) μικρότερο από την τιμή pH 8.8 να φορτίζονται αρνητικά και να μεταναστεύσουν μέσα από μέσα από την ομοιογενή ζώνη της πηκτής επιστοίβαξης. Μόλις οι πρωτεΐνες φτάσουν στο σημείο διαχωρισμού της πηκτής επιστοίβαξης με την πηκτή διαχωρισμού, η κινητικότητά τους μειώνεται δραματικά λόγω της αιφνίδιας μείωσης στο μέγεθος των πόρων της πηκτής. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται στην πηκτή διαχωρισμού βάσει του μεγέθους τους και του φορτίου τους. Η δημιουργία των πηκτών διαχωρισμού είναι ίδια με τη διαδικασία του SDS-PAGE με την κύρια διαφορά να έγκειται στην απουσία προσθήκης SDS (βλ. Πίνακας ΙΙΙ). Η πηκτή σχηματίζεται στην ίδια κάθετη διάταξη τζαμιών απόστασης 1mm και προστίθεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Κύρια διαφορά μεταξύ των δυο μεθόδων ηλεκτροφόρησης είναι πως λόγω της απουσίας SDS, και κατά συνέπεια της διατήρησης της δομής των πρωτεϊνών, τα μόρια κινούνται πιο αργά μέσω της πηκτής με αποτέλεσμα, η διαδικασία της ηλεκτροφότησης να διαρκεί περισσότερη ώρα και να θερμαίνει περισσότερο την πηκτή. Για το λόγο αυτό η

ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα στους 4°C (ψυκτικός θάλαμος), και προαιρετικά με την προσθήκη παγοκύστης στο σύστημα ώστε να διατηρείται σταθερή χαμηλή θερμοκρασία και να μην επηρεάζεται η πηκτή και οι περιεχόμενες σε αυτή πρωτεΐνες.

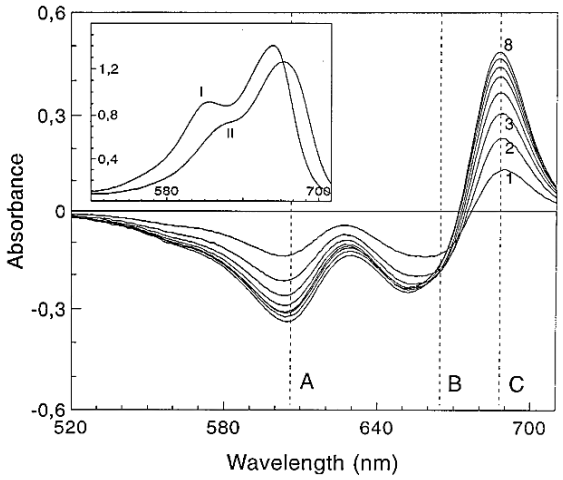
ΠΙΝΑΚΑΣ IV. ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΗΚΤΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ & ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ NATIVE- PAGE

Πηκτή διαχωριμού		**Πηκτή επιστοίβαξης**	
	10%		**4%**
dH_2O	2.569 mL	dH_2O	3.2 mL
Tris-HCl 1.5M pH8.8	1.462 mL	Tris-HCl 1M pH6.8	1.25 μL
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	1.943 mL	Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	500 μL
APS 10%	20.89 μL	APS 10%	50 μL
TEMED	4.8 μL	TEMED	5 μL

- *Κινητικές μελέτες με τη μέθοδο του κυανού του μεθυλενίου*

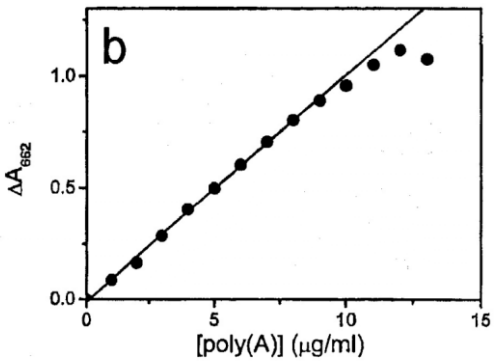
Η μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής δραστικότητας της AtHesp έγινε σύμφωνα με τους Greiner-Stoeffele, T., et al. (1996) [51] και Cheng, Y., et al (2006) [5] με τροποποιήσεις. Το κυανό του μεθυλενίου (3,7- δις(Διμεθυλάμινο)-φαινοθειαζίν-5-χλωρίδιο, κατά IUPAC) είναι μια ετεροκυκλικη ένωση τριών δακτυλίων και ανήκει στην ομάδα των φαίνοθειαζινών.

Η ανάμιξη του κυανού του μεθυλενίου με RNA προκαλεί αύξηση του μεγίστου της απορρόφησής του από τα 653nm στα 688nm (βλ. εικόνα 19). Η αλλαγή αυτή στο φάσμα απορρόφησής του είναι ένδειξη της παρεμβολής των μορίων του κυανού του μεθυλενίου μεταξύ των ζευγών βάσεων των νουκλεϊκών οξέων της ίδιας πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Η αλλαγή στην απορρόφηση του κυανού του μεθυλενίου στα 688nm με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ριβονουκλεϊκών οξέων, αντιστοιχεί σε εξίσωση υπερβολής [51].



Εικόνα 23. Διάφορα φάσματα απορρόφησης του κυανού του μεθυλενίου με διάφορες ποσότητες RNA. Η βαθμονόμηση του φωτομέτρου έγινε με διάλυμα κυανού του μεθυλενίου απουσία RNA. Οι συγκεντρώσεις του RNA είναι οι εξής: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mg RNA/mL και αντιστοιχούν στα φάσματα με αυξανόμενη σειρά 1,2,3,4,5,6,7,8. **Α. φάσμα απορρόφησης διμερισμένου κυανού του μεθυλενίου, Β. φάσμα απορρόφησης μονομερούς κυανού του μεθυλενίου, C. φάσμα κυανού του μεθυλενίου παρεμβάλλον στο RNA.**
Εσωτερικά φαίνεται το φάσμα απορρόφησης του ρυθμιστικού διαλύματος του κυανού του μεθυλενίου χωρίς RNA (I) και με 0.8 mg RNA/mL (II) προς το ρυθμιστικό διάλυμα [51].

Η AtHesp πιθανότατα αποτελεί μια υδρολάση, δηλαδή, διασπά δεσμούς με την παρεμβολή νερού. Πιο συγκεκριμένα είναι μια πολύ(Α) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση με δράση εξωριβονουκλεάσης που πιθανόν απελευθερώνει 5' μονοφωσφοεστέρες. Στην αντίδραση της αποαδενυλίωσης το υπόστρωμα στο οποίο θα προσδεθεί το κυανό του μεθυλενίου είναι ένα πολυμερές πολυ(Α). Η ανάμιξη του κυανού του μεθυλενίου με πολύ(Α) προκαλεί μετατόπιση του μεγίστου του φάσματος απορρόφησης από τα 653nm στα 662nm αντί για τα 688nm [5] (βλ. εικόνα 20). Η ενζυμική υδρόλυση που λαμβάνει χώρα μεταξύ του συμπλόκου πολυ(Α)- κυανού του μεθυλενίου οδηγεί σε μείωση της απορρόφησης, κάτι το οποίο καταδεικνύει μείωση της παρεμβολής του κυανού του μεθυλενίου ανάμεσα από τις βάσεις του υποστρώματος (πχ RNA, πολύ(Α)) [51].



Εικόνα 24. Διαφορά στο φάσμα απορρόφησης του κυανού του μεθυλενίου (1,2% w/v) σε διάφορες ποσότητες πολυ(Α). Η συμπαγής ευθεία αντιπροσωπεύει τη γραμμή τάσης. Το φωτόμετρο βαθμονομήθηκε με διάλυμα κυανού του μεθυλενίου χωρίς πολυ(Α) [5].

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης πολυ(Α): για να είναι εφικτή η μετατροπή των τιμών των διαφορών των απορροφήσεων σε συγκέντρωση αποικοδομημένου πολύ(Α) πρέπει να κατασκευαστεί μια πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων πολυ(Α) (βλ. Πίνακας V).

Η πειραματική διαδικασία για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ακολουθεί ως εξής:

Ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων που θα λάβουν χώρα, προετοιμάζονται τόσοι σωλήνες τύπου eppendorf στους οποίους θα ετοιμαστούν οι αντιδράσεις 100 μL (βλ. Πίνακας VI). Στη συνέχεια, προστίθενται 900μL 0,0012% κυανού του μεθυλενίου και μεταφέρονται σε αποστειρωμένες κυψελίδες του 1mL. Οι κυψελίδες επωάζονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 25°C για 15min σε σκοτάδι. Ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων που θα λάβουν χώρα, προετοιμάζονται τόσοι σωλήνες τύπου eppendorf στους οποίους θα ετοιμαστούν οι αντιδράσεις 100 μL (βλ. Πίνακας V). Στη συνέχεια, προστίθενται 900μL 0,0012% κυανού του μεθυλενίου και μεταφέρονται σε αποστειρωμένες κυψελίδες του 1mL. Οι κυψελίδες επωάζονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 25°C για 15min σε σκοτάδι. Στη συνέχεια γίνεται φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός σε φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός σε λ= 662nm μηδενίζοντας με τον σωλήνα που δεν περιέχει πολυ(Α) (0μg/mL) και λαμβάνοντας τις τιμές των απορροφήσεων για χρόνους 0,5,10 και 30 min. Στη συνέχεια κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της πρότυπης καμπύλης αποικοδόμησης πολυ(Α) της μορφής OD_{662nm}= f([πολύ(Α)]) σε μονάδες μg/mL.

ΠΙΝΑΚΑΣ V. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΠΟΛΥ(Α)

Συγκέντρωση πολύ(Α)	**0μg/mL**	**2μg/mL**	**4 μg/mL**	**5 μg/mL**	**6 μg/mL**	**8 μg/mL**
πολύ(Α) (μL)	-	10	10	10	10	10
Διάλυμα αντιδρασης (μL)	100	90	90	90	90	90
Methylene Blue 0.0012%	900	900	900	900	900	900

Λήφθησαν 10μL από κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος stock του υποστρώματος. Όγκος αντίδρασης 100μL, τελικός όγκος 1mL.

Η πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου ακολουθεί ως εξής:

Ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων που θα λάβουν χώρα, προετοιμάζονται τόσοι σωλήνες τύπου eppendorf στους οποίους θα ετοιμαστούν οι αντιδράσεις 100 μL (βλ. Πίνακας VI). Στη συνέχεια, προστίθενται 900μL 0,0012% κυανού του μεθυλενίου και μεταφέρονται σε αποστειρωμένες κυψελίδες του 1mL. Οι κυψελίδες επωάζονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 25°C για 15min σε σκοτάδι. Καμία από τις κυψελίδες δεν περιέχει ένζυμο. Η φωτομετρήσεις γίνονται σε φασματοωτομόμετρο ορατού φωτός στα 662nm. Ακολουθεί η φωτομέτρηση του τυφλού (αντίδραση που δεν περιέχει ένζυμο και αναστολέα) και στη συνέχεια ακολουθούν όλες οι υπόλοιπες αντιδράσεις. Μόλις φωτομετρηθεί η πρώτη αντίδραση και επιστραφεί για περεταίρω επώαση στο σκοτάδι σημειώνεται ο επόμενος χρόνος. Οι χρόνοι για τους οποίους έγινε καταγραφή της ενζυμικής δραστικότητας της AtHesp είναι: 0, 5, 10, 30 min. Μετά τα 15 πρώτα λεπτά στις αντιδράσεις προστίθεται κατάλληλη συγκέντρωση ενζύμου και φωτομετρείται μετά από πολύ ήπια ανάδευση (t= 0min).

Μετά το τέλος της αντίδρασης, το πέρας δηλαδή των 30 min, υπολογίζονται οι διαφορές των απορροφήσεων μεταξύ των τυφλών σε t= 0min και των αντιδράσεων που αντιστοιχούν στο τυφλό αυτό. Οι τιμές που προκύπτουν για κάθε αντίδραση επεξεργάζονται και προκύπτει η χρονοκαμπύλη ενζυμικής δράσης, και σε συνδυασμό με την πρότυπη καμπύλη πολυ(Α) σχεδιάζονται τα διαγράμματα ταχύτητας προς συγκέντρωση υποστρώματος, τα διαγράμματα Lineweaver –Burk (διπλού αντιστρόφου) και υπολογίζονται οι τιμές K_M και V_{max}.

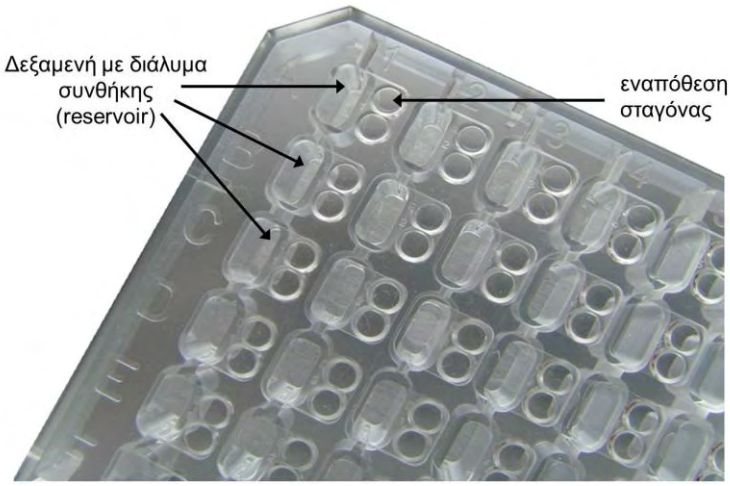
ΠΙΝΑΚΑΣ VI. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Αντίδραση	**T/E**	**C/E**	**T/AMP**	**0,5K_M**	**K_M**	**10K_M**	**100 K_M**	**1000 K_M**
Διάλυμα αντίδρασης (μL)	(100-[S]-[AMP]-RNasin-E)							
Υπόστρωμα (μg/mL)								
AMP (μM)	-	-	1000 K_M	0,5K_M	K_M	10 K_M	100 K_M	1000 K_M
RNasin (U)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Hesp	-	$[S]_{min}/5$	-	$[S]_{min}/5$	$[S]_{min}/5$	$[S]_{min}/5$	$[S]_{min}/5$	$[S]_{min}/5$
Met. Blue 0.0012% (μL)	**900**	**900**	**900**	**900**	**900**	**900**	**900**	**900**

T/E: τυφλό ενζυμικής δραστικότητας, C/E: αντίδραση ενζυμικής δραστικότητας χωρίς αναστολέα, T/AMP: τυφλό ενζυμικής δραστικότητας παρουσία αναστολέα, 0.5,1,10,100,1000K_M: αντιδράσεις παρουσία αναστολέα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις σε σχέση με την K_M του ενζύμου, RNasin: RNase inhibitors, αναστολέας RNασών, Υπόστρωμα: πολυ(Α). Όγκος αντίδρασης 100μL, τελικός όγκος 1mL.

- *Σάρωση συνθηκών κρυστάλλωσης*

Εφόσον η πρωτεΐνη βρίσκεται σε επαρκή ποσότητα και καθαρότητα, επιχειρήθηκε η σάρωση συνθηκών με τη βοήθεια του kit σάρωσης συνθηκών της Molecular Dimensions και του ρομπότ κρυσταλλώσεων Oryxnano. Η μέθοδος γίνεται σε θάλαμο 16°C, όπου βρίσκεται το ρομπότ, στο οποίο τοποθετείται πλάκα 96 θέσεων, καθεμία από τις οποίες, ανάλογα με το kit που χρησιμοποιείται, έχει μια καθορισμένη συνθήκη που αποτελείται από συγκεκριμένη συγκέντρωση αλάτων, συγκεκριμένη συγκέντρωση ρυθμιστικών διαλυμάτων και συγκεκριμένη συγκέντρωση κατακρημνιστικών παραγόντων. Η σάρωση συνθηκών βασίζεται στη διάχυση ατμών καθήμενης σταγόνας, καθώς το μίγμα πρωτεΐνης διαλύματος κρυστάλλωσης, εναποτίθεται σε θέση οριζόντια σε επικοινωνία με τη δεξαμενή του υπόλοιπου διαλύματος, μέχρι να εξατμιστεί και να πραγματοποιηθεί η κρυστάλλωση του μακρομορίου. Κατόπιν, αφού ρυθμίσουμε τις παραμέτρους του ρομπότ, και τη συγκέντρωση πρωτεΐνης που θα διαμοιράσει στις 96 συνθήκες, το ρομπότ αναλαμβάνει να γεμίσει κάθε επιφάνεια εναπόθεσης σταγόνας με συγκεκριμένη αναλογία πρωτεΐνης και ρυθμιστικού διαλύματος από τις μικρές 96 δεξαμενές που περιέχουν 96 διαφορετικές συνθήκες (βλ. εικόνα 21).

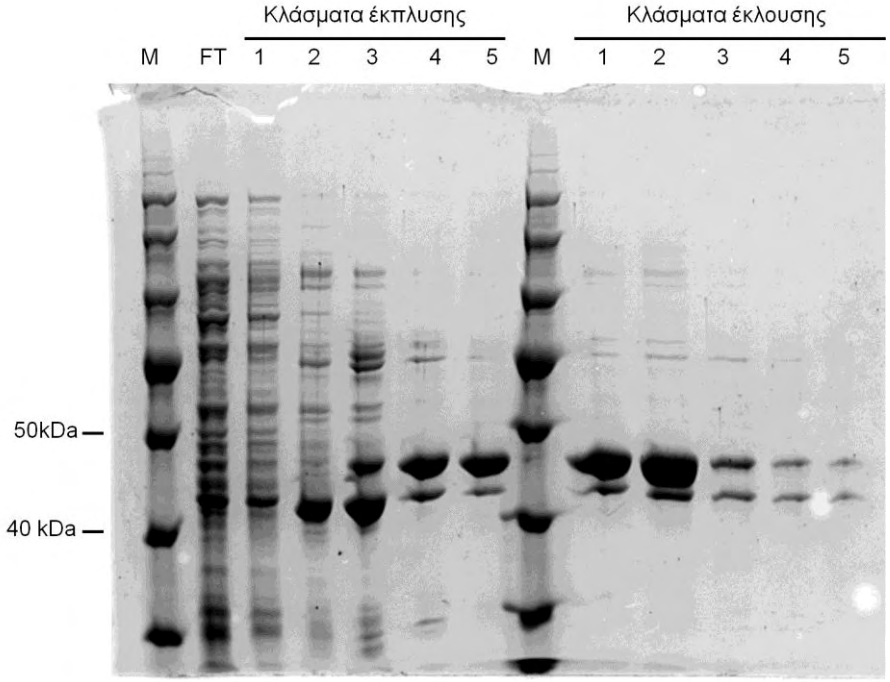


Εικόνα 25. Μια πλάκα που χρησιμοποιείται για σάρωση συνθηκών κρυστάλλωσης. Υποδεικνύεται με βέλος η δεξαμενή με το διάλυμα για κάθε συνθήκη, και ο χώρος που εναποτίθεται η σταγόνα.

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- *Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου απομόνωσης AtHesp με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας*

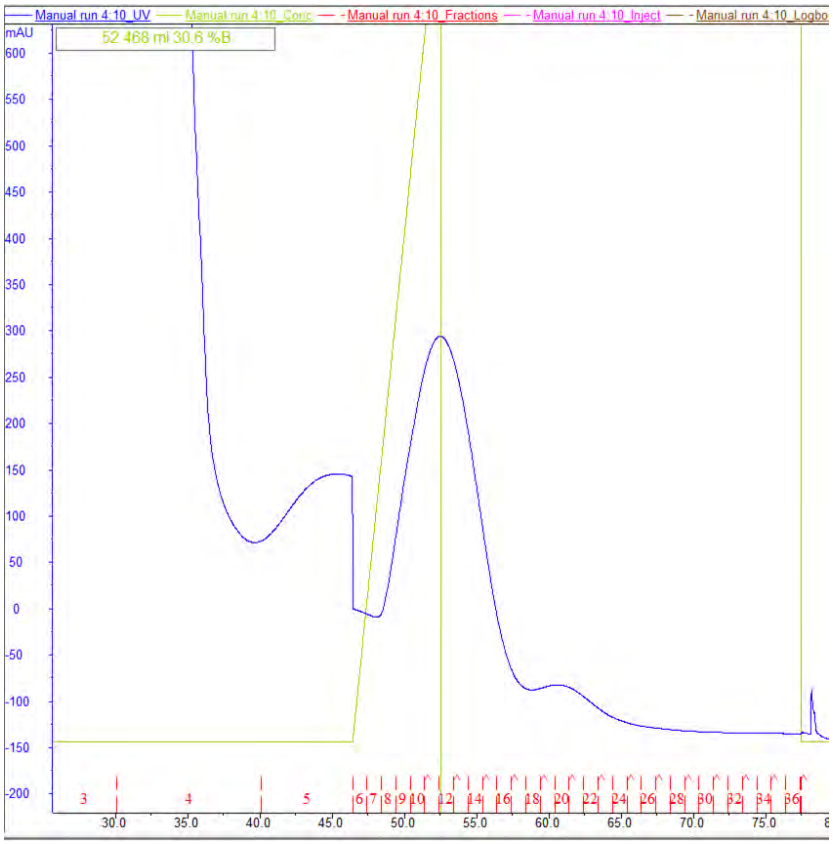
Η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου απομόνωσης, με χρωματογραφία συγγένειας, έγινε έχοντας λάβει δεδομένα από προηγούμενες εργασίες που είχαν ως σκοπό την απομόνωση της AtHesp [55]. Ξεκινώντας, επιχειρήθηκε η απομόνωση του ενζύμου σε στήλη νικελίου σεφαρόζης (η διαδικασία της υπερέκφρασης περιγράφεται λεπτομερώς στην παράγραφο: *3.2. Μέθοδοι, Υπερέκφραση AtHesp από βακτήρια E.coli στελέχους BL21-Gold*) από 800mL καλλιέργεια. Μετά τη συλλογή των κλασμάτων, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) πυκνότητας 7.5% και η πηκτή βάφτηκε με Coomassie 0.05% (βλ.εικόνα 26). Η έκπλυση της στήλης έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1, με 50mM περιεκτικότητα σε ιμιδαζόλιο, και ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 2, με 200mM περιεκτικότητα σε ιμιδαζόλιο. Η έκλουση της στήλης έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης με 500mM ιμιδαζόλιο. Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν τα κλάσματα έκπλυσης 4,5 και τα κλάσματα έκλουσης 1,2 και συμπυκνώθηκαν σε φίλτρο vivaspin 500 σε τελικό όγκο 400μL. Η συγκέντρωση της προκύπτουσας πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford και ήταν 0,1mg/mL. Η συνολική απόδοση της καλλιέργειας ήταν 0,05mg πρωτεΐνης/L καλλιέργειας.



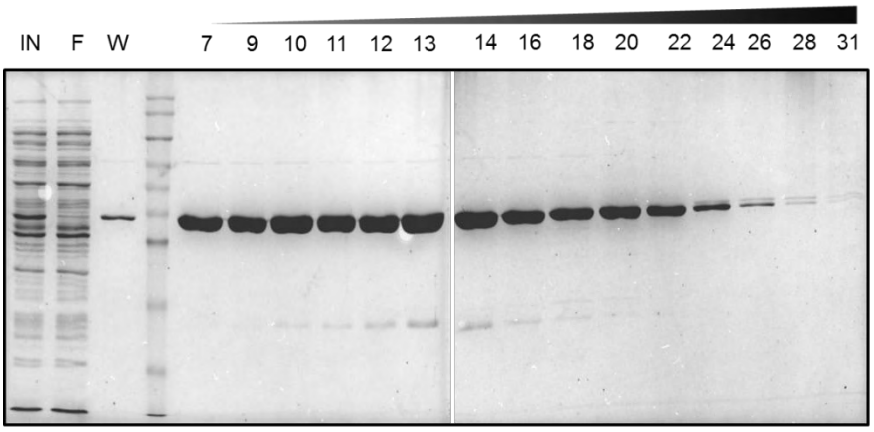
Εικόνα 26. Απομόνωση AtHesp με χρήση στήλης Ni^{2+}-NTA σεφαρόζης. (M: Δείκτης μοριακών βαρών)

Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η απομόνωση της AtHesp με χρωματογραφία συγγένειας τύπου FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) με χρήση του συστήματος ÄKTA purifier με στήλη νικελίου-σεφαρόζης (HisTrapHP, GE Healthcare).

Προηγήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης όπως περιγράφεται στην παράγραφο: *3.2. Μέθοδοι, Υπερέκφραση AtHesp από βακτήρια E.coli στελέχους BL21-Gold*, και έγινε η απομόνωση της πρωτεΐνης. Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης κατά 5% αύξηση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου ανά mL, δηλαδή αύξηση κατά 35mM ιμιδαζολίου ανά mL. Με τη βοήθεια του λογισμικού Unicorn λήφθηκε η εικόνα του χρωματογραφήματος (βλ. εικόνα 27). Η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% ώστε να συλλεχθούν, στο τέλος, τα κλάσματα που περιλαμβάνουν μόνο την AtHesp (βλ. εικόνα 28). Στη συνέχεια, τα κλάσματα 16-33 συμπυκνώθηκαν σε φίλτρο vivaspin 4 με φυγοκέντρηση σε 3000 rcf και ηλεκτροφορήθηκαν εκ νέου σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% ώστε να γίνει εκτίμηση της καθαρότητας της πρωτεΐνης (βλ. εικόνα 29). Η συνολική απόδοση της απομόνωσης της AtHesp ήταν 11.31 mg πρωτεϊνης από 3L καλλιέργειας, δηλαδή 3,77 mg πρωτεϊνης/L καλλιέργειας.

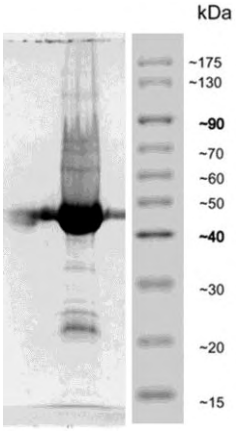


Εικόνα 27. Χρωματογράφημα έκλουσης της πρωτεΐνης από τη στήλη αγχιστείας Ni^{2+}-Sepharose *(HisTrapHP ®).* Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει το μέγιστο της κορυφής που διαγράφεται και αντιστοιχεί στο 30,6% της συγκέντρωσης του διαλύματος έκλουσης B, δηλαδή στα 214,2 mM ιμιδαζολίου.



10% SDS-PAGE. Χρώση με Coomassie 0.05%

Εικόνα 28. Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου 10%. Σε όλες τις διαδρομές περιέχεται σύνολο πρωτεϊνών 0,05mg/mL (I: Υπερκείμενο μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και φυγοκέντρηση, FT: Υπερδιήθημα-πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στη στήλη και εκπλύθηκαν από αυτή, 3: κλάσμα έκπλυσης,11,13 -31: έκλουση με βαθμίδωση συγκέντρωσης αυξανόμενη 5%/mL, αριστερά και M: Δείκτης μοριακών βαρών). Κάτω αριστερά και πάνω από την πηκτή φαίνεται η βαθμίδωση συγκέντρωσης ιμιδαζολίου από 0-100%, το ποσοστό αντιστοιχεί σε μοριακή συγκέντρωση 0-0,7M ιμιδαζολίου.



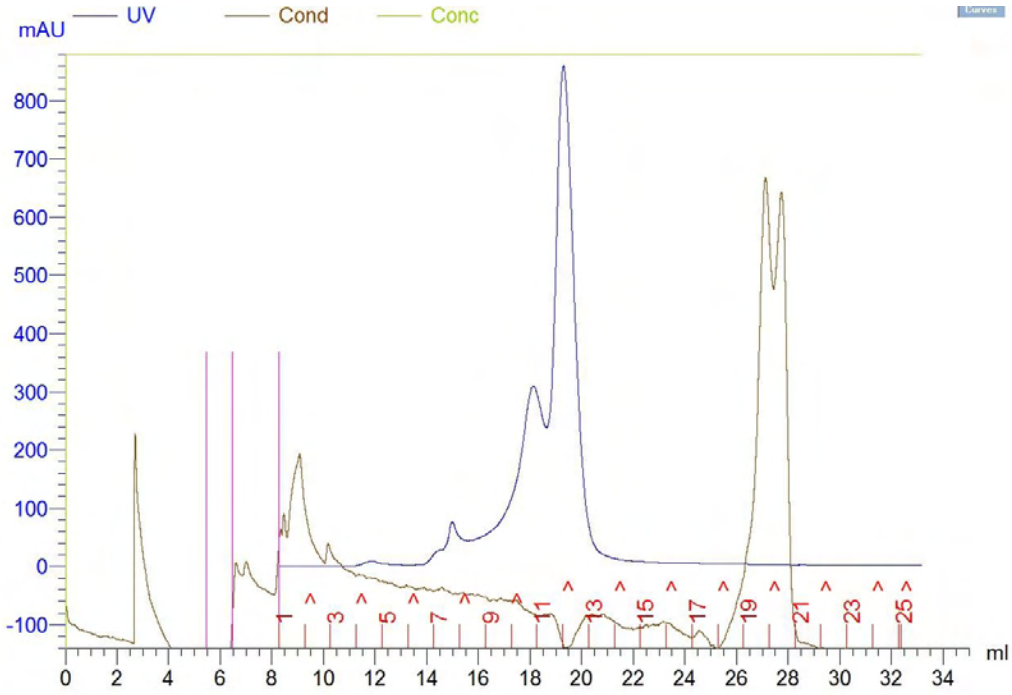
Εικόνα 29. Συμπυκωμένη AtHesp 2,7mg/mL, 10% SDS-PAGE. Χρώση με Coomassie 0.05%, καθαρότητα >90%

- *Χρωματογραφία μοριακής Διήθησης*

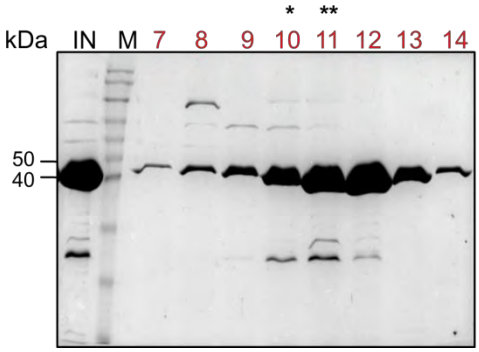
  Μετά τη συμπύκνωση του δείγματος μετά την απομόνωση μέσω της χρωματογραφίας συγγένειας, διατηρώντας στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα την πρωτεΐνη ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη σταθερότητα για την πρωτεΐνη, επιχειρήθηκε απομόνωση μέσω χρωματογραφίας μοριακής διήθησης με αρχικό δείγμα πρωτεΐνης 7.7mg. Στη συνέχεια τα δείγματα έκλουσης από τη στήλη (βλ. εικόνα 30) ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (βλ. εικόνα 31). Από την εικόνα 31 συμπεραίνεται πως η στήλη μοριακής διήθησης δεν καθαρίζει επιτυχώς την AtHesp από τις προσμίξεις που συν-εκλούονται από τη στήλη συγγένειας με Ni^{+2}.

  Η ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες είχε ως σκοπό την εξακρίβωση της ολιγομέρειας ή μη, της AtHesp, ηλεκτροφορώντας τα κλάσματα της στήλης μοριακής

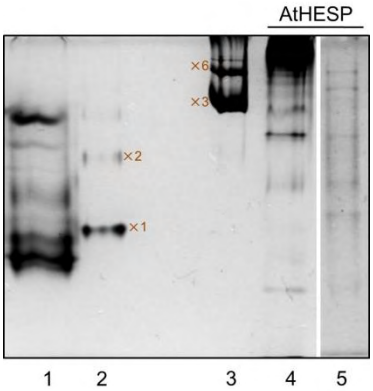
διήθησης με σκοπό την εξακρίβωση εάν τα κλάσματα που αντιστοιχούν στις διάφορες κορυφές, αντιστοιχούν και σε διάφορες καταστάσεις ολιγομερισμού του ενζύμου.



Εικόνα 30. Χρωματογράφημα στήλης μοριακής διήθησης *(TricornSuperose 12 10/300GL®).* Μπλε γραμμή: απορρόφηση 280nm, Ροζ γραμμή: εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, οι δυο πρώτες γραμμές υποδεικνύουν την έκπλυση του σωλήνα τύπου loop, καφέ γραμμή: αγωγιμότητα ρυθμιστικού διαλύματος. Τα κλάσματα 1-10 (αντιστοιχία σε mL: 8-18) αντιστοιχούν στον κενό όγκο στήλης.



Εικόνα 31. 10% SDS-PAGE μετά τη στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Input: συμπυκνωμένη AtHesp που φορτώθηκε στη στήλη, χρώση Coomassie 0.05%



Εικόνα 32. 10% Native-PAGE. Οι διαδρομές 1-3 αντιπροσωπεύουν τους δείκτες γνωστών μοριακών βαρών. 1. Chicken egg albumin 45kDa, 2. BSA x1: 66kDa , x2: 132kDa, 3. Urease x3: 272kDa, 6x: Urease 545kDa. Οι διαδρομές 4-5 αντιστοιχούν στην AtHesp σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι διαδρομές 1-4 έχουν χρωματιστεί με Coomassie 0.05% και η διαδρομή 5 έχει χρωματιστεί με Νιτρικό άργυρο.

- *Πίνακας σταδίων καθαρισμού*

  Στον πίνακα VII περιγράφεται η πορεία της απομόνωσης της *AtHesp* ως αναφορά τον όγκο δείγματος που ήταν σε κάθε βήμα διαθέσιμο σε σχέση με το ποσοστό (%) απόδοσης. Το βήμα του κυτταρολύματος αναφέρεται στο βήμα αμέσως μετά τη λύση των επαναδιαλυμένων κυτταρικών ιζημάτων με τη χρήση υπερήχων. Οι μετρήσεις βασίζονται στον προσδιορισμό με την μέθοδο *Bradford*.

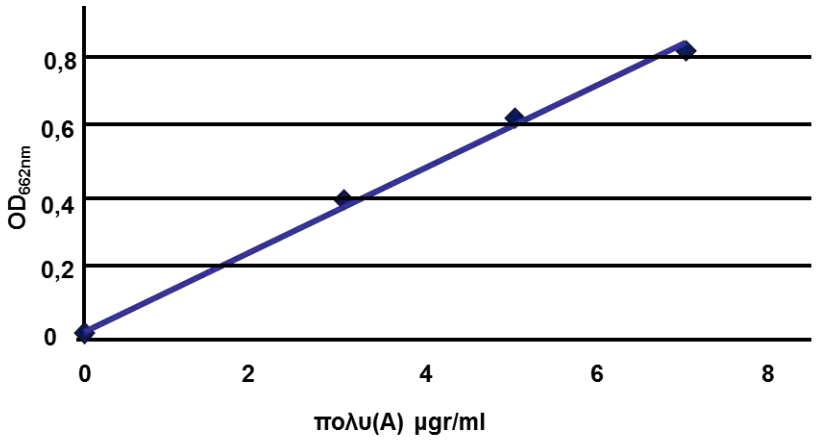
ΠΙΝΑΚΑΣ VII. ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΤΑΔΙΩΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ

Βήμα	Όγκος (mL)	Συνολική πρωτεΐνη (mg)	% απόδοση
Κυτταρόλυμα	24	176.34*	100
HisTrapHP	23.52	11.31**	6.4
Συμπύκνωση	0.3	7.7	68.1
Gel filtration	9	4.7	61.04
Συμπύκνωση/ αλλαγή διαλύματος	0.2	3.1	65.96
Συνολική απόδοση από την καλλιέργεια	3000	11.31	3.8 mg/L καλλιέργειας

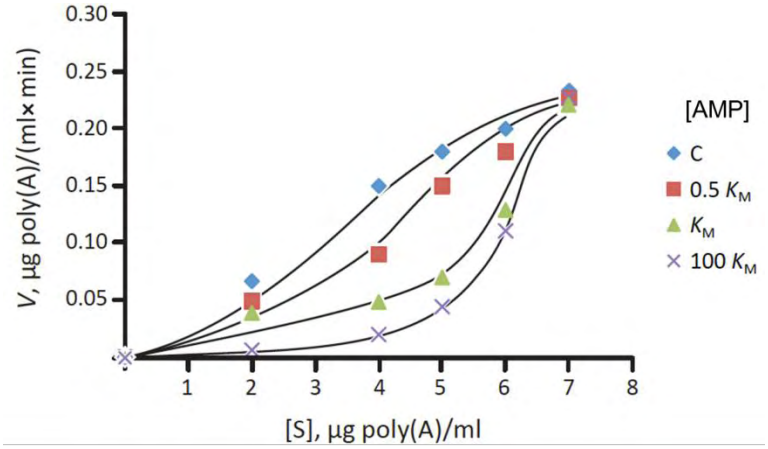
*υπολογισμός κατά προσέγγιση μετά από αναγωγή από αραίωση (1:10),**υπολογισμός κατά προσέγγιση κατόπιν άθροισης ποσοτήτων πρωτεϊνών από 12 διαφορετικά κλάσματα του 1mL. Όλες οι μετρήσεις είναι εις διπλούν.

- *Κινητικές μελέτες AtHesp παρουσία AMP*

  Οι κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο Υλικά και μέθοδοι και οι αντιδράσεις σχεδιάστηκαν βάσει του πίνακα VI. Σκοπός των πειραμάτων ήταν η διερεύνηση της επίδρασης που έχει το εξωγενώς προστεθέν προϊόν της αντίδρασης (5’ AMP) στη δραστικότητα του ενζύμου, καθώς επίσης και αν υπακούει στους κανόνες κινητικής των Michaelis-Menten. Οι υπολογισμοί έγιναν σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη πολυ(A) (βλ. γράφημα 1). Το ένζυμο φαίνεται να αναστέλλεται από το AMP όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του και η καμπύλη που σχηματίζεται από το γράφημα ταχύτητας προς υπόστρωμα είναι σιγμοειδής, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι πρόκειται για αλλοστερικό ένζυμο. Η K_M του ενζύμου υπολογίσθηκε πως είναι 0,021μg πολυ(A)/mL (βλ. γράφημα 2).



Γράφημα 1. Πρότυπη καμπύλη πολυ(A) [46]



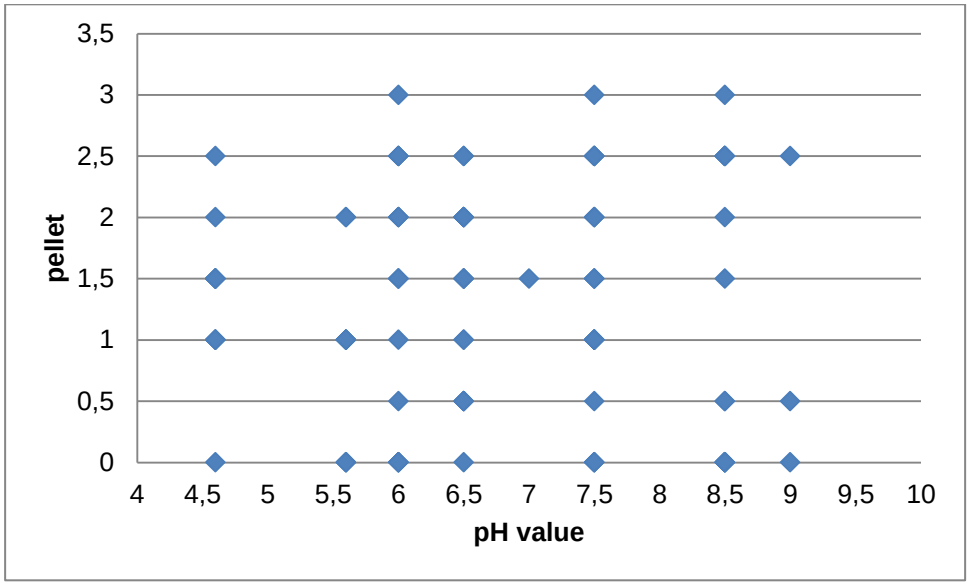
Γράφημα 2. Το 5'AMP αναστέλλει τη δραστικότητα της AtHESP. C: αντίδραση απουσία AMP, 0.5, 1 και 100 K_M: αντίδραση παρουσία AMP σε συγκεντρώσεις ανάλογες με την K_M του ενζύμου. K_M 0,021 μg πολυ(A)/mL.

- *Εξέταση συνθηκών κρυστάλλωσης*

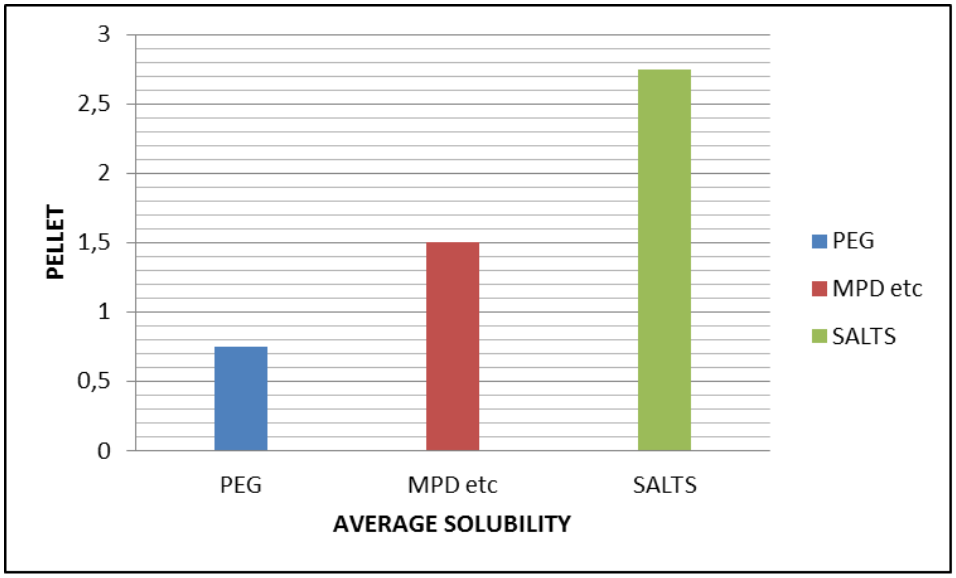
Η χρήση του κιτ συνθηκών κρυστάλλωσης της Molecular Dimensions έκανε δυνατή τη σάρωση των συνθηκών κατά τις οποίες η AtHesp. Εξετάσθηκαν οι συνθήκες στις οποίες η πρωτεΐνη είχε κατακρημνιστεί τελείως και εκείνες στις οποίες επέδειξε τη μέγιστη διαλυτότητα, ώστε να δημιουργηθεί ένα προφίλ διαλυτότητας για την πρωτεΐνη και να περιοριστούν και να ομαδοποιηθούν οι παράμετροι που μπορεί να οδηγήσουν σε κρυστάλλωση. Έγινε ομαδοποίηση των συνθηκών και σύγκριση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης με βάση το pH (βλ. γράφημα 3) και με βάση τον κατακρημνιστικό παράγοντα (βλ. γράφημα 4). Στην εικόνα 32 φαίνονται ενδεικτικά φωτογραφίες από κάποιες από τις διάφορες συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Στις περισσότερες συνθήκες παρατηρήθηκε άμορφο ίζημα κατακρημνισμένης πρωτεΐνης (βλ. Εικόνα 32 Α, Β, Γ, Δ), σε κάποιες από τις συνθήκες σχηματίστηκαν κρύσταλλοι άλατος το οποίο ήταν ως συστατικό της συνθήκης (βλ. εικόνα 32 Ε) και σε μια συνθήκη σχηματίστηκαν

κρύσταλλοι οι οποίοι θα μπορούσαν να είναι και κρύσταλλοι πρωτεΐνης (βλ. Εικόνα 32 ΣΤ), αλλά αυτή η υπόθεση είναι υπό εξέταση, καθώς δεν είναι βέβαιο.

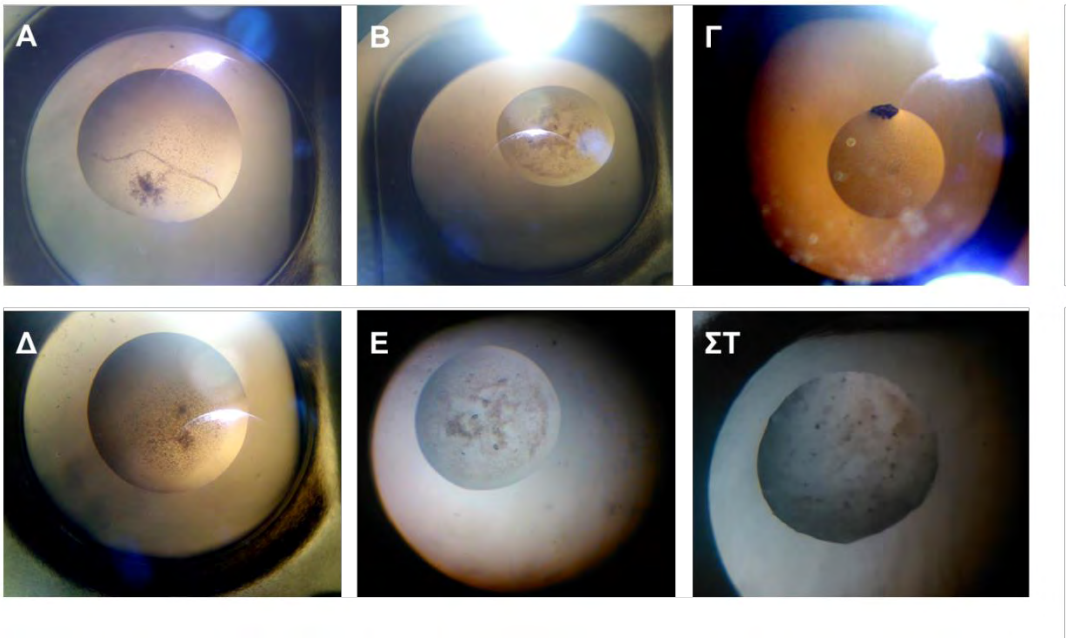
Ένα συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί μετά από αυτή την εξέταση είναι ότι η πρωτεΐνη εμφανίζει μεγαλύτερη διαλυτότητα όταν ο κατακρημνιστικός παράγοντας είναι η PEG (Polyethylene Glycol) ενώ εμφανίζει την ελάχιστη διαλυτότητα, σε μορφή ιζήματος μετουσιωμένης πρωτεΐνης, όταν ως κατακρημνιστικός παράγοντας είναι κάποιο άλας.



Γράφημα 3. Αναπαράσταση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης (0: καθόλου ίζημα – 3: πολύ ίζημα) ανάλογα με τις διάφορες τιμές pH των διαφόρων συνθηκών



Γράφημα 4. Σχέση διαλυτότητας για κάθε ομάδα κατακρημνιστικού παράγοντα. Ομαδοποίηση κατακρημνιστικών παραγόντων σε σχέση με τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης. (0: καθόλου ίζημα – 3: πολύ ίζημα)



Εικόνα 33. Διάφορες συνθήκες κρυσταλλώσεων. Α. Ως κατακρημνιστικός παράγοντας είναι ο οργανικός διαλύτης MPD, Β. Ως κατακρημνιστικός παράγοντας είναι το άλας δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4), Γ. Ως κατακρημνιστικός παράγοντας είναι το άλας θειικό λίθιο ($LiSO_4$), Δ. ως κατακρημνιστικός παράγοντας είναι το MPD, Ε. Ως κατακρημνιστικός παράγοντας είναι το MPD όπου υπάρχουν και δυο κρύσταλλοι, πιθανόν, άλατος ΣΤ. Ως κατακρημνιστικός παράγοντας είναι η PEG όπου παρατηρούνται κρύσταλλοι, πιθανόν, πρωτεΐνης

2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι άνθρωποι από πολύ παλιά γοητεύονταν από τη σχέση τους με το χρόνο. Σύμφωνα με τον Πλούταρχο, ο Περικλής (461 – 429 π.Χ.) φαίνεται να είχε συμβουλέψει έναν φιλοπόλεμο στρατηγό Τολμίδη εναντίον κάποιας εκστρατείας λέγοντάς του ότι αν δεν άκουγε τον ίδιο (τον Περικλή), θα έκανε πολύ καλύτερα αν περίμενε το σοφότερο όλων των συμβούλων, το χρόνο[8]. Παρ' ότι ο στρατηγός Τολμίδης αγνόησε τη συμβουλή αυτή (με μοιραίες συνέπειες), πολλοί οργανισμοί λαμβάνουν πολύ σοβαρά υπόψη τα λόγια του Περικλή. Μεγάλο μέρος της συμπεριφοράς, της φυσιολογίας και της βιοχημείας των οργανισμών αλλάζει ρυθμικά κατά τη διάρκεια της κάθε ημέρας. Οι ρυθμοί που ενέχουν περιοδικότητα περίπου όμοια με αυτή της περιστροφής της γης γύρω από τον άξονά της και διατηρούν την περιοδικότητα αυτή απουσία εξωγενών ερεθισμάτων ονομάζονται κιρκάδιοι [13].

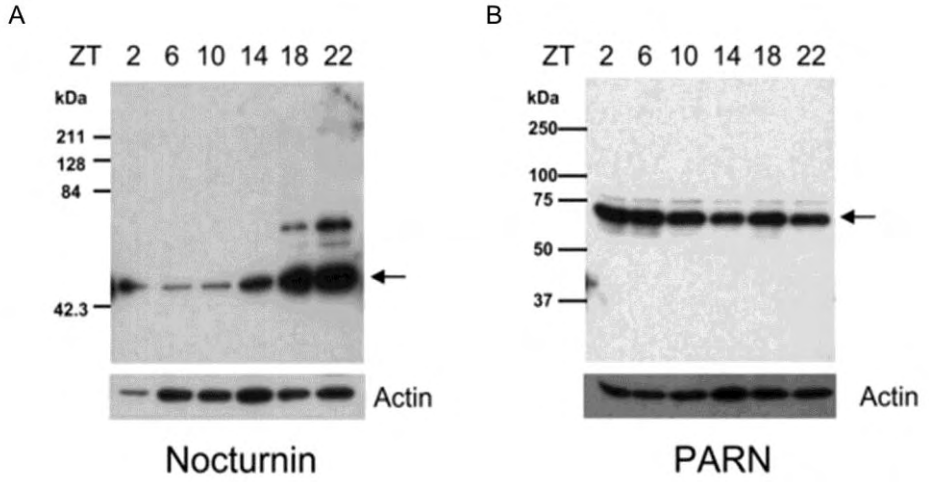
Το βιολογικό ρολόι ελέγχει κατά προσέγγιση το 10% του μεταγραφώματος (τρανσκριπτώματος) και οι ομάδες mRNA που είναι ρυθμικά ρυθμιζόμενες ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων ιστών [9]. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η αφθονία των μεταγράφων του 12% των γονιδίων έχει δειχτεί πως βρίσκονται υπό τον έλεγχο του κιρκαδίου ρυθμού, και θα μπορούσε να ισχύει, αν χρησιμοποιηθούν πιο ευαίσθητες μέθοδοι, ότι η πλειοψηφία των πυρηνικών γονιδίων αποκρίνονται στο κιρκάδιο ρολόι στο επίπεδο αφθονίας του mRNA [28]. Κάθε πλεονέκτημα αρμοστικότητας που προκύπτει από τη λειτουργία του κιρκάδιου ρολογιού έχει πολλές πιθανές βάσεις, καθώς το κιρκάδιο ρολόι ρυθμίζει πολλές πτυχές της βιολογίας των φυτών, καθώς και του βασικού μεταβολισμού, της ορμονικής σηματοδότησης και των αποκρίσεων σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις [31].

Η Nocturnin εμπλέκεται σε διαδικασίες πέρα από τη βράχυνση της πολυ(Α) ουράς. Στις λειτουργίες αυτές είναι και η συνοδεία της κίνησης παραγόντων στον πυρήνα μέσω αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό, θα ήταν δόκιμο να είναι κανείς απροκατάληπτος όσον αφορά στις βιοχημικές λειτουργίες ενζύμων όπως η Nocturnin και να τα θεωρεί ως μέρος ενός ευρύτερου πλαισίου δικτύωσης της γονιδιακής έκφρασης του κυττάρου. Η Nocturnin δεν επιτελεί μόνο ένα ένζυμο κλειδί στον κιρκάδιο ρυθμό, αλλά έχει αποδειχθεί ότι έχει ενδιαφέρον αντίκτυπο στη λιπογενετική διαφοροποίηση και τις μεταβολικές αποκρίσεις σχετικές με την παχυσαρκία και τη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης. Η Nocturnin έχει κατηγοριοποιηθεί ως κιρκάδιο γονίδιο, ένα γονίδιο δηλαδή, του οποίου η έκφραση καθοδηγείται από το κιρκάδιο ρολόι, και αυτό το πρότυπο ρυθμικής έκφρασης τη διαφοροποιούν από τις άλλες αποαδενυλάσες (βλ. εικόνα 34) [9]. Η Nocturnin ανακαλύφθηκε μέσω διαφορικής απεικόνισης με σκοπό την ανίχνευση mRNA μορίων που εναλλάσσονταν σε αφθονία κάτω από τον έλεγχο του κιρκάδιου ρολογιού στους φωτοϋποδοχείς του αμφιβλιστροειδή του Xenopus laevis [11].

Η AtHesp είναι μια ενδιαφέρουσα πρωτεΐνη προς μελέτη, γιατί διέπεται από κιρκάδια ρύθμιση, παρουσιάζοντας μέγιστη έκφραση λίγο πριν τη σκοτεινή περίοδο, και ταυτόχρονα συνδυάζει την έκφρασή της με τη δράση της ως αποαδενυλάση. Μην έχοντας αποκτήσει ακόμη μια πλήρη εικόνα in vivo δράσης, επιχειρήθηκε η έκφρασή της σε σύστημα ετερόλογης έκφρασης, ώστε να επιτευχθεί ο βιοχημικός της χαρακτηρισμός. Η ταυτοποίησή της έγινε

[8] «ὡς εἰ μὴ πείθοιτο Περικλεῖ, τόν γε σοφώτατον οὐχ ἁμαρτήσεται σύμβουλον ἀναμείνας χρόνον» [44]

αναζητώντας την πιθανή ύπαρξη κάποιας αποαδενυλάσης που σχετίζεται με τον κιρκάδιο ρυθμό στο φυτό Arabidopsis thaliana με βάση –καταρχήν- την αλληλουχία της Nocturnin.



Εικόνα 34. Σύγκριση της πρωτεϊνικής έκφρασης της Nocturnin και της πολύ(Α) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN) στον αμφιβληστροειδή του Xenopus laevis. Ανοσοστύπωση κατά Western για δείγματα που λαμβάνονταν ανά 4 ώρες, ZT: η χρονοθέτηση με περίοδο 24 ωρών. ZT0 είναι η έναρξη της φωτεινής περιόδου και ZT12 είναι η έναρξη της σκοτεινής περιόδου (12ωρες φως/12 ώρες σκοτάδι). **A.** Διακρίνεται εμφανώς η διακύμανση της πρωτεΐνης Nocturnin στα διάφορα στάδια της ημέρας **B.** σε σύγκριση με την πρωτεΐνη PARN, της οποίας τα επίπεδα διατηρούνται όμοια κατά τη διάρκεια του 24ωρου [3].

Καθώς το πρώτο και το κύριο βήμα για τη διερεύνηση του ρόλου μιας πρωτεΐνης αποτελεί η απομόνωσή της μέσω ετερόλογης έκφρασης και ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών και των ιδιοτήτων της, η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε με προσπάθειες απομόνωσης της *AtHesp* σε ικανοποιητική ποσότητα και καθαρότητα. Καθώς όπως έχει ειπωθεί και από τον *Efraim* Racker: «μη σπαταλάς καθαρή σκέψη σε μη καθαρά ένζυμα[9]» Έγινε σύγκριση μεταξύ δυο συστημάτων χρωματογραφίας συγγένειας, ώστε οι συνθήκες καθαρισμού και απομόνωσης της πρωτεΐνης να είναι οι βέλτιστες. Το πρώτο σύστημα χρωματογραφίας συγγένειας που χρησιμοποιήθηκε ήταν με στήλη βαρύτητας Ni^{2+}-NTA σεφαρόζης, το οποίο παρότι επέδειξε απομόνωση της πρωτεΐνης μέχρι ένα βαθμό, απαιτούσε τη χρήση επιπλέον στηλών καθαρισμού εις βάρος του χρόνου και της απόδοσης. Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε απομόνωση με το σύστημα FPLC το οποίο επέφερε σχεδόν άριστο καθαρισμό της πρωτεΐνης σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα χωρίς να είναι απαραίτητες επιπλέον στήλες καθαρισμού.

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης είναι μια μέθοδος όπου το δείγμα ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που το απαρτίζουν και το μέγεθος των πόρων του υλικού που βρίσκεται πακεταρισμένο στη στήλη, διαχωρίζεται βάσει του μοριακού του μεγέθους, και διαχωρίζεται από προσμείξεις ή συσσωματώματα. Η χρήση αυτού του είδους χρωματογραφίας για την AtHesp είχε δυο προσεγγίσεις. Η πρώτη ήταν η απόπειρα του πλήρους καθαρισμού της AtHesp, καθώς οι προσμείξεις που φαίνεται να παραμένουν μετά τη στήλη συγγένειας έχουν αρκετά μεγάλη διαφορά στο μοριακό βάρος με την AtHesp (βλ. Εικόνα 28). Η δεύτερη προσέγγιση εστίασε στην ικανότητα της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης να διαχωρίζει μονομερή και συσσωματώματα πρωτεϊνών [54] και θα έριχνε φως στην υπόθεση πως η AtHesp ολιγομερίζεται. Παρότι φαίνεται πως η πρώτη προσέγγιση, αυτή του πλήρους

[9] Don’t waste clean thinking on dirty enzymes

καθαρισμού της πρωτεΐνης, δεν είχε το επιθυμητό και αναμενόμενο αποτέλεσμα, φάνηκε πως η δεύτερη προσέγγιση επαλήθευσε την υπόθεση του ολιγομερισμού. Οι κορυφές του χρωματογραφήματος καταδεικνύουν ότι υπάρχει ένα ολιγομερές σύμπλοκο μοριακού βάρους ~150kDa, το οποίο εκλούεται αμέσως μετά την περιοχή του κενού όγκου στήλης (βλ. Εικόνα 30, 31). Η AtHesp υπάρχει και στα κλάσματα που αντιστοιχούν στον κενό όγκο στήλης, πράγμα που πιθανών υπαινίσσεται την ύπαρξη μιας διαμόρφωσης μεγαλύτερου μεγέθους ακόμη και από τα 150kDa, μια υπόθεση που επαληθεύεται μερικώς και από την ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (βλ. Εικόνα 32, διαδρομές 3-4).

Η AtHesp είναι ένα ένζυμο με μια επικράτεια ενδονουκλεάσης- εξωνουκλεάσης-φωσφατάσης (EEP) με δράση αποαδενυλάσης. Είναι, πιθανόν, αλλοστερικό ένζυμο και εξαρτάται από μαγνήσιο [46],[55]. Οι κινητικές μελέτες εστιάστηκαν στην έμμεση απόδειξη της σχέσης του ενζύμου με το υποθετικό προϊόν της αντίδρασης της αποαδενυλίωσης, το 5'AMP. Διαφαίνεται σχέση αναστολής μεταξύ του ενζύμου και του 5'AMP, πράγμα αναμενόμενο, καθώς πολλά ένζυμα αναστέλλονται από το προϊόν της αντίδρασης την οποία καταλύουν. Αυτό δείχνει μια σχέση αρνητικής ανατροφοδότησης και είναι συνήθης τακτική διατήρησης της ομοιόστασης εντός του κυττάρου κατά τη διάρκεια μεταβολικών αντιδράσεων όπου η ενζυμική δραστικότητα μειώνεται όταν αρχίζουν να συσσωρεύονται ενδοκυτταρικά τα προϊόντα της καταλυόμενης αντίδρασης. Το AMP δείχνει να συμπεριφέρεται ως συναγωνιστικός αναστολέας καθώς όπως παρατηρούμε και στο γράφημα 2, στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υποστρώματος η αναστολή από το AMP αίρεται, καθώς οι τιμές τείνουν να πλησιάζουν τη V_{max} του ενζύμου. Επιπλέον, η AtHesp φαίνεται να συμπεριφέρεται ως αλλοστερικό ένζυμο καθώς το διάγραμμα κινητικής που σχηματίζεται σχηματίζει τη χαρακτηριστική σιγμοειδή καμπύλη των αλλοστερικών ενζύμων (βλ. γράφημα 2).

Καθώς οι κινητικές μελέτες που είχαν προηγηθεί σε προηγούμενη διπλωματική εργασία από την Τοματσίδου Α. (2010) είχαν αφήσει ισχυρή υπόνοια πως η AtHesp συμπεριφέρεται ως αλλοστερικό ένζυμο, επιχειρήθηκε για το λόγο αυτό ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες για την εξακρίβωση του αριθμού των υπομονάδων του ενζύμου, καθώς τα αλλοστερικά ένζυμα είναι ένζυμα που αποτελούνται από τουλάχιστον δυο υπομονάδες. Η AtHesp φαίνεται να επαληθεύει τις κινητικές μελέτες, καθώς δείχνει να ολιγομερίζεται.

Η κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης της οποίας η δομή δεν είναι γνωστή είναι πολύ σημαντική διαδικασία. Η περίθλαση ακτίνων Χ, και κατά συνέπεια η αποσαφήνιση της δομής της AtHesp θα απαντήσει αναμφισβήτητα στο ερώτημα του πόσες όμοιες υπομονάδες απαρτίζουν την AtHesp καθώς και σε άλλα βασικά ερωτήματα της δομής, όπως το πώς προσεγγίζει το υπόστρωμα, πως καταλύει την αντίδραση και πού βρίσκονται πιθανά αλλοστερικά κέντρα. Εφόσον ήταν δυνατή η απομόνωση ικανής ποσότητας και αρκετά μεγάλης καθαρότητας, επιχειρήθηκε η σάρωση διαφόρων συνθηκών κρυστάλλωσης στο ρομπότ κρυσταλλώσεων του τμήματος. Οι δοκιμές κρυστάλλωσης του ενζύμου, έδωσαν πολύτιμες πληροφορίες, περί της συμπεριφοράς του ενζύμου στις διάφορες συνθήκες. Αρχικά, με την ομαδοποίηση των συνθηκών κρυστάλλωσης που εξετάσθηκαν, μπορέσαμε να λάβουμε μια εικόνα για τη συμπεριφορά της πρωτεΐνης στις διάφορες τιμές pH, στα ρυθμιστικά διαλύματα που διαφέρουν μεταξύ τους στη σύσταση και στους κατακριμνηστικούς παράγοντες. Το συμπέρασμα που βγάλαμε είναι πως η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται σχηματίζοντας ίζημα μετουσιωμένης πρωτεΐνης όταν οι κατακρημνιστικοί παράγοντες είναι άλατα ή οργανικοί διαλύτες (πχ MPD, ισοπροπανόλη, κα) ενώ οι συνθήκες που φαίνεται να είναι οι περισσότερο υποσχόμενες είναι

τις περισσότερες φορές αυτές στις οποίες ο κατακρημνιστικός παράγοντας είναι πολυμερείς κατακρημνιστικοί παράγοντες (PEG). Με τη χρήση επιπλέον συνθηκών μπορούμε να μειώσουμε το φάσμα των μεταβλητών και να οριοθετήσουμε την περιοχή όπου το ένζυμο είναι διαλυτό και την περιοχή όπου κατακρημνίζεται.

Αντικείμενο μελλοντικών στόχων αποτελεί η περαιτέρω μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς της AtHesp, αλλά και η κατά θέση μετάλλαξη του ενζύμου στα υποψήφια αμινοξέα του ενεργού του κέντρου. Η πλήρης εικόνα της κινητικής του ενζύμου θα αποδώσει πολλές πληροφορίες για τη συμπεριφορά αλλά και τη δομή του ενζύμου γενικότερα. Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η διερεύνηση ενζυμικών δοκιμασιών με υπόστρωμα ευκαρυωτικό πλήρους μήκους mRNA. Επίσης, στους άμεσους στόχους είναι και ο καθορισμός των πρωτοκόλλων και των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται με σκοπό τον πειραματισμό με την AtHesp έτσι ώστε, το ένζυμο να βρίσκεται σε κατά το δυνατόν μεγαλύτερη σταθερότητα. Τέλος, θα ήταν επιθυμητή η ανάπτυξη κρυστάλλων της AtHesp, με απώτερο σκοπό τη λύση της δομής της μέσω περίθλασης ακτίνων X.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1]Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2008, Molecular Biology of the Cell (5th Edition), Garland Science

[2]Bradford, M.M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry

[3]Baggs, J.E., Green, C.B., 2003, Nocturnin, a Deadenylase in Xenopus laevis Retina: A Mechanism for Posttranscriptional Control of Circadian-Related mRNA, Current Biology

[4]Compton, S.J., Jones, C.G., 1985, Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, Analytical Biochemistry

[5]Cheng, Y., Liu, W.F., Yan, Y.B., Zhou, H.M., 2006, A nonradioactive assay for poly(A)-specific ribonuclease activity by methylene blue colorimetry, Protein & Peptide Letters

[6]Gherzi R., Trabucchi M., Ponassi M., Ruggiero T., Corte G., Moroni C., Chen C.Y., Khabar K.S., Andersen J.S., Briata P., 2006, The RNA-binding protein KSRP promotes decay of beta-catenin mRNA and is inactivated by PI3K-AKT signaling, PlosOne

[7]Gancendo, J.M., 1998, Yeast carbon catabolite repression, Microbiol Mol Biol

[8]Garneau N.L., Wilusz J., Wilusz C.J., 2007, The highways and byways of mRNA decay. Nat Rev Mol Cell Biol

[9]Godwin, A.R., Kojima, S., Green, C.B., Wilusz, J., 2013, Kiss your tail goodbye: The role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology, Biochimica et Biophysica Acta

[10]Goldstrohm, A.C., Wickens, M., 2008, Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control, Nature Reviews, Molecular Cell Biology

[11]Green, C.B. & Besharse, J.C, 1996, Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin, Proc. Natl. Acad. Sci.

[12]Fazekas De St. Groth, S., Webster, R.G., Datyner, A., 1963, Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips, Biochimica et Biophysica Acta

[13]Harmer, S.L., Panda, S., Kay, S.A., 2001, Molecular bases of circadian rhythms, Annu. Rev. Cell Dev. Biol.

[14]Harnisch, C., Moritz, B., Rammelt, C., Temme, C., Wahle, E., 2012, Activity and Function of Deadenylases, Chapter 9, The Enzymes Vol.31, Elsevier

[15]Hook, B., Goldstrohm, A. C., Seay, D. J., Wickens, M., 2007, Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. J. Biol. Chem.

[16]John, M., Clark, J.R., Switzer, R.L., 1991, Ηλεκτροφόρηση, Πειραματική Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.

[17]Jurado, A.R., Tan, D., Jiao, X., Kiledjian, M., Tond, L., 2014, Structure and function of pre-mRNA 5´-end capping quality control and 3´-end processing, Biochemistry

[18]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

[19]Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature

[20]Liu, X., Green, C.B., 2002, Circadian Regulation of Nocturnin Transcription by Phosphorylated CREB in Xenopus Retinal Photoreceptor Cells, Molecular and Cellular Biology

[21]Meyer S., Temme C., Wahle E., 2004, Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. Crit Rev Biochem Mol Biol

[22]Nelson, D.L., Cox, M.M., 2000, Principles of Biochemistry, Chapter 26: RNA metabolism, 3rd Edition
[23]Parker, R., Sheth, U., 2007, P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation, Molec. Cell
[24]Parker R., Song H., 2004, The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. Nat Struct Mol Biol
[25]Paschoud, S., Dogar, A.M., Kuntz, C., Grisoni-Neupert, B., Richman, L., Kühn, L.C., 2006, Destabilization of interleukin-6 mRNA requires a putative RNA stem-loop structure, an AU-rich element, and the RNA-binding protein AUF1, Mol. Cell. Biol
[26]Patsi-Garin, E., 1969, Επίτομο λεξικό Ελληνικής Μυθολογίας, εκδ. οίκος Χάρη Πάτση
[27]Pulcrano, G., Leonardo, R., Piscopo, M., Nargi, E., Locascio, A., Aniello, F., Branno, M., Fucci, L., 2007, PLAUF binding to the 3′ UTR of the H3.3 histone transcript affects mRNA stability, Gene
[28]Ral, J.P., Colleoni, C., Wattebled, F., Dauvillée, D., Nempont, C., Dechamps, P., Li, Z., Morell, M.K., Chibbar, R., Purton, S., d'Hulst, C., Ball, S.G., 2006, Circadian Clock Regulation of Starch Metabolism Establishes GBSSI as a Major Contributor to Amylopectin Synthesis in Chlamydomonas reinhardtii, Plant Physiology
[29]Reisner, A.H., Nemes, P., Bucholtz, Carolyn, 1975, The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels, Analytical Biochemistry
[30]Rhodes G., 2006, Crystallography made crystal clear – 3rd ed., Elsevier, ISBN 0-12-587073-6 (alk. paper)
[31]Robertson McClung, C., 2014, Wheels within wheels: new transcriptional feedback loops in the Arabidopsis circadian clock, f1000Prime Reports
[32]Robles, M.S., Cox, J., Mann, M., 2014, In-Vivo Quantitative Proteomics Reveals a Key Contribution of Post-Transcriptional Mechanisms to the Circadian Regulation of Liver Metabolism, PlosOne
[33]Ross J., 1995, mRNA stability in mammalian cells. Microbiol Rev
[34]Schoenberg D.R., Maquat L.E., 2012, Regulation of cytoplasmic mRNA decay, Nat Rev Genet
[34]Shapiro, A.L., 1967, Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, Biochemical and Biophysical Research Communications
[35]Switzer, R.C, Merril, C.R., Shifrin, S., 1979, A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels, Analytical Biochemistry
[36]Van Holde K. E., Johnson W. C., Ho P. S., 2010, Αρχές Φυσικής Βιοχημείας, Έμβρυο, ISBN 978-960-8002-55
[37]Weber, K., Osborn, M., 1969, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Journal of Biological Chemistry
[38]Wu X., Brewer G., 2012, The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0, Gene
[39]Zhao J., Chen J., Lu B., Dong L., Wang H., Bi C., Wu G., Guo H., Wu M., Guo Y., 2008, TIP30 induces apoptosis under oxidative stress through stabilization of p53 messenger RNA in human hepatocellular carcinoma, Cancer Res
[40]Zuo, Y., Deutscher, M.P., 2001, Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution, Nucleic Acids Res

[41]Γιαννούλη, Σ.Ε., 2008, Γονιδιωματική ανάλυση και λειτουργικός χαρακτηρισμός ασύνηθων συστημάτων αμινοακυλίωσης του μεταφορικού RNA σε παθογόνους μικροοργανισμούς, Διδακτορική διατριβή, ΤΒΒ
[42]Καραϊσκάκης Γ., 1998, Φυσικοχημεία, εκδόσεις Π. Τραυλός, ISBN 960-7122-31-3
[43]Μπαλατσός, Ν.Α.Α., 1999, Δράση τροποποιητών βιολογικής απόκρισης και αντικαρκινικών φαρμάκων στην δομή και τη λειτουργία ενζύμων σταθερότητας μηνύματος RNA, ο ρόλος τους ση βιολογία του καρκίνου και η σημασία στη διάγνωση και τη θεραπεία, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Ιατρικής Παν. Αθηνών
[44]Πλούταρχος, Βίοι παράλληλλοι, Περικλής
[45]Σκουτέλνικ, Ν., 2013, Μελέτες στο συσχετισμό αποαδενυλασών και microRNAs στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs, Μεταπτυχιακή διατριβή, ΤΒΒ
[46]Τοματσίδου, Α., 2010, AtNOC, μια νέα αποαδενυλάση που ρυθμίζεται από τον κιρκάδιο ρυθμό στο *Arabidopsis thaliana,* Διπλωματική εργασία, ΤΒΒ
[47]Χαραλαμπίδης, Κ., 2009, Αναπτυξιακή & Μοριακή Βιολογία φυτών, Κεφ. 11, Εκδόσεις Έμβρυο
[48]Martin Caffrey & Vadim Cherezov, 2009, Ways to set up *in meso* crystallization trials using commercial plates, Nature protocols
[49]Lewin, B., 2004, Genes VIII, Pearson, Ακαδημαϊκές εκδόσεις
[50]Hammet, A., Pike, B.L. & Heierhorst, J., 2002, Posttranscriptional regulation of the *RAD5* DNA repair gene by the dun1 kinase and the Pan2-Pan3 poly(A)-nuclease complex contributes to survival of replication blocks. J. Biol. Chem.
[51]Greiner-stoeffele, T., Grunow, M., Hahn, U., 1996, A general Ribonuclease assay using methylene blue, Analytical Biochemistry
[52]Μπαλατσός Νικόλαος, 2014, Διαλέξεις Βιοχημείας ΙΙ, Γ' Εξάμηνο, ΤΒΒ
[53]Gel Filtration Principles and methods, 2010, GE Healthcare Life Sciences
[54]Gel filtration columns and media, Selection Guide, 2012, GE Healthcare Life Sciences
[55] Delis C., Krokida A., Tomatsidou A., Tsikou D., Papanastasi E., Tsioumbekou M., Balatsos N.A.A., Papadopoulou K.K., *υποβλήθηκε προς δημοσίευση*, 2014, A novel regulator of circadian rhythms with poly(A)-degrading activity in plants